

## 施氏鲟、达氏鳇及其杂交子代的分子鉴定

胡佳<sup>1,2</sup>, 汪登强<sup>2</sup>, 危起伟<sup>1,2,3</sup>, 沈丽<sup>2</sup>

(1. 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430070; 2. 农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000; 3. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

**摘要:** 采用 39 对微卫星引物扩增施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)、达氏鳇(*Huso dauricus*)及其正反杂交子代 [*A. schrenckii*(♀) × *H. dauricus*(♂), *H. dauricus*(♀) × *A. schrenckii*(♂)] 的全基因组。其中 5 对引物无扩增产物, 其余 34 对引物中, 有 3 对只在施氏鲟中得到扩增产物, 有 31 对能同时在 3 种鱼中进行有效扩增, 其中均呈单态的有 7 对, 均呈多态的有 22 对, 位点 *LS19* 和 *LS22* 在施氏鲟中呈多态, 在达氏鳇中呈单态。34 个微卫星位点共得到 96 个等位基因, 大小在 80~394 bp 之间。检测到种间特异位点 6 个(*HLJSX22*, *HLJSX23*, *HLJSX37*, *HLJSX41*, *HLJSX48*, *LS54*), 将这些位点部分组合, 可以有效鉴别出施氏鲟、达氏鳇和其杂交子代。同时测定杂交子代的线粒体控制区序列, 将测序结果与 GenBank 中施氏鲟和达氏鳇的同源序列进行比对, 根据线粒体母性遗传特性, 通过比对序列的差异大小来判断杂交子代的母本来源。结果表明, 采用微卫星分子标记结合线粒体控制区同源序列比对的方法, 可以很好地鉴别出施氏鲟、达氏鳇及其正反杂交子代。[中国水产科学, 2010, 17(1): 21-30]

**关键词:** 施氏鲟; 达氏鳇; 杂交子代; 微卫星; 线粒体 DNA; 鉴定

**中图分类号:** S91

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8737-(2010)01-0021-10

施氏鲟(*Acipenser schrenckii*) 和达氏鳇(*Huso dauricus*) 均属于鲟科 (*Acipenseridae*), 分别属于鲟属 (*Acipenser*) 和鳇属 (*Huso*), 主要分布于中国和俄罗斯交界的黑龙江中下游, 有时进入乌苏里江, 但极少进入松花江, 为典型淡水定居鲟种<sup>[1-2]</sup>。鲟形目鱼类全部为多倍体起源的鱼类<sup>[3]</sup>, 具有较强的杂交能力<sup>[4]</sup>, 很容易造成基因渗入现象 (Introgression)。目前在中国养殖的杂交鲟占有所有养殖鲟种类的 40%<sup>[5]</sup>。因此随着鲟养殖产业的不断扩大和鲟类产品 (主要包括鱼子酱和鱼肉) 贸易的国际化, 明确标识产品来源就成为规范鲟贸易的关键。

在鲟类鉴定方面, 国际上采用的方法主要包括形态学、生物化学和遗传学方法。选择合适的分子标记是从遗传学角度进行鉴别的前提和保证<sup>[6]</sup>。在杂交鲟的遗传学鉴别方面, 已有 Congiu 等<sup>[7-8]</sup> 使用

AFLP 分子标记和 Chelomina 等<sup>[9]</sup> 使用多个 RAPD 分子标记进行分析的报道。本实验以施氏鲟和达氏鳇之间的杂交为例, 利用核基因的简单序列重复 (Simple sequence repeats, SSR) 在施氏鲟、达氏鳇及其杂交子代中扩增条带的差异鉴定这 3 种鲟, 并结合线粒体 DNA (mtDNA) 的母性遗传效应和线粒体控制区种间变异较种内变异大的特点<sup>[10]</sup>, 判断杂交子代的母本来源, 以期对鲟及其杂交子代的鉴别提供科学依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

实验用施氏鲟与达氏鳇的性成熟个体和施氏鲟幼体来源于黑龙江抚远县, 正交子代 [*A. schrenckii*(♀) × *H. dauricus*(♂)] 和反交子代 [*H. dauricus*(♀) × *A. schrenckii*(♂)]。

收稿日期: 2009-05-22; 修订日期: 2009-07-21.

基金项目: 科技部社会公益性研究专项 (2004DIB3J099); 湖北省科技攻关计划项目 (N12-03)。

作者简介: 胡佳 (1984-), 女, 硕士, 主要从事鱼类生物技术和遗传育种研究。E-mail: hujia\_h@163.com

通讯作者: 危起伟。E-mail: weiqw@yfi.ac.cn

× *A. schrenckii* (♂)] 为不同野生亲本的人工繁殖子一代, 体长范围为 0.28 ~ 3.1 m, 均分批采自湖北天峡鲟业有限公司宜都基地和当阳基地。每个样本剪少量新鲜尾鳍条, 保存于 95% 乙醇, 带回实验室备用。分批采到的不同规格的鱼, 有施氏鲟 8 尾, 达氏鲟 12 尾和杂交子代 12 尾, 用于基因组扩增分析。

## 1.2 基因组 DNA 提取

采用高盐法提取基因组 DNA。取大约 0.5 g 尾鳍条, 灭菌双蒸水洗去酒精后, 加入 500 μL 的 HOM Buffer (80 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris, 0.5% SDS, pH 8.0) 和 10 ~ 15 μL 的蛋白酶 K (20 mg/mL) 于 55 °C 温育 3 h 以上, 加入 4.5 mol/L NaCl 500 μL 和 300 μL 氯仿, 均匀混合 20 min, 13 000 r/min 常温离心 10 min, 取上清液加入 595 μL 异丙醇混匀 20 min, 离心去上清液, 加入 0.5 mL 75% 冰乙醇洗涤, 13 000 r/min 常温离心 20 min, 去上清液, 自然干燥后加入 50 μL 的去离子水溶解。于 -20 °C 保存备用。用时解冻后稀释 100 倍。

## 1.3 微卫星分析

扩增微卫星序列的引物来源于 May 等<sup>[11]</sup> 根据湖鲟 (*Acipenser fulvescens*) 的微卫星位点而设计的全部 11 对引物和于冬梅等<sup>[12]</sup> 用磁珠富集法制备的全部 28 对施氏鲟引物 (表 1)。引物由上海生工生物公司合成, 每一对引物通过温度梯度筛选找到最合适的退火温度后, 进行 PCR 扩增。

PCR 反应体系为 25 μL, 包括 1 μL 模板 DNA, 2.5 μL 10 × Buffer, dNTP (Promega) 各 120 μmol/L, 上下游引物均为 0.2 μmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U (TaKaRa), ddH<sub>2</sub>O 19.87 μL。热循环条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 46 ~ 61 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 50 s, 经 35 个循环后再 72 °C 充分延伸 5 min。PCR 产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳及紫外凝胶成像系统检测, 确定有扩增产物后, 用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染检测, 并在凝胶成像系统下观察结果与拍照。

## 1.4 mtDNA 分析

**1.4.1 线粒体 D-loop 扩增** 对不同亲本繁殖的杂交子代的线粒体 D-loop 进行测序, 以验证依据线粒

体 DNA 确定杂交子代母本来源的可靠性。扩增 D-loop 的引物序列<sup>[13]</sup> 如下:

DL: 5' CAAGAACACAAGATTAATGAG3'

H740: 5' GATCAAGGTATGTCGATGACA3'

PCR 反应总体积 50 μL。其中含模板 DNA 2 μL, 10 × Buffer 5 μL, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.4 μL, dNTPs (10 mmol/L) 各 1 μL, 引物各 2 μL, 灭菌双蒸水补至 50 μL。反应程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 40 s, 52 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 充分延伸 5 min。

**1.4.2 线粒体 D-loop 回收和测序** 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增效果, 对扩增效果好的 PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 用 DNA 回收试剂盒 (AxyGen) 回收目的 DNA 片段。将回收产物送往联合基因科技 (集团) 有限公司测序。

## 1.5 数据处理

根据微卫星电泳图谱和测序结果分析如下数据:

(1) 用 Quantity One 软件 (BioRad) 的 standard 功能确定微卫星扩增条带的分子量大小。

(2) 用 Clustal X1.83 软件<sup>[14]</sup> 对所测得的序列进行比对。利用 Mega 软件<sup>[15]</sup> 统计变异位点、碱基组成等。

(3) 用 Lasergene 软件计算两两序列的遗传相似度和序列差异百分比。

(4) 基于双参数 Kimuar-2-Parameter 距离, 采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建施氏鲟、达氏鲟和杂交子代的分子系统树, 各分枝的置信度由 1 000 次自举法 (Bootstrap) 重复检测<sup>[16]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 微卫星位点的 PCR 扩增结果

本实验所用 39 对微卫星引物中, 有 5 对无扩增产物 (HLJSX9, HLJSX49, LS58, LS23, LS69)。其余 34 对引物中, 在 3 种鱼中均能有效扩增的有 31 对, 其中均呈单态的 7 对, 均呈多态的 21 对; 位点 *LS19* 和 *LS22* 在达氏鲟中呈单态, 在施氏鲟中呈多态。在施氏鲟中多态位点 24 个, 单态位点 7 个, 共得到等位基因 55 个, 每个位点平均等位基因数为 1.77, 大

表 1 39 对微卫星引物的基本信息<sup>[11-12]</sup>  
 Tab. 1 Primer sequences of 39 pairs of microsatellite loci selected in this study<sup>[11-12]</sup>

| 位点<br>Locus | 重复序列<br>Repeat motif                                     | 上游引物(5'-3')<br>Forward primer (5'-3') | 下游引物(5'-3')<br>Reverse primer (5'-3') | 退火温度 /℃<br>Annealing temperature |
|-------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| HLJSX2      | (CT) <sub>6N</sub> (CT) <sub>4</sub>                     | GTTCGTATTTTAACCCCTCT                  | CATCTTCTCCTCGTCCTT                    | 49                               |
| HLJSX3      | (CT) <sub>6N</sub> (CT) <sub>6N</sub> (CT) <sub>4</sub>  | AGGAGGCGGAGAAGGTAG                    | AGGGGTAAAAATACAAACAGAT                | 60                               |
| HLJSX6      | (CT) <sub>53</sub>                                       | TCATCTCACTACTTGCTCT                   | GTGTTTGCTACCCCGTCT                    | 51                               |
| HLJSX7      | (GT) <sub>13</sub>                                       | GAAAGGACACCAGCAGTG                    | AACCCATTAACAATTACAGC                  | 57                               |
| HLJSX9      | (GT) <sub>49</sub>                                       | TAGACTAAATTGCGATGCTG                  | CGATTAAAGTTGGCTGACG                   | 54                               |
| HLJSX11     | (GT) <sub>35N</sub> (GT) <sub>11</sub>                   | CCTGTTAGTCGGTTCATT                    | TTTGATAGGTTTGCCAGT                    | 49                               |
| HLJSX13     | (CT) <sub>4N</sub> (CT) <sub>20</sub>                    | TCAAATGGCAACAGGGTG                    | ACAGGCGTATGAAGCAGA                    | 52                               |
| HLJSX15     | (GT) <sub>25</sub>                                       | TTTTAGCCTGTTTGCTCG                    | GCCTTCCGTTCTTTATTT                    | 57                               |
| HLJSX17     | (CT) <sub>27</sub>                                       | TAAGGTTGATGGGCTGAG                    | GATTGTGACTGCGGTGAA                    | 62                               |
| HLJSX21     | (GA) <sub>14</sub>                                       | TAAAGAGCGTGGCGTGTG                    | CAGCCTTCATCATCTCCC                    | 61                               |
| HLJSX22     | (CA) <sub>6N</sub> (CA) <sub>9N</sub> (CT) <sub>20</sub> | CAGCCAACACACACACACAG                  | CATGCGCTACAGACTCCAAA                  | 52                               |
| HLJSX23     | (CT) <sub>23</sub>                                       | TCAGCTGGCTGGATTTCTCT                  | GGAGCTCCAACACATCCCTA                  | 59                               |
| HLJSX24     | (CT) <sub>6N</sub> (CT) <sub>6N</sub> (CT) <sub>4</sub>  | TGTCTCTGCGTGTGTGTGAA                  | CTGCAGCTCCATCTTCTCCT                  | 59                               |
| HLJSX25     | (CT) <sub>40</sub>                                       | GTCAATCCCTCTCCCTCCTC                  | ATACCTATCCCGCTGTCGAA                  | 53                               |
| HLJSX26     | (GA) <sub>5N</sub> (GA) <sub>2</sub>                     | CTCGCTTTTCGCACTAGCTGA                 | CGCGCACATTACTGAAGAGA                  | 53                               |
| HLJSX29     | (CT) <sub>3N</sub> (CA) <sub>3N</sub> (CA) <sub>3</sub>  | GATGCCCCGATTCACTCCTTA                 | TCAGCGTGTGATCTGTGTGA                  | 51                               |
| HLJSX30     | (CTAT) <sub>12</sub>                                     | GGGGAGAAAAGTGGGGTAAA                  | CACGTGGATGCGAGAAATAC                  | 57                               |
| HLJSX32     | (GT) <sub>2N</sub> (GT) <sub>4</sub>                     | AGATGCTGTGTGCCCTTTGTG                 | GTGTGGGCATATTGCGTTTT                  | 55                               |
| HLJSX36     | (CA) <sub>2N</sub> (CA) <sub>3N</sub> (CA) <sub>5</sub>  | GACCCTCAGCACTCACACAA                  | GTTTTCCAGTCACGACGTT                   | 53                               |
| HLJSX37     | (GT) <sub>18</sub>                                       | TAGGAATCGCATCAGCAGTG                  | GTAAAAACCGCGAGTTCACA                  | 48                               |
| HLJSX40     | (GT) <sub>25</sub>                                       | GTTTGCTCGTCGATTGGAGT                  | TTTCAATACCCATGCCACA                   | 55                               |
| HLJSX41     | (GA) <sub>3N</sub> (CA) <sub>2N</sub> (CA) <sub>2</sub>  | GCGCCACACACTCAACTCT                   | GCGTCCCAATAGACCACATT                  | 47                               |
| HLJSX42     | (GT) <sub>3N</sub> (CA) <sub>2</sub>                     | CGGTGCGACTGTTGTGTCTA                  | AAAGCGCAATCATAGGGAGA                  | 51                               |
| HLJSX43     | (TA) <sub>2N</sub> (TA) <sub>2N</sub> (CT) <sub>11</sub> | GGAGGCGAGAATACTTGAGG                  | GGGGGAGGTGTCTGTGTTAG                  | 47                               |
| HLJSX44     | (CT) <sub>12</sub>                                       | CTGAGGCAGGGGTGTACTGT                  | AGACGCCATCGAATGACTTT                  | 55                               |
| HLJSX45     | (GA) <sub>31</sub>                                       | CTCAAGCTATGCATCCAACG                  | CATTGAAGCAGGGACCAAAT                  | 45                               |
| HLJSX48     | (GT) <sub>9</sub>                                        | CTAAGCAAGCCTCTCGCTGT                  | GTTTTCCAGTCACGACGTT                   | 49                               |
| HLJSX49     | (GT) <sub>11</sub>                                       | AGTGTGTGTGTGTGGGGTGT                  | GTTGTGTAACGCCAGGGTTT                  | 53                               |
| LS19        | (TTG) <sub>9</sub>                                       | CATCTTAGCCGCTCTGTGGTAC                | CAGGTCCCTAATAACAATGGC                 | 57                               |
| LS22        | (AAAT) <sub>6</sub> (AAG) <sub>30</sub>                  | TCCACAATCCTGAATAATGAC                 | GCACCATCTAATACGAAATTG                 | 57                               |
| LS23        | (GTTT) <sub>8</sub>                                      | TGCAGTAGATCATTGGTGG                   | CCTACATCCCACNACGGTAG                  | 57                               |
| LS34        | (GTT) <sub>10</sub>                                      | TACATACCTTCTGCAACG                    | GATCCCTTCTGTTATCAAC                   | 57                               |
| LS39        | (GTT) <sub>10</sub>                                      | TTCTGAAGTTCACACATTG                   | ATGGAGCATTATTGGAAGG                   | 57                               |
| LS54        | (GATA) <sub>6</sub> (GACA) <sub>7</sub>                  | CTCTAGTCTTTGTTGATTACAG                | CAAAGGACTTGAAACTAGG                   | 57                               |
| LS57        | (GAA) <sub>29</sub>                                      | GCTTGCTGTCTAGTTTGC                    | GTACAGATGAGACCAGAGGC                  | 57                               |
| LS58        | (GATA) <sub>20</sub>                                     | TCGGTTGAGTGATTGGTATC                  | CTGAAAGGTGAATCTACTCCC                 | 57                               |
| LS62        | (GACA) <sub>7</sub>                                      | GATCAGGAGGGCAGAGNAAC                  | CCCTGGATTTGAATTAACAG                  | 57                               |
| LS68        | (GATA) <sub>13</sub>                                     | TTATTGCATGGTGTAGCTAAAC                | AGCCCAACACAGACAATATC                  | 57                               |
| LS69        | (TATC) <sub>13</sub>                                     | ATCTGAATTGANTTCGTG                    | TTGGATACTGTGTTCCAAC                   | 57                               |

小范围为 94 ~ 378 bp。在达氏鳇中多态位点 22 个,单态位点 9 个,共得到等位基因 67 个,每个位点平均等位基因数为 2.16,大小范围在 80 ~ 394 bp。杂

交子代的条带类型基本上包含了施氏鳇和达氏鳇的条带类型。部分扩增结果见图 1-3。

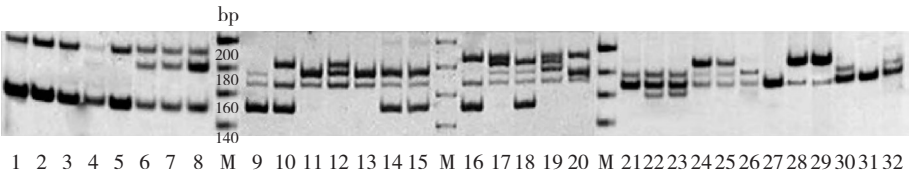


图 1 引物 LS54 的电泳图谱

M: 标准分子量; 1-8: 施氏鳇; 9-15: 反交子代 [达氏鳇(♀) × 施氏鳇(♂)]; 16-20: 正交子代 [施氏鳇(♀) × 达氏鳇(♂)]; 21-32: 达氏鳇。  
Fig. 1 SDS-PAGE electrophoretic patterns of primer LS54  
M: DNA marker; 1-8: *Acipenser schrenckii*; 9-15: *H. dauricus* (♀) × *A. schrenckii* (♂); 16-20: *A. schrenckii* (♀) × *H. dauricus* (♂); 21-32: *Huso dauricus*.

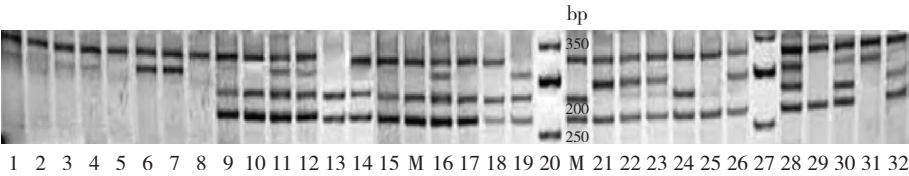


图 2 引物 HLJSX48 的电泳图谱

M: 标准分子量; 1-8: 施氏鳇; 9-20: 达氏鳇; 21-27: 反交子代 [达氏鳇(♀) × 施氏鳇(♂)]; 28-32: 正交子代 [施氏鳇(♀) × 达氏鳇(♂)].  
Fig. 1 SDS-PAGE electrophoretic patterns of primer HLJSX48  
M: DNA marker; 1-8: *Acipenser schrenckii*; 9-20: *Huso dauricus*; 21-27: *H. dauricus* (♀) × *A. schrenckii* (♂); 28-32: *A. schrenckii* (♀) × *H. dauricus* (♂).



图 3 引物 HLJSX37 的电泳图谱

M: 标准分子量; 1-8: 施氏鳇; 9-20: 达氏鳇; 21-27: 反交子代 [达氏鳇(♀) × 施氏鳇(♂)]; 28-32: 正交子代 [施氏鳇(♀) × 达氏鳇(♂)].  
Fig. 3 SDS-PAGE electrophoretic patterns of primer HLJSX37  
M: DNA marker; 1-8: *Acipenser schrenckii*; 9-20: *Huso dauricus*; 21-27: *H. dauricus* (♀) × *A. schrenckii* (♂); 28-32: *A. schrenckii* (♀) × *H. dauricus* (♂).

2.2 施氏鳇、达氏鳇特异微卫星位点筛选

在 34 个能够有效扩增的微卫星位点中,检测到有 6 个位点能在施氏鳇和达氏鳇中扩增出稳定的特异条带(*HLJSX22*, *HLJSX23*, *HLJSX37*, *HLJSX41*, *HLJSX48*, *LS54*)。其中位点 *HLJSX22*, *HLJSX23* 和 *HLJSX37* 在达氏鳇中无任何扩增产物,只在施氏鳇中得到扩增产物,推测这 3 个位点为施氏鳇的特异微卫星位点,达氏鳇无该位点;位点 *HLJSX41* 和

*HLJSX48* 在施氏鳇和达氏鳇中均能得到扩增产物,但它们的扩增条带存在差异,前者在施氏鳇中多 1 个稳定条带(182 bp),后者在达氏鳇中多 2 个稳定条带(282 bp 和 268 bp);位点 *LS54* 在 2 种鱼中扩增得到的条带有较大差异,其中施氏鳇中稳定条带为 154 bp,达氏鳇中稳定条带为 174 bp。杂交子代在群体水平上基本上继承了施氏鳇和达氏鳇的全部扩增条带。对这 6 个位点的详细统计结果如表 2 所示。

表 2 3 种鲟在 6 个微卫星特异位点上的扩增产物信息  
Tab. 2 Amplified product information of six specific microsatellite loci in three species of sturgeons

| 特异位点<br>Specific loci | 扩增产物大小 /bp Amplified product size      |                             |                                        |
|-----------------------|----------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------|
|                       | 施氏鲟<br><i>Acipenser schrenckii</i>     | 达氏鲟<br><i>Huso dauricus</i> | 正反杂交子代<br>Reciprocal hybrids           |
| HLJSX22               | 149                                    | 无 None                      | 149                                    |
| HLJSX23               | 319, 312, 306, 300, 292, 274, 261, 225 | 无 None                      | 319, 312, 306, 300, 292, 274, 261, 225 |
| HLJSX37               | 122                                    | 无 None                      | 122                                    |
| HLJSX41               | 270, 262, 230, 225, 204, 182           | 270, 262, 230, 225, 204     | 270, 262, 230, 225, 204, 182           |
| HLJSX48               | 331, 309                               | 331, 309, 282, 268          | 331, 309, 282, 268                     |
| LS54                  | 192, 180, 154                          | 188, 180, 174, 160          | 192, 188, 180, 174, 154                |

根据表 2 的实验结果,可将部分特异位点进行组合以区分这 3 种鲟。例如在 HLJSX48 位点扩增出 268 bp 和 282 bp 条带即可排除是施氏鲟的可能性;再继续用 HLJSX22 位点确定是达氏鲟还是杂交子代,如果能扩增出 149 bp 的条带,说明是杂交子代,否则是达氏鲟。按照先排除施氏鲟的鉴别思路,统计出鉴别这 3 种鱼最方便可靠的引物组合为 HLJSX48/HLJSX22, HLJSX48/HLJSX23, HLJSX48/HLJSX37, HLJSX54/HLJSX22, HLJSX54/HLJSX23, HLJSX54/HLJSX37。

2.3 线粒体 D-loop 序列测定

测定不同正交子代和反交子代的线粒体 D-loop 序列,均分别得到 500 bp 和 510 bp 的核苷酸片段。经

Clustal X 同源比对后,发现正交子代群体缺失 11 个核苷酸,反交子代群体缺失 1 个核苷酸,序列实际长度为 507 bp。正反杂交子代在第 269 ~ 410 bp 之间检测到了 46 个变异位点,是变异频率较高的区段,可考虑作为鲟科鱼类种群鉴别的分子标记。施氏鲟、达氏鲟及其正反杂交子代同源序列比对结果如图 4 所示。

2.4 遗传差异与系统树

将杂交子代与 GenBank 中施氏鲟和达氏鲟的 D-loop 序列(GenBank 登录号分别为 FJ843098 和 FJ843095)进行比对,经 Lasergene 软件计算出的遗传差异度和相似度见如表 3 所示,用 MEGA 4.0 基于 Kimuar-2-Parameter 参数构建的分子系统树如图 5 所示。

表 3 本研究中的 4 种鲟 mtDNA D-loop 序列的遗传差异度 % (对角线以下)和遗传相似度 % (对角线以上)  
Tab. 3 Genetic distance ( below diagonal )and genetic similarity ( above diagonal )of 4 species of sturgeons based on alignment of mtDNA D-loop nucleotide sequences

|    | A    | H    | H1   | H2   | H3   | H4   | H5   | H6   | H7   | A1   | A2   | A3   | A4   | A5   |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| A  |      | 82.2 | 86.9 | 86.5 | 86.7 | 86.3 | 86.5 | 86.1 | 86.3 | 98.6 | 97.6 | 97.4 | 97.6 | 97.8 |
| H  | 20.7 |      | 97.8 | 97.4 | 97.6 | 97.2 | 97.2 | 96.8 | 97.0 | 86.1 | 85.3 | 85.3 | 85.1 | 85.3 |
| H1 | 14.9 | 2.2  |      | 99.4 | 99.2 | 99.4 | 99.4 | 99.0 | 99.2 | 87.1 | 86.5 | 85.9 | 86.1 | 86.3 |
| H2 | 15.4 | 2.6  | 0.6  |      | 98.6 | 98.8 | 98.2 | 98.4 | 99.6 | 86.5 | 85.9 | 85.3 | 85.5 | 85.7 |
| H3 | 15.1 | 2.4  | 0.8  | 1.4  |      | 98.6 | 98.6 | 98.2 | 98.4 | 86.9 | 86.3 | 85.7 | 85.9 | 86.1 |
| H4 | 15.6 | 2.8  | 0.6  | 1.2  | 1.4  |      | 98.8 | 98.4 | 98.6 | 86.5 | 85.9 | 85.3 | 85.5 | 85.7 |
| H5 | 15.4 | 2.8  | 0.6  | 1.2  | 1.4  | 1.2  |      | 98.4 | 98.6 | 86.7 | 86.1 | 85.5 | 85.7 | 85.9 |
| H6 | 15.9 | 3.2  | 1.0  | 1.6  | 1.8  | 1.6  | 1.6  |      | 98.2 | 86.3 | 86.1 | 85.1 | 85.3 | 85.5 |
| H7 | 15.6 | 3.0  | 0.8  | 1.4  | 1.6  | 1.4  | 1.4  | 1.8  |      | 86.7 | 86.1 | 85.5 | 85.7 | 85.9 |
| A1 | 1.4  | 15.9 | 14.6 | 15.3 | 14.8 | 15.3 | 15.0 | 15.6 | 15.1 |      | 99.0 | 98.8 | 99.0 | 99.2 |
| A2 | 2.5  | 16.9 | 15.3 | 16.0 | 15.5 | 16.0 | 15.7 | 15.7 | 15.8 | 1.0  |      | 97.8 | 98.0 | 98.2 |
| A3 | 2.7  | 16.8 | 16.1 | 16.8 | 16.3 | 16.8 | 16.5 | 17.0 | 16.6 | 1.2  | 2.3  |      | 97.8 | 98.0 |
| A4 | 2.5  | 17.1 | 15.8 | 16.5 | 16.0 | 16.5 | 16.3 | 16.8 | 16.3 | 1.0  | 2.0  | 2.3  |      | 98.2 |
| A5 | 2.3  | 16.9 | 15.6 | 16.3 | 15.8 | 16.3 | 16.0 | 16.5 | 16.1 | 0.8  | 1.8  | 2.0  | 1.8  |      |

注: A. 施氏鲟; H. 达氏鲟; H1-H7: 反交子代; A1-A5: 正交子代。  
Note: A. *Acipenser schrenckii*; H. *Huso dauricus*; H1-H7: *H. dauricus* (♀) × *A. schrenckii* (♂); A1-A5: *A. schrenckii* (♀) × *H. dauricus* (♂)。

于反交子代与施氏鲟和正交子代的遗传差异。构建的分子系统树显示,正交子代全部与施氏鲟聚在一支,而反交子代也全部与达氏鳇聚在一支(图5)。

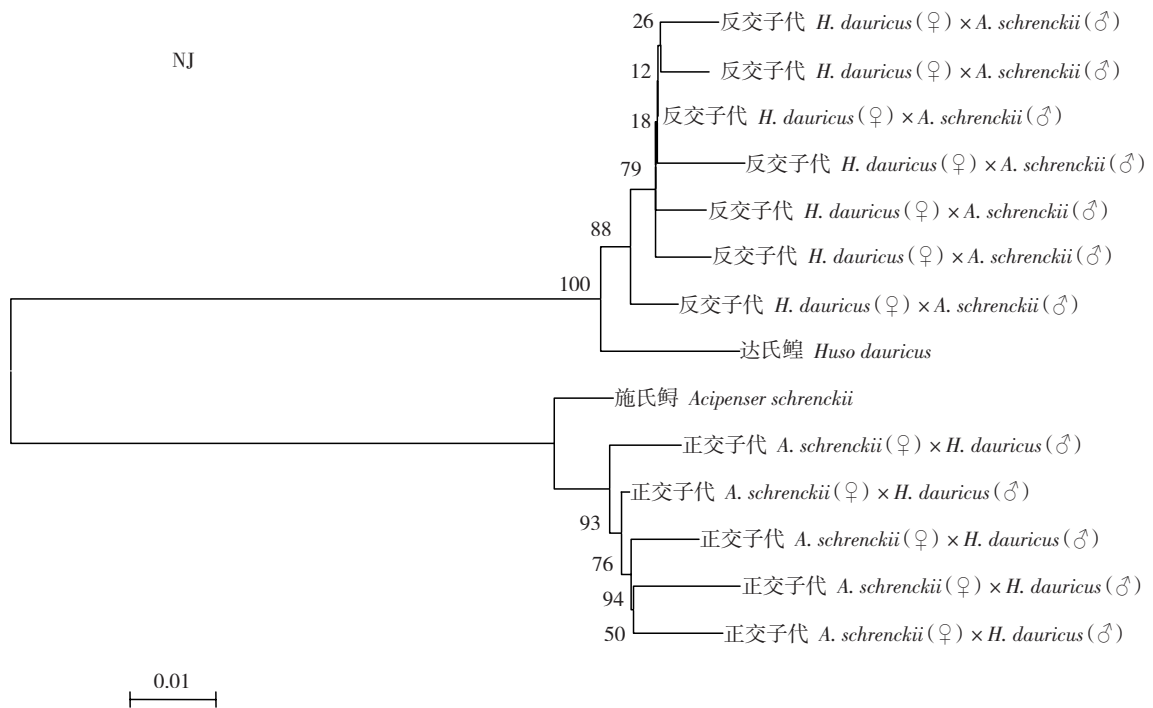


图5 基于线粒体 DNA D-loop 构建的鲟 NJ 分子系统树  
节点处数字表示 Bootstrap 检测重复 1 000 次的自举检测值.

Fig. 5 Molecular phylogenetic tree of four species of sturgeons based on mtDNA D-loop sequence. Numbers on the nodes are percentages of bootstrap of 1 000 replications.

### 3 讨论

### 3.1 关于微卫星引物的通用性和其在物种鉴定中的应用

本实验显示出鲟科鱼类微卫星 DNA 侧翼序列具有高度保守性,同一引物可在属间进行有效扩增,且在不同种中得到的等位基因大小和数目不尽相同,说明同一座位在种间亦存在广泛变异,这是应用微卫星分子标记进行物种鉴定的理论基础。实验中检测了 39 对微卫星引物在施氏鲟、达氏鳇和杂交子代中的扩增情况,筛选出 6 个微卫星特异位点,并通过部分位点之间的组合鉴别出施氏鲟、达氏鳇和杂交子代。若增加实验用鲟种类,相同微卫星位点就有可能在更多鲟中检测出来,那么用于鉴别的特异等位基因位点就要相应发生变化。若要准确鉴别更多的鲟种,则有必要确定更多的鲟科鱼类微卫星特异位点,进而建立一套相对完整的微卫星标记数据库。

微卫星分子标记由于具有高度多态性、共显性的孟德尔遗传方式以及数目巨大且随机分布的特点,被广泛应用到性状分析、群体遗传分析、进化和种质鉴定等研究中<sup>[17]</sup>。在利用微卫星分子标记进行种质鉴定方面, Jenneckens 等<sup>[18]</sup>用湖鲟 LS39 引物扩增 10 种鲟微卫星位点,该位点在闪光鲟上独有且仅有 1 个 110 bp 的等位基因,从而与其他 9 种鲟区分开。Beacham 等<sup>[19]</sup>应用 13 个微卫星位点区分了环太平洋区不同区域种群的大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)。本实验以同一个微卫星位点上等位基因的存在和无和片段大小差异作为鉴别指标,来区分施氏鲟、达氏鳇和杂交子代。值得一提的是,位点 *HLJSX22* 和 *HLJSX37* 在施氏鲟和杂交子代中均表现单态,且在达氏鳇中无该位点。若能找到某一位点只存在于达氏鳇基因组且表现单态,那么根据微卫星的遗传方式,在杂交子代中也能得到该单态位点。从而将这些种间特异单态位点组合用以鉴别这 4 种鲟会显得更为直观和方便。

### 3.2 应用微卫星分子标记进行物种鉴定时需注意的问题

微卫星是以 1~6 个核苷酸为基本重复单元的串联重复序列,其本身重复单元数的变异是物种具有遗传多态性的基础<sup>[20]</sup>。若这种变异被保存下来,那么该位点在群体水平上将会表现出较高的多态性,如位点 *HLJSX23* 和 *HLJSX41*。而对于个体而言,某一微卫星位点的等位基因数是和该生物的染色体倍性相关的。一般地,对于一个普通二倍体生物个体,由于引物是针对特异的微卫星位点设计的,因而每对引物在杂合个体中只能扩增出 2 条带,在纯合个体中只能扩增 1 条带<sup>[21-22]</sup>。如果扩增结果和染色体倍性不相符合,那么就有必要判断扩增条带的真实性,排除非特异性扩增,因此正确判别等位基因对种的鉴别显得极为重要。本实验中所用 39 对微卫星引物在少数位点扩增出的条带强度相同,且数目与倍性关系不相符合,如 *LS57*、*LS68*、*HLJSX13*、*HLJSX44*,针对这些 DNA 片段还需要进一步回收、克隆和测序,以排除假阳性带。有些位点还出现了诸如“影子带”(Shadow band)、“异源双链核酸分子”(Heteroduplex)<sup>[23]</sup>的扩增条带,如 *HLJSX41*、*HLJSX3*、*LS54*、*HLJSX11*、*HLJSX25*。在统计时需将这些非目的条带排除。这些初步结果表明,在利用微卫星分子标记进行物种鉴定时,确定各位点等位基因数目和大小尤为重要。

### 3.3 利用线粒体基因母性遗传特性探讨杂交子代的母本来源

mtDNA 是核外遗传物质,呈母系遗传(Maternal inheritance)特征,来自父系的 mtDNA 不对子代遗传做出重要贡献,后代的 mtDNA 几乎全部来自母本。鱼类线粒体控制区(D-loop region)位于 tRNA<sup>Pro</sup>和 tRNA<sup>Phe</sup>基因之间,是整个 mtDNA 中变异最大的区域<sup>[24-25]</sup>。鲟线粒体控制区序列在种间的差异显著大于种内的差异(约 6~10 倍,见表 2),因此利用该序列能够方便可靠地鉴别物种的母系来源,并且在构建系统发生树和进行物种鉴别方面都有较好的应用<sup>[26-27]</sup>。在本实验中以序列测定为基础,扩增了长为 507 bp 的 D-loop 序列,对比序列的同源性,计

算遗传相似度和差异度百分比,与基于邻位相连法(NJ)计算的系统树相结合,可得出正交子代[施氏鲟(♀)×达氏鲤(♂)]和施氏鲟的序列相似度较高,反交子代(达氏鲤(♀)×施氏鲟(♂)]与达氏鲤的序列相似度较高的结论,以此可确定 2 种杂交子代的母本来源。本研究结果证实线粒体 DNA 控制区序列可以用于杂交子代鉴定。

致谢:湖北天峡鲟业有限公司提供大量实验样品。长江水产研究所博士李创举、硕士张燕,上海海洋大学硕士研究生姚廷丹,华中农业大学博士研究生邹远超在样品采集和实验过程中给予有益帮助,谨表由衷谢忱。

#### 参考文献:

- [1] Wei Q W, Ke F E, Zhang J M, et al. Biology, fisheries, and conservation of sturgeons and paddlefish in China [J]. *Environ Biol Fish*, 1997, 48: 241-255.
- [2] Zhuang P, Kynard B, Zhang L, et al. Overview of biology and aquaculture of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) in China [J]. *J Appl Ichthyol*, 2002, 18: 659-664.
- [3] 张四明,晏勇,邓怀,等.几种鲟鱼基因组大小、倍性的特性及鲟形目细胞进化的探讨[J]. *动物学报*, 1999, 45(2): 200-206.
- [4] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 95-96.
- [5] 李融. 中国鲟鱼养殖产业可持续发展研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008: 30-33.
- [6] Ludwig A. Identification of Acipenseriformes species in trade [J]. *J Appl Ichthyol*, 2008, 24: 2-19.
- [7] Congiu L, Fontana F, Patarnello T, et al. The use of AFLP in sturgeon identification [J]. *J Appl Ichthyol*, 2002, 18: 286-289.
- [8] Congiu L, Dupanloup I, Patarnello T, et al. Identification of interspecific hybrids by amplified fragment length polymorphism: the case of sturgeon [J]. *Mol Ecol*, 2001, 10: 2355-2359.
- [9] Chelomina G, Rozhkovskiy K, Ivanov S, et al. Discrimination of interspecific hybrids in natural populations of Amur sturgeon fish by means of multilocus RAPD-PCR markers [J]. *Cytol Genet*, 2008, 42: 342-350.
- [10] 谢振宇,杜继曾,陈学群,等.线粒体控制区在鱼类种内遗传分化中的意义[J]. *遗传*, 2006, 28(3): 362-368.
- [11] May B, Krueger C C, Kincaid H L. Genetic variation at

- microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus* [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1997, 54: 1542–1547.
- [12] 于冬梅, 匡友谊, 马海涛, 等. 用磁珠富集法制备史氏鲟的微卫星分子标记 [J]. *大连水产学院学报*, 2007, 22 ( 6 ): 431–435.
- [13] Zhang S M, Wang D Q, Zhang Y P. Mitochondrial DNA variation, effective female population size and population history of the endangered Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* [J]. *Conserv Genet*, 2003, 4: 673–683.
- [14] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 2: 4876–4882.
- [15] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software [J]. London: Oxford University Press, 2001, 17 ( 12 ): 1244–1245.
- [16] Hall B G. Comparison of the accuracies of several phylogenetic methods using protein and DNA sequences [J]. *Mol Biol Evol*, 2005, 22: 792–802.
- [17] 孙效文, 张晓锋, 赵莹莹, 等. 水产生物微卫星标记技术研究进展及其应用 [J]. *中国水产科学*, 2008, 15 ( 4 ): 689–703.
- [18] Jenneckens I, Meyer J N, Schwark G H, et al. A fixed allele at microsatellite locus LS-39 exhibiting species-specificity for the black caviar producer *Acipenser stellatus* [J]. *J Appl Ichthyol*, 2001, 17: 39–42.
- [19] Beacham T D, Candy J R, Jonsen K L, et al. Estimation of stock composition and individual identification of chinook salmon across the Pacific rim by use of microsatellite variation [J]. *Trans Am Fish Soc*, 2006, 135: 861–888.
- [20] 宋国华, 刘田福. 微卫星标记及其在实验动物中的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2005, 15 ( 4 ): 244–248.
- [21] Crooijmans R P M A, Bierbooms V A F, Komen J, et al. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Anim Genet*, 1997, 28: 129–134.
- [22] 刘静霞, 周莉, 赵振山, 等. 锦鲤 4 个人工雌核发育家系的微卫星标记研究 [J]. *动物学研究*, 2002, 23 ( 2 ): 97–105.
- [23] 林凯东, 罗琛. 鲤的微卫星引物对草鱼基因组分析适用性的初步研究 [J]. *激光生物学报*, 2003, 12 ( 2 ): 121–127.
- [24] 夏德全, 王文君. 动物线粒体 DNA 研究及在鱼类种群遗传结构研究中的应用 [J]. *水产学报*, 1998, 22 ( 4 ): 365–370.
- [25] 郭新红, 刘少军, 刘巧, 等. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展 [J]. *遗传学报*, 2004, 31 ( 9 ): 983–1000.
- [26] Zhang S M, Wu Q J, Zhang Y P, et al. On the taxonomic status of Yangtze sturgeon, Asian and American green sturgeon based on mitochondrial control region sequences [J]. *Acta Zool Sin*, 2001, 47: 632–639.
- [27] Mugue N S, Barmintseva A E, Rastorguev S M, et al. Polymorphism of the mitochondrial DNA control region in eight sturgeon species and development of a system for DNA-based species identification [J]. *Russ J Genet*, 2008, 44: 793–798.

## Molecular identification of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*), kaluga (*Huso dauricus*) and their reciprocal hybrids

HU Jia<sup>1,2</sup>, WANG Dengqiang<sup>2</sup>, WEI Qiwei<sup>1,2,3</sup>, SHEN Li<sup>2</sup>

(1.College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2.Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation and Utilization, Ministry of Agriculture; Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China; 3.Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) and kaluga (*Huso dauricus*) are both ancient freshwater Chondrostei species, which historically ranged throughout Amur River and its tributaries, especially Ussuri River. Their eggs (sold as caviar) and meat are still valuable wildlife products. They are sympatric species throughout the distribution areas of each other, and they are easy to hybridize in wild fields and in aquaculture. Due to the high occurrence of interspecific hybridization, a species identification method will be helpful to commercial trade supervision and protection of the endangered aquatic animal. Here we try to apply SSR techniques to develop the method. Thirty-nine pairs of microsatellite primers were synthesized for PCR amplification on the genome DNA of *Acipenser schrenckii*, *Huso dauricus* and their reciprocal hybrids. Five primer pairs amplified no products. Among the 34 primer pairs which could effectively amplify products, 3 primer pairs functioned only in *A. schrenckii*, and 31 universal primer pairs could effectively amplify in the three species of sturgeons which included 7 monomorphic loci and 22 polymorphic loci. In addition, loci *LS19* and *LS22* both exhibited monomorphic in *H. dauricus* and polymorphic in *A. schrenckii*. The total allele number of *A. schrenckii* and *H. dauricus* were 55 and 67, respectively, and the sizes ranged from 94 bp to 378 bp in *A. schrenckii* and from 80 bp to 394 bp in *H. dauricus*. Moreover, 6 interspecies specific loci were screened out which were *HLJSX22*, *HLJSX23*, *HLJSX37*, *HLJSX41*, *HLJSX48* and *LS54*. Combining part of those loci can effectively identify those three species of sturgeons. Besides, mitochondrial control region (D-loop) sequence alignment between parental generation and hybrid generation was adopted to determine maternal origin of reciprocal hybrids based on the characteristics of maternal inheritance of mitochondria. Results demonstrate that microsatellite markers combined with mitochondrial D-loop sequence alignment can well discriminate Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*), kaluga (*Huso dauricus*) and their reciprocal hybrids. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 ( 1 ) : 21–30]

**Key words:** *Acipenser schrenckii*; *Huso dauricus*; hybrid; microsatellite; mtDNA; identification

**Corresponding author:** WEI Qiwei. E-mail: weiqw@yfi.ac.cn