

文章编号: 1000-0615(2018)01-0010-08

DOI: 10.11964/jfc.20160210286

基于微卫星评估草鱼放流亲本对野生群体遗传多样性的影响

季晓芬^{1,2}, 段辛斌¹, 刘绍平¹, 陈大庆¹, 汪登强^{1*}

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;

2. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 利用筛选的13对草鱼多态性微卫星标记, 开展了2011至2015年长江中游草鱼亲本增殖放流对野生群体遗传多样性的影响评估。通过对各位点的遗传多样性分析, 13个微卫星位点的多态信息含量为0.8622(0.657~0.950), 基因多样性为0.8555(0.675~0.936)。15个群体的有效等位基因数为7.4503~10.1536, 等位基因丰度为11.483~15.204, 说明15个草鱼群体的遗传多样性水平总体较高。遗传分化指数分析表明, 群体间不存在显著遗传分化($F_{ST}<5\%$)。通过贝叶斯聚类分析和主成分分析可将草鱼群体分为4个组群, 根据分组结果以及来源划分分别对草鱼群体进行AMOVA分析, 发现遗传变异大部分来自于群体内个体间, 组间及组内群体间的分化水平较低($F_{CT}<5\%$, $F_{SC}<5\%$), 与 F_{ST} 分析结果一致。研究表明, 当前草鱼亲本增殖放流模式对野生群体遗传结构影响不明显。

关键词: 草鱼; 微卫星; 遗传多样性; 增殖放流

中图分类号: Q 347; S 917.4

文献标志码: A

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是中国四大家鱼之一, 因其具有生长快、肉质鲜美等特点而深受广大消费者喜爱, 是目前中国乃至世界上产量最大的淡水经济鱼类, 在我国渔业生产中占有重要经济地位^[1]。在20世纪80年代, 中国草鱼的生物资源非常丰富, 但由于生产上的过度捕捞和盲目近亲交配, 以及草鱼生境的破坏, 草鱼种质资源目前已出现严重退化^[2]。草鱼在中国的主要河流都有分布, 但其中以长江的草鱼资源最为丰富, 产卵场散布于从四川到安徽的干流江段, 以及汉江、湘江等主要支流中^[3]。因此, 保护长江水系草鱼的种质资源对我国淡水渔业持续稳定地发展具有重要意义。为恢复长江水系草鱼资源量, 不同的技术手段不断被采用, 其中增殖放流更是受到广泛关注。特别是自2010年起, 湖北长江江段进行了大规模的四大家鱼亲本人工增殖放流活动, 其对自然群体遗传多样性的影响也成为人们十分关心的问题。深入研究遗传结构与遗传多样性是科学制定资

源保护与开发规划的基础。

近年来, 国外已经有很多关于人工增殖放流对野生群体遗传多样性影响的研究。Perez-Enriquez等^[4]利用3个微卫星位点对四国岛周边的7个不同地点的真鲷(*Pagrus major*)群体进行了分析, 认为这7个野生群体未发生显著的遗传分化, 属于一个孟德尔群体, 但可能由于人工增殖放流导致野生群体遗传不稳定, 这与Gonzalez等^[5]2013年利用15个微卫星位点和线粒体控制区序列对放流真鲷群体以及东京湾和相模湾的野生真鲷群体进行分析的结果一致。Gonzalez等^[6]在2008年用6对微卫星引物对广岛湾的放流和野生黑鲷(*Sparus macrocephalus*)群体进行了变异分析及家系重建, 结果显示各群体的遗传多样性有轻微偏差, 但群体间的分化不明显; 然而Gonzalez等^[7]又在2009年发现位于广岛湾不同地点的5个黑鲷野生群体出现了显著的遗传分化, 而在将这些野生个体按年龄分组之后却发现这种显著的遗传分化消失了, 说明连续大规模的黑鲷

收稿日期: 2016-02-17 修回日期: 2017-04-10

资助项目: 国家自然科学基金(51579247)

通信作者: 汪登强, E-mail: wdq@yfi.ac.cn

放流活动对于野生黑鲷群体遗传结构的影响有一定加成作用。此外, 国外还有关于脂鲤(*Piaractus mesopotamicus*)^[8]、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hananai*)^[9]、条斑星鲽(*Verasper moseri*)^[10]等鱼类增殖放流群体对其野生群体遗传多样性影响的报道。而迄今我国在这方面的研究还非常少。因此本研究利用13个草鱼微卫星位点对2011年至2015年长江中游草鱼放流亲本及早期资源的遗传多样性进行分析, 评估草鱼放流群体对野生群体遗传多样性的影响, 以期为今后合理开展天然水域的人工放流提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2011年至2015年每年4月在长江中游石首和监利江段开展四大家鱼亲本标记放流, 亲本来源为长江采集的鱼苗在监利老江河四大家鱼国家级原种场和石首老河国家级四大家鱼原种场培养。所有草鱼亲本经检验, 发育性成熟, 共采集2516尾草鱼放流亲本, 每一尾亲本记录体质量、体长及性别后剪取少量尾鳍, 用无水乙醇保存。每年每地样品当作一个采样群体处理, 共10个放流群体, 各群体编号及样本量见表1。

同时, 2011年至2015年每年5月至7月在监利三洲江段进行鱼类早期资源监测, 采用筛网和圆锥网采集鱼卵和幼鱼^[11], 草鱼苗的鉴定按易伯鲁^[12]的方法。

表1 草鱼放流亲本信息

放流日期 date	地点 place	编号 ID	样本量/尾 <i>n</i>	体长/cm length	体质量/kg weight	性比 ♂:♀ sex ratio
2011.4	监利	JBC	214	79.5±14.5	13.5±2.2	0.88
	石首	SBC	83	81.5±13.3	14.5±2.7	0.93
2012.4	监利	JCC	351	75.4±15.1	12.1±3.1	0.95
	石首	SCC	330	77.2±12.2	13.1±3.2	0.84
2013.4	监利	JDC	150	80.5±10.5	14.1±2.7	0.92
	石首	SDC	24	76.6±8.7	11.8±2.8	0.71
2014.4	监利	JEC	592	78.4±10.4	13.2±3.2	0.95
	石首	SEC	175	83.1±12.7	14.7±3.3	1.00
2015.4	监利	JFC	520	82.6±13.2	14.6±3.7	0.87
	石首	SFC	77	80.5±11.1	14.1±2.9	0.79

1.2 实验方法

DNA提取 参照Aljanabi等^[13]报道的高盐法, 略加改进, 提取所有样本的DNA(包括亲本和早期资源), 溶解于50 μL TE缓冲液中, 4 °C溶解过夜, 1%琼脂糖凝胶电泳检测, -20 °C保存备用。

表2 草鱼野生群体采集

年份	群体 population	编号 ID	样本量/尾 <i>n</i>
2011	监利三洲	LBC	172
2012	监利三洲	LCC	109
2013	监利三洲	LDC	206
2014	监利三洲	LEC	397
2015	监利三洲	LFC	475

多重PCR 采用多重PCR扩增, 从已发表文献的草鱼微卫星引物中挑选出多态性丰富、带型清晰、杂带少、稳定及特异性强, 在一定的温度范围内都能扩增出目的条带的13对引物^[14-15], 按照组合(5对或4对)引物同时扩增, 如表3所示。PCR反应体系包括10×Buffer (15 mmol/L MgCl₂) 3 μL, MgCl₂(25 mmol/L) 0.5 μL, dNTPs (1 mmol/L) 1 μL, Taq DNA酶2 U, 正反向引物(10 μmol/L)各0.5 μL, 加适量模板DNA 1 μL, 反应总体积为25 μL。PCR扩增条件为95 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 58 °C退火30 s和72 °C延伸50 s, 30个循环; 72 °C延伸10 min。PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 将条带清晰的PCR产物用ABI PRISM 3730测序仪分型。

数据处理 使用软件Gene Marker V1.5读取数据, Cervus 3.0分析等位基因数(N_a)、多态信息含量(PIC)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e), FSTAT v. 2.9.3.2分析遗传多样性指数(H)、基因丰度(A_r)、近交系数(F_{IS}), ArlequinV3.5.1计算成对遗传分化指数(F_{ST})并进行方差分析(AMOVA), Structure 2.3.4计算等位基因频率并用Distruct 1.1绘出贝叶斯聚类分析图, 用PCAgen 1.2.1绘出主成分分析图。

2 结果

2.1 微卫星位点遗传多样性

对3875尾草鱼的13个微卫星位点进行分析

表 3 三个多重PCR中的13个草鱼微卫星位点信息

Tab. 3 Microsatellite marker information for all 13 loci used in the three multiplex systems

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequences (5'-3')	荧光标记 dye label	片段大小/bp size	查询号 GenBank accession no.
五重 Quintuplex				
Cid0025	ACAAAACCAGTTAAGAACCACAGG TGAAAGGAGCCGAGAGTTGAA	FAM	130~160	FJ883178
Cid0367	TTTGCTGATATTTACCACACTG AATGGGTGAGACTCTCCAATAAT	TAMRA	130~170	FJ883309
Cid0388	TGTGCCTTGGTCTTGCTTTATT TTCCTTCCCATGACGCTCTC	HEX	190~220	FJ883313
Cid12	TGTGTCGCGTCTGGTTAG AGCAGCACCAGTGGACAT	FAM	200~240	FJ227909
Cid0327	TCAATATCGCTTAAGGCTGATGA ATGTAGGTGGCGTGTGCTCTC	TAMRA	250~320	FJ883301
四重(一) Quadruplex I				
Cid0276	AAATCACCATCAACCAGTTCAATC AAATGTTGCCACAGGCTTAGTCT	HEX	120~160	FJ883280
Cid0177	AAGCCCTCGAAACAAAAGTTAG CAAGTATGCAGGAGCAGTGTG	FAM	200~240	FJ883250
HLJC115	AAATGCCGTCCAGTGAGTCT TCAGCCTGCACATAACAAAGA	HEX	240~300	FJ213569
Cid0037	CCCTTAACCCTAATCCTACCC AGCATGCGCAAACATTGA	TAMRA	240~300	FJ883182
四重(二) Quadruplex II				
Cid0029	TTGCGTCTCAAGCAGAAATGACT GAGAGTGCAGCGGCTCAGG	FAM	110~140	FJ883180
Cid0015	GTACGTGCCAGCCATTCAGAGAT GTCAGTGGCATGTGGTTTGTCTT	HEX	200~240	EF408906
HLJC116	TGGTTGGACAGCAAACAAAG TGAAGGTCTGGCTGATGATG	TAMRA	200~240	FJ213570
Cid0321	AAACCACTTACGCCTATGGAGAGT CAGCGCTGACGAACACTTTTAC	FAM	220~260	FJ883299

检测, 得到509个等位基因, 其中等位基因数最少的为Cid0029, 有22个等位基因; 最多的为HLJC115, 有54个等位基因, 平均等位基因数为39.15个(表4)。各位点的观测杂合度为0.719~0.962, 平均为0.8338; 期望杂合度为0.680~0.952, 平均为0.8727。所有位点的 $PIC > 0.6$, 平均 PIC 为

0.8622。各位点基因多样性为0.675~0.936, 平均为0.8555。除位点Cid0276的 $F_{ST} < 0.01$ 外, 其他各位点的 F_{ST} 均在0.01至0.05之间, 所有位点 $F_{ST} = 0.0275$ 。Hardy-Weinberg平衡检验显示有8个位点极显著偏离平衡($P < 0.001$), 未偏离的位点分别为Cid0367、Cid0327、Cid0029、Cid0177和

表 4 微卫星位点的遗传多样性参数

位点 locus	等位基 因数 N_a	多态信息 含量 PIC	基因多 样度 H	遗传分化 指数 F_{ST}	Hardy- Weinberg P
Cid0025	29	0.806	0.825	0.0123	<0.001
Cid12	46	0.832	0.823	0.0293	<0.001
Cid0388	36	0.918	0.912	0.0207	<0.001
Cid0367	34	0.741	0.748	0.0239	0.999
Cid0327	48	0.921	0.918	0.0173	0.999
Cid0029	22	0.657	0.675	0.0282	0.999
HLJC116	50	0.903	0.882	0.0369	<0.001
Cid0015	35	0.875	0.857	0.0459	<0.001
Cid0321	42	0.895	0.881	0.0272	<0.001
Cid0177	35	0.867	0.846	0.0465	0.234
Cid0276	33	0.909	0.913	0.0085	0.797
HLJC115	54	0.950	0.936	0.0208	<0.001
Cid0037	45	0.935	0.906	0.0400	<0.001
average	39	0.862	0.856	0.0275	<0.001

表 5 15 个草鱼群体的遗传多样性参数

Tab. 5 Genetic diversity parameters of 15 *C. idella* populations

群体 population	等位基 因数 A	等位基因 丰度 A_r	观测杂 合度 H_o	期望杂 合度 H_e	近交系数 F_{IS}
JBC	21.76	12.500	0.8915	0.8407	-0.060
SBC	15.92	11.483	0.8297	0.8223	-0.009
LBC	20.54	12.178	0.8491	0.8381	-0.013
JCC	23.69	13.318	0.8382	0.8696	0.017
SCC	25.54	13.477	0.8445	0.8538	0.011
LCC	24.62	15.204	0.8683	0.8771	0.009
JDC	23.78	14.435	0.8252	0.8819	0.064
SDC	13.27	13.132	0.8221	0.8483	0.049
LDC	25.00	13.613	0.7204	0.8549	0.179
JEC	24.08	12.563	0.8467	0.8552	0.010
SEC	20.69	12.632	0.8003	0.8516	0.060
LEC	22.08	12.586	0.8272	0.8415	0.017
JFC	24.46	13.188	0.8485	0.8545	0.007
SFC	17.77	13.329	0.8478	0.8736	0.030
LFC	23.69	12.660	0.8283	0.8481	0.033

Cid0276。

2.2 遗传结构

用Arlequin计算15个草鱼群体的成对 F_{ST} 值(表6)。群体间成对 F_{ST} 值表明, LDC与其他所有群体分歧较大($0.269 \leq F_{ST} \leq 0.055$)。JBC、SBC和LBC三个群体间, JCC、SCC、LCC和JDC四个群体间的分歧非常小($F_{ST} < 0.01$)。另外, SEC-LEC、SEC-JFC、SEC-JEC以及JEC-JFC群体的分歧也非常小。

利用Structure和Distruct软件对研究的15个草鱼群体13个微卫星座位等位基因数据进行贝叶斯聚类分析(Bayesian clustering analysis)与遗传结构推导分析(图1, 图中不同颜色表示不同的遗传聚类)。当 $K=2$ 时, JBC、SBC和LBC群体在遗传结构上相似, 可归为一类, JCC、SCC、LCC、JDC、SDC和LDC在遗传结构上相似, 归为另一类, 其他所有群体归为一类。当 $K=3$ 时, LDC出现不同, 归为一类。当 $K=4$ 时, 15个草鱼群体的遗传结构相似程度分类结果与 $K=3$ 时的分类结果一致, 因此 $K=4$ 、 $K=5$ 的遗传结构分析结果无意义。综上所述, 通过遗传结构推导分析, 15个草鱼群体可分为4个类群, 即JBC、SBC和LBC为一类, JCC、SCC、LCC、JDC和SDC为一类, LDC为一类, 其他群体为一类。

利用PCAgen软件对15个草鱼群体进行主成分分析(principal components analysis; PCA)(图2)。前3个主成分的百分比分别为33.26%、21.26%、14.32%, 百分比之和为68.84%。第一主成分将LDC单独归为一类, JCC、SCC、LCC、JDC和SDC归为一类, 其他群体归为一类; 第二主成分将JBC、SBC和LBC归为一类; 第三主成分将JBC、SBC和LBC归为一类, LDC单独分离出来。因此, 根据这3个主成分将15个群体分成了4个类群, 即JBC、SBC和LBC为一类, JCC、SCC、LCC、JDC和SDC为一类, LDC为一类, 其他群体为一类, 这一结果与贝叶斯聚类分析结果基本一致。

根据等位基因型的分子资料, 对具有等级结构的群体进行方差分析(AMOVA), 可以揭示群体的遗传结构及其遗传分化程度。根据贝叶斯聚类分析和主成分分析结果, 将15个群体分为4个组, 分析群体分化分子方差以及将群体按地理位置分为3组, 分析群体分化分子方差, 结果

表 6 群体间成对 F_{ST} 值Tab. 6 Pairwise F_{ST} values

群体 population	JBC	SBC	LBC	JCC	SCC	LCC	JDC	SDC	LDC	JEC	SEC	LEC	JFC	SFC
SBC	0.0067													
LBC	0.0059	0.0038												
JCC	0.0319	0.0222	0.0306											
SCC	0.0313	0.0232	0.0298	0.0033										
LCC	0.0286	0.0221	0.0285	0.0055	0.0056									
JDC	0.0347	0.0336	0.0325	0.0048	0.0077	0.0072								
SDC	0.0336	0.0292	0.0309	0.0088	0.0083	0.0088	0.0046							
LDC	0.0438	0.0477	0.0405	0.0365	0.0269	0.0294	0.0333	0.0367						
JEC	0.0244	0.0206	0.0251	0.0223	0.0249	0.0203	0.0182	0.0235	0.0438					
SEC	0.0207	0.0162	0.0204	0.0204	0.0206	0.0173	0.0188	0.0182	0.0446	0.0082				
LEC	0.0234	0.0218	0.0224	0.0281	0.0279	0.0221	0.0259	0.0268	0.0490	0.0116	0.0060			
JFC	0.0284	0.0241	0.0292	0.0270	0.0292	0.0245	0.0224	0.0274	0.0482	0.0075	0.0065	0.0108		
SFC	0.0269	0.0253	0.0268	0.0288	0.0292	0.0241	0.0237	0.0289	0.0461	0.0101	0.0101	0.0147	0.0066	
LFC	0.0369	0.0347	0.0392	0.0358	0.0376	0.0342	0.0306	0.0333	0.0545	0.0187	0.0158	0.0269	0.0122	0.0131

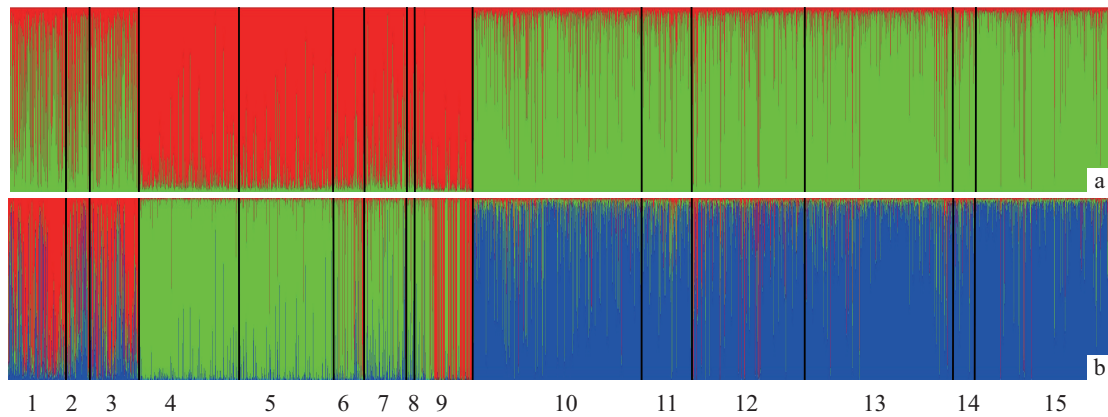


图 1 15个草鱼群体的贝叶斯聚类分析(a: K=2; b: K=3)

Fig. 1 Results of the Bayesian clustering analysis of 15 *C. idella* populations

1. JBC, 2. SBC, 3. LBC, 4. JCC, 5. SCC, 6. LCC, 7. JDC, 8. SDC, 9. LDC, 10. JEC, 11. SEC, 12. LEC, 13. JFC, 14. SFC, 15. LFC

见表7。以4个组15个群体作为变异来源的分子方差分析结果表明,草鱼个体间的遗传差异占96.89%,组间差异占2.11%,组内差异占1.00%;以地理隔离作为变异来源的分子方差分析结果表明,草鱼个体间的遗传差异占97.69%,组间差异占-0.27%,组内差异占2.56%,组间存在一定程度的渐渗现象($F_{CT}=-0.0027$)。两种变异来源的分子方差分析说明,草鱼遗传多样性变化主要来自个体间的差异。

3 讨论

本研究利用13个微卫星位点对15个草鱼群体进行了遗传多样性分析,所选用的15个微卫星位点均为高度多态位点($PIC>0.6$; $H>0.6$),这些位点等位基因分布较均匀,遗传多样性较丰富,能提供较丰富的遗传信息,适合用于草鱼群体的遗传多样性评估。等位基因丰度可用来评估等位基因数,不受样本量的影响,可以满

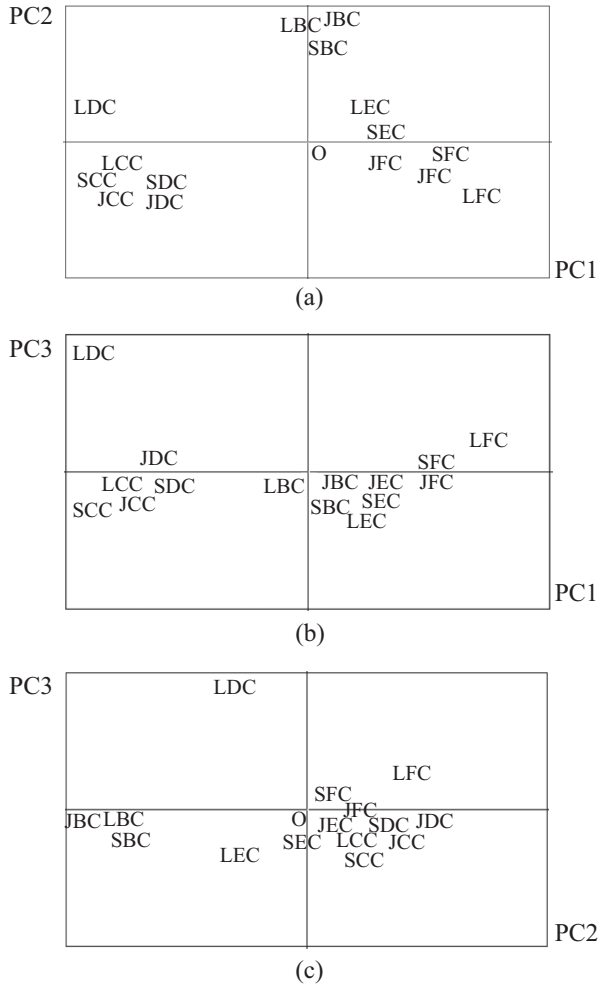


图 2 15个草鱼群体的主成分分析

Fig. 2 Principal components analysis (PCA) of allele frequencies of 15 *C. idella* samples

足此次不同群体样本量存在差异的需要。本研究15个草鱼群体的等位基因丰度、观测杂合度以及期望杂合度均高于Liu等^[16]对长江5个草鱼野生

群体的遗传多样性分析。虽然石首、监利放流群体为人工养殖群体,但由于苗种来源于长江,因此仍保持着较高的遗传多样性,15个群体的遗传多样性水平总体较高。通常来说,野生群体的遗传多样性要高于养殖群体,但是如果放流群体的遗传多样性显著低于野生群体,那么大规模增殖放流活动很可能会降低放流物种整体的遗传多样性水平,进而影响到该物种的可持续发展^[17]。本研究显示,部分年份的野生群体的基因丰度和杂合度低于放流群体,如2015年(表5),可能与采样有关,每年原种场中用于放流的群体存在多个年份收集的鱼苗混合培育至性成熟的个体,代表长江多个年份的样本,而采集野生群体则是由同一年的子代所组成,甚至可能主要是产卵高峰期的子代,所代表的群体较小,但是差异并不显著(表6)。

尽管根据贝叶斯遗传聚类分析和主成分分析能够将本研究的年度放流群体和子代群体划分为不同的聚类群体(图1,图2),但是这些聚类并没有得到AMOVA的支持,基于遗传分化系数(F_{ST})的结果,本研究各座位的 F_{ST} 平均值为0.0275,即2.75%的遗传变异来自于群体间,97.25%的变异存在于群体内,说明15个草鱼群体间遗传分化程度较低。根据群体间成对 F_{ST} 值,除LDC-LFC外,其他群体间的遗传分化程度均较低($F_{ST}<0.05$)。值得注意的是,LDC与LFC的 F_{ST} 值是唯一大于0.05的,而LDC与各个群体间的 F_{ST} 值也比较大(表6),从遗传多样性参数分析,在所有群体中,这一群体的观测杂合度最低,而近交系数最大,但等位基因丰度并不低(表5),说明LDC样本基因纯合度高于其他群体。其原因

表 7 15个草鱼群体的分子方差分析

Tab. 7 Analysis of molecular variance (AMOVA) in 15 *C. idella* populations

分组 groups	变异来源 source of variation	方差组分 variance components	方差率/% percentage of variation	固定指数 fixation index
上文被分出的4个组群 4 groups according to the divided above	组间 F_{CT} among groups	0.117	2.11	0.0212
	组内群体间 F_{SC} among populations within groups	0.055	1.00	0.0102
	个体间 F_{ST} within individuals	5.341	96.89	0.0311
	监利、石首放流群体与野生群体 Groups from Jianli, Shishou and nature	组间 F_{CT} among groups	-0.015	-0.27
	组内群体间 F_{SC} among populations within groups	0.141	2.58	0.0258
	个体间 F_{ST} within individuals	5.341	97.69	0.0231

是受采样误差还是其他因素影响有待进一步研究。尽管LDC与其他的 F_{ST} 值稍大,但并未发生显著遗传分化。

为了增加长江草鱼资源量,每年都有大量的成熟草鱼亲本被投入长江水体。但由于本研究中草鱼放流群体本就来源于长江流域,与野生群体在遗传多样性上保持较高的一致性,比较贴近放流江段野生群体的原有水平,种质资源质量较好,对于保护和维持草鱼野生群体的遗传多样性起着重要作用。本研究中,连续大规模的亲本增殖放流活动并未明显影响到野生群体的遗传多样性,主要可能得益于两个方面,一方面是草鱼本身具有较高的抗逆能力,另一方面是因为放流亲本就其根本而言来自于野生群体。因此,若要进行有效的大规模草鱼亲本增殖放流活动,首先要加强原种场的管理,确保放流群体来源于放流江段,保持放流群体的遗传多样性。尽管目前研究显示草鱼亲本增殖放流对野生群体遗传结构还未产生明显的影响,但还有一些问题需要进一步研究,如亲本放流对早期资源的贡献率、长期放流对野生群体遗传渐渗及累加效应、放流亲本的子代生存力等,以期淡水鱼类增殖放流提供科学依据。

参考文献:

- [1] 范玉顶,张燕,汪登强,等. 长江草鱼多态微卫星位点的分离及后备亲鱼的遗传多样性分析[J]. 淡水渔业, 2010, 40(6): 3-8, 21.
Fan Y D, Zhang Y, Wang D Q, et al. Microsatellite markers isolation and genetic analysis of wild grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in Yangtze River[J]. Freshwater Fisheries, 2010, 40(6): 3-8, 21(in Chinese).
- [2] 周盼,张研,徐鹏,等. 基于26个微卫星标记的三江水系草鱼遗传多样性分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1011-1020.
Zhou P, Zhang Y, Xu P, et al. Genetic analysis of grass carp populations from three major watersheds based on 26 microsatellite markers[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(5): 1011-1020(in Chinese).
- [3] 李思发,吕国庆,贝纳切兹 L. 长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体DNA多样性分析[J]. 动物学报, 1998, 44(1): 82-93.
Li S F, Lv G Q, Bernatchez L. Diversity of mitochondrial DNA in the populations of silver carp, bighead carp, grass carp and black carp in the middle- and lower reaches of the Yangtze River[J]. Acta Zoologica Sinica, 1998, 44(1): 82-93(in Chinese).
- [4] Perez-Enriquez R, Takemura M, Tabata K, et al. Genetic diversity of red sea bream *Pagrus major* in western Japan in relation to stock enhancement[J]. Fisheries Science, 2001, 67(1): 71-78.
- [5] Gonzalez E B, Aritaki M, Sakurai S, et al. Inference of potential genetic risks associated with large-scale releases of red sea bream in Kanagawa Prefecture, Japan based on nuclear and mitochondrial DNA analysis[J]. Marine Biotechnology, 2013, 15(2): 206-220.
- [6] Gonzalez E B, Nagasawa K, Umino T. Stock enhancement program for black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) in Hiroshima Bay: monitoring the genetic effects[J]. Aquaculture, 2008, 276(1-4): 36-43.
- [7] Gonzalez E B, Umino T. Fine-scale genetic structure derived from stocking black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii* (Bleeker, 1854), in Hiroshima Bay, Japan[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2009, 25(4): 407-410.
- [8] Lopera-Barrero N M, Ribeiro R P, Povh J A, et al. Genetic evaluation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) natural populations and from the broodstocks of a stock enhancement program using microsatellite markers[J]. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010, 62(4): 954-963.
- [9] Sekino M, Saido T, Fujita T, et al. Microsatellite DNA markers of Ezo abalone (*Haliotis discus hannai*): A preliminary assessment of natural populations sampled from heavily stocked areas[J]. Aquaculture, 2005, 243(1-4): 33-47.
- [10] Ortega-villaizán R M D M, Suzuki S, Ikeda M, et al. Monitoring of the genetic variability of the hatchery and recaptured fish in the stock enhancement program of the rare species barfin flounder *Verasper moseri*[J]. Fisheries Science, 2005, 71(5): 1120-1130.
- [11] Duan X B, Liu S P, Huang M G, et al. Changes in abundance of larvae of the four domestic Chinese carps in the middle reach of the Yangtze River, China, before and after closing of the Three Gorges Dam[J]. Environmental Biology of Fishes, 2009, 86(1): 13-22.
- [12] 易伯鲁,余志堂,梁秩燊,等. 长江干流草,青,鲢,鳙四大家鱼产卵场的分布,规模和自然条件[M]//易伯鲁,余志堂,梁秩燊,等. 葛洲坝水利枢纽与长江四大家鱼. 武汉:湖北科学技术出版社,1988.
Yi B L, Yu Z T, Liang Z S, et al. The distribution, natural conditions, and breeding production of the spawning ground of four famous freshwater fishes on the main stream of the Yangtze River[M]// Yi B L, Yu Z T, Liang

- Z S, *et al.* Gezhouba water control project and four famous fishes in Yangtze River. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 1988 (in Chinese).
- [13] Aljanabi S M, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22): 4692-4693.
- [14] Guo S S, Zou G W, Yang G P. Development of microsatellite DNA markers of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and their cross-species application in black carp (*Mylopharyngodon piceus*)[J]. *Conservation Genetics*, 2009, 10(5): 1515-1519.
- [15] Li O, Zhao Y Y, Zhang Y, *et al.* Twenty-five polymorphic microsatellite markers from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Animal Genetics*, 2009, 40(6): 1002-1003.
- [16] Liu F, Xia J H, Bai Z Y, *et al.* High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis[J]. *Aquaculture*, 2009, 297(1-4): 51-56.
- [17] 杨爽, 宋娜, 张秀梅, 等. 基于线粒体控制区序列的三疣梭子蟹增殖放流亲蟹遗传多样性研究[J]. *水产学报*, 2014, 38(8): 1089-1096.
- Yang S, Song N, Zhang X M, *et al.* Genetic diversity of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) from four broodstock populations in stock enhancement inferred from mitochondrial control region[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(8): 1089-1096(in Chinese).

Genetic effect of released brood grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) on wild population in the Yangtze River inferred from microsatellite markers

Ji Xiaofen^{1,2}, DUAN Xinbin¹, LIU Shaoping¹, CHEN Daqing¹, WANG Dengqiang^{1*}

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The natural resources of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) in Yangtze River have significantly decreased in the past decades. In recent years, large-scale releases of brood grass carp are carried out for ecological restoration in Yangtze River. In order to assess the genetic effect of released brood fishes on wild population in the middle reaches of Yangtze River, thirteen polymorphism microsatellite markers were selected to genotype the genetic differentiation among released and wild populations. Fifteen populations were sampled, including ten released and five wild populations. The results showed that polymorphic information content and gene diversity of the microsatellite loci was 0.8622 (0.657–0.950) and 0.8555 (0.675–0.936), respectively. The number of effective alleles of the 15 populations ranged from 7.4503 to 10.1536, and allelic richness from 11.483 to 15.204, which indicated that genetic diversity of grass carp populations was moderately high. The total and pairwise genetic differentiation indexes (F_{ST}) were low to 5%, loci implying that there was no significant genetic differentiation among populations. The 15 grass carp populations were divided into 4 groups based on Bayesian clustering analysis and principal component analysis. According to above grouping and geographic distribution of the 15 grass carp populations, we have conducted AMOVA analysis, as a result, most of the genetic variation of grass carp populations came from inter-individuals, and the level of genetic differentiation among groups was low ($F_{CT}<5\%$; $F_{SC}<5\%$). In summary, there was hardly any genetic effect of releasing nature grass carp on wild populations in the Yangtze River under current model.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; microsatellite; genetic diversity; releasing

Corresponding author: WANG Dengqiang. E-mail: wdq@yfi.ac.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (51579247)