

# 人工繁育大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)群体 F<sub>2</sub> 及 F<sub>3</sub> 遗传差异分析\*

常玉梅<sup>1</sup> 王文文<sup>2</sup> 徐万土<sup>3</sup> 李明云<sup>4</sup> 薛良义<sup>4</sup> 梁利群<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 哈尔滨 150070; 2. 南开大学生命科学学院 天津 300071;  
3. 象山港湾水产苗种有限公司 象山 315702; 4. 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

**提要** 利用 15 对微卫星标记对人工繁育的岱衢族(DQ1 和 DQ2)、闽-粤东族(MY1 和 MY2)及正交(DM1 和 DM2)和反交(MD 和 MD21) F<sub>2</sub> 及 F<sub>3</sub> 连续两代共 8 个群体的 250 个样品进行了遗传多样性及遗传差异检测。15 个位点在所有检测群体中均为高度多态, 共检测等位基因 215 个, 每个位点的平均等位基因数是 8.1—11.7, 平均观察和期望杂合度分别是 0.598—0.790 和 0.732—0.794。F<sub>2</sub> 和 F<sub>3</sub> 代内的等位基因频率无明显差异( $P>0.05$ ), 而两代间在 15 个位点的等位基因频率上存在约 34.13% 的遗传差异;  $F_{st}$  值检测发现, F<sub>2</sub> 的 4 个群体间的  $F_{st}$  值是 0.028—0.067, 平均 0.0429, F<sub>3</sub> 的  $F_{st}$  值是 0.037—0.068, 平均 0.0535。经过一代繁殖, F<sub>2</sub> 和 F<sub>3</sub> 之间的遗传分歧平均增加了 1% (0.0106); 群体间的 N-J 聚类图显示, 8 个群体虽然聚成一族, 但是 F<sub>2</sub> 和 F<sub>3</sub> 之间的遗传距离有增大的趋势。以上结果表明, 随着人工选育力度的加强, 岱衢族和闽-粤东族大黄鱼群体间的遗传距离由近及远, 遗传分歧有加大的趋势。

**关键词** 大黄鱼, 微卫星标记, 遗传多样性, 遗传分化

**中图分类号** Q953

大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 隶属鲈形目 (Perciformes)、石首鱼科 (Sciaenidae)、黄鱼属 (*Pseudosciaena*), 是我国近海最重要的传统经济鱼类之一, 主要分布于东海、黄海南部以及南海的雷州半岛东侧, 水深 80m 以内的沿岸近海水域(徐开达等, 2007)。20 世纪 80 年代以前, 东海区大黄鱼产量占全国大黄鱼总产量的 90% 以上, 年产量在 5 万—20 万吨之间。随着捕捞作业的推陈出新, 大黄鱼的捕捞强度和力度进一步加强, 至 20 世纪 80 年代中后期开始, 其年产量逐年下降, 最低时仅为 0.26 万吨, 而且渔获物的年龄组成也从以前的 1—29 龄下降至 1—9 龄, 群体组成逐渐小型化(罗秉征, 1993)。尽管在各级部门的监督与监管下, 酷捕滥杀的情况有所改善, 但是截至目前, 曾享有“四大海产”美誉之称的大黄鱼, 在

我国各近海水域的种群资源仍未得到有效恢复。人工繁殖大黄鱼的成功, 不仅缓解了野生大黄鱼资源匮乏的困境, 而且带动了大黄鱼养殖产业的兴起与发展。虽然养殖大黄鱼是由捕捞的野生大黄鱼经人工驯化繁育的, 但是可捕捞的野生大黄鱼数量极其有限, 如浙江象山大黄鱼育苗中心, 其最初的繁育亲本只有 4—6 尾野生大黄鱼。全人工累代育苗使得大黄鱼养殖产业面临巨大的风险和挑战。目前大黄鱼的许多经济性性状已开始出现衰退, 如性成熟提前、成鱼个体小型化、病害频发及品质下降等。尽管, 育种专家也通过尝试杂交选育的方法对大黄鱼进行遗传改良, 但是由于对杂交亲本的遗传背景缺乏认识, 养殖大黄鱼群体面临的诸多问题还是没有得到根本改善。因此, 十分有必要对不同的地理养殖群体进行遗传多

\* 国家“863”计划资助项目, 大黄鱼优质抗逆新品种培育(2006AA10A405 号); 常玉梅, 博士, 助理研究员, E-mail: ymchang2002@sohu.com

通讯作者: 梁利群, 研究员, E-mail: llq-1019@163.com

收稿日期: 2008-04-20, 收修稿日期: 2008-07-30

样性和遗传分化评估, 选育优良品种。另外, 对选育的优良品种, 通过科学管理, 保持其遗传多样性也是十分重要的。

微卫星 DNA 分子标记是目前众多分子标记中应用最广泛的标记之一。这种标记不仅具有种属特异性, 而且高度多态、共显性分离并结合 PCR 技术发展起来的一种新型标记。目前, 微卫星标记已被广泛地应用到许多水产生物领域, 如构建遗传连锁图谱、亲子鉴定、群体遗传结构分析等(Waldbieser *et al.*, 2001; Chistiakov *et al.*, 2005; Alam *et al.*, 2005; Aldbieser *et al.*, 2007)。早期我国学者对大黄鱼野生和养殖群体的遗传多样性分析多采用同功酶和无种属特异性的 RAPD 和 AFLP 显性分子标记(全成干等, 1999; 王军等, 2001; 王志勇等, 2002; 李星云等, 2003; 刘必谦等, 2005; 丁诗华等, 2006; 黄良敏等, 2006)。而大黄鱼微卫星标记的开发及应用只是近两年才有零星报道(Guo *et al.*, 2005; 王晓清等, 2006; 郝君等, 2006; Chang *et al.*, 2008a)。但应用微卫星标记对不同大黄鱼养殖群体进行遗传多样性分析的报道更是凤毛麟角。

本研究利用 15 对微卫星标记对连续两代全人工繁殖大黄鱼群体进行基因分型及数据统计, 主要检测连续两代全人工繁殖是否造成大黄鱼群体的遗传多样性水平下降, 以及累代繁殖是否对群体间遗传分化产生影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究中所有大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)实验材料均由宁波市海湾水产苗种繁育中心提供。其中, 岱衢族群体 1(DQ1)和闽-粤东族群体 1(MY1)分别由 4—6 尾野生岱衢族和野生闽-粤东族经人工繁育的 F<sub>2</sub>。正交群体 1(DM1)为岱衢族 F<sub>1</sub>( )和闽-粤东族

F<sub>1</sub>( )杂交后代; 反交群体 1(MD1)为闽-粤东族 F<sub>1</sub>( )和岱衢族 F<sub>1</sub>( )杂交后代。上述 4 个群体经相同选育程序翌年繁殖的后代样本分别为 DQ2、MY2、DM2 和 MD2。样本来源、规格、采样数及采样时间见表 1。

### 1.2 大黄鱼总 DNA 的提取

剪取适当大小无水乙醇浸泡的大黄鱼背鳍至离心管中, 双蒸水洗涤 3—4 次, 每次间隔约 10min。待闻其无酒精味时, 用滤纸吸干水分, 转入新管; 每管加入 200μl 新鲜配置的细胞裂解液(200μg/ml 蛋白酶 K, 0.5%十二烷基肌氨酸钠, 10mmol/L EDTA); 将样品放在 50 的保温箱中消化 1—2h, 期间缓慢地上下颠倒 1—2 次, 至组织完全消化。消化后的样品加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 缓慢抽提 3 次; 抽提后的 DNA 样品加入 2 倍体积预冷的无水乙醇纯化, 并用 70%乙醇洗涤两次; 干燥后的 DNA 沉淀加入适量的 TE 溶解, 并于 4 保存备用。

### 1.3 微卫星引物来源

本研究共采用 15 个微卫星标记。其中 11 个编号为“HLJDH”系列的由本实验室自主开发(Chang *et al.*, 2008a)(GenBank accession no. EU590671—EU590681)。另外 4 个编号为“LYC”系列的是引用 Guo 等(2005)在 MEN 上发表的标记(GenBank accession no. AY885692—AY885696)。所有上游引物 5'端在合成时添加 FAM 荧光染料(上海生工)。

### 1.4 PCR 反应及基因分型

PCR 反应体积为 15μl, 含有 50mmol/L KCl, 10mmol/L Tris-HCl, 1.5mmol/ml MgCl<sub>2</sub>, 100μg/ml 的明胶, 4 种 dNTP 各 100μmol/ml, 0.1% Triton X-100, 0.1% NP-40, 正反引物终浓度为 0.67μmol/L, Taq 酶 1U(Fermentas, USA), DNA 模板 30—50ng。PCR 反应程序设定为: 94 预变性 3min, 28 个循环(92 /20s, 50—59 /30s; 72 /45s), 最后 72 延伸 10min。具体

表 1 连续两代人工繁殖大黄鱼群体的样本信息

Tab.1 The information of samples of large yellow croaker bred for two continuous generations

群体	样本数	产生来源	规格	采样时间(年.月)
DQ1 (F <sub>2</sub> )	19	野生岱衢族大黄鱼人工繁育 F <sub>1</sub> 自交后代	成鱼	2006.11
DQ2 (F <sub>3</sub> )	39	野生岱衢族大黄鱼人工繁育 F <sub>1</sub> 和 F <sub>2</sub> 群交后代	鱼种	2007.09
MY1 (F <sub>2</sub> )	20	野生闽-粤东族大黄鱼人工繁育 F <sub>1</sub> 自交后代	成鱼	2006.11
MY2 (F <sub>3</sub> )	47	野生闽-粤东族大黄鱼人工繁育 F <sub>1</sub> 和 F <sub>2</sub> 群交后代	鱼种	2007.09
DM1 (F <sub>2</sub> )	20	岱衢族 F <sub>1</sub> ( ) × 闽-粤东族 F <sub>1</sub> ( ) 杂交后代	成鱼	2006.11
DM2 (F <sub>3</sub> )	36	岱衢族 F <sub>1</sub> ( ) × 闽-粤东族 F <sub>1</sub> ( ) 杂交后代 F <sub>1</sub> 和 F <sub>2</sub> 群交后代	鱼种	2007.09
MD1 (F <sub>2</sub> )	19	闽-粤东族 F <sub>1</sub> ( ) × 岱衢族 F <sub>1</sub> ( ) 杂交后代	成鱼	2006.11
MD2 (F <sub>3</sub> )	50	闽-粤东族 F <sub>1</sub> ( ) × 岱衢族 F <sub>1</sub> ( ) 杂交后代 F <sub>1</sub> 和 F <sub>2</sub> 群交后代	鱼种	2007.09

参见 Guo 等(2005)和 Chang 等(2008a, b)的文献报道。

PCR 扩增产物在 ABI PRISM 377 测序仪上进行检测。PCR 产物在含有 6mol/L 尿素的 4.5%的变性聚丙烯酰胺凝胶上进行分离, 以内标 ROX-500(ABI)为参照, 由软件 GENESCAN3.1 判读分子量大小。

## 1.5 数据处理

**1.5.1 遗传多样性参数** 每个群体每个位点的等位基因数( $N$ )、等位基因频率、期望和观察杂合度( $H_e$ 和  $H_o$ )及哈德-温伯格平衡检验(Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE)由软件 POWERMARKER (Liu *et al.*, 2002)计算; 有效等位基因数( $N_e$ )由软件 POPGENE (Yeh *et al.*, 1999)计算; 每个群体每个位点的近交系数( $F_{is}$ ) (Weir *et al.*, 1984)由软件 FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001)计算; 群体间每个位点的平均等位基因数和平均期望杂合度由统计软件 SPASS10.0 进行非参数的方差分析(Kruskal-Wallis test) (Sokal *et al.*, 1995)。利用 SAS 8.2 对单个位点群体间等位基因频率进行 Fisher 检验( $P < 0.05$ )。

**1.5.2 遗传分化指数  $F_{st}$  和  $R_{st}$**  通过计算基于微卫星两种突变模式 IAM (Infinite Allele Model)和 SMM (Stepwise Mutation Model)的固定指数, 检测不同群体间的遗传变异度。根据微卫星突变模式 IAM 计算的  $F_{st}$  (Weir *et al.*, 1984)由软件 MICROSATELLITE ANALYSER (MSA; Dieringer *et al.*, 2003)计算; 基于微卫星突变模式 SMM 计算的  $R_{st}$  (Slatkin, 1995)由软件 RstCalc (Goodman, 1997)计算。以上两个遗传分化参数通过 1000 次置换检验(Permutation test)进行显著水平检验。

**1.5.3 遗传距离** 群体间遗传差异和亲缘关系通过计算 Cavalli-Sforza 等(1967)的遗传距离  $D_c$  进行评估, 并将所有位点每个分支树通过 1000 次的 bootstrap 抽样进行校正。这些数据的采集由软件 MICROSATELLITE ANALYSER 完成。通过软件 PHYLIP 3.5c (Felsenstein, 1993)中的 NEIGHBOR 命令, 将基于 neighbor-joining 方法计算的遗传距离  $D_c$  构建聚类图, 最后由软件 PHYLIP 3.5c 中的 CONSENSE 汇总重建, 并通过软件 MEGA4.0 显示该聚类图 (Tamura *et al.*, 2007)。

## 2 结果

### 2.1 每个群体的遗传多样性

每个群体 15 个微卫星位点的等位基因数、期望和观察杂合度见表 2。从表 2 可以看出, 15 个位点在

所有群体中均呈现高度多态, 尽管每个位点的多态程度不同。HLJDH143 在群体 MD2 有 21 个等位基因, 其它 14 个位点的最多等位基因数分别为 16(HLJDH137 和 HLJDH107)、15(HLJDH165、HLJDH175 和 HLJDH186)、12(HLJDH085 和 HLJDH125)、11(HLJDH156)、10(HLJDH182)、9(HLJDH185 和 LYC0003)、7(LYC0002 和 LYC0004)和 5(LYC0006)。

每个群体的平均等位基因数依次为 DQ1(8.4)、DQ2(8.1)、MY1(8.8)、MY2(9.3)、DM1(8.5)、DM2(9.2)、MD1(9.4)和 MD2(11.7), 显著性检验结果显示 8 个群体的等位基因数无明显差异(Kruskal-Wallis test,  $df = 7, P = 0.488$ )。每个位点的有效等位基因数( $N_e$ )都显著低于其观察等位基因数( $N$ )( $P < 0.05$ ), 表明每个位点的等位基因频率分布极不均匀。每个群体的平均期望杂合度都较高, 从 0.732—0.794 不等, 但群体间无显著差异(Kruskal-Wallis test,  $df = 7, P = 0.525$ )。群体 DM1 的平均观察杂合度最高(0.790), 其他依次为 MD1(0.747)、DQ1(0.723)、MD2(0.689)、DQ2(0.667)、MY1(0.647)、MY2(0.613)和 DM2(0.598), 群体间存在一定明显差异(Kruskal-Wallis test,  $df = 7, P = 0.012$ )。同时, 也可以看出经过连续两代的全人工繁殖, 4 个群体  $F_2$  的观察杂合度均高于其  $F_3$  的观察杂合度, 表明连续累代繁殖已造成大黄鱼养殖群体遗传多样性的下降。

在 120 次的群体-位点(8 个群体  $\times$  15 位点)的 HWE 检测中发现, 有 3 个位点(HLJDH085、LYC0002 和 LYC0006)在所有 8 个群体中均无偏离 HWE, 且群体 MD1 在所有检测位点中呈哈德-温伯格平衡, 其余 7 个群体在 12 个位点中分别有 1—10 个位点偏离 HWE ( $P < 0.01$ ) (表 2)。另外, 7 个群体 12 个位点的  $F_{is}$  值中, 有 72 个数值为正值, 表明约有 85.7%(72/84)的群体-位点检测中存在杂合子缺失。

### 2.2 每个群体的等位基因频率及私有等位基因

每个群体 15 个位点的等位基因频率分布情况见图 1。15 个微卫星位点在 8 个群体中共检测出 215 个等位基因, 最少的有 7 个(LYC0002), 最多的有 23 个(HLJDH143)。在 8 个群体中, 大部分的等位基因(53.0%—66.5%)频率都非常低( $< 0.05$ ), 大约 11.6%—25.1%的等位基因频率适中(0.05—0.10)。另外, 除群体 DM2 未检测到特有等位基因外(等位基因只在一个群体中出现), 其它 7 个群体都检测到了特有等位基因。15 个位点中有 11 个位点在 7 个群体中共检测到 40 个特有等位基因, 其频率范围为 0.01—0.23。

表 2 大黄鱼 8 个养殖群体的遗传多样性信息  
Tab.2 Genetic variability in eight samples of large yellow croaker *P. crocea*

位点	遗传参数	DQ1 (n=19)	DQ2 (n=39)	MY1 (n=20)	MY2 (n=47)	DM1 (n=20)	DM2 (n=36)	MD1 (n=19)	MD2 (n=50)
HLJDH137	$N/N_e$	9/3.8	11/6.7	13/7.3	14/7.9	12/7.3	15/10.5	11/7.1	16/10.3
	$H_o$	0.684	0.590	0.550	0.532	0.900	0.889	0.737	0.860
	$H_e$	0.716	0.851	0.833	0.873	0.841	0.904	0.832	0.903
	$P$	0.056	0.000*	0.001*	0.000*	0.594	0.171	0.048	0.137
	$F_{is}$	0.098	0.319	0.384	0.400	- 0.018	0.031	0.168	0.057
HLJDH143	$N/N_e$	13/9.5	12/4.2	11/7.5	16/10.9	13/8.6	13/5.8	14/9.8	21/15.7
	$H_o$	0.895	0.667	0.750	0.766	0.850	0.778	0.947	0.840
	$H_e$	0.871	0.763	0.841	0.908	0.860	0.829	0.875	0.936
	$P$	0.374	0.071	0.008*	0.001*	0.000*	0.017	0.472	0.006*
	$F_{is}$	0.027	0.139	0.159	0.167	0.064	0.076	- 0.029	0.113
HLJDH156	$N/N_e$	7/3.3	6/2.7	8/2.1	5/2.0	6/3.5	8/2.1	9/2.7	11/5.0
	$H_o$	0.579	0.564	0.300	0.191	0.750	0.361	0.737	0.480
	$H_e$	0.679	0.634	0.507	0.504	0.695	0.529	0.620	0.800
	$P$	0.173	0.001*	0.000*	0.000*	0.618	0.000*	0.962	0.000*
	$F_{is}$	0.200	0.123	0.451	0.627	- 0.027	0.330	- 0.135	0.409
HLJDH175	$N/N_e$	12/3.3	11/8.4	9/4.7	12/8.2	10/6.6	10/3.8	10/5.39	15/9.0
	$H_o$	0.684	0.846	0.750	0.723	0.850	0.583	0.789	0.720
	$H_e$	0.676	0.881	0.766	0.878	0.826	0.740	0.792	0.889
	$P$	0.052	0.271	0.234	0.000*	0.480	0.188	0.218	0.000*
	$F_{is}$	0.043	0.053	0.073	0.186	0.023	0.225	0.058	0.200
HLJDH182	$N/N_e$	6/4.3	7/3.5	7/4.9	9/6.8	9/5.4	8/5.7	10/7.1	8/6.1
	$H_o$	0.632	0.538	0.600	0.745	0.950	0.528	0.789	0.660
	$H_e$	0.743	0.715	0.770	0.853	0.799	0.825	0.834	0.836
	$P$	0.002*	0.000*	0.001*	0.000*	0.923	0.000*	0.047	0.009*
	$F_{is}$	0.200	0.259	0.269	0.137	- 0.139	0.372	0.107	0.220
HLJDH185	$N/N_e$	7/3.0	7/4.4	6/4.9	7/3.0	9/3.8	6/3.4	8/5.6	9/4.9
	$H_o$	0.526	0.923	0.800	0.681	0.700	0.778	0.789	0.760
	$H_e$	0.648	0.775	0.776	0.669	0.718	0.705	0.800	0.795
	$P$	0.083	0.996	0.401	0.690	0.004*	0.056	0.371	0.066
	$F_{is}$	0.241	- 0.179	0.021	- 0.007	0.076	- 0.090	0.067	0.054
HLJDH186	$N/N_e$	10/7.5	10/6.9	13/6.6	11/6.2	11/6.9	11/4.4	12/5.6	15/7.6
	$H_o$	0.842	0.769	0.800	0.468	0.900	0.361	0.842	0.720
	$H_e$	0.843	0.856	0.825	0.839	0.834	0.772	0.801	0.868
	$P$	0.311	0.004*	0.159	0.000*	0.005*	0.000*	0.624	0.151
	$F_{is}$	0.058	0.114	0.082	0.450	- 0.027	0.543	0.004	0.180
HLJDH085	$N/N_e$	10/5.0	9/5.0	9/6.3	8/2.1	9/3.7	10/7.0	10/4.2	12/3.3
	$H_o$	0.579	0.872	0.800	0.532	0.700	0.750	0.737	0.620
	$H_e$	0.772	0.798	0.819	0.518	0.711	0.858	0.738	0.698
	$P$	0.029	0.829	0.260	0.011	0.085	0.063	0.177	0.015
	$F_{is}$	0.300	- 0.079	0.075	- 0.016	0.067	0.139	0.056	0.122
HLJDH107	$N/N_e$	8/4.4	9/4.6	11/6.4	10/3.7	9/5.5	12/6.2	11/6.5	16/7.5
	$H_o$	0.842	0.744	0.700	0.617	1.000	0.722	0.789	0.860
	$H_e$	0.751	0.780	0.817	0.727	0.801	0.839	0.821	0.867

(续表 2)

位点	遗传参数	DQ1 (n=19)	DQ2 (n=39)	MY1 (n=20)	MY2 (n=47)	DM1 (n=20)	DM2 (n=36)	MD1 (n=19)	MD2 (n=50)
HLJDH125	$P$	0.638	0.162	0.011	0.008*	0.185	0.001*	0.194	0.063
	$F_{is}$	-0.067	0.060	0.194	0.161	-0.199	0.153	0.092	0.018
	$N/N_e$	12/7.9	9/6.2	12/6.6	10/6.2	7/5.3	12/7.0	10/7.0	12/7.7
	$H_o$	0.842	0.718	0.800	0.809	0.800	0.639	0.842	0.580
	$H_e$	0.850	0.840	0.825	0.840	0.789	0.857	0.834	0.869
HLJDH165	$P$	0.386	0.055	0.106	0.327	0.002*	0.000*	0.310	0.000*
	$F_{is}$	0.063	0.158	0.082	0.048	0.038	0.268	0.045	0.342
	$N/N_e$	12/9.0	10/7.3	13/8.2	11/7.9	9/7.7	13/6.5	14/9.3	15/8.4
	$H_o$	0.895	0.895	0.744	0.638	0.850	0.500	0.842	0.760
	$H_e$	0.865	0.865	0.863	0.873	0.847	0.847	0.867	0.880
LYC0002	$P$	0.411	0.115	0.026	0.000*	0.000*	0.000*	0.442	0.028
	$F_{is}$	0.021	0.151	0.227	0.279	0.049	0.421	0.083	0.147
	$N/N_e$	5/3.6	5/2.5	5/3.8	7/4.0	6/3.8	5/4.0	5/3.2	7/4.8
	$H_o$	0.632	0.632	0.564	0.766	0.700	0.778	0.789	0.880
	$H_e$	0.697	0.697	0.592	0.750	0.720	0.747	0.668	0.793
LYC0003	$P$	0.340	0.455	0.695	0.572	0.411	0.428	0.863	0.928
	$F_{is}$	0.148	0.060	-0.057	-0.010	0.080	-0.028	-0.127	-0.100
	$N/N_e$	6/4.8	7/4.8	6/3.4	8/5.3	6/3.5	6/2.6	9/4.6	9/5.0
	$H_o$	0.789	0.789	0.359	0.489	0.400	0.306	0.632	0.500
	$H_e$	0.768	0.768	0.790	0.811	0.684	0.610	0.756	0.798
LYC0004	$P$	0.152	0.000*	0.000*	0.000*	0.001*	0.000*	0.014	0.000*
	$F_{is}$	0.027	0.554	0.522	0.406	0.457	0.510	0.217	0.382
	$N/N_e$	5/3.0	4/3.5	5/2.8	7/3.7	7/3.7	5/3.9	5/3.0	5/2.8
	$H_o$	0.737	0.737	0.795	0.638	0.700	0.556	0.737	0.620
	$H_e$	0.653	0.653	0.710	0.729	0.711	0.742	0.653	0.643
LYC0006	$P$	0.800	0.876	0.702	0.008*	0.005*	0.020	0.770	0.081
	$F_{is}$	-0.075	-0.107	-0.056	0.135	0.067	0.265	-0.075	0.047
	$N/N_e$	4/2.8	4/1.4	4/1.8	4/2.3	4/2.7	4/2.2	3/1.4	5/1.9
	$H_o$	0.684	0.684	0.308	0.596	0.800	0.444	0.211	0.480
	$H_e$	0.622	0.622	0.291	0.570	0.611	0.551	0.269	0.481
	$P$	0.827	0.698	0.048	0.620	0.985	0.187	0.155	0.105
	$F_{is}$	-0.045	-0.045	0.365	-0.034	-0.261	0.206	0.269	0.019

注：P 值采用马尔科夫链方法计算；星号表示  $P < 0.01$

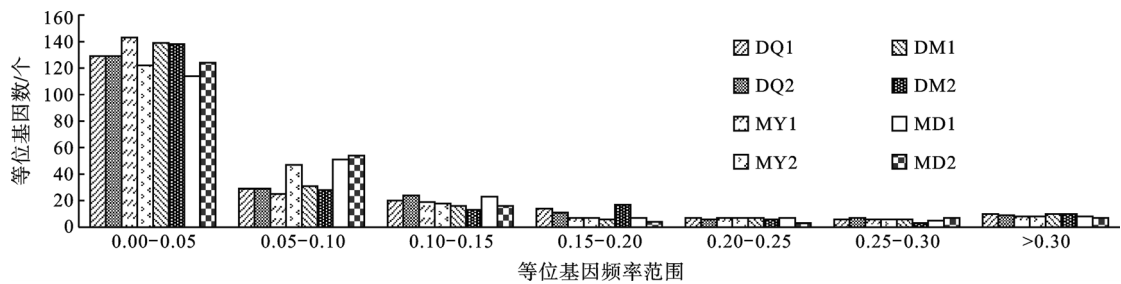


图 1 每个群体 15 个微卫星位点等位基因频率分布图

Fig.1 Allele distribution at 15 microsatellites in each population

虽然未找到能够区分岱衢族和闽-粤东族群体特有的微卫星标记或等位基因,但是在岱衢族 F<sub>3</sub> 个体中(DQ2),有 43.59% 的个体具有位点 HLJDH143 的 110bp 大小的条带,而相应地在闽-粤东族 F<sub>3</sub> 个体中(MY2)只有 5.32%的个体具有这个等位基因片断(图 2)。而在它们的 F<sub>2</sub> 群体中(DQ1 和 MY1),HLJDH143110 的等位基因频率分别为 13.16%和 15.0%,差别不明显。这可能由于在选择育种过程中,由于选择压力或强度不同造成 DQ1 在这个位点的大片段等位基因丢失。

### 2.3 群体间遗传分化和亲缘关系

采用成对样本的 Fisher 检验,对单座位两两配对群体的等位基因频率进行遗传异质性检测。结果显示,除位点 HLJDH085 和 LYC0006 的等位基因频率在 8 个群体间无明显差异外,其余 13 个位点在 F<sub>2</sub> 和 F<sub>3</sub> 代间的 208 次配对检测中,有 71 次出现明显差异

( $P < 0.05$ ),表明大黄鱼群体选育一代就产生约 34.13% (71/208)的遗传差异。

群体间多重位点的遗传分化指数  $F_{st}$  检测显示,群体 DQ1/DQ2 的分歧最大(0.084),而群体 MD1/MD2 分歧最小(0.012),平均为 0.047。F<sub>2</sub> 的 4 个大黄鱼群体间的  $F_{st}$  值是 0.028—0.067,平均 0.0429, F<sub>3</sub> 的 4 个大黄鱼群体间的  $F_{st}$  值是 0.037—0.068,平均为 0.0535。另外,  $R_{st}$  的检测结果与  $F_{st}$  一致,但数值均比  $F_{st}$  大(0.014—0.121),平均为 0.060 (表 3)。相关性检测表明两个遗传分化指数呈显著正相关( $r = 0.817$ ,  $P = 0.01$ )。置换 1000 次检验结果显示,  $F_{st}$  和  $R_{st}$  都极显著偏离数值 0 ( $P < 0.008$ )。

群体间遗传距离  $D_c$  见表 4。从表 4 可以看出,遗传距离最大的是群体 DQ1/MD1(0.450),最小的是 MY2/DM1(0.296)。F<sub>2</sub> 群体的 DQ1 与 MY1 的遗传距

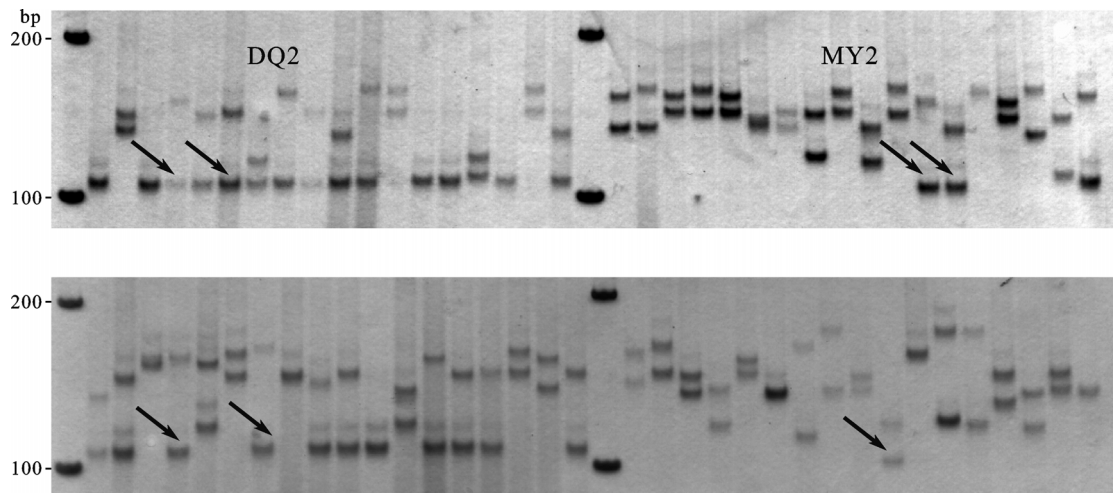


图 2 微卫星标记 HLJDH143 在大黄鱼群体 DQ2 和 MY2 的普通 PAGE 电泳图

Fig.2 Electrophoresis patterns of normal PAGE at locus HLJDH143 in population DQ2 and MY2

注:图中箭头表示位点 HLJDH143 的 110bp 大小的等位基因

表 3 群体间遗传分化指数  $F_{st}$ (右下角)和  $R_{st}$ (左上角)分析

Tab.3 The analysis of genetic differentiation among pairs of samples based on estimates of  $F_{st}$  (below diagonal) and  $R_{st}$  (above diagonal)

群体	DQ1	DQ2	MY1	MY2	DM1	DM2	MD1	MD2
DQ1	—	0.121*	0.069*	0.095*	0.071*	0.088*	0.063*	0.043*
DQ2	0.084*	—	0.062*	0.094*	0.119*	0.078*	0.052*	0.061*
MY1	0.043*	0.055*	—	0.048*	0.044*	0.033*	0.043*	0.053*
MY2	0.073*	0.054*	0.044*	—	0.022*	0.054*	0.042*	0.066*
DM1	0.051*	0.061*	0.033*	0.018	—	0.055*	0.036*	0.050*
DM2	0.065*	0.068*	0.036*	0.061*	0.046*	—	0.053*	0.058*
MD1	0.067*	0.039*	0.038*	0.021*	0.028*	0.048*	—	0.014
MD2	0.054*	0.049*	0.038*	0.037*	0.035*	0.053*	0.012*	—

注:星号表示  $P < 0.008$

离最近(0.366), 与  $F_2$  相比,  $F_3$  的 DQ2 与 MY2 之间的遗传距离增加了 0.03(0.396), 表明全人工定向选育已造成二者之间的遗传分歧逐步扩大, 这与  $F_{st}$  和  $R_{st}$  的结果是相符的。对遗传距离  $D_c$  与  $F_{st}$  和  $R_{st}$  进行相关性检验, 结果表明遗传距离  $D_c$  与  $F_{st}$  ( $r = 0.774, P = 0.01$ ) 和  $R_{st}$  ( $r = 0.615, P = 0.01$ ) 均呈显著正相关。N-J 聚类图显示, 8 个群体虽有不同程度的分歧, 但由于岱衢族和闽-粤东族两个杂交亲本亲缘关系密切, 所以 8 个群体始终聚在一起, 遗传差异不明显(图 3)。

### 3 讨论

#### 3.1 遗传多样性

等位基因多样性和观察杂合度都是衡量遗传变异的指标。本研究采用 15 个微卫星标记在 8 个群体中检测到等位基因 8.1—11.7, 每个群体平均 9.2 个, 观察杂合度 0.598—0.790, 每个群体平均 0.684。而同工酶和 RAPD 标记检测的养殖大黄鱼群体的观察杂

合度分别只有 0.013—0.028 和 0.30—0.33(全成干等, 1999; 李星云等, 2003; 丁诗华等, 2006)。相比之下, 本研究采用微卫星标记获得的有效数据是同工酶和 RAPD 标记的几倍或十几倍, 较真实地反映了研究群体当前的遗传多样性水平。虽然 8 个群体的等位基因数无明显差异, 但是  $F_2$  群体的观察杂合度显著高于其  $F_3$  群体( $P < 0.05$ )。Reed 等(2003)认为, 杂合度的降低会对群体的韧性(fitness)产生破坏性的影响。结合大黄鱼目前的养殖现状, 过小的奠基群体和全人工累代繁殖势必会造成养殖大黄鱼群体的近交衰退, 所以科学地开展大黄鱼的人工繁育是十分必要的。宁波市海湾水产苗种繁育中心每年都对繁育亲本进行人工选择, 并且每年从养殖户收购体质健壮的亲鱼作为后备亲鱼来扩大繁育群体。如果利用微卫星标记对繁育亲本辅助遗传多样性和遗传结构分析, 累代繁殖同样可以维持较高的杂合度, 增强养殖群体的遗传可塑性。

表 4 8 个群体间的遗传距离( $D_c$ )  
Tab.4 Genetic distance ( $D_c$ ) among pairs of eight samples

群体	DQ1	DQ2	MY1	MY2	DM1	DM2	MD1	MD2
DQ1								
DQ2	0.426							
MY1	0.366	0.391						
MY2	0.431	0.395	0.401					
DM1	0.437	0.424	0.406	0.296				
DM2	0.387	0.407	0.351	0.388	0.398			
MD1	0.450	0.390	0.410	0.345	0.387	0.409		
MD2	0.418	0.418	0.369	0.345	0.386	0.392	0.314	

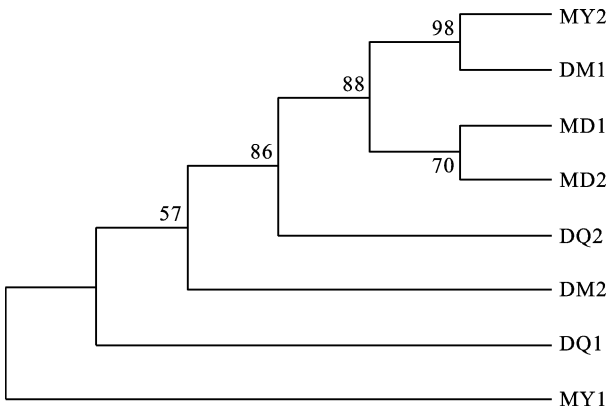


图 3 8 个群体间的 N-J 聚类图

Fig.3 Phylogenetic trees based on genetic distance ( $D_c$ ) using Neighbor-Joining method

本研究用 15 个微卫星位点检测 8 个养殖大黄鱼群体是否显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。结果除 3 个位点(HLJDH085、LYC0002 和 LYC0006)在 8 个群

体中和 1 个群体(MD1)在所有检测位点中无偏离外, 其余 7 个群体在 12 个位点中均有不同程度的偏离 ( $P < 0.01$ )。杂合子缺失一般是造成群体偏离 HWE 的主要原因(Chang *et al.*, 2008b), 而指标  $F_{is}$  可直接反映每个位点的杂合子缺失情况。从本研究 12 个位点在 7 个群体中的  $F_{is}$  值可以看出, 85.7%的  $F_{is}$  值是正值, 说明在本研究中, 杂合子缺失是造成其它 7 个养殖大黄鱼群体偏离 HWE 的主要原因, 而无效等位基因的产生是影响杂合子缺失的主要原因之一。Li 等(2003)在对牡蛎的微卫星标记研究中发现, 79 个微卫星标记中有 41 个都会产生无效等位基因。可见, 无效等位基因是微卫星标记研究中不可避免的。另外, 非随机交配群体、不同独立交配群体的混合及育苗过程中的人工选择都会造成偏离 HWE。从本研究的样本来源中可以看出, 非随机交配群体和多个独立交配群体的混合可能是造成大部分位点偏离 HWE 的另一个主

要原因。

### 3.2 群体间的遗传变异度与亲缘关系

群体间遗传分化指数  $F_{st}$  和遗传距离  $D_c$  是衡量群体间遗传差异的主要指标, 并且二者都是根据每个位点不同等位基因的基因频率计算的。 $F_2$  和  $F_3$  代内的 4 个群体间的等位基因频率均无明显差异( $P>0.05$ ), 而两代间在 15 个位点的等位基因频率上存在约 34.13% 的遗传差异( $P<0.05$ )。而这种差异的产生可能主要由于人为选择压力的加强造成某些等位基因丢失。最直接的例子来自于位点 HLJDH143 的等位基因 110bp 在  $F_2$  和  $F_3$  两代间基因频率的变化。HLJDH143<sub>110bp</sub> 的等位基因频率在  $F_2$  的 DQ1 和 MY1 无明显变化, 而在  $F_3$  的 DQ2 和 MY2 之间存在显著差异, 并且 DQ2 中的很多大片段等位基因丢失(图 2)。另外, 通过分析每个群体的等位基因频率也可以看出, 大部分等位基因频率偏低(图 1), 低频等位基因在人工选育过程中很容易发生丢失(Simianer, 2005)。

虽然 8 个群体间的  $F_{st}$  值都显著偏离数值 0 ( $P<0.008$ ), 说明 8 个群体已开始出现分化, 但是分化程度还较弱。8 个群体间的  $F_{st}$  值是 0.012—0.084, 表明最多只有 8.4% 的遗传差异来自于群体间, 而 92% 的差异存在群体内。另外, 据 Wright(1978)认为,  $F_{st}$  在 0—0.05 之间表明群体间遗传分化微弱, 0.05—0.15 之间表示群体遗传分化中等, 0.15—0.25 表示群体遗传分化较大, 当  $F_{st}$  大于 0.25 时, 表示遗传分化极大。在本研究中, 8 个大黄鱼群体在 15 个位点的  $F_{st}$  和  $R_{st}$  均小于 0.15, 表明群体间已出现了中等程度的分化, 但是造成群体间出现遗传分歧的原动力并不是来自群体自身, 而是人为选择压力造成的。人工选育一代,  $F_2$ (0.0429)和  $F_3$ (0.0535)之间的遗传分歧增加约 1% (0.0106), 这与两代之间在等位基因频率上存在差异的结果是相吻合的。从 8 个群体的 N-J 聚类图中也可以清晰地看出 DQ1 和 MY1 距离较近, 而 DQ2 和 MY2 的距离较远, 说明岱衢族和闽-粤东族的亲缘关系密切, 随着人工选育的干扰, 两个群体的遗传距离有增大的趋势。

岱衢族和闽-粤东族大黄鱼虽然属于两个不同的地理种群, 但是本研究通过微卫星标记进行遗传异质性检测发现, 二者( $F_2$ )的遗传距离为 0.366, 遗传分化指数  $F_{st}$  只有 0.043(小于 0.05), 表明二者亲缘关系密切, 遗传分歧较弱, 该结果与同工酶和 RAPD 分子标记的研究结果是一致的(全成干等, 1999; 丁诗华等, 2006)。通常, 种属之间遗传分化程度越高, 就越容易

获得区分种属特异性的分子标记。从本研究的研究结果来看, 虽然有 7 个群体找到了 40 个特有等位基因, 但是频率都较低, 不能作为群体间的特异性分子标记。另外, HLJDH143<sub>110bp</sub> 等位基因频率在  $F_3$  的岱衢族和闽-粤东族出现明显差异, 而在  $F_2$  代无明显差异, 进一步说明了二者随着人工选育力度的加强, 遗传分歧有增大的趋势。

### 参 考 文 献

- 丁诗华, 黄丽英, 张海琪等, 2006. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)岱衢洋选育群体和官井洋养殖群体的遗传差异分析. 海洋与湖沼, 37(1): 41—46
- 王 军, 全成干, 苏永全等, 2001. 官井洋大黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析. 海洋学报, 23(3): 87—91
- 王志勇, 王艺磊, 林利民等, 2002. 福建官井洋大黄鱼 AFLP 指纹多态性的研究. 中国水产科学, 9(3): 198—201
- 王晓清, 王志勇, 柳小春等, 2006. 大黄鱼人工诱导雌核发育后代的微卫星标记分析. 遗传, 28(7): 831—837
- 全成干, 王 军, 丁少雄等, 1999. 大黄鱼养殖群体遗传多样性的同工酶. 厦门大学学报(自然科学版), 38(4): 584—588
- 刘必谦, 董闻琦, 王亚军等, 2005. 岱衢族大黄鱼种质的 AFLP 分析. 水生生物学报, 29(4): 413—416
- 李明月, 张海琪, 竺俊全等, 2003. 象山港养殖大黄鱼同工酶的分析. 海洋学报, 25(增 2): 231—236
- 罗秉征, 1993. 中国近海主要鱼类种族变动与生活史的演变. 海洋科学集刊. 北京: 科学出版社
- 郝 君, 孙效文, 梁利群等, 2006. 大黄鱼微卫星标记的富集与筛选. 中国水产科学, 13(5): 762—766
- 徐开达, 刘子藩, 2007. 东海区大黄鱼渔业资源及资源衰退原因分析. 大连水产学院学报, 22(5): 392—396
- 黄良敏, 谢仰杰, 苏永全, 2006. 闽-粤东族与岱衢族养殖大黄鱼的遗传多样性研究. 厦门大学学报(自然科学版), 45(6): 836—840
- Alam M S, Islam M S, 2005. Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. Aquaculture, 246: 151—160
- Aldbieser G C, Wolers W R, 2007. Definition of the USDA103 strain of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Animal Genetics, 38(2): 180—183
- Cavalli-Sforza L L, Edwards A W F, 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. Evolution, 32, 550—570
- Chang Y M, Ding L, Wang W W *et al*, 2008a. Isolation and characterization of 11 microsatellite markers for the large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Conserv Genet, DOI 10.1007/s10592-008-9708-9
- Chang Y M, Liang L Q, Ma H T *et al*, 2008b. Microsatellite analysis of genetic diversity and population structure of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Journal of Genetics and Genomics, 35(3): 171—176
- Chistiakov D A, Hellemans B, Haley C S *et al*, 2005. A Microsatellite linkage map of the European sea bass *Dicentrarchus*



- labrax* L. Genetics, 170: 1821—1826
- Dieringer D, Schlotterer C, 2003. MICROSATELLITE ANALYSER (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. Molecular Ecology Notes, 3: 167—169
- Felsenstein J, 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5c. Depart of Genetics, University of Washington, Seattle
- Goodman S J, 1997.  $R_{st}$  Calc: a collection of computer program for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. Molecular Ecology, 6: 881—885
- Goudet J, 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Guo W, Wang Z Y, Wang Y L *et al*, 2005. Isolation and characterization of six microsatellite markers in the large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* Richardson). Molecular Ecology Notes, 5: 369—371
- Li G, Hubert S, Bucklin K *et al*, 2003. Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Molecular Ecology Notes, 3: 228—232
- Liu K, Muse S V, 2002. Powermarker: integrated analysis environment for genetic marker data. Bioinformatics, 21(9): 2128—2129
- Reed D H, Frankham R, 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. Conservation Biology, 17(1): 230—237
- Simianer H, 2005. Using expected allele number as objective function to design between and within breed conservation of farm animal biodiversity. Journal of Animal Breeding and Genetics, 122(3):177—187
- Slatkin M, 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics, 139, 457—462
- Sokal R R, Rohlf F J, 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research, 3rd ed. W. H. Freeman and Co, New York
- Tamura K, Dudley J, Nei M *et al*, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24: 1596—1599
- Waldbieser G C, Bosworth B G, Nonneman D J *et al*, 2001. A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Genetics, 158: 727—734
- Weir B S, Cockerham C C, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution, 38: 1358—1370
- Wright S, 1978. Evolution and the Genetics of Populations. Chicago, The Univ of Chicago Press
- Yeh F C, Yang R, 1999. Popgene Version 1.31. Microsoft window based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Tim Boyle, Centre for International Forestry Research, Canada

## GENETIC DIFFERENTIATION BETWEEN $F_2$ AND $F_3$ CULTURED POPULATIONS IN LARGE YELLOW CROAKER *PSEUDOSCIAENA CROCEA*

CHANG Yu-Mei<sup>1</sup>, WANG Wen-Wen<sup>2</sup>, XU Wan-Tu<sup>3</sup>, LI Ming-Yun<sup>4</sup>,  
XUE Liang-Yi<sup>4</sup>, LIANG Li-Qun<sup>1</sup>

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin, 150070; 2. The College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin, 300071; 3. Xiangshan Seaport Aquatic Seedling & Fingerling Limited Company, Xiangshan, 315702; 4. Life Science and Biotechnology Faculty, Ningbo University, Ningbo, 315211)

**Abstract** Large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*, is one of the economically important marine fish in China. Four populations bred consecutively for two generations ( $F_2$  and  $F_3$ ) were studied with genetic variability using 15 microsatellite markers. A total of 250 individuals comprised population Daiqu (DQ1 and DQ2), population Min-Yue (MY1 and MY2) and their reciprocal crosses (DM1, DM2, MD1 and MD2). The genetic variability of 15 loci was high for all the populations. The mean numbers of alleles per locus ranged from 8.1—11.7, while the mean observed and expected heterozygosity ranged from 0.598 to 0.790, and from 0.732 to 0.794, respectively. There was no significant difference in allele frequencies within  $F_2$  and  $F_3$  ( $P > 0.05$ ); however, approximately 34.13% differences were found between them. In addition, the average values of  $F_{st}$  between  $F_2$  and  $F_3$  were 0.0429 and 0.0535 respectively, having increased by 1% of genetic divergence per generation. The Neighbor-Joining tree topology constructed on the basis of genetic distances among eight populations showed also such a tendency, i.e. the genetic distance was generally increased between  $F_2$  and  $F_3$  during breeding. The results mentioned above demonstrate that artificially selective breeding would strengthen the genetic divergence between  $F_2$  and  $F_3$ , especially populations Daiqu and Min-Yue.

**Key words** Large yellow croaker, Microsatellite, Genetic variability, Genetic differentiation