

呼玛河哲罗鱼遗传多样性的 AFLP 分析

匡友谊^{1,2}, 佟广香¹, 尹家胜¹, 梁利群¹, 孙效文¹, 马波¹

(1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 大连水产学院, 辽宁 大连 116023)

摘要:2002年4月在黑龙江水系呼玛河塔河河段100 km范围内,用三刺网捕获索饵洄游哲罗鱼(*Hucho taimen* Pallas)个体20尾,用12对引物对其进行AFLP分析,每对引物组合扩增的位点在39~53之间,共扩增出了565个位点,多态性位点为477个,多态性比例为84.43%,平均Nei氏基因多样性指数 H 为0.3867,平均Shannon氏指数 I 为0.5102,个体间平均遗传距离为0.4552,UPGMA聚类结果显示呼玛河水系哲罗鱼群体内有严重的近亲交配现象。研究结果表明呼玛河水系哲罗鱼具有适度的遗传多样性,这对呼玛河水系哲罗鱼资源量的恢复有着至关重要的作用。[中国水产科学,2007,14(4):615-621]

关键词:哲罗鱼;AFLP;遗传多样性

中图分类号:Q959.466

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2007)04-0615-07

哲罗鱼(*Hucho taimen* Pallas)是鲑科鱼类中个体最大的种类^[1],是中国特有的名贵鲑科鱼类。20世纪60年代,哲罗鱼在中国分布较广,在黑龙江流域的牡丹江、松花江、乌苏里江、黑龙江及额尔齐斯河水系的布尔津河、哈巴河、喀拉额尔齐斯河、哈纳斯湖中都有较大的渔获量^[2-5]。由于近几十年自然环境的恶化、捕捞强度的增大,使哲罗鱼资源遭到了严重的破坏,加之哲罗鱼个体大、性成熟晚、个体产卵量小的生物学特性使其群体的恢复能力较差^[1,6-7],导致群体数量急剧下降,分布区迅速缩小。到目前为止,哲罗鱼仅在黑龙江上游的支流呼玛河、乌苏里江、以及新疆的哈纳斯湖存在极小的繁殖群体,其他水域已十分罕见^[4,7],因而被中国列为濒危物种^[8]。因此,充分认识哲罗鱼的种群遗传结构、遗传多样性现状等,对今后进行保护与持续利用具有重要意义。

已有学者利用同工酶方法或通过线粒体序列比对对哲罗鱼的进化关系进行了研究^[9-11],也在近缘种远东哲罗鱼(*Hucho perryi*)中获得部分微卫星分子标记^[12],但对哲罗鱼遗传多样性方面的研究较少,仅有应用同工酶和微卫星技术对乌苏里江虎头江段哲罗鱼群体进行遗传多样性研究的报道^[13-15]。而且同工酶和可利用的微卫星标记的位点数相对较少,

无法全面评价哲罗鱼基因频率和遗传结构。在对呼玛河水系哲罗鱼群体的研究上,仅有洪兴^[16]、董崇智等^[7]初步调查了哲罗鱼在呼玛河自然保护区的分布及栖息区域的变化,调查结果表明,呼玛河哲罗鱼野生种群数量极少,年捕捞量100~200条,主要分布于呼玛河中游。梁利群等^[13]利用6对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)微卫星标记分析了乌苏里江虎头江段哲罗鱼群体的遗传多样性。

DNA扩增片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism of DNA,简称AFLP)技术是一种高容量标记技术^[17],能利用其揭示生物种间和种内的遗传差异^[18]。本实验利用AFLP技术对呼玛河水系哲罗鱼群体的遗传多样性进行了研究,以期对呼玛河哲罗鱼的种质保护、人工选育提供技术支持,同时为建立哲罗鱼种质资源库积累一定的科学数据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

2002年4月,在黑龙江水系的呼玛河塔河河段100 km范围内,采集用三刺网捕获的索饵洄游哲罗鱼个体,剪取20尾鳍条,放入无水乙醇中固定保存。

收稿日期:2006-09-04; 修订日期:2007-01-04.

基金项目:国家“973”计划项目(2004CB117405);国家“十五”科技攻关计划项目(2004BA526B0116)。

作者简介:匡友谊(1980-),男,助理研究员,硕士研究生,从事鱼类种质资源研究。E-mail: tong2200@gmail.com

通讯作者:孙效文。Tel: 0451-84842646; E-mail: Sunxw2002@163.com

1.2 基因组 DNA 的提取及纯度的检测

将保存在无水乙醇中的鳍条样品在超纯水中反复清洗3次,室温晾干使乙醇完全挥发。提取方法见参考文献[15]。经紫外分光光度计在230 nm、260 nm和280 nm波长下测定其浓度和纯度,并用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。然后,将DNA稀释至100 ng/ μ L, -20℃存放备用。

1.3 AFLP 实验方法

1.3.1 基因组 DNA 酶切 用限制性内切酶 *Eco*RI (切点 G/AATTC) 和 *Tru*9I (切点 T/TAA) 双酶切。每个样品酶切体系如下: DNA 模板 (100 ng/ μ L) 2 μ L, 10×buffer 1 μ L, BSA (10 ng/ μ L) 0.1 μ L, *Eco*RI (12 U/ μ L) 0.4 μ L, 加入超纯水补足至 10 μ L, 37℃保温4h后加入 10×Buffer 1.5 μ L, BSA (10 ng/ μ L) 0.15 μ L, *Tru*9I (10 U/ μ L) 0.45 μ L, 加超纯水补足至 15 μ L, 68℃保温4h。用酚、氯仿、异戊醇 (体积比为 25:24:1) 抽提2次, -20℃预冷的无水乙醇沉淀, 12 000 r/min 离心, -20℃预冷的70%乙醇冲洗1次, 室温干燥后, 10 μ L 0.1TE 溶解, 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.2 接头制备及连接 用单链寡核苷酸制备接头, *Eco*RI 接头序列为: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3', 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'; *Tru*9I 接头序列: 5'-GACGATGAGTCTCTGAG-3', 5'-TACTCAGGACTCTA-3'。混合每两组寡核苷酸, 使 *Eco*RI 接头序列终浓度为 5 pmol/ μ L, *Tru*9I 接头序列终浓度为 50 pmol/ μ L。95℃变性10 min, 然后经过4h缓慢冷却至10℃, 最终形成双链接头。

建立20 μ L的连接体系, 其中包含5 μ L酶切产物, 1 μ L *Eco*RI 接头, 1 μ L *Tru*9I 接头, 6 μ L T4 DNA 连接酶 (Promega, USA), 超纯水补足至20 μ L 于4℃水浴中连接过夜。

1.3.3 PCR 扩增 预扩增引物为 E+A (5'-GACT-GCGTACCAATTC + A-3') 和 T+C (5'-GTA-GAGTCCTGAGTAA + C-3'), 建立25 μ L反应体系, 其中包括3 μ L连接产物, 引物 E+A 1 μ L, T+C 1 μ L, 10×Buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.3~1.9 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, 5 U/ μ L *Taq* 聚合酶 0.3 μ L, 无菌超纯水补足25 μ L。反应程序为: 72℃ 2 min, 94℃预变性2 min, 循环设置为: 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30个循环, 最后72℃延伸10 min。

选择性扩增引物组合如表1所示。建立25 μ L反应体系, 其中含有3 μ L预扩增产物, 引物 E 1 μ L, 引物 M 1 μ L, 10×Buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.3~1.9 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, 5 U/ μ L *Taq* 聚合酶 0.3 μ L, 无菌超纯水补足至25 μ L。反应条件为: 72℃ 2 min, 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 90 s, 1个循环; 94℃ 30 s, 退火30 s, 72℃ 90 s, 12个循环, 每个循环的退火温度从65℃开始逐次降0.7℃; 然后, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 90 s, 25个循环; 最后72℃延伸10 min。

1.3.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳 反应完毕后, 扩增片段用8%非变性聚丙烯酰胺 (丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺体积比为29:1) 凝胶电泳8~12 h (120 V), 银染^[19], 利用扫描仪成像。

1.4 数据处理

用 Gel-pro4.5 软件 (Media Cybernetics, USA) 分析获得的 AFLP 电泳图谱, 根据标准 GeneRuler™100 bp DNA Ladder 计算扩增片段的大小。假定凝胶上迁移位置相同的所有条带均来自同一位点上的同一等位基因, 按电泳图上带的有无, 转化为0、1矩阵 (1表示出现扩增条带, 0表示未出现扩增条带), 统计位点总数和多态性位点比例, 绘制DNA指纹图。利用 Popgene1.32^[20] 版软件计算等位基因频率, Nei氏基因多样性指数和 Shannon 氏指数^[21-24]。利用公式 $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ ^[25] 计算个体之间的遗传相似性系数 (N_{xy} 为 x 个体和 y 个体所共有的位点数目, N_x 、 N_y 分别为 x 个体和 y 个体分别具有的位点数目), 用公式 $D = 1 - S$ 计算个体之间的遗传距离。用 Phlip3.6 版软件^[24] 和 MEGA3 (<http://www.megasoftware.net/>) 进行个体聚类分析, bootstrap 抽样5 000次。

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度和纯度的检测及双酶切

经紫外分光光度计测定, 其 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 比值大于2.0, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在1.8左右, 随机抽取13个个体的DNA用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示提取的DNA为一条清晰完整的带, DNA质量符合 AFLP 分析要求 (图1)。限制性内切酶 *Eco*RI (切点 G/AATTC) 和 *Tru*9I (切点 T/TAA) 双酶切 DNA 电泳图如图2所示。

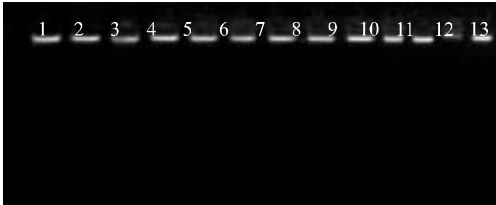


图 1 呼玛河哲罗鱼基因组 DNA 电泳图
1~13:基因组 DNA 样品

Fig.1 Electrophoresis profiles of genome DNA of taimen in Huma River
1 – 13: genome DNA samples

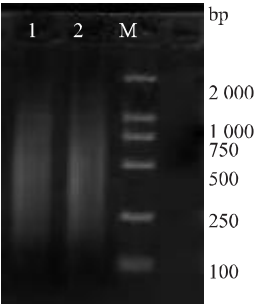


图 2 呼玛河哲罗鱼基因组 DNA 双酶切结果
M: 分子量标准;1,2:DNA 酶切产物

Fig.2 Map of genome DNA of taimen in Huma River by restrict enzyme cutting
M: Molecular Marker; 1,2: DNA digested products

表 1 呼玛河哲罗鱼遗传多样性的 AFLP 扩增结果及遗传多样性分析

Tab.1 Amplification with AFLP primers and genetic diversity analysis of *H. taimen* in Huma River

引物组合 Primer combination	选择碱基 Selective base	扩增位点数 Amplified loci	多态性位点数 Polymorphic loci	多态性位点百分率 Ratio of polymorphic loci	Nei 氏基因 多样性指数 <i>H</i>	Shannon 氏指数 <i>I</i>
1 / 2	E + AGC / T + CAC	53	42	79.25	0.391 1	0.533 7
3 / 4	E + ACA / T + CTT	58	49	81.67	0.392 8	0.553 5
4 / 2	E + AAG / T + CAC	42	34	84.48	0.365 3	0.539 2
4 / 5	E + AAG / T + CTG	47	33	70.21	0.343 8	0.449 4
4 / 8	E + AAG / T + CTC	43	39	90.70	0.414 1	0.609 8
6 / 1	E + ACG / T + CTA	52	40	84.00	0.438 3	0.535 6
6 / 6	E + ACG / T + CAT	42	36	85.71	0.387 9	0.463 1
6 / 7	E + ACG / T + CAG	45	41	91.11	0.365 1	0.486 5
6 / 8	E + ACG / T + CTC	46	39	84.78	0.391 6	0.537 2
8 / 5	E + AAC / T + CTG	50	46	92.00	0.381 0	0.519 0
4 / 1	E + AAG / T + CTA	48	44	91.67	0.409 9	0.479 6
3 / 3	E + ACA / T + CAA	39	34	87.18	0.359 6	0.415 6
平均 Mean		47.08	39.75	88.39	0.386 7	0.510 2

2.2 AFLP 扩增结果

用 12 个引物组合分别对呼玛河哲罗鱼群体 20 个个体进行 AFLP 扩增,共扩增出 565 个位点,每个引物组合扩增的位点数在 39~53 之间,平均扩增位点 47.08 个。多态性位点 477 个,多态性比例为 84.43%,平均每个引物组合多态性位点数目为 39.75。各引物组合所扩增的位点数及多态性位点数差异较大 ($P<0.05$),其中 3/4 引物组合多态性

位点最多,为 49 个,4/5 引物组合最少,为 33 个;各引物组合的多态性比例相差也较大 ($P<0.05$),4/5 引物组合多态位点的比例最小,为 70.21%;8/5 引物组合多态位点的比例最大,为 92.00% (表 1)。图 3 为 3/3 引物的扩增结果,由图 3 可知引物扩增的片段主要分布于 80~700 bp,其中多态性片段主要分布 100~400 bp。

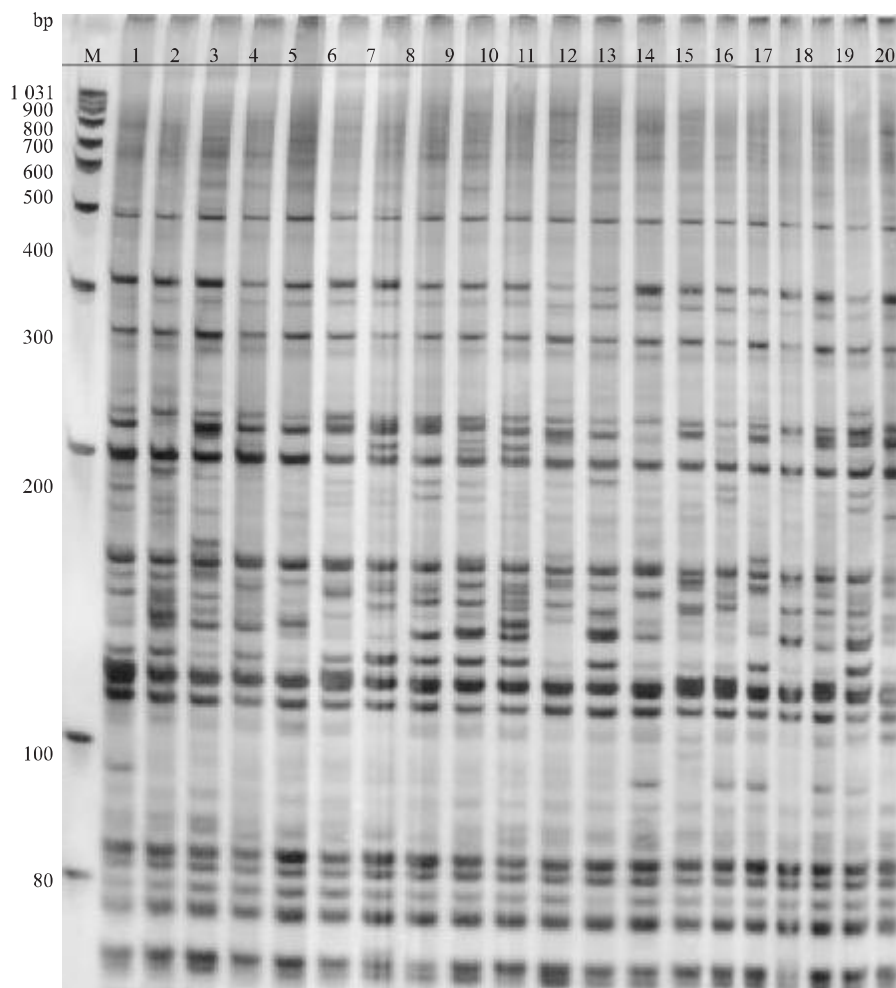


图3 引物组合3/3在呼玛河哲罗鱼群体的扩增图谱

M: 分子量标准;1~20: 样本个体.

Fig.3 Map of *H. taimen* population in Human River amplified with primer combination 3/3

M: Molecular; 1~20: Sample individuals.

2.3 遗传多样性分析

在 Hardy-Weinberg 平衡假设的前提下, 计算 AFLP 扩增位点的基因频率在 0.05~0.95 之间, 其中基因频率小于 0.1 的稀有基因 13 个, 占总位点总数的 2.30%, 基因频率大于等于 0.9 的绝对优势基因为 12 个, 占总位点总数的 2.12%。个体之间的 Nei 氏基因多样性指数 H 在 0.095 0~0.500 0 之间变动, 平均值为 0.386 7。Shannon 氏指数 I 在 0.118 1~0.693 1 之间, 平均值为 0.510 2 (表 1), 各引物组合的基因多样性指数和 Shannon 氏指数 I 差异不大 ($P>0.05$)。

2.4 遗传距离及聚类分析结果

对呼玛河哲罗鱼 20 个个体之间的遗传距离及

遗传相似性进行矩阵分析, 可知个体之间的遗传相似性最小为 0.349 1, 最大为 0.764 3, 平均遗传相似性系数为 0.544 8; 遗传距离在 0.235 7~0.650 9 之间, 平均遗传距离为 0.455 2。

图 4 是经过 Bootstrap 5 000 次抽样得到的呼玛河哲罗鱼 20 个个体的 UPGMA 聚类图。可以看出 20 个个体明显地聚类为 a、b 2 部分, 在 a 部分里, ind18、ind17、ind14、ind15 和 ind16 显著聚为一类 c, 具有较高的 Bootstrap 值 (>0.67), 表明 c 枝的这几个个体遗传相似性较高, 具有较近的亲缘关系, 特别是 ind14 和 ind15 (Bootstrap 值 >0.97)、ind17 和 ind18 (Bootstrap 值 >0.87) 具有很近的亲缘关系; 在 b 部分里, ind5 和 ind7、ind2 和 ind4 具有较高的

Bootstrap 值(>0.4),表明 ind5 和 ind7、ind2 和 ind4 与 b 部分中的其他个体相比亲缘关系较近。

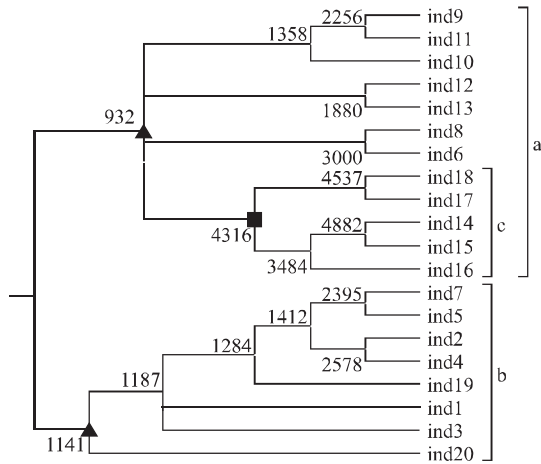


图4 呼玛河哲罗鱼个体 UPGMA 聚类图

注:节点处数字表示 Bootstrap 值

Fig.4 Individuals' UPGMA dendrogram of *H. taimen* population in Huma River

Note: Numbers at branch node donate bootstrap levels

3 讨论

3.1 AFLP 分子标记在哲罗鱼遗传多样性研究中的优越性

AFLP 是 RFLP 和 PCR 的结合,既有 RFLP 可靠性,又有 PCR 的高效性。AFLP 分析可以采用的限制性内切酶及选择性碱基的种类、数目很多,因此理论上能产生的标记数目是巨大的。另外,典型的 AFLP 反应在聚丙烯酰胺凝胶上可检测到 50~100 个扩增产物,甚至可以检测出品种之间 1 个碱基对的差异,能比较全面地揭示不同物种种质资源的遗传特征,非常适用于亲缘关系较近的材料遗传多样性研究^[26]。在 AFLP 分析中,每一条扩增带对应着 DNA 分子上的一个位点。多态性扩增带的出现则意味着样品 DNA 分子在该位点上存在变异,这种变异的原因是突变、插入、缺失或颠换引起的酶切位点的变化。本研究中平均每对引物扩增 47.08 个位点,检测出 477 个多态位点,多态位点率为 84.43%,说明在被检测的位点中有 84.43% 的位点存在变异。这种检测的灵敏度和效率是以往任何一种检测技术所难以比拟的。因此,可以认为 AFLP 技术是目前哲罗鱼基因型检测和遗传多样性分析效率较高的一种。

3.2 哲罗鱼种质资源遗传多样性

遗传多样性主要是指物种内的不同种群间以及种群内不同个体之间的遗传变异,是生物进化的内在源泉,与物种的繁衍或濒危灭绝有密切的关系。遗传多样性在一定程度上决定了物种的分布以及数量多样性,如缺乏对生物遗传多样性的深入研究,就无法完整地认识物种的进化过程或适应机理、以及种群地理分布格局、数量增长及有害生物的检测和防治等问题^[27]。目前哲罗鱼的遗传多样性的研究仅有同工酶和微卫星方面的相关报道^[13-15]。本研究采用 AFLP 方法对哲罗鱼的遗传多样性进行了分析,在检测到的 565 个位点中,基因频率小于 0.1 的稀有基因 13 个,占总位点总数的 2.30%,这可能与哲罗鱼处于濒危状态有着直接的联系。呼玛河哲罗鱼群体基因频率的剧烈变动,与其特殊的生态类型及外界环境的剧烈变动有关,哲罗鱼在物种进化过程中的生态类型为 k 型^[1],k 型选择者一般个体大、成熟晚、繁殖力低、寿命长,处于食物链的高层,种群的恢复能力低,很容易面临濒危甚至灭绝^[28]。哲罗鱼符合上述特征,且为隔年产卵^[1,6],当种群过度死亡后,这种特殊的生态类型直接导致了哲罗鱼处于濒危状况;外界环境的剧烈变动则是哲罗鱼种群过度死亡的直接因素,近几十年来,哲罗鱼繁衍栖息地的森林植被急剧减少,水体污染严重,产卵场环境被破坏及捕捞量增大,这些原因导致了群体的数量急剧下降,繁殖群体日益减少^[6-7],由此导致近亲交配机率增加,使种群恢复更加困难。由于上述两种因素的综合作用,使哲罗鱼种群的基因频率剧烈变动,群体遗传结构趋向单一化,稀有基因逐渐减少^[17]。

梁利群等^[13]利用虹鳟微卫星标记研究了乌苏里江虎头江段的哲罗鱼遗传多样性,结果表明虎头江段哲罗鱼群体的平均 Nei 氏基因多样性指数为 0.498 0,平均 PIC 为 0.417 8,该江段哲罗鱼群体的遗传多样性处于中等偏下水平。本研究平均 Nei 氏基因多样性指数 *H* 为 0.386 7,Shannon 氏指数 *I* 在 0.118 1~0.693 1 之间,平均为 0.510 2,表明呼玛河哲罗鱼的遗传多样性处于中等水平。呼玛河哲罗鱼较为丰富的遗传多样性,对于黑龙江流域哲罗鱼资源量的恢复起着关键的作用,因此对呼玛河哲罗鱼遗传多样性的保护非常必要。

根据呼玛河哲罗鱼群体的 AFLP 遗传距离及遗传相似性矩阵分析,可知平均遗传距离为 0.455 2,

表明呼玛河哲罗鱼群体的遗传分化较大。从群体UPGMA聚类分析图也可以看出,群体明显的聚类为a、b两个部分,而在a、b两个部分里,都分别有部分个体聚类成紧密的分支,具有较强的遗传相似性和亲缘关系,说明呼玛河水系的哲罗鱼可能已经发生了较强的近亲交配行为。近年来自然环境的日益恶化引起了哲罗鱼栖息地和产卵场消失或缩小,及捕捞强度的加大,使呼玛河水系哲罗鱼种群数量迅速下降,特别是繁殖群体数量减少,导致了这一现象的发生^[4-5,7,16]。呼玛河哲罗鱼种群数量较小^[7,16],群体有亲缘关系很近的个体,这种现象也可能与哲罗鱼特殊的繁殖习性相关,鱼类中很多种类如大多数鲤科鱼类和鲑科鱼类中的大麻哈鱼等都是进行群体产卵,不同类型的亲本个体之间基因交流较多,使得个体之间具有较大的遗传变异;而哲罗鱼是成对产卵,具有排它性,在数十米的江段中通常只有一对亲鱼交配产卵^[1,6-7],不同类型的亲本之间基因交流较少,且繁殖群体数量较少,两相同亲本或同胞间配对繁殖的几率增加,客观上增加了群体内个体之间的遗传相似度。呼玛河水系哲罗鱼近亲交配严重,可能会造群体的种质退化,甚至造成群体的消失,这是一个很不利的因素,这就要求应加强对呼玛河水系哲罗鱼的栖息地及产卵场详细的调查,并在此基础上进行人为的繁殖群体的交流。

研究结果表明呼玛河水系哲罗鱼处于濒危状态并不是群体遗传多样性低造成的,但是哲罗鱼群体数量日益减少很难避免近亲交配,致使遗传多样性急剧下降,物种濒临灭绝,可见开展哲罗鱼的保护工作刻不容缓。呼玛河自然保护区的建立对呼玛河水系哲罗鱼资源的保护有重要的作用,但是呼玛河水系哲罗鱼资源量仍处于下降的状态^[7,16],因此有必要对其进行加强管理。哲罗鱼原种场的建立也是对哲罗鱼种质资源保护的重要措施。一方面可以保护哲罗鱼的遗传多样性;另一方面,可以利用分子生物学手段,选择杂合度高和亲缘关系较远的群体进行交配繁殖,进而进行人工放流,这样既可以增加哲罗鱼的自然资源,又避免了近亲交配所引起的遗传瓶颈效应,以期恢复哲罗鱼的资源量。呼玛河自然保护区哲罗鱼具有适度的DNA遗传多样性水平,为该群体的长期生存与发展奠定了基础,更多的具有不同遗传变异的个体应该被迁入保护区,以形成更大的群体,为获得更好的群体遗传结构提供前提。

参考文献:

- [1] Holcik J, Hensel K, Nieslanik J, et al. The Eurasian Huchen *Hucho hucho*: Largest Salmon of the World[M]. Hingham (USA), Kluwer Academic Publishers, 1988: 1-131.
- [2] 王清印, 徐来宁, 杨宁生. 中国水产生物种质资源与利用[M]. 北京: 海洋出版社, 2005: 64-70.
- [3] 李思忠. 新疆北部鱼类的调查[J]. 动物学报, 1966, 18(1): 41-56.
- [4] 任慕莲, 郭焱, 张秀善, 等. 中国额尔齐斯河鱼类资源及渔业[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 2002: 58-63.
- [5] 张觉民. 黑龙江省鱼类志[M]. 哈尔滨: 黑龙江科技出版社, 1995: 34-36.
- [6] 尹家胜, 徐伟, 曹鼎臣, 等. 乌苏里江哲罗鲑的年龄结构性比和生长[J]. 动物学报, 2003, 49: 687-692.
- [7] 董崇智, 李怀明, 赵春刚, 等. 濒危名贵哲罗鱼保护生物学的研究[J]. 1998b, 11: 34-39.
- [8] 乐佩琦, 陈宜瑜. 中国濒危动物(鱼类)红皮书[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 29-31.
- [9] Froufe E, Alekseyev S, Knizhin I, et al. Comparative phylogeography of salmonid fishes (Salmonidae) reveals late to post-Pleistocene exchange between three now disjunctive river basins in Siberia[J]. Divers Distrib, 2003, 9: 269-282.
- [10] Froufe E, Alekseyev S, Knizhin I, et al. Comparative mtDNA sequence (control region, ATPase 6 and NADH-1) divergence in *Hucho taimen* (Pallas) across four Siberian river basins[J]. Fish Biol, 2005, 67: 1 040-1 053.
- [11] Osinov A G, Lebedev V S. Genetic divergence and phylogeny of the Salmoninae based on allozyme data[J]. Fish Biol, 2000, 57: 354-381.
- [12] Makoto H, Tomohisa W, Minoru I, et al. Isolation and characterization of microsatellite DNA loci for endangered fish, Japanese huchen (*Hucho perryi*) [J]. Mol Ecol Notes, 2005, 5(4): 893-896.
- [13] 梁利群, 常玉梅, 董崇智, 等. 微卫星DNA标记对乌苏里江哲罗鱼遗传多样性的分析[J]. 水产学报, 2004, 28: 241-244.
- [14] 马波, 姜作发, 尹家胜. 哲罗鱼几种同工酶表型的初步研究[J]. 水产学杂志, 2003, (1): 23-25.
- [15] 佟广香, 鲁翠云, 匡友谊, 等. 哲罗鱼基因组微卫星富集文库的构建与分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(2): 26-30.
- [16] 洪兴. 哲罗鱼在呼玛河自然保护区的分布及变化[J]. 黑龙江水产, 2003(2): 97.
- [17] 万俊芬, 包振民, 汪小龙, 等. 亲本数目对鲍养殖群体 AFLP 标记位点及其遗传结构的影响[J]. 水产学报, 2004, 28(2): 127-132.
- [18] 张俊彬, 黄良民. 紫红笛鲷遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 热带海洋学报, 2004, 23(5): 50-55.
- [19] 曲鲁江, 李显耀, 杜志强, 等. 微卫星 PCR 产物变性与非变性 PAGE-银染检测方法的比较[J]. 遗传, 2004, 26(4): 522-524.
- [20] Yeh F C, Boyle T J B. Population genetic analysis of co-dominant

- and dominant markers and quantitative traits [J]. *Belgian Botany*, 1997, 129: 157.
- [21] 夏军红, 郑劲松, 魏卓, 等. 天鹅洲保护区长江江豚 AFLP 遗传多样性分析 [J]. *高技术通讯*, 2004, 7: 25–28.
- [22] 李文革, 顾万春, 周世良. 蒙古栎天然群体遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. *林业科学*, 2003, 39 (5): 29–36.
- [23] 岳志芹, 王伟继, 孔杰. 用 AFLP 方法分析中国对虾抗病选育群体的遗传变异 [J]. *水产学报*, 2005, 29 (1): 13–19.
- [24] Muluvi G M, Sprent J I, Soranzo N, et. al. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa Oleifera* Lam [J]. *Mol Ecol*, 1999, 8: 463–470.
- [25] 刘必谦, 董闻琦, 王亚军, 等. 岱衢族大黄鱼种质的 AFLP 分析 [J]. *水生生物学报*, 2005, 29 (4): 413–416.
- [26] Vos P, Hogers R, Bleeker M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 4 407–4 414.
- [27] 陈灵芝, 马克平. 生物多样性科学: 原理与实践 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 93–123.
- [28] 殷名称. 鱼类生态学 [M]. 北京: 农业出版社, 1995: 204–206.

AFLP analysis of genetic diversity of *Hucho taimen* in Huma River

KUANG You-yi^{1,2}, TONG Guang-xiang¹, YIN Jia-sheng¹, LIANG Li-qun¹, SUN Xiao-wen¹, MA Bo¹

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 2. Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: *Hucho taimen* is the biggest salmonid species and endemic to cold water systems around China, especially widely distributed in Amur Basin and water systems in Xinjiang Autonomous Region in 1960s. In the recent decades, the census size of the whole populations has dramatically decreased and its habitat has become narrow, resulting from habitat damage, overfishing and climate change as well as its propagating characteristics of later maturity and weak fecundity. In order to protect this precious species, *Hucho taimen* has been listed in Red Book as endangered fish species in China since 1998. Additionally, some researchers not only evaluated the current status of its habitats but made some progresses on evolution, genetic diversity and population structure using biological methods. Huma River, a branch of Amur River, was authorized to nature protection region for *Hucho taimen*. However, documents about population structure and genetic diversity of *H. taimen* in Huma River are very limited. Amplified fragment length polymorphism of DNA (AFLP) is a kind of molecular markers famous for its higher sensitivity and capability. In our study, we use 12 primer pairs to amplify genomic DNA samples from 20 wild individuals captured in Huma River with AFLP method. As a result, a total number of loci detected are 565 with 39–53 loci per primer pair. Of the 565 loci, 477 loci are polymorphic and the percentage of polymorphisms is 84.43%. The mean Nei's genetic diversity index (H) is 0.3867, the mean Shannon's information index (I) is 0.5102, showing a relative higher genetic polymorphism. The mean genetic distance among individuals is 0.4552. UPGMA dendrogram shows that 20 individuals are divided into two groups. It is noteworthy that the phylogenetic tree also demonstrates that there is serious inbreeding within taimen population, which is a disadvantageous factor for stock enhancement. Although the genetic diversity of taimen in Huma River is moderate based on our results, the inbreeding degeneration cannot be ignored. And further more it is necessary to investigate the habitat and spawning sites of *H. taimen* in detail. In this case, the chances of propagation for individuals from different genetic backgrounds will be increased by human's intervention, which will play a vital role for population recovering. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (4): 615–621]

Key words: *Hucho taimen* Pallas; AFLP; genetic diversity

Corresponding author: SUN Xiao-wen. E-mail: Sunxw2002@163.com