

绥芬河三块鱼属“银滩头”洄游群体的分子鉴定

赵雪飞, 梁利群, 黄晶, 孙博, 张立民, 常玉梅

Molecular identification of *Tribolodon* “silver beachhead” migratory population in Suifen River

ZHAO Xuefei, LIANG Liqun, HUANG Jing, SUN Bo, ZHANG Limin, CHANG Yumei

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20200903175>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[中国绥芬河三块鱼不同群体的种属划分及起源](#)

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

中国水产科学. 2018, 25(4): 811 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1118.2018.18056>

[基于地标点法的绥芬河绒螯蟹种群鉴定](#)

Landmark-Based Morphometric Identification of Mitten Crab *Eriocheir* from Suifen River

水产科学. 2021, 40(4): 501 <https://doi.org/10.16378/j.cnki.1003-1111.20016>

[滩头雅罗鱼幼鱼对 NaCl 浓度和碱度的适应性分析](#)

Adaptability of *Tribolodon brandti* (Dybowski) to NaCl concentration and alkalinity

中国水产科学. 2011, 18(3): 689 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1118.2011.00689>

[绥芬河大麻哈鱼个体生物学研究](#)

INDIVIDUAL BIOLOGY OF CHUM SALMON FROM SUIFEN RIVER

水生生物学报. 2020, 44(1): 162 <https://doi.org/10.7541/2020.019>

[长江口日本鳗鲡降海产卵洄游群体的银化指标研究](#)

SILVERING INDEXES FOR SPAWNING MIGRATORY POPULATION OF THE JAPANESE EEL *ANGUILLA JAPONICA* IN THE YANGTZE RIVER ESTUARY, CHINA

水生生物学报. 2019, 43(1): 133 <https://doi.org/10.7541/2019.017>

[长江刀鲚寄生的异钩棘虫分子鉴定及形态学研究](#)

Morphological and molecular identification of *Heteromazocraes* parasitizes in *Coilia nasus* of the Yangtze River

水产学报. 2013, 37(7): 1081 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1231.2013.38627>

文章编号: 1674-5566(2021)06-0951-09

DOI:10.12024/jsou.20200903175

绥芬河三块鱼属“银滩头”洄游群体的分子鉴定

赵雪飞^{1,2,3}, 梁利群^{1,2}, 黄晶^{1,2,4}, 孙博^{1,2}, 张立民^{1,2}, 常玉梅^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 淡水鱼类育种国家地方联合工程实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 黑龙江省特殊生境鱼类种质特性与抗逆育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070; 3. 东北林业大学 野生动物与自然保护地学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 4. 江苏海洋大学 海洋生命与水产学学院, 江苏 连云港 222000)

摘要: 绥芬河三块鱼属洄游群体中“银滩头”的分类地位一直存在争议。利用 DNA 条形码 *CO I* 和基因标记(*fst* 和 *mitfa*)分析相结合的方法,对采自我国绥芬河的珠星三块鱼(*Tribolodon hakonensis*, 40 尾)、三块鱼(*T. brandtii*, 38 尾)和“银滩头”(34 尾)及采自日本宇曾利山湖的珠星三块鱼(3 尾),共计 115 尾个体进行了种质鉴定。线粒体 *CO I* 基因扩增结果显示,共获得单倍型 11 种,其中,珠星三块鱼独享 5 种,三块鱼独享 5 种,珠星三块鱼日本群体独享 1 种(Hap6)，“银滩头”群体与珠星三块鱼共享 1 种,与三块鱼共享 3 种,聚类分析不支持“银滩头”群体为一个独立种。基因标记扩增结果显示,“银滩头”群体中兼具珠星三块鱼和三块鱼两种基因型。结合以上两种分析结果发现“银滩头”中存在珠星三块鱼与三块鱼的杂交个体。明确了“银滩头”群体的分类地位,即“银滩头”是由珠星三块鱼、三块鱼及二者的杂交个体组成的一个混合群体。研究结果为三块鱼属鱼类的分类、种质资源保护和野外增殖放流提供了科学依据。

关键词: 绥芬河; 银滩头; *CO I* 基因; 基因标记

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

三块鱼俗称滩头鱼,是雅罗鱼亚科三块鱼属(*Tribolodon*)几种土著经济种的统称^[1]。三块鱼是鲤科鱼类中唯一溯河洄游产卵的鱼类^[2],也是名贵的经济鱼类之一,在我国仅分布于图们江和绥芬河^[3]。

每年繁殖季节,绥芬河会有 3 个三块鱼群体分批溯河洄游至产卵场。第一批在 4 月初出现,体表有 3 条橘红色条纹;第二批在 5 月,体色为银白色,无明显婚姻色;第三批到达时间在 6 月,体表为黑色,体侧有一条橘红色条带。当地渔民根据 3 个群体不同婚姻色和洄游时间分别将其命名为“金滩头”、“银滩头”和“黑滩头”^[1,4]。目前我国学者^[3-7]已对不同洄游群体的生物学特性、性腺发育、人工繁殖、盐碱耐受性及种属划分等方面开展了一系列研究,但争议最大的还是这 3 种洄游群体的种属划分。任慕莲^[8]将其归类于

三块鱼(*Tribolodon brandtii*)的 3 个洄游群体;尹家胜等^[4]根据形态学测量结果和人工催产试验认为“银滩头”群体是成熟度较差的“黑滩头”,洄游群体只有“金滩头”和“黑滩头”2 个种群;张觉民^[9]和董崇智等^[10]根据形态学差异认为这 3 个洄游群体属于雅罗鱼属的两个种,即俗称“金滩头”的珠星雅罗鱼(*Leuciscus hakonensis*)和俗称“黑滩头”的滩头雅罗鱼(*Leuciscus brandtii*);陈宜瑜等^[11]根据鳞片基部是否具有放射肋口的位置及侧线鳞数,重新将滩头雅罗鱼和珠星雅罗鱼划分为三块鱼属的两个种;随后陈金平等^[12]与马波等^[13]利用分子标记和同工酶技术研究证实,洄游到我国绥芬河产卵的只有 2 个种群,即珠星三块鱼(*T. hakonensis*)和三块鱼(*T. brandtii*)。近期,常玉梅等^[1]利用 DNA 条形码技术,同时结合国外已发表的三块鱼属鱼类的序列,再次从分子的

收稿日期: 2020-09-14 修回日期: 2020-11-23

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFD0900405);中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD22);黑龙江省自然科学基金(LC2017017)

作者简介: 赵雪飞(1992—),女,博士研究生,研究方向为水环境生物学。E-mail: zhaoxuefei147741@163.com

通信作者: 常玉梅, E-mail: changyumei@hrfi.ac.cn

角度证实了绥芬河珠星三块鱼实为珠星三块鱼南方型(southern forms of *T. hakonensis*), 绥芬河三块鱼为三块鱼(*T. brandtii*), 至此, 俗称“金滩头”的珠星三块鱼和俗称“黑滩头”的三块鱼的分类地位已较为清晰。但对“银滩头”种群的分类地位一直没有明确的统一观点, 且缺乏充足的分类依据。

本研究采用 DNA 条形码(DNA barcoding)技术, 结合本研究开发的用于区分珠星三块鱼和三块鱼种质的 DNA 特异基因标记, 从 mtDNA 和核 DNA 水平对洄游至绥芬河的珠星三块鱼、三块鱼和“银滩头”进行分子鉴定, 以期为绥芬河三块鱼

属鱼类的种质鉴定、人工繁育和野外增殖放流提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2018年4—6月, 根据形态学与洄游时间的不同在黑龙江省东宁县绥芬河采集珠星三块鱼38尾、三块鱼40尾及“银滩头”34尾(图1); 珠星三块鱼日本群体3尾, 采自日本青森县宇曾利山湖(日本东京大学, KANEKO 教授惠赠)。共计115尾个体, 所有样本鳍条保存在体积分数为95%的乙醇中备用。



图1 3个洄游群体表型特征

Fig.1 Phenotypic characteristics of three migratory populations

1.2 基因组 DNA 的提取

剪取少量体积分数为95%乙醇保存的鳍条, 滤纸吸干后放入2 mL离心管中, 加入DNA提取裂解液600 μ L(成分: 1 mol/L Tris pH 8.0、5 mol/L NaCl、0.5 mol/L EDTA pH 8.0、10% SDS 和200 μ g/mL蛋白酶K)于55 $^{\circ}$ C过夜消化。翌日, 加入V(酚): V(氯仿) = 1:1混合液抽提1次, 12 000 r/min室温离心10 min, 吸取上清500 μ L, 加入无水乙醇1 mL沉淀, 12 000 r/min室温离心10 min, 弃液, 70%乙醇洗涤1次, 室温干燥10 min, 加入0.1 \times TE溶解。采用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的完整性, 采用Nanodrop 8000(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)测定样品的纯度和浓度后稀释至10 ng/ μ L, 于4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

1.3 线粒体 CO I 基因的引物来源及 PCR 扩增

线粒体 CO I 引物及扩增方法参考常玉梅等^[1]的报道。PCR扩增产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测后, 送至北京诺赛基因有限公司进行

测序。

1.4 体色调控相关基因的引物来源及 PCR 扩增

鉴于珠星三块鱼和三块鱼洄游产卵时具有不同婚姻色的特性, 从GenBank数据库中调取了 *melanocortin-1 receptor (MC1R)*、*Microphthalmia-associated transcription factor a (mitfa)*、*follicle-stimulating factor (fst)*、*coatamer protein complex, subunit zeta 1 (COPZ1)*、*panther(fms)* 和 *sparse(kit)* 等6个与鱼类体色调控相关基因的序列, 设计引物15对, 用野生珠星三块鱼和三块鱼各10个个体筛选鉴定, 获得能够有效区分珠星三块鱼和三块鱼种质的基因标记2个, 分别为 *fst* 和 *mitfa*, 具体引物信息见表1。

PCR反应体系同CO I基因扩增体系。反应程序为95 $^{\circ}$ C预变性3 min; 35个循环包括94 $^{\circ}$ C变性30 s, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 30 s; 最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min。PCR扩增产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 基因标记引物信息
Tab.1 Primer information of gene marker

基因名称 Gene name	引物序列(5'~3') Primer sequences (5'-3')	退火温度 Temperature /°C	片段大小 Length of products/bp	GenBank 登录号 GenBank Accession No.
<i>fst</i>	F:GGCTACAGCAAGGCAAGAAC R:ATGCATTTCCCTTCGTATGC	56	1 030 ~ 1 690	MG388101
<i>mitfa</i>	F:CTGGGGTTGACAAAGAATGCT R:TGGTGTGTTTCGTTTCTGCTG	56	170 ~ 1 920	XM_021476774

1.5 数据处理及分析

用 DNASTAR. Lasergene 7.1 中的 EditSeq 软件将测序所得序列文件转换成 fasta 格式,便于后续分析^[14]。采用 Clustal X 1.83 对 *CO I* 基因序列进行多重比对,获得对齐序列后,用 UltraEdit 26.20 截取获得相同长度的同源序列,然后用 DNA Sequence Polymorphism 5.10.01 分析序列单倍型情况^[15-16]。根据常玉梅等^[1]的报告,从 NCBI GenBank 数据库中下载已发表的三块鱼 *CO I* 序列,包括来自俄罗斯萨哈林和哈巴罗夫斯克的珠星三块鱼北方型(isolate 4F & 5F, EU392225.1 & EU392226.1)、俄罗斯滨海区的珠星三块鱼南方型(isolate Vkk, EU392224.1)、俄罗斯萨哈林的萨哈林三块鱼(EU392231.1 & EU392232.1)、俄罗斯滨海区的三块鱼(EU392229.1)和鄂霍次克海的 *T. nakamurai* (EU392230.1)共 7 条^[17]。将下载的序列与本研究中的 115 条序列合并后采用邻接法(Neighbor-

Joining)构建基于 Kimura 双参数模型(Kimura 2-parameter, K2P)的单倍型进化树,并经 1 000 次自展检验(Bootstrap),选用草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) *CO I* 基因相应片段(NC_010288.1)作为系统进化分析的外类群。

2 结果

2.1 “银滩头”的单倍型分析结果

CO I 基因扩增产物所得测序序列经过对比处理后,序列有效长度 633 bp,115 条有效序列共检测到 11 种单倍型(图 2),这些单倍型在 4 个采样群体中具体分布情况见表 2。其中:三块鱼特异单倍型有 5 种,为 Hap1 ~ Hap5;珠星三块鱼特异单倍型也有 5 种,为 Hap7 ~ Hap11;“银滩头”共有 4 种单倍型,其中有 12 个个体与三块鱼共享 3 种单倍型(Hap3、Hap4、Hap5),有 22 个个体与珠星三块鱼共享 1 种单倍型(Hap8);珠星三块鱼日本群体则独享 1 种单倍型(Hap6)。

```
Hap_1  GTCGTCTGACTCCTCTACAGGTACCGACGGTCTACGTAATAAACCAGGAGTCCCAATTACACAATTCAGATTTCCACTATAATCTCCTCAGTTGTTACGGACCGCGC
Hap_2  ..T..C...CT....TACAGGT.CC.A.....C...GTAA.T.AA..GC...G...A..TAC.CAA.T.A..T..C.A....A..T..T.AAT..T.A.GCG....GC
Hap_3  ..T..C...CT....TACAGGT.CC.A.....C...GTGA.T.AA..GC...G...A..TAC.CAA.T.C..A..T.A....A..T..T.AGT..T.A.GCG....GC
Hap_4  ..T..C...CT....TACAAGT.CC.A.....C...GTAA.T.AA..GC...G...A..TAC.CAA.T.A..T..C.A....A..T..T.AGT..T.A.GCG....GC
Hap_5  ..T..C...CT....TACAGGT.CC.A.....C...GTAA.T.AA..GC...G...A..TAC.CAA.T.A..T..C.A....A..T..T.AGT..T.A.GCG....GC
Hap_6  ..T..T...TC....CGTGGAC.TT.G.....T...AAGG.C.GG..GA...A...A..CAT.TAG.C.G..C..T.G....A..T..C.GGC..C.G.ACA....AT
Hap_7  ..T..T...TT....CATGGAC.TT.G.....T...AAGA.C.AA..AA...A...A..CTT.TGA.C.A..T..T.G....G..C..C.GGC..C.A.ATA....AC
Hap_8  ..T..T...TC....CATGGAC.TT.G.....T...AAGA.C.AA..AA...A...A..CTT.TAA.C.A..T..T.G....G..C..C.GGC..C.A.ATA....AC
Hap_9  ..T..T...TT....CATGGAC.TT.G.....T...AAGA.C.AA..AA...A...A..CTT.TAA.C.A..T..T.G....G..C..C.GGC..C.A.ATA....AC
Hap_10 ..T..T...TC....CATGGAC.TT.G.....T...GAGA.C.AA..AA...A...A..CTT.TAA.C.G..T..T.G....G..C..C.GGC..C.A.ATA....AC
Hap_11 ..T..T...TC....CATGGAC.TT.G.....T...AAGA.C.AA..AA...A...A..CTT.TAA.C.A..T..T.G....A..C..C.GGC..C.A.ATA....AC
```

图 2 *CO I* 基因在 4 个检测群体中的 11 种单倍型

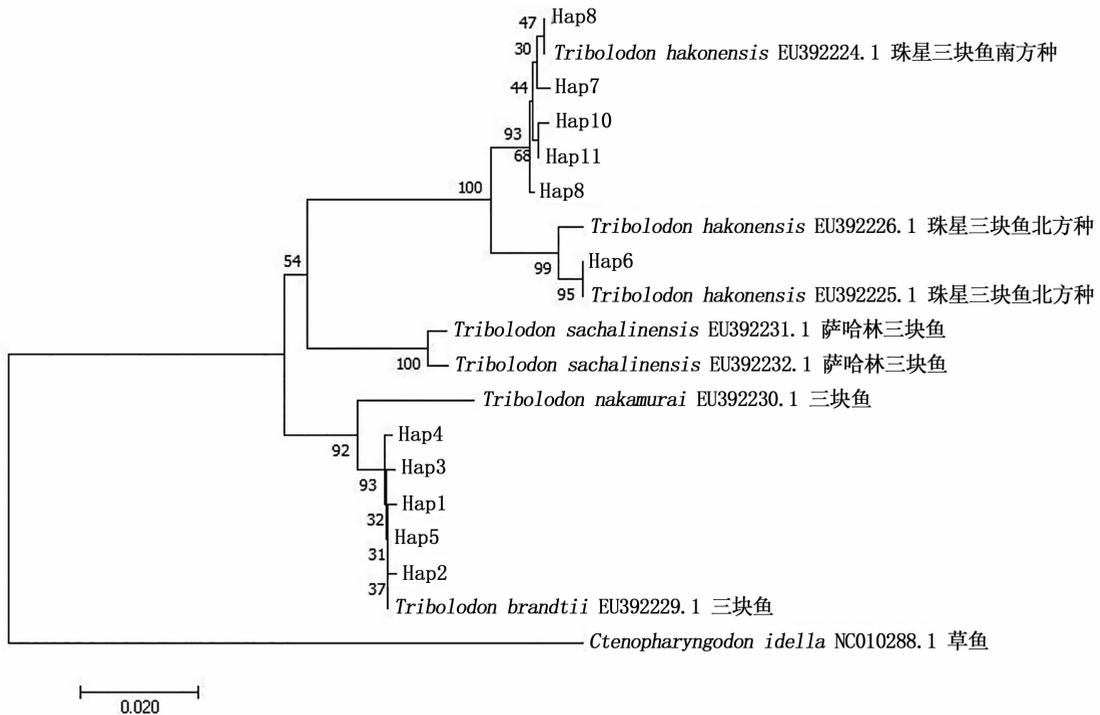
Fig.2 A total of 11 haplotypes of *CO I* gene in four different populations

表 2 11 种单倍型在各群体的分布
Tab. 2 Distribution of 11 haplotypes in each population

单倍型 Haplotype	珠星三块鱼 <i>Tribolodon hakonensis</i>	三块鱼 <i>Tribolodon brandtii</i>	“银滩头” “silver beachhead”	珠星三块鱼日本群体 <i>Tribolodon hakonensis</i>
Hap1		1		
Hap2		1		
Hap3	10	3		
Hap4		2	1	
Hap5		26	8	
Hap6				3
Hap7	1			
Hap8	34		22	
Hap9	1			
Hap10	1			
Hap11	1			
合计 Total number	38	40	34	3

将国外发表的三块鱼属鱼类的单倍型序列与本研究所得的 11 种单倍型序列合并,再次构建三块鱼属鱼类的系统进化关系图(图 3)。结果显示,系统进化树划分为两大分支,珠星三块鱼和三块鱼各占据 1 个大分支,其中:三块鱼特有的 5 种单倍型与俄罗斯滨海区的三块鱼单倍型 (EU392229) 及鄂霍次克海的 *T. nakamurai* 聚为 1

大支;珠星三块鱼特有的 5 种单倍型与珠星三块鱼南方型 (EU92224)、珠星三块鱼日本群体 (Hap6) 和珠星三块鱼北方型 (EU392225, EU392226) 及萨哈林三块鱼 (EU392231, EU392232) 3 个小分支聚为一大支。由于“银滩头”群体没有特异的单倍型,该聚类结果不支持“银滩头”为 1 个独立种。



节点上数字显示 1 000 次重复的 bootstrap 验证结果;标尺代表序列分歧度。

Bootstrap values in 1 000 replications are shown on branches; Scale represents the genetic divergence.

图 3 三块鱼属鱼类 CO I 基因单倍型的系统发育进化 NJ 树
Fig. 3 Neighbour-Joining tree of CO I gene in genus Tribolodon

2.2 “银滩头”的基因型分析结果

采用 2 个能有效区分珠星三块鱼和三块鱼的基因标记对所有“银滩头”进行了基因型分析,结果显示,2 个标记对所有个体的基因分型结果是一致的。

基因 *fst* 在珠星三块鱼和珠星三块鱼日本群体中只扩增出一条单带,而在三块鱼中扩增出两

条条带,其中一条与珠星三块鱼共享,另一条为三块鱼特有谱带。“银滩头”的扩增结果则介于珠星三块鱼和三块鱼之间,其中 24 个个体扩增出单一条带,基因型与珠星三块鱼相同,另外 10 个个体扩增出两条条带,与三块鱼基因型一致(图 4)。

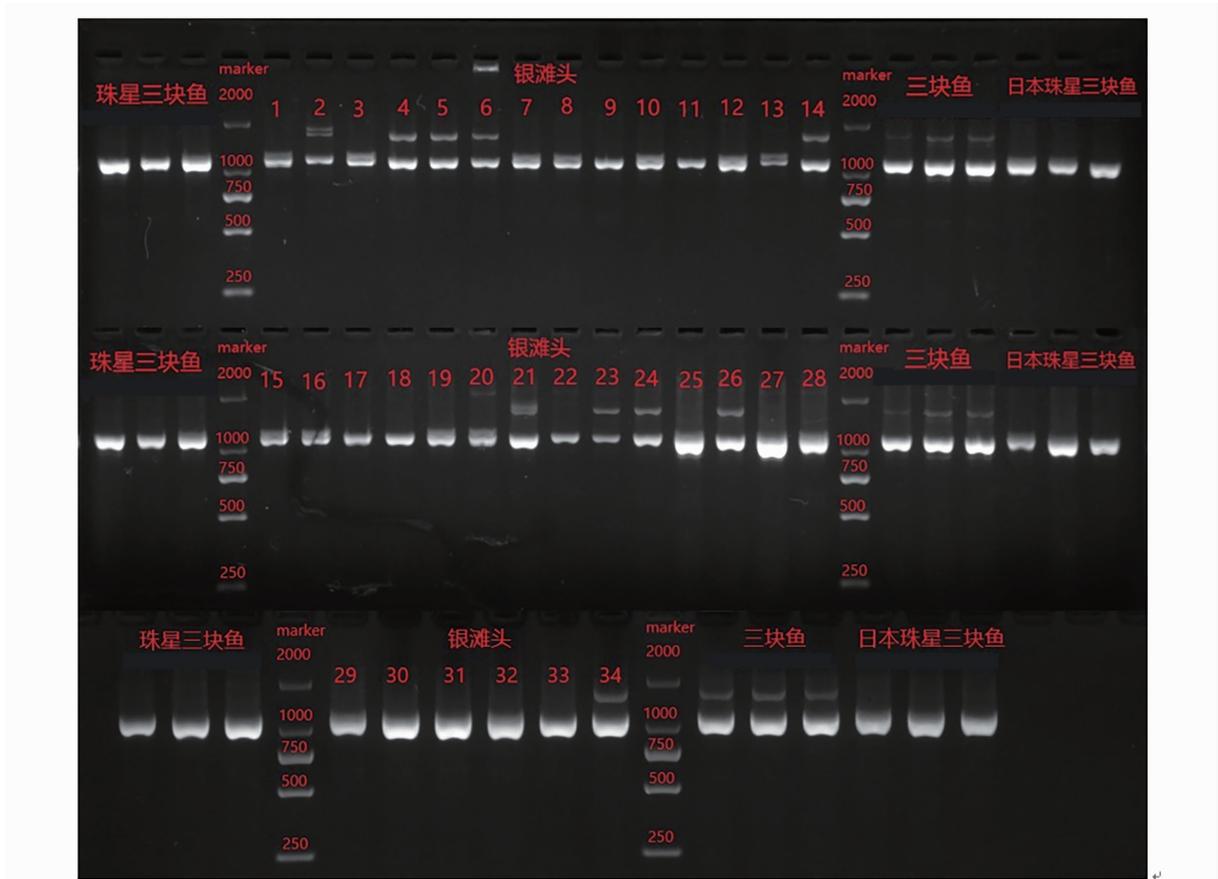


图 4 基因 *fst* 对“银滩头”扩增结果的电泳谱带

Fig. 4 Electrophoretic bands of *fst* gene in “silver beachhead”

在 100 ~ 300 bp 目的条带内,基因 *mitfa* 在珠星三块鱼和珠星三块鱼日本群体中扩增基因型相同,均显示为两条条带,而在三块鱼中则仅扩增出一条目的条带。同样地,基因 *mitfa* 对“银滩头”的扩增结果与基因 *fst* 相似,所有个体兼具两种基因型,其中 24 个个体基因型与珠星三块鱼相同,10 个个体基因型与三块鱼一致(图 5)。

2.3 银滩头分类地位的判定

根据线粒体 *CO I* 单倍型(表 2,图 3)研究结果可以看出,34 个“银滩头”个体中,有 12 个个体为三块鱼单倍型,有 22 个个体为珠星三块鱼单

倍型。而基因扩增结果显示,有 10 个个体基因型与三块鱼相同,有 24 个个体基因型与珠星三块鱼一致(图 4,图 5)。结合二者分析结果可以判定,“银滩头”群体中有 2 个为杂交个体,其单倍型为三块鱼的 Hap5,而基因型却与珠星三块鱼一致。对比发现,这两个个体分别为“银滩头”第 8 号和第 29 号个体,二者是三块鱼为母本,珠星三块鱼为父本的杂交个体(图 4,图 5)。综合单倍型和基因型的分析结果可以看出,“银滩头”是一个由珠星三块鱼,三块鱼和二者杂交后代组成的混合群体。



图5 基因 *mitfa* 对“银滩头”扩增结果的电泳谱带

Fig. 5 Electrophoretic bands of *mitfa* gene in “silver beachhead”

3 讨论

3.1 绥芬河三块鱼不同洄游群体的分类地位

利用线粒体 DNA 和核 DNA 分子标记技术对物种进行种属鉴定具有操作简单,可信度高等优点,是鱼类种属鉴定的有效手段之一^[18-19]。MURAYAMA 等^[20]和 YU 等^[21]曾利用 RAPD 和 SSR 技术分别对褐胞藻 (*Chattonella*) 与日本凤尾鱼 (*Engraulis japonicus*) 的种属进行有效区分。自 HERBERT 等^[22]发现线粒体 *CO I* 基因可进行物种区分后, DNA 条形码技术受到生物分类学家广泛关注。HOLMES 等^[23]利用 DNA 条形码对形态难以鉴定的渔获物进行有效识别。程磊等^[24]利用线粒体 *CO I* 基因成功将银鲫划分为鲫 (*Carassius auratus*) 的一个亚种。

DNA 条形码对表型不易区分的种间鉴定十

分有效,但由于线粒体 DNA 实行严格的母系遗传,因而对杂交种的鉴定效果并不理想^[25-26]。YUN 等^[27]利用线粒体基因未能对朝鲜鳊鲂 (*Rhodeus uyekii*) 和济南鳊鲂 (*R. notatus*) 的杂交种进行区分。杨喜书^[28]认为对种间杂交导致的基因渗透除 *CO I* 基因外还需结合多个基因标记共同分析鉴定。而核 DNA 的基因标记能避免母系遗传在杂交种鉴定中存在的缺陷, TAKAFUMI 等就利用 3 个核 DNA 标记有效区分了泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 的两个不同群体及其杂交种^[29]。

针对绥芬河三块鱼不同洄游群体的种属划分,前期虽然采用表型特征、同工酶、DNA 分子标记及线粒体 DNA 条形码技术成功地明确了绥芬河两种洄游群体珠星三块鱼和三块鱼的种属划分地位^[1,5,12-13],但这些研究均只采用了一种判定

方法, 研究结果存在一定的不确定性。本研究首次采用表型鉴定、线粒体 DNA 条形码技术和基因标记“三重”鉴定方法, 进一步从表型、单倍型和基因型水平明确了绥芬河三块鱼 3 种洄游群体的分类地位, 即由日本海大彼得湾洄游至绥芬河产卵的 3 批洄游群体, 实则为珠星三块鱼(金滩头)、珠星三块鱼和三块鱼及二者杂交后代组成的混合群体(银滩头)和三块鱼(黑滩头)共同构成的洄游群体。

3.2 “银滩头”群体分类地位的探讨

针对“银滩头”群体的分类地位, 在 20 世纪 90 年代, 我国学者^[4]已对其形态、繁殖生物学特性进行过研究, 结果发现“银滩头”的形态学测量结果与三块鱼无明显差异, 人工催产试验发现, 催产后个体体表显现出与三块鱼一致的婚姻色, 由此推测“银滩头”是三块鱼的亚成体^[4]。但在本研究中, 结合线粒体 CO I 和基因标记的鉴定结果可以看出, “银滩头”不论从单倍型还是基因型都表现出是珠星三块鱼和三块鱼的混合群体, 而不仅仅是成熟度较差的三块鱼个体, 该结果与陈金平等^[12]利用 RAPD 标记检测的结果一致。这些分子证据充分表明“银滩头”并不是一个独立种群。结合绥芬河 3 个洄游群体的洄游时间, 笔者推测, 除杂交种外, 该群体很可能是由性成熟时间较晚、成熟度较差或尚未完全性成熟的珠星三块鱼与成熟度不足的三块鱼的早期洄游繁殖个体组成的婚姻色不明显的过渡群体。

另外, 尹家胜等^[4]早期野外观察发现, 珠星三块鱼和三块鱼繁殖产卵场完全相同, 所产的卵常两层相互重叠, 人工授精进行成对杂交均可孵出仔鱼, 由此证实珠星三块鱼和三块鱼不存在生殖隔离, 可杂交产生后代。但后续的研究^[30]并未观察到绥芬河出现过明显的杂交群体, 也一直缺乏能够证明“银滩头”群体中存在杂交种这一事实的有力分子证据。常玉梅等^[1]利用 DNA 条形码技术分析了三块鱼和三块鱼疑似杂交个体的单倍型和微卫星标记的基因型结果, 推测二者存在杂交。本研究基于条形码技术和基因分型结果, 首次从核 DNA 水平和线粒体 DNA 水平证实二者杂交个体的存在, 为两种鱼类存在野外杂交提供了有力的分子证据。

4 结论

绥芬河洄游群体“银滩头”, 是由占比较多的

珠星三块鱼和占比较少的三块鱼及二者少量的杂交个体组成的一个混合群体。

参考文献:

- [1] 常玉梅, 程磊, 孙博, 等. 中国绥芬河三块鱼不同群体的种属划分及起源[J]. 中国水产科学, 2018, 25(4): 811-818.
CHANG Y M, CHENG L, SUN B, et al. Species classification and origin of *Tribolodon* in the Suifen River, China[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(4): 811-818.
- [2] OKAADA S. Spawning habit of dace (*Leuciscus brandti*) [J]. Zoology Magazine, 1935, 47: 778-783.
- [3] 戴定远, 张玉玲, 黄浩明. 图们江滩头鱼生物学研究[J]. 动物学报, 1982, 28(3): 283-292.
DAI D Y, ZHANG Y L, HUANG H M. Biological studies of the far-eastern dace, *Leuciscus brandti* (Dybowski), in Tumen River [J]. Acta Zoologica Sinica, 1982, 28(3): 283-292.
- [4] 尹家胜, 沈俊宝, 栾晓红, 等. 绥芬河滩头雅罗鱼种群生物学研究[J]. 中国水产科学, 1991, 4(1): 7-16.
YIN J S, SHEN J B, LUAN X H, et al. Study on population and biology of dace (*Leuciscus brandti*) in the Suifen River [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1991, 4(1): 7-16.
- [5] 尹家胜, 沈俊宝, 徐伟, 等. 水温变化对绥芬河滩头雅罗鱼产卵的影响[J]. 动物学报, 2001, 47(6): 704-708.
YIN J S, SHEN J B, XU W, et al. Effect of water temperature on spawning of dace (*Leuciscus brandti*) in the Suifen River [J]. Acta Zoologica Sinica, 2001, 47(6): 704-708.
- [6] 闫浩, 苏宝锋, 常玉梅, 等. 不同养殖条件下滩头雅罗鱼性腺发育的组织学研究及生长比较[J]. 生物学杂志, 2017, 34(5): 47-52.
YAN H, SU B F, CHANG Y M, et al. Histological studies on the gonadal development and growth comparison of *Tribolodon brandti* in different culture conditions [J]. Journal of Biology, 2017, 34(5): 47-52.
- [7] 池炳杰, 梁利群, 刘春雷, 等. 滩头雅罗鱼幼鱼对 NaCl 浓度和碱度的适应性分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(3): 689-694.
CHI B J, LIANG L Q, LIU C L, et al. Adaptability of *Tribolodon brandti* (Dybowski) to NaCl concentration and alkalinity [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(3): 689-694.
- [8] 任慕莲. 黑龙江鱼类[M]. 哈尔滨: 黑龙江人民出版社, 1981.
REN M L. Fish species in Heilongjiang River [M]. Harbin: Heilongjiang People's Publishing House, 1981.
- [9] 张觉民. 黑龙江省鱼类志[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1995.

- ZHANG J M. Fish fauna of Heilongjiang Province [M]. Harbin: Heilongjiang Science & Technology Press, 1995.
- [10] 董崇智, 赵春刚, 金贞礼. 绥芬河滩头雅罗鱼溯河生殖群体结构的探讨 [J]. 水产学报, 1993, 17(4): 304-311.
- DONG C Z, ZHAO C G, JIN Z L. An approach on the breeding population structure of *Leuciscus brandti* during migration in Suifen River [J]. Journal of Fisheries of China, 1993, 17(4): 304-311.
- [11] 陈宜瑜, 褚新洛, 罗云林, 等. 中国动物志: 硬骨鱼纲·鲤形目(中卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 64-75.
- CHEN Y Y, CHU X L, LUO Y L, et al. Fauna sinica: Osteichthyes Cypriniformes (in volume) [M]. Beijing: Science Press, 1998: 64-75.
- [12] 陈金平, 梁利群, 孙效文, 等. 绥芬河三块鱼属鱼类和东北雅罗鱼亲缘关系的 RAPD 分析 [J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 1-4.
- CHEN J P, LIANG L Q, SUN X W, et al. Relationships of *Leuciscus walekii* dy bowsky and *Tribolodon* fishes in Suifen River by RAPD technique [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(1): 1-4.
- [13] 马波, 陈金平, 董崇智. 绥芬河三块鱼和珠星三块鱼种群的生化遗传变异及亲缘关系 [J]. 中国水产科学, 2005, 12(6): 688-693.
- MA B, CHEN J P, DONG C Z. Biochemical genetic variations and relationships for populations of *Tribolodon brandti* and *Tribolodon hakonensis* in the Suifen River, China [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(6): 688-693.
- [14] ARNOLD C, CLEWLEY J P. From ABI sequence data to Lasergene' s editseq [J]. Methods in Molecular Biology, 1997, 70: 65-74.
- [15] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The CLUSTAL_ X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [16] ROZAS J. DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP [J]. Methods in Molecular Biology, 2009, 537: 337-350.
- [17] POLYAKOVA N E, SEMINA A V, BRYKOV V A. Analysis of mtDNA and nuclear markers points to homoploid hybrid origin of the new species of far eastern redbfins of the genus *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae) [J]. Russian Journal of Genetics, 2015, 51(11): 1075-1087.
- [18] 姜冰洁, 傅建军, 朱文彬, 等. 基于 *CO I* 基因分析 7 个罗非鱼群体的遗传变异 [J]. 上海海洋大学学报, 2019, 28(6): 827-834.
- JIANG B J, FU J J, ZHU W B, et al. Genetic variation analysis of seven tilapia populations based on *CO I* gene [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2019, 28(6): 827-834.
- [19] MUTTAQIN E, ABDULLAH A, NURILMALA M, et al. DNA-barcoding as molecular marker for seafood forensics: species identification of locally consumed shark fish products in the world' s largest shark fishery [J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2019, 278: 012049.
- [20] MURAYAMA K, YOSHIMATSU S, KAYANO T, et al. Application of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to distinguishing species of the red tide phytoplankton *Chattonella* (Raphidophyceae) [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 85(3): 343-345.
- [21] YU H T, LEE Y J, HUANG S W, et al. Genetic Analysis of the populations of Japanese Anchovy (Engraulidae: *Engraulis japonicus*) using microsatellite DNA [J]. Marine Biotechnology, 2002, 4(5): 471-479.
- [22] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [23] HOLMES B H, STEINKE D, WARD R D. Identification of shark and ray fins using DNA barcoding [J]. Fisheries Research, 2009, 95(2/3): 280-288.
- [24] 程磊, 常玉梅, 鲁翠云, 等. 鲫属鱼类 DNA 条码及种与亚种划分 [J]. 动物学研究, 2012, 33(5): 463-472.
- CHENG L, CHANG Y M, LU C Y, et al. DNA barcoding and species and subspecies classification within genus *Carassius* [J]. Zoological Research, 2012, 33(5): 463-472.
- [25] 肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化 [J]. 水生生物学报, 2000, 24(4): 384-391.
- XIAO W H, ZHANG Y P. Genetics and evolution of mitochondrial DNA in fish [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2000, 24(4): 384-391.
- [26] 朱书琴, 曹晓颖, 赵金良, 等. 长江中游湖泊鳊与大眼鳊的渐渗杂交 [J]. 上海海洋大学学报, 2020, 29(1): 1-8.
- ZHU S Q, CAO X Y, ZHAO J L, et al. Hybridization and introgression between *Siniperca chuatsi* and *S. kneri* from two lakes in middle Yangtze River [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2020, 29(1): 1-8.
- [27] YUN Y E, LEEI R, PARKS Y, et al. Genetic identification of hybrids between *Rhodeus uyekii* and *R. notatus* by sequence analysis of RAG-1 gene [J]. Journal of Aquaculture, 2009, 22(1): 79-82.
- [28] 杨喜书. 中国及邻近地区常见鲈形目鱼类 DNA 条形码研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2017.
- YANG X S. DNA barcoding of common scorpaeniformes of China and its adjacent areas [D]. Guangzhou: Jinan University, 2017.
- [29] FUJIMOTO T, YAMADA A, KODO Y, et al. Development of nuclear DNA markers to characterize genetically diverse groups of *Misgurnus anguillicaudatus* and its closely related species [J]. Fisheries Science, 2017, 83(5): 743-756.
- [30] 陈金平. 绥芬河三块鱼属 (*Tribolodon*) 鱼类的分类学讨论 [J]. 水产学杂志, 2001, 14(2): 82-84.

CHEN J P. A taxonomic discussion of genus *Tribolodon* in (2): 82-84.
Suifen River [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2001, 14

Molecular identification of *Tribolodon* “silver beachhead” migratory population in Suifen River

ZHAO Xuefei^{1,2,3}, LIANG Liqun^{1,2}, HUANG Jing^{1,2,4}, SUN Bo^{1,2}, ZHANG Limin^{1,2}, CHANG Yumei^{1,2}

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, National and Local Joint Engineering Laboratory for Freshwater Fish Breeding, Harbin 150070, Heilongjiang, China; 2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Heilongjiang Province's Key Laboratory of Fish Stress Resistance Breeding and Germplasm Characteristics on Special Habitats, Harbin 150070, Heilongjiang, China; 3. College of Wildlife and Protected Area, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 4. College of Marine Life and Fisheries Sciences, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222000, Jiangsu, China)

Abstract: The taxonomic status of “silver beachhead” in *Tribolodon* migratory population in Suifen River has always been controversial. In this study, we used DNA barcoding *CO I* and gene markers (*fst* and *mitfa*) to identify 115 individuals from Suifen River, including *Tribolodon hakonensis* (40), *T. brandtii* (38) and “silver beachhead” (34), and 3 individuals of *T. hakonensis* from Lake Osorezan, Japan. The results of mitochondrial *CO I* gene amplification showed that a total of 11 haplotypes were obtained, of which 5 haplotypes were exclusive to *T. hakonensis*, 5 haplotypes were exclusive to *T. brandtii*, and 1 haplotype (hap6) was exclusively shared by Japanese population of *T. hakonensis*, “silver beachhead” population shared 1 haplotype with *T. hakonensis*, and shared 3 haplotypes with *T. brandtii*. Cluster analysis did not support the “silver beachhead” population as an independent species. The results of amplification of two gene markers showed that “silver beachhead” population had both genotypes of *T. hakonensis* and *T. brandtii*. Combining the above two analysis results, it is found that there are hybrid individuals of *T. hakonensis* and *T. brandtii* “silver beachhead”. In conclusion, this study confirmed the taxonomic status of the “silver beachhead” population, that is, “silver beachhead” is a mixed population composed of *T. hakonensis*, *T. brandtii* and their hybrids. The results of this study provide a scientific basis for the classification, conservation of germplasm resources and wild release and enhancement of *Tribolodon*.

Key words: Suifen River; silver beachhead; *CO I* gene; gene markers