

史氏鲟和达氏鳇养殖亲鱼群体遗传多样性分析

牛翠娟^{1,2*}, 胡红霞³, 罗静¹, 李陈²

(1. 中国科学院昆明动物研究所遗传资源与进化国家重点实验室, 云南昆明 650223;

2. 北京师范大学生命科学学院, 教育部生物多样性与生态工程重点实验室, 北京 100875;

3. 北京市水产科学研究所, 北京 100075)

摘要: 利用线粒体控制区序列片段(史氏鲟, 425 bp, 达氏鳇, 434 bp)分析检测了两个养殖场留做后备亲鱼的史氏鲟和达氏鳇的遗传多样性。在所检测的养殖史氏鲟后备亲鱼4个年龄群体共34个体中, 发现5个单倍型, 共有11个多态位点, 占碱基总数的2.6%, 无简约信息位点。不同单倍型之间有1~10个变异位点, 占碱基总数的0.2%~2.4%。各单倍型之间的遗传距离为0.002~0.024。单倍型多样性 $Hd = 0.768$, 平均核苷酸差异数 $k = 4.367$, 核苷酸多样性 $Pi = 0.011$ 。而分别来自2个养殖场的2个达氏鳇养殖群体都是1个群体仅1个单倍型, 2个单倍型之间仅有2个碱基差异, 遗传距离为0.005, 遗传变异极度缺乏。结果提示在利用史氏鲟和达氏鳇后备亲鱼进行繁殖育苗时要充分注意近交的影响。

关键词: 史氏鲟; 达氏鳇; 后备亲鱼; 线粒体控制区; 遗传多样性

中图分类号: S 917

文献标识码: A

史氏鲟(*Asipenser schrenckii*)和达氏鳇(*Huso dauricus*)是生活在我国黑龙江流域的两种大型经济鱼类, 具有很高的经济价值。特别是达氏鳇, 最大个体可达500 kg以上, 野生资源已极为稀少^[1]。由于经济价值大, 生长快, 易于驯养, 鲟鱼养殖业近年来得到迅速发展, 而苗种短缺问题也日益突出, 成为制约鲟鱼养殖业发展的瓶颈。虽然鲟鱼全人工繁殖技术的成功部分地解决了对野生亲鱼的依赖, 但由于鲟鱼性成熟晚, 亲鱼培育成本高, 人工养殖亲鱼数量相对不足, 许多单位将自养的鲟鱼留做后备亲鱼繁殖苗种, 而忽略了亲鱼选育应该注意的遗传背景问题。加上鲟鱼个体大, 采用同一亲鱼可繁殖大量的后代, 使得养殖群体近交风险大大增加^[2]。目前鲟鱼繁育中苗种质量问题受到普遍重视, 但与苗种质量密切相关的后备亲鱼遗传背景的相关研究却很少, 仅从系统发育和保护遗传学角度对史氏鲟和达氏鳇的遗传分化做了报道^[2-5]。

本研究利用多态性较高的线粒体DNA控制

区序列片断, 分析了4个史氏鲟后备亲鱼和2个达氏鳇后备亲鱼群体的遗传多态性, 以期这两种鱼类的养殖群体遗传学分析提供有价值的基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

研究用史氏鲟和达氏鳇样品, 2000年于北京市国家淡水渔业工程技术研究中心采集, 2009年在重庆市武隆县黄莺乡鲟鱼养殖场分别补充采集了史氏鲟(10尾)和达氏鳇(10尾)各一个群体。史氏鲟样本分别来自3~5龄的4个不同养殖后备亲鱼群体(AG1~AG4)共34尾, 其中AG1(7尾)、AG2(12尾)、AG3(5尾)采自北京, AG4(10尾)采自重庆。达氏鳇后备亲鱼样本采了4龄的2个后备亲鱼群体(HG1, HG2)共24尾, 其中HG1(14尾)采自北京, HG2(10尾)采自重庆。这些后备亲鱼的亲本均为产自黑龙江的野生鱼类。鱼体尾静脉采血1 mL入冻存管中置冰盒内, 带回实验室转入-80℃冰箱冷冻保存。

收稿日期:2010-09-03 修回日期:2010-11-05

资助项目:中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化重点实验室开放课题;北京市自然科学基金项目(5022005)

通讯作者:牛翠娟, Tel:010-58807966, E-mail:cjniu@bnu.edu.cn

1.2 方法

基因组 DNA 的提纯 常温下等冷冻样品溶解后取全血 150 μL , 加入 450 μL STE 缓冲液 (30 mmol/L Tris-HCL, 200 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, pH 8.0) 以及终浓度分别为 1% 的 SDS 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蛋白酶 K, 充分混匀后置 56 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中消化 6~8 h 至澄清, 中间轻轻混匀 2~3 次。加入等体积的水饱和酚缓慢混匀 20 min 后, 6 000 r/min 离心 10 min, 上清液转至另一干净的 Eppendorf 管中, 再加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提 10 min, 6 000 r/min 离心 10 min, 上清液转至另一干净的 Eppendorf 管中, 加入等体积的异丙醇沉淀 DNA, 视沉淀的有无, 用 6 000 r/min 离心 5~10 min 后弃上清, 将 DNA 样品置 56 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中干燥 10~15 min 左右, 加入适量的 TE 缓冲液溶解, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用或保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

PCR 扩增与 DNA 序列测定 本研究扩增了 mtDNA D-loop 绝大部分区域。扩增引物及实验步骤参照 Zhang 等^[3], 略有不同。概述如下, PCR 扩增正链引物序列为 DL: 5'-CAAGAACACAAGATTAATGAG-3'; 副链引物序列为 H740: 5'-GATCAAGGTATGTCGATGACA-3'。扩增位置位于 D-loop 靠近 Cyto b 端的非重复序列区域。引物由上海生工合成。PCR 反应总体积 25 μL , 包括 10 \times buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μL , dNTPs (4 mmol/L) 2 μL , 正、反链引物各 0.5 μL (10 pmol/L), *Taq* 酶 (5U) 0.2 μL , 模板 DNA 50 ng 以及 ddH₂O。PCR 扩增反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 后按 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ (史氏鲟) 或 55 $^{\circ}\text{C}$ (达氏鲤) 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 循环 35 次, 然后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 10 min。该反应过程使用德国 Biometra 公司产 UNO-Themoblok PCR 仪。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶检测并回收, 然后用 DNA 纯化试剂盒 (上海生工) 纯化。纯化后的 PCR 产物直接用 ABI 377 全自动 DNA 序列分析仪进行序列分析。

1.3 数据处理

测序后的电泳图谱及序列用 DNASTAR 软件包中的 Seqman 和 Megalign 做正反链拼接, 排序。用 Mega 3.0 统计不同样本之间的核苷酸组成, 采用 Kimura 双参数模型计算不同单倍型及群体之间的遗传距离。用 DnaSP 4.0 计算群体内的单倍

型多样性 (Hd)、平均核苷酸差异数 (k) 及核苷酸多样性 (Pi) 以及群体之间的遗传分化指数 (F_{ST} 及 G_{ST})。用 Network 4.5.1.6 构建史氏鲟与达氏鲤的单倍型系统发生网络图。

2 结果与分析

史氏鲟样本线粒体 D-loop 序列片段测序长度为 425 bp。这段序列富含 A 和 T 碱基, A + T 含量平均为 57.8%, G + C 含量为 42.2%。密码子的第一位、第二位和第三位上的 A + T 含量分别为 57.6%、54.0% 和 62.0%。序列共有 11 个变异位点, 占碱基总数的 2.6%, 无简约信息位点。序列单倍型共有 5 个——AS1 [8 样本, 分别来自北京 AG1 (2)、AG2 (1)、AG3 (5) 群体], AS2 (1 样本, 全部来自 AG2 群体)、AS3 (10 样本, 全部来自 AG2 群体)、AS4 (5 样本, 全部来自 AG1 群体)、AS5 (10 样本, 全部来自重庆 AG4 群体)。不同单倍型之间有 1~10 个变异位点 (表 1), 占碱基总数的 0.2%~2.4%。各单倍型之间的遗传距离为 0.002~0.024 (表 2), 其中 AS3 与其他 4 个单倍型有 8~10 个碱基差异, 遗传距离为 0.020~0.024, 而其他 4 个单倍型之间仅有 1~2 个碱基的差异, 遗传距离为 0.002~0.005。根据构建的系统发生网络图也可以看出, AS3 相对其他 4 个单倍型的遗传距离较远 (图 1)。

表 1 史氏鲟 5 个单倍型序列中的变异位点
Tab. 1 Mutation positions among 5 haplotypes of *A. schrenckii*

	变异位点 mutation positions
	111222 223
	45006222 393
	2334172347 933
AS1	TCCTGATTAA ATC
AS2	... C.
AS3	.. T. AGCC. G GCT
AS4 G.
AS5	AA. . A.

表 2 史氏鲟各单倍型之间的遗传距离
Tab. 2 Pairwise distance of *A. schrenckii* (p-distance)

	AS1	AS2	AS3	AS4	AS5
AS1					
AS2	0.002				
AS3	0.022	0.024			
AS4	0.002	0.005	0.024		
AS5	0.002	0.005	0.020	0.005	

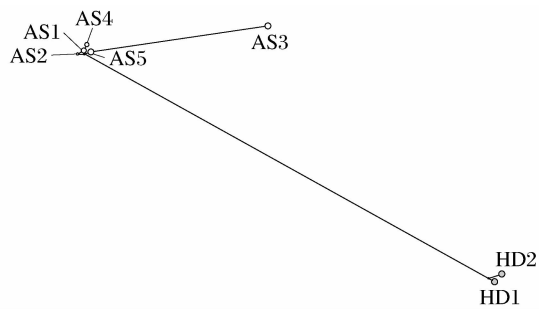


图1 Network 软件构建的史氏鲟与达氏鳊单倍型系统发生网络图

Fig. 1 Network describing the relationships among 7 haplotypes of *A. schrenckii* and *H. dauricus*

4 个不同的史氏鲟后备亲鱼群 AG1 (7 样本)、AG2 (12 样本)、AG3 (5 样本)、AG4 (10 样本) 中, AG1 的单倍型组成为 AS1: AS4 = 2: 5, 其单倍型多样性 Hd = 0. 476, 平均核苷酸差异数 $k = 0. 476$, 核苷酸多样性 Pi = 0. 001; AG2 的单倍型组成为 AS1: AS2: AS3 = 1: 1: 10, 其单倍型多样性 Hd = 0. 318, 平均核苷酸差异数 $k = 2. 477$, 核苷酸多样性 Pi = 0. 007; AG3 和 AG4 分别由 AS1 和 AS5 组成, 这两个种群的单倍型多样性 (Hd)、平均核苷酸差异数 (k) 及核苷酸多样性 (Pi) 均为 0。所有后备亲鱼群一起分析时的单倍型多样性 Hd = 0. 768, 平均核苷酸差异数 $k = 4. 367$, 核苷酸多样性 Pi = 0. 011。

达氏鳊样本线粒体 D-loop 序列片段测序长度为 434 bp。这段序列富含 A 和 T 碱基, A + T 含量平均为 58. 5%, G + C 含量为 41. 5%。密码子的第一位、第二位和第三位上的 A + T 含量分别为 60. 4%、57. 3% 和 58. 0%。达氏鳊养殖群体中共发现 2 个单倍型 HD1 (14 样本, 全部来自北京 HG1 群体) 和 HD2 (10 样本, 全部来自重庆 HG2 群体), 单倍型之间仅有 2 个碱基差异, 遗传距离为 0. 005。

2 个不同的后备亲鱼群 HG1 (14 样本)、HG2 (10 样本), 分别由 HD1 和 HD2 组成, 亲鱼群的单倍型多样性 (Hd)、平均核苷酸差异数 (k) 及核苷酸多样性 (Pi) 均为 0。所有后备亲鱼群放在一起分析的单倍型多样性 Hd = 0. 507, 平均核苷酸差异数 $k = 1. 014$, 核苷酸多样性 Pi = 0. 002。

史氏鲟与达氏鳊的养殖后备亲鱼群体中, 单倍型 HD1 ~ HD2 与 AS1 ~ AS4 分别有 54 ~ 59 个碱基差异, 遗传距离分别为 0. 117 ~ 0. 127, 2 个群

体之间的平均遗传距离为 0. 123。

3 讨论

衡量一个种群 mtDNA 的遗传变异有两个重要指标: 单倍型间的平均遗传距离 (P) 和核苷酸多态性 (Pi), 由于 Pi 值考虑了各种 mtDNA 单倍型在群体中所占的比例, 因此在反映一个群体的 mtDNA 的多态程度时往往比单纯的遗传距离平均值要精确^[6]。而本文所考察的史氏鲟种群的 Pi 除 AG2 稍高为 0. 007 外, 有 2 个为 0, 1 个为 0. 001。达氏鳊的两个亲鱼群均为 0。由此可以看出, 其遗传多样性是非常低的。不过如果将所有的史氏鲟后备亲鱼群一起分析, 史氏鲟的 Pi 为 0. 011。杨博等^[7]利用 mtDNA D-loop 全序列观测了鳊浪白鱼 (*Anabarilius grahami*) 的遗传多样性, 发现尽管其群体 mtDNA 多态性较高, 24 个体就检出 23 个单倍型, 但 Pi 值仅为 0. 006。已被证明遗传多样性水平较低的长江铜鱼 (*Coretus heterodon*) 平均 Pi 值为 0. 002 18^[8], 本研究达氏鳊所有后备亲鱼样本的 Pi 值为 0. 002。由此可推测, 达氏鳊所有后备亲鱼群体遗传多样性水平总体较低, 但对于养殖史氏鲟后备亲鱼, 如果在进行人工繁殖时注意同时从多个不同的后备亲鱼群体中取样进行繁殖, 似可保证这些亲鱼具有一定的遗传变异, 有望改善近亲繁殖的程度。

根据分析结果, 大多数养殖场的史氏鲟或者达氏鳊均是只有一个单倍型, 如 AG3、AG4、HG1 和 HG2, 而 AG2 虽然拥有 3 种单倍型, 但是单倍型的比例却相差极大, AS1: AS2: AS3 = 1: 1: 10, 其主要的单倍型还是只有 AS3, 而 AS3 仅在 AG2 种群中, 且距离其他 4 个单倍型遗传距离较远, 最大达 0. 024。史氏鲟其它几个单倍型之间遗传距离不大, 不高于 0. 005。两个达氏鳊单倍型间的遗传距离为 0. 005。肖翔和刘楚吾^[9]研究了 4 种笛鲷群体的遗传多样性, 发现其种内单倍型间遗传距离在 0. 009 ~ 0. 015 之间。方耀林等^[10]报道长江中游不同湖泊中黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 单倍型间的遗传距离在 0. 002 ~ 0. 021 之间。遗传多样性匮乏的四川裂腹鱼 (*Schizothorax kozlovi* Nikolsky) 乌江种群单倍型间平均遗传距离为 0. 006^[11]。对比可见, 除 AS3 单倍型外, 史氏鲟其他单倍型之间及达氏鳊单倍型之间遗传距离是偏低的。不过, 由于本研究受

采样限制所观测的后备亲鱼群体数量较少,很可能没有发现一些遗传差异较大的单倍型。本研究结果表明同一群体内亲鱼间遗传变异很小,但不同群体间可能存在遗传距离较远的个体。因此,采用同一群体的后备亲鱼进行人工繁殖,很容易产生近交衰退现象。建议种苗繁育场在进行人工繁殖时,除尽量采用多种来源的不同亲鱼群体进行繁殖外,有条件的地方应对亲鱼的遗传背景进行检测,尽量采用遗传距离远的亲鱼进行繁殖,这样有利于保持苗种的遗传多样性。

线粒体控制区 D-loop 基因序列分析已被证明是很好的可用于评价鲟鱼种群遗传分化的分子标记^[12]。本文运用 425 bp(史氏鲟)和 434 bp(达氏鳇)的线粒体控制区 D-loop 基因序列为分子标记,观测了两个养殖场不同批次的 4 个史氏鲟、2 个达氏鳇养殖后备亲鱼群体的遗传多样性,发现来自同一批苗种的同 1 个养殖后备亲鱼群体内的遗传多样性极低,同一批次(年龄)的后备亲鱼群体大部分是相同单倍型。特别是达氏鳇,1 个群体内个体都是同一单倍型,表明这些个体可能均来自同一个母本。即使是来自两个养殖场的 2 个不同达氏鳇群体之间,其个体间在 434 bp 的 D-loop 基因片段也仅有 2 个碱基的差异,群体间遗传距离仅为 0.005。如果以这样的达氏鳇亲鱼进行人工繁殖育苗,近交衰退的风险会非常大。本研究的不足之处是采集的养殖后备亲鱼群体体数量不够多,今后应进一步加强这方面工作。

感谢中国科学院昆明动物研究所张亚平院士对该项研究所给予的悉心指导和帮助。感谢朱华、张照斌博士及北京市国家淡水渔业工程技术研究中心与重庆市武隆县黄莺乡鲟鱼养殖场的同事们帮助采样。真诚感谢李黎、鲍蕾博士及昆明动物研究所遗传资源与进化重点实验室的同学与老师们在实验技术和数据分析上所给予的热情帮助。

参考文献:

- [1] 金泰哲. 鲟鳇杂交的人工繁殖技术[J]. 渔业经济研究, 2008(4): 40-43.
- [2] 吴艺, 孙中武, 王宏伟, 等. 史氏鲟、西伯利亚鲟及其杂交种的同工酶分析[J]. 水产学杂志, 2008, 21(1): 59-63.
- [3] Zhang S, Wu Q, Zhang Y. On the taxonomic status of Yangtze sturgeon, Asian and American green sturgeon based on mitochondrial control region sequences[J]. Acta Zoologica Sinica, 2002, 47(6): 632-639.
- [4] 梁利群, 孙效文, 董崇志, 等. 5 种鲟、鳇鱼基因组 DNA 遗传多样性分析[J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 273-276.
- [5] 王巍, 朱华, 胡红霞, 等. 五种鲟鱼线粒体控制区异质性和系统发育分析[J]. 动物学研究, 2009, 30(5): 487-496.
- [6] Zhou H, Li D Q, Zhang Y G, et al. Study on mitochondrial DNA genetic diversity of Tibetan Antelope [J]. Heredita, 2006, 28(3): 299-305.
- [7] 杨博, 陈小勇, 杨君兴. 鱈浪白鱼线粒体 DNA 控制区结构和种群遗传多样性分析[J]. 动物研究, 2008, 29(4): 379-385.
- [8] 袁娟, 张其中, 李飞, 等. 铜鱼线粒体控制区的序列变异和遗传多样性[J]. 水生生物学报, 2010, 34(1): 9-19.
- [9] 肖翔, 刘楚吾. 4 种笛鲷的线粒体 DNA 多样性分析[J]. 海洋科学, 2006, 30(4): 59-63.
- [10] 方耀林, 汪登强, 刘绍平, 等. 长江中游湖泊中黄颡鱼线粒体 DNA 的遗传变异[J]. 中国水产科学, 2005, 12(1): 56-61.
- [11] 代应贵, 邹习俊, 肖海. 四川裂腹鱼乌江种群 mtDNA 控制区序列的遗传多样性分析[J]. 四川动物, 2010, 29(4): 505-509.
- [12] Wirgin I, Waldman J, Stabile J, et al. Comparison of mitochondrial DNA control region sequence and microsatellite DNA analysis in estimating population structure and gene flow rates in Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus* [J]. J Appl Ichthyol, 2002, 18(4-6): 313-319.

Genetic diversity in the reserved parent fish broodstocks of *Asipenser schrenckii* and *Huso dauricus*

NIU Cui-juan^{1,2*}, HU Hong-xia³, LUO Jing¹, LI Chen²

(1. State Key Laboratory of Genetic Resources, Kunming Institute of Zoology,
Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;

2. Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering, Ministry of Education,
College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

3. Beijing Fisheries Research Institute, Beijing 100075, China)

Abstract: Germplasm degradation caused by inbred is an important problem that should be avoided during fish fry production in aquaculture. The inbred risk may be more severe in fry production of Amur sturgeon *Asipenser schrenckii* and Kaluga *Huso dauricus* because of their late maturation, rare mature fish resource and the ability to reproduce a large amount of eggs at one time. The present work examined the genetic diversity of 4 Amur sturgeon and 2 Kaluga reserved parent fish broodstocks from two hatcheries, using mitochondrial control region (D-loop) fragment sequence (Amur sturgeon 425 bp; Kaluga 434 bp) as the molecular marker. A total of 5 haplotypes were detected among 34 individuals from 4 Amur sturgeon stocks. There were 11 polymorphic sites, accounted for 2.6% of the total sites, no parsimony-informative sites. There were 1–10 variable size among different haplotypes, accounted for 0.2%–2.4% of the total sites. Genetic distance among these haplotypes varied from 0.002–0.024. The haplotype divergence, average number of nucleotide differences and nucleotide divergence were 0.768, 4.367 and 0.011, respectively. There was only one haplotype for each Kaluga stock from the two different hatcheries. Genetic difference between the two Kaluga haplotypes was 0.005, indicating a marked low genetic difference in Kaluga reserved parent fish broodstocks. These results show that much attention should be paid to avoid the inbred risk in sturgeon fry production, especially for Kaluga.

Key words: *Asipenser schrenckii*; *Huso dauricus*; reserved parent fish; mt DNA d-loop; genetic diversity

Corresponding author: NIU Cui-juan. Tel:010–58807966, E-mail:cjniu@bnu.edu.cn