

## 黑龙江流域哲罗鲑的遗传结构分析

匡友谊, 佟广香, 徐伟, 孙效文, 尹家胜

(中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

**摘要:** 哲罗鲑(*Hucho taimen*)是中国土著濒危鱼类, 仅黑龙江和新疆存在极小的繁殖群体, 本研究利用 17 对微卫星分子标记对黑龙江流域哲罗鲑 4 个野生群体的遗传结构现状进行了分析。结果表明, 黑龙江流域哲罗鲑野生群体具有中等水平的遗传多样性, 其遗传多样性水平与种群数量具有相关性, 呈逐年下降的趋势。遗传结构分析表明, 群体间遗传分化显著, 黑龙江流域哲罗鲑分化为 2 个遗传类型, HM 遗传类型和 WSL 遗传类型, 且 WSL 类型群体出现了进一步亚分化。黑龙江流域哲罗鲑各群体具有较小的有效群体, 造成了各群体较大的近交压力。较小的有效群体主要是由于群体数量的变化及遗传瓶颈造成的。对黑龙江流域哲罗鲑野生群体近期和长期基因流检测发现, 各群体间基因流不一致, 迁入和迁出率不对称, 表现为大群体向小群体流动。以上分析结果表明, 环境的变迁、群体数量的下降等已造成黑龙江流域哲罗鲑遗传多样性的降低、遗传结构的分化, 并导致了较小的有效群体数量, 且对群体间基因流造成了障碍。本研究旨在为制定哲罗鲑的遗传保护措施提供基础科学依据。  
[中国水产科学, 2010, 17(6): 1208-1217]

**关键词:** 哲罗鲑; 遗传结构; 基因流; 遗传瓶颈; 有效群体

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)06-1208-10

物种的濒危现象是由生态和遗传进化两方面因素的综合作用引起的, 生态因素主要是指环境变动引起群体结构、生活史的变化, 栖息地毁损, 产卵场消失及过渡捕捞导致的群体数量的急剧减少; 遗传进化因素主要包括遗传多样性的衰退、遗传结构的不稳定性及近交等因素<sup>[1]</sup>。因此对群体遗传多样性和遗传结构的研究是物种保护的一个重要方面<sup>[2]</sup>。在群体遗传多样性及遗传结构的研究中, 群体的近交压力、基因流、有效群体大小、遗传组成等是研究的重要内容<sup>[3-5]</sup>, 因此开展以上几个方面的研究对濒危动物的保护是十分必要的。

哲罗鲑(*Hucho taimen*) 是中国土著的珍稀冷水性鱼类, 1998 年被列为中国的濒危物种<sup>[6]</sup>。20 世纪 60 年代哲罗鲑广泛分布在黑龙江流域的牡

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<sup>[7-8]</sup>。但由于近几十年来自然环境的恶化、捕捞强度的增大, 使哲罗鲑资源遭到了严重的破坏, 加之哲罗鲑个体大、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, 导致群体数量急剧下降, 分布区域迅速缩小。到目前为止, 哲罗鲑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<sup>[9-11]</sup>。为保护与合理开发这一物种, 学者们分别研究了哲罗鲑的栖息环境、分布区域、种群结构、资源量及人类活动对其生存的影响<sup>[7-12]</sup>, 研究结果表明, 哲罗鲑在黑龙江流域的资源量急剧下降, 从 1998 年到 2003 年 6 年的时间内, 其资源量下降了约 50%<sup>[7]</sup>。董崇智

收稿日期: 2010-02-09; 修订日期: 2010-03-18.

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); 农业部水产生物技术重点实验室项目(2006NYBZS-10); 黑龙江水产研究所基本科研专项资金资助项目(2008HSYZX-SJ-08).

作者简介: 匡友谊(1980-), 男, 助理研究员, 从事鱼类遗传育种研究. E-mail: youyikuang@fishbreeding.org

通讯作者: 尹家胜, 研究员. Tel: 0451-84861310. E-mail: yinjiasheng@gmail.com

等<sup>[11]</sup>在黑龙江 3 年的调查中仅发现 8 尾 5 龄以上的性成熟个体, 表明黑龙江流域哲罗鲑种群的濒危现状。哲罗鲑资源量的急剧下降必将对其群体的遗传多样性及遗传结构产生影响, 因此有必要研究现有状态下哲罗鲑群体的遗传多样性及遗传结构。目前仅有少数可利用的微卫星分子标记可用于哲罗鲑遗传结构的研究<sup>[13-16]</sup>, 相关报道也较少<sup>[17-18]</sup>, 仅梁利群等<sup>[17]</sup>用 6 对微卫星标记对乌苏里江虎头江段哲罗鲑群体进行了遗传多样性的初步分析, 认为虎头江段哲罗鲑具有中度的遗传多样性水平; 笔者用 AFLP 标记分析了呼玛河哲罗鲑的遗传结构<sup>[18]</sup>, 结果表明呼玛河哲罗鲑群体具有较严重的近交行为, 群体近交压力较大。

由以上可知, 哲罗鲑资源量少, 濒危严重, 其保护遗传学方面的研究较少, 因此为了充分说明黑龙江流域哲罗鲑遗传结构的现状及探讨影响遗传结构的因素, 本研究利用 17 对微卫星分子标记对黑龙江流域能够采集到哲罗鲑的 4 个地理群体(137 个样本)的基因流、近交压力、有效群体大小及遗传组成进行了分析, 以期对哲罗鲑的遗传保护提供基础科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源与 DNA 提取

本研究在黑龙江流域乌苏里江和呼玛河的 4 个江段采集了 137 个样品, 分别为呼玛河上游塔河江段(约 100 km)群体<sup>[7]</sup> 25 个(HM), 采于 2003 年 11 月; 乌苏里江上游虎头江段(约 100 km)群体<sup>[11-12]</sup> 50 个(HT), 采于 2002 年 10 月(18 个)和 2006 年 10 月(32 个); 中下游海青江段(约 50 km)群体 41 个(HQ), 采于 2005 年 5 月(8 个)和 10 月(33 个); 下游抓吉江段(约 30 km)群体<sup>[8]</sup> 21 个(ZJ), 采于 2005 年 5 月(15 个)和 10 月(6 个)。目前这 4 个群体呈现繁殖隔离状态<sup>[7,10-12]</sup>。各群体样品均剪取鳍条于 75%乙醇中保存, 采用酚、氯仿提取样品 DNA<sup>[15]</sup>。

### 1.2 微卫星筛选及 PCR 扩增

本研究选取 17 对微卫星分子标记对哲罗鲑进行检测, 其扩增大小为 90~400 bp。这 17 对标记

分别为: *OMM1016*<sup>[19]</sup>、*OMM5000*、*OMM5017*<sup>[20]</sup>、*OMM1125*、*OMM1088*、*OMM1077*、*OMM1064*、*OMM1032*、*OMM1097*<sup>[21]</sup>、*HLJZ023*、*HLJZ031*<sup>[16]</sup>、*HLJZ056*(DQ121061)、*HLJZ069*(DQ120978)、*BLE-TET2*、*BLETET5*、*BLETET6*、*BLETET9*<sup>[13]</sup>。

PCR 扩增采用标准的 25  $\mu$ L 体系, 其中包括 20 ng/ $\mu$ L 模板 1 $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.3~1.9  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ L, 10 pmol/ $\mu$ L 上下游引物各 1  $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L *Taq* 酶 0.2  $\mu$ L, 无菌超纯水补足 25  $\mu$ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 扩增产物用 10%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(8 V/cm, 4 $^{\circ}$ C, 8~10 h)进行检测, 经银染后, 用扫描仪扫描成像。

### 1.3 数据分析

遗传多样性分析: 利用 gel-pro 软件(version 4.5, Media Cybernetics, USA)分析所获得的微卫星指纹图, 确定个体基因型。所得基因型数据用 EM 算法检测无效等位基因频率(Null Allele Frequency), 并用 INA 算法对群体基因型进行校正<sup>[22]</sup>。用马尔可夫链方法进行单群体单位点和全局(Globe)的哈代温伯格平衡(HWE)检验(参数为: 10 000 Dememorization, 100 batches, 5 000 Iterations per batch), 用最大似然率算法进行连锁不平衡检验(参数同上), 上述检验用 GenePop (version 4.1) 进行分析<sup>[23]</sup>, 分析结果采用 Bonfer-roni 进行校正。基因频率  $P$ 、等位基因数(观测等位基因  $A_o$ 、有效等位基因  $A_e$ )、杂合度(观测杂合度  $H_o$ 、期望杂合度  $H_e$ )、Nei's 遗传距离( $D$ )、固定指数( $f_{is}$ )等用 Popgene(version 1.32)计算<sup>[24]</sup>, 各位点的多态性信息含量 PIC。遗传结构分析: 将 4 个群体设置为同一组(Group), 用 AMOVA<sup>[26]</sup>方法分析群体间全局(Globe) $F$  统计量( $F$ -stat)及配对群体间遗传分化  $F_{st}$ (pairwise  $F_{st}$ ), 并进行置换检验(Permutation tests, 10 000 次)。

用 Structure<sup>[27]</sup>分析群体的遗传组成及个体混杂情况。假定类群  $k$  从 1 到 4, 每个类群运行 10 次, 运行参数为 50 000 burnin-in iterations, 100 000 MCMC chain length。用最大似然率法对个体间的

亲缘关系进行评估, 构建全同胞和半同胞系, 个体亲缘关系评估及同胞系构建用 Kingroup (version 20080229) 进行分析<sup>[28]</sup>。

基因流及遗传瓶颈分析: 使用 BayesAss 软件<sup>[29]</sup>分析近期群体间的迁徙率(Recent migration rates, 采用默认参数); 使用 Migrate-n 软件<sup>[30]</sup>计算有效群体大小( $N_e$ )及群体间的长期(Long-term)迁徙率, 分析使用 Bayesian MCMC 方法(参数为 3 Long chains, 20 Increment, 10 000 Record steps, 5 replicates, adaptive heating scheme, 分别为 1.0、1.2、1.5、3.0), 微卫星变异率采用 Palstra 等的计算结果<sup>[4]</sup>。对有效群体大小还采用遗传连锁不平衡计算方法计算<sup>[31-32]</sup>。用 Bottleneck 软件<sup>[33]</sup>检测群体遗传瓶颈, 采用 IAM、SMM 和 TPM(30% IAM, 70%SMM)3 种变异模型进行综合评价。

## 2 结果与分析

### 2.1 遗传多样性分析

17 对分子标记在 4 个群体中成功扩增出 21

个位点(*OMM5017*、*OMM1016*、*OMM1077*、*OMM1064* 这 4 个标记各扩增出 2 个位点), 其中 3 个为单态(*OMM1064*-123bp、*BLETET5*、*BLETET6*)。18 个位点扩增的等位基因数在 2~9, 观测杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )分别在 0.275 9~0.940 7 和 0.491 1~0.867 5, PIC 在 0.370 5~0.853 1(表 1)。各群体检测的结果见表 2, 检测结果表明, HT 群体 2006 年样本的参数值低于 2002 年样本检测值, 但差异未达到显著性水平( $P>0.05$ ), 因此将这 2 个年份的样本合并一起进行进一步分析。各遗传参数值( $A_o$ 、 $A_e$ 、 $H_o$ 、 $H_e$ 、 $I$ 、PIC)均遵循 HT>HQ>ZJ>HM 的规律, 其差异不显著( $P>0.05$ )。检测结果表明这 4 个群体具有中等水平的遗传多样性水平, HT 群体的遗传多样性水平有下降的趋势。

### 2.2 HW 检验

用 EM 算法对 18 个多态性位点进行无效等位基因检测, 结果发现在各个群体中均有部分位点出现无效等位基因, 其中 HM 群体有 3 个位点,

表 1 各位点无效等位基因检测和哈代温伯格平衡检验  
Tab. 1 Null allele detection at each locus and exact test of HW for each population

位点 Locus	观测等位 基因 $A_o$	大小/ bp Size	观测杂 合度 $H_o$	期望杂 合度 $H_e$	多态性信息 含量 PIC	无效等位基因频率 Null allele frequency				哈代温伯格平衡检验 HWE exact test				
						HM	HT	ZJ	HQ	HM	HT	ZJ	HQ	Global
<i>OMM1016-A</i>	2	231-251	0.9407	0.4983	0.3741	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	*+	*+	*+	*+	*+
<i>OMM1016-B</i>	2	161-166	0.4815	0.4911	0.3705	0.0000	0.0611	0.1661	0.0000				*+	
<i>OMM5000</i>	6	246-318	0.7778	0.8089	0.7818	0.0000	0.0596	0.0167	0.0000	*				
<i>OMM5017-A</i>	3	224-234	0.3111	0.6151	0.5335	0.2030	0.1612	0.1309	0.2538					
<i>OMM5017-B</i>	5	197-216	0.7407	0.7066	0.6586	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		*+			*+
<i>OMM1125</i>	5	113-161	0.8148	0.6341	0.5641	0.0000	0.0000	0.0000	0.0064			*+		*+
<i>OMM1088</i>	9	91-223	0.8222	0.8424	0.826	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000				*	
<i>OMM1077-A</i>	5	311-387	0.6000	0.7596	0.7222	0.0374	0.0562	0.1795	0.0993					
<i>OMM1077-B</i>	3	257-281	0.4519	0.6271	0.5549	0.0000	0.0417	0.2413	0.1936					
<i>OMM1064-A</i>	9	165-271	0.8593	0.8675	0.8531	0.0000	0.0000	0.0000	0.0150					
<i>OMM1064-B</i>	1	123	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000					
<i>OMM1032</i>	6	204-232	0.8519	0.8156	0.7891	0.0000	0.0040	0.0000	0.0266				*	
<i>OMM1097</i>	3	93-109	0.3556	0.5422	0.4530	0.0000	0.0000	0.2048	0.1955					
<i>HLJZ023</i>	5	241-259	0.2759	0.7667	0.7305	0.0000	0.0000	0.0000	0.0803			*		
<i>HLJZ056</i>	2	219-232	0.2815	0.4664	0.3576	0.0000	0.0472	0.2088	0.0000					
<i>HLJZ069</i>	7	180-211	0.7037	0.8419	0.8217	0.0000	0.0737	0.2311	0.0230	*	*		*	
<i>HLJZ031</i>	3	117-132	0.9556	0.5802	0.4901	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	*+	*+	*+	*+	*+
<i>BLETET2</i>	4	148-165	0.6148	0.6315	0.5836	0.0000	0.0000	0.0000	0.0553	*				
<i>BLETET9</i>	6	166-219	0.5259	0.8145	0.7878	0.1164	0.1679	0.1618	0.1356					
<i>BLETET5</i>	1	169	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000					
<i>BLETET6</i>	1	230	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000					
均值 Mean	4.1905		0.5626	0.5862	0.5626	0.0170	0.0320	0.0734	0.0516					

注: Global, 哈代温伯格平衡检验所有群体; +, 杂合子过剩( $P<0.05$ ); \*, 偏离哈代温伯格平衡( $P<0.05$ )。

Note:  $A_o$ , number of Alleles; Global, HW exact test over all population; +, heterozygote excess ( $P<0.05$ ); \*, Hardy-Weinberg disequilibrium ( $P<0.05$ ).

HT 和 ZJ 群体各有 9 个位点, HQ 群体有 11 个位点(表 1)。用 INA 算法对基因型进行校正后, 对哲罗鲑的群体遗传结构进行下一步分析。全局 HWE 检验发现, 有 4 个位点偏离了 HWE, 均表现为杂合子过剩, 各群体均有 20%左右的位点偏离 HWE(表 1)。对群体的连锁不平衡检测发现, 有 4 对位点组合偏离平衡( $P<0.01$ ), 分别为 *OMM5017-A* 和 *OMM5017-B*、*OMM1077-B* 和 *OMM1064-A*、*OMM1125* 和 *OMM1032*、*OMM1064-A* 和 *BLET-ET9*。单个群体的连锁不平衡检测发现, HM、ZJ 和 HQ 群体分别有 4、3 和 2 对位点组合偏离平衡( $P<0.01$ )。

2.3 群体遗传分化分析

用 AMOVA 方法对全局  $F_{st}$  和群体间配对  $F_{st}$ (pairwise  $F_{st}$ )进行了分析,  $F_{st}$  的全局计算结果发现, 群体间方差组分占总方差的 6.12%, 并达到极显著水平( $P<0.0001$ ), 群体内遗传差异方差组分为 -0.12%, 未达到显著性水平( $P=0.5240$ ), 表明种群的遗传变异主要来源于群体间(表 3)。群体间配对  $F_{st}$  在 0.0193~0.1229(表 4), 表现出较高的显著性水平( $P<0.0001$ ), 说明这 4 个群体的遗传结构具有一定差别。HT 群体 2002 年和 2006

年样本间遗传差异小于各群体间的  $F_{st}$  值, 并未出现群体亚分化( $F_{st}=0.0164, P>0.05$ )。从表 4 中可以得知呼玛河群体 HM 与乌苏里江 3 个群体 HT、HQ、ZJ 的  $F_{st}$  大于后 3 个群体间的  $F_{st}$ , 说明 HM 群体的遗传结构与后 3 个群体的遗传结构具有差异。将乌苏里江的 HT、HQ、ZJ 3 个群体作为 1 个类群(用 WSL 表示), HM 作为另一个类群(用 HM 表示)进行 AMOVA 分析发现, WSL 和 HM 两类群间的遗传方差的贡献率为 8.36%, 达到极显著水平( $P=0.0001$ )。

2.4 群体遗传组成分析

Structure 软件分析表明, 当  $k=2$  时, 似然率峰值达到最大, 个体明显的聚为 2 个类群(图 1), HM 从整个大群体分离出来, HT、ZJ 和 HQ 这 3 个群体属于同一遗传群体, 这说明目前黑龙江流域哲罗鲑存在 2 个遗传类型, 呼玛河遗传类型(HM)和乌苏里江遗传类型(WSL)。

2.5 群体基因流分析

群体遗传组成分析结果表明, 本研究中 4 个群体均有遗传混杂的个体, 说明群体间存在有迁徙现象。BayesAss 软件对近期迁移率检测发现, 群体间的迁入率和迁出率较小且不对称, 资源量大的

表 2 哲罗鲑 4 个地理群体的遗传多样性检测  
Tab. 2 Genetic diversity analysis for *H.taimen* in four geographic populations

群体 Population	样品数 <i>n</i>	观测等位基因 <i>A<sub>o</sub></i>	有效等位基因 <i>A<sub>e</sub></i>	香浓指数 <i>I</i>	观测杂合度 <i>H<sub>o</sub></i>	期望杂合度 <i>H<sub>e</sub></i>	固定指数 <i>f<sub>is</sub></i>	多态性信息含量 PIC	
HM	25	3.9524	2.7580	0.9628	0.5695	0.5091	-0.1415	0.4607	
2002	18	4.1429	3.2439	1.0970	0.6270	0.5713	-0.1276	0.5192	
HT	2006	32	4.0952	3.0480	1.0685	0.5622	0.5609	-0.0109	0.5100
02/06	50	4.1429	3.2580	1.1018	0.5860	0.5735	-0.0371	0.5228	
ZJ	21	4.0952	2.9906	1.0473	0.5143	0.5532	0.07423	0.4973	
HQ	41	4.0952	3.2072	1.0784	0.5540	0.557	-0.0227	0.5094	
全局 Global	137	4.1905	3.4402	1.1358	0.5626	0.5862	0.02784	0.5358	

注: 全局, 所有群体遗传多样性; 02/06, HT 群体 2002 年和 2006 年两年样本的遗传多样性。  
Note: Global, genetic diversity over all population.

表 3 哲罗鲑群体间和群体内的分子方差分析  
Tab. 3 Analysis of molecular variance(AMOVA) within and among populations of taimen

方差来源 Source of variation	总变异百分比/% Total variance	遗传分化指数 Fixation index
群体间 Among populations	6.12	0.0612*( $P<0.0001$ )
群体内 Within populations	-0.12	

注: “\*”表示分化极显著( $P<0.0001$ )。  
Note: “\*” indicates significant difference( $P<0.0001$ ).

表 4 哲罗鲑群体间配遗传分化值

Tab. 4 Pairwise  $F_{st}$  values between all pairs of geographic populations

群体 Population	HM	HT	ZJ	HQ
HM				
HT	0.0930*			
ZJ	0.1167*	0.0252*		
HQ	0.1229*	0.0251*	0.0193*	

注: \*表示差异极显著( $P < 0.0001$ ).

Note: \*indicates as significant difference( $P < 0.0001$ ).

群体是迁移的主要来源(如 HT 群体的迁出率为 0.1003, 迁入率为 0.0256), HM 群体与乌苏里江的 3 个群体间的迁移率小于乌苏里江的 3 个群体间的迁移率, ZJ 和 HQ 两群体间的迁移率最大(表 5)。长期迁徙率变化规律和上述结果相似, 在 0.0143~0.0414 之间变化, 群体间的迁入率和迁出率也不对称(表 5)。群体间的迁移率和群体间的地理距离具有相关性, HM 和乌苏里江的 3 群体的地理距离较远, 其迁移率均低于这 3 个群体间的迁移率, 而 ZJ

和 HQ 的距离近, 两群体间的迁移率均比其他群体间的迁移率高。群体间的迁移率也和群体间遗传分化具有相关性(表 5), HM 和 HT、ZJ、HQ 间的遗传分化大, 其迁移率小, 而 ZJ 和 HQ 的遗传分化最小, 其群体间的迁入和迁出率均最大。

## 2.6 有效群体大小

有效群体分析结果显示有效群体和群体的密度成正比关系, 群体密度 HT 最大, HQ 次之, HM 最小<sup>[7-11]</sup>; 有效群体  $N_e$  大小也呈现这种关系(表 6)。连锁不平衡法(LDNE)估计有效群体  $N_e$  结果显示有效群体数量在 31.4~358.1 之间变化, HM 群体最小为 31.4, HT 群体最大为 358.1。Bayesian MCMC 算法计算的结果也遵循上述规律, 但 HM 和 ZJ 群体的计算结果比 LDNE 的计算结果大, 而 HT 和 HQ 的计算结果却比 LDNE 计算的结果小。

图 1 哲罗鲑群体遗传组成分析结果

每条竖线代表 1 个个体, 不同的颜色表示不同的遗传组分, 黑线为各群体的分隔线。

Fig. 1 Estimated population genetic structure of *H. taiman*

Each individual is represented by a thin vertical line, which is partitioned into  $K$  colored segments that represent the individual's estimated membership fractions in  $K$  clusters. Black lines separate individuals of different populations. Populations are labeled below the figure, with their regional affiliations above it.

表 5 哲罗鲑各地理群迁移率、95%置信区间及不同计算方法的比较

Tab. 5 Comparative migration estimations among all pairs of taimen populations for contemporary (BAYEASS) and coalescent (MIGRATE) estimators along with 95% confidence intervals

配对比较群体 Pairwise population	近期迁徙率 Recent migration (BAYEASS)		长期迁徙率 Long-term gene flow (MIGRATE)	
	$m_{1 \rightarrow 2}$	$m_{2 \rightarrow 1}$	$m_{1 \rightarrow 2}$	$m_{2 \rightarrow 1}$
	HM 和 HT	0.0071	0.0158	0.0143
HM vs HT	(0.0001, 0.0298)	(0.0001, 0.0755)	(0.0088-0.0201)	(0.0228-0.0368)
HM 和 ZJ	0.0120	0.0058	0.0223	0.0159
HM vs ZJ	(0.0001, 0.0450)	(0.0000, 0.0270)	(0.0122-0.0306)	(0.0096-0.0219)
HM 和 HQ	0.0060	0.0067	0.0163	0.0299
HM vs HQ	(0.0001, 0.0257)	(0.0000, 0.0354)	(0.0105-0.0210)	(0.0228-0.0359)
HT 和 ZJ	0.0790	0.0136	0.0304	0.0102
HT vs ZJ	(0.0016, 0.1787)	(0.0835, 0.0308)	(0.0224-0.0315)	(0.0053-0.0140)
HT 和 HQ	0.0055	0.0049	0.0337	0.0244
HT vs HQ	(0.0000, 0.0233)	(0.0000, 0.0212)	(0.0263-0.0403)	(0.0184-0.0298)
ZJ 和 HQ	0.2149	0.3134	0.0135	0.0356
ZJ vs HQ	(0.1112, 0.3156)	(0.2828, 0.3300)	(0.0070-0.0193)	(0.0271-0.0362)

表 6 哲罗鲑各地理群有效群体、95%置信区间及不同计算方法的比较  
 Tab. 6 Comparative  $N_e$  estimations among all pairs of populations for *H. taimen* linkage disequilibrium (LDNE) and coalescent (MIGRATE) estimators along with 95% confidence intervals

群体 Pop	长期估计(MIGRATE-n) Long-term (coalescent) estimator (MIGRATE)				连锁不平衡分析 Linkage disequilibrium estimator (LDNE)	
	$\theta$	95%CI	$N_e$	95%CI	$N_e$	95%CI
	HM	0.0487	0.0400–0.0610	69.59	57.1–87.1	31.4
HT	0.0954	0.0890–0.1000	136.3	127.1–142.9	358.1	137.2–Infinite
ZJ	0.0701	0.0495–0.0880	100.2	70.7–125.7	45.2	26.7–113.4
HQ	0.0927	0.0815–0.0995	132.4	116.4–142.1	127.9	72.6–395.9

表 6 的结果显示, 哲罗鲑各群体具有较小的有效群体, 较小的有效群体会导致群体的近交现象, 各群体的同胞/半同胞系检测证实了这一点。用 Kingroup 对各群体进行同胞和半同胞对检测发现, 4 个群体中共检测出 32 对同胞系, 最少的为 ZJ 群体, 检测出 2 个同胞/半同胞对, 含有 4 个个体, 占群体样品数的 19.04%, HQ 群体检测出 14 个同胞/半同胞对, 含有 28 个个体, 占群体样品数的 68.29%, HM 群体检测出 6 个同胞/半同胞对, 含有 20 个个体, 占群体样品数目的 80%, HT 群体检测出 10 个同胞/半同胞对, 含有 24 个个体, 占群体样品数的 48.0%。

### 2.7 遗传瓶颈分析

对全局的遗传瓶颈检测发现, 位点在 IAM、SMM 和 TPM 变异模型的假设前提下, 均表现出极显著的杂合子过剩( $P < 0.0001$ ), 基因频率偏离 L-shape 分布。在这 3 种变异模型下对单个群体的遗传瓶颈检测发现, HT 和 HQ 群体基因频率均偏离 L-shape 分布, 且位点表现出杂合子过剩( $P < 0.0001$ ); ZJ 群体各位点杂合子过剩表现出极显著性水平( $P < 0.0001$ ), 但其基因频率未偏离 L-shape 分布; 而 HM 群体在 IAM 和 TPM 变异模型下位点表现出杂合子过剩( $P < 0.001$ ), 在 SMM 变异模型下, 无杂合子过剩现象, 且位点的基因频率符合 L-shape 分布。由此可知 HT、HQ 和 ZJ 3 个群体在群体演化过程中发生过遗传瓶颈, HM 群体虽未发生遗传瓶颈, 但其杂合子过剩现象严重, 不排除其在演化过程中遗传瓶颈发生的可能性<sup>[33]</sup>。

## 3 讨论

### 3.1 遗传多样性分析

对濒危物种遗传多样性变化的评估, 保护遗传学家认为应该利用历史样本或标本作为遗传多样性检测的基准点, 以便区分低遗传多样性效应和遗传多样性的变化<sup>[34]</sup>, 如 Wu 等<sup>[35]</sup>用 1957–1958 年和 1998–1999 年的 2 组样本检测川陕哲罗鲑遗传多样性的变化, 发现杂合度等遗传变异显著降低, 并推断川陕哲罗鲑正面临灭绝危险。本研究未利用历史样本或标本, 但对虎头 2002 年和 2006 年样本的检测发现, 2006 年样本的等位基因( $A_o$ 、 $A_e$ )、杂合度( $H_o$ 、 $H_e$ )和香浓指数( $I$ )等均有下降, 固定指数( $f_{is}$ )上升, 推测黑龙江流域哲罗鲑的遗传多样性在逐年下降, 因此需要对哲罗鲑遗传多样性的变化程度及其造成的影响进行深入研究。

### 3.2 群体分化分析

黑龙江流域哲罗鲑群体间遗传变异对遗传方差的贡献率为 6.12%, 表现出较高的显著性水平( $P < 0.0001$ ), 表明群体间具有较高的遗传分化。配对群体间(pairwise  $F_{st}$ )遗传分化也表现出较高的显著性水平( $P < 0.0001$ ), HM 群体与乌苏里江 3 个群体的遗传分化显著高于乌苏里江 3 群体之间的值(表 4), 且 HM 类群和 WSL 类群的分子方差分析表明 HM 和 WSL 两类群的遗传分化极显著( $P = 0.0001$ ), 表明 HM 群体与乌苏里江群体在遗传结构上产生了较大差距, 这一点也被 Structure 软件分析结果证明。这些表明黑龙江流域哲罗鲑

由 2 个遗传类型组成, 呼玛河(HM)和乌苏里江(WSL)遗传类型。结合群体间遗传分化矩阵(表 4)。推测在哲罗鲑群体演化过程中, HM 群体被逐渐分化出来, 形成了独特的遗传结构。Strucutre 软件分析结果表明乌苏里江 3 个群体为同一个遗传群体, 但这 3 个群体的遗传结构具有显著的差异(表 4,  $P < 0.0001$ ), 说明 WSL 遗传类型产生了群体亚分化(Subdivision)。黑龙江流域哲罗鲑群体的遗传分化和地理距离无关, HM 和 HT 之间的距离最远, 但遗传分化小于 HM 和 HQ、ZJ 间的遗传分化。原因是由于历史和地理位置的关系, HT 群体受到较好的保护, 种群结构保留着原始状态<sup>[10]</sup>, 且其资源量较大<sup>[9-10]</sup>, 遗传漂变较小, 因此其遗传结构保留着乌苏里江(WSL)遗传类型的原始群体遗传结构, 而 ZJ 和 HQ 群体是 WSL 遗传类型进一步亚分化的结果, 和 HT 群体的遗传结构具有显著的差异, 因此 HM 和 ZJ、HQ 间的遗传分化较 HM 和 HT 间的遗传分化大。遗传分化和基因流具有一定的相关性, ZJ 和 HQ 的遗传结构具有显著性差异, 其遗传多样性也表现出不同水平(表 2), 但其遗传分化和其他群体间相比较小, 这是因为这 2 个群体之间的地理距离较近(约 30 km), 基因交流比其他群体间频繁(表 5), 使其群体遗传分化维持在一个较低水平。

### 3.3 有效群体大小分析

2 种不同方法估计的有效群体数量存在有一定的偏差, 这是由于计算方法不同引起的。连锁不平衡计算方法具有偏差(Bias estimate), 特别是在样本量小于有效群体真实数量的情况下, 其计算结果严重偏小<sup>[31-32]</sup>。虽然 2 种计算方法的结果有一定差异, 但均显示出了相同规律, 即黑龙江流域哲罗鲑的有效群体数量均偏小, 且和目前群体的资源量呈正相关, 因此其能够反应出目前哲罗鲑群体的生物学特征, 黑龙江流域哲罗鲑的有效群体数量偏小和其群体数量的变化、遗传瓶颈等因素具有一定的关系<sup>[36]</sup>。群体数量的下降会使有效群体减少<sup>[36]</sup>, 哲罗鲑群体数量下降显著, 这一点已有学者证实<sup>[7-8,11]</sup>, 本研究中哲罗鲑群体遗

传瓶颈的全局检测结果证明其发生过遗传瓶颈, 各群体的检测结果也证明 HT、HQ、ZJ 3 个群体发生过遗传瓶颈, HM 群体也有遗传瓶颈发生的迹象, 因此遗传瓶颈也是造成黑龙江流域哲罗鲑有效群体较小的一个因素。

### 3.4 近交压力分析

哲罗鲑各群体的同胞/半同胞对分析结果表明, 各群体中均有同胞/半同胞对的出现, HM 群体最严重, 这和 AFLP 分析 HM 群体的结果类似<sup>[18]</sup>, 均显示黑龙江流域哲罗鲑群体具有“家系效应”, 这可能有三方面原因: 1、与哲罗鲑的繁殖习性相关, 哲罗鲑为单亲本产卵繁殖, 具有排他性, 在数十米的水域内只能有 1 对亲本繁殖<sup>[37]</sup>, 孵化后稚鱼在产卵场附近觅食育肥, 10 月入冬时再进入深水处越冬, 本研究的大部分样本在 10 月采集, 采集的样本也大部分为未性成熟个体, 因此增加了同胞和半同胞采集的机会<sup>[38]</sup>。2、群体数量少造成了群体近亲交配, 有资料表明黑龙江流域哲罗鲑资源量逐年下降<sup>[7, 9-10]</sup>, 其资源量少, 群体密度低(约 30 尾/km<sup>2</sup>)等因素客观上增加了群体近亲繁殖的机会; 有效群体小, 增加了近亲压力, 有效群体  $N_e = 500$  被认为是野生群体的遗传变异能够适应自然选择和环境变化的最小值<sup>[1]</sup>, 但黑龙江流域哲罗鲑有效群体远远低于这一值, 因此其面临的近交压力是显著的。

### 3.5 基因流分析

有学者对基因流的 Bayesass 和 Migrate-n 两种计算方法进行过比较, 认为这两者的分析结果具有一定的偏差, 不能确定计算结果的无偏性(Unbiased estimated), 但可以反应群体间实际的基因流特征<sup>[4]</sup>。本研究采用了这 2 种方法进行评估, 2 种方法计算的结果虽具有一定的偏差, 但反应的群体间基因流的规律一致, 因而能够反应群体间的基因流特征。分析结果表明, 大群体是迁出率的主要来源, 基因流从大群体向小群体流动, 暗示这些群体急需保护<sup>[39]</sup>, 同时表明群体间近期基因流要低于长期基因流, 近期基因流和长期基因流均对群体遗传结构的稳定十分重要, 基

因流的改变反应了环境、群体数量和种群结构等的变化对遗传结构的影响, 近期基因流要低于长期基因流, 这充分显示了几十年环境的变动(栖息地破碎、产卵场消失等)、群体数量下降等因素引起了群体间基因交流的障碍<sup>[4]</sup>。

基因流对维持群体遗传结构的稳定性有着十分重要的作用, 对于小群体基因流可以增加群体的遗传变异, 减缓或避免近亲压力, 增强群体对环境变化的适应能力<sup>[4]</sup>, 但群体的数量仍是群体保护的关键因素<sup>[1,4]</sup>, HM 群体资源量少, 其基因流也相对其他群体小, 因此对其种群数量的保护及增强基因交流非常重要。乌苏里江 3 个群体间具有一定水平的基因流, 可以预防群体的进一步分化, 但由于环境的变动、群体数量的减少等因素造成了目前基因交流的障碍, 也急需对其进行全面的保护。

本研究利用微卫星标记分析了黑龙江流域哲罗鲑地理群体的遗传多样性和遗传结构, 阐述了中国境内黑龙江流域哲罗鲑的种群遗传结构现状。研究表明黑龙江流域哲罗鲑资源量的降低和栖息地、产卵场破碎或消失, 引起了哲罗鲑群体的动态变化, 群体遗传多样性水平逐渐下降, 地理群体也进一步分化, 基因交流较小, 急需对其进行全面保护。根据这些遗传结构的特点, 作者认为黑龙江流域内哲罗鲑存在呼玛河和乌苏里江 2 个不同遗传类型, 应将这 2 个遗传类型的种群作为基本保护单元进行全面保护。同时应人为加强群体间基因交流, 在整个流域内应清除阻碍基因流的因素, 如限制捕捞规格、网具类型和实施禁渔期等, 以减缓群体内近交压力, 防止群体进一步分化。

#### 参考文献:

- [1] Lande R. Genetics and demography in biological conservation[J]. *Science*, 1988, 241(4872): 1455–1460.
- [2] 陈灵芝. 中国的生物多样性现状及其保护对策[M]. 北京: 科学出版社, 1993.
- [3] Saccheri I, Kuussaari M, Kankare M, et al. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation[J]. *Nature*, 1998, 392(6675): 491–494.

- [4] Palstra F P, O'Connell M F, Ruzzante D E. Population structure and gene flow reversals in Atlantic salmon (*Salmo salar*) over contemporary and long-term temporal scales: Effects of population size and life history[J]. *Mol Ecol*, 2007, 16(21): 4504–4522.
- [5] Ebert D, Haag C, Kirkpatrick M, et al. A selective advantage to immigrant genes in a daphnia metapopulation[J]. *Science*, 2002, 295(5554): 485–488.
- [6] 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.
- [7] 姜作发, 唐富江, 尹家胜, 等. 乌苏里江上游虎头江段哲罗鱼种群结构及生长特性[J]. *东北林业大学学报*, 2004, 33(4): 53–55.
- [8] 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(5): 687–692.
- [9] 任慕莲, 郭焱, 张秀善. 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.
- [10] 董崇智, 李怀明, 赵春刚. 哲罗鱼性状及生态学资料[J]. *水产学杂志*, 1998, 11(2): 34–39.
- [11] 董崇智, 李怀明, 赵春刚. 哲罗鱼分布区域及其变化[J]. *水产学杂志*, 1998, 11(1): 65–70.
- [12] 李思忠. 新疆北部鱼类的调查 [J]. *动物学报*, 1966, 18(1): 41–56.
- [13] Froufe E, Sefc K M, Alexandrino P, et al. Isolation and characterization of *Brachymystax lenok* microsatellite loci and cross-species amplification in *Hucho* spp. and *Parahucho perryi*[J]. *Mol Ecol Notes*, 2004, 4(2): 150–152.
- [14] Hatakeyama M, Watanabe T, Ikeda M, et al. Isolation and characterization of microsatellite DNA loci for endangered fish, Japanese huchen (*Hucho perryi*)[J]. *Mol Ecol Notes*, 2005, 5(4): 893–895.
- [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): 181–186.
- [16] Tong G X, Kuang Y Y, Yin J S, et al. Isolation of microsatellite DNA and analysis on genetic diversity of endangered fish, *Hucho taimen* (Pallas)[J]. *Mol Ecol Notes*, 2006, 6(4): 1099–1101.
- [17] 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(3): 241–244.
- [18] 匡友谊, 佟广香, 尹家胜, 等. 呼玛河哲罗鱼遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(4): 615–621.
- [19] Rexroad C E, Gustafson A L, Hershberger W K, et al. Development of rainbow trout microsatellite markers from repeat enriched libraries[J]. *Mar Biotechnol*, 2002, 4(1): 1436–2236.
- [20] Rexroad C E, Rodriguez M F, Coulibaly I, et al. Comparative mapping of expressed sequence tags containing microsatellites



- in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. BMC Genomics, 2005, 6: 54.
- [21] Rexroad C E, Coleman R L, Hershberger W K, et al. Rapid communication: thirty-eight polymorphic microsatellite markers for mapping in rainbow trout[J]. J Anim Sci, 2002, 80: 541–542.
- [22] Chapuis M P, Estoup A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(3): 621–631.
- [23] Rousset F. Genepop'007: A complete re-implementation of the Genepop software for windows and linux[J]. Mol Ecol Res, 2008, 8(1): 103–106.
- [24] Yeh F C, Boylet J B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits[J]. Belgian J Botany, 1997, 129: 157.
- [25] Bostein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1980, 32: 317–331.
- [26] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data[J]. Genet, 1992, 131: 470–491.
- [27] Falush D, Stephens M, Pritchard J K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies[J]. Genet, 2003, 164(4): 1567–1587.
- [28] Konovalov D A, Manning C, Henshaw M T. Kingroup: A program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers[J]. Mol Ecol Notes, 2004, 4(4): 779–782.
- [29] Wilson G A, Rannala B. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes[J]. Genet, 2003, 163(3): 1177–1191.
- [30] Beerli P, Felsenstein J. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach[J]. Proc Natl Acad Sci U S A., 2001, 98: 4563–4568.
- [31] Robin S W. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci[J]. Conserv Genet, 2006, 7(7): 167–184.
- [32] Waples R S, Do C. LDNE: A program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium[J]. Mol Ecol Res, 2008, 8(4): 753–756.
- [33] Cornuet J M, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data[J]. Genet, 1996, 144(4): 2001–2014.
- [34] Matocq M D, Villablanca F X. Low genetic diversity in an endangered species: Recent or historic pattern [J]. Biolog Conserv, 2001, 98(1): 61–68.
- [35] Wu X C. The loss of genetic diversity in Sichuan taimen as revealed by DNA fingerprinting[J]. Biochem Genet, 2006, 44(5-6): 177–185.
- [36] Shrimpton J M, Heath D D. Census vs. Effective population size in chinook salmon: Large- and Small-scale environmental perturbation effects[J]. Mol Ecol, 2003, 12(10): 2571–2583.
- [37] Holcik J, Hensel K, Nieslanik J. The Eurasian huchen *Hucho hucho* : Largest salmon of the world [M]. Hingham(USA): Kluwer Academic Publishers, 1988: 1–131.
- [38] Nielsen E E, Hansen M M, Bach L A. Looking for a needle in a haystack: Discovery of indigenous Atlantic salmon (*Salmo salar*) in stocked populations[J]. Conserv Genet, 2001, 2(3): 219–232.
- [39] 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, Nnorway[J]. Mol Ecol, 2007, 16(7): 1413–1425.

## Analysis on population genetic structure of taimen (*Hucho taimen*) in the Heilongjiang River

KUANG Youyi, TONG Guangxiang, XU Wei, SUN Xiaowen, YIN Jiasheng

(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

**Abstract:** As an endangered fish species, Taimen (*Hucho taimen*) has been recorded in the *Red Lists of Threatened species* in 1998 in China. To protect and exploit this endangered species effectively, investigations on population structures, resources and artificial reproduction have been conducted. However, seldom study was reported in analysis of population genetic structure using molecular markers. In this study, 17 microsatellite markers were used to analyze genetic diversity and structure of 4 populations of Taimen from Heilongjiang River, named Huma population (HM), Hutou population (HT), Haiqing population (HQ) and Zhuaji population (ZJ), separately. Statistical results showed that each population was on a mediate level in genetic diversity, and the genetic diversity level of Taimen had a positive correlation with population size, which presented a declining trend annually. The analysis of population genetic structure showed that there existed remarkable genetic differentiation among the 4 populations. Taimen in Heilongjiang River was divided into two genetic types, HM type and WSL type, and WSL type was further subdivided. The small size of effective population was caused mainly by the changes of population number and the genetic bottleneck, which led to greater inbreeding pressure within populations. Through the examination of recent and long-term gene flows for Taimen in Heilongjiang River, we found that immigratory rate and migratory rate in each population were asymmetrical, and the large population migrated to the small population. The values of recent gene flow were smaller than those of long-term gene flow, indicating that gene exchanges were blocked due to the harsh environments and shrunk population censuses. According to the above mentioned, we thought that the harsh environments and the decreased population number caused the degradation of genetic diversity, the divergence of genetic structure, the occurrence of genetic bottleneck, the small size of effective population and the obstacle of gene flow amongst populations. Overall, Taimen in Heilongjiang River should be preserved comprehensively as an endangered fish species. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(6):1208–1217]

**Key words:** *Hucho taimen*; genetic structure; gene flows; genetic bottleneck; effective population

**Corresponding author:** YIN Jiasheng. E-mail: yinjiasheng@gmail.com