

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.19039

基于微卫星标记对长江江苏段鳊增殖放流效果评估

冯晓婷¹, 杨习文¹, 杨雪军¹, 刘熠¹, 周彦锋², 方弟安^{1,2}, 徐东坡^{1,2}

1. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部长江下游渔业资源环境科学观测实验站, 江苏 无锡 214081

摘要: 为评估长江江苏段鳊(*Aristichthys nobilis*)增殖放流效果, 本研究基于微卫星标记的亲缘鉴定技术, 选用 10 对扩增效果稳定的微卫星荧光标记引物, 结合毛细管电泳对江苏省内良种场 563 尾鳊亲鱼和长江江苏段 687 尾回捕鳊进行基因分型, 并对位点多态性及亲缘鉴定结果进行了分析。结果表明, 各位点等位基因介于 19~55 之间, 其观测杂合度为 0.530~0.909(平均值为 0.748), 期望杂合度为 0.818~0.929(平均值为 0.882), 多态性信息含量为 0.797~0.924(平均值为 0.871); Cervus3.0 模拟结果显示, 当双亲未知且置信度为 95%时, 10 个微卫星位点的累积非亲权排除率为 99.996%。亲缘鉴定结果发现, 所有回捕鳊中有 42 尾与亲本之间存在亲缘关系, 被确认来源于鳊增殖放流群体, 并由此推算此次评估亲本的放流子代对长江江苏段野生群体的贡献率为 6.11%。结果显示该研究进行的鳊亲缘鉴定技术可为长江鳊增殖放流效果评估工作提供可靠的数据支撑, 为长江渔业资源管理提供参考资料。

关键词: 鳊; 微卫星标记; 增殖放流评估; 长江江苏段

中图分类号: S93

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)06-1185-09

鳊(*Aristichthys nobilis*)又称花鲢, 隶属于鲤形目(Cypriniformes), 鲤科(Cyprinidae)。鳊具有十分重要的生态作用和科研价值, 广泛分布于我国大部分的淡水水域^[1-2]。长江江苏段位于长江下游, 是众多经济鱼类的生存场所。近年来因过度捕捞和航运发展等人类活动综合因素的影响, 野生鳊整体资源量以及种群大小明显下降, 这给长江渔业的可持续性发展带来了强烈冲击^[3]。目前, 针对恢复鳊群体资源量最行之有效的方法是人工增殖放流^[4]。据统计, 2016—2018 年长江江苏段鳊增殖放流累积投放量为一千余万尾。大量鱼苗被投放到长江, 其成活率、回捕率、贡献率和放流苗种对野生群体遗传结构的影响等问题是增殖放流效果和渔业资源生态风险评估工作的关注重点。准确鉴定回捕鱼中的个体是否来源于放流群体是评估增殖放流效果的关键。目前标志放流是进行放流

个体回捕认证的普遍方法, 包括外部标记方法和内部标记法等^[5]。传统标志方法因伤害鱼体且标记量有限, 不利于增殖放流对野生群体遗传影响的评估等缺陷已经逐渐被弃用^[6]。而基于现代分子标记技术建立起来的微卫星标记技术, 越来越受到广大渔业科研工作者的青睐, 并成功应用于多种渔业资源的增殖放流效果评估。

微卫星(microsatellite), 又称为简单序列重复(simple sequence repeats, SSRs)^[7], 其作为共显性遗传标记, 具有多态性丰富和遗传方式简单等特点, 不仅被应用于遗传多样性^[8-10]、遗传育种^[11]和遗传连锁图谱构建与定位^[12]等群体遗传学研究方面, 而且近年来已广泛应用于多种水产动物的亲缘鉴定和亲缘关系分析^[13]。微卫星在亲缘鉴定的作用原理为子代同一位点的等位基因分别来自于其父本和母本, 即每对父母本的后代均会携

收稿日期: 2019-03-08; 修订日期: 2019-04-15.

基金项目: 农业部农村部渔业种质资源保护项目(200903048); 江苏省水生生物资源重大专项暨首次水生野生动物资源普查(ZYHB16).

作者简介: 冯晓婷(1993-), 女, 硕士研究生, 主要从事渔业资源评估研究. E-mail: fengxiaoting0610@163.com

通信作者: 方弟安, 副研究员. E-mail: fangdian@ffrc.cn.

带特定的基因座^[14]。通过亲本与回捕鱼的遗传信息对比,微卫星分子标记便可以鉴定出回捕鱼中的放流个体。Sekino 等^[15]分别用微卫星和 mtDNA 控制区序列对日本养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)进行标记,成功地追踪到放流个体。李小芳等^[16]利用微卫星标记技术成功推算出湖北省石首和监利两个江段的鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)增殖放流贡献率,累积非亲权排除率为 99.79%;成为为等^[17]利用 11 个微卫星对胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)增殖放流贡献率进行推算,所有位点累积非亲权排除率高达 99.99%。而基于微卫星亲子鉴定技术的鳊增殖放流效果评估的相关研究尚未见报导。

为此,本研究以长江江苏段主要参与增殖放流的良好场所采集的鳊亲鱼和长江江苏段各采样点的回捕鳊作为研究样本,利用高度多态性的微卫星分子标记,进行亲子鉴定,对所评估鳊亲本的放流子代对野生群体的贡献率进行估算,以期今后该江段的鳊增殖放流策略的制定提供数据支撑与理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2016—2018 年,在鳊繁殖期间或冬季并塘期,随机采集江苏省 7 个良种场亲本 563 尾,以上亲

本部分后代用于长江人工放流;此外,从长江江苏段 7 个采样点持续回捕 687 尾鳊作为子代研究样本。累计采集样本 1250 尾,江段及原种场采样点分布见图 1,样本采集具体信息见表 1。

1.2 基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增和测序

所有采集样本均剪取少部分腹鳍保存于分析纯乙醇当中,带回实验室备用。DNA 提取采取试剂盒法(TIANamp Marine Animals DNA Kit, TIANGEN, 天根生化科技(北京)有限公司)抽提,经 1.0%琼脂糖凝胶(Nared 染色)电泳检测,合格的 DNA 样品保存于-20℃冰箱用于后续 PCR 扩增。参照张丹^[18]已经发表的 10 对高度多态性且易分型的微卫星标记,由江苏天霖科技无锡有限公司合成引物,并对引物 5'端做荧光基团(FAM 或 HEX)修饰见表 2。PCR 反应体系为 20 μL: Premix Taq (TaKaRa TaqTM Version 2.0 plus dye) 10 μL、上下游引物各 0.5 μL、基因组 DNA 模板(50 ng/μL) 1 μL 和无菌水 8 μL。扩增程序为: 94℃ 预变性 2 min; 94℃变性 20 s, 50~56℃(表 2)退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 30 个循环; 72℃延伸 5 min, 10℃保存。扩增产物经 2.0%琼脂糖凝胶电泳检验,通过全自动凝胶成像分析系统(Syngene)观察目的条带成像效果。利用基于毛细电泳技术的自动测序仪 ABI Prism3 730 xl(Rox-500 standard)对扩增产物进行分型。



图 1 鳊采样点分布图

Fig. 1 Map of the sampling sites of *Aristichthys nobilis*

表 1 鳊亲本及子代采样信息
Tab. 1 Sample collecting information of *Aristichthys nobilis* parents and offspring

亲本 parents 良种场 hatchery	时间 time	数量 n	子代 offspring		
			江段 capturing site	时间 time	数量 n
扬州市邗江区长江系家鱼原种场 Hanjiang Changjiang River Chinese Carps Original Breeding Farm in Yangzhou	2016-07/12	196	镇江 Zhenjiang	2017-10/11 2018-9/11	221
曲霞国平良种场 Quxia Guoping Hatchery	2017-05 2018-05	165	张家港 Zhangjiagang	2016-12 2017-07	136
泰兴市水产良种场 Taixing Hatchery	2017-05/12 2018-05	87	泰州 Taizhou	2016-11 2017-03	128
如皋市良种场 Rugao Hatchery	2017-05 2018-05	50	靖江 Jinjiang	2016-12 2017-04	72
常州市技丰水产良种繁育场 Changzhou Jifeng Hatchery	2018-06	33	如皋 Rugao	2017-07	48
镇江皇塘镇水产良种场 Zhenjiang Huangtang Hatchery	2018-06	27	常熟 Changshu	2018-04	48
句容湖生态渔业养殖繁育中心 Jurong Lake Hatchery	2017-05	5	南通 Nantong	2017-07	34

表 2 鳊 10 对引物基本信息
Tab. 2 Basic information of ten microsatellites from *Aristichthys nobilis*

位点 locus	登录号 GenBank accessions No.	荧光标记 dye label	引物序列(5'-3') primer sequences(5'-3')	片段大小/bp size	退火温度/℃ T _m
Arsd56	KC191154	HEX	F: CACGAATCTCATGCTGGATAG R: TTGGAACCTTGCCACTACTT	191-249	50
Arsd77	KC191308	HEX	F: TTTGAGCGTGGCTGGAGA R: CTACCATTTCCTACTGCGACA	209-217	50
Asd86	KC191351	HEX	F: TTCATTTCTGTGCTATGTGC R: GAAGCAACAGCCGTGATTAG	186-210	50
Arsd291	KC191345	FAM	F: GCAAACATCATTGGTAGACGC R: AACATCCTCTATGGCACCGAC	283-311	52
Hym435	FJ959330	HEX	F: AGCACTTCCCTCCCTTGTTT R: CGAACCCCTTACACTCGTT	213-225	56
Hysd9-2	KC191562	FAM	F: GCAAAGATGCCAGAGTGA R: GTGCTACAGGTGCCAAGA	289-323	50
Hysd835-1	JX499425	HEX	F: GGCAAGGACAGATACCAGTT R: CCGTTCACATTCCAGAGATC	252-268	53
Hysd943-1	KC191397	FAM	F: GCCCTACAGAGGCACATTACAT R: CTGGCATTGTGCTACTGTGAAG	289-309	52
Hysd1422-1	KC191247	FAM	F: CTTTTTGATTCCGTAGGC R: ATCTGGGGGAGTAGTGCT	289-311	52
HysdE1320-1	JX499715	FAM	F: TAATGCCTTTATGAGGGGAGAC R: CAGCCGCCATTACATCAC	353-371	54

1.3 亲子关系鉴定及增殖放流效果评估

使用软件 GeneMapper v.4.1^[19]读取等位基因大小, 为确保等位基因片段大小的准确性, 电泳结束后人工核对主峰判别是否准确, 最终确定其基因型。将回捕子代与亲本基因型数据分别整理成文本文件以备导入软件。利用谱系鉴定软件 Cervus 3.0^[20]分析各个基因座上的等位基因数量 N_a (the number of alleles)、观测杂合度 H_o (ob-

served heterozygosity)和期望杂合度 H_e (expected heterozygosity)、多态信息含量 PIC (polymorphism information content)、非亲权排除率 NEP (non-exclusion probability)和累计非亲权排除率 CEP (combined non-exclusion probability), 检测微卫星位点无效等位基因频率以及各位点是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。选择以未知性别的亲子代基因型数据建模(simulation), 设置至少使用

4 个位点进行亲子分配, 在自信度 95%下模拟 10000 个子代得到 Delta 分布值标准。根据每个候选亲本的 LOD (the nature log of the overall likelihood ratio)值进行亲权鉴定分析, 最终鉴别出评估亲本的子代。计算子代占总回捕鳙的比例, 获得所有评估亲本的放流子代对鳙野生群体的贡献率。

2 结果与分析

2.1 微卫星位点多态性分析

实验所用的 10 对微卫星引物在优化条件下扩增效果良好, PCR 产物经测序仪检测荧光信号明显, 最终检测出 348 个等位基因。其中等位基

因数量相对较少的位点是 Hysd835-1 和 HysdE1320-1, 最多的位点是 Arsd56, 检测到 55 个等位基因。其观测杂合度为 0.530~0.909(平均值为 0.748), 期望杂合度为 0.818~0.929 (平均值为 0.882), 10 个位点均表现高度多态性(PIC>0.5), 多态性信息含量为 0.797~0.924 (平均值为 0.871), Hardy-Weinberg 检测结果均存在显著偏离。Hysd835-1 和 Arsd56 的毛细电泳检测结果见图 2, 微卫星标记主要多态性参数见表 3。当亲本性别未知时, 每个位点的单独非亲权排除率范围为 25.1%~51.5%, 10 个微卫星位点累积非亲权排除率为 99.996%, 非亲权排除率(NEP)和累积非亲权排除率(CEP)见表 4。

表 3 10 个微卫星引物主要多态性参数和 Hardy-Weinberg 检测结果
Tab. 3 Main polymorphic parameters for the 10 microsatellite loci and Hardy-Weinberg test result

基因座 locus	等位基因数 N_a	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量 PIC	Hardy-Weinberg 检测结果 H-W test result
Arsd56	55	0.814	0.904	0.896	**
Arsd291	35	0.789	0.929	0.924	**
Arsd77	33	0.765	0.842	0.826	**
Hysd943-1	43	0.637	0.874	0.866	**
Asd86	33	0.732	0.909	0.902	**
Hysd9-2	35	0.785	0.919	0.912	**
Hym435	36	0.817	0.903	0.896	**
Hysd1422-1	37	0.909	0.881	0.871	**
Hysd835-1	19	0.704	0.842	0.823	**
HysdE1320-1	22	0.653	0.818	0.797	**
平均值 mean	34	0.748	0.882	0.871	**

注: **表示极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P<0.01$).
Note: ** means extremely significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium($P<0.01$).

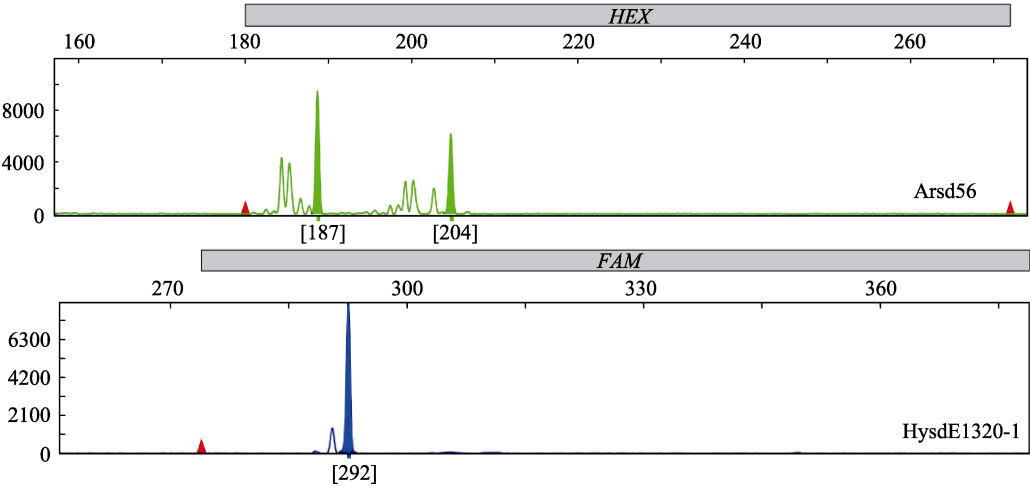


图 2 卫星位点 Arsd56 和 HysdE1320-1 基因分型结果
Fig. 2 Genotype of the microsatellite loci Arsd56 and HysdE1320-1 in *Aristichthys nobilis*

表 4 非亲权排除率(NEP)和累积非亲权排除率(CEP)
Tab. 4 Non-exclusion probability (NEP) and combined non-exclusion probability (CEP)

基因座 locus	无效等位基因频率 frequency of null	非亲权排 除率 NEP	累计非亲权 排除率 CEP
Arzd291	0.0727	0.251	
Hysd9-2	0.0756	0.281	0.9294690
Asd86	0.1086	0.308	0.9782765
Arzd56	0.0469	0.321	0.9930267
Hym43	0.0445	0.322	0.9977546
Hysd1422-1	-0.0255	0.376	0.9991557
Hysd943-1	0.0646	0.382	0.9996775
Arzd77	0.0287	0.464	0.9998504
Hysd835-1	0.0905	0.475	0.9999289
HysdE1320-1	0.1092	0.515	0.9999634

2.2 亲子关系鉴定结果

通过 Cervus 3.0 对 563 尾鳊亲本与回捕的 687 尾鳊子代基因型数据进行亲子鉴定分析。设置模

拟指定最少位点数为 4, 将所有满足最少位点数量的子代分别指派了第一候选亲本, 在两者所有微卫星位点无错配的情况下, 最终根据 95%置信区间的 LOD 值确定是否为亲子关系。结果显示, 排除被分型位点数少于模拟指定最少位点数的回捕鳊 92 尾后, 存在 59 尾回捕鳊与候选亲本不存在错配位点, 其中 42 尾子代在 95%置信区间下 LOD 值大于零, 视为良种场亲本繁殖的放流个体, 占总评估回捕样本的 6.11%; 而其中包含 8 尾回捕个体与候选亲本在 10 个基因座下均不存在缺失和错配见表 5。根据样品编号显示, 所鉴定出的 42 尾放流鳊中有 25 尾来源于扬州市邗江区长江系家鱼原种场, 9 尾来源于泰兴曲霞国平良种场, 5 尾来源于常州技丰水产良种繁育场, 2 尾来源于如皋水产养殖场, 1 尾来源于泰兴市水产良种场。

表 5 8 尾无错配位点鳊的亲子鉴定结果
Tab. 5 Paternity test of 8 *Aristichthys nobilis* with no pair loci mismatching

母本编号 candidate parents	子代编号 offspring	错配位点数 pair loci mismatching	LOD 值 pair LOD score	自信度 95% pair confidence 95%
YZHJ131	TAX249	0	6.73	*
YZHJ142	TAX213	0	7.07	*
YZHJ191	TAX253	0	4.12	*
QXGP332	TAX205	0	8.89	*
QXGP332	TAX207	0	9.16	*
QXGP332	TAX212	0	1.01	*
QXGP332	TAX217	0	8.92	*
QXGP424	TAX279	0	7.51	*

注: QXGP-泰兴曲霞国平良种场; YZHJ-扬州市邗江区长江系家鱼原种场; TAZ-泰兴; *LOD 在 95%自信度下显著。
Note: QXGP-Quxia Guoping Hatchery; YZHJ-Hanjiang Changjiang River Chinese Carps Original Breeding Farm in Yangzhou; TAX-Taixing; * pair LOD score is significant with a 95% confidence interval.

3 讨论

3.1 评估样本优越性

本研究通过采集良种场亲本群体, 避免了增殖放流现场采样工作与放流的其他多项工作同时进行所带来的冲突, 同时预留足够的时间供放流群体与自然野生群体形成混合群体后捕捞在江鳊, 最大程度避免抽样误差。良种场鳊亲本繁殖高峰期在每年的 5—7 月, 本研究在此期间或亲本冬季并塘期进行亲本采样; 长江下游鳊大规模增殖放流在冬季进行, 良种场将亲本繁殖的苗种培育至

冬片阶段放流进入长江, 随后充分利用春季禁渔期进行保种育苗; 回捕时间基本选在当年放流工作结束 2 至 3 个月以后。形成合理的亲本采集、子代放流和野外回捕的时间机制。另外, 确定科学合理的采捕对象是评估放流效果的基础。提供亲本的 7 个良种场几乎涵盖了江苏省主要参与长江增殖放流的良种场, 收集小部分亲本腹鳍作为研究样品, 不对亲鱼造成损害, 保证了采样范围和样品数量。鳊的回捕群体来源于长江江苏段 7 个断面和向当地渔民收集的渔获物, 回捕的规格包含鳊成鱼和幼鱼。通过微卫星标记亲本群体,

达到间接标记所有其繁殖的子代放流群体目的,同时回捕的鳊群体涵盖了历史放流群体及其后代和本次放流群体,更能真实地反映现阶段增殖放流情况。佟广香等^[21]采用 18 对微卫星标记对哲罗鱼(*Hucho taimen*)放流回捕群体进行亲子鉴定,放流对象为采捕野生亲鱼人工繁殖的子代,从放流群体中抽样作为实验的候选亲本。而本研究直接采集亲鱼相比在放流工作开展时采集子一代囊括的基因型或变异更具有根源性。李树华等^[22]运用 13 对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)微卫星引物评估了长江中游草鱼亲本放流效果,待鉴定的子代为当年早期资源调查中采集的鱼苗或鱼卵。而本研究回捕对象与其相比排除了早期资源在发育过程中的折损。本研究对样本采捕的时间和对象上进行较为周全的考虑,确保能科学、合理地采集到具有评估价值的样本。

3.2 微卫星位点多态性的适用

对微卫星位点多态信息含量(PIC)的评估可以明确微卫星在鉴别个体所属群体方面的适用性^[23]。Botstein 等^[24]把微卫星分为 3 个等级, $PIC < 0.25$ 为低度多态性, $0.25 < PIC < 0.5$ 为中度多态, $PIC > 0.5$ 为高度多态。本研究选用的 10 个微卫星位点均具有高度多态性(表 2),且其观测杂合度均在 0.63 以上,期望杂合度均在 0.81 以上,说明这 10 个微卫星位点可以提供丰富的遗传信息,可以作为鳊亲子鉴定的有效遗传标记。本研究发现非亲权排除率(NEP)基于微卫星位点的多态性,非亲权排除率(NEP)与 PIC 成反比关系,与季晓芬等^[25]的研究结果具有一致性。此外,相关研究还证实了微卫星标记的数量是影响累积非亲权排除率(CEP)的重要因素,与鉴定率相关。Dena 等^[26]利用微卫星标记确定日本对虾(*Penaeus japonicus*)的亲子关系时发现,至少组合使用 5 个位点才能将后代分配给正确的亲本。Zhang 等^[27]组合使用 6 个和 8 个微卫星标记对 180 尾黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)后代进行亲子鉴定,实际达到的鉴定率分别为 98.9%和 100%。本研究中累积非亲权排除率(CEP)与微卫星位点数量成正比。微卫星位点数累积到 4 个时 CEP 大于 99.30%,位点数累积到 9 个时 CEP 即大于 99.99%,

累积 10 个位点 CEP 高达 99.996%(表 4),可以证明这 10 个微卫星标记在鳊亲子鉴定的适用上是可行的。

微卫星标记是进行亲子鉴定的有力工具,其特异性引物相比于其他分子标记具有更好的重复性以及保真性,但依旧因其无效等位基因和分型误差对亲子鉴定结果造成影响。Marshall 等^[28]认为无效等位基因存在但未被检测可能会导致亲本的错误排除,因此在亲子鉴定中微卫星位点的筛选显得尤为重要。另外,基因分型技术的精准度也会对鉴定结果造成影响。传统非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳虽然具有高于琼脂糖凝胶电泳的分辨率,且分型成本较低^[29]。但等位基因条带判读结果受自身理化条件影响,胶片之间分型数据难以统一,人工比对结果不够可靠^[30]。为降低以上问题对结果的影响,实验选用了无效等位基因频率较低的 10 个微卫星位点(表 3),可避免在杂合位点读取时产生误差,一定程度上控制亲本错误排除的风险。在分型技术选择上,实验采用荧光标记结合毛细管电泳技术对扩增的 DNA 片段进行分型,可以识别 1bp 长度的序列差异,正确判读杂合位点与等位基因大小,于提高数据的准确性、实验的可重复性及基因分型的效率都具有显著的效果和优势。

3.3 增殖放流贡献率

遗传学表明在进行亲子鉴定时,累积非亲权排除率(CEP)达到 95%作为满足亲子关系的最低标准。本研究对未知性别的亲本基因型数据模拟分析,设置亲子代正确配对数不少于 4 个位点,得到 99%及以上的累积非亲权排除率(CEP),符合遗传学上满足亲子关系的基本要求。通过模拟运行所有基因型数据可以推算出,所有评估亲本的放流子代对鳊野生群体的贡献率为 6.11%。

目前,增殖放流效果是利用放流个体在回捕个体中的占比衡量。根据本鉴定结果,认为长江江苏段回捕鳊鱼中确实存在一定数量占比的放流个体,证明鳊的增殖放流策略对长江鳊资源量补偿起到良好的作用。考虑到放流群体与野生群体在自然环境中的适应能力不同,往往野生鳊能对回捕时所用的网具做出更加明显的应激反应,这

使放流群体比野生群体具有更高的被捕获机率。另外长江鳊迁徙行为是影响野外采样的重要因素, 由于长江水动力条件以及鳊自身生态习性的影响, 部分放流的鱼苗与野生群体可能会与长江的支流或者附属湖泊的鳊发生群体交换。本研究仅在长江干流中设置采样点, 无法在总资源量基础上进行回捕抽样。因此推测综合资源贡献率应与使用 Cervus 3.0 进行亲权分析的结果略有偏差。今后的研究需要建立更加完善的生态评估模型, 在总资源量和捕捞量准确的推算模式下, 结合微卫星亲子鉴定技术进行更加精确的增殖放流贡献率评估。

3.4 放流效果评估系统的建立与展望

鳊作为长江下游增殖放流的主要种类之一, 从资源量变化和渔业产出能力上可以推测人工增殖放流确实是恢复长江鳊资源量的有效措施。但在此之前未有对江苏段鳊增殖放流贡献率的客观评价, 尚未明确放流群体在辅助资源量增长中发挥的作用。为了评估放流效果, 本研究初步构建了“建立亲鱼微卫星基因库—增殖放流—回捕—亲子鉴定”的鳊增殖放流效果评估系统。此系统以基于微卫星荧光标记的亲子鉴定技术为核心, 为鳊增殖放流贡献率评估提供了便利。运用此系统构建的良种场亲本微卫星基因库对亲本基因型数据进行收集, 使亲本的遗传信息得以保全。利用现有微卫星基因库可开展对放流个体的持续追踪, 对增殖放流累积贡献率的研究有重大意义。在今后放流效果评估中, 可持续丰富亲本基因库, 对回捕的鳊进行亲子鉴定, 根据多年贡献率的变化趋势制定相应的增殖放流策略。本研究结果充分肯定了增殖放流对长江江苏段鳊野生群体的贡献作用, 但增殖放流效果评估还应包括对在江群体遗传结构的影响。现阶段, 随着人们对增殖放流生态风险的关注程度不断加强, 意识到维持野生群体遗传多样性在增殖放流工作中的重要性。因此在后续的研究中, 可以充分利用此评估系统中获得的微卫星基因型数据, 对良种场鳊亲本和长江野生鳊进行遗传多样性分析, 进一步评估增殖放流的遗传效果。

4 结论

综上所述, 本研究初步构建了“建立亲鱼微卫星基因库—增殖放流—回捕—亲子鉴定”的鳊增殖放流效果评估系统。所选用 10 个微卫星特异性位点具有丰富的多态信息含量, 能得到较高的累积非亲权关系排除率, 使用此方法可以便捷有效地鉴别鳊各群体是否存在亲权关系。本研究所评估亲本的放流子代对鳊野生群体的贡献率为 6.11%。今后可利用现有基因型数据, 进一步对鳊良种场亲本和长江野生群体种质资源进行准确的遗传分析。研究结果可为鳊增殖放流效果评估和鳊在长江水域的放流策略提供可靠的理论依据和技术支撑。

参考文献:

- [1] Deng J Y, Ye C C. Science of Fisheries Resources[M]. Chongqing: Chongqing Press, 2001: 317-319. [邓景耀, 叶昌臣. 渔业资源学[M]. 重庆: 重庆出版社, 2001: 317-319.]
- [2] Yan J C, Zhao J L, Li S F, et al. Genetic variation of bighead carp *Aristichthys nobilis* from Chinese native populations and introduced populations by AFLP[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 283-289. [严骏骢, 赵金良, 李思发, 等. 鳊中国土著群体与移居群体遗传变异的 AFLP 分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 283-289]
- [3] Peng G. Current situation and protection countermeasures of fishery resources in Jiangsu section of the Yangtze River[J]. Agricultural Economics and Management, 2006(5): 18-21. [彭刚. 长江江苏段渔业资源现状及保护对策[J]. 渔业经济研究, 2006(5): 18-21.]
- [4] Yang J X, Pan X F, Chen X Y, et al. Overview of the artificial enhancement and release of endemic freshwater fish in China[J]. Zoological Research, 2013, 34(4): 267-280. [杨君兴, 潘晓赋, 陈小勇, 等. 中国淡水鱼类人工增殖放流现状[J]. 动物学研究, 2013, 34(4): 267-280.]
- [5] Chen J T, Dai X J. Current status of fish tagging technology[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2005, 14(4): 451-456. [陈锦涛, 戴小杰. 鱼类标志放流技术的研究现状[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(4): 451-456.]
- [6] Liang W B, Jiang L X, Yu S L. The review and developmental strategies on the enhancement and release of jellyfish in offshore fishing areas in Liaoning Province[J]. Fisheries Science, 2007, 26(7): 423-424. [梁维波, 姜连新, 于深礼. 辽宁近海渔场海蜇增殖放流的回顾与发展[J]. 水产科学, 2007, 26(7): 423-424.]
- [7] O'Connell M, Wright J M. Microsatellite DNA in fishes[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1997, 7(3): 331-363.

- [8] Miesfeld R, Krystal M, Amheim N. A member of a new repeated sequence family which is conserved throughout eucaryotic evolution is found between the human δ and β globin genes[J]. *Acids Research Nucleic*, 1981, 9(22): 5931-5948.
- [9] Liao X L, Yu X M, Tong J G. Genetic diversity of common carp from two largest Chinese lakes and the Yangtze River revealed by microsatellite markers[J]. *Hydrobiologia*, 2006, 568(1): 445-453.
- [10] Wang C Y, Yu X M, Tong J G. Microsatellite diversity and population genetic structure of redfin culter (*Culter erythropterus*) in fragmented lakes of the Yangtze River[J]. *Hydrobiologia*, 2007, 586(1): 321-329.
- [11] Lu S Q, Liu Z, Xiao D Y. Application of microsatellite marking in studies of fish genetics and breeding[J]. *Journal of Hydroecology*, 2003, 23(6): 11-13. [鲁双庆, 刘臻, 肖调义. 微卫星标记在鱼类遗传育种研究中的应用[J]. *水生态学杂志*, 2003, 23(6): 11-13.]
- [12] Liao M, Zhang L, Yang G, et al. Development of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and bighead carp (*Aristichthys nobilis*) genetic maps using microsatellite and AFLP markers and a pseudo-testcross strategy[J]. *Animal Genetics*, 2007, 38(4): 364-370.
- [13] Wang X H, Yu X M, Feng J X, et al. Parentage assignment for full-sib families of the Yellow River carp *Cyprinus carpio haematoperus* based on microsatellites[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 1023-1031. [王新华, 俞小牧, 冯建新, 等. 黄河鲤全同胞家系的微卫星标记亲子鉴定[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(5): 1023-1031.]
- [14] Tian H. A study on genetic diversity between Yangtze River wild and domestic populations of silver carp and bighead carp using microsatellite markers[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008. [田华. 鲢鳙长江野生群体和养殖群体微卫星的遗传多样性分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.]
- [15] Sekino M, Saitoh K, Yamada T, et al. Genetic tagging of released Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) based on polymorphic DNA markers[J]. *Aquaculture*, 2005, 244(1-4): 49-61.
- [16] Li X F. The genetic effect evaluation of released parent silver carp[D]. Chongqing: Southwest University, 2012. [李小芳. 鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)亲本增殖放流遗传效果评估[D]. 重庆: 西南大学, 2012.]
- [17] Cheng W W, Wang D Q, Wei Q W, et al. Effect of restocking enhancement of Chinese sucker in the middle and upper reaches of Yangtze River based on microsatellite loci[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(3): 574-580. [成为为, 汪登强, 危起伟, 等. 基于微卫星标记对长江中上游胭脂鱼增殖放流效果的评估[J]. *中国水产科学*, 2014, 21(3): 574-580.]
- [18] Zhang D, Fu J J, Zhang L D, et al. The parentage analysis of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) based on ten microsatellite markers[J/OL]. *Genomics and Applied Biology*, 2018. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20180601.1246.002.html>. [张丹, 付建军, 张利德, 等. 鳊基于 10 个微卫星标记的亲子鉴定分析[J/OL]. *基因组学与应用生物学*, 2018. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20180601.1246.002.html>.]
- [19] Currieffraser E, Shah P, True S. Data analysis using GeneMapper® v4.1: Comparing the newest generation of GeneMapper software to Legacy Genescan® and Genotyper® Software[J]. *Journal of Biomolecular Techniques*, 2010 (3Suppl): S31.
- [20] Souza C A, Paiva S R, McManus C M, et al. Genetic diversity and assessment of 23 microsatellite markers for parentage testing of Santa Inês hair sheep in Brazil[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2012, 11(2): 1217-1229.
- [21] Tong G X, Kuang Y Y, Zhang Y Q, et al. Application of microsatellite markers in endangered *Hucho taimen* enhancement and releasing[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2015, 30(S1): 38-45. [佟广香, 匡友谊, 张永泉, 等. 微卫星标记在濒危哲罗鱼增殖放流中的应用[J]. *华北农学报*, 2015, 30(S1): 38-45.]
- [22] Li S H, Chen D Q, Duan X B, et al. Genetic effects of released mature *Ctenopharyngodon idellus* on natural populations based on the mitochondrial DNA markers in the middle reaches of the Yangtze River[J]. *Freshwater Fisheries*, 2014, 44(3): 45-50. [李树华, 陈大庆, 段辛斌, 等. 基于线粒体 DNA 标记的长江中游草鱼亲本增殖放流的遗传效果评估[J]. *淡水渔业*, 2014, 44(3): 45-50.]
- [23] Zhang X G, Tong J G, Xiong B X. Applications of microsatellite markers on studies of genetics and breeding of fishes[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2006, 14(1): 117-121. [张小谷, 童金苟, 熊邦喜. 微卫星标记在鱼类遗传及育种研究中的应用[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(1): 117-121.]
- [24] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [25] Ji X F. Construction and application of microsatellite gene bank of released brood grass carp[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016. [季晓芬. 草鱼放流亲本微卫星基因库的构建与应用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.]
- [26] Jerry D R, Preston N P, Crocos P J, et al. Parentage determination of Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* using microsatellite markers (Bate)[J]. *Aquaculture*, 2004, 235(1-4): 237-247.
- [27] Zhang J, Ma W G, Wang W M, et al. Parentage determina-

- tion of yellow catfish (*Pelteobagrus Fulvidraco*) based on microsatellite DNA markers[J]. Aquaculture International, 2016, 24(2): 567-576.
- [28] Marshall T C, Slate J, Kruuk L E B, et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations[J]. Molecular Ecology, 1998, 7(5): 639-655.
- [29] Wang D, Shi J, Carlson S R, et al. A low-cost, high-throughput polyacrylamide gel electrophoresis system for genotyping with microsatellite DNA markers[J]. Crop Science, 2003, 43(5): 1828-1832.
- [30] Rubtsova G A, Ponomareva E V, Afanasiev K I, et al. A detection of allelic variants at microsatellite markers by using capillary and traditional electrophoresis[J]. Russian Journal of Genetics, 2016, 52(4): 423-427.

Microsatellite method assessment of the effects of restocking enhancement of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) in Jiangsu reaches of the Yangtse River

FENG Xiaoting¹, YANG Xiwen¹, YANG Xuejun¹, LIU Yi¹, ZHOU Yanfeng², FANG Dian^{1,2}, XU Dongpo^{1,2}

1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Scientific Observing and Experimental Station of Fishery Resources and Environment in the Lower Reaches of the Changjiang River, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: Bighead carp (*Aristichthys nobilis*), an important cultured freshwater fish in China, is one of the four major Chinese carps. The natural habitation of bighead carp in the Yangtse River has been destroyed because of environmental water pollution and overfishing, among other factors. Stock enhancement of bighead carp has been conducted for years, being regarded as a positive fisheries management tool. Currently, hatchery-reared bighead carp juveniles were released into the natural river system to supplement the wild population in the Yangtse River. However, the effectiveness of these enhancement efforts has not been evaluated to date. The application of microsatellite markers for parentage determination is becoming more acceptable and popular in aquaculture. To analyze the effect of stock enhancement of bighead carp, a parentage test based on SSR markers was applied in this study. Fins of 563 brood stocks of unknown sexes and 687 recaptured individuals were sampled. Ten SSR markers were modified using fluorescent dyes (FAM/HEX). Genotype data of all brood stocks and all offspring were screened using an ABI Prism3 730 sequencer. The results showed that the number of alleles of microsatellite markers ranged from 19 to 55, and the mean observed and expected heterozygosities were 0.748 and 0.882. The range of the polymorphism information content (PIC) was 0.797–0.924. The simulation of parentage assignment for the situation of unknown sexes showed the combined non-exclusion probability of 10 loci was 99.996% using Cervus3.0. The results showed that the 42 recaptured individuals were offspring of brood stocks. The study suggested that the total contribution of the brood stocks to the wild population was 6.11% in the Jiangsu reaches of the Yangtse River. In summary, this study established an evaluation system of “marking brood stocks-releasing offspring-recapturing-parentage assignment” to assess the contribution rate for the large-scale stock enhancement. The evaluation system was used in this study to monitor all offspring of the marked brood stocks, which achieved the goal of one-time labeling and multi-year monitoring. A microsatellite gene bank was constructed using 10 microsatellite loci for brood stocks from 2016 to 2018. Future research should pay more attention to the assessment of genetic differentiation between the released population and wild population. This study will provide technical support for the stock enhancement process of bighead carp.

Key words: *Aristichthys nobilis*; microsatellite; stock enhancement; Jiangsu reaches of the Yangtse River

Corresponding author: FANG Dian. E-mail: fangdian@ffrc.cn.