

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.16064

基于 *COI* 基因序列的东、黄海区野生与养殖大黄鱼遗传多样性分析

谌微, 张凤英, 王景, 魏鸿擎, 姜亚洲, 张辉, 凌建忠, 程家骅, 马凌波

农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室, 中国水产科学研究院 东海水产研究所, 上海 200090

摘要: 为研究野生与养殖大黄鱼(*Larimichthys crocea*)群体的遗传多样性, 对大黄鱼 8 个野生群体及 6 个养殖群体共 336 个样本的线粒体 *COI* 基因部分序列进行了扩增和测序分析。实验最终获得序列片段长 621 bp, 总变异位点 38 个, 简约信息位点 23 个, 单变异位点 15 个, 其中野生群体包含 38 个变异位点, 占总变异的 100%, 养殖群体包含 8 个变异位点, 占总变异的 21.05%。在所有样本中共检测出单倍型 34 个, 单倍型多样性为 0.587, 核苷酸多样性为 0.00194, 野生及养殖群体单倍型多样性指数分别为 0.714~0.952、0.000~0.581。大黄鱼养殖与野生两个组群间的遗传分化指数为 0.04982, 占总变异的 4.98%, 差异极显著($P<0.01$), 组群间群体间的变异占 1.46%($P>0.05$), 群体内的变异占 93.56%($P<0.01$)。以上结果表明, 大黄鱼的遗传变异主要来自于群体内, 养殖群体的遗传多样性显著低于野生群体, 两者的遗传多样性程度均处于较低水平, 养殖群体间或野生群体间不存在显著的遗传分化, 而养殖与野生两大组群间存在着显著的遗传分化。此外, 通过对群体遗传结构及进化树的分析表明, 东、黄海大黄鱼应属于同一地理种群, 但两者间存在较低程度的遗传分化现象, 黄海的大黄鱼群体遗传多样性高于东海群体。本研究可为大黄鱼种质资源的保护和恢复提供理论依据。

关键词: 大黄鱼; *COI* 基因; 遗传多样性; 遗传分化; 群体

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)06-1255-13

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)隶属于鲈形目(Perciformes)、石首鱼科(Sciaenidae)、黄鱼属, 俗称黄鱼、黄瓜鱼、黄花鱼等, 为暖温性集群洄游性鱼类^[1-2]。在中国南至雷州半岛, 北达山东半岛的海域以及朝鲜西南部外海均有分布^[3]。大黄鱼曾位居中国传统的“四大海产”之首, 有“海水国鱼”之称。在 20 世纪 70 年代以前, 大黄鱼还具有明显的渔汛期, 但由于受过度捕捞及环境恶化等影响, 到 80 年代中期以后已基本不能形成渔汛, 其自然资源几近枯竭, 渔业部门虽然制定了多项资源保护措施, 但大黄鱼至今仍属于东海区资源严重衰退的种类^[4-5]。因此, 对现有的野生及养殖大黄鱼资源进行调查, 探讨其遗传背景及遗传多样性程度, 对于大黄鱼自然资源的保护和恢复具

有重大意义。

自大黄鱼人工繁殖和育苗技术取得成功以来, 中国科技工作者对其进行了大量的研究, 虽然有关大黄鱼种群结构及遗传多样性的研究已有诸多报道, 但这些研究主要集中在不同养殖群体间遗传差异的分析。目前, 对于野生群体的研究较少且范围不大, 仅有对福建宁德及湄洲野生群体的研究^[6-8]、浙江岱衢族群体的种质研究^[9], 以及江苏吕泗群体的遗传多样性研究^[10], 这些研究的群体都在靠近大陆的近海海域且群体单一, 缺乏对不同野生群体, 尤其是不同海区及远海海域野生群体间的比较。本研究采用线粒体 *COI* 基因序列标记, 对江苏、浙江和福建地区的 6 个大黄鱼养殖群体及采自黄海南部至东海北部海域的、较大

收稿日期: 2016-03-02; 修订日期: 2016-03-22.

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303047); 中央级科研院所基本科研业务费项目(东 2012T05); 水产种质资源平台(2014DKA30470).

作者简介: 谌微(1989-), 男, 研究实习员, 硕士, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: 328160296@qq.com

通信作者: 马凌波, 研究员, 研究方向为水产生物技术及水产动物遗传育种. E-mail: malingbo@sina.com

范围内且经纬度明确的 8 个野生群体进行了研究,详细分析了各群体的遗传多样性与群体遗传结构。该结果可为大黄鱼良种选育及增殖放流提供科学的理论依据,这对于大黄鱼养殖产业的健康发展及其自然资源的保护意义重大。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用大黄鱼样品采集时间为 2013 年 6 月至 2014 年 5 月。研究的 8 个野生群体从北往南分别来自黄海海域的 142 渔区(142)、吕泗渔场(LS),以及东海海域的 158 渔区(158)、170 渔区(170)、S35 站点(S35)、S38 站点(S38)、三门湾(SM)及 C15 站点(C15),共 140 个个体;6 个养殖群体从北到南分别来自江苏如东(RD)、江苏启东(QD)、浙江舟山(ZS)、浙江象山(XS)、福建宁德(ND)和福建连江(LJ),共 196 个个体。大黄鱼样品采集地点分布见图 1,各群体的简称以及采样点的经纬度、样本数目和采样时间等信息见表 1。样品用冰袋保存带回实验室后立即取少量的鱼体背部肌肉,置于

超低温冰箱保存,用于本实验所需 DNA 的提取。

1.2 基因组 DNA 提取

基因组 DNA 提取参照 Sambrook 等^[11]的方法进行,具体而言,取鱼背部肌肉约 100 mg,加 600 μ L STE 抽提缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 100 mmol/L EDTA, pH8.0; 10 mmol/L NaCl),剪碎组织,加入 10% SDS 溶液和 20 mg/mL 蛋白酶 K(终浓度分别为: 1%和 200 μ g/mL), 55 $^{\circ}$ C 水浴消化至溶液透明,待冷却后,分别加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、氯仿各抽提 1 次,再用两倍体积预冷的无水乙醇沉淀 DNA,最后用 75%乙醇洗涤两次,经自然干燥后溶于 TE 溶液中, 4 $^{\circ}$ C 暂存备用。

1.3 线粒体 CO I 基因片段扩增及测序

采用通用的简并引物 CFF(5'-TCR ACY AAY CAY AAA GAY ATY GGC AC-3')和 CFR(5'-ACT TCW GGG TGR CCR AAG AAT CA-3')扩增大黄鱼 mtDNA 的 CO I 基因部分序列。PCR 反应总体积为 25 μ L, 包括: 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L, dNTP 2 μ L

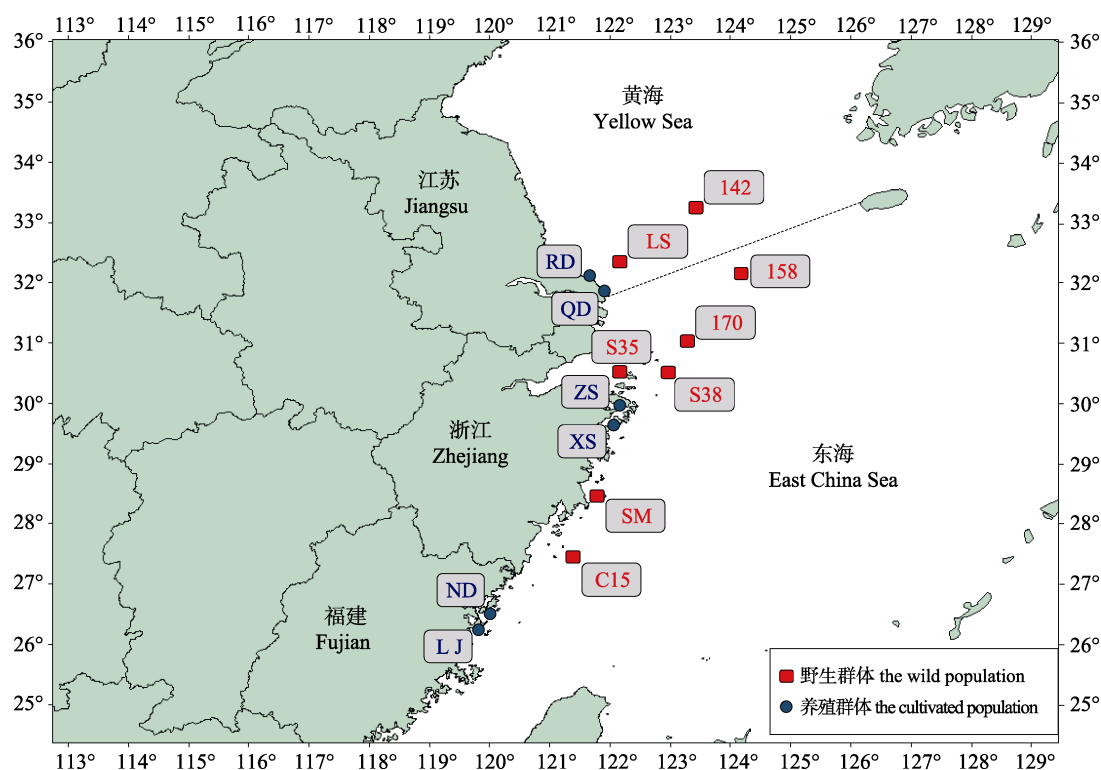


图 1 东海、黄海大黄鱼采样点分布示意图

Fig. 1 Sampling sites of *Larimichthys crocea* in East China Sea and the Yellow Sea

表 1 大黄鱼样本采集的时间、地点及数量
Tab. 1 Sampling time, sites and numbers of *Larimichthys crocea*

海区 sea area	群体 population	取样地点 sampling site	经纬度 latitude and longitude	取样时间 sampling time	样本数量 number
苏浙闽养殖群体 the cultured population	RD	江苏如东 Jiangsu	—	2013.12	39
	QD	江苏启东 Jiangsu	—	2013.12	20
	ZS	浙江舟山 Zhejiang	—	2013.12	30
	XS	浙江象山 Zhejiang	—	2013.12	34
	ND	福建宁德 Fujian	—	2014.5	37
	LJ	福建连江 Fujian	—	2014.5	36
东海野生群体 the wild populations of East China Sea	C15	C15	27°30'N 121°30'E	2013.6	8
	SM	三门湾 Sanmenwan	—	2013.6	9
	S35	S35	30°30'N 122°15'E	2013.6	5
	S38	S38	30°30'N 123°00'E	2013.6	7
	170	170 渔区 region	31°~31°30'N 123°~123°30'E	2013.10	7
	158	158 渔区 region	32°~32°30'N 124°~124°30'E	2013.9	26
黄海野生群体 the wild populations of Yellow Sea	LS	吕泗渔场 Lüsü	—	2013.11	35
	142	142 渔区 region	33°~33°30'N 123°30'~124°E	2013.10	43

(0.2 mmol/L), 上下游引物各 1 μL(0.2 μmol/L), *Taq* plus DNA 聚合酶 1 U(购自上海生工生物技术有限公司), 模板 DNA 50 ng, 加双蒸水至 25 μL。PCR 扩增反应在 AG-22331 型 PCR 仪(Eppendorf)上进行, 反应条件: 94℃预变性 5 min; 94℃ 45 s, 52℃ 45 s, 72℃ 55 s, 36 个循环; 72℃延伸 6 min。PCR 产物用含 EB 的 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 用 UNIQ-10(上海生工生物工程有限公司)柱式纯化试剂盒纯化, 纯化产物送至上海杰李生物技术有限公司进行双向测序及拼接。

1.4 数据处理

序列经拼接完以后, 将所得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源检测确认, 再通过 Clustal X 1.83^[12]对序列进行编辑排序及校正。采用 DnaSP 5.1 软件^[13]计算序列的碱基含量、多态位点数(V)、简约信息位点数(P)、单倍型多样性(H_d)、核苷酸多样性(π)和平均核苷酸差异数(K)等参数。利用 MEGA 5.1 软件^[14]计算群体内及两两群体间的遗传距离, 并应用木村资生的双参数替代模型(K-2-P)来计算群体间的遗传距离, 用 UPGMA 法重建单倍型的系统发生树。用 Arlequin3.1 软件^[15]计算两两群体间的遗传分化指数(F_{st}), 并采用 AMOVA 来分析群体内及群体间的遗传结构和分

子方差, 并通过 1000 次重复抽样来验证 F_{st} 的显著性。用 Network5.0 软件^[16]中的 Median-Joining 法构建各单倍型之间的网络关系图。

2 结果与分析

2.1 *COI* 基因序列特征

大黄鱼的 *COI* 序列均可被稳定扩增, 凝胶电泳检测大小为 700 bp 左右, 测序获得 140 个野生个体和 196 个养殖个体的 *COI* 序列。经比对及校正后, 获得用于分析的序列长 621 个碱基, 变异位点 38 个(图 2), 占总位点数的 6.1%, 其中简约信息位点 23 个, 单变异位点 15 个, 所有变异位点均为转换或颠换, 且转换明显多于颠换, 转换与颠换的比值为 8.5。对野生与养殖群体分别进行分析, 野生群体 *COI* 基因序列包含 38 个变异位点, 占总变异位点的 100%, 碱基 T、C、A、G 的平均含量分别为 27.2%、30.7%、22.4%和 19.7%, (A+T)% 为 49.6%, (G+C)% 为 50.4%; 养殖群体 *COI* 基因序列包含 8 个变异位点, 占总变异位点的 21.05%, 且这 8 个位点均为简约信息位点, 碱基 T、C、A、G 的平均含量分别为 27.2%、30.8%、22.4%和 19.6%, (A+T)% 为 49.6%, (G+C)% 为 50.4%, 野生与养殖群体的 *COI* 序列的碱基组成基本一致。

表 2 单倍型在东海与黄海大黄鱼各群体中的分布
Tab. 2 Distribution of haplotypes in *Larimichthys crocea* populations of East China Sea and the Yellow Sea

单倍型 haplotype	养殖群体 the cultured population							野生群体 the wild population							总计 total
	RD(39)	QD(20)	ZS(30)	XS(34)	ND(37)	LJ(36)	C15(8)	SM(9)	S35(5)	S38(7)	170(7)	158(26)	LS(35)	142(43)	
Hap_1	39	20	30	34	21	29	3	5	2		4	13	8	5	213
Hap_2					12	4	2	1		1			2	5	27
Hap_3					3	1		1	1	1		4		2	13
Hap_4					1							1	3	3	8
Hap_5						1						2		3	6
Hap_6						1	1	1	1				3	1	8
Hap_7							1	1		1		1	5	6	15
Hap_8							1								1
Hap_9									1						1
Hap_10											2			2	4
Hap_11										1					1
Hap_12										1	1	1	1	1	5
Hap_13											1			3	4
Hap_14											1		1		2
Hap_15												1			1
Hap_16												1			1
Hap_17												1			1
Hap_18												1	2		3
Hap_19													1		1
Hap_20													2		2
Hap_21													1	1	2
Hap_22													1		1
Hap_23													1		1
Hap_24													1	2	3
Hap_25													1		1
Hap_26													1		1
Hap_27													1		1
Hap_28														2	2
Hap_29														1	1
Hap_30														1	1
Hap_31														1	1
Hap_32														2	2
Hap_33														1	1
Hap_34														1	1

0.952, 核苷酸多样性指数为 0.00184~0.00470; 养殖群体的单倍型多样性指数为 0.000~0.581, 核苷酸多样性指数为 0.00000~0.00132。单倍型多样性指数大于 0.9 的群体有 4 个, 分别为 142 区、吕泗、S35、S38 群体, 最高的是 S38 群体, h 值为 0.952, 核苷酸多样性指数最高的两个群体为黄海海域的群体, 即 142 及吕泗群体, 其 π 值分别为 0.00455、

0.00470。含变异位点最多的群体为 142 区群体, 包含 24 个变异位点, 占总变异位点的 63.16%, 平均核苷酸变异数最高的两个群体也为 142 区及吕泗群体, 分别为 2.828 及 2.921。以上结果表明, 大黄鱼野生群体的遗传多样性的丰富程度显著高于养殖群体的, 而在野生群体中又以黄海的 2 个群体遗传多样性程度为最高。

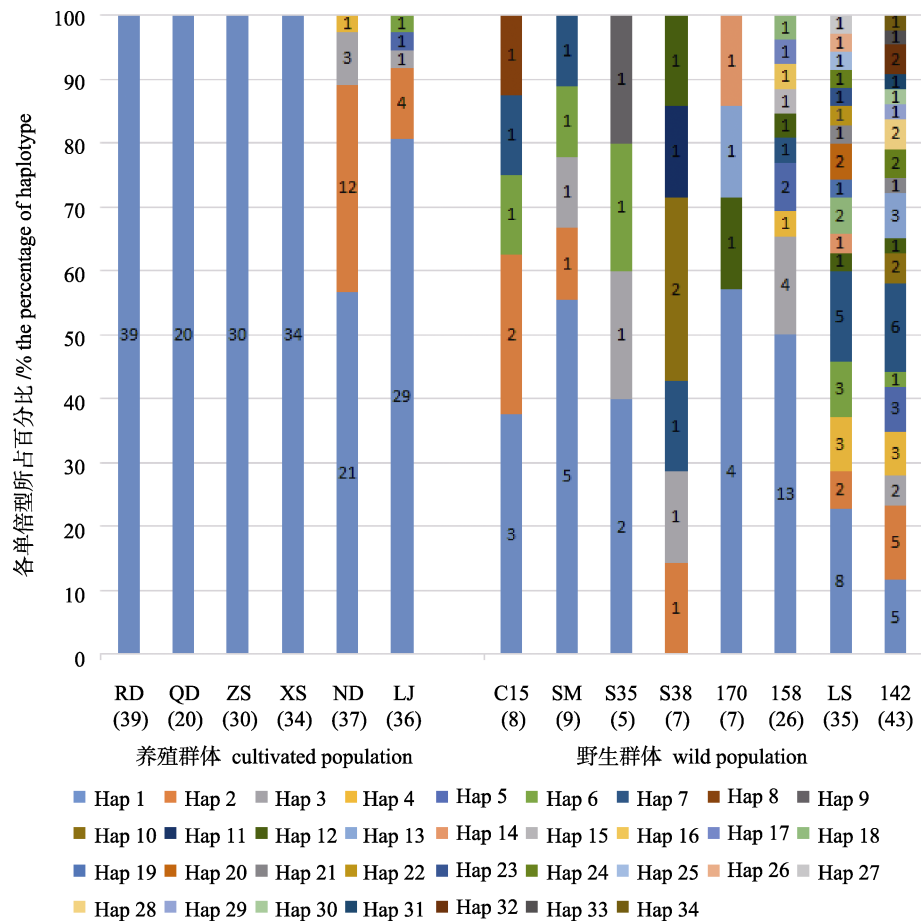


图 3 大黄鱼在东海与黄海各群体的 COI 基因单倍型百分比
Fig. 3 The COI gene haplotype percentage of *Larimichthys crocea* in the populations of the East China Sea and the Yellow Sea

表 3 东海与黄海大黄鱼 14 个群体遗传多样性参数
Tab. 3 Genetic diversity index for 14 populations of *Larimichthys crocea* in the East China Sea and the Yellow Sea

群体 population	样本量 number of samples	变异位点 variable site	单倍型数目 number of haplotypes	单倍型多样性 haplotype diversity	核苷酸多样性 nucleotide diversity	平均核苷酸变异数 average number of nucleotide
RD	39	0	1	0.000	0.00000	0.000
QD	20	0	1	0.000	0.00000	0.000
ZS	30	0	1	0.000	0.00000	0.000
XS	34	0	1	0.000	0.00000	0.000
ND	37	6	4	0.581	0.00132	0.820
LJ	36	7	5	0.346	0.00086	0.537
C15	8	9	5	0.857	0.00391	2.429
SM	9	7	5	0.722	0.00250	1.556
S35	5	5	4	0.900	0.00322	2.000
S38	7	7	6	0.952	0.00383	2.381
170	7	4	4	0.714	0.00184	1.143
158	26	16	10	0.728	0.00309	1.920
LS	35	22	17	0.921	0.00470	2.921
142	43	24	19	0.946	0.00455	2.828

2.3 群体遗传结构

大黄鱼群体内及群体间的遗传距离见表 4。从整体上分析, 大黄鱼群体内的遗传距离为 0.0000~0.0047, 两两群体间的遗传距离为 0.0000~0.0046, 群体内遗传距离最大的是吕泗群体, 其值为 0.0047, 群体间遗传距离最大的是吕泗与 142 群体, 其值为 0.0046。从养殖与野生两大组群分析, 养殖群体两两间的遗传距离为 0.0000~0.0011, 遗传距离最大的为宁德与连江群体; 野生群体两两间的遗传距离为 0.0022~0.0046, 遗传距离最大的为吕泗与 142 群体; 养殖与野生群体两两间的遗传距离为 0.0009~0.0032, 遗传距离最大的为宁德与吕泗群体。如东、启东、舟山及象山 4 个养殖群体之间的遗传距离为 0, 在 8 个野生群体中, 170 群体与这 4 个养殖群体的遗传距离为 0.0009, 相距最近。

大黄鱼两两群体间的遗传分化系数 F_{st} (表 4) 为-0.1011~0.4827, 野生群体间的 F_{st} 值为-0.1011~0.0298, 养殖群体间的 F_{st} 值为 0.0000~0.2067, 养殖与野生群体间的 F_{st} 值为 0.0047~0.4827。对 F_{st} 值进行差异显著性检验, 结果表明养殖群体中的舟山、如东及象山群体与所有野生群体遗传分化

均达到极显著水平($P<0.01$), 而另外 3 个养殖群体启东、宁德及连江群体只与部分野生群体达到显著或极显著遗传分化水平。此外, 宁德群体在养殖群体中比较特殊, 与其他 5 个养殖群体都存在显著或极显著的遗传差异。

对群体间遗传变异的分子方差分析采用两种策略(表 5), 一种方法是将所有 14 个群体作为一个整体进行分析, 结果显示, 来自群体内的变异贡献了大黄鱼的大部分遗传变异, 占总变异的 94.75%, 群体间的遗传分化指数为 0.05251, 差异达极显著水平($P<0.01$)。另外一种方法则是将其分成野生及养殖两个组群进行分析, 养殖与野生两个组群间的遗传分化指数为 0.04982, 占总变异的 4.98%, 差异极显著($P<0.01$), 各组内的群体间遗传分化指数为 0.01539, 差异不显著($P>0.05$), 群体内的遗传分化指数为 0.06444, 占总变异的 93.56%, 差异极显著($P<0.01$)。由以上结果可知, 大黄鱼的遗传变异主要来自于群体内, 养殖群体间或野生群体间不存在显著的遗传分化, 而养殖组群与野生组群间却存在显著的遗传分化。

为了更直观地阐述各群体之间的遗传结构, 绘制了单倍型之间的网络关系图(图 4)。由图可知,

表 4 东海与黄海大黄鱼各群体间的遗传分化系数(F_{st})(对角线上)和群体内(对角线, 粗体)及两两群体间(对角线下)的遗传距离

Tab. 4 The fixation index (F_{st}) (above diagonal) among populations, genetic distance within populations (diagonal bold) and among populations (below diagonal) of *Larimichthys crocea* in the East China Sea and the Yellow Sea

群体 population	RD	QD	ZS	XS	ND	LJ	C15	SM	S35	S38	170	158	LS	142
RD	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2067**	0.0375**	0.2940**	0.1993**	0.4827**	0.4208**	0.3042**	0.0631**	0.0926**	0.0578**
QD	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1487**	0.0096	0.1643**	0.0956**	0.3093**	0.2670**	0.1665*	0.0246	0.0529*	0.0280
ZS	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1815**	0.0263	0.2391**	0.1547**	0.4135**	0.3576**	0.2462**	0.0470**	0.0759**	0.0457**
XS	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1930**	0.0316	0.2647**	0.1753**	0.4465**	0.3874**	0.2732**	0.0545**	0.0836**	0.0513**
ND	0.0008	0.0008	0.0008	0.0008	0.0013	0.0448*	0.0153	0.0277	0.1327	0.1271*	0.1243*	0.0452*	0.0603**	0.0430**
LJ	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0011	0.0009	0.0609	0.0047	0.1206	0.1696**	0.0563	0.0084	0.0462*	0.0234*
C15	0.0020	0.0020	0.0020	0.0020	0.0025	0.0023	0.0039	-0.1011	-0.0870	-0.0361	0.0125	-0.0282	-0.0445	-0.0431
SM	0.0013	0.0013	0.0013	0.0013	0.0019	0.0016	0.0029	0.0025	-0.1010	-0.0267	-0.0049	-0.0537	-0.0508	-0.0547
S35	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.0023	0.0020	0.0033	0.0026	0.0032	-0.0140	0.0180	-0.0588	-0.0553	-0.0520
S38	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.0027	0.0024	0.0038	0.0031	0.0035	0.0038	0.0298	0.0085	0.0249	-0.0124
170	0.0009	0.0009	0.0009	0.0009	0.0018	0.0014	0.0029	0.0022	0.0025	0.0029	0.0018	-0.0267	-0.0024	-0.0260
158	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.0023	0.0020	0.0034	0.0027	0.0030	0.0035	0.0025	0.0031	0.0080	-0.0090
LS	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	0.0032	0.0029	0.0042	0.0035	0.0039	0.0045	0.0034	0.0040	0.0047	-0.0063
142	0.0024	0.0024	0.0024	0.0024	0.0031	0.0028	0.0041	0.0034	0.0038	0.0042	0.0033	0.0038	0.0046	0.0046

注: “*”表示差异显著($P<0.05$); “**”表示差异极显著($P<0.01$)。

Note: “*”means significant difference ($P<0.05$); “**” means extremely significant difference ($P<0.01$).

表 5 东海与黄海大黄鱼各群体遗传变异的 AMOVA 分析
Tab. 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) among populations of *Larimichthys crocea* in the East China Sea and the Yellow Sea

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	方差组分 variance component	变异百分比 percentage of variance	遗传分化指数 fixation index
AMOVA(未分组)					
群体间 among populations	1	5.923	0.03266	5.25	$F_{st} = 0.05251^{**}$
群体内 within populations	334	196.825	0.58930	94.75	
AMOVA(分成养殖与野生两组)					
组间 among groups	1	5.923	0.03098	4.98	$F_{ct} = 0.04982^{**}$
组内群体间 populations within groups	12	9.468	0.00909	1.46	$F_{sc} = 0.01539$
群体内 within populations	322	187.357	0.58185	93.56	$F_{st} = 0.06444^{**}$

注：“*”表示差异显著($P<0.05$)；“**”表示差异极显著($P<0.01$)。
Note: “*”means significant difference ($P<0.05$); “**” means extremely significant difference ($P<0.01$).

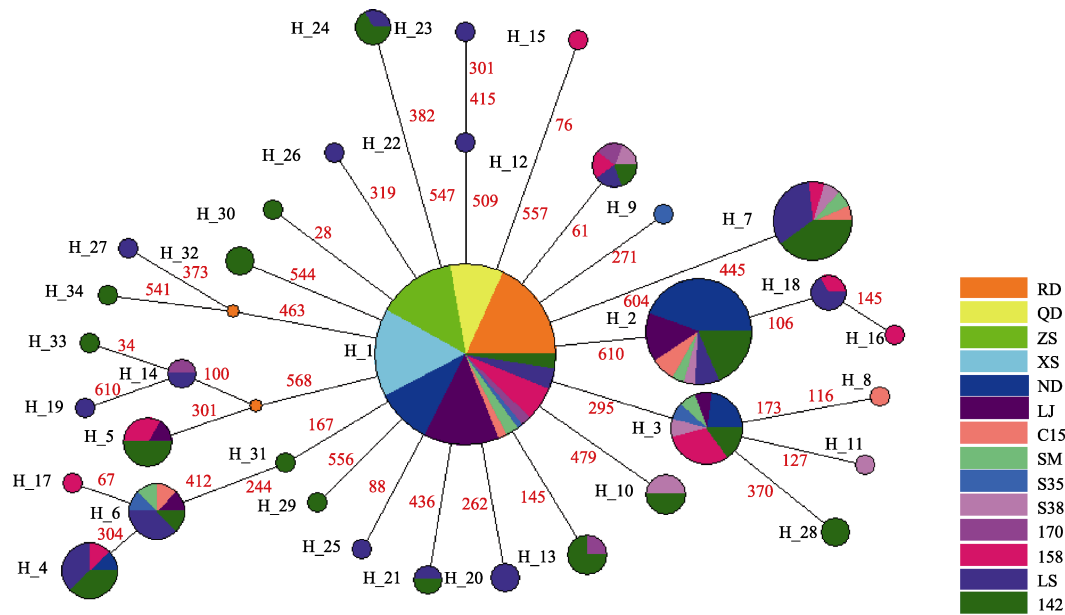


图 4 东海与黄海各群体大黄鱼 *COI* 基因的 34 个单倍型网络关系图
各群体分别用不同颜色标注, 圆形面积代表单倍型的频率, 连接线上的数字代表突变位点。

Fig. 4 Median-joining network of 34 *COI* gene haplotypes of *Larimichthys crocea* in the East China Sea and the Yellow Sea
Different colors indicate different populations; circular area represents the frequency of haplotype; the numbers on the line represent mutations.

各单倍型并没有依不同的地理群体而形成各自分支, 而是基本呈现非典型的星状分布态势, 除 Hap2、Hap3、Hap31 等少数几个单倍型具有少量拓展单倍型外, 其余均由单倍型 Hap1 拓展而来, 可以推测出单倍型 Hap1 为大黄鱼最主要及原始的单倍型。虽然各群体单倍型分布存在交叉, 但从图可以看出养殖群体的单倍型较为集中, 主要为 Hap1 及 Hap2, 而野生群体的单倍型分布弥散, 吕泗及 142 群体包含较多的特有单倍型。

2.4 基于 *COI* 序列的系统进化树

利用 MEGA5.1 软件中的 K-2-P 法, 以近邻物

种小黄鱼作为外群, 计算出 14 个群体及小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*) 两两间的遗传距离, 再采用非加权组平均法 (UPGMA), 构建基于 *COI* 序列的大黄鱼 14 个群体的系统进化树 (图 5)。由进化树可以看出, 大黄鱼不同群体间没有形成明显大的分支, 但是按照不同的海区可以划分为三大类群, 野生群体中的吕泗及 142 群体最早形成分支, 它们与养殖群体间的遗传距离最大, 这两个群体在地理位置上属于黄海群体, 其他 6 个野生群体为东海群体, 系统树上处于养殖群体及黄海群体之间, 而 6 个养殖群体紧邻在一起, 在进化树上最

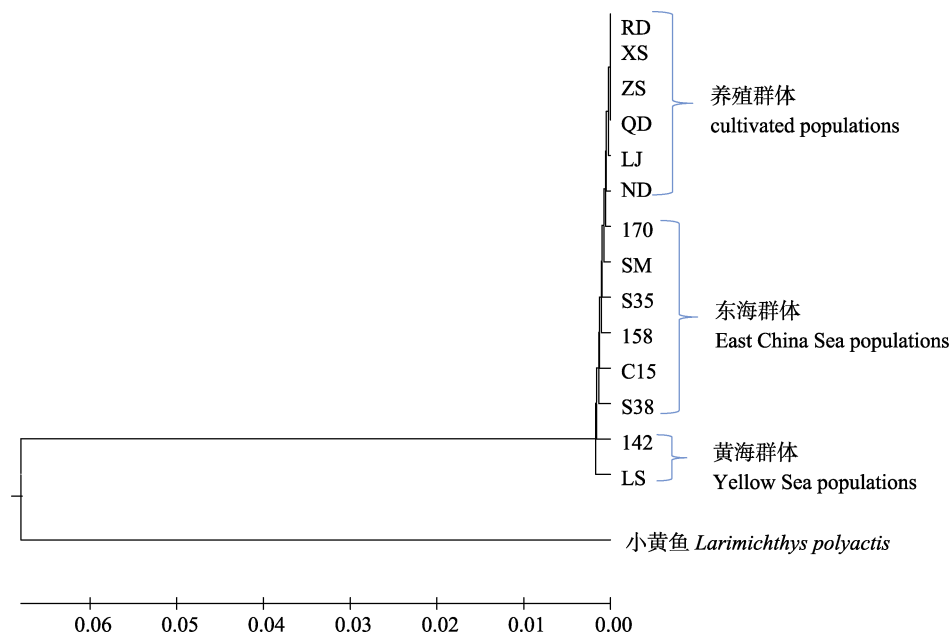


图 5 基于 *COI* 序列的大黄鱼 14 个群体的 UPGMA 进化树

Fig. 5 UPGMA tree between 14 populations of *Larimichthys crocea* based on *COI* sequences

后分支出来,且养殖群体中的宁德群体与野生群体在进化树中最靠近,这一结果与群体遗传多样性及遗传分化的分析结论相一致。

3 讨论

3.1 大黄鱼群体的遗传多样性

物种遗传多样性研究是进行生物多样性分析、生物资源调查等科学研究的前提,遗传多样性的高低决定了物种自身的发展水平和进化方向。遗传多样性越丰富,物种抵抗和适应自然环境的能力越强,其种群生存下来,繁衍扩张的机会越大;反之,则易受环境变化的影响,不利于物种的发展进化^[17]。因此,研究大黄鱼遗传多样性对于其养殖业及野生资源的恢复有非常重要的指导意义。本研究依托良好的渔业资源调查平台,采集到了较大范围内且地点明确的 8 个大黄鱼野生群体,与来自江苏、浙江及福建的 6 个养殖群体进行了比较研究。

在总共 336 个样本中检测出了 34 个单倍型,其单倍型多样性为 0.587,处于中等水平,核苷酸多样性为 0.00194,处于较低水平。从不同的群组水平分析,野生群体的单倍型多样性($h=0.714\sim 0.952$)及核苷酸多样性($\pi=0.00184\sim 0.00470$)明显

高于养殖群体($h=0.000\sim 0.581$, $\pi=0.00086\sim 0.00132$)。根据 Grant 等^[18]对海水鱼类线粒体 DNA 的分析,其按照 h 、 π 值及其关系将遗传种类划分为 4 种类型。本研究得出大黄鱼养殖群体应属于第一种模式(低 h 低 π),表明其最近经历过瓶颈效应或种群由单一、少数族群所产生的奠基者效应形成,这与目前大黄鱼繁育亲本来源不丰富,遗传背景单一相一致。而野生群体应属于第二种模式(即高 h 低 π),显示野生群体可能经历过快速的历史扩张事件,即由一个数量较小的有效群体快速扩张成一个较大群体。据 Bowen 等^[19]的研究,在群体快速扩张事件中,随着种群数量的急剧增加,导致单倍型多样性的增加,而核苷酸的变异速率较低,没有足够的时间来积累核苷酸变异,最终导致了高 h 低 π 类型的出现。除大黄鱼外,已经报道的许多海水鱼类如小黄鱼^[20]、茎柔鱼^[21]、松江鲈^[22]、棘头梅童鱼^[23]等都属于此种变异类型。

王志勇等^[7]利用 AFLP 标记对官井洋 3 个大黄鱼群体进行了研究,显示养殖群体遗传多态性低于野生群体,养殖群体遗传多样性较低,其遗传变异相对贫乏。黎中宝等^[24]也对福建地区的 4 个大黄鱼群体进行了研究,得到了与前面相同结论,认为养殖群体遗传多样性普遍降低。Wang 等^[25]

利用微卫星标记对福建及浙江地区的 5 个养殖群体及 3 个野生群体进行了研究,与野生群体相比,养殖大黄鱼群体遗传多样性显著降低,且养殖与野生群体间发生了遗传分化现象。本研究也表明,大黄鱼养殖群体的遗传多样性极低,东海的野生群体高于养殖群体,而黄海群体又高于东海群体。其中,江苏的如东、启东与浙江的舟山、象山 4 个养殖群体共享唯一的单倍型 Hap1,表现出极高的纯合度,推测其可能由共同的早期亲本繁育而来。养殖大黄鱼由于有效亲本数量极少,育苗程度高度集中,即使不同地方的养殖群体,也有可能是同一批亲本繁育的后代,因此,才会出现如此高的遗传相似度。在野生群体中,黄海的吕泗群体具有很高的单倍型多样性($h=0.921$),这与陈淑吟等^[10]所报道的同一海区的研究结果($h=0.915$)非常接近,证明了本研究结果的可靠性。

黄海野生群体遗传多样性高于东海群体,其原因可能有 2 个:一是由于福建及浙江为大黄鱼主要养殖区,且近年来这些地方为恢复其自然资源,进行了大规模的人工放流,从养殖逃逸及人工放流的数量来看,东海区远远大于黄海区,这些养殖个体进入海区后,与野生群体发生基因交流,从而导致了东海区野生群体遗传多样性的降低;二是在 20 世纪 50~60 年代,位于东海区的福建及浙江沿海的敲罾作业使大黄鱼资源遭到严重破坏^[4-5],其捕捞规模远远超过黄海区,虽然东海区群体数量远大于黄海区,但是这种破坏导致了其数量的急剧减少,由于发生瓶颈效应导致了其多样性迅速降低,而黄海区虽然群体数量少,但是捕捞强度低于东海区,故其能够保存下来相对较多的稀有等位基因,因此,遗传多样性要高于东海区的群体。黄海群体较高的遗传多样性水平启发我们,若想提高繁殖亲本的遗传丰富度,可选取黄海区域的野生群体作为大黄鱼育种的亲本候选群。

3.2 大黄鱼不同群体间的遗传结构

根据 Freeland^[26]对遗传分化的研究理论,当 F_{st} 值为 0~0.05 时,群体间存在低度遗传分化;在 0.05~0.15 时,存在中度遗传分化;在 0.15~0.25 时,遗传分化较大; F_{st} 值大于 0.25 时,表示群体间遗

传分化极大。本研究大黄鱼群体间的 F_{st} 值为 0.05251,结合方差分析的结果可知,大黄鱼群体间存在中等偏低度的遗传分化,其主要的遗传变异来自于群体内。若单独分析养殖群体或野生群体,都不存在显著的遗传分化,但养殖群体与野生群体两个组群间却存在极显著的遗传分化现象。揭示了在经过几代甚至几十代的人工繁育与养殖后,养殖群体与野生群体间由于缺乏基因交流,最终导致了一定程度的遗传分化。

目前,有关大黄鱼不同地理种群划分的研究大多是基于形态学、生态学及海文数据等范畴。田明诚等^[27]根据分节特征及量度性状,将大黄鱼地理种群分为岱衢族、闽-粤东族和瓯州族 3 个种群。而徐兆礼等^[28]、陈佳杰等^[29]结合大黄鱼洄游路线及地理隔离、渔获量及海洋水文数据分析认为,官井洋所在的闽东渔场大黄鱼与浙江岱衢族大黄鱼同属于一个种群,都归为东、黄海大黄鱼种群。张其永等^[30]则以自然海区分布和海洋地理隔离这两个因素来区分大黄鱼种群,认为大黄鱼地理种群可以划分为南黄海-东海地理种群、台湾海峡-粤东地理种群和粤西地理种群。李明云等^[31]基于种群生态学概念及中国近海的海流体系,将大黄鱼划分成南黄海-东海以及台湾海峡-南海 2 个地理种群。此外, Wang 等^[25]利用微卫星标记技术研究了东、黄海 3 个野生群体,它们相互间不存在遗传分化情况,认为其属于同一个种群。综上所述,除田明诚的研究外,大部分学者的研究都认为台湾海峡以北的大黄鱼同属一个种群。本研究的大黄鱼样本取自黄海南部及东海,结合系统进化树的结果可知,各群体间并没有明显的系统地理格局,遗传距离非常接近,因此认为东、黄海大黄鱼同属一个种群,与徐兆礼等^[28]、陈佳杰等^[29]李明云等^[31]的研究结论一致。除此之外,更深入的研究表明,在分子遗传水平上,东海与黄海大黄鱼虽归为一个地理种群,但仍然存在一定的遗传差异,在进化树中,黄海 2 个群体最先分支出来,紧接着才是东海群体,表明这两个海域的大黄鱼虽然为同一地理种群,但可能由于越冬场及产卵场的差异,导致两者间存在较低程度的遗传分化现象。

3.3 大黄鱼资源现状分析及展望

在 20 世纪 70 年代以前, 大黄鱼还具有明显的渔场和渔汛, 但由于敲罾作业、对越冬大黄鱼的围捕、以及捕捞设施和技术提高, 使大黄鱼种质资源遭到严重破坏^[24]。虽然相关部门针对大黄鱼种质保护采取了很多措施, 其养殖规模也不断扩大, 2014 年养殖产量超过 12 万 t^[32]。但比较王志勇等^[7]、黎中宝等^[24]、全成干等^[33]对大黄鱼遗传多样性的研究, 结合本实验的研究结果可知, 无论养殖或野生大黄鱼, 其遗传多样性都处于较低水平。一方面, 虽然养殖群体产量很大, 但是其遗传背景单一, 遗传同质性较高, 较低的遗传多态性导致大黄鱼抗病力差, 生长性能降低, 适应环境变化的能力减弱, 一旦遇到极端自然环境, 就有可能遭受灭顶之灾; 另一方面, 虽然野生大黄鱼遗传多样性要高于养殖群体, 但其资源量已经匮乏, 且由于人工放流、养殖逃逸等多种因素导致其基因受到污染, 致使其遗传杂合度与养殖群体趋同, 同样面临着遗传资源枯竭的危险。

从目前形势分析, 大黄鱼的野生资源相对匮乏, 养殖群体遗传多样性偏低, 这对于大黄鱼养殖产业的发展及野生资源的恢复是非常不利的。但即使是遗传多样性匮乏的物种, 也有非常成功的保种经验, 如饲养于北美的一种斯氏瞪羚, 起初常规饲养也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, 其遗传多样性获得较大提升^[34]。此外, 日本引进的一种尼罗罗非鱼, 得益于执行了严格而科学的管理制度, 在经过 20 多年的养殖繁育之后, 仍然保持了较高的遗传变异水平^[35]。由此可见, 只要制定科学合理的繁育计划, 执行科学严谨的放流措施, 同时加强对野生资源的保护, 对于大黄鱼资源的恢复及其养殖业的可持续发展是完全有可能的。

参考文献:

- [1] Richardson J. Report on the Ichthyology of the seas of China and Japan[M]. Britain: John Murray, 1846: 187-320.
- [2] Zhu Y D, Wu H L. Fishes of Fujian Province (Vol.2)[M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 1985: 101-136. [朱元鼎, 伍汉霖. 福建鱼类志: 下卷[M]. 福州: 福建科技出版社, 1985: 101-136.]
- [3] Su Y Q, Zhang C L, Wang J, et al. The Culture of Large Yellow Croaker[M]. Beijing: China Ocean Press, 2004. [苏永全, 张彩兰, 王军, 等. 大黄鱼养殖[M]. 北京: 海洋出版社, 2004.]
- [4] Hu Y M. The historical and present status of large yellow croaker germ plasm in East Sea[J]. Journal of Shaoxing University, 2006, 26(7): 49-53. [胡银茂. 东海海区大黄鱼种质资源的历史演变和现状分析[J]. 绍兴文理学院学报, 2006, 26(7): 49-53.]
- [5] Xu K D, Liu Z F. The current stock of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* in the East China Sea with respects of its stock decline[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2007, 22(5): 392-396. [徐开达, 刘子藩. 东海区大黄鱼渔业资源及资源衰退原因分析[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(5): 392-396.]
- [6] Wang J, Quan C G, Su Y Q, et al. RAPD analysis of the reared and wild *Pseudosciaena crocea*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2001, 23(3): 87-91. [王军, 全成干, 苏永全, 等. 官井洋大黄鱼群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 海洋学报, 2001, 23(3): 87-91.]
- [7] Wang Z Y, Wang Y L, Lin L M, et al. Genetic polymorphisms in wild and cultured large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* using AFLP fingerprinting[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(3): 198-202. [王志勇, 王艺磊, 林利民, 等. 福建官井洋大黄鱼 AFLP 指纹多态性的研究[J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 198-202.]
- [8] Chen J, Li Z B, Fang X, et al. The genetic structure of wild and cultivated populations of *Pseudosciaena crocea*[J]. Marine Sciences, 2010, 34(2): 45-48. [陈锦, 黎中宝, 方秀, 等. 大黄鱼野生与养殖群体遗传结构的比较研究[J]. 海洋科学, 2010, 34(2): 45-48.]
- [9] Liu B Q, Dong W Q, Wang Y J, et al. Identification of germ plasm in *Pseudosciaena crocea* Tai-chu race by AFLP[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(4): 413-416. [刘必谦, 董闻琦, 王亚军, 等. 岱衢族大黄鱼种质的 AFLP 分析[J]. 水生生物学报, 2005, 29(4): 413-416.]
- [10] Chen S Y, Xu S X, Zhang Z Y, et al. Study of genetic diversity of wild and culture populations of *Pseudosciaena crocea* using two molecular markers[J]. Marine Sciences, 2011, 35(12): 82-87. [陈淑吟, 徐士霞, 张志勇, 等. 大黄鱼野生群体与养殖群体遗传多样性研究[J]. 海洋科学, 2011, 35(12): 82-87.]
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [12] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucl Acids Res,

- 1997, 25: 4876–4882.
- [13] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25: 1451–1452.
- [14] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28: 2731–2739.
- [15] Excoffier L, Lischer H E L. Arlequin suite ver3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. *Mol Ecol Res*, 2010, 10: 564–567.
- [16] Huenneke L F. *Ecological Implications of Genetic Variation in Plant Populations*[M]. New York: Oxford University Press, 1991: 31–44.
- [17] Bandelt H J, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies[J]. *Mol Biol Evol*, 1999, 16: 37–48.
- [18] Grant W, Bowen B. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. *J Hered*, 1998, 89: 415–426.
- [19] Bowen B W, Bass A L, Rocha L A, et al. Phylogeography of the trumpetfishes (*Aulostomus*): ring species complex on a global scale[J]. *Evolution*, 2001, 55(5): 1029–1039.
- [20] Wu R X, Liu S F, Zhuang Z M, et al. Population genetic structure of yellow croaker (*Larimichthys poyais*) in Yellow sea and East China Sea based on the mitochondrial Cyt b gene[J]. *Progress in Natural Science*, 2009, 19(9): 924–930. [吴仁协, 柳淑芳, 庄志猛, 等. 基于线粒体 Cyt b 基因的黄海、东海小黄鱼(*Larimichthys poyais*)群体遗传结构[J]. 自然科学进展, 2009, 19(9): 924–930.]
- [21] Yan J, Xu Q H, Chen X J, et al. Primary studies on the population genetic structure of *Dosidicus gigas* in the high seas of eastern Pacific Ocean[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(11): 1617–1623. [闫杰, 许强华, 陈新军, 等. 东太平洋公海茎柔鱼种群遗传结构初步研究[J]. 水产学报, 2011, 35(11): 1617–1623.]
- [22] Gao T X, Bi X X, Zhao L L, et al. Population genetic structure of roughskin sculpin *Trachidermus fasciatus* based on the mitochondrial Cyt b sequence[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(2): 199–207. [高天翔, 毕潇潇, 赵林林, 等. 基于线粒体 Cyt b 基因全序列的松江鲈群体遗传结构分析[J]. 水生生物学报, 2013, 37(2): 199–207.]
- [23] Zhao M, Song W, Ma C Y, et al. Population genetic structure of *Collichthys lucidus* based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I sequence[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(2): 233–242. [赵明, 宋炜, 马春艳, 等. 基于线粒体 COI 基因序列的棘头梅童鱼 7 个野生群体遗传结构分析[J]. 中国水产科学, 2015, 22(2): 233–242.]
- [24] Li Z B, Fang X, Chen J, et al. Loss of the genetic diversity in cultivated populations of *Pseudosciaena crocea* by AFLP[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(4): 446–450. [黎中宝, 方秀, 陈锦, 等. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)养殖群体遗传多样性的降低[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(4): 446–450.]
- [25] Wang L, Shi X F, Su Y Q, et al. Loss of genetic diversity in the cultured stocks of the large yellow croaker, *Larimichthys crocea*, revealed by microsatellites[J]. *Intern J Molec Sci*, 2012(13): 5584–5597.
- [26] Freeland J R. *Molecular Ecology*[M]. Chichester: John Wiley & Sons, 2005: 112–116.
- [27] Tian M C, Xu G Z, Jin R X. Geographic variation of morphological characteristics and problem in geographic population of *Pseudosciaena crocea*[M]. *Studia Marina Sinica*. Beijing: Science Press, 1962(2): 79–97. [田明诚, 徐恭昭, 金日秀. 大黄鱼形态特征的地理变异和地理种群问题[M]. 海洋科学集刊. 北京: 科学出版社, 1962(2): 79–97.]
- [28] Xu Z L, Chen J J. Analysis of migratory route of *Larimichthys crocea* in the East China Sea and Yellow Sea[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(3): 429–437. [徐兆礼, 陈佳杰. 东黄海大黄鱼洄游路线的研究[J]. 水产学报, 2011, 35(3): 429–437.]
- [29] Chen J J, Xu Z L. Analysis of population division and geographical isolation of *Larimichthys crocea* in the East China Sea and Yellow Sea[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(2): 310–320. [陈佳杰, 徐兆礼. 东、黄海大黄鱼种群划分与地理隔离分析[J]. 中国水产科学, 2012, 19(2): 310–320.]
- [30] Zhang Q Y, Hong W S, Yang S Y, et al. Discussion on the division of geographic populations for the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Modern Fisheries Information*, 2011, 26(2): 3–8. [张其永, 洪万树, 杨圣云, 等. 大黄鱼地理种群的探讨[J]. 现代渔业信息, 2011, 26(2): 3–8.]
- [31] Li M Y, Miao L, Chen J, et al. Division of populations for *Pseudosciaena crocea* based on population ecology concept: discussion[J]. *Journal of Ningbo University (NSEE)*, 2013, 26(1): 1–5. [李明云, 苗亮, 陈炯, 等. 基于种群生态学概念论大黄鱼种群的划分[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2013, 26(1): 1–5.]
- [32] Liu J F, Liu Z K. The progress and development trends of large yellow croaker industry in china[C]. Ningde: Proceedings of the Third Industry Development Conference of Large

- Yellow Croaker, 2015: 1–7. [刘家富, 刘招坤. 我国大黄鱼产业进展与发展趋势[C]. 宁德: 第三届中国大黄鱼产业发展论坛论文集, 2015: 1–7.]
- [33] Quan C G, Wang J, Ding S X, et al. Genetic diversity of cultured *Pseudosciaena crocea* (Richardson) stock by PAGE[J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 1999, 38(4): 584–588. [全成干, 王军, 丁少雄, 等. 大黄鱼养殖群体遗传多样性的同工酶[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1999, 38(4): 584–588.]
- [34] Kalinowski S T, Hedrick P W, Miller P S. Inbreeding depression in the Speke's gazelle captive breeding program[J]. Conserv Biol, 2000, 15(5): 1375–1384.
- [35] Basiao Z U, Taniguchi N. An investigation of enzyme and other protein polymorphisms in Japanese stocks of the tilapia *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zilli*[J]. Aquaculture, 1984, 38: 335–345.

Genetic diversity of wild and cultured populations of *Larimichthys crocea* in the East China Sea and Yellow Sea based on *CO I* sequence

CHEN Wei, ZHANG Fengying, WANG Jing, WEI Hongqing, JIANG Yazhou, ZHANG Hui, LING Jianzhong, CHENG Jiahua, MA Lingbo

Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture;
East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China

Abstract: The large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), mainly distributed in coastal waters of China and East Asia, is one of the most important economic marine fish in China, and represents the largest yield for a single species in Chinese marine net-cage farming. Nevertheless, because of exhaustive fishing, habitat degradation and high-density aquaculture, the genetic diversity of the species is at a low level, and mariculture of the species is facing serious challenges from germplasm degeneration and susceptibility to infectious disease agents. Studies of the large yellow croaker have focused on the comparison of genetic differences among culture populations, and few of them have reported on comparative analysis among a wide range of wild and cultured stocks. To study the genetic diversity of wild and cultivated populations, we amplified and sequenced the mitochondrial cytochrome oxidase I (*CO I*) gene of 336 samples from eight wild populations and six cultivated populations. The amplified fragment was 621 bp, containing a total of 38 mutation sites which included 23 parsimony-informative sites and 15 singleton mutation sites. The results showed that the wild populations contained 38 mutation sites, accounting for 100% of the total variations, while the cultivated populations contained 8 mutation sites accounting for 21.05%. We also detected 34 haplotypes in all 14 groups, and these were characterized by high haplotype diversity (0.587) and low nucleotide diversity (0.00194). The haplotype diversity index of the wild and cultivated populations ranged from 0.714 to 0.952 and from 0.000 to 0.581, respectively. The coefficient of gene differentiation (F_{st}) between wild and cultured groups was 0.04982, accounting for 4.98% of the total variance. There was an extremely significant difference ($P < 0.01$), the variation accounting for 1.46% among populations ($P > 0.05$), and accounting for 93.56% within populations ($P < 0.01$). Analysis of AMOVA and phylogenetic trees revealed that the genetic diversity of the large yellow croaker was in lower level, and that the genetic diversity in cultivated populations was significantly lower than that in wild populations. In addition, the variation within populations contributed its major genetic variation, and there was extremely high genetic differentiation between wild and cultivated groups but not significant within populations. The large yellow croaker from the East China Sea and Yellow Sea should belong to the same geographic population, but there is still a low level of genetic differentiation among the two groups, the genetic diversity of Yellow Sea groups being higher than that of the East China Sea. This study can provide a theoretical basis for resource conservation and germplasm recovery.

Key words: *Larimichthys crocea*; cytochrome oxidase I (*CO I*); genetic diversity; genetic differentiation; population

Corresponding author: MA Lingbo. E-mail: malingbo@sina.com