

A diagram illustrating the genetic breeding process in Largemouth Bass. It shows a flow from a large circular structure at the top left, through several smaller circles labeled 'AB', 'CD', and 'STI', leading to a final stage with four circles labeled 'AB', 'B', 'AB', and 'A'. The circles contain various patterns of dots and lines, representing genetic markers or traits.

*Research on Genetic Breeding  
in Largemouth Bass*

# 大口黑鲈遗传育种

白俊杰 李胜杰 等 著



海洋出版社

# 大口黑鲈遗传育种

白俊杰 李胜杰 等著

海洋出版社

2013年·北京

## 图书在版编目(CIP)数据

大口黑鲈遗传育种/白俊杰, 李胜杰等著.  
—北京:海洋出版社,2013. 10  
ISBN 978 - 7 - 5027 - 8633 - 5

I. ①大… II. ①白… ②李… III. ①鲈形目 - 遗传  
育种 IV. ①S965. 211. 2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 192540 号

责任编辑:方 菁

责任印制:赵麟苏

**海洋出版社 出版发行**

<http://www.oceanpress.com.cn>

北京市海淀区大慧寺路 8 号 邮编:100081

北京画中画印刷有限公司印刷 新华书店北京发行所经销

2013 年 10 月第 1 版 2013 年 10 月第 1 次印刷

开本:787 mm × 1092 mm 1/16 印张:23. 25

字数:580 千字 定价:80. 00 元

发行部:62132549 邮购部:68038093 总编室:62114335

海洋版图书印、装错误可随时退换

谨以此书献给中国水产科学研究院  
珠江水产研究所六十周年华诞

## 序

大口黑鲈是我国重要的淡水养殖经济鱼类之一,原产于北美淡水河流和湖泊,1983年从我国台湾引入大陆,因其外形美观、肉质鲜美、无肌间刺、生长速度快、适应性强、易起捕等诸多优点,在全国各地得到广泛推广养殖,深受人民群众欢迎。大口黑鲈养殖30年来,产业规模逐步扩大,已成为我国重要淡水养殖品种之一,但其种质质量和生产性能明显下降,因此系统地开展大口黑鲈遗传育种研究,不仅对其养殖性状改良和优良品种培育有着重要意义,也为其产业健康稳定发展提供技术支撑。

中国水产科学研究院珠江水产研究所是我国最早进行大口黑鲈繁育研究单位之一,多年来在病害防治、饲料及养殖技术等方面开展了卓有成效的研究,特别是该所白俊杰研究员及其研究团队全面而系统地开展了大口黑鲈种质资源、基础生物学、数量遗传学、选择育种、品种杂交及分子标记辅助育种研究,取得了显著的成绩,还培育出生长上有明显优势的新品种大口黑鲈“优鲈1号”,并通过了全国水产原种和良种审定委员会的审定,已在产业中推广,取得了良好的经济效益。专著《大口黑鲈的遗传育种》归纳与总结了他们在大口黑鲈遗传育种的理论研究与实践应用相结合中所取得的成果,是他们多年辛勤劳动的结晶。

当前,随着我国水产养殖规模的发展和扩大,养殖品种的种质质量退化和优良品种稀缺已成为制约水产养殖业进一步健康和持续发展的关键因素,必须重视与加强水产养殖良种的科技创新。该专著适时出版,不仅为大口黑鲈遗传改良及品种培育提供了理论基础和技术支撑,而且亦是其他重要养殖鱼类遗传育种研究和优良品种培育的良好借鉴。我们期望鱼类遗传育种工作者们对重要的养殖品种都能系统开展种质资源保护和遗传育种研究,培育出一批又一批优质、高产的新品种,进而创建我国水产养殖优良品种培育的新技术体系。

该专著以理论研究为先导,与实践应用紧密结合,注重技术方法的介绍和

数据结果的分析,是一本有实际应用价值的参考书,适合于实际从事水产遗传育种研究工作者们学习与参考,亦可供高等院校和中等院校生物学和农业、水产学科的水产遗传育种相关专业的本科生和研究生学习与参考。

中国工程院院士 中山大学教授

林浩然

# 前 言

大口黑鲈 (*Micropterus salmoides* (Lacépède)), 原产于北美洲, 属广温性鱼类, 在水温 2~34℃、盐度 0~15 时均可存活。从 20 世纪 70 年代开始大口黑鲈被引到世界其他地区作为游钓鱼种或水产养殖种类。20 世纪 70 年代末我国台湾从国外引进大口黑鲈, 并于 1983 年人工繁殖获得成功, 同年从台湾引入广东省。由于其适应性强、生长快、易起捕、养殖周期短等优点, 加之肉质鲜美细嫩, 无肌间刺, 外形美观, 深受养殖者和消费者的欢迎。经过近 30 年的发展, 大口黑鲈养殖形成产业规模, 已成为我国重要的淡水养殖品种之一。据统计, 目前全国大多数省、市、自治区都养殖大口黑鲈, 总年产量达 16 万至 20 万吨, 其中广东、江苏和浙江是大口黑鲈最主要的养殖区域。

目前我国养殖的大口黑鲈是由野生种家养驯化而成的, 缺少定向选育, 由于引进近 30 年来大多苗种场在种苗生产时未遵循科学的操作规范, 为追求经济利益及生产上的方便, 通常选择上年未达到规格上市的大口黑鲈留种, 再加上国内首次引进时的奠基群体数量偏小及未再补充引进种质资源等多种因素, 导致大口黑鲈种质质量明显下降, 主要表现在大口黑鲈生长速度下降、性成熟年龄提前、饵料转化效率低和抗逆性能下降等, 制约了我国大口黑鲈养殖业的健康稳定发展。因此, 系统地开展大口黑鲈遗传育种研究, 进行养殖性状改良和培育出优良品种对大口黑鲈养殖业有着重要的意义, 为其产业健康稳定发展提供技术支撑。

从 2004 年开始, 我们在国家科技基础条件平台项目、国家“十一五”科技支撑计划、广东省科技兴渔项目、广东省科技计划项目、农业部“948”项目、国家自然科学基金(30901102、31201985)以及农业部公益性行业科研专项等项目的资助下, 对大口黑鲈种质资源进行引进、收集和保存研究; 进行了大口黑鲈基础生物学和遗传学研究; 开展了快长优良品种的选育和杂交育种探索; 进行了大口黑鲈分子辅助育种的探索和实践。2010 年, 选育的大口黑鲈新品种“优鲈 1 号”通过了全国水产原种和良种审定委员会的审定, 并在广东、江苏、湖南等地进行

了大面积的推广,获得养殖户的普遍好评,取得良好的经济和社会效益。本书是在这些研究工作的基础上对大口黑鲈遗传育种的理论和实践进行总结,另外书末还附有“大口黑鲈‘优鲈1号’繁殖和制种技术规范”与“大口黑鲈‘优鲈1号’养殖技术规范”,一并奉献给广大读者。然而当今新的鱼类育种理论和技术不断呈现,特别是分子育种技术的介入,给育种工作者提供了新的机遇和挑战。由于我们的研究积累和水平有限,错漏在所难免,敬请广大读者批评指正。

全书共分十章,第一章介绍了大口黑鲈种质资源;第二章是大口黑鲈生长相关的数量遗传学;第三章和第四章分别介绍了大口黑鲈的选择育种和“优鲈1号”的品种培育;第五章是大口黑鲈亚种间的杂交育种研究;第六章是大口黑鲈分子标记辅助育种;第七章是大口黑鲈与生长性状相关的分子标记筛选;第八章、第九章和第十章分别是大口黑鲈生长轴、生肌决定因子(MRFs)家族和肌肉生长抑制素功能基因研究,目的是为下一步与生长相关的标记筛选和利用提供基础。参加本书的主要编著人员为:白俊杰、李胜杰、于凌云、樊佳佳、陈昆慈、何小燕、李镕、李小慧、蔡磊、韩林强、卢建峰、梁素娴、郭玉函、杜芳芳和张宁宁等,另外参与编写的人员还有叶星、马冬梅、简清、全迎春、劳海华、罗建仁等。

最后我们要感谢中国工程院院士、中山大学林浩然教授在百忙中为我们的书作序,感谢实验室黄灼明和刘海涌先生在本书的相关研究中对研究室实验的准备工作,对实验鱼的喂养、管理和测量所付出的辛勤劳动。

白俊杰 李胜杰

2013年3月

# 目 次

|                                          |      |
|------------------------------------------|------|
| 第一章 大口黑鲈的种质资源 .....                      | (1)  |
| 第一节 大口黑鲈的生物学特征 .....                     | (1)  |
| 第二节 大口黑鲈亚种的形态学特征 .....                   | (2)  |
| 第三节 大口黑鲈亚种的微卫星分子标记 .....                 | (4)  |
| 第四节 大口黑鲈亚种的线粒体 DNA 差异 .....              | (6)  |
| 第五节 大口黑鲈微卫星 DNA 指纹图谱 .....               | (9)  |
| 第六节 中国大口黑鲈养殖群体遗传结构的 RAPD 分析 .....        | (18) |
| 第七节 大口黑鲈养殖群体遗传多样性的微卫星分析 .....            | (21) |
| 第八节 大口黑鲈中国养殖群体与美国野生群体的遗传多样性比较 .....      | (27) |
| 第二章 大口黑鲈生长性状遗传和育种值估计 .....               | (35) |
| 第一节 鱼类数量性状的遗传 .....                      | (35) |
| 第二节 大口黑鲈早期生长规律 .....                     | (38) |
| 第三节 大口黑鲈不同家系早期形态性状 .....                 | (45) |
| 第四节 大口黑鲈形态性状对体重的影响 .....                 | (51) |
| 第五节 大口黑鲈生长性状的遗传参数 .....                  | (57) |
| 第六节 大口黑鲈生长性状的育种值估计 .....                 | (61) |
| 第三章 大口黑鲈的选择育种 .....                      | (69) |
| 第一节 鱼类育种的目标和方向 .....                     | (69) |
| 第二节 选择育种的原则与方法 .....                     | (71) |
| 第三节 大口黑鲈群体选育 .....                       | (75) |
| 第四节 大口黑鲈家系微卫星 DNA 标记的亲权鉴定 .....          | (78) |
| 第四章 大口黑鲈“优鲈 1 号”新品种培育 .....              | (89) |
| 第一节 大口黑鲈“优鲈 1 号”的选育 .....                | (89) |
| 第二节 大口黑鲈“优鲈 1 号”选育中遗传结构变化 .....          | (93) |
| 第三节 大口黑鲈“优鲈 1 号”选育群体遗传多样性的 AFLP 分析 ..... | (98) |

|     |                                               |       |
|-----|-----------------------------------------------|-------|
| 第四节 | 大口黑鲈“优鲈 1 号”选育群体肌肉营养成分和品质评价 .....             | (102) |
| 第五节 | 生长相关优势基因型在大口黑鲈“优鲈 1 号”的富集 .....               | (108) |
| 第五章 | 大口黑鲈亚种间的杂交 .....                              | (115) |
| 第一节 | 鱼类杂交育种 .....                                  | (115) |
| 第二节 | 大口黑鲈杂交研究进展 .....                              | (122) |
| 第三节 | 大口黑鲈北方亚种、佛罗里达亚种及其杂交子代的生长和形态差异 .....           | (123) |
| 第四节 | 大口黑鲈北方亚种、佛罗里达亚种及其杂交子代的耐低温和耗氧率 .....           | (131) |
| 第五节 | 大口黑鲈北方亚种、佛罗里达亚种及其正反交子代的遗传结构分析 .....           | (135) |
| 第六章 | 大口黑鲈分子标记 .....                                | (144) |
| 第一节 | 微卫星分子标记技术在水产动物遗传育种中的应用 .....                  | (144) |
| 第二节 | 单核苷酸多态性及其在水产动物遗传育种中的应用 .....                  | (146) |
| 第三节 | EST 技术的研究进展及在水产领域的应用 .....                    | (155) |
| 第四节 | 遗传连锁图谱及其在水产动物遗传育种中的应用 .....                   | (159) |
| 第五节 | 磁珠富集法制备大口黑鲈微卫星分子标记 .....                      | (165) |
| 第六节 | 大口黑鲈两个亚种 EST 数据库的构建与分析 .....                  | (169) |
| 第七节 | 大口黑鲈 AFLP 标记筛选与遗传连锁图谱的构建 .....                | (174) |
| 第八节 | 大口黑鲈分子标记辅助育种探讨 .....                          | (181) |
| 第七章 | 大口黑鲈与生长性状相关的分子标记 .....                        | (193) |
| 第一节 | 大口黑鲈生长性状相关的微卫星分子标记 .....                      | (193) |
| 第二节 | 大口黑鲈 <i>POU1F1</i> 启动子区域 SNPs 对生长的影响 .....    | (201) |
| 第三节 | 大口黑鲈肌肉生长抑制素基因 SNPs 的筛选及其与生长性状关联性分析 .....      | (206) |
| 第四节 | 大口黑鲈 <i>PSS III</i> 基因启动子区域 SNPs 对生长的影响 ..... | (211) |
| 第五节 | 大口黑鲈 <i>IGF-I</i> 基因启动子多态性与生长性状的相关性 .....     | (217) |
| 第六节 | 大口黑鲈 <i>IGF-II</i> 基因多态性与生长性状的相关性 .....       | (223) |
| 第七节 | 大口黑鲈“优鲈 1 号”选育世代优势基因型聚合分析 .....               | (228) |
| 第八节 | 大口黑鲈生长性状相关标记的聚合效果分析 .....                     | (230) |
| 第八章 | 大口黑鲈生长轴基因结构、功能和多态性 .....                      | (238) |
| 第一节 | GH-IGF 生长轴概述 .....                            | (238) |

|                                                                   |       |
|-------------------------------------------------------------------|-------|
| 第二节 大口黑鲈生长激素和胰岛素样生长因子 I cDNA 序列 .....                             | (240) |
| 第三节 大口黑鲈生长激素促分泌素 cDNA 结构和胚胎期表达谱 .....                             | (244) |
| 第四节 大口黑鲈 <i>IGF-I</i> 基因内含子 1、3 和 4 序列多态性 .....                   | (250) |
| 第五节 大口黑鲈 <i>IGF-I</i> 基因内含子 1 上 SNP G208A 的 CRS-PCR 检测方法<br>..... | (256) |
| 第六节 大口黑鲈 <i>GHRH</i> 启动子区域缺失突变对基因表达及生长的影响 .....                   | (260) |
| 第七节 大口黑鲈 <i>GHRH-LP</i> 和 <i>GHRH</i> 基因序列同源性、基因结构和时序表达<br>.....  | (265) |
| 第八节 禁食对大口黑鲈 <i>PACAP/GHRH-LP</i> 基因表达的影响 .....                    | (273) |
| 第九章 大口黑鲈生肌决定因子(MRFs)家族功能基因的研究 .....                               | (285) |
| 第一节 生肌决定因子概述 .....                                                | (285) |
| 第二节 大口黑鲈 <i>Myf5</i> 基因 cDNA 和基因组序列的克隆与分析 .....                   | (286) |
| 第三节 大口黑鲈 <i>MyoD</i> cDNA 的克隆和序列分析 .....                          | (294) |
| 第四节 大口黑鲈 <i>Myf5</i> 基因表达对肌肉生长的影响 .....                           | (299) |
| 第五节 大口黑鲈 <i>MyoD</i> 基因单核苷酸多态性位点的筛选 .....                         | (304) |
| 第十章 大口黑鲈肌肉生长抑制素基因的研究 .....                                        | (314) |
| 第一节 肌肉生长抑制素概述 .....                                               | (314) |
| 第二节 大口黑鲈肌肉生长抑制素 cDNA 的克隆和序列分析 .....                               | (317) |
| 第三节 大口黑鲈卵泡抑素 cDNA 的克隆、分析和原核表达 .....                               | (323) |
| 第四节 大口黑鲈 <i>Myostatin</i> 基因结构和启动子的序列分析 .....                     | (329) |
| 第五节 大口黑鲈肌肉生长抑制素多克隆抗体的制备及其对仔鱼生长影响的初步研究<br>.....                    | (335) |
| 第六节 大口黑鲈肌肉生长抑制素前肽真核表达载体的构建及其在鱼体中的表达<br>.....                      | (340) |
| 附件 1:大口黑鲈“优鲈 1 号”繁殖和制种技术规范 .....                                  | (350) |
| 附件 2:大口黑鲈“优鲈 1 号”养殖技术规范 .....                                     | (353) |

# 第一章 大口黑鲈的种质资源

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*(Lacépède)),俗名加州鲈,属鲈形目(Perciformes),太阳鱼科(Centrarchidae),黑鲈属(*Micropterus*),原产于北美的淡水湖泊与河流。在原产地大口黑鲈由两个亚种组成(Bailey et al, 1949),分布在美国佛罗里达半岛的大口黑鲈佛罗里达州亚种(Maceina et al, 1992)(*M. salmoides floridanus*)和分布遍及美国中部及东部地区、墨西哥东北部地区以及加拿大东南部地区的大口黑鲈北方亚种(*M. salmoides salmoides*)。20 世纪 70 年代末我国台湾从国外引进大口黑鲈,并于 1983 年人工繁殖获得成功,同年从台湾引入广东省。由于其适应性强、生长快、易起捕、养殖周期短等优点,加之肉质鲜美细嫩,无肌间刺,外形美观,深受养殖者和消费者欢迎。现已推广到全国各地,已成为我国重要的淡水养殖种类之一。经鉴定,当年引进的品种以及我国目前养殖的大口黑鲈属于北方亚种。在本书中如果没有特指的话,所说的大口黑鲈指的是北方亚种。

## 第一节 大口黑鲈的生物学特征

### 一、外部形态

大口黑鲈身体呈纺锤形,侧扁,背肉稍厚,横切面为椭圆形。口裂大,斜裂,颌能伸缩。牙齿为绒毛细齿,比较锐利。身体背部为青灰色,腹部灰白色。从吻端至尾鳍基部有排列成带状的黑斑。鳃盖上有 3 条呈放射状的黑斑。体被细小栉鳞。背鳍硬棘部和软条部间有一小缺刻,不完全连续;侧线不达尾鳍基部。第一鳃弓外鳃耙发达,骨质化,形状似禾镰,除鳃耙背面外,其余三面均布满倒锯齿状骨质化突起,第五鳃弓骨退化成短棒状,无鳃丝和鳃耙。体被细小栉鳞。背部为青绿橄榄色,腹部黄白色。尾鳍浅凹形。

### 二、可数性状

背鳍鳍式:D. IX, 1-13~15,臀鳍鳍式:A. III-9,胸鳍 1-12~13,腹鳍 1-15;侧线鳞 62~63,侧线上鳞 7~8,侧线下鳞 15;鳃耙数 6~7;脊椎骨数 26~32。

### 三、内部特征

鳔 1 室,长圆柱形;腹膜白色;肠粗短,2 盘曲,为体长的 0.54~0.73 倍。

### 四、生长特性

在北美自然水域内生长速度较快,记录最大个体体重达 10 kg,全长 970 mm。在我国华南地区当年可长到 500~750 g,在华东也可长到 250~500 g。通常 1~2 龄生长速度较快,3

龄生长速度开始减慢。性成熟年龄为 1 年以上,性腺 1 年成熟一次,且多次产卵,产卵季节为 2—7 月,卵子属性为黏性卵。

## 第二节 大口黑鲈亚种的形态学特征

大口黑鲈的两个亚种在形态、生理、生态等方面均有不同。Bailey 等(1949)研究表明:大口黑鲈两亚种在侧线鳞和肋骨数方面不同;生长性能方面多数研究认为北方亚种生长比佛罗里达亚种快,但 David 等(1979)和 Bottroff 等(1978)通过生长对比试验,却认为在相同生长环境条件下,佛罗里达亚种比北方亚种生长速度快;Fields 等(1987)试验证明北方亚种适应温度变化比佛罗里达亚种强。大口黑鲈被引种到中国以来,其养殖和销售已经被推广到全国各地,成为中国重要的淡水养殖品种之一。由于早期大口黑鲈在引进时没有亚种分类和引种原产地的记录,我国养殖大口黑鲈的亚种分类地位一直没确定。本书中,我们拟应用形态学方法鉴别我国养殖大口黑鲈的亚种分类地位,旨为以后大口黑鲈种质改良和良种引进提供依据。

### 一、材料与方法

#### 1. 材料

我国养殖大口黑鲈取自中国水产科学研究院珠江水产研究所良种基地,选择健康 8 月龄大口黑鲈 124 尾进行可量可数性状测量。

#### 2. 测量方法

采用传统测量方法(李思发等,1998),用电子秤、测量板和游标卡尺分别测量 124 尾大口黑鲈的体重、全长、体长(标准长)、体高、体宽、头长、吻长、眼径、眼间距(眼间隔宽)、尾柄长、尾柄高共 11 个可量性状。重量精确到 0.1 g,形态性状精确到 0.1 cm;另外随机选择 30 尾大口黑鲈,对其背鳍、臀鳍、胸鳍、腹鳍、侧线鳞、脊椎骨和肋骨等可数性状计数,体型指数按体长/体高、体长/头长、尾柄长/尾柄高的比值分析。

#### 3. 统计方法

运用 Excel 2007 和 SPSS 15.0 对试验数据进行处理分析。计算各指标的平均值、标准差、主要变化范围和标准误。

### 二、结果与分析

#### 1. 形态特征

大口黑鲈身体呈纺锤形,侧扁,头部中大。眼略小,上侧位。属上位口。上颌骨向后延伸超过眼后缘下方。侧线完全,略向上弯,由鳃盖上缘延伸至尾鳍基部。两背鳍以低的鳍膜相连接,背鳍高仅略大于尾柄高度,腹鳍胸位。尾鳍略小,两叶圆钝而后缘中央微凹。体色呈灰青色,背侧为深灰色,腹面灰白色,从尾端至尾鳍基部有排列成带状的黑斑。鳃耙为梳齿状。

## 2. 可数和可量性状

我国养殖大口黑鲈的可数和可量性状分别见表 1-1 和表 1-2。

表 1-1 我国养殖大口黑鲈的可数性状

| 性状   | 范围            | 平均值   | 标准差  | 主要变化范围<br>( $\bar{x} \pm SD$ ) | 标准误   |
|------|---------------|-------|------|--------------------------------|-------|
| 背鳍条  | IX - 13 ~ 15  | 14.20 | 0.63 | 14.2 $\pm$ 0.63                | 0.2   |
| 臀鳍条  | III - 10 ~ 12 | 11.00 | 0.67 | 11.0 $\pm$ 0.67                | 0.211 |
| 胸鳍条  | 12 ~ 13       | 12.30 | 0.48 | 12.3 $\pm$ 0.48                | 0.153 |
| 腹鳍条  | I - 4 ~ 5     | 4.70  | 0.48 | 4.70 $\pm$ 0.48                | 0.153 |
| 脊椎骨  | 26 ~ 32       | 30.40 | 2.46 | 30.40 $\pm$ 2.46               | 0.777 |
| 侧线鳞  | 58 ~ 68       | 61.66 | 2.64 | 61.66 $\pm$ 2.64               | 0.489 |
| 侧线上鳞 | 6 ~ 9         | 7.83  | 0.60 | 7.83 $\pm$ 0.60                | 0.112 |
| 侧线下鳞 | 12 ~ 17       | 15.69 | 1.04 | 15.69 $\pm$ 1.04               | 0.193 |
| 鳃耙   | 2 + 6         |       |      |                                |       |
| 肋骨   | 15 对          |       |      |                                |       |

表 1-2 我国养殖大口黑鲈的可量性状

| 性状      | 范围            | 平均值    | 标准差    | 主要变化范围              | 标准误   |
|---------|---------------|--------|--------|---------------------|-------|
| 体重/g    | 103.5 ~ 967.5 | 468.27 | 194.54 | 468.27 $\pm$ 194.54 | 17.47 |
| 全长/cm   | 18.95 ~ 37.30 | 29.05  | 3.38   | 29.05 $\pm$ 3.38    | 0.30  |
| 体长/cm   | 16.30 ~ 33.13 | 25.50  | 3.13   | 25.50 $\pm$ 3.13    | 0.28  |
| 体高/cm   | 4.81 ~ 12.00  | 8.34   | 1.42   | 8.34 $\pm$ 1.42     | 0.13  |
| 头长/cm   | 5.35 ~ 29.00  | 8.35   | 2.11   | 8.35 $\pm$ 2.11     | 0.19  |
| 吻长/cm   | 0.97 ~ 2.17   | 1.46   | 0.23   | 1.46 $\pm$ 0.23     | 0.02  |
| 体宽/cm   | 2.5 ~ 6.0     | 4.38   | 0.76   | 4.38 $\pm$ 0.76     | 0.07  |
| 眼径/cm   | 0.90 ~ 1.80   | 1.18   | 0.13   | 1.18 $\pm$ 0.13     | 0.01  |
| 眼间距/cm  | 1.20 ~ 2.90   | 2.17   | 0.31   | 2.17 $\pm$ 0.31     | 0.03  |
| 尾长/cm   | 5.42 ~ 33.79  | 8.42   | 2.51   | 8.42 $\pm$ 2.51     | 0.23  |
| 尾柄长/cm  | 3.16 ~ 7.69   | 5.10   | 0.74   | 5.10 $\pm$ 0.74     | 0.07  |
| 尾柄高/cm  | 1.93 ~ 7.67   | 3.28   | 0.62   | 3.28 $\pm$ 0.62     | 0.06  |
| 体长/体高   | 2.57 ~ 3.48   | 3.08   | 0.18   | 3.08 $\pm$ 0.18     | 0.02  |
| 体长/头长   | 0.88 ~ 3.75   | 3.10   | 0.23   | 3.10 $\pm$ 0.23     | 0.02  |
| 尾柄长/尾柄高 | 0.62 ~ 2.86   | 1.58   | 0.21   | 1.58 $\pm$ 0.21     | 0.02  |

从表 1-1 可以看出,我国养殖大口黑鲈的鳍式为 D IX - 13 ~ 15, A III - 10 ~ 12, V I - 4 ~ 5, P 12 ~ 13; 鳞式(58 - 68) [(6 - 9)/(12 - 17)]; 鳃耙 2 + 6; 脊椎骨 26 ~ 32 枚, 肋骨 15 对; 侧线鳞数 58 - 68 片。从表 1-2 可以看出,选取的大口黑鲈体重为(468.27  $\pm$  194.54)g, 全长(29.05  $\pm$  3.38)cm。体长/体高的变化范围 3.08  $\pm$  0.18; 体长/头长的变化范围 3.10  $\pm$  0.23; 尾柄长/尾柄高的变化范围 1.58  $\pm$  0.21。这与张韵桐(1994)和李仲辉等(2001)对我

国养殖大口黑鲈形态性状研究结果相一致,说明我国养殖大口黑鲈的可量可数性状比较稳定。

本试验得到我国养殖大口黑鲈的背鳍式是  $DIX-13 \sim 15$ , 脊椎骨范围是  $26-32$  枚,这与 Ramsey (1975) 报道大口黑鲈的背鳍式  $DIX-12 \sim 13$ , 脊椎骨数是  $30-32$  枚有少许差异,但与国内学者报道的大口黑鲈的背鳍式  $DIX-13 \sim 15$  和脊椎骨数  $29-30$  枚基本一致。大口黑鲈两个亚种的胸、腹、臀鳍条数和侧线上下鳞数目之间没有差别,国内外学者所得研究结果与本试验基本一致。

Bailey 等 (Bailey et al, 1949; Bryan et al, 1969) 根据数量性状的差异把大口黑鲈分为大口黑鲈北方亚种和大口黑鲈佛罗里达亚种,在形态学上两亚种主要存在两个方面差异:侧线鳞数目和肋骨数。大口黑鲈北方亚种和佛罗里达亚种的侧线鳞数目分别为  $59 \sim 65$  片与  $69 \sim 73$  片,肋骨数分别为 15 对和 14 对。本试验得到我国养殖大口黑鲈的侧线鳞数变化范围是  $59 \sim 64$  片,可以看出,我国养殖的大口黑鲈的侧线鳞数与大口黑鲈北方亚种的侧线鳞数一致。本试验测得的我国养殖大口黑鲈的肋骨数为 15 对,亦与大口黑鲈北方亚种相符。因此初步分析表明我国养殖大口黑鲈应属于大口黑鲈北方亚种。

### 第三节 大口黑鲈亚种的微卫星分子标记

20 世纪 70 年代,大口黑鲈被广泛引种到世界各地,造成大口黑鲈亚种地理隔离被打破,并且因为种质引进和管理不规范,现在很多水体出现大口黑鲈“中间种”(大口黑鲈佛罗里达亚种  $\times$  大口黑鲈北方亚种),而“中间种”的外部形态介于两亚种之间,因此仅从外部形态对大口黑鲈的亚种来源进行鉴定存在一定困难 (Rogers et al, 1992)。近来人们开始应用分子生物学技术鉴定两亚种:Nedbal 等 (1994) 应用 RFLP 技术研究发现两亚种的大口黑鲈的线粒体 DNA 扩增条带有差别;Williams 等 (1998) 运用 RAPD 对两亚种进行鉴定,并能区分出两亚种杂交产生的“中间种”;Philipp 等 (1983) 找出两亚种的同工酶特异位点;Lutz-Carrillo 等 (2006) 用微卫星技术鉴定两亚种,并找到鉴别两亚种的特异性微卫星引物。我们应用微卫星分子标记方法鉴别我国养殖大口黑鲈的亚种分类地位,为其分类地位的进一步确定提供依据。

#### 一、材料与方 法

##### 1. 材料

我国养殖大口黑鲈取自中国水产科学研究院珠江水产研究所良种基地,选择健康 8 月龄大口黑鲈 124 尾作为实验材料,尾静脉活体取血保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  备用。用于微卫星标记分析的美国原产地大口黑鲈鳍条样品 24 份由美国 Texas Parks & Wildlife Department, A. E. Wood 实验室 Djar J. Lutz-Carrillo 博士赠送,其中 14 份为大口黑鲈北方亚种,10 份为大口黑鲈佛罗里达亚种。

##### 2. 试剂

基因组 DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 和 OMEGA 生物技术公司;微卫星引物由上海

英俊生物工程有限公司合成; *Taq* DNA 聚合酶体系购自上海申能博彩生物科技有限公司; SSR DNA Marker II 购自北京鼎国生物技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

3. 基因组 DNA 的提取

我国养殖大口黑鲈采用 ACD 抗凝剂固定的血液按天根离心柱型基因组 DNA 提取试剂盒介绍的方法提取样品基因组 DNA,美国原产地大口黑鲈鳍条样品按 OMEGA 离心柱型基因组 DNA 提取试剂盒介绍的方法提取样品基因组 DNA。0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 质量和浓度,并保存于 -20℃ 备用。

4. 引物的选择和 PCR 扩增

选择能够鉴别大口黑鲈北方亚种和佛罗里达亚种的特异性微卫星引物 Mdo6 和 Msal21 (Malloy et al,2000;Lutz-Carrillo et al,2006)对我国养殖大口黑鲈的亚种进行鉴定。PCR 反应总体积为 20 μL,包括: 10 × buffer 2.0 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 0.8 μL; 4 × dNTP (10 μmol/L)0.3 μL;上下游引物(20 μmol/L)各 0.5 μL;基因组 40 ng;聚合酶 1 U;加适量的 ddH<sub>2</sub>O 定容体积。反应在 PTC-200 扩增仪上经过 94℃ 预变性 4 min 后,进行 25 个循环,每个循环包括 94℃ 30 s、退火 (Mdo6 55℃、Msal21 48℃) 30 s、72℃ 延伸 30 s,最后 72℃ 延伸 7 min。采用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 PCR 扩增产物,银染显色,最后用扫描仪记录电泳图谱。两对微卫星引物序列见表 1-3。

表 1-3 大口黑鲈特异性微卫星分子标记及其引物

| 引物     | 引物序列(5'—3')              | 扩增条带大小/bp |           |          |
|--------|--------------------------|-----------|-----------|----------|
|        |                          | 原产地北方亚种   | 原产地佛罗里达亚种 | 我国养殖大口黑鲈 |
| Mdo6   | F: TGAATGTACGCCAGAGCAG   | 146/151   | 153/153   | 146/151  |
|        | R: TGTGTGGGTGTTTATGTGGG  |           |           |          |
| Msal21 | F: CACTGTAAATGGCACCTGTGG | 196/196   | 205/210   | 196/196  |
|        | R: GTTGTCAGCTCGTACTCCGC  |           |           |          |

注: F 为上游引物, R 为下游引物。

二、结果与分析

用大口黑鲈亚种的特异性引物 Mdo6 和 Msal21 分别对我国养殖大口黑鲈、原产地北方亚种和佛罗里达亚种进行 PCR 扩增,扩增结果见表 1-3。表 1-3 显示我国养殖大口黑鲈扩增条带与原产地大口黑鲈北方亚种的扩增条带相同,文献报道 Mdo6 在佛罗里达亚种、Msal21 在北方亚种中均能扩增出特异的单条带 (Mdo6 在佛罗里达亚种扩出 153 bp 特异条带, Msal21 在北方亚种扩出 196 bp 特异条带)。本实验中显示 Mdo6 在原产地佛罗里达亚种中扩出 153 bp 的特异条带,而 Msal21 在原产地北方亚种和我国养殖大口黑鲈中均扩出 196 bp 的特异条带。从电泳图谱(图 1-1 和图 1-2)可看出我国养殖大口黑鲈与原产地北方亚种的扩增条带均相同。

据 Rogers 等(2006)报道,在佛罗里达北部和部分引种地存在大口黑鲈的“中间种”。因“中间种”的外部形态均介于两亚种之间,故仅从形态学方面对我国养殖的大口黑鲈亚种

C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C12 M N1 N2 N3 N4 N5 N6 N7 N8 N9 N10 N11 N12 N13 N14 M S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9 S10

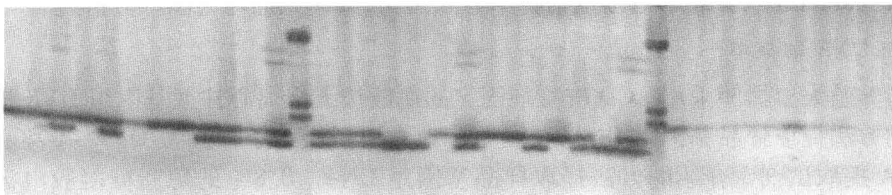


图 1-1 引物 Mdo6 对 3 个群体的扩增图谱

注: M 为 DL2000 marker; C1 ~ C12 为我国养殖大口黑鲈; N1 ~ N14 为原产地北方亚种; S1 ~ S10 为原产地佛罗里达亚种。

C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C12 M N1 N2 N3 N4 N5 N6 N7 N8 N9 N10 N11 N12 N13 N14 M S1 S2 S3 S4

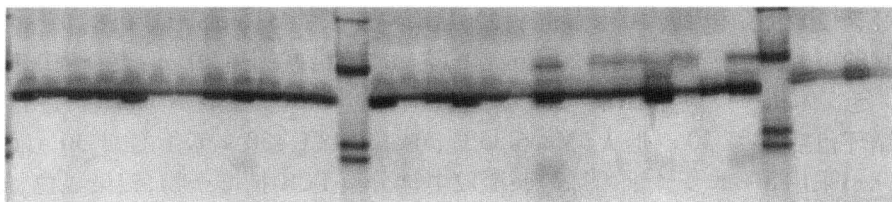


图 1-2 引物 Msal21 对 3 个群体的扩增图谱

注: M 为 DL2000 marker; C1 ~ C12 为我国养殖大口黑鲈; N1 ~ N14 为原产地北方亚种; S1 ~ S4 为原产地佛罗里达亚种。

分类地位进行鉴定还不充分。本试验同时应用大口黑鲈亚种的特异性微卫星引物(Mdo6、Msal21)进行鉴定。据文献报道这两个特异性微卫星标记均能有效鉴别大口黑鲈的亚种分类地位。试验结果表明,我国养殖大口黑鲈扩增条带与原产地大口黑鲈北方亚种的扩增条带相同,进一步证实了我国养殖大口黑鲈属于大口黑鲈北方亚种。

#### 第四节 大口黑鲈亚种的线粒体 DNA 差异

上面分别从形态学和微卫星方面鉴定了我国养殖大口黑鲈属于大口黑鲈北方亚种,本节通过测定国内大口黑鲈养殖群体和国外大口黑鲈北方亚种和佛罗里达亚种两个野生群体的线粒体 DNA D-loop 区序列,进行序列差异分析,进一步分析大口黑鲈两个亚种的分子差异。

##### 一、材料与方法

###### 1. 实验鱼采集

本研究使用的国内养殖的大口黑鲈(G)采自中国水产科学研究院珠江水产研究所良种基地,共 5 尾,美国原产地 18 尾大口黑鲈鳍条样品由美国 A. E. Wood 实验室提供,其中 11 尾为北方亚种(N),7 尾为佛罗里达亚种(F)。

###### 2. 大口黑鲈基因组 DNA 样品的制备

取上述 23 尾大口黑鲈尾鳍条各 30 mg 左右,按 OMEGA 离心柱型基因组 DNA 提取试