

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180420002

http://www.yykxjz.cn/

樊佳佳, 白俊杰, 李胜杰, 马冬梅, 姜鹏. 驯食配合饲料的大口黑鲈3个选育世代的遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 57-64

Fan JJ, Bai JJ, Li SJ, Ma DM, Jiang P. Analysis on genetic diversity of three breeding populations of largemouth bass using formulated feeds. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 57-64

驯食配合饲料的大口黑鲈3个选育世代的遗传多样性分析*

樊佳佳 白俊杰 李胜杰^① 马冬梅 姜鹏

(中国水产科学研究院珠江水产研究所 热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室 广州 510380)

摘要 为了检测驯食配合饲料的大口黑鲈(*Micropterus salmoides*) 3个选育世代群体遗传多样性水平变化, 利用微卫星标记技术对驯食配合饲料大口黑鲈选育基础群体(Sp0)和第二、三和四代选育群体(Sp2、Sp3和Sp4)共240尾样品进行检测。结果显示, 18个微卫星位点共获得44个等位基因。Sp0、Sp2、Sp3和Sp4的平均观测杂合度(H_o)分别为0.4895、0.4802、0.4579和0.4206, 平均期望杂合度(H_e)分别为0.4615、0.4454、0.4621和0.3916, 平均多态信息含量(PIC)分别为0.3791、0.3659、0.3764和0.3257。4个群体间的配对比较群体间遗传分化指数(F_{st})值在0.01612~0.16162之间、遗传距离(D_a)在0.0249~0.1434之间。遗传变异来源(AMOVA)分析显示, 只有8.38%的变异来自于群体间, 其余遗传变异均来自于个体间。研究表明, 经连续多代选育之后, 易驯食配合饲料的快长大口黑鲈选育群体具有中度遗传多样性, 具备选育潜力, 可继续进行选育。

关键词 大口黑鲈; 配合饲料; 选育群体; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号 Q953+3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0057-08

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*), 俗名加州鲈, 原产于北美洲。根据地理分布和形态学不同分为2个亚种: 大口黑鲈北方亚种(*M. salmoides salmoides*)和大口黑鲈佛罗里达亚种(*M. salmoides floridanus*) (Bailey *et al.*, 1949; MacEina *et al.*, 1992)。因该鱼具有适应性强、病害少、易起捕、生长迅速、肉质细嫩、味道鲜美等优点, 20世纪中期被引种到世界各地。中国台湾在20世纪70年代引进, 1983年广东省从台湾引

种并繁殖成功, 目前已成为中国重要的淡水养殖品种之一。樊佳佳等(2009b)通过形态学和分子生物学技术鉴定表明, 国内目前养殖的大口黑鲈群体属于大口黑鲈北方亚种。

传统大口黑鲈成鱼养殖采用冰鲜鱼进行投喂, 据统计, 中国大口黑鲈冰鲜鱼年消耗约150万t, 随着海洋捕捞业产量的下降和冰鲜鱼价格大幅度上升, 大口黑鲈养殖成本大幅增高。冰鲜鱼残饵容易滋生和携

* 渔港建设和渔业产业发展专项(A201601A12)、广东省科技计划项目(2016A020210020; 2015A020209035)、南京市高端人才团队引进计划项目(2016)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2017HY-ZC04; 2018SJ-YZ03)共同资助[This work was supported by the Fishing Port Construction and Fishery Industry Development Project (A201601A12), the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2016A020210020; 2015A020209035), the Top Talent Team Introduction Planning Project of Nanjing (2016), and the Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017HY-ZC04; 2018SJ-YZ03)]. 樊佳佳, E-mail: fanjiajiaok@163.com

① 通讯作者: 李胜杰, 副研究员, E-mail: ssjjli@163.com

收稿日期: 2018-04-20, 收修改稿日期: 2018-07-09

带有害病菌,污染养殖水体和导致病害频发,养殖产品质量得不到保障。冰鲜鱼投喂模式需要投入的劳动量大,因此,配合饲料替代冰鲜鱼养殖是大口黑鲈养殖产业的发展趋势。为了降低养殖成本、保护环境,实现大口黑鲈标准化质控养殖进程,选育进食人工配合饲料大口黑鲈新品种,是促进大口黑鲈养殖可持续发展的研究热点之一(吴锐全等,2004;白俊杰等,2013)。针对配合饲料养殖推广中出现的生长慢、鱼苗转食驯化效率和成功率低、个体间表型差异大,2012年珠江水产研究所在以大口黑鲈“优鲈1号”和大口黑鲈北方亚种原种作为选育基础群体,采用传统选育技术和分子标记辅助育种技术经连续多代选育而获得易驯食配合饲料的快长品种。但连续多代的人工定向选择易造成群体遗传多样性降低,导致后代选育潜力不足(张天时等,2005)。

微卫星又称简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR),具有分型容易、多态性稳定、共显性且符合孟德尔遗传等特点,现广泛应用于动植物的遗传多样性分析。王军等(2018)利用15个微卫星标记对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)野生“黄海2号”第10代选育群体进行分析,显示选育到10代其遗传多样性仍较高;王日芳等(2017)利用33个微卫星标记对3个脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)近交系进行遗传检测,表明各家系均已构成独立遗传群体;李镛等(2010)利用11个微卫星标记对进食冰鲜鱼快长大口黑鲈第2~4代群体遗传多样性进行分析,选育可以造成群体发生遗传分化;袁文成等(2018)利用13个多态性EST-SSR标记,对4个翘嘴鲈(*Siniperca chuatsi*)群体进行分析,表明选育群体属于中度多态水平。

为进一步做好驯食配合饲料大口黑鲈的选育工作,本研究采用18对微卫星标记对选育基础群体、第二、三和四代选育群体进行遗传多样性分析,监测其变化情况,为后续的人工选育方案制定、遗传改良和种质资源保护等提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 本 2012年3月,从中国水产科学研究院珠江水产研究所九江亲本保种基地挑选体型修长、健康、体重大于0.65 kg的大口黑鲈“优鲈1号”和广州良种保种基地挑选引进的大口黑鲈北方亚种原种各500尾建立选育基础群体。亲本雌雄鱼1:1群体繁殖,生产约500万的水花苗种。鱼苗用小型的浮

游动物开口,当鱼苗长至2 cm左右时,开始驯食人工配合饲料。大口黑鲈幼鱼驯食人工配合饲料的方法为每日4次,少量多次投放幼鱼适口饲料(饲料成分:水分7.4%,粗蛋白44.7%,粗脂肪8.2%,碳水化合物17.6%,灰分12.2%,粗纤维0.6%)。到繁殖季节,选择生长优势前20%的雌雄个体各500尾作为繁殖亲本,群体繁殖后代,后代水花苗种约500万,以此进行连续多代的群体选育。本研究在选育基础群体(简称Sp0)、驯食第二代群体(简称Sp2)、驯食第三代群体(简称Sp3)和驯食第四代群体(简称Sp4)中各随机选择60尾样品,每个选育世代样品均在10 g左右幼鱼阶段进行随机取样,剪取尾鳍,用无水乙醇保存备用。

1.1.2 微卫星引物 该研究采用的大口黑鲈微卫星标记引物均来自文献(梁素娴等,2008; Colbourne *et al*, 1996; DeWoody *et al*, 2000; Malloy *et al*, 2000)。通过扩增验证,共挑选18个扩增稳定、多态性高的微卫星用于该研究。上游引物5'端加上FAM或HEX荧光标记,引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成,引物信息见表1。

1.2 方 法

1.2.1 基因组提取 鳍条基因组DNA采用海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒(天根)提取。采用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA质量,利用紫外分光光度计(Eppendorf公司AG2231型)检测浓度,用ddH₂O稀释至50 ng/μl,保存于-20℃备用。

1.2.2 PCR反应程序 反应体积为20 μl,包含2.0 μl 10×Buffer、2 μl MgCl₂ (25 mmol/L)、0.4 μl dNTP (10 mmol/L)、上下游引物(10 μmol/L)各0.2 μl、1 μl模板DNA(50 ng/μl)、0.4 μl Taq酶(5 μ/μl) (Fermentas公司)和13.8 μl ddH₂O。PCR扩增反应条件:94℃预变性3 min后进入35个循环,94℃变性15 s,退火15 s,72℃延伸30 s,循环结束后72℃再延伸3 min,4℃保存。

1.2.3 PCR产物检测及分型 PCR扩增产物利用1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测后,根据条带亮度和产物浓度,使用灭菌的ddH₂O将PCR产物稀释5~10倍后,与ROX 500内标混匀,然后置于ABI3730XL测序仪(ABI,美国)样本架上进行毛细管电泳检测。利用Peak Scanner Software V1.0软件读取PCR扩增产物的分子量,按照每个微卫星引物在不同样本中扩增的条带的分子量差异确定各样本各基因座的基因型(樊佳佳等,2019a;李婷等,2016)。

表 1 大口黑鲈微卫星标记引物信息
Tab.1 The primer information of microsatellite markers in largemouth bass

序号 No.	位点 Locus	引物序列(5'~3') Primer sequences	片段长度 Size(bp)	等位基因数 Number of alleles	退火温度 Annealing temperature(°C)	参考文献 Reference
1	JZL12	F: ACTCAGAGCCTCACATTC R: CAGGTGGACTCAAGACAG	202	2	50	梁素娴等(2008)
2	JZL23	F: GTCCGCTGCTTAGTTTAT R: TCCTTTATCCTTCCCTCT	397	3	50	梁素娴等(2008)
3	JZL31	F: TGGACTGAGGCTACAGCAGA R: CCAAGAGAGTCCCAAATGGA	202	2	60	梁素娴等(2008)
4	JZL36	F: GCTGAGAGCCTGAAGACCAG R: ATGGAGGACAGCAGGAACAT	214	2	56	梁素娴等(2008)
5	JZL40	F: GCTGAGAGCCTGAAGACCAG R: ATGGAGGACAGCAGGAACAT	214	2	58	梁素娴等(2008)
6	JZL43	F: GCTGCGAGTGCCTGTAACATA R: GGAAGCGAGAGTCAGAGTG	215	2	58	梁素娴等(2008)
7	JZL48	F: TCGACGATCAATGGACTGAA R: TCTGGACAACACAGGTGAGG	207	2	56	梁素娴等(2008)
8	JZL59	F: CACAAGGCAAACAGAACGTC R: TTGGCTACCCAGTGATGACA	183	2	55	梁素娴等(2008)
9	JZL60	F: AGTTAACCCGCTTTGTGCTG R: GAAGGCGAAGAAGGGAGAGT	205	2	60	梁素娴等(2008)
10	JZL67	CCGCTAATGAGAGGGAGACA ACAGACTAGCGTCAGCAGCA	248	2	60	梁素娴等(2008)
11	JZL68	F: ACCCACCGTCTTCTCTTCA R: CATTGTGGGTGCATTCTCC	166	3	58	梁素娴等(2008)
12	JZL83	F: TGTGGCAAAGACTGAGTGGA R: ATITCTCAACGTGCCAGGTC	157	3	59	梁素娴等(2008)
13	JZL84	R: GTGCGCAGACAGCTAGACAG F: CAGCTCAATAGTTCTGTCAGG	197	3	56	梁素娴等(2008)
14	JZL85	R: ACTACTGCTGAAGATATTGT F: TCAAACGCACCTTCACTGAC	312	3	58	梁素娴等(2008)
15	Lma21	CAGCTCAATAGTTCTGTCAGG ACTACTGCTGAAGATATTGTG	158~183	3	47.5	Colbourne 等(1996)
16	Mdo7	TCAAACGCACCTTCACTGAC GTCACTCCCATCATGCTCCT	156~172	2	53	Malloy 等(2000)
17	Mdo6	TGAAATGTACGCCAGAGCAG TGTGTGGGTGTTTATGTGGG	150	3	55	Malloy 等(2000)
18	Msal21	CACTGTAAATGGCACCTGTGG GTTGTCAAGTCGTAGTCCGC	214~224	4	58	DeWoody 等(2000)

1.3 数据统计与分析

统计每个样品扩增的条带值, 确定基因型, 用 POPGEN 3.2 软件(Nei, 1978)计算等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、群体间遗传距离(D_o)、固定指数 F_{is} 和 F -统计量群体间遗传分化指数(F_{st})值的 F -分析。利用 MEGA 5.0 软件根据 Nei 氏遗传距离使用邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统树(Tamura *et al*, 2011)。用 CERVUS 3.0 软件计算多态信息含量(Polymorphism information

content, PIC)(Kalinowski *et al*, 2007)。ARLEQUIN 3.1 软件计算 F_{st} 和群体分子方差分析(AMOVA)(Excoffier *et al*, 2010; 孙成飞等, 2015)。

2 结果

2.1 各世代间的微卫星遗传多样性

采用 18 对微卫星引物对 4 个大口黑鲈世代共 240 个样本基因组 DNA 进行扩增, 均获得目的条带。分析结果见表 2。18 对引物在 4 个世代中共获得等位

表 2 微卫星位点的等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度和多态信息含量

序号	位点	片段大小(bp)	等位基因数 N_e				观测杂合度 H_o				期望杂合度 H_e				多态信息含量 PIC							
			Sp0	Sp2	Sp3	Sp4	Sp0	Sp2	Sp3	Sp4	Sp0	Sp2	Sp3	Sp4	Sp0	Sp2	Sp3	Sp4				
1	JZL12	149/156/199	3	3	3	1.91	2.48	2.02	2.57	0.5690	0.6724	0.5345	0.6286	0.4799	0.6058	0.5084	0.6163	0.4016	0.5232	0.4241	0.5426	
2	JZL23	369/401/440	3	3	3	2.03	2.11	2.18	2.56	0.6379	0.8621	0.6552	0.5143	0.5126	0.5333	0.5463	0.6147	0.4315	0.4614	0.4612	0.5262	
3	JZL31	187/200	2	2	2	1.95	1.97	2.00	1.60	0.4310	0.5000	0.5517	0.6571	0.4922	0.5006	0.5037	0.3783	0.3689	0.3717	0.3747	0.3047	
4	JZL36	210/220/226	3	3	3	2.79	2.23	2.75	2.05	0.6552	0.4138	0.4828	0.4857	0.6477	0.5594	0.6424	0.5175	0.5658	0.4592	0.5652	0.3979	
5	JZL40	214/222/227	3	3	3	2.79	2.23	2.73	2.05	0.6552	0.4138	0.5000	0.4857	0.6477	0.5594	0.6385	0.5175	0.5658	0.4592	0.5617	0.3979	
6	JZL43	207/213	2	2	2	1.69	1.43	1.51	1.69	0.5690	0.569	0.3966	0.3143	0.4106	0.3068	0.3411	0.4106	0.3242	0.2567	0.2810	0.3242	
7	JZL48	209/217	2	2	2	1.69	1.54	1.96	1.52	0.4655	0.4172	0.6207	0.2857	0.4106	0.3578	0.4948	0.1720	0.3242	0.2905	0.3702	0.1691	
8	JZL59	171/179	2	2	2	1.51	1.40	1.96	1.49	0.3276	0.4138	0.4483	0.2286	0.3411	0.2882	0.4948	0.3310	0.2810	0.2437	0.3702	0.2743	
9	JZL60	180/206/214/223	3	3	4	2.30	2.38	2.92	1.70	0.5517	0.5517	0.6207	0.6000	0.5711	0.5884	0.6628	0.4154	0.4882	0.4981	0.5864	0.3338	
10	JZL67	241/249/252	3	3	3	2.42	2.85	2.13	2.73	0.4483	0.7759	0.5172	0.6000	0.5921	0.6588	0.5360	0.6385	0.5017	0.5753	0.4223	0.5617	
11	JZL68	162/176	2	2	2	1.99	1.92	1.99	1.62	0.5345	0.4172	0.4138	0.4000	0.5006	0.4870	0.5019	0.1720	0.3731	0.3648	0.3738	0.1691	
12	JZL83	142/155	2	2	2	1.93	1.85	2.00	2.00	0.6379	0.6545	0.5862	0.3714	0.4862	0.4658	0.5043	0.5043	0.3659	0.3537	0.3750	0.3750	
13	JZL84	196/208	2	2	2	1.99	1.92	1.99	1.62	0.5345	0.5172	0.4138	0.4000	0.5006	0.4870	0.5019	0.1720	0.3731	0.3648	0.3738	0.1691	
14	JZL85	197/213/222	3	3	3	1.94	2.04	1.74	1.58	0.5345	0.4828	0.4138	0.6000	0.4895	0.5180	0.4292	0.3694	0.4368	0.4463	0.3846	0.2992	
15	Lma21	159/171/189	3	3	3	2.37	2.29	2.12	1.94	0.6034	0.431	0.5862	0.5429	0.5834	0.5710	0.5324	0.4895	0.4882	0.4659	0.4385	0.3757	
16	Mdo7	159/176	2	2	2	1.51	1.47	1.19	1.62	0.3621	0.5172	0.1724	0.2857	0.3411	0.3246	0.1589	0.3868	0.2810	0.2688	0.1451	0.3099	
17	Mdo6	146/151	2	2	2	1.42	1.25	1.47	1.25	0.2931	0.0345	0.3276	0.1714	0.2991	0.2054	0.3207	0.3420	0.2525	0.1820	0.2674	0.3324	
18	Msal21	196	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	平均值	Mean	2.39	2.39	2.44	2.33	1.96	1.91	1.98	1.81	0.4895	0.4802	0.4579	0.4206	0.4615	0.4454	0.4621	0.3916	0.3791	0.3659	0.3764	0.3257

注: Sp0 为选育基础群体; Sp2 为驯食第二代群体; Sp3 为驯食第三代群体; Sp4 为驯食第四代群体。下同

Notes: Sp0: Fundation group; Sp2: Second generation group; Sp3: Third generation; Sp4: Forth generation. The same as below

基因44个。Sp0、Sp2、Sp3和Sp4群体平均等位基因数(N_a)分别为2.39、2.39、2.44和2.33; 平均有效等位基因数(N_e)分别为1.96、1.91、1.98和1.81; 平均观测杂合度(H_o)分别为0.4895、0.4802、0.4579和0.4206; 平均期望杂合度(H_e)分别为0.4615、0.4454、0.4621和0.3916; 平均多态信息含量(PIC)分别为0.3791、0.3659、0.3764和0.3257。

2.2 各世代间的 F -检验

利用 POPGEN 3.2 软件进行各世代间 F -检验, 结果见表 3, 对 F_{is} 值的计算显示, 各世代群体均表现出杂合子缺失, Sp0、Sp2、Sp3 和 Sp4 杂合子缺失位点数分别为 10、12、5 和 8 个。分析位点 F_{st} 值, 共 5 个位点达到高度分化程度($0.15 < F_{st} < 0.25$), 4 个位点低度分化 ($F_{st} < 0.05$), 9 个位点中度分化 ($0.05 < F_{st} < 0.15$), 表明 4 个群体之间出现一定遗传分化。

表 3 18 个微卫星位点的 F -检验

Tab.3 The F -statistics of eighteen microsatellite loci

位点 Loci	F_{is}				F_{st}
	Sp0	Sp2	Sp3	Sp4	All groups
JZL12	-0.1005	-0.1959	-0.0526	-0.0605	0.2265
JZL23	-0.4146	-0.2553	0.0217	-0.2097	0.0201
JZL31	-0.3333	0.1167	-0.3317	-0.1048	0.1240
JZL36	0.1935	-0.0204	0.1192	0.2420	0.1873
JZL40	0.1935	-0.0204	0.1192	0.2101	0.1889
JZL43	-0.3976	-0.3976	-0.0391	-0.1727	0.0284
JZL48	-0.0087	-0.1435	0.1898	-0.2655	0.1020
JZL59	0.2609	0.0312	0.1954	0.0861	0.0953
JZL60	-0.3396	0.0255	-0.0345	0.0554	0.1098
JZL67	0.2256	0.2363	0.0761	0.0266	0.0478
JZL68	-0.0087	-0.0770	0.1667	0.1685	0.2573
JZL83	-1.0000	-0.3235	0.1911	-0.1724	0.1495
JZL84	-0.3182	-0.0770	0.1667	0.1685	0.2573
JZL85	0.1118	-0.1014	-0.1751	0.0276	0.0500
Lma21	-0.3488	-0.0434	0.0355	-0.1107	0.1100
Mdo7	0.0113	-0.0708	0.1071	-0.0943	0.0660
Mdo6	0.0286	0.0115	0.1532	0.0304	0.0725
Msa121	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
平均值 Mean	-0.1247	-0.0725	-0.0505	-0.0097	0.1163

表 5 4 个大口黑鲈群体的 AMOVA 分析

Tab.5 AMOVA analysis among four largemouth bass populations

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance component	百分率 Percentage(%)
群体间 Among populations	3	141.600	0.40136	8.38
群体内 Within populations	428	1877.944	4.38772	91.62
总变异 Total	431	2019.544	4.78908	

2.3 群体间的遗传分化

利用 ARLEQUIN 3.2 软件分析 4 个大口黑鲈群体间的遗传分化指数(F_{st})值(表4, 对角线上), 表明 4 个大口黑鲈群体间的 F_{st} 介于 0.01612~0.16162 之间, 为轻度分化或中度分化。在 AMOVA 分析中, 对 4 个大口黑鲈群体进行分析, 结果显示, 有 8.38% 的遗传变异来自于群体间, 91.62% 的遗传变异来自群体内(表5)。

表 4 4 个大口黑鲈群体的遗传距离(对角线下)和遗传分化指数(对角线上)

Tab.4 Nei's genetic distance (below diagonal) and pairwise F_{st} (above diagonal) among four largemouth bass populations

群体 Population	Sp0	Sp2	Sp3	Sp4
Sp0	****	0.11692	0.15039	0.16162
Sp2	0.0995	****	0.01902	0.01612
Sp3	0.1415	0.0344	****	0.02795
Sp4	0.1434	0.0249	0.0295	****

注: 对角线以下为遗传距离, 对角线以上为遗传分化指数

Notes: The data below the diagonal represent genetic distance, data above the diagonal represent genetic pairwise F_{st}

2.4 群体间遗传距离和聚类分析

依据 Nei(1978)计算群体间的遗传距离(D_a)结果表明(表 4, 对角线下), 4 个大口黑鲈群体间的遗传距离较近, 其中 Sp2 和 Sp4 群体的遗传距离最近($D_a=0.0249$), Sp0 和 Sp4 群体的遗传距离最远($D_a=0.1434$)。UPGMA 聚类图显示, 4 个大口黑鲈群体, Sp2 和 Sp4 最先聚类, 然后与 Sp3 聚类, 最后与 Sp0 聚在一起(图 1)。

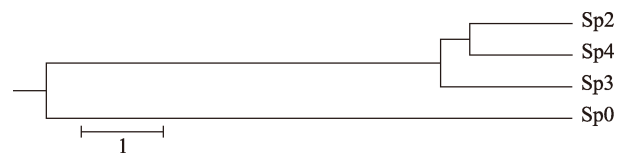


图 1 基于 Nei's 遗传距离构建的 4 个大口黑鲈群体的 NJ 聚类树

Fig.1 NJ clustering using Nei's unbiased genetic distance (1978) of four largemouth bass populations

3 讨论

3.1 选育基础群体的选择

良种是养殖产业的基础,而选择合适的选育基础群体,是良种选育的关键,并直接决定良种选育进程和效果。大口黑鲈“优鲈1号”是在1983年从中国台湾引入大陆经长期养殖自然选留的大口黑鲈群体为奠基种群选育而来,因经长期自然选择,该品种已经很好地适应中国养殖环境和养殖模式,并且生长性状优良,整齐度较好,是进一步良种选育理想的奠基种(李胜杰等,2011)。利用分子标记方法研究国内大口黑鲈遗传多样性显示,中国大口黑鲈群体遗传多样性比原种地低,并出现了一定水平的近交(樊佳佳等,2012)。2010年,本研究团队从美国引进大口黑鲈北方亚种原种,在中国水产科学研究院珠江水产研究所广州良种基地进行隔离繁殖和养殖,经生长对比分析发现,其生长速度较国内养殖群体慢,推测大口黑鲈引进群体还未完全适应中国水产养殖环境和养殖模式(刘海涌等,2015)。樊佳佳等(2012)研究分析了中国和引进的大口黑鲈遗传多样性,表明引进群体多样性水平显著高于国内养殖群体,引进的大口黑鲈北方亚种选育潜力较大,可作为大口黑鲈新品种选育重要的奠基种群(樊佳佳等,2012)。鉴于此,选择大口黑鲈“优鲈1号”和大口黑鲈北方亚种引进群体作为选育基础群体进行培育进食人工配合饲料大口黑鲈新品种。本研究选用 *Mdo6* 和 *Msal21* 这2个亚种特异性标记对4个选育群体进行扩增,结果表明, *Msal21* 在各选育世代个体仅存在196 bp大口黑鲈北方亚种特异条带, *Mdo6* 存在146 bp和151 bp条带,不存在佛罗里达亚种的153 bp特异条带,表明选育的食人工配合饲料大口黑鲈群体均为大口黑鲈北方亚种(Lutz-Carrillo *et al*, 2006)。

3.2 选育群体的遗传多样性分析

群体的遗传多样性水平,最常用 N_a 、 H_e 和 PIC 等指标来评估,多样性水平高低与群体的遗传潜力的大小相关,所以也是常用来作为品种选育世代遗传潜力趋势的一种常用手段(侯宁等,2007)。本研究选用18个微卫星对4个大口黑鲈选育世代进行遗传多样性监测,所选用的微卫星位点除了 *Msal21* 是单态外,其他 N_a 为2~4个,其中,除了 *JZL60* 标记在 Sp3 群体比其他群体多1个等位基因(180 bp),其他标记等位基因数在4个世代均相同,推测 *JZL60* 标记在 Sp3 部分个体可能发生突变。 H_e 是评价群体遗传变异程度

和遗传结构最适指标之一,是反映群体内所有等位基因的丰富程度和分布状况,揭示群体的生存和适应能力以及进化程度, H_e 的高低与其生命力和适应能力成正相关(Botstein *et al*, 1980)。本研究 Sp0 的 H_e 为0.4615,梁素娴等(2008)利用相同的微卫星标记对早期国内3个养殖大口黑鲈群体 H_e 分析(分别为0.375、0.403和0.368),表明通过选择引种的北方亚种原种作为选育基础群体,大大提高了选育群体的杂合度。除了 *Msal21* 标记外,其他标记的 PIC 在0.1451~0.5864之间, Sp0 群体的平均 PIC 为0.3791,根据 Botstein 等(1980)对多态信息含量指数的界定,4个群体均处于中度多态水平,高于梁素娴等(2008)用相同微卫星标记评估早期国内养殖大口黑鲈群体 PIC 值(分别为0.2392、0.3047和0.3610),说明国外种质引进一定程度上提高了群体遗传多样性, Sp0、Sp2、Sp3 和 Sp4 群体 PIC 值均为中度多态性,表明大口黑鲈选育群体仍具有选育潜力。

随着大口黑鲈选育世代增加,除了 Sp3 外,选育群体的 H_e 和 PIC 均表现为逐步降低的趋势,反映了人工选择育种会引起群体遗传多样性下降,推测经过人工选育,群体的目标性状相关的遗传基因逐步趋向纯化,最终形成稳定品系。但分析过程发现, Sp3 的 H_e 和 PIC 均比 Sp2 数值高。管云雁等(2013)在分析马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)选育群体4个世代遗传变异中也发现, JCS-3 群体的 H_e (0.361)比 JCS-2 群体 H_e 数值高(0.317)。池喜峰等(2010)分析鲤(*Cyprinus carpio*)易捕性状选育群体不同世代遗传多样性,也存在相同现象,他们分析原因均为实验样本量小造成的,本研究出现这种现象可能也是取样造成的,另外, Sp3 的 *JZL60* 标记比其他群体多1个等位基因,也是造成其 H_e 和 PIC 数值较高的主要因素。

通过对位点进行 F_{is} 分析,发现各群体均表现为杂合子缺失,推测与选育群体亲本被高强度选择有关。分析群体间遗传距离表明, Sp0 与其他群体遗传距离均较远(0.0995~0.1434),而 Sp2、Sp3 和 Sp4 遗传距离较近(0.0249~0.0344),推测通过人工选育,选育基础群体通过饲料驯化,由于其食物由冰鲜鱼转到配合饲料,大部分个体被淘汰,造成 Sp0 与后面选育世代遗传距离较大。分析群体间变异,大部分来自个体之间,仅8.39%的遗传变异来自世代之间。综上所述,对驯食配合饲料的大口黑鲈4个选育世代进行分析表明,经过选育期望杂合度、遗传多样性水平和遗传距离等均有下降趋势,表明人工选育性状基因趋于纯合。但群体遗传多样性仍为中度多态性,表明其继续人工选育的遗传潜力还是足够的,可以继续遗传选育。

参 考 文 献

- Bai JJ, Li SJ. Current status and development trend on China largemouth bass industry. *Chinese Fisheries Economics*, 2013, 31(5): 104–108 [白俊杰, 李胜杰. 我国大口黑鲈产业现状分析与对策. *中国渔业经济*, 2013, 31(5): 104–108]
- Bailey RM, Hubbs CL. The black basses (*Micropterus*) of Florida, with description of a new species. University of Michigan Museum of Zoology Occasional Papers, 1949, 516: 1–40
- Botstein D, White RL, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314–331
- Chi XF, Jia ZY, Li CT, *et al.* SSR analysis of selected high-harvesting populations of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Shanghai Ocean University*, 2010, 19(3): 308–313 [池喜峰, 贾智英, 李池陶, 等. 鲤易捕性状选育群体不同世代微卫星分析. *上海海洋大学学报*, 2010, 19(3): 308–313]
- Colbourne JK, Neff BD, Wright JM, *et al.* DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT)_n microsatellites and its potential for assessment of mating success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1996, 53(2): 342–349
- DeWoody JA, Avise JC. Microsatellite variation in marine, freshwater, and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 2000, 56(3): 461–473
- Excoffier L, Lischer H. Arlequin suite ver3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10(3): 564–567
- Fan JJ, Bai JJ, Li SJ, *et al.* Establishment of DNA fingerprinting and analysis on genetic structure of largemouth bass with microsatellite. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(4): 600–609 [樊佳佳, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈微卫星 DNA 指纹图谱的构建和遗传结构分析. *水生生物学报*, 2012, 36(4): 600–609]
- Fan JJ, Bai JJ, Li XH, *et al.* Identification of microsatellite markers associated with growth traits in largemouth bass (*Micropterus salmoides* L.). *Hereditas*, 2009a, 31(5): 515–522 [樊佳佳, 白俊杰, 李小慧, 等. 大口黑鲈生长性状的微卫星 DNA 标记筛选. *遗传*, 2009a, 31(5): 515–522]
- Fan JJ, Bai JJ, Ye X, *et al.* Taxonomic status of largemouth bass cultured in China. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2009b, 24(1): 83–86 [樊佳佳, 白俊杰, 叶星, 等. 中国养殖大口黑鲈的亚种分类地位探讨. *大连水产学院学报*, 2009b, 24(1): 83–86]
- Guan YY, Liu WG, He MX. Genetic variation during four generations of selective breeding in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(4): 764–770 [管云雁, 刘文广, 何毛贤. 马氏珠母贝选育群体 4 个世代的遗传变异. *中国水产科学*, 2013, 20(4): 764–770]
- Hou N, Zhang Y, Lu CY, *et al.* Genetic potential analysis of Germany mirror carp (*Cyprinus carpio* L.) using microsatellite markers. *Hereditas*, 2007, 29(12): 1509–1518 [侯宁, 张研, 鲁翠云, 等. 微卫星 DNA 标记分析德国镜鲤的遗传潜力. *遗传*, 2007, 29(12): 1509–1518]
- Kalinowski T, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 2007, 16(5): 1099–1106
- Li R, Bai JJ, Li SJ, *et al.* Analysis on genetic structure of selected population of largemouth bass by microsatellite DNA markers. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2010, 30(3): 11–15 [李睿, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈选育群体遗传结构的微卫星分析. *广东海洋大学学报*, 2010, 30(3): 11–15]
- Li SJ, Bai JJ, Wang HY. The introduction of new varieties in Youlu No.1 largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Scientific Fish Farming*, 2011(9): 46–47 [李胜杰, 白俊杰, 汪洪永. 大口黑鲈“优鲈 1 号”新品种简介. *科学养鱼*, 2011(9): 46–47]
- Li T, Li W, Zhao J, *et al.* Correlation analysis of the microsatellite DNA markers and growth traits of Chinese soft shell turtle (*Trionyx sinensis*). *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(1): 63–71 [李婷, 李伟, 赵建, 等. 中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 微卫星标记与生长性状的相关分析. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(1): 63–71]
- Liang SX, Sun XW, Bai JJ, *et al.* Genetic analysis for cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in China with microsatellites. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(5): 694–700 [梁素娴, 孙效文, 白俊杰, 等. 微卫星标记对中国引进加州鲈养殖群体遗传多样性的分析. *水生生物学报*, 2008, 32(5): 694–700]
- Liu HY, Li SJ, Bai JJ. Comparison and analysis of growth performance of breeding population and imported population of largemouth bass. *Journal of Aquaculture*, 2015(9): 1–5 [刘海涌, 李胜杰, 白俊杰. 大口黑鲈养殖群体和引进群体生长性能的比较分析. *水产养殖*, 2015(9): 1–5]
- Lutz-Carrillo DJ, Nice CC, Bonner TH, *et al.* Admixture analysis of Florida largemouth bass and northern largemouth bass using microsatellite loci. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2006, 135(3): 779–791
- MacEina MJ, Murphy BR. Stocking Florida largemouth bass outside its native range. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1992, 121: 686–691
- Malloy TP, van den Bussche RA, Coughlin WD, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite loci in smallmouth bass, *Micropterus dolomieu* (Teleostei: Centrarchidae), and cross-species amplification in spotted bass, *M. punctulatus*. *Molecular Ecology*, 2000, 9(11): 1946–1948
- Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89(3): 583–590
- Sun CF, Ye X, Dong JJ, *et al.* Genetic diversity analysis of six cultured populations of *Macrobrachium rosenbergii* using microsatellite markers. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(2): 20–26 [孙成飞, 叶星, 董浚键, 等. 罗氏沼虾 6 个养殖群体遗传多样性的微卫星分析. *南方水产科学*, 2015, 11(2): 20–26]
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,

- evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739
- Wang J, Wang QY, Kong J, *et al.* SSR analysis on genetic diversity in breeding and wild populations of *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 104–111 [王军, 王清印, 孔杰, 等. 中国明对虾人工选育群体与野生群体遗传多样性的 SSR 分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 104–111]
- Wang RF, Li J, Li JT, *et al.* Genetic analysis of 33 microsatellite loci in 3 families of *Exopalaemon carinicauda* inbred line. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 78–86 [王日芳, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)近交系 3 个家系 33 个微卫星座位的遗传分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 78–86]
- Wu RQ, Huang ZH, Lu MX. Nutritional requirements of largemouth bass and prospect of its commercial feed. *Guangdong Feed*, 2004, 13(2): 38–39 [吴锐全, 黄樟翰, 卢迈新. 大口黑鲈营养研究及配合饲料发展前景. *广东饲料*, 2004, 13(2): 38–39]
- Yuan WC, Ye JM, Huang HZ, *et al.* Study on correlation of EST-SSR markers with growth traits and genetic structure of 4 breeding populations in mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(1): 224–231 [袁文成, 叶金明, 黄鹤忠, 等. 翘嘴鲻(*Siniperca chuatsi*) EST-SSR 标记与生长性状相关性及其 4 个选育群体遗传结构研究. *海洋与湖沼*, 2018, 49(1): 224–231]
- Zhang TS, Wang QY, Liu P, *et al.* Genetic diversity analysis on selected populations of shrimp *Fenneropenaeus chinensis* by microsatellites. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, 36(1): 72–80 [张天时, 王清印, 刘萍, 等. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)人工选育群体不同世代的微卫星分析. *海洋与湖沼*, 2005, 36(1): 72–80]

(编辑 马瑰艳)

Analysis on Genetic Diversity of Three Breeding Populations of Largemouth Bass Using Formulated Feeds

FAN Jiajia, BAI Junjie, LI Shengjie^①, MA Dongmei, JIANG Peng

(Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380)

Abstract Largemouth bass (*Micropterus salmoides*) is a very important fish in commercial farming. As it is a carnivorous teleost, a large amount of forage fish and fish meal were used as food for largemouth bass every year. Residual forage fish and fish meal not only increase the costs of largemouth bass aquaculture, but also seriously pollute water bodies and farm lands. In order to reduce farming costs and protect the natural environment, selective breeding suitable for formulated feeds was carried out. In 2012, our research team selected the breeding population contain Youlu No.1 largemouth bass and introduced north largemouth bass. The genetic structure of largemouth bass breeding population was analyzed based on microsatellite DNA markers. A total of 240 individuals, from the foundation population (Sp0), the second generation group (Sp2), the third generation group (Sp3), and the fourth generation group (Sp4) (60 individuals per population) were assayed with 18 microsatellites. The results showed that a total of 44 alleles were identified, the numbers of alleles (N_a) were 1–4 in four selected populations, respectively. The observed heterozygosity (H_o) of Sp0, Sp2, Sp3 and Sp4 was 0.4895, 0.4802, 0.4579 and 0.4206, respectively; the expected heterozygosity (H_e) was 0.4615, 0.4454, 0.4621 and 0.3916, respectively; the polymorphism information content (PIC) of Sp0, Sp2, Sp3 and Sp4 was 0.3791, 0.3659, 0.3764 and 0.3257, respectively. The F_{st} value is between 0.01612 and 0.16162, and the genetic distance (D_a) is between 0.0249 and 0.1434. Partitioning of the genetic variation revealed that only 8.38% genetic variation was among the populations, and the other genetic variation was within the populations. The results showed that the artificially selected population using formulated feeds showed moderate genetic diversity, and still had great potential for future selective breeding.

Key words *Micropterus salmoides*; Formulated feed; Breeding population; Microsatellite; Genetic diversity

① Corresponding author: LI Shengjie, E-mail: ssjli@163.com