

密级: (涉密论文填写密级, 公开论文不填写)



中国科学院大学
University of Chinese Academy of Sciences

博士学位论文

胭脂鱼种群遗传多样性及家系管理研究

作者姓名: 成 为 为

指导教师: 危起伟 研究员 中国科学院水生生物研究所

汪登强 副研究员 中国水产科学研究院长江水产研究所

学位类别: 理 学 博 士

学科专业: 水 生 生 物 学

研 究 所: 水 生 生 物 研 究 所

2014 年 05 月

**Population genetic diversity and pedigree
management of Chinese sucker**
(*Myxocyprinus asiaticus*)

By

Cheng Weiwei

**A Dissertation Submitted to
The University of Chinese Academy of Sciences
In partial fulfillment of the requirement
For the degree of
Doctor of Science**

Institute of Hydrobiology

May, 2014

致 谢

首先感谢公益性行业（农业）科研专项：珍稀水生动物繁育与物种保护技术研究（201203086）和公益性行业（农业）科研专项：淡水水生生物资源增殖放流及生态修复技术研究（200903048-02）。正是在这两个项目的支持下，本博士学位论文的相关实验才能得以顺利开展。

等这一刻等了很久，也许是付出太多，所以激情已然被磨灭；也许是付出太少，所以感触不够深刻，但无论怎样，走过来了，有遗憾，但更多的是感谢。感谢那些陪我一起走过、给我关怀和帮助的老师、朋友、同学甚至很多萍水相逢的人，以及我的亲人，没有他们，我不可能完成学业。

首先，要感谢我的恩师中国水产科学院长江水产研究所的危起伟研究员。2009年，有幸成为危老师的弟子，师恩如海，衔草难报。危老师学识渊博、治学严谨、高瞻远瞩，生活中待人宽厚随和，既是导师又像一个父亲。在5年的攻读学位期间，危老师无论多忙都要抽出时间指导我的实验方向、设计、实施、论文的撰写，危老师深厚的学术造诣、严谨的科学态度和严谨的治学风格，言传身教，让我终身受益。更感谢危老师在日常的学习和生活中给予的关心和帮助，在此，谨向恩师危起伟研究员致以最诚挚的感谢！

再次，我要感谢我的第二导师汪登强老师，汪老师温和谦逊，治学严谨，时刻监督指导我的实验方向、设计、实施进展情况和论文的撰写，及时解答我在学习和实验过程中的任何问题，他渊博的知识，敏锐的思维，矜矜业业的工作态度给我留下了深刻印象，给我今后的工作和学习树立了榜样，在此表示最衷心的感谢！

同时我要感谢课题组的杜浩副研究员和张辉副研究员在学习上给予的建议、指导和鼓励；感谢李创举副研究员在我学习和实验遇到困难时无私的解答，论文的撰写的指导和修改，并且李老师在百忙中还身兼我们教学秘书，随时关心我们的生活学习问题。

感谢王成友博士和吴金明博士在论文的修改，样本采集给予的无私的帮助；感谢厉萍博士、张书环博士、岳华梅博士对实验的指导和帮助；感谢刘志刚老师

和沈丽老师在生活和学习方面无私关心；感谢周琼、黄瑾、石莹、杨猛、李曼、胡志华在生活和工作中的帮助。

同时我还要感谢课题组孙庆亮师兄、邹远超师姐、李艳华师兄、胡佳师姐、李伟师兄、靳建波师兄、王崇瑞师兄；同门李雷、施德亮；薛超、史玲玲、孙立元、骆慧、杨晓鸽、叶欢、谢晓、王恒、任泷、席萌丹、李君轶、霍来江、蔺丹清、汪珂、杨焕超、张磊等师弟师妹，感谢你们在生活学习中的帮助。

感谢水生生物研究所研究所处冯玺老师、廖彩萍老师、赵东辉老师、查梅老师、刘克奋老师在读研期间的帮助，使我能够顺利完成学业。

感谢水生所同届好友王春伶、郭爱环、王美容、黄伟超、谷金辉、何君等，感谢你们在研究生的陪伴。

五年来，家人在读研方面给了我最大的理解和支持，使我能安心学习和实验，感谢我的爸爸、妈妈、弟弟，是你们的关爱和鼓励，使我顺利完成了学业，你们永远是最爱我的人！

感谢所有曾给我关心和帮助的人！

摘要

胭脂鱼遗传多样性及其家系管理研究

胭脂鱼 (*Myxocyprinus asiaticus*) 隶属于鲤形目亚口鱼科胭脂鱼属, 为国家 II 级重点保护动物, 是迄今所知亚口鱼科分布于我国的单型属和种, 分布于长江和闽江水系。近年来, 由于无节制的捕捞、水域污染、水利工程建设等人为因素的影响, 其资源量急剧下降。闽江水系已经很难发现胭脂鱼的踪迹, 分布于长江的胭脂鱼可能是现存胭脂鱼的唯一野生种群, 并且在长江中的分布区域也逐渐缩小, 主要集中于宜宾至重庆的川江江段、长江中下游集中于葛洲坝下游一带及部分支流, 已处于非常濒危的程度。鉴于该物种目前的资源量和所处的环境来看, 以人工增殖放流的方式增加其在长江中的资源量可能是避免其资源进一步减少及资源量较快恢复的有效途径。

增殖放流的目的除了需要不断增加放流物种的种群数量, 还需保证物种自然的野生种质资源遗传特征不被干扰, 不影响放流水域的自然生态系统。本文通过采集 5 个胭脂鱼养殖场内所有繁殖亲鱼以及部分长江野生胭脂鱼样本, 利用分子标记(mt-DNA 和 SSR)对养殖场内养殖群体和长江野生群体遗传多样性进行分析, 开发胭脂鱼亲子鉴定技术; 建立胭脂鱼亲鱼谱系档案, 对胭脂鱼增殖放流效果进行评估, 从而保护胭脂鱼种质资源、实现胭脂鱼的资源量恢复和增殖。主要研究结果如下:

1. 胭脂鱼微卫星标记的开发

利用生物素-磁珠富集法开发并得到 23 对胭脂鱼微卫星标记, 使用该微卫星标记对 24 尾万州胭脂鱼养殖个体进行了遗传多样性的初步研究, 结果表明: 等位基因数目为 3~12 个; 观测杂合度 0.292~0.958; 期望杂合度 0.423~0.900; 多样性指数 0.356~0.869, 其中微卫星标记 Mas2, Mas16, Mas17, Mas18 和 Mas20 显著偏离哈德文平衡 ($P < 0.01$)。其微卫星标记可应用于胭脂鱼遗传多样性分析、种质鉴定及人工增殖放流效果评估等进一步研究。

2. 建立胭脂鱼亲子鉴定技术及开发试剂盒

将其中 17 对多态性高并且能稳定扩增的微卫星标记，分别在 F 正向引物标上 2 种常用的荧光引物（5-HEX 和 5-FAM），取 30 尾胭脂鱼个体作为子代群体，同时选取繁殖亲本个体 30 尾作为候选亲本用于建立亲子鉴定体系。使用 Cervus 3.0 软件判定亲缘关系，在双亲未知时，17 个位点累积排除概率为 0.98746106；在双亲之一已知的情况下，17 个位点累积排除概率为 0.99971843；在双亲都已知的情况下，17 个位点累积排除概率为 0.9999988。30 尾子代个体均准确找到亲本，分析结果证实这 17 对胭脂鱼微卫星标记用于建立胭脂鱼亲子鉴定技术是可行的，并且开发了胭脂鱼亲子鉴定试剂盒。

3. 线粒体 DNA（d-loop 和 cyt-b）和微卫星标记对胭脂鱼遗传多样性评估

线粒体 DNA：采集胭脂鱼样本 199 尾（养殖场 149 尾和长江胭脂鱼 50 尾），线粒体 DNA 中 d-loop 和 cyt-b 拼接后得到 2047bp 碱基序列中平均各碱基比为 28.3T: 26.2C: 28.4A: 17.1G，其中 88 个变异位点并且定义了 33 个单倍体型，单倍型多样性指数 h 为 0.916，核苷酸多样性指数 p 为 0.01234，分子变异方差（AMOVA）分析显示 6 个群体间变异指数 F_{ST} 为 9.28% 的遗传变异来自于种群间，说明胭脂鱼群体间存在一定的遗传分化，进一步对群体间两两比较，发现引起遗传分化的主要是长江采集群体和万州养殖群体。Network 结果显示胭脂鱼线粒体 DNA 存在 2 个明显分开的进化单元，为不同采样群体共享。

微卫星标记：利用筛选的 11 个微卫星标记对 214 尾胭脂鱼（养殖场 149 尾和长江采集胭脂鱼 65 尾）遗传多样性分析发现，长江群体等位基因数明显多于养殖场群体（13~7.3），期望杂合度和观测杂合度均为（ $H_o=0.771$ ， $H_E=0.748$ ）。分子变异方差（AMOVA）分析显示养殖场群体和长江群体遗传分化指数 $F_{ST}=0.028$ ，（ $P < 0.01$ ）；Structure 分层分析和 Neighbor-Joining tree 建树均显示分为 2 个进化单元，四川养殖种群为一个单独的进化单元，与养殖场内胭脂鱼存在遗传分化；四川、宜宾和宜昌养殖群体在二段突变模型（T.P.M.）检测中发现存在“瓶颈效应”并达到显著水平（ $P < 0.05$ ）。

4. 建立胭脂鱼繁殖亲鱼谱系档案

利用微卫星标记建立了 5 个养殖场内全部繁殖亲鱼（149 尾）在 11 个基因座的上所有座位谱系档案，评估了 5 个养殖场内全部个体间的遗传分化与亲缘关系，包括家系间各种遗传距离、家系内个体间的遗传关系及亲缘系数，并利用 UPGMA 算法绘制出不同养殖场胭脂鱼亲本系统发育图。通过优先选取系统发育树分支个体少的支系，以一雄配多雌的繁殖方式在 3 种遗传距离（小于 0.02，0.02~0.2，大于 0.2）的亲本建立繁育家系 56 个，以期通过后代优势个体确定最适繁殖亲本的遗传距离，防止近亲繁殖引起的遗传衰退，为胭脂鱼养殖场人工繁殖提供建议。

5. 胭脂鱼人工增殖放流效果评估

利用 11 对多态性微卫星标记进行胭脂鱼增殖放流效果评估。结果表明，199 尾胭脂鱼样本（养殖场 149 尾和长江胭脂鱼 65 尾）中共观测到 140 个等位基因，其平均观测杂合度和期望杂合度的平均值（范围）分别为 0.771（0.519~0.906）和 0.759（0.469~0.894），多态信息含量为 0.726（0.392~0.882）。通过软件 Cervus 运算统计，11 个微卫星座位累计排除率为 0.999983%，并且在长江采集的 65 个样本中，11 个样本与养殖场内繁殖亲本确定存在亲子关系，据此我们确定这 11 尾为增殖放流的胭脂鱼，并由此推算增殖放流的胭脂鱼对长江野生群体的贡献量为 16.92%；另外，我们利用线粒体 DNA 和微卫星标记对长江增殖放流胭脂鱼和野生胭脂鱼遗传多样性分析，结果表明，人工增殖放流胭脂鱼还没有对长江胭脂鱼遗传结构产生影响，因此，人工增殖放流胭脂鱼是可行的，能够有效避免其野生资源进一步减少、或资源量较快的恢复，能够实现胭脂鱼增殖与保护。

关键词：遗传多样性；家系管理；亲子鉴定；胭脂鱼

ABSTRACT**Population genetic diversity and pedigree management of Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*)****By Cheng Weiwei****Directed by Wei Qiwei**

Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*) is a class II state-protected species in China. It is also as an endemic freshwater fish in China and the only representative of the Catostomidae family in Asia. Historically, *M. asiaticus* distributed in the Yangtze River and Minjiang River (Fujian Province), and was an important economical fish. However, due to over-fishing, water pollution, and dam construction, the numbers of *M. asiaticus* have declined sharply in nature in past few years. Fortunately, *M. asiaticus* has been artificially propagated successfully and juveniles were released in the Yangtze River to enhance the local stock recently.

The conservation management of endangered species contains ensuring the extant populations and increasing their abundance and distribution, and it requires the knowledge of the behavior and ecology of this species, but also involves assessing genetic diversity of the populations, which can limit the adaptive potential of the species. Small or isolated populations represent limited genetic diversity due to the loss of alleles more susceptible at risk of extinction. Genetic variation is essential for securing the evolutionary potential of a species. Our study used Mitochondrial DNA (d-loop and cyt-b) and Microsatellite loci to assess population genetic diversity and pedigree management of *M. asiaticus*.

1. We developed twenty-three polymorphic microsatellite loci in *M. asiaticus*. The observed and expected heterozygosity ranged from 0.292 to 0.958 and 0.423 to 0.900, respectively. The polymorphic information content ranged from 0.356 to 0.869, with a mean of 0.710. These microsatellite loci were expected to be useful for further studies of genetic diversity, population genetic structure, and assessments of the artificial propagation release effect of *M. asiaticus*.

2. We used 17 mcrosatellite loci to establish paternity test technology, and marked two commonly used fluorescent labeled primers (5-HEX and 5-FAM) in F-primer.

Thirty younger fish (offspring) and thirty parent fish were used to establish paternity test technology. The combined non-exclusion probability (first parent) was 0.98746106; the combined non-exclusion probability (second parent) was 0.99971843; the combined non-exclusion probability (parent pair) was 0.9999988. All the offspring was correctly find their parents. And we also developed a mullet paternity test kit of *M. asiaticus*.

3. The sequences of mitochondrial DNA control region (d-loop) and cytochrome b gene (cyt-b) were identified to evaluate its genetic diversity and population structure from five fish farms. One hundred and ninty-nine specimens were collected and 2047 base pairs were surveyed. Eighty-eight polymorphic nucleotide positions were found, and 33 haplotypes were identified. High levels of haplotype diversity (0.916) were detected, with nucleotide diversity of 0.01234 ($P < 0.05$). The median network analysis and neighbor-joining tree showed three clearly distinguishable clades, each of which were present in multiple populations and not limited to a single farm or region. Analysis of molecular variance indicated that 9.28% of the genetic variance occurred among populations, while 90.72% was contained within populations ($P < 0.01$).

We screened 11 microsatellite loci to assess potential genetic differentiation between wild and culture populations based on 214 individuals. We found the wild population had higher number of alleles compare to the culture population (13–7.3), and high levels of genetic diversity expressed as heterozygosity ($H_o=0.771$, $H_E=0.748$) both in wild and cultured population. Significant differentiation was among wild and culture population (global $F_{ST}=0.028$, $P < 0.001$). The Structure analyze and Neighbor-Joining tree assignment models revealed three primary genetic clusters with moderate divergence between the clusters: the wild Yangtze population was a separate cluster, Sichuan cultured population was another cluster, the rest cultured population was the third cluster. Our analyses also revealed that 22 wild samples from Yangtze River were assigned to the cultured population, which proves the rearing and release of artificially propagated fish was the approachable way to avoid sharp reduction of *M. asiaticus* resources. Overall, these genetic data support the endangered status of *M. asiaticus* and suggest the future conservation management planning.

4. Small populations are vulnerable to the consequences of breeding within closed groups, because the loss of genetic variability can lead to inbreeding depression. In this study, we used eleven microsatellite loci to establish the pedigree of all the cultured

population in five *M. asiaticus* farms, and evaluated the genetic differentiation and genetic relationship in the all individuals. We also using UPGMA method to map the different farms and individuals. To avoid inbreeding, we established thirty-nine families.

5. In this study, one hundred and forty-nine breeding parents and 65 recaptured fishes of *M. asiaticus* were collected, and 11 polymorphic microsatellite loci were used to assess the parentage relationship between them. A total of 140 alleles were obtained and the mean observed and expected heterozygosity was 0.771 and 0.759, respectively. The range of the non-exclusion probability was 0.356 to 0.890 and the combined non-exclusion probability (first parent) of 11 loci was 99.9983%. Eleven from 65 recaptured fishes were assessed as offsprings of breeding parents (4 from 26 samples in 2011, 3 from 16 samples in 2012, 4 from 23 samples in 2013). It indicated that the total contribution of the enhancement to natural population of *M. asiaticus* was 16.92% in the Yangtze River.

Keywords: genetic diversity, pedigree management, paternity test, *Myxocyprinus asiaticus*

目 录

致 谢	I
摘 要	III
ABSTRACT	VII
目 录	XI
第一章 引 言	1
第二章 文献综述	3
1 分子标记	3
1.1 分子标记特点及其种类	3
1.2 微卫星标记特点及其获取途径	4
1.3 线粒体 DNA 标记的结构特点及遗传规律	6
2 亲子鉴定原理及其研究应用	8
2.1 亲子鉴定原理及其种类	8
2.2 亲子鉴定操作流程	8
2.3 亲子鉴定的应用	9
3 种群遗传多样性研究应用	12
3.1 种群遗传多样性定义	12
3.2 线粒体 DNA 和微卫星技术在鱼类种群遗传研究中的应用	12
4 胭脂鱼的研究概况	14
4.1 胭脂鱼基础生物学研究	15
4.2 胭脂鱼资源现状	15
4.3 胭脂鱼全人工繁殖研究	16
4.4 胭脂鱼分子生物学研究	16
4.5 胭脂鱼其他方面研究	18
5 本研究的意义和技术路线	18
第三章 胭脂鱼微卫星标记的开发	21
1 前言	21
2 材料和方法	22
2.1 实验材料	22
2.2 基因组 DNA 的提取	23

2.3	微卫星富集文库的构建	23
2.4	群体分析	26
2.5	基因型判定与数据分析	26
3	结果	27
3.1	胭脂鱼基因组 DNA 的提取	27
3.2	酶切及目的基因片段的获得	27
3.3	菌落 PCR 阳性克隆检测及引物设计	28
3.4	多态引物筛选及微卫星标记特征	30
4	讨论	35
4.1	DNA 的提取与探针选择	35
4.2	微卫星位点的多态性	35
第四章	胭脂鱼 SSR 荧光标记亲子鉴定技术的建立及试剂盒的开发	37
1	前言	37
2	材料和方法	38
2.1	实验材料	38
2.2	基因组 DNA 的提取	38
2.3	微卫星标记的筛选和合成荧光标记	38
2.4	PCR 扩增和检测	39
2.5	亲子鉴定分析	39
3	结果	40
3.1	筛选的微卫星标记特征	40
3.2	荧光标记微卫星亲子鉴定结果	41
3.3	胭脂鱼亲子鉴定试剂盒	47
4	讨论	48
4.1	亲子鉴定可靠性及所选微卫星位点	48
第五章	胭脂鱼遗传多样性的研究	49
1	前言	49
2	材料和方法	50
2.1	实验材料和采样地点	50
2.2	基因组 DNA 提取和 PCR 扩增	51
2.3	产物检测 and 数据分析	52
3	结果	54

3.1	基于线粒体 DNA 核苷酸及单倍型多样性分析	54
3.2	基于微卫星标记种群遗传多样性分析	57
3.3	不同种群 DNA 分子变异分析	57
3.4	基于线粒体 DNA 单倍型网络结构图	60
3.5	基于微卫星标记 Sturcture 聚类分析	61
3.6	基于微卫星标记胭脂鱼个体分配分析	63
3.7	基于微卫星标记 Poptree 聚类分析	63
3.8	基于微卫星标记不同群体瓶颈效应分析	64
4	讨论	65
4.1	胭脂鱼遗传多样性分析	65
4.2	胭脂鱼不同群体遗传分化和遗传结构	66
4.3	对比长江野生胭脂鱼遗传多样性以及遗传结构分析	67
第六章	胭脂鱼家系档案的建立	71
1	前言	71
2	材料和方法	72
2.1	实验材料鱼	72
2.2	基因组 DNA 提取及 PCR 扩增和测序	72
2.3	数据分析	72
3	结果	73
3.1	微卫星位点多态性	73
3.2	胭脂鱼亲本亲缘关系鉴定	74
3.3	胭脂鱼不同家系系统进化树	77
3.4	世代迁移者	79
3.5	胭脂鱼家系谱系建立	80
4	讨论	85
4.1	胭脂鱼养殖群体的遗传潜力评估	85
4.2	微卫星辅助家系建立及选育体系构建及效应评估	85
4.3	微卫星辅助胭脂鱼家系选育存在的问题	86
第七章	胭脂鱼增殖放流效果评估	87
1	前言	87
2	材料和方法	88
2.1	实验材料鱼	88

2.2	基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增和测序	89
2.3	亲子关系鉴定及增殖放流效果评估	89
3	结果	90
3.1	微卫星位点多态性	90
3.2	亲子关系鉴定结果	92
3.3	增殖放流效果贡献率评估	93
3.4	增殖放流对野生群体的遗传影响	93
4	讨论	95
4.1	亲子鉴定中对微卫星座位的选择	95
4.2	亲子鉴定在胭脂鱼增殖放流效果评估中的应用	95
4.3	胭脂鱼种质资源保护	96
	结 论	97
	参考文献	99
	作者简历及攻读学位期间发表的学术论文与研究成果	115
	声 明	117

第一章 引言

胭脂鱼为国家Ⅱ级重点保护动物，近年来，由于其自身原因（性成熟时间长）和人为因素（无节制的捕捞、水域污染、水利工程建设）等，其资源量急剧下降，闽江水系已经很难发现其踪迹，长江中的分布区也逐渐缩小，已处于非常濒危的程度，因此，从分子水平上评价现存胭脂鱼的遗传背景十分重要。目前人工增殖放流是避免其在长江中的资源量进一步减少、或资源量较快恢复的有效途径，人工增殖放流除了需要不断增加放流物种的种群数量，还需保证物种自然的野生种质资源遗传特征不被干扰，不影响放流水域的自然生态系统。

为解决以上问题本论文开展了以下研究，首先综述了分子标记（主要是线粒体 DNA 标记和微卫星标记）的种类和应用、亲子鉴定的原理和研究进展、种群遗传多样性的研究进展和胭脂鱼的物种概况和研究进展（第二章）；其次是利用生物素磁珠富集法开发胭脂鱼微卫星标记（第三章），构建微卫星富集文库，筛选多态性高的微卫星标记用于后面胭脂鱼遗传多样性分析、亲子鉴定、家系管理以及人工增殖放流效果的评估；以及建立胭脂鱼亲子鉴定技术和试剂盒的开发（第四章）；第三本文分别利用分子标记线粒体 DNA（d-loop 和 cyt-b）和微卫星标记对胭脂鱼遗传多样性进行分析（第五章）；利用微卫星标记辅助胭脂鱼家系谱系档案建立（第六章），用于指导胭脂鱼全人工繁殖，防止近亲繁殖引起的遗传衰退；最后对人工增殖放流的胭脂鱼效果进行评估（第七章），并估算其放流贡献率，对比放流胭脂鱼与长江胭脂鱼遗传背景，以期实现胭脂鱼资源量的增殖与保护。

本论文开发了 23 对胭脂鱼微卫星标记；首次建立了胭脂鱼亲子鉴定体系和试剂盒；为人工增殖胭脂鱼养殖场繁殖指导建议；并首次利用分子标记对胭脂鱼人工增殖放流效果进行评估。

第二章 文献综述

1 分子标记

1.1 分子标记特点及其种类

20世纪80年代,诞生了直接从DNA水平上进行遗传分析的分子标记(即DNA分子标记),DNA分子标记是用于标定或追踪某一特殊染色体上某一特殊位点的一段DNA序列,它可以是一个染色体位置或表型已知的基因,也可以是一段能够对某一基因或性状的遗传进行研究的DNA序列,且必须是可遗传和可检测的(Zaid et al, 1999)。常见的分子标记有数十种,目前可以分为4类,以分子杂交为基础的分子标记(RFLP、VNTR)、以PCR为基础的分子标记(DAF、RAPD、STS、AP-PCR、SCAR、SSR、SSCP、SPAR、DdF)、PCR与酶切相结合的标记(AFLP、CAPS)和DNA芯片技术的标记(SNP)。

DNA分子标记作为一种新的遗传标记技术其主要特点如下:

A) 直接以DNA形式表现,在生物体各个组织、发育时期均可检测到,不会受生物某些外在因素的影响,不存在表达与否的问题;

B) 多态信息含量高,数量丰富,遍布整个基因组,不需要另外创造遗传材料;

C) 大多数分子标记为共显性,能够鉴别出杂合和纯合基因型(Ganal et al, 1989),提供完整的遗传信息;

D) 大多数分子标记为“中性标记”,不会引起群体表现型的较大改变;

E) 没有上位效应和互隐性作用;

F) 检测手段简单、准确、迅速(郑敏和罗玉萍, 1999; 方宣钧等, 2001)。

分子标记这些特征奠定了其广泛的应用基础,极大的推动了生物科学的发展。随着分子生物学的快速发展,分子标记的研究和应用也得到长足的发展,已广泛应用于生物多样性分析、种质资源的分类演化、遗传育种、基因库构建、遗传图谱构建、基因定位、物种亲缘关系鉴定和基因克隆等方面,并显示了其独特的优势(黎裕等, 1999; 危文亮和赵应忠, 2000; Sakamoto et al, 2000; 王凯等, 2003;

董世瑞, 2006; 初冠因, 2012; Ben Naceur et al, 2012)。目前在水产动物鱼类研究中可以选择的分子标记很多, 本文以微卫星标记和线粒体标记作以简要概述。

1.2 微卫星标记特点及其获取途径

(1) 微卫星标记的特点

微卫星 DNA (microsatellite), 又称为简单序列重复 (Simple Sequence Repeats, SSR) 或短串联重复序列 (Short Tandem Repeats, STR), 一般由 1~6 bp 的核心重复单位和重复区域两端的保守序列两部分组成, 不同的重复数目和重复位置是形成微卫星位点多态性的基础 (Litt and Luty, 1989), 其优点表现在以下方面:

A) 微卫星标记遵循孟德尔遗传定律, 为共显性遗传, 能很好的区分纯合子和杂合子, 因此可以直接通过比较亲本和后代的基因型来区分自交后代和杂交后代, 在亲缘关系分析以及利用微卫星数据编制谱系档案是极为可靠的 (倪小伟, 2012)。

B) 广泛分布于真核生物基因组中且数量多, Tautz (1989) 发现在真核生物中每 5~10 kbp 序列中就存在一个重复序列, Hamada 等 (1982) 年发现真核生物基因组中含大量的 dT-dG, 同时证实了从酵母到人类基因组中均广泛存在微卫星序列。

C) 微卫星多态性高且变异丰富, 一个微卫星位点在不同的群体中能显示不同的等位基因。一般微卫星核心序列的重复数越高, 等位基因数目就越多, 多态性也随之越高 (Ma et al, 1996), 可较好的应用于物种遗传多样性分析和基因资源调查 (Patricia et al, 2012)。

D) 微卫星引物具有通用性, 由于核心区域两侧序列在不同物种中保守性较高, 近缘物种的相度性更高, 因此微卫星标记在近缘种、属间经常可以通用 (曾岩等, 2000; 骆慧, 2013)。

E) 检测方法快速、简单。通常使用常规 PCR 方法、琼脂糖凝胶电泳技术、聚丙烯酰胺凝胶电泳和毛细管电泳等方法读取等位基因大小值 (高一龙等, 2009), 其检测成本低、检测程序标准化、灵敏度高。

微卫星分子标记在特定位点上按照孟德尔定律分离并且提供高度多态性的、共显性的、选择中性的优点, 因此广泛应用到分子生态和系统发育与进化研究中。

其缺点需要是测定并找到两端的特异的单拷贝并设计引物，因此需要投入大量的人力和物力。

(2) 获取微卫星标记的途径

微卫星序列的获取是微卫星标记的基本前提，目前获得微卫星标记主要有以下 3 种途径：

A) 从公共数据库和文献上查找微卫星标记

GenBank、DDBJ (DNA Data Bank of Japan)、EMBL (European Molecular Biology Laboratory) 等公共 DNA 数据库中包含部分物种的微卫星序列、引物、EST 或 DNA 序列，可以直接从中筛选或设计微卫星引物；此外，从已发表的文献中也能查找到微卫星位点或引物，这是获得微卫星位点比较经济、快捷的方法，但受数据库中数据量的限制，目前只有多数模式生物和经济作物能够实现。

B) 富集法

大多数生物需要从基因组 DNA 中筛选微卫星标记，即建立微卫星文库进行标记的筛选。富集法又分为引物延伸法 (primer extension)、杂交选择法 (hybridization selection) 和 FIASCO (fast isolation by AFLP of sequences containing repeats) 法 3 种，其中 FIASCO 应用的最多，该方法将 AFLP 技术与杂交技术相结合，利用磁珠与 AFLP 片段中含有的微卫星序列进行杂交，然后将获得的微卫星序列的杂交进行克隆后测序。已成功的筛选了多种鱼类的多态性微卫星标记，如濒危物种中华鲟、达氏鲟、胭脂鱼等 (张四明等, 2000; Cheng et al, 2013; Zhang et al, 2013)。

C) 近缘物种交叉扩增

利用近缘物种的通用性通过引物筛选获得微卫星标记，即利用微卫星核心重复区的两侧保守区序列在近缘物种中具有高度保守性的特点，用近缘物种保守区设计微卫星引物对目的 DNA 扩增以获取微卫星标记。该方法能较快的且有效的获得微卫星位点，并且这种扩增方法在鱼类中也得到越来越多的应用 (Lima et al, 2009; Pickles et al, 2009; Luo et al, 2013)。

微卫星分子标记其诸多优点和巨大的应用前景，被广泛应用于各种生物学研究中，在水产动物中主要应用群体遗传学、亲缘关系鉴定与个体识别、遗传图谱的构建和分子标记辅助育种等方面。

1.3 线粒体 DNA 标记的结构特点及遗传规律

(1) 线粒体 DNA 的结构和特点

线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 是一种共价闭合环状双链 DNA (Awise et al, 1987), 能够独立地进行复制和转录, 是目前已知的唯一的母系遗传核外 DNA 分子标记 (Claytoo, 1982)。

Chen (2013) 对胭脂鱼线粒体 DNA 全基因组进行了测定和基因重排, 胭脂鱼线粒体结构如图 2.1。胭脂鱼线粒体全长 16,636 bp, 其中包括 13 个蛋白质编码基因 (Cytb、COI、COII、COIII、NDI、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5、ND6、ATPase6、ATPase8)、22 个 tRNA、2 个 rRNA 基因 (12S rRNA、16S rRNA) 和一个长度为 944 bp 的控制区处于 tRNA^{Pro} 和 tRNA^{Phe} 之间。

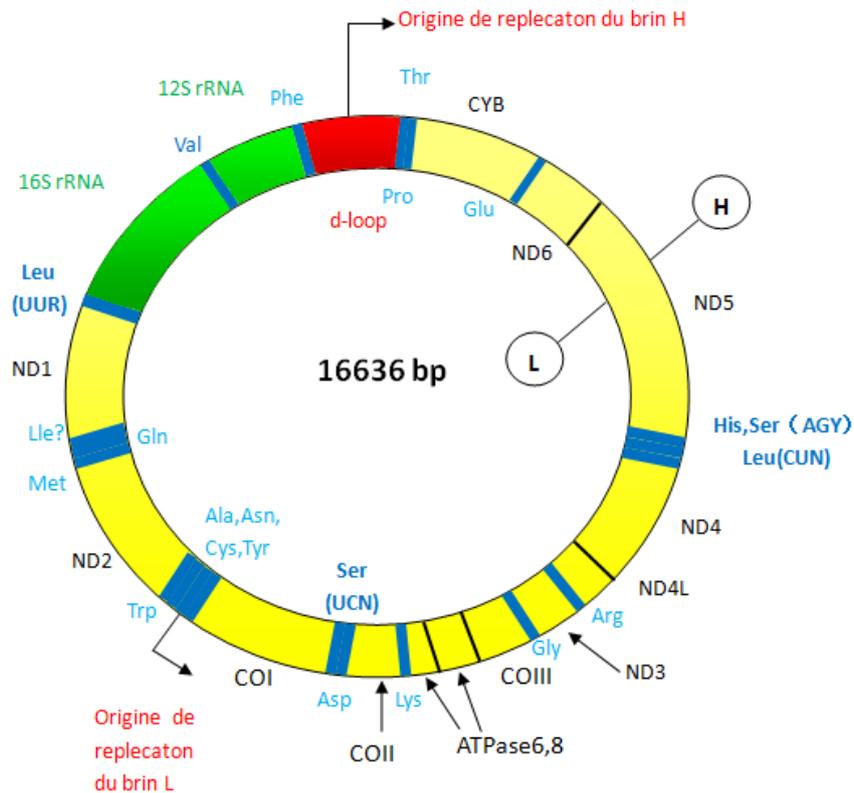


图 2.1 胭脂鱼线粒体 DNA 结构图

Fig 2.1 The structure of Chinese sucker Mitochondrial DNA

mtDNA 进化的主要特征是插入和缺失较少，主要是以碱基替换为主，控制区（d-loop）进化最快，其次是细胞色素 b（cyt-b），蛋白质和 tRNA 居中，rRNA 最慢（朱雪莲等，2006；金菊，2011）。因此在研究分化时间较短的物种间亲缘关系和遗传分化时，一般选择进化最快的 d-loop 和 cyt-b 基因。

（2）线粒体 DNA 的遗传规律

A) 严格的母系遗传

鱼类 mtDNA 一般呈母系遗传，虽然在鱼类受精过程中，有精子进入卵细胞，但精子只有 100 个左右的 mtDNA 拷贝，而卵细胞内却含有 $10^5\sim 10^8$ 个以上的 mtDNA 分子拷贝，因此可以说鱼类线粒体 DNA 属于严格的母系遗传；

B) 无组织特异性（Fransisco, 1979; Avise and Saunders, 1984）

C) 分子量小

分子大小只有 15.7~19.5 kb，处于限制性内切酶酶切范围内，线粒体基因组结构紧凑，没有间隔区和重复序列，非编码序列也很少，编码区不含内含子；

D) 拷贝数多

每个细胞中有 1000~10000 个拷贝，容易从组织中分离，重复性好；

E) 进化速度快且不同区域进化速度不同

通过 DNA 序列研究表明，mtDNA 的进化速率比单拷贝核基因要高 5~10 倍（Borwn et al, 1979）；不同的区域进化速度存在差异，允许选择不同的区域进行不同时间尺度的进化分析（桂建芳，1990；肖武汉和张亚平，2000）；

F) 编码效率高

同基因组 DNA 相比，mtDNA 上的基因排列极其紧凑，且无内含子。

目前 mtDNA 在水产动物中的应用，从 DNA 分子水平上认识到不同的品种和个体上的遗传差异，通过特异性引物 PCR 扩增反应电泳和银染，检测出 DNA 区域多态性反映群体的遗传特征、种群分化以及种属关系，已成为研究水产动物起源进化、分子钟、基因流、系统发育、群体遗传多样性、近缘种杂交、种质鉴定和濒危物种保护的重要方面。

2 亲子鉴定原理及其研究应用

2.1 亲子鉴定原理及其种类

亲子鉴定 (Parentage identification) 亦称亲权鉴定, 在 DNA 分子水平利用分子遗传学, 生物学及医学的理论和判断亲代与子代是否具有血缘关系 (Kashi et al, 1990), 即验证被检个体间单基因型遗传标记是否有某种亲缘关系。遵循的遗传规律有常染色体基因座遗传、性染色体遗传和核外基因组遗传规律三种。

亲子鉴定的内容包括以下几个方面: 个体生父的确定; 个体生母的确定; 个体生父、生母的确定; 也包括生父、生母后代的确定。亲子鉴定技术最早应用于司法鉴定领域, 随着分析技术的发展, 亲子鉴定的方法越来越多, 可靠性也越来越高。从早期的表型标记, 系谱登记等传统方法, 逐步发展到生理生化水平依据血型、蛋白质多态性和同功酶等进行亲权关系鉴定, 再到分子水平依据 DNA 分子进行亲权鉴定 (韩春梅等, 2004; 吴艳等, 2004)。

2.2 亲子鉴定操作流程

微卫星分子标记具有较高的变异率和高度的遗传多样性, 等位基因在任何两个个体之间不可能一样 (同卵双生除外), 从而使得微卫星代替了人们最早使用的血型、血液蛋白, 其多态性在个体识别及亲缘关系鉴定方面成为重要的研究手段。

利用微卫星进行亲子鉴定过程主要有: 1) 采集血样、毛发或组织样品, 并从中提取基因组 DNA; 2) 筛选合适的微卫星多态性引物, 合成荧光引物后对其进行 PCR 扩增, 然后进行凝胶电泳分析; 3) 对实验结果进行分析, 与谱系进行对照, 对亲缘关系概率进行估计并确定。

2.3 亲子鉴定的应用

(1) 亲子鉴定在家系管理的研究

目前,亲子鉴定不仅在法医学上有特殊的用途,而且在动物遗传育种与繁殖领域并且在濒危野生动物育种中也得到了广泛的应用。进行亲权鉴定和建立遗传谱系,在现代保护生物学和动物管理中已显得越来越重要,特别濒危物种种群数量小、近亲繁殖严重地威胁种群的扩大和发展,需要有一个详细、确切的谱系档案才能做好繁殖管理。

在水产养殖方面,亲子鉴定技术广泛应用于良种选育、系谱追踪等方面。亲缘关系鉴定或子代个体识别是确定个体间准确的亲缘关系以及建立正确的家系谱系档案的前提。正确的家系谱系档案可以有效的避免或减少近交,以此达到避免近亲衰退现象,对于提高鱼类育种效率和生产实践有着重要意义。有效的减少近亲繁殖威胁种群的扩大和发展,特别是对于某些种群数量较小的濒危物种如中华鲟、达氏鲟、胭脂鱼。利用亲子鉴定原理确定一个详细、准确的种群谱系档案,做好繁殖管理,避免后代中可能存在的近亲交配,严格控制小群体内的近交行为导致群体的生存力下降,从而避免近交衰退和遗传多样性丢失。

Kellogg 等(1995)利用微卫星标记研究罗非鱼的亲子关系时发现,由同一批罗非鱼卵发育的后代大多数情况下存在着一种以上的血缘关系,甚至在实验中证明其中某一窝卵的后代的父本是7条不同的雄鱼。Herbinger 等(1995)对来源于不同种群的同一环境下饲养的100尾虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)幼鱼仅通过4个基因位点准确鉴定了91%个体的血缘关系。朱滨等(1999)利用4对湖鲟微卫星引物对中华鲟随机个体样本构建DNA指纹图谱,研究表明,该指纹图谱能对1999年获得的中华鲟亲鱼样本进行有效的区分,且其中两对微卫星引物得到的等位基因数较多,在个体间表现出较高的多态性,并可用于鉴定人工增殖放流个体和自然繁殖个体。张春雷等(2010)通过7对微卫星标记,对哲罗鱼的微卫星亲子鉴定准确率、亲子鉴定能力与候选亲本群体大小的关系作了研究。

刘静霞等(2002)利用的8个微卫星DNA标记(Crooijmans et al, 1997)对从锦鲤(*Cyprinus carpio*L.)的红白、大正和昭和3个不同品系中所获得的4个

不同人工雌核发育家系的 20 尾个体进行 PCR 扩增，进行了 1 代的人工雌核发育，其家系内仅部分个体的部分座位出现纯合，所获得的人工雌核发育锦鲤为后续色素遗传调控机制研究提供了必要的实验材料。Jerry 等（2006）从斑节对虾（*Penaeus monodon*）公开的微卫星标记中挑选出多态性含量较高的 7 个位点，对 13 个家系进行了亲权鉴定，结果表明全部子代个体都可以准确的找到相应的家系中。杨国梁等（2008）为建立罗氏沼虾育种项目，2006 年利用罗氏沼虾 3 个群体，通过巢式交配设计，实现了大规模构建罗氏沼虾父系半同胞家系，通过标准化培育，最终建立了 123 个家系，其中含有父系半同胞家系 37 个，为建立罗氏沼虾全同胞和半同胞家系提供了依据。陈松林等（2010）以半滑舌鳎渤海野生群体和人工养殖群体为基础群体，建立了半滑舌鳎家系 18 个，对不同家系鱼苗进行荧光标记后放在同池进行生长比较，结果表明不同家系鱼苗生长速度差异显著，筛选出生长快速的家系 2 个，生长较快的家系 4 个，生长速度一般的家系 12 个，通过家系选育方法可以筛选出生长速度快、抗病力强的半滑舌鳎优良家系，从而为半滑舌鳎高产、抗病优良品种培育提供新的技术手段。Wang 等（2010）利用 16 重 PCR 复合体系对太平洋牡蛎（*Crassostrea virginica*）进行了亲子鉴定研究，结果发现 160 个子代个体可以全部成功的找到正确的家系。

（2）亲子鉴定在人工增殖放流效果评估的应用

渔业人工增殖放流是通过向天然水域投放鱼、虾、蟹、贝等各种渔业生物以达到恢复或增加渔业资源种群数量和资源量的目的（邓景耀和叶昌臣，2001），自 20 世纪 50 年代以来，我国在一些湖泊和沿海地区开展了以引种和增殖当地种为主的增殖放流活动（张航利等，2012）。经过近几十年的努力，长江流域鱼类人工增殖发展很快，不仅包括四大家鱼、鲤、鲫等重要经济鱼类，同时也包括中华鲟、达氏鲟、胭脂鱼、岩原鲤等珍稀特有物种的人工增殖放流，这是渔业资源增殖和鱼类资源保护的重要措施。

将放流的渔业资源经过一定时间的增殖后进行回捕，回捕的个体数与总放流个体数之比称为回捕率，回捕率可以准确直观的反映人工增殖放流效果（邓景耀和庄志猛，2001）。目前回捕率计算法普遍采用的是统计标志回捕率，即根据放流和野生群体的比例估算放流群体的回捕率，物理性的标志方法如剪尾鳍或挂牌，

或用茜素络合物和盐酸四环素溶液浸泡仔鱼、稚鱼对耳石进行标记（李伟亚，2012），或者采用可见植入荧光标记（VIE）和编码金属标（CWT）（杨晓鸽等，2013），这些方法操作繁琐，费用昂贵，且标志容易脱落，从而不易区分放流和野生个体（梁维波和于深礼，2007），另外放流个体的损害较大，容易造成不可修复性损伤，导致个体放流后不适应放流环境，生活力的下降，死亡率上升，影响放流回捕率的估算。

利用微卫星分子标记经过亲子鉴定家系认证，进行放流回捕率的精确估算的原理是同一个家系个体具备相同的、可识别的指纹图谱，且每一个放流个体中均存在（张凯，2013）。具体做法是获得一个家系的分子指纹图谱信息后，将这个家系或后代掺入放流群体中，实际上就是掺入了一种肉眼不可见的“荧光标记”，在获得回捕个体后，就可以用仪器准确的检测出这种特殊的“荧光标记”。这种内在的“荧光标记”即微卫星标记，具有以下特点：

A) “荧光标记”是放流个体自身所携带的，并不是人为进行的物理标志，因此不会对放流个体造成任何伤害，更不会影响放流“内标”个体的生活力，且在放流后放流个体的标记不会丢失；

B) 分子标志符合孟德尔遗传定律，子代的遗传信息完全遗传父母本，因此在放流前仅需要获得放流“内标”家系的亲本样本信息，放流回捕后，用 PCR 扩增基因分型的方法即可快速检测放流“内标个体”；

C) 和生产性苗种繁育一样，“内标”个体可以大规模生产，满足人工放流总量的需求；

D) 鉴于微卫星分子标记自身的特点，标记可以分布广泛，用以区分放流个体和自然群体，以满足放流回捕后“内标”个体的鉴定；

E) 放流这种“内标”个体，不会对野生资源的结构造成破坏，从而保证了渔业资源的可持续性发展。

目前，利用微卫星分子标记亲子鉴定技术对人工增殖放流效果评估还未有较多的报道，本文成功的运用胭脂鱼微卫星标记对人工增殖放流胭脂鱼的放流贡献率和遗传结构方面进行了评估（成为为等，2013）。

3 种群遗传多样性研究应用

3.1 种群遗传多样性定义

生物多样性主要体现在四个层次：即物种多样性、遗传多样性、生态系统多样性和景观多样性（马克平，1993）。物种多样性是生物多样性的中心，遗传多样性是物种多样性的基础，而生态系统多样性则是维系物种多样性的保证。广义的遗传多样性是指地球上所有生物携带的遗传信息的总和，而狭义的遗传多样性亦称基因多样性是指种内基因的变化，包括同一群体中不同个体或生物种内不同群体之间的遗传变异总和。

遗传多样性最直接的表达形式就是遗传变异性的多少，但也包括遗传变异分布格局，即群体的遗传结构。遗传多样性是重要的生物资源，其产生是由于遗传信息在外界或内在的因素作用下，在复制过程中出现了 DNA 片段的倒位、易位、缺失或转座等，从而导致不同程度的遗传变异。物种或群体的遗传多样性大小是长期进化的产物，是其生存（适应）和发展（进化）的前提（Sotis et al, 1991）。一个群体（或物种）遗传多样性越高或遗传变异越丰富，对环境变化的适应能力就越强，越容易扩展其分布范围和开拓新的环境。

3.2 线粒体 DNA 和微卫星技术在鱼类种群遗传研究中的应用

（1）线粒体 DNA 在鱼类种群遗传研究中的应用

遗传多样性是生物多样性的一个重要组成部分。鱼类保护遗传学的一个重要内容，就是保护物种的遗传多样性，保持物种种质及其进化潜力，防止等位基因频率发生变化，特别是某些稀有等位基因的消失。mtDNA 在分析鱼类遗传结构有较大优势，与其它物种一样，mtDNA 应用于鱼类种群遗传结构最初是对整个基因组或部分基因进行限制性片段长度多态分析（RFLP），目前主要采用 DNA 测序技术对 mtDNA 的部分序列，如控制区序列或细胞色素 b 进行序列分析。

童金苟等（2001）结合线粒体 16S rRNA 和 Cyt b 基因研究了鲤的 3 个品种，结果发现，在 859bp 的 DNA 序列中 3 个鲤品种无差异，表明 3 个鲤品种可能在起源上是独立的一支，并且分化低。Zhang 等（2003）用 mtDNA 的 d-loop 序列分析中华鲟野生种群遗传多样性及有效雌性群体大小，认为中华鲟遗传多样性较贫乏，据此推测中华鲟在历史上曾发生遗传瓶颈，估计 1995 – 1999 年中华鲟产卵的有效雌性群体大小为 2500 – 3000 尾。黄种持等（2008）通过对中国南方 3 水系黑脊倒刺鲃 cyt-b 基因的序列分析，发现黑脊倒刺鲃可能存在多个地理种群。梁宏伟等（2009）通过 mtDNA d-loop 序列多态性探讨 3 种中国鲤的系统进化关系，研究结果表明，荷包红鲤和兴国红鲤虽都原产于江西省，但 2 种鲤鱼最初是独立从野生鲤鱼中通过体色变异分化而来的。

（2）微卫星标记在鱼类种群遗传研究中的应用

微卫星标记在鱼类研究上的应用始于 20 世纪 90 年代初（Goffetal, 1992），利用微卫星 DNA 具有孟德尔遗传模式及共显性的特征，不同的生物个体具有不同的 DNA 碱基排列顺序，这种 DNA 分子差异形成了不同个体间的遗传变异，微卫星标记高度多态性和准确基因型判别使其成为研究种群遗传结构的强有力的工具（李琪，2006）。即根据多个微卫星位点在不同群体中的等位基因数、等位基因频率、期望杂合度、观测杂合度、种群遗传分化指数和遗传距离等，来评估种群遗传多样性和种群遗传结构的研究，分析进化历史和潜力，从而针对珍稀濒危稀有物种提出合理的保护措施。

Liu 等（2009）采用 10 对多态性微卫星标记对 5 个野生群体和 4 个养殖群体的草鱼的遗传结构和遗传多样性进行了研究，结果表明我国的 5 个野生和 3 个养殖群体都有较高的遗传多样性，而马来西亚这一个养殖群体则呈现较低的遗传多样性，AMOVA 分析结果显示野生群体和养殖群体存在显著的遗传分化，其研究结果可以为草鱼的种质改良提供遗传依据。Hulak 等（2010）利用 10 对鲤鱼微卫星标记对 13 个野生和养殖鲤鱼群体的遗传多样性和遗传分化程度进行研究，结果表明鲤鱼在人工饲养条件下鲤鱼繁殖群体的遗传多样性显著低于自然条件下随机交配模式的群体。

4 胭脂鱼的研究概况

胭脂鱼（Chinese sueker, *Myxocyprinus asiaticus*），在鱼类分类上属于硬骨鱼纲（*Osteichthyes*）、鲤形目（*Cypriniformes*）、胭脂鱼科（*Catostomidae*），为国家Ⅱ级重点保护动物（伍献文，1979）。



图 2.2 胭脂鱼幼鱼

Fig 2.2 Juvenile of Chinese sucker



图 2.3 胭脂鱼成鱼

Fig 2.3 Adult of Chinese sucker

4.1 胭脂鱼基础生物学研究

胭脂鱼体侧扁，头后背部显著隆起，身体最高点为背鳍起点。头短，吻端圆；口下位，呈马蹄状，唇发达，富肉质；眼侧上位，无须；下咽齿较细，单行，稍侧扁，末端钝，略弯曲成钩状；背鳍没有硬刺，背鳍基颇长；尾柄细长，尾鳍叉形；侧线完全；鳞圆形。

胭脂鱼形态最大的特征是存在“转色和变态”的生理过程，在不同的生长阶段，其体型、体色的变化差异非常大。在稚鱼时期，体色半透明或灰白色（如图 2.2）；稍大，转为灰褐色，并杂以红紫色彩晕；成鱼身体延长，增粗，背部隆起不明显，背鳍低，体侧黑斑逐渐隐没，全身呈胭脂红色或黄褐色（如图 2.3）（饶发祥，1993；李年文，1999a；李年文，1999b；张奇亚，2000；胡隐昌，2001；万松良，2004；陈兆，2005）。

4.2 胭脂鱼资源现状

胭脂鱼科在全世界约有 14 属，近 80 种，大多数分布于北美洲（汪松，1998）。在亚洲仅有亚口鱼（*Catostomus catostomus*）和胭脂鱼分布，胭脂鱼仅分布于我国长江和闽江，为单型属、种。

据统计，1958 年胭脂鱼占岷江渔获量的 13%以上（湖北省水生生物研究所，1976）；20 世纪 70 年代，胭脂鱼资源量已经开始明显下降，只占到 2%左右（四川省长江水产资源调查组，1975）；20 世纪 80 年代，胭脂鱼占长江上游渔获物已经不足 1%，捕捞记录只能以尾为单位计算，特别是闽江流域胭脂鱼野生种群几乎濒临绝迹，分布在长江的胭脂鱼可能是现存胭脂鱼的唯一野生种群（汪松，1998）。蒋文华等（2003）指出造成胭脂鱼资源下降的原因主要与其自身繁殖力低、发育时间长、过度捕捞、大型水利工程建坝截流、水体污染和江沙采挖等因素有关，并提出人工增殖放流是恢复长江胭脂鱼资源的重要手段。

4.3 胭脂鱼全人工繁殖研究

胭脂鱼成鱼体长最长能达到 1 m，由于其生长缓慢，发育成熟较晚，一般野生雌性亲鱼性成熟年龄为 6 龄，雄鱼 5 龄以上（湖南省水产科学研究所，1980；邓中群，1987），体重约 10 kg 左右。每年 2 月中旬（雨水节前后），性腺接近成熟的亲鱼均要上溯到上游，于 3-5 月在急流中繁殖。

我国水产工作者早在 20 世纪 70 年代便开始胭脂鱼全人工繁殖的研究工作，1972 年，宜宾地区开始胭脂鱼人工繁殖技术的研究，主要是繁殖季节利用从长江中收集成熟亲鱼进行人工催产。同时，部分单位在池塘、水库中进行试养。万州水产研究所自 1973 年开始，对胭脂鱼进行移养驯化，攻克了移养驯化中的伤病、饲料、池塘生态环境等诸多问题之后，并于 1979 年对性腺发育成熟的胭脂鱼进行人工催产并获成功。1994 年万州水产所利用池塘繁殖的子代苗种，培育成亲鱼，进行催产，成功获得了子二代鱼苗，首次实现了胭脂鱼的全人工繁殖（陈焜慈，1999）。子二代繁育成功为胭脂鱼的繁殖、保护和开发利用，提供了可靠的技术保证。

4.4 胭脂鱼分子生物学研究

20 世纪 80 年代开始，便有学者在分子生物学方面对胭脂鱼进行研究，李树深等（1983）对中国胭脂鱼核型进行了研究；随后，熊全沫等（1985）对中国胭脂鱼同工酶进行研究。

曾青兰等（2001）采用在特定引物下 PCR 扩增，测序得到了大口胭脂鱼线粒体 DNA 控制区的序列，经过对比分析，其序列全长为 920bp，并且成功地识别了终止序列区（nt, 1~235 处）、中央守区（nt, 236~566 处）和保守序列区（nt, 567~920 处），并找到了终止相关的序列 ETAS 以及保守 D（CBS-D）和保守序列 CSB1, CSB2, CSB3。

孙玉华等（2002）利用 PCR 扩增了采自长江宜昌江段和清江的 8 尾中国胭脂鱼线粒体 DNA 控制区全序列，得到的 958 bp 的碱基序列中，检测出 32 个多态性核苷酸变异位点，多态位点比例为 0.033，个体的变异在 0~1.36%之间，表现出较

大的个体多态性差异，并且发现中国胭脂鱼的线粒体控制区的变异远大于美国胭脂鱼的 0.016。

孙玉华等（2003）采用 RAPD 和 PCR-RFLP 技术，分析了长江中游两个胭脂鱼群体的遗传结构，结果表明，宜昌、金口群体内个体之间的遗传相似性分别为 0.9274，0.9313，群体之间遗传相似性为 0.9000，结果显示，长江中游两个胭脂鱼群体遗传结构较为单一，群体之间表现了较为明显的遗传分化。

Sun 等（2004）采用线粒体 DNA 分析了长江 4 个江段（宜宾、万州、武汉、宜昌）野生胭脂鱼的遗传多样性，结果得到线粒体控制区全长序列为 920 bp，70 个样本中得到 223 个多态位点并定义了 39 个单倍型，4 个野生群体存在较大的遗传分化。

杨星等（2006）采用 PCR-RFLP 对长江中国胭脂鱼群体的遗传分化进行了研究，分析了长江上、中游的宜宾，万州、宜昌和武汉金口 4 个江段的中国胭脂鱼群体的遗传结构。结果显示，长江宜宾江段的中国胭脂鱼群体与其他 3 群体产生了明显的分化现象，长江中、下游群体间的基因交流高于上游群体，中国胭脂鱼群体内遗传结构比较单一，其群体的遗传多样性程度有减退的可能性。

杨钟等（2010）运用微卫星分子标记对长江中、上游的 80 尾人工增殖放流的子一代个体的遗传多样性和种群遗传结构进行了分析。在 18 个微卫星位点中其中 5 对引物呈现多态性，等位基因数目为 2~8 个；多态信息含量 0.2957~0.8038；Shannon 多样性指数 0.5466~1.8840；观测杂合度 0.3056~0.7222；期望杂合度 0.3658~0.8381；Hard-Weinberg 遗传偏离指数 (D) - 0.1818~0.4287，结果表明，胭脂鱼人工放流子一代处于较高的遗传多样性水平，但很大程度上仍受到人类活动的影响。

张丽丽等（2011）测定了 3 尾胭脂鱼的细胞色素 b 基因序列，并结合 GenBank 上 5 条亚口鱼科鱼类的相应序列一并分析。构建的系统发育树显示，颈棱亚口鱼属 (*Xyrauchen texanus*) 和吸口鱼属 (*Moxostoma robustum*) 构成 1 支，胭脂鱼属 (*Myxocyprinus*)、长背亚口鱼属 (*Cycleptus elongatus*) 和牛胭脂鱼属 (*Ictiobus*) 构成另 1 分支。

郑凯迪等（2012）年测定了胭脂鱼胰蛋白酶 cDNA 全长为 912 bp，结果显示胰蛋白酶活力的变化与 mRNA 水平的变化之间未呈现直接相关性。因此，胭脂鱼胰蛋白酶合成可能是一个由多种因素共同调控的复杂过程。

Cheng 等（2013）和 Li 等（2013）分别利用磁珠富集法和 454 测序法开发胭脂鱼微卫星标记，结果显示，这些微卫星标记均能够提供丰富的遗传信息，可作为有效的遗传标记用于胭脂鱼遗传多样性和亲子鉴定分析。

祝东梅等（2013）采用植物血凝素、秋水仙素活体注射和肾细胞直接制片法分析了胭脂鱼（*Myxocyprinus asiaticus*）的染色体核型和 Ag-NORs 显带，并以胭脂鱼血细胞为样本，鸡血细胞 DNA 含量为标准（2.50 pg），用流式细胞仪测定了胭脂鱼的 DNA 含量。

4.5 胭脂鱼其他方面研究

近年来有关胭脂鱼的研究还有集中在营养需求（袁勇超，2011；林郁葱，2012；Lin et al, 2013；张颂等，2013；Yu et al, 2013；Chu et al, 2014；Liu et al, 2014；Yu et al, 2014）、幼鱼的早期发育（张涛等，2002；Liu et al, 2013；石小涛等，2013）、病毒（李正秋和张奇亚，2001；张奇亚和李正秋，2001；阮红梅等，2002；田飞焱等，2013）以及听觉阈值及其噪声影响（Liu et al, 2013；刘猛，2013）等方面。

5 本研究的意义和技术路线

胭脂鱼在鱼类系统分类和动物地理学上有着极为重要的意义，曾在长江和闽江有过广泛的分布，具有较大经济价值，近几十年来资源量急剧下降，相关研究保护工作亟待开展。从分子水平评价物种种质资源遗传多样性的水平是恢复自然资源量的前提和基础，对于鱼类多样性的研究，重要的是调查物种种群间、种群内的遗传结构和遗传分化，阐明其多样性衰退的程度，从而采取相应的保护对策。本论文将以国家 II 类野生保护动物---胭脂鱼（*Myxocyprinus asiaticus*）为研究对象，采集胭脂鱼养殖场和长江胭脂鱼样本，从以下几个方面进行研究：

(1) 通过构建胭脂鱼微卫星 DNA 富集文库, 筛选多态性高的微卫星标记用于遗传多样性、亲子鉴定、家系管理以及人工增殖放流效果的评估(第三章)。

(2) 利用筛选到的多态性微卫星标记合成荧光引物, 建立胭脂鱼亲子鉴定技术和试剂盒(第四章)。

(3) 基于微卫星标记和线粒体标记对养殖场和长江胭脂鱼的种群遗传多样性进行分析, 查清目前我国胭脂鱼人工增殖放流亲本状况以及野生种群遗传背景(第五章)。

(4) 利用微卫星标记辅助胭脂鱼家系谱系档案建立, 用于指导胭脂鱼全人工繁殖, 防止近亲繁殖引起的遗传衰退(第六章)。

(5) 对人工增殖放流的胭脂鱼效果评估, 估计其放流贡献率, 对比放流胭脂鱼与长江胭脂鱼遗传背景, 实现胭脂鱼资源量的增殖与保护(第七章)。

技术路线:

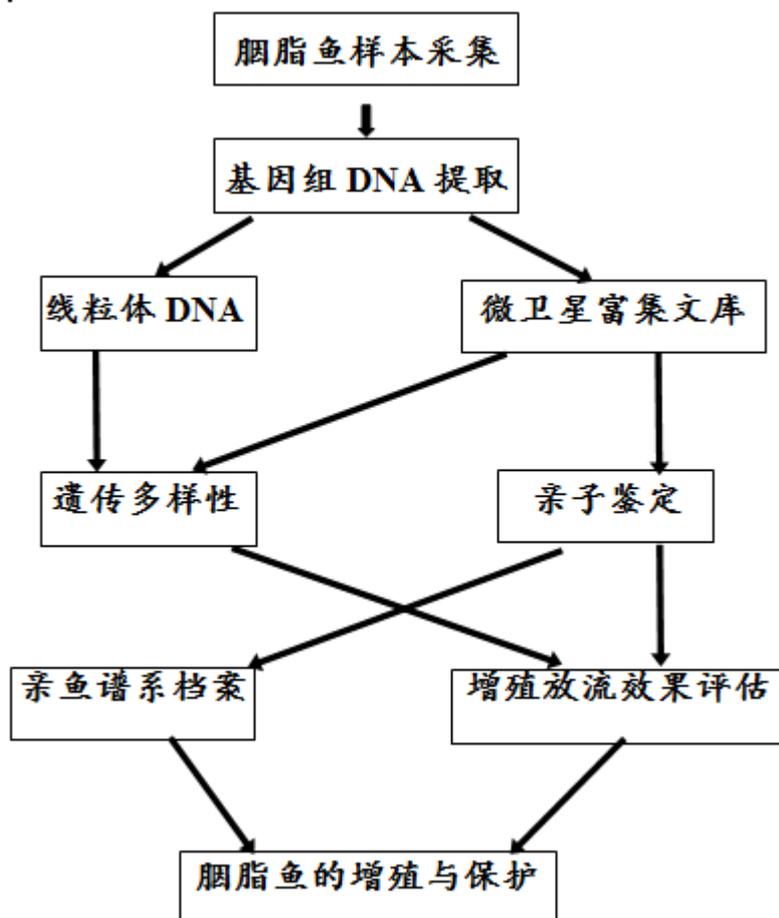


图 2.4 胭脂鱼种群遗传多样性及家系管理研究技术路线图

Fig 2.4 Technical route for Population genetic diversity and pedigree management of Chinese sucker

第三章 胭脂鱼微卫星标记的开发

1 前言

微卫星 (microsatellite) 是原核生物和真核生物基因组中普遍存在的 1~6 个核苷酸的简单串联重复序列 (Zane et al, 2002), 作为新一代分子标记因其多态性高、稳定性高、特异性高、共显性遗传和检测快捷等优点, 在构建遗传连锁图谱时备受青睐。

用生物素包被的磁珠富集法 (FIASCO) 分离微卫星分子标记是一种简单高效的方法。磁珠富集法首先是利用末端被生物素标记的核苷酸重复序列如 (GA)_n、(CT)_n 和基因组 DNA 中含有微卫星序列片段杂交, 利用磁珠上包被有链霉亲和素 (Streptavidin) 与探针上的生物素相结合, 通过磁力将所需的微卫星 DNA 序列隔离出来, 然后利用磁力架将已杂交的磁珠从溶液中分离出来, 随后经过松弛和严谨的洗脱将微卫星片段从磁珠上洗脱下来, 最后经过与菌落杂交测序查找已插入的微卫星序列 (图 3.1)。

杨钟等 (2009) 利用生物素磁珠富集法构建了 18 个胭脂鱼微卫星文库, 并且将设计的这些微卫星标记用于人工放流子一代胭脂鱼遗传多样性研究, 其中 5 对引物呈现多态性。Chen 等 (2010) 利用 (CA)_n 和 (GA)_n 两种探针构建 14 个新的微卫星文库。

前面学者的研究结果表明利用生物素磁珠富集法构建胭脂鱼微卫星文库是切实可行的, 并且一旦建立了胭脂鱼微卫星文库, 便可将这些微卫星标记应用到胭脂鱼各个研究领域。因此本文通过利用两种新的探针 (CT)_n 和 (AC)_n 用于构建微卫星文库, 以期将这些建立的多态微卫星引物用于胭脂鱼群体遗传多样性分析、亲子鉴定研究、家系谱系建立、增殖放流效果的评估等研究。

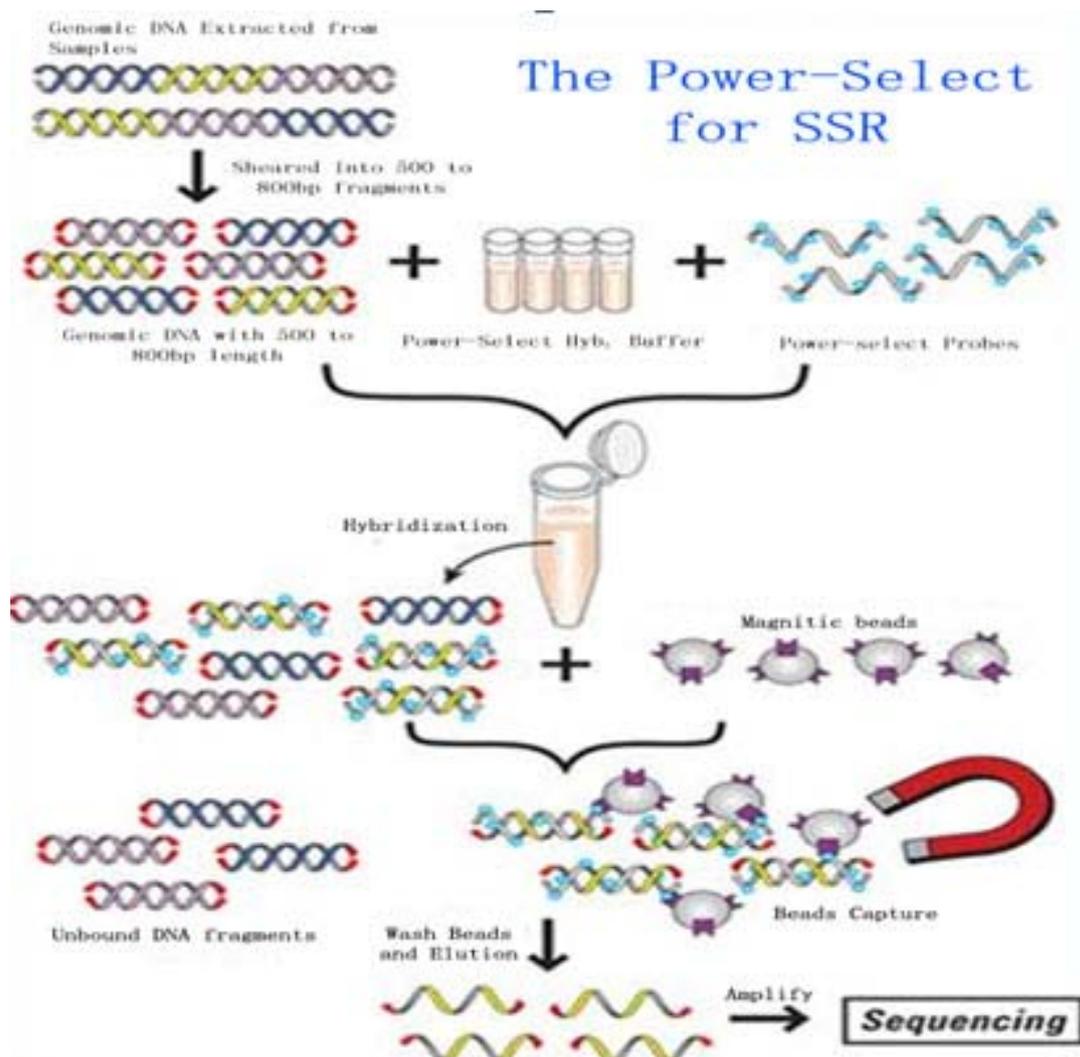


图 3.1 FISACO 法筛选微卫星标记的流程及原理图

Fig 3.1 The method of FISACO for microsatellite DNA isolation

2 材料和方法

2.1 实验材料

2010年2月~2013年9月，在长江中上游干流各江段和重庆、四川、湖北地区5个养殖场内（即目前国内胭脂鱼增殖放流主要的苗种供应单位）采集胭脂鱼鳍条样本214尾，所有样本均用无水乙醇浸泡于4℃冰箱保存备用。

2.2 基因组 DNA 的提取

采用经典的酚氯法 (Sambrook et al, 1989) 提取胭脂鱼基因组DNA, 具体操作方法如下:

(1) 剪取0.5g左右的鳍条组织, 用双蒸水清洗鳍条上残留的酒精, 并于TE缓冲液 (2mM Tris-HCL PH=8.0, 1mM EDTA PH=8.0) 中浸泡1-2 h以充分置换组织内残余的酒精;

(2) 将浸泡后的组织样本置于1.5ml离心管中, 分别加入600 ul STE缓冲液 (5.85mM NaCl, 1M Tris-HCL PH=8.0, 2mM EDTA PH=8.0), 40ul 10% SDS, 10ul 20mg/ml蛋白酶K, 充分混匀, 于50°C~54°C培养箱中消化4h, 消化过程中摇晃离心管3~4次, 直到组织消化完全为止;

(3) 加入等体积Tris酚-氯仿-异戊醇 (体积比为25: 24: 1), 机械缓慢混匀20分钟, 10000rpm离心10min (4°C), 吸取上清液, 重复该过程一次;

(4) 加入等体积氯仿-异戊醇 (体积比24:1), 机械缓慢混匀20分钟, 10000rpm离心10min (4°C), 吸取上清液;

(5) 在上清液中加入2倍体积的无水乙醇 (-20°C预冷) 4°C保存12 h后10000rpm离心10min (4°C), 去上清液, 留取沉淀于离心管并于空气中干燥;

(6) 加入50ul双蒸水溶解, 于4°C保存备用。

2.3 微卫星富集文库的构建

胭脂鱼微卫星富集文库的构建参照生物素磁珠富集法 FIASCO (Fast Isolation by ALFP of Sequences Containing repeats) (Zane et al, 2002)

(1) 混合基因组 DNA 的酶切

为了满足文库的多样性, 将不同地理种群的胭脂鱼 DNA 混合后构建胭脂鱼微卫星文库, 基因组 DNA 使用限制性内切酶 *Mse* I 酶切, 总体积为 30 ul, 包括 150ng 混合基因组 DNA, 5 U *Mse* I 限制性内切酶 (New England Biolabs, 英国), 1×BSA (New England Biolabs, 英国) 和 1×NBE Buffer, 37°C酶切 4 h, 1%琼脂糖电泳检测酶切效果。

(2) *Mse* I 接头制作和连接反应

接头采用的是寡核苷酸 *Mse* I 接头，其序列为：5' - GACGATGAGTCCTGAG - 3'; 3' - TACTCAGGACTCAT - 5'，200 uM 的接头各 100 ul 于 94°C 混合 3min，室温 30 min 备用；连接反应总体积为 30 ul，包括 3 ul 1×ligation buffer，1 U T4 DNA 连接酶（New England Biolabs，英国），20 ul *Mse* I 酶切产物，20 uM *Mse* I 接头，加双蒸水至 30 ul，16°C 连接 12 h，4°C 保存备用。

(3) PCR 扩增及产物回收

采用 *Mse* I 扩增引物 5' - GATGAGTCCTGAGTAA - 3'，同时扩增 8 管 25 ul 扩增体系包括 1×PCR buffer，200 μM dNTPs，0.5 μM *Mse* I 引物，1.5 mM MgCl₂，0.5 U DNA Taq 酶，PCR 条件如下：94°C 30 s，53°C 1 min，72°C 1 min，20 个循环；72°C 延伸 10 min。经 1% 琼脂糖电泳检测扩增产物。

(4) 扩增产物与生物素探针杂交

SSR 探针为生物素标记的寡核苷酸，将上述 PCR 产物 95°C 水浴变性 5 min，加入 25 uL 55°C 预热的杂交缓冲液（20×SSC，10%SDS）和 5 uL 生物素标记探针（上海生工生物工程有限公司合成），总体积为 100 uL 杂交反应体系，在 PCR 仪中 58°C 杂交 5 min，取出后，迅速冷却至室温（约 1 h）。

(5) 磁珠活化后与生物素探针复合体结合

充分摇匀 Streptavidin MagneSphere® 链霉亲和素磁珠（Promega），加入 1 mL TEN₁₀₀ 清洗磁珠 2 min，置磁性分离架中约 1 min，至所有磁珠沉淀后，弃上清；重复洗涤 3 次后加入 40 uL TEN₁₀₀ 悬浮磁珠；将活化后的磁珠与杂交产物混合均匀后加入 300 ul TEN₁₀₀，室温放置 30 min，期间间断轻柔摇匀磁珠，防止沉淀。

(6) 松弛性洗涤和严谨性洗涤

松弛性洗涤：用 400 uL TEN₁₀₀₀ 于室温下洗涤磁珠 3 次，每次 5 min，不时搅动或吹打混合物。3 次漂洗后再用 400 uL 预热至 55°C 的 TEN₁₀₀₀ 溶液洗涤 1 次。

严谨性洗涤：用 400 uL 洗涤液（0.2×SSC，0.1%SDS）于室温下洗涤磁珠 3 次，每次 5 min，不时搅动或吹打混合物。用磁力架固定磁珠，移去洗涤液。

(7) 富集 DNA 片段的洗脱

将清洗好的磁珠悬浮于 50 ul TE 缓冲液中，用移液枪吹吸使磁珠重新悬浮，于 100℃水浴 5 min 期间不时用移液枪轻轻吹打，避免磁珠沉到管底，用磁力架固定磁珠后，迅速吸出上清液于 EP 管中，冻存于 4℃备用。

(8) PCR 扩增片段的纯化

将洗脱后的 DNA 片段进行 PCR 扩增并摸索扩增循环数，扩增体系和条件如步骤 3，获得富含微卫星 DNA 序列的双链短基因组 DNA 片段，用 PCR 纯化试剂盒 (TakaRa) 对 PCR 产物 (200 - 800 bp 的片段) 进行回收纯化。回收纯化具体步骤参考 TakaRa (纯化试剂盒使用说明)，纯化后使用 1%琼脂糖凝胶检测回收效果。

(9) PCR 扩增片段的克隆和阳性克隆的筛选

将回收的 DNA 片段与 pMD18-T Vector 载体 (Promega, 美国) 进行连接，连接反应体系为 10 uL，其中包含 50 ng pMD18-T vector, 1×ligation buffer, 3 uL (约 100 ng) 的回收产物, 3 U T4 DNA 连接酶 (New England Biolabs, 英国)。15℃连接 8 h，然后电转化大肠杆菌感受态细胞，在固体培养基平皿上培养 12 h。挑取平皿上单菌落于含有氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中，进行扩大培养，PCR 检测阳性克隆，将含有插入片段并且大小在 150 - 800 bp 的阳性克隆菌液送测序公司测序。

(10) 序列结果分析及微卫星引物的设计及筛选

用软件 Chromas 观察测序峰图，去除 pMD18 - T 载体及 *Mse* I 接头序列，用软件 SSRHunter 查找重复单元序列，并人工校对，记录重复次数较多、测序峰图好且重复区域两翼具有足够长的序列。

使用软件 Primer Premier 5 (Vinay et al, 1998) 设计引物，引物长度在 18 - 25 bp 之间，GC 含量 (GC%) 在 50~70%之间，退火温度在 45~68℃之间，扩增片段长度在 150~500 bp 之间。将设计的引物序列送至上海生工公司合成。

筛选引物 PCR 条件为：94℃预变性 5 min；94℃变性 45 sec，最适复性温度下复性 45 sec，72℃延伸 1 min，共 30 个循环；之后 72℃延伸 10 min，4℃保存。最

佳扩增结果为在琼脂糖电泳时产生与预计大小相符的清晰条带且没有杂带或杂带相对较少的引物。

2.4 群体分析

将筛选出的扩增效率高、特异性好的胭脂鱼微卫星多态引物进一步对其多态性进行筛选，随机选择万州养殖群体的 24 个胭脂鱼的 DNA 样本作为模板，利用初筛的多态性引物进行扩增，在 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后进行 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳，PAGE 胶配制方法及步骤，以及具体染色步骤参考纪志宾（2010）硕士学位论文。

2.5 基因型判定与数据分析

用凝胶成像分析系统对聚丙烯酰胺凝胶（PAGE）图进行拍照，并用自带的软件 JUNYI Gel-Analysis，读取 PAGE 胶图条带片段大小，判断条带的基因型，并辅以人为校正基因型。利用软件 Pop-gen32 计算等位基因数、期望和观测杂合度以及是否偏离哈德文平衡（Hardy-Weinberg equilibrium）等参数，利用软件 PIC_CALC 计算多态信息含量（PIC）。

3 结果

3.1 胭脂鱼基因组 DNA 的提取

采用经典的酚氯法提取高质量的胭脂鱼基因组 DNA，基因组具有较好的完整性和较高的浓度且无降解现象（如图 3.2），为胭脂鱼微卫星文库的构建奠定了基础。

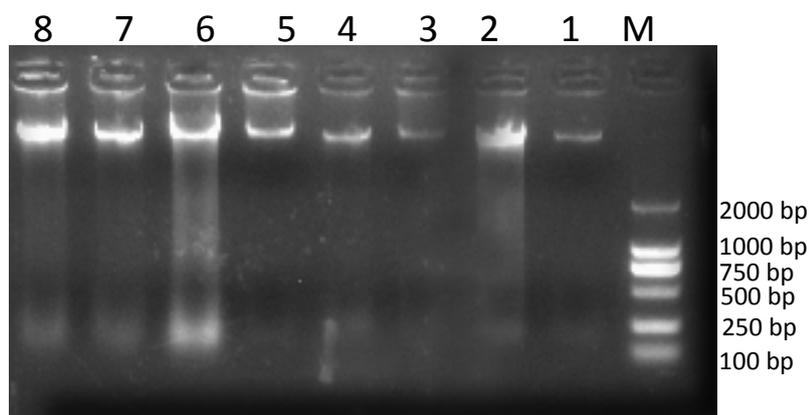


图 3.2 胭脂鱼基因组 DNA

M: DL2000 bp DNA Marker; 1 – 8: 不同胭脂鱼个体 DNA

Fig. 3.2 The extracted total genomic DNA from Chinese sucker

M: DL2000 bp DNA Marker; 1 – 8: The extracted total genomic DNA from Chinese sucker

3.2 酶切及目的基因片段的获得

不同地理种群的胭脂鱼基因组 DNA 混合后，在 *Mse* I 内切酶作用下酶切后琼脂糖凝胶电泳显示（图 3.3），DNA 片段在 150 – 800 bp 之间，符合后续构建胭脂鱼微卫星文库的需要。

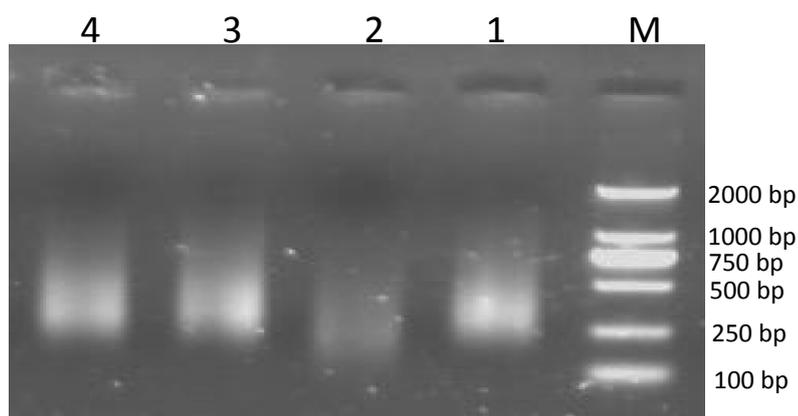


图 3.3 胭脂鱼基因组 DNA *Mse* I 酶切结果

M: DL2000 bp DNA Marker; 1 – 4: *Mse* I 酶切后 DNA 片段

Fig. 3.3 Restriction fragments from genomic DNA digested with restriction enzyme *Mse* I

M: DL2000 bp DNA Marker; 1 – 4: Restriction DNA fragments digested with restriction enzyme *Mse* I

3.3 菌落 PCR 阳性克隆检测及引物设计

从构建的微卫星富集文库中挑选 558 个单菌落在液体 LB 培养基中扩大培养，以菌液为模板 PCR 扩增，1%琼脂糖检测发现重复片段大小在 150 – 800 bp 之间(图 3.4)，挑选出 100 个阳性克隆送交上海生工测序。

3.4 多态引物筛选及微卫星标记特征

用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计引物 69 对，将筛选出的胭脂鱼引物以 4 个不同地理种群胭脂鱼 DNA 为模板进行多态性验证，结果显示有 23 个位点可以获得稳定的特异性扩增产物，且扩增条带大小与预期结果一致，扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳和溴化乙锭染色显色分析，根据凝胶上出现不同条带位置确定其多态性，如图 3.6 所示为 6 个不同微卫星引物在 4 个胭脂鱼 DNA 扩增的聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

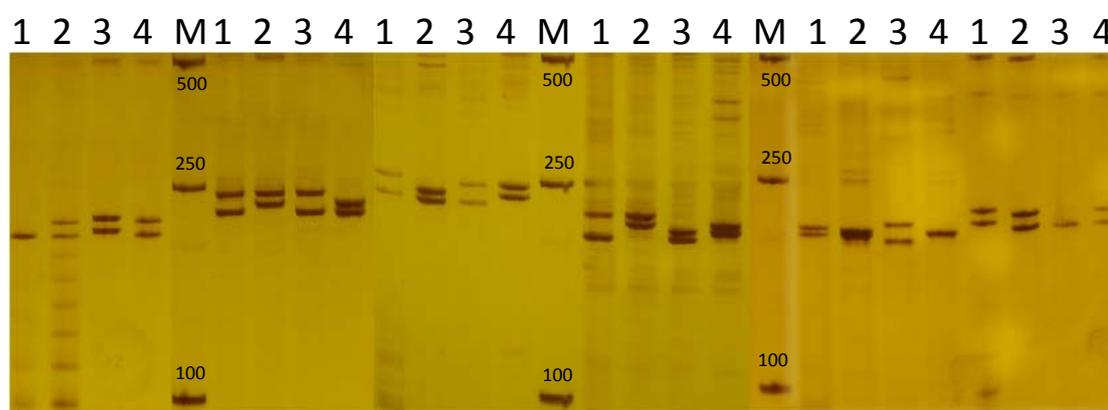


图 3.6 6 个微卫星位点在 4 个胭脂鱼个体扩增图谱

M: DNA Marker; 1 – 4: 不同胭脂鱼个体 DNA

Fig. 3.6 Amplification pattern of 6 microsatellite locus in 4 individuals of Chinese sucker

M: DNA Marker; 1 – 4: The extracted total genomic DNA from Chinese

为了进一步确定筛选出来的 34 对微卫星引物的稳定性及其各微卫星标记的特征，将这些微卫星引物在 24 个万州胭脂鱼个体进行聚丙烯酰胺凝胶电泳以进行群体多态的筛选，经实验分析其中 23 对能够稳定清晰的扩增，且多态性高，如图 3.7 微卫星标记 Mas10 所示。

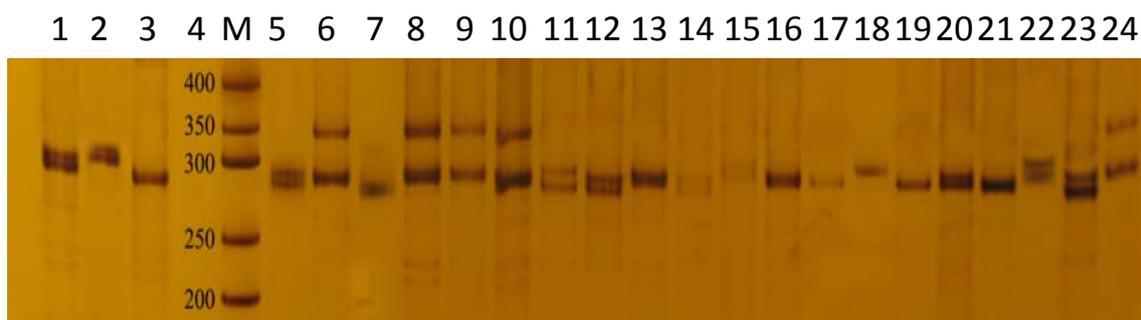


图 3.7 微卫星位点 Mas10 在 24 个胭脂鱼个体扩增图谱

M: DNA Marker; 1 – 24: 不同胭脂鱼个体 DNA

Fig. 3.7 Amplification pattern of microsatellite locus M10 in 24 individuals of Chinese sucker

M: DNA Marker; 1 – 24: The extracted total genomic DNA from Chinese

将 23 对微卫星标记对胭脂鱼万州 24 个个体进行了遗传多样性的初步研究，利用软件 Popgen 32 和 PIC_CALC 分析 23 个微卫星标记特征，结果如表 3.1 所示，等位基因数目为 3~12 个；观测杂合度 0.292~0.958；期望杂合度 0.423~ 0.900；多样性指数 0.356~0.869，其中微卫星标记 Mas2, Mas16, Mas17, Mas18 和 Mas20 显著偏离哈德文平衡 ($P < 0.01$)。其微卫星标记可应用于胭脂鱼遗传多样性、种质鉴定等进一步研究及人工增殖放流效果评估。

表 3.1 23 个胭脂鱼微卫星标记特征

Table 3.1 Characterization of 23 polymorphic microsatellite loci in the Chinese sucker

标记 Locus 登录号 Accession no.	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度 Tm (°C)	片段范围值 Size range (bp)	等位基因数 Na	多态性指数 PIC	观测杂合度 Ho	期望杂合度 He	哈德文指数 P-HWE
Mas1 JX855137	CCGACATGGAATGGATAGA TAGCTCCTCCTCACTGGAC	45	180-210	7	0.685	0.500	0.745	0.505
Mas2 JX855138	ATCCGAACATAGCCAGAG AAGGACAGAGCGTCTACCA	42	350-400	6	0.759	0.542	0.808	0.001
Mas3 JX855139	AGACCAGACCCACCTTTAC GAACTGCTGAATCACCCCTC	50	249-280	12	0.869	0.750	0.900	0.941
Mas4 JX855140	CCGACTTACAGCTACAAA GTCAAATAACGCGGGACT	51	220-250	3	0.581	0.750	0.669	0.244
Mas5 JX855141	GAAGTGAATAGTAGCAGGTG AAGCAAGATAAATGGAGA	50	140-160	8	0.742	0.542	0.786	0.037
Mas6 JX855142	CTGCCAGGAAACTCTAAA TTCTTACTGCATAGTCTTTA	45	100-120	8	0.818	0.833	0.856	0.299
Mas7 JX855143	TAGCGTCTGCCCATTTAGC TACGAGCCGTTCACTT	52	230-300	9	0.812	0.875	0.851	0.019
Mas8 JX855144	ACAATGAAAGCCACAGAG TGGTAGTTACAAGGCAGAATA	51	205-260	7	0.723	0.875	0.769	0.554

第三章 胭脂鱼微卫星标记的开发

Mas9	GAGTAATAACAAGGAGGGC	50	165-220	7	0.692	0.875	0.745	0.048
JX855145	TGTAAGTGGCAACATCTAA							
Mas10	CCTGAGTAACTGATGCCCTAA	50	230-270	10	0.858	0.833	0.890	0.456
JX855146	ATGTAGCCGTCTGAAGCAA							
Mas11	AACCACCAGACTCAAACA	49	240-270	9	0.806	0.833	0.846	0.074
JX855147	GGTTATGCCCTCCTGAAA							
Mas12	GCAGCCATTGAACAAGTAC	59	450-500	4	0.541	0.667	0.618	0.623
JX855148	AATCGTGCCAGGGTTAGAC							
Mas13	ATGAATAGTTTGACAAGCAG	50	190-275	11	0.846	0.917	0.879	0.823
JX855149	GGGGAAACAATAACAATAA							
Mas14	ACTTCTAACTTCCAACTACA	50	200-250	5	0.749	0.958	0.801	0.073
JX855150	TCTGGCCTGAAACCTCAT							
Mas15	AGACATTTGTGCCGAAGT	49	285-370	6	0.659	0.708	0.723	0.766
JX855151	TCAGTGGAAGAGGGAAG							
Mas16	AAAATGGAAGAGGGAGAT	51	270-300	3	0.356	0.458	0.423	0.005
JX855152	ACCGAGGTGGTACTAAAA							
Mas17	GTTATCGTACAAGCGGAGAC	51	290-340	5	0.706	0.292	0.762	0.000
JX855153	TATGCAACCACAAGAGGG							
Mas18	ATCCCAAAGACCACAATG	50	380-410	4	0.617	0.792	0.684	0.000
JX855154	TTCCGGGTTCAATACAAG							
Mas19	ATCAACGCACCAAATACA	49	270-285	4	0.493	0.625	0.566	0.553
JX855155	TGGAAGGCAGCATAAGTC							
Mas20	GTTAGGTTTAGGAGTAGGGTTA	42	200-250	7	0.631	0.458	0.681	0.007

胭脂鱼种群遗传多样性及家系管理研究

JX855156	CCTGAATGTGGAGGGTAG							
Mas21	GAGTAACTGATGCCCTAA	50	220-270	7	0.763	0.750	0.810	0.438
JX855157	AGCCGTCTGAAGCAATAT							
Mas22	AAATCCCAAAGACCACAA	51	230-270	10	0.838	0.882	0.879	0.881
JX855154	GTCGTATTACCACGCACA							
Mas23	GAGTAACAGCACAGGAAC	50	200-250	8	0.781	0.824	0.831	0.834
JX855158	ATCACAGAAACGGTCATC							

4 讨论

4.1 DNA 的提取与探针选择

获得高质量的基因组 DNA 是实验成功的基础, 采用酚氯法提取胭脂鱼基因组 DNA, 在消化过程中应摇晃混匀使蛋白酶 K 充分发挥作用而将胭脂鱼鳍条消化完全, 从而减少基因组 DNA 的丢失, 提高 DNA 的溶度和质量。另外 STE 缓冲液在使用前必须测试 PH 值, 过酸和过碱都会使 DNA 产生降解, 影响后续的酶切效果; 在琼脂糖凝胶电泳检测后应选择 DNA 分子量大、无降解、不存在的拖尾现象的 DNA 用于后续实验, 同时, 我们可以通过混合几个不同地理种群的胭脂鱼 DNA 以此来筛选多态性更高的微卫星标记。

微卫星以 2 - 3 个核苷酸重复单位最多, 如 (AT)_n、(GA)_n 和 (GAA)_n 等, Toth 等 (2000) 对 9 个物种的 SSR 进行了实验, 结果显示 SSR 主要分布在外显子、内含子和基因间的区域, 其中二核苷酸重复次数较多, 其中 (AC)_n、(AT)_n、(AG)_n 是主要成份。为避免由于重复次数过短, 造成筛选出的微卫星引物多态性比例过低而造成实验重复浪费, 本实验通过选择 (AC)_n 和 (CT)_n 这两种探针进行胭脂鱼富集文库的构建。

4.2 微卫星位点的多态性

如表 3.1 所示, 所筛选的 23 个微卫星多态位点的等位基因数均在 3 个以上, 其中 Mas3、Mas10 和 Mas13 均在 10 以上; 观测杂合度是观测到的杂合子在每个微卫星位点的比例, 期望杂合度是杂合子在每个微卫星位点的比例的期望值, 这些是常用的衡量种群遗传变异的指标, 它所包含的信息可以反映生物群体的某种生命现象的离散性, 即多样性, 多样性指数越大表明群体的离散性越高, 进而表明群体的遗传多样性越丰富, 这些指标的高低反映了群体的遗传一致性程度: 值越高, 表明该群体的遗传一致度越低, 遗传多样性越高, 如表 3.1 所示, 这 23 个胭脂鱼微卫星标记均表现出较高的遗传多样性。

多态信息含量 (PIC) 描述微卫星位点的变异程度, 在所筛选的 13 个位点中, 除 Mas16 和 Mas19 表现为中度多态外 ($0.25 \leq \text{PIC} \leq 0.5$) 以外, 其余在万州群体中均表现为高度多态 ($\text{PIC} \geq 0.5$)。

本研究成功的构建了胭脂鱼微卫星文库, 对于开展胭脂鱼微卫星研究具有十分重要的理论和实践意义。后续工作可以在获得的 23 对胭脂鱼微卫星引物中筛选出鉴别能力较强的微卫星位点, 经有效性检验后, 应用于种质鉴定和遗传结构分析以及家系谱系建立等研究。

第四章 胭脂鱼 SSR 荧光标记亲子鉴定技术的建立及试剂盒的开发

盒的开发

1 前言

随着胭脂鱼野生种群急剧下降,野外生存的个体数量已相当稀少,为保护这些濒危物种不至于灭绝,对其进行人工饲养繁殖和半自然的保护是一种有效的途径,各科研院所和养殖场开始胭脂鱼全人工繁殖工作,于 1991 年首次获得成功,随后,各个胭脂鱼养殖场逐步实施胭脂鱼全人工繁殖,并且通过人工增殖放流工作以期增加胭脂鱼的资源量,实现胭脂鱼的增殖与保护。但是各个养殖场普遍存在种群数量过少,遗传资源不丰富而产生严重的近亲繁殖现象,近亲繁殖可导致繁殖率、存活率下降,后代适应能力降低、对疾病和灾害的抵抗力减弱(Pante et al, 2001; Arkush et al, 2002)以及死亡率上升。

为防止胭脂鱼养殖场内近亲交配,特别是胭脂鱼子二代子三代性成熟导致近亲交配的加剧,急需建立胭脂鱼亲子鉴定技术,对养殖场内胭脂鱼个体进行亲缘关系鉴定,建立可靠的胭脂鱼谱系,并且实施有效的遗传管理方案以最大限度地保存养殖场胭脂鱼群体的遗传多样性,同时保证人工增殖放流的胭脂鱼不影响长江野生胭脂鱼的遗传结构,为胭脂鱼增殖放流效果评估提供基础。

微卫星亲子鉴定是将一个新兴发展起来的分子标记应用于亲子鉴定技术,其原理是在形成配子细胞时,成对的等位基因彼此分离,分别进入各自的配子细胞,精、卵细胞受精形成子代,子代的两个基因组一个来自母本,一个来自父本,因此在同对的两个等位基因中,一个来自母本,一个来自父本,即亲本与子代符合孟德尔遗传规律,则不排除存在亲子关系;当使用的微卫星座位数增加时,若亲本与子代有 1 个或多个基因座不符合孟德尔遗传规律,则排除亲子关系。

微卫星亲子鉴定相比其它亲子鉴定方法,微卫星 DNA 标记有杂合度高、多态性好等优点,而且在样品采集和统一检测标准方面更为方便,血液、组织、毛发以及福马林保存样品等均是很好的原材料(晏鹏等, 2003)。同时检测快速、规模化操作且不受年龄和环境等因素的影响,特别在法医学领域中用于个体识别和亲子鉴定时,被认为是准确性最好的一种检测方法(管峰等, 2003)。其诸多

优点广泛应用在法医学鉴定、家畜系谱鉴定和重要经济动物和濒危动物种群的系谱鉴定中（朱滨等，1999；张于光等，2003；张志和等，2003；Thitaram et al, 2008；Tian et al, 2008；冯俊伟等，2009）。

本研究通过 30 组已知亲缘关系的胭脂鱼，通过微卫星标记建立胭脂鱼亲子鉴定技术试剂盒。微卫星亲子鉴定前提是筛选到合适的多态性高的微卫星引物，然后采集研究对象的血液、毛发或者毛发组织等样本提取基因组 DNA，合成不同颜色的带有荧光标记的微卫星标记，随后在合适的退火温度下进行 PCR 扩增，产物纯化测取等位基因大小值，最后根据结果分析确定和排除亲子关系。利用胭脂鱼亲子鉴定试剂盒操作简单且快速。

2 材料和方法

2.1 实验材料

2011 年 2 月底胭脂鱼繁殖期间，在万州水产研究所将 1 组胭脂鱼亲本的受精卵带回实验室分别进行单独孵化，出膜后待全长大约 2 cm 长时取 30 尾用无水乙醇固定。另外剪取 30 尾繁殖亲本的鳍条同样用无水乙醇 4℃冰箱保存备用。

2.2 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取采用经典的酚氯法（Sambrook et al, 1989），具体实验步骤参照第三章 2.2 的实验步骤。

2.3 微卫星标记的筛选和合成荧光标记

在选定的 17 对胭脂鱼微卫星引物（13 对来自第三章群体分析得到的微卫星多态性标记，4 对选自 Li 等（2013）通过 454 测序得到的微卫星标记），分别在 F 正向引物末端标记上 2 种常用的荧光引物（5-HEX 和 5-FAM）（上海生工合成）。

2.4 PCR 扩增和检测

PCR 扩增反应体系如下表 4.1, PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 45s, 在各自引物的退火温度下退火 45s, 72℃ 延伸 90s, 35 个循环; 72℃ 再延伸 10 min, 4℃ 保存 PCR 产物。然后经 1% 琼脂糖凝胶电泳初步检测后, 将每 2 对引物扩增的 PCR 产物混合之后在 ABI 3730 测序仪测取等位基因值。

表 4.1 PCR 反应体系

Table 4.1 The reaction systems of PCR

反应物 (Reactant)	体积(μ L)Volume
10×PCR Buffer (15 mM Mg ²⁺)	3.0
Mg ²⁺ (25 mmol/L)	0.5
dNTPs (10 mM)	1.0
Primer (F.R)	各0.5
rTaq Enzyme (5 U/ μ L)	0.4
Template (1000 ng/ μ L)	1.0
ddH ₂ O	18.1
Total	25

2.5 亲子鉴定分析

利用软件 GeneMarker V1.5 (David et al, 1998) 读取等位基因大小值, 使用 Cervus 3.0 (Kalinowski et al, 2007) 软件统计等位基因数、杂合度 (Ho)、期望杂合度 (H_E)、多态信息含量 (PIC)、平均排除概率、以及累积排除概率, 通过这些参数建立亲子鉴定体系。

3 结果

3.1 筛选的微卫星标记特征

通过软件 Popgene 32 计算各微卫星的等位基因数 (K), 观测杂合度 (H_O), 期望杂合度 (H_E), 使用 PIC - CALC 计算多态信息含量 (PIC)。筛选出 17 对胭脂鱼微卫星标记用于建立胭脂鱼亲子鉴定体系, 各微卫星标记特征如表 4.2。

表 4.2 17 对胭脂鱼微卫星标记特征

Table 4.2 Polymorphic parameters for the 17 microsatellite loci of Chinese

sucker						
标记	引物序列(5'-3')	退火	片段	多态信	观测	期望
Locus	Primer sequence (5'-3')	温度	范围值	息含量	杂合度	杂合度
登录号		Tm	Size	PIC	H_O	H_E
Accession no.			range			
Mas1	CCGACATGGAATGGATAGA	45	180-210	0.685	0.500	0.745
JX855137	TAGCTCCTCCTCACTGGAC					
Mas2	ATTCCGAACATAGCCAGAG	42	350-400	0.759	0.542	0.808
JX855138	AAGGACAGAGCGTCTACCA					
Mas3	AGACCAGACCCACCTTTAC	50	249-280	0.869	0.750	0.900
JX855139	GAACTGCTGAATCACCCCTC					
Mas10	CCTGAGTAACTGATGCCCTAA	50	230-270	0.858	0.833	0.890
JX855146	ATGTAGCCGTCTGAAGCAA					
Mas11	AACCACCAGACTCAAACA	49	240-270	0.806	0.833	0.846
JX855147	GGTTATGCCCTCCTGAAA					
Mas13	ATGAATAGTTTGACAAGCAG	50	190-275	0.846	0.917	0.879
JX855149	GGGGAAACAATAACAATAA					
Mas14	ACTTCTAACTTCCA ACTACA	50	200-250	0.749	0.958	0.801
JX855150	TCTGGCCTGAAACCTCAT					
Mas15	AGACATTTGTGCCGAAGT	49	285-370	0.659	0.708	0.723
JX855151	TCAGTGAAAGAGGGAAG					

Mas20	GTTAGGTTTAGGAGTAGGGTTA	42	200-250	0.631	0.458	0.681
JX855156	CCTGAATGTGGAGGGTAG					
Mas21	GAGTAACTGATGCCCTAA	50	220-270	0.763	0.750	0.810
JX855157	AGCCGTCTGAAGCAATAT					
Mas22	AAATCCCAAAGACCACAA	51	230-270	0.838	0.882	0.879
JX855154	GTCGTATTACCACGCACA					
Mas23	GAGTAACAGCACAGGAAC	50	200-250	0.781	0.824	0.831
JX855158	ATCACAGAAACGGTCATC					
Mas9	TCTTCATTCAAGCCTTCC	50	170-210	0.732	0.801	0.822
JX855160	AAACATCTGATGTGCCTA					
M5	AGCACCTGACAATCCTTC	54	200-240	0.740	0.600	0.780
KC012952	ATCAAGTCCAGAGGCGAG					
M11	TGGACAAGGAGCCCAGAAG	52	210-250	0.790	0.880	0.830
KC012954	CCTGTCACTGTTTCTCCCAT					
M23	CTGGCATTTCAGAACACCTCC	53	200-220	0.800	0.750	0.830
KC012959	GTTTCCAGTCGTTTCCACGT					
M46	ACGCTGTAACAATGCTGGC	52	190-210	0.780	0.740	0.820
KC012966	TGCCTATTGTCCTTGGTCG					

3.2 荧光标记微卫星亲子鉴定结果

使用 Cervus 3.0 软件统计等位基因数、杂合度 (Ho)、期望杂合度 (He)、多态信息含量 (PIC)、平均排除概率和累积排除概率如表 4.3, 部分微卫星测序图如图 4.1□4.9。

表 4.3 微卫星标记亲子鉴定参数

Table 4.3 Parameters for the 17 microsatellite loci in paternity test

位点 Locus	等位 基因数 k	观测 杂合度 Ho	期望 杂合度 He	多态信 息含量 PIC	双亲均不知 排除概率 NE-1P	单亲不知 排除概率 NE-2P	双亲均知 排除概率 NE-PP
Mas1	3	0.700	0.562	0.456	0.846	0.743	0.615
Mas2	3	1.000	0.531	0.411	0.863	0.781	0.670
Mas3	6	1.000	0.747	0.696	0.666	0.490	0.303
Mas10	6	0.900	0.644	0.565	0.784	0.638	0.474
Mas11	4	1.000	0.66	0.594	0.769	0.607	0.435
Mas13	7	0.667	0.527	0.464	0.856	0.716	0.559
Mas14	5	0.925	0.648	0.578	0.777	0.621	0.451
Mas15	7	0.538	0.603	0.520	0.810	0.675	0.517
Mas20	4	0.650	0.556	0.491	0.846	0.702	0.548
Mas21	6	0.975	0.646	0.57	0.781	0.632	0.466
Mas22	4	0.700	0.640	0.556	0.796	0.654	0.502
Mas23	4	0.650	0.636	0.554	0.799	0.656	0.503
Mas9	7	0.975	0.723	0.664	0.704	0.533	0.355
M5	5	0.632	0.630	0.551	0.796	0.651	0.49
M11	7	0.775	0.680	0.634	0.73	0.55	0.354
M23	9	0.697	0.695	0.643	0.721	0.544	0.353
M46	10	0.650	0.709	0.649	0.714	0.545	0.363

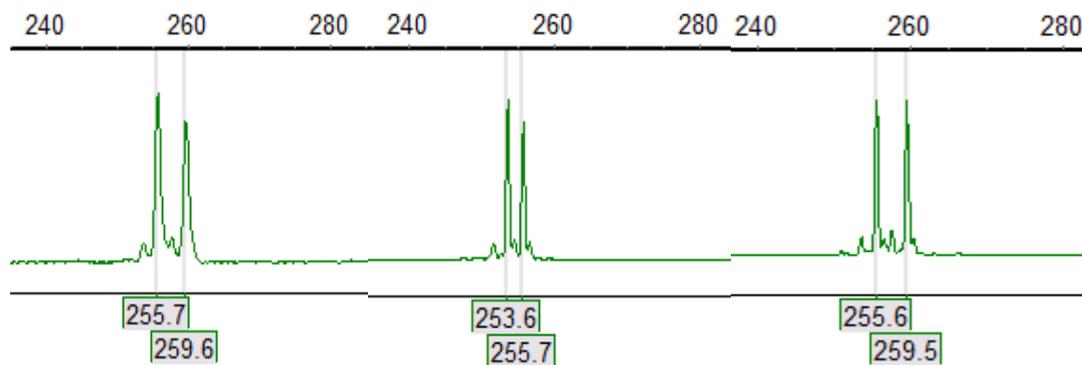


图 4.1 引物 Mas1 测序图 (依次为亲本 5487, 非亲本 5478, 子代 Z1)

Fig 4.1 Genotype of microsatellite loci Mas1 (parent 5487, non-parent 5478, offspring Z1)

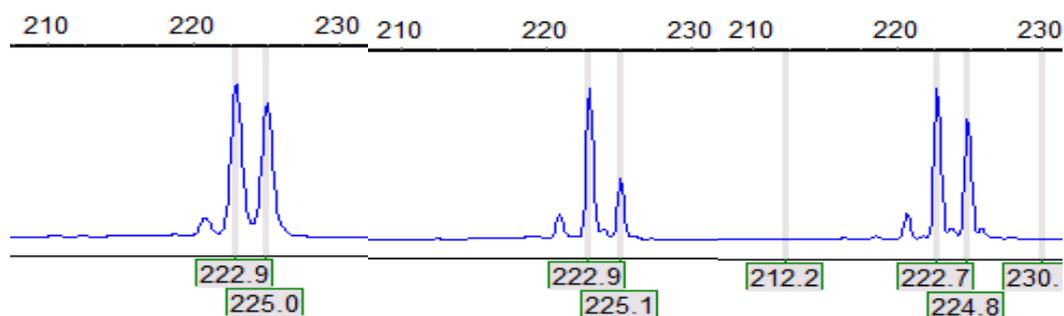


图 4.2: 引物 Mas2 测序图 (依次为亲本 5487, 非亲本 5478, 子代 Z1)

Fig 4.2 Genotype of microsatellite loci Mas2 (parent 5487, non-parent 5478, offspring Z1)

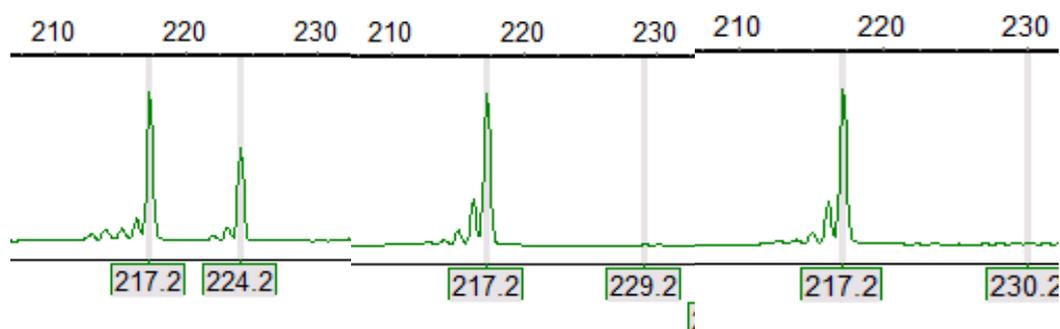


图 4.3: 引物 Mas10 测序图 (依次为亲本 5487, 非亲本 5478, 子代 Z1)

Fig 4.3 Genotype of microsatellite loci Mas10 (parent 5487, non-parent 5478, offspring Z1)

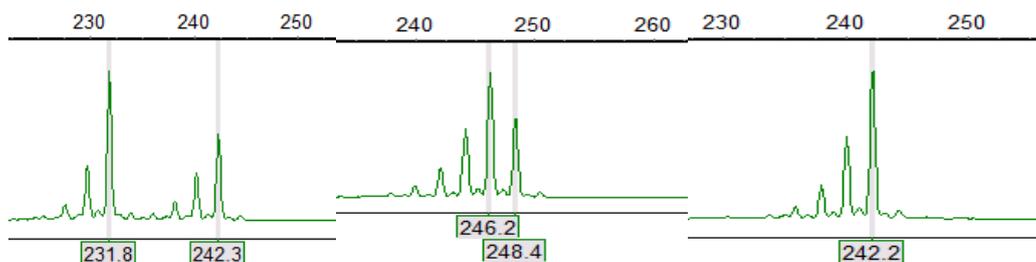


图 4.4: 引物 Mas20 测序图 (依次为亲本 5487, 非亲本 5478, 子代 Z1)
Fig 4.4 Genotype of microsatellite loci Mas20 (parent 5487, non-parent 5478, offspring Z1)

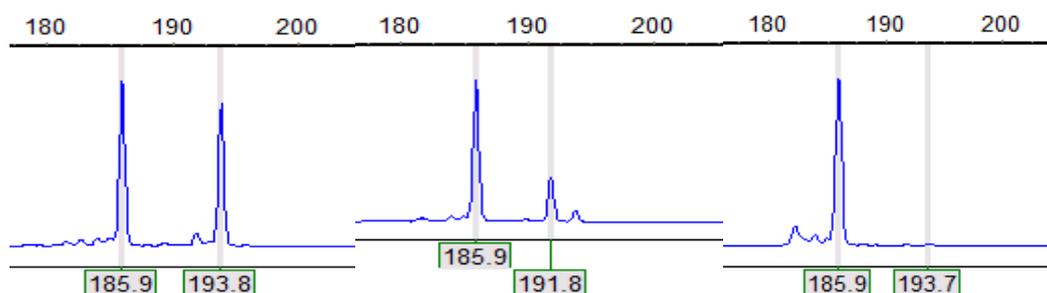


图 4.5: 引物 Mas21 测序图 (依次为亲本 5487, 非亲本 5478, 子代 Z1)
Fig 4.5 Genotype of microsatellite loci Mas21 (parent 5487, non-parent 5478, offspring Z1)

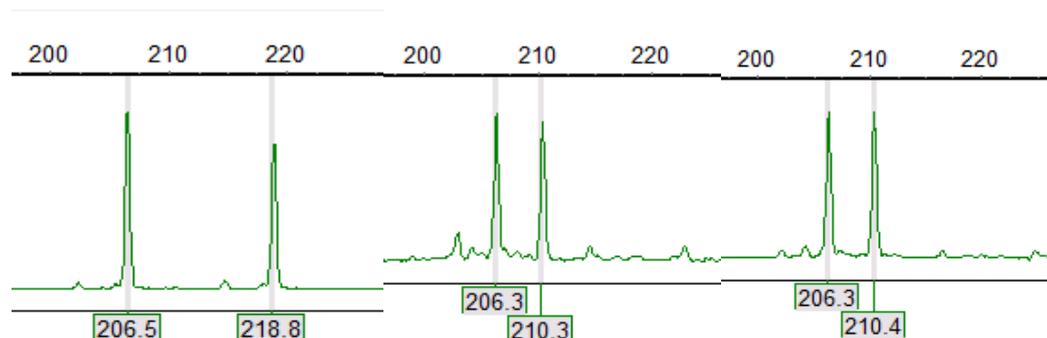


图 4.6: 引物 M5 测序图 (依次为亲本 5487, 非亲本 5478, 子代 Z1)
Fig 4.6 Genotype of microsatellite loci M5 (parent 5487, non-parent 5478, offspring Z1)

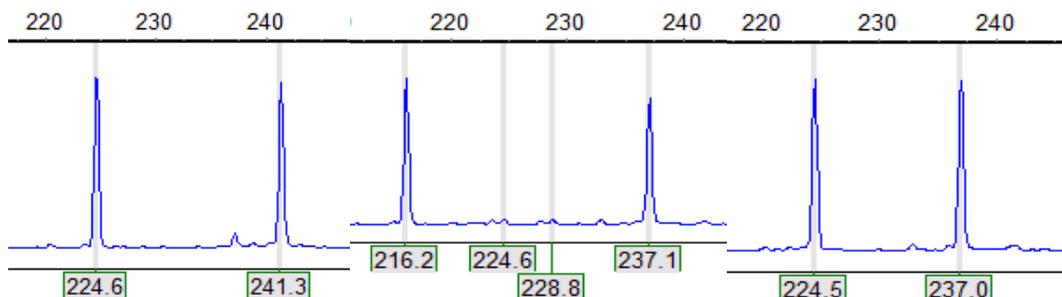


图 4.7: 引物 M11 测序图 (依次为亲本 5487, 非亲本 5478, 子代 Z1)

Fig 4.7 Genotype of microsatellite loci M11 (parent 5487, non-parent 5478, offspring Z1)

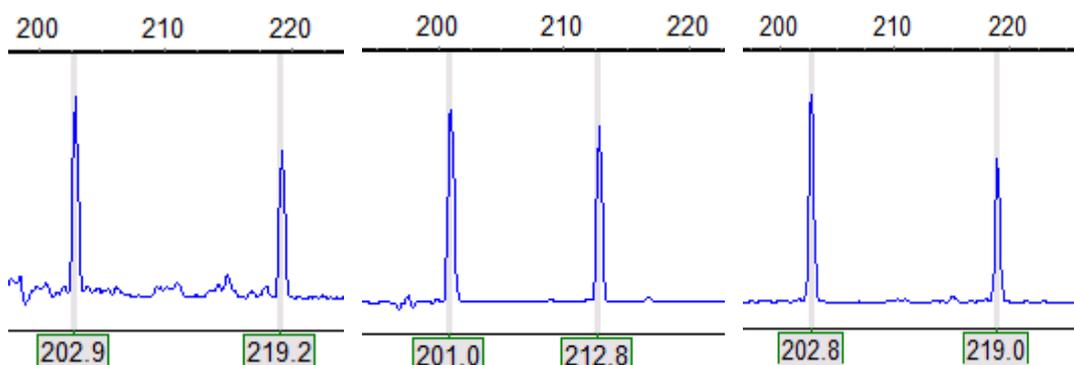


图 4.8: 引物 M23 测序图 (依次为亲本 5487, 非亲本 5478, 子代 Z1)

Fig 4.8 Genotype of microsatellite loci M23 (parent 5487, non-parent 5478, offspring Z1)

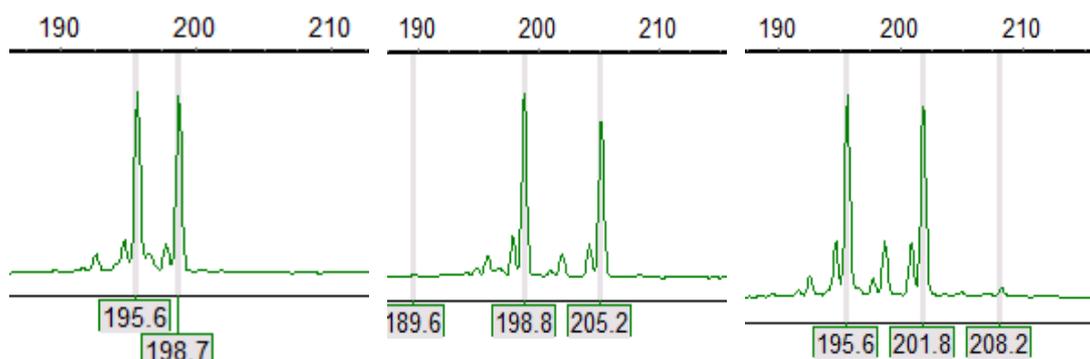


图 4.9: 引物 M46 测序图 (依次为亲本 5487, 非亲本 5478, 子代 Z1)

Fig 4.9 Genotype of microsatellite loci M46 (parent 5487, non-parent 5478, offspring Z1)

以 30 个个体作为子代群体，假设 30 尾候选亲本均为这 30 个子代个体的亲本，用筛选出的 17 个胭脂鱼微卫星进行模拟亲子鉴定，抽样 10000 次，以父母本均不知进行建模分析，同时选取其他繁殖亲本个体 30 尾作为候选亲本用于建立亲子鉴定体系，分别以母本或父本已知、父母本均已知和父母本均未知建模进行亲子鉴定分析，初步结果显示，在双亲未知时，17 个位点累积排除概率为 0.98746106，在双亲之一已知的情况下，17 个位点累积排除概率为 0.99971843，在双亲都已知的情况下，17 个位点累积排除概率为 0.9999988。30 个子代个体均准确找到亲本，其亲子鉴定结果如表 4.4 所示。

表 4.4 30 尾子代胭脂鱼亲子鉴定结果

Table 4.4 Paternity test of 30 Chinese sucker offspring

子代 ID Offspring ID	第一候选亲本 ID First Candidate Mother ID	检测标记数 Number of test loci	错配座位数 Pair loci mismatching	似然率对数值 Pair LOD score	自信度 Pair confidence
Z1	5487	17	0	2.85E-01	+
Z2	5487	17	0	8.34E-01	+
Z3	5487	17	0	1.91E+00	*
Z4	5487	17	0	6.93E-01	*
Z5	5487	17	0	2.60E+00	*
Z6	5487	17	0	7.23E-01	+
Z7	5487	17	0	6.87E-01	+
Z8	5487	17	0	2.06E+00	*
Z9	5487	17	0	2.57E+00	*
Z10	5487	17	0	1.24E+00	+
Z11	5487	17	0	1.66E+00	*
Z12	5487	17	0	7.07E-01	+
Z13	5487	17	0	4.69E-01	+
Z14	5487	17	0	1.08E+00	+
Z15	5487	17	0	2.77E+00	*

Z16	5487	17	0	5.66E-01	+
Z17	5487	17	0	3.49E-01	+
Z18	5487	17	0	1.28E+00	*
Z19	5487	17	0	2.79E+00	*
Z20	5487	17	0	8.05E-01	+
Z21	5487	17	0	2.13E+00	*
Z22	5487	17	0	1.70E+00	*
Z23	5487	17	0	2.79E+00	*
Z24	5487	17	0	2.05E+00	*
Z25	5487	17	0	2.21E+00	*
Z26	5487	17	0	3.51E+00	*
Z27	5487	17	0	4.17E-01	+
Z28	5487	17	0	6.11E-01	+
Z29	5487	17	0	6.90E-01	+
Z30	5487	17	0	2.59E+00	*

上述 30 个个体亲子鉴定结果如表 4.4 所示，其中 LOD 值为亲子指数（paternity index）的对数值，LOD 大于 0 的意义是，与任意亲本相比，候选亲本最有可能是真实的亲代，且在置信区间内没有错配座位。上述结果显示 30 个个体均准确的找到了真正的亲本 5487，以上分析结果证实这 17 个胭脂鱼微卫星标记用于胭脂鱼亲子鉴定是可行的。

3.3 胭脂鱼亲子鉴定试剂盒

上述实验证明应用 17 个微卫星标记可以建立胭脂鱼亲子鉴定技术，因此用这 17 个胭脂鱼微卫星标记组成用于胭脂鱼亲子鉴定的试剂盒。试剂盒（100 次规格）包括一下试剂如表 4.5。

表 4.5 胭脂鱼亲子鉴定试剂盒

Table 4.5 Paternity test kit of Chinese sucker

Type	Concentrations	Dose (ul)
名称	浓度	剂量 (ul)
10×PCR Buffer	10mM/L	300
MgCl ₂	25 mmol/L	50
dNTPs	10 mM/L	100
17个微卫星标记 (F.R)	10 mM/L	50
rTaq Enzyme	5 U/μL	40
ddH ₂ O		2000

按上述剂量对试剂盒中的各组分分别进行包装组成胭脂鱼亲子鉴定试剂盒，便可对胭脂鱼进行准确快速的亲子鉴定分析工作。

4 讨论

4.1 亲子鉴定可靠性及所选微卫星位点

在亲子鉴定中，利用累积非亲排除率（CPE）是否达到一定的标准来衡量是否可以用于亲子鉴定。赵茂桐等（1988）提出亲权鉴定中累积非亲排除率在 99.73%及以上，就可以认定存在亲子关系；若累积非亲排除率在 99%-99.73%时，极有可能有亲子关系；累积非亲排除率在 95%-99%时，是有可能有亲子关系；当累积非亲排除率在 80%及以下就不能肯定有亲子关系，需要进一步进行检测分析。本论文中，所用的 17 个胭脂鱼微卫星位点累积非亲排除率为 99.99988%，因此我们可以认定存在亲子关系。

我们利用 cervus 软件中的 Parentage analysis 模块检测了 30 个胭脂鱼子代个体与 30 个可疑亲本之间的亲子关系，结果与记录已知亲子关系一致，所有子代个体均在 95%置信区间内 LOD 值大于 0 且没有座位不匹配的现象（LOD 值越大，越可能是真实的父母本），均准确的找到了所属的亲本，与实际情况一致，因此我们认定这 17 个微卫星标记能够用于建立胭脂鱼亲子鉴定体系。

第五章 胭脂鱼遗传多样性的研究

1 前言

胭脂鱼幼鱼和成鱼在体形和体色上存在着较大差异，曾被定为不同的亚种，随着研究工作的不断深入和研究水平的不断提高，目前较为一致的看法是胭脂鱼为一个单型种为我国也是亚洲特有种，在鱼类系统分类和动物地理学上有着极为重要的研究价值。胭脂鱼曾在长江和闽江有过广泛的分布，并有较大的产量，近年来由于过度捕捞、水域污染、水利工程建设等人为因素的影响，资源量急剧下降，特别是一些原分布地的天然种群已经绝迹，闽江水系已经很难发现胭脂鱼的踪迹，长江胭脂鱼可能是现存的中国胭脂鱼唯一的野生种群，1998年胭脂鱼被列入我国重点保护野生动物名录，并被定为国家Ⅱ类野生保护动物（张春光等，2000）。

物种保护之目的是尽最大可能维持种内遗传变异水平和物种进化潜力，种质资源的保护就是保护物种的遗传多样性，遗传多样性愈丰富，物种对环境变化的适应能力愈强，其进化的潜力也就愈大，越有助于保护物种的多样性，减慢由于适应和进化所导致的灭绝。保护胭脂鱼这一濒危动物的关键是保护物种的遗传多样性，制定切实有效的保护策略和措施必须建立在对濒危物种遗传多样性水平和种群遗传结构充分了解的基础上。国内在对胭脂鱼保护遗传学和分子生态学方面的研究有了一定的基础，但仍缺乏系统性和完整性，尤其是缺乏近几年长江胭脂鱼种群的遗传变异资料。

线粒体 DNA 和微卫星标记其显著的优点被在遗传学上有重要的价值，越来越多地被应用于遗传多样性的评估和种群遗传结构的研究。本研究利用线粒体 DNA 进化速率最快的控制区（d-loop）和细胞色素 b（cyt-b）以及已筛选的 11 对胭脂鱼微卫星标记，对长江中上游 5 个胭脂鱼养殖场和长江采集的野生胭脂鱼样本进行遗传多样性和遗传结构分析，为胭脂鱼保育遗传策略和保育管理提供分子水平的科学依据。

2 材料和方法

2.1 实验材料和采样地点

胭脂鱼实验样本分为长江采集样本和养殖场采集样本，长江样本来自长江中上游各江段（如图 5.1），养殖场样本来自长江中上游 5 个胭脂鱼养殖场（如图 5.1），各地详细的样本数见表 5.1。所有样本均用无水乙醇 4℃冰箱保存备用。

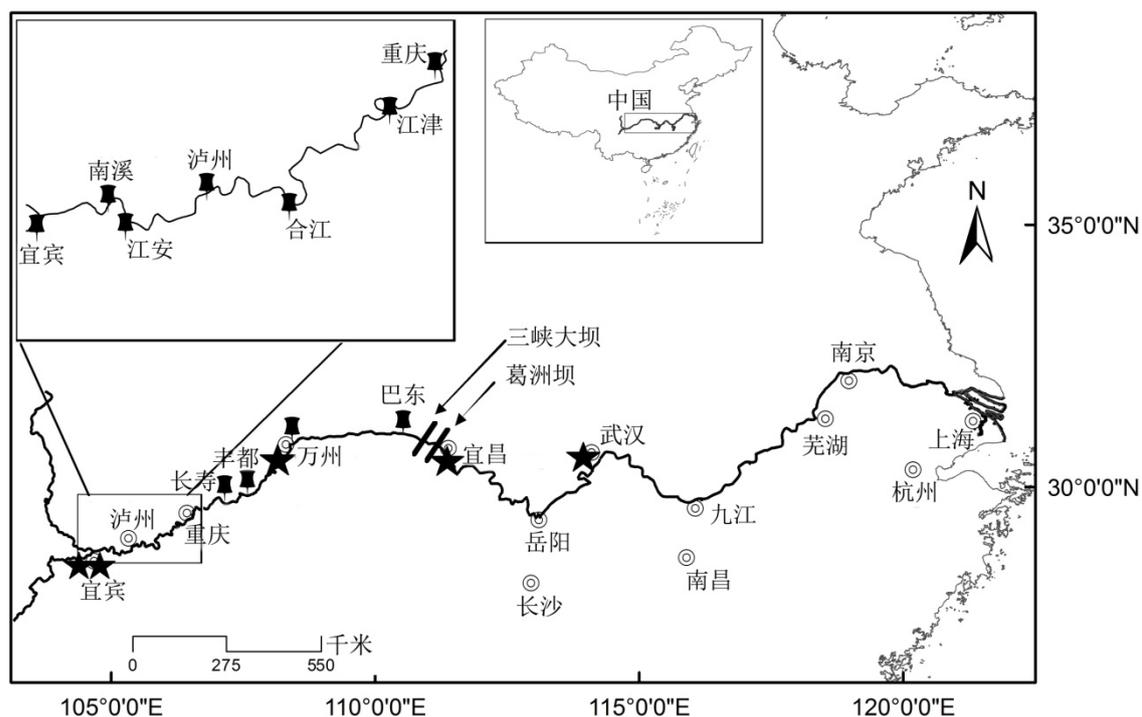


图 5.1 胭脂鱼采样点分布图

Fig 5.1. Map of the sampling sites of *Myxocyprinus asiaticus*

★：胭脂鱼养殖场位置；■：胭脂鱼长江采样点

★: The position of the Chinese sucker farm; ■: the monitoring sites of Chinese sucker in the Yangtze River

表 5.1 胭脂鱼采集样本信息

Table 5.1 Information of samples in Chinese sucker

采样地点	代码	纬度/经度	线粒体 DNA	微卫星标记
Sample location	Number	Latitude/longitude	样本数	样本数
			Samples of mt-DNA	Samples of SSR
四川水产研究所	SC	28°44'21.91"/104°35'02.08"	14	14
武汉水产引种中心	WH	30°28'47.96"/114°19'44.70"	28	28
万州水产研究所	WZ	30°52'42.81"/108°25'17.75"	85	85
宜宾珍稀水生保护动物	YB	28°45'23.97"/104°40'40.23"	13	13
宜昌三江渔业有限公司	YC	30°42'27.53"/111°17'34.62"	9	9
长江中上游江段	YZ		50	65
共计			199	214

2.2 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增

基因组 DNA 的提取采用经典的酚氯法 (Sambrook et al, 1989), 具体实验步骤参照第三章 2.2 的实验步骤。

PCR 扩增引物采用两种分子标记线粒体 DNA (控制区 d-loop 和细胞色素 b 基因 cyt-b) 标记和微卫星分子标记进行扩增。

(1) 线粒体 DNA 标记: 线粒体 DNA 控制区 d-loop 扩增引物为 MitDL - F (5'-CACCCYTRRCTCCCAAAGCYA-3') 和 MitDL-R (5'-GGTGCGGRKACTTGCATGTRTAA-3') (黄志坚等, 2009), 细胞色素 b 基因 cyt-b 扩增引物为 L14724 (5'-GACTTGAAAAACCACCGTTG-3') 和 H15915 (5'-CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC-3') (Xiao et al, 2001)。按照如下体系 (表 5.2) 进行 PCR 扩增。将反应混合物加入灭菌离心管中, 最后加 Taq 聚合酶, 整个过程保证准确量取和加样, 振荡、离心, 并混匀后放入 PCR 仪中, 进行扩增反应。扩增程序: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 30s, 50℃ 退火温度下退火 30s, 72℃ 延伸 90s, 35 个循环; 72℃ 再延伸 5 min, 4℃ 保存 PCR 产物。

表 5.2 PCR 扩增体系

Table 5.2 PCR system

反应物	体积 (μl)
Reactant	Volume
ddH ₂ O	补水至50
10×buffer (Mg ²⁺)	5
dNTPs (10 mM)	1.0
Primer (F, R) (10 μM)	各1
Taq Enzyme (2.5 U)	0.2
Template	1
总计	50

(2) 微卫星标记：胭脂鱼微卫星标记利用 11 对多态性高的胭脂鱼荧光标记 (FAM 和 HEX) 微卫星标记 (Cheng et al, 2013: Mas3, Mas11, Mas13, Mas15, Mas21, Mas22, Mas23; Peng et al, 2013: M5, M11, M23, M46), PCR 反应体系和扩增程序参照第三章 2.3。

2.3 产物检测 and 数据分析

(1) 线粒体 DNA 标记

PCR 产物经纯化试剂盒纯化后, 在自动测序仪 ABI 3730XL 上测取扩增序列峰值, 利用以下软件进行数据分析:

A) 使用软件 Seqman 拼接序列, 截至相同长度, 除去重复片段后的 2 段片段进行拼接, 软件 Lasergene (Megalign) 比对序列 (Thompson, 1994);

B) 使用软件 MEGA 5.1 (Tamura et al, 2007) 统计碱基组成, 变异位点数以及多态位点转化和颠换比;

C) 利用 DNASP v5 (Rozas, 2009) 进行种群分组中性检验, 单倍型在各群体中的分布, 计算突变位点数、单倍型数 (number of haplotypes)、核苷酸多样性指数 (nucleotide diversity)、单倍型多样性指数 (haplotype diversity) 等数据;

D) 利用软件 MEGA 5.1 基于 Kimura 2-Parameter (K-2P) 双参数模型计算各基因片段单倍型间遗传距离, 并采用 NJ 法构建进化树进行聚类分析(1000 次);

E) 使用 Arlequin 3.5 (Excoffier et al, 2010) 程序进行分子变异方差分析 (AMOVA), 计算群体间遗传分化指数 (F_{ST}), 并检测 F_{ST} 的显著性 (重复次数为 1000 次);

F) 使用 Network 4.6 (Bandelt et al, 1999) 程序构建单倍型网络结构图, 对各个单倍型进行对应关系分析。

(2) 微卫星标记

利用 DNA 测序仪 (ABI 3730XL) 对经过琼脂糖电泳初步检测 PCR 产物进行毛细管电泳, 使用软件 Genemapper v.4.0 以分子内标 Rox-500 读取等位基因值, 利用以下软件进行数据分析:

A) 使用软件 GenAIEx v6.4 (Peakall and Smouse, 2006) 统计等位基因数 (Allele)、观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_E)、多态信息含量 (PIC) 等遗传多样性参数;

B) 使用在线软件 Genepop 4.0.10 (Raymond and Rousset, 2003) 对每个微卫星位点和每个地理种群检测是否偏离哈迪 - 温伯格平衡 (Hardy - Weinberg equilibrium, HWE) (Guo and Thompson, 1992) 和连锁不平衡 (Linkage disequilibrium, LD) 检测 (Barton and Slatkin, 1986);

C) 使用软件 Microchecker ver. 2.2. (Van Oosterhout et al, 2004) 微卫星数据进行无效等位基因 (Null alleles) 是否存在。

D) 使用软件 Arlequin 3.5 计算各种群之间中的分子方差分析 (AMOVA) (Analysis of Molecular Variance) (Weir and Cockerham, 1984) 和两两种群间的遗传分化程度 F_{ST} (Weir et al, 1984), 通过 10000 次迭代检验 F_{ST} 值的显著性, 深入了解种群的遗传变异分布以及种群内和种群间的变异程度;

E) 使用软件 Structure 2.3.2 (Falush et al, 2007) 进行群体遗传结构划分, 通过以贝叶斯模型为基础对每一个推断类别值 K (可能的遗传聚类群数目) 重复运行 Structure 程序 10 次, 计算各个 K 值 10 次重复 $\ln P(D)$ 的平均值, 以 $\ln P(D) (\pm SD)$ 达到最大值时的 K 值 (2-6), 作为该群体的类群数 (Falush et al, 2003)

F) 使用软件 GeneClass (Piry et al, 2004) 分析检测种群间基因流, 利用贝叶斯模型为基础对所有样本从个体水平进行个体归属地分析 (Rannala and Mountain, 1997)。

G) 利用软件 Poptree 2 (Naoko et al, 2010) 的邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 基于 Nei's 遗传距离对归属地分配后的 5 个地理种群进行聚类分析和聚类图绘制。

H) 使用软件 Bottleneck (Cornuet and Luikart, 1997) 胭脂鱼种群是否偏离突变 - 漂变平衡, 即是否经历了近期的瓶颈效应, 通过逐步突变模型 SMM (the more conservative stepwise mutation model) 和无限等位基因模型 IAM (the less conservative infinite allele model) (Luikart and Cornuet 1998; Maudet et al, 2002) 来测验观测杂合度 (H_o) 偏离突变 - 漂变模型的显著性 ($P=0.05$), 从而判断种群是否经历瓶颈效应。

3 结果

3.1 基于线粒体 DNA 核苷酸及单倍型多样性分析

经过比对后得到胭脂鱼线粒体 DNA (d-loop 和 cyt-b) 总长为 2047 bp, 平均 T、C、A、G 的含量分别为 28.3%、26.2%、28.4%、17.1%, A+T 含量(56.7%) 明显高于 G+C 含量(43.3%)。

在 199 尾胭脂鱼线粒体 DNA 序列中发现 88 个变异位点 (表 5.3), 定义了 33 个单倍体型, 平均单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数分别为 0.916 和 0.01234, 从表中我们可以看到长江采集群体无论是单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数均低于 5 个养殖场群体。

表 5.3 胭脂鱼 6 个群体线粒体 DNA 遗传多样性

Table 5.3 Genetic diversity analysis for Chinese sucker in six populations based on mt-DNA

群体	样本量	多态位点数	单倍型	核苷酸多样性	单倍型多样性
Population	Samples size	Polymorphic size	Haplotype	Pi	Hd
四川 (SC)	14	70	7	0.01012	0.846
武汉 (WH)	28	80	14	0.00904	0.939
万州 (WZ)	85	85	20	0.01461	0.844
宜宾 (YB)	13	70	7	0.01283	0.872
宜昌 (YC)	9	74	6	0.00966	0.917
长江 (YZ)	50	80	17	0.00779	0.844
合计/平均	199	88	33	0.01234	0.916

单倍型分布在各地地理种群分布见表 5.4, 其中 45% 的单倍体型为混合单倍体型, 另外 28% 单倍体型为万州养殖群体 (WZ) 所独有, 16% 的单倍体型为长江采集群体 (YZ) 所独有; Hap 9 和 Hap 15 均为 6 个地理种群共享。

表 5.4 胭脂鱼单倍体型分布及频率

Table 5.4 Haplotype frequency of Chinese sucker

单倍体型	长江	万州	宜昌	武汉	宜宾	四川	频率
Haplotypes	YZ	WZ	YC	WH	YB	SC	Frequency
Hap 1	3	11	2	3		1	0.1005
Hap 2	1						0.0050
Hap 3	5	1		2			0.0402

Hap 4	18	2		1		1	0.1106
Hap 5	1						0.0050
Hap 6	1	2		3	4	3	0.0653
Hap 7	7	18	1	2			0.1407
Hap 8	1	6		1			0.0402
Hap 9	2	26	1	1	1	2	0.1658
Hap 10	1	1					0.0101
Hap 11		2					0.0101
Hap 12		1					0.0050
Hap 13	1	1					0.0101
Hap 14						1	0.0050
Hap 15	2	3	2	1	3	5	0.0804
Hap 16			2	3			0.0252
Hap 17	2			5	2		0.0452
Hap 18		3	1	2			0.0302
Hap 19		2					0.0101
Hap 20		1					0.0050
Hap 21		1					0.0050
Hap 22		1					0.0050
Hap 23		1					0.0050
Hap 24		1					0.0050
Hap 25				1		1	0.0101
Hap 26					1		0.0050
Hap 27					1		0.0050
Hap 28	2			2	1		0.0252
Hap 29	1						0.0050
Hap 30	1						0.0050
Hap 31	1						0.0050
Hap 32				1			0.0050

Hap 33		1					0.0050
Total	50	85	9	28	13	14	1.0000

3.2 基于微卫星标记种群遗传多样性分析

11 个微卫星标记对 6 个不同地理种群 214 个胭脂鱼个体进行遗传多样性分析, 共检测得到 215 个等位基因, 每个群体平均有效等位基因数 6.7~13.0 不等, 观测杂合度 0.738~0.804, 期望杂合度 0.714~0.767, 从表 5.5 中显示, 长江采集群体有效等位基因数 (13.0) 显著高于 5 个养殖群体 (7.3), 但观测杂合度均比养殖群体低。

表 5.5 胭脂鱼群体遗传多样性参数检测

Table 5.5 Genetic diversity analysis for Chinese sucker

群体	样本数	等位基因数	观测杂合度	期望杂合度
Population	N	Na	H _O	H _E
四川 (SC)	14	7.0	0.769	0.726
武汉 (WH)	28	10.1	0.766	0.767
万州 (WZ)	85	11.5	0.784	0.758
宜宾 (YB)	13	8.5	0.804	0.767
宜昌 (YC)	9	6.7	0.768	0.714
平均(culture)	31	7.3	0.783	0.730
长江 (YZ)	59	13.0	0.738	0.758
平均	35.3	9.5	0.771	0.748

3.3 不同种群 DNA 分子变异分析

(1) 基于线粒体 DNA 分子变异分析

通过 AMOVA 分析显示, 胭脂鱼线粒体 DNA 的控制区和细胞色素 b 中遗传变异主要来源于胭脂鱼种群内 (90.72%) (表 5.6), 9.28% 遗传变异来自于种群间, 说明胭脂鱼群体间存在一定的遗传分化。

表 5.6 胭脂鱼群体遗传变异方差分析 (AMOVA)

Table 5.6 Results of analysis of molecular variance testing genetic structure (AMOVA) of Chinese sucker

变异来源 Source of variation	自由度 d.f.	变异百分比 Percentage of variation	P 值 P-value
群体间	5	9.28	0.0000
群体内	193	90.72	
总和	198		

进一步对群体间两两比较 (表 5.7), 发现引起遗传分化的主要是长江采集群体和万州养殖群体, 长江采集群体与处于长江上游四川、宜宾和万州养殖群体存在显著的遗传分化, 而与处于中下游的武汉和宜昌养殖群体分化不明显; 万州养殖群体除了与宜宾养殖场群体不存在显著分化外与其他采样群体分化明显。

表 5.7 胭脂鱼群体两两间 F_{ST} 值（下）和 F_{ST} 值的 P 值（上）Table 5.7 Pairwise F_{ST} (below) and P-values (above) among populations of Chinese sucker

	四川 (SC)	武汉 (WH)	万州 (WZ)	宜宾 (YB)	宜昌 (YC)	长江 (YZ)
四川 (SC)		0.38739 +-0.0490	0.09009 +-0.0271	0.82883 +-0.0354	0.57658 +-0.0411	0.07207 +-0.0227
武汉 (WH)	-0.01232		0.01802 +-0.01218	0.29730 +-0.0333	0.81081 +-0.0429	0.15315 +-0.0385
万州 (WZ)	0.07248	0.11725		0.19820 +-0.0521	0.11712 +-0.0194	0.00000 +-0.0000
宜宾 (YB)	-0.05570	0.00867	0.02075		0.36937 +-0.0515	0.03604 +-0.0148
宜昌 (YC)	-0.03405	-0.04907	0.07448	-0.01266		0.18919 +-0.0163
长江 (YZ)	0.05385	0.02491	0.15078	0.08691	0.03417	

(2) 基于微卫星标记分子变异分析

另外通过微卫星等位基因频率计算胭脂鱼群体间遗传分化程度, 遗传变异主要来源于胭脂鱼种群内 (97.67%) (表 5.8), 2.33%遗传变异来自于种群间。

表 5.8 胭脂鱼群体遗传变异方差分析 (AMOVA)

Table 5.8 Results of analysis of molecular variance testing genetic structure (AMOVA) of Chinese sucker

变异来源	自由度	变异百分比	P 值
Source of variation	d.f.	Percentage of variation	P-value
群体间	5	2.33	0.0000
群体内	208	97.67	
总和	213		

群体间两两比较（表 5.9），未发现有哪两个群体间发生显著的遗传分化。

表 5.9 胭脂鱼群体两两间 F_{ST} 值（下）和 F_{ST} 值的 P 值（上）

Table 5.9 Pairwise F_{ST} (below) and P-values (above) among populations of Chinese sucker

	四川 (SC)	武汉 (WH)	万州 (WZ)	宜宾 (YB)	宜昌 (YC)	长江 (YZ)
四川 (SC)		0.03604 +/-0.0148	0.00000 +/-0.0000	0.10811 +/-0.0297	0.00000 +/-0.0000	0.00000 +/-0.0000
武汉 (WH)	0.01598		0.00000 +/-0.0000	0.19820 +/-0.0297	0.02703 +/-0.0139	0.00000 +/-0.0000
万州 (WZ)	0.02200	0.01261		0.03604 +/-0.0148	0.24324 +/-0.0305	0.00000 +/-0.0000
宜宾 (YB)	0.01144	0.00434	0.00896		0.06306 +/-0.0237	0.00000 +/-0.0000
宜昌 (YC)	0.03918	0.01578	0.00140	0.01635		0.00000 +/-0.0000
长江 (YZ)	0.02626	0.02476	0.03432	0.03133	0.04706	

3.4 基于线粒体 DNA 单倍型网络结构图

Network 网络结构分析 33 个单倍体型被分为 2 个进化单元：Clusters 1 和 Clusters 2，其中 8 个单倍体型共 44 个个体组成了进化单元 Clusters 1，另外 25 个单倍体型 155 个个体组成了进化单元 Clusters 2，并且这些进化单元并不为某一种群或某一地理种群所独有（图 5.2）。

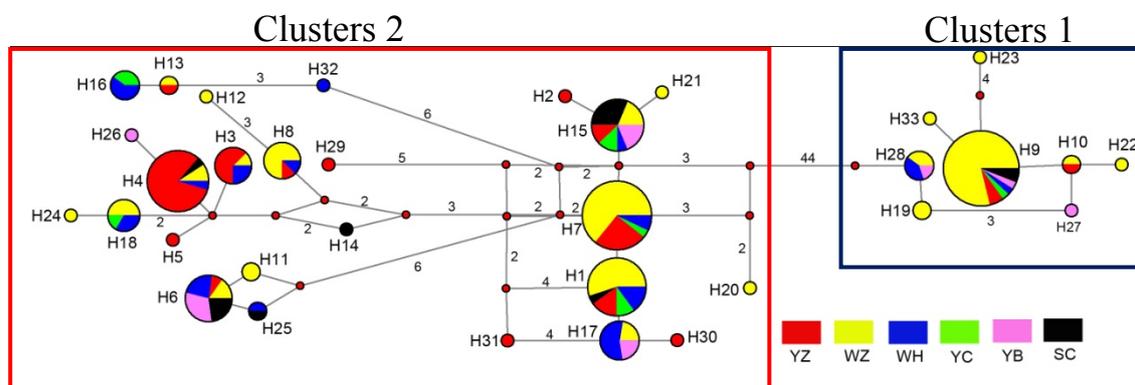


图 5.2 胭脂鱼单倍体型 network 网络结构图

长江采集样本 (YZ)，万州养殖群体，武汉养殖群体，宜昌养殖群体，宜宾养殖群体，四川养殖群体，分别用红色，黄色，蓝色，绿色，粉色和黑色显

示，红色小圆代表的是潜在的单倍体型，数字代表突变步骤

Fig 5.2. Median joining network of all the Chinese sucker haplotypes. Samples from Yangtze river (YZ) population and WZ culture population, WH culture population and YC culture population, YB culture population and SC culture population are shown in red, yellow, blue, green, pink and black, respectively. Red dots represent a potential mutation site. Numbers are the mutation step.

3.5 基于微卫星标记 Sturcture 聚类分析

为了进一步比较各群体间的聚类和分化情况，利用 Sturcture 进行遗传结构分析，结果显示，当 K=2 时，似然率的峰值为最高，此时 6 个群体 214 个个体明显聚为两大类，78.3%的长江采集群体聚为第一大类 Clusters 1，另外 5 个养殖场群体绝大部分个体聚为另一类 Clusters 2（表 5.10；图 5.3）；当 K=3 时，四川和宜昌养殖群体聚为 Clusters 1，武汉、万州和宜宾养殖群体聚为 Clusters 2，而长江采集群体还是单独聚为 Clusters 3（表 5.10；图 5.3）。

表 5.10 胭脂鱼群体在聚群比例

Table 5.10 Proportion of membership of each pre-defined population in each of the clusters of Chinese sucker

	K=2		K=3		
	Clusters 1	Clusters 2	Clusters 1	Clusters 2	Clusters 3
四川 (SC)	0.468	0.532	0.414	0.305	0.281
武汉 (WH)	0.326	0.674	0.329	0.453	0.218
万州 (WZ)	0.248	0.752	0.420	0.455	0.125
宜宾 (YB)	0.243	0.757	0.313	0.516	0.171
宜昌 (YC)	0.175	0.825	0.595	0.355	0.050
长江 (YZ)	0.783	0.217	0.176	0.160	0.664

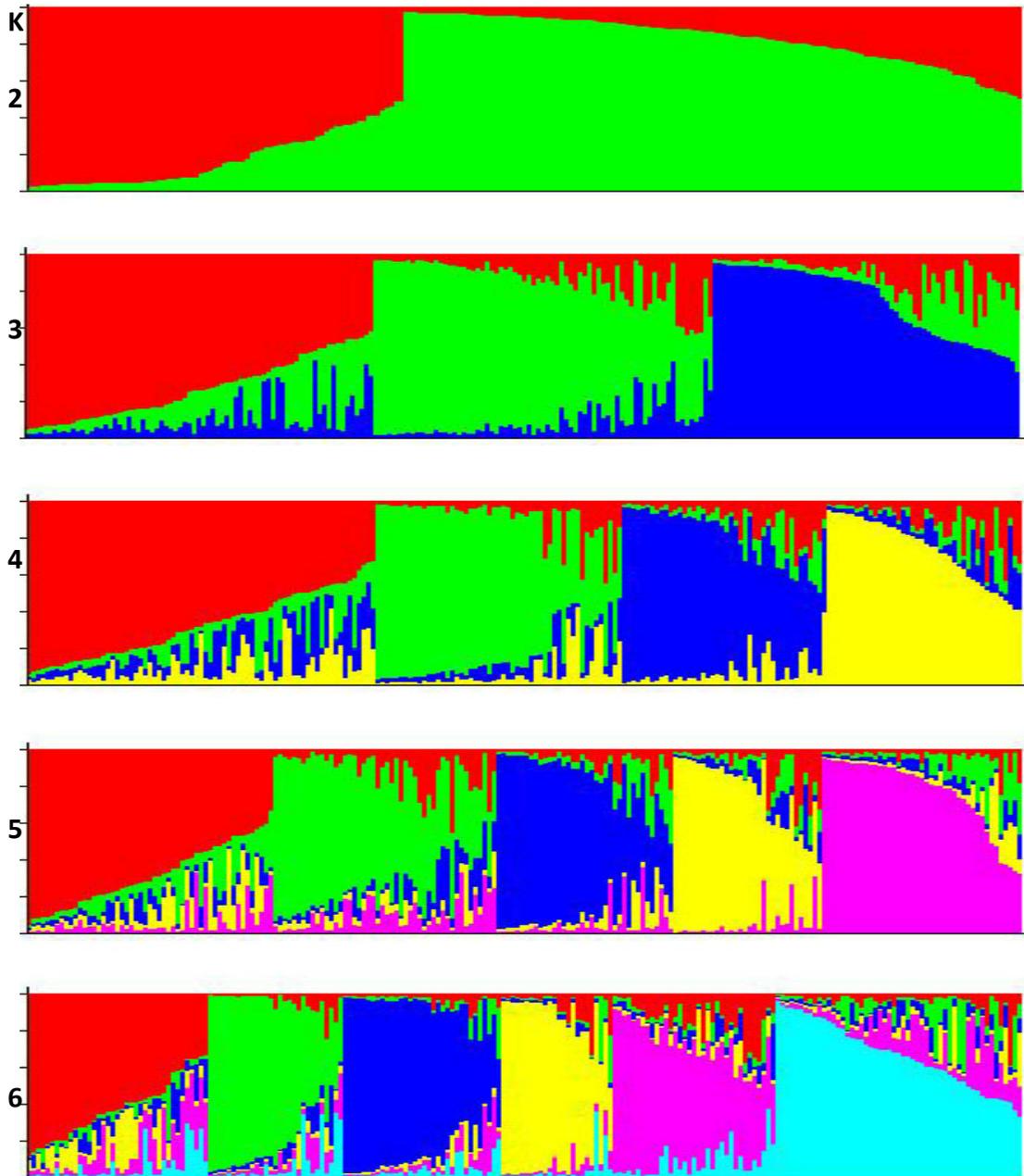


图 5.3 基于贝叶斯算法的个体分配分析 (K=2 至 K=6)

不同的颜色代表不同的聚类群 (K 值)，每个胭脂鱼个体用一个竖条表示，竖条的颜色代表其被分配到该类群的比例

Fig 5.3 Individual Bayesian assignment probabilities for K=2 to k=5

Each individual snail is represented by a single vertical bar divided into K colours, where K is the number of clusters assumed. Each colour represents one cluster, and the length of the coloured segment shows the individual's estimated proportion of membership in that cluster.

3.6 基于微卫星标记胭脂鱼个体分配分析

运用 GeneClass 软件的贝叶斯概率理论对胭脂鱼种群中可能为迁入（即个体被各个原种群排除的个数）的个体数进行分析。在分析的 214 个胭脂鱼个体中，共有 92 个个体被鉴定为迁移个体（表 5.11）。5 个养殖群体大多数为迁移个体（5 个个体来自四川养殖群体，15 个个体来自武汉养殖群体，34 个个体来自万州养殖群体，12 个个体为宜宾养殖群体，宜昌养殖群体全部为迁入个体）；长江采集个体也存在部分个体归属地属于养殖场。

表 5.11 基于贝叶斯概率理论胭脂鱼种群个体的分配分析

Table 5.11 Results of assignment tests (self-classification) based on the Bayesian method of Chinese sucker individuals

种群 population	分配至 Assigned to					
	四川 (SC)	武汉 (WH)	万州 (WZ)	宜宾 (YB)	宜昌 (YC)	长江 (YZ)
四川 (SC)	9	1	2	0	0	2
武汉 (WH)	2	19	6	2	3	2
万州 (WZ)	4	10	52	5	10	4
宜宾 (YB)	0	3	2	5	2	1
宜昌 (YC)	0	3	6	0	0	0
长江 (YZ)	5	6	4	5	2	37
Correctly assigned (%)	0.64	0.59	0.61	0.39	0	0.63

3.7 基于微卫星标记 Poptree 聚类分析

利用 Poptree 软件的邻接法基于 Nei's 遗传距离对胭脂鱼 5 个地理（除去宜昌养殖群体）种群进行聚类分析（图 5.4）。结果显示，5 个地理种群可分为三大类群，四川养殖群体归为一个类群，宜宾、武汉和万州养殖群体归为另一个类

群，长江采集群体为一个单独的类群。

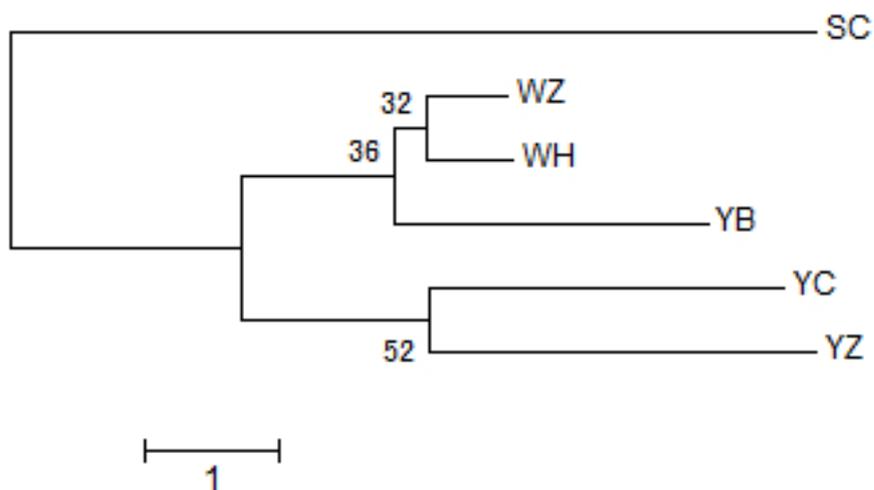


图 5.4 胭脂鱼 6 个地理种群的 NJ (Neighbour-Joining) 图

Fig. 5.4 Neighbor-Joining tree of 6 populations of Chinese sucker

YB: 宜宾珍稀濒危水生保护动物研究所; WZ: 重庆市万州区水产研究所; SC: 四川省水产研究所 (宜宾); WH: 武汉水产引种中心; YC: 宜昌三江渔业公司; YZ: 长江采集种群

YB: Yibin Rare Aquatic Animal Research Institute; WZ: Wanzhou Fisheries Research Institute; SC: Sichuan Fisheries Research Institute (Yibin); WH: Wuhan Aquatic Restocking Center; YC: Yichang Sanjiang Fisheries Co, Ltd; YZ: Yangtze River population

3.8 基于微卫星标记不同群体瓶颈效应分析

基于无限等位基因模型 (IAM)、双向突变模型 (TPM) 和逐步突变模型 (SMM) 3 种突变模型对胭脂鱼 6 个群体进行 Wilcoxon 符号秩次检验 (见表 5.12)。结果表明, 四川、宜宾和宜昌养殖群体在二段突变模型 (T.P.M.) 检测中发现存在“瓶颈效应”并达到显著水平。

表 5.12 在三种模型（无限等位基因模型，双向突变模型和逐步突变模型）下胭脂鱼 6 个种群的“瓶颈效应”检验

Table 5.12 BOTTLENECK tests in 6 Chinese sucker populations under the infinite allele models (I.A.M), two phase models (T.P.M) and stepwise mutation models (S.M.M)

群体 Population	样本量 Samples size	威尔科克森符号秩检验		
		I.A.M.	T.P.M.	S.M.M.
四川 (SC)	14	0.026	0.019	0.001
武汉 (WH)	28	0.148	0.104	0.003
万州 (WZ)	85	0.230	0.173	0.004
宜宾 (YB)	13	0.000	0.000	0.000
宜昌 (YC)	9	0.000	0.000	0.000
长江 (YZ)	65	0.074	0.518	0.000

4 讨论

4.1 胭脂鱼遗传多样性分析

(1) 线粒体 DNA 标记

核苷酸多样性指数 (Pi) 和单倍型多样性 (Hd) 是衡量群体内遗传变异程度的高低的重要指标, 其值越大, 遗传多样性就越大, 对一个物种来说, 其遗传多样性越高, 则其对生存环境变化所产生的适应能力越强, 进化的潜力也越大。本实验的六个群体核苷酸多样性指数在 0.00779~0.01461 范围内, 单倍型多样性指数在 0.844~0.939 范围内, 其中长江采集群体无论是 Pi 值还是 Hd 值都低于 5 个养殖场群体, 说明长江胭脂鱼遗传多样性低于养殖场内养殖亲本胭脂鱼的遗传多样性, 一方面可能是长江采集样本的局限性, 在样本采集过程中, 多数样本体长范围为 15 cm~20 cm, 我们推测这些胭脂鱼很有可能为增殖放流的胭脂鱼; 另外

一方面,目前记录的误捕量、出现频度和分布情况看,胭脂鱼在长江已处于非常濒危的程度(张春光等,2000),导致了长江胭脂鱼处于较低的遗传多样性。

(2) 微卫星标记

一般认为,杂合度越高,等位基因数越多,物种遗传多样性越丰富,对生活环境适应的潜能越大,等位基因数(N_a)和杂合度被认为是度量物种遗传多样性 2 个较好的指标。 N_a 是研究遗传变异度的基础,等位基因数目的多少反映了物种在该区域的变异程度,而多个微卫星位点的变异情况能反映种群的总体遗传变异水平,但等位基因数的大小在一定范围内会受到样本量大小的影响,因此在微卫星遗传多样性的研究中单个群体的样本量最好在 30 个个体以上(闫路娜等,2004);本研究中的 6 个胭脂鱼群体中有 3 个胭脂鱼养殖场(SC、YB、YC)的样本量不足 30 尾,且其等位基因数并未呈明显偏低的现象;且杂合度的检测不受样本数量的影响,因此被认为是评价群体遗传变异水平的最适参数,杂合度结果显示和线粒体 DNA 结果一致,也是长江采集群体观测和期望杂合度均低于 5 个养殖场。

多态信息含量(PIC)是衡量等位基因片段多态性的理想指标,当 $PIC > 0.5$ 时,为高度多态位; $0.25 < PIC < 0.5$ 时,为中度多态位点; $PIC < 0.25$ 时,为低度多态位点。本研究中 11 个微卫星位点在各群体的 PIC 都大于 0.5,说明选择的这 9 个位点都处于高度多态水平,可以准确用于胭脂鱼遗传多样性评估。

4.2 胭脂鱼不同群体遗传分化和遗传结构

物种不同种群间的遗传分化的程度常用遗传分化指数 F_{st} 来进行判别,如果 $F_{st} < 0.05$,则表示群体间几乎没有遗传分化;如果 $0.05 < F_{st} < 0.15$,则表示群体间的分化程度较低;若 $0.15 < F_{st} < 0.25$,则表示群体间为中度分化;若 $F_{st} > 0.25$ 时,表明群体间分化程度很高(Wright, 1965)。本实验线粒体 DNA 和微卫星标记结果均显示遗传变异主要发生在种群个体内,只有线粒体 DNA 结果分析各个种群间存在较低的遗传分化($F_{st} = 0.0928$, $P < 0.001$),微卫星标记结果显示各群体间几乎没有遗传分化($F_{st} = 0.0233$, $P < 0.001$),这可能与这两种分子标记的分子进化速率不同、在环境因素变化的情况下基因突变速率不同及对自然选择的反应不同有关,一般情况下,mt-DNA 比单拷贝核 DNA 具有更快的进

化速率，因此，在分析不同地理种群间的遗传分化水平时更加灵敏。

Network 网络结构图和 Structure、Poptree 聚类分析结果均显示这 6 个胭脂鱼种群被分为 2 个进化单元，四川养殖群体为一个进化单元，另外 5 个种群为一个进化单元。通过 GeneClass 我们还发现一半以上的个体都属于迁入个体，在胭脂鱼养殖场实际繁殖过程中，确实也存在繁殖期亲本交换情况，通过交换性成熟的雄鱼和雌鱼来进行繁殖，这也是导致单倍体型 Network 网络结构途中每一个进化单元都不为某一采样群体或某一地域采样群体所独有的原因。另外长江采集的样本有 22 尾被分配至另外 5 个养殖场，这很有可能是来自人工增殖放流的胭脂鱼，在第七章作详细分析。

在种群遗传瓶颈分析中，由于无限等位基因模型 (I.A.M.) 不能充分的解释微卫星数据，尤其是微卫星的长度为什么不能发展到无限长等问题，而只有少数微卫星位点的突变是完全符合逐步突变模型 (S.M.M.)，因此，相比而言微卫星数据更符合二阶突变模型 (T.P.M.)，这也使得很多以微卫星为分子标记的研究都更偏向相信二阶突变模型对种群遗传瓶颈检测的结果。本次实验也选择二阶突变模型对胭脂鱼 6 个种群进行瓶颈效应分析，结果 3 个养殖种群 (SC、YB、YC) 出现瓶颈效应，在这 3 个养殖场内胭脂鱼个体数较少，并且繁殖效率并不高，因此急需采取有效的措施对这些胭脂鱼进行保护和增殖。

4.3 对比长江野生胭脂鱼遗传多样性以及遗传结构分析

Sun 等 (2004) 利用线粒体 DNA 控制区 (d-loop) 对长江 (宜宾、万州、宜昌、武汉) 采集的 70 尾野生胭脂鱼遗传多样性及遗传结构分析，我们通过对比分析 d-loop 发现，在我们采集的 199 尾胭脂鱼中变异位点数和单倍体数都远小于 Sun 等 (2004) 分析的野生胭脂鱼 (表 5.13)；利用我们 d-loop 区得到的 21 个单倍体型和 Sun 等 AMOVA 分析发现存在显著的遗传分化 ($F_{st} = 0.3081$, $P < 0.005$)，NJ 系统进化数显示 Sun 等进化单元 Clusters B (宜宾野生群体) 在我们的采样群体中并没有出现 (图 5.5)，宜宾野生群体与其他 3 个野生群体存在明显分化，并且遗传多样性最低，由于繁殖期间选择性的亲本交换和近亲繁殖导致 Clusters B 进化单元的消失以及其他稀有单倍体型的消失。

表 5.13 Sun 等（2004）和本实验对比结果

Table 5.13 Compare with Sun et al（2004） and our result

	采集样本（d-loop）	Sun等，2004
	Sample（d-loop）	Sun et al，2004
样本数	199	70
变异位点数	86	223
单倍体数	21	39
种群间变异	7.81	60.29
进化单元	Clusters A	Clusters A and Clusters B

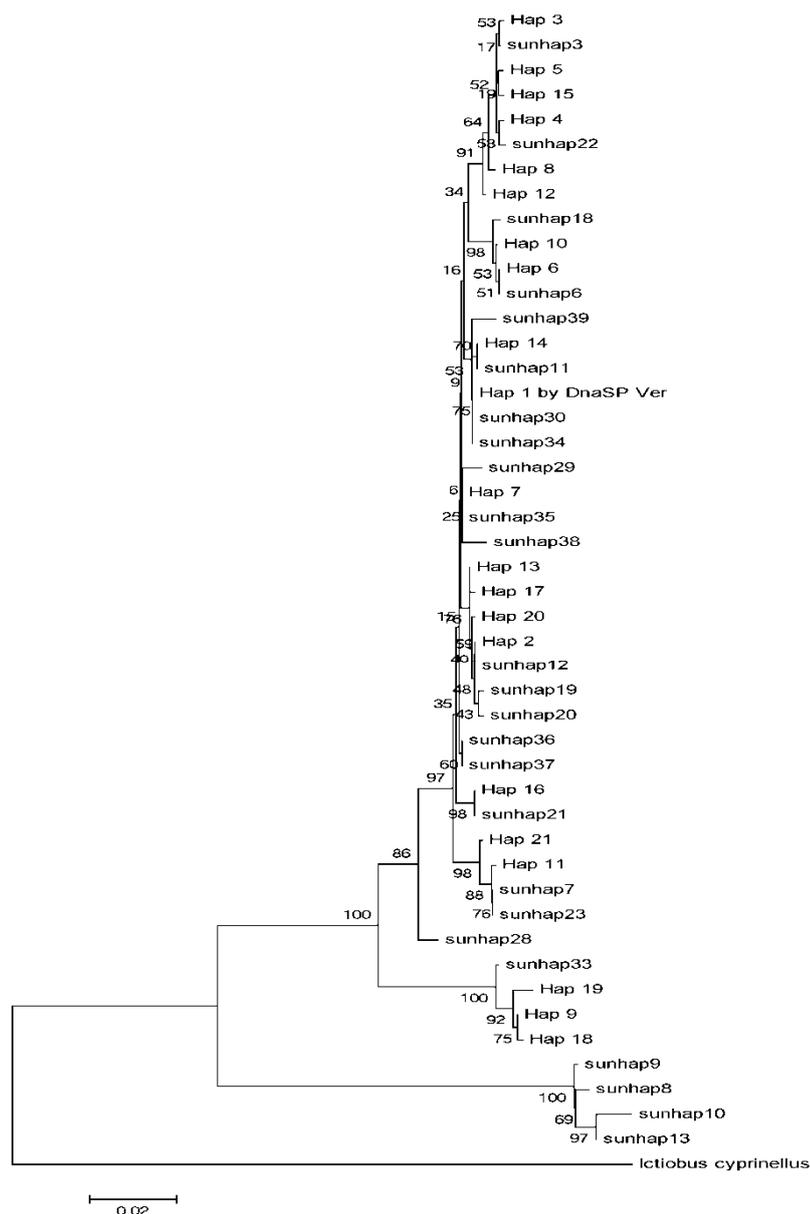


图 5.5 Sun 等 2004 的 39 个单倍体型和我们的 21 个单倍体型 NJ 系统进化数
所有的单倍体型 Sun (2004) 为 (sunhap 1-sunhap 39) 和我们的 21 个单倍体型
(Hap 1-21)

**Fig. 5.5 Neighbour-joining tree estimated among 39 haplotypes of Sun (2004)
and 21 haplotypes of Chinese sucker.**

**All the haps contain haps from Sun (2004) (sunhap 1-sunhap 39) and 19
haps from culture farms (Hap 1-21)**

第六章 胭脂鱼家系档案的建立

1 前言

胭脂鱼为我国特有鱼类，国家Ⅱ类野生保护动物。20世纪70年代以前，胭脂鱼曾是长江上游大型重要经济鱼类之一，在渔获物中占有较大的比例，分布于长江和闽江。从目前记录的误捕量、出现频度和分布情况显示胭脂鱼在长江水系中的资源量明显减少（陈春娜，2008），在长江中的分布区也逐渐缩小，在长江胭脂鱼主要集中于宜宾至重庆的川江段及部分支流，中下游集中于葛洲坝下游一带，已处于非常濒危的程度，闽江胭脂鱼种群几近绝迹。

孙玉华等（2003）和杨星等（2006）均指出胭脂鱼群体内遗传结构比较单一，其群体的遗传多样性程度有进一步减退的可能性。胭脂鱼自身性成熟晚、成活率低，短期内依靠自然增殖使资源得以很快恢复的可能性不大，目前胭脂鱼所处的环境和资源状况，采用人工放流的增殖方式是胭脂鱼野生资源得以恢复或增殖的有效途径，目前胭脂鱼养殖场繁殖工作并没有考虑遗传背景，普遍采取盲目的随机的交配方式，以1997年万州水产研究所胭脂鱼人工繁殖结果为例，对当年5尾雌性亲鱼进行人工繁殖，共获得受精卵5169万余粒。其中2尾亲鱼的受精卵发育至开口期全部死亡；另两尾的合计成活率为0.18%；只一尾成活率稍高，但也只有8.25%（张春光等，2000），小群体内近亲交配不仅不能增加胭脂鱼野生资源，反而会加剧遗传多样性丢失，小群体遗传多样性丢失则可能导致种群灭绝。

本文中，我们搜集长江中上游5个养殖场内所有胭脂鱼亲鱼样本，利用线粒体DNA（d-loop和cyt-b）和微卫星标记对这些亲鱼建立分子谱系档案，做好繁殖管理，有效的避免或减少近交，正确的家系谱系档案可以对于鱼类育种效率的提高和生产实践有着重要意义，特别是对于某些种群数量较小的如中华鲟、达氏鲟、胭脂鱼，近亲繁殖严重威胁种群的扩大和发展。利用分子标记制定一个详细、准确的种群谱系档案，以此达到避免近亲衰退现象。

2 材料和方法

2.1 实验材料鱼

家系谱系档案建立样本来自 5 个胭脂鱼养殖场内所有繁殖亲本，共计 149 尾，具体采样地点如图 5.1 和表 5.1，样本均用无水乙醇 4℃冰箱保存备用。

2.2 基因组 DNA 提取及 PCR 扩增和测序

基因组 DNA 的提取采用经典的酚氯法 (Sambrook et al, 1989)，具体实验步骤参照第三章 2.2 的实验步骤。

PCR 扩增引物和测序具体步骤参照第五章 2.2 的实验步骤。

2.3 数据分析

PCR 产物经纯化试剂盒纯化后，在自动测序仪 ABI 3730XL 上测取扩增序列峰值，利用以下软件进行数据分析，GeneMarker V1.5、Cervus vs 2.0、GenAlex 及 Poptree、GeneClass vs 2.0:

软件 GeneMarker V1.5 (David et al, 1998) 用于读取微卫星等位基因大小值，使用软件 Cervus 3.0 (Kalinowski et al, 2007) 和软件 GenAlex 统计等位基因数 (K)、杂合度 (Ho)、期望杂合度 (He)、多态信息含量 (PIC)、平均排除概率、以及累积排除概率，通过这些参数建立亲子鉴定体系。

软件 Poptree 用于评价了 5 个养殖场内所有个体间的遗传分化关系与亲缘关系，包括家系间各种遗传距离、家系内个体间的遗传关系及亲缘系数，并利用 UPGMA 算法绘制出不同养殖场胭脂鱼亲本系统发育图。

软件 GeneClass (Piry et al, 2004) 基于多位点基因型数据，对分配或排除作为双倍体或单倍体个体起源以及每组个体起源的参照群体，可以探测第一世代迁移者。

3 结果

3.1 微卫星位点多态性

运行 Cervus2.0 中 Allele Frequency Analysis 程序和软件 GenAlex 中 Allele Frequency Data Parameters 程序, 对微卫星位点和养殖群体遗传参数分析, 具体信息见表 6.1-6.2。

如表 6.1 所示, 所选用的 11 微卫星位点等位基因数均在 5 以上, 在 5 个养殖群体中共检测到 118 个等位基因, 观测杂合度和期望杂合度均大于 0.5 属于高度多态, 多态信息含量除基因座 Mas23 属于中度多态外 ($P < 0.5$) 其他的均为高度多态, 除基因座 Mas23 和 M5 偏离哈德文平衡外其他位点均不偏离。

表 6.1 11 个微卫星引物的主要多态性参数和 Hardy-Weinberg 检测结果

Table 6.1 Main polymorphic parameters for the 11 microsatellite loci and Hardy-Weinberg

基因座 Locus	等位基因数 K	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 HW
Mas22	7	0.521	0.579	0.537	NS
Mas23	5	0.733	0.503	0.416	***
Mas21	10	0.842	0.809	0.781	NS
Mas3	10	0.842	0.833	0.809	NS
Mas11	4	0.616	0.615	0.533	NS
Mas13	15	0.910	0.894	0.881	NS
Mas15	11	0.859	0.810	0.788	NS
M5	15	0.842	0.771	0.738	*
M11	10	0.795	0.780	0.750	NS
M23	15	0.828	0.854	0.835	NS
M46	16	0.870	0.865	0.847	NS
平均	10.7	0.787	0.756	0.720	

*: 偏离 Hardy-Weinberg 平衡; ***: 显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡; NS: 不显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡

*: means deviation from Hardy-Weinberg equilibrium; ***: means significant deviation Hardy-Weinberg equilibrium; NS: Not significant deviation Hardy-Weinberg equilibrium

如表 6.2 所示，5 个胭脂鱼养殖场等位基因数都在 6 以上，观测杂合度、期望杂合度以及多态信息含量都不存在显著性差异，且都不偏离哈德文平衡。

表 6.2 5 个胭脂鱼养殖场主要多态性参数和 Hardy-Weinberg 检测结果
Table 6.2 Main polymorphic parameters for the 5 cultured population of Chinese sucker and Hardy-Weinberg

种群 Population	等位基因数 K	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 HW
四川 (SC)	6.091	0.786	0.704	1.486	NS
武汉 (WH)	7.818	0.786	0.747	1.664	NS
万州 (WZ)	8.727	0.785	0.739	1.634	NS
宜宾 (YB)	7.545	0.804	0.755	1.691	NS
宜昌 (YC)	6.182	0.768	0.701	1.487	NS

NS:不显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡

NS: Not significant deviation Hardy-Weinberg equilibrium

3.2 胭脂鱼亲本亲缘关系鉴定

微卫星位点的排除概率越高说明该位点的亲权鉴定能力越强。通过分析位点在胭脂鱼养殖群体中的排除概率表明，当双亲均不知时，11 个微卫星座位的单位点排除概率 (NE-1P) 在 0.362~0.873 (表 6.3)，微卫星位点数为 11 个时累积排除概率 (CE-1P) 可以达到 0.997805 (达到国际标准 99.73%)；当双亲信息已知其一时，排除概率 (NE-2P) 在 0.220~0.769，微卫星座位数达到 8 个时，累积排除概率 (CE-2P) 为 0.997361 以上；当双亲信息都知道时，排除概率 (NE-PP) 在 0.076~0.646，微卫星座位数仅达到 6 个时，累积排除概率 (CE-PP) 为 0.998433，11 个位点排除率接近 100%，以上所选用的微卫星座位的累积非亲排除概率都在 99% 以上，说明所使用 11 个胭脂鱼微卫星标记进行的亲权鉴定结果可以认定是否具有亲缘关系。

表 6.3 11 个微卫星标记在胭脂鱼养殖群体的排除概率

Table 6.3 The exclusion probability calculated over the 11 microsatellite loci in cultured population of Chinese sucker

基因座 Locus	双亲均不知		已知一个亲本		双亲均知	
	排除率	累积排除率	排除率	累积排除率	排除率	累积排除率
	NE-1P	CE-1P	NE-2P	CE-2P	NE-PP	CE-PP
Mas23	0.873		0.769		0.646	
Mas22	0.816	0.712368	0.647	0.497543	0.464	0.299744
Mas11	0.806	0.574169	0.671	0.333851	0.519	0.155567
M5	0.604	0.346798	0.426	0.142221	0.233	0.036247
M11	0.596	0.206692	0.415	0.059022	0.224	0.008119
Mas21	0.553	0.114300	0.376	0.022192	0.193	0.001567
Mas15	0.531	0.060694	0.355	0.007878	0.165	0.000259
Mas3	0.506	0.030711	0.335	0.002639	0.159	0.000041
M23	0.458	0.014066	0.295	0.000779	0.127	0.000005
M46	0.431	0.006062	0.273	0.000213	0.110	0.000001
Mas13	0.362	0.002195	0.220	0.000047	0.076	0.000000

利用软件 Cervus 判定 5 个胭脂鱼养殖场所有亲本的亲缘关系，既有养殖场内部存在亲缘的亲本也有养殖场之间存在亲缘关系（表 6.4）的亲本，由此我们判定这些亲本在繁殖过程中不宜同时选择成为一对父母本进行繁殖，应选择亲缘关系较远的亲本进行繁殖。

表 6.4 5 个养殖场采集的胭脂鱼亲缘鉴定结果

Table 6.4 Paternity test of 5 cultured population of Chinese suckers

雌性个体 Female	雄性个体 Male	错配座位数 Loci mismatching	LOD 值 LOD score	置信区间 Confidence
SC1	SC14	0	9.96E+00	*
SC3	WZ67	1	2.19E+00	*

WH1	SC10	1	4.02E+00	*
WH10	WZ74	0	6.02E+00	*
WH10	WZ71	1	2.60E+00	*
WH14	SC13	0	6.05E+00	*
WH3	WH18	0	1.06E+01	*
WH6	WH17	2	2.41E+00	*
WH7	WZ82	0	5.65E+00	*
WH9	WH17	1	6.17E+00	*
WH9	WH23	1	2.05E+00	*
WH9	WZ60	1	3.40E+00	*
WZ12	WZ82	0	6.02E+00	*
WZ13	WZ67	1	3.67E+00	*
WZ16	WZ70	1	4.16E+00	*
WZ18	YC7	0	5.01E+00	*
WZ22	YB13	2	1.14E+00	*
WZ23	WZ66	1	4.92E+00	*
WZ28	WZ64	1	4.14E+00	*
WZ29	WZ72	1	4.51E+00	*
WZ30	WZ83	0	6.71E+00	*
WZ31	WZ59	1	6.17E-02	+
WZ31	WZ73	1	3.17E+00	*
WZ36	WZ74	0	3.64E+00	*
WZ45	WZ85	0	6.50E+00	*
WZ46	WZ82	0	4.36E+00	*
WZ50	WZ63	1	3.35E+00	*
WZ52	WZ77	0	7.06E+00	*
WZ53	WZ82	1	6.77E-01	*
YB1	WZ57	1	3.43E+00	*
YB2	WZ69	1	2.92E+00	*

YB7	YB12	1	7.81E+00	*
YB9	WH20	1	1.80E+00	*
YC1	WZ77	1	1.28E+00	*
YC3	YC7	0	3.20E+00	*
YC3	WZ81	0	3.02E+00	*

YB: 宜宾珍稀濒危水生保护动物研究所; **WZ:** 重庆市万州区水产研究所; **SC:** 四川省水产研究所(宜宾); **WH:** 武汉水产引种中心; **YC:** 宜昌三江渔业有限公司

YB: Yibin Rare Aquatic Animal Research Institute; WZ: Wanzhou Fisheries Research Institute; SC: Sichuan Fisheries Research Institute (Yibin); WH: Wuhan Aquatic Restocking Center; YC: Yichang Sanjiang Fisheries Co, Ltd

3.3 胭脂鱼不同家系系统进化树

基于标准遗传距离在 Poptree 中采用 UPGMA 算法构建系统进化树, 所有 5 个胭脂鱼养殖场亲本被分为 6 个大支(遗传距离大于 0.04)(图 6.1)。从图 6.2 中可以看出多数亲本个体具有相似的遗传背景, 在同一节点处 149 个个体分为大小不同的 27 个小分支, 分支内含的个体数在 2~31 个不等, 有 11 个个体以不同大小的遗传距离聚到大分支之外。因此我们建议养殖场亲本个体的繁殖可以依据雌、雄亲本的遗传距离及聚类图, 按照养殖场内雄性个体多于雌性个体的情况下, 选取亲本 3 种遗传距离(小于 0.02、0.02-0.2 和大于 0.2), 处于不同分支的组合建立 1 对 1 或者 1 对多的繁育亲本家系, 优先选择稀有单倍体型个体或分支处较少的亲本个体, 同时应避开具有亲缘关系的个体。

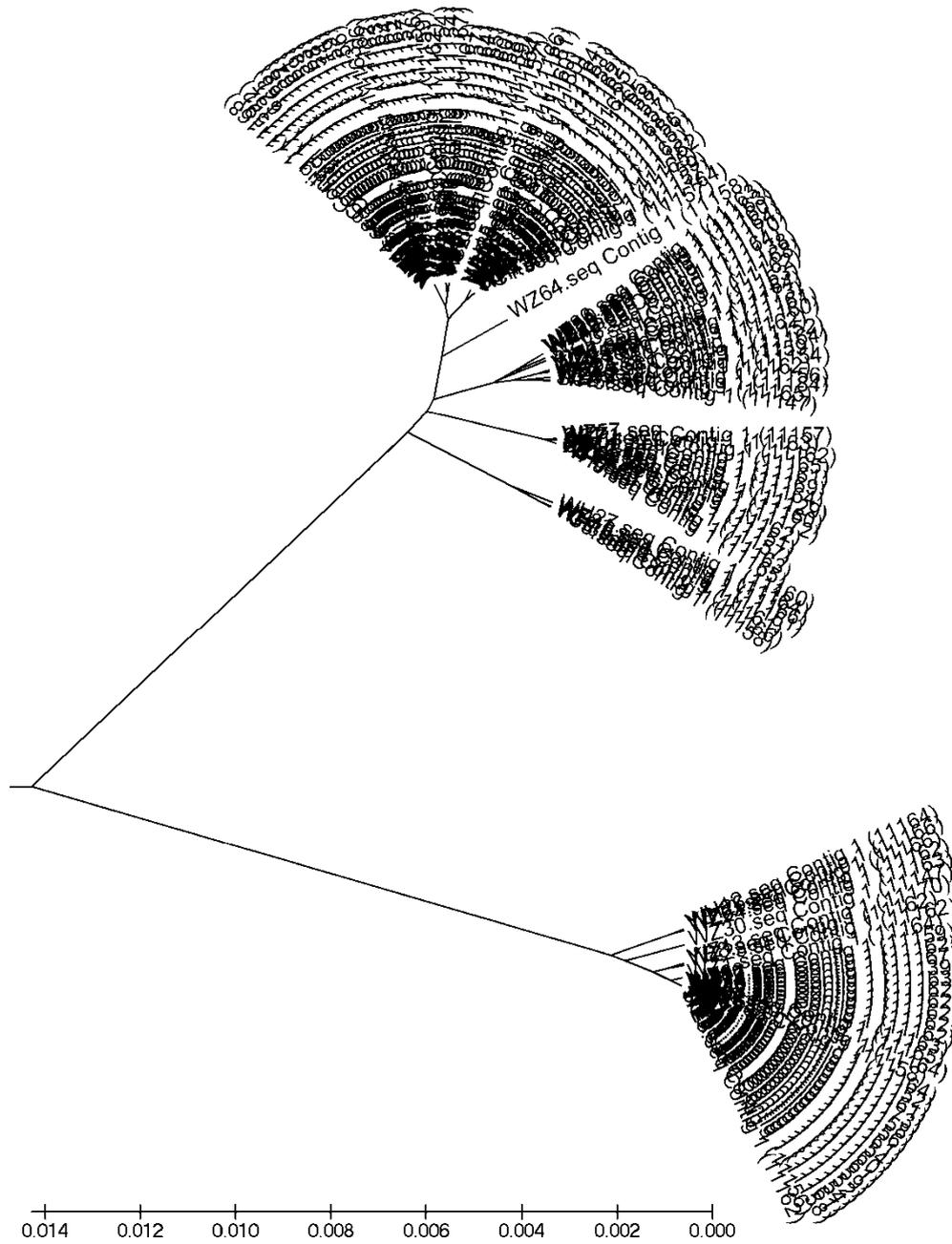


图 6.1 基于标准遗传距离的胭脂鱼亲本个体聚类图

Fig 6.1 Dendrogram of Chinese sucker individuals based on standard genetic distance using UPGMA

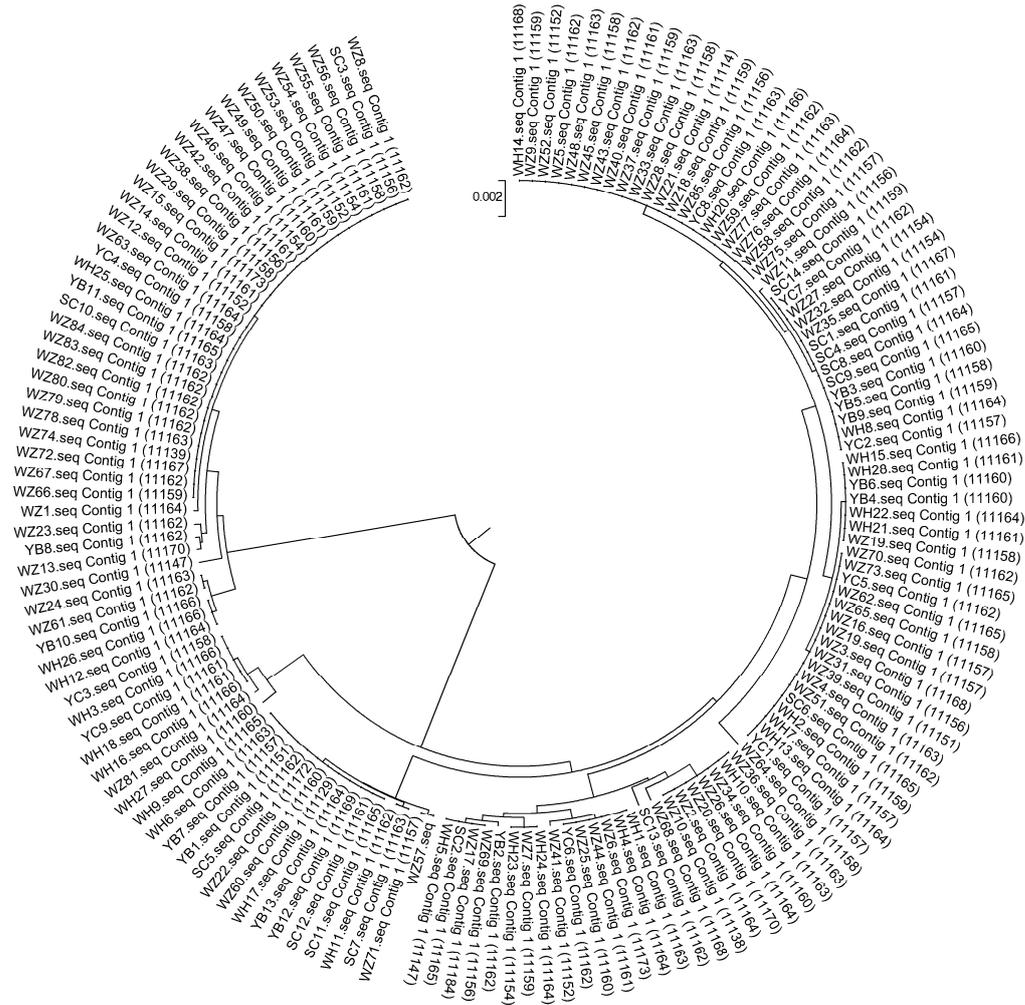


图 6.2 基于标准遗传距离的胭脂鱼亲本个体聚类图

Fig 6.2 Dendrogram of Chinese sucker individuals based on standard genetic distance using UPGMA

3.4 世代迁移者

按照胭脂鱼养殖场谱系记录显示养殖场内亲本基本上均是全人工繁殖子一代个体，只有极少数为存活至今的长江采集野生个体，基于 GeneClass 分析显示 5 个养殖场均有迁移个体，具体迁移个体所属养殖场见表 6.5，这些迁移个体在养殖场内属于第一代迁移个体，并且正好符合养殖场在繁殖期间交换缺少雄鱼或雌鱼作为后备亲鱼来进行胭脂鱼全人工繁殖工作。

表 6.5 基于贝叶斯概率理论胭脂鱼养殖种群个体的分配分析

Table 6.5 Results of assignment tests (self-classification) based on the Bayesian method of cultured population of Chinese sucker individuals

种群 population	分配至 Assigned to				
	SC	WH	WZ	YB	YC
SC	9	1	2	0	0
WH	2	19	6	2	3
WZ	4	10	52	5	10
YB	0	3	2	5	2
YC	0	3	6	0	0

3.5 胭脂鱼家系谱系建立

基于胭脂鱼养殖场内遗传距离和亲缘关系，我们选取亲本间遗传距离大于 0.2，两亲本间不存在亲缘关系，择优选取系统发育树分支个体少的支系，以一雄配多雌的繁殖方式在遗传距离大于 0.2 建立家系 28 个（WZ 养殖群体 13 个、WH 养殖群体 8 个、SC 养殖群体 5 个、YB 养殖群体 2 个）；遗传距离在 0.02-0.2 之间建立家系 19 个（WZ 养殖群体 9 个、WH 养殖群体 4 个、YB 养殖群体 2 个、YC 养殖群体 4 个）；遗传距离小于 0.02 建立家系 9 个（WZ 养殖群体 3 个、WH 养殖群体 2 个、SC 养殖群体 1 个、YB 养殖群体 2 个、YC 养殖群体 1 个）共计 56 个不同遗传距离家系（图 6.3-6.10）。

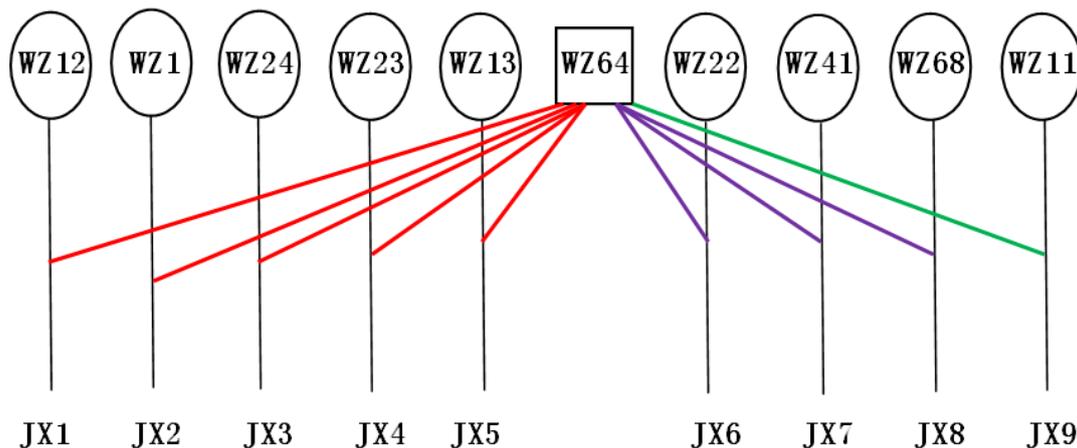


图 6.3 胭脂鱼万州养殖群体 WZ64 家系谱系图

红色线条遗传距离大于 0.2；紫色线条遗传距离 0.02-0.2 之间；绿色线条遗传距离小于 0.02

Fig 6.3 Family tree of WZ64 family in WZ cultured population of Chinese sucker

Red line means the genetic distance is greater than 0.2; Purple line means the genetic distance is between 0.02 and 0.2; Green line means the genetic distance is less than 0.02

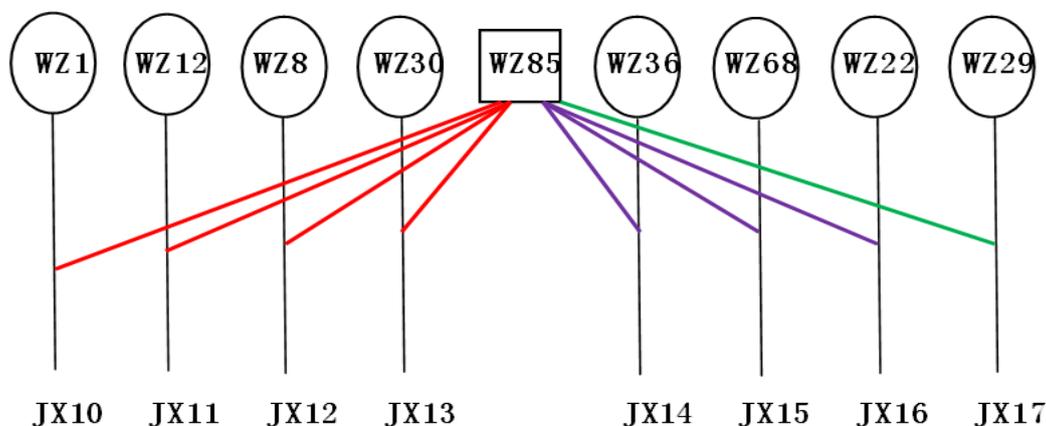


图 6.4 胭脂鱼万州养殖群体 WZ85 家系谱系图

红色线条遗传距离大于 0.2；紫色线条遗传距离 0.02-0.2 之间；绿色线条遗传距离小于 0.02

Fig 6.4 Family tree of WZ85 family in WZ cultured population of Chinese sucker

Red line means the genetic distance is greater than 0.2; Purple line means the genetic distance is between 0.02 and 0.2; Green line means the genetic distance is less than 0.02

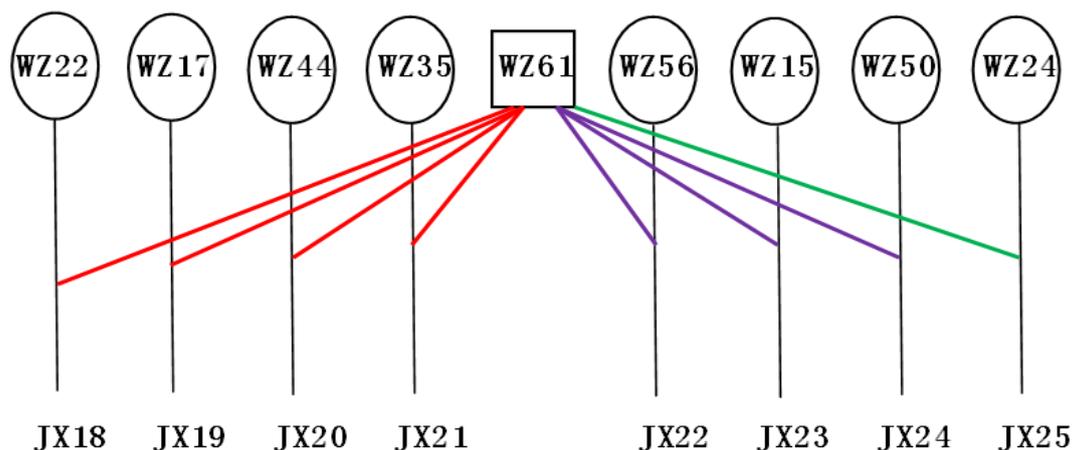


图 6.5 胭脂鱼万州养殖群体 WZ61 家系谱系图

红色线条遗传距离大于 0.2；紫色线条遗传距离 0.02-0.2 之间；绿色线条遗传距离小于 0.02

Fig 6.5 Family tree of WZ61 family in WZ cultured population of Chinese sucker
Red line means the genetic distance is greater than 0.2; Purple line means the genetic distance is between 0.02 and 0.2; Green line means the genetic distance is less than 0.02

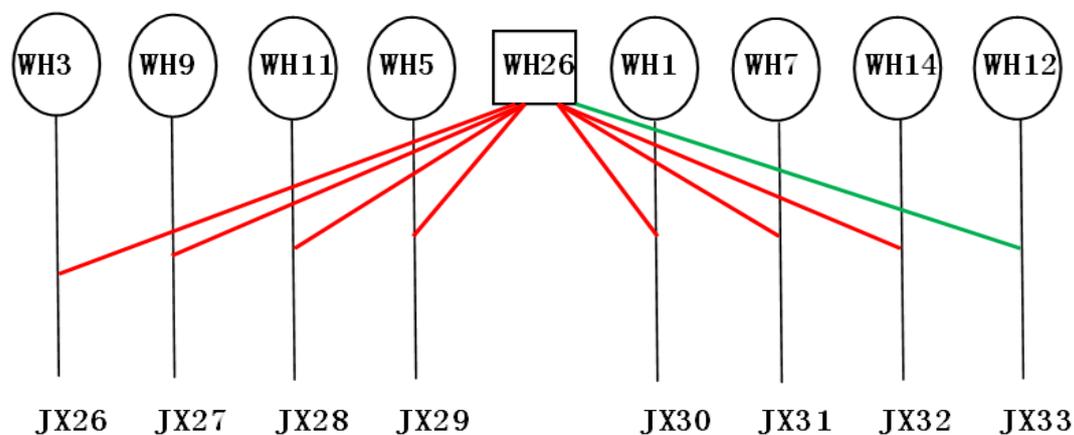


图 6.6 胭脂鱼武汉养殖群体 WH26 家系谱系图

红色线条遗传距离大于 0.2；紫色线条遗传距离 0.02-0.2 之间；绿色线条遗传距离小于 0.02

Fig 6.6 Family tree of WH26 family in WH cultured population of Chinese sucker
Red line means the genetic distance is greater than 0.2; Purple line means the genetic distance is between 0.02 and 0.2; Green line means the genetic distance is less than 0.02

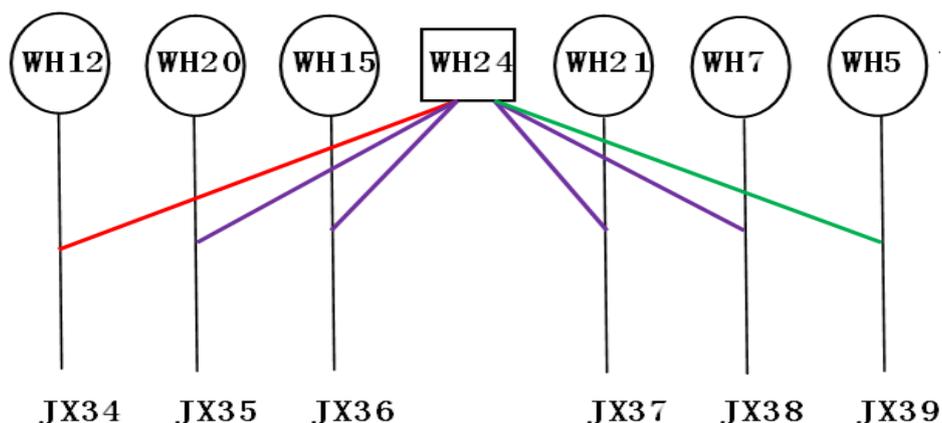


图 6.7 胭脂鱼武汉养殖群体 WH24 家系谱系图

红色线条遗传距离大于 0.2；紫色线条遗传距离 0.02-0.2 之间；绿色线条遗传距离小于 0.02

Fig 6.7 Family tree of WH24 family in WZ cultured population of Chinese sucker
Red line means the genetic distance is greater than 0.2; Purple line means the genetic distance is between 0.02 and 0.2; Green line means the genetic distance is less than 0.02

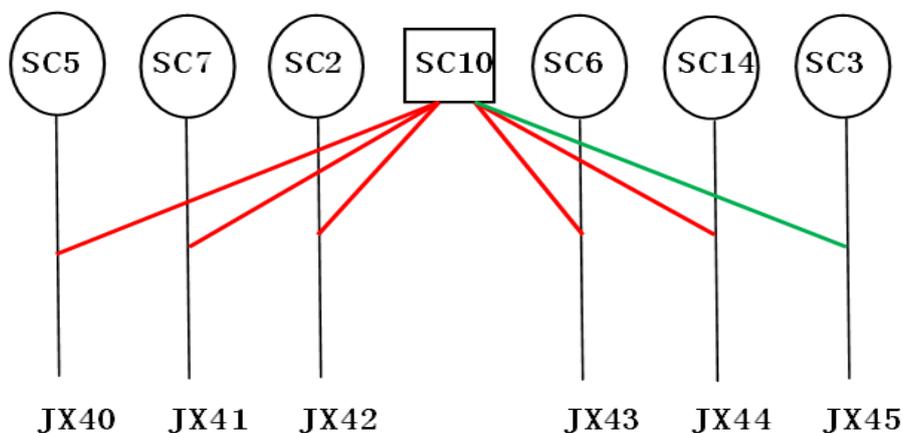


图 6.8 胭脂鱼四川养殖群体 SC10 家系谱系图

红色线条遗传距离大于 0.2；绿色线条遗传距离小于 0.02

Fig 6.8 Family tree of SC10 family in SC cultured population of Chinese sucker
Red line means the genetic distance is greater than 0.2; Green line means the genetic distance is less than 0.02

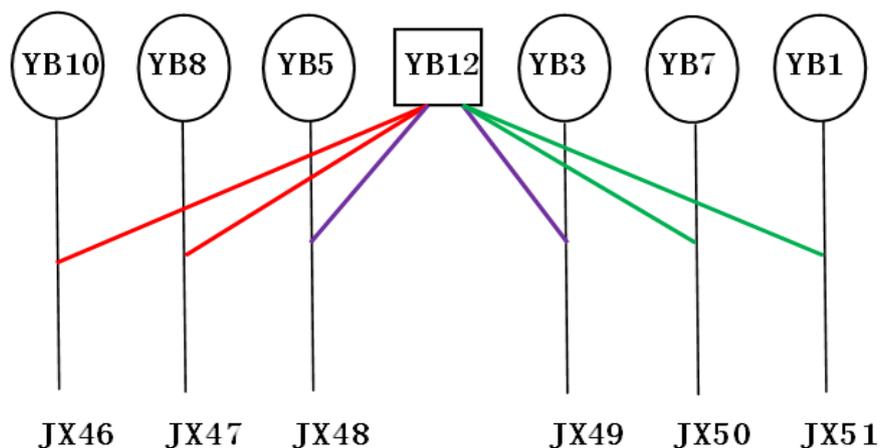


图 6.9 胭脂鱼宜宾养殖群体 YB12 家系谱系图

红色线条遗传距离大于 0.2；紫色线条遗传距离 0.02-0.2 之间；绿色线条遗传距离小于 0.02

Fig 6.9 Family tree of YB12 family in YB cultured population of Chinese sucker
Red line means the genetic distance is greater than 0.2; Purple line means the genetic distance is between 0.02 and 0.2; Green line means the genetic distance is less than 0.02

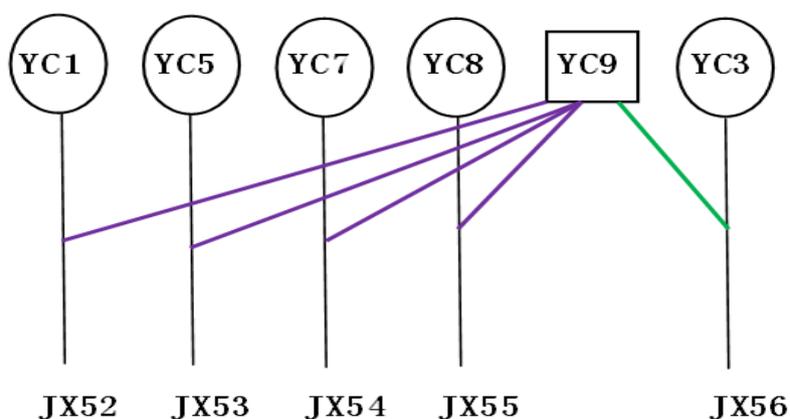


图 6.10 胭脂鱼宜昌养殖群体 YC9 家系谱系图

紫色线条遗传距离 0.02-0.2 之间；绿色线条遗传距离小于 0.02

Fig 6.10 Family tree of YC9 family in YC cultured population of Chinese sucker
Purple line means the genetic distance is between 0.02 and 0.2; Green line means the genetic distance is less than 0.02

4 讨论

4.1 胭脂鱼养殖群体的遗传潜力评估

目前,中国主要养殖鱼类的苗种多数来源于野生群体驯化和引种后的人工繁殖,胭脂鱼亦是如此,受生产规模的限制,各个胭脂鱼养殖场保存的亲鱼数量不多(宜宾、宜昌、四川养殖群体),且相对个体数较多的万州养殖群体也是大部分选于自繁后代,由于生殖隔离和近交繁殖,引起了养殖性状不同程度的退化。通过与 Sun 等(2004)结果对比显示(第四章 4.3),相比于胭脂鱼长江野生群体,养殖群体平均有 30%变异位点数和单倍体型丢失,长江野生群体遗传分化大部分由发生在种间演变为在养殖场内分化不明显。这表明,胭脂鱼养殖个体遗传多样性急剧减少,某些位点少数等位基因的富集较为严重,特别是某些稀有单倍体型的丢失,表现出明显的人工选择趋向,对优良种质资源的保护和持续利用是极为不利的。养殖群体遗传多样性明显下降致使遗传潜力的降低。因此,在品种建立和保持过程中如何利用分子标记来避免近亲繁殖带来的种质衰退并使所选育的品种遗传本质和生产性能不断提高是水产育种学家必需解决的课题(鲁翠云等, 2008)。

4.2 微卫星辅助家系建立及选育体系构建及效应评估

水产动物的生长环境较农作物难以控制,物理标志如剪取鳍条标记的方法入大池养殖后,不易区分。微卫星分子标记直接反映的是亲本间基因组水平上的遗传差异,能够在一定程度上预测后代杂交优势的产生,家系选育作为传统的选择育种手段,在鱼类育种中发挥着重要的作用。运用大规模家系选育不断进行遗传改进,不仅避免了在养殖过程中某些性状的衰退现象,而且还使性状获得了不断地改进。家系建立及选育的成功很大程度上取决于选配组亲本的选择,如亲本性状互补,亲缘关系及地理条件相距较远等,作为选配亲本的原则。本研究选用胭脂鱼微卫星标记辅助进行家系亲本的选配,通过微卫星标记揭示胭脂鱼亲本个体之间的遗传差异,选择个体遗传距离大于 0.2、0.02-0.2 和小于 0.02,并且处于不同聚类分支的亲本建立家系 56 个。

4.3 微卫星辅助胭脂鱼家系选育下一步计划

微卫星分子标记辅助进行家系的建立及选育,从基因组水平上评估了亲本个体的遗传差异,最大限度地避免了近亲繁育,对现有种质资源的遗传改良和保护具有重要意义。本研究基于家系亲本间的亲缘关系遗传距离指导胭脂鱼全人工繁殖,避免近亲繁殖,目前只停留在选育阶段,后面可以通过子代的生长、遗传结构以及遗传分化等方面评估微卫星辅助家系选育的效果,通过数代的选育达到对现有良种进行遗传改良的目的,证实微卫星标记指导亲本选配能够大幅度地避免近交衰退、加快家系选育。

第七章 胭脂鱼增殖放流效果评估

1 前言

自 20 世纪 80 年代以来,通过向长江放流胭脂鱼鱼种,以增加其长江中的野生资源。据统计,2011 年-2013 年间,在四川宜宾江段和重庆万州江段放流胭脂鱼 8 万余尾(2011 年和 2012 年各 2 万余尾,2013 年 4 万余尾),其体长范围在 10cm-50cm 之间。以该物种目前所处的环境和资源量来看,以人工增殖放流的方式增加其在长江中的资源量可能是避免其资源进一步减少、或资源量较快的恢复有效的途径(Song et al, 2007)。

放流效果评估普遍采用的是统计标志回捕率,既根据捕获标志个体数在放流群体的比例估算放流群体的回捕率,目前对胭脂鱼的标志主要有用茜素络合物和盐酸四环素溶液浸泡胭脂鱼仔、稚鱼对耳石标记(付自东等, 2005),或者采用可见植入荧光标记(VIE)和编码金属标(CWT)(杨晓鸽等, 2013),这些方法存在操作繁琐,费用昂贵,对鱼体有伤害,且标志容易脱落,从而不易区分放流和野生个体(李伟亚, 2012),胭脂鱼增殖放流效果目前还没有准确评估的手段和方法。此外,对于增殖放流效果的评估往往在放流个体进入渔业阶段后就停止了,而无法得到完全的评估结果,缺乏对野生群体遗传多样性和生态系统平衡的负面影响等方面的评价内容(梁维波和于深礼, 2007)。微卫星分子标记符合孟德尔遗传规律,多态性高且为共显性遗传,是一种极具应用价值的遗传分子标记,利用微卫星分子标记位点的多态性,以多个微卫星位点的在群体中的等位基因的频率为基础,计算排除率来进行亲子鉴定和谱系鉴定(吴继法和吴登俊, 2001; Abigail et al, 2012),近年来在濒危动物种群特别是保护遗传学上得到越来越多的应用(Raquel et al, 2012; Rotheray et al, 2012)。如微卫星遗传多样性检测(Hulak et al, 2010)、个体/家系溯源(Borrell et al, 2011; Arabnezhad et al, 2011)、遗传图谱构建(Ruan et al, 2010)等。

子代等位基因只会来源于父本和母本,每对繁殖的父母本的后代均会携带一定的基因座既 DNA 分子指纹,且该分子指纹会随着个体维系一生并且用于区别个体或家系。依据分子指纹的特异性,以亲本基因型为参照,便可从混合群体中精确的识别出该家系的后代,即亲子鉴定技术。利用微卫星标记进行亲子关系鉴

定,能准确区分人工增殖放流鱼和长江野生鱼,是评估增殖放流效果的一种可行方法,且标记无需任何形式的物理标志或者是对鱼体有伤害如剪尾处理等,并且终生存在而不影响鱼类正常生活史。通过基因组 DNA 获取放流个体和亲本的遗传信息,便可对增殖放流效果进行评估和追踪。因此,本研究利用微卫星标记依据胭脂鱼亲子鉴定技术判定亲缘关系,从而估算人工增殖放流胭脂鱼对长江胭脂鱼的贡献率,对增殖放流效果进行评估,另外一方面,通过对比胭脂鱼养殖场样本和长江样本的遗传结构和遗传分化,来评估放流胭脂鱼是否会对长江胭脂鱼遗传产生影响。

2 材料和方法

2.1 实验材料鱼

2011 年~2013 年胭脂鱼繁殖期间,采集 5 个胭脂鱼的养殖场所有的繁殖亲鱼 149 尾,其部分后代用于人工增殖放流,其中重庆市万州区水产研究所 85 尾,四川省水产研究所(宜宾)14 尾,宜宾珍稀濒危水生保护动物研究所 13 尾,宜昌三江渔业有限公司 9 尾,武汉水产引种中心 28 尾。另外,2011 年 2 月~2013 年 9 月,从长江中上游各个江段采集野外胭脂鱼 65 尾作为混合子代群体,长江干流 13 个采样点 2011 年 26 尾(宜宾 9 尾、南溪 3 尾、巴东 2 尾、万州 5 尾、武汉 6 尾、合江 1 尾),2012 年 16 尾(合江 11 尾、巴东 1 尾、宜昌 4 尾),2013 年 23 尾(宜宾 1 尾、南溪 1 尾、泸州 6 尾、弥陀 13 尾、江津 2 尾)3 年共采集 65 尾胭脂鱼鳍条样本(图 7.1)。

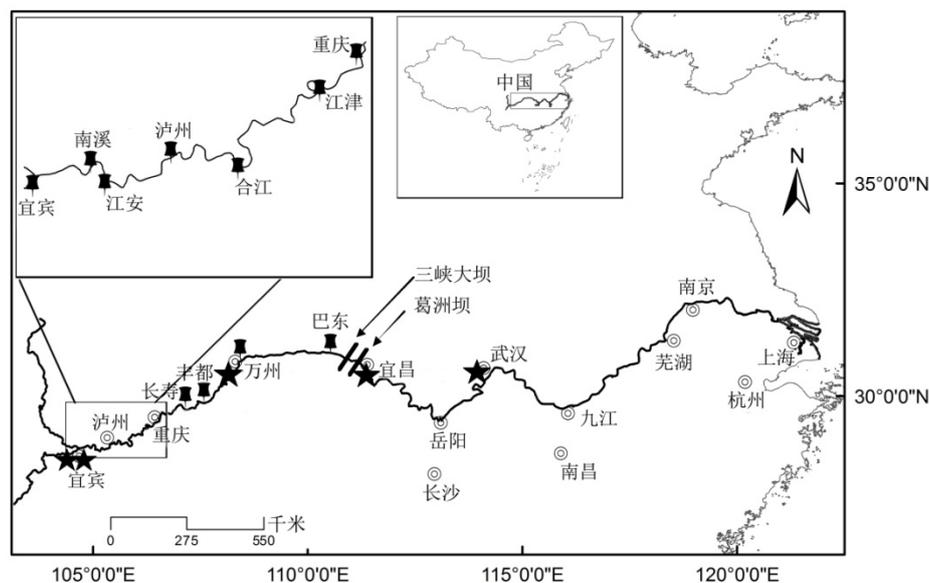


图 7.1 胭脂鱼采样点分布图

Fig 7.1 Map of the sampling sites of *Myxocyprinus asiaticus*

★ : 胭脂鱼养殖场位置; ■: 胭脂鱼长江采样点

★ : The position of the Chinese sucker farm; ■: the monitoring sites of Chinese sucker in the Yangtze River

2.2 基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增和测序

所有采集样本均剪取鳍条并用无水乙醇保存备用, DNA 提取采用经典的酚氯法 (Sambrook and Russell, 2001), 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后稀释到约 100 ng/uL 用于 PCR 扩增。利用 11 对多态性高的胭脂鱼微卫星标记 (Cheng et al, 2013: Mas3, Mas11, Mas13, Mas15, Mas21, Mas22, Mas23; Peng et al, 2013: M5, M11, M23, M46) 合成荧光引物 (FAM 和 HEX), 在各自特定的退火温度下进行 PCR 扩增, PCR 扩增体系和反应程序参照李小芳等 (2012) 的优化体系。PCR 产物经自动测序仪 ABI Prism3730 xl (Rox-500 standard) 测序并在软件 GENEMAPPER v. 4.0 (Sourav and Lior, 2006) 读取等位基因大小。

2.3 亲子关系鉴定及增殖放流效果评估

利用软件 Cervus 2.0 (Kalinowski et al, 2007) 分析各个基因座上的等位基因频率, 观测杂合度 H_O 和期望杂合度 H_E , 多态信息含量 PIC 以及非亲排除率

(NEP) 和累计非亲权排除率 (CEP)，检测微卫星位点是否符合 Hardy-Weinberg 平衡及各位点无效等位基因频率，再以父母本双盲建模 (simulation) 模拟运行 10000 次得到 Delta 分布值，以每个候选父母的 LOD(The Nature log of The Overall Likelihood Ratio) 值进行亲权鉴定分析 (Marshall et al, 1998)。

分子标记对增殖放流效果评估 (胭脂鱼养殖群体和长江群体遗传结构) 软件使用参照第五章 2.3。

3 结果

3.1 微卫星位点多态性

11 个微卫星标记分析检测得到 140 个等位基因。其中等位基因数最少的为座位 Mas23 和 Mas11，均只有 5 个等位基因；最多的为座位 M46，检测到 21 个等位基因 (如表 7.1)，其中座位 M23 和座位 M46 的微卫星测序图如图 7.2。其观测杂合度 0.519~0.906 (平均值为 0.771)，期望杂合度 0.469~0.894 (平均值为 0.759)，多态性信息含量为 0.392~0.882 (平均值为 0.726)，另外座位 Mas22、M5、M11 偏离 Hardy-Weinberg 指数，座位 Mas23 显著偏离。微卫星标记主要多态性参数见表 7.1，非亲排除率 (NEP) 和累积非亲权排除率 (CEP) 见表 7.2。

表 7.1 本研究所用的 11 个微卫星引物的主要多态性参数和 Hardy-Weinberg 检测结果

Table 7.1 Main polymorphic parameters for the 11 microsatellite loci and Hardy-Weinberg applied in this study

基因座	等位基因数	观测杂合度	期望杂合度	多态信息含量	Hardy-Weinberg 检测
Locus	K	H _O	H _E	PIC	HW
Mas22	7	0.519	0.562	0.519	*
Mas23	5	0.636	0.469	0.392	***
Mas21	14	0.860	0.828	0.806	NS
Mas3	12	0.832	0.825	0.801	NS
Mas11	5	0.654	0.640	0.569	NS
Mas13	15	0.906	0.893	0.881	NS
Mas15	12	0.833	0.819	0.798	NS
M5	16	0.794	0.746	0.709	*

M11	17	0.762	0.831	0.811	*
M23	16	0.808	0.838	0.816	NS
M46	21	0.874	0.894	0.882	NS
平均	12.73	0.771	0.759	0.726	

*: 偏离 Hardy-Weinberg 平衡; ***: 显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡

*: means deviation from Hardy-Weinberg equilibrium; ***: means significant deviation Hardy-Weinberg equilibrium

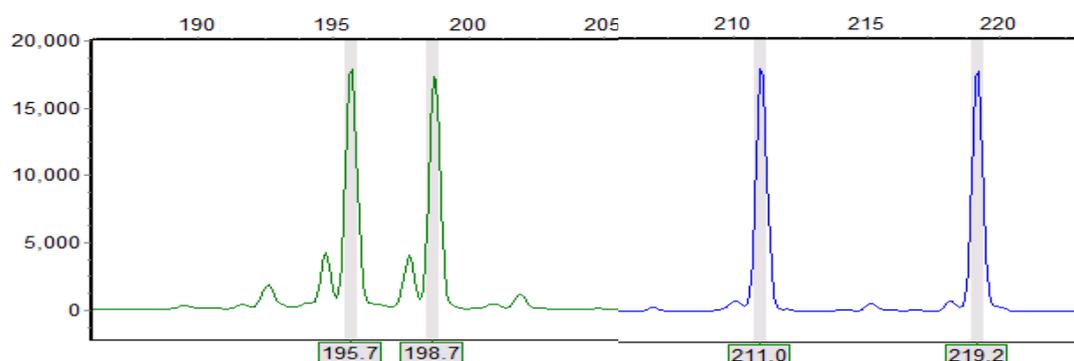


图 7.2 胭脂鱼微卫星座位 M23 (绿色) 和 M46 (蓝色) 基因分型结果

Fig 7.2 Genotype of the microsatellite loci M23 (green) and M46 (blue) in Chinese sucker

表 7.2 非亲排除率 (NEP) 和累积非亲权排除率 (CEP)

Table 7.2 Non-exclusion probability (NEP) and Combined non-exclusion probability (CEP)

基因座	GenBank	无效等位基因频率	非亲排除率	累积亲权排除率
Locus	登录号	F(Null)	NEP	CEP
M46	KC012966	0.01	0.356	
Mas13	JX855149	-0.0087	0.363	0.589772
M23	KC012959	0.0152	0.490	0.790784
M11	KC012954	0.041	0.494	0.894137
Mas21	JX855157	-0.0237	0.511	0.948233
Mas15	JX855151	-0.0147	0.517	0.974996
Mas3	JX855139	-0.0039	0.519	0.987973
M5	KC012952	-0.0389	0.641	0.995682
Mas11	JX855147	-0.0109	0.785	0.999072
Mas22	JX855154	0.0296	0.829	0.999841
Mas23	JX855158	-0.1592	0.890	0.999983

3.2 亲子关系鉴定结果

通过 Cervus 2.0 软件对长江干游中上游采集的 65 尾胭脂鱼与 149 尾候选亲本进行亲子关系分析，结果显示，11 个微卫星座位累计排除率为 99.9983%，共有 39 尾在置信区间（95%）LOD 值大于零（数据未列出）。其中 28 尾中有 1 个微卫星座位与候选亲本不匹配，只有 11 尾子代个体与第一候选亲本 11 个基因座均没有错配座位（表 7.3），因此，可以确定 11 尾子代胭脂鱼来自 149 尾候选亲本。

表 7.3 于长江中上游采集的 11 尾胭脂鱼亲子鉴定结果

Table 7.3 Paternity test of 11 Chinese suckers collected from the Yangtze River

自然群体	采集时间	候选亲本	错配座位数	似然率对数值	Delta 值	自信度
Offspring	Sample time	Candidate mother	Pair loci mismatching	Pair LOD score	Pair top LOD	Pair confidence
YZ57	2011	YB2	0	8.56	8.56E+00	*
YZ11	2012	SC13	0	8.34	8.34E+00	*
YZ8	2012	SC2	0	8.20	8.20E+00	*
YZ27	2013	SC13	0	7.94	7.94E+00	*
YZ30	2013	SC2	0	6.96	6.96E+00	*
YZ51	2011	YB6	0	6.49	6.49E+00	*
YZ7	2011	WZ22	0	5.66	5.66E+00	*
YZ44	2013	SC2	0	5.65	5.65E+00	*
YZ12	2012	WZ70	0	5.49	5.49E+00	*
YZ4	2011	WZ70	0	4.62	4.62E+00	*
YZ48	2013	WZ82	0	3.57	3.57E+00	*

YB: 宜宾珍稀濒危水生保护动物研究所; **WZ:** 重庆市万州区水产研究所; **SC:** 四川省水产研究所 (宜宾); **WH:** 武汉水产引种中心; **YC:** 宜昌三江渔业有限公司

YB: Yibin Rare Aquatic Animal Research Institute; **WZ:** Wanzhou Fisheries Research Institute; **SC:** Sichuan Fisheries Research Institute (Yibin); **WH:** Wuhan Aquatic Restocking Center; **YC:** Yichang Sanjiang Fisheries Co, Ltd

3.3 增殖放流效果贡献率评估

在采集的 65 尾长江胭脂鱼样本中, 确定 11 尾来自养殖群体的后代, 占总采集样本的 16.92% (表 7.4), 其中 2011 年 26 尾样本中有 4 尾来自万州水产研究所 (2 尾) 和宜宾珍稀水生动物保护研究所 (2 尾) 繁殖亲本后代, 占当年采集样本 15.39% (表 7.4); 2012 年 16 尾样本中有 3 尾来自万州水产研究所 (1 尾) 和四川水产研究所的繁殖后代 (2 尾), 占当年采集样本 18.75% (表 7.4); 2013 年 23 尾样本中有 4 尾来自万州水产研究所 (1 尾) 和四川水产研究所的繁殖后代 (3 尾), 占当年采集样本 17.39% (表 7.4)。

表 7.4 2011 年-2013 年胭脂鱼人工增殖放流贡献率评估

Table 7.4 The release effect of Chinese sucker from 2011 to 2013

采集年份	采集样本数	养殖场亲本后代个数	贡献率
Sample year	The number of samples	The number of offspring from farm	Contribution
2011	26	4	15.39%
2012	16	3	18.75%
2013	23	4	17.39%
总计	65	11	16.92%

3.4 增殖放流对野生群体的遗传影响

利用线粒体 DNA (d-loop 和 cyt-b) 和微卫星标记对胭脂鱼养殖场群体和长江群体遗传多样性和遗传分化比较发现, 无论是线粒体 DNA 标记还是微卫星标记显示胭脂鱼养殖场群体和长江群体个遗传多样性指数却别不大 (表 7.5 和表 7.6), 线粒体 DNA 分子变异分析显示两个群体间存在一定的遗传分化, 但 92.1% 的变异来自个体间 (表 7.7); 微卫星标记分子变异分析显示两个群体间不存在遗传分化 (表 7.7)。

表 7.5 线粒体 DNA 标记分析胭脂鱼养殖场和长江群体遗传多样性

Table 7.5 Genetic diversity analysis for Chinese sucker in cultured populations and Yangtze River population based on Mitochondria DNA

	养殖场群体 Cultured population	长江群体 Yangtze River population
样本数	149	50
多态位点数	86	80
单倍体个数	28	17
单倍体多样性指数	0.905	0.844
核苷酸多样性指数	0.01332	0.0079

表 7.6 微卫星标记分析胭脂鱼养殖场和长江群体遗传多样性

Table 7.6 Genetic diversity analysis for Chinese sucker in cultured populations and Yangtze River population based on microsatellite

	养殖场群体 Cultured population	长江群体 Yangtze River population
样本数	149	50
等位基因数	10.8	10.0
观测杂合度	0.753	0.738
期望杂合度	0.755	0.744
多态信息含量	1.729	1.704
Hardy-Weinberg 检测		

表 7.7 胭脂鱼群体遗传变异方差分析 (AMOVA)

Table 7.7 Results of analysis of molecular variance testing genetic structure (AMOVA) of Chinese sucker

变异来源 Source of variation	自由度 d.f.	变异百分比 Percentage of variation	P 值 P-value
群体间	1	7.99	0.00391
群体内	197	92.1	

群体间	1	2.78
群体内	213	92.22

4 讨论

4.1 亲子鉴定中对微卫星座位的选择

等位基因数越多，多态性越丰富，杂合度越高表明该遗传标记在个体识别中的应用价值也就越大。多态信息含量（PIC）是衡量位点多态性的重要指标，一般认为当 $0.25 < \text{PIC} < 0.5$ 为中度多态， $\text{PIC} > 0.5$ 即为高度多态（Botstein et al, 1980），11 个微卫星标记除座位 Mas23 为中度多态外其他所有的座位均表现为高度多态（表 1），且平均观测杂合度和期望杂合度均在 0.75 以上，说明这 10 个微卫星座位能够提供丰富的遗传信息，可作为有效的遗传标记用于胭脂鱼亲子鉴定分析。

非亲排除率（NEP）与 PIC 值成反比关系，PIC 值越高，NEP 值越低，这与其他学者的研究也是一致的，既非亲排除率基于微卫星座位的多态性（周磊等，2011）。累积非亲排除率（CEP）亲子鉴定的重要标准，一般以达到 95% 为最低标准（李桐茂，1987）。本文中当座位数达到 6 个时，累积排除概率（CEP）即达到了 97.50%，座位数达到 9 个时，CEP 值为 99.91%，座位数为 10 时，CEP 为 99.98%，11 个座位的排除率达到了 99.9983%（表 7.2），进一步确定了这 11 个座位用于亲子鉴定的准确性。

4.2 亲子鉴定在胭脂鱼增殖放流效果评估中的应用

确定存在亲子关系必须同时满足以下 3 个条件，LOD 值大于零、所有的座位完全匹配（即每一个座位中，亲代和子代至少共享一个等位基因）以及在 95% 置信区间下显著。通过软件的模拟分析，65 个子代个体中（长江中上游捕获样本）39 个 LOD 值大于零，但只有其中 11 个在 95% 置信区间内没有错配座位，另外 28 尾与候选亲本均存在 1 个错配座位，判定该 28 尾个体与候选亲本不存在亲子关系。因此，长江中上游捕获的 65 尾胭脂鱼中有 11 尾属于养殖场繁殖亲鱼的子代，是人工增殖放流胭脂鱼，占捕获样本总数的 16.92%，据此我们可以推

算放流胭脂鱼对长江中上游胭脂鱼的贡献量为 16.92%。跟据长江中上游各江段监测点渔民样本采集统计,已经很少能捕获较大个体的野生胭脂鱼,渔获物一般为 15~25 cm 的 1 龄鱼,有些渔获物上还能发现显著的荧光标志或者挂牌标志,且放流后较放流前捕获量显著增加,可能原因是刚放流个体适应能力偏弱,并且较为集中,容易被渔民捕获。

4.3 胭脂鱼种质资源保护

据统计,1958 年胭脂鱼占岷江渔获量的 13%以上;20 世纪 70 年代,胭脂鱼资源量已经开始明显下降,只占到 2%左右;20 世纪 80 年代,胭脂鱼占长江上游渔获物已经不足 1%,捕捞记录只能以尾为单位计算(朱滨等,2009)。65 尾长江胭脂鱼样本来自 13 个监测点 2011 年 2 月~2013 年 9 月的渔获物,样本量少且不易获得。人工增殖放流是目前世界各国增殖渔业资源的普遍方法,也是恢复和重建濒危物种的重要手段。增殖放流的目的除了需要不断增加放流物种的种群数量,还需保证物种自然的野生种质资源遗传特征不被干扰,不影响放流水域的自然生态系统。因此我们应该严格执行国家和省市有关繁殖和保护渔业资源的法律、法规,科学加大人工增殖放流胭脂鱼的力度,进一步做好放流管理工作。

在生态系统方面同时也要避免长江野生胭脂鱼的遗传结构不被改变,我们利用线粒体 DNA 和微卫星两种分子标记对长江增殖放流胭脂鱼和野生胭脂鱼遗传多样性分析,尽管目前人工增殖放流胭脂鱼还没有对长江胭脂鱼遗传结构产生显著影响,但考虑到当前长江胭脂鱼资源量较少,以及亲子鉴定分析中显示增殖放流对长江胭脂鱼资源具有较高的贡献量,今后应加强对繁殖场人工繁殖行为和增殖放流活动进行遗传监测和管理,建立人工繁殖群体的遗传档案,科学有序地开展人工繁殖和增殖放流,以保证长江胭脂鱼种质资源得到充分保护和可持续利用。

结 论

本文利用分子标记对胭脂鱼种群遗传多样性和家系管理进行研究,主要有以下结论:

1.开发了 23 对新的多态性高的胭脂鱼微卫星标记,用于胭脂鱼或近缘物种亲子鉴定、遗传多样性分析、家系管理和增殖放流效果评估。

2.利用微卫星标记建立了胭脂鱼亲子鉴定技术及其试剂盒,17 个胭脂鱼微卫星位点累积非亲排除率为 99.99988%,所建立的亲子鉴定体系同样也可用于指导家系管理和人工增殖放流效果评估。

3.分别利用线粒体 DNA (d-loop 和 cyt-b) 和微卫星标记对养殖场 5 个种群和长江采集群体遗传多样性和遗传分化进行研究,结果发现 6 个种群被分为 3 个进化单元,长江种群为一个单独的进化单元,四川养殖种群为一个单独的进化单元,与养殖场内胭脂鱼存在遗传分化;四川、宜宾和宜昌养殖群体在二段突变模型(T.P.M.)检测中发现存在“瓶颈效应”并达到显著水平。通过与 Sun 等(2004)长江 4 个野生群体比较发现,30%的变异位点数和单倍体型都消失,并且由于繁殖期间选择性的亲本交换和近亲繁殖导致 Clusters B 进化单元的消失以及其他稀有单倍体型的消失。

4.利用微卫星标记建立了 5 个养殖场内所有繁殖亲鱼 149 尾在 11 个基因座上所有座位谱系档案,评价了所有个体间的遗传分化关系与亲缘关系,包括家系间各种遗传距离、家系内个体间的遗传关系及亲缘系数,并利用 UPGMA 算法绘制出不同养殖场胭脂鱼亲本系统发育图,建立繁育家系 56 个。

5.利用 11 对多态性微卫星标记对胭脂鱼增殖放流效果评估。并且在长江采集的 65 个样本中,11 个样本与养殖场内繁殖亲本确定存在亲子关系,据此我们确定这 11 尾为增殖放流的胭脂鱼,并由此推算增殖放流的胭脂鱼对长江野生群体的贡献量为 16.92%;线粒体 DNA 和微卫星两种分子标记对长江增殖放流胭脂鱼和野生胭脂鱼遗传多样性分析发现,人工增殖放流胭脂鱼并没有对长江胭脂鱼遗传结构产生影响,人工增殖放流胭脂鱼是避免其野生资源进一步减少、或资源量较快恢复的有效途径,能够实现胭脂鱼增殖与保护。

参考文献

1. 陈焜慈, 邬国民, 李恒颂. 胭脂鱼人工繁殖技术 [J]. 广东科技, 1999, 10: 20 - 21
2. 陈松林, 杜民, 杨景峰, 胡乔木, 徐营, 翟介明. 半滑舌鳎家系建立及其生长和抗病性能测定 [J]. 水产学报, 2010, 12: 1789 - 1794
3. 陈兆. 胭脂鱼的生物学特性及饲养技术 [J]. 渔业致富指南, 2005, (2): 40 - 43
4. 初冠因. 许氏平鲈 (*Sebastes schlegelii*) 微卫星标记筛选及遗传连锁图谱构建 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012
5. 邓景耀, 叶昌臣. 渔业资源学 [M]. 重庆: 重庆出版社, 2001: 306 - 307
6. 邓景耀, 庄志猛. 渤海对虾补充量变动原因的分析及对策研究 [J]. 中国水产科学, 2001, 7 (4): 125 - 128
7. 邓中群, 余志堂, 赵燕等. 三峡水利枢纽对长江白鲟和胭脂鱼影响的评价及资源保护的研究. 长江三峡工程对生态与环境的影响及其对策研究论文集 [C]. 北京: 科学出版社, 1987: 42 - 52
8. 董世瑞. 形态标记与微卫星标记在中国对虾遗传选育中的应用研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006
9. 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物DNA标记辅助育种 [M]. 北京: 科学出版社, 2001
10. 冯俊伟, 郑劲松, 周钊, 林刚, 王丁, 郑邦友, 蒋文华. 卫星分型法应用于豨养繁殖长江江豚的父权鉴定 [J]. 现代生物医学进展, 2009, 9 (21): 4015 - 4020
11. 付自东, 李静, 岳碧, 等. 用荧光物质浸泡标记胭脂鱼仔、稚鱼耳石 [J]. 动物学杂志, 2005, 40 (4): 60 - 65
12. 高一龙, 张汇东, 缪勤, 温海, 马大君, 谢庄. 微卫星技术在犬亲子鉴定中的应用一例 [J]. 家畜生态学报, 2009, 30 (06): 14 - 18
13. 管峰, 杨利国, 贾名成, 等. 用微卫星标记技术对动物进行亲子鉴定 [J]. 黑

- 龙江畜牧兽医, 2003, 4: 43 - 44
14. 管峰, 杨利国, 贾名成, 陆汉稀, 金穗华. 用微卫星标记技术对动物进行亲子鉴定 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2003, 38 (04): 43 - 44
 15. 桂建芳. 脊椎动物线粒体 DNA 的进化遗传学 [J]. 动物学杂志, 1990, 25 (1): 50 - 55
 16. 韩春梅, 张嘉保, 高庆华. DNA 多态在动物亲子鉴定中的应用 [J]. 草食家畜, 2004, 122: 11~13
 17. 胡隐昌. 胭脂鱼的主要生物学 [J]. 珠江水产, 2001, (2): 33 - 35
 18. 湖北省水生生物研究所. 长江鱼类 [M]. 北京: 科学出版社, 1976, 150 - 152
 19. 湖南省水产科学研究所. 湖南鱼类志 [M]. 长沙, 湖南科学技术出版社, 1980: 24 - 25
 20. 黄种持, 黄柳婷, 林学文, 凌伟专. 黑脊倒刺鲃线粒体 DNA 多样性分析 [J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38 (2): 259 - 262
 21. 蒋文华, 于道平. 铜陵江段胭脂鱼资源现状与恢复的研究 [J]. 特产研究, 2003, 25 (3): 31 - 33
 22. 金菊. 澜沧江老挝纹胸鲃遗传结构分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011
 23. 黎裕, 贾继增, 王天宇. 分子标记的种类及其发展 [J]. 生物技术通报, 1999, 15 (4): 19 - 22
 24. 李年文. 胭脂鱼的生物学特性及人工饲养技术 (上) [J]. 科学养鱼, 1999a, (7): 12 - 13
 25. 李年文. 胭脂鱼的生物学特性及人工饲养技术 (下) [J]. 科学养鱼, 1999b, (8): 11 - 12
 26. 李琪. 海洋贝类微卫星 DNA 标记的开发及其在遗传学研究中的应用 [J]. 中国水产科学, 2006, 13 (3): 502 - 509
 27. 李树深, 王蕊芳, 刘光佐, 王应祥, 李崇云. 中国胭脂鱼的核型研究 [J]. 动物学研究, 1983, 4: 182 - 183
 28. 李桐茂. 人类血型遗传学 [M]. 上海: 科学出版社, 1987: 330 - 346
 29. 李伟亚. 利用分子标记评估中国对虾放流效果研究 [D]. 上海: 上海海洋大

- 学, 2012. 1 - 47
30. 李小芳, 程晓凤, 王生等. 鲢微卫星标记的荧光多重 PCR 体系建立及其应用 [J]. 农业生物技术学报, 2012, 20 (7): 822 - 830
31. 李正秋, 张奇亚. 胭脂鱼弹状病毒包涵体在培养细胞中的形成 [J]. 中国兽医学报, 2001, 21 (1): 38 - 41
32. 梁宏伟, 邹桂伟, 罗相忠, 王长忠, 呼光富, 李忠. 3 种中国鲤 mtDNA D-Loop 序列多态性与系统进化研究 [J]. 西北农林科技大学学报, 2009, 3 (37): 55 - 59
33. 梁维波, 于深礼. 辽宁近海渔场海蜇增殖放流情况回顾与发展的探讨 [J]. 中国水产, 2007, 380 (7): 72 - 74
34. 林郁葱. 胭脂鱼幼鱼对赖氨酸和蛋氨酸的最适需要量 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011
35. 刘静霞, 周莉, 赵振山, 桂建芳. 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, 02: 97 - 105
36. 刘猛, 危起伟, 杜浩, 付子英, 陈其才. 胭脂鱼听觉阈值研究 [J]. 中国水产科学, 2013, 20 (4): 750 - 757
37. 骆慧. 达氏鲟微卫星分离及其亲子鉴定研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013
38. 倪小伟. 浙江扬子鳄迁地保护种群的谱系构建和放归野外奠基种群的筛选 [D]. 浙江: 浙江大学, 2012
39. 彭薇. 仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 微卫星标记的开发及应用 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011
40. 饶发祥. 胭脂鱼的外部形态与生物学特性及其资源保护 [J]. 江西水产科技, 1993, (2): 31 - 34
41. 任轶. 应用微卫星 DNA 标记进行秦岭川金丝猴亲子鉴定和遗传多样性研究 [D]. 重庆: 西北大学, 2007
42. 阮红梅, 李正秋, 张奇亚. 胭脂鱼弹状病毒对鲤科鱼类感染性的测定 [J]. 水生生物学报, 2002, 26 (5): 555 - 559
43. 石小涛, 王博, 王雪, 陈求稳, 白艳勤, 高柱, 涂志英, 刘德富. 胭脂鱼早期发育过程中集群行为的形成 [J]. 水产学报, 2013, 37 (5): 705 - 710

44. 申雪艳. 孔雀鱼微卫星 DNA 标记的研制及其遗传连锁图谱的构建 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007
45. 四川省长江水产资源调查组. 四川省长江水产资源调查资料汇编 [M]. 湖北沙市. 1975: 14
46. 孙玉华, 刘思阳, 彭智等. 中国胭脂鱼种群的遗传分析 [J]. 水生生物学报, 2003, 27 (3): 248 - 252.
47. 孙玉华, 谢从新, 刘思阳. 亚口鱼科鱼类核 DNA 18S-ITS1-5. 8s 序列比较分析 [J]. 水生生物学报, 2006, 30 (3): 367 - 370
48. 孙玉华. 亚口鱼科鱼类分子系统学研究 [J]. 水利渔业, 2006, 26 (4): 1 - 2
49. 田飞焱, 欧阳敏, 花麒, 等. 胭脂鱼致病性嗜水气单胞菌的分离鉴定及药物敏感试验 [J]. 生物灾害科学, 2013, 14 (4): 408 - 413
50. 童金苟, 吴清江. 三个鲤品种线粒体基因片段保守性 [J]. 水生生物学报, 2001, 25 (1): 54 - 60
51. 万松良. 胭脂鱼的生物学特性及养殖技术 [J]. 农村养殖技术, 2004, (1): 20 - 22
52. 汪登强, 危起伟, 王朝明, 等. 13 种鲟形目鱼类线粒体 DNA 的 PCR-RFLP 分析 [J]. 中国水产科学, 2005, 12 (04): 383 - 389
53. 汪松, 乐佩琦, 陈宜瑜. 中国濒危动物红皮书-鱼类[M]. 北京: 科学出版社, 1998
54. 王凯, 韦善忠, 罗江, 等. DNA 分子标记及其进展 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2003, 15 (1): 39 - 43
55. 危文亮, 赵应忠. 分子标记在作物育种中的应用 [J]. 生物技术通报, 2000, 16 (2): 12 - 16
56. 吴继法, 吴登俊. 微卫星 DNA 在家畜亲子鉴定中的应用及研究进展 [J]. 国外畜牧科技, 2001, 28 (5): 28 - 32
57. 吴艳, 侯水生, 肖红卫, 刘小林. 微卫星 DNA 在动物亲子鉴定中的应用及研究进展 [J]. 辽宁畜牧兽医, 2004, 20: 38 - 39
58. 伍献文, 杨干荣, 乐佩琦, 等. 中国经济动物志—淡水鱼类(第二版)[M]. 北

- 京：科学出版社，1979：32 - 33
59. 肖武汉，张亚平. 银鲴自然群体线粒体 DNA 的遗传分化 [J]. 水生生物学报，2000，24 (1)：1 - 10
60. 熊全沫，夏盛林. 中国胭脂鱼同工酶的研究 [J]. 动物学报，1985，1：20 - 27
61. 闫路娜，张德兴. 种群微卫星 DNA 分析中样本量对各种遗传多样性度量指标的影响 [J]. 动物学报，2004，50 (2)：279 - 290
62. 晏鹏，吴孝兵，史燕，等. 微卫星多态性检测技术及其在保护遗传学中的应用 [J]. 应用生态学报，2003，14 (3)：461 - 464
63. 杨国梁，王军毅，孔杰，罗坤，杨翠华，宫金华，张宇飞，高强. 罗氏沼虾大规模家系构建与培育技术研究 [J]. 海洋水产研究，2008，3：62 - 66
64. 杨晓鸽，危起伟，杜浩等. 可见植入荧光标记和编码金属标对达乌尔鳊标效果的初步研究 [J]. 淡水渔业，2013，43 (2)：43 - 47
65. 杨星，杨军峰，汤明亮. 长江中国胭脂鱼群体的遗传分化 [J]. 武汉大学学报 (理学版)，2006. 52 (4)：503 - 507.
66. 杨钟，史方，阙延福，熊美华，朱滨，徐念. 长江胭脂鱼人工放流子一代遗传多样性初步研究 [J]. 水生态学杂志，2010，5：17 - 20
67. 袁勇超. 胭脂鱼适宜蛋白能量水平、投喂水平和磷需要量及对植物蛋白源的利用研究 [D]. 武汉：华中农业大学，2011
68. 曾青兰，刘焕章. 大口胭脂鱼线粒体 DNA 控制区序列的研究 [J]. 湖北大学学报，2001，23 (3)：261 - 264
69. 曾岩，蒋志刚，韩更新. 偶蹄类动物的遗传多样性研究与技术比较 [J]. 兽类学报，2000，20 (3)：217 - 23
70. 张春光，赵亚辉，康景贵. 我国胭脂鱼资源现状及其资源恢复途径的探讨 [J]. 自然资源学报，2000，15 (2)：155 - 159
71. 张春雷，佟广香，匡友谊. 哲罗鱼微卫星亲子鉴定的应用 [J]. 动物学研究，2010，31(4)：395 - 400
72. 张航利，王海华，冯广鹏. 长江口中华绒螯蟹和中华鲟的增殖放流及其效果评估 [J]. 江西水产科技，2012，(3)：45 - 48

73. 张凯. 海洋凡纳滨对虾引进群体分子系谱构建及中国对虾分子标志家系放流效果评估 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013
74. 张丽丽, 万全, 程起群. 胭脂鱼细胞色素 b 基因序列测定及亚口鱼科系统进化分析 [J]. 淡水渔业, 2011, 41 (4): 55 - 60
75. 张四明, 邓怀, 晏勇, 汪登强, 吴清江. 中华鲟随机扩增多态性 DNA 及遗传多样性研究 [J]. 海洋与湖沼, 2000, 31 (01): 1 - 7
76. 张颂, 文华, 蒋明. 胭脂鱼仔鱼饵料及蛋白质和脂肪需求量的研究进展 [J]. 中国饲料, 2013, 10: 27 - 29
77. 张涛, 庄平章, 章龙珍, 张征, 刘鉴毅, Boyd Kynard. 胭脂鱼早期生活史行为发育 [J]. 中国水产科学, 2002, 9: 215 - 219
78. 张于光, 李迪强, 饶力群, 等. 东北虎微卫星 DNA 遗传标记的筛选及在亲子鉴定中的应用 [J]. 动物学报, 2003, 49 (1): 118 - 123
79. 张志和, 沈富军, 孙姗, Victor A. David, 张安居, Stephen J. O' Brien. 应用微卫星分型方法进行大熊猫父亲鉴定 [J]. 遗传, 2003, 25 (5): 504 - 510
80. 赵兴春, 季安全, 胡兰, 等. 法医 DNA 鉴定实验室质量控制和质量保证 [J]. 中国法医学杂志, 2002, 17 (1): 46 - 47
81. 郑凯迪, 冯波, 李云, 李英文. 胭脂鱼胰蛋白酶 cDNA 克隆以及不同蛋白含量日粮和饥饿对 mRNA 表达和酶活力的影响 [J]. 水生生物学报, 2012, 36 (1): 9 - 17
82. 郑敏, 罗玉萍. 真核生物基因组多态性分析的 DNA 指纹技术 [J]. 生物技术, 1999, 9 (3): 35 - 38
83. 周磊, 初芹, 刘林等. 利用微卫星和 SNP 标记信息进行奶牛亲子鉴定的模拟研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42 (2): 169 - 176.
84. 朱滨, 常剑波, 谭细畅, 虞功亮, 吴志强, 肖从学. 湖鲟微卫星 DNA 引物应用于中华鲟亲子关系分析的初步研究 [J]. 水生生物学报, 1999, 26 (6): 547 - 553
85. 朱滨, 郑海涛, 乔晔等. 长江流域淡水鱼类人工繁殖放流及其生态作用 [J]. 中国渔业经济, 2009, 2: 74 - 89

86. 朱雪莲, 王志勇, 陈明茹. 系统地理学的研究及其在鱼类上的应用 [J]. 浙江海洋学院学报, 2006, 25 (2): 183 - 191
87. 祝东梅, 杨坤, 王卫民, 宋文. 中国胭脂鱼的细胞遗传学分析 [J]. 中国水产科学, 2013, 20 (3): 682 - 688
88. 庄平. 胭脂鱼早期生活史行为发育 [J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 215 - 219
89. Abigail SG, Jacqueline MB, Stuart JC, et al. Parentage analysis in a managed free ranging population of southern white rhinoceros: genetic diversity, pedigrees and management. *Conserv Genet*, 2012, 13 (3): 811 - 822
90. Arabnezhad H, Bahar M, Pour A T. Evaluation of genetic relationships among Iranian pistachios using microsatellite markers developed from *Pistacia khinjuk* Stocks. *Scientia Horticulturae*, 2011(3) , 128: 249 - 254
91. Arkush KD, Giese AR, Mendonca HL, McBride AM, Marty GD, Hedrick PW. Resistance to three pathogens in the endangered winter-run Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): effects of inbreeding and major histocompatibility complex genotypes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2002, 59(6): 966 - 975
92. Avise JC, Arnold J, Ball RM, et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1987, 18(1): 489 - 522
93. Avise JC, Saunders NC. Hybridization and introgression among species of sunfish (*Lepomis*): analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers. *Genetics*, 1984, 108(1): 237 - 255
94. Bandelt H J, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 1999, 16(1): 37 - 48
95. Barton N H, Slatkin M. A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity*, 1986, 56(3): 409 - 415
96. Ben N A, Chaabane R, El-Faleh M, et al. Genetic diversity analysis of North Africa' s barley using SSR markers. *Journal of Genetic Engineering and*

- Biotechnology, 2012, 10(1): 13 - 21
97. Borrell Y J, Alvarez J, Blanco G, et al. A parentage study using microsatellite loci in a pilot project for aquaculture of the European anchovy *Engraulis encrasicolus* L. *Aquaculture*, 2011, 310(3): 305 - 311
98. Botstein D, White R L, Skolnik M et al. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, 1980, 32 (3): 314 - 331
99. Brown W M, George M, Wilson A C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979, 76(4): 1967 - 1971
100. Cheng W W, Wang D Q, Du H, et al. Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*). *Conserv Genet Resour*, 2013, 5(2): 375 - 377
101. Chen I S. The complete mitochondrial genome of Chinese sucker *Myxocyprinus asiaticus* (Cypriniformes, Catostomidae). *Mitochondrial DNA*, 2013, 24(6): 680 - 682
102. Cheng W W, Wang D Q, Du H et al. Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*). *Conserv Genet Resour*. 2013, 5(2): 375 - 377
103. Chu Z J, Gong Y, Lin Y C, et al. Optimal dietary methionine requirement of juvenile Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. *Aquaculture Nutrition*, 2014
104. Clayton DA. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 1982, 28(4): 693 - 709.
105. Cornuet J M, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 1996, 144(4): 2001 - 2014
106. Crooijmans R PMA, Bierbooms VAF, Komen J, et al. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.), 1997, *Animal Genetics*, 28: 129 - 134
107. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin(version 3. 0): An integrated software

- package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, 1: 47 - 50
108. Falush D, Stephens M, Pritchard J K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7(4): 574 - 578
109. Falush D, Wirth T, Linz B, et al. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*, 2003, 299(5612): 1582 - 1585
110. Fransisco JF. Further studies on type A and type B rat mtDNAs: cleavage maps and evidence for cytoplasmic inheritance in mammals. *Plasmid*, 1979, 2(3): 426 - 436.
111. Ganai M W, Young N D, Tanksley S D. Pulsed field gel electrophoresis and physical mapping of large DNA fragments in the Tm-2a region of chromosome 9 of tomato. *Mol Gen Genet*, 1989, 215(3): 395-400
112. Goff D J, Galvin K, Katz H et al. Identification of polymorphic simple sequence repeats in the genome of the zebrafish. *Genomics*, 1992, 14: 200 - 202
113. Guo S W, Thompson E A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 1992: 361 - 372
114. Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1982, 79(21): 6465 - 6469
115. Herbinger CM, Doyle RW, Pitman ER, Paquet D, Mesa KA, Morris DB, Wright JM, Cook D. DNA fingerprint based analysis of parental and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture*, 1995, 137(1): 245 - 256
116. Hulak M, Kaspar V, Kohlmann K, et al. Microsatellite based genetic diversity and differentiation of foreign common carp (*Cyprinus carpio*) strains farmed in the Czech Republic. *Aquaculture*, 2010, 298(3): 194 - 201
117. Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program

- CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment . *Mol Ecol*, 2007, 16(5): 1099 - 1106
- 118.Kashi Y, Lipkin E, Darvasi A, Nave A, Gruenbaum, Beckmann J S, Soller M. Parentage Identification in the Bovine Using “Deoxyribonucleic Acid Fingerprints”. *Journal of Dairy Science*, 1990, 73(11), 3306 - 3311
- 119.Kellogg KA, Market JA, Stauffer JR, Kocher TD. Microsatellite variation demonstrates multiple paternity in lekking cichlid fish from Lake Malawi, Africa. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 1995, 260(1357): 79 - 84
- 120.Kocher T D, Lee W J, Sobolewska H, et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics*, 1998, 148(3): 1225 - 1232
- 121.Lima PF, Ramos FN, Zucchi MI, et al. Development and characterization of microsatellite markers for *Psychotria tenuinervis* (Rubiaceae) , a shrub species from the Atlantic forest, and primers transferability from *Coffea*. *Conservation Genetics*, 2009, 10(6): 1883 - 1886
- 122.Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*; 1989, 44(3): 397 - 401
- 123.Liu F, Xia JH, Bai ZY, et al. High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis. *Aquaculture*, 2009, 297(1): 51 - 56
- 124.Li P, Zhang Y G, Peng Z G. Development of 34 new microsatellite markers for the endangered Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*) using 454 sequencing . *Conserv Genet Resour*, 2013, 5(2): 441 - 444
- 125.Lin Y, Gong Y, Yuan Y, et al. Dietary l - lysine requirement of juvenile Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. *Aquaculture Research*, 2013, 44(10): 1539 - 1549
- 126.Liu C X, Luo Z, Hu W, et al. Kinetics of Carnitine Palmitoyltransferase I (CPTI) in Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*) Change with its

- Development. *Lipids*, 2014, 49(2): 173 - 181
- 127.Liu C X, Luo Z, Tan X Y, et al. Ontogenetic development of the digestive system in agastric Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*, larvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2013, 44(3): 350 - 362.
- 128.Liu M, Wei Q W, Du H, et al. Ship noise - induced temporary hearing threshold shift in the Chinese sucker *Myxocyprinus asiaticus* (Bleeker, 1864). *Journal of Applied Ichthyology*, 2013, 29(6): 1416 - 1422
- 129.Luikart G, Cornuet J M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation biology*, 1998, 12(1): 228 - 237
- 130.Ma ZQ, Röder M, Sorrells ME. Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat. *Genome*, 1996, 39(1): 123 - 130
- 131.Marshall T, Slate J, Kruuk L et al. Statistical confidence for likelihood based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 1998, 7(5): 639 - 655
- 132.Maudet C, Miller C, Bassano B, et al. Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex [*Capra ibex* (ibex)]. *Molecular Ecology*, 2002, 11(3): 421 - 436
- 133.Nielsen D A, Virkkunen M, Lappalainen J, et al. A tryptophan hydroxylase gene marker for suicidality and alcoholism. *Archives of general psychiatry*, 1998, 55(7): 593 - 602
- 134.Pante MJR, Gjerde B, McMillan I. Effect of inbreeding on body weight at harvest in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 2001, 192(2-4): 201 - 211
- 135.Peakall R O D, Smouse P E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6(1): 288 - 295
- 136.Piry S, Alapetite A, Cornuet J M, et al. GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of heredity*, 2004,

- 95(6): 536 – 539
137. Patricia Szczys, Ian C. T. Nisbet, David B. Wingate. Conservation genetics of the Common Tern (*Sterna hirundo*) in the North Atlantic region; implications for the critically endangered population at Bermuda. *Conservation Genetics*, 2012, 13(4): 039 – 1043
138. Pickles RSA, Groombridge JJ, Rojas VDZ, et al. Cross-species characterisation of polymorphic microsatellite loci in the giant otter (*Pteronura brasiliensis*). *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9(1): 415 – 417
139. Rosenbaum HC, Egan MG. An effective method for isolating DNA from historical specimens of baleen. *Mol Ecol*, 1997, 6(7): 677 – 681
140. Rannala B, Mountain J L. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94(17): 9197 – 9201
141. Raquel G, Teresa A, Susana L, et al. Conservation genetics of the endangered Dorcas gazelle (*Gazella dorcas spp.*) in Northwestern Africa. *Conserv Genet*, 2012, 13(4): 1003 – 1015
142. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 3. 4): A population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Heredity*, 2003, 68: 248 – 249
143. Rotheray E L, Lepais O, Nater A, et al. Genetic variation and population decline of an endangered hoverfly *Blera fallax* (Diptera: Syrphidae). *Conserv Genet*, 2012, 13(5): 1283 – 1291
144. Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguer X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 2003, 19(18): 2496 – 2497
145. Ruan X H, Wang W J, Kong J, et al. Genetic linkage mapping of turbot (*Scophthalmus maximus L.*) using microsatellite markers and its application in QTL analysis. *Aquaculture*, 2010, 308(3): 89 – 100
146. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001

-
147. Sakamoto Y, Kaneda M, Terasaki O, et al. Direct imaging of the pores and cages of three-dimensional mesoporous materials. *Nature*, 2000, 408(6811): 449 - 453
148. Singh V K, Mangalam A K, Dwivedi S, et al. Primer premier: program for design of degenerate primers from a protein sequence. *Biotechniques*, 1998, 24(2): 318 - 319
149. Soltis D E, Haufler C H, Drrow D C, Gastony G J. Starch gel electrophoresis of ferns: a complication of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *American Fern Journal*. 1983, (73): 9 - 27
150. Song Z, He C, Fu Z, et al. Otolith thermal marking in larval Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. *Environmental biology of fishes*, 2008, 82(1): 1 - 7.
151. Sourav C J, Lior P. Reference based annotation with GeneMapper. *Genome Biology*, 2006, 7(4): R29
152. Sun Y, Liu S, Zhao G, et al. Genetic structure of Chinese sucker population *Myxocyprinus asiaticus* in the Yangtze River based on mitochondrial DNA marker. *Fisheries Science*, 2004, 70(3): 412 - 420
153. Takezaki N, Nei M, Tamura K. POPTREE2: Software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with Windows interface. *Molecular biology and evolution*, 2010, 27(4): 747 - 752
154. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 2011, 28(10): 2731 - 2739
155. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(16): 6463 - 6471
156. Thitaram C, Thongtip N, Somgird C, et al. Evaluation and selection of microsatellite markers for an identification and parentage test of Asian elephants (*Elephas maximus*). *Conservation genetics*, 2008, 9(4): 921 - 925
157. Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

- position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 1994, 22(22): 4673 - 4680
158. Tian F, Sun D, Zhang Y. Establishment of paternity testing system using microsatellite markers in Chinese Holstein. *Journal of Genetics and Genomics*, 2008, 35(5): 279 - 284
159. Van Oosterhout C, Weetman D, Hutchinson W F. Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6(1): 255 - 256
160. Wan Y, Zhou C, Ouyang S, et al. Genetic diversity analysis of mitochondrial DNA control region in artificially propagated Chinese sucker *Myxocyprinus asiaticus*. *Mitochondrial DNA*, 2014, (0): 1 - 6
161. Weir B S, Cockerham C C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *evolution*, 1984, 38(6): 1358 - 1370
162. Xiao W, Zhang Y, Liu H. Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 18(2): 163 - 173
163. Xu N, Yang Z, Que Y, et al. Genetic Diversity and Differentiation in Broodstocks of the Endangered Chinese Sucker, *Myxocyprinus asiaticus*, Using Microsatellite Markers. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2013, 44(4): 520 - 527
164. Yu D H, Gong S Y, Lin Y C, et al. Partial replacement of fish meal by several plant proteins with or without iron and lysine supplement in diets for juvenile Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. *Aquaculture Nutrition*, 2014
165. Yu D H, Gong S Y, Yuan Y C, et al. Effect of partial replacement of fish meal with soybean meal and feeding frequency on growth, feed utilization and body composition of juvenile Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*(Bleeker). *Aquaculture Research*, 2013, 44(3): 388 - 394
166. Zaid A, Hughes H G, Porceddu E, Nicholas F W. Glossary of biotechnology and genetic engineering. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1999

- 167.Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology*, 2002, 11(1): 1 - 16
- 168.Zhang S H, Luo H, Du H, Wang D Q, Wei Q W. Isolation and characterization of twenty-six microsatellite loci for the tetraploid fish Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*). *Conservation Genetics Resources*, 2013, 5(2): 409 - 412
- 169.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*. *Conservation Genetics*, 2003, 4(6): 673 - 683

作者简介及攻读学位期间发表的学术论文与研究成果

作者简介

成为为，女，汉族，生于1986年9月，籍贯湖北荆州，2009年6月于四川师范大学获得理学学士学位。2009年9月进入中国科学院大学水生生物研究所学习，从师危起伟研究员，硕博连读至今。

在学期间发表的学术论文和专利

1. Weiwei Cheng, Dengqiang Wang, Hao Du, Shuhuan Zhang, Qiwei Wei. Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*). *Conservation Genet Resour*, 2013, 5:375–377
2. 成为为，汪登强，危起伟，王成友，杜浩，吴金明，李雷. 基于微卫星标记对长江中上游中国胭脂鱼增殖放流效果评估. *中国水产科学*, 21(3), 待发表
3. 成为为，汪登强，危起伟，杜浩，王成友，周琼. 胭脂鱼亲子鉴定的方法与试剂盒. 专利号: 201310212119.4

参加的研究项目与参与撰写的报告

1. 参加农业部科技教育司项目---淡水水生生物资源增殖放流及生态修复技术研究
2. 参加农业部科技教育司项目---珍稀水生动物繁育与物种保护技术研究
3. 参与编写长江珍稀鱼类增殖放流技术手册

声 明

本人郑重声明：所提交的博士学位论文“胭脂鱼种群遗传多样性和家系管理研究”，是本人在导师危起伟研究员的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经引用的内容外，本文不包括任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式表明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名

2014年4月30日