

历史 DNA 在鱼类群体遗传与进化研究中的应用

徐 喆^{1,2,3,4}, 刘进贤^{1,2,3}

(1. 中国科学院 海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室, 山东 青岛 266237; 3. 中国科学院 海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 历史耳石、鳞片作为鱼类群体遗传与进化研究宝贵的 DNA 来源, 记录了几十年甚至几百年间的遗传信息, 使得鱼类群体遗传与进化研究可以扩展到历史时间尺度, 从而可以直接反映人类活动对鱼类遗传多样性及适应性进化的影响。近十几年来, 随着高通量测序技术的蓬勃发展, 历史耳石、鳞片作为基因组数据的来源成为现实, 可提供更为精细的遗传数据。然而, 历史样本具有 DNA 高度降解、外源 DNA 污染等特点, 利用历史 DNA 进行群体遗传学研究仍然是一项十分困难的工作。作者对历史耳石、鳞片样本 DNA 的提取方法, 基因分型技术进行了总结, 以期为克服这些困难提供思路。另外, 作者综述了利用历史样本进行鱼类群体遗传与进化研究的现状与热点。伴随新一代分子技术的普及与发展, 历史 DNA 可以提供更为丰富的遗传信息, 将为鱼类群体遗传与进化相关研究提供新的思路与证据, 未来势必拥有更广阔的应用前景。

关键词: 耳石; 鳞片; 历史 DNA; 群体遗传; 进化

中图分类号: Q-31 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2020)08-0039-09

DOI: 10.11759/hyxx20200120001

鱼类是脊椎动物中多样性最高的类群, 具有重要的经济和生态价值^[1]。然而, 鱼类也是受人类活动影响较为严重的类群之一。鱼类作为丰富的动物蛋白来源, 一直是人类捕捞的对象。从 20 世纪开始, 大型商业捕捞的兴起使得鱼类资源快速衰退^[2-4]。2016 年, 联合国粮农组织报道, 据估计全世界有 31% 的鱼类处于被过度开发的现状^[5]。

过度捕捞会导致群体生物量的急剧降低、缺乏足够的个体来维持群体的遗传多样性^[6, 7]。在随机遗传漂变的作用下, 群体等位基因以及杂合子将逐渐丢失^[8, 9]。遗传多样性的降低进一步加剧群体近亲繁殖, 有害等位基因不断积累, 导致群体应对未来环境变化以及抗病能力降低, 增加了群体灭绝的风险^[10]。遗传多样性的恢复是一个缓慢的过程, 即使群体生物量恢复到一定的水平, 遗传多样性也无法在短时间内恢复到之前水平。因此, 维持尽可能高的群体遗传多样性已成为渔业长期管理计划的中心目标^[11]。

鱼类群体在人类剧烈活动影响前的遗传多样性水平可以作为基线来评估当前或者历史其他时期鱼类群体多样性水平动态变化, 从而反映人类活动及其他因素对鱼类遗传多样性及适应性进化的影响^[1], 为

群体恢复以及可持续利用提供指导和帮助^[6]。历史 DNA 记录了几十年甚至几百年前的遗传信息, 是解决这一问题的有效手段。由于历史上很多渔业研究机构及博物馆收藏了大量的鱼类耳石、鳞片样本, 这些样本最初用于鱼类年龄测定, 现在可以作为鱼类群体遗传与进化研究的珍贵历史 DNA 来源^[12]。因此, 与其他生物类群相比, 鱼类历史 DNA 的获取更为简单。

自 20 世纪 90 年代中期, 历史耳石、鳞片样本 DNA 开始用于鱼类群体遗传学研究, 为研究鱼类群体时间尺度上的遗传变化及历史动态提供了丰富信息^[13-15]。然而, 相关的研究案例依然较少, 主要有以下 3 个原因: (1) 历史样本如耳石、鳞片是博物馆或者研究机构珍贵的历史标本材料, 致使历史样本的获

收稿日期: 2020-01-20; 修回日期: 2020-04-01

基金项目: 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室青年人才培育项目(LMEES-YTSP-2018-01-05)

[Foundation: The Youth Talent Support Program of the Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), No. LMEES-YTSP-2018-01-05]

作者简介: 徐喆(1990-), 男, 山东淄博人, 博士研究生, 主要从事海洋分子生态学研究, 电话: 0532-82898894, E-mail: xuzhewu@sina.com; 刘进贤, 通信作者, 研究员, 电话: 0532-82898909, E-mail: jinxianliu@gmail.com

取存在一定的困难。(2)历史样本表面残留的组织细胞是极微量的,为DNA提取以及后续实验操作带来一定技术难度。(3)历史样本由于存放时间长,保存条件不当等原因,会造成DNA严重降解、污染,进而导致基因分型成功率低,等位基因丢失等情况^[12]。

线粒体DNA(mtDNA)片段以及微卫星DNA一直是鱼类历史DNA研究中采用的主要分子标记。近十几年来,伴随着高通量测序技术的发展以及测序成本的降低,鱼类历史DNA研究已经开始步入组学时代^[1]。尽管历史DNA存在降解严重、低浓度、外源污染等挑战,新的技术例如DNA修复、提取以及测序平台的发展使得从鱼类历史标本DNA中获得大量遗传数据成为可能。相关分子技术的迅猛发展正快速地改变科研工作者研究策略的制定以及历史样本的使用方式^[13]。

目前,应用历史样本进行鱼类群体遗传学研究多集中在北美、欧洲等地区的研究机构,中国尚未见相关研究报道。然而,中国海洋渔业资源衰退现状尤为严峻,约57%的海洋渔业资源群体处于过度开发或资源衰竭状态,远远高于全球平均水平^[16]。为促进中国渔业资源恢复以及可持续利用,采用历史标本DNA开展相关研究,探讨人类活动对鱼类群体遗传多样性及适应性的影响机制将具有非常重要的科学意义。作者对鱼类历史DNA的提取方法和分型技术进行了总结。同时,综述了国际同行利用历史DNA开展鱼类群体遗传与进化的研究现状和热点,以期为中国鱼类历史DNA研究的开展提供技术支持。随着测序技术的发展,历史样本的基因组资源已向科研工作者开放,开展相关研究的途径也正发生着革命性变化。

1 历史样本的获取

历史耳石及鳞片样本的获取是开展时间尺度上鱼类群体遗传学分析的主要障碍。历史上采集的样本通常用于鱼类生态及渔业管理相关的特定应用,尤其是年龄测定,当时的渔业科研工作者很难预料到这些样品可以用于未来的DNA分析。由于缺乏对历史样本价值的认识,很多博物馆和渔业研究单位对这些历史样本的保存不当,并遗失了大量的鱼类历史样本。同时,很多机构及研究者已经正确地认识到历史样本是追溯历史信息的唯一来源,并对已有样本加以保护和搜集补充新的样本^[17,18]。另外,我们还要意识到未来DNA提取及测序技术将发生巨大的

变化,历史DNA在未来会产生更大的科研价值。这些历史样本如果已然被耗尽,未来技术的进步也将显得毫无用处。对耳石样本来说,因为每个个体只有两枚耳石可以用于历史DNA的提取,极易被消耗。因此,在耳石、鳞片被用于各种实验的同时应确保留有足够的DNA,并且同一个体的历史样本尽量留有备份以供未来研究。实验过程中,可以采用多重PCR技术减少DNA模板的损耗。此外,可以采用全基因组扩增技术来增加样本DNA数量^[19]。当然,这些方法都需要我们在历史DNA的工作中去验证和使用。

2 历史DNA提取方法

历史DNA通常高度降解,片段化且浓度较低。在多数情况下,历史样本中DNA的含量要比现代样本低得多,且由于污染,其中包含了大量的外源DNA,因此用于测序的目的DNA含量通常很低^[20-26]。历史DNA的提取方法关注于如何从微量、降解的材料中获得最多产量的DNA并减少污染。下面我们对鱼类历史耳石、鳞片的DNA提取方法进行了总结。

2.1 EDTA-SDS 直接裂解法

Hutchinson^[15]等首次提出了基于EDTA-SDS裂解提取耳石DNA的方法。此方法首先将耳石置于含有EDTA、SDS以及蛋白酶K的裂解液中,5h温浴后离心,上清液加入无水乙醇、NaCl以及MgCl₂的混合溶液中沉淀DNA,沉淀得到的DNA用70%的乙醇洗涤两遍。之后将剩余的DNA沉淀在室温下干燥,加入双蒸水溶解DNA。此方法没有经有机溶剂或者吸附柱等方法纯化,最大限度地保留了历史样本中的DNA。

Cuveliers^[27]等对该方法进行了改良,在此方法的基础上降低了EDTA以及SDS的浓度,并减少了温育时间。改良后的方法降低了对耳石结构的损伤^[27]。但是,裂解液浓度和温育时间的减少并没有降低扩增的成功率,这可能是由于耳石表面残留的组织较少,较低的裂解液浓度,较短的水浴时间也可以使耳石表面的DNA快速转移到裂解液中,最终得到较为理想的DNA提取效果^[27]。

该方法被广泛用于鱼类耳石、鳞片DNA的提取,并得到了较为理想的结果,如:用于大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)、海鲈(*Pleuronectes platessa*)、欧洲沙丁鱼(*Sardina pilchardus*)、欧洲鳊(*Engraulis encrasicolus*)、无须鳕(*Merluccius merluccius*)等物种群

体遗传研究中的 DNA 提取^[28-32]。

2.2 苯酚氯仿萃取法

苯酚-氯仿萃取法是确保从历史样本中获得高产量 DNA 最为可靠的方法,该方法可以减少低分子量双链 DNA 的损失^[33]。

Nielsen^[14]等首次提出基于苯酚氯仿萃取鳞片 DNA 的方法。首先将鳞片样本置于含有蛋白酶 K 的裂解液中,在 37℃ 下过夜。随后使用苯酚/氯仿/异戊醇进行抽提,最后使用无水乙醇沉淀 DNA^[34]。为了获取高浓度的 DNA,使用 Microcon-50 (Amicon)超滤管将 DNA 浓缩。

该方法为历史鳞片样本 DNA 提取常用的方法之一,能够获得较高的分型成功率。此方法已经被应用于采集于 1931—1939 年间的大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)鳞片样本以及采集于 1944—1966 年间的欧洲河鲈(*Thymallus thymallus*)鳞片样本的基因组 DNA 提取。在这两个物种的相关研究中,微卫星分型成功率均大于 90%^[14, 35]。

2.3 聚合树脂吸附法

Chelex-100 是一种化学聚合树脂,由苯乙烯、二乙烯苯共聚体组成。它表面有成对的亚氨基二乙酸盐离子,可以整合多价金属离子,尤其是选择性整合二价离子。在 DNA 提取过程中,细胞中的某些金属离子可以催化 DNA 降解。利用 Chelex-100 在高温条件下整合可以催化 DNA 降解的金属离子,通过离心除去 Chelex-100 颗粒,使与 Chelex-100 结合的外源物质与 DNA 分离,防止 DNA 降解。适合从微量样本中得到较高分子量的 DNA^[36]。

首先将耳石置入含有 Chelex-100、蛋白酶 K 的混合液中,在振荡器上反复振荡;56℃ 水浴,取出后振荡;100℃ 水浴 15 min,振荡;离心使 Chelex 颗粒沉淀。上清液即可用于 PCR 扩增,或置于 4℃ 保存备用^[37, 38]。

此方法具有简单、快速,提取过程中不需要有机溶剂等优点^[39]。常用于微量组织 DNA 的提取,也适用于历史耳石、鳞片样本 DNA 的提取。Nielsen 等^[40]利用此方法提取大西洋鲑鱼历史耳石 DNA,其微卫星分型成功率达到 96%~100%。

2.4 商业试剂盒法

目前利用商业试剂盒提取 DNA 越来越普遍。很多采用历史耳石、鳞片的相关研究也采用商业试剂

盒并获得成功^[40]。与其他方法相比,试剂盒法具有操作简便,节省时间,得到的 DNA 片段较长等优点。然而,由于低分子量 DNA 的丢失,试剂盒法得到的 DNA 产量通常比用苯酚-氯仿萃取法低很多。而许多高通量测序方法需要相对高浓度的 DNA,商业试剂盒可能不是制备历史 DNA 基因组文库的最佳选择。另外,商业试剂盒由于专利保护等原因,试剂成分及浓度相关信息未知,因此使用者无法确定其对耳石结构的影响^[27]。

以上作者对历史耳石、鳞片样本的 DNA 提取方法进行了总结。3 种方法均应用于鱼类历史耳石、鳞片的相关研究中,并得到了较为理想的分型成功率。但是不同方法都具有较为明显的优缺点,在具体研究中,要综合考虑样本实际情况,实验目的,时间、经济成本,并通过预实验选择最适合的提取方法。

3 历史 DNA 基因分型技术

3.1 基于 PCR 的基因分型技术

基于 PCR 扩增的一代分型技术是历史耳石、鳞片样本 DNA 研究中最先采用也是应用最为广泛的技术。尽管这一技术已经应用了几十年,这种基于 PCR 的分型技术仍然存在一些缺陷。这种缺陷主要源于 DNA 污染和降解。污染可能来源于现代鱼类样本 DNA,或者是覆盖在历史样本表面的真菌以及细菌 DNA^[26]。目标 DNA 的样本量越小,外源 DNA 被扩增的可能性就越大,并且其数量可能超过目标 DNA^[41]。因此在使用基于 PCR 扩增的一代分型时,应尽可能地避免污染。涉及历史样本的实验工作应尽可能在专门的古生物实验室或者超净台内进行,以避免现代样本以及环境微生物的污染。这些专门用于历史 DNA 实验操作的仪器应定期用紫外灭菌,试剂耗材也应与现代样本的分开存放^[26]。另外,由于不同历史样本 DNA 的降解程度不同,可能使得部分样品某些位点的 PCR 扩增失败,导致等位基因丢失。这些缺陷最终都会对后续的分析产生影响。

为了克服历史 DNA 本身 DNA 含量少的缺陷,常选用线粒体 DNA (mtDNA)开展研究。mtDNA 在细胞中是多拷贝,相较于核 DNA 来说,数量更多。这一优势保证了目的 DNA 扩增的成功率并能有效避免外源 DNA 污染。然而,即使历史样本中 mtDNA 的拷贝数较高,mtDNA 仍然是严重降解和片段化的(片段长度通常小于 200 bp)^[26]。因此对鱼类历史样本进行 mtDNA 测序时,通常选择短片段进行扩增^[41]。此

外,微卫星标记也常用于鱼类历史 DNA 的研究。微卫星标记通常较短,并且是基因组 DNA 序列中变异最多的类型之一^[42]。与 mtDNA 相比较,微卫星标记的优势在于它是核 DNA 序列共显性标记,获得的遗传信息更为全面。此外,多重 PCR 扩增技术的应用可以在一个体系中同时扩增多个微卫星位点,可大大节约 DNA 模板^[43]。

尽管存在一定缺陷,基于 PCR 扩增技术的基因分型技术凭借低成本的优势,被绝大多数鱼类历史 DNA 研究所采用,是鱼类群体遗传以及进化研究中不可或缺的技术手段,如 Ciborowski^[44]等利用线粒体 DNA 对大西洋鲑鱼历史鳞片样本进行分析,结果发现,放流非本地的鲑鱼可能在短期内增加群体的遗传多样性,但可能无法逆转种群数量的下降。Cuveliers^[45]等利用微卫星技术对欧洲鳎(*Solea solea*)历史耳石样本进行分析,认为欧洲鳎群体的遗传多样性在 50 a 间保持稳定,并没有因过度捕捞而出现明显的降低。

3.2 高通量基因分型技术

采用 mtDNA、微卫星分型方法用于鱼类历史 DNA 研究只能得到少量的位点,对鱼类群体遗传与进化问题的解析能力相对有限,而高通量测序却能一次性得到成百上千个位点,有助于精确解析鱼类群体遗传多样性在时间序列上的动态变化规律。

从历史 DNA 中获取全基因组序列具有一定难度,这主要与全基因组测序对 DNA 质量、浓度要求较高有关^[46]。另外,历史 DNA 中存在大量的外源 DNA,使测序得到的数据存在较大比例的外源 DNA 序列,导致测序成本提高。为了规避这些问题,研究者通常采用杂交捕获测序技术,可以快速富集大量目的 DNA 片段^[47]。该方法需要提前获得目的物种的(部分)基因组序列,针对感兴趣的基因组区域设计探针。通过基因组文库与探针之间的杂交来富集目的 DNA 片段并应用于后续高通量测序。杂交捕获方法可以一次性获得大量目的片段,并且能够很好与高通量测序技术衔接。基于这些优点,杂交捕获已经应用于鱼类历史 DNA 研究中并在解析鱼类群体遗传多样性、适应性进化等方面取得了理想结果^[48, 49],如 Christensen^[49]等采集了红点鲑(*Salvelinus alpinus*)历史耳石、鳞片样本,采用杂交捕获的方法总共得到了 53 个 SNP 位点,研究结果显示该群体遗传结构在时间上较为稳定,并且空间尺度上的遗传变异要显

著大于时间尺度上的遗传变异。

另外,基于限制性内切酶的简化基因组测序以及全基因组重测序技术也已开始应用于历史标本 DNA 的研究。然而目前还没有应用于鱼类历史样本的相关报道。主要原因可能是这两种方法对 DNA 浓度及质量要求较高。然而,无论是耳石还是鳞片标本,都不是由细胞成分构成,提取得到的历史 DNA 仅来源于覆盖在样本表面很少的一部分组织,提取得到的 DNA 量少,其与空气接触导致 DNA 降解更为严重,从而限制了这两种方法的广泛应用。

4 历史 DNA 的应用热点

4.1 遗传多样性评估

遗传漂变和选择的作用会使群体的等位基因丢失,遗传多样性下降^[50]。特别是在有效群体大小(N_e)较低的群体中,遗传漂变的作用更大。研究认为过度捕捞会降低海洋鱼类的有效群体大小,从而进一步加剧群体等位基因的丢失,降低群体的进化潜力,增加群体灭绝的风险^[51]。模拟结果显示有效群体大小在 3 000 以下的群体遗传多样性降低的风险较大^[52]。已有的研究通常通过比较分析采集于不同地理群体的样本来推测遗传多样性以及有效群体大小的变化,即通过比较不同人为活动影响下(如过度捕捞,栖息地破坏,养殖个体入侵等)的不同地理群体的遗传多样性水平及有效群体大小的差异^[53]。然而,利用历史样本来比较同一群体在不同历史时期的遗传多样性水平及有效群体的变化趋势是更为有效的研究策略。

Säisä^[54]等采用历史鳞片样本对分布于芬兰中部奥卢河的大西洋鲑鱼的遗传多样性变化开展了研究,采用了苯酚氯仿萃取法提取样本 DNA,检测到该群体等位基因丰富度在 1940—1995 年这段时间降低了 25%。然而,位于塔诺河较大的野生群体在 1939—1995 年这段时间内未检测到明显的等位基因丢失的现象。Hauser^[6]等通过分析不同历史时期的鳞片样本 DNA 来解析捕捞对新西兰鲷(*Pagrus auratus*)群体遗传多样性的影响,结果发现捕捞引起的群体衰退可导致新西兰鲷明显的遗传多样性丢失。Ruggeri^[30]等通过 EDTA-SDS 直接裂解法提取了历史耳石及鳞片样本 DNA,分析了欧洲沙丁鱼南北两个群体的遗传多样性的历史变化趋势,研究发现南方群体的遗传多样性比较稳定,而北方群体遗传多样性存在降低的信号,推测可能由于过度捕捞以及明

显的地理隔离导致的瓶颈效应带来的遗传漂变导致。Ruggeri^[31]等采用 EDTA-SDS 直接裂解法提取了历史耳石样本 DNA, 比较分析了亚得里亚海欧洲鳎群体过度捕捞前后的遗传多样性水平, 结果表明亚得里亚海欧洲鳎群体遗传多样性的丢失与群体数量开始下降的时间吻合。Pita^[32]等利用 EDTA-SDS 直接裂解法提取了历史耳石样本 DNA, 并解析了无须鳕的有效群体大小历史变化趋势, 研究发现无须鳕的有效群体大小随着过度捕捞逐年下降, 到 2004 年降到最低点, 之后由于渔业管理保护措施的实施, 开始逐渐恢复。

4.2 时间尺度上的群体遗传结构变化研究

人类活动改变了鱼类的生存环境, 导致鱼类栖息地破碎化, 过度捕捞引起鱼类群体衰退, 部分物种濒临灭绝, 这些因素可能导致群体间的基因流降低, 不同群体间的遗传分化水平提高。另外, 自然或人为原因引起群体间的迁移以及养殖、增殖性放流等措施则会改变野生群体的遗传组成^[55], 这些因素导致群体遗传组成及结构的改变。历史样本 DNA 在鱼类群体遗传学中的应用, 可查明历史时期鱼类群体间的遗传结构, 通过与当前鱼类群体的遗传结构进行比较, 可评估人类活动对鱼类群体遗传结构的影响。

Tessier^[56]等通过微卫星 DNA 分析了加拿大圣让湖的大西洋鲑鱼群体遗传结构在时间尺度上的变化, 结果显示现代群体间存在高水平的遗传分化, 同一河流的两条支流群体间的分化水平高于不同河流间群体的分化水平。在该研究中, 仅采用当代样本无法消除近期群体动态变化对遗传结构的影响。作者通过对采集于 1970—1980 年的历史鳞片样本分析确认了不同历史时期存在几乎相同的群体遗传结构, 证明了遗传结构在时间上的稳定性。Østergaard^[57]等通过聚合树脂吸附法提取 1944—1997 年采集于波罗的海的海鳟(*Salmo trutta*)历史鳞片样本 DNA 并解析了遗传结构的时空变化, 结果显示群体在时间序列上的遗传分化水平高于不同地理群体间的遗传分化。Poulsen^[58]等通过聚合树脂吸附法提取历史耳石样本 DNA, 解析了北大西洋及邻近区域的大西洋鲑鱼群体遗传结构的时空变化, 结果显示不同群体间存在较低的遗传分化($F_{ST}=0.003$), 部分群体的遗传组成具有长期的时间稳定性, 可能是由较强的局部地区选择压力导致。Hansen^[59]等采用苯酚氯仿萃取法提

取了丹麦 6 条相邻河流的海鳟历史鳞片样品 DNA, 并结合当代样本探讨了人工增殖放流活动对群体遗传组成的影响, 结果显示受人工增殖放流活动的影响, 相关群体增殖放流前后的遗传组成发生了显著的变化。

4.3 时间尺度上的适应性分化研究

前文提到的应用都是采用中性位点进行相关分析。中性位点可用于解析群体的遗传结构, 但是无法揭示自然和人为等选择作用引起的群体适应性分化。因此, 通过筛选受选择作用的位点来进行群体遗传分析成为探讨人类活动影响下鱼类群体适应性分化的有效方法。

近年来, 通过研究物种在时间尺度上的适应性分化揭示可能驱动力的研究案例越来越多^[60]。然而, 鱼类的相关研究依然较少^[61], 这可能与相关鱼类研究中涉及的遗传数据量较少, 筛选受选择作用的位点难度较大有关, 且鱼类群体遗传学普遍使用的遗传标记通常为中性遗传标记等因素造成^[62-64]。

Hansen^[61, 65]等采用聚合树脂吸附以及苯酚氯仿萃取法提取海鳟历史鳞片样本 DNA, 挑选免疫应答相关的 MHC 基因(主要组织相容性复合体)和 TAP 基因(抗原处理相关的转运蛋白)嵌入的微卫星位点分别对挪威、丹麦的海鳟开展了研究, Hansen^[61]等发现嵌入 MHC 的微卫星位点在不同群体间存在明显的遗传分化, 但在时间尺度上(1972—1983 年)的分化不明显。然而, Jensen^[65]等发现嵌入 TAP 的微卫星位点在空间、时间尺度上均存在明显的分化, 研究结果提示病原体介导的选择作用在鱼类群体中可在较短时间内产生。

近几年来, 伴随着基因组技术的发展, 鱼类遗传学数据有了大幅度的增长。这使从基因组层面大规模筛选受选择作用的位点成为可能, 并为研究鱼类时间尺度上的适应性分化提供机遇。

5 展望

近几十年来过度捕捞、养殖、放流等人为活动, 不但引起鱼类群体数量的下降, 也造成遗传多样性及遗传结构的改变, 严重影响了鱼类自然群体的进化潜力。历史标本 DNA 能够提供珍贵的历史遗传信息, 可用来探究由人类活动所引起的鱼类自然群体遗传多样性改变以及适应性变化^[59]。收藏在博物馆以及渔业研究机构的历史耳石、鳞片样品是提供历

史 DNA 的宝贵来源。这些历史样本不但可以作为鱼类分类、年龄鉴定的材料,也可为评估群体遗传多样性、适应性以及进化潜力提供了至关重要的基线标准。

伴随标本 DNA 提取技术以及测序技术的进步,鱼类历史样本重新引起了研究者的广泛关注,相关研究正在蓬勃发展。鱼类基因组数据的不断丰富,不但降低了设计探针的难度,同时为下游的数据过滤、比对以及 SNP 检索提供了技术支撑。

历史样本可以用来揭示群体遗传结构在时间序列上的变化趋势,阐明环境和人为等选择作用如何驱动鱼类进化。增强我们对人类活动以及全球变化背景下,鱼类群体动态以及遗传结构变化的认识。历史样本揭示的是人类捕捞活动前,鱼类群体的遗传状态,可为鱼类群体遗传多样性恢复、物种保护以及渔业可持续发展提供参考。

作为研究的前提,历史样本的合理保存显得尤为重要。博物馆和渔业研究机构保存了大量的历史耳石、鳞片样本,此外,正如历史上收集的样本可以作为当代珍贵的历史样本一样,当代收集的样本在未来也会成为珍贵的历史样本。因此,必须规范合理的保存现有的样本,并不断丰富样本数量,以便为未来的研究提供条件。历史 DNA 作为鱼类群体遗传与进化研究的重要材料,在未来一定会有更广阔的应用。

参考文献:

- [1] Oosting T, Star B, Barrett J H, et al. Unlocking the potential of ancient fish DNA in the genomic era[J]. *Evolutionary Applications*, 2019, 12(8): 1513-1522.
- [2] Botsford L W, Castilla J C, Peterson C H. The management of fisheries and marine ecosystems[J]. *Science*, 1997, 277(5325): 509-515.
- [3] Ludwig D, Hilborn R, Walters C. Uncertainty, resource exploitation, and conservation: lessons from history[J]. *Science*, 1993, 260(5104): 17-36.
- [4] Pauly D, Christensen V, Dalsgaard J, et al. Fishing down marine food webs[J]. *Science*, 1998, 279(5352): 860-863.
- [5] FAO. The state of world fisheries and aquaculture[M]. Rome: Food and Agricultural Organisation, 2016.
- [6] Hauser L, Adcock G J, Smith P J, et al. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(18): 11742-11747.
- [7] Lage C, Kornfield I. Reduced genetic diversity and effective population size in an endangered Atlantic salmon (*Salmo salar*) population from Maine, USA[J]. *Conservation Genetics*, 2006, 7(1): 91-104.
- [8] Allendorf F W, England P R, Luikart G, et al. Genetic effects of harvest on wild animal populations[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2008, 23(6): 327-337.
- [9] Hoelzel A R, Shivji M S, Magnussen J, et al. Low worldwide genetic diversity in the basking shark (*Cetorhinus maximus*)[J]. *Biology Letters*, 2006, 2(4): 639-642.
- [10] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. Introduction to conservation genetics[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- [11] Pita A, Pérez M, Velasco F, et al. Trends of the genetic effective population size in the Southern stock of the European hake[J]. *Fisheries Research*, 2017, 191: 108-119.
- [12] Nielsen E E, Hansen M M. Waking the dead: the value of population genetic analyses of historical samples[J]. *Fish and Fisheries*, 2008, 9(4): 450-461.
- [13] Miller L M, Kapuscinski A R. Historical analysis of genetic variation reveals low effective population size in a northern pike (*Esox lucius*) population[J]. *Genetics*, 1997, 147(3): 1249-1258.
- [14] Nielsen E E, Hansen M M, Loeschcke V. Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon *Salmo salar*: a comparison of genetic composition over 60 years[J]. *Molecular Ecology*, 1997, 6(5): 487-492.
- [15] Hutchinson W. A nondestructive technique for the recovery of DNA from dried fish otoliths for subsequent molecular genetic analysis[J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 893-894.
- [16] Cao L, Chen Y, Dong S, et al. Opportunity for marine fisheries reform in China[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(3): 435-442.
- [17] Campana S E, Thorrold S R. Otoliths, increments, and elements: keys to a comprehensive understanding of fish populations?[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2001, 58(1): 30-38.
- [18] Jørgensen C, Enberg K, Dunlop E S, et al. Ecology: managing evolving fish stocks[J]. *Science*, 2007, 318(5854): 1247-1248.
- [19] Zhang L, Cui X, Schmitt K, et al. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89(13): 5847-5851.
- [20] Bi K, Linderoth T, Vanderpool D, et al. Unlocking the vault: next-generation museum population genomics[J]. *Molecular ecology*, 2013, 22(24): 6018-6032.

- [21] Binladen J, Wiuf C, Gilbert M T P, et al. Assessing the fidelity of ancient DNA sequences amplified from nuclear genes[J]. *Genetics*, 2006, 172(2): 733-741.
- [22] Hofreiter M, Jaenicke V, Serre D, et al. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(23): 4793-4799.
- [23] Lim H C, Braun M J. High-throughput SNP genotyping of historical and modern samples of five bird species via sequence capture of ultraconserved elements[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(5): 1204-1223.
- [24] Shapiroá, Hofreiter M. A paleogenomic perspective on evolution and gene function: new insights from ancient DNA[J]. *Science*, 2014, 343(6169): 1236573.
- [25] Suchan T, Pitteloud C, Gerasimova N S, et al. Hybridization capture using RAD probes (hyRAD), a new tool for performing genomic analyses on collection specimens[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151651.
- [26] Wandeler P, Hoeck P E A, Keller L F. Back to the future: museum specimens in population genetics[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2007, 22(12): 634-642.
- [27] Cuveliers E L, Bolle L J, Volckaert F A M, et al. Influence of DNA isolation from historical otoliths on nuclear-mitochondrial marker amplification and age determination in an overexploited fish, the common sole (*Solea solea* L.)[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9(3): 725-732.
- [28] Ruzzante D E, Taggart C T, Doyle R W, et al. Stability in the historical pattern of genetic structure of Newfoundland cod (*Gadus morhua*) despite the catastrophic decline in population size from 1964 to 1994[J]. *Conservation Genetics*, 2001, 2(3): 257-269.
- [29] Hoarau G, Boon E, Jongma D N, et al. Low effective population size and evidence for inbreeding in an overexploited flatfish, plaice (*Pleuronectes platessa* L.)[J]. *Proceedings Biological Sciences*, 2005, 272(1562): 497-503.
- [30] Ruggeri P, Splendiani A, Bonanimiti S, et al. Temporal genetic variation as revealed by a microsatellite analysis of European sardine (*Sardina pilchardus*) archived samples[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2012, 69(10): 1698-1709.
- [31] Ruggeri P, Splendiani A, Muri C D, et al. Coupling demographic and genetic variability from archived collections of European Anchovy (*Engraulis encrasicolus*)[J]. *Plos One*, 2016, 11(3): e0151507.
- [32] Pita A, Pérez M, Velasco F, et al. Trends of the genetic effective population size in the Southern stock of the European hake[J]. *Fisheries Research*, 2017, 191: 108-119.
- [33] Billerman S M, Walsh J. Historical DNA as a tool to address key questions in avian biology and evolution: A review of methods, challenges, applications, and future directions[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2019, 19(5): 1115-1130.
- [34] Taggart J B, Hynes R A, Prodöuhl P A, et al. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes[J]. *Journal of Fish Biology*, 1992, 40(6): 963-965.
- [35] Meldgaard T, Nielsen E E, Loeschcke V. Fragmentation by weirs in a riverine system: a study of genetic variation in time and space among populations of European grayling (*Thymallus thymallus*) in a Danish river system[J]. *Conservation Genetics*, 2003, 4(6): 735-747.
- [36] 刘倩颖, 孙立新. 陈旧标本 DNA 提取方法[J]. *中国微生态学杂志*, 2014, 26(10): 1230-1235.
Liu Qianying, Sun Lixin. Genomic DNA extraction from stale samples[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2014, 26(10): 1230-1235.
- [37] Estoup A, Largiader C, Perrot E. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1996, 5(4): 295-298.
- [38] Frake K. The Genetics of a Managed Atlantic Salmon Stock and Implications for Conservation[M]. Stirling: University of Stirling, 2007.
- [39] Yue G H, Orban L. Rapid isolation of DNA from fresh and preserved fish scales for polymerase chain reaction[J]. *Marine Biotechnology*, 2001, 3(3): 199-204.
- [40] Nielsen E E, MacKenzie B R, Magnussen E, et al. Historical analysis of Pan I in Atlantic cod (*Gadus morhua*): temporal stability of allele frequencies in the southeastern part of the species distribution[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2007, 64(10): 1448-1455.
- [41] Hung C M, Lin R C, Chu J H, et al. The de novo assembly of mitochondrial genomes of the extinct passenger pigeon (*Ectopistes migratorius*) with next generation sequencing[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56301.
- [42] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA) n-(dG-dT) n polymorphisms[J]. *Genomics*, 1990, 7(4): 524-530.
- [43] Smith M J, Pascal C E, Grauvogel Z, et al. Multiplex preamplification PCR and microsatellite validation enables accurate single nucleotide polymorphism genotyping of historical fish scales[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2011, 11(s1): 268-277.
- [44] Ciborowski K L, Consuegra S, De Leániz C G, et al. Stocking may increase mitochondrial DNA diversity but fails to halt the decline of endangered Atlantic salmon populations[J]. *Conservation Genetics*, 2007, 8(6): 1355-1367.
- [45] Cuveliers E L, Volckaert F A M, Rijnsdorp A D, et al. Temporal genetic stability and high effective population size despite fisheries-induced life-history trait evolution

- in the North Sea sole[J]. *Molecular Ecology*, 2011, 20(17): 3555-3568.
- [46] Ekblom R, Wolf J B W. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation[J]. *Evolutionary Applications*, 2014, 7(9): 1026-1042.
- [47] Gasc C, Peyretailade E, Peyret P. Sequence capture by hybridization to explore modern and ancient genomic diversity in model and nonmodel organisms[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(10): 4504-4518.
- [48] Jacobsen M W, Christensen C, Madsen R, et al. Single nucleotide polymorphism markers for analysis of historical and contemporary samples of Arctic char (*Salvelinus alpinus*)[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2017, 9(4): 587-589.
- [49] Christensen C, Jacobsen M W, Nygaard R, et al. Spatiotemporal genetic structure of anadromous Arctic char (*Salvelinus alpinus*) populations in a region experiencing pronounced climate change[J]. *Conservation Genetics*, 2018, 19(3): 687-700.
- [50] Kenchington E, Heino M, Nielsen E E. Managing marine genetic diversity: time for action?[J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2003, 60(6): 1172-1176.
- [51] Allendorf F W, Berry O, Ryman N. So long to genetic diversity, and thanks for all the fish[J]. *Molecular Ecology*, 2014, 23(1): 23-25.
- [52] Pinsky M L, Palumbi S R. Meta-analysis reveals lower genetic diversity in overfished populations[J]. *Molecular Ecology*, 2014, 23(1): 29-39.
- [53] Hoelzel A R, Fleischer R C, Campagna C, et al. Impact of a population bottleneck on symmetry and genetic diversity in the northern elephant seal[J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 2002, 15(4): 567-575.
- [54] Säisä M, Koljonen M L, Tähtinen J. Genetic changes in Atlantic salmon stocks since historical times and the effective population size of a long-term captive breeding programme[J]. *Conservation Genetics*, 2003, 4(5): 613-627.
- [55] Eldridge W H, Myers J M, Naish K A. Long-term changes in the fine-scale population structure of coho salmon populations (*Oncorhynchus kisutch*) subject to extensive supportive breeding[J]. *Heredity*, 2009, 103(4): 299-309.
- [56] Tessier N, Bernatchez L, Wright J M. Population structure and impact of supportive breeding inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses in land-locked Atlantic salmon *Salmo salar* L.[J]. *Molecular Ecology*, 1997, 6(8): 735-750.
- [57] Østergaard S, Hansen M M, Loeschcke V, et al. Long-term temporal changes of genetic composition in brown trout (*Salmo trutta* L.) populations inhabiting an unstable environment[J]. *Molecular Ecology*, 2003, 12(11): 3123-3135.
- [58] Poulsen N A, Hemmer-Hansen J, Loeschcke V, et al. Microgeographical population structure and adaptation in Atlantic cod *Gadus morhua*: spatio-temporal insights from gene-associated DNA markers[J]. *Marine Ecology Progress*, 2011, 436(9): 231-243.
- [59] Hansen M M, Fraser D J, Meier K, et al. Sixty years of anthropogenic pressure: a spatio-temporal genetic analysis of brown trout populations subject to stocking and population declines[J]. *Molecular Ecology*, 2009, 18(12): 2549-2562.
- [60] Stockwell C A, Hendry A P, Kinnison M T. Contemporary evolution meets conservation biology[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2003, 18(2): 94-101.
- [61] Hansen M M, Skaala O, Jensen L F, et al. Gene flow, effective population size and selection at major histocompatibility complex genes: brown trout in the Hardanger Fjord, Norway[J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(7): 1413-1425.
- [62] Billington N, Hebert P D N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1991, 48(S1): 80-94.
- [63] Campbell D, Duchesne P, Bernatchez L. AFLP utility for population assignment studies: analytical investigation and empirical comparison with microsatellites[J]. *Molecular Ecology*, 2003, 12(7): 1979-1991.
- [64] Jarne P, Lagoda P J L. Microsatellites, from molecules to populations and back[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 1996, 11(10): 424-429.
- [65] Jensen L F, Hansen M M, Mensberg K D, et al. Spatially and temporally fluctuating selection at non-MHC immune genes: evidence from TAP polymorphism in populations of brown trout (*Salmo trutta* L.)[J]. *Heredity*, 2008, 100(1): 79-91.

Application of historical DNA in study of fish population genetics and evolution

XU Zhe^{1, 2, 3, 4}, LIU Jin-xian^{1, 2, 3}

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China; 3. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Jan. 20, 2020

Key words: Otolith; scale; historical DNA; population genetics; evolution

Abstract: Historical otoliths and scales constitute a valuable source of genetic information in the form of the DNA record spanning decades and even centuries, which potentially enables extension of the temporal scale of genetic and evolutionary studies of fish populations. Thus, historical DNA could directly reflect the influence of human activities on genetic diversity and adaptive evolution of fish. In recent decades, with advances in high-throughput sequencing technologies, historical otoliths and scales have been used as sources of genomic data, which provides extensive genetic data. Nevertheless, population genetic studies conducted on historical DNA remain a challenge. This is primarily due to the high level of DNA degradation and exogenous DNA contamination of historical DNA. Here, we review the DNA extraction protocols and genotyping technologies applied to historical otoliths and scales which could help researchers to plan their studies using historical specimens. In addition, we reviewed hot topics in fish population genetics and evolution with historical samples. Increasing accessibility to new technologies will provide researchers with more abundant genetic information from historical DNA. As an effective tool, historical DNA will provide new ideas and evidence for the study of fish population genetics and evolution, which will certainly have a broader application in the future.

(本文编辑: 谭雪静)