

香鱼野生群体和养殖群体遗传多样性比较

宋娜¹, 都基隆¹, 王志勇², 张庆文³, 高天翔^{1*}

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;

2. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 香鱼是分布于中国、日本和朝鲜的一种珍稀名贵经济鱼类, 本实验比较分析了香鱼养殖和野生群体的遗传多样性。研究结果显示, 在长度为 445 bp 的控制区部分序列上, 鳌山卫养殖群体的单倍型多样性 $h(0.1984 \pm 0.0924)$ 和核苷酸多样性 $\pi(0.0008 \pm 0.0009)$ 显著低于东张水库野生群体 ($h=0.8105 \pm 0.067$; $\pi=0.0026 \pm 0.0020$), 两群体产生了较大的遗传分化 ($F_{st}=0.447, P=0$); 单倍型邻接关系树的拓扑结构简单, 未呈现明显的地理谱系结构, 日本香鱼个体与中国香鱼亲缘关系较远; 东张群体的历史动态分析结果表明其可能经历过近期的群体扩张事件。无论是养殖群体还是野生群体, 中国香鱼群体的遗传多样性现状不容乐观。

关键词: 香鱼; 线粒体 DNA 控制区; 遗传多样性; 养殖群体; 野生群体

中图分类号: Q 347; S 932.4

文献标志码: A

香鱼 (*Plecoglossus altivelis*), 隶属于鲑形目 (Salmoniformes)、香鱼科 (Plecoglossidae)、香鱼属, 因其背脊上有一条充满香脂的腔道, 能发出香味而得名。香鱼为一年生两侧洄游型的珍稀名贵鱼类, 是东亚特有鱼种, 在国际市场上有“淡水鱼王”之称, 具有重要经济价值^[1]。中国分布的香鱼有两种生态型, 其中洄游型香鱼主要分布在辽宁、山东、福建、浙江等省的一些入海河流中, 另外在一些入海江河上游的水库中如福建东张水库等, 也存在一些陆封型香鱼; 国外如日本、朝鲜、越南等地也有两种生态型香鱼的分布^[2]。近年来, 由于江河水利设施的阻隔、环境污染和过度捕捞等原因, 香鱼自然资源濒临灭绝。世界自然保护联盟 (IUCN) 物种红色名录已将香鱼列为濒危物种^[3], 中国濒危动物红皮书和中国物种红色名录也将其列为易危物种^[4]。由此可见, 香鱼种质资源调查和自然资源的有效管理及保护工作亟待开展。

日本学者早在上个世纪就将日本香鱼划分为香鱼指名亚种 (*P. altivelis altivelis*) 和琉球亚种

(*P. altivelis ryukyensis*) 两个亚种^[5-7], 随后很多日本学者采用不同的标记技术对香鱼分类地位进行了深入研究^[8-10]; 国内学者也采用形态学、线粒体 DNA 等多种标记方法对中国香鱼的分类地位进行了探讨, 并认为中国分布的香鱼属于香鱼指名亚种^[11-13]。日本学者对于香鱼遗传多样性的研究工作开展得较早, 主要是采用同工酶、RFLP、线粒体 DNA 和微卫星等多种标记对不同生态型的香鱼以及香鱼野生和养殖群体遗传多样性进行了较为详细的研究^[9, 14-16], 得出了洄游型遗传多样性高于陆封型以及野生群体遗传多样性高于养殖群体的结论。到目前为止, 国内学者对香鱼的遗传多样性研究较少, 仅有黄福勇等^[17]、钱开诚^[11]、李娜等^[18]、乐小亮^[12]对中国香鱼的遗传学研究相关报道, 但未见关于中国香鱼野生群体与养殖群体的遗传多样性比较研究。本实验采用线粒体 DNA 控制区第一高变区序列对采自山东鳌山卫的香鱼养殖群体和福建东张水库的野生群体进行遗传学比较分析, 旨在揭示香鱼资源的遗传多样性状况, 以期对香鱼种质资源管理和可

收稿日期: 2013-06-28

修回日期: 2013-11-07

资助项目: 海洋公益性行业科研专项 (201305043, 2014050); 中国海洋大学水生生物种质资源标准化及资源共享项目

通信作者: 高天翔, E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn

持续利用提供合理的建议。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用样品分别于2008年9月20日和2012年4月1日采自福建东张水库(18尾)和山东鳌山卫养殖基地(28尾)(表1),经形态鉴定后,取肌肉组织于95%酒精固定或冷冻保存。

1.2 DNA提取与PCR扩增

取香鱼样品肌肉组织约100 mg,采用传统的酚-氯仿方法提取基因组DNA,用超纯水将乙醇沉淀后的基因组DNA溶解,4℃保存备用。

香鱼线粒体DNA控制区第一高变区的扩增引物序列为正向引物DL-S(5'-CCCACCACTAACTCCCAAAGC-3')和反向引物DL-R(5'-CTGGAAAGAACGCCCGCATG-3')^[19]。PCR反应体系为25 μL,包括1.25 U *Taq* DNA聚合酶,各种反应组分的终浓度为200 nmol/L的正反向引物;200 μmol/L dNTP,10 mmol/L Tris(pH 8.3),50 mmol/L KCl和1.5 mmol/L MgCl₂。反应条件为94℃预变性3 min;94℃变性1 min,52℃退火1 min,72℃延伸1 min,35个循环;72℃延伸10 min。以上反应均设阴性对照以排除DNA污染的情况。取2 μL的PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测($U=5$ V/cm),用UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒进行目的片段的回收纯化,送桑尼生物科技(上海)有限公司进行双向测序。

1.3 数据分析

将测得序列用DNASTar(DNASTAR, Inc)软件包中Seqman软件进行比对,核对测序胶图,并辅以人工校正;两个群体的碱基组成、变异位点、转换/颠换值采用Arlequin 3.0软件包进行分析;运用PAUP和Modeltest ver 3.06计算反映突变速率在不同位点间异质性的gamma分布形状参数。本实验中筛选出的核苷酸最佳替换模型为TrN+I;采用Arlequin 3.0软件进行两群体间遗传分化指数 F_{st} 的计算及确切 P 检验;从GenBank上下载序列号为AB181731的香鱼琉球亚种序列与序列号为AB181717的香鱼指名亚种序列进行比对,截取同源序列构建单倍型邻接关系树,采用1 000次重抽样评估系统树的可靠性。采用Arlequin 3.0软件来进行Tajima's D 和Fu's F_s 中性检验,Tajima's D 和Fu's F_s 中性检验如果是

负值并且显著偏离中性,表明可能是由于群体扩张引起的;采用核苷酸不配对分布(mismatch distribution)来分析检验香鱼是否存在群体扩张。

2 结果

本研究扩增得到香鱼2个群体46个个体的mtDNA片段的长度为472 bp,其中,tRNA-pro长度为27 bp,控制区第一高变区的序列长度为445 bp。在27 bp的tRNA-Pro的序列内没有位点发生变异,本实验所有分析都基于445 bp长度的控制区第一高变区片段进行(表1)。

所有个体的445 bp控制区部分序列内共检测到5个多态位点,这些多态位点共定义了6个单倍型,其中有2个单倍型为群体间所共享。在控制区片段的碱基组成上,鳌山卫养殖群体的C、T、A、G含量分别为23.82%、25.39%、33.93%、16.85%;东张野生群体的C、T、A、G含量分别为23.82%、25.39%、34.00%、16.79%,两个群体的A+T碱基含量都明显大于C+G含量。东张野生群体的控制区序列共检测到5个多态位点,其中有4个是简约性信息位点,这些多态位点共定义了5处核苷酸替换,全部为A-G转换,没有检测到颠换和碱基插入/缺失位点;鳌山卫养殖群体的控制区片段共检测到2个多态位点,全部是简约信息位点,这些多态位点共定义了2处核苷酸替换,全部为A-G转换,没有检测到颠换和碱基插入/缺失位点。

鳌山卫养殖群体的单倍型多样性为 0.1984 ± 0.0924 ,核苷酸多样性为 0.0008 ± 0.0009 ,东张野生群体的单倍型多样性为 0.8105 ± 0.0672 ,核苷酸多样性为 0.0026 ± 0.0020 ;野生群体的遗传多样性指数显著高于养殖群体(表1)。

表1 香鱼两个群体的遗传多样性指数

Tab.1 Population genetic diversity index of *P. altivelis*

控制区 D-loop	鳌山卫 ASW	东张 DZ	总样本 total
个体数 number	28	18	46
序列长度/bp sequence length	445	445	445
变异位点 variable site	2	5	5
单倍型 haplotype number	2	6	6
核苷酸多样性 π nucleotide diversity	0.0008 ± 0.0009	0.0026 ± 0.0020	0.0023 ± 0.0017
单倍型多样性 h haplotype diversity	0.1984 ± 0.0924	0.8105 ± 0.0672	0.6010 ± 0.0736

表 2 香鱼 2 个群体的单倍型频率分布图
Tab.2 Distribution of haplotypes in two *P. altivelis* populations

ID	H1	H2	H3	H4	H5	H6
ASW	25	3				
DZ	3	2	7	2	3	1

采用 Mega 3.0 软件计算系统发育重建所需的遗传距离,从 GenBank 上下载序列号为 AB181731 的香鱼琉球亚种序列与序列号为 AB181717 的香鱼指名亚种序列进行比对,截取同源序列 300 bp 构建单倍型邻接关系树(图 1),结果显示,两个香鱼群体单倍型邻接关系树的拓扑结构比较简单,鳌山卫养殖群体与东张野生群体各单倍型混杂在一起,没有形成明显的谱系结构。琉球亚种与中国香鱼两个群体的亲缘关系较远,在系统树上先分化出来,表明指名亚种与中国群体亲缘关系较近,但是仍然存在一定的分化。

香鱼两个群体的遗传分化指数 F_{st} 值很大,在经过 Bonferroni 校正之后仍显著 ($F_{st} = 0.447$, $P = 0$)。P 检验的结果显示,经过 Bonferroni 校正之后,两个群体之间的 P 值显著,不支持中性假说的理论,即群体之间不是随机交配群体。

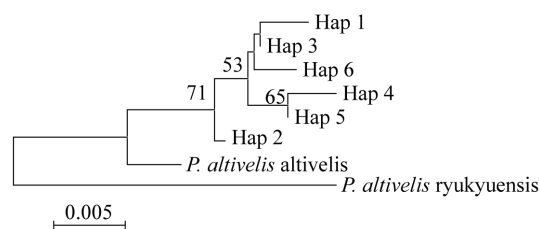


图 1 基于香鱼控制区单倍型构建的邻接关系树

各分支上数字为重抽样分析得到的大于 50% 的支持率

Fig.1 Neighbour-joining tree for control region haplotypes of *P. altivelis*

Bootstrap supports of more than 50% in 1 000 replicates are shown

香鱼东张野生群体的核苷酸不配对分布图呈明显的单峰状态(图 2),基于观测值和模拟值的拟合度检验显示,观测值与模拟值非常吻合 ($Hri = 0.144$, $P > 0.05$),没有显著偏离群体扩张模型。虽然统计检验的结果并不显著,但 F_s 和 D 中性检验的值皆为负值 ($D = -0.44705$, $P > 0.05$; $F_s = -1.78258$, $P > 0.05$),与核苷酸不配对分布分析的结果也一致,暗示香鱼经历了群体扩张事件。

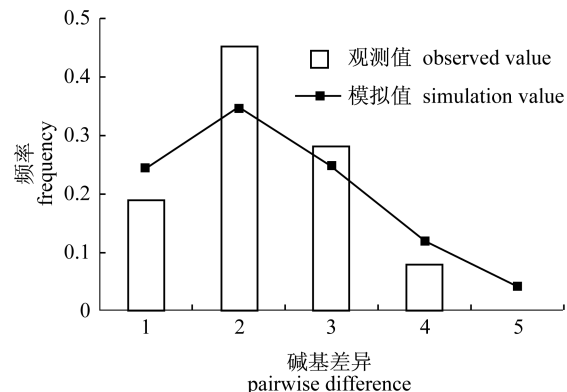


图 2 香鱼控制区单倍型的核苷酸不配对分布

柱状图为观测值,曲线为群体扩张模型下的预期分布

Fig.2 The observed pairwise difference (bars) and the expected mismatch distributions under the sudden expansion model (solid line) of control region haplotypes in *P. altivelis*

3 讨论

到目前为止,同工酶、RAPD、微卫星等多种分子标记已经被广泛应用于一些养殖鱼类的遗传多样性研究^[20-22],而线粒体 DNA 控制区由于具有选择压力较小,碱基替代速率较快等优点,被证实对海洋鱼类群体遗传结构的检测非常有效^[23],亦成功用于鱼类养殖群体和野生群体的遗传差异比较研究。例如,Song 等^[24]采用线粒体 DNA 控制区对中国近海褐牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 8 个养殖群体和 2 个野生群体遗传多样性进行比较分析的结果表明,褐牙鲆养殖群体遗传多样性明显低于野生群体,养殖群体之间以及养殖群体和野生群体之间产生了较大遗传分化;Iguchi 等^[9]对日本香鱼 3 个野生群体和 6 个养殖群体的控制区序列比较分析结果表明,与野生群体相比,养殖群体遗传多样性明显降低,并且随着养殖代数的增加,遗传多样性也呈一个下降的趋势。本实验结果也表明,青岛鳌山卫香鱼养殖群体的遗传多样性指数明显小于福建东张野生群体,与 Iguchi 等^[25]的研究结果比较发现,我们采集的陆封香鱼群体的遗传多样性显著小于采自 Inukami 河流的陆封群体。遗传漂变可能是导致养殖鱼类遗传多样性降低的主要原因^[26],养殖群体都存在亲鱼数目较少这一普遍现象,随着养殖代数的增加,子代会出现等位基因丧失的情况。另外,养殖鱼类对养殖环境的适应也可能导致遗传多样性的降

低^[27]。养殖群体的遗传多样性降低可能会引起养殖群体与野生群体间产生遗传分化,这些遗传差异会随着养殖代数的增加而逐渐增大。

香鱼作为一种具有重要养殖价值的鱼类,养殖前景广阔。随着对野生资源的持续破坏,香鱼的增殖放流活动也逐渐开展起来。1979年,李明云等^[28]曾在浙江宁海进行过香鱼的增殖放流实验,取得了一定的效果。近年来,浙江、福建等地陆续开展了香鱼增殖放流,已经取得了较为显著的成果。研究表明,虽然大规模的增殖放流活动对野生资源基因库的影响尚不可预测,到目前为止也还没有关于养殖群体对野生群体产生有害影响的研究报道,但由于遗传漂变和对养殖环境的适应,养殖群体已经与野生群体产生了较大的遗传分化,若与野生群体发生基因交流,可能会对整个野生群体的基因库产生较大的影响^[29]。鳌山卫香鱼养殖群体的遗传多样性明显降低,进行增殖放流时应慎重。

福建东张群体的核苷酸不配对分布图呈明显的单峰状态,虽然统计检验结果不显著,但 F_s 和 D 中性检验的值皆为负值,与核苷酸不配对分布分析结果一致,暗示香鱼可能经历了群体扩张事件。较高的单倍型多样度和较低的核苷酸多样性,也暗示东张群体可能在经历过瓶颈效应后,从一个小的群体发生急剧的群体扩张。东张群体的中性检验结果与乐小亮^[12]对香鱼群体的检验结果相似,但是核苷酸不配对分布分析结果支持群体扩张事件的发生,与其结论有差异。

根据本实验结果,无论是养殖群体还是野生群体,中国香鱼群体的遗传多样性现状均不容乐观。为保证野生香鱼资源的基因品质,应进一步采用更多的分子标记如微卫星DNA等对中国香鱼群体的遗传多样性现状进行深入研究,制定增殖放流苗种的质量标准,保护香鱼野生种质资源。

参考文献:

- [1] Yang C P. Biological Characteristics and Breeding Technology of *Plecoglossus altivelis* [J]. Shandong Fisheries, 2007, 24(2): 46-47. [杨翠平. 香鱼的生物学特性及养殖技术. 齐鲁渔业, 2007, 24(2): 46-47.]
- [2] Cheng Q T, Zheng B S. Systematic synopsis of Chinese fishes (first volume) [M]. Beijing: Science Press, 1987. [成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索 (上册). 北京: 科学出版社, 1987.]
- [3] Groombridge B. IUCN red list of threatened animals [R]. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, 1993.
- [4] Wang S. China red data book of endangered animals [M]. Beijing: Science Press, 1998: 47-49. [国家环保局, 中华人民共和国濒危物种科学委员会. 中国濒危动物红皮书(鱼类). 北京: 科学出版社, 1998: 47-49.]
- [5] Nishida M. Substantial genetic differentiation in ayu *Plecoglossus altivelis* of the Japan and Ryukyu Islands [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1985, 51(8): 1269-1274.
- [6] Nishida M. Geographic variation in the molecular, morphological and reproductive characters of the ayu *Plecoglossus altivelis* (Plecoglossidae) in the Japan-Ryukyu Archipelago [J]. Ichthyological Research, 1986, 33(3): 232-248.
- [7] Nishida M. A new subspecies of ayu *Plecoglossus altivelis* (Plecoglossidae) from the Ryukyu Islands [J]. Ichthyological Research, 1988, 35(3): 236-242.
- [8] Seki S, Taniguchi N, Jeon S. Genetic divergence among natural populations of ayu from Japan and Korea [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1988, 54(4): 559-568.
- [9] Iguchi K, Watanabe K, Nishida M. Reduced mitochondrial DNA variation in hatchery populations of ayu (*Plecoglossus altivelis*) cultured for multiple generations [J]. Aquaculture, 1999, 178(3-4): 235-243.
- [10] Takeshima H, Iguchi K, Nishida M. Unexpected ceiling of genetic differentiation in the control region of the mitochondrial DNA between different subspecies of the ayu *Plecoglossus altivelis* [J]. Zoological Science, 2005, 22(4): 401-410.
- [11] Qian K C. Study on taxonomic status and genetic diversity of Chinese Ya Lujiang River Ayu [D]. Guangzhou: Jinan University, 2006. [钱开诚. 中国鸭绿江香鱼的分类地位与遗传多样性研究汇. 广州: 暨南大学, 2006.]
- [12] Le X L. Genetic diversity of wild populations of *Plecoglossus altivelis* in China [D]. Guangzhou: Jinan University, 2010. [乐小亮. 中国野生香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 遗传多样性分析. 广州: 暨南大学, 2010.]
- [13] Chen Q M, Lu Y F, Zhang Q. On the taxonomic status of Chinese sweetfish *Plecoglossus* sp. based on

- mitochondrial DNA analysis [J]. *Ecologic Science*, 2007, 26(2): 143 - 145. [陈泉梅, 鲁延付, 章群. 关于中国香鱼分类地位的线粒体 DNA 基因序列分析. *生态科学*, 2007, 26(2): 143 - 145.]
- [14] Taniguchi N, Seki S, Inada Y. Genic variability and differentiation of Amphidromous, landlocked, and hatchery populations of ayu *Plecoglossus altivelis* [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1983, 49(11): 1655 - 1663.
- [15] Pastene L, Numachi K, Tsukamoto K. Examination of reproductive success of transplanted stocks in an amphidromous fish, *Plecoglossus altivelis* (Temmink et Schlegel) using mitochondrial DNA and isozyme markers [J]. *Journal of Fish Biology*, 1991, 39 (suppl.) : 93 - 100.
- [16] Ikeda M, Takagi S, Taniguchi N. Relationships between genetic diversity and number of successive generations in hatchery populations of ayu *Plecoglossus altivelis* assessed by microsatellite DNA polymorphism [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 2005, 71(5): 768 - 774.
- [17] Huang F Y, Li M Y. Biochemical genetic analysis of isozymes in *Plecoglossus altivelis* population in Fuxi [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(5): 579 - 584. [黄福勇, 李明云. 鬼溪香鱼群体同工酶的生化遗传分析. *水产学报*, 2004, 28(5): 579 - 584.]
- [18] Li N, Chen S B, Xie Q L, et al. Polymorphisms of mitochondrial *Cyt b* gene and D-loop region in sweetfish (*Plecoglossus altivelis Temminck et Schlegel*) from Zhejiang and Fujian Provinces [J]. *Hereditas*, 2008, 30(7): 919 - 925. [李娜, 陈少波, 谢起浪, 等. 闽浙地区香鱼线粒体 *Cyt b* 基因和 D-loop 区序列多态性分析. *遗传*, 2008, 30(7): 919 - 925.]
- [19] Kocher T, Thomas W, Meyer A, et al. Dynamic of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989, 86(16): 6196 - 6200.
- [20] Allendorf F W, Phelps S R. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout [J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1980, 109: 537 - 543.
- [21] Meng X H, Kong J, Zhuang Z M, et al. Genetic diversity in the wild and hatchery populations of Red Seabream (*Pagrus major*) [J]. *Biodiversity Science*, 2000, 8(3): 248 - 252. [孟宪红, 孔杰, 庄志猛, 等. 真鲷自然群体和人工繁殖群体的遗传多样性. *生物多样性*, 2000, 8(3): 248 - 252.]
- [22] Kincaid H. An evaluation of inbreeding and effective population size in salmonid broodstocks in federal and state hatcheries [J]. *American Fisheries Society Symposium*, 1995, 15: 193 - 204.
- [23] Buonnacorsi V, McDowell J, Graves J. Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*) [J]. *Molecular Ecology*, 2001, 10(5): 1179 - 1196.
- [24] Song N, Zhang X, Gao T. Genetic variability in eight cultured and two wild populations of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, based on the mitochondrial DNA control region [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2011, 42(4): 512 - 521.
- [25] Iguchi K, Tanimura Y, Nishida M. Sequence divergence in the mtDNA control region of amphidromous and landlocked forms of ayu [J]. *Fisheries Science*, 1997, 63(6): 901 - 905.
- [26] Ferguson M. The role of molecular genetic markers in the management of cultured fishes [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1995, 4(3): 351 - 373.
- [27] Allendorf F W. Delay of adaptation to captive breeding by equalizing family size [J]. *Conservation Biology*, 1993, 7(2): 416 - 419.
- [28] Li M Y; Ding T X; Zhu J Q, et al. Present status for the research and perspective on stocking and culture of Ayu (*Plecoglossus altivelis*) in China [J]. *Journal of Ningbo University: Natural Science & Engineering Edition*, 1999, 12(4): 85 - 90. [李明云, 丁天喜, 竺俊全, 等. 我国香鱼的研究现状及增养殖前景. *宁波大学学报*, 1999, 12(4): 85 - 90.]
- [29] Bert T M, Crawford C R, Tringali M D, et al. Genetic management of hatchery-based stock enhancement [M] // *Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities*. Berlin: Springer Netherlands, 2007, 6: 123 - 174.

Comparative study on the populations genetic diversity between hatchery and wild populations of *Plecoglossus altivelis*

SONG Na¹, DU Jilong¹, WANG Zhiyong², ZHANG Qingwen³, GAO Tianxiang^{1*}

(1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: *Plecoglossus altivelis* is an important rare economic fish distributed along Chinese, Japanese and Korean coasts. In the present study, genetic diversity of hatchery and wild population was compared. A 445 bp fragment of control region was obtained. The haplotype diversity (0.1984 ± 0.0924) and nucleotide diversity (0.0008 ± 0.0009) of hatchery population were obviously lower than those of wild population ($h = 0.8105 \pm 0.067$; $\pi = 0.0026 \pm 0.0020$). Great differentiation was detected between these two populations ($F_{st} = 0.447$, $P = 0.000$). The topology constructed by neighbour-joining tree indicated no significant genealogical structures for two populations. Individuals from Japan showed a distant relationship with individuals from China. Mismatch distribution analysis indicated that *P. altivelis* may have experienced a recent population expansion. The present study indicated that current genetic situation of hatchery and wild populations was not optimistic.

Key words: *Plecoglossus altivelis*; mitochondrial DNA control region; genetic diversity; hatchery population; wild population

Corresponding author: GAO Tianxiang. E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn