



单位代码 10635

学 号 112012317001299

西南大學

硕士学位论文

基于 SSR 的中华鲟親子鉴定和遗传特性研究

论文作者：辛苗苗

指导教师：危起伟 研 究 员

张书环 助理研究员

学科专业：水生生物学

研究方向：渔业资源与环境

提交论文日期： 2015 年 4 月 18 日

论文答辩日期： 2015 年 6 月 1 日

学位授予单位：西南大学

中 国 • 重 庆

2015 年 6 月

理学硕士学位论文

基于 SSR 的中华鲟亲子鉴定和遗传特性研究

研 究 生：辛苗苗

导 师：危起伟 研 究 员

指导老师：张书环 助理研究员

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）资助

西南大学生命科学学院

中 国 • 重 庆

2015 年 5 月

MASTER DISSERTATION

Genetic characteristics and parentage
identification of Chinese sturgeon (*Acipenser
sinensis*) based on SSR markers

Candidate: Xin Miaomiao

Supervisor: Prof. Wei Qiwei

Adviser: Assistent Research Prof. Zhang Shuhuan

Supported by Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public

Interest (201203086)

School of Life Science, Southwest University

Chongqing, China

June, 2015

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
第 1 章 文献综述.....	1
1.1 分子标记.....	1
1.1.1 分子标记的类型.....	1
1.1.2 DNA 分子标记的特点.....	2
1.1.3 微卫星标记.....	4
1.2 亲子鉴定.....	7
1.2.1 亲子鉴定的定义及原理.....	7
1.2.2 基于 SSR 的常用亲子鉴定判定方法.....	7
1.2.3 亲子鉴定在水生生物中的应用.....	8
1.3 种群遗传多样性研究.....	9
1.3.1 种群遗传多样性定义.....	9
1.3.2 微卫星标记在水生生物种群遗传多样性中的应用.....	10
1.4 中华鲟的研究概况.....	11
1.4.1 中华鲟的简介.....	11
1.4.2 中华鲟资源现状.....	12
1.4.3 中华鲟多倍体研究.....	13
1.4.4 中华鲟分子生物学研究.....	13
1.4.5 中华鲟其他方面研究.....	15
1.5 本研究的意义及技术路线.....	15
第 2 章 中华鲟多态微卫星引物的筛选.....	17
2.1 前言.....	17
2.2 材料与方法.....	17
2.2.1 实验材料.....	17
2.2.2 主要仪器.....	17
2.2.3 主要试剂.....	18
2.2.4 基因组 DNA 的提取.....	18
2.2.5 基因组 DNA 的检测.....	19
2.2.6 微卫星序列选取及引物的设计.....	19
2.2.7 PCR 扩增.....	20
2.2.8 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 检测.....	21
2.2.8.1 12% PAGE 凝胶配方.....	21
2.2.8.2 PAGE 凝胶试剂配方.....	21
2.2.8.3 PAGE 凝胶检测.....	21
2.2.9 银染法.....	22
2.2.10 数据分析.....	23
2.3 结果.....	23
2.3.1 中华鲟基因组 DNA 的提取.....	23

2.3.2	微卫星引物的设计.....	24
2.3.3	多态微卫星引物筛选及微卫星标记特征.....	24
2.4	讨论.....	29
2.4.1	微卫星位点多态性.....	29
2.4.2	哈迪-温伯格平衡检验.....	29
2.4.3	多倍体中华鲟.....	30
第 3 章	多倍体中华鲟微卫星亲子鉴定体系的建立.....	31
3.1	前言.....	31
3.2	材料和方法.....	31
3.2.1	实验材料.....	31
3.2.2	实验仪器.....	32
3.2.3	实验试剂.....	32
3.2.4	基因组 DNA 的提取.....	32
3.2.5	荧光引物合成.....	32
3.2.6	PCR 扩增.....	32
3.2.7	统计方法.....	33
3.3	结果.....	33
3.3.1	微卫星标记的多态性.....	33
3.3.2	遗传多样性分析.....	35
3.3.3	微卫星标记对已知亲本中华鲟家系的检测分析.....	36
3.3.4	排除率和累积排除率.....	37
3.3.5	欧氏距离与亲缘系数.....	38
3.4	讨论.....	40
3.4.1	微卫星标记的多态性.....	40
3.4.2	微卫星标记等位基因的分型.....	40
3.4.3	亲子鉴定分析.....	41
第 4 章	中华鲟 3 个养殖群体遗传多样性研究.....	43
4.1	前言.....	43
4.2	材料与方法.....	43
4.2.1	实验材料.....	44
4.2.2	实验仪器.....	44
4.2.3	实验试剂.....	44
4.2.4	基因组 DNA 的提取.....	44
4.2.5	荧光引物合成.....	44
4.2.6	PCR 扩增.....	44
4.2.7	统计方法.....	45
4.3	结果.....	45
4.3.1	中华鲟 3 个养殖群体遗传多样性分析.....	45
4.3.2	中华鲟微卫星标记的 G-统计分析.....	48
4.3.3	中华鲟群体间的遗传变异分析.....	48
4.3.4	基于微卫星标记的中华鲟群体聚类分析.....	49

4.4 讨论.....	51
4.4.1 中华鲟群体微卫星遗传分析.....	51
4.4.2 中华鲟群体间遗传分化.....	51
4.4.3 近年来中华鲟群体遗传多样性变化.....	52
小结.....	55
参考文献.....	57
致谢.....	69
发表论文和参与科研项目.....	71

基于 SSR 的中华鲟亲子鉴定和遗传特性研究

水生生物学专业硕士研究生：辛苗苗

导 师：危起伟 研 究 员

指导老师：张书环 助理研究员

摘 要

中华鲟 (*Acipenser sinensis*) 为典型的大型溯河产卵洄游性鱼类，是我国国家一级重点保护野生动物。建立中华鲟人工养殖群体，实现全人工繁殖是人工保存中华鲟物种、实施迁地保护不可或缺的途径。尽管中华鲟已具有一定的养殖规模并且人工繁殖已获得成功，然而在中华鲟资源管理和种群保护中，种群遗传多样性、遗传结构以及系谱关系等遗传学研究一直未受到足够的重视，人工养殖的中华鲟遗传管理方面还相当薄弱。

本项目将以中华鲟为研究对象，筛选适用种群遗传研究的微卫星分子标记；通过微卫星标记的进一步筛选建立了亲子鉴定体系，为研究中华鲟养殖群体的系谱结构奠定基础；通过分析中国水产科学院长江水产研究所荆州太湖中华鲟试验场 (TH)、湖北恒升中华鲟驯养繁殖试验场 (HS) 和荆州凤凰山中华鲟养殖场 (FHS) 3 个中华鲟养殖群体的遗传结构，评价中华鲟人工养殖群体的遗传多样性水平，为中华鲟科学有效的人工保护提供理论基础。本研究将为中华鲟人工养殖群体的谱系建立和种群遗传管理策略的制定提供理论依据，也为其它鲟鱼的亲子鉴定及遗传结构分析给予借鉴。主要研究结果如下：

(1) 通过性腺转录组 Illumina 测序获得 2838 个含有微卫星的序列，以重复碱基数 2~6，重复次数大于 6 为原则选取 165 个微卫星序列设计引物，在 24 个野生中华鲟个体中进行 PCR 扩增，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，银染筛选后得到 24 对多态微卫星引物。遗传信息分析显示，微卫星位点的等位基因数为 2~6，平均等位基因数为 4.0；期望杂合度为 0.235~0.786；Shannon-Wiener 多样性指数为 0.396~1.608。检测结果显示：9 个多态微卫星引物偏离了哈迪温-伯格平衡，24 个多态微卫星引物中没有发现连锁不平衡。引物 Asi-67123、Asi-77057 和 Asi-67648 经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测的扩增条带数 > 4，引物 Asi-55961、Asi-52396、Asi-74654、Asi-68632 和 Asi-62964

聚丙烯酰胺凝胶电泳检测的扩增条带数 ≤ 2 ，引物Asi-72632、Asi-66034、Asi-46902、Asi-68191、Asi-48230、Asi-65194、Asi-75067、Asi-75905、Asi-71347、Asi-71954、Asi-73843、Asi-76964、Asi-72040、Asi-74518、Asi-70421和Asi-56700聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增条带数 ≤ 4 。

(2) 在已筛选出的24对多态微卫星引物中选取10对合成荧光引物对2个家系共68个中华鲟个体进行遗传分析。结果表明：10个微卫星标记共检测到124个等位基因，等位基因数为7~22，期望杂合度为0.733~0.873，Shannon-Wiener多样性指数为1.545~2.179。基于亲子鉴定排除率不低于0.99的标准，最终确定Asi-75067、Asi-67648、Asi-67123、Asi-73843、Asi-72040、Asi-70421和Asi-56700等7个微卫星标记为中华鲟亲子鉴定的核心体系，其单亲、父权和双亲的累积排除率分别为99.12%、99.95%和99.99%。该微卫星标记组合为中华鲟准确高效经济的亲子鉴定体系建立提供了科学依据。

(3) 在已筛选出的24对多态微卫星引物中选取12对合成荧光引物对3个中华鲟养殖群体进行遗传多样性分析。结果显示，3个养殖群体平均等位基因数为10.250~13.41，平均期望杂合度为0.790~0.802，平均Shannon-Wiener多样性指数为1.830~1.953，遗传分化指数 F_{st} 变化范围是0.114~0.157，表明中华鲟遗传分化程度处于中等水平，无近亲繁殖现象，且太湖与凤凰山中华鲟群体之间的遗传距离小于其他种群之间的遗传距离。分子变异方差分析(AMOVA)显示变异主要来源于群体内(87.4%)，小部分来源于群体间(12.7%)。根据Calinski和Harabasz pseudo-F分析，将3个中华鲟养殖群体分为2个聚类群，根据贝叶斯信息准则分析，将3个中华鲟养殖群体分为6个聚类。本实验不仅对保护现有中华鲟种群数量有重要价值，而且为中华鲟养殖群体的管理策略及遗传多样性水平提供了基础理论。

关键词：中华鲟；多倍体；微卫星；亲子鉴定；遗传多样性

Genetic characteristics and parentage identification of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) based on SSR markers

Major: Hydrobiology

Candidate: Xin Miaomiao

Supervisor: Prof. Wei Qiwei

Adviser: Assistant Research Prof. Zhang Shuhuan

Abstract

Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) is a large anadromous fish which is listed as the national level for the protection of wild animals in China. Performing controlled breeding are indispensable ways to support the recovery of this endangered species. Although the controlled propagation of Chinese sturgeon has been succeed, it did not get enough attention in study of genetic diversity, genetic structure and pedigree in *A. sinensis* population. The genetic management for broodstock of Chinese sturgeon is still quite weak.

In this study, microsatellite primers were developed in Chinese sturgeon, which were used to study the paternity test and population genetics. The genetic diversity of broodstock was assessed by microsatellite analysis in three Chinese sturgeon cultured populations. The research will not only provide a scientific basis for establishing pedigree and genetic management strategy, but also offer a reference for paternity test and analyzing genetic structure of other sturgeon.

(1) We isolated and characterized a total of 24 polymorphic microsatellite loci using Illumina sequencing for Chinese sturgeon. Primers were designed for each of 165

microsatellites with enough flanking sequences and more number of repeats (>6) using Primer Premier 5.0. The PCR was conducted in 24 wild individuals and the PCR products were separated on 12% non-denaturing polyacrylamide gel and visualized by silver staining. The number of alleles (N_a) per locus ranged from 2 to 6, expected heterozygosities (H_e) and Shannon-Wiener Diversity Indices (SW) ranged from 0.235 to 0.786 and from 0.396 to 1.608, respectively. Exact tests revealed that 9 loci showed significant ($P < 0.01$) deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). No ($P > 0.05$) linkage disequilibrium was detected among these loci. The loci tested by PAGE showed that Asi-67123, Asi-77057 and Asi-67648 displayed more than 4 bands; Asi-55961, Asi-52396, Asi-74654, Asi-68632 and Asi-62964 displayed 2 bands; other loci (Asi-72632, Asi-66034, Asi-46902, Asi-68191, Asi-48230, Asi-65194, Asi-75067, Asi-75905, Asi-71347, Asi-71954, Asi-73843, Asi-76964, Asi-72040, Asi-74518, Asi-70421 and Asi-56700) displayed 4 bands in these specimen.

(2) 10 novel microsatellite markers were used for assessing genetic diversity of 68 Chinese sturgeon individuals from two families. The results showed that there were 124 alleles in 10 loci. The N_a , H_e and SW per locus ranged from 7 to 22, from 0.733 to 0.873 and from 1.545 to 2.179, respectively. With the criterion that cumulative exclusion probabilities were not lower than 0.99, the 7 high polymorphic microsatellite markers (Asi-75067, Asi-67648, Asi-67123, Asi-73843, Asi-72040, Asi-70421 and Asi-56700) make up the system of paternity test for Chinese sturgeon. The cumulative exclusion probabilities over the 7 loci of single parent, paternity and pair parent were 0.991 232, 0.999 503 and 0.999 997, respectively. These high polymorphic microsatellite markers will provide a scientific basis for validating paternity testing efficiently in Chinese sturgeon.

(3) The genetic diversity of 215 first filial generation specimens randomly collected from three Chinese sturgeon farms (Taihu (TH), Hengsheng company (HS) and Fenghuangshan (FHS)) in Hubei Province, China were investigated using 12 microsatellite loci. A high level of genetic diversity was observed in all three culture breeds with the N_a , H_e and SW per locus varying from 10.250 to 13.417, from 0.790 to 0.802 and 1.830 to 1.953, respectively. A middle-level genetic differentiation and no inbreeding was observed among samples collected among three cultured farms based on G_{st} values ranged from 0.037 to 0.193 and G_{is} -0.018 to 0.095. The Analysis of

Molecular Variance (AMOVA) showed that most genetic variation distributed within populations, and very little genetic variation distributed among populations. The 215 individuals were divided into two clusters based on Calinski and Harabasz'pseudo-F and were divided into six clusters based on Bayesian Information Criterion. Thus, the findings of this study will be valuable for protecting the extant population of Chinese sturgeon. At the same time, it is essential to provide baseline data on the state of genetic diversity for evaluating the effect of controlled reproduction and national policy of conversation of this endangered species.

Keywords: *Acipenser sinensis*; polyploidy; microsatellite; parentage identification; genetic variation

第 1 章 文献综述

1.1 分子标记

分子标记是根据基因组DNA的丰富多态性发展起来的可直接反映生物个体在DNA水平上差异的一类新型遗传标记，它是继形态学标记、细胞学标记、生化标记之后最为可靠的遗传标记技术（单雪等，2005）。广义的分子标记是指可遗传且可检测的DNA序列或蛋白质分子，通常所说的分子标记是指以DNA多态性为基础的遗传标记（任旭琴，2002）。

1.1.1 分子标记的类型

分子标记从诞生起，就引起了生物学家极大的兴趣，在经历了短短几十年的迅猛发展后，分子标记技术日趋成熟，现已出现的DNA分子标记技术有几十种，以下是部分分子标记类型：

（1）建立在Southern杂交基础上的分子标记技术：限制性内切酶片段长度多态性标记（Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP）；染色体原位杂交（Chromosome In Situ Hybridization, CISH）。

（2）以重复序列为基础的分子标记技术：卫星DNA（Satellite DNA）；小卫星DNA（Minisatellite DNA）；简单序列重复，即微卫星DNA（Simple Sequence Repeat, SSR）。

（3）以PCR为基础的分子标记技术：随机扩增多态性DNA（Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD）；扩增片段长度多态性（Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP）；单链构象多态性（Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP）；cDNA-扩增片段长度多态性（cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism, cDNA-AFLP）；靶位区域扩增多态性（Target Region Amplified Polymorphism, TRAP）；序列特征化扩增区域（Sequence Characterized Amplified Region, SCAR）；相关序列扩增多态性（Sequence-Related Amplified Polymorphism, SRAP）。

（4）以mRNA为基础的分子标记技术：表达序列标签（Expressed Sequence Tags, ESTs）；差异显示（Differential Display, DD）；逆转录PCR（Reverse Transcription PCR, RT-PCR）；差异显示逆转录PCR（Differential Display Reverse Transcription PCR, DDRT-PCR）；特征性差异分析（Representative Difference Analysis, RAD）；基因表达系列分析（Serial Analysis of Gene Expression, SAGE）。

(5) 以单个核苷酸变异为核心的分子标记技术：单核苷酸多态性标记 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)。

(6) 以特定序列为核心的分子标记技术：线粒体DNA分子标记 (Mitochondrial DNA, mtDNA)。

通常我们根据自己要解决的科学问题利用不同的分子标记技术进行科学研究，表1.1是几种常用分子标记技术的比较。

1.1.2 DNA分子标记的特点

DNA分子标记作为一种新的遗传标记主要有以下特点 (贾继增, 1996; 成为, 2014; 陈兆波, 2009; Ganal et al, 1989)

- (1) 数量极多，遍及整个基因组。
- (2) 多态性高，自然界存在着许多等位变异，不需专门创造特殊遗传材料。
- (3) 表现为“中性”，即不影响目标性状的表达，与不良性状无必然的连锁。
- (4) 有许多分子标记表现为共显性，能够鉴别出纯合基因型与杂合基因型，提供完整的遗传信息。
- (5) 无上位效应和互隐性作用。
- (6) 检测手段简单快捷，易于实现自动化，开发成本和使用成本低。
- (7) 稳定性和重现性好。
- (8) 信息量大，分析效率高。

DNA分子标记这些特征奠定了其广泛的应用基础。近年来，分子标记技术的发展突飞猛进，为不同研究目标提供了比较丰富的技术手段，被广泛应用于分子遗传连锁图谱构建、遗传多样性分析、种质鉴定、转基因植物鉴定和分子标记辅助育种等方面 (Sakamoto et al, 2000; 王凯等, 2003; 陆才瑞等, 2008; Ben Naceur et al, 2012)。

第 1 章 文献综述

表1.1 不同分子标记特征比较（姚红伟等，2010）

Tab.1.1 The characteristic of molecular markers

标记类型	DNA质量要求	DNA检测范围	遗传特点	多态性	技术难度	重复性	费用
The type of markers	The quality of DNA	The testing range of DNA	Characterists of inheritance	Polymorphism	Technological hurdles	Repeatability	Cost
RFLP	高	低拷贝区	共显性	中等	高	高	高
SSR	中高	重复序列区	共显性	高	低	高	中等
RAPD	低	整个基因组	显性	较高	低	中等	低
ESTs	高	功能基因组	共显性	高	高	高	高
SNP	高	整个基因组	共显性	高	高	高	高
AFLP	高	整个基因组	显性	较高	中等	高	高

1.1.3 微卫星标记

(1) 微卫星标记的优点

微卫星DNA (Microsatellite DNA) 又称简单重复序列 (Simple Sequence Repeats, SSR) 或短串联重复序列 (Short Tandem Repeats, STR), 是指以少数几个核苷酸 (1~6个) 为单位多次串联重复的DNA序列, 微卫星位点多态性的基础是微卫星重复次数和重复区域不同 (Litt and Luty, 1989), 其优点主要表现在以下几个方面:

A) 保守性

微卫星标记在哺乳动物种间, 特别是一些亲缘关系很近的物种间具有一定的保守性。Crawford等 (1995) 研究证明, 牛、绵羊和山羊的染色体有很高的相似性, 而且牛和绵羊的微卫星引物能在山羊上检测出多态性。因此, 微卫星标记在近缘物种、属间经常可以通用 (骆慧, 2013; 彭涛等, 2009)。

B) 共显性遗传

微卫星标记遵循孟德尔遗传规律, 能够稳定地从上一代遗传给下一代, 从子代可追寻亲代的等位基因, 并易于区分出纯合型和杂合型 (张吉清等, 2001)。同时这种稳定性还表现在同一个个体的不同年龄段、不同组织器官等产生的DNA指纹图都是完全一致的。

C) 微卫星标记杂合程度高

由于微卫星位点的等位基因数相当多, 因而微卫星位点得出的杂合程度高, 多态信息含量大, 区分亲缘关系极近的个体 (群体) 时效率较高, 分析遗传多样性时比其它标记方法的信息含量大。一般情况下, 一个微卫星DNA核心序列重复次数越高, 等位基因数也就越多, 多态性也就越高 (张丽娟, 2003)。

D) 分布广泛

Beckmann等 (1992) 估算发现微卫星均匀而广泛分布于物种基因组中, 几乎每6000个碱基就存在一个微卫星基因座, 碱基数之和足可以代表整个基因组。

E) 检测方便, 结果稳定

使用常规的PCR方法、琼脂糖凝胶技术、聚丙烯酰胺凝胶电泳技术、银染法和毛细管电泳等方法可读取等位基因大小 (高一龙等, 2009)。

(2) 微卫星标记的缺点

A) 必须依赖微卫星两端侧翼序列设计引物。

B) 微卫星标记的诸多优点也增大了基因型判别错误的可能性。

C) 无效等位基因 (null allele)、 “结巴” 带 (stutter bands)、短等位基因显

性 (short allele dominance) 和等位基因“扩增丢失” (allelic drop out) 现象的发生都可能导致微卫星基因型的判定错误 (姚红伟等, 2010)。

(3) 微卫星标记的制备

A) 传统法

传统制备微卫星标记的方法费时费力, 效率低, 但操作流程简单、费用低, 国内外仍有一些实验室使用传统法克隆微卫星。很多其它制备微卫星的方法基本上是在传统法的基础上不断发展完善的, 尤其是对以下两点的不断改进与完善: a: 在构建部分基因组文库时, 模板DNA断裂方式的选用; b: 阳性克隆筛选鉴定法的选用 (常玉梅等, 2005)。

B) PIMA法 (PCR Isolation of Microsatellite Array)

PIMA法是以RAPD为基础发展起来的快速从基因组中分离微卫星及其侧翼序列的一种新方法。PIMA法以其操作简单、方便、安全、经济, 颇受科研人员欢迎。然而, PIMA法制备的微卫星数量十分有限, 尚不能进行批量生产遗传标记以满足遗传连锁图谱的制备、QTL分析等研究。

C) 富集法

微卫星富集法的优点是能从基因组中高效分离出大量微卫星标记。富集法包括选择性杂交法 (Selective Hybridization) 和FIASCO法 (Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats)。选择性杂交法最大的优点是阳性克隆率高, (Oumesh et al, 2001), 与选择性杂交法相比, FIASCO法步骤简单、成本低, 而且能够高效地从基因组中分离出微卫星序列。

D) 利用网上基因组信息获得微卫星标记

借助网上庞大的可利用的遗传信息, 是获得微卫星位点比较快捷、经济的方法。利用互联网获得微卫星序列主要可以通过以下3方面: a: 直接在Genebank数据库中搜寻目标生物的微卫星序列; b: 从基因组DNA序列中查找; c: 从ESTs数据库中筛选。基因组EST资源开发非常迅速, 需要注意的是, 有时所设计的引物因跨越内含子而无法扩增出目标产物, 且数据库中数据数量有限, 不一定能找到所需生物的微卫星标记。

E) 借助亲缘关系相近物种的微卫星标记

在一些亲缘关系较近的生物之间, 有很多遗传元件都具有一定的保守性。这种保守性为借助模式生物或其他近缘物种的分子标记, 加快目标生物的研究提供了捷径。借助近缘物种获得微卫星标记的方法非常快速、有效, 这在水生生物遗传分析中得到了越来越多的应用 (Pickles et al, 2009; 邵昭君等, 2002; 朱滨等, 1999)。但需要注意的是, DNA复性时错配可能会导致假阳性带的产生或副产物

带过多等问题。

(4) 微卫星标记在种群遗传中的应用

微卫星在基因组内分布广泛而均匀，有多态性信息丰富，检测简便快捷，且单个微卫星位点上可用于共显性等位基因分析等特点，使得微卫星标记很快发展成为一种极具价值的遗传标记（Weber et al, 1989），广泛应用于遗传基因连锁图谱的建立、种群结构和遗传多样性的分析、亲缘关系分析和人工增殖放流效果的评价等方面（鲁双庆等，2003；孙建帮，2006；成为为等，2014）。近年来，随着对濒危物种遗传保护研究的日益增强，微卫星分子标记在濒危动物保护中得到越来越多的应用（王绍先等，2008）。

A) 在群体遗传分析中的应用

生物群体的遗传组成是群体所有基因型的集合。生物群体发生变异或同一物种不同群体间的差异主要表现在基因频率的不同上（孙效文等，2008）。根据位点等位基因频率可以计算出生物群体的杂合度、多态信息量、Shannon-Wiener多样性指数和群体间的遗传距离等数值，为评估物种种群的遗传多样性，资源的保护和物种的分类提供了依据。目前关于应用微卫星标记分析水生动物群体遗传结构的研究很多（Desvignes et al, 2001；Huang et al, 2000；Zhang et al, 2005）。

B) 在遗传基因连锁图谱建立中的应用

遗传学家长期以来一直在寻找合适的标记建立遗传基因图谱，建立基因遗传连锁图谱不但能了解功能基因的组成和结构，还能帮助鉴定有经济价值的表达基因。目前已经用微卫星标记建立了罗非鱼、虹鳟、鲤等鱼类的遗传连锁图谱（Lee et al, 2005；Nichol et al, 2003；Zheng et al, 2011）。

C) 在水生生物种质鉴定中的应用

水生生物种质鉴定包括：种间鉴定、种内鉴定、杂种鉴定、亲子鉴定等。微卫星进行种内和近缘物种间亲缘关系分析的基础是微卫星序列的丰富多态性和稳定保守性。鱼类微卫星属于共显性遗传，可以准确计算出所有等位基因的频率，因此微卫星在种质鉴定中具有一定的优越性。朱滨等（1999）利用湖鲟的4对微卫星引物对中华鲟随机个体样本构建了DNA指纹图谱，结果表明该图谱能够对获得的中华鲟亲鱼样本进行有效区分。Jeff 等（2004）利用多个微卫星位点对高首鲟（*Acipenser Transmontanus*）的血缘关系进行了分析，这对物种资源保护起到了积极作用。

D) 在遗传育种中的应用

通过微卫星标记研究水生生物遗传育种主要集中在2个方面，一是利用微卫星分析群体、家系和个体的遗传差异，计算群体间、家系间和个体间的遗传距离，

再结合表型确定亲本的分配方案，达到选出个体表型优良，又无近亲交配的目的；二是依据QTL等性状分析结果，利用与性状相关的微卫星标记筛选出性状优良的个体，再从优秀个体中建立品种或品系（孙效文等，2008）。

E) 在人工增殖放流效果评价中的应用

目前人们主要采用放流人工繁殖孵化的幼苗等方法来增加野生濒危种群的数量，目的是恢复某一地方濒危物种野生种群的数量。对放流个体进行适当的标记有利于我们对放流效果作出中肯的评价。与其他标记方法相比较，微卫星标记对标记个体无损伤，灵敏度更高，且易于操作，还可以进一步研究标记群体的种群结构，生活行为和繁殖模式等生态学问题。目前，关于应用微卫星标记评价胭脂鱼、鲢和鳙等鱼类人工增殖放流效果的报道已有很多（成为为等，2014；张敏莹等，2012；张敏莹等，2013）。

1.2 亲子鉴定

1.2.1 亲子鉴定的定义及原理

亲子鉴定（parentage identification）又称亲权鉴定、个体识别等，是利用生物学、分子遗传学及医学的理论和技術，从子代和亲代的形态构造、生理机能、遗传物质基础等方面的相似特点来分析遗传特征，判断亲代与子代是否有亲缘关系的方法（吴继法和吴登俊，2001；吴艳等，2004；孙业良等，2005）。亲子鉴定所遵循的遗传规律主要有3种，分别是核外基因组遗传规律、性染色体遗传规律和常染色体基因座遗传规律。亲子鉴定的遗传学基础是孟德尔两大遗传定律：基因的分离定律和自由组合定律。目前亲子鉴定不仅在法医学上有特殊的用途，而且在动物繁殖育种领域，尤其在濒危动物育种中也得到了广泛的应用。

1.2.2 基于SSR的常用亲子鉴定判定方法

在水生生物的亲子鉴定中，常用基于排除概率的排除法和基于似然比的似然法这两种鉴定方法。排除法依据当假设父亲与后代至少2个位点（或者10%的位点）的基因型存在差异，可排除它们之间具有亲子关系。似然法计算假设亲本为真实亲本和为无关个体的似然函数比值的自然对数值（The Log of Likelihood Ratio, LOD）。

（1）基于排除法的亲子鉴定

排除法是基于孟德尔遗传定律，利用各位点的等位基因频率计算非父排除概率（Probability of paternity Exclusion, PE）。排除法在进行亲子鉴定最早使用且最为简单有效的方法（Jones and Ardren, 2003）。很多动物的亲子鉴定研究都可以

利用排除法来进行推断，排除法在标记多态性高、候选亲本少时效果最好，但是如果存在判型错误，就会造成亲本排除错误（杨宗英，2014）。排除概率是评价遗传标记在亲子鉴定中实用价值大小的一个重要指标，是指通过计算某标记体系的等位基因频率将不是亲生父亲的候选父亲排除的概率。根据 Gerber 等（2000）描述的共显性标记的模型公式，多倍体鱼类亲子鉴定排除概率的计算方法如下：

首先（ n 是等位基因数， P_i 是种群中第 i 个等位基因的频率， k 是等位基因频率的丰度）：

$$a_k = \sum_{i=1}^n p_i^k$$

然后，双亲均未知时，排除子代与假设亲本是亲子关系的排除概率为：

$$P=1-4a_2+2a_2^2+4a_3-3a_4$$

当母本信息已知时，排除子代与假设父本是亲子关系的排除概率为：

$$P=1-2a_2+2a_3+2a_4-3a_5-2a_2^2+4a_3+3a_2a_3$$

排除子代与假设双亲是亲子关系的排除概： $P=1+4a_4-4a_5-3a_6-8a_2^2+8a_2a_3+2a_3^2$

（2）基于似然比的似然法

基于似然法的亲子鉴定是通过建立似然函数，应用假设检验的方法找到最似亲本。似然法有效的避免了基因型判别错误所造成的影响（Kalinowski et al, 2007），将似然法应用于亲子鉴定中，可以在一定的置信度范围内为子代找到最似亲本。

Thompson等（1975）首次引进似然法应用于亲子鉴定研究；Meagher（1991）提出了似然得分（似然比）这个指标，进一步完善了似然法，并且成功的推断出一个野生百合花群体的父本；Marshall等（1998）将这种亲子鉴定的方法编成了软件Cervus1.0；Kalinowski等（2007）纠正了软件Cervus1.0和软件Cervus2.0中存在的问题，并且开发了软件Cervus3.0。软件Cervus3.0可以对子代所提供的每个候选父亲进行计算，并给出似然比最高的候选亲本。LOD值是应用似然法进行亲子推断的重要指标。LOD值等于0表示候选父亲与群体中随机雄性个体成为子代真实父亲的可能性相同；LOD值小于0表示候选父亲不可能为子代的真实父亲；LOD大于0则认为候选父亲是子代的真实父亲，LOD值越大，可靠性越高。

1.2.3 亲子鉴定在水生生物中的应用

亲子鉴定不仅在法医学上有重要的作用，在水生生物、畜牧业生产中也具有重要实际应用价值，在水生生物的应用中，目前多采用微卫星标记来建立准确的系谱档案以避免或减少近亲繁殖造成的种群衰退，对于提高鱼类育种效率和指导

生产实践有重要的意义,尤其对中华鲟、达氏鲟和胭脂鱼等这类极度濒危的物种。Kellogg 等(1995)采用 2 个微卫星分子标记研究圆头桨鳍丽鱼(*Copadichromis cyclicos*)的亲子关系,研究结果显示,2 个微卫星位点得出的圆头桨鳍丽鱼亲权排除率很高。朱滨等(1999)利用湖鲟(*Acipenser fulvescens*)的 4 对微卫星引物对中华鲟进行亲子鉴定分析,研究表明,其中 2 对微卫星引物在中华鲟个体间表现出多态性,可以有效的区分中华鲟亲鱼。Perez 等(1999)利用 4 至 5 个高度多态的微卫星标记在 7800 个可能的父母中为 73%的真鲷(*Pagrus major*)后裔找到了到亲本。Ashie 等(2000)应用 4 个微卫星标记(等位基因数在 10~17 个之间)从 110 对潜在父母中为 94.3%的大西洋鲑(*Salmo salar*)找到了亲本。Takuma 等(2002)利用 5 个微卫星位点确定了日本对虾(*Penaeus japonicus*)7 个家系的亲缘关系。Castro 等(2003)利用 11 个微卫星标记对人工诱导的雌核发育大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)进行亲子关系分析,11 个标记的累积非父排除率为 0.9999,证明了后代的遗传物质完全来自于母本而无父本基因的参与。Herlin 等(2008)利用 8 个微卫星标记对 300 尾大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)鱼苗和 99 尾亲鱼进行亲子关系分析,这些标记的非父排除率达到 81%,从 99 个亲鱼中寻找到了 26 个亲本。何小燕等(2009)选择了 12 个多态信息含量较高的微卫星位点,在人工选育的 5 个全同胞家系的大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)中进行检测,结果说明,所选用的 12 个微卫星位点可用于大口黑鲈亲子鉴定研究。张春雷(2010)应用 7 个微卫星标记对哲罗鱼(*Hucho taimen*)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及应用作了研究,表明微卫星分子标记可以用于哲罗鱼的家系鉴定。顾颖等(2012)研究建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)亲子鉴定体系发现,双亲未知时通常需要 8~12 个微卫星位点,已知单亲时,则需要 5~8 个微卫星位点。成为等(2014)利用已经发表的 11 对胭脂鱼多态性微卫星标记,对长江中上游胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)增殖放流效果进行评估。确定 11 个样本与养殖场内繁殖亲本存在亲子关系,据此确定这 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中上游野生群体的贡献量为 16.92%。

1.3 种群遗传多样性研究

1.3.1 种群遗传多样性定义

生物多样性包括遗传多样性、物种多样性、生态系统多样性和景观多样性(马克平,1993),其中遗传多样性是生物多样性的核心组成部分,可以反映物种多样性和生态系统多样性存在的本质。遗传多样性即基因多样性,广义上是指地球上所有生物所携带的遗传信息的总和,也就是各种生物拥有的多种多样的遗传信

息。狭义上是指种内不同群体之间或一个群体内不同个体间基因的变化。遗传多样性代表种群之间的遗传结构的变异，是生物适应环境与进化的基础，只有物种的遗传变异越丰富，即多样性越高时，这个物种所能承受的外界变化的压力才越强，也就越容易进行地域扩张并适应该地区新的环境。

1.3.2 微卫星标记在水生生物种群遗传多样性中的应用

遗传多样性研究是探讨生物适应、物种形成及进化机制的基础，同时也是保护生物学研究的核心之一（Wang et al, 2003）。微卫星DNA高度多态性提供的高分辨率遗传信息是种群遗传结构多样性分析的有效分子标记（王振山等, 1998）。根据微卫星标记在不同群体中等位基因数、等位基因频率、期望杂合度、多态信息含量、种群遗传分化指数和遗传距离等来评估分析种群遗传多样性和种群遗传结构，从而为珍稀濒危物种合理有效的保护提供理论依据。黄磊和王义权（2004）用微卫星DNA分子标记对扬子鳄（*Alligatorsinensis*）进行研究，结果显示，扬子鳄种群在微卫星水平表现出很低的遗传多样性，现阶段应将全部现存的扬子鳄作为一个整体加以保护。全迎春等（2005）选择12个斑马鱼（*Danio rerio*）功能基因的微卫星标记和12个鲤鱼微卫星标记，检测了黑龙江鲤（*Cyprinus carpio haematopterus*）、散鳞镜鲤（*Cyprinus Carpio*）、荷包红鲤抗寒品系（*Cyprinus carpio var. wuyuanensis*）、松浦鲤（*Cyprinus carpio Songpu carp*）的群体遗传多样性，结果表明，4个群体平均观测杂合度为0.36~0.43，平均期望杂合度为0.49~0.53，平均多态信息含量为0.21~0.25；群体间相似系数均在0.84以上，遗传距离较近，为0.067~0.170；聚类分析显示，松浦鲤与散鳞镜鲤亲缘关系最近，荷包红鲤抗寒品系与它们的亲缘关系较黑龙江鲤更近。宋红梅等（2008）用33对在尼罗罗非鱼（*Oreochromis niloticus*）中有效扩增的微卫星引物，对橙色莫桑比克罗非鱼（*Oreochromis mossambicus*）进行PCR扩增，结果有32对引物能获得稳定的特异性条带，其中15个微卫星位点具多态性，表明大部分尼罗罗非鱼的微卫星位点存在于橙色莫桑比克罗非鱼中。然后用这15个多态微卫星位点对橙色莫桑比克罗非鱼30个个体进行扩增分析，结果共检测到44个等位基因，平均多态信息含量为0.431，平均观测杂合度为0.549，平均期望杂合度为0.525，个体间平均遗传距离为0.313，表明橙色莫桑比克罗非鱼群体遗传多样性较丰富，种群结构比较合理，且发现其中有7个位点可有效区分莫桑比克罗非鱼和尼罗罗非鱼，可作为罗非鱼种质鉴定的分子标记。Liu等（2009）采用10对多态微卫星标记分别对草鱼（*Ctenopharyngodon idellus*）野生群体和养殖群体的遗传结构和遗传多样性进行了研究，结果表明我国草鱼野生群体和养殖群体的遗传多样性都较高，而马来西亚的养殖群体遗传多样

性较低，且野生群体和养殖群体都存在显著的遗传分化，研究结果可为草鱼的种质改良提供遗传依据。李大宇等（2009）利用40个黄颡鱼（*Pelteobagrus fulvidraco*）微卫星分子标记对6个黄颡鱼群体进行了遗传检测，结果显示，6个黄颡鱼群体的多态性指标均适中。Hulak等（2010）利用10对多态微卫星标记对鲤鱼野生和养殖群体的遗传多样性和遗传分化程度进行研究，结果表明，鲤鱼养殖群体遗传多样性显著低于鲤鱼野生群体的遗传多样性。赵广泰等（2010）利用13个多态性微卫星位点分析了大黄鱼（*Larimichthys crocea*）F1到F4 4个选育世代的遗传结构与遗传多样性变化情况，结果显示，4个世代群体遗传多样性指标值逐渐下降，经过连续4代的选育，部分不利基因遭到淘汰，选育群体的遗传基础逐步得到纯化，基因型逐渐趋向纯合、稳定，经进一步的选育可望获得较稳定的品系。赵沐子等（2011）用8对微卫星标记对1997-2004年引进的5个斑点叉尾鮰（*Ictalurus punctatus*）群体进行遗传多样性分析，结果显示，引进的5个斑点叉尾鮰群体均具有较高的遗传多样性，遗传信息丰富，遗传变异大，可为良好的育种材料。覃盼等（2013）利用微卫星标记对漠斑牙鲃（*Paralichthys lethostigma*）山东胶南养殖群体（子一代）和江苏南通养殖群体（子三代）的遗传结构进行分析比较，结果表明山东胶南群体的遗传多样性显著高于江苏南通养殖群体，且两个群体中度分化，这一研究结果为将来制定合理的漠斑牙鲃育苗规划提供指导性的理论依据。王瑾瑾等（2014）选取10个多态性较高且未偏离哈迪-温伯格平衡的微卫星标记对2个厚颌鲂（*Megalobrama pellegrini*）野生群体进行遗传多样性分析，结果表明，与长江上游其他特有物种相比，厚颌鲂2个野生群体的遗传多样性均处于中等偏低水平，且2个群体间存在显著的遗传分化。邢智璐等（2014）利用8个微卫星标记分析了江苏省8个地区克氏原螯虾（*Procambarus clarkii*）的遗传多样性，研究发现江苏克氏原螯虾野生群体遗传多样性较高并且群体间存在中度分化，这为我国克氏原螯虾种质资源保护及遗传育种研究提供了参考资料。

1.4 中华鲟的研究概况

1.4.1 中华鲟的简介

中华鲟（*Acipenser sinensis*）俗称鲟鱼、鳊鱼，隶属于脊索动物门（Chordata）、脊椎动物亚门（Vertebrata）、硬骨鱼纲（Osteichthyes）、辐鳍亚纲（Actinopterygii）、软骨硬鳞总目（Chondrostei）鲟形目（Acipenseriformes）、鲟科（Acipenseridae）。2010年被列为极危物种（IUCN, 2010）。

基础生物学特征：体长梭形，胸腹部平坦，尾部细。头呈三角形，吻尖长，微上翘。口下位，横裂，能自由伸缩。唇具乳突。吻腹面横行排列须2

对。眼甚小。鼻孔大。鳃孔大。腮弓肥厚，鳃耙呈棒状，排列稀疏。体具骨板状硬鳞5行，背行大，鳞间皮肤光滑。背鳍位后，胸鳍发达，位近腹面；尾鳍歪形，甚发达，上叶长。鳔大，一室。头部及体背侧青灰或带褐色，腹面灰白，鳍灰色（乐佩琪和陈宜瑜，1998）。

分布：中华鲟为世界鲟科鱼类中分布最南的一种。近代分布于我国近海（包括东海、黄海、台湾海峡等）以及长江、珠江、闽江、钱塘江和黄河等大型江河。目前，闽江、珠江、钱塘江和黄河的中华鲟已经绝迹，仅在长江还有中华鲟（Wei et al, 1997；陈细华，2007）。

1.4.2 中华鲟资源现状

中华鲟是在中国长江流域发现的三种鲟鱼之一，另两种分别是达氏鲟（*Acipenser dabryanus*）和白鲟（*Psephurus gladius*）（陈细华，2007）。目前白鲟已经多年未发现，达氏鲟人工养殖群体还较多，但野生种群数量却已很少。据1971-1975年估计，长江的主要鲟鱼中华鲟年总产量约10万公斤（宁宗德等，1982）。我国鲟鱼人工繁殖研究起步较晚，1957年黑龙江水产研究所首次取得史氏鲟（*Acipenser schrenckii*）人工繁殖成功，成功孵化出少量鲟幼鱼（魏青山，1985）；1973年四川省长寿湖水产研究所取得中华鲟人工繁殖成功（湖北省水生生物研究所鱼类研究，1976）；1981-1982年长江水产研究所沙市分所等单位首次人工蓄养2尾中华鲟雄体成熟（付朝君，1983），这是我国研究鲟鱼人工繁殖的一项重要成果。近年来，由于葛洲坝建设、环境污染等因素，中华鲟已经极度濒危，资源量不断下降，主要表现在：

（1）产卵量下降

自2003年以来，中华鲟产卵量急剧下降，年均产卵量由原来的2195万粒（1998-2003年）下降到现在的238万粒（2004-2007年），其繁殖规模下降了1个数量级（陶江平等，2009）。更严重的是，2013年和2014年野生中华鲟是否发生自然产卵现象还尚未确定。

（2）亲鱼及幼鱼数量下降

长江葛洲坝水利枢纽工程的兴建，阻断了中华鲟产卵洄游通道，致使中华鲟产卵洄游群体被阻隔于葛洲坝下并遭到大量的捕杀，造成了中华鲟幼鱼资源大幅度减少。葛洲坝截流后3年来，中华鲟幼鱼资源减少97%左右，1982和1983两年，通过两次在葛洲坝下宜昌江段对中华鲟产卵场进行调查发现，虽然中华鲟在坝下能够进行自然产卵繁殖，但无论产卵场的范围还是参加产卵亲鱼的数量都都很有限，而这些有限的亲鱼所产出的卵还远远不能满足坝下铜鱼等敌害鱼类的吞食，根本

无法形成中华鲟资源的补充（柯福恩，1984）。从1981年至1999年的19年间，中华鲟幼鲟补充群体和亲鲟补充群体分别减少了80%和90%左右（柯福恩，1999）。中华鲟性成熟晚，群体结构变化周期长，初次性成熟年龄雄鲟8-18年，雌鲟14-26年（Wei, 1997; 余志堂, 1983）。大坝的阻隔使产卵群体结构具有明显的滞后性，滞后的时间大致相当于鲟鱼最小性成熟年龄（危起伟等，2005）。

1.4.3 中华鲟多倍体研究

生殖细胞通过减数分裂形成的配子只含有一套染色体组的生物体，称为单倍体；体细胞含有内容基本相同的两套染色体的生物体称为二倍体；体细胞含有3套或3套以上完整染色体组的生物体称为多倍体（宋灿等，2012）。在高等脊椎动物中，多倍体现象是比较罕见的，但在鱼类中多倍体现象则较为普遍。在做过染色体研究的1600多种鱼中，其中多倍体鱼类至少不下150种或亚种，涉及8个科。据不完全统计，我国已初步发现近30种（亚种或品种）多倍体鱼类，除中华鲟和泥鳅分别属于鲟科和鳅科外，其余均属鲤科（桂建芳，1985）。鲟形目鱼类中，白鲟属（*Psephurus*）、匙吻鲟属（*Polyodon*）、铲鲟属（*Scaphirhynchus*）和拟铲鲟属（*Pseudoscaphirhynchus*）均属于四倍体鱼类，中华鲟和达氏鲟两种鲟属鱼类为八倍体类型，史氏鲟也初步被判断为八倍体（张四明等，1999；咎瑞光，1985）。但Rajkov等（2014）和Ludwig等（2001）采用微卫星等方法认为中华鲟和达氏鲟为四倍体。

1.4.4 中华鲟分子生物学研究

20世纪80年代起，就有学者在分子生物学方面对中华鲟进行研究，许克圣等（1986）对中华鲟染色体组型进行了研究。

张四明等（1999）用PCR技术扩增47尾中华鲟线粒体DNA（mtDNA）控制区（D-loop）时，发现中华鲟天然群体内存在个体间和个体内的mtDNA长度变异现象。

张四明等（2000）采用随机扩增多态性DNA（RAPD）技术对连续3年（1995-1997）共70尾来源于长江水系中华鲟样本进行遗传分析，结果显示，26个引物中只有6个引物的RAPD-PCR产物有多态性，3年野生中华鲟样本的综合遗传多样性指数为0.0334。比较而言，中华鲟天然群体核DNA水平的遗传多样性较低。

邵昭君等（2002）将21对铲鲟（*Scaphirhynchus platorynchus*）微卫星引物在中华鲟基因组DNA中进行PCR扩增，其中2对引物多态性较高，可直接作为分子标记应用于相关的研究。此外，对具有特异性扩增但有拖带现象的4对引物的PCR产物进行回收和测序，并对其中3对引物序列重新设计，最后得到2对可用于中华鲟的

引物。研究表明,对相近种的微卫星引物进行优化设计来获得一个物种的微卫星引物是条简捷有效的途径。

马冬梅等(2003)将PCR改造后的编码成熟肽中华鲟cystatin基因亚克隆到毕赤酵母整合型表达载体pPICZ α A,氯化锂法转化毕赤酵母菌株GS115,构建表达cystatin的酵母基因工程菌,经甲醇诱导、SDS-PAGE检测培养基上清液来研究鱼类半胱氨酸蛋白酶抑制剂Cystatin的功能并探索其在水产加工和病害防治中的应用潜力,结果表明中华鲟cystatin在毕赤酵母中实现了高效表达,重组cystatin表达量约为215 mg·L⁻¹。纯化后重组蛋白纯度达94.2%。生物活性检测结果表明,1 μ g重组中华鲟cystatin约能抑制15 μ g木瓜蛋白酶的水解活性。

Zhao等(2005)应用4个微卫星标记对1999-2001年共60尾中华鲟进行遗传多样性分析,研究表明,中华鲟等位基因数和杂合度均较低,这60尾中华鲟之间并未发生大的遗传分化。

Zhu等(2006)应用6个微卫星标记对1999-2001年共60尾中华鲟进行分析,实验结果表明,这3年的中华鲟遗传多样性差异不显著,也没发现严重的近交现象,但进一步建议在人工繁殖时尽量明确亲鱼来源,以免近亲繁殖造成种群衰退。

曾勇等(2007)采用随机扩增多态性DNA(RAPD)技术对2000年共30尾中华鲟幼鲟遗传多样性进行分析。在25个可分析的引物中,只有5个引物的RAPD-PCR产物有多态现象,结果表明,其遗传多样性明显低于葛洲坝截流以前。

陈晓武和施志仪(2008)以日本鳗鲡的PYY基因cDNA序列为信息探针,搜索中华鲟EST文库,得到中华鲟PYY的EST序列。结果表明,此cDNA序列包含完整的开放读码框,蛋白序列和牙鲆、河豚及斑马鱼的PYY肽同源性较高。包含中华鲟PYY在内的139条真核生物神经肽Y蛋白质序列比对结果显示,有6个氨基酸位点高度保守,其中有5个氨基酸位于 α 螺旋上,另外1个脯氨酸位于无规则卷曲区,提示 α 螺旋也可能起到重要作用。

Chen等(2009)根据铁蛋白基因的保守序列,搜索GenBank数据库中华鲟的EST数据库得到一条同源序列。通过RT-PCR的方法对该序列进行扩增,获得中华鲟铁蛋白亚基cDNA全长(896 bp),包含531 bp的完整编码区,推测编码的蛋白质为176 aa,它和大西洋鲑鱼铁蛋白序列同源性最高,达到82.9%,该基因在中华鲟肝脏、胰脏、肌肉、脑、心脏、鳃和胃粘膜等多种组织表达,在胰脏和心脏中表达量较高,在肌肉组织中表达较低。根据同源模建的方法得到该蛋白质三维结构,包括5个 α 螺旋和10个转角结构,与人、蛙和细菌的铁蛋白均能很好叠合,表现很高的相似性,表明该蛋白结构和功能在基因进化中的高度保守性。

祝长青等(2011)根据NCBI上已公布的中华鲟D-loop基因、细胞色素b基因、

12 S rRNA基因的核酸序列设计出4对引物，经SYBR Green实时荧光PCR反应、熔解曲线分析和扩增片段克隆测序后，发现针对D-loop基因的F2-R1引物能够高效、特异地实现对靶序列扩增，选择其作为中华鲟基因特异性扩增引物，建立中华鲟基因SYBR Green实时荧光PCR检测方法特异性好、可操作性强，具有较好的应用价值。

向燕等（2013）利用线粒体控制区部分序列对49个鲟鱼亲鱼进行遗传多样性分析。结果表明，鲟鱼亲鱼可划分为3大类：达氏鲟、中华鲟、史氏鲟，分别包括3、2、13个单倍型，多态位点分别有13、15、30个，单倍型多样性分别为0.417、0.2、0.853，核苷酸多样性分别为0.005 41、0.007 28、0.013 14，平均核苷酸差异数分别为2.222、3、5.52。同类各单倍型之间的遗传距离为0.002 39~0.059 44，不同类鲟鱼单倍型之间的遗传距离在0.045 72~0.221 27。表明，3类鲟鱼亲鱼群体遗传多样性均较丰富。

1.4.5 中华鲟其他方面研究

关于中华鲟的研究还集中在幼鱼的早期发育（柴毅等，2007；柴毅等，2009；柴毅等，2011；史玲玲等，2013）、饵料选择及营养需求（庄平，2009；陈喜斌，2002；高强，2006）、水声学研究及产卵场水文状况（Wang等，2013；Wang等，2014；Zhang等，2014；杨德国等，2007；张辉等，2007；张辉等，2010；危起伟等，2007）、毒理（姚志峰等，2010；杜浩，2007；章龙珍等，2012）、盐度适应性（李伟，2014；杨德国等，2007）、繁殖生物学及产卵群体结构变化（危起伟等，2005；危起伟等，2014；刘坚毅等，2007）和苗种质量及培育探究（柴毅等，2008；柴毅等，2012；柴毅等，2014；王恒等，2014；张晓燕等，2011；杨德国等，2008）等方面。

1.5 本研究的意义及技术路线

中华鲟为典型的大型溯河产卵洄游性鱼类，是我国国家一级重点保护野生动物。建立中华鲟人工养殖群体，实现全人工繁殖是保存中华鲟物种、实施迁地保护不可或缺的途径。尽管中华鲟已具有一定的蓄养规模并且人工繁殖获得成功，然而在中华鲟资源管理和种群保护中，种群遗传多样性、遗传结构以及系谱关系等遗传学研究一直未受到足够的重视，人工养殖的中华鲟遗传管理方面还相当薄弱。亲子鉴定研究能够指导中华鲟科学繁殖，防止近亲繁殖导致的种群衰退和遗传多样下降等严重后果，从而保证中华鲟人工养殖群体良性发展；从分子水平评价物种种质资源遗传多样性，对生物多样性的保护和生物资源的可持续利用都有重要的意义。也可为其它鲟鱼的分子研究等提供方法借鉴和通用性的引物。

本研究的主要内容包括以下 3 个方面：

(1) 本研究在前期中华鲟性腺转录组测序的基础上，筛选多态性微卫星引物（第二章）。

(2) 选取其中 10 对多态微卫星引物合成荧光引物，用于建立中华鲟亲子鉴定体系（第三章）。

(3) 选取其中 12 对多态微卫星引物合成荧光引物，用于中华鲟 3 个养殖群体遗传特性分析，对中华鲟遗传多样性水平做出评价，为中华鲟科学合理的保护提供理论依据（第四章）。

技术路线：

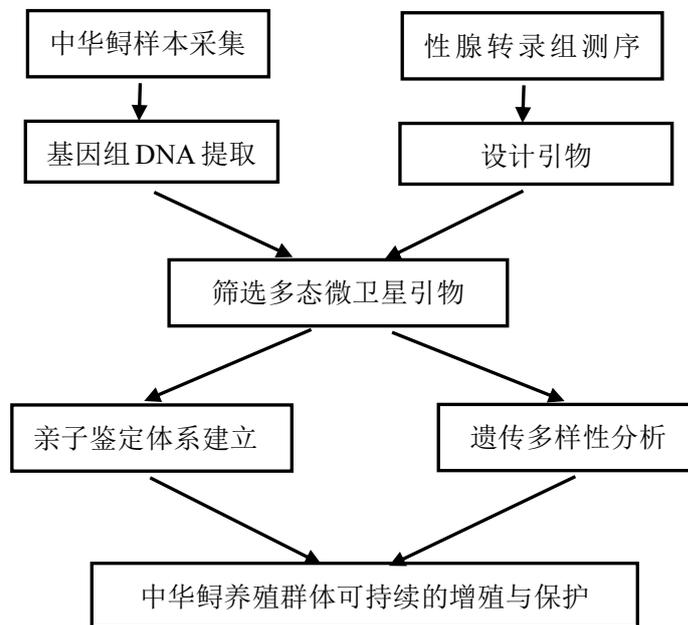


图1.2 中华鲟亲子鉴定及遗传特性研究技术线路图

Fig 1.2 Technical route for parentage identification and population genetic characteristics for *A. sinensis*.

第 2 章 中华鲟多态微卫星引物的筛选

2.1 前言

中华鲟为典型的大型溯河产卵洄游性鱼类，是我国国家一级重点保护野生动物。近年来，由于环境污染、过度捕捞、栖息地改变与破坏、葛洲坝修建等人类活动的干扰，资源量大幅度锐减，雌雄比例失调，自然种群严重衰退，有灭绝的危险。建立中华鲟人工养殖群体，实现全人工繁殖是保存中华鲟物种、实施迁地保护不可或缺的途径。尽管中华鲟已具有一定的蓄养规模并且人工繁殖已获得成功，但是在中华鲟资源管理和种群保护中，种群遗传多样性、遗传结构以及系谱关系等遗传学研究一直未受到足够的重视，人工养殖的中华鲟遗传管理方面还相当薄弱。近年来，微卫星 DNA 广泛应用于群体遗传学和系谱研究（Norris et al, 1999; Bierne et al, 1998）、品种鉴定、亲本与个体分析等（Stockburge et al, 2000; Bessert and Ortí, 2003）。关于鲟鱼微卫星方面的研究已有少量报道，May 等（1997）在湖鲟的基因组文库中筛选出 11 个微卫星位点，对 6 种鲟属鱼类和 2 种铲鲟属鱼类进行了检验。另外，Zhu 等（2002）利用湖鲟的 3 个多态性较高的微卫星位点以及铲鲟的 Spl-168 位点，对中华鲟人工放流个体占长江口幼鲟群体的比例进行了估算。目前关于筛选中华鲟多态微卫星引物的报道仅有一篇，主要应用传统的构建微卫星文库的方法来获得多态微卫星引物（Zhu et al, 2005）。本研究采用性腺转录组测序的方法以及常规的分子技术手段来筛选中华鲟多态微卫星标记，可作为中华鲟及同科鱼类亲子鉴定、遗传多样性和种质资源的评估及保护等研究的基础工具。

2.2 材料与方法

2.2.1 实验材料

本研究所用的 24 尾野生中华鲟鳍条样本于 2006-2007 年采自湖北省宜昌市，保存于无水乙醇中。

2.2.2 主要仪器

表 2.1 主要仪器

Tab.2.1 The instruments in this study

仪器名称 The name of instrument	生产厂家 Manufacturer
琼脂糖凝胶电泳槽	北京六一仪器厂
BIO-RAD型凝胶成像分析系统	美国SIM公司
GZX-DH电热恒温干燥箱	上海铁通医疗器械
PTC-200型PCR仪	美国MJ公司
DYCZ-24A垂直电泳槽	北京六一仪器厂
低温离心机5415R	德国Eppendorf公司
台式高速离心机5417R型	德国Eppendorf公司
微量移液器	德国Eppendorf公司
WD-9405B水平摇床	北京六一仪器厂

2.2.3 主要试剂

DNA提取试剂: 1×TE缓冲液(10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 高压灭菌, PH=8.0); 无菌抽提缓冲液 (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 0.4 M NaCl, 高压灭菌, PH=8.0); 20% SDS (20 g SDS, 加80 mL灭菌水, 定容至100 mL); Proteinase K; 6 M NaCl (70.2 g NaCl, 加160 mL灭菌水, 定容至200 mL); 异丙醇; 70%乙醇 (140 mL 无水乙醇, 加灭菌水60 mL)。

PCR所需试剂: dNTP (10 mM); 10×Buffer (含Mg²⁺); Taq DNA聚合酶: 5 U/μL。

50×TAE电泳缓冲液: 600 mL灭菌双蒸水中加242 g Tris-base, 溶解后加100 mL、0.5 M EDTA和57.1 mL冰醋酸, 调PH=8, 定容至1 L。

溴化乙锭 (EB): 1 g溶于100 mL灭菌水中。

聚丙烯酰胺凝胶电泳所需试剂: 30%丙烯酰胺溶液; 5×TBE; 10%的过硫酸铵; TEMED。

染色液: AgNO₃; 无水乙醇; 冰醋酸。

显色液: NaOH; 甲醛。

扩增引物均由上海生工生物有限公司合成。

2.2.4 基因组 DNA 的提取

采用高盐法提取中华鲟样本的基因组DNA (Salah and Iciar, 1997), 主要步骤如下:

(1) 从无水乙醇中取出保存的野生中华鲟鳍条样本, 剪取0.5 g左右, 放入2 mL离心管中, 用1×TE缓冲液浸泡12 h充分置换出酒精。

(2) 取出鳍条放入352 μL 的无菌抽提缓冲液中, 加入40 μL 20% SDS和10 μL 20 mg/mL蛋白酶K混匀, 56 $^{\circ}\text{C}$ 消化4 h以上, 每30 min轻轻摇晃EP管1次以利消化, 若组织不容易消化, 可延长消化时间至8 h, 也可37 $^{\circ}\text{C}$ 消化过夜。

(3) 待组织消化完全后, 加入300 μL 6 M NaCl溶液, 立刻剧烈震动30 s, 12 000 rpm离心10 min。

(4) 弃沉淀, 取上清液至新的EP管中, 加入等体积的预冷异丙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置1 h (也可过夜)。

(5) 12 000 rpm离心15 min (4 $^{\circ}\text{C}$)。

(6) 弃上清, 沉淀用70%的乙醇溶液洗涤1次, 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干或自然晾干。

(8) 加入50 μL 灭菌双蒸水溶解, 待完全溶解后稀释成100 ng/ μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存备用。

2.2.5 基因组DNA的检测

(1) 制备1.0%琼脂糖凝胶: 称取1.3 g琼脂糖粉末和量取130 mL 1×TAE缓冲液加入锥形瓶中, 手动摇匀后放入微波炉中加热3~4 min至溶液澄清, 然后取出待溶液稍微冷却后加入2~3滴EB摇匀。

(2) 制备胶板: 将制备胶板所需的胶槽、胶板、梳子洗干净晾干后, 放置于水平桌面上, 先把胶板放入胶槽, 再把梳子放在胶板边缘的凹槽中, 将配好的琼脂糖胶缓缓倒入胶板上, 待胶凝固后轻轻拔出梳子, 将胶板上的琼脂糖胶放入电泳槽中, 加入1×TAE缓冲液。

(3) 点样电泳: 取2 μL 提取好的基因组DNA样品与约1 μL 6×Loading buffer混合, 用移液枪将混匀的样品加入胶孔中, 在200 V电压下电泳约15 min。

(4) 观察: 电泳完成后, 将琼脂糖胶放入凝胶成像系统, 紫外光下观察条带亮度及位置, 结合标准分子量DL2000 (Takara) DNA Maker判断提取的基因组DNA是否完整。

2.2.6 微卫星序列选取及引物的设计

应用Excel分析从性腺转录组获得的微卫星序列, 选取碱基重复次数较高的序列用于引物设计, 选取序列的标准为: 2碱基重复10次及以上, 3碱基重复7次及以上, 4碱基重复6次及以上。利用软件Primer Premier 5.0 (Lalitha, 2000; Kamel et al, 2003) 在微卫星DNA序列的侧翼区上下游20 bp以外的保守区域设计引物。引物设

计原则为:

- (1) 引物序列长度在18~25 bp之间，上下游引物长度差异小于3 bp。
 - (2) GC含量40%~60%之间， T_m 值大于58 °C，且上下游引物的 T_m 值相差不超过3 °C，便于提高引物的特异性，减少扩增产生的干扰杂带。
 - (3) 引物3'端不以-A结尾。
 - (4) 引物扩增产物以300 bp左右为宜，以便后续对电泳条带的分析。
 - (5) 碱基组成随机分布，避免聚嘌呤、聚嘧啶出现。
 - (6) 引物之间不能有互补性，一般1对引物之间不应多于4个连续碱基互补。
- 最后将所设计的引物送至上海生工生物工程技术有限公司合成。

2.2.7 PCR 扩增

选择湖北省宜昌市 24 个野生中华鲟 DNA 样本作为模板，优化各组微卫星引物，调节模板浓度和反应退火温度，设置模板浓度梯度和退火温度梯度，视 PCR 扩增效果逐步进行调节。

进行 PCR 扩增实验时，应将反应混合物加入灭菌的 EP 管中，整个操作过程都在冰上进行，用移液枪准确量取、加样。各反应物加样完后要进行轻微震荡、混匀，之后再分装到各 PCR 管中，然后加入模板，放置于 PCR 仪中进行扩增反应。PCR 反应所需反应物如下表所示。

表 2.2 PCR 扩增体系

反应物 Reactant	体积 Volume (μL)
ddH ₂ O	17.6
10×PCR Buffer (15 mM Mg ²⁺)	3
dNTPs (10 mM)	1.0
Mg ²⁺ (25 mM)	0.5
Primer F (10 mM)	0.5
Primer R (10 mM)	0.5
Template (1000 ng/ μL)	1.5
<i>rTaq</i> Enzyme (5 U/ μL)	0.4
总反应体积	25

PCR反应条件: 首先94 °C 预变性5 min; 然后94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环30次; 其次72 °C 延伸10 min; 最后12 °C 10 min。PCR扩增产物用12%聚丙烯酰胺凝胶在垂直电泳槽中以150 V固定电压电泳, 结束后取出凝胶, 银染法染色, 在照明箱上拍照。观察照片, 选择扩增效率高、特异性好的引物, 然后进一步改变退火温度再次对其多态性进行筛选。

2.2.8 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 检测

2.2.8.1 12% PAGE 凝胶配方

表 2.3 PAGE 凝胶所需试剂及用量

Tab.2.3 The reagent and dosage of PAGE precast gel

试剂 Reagent	用量 Dosage
ddH ₂ O	15.7 mL
30% Acrylamide	16 mL
5×TBE	8 mL
10%AP	0.28 mL
TEMED	0.026 mL

2.2.8.2 PAGE 凝胶试剂配方

表 2.4 PAGE 凝胶试剂配方

Tab.2.4 The formula of reagents in PAGE precast gel

试剂 Reagent	总体积 Volume	组分 Components	用量 Dosage (g)
30% Acrylamide	1 L	丙烯酰胺	290
		甲叉双丙烯酰胺	10
5×TBE	1 L	Tris	54
		硼酸	27.5
		Na ₂ EDTA·2H ₂ O	3.72
10%AP	10 mL	过硫酸铵	1

2.2.8.3 PAGE 凝胶检测

(1) 前期准备: 严格清洗方玻璃板、耳玻璃板和小槽, 烘干后用 70%乙醇擦洗干净, 使用前用 1 mL 2%的剥离硅烷和亲和硅烷分别硅化耳玻璃板和方玻璃板。在方、耳玻璃板轮流处理过程中要更换手套, 防止两块硅烷交叉污染, 然后至少

干燥 10 min。

(2) 玻璃板组装：准备玻璃板架子，将小槽放置于玻璃板架底部并紧靠玻璃板，然后在小槽内放置方玻璃板和耳玻璃板，耳玻璃板在外，方玻璃板在内，使两块玻璃板稍微倾斜，其上方靠于玻璃板架，以便放稳，其次将 0.4 mm 厚的边条打湿置于方、耳玻璃板左右两侧，最后用夹子将方、耳玻璃板两侧固定于玻璃板架上。

(3) 配制 1%的琼脂糖胶：在锥形瓶中加入 1 g 琼脂糖粉和 100 mL 去离子水摇匀，放置于电炉上加热至琼脂糖溶液澄清，然后将 1%的琼脂糖溶液加入小槽至四分之三，用移液枪吸取琼脂糖溶液，顺着 0.4 mm 厚的边条缓缓将 1%的琼脂糖溶液打出，使其流至玻璃板底部，室温凝固约 1 h 以防止漏胶。

(4) 配制聚丙烯酰胺凝胶：将 30%的丙烯酰胺溶液、5×TBE、10%的过硫酸铵、TEMED 和去离子水按比例配置成 12%的非变性聚丙烯酰胺凝胶，沿灌胶口缓缓灌入，直至聚丙烯酰胺凝胶充满耳玻璃板与方玻璃板的缝隙，然后在灌胶口轻轻插入齿梳。在灌胶过程中要严格防止气泡，否则会影响电泳的效果，灌胶结束后，倾斜放置使之至少聚合 2.5 h。

(5) 电泳：当凝胶聚合完全后，轻轻拔出齿梳，从玻璃板架上卸下含聚丙烯酰胺凝胶的玻璃板，并将其组装到电泳槽上（耳玻璃板朝内，方玻璃板朝外），将 1×TBE 缓冲液加入上下两个电泳槽，然后用移液枪在齿梳孔内加入 PCR 产物与 6×Loading buffer 混合后的样品，接通电源，150 V 下电泳约 4 h。

(6) 电泳结束后，关闭电源，小心分开两块玻璃板，准备染色。

2.2.9 银染法

(1) 染色液配制：1 g AgNO_3 ，50 mL 无水乙醇，2.5 mL 冰醋酸，加去离子水定容至 500 mL，搅拌，混匀。

(2) 显色液配制：15 g NaOH，2.5 mL 甲醛，加去离子水定容至 500 mL，搅拌，混匀。

(3) 染色：轻轻将凝胶剥离玻璃板至盘中，加入染色液 200 mL 左右，然后将盘置于水平摇床上，摇床轻摇 8~10 min，然后将染色液倒掉，用去离子水冲洗 15 s。

(4) 显色：在盘中加入显色液 200 mL 左右，置于摇床，轻轻摇晃至条带清楚出现，然后用自来水清洗凝胶 2 次，去离子水清洗 1 次。

(5) 拍照：将清楚显现条带的聚丙烯酰胺凝胶置于灯箱上拍照。

(6) 保存：准备一块洁净的玻璃板用蒸馏水浸湿，取一张比玻璃板大的玻璃

纸用水浸湿覆盖于玻璃板上，将凝胶小心捞出放置于玻璃板上，洒上少许蒸馏水让凝胶充分润湿，用另外一张同样大小的玻璃纸浸湿后覆盖于凝胶上，赶走两层玻璃板之间的气泡并抚平，将玻璃板周围的玻璃纸折叠压于玻璃板下，室温干燥1~2 d，即可从玻璃板上揭下胶片，长期保存。

2.2.10 数据分析

应用 Excel 分类微卫星碱基不同重复次数的序列以及统计等位基因数(Number of allele, Na)；软件 Primer Premier 5.0 设计微卫星引物；软件 ATetra 1.2 (Van Puyvelde 等, 2010) 分析计算期望杂合度 (Expected heterozygosities, He)、Shannon-Wiener 多样性指数(Shannon-Wiener Diversity Indices, SW), 软件 Genodive (Meirmans & Van Tienderen 2004) 分析微卫星位点的哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)；软件 LD4X (Julier 2009) 分析连锁平衡 (Linkage Disequilibrium, LD)。

2.3 结果

2.3.1 中华鲟基因组 DNA 的提取

本研究采用高盐法，简便、快速地提取到了高质量的中华鲟基因组 DNA，且具有一定的完整性和较高的浓度(如图 2.1)，为成功的 PCR 扩增奠定了良好基础。有部分个体基因组存在小片段的弥散条带，说明基因组在提取的过程中有一定程度的断裂或降解(如图 2.1)。

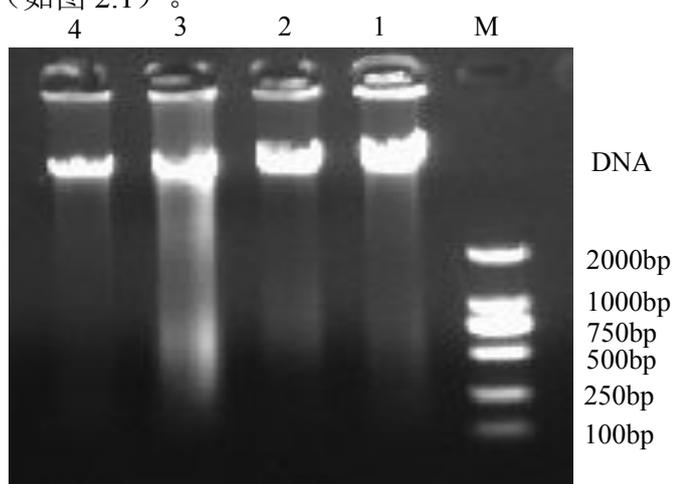


图 2.1 中华鲟基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

M: DL2000 bp DNA Maker; 1-4: 不同中华鲟个体 DNA

Fig.2.1 The extracted total genomic DNA of Chinese sturgeon

M: DL2000 bp DNA Maker; 1-4: The extracted total genomic DNA from different *A. Sinensis*

2.3.2 微卫星引物的设计

中华鲟转录组序列的含微卫星位点中，2 碱基重复型最多，如图 2.4 所示为一个 2-3 碱基复合重复型的微卫星序列，该序列中 CT 两碱基重复 9 次和 CTC 3 碱基重复 5 次（大写所示），且两端侧翼序列均大于 300 bp，可用于中华鲟微卫星引物的设计。应用软件 Primer Premier 5.0 共设计微卫星引物 165 对。

```
ctgtatcactgtgctcccagaaatggaggatcagttaaaaagtcttgcctggcctccagttctaaaggggagggggacgctg
tacgctttcttacaatgtatttgaatctttcattgatttatttgaattgtcctcacgggaccgtgctaaaccgttcttaaagttt
aaagtgcctgcctccgaaaggtcacgtcaagcgcacagacagtttaataatagcgtgaagacgttcaggtgcagcagaa
acatttgattgactgaagcttggtgagttctacagttcagcCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTtactctctctatccctC
TCCTCCTCCTCCTCtctcgatttctggcgaagaagcccagctccacaggatgaagatgatgagggcgaggagc
aacaggcctccgatgatgtgccaatgagaatccagagagagaccgggatgcgccggccttcatcacctccagggggctc
tcttccagtccccgctctgtcccaggacaatcacactggagtcggtcgtcggagaacgtgcacgctcacgatctcaccga
ccggaactgggcctcgcggtagaagtcctggtgactctcctgccgaccggatctgcactgcttggttccgctg
```

图2.2 典型微卫星序列

Fig.2.2 A typical microsatellite sequences

2.3.3 多态微卫星引物筛选及微卫星标记特征

随机挑选湖北省宜昌市 5 个野生中华鲟基因组 DNA 作为模板，用设计的 165 对微卫星引物进行 PCR 扩增，验证微卫星引物的多态性。PCR 产物经 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染法染色后，结果显示有 24 个微卫星位点扩增条带清晰且具有明显多态性，扩增条带大小与预期结果一致。为进一步确定筛选的微卫星引物的稳定性及各微卫星标记的特征，将初步筛选的微卫星引物在 24 个野生中华鲟个体基因组中进行 PCR 扩增，经聚丙烯酰胺凝胶电泳仪进行多态性筛选。实验结果得，24 个微卫星位点能够稳定清晰的扩增，且具有多态性，包括 13（54.2%）个 2 碱基重复型、9（37.5%）个 3 碱基重复型和 2（8.3%）个 2-3 碱基复合重复型（表 2.6）。图 2.3 是微卫星标记 Asi-46902 在 24 个野生中华鲟个体中的扩增结果。

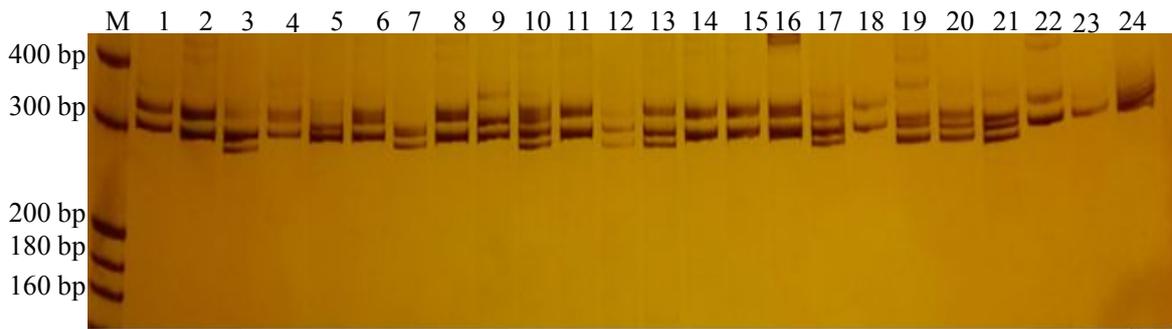


图2.3 微卫星标记Asi-46902在24个中华鲟个体中的扩增图谱

M: 20bp DNA Marker; 1-24: 不同中华鲟个体DNA

Fig.2.3 Amplification pattern of microsatellite locus Asi-46902 in 24 individuals of *A. sinensis*

M: 20bp DNA Marker; 1-24: The extracted total genomic DNA from different *A. sinensis*

将24个多态微卫星标记用于24个野生中华鲟个体遗传多样性研究，利用软件ATetra 1.2和软件Genodive分析24个微卫星标记的遗传特征，结果如表2.5，24个多态微卫星标记的等位基因数为2~6个，期望杂合度为0.235~0.786，Shannon-Wiener多样性指数为0.396~1.608。其中有9个微卫星标记（Asi-72632、Asi-75905、Asi-71347、Asi-67123、Asi-71954、Asi-77057、Asi-74518和Asi-70421）显著偏离哈迪-温伯格平衡（ $P < 0.01$ ）。位点Asi-67123、Asi-77057和Asi-67648扩增产物中，部分个体扩增条带数 ≥ 4 ；位点Asi-55961、Asi-52396、Asi-74654、Asi-68632和Asi-62964扩增条带数 ≤ 2 ；位点Asi-72632、Asi-66034、Asi-46902、Asi-68191、Asi-48230、Asi-65194、Asi-75067、Asi-75905、Asi-71347、Asi-71954、Asi-73843、Asi-76964、Asi-72040、Asi-74518、Asi-70421和Asi-56700扩增条带数 ≤ 4 ，表明中华鲟是多倍体生物，同时这些微卫星位点可用于中华鲟亲子鉴定、遗传多样性分析及种间鉴定等研究。

表2.5 24个中华鲟微卫星标记特征

Tab.2.5 Characterization of 24 polymorphic microsatellite loci in *A. sinensis*

位点 Locus 登录号 GenBank Accession no.	重复单元 Repeat motif	引物序列 Primer (5'-3')	退火 温度 Tm (°C)	片段大小 Size (bp)	等位 基因数 Na	期望 杂合度 He	Shannon-Wiener 多样性指数 SW	哈迪-温伯 格指数 HWE	倍性 Ploidy (n)
Asi-72632 KM379071	(GT)7...(GT)6	F:AGGGCACTCACCTGGGA R:AGACCTGGAGAAAGCGAGACAC	62	296	4	0.633	1.132	0.001*	4n
Asi-66034 ^{#y} KM379072	(CGA)7	F:CCTACGCCAAGCTCAACCAG R:ACCGCAGAGTCACGGAGTTG	56	309	3	0.660	1.088	0.362	4n
Asi-46902 ^y KM379073	(TG)8...(TG)6	F:GGGTGTGTGTGTTTGT R:ACACTCCCACACACCTCTTCATT	58	313	4	0.668	1.227	0.164	4n
Asi-55961 KM379074	(AG)7...(AG)7	F:AAGTTCGGGCTCAACCTTGC R:CTCTCACATCCCCTTCTCCAG	62	294	3	0.403	0.723	0.999	2n
Asi-68191 KM379075	(CTG)7	F:ATTATCACCAGCAGCAGCAGG R:AAGGAGAGGCAGAGCTTCAGG	52	302	4	0.687	1.255	0.962	4n
Asi-48230 KM379076	(CTA)7	F:TTAGTAGTTTCTGGTCTGCTTGTC R:AAGTCACACATTTTCTGGCGG	46	298	4	0.613	1.066	0.895	4n
Asi-65194 ^{#y} KM379077	(ATT)5...(CA)6	F:TACAAAATCGGCAGAAAGGCT R:GCAGGCATGATGAGAATAGGC	58	296	5	0.723	1.386	0.381	4n
Asi-52396 KM379078	(CTG)7	F:CGGCGACTCTGTTCCTCATC R:CTCTAGCGTCAGCATGCACC	58	299	2	0.235	0.396	0.925	2n

Asi-75067# [¥] KM379079	(TG)7...(AG)8	F:AGAGTTCTCGAAGCGGAAACAG R:CTGGTTCAAACCTGGGAGCGAT	60	293	5	0.736	1.435	0.222	4n
Asi-75905 KM379080	(TA)8...(CA)7	F:GCATACTTTTTTGTTCAGTGCCTT R:TAATGACAACCTTTTTGCTGGGAAT	60	306	4	0.672	1.145	0.004*	4n
Asi-71347 [¥] KM379081	(AC)6...(AT)6	F:AAGGAATACAAACACTGCAATGG R:AGGAAAAGGGATGTGTGTATTGTT	62	298	6	0.765	1.563	0.001*	4n
Asi-67123# [¥] KM379082	(AC)8...(CA)8	F:AGCTAACAGCAGTGCATGGTATTT R:CTTGAGATAAAAAGGCGCTGTAGAG	62	276	6	0.733	1.477	0.002*	>4n
Asi-71954 KM379083	(AG)6...(AG)7	F:CTACCTGTCCAAGTGCTCCG R:TCTTCCTCCTCTCTGCTCACC	48	303	3	0.564	0.904	0.001*	4n
Asi-73843# [¥] KM379084	(AGC)7	F:GGTGTGTTGAAAGACAGCGAGAA R:TTCCTCCAGGACAGAGTTTGC	58	292	4	0.702	1.293	0.065	4n
Asi-74654 KM379085	(TA)6...(AT)6	F:ATGCAAAACGAGTGCCTGTG R:TAAGTGTGCCCTAGTGACGATTC	56	290	3	0.343	0.634	0.667	2n
Asi-68632 KM379086	(TA)10	F:AGTGTCAATCATACCCCTGCTG R:CGACACGCTGGAATGTTTTG	58	287	3	0.459	0.810	0.450	2n
Asi-77057# [¥] KM379087	(TG)6...(TG)8	F:GGGTCCCGCACAGTTTAAAG R:GACGGCAAGGCAAGATAGGT	56	300	6	0.751	1.549	0.006*	>4n
Asi-76964 [¥] KM379088	(AGC)7	F:GGACAAAGGACAGCCAAAGC R:CATTTTTGTCACAATCGGCAG	58	299	3	0.647	1.069	0.125	4n
Asi-72040# [¥] KM379089	(CTT)5...(TGC)5	F:AGCAGAGTCCACATCCCCCT R:GAGTGTGCTCGAAAGCCCT	62	306	3	0.652	1.077	0.129	4n

Asi-67648 ^{#¥} KM379090	(GGA)6...(GGT)5	F:TCCGGTACTGGAAACCCTTG R:ATTCGCCTGGAAGAGCACAC	60	302	6	0.786	1.608	0.184	>4n
Asi-74518 KM379091	(TA)9(AGC)5*	F:GCATTCCACTTAAATTAGGATTGC R:TATTGAGGCAGGCATGGAGC	46	297	5	0.719	1.362	0.001*	4n
Asi-70421 [#] KM379092	(TGA)8	F:TGCCACAAATAAGATGCAGGAG R:TTTGCTTTGGAAACTGTACTGC	56	309	3	0.614	1.010	0.001*	4n
Asi-62964 KM379093	(CT)11	F:CGATGAACCCAAACCCACAC R:ACAAACTGCACCAATCCCCTT	50	288	3	0.488	0.749	0.001*	2n
Asi-56700 ^{#¥} KM379094	(GA)7...(GA)7	F:CAACCTCTTCACTACCGCAAAC R:TGCAAAAAGGAATTGGAATCG	50	295	5	0.684	1.244	0.237	4n

注：*：表示严重偏离哈迪-温伯格平衡 ($P < 0.01$)；#：第三章用于建立中华鲟亲子鉴定体系的微卫星标记；¥：第四章用于中华鲟遗传多样性分析的微卫星标记。

*: means significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium; #: represents the loci were used to establish the system of parentage identification in chapter 3; ¥: represents the loci were used to Analyze the genetic variation in chapter 4.

2.4 讨论

2.4.1 微卫星位点多态性

本研究筛选的多态微卫星重复序列中，2 碱基重复型有 13 个（54.2%）、3 碱基重复型有 9 个（37.5%），2-3 碱基复合重复型有 2 个（8.3%）。在鱼类中，一般 2 碱基重复型微卫星含量最高，传统的微卫星分离方法多以 2 碱基重复类型的微卫星探针为主（谭照君等，2011），且适合设计引物的序列也较多，4 碱基及以上重复型较少且适合进行引物设计的序列也较少。由此看来，从二代测序技术获得的转录组文库中筛选微卫星多态位点是一个比较好的方式。

由表 2.5 可知，除位点 Asi-52396 外，所筛选的 24 个多态微卫星位点的等位基因数均在 3 以上，表明这些微卫星位点的多态性较高。期望杂合度是杂合子在每个微卫星位点的比例的期望值，Shannon-Wiener 多样性指数用来估算群落多样性的高低，这些都是常用的衡量种群遗传变异的指标，这些指标越高，表明群体遗传多样性越高，本研究中只有 5 个微卫星位点期望杂合度小于 0.6，其余均大于 0.6，平均期望杂合度为 0.622。徐丹丹（2013）分别使用荧光分型方法和 PAGE 凝胶电泳方法来确定各位点等位基因大小，结果表明通过 PAGE-计数法统计微卫星等位基因大小会低估多样性相关参数，并且误差较大。本研究是基于传统的 PAGE-计数法对微卫星位点进行分型计数，说明这些微卫星标记的实际遗传多样性指数均高于本研究得出的数值，表明本研究开发的微卫星均可用于对中华鲟群体长期的监测和遗传分析。

2.4.2 哈迪-温伯格平衡检验

哈迪-温伯格平衡检验是有性繁殖群体上下代之间基因型频率和基因频率是否保持平衡的检验尺度，HWE 大于 0.05，表示处于哈迪-温伯格平衡状态，HWE 小于 0.01，表示极显著偏离了哈迪-温伯格平衡状态（Guo and Thompson, 1992; Wigginton et al, 2005）。本研究共筛选得 24 对多态微卫星引物，如表 2.5 所知，其中 9 个微卫星位点偏离了哈迪温伯格平衡。Zeng 等（2013）在筛选达氏鲟微卫星引物时，同样发现大部分微卫星位点偏离了哈迪温伯格平衡。无效等位基因、非随机交配、基因漂流、近亲繁殖及繁殖时没有进行个体重新组合等都会造成多倍体物种偏离哈迪温伯格平衡（Hou et al, 2013）。本实验样本均采集于湖北宜昌，众所周知，自葛洲坝截流，阻断其生殖洄游通道，中华鲟处于极度濒危状态，种群数量非常有限，已成熟的亲鱼数量更是有限，已很难形成一个随机交配的群体，因此自然条件下近亲繁殖很难避免，这可能是本研究中微卫星位点偏离哈迪-温伯

格平衡的主要原因。

2.4.3 多倍体中华鲟

鲟鱼是一类多倍体鱼类，一般有比亲缘两性二倍体更强的适应和生长繁殖能力。本研究 24 个微卫星位点中，12.5%微卫星位点扩增产物的等位基因数 ≥ 4 ，20.8%微卫星位点扩增产物的等位基因数 ≤ 2 ，66.7%微卫星位点扩增产物的等位基因数 ≤ 4 。然而，在位点 Asi-67123、Asi-77057 和 Asi-67648 中，仅有少数几个个体的等位基因数 >4 ，而大部分个体的等位基因 ≤ 4 。Ludwig 等（2001）通过采用微卫星等方法认为中华鲟是四倍体生物，且存在部分位点极少量个体等位基因数大于 4 的现象。本实验结果中，多数位点显示中华鲟为四倍体，但部分位点中少数个体等位基因大于 4，与 Ludwig 等的观点一致。

本研究成功的筛选出 24 对多态性微卫星引物，对于开展中华鲟遗传研究具有重要的理论和实践意义，同时也为后续中华鲟亲子鉴定体系建立和遗传多样性研究提供了基础。

第3章 多倍体中华鲟微卫星亲子鉴定体系的建立

3.1 前言

中华鲟野生种群数量不断下降，野生个体数量已非常稀少，仅在葛洲坝下发现一处适宜其繁殖和栖息的自然产卵场，且有效面积非常有限(Wang et al, 2013)。2013年和2014年已连续两年没有监测到中华鲟自然产卵现象。同时全人工繁殖的中华鲟子二代受精率低，抗病能力弱，目前也无法完成这一物种成功有效的长久保存。中华鲟人工养殖亲鱼数量有限，且人工繁殖时通常未进行配种设计，多年累代养殖后，将会造成不同程度的近亲繁殖，导致养殖群体遗传结构破坏，种质退化，使得抗病能力极弱，畸形比例增加，严重影响中华鲟物种保护的效果。为减少近亲繁殖导致的遗传问题以及培养出具有较好生存力的繁殖后代，保护这一濒危物种不至于灭绝，迫切需要建立科学可靠的遗传系谱来有效指导中华鲟规模化的人工繁殖。

微卫星DNA，是一种共显性标记，具有多态性丰富、检测简便快捷、PCR扩增结果重复性好等特点。近年来，随着濒危物种遗传保护研究日益增强，微卫星分子标记在濒危动物保护中也得到越来越多的应用(王绍先等, 2008)。基于微卫星标记的二倍体动物亲子鉴定体系已经建立(成为为等, 2014)，并成功应用于系谱建立和遗传管理。然而国内外关于鲟鱼等多倍体动物亲子鉴定报道还较少。Rodzen等(2004)应用微卫星标记对高首鲟(*Acipenser Transmontanus*)进行了亲子鉴定分析。近期，Boscari等(2014)通过采用微卫星和线粒体测序对多倍体意大利鲟(*Acipenser naccarii*)进行家系管理并根据遗传数据设计短期和长期繁育计划。多倍体中华鲟(Ludwig et al, 2001)因其复杂的遗传特性和未知的染色体数目使其亲子鉴定研究遇到瓶颈，朱滨等(1999)利用湖鲟的2个微卫星标记对中华鲟进行了亲子鉴定研究，但只对少量样本进行了简单的分析，并未建立中华鲟亲子鉴定的微卫星标记体系。本试验采用微卫星标记方法，在已有研究的基础上，进一步优化亲子鉴定微卫星标记组合，形成鉴定准确、检测费用低廉的微卫星亲子鉴定体系，为中华鲟成功高效的人工繁殖提供理论依据和技术指导。

3.2 材料和方法

3.2.1 实验材料

本试验材料取自中国水产科学院长江水产研究所荆州太湖中华鲟试验场，其中包括 2012 年和 2013 年通过人工繁殖获得的中华鲟 2 个家系，子代各 28 尾、真实的亲本 4 尾及随机挑取与家系无关的 8 尾后备亲鱼。样品均采集鳍条，保存在无水乙醇中备用。

3.2.2 实验仪器

参考第二章 2.2.2。

3.2.3 实验试剂

参考第二章 2.2.3。

3.2.4 基因组 DNA 的提取

采用高盐法提取中华鲟基因组 DNA，具体实验步骤参考第二章 2.2.4。

3.2.5 荧光引物合成

基于实验室已筛选出的 24 个多态微卫星标记，选取其中多态性较高的 10 个（表 2.5 用“#”标注的微卫星位点）用于亲子鉴定，由上海生工生物工程技术服务有限公司合成 5'端带有 FAM 或 HEX 的荧光引物。

3.2.6 PCR 扩增

将提取的中华鲟亲本及子代的基因组 DNA 稀释 100 倍，终浓度约 50 ng/ μ L，用上述 12 对荧光标记的微卫星引物进行 PCR 扩增，避光操作，反应体系参照 2.2.7。

PCR 反应条件为：95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；95 $^{\circ}$ C 变性 30 s，退火（表 2.5）30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min，30 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min；4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳，EB 染色，自动凝胶成像系统拍照检测，然后送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序，在 ABI3730 自动测序仪上进行荧光信号收集，利用毛细管电泳方法进行基因型检测。为降低微卫星基因型测序成本，将带有不同荧光基团的 PCR 产物两两混合进行测序。本试验将 10 个微卫星标记分为 5 组，标记组合及其所携带荧光基团见表 3.1。

表 3.1 微卫星标记分组情况

Tab.3.1 The grouping of microsatellite markers in *A. sinensis*

分组 Group	位点名称 Loci	荧光标记 Fluorescent label	片段大小 Fragment size (bp)
A	Asi-75067	HEX	293
	Asi-67648	FAM	302
B	Asi-67123	FAM	276
	Asi-73843	HEX	292
C	Asi-72040	FAM	306
	Asi-65194	HEX	296
D	Asi-70421	FAM	309
	Asi-56700	HEX	295
E	Asi-77057	FAM	300
	Asi-66034	HEX	309

3.2.7 统计方法

应用 Excel 统计等位基因数 (Na)；软件 ATetra 1.2 (Van Puyvelde et al, 2010) 分析计算期望杂合度 (He) 和 Shannon-Wiener 多样性指数 (SW)；软件 GeneMarker V1.5 读取等位基因大小；软件 FaMoz (Gerber et al, 2003) 进行中华鲟亲子鉴定分析, 计算排除率 (Exclusion probabilities, PE) 与累积排除率 (Cumulative exclusion probabilities, CPE)；软件 Genodive (Meirmans & Van Tienderen, 2004) 分析欧氏距离 (Euclidean distance) 与遗传系数 (kinship coefficient)。

3.3 结果

3.3.1 微卫星标记的多态性

微卫星标记的等位基因、等位基因数和等位基因频率统计结果见表 3.2, 10 个微卫星标记共检测到 124 个等位基因, 平均等位基因数为 12.4, 其中等位基因数最多的位点为 Asi-77057, 检测到 22 个等位基因; 其次为 Asi-75067, 检测到 17 个等位基因; 等位基因数最少的位点是 Asi-66034, 有 7 个等位基因。

表 3.2 中华鲟微卫星标记等位基因及其等位基因频率

Tab.3.2 Number of alleles and allele frequencies of microsatellite markers in *A. sinensis*

位点 Loci	等位基因大小 Allele size	等位基因频 Allele frequency	位点 Loci	等位基因大小 Allele size	等位基因频 Allele frequency
Asi-75067	274	0.182	Asi-67648	300	0.011

西南大学硕士学位论文

276	0.050		302	0.123	
280	0.004		305	0.062	
284	0.070		308	0.004	
286	0.008		312	0.202	
288	0.150		317	0.063	
290	0.128		320	0.140	
292	0.124		324	0.148	
296	0.178		327	0.109	
300	0.004		330	0.060	
302	0.004		333	0.014	
304	0.008		336	0.011	
308	0.066		339	0.004	
314	0.004		342	0.049	
316	0.004		281	0.077	
320	0.008		286	0.005	
322	0.008		298	0.005	
238	0.004		301	0.145	
248	0.008	Asi-72040	304	0.010	
250	0.012		307	0.343	
252	0.142		311	0.222	
256	0.012		314	0.087	
258	0.008		317	0.005	
260	0.004		321	0.010	
262	0.244		280	0.004	
Asi-77057	264	0.020	284	0.004	
	272	0.004	286	0.004	
	276	0.008	289	0.209	
	278	0.021	300	0.044	
	280	0.004	Asi-70421	304	0.161
	282	0.012		307	0.229
	284	0.200		310	0.225
	286	0.004		313	0.116
	294	0.004		316	0.004

第 3 章 多倍体中华鲟微卫星亲子鉴定体系的建立

	296	0.008		260	0.007
	298	0.008		287	0.007
	300	0.228		296	0.270
	304	0.041		298	0.292
	306	0.004	Asi-56700	300	0.109
	281	0.016		302	0.044
	283	0.208		304	0.044
	288	0.074		310	0.161
	292	0.372		312	0.066
Asi-65194	294	0.005		262	0.147
	300	0.09		274	0.004
	302	0.085		278	0.004
	304	0.085		282	0.013
	314	0.065		284	0.017
	263	0.098		287	0.176
	269	0.053	Asi-73843	290	0.164
	273	0.214		293	0.118
	274	0.004		295	0.218
	278	0.053		298	0.046
	282	0.019		300	0.060
Asi-67123	284	0.049		302	0.004
	287	0.192		305	0.029
	291	0.011		256	0.290
	294	0.144		291	0.283
	297	0.147		298	0.020
	303	0.008	Asi-66034	300	0.195
	306	0.008		303	0.058
				306	0.150
				312	0.004

3.3.2 遗传多样性分析

微卫星标记的遗传多样性检测结果显示（表 3.3），10 个微卫星位点期望杂合度为 0.733~0.873，Shannon-Wiener 多样性指数为 1.545~2.179，说明这 10 个微卫

星标记具有较高的多态性，可用于中华鲟亲子鉴定及系谱建立等遗传学分析。

表 3.3 中华鲟微卫星各位点的遗传信息

Tab.3.3 Genetic information of the microsatellite loci in *A. sinensis*

位点 Loci	等位基因数 Na	期望杂合度 He	Shannon-Wiener 多样性指数 SW
Asi-75067	17	0.858	2.033
Asi-67648	14	0.873	2.179
Asi-67123	13	0.756	1.562
Asi-73843	13	0.803	1.697
Asi-72040	10	0.774	1.661
Asi-70421	10	0.733	1.590
Asi-56700	9	0.802	1.888
Asi-65194	9	0.764	1.545
Asi-77057	22	0.845	2.015
Asi-66034	7	0.843	1.977

3.3.3 微卫星标记对已知亲本中华鲟家系的检测分析

通过对中华鲟繁殖亲本与子代基因型(表 3.4 和 3.5)比较发现,位点 Asi-75067、Asi-67123、Asi-73843、Asi-72040、Asi-70421 和 Asi-65194 对该两个家系成员扩增结果中,子代与亲本基因型保持一致,且 56 个子代基因型在该 6 个微卫星位点均呈杂合态。其余 4 个位点子代基因型与亲本基因型都存在不同程度的差异:位点 Asi-67648 有 13 个子代个体的部分等位基因 330、333 和 336 不是来自亲本,位点 Asi-56700 有 13 个子代个体的其中一个等位基因 310 不是来自亲本,位点 Asi-77057 有 4 个个体的 7 个等位基因不是来自亲本,位点 Asi-66034 有 2 个个体的一个等位基因 298 不是来自亲本,其余个体全部等位基因均来源于亲本(表 3.5)。

表 3.4 中华鲟 10 个微卫星标记的基因型

Tab.3.4 Genotype of 10 microsatellite markers in *A. sinensis*

位点 Loci	2013 年父本基因型 Male parent genotypes				2013 年母本基因型 Female parent genotypes				2013 年子代 1 基因型 Genotypes of offspring 1			
Asi-75067	274	276	290	296	274	290	292	308	276	292	296	308
Asi-67648	302	312	317	327	312	320	327	342	302	312	327	342
Asi-67123	269	287	297		263	273	284	297	269	273	287	297
Asi-73843	287	293			262	290	295	298	262	287	293	298
Asi-72040	301	307	311		301	307	311		301	307	311	
Asi-70421	289	307	310	313	289	304	307		289	304	307	310
Asi-56700	298	300	312		296	298			296	298	312	
Asi-65194	292	304			283	288	292		283	292	304	
Asi-77057	262	284	300		252	262	284	300	262	284	300	
Asi-66034	256	291	300	306	256	291	300	303	256	291	300	

表 3.5 中华鲟子代与亲本等位基因比较结果

Tab.3.5 Comparison of the alleles between parents and offspring of *A. sinensis*

位点 Loci	A	B	C	D											
Asi-75067	√														
Asi-67648		13	3		330	333	336								
Asi-67123	√														
Asi-73843	√														
Asi-72040	√														
Asi-70421	√														
Asi-56700		13	1		310										
Asi-65194	√														
Asi-77057		4	7		248	250	260	264	280	282	298				
Asi-66034		2	1		298										

注：A：子代全部等位基因来自亲本的位点；B：非全部等位基因来自亲本的后代个体数；C：来自非父母的等位基因个数；D：非父母的等位基因。

A: the loci that the offspring's alleles are all from parents; B: the number of offspring whose some of alleles are from parents; C: the number of alleles are not from parents; D: the alleles are not from parents.

3.3.4 排除率和累积排除率

由表 3.6 可知，位点 Asi-75067 的排除率最高，为 0.555 491；Asi-65194、Asi-77057 和 Asi-66034 三个位点的排除率较低，均低于 0.4。依据中华鲟微卫星标记排除率由高到低的顺序（表 3.6），当微卫星位点数目不小于 7 时，累积排除率均大于 0.99，分别为 0.992 799、0.999 681 和 0.999 998。因此，确定 Asi-75067、Asi-67648、Asi-67123、Asi-73843、Asi-72040、Asi-70421 和 Asi-56700 等 7 个多态性较高的微卫星标记为中华鲟微卫星亲子鉴定体系。在某些标记不能顺利提供信息时，为达到排除率大于 0.99 的标准，把位点 Asi-65194、Asi-77057 和 Asi-66034 作为候选标记。

表 3.6 中华鲟微卫星标记的排除率及累积排除率

Tab.3.6 Exclusion probability and cumulative exclusion probability of different microsatellite markers for parentage testing in *A. sinensis*

位点 Loci	PE1	PE2	PE3	CPE1	CPE2	CPE3
Asi-75067	0.555 491	0.717 114	0.880 012	0.555 491	0.717 114	0.880 012
Asi-67648	0.534 586	0.699 645	0.867 453	0.793 119	0.915 034	0.984 096
Asi-67123	0.526 405	0.692 778	0.862 250	0.902 022	0.973 896	0.997 809
Asi-73843	0.523 063	0.690 126	0.859 557	0.953 271	0.991 911	0.999 692
Asi-72040	0.442 998	0.620 577	0.806 304	0.973 972	0.996 931	0.999 940
Asi-70421	0.431 458	0.609 188	0.788 036	0.985 202	0.998 801	0.999 987
Asi-56700	0.407 490	0.585 600	0.771 956	0.991 232	0.999 503	0.999 997
Asi-65194	0.396 250	0.575 876	0.762 169	0.994 706	0.999 789	0.999 999
Asi-77057	0.399 454	0.577 398	0.758 192	0.996 821	0.999 911	1.000 000
Asi-66034	0.366 892	0.555 952	0.725 063	0.997 987	0.999 959	1.000 000

注：PE1: 单亲排除率; PE2: 父权排除率; PE3: 双亲排除率; CPE1: 单亲累积排除率; CPE2: 父权累积排除率; CPE3: 双亲累积排除率

PE1: exclusion probability of single parent; PE2: exclusion probability of paternity; PE3: exclusion probability of pair parent; CPE1: cumulative exclusion probabilities of single parent; CPE2: cumulative exclusion probabilities of paternity; CPE3: cumulative exclusion probabilities of pair parent.

3.3.5 欧氏距离与亲缘系数

由表 3.7 可知，2013 年和 2012 年子代与真实亲本间的平均欧氏距离分别为 1.809 ± 0.043771 和 1.768 ± 0.048545 ；2013 年和 2012 年子代与候选亲本间的平均欧氏距离分别为 2.119 ± 0.044072 和 2.2543 ± 0.043196 （表 3.7）。根据两个家系子代与真实亲本和候选亲本间平均欧氏距离得出：当候选亲本与子代间的欧氏距离 $\leq 1.781 \pm 0.046158$ 时，则是子代的真实亲本；当候选亲本与子代间的欧氏距离在

1.781±0.046158~2.160±0.043949 之间,则可能是子代的真实亲本;当候选亲本与子代间的欧氏距离 $\geq 2.160\pm 0.043949$ 时,则不是子代的真实亲本。由表 3.8 知,2013 年和 2012 年子代与真实亲本间的平均亲缘系数分别为 0.028 ± 0.007627 和 0.046 ± 0.008841 ; 2013 年和 2012 年子代与候选亲本间的平均亲缘系数分别为 0.0016 ± 0.006290 和 -0.0226 ± 0.010246 (表 3.8)。根据两个家系子代与真实亲本和候选亲本间平均亲缘系数得出:当候选亲本与子代间的亲缘系数 $\geq 0.037\pm 0.008234$ 时,则是子代的真实亲本;当候选亲本与子代间的亲缘系数在 $-0.011\pm 0.008268\sim 0.037\pm 0.008234$ 之间时,则可能是子代的真实亲本;当候选亲本与子代间的欧氏距离 $\leq -0.011\pm 0.008268$ 时,则不是子代的真实亲本。

表 3.7 中华鲟真实亲本及候选亲本与子代间的欧氏距离

Tab.3.7 The standard Euclidean distance between parents and offspring in *A. sinensis*

亲本 Parents	2013 年子代 Offspring in 2013	2012 年子代 Offspring in 2012	阈值 Threshold value
真实亲本 1	1.788±0.042802	1.698±0.052390	
真实亲本 2	1.830±0.044740	1.838±0.044700	
真实亲本平均值	1.809±0.043771	1.768±0.048545	1.781±0.046158
候选亲本 1	2.028±0.048978	2.163±0.042993	
候选亲本 2	2.167±0.041182	2.051±0.049558	
候选亲本 3	2.051±0.031285	2.101±0.039067	
候选亲本 4	2.215±0.074483	2.276±0.042182	
候选亲本 5	2.094±0.032753	2.247±0.042230	
候选亲本 6	1.990±0.035226	2.166±0.049355	
候选亲本 7	2.017±0.034093	2.304±0.040260	
候选亲本 8	2.390±0.031144	2.560±0.035692	
候选亲本 9	2.169±0.028451	2.287±0.026023	
候选亲本 10	2.066±0.083128	2.388±0.064601	
候选亲本平均值	2.119±0.044072	2.2543±0.043196	2.160±0.043949

表 3.8 中华鲟真实亲本及候选亲本与子代间的亲缘系数

Tab.3.8 The kinship coefficient between parents and offspring in *A. sinensis*

亲本 Parents	2013 年子代 Offspring in 2013	2012 年子代 Offspring in 2012	阈值 Threshold value
真实亲本 1	0.035±0.007432	0.047±0.009637	
真实亲本 2	0.022±0.007822	0.044±0.008044	
真实亲本平均值	0.028±0.007627	0.046±0.008841	0.037±0.008234
候选亲本 1	-0.028±0.007647	-0.039±0.007933	
候选亲本 2	-0.034±0.005545	-0.013±0.007003	
候选亲本 3	-0.003±0.004705	-0.009±0.006395	
候选亲本 4	0.002±0.007993	-0.013±0.010034	
候选亲本 5	0.009 ±0.007120	-0.046±0.022254	
候选亲本 6	0.010±0.005530	-0.004±0.024924	
候选亲本 7	0.031±0.004810	-0.035±0.004735	
候选亲本 8	0.014±0.007016	-0.025±0.006513	
候选亲本 9	0.004±0.006455	-0.018±0.005685	
候选亲本 10	0.011±0.006076	-0.024±0.006984	
候选亲本平均值	0.0016±0.006290	-0.0226±0.010246	-0.011±0.008268

3.4 讨论

3.4.1 微卫星标记的多态性

微卫星标记分析中检测到遗传座位越多，得到正确鉴定结果的概率越大；同时每个座位在群体中含有的等位基因数越多，得到正确鉴定结果的概率也会越高（钱林东等，2010）。本研究初步选择 10 个微卫星标记，对 68 个中华鲟个体进行遗传多态性检测，该标记组合的平均等位基因数为 12.4，且每个座位上等位基因数均不低于 6。杂合度反应微卫星标记多态性的变化（周磊等，2011），本研究中 10 个微卫星标记平均期望杂合度为 0.811，平均 Shannon-Wiener 多样性指数为 1.879。综上所述，10 个微卫星标记均表现为高度多态性且能够提供丰富准确的遗传信息，可作为有效的遗传标记用于中华鲟亲子鉴定分析。

3.4.2 微卫星标记等位基因的分型

判定亲子关系的理论依据是孟德尔遗传定律，子代的基因组分别来自双亲。但微卫星标记在遗传过程中存在着突变的可能，且基因分型时，并非所有基因座都能获得正确的分型结果（Lathrop et al, 1983）。由表 3.5 可知位点 Asi-75067、Asi-67123、Asi-73843、Asi-72040、Asi-70421 和 Asi-65194 在中华鲟个体的扩增结果中，子代基因型均来源于亲本，符合孟德尔遗传规律。位点 Asi-67648、Asi-56700、

Asi-77057 和 Asi-66034 在中华鲟个体的扩增结果中, 子代部分基因型不存在于亲本基因型中, 因此推测在遗传过程中, 子代等位基因可能发生了基因突变或者错误分型。O'Reilly 等 (1998) 发现平均每个基因座位存在 2%~3% 的基因分型错误而无法达到 100% 的准确。如果个体在多个基因座位都出现错误的分型结果, 就会产生错配现象, 但如果在 1~2 个基因座位出现错误的分型结果, 仍会得到正确结果 (董世瑞等, 2008), 因此位点 Asi-67648 和 Asi-56700 作为亲子鉴定核心体系不会影响亲子鉴定结果的准确性。此外, 位点 Asi-65194、Asi-77057 和 Asi-66034 的排除率较低, 故将其作为候选标记。

3.4.3 亲子鉴定分析

亲子鉴定中, 常用的方法有两种: 一种是基于排除概率的排除法; 另一种是基于似然比的似然法。排除法是进行亲子鉴定最早使用且最为简单有效的方法 (Jones and Ardren, 2003)。本研究主要应用排除法分析多倍体中华鲟的亲子鉴定体系。Ellegren 等 (1992) 研究表明, 组合 5 个微卫星座位 (每个有 6 个以上的等位基因) 可使排除率达 98% 以上, 使用 10 个这样的座位排除率可达 99.99%。张志和等 (2003) 和高建伟 (2012) 分别应用 18 对和 15 对微卫星座位对大熊猫和黑熊进行亲子鉴定研究, 结果显示排除率均大于 99.99%。本研究中, 标记数达到 5 个时, 其单亲、父权、双亲累积排除率分别为 97.40%、99.69%、99.99%; 标记数达到 7 个时, 其单亲、父权、双亲累积排除率分别为 99.12%、99.95%、99.99%; 标记数为 10 时, 其单亲、父权、双亲累积排除率分别为 99.80%、99.99%、100% (表 3.6), 其结果与 Ellegren 等的研究基本一致。基于亲子鉴定累积排除率不低于 99% 的标准 (郭立平等, 2013) 和尽量降低检测成本和减少工作量的原则, 本研究确定微卫星标记 Asi-75067、Asi-67648、Asi-67123、Asi-73843、Asi-72040、Asi-70421 和 Asi-56700 为中华鲟亲子鉴定的核心体系。

欧氏距离与亲缘系数是评价不同个体间亲缘关系远近的标准, 本研究中部分候选亲本与 2013 年子代间的欧氏距离相对偏低, 亲缘系数相对偏高, 这可能是由于部分候选亲本与真实亲本亲缘关系较近。Rodzen 等 (2004) 发现利用微卫星分子标记, 采用似然法计算 LOD 值对高首鲟进行亲子鉴定和亲缘关系分析是可行的。Boscari 等 (2014) 通过设计一个基于 R 软件的“BreedingSturgeon”程序用于多倍体意大利鲟的家系管理。为进一步考虑亲子鉴定的准确性, 下一步我们将在已有研究的基础上, 选取更多组中华鲟家系, 对本研究得出的欧氏距离与亲缘系数阈值进一步进行验证。并采用排除法和似然法相结合的方式, 更为稳健的在多个中华鲟家系中开展亲子鉴定应用, 同时进一步采用 Boscari 等 (2014) 设计

“BreedingSturgeon”软件进一步验证我们的分析结果。

本研究成功的建立了中华鲟亲子鉴定体系，确定 Asi-75067、Asi-67648、Asi-67123、Asi-73843、Asi-72040、Asi-70421 和 Asi-56700 等 7 个微卫星标记为中华鲟亲子鉴定的核心体系。该微卫星标记组合将为中华鲟系谱建立提供科学依据。

第 4 章 中华鲟 3 个养殖群体遗传多样性研究

4.1 前言

中华鲟是我国国家一级重点保护动物。近年来由于涉水工程建设、过度捕捞、环境污染及航运等人类活动的干扰，其赖以生存的栖息生境退化甚至功能丧失，致使自然种群严重衰退（Wang et al, 2011; Qiao et al, 2006）。目前，中华鲟自然繁殖效果和物种自我维持境况非常不佳，2013 年和 2014 年都没有发现种群自然繁殖迹象，中华鲟自然种群灭绝在即，情况堪忧。建立中华鲟人工养殖群体，实现全人工繁殖已成为保存中华鲟物种不可或缺的途径。1976 年，我国就以江边栓养的方式成功的实现了野生中华鲟的人工繁殖（长江水产资源调查组，1988）；1983 年又实现了坝下中华鲟人工繁殖（傅朝君等，1985）；20 世纪 90 年代初，中华鲟人工种群蓄养仅呈零星状态；1997 年中华鲟苗种规模化培育技术取得突破后，其人工种群蓄养形成一定的规模（危起伟等，2013）。种质资源的保护就是保护物种的遗传多样性，遗传多样性越丰富，物种对环境变化的适应能力越强，进化的潜力也就越大，越有助于保护物种的多样性。保护中华鲟这一濒危动物的关键就是保护物种的遗传多样性水平，为达到此目的，必须建立在对濒危物种遗传多样性和种群遗传结构充分了解的基础上。目前关于中华鲟人工养殖群体遗传多样性和分子生态学方面的研究还相对比较缺乏，尤其缺乏近几年中华鲟养殖群体遗传变异的资料。

关于中华鲟遗传多样性的研究已有少量报道，张四明等（2000）和曾勇等（2007）采用随机扩增多态性 DNA（RAPD）技术分别对连续 3 年（1995-1997）共 70 尾来源于长江水系中华鲟样本和 2000 年共 30 尾长江中华鲟幼鲟进行遗传多样性分析，均表明中华鲟遗传多样性水平较低。Zhao 等（2005）和 Zhu 等（2006）应用微卫星标记对 1999-2001 年野生中华鲟的遗传多样性进行研究，探讨其遗传多样性水平和近交情况，进一步建议在人工繁殖时尽量明确亲鱼来源，以避免近亲繁殖造成的种群衰退。近几年来，中华鲟的种群数量仍然不断在下降，目前国内尚未见采用微卫星标记对中华鲟后备亲鱼养殖群体遗传多样性及遗传结构进行研究的报道。本研究中选取 3 个中华鲟人工养殖群体为研究对象，采用微卫星标记技术来探究中华鲟人工养殖群体进行遗传多样性，以期中华鲟遗传保护提供科学方法和依据。

4.2 材料与方法

4.2.1 实验材料

本试验材料分别从中国水产科学院长江水产研究所荆州太湖中华鲟试验场采集 46 尾、湖北恒升实业有限公司中华鲟驯养繁殖试验场采集 41 尾和荆州凤凰山中华鲟养殖场采集 128 尾（表 4.1），共 215 尾，所有样本均为子一代中华鲟后备亲鱼。采集鳍条，均保存于无水乙醇中备用。

表 4.1 中华鲟样本采集信息

Tab.4.1 Sample collecting information of *A. sinensis*

采样地点 Sampling loction	缩写 Abbreviation	采样时间 Time	样本数量 Number of samples
荆州太湖中华鲟试验场	TH	2014	46
湖北恒升实业有限公司中华鲟驯养繁殖试验场	HS	2014	41
荆州凤凰山中华鲟养殖场	FHS	2014	128
F1 中华鲟样本总数			215

4.2.2 实验仪器

参考第二章 2.2.2。

4.2.3 实验试剂

参考第二章 2.2.3。

4.2.4 基因组 DNA 的提取

参考第二章 2.2.4。

4.2.5 荧光引物合成

本实验所用的 12 对引物选自第 2 章已筛选出的微卫星标记，（表 2.5 用“[¥]”标注的微卫星位点），微卫星引物由上海生工生物工程技术有限公司合成 5' 端带有 FAM 或 HEX 的荧光引物用于中华鲟养殖群体遗传多样性检测试验。

4.2.6 PCR 扩增

将提取的 3 个中华鲟养殖群体 215 尾样本基因组 DNA 稀释 100 倍，终浓度约 50 ng/μL。用上述 12 对荧光标记的微卫星引物进行 PCR 扩增，避光操作，反应体系参考第二章 2.2.7。

PCR 反应条件为：95 °C 预变性 5 min；95 °C 变性 30 s，退火（表 2.5）30 s，

72 °C延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C延伸 10 min; 4 °C保存。

PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 自动凝胶成像系统拍照检测, 然后送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 在 ABI3730 自动测序仪上进行荧光信号收集, 利用毛细管电泳方法进行基因型检测。为降低微卫星基因型测序成本, 将带有不同荧光基团的 PCR 产物两两混合进行测序。本试验将 12 个微卫星标记分为 6 组, 标记组合及其所携带荧光基团见表 4.2。

表 4.2 微卫星标记分组情况

Tab.4.2 The grouping of microsatellite markers in *A. sinensis*

分组 Group	位点名称 Loci	荧光标记 Fluorescent label	片段大小 Fagment size (bp)
A	Asi-75067	HEX	293
	Asi-67648	FAM	302
B	Asi-67123	FAM	276
	Asi-71347	HEX	292
C	Asi-72040	FAM	306
	Asi-65194	HEX	296
D	Asi-66034	FAM	309
	Asi-56700	HEX	295
E	Asi-77057	FAM	300
	Asi-46902	HEX	309
F	Asi-76964	FAM	299
	Asi-73834	HEX	292

4.2.7 统计方法

应用 Excel 统计等位基因数 (Na); 软件 ATetra 1.2 (Van Puyvelde et al, 2010) 分析计算期望杂合度 (He)、Shannon-Wiener 多样性指数 (SW); 软件 Genodive (Meirmans & Van Tienderen, 2004) 分析近交系数 (Inbreeding coefficient, Gis)、固定指数 (Fixation index, Gst)、校正固定指数 (Corrected fixation, G'st)、遗传分化指数 (Pairwise differentiation, Fst)、Nei 氏遗传距离 (Nei's measures of genetic distance)、分子变异分差 (Analysis of Molecular Variance, AMOVA) 和聚类分析。

4.3 结果

4.3.1 中华鲟3个养殖群体遗传多样性分析

12 个微卫星标记对 3 个养殖群体共 215 尾中华鲟子一代进行遗传多样性检测,

结果显示（表 4.3），3 个中华鲟养殖群体平均等位基因数为 10.250~13.417，平均期望杂合度为 0.790~0.801，平均 Shannon-Wiener 多样性指数为 1.830~1.953，从表 4.3 中显示，荆州凤凰山中华鲟群体等位基因数和 Shannon-Wiener 多样性指数都显著大于湖北恒生公司中华鲟群体的等位基因数和 Shannon-Wiener 多样性指数。

第 4 章 中华鲟 3 个养殖群体遗传多样性研究

表 4.3 中华鲟 3 个养殖群体各微卫星位点的遗传信息

Tab 4.3 Descriptive statistics of the 12 analysed microsatellite markers in *A. sinensis*

位点 Loci	太湖 (TH)			恒升 (HS)			凤凰山 (FHS)		
	等位基因数	期望杂合度	Shannon-Wiener	等位基因数	期望杂合度	Shannon-Wiener	等位基因数	期望杂合度	Shannon-Wiener
	Na	He	多样性指数 SW	Na	He	多样性指数 SW	Na	He	多样性指数 SW
Asi-71347	13	0.666	1.463	7	0.772	1.652	8	0.636	1.287
Asi-75067	16	0.867	2.269	12	0.874	2.198	17	0.852	2.140
Asi-67123	17	0.895	2.429	10	0.835	1.975	18	0.855	2.212
Asi-65194	10	0.849	2.088	8	0.734	1.572	15	0.883	2.341
Asi-73843	12	0.833	1.992	11	0.792	1.839	15	0.869	2.280
Asi-66034	8	0.713	1.462	6	0.603	1.110	12	0.781	1.709
Asi-67648	16	0.895	2.468	10	0.778	1.755	17	0.897	2.449
Asi-56700	9	0.676	1.474	12	0.857	2.089	10	0.782	1.759
Asi-76964	8	0.762	1.594	5	0.696	1.357	6	0.686	1.333
Asi-72040	10	0.773	1.728	15	0.880	2.318	10	0.712	1.685
Asi-46902	15	0.773	1.851	13	0.815	2.011	15	0.800	1.948
Asi-77057	20	0.877	2.382	14	0.848	2.082	18	0.870	2.289
Average	12.833	0.798	1.933	10.250	0.790	1.830	13.417	0.801	1.953

4.3.2 中华鲟微卫星标记的 G-统计分析

中华鲟 G-统计分析包括群体内近交系数、固定指数和校正固定指数见表 4.4。在 12 个微卫星位点中, 中华鲟群体内近交系数为-0.018~0.095, 其平均近交系数为-0.014, 表明 3 个中华鲟群体间无近亲繁殖现象。中华鲟群体间固定指数为 0.037~0.193, 其平均值为 0.097, 表明中华鲟遗传分化程度中等。中华鲟群体间校正固定指数变化范围为 0.054~0.264, 平均值 0.139。

表 4.4 中华鲟微卫星标记的 G-统计

Tab.4.4 Summary of G-statistics for all loci

位点 Loci	群体内近交系数 G_{is}	固定指数 G_{st}	校正固定指数 G'_{st}
Asi-46902	0.048	0.099	0.142
Asi-77057	-0.126	0.059	0.085
Asi-73843	-0.068	0.037	0.054
Asi-76964	0.077	0.109	0.155
Asi-71347	-0.131	0.193	0.264
Asi-67123	-0.019	0.043	0.063
Asi-65194	0.094	0.107	0.152
Asi-72040	-0.059	0.159	0.221
Asi-75067	-0.018	0.058	0.084
Asi-67648	-0.081	0.069	0.100
Asi-66034	0.049	0.164	0.227
Asi-56700	0.095	0.090	0.129
Mean	-0.014	0.097	0.139

4.3.3 中华鲟群体间的遗传变异分析

通过对3个中华鲟养殖群体进行分子变异方差分析 (AMOVA), 根据等位基因频率计算中华鲟群体间遗传变异程度, 结果显示群体内遗传变异所占比例最大, 为87.4%, 来自不同种群间的变异为12.7% (表4.5) 说明中华鲟的主要遗传变异主要来源于种群内。

表4.5 中华鲟群体遗传变异方差分析 (AMOVA)

Tab.4.5 Results of analysis of molecular variance testing genetic structure (AMOVA) of *A. sinensis*

变异来源	自由度	变异百分比 (%)	P值
Source of variation	d.f.	Percentage of variation	P-value
群体内	645	87.4	0.001
群体间	2	12.7	
总和	647		

使用软件 Genodive 分析了中华鲟群体间的遗传分化程度, 对3个中华鲟养殖群体两两之间的遗传分化系数和 Nei 氏遗传距离进行计算 (表 4.6), 结果表明群体之间的遗传分化系数最大为 0.157 (FHS 和 HS); 荆州太湖中华鲟试验场 (TH) 和荆州凤凰山中华鲟试验场 (FHS) 的遗传分化指数为 0.144, 呈中等分化水平; 遗传分化系数最小为 0.114 (FHS 和 TH)。从3个中华鲟群体的 Nei 氏遗传距离来看, 湖北恒升中华鲟驯养繁殖试验场 (HS) 和荆州凤凰山中华鲟试验场 (FHS) 的 Nei 氏遗传距离最大为 0.158, 荆州太湖中华鲟试验场 (TH) 和荆州凤凰山中华鲟试验场 (FHS) 的 Nei 氏遗传距离最小为 0.114, 总的来看, 群体之间的遗传距离介于 0.114-0.158, 且荆州太湖中华鲟试验场 (TH) 和荆州凤凰山中华鲟试验场 (FHS) 的遗传距离最小, 这符合部分荆州凤凰山中华鲟试验场 (FHS) 亲鱼来自荆州太湖中华鲟试验场 (TH) 的事实。

表4.6 中华鲟养殖群体间的遗传分化系数 (对角线上方) 和 Nei 氏遗传距离 (对角线下方)

Tab.4.6 Estimates of pairwise differentiation (Fst) (above diagonal) and Nei's measures of genetic distance (below diagonal) between the studied breeds.

群体 Population	凤凰山 (FHS)	太湖 (TH)	恒升 (HS)
凤凰山	-	0.114	0.157
太湖	0.114	-	0.144
恒升	0.158	0.144	-

4.3.4 基于微卫星标记的中华鲟群体聚类分析

为进一步比较各群体间的聚类情况, 利用软件 Genodive 对3个中华鲟养殖群体进行聚类分析, 结果显示, 当 K=2 时, pseudo-F 值最大 (表 4.7), 因此根据 Calinski 和 Harabasz'pseudo-F 分析时, 将中华鲟3个养殖群体分为两个聚类为最佳聚类群; 当 K=6 时, BIC=1744.541 最小 (表 4.7), 因此根据贝叶斯信息准则分析时, 将中华鲟3个养殖群体分为6个聚类为最佳聚类群。

表 4.7 中华鲟养殖群体聚类统计分析

Tab.4.7 The clustering statistics of *A. sinensis*

K	伪-F	贝叶斯信息准则 BIC
	Pseudo-F	Bayesian Information Criterion
2*	41.278	1806.103
3	38.401	1783.089
4	31.280	1775.824
5	25.693	1774.652
6&	22.064	1774.541
7	19.622	1774.607
8	17.784	1775.172
9	16.198	1776.861
10	15.001	1778.373

注：*是根据 Calinski 和 Harabasz pseudo-F 分析的最佳聚类群；&是根据贝叶斯信息准则分析的最佳聚类群。

*: best clustering according to Calinski and Harabasz pseudo-F: K=2; &: best clustering according to Bayesian Information Criterion:

K=6.

当 K=2 时，3 个中华鲟养殖群体 215 个个体聚为 2 大类，荆州凤凰山中华鲟养殖场（FHS）共 128 个个体聚为第一大类 Cluster 1，另外两个养殖场荆州太湖中华鲟试验场（TH）和湖北恒升中华鲟驯养繁殖试验场（HS）共 87 个个体聚为第二大类 Cluster 2（表 4.8）；当 K=6 时，荆州凤凰山中华鲟养殖场（FHS）共 128 个个体聚为 Cluster 1、Cluster 3 和 Cluster 5；湖北恒升中华鲟驯养繁殖试验场（HS）共 41 个个体聚为 Cluster 2 和 Cluster 4，荆州太湖中华鲟试验场（TH）共 46 个个体聚为第六大类 Cluster 6（表 4.8）。此外，发现 K = 6 时，湖北恒升中华鲟驯养繁殖试验场（HS）和荆州凤凰山中华鲟养殖场的中华鲟群体中存在一定程度的交叉，说明这两个种群的遗传系谱关系较荆州太湖中华鲟试验场（TH）中华鲟群体复杂。

表 4.8 中华鲟养殖群体在聚群中的数目及百分比 (%)

Tab.4.8 Proportion and quantity of membership of each pre-defined population in each of the cluster of *A. sinensis*

	K=2		K=6					
	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6
TH		46 (100)						46 (100)
HS		41 (100)		21 (51.2)		20 (48.8)		
FHS	128 (100)		43 (33.6)		47 (36.7)		38 (29.7)	

4.4 讨论

4.4.1 中华鲟群体微卫星遗传分析

遗传多样性最有效最普遍的衡量标准是：等位基因数、杂合度和 Shannon-Wiener 多样性指数。一般认为等位基因数越多，杂合度越高，Shannon-Wiener 多样性指数越大，物种遗传多样性越丰富，对环境适应的潜能越大。Shannon-Wiener 多样性指数反映出的遗传多样性和样本量有一定的正相关关系。在对群体进行遗传多样性分析时，样本的数量多少是需要考虑的一个重要因素，如果样本数过少，就不能整体、全面的反映和评价群体的变异情况，一般情况下样本越多，反映出的遗传多态性越高，评价和分析就越靠近真实情况，微卫星遗传多样性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 3 个中华鲟养殖群体平均 Shannon-Wiener 多样性指数分别为凤凰山中华鲟（1.953）>太湖（1.933）>恒升（1.830），相应的群体样本量分别为 128 尾、46 尾、41 尾，表明本研究中 3 个中华鲟养殖群体遗传多样性分析结果靠近真实情况。等位基因数是研究遗传变异度的基础，等位基因数的多少反应物种在该区域的变异程度。本研究中 3 个中华鲟养殖群体在 12 个微卫星座位中平均等位基因数分别为凤凰山（13.417）>太湖（12.833）>恒升（10.250），均表现出了丰富的遗传变异度。杂合度分为期望杂合度和观测杂合度。其中期望杂合度是评估种群变异量的一个重要标准，期望杂合度主要是依据种群内当前最具有优势的等位基因分布频率来计算的，稀有基因对它影响很小，当群体数量发生变化时，虽然可能会影响到对稀有基因的检出，但对期望杂合度的影响几乎没有（Nei 1978）。本研究中，3 个后备亲鱼群体的平均期望杂合度分别为凤凰山中华鲟（0.801）>太湖（0.798）>恒升（0.790）。

4.4.2 中华鲟群体间遗传分化

不同种群间的遗传分化程度通常用遗传分化指数和遗传距离来判定，群体间亲缘关系越远，则遗传分化指数越大，遗传距离越大；群体间亲缘关系越近，遗传分化指数越小，遗传距离越小（Nei, 1978）。如果 $F_{st} < 0.05$ ，则表明群体间遗传分化程度非常小；如果 $0.05 < F_{st} < 0.15$ ，表明群体间分化程度中等；如果 $0.15 < F_{st} < 0.25$ ，则表明群体间分化程度较大；如果 $0.25 < F_{st}$ 时，表示群体间分化程度很高（Wright, 1965; Wright, 1978）。本研究结果表明，太湖中华鲟和凤凰山中华鲟群体间分化程度中等（ $F_{st}=0.114$ ），太湖中华鲟与恒升中华鲟群体间遗传分化程度也是中等（ $F_{st}=0.144$ ），凤凰山中华鲟与恒升中华鲟群体间遗传分化程度较高（ $F_{st}=0.157$ ）。说明中华鲟群体之间处于中等偏高程度的遗传分化。

G-统计量中的 G_{is} 指亚群内个体之间的近交系数，与 F-统计量中的 F_{is} 相似，它的取值范围为-1 至 1。当 G_{is} 的值为正值时，则表示群体内存在近交，若为负值，则群体内观测杂合度大于期望杂合度，则表示群体内存在远交（Weir & Cockerham, 1984）。G-统计量中的 G_{st} 与 F-统计量中的 F_{st} 相似，本研究中 12 个微卫星位点的平均 G_{is} 为-0.014，平均 G_{st} 为 0.097（表 4.4），说明中华鲟群体内存在轻微的远交现象，遗传分化程度呈中等，这与遗传分化指数 F_{st} 分析的结果基本一致。3 个中华鲟养殖群体间分子方差分析（AMOVA）结果也显示：中华鲟的遗传变异主要来源于种群内个体间的变异（87.4%），种群间的分化程度（12.7%）中等，没有形成完全的种群隔离。

4.4.3 近年来中华鲟群体遗传多样性变化

目前，已有较多与本研究类似的通过微卫星分子标记研究长江中华鲟及其他常见鱼类遗传多样性的报道：Zhao 等（2005）利用 4 个微卫星标记检测了 60 尾野生中华鲟遗传多样性水平，其群体平均观测杂合度为 0.54，平均期望杂合度为 0.69，作者认为 1999-2001 年中华鲟平均遗传多样性处于中等水平。张四明等（2000）采用随机扩增多态性 DNA（RAPD）技术对连续 3 年（1995-1997）共 70 尾来源于长江水系中华鲟样本进行遗传分析，结果显示，1995、1996 和 1997 年的遗传多样性指数分别为 0.0327、0.0312 和 0.0354，3 年样本的综合遗传多样性指数为 0.034，中华鲟天然群体核 DNA 水平遗传多样性仍较低。黄磊和王义权（2004）用微卫星 DNA 分子标记对扬子鳄进行研究，结果显示，扬子鳄种群在微卫星水平表现出很低的遗传多样性，平均等位基因数 $A=238$ ，平均有效等位基因数 $N_e=160$ ，平均观察杂合度 $H_o=0.374$ ，平均期望杂合度 $H_e=0.350$ ，平均多态信息含量 $PIC=0.327$ ，现阶段应将全部现存的扬子鳄作为一个整体加以保护。杨钟等（2010）运用微卫

星分子标记对80尾人工放流子一代胭脂鱼的遗传多样性和种群遗传结构进行了分析,结果显示,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。表明胭脂鱼人工放流子一代处于较高的遗传多样性水平。本研究中3个中华鲟养殖群体共215个个体平均等位基因数为10.250~13.417,平均期望杂合度为0.790~0.801,平均Shannon-Wiener多样性指数为1.830~1.953(表4.3),将本研究中中华鲟养殖群体遗传多样性水平与以上鱼类遗传多样性水平比较发现,人工养殖的子一代中华鲟后备亲鱼具有较高的遗传多样性水平,这非常有利于中华鲟的人工保种。基于中华鲟3个养殖群体遗传分化水平偏高等分析结果,建议在今后开展中华鲟全人工繁殖的过程中,可以考虑选用于来源于不同聚类群的后备亲鱼,增加中华鲟群体间的基因交流频率,提高中华鲟后代遗传多样性水平,使其在最大化的良性条件中长久保存。

本研究利用12个微卫星引物分析了3个中华鲟养殖群体的遗传多样性,将为保护中华鲟遗传多样性水平和制定切实可行的中华鲟保护策略提供理论基础。

小结

本研究利用微卫星分子标记对中华鲟亲子鉴定体系和群体遗传多样性进行研究，主要有以下结论：

1. 从性腺转录组测序文库中筛选了 24 对中华鲟多态微卫星标记，可用于建立中华鲟亲子鉴定体系和探讨中华鲟群体遗传多样性研究。

2. 建立了中华鲟微卫星亲子鉴定体系，最终确定 Asi-75067、Asi-67648、Asi-67123、Asi-73843、Asi-72040、Asi-70421 和 Asi-56700 等 7 个微卫星标记为中华鲟亲子鉴定的核心体系，其单亲、父权和双亲的累积排除率分别为 99.12%、99.95%和 99.99%。该微卫星标记组合有望成为中华鲟亲子鉴定的重要工具。

3. 利用 12 个微卫星标记对 3 个中华鲟养殖群体的 215 尾后备亲鱼进行遗传多样性研究，结果表明后备亲鱼遗传多样性水平较高，遗传分化程度处于中等水平。

参考文献

- 柴毅, 谢从新, 危起伟. 中华鲟吻须部味蕾的早期发育[J]. 长江大学学报(自科版)农学卷, 2007, 03: 62-64+128.
- 柴毅, 危起伟, 李罗新, 等. 中华鲟仔鱼的转食驯化[J]. 安徽农学通报, 2008, 17: 179+203.
- 柴毅, 谢从新. 中华鲟眼球的早期发育[J]. 水生态学志, 2009, 06: 124-126.
- 柴毅, 王道飞. 中华鲟脑的形态学观察[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2011, 08: 236-238 + 284-285.
- 柴毅, 危起伟, 谭凤霞. 延迟投饵对中华鲟仔鱼摄食、存活及生长的影响[J]. 湖北农业科学, 2012, 23: 5432-5435.
- 柴毅, 龚进玲, 杜浩, 等. 中华鲟子一代配子质量及其子二代生长特征分析[J]. 水产学报, 2014, 03: 350-355.
- 长江水产资源调查组. 长江鲟鱼类生物学及人工繁殖技术研究[M]. 成都: 四川省科技出版社, 1988, 284.
- 常玉梅, 李绍戊, 梁利群, 等. 微卫星标记的制备策略[J]. 中国生物工程杂志, 2005, S1: 210-214.
- 陈喜斌, 庄平, 曾翠平, 等. 中华鲟幼鲟蛋白质营养最适需要量[J]. 中国水产科学, 2002, 01: 60-64.
- 陈细华. 鲟形目鱼类生物学与资源现状[M]. 北京: 海洋出版社, 2007, 136.
- 陈晓武, 施志仪. 中华鲟YY肽基因电子克隆表达与生物信息学分析[J]. 生物技术通报, 2008, 05: 166-170.
- 陈兆波. 分子标记的种类及其在作物遗传育种中的应用[J]. 现代生物医学进展, 2009, 11: 2179-2181+2148.
- 成为为. 胭脂鱼种群遗传多样性及家系管理研究[博士学位论文]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2014.
- 成为为, 汪登强, 危起伟, 等. 基于微卫星标记对长江中上游胭脂鱼增殖放流效果的评估[J]. 中国水产科学, 2014, 03: 574-580.
- 董世瑞, 孔杰, 张天时, 等. 中国对虾微卫星家系鉴定的模拟分析与应用[J]. 水生生物学报, 2008, 01: 96-101.
- 杜浩, 危起伟, 刘鉴毅, 等. 苯酚、Cu²⁺、亚硝酸盐和总氨氮对中华鲟稚鱼的急性毒性[J]. 大连水产学院学报, 2007, 02: 118-122.
- 傅朝君, 刘宪亭, 鲁大椿, 等. 中华鲟人工蓄养和催情试验[J]. 淡水渔业, 1983, 04: 38-40.

- 傅朝君, 刘宪亭, 鲁大椿, 等. 葛洲坝下中华鲟的人工繁殖[J]. 淡水渔业, 1985, 01: 1-5.
- 高建伟. 应用微卫 DNA 标记对延边圈养黑熊进行亲子鉴定和遗传多样性研究[博士学位论文]. 吉林: 延边大学, 2012.
- 高 强, 文 华, 李英文, 等. 中华鲟幼鲟维生素C营养需要的研究[J]. 动物营养学报, 2006, 02: 99-104.
- 高一龙, 张汇东, 缪 勤, 等. 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, 06: 14-18.
- 顾 颖, 李 超, 鲁翠云, 等. 建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)微卫星DNA亲权鉴定[J]. 遗传, 2012, 11: 1463-1471.
- 桂建芳. 多倍体鱼类的开发和利用[J]. 水库渔业, 1985, 03: 53-56.
- 郭立平, 徐 丽, 朱 淼, 等. 西门塔尔牛微卫星亲子鉴定体系的优化[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 06: 871-879.
- 何小燕, 白俊杰, 刘小林, 等. 微卫星DNA标记在大口黑鲈亲权鉴定中的应用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 08: 55-62.
- 湖北省水生生物研究所鱼类研究室. 长江鱼类[M]. 科学出版社, 1976, 16-17.
- 黄 磊, 王义权. 扬子鳄种群的微卫星DNA多态及其遗传多样性保护对策分析[J]. 遗传学报, 2004, 02: 143-150.
- 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. 中国农业科学, 1996, 04: 2-11.
- 柯福恩, 胡德高, 张国良. 葛洲坝水利枢纽对中华鲟的影响——数量变动调查报告[J]. 淡水渔业, 1984, 03: 16-19.
- 柯福恩. 论中华鲟的保护与开发[J]. 淡水渔业, 1999, 29(9): 4-7.
- 乐佩琪, 陈宜瑜. 中国濒危动物红皮书[M]. 科学出版社, 1998, 13.
- 李大宇, 殷倩茜, 侯宁, 等. 黄颡鱼(*Pelteobagrus eupogon*)不同生态地理分布群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 海洋与湖沼, 2009, 04: 460-469.
- 李 伟. 盐度对中华鲟生长的影响机制及中华鲟的等渗点分析[博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- 刘鉴毅, 危起伟, 陈细华, 等. 葛洲坝下中华鲟繁殖生物学特性及其人工繁殖效果[J]. 应用生态学报, 2007, 06: 1397-1402.
- 陆才瑞, 喻树迅, 于霁雯, 等. 功能型分子标记(ISAP)的开发及评价[J]. 遗传, 2008, 09: 1207-1216.
- 鲁双庆, 刘 臻, 肖调义. 微卫星标记在鱼类遗传育种研究中的应用[J]. 水利渔业, 2003, 16: 421-431.
- 骆 慧. 达氏鲟微卫星分离鉴定及其亲子鉴定研究[硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学,

- 2013.
- 马冬梅, 白俊杰, 简清, 等. 中华鲟半胱氨酸蛋白酶抑制剂在毕赤酵母中的表达和活性分析[J]. 生物工程学报, 2003, 05: 598–602.
- 马克平. 试论生物多样性的概念[J]. 生物多样性, 1993, 01: 20–22.
- 宁宗德, 贾敬德. 长江渔业资源变动情况的调查[J]. 淡水渔业, 1982, 06: 6–10.
- 彭涛, 王念民, 佟广香, 等. 湖鲟微卫星引物在三种鲟鱼及杂交子代的通用性研究[J]. 水产学杂志, 2009, 02: 12–16.
- 钱林东, 张自芳, 田应华, 等. 利用微卫星 DNA 标记进行黄牛的亲子鉴定[J]. 云南农业大学学报, 2010, 01: 69–74.
- 全迎春, 孙效文, 梁利群. 应用微卫星多态分析四个鲤鱼群体的遗传多样性[J]. 动物学研究, 2005, 06: 595–602.
- 任旭琴. 遗传多样性及其研究方法[J]. 淮阴工学院学报, 2002, 11(5): 6–8.
- 单雪, 王秀丽, 仇雪梅. 分子标记及其在海洋动物遗传研究中的应用[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(4): 463–466.
- 邵昭君, 赵娜, 朱滨, 等. 铲鲟微卫星引物对中华鲟的适用性研究[J]. 水生生物学报, 2002, 06: 577–584.
- 史玲玲, 危起伟, 柴毅, 等. 达氏鲟视网膜早期发育及其相关机能[J]. 中国水产科学, 2013, 05: 958–967.
- 宋灿, 刘少军, 肖军, 等. 多倍体生物研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 03: 173–184+259–265.
- 宋红梅, 白俊杰, 叶星, 等. 橙色莫桑比克罗非鱼微卫星遗传多样性分析及其与尼罗罗非鱼差异位点的筛选[J]. 中国水产科学, 2008, 03: 400–406.
- 孙建帮. 5个鲫鱼群体遗传多样性的微卫星研究[硕士学位论文]. 长沙: 湖南农业大学, 2006.
- 孙效文, 张晓锋, 赵莹莹, 等. 水产生物微卫星标记技术研究进展及其应用[J]. 中国水产科学, 2008, 04: 689–703.
- 孙业良, 谢庄, 刘国庆, 等. 利用微卫星DNA技术进行绵羊亲子鉴定[J]. 安徽农业大学学报, 2005, 03: 301–305.
- 覃盼, 廖梅杰, 徐永江, 等. 漠斑牙鲆养殖群体微卫星遗传多样性的初步分析[J]. 海洋科学, 2013, 12: 10–16.
- 谭照君, 张天奇, 鲁翠云, 等. 鲢三、四核苷酸重复微卫星标记的筛选及其特征分析[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 03: 328–335.
- 陶江平, 乔晔, 杨志, 等. 葛洲坝产卵场中华鲟繁殖群体数量与繁殖规模估算及其变动趋势分析[J]. 水生态学杂志, 2009, 02: 37–43.

- 王 恒, 危起伟, 李 伟, 等. 5月龄、7月龄中华鲟子二代光照偏好性研究[J]. 水产学报, 2014, 07: 929–938.
- 王瑾瑾, 童金苟, 张耀光, 等. 厚颌鲂两个野生群体遗传多样性分析[J]. 水生生物学报, 2014, 05: 975–979.
- 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, 01: 39–43.
- 王绍先, 王 飞, 刘成柏. DNA 分子标记技术在濒危物种保护中的应用[J]. 生态学杂志, 2008, 27(2): 250–256.
- 王振山, 陈 浩, 李小兵, 等. 一个AA基因组特异的串联重复序列的克隆及其在中国普通野生稻和栽培稻中的分化特征[J]. 植物学报, 1998, 10: 27–35.
- 魏青山. 发展我国鲟鱼业的探讨[J]. 华中农学院学报, 1985, 02: 23–31.
- 危起伟, 陈细华, 杨德国, 等. 葛洲坝截流24年来中华鲟产卵群体结构的变化. 中国水产科学 [J], 2005, 04: 452–457.
- 危起伟, 陈细华, 杨德国, 等. 葛洲坝截流24年来中华鲟产卵群体结构的变化[J]. 中国水产科学, 2005, 04: 452–457.
- 危起伟, 班 璇, 李大美. 葛洲坝下游中华鲟产卵场的水文学模型[J]. 湖北水力发电, 2007, 02: 4–6.
- 危起伟, 李罗新, 杜 浩, 等. 中华鲟全人工繁殖技术研究[J]. 中国水产科学, 2013, 01: 1–11.
- 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): 28–29.
- 吴 艳, 侯水生, 肖红卫, 等. 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, 10: 38–39.
- 向 燕, 孔 杰, 周 洲, 等. 鲟鱼养殖亲鱼群体遗传多样性分析[J]. 西南农业学报, 2013, 05: 2112–2115.
- 邢智珺, 姜虎成, 陆 伟, 等. 江苏8个克氏原螯虾群体遗传多样性微卫星分析[J]. 上海海洋大学学报, 2014, 05: 656–662.
- 徐丹丹. 基于微卫星标记和线粒体C串6基因序列的鲇遗传多样性研究[硕士学位论文]. 重庆: 西南大学, 2013.
- 许克圣, 苏泽古, 白国栋. 中华鲟染色体组型的研究[J]. 动物学研究, 1986, 03: 262.
- 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, 02: 279–290.
- 杨宗英. 长江中游青鱼群体遗传结构分析及亲子鉴定技术的建立[硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2014.

- 杨德国, 危起伟, 陈细华, 等. 葛洲坝下游中华鲟产卵场的水文状况及其与繁殖活动的关系[J]. 生态学报, 2007, 03: 862-869.
- 杨德国, 朱永久, 危起伟, 等. 淡水人工培育中华鲟亚成体的海水驯化试验[J]. 海洋水产研究, 2007, 03: 120-124.
- 杨德国, 危起伟, 朱永久, 等. 中华鲟苗种的集约化生产系统[J]. 农业工程学报, 2008, 06: 214-217.
- 杨 钟, 史 方, 阙延福, 等. 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, 05: 17-20.
- 姚红伟, 张立冬, 孙金阳, 等. DNA分子标记技术概述[J]. 河北渔业, 2010, 07: 42-46.
- 姚志峰, 章龙珍, 庄 平, 等. 铜对中华鲟幼鱼的急性毒性及对肝脏抗氧化酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2010, 04: 731-738.
- 余志堂, 许 蕴, 邓 中, 等. 葛洲坝水利枢纽下游中华鲟繁殖生态的研究[J]. 鱼类学论文集(第五辑) [C]. 北京:科学出版社, 1986, 1-13.
- 替瑞光. 鱼类中的多倍性及其在鱼类演化中的作用[J]. 云南大学学报(自然科学版), 1985, 02: 235-243.
- 曾 勇, 危起伟, 汪登强. 长江中华鲟遗传多样性变化[J]. 海洋科学, 2007, 10: 67-69+76.
- 张春雷, 佟广香, 匡友谊, 等. 哲罗鱼微卫星亲子鉴定中的应用[J]. 动物学研究, 2010, 04: 395-400.
- 张 辉, 危起伟, 杨德国, 等. 葛洲坝下中华鲟自然繁殖流速场的初步观测[J]. 中国水产科学, 2007, 02: 183-191.
- 张 辉, 危起伟, 杨德国, 等. 葛洲坝下游中华鲟(*Acipenser sinensis*)产卵场地形分析[J]. 生态学报, 2007, 10: 3945-3955.
- 张 辉, 危起伟, 杜 浩, 等. 中华鲟自然繁殖的水文状况适合度研究[J]. 长江科学院院报, 2010, 10: 75-81.
- 张吉清, 赵宗胜, 李大全, 等. 微卫星标记及其在牛遗传育种中的应用[J]. 黄牛杂志, 2001, 03: 1-5+9.
- 张丽娟, 张保军, 耿社民. 微卫星标记与动物遗传育种[J]. 黄牛杂志, 2003, 02: 49-52.
- 章龙珍, 姚志峰, 庄 平, 等. 铜暴露对中华鲟幼鱼的生长、消化酶活性和组织中铜积累的影响[J]. 复旦学报(自然科学版), 2012, 06: 789-795.
- 张四明, 邓 怀, 汪登强, 等. 中华鲟(*Acipenser sinensis*)间的长度变异与个体内的长度异质性[J]. 遗传学报, 1999, 05: 489-496.
- 张四明, 晏 勇, 邓 怀, 等. 几种鲟鱼基因组大小、倍体的特性及鲟形目细胞进化的探讨[J]. 动物学报, 1999, 02: 200-206.

- 张四明, 邓 怀, 晏 勇, 等. 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, 01: 1–7.
- 张晓雁, 李罗新, 危起伟, 等. 养殖密度对中华鲟行为、免疫力和养殖环境水质的影响[J]. 长江流域资源与环境, 2011, 11: 1348–1354.
- 张志和, 沈富军, 孙 姗, 等. 应用微卫星分型方法进行大熊猫父亲鉴定[J]. 遗传, 2003, 05: 504–510.
- 赵广泰, 刘贤德, 王志勇, 等. 大黄鱼连续4代选育群体遗传多样性与遗传结构的微卫星分析[J]. 水产学报, 2010, 04: 500–507.
- 赵沐子, 李 茜, 秦 钦, 等. 五个斑点叉尾鮰群体的微卫星遗传多样性分析[J]. 水产养殖, 2011, 01: 24–30.
- 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, 02: 169–176.
- 朱 滨, 常剑波, 谭细畅, 等. 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, 06: 547–553.
- 祝长青, 陈光哲, 周 阳, 等. 中华鲟基因SYBR Green实时荧光PCR检测方法的建立[J]. 江苏农业科学, 2011, 06: 60–63.
- 庄 平, 宋 超, 章龙珍, 等. 中华鲟幼鱼饵料生物及人工饲料的蛋白质和脂肪酸营养价值评价[J]. 水产学报, 2009, 03: 496–502.
- Ashie TN, Daniel GB, Edward PC. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers[J]. Aquaculture, 2000, 182: 73–83.
- Ben NA, Chaabane R, El-Faleh M, et al. Genetic diversity analysis of North Africa's barely using SSR markers[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2012, 10(1): 13–21.
- Beckmann JS, Weber JL. Survey of human and rat microsatellites[J]. Genomics, 1992, 12: 627–631.
- Bessert ML, Ortí G. Microsatellite loci for paternity analysis in the fathead minnow, *Pimephales promelas* (Teleostei: Cyprinidae)[J]. Molecular Ecology Notes, 2003, 3(4): 532–534.
- Bierne N, Launey S, Naciri-Graven Y, et al. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae[J]. Genetics, 1998, 148(4): 1893–1906.
- Boscari E, Pujolar JM, Dupanloup I, et al. Captive breeding programs based on family groups in polyploid sturgeons[J]. Plosone, 2014, 9(10): e110951. doi:10.1371/journal.pone.0110951
- Crawford AM, Dodds KG, Ede AJ, et al. An autosomal genetic linkage map of sheep genome[J]. Genetics, 1995, 140: 730–724.
- Castro J, Bouza C, Sánchez L, et al. Gynogenesis assessment using microsatellite genetic markers in turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Marine Biotechnology, 2003, 5(6): 584–592.

- Chen XW, Shi ZY, Cheng QQ. Full-length cDNA Cloning and Tissues Expression Analysis of Ferritin Gene from *Acipenser sinensis*[J]. Zoological Research, 2009, 30(2): 144–150.
- Desvignes JF, Laroche J, Durand JD, et al. Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites[J]. Aquaculture, 2001, 194: 291–301.
- Ellegren H, Johansson MS, Sandberg K, et al. Cloning of highly polymorphic microsatellite in the horse[J]. Animal Genetics, 1992, 23: 133–142.
- Ganal MW, Young ND, Tanksley SD. Pulsed field gel electrophoresis and physical mapping of large DNA fragments in the Tm-2a region of chromosome 9 of tomato[J]. Molecular and General Genetics, 1989, 215(3): 395–400.
- Gerber S, Chabrier P, Kremer A. FAMOZ: a software for parentage analysis using dominant, codominant and uniparentally inherited markers[J]. Molecular Ecology Notes, 2003, 3: 479–481.
- Gerber S, Mariette S, Streiff R, et al. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis[J]. Molecular Ecology, 2000, 9: 1037–1038.
- Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles[J]. Biometrics, 1992, 361–372.
- Herlin M, Delghandi M, Wesmajervi M, et al. Analysis of the parental contribution to a group of fry from a single day of spawning from a commercial Atlantic cod (*Gadus morhua*) breeding tank[J]. Aquaculture, 2008, 274(2–4): 218–224.
- Huang BX, Peakall R, Hanna PJ. Analysis of genetic structure of blacktop abalone (*Haliotis rubra*) populations using RAPD, minisatellite and microsatellite markers[J]. Marine Biotechnology, 2000, 136: 207–216.
- 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[J]. Aquaculture, 2010, 298(3): 194–201.
- IUCN. IUCN red list of threatened species. Version 2010.3. Available online: <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/231/>. Accessed on 24 Oct 2010.
- Jones AG, Ardren WR. Methods of parentage analysis in natural populations[J]. Molecular Ecology, 2003, 12: 2511–2523.
- Julier B. A program to test linkage disequilibrium between loci in autotetraploid species[J]. Molecular Ecology Resource, 2009, 9: 746–748.
- Hou F, Zhang H, Wu B, et al. Characterization of microsatellite loci in *Schizopygopsis chengi chengi*

- and their utilization in assessment of the genetic diversity in *Schizopygopsis chengi baoxingensis*[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2013, 46: 50–54.
- Jeff AR, Thomas RF, Bernie M. Estimation of parentage and relatedness in the polyploid white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) using a dominant marker approach for duplicated microsatellite loci[J]. *Aquaculture*, 2004, 232: 265–182.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(5): 1099–1106.
- Kellogg KA, Markert JA, Stauffer JR et al. Microsatellite variation demonstrates multiple paternity in lekking cichlid fishes from Lake Malawi, Africa. *Proceedings of the Royal Society of London*[J]. Series B: Biological Sciences, 1995, 260(1357): 79–84.
- Lathrop GM, Hooper AB, Huntsman JW, et al. Evaluating pedigree data. 1. The estimation of pedigree error in the presence of marker mistyping[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1983, 35: 241–262.
- Lee BY, Lee WJ, Streebman JT, et al. A Second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.)[J]. *Genetics*, 2005, 170(1): 237–244.
- Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1989, 44(3): 397–401.
- Liu F, Xia JH, Bai ZY, et al. High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis[J]. *Aquaculture*, 2009, 297(1): 51–56.
- Ludwig A, Belfiore NM, Pitra C, et al. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*)[J]. *Genetics*. 2001, 158: 1203–1215.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations[J]. *Molecular Ecology*, 1998, 7(5): 639–655.
- May B, Krueger CC, Kincaid HL. Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1997, 54: 1542–1547.
- Meagher TR. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. II. Patterns of male reproductive success[J]. *American Naturalist*, 1991, 738–752.
- Meirmans PG, Van Tienderen PH. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of

- genetic diversity of asexual organisms[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4: 792–794.
- Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. *Genetics*, 1978, 89: 583–590.
- Nichol KM, Young WP, Danzmann RG. A consolidated linkage map for rainbow trout[J]. *Animal Genetics*, 2003, 34: 102–115.
- Norris AT, Bradley DG, Cunningham EP. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations[J]. *Aquaculture*, 1999, 180: 247–264.
- O'Reilly PT, Herbinger C, Wright JM. Analysis of parentage determination in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellites[J]. *Animal Genetics*, 1998, 29: 363–370.
- Oumesh KR, Alan EP, Ibrokhim A, et al. New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research[J]. *The Journal of Cotton Science*, 2001, 5: 103–113.
- Perez ER, Takagi M, Taniguchi N. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers[J]. *Aquaculture*, 1999, 173: 413–423.
- Pickles RSA, Groombridge JJ, Rojas VDZ, et al. Cross-species characterisation of polymorphic microsatellite loci in the gaint otter (*Pteronura brasiliensis*)[J]. *Molecular Ecology Resource*, 2009, 9(1): 415–417.
- Qiao Y, Tang X, Brosse S, et al. Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) in the Yangtze River: a hydroacoustic assessment of fish location and abundance on the last spawning ground[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2006, 22: 140–144.
- Rajkov J, Shao ZJ, Berrebi P. Evolution of Polyploidy and Functional Diploidization in Sturgeons: Microsatellite Analysis in 10 Sturgeon Species[J]. *Journal of Heredity*, 2014, 5: 521–531.
- Rodzen JF, Famula TR, Bernie May. Estimation of parentage and relatedness in the polyploid white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) using a dominant marker approach for duplicated microsatellite loci[J]. *Aquaculture*, 2004, 232: 165–182.
- Sakamoto Y, Kaneda M, Terasaki O, et al. Direct imaging of the pores and cages of three-dimensional mesoporous materials[J]. *Nature*, 2000, 408(6811): 449–453.
- Salah MA, Iciar M. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4692–4693.
- Stockburge EM, Green RD, Wood WO, et al. Determination of the stringency of DNA microsatellite marker genotypes for use in individual animal identification[J]. *Animal Genetics*, 2000, 53: 345–348.
- Takuma S, Minoru I, Hideshi M, et al. Inheritance mode of microsatellite DNA markers and their use

- for kinship estimation in kuruma prawn *Penaeus japonicus*[J]. Fisher Scientific, 2002, 68: 299–305.
- Thompson EA. The estimation of pairwise relationships[J]. Annals of Human Genetics, 1975, 39: 173–188.
- Van Puyvelde K, Van Geert A, Triest L. ATETRA, a new software program to analyze tetraploid microsatellite data: comparison with TETRA and TETRASAT[J]. Molecular Ecology Resources, 2010, 10: 331–334.
- Wang CY, Kynard B, Wei QW, et al. Spatial distribution and habitat suitability indices for non-spawning and spawning adult Chinese sturgeons below Gezhouba Dam, Yangtze River: Effects of river Alterations[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2013, 29: 31–40.
- Wang CY, Du H, Zhang H, et al. Migration of juvenile and sub-adult Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* Gray, 1835 in the Yangtze River, China below the Gezhouba Dam[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2014, 30: 1109–1114.
- Wang GD, Tian PF, Cheng ZK, et al. Genomic characterization of Rim2/Hipa elements reveals a CACT A-like transposon super family with unique features in the genome[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2003, 270: 234–242.
- Wang JH, Wei QW, Zou YC. Conservation strategies for the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*: an overview on 30 years of practices and future needs[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2011, 27(2): 176–180.
- Wei QW, Ke FEn, Zhang JM, et al. Biology, fisheries and conservation of sturgeons and paddlefish in China[J]. Environmental Biology of Fishes, 1997, 48: 241–255.
- Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-statistics for the analysis of population structure[J]. Evolution, 1984, 38: 1358–1370.
- Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. A note on exact tests of Hardy–Weinberg equilibrium[J]. The American Journal of Human Genetics, 2005, 76(5): 887–893.
- Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating[J]. Evolution, 1965, 19(3): 395–420.
- Wright S. Variability within and Among Natural Populations[J]. Evolution and the Genetic of Population. University of Chicago Press, 1978, p580.
- Zeng Q, Ye H, Ludwig A, et al. Microsatellite development for the endangered Yangtze sturgeon (*Acipenser dabryanus* Dumeril, 1869) using 454 sequencing[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2013, 29: 1219–1221.
- Zhang H, Wang CY, Yang DG, et al. Spatial distribution and habitat choice of adult Chinese sturgeon

- (*Acipenser sinensis* Gray, 1835) downstream of Gezhouba Dam, Yangtze River, China[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2014, 30: 1483–1491.
- Zhang Q, Allen SK, Reece KS. Genetic variation in wild and hatchery stocks of seminole oyster (*Crassostrea ariakensis*) assessed by PCR–RFLP and microsatellite markers[J]. Marine Biotechnology, 2005, 7: 588–599.
- Zheng XH, Kuang YY, Zhang XF, et al. A genetic linkage map and comparative genome analysis of common carp (*Cyprinus carpio* L.) using microsatellites and SNPs[J]. Molecular Genetic Genomics, 2011, 286: 261–277.
- Zhao N, Ai W, Shao Z, et al. Microsatellites assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) genetic variability[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2005, 21: 7–13.
- Zhu B, Liao X, Shao Z, et al. Isolation and characterization of microsatellites in Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*[J]. Molecular Ecology Notes, 2005, 5: 888–892.
- Zhu B, Zhao N, Shao ZJ, et al. Genetic population structure of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) in the Yangtze River revealed by artificial network[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2006, 22: 82–88.

致谢

岁月如梭，转眼间，三年的研究生求学生活即将结束，站在毕业的门槛上，回首往昔，唯一的情感就是留恋，留恋那美丽的校园，留恋陪伴我共同走过三年的你们。研究生三年生活用一句话总结就是痛并快乐着，奋斗和辛劳是青春的防腐剂，让我明白生活只有经历磨难才能精彩；欢笑与收获是青春的幸福果实，让我更加珍惜生命赋予我的一切，并懂得生命的意义就是落幕无悔，懂得感恩生命中陪我一起走过、给我关怀和帮助的老师、朋友、亲人甚至很多萍水相逢的人，没有他们，我不可能顺利完成学业，没有他们我的生命不会如此精彩美妙。

首先，我要感谢恩师中国水产科学院长江水产研究所危起伟研究员，三年来，恩师渊博的专业知识，严谨的治学态度，精益求精的工作作风，缜密的思维能力和锲而不舍的科学精神和诲人不倦的高尚师德等人格魅力对我影响深远。本论文从选题到完成，几易其稿，每一步都是危老师在百忙之中抽出时间的指导下完成的，倾注了危老师大量的心血。危老师不仅授我以文，而且给了我很多使我人生丰富精彩的机会，使我不仅积累了丰富的知识，更学到了如何感恩生活，终生受益，我将随身携带着它们，踏上新的人生之路。在此我向我的恩师危起伟研究员表示深切的谢意与祝福！

其次我要感谢善良真诚、治学严谨的张书环老师，张书环老师是我平时科研工作的指导老师，初到实验室时，我对实验技能和专业知识都不了，是张书环老师耐心仔细的手把手教我，使我从对科研的懵懂状态一点点进行深入的了解。对于我的每一个实验，每一份数据，张书环老师都悉心关切，无论是选题还是完成毕业论文期间，张书环老师都为我花费大量时间和精力，帮助我修改文章。在论文即将完成之际，我想对您真诚的说声谢谢。

同时感谢汪登强老师对我实验的指导和对我文章的修改以及为我购买所有实验耗材；感谢厉萍副研究员在我学习上和生活上对我的帮助和鼓励，尤其感谢她在我申请博士学习上的帮助；感谢课题组杜浩副研究员、张辉副研究员、吴金明助理研究员和王成友助理研究员在学习上给我指导和鼓励。

感谢刘志刚老师、乔新美老师和罗江先生在生活及实验过程中的提供的无私帮助。感谢沈丽助理研究员在打印重要资料等方面给予的帮助；感谢周琼女士在报账等方面给予的指导和帮助。

感谢课题组司机胡志华先生和王后建先生在采样及出差等需要用车时给予的便利和帮助；感谢成为为师姐对我实验的指导与帮助；感谢叶欢师兄、杨晓鸽师姐在我初到实验室时给予的实验室要领指导；感谢师弟张磊、师妹黄君在实验中的帮助；感谢李昊辰在数据处理方面对我的帮助；感谢太湖所有职工在太湖出差中提供的帮助。

感谢 06 级孙庆亮师兄；感谢 08 级李伟师兄；感谢 09 级李雷师兄和成为为师姐；感谢 10 级梁志强师兄；感谢 11 级师兄师姐王恒、叶欢、杨晓鸽、谢晓、蔺丹清、汪珂；感谢 12 级邵俭师兄、同门李君轶、席萌丹、霍来江；感谢 13 级师弟师妹郭威、杨焕超、颀璇、张磊、王旭歌；感谢 14 级师弟师妹颀江、邸军、黄君、褚志鹏。谢谢你们在我科研、学习、生活过程中的鼓励、帮助和陪伴。感谢可爱的舍友们，谢谢你们带给我温馨的宿舍小家。

感谢西南大学罗其勇、陈幕飞、金星星、黄自豪、陈冬明、赵金凤、刘书婷、张玄可、刘娜、李艳萍、宋羽葳、何雪等同学在我遇到困难时给予的帮助及陪伴。

感谢男友“灰灰”这么多年的陪伴和鼓励，感谢你的鼓励和无私的帮助，这一路走来，我们真的很不容易，借此机会我想真诚的跟你说声谢谢，也愿我们携手越走越远。

感谢爸爸、妈妈和弟弟在我求学生涯中给予我无微不至的关怀和照顾，一如既往地支持我、鼓励我。谢谢你们，是你们的帮助和鼓励使我不断地成长、进步，祝愿你们幸福快乐每一天。

最后感谢公益性行业(农业)科研专项:珍稀水生动物繁育与物种保护技术研究的资助；感谢西南大学和中国水产科学研究院长江水产研究所对我的培养和给我实现梦想的舞台。

发表论文和参与科研项目

在读期间发表论文:

辛苗苗, 张书环, 汪登强, 汪珂, 张磊, 霍来江, 危起伟. 多倍体中华鲟微卫星分子鉴定体系的建立. 淡水渔业 (已接收)。

辛苗苗, 危起伟, 王志坚, 陈慕飞, 陈冬明. 对硝基酚对稀有鮡鲫胚胎的急性毒性. 淡水渔业, 2014 (4).

Miaomiao Xin, Shuhuan Zhang, Dengqiang Wang, Chuangju Li, Huamei Yue, Qiwei Wei. Study of the genetic diversity in broodstocks of the endangered Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, using novel microsatellite markers by EST sequencing (prepared).

Ke Wang, Shuhuan Zhang, Dengqiang Wang, Miaomiao Xin, Jinming Wu, Qingliang Sun, Hao Du, Chengyou Wang, Jun Huang, Qiwei Wei. Development of 27 novel cross-species microsatellite markers for the endangered *Hucho bleekeri* using next-generation sequencing technology. conservation genetics resources(accepted).

Shuhuan Zhang, Qiwei Wei, Ke Wang, Hao Du, Miaomiao Xin, Jinming Wu. The complete mitochondrial genome of the endangered *Hucho hucho* (Salmonidae: Huchen), Mitochondrial DNA, 2014.

陈慕飞, 张耀光, 郑朝依, 辛苗苗, 金星星, 金丽. CdSe/Zn 量子点对稀有鮡鲫胚胎发育的影响及其氧化应激作用. 环境科学学报, 2014, 34(7): 1884-1890.

霍来江, 吴金明, 杜浩, 辛苗苗, 张磊, 危起伟. 茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼急性毒性及其血液生化指标的影响. 淡水渔业 (已接收)。

参加科研项目:

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)