

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.18056

中国绥芬河三块鱼不同群体的种属划分及起源

常玉梅¹, 程磊¹, 孙博¹, 苏宝锋¹, 梁利群¹, 王维坤²

1. 淡水鱼类育种国家地方联合工程实验室, 农业农村部淡水水产生物技术与遗传育种重点实验室, 中国水产科学研究院特殊生境鱼类种质特性与抗逆育种重点实验室, 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. 黑龙江省东宁市水产局, 黑龙江 东宁 157200

摘要: 为进一步明确中国绥芬河三块鱼属(*Tribolodon*)鱼类的分类地位及其起源, 本研究依据表型和洄游产卵时间, 将珠星三块鱼(*Tribolodon hakonensis*)、三块鱼(*T. brandtii*)及二者疑似杂交种与日本珠星三块鱼共 53 尾样本的 COI 基因序列进行了分析和比较。COI 有效序列长度为 637 bp, 共检测到 8 种单倍型, 其中三块鱼独享 4 种、珠星三块鱼独享 3 种、日本珠星三块鱼独享 1 种; 疑似杂交种虽与三块鱼共享 2 种单倍型, 却有 80% 的个体的单倍型与珠星三块鱼主效单倍型一致。系统进化分析显示, 珠星三块鱼与珠星三块鱼南方型(southern forms of *T. hakonensis*)聚为一支, 日本珠星三块鱼与珠星三块鱼北方型(northern forms of *T. hakonensis*)聚为一支, 三块鱼(*T. brandtii*)单独聚为一支, 由此可以确定日本海大彼得湾经俄罗斯滨海区溯河到中国河区产卵的三块鱼实为珠星三块鱼南方型和三块鱼。遗传距离结果显示, 珠星三块鱼南方型和北方型的遗传距离为 0.023, 符合 COI 类群间的划分依据(>0.02), 支持将它们划分为两个有效种或亚种更妥当。依据 COI 分析结果, 推测珠星三块鱼南方型和三块鱼存在杂交的可能性, 提出了三块鱼野生种质资源保护和合理利用的相关建议。

关键词: 绥芬河; 三块鱼; 杂交种; COI 基因; 系统进化

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)04-0811-08

三块鱼又名远东红鳍鱼、滩头鱼, 是雅罗鱼亚科三块鱼属(*Tribolodon*)几种土著经济种的统称。主要分布于太平洋西北部的日本海及一些内陆淡水河流, 包括俄罗斯的滨海省、哈巴罗夫斯克和萨哈林, 日本和朝鲜半岛, 在中国仅分布于绥芬河和图们江流域^[1-2]。绥芬河是日本海的注水河流之一, 三块鱼性腺发育成熟后, 分批溯河而上进入河口, 在急滩峭口处中产卵, 故此得名“滩头鱼”, 产卵后立即返回近海区^[2]。渔民根据其洄游时间和体色差异分为“金滩头”、“银滩头”和“黑滩头”。4 月初游来第一批, 鱼身两侧各有数条橘红色条纹, 在阳光照耀下金光闪闪, 称“金滩头”; 5 月第二批, 体侧条纹为银白色, 称“银滩头”;

6 月第三批, 鱼身条纹浓黑, 称“黑滩头”, 数量比前两批多。

中国学者虽然已对三块鱼洄游群体的生物学、生殖结构组成、生态学、盐碱耐受性等方面进行了详细报道^[2-6], 但关于其分类地位一直存有争议。早期一些学者将金、银、黑 3 种滩头鱼归为 3 个不同的生态群体, 并且认为银滩头只是金、黑滩头的亚成体^[7-8]; 后续研究发现, 金、黑滩头在形态学、繁殖生物学、同工酶和 RAPD 基因型等方面存在比较明显的差异, 将二者归为两个不同的种, 即珠星三块鱼(*Tribolodon hakonensis*)和三块鱼(*T. brandtii*)^[2, 9-11]。由于三块鱼主要分布在俄罗斯和日本境内, 关于其种属划分及起

收稿日期: 2018-02-07; 修订日期: 2018-05-28.

基金项目: 科技部科技基础性工作专项(2013FY110700); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2014A11JC04).

作者简介: 常玉梅(1978-), 女, 博士, 从事鱼类分子生物学和抗逆育种研究. E-mail: changyumei@hrfri.ac.cn

通信作者: 梁利群, 研究员, 从事鱼类分子生物技术研究. E-mail: liangliqun@hrfri.ac.cn

源都进行了较为系统的研究。早期根据血清和肌肉蛋白谱带、同工酶及 mtDNA 的研究结果将三块鱼划分为 4 个有效种,分别为珠星三块鱼(Günther,1877)、三块鱼(Dybowski, 1872)、萨哈林三块鱼(*T. sachalinensis*) (Nikolsky,1889)和 *T. nakamura* (Doi et Shinzawa, 2000)^[12-14]。但最新研究发现,来自俄罗斯滨海区的珠星三块鱼和哈巴罗夫斯克、萨哈林及日本的珠星三块鱼在形态、核型、精子微观结构及 mtDNA 序列都存在明显分化^[15-18]。因此,也有学者将俄罗斯滨海区的珠星三块鱼南方型(southern forms of *T. hakonensis*)视为一个隐秘的新种(*T. sp*)^[15, 18]。

DNA 条形码技术(DNA barcoding),即利用一个标准基因的 DNA 序列作为物种的鉴定手段,首次由加拿大 Guelph 大学的 Hebert 教授及其研究团队于 2003 年提出,并发现线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I (cytochrome c oxidase subunit I, COI) 靠近 5'端的一段序列对物种鉴定十分有效^[19-20]。程磊等^[21]利用该技术分析了鲫属鱼类种与亚种的划分,认为黑鲫(*Carassius carassius*)、白鲫(*C. cuvieri*)和鲫(*C. auratus*)为 3 个有效种,而银鲫(*C. auratus gibelio*)只是鲫的一个亚种。刘璐等^[22]对

17 种鲴科鱼类进行了鉴定,证实了该技术在物种鉴定方面的有效性。由于缺乏与来自日本或俄罗斯等产地三块鱼样本遗传学数据的直接比较,目前中国绥芬河三块鱼的种属划分结果仍缺乏足够的分子证据。本研究利用 DNA 条形码技术,对分布在中国绥芬河的珠星三块鱼和三块鱼及二者疑似杂交种与采自日本的珠星三块鱼进行系统发育分析,同时与国外发表的三块鱼属鱼类的 COI 序列进行同源比较,以明确中国三块鱼的种属划分,同时探讨疑似杂交种产生的缘由,避免人为因素造成的种质混杂,为更好地保护和利用这些优异的种质资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2016 年 4—6 月,根据三块鱼不同繁殖群体在黑龙江东宁县绥芬河的洄游时间及形态学差异,分别采集珠星三块鱼 21 尾、三块鱼 19 尾,以及二者可能的疑似杂交种 10 尾(图 1);日本珠星三块鱼 3 尾,采自日本青森县宇曾利山湖(日本东京大学, Kaneko 教授惠赠)。所有样本鳍条于 95%乙醇中保存备用。



图 1 绥芬河三块鱼

Fig. 1 *Tribolodon* species in Suifen River

1.2 基因组 DNA 的提取

剪取少量 95%乙醇保存的鳍条,滤纸吸干乙醇,放入 2 mL 离心管中加入 600 μ L DNA 提取裂解液(成分: 1 mol/L Tris pH 8.0、5 mol/L NaCl、0.5 mol/L EDTA pH 8.0、10% SDS 和 200 μ g/mL 蛋白酶 K)于 55℃过夜消化;次日加入等体积的酚/氯仿混合液(1:1)抽提 1 次,12000 r/min 室温离心 10 min,吸取上清(约 550 μ L)加入 1 mL 无水乙醇沉淀,12000 r/min 室温离心 10 min,70%乙醇洗涤 1 次,室温干燥 10 min,加入 0.1× TE 溶解。

采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)测定 DNA 浓度后稀释至 10 ng/ μ L, 4℃保存备用。

1.3 COI 基因的引物来源及 PCR 扩增

线粒体 COI 引物参照 Prasanna 等^[23]报道的通用引物(COI-F: 5'-TCAACCAACCACAAAGACA-TTGGCAC-3'; COI-R: 5'-TAGACTTCTGGGTGG-CCAAAGAATCA-3')。PCR 反应总体积体系为 25 μ L,其中包含自制 PCR buffer mix 18 μ L (包括

50 mmol/L KCl、10 mmol/L Tris-HCl、0.10% Triton X-100、1.5 mmol/L MgCl₂、0.10% NP-40、0.01% 明胶、200 μmol/L 4 种 d NTP), 浓度 10 μmol/L 的上下游引物各 1 μL, Taq DNA 聚合酶 0.2 μL (Fermentas, 5 U/L), 模板 DNA 2 μL, 去离子灭菌水补至总体积 25 μL。反应程序为 95℃ 预变性 3 min; 35 个循环包括 95℃ 15 s, 57.7℃ 30 s, 72℃ 30 s; 最后 72℃ 延伸 7 min。PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 送至北京诺赛基因公司进行测序。

1.4 序列处理及分析

将测序得到的序列文件用 DNASTAR. Lasergene 7.1 中的 EditSeq 模块转换成 fasta 格式用于后续分析。采用 ClustalX 1.83 对 COI 基因序列进行多重比对, 获得对齐后的同源序列, 采用 NCBI 网站提供的 Bankit 提交到 GenBank 数据库中。利用 DNAsp 5.10.01 计算多态位点数(S)、单倍型数(H)、单倍型多样性(H_d)、核苷酸多样性(P_i)、平均核苷酸差异数(K)。使用 MEGA7.0 计算所得单倍型的碱基组成、单倍型间的转换/颠换 R 值; 从 NCBI GenBank 数据库中下载 7 条已发表的三块鱼 COI 序列, 包括来自俄罗斯萨哈林和哈巴罗夫斯克的珠星三块鱼北方型(isolate 4F&5F, EU392225.1& EU392226.1)、俄罗斯滨海区的珠星三块鱼南方型(isolate Vkk, EU392224.1)、俄罗斯萨哈林的萨哈林三块鱼(EU392231.1& EU392-232.1)、俄罗斯滨海区的三块鱼(EU392229.1)和鄂霍次克海的 *T. nakamurai* (EU392230.1)^[24-25]。将这些发表序列与本研究得到的序列合并后采用邻接法(neighbor-joining)构建基于 Kimura 双参数模型(Kimura 2-parameter, K2P)的单倍型进化树, 并经 1000 次自展检验(bootstrap), 选用草鱼(*Cteno-*

pharyngodon idellus) COI 基因相应片段(GenBank 登录号: NC_010288.1)作为系统进化分析的外类群; 使用 MEGA7.0 计算基于 K2P 模型下各个类群内部的遗传距离及各类群间的平均遗传距离。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性分析

序列经比对处理后得到 COI 有效序列长度为 637 bp。53 条有效序列共检测到 8 种单倍型(图 2), 单倍型序列编辑后提交到 GenBank 数据库中 (GenBank 登录号: MF450497~MF450504)。其中三块鱼有 4 种单倍型(Hap1~Hap4), 珠星三块鱼有 3 种单倍型(Hap5~Hap7), 疑似杂交种有 3 种单倍型(Hap2、Hap3 和 Hap5), 日本珠星三块鱼独享 1 种单倍型(Hap8)(表 1)。单倍型碱基组成分析显示, A、T、C、G 4 种碱基所占比例比较恒定, 平均含量分别为 25.5%、28.2%、27.6%和 18.8%, A+T 含量(53.7%)明显高于 C+G 含量(46.4%)。平均碱基交换/颠换 R 值为 16。遗传多样性参数分析表明, 三块鱼的遗传多样性高于珠星三块鱼(表 2)。

2.2 不同群体亲缘关系分析

分别计算了 8 种单倍型间的序列分歧度(表 3)。结果显示, 三块鱼 4 种单倍型间(Hap1~Hap4)的分歧度只有 0.001~0.002, 珠星三块鱼的 3 种单倍型间(Hap5~Hap7)的分歧度也只有 0.001~0.002, 而两种三块鱼间的分歧度则达到 0.035~0.038; 珠星三块鱼和日本珠星三块鱼的分歧度为 0.013~0.014, 三块鱼和日本珠星三块鱼的分歧最大, 为 0.040~0.043。从单倍型间的分歧可以看出, 中国绥芬河珠星三块鱼和日本珠星三块鱼亲缘关系较近, 次之为三块鱼和珠星三块鱼, 再者为三块鱼和日本珠星三块鱼。

```
Hap_1 CTTTCTTCTCCTTTACAGGTACCGAGCCCGTAAATAACCGCTGACGTCTACACGATTGAGAATTTTCACTATACTTTAGTCATGTACCGCGCCTCGGC
Hap_2 CTTTCTTCTCCTTTACAGGTACCGAGCCCGTGAATAACCGCTGACGTCTACACGATTGAGAATTTTCACTATACTTTAGTCATGTACCGCGCCTCGGC
Hap_3 CTTTCTTCTCCTTTACAGGTACCGAGCCCGTAAATAACCGCTGACGTCTACACGATTGAGAATTTTCACTATACTTTAGTCATGTACCGCGCCTCGGC
Hap_4 CTTTCTTCTCCTTTACAAGTACCGAGCCCGTAAATAACCGCTGACGTCTACACGATTGAGAATTTTCACTATACTTTAGTCATGTACCGCGCCTCGGC
Hap_5 CTTTCTTTTCTCTCATGGACATTGGGCCTAAGAACAACCAATGACATCCTTATGATCCAGAATTTTGTGCTGTACCCCTGGCCATGCACCATACCTCGAC
Hap_6 CTTTCTTTTCTCTCATGGACATTGGGCCTAAGAACAACCAATGACATCCTTATGATCCAGAATTTTGTGCTGTACCCCTGGCCATGCACCATACCTCGAC
Hap_7 CTTTCTTTTCTCTCATGGACATTGGGCCTGAGAACAACCAATGACATCCTTATGATCCGGAATTTTGTGCTGTACCCCTGGCCATGCACCATACCTCGAC
Hap_8 CTTTCTTTTCTCTCGTGGACATTGGGCCTAAGGACGCGCGATGACATCCATATGGTCCGGAATTTCTGTGCTATACTCTGGCCATGCGCCACACCTCGAT
```

图 2 COI 基因在三块鱼不同群体中的 8 种单倍型

Fig. 2 Eight haplotypes of COI gene found in different populations of *Tribolodon*

表 1 COI 基因的 8 种单倍型在三块鱼不同群体中的分布
Tab. 1 Distribution of eight haplotypes of COI gene in different populations of *Tribolodon*

单倍型 haplotype	三块鱼 <i>Tribolodon brandtii</i>	珠星三块鱼 <i>Tribolodon hakonensis</i>	疑似杂交种 suspected hybrid	日本珠星 三块鱼 <i>Tribolodon hakonensis</i>
Hap1	6			
Hap2	12		1	
Hap3	2		1	
Hap4	1			
Hap5		17	8	
Hap6		1		
Hap7		1		
Hap8				3
总个体数 total number	21	19	10	3

2.3 中国三块鱼的系统进化分析

将本研究得到的 8 种单倍型与国外发表的三块鱼属鱼类的单倍型序列合并^[24], 重新构建了三块鱼属鱼类的系统进化关系图(图 3)。由图 3 可以看出, 绥芬河珠星三块鱼(Hap5~Hap7)与珠星三块鱼南方型(EU392224)聚在一起, 日本珠星三块鱼(Hap8)与珠星三块鱼北方型(EU392225, EU39-2226)聚在一起; 绥芬河三块鱼(Hap1~Hap4)则与三块鱼(EU392229)聚为一支; 另外两种三块鱼分别单独聚类。根据聚类结果得知, 中国绥芬河的珠星三块鱼实为珠星三块鱼南方型, 三块鱼与早期的分类结果一致。将珠星三块鱼南方型、珠星三块鱼北方型与三块鱼划分为 3 个类群, 各个类群内和类群间的平均 K2P 遗传距离如表 4 所示。

表 2 珠星三块鱼和三块鱼群体的遗传多样性参数 Tab. 2 Genetic parameters in populations of <i>Tribolodon hakonensis</i> and <i>Tribolodon brandtii</i>						
物种 species	样本数 N	多态性位点 S	单倍型数目 H	单倍型多样性 H_d	核苷酸多样性 P_i	平均核苷酸差异数 K
三块鱼 <i>Tribolodon brandtii</i>	21	3	4	0.595	0.00107	0.684
珠星三块鱼 <i>Tribolodon hakonensis</i>	19	3	3	0.205	0.00005	0.316

表 3 8 个单倍型间的序列分歧 Tab. 3 The sequence divergence between eight haplotypes								
	Hap1	Hap3	Hap4	Hap2	Hap8	Hap7	Hap5	Hap6
Hap1		0.002	0.002	0.001	0.017	0.015	0.015	0.015
Hap3	0.002		0.002	0.001	0.017	0.016	0.016	0.015
Hap4	0.002	0.002		0.001	0.018	0.016	0.016	0.015
Hap2	0.001	0.001	0.001		0.017	0.015	0.015	0.015
Hap8	0.040	0.043	0.043	0.042		0.007	0.007	0.006
Hap7	0.036	0.038	0.038	0.037	0.014		0.002	0.002
Hap5	0.036	0.038	0.038	0.037	0.014	0.002		0.001
Hap6	0.035	0.037	0.037	0.036	0.013	0.003	0.001	

注: 对角线下方是序列间的分歧度, 对角线上方是 1000 次 bootstrap 得到的相应的标准误差。
Notes: The sequence divergence between haplotypes is below the diagonal; the corresponding standard error obtained by the 1000 bootstrap is above the diagonal.

3 讨论

3.1 绥芬河三块鱼的种属划分依据

早期国内外学者对三块鱼的属名和分类一直存有争议。依据外部形态特征, 有些学者将其划分为雅罗鱼属(*Leuciscus*), 有些学者则划分为三块鱼属(*Tribolodon*)^[25], 而中国学者陈宜瑜等^[26]

将鳞片是否具有放射肋、口位及侧线鳞数作为雅罗鱼属和三块鱼属的鉴别特征, 重新将三块鱼划分为三块鱼属。随着现代分子生物学的发展, 国内外学者分别采用 RAPD、mtDNA 和基因标记分析了三块鱼和瓦氏雅罗鱼的系统发育关系, 认为二者存在非常明显的遗传分化, 证实将二者划分为不同属是合理的^[1, 10, 27]。

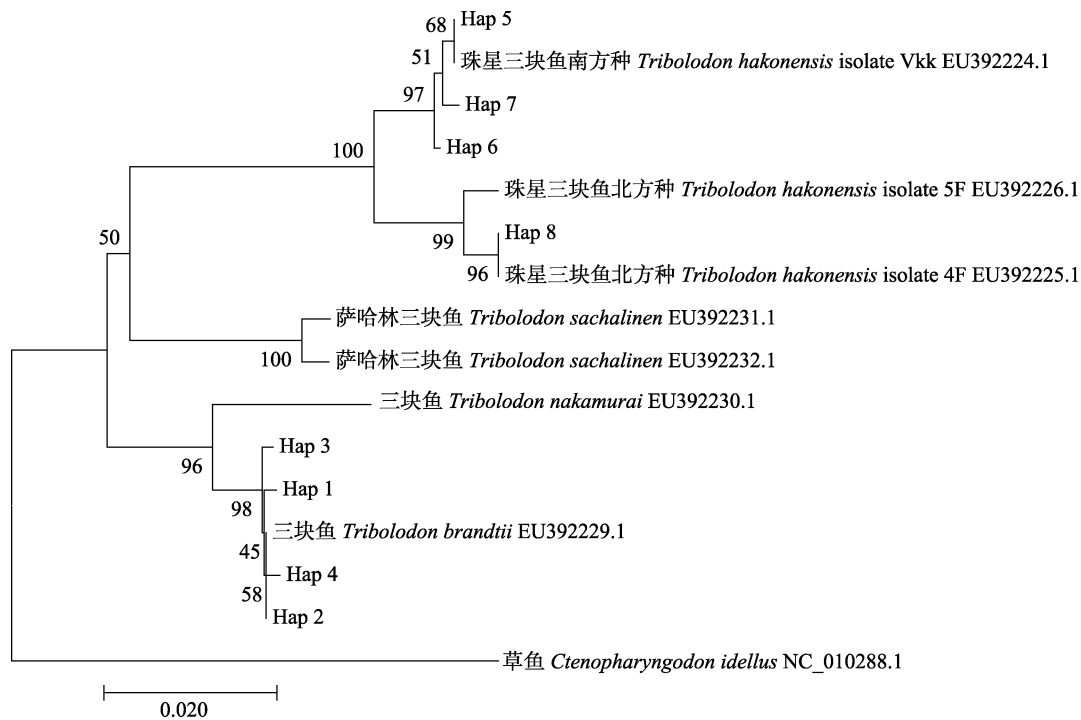


图 3 三块鱼属鱼类 COI 基因单倍型的系统发育进化 NJ 树
节点上数字显示 1000 次重复的 bootstrap 验证结果, 标尺代表序列分歧度.

Fig. 3 Neighbour-joining tree of COI gene in genus *Tribolodon*
Bootstrap values in 1000 replications are shown on branches; the scale bar represents the sequence divergence.

表 4 三块鱼各类群间和各类群内平均遗传距离
Tab. 4 Mean genetic distance between and within each groups in *Tribolodon*

类群 group	类群间平均遗传距离 mean distance between groups		类群内平均遗传距离 mean distance within group
	珠星三块鱼南方型 southern form of <i>T. hakonensis</i>	珠星三块鱼北方型 northern form of <i>T. hakonensis</i>	
珠星三块鱼南方型 southern form of <i>T. hakonensis</i>			0.002
珠星三块鱼北方型 northern form of <i>T. hakonensis</i>	0.023		0.005
三块鱼 <i>T. brandtii</i>	0.06	0.067	0.002

三块鱼是鲤科鱼类仅有的存在不同生态类型群体的物种, 如 *T. sachalinensis* 和 *T. nakamurai* 为淡水种, 珠星三块鱼北方型为洄游种, 三块鱼和珠星三块鱼南方型为溯河产卵型种群^[12-15]。因此, 开展其物种起源、进化及与相近物种亲缘关系的研究吸引了国内外学者的关注。但是中国三块鱼的分布范围窄, 仅在产卵期才形成规模, 这在一定程度上限制了对此物种长期系统的研究, 尤其在种属划分上游与下游产地(如俄罗斯和日本)缺乏比较, 导致种属划分不清, 命名混乱。相较而言, 国外学者系统地从事形态学、同工酶和遗

传学进行了研究, 对三块鱼的种属划分还是比较清楚的。前已述及, 只有分布在俄罗斯滨海区的珠星三块鱼南方型和三块鱼为溯河产卵型群体。而据文献报道, 中国绥芬河的三块鱼是由日本海大彼得湾经俄罗斯滨海区溯河到中国河区产卵的^[2]。因此可以推测, 溯河到中国绥芬河产卵的三块鱼应为珠星三块鱼南方型和三块鱼。

3.2 珠星三块鱼南方型的起源

进一步与国外发表的三块鱼序列比较发现, 珠星三块鱼与日本珠星三块鱼又划分为两个不同的分支, 绥芬河珠星三块鱼与珠星三块鱼南方型

聚在一起,日本珠星三块鱼与珠星三块鱼北方型聚在一起(图 3),这与它们的地理分布也是吻合的。因此,本研究进一步从分子角度证实了中国绥芬河珠星三块鱼实为珠星三块鱼南方型。COI 基因作为物种鉴定的有效基因,主要基于该基因在种间的遗传变异显著大于种内的遗传变异^[19]。不同生物类群该基因的保守性存在很大差异,物种分化阈值的界定由生物类群自身的特性决定^[20]。但大量研究表明,大部分物种内 COI 基因的序列分歧介于 1%~2%^[20]。由表 4 可以看出,珠星三块鱼南方型和北方型种内遗传距离均小于 1%,而类群间遗传距离大于 2%,表明这两个类群已出现明显分化,不能视为同一个种,结合国外学者在形态、核型和细胞学结构差异的研究结果,将珠星三块鱼南方型和北方型划分为两个有效种或亚种是合理的。

珠星三块鱼在俄罗斯和日本分布十分广泛,而且生态类型丰富多样,有淡水种群、溯河产卵型种群和酸性种群^[15, 28]。Semina 等^[18]曾利用 mtDNA 的 4 个基因片段检测发现来自库页岛鄂霍次克海岸的珠星三块鱼和来自日本海海岸的珠星三块鱼存在显著的遗传分化,推测分布在南方一带的珠星三块鱼是一个隐秘种;随后, Brykov 等^[29]分析俄罗斯境内的珠星三块鱼发现,该物种由于地理隔离存在 3 个不同的线粒体谱系 A、B、C,其中谱系 A 和 B 分布在北方区,谱系 C 分布在俄罗斯滨海区。近期, Polyakova 等^[24]研究发现,珠星三块鱼南方型在生长激素基因位点为杂合型,推测可能是珠星三块鱼北方型和三块鱼历史上的杂交种。鱼类线粒体 DNA 是母性遗传,根据 Brykov 等^[29]和本文的研究结果可以看出,珠星三块鱼南方型具有自己独特的线粒体谱系,与三块鱼和珠星三块鱼北方型有明显的分化,因此并不支持珠星三块鱼南方型可能是珠星三块鱼北方型和三块鱼的杂交种的观点。

3.3 三块鱼杂交种的产生及种质保护

已有报道显示,三块鱼之间极易发生杂交,包括自然杂交和人工杂交^[30]。中国绥芬河是三块鱼溯河产卵的重要场所。虽然早期认为有第三批产卵群体出现,但是根据国外对三块鱼属鱼类的分

类和分布情况来看,洄游到中国的只有珠星三块鱼南方型和三块鱼。然而,在实际采样过程中发现,有些洄游个体的表型特征不明显,难以判别,暂且将其归为疑似杂交种。根据本研究 mtDNA 的分析结果,有 8 个疑似杂交种与珠星三块鱼南方型的主效单倍型一致(Hap5, 表 1),有 2 个个体与三块鱼的单倍型一致(Hap2, Hap3),表明正反杂交产生的可能性都有。为弥补 mtDNA 是母系遗传的不足,作者随后采用 5 个微卫星标记研究发现,10 个疑似杂交种中有 2 个个体确实是杂交产生(与三块鱼单倍型 Hap2 和南方型珠星三块鱼 Hap5 一致的 2 个个体)(待发表),为三块鱼杂交种的产生提供了有力的分子证据。

人工增殖放流是增加和保护水生生物野生种群资源量的有效措施。中国从 2006 年颁布《中国水生生物资源养护行动纲要》以来,大力开展水生生物增殖放流行动,产生了良好的生态、经济和社会效益。但增殖放流行动大多是由基层部门完成,缺乏系统性地科学指导,放流活动的盲目性及科学评估工作的严重缺位,致使水域生态环境破坏、土著种濒危、种质混杂等问题日趋严重。例如,云南大头鲤(*Cyprinus (C.) Pellegrini*)与外来鲤的渐渗杂交已在星云湖野生种群中广泛发生,能够采集到的“大头鲤”形态介于土著大头鲤和普通鲤之间,不合理的增殖放流正是导致其灭绝的重要因素之一^[31]。三块鱼属的鱼类在形态方面非常相近,且洄游至绥芬河产卵的三块鱼不同群体在洄游时间和场所存在交集,因此在人工繁殖过程中易发生形态判别错误造成种质混杂。本研究已经发现表型判定错误个体及杂交种的产生,这对三块鱼属鱼类野生种质资源造成了严重污染。建议有关部门暂缓三块鱼增殖放流活动,科学评估增殖放流带来的种质混杂及杂交种污染程度,以保证该物种合理永续的利用。

参考文献:

- [1] Kartavtsev Y F, Sviridov V V, Hanzawa N, et al. Genetic divergence of Far-Eastern dace species belonging to the genus *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae) and closely related taxa[J]. *Genetica*, 2002, 38(11): 1518-1531.
- [2] Dong C Z, Zhao C G, Jin Z L. An approach on the breeding

- population structure of *Leuciscus brandti* during migration in Suifen River[J]. Journal of Fisheries of China, 1993, 17(4): 304-311. [董崇智, 赵春刚, 金贞礼. 绥芬河滩头雅罗鱼溯河生殖群体结构的探讨[J]. 水产学报, 1993, 17(4): 304-311.]
- [3] Dai D Y. Biological study for *Tribolodon hakonensis* in Tumen River[J]. Acta Zoologica Sinica, 1982, 28(8): 283-292. [戴定远. 图们江珠星雅罗鱼生物学研究[J]. 动物学报, 1982, 28(8): 283-292.]
- [4] Yin J S, Shen J B, Xu W, et al. Effect of water temperature on spawning of dace (*Leuciscus brandti*) in the Suifen River[J]. Acta Zoologica Sinica, 2001, 47(6): 704-708. [尹家胜, 沈俊宝, 徐伟, 等. 水温变化对绥芬河滩头雅罗鱼产卵的影响[J]. 动物学报, 2001, 47(6): 704-708.]
- [5] Zhao C G, Wang W K, Ma G J, et al. The structure of spawning population of anadromous Japanese dace in Suifen River[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2011, 24(3): 25-28. [赵春刚, 王维坤, 马国军, 等. 绥芬河珠星雅罗鱼溯河生殖群体结构特征研究[J]. 水产学杂志, 2011, 24(3): 25-28.]
- [6] Chi B J, Liang L Q, Liu C L, et al. Adaptability of *Tribolodon brandti* (Dybowski) to NaCl concentration and alkalinity[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(3): 689-694. [池炳杰, 梁利群, 刘春雷, 等. 滩头雅罗鱼幼鱼对 NaCl 浓度和碱度的适应性分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(3): 689-694.]
- [7] Ren M L. Fish Species in Heilongjiang River[M]. Harbin: Heilongjiang People Press, 1981. [任慕莲, 黑龙江鱼类[M]. 哈尔滨: 黑龙江人民出版社, 1981.]
- [8] Yin J S, Shen J B, Luan X H, et al. Study on population and biology of dace (*Leuciscus brandti*) in the Suifen River[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1991, 4(1): 7-16. [尹家胜, 沈俊宝, 栾晓红, 等. 绥芬河滩头雅罗鱼种群生物学研究[J]. 中国水产科学, 1991, 4(1): 7-16.]
- [9] Zhang J M. Fish Fauna of Heilongjiang Province[M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press, 1991. [张觉民. 黑龙江省鱼类志[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1991.]
- [10] Chen J P, Liang L Q, Sun X W, et al. Relationships of *Leuciscus waleckii* Dybowski and *Tribolodon* fishes in Suifen River by RAPD technique[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(1): 1-4. [陈金平, 梁利群, 孙效文, 等. 绥芬河三块鱼属鱼类和东北雅罗鱼亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 1-4.]
- [11] Ma B, Chen J P, Dong C Z. Biochemical genetic variations and relationships for populations of *Tribolodon brandti* and *Tribolodon hakonensis* in the Suifen River, China[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(6): 688-693. [马波, 陈金平, 董崇智. 绥芬河三块鱼和珠星三块鱼种群的生化遗传变异及亲缘关系[J]. 中国水产科学, 2005, 12(6): 688-693.]
- [12] Sakai H, Goto A, Jeon S R. Speciation and dispersal of *Tribolodon* species (Pisces, Cyprinidae) around the Sea of Japan[J]. Zoological Science, 2002, 19(11): 1291-1303.
- [13] Doi A, Shinzawa H. *Tribolodon nakamurai*, a new cyprinid fish from the middle part of Honshu Island, Japan[J]. Raffles Bulletin of Zoology, 2000, 48(2): 241-247.
- [14] Brykov V A, Polyakova N E, Semina A V. Comparative analysis of mitochondrial DNA variation in four species of Far Eastern redfins of the genus *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae)[J]. Russian Journal of Genetics, 2013, 49(3): 310-319.
- [15] Gudkov P K, Polyakova N E, Semina A V, et al. Comparative morphological analysis of big-scaled redfin *Tribolodon hakonensis*, Günther, 1877 (Cyprinidae, Cypriniformes) from Sakhalin and southern Primorye[J]. Journal of Ichthyology, 2010, 50(9): 740-744.
- [16] Ryazanova I N, Polyakova N E. Differentiation of large-scaled redfin *Tribolodon hakonensis*, (Pisces, Cyprinidae) in the Russian part of the range as inferred from the data of karyological analysis and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA[J]. Russian Journal of Genetics, 2012, 48(2): 199-207.
- [17] Neznanova S Y. Comparative analysis of gamete ultrastructure in big-scaled redfin *Tribolodon hakonensis*, (Cyprinidae) from Southern Primorye and Sakhalin[J]. Journal of Ichthyology, 2015, 55(6): 900-905.
- [18] Semina A V, Polyakova N E, Brykov V I A. Genetic analysis reveals a cryptic species in far eastern dace of the genus *Tribolodon*[J]. Doklady Biological Sciences, 2006, 407(1): 173-175.
- [19] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [20] Hebert P D N, Ratnasingham S, deWaard J R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings: Biological Sciences, 2003, 270(Suppl 1): S96-S99.
- [21] Cheng L, Chang Y M, Lu C Y, et al. DNA barcoding and species and subspecies classification within genus *Carassius*[J]. Zoological Research, 2012, 33(5): 463-472. [程磊, 常玉梅, 鲁翠云, 等. 鲫属鱼类 DNA 条码及种与亚种划分[J]. 动物学研究, 2012, 33(5): 463-472.]
- [22] Liu L, Sun D R, Li C H, et al. Application of DNA barcoding in classification of Mugilidae fishes[J]. Periodical of Ocean University of China, 2016, 46(11): 178-186. [刘璐, 孙典荣, 李纯厚, 等. DNA 条形码技术在鲢科鱼类鉴定中的应用[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2016, 46(11): 178-186.]
- [23] Prasanna K C, Akbar J B, Ajmal K S, et al. Efficiency of universal barcode gene (COI) on morphologically cryptic Mugilidae fishes delineation[J]. Trends in Applied Sciences Research, 2011, 6(9): 1028-1036.
- [24] Polyakova N E, Semina A V, Brykov V A. Analysis of mtDNA and nuclear markers points to homoploid hybrid origin of the new species of far eastern redfins of the genus *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae)[J]. Russian Journal of Genetics, 2015, 51(11): 1250-1263.
- [25] Chen J P. A taxonomic discussion of genus *Tribolodon* in Suifen River[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2001, 14(2):

- 82-84. [陈金平. 绥芬河三块鱼属(*Tribolodon*)鱼类的分类学讨论[J]. 水产学杂志, 2001, 14(2): 82-84.]
- [26] Chen Y Y, Chu X L, Luo Y L, et al. Fauna of China: Osteichthyes Cypriniformes (in volume)[M]. Beijing: Science Press, 1998: 64-75. [陈宜瑜, 褚新洛, 罗云林, 等. 中国动物志: 硬骨鱼纲·鲤形目(中卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 64-75.]
- [27] Dou X J, Chang Y M, Tang R, et al. Relationship of Leuciscinae fish based on mtDNA sequence[J]. Jiangsu Journal of Agriculture Sciences, 2014, 30(4): 826-832. [窦新杰, 常玉梅, 唐然, 等. 几种雅罗鱼亚科鱼类基于 mtDNA 序列的亲缘关系[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(4): 826-832.]
- [28] Hirata T, Kaneko T, Ono T, et al. Mechanism of acid adaptation of a fish living in a pH 3.5 lake[J]. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2003, 284(5): 1199-1212.
- [29] Brykov V A, Poliakova N E, Semina A V. Phylogeographic analysis reveals two periods of divergence in large-scaled redbfin *Tribolodon hakonensis* (Pisces, Cyprinidae)[J]. Russian Journal of Genetics, 2011, 47(11): 1324-1333.
- [30] Sakai, H, Hamada, K. Electrophoretic discrimination of *Tribolodon* species (Cyprinidae) and the occurrence of their hybrids[J]. Japanese Journal of Ichthyology, 1985, 32(2): 216-224.
- [31] Tang W X. Hybridization and introgression between *Cyprinus pellegrini* and introduced common carp (*C. cyprinus*) in Xingyun Lake[D]. Wuhan: Institute of Aquatic Biology, Chinese Academy of Sciences, 2008. [唐卫星. 星云湖大头鲤与外来鲤鱼的杂交和基因渗透[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2008.]

Species classification and origin of *Tribolodon* in the Suifen River, China

CHANG Yumei¹, CHENG Lei¹, SUN Bo¹, SU Baofeng¹, LIANG Liquan¹, WANG Weikun²

1. National & Local United Engineering Laboratory of Freshwater Fish Breeding; Key Laboratory of Freshwater Aquatic Biotechnology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Fish Stress Resistance Breeding and Germplasm Characteristics on Special Habitats, Chinese Academy of Fishery Sciences; Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;
2. Dongning Municipal Bureau of Fishery of Heilongjiang Province, Dongning 157200, China

Abstract: To further clarify the taxonomic status of *Tribolodon* species in the Suifen River in China, COI gene sequences of 53 samples including *Tribolodon hakonensis*, *T. brandtii*, their suspected hybrids in Suifen River, and *T. hakonensis*, which was collected from Japan, were compared and analyzed. Eight haplotypes were obtained with an effective sequence length of 637 bp. Haplotype analysis showed that *T. brandtii* had four haplotypes, *T. hakonensis* had three haplotypes, whereas *T. hakonensis* collected from Japan had an independent haplotype. Although the suspected hybrids shared two haplotypes with their parents, 80% individuals shared the same main haplotype with *T. hakonensis*. Phylogenetic analysis using the neighbor-joining method based on the K2P model showed that *T. hakonensis* clustered with the southern forms of *T. hakonensis* in the southern region of Russia (i.e., Primorsky krai), *T. hakonensis* from Japan clustered with northern forms of *T. hakonensis* in the northern region of Russia (i.e. Sakhalin Island and Khabarovsk krai), and *T. brandtii* clustered singly. Therefore, anadromous spawning populations of *Tribolodon* species from the Japan Sea to the Suifen River actually are the southern forms of *T. hakonensis* and *T. brandtii*, respectively. The average genetic distance between the southern and northern forms of *T. hakonensis* was 0.023, conforming to the basis of segregation of COI between groups (>0.02). We support the classification of the southern and northern forms of *T. hakonensis* into two effective species or subspecies. Based on the results of the COI analysis, we speculate that hybrids of *T. hakonensis* and *T. brandtii* were probably produced in nature or by artificial propagation, and therefore, suggestions were proposed on how to protect and utilize the fish germplasm resources rationally.

Key words: Suifen River; *Tribolodon* species; hybrid; COI gene; phylogeny

Corresponding author: LIANG Liquan. E-mail: liangliquan@hrfri.ac.cn