

## 岱衢族大黄鱼种质的 AFLP 分析

刘必谦<sup>1</sup> 董闻琦<sup>1</sup> 王亚军<sup>1</sup> 朱世华<sup>1</sup> 吴望星<sup>2</sup>

(1. 宁波大学海洋生物工程浙江省重点实验室, 宁波 315211; 2. 奉化市水产病害防治中心, 宁波 315500)

**摘要:** 根据耳石年轮确定作为研究材料的浙江海区捕捞野生大黄鱼为岱衢族大黄鱼, 并用 AFLP 技术进行种质分析。结果表明岱衢族大黄鱼可分为两类: 岱衢族大黄鱼 I 型和岱衢族大黄鱼 II 型, 这种划分与文献报道的岱衢族大黄鱼有“春综”和“秋综”两种群之分相吻合。岱衢族大黄鱼 I 型生长速度比岱衢族大黄鱼 II 型要快, 海水养殖开发和利用岱衢族大黄鱼应选用岱衢族大黄鱼 I 型作为亲本较好。获得的岱衢族大黄鱼种质 AFLP 指纹图谱, 可以作为鉴定岱衢族大黄鱼的依据。

**关键词:** 大黄鱼; 岱衢族; 种质; 种群; AFLP

中图分类号: Q173

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2005)04-0413-04

大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* (Richardson) 是重要的经济鱼类之一, 田明斌等<sup>[1]</sup> 根据大黄鱼七个主要产卵场, 对大黄鱼的形态和生态地理学研究把大黄鱼分为三个地理种群: 岱衢族、闽-粤东族和碓洲族<sup>[1-4]</sup>。由于资源的过度利用, 岱衢族大黄鱼自然资源有濒临灭绝的危险。20 世纪 70 年代后, 岱衢族大黄鱼种质研究基本上是空白<sup>[5]</sup>。近来利用 DNA 分子技术对闽-粤东族大黄鱼开展了一些研究<sup>[6-8]</sup>, 但未见对捕捞影响最大的岱衢族大黄鱼<sup>[9]</sup>这方面的报道。目前养殖的闽-粤东族大黄鱼出现了性状衰退的现象, 开展岱衢族大黄鱼人工养殖, 或利用岱衢族大黄鱼对现有养殖大黄鱼进行遗传改良, 已经得到越来越广泛的认同。但岱衢族大黄鱼和闽-粤东族大黄鱼从外部形态上, 难以进行区分, 这对利用岱衢族大黄鱼十分不利。

浙江地区从 1996 年开始养殖闽-粤东族大黄鱼, 从 1998 年开始向自然水域放流闽-粤东族大黄鱼人工鱼苗。所以现在浙江自然海区捕捞到的大黄鱼, 很难保证就是真正的岱衢族大黄鱼。但只要这一海区捕获的野生个体是 1996 年以前出生的, 就可以肯定为岱衢族大黄鱼。但随着岁月的流逝, 大龄鱼减少, 年龄作为判断依据的机会随之变小。再考

虑到两种类型的大黄鱼在自然水域发生基因交流的可能性, 所以建立岱衢族大黄鱼与粤东族大黄鱼各自遗传背景资料库, 已经迫在眉睫。本实验对海捕野生岱衢族大黄鱼进行了扩增片段长度多态 (AFLP) 研究, 以期为岱衢族大黄鱼的种质保护、人工选育提供技术支持及为建立岱衢族大黄鱼种质资源库积累资料。

## 1 材料和方法

**1.1 材料采集** 2001 年 7 月—2002 年 12 月, 前后共收集东海海捕岱衢族大黄鱼 100 尾, 经过年轮鉴定后用于 AFLP 实验的 4 龄以上、大个体大黄鱼 (简称野生大黄鱼) 31 尾, 最大体重 3390g, 最轻 1150g。

**1.2 大黄鱼年龄鉴定** 根据毛锡林、徐恭昭鉴别大黄鱼年龄的方法<sup>[10-11]</sup>, 以耳石结合鳞片, 对捕捞大黄鱼进行年龄确定, 以便确定岱衢族大黄鱼。

**1.3 DNA 模板的制备** 参照文献中动物细胞 DNA 提取的方法并略做改动<sup>[12]</sup>。

**1.4 AFLP** AFLP 方法参照 Vos 等的方法<sup>[13]</sup>。药品均为 MBI 公司产品。选择性引物序列为 EcoRI : GACIGCGTACCAATTC-ACG、-ACA、-ACT、-ACC; Mse I : GATGAGTCCTGAGTAA-CAA、-CAG、-CAT、-CAC。

收稿日期: 2005-01-07; 修订日期: 2005-03-31

基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目 (ZD0006) 资助

作者简介: 刘必谦 (1960—), 男, 湖南祁阳人; 副研究员, 博士; 主要研究方向: 海洋生物分子遗传学、海洋生物工程

凝胶电泳系统: Sequi-Gen GT nickelic acid electrophoresis cell (Bio-Rad 公司产品), 4.5%的聚丙烯酰胺变性凝胶电泳。银染显色, ScanMarker9600 扫描仪扫描并记录结果。

**1.5 数据统计与分析** 将每个条带视为一个位点, 统计位点总数、多态位点数及其在各群体中的分布。筛选具有种特异性的标记谱带, 绘制 DNA 指纹图谱用于大黄鱼的种质鉴定。将 DNA 条带的有无转化成 1, 0 数据(当某一片段在一个个体中存在时记为 1, 否则为 0)。计算不同个体间的遗传相似性系数  $S$  [ $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ , 其中  $N_{xy}$  为个体  $x, y$  共有的片段数,  $N_x$  和  $N_y$  分别为个体  $x, y$  中出现的片段数] 和遗传距离  $D$  ( $D = 1 - S$ ), 并且利用软件 PopGene32 进行聚类分析。

## 2 结果

### 2.1 东海捕捞大黄鱼年龄鉴定

岱衢族大黄鱼耳石依据形态可分为两个类型: 一类年轮宽, 个体生长比较快, 最大年龄 8 龄, 体重 3390g(图 1 左), 最小年龄 4 龄, 体重 1150g, 平均体重  $2.279 \pm 0.462$ , 平均年龄  $5.79 \pm 1.18$  龄。将这类鱼称之为岱衢族 I 型, 共 20 尾, 编号 12—31。另一类年轮窄, 个体生长速度慢, 最大年龄 16 龄, 体重 2110g(图 1 右), 最小年龄 7 龄, 体重 1370g, 平均体重  $1.975 \pm 0.252$ kg, 平均年龄  $9.16 \pm 2.81$  龄。这类鱼称之为岱衢族 II 型, 共 11 尾, 编号 1—11。

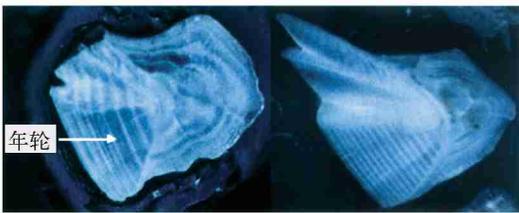


图 1 大黄鱼耳石磨片图(左 I 型, 右为 II 型)

Fig. 1 Cross sections of the otoliths to show annual(left: Type I; right: Type II)

### 2.2 扩增结果及多态性指数

本研究共用了 12 个选择性引物组合, 引物扩增的条带数在 29—66 之间, 平均 42.4。岱衢族大黄鱼中检测到 509 个位点, 其中多态性位点 284 个, 多态性比例为 55.80%。岱衢族大黄鱼 I 型中多态性位点 206 个, 多态性比例 40.47%; 岱衢族大黄鱼 II 型多态性位点 278 个, 多态性比例为 54.62%。岱衢族两种类型大黄鱼之间有两条在 I 型为多态, 而 II 型

所没有的带, 但没有发现两者各自特异性的标记带。图 2 是引物组合 ACT-CAA 扩增结果, 其中 540bp 是岱衢族大黄鱼所特有(与闽-粤东族大黄鱼对比研究另文报道)。

### 2.3 数据处理和聚类分析

将 31 个个体视为一个群体用软件 PopGen 32 做数据分析和聚类分析。图 3 是岱衢族大黄鱼 31 个个体之间的 UPGMA 聚类图, 结果与根据耳石分类、RAPD 分析结果相吻合(另行报道)。岱衢族大黄鱼 II 型与岱衢族大黄鱼 I 型先各聚成一小组, 然后再聚合成大群。

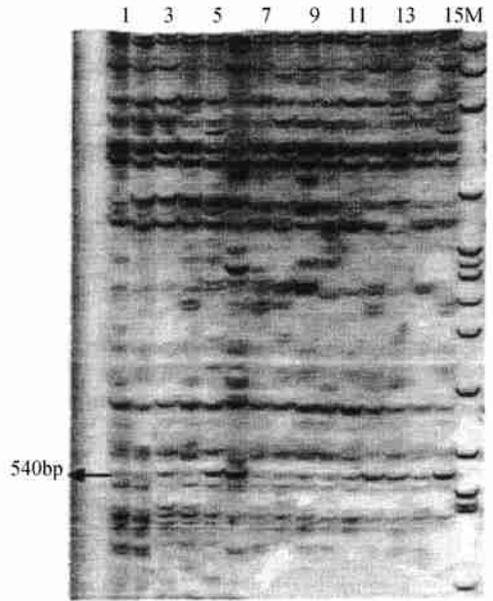


图 2 岱衢族大黄鱼引物组合 ACT-CAA 扩增图

Fig. 2 Results of amplification using ACT-CAA primers combination(1—6: Tai-chu race Group I, 7—15: Tai-chu race Group II. M = marker)

## 3 讨论

由于岱衢族大黄鱼濒临绝迹, 海捕野生大黄鱼变得十分珍贵, 采样点遍及宁波大市范围内, 在一年半时间收集到 100 尾大个体东海海捕野生大黄鱼样本。通过耳石磨片年轮鉴定, 确定本研究中使用的 31 个个体的年龄都在 4 龄以上(2001—2002 年), 最大的为 16 龄, 可以认定为岱衢族大黄鱼。因为 1998 年才开始人工放流, 而 1996 年开始养殖的头两年, 规模还不小, 逃逸数量非常有限。

从图 3 可看出将岱衢族大黄鱼分为 I 型和 II 型两类是可以成立的。在进行本研究的同时, 作者还进行了岱衢族大黄鱼耳石形态特征、耳石与体重的关系、

RAPD 分析等研究(结果另行报道),结果与本研究的

结果相一致:岱衢族大黄鱼应该存在两个类型。

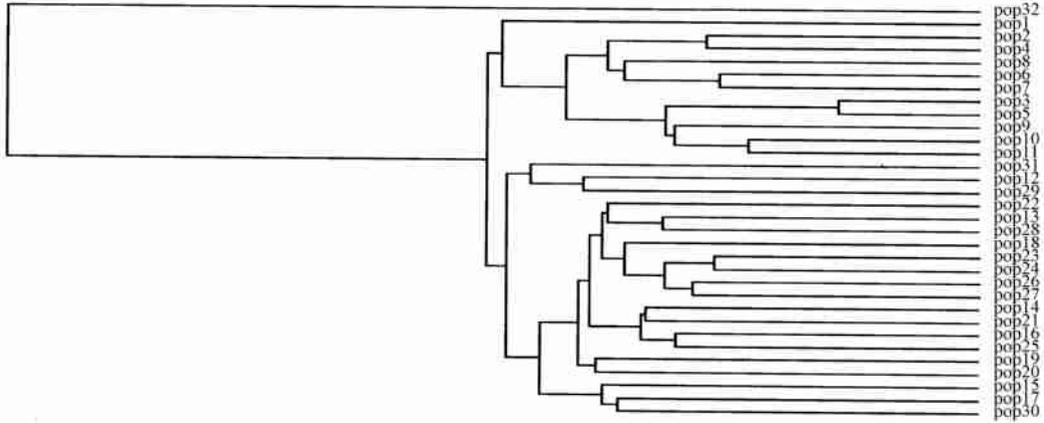


图3 岱衢族大黄鱼 UPGMA 聚类分析

pop1—11 为岱衢族大黄鱼 II, pop12—31 为岱衢族大黄鱼 I, pop32 是作为外群的小黄鱼

Fig. 3 UPGMA cluster of on the AFLP data of *P. crocea* Tai-du race (pop1—11 are type II, pop12—31 are type I, pop32 is *P. polyactis*)

徐恭昭等<sup>[2]</sup>研究大黄鱼的性腺发育时发现:浙江岱衢族大黄鱼存在的春季和秋季鱼群的生殖季节是不连续的,而且在秋季繁殖的鱼群也并非是一年内的第二次产卵。所以他认为春季和秋季生殖鱼群是两个具有不同繁殖季节的鱼群。在自然条件下,它们在同一年之中进行杂交的可能性是没有的,因此初步认为春、秋季鱼群属于生物学类型中各自具有不同生殖期的“春综”与“秋综”两个种群<sup>[2,9]</sup>。但后来再没见到对春综和秋综生殖规律更深入研究的报道,所以“春综”和“秋综”大黄鱼的生殖隔离还不能下最后的定论。另外,笔者曾深入舟山沈家门和象山石浦渔区,从老渔民那里获得一个一致的信息:19世纪60—70年代捕捞所获的大黄鱼有黄鳞和白鳞两种类型,其中,舟山本地内海大黄鱼以黄鳞为主,而相对外海、偏向于吕泗洋捕获的大黄鱼以白鳞为主。笔者查了很多有关于大黄鱼的文献,但没有发现有关大黄鱼黄鳞和白鳞的记录。

由于条件所限,作者所取的大黄鱼样品仅知道由舟山渔区捕捞所得,而不知道其具体的经度和纬度。从获取样品时间看:岱衢族大黄鱼 I 型样品在周年都能获得,而岱衢族大黄鱼 II 型样品获得时间仅在一到八月份,以四、五月份最为集中。而四、五月份为自然海区大黄鱼到各产卵场产卵的季节,据此推测,所获得的岱衢族大黄鱼 II 型可能为春季来舟山渔场产卵的大黄鱼,因而可能就是徐恭昭所说的“春综”大黄鱼,而 I 型则可能为秋综大黄鱼。另外从生长速度方面看,II 型大黄鱼生长速度要比 I 型慢得多。一般来讲,靠近大陆的海区,饵料要比远

离大陆的海区丰富,因而分布在该海区的鱼生长速度要较生活在外海的要快些。由此推断 I 型可能就是分布在靠近大陆的黄鳞大黄鱼,而 II 型可能是分布在远离大陆的白鳞大黄鱼,它只在生殖季节向舟山海区进行生殖洄游。通过本研究,发现岱衢族种群的两个类型中,岱衢族大黄鱼 I 型的遗传多态性指数和平均遗传距离都略高于 II 型。而耳石体重的研究表明在自然状态下, I 型的生长速度要比 II 型快。而两者之间的肉质风味则相差不大,因此,从经济学和遗传学角度来说,在开展岱衢族大黄鱼人工苗种培育中,应该尽量选用岱衢族大黄鱼 I 型个体作为亲鱼。

#### 参考文献:

- [1] Tian C M, Xu G Z, Yu R X. The geographical variation and population problems of the morphological traits of *Pseudosciaena crocea* (Richardson) [J]. *Marine Science*, 1962, 2: 79—97 [田明诚、徐恭昭、余日秀. 大黄鱼形态特征的地理变异和地理种群问题. 海洋科学, 1962, 2: 79—97]
- [2] Xu G Z, Tian M C, Zheng X L. The races of *Pseudosciaena Crocea* (Richardson) [J]. The fourth meeting papers collection of the west Pacific Ocean fishery research committee [M]. Beijing: Science Press, 1963: 39—46 [徐恭昭、田明诚、郑文莲, 等. 大黄鱼 *Pseudosciaena Crocea* (Richardson) 的种族. 太平洋西部渔业研究委员会第四次全体会议论文集. 北京: 科学出版社, 1963: 39—46]
- [3] Xu G Z, Luo B Z, Wang K L. The race constitute and geographical variation of *Pseudosciaena crocea* (Richardson) [J]. *Marine Science*, 1962, 2: 98—109 [徐恭昭、罗秉征、王可怜. 大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* (Richardson) 种群结构的地理变异. 海洋科学, 1962, 2: 98—109]
- [4] Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences. The pri-

- mary study of races in *Pseudosciaena crocea* (Richardson) [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1959, (20): 69 [中国科学院海洋研究所. 大黄鱼种族问题的初步研究. 科学通报, 1959, (20): 69]
- [ 5 ] Yang D K, Lin F. The primary research of reproductive groups in *Pseudosciaena crocea* (Richardson) at the offing of Zhejiang Province [J]. *Marine fishery*, 1987, (5): 208—210 [杨德康, 林飞. 浙江北部近海大黄鱼生殖群体现状的初步研究. 海洋渔业, 1987, (5): 208—210]
- [ 6 ] Quan G C, Wang J, Ding S X, *et al.* Genetic diversity of cultured *Pseudosciaena crocea* (Richardson) Stock by PAGE [J]. *Journal of Xiamen University*, 1999 38(4): 584—588 [全干成, 王军, 丁少雄, 等. 大黄鱼养殖群体遗传多样性的同工酶研究. 厦门大学学报, 1999, 38(4): 584—588]
- [ 7 ] 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, 全干成, 苏永全, 等. 官井洋大黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析. 海洋学报, 2001, 23(3): 87—91]
- [ 8 ] 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. 中国水产科学, 2002, 9(3): 198—202]
- [ 9 ] Deng J R, Zhao C Y, Tang Q S, *et al.* Marine fishery biology [M]. Beijing: The agricultural press of China, 1991, 201—239 [邓景耀, 赵传烟, 唐启升, 等. 海洋渔业生物学. 北京: 农业出版社, 1991, 201—239]
- [ 10 ] Mao X L. The primary researches on the age and growth of *Pseudosciaena crocea* (Richardson) in the offing of Zhejiang Province [M]. The paper collection of agricultural resource. Beijing: The agricultural press of China, 1962 [毛锡林. 浙江近海大黄鱼年龄和生长的初步研究. 农业资源论文集. 北京: 农业出版社, 1962]
- [ 11 ] Xu G Z, Luo B Z, Wu H Z. The cycle and age identification in the otolith of *Pseudosciaena crocea* (Richardson) [J]. *The Marine Science*, 1962(2): 1—13 [徐恭昭, 罗秉征, 吴鹤洲, 等. 大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* (Richardson) 耳石的轮纹形成周期及其年龄鉴定问题. 海洋科学, 1962, (2): 1—13]
- [ 12 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning—A Laboratory Manual (second edit) [M]. Beijing: Science Press, 1996, 464—467 [萨姆布鲁克 J, 费里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 (第二版). 北京: 科学出版社, 1996, 464—467]
- [ 13 ] Vos P, Honger R, Bleeker M, *et al.* AFLP a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acid Reseach*, 1995 23(21): 4407—4414

## IDENTIFICATION OF GERM PLASM IN *PSEUDOSCIAENA CROCEA* TAI-CHU RACE BY AFLP

LIU Bi-Qian<sup>1</sup>, DONG Wen-Qi<sup>1</sup>, WANG Ya-Jun<sup>1</sup>, ZHU Shi-Hua<sup>1</sup> and WU Wang-Xing<sup>2</sup>

(1. Key Lab of Zhejiang Province at Ocean Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211; 2. Center of Aquaculture Disease Prevention of Fenghua, Ningbo 315500)

**Abstract:** *Pseudosciaena crocea*, local name Large yellow croaker, is a very important economic fish in China coast. There are three geographical populations (races) from north to south of China coast. In Zhejiang sea area, the indigen is *P. crocea* Dai-chu race. Because the artificial weif of non indigen *P. crocea* Min-Uehtung race, the indigen in Fujiang sea area, in zhejiang sea area from 1998, the individuals captured from this area not always belong to the indigen, *P. crocea* Dai-chu race. But the individuals born before 1996 must be the *P. crocea* Dai-chu race. Cross section of the otoliths was used to identify the age of wild Large yellow croaker captured from the year 2001 to 2002 from Zhejiang sea area. 31 out of 100 individuals captured in 2001—2002 were identified to be the *P. crocea* Dai-chu race, the youngest was 4 year old; the oldest was 16 year old. The germ plasm analysis by AFLP (Amplified fragment-length polymorphism) suggested that the *P. crocea* Dai-chu race could be divided into two types one was type I of *P. crocea* Dai-chu race, and another was type II of *P. crocea* Dai-chu race. This partition was accordant with the literature that the Large yellow croaker in East China sea consisted of two populations, Spring Population and Autumn Population. And they were different from reproductive period. The type I of *P. crocea* Dai-chu race grows quicker than the type II. So the type I should be chosen as the parents in mariculture of *P. crocea* Dai-chu race. The AFLP fingerprint achieved by this investigation could be used to identify *P. crocea* Dai-chu race.

**Key words:** *Pseudosciaena crocea*; Tai-chu race; Germ plasm; Population; AFLP