

“东海1号”大黄鱼选育F₄代遗传多样性的 AFLP 分析

侯红红, 苗 亮, 李星云*, 穆方申, 徐玉敏

(宁波大学 教育部应用海洋生物技术重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 应用扩增片段长度多态性(AFLP)技术对以岱衢洋野生大黄鱼为亲本、通过群体选育方法获得的“东海1号”大黄鱼选育系F₄代进行了遗传多样性分析. 结果显示: 16对 AFLP 选择性扩增引物组合在选育F₄代的20尾个体中共扩增出736个位点, 其中多态位点292个, 多态率为39.67%; 各引物对的Nei's遗传多样性指数范围为0.0904~0.2037, 平均值为0.1399; Shannon多样性范围为0.1320~0.3047, 平均值为0.2099; 其遗传多样性水平与原始亲本群体相当. 表明若群体选育方法得当, 多代选育后仍能维持较好的遗传多样性水平.

关键词: 大黄鱼; 扩增片段长度多态性(AFLP)技术; 遗传多样性

中图分类号: Q347

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2018) 04-0031-05

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)是我国近海主要的经济鱼类, 为传统“四大海产”之一. 因20世纪中后期的毁灭性捕捞, 野生大黄鱼数量急剧减少^[1], 遗传多样性也明显低于正常水平^[2]. 在刘家富等^[3]以捕自福建官井洋的野生大黄鱼为亲本突破了人工繁育和养殖技术后, 近20年来我国大黄鱼养殖产业不断扩大, 但逐渐出现了生长速度变慢、性成熟提早等现象, 病害频发^[4]. 究其原因, 除养殖规模扩大和长期养殖造成的养殖水体环境变差^[5]外, 多代人工繁育和养殖后的种质退化也是一个重要因素. 目前我国养殖的主要是福建官井洋大黄鱼, 在野生群体资源崩溃、遗传多样性水平较低背景下, 加上育苗、养殖规模扩大的过程中对种质问题重视不够, 繁养多代后养殖大黄鱼的遗传多样性水平更低^[4,6]. 生物多样性是遗传育种的基因源泉, 因此有必要关注选育群体的遗传多样性状况.

舟山岱衢洋曾是我国海捕大黄鱼的主产区, 岱衢洋大黄鱼群体最大、产量最高, 且体色、肉质较好, 开发岱衢洋大黄鱼进行繁育和养殖将有利于我国大黄鱼产业的发展^[7]. 2000年, 本课题组在地方政府的支持和配合下, 从岱衢洋中采捕了野生大黄鱼进行人工选育, 并于2014年获得国家水

产新品种, 定名为“东海1号”^[8]. 鉴于岱衢洋大黄鱼资源被破坏程度更大, 遗传多样性水平甚至低于官井洋大黄鱼^[9], 并且最初驯养存活的138尾野生岱衢洋大黄鱼中仅有4尾达到性成熟用于繁育子代, 因此我们在后续的人工繁育中通过增加亲本数量、制定配组策略、扩大子代选育群体等措施来避免近交衰退. 为了解选育系大黄鱼经多代繁育后遗传多样性状况, 本研究使用扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)技术对“东海1号”大黄鱼选育F₄代进行了扩增和遗传多样性分析, 以作为后续良种选育的基础信息, 并可为大黄鱼及其他鱼类的种质资源保护提供参考资料.

1 材料与方法

1.1 实验材料

试验用鱼取自浙江省象山港湾水产苗种有限公司, 是本课题组与该公司合作, 以2000尾采捕自浙江岱衢洋的野生大黄鱼为亲鱼, 经连续4代选育而得到的选育F₄代(繁育时间: 2008年). 于2009年11月从海水养殖网箱中取2龄成鱼20尾, 雌雄各半, 体重378.58~540.31 g(平均468.41 g), 体长

收稿日期: 2017-11-06.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2012AA10A403-4); 浙江省农业(水产)新品种选育重大科技专项(2016C02055-7).

第一作者: 侯红红(1990-), 女, 山东邹城人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 鱼类遗传育种与种质资源保护. E-mail: hhhou0908@163.com

*通信作者: 李星云(1942-), 男, 浙江舟山人, 博导/教授, 主要研究方向: 鱼类增养殖、遗传育种和种质资源保护. E-mail: limingyun@nbu.edu.cn

29.98~35.62 cm(平均 33.51 cm), 剪取鳍条, 液氮速冻后保存于-80℃冰箱中。

1.2 大黄鱼基因组 DNA 提取

用改进的酚-氯仿法^[10]提取大黄鱼基因组 DNA, 1%琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的完整性, 测定 OD260、OD280 值并计算纯度和浓度。

1.3 AFLP 扩增

使用 AFLP 试剂盒(*Eco*RI/*Mse*I 型, 北京鼎国昌盛生物技术公司)进行 AFLP 扩增, 步骤为:

(1)采用 *Eco*R I 和 *Mse* I 进行双酶切, 利用 T4 连接酶为酶切片段加上接头, 进行酶切、连接反应, 然后进行预扩增。接头及引物序列见表 1。

表 1 AFLP 酶切连接接头、预扩增引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
<i>Eco</i> R I 接头 1	CTCGTAGACTGCGTACC
<i>Eco</i> R I 接头 2	AATTGGTACGCAGTCTAC
<i>Mse</i> I 接头 1	GACGATGAGTCCTGAG
<i>Mse</i> I 接头 2	TACTCAGGACTCAT
E 预扩	GACTGCGTACCAATTCA
M 预扩	GATGAGTCCTGAGTAAC

(2)根据预实验结果, 共使用由 5 种 *Eco*R I 引物和 6 种 *Mse* I 引物(表 2)形成的 16 对引物组合进行选择扩增。25 μL 反应体系配置和 PCR 程序设定均按照说明书进行。

表 2 AFLP 选择性扩增引物

引物名称	引物序列(5'-3')
E-ACA	GACTGCGTACCAATTCA
E-ACC	GACTGCGTACCAATTCA ACC
E-ACG	GACTGCGTACCAATTCA ACG
E-ACT	GACTGCGTACCAATTCA ACT
E-AGG	GACTGCGTACCAATTCA AGG
M-CAA	GATGAGTCCTGAGTAA CAA
M-CAC	GATGAGTCCTGAGTAA CAC
M-CAG	GATGAGTCCTGAGTAA CAG
M-CTA	GATGAGTCCTGAGTAA CTA
M-CTC	GATGAGTCCTGAGTAA CTC
M-CTT	GATGAGTCCTGAGTAA CTT

(3)对选择性扩增产物进行 8%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 硝酸银染色显示 DNA 条带^[11]。

1.4 条带统计与数据分析

用 GS-800 凝胶成像分析系统(Bio-Rad 公司)

获取凝胶成像, 用 Quantity One 4.62 (Bio-Rad 公司)统计同一位置上条带的有无后转化为 0、1 数据矩阵(有标记的记为“1”、无标记的记为“0”), 将矩阵数据导入 POPGEN 1.32 软件统计多态性位点数并计算多态率、Nei's 遗传多样性指数和 Shannon 多样性指数 I 。

多态率=(多态性片段数量/检出的片段总数)×100%,

Nei's 遗传多样性指数 $=1 - \sum P_i^2$,

$I = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$,

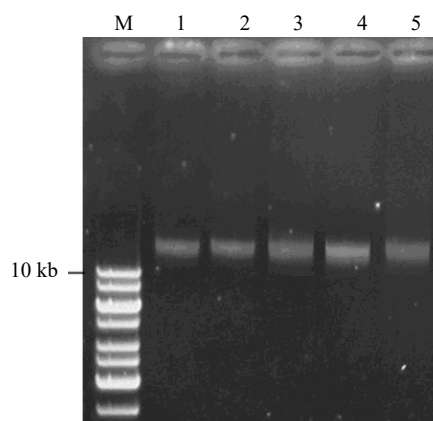
其中 S 为样本个体总数, P_i 为第 i 个个体的等位基因频率^[12]。

杂合度计算: AFLP 为显性标记, 将每个扩增条带视为 1 个位点, 假定该位点无条带的个体为隐性纯合体(基因型为 aa), 且符合遗传平衡, 统计各位点隐性纯合体数量并计算隐性基因频率(a =隐性纯合体数/个体总数)和显性基因 A 的基因频率($A=1-a$)。

2 结果

2.1 大黄鱼基因组 DNA 提取的质量

提取的 F_4 代大黄鱼基因组 DNA 经 1%琼脂糖凝胶电泳显示大小都在 10 kb 以上, 无拖带(图 1), OD260/OD280 值在 1.80~2.00 之间, 表明提取的基因组 DNA 没有降解且纯度较高, 符合实验要求。



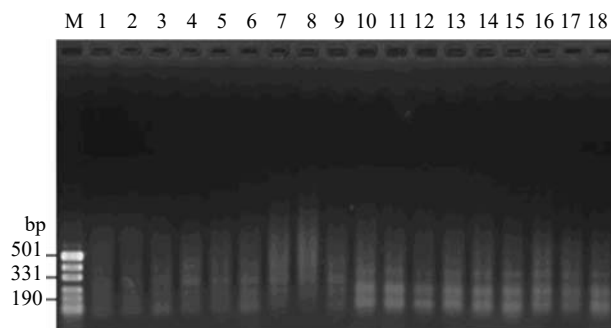
M: 标准分子量; 1~5: 选育 F_4 代大黄鱼基因组 DNA。

图 1 提取的选育 F_4 代大黄鱼基因组 DNA 电泳图

2.2 限制性酶切产物

提取的选育 F_4 代大黄鱼基因组 DNA 经过 *Eco*R I 和 *Mse* I 双酶切和连接接头后, 经 1%琼脂糖

凝胶电泳检测,条带大约 200~2 000 bp 范围内呈弥散状分布(图 2),表明酶切完全,符合实验要求。

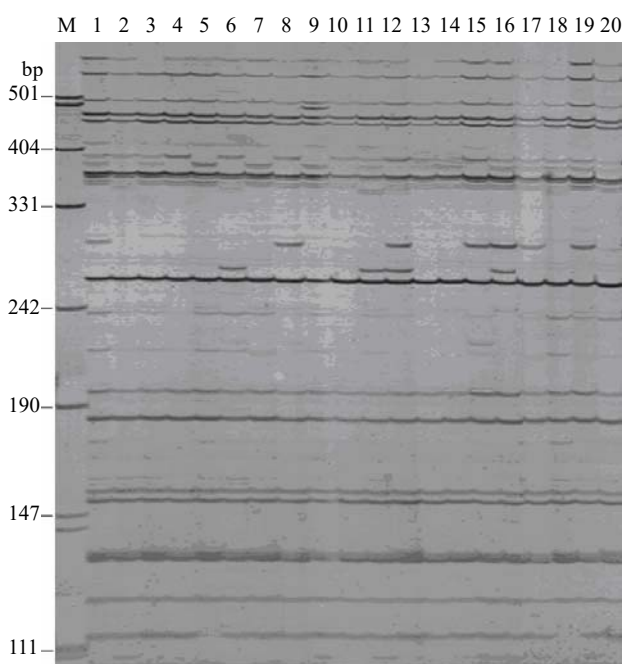


M: 标准分子量; 1~18: 选育 F₄ 代大黄鱼基因组 DNA 酶切产物。

图 2 选育 F₄ 代大黄鱼基因组 DNA 酶切产物电泳图

2.3 AFLP 遗传多样性

经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸银染色,所用 16 对选扩引物组合均可得到清晰的条带,图 3 为引物组合 E-ACT/M-CAA 的扩增条带电泳图谱。



M: 标准分子量; 1~20: 选育 F₄ 代大黄鱼 AFLP 选择性扩增产物。

图 3 AFLP 选择性扩增电泳图谱(引物组合: E-ACC/M-CAG)

16 对选择性扩增引物组合共扩增出 736 个不同的片段,每对引物组合的扩增片段数在 28~66 之间,平均每个引物的扩增片段 46.73 个;多态性片段比例为 39.67%(共 292 个);各引物组合可扩增到 7~27 个多态性片段(平均 18.73 个)(表 3)。

引物组合 E-ACG/M-CAC 扩增到的多态性片

段最多,有 27 个;E-ACA/M-CAG 引物组合的多态性片段最少,为 7 个;E-ACA/M-CAG 引物组合多态性片段的比例最小,为 25.00%;E-ACT/M-CAA 引物组合多态性片段的比例最高,占 56.25%(表 3)。

所检测选育 F₄ 代大黄鱼群体的 Nei's 遗传多样性指数范围为 0.090 4~0.203 7,平均值为 0.139 9;Shannon 多样性指数范围为 0.132 0~0.304 7,平均值为 0.209 9(表 3)。

表 3 选育 F₄ 代大黄鱼 AFLP 扩增结果及遗传多样性分析

引物组合	多态性片段数/个	总片段数/个	多态性率/%	Nei's 遗传多样性指数	Shannon 多样性指数	杂合度
E-ACA/M-CAA	11	35	31.43	0.111 5	0.165 5	0.109 4
E-ACA/M-CAC	21	56	37.50	0.153 1	0.225 5	0.154 6
E-ACA/M-CAG	7	28	25.00	0.133 7	0.192 0	0.106 5
E-ACA/M-CTC	12	47	25.53	0.092 0	0.136 8	0.120 7
E-ACC/M-CAC	19	39	48.72	0.172 7	0.259 2	0.168 8
E-ACC/M-CAG	13	31	41.94	0.156 8	0.236 9	0.148 4
E-ACC/M-CTT	16	40	40.00	0.173 7	0.254 0	0.160 1
E-ACG/M-CAA	19	49	38.78	0.135 4	0.204 4	0.139 9
E-ACG/M-CAC	27	59	45.76	0.132 1	0.206 0	0.160 0
E-ACG/M-CAG	22	49	44.90	0.151 2	0.227 2	0.128 5
E-ACG/M-CTA	21	41	51.22	0.171 4	0.257 6	0.168 8
E-ACG/M-CTC	12	32	37.50	0.100 5	0.157 9	0.099 5
E-ACT/M-CAA	27	48	56.25	0.203 7	0.304 7	0.273 3
E-ACT/M-CAC	24	50	48.00	0.152 1	0.231 3	0.159 8
E-AGG/M-CTA	17	66	25.76	0.090 4	0.132 0	0.111 7
E-AGG/M-CTC	24	66	36.36	0.108 2	0.167 2	0.100 6
总数	292	736	-	-	-	-
平均值	18.73	46.73	39.67	0.139 9	0.209 9	0.144 4

3 讨论

AFLP 标记可获得丰富的谱带,但需酶切、连接、预扩张、选择性扩增等多步反应,对基因组 DNA 完整性和纯度要求较高^[13]。使用改进的酚-氯仿法从大黄鱼鳍条中提取基因组 DNA,在完整性和纯度上均能满足 AFLP 反应的要求,且得率较高,酶切完全、条带弥散度好,选择性扩增条带丰富。常规酚-氯法和试剂盒提取的基因组 DNA 也都可用于 AFLP 反应^[14-15],但无论使用哪种方法都要注意样品的保存和提取中的实验操作,以避免基因组 DNA 的降解和污染。进行遗传多样性分析

需要较丰富的信息量,就 AFLP 标记而言一般认为位点数至少应在 200 个以上^[16]。在官井洋大黄鱼、鲤鱼、香鱼等鱼类群体遗传多样性的 AFLP 分析中都扩增到了 500 个以上的位点^[14,17-18];本研究用 16 对 AFLP 选扩引物组合在“东海 1 号”大黄鱼选育 F₄ 代中共扩增到 736 个位点,其中多态性位点 292 个,多态比例为 39.67%,为准确估算选育群体遗传多样性提供了足够丰富的信息量。

为保护已遭破坏的野生大黄鱼资源,各级部门采取了休渔保护、限制捕捞及增殖放流等多项措施,但仍未能恢复^[1],不仅采捕数量少,并且 RADP、AFLP 等标记分析均显示无论是官井洋还是岱衢洋野生大黄鱼的遗传多样性均处于较低水平^[2,4,19],明显低于鲢鱼、鳙鱼、蓝圆鲈等海水鱼类野生群体^[20-21]。并且人工繁育养殖鱼类群体的遗传多样性可能会进一步降低,在大黄鱼、半滑舌鳎等养殖鱼类中都已出现过这种情况^[6,22]。但也有证据表明在适当的选育方法下也可以有效保持人工繁育群体的遗传多样性,例如:山西长治地区的党参(*Codonopsis pilosula*)由于过度采挖致使野生群体遗传多样性较低,陇西地区从山西长治引种后进行人工选育栽培,40 a 后陇西栽培党参仍保持了山西长治地区党参的遗传多样性水平^[23];1962 年引入日本的约 200 尾尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)经过 20 a 人工选育后遗传多样性水平甚至要高于非洲的野生群体^[24]。本研究所用“东海 1 号”大黄鱼选育系 F₄ 代的原始亲本是 2000 年采捕自浙江岱衢洋的野生大黄鱼,但驯养存活的 138 尾中仅有 4 尾达到性成熟并用于繁育子代。董闻琦^[25]对 2001~2002 年采集的野生岱衢洋大黄鱼按照采捕时间和耳石形态分为 I 型和 II 型,AFLP 分析显示二者的遗传多样性水平都不高,其中多态性条带比例 I 型和 II 型分别为 54.81%和 40.86%(平均为 47.84%),Nei's 遗传多样性指数 I 型和 II 型分别为 0.1807 和 0.1290(平均为 0.1549)。因此在由仅数尾野生亲本繁育出 F₁ 代后如何避免近交衰退和遗传多样性降低显得尤为重要。Templeton 等^[26-27]在濒危动物斯氏瞪羚中的研究证实:即使原始亲本数量极少,只要亲本间有较大的遗传差异,也能有效避免近交衰退,并且经过 2~3 代繁育后子代群体的遗传多样性会有所恢复。据此,我们在原始亲本群

体基数不大、遗传多样性水平不高的情况下,在选育过程中一方面通过加大选择群体数量(F₁ 代 6 万尾, F₂~F₄ 代 15 万尾~30 万尾),提高选择压力(F₁ 代为 1.4%,之后每一代均为 0.6%)选留性状优良个体,另一方面在繁殖中通过亲鱼优化配组等方法降低近亲繁殖几率^[8],因此经过连续选育后 F₄ 代的群体遗传多样性水平(F₄ 代多态性位点比例为 39.67%, Nei's 遗传多样性指数为 0.1399)仍基本保持与原始亲本群体一致,表明科学合理的育种方法可避免连续多代选育后遗传多样性的降低。本课题组以岱衢洋野生大黄鱼为亲本选育而来的国家水产新品种“东海 1 号”大黄鱼具有生长速度快、耐低温能力强的特点^[8],获得了养殖单位、市场的认可和好评,特别是采用仿生态分阶段养殖新模式养出的大黄鱼达到了拟野生的品质和口感^[28]。本研究显示其选育 F₄ 代仍保持了较好的遗传多样性,可作为继续对大黄鱼进行遗传选育的良好育种材料。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 王军,全成干,苏永全,等.官井洋大黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析[J].海洋学报,2001,23(3):87-91.
- [3] 刘家富,韩坤煌.我国大黄鱼产业的发展现状与对策[J].福建水产,2011,33(5):4-8.
- [4] 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.
- [5] 朱峰,石志洲,凌信文,等.宁德三沙湾网箱养殖与环境质量的关系[J].海洋通报,2013,32(2):171-177.
- [6] 赵广泰,刘贤德,王志勇,等.大黄鱼连续 4 代选育群体遗传多样性与遗传结构的微卫星分析[J].水产学报,2010,34(4):500-507.
- [7] 李多云,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.
- [8] 苗亮,李多云,陈炯,等.快长、耐低温大黄鱼新品种东海 1 号的选育[J].农业生物技术学报,2014,22(10):1314-1320.
- [9] 丁诗华,黄丽英,张海琪,等.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[J].海洋与湖沼,2006,37(1):41-46.
- [10] 范慧慧,李多云.香鱼基因组 DNA 提取方法的优化[J].生物技术通报,2012,28(5):158-162.

- [11] Wang Z Y, Tsoi K H, Chu K H. Applications of AFLP technology in genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp[J]. *Biochemical Systematics & Ecology*, 2004, 32(4):399-407.
- [12] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979, 76(10):5269-5273.
- [13] Vuylsteke M, Peleman J D, Eijk M J T. AFLP technology for DNA fingerprinting[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(6): 1387-1398.
- [14] 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.
- [15] Nomura K, Ozaki A, Morishima K, et al. A genetic linkage map of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) based on AFLP and microsatellite markers[J]. *Aquaculture*, 2011, 310(3/4):329-342.
- [16] Bonin A, Ehrich D, Manel S. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: A toolbox for molecular ecologists and evolutionists[J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(18):3737-3758.
- [17] 闫松松, 苗亮, 李多云, 等. 香鱼(*Plecoglossus altivelis*) 养殖群体遗传多样性的 AFLP 分析及性别特异性分子标记筛选[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(2):395-399.
- [18] 钟立强, 张成峰, 周凯, 等. 四个鲤鱼种群遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29(2): 259-265.
- [19] 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.
- [20] 张辛, 许璞, 许广平, 等. 中国东海日本鳎种群遗传结构的 AFLP 分析[J]. *水生态学杂志*, 2010, 3(1):82-86.
- [21] 张丽艳, 苏永全, 丁少雄, 等. 福建近海蓝圆鲂种群遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *水产学报*, 2010, 34(5):680-687.
- [22] 黎中宝, 雷光高, 常建波, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)野生与养殖群体遗传多样性的比较研究[J]. *海洋与湖沼*, 2011, 42(3):414-418.
- [23] 郭宏波. 野生与栽培党参遗传多样性及其保存和保护策略研究[D]. 上海: 复旦大学, 2007.
- [24] Basiao Z U, Taniguchi N. An investigation of enzyme and other protein polymorphisms in Japanese stock of the tilapias *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zilli*[J]. *Aquaculture*, 1984, 38:335-345.
- [25] 董闻琦. 浙江海区黄鱼属种群的遗传变异和种质研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2003.
- [26] Templeton A R, Read B. Factors eliminating inbreeding depression in a captive herd of Speke's gazelle (*Gazella spekei*)[J]. *Zoo Biology*, 1984, 3:177-199.
- [27] Templeton A R, Read B. Elimination of inbreeding depression from a captive population of Speke's gazelle: Validity of the original statistical analysis and confirmation by permutation testing[J]. *Zoo Biology*, 1998, 17:77-94.
- [28] 李多云, 苗亮, 陈炯, 等. 大黄鱼仿生态分阶段养殖新模式的构建及问题探讨[J]. *宁波大学学报(理工版)*, 2017, 30(2):1-5.

The genetic diversity of F₄ generations of “Donghai No.1” large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) analyzed by AFLP

HOU Hong-hong, MIAO Liang, LI Ming-yun*, MU Fang-shen, XU Yu-min

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique was used to analyze the genetic diversities of the 4th generation (F₄) of “Donghai No.1” large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) breeding line. The breeding line was derived from the wild large yellow croaker that captured from Daiquyang in Zhejiang Province. Using 16 AFLP selective primer-pairs, a total of 736 loci were detected from 20 individuals, of which 292 loci were polymorphic. The percentage of polymorphism was 39.67%. The range of Nei's genetic diversity and Shannon genetic diversity index were 0.090 4-0.203 7 (mean 0.139 9) and 0.132 0-0.304 7 (mean 0.209 9), respectively. The genetic diversity of F₄ was at the similar level compared to original parents. It indicates that the genetic diversity would not decrease significantly after several generations with proper mass selection method.

Key words: *Larimichthys crocea*; amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique; genetic diversity

(责任编辑 韩超)