

下游黑龙江茴鱼种群遗传变异及地理分化的微卫星分析

马波,姜作发,霍堂斌

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所,农业部黑龙江流域渔业资源环境重点野外科学观测试验站,黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要: 下游黑龙江茴鱼(*Thymallus tugarinae*)为黑龙江水系中国境内茴鱼属(*Thymallus*)新纪录种,也是黑龙江水系特有的珍稀濒危冷水性鱼类。本研究利用7对微卫星引物,对乌苏里江(WS)、黑龙江上游的呼玛河(HM)和额木尔河(EM)3个下游黑龙江茴鱼地理种群的遗传多样性进行了比较研究,以探讨其种群遗传结构及地理分化水平,并为制定保护管理策略提供遗传学依据。结果显示,WS、HM和EM种群的平均等位基因数(N_a)分别为18.1、14.4和11.7,平均杂合度(H)分别为0.816 5、0.807 2和0.818 4,多态信息含量(PIC)分别为0.891 3、0.805 3和0.757 7,种群中的特有等位基因数分别为33、16和7。遗传多样性水平以WS最高, HM次之, EM最低,在地理上呈现出由黑龙江下游至上游逐渐下降的趋势。3个种群间等位基因及基因型分布不均衡($P < 0.01$), WS与HM、EM的遗传距离(D_s)分别为0.609 3、0.635 7,遗传分化系数(F_{st})分别为0.068 0和0.082 7, HM与EM亲缘关系最近, D_s 和 F_{st} 分别为0.221 2和0.035 6,3个种群间的遗传距离及分化程度与地理距离呈正相关。AMOVA分子方差分析显示,6.35%的遗传变异来自于种群间,93.65%的变异来自于群体内个体之间。研究表明,黑龙江水系下游黑龙江茴鱼种群具有很高的遗传多样性水平,3个地理种群间产生了一定的遗传分化,推测其独特的生活史特性及地理距离是导致种群间产生遗传分化的主要原因。综合以上研究,建议将乌苏里江种群和黑龙江上游种群(呼玛河、额木尔河)作为下游黑龙江茴鱼的2个独特进化单元,并制订相应的保护管理策略。[中国水产科学,2009,16(5): 678-688]

关键词: 下游黑龙江茴鱼; 微卫星; 遗传多样性; 进化单元; 黑龙江

中图分类号: Q959.46

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)05-0678-11

茴鱼属(*Thymallus*)隶属于鲑形目(Salmoniformes), 鲑科(Salmonidae), 茴鱼亚科(Thymallinae), 目前已知该属在整个黑龙江水系有4种, 分别为黑龙江茴鱼(*Thymallus grubii grubii*)^[1]、布列亚茴鱼(*T. burejensis*)^[2]、黄斑茴鱼(*T. g. flavomaculatus*)^[3]和下游黑龙江茴鱼(*T. tugarinae*)^[4-5]。其中, 下游黑龙江茴鱼在中国境内主要分布于乌苏里江及黑龙江的中上游, 在国外主要分布在俄罗斯境内的黑龙江下游和部分日本海水系, 为黑龙江水系特有的珍稀名贵冷水性鱼类, 具有重要的渔业经济价值和科研价值。由于环境恶化及人类过度捕捞, 同属的欧洲茴鱼(*T. thymallus*)^[6-7]、北美洲的北极茴鱼(*T. arcticus*)^[8]以及黑龙江水系的黑龙江茴鱼的种群资源数量已因严重衰退而被列为濒

危鱼类^[9-10]。渔业资源调查表明, 虽然下游黑龙江茴鱼发现较晚, 但与上述几种茴鱼一样, 在黑龙江水系中国境内的分布区狭小, 种质资源衰退, 也将面临濒危状态, 急需开展有关其物种资源的保护性研究工作。

研究表明, 茴鱼具有独特的生活史特征, 表现为有限的扩散行为与很强的繁殖洄游, 容易形成家族式群体^[11-12], 这会使种群间的基因交流产生一定障碍, 使地理种群间容易产生显著的遗传分化^[13]。例如分布于欧洲大陆的欧洲茴鱼及北美洲的北极茴鱼不同地理种群间具有显著的遗传分化, 即使不存在生殖隔离的种群间遗传分化程度也非常高^[14-16]。这些研究结果为有效开展欧洲茴鱼和北极茴鱼的保护

收稿日期: 2009-01-12; 修订日期: 2009-03-04.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2007HSYZX-ZH-24).

作者简介: 马波(1974-), 男, 副研究员, 主要从事渔业资源与鱼类分子生态学研究. E-mail:hsymb@tom.com

管理提供了科学的遗传学依据。近年来,利用基因序列分析及微卫星等分子技术对黑龙江水系及东西伯利亚地区茴鱼属鱼类的起源演化、系统发生及物种分类进行了广泛的研究^[17-21],但对下游黑龙江茴鱼种群遗传多样性及地理分化的研究还未见报道。本研究采用微卫星DNA分子标记技术,从基因水平上对分布于黑龙江水系中国境内的下游黑龙江茴鱼3个地理种群的遗传多样性及地理分化进行研究,旨在探讨其种群遗传结构及地理分化水平,并为制定保护管理策略提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 取样及基因组DNA的提取

于2008年10月,下游黑龙江茴鱼的3个地理种群分别采自乌苏里江中游(WS)、黑龙江上游支流呼玛河(HM)与额木尔河(EM),鱼类标本形态见图1,标本的采集地、样本数及地理经纬度等情况见表1。样本经形态鉴定后,取背部肌肉10 g,置于无水乙醇中保存。总DNA利用UNIQ-10柱式DNA抽提试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司)提取。

1.2 微卫星PCR扩增及电泳检测

根据部分北极茴鱼的微卫星引物序列^[22],由上海生工生物工程技术有限公司合成,筛选出7对

引物,用于下游黑龙江茴鱼种群遗传结构分析,引物序列见表2。PCR反应在美国PE公司的9700 PCR仪上进行,反应体系为25 μ L,其中含有:1 \times PCR buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂,正反向引物各0.2 μ mol/L, dNTP 各0.2 mmol/L,模板DNA 100 ng, Taq DNA聚合酶0.2 U。反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性4 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,退火30 s(不同引物的退火温度见表2),72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共30个循环;然后72 $^{\circ}$ C延伸8 min。对PCR反应的产物用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,电泳缓冲液为1 \times TBE。凝胶经银染显色后,用凝胶成像系统对凝胶进行拍摄,并用图像分析软件对电泳图谱进行分析,根据标准 $\Phi \times 174$ /Hae III Marker计算扩增片段的大小,确定个体的等位基因和基因型。

1.3 数据统计与分析

种群内的等位基因频率(P)、有效等位基因数(N_e)、平均杂合度(H)及Hardy-Weinberg平衡检验(P_{WT})、种群间的Nei's遗传距离(D_s)^[23]与基因流(N_m)使用Popgene 32软件进行统计与分析;种群间等位基因与基因型的分化及遗传分化系数(F_{st})使用Genepop 4.3软件分析;多态信息含量(PIC)参照Bostein等^[24]的方法计算;种群间的AMOVA分子方差分析使用Arlequin 3.11软件,种群间遗传距离的UPGMA聚类分析使用MEGA 3软件。



图1 下游黑龙江茴鱼(引自马波等^[5])

Fig. 1 *Thymallus tugarinae* (citation from Ma et al^[5])

表1 下游黑龙江茴鱼3个种群样本数及采集地点
Tab.1 Sample sizes and collection locations of three populations of *T. tugarinae*

种群 Population	编号 Code	样本数 Sample size	采集地 Collection location	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)
乌苏里江 Wusuli River	WS	40	海清 Haiqing	134° 39'	47° 52'
呼玛河 Huma River	HM	38	塔河 Tahe	124° 42'	52° 18'
额木尔河 Emur River	EM	38	图强 Tuqiang	122° 47'	52° 55'

2 结果与分析

2.1 基因位点与等位基因

7对微卫星引物在下游黑龙江茴鱼3个地理种群中共检测出156个等位基因,平均每个位点等位基因数为22.3个。其中,位点*Tar110*的等位基因数最多为36个,*Tar115*最少为7个(表2),部分基因位点的电泳图谱如图2所示。每个种群中检测出的等位基因总数以乌苏里江(WS)最多,为127,呼玛河(HM)其次,为101,额木尔河(EM)最少,为82。3个种群中特有等位基因数仍以WS最多,为33, HM其次,为16, EM最少,为7,即WS为HM的2倍多, HM为EM的2倍多(表3);进一步统计显示,WS和HM共有而

与EM不共有的等位基因数为27个,WS和EM共有而与HM不共有的等位基因数为14个, HM和EM共有而与WS不共有的等位基因数为9个。由以上数据统计可知,在7个基因位点上,下游黑龙江茴鱼3个地理种群中的总等位基因数、特有等位基因数均以乌苏里江种群最高,额木尔河种群最低,呼玛河种群居中,等位基因的丰富程度及种群两两间共有的等位基因数呈现出由黑龙江下游至上游逐渐降低的趋势。对等位基因和基因型分布差异分析表明,7个基因位点在3个种群中均表现出显著性差异($P<0.01$)(表4),表明这些位点的等位基因在不同种群间的分布不均衡。

表2 7对微卫星引物信息及其在下游黑龙江茴鱼中的等位基因片段大小与等位基因数
Tab.2 Information about seven microsatellite primers, their allele sizes and numbes in *T. tugarinae* populations

位点 Locus	引物序列 (5' -3') Primer sequence (5' -3')	核心重复序列 Core motif	退火温度/°C Ann temp.	片段大小/bp Allele size	等位基因数 Allele number
<i>Tar100</i>	F: TTTGGATGTGTCAGACCTG R: GAGAAAGCAAGGAGAAATCAC	(CTTT) ₅ CTTC(CTTT) ₁₈	60	213-277	16
<i>Tar101</i>	F: CAGAGCAGACCAAGCAGAG R: AGGGCAAGTCATTCCAGTC	(CTTT) ₂₂	56	233-317	22
<i>Tar103</i>	F: CGGGGATCAATAAAGTATCC R: CTTCACTGTCGCTGTGAGTAC	(ATCC) ₇ TCC(ATCC) ₁₄	60	176-258	21
<i>Tar104</i>	F: TCTTCTCAGTGGCATGACATC R: CCTCGTACTCTCTTGTGCC	(CATA) ₂₃	61	120-208	21
<i>Tar105</i>	F: GGCTATTACCACAATCAAACC R: GCTCTGTGCGTTGCCAAGTA	(ATCC) ₁₆ (ATCT) ₁₀ ATCC (ATCT) ₁₆ ATT(TATC) ₁₁	61	164-304	33
<i>Tar110</i>	F: GCAATAACAATTCCATGAGAAG R: CTCCTCTGATTCCAAGAAATG	(TAGA) ₃₀	59	318-466	36
<i>Tar115</i>	F: GGAATATGAGTGGTGAATATG R: CGAGTGATTGAAGTCTGTCC	(TAGA) ₄₄	59	262-356	7

表3 下游黑龙江茴鱼3个种群在7个微卫星位点的特有等位基因及频率

Tab.3 Characteristic alleles and frequencies of seven microsatellite loci in three populations of *T. tugarinae*

位点/基因 Locus/ allele	乌苏里江 种群 Wusuli River population	呼玛河 种群 Huma River population	额木尔河 种群 Emur River population	位点/基因 Locus/ allele	乌苏里江 种群 Wusuli River population	呼玛河 种群 Huma River population	额木尔河 种群 Emur River population	位点/基因 Locus/ allele	乌苏里江 种群 Wusuli River population	呼玛河 种群 Huma River population	额木尔河 种群 Emur River population
<i>Tar100</i>				180	0.037 5			304	0.013 2		
237	0.089 7			184	0.037 5			<i>Tar110</i>			
241	0.153 8			188	0.012 5			318			0.029 4
245	0.076 9			192	0.012 5			326	0.031 3		
<i>Tar101</i>				196	0.062 5			338			0.014 7
237	0.051 3			200	0.012 5			346	0.015 6		
241	0.025 6			204	0.025 0			362		0.040 5	
257	0.051 3			208	0.012 5			398	0.031 3		
317	0.012 8			<i>Tar105</i>				426		0.040 5	
<i>Tar103</i>				164		0.013 9		434		0.121 6	
180	0.073 2			172			0.027 8	438	0.046 9		
184	0.073 2			184			0.013 9	442		0.013 5	
188	0.195 1			188		0.125 0		446	0.015 6		
190	0.097 6			208			0.069 4	450		0.040 5	
194	0.097 6			216			0.013 9	454		0.054 1	
222		0.054 1		232		0.041 7		458		0.054 1	
250		0.027 0		252		0.055 6		462		0.027 0	
254	0.012 2			280			0.013 9	<i>Tar115</i>			
258		0.013 5		288	0.026 3			262	0.027 0		
<i>Tar104</i>				292		0.013 9		274	0.013 5		
120	0.012 5			296	0.052 6			306	0.135 1		

表4 下游黑龙江茴鱼3个种群等位基因分化的Fisher's检验和基因型分化的G-likelihood检验

Tab.4 Fisher's exact test of allelic differentiation and G-likelihood test of genotypic differentiation among three populations of *T. tugarinae*

位点 Locus	等位基因差异 Allelic differentiation		基因型差异 Genotypic differentiation	
	概率值 P	标准误差 SE	概率值 P	标准误差 SE
<i>Tar100</i>	0.001	<0.000	0.002	<0.000
<i>Tar101</i>	0.000	<0.000	0.001	<0.000
<i>Tar103</i>	0.004	<0.000	0.005	<0.000
<i>Tar104</i>	0.000	<0.000	0.000	<0.000
<i>Tar105</i>	0.003	<0.000	0.000	<0.000
<i>Tar110</i>	0.000	<0.000	0.001	<0.000
<i>Tar115</i>	0.003	<0.000	0.004	<0.000

2.2 种群内遗传变异

由表5可见,黑龙江水系下游黑龙江茴鱼3个地理种群的7个基因位点中,种群的等位基因数(N_a)为2~26(平均14.7),有效等位基因数(N_e)为1.7~17.4(平均9.5),多态信息含量(PIC)为0.312 6~0.939 5

(平均0.818 1),杂合度(H)为0.315 8~1.000 0(平均0.814 0);位点*Tar105*、*Tar110*在3个种群中遗传多样性水平较高,而位点*Tar115*最低。WS、HM和EM种群的平均 N_a 分别为18.1、14.4和11.7,平均 N_e 分别为12.2、9.6和7.0;平均PIC分别为0.891 3、0.805 3和

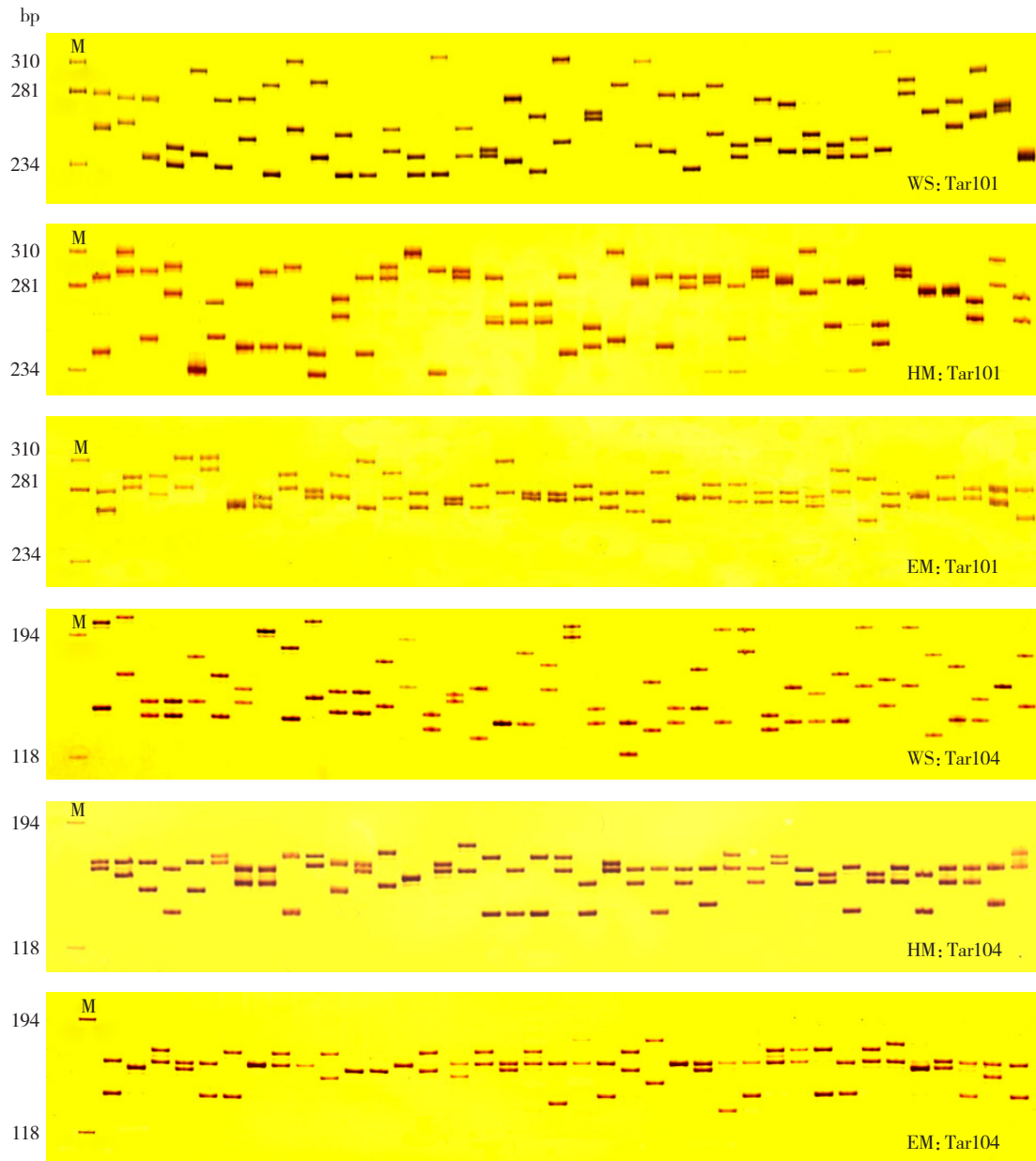


图2 微卫星位点 *Tar101* 和 *Tar104* 在下游黑龙江茴鱼3个种群中扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测图谱

WS: 乌苏里江种群; HM: 呼玛河种群; EM: 额木尔河种群; M: $\Phi \times 174/Hae$ III marker.

Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products of microsatellite loci *Tar101* and *Tar104* in three populations of *T. tugarinae*
WS: Wusuli River population; HM: Huma River population; EM: Emur River population; M: $\Phi \times 174/Hae$ III marker.

0.757 7; 平均 H 分别为0.816 5、0.807 2、0.818 4。以上数据表明,黑龙江水系下游黑龙江茴鱼的3个地理种群的遗传变异丰富,多样性水平较高;除了额木尔河种群(EM)的 H 略高外,其他参数均为乌苏里江种群(WS)最高,呼玛河种群(HM)其次,额木

尔河种群(EM)最低,遗传多样性水平在地理上呈现出由黑龙江下游至上游逐渐降低的趋势。WS种群中的*Tar115*位点, HM种群中的*Tar101*和*Tar103*位点及EM种群中的*Tar105*和*Tar110*位点显著偏离了Hardy-Weinberg平衡。

表5 下游黑龙江茴鱼3个种群遗传多样性统计

Tab.5 Observed number (N_a) and effective number (N_e) of alleles, heterozygosity among populations (H), polymorphism in formation content (PIC) and Hardy-Weinberg equilibrium analysis (P_{HW}) in three populations of *T. tugarinae*

种群 Population	参数 Parameter	位点 Locus							平均 Mean
		<i>Tar100</i>	<i>Tar101</i>	<i>Tar103</i>	<i>Tar104</i>	<i>Tar105</i>	<i>Tar110</i>	<i>Tar115</i>	
乌苏里江 WS	N_a	14	21	17	21	22	25	7	18.1
	N_e	10.2	14.5	10.3	11.7	17.4	17.1	4.4	12.2
	PIC	0.894 2	0.926 9	0.895 4	0.908 9	0.939 5	0.938 3	0.735 6	0.891 3
	H	0.948 7	0.789 5	0.750 0	0.900 0	0.947 4	0.812 5	0.567 6	0.816 5
	P_{HW}	0.496 9	0.510 3	0.307 1	0.120 9	0.439 3	0.127 2	0.000 0**	
呼玛河 HM	N_a	13	16	14	10	20	26	2	14.4
	N_e	7.5	12.1	9.1	6.1	13.9	17.2	1.6	9.6
	PIC	0.853 6	0.911 7	0.880 1	0.816 7	0.923 4	0.938 9	0.312 6	0.805 3
	H	0.815 8	0.815 8	0.891 9	0.973 0	1.000 0	0.837 8	0.315 8	0.807 2
	P_{HW}	0.570 6	0.000 1**	0.011 2*	0.414 7	0.171 6	0.533 1	0.216 1	
额木尔河 EM	N_a	10	12	10	9	19	18	4	11.7
	N_e	3.6	7.6	6.3	4.0	12.5	12.7	2.2	7.0
	PIC	0.643 8	0.856 0	0.821 2	0.720 0	0.914 7	0.915 8	0.432 3	0.757 7
	H	0.789 5	0.885 7	0.939 4	0.771 4	0.861 1	0.852 9	0.628 6	0.818 4
	P_{HW}	0.145 3	0.555 1	0.799 8	0.069 0	0.000 0**	0.012 9*	0.667 6	
平均 Mean	N_a	12.3	16.3	13.6	13.3	20.3	23.0	4.3	14.7
	N_e	7.1	11.4	8.6	7.3	14.6	15.7	2.7	9.5
	PIC	0.797 2	0.898 2	0.865 6	0.815 2	0.925 9	0.931 0	0.493 5	0.818 1
	H	0.851 3	0.830 3	0.860 4	0.881 5	0.936 2	0.834 4	0.504 0	0.814 0

注: * 表示显著偏离Hardy-Weinberg平衡 ($P < 0.05$); ** 表示极显著偏离Hardy-Weinberg平衡 ($P < 0.01$).

Note: * indicates significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium; ** indicates highly significant correlation deviation from Hardy-Weinberg equilibrium.

2.3 种群间遗传分化

基于等位基因频率, 计算下游黑龙江茴鱼3个地理种群间的遗传相似度 (I)、遗传距离 (D_s)、基因流 (N_m) 及遗传分化系数 (F_{st})。结果如表6所示, HM与EM种群间的遗传相似度 (I) 最高 (0.801 6), WS与EM间最低 (0.529 5); HM与EM种群间的遗传距离 (D_s) 最近 (0.221 2), WS与EM间最远 (0.635 7)。相邻种群的 D_s (WS与HM间为0.609 3、HM与EM间为0.221 2) 较相隔种群 (WS与EM间为0.635 7) 要小, 且WS与HM、EM间的 D_s 要高于HM与EM的近3倍, 表现为3个种群间的遗传距离与地理距离呈正相关。基于Nei's标准遗传距离的UPGMA聚类图 (图3), 可

将3个种群分为2类, HM和EM间的 D_s 较近聚为一类, WS与HM、EM间的 D_s 较远单独为一类。

3个群体间的平均基因流 (N_m) 为4.92, 其中, WS与EM种群间的 N_m 最小 (3.25), HM与EM间最大 (7.39), 约为WS与EM间的2倍多。WS与EM种群间遗传分化系数 (F_{st}) 最大 (0.082 7), HM与EM间最小 (0.035 6), 平均 F_{st} 为0.062 1, 表明6.21%的遗传变异来自种群间, 93.79%的遗传变异来自种群内个体之间; AMOVA分子方差分析也显示, 6.35%的遗传变异来自于种群间, 93.65%的变异来自于群体内个体之间 (表7)。以上数据表明, 3个种群间基因流与地理距离呈负相关, 而遗传分化程度与地理距离呈正相关。

表6 下游黑龙江茴鱼3个种群间的遗传距离 (D_s) \ 遗传相似度 (I) (对角线以下) 及基因流 (N_m) \ 遗传分化系数 (F_{st}) (对角线以上)

Tab.6 Genetic distances (D_s) \ genetic similarity indices (I) (below diagonal), gene flow (N_m) \ genetic differentiation coefficient (F_{st}) (above diagonal) among three populations of *T. tugarinae*

种群 Population	乌苏里江 WS	呼玛河 HM	额木尔河 EM
乌苏里江 WS		4.11 \ 0.0680	3.25 \ 0.0827
呼玛河 HM	0.609 3 \ 0.5437		7.39 \ 0.0356
额木尔河 EM	0.635 7 \ 0.5295	0.221 2 \ 0.8016	

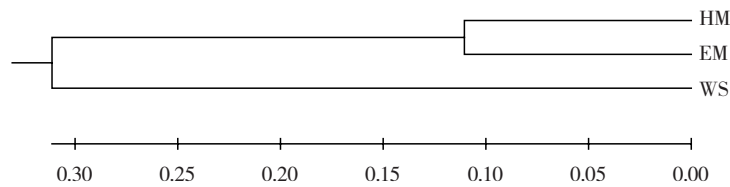


图3 基于下游黑龙江茴鱼3个种群遗传距离构建的UPGMA聚类树

WS: 乌苏里江种群; HM: 呼玛河种群; EM: 额木尔河种群

Fig. 3 UPGMA dendrogram of three populations of *T. tugarinae* based on genetic distance

WS: Wusuli River population; HM: Huma River population; EM: Emur River population

表7 下游黑龙江茴鱼3个种群的AMOVA分析

Tab.7 AMOVA analysis of three populations of *T. tugarinae*

变异来源 Source of variation	自由度 Degrees of freedom	方差总和 Sum of squares	方差分量 Variance components	变异比例/% Variation percentage
种群间 Among populations	2	29.019	0.167 06	6.35
种群内 Within populations	213	529.143	2.484 24	93.65
总计 Total	215	558.162	2.651 30	

3 讨论

3.1 下游黑龙江茴鱼种群的遗传多样性

欧洲大陆的欧洲茴鱼遗传多样性水平较低^[14], 平均等位基因数为3.5, 平均杂合度为0.41; 北美洲的北极茴鱼^[16]平均等位基因数为2.1, 平均杂合度为0.226, 更低于欧洲茴鱼; 东西伯利亚地区的北极茴鱼和黑龙江茴鱼^[18]平均等位基因数分别为4.8和6.5, 要高于欧洲茴鱼和北美洲的北极茴鱼。本研究显示, 7个微卫星位点在乌苏里江、呼玛河和额木尔河3个地理种群中平均等位基因数高达14.7, 平均杂合度为0.814 0, 遗传多样性水平远远高于上述几种茴鱼。本研究所用引物根据Matthewd等^[22]筛选的北极茴鱼微卫星位点所设计。用这些位点研究显示北极茴鱼

(Bobcat湖)具有较高的遗传多样性水平(平均等位基因9.5, 平均杂合度0.719 2), 而欧洲茴鱼平均等位基因数也达到6.5个, 表明这些微卫星位点在茴鱼中具有较高的变异水平^[24]。而利用Sušnik^[25-26]筛选的微卫星位点所研究的北极茴鱼^[27]和欧洲茴鱼^[28]的遗传多样性水平就很低, 表明这些微卫星位点在茴鱼中的变异比较保守。微卫星位点不同导致遗传变异水平不同这一现象在鲑科鱼类的研究中也有所体现^[29]。因此, 当选择不同微卫星位点时, 鱼类种群所表现出的遗传多样性水平的高低可能会不同。

尽管北极茴鱼新的微卫星位点在北极茴鱼、欧洲茴鱼和黑龙江茴鱼中的遗传变异水平与以往的研究相比要高^[22], 但在现有的研究中下游黑龙江

茴鱼种群的遗传多样性水平仍为最高,也远高于同样分布于黑龙江水系的细鳞鲑^[29]、哲罗鲑^[30](*Hucho taimen*)、大麻哈鱼^[31](*Oncorhynchus keta*)等其他冷水性鲑科鱼类。下游黑龙江茴鱼分布于黑龙江的下游至上游及部分日本海水系,而黑龙江茴鱼仅分布于黑龙江的中上游^[4-5],也表明具较高遗传多样性水平的下游黑龙江茴鱼可能比黑龙江茴鱼适应环境的能力要强。

3.2 下游黑龙江茴鱼种群间遗传变异及地理分化

分布于北美洲育空河的北极茴鱼种群的等位基因数与杂合度与地理距离呈显著的负相关,由下游至上游呈下降趋势^[16]。在欧洲中部北方地区(莱茵河、易北河)的欧洲茴鱼遗传多样性水平(等位基因数和杂合度)明显低于南方(多瑙河)^[14]。本研究中,下游黑龙江茴鱼的等位基因数和基因型分布在3个地理种群中产生显著分化($P < 0.01$),且乌苏里江、呼玛河和额木尔河种群的等位基因数(分别为127、101、82)、特有等位基因数(分别为33、16、7)和多态信息含量(PIC)(分别为0.891 3、0.805 3、0.757 7)由黑龙江下游至上游呈下降趋势,即下游黑龙江茴鱼等位基因的变异水平下游要高于上游,但其杂合度未表现出明显的地理差异(WS、HM和EM分别为0.816 5、0.807 2、0.818 4)。这种遗传多样性的地理差异与对环境的适应能力有关,如欧洲茴鱼种群间的遗传多样性水平显著差异,就被认为可能与适应不同海拔湖中的温度等环境条件有关^[32]。下游黑龙江茴鱼南方种群(乌苏里江种群)的等位基因数和多态信息含量均高于北方种群(呼玛河、额木尔河种群),也表明地理纬度较低的种群可能更需要适应复杂的环境温度变化,而比地理纬度较高的种群表现出更丰富的遗传变异。此外,茴鱼的等位基因变异水平也被认为与地理纬度有关^[33],可能由于始祖效应,使得南方地区的残遗种群比殖民侵入至北方地区的群体遗传多样性要高^[34]。据此推测,下游黑龙江茴鱼的黑龙江上游种群可能由下游种群殖民迁移而来,即下游的种群为上游种群的始祖种群,且遗传变异水平与从下游至上游的地理距离呈负相关。

欧洲中部和北部3大水系间欧洲茴鱼的等位基因型频率显著不同,有很高水平的特有等位基因,并提示长期生殖隔离产生显著的遗传分化(F_{st} 为29.1%)^[28],多瑙河上游和易北河间的欧洲茴鱼存在明显的差异^[35],北美洲不同地理水系的北极茴鱼明显分为3个进化分支(F_{st} 为24%)^[16]。本研究显示,虽然下游黑龙江茴鱼3个地理种群间未达到显著的遗传分化(F_{st} 为5.6%),但仍表明其在黑龙江水系内部产生了一定程度的遗传分化,其 F_{st} 远高于黑龙江流域的唇鲮(*Hemibarbus labeo*) (2.36%)^[36],甚至也明显高于具有地理隔离的大麻哈鱼(3.66%)^[31]。茴鱼种群间显著的遗传分化被认为与其独特的生活史特征有关,表现为具有很强的繁殖回归与较弱的扩散能力。产卵洄游范围仅为10~15 km,而越冬洄游仅为0~14 km^[11]。与秋季产卵的鲑鱼相比很少远距离迁移,并存在许多家族式群体^[12]。另外,茴鱼为山溪冷水性鱼类,对产卵环境要求比较苛刻(水温4~9℃)^[37],并终生栖息在冷水环境中。茴鱼的有限扩散行为与强烈生殖洄游习性会使小地理种群间基因交流产生一定障碍,容易产生显著的遗传分化,因此地理距离(或地理隔离)是茴鱼种群产生遗传分化的重要原因。Saimaa湖内欧洲茴鱼3个地理种群的遗传分化程度非常高(F_{st} 为0.261)^[13],多瑙河内部欧洲茴鱼种群间也存在很大程度的遗传分化^[28]。在本研究中,下游黑龙江茴鱼在黑龙江水系内部不存在绝对的地理隔离,但乌苏里江种群与呼玛河、额木尔河种群的 D_s 分别为0.609 3和0.635 7, F_{st} 分别为0.068 0、0.082 7(地理距离约为1 500 km和1 800 km),远高于呼玛河与额木尔河种群间的 D_s 和 F_{st} (0.221 2和0.035 6)(地理距离约为600 km),可能由于茴鱼所具有的独特生态习性,使下游黑龙江茴鱼3个地理种群间的遗传分化水平与地理距离呈正相关。

3.3 下游黑龙江茴鱼的保护与管理策略

本研究拟确定分布于黑龙江水系中国境内的下游黑龙江茴鱼不同地理种群的进化显著单元(ESUs),以制定科学的保护和管理策略。根据显著的遗传分化,多瑙河、莱茵河、易北河的欧洲茴鱼需要

作为3个独特的进化单元分别保护管理^[14],而多瑙河的南部和北部附属水系不同地理种群的欧洲茴鱼需要考虑单独分开保护管理^[30]。本研究中,虽然下游黑龙江茴鱼的种群遗传多样性水平还很高,但应注意其渔业资源所面临的濒危现状。下游黑龙江茴鱼的乌苏里江种群与黑龙江上游种群在等位基因及基因型上存在显著的差异,且遗传多样性的变异水平乌苏里江种群要明显高于黑龙江上游种群(呼玛河、额木尔河),3个种群间产生一定的遗传分化,并保持较低的基因流。结合茴鱼独特的生活史特性,应该考虑将乌苏里江种群与黑龙江上游种群(呼玛河、额木尔河)作为2个独特的进化单元分别保护管理。保护管理计划包括:保护天然的遗传多样性水平;避免不同保护单元间的基因交流;利用亲缘关系接近的天然个体和基因库群体进行基因交流,并慎重使用人工养殖繁育群体进行放流增殖。鉴于茴鱼所具有的独特生态习性,还需要尽量多地深入研究具有一定地理隔离的小地理种群或残遗种群茴鱼的遗传结构,以便发现更多的显著进化单元,并优先保护其独特的天然基因库。

参考文献:

- [1] Dybowski B N. Vorläufige mittheilungen über die fischfauna des ononflusses and des ingoda in Transbaicalien[J]. Verh Zool Bot Ges Wien 1869,19: 209–222 .
- [2] Antonov A L. A new species of grayling *Thymallus burejensis* sp. nov (Thymallidae) from the Amur Basin[J]. J Ichthyol,2004,44 (6): 401–411.
- [3] Knizhin I B , Antonov A L , Weiss S J. A new subspecies of the amur grayling *Thymallus grubii flavomaculatus* ssp. nova (Thymallidae)[J]. J Ichthyol,2006,46 (8): 555–562.
- [4] Knizhin I B, Antonov A L, Safronov S N, et al. New species of grayling *Thymallus tugarinae* sp. nov (Thymallidae) from the Amur River Basin [J]. J Ichthyol,2007,47 (2): 139–156.
- [5] 马波,霍堂斌,姜作发. 中国黑龙江水系茴鱼属一新纪录(鲢形目,茴鱼科)[J]. 动物分类学报,2007,32 (4) : 986–988.
- [6] Maitland A, Campbell R N. Freshwater fishes of the British Isles [M]. Somerset: Butler & Tanner. 1992.
- [7] Uiblein F, Jagsch A, Honsig-Erlenburg W, et al. Status, habitat use, and vulnerability of the European grayling in Austrian waters [J]. J Fish Biol,2001,59: 223–247.
- [8] Kozhova O M, IzmetŌeva L R. Lake Baikal evolution and biodiversity [M]. Leiden: Backhyus Publishers. 1998.
- [9] Lelek A. Threatened fishes of Europe [M]// European committee for the conservation of nature and natural resources-council of Europe. The Freshwater Fishes of Europe 9 AULA-Verlag. Wiesbaden.1984: 93–96.
- [10] 乐佩琦,陈宜瑜. 中国濒危动物红皮书鱼类[M]. 北京: 科学出版社,1998: 44–45.
- [11] Nykänen M, Huusko A, Mäki-Petäys A. Seasonal changes in the habitat use and movements of adult European grayling in a large subarctic river [J]. J Fish Biol,2005,58 (2): 506–519.
- [12] Northcote T G. Comparative biology and management of Arctic and European grayling (Salmonidae, *Thymallus*) [J]. Rev Fish Biol Fish, 1995,5: 141–194.
- [13] Koskinen M T, Primmer C R. Interpopulation genetic divergence in European grayling (*Thymallus thymallus*, Salmonidae) at a microgeographic scale: Implications for conservation [J]. Conserv Genet,2001,2: 133–143.
- [14] Bernhard G, Riho G, Oswald R, et al. Microsatellite variation in Bavarian populations of European grayling (*Thymallus thymallus*): Implications for conservation [J]. Conserv Genet,2003,4: 659–672.
- [15] Koskinen M T, Nilsson J, Veselov A J, et al. Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling, *Thymallus thymallus*, Salmonidae[J]. Heredity,2002,88: 391–401
- [16] Stamford M D, Taylor E B. Phylogeographical lineages of Arctic grayling (*Thymallus arcticus*) in North America: divergence, origins and affinities with Eurasian *Thymallus*[J]. Mol Ecol,2004,13: 1 533–1 549.
- [17] 马波,霍堂斌,姜作发. 线粒体DNA基因序列变异显示鸭绿江茴鱼为黑龙江茴鱼同物异名[J]. 动物分类学报,2008,33 (2) : 414–419.
- [18] Koskinen M T, Knizhin I, Primmer C R, et al. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Thymallus* spp. (grayling) provides evidence of ice-age mediated environmental perturbations in the world's oldest body of fresh water, Lake Baikal[J]. Mol Ecol,2002,11: 2 599–2 611.
- [19] Weiss S, Persat H, Epe R, et al. Complex patterns of colonization and refugia revealed for European grayling *Thymallus thymallus*, based on complete sequencing of the mitochondrial DNA control region [J]. Mol Ecol,2002,11: 1 393–1 407.
- [20] Weiss S, Knizhin I, Kirillov A, et al. Phenotypic and genetic differentiation of two major phylogeographical lineages of arctic grayling *Thymallus arcticus* in the Lena River, and surrounding Arctic

- drainages[J]. Biol J Linn Soc, 2006, 88: 511–525.
- [21] Froufe E, Knizhin I, Koskinen M T, et al. Identification of reproductively isolated lineages of Amur grayling (*Thymallus grubii* Dybowski 1869): concordance between phenotypic and genetic variation[J]. Mol Ecol, 2003, 12: 2 345–2 355.
- [22] Matthewd D, Williamr A. Characterization of 12 highly variable tetranucleotide microsatellite loci for Arctic grayling (*Thymallus arcticus*) and cross amplification in other *Thymallus* species [J]. Mol Ecol Res, 2008.
- [23] Nei M. Genetic distance between populations [J]. Am Nat, 1972, 106: 283–291.
- [24] Bostein D, White T L, Skolnick M. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum genet, 1980, 32: 314–331.
- [25] Sušnik S, Snoj A, Dovec P. Microsatellites in grayling (*Thymallus thymallus*): comparison of two geographically remote populations from the Danubian and Adriatic river basin in Slovenia [J]. Mol Ecol, 1998: 1 756–1 758.
- [26] Sušnik S, Snoj A, Dovec P. A new set of microsatellite markers for grayling: BFRO014, BFRO015, BFRO016, BFRO017 and BFRO018 [J]. Anim Genet, 1999, 30: 478.
- [27] Sušnik S, Berrebi P, Dovec P, et al. Genetic introgression between wild and stocked salmonids and the prospects for using molecular markers in population rehabilitation: the case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus* L. 1785)[J]. Heredity, 2004, 93: 273–282.
- [28] Gum B, Gross R, Kuehn R. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of European grayling (*Thymallus thymallus*): evidence for secondary contact zones in central Europe [J]. Mol Ecol, 2005, 14: 1 707–1 725.
- [29] 马波, 姜作发. 乌苏里江2种细鳞鲑种群遗传多样性及亲缘关系的微卫星分析[J]. 中国水产科学, 2007, 14(1): 39–45.
- [30] 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): 1 099–1 101.
- [31] 陈金平, 董崇智, 孙大江. 微卫星标记对黑龙江流域大麻哈鱼遗传多样性的研究[J]. 水生生物学报, 2004, 28(6): 607–612.
- [32] Haugen T O, Vølestad L A. Population differences in early life history traits in grayling [J]. J Evol Biol, 2000, 13: 897–905.
- [33] Koskinen M T, Nilsson J, Veselov A, et al. Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling, *Thymallus thymallus*, Salmonidae [J]. Heredity, 2002, 88: 391–402.
- [34] Bernatchez L, Wilson C C. Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes [J]. Mol Ecol, 1998, 7: 431–451.
- [35] Gross R, Kühn R, Baars M, et al. Genetic differentiation of European grayling populations across the Main, Danube and Elbe drainages in Bavaria [J]. J Fish Biol, 2001, 58: 264–280.
- [36] 胡雪松, 石连玉, 李池陶, 等. 黑龙江和乌苏里江唇鱼鲮的微卫星引物筛选及群体遗传结构[J]. 中国水产科学, 2008, 15(2): 232–235.
- [37] Gönczi A P. A study of physical parameters at the spawning sites of the european grayling (*Thymallus thymallus* L.) [J]. Regulated Ricers: Research & Management, 2008, 3(1): 221–224.

Analysis of genetic variation and geographic divergence of *Thymallus tugarinae* by microsatellite

MA Bo, JIANG Zuo-fa, HUO Tang-bin

(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Field Scientific Observation Station of Fisheries Resource and Environment in Heilongjiang River Basin of Agriculture Ministry, Harbin 150070, China)

Abstract: *Thymallus tugarinae* is a newly recorded species of *Thymallus*, which is an economically important coldwater fishes and endemic to Amur River system. Comparison research on genetic variation among three *T. tugarinae* populations from Wusuli River (E 134°39', N 47°52'), Huma River (E 124°42', N 52°18') and Emur River (E 122°47', N 52°55') was carried out to investigate their population genetic structure and geographic subdivision, which would help to develop their management and conservation strategy. The results show the average alleles numbers (N_a) are 18.1, 14.4 and 11.7, and average heterozygosity (H) are 0.816 5, 0.807 2 and 0.818 4, and average polymorphism information content (PIC) are 0.891 3, 0.805 3 and 0.757 7 for Wusuli River (WS), Huma River (HM) and Emur River (EM) populations, respectively. Population-specific allele numbers are 33, 16 and 7. From these results, we can conclude that the order of population genetic diversity from high to low is Wusuli, Huma and Emur population except higher heterozygosity of Emur population. That's to say, genetic diversity of the three *T. tugarinae* populations declined from downstream to upstream of Heilongjiang River. On the other hand, alleles and genotype are significantly different among 3 populations ($P < 0.01$). Genetic distance (D_s) and genetic differentiation coefficient (F_{st}) between Wusuli and Huma are 0.609 3, 0.068 0, between Wusuli and Emur are 0.635 7 and 0.082 7. Huma population has more close genetic relationship with Emur population with D_s and F_{st} values being 0.221 2 and 0.035 6, respectively. Genetic distance and differentiation between populations have positive correlation with geographical distance. AMOVA results show that 93.6% of genetic divergence comes from intra-population and 6.35% comes from inner population, which is due to the habit of *T. tugarinae*, such as migration and geographic isolation. Our data support that Wusuli population and upper Heilongjiang River populations (Huma and Emur) should be conserved as two independent ESUs. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (5): 678–688]

Key words: *Thymallus tugarinae*; microsatellite; genetic diversity; ESUs; Heilongjiang River; China