

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15281

长江江苏溱浦段 2015 年发现中华鲟野生幼鱼的形态和分子鉴定

张书环¹, 杨焕超¹, 辛苗苗¹, 吴金明¹, 戴振国², 杜浩¹, 刘志刚¹, 危起伟¹

1. 中国水产科学研究院 长江水产研究所 农业部淡水生物多样性保护重点实验室, 湖北 武汉 430223;

2. 常熟市渔政管理站 江苏 常熟 215500

摘要: 在葛洲坝下中华鲟(*Acipenser sinensis*)产卵场连续两年未监测到自然繁殖的情况下, 2015年6月在江苏溱浦段发现15尾疑似中华鲟幼鱼。本研究通过形态学和分子生物学方法对该15尾幼鲟进行鉴定。形态学度量结果显示, 除1尾个体外, 新发现的14尾幼鲟与历史记载的中华鲟野生幼鱼生物学性状完全一致, 但其体长和体重低于历史同期出现在该区域的中华鲟。同时采用11个多态微卫星位点, 对15尾幼鲟样本和分布于我国的3种鲟鱼, 包括30尾中华鲟(*A. sinensis*)、39尾达氏鲟(*A. dabryanus*)和33尾施氏鲟(*A. dabryanus*)进行遗传分析, 发现这15尾幼鲟与中华鲟的遗传距离最近($F_{st}=0.039$, $P<0.05$), 其次为达氏鲟($F_{st}=0.108$, $P<0.05$), 最远为施氏鲟($F_{st}=0.209$, $P<0.05$), 从遗传和进化的角度判定该批幼鱼为中华鲟, 该结果暗示中华鲟在葛洲坝下游极有可能找到了新的产卵场, 为中华鲟的繁殖群体和幼鱼的种群监测提供了依据。遗传多样性分析显示, 该批鱼的遗传多样性($SW=1.998$)略低于野生中华鲟($SW=1.886$), 暗示中华鲟幼鱼遗传多样性水平降低, 野生亲本的数量仍不容乐观。

关键词: 中华鲟; 种间鉴定; 微卫星; 产卵场; 长江口

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)01-0001-09

中华鲟(*Acipenser sinensis*)是一种大型溯河产卵的江海洄游性鱼类, 为我国国家一级重点保护野生动物, IUCN 极危级(CR)物种^[1-2]。历史上主要分布在中国的东南近海, 是世界鲟类中分布在最南端的鲟种。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^[3-4]。葛洲坝截流前中华鲟可以上溯到长江上游金沙江; 1981年葛洲坝截流后, 阻断了上溯洄游通道, 目前长江中华鲟自然种群在长江中的分布区域仅限于葛洲坝至长江口江段^[1-4]。本研究室自20世纪80年代初就对葛洲坝下中华鲟的自然繁殖群体进行密切监测, 结果显示尽管中华鲟的繁殖群体数量逐年下降, 但每年均能监测到自然繁殖的中华鲟成鱼。2013年和2014年, 多家单位在目前已知的葛洲坝下中华鲟唯一的产卵场对性成熟中华鲟

的繁殖情况进行监测, 均未能监测到产卵繁殖迹象。长江口是中华鲟幼鱼入海的必经之路, 自1975年研究人员一直对长江口中华鲟幼鱼的出现时间和地点、生长状况、资源量等进行调查研究^[5-11]。然而2014年末监测到降河的中华鲟幼鱼, 进一步印证了中华鲟自然繁殖中断, 这为中华鲟的物种保护蒙上一层阴影, 也说明对该物种的保护已经到了刻不容缓的地步。2015年6月15日至21日, 在长江口溱浦江段获得15尾疑似中华鲟幼鱼样本。由于已连续两年未发现中华鲟的自然繁殖, 因此对该批幼鲟的鉴定工作显得极为重要。

鲟鱼种间极易杂交, 而鲟鱼产业又发展迅猛, 出于贸易需求和物种保护的角度, 种间鉴定一直都是研究的热点。早在2001年Congiu等^[12]通过AFLP图谱成功对意大利鲟(*A. naccarii*)、高首鲟

收稿日期: 2015-07-16; 修订日期: 2015-09-29.

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(201203086).

作者简介: 张书环(1981-), 女, 博士, 研究方向鱼类分子遗传学. E-mail: zhangshuhuan@yfi.ac.cn

通信作者: 危起伟, 研究员, 研究方向为鱼类生态与资源保护. E-mail: weiqw@yfi.ac.cn

(*A. transmontanus*) 以及二者的杂交种 (*A. naccarii* × *A. transmontanus*) 进行鉴定。随后作者又进一步采用相同方法^[13]对意大利鲟(*A. naccarii*)、西伯利亚鲟(*A. baerii*)和高首鲟(*A. transmontanus*) 进行种间鉴定。Rozhkovan 等^[14]通过 RAPD 的方法对施氏鲟(*A. schrenckii*)、西伯利亚鲟(*A. baerii*) 和小体鲟(*A. ruthenus*) 3 种鲟鱼的杂交种进行鉴定。

微卫星 DNA (microsatellite DNA) 又称简单重复序列 (simple sequence repeats, SSRs), 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, 集中了其他分子标记的优点, 从而很快发展成为极具价值的遗传标记方法之一^[15-16]。目前仅有少量将微卫星分子标记用于鲟鱼种间鉴定的报道^[17-18]。然而, 关于中国分布的鲟鱼的种间分子鉴定研究较为滞后, 尚无相关报道。

近期, 本研究室已经成功开发了 24 对多态微卫星分子标记并应用于中华鲟的亲系鉴定和养殖群体的遗传多样性分析^[19]。本研究在先前研究的基础上通过微卫星多态分子标记对本次发现的幼鲟样品与我国分布的 3 种重要鲟鱼(中华鲟、达氏鲟和施氏鲟)进行种间鉴定, 并与形态学鉴定结果进行对比, 试图确定其是否为中华鲟幼鱼, 为中华鲟的繁殖群体和幼鱼的种群监测提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验材料为 2015 年 6 月 15 日至 21 日, 在长江口江苏省溱浦江段利用插网和深水张网等网具获得的 15 尾幼鲟样本。对比材料取自中国水产科学研究院长江水产研究所农业部中华鲟保育与增殖放流中心, 包括来源于长江宜昌江段的 30 尾自然繁殖的人工养殖中华鲟(*A. sinensis*), 39 尾人工养殖达氏鲟子一代(*A. dabryanus*), 33 尾自然繁殖的人工养殖施氏鲟(*A. schrenckii*)。样品均采集鳍条, 保存在无水乙醇中备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

本实验采用 NaCl 高盐法^[20]提取基因组 DNA, 具体步骤如下: 将保存的鳍条样本剪取 0.5 g 左右,

放入 2 mL 离心管中, 用 TE 缓冲液浸泡 12 h 充分置换出酒精, 取出放入 352 μ L 的无菌抽提缓冲液中, 加入 40 μ L 20% SDS 和 10 μ L 20 mg/mL 蛋白酶 K 混匀, 在 56 $^{\circ}$ C 消化 4 h, 待组织完全消化后加入 300 μ L 6 mol/L NaCl 溶液, 立刻震动 30 s, 12000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 加入等体积的异丙醇, -20 $^{\circ}$ C 放置 1 h, 12000 r/min 离心 15 min (4 $^{\circ}$ C), 弃上清, 沉淀用 70% 的乙醇溶液洗涤 1 次, 37 $^{\circ}$ C 烘干或自然晾干后, 加入 50 μ L 双蒸水, 待完全溶解后稀释成 100 ng/ μ L 保存备用。

1.3 引物设计与 PCR 扩增

基于实验室已筛选出的 24 对多态微卫星引物, 选取其中多态性较高的 11 对(表 1)用于遗传分析, 由上海生工生物工程技术有限公司合成 5'端带有 FAM 和 HEX 的荧光引物。PCR 反应体系总体积为 25 μ L: 10 \times PCR (TaKaRa) 缓冲液 3 μ L, 25 mmol/L Mg^{2+} 离子溶液 0.5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 1 μ L, 0.4 μ L Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa) 0.5 U, 正反向引物各 0.5 μ L, 100 ng 基因组 DNA 以及无菌双蒸水。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火(表 1)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 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将扩增条带清晰明亮且无杂带的样品, 送至上海生工生物工程技术有限公司进一步测序。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。

1.4 鉴定及统计方法

对保存的 15 尾标本进行了形态学观察, 并对其中 5 尾鱼进行形态学测量, 具体测量指标见表 2、3 和 4, 将测量结果与文献^[21-23]记载的中华鲟幼鱼相关数据进行了比较分析。应用 Excel 统计等位基因数; 应用软件 GeneMarker V1.5 读取等位基因大小; 应用软件 Genodive^[24]分析样本的等位基因数、有效等位基因数、种群内杂合度 (H_s)、总杂合度 (H_t) 和遗传距离 (genetic distance, F_{st}) 等。采用软件 ATetra 1.2^[25] 分析计算种群的香农-威纳指数 (Shannon-Wiener Diversity Indices, SW)。

表 1 11 个微卫星标记引物序列及退火温度

Tab. 1 Primer sequences and annealing temperature of 11 microsatellite markers in Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*

位点 locus (登录号 access no)	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	退火温度 / Tm	片段大小 /bp size	哈迪-温伯格 指数 HWE	倍性 ploidy
Asi-66034 (KM379072)	F: CCTACGCCAAGCTCAACCAG R: ACCGCAGAGTCACGGAGTTG	56	309	0.362	4n
Asi-46902 (KM379073)	F: GGGTGTGTGTGTTGTTTTGTTT R: AACTCCACACACCTCTTCATT	58	313	0.164	4n
Asi-65194 (KM379077)	F: TACAAAATCGGCAGAAAGGCT R: GCAGGCATGATGAGAATAGGC	58	296	0.381	4n
Asi-75067 (KM379079)	F: AGAGTTCTCGAAGCGAAACAG R: CTGGTTCAAACCTGGGAGCGAT	60	293	0.222	4n
Asi-67123 (KM379082)	F: AGCTAACAGCAGTGCATGGTATTT R: CTTGAGATAAAAAGGCGCTGTAGAG	62	276	0.002*	>4n
Asi-73843 (KM379084)	F: GGTGTTTGAAAGACAGCGAGAA R: TTCCTCCAGGACAGAGTTTGC	58	292	0.065	4n
Asi-77057 (KM379087)	F: GGGTCCCGCACAGTTTAAAG R: GACGGCAAGGCAAGATAGGT	56	300	0.006*	>4n
Asi-76964 (KM379088)	F: GGACAAAGGACAGCCAAAGC R: CATTTTGTGCACAATCGGCAG	58	299	0.125	4n
Asi-72040 (KM379089)	F: AGCAGAGTCCACATCCCCCT R: GAGTGTCGCTCGAAAGCCCT	62	306	0.129	4n
Asi-67648 (KM379090)	F: TCCGGTACTGGAAACCCTTG R: ATTCGCCTGGAAGAGCACAC	60	302	0.184	>4n
Asi-56700 (KM379094)	F: CAACCTCTTCACTACCGCAAAC R: TGCAAAAAGGAATTGGAATCG	50	295	0.237	4n

2 结果与分析

2.1 形态特征鉴定

根据鱼类形态学和测量指标(图 1 和表 2、3、4), 在目标样本的主要生物学数据中, 标准长与体高、头长、尾柄长和尾柄高的比值和头长与吻长、眼间距、眼径和眼后长的比值基本符合《四川鱼类志》^[21]、《长江鱼类》^[22]和毛翠凤^[23]记载的中华鲟相应数值区间, 但头长与眼径的比值与毛翠凤记载差异较大; 随机 5 尾中华鲟幼鱼骨板数和鳃耙数、背鳍条数与《四川鱼类志》^[21]、《长江鱼类》^[22]和毛翠凤^[23]记载的中华鲟幼鱼基本一致, 仅 2 尾(4#和 14#)鱼鳃耙数和身体右侧骨板数略高于历史记录。

2.2 分子鉴定

采用 11 个微卫星多态位点, 对 15 尾幼鲟样本和中国境内的 3 种鲟鱼(30 尾中华鲟、39 尾达



图 1 2015 年长江口溱浦江段野生中华鲟幼鱼

Fig. 1 Wild juvenile *Acipenser sinensis* obtained from Xupu section of the Yangtze River estuary

氏鲟和 33 尾施氏鲟)进行遗传分析。结果显示, 平均每个位点的等位基因数、有效等位基因数、种群内杂合度和总杂合度分别为 16.273、4.764、0.757 和 0.848(表 5)。对每个鲟鱼种群在 11 个微卫星位点的遗传变异进行分析(表 6), 发现种群 2

表 2 15 尾幼鲟体重、体长和全长数据
Tab. 2 Weight, body length and total length of 15 juvenile *Acipenser sinensis*

编号 serial number	测量日期 measure date	体重/g weight	体长/cm body length	全长/cm total length
1#	2015/6/16	30	17.0	20.0
2#	2015/6/16	83	24.0	29.0
3#	2015/6/16	59	21.0	26.0
4#	2015/6/17	63	23.1	26.9
5#	2015/6/17	48	21.5	25.9
6#	2015/6/17	125	28.3	33.2
7#	2015/6/17	64	22.5	27.5
8#	2015/6/17	148	30.0	34.3
9#	2015/6/17	57	21.7	26.2
10#	2015/6/17	29	18.4	21.0
11#	2015/6/17	94	25.6	31.4
12#	2015/6/18	53	21.5	25.4
13#	2015/6/18	131	28.0	32.7
14#	2015/6/19	63	22.5	27.6
15#	2015/6/19	71	23.0	28.2
平均值±标准差 mean±SD	-	74.5±35.6	23.2±3.6	27.7±4.0

表 3 随机 5 尾幼鲟基础生物学数据比较

Tab. 3 Comparisons of morphological characteristics among random 5 juvenile *Acipenser sinensis* samples

编号 serial number	标准长/体高 body length /body height	标准长/头长 body length /head length	标准长/尾柄长 body length /caudal peduncle length	标准长/尾柄高 body length /caudal peduncle height	头长/吻长 head length/snout length	头长/眼间距 head length /interorbital distance	头长/眼径 head length /diameter of eye	头长/眼后长 head length / head length behind the eyes
A	6.0-9.9	3.0-4.5	8.1-15.0	20-24.5	1.9-2.5	2.5-3.7	13.3-15.0	2.2-2.5
B	5.9-9.8	3.1-4.4	8.0-14.0	-	1.7-2.4	2.7-3.6	-	-
C	6.43-8.03	2.76-3.16	9.71-12.31	21.12-28.04	1.96-2.18	3.04-3.62	16.55-20.25	1.96-2.33
3#	7.49	3.06	12.11	23.23	1.85	3.25	13.44	2.25
4#	8.17	3.00	12.89	23.99	1.84	3.29	14.24	2.33
9#	6.74	3.04	12.09	24.21	1.81	3.31	13.77	2.26
12#	7.83	3.03	12.39	22.44	2.02	3.18	13.26	2.22
14#	8.40	3.08	12.15	24.35	2.20	3.51	14.17	2.21

注: A: 《四川鱼类志》^[21], 样本量为 10 尾; B: 《长江鱼类》^[22], 样本量为 20 尾; C: 毛翠凤^[23], 样本量为 30 尾。

Note: A denotes sample from *Fishes of Sichuan*^[21] with sample size of 10; B denotes sample from *Fish in the Yangtze River*^[22] with sample size of 20; C denotes sample from Mao^[23] with sample size of 30.

表 4 随机 5 尾中华鲟幼鱼骨板数、鳃耙数和背鳍条数

Tab. 4 The number comparisons of bone lamella, aill raker, and dorsal rags among random 5 juvenile *Acipenser sinensis* samples

编号 serial number	骨板 bone lamella						鳃耙 aill raker	背鳍条 dorsal rag
	背(前+后)back (front+back)	臀鳍后 behind anal fin	腹部左侧 left abdomen	腹部右侧 right abdomen	身体左侧 left body	身体右侧 right body		
A	11-15+1-2	1-2	9-15	9-15	27-39	28-38	13-26	52-66
B	9-14+1-2	1-2	8-15	9-14	24-37	27-37	14-28	54-66
C	12.1-14.3	-	9.6-12.8	9.8-12.4	32.1-37.9	31.7-37.9	15.8-19.8	54.3-62.5
3#	13+2	2	12	12	32	31	16	55
4#	12+2	2	12	12	37	34	22	54
9#	14+1	1	10	10	32	31	17	57
12#	12+2	2	12	11	32	32	16	61
14#	13+2	2	12	14	37	40	15	60

注: 粗体表示与 A 和 B 不相符数值; A: 《四川鱼类志》^[21], 样本量为 10 尾; B: 《长江鱼类》^[22], 样本量为 20 尾; C: 毛翠凤^[23], 样本量为 30 尾。

Note: The bold number indicates it is inconsistent with A and B; A denotes sample from *Fishes of Sichuan*^[21] with sample size of 10; B denotes sample from *Fish in the Yangtze River*^[22] with sample size of 20; C denotes sample from Mao^[23] with sample size of 30.

表 5 每个位点在 4 个鲟鱼种群中的遗传变异
Tab. 5 Indices of genetic diversity per locus among four *Acipenser sinensis* populations

位点 locus	等位基因数 allele number	有效等位基因数 effective allele number	种群内杂合度 H_s	总杂合度 H_t
Asi-65194	18	3.316	0.707	0.875
Asi-73834	14	6.358	0.852	0.884
Asi-67123	23	7.558	0.877	0.936
Asi-76964	7	2.541	0.613	0.693
Asi-46902	17	3.404	0.714	0.853
Asi-75067	16	6.722	0.860	0.893
Asi-77057	24	5.070	0.811	0.873
Asi-67648	20	8.413	0.890	0.916
Asi-56700	17	2.797	0.649	0.793
Asi-72040	11	3.526	0.724	0.807
Asi-66034	12	2.701	0.636	0.808
合计 overall	16.273	4.764	0.757	0.848

表 6 每个鲟鱼种群在 11 个微卫星位点的遗传变异
Tab. 6 Indices of genetic diversity per *Acipenser sinensis* population across 11 microsatellite loci

种群 population	样本量 sample size	等位基因数 allele number	有效等位基因数 effective allele number	种群内杂合度 H_s	总杂合度 H_t	香农-威纳指数 SW
Pop1	39	8.000	4.705	0.743	0.743	1.634
Pop2	30	13.455	6.464	0.810	0.810	1.998
Pop3	33	7.182	4.377	0.686	0.686	1.548
Pop4	15	9.455	5.667	0.796	0.796	1.886

注: Pop1, 达氏鲟; Pop2, 中华鲟; Pop3, 施氏鲟; Pop4, 目标样本。

Note: Pop1, *A. dabryanus*; Pop2, *A. sinensis*; Pop3, *A. schrenckii*; Pop4, population in this study.

(中华鲟)的遗传多样性最高, 其中等位基因数、有效等位基因数、种群内杂合度、总杂合度和香农-威纳指数分别为 13.455、6.464、0.810、0.810 和 1.998; 种群 3(施氏鲟)遗传多样性最低, 其等位基因数、有效等位基因数、种群内杂合度、总杂合度和香农-威纳指数分别为 7.182、4.377、0.686、0.686 和 1.548; 种群 4(目标样本)的遗传多样性仅次于野生中华鲟样本, 对应的参数分别为: 9.455、

5.667、0.796、0.796 和 1.886。

为了鉴定目标鲟鱼种群的分类地位, 将其与其他 3 种鲟鱼进行遗传分化检验, 结果显示(表 7), 目标样本与种群 3(施氏鲟)的遗传距离最远, 为 0.209($P < 0.05$); 与种群 2(中华鲟)的遗传距离最近, 为 0.039($P < 0.05$); 与种群 1(达氏鲟)的遗传距离介于中华鲟和施氏鲟之间, 为 0.108($P < 0.05$), 说明长江口溱浦江段获得的 15 尾幼鲟样本在分类上属于中华鲟。

表 7 4 个鲟鱼种群间的遗传分化
Tab. 7 Pairwise differentiation among four *Acipenser sinensis* populations across 11 microsatellite loci

统计数值 statistic	种群 1 Pop1	种群 2 Pop2	种群 3 Pop3	种群 4 Pop4
Pop1	—	0.001	0.001	0.001
Pop2	0.100	—	0.001	0.001
Pop3	0.224	0.202	—	0.001
Pop4	0.108	0.039	0.209	—

注: 上三角为种群间配对 F_{st} , 下三角为 t 检验 P 值; Pop1: 达氏鲟; Pop2: 中华鲟; Pop3 施氏鲟; Pop4: 目标样本。

Note: Values of F_{st} for all pairs of populations are in the upper triangular matrix; P -values for all pairs of populations are in the lower triangular matrix; Pop1: *A. dabryanus*; Pop2: *A. sinensis*; Pop3: *A. schrenckii*; Pop4: population in this study.

3 讨论

2015年4月16日在长江口水域获得1尾疑似野生中华鲟幼鱼,通过形态学和分子生物学鉴定为中华鲟^[26]。近日,上海市长江口中华鲟自然保护区管理处对外公布,从4月16日开始,已监测到1000余尾野生中华鲟幼鱼,其中包括2015年6月15日至21日,由江苏省常熟渔政监督大队在长江口溱潼江段发现的15尾幼鲟。由于在已知的中华鲟产卵场已连续两年未发现中华鲟自然繁殖,2014年在长江口也未发现中华鲟幼鱼,因此该批幼鱼的鉴定工作对判定中华鲟自然繁殖状况具有极其重要的意义。目前通过形态学方法可以将中华鲟与其他纯种鲟鱼特别是近缘种达氏鲟进行鉴定,如中华鲟鳃耙数为13~26个,而达氏鲟为25~55个^[21]。通过本研究的一系列形态学度量,得出新发现的15尾鲟鱼与文献^[21-23]记载的中华鲟野生幼鱼的生物学性状基本一致,仅1尾(14#鱼)身体右侧骨板数略高于历史记录,这可能由于历史上用于物种判定的鱼体数目较少或个体变异造成的。

尽管形态学上判定该批鱼为中华鲟,但是仍很难将其与中华鲟的杂交种进行区别,因此本研究首次引入分子生物学方法进行种间判定。前期的研究已经成功采用微卫星方法进行多倍体中华鲟亲子鉴定^[19]、人工养殖中华鲟群体遗传多样性以及鲟鱼种间鉴定等研究(待发表),这些成果为本研究开展野生中华鲟物种鉴定提供了坚实的基础。中华鲟和达氏鲟自然分布于长江流域,施氏鲟主要分布在黑龙江河及其支流^[4],但近年来,在湖北省养殖较多,因此有逃逸至长江水系的可能。本研究将新发现的15尾幼鲟与这3种鲟鱼的遗传关系进行比较分析,发现该15尾幼鲟与中华鲟的遗传距离最近($F_{st}=0.039$, $P<0.05$),其次为达氏鲟($F_{st}=0.108$, $P<0.05$),最远为施氏鲟($F_{st}=0.209$, $P<0.05$),从遗传和进化的角度可初步判定该批鱼为中华鲟。遗传多样性分析显示,该批鱼的遗传多样性略低于野生中华鲟,暗示了新发现的中华

鲟幼鱼遗传多样性水平降低,野生亲本的数量不容乐观。

2013年和2014年多家科研单位在葛洲坝下产卵场和长江口均未发现中华鲟的自然繁殖现象,然而近期在长江口发现为数较多的中华鲟幼鱼,两个事件看似矛盾。历史上中华鲟幼鱼每年主要于5—9月在常熟溱潼江段出现,6月份最为集中^[9,11],出现时间平均86.6d(8尾),所采获样本(8尾)全长、体长和体重年度平均值的变化范围分别为25.2~40.1 cm、23.2~33.5 cm和70.7~314.8 g^[11]。本次中华鲟幼鱼出现的时间与历史上基本保持一致,但其生物学指标(全长20~34.3 cm、体长17~30 cm和体重29~148 g)低于历史同期。分析产生这种矛盾和现象的原因可能与中华鲟产卵时间推移,或者产卵场转移到下游距离长江口更近的位置,或者饵料匮乏等因素有关。由于2013年和2014年连续两年在目前葛洲坝下产卵场采取多种途径监测中华鲟繁殖情况,均未发现繁殖迹象,因此,在原产卵场产卵时间向后推移的可能性较小。历史上确定的中华鲟产卵场在长江上游有5处之多^[27]。1981年葛洲坝截流,中华鲟的洄游路线被切断,无法再上溯到长江上游进行产卵,次年发现中华鲟在葛洲坝下形成了一个新的产卵场,说明中华鲟为了繁衍生息,产卵场可以发生适应性迁移;2003年,位于葛洲坝上游的三峡大坝开始蓄水,进一步改变了葛洲坝下中华鲟产卵场的水文特征^[28]。多数鲟鱼对产卵场河流形态和河床底质有特定的需求,杨德国等^[29]认为,特殊的河床形态决定了特殊的水力学特征,产生了特殊的微环境,这可能是鲟类产卵场条件的决定性因素。历史上,中华鲟产卵场的多次主动或被动变迁,说明中华鲟是一种适应性较强的物种,因此为了适应环境的改变,再次找到新的产卵场也是极有可能的。

参考文献:

- [1] Wei Q W, Ke F, Zhang J M, et al. Biology, fisheries, and conservation of sturgeons and paddlefish in China[J]. Environ Biol Fish, 1997, 48(1-4): 241-255.
- [2] Wang J H, Wei Q W, Zou Y C. Conservation strategies for

- the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*: an overview on 30 years of practices and future needs[J]. J Appl Ichthyol, 2011, 27(2): 176–180.
- [3] Investigation group of fishery resources in the Yangtze River. Research on biology and controlled breeding technology of sturgeons in the Yangtze river[M]. Sichuan: Science and Technology Press, 1988: 284. [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]. 四川: 科技出版社, 1988: 284.]
- [4] Chen X H. Biology and resources status of sturgeons[M]. Beijing: China Ocean Press, 2007: 10–21. [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: 10–21.]
- [5] Yi J F. Resources survey of juvenile *Acipenser sinensis* in Yangtze River[J]. Gezhouba Hydropower, 1994(1): 53–58. [易继舫. 长江中华鲟幼鲟资源调查[J]. 葛洲坝水电, 1994(1): 53–58.]
- [6] 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]. J Appl Ichthyol, 2006, 22(Suppl. 1): 140–144 .
- [7] Tao J P, Qiao Y, Yang Z, et al. Estimation on the spawning population and (*Acipenser sinensis*) and trend analysis spawning sizes of Chinese sturgeon of their change in recent years[J]. Journal of Hydroecology, 2009, 2(2): 37–43. [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, 2(2): 37–43.]
- [8] Chang J B. The research on the tendency of quantity changes and s tructure Characteristics of Chinese sturgeon propagation population[D]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 1999. [常剑波. 长江中华鲟繁殖群体结构特征和数量变动趋势研究[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 1999.]
- [9] Zhao Y, Huang X, Yu Z T. Status survey of juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)[J]. Water Resources and Fisheries, 1986(6): 38–41. [赵燕, 黄琇, 余志堂. 中华鲟幼鱼现状调查[J]. 水利渔业, 1986(6): 38–41.]
- [10] Yang D G, Wei Q W, Wang K, et al. Downstream migration of tag-released juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) in the Yangtze River[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(1): 26–30. [杨德国, 危起伟, 王凯, 等. 人工标志放流中华鲟幼鱼的降河洄游[J]. 水生生物学报, 2005, 29(1): 26–30.]
- [11] Li L X, Zhang H, Wei Q W, et al. Occurrence time and amount variation of juvenile Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* at Xupu, Changshu section of Yangtze River after closure of Three Gorges Dam[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(3): 611–618. [李罗新, 张辉, 危起伟, 等. 长江常熟溱浦段中华鲟幼鱼出现时间与数量变动[J]. 中国水产科学, 2011, 18 (3): 611–618.]
- [12] Congiu L, Dupanloup I, Patarnello T, et al. Identification of interspecific hybrids by amplified fragment length polymorphism: the case of sturgeon[J]. Mol Ecol, 2001, 10(9): 2355–2359.
- [13] Congiu L, Fontana F, Patarnello T, et al. The use of AFLP in sturgeon identification[J]. J Appl Ichthyol, 2002, 18(4-6): 286–289.
- [14] Rozhkovan K V, Chelomina G N, Rachek E I. Molecular identification and the features of genetic diversity in interspecific hybrids of amur sturgeon (*Acipenser schrenckii* × *A. baerii*, *A. baerii* × *A. schrenckii*, *A. schrenckii* × *A. ruthenus*, and *A. ruthenus* × *A. schrenckii*) based on variability of multilocus RAPD markers[J]. Russ J Genet, 2008, 44(11): 1258–1265.
- [15] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n. (dG-dT)_n polymorphisms[J]. Genomics, 1990, 7(4): 524–530.
- [16] Powell W, Morgante M, Andre C, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP, and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis[J]. Mol Breed, 1996, 2(3): 225–238.
- [17] Chassaing O, Hänni C, Berrebi P. Distinguishing species of European sturgeons *Acipenser* spp. using microsatellite allele sequences[J]. J Fish Biol, 2011, 78(1): 208–226.
- [18] Barmintseva A E, Mugue N S. The use of microsatellite loci for identification of sturgeon species (Acipenseridae) and hybrid forms[J]. Russ J Genet, 2013, 49(9): 950–961.
- [19] Xin M M, Zhang S H, Wang D Q, et al. Parentage identification of polyploidy *Acipenser sinensis* based on microsatellite marker[J]. Freshwater Fisheries, 2015, 45(4): 3–9. [辛苗苗, 张书环, 汪登强, 等. 多倍体中华鲟微卫星亲子鉴定体系的建立[J]. 淡水渔业, 2015, 45(4): 3–9.]
- [20] Salah M A, Iciar M. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. Nucl Acids Res, 1997, 25(22): 4692–4693.
- [21] Ding R H. Fishes of Sichuan[M]. Sichuan: Science and Technology Press, 1994: 28–33. [丁瑞华. 四川鱼类志[M]. 四川: 科学技术出版社, 1994: 28–33.]
- [22] Fishes Research Laboratory in the Institute of Hydrobiology of Hubei Province. Fish In the Yangtze River[M]. Beijing: Science Press, 1976: 16–20. [湖北省水生生物研究所鱼类研究室. 长江鱼类[M]. 北京: 科学出版社, 1976: 16–20.]
- [23] Mao C F. Biology and conservation of juvenile Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, in the Yangtze River

- estuary[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2005: 16–20. [毛翠凤. 长江口中华鲟幼鱼的生物学特性及其保护[D]. 上海: 上海海洋大学, 2005: 16–20.]
- [24] Meirmans P G, Van Tienderen P H. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms[J]. *Mol Ecol Notes*, 2004, 4(4): 792–794.
- [25] Van Puyvelde K, Van Geert A, Triest L. ATETRA, a new software program to analyze tetraploid microsatellite data: comparison with TETRA and TETRASAT[J]. *Mol Ecol Resour*, 2010, 10(2): 331–334.
- [26] Zhao F, Zhuang P, Zhang T. New timing record of juvenile *Acipenser sinensis* appearing in the Yangtze Estuary[J]. *Marine Fisheries*, 2015, 37(3): 288–292. [赵峰, 庄平, 张涛, 等. 中华鲟幼鱼到达长江口时间新记录. *海洋渔业*, 2015, 37(3): 288–292.]
- [27] Wang C Y. Migrations for reproduction of Chinese Sturgeons (*Acipenser sinensis*) and its habitat selections in the Yangtze river[D]. Wuhan: Huazhong Agriculture University, 2012. [王成友. 长江中华鲟生殖洄游和栖息地选择[D]. 华中农业大学, 2012.]
- [28] Zhou J Z, Zhao Y, Song L X, et al. Assessing the effect of the Three Gorges reservoir impoundment on spawning habitat suitability of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) in Yangtze River, China[J]. *Ecol Inform*, 2014, 20: 33–46.
- [29] Yang D G, Wei Q W, Chen X H, et al. Hydrology status on the spawning ground of *Acipenser sinensis* below the Gezhouba Dam and its relation to the spawning run[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(3): 862–869. [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, 27(3): 862–869.]

External morphology and molecular identification of wild juvenile *Acipenser sinensis* newly found in the Jiangsu Xupu section of the Yangtze River

ZHANG Shuhuan¹, YANG Huanchao¹, XIN Miaomiao¹, WU Jinming¹, DAI Zhenguo², DU hao¹, LIU Zhigang¹, WEI Qiwei^{1,2}

1. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture of China; Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;
2. Fishery Supervision and Management Brigade, Changshu 215500, China

Abstract: Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) is a large anadromous fish listed under Category I State protection in China and is critically endangered. This anadromous fish has historical commercial importance and was widely dispersed in the main tributaries of the Yangtze River and the coastal regions of the Qiantang River, Minjiang River, and Pearl River. However, natural populations have declined severely in the last three decades as a result of blocking of the migration route by the Gezhouba Dam. Natural reproduction of *A. sinensis* was interrupted during 2013–2014 according to the monitored number of fish in the breeding population at the Gezhouba Dam spawning site and catadromous juvenile fish in the estuary. Fifteen juvenile sturgeons were found in the Jiangsu Xupu section of the Yangtze River in June 2015. It is of great significance to evaluate whether these juvenile fish are Chinese sturgeon or hybrid sturgeon; however, few studies have tried to identify Chinese sturgeon among other sturgeons. In this study, we successfully identified and differentiated the newly found juvenile fish from three other sturgeon species endemic to China, including 30 *A. sinensis*, 39 *A. dabryanus*, and 33 *A. schrenckii*. Morphological characters, such as bone lamella, gill rakers, and dorsal rays, of these newly found juvenile fish were consistent with those of Chinese sturgeon. Eleven polymorphic microsatellite loci isolated and characterized in a previous study were used to identify the three sturgeon species. The results showed that the newly found sturgeon in the Yangtze River was closest to *A. sinensis* ($F_{st}=0.039$, $P<0.05$) and farthest from *A. schrenckii* ($F_{st}=0.209$, $P<0.05$), indicating that these fish were undoubtedly juvenile Chinese sturgeon. The level of genetic diversity (mean number of alleles=9.455; total heterozygosity=0.796; Shannon-Wiener Diversity Index=1.998) of these juvenile Chinese sturgeon was lower than that of other wild Chinese sturgeon (mean number of alleles=13.455; total heterozygosity=0.810; Shannon-Wiener Diversity Index=1.886), suggesting that the size of the wild Chinese sturgeon breeding population is decreasing. No natural *A. sinensis* reproduction was found during 2014 at the Gezhouba Dam spawning site, which is the only known spawning site for this endangered species. We speculate that these fish came from another spawning ground. In recent years, the Three Gorges Dam, which is the world's largest hydroelectric project, was put on-line, and it has had a tremendous impact on the natural reproduction of Chinese sturgeon by influencing the seasonal fluctuations in downstream water flow and temperatures, potentially resulting in loss of the eco-hydrological conditions needed by the fish for spawning. The Chinese sturgeon is an adaptable fish judging from its life history, so it is likely that other spawning sites located downstream of the Gezhouba Dam are being used. It is necessary to identify the exact positions of these spawning grounds to describe the hydrological conditions and better protect this endangered species. Our results will be useful for monitoring natural populations, surveying new spawning sites, and designing conservation strategies.

Key words: *Acipenser sinensis*; interspecific identification; microsatellite; spawning site; Yangtze River estuary

Corresponding author: WEI Qiwei. E-mail: weiqw@yfi.ac.cn