

DOI: 10.12264/JFSC2020-0542

## 微卫星分子标记技术在大黄鱼增殖放流效果评估中的应用

吴利娜<sup>1,2</sup>, 张凝璠<sup>2</sup>, 孙松<sup>3</sup>, 袁吉贵<sup>2</sup>, 陈佳<sup>1</sup>, 李苗苗<sup>4</sup>, 林楠<sup>4</sup>, 游宇<sup>4</sup>, 王伟继<sup>3</sup>, 丁少雄<sup>1,2</sup>

1. 大黄鱼育种国家重点实验室, 福建 宁德 352103;
2. 厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361002;
3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
4. 福建省水产技术推广总站, 福建 福州 350002

**摘要:** 为研究微卫星分子标记在大黄鱼(*Larimichthys crocea*)增殖放流效果评估中的适用性, 本研究利用 8 个多态性丰富的微卫星位点, 对 100 尾放流大黄鱼亲鱼以及官井洋海域回捕的 295 尾大黄鱼样本进行亲子鉴定, 并提出了一种基于微卫星分子标记的大黄鱼回捕效果评估方法。8 个微卫星位点共检测到 78 个等位基因, 其观测杂合度为 0.511~0.939 (平均值 0.764), 期望杂合度为 0.643~0.897 (平均值 0.781), 多态性信息含量为 0.587~0.883 (平均值为 0.751); 通过 Cervus 3.0.7 软件模拟分析得到, 在置信度大于 95% 的情况下, 8 个微卫星位点的个体累积排除率达到 99.99% 以上水平; 2019 年 7 月从官井洋海域回捕到的 190 尾大黄鱼中, 检测出 5 尾与放流亲本存在亲子关系的个体, 占回捕样本总数的 2.63%。推算本次富发放流大黄鱼在回捕样本中所占比例为 60.53% 左右, 进一步推算出 7 月富发公司放流大黄鱼的回捕率为 0.0038% 左右。8 月、9 月的 105 尾回捕样品中未能检出标记个体。本研究构建的大黄鱼亲子鉴定技术体系不仅可为三沙湾大黄鱼增殖放流效果评估工作提供可靠的技术支撑, 亦可为三沙湾大黄鱼保护区的科学管理提供参考, 此外本研究对于我国其他海水鱼类的增殖放流评估工作的开展也将有重要的参考价值。

**关键词:** 大黄鱼; 微卫星分子标记; 增殖放流; 亲子鉴定

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)09-1100-09

从 19 世纪末期至今, 世界各国相继开展了大量增殖放流实践, 以试图解决世界性海洋渔业资源日益衰竭的问题, 而对增殖放流活动的生态风险进行系统评价及有效的生态风险预警和防控, 亦已成为目前增殖放流领域的研究热点<sup>[1]</sup>。海洋渔业增殖放流效果评估方法有很多, 虽然一些研究表明通过渔业资源评估模型可以间接地评估增殖放流效果<sup>[2]</sup>, 然而通过标记回捕方法对放流效果进行评估仍然是最精确、最直接的方法。传统物理标记放流法存在操作复杂、价格昂贵、标记

易脱落以及损伤鱼体等缺点, 不利于实际有效地开展放流效果评估。随着分子标记技术的发展, 利用携带特定分子标记个体来替代传统物理标记个体, 通过分子标记溯源分析来鉴别标记个体, 已成为渔业生物增殖放流评估的一种可行途径<sup>[3]</sup>。微卫星(simple sequence repeat, SSR)分子标记因其在基因组中具有分布广泛、多态性高、共显性遗传等特点, 是目前进行个体或系谱溯源跟踪的理想分子标记, 其可靠性也已在一些鱼类的亲子鉴定中得到证实。目前国际上如日本的

收稿日期: 2020-12-01; 修订日期: 2020-12-29.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1406301); 大黄鱼育种国家重点实验室开放课题基金项目(LYC2017RS04).

作者简介: 吴利娜(1992-), 女, 博士研究生, 主要从事增殖放流效果评估研究. E-mail: 1720474179@qq.com

通信作者: 丁少雄, 教授, 主要从事鱼类系统学与进化生物学、资源与保护生物学、繁殖生物学研究, E-mail: sxding@xmu.edu.cn; 王伟继, 研究员, 主要从事海水鱼类(大菱鲆)遗传育种及中国对虾等大宗物种增殖放流效果评估研究, E-mail: wangwj@ysfri.ac.cn

Sekino 等<sup>[4]</sup>结合微卫星位点与线粒体 DNA (mtDNA)控制区核苷酸序列作为遗传标记对日本养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的放流群体进行溯源,成功地鉴别出 35 条放流个体;国内杨长平等<sup>[5]</sup>利用微卫星标记亲子鉴定技术对珠江口海域的岩礁定居性鱼类黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)进行了增殖放流效果评估。但目前国内利用该技术进行洄游性海水鱼类增殖放流的效果评估工作尚未见公开报道。

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)俗称黄花鱼,其分布范围覆盖北起黄海中南部、南至琼州海峡的中国近岸海域,是我国最重要的海洋经济鱼类之一<sup>[6]</sup>,20 世纪 70 年代以前的大黄鱼野生资源丰富,但由于过度捕捞和栖息环境恶化而导致我国大黄鱼野生资源量的急剧恶化和枯竭,已成为众所周知的人类活动破坏重要渔业资源的典型案例。为保护、恢复急剧衰退的大黄鱼渔业资源,随着大黄鱼人工养殖业的发展,特别是大黄鱼人工繁育关键技术的突破,福建省宁德市于 1987 年率先开始大黄鱼增殖放流尝试,通过释放人工繁育大黄鱼鱼苗到自然水域中补充野生大黄鱼种群数量,并验证了放流后代可在野外成功存活<sup>[7]</sup>。2000 年以后,基于大黄鱼规模化人工繁育产业的建立,福建宁德、浙江舟山和宁波等地开始了大黄鱼系统性增殖放流活动,2010 年以后,江苏沿海和福建厦门、漳州等地区也开始了大黄鱼的增殖放流。作为大黄鱼主要的放流海区,据近 10 年官方统计,福建宁德三沙湾大黄鱼放流规模已达到年均 500 万尾左右。据《福建省渔业统计年鉴》数据显示,2000 年迄今福建省大黄鱼年捕捞产量长期在 4000 t 左右波动,捕捞产量并未呈现逐年增长的趋势。而据 2011—2014 年福建省组织开展的大黄鱼增殖放流效果评估调查资料显示,官井洋大黄鱼繁殖保护区的大黄鱼资源量却有明显增加<sup>[8]</sup>,表明增殖放流是增加自然海域大黄鱼渔业生物量甚至恢复资源量的有效途径之一<sup>[9]</sup>。由于通过捕捞产量间接判断增殖放流效果可能存在较多因素的干扰,对特定区域的调查亦可能得出片面性的结果,而最关键的是,能直接体现放流效果及放流群体动向的传统物理标记评估一直难以在大黄鱼

上进行大规模的应用。基于分子标记所具有的优点,本研究以所筛选的大黄鱼相关微卫星位点为基础,结合盲样实验验证了其在大黄鱼亲子溯源中具有准确性,在此前提下,对 2019 年福建三沙湾海域放流的大黄鱼进行跟踪溯源分析,尝试应用微卫星分子标记对大黄鱼增殖放流效果进行评估的可行性,以期三沙湾大黄鱼增殖放流策略的制定提供数据支撑与理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 标记亲本及盲样实验样品** 本研究用于增殖放流标记的大黄鱼亲本(简称“标记亲本”)(雌雄各 50 尾)来自中国福建省宁德富发水产有限公司(简称“宁德富发”)的大黄鱼育苗场。用于盲样实验的子代共 150 尾,均为体长 5 cm 左右的幼鱼,其中 50 尾来自上述 100 尾标记亲本的子代群体,其余 100 尾来自于其他育苗场。

**1.1.2 增殖放流个体** 所有标记亲鱼置于室内同一水泥池中混合培养并促使其自然产卵,连续收集受精卵并将其放置于孵化槽内孵化,孵化后幼体培育至体长 5~7 cm 时进行放流。福建省宁德市三沙湾官井洋历史上一直是大黄鱼产卵场及育幼场,亦是宁德市大黄鱼增殖放流的主要场所,本研究同样选择此海域作为放流及回捕的实验场所。2019 年 6 月 25 日宁德市富发水产有限公司在三沙湾的青山岛东部海域(图 1 星号处)共放流

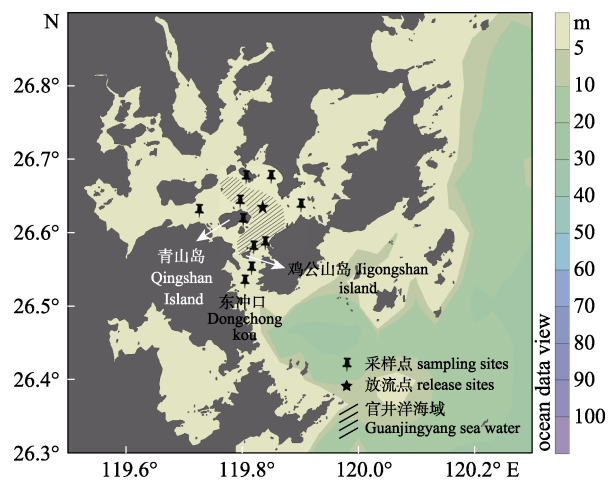


图 1 三沙湾采样站点分布图

Fig. 1 The sampling sites in Sansha Bay

300 万尾大黄鱼幼鱼, 其中 13 万尾为来源于标记亲本子代的幼鱼(简称“标记幼鱼”), 将作为内参用于回捕个体的检测和回捕率评估。从 2019 年 7—9 月, 以官井洋为主, 在三沙湾海域不同位置, 随机回捕大黄鱼样本共 295 尾。回捕地点、时间、捕捞工具和回捕个体数量、样本体长体重数据等具体信息见表 1。

**1.1.3 回捕样品** 回捕群体共 295 尾, 主要来自官井洋海域(包括青山岛四周海域、鸡公山岛东面和东冲口等海域)(图 1)。所有大黄鱼样品剪取肌肉组织以备基因组 DNA 提取。样本基因组 DNA 提取采用传统的酚氯仿法<sup>[10]</sup>, 分别采用分光光度计和 1%琼脂糖凝胶电泳对提取的 DNA 纯度及完整度进行检测。

表 1 大黄鱼回捕样本信息

Tab. 1 The information of recaptured *Larimichthys crocea* samples

编号 serial number	采样时间 sampling time	采样地点 sampling site	数量 <i>n</i>	平均体长/cm body length	平均体重/g body weight	捕捞工具 fishing tool
SSW2019071601-120	2019/7/16	青山岛四周海域	120	11.00	21.60	定置网 set net
YCSSL2019072963-70	2019/7/29	鸡公山岛东侧	8	10.24	19.35	定置网 set net
YCSSL2019073101-62	2019/7/30	青山岛南侧	62	11.21	20.10	定置网 set net
		鸡公山岛东侧	24	9.41	15.42	定置网 set net
YCSSL2019081501-58	2019/8/15	东冲口	11	9.55	16.15	定置网 set net
		青山岛东侧	23	11.56	13.76	定置网 set net
YCSSL2019090301-47	2019/9/3	鸡公山岛东侧	16	10.49	19.89	定置网 set net
		青山岛南侧	31	10.30	18.67	定置网 set net

## 1.2 方法

### 1.2.1 微卫星位点筛选及亲本基因型数据库的构建

本研究首先利用 100 尾标记亲本对已发表文献中筛选出的 15 个大黄鱼候选微卫星位点进行多态性检测评估<sup>[11-13]</sup>。从中筛选出 8 个多态性最为丰富的位点进行标记亲本微卫星 PCR 扩增, 8 个位点的等位基因数据用于构建标记亲本的基因分型数据库。

**1.2.2 盲样实验** 待测的 150 尾盲样先由采集人进行随机编号, 在仅有采集人知道待测个体遗传背景的前提下进行微卫星分子标记的亲子溯源检测。根据检测结果再与已知的个体遗传背景进行对照, 以确定通过所筛选的微卫星引物进行分子标记亲子溯源的准确率和该技术的有效性。

**1.2.3 PCR 扩增及基因分型** 微卫星 PCR 扩增体系包括: PCR 扩增预混液 Taq Master Mix (Dye Plus) 12.5  $\mu\text{L}$  (南京诺唯赞公司), 模板 DNA (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ , 各位点微卫星正反向特异性引物(5 mmol/L) 各 1.0  $\mu\text{L}$ , 灭菌 ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{L}$  补充至总反应体系 25  $\mu\text{L}$ 。引物由生工(上海)生物工程股份有限公司合成, 每个位点特异性扩增的正向引物 5'端分别

用下列 4 种荧光染料中的 1 种进行修饰: 6-FAM, HEX, ROX 和 TAMRA。PCR 扩增体系和反应程序参考 Lyu 等<sup>[14]</sup>的优化体系。PCR 产物通过 ABI 3730 型全自动基因测序仪进行基因分型, 等位基因大小由 GeneScanTM-500 LIZ 标准(ABI)进行测量, 并使用 GeneMapper™V4.1 (ABI)进行判读及数据收集。

**1.2.4 数据处理** 利用 Cervus 3.0.7<sup>[15]</sup>软件计算微卫星位点的等位基因频率、杂合度(*H*)、多态信息含量(PIC)及进行哈迪-温伯格平衡(HWE)分析, 同时进行排除率和无效等位基因频率分析。利用 Cervus 3.0.7 模拟分析微卫星位点数量与累积排除率的关系。根据累积排除率和 LOD 值等参数进行标记亲本和回捕个体亲权关系的分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 微卫星引物的筛选

剔除扩增不成功或多态性含量低的 7 个位点之后, 从 15 个微卫星位点中筛选获得 8 个多态性较高的微卫星位点用于随后的亲子溯源分析。8 个微卫星位点信息如表 2 所示。

表 2 筛选获得的 8 个用于亲子溯源分析的大黄鱼微卫星位点信息

Tab. 2 Basic information of eight selected SSR loci used for the parentage analysis in *Larimichthys crocea*

位点 locus	重复单元 repeat module	荧光引物标记 dye label	引物序列 primer sequence	片段大小/bp size	退火温度/°C $T_m$
<i>LYC01</i>	(CTTT) <sub>9</sub>	FAM	F: 5'-ATGCTGACCCATGTTGGACT-3' R: 5'-TGCATGCAGTCAAAAATACCA-3'	197/250	58
<i>LYC07</i>	(CTTT) <sub>9</sub>	ROX	F: 5'-CCTGTTTTGCTCTCTCTGG-3' R: 5'-GCAGCACACAATGGAAACAC-3'	185/227	58
<i>LYC013</i>	(CTTT) <sub>8</sub>	FAM	F: 5'-GAATGGCATAGAGCCCGTAA-3' R: 5'-GAATGGCATAGAGCCCGTAA-3'	161/274	56
<i>LYC017</i>	(CTTT) <sub>8</sub>	HEX	F: 5'-TTC AAGGAGCCAGTATGGT-3' R: 5'-CTTGAGAATGAGCGCAACAG-3'	219/290	59
<i>LYC033</i>	(CTTT) <sub>8</sub>	ROX	F: 5'-TGCATGTCTCAGTCCCTGAA-3' R: 5'-AAGTCTTCCAGCATGCACT-3'	245/285	59
<i>LYC042</i>	(CTTT) <sub>9</sub>	FAM	F: 5'-ATTCAGCGGAAGCTCTTT-3' R: 5'-ATTTACTTTTCGGGGCTGCT-3'	210/280	55
<i>LYC047</i>	(CTGT) <sub>9</sub>	HEX	F: 5'-AATGTGGACGGAGTTGCTTC-3' R: 5'-CCCCAATCTCCACTAATCC-3'	147/220	59
<i>LYC059</i>	(ACAT) <sub>9</sub>	TAM	F: 5'-CACAGCCTTTCTTTGGAATCA-3' R: 5'-CACTGTCACCTTTGCTGTATGGA-3'	120/180	59

2.2 标记亲本基因分型数据库的构建

8 个微卫星位点在 100 尾大黄鱼标记放流亲本中共检测得到 78 个等位基因。其中等位基因数最少的位点为 *LYC033*, 只有 5 个等位基因, 最多的位点为 *LYC017*, 检测到 14 个等位基因。观测杂合度 ( $H_o$ ) 与期望杂合度 ( $H_e$ ) 范围分别为 0.511~0.939 (平均值为 0.764) 和 0.643~0.897 (平均值为 0.781)。8 个微卫星位点多态信息含量为 0.587~0.883 (平均值为 0.751), 均表现出高度多态性 (PIC>0.5)。此外, 哈迪-温伯格平衡 (HWE) 检测结果显示, 位点 *LYC033* 极显著偏离 ( $P<0.001$ ) HWE, 位点 *LYC013* 也与 HWE 显著偏离 ( $P<0.05$ ) (表 3)。

2.3 微卫星位点个体排除率统计

利用 Cervus 3.0.7 软件, 评估出的 8 个微卫星位点单一及累积个体排除概率表明, 在候选亲本基因型未知的情况下 (NE-1P), 8 个微卫星位点的单一非排除率 (non-exclusion probability, NEP) 为 35.8%~77.2%, 仅一个单亲已知基因型的情况下 (NE-2P) 非排除概率为 21.7%~60.8%, 个体双亲基因型均已知的情况下 (NE-PP) 非排除概率为 7.4%~42.9% (表 4)。在个体双亲基因型未知以及

表 3 8 个微卫星位点的遗传多样性信息

Tab. 3 The information of genetic diversity for eight SSR loci

位点 locus	等位 基因数 $K$	观测 杂合度 $H_o$	期望 杂合度 $H_e$	多态性 PIC	哈迪- 温伯格平衡 HWE
<i>LYC01</i>	8	0.511	0.691	0.662	NS
<i>LYC07</i>	9	0.82	0.82	0.793	NS
<i>LYC013</i>	10	0.653	0.795	0.766	*
<i>LYC017</i>	14	0.869	0.852	0.831	NS
<i>LYC033</i>	5	0.839	0.643	0.587	***
<i>LYC042</i>	13	0.939	0.897	0.883	ND
<i>LYC047</i>	9	0.77	0.771	0.739	NS
<i>LYC059</i>	10	0.71	0.779	0.745	NS
平均值 mean	9.8	0.764	0.781	0.751	

注: ND 表示无结果; NS 表示偏离哈迪-温伯格平衡不显著 ( $P>0.05$ ); \* 指显著偏离哈迪-温伯格平衡 ( $P<0.05$ ); \*\*\* 表示极显著偏离哈迪-温伯格平衡 ( $P<0.001$ )。

Note: ND means no results; NS means no significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ( $P>0.05$ ); \* means significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ( $P<0.05$ ); \*\*\* means extremely significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ( $P<0.001$ ).

单一亲本基因型已知的条件下, 8 个位点的累积排除概率分别为 99.43% 和 99.98%, 而对于个体双亲基因型已知的情况下, 8 个位点的累积排除概率为 99.99%, 具有很高的累积排除概率 (表 4)。

表 4 8 个微卫星位点的单一及累积排除概率  
Tab. 4 Single-locus exclusion probability and combined exclusion probability (CEP) of eight SSR loci

位点 locus	无效等位 基因频率 frequency of null	非亲权排除概率 non-exclusion probability			累积排除 概率 CEP
		NE-1P	NE-2P	NE-PP	
LYC01	0.151	0.698	0.510	0.300	0.870853
LYC07	-0.004	0.533	0.359	0.179	0.990452
LYC013	0.101	0.570	0.392	0.201	0.998491
LYC17	-0.016	0.464	0.300	0.129	0.999647
LYC033	-0.155	0.772	0.608	0.429	0.999929
LYC042	-0.025	0.358	0.217	0.074	0.999984
LYC047	-0.009	0.604	0.424	0.228	0.999997
LYC059	0.044	0.602	0.423	0.234	0.999999

注: NE-1P 指双亲基因型未知时单亲本的非亲权排除概率; NE-2P 指单亲基因型已知时的另一亲本的非亲权排除概率; NE-PP 指双亲基因型已知时父母本的非亲权排除概率; CEP 指代累积排除概率。

Note: NE-1P means non-exclusion probability for one candidate parent; NE-2P means non-exclusion probability for one candidate parent given the genotype of a known parent of the opposite sex; NE-PP means non-exclusion probability for a candidate parent pair; CEP means combined exclusion probability.

## 2.4 已知子代准确率验证

8 个微卫星位点提供的大黄鱼亲子溯源能力及准确性在盲样实验中得到了验证: 将亲本已知 50 尾子代与其他 100 尾个体作为盲样, 基于 8 个微卫星位点对 100 尾标记亲本与上述 150 尾盲样进行了亲子溯源分析, 成功鉴别出 47 尾来自于放流亲本的子代, 匹配率达到了 94%, 累积排除率在 99.99% 以上。

## 2.5 回捕样本中标记放流个体溯源及增殖放流效果评估

利用软件 Cervus 3.0.7 对 100 尾标记亲本与回捕的 295 尾大黄鱼子代基因型数据进行亲子溯源鉴定分析。判定结果在 95% 置信区间且 LOD 值超过临界值的亲子关系, 视为来自于标记亲本的子代。亲权鉴定结果显示, 共有 5 尾回捕大黄鱼样本是来自于 100 尾放流亲本(表 5), 这 5 尾标记放流个体分别在青山岛附近海域(2 尾)、鸡公山岛东北面海域(1 尾)和青山岛南面海域捕获(2 尾)。

通过微卫星分子标记放流个体溯源, 依据放流群体中“标记”大黄鱼的投放比例, 结合所“检出”标记大黄鱼数量来推算出回捕群体中来自于

宁德富发的大黄鱼放流数量, 进而实现回捕率精确估算。在放流群体中, “标记”个体与混合背景群体(300 万)的比例为 4.33% (13/300)。7 月从官井洋海域回捕到的 190 尾大黄鱼中, 共鉴定出“标记”个体 5 尾, 按照放流时的比例 4.33%, 可推算出回捕的样本中放流群体数为 115 尾, 由此推算, 7 月回捕样本中富发放流个体所占比例为 60.53% (115/190)。8、9 月的回捕样本中未能检出标记个体。在本次的放流评估中, 根据推算出来的回捕样本中放流群体数量( $M$ )和实际放流数量( $N$ ), 可算出 7 月富发公司的放流大黄鱼回捕率为 0.0038%。此外, 按照回捕样本中宁德富发放流个体所占的比例 60.53%, 也可推算出 2019 年 6 月底(放流前)官井洋海域内与放流大黄鱼同规格体长的已有个体总数约有 195.87 万尾, 考虑到放流群体在放流初期可能比原存群体具有更高的死亡率, 其数值可能还存在一定程度的高估。

表 5 三沙湾回捕样本中用微卫星分子标记  
大黄鱼个体的亲子溯源结果

Tab. 5 The results of parentage analysis for *Larimichthys crocea* individuals marked with microsatellite markers from recaptured samples in Sansha bay

子代编号 offspring no.	候选亲本编号 candidate parent no.	似然率对数值 pair LOD score	95% 置信度 95% pair confidence
SSW2019071634	Y7/Y20	10.80	*
SSW2019071669	Y28/Y55	7.98	*
YCSS2019072964	Y35/Y95	8.54	*
YCSS2019073121	Y18/Y99	7.65	*
YCSS2019073122	Y30/Y84	7.78	*

注: \*表示 LOD 值在 95% 置信度下显著。

Note: \* means the significance of the LOD value with a confidence level greater than 95%.

## 3 讨论

### 3.1 微卫星位点多态性

微卫星位点的等位基因数目决定了其遗传多态性以及杂合度水平, 基于 BOTSEIN 提出的多态性水平判定标准<sup>[16]</sup>, 本实验筛选出的 8 个微卫星位点的 PIC 均值为 0.751, 具有较高的多态性水平。杂合度是衡量群体遗传多样性水平的重要指标, 本研究筛选获得的 8 个微卫星位点观测和期

望杂合度均大于 0.5, 且平均观测杂合度和期望杂合度均在 0.75 以上, 表明所筛选的 8 个位点能够提供比较丰富的遗传信息。哈迪-温伯格平衡检测结果显示, 除去微卫星位点 *LYC017* 和 *LYC01* 在放流亲本群体中表现为极显著( $P < 0.001$ )和显著偏差( $P < 0.05$ )水平外, 其余 6 个位点均表现为与 HWE 偏差不明显( $P > 0.05$ )。少量偏离 HWE 平衡的位点可能与所分析的亲本群体有关(如存在一定程度近交), 不会对亲子溯源分析结果准确性产生显著影响<sup>[17]</sup>。因此本研究筛选出的 8 个微卫星位点在群体中表现出丰富的遗传多样性水平, 且多数位点在群体表现稳定遗传状态, 可以满足后续大黄鱼亲子溯源分析需求。

### 3.2 基于微卫星标记的亲子溯源准确性

累积排除率(CEP)与微卫星位点数量成正比, 是反映亲子鉴定有效程度的重要标准<sup>[18]</sup>。本研究中微卫星位点累积到 3 个时, 在个体双亲基因型已知的情况下, CEP 大于 99.84%, 位点数累积到 8 时, CEP 大于 99.99%。Vankan 等<sup>[19]</sup>的研究表明, 亲子鉴定结果在亲子排除概率为 0.99 及以上时具有 98%~99%的可靠性, 间接表明 8 个微卫星位点在大黄鱼亲子鉴定的准确度是可信的。同时, 为了避免由于微卫星 PCR 扩增时无效等位基因及基因分型误差对判定结果的影响, 一方面本研究选用无效等位基因频率较低的 8 个微卫星位点, 尽量避免在杂合位点读取时产生误差; 另一方面本实验采用荧光标记法和毛细管电泳技术相结合对样品的 DNA 片段进行基因分型, 提高了判读杂合位点和等位基因大小数据的准确性。在盲样实验中, 利用 8 个微卫星位点基因分型信息, 从 150 尾子代中确证了其中 47 尾与放流亲本存在亲子关系。8 个微卫星位点组合的亲子关系个体识别率为 94%, 所识别出的 47 尾子代的准确率在 99.99%以上水平, 验证了这 8 个微卫星位点在大黄鱼亲子溯源中的准确性。

### 3.3 增殖放流效果评估

本次放流实验中, 在 7 月的回捕样本中, 来自宁德富发的放流个体占 60.53%左右, 说明本次官井洋的增殖放流在 7 月的三沙湾大黄鱼渔业资源生物量中占据重要组成部分。不过在本次的放

流评估中, 计算出的富发公司的当次回捕率仅为 0.0038%, 明显低于传统的标志放流法的回捕率<sup>[20-21]</sup>。这是由于外标式的传统标记有利于渔民的识别和回缴, 而本实验中的内标式标记则因难以通过肉眼鉴别而无法将未经检测的捕获个体纳入统计。但本研究所采用的微卫星分子标记在理论上可以基于其遗传学特性, 高效、“自主”地完成大量终身携带的标记, 而且不会造成标记个体损伤, 因此利用微卫星标记法换算所得的“放流个体占回捕样本比例”相比于传统标记放流更接近真实回捕数据。

### 3.4 放流个体在三沙湾内的迁徙分布

放流回捕率的准确估算受到多种因素影响, 包括放流时间与放流地点、回捕方法、回捕地点及放流持续时长。官井洋大致位于青山岛至鸡公山东侧一带主航道上(图 1), 该海域水流湍急, 是刺激大黄鱼亲鱼成熟的理想场所, 而附近水域由于岛礁庇护水流较缓, 兼以丰富的浮游动物作为适口饵料, 这一切优势使得三沙湾成为我国大黄鱼最大的内湾型产卵场和育幼场<sup>[22]</sup>。本实验中所检测出的标记个体, 均捕获于官井洋两侧水流较缓的水域, 进一步佐证了该海域是大黄鱼适合的育幼场所。需要注意的是, 在 2019 年 7、8 和 9 月回捕样本中, 7 月回捕样本中宁德富发放流个体所占比例为 60.53%, 而 8 月和 9 月均为 0%, 出现这种情况的可能原因之一是分子标记个体(13 万尾)在整个宁德富发放流群体中(300 万尾)的比例偏低且回捕样本较少(休渔期的管理制度下难以获得充足样本数), 导致存在取样误差。同时, 考虑到 7 月回捕样本中来自于宁德富发的放流个体比例较高(60.53%), 笔者认为亦有可能是放流群体已发生较大范围的迁移或分散于湾内其他海域。根据对闽东野生大黄鱼洄游路线的相关研究可知<sup>[23]</sup>, 在闽江口到四礂列岛禁渔线外侧越冬的大黄鱼经过洄游, 于 5 月中旬到 6 月中旬在三沙湾官井洋产卵。10 月, 随着近海水温下降, 湾内的幼鱼一部分会留在湾内越冬, 尚有部分鱼群会游出三沙湾越冬洄游至四礂列岛, 并形成秋冬季大黄鱼渔汛。由此推测, 8、9 月份时未发现富发放流标记个体的原因除回捕样本量较少之外, 亦



有可能因当其时的大黄鱼放流群体已发生了较大范围的扩散。

### 3.5 增殖放流的建议

宁德市三沙湾官井洋海域是历史上重要的大黄鱼产卵场和育幼场,也是大黄鱼理想的放流区域,在该水域进行大黄鱼增殖放流对于恢复大黄鱼资源量有重要意义。为了更好地对大黄鱼增殖放流效果进行评估,根据本研究结果提出以下两点建议:(1)制订严格的大黄鱼放流规范。据现场调研,2019年除了由政府主管部门组织的宁德富发公司规范性放流外,其他育苗场也存在少量无序放流,以及出于商业利益的大规模排苗行为,大量小规格、残次苗(数量超 2 亿尾)被人为排入三沙湾。不过从 7 月回捕样本中宁德富发放流个体所占 60.53%的高比例来看,可以推测这种无序放流及排苗行为未对三沙湾大黄鱼渔业生物量增加产生明显效果。(2)建立亲鱼基因库,增加检测个体数量。放流效果评估需要长期的监测数据支撑才能得到更为准确的判断,越庞大的亲鱼基因型数据库、越高比例的标记放流数量及越多的规格齐全的检测个体(从技术水平,可以实现对所有放流个体的跟踪溯源),将会带来更多的参考信息,为准确评估大黄鱼的放流效果,放流群体的生活习性以及对野生群体、资源恢复影响的研究提供可靠的数据支持。

### 参考文献:

- [1] Lorenzen K, Leber K M, Blankenship H L. Responsible approach to marine stock enhancement: An update[J]. *Reviews in Fisheries Science*, 2010, 18(2): 189-210.
- [2] Chen P M. Study on the method for assessment of enhancement effect of fishery stock[J]. *South China Fisheries Science*, 2006, 2(1): 1-4. [陈丕茂. 渔业资源增殖放流效果评估方法的研究[J]. *南方水产*, 2006, 2(1): 1-4.]
- [3] Wang W J, Zhang K, Luo K, et al. Assessment of recapture rates after hatchery release of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in Jiaozhou Bay and Bohai Bay in 2012 using pedigree tracing based on SSR markers[J]. *Fisheries Science*, 2014, 80(4): 749-755.
- [4] Sekino M, Saitoh K, Yamada T, et al. Genetic tagging of released Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) based on polymorphic DNA markers[J]. *Aquaculture*, 2005, 244(1-4): 49-61.
- [5] Yang C P, Sun D R. Study and demonstration of key technologies for fishery resources enhancement in the South China Sea area[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2019: 118-126. [杨长平, 孙典荣. 南海区渔业资源增殖放流关键技术研究及示范[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019: 118-126.]
- [6] Chen S X, Su Y Q, Hong W S. Aquaculture of the large Yellow Croaker[M]//*Aquaculture in China*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2018: 297-308.
- [7] Liu J F, Weng Z C, Tang X G, et al. Tagging techniques of *pseudosciaena crocea* (richardson) in Guanjingyang sea area and a preliminary study on ecological habits and characteristics of early tagged fish[J]. *Marine Sciences*, 1994, 18(5): 53-58. [刘家富, 翁忠钊, 唐晓刚, 等. 官井洋大黄鱼标志放流技术与放流标志鱼早期生态习性的初步研究[J]. *海洋科学*, 1994, 18(5): 53-58.]
- [8] You Y. Promoting sustainable development of fishery economy through enhancement release — Taking Fujian Province as an example to discuss the problems affecting the effect of enhancement release and countermeasures[J]. *China Fisheries*, 2015(12): 39-42. [游玉. 开展增殖放流促进渔业经济可持续发展——以福建省为例探讨影响增殖放流效果的问题及对策[J]. *中国水产*, 2015(12): 39-42.]
- [9] Zhang Q Y, Hong W S, Yang S Y, et al. Review and prospects in the restocking of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Modern Fisheries Information*, 2010, 25(12): 3-5, 12. [张其永, 洪万树, 杨圣云, 等. 大黄鱼增殖放流的回顾与展望[J]. *现代渔业信息*, 2010, 25(12): 3-5, 12.]
- [10] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 468-470.
- [11] Mu F S, Miao L, Li M Y, et al. Screening of microsatellite markers associated with cold tolerance of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. *Journal of Biology*, 2017, 34(1): 34-38. [穆方申, 苗亮, 李明云, 等. 微卫星技术筛选大黄鱼耐低温标记[J]. *生物学杂志*, 2017, 34(1): 34-38.]
- [12] Ye H, Liu Y, Liu X D, et al. Correlation analysis of microsatellite markers with growth traits in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2014, 36(3): 27-33. [叶华, 刘洋, 刘贤德, 等. 大黄鱼微卫星标记与生长性状的相关分析[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2014, 36(3): 27-33.]
- [13] Ye H, Ren P, Liu Y, et al. Isolation and genetic analysis of microsatellite markers for *Larimichthys crocea*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(6): 1156-1163. [叶华, 任鹏, 刘洋, 等. 大黄鱼微卫星标记的开发及其遗传方式分析[J]. *水生生物学报*, 2012, 36(6): 1156-1163.]

- [14] Lyu D, Wang W J, Luan S, et al. Estimating genetic parameters for growth traits with molecular relatedness in turbot (*Scophthalmus maximus*, Linnaeus)[J]. *Aquaculture*, 2017, 468: 149-155.
- [15] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(5): 1099-1106.
- [16] Botstein D R, White R L, Skolnick M H, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [17] Zhong M M. Applying fifteen microsatellites to identify the Paternity of Holstein cow[J]. *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2010, 31(4): 5-8. [钟美明. 利用 15 个微卫星位点对荷斯坦奶牛进行亲子鉴定[J]. 山东畜牧兽医, 2010, 31(4): 5-8.]
- [18] Feng X T, Yang X W, Yang X J, et al. Microsatellite method assessment of the effects of restocking enhancement of big-head carp (*Aristichthys nobilis*) in Jiangsu reaches of the Yangtse River[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(6): 1185-1193. [冯晓婷, 杨习文, 杨雪军, 等. 基于微卫星标记对长江江苏段鳊增殖放流效果评估[J]. 中国水产科学, 2019, 26(6): 1185-1193.]
- [19] Vankan D M, Faddy M J. Estimations of the efficacy and reliability of paternity assignments from DNA microsatellite analysis of multiple-sire matings[J]. *Animal Genetics*, 1999, 30(5): 355-361.
- [20] Xu H X, Zhou Y D. A preliminary study on release and enhancement of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* in the north coast of Zhejiang[J]. *Marine Fisheries*, 2003, 25(2): 69-72. [徐汉祥, 周永东. 浙北沿岸大黄鱼放流增殖的初步研究[J]. 海洋渔业, 2003, 25(2): 69-72.]
- [21] Ma X L. Releasing enhancement of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in Dongtou sea water and its effect evaluation[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2016. [马晓林. 洞头海域大黄鱼增殖放流及其效果初步评价[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2016.]
- [22] Cai Q H, Du Q, Qian X M, et al. Comprehensive evaluation on marine ecological environment of Sansha Bay in Fujian, China[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, 29(2): 156-160. [蔡清海, 杜琦, 钱小明, 等. 福建省三沙湾海洋生态环境质量综合评价[J]. 海洋学报, 2007, 29(2): 156-160.]
- [23] 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.]

## Application of microsatellite markers for evaluating the effect of restocking enhancement in *Larimichthys crocea*

WU Lina<sup>1,2</sup>, ZHANG Ningjun<sup>2</sup>, SUN Song<sup>3</sup>, YUAN Jigui<sup>2</sup>, CHEN Jia<sup>1</sup>, LI Miaomiao<sup>4</sup>, LIN Nan<sup>4</sup>, YOU Yu<sup>4</sup>, WANG Weiji<sup>3</sup>, DING Shaoxiong<sup>1,2</sup>

1. State Key Laboratory of Large Yellow Croaker Breeding, Ningde 352103, China;
2. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361002, China;
3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
4. Fujian Provincial Fisheries Technology Extension Center, Fuzhou 350002, China

**Abstract:** Large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) is an important commercial marine fish endemic to China. It has long been ranked as one of four major seafood items in China. Unfortunately, overfishing, pollution of the ocean environment, and other factors have led to a severe decline in the natural resources of large yellow croaker. Enhancement release of large yellow croaker has been conducted since 1987 and is considered an effective fishery management measure. Although the traditional tagged method can indirectly assess the effect of enhancement release, it has numerous disadvantages, such as high cost, complicated operation, tags easily falling off, and fish body damage, which obstruct the effectiveness of the assessment. Furthermore, few strategies and methods have previously been proposed to precisely assess the effect of enhancement release of large yellow croaker. Through



mixing “labeled” individuals with a known parental origin and the released population at a certain proportion, and identifying “labeled” individuals through parentage identification after recapturing, microsatellite marker technology calculates the rate of recapture with a higher precision, and is becoming more popular in the enhancement release assessment. To assess the applicability of microsatellite markers in evaluating the effect of enhancement releasing programs in *Larimichthys crocea*, this study used a total of 8 microsatellite loci with rich polymorphism to conduct parentage identification for 100 parents of released offspring and 295 individuals recaptured from Guanjingyang sea water. In addition, this study also proposed a method for evaluating the recapture effect of large yellow croaker enhancement programs based on microsatellite molecular markers. In total, 78 alleles were detected at the 8 microsatellite loci. The values of observed heterozygosity and expected heterozygosity were 0.511–0.939 (mean 0.764) and 0.643–0.897 (mean 0.781), respectively, and the polymorphism information content of the 8 loci was 0.587–0.883 (mean value was 0.751). The results of simulated analysis using Cervus 3.0.7 software showed that the combined exclusion probability of individuals at the 8 microsatellite loci reached 99.99% or more with a confidence level greater than 95%. Among the 190 large yellow croakers recaptured from Guanjingyang sea water in July, only five were identified as the offspring of the 100 released parents, accounting for 2.63% of all recaptures. This study estimated that the proportion of the large yellow croaker from released individuals to the recaptured ones should be approximately 60.53% in July. The recapture rate of large yellow croaker released by Fufa company was around 0.0038% in July, while the marked individuals failed to be detected in the recaptured samples in August and September. The recapture rate of 0.0038% is lower than that of the traditional tagged release. Compared with traditional tags that have visible external-scale tags to assist with identification and recapture by fishermen, it was difficult to include the internal markers in the statistics, as the captured individuals were not detected by visual identification. Microsatellite markers can efficiently and “autonomously” implement numerous permanent carrying markers based on genetic characteristics, and will not damage the marked individuals. Therefore, the proportion of released individuals to recaptured samples, which was calculated through the microsatellite method, is closer to the real data as opposed to traditional tagged release calculations. All the marked individuals detected in this study were recaptured in water with a slow current on both sides of Guanjingyang, which further confirmed that Guanjingyang is a suitable feeding ground for large yellow croaker juveniles. Nevertheless, this study also found that no marked individuals were detected in August and September. This could be attributed to the small proportion of recaptured individuals and the wider range of release of the population at that time. This study provides a new method for assessing the effect of stock enhancement, and affirms that enhancement release can restore the wild stock of large yellow croaker to a certain extent.

**Key words:** *Larimichthys crocea*; microsatellite marker; enhancement release; parentage identification

**Corresponding author:** DING Shaoxiong. E-mail: sxding@xmu.edu.cn

WANG Weiji. E-mail: wangwj@ysfri.ac.cn