

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19355

施氏鲟、西伯利亚鲟、达氏鳇及其杂交种种质鉴定方法的建立及其应用

孔杰, 李世凯, 王金乐, 曾诗雨, 刘霆

贵州省农业科学院水产研究所, 贵州省特种水产工程技术中心, 贵州 贵阳 550025

摘要: 以施氏鲟(*Acipense rschrenckii*)、西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)、达氏鳇(*Huso dauricus*)为研究材料, 分别从线粒体基因组及核基因组两个层面进行物种分子鉴定方法研究。在线粒体基因组层面, 对 3 种鲟及未知鲟种类共计 119 个样品的 D-Loop 区进行测序, 通过同源序列比对, 构建 NJ 进化树、计算群体间遗传距离, 以鉴定其中 30 尾未知种类。在核基因组层面, 利用 15 对微卫星标记扩增 3 种鲟 DNA, 筛选出特异性标记 Ls19 和 SX226。Ls19 在施氏鲟中扩增出特异条带 126 bp、130 bp, 在西伯利亚鲟中扩增出特异条带 139 bp、143 bp, 在达氏鳇中扩增出特异条带 124 bp、127 bp; SX226 在施氏鲟中扩增出特异条带 185 bp, 在西伯利亚鲟中扩增出特异条带 260 bp、273 bp、283 bp, 在达氏鳇中扩增出特异条带 180 bp、182 bp。通过特异条带对未知鲟进行鉴定, 结果显示: 30 尾未知鲟种类中, 有西伯利亚鲟 17 尾, 施氏鲟 1 尾, 达氏鳇 1 尾, 达氏鳇×施氏鲟 2 尾, 施氏鲟×达氏鳇 1 尾, 施氏鲟×西伯利亚鲟 8 尾。结果表明, 特异性微卫星引物 Ls19 和 SX226 可以应用于施氏鲟、西伯利亚鲟、达氏鳇的纯种及杂交种分子水平种质鉴定。

关键词: 施氏鲟; 西伯利亚鲟; 达氏鳇; 种质鉴定

中图分类号: S96; S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)07-0771-08

21 世纪以来, 中国鲟养殖业快速发展, 2019 年《中国渔业统计年鉴》^[1]记录 2018 年鲟鱼在中国大陆的总产量为 96914 t, 中国已经成为世界第一鲟养殖大国^[2]。伴随着鲟养殖产量的攀升, 带来了种质退化、品质下降的问题, 由此涌现出大量不明种质的杂交鲟, 导致许多鲟养殖场不明亲鱼种质, 随意杂交, 加剧了鲟种质资源的混杂, 生产苗种质量和数量的下降, 制约了鲟产业的整体发展。因此, 开展施氏鲟(*Acipense rschrenckii*)、达氏鳇(*Huso dauricus*)、西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)及其杂交种种质鉴定的研究对指导生产具有重要意义。

鲟科(Acipenseridae)是一类多倍体起源的鱼

类, 染色体数量多, 存在多种天然杂交种, 鲟科鱼类的杂交种具有高的能育性的生物学特性^[3]。鲟, 特别是杂交鲟, 很难从形态学上进行区分, 且形态学主观判断性强, 易造成错判^[4]。鱼类种质分子鉴定技术是利用分子生物学技术发展起来的以研究生物种类鉴定和系统进化关系为目的的新技术, 通过鉴定 DNA 水平上的差异来鉴别品种。鲟种质分子鉴定方法, 如采用 PCR-RFLP 技术^[5-6]、多重 PCR^[7]鉴定多种鲟鳇, 采用实时荧光 PCR 法鉴定小体鲟^[8]都是基于线粒体基因组进行, 然线粒体基因组是母系遗传只能鉴别母本来源, 不能鉴定父本来源, 也不能区分纯种鲟和杂交种鲟。因此, 基于核基因组的微卫星标记被广泛用于种质

收稿日期: 2019-11-25; 修订日期: 2020-01-06.

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2016]2584); 现代农业产业技术体系专项(CARS-46); 贵州省科研机构服务企业行动计划项目(黔科合平台人才[2016]5714); 贵州省特色水产产业技术体系项目(GZ-CYTX2018-011).

作者简介: 孔杰(1986-), 女, 助理研究员, 研究方向为鱼类生物技术和遗传育种. E-mail: kellykj@126.com

通信作者: 刘霆, 男, 副研究员, 研究方向为冷水鱼选育与养殖. E-mail: 15204958@qq.com

鉴定,但采用微卫星标记进行种质鉴定的分析方法也不尽相同,如 Chassaing 等^[9]是根据标记在不同种类鲟中等位基因片段的大小范围来区分,其研究表明大西洋鲟(*Acipense sturio*)等位基因片段大小范围为 161~173 bp,尖吻鲟(*Acipense oxyrhynchus*)为 125~149 bp;在杨瑞^[10]在达氏鳇和西伯利亚鲟遗传多样性研究中,根据微卫星引物是否能在鲟中产生扩增产物来区分鲟鳇类;在刘洋等^[11]的研究中,通过分析微卫星引物 HLJSX226、HLJSX329、HLJSX332、HLJSX350、HLJSX351 在施氏鲟、达氏鳇及其杂交种中产生的特异性条带,将其进行区分;郭媛等^[12]利用引物 AF346686 在白斑红点鲑和美洲红点鲑中扩增条带大小的不同对其进行分子鉴定;徐浩^[13]的分子鉴定研究也是通过微卫星在 4 个虹鳟养殖品系中产生的特异性条带进行鉴定;在史君洁等^[14]对鲤的种质鉴定研究中,通过组合 3 种微卫星引物,并应用 Structure 软件进行鉴定分析,个体鉴定效率可达 100%。

本文研究对象为中国鲟养殖的主要种类,施氏鲟、西伯利亚鲟、达氏鳇及其杂交种。通过线粒体 D-Loop 序列的种间变异判断杂交鲟的母本种质来源,分析施氏鲟、西伯利亚鲟和达氏鳇的微卫星扩增产物,寻找不同鲟种类的特异性条带,根据特异性条带判断杂交鲟的亲本来源以进一步鉴定出父本来源。以期施氏鲟、西伯利亚鲟和达氏鳇及其杂交种的种质鉴定提供科学简便的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2017 年 11 月于贵州省水产研究所惠水鲟鱼养殖基地,分别采集西伯利亚鲟亲鱼 30 尾、施氏鲟亲鱼 30 尾、达氏鳇亲鱼 29 尾、杂交鲟鱼(未知种类) 30 尾的尾鳍样本。将尾鳍样本固定于无水乙醇中,4 °C 保存备用。

1.2 D-Loop 全序列的扩增及测序

剪取约 50 mg 鲟鱼鳍条样本,液氮研磨至粉末,采用磁珠法基因组 DNA(动物)抽提试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司)进行 DNA 提取,DNA 的质量与浓度用琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop

lite (Thermo Scientific)紫外分光光度计进行测定。D-Loop 区序列的扩增引物^[15]为: tpro-F1: 5'-AACTCCCAAAGCTAAGATTC-3'; tphe-R2: 5'-ATCCTTTAGTTAAGCTACGC-3'。

PCR 反应总体积为 50 μ L,其中:模板 DNA 100 ng, High-Fidelity Master Mix (MCLAB) 25 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L,补充无菌双蒸水至 50 μ L。PCR 扩增程序:98 °C 预变性 2 min;98 °C 变性 10 s,54 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 15 s,扩增 30 个循环;最后 72 °C 延伸 1 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,送往擎科生物科技有限公司进行测序。

1.3 微卫星扩增与分型

从文献中挑选微卫星引物用于达氏鳇、施氏鲟以及西伯利亚鲟的种质鉴定,经过实验验证,获得稳定扩增三种鲟鳇的微卫星引物 15 对(表 1),送往上海生工生物工程公司合成荧光引物,其中每对引物的上游引物的 5'端采用 ROX 进行荧光标记,PCR 扩增产物送上海生工生物工程公司进行 STR 分型检测。

PCR 反应总体积为 50 μ L,其中:模板 DNA 100 ng, High-Fidelity Master Mix (MCLAB) 25 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L,补充无菌双蒸水至 50 μ L。PCR 扩增程序:98 °C 预变性 2 min;98 °C 变性 10 s,退火 15 s(退火温度见表 1),72 °C 延伸 15 s,扩增 30 个循环;最后 72 °C 延伸 1 min。

1.4 数据统计与分析

MEGA 6.0 软件比对各品种鲟 D-Loop 序列,基于双参数 Kimuar-2-Parameter 距离,采用 neighbor joining (NJ)构建施氏鲟、西伯利亚鲟、达氏鳇及其杂交种的系统进化树,置信度为 1000 次自举法检测。计算施氏鲟、西伯利亚鲟、达氏鳇和母本为施氏鲟的杂交鲟、母本为西伯利亚鲟的杂交鲟、母本为达氏鳇的 6 个群体间的遗传距离。

2 结果与分析

2.1 基于 D-Loop 序列的遗传距离与系统树

通过 PCR 产物测序,获得了施氏鲟、达氏鳇、西伯利亚鲟及杂交鲟共 119 个个体的 D-Loop 序列。施氏鲟的 D-Loop 序列 A+T 和 G+C 含量分

表 1 微卫星引物信息
Tab. 1 Information of microsatellite primers

引物 locus	引物序列(5'-3') primer sequence	退火温度/°C annealing temperature	文献 来源 reference	引物 locus	引物序列(5'-3') primer sequence	退火温度/°C annealing temperature	文献 来源 reference
SX22	F: CAGCCAACACACACACAG R: CATGCGCTACAGACTCCAAA	55.8	[16]	SX351	F: CCTCGCCCTGTTACAGTCAT R: CCACACAGTTCACACTCTCAGAC	58	[17]
SX23	F: TCAGCTGGCTGGATTCTCT R: GGAGCTCCAACACATCCCTA	59	[16]	SX350	F: AGTGAGCGAGGAAGCAAAAA R: TGCCTGACTTATGGGAAACC	55	[17]
SX37	F: TAGGAATCGCATCAGCAGTG R: GTAAAAACCGCGAGTTCACA	48	[16]	Spl106	F: CACGTGGATGCGAGAAATAC R: GGGGAGAAAAGTGGGGTAAA	56	[18]
SX41	F: GCGCCACACACTCAACTCT R: GCGTCCCAATAGACCACATT	55	[16]	Ls19	F: CATCTTAGCCGTCTGTGGTAC R: CAGGTCCCTAATACAATGGC	55	[19]
SX48	F: CTAAGCAAGCCTCTCGCTGT R: GTTTTCCCAGTCACGACGTT	49	[16]	LS54	F: CTCTAGTCTTTGTTGATTACAG R: CAAAGGACTTGAAACTAGG	55	[19]
SX226	F: GGGGCTATCTGCTCCCAATTA R: AGGCAGTTCACCCAGAAGTC	56	[17]	Ls68	F: TTATTGCATGGTGTAGCTAAAC R: AGCCCAACACAGACAATATC	56	[19]
SX329	F: ACTGCTGTGTGCCACTGTC R: GGGAAACAGCTTCATTGGAA	54	[17]	As100	F: GGGAGAAAAGTGGGGTAAA R: CCAAAAAGAAGAATGGTAGACGG	56	[20]
SX332	F: GGAAAATTAGCGTCCAATGC R: AGGCCTTCTCTCTTGAAGC	56	[17]				

别为 61.8%、38.2%; 西伯利亚鲟的 D-Loop 序列 A+T 和 G+C 含量分别为 64.3%、35.7%; 达氏鳇的 D-Loop 序列 A+T 和 G+C 含量分别为 62.59%、37.41%。将杂交鲟的 D-Loop 序列在 Genbank 中进行相似性比对, 其中, 17 尾杂交鲟与西伯利亚鲟的 D-Loop 序列(Genbank 登录号: FJ843094)相似性为 99%, 10 尾杂交鲟与施氏鲟 D-Loop 序列(Genbank 登录号: FJ843098.1)相似性为 99%, 3 尾杂交鲟与达氏鳇 D-Loop 序列(Genbank 登录号: FJ843095.1)相似性为 99%。

将施氏鲟、西伯利亚鲟、达氏鳇及杂交鲟共 119 个个体的 D-Loop 序列进行比对分析, 构建 NJ 系统树(图 1), 其中与纯种施氏鲟聚为一类的杂交鲟有 10 尾, 与纯种西伯利亚鲟聚为一类的杂交鲟有 17 尾, 与纯种达氏鳇聚为一类的杂交鲟有 3 尾。与 GenBank 中比对结果一致。

基于 D-Loop 序列, 将纯种的施氏鲟(S)、达氏鳇(D)、西伯利亚鲟(Xb), 以及母本分别为施氏鲟(Z-Sch)、达氏鳇(Z-Dau)、西伯利亚鲟(Z-Baerii)的杂交鲟共 6 个群体进行群体间遗传距离的计算(表 2)。杂交鲟的母本与对应纯种鲟的遗传距离最

近, 达氏鳇与西伯利亚鲟、施氏鲟的遗传距离最远。

2.2 STR 分型检测

在 15 对微卫星引物中, Ls19 和 SX226 在 3 种鲟中扩增出特异性条带, 可区分 3 种鲟。Ls19 在施氏鲟群体中共扩增出 4 个等位基因, 特异性条带为 126 bp 和 130 bp, 施氏鲟样本至少含有其中 1 条特异性条带; Ls19 在西伯利亚鲟群体中共扩增出 5 个等位基因, 特异性条带为 139 bp、143 bp, 西伯利亚鲟样本至少含有其中一条特异性条带; Ls19 在达氏鳇群体中共扩增出 2 个等位基因, 特异性条带为 124 bp、127 bp, 达氏鳇样本至少含有其中一条特异性条带。具体信息见表 3、图 2。

SX226 在施氏鲟群体中共扩增出 5 个等位基因, 特异性条带为 185 bp, 各样本均含有此特异性条带; SX226 在西伯利亚鲟群体中共扩增出 8 个等位基因, 特异性条带为 260 bp、273 bp、283 bp, 各样本至少含有其中一条特异性条带; SX226 在达氏鳇群体中共扩增出 3 个等位基因, 特异性条带为 180 bp、182 bp, 各样本至少含有其中一条特异性条带; 具体信息见表 3 和图 2。



图 1 施氏鲟(S)、达氏鲟(D)、西伯利亚鲟(Xb)、杂交鲟(Z)基于 D-Loop 序列的 NJ 系统树
 Fig. 1 NJ phylogenetic tree of *Acipenser schrenckii* (S), *Acipenser baerii* (Xb), *Huso dauricus* (D) and hybrids (Z) reconstructed based on D-Loop sequence

表 2 施氏鲟、西伯利亚鲟、达氏鲟与杂交种鲟基于 D-Loop 序列的遗传距离
 Tab. 2 Genetic distance based on D-Loop sequence in purebred and hybrid sturgeons

种类 species	施氏鲟 <i>Acipenser schrenckii</i>	西伯利亚鲟 <i>Acipenser baerii</i>	达氏鲟 <i>Huso dauricus</i>	Z-Sch	Z-Baerii	Z-Dau
施氏鲟 <i>Acipenser schrenckii</i>	-	-	-	-	-	-
西伯利亚鲟 <i>Acipenser baerii</i>	0.205	-	-	-	-	-
达氏鲟 <i>Huso dauricus</i>	5.698	6.053	-	-	-	-
Z-Sch	0.003	0.205	5.725	-	-	-
Z-Baerii	0.205	0.000	6.053	0.205	-	-
Z-Dau	5.698	6.053	0.001	5.725	6.052	-

注: Z-Baerii 为母本是西伯利亚鲟的杂交鲟, Z-Dau 为母本是达氏鲟的杂交鲟; Z-Sch 为母本是施氏鲟的杂交鲟.

Note: Z-Baerii indicates the hybrids whose female parent was Siberian sturgeon; Z-Dau indicates the hybrids whose female parent was Kaluga; Z-Sch indicates the hybrids whose female parent was Amur sturgeon.

表 3 3 种鲟在 2 个微卫星特异位点上的特征条带
 Tab. 3 Specific amplified product information of 2 specific microsatellite loci in three species of sturgeons

特异位点 specific loci	施氏鲟 <i>Acipenser schrenckii</i>		西伯利亚鲟 <i>Acipenser baerii</i>		达氏鲟 <i>Huso dauricus</i>	
	片段长度/bp size range	特征条带/bp specific band	片段长度/bp size range	特征条带/bp specific band	片段长度/bp size range	特征条带/bp specific band
Ls19	121-130	126	133-150	139	124-127	124
		130		143		127
SX226	147-209	185	243-283	260	180-186	180
				273		182
				283		

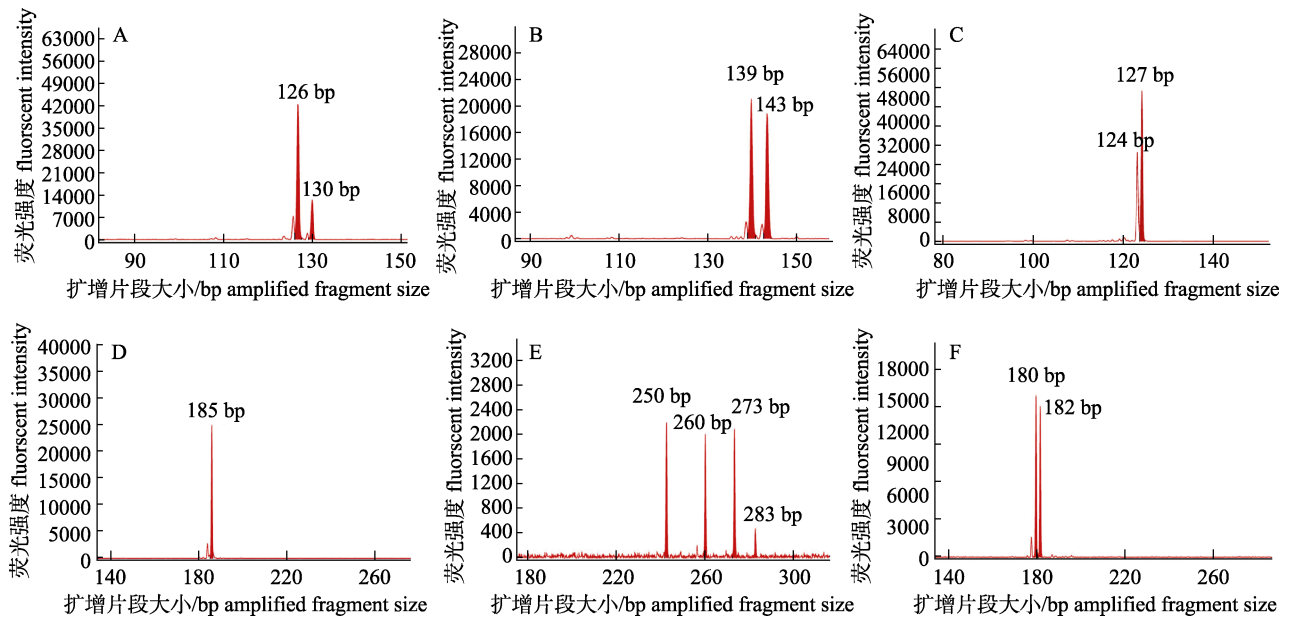


图 2 微卫星位点 Ls19、SX226 在 3 种鲟个体中的特异性条带

- A: 施氏鲟个体在位点 Ls19 上的等位基因峰图; B: 西伯利亚鲟个体在位点 Ls19 上的等位基因峰图;
C: 达氏鳇个体在 Ls19 上的等位基因峰图; D: 施氏鲟个体在位点 SX226 上的等位基因峰图; E: 西伯利亚鲟个体在位点 SX226 上的等位基因峰图; F: 达氏鳇个体在位点 SX226 上的等位基因峰图。

Fig. 2 The typical genotype of microsatellite loci Ls19, SX226 in Amur sturgeon, Siberian sturgeon and Kaluga
A: The typical genotyping of Ls19 from Amur sturgeon individual; B: The typical genotyping of Ls19 from Siberian sturgeon individual; C: The typical genotyping of Ls19 from Kaluga individual; D: The typical genotyping of SX226 from Amur sturgeon individual; E: The typical genotyping of SX226 from Siberian sturgeon individual; F: The typical genotyping of SX226 from Kaluga individual.

2.3 未知种类鲟的鉴定

Ls19 和 SX226 引物扩增 30 尾杂交鲟 DNA, STR 分型检测结果见表 4, 根据各鲟的特征条带对 30 尾未知品种鲟进行鉴定, 含有种类特异性条带的鲟即为相应鲟种类。

3 讨论

基于线粒体基因组的种质鉴定, 操作简便、分析方法简单、准确率高, 可根据检测规模采用不同的鉴定方法, 达到快速鉴定的目的, 但由于其属于母性遗传, 不能区分杂交种和纯种, 更不能反映杂交种父本信息^[21]。因此, 基于核基因组的鉴定技术很有必要, 常采用的有微卫星标记, 它是进行种群遗传学研究中常用的分子标记, 具有共显性、分辨率、重复率及可信度高的优点, 是水产研究中使用最为广泛核基因组标记^[22]。鲟的种质鉴定分别从线粒体基因组和核基因组两个层面展开, 是全面准确检测杂交种鲟父母本来源的

有效方式。胡佳等^[23]分析了微卫星标记在施氏鲟、达氏鳇及其杂交子代中的扩增条带, 证明通过两条引物的组合可以鉴定出这 3 种鲟, 通过线粒体控制区同源序列比对和系统树的分析表明了杂交子代与其母本聚为一类。郭向贺^[24]用 D-Loop 序列多重 PCR 方法鉴定出未知鲟样品的母本来源, 进一步利用 Structure 软件对父本种质进行了鉴定。本文采用线粒体标记和核基因组标记相结合的方式, 研究施氏鲟、西伯利亚鲟、达氏鳇的微卫星扩增的特异性条带, 并据此以盲查的方式鉴定了 30 个未知样品的亲本来源, 并根据 D-Loop 序列的遗传距离和系统树分析确定未知样品母本种质。本文研究表明引物 Ls19 和 SX226 可以用于区分这 3 种鲟并鉴定杂交种。在 30 尾未知样品鲟的鉴定中, 有 29 个个体, Ls19 及 SX226 鉴定的亲本结果一致, 并与 D-Loop 母本鉴定结果一致; 其中个体 Z12 的 D-Loop 鉴定结果为达氏鳇, 微卫星引物 Ls19 鉴定结果为达氏鳇, 微卫星引

表 4 30 尾未知种类鲟的鉴定结果
Tab. 4 Identification results of 30 individuals unknown sturgeons

样品编号 sample code	Ls19		SX226		D-Loop
	扩增片段/bp amplified fragment	鉴定结果 identified result	扩增片段/bp amplified fragment	鉴定结果 identified result	鉴定结果 identified result
Z1	139	Baerii	260,263,283	Baerii	Baerii
Z2	126,139,143	Sch Baerii	161,185,260,270	Sch Baerii	Sch
Z3	124,126	Sch Dau	180,185	Sch Dau	Sch
Z4	124,126	Dau Sch	180,185	Dau Sch	Dau
Z5	124,126	Dau Sch	180,185	Dau Sch	Dau
Z6	139,143	Baerii	260,273,278	Baerii	Baerii
Z7	139	Baerii	256,265,273	Baerii	Baerii
Z8	126	Sch	179,181,185,269	Sch	Sch
Z9	126,139	Sch Baerii	185,256,273	Sch Baerii	Sch
Z10	139,143	Baerii	260,273,283	Baerii	Baerii
Z11	135,139,143	Baerii	265,273,283	Baerii	Baerii
Z12	120,124	Dau	179,181,185	Sch	Dau
Z13	126,129,139	Sch Baerii	185,260,273	Sch Baerii	Sch
Z14	139,143	Baerii	273,283	Baerii	Baerii
Z15	126,135,143	Sch Baerii	162,185,260,271	Sch Baerii	Sch
Z16	123,126,139	Sch Baerii	185,260,273	Sch Baerii	Sch
Z17	139,143	Baerii	260,263,283	Baerii	Baerii
Z18	139,143	Baerii	260,265,273	Baerii	Baerii
Z19	139	Baerii	260,265,273,278	Baerii	Baerii
Z20	123,135,143	Baerii	260,265,275	Baerii	Baerii
Z21	126,139	Sch Baerii	181,185,273	Sch Baerii	Sch
Z22	143	Baerii	260,264,275,279	Baerii	Baerii
Z23	131,139	Baerii	260,265,273	Baerii	Baerii
Z24	139,143	Baerii	260,264,283	Baerii	Baerii
Z25	139,143	Baerii	260,265	Baerii	Baerii
Z26	126,135,139	Sch Baerii	161,185,260,271	Sch Baerii	Sch
Z27	123,139,143	Baerii	260,273,283	Baerii	Baerii
Z28	139,143	Baerii	260,263	Baerii	Baerii
Z29	135,139,143	Baerii	260,265,273	Baerii	Baerii
Z30	126,139,143	Sch Baerii	181,185,265,273	Sch Baerii	Sch

注: Sch 为施氏鲟, Baerii 为西伯利亚鲟, Dau 为达氏鳊。

Note: Sch indicates Amur sturgeon; Baerii indicates Siberian sturgeon; Dau indicates Kaluga.

物 SX226 鉴定结果为施氏鲟。本研究结果显示, 微卫星引物 Ls19 和 SX226 鉴定出两个亲本的检出率为 96.7%, 若同时采用两对引物对一个样品进行鉴定可 100% 的鉴定出双方亲本来源, 表明基于核基因组的微卫星检测技术可以很好地鉴定出杂交鲟的双亲来源。

本研究建立的鲟种质鉴定方法, 采用基于核基因组的微卫星标记可判断纯种或杂种, 采用线

粒体基因组的 D-Loop 标记可进一步鉴定母本来源以区分父本母本种质, 分析方法简单, 可以满足施氏鲟、西伯利亚鲟、达氏鳊及其杂交种的鉴定。鲟种类繁多, 中国主养的鲟种类除本文所涉及种类外, 还有俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedti*)、匙吻鲟、小体鲟(*Acipenser ruthenus*)等, 而本研究中的引物 SX226 是自施氏鲟中开发而来, Ls19 是自湖鲟中开发而来, 它们均能在施氏鲟、

达氏鳇和西伯利亚鲟中扩增出特异性条带并可应用于其杂交种的鉴定,但是在俄罗斯鲟和小体鲟中的扩增情况仍有待进一步研究。在鲟种质鉴定的研究中,找到能鉴定更多种类鲟的引物,让引物具有更广泛的适用性并简化鉴定步骤,是下一步开展鲟种质鉴定研究的关键。

参考文献:

- [1] Bureau of Fisheries, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2019 China Fisheries Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2019: 25. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2019 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019: 25.]
- [2] Chen X H, Li C J, Yang C G, et al. Status and prospects of techniques in the sturgeon aquaculture industry in China[J]. Freshwater Fisheries, 2017, 47(6): 108-112. [陈细华, 李创举, 杨长庚, 等. 中国鲟鱼产业技术研发现状与展望[J]. 淡水渔业, 2017, 47(6): 108-112.]
- [3] Lou Y D. Fish Breeding[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2009: 84-119. [楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 84-119.]
- [4] Guo X H, Dong Y, Hu H X, et al. Research progresses of germplasm identification methods in sturgeons[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(2): 56-63. [郭向贺, 董颖, 胡红霞, 等. 鲟鱼种质鉴定方法研究进展[J]. 生物技术通报, 2014(2): 56-63.]
- [5] Dong C J, Liu Y Y, Liu X Y, et al. PCR-RFLP analysis of mtDNA to identify four kinds of sturgeons[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(12): 78-85. [董传举, 刘园园, 刘晓勇, 等. 四种鲟鱼线粒体 PCR-RFLP 鉴定方法的研究[J]. 生物技术通报, 2014(12): 78-85.]
- [6] Wolf C, Hübner P, Lüthy J. Differentiation of sturgeon species by PCR-RFLP[J]. Food Research International, 1999, 32(10): 699-705.
- [7] 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]. Russian Journal of Genetics, 2008, 44(7): 793-798.
- [8] Ding J, Liu S Y, Su W, et al. A rapid quantitative real-time PCR method for identification of *Acipenser ruthenus*[J]. Journal of Molecular Science, 2018, 34(2): 144-148. [丁健, 刘淑艳, 苏旺, 等. 利用实时荧光 PCR 鉴定小体鲟物种的快速方法[J]. 分子科学学报, 2018, 34(2): 144-148.]
- [9] Chassaing O, Hänni C, Berrebi P. Distinguishing species of European sturgeons *Acipenser* spp. using microsatellite allele sequences[J]. Journal of Fish Biology, 2011, 78(1): 208-226.
- [10] Yang R. Identification of microsatellite and analysis of genetic diversity for farmed Kaluga and Siberian sturgeon[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2016. [杨瑞. 养殖达氏鳇和西伯利亚鲟种群微卫星验证及遗传多样性分析[D]. 大连: 大连海洋大学, 2016.]
- [11] Liu Y, Lu C Y, Li C, et al. Genetic identification of Amur sturgeon, Kaluga and their hybrids based on microsatellite markers[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2015, 28(1): 18-23. [刘洋, 鲁翠云, 李超, 等. 应用微卫星标记鉴别施氏鲟、达氏鳇及其杂交子代[J]. 水产学杂志, 2015, 28(1): 18-23.]
- [12] Guo Y, Hu G, Zhao W G, et al. Molecular identification of Siberian char *Salvelinus leucomaenis* and brook trout *Salvelinus fontinalis*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2015, 28(2): 12-15. [郭媛, 卢国, 赵文阁, 等. 白斑红点鲑 *Salvelinus leucomaenis* 和美洲红点鲑 *Salvelinus fontinalis* 的分子鉴定[J]. 水产学杂志, 2015, 28(2): 12-15.]
- [13] Xu H, Lu C Y, Guo W, et al. Identification and genetic diversity analysis of four rainbow trout strains using microsatellites[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(4): 713-721. [徐浩, 鲁翠云, 郭薇, 等. 4 个虹鳟养殖品系的分子鉴定和遗传多样性分析[J]. 中国水产科学, 2013, 20(4): 713-721.]
- [14] Shi J J, Shi L Y, Li C T, et al. Research on germplasm identification technology for four species of common carp by microsatellite markers[J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(2): 748-755. [史君洁, 石连玉, 李池陶, 等. 微卫星标记对 4 种鲤鱼种质鉴定技术的研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(2): 748-755.]
- [15] Wang W, Zhu H, Hu H X, et al. Heteroplasmy in mtDNA control region and phylogenetics of five sturgeons[J]. Zoological Research, 2009, 30(5): 487-496. [王巍, 朱华, 胡红霞, 等. 五种鲟鱼线粒体控制区异质性和系统发育分析[J]. 动物学研究, 2009, 30(5): 487-496.]
- [16] Yu D M, Kuang Y Y, Ma H T, et al. Microsatellite enrichment in Amur sturgeon *Acipenser schrenckii* by magnetic beads[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2007, 22(6): 431-435. [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.]
- [17] Liu Y, Li C, Cheng L, et al. Development and characterization of new microsatellite markers for Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*)[J]. Conservation Genetics Resources, 2014, 6(1): 65-67.
- [18] McQuown E C, Sloss B L, Sheehan R J, et al. Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon: New primer se-

- quences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser*[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 2000, 129(6): 1380-1388.
- [19] May B, Krueger C C, Kincaid H L. Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: Primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1997, 54(7): 1542-1547.
- [20] Shao Z J, Zhao N, Zhu B, et al. Applicability of microsatellite primers developed from shovelnose sturgeon in Chinese sturgeon[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2002, 26(6): 577-584. [邵昭君, 赵娜, 朱滨, 等. 铲鲟微卫星引物对中华鲟的适用性研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(6): 577-584.]
- [21] Bai J J, et al. Molecule Identification Technique for Fish Genetic Resources[M]. Beijing: China Ocean Press, 2011: 12-13. [白俊杰, 等. 鱼类种质分子鉴定技术[M]. 北京: 海洋出版社, 2011: 12-13.]
- [22] Kong J, Wang J L, Guan M, et al. Advances in applications of molecular marker in fishes[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2012, 40(6): 158-162. [孔杰, 王金乐, 关梅, 等. 分子标记的研究进展及其在鱼类中的应用[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(6): 158-162.]
- [23] Hu J, Wang D Q, Wei Q W, et al. Molecular identification of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*), Kaluga (*Huso dauricus*) and their reciprocal hybrids[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(1): 21-30. [胡佳, 汪登强, 危起伟, 等. 施氏鲟、达氏鳇及其杂交子代的分子鉴定[J]. 中国水产科学, 2010, 17(1): 21-30.]
- [24] Guo X H. The germplasm identification and genetic diversity analysis of five sturgeon[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2014. [郭向贺. 五种鲟鳇鱼种质鉴定及遗传多样性分析[D]. 保定: 河北农业大学, 2014.]

Application of germplasm identification in Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*), Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), and Kaluga (*Huso dauricus*), and their hybrids

KONG Jie, LI Shikai, WANG Jinle, ZENG Shiyu, LIU Ting

Fisheries Research Institute of Guizhou Academy of Aquaculture Sciences, Guizhou Engineering Technology Center of Special Aquaculture, Guiyang 550025, China

Abstract: In this paper, we analyzed the mitochondrial and nuclear genomes of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*), Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and Kaluga (*Huso dauricus*) to establish genetic markers that can be used for germplasm identification. In the D-Loop region of the mitochondrial genome, 119 samples from the three known sturgeon species as well as samples from 30 unknown sturgeon species were sequenced. The unknown species were identified by multiple sequence alignment, constructing NJ phylogenetic trees, and calculating genetic distance. In the nuclear genome, fifteen microsatellite markers were used to analyze differences in the genomes of the three known species. Two primers were obtained, Ls19 and SX226, which amplified specific bands in the three known species. In Amur sturgeon, the specific bands of Ls19 amplification products were 126 bp and 130 bp. In Siberian sturgeon, they were 139 bp and 143 bp, and in Kaluga, they were 124 bp and 127 bp. For SX226, the specific band of amplification products was 185 bp in Amur sturgeon. In Siberian sturgeon, the specific bands of SX226 amplification products were 260 bp, 273 bp and 283 bp, and in Kaluga, they were 180 bp and 182 bp. Based on the above results, the unknown sturgeon germplasm samples were identified as: 17 *Acipenser baerii*, 1 *Acipenser schrenckii*, 1 *Huso dauricus*, 2 *Huso dauricus*×*Acipenser schrenckii*, 1 *Acipenser schrenckii*×*Huso dauricus*, and 8 *Acipenser schrenckii*×*Acipenser baerii*. These results show that the Ls19 and SX226 microsatellite primers can be used in the molecular identification of germplasm from Amur sturgeon, Siberian sturgeon, Kaluga, and their hybrids.

Key words: *Acipenser schrenckii*; *Acipenser baerii*; *Huso dauricus*; germplasm identification

Corresponding author: LIU Ting. E-mail: 15204958@qq.com