

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19266

基于 SSR 标记的长江下游原良种场鳊亲本和后备亲本种质资源现状分析

冯晓婷^{1,2}, 张桂宁², 薛向平², 王邢燕³, 周彦锋², 方弟安^{1,2}, 徐东坡^{1,2}

1. 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;

2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

3. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081

摘要: 分析长江下游原良种场鳊(*Aristichthys nobilis*)亲本和后备亲本的遗传多样性和遗传结构, 评估鳊育种群体的种质资源现状, 可为鳊的种质资源管理和活体资源库建设提供科学的参考依据。本研究利用已发表的 10 对 SSR 荧光引物结合毛细管电泳技术, 对 7 个亲本群体和 1 个后备亲本群体共 638 份 DNA 进行基因分型。主要应用 GenAlEx 6.501、Cervus 3.0 和 Structure 2.3.4 等软件进行遗传多样性参数计算和群体遗传结构分析。结果表明, 8 个群体总体遗传多样性水平较高, 但存在一定程度的近亲繁殖风险。其平均等位基因数(N_a)为 14.83 ± 1.45 , 观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)分别为 0.76 ± 0.05 、 0.82 ± 0.02 , Shannon's 信息指数(I)为 2.08 ± 0.09 , 近交系数(F)为 0.08 ± 0.05 。各亲本群体之间遗传多样性水平存在差异, 后备亲本遗传多样性水平最高。鳊的贝叶斯群体遗传结构分析图(Structure)与主坐标分析(PCoA)结果具有一致性, 将所有样本划分为两个类群, 大部分亲本群体之间并无明显的遗传分化, 而后备亲本和亲本之间则表现明显的遗传分化。分子方差分析(AMOVA)显示, 11%的遗传变异来自群体间, 群体间的遗传分化处于中等水平, 而 89%的遗传变异来自群体内。本研究探究了鳊亲本和后备亲本的遗传差异性, 对野生原种引进和保护提供了建议, 以期构建健康负责的增殖放流种苗繁育体系提供理论支持和数据参考。

关键词: 鳊; 亲本; 后备亲本; 遗传多样性; SSR 标记

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)05-0589-09

鳊(*Aristichthys nobilis*)又称花鲢, 隶属于鲤形目、鲤科^[1], 是中国重要的水产养殖种类。由于其在增殖放流和生物控藻上的应用价值, 备受水产科学研究者的关注^[2-4]。近年来, 随着中国水生生物增殖放流的快速发展和放流规模的不断扩大, 增殖放流已经成为一项非常复杂的渔业生态系统工程^[5]。增殖放流的实施是以维护生态系统平衡为前提, 在恢复目标物种种群丰度的同时, 以不干扰其原始遗传特征为基本原则。水产种苗是渔业增养殖和培育生态修复物种的源头, 其质量直

接或间接影响水产品质量和野生资源补偿的生态效益。完善的苗种供应体系对保障增殖放流持续健康发展具有重要意义。为普及和推广繁殖亲鱼原种化, 目前江苏省国家级原种场“邗江区长江系家鱼原种场”集合渔业局《草鱼、青鱼、鲢、鳊原种生产技术操作规程》各项要求, 以四大家鱼原种生产技术路线为标准精心组织生产^[6]。从长江安徽省枞阳江段引进家鱼仔苗, 培育成原种亲本供应给种苗繁育场或养殖场。经调查, 原种场从 1 龄鱼种放入东夹江培育到 4 龄后备亲本的人

收稿日期: 2019-09-30; 修订日期: 2019-12-09.

基金项目: 国家重点研发计划重点专项(2018YFD0900905); 农业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项目(ZYHB16).

作者简介: 冯晓婷(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为渔业资源评估. E-mail: fengxiaoting0610@163.com

通信作者: 方弟安, 副研究员, 研究方向为渔业资源评估. E-mail: fangdian@ffrc.cn

工选择率为 40.8%，原种生产过程中的总人工选择率为 1.8% (数据来源于邗江长江系家鱼原种场生产技术操作规程)。因此，原种场后备亲本以及各养殖场亲本是否还具备长江原种的遗传多样性及原始遗传背景亟待进一步探究。

遗传多样性是保护生物学重要的研究领域，也是种质鉴定的核心内容。分析物种内遗传变异及其群体结构在探讨种质保护和进化潜力等方面具有重要的作用^[7-8]。因此，对物种遗传多样性的研究是国内学者评估其种质资源状况的主要途径。高度遗传的表型性状是最早研究遗传多样性的标记类型，后经次生代谢产物标记、蛋白质和同工酶标记、细胞学标记进而进入 DNA 分子标记时代。已有学者运用 RAPD^[9-10]、AFLP^[11]、RFLP^[12]、SSR^[13-14]和 SNP^[15]等检测技术对鳊养殖群体或野生群体的遗传多样性进行了分析。这些技术与微卫星相比或有对 DNA 质量要求严格、多态性检验不全面、实验结果重复性差、分析步骤繁琐和成本高等缺点。而微卫星标记技术因具有高度多态性、共显性、通用性和分析操作自动化等

优势迅速成为遗传多样性评估的有效技术手段。

本研究拟利用微卫星标记结合毛细管电泳测序技术对 7 个良种场亲本和 1 个原种场后备亲本的种质资源现状开展监测和调查，通过详细分析和比较其遗传多样性和遗传结构，客观反映群体内亲缘关系和原种遗传资源保存与延续情况。结合原良种场鳊亲本生产实况，揭示原种引进和亲本繁育所面临的问题并提出建议。初步探索增殖放流育种群体种质资源监控实施方案，为鳊种苗源头质量保障和放流活动的可持续实施提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2017—2019 年，在鳊繁殖高峰期或冬季并塘期，随机采集江苏省 7 个原良种场亲本 469 尾；2019 年 1 月，在邗江区长江系家鱼原种场冬季夹江后备亲本捕捞之际，随机采集 169 尾 4 龄后备亲本。总样本量为 638 尾，具体样品分布信息见表 1。

表 1 鳊亲本和后备亲本采样信息
Tab. 1 Information of *Aristichthys nobilis* parents and candidate parents

样本 species	原良种场 hatchery	时间 time	数量 number	代码 code
亲本 parents	扬州市邗江区长江系家鱼原种场	2017-07-12	169	HJ
	Hanjiang Changjiang River Chinese Carps Original Breeding Farm in Yangzhou	2017-12-21		
	曲霞国平良种场 Quxia Guoping Hatchery	2018-05-13	50	QX
	泰兴市水产良种场 Taixing Hatchery	2018-05-08	50	TX
	如皋市良种场 Rugao Hatchery	2018-05-21	50	RG
	常州市技丰水产良种繁育场 Changzhou Jifeng Hatchery	2018-06-05	50	CZ
	皇塘镇水产良种场 Huangtang Hatchery	2018-12-17	50	HT
	句容湖生态渔业养殖繁育中心 Jurong Lake Hatchery	2018-05-23	50	JR
后备亲本 candidate parents	扬州市邗江区长江系家鱼原种场	2019-01-12	169	HB
	Hanjiang Changjiang River Chinese Carps Original Breeding Farm in Yangzhou			

注：CZ：常州亲本；HB：邗江后备亲本；HJ：邗江亲本；HT：皇塘亲本；JR：句容亲本；QX：曲霞亲本；RG：如皋亲本；TX：泰兴亲本。
Note: CZ: parent population of Changzhou; HB: candidate parent population of Hanjiang; HJ: parent population of Hanjiang; HT: parent population of Huangtang; JR: parent population of Jurong; QX: parent population of Quxia; RG: parent population of Rugao; TX: parent population of Taixing.

1.2 总 DNA 的提取

在鱼体出水后迅速对其进行非致命法采集鳍条，在每尾实验鱼尾鳍剪取大小约为 0.5 cm×0.5 cm 的鳍条，无水乙醇浸泡保存。采用试剂盒法

[TIANamp Marine Animals DNA Kit, 天根生化科技(北京)有限公司]提取鳊基因组 DNA，1%的琼脂糖凝胶电泳(Nared 染色)检验提取效果并于微量分光光度计检测其纯度后，将浓度调至 50 ng/μL，

-20℃保存备用。

1.3 PCR 扩增

选用 10 对多态性丰富、扩增效果好的微卫星荧光标记^[16], 引物由江苏天霖科技无锡有限公司合成, 对所有鳊样本 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系为 10 μL 混合反应体系: Premix Taq (TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye) 5 μL、上下游引物各 0.1 μL、基因组 DNA 模板(50 ng/μL) 1 μL 和 ddH₂O 3.8 μL。扩增程序为: 94℃预变性 2 min; 94℃变性 20 s, 退火温度(50~56℃)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后, 通过全自动凝胶成像分析系统(Syngene)观察目的条带成像效果。利用基于毛细管电泳技术的自动测序仪 ABI Prism3 730 xl(Rox-500 standard)对扩增产物进行检测, 在 GeneMapper v.4.1 软件中读取每个位点的片段大小。

1.4 数据处理和分析

将检测到的微卫星分型信息录入到 Excel 中, 转化为文本格式。利用 Cervus3.0.7^[17]谱系分析软件分析 10 个微卫星位点等位基因数量(N_a)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、多态信息含量(PIC)和无效等位基因频率(F_{na})。利用 GenAlEx 6.501^[18]计算各群体的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)、Shannon's 多样性指数(I)、群体内部近交系数(F)、特有等位

基因数(N_p)和 Nei's 遗传距离(D)。同时计算各位点近交系数(F_{IS})和遗传分化系数(F_{ST})以了解群体遗传分化程度。利用 Arlequin v3. 1 软件检测各群体是否符合哈迪-温伯格平衡(HWE)平衡。

为对群体遗传结构进行分析, 利用 Structure 3.2.4^[19]软件的贝叶斯(Bayesian)聚类法, 将类群数 K 设置为 1~9, 将 MCMC (Markov Chain Monie Carfo)开始时的不作数迭代(length of burn-in period)设为 50000 次, 每个 K 重复运行 5 次。选取 ΔK 最大值对应的 K 作为最佳 K 值, 结果由 Structure Harvester^[20](<http://taylor0.biology.ucla.edu.tructharvest/>)在线计算, 并通过 Clumpp^[21]软件重复抽样分析, 由 Graph PadPrism^[22]软件绘制群体遗传结构图。同时在 GenAlEx 6.501 中, 以 Nei's 遗传距离(D)为参数进行主坐标分析(PCoA)验证。对样本遗传变异进行分子方差分析(AMOVA), 得到群体间和群体内的遗传差异性。

2 结果与分析

2.1 SSR 位点多态性

10 对微卫星引物在 638 个实验样本中, 共检测到 368 个等位基因, 平均每个位点有 36.8 个等位基因(N_a)。除 Hysd1422-1 位点外, 其他位点无效等位基因频率(F_{na})为正值, 但其频率均小于 0.2 (表 2)。各位点期望杂合度(H_e)范围为 0.801~0.934, 平均值为 0.889, 观测杂合度(H_o)范围为 0.574~

表 2 基于 10 个微卫星标记的鳊遗传多样性水平
Tab. 2 *Aristichthys nobilis* genetic diversity level based on 10 SSR markers

位点 locus	等位基因数 N_a	期望杂合度 H_e	观察杂合度 H_o	Shannon's 多样性指数 I	多态信息 含量 PIC	群体内 近交系数 F_{IS}	遗传分化 系数 F_{ST}	无效等位 基因频率 F_{na}
Arsd56	54	0.921	0.870	2.355	0.916	-0.006	0.037	0.0257
Arsd291	45	0.932	0.798	2.269	0.927	0.040	0.067	0.0789
Arsd77	35	0.883	0.755	1.860	0.873	0.088	0.051	0.0647
Hysd943-1	47	0.849	0.613	1.990	0.840	0.241	0.062	0.1718
Asd86	40	0.934	0.743	2.257	0.930	0.137	0.048	0.1148
Hysd9-2	36	0.918	0.782	2.315	0.911	0.105	0.037	0.0768
Hym435	31	0.903	0.851	2.015	0.895	-0.026	0.056	0.0220
Hysd1422-1	29	0.872	0.889	1.941	0.860	-0.184	0.055	-0.0230
Hysd835-1	29	0.878	0.739	1.946	0.866	0.080	0.052	0.0860
HysdE1320-1	22	0.801	0.574	1.891	0.784	0.304	0.032	0.1857
平均值 mean	36.8	0.889	0.761	2.084	0.880	0.078	0.050	0.0803

0.889, 平均值为 0.761。各位点多态信息含量(PIC)范围在 0.784~0.930 之间, 平均值为 0.880。初步揭示实验所用的 10 对引物在后续遗传多样性分析中的结果具有可行性。Shannon's 信息指数(I)变异范围为 1.860~2.355。10 个微卫星位点的 F 统计量显示, 群体内平均近交系数(F_{IS})为 0.078, 平均遗传分化系数为(F_{ST})为 0.050, 说明整个分析样本展现中度的遗传分化。

2.2 遗传多样性分析

遗传多样性分析结果表明(表 3), 所测试鳊群体遗传多样性处于不同水平。各群体等位基因范围为 7.30~23.30, 平均值为 14.83。有效等位基因

范围为 4.42~9.16, 平均值为 6.42。Shannon's 信息指数(I)平均值为 2.08。观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)的平均值分别为 0.76 和 0.82。其中后备亲本群体遗传多样性最高, QX 亲本群体遗传多样性最低, 且除此群体之外其余群体均存在不同数量的特有等位基因(N_p), 数量范围在 1~32, 其中后备亲本群体 HB 的特有等位基因最多, 遗传多样性也最高。除 QX 群体之外其他群体内近交系数 F 均大于零, 范围在 0.03~0.15 之间, 平均值为 0.08。Hardy-Weinberg 平衡检测(HWE)结果显示, QX、JR 群体极显著偏离 HWE, CZ、HJ 和 RG 群体显著偏离 HWE, 其他群体不偏离 HWE。

表 3 8 个鳊群体的遗传多样性水平
Tab. 3 Genetic diversity of 8 *Aristichthys nobilis* populations

n=8; $\bar{x} \pm SE$

群体 population	等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	观察杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	Shannon's 多样性指数 I	群体内 近交系数 F	特有等位 基因数 N_p	哈迪-温伯格 平衡 HWE
CZ	13.90±1.170	6.50±0.39	0.77±0.04	0.84±0.01	2.13±0.07	0.09±0.05	1	*
HJ	18.10±2.03	6.69±0.87	0.77±0.05	0.82±0.03	2.12±0.12	0.07±0.06	14	*
HT	17.40±1.68	7.60±0.65	0.73±0.04	0.86±0.01	2.34±0.09	0.15±0.05	17	ns
JR	12.90±1.45	6.03±0.45	0.78±0.04	0.83±0.01	2.04±0.08	0.05±0.06	1	**
QX	7.30±0.60	4.42±0.31	0.77±0.06	0.76±0.02	1.62±0.07	-0.01±0.08	0	**
RG	12.80±0.95	5.79±0.46	0.75±0.05	0.81±0.02	2.02±0.08	0.09±0.06	2	*
TX	12.90±1.09	5.19±0.31	0.78±0.06	0.80±0.01	1.96±0.06	0.03±0.06	3	ns
HB	23.30±2.64	9.16±1.11	0.75±0.03	0.87±0.02	2.45±0.13	0.14±0.02	32	ns
平均值 mean	14.83±1.45	6.42±0.57	0.76±0.05	0.82±0.02	2.08±0.09	0.08±0.05	8.75	

注: **表示极显著偏离哈迪-温伯格平衡($P<0.01$), *表示显著偏离哈迪-温伯格平衡($P<0.05$); ns 表示不偏离于哈迪-温伯格平衡($P>0.05$)。CZ: 常州亲本; HB: 邗江后备亲本; HJ: 邗江亲本; HT: 皇塘亲本; JR: 句容亲本; QX: 曲霞亲本; RG: 如皋亲本; TX: 泰兴亲本。
Note: ** denotes extremely significantly deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.01$); *: denotes significantly deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.05$); ns denotes non-significantly deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P>0.05$). CZ: parent population of Changzhou; HB: candidate parent population of Hanjiang; HJ: parent population of Hanjiang; HT: parent population of Huangtang; JR: parent population of Jurong; QX: parent population of Quxia; RG: parent population of Rugao; TX: parent population of Taixing.

2.3 遗传结构分析

应用 Structure 软件和 Structure Harvest 在线分析所有鳊群体的遗传结构, 图 1 为 ΔK 随 K 值变化的折线图。当 ΔK 最大时, $K=2$, 表示 638 尾鳊属于两个不同的类群(图 2)。后备亲本和亲本之间表现为少量的遗传混杂和明显的遗传分化。通过计算样本 Q (基因变异源于某一亚群的比例)发现, 本研究的 633 尾鳊样本遗传组成相对单一($Q>0.6$), 被分配到相应的两个类群当中。红色基因池包括

7 个良种场采集的亲本群体, 有 1 尾后备亲本个体也被划分到该类群; 绿色基因池包含几乎全部的后备亲本群体, 有 3 尾来自亲本群体的鳊被划分到该类群, 包括 HJ 的 1 尾、HT 的 2 尾。

为了分析鳊所有研究样本个体间展现的遗传关系并进一步探讨群体间的遗传结构, 利用 8 个鳊群体共 638 尾样本的 Nei's^[23]遗传距离(D)进行主坐标(PCoA)分析(图 3)。其结果与 Structure 结果具有相似性, 表现为亲本群体与后备亲本群体

之间具有明显的遗传分化, 部分 HT 群体样本位置与后备亲本群体相接近。

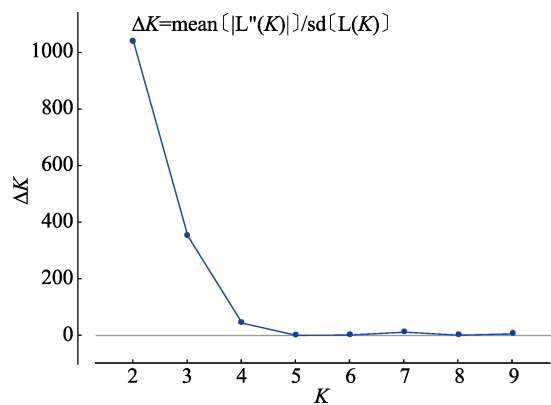


图 1 鳊 8 个群体的类群数 K 与 ΔK 的关系
Fig. 1 Relations of the cluster number(K) and ΔK value of 8 *Aristichthys nobilis* populations

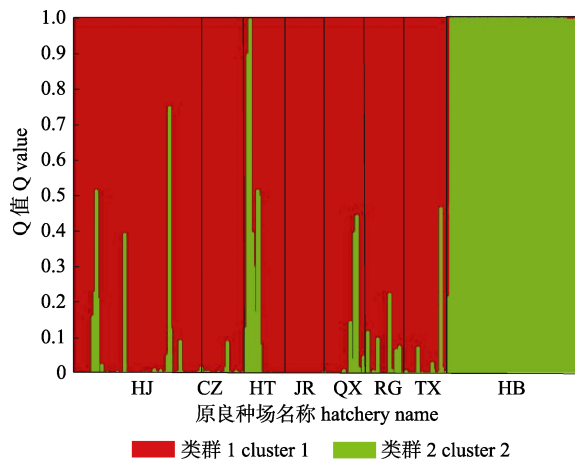


图 2 $K=2$ 时 8 个鳊群体聚类结果图
CZ: 常州亲本; HB: 邗江后备亲本; HJ: 邗江亲本;
HT: 皇塘亲本; JR: 句容亲本; QX: 曲霞亲本;
RG: 如皋亲本; TX: 泰兴亲本.
Fig. 2 Clustering diagram of 8 *Aristichthys nobilis* populations at $K=2$
CZ: parent population of Changzhou; HB: candidate parent population of Hanjiang; HJ: parent population of Hanjiang;
HT: parent population of Huangtang; JR: parent population of Jurong; QX: parent population of Quxia; RG: parent population of Rugao; TX: parent population of Taixing.

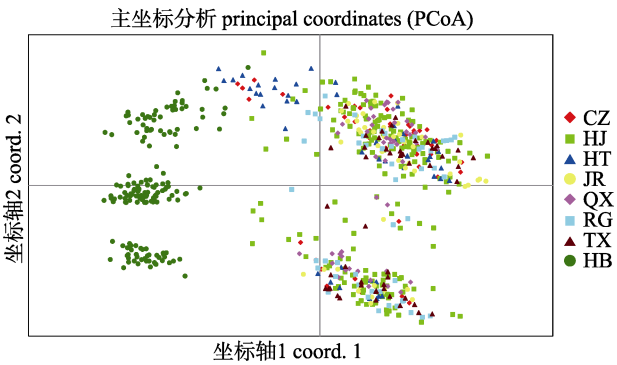


图 3 基于 Nei's 遗传距离的鳊 638 个个体主坐标分析图
CZ: 常州亲本; HB: 邗江后备亲本; HJ: 邗江亲本;
HT: 皇塘亲本; JR: 句容亲本; QX: 曲霞亲本;
RG: 如皋亲本; TX: 泰兴亲本.

Fig. 3 Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on Nei's genetic distance of 638 *Aristichthys nobilis* individuals
CZ: parent population of Changzhou; HB: candidate parent population of Hanjiang; HJ: parent population of Hanjiang;
HT: parent population of Huangtang; JR: parent population of Jurong; QX: parent population of Quxia; RG: parent population of Rugao; TX: parent population of Taixing.

AMOVA (analysis of molecular variance)显示, 所试样本中遗传变异主要存在于群体内部不同个体之间(89%), 少部分来源于不同群体之间(11%, 表 4)。鳊各个群体间遗传分化系数(F_{ST})的范围在 0.009~0.188(表 5)。总体上, 除 HT 群体与其他 6 个亲本群体展现中度的遗传分化($0.05 < F_{ST} < 0.15$)外, 其他良种场亲本群体间遗传分化较低。而亲本群体与后备亲本群体之间均出现了高度的遗传分化($0.15 < F_{ST} < 0.25$)。这与 Structure 群体结构分析图和主坐标分析图(PCoA)划分的结果相符合。

3 讨论

3.1 鳊亲本和后备亲本遗传多样性

本研究利用 10 个荧光微卫星标记对鳊的 7 个亲本群体和 1 个后备亲本群体进行遗传多样性分析。根据微卫星所划分的 3 个等级^[24](低度多态性,

表 4 基于分子方差分析法(AMOVA)的 8 个鳊群体遗传变异结果
Tab. 4 Results of molecular variance (AMOVA) of 8 *Aristichthys nobilis* populations

变异来源 source of variation	自由度 df	离差平方和 sum of squares	方差分量 variance component	方差分量比例/% percentage of variation
群体间 among population	7	729.080	1.223	11
群体内 within population	657	6253.692	9.519	89
总变异 total variation	664	6982.771	10.741	100

表 5 鳙 8 个群体成对遗传分化系数(F_{ST} , 对角线下方)
Tab. 5 Pairwise F -statistics (F_{ST} , below diagonal) values among 8 *Aristichthys nobilis* populations

群体 population	CZ	HJ	HT	JR	QX	RG	TX	HB
CZ								
HJ	0.034							
HT	0.062	0.101						
JR	0.009	0.038	0.055					
QX	0.030	0.037	0.117	0.034				
RG	0.013	0.027	0.109	0.031	0.028			
TX	0.025	0.031	0.127	0.044	0.022	0.012		
HB	0.158	0.174	0.164	0.154	0.182	0.173	0.188	

注: CZ: 常州亲本; HB: 邗江后备亲本; HJ: 邗江亲本; HT: 皇塘亲本; JR: 句容亲本; QX: 曲霞亲本; RG: 如皋亲本; TX: 泰兴亲本。
Note: CZ: parent population of Changzhou; HB: candidate parent population of Hanjiang; HJ: parent population of Hanjiang; HT: parent population of Huangtang; JR: parent population of Jurong; QX: parent population of Quxia; RG: parent population of Rugao; TX: parent population of Taixing.

$PIC < 0.25$; 中度多态性, $0.25 < PIC < 0.5$; 高度多态性 $PIC > 0.5$), 可以判断本研究所选用微卫星位点 ($PIC > 0.789$) 均具有高度的多态性。所有位点平均观测杂合度 (H_o) 和平均期望杂合度 (H_e) 分别为 0.761 和 0.889。说明这 10 个微卫星位点能够提供丰富的遗传信息, 适用于评估鳙群体遗传质量。

通过计算鳙亲本和后备亲本群体遗传多样性参数可以揭示鳙原种培育情况并间接反映放流种苗遗传质量。经分析, 8 个群体观测杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e) 平均值分别为 0.76 和 0.82, Shannon's 信息指数 (I) 平均值为 2.084, 高于田华^[14]利用微卫星标记对鳙养殖群体的评估结果, 甚至略高于对长江鳙野生群体的研究结果。此结果也略高于张敏莹等^[25]对鳙放流群体的研究, 其中观测杂合度与其对天然捕捞群体的研究结果相当, 说明本研究所取样本整体遗传多样性水平良好。其原因在于所有亲本和后备亲本虽然均为养殖群体, 但亲本群体均引种于长江系家鱼原种场, 与后备亲本的种苗来源一致, 全部是由长江野生仔苗培育而成。经对比发现, 亲本遗传多样性逊于后备亲本, 这可能是由于亲本鳙作为封闭养殖群体要经过人工选择和淘汰, 这也证实了原种的选育是导致良种场育种亲本遗传多样性降低的原因之一。另外, 除 QX 外, 其他鳙群体近交系数 F 均大于零, 其中 HT 群体和 HB 群体 F 大于 0.1, 表明群体内均存在着一定程度的近交现象。Moss 等^[26]研究表明, 若群体近交系数平均值高于 0.1, 种群

会受到近交抑制。根据这一结论判断, HT 和 HB 群体可能已经面临近交抑制的影响。这 7 个群体中的观测杂合度皆小于期望杂合度, 可以证明群体内缺乏足够的杂合子, 多年繁殖则难以维持后代群体高水平的遗传多样性。类似现象也在其他鱼类群体中发生, 在中国最大的两个淡水湖泊中鲤 (*Cyprinus carpio*) 的遗传多样性较为丰富, 但因长期混入养殖群体的影响, 均表现为杂合子缺失^[27]。在其他学者的相关研究中, 也证实群体内的同胞或半同胞交配可以导致杂合子不足, 遗传多样性水平降低^[28-30]。

3.2 鳙亲本和后备亲本群体遗传结构

在遗传结构分析中, Structure 将所有的样本划分为两个类群。第 I 类群几乎包含了所有亲本和少量后备亲本, 后备亲本群体则主要被划分到第 II 类群。由此可以证明本研究所采集的后备亲本群体与良种场亲本群体之间并无明显的亲缘关系, 两者来源于不同的祖先亚群。在本实验中, 亲本采集时间要早于后备亲本, 并且结合亲本和后备亲本的年龄情况(后备亲本 4 龄、亲本 4 龄以上)可知, 本研究中各良种场大部分亲本群体并非由所采集的后备亲本群体选育而来。因此可以推测, 虽然种苗源头均来自长江枞阳江段, 却在不同的年度集中捕捞到了不同亚群。基于 Nei's 遗传距离的 638 个个体主坐标分析图(图 3)在 Structure 群体遗传结构分析图基础上消除了假阳性相关, 较为直观地体现出群体中不同个体的分布情况, 聚类

划分总体结果与 Structure 一致。另外, 遗传分化系数(F_{ST})是反映群体遗传结构的重要指标。从 8 个群体遗传分化系数(F_{ST})矩阵可知, 除 HT 群体外, 其他亲本群体之间遗传分化程度较低。HT 群体与其他亲本群体表现出中度遗传分化的原因推测如下, HT 群体样本采集时间正值 2018 年 12 月, 镇江皇塘镇水产良种场部分亲本更新后, 其部分样本遗传结构更贴近于后备亲本, 而亲本群体与后备亲本群体之间呈现的结果也符合类群分析和主坐标分析图所反映的情况, 表现为高度遗传分化。此外, AMOVA 分析显示, 鳊亲本与后备亲本群体内遗传变异水平较高, 而群体间遗传变异水平较低, 符合鲢、鳊和草鱼等大宗淡水鱼野生群体普遍呈现的遗传变异结果^[11-14, 31]。

3.3 鳊种质保护机制

为补充长江下游野生鳊资源量, 扩大鳊种群规模, 每年都有大量种苗被投入到长江天然水体中。目前已有多项研究表明, 渔业增殖放流能够对自然种群产生显著的负面遗传影响^[32]。这种影响主要来源于放流种群与自然种群的遗传差异。为保持放流群体的遗传多样性接近野生群体的原始水平, 防止差异性遗传信息混入自然群体, 必须建立科学合理的放流种苗繁育和种质保护机制。原种场引进长江原种逐渐培育成育种群体, 这对保障种源质量、施行健康负责的放流策略具有重大的意义。在本研究所涉及的生产实践中, 野生苗种培育成后备亲本直至成为放流种苗繁育群体, 在不同阶段都要进行不同程度的人工选育和自然淘汰, 因此亲本群体遗传多样性难以维持至原种水平。经评估, 繁殖种苗的亲本群体仍具有较高的遗传多样性, 然而若持续多年使用同一批亲本进行繁殖, 累积放流入江群体的遗传多样性水平会难以维持, 从而在长期的放流活动中对野生鳊群体造成遗传风险。在最初的野生苗种引进工作中, 不同年度之间引进群体虽不存在明显的亲缘关系, 但同一批次捕获的野生苗种却属于同一类群, 同一类群中各群体内存在同胞或半同胞关系的可能性较大。本研究所分析的后备亲本遗传多样性水平高于亲本且分属于两个类群, 可以作为亲本优良的替换和补充群体。

综合以上分析, 建立健康优质的放流种苗繁育体系首先要加强原种场的管理, 控制亲本来源, 建议多网多次或变更引种地采集不同类群的个体, 并且在培育过程中降低人工选择率。其次, 良种场应严格管控人工传代过程, 通过对亲鱼基础群体的定期扩增或更换, 加强高分化群体间的亲鱼交流, 以维持累积放流群体的高水平遗传多样性。第三, 建议将以本研究为基础的“亲本种质遗传监测”逐步纳入到中国增殖放流技术操作规程中, 建立完善的增殖放流种质保护机制。在后续的研究中, 可持续监测育种群体阶段性遗传质量, 并深入探究增殖放流对野生群体的遗传影响和长期放流对野生群体遗传渐渗和世代累加效应等, 以期为构建健康负责的增殖放流策略提供理论支持和数据参考。

参考文献:

- [1] Wu H L, Ni Y. Fishes of Jiangsu Province[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2006: 315-317. [伍汉霖, 倪勇. 江苏鱼类志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 315-317.]
- [2] Liu Q G, Zhang Z. Controlling the nuisance algae by silver and bighead carps in eutrophic lakes: Disputes and consensus [J]. Journal of Lake Sciences, 2016, 28(3): 463-475. [刘其根, 张真. 富营养化湖泊中的鲢、鳊控藻问题: 争议与共识[J]. 湖泊科学, 2016, 28(3): 463-475.]
- [3] Liu M, Xu M X, Xu D L, et al. Status quo and progress in research and application on nonclassical biomanipulation of silver carp and bighead carp[J]. Journal of Hydroecology, 2010, 31(3): 99-103. [刘敏, 徐敏娴, 许迪亮, 等. 鲢、鳊非经典生物操纵作用的研究进展与应用现状[J]. 水生生态学杂志, 2010, 31(3): 99-103.]
- [4] Liu E S. Analysis on biomanipulation, non-traditional biomanipulation and discussion of the countermeasures of biomanipulation application in waters[J]. Journal of Lake Sciences, 2010, 22(3): 307-314. [刘恩生. 生物操纵与非经典生物操纵的应用分析及对策探讨[J]. 湖泊科学, 2010, 22(3): 307-314.]
- [5] Luo G, Zhang Z D. Problems and countermeasures of aquatic organisms stocking enhancement in China[J]. China Fisheries, 2015(3): 32-34. [罗刚, 张振东. 我国水生生物增殖放流存在的问题及对策建议[J]. 中国水产, 2015(3): 32-34.]
- [6] Yu X X, Yang T Y, Qian G Y. Analysis on parental breeding and breeding advantages of “the four major Chinese carps” [J]. China Fisheries, 2002(5): 67-73. [俞小先, 杨庭玉, 钱钢仪. 长江系“四大家鱼”原种亲本选育与繁育优势分析[J]. 中国水产, 2002(5): 67-73.]
- [7] Liu F, Xia J H, Bai Z Y, et al. High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis[J]. Aquaculture, 2009, 297(1-4): 51-56.

- [8] Xu P, Zhang X F, Wang X M, et al. Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*[J]. Nature Genetics, 2014, 46(11): 1212-1219.
- [9] Jamshidi S, Kalbassi M R, Sadeghizadeh M. Inheritance of RAPD marker in female grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), male bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) and their F₁ hybrids[J]. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 2009, 8(1): 47-56.
- [10] Yan B, Peng L Y, Xie W M, et al. RAPD and microsatellite analysis of red bighead carp (*Aristichthys nobilis*)[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2011, 20(1): 54-60, 73. [严斌, 彭亮跃, 谢伟民, 等. 新型湘云金鳊遗传多样性的 RAPD 及微卫星分析[J]. 激光生物学报, 2011, 20(1): 54-60, 73.]
- [11] 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.]
- [12] Shan Q, Dong S, Wu H F, et al. Diversity analysis on mtDNA D-loop region of three populations of *Aristichthys nobilis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 174-180. [单淇, 董仕, 吴海防, 等. 3 个群体鳊鱼 mtDNA D-loop 区段的限制性片段长度多态性分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(2): 174-180.]
- [13] Liao M J, Yang G P, Wang X C, et al. Development of microsatellite DNA markers of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and their cross-species application in bighead carp (*Aristichthys nobilis*)[J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 7(1): 95-99.
- [14] Tian H. A study on genetic diversity between Yangtze River wild & domestic populations of silver carp and bighead carp using microsatellite markers[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008. [田华. 鳊鳊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] Tan X. The applications of SNP and microsatellite markers in genetic analyses of bighead carp[D]. Beijing: Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2010. [谭新. SNP 和微卫星标记在鳊遗传分析中的初步应用[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2010.]
- [16] Zhang D, Fu J J, Zhang L D, et al. The parentage analysis of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) based on ten microsatellite markers[J]. Genomics and Applied Biology, 2019(7): 2949-2957. [张丹, 傅建军, 张利德, 等. 鳊基于 10 个微卫星标记的亲缘鉴定分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2019(7): 2949-2957.]
- [17] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. Molecular Ecology, 2007, 16(5): 1099-1106.
- [18] Peakall R, Smouse, P E. GenAlEx 6: Genetic analysis in Excel population genetic software for teaching and research[J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(1): 288-295.
- [19] Smouse P E, Peakall R. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure[J]. Heredity, 1999, 82(5): 561-573.
- [20] Earl D A, VonHoldt B M. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method[J]. Conservation Genetics Resources, 2012, 4(2): 359-361.
- [21] Jakobsson M, Rosenberg N A. CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure[J]. Bioinformatics, 2007, 23(14): 1801-1806.
- [22] Swift M L. GraphPad prism, data analysis, and scientific graphing[J]. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 1997, 37(2): 411-412.
- [23] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1973, 70(12): 3321-3323.
- [24] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [25] Zhang M Y, Liu K, Xu D P, et al. Analysis of genetic diversity in populations released for stock enhancement and population caught in natural water of bighead carp in the lower reaches of the Yangtze River using microsatellite markers[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2013, 35(3): 579-586. [张敏莹, 刘凯, 徐东坡, 等. 长江下游鳊放流群体和天然捕捞群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(3): 579-586.]
- [26] Moss D R, Arce S M, Otsu C A, et al. Effects of inbreeding on survival and growth of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*[J]. Aquaculture, 2007, 272(S1): S30-S37.
- [27] Liao X L. Development of molecular markers and population genetic analyses in several important fishes distributed in the Yangtze River system[D]. Wuhan: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Hydrobiology), 2006. [廖小林. 长江流域几种重要鱼类的分子标记筛选开发及群体遗传分析[D]. 武汉: 中国科学院研究生院(水生生物研究所), 2006.]
- [28] Wang W, You F, Gao T X, et al. Genetic variations at ten microsatellite loci in natural and cultured stocks of left-eyed flounder *Paralichthys olivaceus* in Shandong coastal waters[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2004, 35(6): 530-537. [王伟, 尤锋, 高天翔, 等. 山东近海牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)自然和养殖群体 10 个微卫星基因座位的遗传多态性分析[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(6): 530-537.]
- [29] Lei S Y, Zhang Y L, Zhou L, et al. Analysis of genetic differences among four breeding populations of *Culter alburnus* Basilewsky[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2016, 43(3): 131-135. [雷双永, 张友良, 周陆, 等. 翘嘴鲌四个育种群体的遗传差异分析[J]. 水产科技情报, 2016, 43(3): 131-135.]
- [30] Gao B Q, Liu P, Li J, et al. Effect of inbreeding on growth and genetic diversity of *Portunus trituberculatus* based on the full-sibling inbreeding families[J]. Aquaculture International, 2015, 23(6): 1401-1410.
- [31] Zhang S M, Wang D Q, Deng H, et al. Mitochondrial DNA variations of silver carp and grass carp in populations of the

middle reaches of the Yangtze River revealed by using RFLP-PCR[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26(2): 142-147.
[张四明, 汪登强, 邓怀, 等. 长江中游水系鲢和草鱼群体 mtDNA 遗传变异的研究[J]. *水生生物学报*, 2002, 26(2):

142-147.]

[32] Araki H, Schmid C. Is hatchery stocking a help or harm? Evidence, limitations and future directions in ecological and genetic surveys[J]. *Aquaculture*, 2010, 308(S1): S2-S11.

Current germplasm situation of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) candidate parent and parent from hatchery in the lower reaches of Changjiang River based on SSR markers

FENG Xiaoting^{1,2}, ZHANG Guining², XUE Xiangping², WANG Xingyan³, ZHOU Yanfeng², FANG Di'an^{1,2}, XU Dongpo^{1,2}

1. 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;
2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China

Abstract: This study aimed to assess stock enhancement of the bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *A. nobilis* is a fish of ecological and scientific significance, inhabiting most of Chinese freshwaters. Moreover, it is one of the most released species in the lower reaches of the Changjiang River. The primary focus of stock enhancement was to release juveniles into natural environments and enhance the stocks of interest. However, the genetic quality of large-scale stock fish is difficult to quantify. Consequently, it is essential to examine the genetic quality of the brood stocks in the hatchery, in order to provide a scientific reference for genetic resource management as well as living resources database construction of *A. nobilis* brood stocks in the lower reaches of the Changjiang River. During our study, the genetic diversity and population structure of 8 *A. nobilis* populations were studied using SSR markers. A total of 638 individuals from 7 parent populations and 1 candidate parent population were assayed by 10 pairs of SSR primers. Genetic diversity parameters, principal coordinate analysis (PCoA), and analysis of molecular variance (AMOVA) were generated using Cervus 3.0, GenAlEx 6.501 and Arlequin 3.1 software. Structure and CLUMP software were used to analyze the genetic structure of the populations. The results revealed that the genetic diversity was superior despite inbreeding risk within *A. nobilis* populations. The average number of alleles was 14.83 ± 1.45 , expected heterozygosity and observed heterozygosity were 0.82 ± 0.02 and 0.76 ± 0.05 , respectively, while Shannon information index was 2.08 ± 0.09 , and inbreeding coefficient was 0.08 ± 0.05 . The highest level of genetic diversity was in the candidate parent population. Furthermore, the genetic diversity of parent populations was different. According to structure and PCoA, all individuals could be divided into two genetic clusters, which showed that the genetic differentiation among parent populations were not significantly different, in addition the genetic differentiation between parent and candidate parent populations was significantly different. AMOVA analysis showed that 11% of genetic variation was among the populations and 89% of genetic variation was within populations. The genetic differences between candidate parent and the parent of bighead carp suggest the importance for the introduction and protection of natural germplasm. The results from this study further suggest that it is possible to improve hatchery practices and mitigate the negative effects on wild stocks. However, theoretical support and data reference are required for constructing a healthy and sustainable stock enhancement strategy.

Key words: *Aristichthys nobilis*; parents; candidate parents; genetic diversity; SSR markers

Corresponding author: FANG Di'an. E-mail: fangdian@ffrc.cn