

## 野生哲罗鱼种质资源遗传多样性的 AFLP 分析

佟广香<sup>1,2</sup>, 匡友谊<sup>2</sup>, 尹家胜<sup>2</sup>

(1. 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081; 2. 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:** 目前哲罗鱼 (*Hucho taimen*) 处于濒危状态, 野生样品采集较困难, 因此对其种群遗传结构了解甚少。本研究应用 7 对 AFLP 引物对 5 个野生哲罗鱼群体 (104 个体) 进行了扩增和遗传结构分析。结果显示 7 对引物共扩增出 193 个多态位点, 多态位点比率为 70.18%; 多态性位点数 (AP)、多态性位点比率 (P)、观测等位基因 ( $N_a$ )、有效等位基因 ( $N_e$ )、Nei's 基因多样性指数 (H)、Shannon's 信息指数 (I) 和遗传距离 (D) 揭示的规律一致, 在 5 个群体中上述指标从大到小依次为虎头江段 2002、抓吉江段、海青江段、虎头江段 2006、呼玛河, H 在 0.148 ~ 0.195 3 之间, I 在 0.221 5 ~ 0.291 3 之间, 5 个群体的遗传多样性均偏低; 且遗传距离 (D)、遗传相似度 (S)、遗传分化度 ( $G_{st}$ )、基因流 ( $N_m$ ) 和聚类结果显示 5 个群体间的基因交流少, 遗传分化程度均很大, 并在一定程度上存在近亲交配的现象。以上结果表明, 哲罗鱼资源量的减少已经影响了其种群遗传多样性, 保护野生哲罗鱼资源已迫在眉睫, 应采取及时有效的措施对野生哲罗鱼资源进行保护以期恢复哲罗鱼资源。[中国水产科学, 2009, 16 (6): 833-841]

**关键词:** 哲罗鱼; 种质资源; 遗传多样性; AFLP; 聚类分析

**中图分类号:** S91

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8737-(2009)06-0833-09

哲罗鱼 (*Hucho taimen*) 又称哲罗鲑, 属鲑形目 (Salmoniformes)、鲑科 (Salmonidae)、哲罗鱼属 (*Hucho*), 是鲑科鱼类中个体最大也最易濒临灭绝的凶猛肉食性鱼类, 具有较高的经济价值<sup>[1-2]</sup>。20 世纪 60 年代哲罗鱼在中国分布较广, 但近几十年由于自然环境恶化、栖息地破碎、捕捞强度增大, 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<sup>[1,3-4]</sup>, 这些因素导致哲罗鱼群体数量急剧下降, 分布区迅速缩小, 濒危等级逐年上升<sup>[5-6]</sup>, 因此, 充分了解哲罗鱼的遗传结构、遗传多样性现状、栖息环境状况等, 对其种质保护、资源恢复与持续利用具有重要意义。

在对濒危物种的研究和保护中, 遗传多样性和遗传结构的研究是十分重要的内容。遗传多样性和遗传结构是一个物种的重要特征, 遗传多样性反映一个物种适应环境的能力和对环境变迁持续进化的潜力, 遗传结构的分布与物种的繁育机制密切相关, 同时反映生态适应进化、环境变迁与自然选择的效应<sup>[7]</sup>, 且稀有物种或特有物种往往出现遗传上的衰退, 因此对哲罗鱼进行遗传多样性及遗传结构分析是非常必要的。

目前有关野生哲罗鱼种质资源的研究报道较少<sup>[8-10]</sup>, 对哲罗鱼的基因组了解也甚少, 到 2008 年 4 月为止, Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中哲罗鱼的 DNA 序列仅 240 多条, 其可用的分子标记不到

收稿日期: 2008-12-24; 修订日期: 2009-03-16.

基金项目: 黑龙江水产研究所基本科研专项资金 (2007HSYZX-SJ-15)、(2008HSYZX-SJ-08); 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点实验室项目 (BZ2007-02); 国家“十五”科技攻关计划项目 (2004BA526B0116)。

作者简介: 佟广香 (1978-), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事水产动物遗传育种研究. E-mail: tong2200@163.com

通讯作者: 尹家胜. Tel: 0451-84861310; E-mail: xwsc20@tom.com

10个,因此要用有序列背景分子标记(如微卫星标记)来研究其遗传结构十分困难,而 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 标记可以在对序列背景一无所知的情况下对其进行遗传背景研究,并具有快速、灵敏、稳定等特点。本研究应用 AFLP 标记技术对黑龙江流域野生哲罗鱼群体进行遗传多样性

及遗传结构分析,评价黑龙江流域哲罗鱼群体的遗传状况,旨在为今后的研究工作提供理论上的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源

104尾野生哲罗鱼采自黑龙江水系不同江段(表1),剪取鳍条,放入75%乙醇中固定保存。

表1 样品采集地点和时间  
Tab. 1 Sampling time and location

项目 Item	采样地点 Location				
	呼玛河 HM	海青江段 HQ	虎头江段 HTA	虎头江段 HTB	抓吉江段 ZJ
采样时间 Time	2002年4月 Apr. 2002	2005年10月 Oct. 2005	2002年4月 Apr. 2002	2006年10月 Oct. 2006	2005年4月 Apr. 2005
样本数量 Individuals	20	22	22	20	20

### 1.2 基因组DNA的提取及纯度的检测

将鳍条样品取出在纯水中反复清洗,使乙醇完全挥发后提取DNA,提取方法见参考文献[11]。用1.0% Agarose 凝胶电泳检测,并用紫外分光光度计测定其浓度和纯度后备用。

### 1.3 AFLP实验

采用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *Tru9I* (Promega) 进行双酶切,酶切后用  $T_4$  DNA (Promega) 连接酶连接人工接头,并进行PCR扩增,基因组DNA酶切、接头连接及PCR扩增等方法见参考文献[12]。本实验的人工接头序列、预扩增引物及选择性扩增引物见表2。

表2 接头、预扩增和选择性扩增引物序列  
Tab. 2 Sequences of adapter, pre-amplified primers and selective amplified primers

引物 Primer	序列 5'-3' Sequence 5'-3'	引物 Primer	序列 5'-3' Sequence 5'-3'
<i>EcoRI</i> adapter	CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGTTAA	<i>Tru9I</i> adapter	GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT
<i>EcoRI</i> -pre	GACTGCGTACCAATTCA	<i>Tru9I</i> -pre	GATGAGTCCTGAGTAAC
E1	GACTGCGTACCAATTCAGC	T1	GATGAGTCCTGAGTAACTA
E3	GACTGCGTACCAATTCACA	T2	GATGAGTCCTGAGTAAACA
E4	GACTGCGTACCAATTC AAG	T6	GATGAGTCCTGAGTAACAT
E7	GACTGCGTACCAATTCACC	T7	GATGAGTCCTGAGTAACAG
		T8	GATGAGTCCTGAGTAACTC

选择扩增产物用10%非变性聚丙烯酰胺(丙烯酰胺与甲叉丙烯酰胺体积为29:1)凝胶电泳检测,260V恒压,电泳15~18h后银染<sup>[13]</sup>,利用扫描仪成像。根据DNA Ladder 计算扩增片段的大小。

### 1.4 数据处理

将AFLP的扩增条带视为二元性状,有扩增

条带计为“1”,无扩增条带计为“0”,将AFLP扩增图谱转化为0,1矩阵,统计位点总数和多态性位点比例。假设群体处于Hardy-Weinberg平衡,用PopGen32<sup>[14]</sup>计算以下各参数:(1)多态性位点AP(Number of Polymorphic loci)和多态性比率P(Proportion of Polymorphic loci);(2)观测等位基因

数  $N_a$  (Number of alleles per loci) 和有效等位基因  $N_e$  (Effective number of alleles per loci); (3) Nei's 基因多样性指数  $H$  (Gene diversity), Shannon's 信息指数  $I$  (Shannon's information index); (4) 种内个体间和群体间的遗传相似度 (Genetic similarity,  $S$ )、遗传距离 (Genetic distance,  $D$ ), 并用 Phylip3.6 版软件<sup>[15]</sup> 和 Treeview 进行个体聚类分析, bootstrap 抽样 5 000 次, 绘制个体聚类图; (5) 应用 Nei 基因多度法计算遗传分化度  $G_{st}$  (Coefficient of gene differentiation among populations within species), 其关系式为  $G_{st}=D_{st}/HT$ , 其中  $D_{st}=HT-HS$ ,  $HT$  为总遗传多样性,  $HS$  为群体内的遗传多样性,  $D_{st}$  为群体间基因多样性; (6) 按

照 Wright 的方法计算反映基因流强度的群体每代迁移数 ( $N_m$ ), 其关系式为:  $N_m=(1-F_{st})/4 F_{st}$ ,  $F_{st}$  值等同于  $G_{st}$ 。  $N_m=0.25(1-G_{st})/G_{st}$ ; (7) 用 AMOVA 方法 (Arlequin 3.0) 进行分子方差分析, 计算反映种群遗传结构及变化的平方和、方差分量以及遗传距离  $F_{st}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 AFLP引物扩增效果

用 7 对 AFLP 引物对 104 尾野生哲罗鱼基因组 DNA 进行 AFLP 扩增, 扩增片段大小在 70~450 bp 的范围内, 其中 80~300 bp 的片段较多 (图 1), 共得到 275 个位点, 平均每对引物扩增出 39.3 个位点; 多态性位点 193 个, 多态性比率为 70.18% (表 3)。

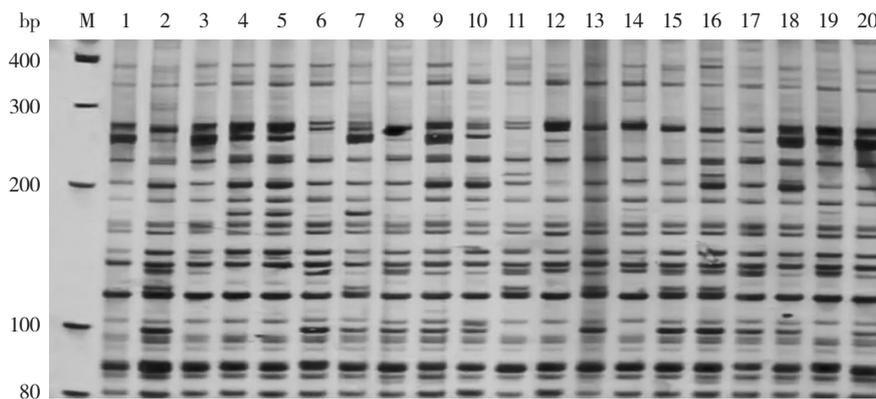


图 1 引物 1/2 组合扩增的抓吉群体 DNA 指纹图谱

M: 分子量标准; 1-20: 抓吉 20 个个体

Fig. 1 Electrophoretogram of AFLP marker amplified by 1/2 in Zhuaji population

M: Molecular Maker; 1-20: 20 individuals of Zhuaji population

表 3 7 对 AFLP 引物组合的扩增结果

Tab. 3 Amplification results from 7 primer combinations

引物组合 Primer pairs	扩增片段大小 /bp Size of band	总位点数 Total number of AFLP loci	多态位点数 Number of polymorphic loci	多态位点百分率 /% Percentage of polymorphic loci
1/1	80-400	37	25	67.57
1/7	130-450	35	27	77.14
1/8	80-350	38	29	76.32
3/8	80-450	38	25	65.79
7/8	80-400	42	27	64.29
1/2	80-400	42	26	61.90
4/6	70-450	43	34	79.07
合计 Total		275	193	
平均 Mean		39.3	27.57	70.18

### 2.2 种群遗传多样性参数分析

一个物种种群内的个体基因水平互有差异,通常表现出各种遗传变异,即遗传多样性。通常多态位点百分率( $P$ )、有效等位基因数( $N_e$ )、Nei 基因多样性指数( $H$ )、Shannon 信息指数( $I$ )是度量遗传多样性水平的常用指标。本研究对 5 个野生哲罗鱼群

体遗传多样性分析结果显示,  $H$  在 0.148 ~ 0.195 3 之间,  $I$  在 0.221 5 ~ 0.291 3 之间, 其中呼玛河群体  $H$  和  $I$  最低 ( $H$ : 0.148;  $I$ : 0.221 5); AP、 $P$ 、 $N_a$ 、 $N_e$ 、 $H$ 、 $I$  和  $D$  揭示的规律一致, 由高到低依次是 HTA、ZJ、HQ、HTB、HM, 而  $S$  的排列顺序正好与之相反(表 4)。

表 4 哲罗鱼群体内遗传多样性参数  
Tab. 4 Genetic diversity among populations of *Hucho taimen*

种群 Population	多态位点数 AP	多态位点百分率 % $P$	观测等位基 因数 $N_a$	有效等位基 因数 $N_e$	Nei's 基因多 样性指数 $H$	Shannon's 信 息指数 $I$	群体内遗传相 似性 $S$	群体内遗传 距离 $D$
呼玛河 HM	120	43.64	1.4364 (0.4968)	1.2541 (0.3573)	0.1480 (0.1944)	0.2215 (0.2795)	0.8776	0.1224
海青 HQ	143	52.00	1.5200 (0.5005)	1.3012 (0.3595)	0.1780 (0.1967)	0.2673 (0.2835)	0.8609	0.1391
虎头 HTA	153	55.64	1.5564 (0.4977)	1.3353 (0.3750)	0.1953 (0.2020)	0.2913 (0.2891)	0.8478	0.1522
虎头 HTB	128	46.55	1.4655 (0.4997)	1.2740 (0.3672)	0.1586 (0.1985)	0.2369 (0.2843)	0.8759	0.1241
抓吉 ZJ	152	55.27	1.5527 (0.4981)	1.3274 (0.3816)	0.1887 (0.2043)	0.2813 (0.2903)	0.8538	0.1462
平均 Mean	139.2	50.62	1.5060	1.298	0.1737	0.2597	0.8632	0.1368
全部 Overall	193	70.18	1.7018 (0.4583)	1.4257 (0.3748)	0.2478 (0.1968)	0.3698 (0.2770)		

注: 括号内为标准差。

Note: Standard deviation in parentheses.

### 2.3 群体间遗传分化度及基因流

群体间遗传分化度( $G_{st}$ )和基因流( $N_m$ )见表 5, 配对群体间的  $G_{st}$  (pairwise  $G_{st}$ ) 在 0.154 5 ~ 0.313 8 之间;  $N_m$  在 1.093 2 ~ 2.73 6 之间; 总的群体间  $G_{st}$  (overall  $G_{st}$ ) 为 0.299 1,  $N_m$  为 1.171 8, 即群体间遗传

变异占总变异 29.91%。种群遗传变异的 AMOVA 分析表明, 种群间差异显著 ( $P < 0.05$ )。种群的遗传多样性主要分布在种群内, 占变异成分的 62.64%, 有 37.36% 分布在种群间(表 6), 与 Nei 基因多度法计算遗传分化度  $G_{st}$  的结果基本一致。

表 5 群体间遗传分化度和基因流  
Tab. 5 Gene differentiation and  $N_m$  between populations

群体 Population	呼玛河 HM	海青 HQ	虎头 HTA	虎头 HTB	抓吉 ZJ
呼玛河 HM	--	0.2567	0.2619	0.3138	0.2358
海青 HQ	1.4479	--	0.1545	0.2052	0.1772
虎头 HTA	1.4091	2.7364	--	0.1593	0.1545
虎头 HTB	1.0932	1.9361	2.6394	--	0.1810
抓吉 ZJ	1.6204	2.3223	2.7363	2.2621	--

注: 对角线上为遗传分化度( $G_{st}$ ); 对角线下方为基因流( $N_m$ )。

Note:  $G_{st}$  (above diagonal) and  $N_m$  (below diagonal).

表 6 种群间和种群内的分子变异方差分析  
Tab. 6 Analysis of molecular variance (AMOVA) within and among populations

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of squares	方差分量 Variance components	方差分量百分率 Percentage variation	遗传距离 $F_{st}$	$P$
群体间 Among populations	4	3971.31	44.1937	37.3565	0.3735	< 0.05
群体内 Within populations	100	7336.79	74.1090	62.6435		

2.4 群体间遗传距离及聚类分析

Nei's 遗传距离( $D$ )和遗传相似性( $S$ )见表 7,  $D$  值的变化范围为 0.079 5~0.176 4,  $S$  值的变化范围为 0.838 3~0.923 6, 各群体与呼玛河群体的  $D$  值相

对较高。个体聚类结果见图 2, 5 个群体明显被分为 5 枝, 其中 HTA 和 HTB 最近, 其次是 HQ 和 ZJ, HM 最远, 5 个群体中均有部分个体紧密的聚类在一起 (图 2)。

表 7 群体间相似度和遗传距离矩阵  
Tab. 7 Inter-species Nei's genetic identity and genetic distance

群体 Population	呼玛河 HM	海青 HQ	虎头 HTA	虎头 HTB	抓吉 ZJ
呼玛河 HM	--	0.8698	0.8576	0.8383	0.8800
海青 HQ	0.1395	--	0.9211	0.9000	0.9084
虎头 HTA	0.1536	0.0822	--	0.9236	0.9185
虎头 HTB	0.1764	0.1054	0.0795	--	0.9122
抓吉 ZJ	0.1279	0.0961	0.0850	0.0919	--

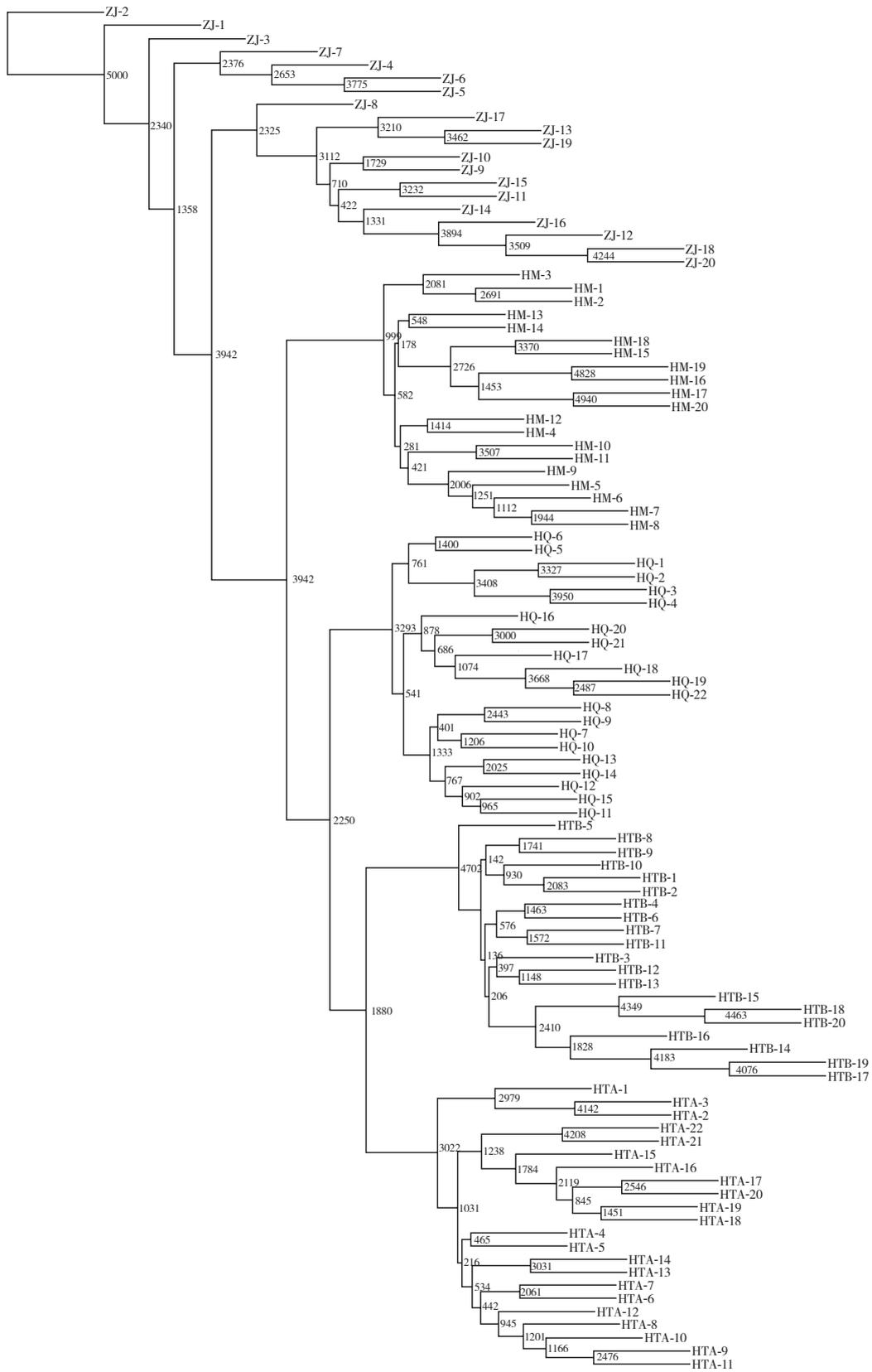
注: 对角线上为遗传相似度; 对角线下方为遗传距离。  
Note: Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

3 讨论

3.1 遗传多样性水平

种群遗传多样性是生命进化和适应环境的基础, 遗传多样性愈丰富, 对环境变化适应性和生存潜力就愈大, 然而, 目前人们对哲罗鱼的认识仅限于资源量降低和栖息地、产卵场丧失等方面<sup>[2-3, 16-17]</sup>, 遗传多样性及遗传结构往往决定了物种的命运, 是濒危物种研究的一个重要方面<sup>[18-19]</sup>。本研究对 5 个野生哲罗鱼的遗传结构和遗传多样性进行研究, 结果显示 5 个群体的遗传多样性均偏低 ( $H$ : 0.148 0~0.195 3;  $I$ : 0.221 5~0.291 3),  $AP$ 、 $P$ 、 $N_a$ 、 $N_e$ 、 $H$ 、 $I$  和  $D$  揭示的规律一致, 从大到小依次为 HTA、ZJ、HQ、HTB、HM, 且以下分析显示遗传多样性的高低与资源量存在着密切关系, 黑龙江流域 2002 年的资源调查显示乌苏里江虎头江段年捕捞量为 33.17 t, 种群密度为 131.1 kg/km<sup>2</sup>, 海青次之 (40 kg/km<sup>2</sup>), 抓吉排在其后

(28.6 kg/km<sup>2</sup>), 而呼玛河的资源量最小, 全年捕捞量仅 150~200 kg; 到 2003 年虎头江段年捕捞量就下降到了 14.8 t, 种群密度减少至 58.495 kg/km<sup>2</sup><sup>[20]</sup>; 近几年哲罗鱼的捕获量很小, 没有其资源量统计的报道, 但尹家胜<sup>[21]</sup>和姜作发等<sup>[20]</sup>的调查显示哲罗鱼资源量呈大幅度下降趋势, 资源量的下降必然导致遗传多样性下降, 2002 年虎头哲罗鱼样品的遗传多样性较 2006 年样品的多样性高也证明了这一点。资源量减少使有效繁殖群体的数量下降, 导致种群结构趋向单一化, 遗传多样性变小, 物种的适应能力下降, 大大增加了种群面临着灭绝的危险。5 个群体中虎头、海青和抓吉群体的遗传多样性较高, 这和乌苏里江特殊的地理位置和历史原因有关, 乌苏里江是中俄的界江, 这些江段对应的俄罗斯一侧均有较大的支流, 属于哲罗鱼的栖息地和繁育场, 对中国境内的资源量起到补充作用; 而呼玛河是中国的内河,



1000

图2 104尾哲罗鱼个体UPGMA聚类图

Fig. 2 Individuals' UPGMA dendrogram of *Hucho taimen*

由于环境的恶化及毁灭性捕捞(电船、农药等方式捕捞)导致资源量严重下降,使其遗传多样性较其他4个群体的遗传多样性较小。总之,哲罗鱼资源量的减少已经严重的影响了遗传多样性,因此应加强对哲罗鱼资源的保护。

### 3.2 群体遗传结构

遗传分化度( $G_{st}$ )是衡量群体再分效应的指标,表示因遗传漂变引起一个亚群杂合度的降低程度。 $G_{st}$ 的取值范围在0~1之间,其中0表示完全随机交配,无群体再分;1表示极端再分,即群体隔离。0.00~0.05: 群体分化程度较小;0.05~0.15: 群体分化程度中等;0.15~0.25: 群体分化程度较大;0.25~1.00: 群体分化程度很大<sup>[22]</sup>。本实验中 $G_{st}$ 在0.154 5~0.313 8,说明群体间的遗传变异主要来自于群体内部,且5个群体间的分化度很大,其中HM与其他4个群体存在着很高的分化度(0.235 8~0.313 8); $N_m$ 分析显示HM群体与其他群体间的基因流均较小(1.093 2~1.620 4),其他各群体间的基因流相对较大(1.936 1~2.736 4),上述实验结果表明, HM群体与其他群体已经产生了差异,这是因呼玛河在地理位置上与其他3个江段相距较远,地理隔离可以导致群体间的遗传分化系数增大,基因流值降低;另一方面虎头,海青,抓吉3个江段虽然地理距离较近,但也在一定程度上存在着分化,可能由于环境恶化和人类活动(过度捕捞、修建水库)等造成的栖息地的片段化,使各群体在空间上相对隔离,在个体的迁移能力不变的情况下,隔离距离越大,群体间的基因流越小,从而导致群体间的遗传分化增大<sup>[23]</sup>。根据Hamrick等<sup>[24]</sup>的观点, $N_m$ 大于1时,基因流就足以抵制遗传漂变的作用,也同时防止群体分化;若 $N_m$ 小于1,漂变就成为刻划群体遗传结构的主导因素。漂变导致某些等位基因消失,另一些等位基因固定,从而改变群体的遗传结构。本实验结果基因流均大于1,说明基因流能够抵制漂变作用,其中HM群体与其他群体间的基因流均较小(1.093 2~1.620 4),已接近临界值,由此可知HM群体与其他群体间基因流动较弱,易受环境变化、遗传漂变等随机因素影

响,但是 $N_m$ 大于1说明漂变还没成为遗传结构的主导因素,能够防止群体产生分化、变种,这对呼玛河哲罗鱼的资源恢复尤为重要,也由此可见对哲罗资源进行保护已迫在眉睫。Nei的遗传多样性分析方法与分子方差分析(AMOVA)得出的群体变异来源研究结果一致,群体内遗传变异大于群体间遗传变异。

### 3.3 遗传距离及聚类分析

遗传距离 $D$ 和遗传相似性 $S$ 分析显示, $D$ 值的变化范围为0.079 5~0.176 4, $S$ 值的变化范围为0.838 3~0.923 6,各群体与HM群体的 $S$ 值较低, $D$ 值相对较高,HTA与HTB的 $S$ 值较大, $D$ 值较小。Thorp<sup>[25]</sup>通过分析研究认为不同物种间的遗传相似系数 $I$ 为0.2~0.8(遗传距离 $D_s$ 为0.2~0.8);同科属群体间 $I$ 为0.5~0.9( $D_s$ 为0.1~0.5);同种群体间 $I$ 为0.8~0.97( $D_s$ 为0.03~0.2)。虽然哲罗群体间存在差异,特别是HM群体,与其他群体的差异已比较明显,但还属于同种群体间的范围内,没有造成大的分化,这种分化与哲罗鱼的生活习惯有很大关系,哲罗鱼是溯河洄游类,每年4~5月份溯河洄游至支流上游产卵繁殖,抓吉、海青江和虎头是乌苏里江的不同江段,距离较近,可能存在少部分基因交流,而呼玛河相对独立,因此在遗传距离和遗传相似性方面与其他3个地区的群体存在差异;个体聚类图显示,5个群体明显的被聚为5个分支,且每个分支内均有1部分个体被紧密的聚集在一起,其中HTA与HTB相比,HTB中聚集紧密的个体较多,这些聚集紧密的个体说明其亲缘关系很近,很可能来自同一亲本,进而说明野生状态下的哲罗鱼发生了较强的近亲交配,资源调查显示,哲罗鱼资源量逐年减少<sup>[3,16]</sup>,且一对一的产卵习性<sup>[1,21]</sup>,使不同类型的亲本之间基因交流较少,加之资源量少,繁殖群体数量更少,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。一般来讲,近亲交配较严重,可能会造成种质退化,或者类群消失,而遗传距离较大的亲本产生的后代遗传优势明显,适应力强,生长较快,可见哲罗鱼资源量的减少已经对其遗传多样性产生了严重的影响,应采取及

时有效的措施对野生哲罗鱼资源进行保护。在对哲罗鱼野生资源保护的同时应积极采取人工放流的方法恢复其资源量,人工放流可以扩大种群数量,避免种群遗传多样性减少,减缓其灭绝速度,目前哲罗鱼人工繁殖和驯化养殖已经成功<sup>[26-27]</sup>,为人工放流创造了良好的条件,且可以利用分子生物学方法选择亲缘关系较远的亲本进行繁殖,放流,这样既可以增加哲罗鱼的资源,又可避免遗传瓶颈效应,这对哲罗鱼的资源恢复具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 王清印,余来宁,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] 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.
- [4] 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.
- [5] 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: 29-31.
- [6] Pronin N M. About changes in the status of rare and disappearing salmoniformes fish species in the red book of Buryatia republic [C]. Second international symposium on ecology and fishery biodiversity in large rivers of northeast asia and western north America, Harbin, China. 2006.
- [7] Sokal R R, Jacquez G M, Wooten M. Spatial autocorrelation analysis of migration and selection[J]. Genetics, 1989, (2): 845-855.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Tong GX, Kuang YY, Yin JS, et al. Isolation of microsatellite DNA and analysis on genetic diversity of endangered fish, *Hucho taimen* (pallas)[J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(4): 1 099-1 101.
- [11] 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.
- [12] 佟广香,包玉龙,匡友谊,等.哲罗鱼 AFLP 技术体系建立的研究[J].江西农业大学学报,2008,30(3): 405-410.
- [13] 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.
- [14] YEH F C, BOYLE T J B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits [J]. Belgian Journal of Botany, 1997, 129: 157.
- [15] 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.
- [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, 97(5): 34.
- [17] 崔喜顺,周长海,李国芳.乌苏里江下游海青江段哲罗鱼渔业生物学研究[J].黑龙江水产,2004,2: 43-45.
- [18] Erickson D L, Fenster C B, Stenoien H K, et al. Quantitative trait locus analyses and the study of evolutionary process [J]. Molecular Ecology, 2004, 13(9): 2 505-2 522.
- [19] Slate J. Quantitative trait locus mapping in natural populations: Progress, caveats and future directions [J]. Molecular Ecology, 2005, 14(2): 363-379.
- [20] 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.
- [21] 尹家胜,徐伟,曹鼎臣,等.乌苏里江哲罗鱼的年龄结构性比和生长[J].动物学报,2003,49(5): 687-692.
- [22] 姜玉锁,刘文忠,张春香,等.中国境内不同地理型东方蜜蜂遗传多样性的 AFLP 分析[J].昆虫学报,2007,50(2): 144-152.
- [23] 张春霖,陈大庆,史建全,等.青海湖裸鲤繁殖群体遗传多样性的 RAPD 分析[J].水产学报,2005,29(3): 141-147.
- [24] Hamrick J L, Godt MJ W, Sherman Broyles SL. Gene flow among plant population: evidence from genetic markers. Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics [J]. Missouri Botanical Garden, 1995, 215-232.
- [25] Thorp J P. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation, and systematics [J]. Annual Review of Ecology Systematics, 1982, 13(1): 139-168.
- [26] 徐伟,尹家胜,姜作发,等.哲罗鱼人工繁育技术的初步研究[J].中国水产科学,2003,10(1): 29-34.
- [27] 徐伟,孙慧武,关海红,等.哲罗鱼全人工繁殖的初步研究[J].中国水产科学,2007,14(6): 896-902.

## AFLP analysis of genetic diversity of taimen (*Hucho taimen*) in wild populations

TONG Guang-xiang<sup>1,2</sup>, KUANG You-yi<sup>2</sup>, YIN Jia-sheng<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory for Genetic Breeding of Freshwater fish and Aquaculture Biology of the Ministry of Agriculture, Wuxi 214081, China;  
2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Harbin 150070, China)

**Abstract:** *Hucho taimen* is in the state of endangerment and has been record in the Red Lists of Threatened Species in 1998. There were lack wild population genetic structure of them because their wild samples were hardly collected. In order to know and protect this species, population genetic diversity and structure for wild taimen in Heilongjiang River are investigated using AFLP markers. Seven pair of AFLP primers were amplicated to five wild *Hucho taimen* groups, which intotal 104 individuals. According to the amplicated results, AP, P,  $N_a$ ,  $N_e$ , H, I, D, S,  $G_{st}$  and  $N_m$  were calculated by PopGen32 software. Individual clustering were analyzed by Phylip 3.6 and Treeview software. There are 193 polymorphic site in total and the polymorphic site rate is 70.18%. AP, P,  $N_a$ ,  $N_e$ , H, I and D have the same variation trend like HTA > ZJ > HQ > HTB > HM. The Nei genetic diversity indices (H) are between 0.148 and 0.1953, the Shannon information indices (I) are between 0.221 5 and 0.293 1. The genetic diversity of five groups are all on the low side. And the genetic diversity has the affinity with the resource. The analysis of D, S,  $G_{st}$  and  $N_m$  showed that low genetic communion between the five groups and great genetic differentional. This low genetic communion and great genetic differentional was caused probably by the overfishing and the fragmented habitats that blocked the gene flows between populations. The clustering result showed that all the five groups had the closed genetic relationship individuals cluster together. Therefore there are inbreeding in some degree. All the results indicated that the decrease of *Hucho taimen* resource had been effected the group genetic diversity and conduce some inbreeding. We recommended to do some effective work to protecting the genetic diversity of taimen resource and discussed the protected measures in this paper. the endangered species. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (6) : 833–841]

**Key words:** *Hucho taimen*; germplasm resource; genetic diversity; AFLP; cluster analysis

**Corresponding author:** YIN Jia-sheng. E-mail: xxsc20@tom.com