

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)养殖群体 遗传多样性的降低*

黎中宝^{1,2} 方秀³ 陈锦^{1,2} 常建波^{1,2} 雷光高^{1,2}
张桂玲^{1,2} 赵斌丽^{1,2} 王展林^{1,2}

(1. 集美大学水产学院 厦门 361021; 2. 集美大学水产生物技术研究所 厦门 361021;
3. 福建闽威水产实业有限公司 福鼎 355200)

提要 采用 AFLP 技术方法,对福建二个野生及二个养殖大黄鱼群体进行了遗传多样性的研究。实验采用 7 对引物组合,在四个群体的 120 个个体中共扩增出 472 个位点,其中多态位点为 220 个,多态位点比例为 46.61%。结果表明,大黄鱼养殖群体的遗传多样性降低:宁德野生群体和湄洲野生群体多态位点比例分别为 42.42%和 45.14%,Nei 遗传多样性指数分别为 0.1046 和 0.1245,Shannon 多样性指数分别为 0.1659 和 0.1942,平均有效等位基因数(N_e)分别为 1.4153 和 1.4428;宁德养殖群体和连江养殖群体多态位点比例分别为 40.83%和 40.53%,Nei 遗传多样性指数分别为 0.1027 和 0.1039,Shannon 多样性指数分别为 0.1615 和 0.1633,平均有效等位基因数(N_e)分别为 1.3919 和 1.3856。四个群体间遗传距离为 0.0359—0.1465,平均为 0.079,群体间基因流为 1.0808。

关键词 大黄鱼, AFLP, 养殖群体, 遗传多样性的降低

中图分类号 Q953

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)是我国重要的经济鱼类之一。历史上大黄鱼作为我国“四大渔产”之一,享有盛名。但由于过度捕捞等原因,野生大黄鱼资源受到毁灭性的破坏,不形成渔汛。1985 年大黄鱼人工育苗和繁殖成功后大黄鱼养殖业得到迅速发展,特别是闽东地区,大黄鱼网箱养殖已成为当地经济支柱之一。近年来养殖大黄鱼普遍存在性早熟、生长缓慢、病害频繁发生等现象,这可能与遗传多样性的下降有着极大的关系。学者曾采用形态学(兰永伦等, 1996)、细胞学(全成干等, 2000)、生化(王军等, 2001)及分子生物学(王志勇等, 2002; 李凌云等, 2003)等方法对大黄鱼进行了相关研究,但关于大黄鱼养殖群体遗传多样性降低的研究并不多见。AFLP 技术具有灵敏度高、信息量大、结果稳定可靠等优点,在鱼类牙鲆(张全启等, 2004)、紫红笛鲷(张俊彬等, 2004)、黄姑

鱼(韩志强等, 2006)等遗传多样性研究中有着广泛的应用。本文采用 AFLP 技术对福建宁德和湄洲两个野生大黄鱼群体及宁德和连江两个养殖大黄鱼群体进行了遗传多样性的比较研究,以了解福建闽东地区野生和养殖大黄鱼种质资源现状,为大黄鱼种质的保护和繁殖育种提供依据,具有重要的理论和实践意义。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)共四个群体,宁德野生与养殖群体(分别简称宁德野生和宁德养殖)取于 2007 年 5 月,连江养殖群体(简称连江养殖)取于 2007 年 7 月,湄洲野生群体(简称湄洲野生)取于 2007 年 8 月。每个群体各 30 尾。所有样品均加冰运送至实验室,立即存于 -80 °C 冰箱保存至分析。

* 福建省高等教育新世纪优秀人才支持计划项目,闽教科[2006]35 号;集美大学创新团队基金项目,2007A001 号。黎中宝,博士,教授, E-mail: lizhongbao@jmu.edu.cn

通讯作者: 常建波, 研究员, E-mail: changjianbo@jmu.edu.cn

收稿日期: 2007-12-26, 收修改稿日期: 2008-03-16

1.2 实验方法

1.2.1 模板制备 采用传统的酚/氯仿抽提法, 将每个个体的背部肌肉 50—100mg, 放入离心管, 剪碎。加入 600 μ l STE (10mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 0.1mol/L EDTA, pH 8.0; 1% *m/V* SDS)及蛋白酶 K (20 μ g/ μ l) 15 μ l, 55 $^{\circ}$ C 消化过夜。然后分别用等体积的平衡酚、酚:氯仿(1:1)、苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)各抽提 2 次, 加入二倍体积预冷乙醇沉淀, 75%的乙醇清洗 2 遍, 适量双蒸水溶解。获得的 DNA 样品以 *Hind* 酶切的 λ DNA 为标准, 进行琼脂糖电泳, 紫外分光光度计测定 DNA 浓度, 置于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 AFLP 实验方法 参照 Vos 等(1995)的方法, 实验选用了 7 个选择性引物对(表 1)。

表 1 AFLP 分析所用的接头、预扩增、选择性扩增引物序列
Tab.1 Adaptor and primer sequences used in AFLP analysis

引物	序列
1. 接头	
<i>Eco</i> RI adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
<i>Mse</i> I adapter	5'-GACGTGAGTCCTGAG-3' 5'-TACTCAGGACTCAT-3'
2. 预扩增引物	
	<i>Eco</i> RI 5'-GACTGCGTACCAATTC-3' <i>Mse</i> I 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'
3. 选择性引物	
E-AAC/M-CAC	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
E-AAC/M-CAA	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'
E-AAC/M-CTG	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTA ACTG-3'
E-AGA/M-CAT	5'-GACTGCGTACCAATTC AGA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
E-AGG/M-CAC	5'-GACTGCGTACCAATTC AGG-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
E-AGG/M-CTC	5'-GACTGCGTACCAATTC AGG-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTA ACTC-3'
E-AGG/M-CTG	5'-GACTGCGTACCAATTC AGG-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTA ACTG-3'

1.2.3 数据统计 对银染之后得到的电泳带谱进行统计, 将每个条带视为一个位点, 有带记为 1, 无带记为 0, 将 DNA 条带的有无转化成 1、0 数据矩阵, 统计总位点数和多态位点数。由于 AFLP 属于显性标

记, 因此将扩增位点上有带视为显性基因型, 无带视为隐性纯合基因型。用 POPGENE 1.3.2 软件统计多态位点数和多态位点比例、平均有效等位基因数(N_e)、Nei's 遗传多样性(H)、Shannon 多样性指数(I)、遗传相似度及遗传距离, UPGMA 系统树由 MEGA 4.0 软件构建。

2 结果

2.1 四个大黄鱼群体的遗传多样性

采用 7 对 AFLP 引物对四个群体共 120 个个体进行 DNA 扩增。共得到 472 个 AFLP 位点, 多态位点比例为 46.61%。每对引物扩增位点在 42—95 个之间, 平均每对引物扩增出 67.4 个 AFLP 位点。扩增位点最多的引物对是 E-AGA/M-CAT, 扩增位点数为 95 个, 扩增位点最少的引物对是 E-AAC/M-CTG, 扩增位点数为 42 个。E-AGA/M-CAT 引物对产生的位点多态比例最高为 62.03%(表 2)。

宁德野生群体和湄州野生群体多态位点比例分别为 42.42%和 45.14%, Nei 遗传多样性指数分别为 0.1046 和 0.1245, Shannon 多样性指数分别为 0.1659 和 0.1942, 平均有效等位基因数(N_e)分别为 1.4153 和 1.4428。

宁德养殖群体和连江养殖群体多态位点比例分别为 40.83%和 40.53%, Nei 遗传多样性指数分别为 0.1027 和 0.1039, Shannon 多样性指数分别为 0.1615 和 0.1633, 平均有效等位基因数(N_e)分别为 1.3919 和 1.3856(表 3)。

2.2 四个大黄鱼群体间的遗传分化

四个大黄鱼群体间遗传距离为 0.0359—0.1465, 平均遗传距离为 0.0727(表 4)。图 1 为由 UPGMA 方法构建的四个大黄鱼群体的系统树。

3 讨论

宁德野生群体和湄州野生群体的多态位点百分比、Shannon 多样性指数、Nei's 遗传多样性指数及平均有效等位基因数与其它鱼类 AFLP 研究结果相比处于较低的水平(表 5), 可见大黄鱼遗传多样性水平较低。本研究中两个野生群体的多态位点百分比低于官井洋大黄鱼群体(69.2%—76.6%)及浙江岱衢族大黄鱼群体(55.80%)(刘必谦等, 2005; 王志勇等, 2002), 这可能是由于所选用的引物不同所致。大黄鱼野生群体遗传多样性水平较低可能有以下三个原因: 首先, 野生资源量少而导致的瓶颈效应。大黄鱼在 20 世纪

表 2 不同引物扩增不同大黄鱼群体的位点数及多态位点比例
Tab.2 Numbers of band amplified by different primer sets in 4 *P. crocea* populations

引物	总扩增位点数	总多态位点数及比例	多态位点数及多态位点比例			
			宁德野生	宁德养殖	湄洲野生	连江养殖
E-AAC/M-CAC	75	36(49.30%)	27(44.26%)	24(39.34%)	23(36.51%)	24(38.10%)
E-AAC/M-CAA	93	33(49.30%)	29(42.03%)	24(38.82%)	22(32.83%)	21(35.00%)
E-AAC/M-CTG	42	33(57.89%)	31(56.36%)	24(50.00%)	25(51.02%)	22(47.83%)
E-AGA/M-CAT	95	54(60.00%)	46(51.69%)	47(53.41%)	42(47.19%)	48(54.55%)
E-AGG/M-CAC	61	27(55.10%)	20(43.48%)	12(31.58%)	12(31.58%)	14(34.15%)
E-AGG/M-CTC	50	23(53.48%)	15(36.59%)	12(34.29%)	10(28.81%)	14(37.84%)
E-AGG/M-CTG	56	24(52.17%)	20(44.45%)	14(35.00%)	12(31.58%)	11(30.56%)

表 3 四个大黄鱼群体的遗传多样性指标
Tab.3 Indexes of genetic diversity in 4 *P. crocea* populations by AFLP

群体	总扩增位点数	多态位点数	多态位点比例	Nei 遗传多样性指数	Shannon 多样性指数	平均有效等位基因数(N_e)
宁德野生	462	196	42.42%	0.1046	0.1659	1.4153
湄洲野生	463	209	45.14%	0.1245	0.1942	1.4428
宁德养殖	453	185	40.83%	0.1027	0.1615	1.3919
连江养殖	449	182	40.53%	0.1039	0.1633	1.3856

表 4 四个大黄鱼群体间的遗传距离(下三角)

Tab.4 Genetic distance among the four *P. crocea* populations by AFLP

群体	宁德野生	宁德养殖	湄洲野生	连江养殖
宁德野生	—			
宁德养殖	0.0668	—		
湄洲野生	0.0359	0.1019	—	
连江养殖	0.0758	0.1465	0.0466	—

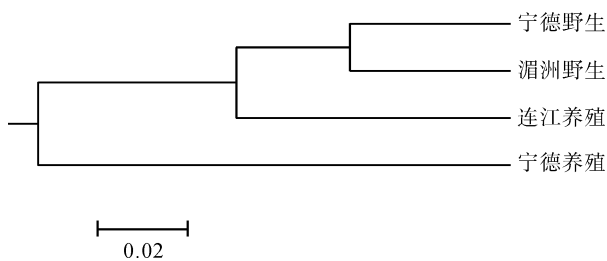


图 1 UPGMA 方法构建的四个大黄鱼群体的系统树

Fig.1 UPGMA dendrogram by AFLP in 4 *P. crocea* populations

70 年代以前, 具有明显的渔场和渔汛期, 东海渔区最高年捕捞量为 16.81 万吨。大黄鱼种质资源的破坏主要归结于敲罾作业、对越冬大黄鱼的围捕及捕捞设施和技术提高等原因(胡银茂, 2006)。20 世纪 70 年代以后, 大黄鱼群体数量开始急剧下降, 20 世纪 80 年代末至 90 年代初, 大黄鱼的年产量仅为 2000t 左右, 至今仍没有恢复的迹象(陈卫忠, 1994)。其次, 人工放流的不良影响。20 世纪 90 年代后为恢复大黄鱼野生资

源量, 各地采取了人工放流大黄鱼鱼苗的措施, 仅宁波地区, 2003—2005 年每年放流 150 万尾(胡银茂, 2006)。而人工放流的大黄鱼苗多为 1985、1986 两年捕获的 32 尾雌鱼及其子一代的后代, 遗传背景单一, 人工放流的大黄鱼与为数不多的野生大黄鱼杂交, 可能进一步降低野生大黄鱼遗传多样性。第三, 养殖个体逃逸对野生资源的不良影响。由于大黄鱼养殖群体遗传背景单一, 因此逃逸个体与野生种的杂交势必降低其遗传多样性。Clifford 等(1998)发现养殖大西洋鲑苗种逃逸到自然界而使得自然群体平均杂合度明显下降。在研究的两个野生群体中, 湄洲群体遗传多样性高于宁德野生群体, 可能由于湄洲养殖逃逸较少有关, 因为宁德地区的养殖量远远超过湄洲地区。因此应减少养殖个体的逃逸及谨慎地进行人工放流或者选用遗传背景丰富的大黄鱼进行放流。

比较大黄鱼野生群体, 其养殖群体的遗传多样性降低。作者的研究结果与对牙鲆(张全启等, 2004)、鳗状黄姑鱼(丁少雄等, 2001)、真鲷(王伟继等, 2000)、斜带髯鲷(王世锋等, 2007)及官井洋大黄鱼(王军等, 2001)等的养殖群体和野生种群的研究结果一致。养殖群体的生长缓慢、个体变小、性成熟提早、抗病能力下降、肉质变差等现象与其遗传多样性的降低有着密切的联系。而大黄鱼养殖群体遗传多样性降低主要由于亲本数量少引起的遗传瓶颈效应及其伴随发生的遗传漂变和近交衰退等作用。也有人认为养殖的环

表 5 基于 AFLP 研究的鱼类遗传多样性
Tab.5 Indexes of genetic diversity in fishes by AFLP

物种	多态位点百分比	Nei's 遗传多样性指数	Shannon 多样性指数	平均有效等位基因数	资料来源
岱衢族大黄鱼	40.47—54.62	—	—	—	刘必谦等, 2005
萨罗罗非鱼	16.6	0.331	0.326	1.812	赵金良等, 2007
半滑舌鲷	40.2—49.8	0.057—0.087	0.097—0.1369	—	韩志强等, 2007
岩原鲤	46.89	0.1768	—	—	宋君等, 2005
官井洋大黄鱼	69.2—76.6	—	—	—	王志勇等, 2002
呼玛河哲罗鱼	84.43	0.386	0.510	—	匡友谊等, 2007
黄姑鱼	51.7—51.9	0.099—0.1022	0.162—0.164	—	韩志强等, 2006
紫红笛鲷	41.89—57.14	—	—	—	张俊彬等, 2004
牙鲆	40.07—46.18	—	—	—	张全启等, 2004
大黄鱼	40.53—45.14	0.102—0.124	0.161—0.194	1.385—1.442	本研究

境条件可以改变等位基因的组成(Mjølnerod *et al.*, 1997)。因此在以后的养殖过程中应该选择遗传多样性丰富的野生大黄鱼作为亲本, 并且保持一定的亲本数量, 注意对养殖群体遗传多样性的检测。另一方面, 比较野生群体, *H. rubra*、*H. midae* 和 *H. tuberculata* 养殖群体的观察杂合度并没有减少(Evans *et al.*, 2004; Mgaya *et al.*, 1995)。然而, 稀有等位基因的减少或降低并不会对观察杂合度有大的影响(Allendorf *et al.*, 1980), 但比观察杂合度的减少或降低更有害(Vuorinen, 1984)。

本研究中野生群体间遗传距离为 0.0359, 野生与养殖群体间平均遗传距离为 0.0727。而聚类分析中野生群体聚为一支, 与养殖群体间存在低的遗传分化(图 1)。这与 *H. rubra* 和 *H. midae* 野生与养殖群体间的遗传分化结果一致(Evans *et al.*, 2004)。

参 考 文 献

- 丁少雄, 王 军, 2001. 野生与养殖鮟状黄姑鱼群体遗传多样性的同工酶比较. 厦门大学学报(自然科学版), 40(4): 922—926
- 王 军, 全成干, 苏永全等, 2001. 官井洋野生与养殖大黄鱼同工酶的研究. 海洋科学, 25(6): 39—41
- 王世锋, 杜佳莹, 苏永全等, 2007. 斜带髯鲷野生与养殖群体遗传结构的 ISSR 分析. 海洋学报, 29(4): 105—110
- 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—213
- 王伟继, 孔 杰, 庄志猛等, 2000. 真鲷野生群体和人工繁殖群体的同工酶遗传差异. 生物多样性, 8(4): 391—396
- 兰永伦, 罗秉征, 1996. 大黄鱼耳石、体长与年龄的关系. 海洋与湖沼, 27(3): 321—330
- 匡友谊, 佟广香, 尹家胜等, 2007. 呼玛河哲罗鱼遗传多样性的 AFLP 分析. 中国水产科学, 14(4): 616—621
- 全成干, 王 军, 丁少雄等, 2000. 大黄鱼染色体核型研究. 厦门大学学报(自然科学版), 39(1): 107—110
- 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, 薛良义等, 2003. 网箱养殖大黄鱼遗传多样性的同工酶和 RAPD 分析. 中国水产科学, 10(6): 523—525
- 宋 君, 宋昭彬, 岳碧松等, 2005. 长江合江江段岩原鲤种群遗传多样性的 AFLP 分析. 四川动物, 24(4): 495—499
- 张全启, 徐晓斐, 齐 洁等, 2004. 牙鲆野生群体与养殖群体的遗传多样性分析. 中国海洋大学学报, 34(5): 816—820
- 张俊彬, 黄良民, 2004. 紫红笛鲷遗传多样性的 AFLP 分析. 热带海洋学报, 23(5): 50—55
- 陈卫忠, 1994. 东海区主要经济鱼类的资源近况. 海洋渔业, 16(4): 163—167
- 赵金良, 王伟伟, 李思发等, 2007. 我国引进萨罗罗非鱼群体的 AFLP 遗传指纹. 上海水产大学学报, 16(3): 293—296
- 胡根茂, 2006. 东海海区大黄鱼种质资源的历史演变和现状分析. 绍兴文理学院学报, 26(7): 49—52
- 韩志强, 庄志猛, 高天翔等, 2007. 半滑舌鲷 DNA 的群体遗传变异. 中国水产科学, 14(2): 192—200
- 韩志强, 高天翔, 王志勇等, 2006. 黄姑鱼群体遗传多样性的 AFLP 分析. 水产学报, 30(5): 640—646
- Allendorf F W, Phelps S R, 1980. Loss of genetic variation in hatchery stock of cutthroat trout. Transactions of the American Fisheries Society, 109: 537—543
- Clifford S L, McGinnity P, Ferguson A, 1998. Genetic Changes in an Atlantic salmon population resulting from escaped juvenile Farm salmon. J Fish Biology, 52: 916—922
- Evans B, Bartlett J, Sweijd N *et al.*, 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South African (*Haliotis midae*). Aquaculture, 233: 109—127
- Mgaya Y D, Gosling E M, Mercer J P *et al.*, 1995. Genetic variation at three polymorphic loci in wild and hatchery stocks of the abalone *Haliotis tuberculata* Linnaeus. Aquaculture, 136: 71—80
- Mjølnerod I B, Refseth U H, Karlsen E *et al.*, 1997. Genetic dif-

- ferences between two wild and one farmed population of Atlantic salmon (*Salmo salar*) resealed by three classes of genetic markers. *Hereditas*, 127: 239—248
- Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al*, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23: 4407—4414
- Vuorinen J, 1984. Reduction of genetic variability in a hatchery stock of brown trout, *Salmo trutta*. *Journal of Fish Biology*, 24: 339—348

LOSS OF THE GENETIC DIVERSITY IN CULTIVATED POPULATIONS OF *PSEUDOSCIAENA CROCEA* BY AFLP

LI Zhong-Bao^{1,2}, FANG Xiu³, CHEN Jin^{1,2}, CHANG Jian-Bo^{1,2}, LEI Guang-Gao^{1,2},
ZHANG Gui-Ling^{1,2}, ZHAO Bin-Li^{1,2}, WANG Zhan-Lin^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen, 361021; 2. Institute of Aquaculture Biotechnology, Jimei University, Xiamen, 361021;
3. Fujian Min Wei Aquatic Products Industrial Co., Ltd., Fuding, 355200)

Abstract Genetic diversity of two wild and two cultivated populations of *Pseudosciaena crocea* in Fujian Province were analyzed by AFLP. A total of 472 loci were detected from 120 individuals in the 4 populations, of which 220 (46.61%) are polymorphic. The results from AFLP technique show that the genetic diversity in the cultivated populations has been reduced compared to that of wild populations. The percentage of polymorphic loci, the Nei's Gene Diversity, Shannon's Information Index and the mean effective number of alleles per locus in two wild populations are 42.42%—45.14%, 0.1046—0.1245, 0.1659—0.1942 and 1.4153—1.4428, respectively, which in two cultivated populations are 40.83%—40.53%, 0.1027—0.1039, 0.1615—0.1633 and 1.3919—1.3856, respectively. Genetic distance among the 4 populations varies from 0.0359—0.1465, in the mean of 0.079, and the gene flow (N_m) is 1.0808. These results show a lower-level genetic diversity compared to other fishes.

Key words *Pseudosciaena crocea*, AFLP, Cultivated population, Loss of genetic diversity