



## 大泷六线鱼放流群体与野生群体遗传多样性比较

郭婷<sup>1</sup>, 宋娜<sup>1</sup>, 刘淑德<sup>2</sup>, 涂忠<sup>2</sup>,  
胡发文<sup>3</sup>, 高天翔<sup>4</sup>, 陈健<sup>4\*</sup>

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266000;

2. 山东省水生生物资源养护管理中心, 山东 烟台 264003;

3. 山东省海洋生物研究院, 山东 青岛 266000;

4. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 浙江 舟山 316000)

**摘要:** 基于线粒体 DNA 控制区高变区部分序列和 4 对微卫星标记, 对大泷六线鱼放流群体及自然海域群体的遗传多样性与遗传差异进行了比较分析。线粒体 DNA 控制区序列分析的结果显示, 413 尾个体共检测到单倍型 117 种, 其中仅 Hap\_3、Hap\_7 和 Hap\_17 为共享单倍型, 占总单倍型数目的 2.5%; 放流、野生群体特有单倍型分别为 20 种和 66 种, 分别占总单倍型数的 17.09% 和 56.41%, 放流群体特有单倍型数明显低于野生群体; 放流群体和野生群体核苷酸多样性分别为 0.005 1~0.006 7 和 0.005 8~0.007 5, 单倍型多样性分别为 0.856 7~0.949 9 和 0.883 1~0.954 9, 遗传多样性均较高。微卫星标记分析结果显示, 放流、野生群体平均等位基因数 ( $N_a$ ) 分别为 13~44 和 13~27, 平均多态信息含量为 0.885 6 和 0.874 0, 均具有较高的遗传多态性; 群体遗传结构分析结果表明, 放流、野生群体间遗传分化水平较低。研究表明, 山东近海大泷六线鱼放流群体与野生群体均具有较丰富的遗传多样性, 且遗传结构未存在显著的群体分化。

**关键词:** 大泷六线鱼; 线粒体控制区; 微卫星; 遗传多样性; 增殖放流

**中图分类号:** S 931

**文献标志码:** A

大泷六线鱼 (*Hexagrammos otakii*), 又名欧氏六线鱼, 隶属鲷形目 (Scorpaeniformes)、六线鱼亚目 (Hexagrammoidei)、六线鱼科 (Hexagrammidae)、六线鱼属 (*Hexagrammos*), 俗称黄鱼、黄棒子<sup>[1-2]</sup>。大泷六线鱼分布于我国东海、黄海、渤海及日本、朝鲜等近海岩礁区域, 属近岸冷温性底层鱼类<sup>[3]</sup>, 因味道鲜美、营养及经济价值较高等优点深受消费者喜爱, 成为我国北方海水养殖的重要鱼种之一。近年来, 受过度捕捞、环境污染等外界因素影响, 大泷六线鱼资源衰退严重, 个体呈现出小型化、低龄化趋势, 市场价格不

断升高<sup>[4]</sup>。自 20 世纪 80 年代, 我国开始大泷六线鱼人工育苗的初步试验<sup>[5]</sup>, 潘雷等<sup>[6]</sup>、胡发文等<sup>[7-9]</sup>、菅玉霞等<sup>[10]</sup> 在 2010 年突破了大泷六线鱼人工繁育关键技术, 实现了苗种的规模化培育。山东省于 2014 年首次进行了大泷六线鱼增殖放流, 并于 2017 年将大泷六线鱼增殖放流设为省级放流项目, 放流力度逐年增大, 其增殖海区主要位于日照、烟台长岛、威海市阴山湾和五垒岛湾等近海领域。大规模的增殖放流活动使自然海域内大泷六线鱼的资源得到了一定程度的补充, 产生了良好的经济和生态效益, 然而

收稿日期: 2019-11-16 修回日期: 2020-04-23

资助项目: 农业农村部渔业渔政管理局“大泷六线鱼增殖放流效果评估和跟踪监测”项目 (YYJZHC201921301350021)

通信作者: 陈健, E-mail: 329297635@qq.com

放流群体对自然群体遗传多样的影响还未有深入的研究和探讨。因此, 为保护大泷六线鱼的野生资源, 亟需对其增殖放流过程中的亲本、苗种的遗传多样性现状及其可能对野生群体产生的遗传学影响进行评价, 以期为放流政策制定与资源开发保护提供理论基础。

线粒体 DNA 控制区片段由于具有较快的进化速率, 且在检测种下水平的遗传变异中灵敏度较高<sup>[11]</sup>, 因此广泛应用于海洋生物的群体遗传学研究。微卫星 DNA, 又称简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR), 由于其含量丰富、多态性高且检测方便等优点, 因此在水生生物的遗传学研究中得到广泛的运用<sup>[12]</sup>。近年来, 上述 2 种标记方法在监测放流群体遗传多样性以及评估增殖放流的遗传学效果等方面已有较多研究。例如, Gonzalez 等<sup>[13]</sup>采用 15 对微卫星引物以及线粒体控制区片段探究日本相模湾和东京湾的真鲷 (*Pagrus major*) 放流可能产生的潜在遗传效应, 2 种标记均检测到放流群体较低的遗传多样性; 司飞等<sup>[14]</sup>采用微卫星标记对秦皇岛近海增殖放流海区的牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 进行分析, 结果发现亲本群体与回捕群体均拥有较高的遗传多样性。季晓芬等<sup>[15]</sup>利用微卫星标记评估了 2011—2015 年长江中游草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 亲本增殖放流对野生群体遗传多样性的影响, 认为当前的增殖放流活动未对野生群体遗传结构产生显著影响。因此, 线粒体 DNA 标记和微卫星标记是目前增殖放流评价主要采用的分子标记手段。

本研究主要基于线粒体控制区高变区部分序列及 4 个微卫星多态位点对威海圣航水产科技

有限公司 2018 年大泷六线鱼放流群体及附近海域的自然捕捞群体进行了遗传多样性的比较与分析, 旨在了解大泷六线鱼增殖群体的遗传背景及其与野生群体间的遗传差异, 并进一步明晰当前增殖放流活动对野生群体遗传结构造成的潜在影响, 以期为我国近岸渔业资源的保护与修复策略的优化提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集

本研究所用的大泷六线鱼采样地点如图 1, 对不同批次采集的大泷六线鱼群体进行编号, 具体详细的采样信息见表 1。所有样品经生物学测量后, 取新鲜鱼体的背部肌肉于冻存管中, 加入 95% 的乙醇固定并于 -20 °C 保存以备 DNA 的提取。

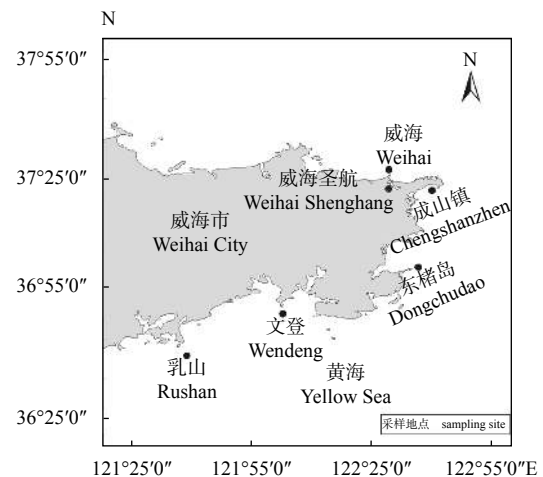


图 1 大泷六线鱼采样地点

Fig. 1 Sampling sites of *H. otakii*

表 1 大泷六线鱼样本信息

Tab. 1 Sample information of *H. otakii*

时间 time	地点 location	编号 code	数量/尾 number	平均体长/mm mean length	平均体质量/g mean weight
2017.12.03	威海近海: 野生群体	WHJH	57	436.38±204.36	298.21±41.90
2018.03.18	威海圣航水产公司: 放流群体	SYZM	89	34.19±3.22	0.27±0.08
2018.07.08	威海圣航水产公司: 放流群体	QYZM	70	95.39±8.78	10.99±3.20
2018.08.02	乳山近海: 野生群体	RSJH	69	109.93±14.04	15.80±6.95
2018.09.14	文登近海: 野生群体	WDJH	34	204.68±16.18	115.70±30.12
2018.10.18	东楮岛: 野生群体	DCD	48	145.01±15.31	36.54±13.03
2018.10.22	成山镇: 野生群体	CSZ	46	155.18±15.68	45.58±13.15

## 1.2 生物学研究

**生物学测量** 使用游标卡尺或者直尺测量采集到的大泷六线鱼样品的体长, 使用电子天平测量其体质量。其中体长测量精确到 1 mm, 体质量测量精确到 0.1 g。

**数据处理** 采用 Excel 2007 软件对体长、体质量的数据进行处理。

## 1.3 线粒体 DNA 控制区片段的扩增

**基因组 DNA 提取及扩增** 剪取豆粒大小的肌肉于离心管中, 剪碎后加入 15  $\mu$ L 的蛋白酶 K 以及 650  $\mu$ L 的 STE 缓冲溶液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 0.1 mol/L EDTA, pH 8.0; 1% *M/V* SDS), 上下颠倒混匀, 放入 57  $^{\circ}$ C 烘箱内孵育过夜。采用传统的酚—氯仿抽提法进行基因组 DNA 的提取, 用 TE 缓冲溶液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 溶解, 并于 -20  $^{\circ}$ C 保存。用于控制区序列扩增的引物: HotCR-F: TAACTCCCACCCTAACTCC, HotCR-R: CCATTAACCTTATGTAA GCGTCG<sup>[16]</sup>。PCR 反应体系为 25  $\mu$ L: ddH<sub>2</sub>O 17.5  $\mu$ L, 10 $\times$ loading buffer 2.5  $\mu$ L, DNTPs 2  $\mu$ L, HotCR-F 1  $\mu$ L, HotCR-R 1  $\mu$ L, *rTaq* 0.15  $\mu$ L。PCR 主要反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 52  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 40 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测后送至北京擎科生物科技有限公司青岛分公司进行测序。

**数据分析** 使用 Dnastar 软件包 (DNASTAR, Inc., Madison, USA) 对所有双向测序返回序列依据峰图进行编辑和校对。利用 MEGA6.0 软件<sup>[17]</sup> 统计多态位点、碱基组成、插入/缺失等分子多

态性指数, 运用 DNASP5.10 软件计算序列的单倍型数 ( $h$ )、单倍型多样性指数 ( $H_d$ )、核苷酸多样性指数 ( $\pi$ ) 和平均核苷酸差异数 ( $K$ )。使用 ARLEQUIN 软件 (Ver. 3.11)<sup>[18]</sup> 计算群体间遗传分化指数 ( $F_{st}$ )。

## 1.4 微卫星标记

**SSR 扩增** 本研究选取 4 个具高度多态性的微卫星位点 (Heot 42<sup>[19]</sup>、HEDE\_E4<sup>[20]</sup>、P5-6、P3-21)(表 2) 对提取的大泷六线鱼 DNA 进行 PCR 扩增, 其中 P5-6 (登录号: MK749130)、P3-21 (登录号: MK749151) 为本研究新开发引物。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后送至北京擎科生物科技有限公司青岛分公司进行电泳分型。该部分实验操作均在避光条件下进行。

**数据分析** 使用 GeneMarker v202 (Soft-Genetics, State College, USA) 软件读取相关等位基因数值。用 PopGene 32 软件<sup>[21]</sup> 对各群体进行遗传分析, 计算等位基因数 ( $N_a$ )、有效等位基因数 ( $N_e$ )、观测杂合度 ( $H_o$ ) 和期望杂合度 ( $H_e$ )。用 Mstools 计算各位点的多态信息含量 (PIC)、用 GENEPOP 4.0 软件<sup>[22]</sup> 进行 Hardy-Weinberg 平衡检验, 用 Micro-Checker 软件<sup>[23]</sup> 对显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡的位点进行无效等位基因的检测。用 FSTAT 软件<sup>[24]</sup> 分析遗传分化指数 ( $F_{st}$ ), 用 STRUCTURE 软件<sup>[25]</sup> 分析群体间遗传结构。

## 2 结果

### 2.1 线粒体标记结果

经 PCR 扩增获得线粒体控制区高变区部分

表 2 大泷六线鱼 4 对微卫星标记引物信息

Tab. 2 Information for 4 microsatellite loci of *H. otakii*

位点 locus	引物序列 (5'-3') primers sequence	重复模块 repeat motif	等位基因长度/bp size range	退火温度/ $^{\circ}$ C annealing temperature	登录号 GenBank accession
Heot42	F:CAGAAAACGTTGCCATGAAA R:GTGAAACGAGCCCCCTACAG	(ACAG) <sup>6</sup>	146~174	53	EU733697
HEDE_E4	F:CCCACCTACATTTTCTCATCC R:CTCTGCTCTCGTCTTCACTTG	(CA) <sup>33</sup>	212~268	54	EU781569
P5-6	F:GTAGTCCTCGTTAAGGGGCG R:TGCCCATCAGGACTCTCTCA	(GTAGC) <sup>6</sup>	261	57	MK749130
P3-21	F:CGGCGGAGAGATGTCAAACCT R:TTCCGTCCCGTAACAACCAG	(AGA) <sup>17</sup>	191	57	MK749151

序列, 与 GenBank 上已有的大泷六线鱼控制区序列进行比对, 并在 DNASTAR 中进行目的片段的截取, 共获得长度为 436 bp 的控制区高变区部分序列 413 条。其中, A、G、T、C 碱基的平均含量分别为 33.37%、17.33%、34.58% 和 14.72%。G+C(32.05%) 含量明显低于 A+T(67.95%) 含量, 表现出了较为明显的碱基组成偏倚性, 与其他脊椎动物线粒体 DNA 控制区碱基特征相符合。在 413 尾大泷六线鱼的控制区序列中, 检测保守位点有 375 个, 变异位点有 61 个, 简约信息位点有 35 个, 插入/缺失位点为 4 个。

本研究中大泷六线鱼遗传多样性参数结果显示, 放流群体和野生群体核苷酸多样性分别为 (0.005 1±0.003 2)~(0.006 7±0.003 9)、(0.005 8±0.003 5)~(0.007 5±0.004 3), 单倍型多样性为 (0.856 7±

0.025 2)~(0.949 9±0.014 0)、(0.883 1±0.033 3)~(0.954 9±0.016 1); 放流群体与野生群体核苷酸多样性均处于较低水平, 单倍型多样性均处于较高水平, 且不同群体间不存在显著差异(表 3)。群体间遗传分化指数结果显示, 7 个群体间  $F_{st}$  值为 -0.004 2~0.033 6(表 4), WDJH 和 DCD 之间  $F_{st}$  最大 (0.033 6), QYZM 和 RSJH 之间  $F_{st}$  最小 (-0.004 2)。SYZM 和 QYZM 与野生群体间  $F_{st}$  值为 -0.004 2~0.028 5, 遗传分化指数差异较小。

使用 MEGA 6.0 软件<sup>[17]</sup> 基于 Kimura 2-parameter 构建大泷六线鱼单倍型邻接关系树(图 2), Bootstrap 检验次数为 1 000 次。结果显示, 413 尾大泷六线鱼控制区序列共定义了 117 种单倍型, 7 个群体间有 3 个共享单倍型(Hap\_3、Hap\_7 和 Hap\_17), 占总单倍型数目的 2.5%。放流、野生

表 3 大泷六线鱼遗传多样性参数

Tab. 3 Genetic diversity parameters of *H. otakii*

群体 population	保守位点 conserved sites	变异位点 variable sites	简约信息位点 parsimony informative site	单倍型数目 number of haplotypes	核苷酸多样性 nucleotide diversity	单倍型多样性 haplotype diversity	两两序列比较的平均碱基差异数 mean number of pairwise differences
WHJH	411	25	22	32	0.007 5±0.004 3	0.954 9±0.016 1	3.248 1±1.699 1
SYZM	406	30	15	25	0.005 1±0.003 2	0.856 7±0.025 2	2.235 4±1.243 6
QYZM	414	22	18	31	0.006 7±0.003 9	0.949 9±0.014 0	2.916 8±1.548 6
RSJH	410	26	14	35	0.006 1±0.003 6	0.942 5±0.016 2	2.650 5±1.431 3
WDJH	420	16	12	15	0.005 8±0.003 5	0.903 7±0.034 1	2.508 0±1.385 4
DCD	408	28	10	22	0.006 6±0.003 9	0.883 1±0.033 3	2.865 7±1.535 7
CSZ	407	29	12	32	0.007 4±0.004 3	0.937 1±0.026 1	3.225 2±1.693 6

表 4 大泷六线鱼 7 个群体遗传分化指数  $F_{st}$

Tab. 4 Pair-wise  $F_{st}$  among 7 populations of *H. otakii*

群体 population	WHJH	SYZM	QYZM	RSJH	WDJH	DCD	CSZ
WHJH	-	0.009 7**	-0.000 8	0.012 2**	0.007 6	0.000 5	0.008 5**
SYZM	0.017 8**	-	0.009 2**	0.010 6**	0.013 4**	0.005 8*	0.011 5**
QYZM	-0.002 9	0.016 1**	-	0.008 7**	0.003 6	-0.001 0	0.006 0*
RSJH	0.003 2	0.009 3	-0.004 2	-	0.008 6*	0.007 7**	0.008 5**
WDJH	0.005 6	0.013 7	0.006 5	0.007 1	-	0.003 5	0.007 8
DCD	0.013 4	0.014 4*	0.011 5	0.015 5*	0.033 6**	-	0.006 3*
CSZ	0.018 9*	0.028 5**	0.017 3*	0.018 7**	0.005 8	0.020 4	-

注: 对角线之上为微卫星标记结果, 对角线之下为线粒体标记结果; \*表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\*表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ); Notes: mitochondrial marking results below the diagonal, microsatellite marking results above the diagonal; \* indicates a significant difference ( $P < 0.05$ ), \*\* indicates a very significant difference ( $P < 0.01$ )

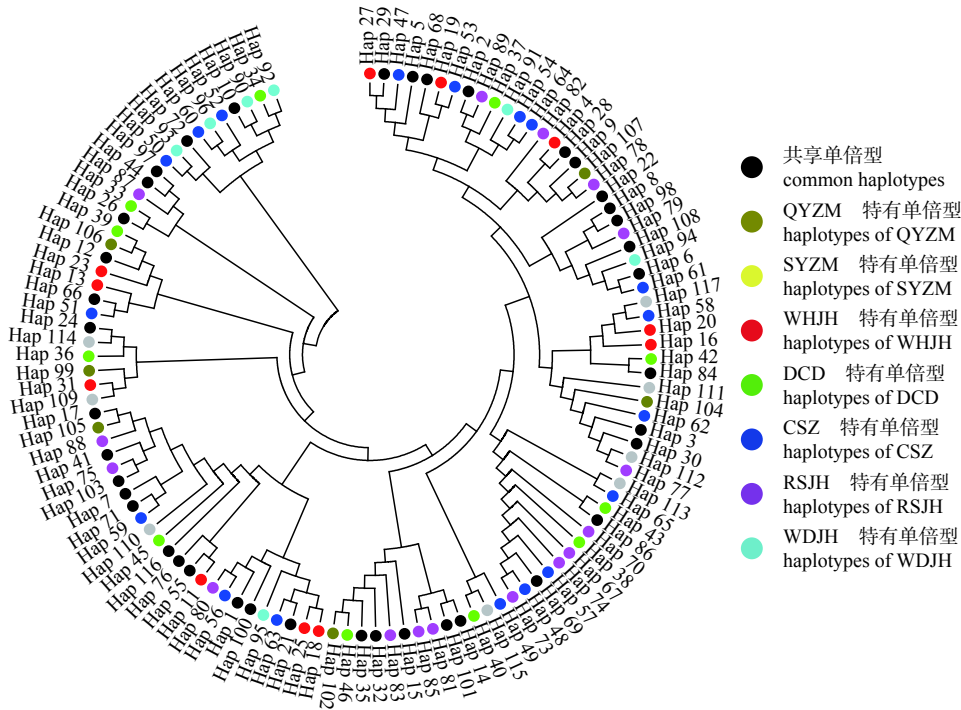


图 2 基于大泷六线鱼线粒体控制区单倍型构建的 NJ 系统树

Fig. 2 Neighbor-Joining tree constructed by D-loop haplotypes of *H. otakii*

群体特有单倍型分别为 20 种和 66 种，分别占总单倍型数的 17.09% 和 56.41%，放流群体特有单倍型数明显低于野生群体 (图 2)。

2.2 微卫星标记结果

本研究中 4 对高度多态性的微卫星引物在 7 个群体扩增结果显示，放流群体、野生群体中  $N_a$  值分别为 13~44、13~27， $N_e$  值分别为 5.429 4~23.894 4、4.454 7~19.968 8， $H_o$  分别介于 0.442 9~0.871 4、0.421 1~0.935 5 之间， $H_e$  分别为 0.821 7~0.966 5、0.787 1~0.967 5，平均 PIC 分别为 0.885 6、0.874 0，表明放流和野生群体均具有较高的遗传多态性且不存在显著差异；各群体中，SYZM 的遗传多样性最高 (0.895 6)，WDJH 的遗传多样性最低 (0.854 2)，放流群体和野生群体遗传多样性指数相差较小。Hardy-Weinberg 平衡检验结果显示，7 个群体均表现极显著遗传不平衡的微卫星位点占全部微卫星位点的 21.4%。两两群体间的  $F_{st}$  介于 -0.001 0~0.013 4 之间 (表 4)，遗传分化水平较低 (表 5)。

运用 STRUCTURE v. 2.2 软件<sup>[25]</sup>，基于混合模型下假设等位基因频度不存在相关性，对大泷六线鱼进行群体遗传结构的贝叶斯聚类运算。参数

设置运算程序，根据在线 STRUCTURE HARVESTER 给出的曲线图结果 (图 3)，判定总体样本的自由交配组数为  $K=2$ ，即 4 个微卫星位点的个体分配模式存在 2 个自由组群 (图 4)。Structure 条形图横坐标表示 7 个群体的 413 个个体的大泷六线鱼，纵坐标表示该个体被分配到该组群的概率。群体遗传结构图显示，第一自由交配群中 WHJH、QYZM 群体分配率 >65%；第二自由交配群中 CSZ、SYZM 群体分配率 >65%；其余所有个体几乎被平分到 2 个组群。

3 讨论

放流群体对于野生群体遗传多样性产生的影响一直是国内外相关学者探讨的热点，Duong TY 等<sup>[26]</sup>通过 6 个微卫星标记对斑点胡鲷 (*Clarias macrocephalus*) 的分析发现，养殖群体同野生群体相比，遗传多样性呈现下降趋势；沈朕等<sup>[27]</sup>通过 *Cyt b* 和 *D-Loop* 片段对我国近海大泷六线鱼的分析显示，3 个野生群体遗传多样性明显高于养殖群体；蔡珊珊<sup>[28]</sup>基于线粒体控制区序列发现，自然环境中三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 遗传多样性明显高于养殖家系。放流群体遗传多样性高低与放流后该物种的成活率有密

表 5 大泷六线鱼 7 个群体的遗传多样性参数

Tab. 5 Genetic diversity indices for 7 populations of *H. otakii*

不同群体 populations	参数 parameter	位点 locus				平均值 average
		Heot42	HEDE_E4	P5-6	P3-21	
WHJH	$N_a$	13	27	18	16	18.500 0
	$N_e$	6.147 6	17.467 7	6.692 1	8.132 7	9.610 0
	$H_o$	0.754 4	0.421 1	0.894 7	0.912 3	0.745 6
	$H_e$	0.844 7	0.952 6	0.858 1	0.884 8	0.885 1
	PIC	0.822 5	0.941 5	0.836 0	0.865 2	0.866 3
	$P$ -value	0.090 5	0**	0.544 8	0.220 3	-
SYZM	$N_a$	14	44	22	19	24.750 0
	$N_e$	7.066 0	23.894 4	11.047 4	8.796 2	12.701 0
	$H_o$	0.831 5	0.550 6	0.809 0	0.820 2	0.752 8
	$H_e$	0.863 3	0.966 5	0.914 6	0.891 3	0.908 9
	PIC	0.843 6	0.959 7	0.902 5	0.876 6	0.895 6
	$P$ -value	0.226 1	0.086 4	0.059 8	0.493 3	-
QYZM	$N_a$	13	29	24	15	25.250 0
	$N_e$	5.429 4	18.955 5	8.019 6	7.153 3	9.889 5
	$H_o$	0.757 1	0.442 9	0.871 4	0.871 4	0.735 7
	$H_e$	0.821 7	0.955 0	0.881 6	0.866 4	0.881 2
	PIC	0.798 9	0.955 0	0.881 6	0.866 4	0.875 5
	$P$ -value	0.003 2*	0**	0.055 8	0.057 6	-
RSJH	$N_a$	16	26	27	22	22.750 0
	$N_e$	5.437 1	19.968 8	15.818 9	11.289 3	13.128 5
	$H_o$	0.919 4	0.887 1	0.806 5	0.935 5	0.887 1
	$H_e$	0.822 7	0.957 6	0.944 4	0.918 8	0.910 9
	PIC	0.795 2	0.947 6	0.933 3	0.905 0	0.895 3
	$P$ -value	1.000 0	0.012 3*	0.239 8	0.378 1	-
WDJH	$N_a$	13	21	19	11	16.000 0
	$N_e$	4.454 7	14.097 6	8.858 2	7.706 7	8.779 36
	$H_o$	0.735 3	0.500 0	0.852 9	0.852 9	0.735 3
	$H_e$	0.787 1	0.942 9	0.900 4	0.883 2	0.878 4
	PIC	0.758 6	0.924 6	0.877 3	0.856 4	0.854 2
	$P$ -value	0.591 3	0**	0.300 7	0.469 8	-
DCD	$N_a$	13	27	20	18	19.500 0
	$N_e$	5.103 0	16.941 2	9.070 9	9.640 2	10.188 8
	$H_o$	0.812 5	0.708 3	0.791 7	0.875 0	0.796 9
	$H_e$	0.812 5	0.967 5	0.899 1	0.905 7	0.896 2
	PIC	0.786 1	0.955 8	0.881 2	0.887 8	0.877 7
	$P$ -value	0.000 9**	0**	0.081 6	0.203 1	-

· 续表 5 ·

不同群体 populations	参数 parameter	位点 locus				平均值 average
		Heot42	HEDE_E4	P5-6	P3-21	
CSZ	$N_a$	16	26	18	21	20.250 0
	$N_e$	5.654 0	14.135 0	9.783 4	8.272 9	9.461 3
	$H_o$	0.708 3	0.770 8	0.770 8	0.812 5	0.765 6
	$H_e$	0.831 8	0.949 3	0.907 2	0.888 4	0.894 2
	PIC	0.809 9	0.936 4	0.889 3	0.869 1	0.876 2
	$P$ -value	0**	0.013 2*	0.096 2	0.191 9	-
平均 average	$N_a$	27	63	33	35	39.500 0
	$H_o$	0.797 0	0.605 0	0.828 0	0.868 0	0.774 5
	$H_e$	0.838 0	0.964 0	0.913 0	0.893 0	0.902 0
	PIC	0.822 0	0.961 0	0.906 0	0.883 0	0.893 0
	$P$ -value	0.003 9**	0.006 8**	0**	0.208 2	-

注：\*表示显著偏离Hardy-Weinberg平衡( $P<0.05$ ), \*\*表示极显著偏离Hardy-Weinberg平衡( $P<0.01$ )

Notes: \*. indicates a significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ( $P<0.05$ ), \*\*. indicates very significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ( $P<0.01$ )

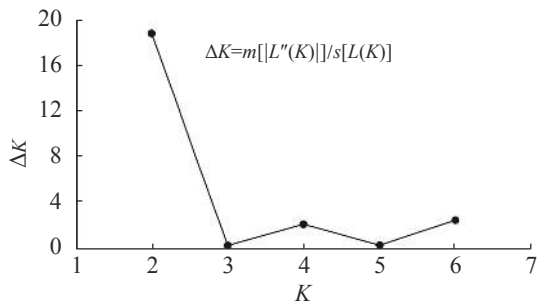


图 3 不同 K 值与  $\Delta K$  之间的关系

Fig. 3 Relationship between different K-value and  $\Delta K$  value

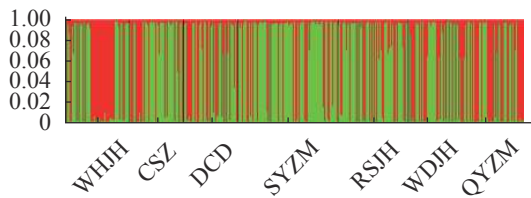


图 4  $K=2$  时 7 个大泷六线鱼群体遗传结构图

Fig. 4 Cluster analysis for *H. otakii* from STRUCTURE( $K=2$ )

切联系，遗传多样性指数越高，放流苗种越易于适应复杂的海洋环境。相对而言，遗传多样性较低则不利于适应新环境，并且存在降低野生群体遗传多样性水平的风险<sup>[29]</sup>。

基于线粒体控制区高变区部分序列对大泷

六线鱼放流群体和野生群体比较分析的结果显示，2018年7月放流的群体(SYZM、QYZM)单倍型多样性指数、核苷酸多样性指数以及两两序列比较的平均碱基差异数等指数与野生群体(WHJH、RSJH、DCD、CSZ)之间未产生明显差异，遗传多样性指数均较高。沈朕等<sup>[27]</sup>通过线粒体控制区片段发现即墨地区养殖群体的单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数分别为0.657 0、0.003 5，均小于本研究中放流群体的单倍型多样性和核苷酸多样性指数，本研究中大泷六线鱼放流群体的亲本主要来源于大连市长海县近海自然海域及荣成近海，亲本数量较多且不同区域亲本的混合交配使放流群体拥有较丰富的遗传信息，较高的遗传多样性指数表明所选用放流群体适合于增殖放流活动的进行，但是Hindar等<sup>[30]</sup>、Krueger等<sup>[31]</sup>认为，当直接从放流海域采集的野生群体作为增殖放流亲本时，更有利于放流群体与野生群体遗传信息的一致性，同时避免使用异地亲本带来的遗传风险，本研究中亲鱼部分使用外地亲鱼，在保证高遗传多样性的前提下需加强对放流海域群体的遗传风险评估。

基于微卫星标记对413个个体的遗传多样性结果显示，4个微卫星位点的平均多态信息含量范围为0.854 2~0.895 6，均显示较高的多态性，

其中 Heot 42 与武世雄等<sup>[32]</sup> 利用 7 对微卫星引物探究 6 个大泷六线鱼群体遗传多样性中结果一致, 表现出相对较低的多态性。Nei 等<sup>[33]</sup> 研究表明,  $H_o$  越接近于  $H_e$  值, 该群体受种内近交、自然选择等因素影响越小, 因此该种群处于相对遗传平衡状态。本研究中 7 个群体的平均  $H_o$  稍小于各自的平均  $H_e$ , 表明这 7 个大泷六线鱼群体处于相对遗传平衡状态, 而武世雄等<sup>[32]</sup> 对大连、丹东、青岛等大泷六线鱼群体遗传多样性的研究表明, 该 6 个群体处于遗传不平衡状态, 可能由于不同地理位置导致群体间基因交流减少; 7 个群体的平均  $N_a$  远大于各自对应的  $N_e$ , 可能为近海礁区环境的恶化、人类大规模的捕捞活动以及旅游业的发展, 破坏鱼类生活环境, 进一步导致有效种群缩小及有效等位基因丢失。同时该研究结果显示, 大泷六线鱼放流群体在暂养过程中, 期望杂合度、观测杂合度及平均有效等位基因数明显降低(表 4), 可能与苗种体积增大, 养殖密度升高等有关, 但整体遗传多样性较高, 相较于野生群体, 遗传多样性指数未出现大幅变化, 与线粒体标记结果一致。

$F_{st}$  用于衡量种群分化程度, 其指数越大, 表明各群体间的遗传差异越大<sup>[34]</sup>。本研究中, 基于 2 种分子标记的  $F_{st}$  分别为 -0.004 2~0.033 6(线粒体标记)、-0.001 01~0.013 36(微卫星标记), 均小于 0.05, 表明 7 个群体间遗传分化水平较低, 同时 STRUCTURE 判别图也表明 7 个群体间未发生明显的组群分别, 李莹等<sup>[35]</sup> 对辽宁沿海及青岛大泷六线鱼群体的遗传多样性分析结果则显示, 6 个野生群体之间存在较大的遗传分化, 并认为发生遗传分化的主要原因是遗传漂变。因此, 结合本研究中遗传多样性和遗传结构, 我们发现, 放流群体和野生群体遗传多样性指数差异较小, 两两群体间遗传分化微弱, 可能由于近年来持续的增殖放流活动使大泷六线鱼资源量得到补充与修复的同时, 也造成了大泷六线鱼种质遗传多样性水平的下降和种质退化。本研究对后续开展大泷六线鱼种质资源保护、增殖放流活动及遗传风险评估具有积极意义。

#### 4 小结

近年来为增加我国近海大泷六线鱼资源量, 每年都有大量的大泷六线鱼苗种在山东近

海进行放流。本研究中主要总结如下, ①在选择亲鱼进行繁殖时, 应尽量选取自然海域内捕捞获取的种质优良野生个体, 亲鱼的数量应达到一定的规模, 丰富的遗传信息是鱼类增殖和育种的基础<sup>[31]</sup>, 以期其繁育的苗种涵盖更多遗传信息, 且提高放流后在自然海域内的成活率; ②结合本研究中放流群体和野生群体遗传多样性较高且遗传差异较小的情况, 需进一步加强亲鱼对放流苗种的贡献率, 放流苗种在自然海域内的成活率的研究以及在增殖放流过程中使用异地亲本可能存在的遗传风险评估等, 以期为大泷六线鱼种质资源保护、增殖放流以及资源的可持续利用提供理论基础。

#### 参考文献 (References):

- [1] 成庆泰, 张孝威, 徐恭昭, 等. 中国经济动物志—海产鱼类 [M]. 北京: 科学出版社, 1962: 135-137.  
Cheng Q T, Zhang X W, Xu G Z, et al. Economic animals of China (Marine Fisheries)[M]. Beijing: Science Press, 1962: 135-137 (in Chinese).
- [2] 黄宗国. 中国海洋生物种类与分布 [M]. 北京: 海洋出版社, 1994: 741.  
Huang Z G. Marine Species and Their Distributions in China's Seas[M]. Beijing: China Ocean Press, 1994: 741 (in Chinese).
- [3] 金鑫波. 中国动物志—硬骨鱼纲, 鲷形目 [M]. 北京: 科学出版社, 2006: 550-561.  
Jin X B. Fauna Sinica: Ostichthyces, Scorpaeniformes [M]. Beijing: Science Press, 2006: 550-561 (in Chinese).
- [4] 冯昭信, 韩华. 大泷六线鱼资源合理利用的研究[J]. 大连海洋大学学报, 1998, 13(2): 24-28.  
Feng Z X, Han H. Rational utilization of *Hexagrammos otakii* resources[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 1998, 13(2): 24-28(in Chinese).
- [5] 吴立新, 秦克静, 姜志强, 等. 大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)人工育苗初步试验[J]. 海洋科学, 1996, 20(4): 32-34.  
Wu L X, Qin K J, Jiang Z Q, et al. Preliminary experiment on the artificial breeding of the fat greenling *Hexagrammos otakii*[J]. Marine Sciences, 1996, 20(4): 32-34(in Chinese).
- [6] 潘雷, 胡发文, 高凤祥, 等. 大泷六线鱼人工繁殖及育苗技术初步研究[J]. 海洋科学, 2012, 36(12): 39-44.



- Pan L, Hu F W, Gao F X, *et al.* Study of artificial breeding and seedling culture technique for greenling *Hexagrammos otakii*[J]. *Marine Sciences*, 2012, 36(12): 39-44(in Chinese).
- [7] 胡发文, 张少春, 王雪, 等. 大泷六线鱼全人工繁育技术研究[J]. *海洋科学*, 2016, 40(3): 71-76.
- Hu F W, Zhang S C, Wang X, *et al.* An artificial breeding technique for the fat greenling *Hexagrammos otakii*[J]. *Marine Sciences*, 2016, 40(3): 71-76(in Chinese).
- [8] 胡发文, 郭文, 潘雷, 等. 大泷六线鱼仔稚幼鱼形态发育与生长特性[J]. *渔业科学进展*, 2012, 33(6): 16-22.
- Hu F W, Guo W, Pan L, *et al.* Morphological development and growth of larval and juvenile *Hexagrammos otakii*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(6): 16-22(in Chinese).
- [9] 胡发文, 潘雷, 高凤祥, 等. 大泷六线鱼胚胎发育及其与水温的关系[J]. *渔业科学进展*, 2012, 33(1): 28-33.
- Hu F W, Pan L, Gao F X, *et al.* Embryonic development of *Hexagrammos otakii* and its relationship with incubation temperature[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(1): 28-33(in Chinese).
- [10] 菅玉霞, 潘雷, 胡发文, 等. 温度和盐度对大泷六线鱼仔鱼存活与生长的影响[J]. *渔业科学进展*, 2012, 33(5): 24-29.
- Jian Y X, Pan L, Hu F W, *et al.* The effects of temperature and salinity on survival and growth of larval *Hexagrammos otakii* Jordan et Starks[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(5): 24-29(in Chinese).
- [11] Sbisà E, Tanzariello F, Reyes A, *et al.* Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications[J]. *Gene*, 1997, 205(1-2): 125-140.
- [12] Chin E C L, Shu H, Smith J S C, *et al.* Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation[J]. *Genome*, 1996, 39(5): 866-873.
- [13] Gonzalez E B, Aritaki M, Sakurai S, *et al.* Inference of potential genetic risks associated with large-scale releases of Red Sea bream in Kanagawa prefecture, Japan based on nuclear and mitochondrial DNA analysis[J]. *Marine Biotechnology*, 2013, 15(2): 206-220.
- [14] 司飞, 孙朝徽, 于姗姗, 等. 秦皇岛近海增殖放流区牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)回捕群体的遗传多样性分析[J]. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 18-24.
- Si F, Sun Z H, Yu S S, *et al.* Analysis of the genetic variability of the captured population of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in the coastal releasing area of Qinhuangdao[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 18-24(in Chinese).
- [15] 季晓芬, 段辛斌, 刘绍平, 等. 基于微卫星评估草鱼放流亲本对野生群体遗传多样性的影响[J]. *水产学报*, 2018, 42(1): 10-17.
- Ji X F, Duan X B, Liu S P, *et al.* Genetic effect of released brood grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) on wild population in the Yangtze River inferred from microsatellite markers[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(1): 10-17(in Chinese).
- [16] 刘奇. 大泷六线鱼 (*Hexagrammos otakii*) 生物学特征与遗传多样性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- Liu Q. Studies of biology characteristics and genetic diversity on populations of *Hexagrammos otakii*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010 (in Chinese).
- [17] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [18] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis[J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, 1: 47-50.
- [19] Chen S L, Miao G D, Shao C W, *et al.* Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from fat greenling (*Hexagrammos otakii*)[J]. *Conservation Genetics*, 2009, 10: 1429.
- [20] Freiwald J, Stewart N L, Yates D C, *et al.* Isolation and characterization of nine polymorphic microsatellite loci of the kelp greenling, *Hexagrammos decagrammus*, a temperate reef fish[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9(2): 563-565.
- [21] Yeh F C, Yang R, Boyle T J, *et al.* PopGene32, Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis, version 1.32[Z]. Edmonton, Alberta, Canada: University of Alberta, 2000.
- [22] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumeni-

- cism[J]. *Journal of Heredity*, 1995, 86(3): 248-249.
- [23] Van Oosterhout C, Hutchinson W F, Wills D P M, *et al.* MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4(3): 535-538.
- [24] Goudet J. FSTAT Version 2.9. 3, A program to estimate and test gene diversities and fixation indices[Z]. University of Lausanne, Switzerland, 2001.
- [25] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data[J]. *Genetics*, 2000, 155(2): 945-959.
- [26] Duong T Y, Scribner K T. Regional variation in genetic diversity between wild and cultured populations of big-head catfish (*Clarias macrocephalus*) in the Mekong Delta[J]. *Fisheries Research*, 2018, 207: 118-125.
- [27] 沈朕, 关洪斌, 郑凤荣, 等. 基于 *cytb* 和 D-loop 的 4 个大泷六线鱼群体遗传多样性分析[J]. *海洋科学进展*, 2017, 35(4): 524-534.
- Shen Z, Guan H B, Zheng F R, *et al.* Analysis of genetic diversity between four populations of *Hexagrammos otakii* based on partial mtDNA *cytb* and D-loop[J]. *Advances in Marine Science*, 2017, 35(4): 524-534(in Chinese).
- [28] 蔡珊珊. 基于分子标记的三疣梭子蟹和中国对虾增殖放流效果研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- Cai S S. Evaluation of stock enhancement in *Portunus trituberculatus* and *Fenneropenaeus chinensis* based on molecular markers[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015 (in Chinese).
- [29] 杨爽, 宋娜, 张秀梅, 等. 基于线粒体控制区序列的三疣梭子蟹增殖放流亲蟹遗传多样性研究[J]. *水产学报*, 2014, 38(8): 1089-1096.
- Yang S, Song N, Zhang X M, *et al.* Genetic diversity of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) from four broodstock populations in stock enhancement inferred from mitochondrial control region[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(8): 1089-1096(in Chinese).
- [30] Hindar K, Ryman N, Utter F. Genetic effects of cultured fish on natural fish populations[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1991, 48(5): 945-957.
- [31] Krueger C C, Gharrett, A J, Dehring T R, *et al.* Genetic aspects of fisheries rehabilitation programs[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1981, 38(12): 1877-1881.
- [32] 武世雄, 姜欣彤, 王伟, 等. 大泷六线鱼 6 个群体遗传多样性的微卫星分析[J]. *中国渔业质量与标准*, 2018, 8(3): 52-60.
- Wu S X, Jiang X T, Wang W, *et al.* Genetic diversity among 6 populations of *Hexagrammos otakii* based on microsatellite analysis[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2018, 8(3): 52-60(in Chinese).
- [33] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations[J]. *Evolution*, 1975, 29(1): 1-10.
- [34] Wright S. *Evolution and the genetics of populations*. Vol. 4: variability within and among natural populations [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978.
- [35] 李莹, 王伟, 孟凡平, 等. 利用线粒体 DNA 控制区部分序列分析不同地理群体大泷六线鱼遗传多样性[J]. *海洋科学*, 2012, 36(8): 40-46.
- Li Y, Wang W, Meng F P, *et al.* Genetic diversity analysis between different stocks of *Hexagrammos otakii* based on analysis of mitochondrial DNA control region partial sequence[J]. *Marine Sciences*, 2012, 36(8): 40-46(in Chinese).

## Comparison of genetic diversity between the released population and the wild population of *Hexagrammos otakii*

GUO Ting<sup>1</sup>, SONG Na<sup>1</sup>, LIU Shude<sup>2</sup>, TU Zhong<sup>2</sup>,  
HU Fawen<sup>3</sup>, GAO Tianxiang<sup>4</sup>, CHEN Jian<sup>4\*</sup>

(1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266000, China;

2. Shandong Hydrobios Resources Conservation and Management Center, Yantai 264003, China;

3. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104, China;

4. Marine Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

**Abstract:** The fat greenling (*Hexagrammos otakii*) is one of the most important commercial fishes found along northern coast of China, with fast growth rate, high nutritional value and wide consumer acceptance. In recent years, large-scale proliferation and release activities have been held to restore its natural resources. In order to analyze the genetic diversity and genetic differences between releasing population and natural population of *H. otakii*, mitochondrial DNA control region and four microsatellite markers were selected for assessment. Mitochondrial DNA control region results showed that the length of the first hypervariable region was 436 bp, and 117 haplotypes were observed in 413 *H. otakii* individuals, among which only Hap\_3, Hap\_7, Hap\_17 were shared by different populations. Number of individuals in releasing population and wild population was 74 and 105, accounting for 46.54% and 41.34% respectively, and the nucleotide diversity in releasing population and wild population was 0.005 1-0.006 7, 0.005 8-0.007 5, while the haplotype diversity was 0.856 7-0.949 9 and 0.883 1-0.954 9, respectively. Both of them showed a high level of genetic diversity for releasing and wild populations. Microsatellite markers results showed that the average allele number ( $N_a$ ) was 13-44, 13-27, and the average polymorphism information content (PIC) was 0.885 6, 0.874 0, respectively, which indicated that genetic polymorphism of releasing and wild population was moderately high; results of population genetic structure analysis showed that the genetic differentiation between released population and wild population was smaller, i.e. at a lower genetic differentiation level. In summary, rich genetic diversity existed in both populations, and there was no significant population differentiation in genetic structure, which indicates that the proliferation and release activities have no obvious genetic diversity impact on the wild population.

**Key words:** *Hexagrammos otakii*; mitochondrial control region; microsatellite; genetic diversity; stock enhancement and hatchery release

**Corresponding author:** CHEN Jian. E-mail: 329297635@qq.com

**Funding projects:** “Evaluation and Follow-up Monitoring of Multiplication and Release of *Hexagrammos otakii*” by the Fishery and Fisheries Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs (YYJZHC201921301350021)