



## 基于微卫星标记的钱塘江上游黄尾鲮增殖放流效果及其潜在遗传风险评估

郭爱环, 原居林, 练青平, 倪蒙, 刘梅, 顾志敏\*

(浙江省淡水水产研究所, 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江湖州 313001)

**摘要:** 为评估钱塘江上游黄尾鲮的增殖放流效果和潜在遗传风险, 本实验利用已开发的 11 对微卫星引物, 基于亲子鉴定技术对钱塘江上游增殖放流黄尾鲮的资源贡献率进行估算, 同时开展黄尾鲮养殖群体和野外群体的遗传多样性比较, 评估其增殖放流的遗传风险。结果显示, 33 尾繁殖亲本群体和 105 尾回捕群体的平均等位基因数 ( $N_a$ ) 为 8.64, 平均观测杂合度 ( $H_o$ ) 为 0.708, 平均期望杂合度 ( $H_e$ ) 为 0.739, 平均多态信息含量 (PIC) 为 0.703, 11 对微卫星引物多样性较高。亲缘关系分析表明, 11 个座位累计非亲排除率 (CEP) 达到 99.999 980%, 在回捕的 105 尾黄尾鲮个体中, 5 尾回捕个体被确认为放流的子代, 对野外群体的资源贡献率为 4.76%。黄尾鲮养殖群体和野外群体均具有较高的遗传多样性, 且群体内各个遗传参数相差较小, 遗传多样性水平相近; 分子方差分析 (AMOVA) 表明, 遗传变异主要来自于群体内 (95.92%), 遗传分化系数  $F_{ST}$  为 0.053 59, 群体间的基因流 ( $N_m$ ) 为 4.42, 属于低等程度的分化, 基因交流无障碍。综合分析表明, 钱塘江增殖放流的黄尾鲮具有良好的资源恢复效果, 且无放流带来的潜在遗传风险。

**关键词:** 黄尾鲮; 增殖放流; 效果评估; 分子标记; 遗传多样性

**中图分类号:** Q 953; S 932.4

**文献标志码:** A

为有效改善天然水域渔业资源匮乏的问题, 增殖放流作为补充渔业资源的有效措施被广泛应用, 通过向公共水体投放水生生物苗种达到鱼类资源增殖的目的。此外, 增殖放流还具有修复水域生态、保护水生生物多样性、促进渔业增效和渔民增收的作用, 因此, 近年来受到世界各国渔业管理机构的高度重视<sup>[1-3]</sup>。增殖放流效果评估又是渔业资源增殖放流过程中最引人关注的问题, 该评估决定“放什么(放流种类)、放多少(放流数量)和如何放(放流方式)”, 为今后的增殖放流策略制定、实施和适应性管理提供重要参考依据。

黄尾鲮 (*Xenocypris davidi*) 隶属鲤形目 (Cyp-

riformes) 鲤科 (Cyprinidae), 是广泛分布于我国河流湖泊的中小型经济鱼类, 主要栖息于水域中下层, 以藻类及植物碎片、有机物碎屑为饵料, 兼食浮游动物和底栖动物。因黄尾鲮作为碎屑性鱼类能有效抑制水体富营养化加剧、控制藻类的异常增殖<sup>[4]</sup>, 近年来在浙江省内被大量放流于江河、水库和湖泊等水体中, 其中 2016 年黄尾鲮在浙江省内的增殖放流量为 4 993 万尾, 2017 年增加至 1.49 亿尾。在如此大规模增殖放流的态势下, 亟需开展黄尾鲮增殖放流效果评估, 以及在大规模增殖放流下, 养殖群体对黄尾鲮野外群体的潜在遗传风险评估, 以便为后续黄尾鲮增殖放流工

收稿日期: 2021-01-24 修回日期: 2021-05-17

资助项目: 浙江省基础公益研究计划 (LGN18C190001)

第一作者: 郭爱环 (照片), 从事渔业资源评估研究, E-mail: guoaihuan10@126.com

通信作者: 顾志敏, 从事遗传育种研究, E-mail: guzhimin2006@163.com



作提供科学指导。

目前, 内陆渔业增殖放流效果评估普遍采用标记回捕法。相比常见的挂牌标志、切鳍标志和 T 标签标志等<sup>[5]</sup>, 微卫星 DNA 标记具有极大减少鱼体损伤、标记不易丢失、标记检测过程完全不受鱼类生长和活动影响的优势; 此外, 微卫星 DNA 标记具有数量大的特点, 不但可以检测个体, 还适合群体的大规模标记<sup>[6-7]</sup>, 已经成为准确和长期评估增殖放流效果最有效的手段<sup>[8-9]</sup>。基于微卫星标记的内陆水域增殖放流效果评估已开展很多研究, 如成为为等<sup>[10]</sup>通过微卫星标记的方法, 对长江上游胭脂鱼 (*Myxocyprinus asiaticus*) 增殖放流效果进行了评估, 推算出增殖放流的胭脂鱼对长江中上游野外群体的贡献量为 16.92%。除此之外, 通过在“四大家鱼”中的鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 中开展基于微卫星和线粒体 DNA 分子标记的增殖放流效果评估, 说明了连续增殖放流活动对渔业资源量的恢复具有累加效果<sup>[11-12]</sup>。而关于增殖放流遗传风险评估的研究还不是很多, Liu 等<sup>[13]</sup>对在盘锦大量增殖放流的三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 进行遗传风险评估, 结果显示, 大规模的增殖放流对盘锦本地种群及辽东半岛水域的种群产生了较大的遗传风险。

鉴于此, 本实验利用微卫星 DNA 分子标记技术, 对钱塘江人工增殖放流的黄尾鲮进行效果评估, 包括资源贡献率的估算及野生和养殖 2 个群体的遗传多样性比较, 以期对钱塘江黄尾鲮的增殖放流提供指导和建议。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

2018 年 5 月 23 日, 在浙江省淡水水产研究所八里店试验综合基地选取 33 尾黄尾鲮繁殖亲本 (父本 16 尾; 母本 17 尾), 将其放在同一孵化池中进行子代繁殖, 后将繁殖的子代转移至池塘内进行饲养。2018 年 12 月将繁殖的黄尾鲮子代进行放流, 放流的数目为 5 万尾, 放流时黄尾鲮子代的平均体质量为  $(19.67 \pm 3.67)$  g, 平均体长为  $(10.98 \pm 0.61)$  cm, 放流点为钱塘江上游 (图 1)。同时剪取黄尾鲮繁殖亲本鳍条, 置于无水乙醇 4 °C 冰箱保存备用。2019 年 7 月开始在放流区域进行放流回捕, 回捕鱼年龄为 1~2 龄, 体长范围 10~

25 cm, 采样点位置见图 1, 合计回捕黄尾鲮 105 尾, 测量回捕黄尾鲮体长、体质量等形态学参数, 并剪取鳍条于无水乙醇 4 °C 冰箱保存备用。

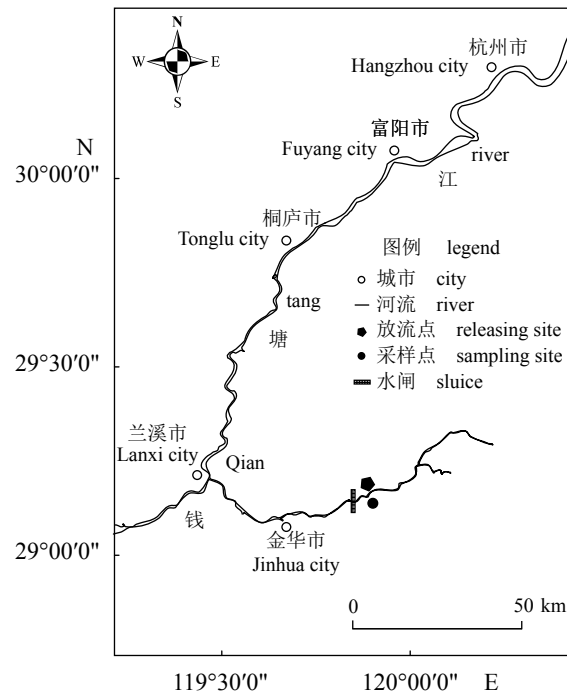


图 1 黄尾鲮放流点和采样点分布图

Fig. 1 Map of the releasing and sampling sites of *X. davidi*

### 1.2 基因组 DNA 提取及 PCR 扩增和测序

使用 Qian DNA 组织提取试剂盒提取黄尾鲮样品 DNA。经 NanoDrop 2000 分光光度计进行 DNA 浓度测定和 1% 琼脂糖凝胶电泳对样品进行检测, 后 -20 °C 保存备用。选用 11 对黄尾鲮微卫星引物, 分别在 F 正向引物末端标记上 2 种常用的荧光引物 (5-HEX 和 5-FAM)[生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 合成 (表 1)。PCR 扩增反应体系为 25  $\mu$ L Taq Master Mix (康为世纪生物科技有限公司), 2  $\mu$ L 上下游引物稀释液, 1  $\mu$ L DNA 稀释液, 20  $\mu$ L 去离子水。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 °C 终延伸 10 min, 4 °C 保存 PCR 产物。然后经 1% 琼脂糖凝胶电泳初步检测后, 在 ABI 3730 测序仪测取等位基因值, 利用软件 GeneMarker V1.5 读取等位基因大小值, 并辅以人工校对, 确保基因片段大小准确识别。基因送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

表 1 黄尾鲮的 11 对微卫星荧光引物参数

Tab. 1 Parameters of 11 pairs of fluorescent microsatellite markers of *X. davidi*

位点 locus	登录号 GenBank accessions no.	引物序列(5'-3') primer sequences (5'-3')	退火温度/°C $T_m$	片段范围值/bp size range	重复单位(重复次数) repeat motif (no. of repetitions)	荧光标记 dye label
XD01	MK888833	CACTACAGCCATTGTTGCCT TGTGTTCTGTCATGGCTGTGCAT	57.5	159~186	(TTA)12	F:FAM
XD03	MK888835	CCATTCTCTAGCCTCAGTG CCATTATTCATGACCAGCCA	53.7	204~228	(TTA)10	F:FAM
XD04	MK888836	CCATTCAAGGAATCTGTGTC TCTTCTGGGTTGGTTGAGT	53.8	182~194	(AAT)10	F:FAM
XD05	MK888837	CCTACGAGTTCTGACAGGGC GAAGCCATTTCCACCATGAC	55.0	191~203	(TTA)6	F:FAM
XD07	MK888839	CCTGTGCTTGCTGCTACTGT TTCAGCATTTGTTATGCATGTG	54.8	158~182	(GAT)11	F:HEX
XD08	MK888840	AACCCAACATCAGAACCTCG CTGCTGAGAGCATCAAACCA	55.0	153~171	(AT)19	F:FAM
XD11	MK888833	TGATGGTGCCAAAGTTGTGTT AAATCTGGTCACCAACTGCAT	53.3	123~138	(AAT)9	F:FAM
XD12	MK888844	TAAACGGATGAATGGTGCAG AGTTCAATGCTAATGAAACCGT	52.0	112~130	(ATA)10	F:FAM
XD13	MK888845	TCCAATGTGAAAGTGCCA TGCCTTCTTCTTCTGGTGAA	53.7	162~224	(ATCT)8	F:FAM
XD16	MK888848	ACACTCCACTCTGAGGTGC CCAAAAGCCATCAGGTCAGT	57.6	158~170	(AGG)6	F:FAM
XD19	MK888851	AGAACAAACGCTGCTGGATT CTGCAGTGAGAGACGAATGTG	55.4	150~162	(TTA)6	F:FAM

### 1.3 数据分析

使用 Cervus 3.0<sup>[14]</sup> 软件统计 11 对微卫星位点的等位基因数 ( $N_a$ )、杂合度 ( $H_o$ )、期望杂合度 ( $H_e$ )、多态信息含量 (PIC) 和非亲排除率 (none-exclusion probability, NEP)。本实验用 Cervus 3.0 提供的最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 来分析亲子关系, 设置 95% 和 80% 2 个显著水平, 设定模拟参数: 位点应用比例为 1.0; 可能的父本和母本的采样比例均设为 0.8; 潜在基因型错误率为 1%, 模拟运行 100 000 次。利用 Genepop 4.0.10 软件检验微卫星位点是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。利用 Arlequin 3.5 软件开展群体间遗传分化系数 ( $F_{ST}$ ) 检测和 AMOVA 分析, 群体间基因流 ( $N_m$ ) 的计算公式为  $N_m = (1/F_{ST} - 1)/4$ <sup>[15]</sup>。  $F_{ST} < 0.05$ 、 $0.05 < F_{ST} < 0.15$  和  $F_{ST} > 0.15$  分别表明无分化、中度分化和高度分化<sup>[16]</sup>。  $N_m > 1$  表示群体间的基因流交流频繁, 可防止群体间发生遗传分化<sup>[17]</sup>。使用 SPSS 17.0 软件对数据进行描述性分析、正态性检

验和非参数分析。

## 2 结果

### 2.1 微卫星标记多态性

微卫星标记多态性结果显示, 11 个位点检测的  $N_a$  为 95 个, 平均  $N_a$  为 8.64, 单个位点  $N_a$  为 6~18;  $H_o$  为 0.493~0.899, 平均  $H_o$  为 0.708;  $H_e$  为 0.544~0.923, 平均  $H_e$  为 0.739; PIC 为 0.498~0.914, 平均 PIC 为 0.703, 除了引物 XD19 以外, 其他微卫星位点 PIC > 0.5, 均表现为高度多态性; 另外, 除座位 XD03 显著偏离 Hardy-Weinberg 指数, 其他均未偏离 (表 2)。

### 2.2 亲子关系鉴定结果分析

Cervus 3.0.7 结果显示, 在父母双亲未知情况下, NEP 的范围为 0.043~0.513, 累计非亲排除率 (CEP) 在第 3 个座位时达到 99% 以上, 在第 11 座位是达到 99.999 980% (表 3)。

表 2 11 个微卫星的多态性参数

Tab. 2 Polymorphism parameters of 11 microsatellite loci

位点 locus	登录号 GenBank accessions no.	等位基因数 $N_a$	观测杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$	多态信息含量 PIC	Hardy-Weinberg平衡检测 Hardy-Weinberg test
XD01	MK888833	10	0.877	0.835	0.810	NS
XD03	MK888835	10	0.428	0.652	0.624	**
XD04	MK888836	6	0.710	0.757	0.716	NS
XD05	MK888837	6	0.783	0.742	0.709	NS
XD07	MK888839	8	0.754	0.737	0.691	NS
XD08	MK888840	12	0.761	0.810	0.782	NS
XD11	MK888833	6	0.746	0.697	0.636	NS
XD12	MK888844	7	0.732	0.768	0.735	NS
XD13	MK888845	18	0.899	0.923	0.914	NS
XD16	MK888848	6	0.609	0.663	0.623	NS
XD19	MK888851	6	0.493	0.544	0.498	NS
平均值 mean		8.64	0.708	0.739	0.703	

注: NS. 未偏离Hardy-Weinberg平衡( $P>0.05$ ); \*\* 中等显著偏离Hardy-Weinberg平衡( $P<0.01$ )

Notes: NS. no significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium( $P>0.05$ ); \*\*, extremely significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ( $P<0.01$ )

表 3 黄尾鲮亲子鉴定非亲排除率 (NEP) 和累计非亲排除率 (CEP)

Tab. 3 Non-exclusion probability (NEP) and combined non-exclusion probability (CEP) of *X. davidi*'s parentage test

位点 locus	登录号 GenBank accessions no.	无效等位基因频率 frequency of null	非亲排除率 NEP	累计非亲排除率 CEP
XD01	MK888833	-0.026 3	0.162	—
XD03	MK888835	0.204 6	0.338	0.945 251 84
XD04	MK888836	0.033 4	0.284	0.984 446 46
XD05	MK888837	-0.027 1	0.268	0.995 836 81
XD07	MK888839	-0.011 3	0.311	0.998 703 32
XD08	MK888840	0.032 9	0.190	0.999 754 03
XD11	MK888833	-0.042 1	0.400	0.999 901 56
XD12	MK888844	0.026 5	0.242	0.999 976 17
XD13	MK888845	0.010 3	0.043	0.999 998 97
XD16	MK888848	0.054 9	0.370	0.999 999 62
XD19	MK888851	0.071 5	0.513	0.999 999 80

注: —. 无

Note: —. none

在 95% 置信度、似然率对数值 ((LOD) 大于 0 条件下, 亲子鉴定结果见表 4, 回捕黄尾鲮子代 105 尾, 其中 5 尾回捕黄尾鲮个体确认为我们放流的子代, 平均体质量为  $(80.83 \pm 14.59)$  g, 平均体长为  $(16.3 \pm 1.01)$  cm (表 5)。因此, 增殖放流黄尾鲮对野外群体的资源贡献率为 4.76%。

### 2.3 群体遗传多样性和遗传结构比较

黄尾鲮野外群体的样本数为 100 尾 (回捕 105 尾, 去除亲子鉴定出的 5 尾), 养殖群体为我们放流子代的亲本, 为 33 尾, 实验将 2 个群体的  $N_a$ 、 $H_o$ 、 $H_e$  和 PIC 进行比较, 结果显示均无

表 4 钱塘江采集的黄尾鲮亲子鉴定结果

Tab. 4 Paternity test of *X. davidi* collected from the Qiantang River

回捕 黄尾鲮ID offspring ID	候选 亲本ID candidate mother ID	匹配 座位数 pair loci matching	似然率 对数值 pair LOD score	匹配 置信度 pair confidence
Z-49	XD-5	11	2.55	*
Z-63	XD-5	11	6.37	*
Z-12	XD-5	10	0.32	*
Z-45	XD-1	10	1.44	*
Z-105	XD-11	10	0.46	*

注: \*. LOD 在 95% 置信度下显著

Note: \*. pair LOD score is significant with a 95% confidence interval

表 5 黄尾鲮回捕个体的基本信息

Tab. 5 Sample collecting information of *X. davidi* offspring

回捕个体 recaptured individual	体质量/g body weight	范围 range	体长/cm body length	范围 range
有标记个体 labeled individual	80.83±14.59	74.30~113.50	16.3±1.01	15.4~18.5
无标记个体 unlabeled individual	151.34±97.28	42.90~340.00	22.13±6.78	13.40~28.2
合计 total	134.41±93.26	42.90~340.00	20.13±6.42	13.40~28.2

显著差异 (表 6)。

野外群体和养殖群体间的  $F_{ST}$  为 0.05, 群体间的  $N_m$  为 4.42。AMOVA 分析表明, 把 2 个群体划分成一个组时, 4.03% 的遗传变异来自群体间, 95.92% 的遗传来自于群体内 (表 7)。

表 6 2 个群体黄尾鲮的遗传多样性比较

Tab. 6 Genetic diversity parameters in two populations of *X. davidi*

群体 population	等位 基因数 $N_a$	观测 杂合度 $H_o$	期望 杂合度 $H_e$	多态 信息含量 $PIC$
野外群体(100尾) wild population (100)	7.91	0.70	0.73	0.69
养殖群体(33尾) cultured population (33)	7.00	0.74	0.73	0.68
$P$	0.556	0.632	0.946	0.838

注:  $P>0.05$ , 表示无显著性差异

Note:  $P>0.05$ , no significant difference between two populations

表 7 2 个黄尾鲮群体遗传结构的分子变异分析

Tab. 7 AMOVA analysis of two populations of *X. davidi*

变异来源 source of variation	平方和 sum of squares	方差组分 variance components	变异百分比 percentage of variance
群体间 among populations	548.085	0.166 67	4.03
群体内 within populations	509.000	3.915 38	95.92
总计 total	1 057.085	4.082 05	

### 3 讨论

#### 3.1 微卫星座位多态性及亲子鉴定分析

$N_a$ 、 $H_e$  值和  $PIC$  可以为个体和繁殖辨别提供重要信息<sup>[18]</sup>。Botstein 等<sup>[19]</sup> 认为微卫星标记  $H_e>0.6$  和  $PIC>0.5$  是最可信的辨别。本实验中 11 个位点的  $PIC$  为 0.500~0.914, 平均  $PIC$  为 0.703, 均表现为高度多态性;  $H_e$  为 0.544~0.923, 平均  $H_e$  为 0.739;  $H_o$  为 0.493~0.899, 平均  $H_o$  为 0.708。表明本实验所用的 11 个微卫星标记的多态性高。

在使用微卫星标记进行亲子鉴定时, 很多因素可影响累计排除率, 如各位点排除率、位点数量和样品总数等。研究表明, 位点的等位基因越

多, 位点的排除率越高; 使用的位点数越多, 总排除率越高; 样本数越多, 总排除率越高<sup>[20]</sup>。杨习文等<sup>[21]</sup> 在对长江江苏段鲢进行亲子鉴定时, 所使用的 11 个微卫星位点的累计排除率在 99.99% 以上; 成为为等<sup>[10]</sup> 在对长江胭脂鱼进行增殖放流评估时选用了 11 个微卫星位点, 累计排除率为 99.998 3%; 李小芳<sup>[12]</sup> 在对鲢进行增殖放流评估时选用了 14 个微卫星座位, 累计排除率为 99.91%。双亲未知时, 当累计排除率大于 99%, 亲子鉴定的结果基本可信<sup>[22]</sup>。本实验选用了 11 对微卫星位点, 当双亲未知时, 累计排除率大于 99.99%。因此, 本实验选用的 11 个微卫星位点已含有足够的遗传信息用于亲子关系分析, 由此得到的亲子鉴定结果可信度高。

#### 3.2 增殖放流效果评估

开展增殖放流效果评估可以对增殖放流的资源修复作用进行监测, 为下一步增殖放流工作的开展提供技术支撑。目前, 运用分子标记技术开展增殖放流效果评估, 已成为准确和长期评估增殖放流效果最有效的手段之一。本实验运用此方法评估出黄尾鲮放流子代对野外群体的贡献率为 4.76%。说明在钱塘江金华江段的黄尾鲮群体中存在一定数量的放流个体, 同时增殖放流对黄尾鲮的资源量补充起到良好的作用。与已有的研究相比, 本实验的回捕率低于已报道部分增殖放流鱼类的回捕率, 如低于长江鲢增殖放流贡献率 (8.21%)<sup>[21]</sup> 和胭脂鱼的贡献率 (16.92%)<sup>[10]</sup>, 这两篇研究估算的鱼类增殖放流贡献率均为累积资源贡献率, 本实验得出的黄尾鲮增殖放流贡献率实际为放流当年的贡献率。累计资源贡献率的计算通常是统计几年的鱼类增殖放流数据, 其鱼类放流的数量、回捕强度和次数一般会高于一年的鱼类放流数据, 可能是造成鱼类累计资源贡献率高于当年的资源贡献率的原因之一; 其次, 针对野外群体数量较少的珍稀濒危物种如胭脂鱼, 增殖放流是其资源量的主要补充来源, 导致回捕群体中放流个体比例较高, 我们推测这也是胭脂鱼增殖放流自然贡

献率较高的原因之一。但与钱塘江下游的三角鲂 (*Megalobrama terminalis*) 当年增殖放流贡献率 (1.08%)<sup>[22]</sup> 相比, 本实验的鱼类回捕率高的主要原因可能是三角鲂所在水域为钱塘江下游, 水体开放且流域面积大, 放流群体分布范围广, 回捕群体样本数相对较少; 而本实验选择的水域区域相对封闭, 放流区域的下游约 3.5 km 处建有杨卜山水电站和上游约 1.5 km 处建设有小型水坝, 在一定程度上会限制鱼类的移动, 回捕难度低, 回捕率较高。

### 3.3 遗传多样性分析

现阶段关于增殖放流效果评估的研究, 侧重点多为增殖放流对野生群体的贡献率。随着人们逐步意识到在增殖放流过程中维持野外群体遗传多样性的重要性, 放流群体对野外群体遗传结构的影响也是后期增殖放流评估工作的重点。因此, 本实验着重比较分析钱塘江黄尾鲴增殖放流子代的养殖亲本群体和野外群体的遗传多样性。群体遗传分化系数  $F_{ST}$  和  $N_m$  是衡量群体遗传分化程度的重要指标。 $F_{ST}$  数值越大, 2 个群体的遗传分化水平越高。本实验黄尾鲴群体  $F_{ST}$  为 0.05, 介于无分化和中度分化之间, 表明 2 个群体的遗传分化程度不高。同时 AMOVA 分析结果同样表明, 黄尾鲴 2 个群体的变异主要为群体内的, 群体间的遗传变异仅为 4.03%,  $N_m$  为 4.42, 表明 2 个群体基因交流无阻隔, 遗传分化低。这些结果说明增殖放流对黄尾鲴野外群体没有产生潜在的遗传风险, 很好地维持了黄尾鲴野外群体的遗传多样性和遗传结构。因此在后续的研究中, 在充分利用微卫星基因型数据的基础上, 加强对放流群体和野外群体的长期持续跟踪, 为黄尾鲴增殖放流的科学评估和种质资源保护提供基础支撑。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [1] Bell J D, Bartley D M, Lorenzen K, *et al.* Restocking and stock enhancement of coastal fisheries: potential, problems and progress[J]. *Fisheries Research*, 2006, 80(1): 1-8.
- [2] Bell J D, Leber K M, Blankenship H L, *et al.* A new era for restocking, stock enhancement and sea ranching of coastal fisheries resources[J]. *Reviews in Fisheries Science*, 2008, 16(1-3): 1-9.

- [3] 张崇良, 徐宾铎, 薛莹, 等. 渔业资源增殖评估研究进展与展望[J]. 水产学报, 2022, 46(8): 1509-1524.
- Zhang C L, Xu B D, Xue Y, *et al.* Fisheries stock enhancement assessment: progress and prospect [J]. *Journal of Fisheries of China*. 2022, 46(8): 1509-1524 (in Chinese) (in Chinese).
- [4] 张燕萍, 章海鑫, 傅义龙, 等. 军山湖黄尾鲴生物学参数及资源量估算[J]. 四川动物, 2016, 35(6): 865-870.
- Zhang Y P, Zhang H X, Fu Y L, *et al.* Assessment of biological parameters and stock biomass of *Xenocypris davidi* in Junshan Lake[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2016, 35(6): 865-870 (in Chinese).
- [5] 潘绪伟, 杨林林, 纪炜炜, 等. 增殖放流技术研究进展[J]. 江苏农业科学, 2010(4): 236-240.
- Pan X W, Yang L L, Ji W W, *et al.* Research progress on technology of enhancement and releasing[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2010(4): 236-240 (in Chinese).
- [6] Liu Z J, Cordes J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics[J]. *Aquaculture*, 2004, 238(1-4): 1-37.
- [7] Catalano M J, Chipps S R, Bouchard M A, *et al.* Evaluation of injectable fluorescent tags for marking centrarchid fishes: retention rate and effects on vulnerability to predation[J]. *North American Journal of Fisheries Management*, 2001, 21(4): 911-917.
- [8] Palsbøll P J. Genetic tagging: contemporary molecular ecology[J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1999, 68(1-2): 3-22.
- [9] Campbell M R, Vu N V, Lagrange A P, *et al.* Development and application of single-nucleotide polymorphism (SNP) genetic markers for conservation monitoring of Burbot populations[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2019, 148(3): 661-670.
- [10] 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, 21(3): 574-580.
- Cheng W W, Wang D Q, Wei Q W, *et al.* Effect of restocking enhancement of Chinese sucker in the middle and upper reaches of Yangtze River based on microsatellite loci[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(3): 574-580 (in Chinese).
- [11] 季晓芬. 草鱼放流亲本微卫星基因库的构建与应用研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- Ji X F. Construction and application of microsatellite

- gene bank of released brood grass carp[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [12] 李小芳. 鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 亲本增殖放流遗传效果评估 [D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- Li X F. The genetic effect evaluation of released parent *Hypophthalmichthys molitrix*[D]. Chongqing: Southwest University, 2012 (in Chinese).
- [13] Liu Q, Cui F, Hu P F, *et al.* Using of microsatellite DNA profiling to identify hatchery-reared seed and assess potential genetic risks associated with large-scale release of swimming crab *Portunus trituberculatus* in Panjin, China[J]. *Fisheries Research*, 2018, 207: 187-196.
- [14] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(5): 1099-1106.
- [15] Hudson R R, Slatkint M, Maddison W P. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data[J]. *Genetics*, 1992, 132(2): 583-589.
- [16] Wright S. Evolution and the genetics of populations. Vol. 4. Variability within and among natural populations[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978: 58.
- [17] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations[J]. *Science*, 1987, 236(4803): 787-792.
- [18] Seo D, Bhuiyan M S, Sultana H, *et al.* Genetic diversity analysis of south and east Asian duck populations using highly polymorphic microsatellite markers[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2016, 29(4): 471-478.
- [19] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [20] 冯晓婷, 杨习文, 杨雪军, 等. 基于微卫星标记对长江江苏段鲮增殖放流效果评估[J]. *中国水产科学*, 2019, 26(6): 1185-1193.
- Feng X T, Yang X W, Yang X J, *et al.* Microsatellite method assessment of the effects of restocking enhancement of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) in Jiangsu reaches of the Yangtse River[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(6): 1185-1193 (in Chinese).
- [21] 杨习文, 刘熠, 薛向平, 等. 基于微卫星标记的长江江苏段鲮(*Hypophthalmichthys molitrix*)增殖放流资源贡献率的评估[J]. *湖泊科学*, 2020, 32(4): 1154-1164.
- Yang X W, Liu Y, Xue X P, *et al.* Resource contribution rate assessment of stock enhancement of silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* in Jiangsu section of the Yangtze River based on microsatellite markers[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2020, 32(4): 1154-1164 (in Chinese).
- [22] 张敏莹, 王邢艳, 张婉平, 等. 基于微卫星亲权鉴定对钱塘江中下游三角鲂增殖放流效果的研究[J]. *农业生物技术学报*, 2020, 28(7): 1260-1268.
- Zhang M Y, Wang X Y, Zhang W P, *et al.* Study on enhancement and releasing effect of triangular bream (*Megalobrama terminalis*) in the middle and lower reaches of the Qiantang River by microsatellite paternity testing[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28(7): 1260-1268 (in Chinese).

## Stock enhancement effect and potential genetic risks of *Xenocypris davidi* by molecular markers in the upper reaches of Qiantang River, China

GUO Aihuan, YUAN Julin, LIAN Qingping, NI Meng, LIU Mei, GU Zhimin\*

(Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,  
Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

**Abstract:** *Xenocypris davidi* is one of the most economically important freshwater fish in China. In recent decades, owing to the construction of dams, overfishing, habitat degradation, pollution of water, and other human disturbances, the number and biomass of *X. davidi* local populations declined sharply. On the other hand, *X. davidi* can effectively restrain the aggravation of eutrophication and control the abnormal proliferation of algae. To restore fishery resources of *X. davidi* and improve water quality, restocking enhancement activities of *X. davidi* have been conducted in natural waters since the 1980s. It is urgent to carry out the evaluation of the effect of restocking enhancement of *X. davidi*, as well as the potential genetic risk assessment of breeding population to wild population of *X. davidi* under large-scale proliferation and release. However, there has been few report on the effect of restocking enhancement of *X. davidi*. In order to assess the effect of restocking enhancement of *X. davidi* and provide guidance and suggestions for the breeding and releasing of *X. davidi* in Qiantang River, the potential genetic risks of *X. davidi* in the upper reaches of Qiantang River were evaluated by using 11 polymorphic microsatellite loci. We collected 33 breeding parents and 105 recaptured individuals. Microsatellite DNA molecular marker technology was used. The number of mean alleles ( $N_a$ ), the mean observed heterozygosity ( $H_o$ ), mean expected heterozygosity ( $H_e$ ) and mean polymorphic information content (PIC) were 8.64, 0.708, 0.739 and 0.703, respectively. It was proved that 11 pairs of microsatellite primers as an effective tool for parentage identification. The combined non-exclusion probability (CEP) of 11 loci was 99.999 980 % by Cervus software. Five individuals were confirmed to be released. The return capture rate of the offspring is 4.76%. The comparative analysis of genetic diversity between the cultured and wild populations of *X. davidi* showed that the two populations had high genetic diversity, and the genetic parameters of population differed little, indicating that their genetic diversity levels were close; AMOVA analysis showed that genetic variation mainly came from within the population (95.92%), the genetic differentiation coefficient  $F_{ST}$  is 0.053 59, and the gene exchange value ( $N_m$ ) was 4.42. The results showed that it was a low degree of differentiation and gene communication was barrier-free. So our study suggested that the stock enhancement of *X. davidi* in Qiantang River had produced a good resource recovery effect, and there was no potential genetic risk caused by the release. In the following studies, on the basis of making full use of microsatellite genotype data, we should strengthen the long-term and continuous tracking of the release population and the field population, so as to provide basic support for the scientific evaluation of the stock enhancement and the conservation of seed resources of *X. davidi*.

**Key words:** *Xenocypris davidi*; stock enhancement; effect evaluation; molecular markers; genetic diversity

**Corresponding author:** GU Zhimin. E-mail: guzhimin2006@163.com

**Funding projects:** The Public Welfare Project of Zhejiang Province (LGN18C190001)