

闽粤群和岱衢群养殖大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) 及其杂交子代遗传差异的 SSR 分析*

黄振远^{1,2} 苏永全¹ 张建设² 吴常文²

(1. 厦门大学海洋与环境学院 厦门 361005; 2. 浙江海洋学院 浙江省海洋养殖装备
与工程技术重点实验室 舟山 316004)

提要 采用 SSR 方法进行了闽粤群(MY)和岱衢群(DQ)及其正交和反交大黄鱼的遗传差异的研究。结果表明, Shannon's 多样性指数为 DQ 群高于 MY 群, 分别为 2.14、2.04; 反交群高于正交群分别为 2.13、2.03; 杂交群体中为 2.24 与其亲体群的相似(2.22)。亲体群间基因分化系数 F_{st} 值为 0.020, 低于杂交后代的 0.026。AMOVA 显示, 亲体群和后代群基因差异均很低, 且亲体群基因分化度低于和杂交后代群, F_{st} 值分别为 0.011、0.032。Nei 遗传距离显示子代间遗传距离大与亲代代间的遗传距离分别为 0.39、0.22。UPGMA 聚类将其分为 3 组, 其中 DQ 群与 MY 群遗传距离最近。可以认为养殖的 DQ 群与 MY 群大黄鱼间遗传背景差异较低, 其中 DQ 族遗传背景较好, 杂交后代群的基因多样性和基因差异性稍有提高, 其中反交效果较好。

关键词 大黄鱼, 基因多样性, 微卫星, 正、反交
中图分类号 Q321+.6

大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* (Richardson) 属硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲈形目(Perciformes)、石首鱼科(Sciaenidae)、黄鱼属(*Pseudosciaena*), 又名黄鱼、大王鱼、大鲜、大黄花鱼等。为传统“四大海产”(大黄鱼、小黄鱼、带鱼、乌贼)之一。头颅内有 2 块白色矢耳石, 为我国近海主要经济鱼类。我国沿海的大黄鱼可分为 3 个地理种群, 由北向南分别为岱衢群、闽粤东群和碇洲群。其中, 岱衢群以岱衢洋鱼群为代表, 主要分布在黄海南部到东海中部(福建瑜山以北); 闽粤东群以官井洋鱼群为代表, 主要分布于东海南部和南海北部(福建瑜山以南到珠江口); 碇洲群主要为广东碇洲近海鱼群, 主要分布区为珠江口以西到琼州海峡以东(田明诚等, 1962)。

20 世纪 80 年代以来, 由于酷捕滥捞, 资源濒临枯竭(陈卫忠, 1994), 已经很难捕获野生的大黄鱼。与此同时, 养殖大黄鱼经过累代繁殖, 也不同程度出现

了生长率、个体大小、抗病性等经济性性状退化的现象(王军等, 2001; 王娟等, 2010)。为了保护大黄鱼资源以及满足消费者需求, 改良养殖大黄鱼的种质, 国内开展了大黄鱼的遗传多样性研究(王军等, 2001; 王晓清等, 2006; 黄良敏等, 2006; 丁诗华等, 2006; 黎中宝等, 2009)。在育种方面, 马梁等(2002)研究了大黄鱼与黄姑鱼(*Nibea albiflora*)种间的杂交育种。还有学者利用分子标记研究了雌核发育和种间杂交大黄鱼的种质资源情况(许建和等, 2006; 马梁等, 2002; 王晓清等, 2007)。目前最主要的育种方法仍是传统的种内杂交育种方法, 很少使用分子标记技术进行辅助, 也未系统地对育种后的种质改良效果进行过分子生物学上的评估, 特别是不同群体亲体群间的正交反交的比较研究。本文采用 SSR(Simple Sequence Repeats, 简单重复序列)标记技术比较研究并评估了正交和反交这两种杂交方法在大黄鱼种内杂交育种中

* 国际科技合作项目, 2006DFA32960 号; 国家公益性行业科研专项, 200903029-06 号。黄振远, 博士, E-mail: zhenyuanh79@yahoo.com.cn

通讯作者: 吴常文, 教授, E-mail: wucw08@126.com

收稿日期: 2010-09-15, 收修改稿日期: 2010-11-29

的作用, 为杂交育种优良亲体群和高效率的杂交方式的选择提供参考, 以加快大黄鱼种质改良工作的进程。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)于 2008 年 5 月初采自浙江省象山港海湾水产苗种繁育中心。在海区网箱养殖的岱衢洋群(2000 年捕自舟山岱衢洋海域的野生大黄鱼驯化繁育的后代)、官井洋群(多代养殖繁育的福建官井洋大黄鱼经选育的后代)的后代, 以及它们的正交(官井洋群 × 岱衢洋群)和反交(岱衢洋群 × 官井洋群)4 个群体的幼鱼, 体长为 1—2cm, 每个群体取 30 尾。活体经塑料袋充氧运回实验室后, 无水乙醇保存在-70℃冰箱。

1.2 研究方法

按 DNA 标准抽提方法并加以改进(王晓清等, 2008), 从鱼体肌肉提取基因组 DNA。SSR 分析参照文献(Sambrook *et al*, 1989)进行, 略有改动。从 GenBank 数据库中筛选出 11 对引物(表 1), 在全部 4 个大黄鱼群体中均扩出了清晰的条带, 所得片段在 100—300bp 之间, 群体中多态位点数位 4—21, 平均为 11.6, 具有很好的重复性。微卫星标记在 4 个大黄鱼群体中检测出较高的多态性。11 个位点总共扩增出 26 个等位基因。数据分析参照 Marker 根据相同迁移率处扩增条带的有无, 有带记为 1, 无带记为 0, 并利用 POPGEN 1.31 软件计算 Nei 氏的遗传距离和遗传相似系数, 用 UPGMA 进行聚类分析, Arlequin 3.11 进行分子方差分析。

表 1 本研究使用的 SSR 引物信息
Tab.1 The SSR primers in the present study

位点	引物序列	Ta(°C)	来源
HLJDH20	F: TCCCTCTTTTCTATCTCAC R: ACTCCACCTGTCTTTTAC	50	郝君等, 2006
HLJDH85	F: AATGTTCACTGCGATGACTCC R: TCCTCATGTGCAGTTACCA	55	GenBank No.EU590671
HLJDH107	F: ATTCTTCTGCCCTCCAAAT R: ACTCCCCTGATGCGTCTCTA	59	GenBank No.EU590676
HLJDH125	F: TCAGCAGGCAAGGTACACAC R: TATGCAGTGCAGCTCTTTCC	55	GenBank No.EU590677
HLJDH185	F: CTGACTCTGAACGCTTGG R: TTCTGTGGTCGTCGCTCT	55	GenBank No.EU590679
HLJDH186	F: AGACACTCCGAGCAATAC R: GACTAAATGCCTCCAGAT	55	GenBank No.EU590681
PC10G6	F: CTTTGCTGTGAGGCTTTTCC R: TCGCAGACAGAATCTCCAAG	50	GenBank No.EF635876
PC7H4	F: CATCTCCCCCACTCATATCG R: TTCAGACTGCTGCCCTGTC	52	GenBank No.EF635869
PC7A2	F: AGTGAGGAGTGAAGGCAGGA R: TTGACCGGTTGTGTTGTGTT	51	GenBank No.EF635867
PC1C4	F: CATGAGACCAACGACTGCT R: AGGGCTGATCTCCTTGTTCA	55	GenBank No.EF635863
PC10F10	F: CCTGTGTCATTTTGGTTTC R: AGACTGGAGCTGTCTCTCTG	53	GenBank No.EF635875

2 结果

11 对微卫星标记(引物序列信息见表 1)在四个大黄鱼群中检测出较高的多态性, 总共扩增出 26 个等位基因, DQ 群、MY 群、ZJ 群和 FJ 群的有效等位基因数 N_e 分别为 7.9、7.2、7.3、8.2, 见表 2, PIC 值分别为 0.818、0.800、0.785、0.811, 平均为 0.804。引物 HLJDH 185 在 FJ 群和 ZJ 群中的扩增结果, 见图 1。

观察杂合度分别为 0.70、0.74、0.73、0.63, 见表 2。4 个群体的 Shannon's 基因多样性指数 h 在杂交群

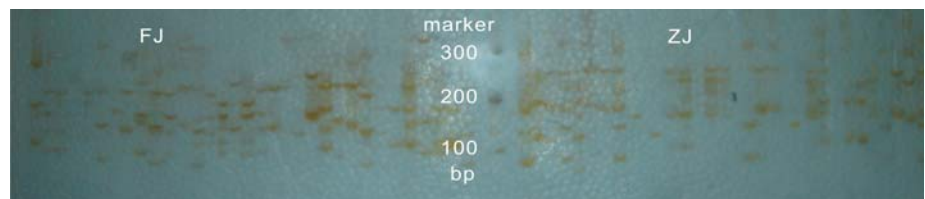


图 1 引物对 HLJDH 185 在 FJ 群和 ZJ 群中的扩增结果图

Fig.1 The amplify results in FJ and ZJ populations using Primers HLJDH 185

体中平均为 2.24 稍高于其亲体群的 2.23, 见表 2, 显示杂交在一定程度上提高了群体的基因多样性。DQ 群和 MY 群基因多样性 h 分别为 2.15、2.04, 见表 2。正交、反交后代群中的基因多样性也差别不大分别为 2.03、2.13, 其中 FJ 群基因多样性高于 ZJ 群 5% 左右,

表 2 大黄鱼 4 个群体的 SSR 分析结果
Tab.2 The SSR analysis result of the four *P. crocea* populations

群体	样本数	观察等位基 因数 N_a	有效等位基 因数 N_e	基因多样性 h	观察杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	近交系数 F_{IS}	基因分化系 数 F_{st}	基因流 Nm
DQ	60	12.5	7.9	2.15	0.70	0.85			
MY	60	10.6	7.2	2.04	0.74	0.84			
亲体群	120	13.4	8.8	2.23	0.72	0.85	0.13	0.020	12.16
ZJ	60	11.3	7.3	2.02	0.73	0.81			
FJ	60	11.8	8.2	2.12	0.63	0.84			
子代群	120	14.2	9.1	2.24	0.68	0.84	0.17	0.026	9.26

注: DQ: 岱衢群; MY: 闽粤东群; ZJ: 岱衢群为母本, 闽粤东群为父本; FJ: 闽粤东群为母本, 闽粤东群为父本

见表 2。亲体群和后代群的基因分化系数 F_{st} 值分别为 0.020、0.026, 显示群体间分化度极低, 基因流 Nm 分别为 12.16、9.26 显示群体间基因交流非常高, 见表 2。

Nei 氏基因距离显示群体间差异较大, 平均为 0.28, 见表 3。聚类显示 DQ、FJ 两个亲体群最近, 先聚在一起, 然后与 MY 群聚在一起, 最后与 ZJ 群聚在一起, 见图 2。AMOVA 分析显示母本间有显著差异 F_{st} 值为 0.01, 方差主要来自群体间, 群内群间方差百分比分别为 1.12%、15.83%; 子代也显示方差主要来自群体间 F_{st} 值为 0.03; 子代较亲代分化度大, 群内群间方差百分比分别为 3.19%、17.87%, 见表 4、表 5。

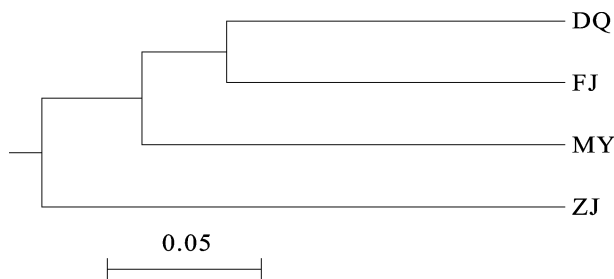


图 2 大黄鱼 4 个群体 UPGMA 聚类图

Fig.2 The UPGMA cluster result of the four populations in *P. crocea*

表 3 四个大黄鱼群体间基因遗传距离

Tab.3 The gene distance of the four populations in *P. crocea*

pop ID	DQ	MY	ZJ	FJ
DQ	—			
MY	0.22	—		
ZJ	0.28	0.34	—	
FJ	0.22	0.33	0.40	—

3 讨论

四个大黄鱼群体中, 平均观察杂合度(H_o)均低于平均期望杂合度(H_e), D 值均为负, 表明这 4 个群体均处于杂合子缺失状态。究其原因, 它们均为养殖群体,

表 4 大黄鱼母本间 AMOVA 分析结果

Tab.4 The AMOVA result of the parental *P. crocea* generation populations

变异来源	平方和	差异组分	变异百分比%
群内	8.57	0.05	1.12
群间	313.77	0.75	15.83
$P: 0.01$			

表 5 大黄鱼子代间 AMOVA 分析结果

Tab.5 The AMOVA result of the filial *P. crocea* generation populations

变异来源	平方和	方差组分	变异百分比%
群内	14.30	0.15	3.19
群间	308.77	0.85	17.87
$P: 0.03$			

且经过累代近交繁殖, 势必造成部分稀有等位基因的丢失, 从而在群体中出现杂合子缺失。大多数 SSR 位点上的遗传多样性较高, 平均观察杂合度为 0.62—0.72, PIC 平均为 0.80, 且均大于 0.5, 表明其等位基因分布较均匀, 多态性较高, 本实验选择的 SSR 引物适合进行大黄鱼的遗传多样性研究。遗传分化系数 (F_{st}) 和基因流 (Nm) 是两个最能反映遗传分化的指标。Wright 等(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为中等; 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, 大黄鱼在亲体和杂交后代群的遗传分化系数分别为 0.020、0.026, 遗传分化较弱。但子代间的分化稍大于亲代间的分化, 与杂交后代的基因多样性高于亲代点一样, 表现为杂种优势。一般认为, 群体之间的 $Nm > 1$, 群体就可以抵抗由于遗传漂变的影响(Millar *et al.*, 1991), 本研究的基因流则为 12.1604—9.2594, 这与基因分化系数的结果相一致。

两个亲体群的遗传分化度很低, 基因流较大, 这

与这 4 个群体为多代养殖群体相关。此外也与这两个群体的野生群体的遗传分化度不高有关, 与其它多数海洋鱼类的结果相一致。一般认为, 海洋生物与陆生生物相比是一类种群结构和分化相对匮乏的生物类群, 这种种群结构的匮乏缘于海洋环境缺乏象陆地环境一样阻止生物种群扩散和交流的有效屏障; 且其野生群体一直处于较大的捕捞压力之下, 也会导致群体间只存在较小的遗传分化(Ward *et al*, 1994; Stabile *et al*, 1996)。最后一种可能的情况是在养殖过程中出现过杂交污染。

丁文超等(2009)研究了这 4 个群体在形态学上的差异, 其结果为 DQ 群高于 MY 群, 子代中的反交群是所有 4 个群体中差异度最大的一个。有研究认为群体中的性状与其基因的多样性是正相关的(王军等, 2001), 因此本研究的结果与丁文超等(2009)的结果相一致, 而与丁诗华等(2006)的 MY 群高于 DQ 群的结果不同。原因可能是本研究的对象与丁诗华等的不同, 是在丁诗华等研究对象几代选育后的后代。因此作者的结论是 DQ 群大黄鱼经过几代选育后, 其基因多样性或许得到了改良。饲养于北美的斯氏瞪羚(*Gazella spekei*), 在饲养之初, 其亲本仅为一雄三雌 4 个个体, 且在常规饲养中产生了严重的近交衰退。但在执行了以遗传管理为指导的繁育计划之后, 斯氏瞪羚无论在数量上还是在体质上均有很大提高(Kalinowski *et al*, 2000)。Basiao 等(1984)的研究也表明, 日本 1963 年引进的尼罗罗非鱼经过 20 多年的养殖后仍能保持较高的遗传变异水平, 这其中科学而严格的遗传管理起了重要作用。因此使用人工种内杂交改良养殖大黄鱼在技术上是可行的。

虽然目前大黄鱼养殖群体遗传多样性水平较低, 且已经出现衰退, 但是只要今后加强遗传管理, 选择遗传变异高的个体进行人工繁殖, 扩大遗传变异度, 降低近交系数, 改良人工繁育大黄鱼种质的可能性还是很大的。

参 考 文 献

- 丁文超, 李星云, 管丹冬等, 2009. 大黄鱼 4 个家系的形态差异分析. 宁波大学学报(理工版), 22(2): 185—190
- 丁诗华, 黄丽英, 张海琪等, 2006. 大黄鱼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
- 马 梁, 王 军, 陈武各等, 2002. 鲩状黄姑鱼与大黄鱼人工杂交子代的胚胎发育. 厦门大学学报(自然科学版), 41(3): 112—116
- 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 娟, 封永辉, 蔡立胜等, 2010. 来自大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)肠道的弧菌拮抗菌的筛选与鉴定. 海洋与湖沼, 41(5): 707—713
- 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
- 王晓清, 王志勇, 柳小春等, 2007. 人工雌核发育大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)的 AFLP 分析. 海洋与湖沼, 36(1): 22—28
- 王晓清, 王志勇, 谢中国等, 2008. 大黄鱼()与鲩()杂交的遗传分析. 水产学报, 32(1): 51—57
- 田明诚, 徐恭昭, 余日秀, 1962. 大黄鱼形态特征的地理变异与地理种群问题. 海洋科学集刊, (2): 79—97
- 陈卫忠, 1994. 东海区主要经济鱼类资源近况. 海洋渔业, 16(4): 163—167
- 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
- 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
- 黎中宝, 方 秀, 陈 锦等, 2009. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)养殖群体遗传多样性的降低. 海洋与湖沼, 40(4): 446—450
- Basiao Z U, Taniguchi N, 1984. An investigation of enzyme and other protein polymorphisms in Japanese populations of the tilapias *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zilli*. Agriculture, 38: 335—345
- Kalinowski S T, Hedrick P W, Miller P S, 2000. Inbreeding depression in the Speke's gazelle captive breeding program. Conservation Biology, 15(5): 1375—1384
- Millar C L, Libby W J, 1991. Strategies for conserving clinal, cecotypic, and disjunct population diversity in wide spread species. In: Fald D A, Holsinger K E ed. Genetics and Conservation of Rare Plants. New York: Oxford University Press, 149—170
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Press, 463—468
- Stabile J, Waldman J R, Parauka F *et al*, 1996. Stock structure and homing fidelity in Gulf of Mexico Sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotoi*) based on restriction fragment length polymorphism and sequence analysis of mitochondrial DNA. Genetics, 144: 767—775
- Ward R D, Woodwark M, Skibinski D F, 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. Journal of Fish Biology, 44: 213—232
- Wright S, 1978. Evolution and the Genetics of Populations. Chicago: The Univ of Chicago Press, 1—112

STUDY OF CULTURED DAIQU AND MINYUE POPULATIONS LAGER YELLOW CROAKER *PSEUDOSCIAENA CROCEA* AND ITS HYBRID FILIAL GENERATIONS USING SSR TECHNOLOGY

HUANG Zhen-Yuan^{1,2}, SU Yong-Quan¹, ZHANG Jian-She², WU Chang-Wen²

(1. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, 361005; 2. Marine Science College of Zhejiang Ocean University, Key Laboratory of Mariculture Equipments and Engineering Technology of Zhejiang Province, Zhoushan, 316004)

Abstract The genetic diversity of 120 accessions of breeding Large Yellow Croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson) was analyzed. Using 11 pair of SSR polymorphic markers, a total of 26 alleles were found, which exhibited high level of diversity. The range of polymorphism information content (*PIC*) was 0.785—0.818, average 0.804. Shannon's Information index of DQ populations was higher than MY populations and it was 2.14, 2.04 respectively. The filial generation higher than parental generation it was 2.24, 2.22 respectively. And minus-hybrid generation higher than plus-hybrid generation it was 2.13, 2.03 respectively. The F_{st} of parental generation was lower than filial generation; it was 0.020, 0.026 respectively. The Gene flow was very high according to F_{st} value. The UPGMA clustering analysis at the genetic similarity grouped the four populations into three groups. The minus-hybrid stock was the most far away from others populations. AMOVA in filial generation higher than parental generation it *P* value was 0.01, 0.03 respectively.

Key words Large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*, Genetic diversity, Microsatellites, Reciprocal crosses hybrid