



分类号 Q173

学 号 2013213001

南京农业大学

博士学位论文

川陕哲罗鲑种群遗传学及分子系统发育研究

汪珂

指导教师	<u>危起伟 研究员</u>
	<u>张书环 助理研究员</u>
	<u>汪登强 副研究员</u>
学科门类	<u>理 学</u>
专业名称	<u>水生生物学</u>
研究方向	<u>分子生态学</u>
答辩日期	<u>二零一六年五月</u>

POPULATION GENETICS AND MOLECULAR
PHYLOGENY OF *HUCHO BLEEKERI*

By

Wang Ke

Supervisor: Prof. Wei Qiwei

A Dissertation

Submitted to

Nanjing Agricultural University

In Partial Fulfillment of the Requirements

For

The Degree of Ph.D of Science

Completed in March, 2016

Commencement in June, 2016

原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者（需亲笔）签名： 年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权南京农业大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密□, 在 年解密后适用本授权书。本学位论文属于不保密□。

(请在以上方框内打“√”)

学位论文作者(需亲笔)签名: 年 月 日

导师(需亲笔)签名: _____ 年 月 日

目录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	V
缩略语中英文对照.....	IX
第一章 文献综述.....	1
1 川陕哲罗鲑研究概况.....	1
1.1 川陕哲罗鲑简介.....	1
1.2 川陕哲罗鲑研究概况.....	1
2 种群遗传学.....	5
2.1 种群遗传学的定义及其研究方法.....	5
2.2 种群遗传学研究手段——分子标记概述.....	6
2.3 种群遗传学主要研究内容——遗传多样性研究概述.....	10
3 亲子鉴定原理及其应用.....	12
3.1 亲子鉴定技术原理及其操作流程.....	12
3.2 亲子鉴定技术在濒危野生动物保护中的应用.....	13
4 分子系统发育研究概述.....	13
4.1 分子系统发育的定义.....	13
4.2 分子系统发育的理论及其研究方法.....	14
4.3 川陕哲罗鲑分子系统发育研究进展.....	15
5 本研究的目的意义及技术路线.....	16
第二章 川陕哲罗鲑微卫星标记的开发.....	19
1 前言.....	19
2 材料与方法.....	20
2.1 实验材料与仪器.....	20
2.2 基因组 DNA 的提取.....	21
2.3 微卫星引物的设计与合成.....	21
2.4 多态微卫星引物的筛选.....	22
2.5 数据分析.....	24
3 结果.....	24
3.1 川陕哲罗鲑基因组 DNA 的提取.....	24

3.2 多态微卫星引物的筛选及微卫星标记特征	25
4 讨论	30
4.1 微卫星引物的设计	30
4.2 微卫星位点的多态性	30
5 小结	31
第三章 川陕哲罗鲑太白河野生种群遗传多样性的研究	33
1 前言	33
2 材料与方法	34
2.1 实验材料与仪器	34
2.2 基因组 DNA 的提取与 PCR 扩增	34
2.3 PCR 产物检测与数据分析	36
3 结果	37
3.1 种群遗传变异分析	37
3.2 种群遗传结构分析	39
3.3 种群历史动态评估	43
4 讨论	44
4.1 川陕哲罗鲑种群遗传多样性分析	44
4.2 川陕哲罗鲑种群遗传分化与遗传结构分析	45
4.3 哈迪-温伯格平衡与种群瓶颈效应	46
5 小结	47
第四章 川陕哲罗鲑养殖群体 3 个家系遗传多样性及亲子鉴定技术的建立	49
1 前言	49
2 材料与方法	50
2.1 实验材料与仪器	50
2.2 微卫星标记的选取与荧光标记的合成	51
2.3 基因组 DNA 的提取	52
2.4 PCR 扩增与产物检测	53
2.5 数据分析	53
3 结果	54
3.1 川陕哲罗鲑微卫星标记基因型测序结果	54
3.2 川陕哲罗鲑子一代遗传多样性分析	56
3.3 川陕哲罗鲑子一代与亲本群体遗传多样性参数对比	58
3.4 川陕哲罗鲑亲子鉴定结果	58

4 讨论.....	61
4.1 所选微卫星标记的多态性.....	61
4.2 微卫星标记等位基因的分型.....	61
4.3 川陕哲罗鲑人工繁殖子一代的遗传多样性.....	62
4.4 亲子鉴定的可靠性.....	63
4.5 对川陕哲罗鲑遗传多样性保护的建议.....	63
5 小结.....	65
第五章 秦岭地区两种鲑科鱼类——川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑种群线粒体基因渐渗的研究	67
1 前言.....	67
2 材料与方法.....	69
2.1 实验材料与仪器.....	69
2.2 样本基因组的提取.....	69
2.3 PCR 扩增与产物检测	69
2.4 数据分析.....	70
3 结果.....	70
3.1 基于线粒体 DNA 分子标记的两个种群遗传多样性分析.....	70
3.2 川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑种群系统进化分析	71
4 讨论.....	72
4.1 线粒体基因渗入.....	72
4.2 川陕哲罗鲑不同种群个体差异原因推测	73
5 小结.....	73
第六章 川陕哲罗鲑分子系统发育研究.....	75
1 前言.....	75
2 材料与方法.....	77
2.1 实验材料.....	77
2.2 分析方法.....	78
3 结果.....	79
3.1 基于线粒体 DNA 序列全长和 13 个蛋白质编码基因的哲罗鲑属分子系统发育位置.....	79
3.2 基于线粒体 DNA 序列全长和 13 个蛋白质编码基因的哲罗鲑属分化年代推断.....	81
4 讨论.....	86
4.1 基于线粒体 DNA 的川陕哲罗鲑系统发育位置	86
4.2 基于线粒体 DNA 的哲罗鲑属分化年代推断	86

5 小结.....	88
全文结论.....	89
全文创新点.....	91
参考文献.....	93
致谢.....	105
攻读博士学位期间发表的学术论文.....	107

川陕哲罗鲑种群遗传学及分子系统发育研究

摘要

哲罗鲑属 (*Hucho*) 隶属于鲑形目 (Salmoniformes)、鲑科 (Salmonidae)。全世界现有 5 个种, 即: 分布于欧洲多瑙河流域的多瑙哲罗鲑 (*Hucho hucho*); 广泛分布于欧亚大陆北部的太门哲罗鲑 (*Hucho taimen*); 分布于我国长江水系的川陕哲罗鲑 (*Hucho bleekeri*); 分布于我国和朝鲜鸭绿江上游的石川哲罗鲑 (*Hucho ishikawae*); 以及分布于库页岛、日本北海道和远东地区的远东哲罗鲑 (*Hucho perryi*)。它们在生物地理学、鱼类系统演化与古生态学的研究中具有重要的学术价值。

川陕哲罗鲑又名四川哲罗鲑, 是哲罗鲑属中唯一的我国特有物种。20 世纪 60 年代以前, 川陕哲罗鲑分布较为广泛, 资源量较丰富。近年来由于生态环境的破坏、过度捕捞等人为因素, 川陕哲罗鲑自然资源量经历了极为严重的下降, 原有的分布区内已经多年未发现其踪迹, 自然种群面临灭绝的威胁。2012 年秋季在陕西太白河重新发现了 19 尾川陕哲罗鲑成鱼, 是近 20 多年来发现的规模最大的一批群体, 也是该物种在太白河绝迹 15 年后的再次发现。对此, 科研工作者立刻开启了该物种的保护计划。保护遗传学的重要研究内容是保护物种的遗传多样性, 从分子生物学的角度来评估物种多样性水平是恢复其野生资源的前提和基础。基于种群遗传学的研究结果制定相应的保护对策是保护濒危物种的有效手段。本文以川陕哲罗鲑为主要研究对象, 一方面开展种群遗传学研究, 筛选出适用于川陕哲罗鲑的高效分子标记, 评估了川陕哲罗鲑种群遗传多样性, 并构建了亲子鉴定体系, 同时研究了川陕哲罗鲑的基因渗入问题。另一方面探究了该哲罗鲑属物种的系统进化与分化过程, 研究了川陕哲罗鲑的系统发育位置和分歧时间。具体研究结果如下:

1 川陕哲罗鲑微卫星标记的开发

通过二代技术获得秦岭细鳞鲑 (*Brachymystax lenok tsinlingensis*) 微卫星文库, 进一步筛选出适用于川陕哲罗鲑的多态微卫星引物 27 对, 并使用该微卫星标记对 20 尾野生川陕哲罗鲑个体进行了遗传多样性初步研究。结果表明: 等位基因数目 (N_a) 为 2~8 个, 观测杂合度 (H_o) 为 0.150~0.906, 期望杂合度 (H_e) 为 0.508~0.845, 多态信息含量 (PIC) 为 0.371~0.808。其中 8 个微卫星位点 (BLT19, BLT28, BLT25, BLT30, Hbl3-5, Hbl5-11, Hbl6-240, Hbl8-163) 显著偏离哈迪温伯格平衡 ($P < 0.01$)。

本实验研究开发的微卫星标记可应用于川陕哲罗鲑个体识别、遗传多样性、亲缘关系鉴定等遗传学的进一步研究。

2 基于线粒体 DNA (CYTB 基因片段和控制区序列) 和微卫星标记对川陕哲罗鲑太白河野生种群遗传多样性的评估

线粒体 DNA 标记: 采集川陕哲罗鲑野生个体 43 尾, 分别利用线粒体 DNA 不同片段 (CYTB 基因片段和控制区序列) 对该种群进行遗传多样性评估。结果显示: 控制区序列拥有 12 个单倍型, CYTB 基因片段则仅拥有 3 个单倍型; 控制区序列的单倍型多样性指数 (H_d) 与核苷酸多样性指数 (P_i) 分别为 0.8208 和 0.00159, 远高于 CYTB 基因片段 (0.0941 和 0.00009)。两个序列的核苷酸变异的平均数分别为 1.871 (控制区序列) 和 0.095 (CYTB 基因片段)。总体来说, 两序列的遗传多样性水平都较低。Network 网络结构图表明该群体的线粒体 DNA 单倍型网络结构较为单一。系统进化分析表明本实验中来自陕西省太白河的样本全部归为一个类群, 该种群没有呈现出明显的遗传分化。

微卫星标记: 从筛选出的多态微卫星引物中挑选出 15 对多态性高、扩增效果好的引物, 分别在正向引物末端标记 2 种常见的荧光 (FAM 或 HEX), 利用其对川陕哲罗鲑野生种群进行遗传多样性分析。结果共检测到 77 个等位基因, 每个位点等位基因数从 2 (Hbl10-16) 到 13 (Hbl8-163) 不等。观测杂合度 $0.04651 \sim 1.0000$, 平均值为 0.59719。期望杂合度 $0.09111 \sim 0.67387$, 平均值为 0.44735。除位点 Hbl4-10, BLT25, Hbl3-5 和 Hbl2-2 外, 其他位点都显著偏离哈迪-温伯格平衡 ($P < 0.01$)。近交系数为 $-0.90487 \sim 0.49398$, 平均值 -0.34033 ($P > 0.05$)。所有检测的微卫星位点间不存在连锁不平衡现象 ($P > 0.05$)。聚类分析表明该种群内不存在遗传分化。种群瓶颈效应检验结果说明该种群近期经历了严重的瓶颈效应, 并达到显著水平 ($P < 0.05$)。

两种分子标记结果都显示: 太白河川陕哲罗鲑野生种群具有较低的遗传多样性。

3 川陕哲罗鲑人工繁殖子一代遗传特征的评估及亲子鉴定技术的建立

从筛选出的多态微卫星引物中选择出 14 个高度多态微卫星位点合成荧光标记引物, 对川陕哲罗鲑人工繁殖子一代群体进行遗传多样性评估。结果显示, 该群体共检测到有 49 个等位基因, 单个位点等位基因数 (N_a) 为 2~6 个, 平均值为 3; 观测杂合度 (H_o) 为 $0.069 \sim 1.000$, 其平均值为 0.574; 期望杂合度 (H_e) 为 $0.067 \sim 0.696$, 平均值为 0.432; 多态信息含量 (PIC) 为 $0.064 \sim 0.644$, 平均值 0.339。这些参数值均

表明该群体的遗传多样性处于较低水平。两两家系之间的遗传分化程度 (F_{ST}) 为 0.02504, 表明家系之间的遗传距离较为接近, 不存在明显的遗传分化。单个种群内近交系数 (F_{IS}) 为 -0.33255, 说明群体未出现明显的近交。与川陕哲罗鲑野生种群相比, 子一代群体的遗传多样性参数明显较低, 利用这 14 对引物构建川陕哲罗鲑亲子鉴定技术。结果显示, 在单亲信息已知和双亲信息已知的情况下, 其累积非父排除概率均大于 99%; 双亲信息均未知情况下, 累积非父排除概率大于 98%, 可以认定亲本与子代之间的亲子关系。分析结果表明这 14 个多态微卫星标记适用于建立川陕哲罗鲑亲子鉴定技术。

4 基于线粒体 DNA *CYTB* 基因片段分析秦岭地区川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑基因渐渗

利用线粒体 DNA 细胞色素 *b* 基因 *CYTB* 片段, 分析了陕西秦岭地区太白河川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑两个种群样本的遗传特征, 其中川陕哲罗鲑样本量为 43 尾, 秦岭细鳞鲑样本量为 50 尾。同时将其与青海省玛柯河川陕哲罗鲑及黑龙江流域的细鳞鲑历史数据进行序列比对与聚类分析。结果显示, 总群体的简约信息位点数为 97, 太白河川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑两个群体之间的遗传分化系数 (G_{ST}) 为 0.06653, 平均核苷酸差异度 (K_{xy}) 为 0.3476、核苷酸歧异度 (D_{xy}) 为 0.08598、基因流 (N_m) 为 3.51。总群体的固定系数 (F_{ST}) 为 0.1080, 两个群体没有共同单倍型。系统进化树显示两个群体各自聚为一类, 二者之间的遗传距离较远。研究结果表明这两种鲑科鱼类在所分析的线粒体 DNA 区域内没有发生杂交渐渗。

5 川陕哲罗鲑分子系统发育位置及分歧年代的研究

利用线粒体 DNA 序列全长和 13 个蛋白质编码基因分别构建了鲑科鱼类(包括部分鲑科鱼类及除石川哲罗鲑外其他哲罗鲑属鱼类)系统进化树; 同时利用线粒体 DNA 全长序列和 13 个蛋白质编码基因拼接序列, 基于恒定进化速率的分子钟推断哲罗鲑属分化年代。结果发现哲罗鲑属鱼类系统进化中, 川陕哲罗鲑与多瑙哲罗鲑和太门哲罗鲑聚为一类, 远东哲罗鲑与红点鲑属物种的分支更为接近。研究结果的系统进化树大部分节点的后验概率大于 95%, 因此该聚类分析具有较高的可信度。

哲罗鲑属分化年代分析推测远东哲罗鲑最先与哲罗鲑属其他鱼类分离, 隔离年代大概为 10.4 Ma, 这种分化可能是地理隔离造成的。分布于欧亚大陆淡水水系的太门哲罗鲑、川陕哲罗鲑与多瑙哲罗鲑则分化年代较晚。川陕哲罗鲑同太门哲罗鲑以及多瑙哲罗鲑的隔离时间均约为 1.7 ~ 2.2 Ma; 多瑙哲罗鲑与太门哲罗鲑的隔离时间则约为 1.4 ~ 1.8 Ma。玛柯河川陕哲罗鲑与太白河川陕哲罗鲑之间的隔离时间约为 1.3 ~

1.7 Ma。此外，黑龙江流域的细鳞鲑与分布于秦岭的秦岭细鳞鲑之间的隔离时间大约为 1.7 ~ 2.2 Ma，这与同样生境下的太门哲罗鲑和川陕哲罗鲑的分化年代相符。由此认为，分布于秦岭地区的两种鲑科鱼类与分布于黑龙江流域的鲑科鱼类的隔离年代大概处于第四纪更新世。

关键词：遗传多样性；亲子鉴定；基因渐渗；分子系统发育；川陕哲罗鲑

POPULATION GENETICS AND MOLECULAR PHYLOGENY OF *HUCHO BLEEKERI*

ABSTRACT

Hucho genus belongs to Salmonidae, Salmoniformes. There are 5 species in the world: *Hucho hucho*, distributed in Danube basin, Europe; *Hucho taimen*, widely distributed in the northern Eurasia; *Hucho bleekeri*, distributed in Yangtze River drainage, China; *Hucho ishikawae*, distributed in the upper reaches of the Yalu River, China and North Korea; *Hucho perryi*, distributed in Sakhalin Island and Hokkaido and the Far East of Japan. They have important academic value to research biogeography, fish phyletic evolution and paleoecology.

Chuanshan taimen (*Hucho bleekeri*), also known as Sichuan taimen, is the only species endemic to China among the *Hucho* genus. Its distribution area was large before 1960s. In recent years, the natural resources experienced serious decline due to many factors such as destruction of the ecological environment, over fishing, and so on. It has disappeared without a trace in most of its usual distribution areas in Shanxi and Sichuan provinces, and facing the threat of extinction. The 19 adults of *Hucho bleekeri* found in Taibai River in 2012 were the largest group in recent 20 years, and this was a rediscovery in Taibai River since this species disappeared in this area 15 years ago. The protection plan of this species was set up. The protection of genetic diversity is an important factor in the research of conservation genetics. Molecular biology techniques are effective methods to protect species from extinction. In this study, we studied the population genetics of *H. bleekeri*, developed microsatellite markers, assessed the genetic diversity and population structure, established paternity test technology, and researched the introgression of *H. bleekeri* and *Brachymystax lenok* tsinlingensis. Furthermore, we researched the molecular phylogeny of this species. Specific findings are as follows:

- 1 Development of 27 novel cross-species microsatellite markers for the endangered *Hucho bleekeri* using next-generation sequencing technology

We developed 27 novel cross-species microsatellite markers for the endangered *Hucho bleekeri* using next-generation sequencing technology. The number of alleles varied from 2 to 8 for each primer set. The observed and expected heterozygosity ranged from 0.150 to

0.906 and 0.508 to 0.845, respectively. The polymorphic information content ranged from 0.371 to 0.808. These microsatellite loci should be useful to study population genetics, paternity identification, and speciation and adaptive evolution of this lineage.

2 Conservation genetics assessment and phylogenetic relationships of critically endangered *Hucho bleekeri* from Taibai River using mitochondrial DNA fragments and microsatellite markers

Mitochondrial DNA fragments: we collected 43 wild individuals of *H. bleekeri*, and used control region and *CYTB* gene fragment to assess the genetic diversity of this population. There were 10 polymorphic sites in the control region but no singleton variable site, and two polymorphic sites in the *CYTB* gene, with two singleton variable sites. Both the number of haplotypes (h) and the haplotype diversity (Hd) of the control region (12 haplotypes and $Hd = 0.8208$) were higher than those of the *CYTB* gene fragment (three haplotypes and $Hd = 0.0941$). The nucleotide diversity (Pi) of both markers was very low: 0.00159 for control region and 0.00009 for the *CYTB* gene. The average numbers of nucleotide differences (k) were also low: 1.871 for the control and 0.095 for the *CYTB* gene. The consequence of network showed a relatively single structure of this population. Phylogenetic analysis showed no obvious differentiation in this population.

Microsatellite markers: we chose 15 primers with high polymorphism and marked them with 2 kinds of fluorescence in the forward primer respectively (FAM or HEX). We found a total of 77 alleles in the *H. bleekeri* population, ranging from 2 (Hbl10-16) to 13 (Hbl8-163) per locus. The calculated Ho varied from 0.04651 to 1.00000, with a mean of 0.59719, whereas He ranged from 0.09111 to 0.67387, with a mean of 0.44735. Most of the 15 microsatellite loci deviated significantly from HWE ($P < 0.05$), except Hbl2-2. The coefficient of inbreeding (F_{IS}) ranged from 0.90487 to 0.49398, with a mean of 0.34033, and was not significant ($P > 0.05$). Significant ($P < 0.05$) linkage disequilibrium was not detected in any loci combinations. No obvious genetic differentiation was found in this population. And it suffered severe bottleneck effect recently ($P < 0.05$).

The results of these two molecular markers all indicated that the genetic diversity of this wild population of *H. bleekeri* from Taibai River was very low.

3 Genetic diversity assessment of first filial generation of breeding group and Establishment of paternity technology of *Hucho bleekeri*

We selected 14 highly polymorphic microsatellite primers from earlier study to estimate the genetic diversity of artificial breeding F1 population. The results showed that the number of microsatellite loci alleles (N_a) ranged from 2 to 6, average number was 3; the observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.069 to 1, and average value was 0.574; the expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.067 to 0.696, average value was 0.432; the polymorphism information content (PIC) ranged from 0.064 to 0.644, average value was 0.339. The degree of genetic differentiation between two families (F_{ST}) was 0.02504, indicating that no significant genetic differentiation existed in the population. The single population inbreeding coefficient (F_{IS}) was -0.33255, which showed that no obvious inbreeding existed in the population. Compared with the wild group, the parameters of genetic diversity of offspring group were significantly lower.

We used 14 highly polymorphic microsatellite primers marked with fluorescent to construct the paternity test technology. Results showed that the combined non-exclusion probability (first parent) was more than 99%, the combined non-exclusion probability (parent pair) was more than 98%. All the offspring can correctly find their real parents. Results showed the 14 polymorphic microsatellite markers were suitable for paternity test of *Hucho bleekeri*.

4 Research of introgression in *Hucho bleekeri* and *Brachymystax lenok* tsinlingensis

We analyzed the genetic characteristics of two species distributed in Taibai River, Qinling Mountains using mitochondrial DNA markers. And we made sequences alignment and clustering analysis between our data and published data of *Hucho bleekeri* from Make River, Qinghai Province and *Brachymystax lenok* from Heilongjiang drainage. Results showed that number of parsimony informative sites was 97, the coefficient of genetic differentiation was 0.06653, and the average number of nucleotide differences was 0.3476, nucleotide diversity was 0.08598, gene flow was 3.51. The fixed coefficient of the general population was 0.1080. No common haplotypes was detected in this two species. Phylogenetic trees showed that the group from two different groups. The results declared

that there was no introgression in analysed DNA region between *Hucho bleekeri* and *Brachymystax lenok tsinlingensis*.

5 Molecular phylogenetic position and differentiation years of *Hucho bleekeri*

The phylogenetic tree was constructed based on full-length of mitochondrial DNA and 13 protein-coding genes of most Salmonidae fishes. We speculated the divergence times of *Hucho* based on molecular clock with a constant evolutionary rate. Phylogenetic trees showed that *H. bleekeri*, *H. taimen* and *H. hucho* were in the same cluster, but branch of *H. perryi* and *Salvelinus* were close. Most posterior probability of nodes were more than 95%, showed this analysis had a high credibility.

Therefore, it was inferred that *H. perryi* first separated from other taimens, with a divergence time of 10.4 Ma. *H. bleekeri* and *H. hucho* differentiated before 1.7 ~ 2.2 Ma, so as with *H. taimen*. *H. hucho* and *H. taimen* differentiated at 1.4 ~ 1.8 Ma. *H. bleekeri* collected from Makehe River and Taibai River differentiated at 1.3 ~ 1.7 Ma. And *H. bleekeri* and *B. lenok tsinlingensis* distributed in Qinling area isolated from species in north area at about 1.7 ~ 2.2 Ma. We speculated that these two species of Salmonidae diffused from north area and settled in this area in Pleistocene.

KEY WORDS: Genetic diversity; Paternity test; Introgression; Molecular phylogeny; *Hucho bleekeri*

缩略语中英文对照

缩略语	英文全称	中文全称
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
N_a	Number of Alleles	等位基因数
H_o	Observed Heterozygosity	观测杂合度
H_e	Expected Heterozygosity	期望杂合度
P-HWE	P value of Hardy-Weinberg Equilibrium	哈迪-温伯格平衡检验 P 值
M	Garza-Williamson Modified Index	GW 修正指数
PIC	Polymorphic Information Content	多态信息含量
S	Number of Polymorphic Sites	多态位点数
h	Number of Haplotypes	单倍型数
H_d	Haplotype Diversity	单倍型多态性
P_i	Nucleotide Diversity	核苷酸多态性
k	The Average Number of Nucleotide Differences	平均核苷酸差异度
D	Tajima's Neutrality Test	Tajima 中性检验
F_s	Fu's F_s Test	Fu 中性检验
F_{ST}	Genetic Differences Among Population	遗传分化指数
F_{IT}	The Total-Population Inbreeding Coefficients	群体总近交系数
F_{IS}	Within-Population Inbreeding Coefficients	种群内近交系数
LOD	The Nature Log of The Overall Likelihood Ratio	似然率对数值
EP	Exclusion Probabilities	排除概率
CEP	Cumulative Exclusion Probabilities	累积排除概率
N_m	Gene Flow	基因流
Ma	Million Anniversary	百万年

第一章 文献综述

1 川陕哲罗鲑研究概况

1.1 川陕哲罗鲑简介

川陕哲罗鲑 (*Hucho bleekeri*)，定名于 1934 年 (Kimura, 1934)，隶属于辐鳍鱼纲 (Actinopterygii)、鲑形目 (Salmoniformes)、鲑科 (Salmonidae)、哲罗鲑属 (*Hucho*)。又名贝氏哲罗鲑、布氏哲罗鲑、虎嘉鱼、长江哲罗鲑、四川哲罗鲑、虎嘉鲑、虎鱼、猫鱼、猫子鱼 (四川)、条鱼 (陕西)、大口鱼等，是哲罗鲑属中唯一我国特有物种。该物种在历史上分布十分广泛，在我国岷江上游、大渡河中上游、秦岭南麓汉江上游支流的渭水、太白河等水系皆有分布，是哲罗鲑属中分布纬度最低的物种 (Hu et al., 2008)。有学者认为，它是第四纪冰川时期由北方扩散而来，冰期结束后经长期的进化而形成的一个独立物种 (李思忠, 1984)；也有人认为它有可能在第三纪末期就已经扩散到了秦岭以南 (杜汉斌, 2012)。无论如何，川陕哲罗鲑都是自然环境变动的一个有力物证，在研究生物地理、系统进化和气候变化等方面具有很高的科研价值 (申志新等, 2006)。除此之外，川陕哲罗鲑还是重要的种质基因资源，是我国丰富多样的物种基因库中重要的组成部分 (丁瑞华等, 2010)。

1.2 川陕哲罗鲑研究概况

对川陕哲罗鲑的研究工作早已开展，主要集中于以下几个方面：

1.2.1 川陕哲罗鲑的基础生物学研究

(1) 形态特征

如图 1-1 所示，川陕哲罗鲑体长，呈椭圆形，略侧扁。头部较为宽大。口端位，大且斜裂，上颌略长于下颌。上颌骨细长，向后伸过眼后缘。眼较大。前上颌骨、上颌骨、犁骨上均密布有锋利细齿，舌骨上有较大型齿。鳃孔大，鳃膜和鳃峡不相连，鳃耙 14。鳃一室，形大而长。鳞小，侧线鳞 125~52，腹鳍基具腋鳞 3 枚。背鳍起点距尾鳍基部略近，脂鳍距背鳍距离约为距尾鳍的 2 倍。侧线平直。背部呈深灰色，腹部银白色。体侧有与侧线垂直排列的粉红色斑块，体表和鳃盖上分布有呈十字形的不规则小斑点，雄鱼的斑点为黑色，雌鱼略带红色。繁殖季节时，雄鱼头部常有珠星 (周仰璟等, 1994; 乐佩琦和陈宜瑜, 1998; 陕西省动物研究所等, 1987)。



图 1-1 川陕哲罗鲑（杜浩等, 2014）

Fig. 1-1 *Hucho bleekeri*

（2）生活习性

川陕哲罗鲑的栖息地可以用“山清水秀”四个字来形容。它们常孤立的分布于一些水域支流的上游，在一些人迹罕至的地区，喜栖居在砾石或砂石底质、海拔高的山麓溪流中，水域两岸多高山遮蔽，周边有茂密的森林。其分布区河道狭窄、水流湍急、溶氧高、水温较低（乐佩琦和陈宜瑜，1998）。川陕哲罗鲑的性格活跃，游泳能力强，常常单独活动，为凶猛肉食性鱼类。通常早晚从深潭游至浅滩觅食。

川陕哲罗鲑春季产卵时进行短距离的洄游，一般从干流上溯到支流产卵，有筑窝产卵的习性。产卵 40 ~ 50 d 后孵出的幼鱼随水流漂移至下游（丁瑞华等, 2010）。图 1-2 为陕西省太白河川陕哲罗鲑样本采集地点水域环境图。



图 1-2 陕西省太白河川陕哲罗鲑栖息地

Fig.1-2 Habitat of *Hucho bleekeri*, Taibai River, Shanxi Province

(3) 年龄与生长

川陕哲罗鲑鳞片上的环纹随年龄的变化而变化，平均每月长出 2 圈生长环线，焦鳞中心随鱼体的生长逐步由前段移向中心部位。鳞片上具有明显的“切割”现象。脊椎骨、鳃盖骨上具有明带与暗带形成的年龄特征。4 龄内体长（毫米）在年龄（年）上的回归方程为：

$$L = 189.9468t + 26.7934$$

其中，L 为川陕哲罗鲑体长，t 为年龄（ $0.21 \leq t \leq 4$ ）。相关系数 $r = 0.991$ （df = 35）。

4 龄内体重（克）与年龄（年）的回归方程为：

$$W = 6.2451 \times e^{2.1212t}$$

其中，W 为体重， $0.21 \leq t \leq 4$ 。相关系数 $r = 0.978$ （df = 35）（吴万荣, 1987）。

(4) 食性与消化

川陕哲罗鲑为大型凶猛肉食性鱼类，其生态位通常在其生活区处于食物链的顶端（吴万荣, 1989）。其食物主要为鱼类和水生昆虫两大类（周仰璟等, 1990），鱼类主要为条鳅、红尾条鳅、齐口裂腹鱼、重口裂腹鱼、唇鲮、泉水鱼等；水生昆虫方面则主要为细蜉、小蜉、灯蛾蜉、毛蠓、沼棱、水蝇、划蝽、石蝇、蜻蜓幼虫、豆娘幼虫、摇蚊幼虫、按蚊幼虫等。吴金明等（2015）研究了不同开口饵料（水丝蚓、丰年虫和鲫鱼卵以及两种不同配方的人工饲料）对养殖场内川陕哲罗鲑仔鱼生长和存活的影响，结合川陕哲罗鲑的摄食特性提出最佳开口投喂方案为：仔鱼出膜 0~10 d 投喂饵料为丰年虫，10 d 以后则逐步添加人工饲料。

1.2.2 川陕哲罗鲑的资源现状

川陕哲罗鲑主要分布于北纬 $29^{\circ} \sim 33^{\circ}$ 的秦岭以南长江流域北侧的岷江水系和汉江水系，历史上数量较多、个体较大。1960s 年代以前，川陕哲罗鲑资源量较为丰富，在岷江上游干流、大渡河、青衣江及其附属支流均有分布。20 世纪 60 年代后，受

气候变化与人类活动的影响,川陕哲罗鲑活动区域不断减小、种群数量大量减少,在很多历史分布区已难以寻找到其踪迹(王绪桢等,2000)。1960s~1980s 川陕哲罗鲑自然分布区缩小至岷江干流上游、大渡河上游和青衣江上游支流江段。1980s~2000s 年,其数量已经十分稀少,仅在大渡河上游的青海省玛柯河与足木足河,岷江上游的黑水河支流、青衣江以及天全河上游等有零星发现。同期,在陕西省汉水支流的太白河、湑水河有少量发现(杨德国等,1999)。21 世纪以来,除了青海省玛柯河偶见可见一到两尾的报道外(申志新等,2006),大部分其原有分布区未见关于此物种野生个体的报道。此外,由于其自然种群中雄性远多于雌性,且怀卵量少,因此一旦种群数量过度下降,资源数量就难以恢复。并且,现今仍有大量、持续以及新型的威胁存在,包括气候变化、栖息地的丧失和过度捕捞,预计在两个世代内(34 年),该物种资源量仍将以 20% 的速率持续下降(Rand, 2013)。鉴于川陕哲罗鲑种群资源量的锐减,1988 年被我国列为国家 II 级野生保护动物;同年以“濒危物种”被收录入《中国濒危动物红皮书·鱼类》(乐佩琦和陈宜瑜,1998);2012 年世界自然保护联盟濒危动物红皮书(IUCN red list)将其列为“极度濒危”(Song, 2012)。2012 年 9 月,村民无意中在陕西省太白河发现了疑似野生成体川陕哲罗鲑 19 尾,后被鉴定为川陕哲罗鲑。这是该物种近二十年发现的规模最大的一批群体,也是在该地区绝迹多年的再发现(杜浩等,2014)。这一重大发现使得该珍稀物种的保护有了新的希望。

1.2.3 川陕哲罗鲑的人工繁殖研究

川陕哲罗鲑雄鱼性成熟年龄约为 2 龄,雌鱼约为 3 龄,产卵群体以 3 龄为主。川陕哲罗鲑产卵期为 3~5 月,各地的不同种群繁殖期略有差异。对产卵场条件要求苛刻,通常为偏僻山区河段,水质清澈、砾石底质、水流缓急相间。川陕哲罗鲑有筑窝产卵的习性,其卵呈黄色,无粘性,卵径 3~4 mm(周仰璟等,1987)。在 2012 年 9 月获悉太白河捕获川陕哲罗鲑成鱼这一消息后,中国水产科学院长江水产研究所立刻对其进行了有关驯养和繁育设施建设,开启了相关的保护计划。通过人工催产、受精,于 2013 年 6 月首次实现了川陕哲罗鲑人工繁殖,并获得仔鱼约 3270 尾(钟云,2013)。川陕哲罗鲑的成功繁殖育苗,对该物种保护具有重要的意义,或将扭转该物种濒临灭绝的现状,为开展川陕哲罗鲑资源增殖及种群恢复带来希望。

1.2.4 川陕哲罗鲑的分子生物学研究

随着分子生物技术的逐步发展,关于川陕哲罗鲑的分子生物学研究也有所开展。

祁得林等(2009)首次克隆了川陕哲罗鲑线粒体细胞色素 *b* (Cyt *b*) 基因, 获得了该基因序列全长(1140 bp)。并与鲑亚科其他 14 个物种的 Cyt *b* 基因进行了同源性比较, 分析了序列的碱基组成以及变异情况, 同时构建了系统进化树。结果表明川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑亲缘关系较近, 这与以往的形态学分类不相符。

Wang et al. (2011) 与 Zhang et al. (2014) 先后报道了采自于不同分布区的川陕哲罗鲑线粒体全长, 并发现不同采样点的样本线粒体序列有较大差异。来自于玛柯河的样本序列全长为 16997 bp, 而来自于太白河的样本全长则为 16837 bp, 二者碱基差异主要为重复区域内碱基重复次数不同。

关于川陕哲罗鲑种群遗传学、个体识别等分子生物学方面的研究则未见报道。

2 种群遗传学

2.1 种群遗传学的定义及其研究方法

种群(population)是一定空间内同种个体的组合(杨持, 2008)。这表示, 种群是由同种个体组成的, 并且占有一定的领域, 它是物种在自然界中存在的基本单位。种群最基本的特征包括种群的生态特征(数量特征和时空分布特征)与种群的遗传特征(遗传变异水平与遗传结构), 由此可见, 其研究内容可分为种群生态学和种群遗传学。种群遗传学(population genetics)主要研究种群的遗传过程, 包括自然选择、基因流、迁移率、有效种群大小与种群瓶颈效应的检测等。种群遗传多样性是种群遗传学研究的主要内容, 等位基因频率及其演变规律是其研究的核心问题(黄族豪和刘迺发, 2008)。

种群遗传学关心的主要问题之一是有效种群大小, 即 N_e , 它通常远小于实际观测的种群规模, 是维持遗传多样性稳定性的关键。自然种群在平衡时是不增长或衰退的, 这时候遗传多样性的预期值与有效种群大小成正相关。其次是基因流(Nm)的遗传估算。基因流实质上是种群间的基因跟随生物个体或配子进行的迁移。基因流高, 则与之相关的两个种群间的基因频率逐渐趋近, 由此可见, 基因流趋向于阻止种群间产生遗传差异。再者是种群的遗传瓶颈效应, 它是指有效种群大小明显下降, 这种下降有可能是暂时的, 也有可能是永久的。其影响程度也会根据最后种群规模的大小和持续时间来决定, 短期的瓶颈效应可能不会对种群遗传多样性造成明显影响, 而长期的瓶颈效应则会造成等位基因丢失过多, 影响种群的遗传多样性。

利用分子标记技术对种群进行遗传差异分析是种群遗传学研究的必要手段(黄文达等, 2010)。近年来, 随着分子生物学技术的发展, 种群遗传学的研究也逐步壮大。

其研究主要有 3 步：有效检测物种 DNA 信息片段；对 DNA 数据库进行统计；利用计算机软件对数据统计结果进行分析（Luikart and England, 1999）。因此，选择合适的遗传标记对个体、种群的遗传水平进行研究，可获得该种群及其进化过程中各个阶段的正确信号及信息。对濒危物种而言，通过获取各项遗传水平的参数，了解种群关系、种群动态变化及其进化历史，可为该物种的保护提供精确的理论依据，从而制定科学的保护策略。

2.2 种群遗传学研究手段——分子标记概述

遗传标记（Genetic markers）是指与目标基因性状紧密连锁，并同该性状共同分离且易于识别的可遗传的等位基因变异（王永飞等, 2001）。它有两个重要特征，即可识别性与可遗传性。遗传标记经历了形态标记（Morphological markers）、细胞标记（Cytological markers）、生化标记（Biochemical markers）及分子标记（Molecular markers）几个主要阶段。形态学、细胞学与生化标记都是基于基因表达结果之间的区别，是基因的间接反映；而 DNA 分子标记则是可反映生物个体或种群间基因组中有差异的特异性 DNA 片段，它是遗传变异在 DNA 分子水平上的直接反映（武玉珍, 2008）。20 世纪 70 年代以来，随着分子生物学的发展，分子标记技术的研究和应用也突飞猛进，被广泛应用于遗传图谱构建（宁海龙等, 2015）、遗传多样性与遗传结构分析（Necip et al., 2014）、遗传育种（Khlestkina, 2014）、基因库构建（赵淑娟等, 2005）、物种鉴定（李献儒等, 2015）、系统进化分析（Wang et al., 2013）、亲缘关系鉴定（李建林等, 2013）以及基因克隆（Yang et al., 2013）等方面，并展现出了其独特的优势。

目前存在的分子标记有数十种，大致可分为以下四大类（Svetlana et al., 2007）：

A. 基于分子杂交的分子标记：限制性内切酶片段长度多态性（Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP）标记；数目可变串联重复序列（Variable Number of Tandem Repeats, VNTR）标记；DNA 指纹技术（DNA Fingerprinting）以及原位杂交（In Situ Hybridization, ISH）等。

B. 基于聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction, 简称 PCR 反应）的分子标记：随机扩增多态性 DNA（Random Amplified Polymorphism DNA, RAPD）；DNA 扩增指纹印迹（DNA Amplification Fingerprinting, DAF）标记；序列标志位点（Sequence-tagged site, STS）；微卫星 DNA（Simple Sequence Repeats, SSR）标记；单链构象多态性（Single-strand Conformation Polymorphism, SSCP）技术；单引物扩增反应（Single Primer Amplification Reaction, SPAR）技术；目标区域扩增多态性（Target

Region Amplification Polymorphism, TRAP) 标记; 任意引物 PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction, AP-PCR) 技术以及双脱氧指纹法 (Dideoxy Fingerprints, DdF) 等。

C. 基于限制性酶切和 PCR 相结合的分子标记: 扩增片段长度多态性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP); 酶切扩增多态性序列 (Cleaved Amplified Polymorphism Sequences, CAPS) 等。

D. 基于 DNA 序列的分子标记: 表达序列标签 (Expressed Sequence Tags, ESTs); 单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) 标记; 线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 分子标记以及叶绿体 DNA (chloroplast DNA, cpDNA) 分子标记等。

用于种群遗传学研究的理想的分子标记应该是易于开发的、价格经济的、高多态性的, 以及自然选择上呈中性的。目前应用于水产动物研究中的分子标记有很多, 本文将以前研究所采用的两种分子标记, 即微卫星 DNA 标记和线粒体 DNA 标记进行概述。

2.2.1 微卫星 DNA 标记

微卫星序列 (microsatellite), 又称为短串联重复序列 (Short Tandem Repeats, STR)、简单重复序列 (Simple Sequence repeats, SSR), 或简单序列长度多态性 (Simple Sequence Length Polymorphism, SSLP), 最早由 Skinner 等人于 1974 年在寄居蟹中发现 (Tautz, 1984)。它是 DNA 分子中的一个片段, 由中间的以少数几个核苷酸序列首尾相连串联且高度重复的核心区及其两侧的侧翼区构成, 均匀分布于整个基因组中。

微卫星标记的多态性定位于其核心区, 不同的重复数目与重复位置是微卫星标记多态性的基础 (Litt and Luty, 1989)。按核心区重复碱基数目来划分, 可分为单、二、三、四、五、六核苷酸重复序列, 其中二、三、四核苷酸重复序列因多态性丰富而受到更多的应用。

微卫星标记的特异性定位于侧翼区的保守序列, 不同个体或物种其侧翼区序列有可能相同。每个微卫星位点可根据其保守的侧翼区序列设计特异性引物, 使用 PCR 技术进行扩增, 对扩增产物进行多态性检测。

(1) 微卫星标记的优点

微卫星标记作为一种广泛应用的遗传标记, 其优点主要表现在下述几个方面:

A. 分布广泛且数量众多。微卫星 DNA 在基因组中分布十分广泛, 大约每隔 5~10 kb 就存在一个微卫星 (Tautz, 1989)。它们不仅存在于非编码区中, 也存在于编码区、调控区和其他任意区域。

B. 具有高度的保守性。微卫星 DNA 侧翼区序列在近缘物种间具有一定的保守性, 不同种、属的微卫星引物经常可以通用 (骆慧, 2013)。

C. 为共显性遗传。利用微卫星引物对被检测的 DNA 模板进行 PCR 扩增, 分析扩增产物, 可清晰判断其基因型 (吴艳, 2005)。

D. 多态性丰富。同一个微卫星位点在不同物种、种群及个体间的重复序列或重复次数的差异较大。一个微卫星位点的核心序列重复次数越高, 其等位基因数就可能越多, 多态性也就随之越高 (Jacob et al., 1991)。

E. 检测方法快速、灵敏、简便、经济; 检测程序标准化; 检测结果准确度高。

(2) 微卫星标记的获取途径

微卫星标记有多种获取途径, 主要包括以下几种方式:

A. 从一些公共数据库中查询微卫星座位。例如 GenBank、EMBL (European Molecular Biology Laboratory)、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) 等, 这些数据库包含部分物种的微卫星序列、EST 序列、DNA 序列和引物序列, 可以从中挑选序列进行引物设计, 或直接选择已发表引物, 然后进行多态引物的筛选。这种方式较为快速、简便、经济, 但受到公开数据量的限制。

B. 利用富集法从基因组 DNA 中分离微卫星座位, 建立微卫星文库。这种方法通常是利用标记的微卫星寡核苷酸探针与目标 DNA 进行杂交, 检测阳性克隆并对其进行测序, 从而建立一个片段小于 1000 bp 的微卫星富集文库。

C. 利用已获得的近缘物种的微卫星引物来筛选微卫星标记。由于微卫星位点的侧翼区具有较高的保守性, 因此可以利用这一特点来获得近缘物种的微卫星标记。此方法快速有效, 应用也越来越多, 但其扩增产物不一定是微卫星座位, 因此需通过杂交、测序等方法来确认所获得的产物是具有多态性的微卫星位点。

2.2.2 线粒体 DNA 标记

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是一种裸露的、共价闭合、环状双链的 DNA 分子 (少数也有线性的) (Bridge et al., 1992)。在脊椎动物中, 其外环为重链 (H 链), 内环为轻链 (L 链) (肖莉莉, 2006)。mtDNA 可独立进行复制和转录, 是目前已知的唯一母系遗传核外 DNA 分子标记 (Clayton, 1982)。

本文主要研究对象——川陕哲罗鲑 (*Hucho bleekeri*) 的线粒体 DNA 结构如图 1-3, 序列全长 16997 bp (Wang et al., 2011)。它包含了 2 个核糖体 RNA (rRNA) 基因 (12S rRNA、16S rRNA), 13 个蛋白质编码基因 (ND1、ND2、COX1、COX2、ATP8、ATP6、COX3、ND3、ND4L、ND4、ND5、ND6、CYTB), 22 个转运 RNA (tRNA) 基因, 和 1 个长度为 1339 bp 的控制区序列 (Control Region, CR)。其中, H 链的复制起始位点位于控制区, L 链的复制起始位点位于一个包含 5 个 tDNA 基因的区域 (WANCY 区)。

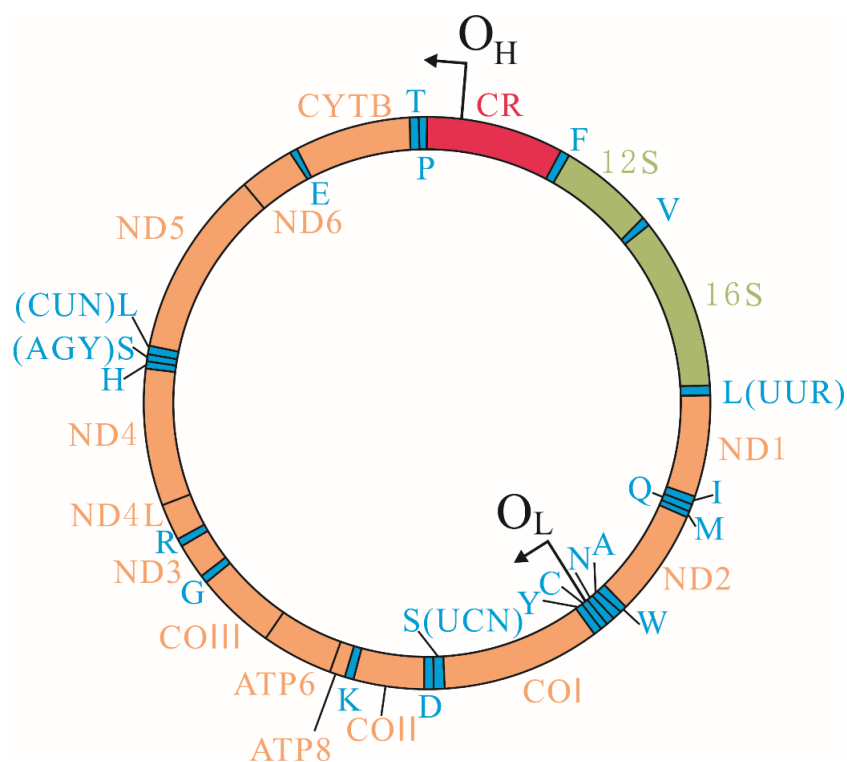


图 1-3 川陕哲罗鲑 (*Hucho bleekeri*) 线粒体 DNA 结构图 (Wang et al., 2011)

Fig. 1-3 The structure of *Hucho bleekeri* mitochondrial DNA (Wang et al., 2011)

线粒体 DNA 具有如下几种遗传特征:

A. 严格的母系遗传, 几乎不发生重组。在受精过程中, 精子仅携带一个线粒体, 包含 100 个左右的 mtDNA 拷贝, 而卵细胞内却含有 $10^5 \sim 10^8$ 以上的 mtDNA 分子拷贝, 因此可以说 mtDNA 是严格的母系遗传。

B. 分子结构简单, 分子量小, 编码效率高。动物 mtDNA 结构紧凑, 无重复序列和内含子, 绝大多数分子量在 15.7 ~ 19.5 kb 之间, 在限制性内切酶酶切范围之内 (张尚宏, 1995)。

C. 遗传变异多, 进化速度快。动物 mtDNA 呈裸露状态, 没有蛋白质的保护, 且 DNA 聚合酶没有校对功能, 故而缺乏有效的修复系统。此外, 有些突变还具有累加效应, 且次数较多、频率较高, 因此其进化速率比单拷贝核基因要高 6~17 倍(立彦, 2006)。

D. 不同区域进化速率不同。mtDNA 的进化主要是以碱基替换为主, 插入和缺失较少。碱基替换主要发生在控制区和基因间隔区, 不同位置替换速率不同, 其中控制区进化最快, 其次为 CYTB、ND2、ND4、ND5 和 COX1 基因; 进化高度保守的基因则为 ATPase6、ATPase8、ND4L 以及 rRNA 和 tRNA 基因。不同进化速率的片段作为分子标记适宜于不同水平的进化研究(朱雪莲等, 2006)。

E. 无组织特异性。动物不同组织细胞的 mtDNA 具有高度的均一性, 这有利于 mtDNA 的取材和遗传学分析研究(Avise et al., 1984)。

F. 拷贝数多。每个细胞中的 mtDNA 拷贝数约为 1000~10000 个, 容易从组织中分离纯化。

G. 多态性与异质性。在不同物种、同一物种的不同个体间, 甚至同一个体的细胞内都可能会出现由于突变而造成的 mtDNA 序列差异, 不同物种的 mtDNA 在其结构和编码能力方面上也存在着相当大的区别(师红雯, 2008)。

2.3 种群遗传学主要研究内容——遗传多样性研究概述

2.3.1 遗传多样性的定义

生物多样性(biological diversity), 是指生物有机体及其赖以生存的生态复合体的多态性和变异性。它包括景观多样性(landscape diversity)、生态系统多样性(ecosystem diversity)、物种多样性(species diversity)和遗传多样性(genetic diversity)(马克平, 1993)。其中, 遗传多样性是生物多样性的基础和核心(王洪新, 1996)。广义的遗传多样性是指地球上所有生物有机体所携带的遗传信息的总和, 这些遗传信息贮存于个体的基因中。狭义的遗传多样性主要指种群内个体间或群体内种群间遗传变异的总和(钱迎倩和马克平, 1994)。

物种遗传多样性的大小是长期进化的产物, 是其生存和进化的前提(Soltis et al., 1983)。一个物种, 其遗传多样性越高, 对环境的适应能力就越强, 越容易拓宽其分布范围; 反之, 物种的遗传多样性越低, 对环境的改变就越敏感, 有濒危甚至灭绝的危险。因此, 生物遗传多样性的保护极为重要, 通过对遗传多样性的研究可揭示生物

各个水平的遗传进程，从而促进生物多样性保护和持续利用研究（Feral, 2002）。保护生物多样性的最终目的是要保护物种的遗传多样性。

遗传多样性最直接的表现形式就是种群的遗传变异水平，遗传变异的大小决定了遗传多样性水平的高低。种群作为进化的基本单位，在自然界中有着特定的分布格局。因此，种群遗传多样性不仅包括遗传变异，也包括种群的遗传结构。遗传多样性另一个重要表现形式就是种群遗传结构的差异。研究种群遗传多样性的有效方法是利用“中性”且恰当的遗传标记对其进行评估。

2.3.2 微卫星标记在遗传多样性研究中的应用

微卫星 DNA 分布广泛且数量众多、具有高度的保守性、共显性遗传、以及多态性丰富，其检测方法快速、灵敏、简便、经济，检测结果准确（Tautz, 1989; 骆慧, 2013; 吴艳, 2005; Jacob et al., 1991），这些优点使其成为种群遗传结构与多样性评估的有效手段。根据多个微卫星位点在不同群体中的等位基因数（Number of alleles, N_a ）、等位基因频率（Allele frequency）、观测杂合度（Observed heterozygosity, H_o ）、期望杂合度（Expected heterozygosity, H_e ）、变异百分比（Percentage of variation）、多态信息含量（Polymorphism information content, PIC）等，即可评估种群的遗传多样性和遗传结构，分析其进化历史和潜力。

许志强等（2011）利用微卫星标记对四个水系的中华绒螯蟹群体的遗传特征进行了分析，结果表明，四个群体均具有较高的遗传多样性，各群体间存在较为频繁的基因流，群体间遗传分化程度较小，此结果揭示了各水系中华绒螯蟹的种质混杂较为严重的情况。梁利群等（2004）利用微卫星标记对乌苏里江太门哲罗鲑进行了种群遗传学分析，结果发现该物种野生种群遗传多样性处于中等偏低的水平，由于其资源量不断下降，由此提出了在保护遗传多样性的前提下进行人工繁育和增殖放流的建议。

2.3.3 线粒体 DNA 标记在遗传多样性研究中的应用

随着 DNA 测序技术和生物信息学的快速发展，对线粒体 DNA 分子标记的研究也日益加剧。由于 mtDNA 具有严格的母系遗传、多态性高、进化速率快等优点，已被广泛应用于群体遗传学分析当中。利用 mtDNA 分析群体遗传结构具有较大的优势，其原理主要是对每个个体的 mtDNA 序列进行比对分析，通过检测该种群各个序列的多态位点数（number of polymorphic sites, S ）；单倍型数（number of haplotypes, h ）；单倍型多样性指数（haplotype diversity, H_d ）；核苷酸多样性指数（nucleotide diversity, P_i ）、平均核苷酸变异数（average number of nucleotide differences, k ）等参数以及构

建单倍型分子系统进化树来了解该种群的遗传多样性与遗传结构。该方法早期是通过对基因组或者部分基因、部分序列进行限制性片段长度多态性 (RFLP) 进行分析。随着 DNA 测序技术的完善, 现而今主要利用对 mtDNA 的全长或部分片段进行测序来分析不同单倍型之间的遗传差异。由于 mtDNA 不同区域进化速率不同, 因此可根据所研究群体的具体分化情况来挑选合适的 mtDNA 片段作为分子标记进行研究。

苏军虎等 (2012) 基于线粒体控制区序列对黄河上游的厚唇裸重唇鱼种群遗传结构进行了分析, 结果表明, 不同采样点的种群未出现遗传分化, 由此建议这些种群应作为一个整体进行保护。Skurikhina et al. (2013) 通过分析库页岛远东哲罗鲑的线粒体部分序列, 研究了该种群的种内遗传多态性, 发现来自于日本海岸、库页岛东岸与西岸三个采样点的样本表现出显著的遗传差异, 且库页岛样本单倍型多样性与日本海岸样本相比呈现出较高的多态性水平。单倍型系谱遗传结构分析结果说明三个采样点的远东哲罗鲑来自于同一个祖先, 其有可能生活在库页岛西岸。

3 亲子鉴定原理及其应用

3.1 亲子鉴定技术原理及其操作流程

亲子鉴定 (parentage identification) 又称亲权鉴定, 它利用医学、生物学和遗传学的理论和技术, 比较不同个体的遗传特征, 主要是验证被检个体间单基因型遗传标记是否符合孟德尔遗传定律, 以判定其是否存在亲缘关系 (Kashi et al., 1990)。

亲子鉴定的内容包括: 个体生父的确定、个体生母的确定、个体生父生母的确定, 以及生父、生母后代的确定。

从古至今, 随着技术的发展, 亲子鉴定的方法越来越多, 可靠性也越来越高。由早期的表型识别、系谱记录、滴血验亲等传统方法, 逐步发展到生理生化水平, 如血型鉴定、染色体形态学鉴定, 再到分子生物学水平, 即依据 DNA 分子进行亲缘关系鉴定。亲子鉴定技术不仅常用于司法鉴定, 在动、植物进化学、生态学、遗传学, 尤其是濒危动物保护方面的研究中也具有重要的发展前景。

微卫星标记具有高度的多态性, 因此在个体识别与亲缘关系鉴定方面成为了重要的研究手段。选用一定数量的多态微卫星标记, 基于这些微卫星位点在该群体的等位基因频率, 通过计算排除概率 (exclusion probability) 便可进行亲缘关系鉴定。在利用微卫星标记进行亲子鉴定时, 需要选择恰当的微卫星标记数目。研究发现, 要确保亲子鉴定结果的准确性, 在单亲时已知至少需要 5~8 个微卫星位点, 而双亲均未知时则需要 8~12 个微卫星位点 (顾颖等, 2012)。

利用微卫星进行亲子鉴定的过程主要为：（1）采集被检测个体组织样本，并从中提取基因组；（2）筛选合适的多态微卫星引物；（3）合成荧光多态微卫星引物，对提取的基因组进行 PCR 扩增、测序；（4）利用适当的软件对实验结果进行数据分析，对亲缘关系概率进行计算。

3.2 亲子鉴定技术在濒危野生动物保护中的应用

对濒危物种进行人工圈养繁育是防止或减缓其走向灭绝的重要保护措施之一，人工圈养群体放归自然是濒危动物野生种群的复壮和恢复生态系统的有效手段（Mowry et al., 2015; Arts et al., 2016）。然而，由于人工圈养群体通常规模有限，容易产生强烈的遗传学波动，包括近交衰退、远交衰退、遗传多样性的降低、有害突变的持续累积、对环境的适应性下降等（Frankham et al., 2002; Woodworth et al., 2002; Christie et al., 2012）。这些后果容易导致人工圈养的子代群体在放归自然后产生诸多的负面效应（Williams and Hoffman, 2009），包括繁殖成功率、子代存活率下降，后代适应能力降低、对疾病和灾害的抵抗力减弱，以及死亡率上升等（Pante et al., 2001; Arkush et al., 2002; Johnson et al., 2011），因此必须通过遗传管理加以遏制或改善。为有效地避免人工饲养群体的衰退，尽最大可能维持种内遗传变异水平和物种进化潜力，保护物种的遗传多样性，利用亲子鉴定技术制定一个详细、准确的种群遗传谱系档案，优化繁育计划，以维持多世代圈养中的遗传健康，具有重要意义。高建伟（2012）利用微卫星标记对圈养黑熊进行了遗传多样性统计，并进行了亲子鉴定研究，为建立可靠的谱系提供了理论依据。倪小伟（2012）研究发现人工繁殖扬子鳄同窝幼鳄具有多父本现象，因此利用亲缘关系鉴定技术构建了浙江扬子鳄迁地保护种群的遗传谱系，用以指导后续的繁育工作。

此外，还可利用亲子鉴定技术对人工放归自然回捕个体进行个体鉴定与家系认证，对放归效果进行评估，检测放归物种的遗传多样性与遗传结构是否受到影响，从而确保人工放归的有效贡献（成为为, 2014）。

4 分子系统发育研究概述

4.1 分子系统发育的定义

生命世界最基本的特征之一是它所包含的生物的充分多样性。系统发育系统学（phylogenetic systematics），又称为分支系统学（cladistics），是指用衍生的或近裔的特征重建共同祖先关系，并在此基础上将分类单元（taxon, 类元）进行归类，建立

自然分类系统的一门科学（李俊兵, 2008）。类元是指一个具体的分类群，包括一个具体的目、科、属等。自然类元（*natural taxon*）是存在于自然界进化过程中的一个类元，其内部生物间共有一个独特的进化历史（Wiley, 1998）。近年来，随着分子生物学技术的不断发展以及其与其他学科之间的相互渗透，同时计算机技术飞速发展，系统发育系统学研究融合了分子生物学试验技术与计算机技术后，产生了分子系统学（*molecular systematics*）这一生物系统学中的前沿学科。它包含了两大领域，一是基于种内变异的分析与阶元进化研究的种群遗传学；二是基于种间及以上的分类阶元系统发生的研究及与之相关的生物地理学过程和进化机制的系统发育学。分子系统发育（*molecular phylogeny*）分析是指在分子水平上研究物种之间的进化关系，它直接利用从核酸或蛋白质分子提取的生物信息，作为该物种的特征，通过比较不同物种序列之间的关系，构建系统发育树，从而阐明物种间的发育关系（孙啸等, 2005）。

4.2 分子系统发育的理论及其研究方法

分子系统发育研究的目的是通过系统进化树来表明各类群之间的相互关系及其演化顺序，其研究方法主要有两种：一种是不考虑分子演化的恒定速率进行系统进化分析，这种方法包括基于邻接法（Neighbor-joining method, NJ）（Saitou and Nei, 1987）、最小进化法（Method of minimal evolution, ME）（Saitou and Imanishi, 1989）、加权最小二乘法（Method of weighted least squares）（Fitch and Margoliash, 1967）等；另一种是认为分子进化具有恒定的进化速率，即分子像时钟一样以一定速率进化（分子钟，*molecular clock*）。因此可以通过分子之间的差异，结合进化速率推断物种分化时间，重现物种系统演化历史（Zhckerkandl and Pauling, 1965）。

分子系统发育的研究技术也多种多样。很少有以种系发生为目的进行 DNA 全序列分析，因为工作量过大，而且所含大部分遗传信息是被检测生物体共同所有，没有较大的判别意义，因此大多数研究选择 DNA 序列的一部分特定的序列（遗传标记物）进行比对分析。一些较为原始的生物，如细菌，可利用核糖体 RNA 进行分析和比较（Pace, 1997）。植物分子系统研究中最常见的分子标记为叶绿体上的基因和编码核糖体蛋白的 DNA（祁哲晨, 2013）。动物中最常见的分子标记则为 mtDNA 中的控制区（Control Region, 具有最快的核苷酸替换速率和高种内多态）（Aquadro et al., 1983; Lee et al., 1995）和 *CYTB* 基因（Gubitz et al., 2000）。其他如 tRNA-Pro 和 tRNA-Thr（Talbot et al., 1996）；tRNA-Ile、tRNA-Leu 和 NADH-1（Redenbach et al., 1999）；12S rRNA（Brown et al., 1998）；16S rRNA、ATP8 和 NADH-5；以及核基因组中的微卫星标记（Johnson et al., 1999）与作为父系分子标记的 Y 染色体（Hurles and

Jobling, 2001) 等也有应用。由于进化过程中核基因的变异会随着基因流逐渐消失, 因此具有稳定的母系遗传特征的 mtDNA 是研究分子系统学的首选标记。早期的分子系统学研究主要应用线粒体 DNA 限制性酶切技术, 通过对限制性片段长度多态性 (RFLP) 的比较分析, 探讨种群之间的种系发生与系统进化关系。关于此类研究最早的报道是 Avise et al. (1979) 对囊鼠 (*Geomys pinetis*) 不同地理种群间种系发生的研究, 基因组经 mtDNA 限制性酶切后, 跑胶带型显示囊鼠总群体明显分化成两个进化单元, 即东部种群和西部种群, 二者序列差异在 3% 以上。此外, 该研究还进一步确定了两个种群中不同单倍型的系统发生。20 世纪 90 年代后, 随着 PCR 技术及 DNA 测序技术的发展与应用, 分子系统学研究技术也得到了飞速发展。DNA 测序与 PCR 技术以其操作简便、结果直观、分析精确的优点逐渐取代了传统的方法。Crête-Lafrenière et al. (2012) 利用 mtDNA 序列片段通过不同模型构建了鲑科部分鱼类的系统发育关系。廖杰等 (2013) 利用 mtDNA 序列片段基于贝叶斯法对笛鲷属进行了分化年代的推断。

4.3 川陕哲罗鲑分子系统发育研究进展

关于鲑科鱼类的分子系统进化的研究已颇有进展。大部分研究是利用鲑科鱼类的线粒体基因组部分序列片段、一些核基因或等位酶数据分析来确定鲑科鱼类各物种的分类学地位。哲罗鲑属的一些种类也在这些研究中也有所涉及。哲罗鲑属现有 5 个种, 即: 川陕哲罗鲑 (*Hucho bleekeri*)、多瑙哲罗鲑 (*Hucho hucho*)、石川哲罗鲑 (*Hucho ishikawae*)、远东哲罗鲑 (*Hucho perryi*) 和太门哲罗鲑 (*Hucho taimen*)。目前关于它们的分子系统发育的研究主要集中于一些鲑科鱼类的种系发生 (Osinov and Lebedev, 2000; Crespi and Fulton, 2004; Shedko et al., 2013)。这些研究均表明, 哲罗鲑属中川陕哲罗鲑与除远东哲罗鲑外其他可获得数据的 2 个物种之间的遗传距离较近, 全属 (除远东哲罗鲑外) 与细鳞鲑属的分支较为接近。然而, 川陕哲罗鲑在该分支内具体的系统发育位置尚亟待确定。远东哲罗鲑则在系统进化分析中表现出不稳定的状态, 不同分析序列、不同模型下该种的系统发育位置可能不同, 不能确定其与哲罗鲑属、红点鲑属或太平洋鲑三者当中最为接近的分支 (Osinov and Lebedev, 2000)。不同物种产生分歧年代的确定也极为重要。贝叶斯分析估算出鲑科鱼类大概在 1.06 亿年前形成, 各属种的出现则在 0.4 ~ 0.2 亿年前 (Shedko et al., 2013)。Froufe et al. (2003) 利用 mtDNA 控制区约 600 bp 序列对哲罗鲑属、细鳞鲑属和茴鱼属进行了分子系统地理学研究, 结果三个不同采样点的种群均有单倍型共享, 这证实了第四纪

更新世冰川时期的大规模水系运动中西伯利亚东部和远东地区的水系交融导致了物种的扩散与迁移。

5 本研究的目的意义及技术路线

川陕哲罗鲑历史上资源量较多、分布较为广泛。其味道鲜美，具有较大的经济价值，同时，它是青藏高原边缘唯一的哲罗鲑，被认为是第四纪冰川时期自北方南迁并定居于此的鱼类，是历史上气候变幻的有力物证，在生物地理学和分子生态学等研究中具有重要学术价值。然而，近几十年来由于生境的破坏、气候的变化等因素，川陕哲罗鲑自然种群资源量呈大幅度下降趋势，自然分布区日益缩减，物种均处于濒危状态，被列为国家Ⅱ级保护动物，并被 IUCN 濒危动物红皮书列为“极危”（Critically Endangered, CR）（Rand, 2013）。而目前川陕哲罗鲑仅存的栖息地——陕西省太白河地区由于水电站、卵石的挖取等破坏性开发，导致该地区生境遭到严重损害。因此，对川陕哲罗鲑相关保护性的研究工作刻不容缓。从分子水平评估物种多样性水平是恢复其野生资源的基础。基于种群遗传学的研究，了解物种遗传多样性与遗传结构，是制定相应保护对策的有效方法。此外，川陕哲罗鲑在系统进化研究中的分类地位尚未明确，因此有必要对其进行分子系统发育的研究，为该物种在川陕哲罗鲑在哲罗鲑属内物种间的系统进化、亲缘关系、地理分布格局及演化过程等提供基础资料。

本文将对国家Ⅱ级野生保护动物——川陕哲罗鲑（*Hucho bleekeri*）为主要研究对象，采集野生和人工养殖样本，同时获取部分鲑科鱼类已发表的线粒体序列全长，从以下几个方面进行研究：

A. 通过川陕哲罗鲑的近缘物种秦岭细鳞鲑（*Brachymystax lenok tsinlingensis*）的微卫星文库，利用采集到的川陕哲罗鲑野生个体样本，筛选具有多态性的川陕哲罗鲑微卫星引物，以用于其遗传多样性、亲子鉴定等研究（第二章）。

B. 基于川陕哲罗鲑多态微卫星引物和线粒体 DNA 标记对川陕哲罗鲑野生种群进行遗传多样性与遗传结构分析，并检验该群体是否发生过瓶颈效应，从而了解野生种群的遗传背景（第三章）。

C. 利用筛选出的川陕哲罗鲑多态微卫星引物对养殖家系子一代群体进行遗传学评估，同时构建川陕哲罗鲑亲子鉴定技术，用以指导川陕哲罗鲑的人工繁育技术及其家系管理，为这一濒危物种保护提供有效的保障（第四章）。

D. 利用线粒体 DNA 标记分析陕西省太白河川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑野生样本，探究两个群体之间是否存在基因杂交渐渗现象（第五章）。

E. 利用部分鲑科鱼类已发表物种的线粒体序列全长和蛋白质编码基因拼接序列，构建哲罗鲑属系统发育关系，确定川陕哲罗鲑的系统发育位置；利用线粒体 DNA 分子标记，基于恒定速率的分子钟推断哲罗鲑属分化年代，从而推测其物种起源、分化与扩散途径（第六章）。

本研究技术路线：

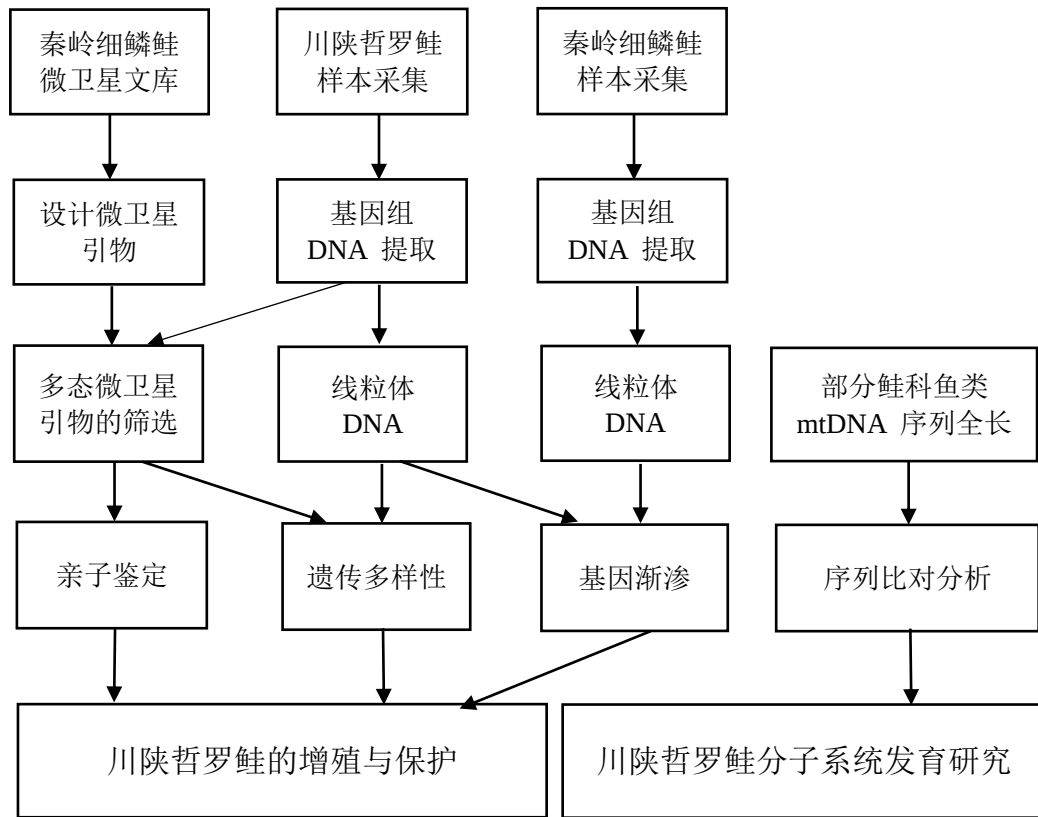


图 1-4 川陕哲罗鲑种群遗传学及分子系统发育研究技术路线图

Fig. 1-4 Technical route of population genetics and molecular phylogeny of *Hucho bleekeri*

第二章 川陕哲罗鲑微卫星标记的开发

1 前言

川陕哲罗鲑 (*Hucho bleekeri*) 隶属于鲑形目、鲑科、哲罗鲑属, 又名贝氏哲罗鲑、虎嘉鱼, 分布于长江水系, 是我国特有物种 (Wang et al., 2015)。上世纪 60 年代以来, 由于生态环境的破坏、水利工程的修建以及过度捕捞等人为或环境因素, 川陕哲罗鲑个体数量大量减少、原有分布区急剧缩小, 处于极度濒危状态。目前, 川陕哲罗鲑的保护工作已经开展, 对该濒危物种的研究主要集中于资源调查与地理分布 (董崇智等, 1998)、分析濒危原因与提出保护对策 (申志新等, 2006; 邓小林, 2007)、生物学特性与生态习性 (王凤等, 2009) 等方面, 其分子生物学研究尤其是遗传学方面还相当薄弱, 仅报道了川陕哲罗鲑在鲑科鱼类系统发育关系 (祁得林等, 2009) 及其线粒体全长 (Wang et al., 2011; Zhang et al., 2014)。为了解川陕哲罗鲑的遗传学信息, 急需获得一种有效的分子标记对其进行研究。

微卫星 DNA 标记多态性丰富, 分析技术简便, 对实验样品和仪器设备的要求低, 已成为种群遗传学、种质鉴定、遗传育种等领域使用最普遍的分子遗传标记之一。目前已有一些开发哲罗鲑属其他哲罗鲑的微卫星标记的研究: Makoto et al. (2005) 开发了 8 对远东哲罗鲑的多态微卫星引物, 并利用 23 个野生个体验证了其多态性。Tong et al. (2006) 针对濒危物种太门哲罗鲑开发了 6 对多态微卫星引物, 并成功检测了样本量为 61 的太门哲罗鲑野生种群的遗传多样性, 证明这 6 对引物可以适用于后续的遗传学研究。Kuang et al. (2009) 选用了 21 对鲑科鱼类微卫星引物用于检测太门哲罗鲑野生个体, 结果发现其中有 18 对具有多态性, 并成功用其检测了太门哲罗鲑野生种群的遗传多样性。Geist et al. (2009) 使用 23 对鲑科鱼类微卫星引物检测了其在多瑙哲罗鲑中的多态性, 成功开发出 6 对适用于多瑙哲罗鲑的多态微卫星引物, 并用此检测了 12 个野生多瑙哲罗鲑种群, 发现该群体可聚为 8 个高度分化的基因簇, 由此提出须保护该物种的进化潜能。而关于川陕哲罗鲑微卫星标记的研究还未见报道。鉴于该物种的资源现状, 因此有必要采用微卫星方法对其遗传特性进行深入研究以期提出更加合理的保护措施。

此前的研究表明, 利用近缘物种交叉扩增是获取微卫星标记的有效手段 (Lima et al., 2009)。因此, 本研究根据已测定的秦岭细鳞鲑微卫星文库设计引物, 使用川陕哲罗鲑野生个体筛选适用于川陕哲罗鲑的多态微卫星引物, 旨在为该物种后续种群遗传学、种质鉴定等研究做铺垫。

2 材料与方法

2.1 实验材料与仪器

2.2.1 实验材料

2012 年 ~ 2013 年, 在陕西省太白县太白河 (N33°50'25.40", E107°14'02.02") 采集川陕哲罗鲑野生个体的鳍条样本 20 个, 所有样本均浸泡于无水乙醇中, 并置于 4 °C 冰箱保存备用。

2.2.2 实验仪器

表 2-1 实验主要仪器

Tab. 2-1 The main instruments in this study

仪器名称 The name of instruments	生产厂家 Manufacturers
琼脂糖凝胶电泳槽	北京六一仪器厂
BIO-RAD 型凝胶成像分析系统	美国 SIM 公司
GZX-DH 电热恒温干燥箱	上海铁通医疗器械
PTC-200 型 PCR 仪	美国 MJ 公司
DYCZ-24A 垂直电泳槽	北京六一仪器厂
低温离心机 5415R	德国 Eppendorf 公司
台式高速离心机 5417R 型	德国 Eppendorf 公司
微量移液器	德国 Eppendorf 公司
WD-9405B 水平摇床	北京六一仪器厂

2.2.3 主要试剂及溶液配制

DNA 提取试剂: 1 × TE 缓冲液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 高温高压灭菌, pH = 8.0); 无菌抽提缓冲液 (0.4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 高温高压灭菌, pH = 8.0); 20% SDS; 20 mg/mL 蛋白酶 K (Merck, 德国); 6 M NaCl; 异丙醇; 70% 乙醇。

PCR 所需试剂: dNTP (10 mM); 10 × PCR Buffer (Mg^{2+}); 引物 10 mM; rTaq DNA 聚合酶 (5 U/μL)。

琼脂糖凝胶电泳所需试剂：50 × TAE Buffer（2 M Tris-醋酸，100 mM EDTA，pH = 8.5）；6 × Loading Buffer（30 mM EDTA，36% Glycerol，0.05% Xylene Cyanol FF，0.05% Bromophenol Blue，pH = 7.0）；溴化乙锭（EB，10 mg/mL，避光保存）。

聚丙烯酰胺凝胶电泳所需试剂：30% 丙烯酰胺溶液（29% 丙烯酰胺，1% 甲叉双丙烯酰胺）；10 × TBE Buffer（890 mM Tris-硼酸，20 mM EDTA，pH = 8.3）；10% 过硫酸铵；TEMED。

染色液：称取 1 g AgNO₃，加入 50 mL 无水乙醇，加入 2.5 mL 冰醋酸，加双蒸水定容至 500 mL，搅拌，混匀。

显影液：称取 15 g 无水 NaOH，加 37% 甲醛 2.5 mL，加双蒸水定容至 500 mL，搅拌，混匀。最好在使用前 6 h 内配好，放于 4 °C 冰箱保存。

2.2 基因组 DNA 的提取

本实验采用经典的高盐法提取川陕哲罗鲑样本的基因组 DNA（Aljanabi and Martinez, 1997）。具体操作步骤如下：

（1）从无水乙醇中取出保存的川陕哲罗鲑鳍条样本，剪取 0.5 g 左右，放入 2 mL 的灭菌离心管中，加入 1 × TE 无菌缓冲液，4 °C 浸泡 12 h 充分置换乙醇；

（2）取出鳍条组织，放入含有 352 μL 的无菌抽提缓冲液中，轻轻混匀，加入 40 μL 20% SDS 和 10 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K（终浓度为 400 μg/mL），混匀；

（3）56 °C 孵育 4 h，每隔半小时轻轻摇晃离心管以利消化。若组织不易消化，可延长孵育时间至 8 h，或 37 °C 消化过夜；

（4）待组织消化完全，取出离心管，加入 300 μL 6 M NaCl 溶液，立刻剧烈震动 30 s；

（5）12000 rpm 离心 10 min；

（6）弃沉淀，将上清液倒入新的离心管中，再以同等条件离心一次，取上清液，加入等体积的预冷异丙醇，-20 °C 放置 1 h 以上；

（7）4 °C，12000 rpm 离心 15 min；

（8）弃上清液，沉淀用 70% 乙醇溶液洗涤一次，37 °C 烘干或自然晾干；

（9）加入 50 μL 灭菌双蒸水溶解 DNA，待完全溶解后稀释成 100 ng/μL，置于 4 °C 冰箱保存备用。

2.3 微卫星引物的设计与合成

应用 Excel 分析通过二代测序技术获得的秦岭细鳞鲑微卫星 DNA 序列, 选取碱基重复次数较高的序列用于引物设计。利用软件 Primer Premier v. 5.0 (Lalitha, 2000), 在微卫星 DNA 序列距核心区上下游 20 bp 以外的保守区设计引物 72 对。引物设计遵循以下原则 (辛苗苗, 2015):

(1) 引物序列长度在 18 ~ 25 bp 之间, 不能超过 38 bp, 上、下游引物序列碱基个数差异小于 3 bp;

(2) 引物序列碱基 G + C 含量在 40% ~ 60% 之间, 以 45% ~ 55% 为最佳, 退火温度 (T_m 值) 大于 58 °C, 以增强引物的特异性, 减少扩增产物杂带的产生, 上、下游引物 T_m 值相差不超过 3 °C;

(3) 引物 3' 端最好不要是重复碱基, 否则可能会引起错误的引发。3' 末端碱基不以 A 或 T 结尾, 否则可能导致错配;

(4) 碱基要随机分布;

(5) 引物自身不能有连续 4 个碱基及以上的互补, 上、下游引物之间不能形成互补。

将所设计的引物送至上海生工生物工程技术有限公司合成。

最后, 将所得引物加灭菌双蒸水配成浓度为 100 μ M 的贮存液置于 4 °C 保存, 稀释十倍使用。

2.4 多态微卫星引物的筛选

2.4.1 PCR 反应条件

选取 20 尾野生川陕哲罗鲑 DNA 样本作为模板, 通过设置模板浓度梯度与退火温度梯度, 根据反应结果, 筛选出最适反应体系。本实验 PCR 反应体系如表 2-2 所示。

PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 最适退火温度 (表 2-4) 下退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 此步骤循环 30 次; 最后 72 °C 再延伸 10 min, 4 °C 保存 PCR 产物。实验中需视扩增产物效果调节反应模板浓度和 PCR 退火温度, 此步骤通过设置 DNA 模板浓度梯度和退火温度梯度进行, 优化反应条件, 以达到最佳扩增效果。

表 2-2 PCR 反应体系

Tab. 2-2 PCR amplification system

反应物 Reactant	体积 Volume (μL)
ddH ₂ O	18.6
10×PCR Buffer (15 mM Mg ²⁺)	3.0
DNTPs (10 mM)	1.0
Primer (F&R)	各 0.5
rTaq Enzyme (5 U/ μL)	0.4
Template (1000 ng/ μL)	1.0
Total	25

2.4.2 PCR 产物检测

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳初步检测后, 选取电泳扩增效果好 (跑胶条带清晰、没有杂带或杂带较少) 的产物进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶 (non-denaturing polyacrylamide gel, PAGE) 电泳。

PAGE 电泳及其检测方法为:

- (1) 严格清洗、烘干并以 70% 乙醇擦拭电泳所需的玻璃板 (包括耳玻璃板和方玻璃板), 处理后需待玻璃板干燥后方可使用;
- (2) 将小槽置于玻璃板架的底部并靠近板架, 然后以耳玻璃板在内、方玻璃板在外的顺序组装好玻璃板, 放入小槽内, 固定于玻璃板架上;
- (3) 配制 1% 的琼脂糖凝胶, 灌入玻璃槽内及玻璃板侧部用以封胶, 室温凝固约 1 h 以防止漏胶;
- (4) 根据表 2-3 的配方配制 12% 聚丙烯酰胺凝胶, 灌入玻璃板内, 插好齿梳, 整个过程中注意严格防止气泡产生, 否则会影响电泳结果的准确性, 结束后静置 2.5 h 以上;
- (5) 当凝胶聚合完全后, 轻拔齿梳, 组装电泳槽, 用移液枪点样, 以 150 V 固定电压电泳 3 h 以上 (具体时间视跑胶速度而定), 电泳缓冲液为 1 × TBE Buffer;
- (6) 电泳结束后取出凝胶, 放入盘中, 倒入染色液, 置于水平摇床轻摇 10 min, 弃液, 用 ddH₂O 清洗一次, 弃液;
- (7) 倒入显色液, 摇床轻摇至有条带显示出, 弃液, 清洗两次; 最后将胶板置于照明箱上拍照。

表 2-3 12% 聚丙烯酰胺凝胶配方

Tab. 2-3 The reagent and dosage of 12% non-denaturing polyacrylamide gel

试剂 Reagent	用量 Dosage (mL)
ddH ₂ O	15.7
30% Acrylamide	16
5×TBE	8
10% AP	0.28
TEMED	0.026

2.5 数据分析

利用软件 PopGen32 (Yeh et al., 1999) 计算每个位点的多态参数, 包括: 等位基因数 (N_a), 观测杂合度 (H_o), 期望杂合度 (H_e) 以及是否偏离哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium)。利用软件 PIC_CALC v. 0.6 计算多态信息含量 (PIC)。

3 结果

3.1 川陕哲罗鲑基因组 DNA 的提取

本实验采用经典的高盐法提取了质量较高的川陕哲罗鲑基因组 DNA, 基因组具有一定的完整性和较高的浓度, 为对川陕哲罗鲑 DNA 模板进行成功的 PCR 扩增奠定了良好的基础。本实验中, 有部分个体基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果出现弥散条带现象, 说明基因组在保存或提取的过程中有一定程度的降解或断裂 (图 2-1)。

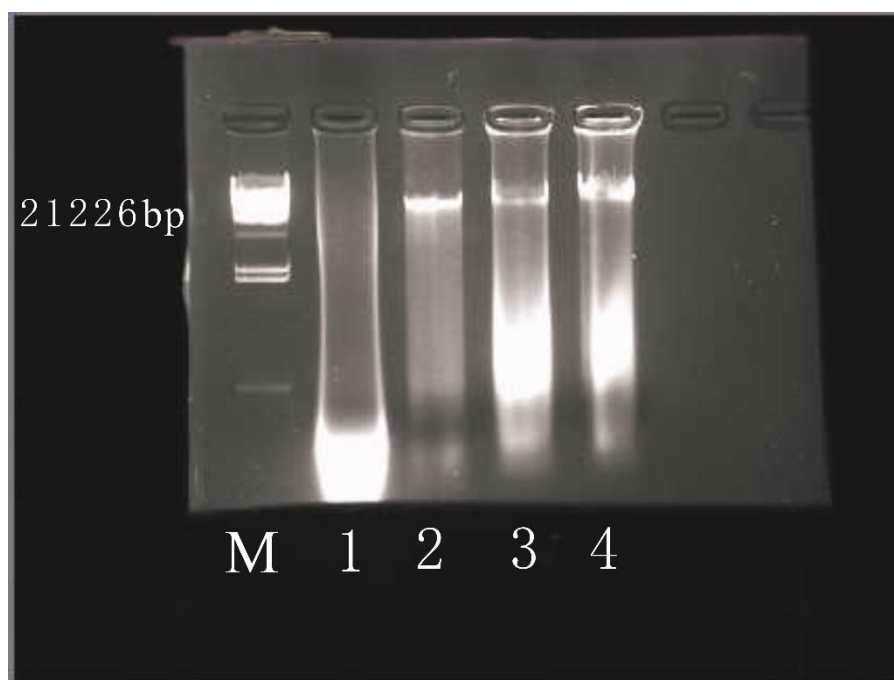


图 2-1 川陕哲罗鲑基因组 DNA

M: Lambda DNA/ *EcoR* I marker; 1-4: 不同川陕哲罗鲑个体基因组 DNA

Fig. 2-1 The extracted total genomic DNA from *Hucho bleekeri*

M: Lambda DNA/ *EcoR* I marker; 1-4 The extracted total genomic DNA from *Hucho bleekeri* individuals

3.2 多态微卫星引物的筛选及微卫星标记特征

根据实验室已获得的川陕哲罗鲑近缘物种——秦岭细鳞鲑微卫星文库，选择合适的微卫星序列进行多态引物筛选，利用软件 **Primer Premier v. 5.0** 设计引物 72 对。如图 2-2 所示，该序列为川陕哲罗鲑微卫星位点 Hbl12-23，是一个典型的 4 碱基重复型的微卫星座位。该序列中 **AGTT** 碱基重复 13 次（大写所示），因此预测其为多态性位点的可能性较大。下划线序列片段分别为所设计的上、下游引物。以 20 个野生川陕哲罗鲑基因组为扩增模板，对这 72 对合成引物进行多态性验证。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳与溴化乙锭染色初步分析后，选取扩增效果较为清晰、无杂带的产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染法染色。依据凝胶上出现的条带数目确定其是否为多态位点，即：电泳条带为单条时，说明该个体在该等位基因座位上表现为纯合子；条带为两条及以上则为杂合子，两条带以上通常表示为多拷贝微卫星位点（张书环，2012）。结果显示，有 27 个微卫星位点能够清晰、稳定地扩增，且表现出明显的多态性。图 2-3 是微卫星标记 Hbl15-31 在 20 个野生川陕哲罗鲑个体中的扩增结果，由图可见，该引物扩增效果较好，具有较高的多态性。

aatgcttattcacgcgaggtatgctacataattacagcagtgccacatgacaagcataataacatcagccattatgaactgtggatccaaat
 aaacaAGTTAGTTAGTTAGTTAGTTAGTTAGTTAGTTAGTTAGTTAGTTAGTTAGTTAGTTtgtt
 aattgtgtgctctctgactcgtagttaattaattattaatatattatcatgtcattccctacatgcctcatctgtgtcccaagctgtgtgt

图 2-2 川陕哲罗鲑微卫星位点 Hbl12-23 序列

Fig. 2-2 Sequence of microsatellite locus Hbl12-23 in *Hucho bleekeri*

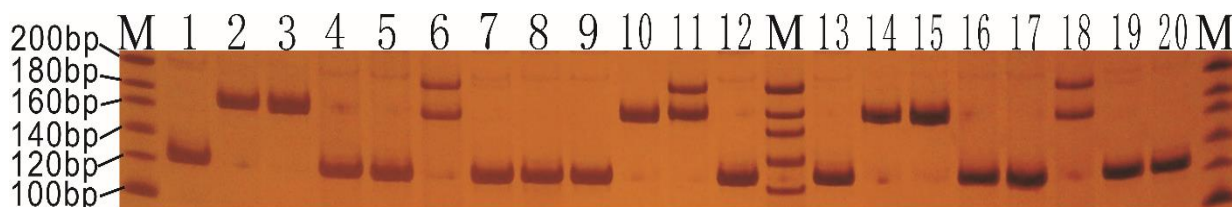


图 2-3 微卫星标记 Hbl15-31 在 20 个川陕哲罗鲑个体中的扩增图谱

M: DNA Marker; 1-20: 不同川陕哲罗鲑个体 DNA

Fig. 2-3 Amplification pattern of microsatellite locus Hbl15-31 in 20 individuals of *Hucho bleekeri*

M: DNA Marker; 1-20: The extracted total genomic DNA from *Hucho bleekeri* individuals

将筛选出的 27 个多态微卫星标记对川陕哲罗鲑 20 个野生个体进行了遗传多样性的初步分析, 利用软件 Pop-gen32 和 PIC_CALC 检测了标记的特征, 结果如表 2-4 所示, 27 个微卫星位点中, 共发现等位基因数 (N_a) 121 个, 每个位点等位基因数目为 2~8 个, 平均数为 4.407; 观测杂合度 (H_o) 为 0.150~0.906, 平均值为 0.618; 期望杂合度 (H_e) 为 0.508~0.845, 平均值为 0.746; 多态信息含量 (PIC) 为 0.371~0.808, 平均值为 0.683。共有 16 个位点偏离哈迪-温伯格平衡 ($P < 0.05$), 其中 8 个微卫星位点 (BLT19, BLT28, BLT25, BLT30, Hbl3-5, Hbl5-11, Hbl6-240, Hbl8-163) 显著偏离哈迪-温伯格平衡 ($P < 0.01$)。这些微卫星标记可应用于川陕哲罗鲑遗传多样性、种质鉴定等进一步研究。

表 2-4 27 个川陕哲罗鲑多态微卫星标记特征

Tab. 2-4 Characterization of 27 polymorphic microsatellite loci in *Hucho bleekeri*

位点	重复单元	引物序列 (5'-3')	退火温度	片段范围	等位基因数	多态信息含量	观测杂合度	期望杂合度	哈迪温伯
Locus	Repeat motifs	Primer sequence(5'-3')	Tm(°C)	Size range(bp)	Na	PIC	Ho	He	格指数
登录号									P-HWE
Accession NO.									
BLT2	(AC)11	F: ATGACGCCACTATGAGACCG	60	230-310	4	0.681	0.656	0.742	0.018
KM051898		R: CAGGAAGAAGAACCAGAACCA							
BLT4	(TG)11	F: TGAACAGACACTCACACAGGC	55	185-215	4	0.696	0.750	0.744	0.036
KM051900		R: GTGTTTCAGCTGCTGCGTT							
BLT20	(GT)17	F: CCGTACTGCCTAGCAACACA	56	205-255	4	0.677	0.719	0.738	0.316
KM051916		R: GGCTGTTTTACAGAAAGGC							
BLT19	(CA)15	F: GTTCCTCTCTGTCCCCTTCC	55	133-185	5	0.718	0.818	0.792	0.009*
KM051915		R: AAACACCATGGAACCTCGACC							
BLT6	(GT)13	F: CCCAGGTCTGGTGTCCAGTA	55	105-123	4	0.696	0.708	0.760	0.024
KM051902		R: GTACCGCGCTCAGCTCAT							
BLT27	(TC)11	F: GGGCAAGGTGTTATGGCTAA	58	135-153	4	0.691	0.719	0.751	0.501
KM051923		R: ATGAAACAGGTCCATAGCGG							
BLT28	(GT)18	F: CCCTACCAAGCACCAATACC	56	155-200	5	0.746	0.563	0.794	0.003*
KM051924		R: TGATGTCAGGTTGCTTATTCAGA							
BLT25	(TG)14	F: AATGAAACCAGCTCATTGCC	56	160-200	3	0.534	0.300	0.647	0.008*

KM051921		R: CAAGTCCTTCCAAATGGTCC							
BLT30	(TG)14	F: CCGCTCACTTTGTTGACGTA	56	165-200	5	0.740	0.531	0.788	0.001*
KM051926		R: CCCTGTCCAACCTCTCTCAG							
BLT16	(CA)17	F: ATCCAGTCAATAACCGCTGG	55	183-205	4	0.692	0.625	0.764	0.019
KM051912		R: CCTCGAGAAACTCGGTTGTT							
BLT31	(AG)12	F: TGGATGGGTGTTACAAGCAA	556	90-100	3	0.505	0.833	0.594	0.142
KM051927		R: CAGATCTTGAGACAAAGAGCCA							
Hbl1-101	(CA)13	F: TGTAATGTCACACACGCACG	55	190-240	4	0.673	0.625	0.742	0.220
KM385538		R: CCAGACCAGAGGGACTTCAA							
Hbl2-2	(TTA)10	F: TCTAGTGCTGCATGTCTGCC	57	140-174	5	0.741	0.625	0.789	0.199
KM385539		R: AGGCTCACATTGGCTCGTAT							
Hbl3-5	(TAA)11	F: TTGAAGTTGCCTTCTGGTCC	58	152-185	4	0.703	0.531	0.761	0.009*
KM385540		R: GGCCACACATGCAAAACAT							
Hbl4-10	(ATC)12	F: GACAACAGCTACAGGGCACA	56	215-240	5	0.737	0.688	0.784	0.194
KM385541		R: GACCTGGCTCTGGGTGATAG							
Hbl5-11	(TAT)11	F: TATGTGCCCAAAATGCTGTC	58	140-210	4	0.676	0.594	0.739	0.005*
KM385542		R: AATGGGATGTATGGGACACG							
Hbl6-240	(AC)22	F: GGGGAATGCAGTTGAAATGT	55	140-180	6	0.808	0.531	0.845	0.001*
KM385543		R: ATGGCATGTGTGGTGTGTTT							
Hbl7-290	(GT)14	F: ACTCTGATCGCTACCTGGGG	56	100-160	6	0.781	0.689	0.821	0.134
KM385544		R: TCTGTTCCGACTGCTACATCA							
Hbl8-163	(GT)15	F: GACTGGTGAGTCACAGGCAA	60	83-105	8	0.800	0.750	0.833	0.001*

KM385545		R: GCCTAGAGTGAGACCGATGC							
Hbl9-643	(TG)14	F: GGCACAGCATGTCCCTTTTA	55	100-125	4	0.702	0.818	0.766	0.031
KM385546		R: CTGCAGCATGTTCTGGATGT							
Hbl10-16	(TAA)10	F: TTCCTCTCCTCCTCCTCCAT	56	155-185	5	0.749	0.719	0.796	0.063
KM385547		R: GACTTCGGGGATGGCTCTAT							
Hbl11-21	(TCAT)10	F: CATTAATCCATCCAACCATGC	56	125-200	5	0.741	0.625	0.789	0.495
KM385548		R: ACATCCCTGCCTTCGAAAC							
Hbl12-23	(AGTT)13	F: AATGCTTATTACGCGAGGT	56	180-220	2	0.371	0.250	0.508	0.036
KM385549		R: ACACACAGCTTGGGACACAG							
Hbl13-25	(TGAG)13	F: TTCACTGTGACCTGCTGCT	56	88-135	5	0.748	0.688	0.796	0.074
KM385550		R: CTCTCAACCAACACACACCG							
Hbl14-29	(TGTA)10	F: GAGGTGCACGTGTTCAAAGA	55	178-190	4	0.697	0.594	0.756	0.047
KM385551		R: TGGTTAAGACCAAGACCAACG							
Hbl15-31	(GTTA)10	F: GAGCTGGCTTG GTTGGTTAG	57	120-200	3	0.447	0.150	0.542	0.010
KM385552		R: GCACCAGTCTTCTTTTTCGG							
Hbl16-128	(GT)13	F: AGCCTGTCAGCACTGATGATT	52	100-120	4	0.696	0.594	0.756	0.093
KM385553		R: TGGTCTGGCCTATGAACACA							

注：* 极显著水平 ($P < 0.01$)

4 讨论

4.1 微卫星引物的设计

在对微卫星引物进行筛选时,需要提取多个川陕哲罗鲑个体的基因组。在比较传统的酚氯仿法(Sambrook et al., 2001)和 NaCl 高盐法(Aljanabi and Martinez, 1997)后,发现高盐法简便、快捷、毒性较低、成本低且效果好,适用于本实验川陕哲罗鲑基因组的提取。

微卫星以 2~3 个核苷酸重复单位较多,鱼类已获得的微卫星多数为双核苷酸重复(鲁翠云等, 2009)。本实验筛选的微卫星重复序列中,2 碱基重复型有 17 个(63.0%)、3 碱基重复型有 5 个(18.5%)、4 碱基重复型有 5 个(18.5%),多态性较高,这表明利用二代测序技术获得微卫星序列是一种极其有效的方法。

在一些近缘物种中,很多遗传元件都有一定的保守性。因此借助近缘物种获得微卫星标记是一种有效的方法,近年来被广泛应用。Froufe et al. (2004)分离了细鳞鲑的多态微卫星位点并证实了这些引物在多瑙哲罗鲑、太门哲罗鲑以及远东哲罗鲑上也具有多态性。本实验利用之前研究获得的秦岭细鳞鲑微卫星文库,在川陕哲罗鲑个体中扩增效果较好,成功筛选出了适用于川陕哲罗鲑多态微卫星引物,说明了通过此方法获得微卫星标记是一种快速、成本低且有效的方法。

4.2 微卫星位点的多态性

一般来说,微卫星位点等位基因数越多,该位点呈多态性的可能性就越大。如表 2-4 所示,本实验结果除了位点 Hbl12-23 外,其余位点等位基因数目均在 3 个以上,占总体的 96.3%。其中,位点 BLT19、BLT28、BLT30、Hbl2-2、Hbl4-10、Hbl6-240、Hbl7-290、Hbl8-163、Hbl10-16、Hbl11-21、Hbl13-25 的等位基因数均在 5 以上(含)。

观测杂合度与期望杂合度所包含的信息可反映生物群体的遗传多样性,其值越高,则该群体的遗传多样性高。本实验研究结果中,所有微卫星位点的平均观测杂合度为 0.618,其中,除了位点 BLT31、Hbl15-31 与 Hbl12-23 之外,其余位点的期望杂合度均大于 0.6,说明本研究筛选出的微卫星引物具有较高的遗传多样性。

多态信息含量(PIC)描述微卫星位点的变异程度,本研究所筛选出的微卫星位点的平均多态信息含量值为 0.683,其中除位点 Hbl12-23 和 Hbl15-31 表现出中度

多态 ($0.25 \leq \text{PIC} \leq 0.5$) 外, 余者皆表现为高度多态 ($\text{PIC} \geq 0.5$)。这说明本实验所开发的微卫星引物均可应用于对川陕哲罗鲑的种群遗传学、亲缘关系鉴定等研究。

5 小结

(1) 本实验的研究目的是筛选出川陕哲罗鲑多态微卫星引物。微卫星引物在近缘物种中具有通用性, 因此本实验利用实验室已获得的川陕哲罗鲑近缘物种——秦岭细鳞鲑微卫星文库成功地获取了适用于川陕哲罗鲑多态微卫星引物。

(2) 本实验共获得了 27 对川陕哲罗鲑多态微卫星引物, 这些引物均可稳定扩增, 并具有较高的多态性, 研究结果具有十分重要的理论和实践意义。后续工作可在这些微卫星引物中挑选出鉴别能力较强的位点, 经有效检验后, 可应用于后期关于川陕哲罗鲑种群遗传学、亲缘关系鉴定等研究。

第三章 川陕哲罗鲑太白河野生种群遗传多样性的研究

1 前言

生态系统多样性、物种多样性,以及遗传多样性是生物多样性三个主要内容,在保护生物学上受同等重视(Sivaramakrishnan, 2014)。种群遗传多样性是物种长期进化的结果,可影响其对环境的适应能力。低遗传多样性容易引起遗传漂变、近亲繁殖等(Young, 1996),导致基因的丢失或有害基因的累积、种群间基因流的减少,从而影响物种的生存能力。所以,物种保护的目的一就是要尽最大可能的维持种群的遗传变异水平,保证其进化潜力,保护其种质资源。因此,必须基于对该物种遗传多样性的了解,有针对性地对一些濒危物种提出合理的保护策略。然而,近年来,由于川陕哲罗鲑野生资源量急剧下降,野生个体数量已经相当稀少,大部分原有分布区已多年未见其踪迹。受限于川陕哲罗鲑种群样本的获取,国内在对该物种的保护遗传学和分子生态学方面缺乏完整的、系统性的研究。

陕西省太白河是川陕哲罗鲑固有栖息地。21 世纪以来,在此区域长期未发现该物种的活动,曾一度认为已消失(丁瑞华等, 2010)。2012 年 9 月,村民无意中在陕西省太白河发现 19 尾野生川陕哲罗鲑成体,这是该物种在太白河绝迹多年的再发现(杜浩等, 2014)。此后,更多的野生川陕哲罗鲑个体被捕获并被进行人工圈养。这次重大发现为川陕哲罗鲑种群遗传学、种质资源的保护等研究提供了便利条件,使得川陕哲罗鲑物种的保护进入了一个新的阶段。

线粒体 DNA 和微卫星标记以其显著的优点使其在种群遗传学研究中具有重要的价值,在哲罗鲑属中也有较多应用。Froufe et al. (2005) 利用线粒体 DNA 三个片段(控制区、ATP6、ND1)研究了四个水系 8 个种群的太门哲罗鲑遗传变异,发现四个水系的样本明显分为两个聚类群,通过此结果说明了更新世水系的变化,并对该物种的保护提出了建议。Kuang et al. (2009) 利用微卫星标记对太门哲罗鲑四个野生种群做了遗传多样性分析,发现其遗传多样性处于中等水平,由此推断,太门哲罗鲑种群数量的急剧下降是因为过度捕捞或环境影响,而非低种群遗传多样性导致的。本研究利用线粒体 DNA 进化速率最快的控制区序列(D-loop)和细胞色素 b 基因(CYTB)片段以及本研究第二章所筛选出来的 15 个高度多态的川陕哲罗鲑微卫星标记,对陕西省太白河采集的川陕哲罗鲑野生种群进行遗传多样性评估和遗传结构分析,旨在为川陕哲罗鲑物种保护提供科学方法和理论依据。

2 材料与方法

2.1 实验材料与仪器

本实验野生川陕哲罗鲑样本皆采集于陕西省宝鸡市太白县太白河（地理坐标： $N33^{\circ}50'25.40''$, $E107^{\circ}14'02.02''$ ）（图 3-1），采样时间为 2012 年 9 月至 2014 年 9 月，样本量为 43 尾，雌雄比约为 1:1。在获取川陕哲罗鲑野生个体后立即采取其鳍条样本，避免重复采样。所有样本均保存于无水乙醇中，4℃ 冰箱中存放备用。

实验仪器与试剂参考第二章 2.1。

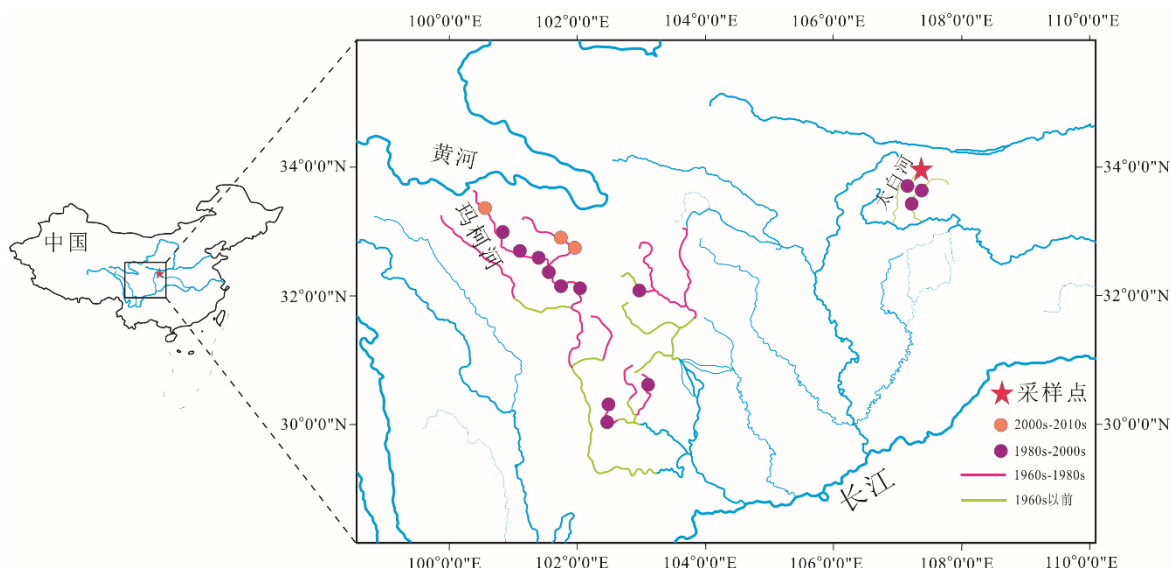


图 3-1 川陕哲罗鲑历史分布区与采样点

红色五角星为本研究采样点；橙色点为川陕哲罗鲑 2000~2010 年发现地点；紫色点为 1980~2000 年发现地点；粉色线标注为 1960~1980 年川陕哲罗鲑分布水域；绿色及粉色线标注为 1960 年以前分布水域

Fig. 3-1 Map of the history distribution area and sampling site of *Hucho bleakeri*

Red pentagram was the sampling site of this study; The orange dots were sampling sites between years 2000s–2010s; The purple dots were areas of this species found in the years 1980s–2000s; The pink lines were rivers of this species found in years 1960s–1980s; Green lines and pink lines were the distribution area of *H. bleakeri* before 1960s.

2.2 基因组 DNA 的提取与 PCR 扩增

基因组 DNA 的提取采用经典的高盐法 (Aljanabi and Martinez, 1997), 具体实验步骤参照第二章 2.2 的实验步骤。

PCR 程序采用两种分子标记——线粒体 DNA (控制区序列和细胞色素 *b* 基因) 和微卫星分子标记进行扩增。

2.2.1 线粒体 DNA 标记

线粒体 DNA 控制区序列 (D-loop) 与细胞色素 *b* 基因 (*CYTB*) PCR 扩增引物序列如表 3-1 所示。扩增体系如表 3-2 所示。

表 3-1 川陕哲罗鲑线粒体 DNA 引物序列

Tab. 3-1 mtDNA primer sequences of *Hucho bleekeri*

引物名称	引物序列 (5'-3')	退火温度 (°C)	片段长度 (bp)
primers	Primer sequence (5'-3')	Tm (°C)	Fragment length (bp)
Dloop-F	GTCTTGTAATCCGGAGGCCGGAG	58	1180
Dloop-R	CCATCTTAACAGCTTCAGTG		
CYTB-F	ATGACTTGAAAAACCACCGT	54	1119
CYTB-R	CTCTGGCGCTGAGCTACTAG		

表 3-2 PCR 扩增体系

Tab. 3-2 PCR system

反应物 Reactant	体积 Volume (μL)
ddH ₂ O	40
10×PCR Buffer (15 mM Mg ²⁺)	5.0
DNTPs (10 mM)	1.5
Primer (F&R)	各 1.0
rTaq Enzyme (5 U/μL)	0.5
Template (1000 ng/μL)	1.0
Total	50

PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 然后 94 °C 变性 30 s, 最适退火温度 (表 3-1) 下退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 此阶段 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存 PCR 产物。

此外, 本实验还从 GenBank 下载了一系列哲罗鲑属鱼类的线粒体 DNA 序列片段, 用以数据分析: (i) *Hucho bleekeri* (KF908853, HM804473, HQ317211, HQ317212, FJ597623); (ii) *Hucho hucho* (KM588351) 作为外类群分析。

2.2.2 微卫星 DNA 标记

川陕哲罗鲑微卫星标记选用第二章筛出的 15 对高度多态微卫星引物, 每对引物加以荧光标记 (HEX 或 FAM)。这 15 个微卫星位点及荧光标记情况为: Hbl4-10 (HEX), BLT25 (FAM), Hbl10-16 (HEX), Hbl14-29 (HEX), BLT4 (FAM), BLT16 (HEX), Hbl6-240 (FAM), Hbl2-2 (HEX), Hbl7-290 (FAM), Hbl12-23 (HEX), Hbl15-31 (FAM), BLT20 (HEX), Hbl3-5 (FAM), Hbl8-163 (HEX) 和 BLT19 (FAM) (Wang et al., 2015)。PCR 反应体系及扩增程序参照第二章 2.4 (全程避光操作)。荧光标记引物与 PCR 产物 4 °C 避光保存。PCR 产物送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

2.3 PCR 产物检测与数据分析

2.3.1 线粒体 DNA 标记

PCR 产物经纯化试剂盒纯化后, 在自动测序仪 ABI 3730XL 上测得扩增序列峰值, 利用一下软件进行分析:

A. 使用软件 Lasergene (Seqman) v. 7 (Clewley and Arnold, 1997) 进行序列拼接; 软件 ClustalX v. 2.0 (Larkin et al., 2007) 进行序列比对。

B. 使用软件 DnaSP v. 5 (Librado and Rozas, 2009) 统计多态位点数 (number of polymorphic sites, S); 单倍型数 (number of haplotypes, h); 单倍型多样性指数 (haplotype diversity, Hd); 核苷酸多样性指数 (nucleotide diversity, Pi) 以及平均核苷酸变异数 (average number of nucleotide differences, k) 等参数。

C. 使用 Arlequin v. 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) 软件程序对种群数量动态作出评估, 进行中性检验, 计算 Tajima D (Tajima, 1989) 和 Fu's F_s (Fu, 1997)。

D. 使用 Network v. 4.6 (<http://fluxus-engineering.com>) 软件基于 Median-Joining 方法构件单倍型网络结构图, 对各单倍型进行对应关系分析。

E. 使用 MEGA v. 5 (Tamura et al., 2011) 计算各基因片段单倍型之间的遗传距离, 并采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 与最大似然法 (Maximum-Likelihood, ML) 构

建系统进化树进行聚类分析。NJ 树基于 Kimura 2-Parameter (K-2P) 双参数模型；ML 树基于 Tamura-Nei 模型 (1000 次)。

2.3.2 微卫星 DNA 标记

利用测序仪 ABI 3730XL 对 PCR 产物进行毛细管电泳，使用软件 Genemapper v. 4 (Applied Biosystems) 读取等位基因值，使用下列软件进行数据分析：

A. 使用软件 Arlequin v. 3.5 评价种群内的遗传多样性水平，参数包括：等位基因数 (number of alleles, N_a)，观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)，期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e)，是否偏离哈迪温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)，近交系数 (inbreeding coefficients, F_{IS}) 以及 Garza-Williamson 指数 (M)。

B. 使用软件 Structure v. 2.3 (Pritchard et al., 2000) 进行种群遗传结构划分。以贝叶斯模型为基础对每一个推断类别值 K (可能的遗传聚类群数目) 重复运行 10 次，软件参数设置为：burn-in, 10000；重复次数为 10000 次； K 值范围 1 ~ 7。通过参数 Log probability 的变动率 ΔK 值的变化 (Evanno et al., 2005) 检验任意推断类别值 K 的连续性与可靠性，当 ΔK 值达到最大值时，其对应的 K 值为推断种群中聚类群的数目。利用 Distruct (Rosenberg, 2004) 程序对 Structure 软件运算结果进行二次构图，从而获得清晰直观的种群聚类图。

C. 利用 PIC_CALC v. 0.6 计算多态信息含量 (PIC)。

D. 使用软件 Genepop v. 4 (Raimond and Rousset, 1995) 检测位点间是否存在连锁不平衡 (Linkage disequilibrium, LD) (1000 次迭代)。

E. 利用软件 Bottleneck v. 1.2 (Piry et al., 1999) 检验川陕哲罗鲑种群是否偏离突变-漂变平衡，即近期是否经历瓶颈效应。基于无限等位基因模型 (the infinite alleles model, IAM)、逐步突变模型 (the stepwise mutation model, SMM) 和双相突变模型 (the two-phase model, TPM, 90% SMM + 10% IAM)，重复次数为 10000 次，通过 Wilcoxon 标记秩检验 (Wilcoxon signed rank test) (Cornuet and Luikart, 1996) 分析杂合过度是否显著。运用 Mode-shift (Luikart et al., 1998) 分析种群等位基因频率分布情况，从而判断种群是否经历瓶颈效应。

3 结果

3.1 种群遗传变异分析

3.1.1 基于线粒体 DNA 的单倍型多样性分析

如表 3-3 所示, 经比对后川陕哲罗鲑线粒体 DNA 控制区序列 (Control region) 全长 1180 bp, *CYTB* 基因片段长为 1119 bp, 它们在 43 尾川陕哲罗鲑中分别包含 10 个和 2 个多态位点。

控制区序列拥有 12 个单倍型, *CYTB* 基因片段则仅拥有 3 个单倍型, 这些单倍型 GenBank 登录号为 KR021391 ~ KR021398, KR021400 ~ KR021402, 以及 KR073000 ~ KR073003。控制区序列的单倍型多样性指数 (*Hd*) 与核苷酸多样性指数 (*Pi*) 分别为 0.8208 和 0.00159, 均远高于 *CYTB* 基因片段 (0.0941 和 0.00009)。两个序列的核苷酸变异的平均数分别为 1.871 (控制区序列) 和 0.095 (*CYTB* 基因片段)。总体来说, 两序列的遗传多样性水平都较低。

表 3-3 川陕哲罗鲑线粒体 DNA 遗传多样性参数

Tab. 3-3 Parameters calculated by mtDNA markers of *Hucho bleekeri*

mtDNA 标记	长度 (bp)	多态位点	单倍型	单倍型多样性	核苷酸多样性	平均核苷酸变异数
Markers	Length (bp)	<i>S</i>	<i>h</i>	<i>Hd</i>	<i>Pi</i>	<i>k</i>
控制区序列	1180	10	12	0.8208	0.00159	1.871
<i>CYTB</i>	1119	2	3	0.0941	0.00009	0.095

3.1.2 基于微卫星标记的种群遗传多样性分析

如表 3-4 所示, 15 个微卫星标记对川陕哲罗鲑种群 (43 个野生个体) 进行遗传多样性分析, 共检测到 77 个等位基因, 每个位点等位基因数从 2 (Hbl10-16) 到 13 (Hbl8-163) 不等, 总群体的平均等位基因数目为 5.133。多态信息含量 (PIC) 为 0.089 ~ 0.595, 平均值为 0.376。观测杂合度 (*Ho*) 0.04651 ~ 1.0000, 平均值为 0.59719。期望杂合度 (*He*) 0.09111 ~ 0.67387, 平均值为 0.44735, 其值小于 0.5, 说明该群体的遗传多样性水平偏低。除位点 Hbl2-2 外, 其余位点均偏移哈迪-温伯格平衡 ($P < 0.05$), 其中除位点 Hbl4-10、BLT25、Hbl3-5 和 Hbl2-2 外, 其他位点都显著偏离哈迪-温伯格平衡 ($P < 0.01$)。近交系数 (F_{IS}) 为 -0.90487 ~ 0.49398, 平均值为 -0.34033 ($P > 0.05$), 表明该群体内无近亲繁殖现象发生。所有检测的微卫星位点间不存在连锁不平衡现象 ($P > 0.05$)。

表 3-4 川陕哲罗鲑种群遗传多样性参数检测

Tab. 3-4 Genetic diversity analysis for *Hucho bleekeri*

位点	等位基因数	多态信息含量	观测杂合度	期望杂合度	近交系数	哈迪-温伯格平衡
Locus	<i>Na</i>	PIC	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F_{IS}</i>	P-HWE
Hbl4-10	6	0.537	0.93023	0.62052	-0.50808	0.00000
BLT25	5	0.425	0.48837	0.54008	0.09677	0.03351
Hbl10-16	2	0.375	0.95349	0.50588	-0.90487	0.00000
Hbl14-29	5	0.435	0.74419	0.52531	-0.42373	0.00035
BLT4	6	0.533	0.95349	0.61231	-0.56759	0.00000
BLT16	5	0.459	0.79070	0.55404	-0.43446	0.00000
Hbl6-240	3	0.238	0.20930	0.26566	0.21414	0.00897
Hbl2-2	5	0.424	0.46512	0.53844	0.13758	0.34716
Hbl7-290	4	0.089	0.04651	0.09111	0.49245	0.00061
Hbl12-23	5	0.089	0.04651	0.09138	0.49398	0.00038
Hbl15-31	4	0.595	1.00000	0.67387	-0.49256	0.00000
BLT20	3	0.392	0.95349	0.51737	-0.86162	0.00000
Hbl3-5	4	0.180	0.18605	0.19371	0.04000	0.01938
Hbl8-163	13	0.407	0.23810	0.41853	0.43409	0.00000
BLT19	7	0.458	0.95238	0.56196	-0.70922	0.00000
Mean	5.133	0.376	0.59719	0.44735	-0.34033	-

3.2 种群遗传结构分析

3.2.1 基于线粒体 DNA 的单倍型网络图

如图 3-2 所示,在川陕哲罗鲑 43 个个体中,通过 *CYTB* 片段检测出共 3 个单倍型,其中 Hbl-CYTBb01 是主要单倍型,包含 41 个个体,占总体的 95.3%;控制区序列检测出共 12 个单倍型,其中 Hbldloop43 是主要单倍型,其个体数占总体的 32.6%,单倍型 Hbldloop02、Hbldloop30、Hbldloop03 和 Hbldloop19 所包含的个体数分别占总数的 23.3%、14.0%、7.0% 和 7.0%,其余 7 个单倍型皆仅包含一个个体(表 3-5)。这些单倍型构成的 Network 网络结构图并没有分为多个进化单元,表明该群体的线粒体 DNA 单倍型网络结构较为单一。

表 3-5 川陕哲罗鲑单倍型数量及百分比

Tab. 3-5 Number and percentage of haplotypes of *Hucho bleekeri*

单倍型	数量	百分比 (%)	单倍型	数量	百分比 (%)
haplotypes	number	percentage	haplotypes	number	percentage
Hbldloop43	14	32.6	Hbldloop51	1	2.3
Hbldloop02	10	23.3	Hbldloop50	1	2.3
Hbldloop30	6	14.0	Hbldloop48	1	2.3
Hbldloop03	3	7.0	Hbldloop05	1	2.3
Hbldloop19	3	7.0	Hbl-CYTBb01	41	95.3
Hbldloop29	1	2.3	Hbl-CYTBb03	1	2.3
Hbldloop49	1	2.3	Hbl-CYTBb03	1	2.3
Hbldloop35	1	2.3			

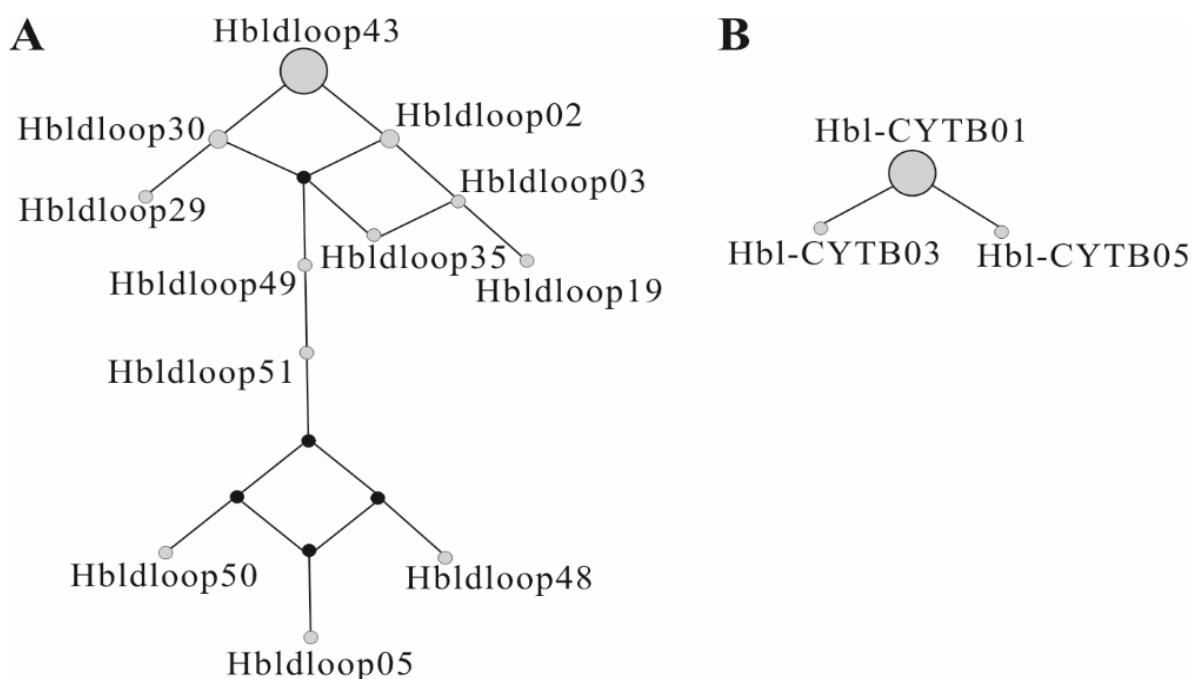


图 3-2 川陕哲罗鲑单倍型网络结构图

(A) 基于控制区序列构建的网络结构图，包含 12 个单倍型；(B) 基于 *CYTB* 构建的网络结构图，包含 3 个单倍型。灰色圆代表本实验所获得单倍型，黑色圆代表潜在的单倍型

Fig. 3-2 Median joining network of all the *Hucho bleekeri* haplotypes

(A) Network based on control region with 12 haplotypes; (B) Network based on *CYTB* gene sequences with three haplotypes. Gray dots represent the haplotype in this research, black dots represent a potential mutation site.

3.2.2 基于微卫星标记的 Structure 聚类分析

为进一步了解川陕哲罗鲑种群的聚类和分化情况,利用 Structure 软件进行遗传结构分析。结果显示,当 $K = 2$ 时, ΔK 值最高,此时该种群明显聚为两大类: Cluster 1 和 Cluster 2 (图 3-3)。根据聚类情况,将该种群划分为两个群体,即 Group 1 和 Group 2,利用 Arlequin 软件,使用微卫星标记计算出两个聚类群之间的固定指数(遗传分化指数 F_{ST}) 值为 0.04041,表明该群体的遗传分化程度较低。

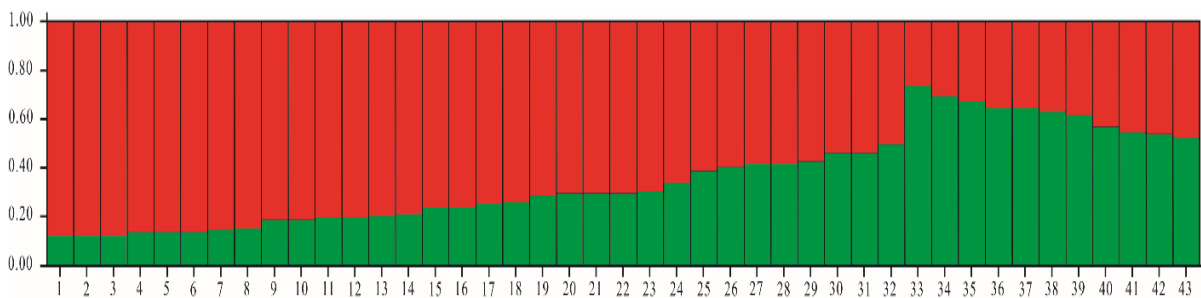


图 3-3 基于贝叶斯算法的个体分配分析 ($K = 2$)

不同的颜色代表不同的聚类群 (K 值), 每个川陕哲罗鲑个体用一个竖条表示, 竖条的颜色代表其被分配到该类群的比例

Fig. 3-3 Individuals Bayesian assignment probabilities for $K = 2$

Each individual snail is represented by a single vertical bar divided into K colors, where K is the number of clusters assumed. Each color represents one cluster, and the length of the colored segment shows the individual's estimated proportion of membership in that cluster

3.2.3 基于线粒体 DNA 的系统进化分析

利用线粒体 DNA 标记(控制区序列和 *CYTB* 基因片段)对川陕哲罗鲑种群进行了系统进化分析,分别构建了 NJ 和 ML 系统进化树,发现同一种标记构建的两种系统进化树结构一致,因此选用 ML 进化树来进行聚类分析(图 3-4 和 图 3-5)。两种线粒体 DNA 分子标记结果均显示,本实验中来自陕西省太白河的样本全部归为一个类群,与文献中记载的来自于玛柯河的样本不属于同一类群,二者呈现出遗传分化。控制区序列分析结果表明,在太白河川陕哲罗鲑种群中,所获得的 12 个单倍型中,仅有 4 个单倍型(Hbldloop03、Hbldloop43、Hbldloop02、Hbldloop19)与已发表的采自于太白河的 *Hucho bleekeri* (KF908853) 处于同一系统发育位置。*CYTB* 基

因片段分析结果则表明，该遗传标记所获得的三种单倍型中，只有单倍型 Hbl-CYTB01 与已发表的 *Hucho bleekeri* (KF908853) 处于同一系统发育位置。

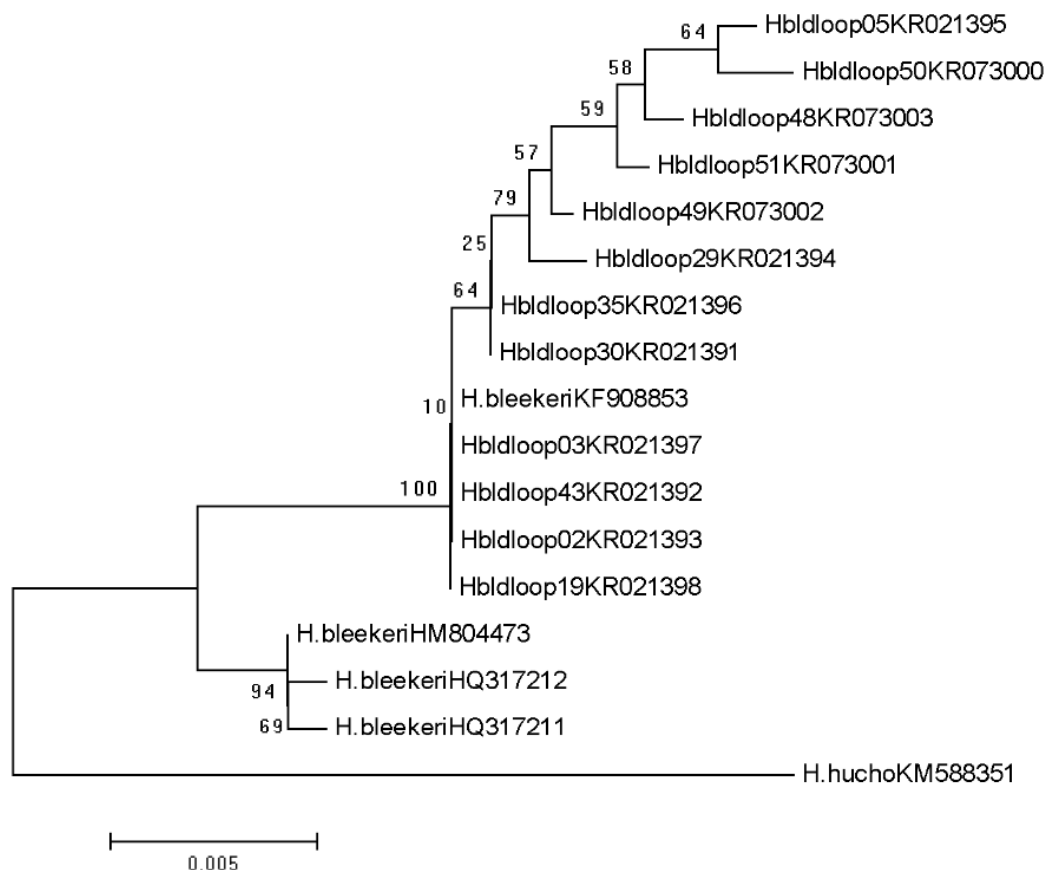


图 3-4 基于线粒体 DNA 控制区序列构建的川陕哲罗鲑 ML (Maximum-Likelihood) 系统进化树

Fig. 3-4 ML (Maximum-Likelihood) phylogenetic trees of *Hucho bleekeri* based on control region of mitochondrial DNA sequences

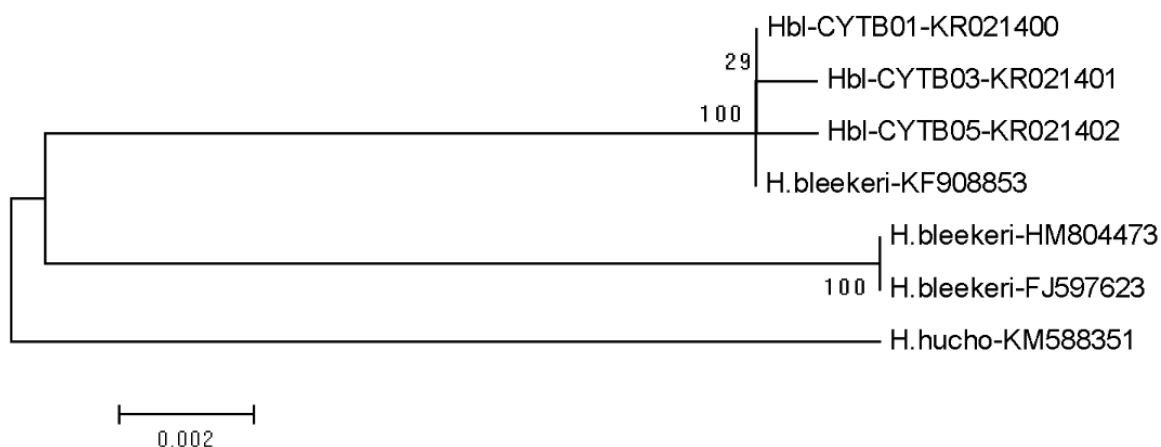


图 3-5 基于线粒体 DNA *CYTB* 基因序列构建的川陕哲罗鲑 ML (Maximum-Likelihood) 系统进化树

Fig. 3-5 ML (Maximum-Likelihood) phylogenetic trees of *Hucho bleekeri* based on *CYTB* gene fragments of mitochondrial DNA sequences

3.3 种群历史动态评估

中性学说的主要内容为：分子水平上的进化以及物种内的变异大多数不是由达尔文自然选择，而是由选择上呈中性的或者近乎中性的突变经随机固定所造成的（王亚馥等, 1999）。Tajima 检验的目的是鉴定目标 DNA 序列在进化过程中是否遵循中性突变模型。当 Tajima D 显著大于 0 时，则认为该群体遵循中性突变模型，历史上没有发生瓶颈效应，种群趋向于平衡；当 Tajima D 显著小于 0 时，则推断该群体偏离中性选择，历史上可能发生过瓶颈效应，种群趋向于定向选择（Tajima, 1989）。与其类似的是，采用 $Fu' F_s$ 进行中性检验时，负值和差异显著的 P 值被认为该种群在历史上有经历过瓶颈效应后扩张的现象发生。本实验利用两种 mtDNA 标记检验了 Tajima D 值为 -0.64500（控制区序列）和 -1.48214（*CYTB* 基因片段）（ $P < 0.05$ ）。 $Fu' F_s$ 检验结果为 -2.91103（控制区序列）和 -2.79487（*CYTB* 基因片段）（ $P < 0.05$ ）。两种结果皆说明川陕哲罗鲑群体历史上经历了瓶颈效应。

基于微卫星标记计算的 Garza-Williamson 指数 (M) 为 0.07018 ~ 0.37500，平均值为 0.18653，说明该群体出现大量的等位基因的缺失（表 3-5）。Garza and Williamson (2001) 指出，在合适的模型下， $M < 0.68$ 表明近期该种群个体数量经历了严重减少。

通过 Mode-shift 验证种群瓶颈效应时，发现种群等位基因频率分布呈“L”形状。然而，基于无限等位基因模型 (IAM)、逐步突变模型 (SMM) 和双相突变模型 (TPM) 三种突变模型对川陕哲罗鲑种群进行威尔科克森 (Wilcoxon) 符号秩次检验（表 3-6）。结果表明，在 TPM 和 SMM 的模型下，种群偏离突变平衡，表现出显著的杂合缺失，二者皆出现 12 个杂合缺失位点和 3 个杂合过剩位点（ $P < 0.05$ ），说明种群近期经历了严重的瓶颈效应。

表 3-6 Garza-Williamson 指数 (M) 与基于三种模型的川陕哲罗鲑种群瓶颈效应检验Tab. 3-6 Garza-Williamson index (M) and bottleneck tests in *Hucho bleekeri* population under 3 models

位点	Garza-Williamson 指数	P-Bottleneck 分析		
Locus	M	P-Bottleneck analysis		
		IAM 模型	TPM 模型	SMM 模型
Hbl4-10	0.37500	0.4816	0.1565	0.0688
BLT25	0.11628	0.4658	0.1517	0.0786
Hbl10-16	0.20000	0.0135	0.0160	0.0166
Hbl14-29	0.20000	0.4302	0.1328	0.0606
BLT4	0.31579	0.3417	0.3084	0.1853
BLT16	0.21739	0.4926	0.1808	0.0851
Hbl6-240	0.20000	0.3991	0.1775	0.1139
Hbl2-2	0.09615	0.3293	0.0640	0.0178
Hbl7-290	0.07018	0.0302	0.0018	0.0004
Hbl12-23	0.08197	0.0018	0.0002	0.0000
Hbl15-31	0.23529	0.0567	0.1619	0.2215
BLT20	0.20000	0.1943	0.3541	0.4245
Hbl3-5	0.30769	0.1118	0.0144	0.0036
Hbl8-163	0.08075	0.0004	0.0000	0.0000
BLT19	0.10145	0.2376	0.0226	0.0060
Mean	0.18653	0.5164	0.0030	0.0029

4 讨论

4.1 川陕哲罗鲑种群遗传多样性分析

自然种群遗传多样性的降低可能由多种因素导致,其中包括有效种群大小的减小 (Vrijenhoek, 1998)。淡水鱼类更容易丧失生物多样性,因为它们通常以小的、分散的种群存在,且易受生境退化、环境污染和外来物种的影响 (Hughes et al., 2012)。近年来,利用 mtDNA 标记评估哲罗鲑属几种鱼类的遗传多样性的研究越来越多。核苷酸多样性指数 (P_i) 和单倍型多样性指数 (H_d) 是衡量群体内遗传变异程度高低的两个重要参数,其值越大,遗传多样性就越大,进化的潜力也就越大。*CYTB* 基因和

控制区序列同为线粒体基因组序列片段，有着不同的进化速度。本研究中，控制区序列无论是 Pi 值还是 Hd 值，都远高于 $CYTB$ 基因，这是由于线粒体 DNA 控制区为非编码区，较编码蛋白质的 $CYTB$ 基因更易产生和积累变异。总体来说，太白河川陕哲罗鲑种群的遗传多样性较低。

一般认为，衡量种群遗传多样性的有效指标为：杂合度与等位基因数。其值越高（越多），物种的遗传多样性就越丰富，对其生活的生态环境适应能力则越强。等位基因数 (Na) 是研究遗传变异的基础，反映了在该区域内种群整体的遗传水平。但是，等位基因数的大小在一定范围内受到样本量大小的影响，因此在种群遗传多样性分析中，单个种群的样本数量最好在 30 个个体以上（闫路娜等, 2004）。本研究中样本量仅为 43 尾，属于较小的种群，但是 15 个微卫星位点的平均等位基因数未呈明显偏低的现象。近交系数 (F_{IS}) 值为负数 (-0.34033)，且不显著 ($P > 0.05$)，表明该种群近期没有显著的近交情况发生。由于杂合度的检测不受样本量影响，因此被认为是评价种群遗传变异水平的最佳指标。濒危物种通常有遗传多样性偏低的现象，与川陕哲罗鲑同属的易危物种太门哲罗鲑种群的遗传多样性也处于较低水平，其观测杂合度 (Ho) 为 0.5064，期望杂合度 (He) 为 0.4813（刘博等, 2011）。本研究中，川陕哲罗鲑种群的观测杂合度 (Ho) 为 0.59719，期望杂合度 (He) 为 0.44735，其值较太门哲罗鲑更低，说明川陕哲罗鲑种群遗传多样性处于一个非常低下的水平。微卫星标记的检测结果与线粒体 DNA 标记的研究结果相符合。

两种分子标记的结果都表明，陕西省太白河采集的川陕哲罗鲑种群遗传多样性处于较低水平。我们推测造成这种结果的可能性有两点，一方面可能是太白河采集样本的局限性。太白河流域上游采集样本极为困难，因此只能在下游部分地区采集样本，因此获得样本数量过少，可能全部为某一个家系或多个亲缘关系较近的家系后代；另一方面是由于川陕哲罗鲑个体数量非常稀少，已处于极度濒危状态，有效种群减小，容易产生近亲交配，发生遗传漂变，导致该物种种群呈现出遗传多样性较低的水平。

4.2 川陕哲罗鲑种群遗传分化与遗传结构分析

种群遗传分化程度通常由遗传分化指数 F_{ST} 来进行判别。若 $F_{ST} < 0.05$ ，则表明群体间几乎没有遗传分化； $0.05 < F_{ST} < 0.15$ ，则表示群体间分化程度较低； $0.15 < F_{ST} < 0.25$ ，则表明群体间出现中度遗传分化； $F_{ST} > 0.25$ ，则表明群体间出现高度遗传分化（Wright, 1965）。本研究中样本全部来源于一个采样点，根据 *Structure* 分析结果人为将该种群分为两个亚种群，基于微卫星 DNA 标记计算出其 F_{ST} 值为 0.04041，表明该种群没有出现遗传分化。

通过线粒体 DNA 序列分析得出的结果与 Zhang et al. (2014) 的研究结果相同, 将本实验样本与玛柯河川陕哲罗鲑样本的线粒体 DNA 控制区序列进行比较, 发现本实验样本的控制区序列中发现有 4 次串联重复序列, 而非玛柯河样本的 6-7 次串联重复序列, 结合系统进化树结果分析, 说明不同地点的川陕哲罗鲑种群具有一定的遗传分化。而无论是系统进化树分析, 还是 Network 网络结构图, 分析结果均显示出采集于陕西省太白河的川陕哲罗鲑种群遗传结构单一, 没有出现较大的遗传分化。由此, 本采样点的川陕哲罗鲑群体应作为一个整体加以保护。

由于本实验只检测了川陕哲罗鲑一个地理种群的遗传特征, 结果表明该群体目前没有发生遗传分化。而根据 Wang et al. (2011) 与 Zhang et al. (2014) 的研究, 陕西省太白河与青海省玛柯河的川陕哲罗鲑样本线粒体序列有较大差异。因此, 若今后采集到其他地理种群样本, 可利用本研究所使用的微卫星标记进行种群遗传学研究, 探究该物种不同地理区域种群的遗传特征。

4.3 哈迪-温伯格平衡与种群瓶颈效应

哈迪-温伯格平衡的主要内容是指: 在理想状态下, 群体中各等位基因频率和基因型频率在遗传中是稳定不变的, 即保持着基因平衡。它是衡量有性繁殖群体基因型频率和基因频率是否保持平衡的有效指标。其满足条件通常有 5 点: 种群足够大; 随机交配; 没有突变产生; 没有新基因的加入; 没有自然选择。因此, 无效等位基因、非随机交配、基因漂移、近亲繁殖等现象均可导致种群偏移哈迪-温伯格平衡 (Hou et al., 2013)。本实验样本全部采集于陕西省太白河, 众所周知, 川陕哲罗鲑物种极度濒危, 该区域已多年未发现川陕哲罗鲑野生个体的踪迹, 中性检验和瓶颈效应检验结果也说明, 由于种种人为或自然因素, 川陕哲罗鲑自然种群近期经历了严重的瓶颈效应, 种群数量急剧减少, 因此导致本实验样本获得量极小。同时, 种群数量减小也可导致群体非随机交配或者近亲繁殖。因此, 上述原因可能是导致本研究中大多数微卫星位点出现偏移哈迪-温伯格平衡的主要原因。

在种群遗传瓶颈分析中, 由于无限等位基因模型 (IAM) 不能充分解释微卫星 DNA 数据, 尤其是微卫星位点序列的长度为什么不能发展到无限长等问题, 因此该模型并不为分析微卫星数据时最佳使用模型。相比之下, 二阶突变模型 (TPM) 和逐步突变模型 (SMM) 更适用于微卫星数据的分析。其中, 由于只有少数微卫星位点的突变是完全符合 SMM 模型的, 因此, TPM 模型成为分析本实验微卫星数据分析的首选模型。本次实验中, 利用 SMM 和 TPM 模型均检测到太白河川陕哲罗鲑种群

个体数较少，经历了严重的瓶颈效应，因此急需采取有效的措施对该地区该物种进行保护和增殖。

5 小结

本实验利用本文第二章开发的多态微卫星标记和线粒体 DNA 分子标记研究了太白河川陕哲罗鲑野生种群的遗传多样性。结果发现，该种群的遗传多样性处于较低水平，种群内未出现遗传分化。根据种群数量变化研究结果推测，该种群经历了严重的瓶颈效应。本研究结果在一定程度上说明了川陕哲罗鲑物种已处于极度濒危状态，对此需要引起高度重视。

第四章 川陕哲罗鲑养殖群体 3 个家系遗传多样性及亲子鉴定技术的建立

1 前言

对濒危野生动物进行人工养殖及放归自然是防止或缓解物种走向灭绝的重要保护措施之一，已在诸多濒危动物保护工作中起到了重要作用，效果良好。随着川陕哲罗鲑野生种群数量的急剧下降，自然分布区域也不断减小，野生个体已经很难发现其踪迹，目前仅在陕西省太白河发现了规模相对较大的种群。为保护这一珍稀物种不至于灭绝，在 2012 年偶然捕获川陕哲罗鲑野生成年个体后，长江水产研究所立即对其进行保护性救助，成立了“陕西省太白河川陕哲罗鲑救护实验站”，并开始对其人工饲养，通过 B 超监测到性腺发育成熟后进行人工繁殖工作。通过人工催产和受精，于 2013 年 6 月成功获得了川陕哲罗鲑仔鱼约 3270 尾。但是，繁殖获得的子代群体存活率很低，推测可能除养殖基础设施条件不够完善外，养殖场内亲本种群数量过少所导致的近亲繁殖也可能是其原因之一。

任何物种的个体数量的下降都可导致其种群遗传多样性减少，尤其是当衰退涉及部分物种分布区的整个种群。遗传多样性衰退本身又能够导致物种适应性的缺乏，从而致使生物应对环境条件变化的失败，以至于最终灭绝。因此，保护濒危物种的目的之一是要保护其遗传多样性，维持其进化潜力，减缓由于对环境的适应和进化所导致的灭绝。本文第三章研究结果发现，川陕哲罗鲑野生种群的遗传多样性处于较低的水平。因此，为了保护这一珍稀物种，在成功获得川陕哲罗鲑人工繁殖子一代后，急需了解养殖群体仔鱼的遗传特征。同时需建立可靠的遗传谱系，从而有效地指导川陕哲罗鲑的繁育工作。为此引入亲子鉴定技术。

使用分子标记来进行亲子鉴定的原理为：在有性生殖中，生殖细胞形成时，等位基因分离，配子细胞内含 DNA 分子数目为体细胞内的一半，即配子为单倍体。受精后，子代的基因组一半来自父本，一半来自母本。当亲本与子代的遗传特征符合孟德尔遗传规律，则不排除存在亲子关系。当使用的标记基因座位数增加时，若亲本与子代有 1 个及以上的基因座位不符合孟德尔遗传规律，则可排除亲子关系。

微卫星标记作为一种新兴的分子标记，有着杂合度高、多态性高、符合孟德尔遗传规律的特点。相较于其他亲子鉴定的方法，利用微卫星分子标记进行亲子鉴定具有快速、经济、准确等优点，因此被广泛应用于法医学检验、动植物个体识别和亲权鉴

定中（薛小琦，2003）。其基本原理是，根据微卫星标记的共显性遗传规律，通过计算排除概率（Exclusion probabilities, EP）来进行个体间的亲缘关系鉴定。这种方法的具体操作流程为：首先筛选出合适的且多态性高的微卫星引物，采集样本基因组 DNA；然后合成带有荧光标记的引物，并对样本 DNA 进行 PCR 扩增，检测扩增产物的等位基因大小；最后根据结果利用适当的软件分析样本间的亲缘关系。

本研究通过采集 3 个家系的川陕哲罗鲑和多个野生川陕哲罗鲑成年个体样本，基于前期实验工作筛选出的川陕哲罗鲑多态微卫星标记，从中挑选出多态性高的引物对样本进行扩增，确定适用于亲子鉴定的微卫星标记组合，从而建立起鉴定方法灵敏快速、鉴定费用低廉、鉴定结果准确的川陕哲罗鲑亲子鉴定技术。旨在为今后川陕哲罗鲑的繁育管理工作提供理论依据和技术指导，为该濒危物种的保护作出一定的贡献。

2 材料与方法

2.1 实验材料与仪器

在 2014 年 4 月川陕哲罗鲑繁殖期间，将 3 个家系的受精卵单独孵化，编号分别为 JX1、JX2 和 JX3。其中，3 个家系的父本均为 FB18，其对应的三个母本分别为 MB15、MB16 和 MB17。MB15 的子代随机选取 20 尾，编号为 ZD1501 ~ ZD1520；MB16 的子代随机选取 22 尾，编号为 ZD1601 ~ ZD1622；MB17 的子代随机选取 20 尾，编号为 ZD1701 ~ ZD1720。同时，选取与家系无关的 10 尾成鱼作为候选亲本，编号 HX1 ~ HX10。成鱼样本采集鳍条，仔鱼样本采集全鱼，无水乙醇、4 °C 保存样本。所有样本采集于长江水产研究所等单位在陕西省太白县建立的“陕西省太白河川陕哲罗鲑救护实验站”。图 4-1 和 图 4-2 分别为在该实验站所采集的川陕哲罗鲑亲本和子代样本。

实验试剂与实验仪器参照第二章 2.1。



图 4-1 川陕哲罗鲑野生个体

Fig. 4-1 Wild individual of *Hucho bleekeri*



图 4-2 川陕哲罗鲑仔鱼

Fig. 4-2 Larva of *Hucho bleekeri*

2. 2 微卫星标记的选取与荧光标记的合成

基于本实验第二章筛选出的 27 个多态微卫星标记, 从中选取了 14 个多态性较高(观测杂合度与期望杂合度大于 0.5)的位点(Hbl4-10, Hbl10-16, Hbl11-21, Hbl14-29, BLT4, BLT16, Hbl6-240, Hbl2-2, Hbl7-290, BLT20, Hbl3-5, BLT28, Hbl8-163, BLT19)用于亲子鉴定实验。所选微卫星标记的多态信息含量、杂合度与等位基因数整体处于较高水平, 适用于川陕哲罗鲑人工繁殖子一代群体遗传多样性检测和亲子鉴定技术的建立。每对引物的上游引物 5' 末端标记 FAM 或 HEX 荧光(表 4-1), 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 4-1 14 对川陕哲罗鲑多态微卫星引物特征

Tab. 4-1 Polymorphic parameters for the 14 microsatellite loci of *Hucho bleekeri*

位点	荧光标记	等位基因数	多态信息含量	观测杂合度	期望杂合度
locus	Dye	Na	PIC	Ho	He
Hbl4-10	HEX	5	0.737	0.688	0.784
Hbl10-16	HEX	5	0.749	0.719	0.796
Hbl11-21	FAM	5	0.741	0.625	0.789
Hbl14-29	HEX	4	0.697	0.594	0.756
BLT4	FAM	4	0.696	0.750	0.744
BLT16	HEX	4	0.692	0.625	0.764
Hbl6-240	FAM	6	0.808	0.531	0.845
Hbl2-2	HEX	5	0.741	0.625	0.789
Hbl7-290	FAM	6	0.781	0.689	0.821
BLT20	HEX	4	0.677	0.719	0.738
Hbl3-5	FAM	4	0.703	0.531	0.761
BLT28	FAM	5	0.746	0.563	0.794
Hbl8-163	HEX	8	0.800	0.750	0.833
BLT19	FAM	5	0.718	0.818	0.792
Mean	-	5	0.735	0.659	0.786

2.3 基因组 DNA 的提取

采用经典的高盐法提取川陕哲罗鲑基因组 DNA (Aljanabi and Martinez, 1997), 具体操作方法参考第二章 2.2 实验步骤。

2.4 PCR 扩增与产物检测

PCR 反应体系与扩增程序参照第二章 2.4。扩增产物 4 ℃ 避光保存。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色初步检测后,将不同荧光标记且产物片段大小相差 30 bp (参照第二章表 2-4) 以上的两种 PCR 产物混合,送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序。扩增产物在 ABI 3730 自动测序仪上进行荧光信号收集,毛细管电泳进行等位基因大小读取。

2.5 数据分析

2.5.1 川陕哲罗鲑 3 个家系的遗传多样性分析

A. 利用软件 GeneMarker v. 1.5 (Holland and Parson, 2011) 读取等位基因值。

B. 使用软件 Cervus v. 3 (Kalinowski et al., 2007) 统计被检测群体的遗传多样性参数,包括:等位基因数 (N_a)、观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e) 和多态信息含量 (PIC)。

C. 使用软件 Arlequin v. 3.5 分析川陕哲罗鲑养殖群体 3 个家系之间的遗传距离,计算各家系之间的分子方差分析 (Analysis of molecular variance, AMOVA) 和 F 统计 (F -statistics) (Weir and Cockerham, 1984),包括 3 个固定指数 (Fixation Indices): 两两家系之间的遗传分化程度 (genetic differences among population, F_{ST})、种群内近交系数 (within-population inbreeding coefficients, F_{IS}) 和群体总近交系数 (the total-population inbreeding coefficients, F_{IT}),通过 10000 次迭代检验固定指数的显著性,深入了解川陕哲罗鲑 3 个家系的遗传变异程度。

2.5.2 川陕哲罗鲑亲子鉴定数据分析

使用软件 Cervus v. 3 软件进行亲子鉴定数据分析。统计参数包括:平均排除概率 (Exclusion probabilities, EP)、累积排除概率 (Cumulative exclusion probabilities, CEP)、似然率对数值 (the nature log of the overall Likelihood ratio, LOD) 以及自信度 (Pair confidence)。通过以上参数建立川陕哲罗鲑亲子鉴定技术。

LOD 为亲子指数 (paternity index) 的对数值。根据分配给每个候选亲本的 LOD 值,选出最佳候选亲本,其依据为,候选亲本的 LOD 值越大,越可能是真实的亲本,

且在置信区间内没有错配座位。排除概率（EP），又称父权排除概率，是指通过检测某一个遗传标记系统，将不是生父的个体（假设父）排除的概率。其计算公式如下：

$$EP = \sum_{i=1}^n P_i(1 - P_i)^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n (P_i P_j) [4 - 3(P_i + P_j)]$$

式中, P_i 代表群体中第 i 个等位基因频率, P_j 代表群体中第 j 个等位基因频率, $j = i + 1$ 。

由于微卫星位点通常存在突变, 因此需要多个微卫星标记才能保证鉴定结果的准确性。所以在求得每个位点的排除概率后, 还需要计算累积非父排除概率 (combined exclusion probability, CEP) :

$$CEP = 1 - \prod_{i=1}^k (1 - EP_i)$$

式中, k 代表遗传标记数。

3 结果

3.1 川陕哲罗鲑微卫星标记基因型测序结果

人工核对与整理川陕哲罗鲑家系的微卫星位点等位基因数据, 表 4-2 列出了川陕哲罗鲑 1 个家系 (JX1) 的 14 个微卫星位点的基因型。部分微卫星标记测序结果如图 4-3 ~ 图 4-5。

表 4-2 川陕哲罗鲑子代 ZD1501 及其亲本的 14 个微卫星标记的基因型

Tab. 4-2 Genotype of 14 microsatellite markers in *Hucho bleekeri* ZD1501 and its parents

位点	父本 FB18 基因型		母本 MB15 基因型		子代 ZD1501 基因型	
Loci	Male parent genotypes		Female parent genotypes		Genotypes of offspring	
Hbl4-10	229	232	229	241	229	241
Hbl10-16	161	170	161	170	161	170
Hbl11-21	128	132	128	132	128	128
Hbl14-29	126	130	126	126	126	126
BLT4	191	203	191	205	191	205

BLT16	180	180	170	180	180	180
Hbl6-240	158	158	158	158	158	158
Hbl2-2	173	185	173	185	173	185
Hbl7-290	100	100	100	134	100	100
BLT20	210	216	216	222	210	216
Hbl3-5	151	154	151	154	151	154
BLT28	160	164	160	164	160	164
Hbl8-163	90	90	92	92	90	92
BLT19	134	192	134	192	134	192

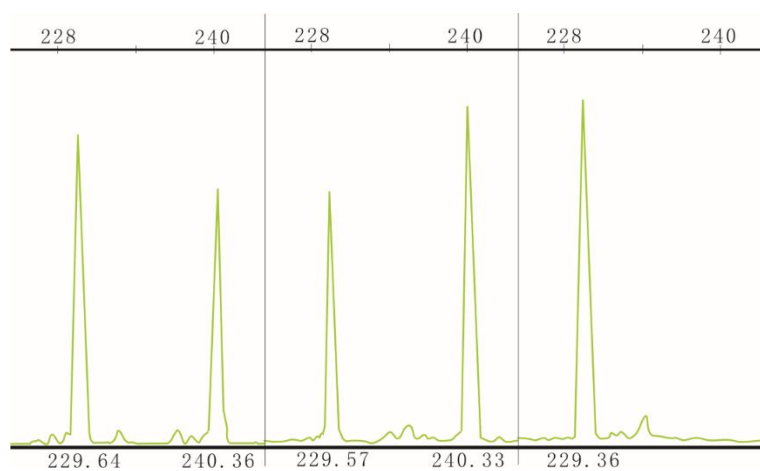


图 4-3 引物 Hbl4-10 测序图（左到右依次为亲本 MB15、子代 ZD1501、候选亲本 HX1）

Fig. 4-3 Genotype of microsatellite loci Hbl4-10 (parent MB15, offspring ZD1501 and non-parent HX1)

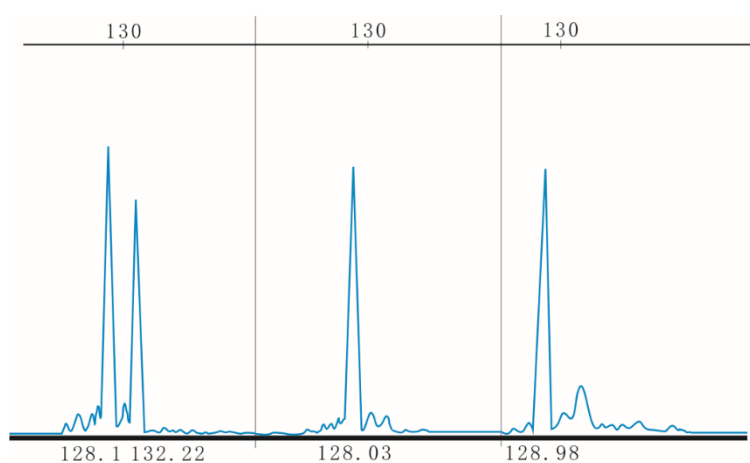


图 4-4 引物 Hbl11-21 测序图（左到右依次为亲本 MB15、子代 ZD1501、候选亲本 HX1）

Fig. 4-4 Genotype of microsatellite loci Hbl11-21 (parent MB15, offspring ZD1501 and non-parent HX1)

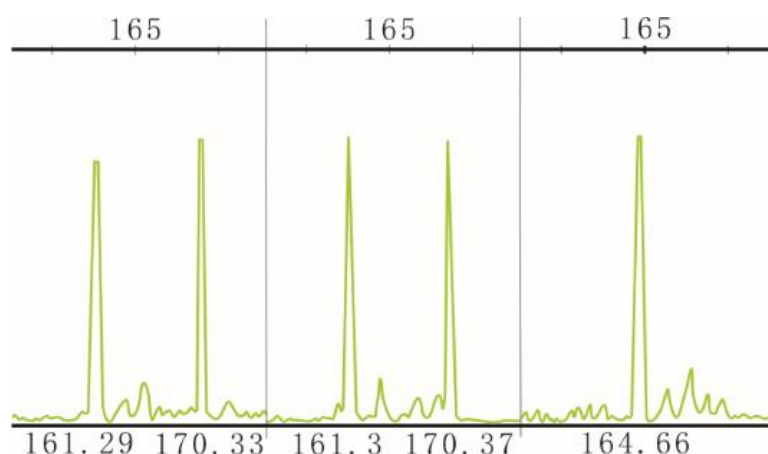


图 4-5 引物 Hbl10-16 测序图（左到右依次为亲本 MB15、子代 ZD1501、候选亲本 HX1）

Fig. 4-5 Genotype of microsatellite loci Hbl10-16 (parent MB15, offspring ZD1501 and non-parent HX1)

3.2 川陕哲罗鲑子一代遗传多样性分析

使用软件 Cervus v. 3 基于 14 个多态微卫星位点统计检测川陕哲罗鲑 3 个家系的遗传学参数，结果如表 4-3 所示：该群体共检测到有 49 个等位基因，单个位点等位基因数 (N_a) 为 2~6 个，平均值为 3；观测杂合度 (H_o) 为 0.069~1.000，其平均值为 0.574；期望杂合度 (H_e) 为 0.067~0.696，平均值为 0.432；多态信息含量 (PIC) 为 0.064~0.644，平均值 0.339。这些参数值均表明该群体的遗传多样性处于较低水平。

表 4-3 川陕哲罗鲑 14 个微卫星位点的遗传多样性参数

Tab. 4-3 Parameters for the 14 microsatellite loci in genetic diversity test

位点	等位基因数	多态信息含量	观测杂合度	期望杂合度
Locus	N_a	PIC	H_o	H_e
Hbl4-10	5	0.417	0.990	0.531
Hbl10-16	3	0.375	0.976	0.502
Hbl11-21	2	0.342	0.675	0.505
Hbl14-29	2	0.089	0.098	0.094
BLT4	3	0.553	1.000	0.627
BLT16	2	0.073	0.078	0.076
Hbl6-240	2	0.064	0.069	0.067

Hbl2-2	4	0.423	0.539	0.535
Hbl7-290	6	0.162	0.157	0.167
BLT20	3	0.472	0.573	0.566
Hbl3-5	2	0.371	0.880	0.495
BLT28	2	0.381	0.688	0.685
Hbl8-163	4	0.644	0.755	0.696
BLT19	2	0.375	0.560	0.502
Mean	3	0.339	0.574	0.432

通过微卫星标记计算川陕哲罗鲑 3 个家系之间的遗传分化程度如表 4-4 所示,发现遗传变异主要来源于川陕哲罗鲑群体内 (within populations) (97.50%), 2.50% 的遗传变异来自于种群之间 (Among populations)。所有微卫星位点的平均 F 分析 (F -statistics) 固定指数分别为: 两两家系之间的遗传分化程度 (F_{ST}) 为 0.02504; 单个种群内近交系数 (F_{IS}) 为 -0.33255; 群体总近交系数 (F_{IT}) 为 -0.29168, 说明这 3 个家系未出现明显的近交现象 ($F_{IS} < 0$; $F_{IT} < 0$)。家系间的两两比较 (表 4-5) 未发现显著的遗传分化 ($F_{ST} < 0.05$)。

表 4-4 川陕哲罗鲑群体遗传变异方差分析 (AMOVA)

Tab. 4-4 Results of analysis of molecular variance testing genetic structure (AMOVA) of *Hucho bleekeri*

变异来源	自由度	变异百分比	P 值
Source of variation	d.f.	Percentage of variation	P-value
种群间	8.328	2.50	0.0000
Among populations			
群体内	64.973	97.50	
within populations			
总和	73.301		
Total			

表 4-5 川陕哲罗鲑两两家系间 F_{ST} 值（下）及 F_{ST} 值得 P 值（上）Tab. 4-5 Pairwise F_{ST} (below) and P-values (above) among populations of *Hucho bleekeri*

	家系 1 (JX1)	家系 2 (JX2)	家系 3 (JX3)
家系 1 (JX1)		0.00000+-0.0000	0.09910+-0.0286
家系 2 (JX2)	0.00750		0.00000+-0.0000
家系 3 (JX3)	-0.00778	0.03235	

3.3 川陕哲罗鲑子一代与亲本群体遗传多样性参数对比

将川陕哲罗鲑子一代与野生群体的遗传多样性参数进行对比,结果如表 4-6 所示,子一代的平均等位基因数($\bar{N}a$)、平均多态信息含量($\overline{PIC}$)、平均观测杂合度($\overline{H}o$)和平均期望杂合度($\overline{H}e$)都小于野生种群。这表明,川陕哲罗鲑子代群体的遗传多样性低于野生群体。

表 4-6 川陕哲罗鲑子一代与亲本群体遗传多样性参数

Tab. 4-6 Genetic diversity analysis for sub generation group and wild population of *Hucho bleekeri*

群体	平均等位基因数	平均多态信息含量	平均观测杂合度	平均期望杂合度
Population	$\bar{N}a$	$\overline{PIC}$	$\overline{H}o$	$\overline{H}e$
野生	5.133	0.376	0.597	0.447
子一代	3	0.339	0.574	0.432

3.4 川陕哲罗鲑亲子鉴定结果

川陕哲罗鲑 14 个微卫星位点的亲子鉴定参数如表 4-7 所示。用筛选出的 14 个微卫星位点对亲本与 3 个家系的子代群体分别以母本/父本单亲已知、双亲信息均已知和双亲信息均未知几种模型进行亲子鉴定分析,模拟运行 10000 次。初步结果显示,双亲信息均未知情况下,14 个微卫星位点的累积排除概率是 0.98879076;在双亲之一信息已知的情况下,14 个微卫星位点的累积排除概率为 0.99958733;在双亲信息均已知的情況下,14 个微卫星位点的累积排除概率为 0.9999957。

利用上述 14 个微卫星位点进行川陕哲罗鲑的亲子鉴定结果如表 4-8 所示,3 个家系共 62 尾子代 LOD 值均大于 0,这表明与任意候选亲本相比,所计算出的候选亲本最有可能是真是的亲代个体。结果中 62 个子代个体均能准确地找到其亲本,说明本实验筛选出的 14 个微卫星位点可用于建立川陕哲罗鲑亲子鉴定技术。

表 4-7 川陕哲罗鲑 14 个微卫星位点的亲子鉴定参数

Tab. 4-7 Parameters for the 14 microsatellite loci in paternity test of *Hucho bleekeri*

位点	双亲均不	单亲不知	双亲均知	位点	双亲均不	单亲不知	双亲均知
Locus	知排除概	排除概率	排除概率	Locus	知排除概	排除概率	排除概率
	率	NE-2P	NE-PP		率	NE-2P	NE-PP
	NE-1P				NE-1P		
Hbl4-10	0.860	0.775	0.661	Hbl2-2	0.858	0.770	0.654
Hbl10-16	0.875	0.813	0.719	Hbl7-290	0.986	0.912	0.836
Hbl11-21	0.864	0.822	0.698	BLT20	0.875	0.813	0.813
Hbl14-29	0.996	0.956	0.917	Hbl3-5	0.879	0.814	0.721
BLT4	0.805	0.660	0.509	BLT28	0.785	0.643	0.501
BLT16	0.997	0.964	0.931	Hbl8-163	0.728	0.555	0.375
Hbl6-240	0.998	0.968	0.939	BLT19	0.675	0.613	0.519

表 4-8 62 尾子代川陕哲罗鲑亲子鉴定结果

Tab. 4-8 Paternity test of 62 *Hucho bleekeri* offspring

子代 ID	候选母本 ID	检测标记数	错配座位数	似然率对数值	自信度
Offspring ID	Candidate mother ID	Loci typed	Pair loci mismatching	Pair LOD score	Pair confidence
ZD1501	MB15	14	0	1.15E-01	+
ZD1502	MB15	14	0	2.04E+00	+
ZD1503	MB15	14	0	6.92E-01	+
ZD1504	MB15	14	0	8.95E-01	+
ZD1505	MB15	14	0	1.66E+00	+
ZD1506	MB15	14	0	7.89E-01	+
ZD1507	MB15	14	0	3.53E+00	+
ZD1508	MB15	14	0	4.24E+00	+
ZD1509	MB15	14	0	4.23E+00	+
ZD1510	MB15	14	0	4.92E+00	+
ZD1511	MB15	14	0	2.35E-01	+
ZD1512	MB15	14	0	5.59E-02	*
ZD1513	MB15	14	0	6.66E-01	*
ZD1514	MB15	14	0	3.01E+00	+

ZD1515	MB15	14	0	2.72E+00	+
ZD1516	MB15	14	0	4.53E+00	+
ZD1517	MB15	14	0	1.30E-02	+
ZD1518	MB15	14	0	5.21E-01	+
ZD1519	MB15	14	0	4.45E-01	+
ZD1520	MB15	14	0	7.39E-01	*
ZD1601	MB16	14	0	7.35E-01	+
ZD1602	MB16	14	0	9.18E-01	+
ZD1603	MB16	14	0	1.30E+00	*
ZD1604	MB16	14	0	1.55E+00	+
ZD1605	MB16	14	0	2.23E-01	+
ZD1606	MB16	14	0	2.42E+00	+
ZD1607	MB16	14	0	2.27E+00	+
ZD1608	MB16	14	0	1.58E+00	+
ZD1609	MB16	14	0	1.13E+00	+
ZD1610	MB16	14	0	1.13E+00	+
ZD1611	MB16	14	0	7.45E-02	+
ZD1612	MB16	14	0	6.92E-01	+
ZD1613	MB16	14	0	3.39E+00	+
ZD1614	MB16	14	0	2.05E+00	+
ZD1615	MB16	14	0	1.59E+00	+
ZD1616	MB16	14	0	7.45E-02	+
ZD1617	MB16	14	0	1.16E+00	+
ZD1618	MB16	14	0	2.42E+00	+
ZD1619	MB16	14	0	9.04E-01	+
ZD1620	MB16	14	0	1.07E+00	+
ZD1621	MB16	14	0	8.95E-01	+
ZD1622	MB16	14	0	4.49E-01	+
ZD1701	MB17	14	0	1.36E+00	+
ZD1702	MB17	14	0	1.96E+00	*
ZD1703	MB17	14	0	1.21E+00	+
ZD1704	MB17	14	0	2.42E+00	+

ZD1705	MB17	14	0	5.32E-01	*
ZD1706	MB17	14	0	3.11E-01	+
ZD1707	MB17	14	0	1.07E+00	*
ZD1708	MB17	14	0	7.54E-01	+
ZD1709	MB17	14	0	1.36E+00	+
ZD1710	MB17	14	0	1.66E+00	+
ZD1711	MB17	14	0	4.07E+00	+
ZD1712	MB17	14	0	6.66E-01	*
ZD1713	MB17	14	0	5.21E-01	+
ZD1714	MB17	14	0	3.01E+00	+
ZD1715	MB17	14	0	4.44E-01	+
ZD1716	MB17	14	0	9.19E-01	+
ZD1717	MB17	14	0	3.01E+00	+
ZD1718	MB17	14	0	1.64E+00	+
ZD1719	MB17	14	0	3.88E-01	*
ZD1720	MB17	14	0	3.55E-01	+

4 讨论

4.1 所选微卫星标记的多态性

理论上, 在使用分子标记进行种群遗传学分析和亲缘关系鉴定时, 所选用的微卫星标记遗传多态性越高越好, 即等位基因数和位点越多、杂合度越高, 分析或鉴定结果越准确。本实验所选择的 14 个微卫星标记来自本文第二章开发的川陕哲罗鲑多态微卫星标记。这 14 个微卫星引物的等位基因数为 4~8, 平均等位基因数为 5.0; 多态信息含量为 0.677~0.808, 平均多态信息含量为 0.735; 观测杂合度为 0.531~0.818, 平均观测杂合度为 0.659; 期望杂合度为 0.738~0.845, 平均期望杂合度为 0.786。说明本实验所选的微卫星标记多态性较高, 符合对川陕哲罗鲑群体进行亲子鉴定的要求。

4.2 微卫星标记等位基因的分型

判定亲缘关系的理论依据是孟德尔遗传定律，即子代的基因组分别来自双亲。由表 4-2 可知，本实验中 14 个微卫星位点在川陕哲罗鲑子一代个体中扩增出的基因型全部来自于其亲本，符合孟德尔遗传规律，非亲排除概率较高，可以确保亲子鉴定结果的准确性。因此本研究所选用的 14 个多态微卫星标记适用于川陕哲罗鲑亲子鉴定技术的建立。

4.3 川陕哲罗鲑人工繁殖子一代的遗传多样性

川陕哲罗鲑属于极度濒危物种，现存种群数量极度稀少。野生种群遗传多样性偏低，遗传结构单一（第三章结论）。因此有必要对人工繁殖获得的子一代群体进行遗传多样性的评估，以了解其遗传特征。养殖群体亲本来自于所获得的野生成鱼，亲本之间的亲缘关系较近。且养殖群体中达到繁殖要求的成年雄鱼过少，因此交配时出现多雌一雄的情况（人工繁殖时由于达到繁殖要求的性成熟雄鱼数量过少，因此使用一尾雄鱼与三尾雌鱼交配），从而导致三个家系子代个体之间具有亲缘关系。

不同种群之间的遗传分化程度通常由遗传分化指数和遗传距离来判定。种群间的亲缘关系越远，其遗传分化系数则越大，遗传距离也越远。本研究中，川陕哲罗鲑养殖群体三个家系的遗传分化程度(F_{ST})为 0.02504，表明三个家系没有出现遗传分化，家系之间的遗传距离较为接近。

F_{IS} 和 F_{IT} 分别表单个种群和整个群体的近交系数，它们的取值范围为 -1 ~ 1。当该值为正数时，则表示所检测群体内存在近交，若为负数，则表明群体内不存在近交（Weir and Cockerham, 1984）。三个家系的近交系数（ F_{IS} 和 F_{IT} ）均为负数，说明该群体无论是单个家系，还是整个种群，都没有明显的近交现象发生。

种质资源的保护就是保护物种的遗传多样性，维持其进化潜力。种群遗传多样性衡量的普遍标准为：等位基因数、杂合度以及多态信息含量。这些参数的数值越大，表明该种群的遗传多样性水平越高。其中，等位基因数是遗传变异研究的基础，其值的多少反应了物种的变异程度，等位基因越丰富，则变异程度越大。杂合度分为观测杂合度和期望杂合度。期望杂合度是衡量种群变异水平的一个重要标准，它是依据种群内当前最具有优势的等位基因的分布频率来计算的，因此稀有基因对其影响作用较小。当种群的数量发生变化时，可能会影响到对稀有基因的检出，但是不会影响到种群期望杂合度（Nei, 1978）。因此，本研究中检测的个体数较小，利用期望杂合度来评价群体遗传多样性是一个较好的选择。通过 14 个微卫星位点检测川陕哲罗鲑养殖群体的平均等位基因数仅为 3，平均观测杂合度为 0.574，平均期望杂合度为 0.432，平均多态信息含量为 0.339，这三个参数均表明该群体的遗传多样性处于较低水平。

鉴于川陕哲罗鲑养殖群体的低遗传多样性与单一的遗传结构,建议在人工繁殖过程中尽量挑选遗传距离较远的个体进行交配,同时扩大繁殖亲本规模,以达到最佳繁育效果,维持该物种的遗传多样性水平,保证其进化潜力。

4.4 亲子鉴定的可靠性

亲缘关系鉴定中常用的理论模型主要分为 3 类:即遗传排除法 (Genetic exclusion)、最大似然法 (Maximum likelihood assignment) 和父性拆分法 (Fractional paternity assignment)。其中排除法是进行亲缘关系鉴定最早使用且最为简单有效的方法 (Jones and Ardren, 2003)。分析亲子鉴定的软件也有很多,当中基于最大似然法的亲本分析软件 Cervus 应用较为广泛,基本可满足亲缘关系鉴定的要求 (李博等, 2013)。本研究主要使用 Cervus 软件基于累积非父排除概率 (CEP) 来衡量该亲子鉴定体系是否可成立。参照标准, CEP 达到 99.73% 则可以认定存在亲子关系;若 CEP 在 95% ~ 99% 以内,则认为有可能存在亲子关系;若 CEP 在 80% 以下,则不能肯定是否存在亲子关系 (王敏, 2011)。本研究中通过 14 个微卫星位点检测了川陕哲罗鲑 3 个家系子代个体和候选亲本的亲子关系,在单亲信息已知和双亲信息已知的情况下,其累积非父排除概率均大于 99%;双亲信息均未知情况下,累积非父排除概率大于 98%,可认定亲本与子代之间的亲子关系。亲子指数的对数值 LOD 的意义是, LOD 值越大,其分析亲本与子代之间存在亲子关系的可能性就越大。本研究使用 Cervus 软件中的 Parentage analysis 模块,利用筛选的 14 对微卫星标记成功地所有子代从 14 个候选亲本中找到了其真实亲本。因此,本研究所使用的 14 对多态微卫星标记所构建的川陕哲罗鲑亲子鉴定技术是可行的。

4.5 对川陕哲罗鲑遗传多样性保护的建议

川陕哲罗鲑是我国特有物种,国家 II 级野生保护动物,广泛分布与我国长江水系,是重要的经济鱼类。20 世纪 60 年代以来,随着自然环境的破坏,川陕哲罗鲑资源量不断减少,分布区也随即缩小。至 21 世纪,大部分原有分布区未能寻找到该物种的踪迹。2012 年 9 月村民无意中在陕西省太白河发现了小规模川陕哲罗鲑野生种群,为该物种的保护带来了新的希望。

物种灭绝在进化史上是十分平常的事,地球上至今已经经历了 5 次大规模灭绝。现而今一个主要的忧虑是当前灭绝的速率之快,以至于被标上了“生物多样性危机”的标签,如果此种趋势持续下去,地球将很快经历第 6 次物种大灭绝 (Leakey and

Lewin, 1995)。并且,这次将不同于前 5 次是自然条件引起的,而是直接或间接由一个优势物种——人类的活动引起的。分子遗传学在保护生物学中正被发现具有许多重要用途。早期的分子生态学对个体的破坏性采样是极其不适用于濒危物种的。由此新兴了一门学科——保护遗传学。其中心目标之一是要了解遗传多样性与种群生存能力之间的关系。鉴于川陕哲罗鲑物种的濒危程度,本文前面章节通过对川陕哲罗鲑遗传多样性的研究,发现该物种陕西太白河野生种群和人工繁殖子一代群体的遗传结构单一、遗传多样性均处于较低的水平。基于本文的研究结果,可对该物种的保护提出如下保护建议:

4.5.1 关于川陕哲罗鲑太白河野生种群的保护建议

由于现阶段仅在陕西省太白河发现川陕哲罗鲑野生个体,因此其生态环境应受到重视。而该地区由于水电站的建立、矿产的采集、卵石的挖取等,导致川陕哲罗鲑栖息地遭到严重破坏。因此,当地应当加强对太白河生境的保护,建立自然保护区。并加强法制管理,防止非法捕捞。同时加强对当地民众的宣传,强调川陕哲罗鲑保护的重要性,如果意外发现该物种野生个体,应立即采取措施进行保护,并告知相关部门,政府应给予发现者一定奖励。

尽管川陕哲罗鲑野生种群的死亡率受生态因子的影响大大超过受遗传因子的影响,但仍需注意其遗传因子的影响。第三章研究结果表明,陕西太白河川陕哲罗鲑种群的遗传结构十分单一,因此应当将该群体作为一个整体进行保护。鉴于该群体的低遗传多样性,如果未来在其他分布区发现川陕哲罗鲑野生个体,可以进行异地引种,并对其进行遗传学评估。同时可利用本研究所开发的微卫星标记和线粒体 DNA 标记所获得的结果,将不同单倍型(尤其是 *CYTB* 和控制区所获得的几种数量较少的单倍型)的个体保存下来,尽量维护种群的遗传多态性。

4.5.2 关于川陕哲罗鲑人工繁殖和增殖放流的建议

当种群变得非常小且持续了多个世代的迁入隔离时,遗传问题就必然十分重要。近交能导致杂合性的丧失和弱有害等位基因的累积以及遗传负荷的增加。近交衰退已经成为濒危物种管理和保护最核心的问题之一。本文研究发现,川陕哲罗鲑亲本群体亲缘关系十分接近,子一代群体的遗传多样性较野生种群而言更低。因此今后对川陕哲罗鲑进行人工繁殖时,可利用本文开发的微卫星标记,对川陕哲罗鲑亲本建立可靠的谱系档案,选取遗传距离(亲缘关系)较远的亲本进行繁殖。

国内外常利用增殖放流来补充和恢复渔业资源，特别是对于一些濒危物种，通过放流可增加其数量。对于川陕哲罗鲑这一物种，也可利用该方法进行资源恢复。为避免川陕哲罗鲑野生种群的遗传结构遭到改变，可在对其进行人工增殖放流后回捕部分个体，利用本研究所开发的微卫星标记和亲子鉴定技术对其进行放流效果评估，以保证太白河川陕哲罗鲑种质资源得到充分保护和可持续利用。

5 小结

（1）本实验利用微卫星标记研究了川陕哲罗鲑人工繁殖子一代群体的遗传多样性与遗传结构，结果表明，该群体遗传多样性水平较低、遗传结构单一，且家系之间没有出现明显的遗传分化。建议在人工繁殖之前了解川陕哲罗鲑亲本个体的遗传特征，挑选出遗传距离较远的亲本进行人工繁育工作，避免子代群体遗传多样性降低，维持物种的遗传多样性水平，从而保护该物种。

（2）本实验利用 14 个多态微卫星标记对川陕哲罗鲑人工繁殖亲本及其子代其进行了亲子鉴定研究，构建了可靠的亲子鉴定体系，为川陕哲罗鲑的繁育工作、家系管理及增殖放流效果的评估等后续研究提供了科学的技术支撑。

（3）基于本文研究结果对川陕哲罗鲑种群遗传多样性的保护提出了针对性的建议，为川陕哲罗鲑种质资源的保护提供了科学的策略。

第五章 秦岭地区两种鲑科鱼类——川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑种群线粒体基因渐渗的研究

1 前言

秦岭形成于距今约 8 千万年的晚古生代的海西运动中, 经过中生代三叠纪末的印支运动、侏罗纪到白垩纪末的燕山运动以及新生代造山运动的影响, 最终形成了现今以中山为主、东西走向的大褶皱带的地貌(陕西省动物研究所等, 1987)。秦岭是黄河与长江水系的主要分水岭, 在地理学研究上具有重大意义(沈玉昌, 1954)。这一地带河流众多, 当中分布着两种鲑科鱼类, 即分布于汉江水系太白河、湑水河的川陕哲罗鲑和分布于渭河水系南、北部各支流上游和长江的汉水北侧支流的湑水河、子午河上游的秦岭细鳞鲑, 二者在秦岭地区都有分布(图 5-1)。在外型上, 川陕哲罗鲑体长形、口大、端位, 上颌骨向后延伸超过眼后缘下方, 体侧和鳃盖上分布着略呈十字形的不规则小斑点; 秦岭细鳞鲑体长形、口小、口亚下位, 上颌骨向后延伸未超过眼中线下方, 头、体侧有圆形小黑斑。川陕哲罗鲑的个体规格大于秦岭细鳞鲑(陕西省动物研究所等, 1987)。这两种鲑科鱼类终生生活在海拔约 900 米以上的山溪深潭中, 成不连续的点状分布, 秦岭是本类群分布的南限。有学者认为这两种鲑科鱼类都是第四纪冰川时期经日本海南迁的北方残留鱼类(李思忠, 1984); 也有学者认为秦岭细鳞鲑是在更新世中期前与北部水系隔离的, 而川陕哲罗鲑则有可能是在第三纪期间扩散到了秦岭以南(杜汉斌, 2012)。

基因渐渗(Introgression)最早由 Anderson et al. 于 1938 年提出, 是指一个种群的基因被整合到另一个种群中。基因渐渗现象在自然界中十分常见, 广泛存在于同一物种不同种群间或近缘种间, 是生物进化的重要因素(Radchenko, 2004)。基因渐渗现象可影响基因接受者的遗传多样性和遗传、形态、行为及生态的完整性(Hayes et al., 1996), 其负面影响包括遗传多样性的降低以及造成远交衰退(Avise, 1994)。杂交现象在哲罗鲑属与细鳞鲑属之间时有发生。薛镇宇等(1959)曾发现一种外形介于哲罗鲑与细鳞鲑之间的鱼类, 认为有可能是二者的天然杂交种。Shedko(2003)利用线粒体 DNA 限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)分析发现细鳞鲑基因中的外源单倍型, 推测这有可能是由于细鳞鲑与哲罗鲑的杂交现象所造成的。研究发现, 与其他鲑科鱼类不同的是, 雌性太门哲罗鲑不会在产卵之后立刻掩埋, 而是在稍等片刻后

才出现此行为(Esteve et al., 2008)。这种繁殖习性与细鳞鲑相符(Esteve et al., 2009), 这也说明哲罗鲑与细鳞鲑发生杂交渐渗现象的可能性较大。

此前的研究分别通过利用线粒体 DNA 的 RFLP 技术(Shedko, 2003)、相关序列扩增多态性(SRAP)技术(许凌雪等, 2011)和微卫星标记(王俊等, 2011)来研究疑似哲罗鲑与细鳞鲑的杂交种, 发现杂交现象未明显出现在核基因标记中, 而是出现在线粒体 DNA 标记中。一些研究发现线粒体 DNA 容易被基因渗入, 适宜于研究基因渐渗现象是否存在(Avise et al., 1984; Currat et al., 2008)。

本实验的两种研究对象——川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑样本都来自于陕西太白, 二者分布区有重叠。而且本实验所采集的川陕哲罗鲑样本(均为性成熟个体)规格普遍小于青海省玛柯河样本(申志新等, 2006)(表 5-1)。鉴于此情况, 我们分析了太白河川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑两个种群样本的线粒体 DNA 细胞色素 *b* 基因 *CYTB* 片段, 并将其与玛柯河川陕哲罗鲑样本及黑龙江流域的细鳞鲑样本进行聚类分析, 以探究太白河川陕哲罗鲑样本与秦岭细鳞鲑是否发生杂交渐渗。

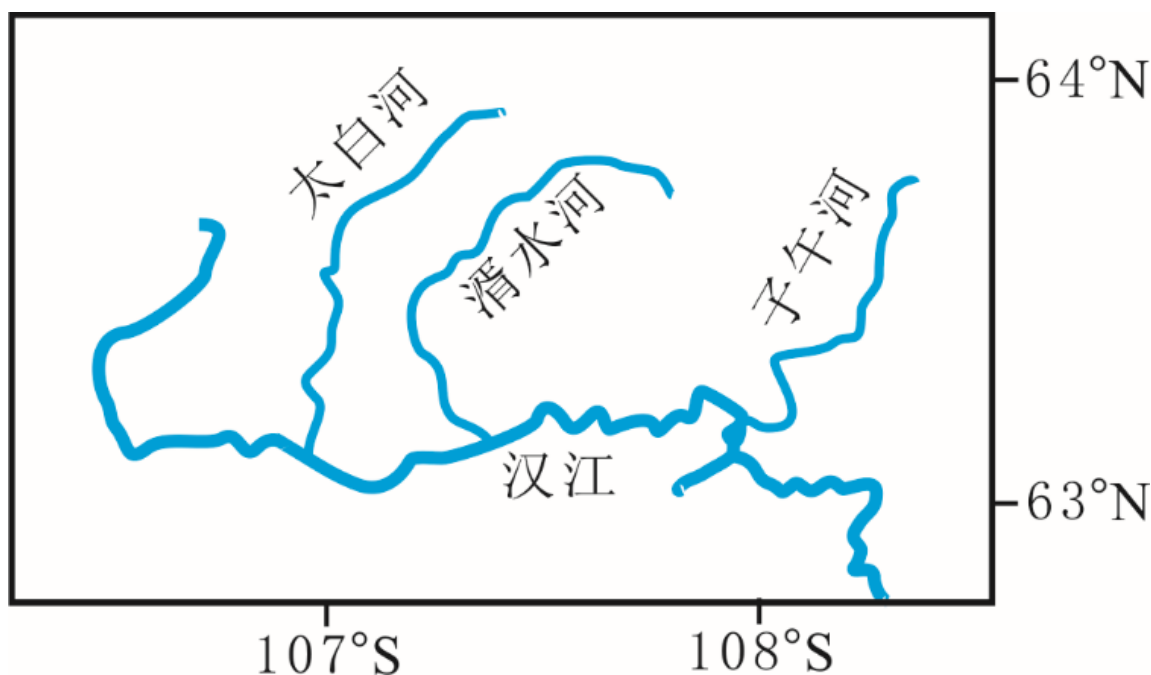


图 5-1 陕西省太白县汉江水系图

Fig. 5-1 Map of Hanjiang River drainage in Taibai County, Shanxi Province

表 5-1 不同采样点川陕哲罗鲑及秦岭细鳞鲑样本部分形态学指标

Tab. 5-1 Several morphology index of *Hucho bleekeri* from different sampling sites and *Brachymystax**lenok tsinlingensis*

物种	采样点	全长 (cm)	体长 (cm)	体重 (kg)
species	sampling site	overall length	body length	weight
川陕哲罗鲑	太白河	48.9 ~ 53.5	43.5 ~ 48.0	0.791 ~ 1.340
川陕哲罗鲑	玛柯河	43.0 ~ 72.0	37.5 ~ 64.0	-
秦岭细鳞鲑	太白河	16.9 ~ 24.8	15.1 ~ 22.5	0.049 ~ 0.139

注：玛柯河川陕哲罗鲑样本数据来自于申志新等（2006）

2 材料与方法

2.1 实验材料与仪器

2012 至 2013 年，在陕西省太白河采集川陕哲罗鲑野生个体样本 43 尾、秦岭细鳞鲑样本 50 尾，抽样测量其全长、体长、体重（表 5-1），每尾样本剪取鳍条，无水乙醇、4 ℃ 保存备用。

实验仪器与试剂参考第二章 2.1。

2.2 样本基因组的提取

两个物种的基因组 DNA 的提取采用经典的高盐法 (Aljanabi and Martinez, 1997)，具体实验方法参照第二章 2.2 的实验步骤。

2.3 PCR 扩增与产物检测

采用线粒体细胞色素 *b* 基因 (*CYTB*) 片段作为分子标记对样本基因组 DNA 模板进行 PCR 扩增反应。引物序列、片段长度及退火温度见第三章表 3-1。

PCR 反应体系参照第三章表 3-2。扩增程序参照第三章 2.2。

PCR 产物 4 ℃ 保存，并送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序。产物经纯化试剂盒纯化后，在自动测序仪 ABI 3730XL 上测得扩增序列峰值，读取碱基序列。

2.4 数据分析

A. 利用软件 Lasergene(Seqman)v. 7 进行线粒体 DNA 序列的人工校对及拼接。

B. 使用软件 ClustalX v. 2.0 进行序列比对。

C. 使用软件 DnaSP v. 5 分析川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑的遗传多样性, 包括统计多态位点数 (number of polymorphic sites, S); 单倍型数 (number of haplotypes, h); 单倍型多样性指数 (haplotype diversity, Hd); 核苷酸多样性指数 (nucleotide diversity, Pi) 以及平均核苷酸变异数 (average number of nucleotide differences, k) 等参数。同时分析总群体的简约信息位点数 (parsimony informative sites)、遗传分化系数 (Gst)、固定系数 (Fst), 以及两个种群之间的平均核苷酸差异度 (Kxy)、核苷酸歧异度 (Dxy) 以及种群间的基因流 (Nm), 用以分析两个群体之间的遗传分化情况。

D. 使用软件 MEGA v. 5 基于 Kimura 2-Parameter (K-2P) 双参数模型计算两个种群各基因片段单倍型之间的遗传距离, 并采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 和最大似然法 (Maximum-Likelihood, ML) 构建系统进化树进行聚类分析 (1000 次迭代)。

此外, 本实验从 GenBank 下载了一系列鲑科鱼类线粒体 DNA 序列片段, 进行聚类分析: (i) *Hucho bleekeri* (KF908853, HM804473, FJ597623); (iv) *Brachymystax lenok* (JQ686730) 和 *Brachymystax lenok tsinlingensis* (JQ686731); 以及 (v) *Oncorhynchus mykiss* (DQ288268) 作为外类群分析。

3 结果

3.1 基于线粒体 DNA 分子标记的两个种群遗传多样性分析

3.1.1 川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑群体内单倍型多样性分析

如表 5-2 所示, 经序列比对后, 分析了线粒体 *CYTB* 基因序列长度为 1120 bp 的片段, 包含 2 个缺失碱基位点和 101 个变异位点, 其中 4 个为单变异位点, 简约信息位点数为 97。群体的核苷酸多样性指数 (Pi) 为 0.04319, 其中川陕哲罗鲑种群 Pi 值为 0.00009, 秦岭细鳞鲑种群的 Pi 值则为 0.00014。

单倍型分析结果显示, 两个群体的总单倍型数 (h) 为 7 个, 总单倍型多样性 (Hd) 为 0.6436。秦岭细鳞鲑种群共有 4 个单倍型 (Hap_1、Hap_2、Hap_3、Hap_4), 其中 Hap_1 包含 37 个个体, 占秦岭细鳞鲑总样本量的 74.0%, 其次为 Hap_4, 个

体数为 10, 占总样本量的 20.0%。川陕哲罗鲑种群共获得 3 个单倍型(Hap_5、Hap_6、Hap_7), 其中 Hap_5 拥有的个体数量占川陕哲罗鲑总样本量的 95.3%, 其余两个单倍型仅各拥有一个个体。单倍型 Hap_1、Hap_4、Hap_5 拥有的个体数量占两个物种总样本量的百分比分别为: 39.8%、10.8% 和 44.1%。两个种群的单倍型分别为各自独有, 没有出现共同的单倍型。

表 5-2 川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑单倍型多样性

Tab. 5-2 Haplotype diversity of *Hucho bleekeri* and *Brachymystax lenok* tsinlingensis

物种	长度 (bp)	多态位点	单倍型	单倍型多样性	核苷酸多样性	平均核苷酸变异数
species	Length (bp)	S	h	Hd	Pi	k
川陕哲罗鲑	1119	2	3	0.0941	0.00009	0.095
秦岭细鳞鲑	1120	3	4	0.1170	0.00014	0.158
总群体	1120	101	7	0.6436	0.04319	48.290

3.1.2 川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑种群间遗传差异分析

利用软件 DnaSP v. 5 分析川陕哲罗鲑和秦岭细鳞鲑两个种群间的遗传分化, 结果显示: 二者之间的遗传分化系数 (G_{st}) 为 0.06653, 平均核苷酸差异度 (K_{xy}) 为 0.3476、核苷酸歧异度 (D_{xy}) 为 0.08598、基因流 (Nm) 为 3.51。总群体的固定系数 (F_{st}) 为 0.1080。

3.2 川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑种群系统进化分析

利用 MEGA 软件使用两个种群的线粒体 *CYTB* 基因片段分子标记, 基于 Kimura 2-Parameter (K-2P) 双参数模型, 采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 和最大似然法 (Maximum-Likelihood, ML) 构建系统进化树进行聚类分析 (1000 次), 两种方法构建的系统进化树结果一致, 选用最大似然法 (ML) 构建系统进化树。

如图 5-2 所示, 川陕哲罗鲑种群(单倍型 Hap_5 ~ Hap_7)与 Zhang et al. (2014) 发表的来自于与本研究为同一采样点的川陕哲罗鲑样本聚为一类, 与来自于玛柯河的川陕哲罗鲑样本 (Wang et al., 2011; 祈得林等, 2009) 有遗传差异。秦岭细鳞鲑种群 (单倍型 Hap_1 ~ Hap_4) 与来自于与本研究同一采样点的样本聚为一类, 而与黑龙江流域的细鳞鲑样本有遗传差异 (Si et al., 2012)。本实验的川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑种群明显分为两支, 且遗传距离较远。

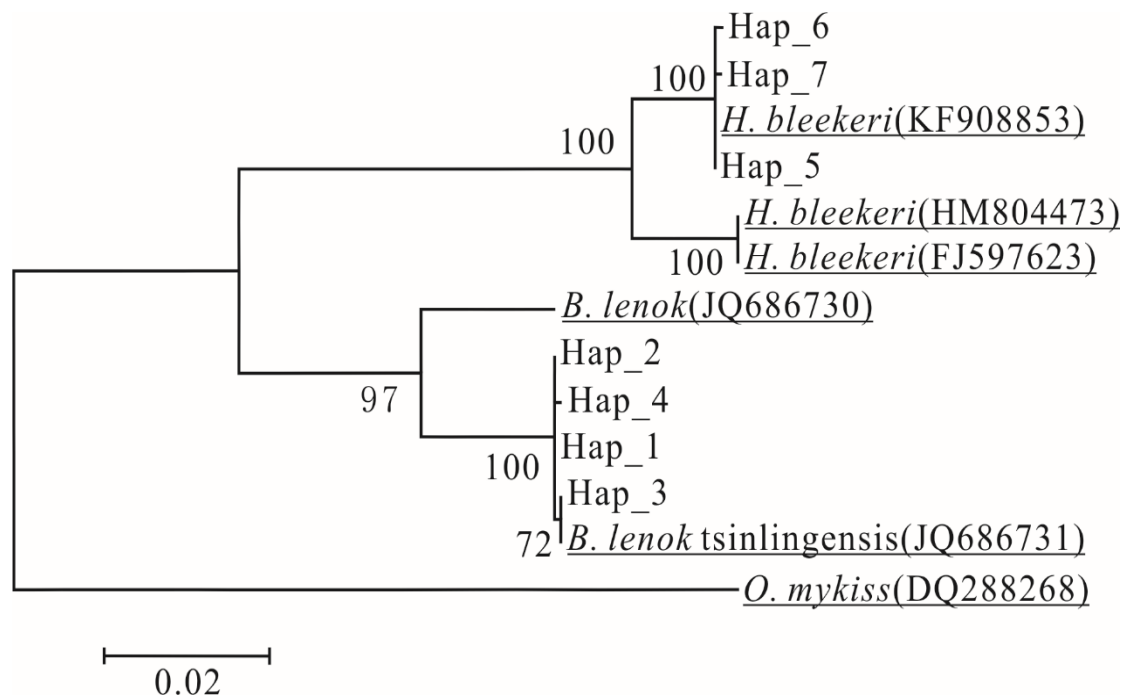


图 5-2 川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑单倍型系统进化树

Hap_1 ~ Hap_4: 秦岭细鳞鲑单倍型; Hap_5 ~ Hap_7: 川陕哲罗鲑单倍型; 下划线标注为从 GenBank 下载的鲑科鱼类线粒体 *CYTb* 基因序列

Fig. 5-2 Phylogenetic tree based on haplotypes of *Hucho bleekeri* and *Brachymystax lenok tsinlingensis*
Hap_1 ~ Hap_4: haplotypes of *Brachymystax lenok tsinlingensis*; Hap_5 ~ Hap_7: haplotypes of *Hucho bleekeri*; Underline: *CYTb* gene sequences of Salmonidae download from GenBank

4 讨论

4.1 线粒体基因渗入

远交衰退是指两个具有遗传分化的种群之间的远缘杂交所引起的后代合适度降低 (Pusey and Wolf, 1996)。远交的遗传代价既可被认为是由不同环境条件下赋予等位基因优势的叠加作用所引起的, 也可以是由共适应基因复合体的解体所引起的。在后一种情况下, 即使是来自相同环境下的不同种群, 如果二者的个体能够进行交配, 也会引起后代的远交衰退。远交衰退比近交作用的研究少得多, 但对物种保护而言却有着极为重要的意义。近缘物种杂交容易导致远交衰退和遗传多样性的降低。细鳞鲑属与哲罗鲑属为鲑科鱼类不同属, 但是两属之间遗传距离接近, 二者的杂交现象时有发生, 对此国内外均有研究。

Balakirev et al. (2013) 利用线粒体 DNA 序列标记研究了太门哲罗鲑与细鳞鲑的基因渐渗现象, 结果发现, 除采自于乌苏里江的太门哲罗鲑样本明显地呈现了渐渗现象, 且渐渗时期较近 (推测为人为操作) 外, 其余所有的样本都没有被细鳞鲑基因渗入。与 Balakirev et al. (2013) 的研究结果类似, 陕西太白河采集的川陕哲罗鲑种群显示陕西太白河水域的川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑没有交叉分布的单倍型, 这表明两个种群在线粒体 DNA 的 *CYTB* 基因片段没有相互基因渗入。究其原因可能有四点。一是哲罗鲑与细鳞鲑杂交, 其后代可能出现不相容状态。许凌雪等 (2011) 利用 SRAP 标记分析了太门哲罗鲑 (母本) 与细鳞鲑 (父本) 及其杂交种的遗传结构, 结果发现 3 个群体的遗传距离较远, 太门哲罗鲑与细鳞鲑群体之间没有发生杂交渐渗。王俊等 (2011) 则发现, 当使用哲罗鲑为父本, 细鳞鲑为母本时, 二者杂交的子代个体上浮率低, 畸形率和死亡率高, 表现出明显的杂交不相容状态。二是两属之间遗传距离较大, 不易产生杂交。本研究发现, 川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑种群间的固定系数 (F_{ST}) 为 0.1080, 表明二者有较大的遗传分化, 遗传距离较远。三是二者繁殖时间有差异。据报道, 川陕哲罗鲑的繁殖季节约在每年春季 3~5 月 (王凤等, 2009), 秦岭细鳞鲑则在 5~6 月产卵 (陕西省动物研究所等, 1987)。川陕哲罗鲑要稍早于秦岭细鳞鲑进行繁殖, 因此这两种鲑科鱼类自然情况下杂交的可能性较小。四是本研究仅选取了线粒体 DNA 序列中部分序列作为研究对象, 其他基因片段如线粒体 DNA 的其他碱基序列或核基因组是否有基因渐渗现象还有待研究。后续的研究工作可利用其他分子标记, 如线粒体 DNA 序列全长、蛋白质编码基因或控制区序列, 以及核基因组中的微卫星标记进行基因渐渗研究。

4.2 川陕哲罗鲑不同种群个体差异原因推测

本研究中系统进化分析表明, 长期的地理隔离与不同的环境因子导致太白河川陕哲罗鲑样本与玛珂河样本各自聚为一类, 呈现出一定的遗传分化; 且太白河川陕哲罗鲑种群数量极度稀少, 而该物种又极为珍贵, 因此要在不伤害鱼体的情况下采集活体样本极为困难。此外, 个体小的样本相较于个体大的更容易获得。因此推测上述两点可能是造成两个分布区所获得的川陕哲罗鲑样本个体出现差别的主要原因。

5 小结

本实验通过线粒体 DNA 序列中进化速率较快的 *CYTB* 基因片段, 研究了陕西太白河川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑两个种群的基因杂交渐渗问题。结果发现, 在所研究

的基因片段中，两个种群遗传距离较远，二者没有相互被基因渗入。由此推测，不同地区的川陕哲罗鲑个体大小的区别可能是由于环境因子导致的遗传分化或者人为因素导致的采样误差所造成，而非被秦岭细鳞鲑基因渗入所影响。

第六章 川陕哲罗鲑分子系统发育研究

1 前言

哲罗鲑属 (*Hucho*) 是冷水性的淡水肉食性洄游鱼类, 分布十分广泛, 分布区囊括欧亚大陆 (图 6-1): 多瑙哲罗鲑 (*Hucho hucho*) 主要分布于欧洲的多瑙河流域; 太门哲罗鲑 (*Hucho taimen*) 主要分布于我国黑龙江、图们江和额尔齐斯河等水系、俄罗斯西伯利亚的勒拿河到伯朝拉河以及东欧的伏尔加河与乌拉尔河上游等河流以及蒙古和哈萨克斯坦; 川陕哲罗鲑 (*Hucho bleekeri*) 主要分布于我国岷江、大渡河、嘉陵江等上游, 及秦岭南麓太白河、渭水河; 石川哲罗鲑 (*Hucho ishikawae*) 主要分布于我国和朝鲜鸭绿江上游; 远东哲罗鲑 (*Hucho perryi*) 则主要分布于西北太平洋包括俄罗斯库页岛和日本北海道以及远东部分地区 (董崇智等, 1998)。川陕哲罗鲑、石川哲罗鲑与太门哲罗鲑在我国境内有分布, 其中川陕哲罗鲑为我国特有物种。哲罗鲑属是研究地质历史、动物地理学与鱼类系统发育的极为有效的物种。近年来由于气候变化、环境污染以及人类活动的影响, 哲罗鲑属资源量大幅度降低, 处于濒危状态, 至 2013 年, 本属 5 个种已全部被世界自然保护联盟 (International Union for Conservation of Nature, IUCN) 列入濒危动物红皮书 (IUCN red list) 中。除石川哲罗鲑被定为“数据缺失 (Data Deficient, DD)”外, 其他 4 个物种皆被定为“易危 (Vulnerable, VU)”、“濒危 (Endangered, EN)”或“极度濒危 (Critically Endangered, CR)” (Rand, 2013)。

20 世纪 70 年代, 伴随着对 mtDNA 的逐渐认识及其研究方法的不断成熟, 利用分子生物技术对系统发育系统学进行探讨开始酝酿发展, 并形成了一门新兴学科——分子系统学。高等动物体内, mtDNA 以其母系遗传特性、几乎无重组现象、进化速率快等显著优点, 使其成为在微进化水平上探讨系统发育关系时具有很强的优势, 其研究方法主要有 RFLP 和测序分析两种。关于哲罗鲑属部分种类的系统发育和地理过程已有较多研究。Oleinik et al. (2008) 运用 RFLP 技术, 利用 mtDNA 片段分析了库页岛远东哲罗鲑的系统发育关系, 发现其单倍型和核苷酸多态性偏低, 有效种群大小减少, 出现了随即遗传漂变。远东哲罗鲑与太门哲罗鲑的 mtDNA 片段差异率为 14.6%, 和细鳞鲑为 14.2%, 而太门哲罗鲑与细鳞鲑之间的遗传差异仅为 7.7%。Crête-Lafrenière et al. (2012) 利用 mtDNA 片段通过不同模型构建了鲑科部分鱼类的系统发育关系, 其中包括哲罗鲑属的太门哲罗鲑、多瑙哲罗鲑与远东哲罗鲑。该研究表明, 不同模型下远东哲罗鲑与其他几种哲罗鲑均分化显著, 与太平洋鲑属和红点鲑

属分支较为接近，但不同模型下远东哲罗鲑与太平洋鲑属和红点鲑属分支的具体聚类却呈明显不同。与 Crête-Lafrenière 的研究结果类似的是，Shedko et al. (2013) 也发现远东哲罗鲑则在系统进化分析中其分类地位呈现出不稳定的状态。

在分子生态学研究，种群分化时间的估算十分重要，它可以确定与种群遗传聚类模式相关的历史事件。Marić et al. (2014) 利用 mtDNA 片段对伏尔加河流域的太门哲罗鲑和多瑙哲罗鲑、川陕哲罗鲑进行分析，发现欧洲太门哲罗鲑种群起源于西伯利亚种群晚更新世的扩散，而不是由多瑙哲罗鲑分化而来。而关于川陕哲罗鲑的生物地理过程则出现了两种不同的说法。李思忠 (1984) 认为川陕哲罗鲑是第四纪冰川时期经日本海南迁的北方残留鱼类，冰期结束后停留在海拔较高、水温较低的河流中生存下来，并逐渐形成新的物种。目前大多数学者都沿用了此观点。杜汉斌 (2012) 则持有不同观点，他根据 mtDNA 片段的分子钟信息推测，分布于秦岭南侧的川陕哲罗鲑可能是第三纪期间扩散到此的。由于线粒体 DNA 序列中不同片段进化速率不同，因此，本研究采用线粒体序列全长和 13 个蛋白质编码基因拼接序列，根据核苷酸碱基突变率来推断哲罗鲑属隔离年代。

基于上述研究，本文拟通过已公开的哲罗鲑属 mtDNA 序列全长和 13 个蛋白质基因拼接序列对该属系统进化与分化时间进行全面地分析，确定川陕哲罗鲑的系统发育位置，旨在为川陕哲罗鲑在哲罗鲑属内与其他物种之间的亲缘关系及分化时间等提供基础研究资料。



图 6-1 哲罗鲑属分布区

红色区域：川陕哲罗鲑分布区；蓝色区域：石川哲罗鲑分布区；橙色区域：远东哲罗鲑分布区；
黄色区域：太门哲罗鲑分布区；黑色区域：多瑙哲罗鲑分布区

Fig. 6-1 The distribution area of *Hucho*

Red area: *Hucho bleekeri*; Blue area: *Hucho ishikawae*; Orange area: *Hucho perryi*; Yellow area: *Hucho taimen*; Black area: *Hucho hucho*

2 材料与方法

2.1 实验材料

从 GenBank 上下载已发表的哲罗鲑属 4 个种和其他 9 属 21 种鲑科鱼类的线粒体 DNA 序列全长, 同时下载鲑科鱼类红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 和斑点绿河鲀 (*Tetraodon nigroviridis*) 线粒体 DNA 序列全长, 作为外类群分析。具体种、属、GenBank 登录号以及哲罗鲑属采样点等信息见表 6-1。

表 6-1 GenBank 部分鲑科鱼类线粒体 DNA 序列信息及哲罗鲑属采样点

Tab. 6-1 List of fish species examined with Genbank accession numbers of mtDNA sequences and sampling sites of *Hucho*

编号	登录号	种	属	采样点
Number	Accession NO.	Species	Genus	Sampling site
Hbl1	HM804473	<i>H. bleekeri</i>	<i>Hucho</i>	玛柯河
Hbl2	KF908853	<i>H. bleekeri</i>	<i>Hucho</i>	太白河
Hhu	KM588351	<i>H. hucho</i>	<i>Hucho</i>	多瑙河
Hta1	HQ897271	<i>H. taimen</i>	<i>Hucho</i>	乌苏里江
Hta2	KJ711550	<i>H. taimen</i>	<i>Hucho</i>	黑龙江
Hta3	KJ711549	<i>H. taimen</i>	<i>Hucho</i>	黑龙江
Hpe	KC897653	<i>H. perryi</i>	<i>Hucho</i>	库页岛
Ble	JQ686730	<i>B. lenok</i>	<i>Brachymystax</i>	-
Blet	JQ686731	<i>B. lenok tsinlingensis</i>	<i>Brachymystax</i>	-
Btu	KJ730525	<i>B. tumensis</i>	<i>Brachymystax</i>	-
Ssa	KF792729	<i>S. salar</i>	<i>Salmo</i>	-
Strt	AM910409	<i>S. trutta trutta</i>	<i>Salmo</i>	-
Strf	KT633607	<i>S. trutta fario</i>	<i>Salmo</i>	-
Sle	NC_022844	<i>S. leucomaenis</i>	<i>Salvelinus</i>	-

Sfo	NC_000860	<i>S. fontinalis</i>	<i>Salvelinus</i>	-
Sal	NC_000861	<i>S. alpinus</i>	<i>Salvelinus</i>	-
Omy	DQ288268	<i>O. mykiss</i>	<i>Oncorhynchus</i>	-
Ocl	NC_006897	<i>O. clarkii</i>	<i>Oncorhynchus</i>	-
Ogo	NC_010959	<i>O. gorbusha</i>	<i>Oncorhynchus</i>	-
Cmu	NC_028593	<i>C. muksun</i>	<i>Coregonus</i>	-
Cus	KM210289	<i>C. ussuriensis</i>	<i>Coregonus</i>	-
Cau	NC_027277	<i>C. autumnalis</i>	<i>Coregonus</i>	-
Pcy	NC_020764	<i>P. cylindraceum</i>	<i>Prosopium</i>	-
Pwi	NC_020763	<i>P. williamsoni</i>	<i>Prosopium</i>	-
Stle	NC_020761	<i>S. leucichthys</i>	<i>Stenodus</i>	-
Tth	NC_012928	<i>T. thymallus</i>	<i>Thymallus</i>	-
Tya	NC_027410	<i>T. yaluensis</i>	<i>Thymallus</i>	-
Tpa	NC_027408	<i>T. pallasii</i>	<i>Thymallus</i>	-
Tru	NC_004299	<i>T. rubripes</i>	<i>Takifugu</i>	-
Tni	NC_007176	<i>T. nigroviridis</i>	<i>Tetraodon</i>	-

2.2 分析方法

2.2.1 基于线粒体 DNA 全序列和 13 个蛋白质编码基因的哲罗鲑属分子系统进化分析

利用 MEGA v. 5 软件基于 Kimura 2-Parameter (K-2P) 双参数模型计算所选鲑科鱼类与外类群线粒体 DNA 序列全长和 13 个蛋白质编码基因拼接序列之间的遗传距离, 采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 和最大似然法 (Maximum-Likelihood, ML) 分别构建有外类群和无外类群的系统进化树进行聚类分析 (1000 次迭代)。

2.2.2 基于线粒体 DNA 序列全长和 13 个蛋白质编码基因的哲罗鲑属分化年代分析

基于线粒体 DNA 序列全长和 13 个蛋白质编码基因拼接序列对哲罗鲑属分化进行分析。利用 MEGA 软件基于 Kimura 2-Parameter (K-2P) 模型计算两两物种间的遗传距离 (Pairwise distances) (Kimura, 1980)。与哲罗鲑属鱼类处于同一生境的

鲑科茴鱼属(*Thymallus*)鱼类线粒体 DNA 碱基突变率约为每百万年 1%(Meraner and Gandolfi, 2012), 因此本研究使用 1%/Ma 来估算哲罗鲑属分化时间。

3 结果

3.1 基于线粒体 DNA 序列全长和 13 个蛋白质编码基因的哲罗鲑属分子系统发育位置

利用部分鲑科鱼类的线粒体 DNA 序列全长进行系统进化分析, 基于 ML 和 NJ 模型构建的含外类群和无外类群系统进化树基本一致。因此使用外类群分析结果作 ML 系统进化树图。结果如图 6-2 所示, 大部分节点的后验概率大于 95%。

系统进化分析结果显示: 哲罗鲑属中, 川陕哲罗鲑与多瑙哲罗鲑和太门哲罗鲑聚为一类, 其中多瑙哲罗鲑和太门哲罗鲑遗传距离更为接近。川陕哲罗鲑的分支中, 不同采样点的川陕哲罗鲑表现出明显的遗传分化。远东哲罗鲑与其他哲罗鲑遗传距离较远, 而与红点鲑属的分支聚为一类。其他三种哲罗鲑则表现出较近的遗传距离, 三者聚为一类, 进化分支与细鳞鲑属分支更为接近。

利用 13 个蛋白质编码基因拼接序列作 ML 系统进化树(含外类群), 结果如图 6-3 所示, 该进化树与利用线粒体 DNA 序列全长所建的系统进化树基本一致。但在此分析中, 川陕哲罗鲑与多瑙哲罗鲑的遗传距离更为接近, 而非线粒体 DNA 序列全长分析所表现出的多瑙哲罗鲑与太门哲罗鲑更为接近。

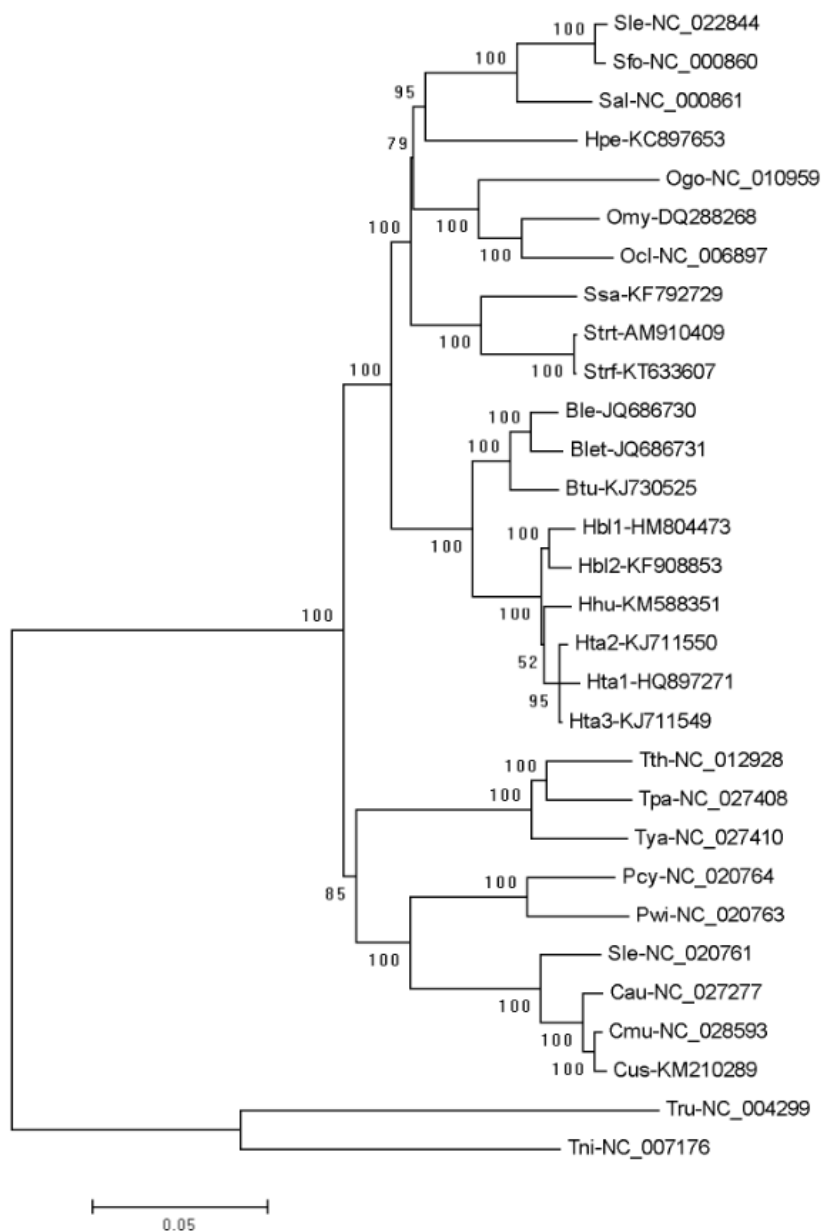


图 6-2 基于线粒体 DNA 全长的部分鲑科鱼类系统进化树（含外类群）

Fig. 6-2 Phylogenetic trees of Salmonidae based on mtDNA complete sequences (with outgroup)

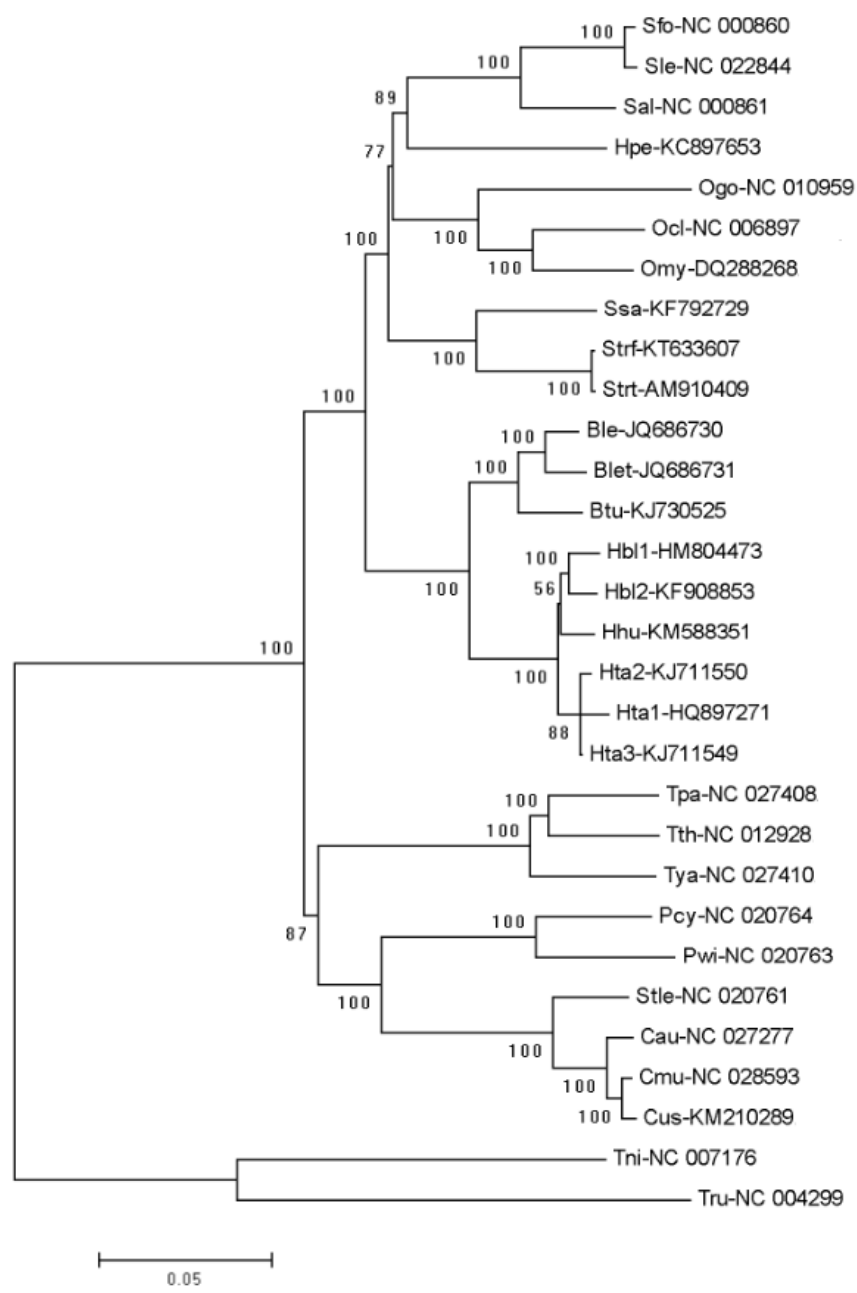


图 6-3 基于线粒体 13 个蛋白质编码基因拼接序列的部分鲑科鱼类系统进化树（含外类群）

Fig. 6-3 Phylogenetic trees of Salmonidae based on mtDNA 13 protein-coding genes sequences (with outgroup)

3.2 基于线粒体 DNA 序列全长和 13 个蛋白质编码基因的哲罗鲑属分化年代推断

基于线粒体 DNA 序列全长和 13 个蛋白质编码基因拼接序列的哲罗鲑属两两物种之间的碱基差异率运算结果与系统进化树分析基本一致。如表 6-2 与表 6-3 所示, 哲罗鲑属中, 远东哲罗鲑(Hpe)与红点鲑属碱基差异率最小(平均差异率为 0.095 ~ 0.119), 与其他几种哲罗鲑属鱼类基于线粒体 DNA 序列全长和 13 个蛋白质编码基因拼接序列的碱基平均差异率分别为 0.103 ~ 0.130 (Hta)、0.104 ~ 0.131 (Hhu) 以及 0.105 ~ 0.132 (Hbl), 平均差异率为 0.104 ~ 0.131。除远东哲罗鲑外的其他几种哲罗鲑中, 不同采样点(玛柯河与太白河)的川陕哲罗鲑(Hbl1 和 Hbl2)有一定的遗传分化(0.013 ~ 0.017); 川陕哲罗鲑与多瑙哲罗鲑之间的平均遗传差异率为 0.017 ~ 0.021; 川陕哲罗鲑与太门哲罗鲑之间的平均碱基差异率分别为 0.017 ~ 0.022; 多瑙哲罗鲑与太门哲罗鲑的平均碱基差异率分别则为 0.014 ~ 0.018。此外, 分布于黑龙江流域的细鳞鲑(Ble)与分布于秦岭地区的秦岭细鳞鲑(Blet)的平均碱基差异率为 0.017 ~ 0.022, 这与分布于黑龙江流域的太门哲罗鲑和分布于秦岭地区的川陕哲罗鲑的平均碱基差异率相符。

如图 6-4 所示, 根据鲑科鱼类线粒体 DNA 碱基进化速率为每百万年 1% 的分析结果表明: 远东哲罗鲑与其他三种哲罗鲑的隔离时间大约为 10.4 ~ 13.1 Ma; 川陕哲罗鲑同太门哲罗鲑以及多瑙哲罗鲑的隔离时间均约为 1.7 ~ 2.2 Ma, 其中玛柯河川陕哲罗鲑与黑龙江太门哲罗鲑的隔离时间约为 1.6 ~ 2.0 Ma, 太白河川陕哲罗鲑与黑龙江太门哲罗鲑的分化时间约在 1.5 ~ 1.9 Ma, 这说明分布于太白河的川陕哲罗鲑种群要早于分布于玛柯河种群与北方鲑科鱼类出现隔离分化; 多瑙哲罗鲑与太门哲罗鲑的隔离时间则约为 1.4 ~ 1.8 Ma。玛柯河川陕哲罗鲑与太白河川陕哲罗鲑之间的隔离时间约为 1.3 ~ 1.7 Ma。此外, 黑龙江流域的细鳞鲑与分布于秦岭的秦岭细鳞鲑之间的隔离时间大约为 1.7 ~ 2.2 Ma, 这与同样生境下的太门哲罗鲑和川陕哲罗鲑的分化年代相符。由此认为, 分布于秦岭地区的两种鲑科鱼类与分布于黑龙江流域的鲑科鱼类的分化年代大概处于第四纪更新世。

而由碱基差异率分析结果可以推断出, 哲罗鲑属中, 远东哲罗鲑最先与其他几种哲罗鲑相隔离。其次是川陕哲罗鲑与太门哲罗鲑和多瑙哲罗鲑隔离, 产生分化; 最后多瑙哲罗鲑与太门哲罗鲑发生隔离分化。

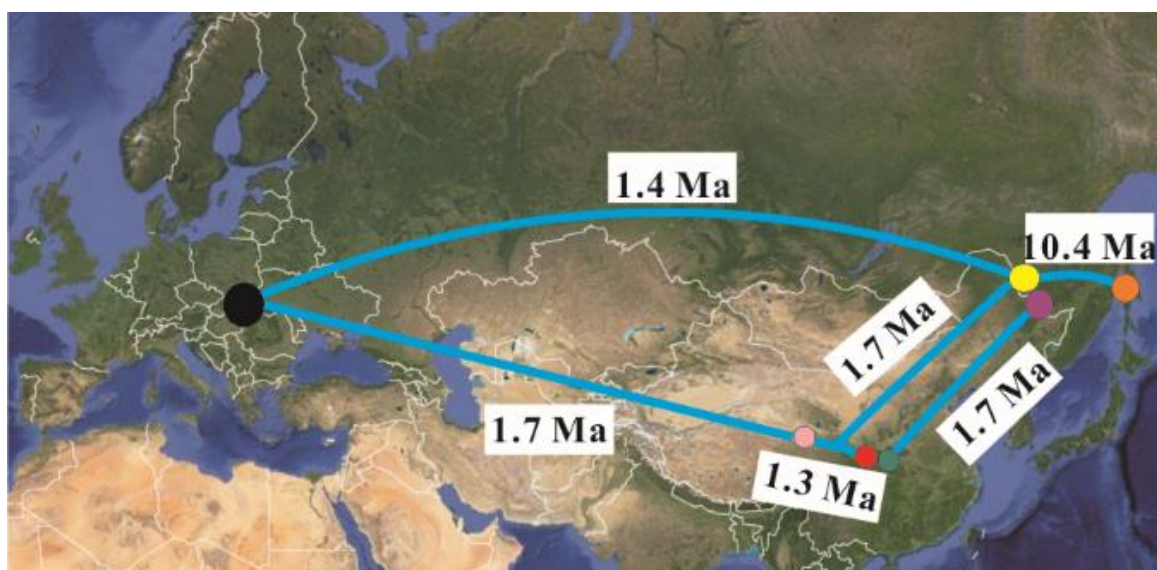


图 6-4 基于线粒体 DNA 序列全长的哲罗鲑属及细鳞鲑属分化年代推断图

红色点：太白河川陕哲罗鲑；粉色点：玛柯河川陕哲罗鲑；橙色点：日本海岸远东哲罗鲑；黄色点：黑龙江太门哲罗鲑；黑色点：多瑙河多瑙哲罗鲑；紫色点：黑龙江细鳞鲑；绿色点：太白河秦岭细鳞鲑

Fig. 6-4 The speculate map of divergence times based on mtDNA total-sequences for *Hucho* and *Brachymystax*

Red dot: *Hucho bleekeri* from Taibai River; Pink dot: *Hucho bleekeri* from Makehe River; Orange dot: *Hucho perryi* from Japan sea coast; Yellow dot: *Hucho taimen* from Heilongjiang River; Black area: *Hucho hucho* from Danube; Purple dot: *Brachymystax lenok* from Heilongjiang River; Green dot: *Brachymystax lenok tsinlingensis* from Taibai River

表 6-2 基于线粒体 DNA 全长的两两序列对比的碱基差异率（下）及其标准差（上）

Tab. 6-2 The number of base substitutions per site based on mtDNA total-sequence from between sequences (below) and their standard error estimates

		(above)														
	Hbl1	Hbl2	Hhu	Hta1	Hta2	Hta3	Hpe	Ble	Blet	Btu	Sle	Sfo	Sal	Omy	Ocl	Ogo
Hbl1		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.003	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003
Hbl2	0.013		0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.001	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
Hhu	0.017	0.016		0.001	0.001	0.001	0.003	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
Hta1	0.020	0.019	0.017		0.001	0.001	0.003	0.001	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
Hta2	0.016	0.015	0.013	0.007		0.001	0.003	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
Hta3	0.016	0.014	0.012	0.006	0.002		0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
Hpe	0.105	0.104	0.104	0.103	0.103	0.103		0.003	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.002	0.002	0.003
Ble	0.056	0.054	0.054	0.049	0.053	0.052	0.101		0.001	0.001	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
Blet	0.056	0.055	0.055	0.049	0.054	0.053	0.100	0.017		0.001	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
Btu	0.055	0.054	0.054	0.050	0.052	0.052	0.099	0.028	0.029		0.003	0.003	0.003	0.004	0.003	0.003
Sle	0.117	0.115	0.116	0.114	0.114	0.113	0.097	0.110	0.110	0.109		0.001	0.002	0.003	0.003	0.003
Sfo	0.117	0.115	0.116	0.114	0.114	0.113	0.098	0.110	0.109	0.109	0.007		0.002	0.003	0.003	0.003
Sal	0.117	0.108	0.108	0.107	0.108	0.107	0.091	0.106	0.104	0.104	0.047	0.047		0.003	0.003	0.003
Omy	0.116	0.115	0.115	0.114	0.114	0.113	0.100	0.111	0.112	0.110	0.108	0.108	0.105		0.002	0.003
Ocl	0.120	0.118	0.119	0.118	0.118	0.117	0.104	0.113	0.113	0.113	0.113	0.112	0.108	0.048		0.002
Ogo	0.130	0.128	0.129	0.127	0.128	0.127	0.117	0.122	0.124	0.124	0.126	0.125	0.121	0.083	0.084	

表 6-3 基于线粒体 13 个蛋白质编码基因拼接序列的两两序列对比的碱基差异率（下）及其标准差（上）

Tab. 6-3 The number of base substitutions per site based on mtDNA 13 protein-coding genes sequence from between sequences (below) and their standard error estimates (above)

	Hbl1	Hbl2	Hhu	Hta1	Hta2	Hta3	Hpe	Ble	Blet	Btu	Sle	Sfo	Sal	Omy	Ocl	Ogo
Hbl1		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.003	0.002	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004
Hbl2	0.017		0.001	0.002	0.001	0.001	0.003	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004
Hhu	0.021	0.021		0.001	0.001	0.001	0.003	0.002	0.002	0.003	0.004	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004
Hta1	0.026	0.026	0.023		0.001	0.001	0.003	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.004	0.005	0.004
Hta2	0.020	0.019	0.016	0.010		0.000	0.003	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004
Hta3	0.020	0.019	0.015	0.008	0.002		0.003	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004
Hpe	0.132	0.132	0.131	0.130	0.130	0.129		0.003	0.004	0.003	0.004	0.003	0.003	0.004	0.003	0.004
Ble	0.073	0.071	0.071	0.063	0.069	0.068	0.129		0.001	0.002	0.003	0.004	0.004	0.004	0.005	0.004
Blet	0.073	0.074	0.072	0.063	0.070	0.069	0.128	0.022		0.001	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005
Btu	0.073	0.072	0.071	0.063	0.069	0.068	0.126	0.037	0.038		0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
Sle	0.148	0.145	0.146	0.144	0.144	0.143	0.122	0.141	0.140	0.139		0.001	0.002	0.004	0.004	0.004
Sfo	0.148	0.145	0.146	0.143	0.144	0.142	0.123	0.141	0.139	0.138	0.007		0.002	0.004	0.004	0.004
Sal	0.137	0.135	0.135	0.134	0.135	0.133	0.113	0.135	0.132	0.131	0.062	0.060		0.004	0.004	0.005
Omy	0.148	0.147	0.147	0.145	0.145	0.143	0.126	0.142	0.144	0.141	0.138	0.137	0.133		0.002	0.003
Ocl	0.152	0.150	0.151	0.149	0.150	0.149	0.130	0.143	0.145	0.144	0.143	0.141	0.136	0.061		0.003
Ogo	0.162	0.160	0.160	0.158	0.159	0.158	0.142	0.151	0.154	0.154	0.154	0.155	0.149	0.103	0.103	

4 讨论

4.1 基于线粒体 DNA 的川陕哲罗鲑系统发育位置

关于鲑科鱼类分子系统发育的研究已有大量报道 (Oleinik et al., 2008; Crête-Lafrenière et al., 2012; Shedko et al., 2013)。这些研究均发现哲罗鲑属的远东哲罗鲑虽然形态与哲罗鲑属其他种类较为接近, 但是通过分子标记研究结果表明, 它的遗传距离与太平洋鲑属或红点鲑属鱼类更为接近。本文以线粒体 DNA 序列全长和 13 个蛋白质编码基因拼接序列对部分鲑科鱼类进行了系统进化分析, 构建了系统发育树, 结果发现远东哲罗鲑与红点鲑属物种的分支更为接近。Bruno et al. (2000) 认为系统发育树节点的后验概率大于 95% 的准确性较高。本实验研究结果的系统进化树大部分节点的后验概率大于 95%, 因此该聚类分析具有较高的可信度。由此, 我们认为, 远东哲罗鲑虽然形态与哲罗鲑属其他鱼类相似, 然而由于长期的隔离 (可能是地理隔离造成的), 其 DNA 水平上的遗传距离已经与其他哲罗鲑较远, 而与红点鲑属更为接近。川陕哲罗鲑、太门哲罗鲑与多瑙哲罗鲑等三种哲罗鲑构成的聚类分支与细鳞鲑属更为接近, 说明它们的遗传距离小。川陕哲罗鲑、太门哲罗鲑与多瑙哲罗鲑分支中, 基于线粒体 DNA 全长和蛋白质编码基因序列的分析结果表现出不一致: 基于线粒体 DNA 序列全长的分析结果表明川陕哲罗鲑首先与另外两种哲罗鲑分化; 而基于蛋白质编码基因序列分析结果表明太门哲罗鲑首先与另外两种哲罗鲑分化。结合碱基差异率分析, 我们认为川陕哲罗鲑的系统发育位置应该处于首先与太门哲罗鲑和多瑙哲罗鲑出现分化 (后验概率为 100)。不同采样点 (太白河与大渡河) 的川陕哲罗鲑各自为一个单系群 (后验概率为 100), 二者组合成为姐妹群, 这说明它们之间出现了遗传分化。

4.2 基于线粒体 DNA 的哲罗鲑属分化年代推断

地球地质历史上曾多次出现冰期, 北半球最近的一次冰期大约发生在第三纪末, 并延续到了第四纪, 两个纪之间的界线大约在 260 万年前 (2.6 Ma)。第四纪更新世的许多阶段, 冰覆盖了北美、欧洲北部和亚洲的许多部分, 对今天的地质、生物的分布具有重大的影响 (Cox and Moore, 2000)。第四纪的大冰川期距今约 200 万年, 它的发生是极地或高山地区沿地面运动的巨大冰体。

共和运动以来,青藏高原内部及其边缘地区普遍抬升,山体高度超过当时雪线,进而发育末次冰期冰川作用。秦岭山脉在地形上是我国西部高山区过渡为东部平原丘陵的桥梁,是长江、黄河两大水系的分水岭;在气候上是我国亚热带气候和暖温带气候的分界。滕志宏和王晓红(1996)研究发现,秦岭造山带新生代构造隆升是在中生代白垩纪晚期构造隆升的基础上,在晚第三纪中新世迅速隆升,并且早更新世早期是新构造活动最强烈的时期。太白山是秦岭的主峰,该地区存在晚第四纪以来的冰川作用遗迹。赵徐(2011)根据对太白山考察结果提出,太白山存在两次冰川作用,分别是末次冰期早期(约 11.5 万年前)和末次冰期盛期(约 2 万年前)。在新构造运动中,太白山地区隆起十分强烈,太白盆地形成于早更新世末期(2 Ma)。

本文研究结果表明,哲罗鲑属最早的分化大概在 10 ~ 13 Ma,属于晚第三纪上新世,处于冰期的开始阶段。其他三种哲罗鲑的分化年代则处于第四纪更新世。值得注意的是,分布于遥远的欧洲多瑙河流域的多瑙哲罗鲑与分布于黑龙江流域的太门哲罗鲑和分布于长江流域的川陕哲罗鲑,无论是遗传距离或是分化时间,都远小于分布于近在咫尺的远东哲罗鲑。类似的情况也出现在刘杰等(2015)对库页岛潮间沉积物细菌的系统发育研究中,在系统发育关系上,与韩国近海菌株相比,采自于库页岛的菌株与日本近海的菌株的遗传距离更为接近。因此可以推断,环绕着日本海的水域隔离要远早于欧亚大陆之间的淡水水域隔离。

地质学研究结果表明,欧洲多瑙河流域的地层与中国黄土高原的地层相似(Marković et al., 2015),并且是在第四纪更新世时期形成的。通过线粒体 DNA 分子标记研究的多瑙哲罗鲑与在我国黄土高原地区有分布的川陕哲罗鲑的分化年代的推断结果与地质学研究结果相符:分布于欧洲多瑙河流域的多瑙哲罗鲑与分布于我国的川陕哲罗鲑的隔离时间大约为 1.7 ~ 2.2 Ma,处于第四纪更新世。多瑙哲罗鲑与川陕哲罗鲑的隔离早于其与太门哲罗鲑的隔离(1.4 ~ 1.8 Ma)。

杜汉斌(2012)利用线粒体 DNA 控制区序列(835 bp)推测来自于黑龙江水域的细鳞鲑、太门哲罗鲑与来自于长江流域的秦岭细鳞鲑、川陕哲罗鲑的分化时间相似,都处于晚第三纪上新世。本研究在此基础上增加分析序列碱基长度,以线粒体 DNA 序列全长和 13 个蛋白质编码基因拼接序列进行推算,认为秦岭地区的两种鲑科鱼类与北方鲑科鱼类的分化时间约在 1.7 ~ 2.2 Ma,处于第四纪更新世,这与秦岭太白盆地的形成期相符。因此我们认为,分布于秦岭地区的川陕哲罗鲑和秦岭细鳞鲑是第四纪冰川时期扩散至此的,此结果与此前大多数研究者的认可一致(李思忠, 1984; 申志新等, 2006)。分布于太白河的川陕哲罗鲑与分布于玛柯河的川陕哲罗鲑同于更新世扩散至此,二者之间的分化时间约为 1.3 ~ 1.7 Ma,这说明两个群体在各自的分布区单独进化,二者之间基因交流较少,因此出现一定的遗传分化。

综上所述，我们推测：第三纪末至第四纪的冰川时期中，远东哲罗鲑随着日本海的隔离首先于晚第三纪上新世与其他哲罗鲑隔离；至第四纪更新世时期，川陕哲罗鲑与剩下两种哲罗鲑隔离，此后，不同地区的川陕哲罗鲑各自进化，它们之间发生遗传分化；最后，多瑙哲罗鲑与太门哲罗鲑出现隔离分化。

5 小结

（1）本文通过线粒体 DNA 序列全长和 13 个蛋白质编码基因拼接序列进行系统进化分析，确认了川陕哲罗鲑系统发育位置，认为其在哲罗鲑属中与多瑙哲罗鲑遗传距离最为接近，同时认为哲罗鲑属的远东哲罗鲑的分类学地位应该与红点鲑属最为接近。

（2）本文通过线粒体 DNA 序列全长和 13 个蛋白质编码基因拼接序列的碱基差异率对比分析，推断分布于秦岭地区的秦岭细鳞鲑与川陕哲罗鲑是第四纪更新世自北方扩散至此的。

全文结论

本文利用分子标记对川陕哲罗鲑种群遗传多样性进行了评估,建立了川陕哲罗鲑亲子鉴定方法;基于线粒体 DNA 标记检测了陕西省太白河川陕哲罗鲑种群是否存在基因渗入,同时对哲罗鲑属分子系统地理学进行了研究。全文主要有以下结论:

1 开发了川陕哲罗鲑 27 个新型多态微卫星标记,可适用于川陕哲罗鲑及其近缘物种的种群遗传学、亲缘关系鉴定、家系管理、人工繁育、增殖放流效果评估等后续研究。

2 利用微卫星 DNA 和线粒体 DNA (控制区序列 和 *CYTB* 基因) 分子标记对川陕哲罗鲑野生种群 (43 尾个体) 进行了遗传多样性和遗传结构研究。结果发现该种群的遗传多样性处于较低水平,群体遗传结构单一,不存在遗传分化。种群近期经历了严重的瓶颈效应,处于极度濒危状态。

3 利用微卫星 DNA 标记对川陕哲罗鲑养殖群体进行了遗传学评估,发现群体遗传多样性偏低,3 个家系间的遗传分化不明显。与野生种群相比,人工繁殖子一代群体遗传多样性明显更低。利用多态微卫星 DNA 标记建立了川陕哲罗鲑亲子鉴定技术,14 个微卫星位点的累积非亲排除概率为 99.99957%,该亲子鉴定技术可用于后期的川陕哲罗鲑家系管理的指导和人工增殖放流效果的评估。

4 利用线粒体 DNA 片段对秦岭地区的川陕哲罗鲑与秦岭细鳞鲑进行了种群基因渐渗研究,发现二者之间没有共同单倍型。聚类分析表明两个种群之间遗传距离较远。结果说明这两种同生境下生存的鲑科鱼类在线粒体 DNA *CYTB* 基因片段中没有互相基因渗入。

5 利用线粒体 DNA 全长和 13 个蛋白质编码基因拼接序列研究了哲罗鲑属分子系统地理学。系统进化树结果确认了远东哲罗鲑与红点鲑属分支最为接近。其他三种哲罗鲑聚为一类,且该分支与细鳞鲑属分支相近,该分支中多瑙哲罗鲑与太门哲罗鲑遗传距离接近,二者与川陕哲罗鲑遗传距离较远。远东哲罗鲑与其他三种哲罗鲑的分化时间大约处于第三纪上新世。分布于秦岭地区的两种鲑科鱼类 (川陕哲罗鲑和秦岭细鳞鲑) 与北方的鲑科鱼类 (太门哲罗鲑和细鳞鲑) 分化年代大约在 1.7 ~ 2.2 Ma,有可能是第四纪更新世从北方南迁并定居于此的。

全文创新点

1 首次开发了川陕哲罗鲑多态微卫星引物，建立了亲子鉴定方法，为川陕哲罗鲑家系管理及人工繁育提供了理论基础。

2 首次通过分子标记评估了川陕哲罗鲑野生种群与人工繁殖子一代群体的遗传多样性，了解了其遗传特征动态，为川陕哲罗鲑保护遗传学提供了理论依据。

3 首次利用线粒体 DNA 标记检测了川陕哲罗鲑物种的遗传分化，并证明了分布于太白河的川陕哲罗鲑种群在线粒体 DNA *CYTb* 基因片段内没有被同生境的秦岭细鳞鲑基因渗入。

参考文献

- [1] Aljanabi S M, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(22): 4692-4693
- [2] Anderson E, Hubricht L. Hybridization in *Tradescantia*. III. The evidence for introgressive hybridization[J]. American Journal of Botany, 1938, 25: 396-402
- [3] Aquadro C F, Greenberg B D. Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals[J]. Genetics, 1983, 103: 287-312
- [4] Arkush K D, Giese A R, Mendonca H L, et al. Resistance to three pathogens in the endangered winter-run Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): effects of inbreeding and major histocompatibility complex genotypes[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2002, 59(6): 966-975
- [5] Arts K, Fischer A, Wal R. Boundaries of the wolf and the wild: a conceptual examination of the relationship between rewilding and animal reintroduction[J]. Restoration Ecology, 2016, 24(1): 27-34
- [6] Avise J C. Molecular markers: natural history and evolution[M]. New York: Chapman & Hall, 1994
- [7] Avise J C, Gidlin D C, Laerm J. Mitochondrial DNA clones and matrilineal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 1979, 76: 6694-6698
- [8] Avise J C, Saunders N C. Hybridization and introgression among species of sunfish (*Lepomis*): analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers[J]. Genetics, 1984, 108: 237-255
- [9] Balakirev E S, Romanov N S, Mikheev P B, et al. Mitochondrial DNA Variation and Introgression in Siberian Taimen *Hucho taimen*[J]. Plos One, 2013, 8(8): 1-10
- [10] Bridge D, Cunningham C W, Schierwater B, et al. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure[J]. Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(18): 8750-8753
- [11] Brown R P, Pestano J. Phylogeography of skinks (*Chalcides*) in the Canary Islands inferred from mitochondrial DNA sequences[J]. Molecular Ecology, 1998(7): 1183-1191
- [12] Bruno W J, Succi N D, Halpern A L. Weighted neighbor joining: A likelihood-based approach distance-based phylogeny reconstruction[J]. Molecular Biology and Evolution, 2000, 17(1): 189-197

- [13] Christie M R, Marine M L, French R A, et al. Genetic adaptation to captivity can occur in a single generation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(1): 238-242
- [14] Clayto D A. Replication of animal mitochondrial DNA[J]. Cell, 1982, 28(4): 693-709
- [15] Clewley J P, Arnold C. MEGALIGN. The multiple alignment module of LASERGENE[J]. Methods in Molecular Biology, 1997, 70: 119-129
- [16] Cornuet J, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data[J]. Genetics, 1996, 144: 2001-2014
- [17] Cox C B, Moore P D. Biogeography: an ecological and evolutionary approach[M]. Oxford: Blackwell Science , Ltd., 2000
- [18] Crespi B J, Fulton M J. Molecular systematics of Salmonidae: combined nuclear data yields a robust phylogeny[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 31: 658-679
- [19] Cr êe-Lafreni ère A, Weir L K, Bernatchez L. Framing the Salmonidae family phylogenetic portrait: A more complete picture from increased taxon sampling[J]. Plos One, 2012, 7(10): e46662
- [20] Currat M, Ruedi M, Petit R J, et al. The hidden side of invasions: massive introgression by local genes[J]. Evolution, 2008, 62: 1908-1920
- [21] Esteve M, Gilroy D, McLennan DD A. Spawning behavior of taimen (*Hucho taimen*) from the Uur River, Northern Mongolia[J]. Environmental Biology of Fishes, 2009, 84: 185-189
- [22] Esteve M, McLennan D A. Spawning behavior of lenok, *Brachymystax lenok* (Salmoniformes) from the Uur River, North Mongolia[J]. Journal of Ichthyology, 2008, 48: 1031-1036
- [23] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study[J]. Molecular Ecology, 2005, 14(8): 2611-2620
- [24] Excoffier L, Lischer H E. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. Molecular Ecology Resources, 2010, 10(3): 564-567
- [25] Feral J P. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? [J]. Journal of experimental marine biology and ecology, 2002, 268(2): 121-145
- [26] Fitch W and Margoliash E. Construction of phylogenetic trees[J]. Science, 1967, 155: 279-284
- [27] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. Introduction to Conservation Genetics[M]. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2002
- [28] Froufe E, Alekseyev S, Knizhin I, et al. Comparative phylogeography of salmonid fishes (Salmonidae) reveals late to post-Pleistocene exchange between three now-disjunct river basins in Siberia[J]. Diversity and Distributions, 2003, 9(4): 269-282

- [29] Froufe E, Alekseyev S, Knizhin I, et al. Comparative mtDNA sequence (control region, ATPase6 and NADH-1) divergence in *Hucho taimen* (Pallas) across four Siberian river basins[J]. Journal of Fish Biology, 2005, 67: 1040-1053
- [30] 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]. Molecular Ecology Notes, 2004, 4: 150-152
- [31] Fu Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection[J]. Genetics, 1997, 147(2): 915-925
- [32] Garza J C, Williamson E G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci[J]. Molecular Ecology, 2001, 10: 305-318
- [33] Geist J, Kolahsa M, Gum B, et al. The importance of genetic cluster recognition for the conservation of migratory fish species: the example of the endangered European huchen *Hucho hucho* (L.)[J]. Journal of Fish Biology, 2009, 75: 1063-1078
- [34] Gubitz T, Thorpe R S, Malhotra A. Phylogeography and natural selection in the Tenerife gecko *Tarentola delalandii*: testing historical and adaptive hypotheses[J]. Molecular Ecology, 2000, 9(9): 1213-1221
- [35] Hayes J P, Guffey S Z, Kriegler F J, et al. The genetic diversity of native, stocked, and hybrid populations of brook in the southern *Appalachians*[J]. Conservation Biology, 1996, 10: 1403-1412
- [36] Holland M M, Parson W. GeneMarker (R) HID: A reliable software tool for the analysis of forensic STR data[J]. Journal of Forensic Sciences, 2011, 56(1): 29-35
- [37] Hou F, Zhang H, Wu B, et al. Characterization of microsatellite loci in *Schizopygopsis chengi chengi* and their utilization in assessment of the genetic diversity in *Schizopygopsis chengi baotingensis*[J]. Biochemical systematics and Ecology, 2013, 46: 50-54
- [38] Hu M, Wang Y, Cao L, et al. Threatened fishes of the world: *Hucho bleekeri* Kimura, 1934 (Salmonidae)[J]. Environmental Biology of Fishes, 2008, 82: 385-386
- [39] Hughes J M, Real K M, Marshall J C, et al. Extreme genetic structure in a small-bodied freshwater fish, the purple spotted gudgeon, *Mogurnda adspersa* (Eleotridae)[J]. Plos One, 2012, 7: 1-11
- [40] Hurles M E, Jobling M A. Haploid chromosomes in molecular ecology: lessons from the human Y[J]. Molecular Ecology, 2001, 10: 1599-1613
- [41] Jacob H J, Lindpaintner K, Lincoln S E, et al. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat[J]. Cell, 1991, 67: 213-224

- [42] Johnson H E, Mills L S, Wehausen J D, et al. Translating effects of inbreeding depression on component vital rates to overall population growth in endangered bighorn sheep[J]. Conservation Biology, 2011, 25(6): 1240-9
- [43] Johnson W E, Slattery J P, Eizirik E, et al. Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species[J]. Molecular Ecology, 1999(8): 579-594
- [44] Jones A G, Ardren W R. Methods of parentage analysis in natural populations[J]. Molecular Ecology, 2003, 12: 2511-2523
- [45] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. Molecular Ecology, 2007, 16(5): 1099-1106
- [46] Kashi Y, Lipkin E, Darvasi A, et al. Parentage identification in the bovine using deoxyribonucleic acid fingerprints[J]. Journal of Dairy Science, 1990, 73(11): 3306-3311
- [47] Khlestkina E K. Molecular markers in genetic studies and breeding[J]. Russian Journal of Genetics, 2014, 4(3): 236-244
- [48] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16: 111-120
- [49] Kimura S. Description of the fishes collected from the Yangtze-kiang, China, by the late Dr. K. Kishinouye and his party in 1927-1929[J]. Journal of the Shanghai Science Institute, 1934, 3(1): 23-25
- [50] Kuang Y Y, Tong G X, Xu W, et al. Analysis of genetic diversity in the endangered *Hucho taimen* from China[J]. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29: 92-97
- [51] Lalitha S. Primer Premier 5[J]. BioTech Software and Internet Report, 2000, 1(6): 270-272
- [52] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948
- [53] Leakey R, Lewin R. The sixth extinction[M]. London: Doubleday/Weidenfeld and Nicolson, 1995
- [54] Lee W J, Conroy J, Howefl W H, et al. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions[J]. Molecular Ecology, 1995, 41(1): 54-66
- [55] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25: 1451-1452
- [56] Lima P F, Ramos F N, Zucchi M I, et al. Development and characterization of microsatellite markers for *Psychotria tenuinervis* (Rubiaceae), a shrub species from the Atlantic forest, and primers transferability from *Coffea*[J]. Conservation Genetics, 2009, 10(6): 1883-1886

- [57] Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene[J]. American Journal of Human Genetics, 1989, 44(3): 397-401
- [58] Luikart G, Allendorf F, Cornuet J, et al. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks[J]. Journal of Heredity, 1998, 89: 238-247
- [59] Luikart G, England P E. Statistical analysis of microsatellite data[J]. Trends in Ecology and Evolution, 1999, 14: 253-256
- [60] Makoto H, Tomohisa W, Minoru I, et al. Isolation and characterization of microsatellite DNA loci for endangered fish, Japanese huchen (*Hucho perryi*)[J]. Molecular ecology notes, 2005, 5(4): 893-895
- [61] Marić S, Alekseyev S, Snoj A, et al. First mtDNA sequencing of Volga and Ob basin taimen *Hucho taimen*: European populations stem from a late Pleistocene expansion of *H. taimen* out of western Siberia and are not intermediate to *Hucho hucho*[J]. Journal of Fish Biology, 2014, 85: 530-539
- [62] Meraner A, Gandolfi A. Phylogeography of European grayling, *Thymallus thymallus* (Actinopterygii, Salmonidae), with the Northern Adriatic basin: evidence for native and exotic mitochondrial DNA lineages[J]. Hydrobiologia, 2012, 693: 205-221
- [63] Mowry R A, Schneider T M, Latch E K, et al. Genetics and the successful reintroduction of the Missouri river otter[J]. Animal Conservation, 2015, 18(2): 196-206
- [64] Necip O, Mikail A, Osman G, et al. Genetic diversity, population structure and linkage disequilibrium among watermelons based on peroxidase gene markers[J]. Scientia Horticulturae, 2014, 176: 151-161
- [65] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics, 1978, 89: 583-590
- [66] Oleinik A G, Skurikhina L A. Phylogenetic relationships of Sakhalin taimen *Parahucho perryi* inferred from PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA[J]. Russian Journal of Genetics, 2008, 44(7): 767-776
- [67] Osinov S G, Lebedev V S. Genetic divergence and phylogeny of the Salmoninae based on allozyme data[J]. Journal of Fish Biology, 2000, 57: 354-381
- [68] Pace N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere[J]. Science, 1997, 276: 734-740
- [69] Pante M J R, Gjerde B, McMillan I. Effect of inbreeding on body weight at harvest in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Aquaculture, 2001, 192(2-4): 201-211

- [70] Piry S, Luikart G, Cornuet J. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data[J]. Journal of Heredity, 1999, 90: 502-503
- [71] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data[J]. Genetics, 2000, 155: 945-959
- [72] Pusey A, Wolf M. Inbreeding avoidance in animals[J]. Trends in Ecology and Evolution, 1996, 11: 201-209
- [73] Radchenko O A. Introgressive hybridization of chars of the genus *Salvelinus* as inferred from mitochondrial DNA variation[J]. Russian Journal of Genetics, 2004, 40(12): 1392-1398
- [74] Raimond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism[J]. Journal of Heredity, 1995, 86: 248-249
- [75] Rand P S. Current global status of taimen and the need to implement aggressive conservation measures to avoid population and species-level extinction[J]. Archives of Polish Fisheries, 2013, 21: 119-128
- [76] Redenbach Z, Taylor E B. Zoogeographical implications of variation in mitochondrial DNA of Arctic grayling (*Thymallus arcticus*)[J]. Molecular Ecology, 1999(8): 23-25
- [77] Rosenberg NA. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure[J]. Molecular Ecology Notes, 2004, 4: 137-138
- [78] Saitou N, Imanishi T. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree[J]. Molecular Biology and Evolution, 1989, 6: 514-525
- [79] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4: 406-425
- [80] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd ed[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 344
- [81] Shedko S V, Miroshnichenko I L, Nemkova G A. Phylogeny of Salmonids (Salmoniformes: Salmonidae) and its Molecular Dating: Analysis of mtDNA Data[J]. Russian Journal of Genetics, 2013, 49(6): 623-637
- [82] Shedko S V. Phylogenetic relationships of lenok genus *Brachymystax* (Salmonidae, Salmoniformes) and features of their speciation[D]. Vladivostok: Russian Academy of Sciences, 2003
- [83] Si S, Wang Y, Xu G, et al. Complete mitochondrial genomes of two lenoks, *Brachymystax lenok* and *Brachymystax lenok tsinlingensis*[J]. Mitochondrial DNA, 2012, 23(5): 338-340

- [84] Sivaramakrishnan K G, Janarthanan S, Selvakumar C, et al. Aquatic insect conservation: A molecular genetic approach[J]. Conservation Genetics Resources, 2014, 6(4): 849-855
- [85] Skurikhina L A, Oleinik A G, Kukhlevsky A D, et al. Intraspecific polymorphism of mtDNA in Sakhalin Taimen *Parahucho perryi*[J]. Russian Journal of Genetics, 2013, 49(9): 924-936
- [86] Marković S B, Stevens T, Kukla G J, et al. Danube loess stratigraphy — Towards a pan-European loess stratigraphic model[J]. Earth-Science Reviews, 2015, 148: 228-258
- [87] Soltis D E. Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules[J]. American fern journal, 1983, 73(1): 9-27
- [88] Song Z. *Hucho bleekeri*. The IUCN Red List of Threatened Species 2012: 2012, e.T13151680A13151682
- [89] Svetlana Landjeva, Viktor Korzun, Andreas Börner. Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding[J]. Euphytica, 2007, 156: 271-296
- [90] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. Genetics, 1989, 123: 585-595
- [91] Talbot S L, Shields G F. Phylogeography of brown bears (*Ursus actors*) of Alaska and Paraphyly within the Ursidae[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1996, 5(3): 477-494
- [92] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28: 2731-2739
- [93] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17(16): 6463-6471
- [94] Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes[J]. Nucleic Acids Research, 1984, 12(10): 4127-4138
- [95] Tong G, Kuang Y, Yin J, et al. Isolation of microsatellite DNA and analysis on genetic diversity of endangered fish, *Hucho taimen* (Pallas)[J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6: 1099-1101
- [96] Vrijenhoek R C. Conservation genetics of freshwater fish[J]. Journal of Fish Biology, 1998, 53: 394-412
- [97] Wang K, Zhang S, Wang D, et al. Development of 27 novel cross-species microsatellite markers for the endangered *Hucho bleekeri* using next-generation sequencing technology[J]. Conservation Genetics Resources, 2015, 7(1) : 263-267
- [98] Wang X Q, Zhao L, Eaton D A R, et al. Identification of SNP markers for inferring phylogeny in temperate bamboos (Poaceae: Bambusoideae) using RAD sequencing[J]. Molecular Ecology Resources, 2013, 13(5): 938-945

- [99] Wang Y, Guo R, Li H, et al. The complete mitochondrial genome of the Sichuan taimen (*Hucho bleekeri*): Repetitive sequences in the control region and phylogenetic implications for Salmonidae[J]. Marine Genomics, 2011, 4: 221-228
- [100] Weir B S, Cockerham C C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure[J]. Evolution, 1984, 38: 1358-1370
- [101] Wiley E O, Johnson G D, Dimmick W W. The phylogenetic relationships of Lampridiform fishes (Teleostei: acanthomorpha), based on a total-evidence analysis of morphological and molecular data[J]. Molecular Phylogenetic and Evolution, 1998, 10(3): 417-425
- [102] Williams S E, Hoffman E A. Minimizing genetic adaptation in captive breeding programs: A review[J]. Biological Conservation, 2009, 142: 2388-2400
- [103] Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating[J]. Evolution, 1965, 19(3): 395-420
- [104] Woodworth L M, Montgomery M E, Briscoe D A, et al. Rapid genetic deterioration in captive populations: Causes and conservation implications[J]. Conservation Genetics, 2002, 3: 277-288
- [105] Yang L, Fu S, Khan M A, et al. Molecular cloning and development of RAPD-SCAR markers for Dimocarpus longan variety authentication[J]. SpringerPlus, 2013, 2(1): 501
- [106] Yeh F C, Boyle T, Yang R. POPGENE version 1.31. A Microsoft window based freeware for population genetic analysis[D]. Edmonton: Univerdity of Alberta, 1999
- [107] Young A, Boyle T, Brown T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants[J]. Tree, 1996, 11(10): 413-418
- [108] Zhang S, Wei Q, Du H, et al. The complete mitochondrial genome of the endangered *Hucho bleekeri* (Salmonidae: huchen)[J]. Mitochondrial DNA, 2014, 27: 124-125
- [109] Zhckerkandl E and Pauling L. Evolutionary divergence and convergence in proteins[M]. New York: Academic Press, 1965: 97-166
- [110] 成为为. 胭脂鱼种群遗传多样性及家系管理研究[D].北京: 中国科学院大学, 2014
- [111] 邓小林. 玛可河水域川陕哲罗鲑的濒危原因与保护措施[J]. 甘肃农业, 2007, 6: 87-88
- [112] 丁瑞华, 桂林华, 李明, 等. 虎嘉鱼及其保护生物学[J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 2010, 28(2): 96-102
- [113] 董崇智, 李怀明, 赵春刚. 濒危名贵哲罗鱼保护生物学的研究 I. 哲罗鱼分布区域及其变化[J]. 水产学杂志, 1998, 11(1): 65-70
- [114] 杜浩, 李罗新, 危起伟, 等. 濒危物种川陕哲罗鲑在汉江上游太白河再发现[J]. 动物学杂志, 2014, 3: 414
- [115] 杜汉斌. 秦岭南北鲑科鱼类渊源质疑[J]. 河南水产, 2012, 2: 5-7

- [116] 高建伟. 应用微卫星 DNA 标记对延边圈养黑熊进行亲子鉴定和遗传多样性研究[D]. 延吉: 延边大学, 2012
- [117] 顾颖, 李超, 鲁翠云, 等. 建鲤 (*Cyprinus carpio* var. Jian) 微卫星 DNA 亲权鉴定[J]. 2012, 34(11): 1447-1455
- [118] 黄文达, 赵学勇, 赵昕, 等. 分子标记在种群遗传学研究中的应用[J]. 草业科学, 2010, 27(1): 115-120
- [119] 黄族豪, 刘迺发. 种群遗传学研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(31): 13490-13491
- [120] 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: 23-33
- [121] 李博, 潘文婷, 李康琴, 等. 三种常用亲本分析软件效率的比较——以鹅掌楸属树种控制授粉子代亲本分析为例[J]. 分子植物育种, 2013, 11(2): 241-248
- [122] 李建林, 唐永凯, 李红霞, 等. 6 个建鲤家系的遗传结构及不同亲缘关系个体间的遗传差异分析[J]. 大连海洋大学学报, 2013, 28(2): 166-170
- [123] 李俊兵. 广义鲤亚科鱼类分子系统发育研究以及多倍体进化[D]. 北京: 中国科学院大学, 2008
- [124] 李思忠. 中国鲑科鱼类地理分布的探讨[J]. 1984, 1: 34-38
- [125] 李献儒, 柳淑芳, 李达, 等. DNA 条形码在鲱形目鱼类物种鉴定和系统进化分析中的应用[J]. 中国水产科学, 2015, 6: 1133-1141
- [126] 立彦. 线粒体 DNA 的研究现状[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(7): 636-638
- [127] 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
- [128] 廖杰, 王中铎, 郭昱嵩, 等. 紫红笛鲷线粒体全序列与笛鲷属鱼类分化年代的贝叶斯分析[J]. 海洋科学, 2013, 37(1): 62-69
- [129] 刘博, 匡友谊, 佟广香, 等. 微卫星分析 9 个哲罗鱼野生群体的遗传多样性[J]. 动物学研究, 2011, 32(6): 597-604
- [130] 刘杰, 卜蒙蒙, 孙景, 等. 俄罗斯库页岛潮间带沉积物可培养细菌的系统发育多样性[J]. 海洋科学, 2015, 39(9): 69-76
- [131] 鲁翠云, 毛瑞鑫, 李鸥, 等. 鲤鱼三、四核苷酸重复微卫星座位的筛选及特征分析[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(6): 979-987
- [132] 骆慧. 达氏鲟微卫星分离及其亲子鉴定研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013
- [133] 马克平. 试论生物多样性的概念[J]. 生物多样性, 1993, 1(1): 20-22
- [134] 倪小伟. 浙江扬子鳄迁地保护种群的谱系构建和放归野外奠基种群的筛选[D]. 杭州: 浙江大学, 2012

- [135] 宁海龙, 李琦, 李文滨, 等. 大豆四向重组自交系群体遗传图谱的构建[J]. 大豆科学, 2015, 34(5): 776-781
- [136] 祁得林, 晁燕, 杨成, 等. 川陕哲罗鲑 *Cyt b* 基因克隆及其在鲑亚科中的系统发育关系[J]. 四川动物, 2009, 28(6): 805-809
- [137] 祁哲晨. 世界菝葜科(百合目)的分子系统发育及其生物地理学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013
- [138] 钱迎倩, 马克平. 生物多样性研究的原理与方法[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994: 13-140
- [139] 陕西省动物研究所, 中国科学院水生生物研究所, 兰州大学生物系. 秦岭鱼类志[M]. 北京: 科学出版社, 1987
- [140] 沈玉昌. 秦岭的地理概观[J]. 地理知识, 1954, 1-12: 347-350
- [141] 申志新, 唐文家, 李柯懋. 青海省玛柯河川陕哲罗鲑数量变动及原因分析[J]. 水利渔业, 2006, 26(1): 71-73
- [142] 师红雯. 白纹佛蝗和暗褐蝓螽线粒体基因组序列测定与分析[D]. 西安: 陕西师范大学, 2008
- [143] 苏军虎, 张艳萍, 娄忠玉, 等. 基于线粒体控制区序列的黄河上游厚唇裸重唇鱼种群遗传结构[J]. 生态学报, 2012, 32(13): 4191-4198
- [144] 孙啸, 陆祖宏, 谢建明. 生物信息学基础[M]. 北京: 清华大学出版社, 2005: 223
- [145] 滕志宏, 王晓红. 秦岭造山带新生代构造隆升与区域环境效应研究[J]. 陕西地质, 1996, 14(2): 33-42
- [146] 王凤, 张永泉, 尹家胜. 川陕哲罗鱼、太门哲罗鱼及石川哲罗鱼的生物学比较[J]. 水产学杂志, 2009, 22(1): 59-63
- [147] 王洪新. 植物繁育系统、遗传结构和遗传多样性的保护[J]. 生物多样性, 1996, 4(2): 92-96
- [148] 王俊, 匡友谊, 佟广香, 等. 哲罗鲑(♂)与细鳞鲑(♀)属间杂交不相容现象的 SSR 分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(1): 547-555
- [149] 王敏. 绒山羊 11 号染色体遗传连锁图谱的构建[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2011
- [150] 王亚馥, 戴灼华. 遗传学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 506
- [151] 王永飞, 马三梅, 刘翠平, 等. 遗传标记的发展和分子标记的检测技术[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2001, 29(6): 130-136
- [152] 王绪楨, 何舜平, 张涛. 秦岭西段鱼类多样性现状初报[J]. 生物多样性, 2000, 8(3): 312-313
- [153] 吴金明, 杨焕超, 王成友, 等. 不同开口饵料对川陕哲罗鲑仔鱼生长和存活的影响[J]. 四川动物, 2015, 5: 752-755
- [154] 吴万荣. 布氏哲罗鲑年龄与生长的初步研究[J]. 水产学报, 1987, 1: 37-44
- [155] 吴万荣. 大川河水生生物与虎嘉鱼的生态位[J]. 水产学杂志, 1989, 1: 23-33

- [156] 吴艳. 部分鸭群体遗传多样性的微卫星标记分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005
- [157] 武玉珍. 濒危鸟类褐马鸡遗传多样性及保护研究[D]. 太原: 山西大学, 2008
- [158] 肖莉莉, 黄原. 线粒体 DNA 复制及其调控[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(6): 435-441
- [159] 辛苗苗. 基于 SSR 的中华鲟亲子鉴定和遗传特性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2015
- [160] 薛超. 陕西陇县自然保护区秦岭细鳞鲑年龄与生长及其资源评估[D]. 北京: 中国科学院大学, 2013
- [161] 许凌雪, 匡友谊, 佟广香, 等. 哲罗鲑、细鳞鲑及杂交种 (哲罗鲑♀×细鳞鲑♂) 遗传结果的 SRAP 分析[J]. 江西农业大学学报, 2011, 33(6): 1187-1194
- [162] 许志强, 葛家春, 李跃华, 等. 四水系中华绒螯蟹天然群体遗传特征的微卫星标记分析[J]. 南京大学学报(自然科学), 2011, 47(1): 82-89
- [163] 薛小琦. 无双亲同胞关系鉴定 1 例[J]. 河南科技大学学报 (医学版), 2003, 21(3): 228-229
- [164] 薛镇宇, 黄尚务, 阎荣元. 黑龙江流域的细鳞鱼和哲罗鱼及其天然杂交种[J]. 水生生物学集刊, 1959, 2: 215-220
- [165] 闫路娜, 张德兴. 种群微卫星 DNA 分析中样本量对各种遗传多样性度量指标的影响[J]. 动物血包, 2004, 14(3): 279-290
- [166] 杨持. 生态学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 45
- [167] 杨德国, 危起伟, 李绪兴等. 秦岭渭水河太白段珍稀水生动物分布现状及保护对策[J]. 中国水产科学, 1999, 3: 124-126
- [168] 赵淑娟, 庞有志, 邓雯, 等. 河南大尾寒羊遗传资源与基因库的构建[J]. 河南农业科学, 2005, 5: 81-83
- [169] 赵徐. 长白山冰川发育与构造运动和气候特征的耦合研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2011
- [170] 张尚宏. 动物与植物线粒体基因组结构的差异——两种进化途径[J]. 动物学研究, 1995, 16(2): 132-145
- [171] 张书环. 日本血吸虫中间宿主——钉螺的种群遗传结构研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2012
- [172] 钟云. 川陕哲罗鲑人工繁殖首次获得成功[J]. 致富天地, 2013, 8: 78
- [173] 周仰璟, 吴万荣. 大川河虎嘉鱼产卵场条件及其产卵习性的初步研究[J]. 水生生物学报, 1987, 4: 375-383
- [174] 周仰璟, 吴万荣. 虎嘉鱼食性及食物消化的研究[J]. 鲢鳙渔业, 1990, 3(1): 67-72
- [175] 周仰璟, 吴万荣, 姚维志. 虎嘉鱼生物学研究[J]. 西南农业大学学报, 1994, 1: 72-75
- [176] 朱雪莲, 王志勇, 陈明茹. 系统地理学的研究及其在鱼类上的应用[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2006, 25(2): 183-199

致谢

——生命因书而苏醒，因搏而精彩

汪家有女初长成，从来书卷未离身。

寒窗一读二十载，而今岁满功将成。

五年风雨艰辛历，个中滋味感触深！

毕业论文已终稿，稿成篇末谢众恩：

一谢博导危老师，学高身正巧育人。

谆谆教诲长记忆，殷殷训导洗灵魂。

二谢硕导施老师，带我入得科研门。

慈言随风潜入夜，善语润物细无声。

三谢助研书环姐，亦师亦友情谊真。

寒冬酷暑细心教，大错小误耐心忍。

四谢副研汪老师，事常关切于躬身。

授业解惑常相助，传道术业多勤恳。

五谢濒危保护组，予我平台尽所能。

愿我师生齐协力，学术道阻共攀登。

六谢舍友多关爱，彼此便利对方心。

同出同入似姐妹，有欢有笑比金兰。

七谢朋友久相伴，山高水长友谊存。

知音融洽语绵意，谙律和谐见赤诚。

八谢父母倚闾里，全心全意我一人。

眷眷温情柔心房，拳拳赤子鉴乾坤。

九谢世间任其他，人是精灵聚慧根。

千言万语道不尽，澎湃豪情新航程！

本课题由公益性行业（农业）科研专项：“珍稀水生动物繁育与物种保护技术研究”（NO. 201203086）（危起伟）和农业部淡水生物多样性保护重点实验室开放课题（NO. LFBC0802）（杜浩）资助。在此表示感谢！

汪珂

2016/3/19 晨

攻读博士学位期间发表的学术论文

- 1 Ke Wang, Shuhuan Zhang, Dengqiang Wang, Miaomiao Xin, Jinming Wu, Qingliang Sun, Hao Du, Chengyou Wang, Jun Huang, Qiwei Wei. Development of 27 novel cross-species microsatellite markers for the endangered *Hucho bleekeri* using next-generation sequencing technology[J]. Conservation Genetics Resources, 2015(7): 263-267 (SCI, IF = 1.172) (论文第二章)
- 2 Ke Wang, Shuhuan Zhang, Dengqiang Wang, Jinming Wu, Chengyou Wang, Qiwei Wei. Conservation Genetics Assessment and Phylogenetic Relationships of Critically Endangered *Hucho bleekeri* in China[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2016, 32(2): 343-349 (SCI, IF = 0.867) (论文第三章)
- 3 Zhang Shuhuan, Wei Qiwei, Wang Ke, Du Hao, Xin Miaomiao, Wu Jinming. The complete mitochondrial genome of the endangered *Hucho hucho* (Salmonidae: Huchen). Mitochondrial DNA, 2014: 1-3 (SCI, IF = 1.209)
- 4 汪珂, 刘凯, 徐东坡, 段金荣, 张敏莹, 陈永进, 施炜纲. 鱼类早期资源研究进展[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(5): 1098-1107
- 5 辛苗苗, 张书环, 汪登强, 汪珂, 张磊, 霍来江, 危起伟. 多倍体中华鲟微卫星亲子鉴定体系的建立[J]. 淡水渔业, 2015, 4: 3-9

攻读博士学位期间获得的荣誉

- 1 2015 年: 南京农业大学 2015 年度研究生金善宝奖学金
- 2 2011 年: 南京农业大学 2011 年度“优秀研究生”二等奖学金