

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00314

黑龙江上游 3 种茴鱼分类地位的线粒体 D-loop 序列变异分析

马波¹, 孙家贤², 姜作发¹

1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 农业部黑龙江流域渔业资源环境重点野外科学观测试验站, 黑龙江 哈尔滨 150070
2. 东北农业大学 水产养殖系, 黑龙江 哈尔滨 150030

摘要: 基于茴鱼属(*Thymallus*)鱼类的线粒体 D-loop 片段全序列变异, 对分布于黑龙江上游中国境内的呼玛河、额木尔河等水系中形态特征差异显著且同域分布的 3 种茴鱼共 24 个个体进行分子系统发育关系研究, 以探讨其在属内的分类学地位。结果显示, 分布于黑龙江上游的茴鱼群体在属内显著分为 3 个独立进化分支, 平均序列分歧为 0.048 ~ 0.062, 已达到种间分化水平。经形态学鉴定, 其中 2 个分支分别为黑龙江茴鱼(*T. grubii*)和下游黑龙江茴鱼(*T. tugarinae*), 而另外 1 个分支应为 1 个新种; 且该种与分布于勒拿河上游的勒拿河茴鱼(*T. sp.*)构成单系群, 平均序列分歧仅为 0.006, 即黑龙江上游和勒拿河上游的待定名茴鱼为同一种, 结合文献, 该茴鱼被确定为北极茴鱼(*T. arcticus*)的 1 个亚种。综合 3 种茴鱼在黑龙江水系的地理分布现状, 对其起源及演化进行了初步推测。[中国水产科学, 2011, 18(2): 314–321]

关键词: 茴鱼属; D-loop 序列; 分类地位; 系统发育; 黑龙江上游

中图分类号: Q961

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)02-0314-08

茴鱼属(*Thymallus*)鱼类隶属于鲑形目(*Salmoniformes*), 鲑科(*Salmonidae*), 茴鱼亚科(*Thymallinae*), 是一类具有渔业价值的珍稀名贵冷水性鱼类。目前已知该属鱼类在世界上主要分布于欧洲(欧洲茴鱼 *T. thymallus*)、北美洲(北极茴鱼 *T. arcticus*)和亚洲的北部。其中, 亚洲东北部是茴鱼属鱼类物种多样性最丰富的地区。在东西伯利亚地区的贝加尔湖、勒拿河、叶尼塞河及其他环北冰洋河流域中分布有贝加尔茴鱼(*T. baicalensis*)^[1]、东西伯利亚茴鱼(*T. pallasii*)^[2]、勒拿河茴鱼(*T. sp.*)^[2]等。在黑龙江水系至少分布有 4 种, 分别为黑龙江茴鱼(*T. grubii grubii*)^[3]、布列亚茴鱼(*T. burejensis*)^[4]、黄斑茴鱼(*T. g. flavomaculatus*)^[5]下游黑龙江茴鱼(*T. tugarinae*)^[6-7], 而在中国境内仅分布有黑龙江茴鱼和下游黑龙江茴鱼^[7]。

笔者在黑龙江上游(中国境内)进行鱼类资源调查中发现, 在呼玛河、额木尔河等支流水系中同域分布着形态特征差异显著的 3 种茴鱼。经鉴定, 其中 2 种分别为黑龙江茴鱼和下游黑龙江茴鱼, 而另一种茴鱼可能为一个待定名的新种。最近的研究显示^[2, 8], 分布于东西伯利亚地区的勒拿河(俄罗斯境内)上游的茴鱼(简称勒拿河茴鱼)被确认为北极茴鱼的一个亚种, 但其有效学名尚未最终确定。对比勒拿河茴鱼的形态特征, 黑龙江上游的待定名鱼种在侧线鳞数、体型、体色等形态学特征上与其很相近。现有的研究显示, 在黑龙江中游和下游等地区有多种不同形态特征的茴鱼为同域分布^[4, 6], 并在属内达到独立种或亚种的遗传分化水平^[9-10], 但黑龙江上游有多种茴鱼同域分布情况尚未见报道, 特别是新发现的待

收稿日期: 2010-06-22; 修订日期: 2010-07-29.

基金项目: 科技部社会公益性专项基金资助项目(2002DIB5012); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2007HSYZX-ZH-24).

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

通讯作者: 姜作发, 研究员. E-mail: jxiffish@163.com

定名种在属内是否达到种或亚种的地位, 以及与勒拿河茴鱼是否为同一种等问题还需要进一步得到确认。

近年来, 线粒体 DNA 控制区(D-loop)序列用于分析茴鱼属鱼类的起源演化、系统发生和种内遗传分化方面的研究已有报道^[8-13], 并已成为研究茴鱼属鱼类的近缘种分类及系统演化关系的有效分子标记。目前, 利用分子系统学对黑龙江上游茴鱼属鱼类的分类学研究还未见报道, 因此在形态学鉴定的基础上, 尚需要开展遗传学分析, 以进一步确定黑龙江上游同域分布 3 种茴鱼的分类学地位, 以及待定种与勒拿河茴鱼的亲缘关系。本研究基于线粒体 D-loop 序列变异, 对分布于黑龙江上游中国境内的 3 种茴鱼进行了分子系统发育关系的研究, 结合形态学的初步分析, 以分析这 3 种茴鱼在属内的分子系统关系与分类学地位, 并对其起源及演化进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

黑龙江茴鱼、下游黑龙江茴鱼及待定名种均采自黑龙江上游中国境内的支流呼玛河塔河段(经度 134°39', 纬度 52°18')和额木尔河图强段(经度 122°47', 纬度 52°55'), 采集地点、样本数等信息见表 1。先对 3 种茴鱼进行初步的形态学特征比较(表 2), 再取鱼体背部肌肉, 置于无水乙醇中保存, 带回实验室待用。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增及测序

总 DNA 利用 UNIQ-10 柱式 DNA 抽提试剂盒提取。扩增线粒体 D-loop 基因序列的引物序列为 LRBT-25 和 LRBT-1195^[14]。PCR 反应体系为: 10×buffer 5 μL, 25 mmol/L 的 MgCl₂ 3 μL, 10 mmol/L 的 dNTPs 1 μL, 10 mmol/L 的引物各 2 μL, Taq 酶 2.0 U, 以及 100 ng/μL 的 DNA 模板 1 μL, 加双蒸水至 50 μL。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性

表 1 黑龙江上游 3 种茴鱼的名称、来源及单倍型数

Tab. 1 Scientific name, sample location and haplotypes of 3 species of <i>Thymallus</i> in the upper Heilongjiang River					
物种 species	种群 population	采集地 sampling location	<i>n</i>	缩写 abbreviation	单倍型数 number of haplotypes
黑龙江茴鱼 <i>Thymallus grubii</i>	呼玛河 Huma River	塔河 Tahe	3	Gru1-6	5
	额木尔河 Emur River	图强 Tuqiang	3		
下游黑龙江茴鱼 <i>T. tugarinae</i>	呼玛河 Huma River	塔河 Tahe	3	Tug1-6	4
	额木尔河 Emur River	图强 Tuqiang	3		
待定名种 <i>T. sp.</i>	呼玛河 Huma River	塔河 Tahe	6	Len1-12	3
	额木尔河 Emur River	图强 Tuqiang	6		

表 2 黑龙江上游 3 种茴鱼主要形态特征比较

Tab. 2 Comparison of morphological characteristics of 3 species of <i>Thymallus</i> in the upper Heilongjiang River				
项目 index	黑龙江茴鱼 <i>T. grubii</i> (<i>n</i> =18)	下游黑龙江茴鱼 <i>T. tugarinae</i> (<i>n</i> =30)	待定名种 <i>T. sp.</i> (<i>n</i> =15)	
体长/mm body length	168–199(184)	160–231(191)	181–235(207)	
侧线鳞 lateral line scales	85–96(89.3) ^a	74–87(81.7) ^b	95–102(98.5) ^c	
背鳍条总数 total dorsal fin rays	18–21(19.5) ^a	23–26(25.2) ^b	17–21(17.9) ^a	
体长/体高 trunk depth in trunk length	4.3–4.8(4.6) ^a	3.8–4.5(4.2) ^a	4.8–5.5(5.1) ^b	
体长/头长 head length in trunk length	4.9–5.3(5.2)	4.6–5.3(4.9)	4.6–5.2(5.0)	
体长/背鳍前部长 length of anterior part of dorsal fin in trunk length	2.8–3.3(3.0) ^a	3.2–3.8(3.6) ^b	2.8–3.1(2.9) ^a	
体长/背鳍基部长 length of dorsal fin base in trunk length	4.0–5.1(4.5) ^a	2.8–3.5(3.1) ^b	4.1–4.8(4.4) ^a	
头长/头高 head depth in head length	1.3–1.4(1.4)	1.1–1.4(1.2)	1.4–1.6(1.5)	
尾柄长/尾柄高 depth of caudal peduncle in length of caudal peduncle	2.3–2.9 (2.6) ^a	1.7–2.4 (1.9) ^b	2.0–2.5 (2.3) ^{ab}	

注: 同一行不同上标字母表示差异显著($P<0.05$), 括号中数值表示平均值。

Note: The different superscripts in the same row show significant difference ($P<0.05$); values in brackets are the means.

3 min; 然后 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s 和 72℃ 延伸 45 s, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 8 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后回收纯化, 送至生物公司(上海生工生物工程技术有限公司)进行测序, 测序用引物为扩增引物。

1.3 序列分析

利用 Clustal X 软件^[15]对测定的序列进行对位排列, 用 DnaSP4.10 软件^[16]进行单倍型分析。按照 Kimura 双参数法^[17]计算遗传距离, 并利用分子进化遗传分析软件 Mega 3.1^[18]中的邻接法(neighbor-joining, NJ)和最大简约法(maximum parsimony, MP)构建系统进化树。选择勒拿河茴鱼(单倍型为 Mol03、Yak02、Chi03 和 Pil03)^[8]、东西伯利亚茴鱼(*T. pallasii*)(单倍型为 Kol07、Sja05 和 Ken05)^[8]、贝加尔茴鱼(*T. baicalensis*)(AY168351)及欧洲茴鱼(*T. thymallus*)(AY841357)等近缘种的线粒体 D-loop 片段全序列构建茴鱼属部分种系统发育树, 应用自举检验(Bootstrap test)估计 NJ 和 MP 系统树中节点的置信度, 设置为 1 000 次重复。

2 结果与分析

2.1 主要形态特征比较

黑龙江上游 3 种茴鱼的主要形态学比较结果见表 2。黑龙江茴鱼和下游黑龙江茴鱼的背鳍条数、体长/背鳍前部长、体长/背鳍基部长等特征存在显著差异, 而待定名种的侧线鳞数、体长/体高等形态特征明显高于黑龙江茴鱼和下游黑龙江茴鱼。从体色上看, 3 种茴鱼可明显相互区别, 待定名种体侧鳞片上的黑色斑点形成多条平行于侧线

鳞的、间断性的条纹, 由头后部延伸至尾端; 而黑龙江茴鱼体侧斑点未形成条纹, 分布比较散乱; 下游黑龙江茴鱼的体侧没有黑色斑点或仅背部有少量几个; 黑龙江茴鱼和下游黑龙江茴鱼体侧中部和尾柄部各有 1 块较大的红色斑块, 而待定种体侧没有红色斑块。

2.2 序列比对分析

经测序比对后, 获得黑龙江上游 3 种茴鱼线粒体 D-loop 片段全序列长度为 1 099~1 104 bp, 在所有的序列中, T、C、A 和 G 的碱基平均含量分别为 31.8 %、21.3 %、32.0 %和 14.9 %, A+T 含量为 63.8 %, C + G 含量为 36.2 %。共检测到可变位点 96 个, 其中简约信息位点 83 个, 定义了 12 个单倍型。序列间转换数 25 个, 颠换数 16 个, 平均转换与颠换数比值为 1.6。用于分析的序列存入 GenBank 中, 登录号为 GU140083- GU140094。

2.3 序列遗传分化

以 Mega 3.1 软件依据 Kimura 2-parameter 模型, 黑龙江上游 3 种茴鱼与近缘种的平均序列分歧距离见表 3。3 种茴鱼中待定名种与黑龙江茴鱼的分歧最大(0.062), 与下游黑龙江最小(0.048), 黑龙江茴鱼与下游黑龙江茴鱼的分歧为 0.059。参照欧洲茴鱼与贝加尔茴鱼、东西伯利亚茴鱼的序列分歧(0.041 ~ 0.053), 黑龙江上游 3 种茴鱼在属内已达到种间的分化程度。待定名种与分布于勒拿河上游的茴鱼序列分歧仅为 0.006, 远低于属内其他种间的分化程度, 应属于同种不同地理种群间的变异水平。待定名种、勒拿河茴鱼与贝加尔茴鱼、东西伯利亚茴鱼的序列分歧为 0.025 ~ 0.038, 参照黑龙江茴鱼、下游黑龙江茴鱼和欧洲

表 3 茴鱼属部分种间线粒体 D-loop 序列的平均 Kimura 2-parameter 遗传距离
Tab. 3 Kimura 2-parameter distance between species of *Thymallus* on mitochondrial control region sequences

种名 species	1	2	3	4	5	6	7
1 待定名种 <i>Thymallus</i> sp.							
2 勒拿河茴鱼 <i>T. sp.</i>	0.006						
3 东西伯利亚茴鱼 <i>T. pallasii</i>	0.038	0.038					
4 贝加尔茴鱼 <i>T. baicalensis</i>	0.029	0.025	0.030				
5 黑龙江茴鱼 <i>T. grubii</i>	0.062	0.055	0.055	0.048			
6 下游黑龙江茴鱼 <i>T. tugarinae</i>	0.048	0.050	0.050	0.045	0.059		
7 欧洲茴鱼 <i>T. thymallus</i>	0.048	0.048	0.050	0.041	0.047	0.053	

茴鱼的序列分歧(0.047 ~ 0.059), 待定名种与勒拿河茴鱼一起与贝加尔茴鱼、东西伯利亚茴鱼在属内达到亚种间的分化程度。

2.4 系统发育关系

以 Mega 3.1 软件的邻接法(NJ)和最大简约法(MP)对欧洲茴鱼、东西伯利亚茴鱼、贝加尔茴鱼、勒拿河茴鱼及分布于黑龙江上游的 3 种茴鱼做茴鱼属部分种的分子系统发育分析, 两种分析方法得到的系统发育树的拓扑结构基本一致(图 1、图 2)。来自于黑龙江上游呼玛河、额木尔河的茴鱼群体在属内显著构成 3 个独立的进化分支, 分别对应着可经形态学鉴定的黑龙江茴鱼、下游黑龙江茴鱼及待定名种, 并分布于欧洲茴鱼和贝加尔茴鱼、东西伯利亚茴鱼之间。其中, 待定名种与勒拿河茴鱼聚在一起, 构成同一个单系群(NJ 树和 MP 树自展支持率分别为 100 和 99), 并与东西伯利亚茴鱼、贝加尔茴鱼形成姊妹群关系。待定名种先与贝加尔茴鱼、东西伯利亚茴鱼相聚, 再与下游黑龙江茴鱼相聚, 最后与欧洲茴鱼和黑龙江茴鱼相聚。

3 讨论

近年来, 在黑龙江水系俄罗斯境内陆续发现 3 种茴鱼新种或新亚种, 分别为布列亚茴鱼^[4]、黄斑茴鱼^[5]及下游黑龙江茴鱼^[6], 而此前茴鱼属鱼类在整个黑龙江水系只记录有 1 种——黑龙江茴鱼。马波等^[7]最近基于形态学研究表明, 黑龙江水系中国境内除分布有黑龙江茴鱼外也分布有下游黑龙江茴鱼。

依据 Knizhin 等^[6]、马波等^[7]的形态学鉴定描述(表 2), 在黑龙江上游支流的呼玛河、额木尔河等水域采集到的茴鱼群体中有黑龙江茴鱼和下游黑龙江茴鱼, 在黑龙江上游为同域分布。在形态学鉴定的基础上, 分子系统学研究显示, 黑龙江茴鱼、下游黑龙江茴鱼在属内各自构成独立的进化分支(图 1、图 2), 平均序列分歧已达到属内种间的分化水平(表 3), 遗传学分析结果进一步证实了黑龙江水系上游中国境内同域分布的黑龙江茴鱼和下游黑龙江茴鱼应具有独立种的分类地位。

此外, 关于黑龙江茴鱼为北极茴鱼亚种(*T. arcticus gruber*)^[19-21]还是独立种(*T. grubii*)^[22-23]尚存有争议。本研究也表明, 黑龙江茴鱼在属内构成独立分支, 并未与东西伯利亚茴鱼、贝加尔茴鱼等(这些茴鱼都被认为是北极茴鱼的亚种^[1, 8])构成姊妹群关系, 而先与欧洲茴鱼聚在一起, 与东西伯利亚茴鱼的序列分歧(0.055)高于东西伯利亚茴鱼与欧洲茴鱼及下游黑龙江茴鱼之间的分化(0.050),

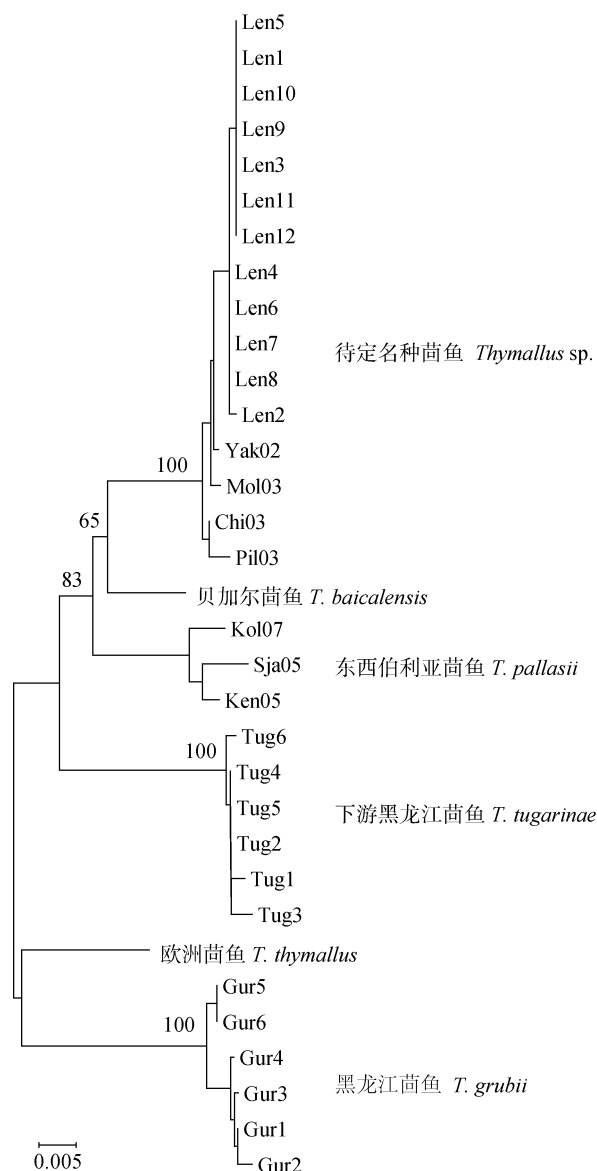


图 1 基于茴鱼属鱼类线粒体 D-loop 序列构建的 NJ 树
节点处的数字为 1 000 次 bootstrap 检验的支持率。

Fig.1 A neighbor-joining tree of genus *Thymallus* based on mitochondrial control region sequence
Numbers at nodes are percent recovery in bootstrap analysis (1 000 replicates).

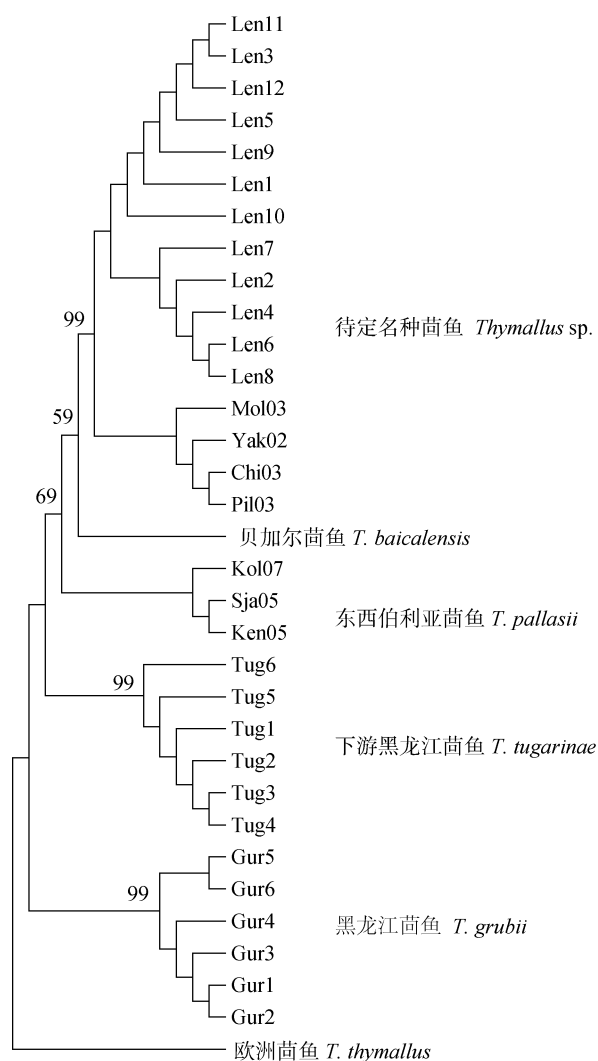


图 2 基于茴鱼属鱼类线粒体 D-loop 序列构建的 MP 树
节点处的数字为 1 000 次 bootstrap 检验的支持率。

Fig.2 A maximum parsimony tree of the genus *Thymallus* based on mitochondrial control region sequences
Numbers at nodes are percent recovery in bootstrap analysis (1 000 replicates).

而表现为处于独立种的进化地位, Knizhin 等^[9]、Froufe 等^[10]的研究结果也支持黑龙江茴鱼为独立种。因此, 黑龙江茴鱼还应恢复为独立种, 而非北极茴鱼的亚种。

本研究表明, 在黑龙江上游的呼玛河、额木尔河等水域内除了分布有黑龙江茴鱼和下游黑龙江茴鱼外, 还存在另外 1 种与以上 2 种茴鱼形态特征差异显著的茴鱼种群(表 2)。主要表现在具较多的侧线鳞、狭长的躯体及独特的体色等特征, 可明显区别于黑龙江茴鱼和下游黑龙江茴鱼, 具

有划分为独立的种或亚种的形态特征水平。对照属内种和亚种间的序列分歧水平(0.041 ~ 0.059), 待定名种与黑龙江茴鱼、下游黑龙江茴鱼的平均序列分歧(0.048 ~ 0.062)已达到属内种间的分化程度(表 3), 并在系统发育树中相对于黑龙江茴鱼、下游黑龙江茴鱼和欧洲茴鱼而构成独立的进化分支(图 1、图 2)。综合以上形态学和遗传学分析, 可以确认在黑龙江上游的中国境内尚分布有茴鱼属 1 个待定名的新种。

基于形态学研究显示, 分布于勒拿河上游的茴鱼在形态学特征上与东西伯利亚茴鱼、贝加尔茴鱼等存在显著差异^[1,24], 遗传学研究进一步证实, 勒拿河茴鱼与东西伯利亚茴鱼、贝加尔茴鱼表现为互为姊妹群的亚种关系^[8,12]。初步对比勒拿河茴鱼的形态特征^[2], 黑龙江上游的待定名茴鱼在侧线鳞、体型、体色等特征上与其很相近。本研究显示, 黑龙江上游待定名种与勒拿河茴鱼序列分歧仅为 0.006, 远低于属内其他种或亚种间分化, 尚不及黑龙江茴鱼不同地理种群间的分化水平^[13], 两者应属于同种的不同地理种群间的变异。构建的系统发育树也显示(图 1、图 2), 黑龙江上游茴鱼待定种和勒拿河茴鱼聚类在一起形成单系群, 并与东西伯利亚茴鱼、贝加尔茴鱼形成互为姊妹群的亚种关系, 这进一步确认了黑龙江上游与勒拿河上游的待定名种应属于同一种茴鱼。按照 Weiss 等^[8,12]的研究结论, 该种茴鱼应属北极茴鱼的 1 个尚未定名的亚种。

茴鱼属鱼类在黑龙江水系内的同域分布情况比较复杂, 除了本研究中的黑龙江茴鱼、下游黑龙江茴鱼和待定种茴鱼仅在黑龙江上游同域分布外, 在黑龙江中、下游也有其他多种茴鱼同域分布情况^[4-5]。遗传学研究表明, 黑龙江中、下游^[3, 11]、贝加尔湖^[24]、叶尼塞河下游^[12]等水域同域分布的多种茴鱼具独立种地位, 应各为独立起源并存在生殖隔离; 在东西伯利亚地区广泛同域分布的细鳞鲑属(*Brachymystax*)鱼类^[25-26]也表现为存在生殖隔离并各具独立起源^[27-29]。本研究显示, 分布于黑龙江上游的黑龙江茴鱼、下游黑龙江茴鱼和

待定名种之间的形态学特征差异显著,在属内各自构成独立的进化分支,表型特征差异与遗传分化水平相一致,表现为 3 种茴鱼间存在显著的生殖隔离,与其他同域分布鱼类一样也反映了各自应为独立起源的进化机制。

在东西伯利地区的勒拿河、贝加尔湖、黑龙江等水系间虽存在地理隔离,但源头紧密相邻,在更新世时期这一地区 3 大水系间曾发生过大规模的古水文交换和混流^[30-31],基于鱼类分子地理系统进化的研究也支持以上的古水文事件^[32]。勒拿河茴鱼还被发现曾分布于贝加尔湖上游局部水域^[24],在冰河后期可能通过临时河流由勒拿河扩散至贝加尔湖上游的支流水系^[33]。结合本研究,可以确认勒拿河茴鱼为唯一在勒拿河、贝加尔湖、黑龙江 3 大水系的上游中都有分布的一种茴鱼,这也证实这些水系历史上曾有过密切联系。根据茴鱼的分化时间以每百万年 1% 的序列变异计算^[32],勒拿河和黑龙江 2 个种群分化的时间大约在 60 万年前,推测可能此时勒拿河和黑龙江的古水文发生过断裂事件,使勒拿河上游茴鱼残留在黑龙江上游,但该种茴鱼目前仅分布于黑龙江上游,未扩散至黑龙江中、下游等地区。

对多种茴鱼独立起源且同域分布现状推测在黑龙江水系内部可能发生过复杂的断裂再融合等古水文事件^[10]。本研究调查发现 3 种茴鱼仅在黑龙江上游为同域分布,而黑龙江茴鱼、布列亚茴鱼和下游黑龙江茴鱼仅在黑龙江中游支流布列亚河为同域分布^[4],黄斑茴鱼与下游黑龙江茴鱼仅在黑龙江下游为同域分布^[5],以及推测下游黑龙江茴鱼的黑龙江下游种群可能是上游种群的始祖种群^[34],这些信息都暗示着在黑龙江地区茴鱼属鱼类历史上可能随着古水文地理事件而历过复杂的起源、扩散及交融过程。

参考文献:

- [1] Knizhin I B, Weiss S J, Sušnik S. Graylings of Baikal Lake basin (*Thymallus*, Thymallidae): diversity of forms and their taxonomic status[J]. J Ichthyol, 2006,46(6): 418–435.
- [2] Knizhin I B, Kirillov A F, Weiss S J. On the diversity and taxonomic status of graylings (*Thymallus* Thymallidae) from the Lena River[J]. J Ichthyol, 2006,46(3): 234–246.
- [3] Dybowski B N. Vorläufige mittheilungen über die fischfauna des ononflusses and des ingoda in transbaicalien[J]. Verh Zool Bot Ges Vien, 1869,19: 209–222.
- [4] Antonov A L. A new species of Grayling *Thymallus burejensis* sp.nov (Thymallidae) from the Amur Basin[J]. J Ichthyol, 2004,44(6): 401–411.
- [5] Knizhin I B, Antonov A L, Weiss S J. A new subspecies of the Amur grayling *Thymallus grubii flavomaculatus* spp. nova (Thymallidae)[J]. J Ichthyol, 2006,46(8): 555–562.
- [6] Knizhin I B, Antonov A L, Safronov S N, et al. New species of grayling *Thymallus tugarinae* sp. nov (Thymallidae) from the Amur River Basin[J]. J Ichthyol, 2007,47(2): 139–156.
- [7] 马波,霍堂斌,姜作发. 中国黑龙江水系茴鱼属一新纪录(鲑形目, 茴鱼科) [J]. 动物分类学报, 2007,32(4): 986–988.
- [8] Weiss S, Knizhin I, Kirillov A, et al. Phenotypic and genetic differentiation of two major phylogeographical lineages of arctic grayling *Thymallus arcticus* in the Lena River, and surrounding Arctic drainages[J]. Biolog J Linnean Soc, 2006, 88: 511–525.
- [9] Knizhin I B, Weiss S J, Antonov A L, et al. Morphological and genetic diversity of Amur graylings (*Thymallus*, Thymallidae)[J]. J Ichthyol, 2004,44(1): 52–69.
- [10] Froufe E, Knizhin I, Koskinen M T, et al. Identification of reproductively isolated lineages of Amur grayling (*Thymallus grubii* Dybowski 1869): concordance between phenotypic and genetic variation[J]. Molec Ecol, 2003, 12: 2345–2355.
- [11] Koskinen M T, Knizhin I B, Primmer C R, et al. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Thymallus* spp. (grayling) provides evidence of ice-age mediated environmental perturbations in the world's oldest body of fresh water, Lake Baikal[J]. Molec Ecol, 2002,11: 2599–2611.
- [12] Weiss S, Knizhin I, Rorantov V, et al. Secondary contact between two divergent lineages of grayling *Thymallus* in the lower Enisey basin and its taxonomic implications[J]. J Fish Biol, 2007,71 (Supplement C): 371–386.
- [13] 马波,霍堂斌,姜作发. 线粒体 DNA 基因序列变异显示鸭绿江茴鱼为黑龙江茴鱼同物异名[J]. 动物分类学报, 2008,33(2): 414–419.
- [14] Uiblein F, Jagsch A, Honsig-Erlenburg W, et al. Status, habitat use, and vulnerability of the European grayling in Austrian water[J]. J Fish Biol, 2001,59: 223–247.
- [15] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal X Windows interface, flexible strategies for multiple sequences

- alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 24: 4874–4882.
- [16] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguer X, et al. DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19: 2496–2497.
- [17] Kimura M. A simple method of estimating evolutionary rate of ase substitutions through comparative studies of nucleotide equences[J]. *Mol Evol*, 1980, 16: 111–120.
- [18] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5: 150–163.
- [19] Berg L S. *Freshwater fishes of the Russian Empire*[M]. Moscow : Izd-vo Departamenta Zemledeliya, 1916.
- [20] 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: 60–62.
- [21] Dorofeeva E A. The genus *Thymallus*[A]. In atlas of freshwater fish of Russia[C]. Ed. by Reshetnikov Yu S. Moscow: Nauka, 2002: 163–169.
- [22] Makoedov A N. Interpopulation differences and history of dispersal of graylings (*Thymallus*): studies of the dorsal fin color variation[J]. *Vopr Ikntiol*, 1987, 27 (6): 906–912.
- [23] Chereshev I A. Biogeography of freshwater fishes of the Far East in Russia [M]. Wladivostok: Dal' nauka, 1998.
- [24] Knizhin I B, Weiss S J, Bogdanov B E, et al. Finding a new form of the grayling *Thymallus arcticus* (Thymallidae) in the basin of Lake Baikal[J]. *J Ichthyol*, 2006, 46(1): 34–43.
- [25] Alekseyev S S, Kirillov A F, Samusenok V P. Distribution and morphology of the sharp-snouted and the blunt-Snouted lenoks of the Genus *Brachymystax* (Salmonidae) of East siberia[J]. *J Ichthyol*, 2003, 43: 350–373.
- [26] 马波, 尹家胜, 李景鹏. 黑龙江水系两种细鳞鲑形态学比较及其分类地位初探[J]. *动物分类学报*, 2005, 30(2): 257–260.
- [27] Froufe E, Alekseyev S, Knizhin I, et al. The evolutionary history of sharp-and blunt-snouted lenok (*Brachymystax lenok* (Pallas, 1773)) and its implications for the paleo hydrological history of Siberia[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8: 40.
- [28] 马波, 姜作发. 乌苏里江 2 种细鳞鲑种群遗传变异及亲缘关系的微卫星分析[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(1): 39–45.
- [29] 马波, 姜作发, 霍堂斌. 基于线粒体 DNA 控制区序列变异探讨黑龙江和图们江细鳞鲑属鱼类的分类地位[J]. *动物分类学报*, 2009, 34(3): 499–506.
- [30] Grosswald M G. New approach to the ice age paleohydrology of northern Eurasia[C]. In: *Paleohydrology and Environmental Change*. Chichester: Wiley and Sons, 1998, 199–214.
- [31] Fastook J L, Grosswald M G. Quaternary glaciation of Lake Baikal and adjacent highlands: modeling experiments[J]. *IPPCCE (International Project on Paleolimnology and Late Cenozoic Climate)*, 1998, 11: 35–45.
- [32] 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]. *Divers Distribut*, 2003, 9: 269–282.
- [33] Knizhin I B, Weiss S J, Bogdanov B E, et al. New data on the distribution of the upper Lena form of grayling (Thymallidae) in the Basin of lake Baikal and its taxonomic status[J]. *J Ichthyol*, 2008, 48(3): 217–223.
- [34] 马波, 姜作发, 霍堂斌. 下游黑龙江茴鱼种群遗传变异及地理分化的微卫星分析[J]. *中国水产科学*, 2009, 16(5): 678–688.

Taxonomic status of three fish species in *Thymallus* from upper Heilongjiang River based on mitochondrial control region sequence variation

MA Bo¹, SUN Jiaxian², JIANG Zuofa¹

1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Field Scientific Observation Station of Fisheries Resource and Environment in Heilongjiang River Basin, Ministry of Agriculture, Harbin 150070, China
2. Department of Aquaculture, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China

Abstract: Three sympatric species in the genus *Thymallus* with distinguishable morphological characters in upper Heilongjiang River of China were sampled from Huma River, Emur River and other branches of upper Heilongjiang River. Twenty-four complete nucleotide control region of the mtDNA were sequenced and the phylogenetic tree was constructed for their taxonomic status. The results showed that the *Thymallus* fishes in upper Heilongjiang River were divided into 3 monophyletic groups, and the mean genetic difference was 0.048 - 0.062, which showed genetic difference among species. The results imply there are 3 species of *Thymallus* in upper Heilongjiang River. According to morphological data, 2 of them were *T. grubii* and *T. tugarinae*, respectively, and another one should be a new record species of Heilongjiang River, which clustered together with the grayling in upper Lena River, and mean genetic diversity was 0.006 and made up of a sister group with *T. pallasii* and *T. baicalensis*, between which the mean genetic diversity was 0.029–0.038. Based on this study, the conclusion is that there are 3 species in *Thymallus* including *T. grubii*, *T. tugarinae* and a new record one. of which the origin and evolution with their distribution are discussed in this study. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 314–321]

Key words: *Thymallus*; D-loop sequence; taxonomic status; molecular phylogeny; upper Heilongjiang River

Corresponding author: JIANG Zuofa. E-mail: jzffish@163.com