

doi: 10.7541/2022.2022.0418

基于线粒体控制区和微卫星标记探讨秦岭细鳞鲑物种有效性

熊冬梅¹ 蒙彦晓¹ 张鑫森¹ 王继隆² 冯广朋³ 邵 俭⁴ 王立新¹

(1. 西北农林科技大学动物科技学院水产科学系, 杨凌 712100; 2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070;
3. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090; 4. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025)

摘要: 文章基于线粒体控制区基因序列和微卫星标记比较秦岭细鳞鲑(*Brachymystax tsinlingensis* Li)、黑龙江流域的尖吻细鳞鲑(*Brachymystax lenok* Pallas)和钝吻细鳞鲑(*Brachymystax tumensis* Mori)的分子遗传差异, 为澄清其分类地位争议提供分子证据。结果表明: (1)扩增217个样本的mtDNA D-loop区序列, 共获得45个单倍型, 类群间无共享单倍型; 基于单倍型构建的系统进化树显示三个细鳞鲑类群呈独立的支系; (2)基于14个呈多态性位点的遗传分化结果表明, 秦岭细鳞鲑与尖吻或钝吻细鳞鲑之间的遗传距离均大于尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑之间的遗传距离; (3)基于线粒体D-loop和多态性微卫星位点计算出的遗传分化系数(F_{ST})都远高于0.25, 表明三个类群间的遗传分化程度极高。这些结果表明, 秦岭细鳞鲑与黑龙江流域细鳞鲑之间遗传分化程度高, 结合前期发现秦岭细鳞鲑与黑龙江细鳞鲑类群有明显形态分化的研究结果及它们之间地理隔离已久的现状, 研究初步判定秦岭细鳞鲑为独立物种, 并建议以*Brachymystax tsinlingensis* Li为拉丁名。同时, 建议将秦岭细鳞鲑作为独立单元进行保护, 避免人为引种或杂交等因素造成种质资源破坏。

关键词: 线粒体控制区; 微卫星标记; 秦岭细鳞鲑; 尖吻细鳞鲑; 钝吻细鳞鲑

中图分类号: S932.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2023)05-0809-10



秦岭细鳞鲑(*Brachymystax tsinlingensis* Li, 1966)为秦巴山区特有土著鱼类, 隶属于鲑形目Salmoniforms、鲑科Salmonidae, 主要分布于陕西黑河、渭水河、石头河和太白河等山区溪流以及甘肃的渭水支流上游, 为细鳞鲑属鱼类在第四纪冰期自北向南移的残留种^[1]。20世纪90年代因野生资源量衰减被列入国家Ⅱ级重点野生保护动物名录^[2, 3], 为避免物种灭绝的悲剧在秦岭细鳞鲑上重演, 对其开展种质资源保护和遗传多样性研究十分必要。

然而, 自1964年秦岭细鳞鲑被发现以来^[4], 其分类地位一直饱受争议, 有学术观点认为秦岭地区的细鳞鲑是一个新的地方亚种, 有别于分布在新疆和黑龙江地区的细鳞鲑*B. lenok lenok* (Pallas, 1773)^[5, 6]; 另一种观点则质疑秦岭细鳞鲑亚种地位, 认为细鳞鲑属在我国不存在亚种分化^[7-9], 只有一个物种。近年来, 分布于黑龙江流域的细鳞鲑依吻部形态差

异分为钝吻细鳞鲑(*B. tumensis* Mori, 1930)和尖吻细鳞鲑(*B. lenok* Pallas, 1773)两个物种^[10-13], 并认为秦岭细鳞鲑形态特征更接近于钝吻细鳞鲑^[10], 但也有学者认为秦岭细鳞鲑的某些形态特征与尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑都不符合^[14], 将秦岭细鳞鲑作为一个独立物种的观点^[14-16]。秦岭细鳞鲑的分类地位不明晰, 为种质资源保护工作、相关科学研究开展及保护政策制定都带来极大不便, 例如学者们在撰写秦岭细鳞鲑有关的研究论文时, 犹豫采用亚种名还是物种名来表述其拉丁学名; 细鳞鲑跨地域引种放流因科学依据不明而存在潜在风险。经分析发现, 上述文献主要采用形态学性状、生化同工酶等研究手段讨论秦岭细鳞鲑分类地位, 或仅报道黑龙江流域的钝吻细鳞鲑和尖吻细鳞鲑的分类地位与遗传多样性, 缺乏采用分子手段比较秦岭细鳞鲑与黑龙江流域细鳞鲑遗传差异从而探讨秦岭细

收稿日期: 2022-10-12; **修订日期:** 2022-12-05

基金项目: 国家自然科学基金(32273138和31302189); 陕西省重点研发计划(2021NY-002); 中央高校基本科研业务费(2452020154)资助
[Supported by the National Natural Science Foundation of China (32273138 and 31302189); the Key Research and Development Projects of Shaanxi (2021NY-002); the Chinese Universities Scientific Fund (2452020154)]

作者简介: 熊冬梅(1982—), 女, 博士, 副教授; 主要从事鱼类遗传资源保护及水域环境监测研究。E-mail: xiongdongmei@nwsuaf.edu.cn

通信作者: 王立新(1968—), 男, 博士, 副教授; 主要从事鱼类遗传资源保护与利用。E-mail: fisherwanglx@nwsuaf.edu.cn

鳞鲑分类地位的报道,而仅有的两篇文章其研究结论又各执一词^[15,16]。

有效进行物种界定是分类学的首要任务,也是研究系统发育、适应性进化、生物地理学和保护生物学的第一步。明确秦岭细鳞鲑的分类地位和野生种群的遗传变异是有效保护和种质资源合理开发利用的前提。本研究以澄清秦岭细鳞鲑分类地位的历史争议为出发点,采集陕西秦岭地区和黑龙江流域的细鳞鲑野生种群样本为试验材料,结合线粒体控制区序列变异和微卫星分子标记比较秦岭细鳞鲑和黑龙江流域细鳞鲑的遗传差异,以期濒危鱼类秦岭细鳞鲑种质资源保护提供其分类地位的支撑数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

野生细鳞鲑样本于2014—2017年采自秦岭地区陕西周至县至太白县的黑河和渭水河,黑龙江流域的呼玛河和乌苏里江,依据样本的地理分布位置和吻部形态、体色及斑点等形态性状^[10,14,17]鉴定划分为尖吻细鳞鲑、钝吻细鳞鲑和秦岭细鳞鲑三个类群。采集样本背鳍下方肌肉,保存于95%酒精中,用于提取基因组DNA。样本数量及采集信息见表1。

1.2 基因组DNA提取及线粒体D-loop区的扩增

采用苯酚-氯仿法从肌肉中提取基因组DNA。1%琼脂糖凝胶电泳和超微量核酸分析仪检测DNA的质量和浓度。利用鲑科鱼类mtDNA D-loop区通用引物^[18]以扩增样本的D-loop序列(F5'-AGAGCGCCGGTGTGTAATC-3'; R5'-GCTAGCGGGACTTTCTAGGGTC-3')。PCR扩增反应体系(50 μL),其中Taq MasterMix 25 μL,模板DNA 1 μL,引物各1 μL,加ddH₂O至50 μL。PCR扩增程序为:94℃预变性4min;94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸45s,38个循环;72℃延伸8min。PCR产物经

1%琼脂糖凝胶电泳检测,对目标条带清晰单一的PCR产物进行纯化回收后送南京金斯瑞生物科技有限公司进行双向测序。

1.3 测序结果比对及遗传分化分析

原始序列经拼接和手工校正后,用Clustalx v.1.83^[19]进行多重序列比对。利用MEGA6^[20]分析碱基组成,转/颠换比,并计算简约信息位点数及变异位点数。用DnaSP v.5.10^[21]计算单倍型数、多态位点数、单倍型多样性、核苷酸多样性指数、单倍型间平均核苷酸差异数和核苷酸多样性等指标;并对基因分化系数(G_{st})及类群间基因流(N_m)进行计算。

以川陕哲罗鲑*Hucho bleekeri* (GenBank No. HM804473)和多瑙哲罗鲑*H. hucho* (GenBank No. KM588351)为外群,利用MEGA6^[20]提供的ML最大似然法构建系统进化树,并进行1000次Bootstrap置信检验。

基于MEGA6的Kimura's 2-parameter模型计算类群间两两遗传距离,并通过Arlequin v. 3.5^[22]计算三个细鳞鲑类群的遗传分化系数(F_{ST})和分子方差分析(AMOVA),进行1000次重排后的显著性检验。

1.4 微卫星位点筛选与引物荧光标记、PCR扩增及微卫星分型

本研究对86个微卫星位点进行了筛选,随机选取20尾样本的基因组DNA为模板,用于筛选多态性微卫星位点。PCR扩增反应体系为(12.5 μL): Reaction Mix 6.2 μL, DNA Polymerase (2.5 U/μL) 0.3 μL,上下游引物各0.5 μL,模板DNA 0.5 μL,加ddH₂O补至12.5 μL。PCR程序为:94℃预变性4min,94℃变性30s,退火温度30s,72℃延伸45s,重复38次循环,最后72℃延伸8min。

据扩增片段大小及特异性最终筛选14个多态性微卫星位点,采用荧光标记微卫星技术检测多态性(表2)。荧光标记引物的PCR反应体系和扩增条

表1 三个细鳞鲑类群样本的基本信息

Tab. 1 Samples information of three *Brachymystax* groups

类群 Group	采集地点 Location	经度 Longitude	纬度 Latitude	样本数量 Sample size for D-loop	样本数量 Sample size for microsatellite	采样时间 Sample time
尖吻细鳞鲑 <i>B. lenok</i>	呼玛河Huma River	126° 29'E	51° 42'N	32	32	2014.7
	乌苏里江抓吉段 Zhuaji in Wusuli River	134° 39'E	48° 13'N	8	8	2014.7
钝吻细鳞鲑 <i>B. tumensis</i>	乌苏里江抓吉段 Zhuaji in Wusuli River	134° 39'E	48° 13'N	18	18	2014.7
	乌苏里江海青段 Haiqing in Wusuli River	134° 39'E	47° 52'N	53	53	2017.6
	陕西黑河Heihe in Shaanxi	107° 49'E	33° 50'N	98	73	2014.10
秦岭细鳞鲑 <i>B. tsinlingensis</i>	陕西渭水河 Xushui River in Shaanxi	107° 27'E	33° 44'N	8	8	2017.7

件同上, 产物委托西安擎科泽西生物科技有限公司进行毛细管电泳(ABI 3730XL测序仪), 以内标Liz-500(ABI)为参照, 使用GeneMapper 4.1软件计算每个微卫星位点等位基因扩增片段的观测值, 并对微卫星数据进行初步分型。

1.5 微卫星分型及数据分析

据各微卫星位点初步分型结果, 利用Popgene v.1.32^[23]计算群体的遗传参数, 包括观测等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)。用Arlequin v.3.5^[22]进行哈迪-温伯格平衡检验, 并计算固定系数(F_{is}); 再由CERVUS v.3.0.7^[24]计算多态信息含量(PIC)。使用GENETIX v.4.05.2^[25]提供的三维因子对应分析(AFC 3D sur populations)分析三个细鳞鲑类群间的遗传关系与分化程度。

2 结果

2.1 线粒体DNAD-loop区的分析结果

D-loop区序列差异及遗传多样性分析 本试验共得到1008—1257 bp的有效片段长度, 经序列比对后除去缺失和错配的位点共得到保守位点(Conserved sites) 939个, 简约信息位点54个, 单变异位点12个。在 217个测序个体中, 共检测到45个单倍型(Haplotype, Hap), 已上传GenBank (MH885368-MH885412)其中秦岭细鳞鲑类群14个单倍型(分别为Hap1-14), 尖吻细鳞鲑类群8个(分别为Hap15-22), 钝吻细鳞鲑类群23个(分别为Hap23-45; 表 3), 三个类群间不存在共享单倍型。单倍型多样性指数(Haplotype diversity, H_d)为0.9405, 平均核苷酸差异数(Average number of nucleotide differences, k)为

表 2 14个多态性微卫星位点荧光修饰引物

Tab. 2 Fourteen microsatellite loci and sequences of fluorescent tagged primers

分组 Group	位点 Locus	重复序列 Repeat motif	荧光标记 Fluorescent label	引物序列 Sequence of primers (5'—3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	产物大小范围 Allele size range (bp)
1	BleTet5	(TGTC) ₅	FAM	CTTCTTCACCCGCCTGAGTGT TTGAATGGGCTATCTGGCTGT	57	160—200
	BleTet6	(CTGC) ₇	TAMRA	AGACATCCGCTGCGAAAT CAGGCATACAGTCAGACATACA	53	214—242
	BleDi36	(CA) ₁₄	HEX	GCATATTATGGTCAGTGGGAGT GTCCTGCTTACACATCAGACAA	56	170—212
	BleTri19	(TAA) ₉	FAM	CGTTTGGTCTCTCTGCTCTTAT TATATCGGTTTCGCCCTTACTTA	56	264—312
2	BLT5	(TG) ₁₈	FAM	TCTTGAATGCCTACTACTAACC GCTTTCATCTCATGCAACTG	53	76—112
	BLT30	(TG) ₁₄	TAMRA	CTGCACACTCACACCTTCAT CCTAACCGATGGCTGTAC	58	243—271
	BleDi39	(CA) ₈ CG(CA) ₁₃	FAM	ATCACCTTCAAGCTCTCGTAAA ATCATAAAAAATTGCATCGCTCT	56	388—433
	BleDi58	(TG) ₁₁	HEX	CAGGTGATGGTTAGTGATTGTG CTGACTGGTTAGGGTCAAGAAG	56	375—430
3	TL10	(GT) ₆ ATGA(GT) ₅ ATGA(GT) ₇ GCGG(GA) ₁₅	FAM	AGCCTACCTCTTCTGTCTAGTGAGG TGTGCAAATAGTTCAAGAACAAAAG	63	180—284
	BLT14	(TG) ₁₁	TAMRA	CTACCAGGCGTCAGTGT GCAGGAGTATTGGCTATCAG	57	194—227
	BLT29	(CA) ₁₅	HEX	TGATACATATGAGGCAAGCA GTCAGGTACCAGTCATAGTAT	58	179—201
4	BleTri08	(GAT) ₁₀	FAM	ACCTTGAGGGGAAGTAGAATGT CTTAGGGCTCAGTGTCTCTTC	56	345—375
	BLT28	(TG) ₅ C(GT) ₁₈	FAM	CACCCTACCAAGCACCAATAC TGTCAGGTTGCTTATTCAGAGT	58	155—186
	TL12	(AC) ₉ ...(GT) ₆ TT(TG) ₅	HEX	CTGCAGACTGGATCTTATCAGGAGC GCATACAAGTACGCACGCCGA	63	201—291

表 3 基于线粒体D-loop的三个细鳞鲑类群遗传多样性分析

Tab. 3 Analysis of genetic diversity for the three *Brachymystax* groups based on mtDNA D-loop sequences

类群 Group	序列全长 Sequence (bp)	单倍型数 Haplotypes	单倍型多样性指数 Haplotype diversity	多态位点数 Polymorphic loci	平均核苷酸差异数 Average number of nucleotide differences (k)	核苷酸多样性指数 Nucleotide diversity (P_i)
秦岭细鳞鲑 <i>B. lenok tsinlingensis</i>	1008—1170	14	0.8221	24	5.290	0.00525
尖吻细鳞鲑 <i>B. lenok</i>	1089—1253	8	0.7077	24	2.037	0.00187
钝吻细鳞鲑 <i>B. tumensis</i>	1092—1257	23	0.9292	17	4.259	0.00390

15.3743。

基于单倍型数据计算各细鳞鲑类群遗传多样性, 结果表明钝吻细鳞鲑类群 H_d 最高, 秦岭细鳞鲑类群居中, 尖吻细鳞鲑类群最低, 分别为0.9292, 0.8221和0.7077; 平均核苷酸差异数(k)和核苷酸多样性指数(P_i)是秦岭细鳞鲑类群的最高, 分别为5.290和0.00525, 尖吻细鳞鲑类群的平均核苷酸差异数(k)和核苷酸多样性指数(P_i)最低, 分别为2.037和0.00187(表 3)。

三个细鳞鲑类群两两之间的遗传分化参数见表 4。秦岭细鳞鲑类群与黑龙江流域内的两个类群(尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑)之间均表现出较高的地理遗传分化差异($\text{GammaSt}=0.57207$ 和 $\text{GammaSt}=0.53694$), 而尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑之间的地理遗传分化差异略低($\text{GammaSt}=0.48123$), 表明秦岭细鳞鲑与尖吻细鳞鲑、钝吻细鳞鲑类群都存在较高的地理遗传分化, 为具有显著的遗传分化的类群。三个类群两两之间的基因流 N_m 值在0.1659—0.8850, 数值小于 1 说明类群之间可能不存在基因交流。

D-loop区单倍型构建系统进化树 基于45个单倍型(D-loop区)构建的最大似然树(ML)显示三个细鳞鲑类群被分为两个较大支系, 即钝吻细鳞鲑类群单独成一个支系, 而秦岭细鳞鲑和尖吻细鳞鲑成一个大的支系, 但秦岭细鳞鲑类群和尖吻细鳞鲑类群的单倍型各自聚为两个独立的支系, 基本能从进化树上区分这三个类群(图 1)。

由单倍型最小网络图(图 2)可知: 不同细鳞鲑类群之间也不存在共享单倍型, 类群间单倍型的突变过程中存在较多缺失的单倍型(mv), 尖吻细鳞鲑类群的单倍型Hap-20(简写: H-20)与钝吻细鳞鲑类群的单倍型H-30之间仅通过一步突变, 由此推测尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑这两个类群在进化历史上有过基因交流。值得一提的是尖吻细鳞鲑类群的两个单倍型(H-15和H-16)与H-22, 以及本类群其他单倍型之间有一定程度的遗传分化(图 2), 这种分化可能与尖吻细鳞鲑样本采自不同河流有关, 如H-15和H-16的样本采自于乌苏里江抚远县抓吉镇的

两个个体, 而H22单倍型的两个个体则采自呼玛河, 这两个采集地地理距离较远。H-15和H-16与本类群的其他单倍型大部分序列一致, 由于存在一个短片段(97 bp)与尖吻类群其他单倍型差异较大, 其中有 23 个 SNP 位点与秦岭类群一致, 有 19 个 SNP 位点与钝吻类群一致, 因而在单倍型网络图中这两个单倍型被归到秦岭类群与钝吻类群之间, 推测这两个单倍型可能代表更古老的尖吻细鳞鲑单倍型。

三个细鳞鲑类群的遗传结构 类群间遗传距离与遗传分化系数分析结果显示: 秦岭细鳞鲑与尖吻细鳞鲑之间的遗传距离和遗传分化系数分别为0.0375和0.75081; 秦岭细鳞鲑与钝吻细鳞鲑之间分别为0.0374和0.66188; 尖吻细鳞鲑与钝吻细鳞鲑之间分别为0.0273和0.36102; 表明三个细鳞鲑类群间存在较大分化, 且秦岭细鳞鲑与尖吻细鳞鲑、钝吻细鳞鲑之间的遗传距离大于尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑之间的遗传距离(表 5)。

分子方差变异分析(AMOVA)结果显示类群间分子变异占66.57%, 而类群内样本间的变异仅33.43%, 三个类群间的固定系数(F_{ST})值为0.66565 ($P<0.001$; 表 6)。

2.2 微卫星标记的分析结果

基于微卫星标记的遗传多样性分析 本试验从14个多态性微卫星位点中获得225个等位基因, 三个类群的平均等位基因数目(N_a)在3.0714(秦岭细鳞鲑)—7.1429(尖吻细鳞鲑)。由表 7可知, 三个类群中, 所有多态性微卫星位点都表现为观测杂合度(H_o)比期望杂合度(H_e)低的现象, 这提示在细鳞鲑类群中存在杂合子缺失的可能。香农信息指数(I)的大小体现了类群内生物多样性的 高低, 秦岭细鳞鲑类群的 I 值(0.6055)偏低, 而尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑类群的 I 值较高, 分别是1.0806和1.0153。秦岭细鳞鲑、尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑的平均近交系数(F_{IS})分别为0.36823、0.42322和0.24285, 多态信息含量(PIC)分别为0.2919、0.4399和0.4334。

三个细鳞鲑类群的遗传结构分析 分子方差分析(AMOVA)结果显示类群间的分子差异占57.13%, 类群内的分子差异占14.04%, 还有28.83%

表 4 基于线粒体D-loop的三个细鳞鲑类群间遗传分化参数

Tab. 4 Analysis of genetic differentiation among three *Brachymystax* groups based on mtDNA D-loop sequences

类群1 Group 1	类群2 Group 2	基因多样性 H_s	平均核苷酸差异数 K_{xy}	基因分化系数 G_{st}	地理单元间遗传分化系数 GammaSt	基因流 N_m
秦岭细鳞鲑 <i>B. lenok tsinlingensis</i>	尖吻细鳞鲑 <i>B. lenok</i>	0.79149	23.88892	0.10717	0.57207	0.1659
秦岭细鳞鲑 <i>B. lenok tsinlingensis</i>	钝吻细鳞鲑 <i>B. tumensis</i>	0.86481	21.78289	0.06481	0.53694	0.2554
尖吻细鳞鲑 <i>B. lenok</i>	钝吻细鳞鲑 <i>B. tumensis</i>	0.85052	14.09930	0.09034	0.48123	0.8850

的差异是由样本本身不同位点间的分子差异造成的(表 6); 由表 5 可知, 秦岭细鳞鲑类群和尖吻细鳞鲑类群之间的 F_{ST} 和遗传距离分别为 0.6143 和 3.6978, 秦岭细鳞鲑类群和钝吻细鳞鲑类群之间的 F_{ST} 和遗传距离分别为 0.5992 和 3.8246, F_{ST} 和遗传距离最小值出现在尖吻细鳞鲑类群和钝吻细鳞鲑类群之间, 分别是 0.4606 和 1.4075, 该结果与 mtDNA D-loop 区分析结果的趋势一致。

基于 14 个多态性微卫星位点的所有等位基因型, 对三个细鳞鲑类群通过三维坐标对三个类群的遗传分化关系进行解释。由图 3 可知, 坐标轴 1(Axe 1)和 2(Axe 2)能够完全区分三个类群, 两者分别解释三个类群间总遗传变异的 57.79% 和 42.21%。在 Axe 1 水平上, 秦岭细鳞鲑类群中的所有样本首先聚在一起, 与黑龙江流域内的尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑明显分隔。其次, 在 Axe 2 水平上, 尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑又被划分为两个互不重叠的类群。

值得注意的是, 基于微卫星位点的三维坐标图也出现了和单倍型网络图类似的结果, 即尖吻细鳞鲑类群内部有一定程度的遗传分化。

3 讨论

3.1 三个细鳞鲑类群的遗传多样性

本试验的三个细鳞鲑类群间无共享单倍型, 其中秦岭细鳞鲑类群的单倍型多样性(H_d)和核苷酸多样性(P_i)分别是 0.8221 和 0.00525; 尖吻细鳞鲑分别是 0.7077 和 0.00187; 钝吻细鳞鲑则为 0.9292 和 0.00390。Grant 和 Bowen^[26]认为当 $H_d > 0.5$ 且 $P_i > 0.005$ 时, 预示着该群体拥有较高的遗传多样性; 当群体 $P_i < 0.005$ 时, 则表现为低核苷酸多样性, 因而秦岭细鳞鲑类群表现出较高的遗传多样性, 可能与本研究中秦岭细鳞鲑采样点横跨秦岭南北两侧的山涧溪流有关, Shao 等^[27]利用线粒体 DNA Cyt b 基因评估秦岭南北坡(即黄河水系和汉江水系)细鳞鲑的分化

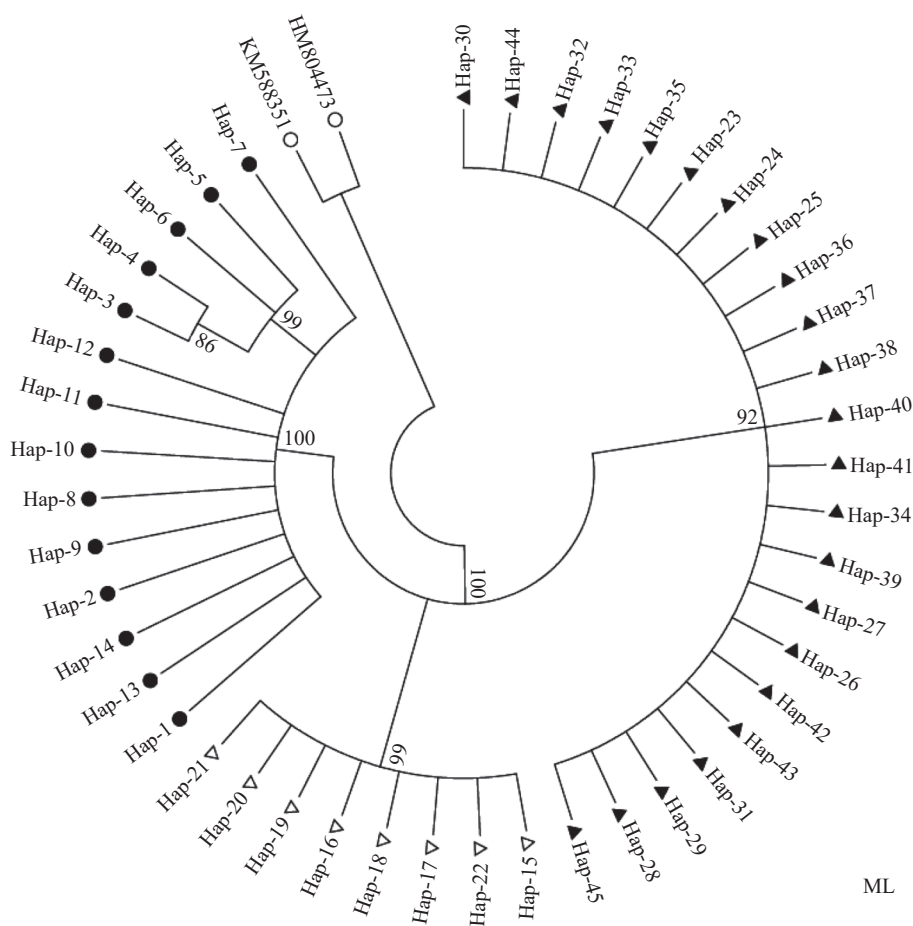


图 1 基于线粒体 D-loop 区构建的三个细鳞鲑类群的系统进化树 (ML), 树上标记支持率 $> 90\%$ 的主要进化枝

Fig. 1 Phylogenetic tree for three *Brachymystax* groups base on mtDNA D-loop sequences (ML), bootstrap values is displayed among main clades when Bootstrap values $> 90\%$

○ 为外群; ▲ 为钝吻细鳞鲑 (Hap23—45); △ 为尖吻细鳞鲑 (Hap15—22); ● 为秦岭细鳞鲑 (Hap1—14)

Different symbols represent different groups; ○ represents outgroup; ▲ represents *B. tumensis* (Hap23—45); △ represents *B. lenok* (Hap15—22); ● represents *B. lenok tsinlingensis* (Hap1—14)

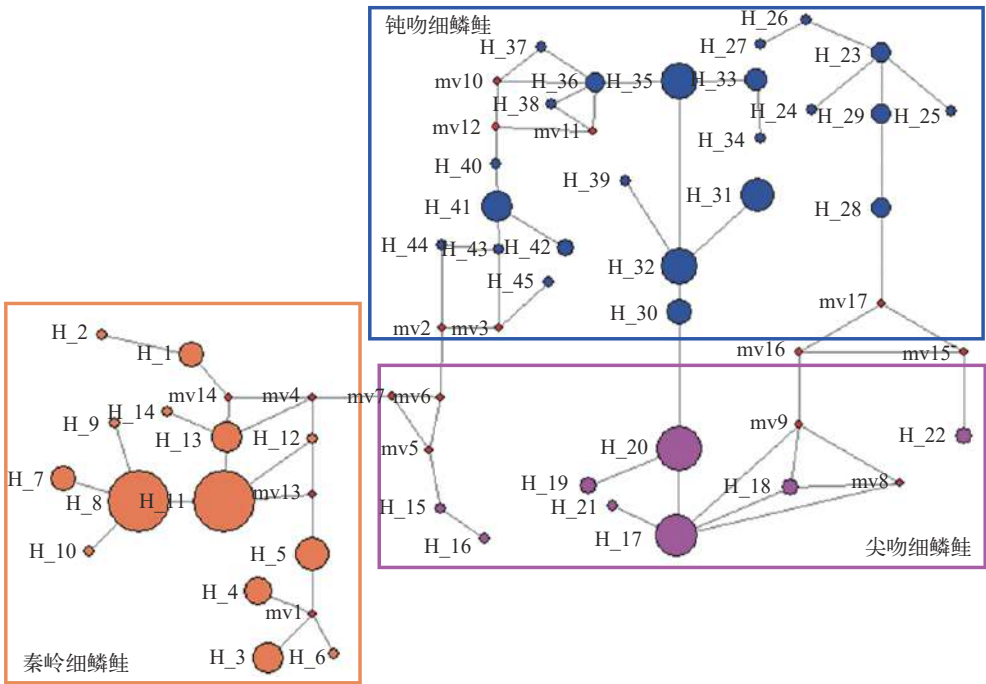


图2 三个细鳞鲑类群的单倍型网络图

Fig. 2 Median-joining networks for three *Brachymystax* groups

红色节点(mv)表示缺失单倍型; 钝吻细鳞鲑(Hap23—45); 尖吻细鳞鲑(Hap15—22); 秦岭细鳞鲑(Hap1—14); 圆圈面积与单倍型频率成正比

red nodes (mv) indicate missing haplotype, *B. tumensis* (Hap23—45); *B. lenok* (Hap15—22); *B. lenok tsinlingensis* (Hap1—14); the sizes of circles are proportional to haplotype frequency

表5 基于线粒体D-loop序列和微卫星标记分析三个细鳞鲑类群的遗传分化系数 F_{ST} (左下)与遗传距离(右上)

Tab. 5 Pairwise F_{ST} values (left bottom) and genetic distance (upper right) among three *Brachymystax* groups based on mtDNA D-loop and microsatellite loci

分子标记 Molecular marker	类群 Group	秦岭细鳞鲑 <i>B. lenok</i> <i>tsinlingensis</i>	尖吻细 鳞鲑 <i>B. lenok</i>	钝吻细 鳞鲑 <i>B.</i> <i>tumensis</i>
D-loop区 mtDNA D- loop	秦岭细鳞鲑 <i>B. lenok</i> <i>tsinlingensis</i>		0.0375	0.0374
	尖吻细鳞鲑 <i>B. lenok</i>	0.75081*		0.0273
	钝吻细鳞鲑 <i>B. tumensis</i>	0.66188*	0.36102*	
	秦岭细鳞鲑 <i>B. lenok</i> <i>tsinlingensis</i>		3.6978	3.8246
微卫星标记 Microsatellite loci	尖吻细鳞鲑 <i>B. lenok</i>	0.6143**		1.4075
	钝吻细鳞鲑 <i>B. tumensis</i>	0.5992**	0.4606**	

注: * $P<0.001$ 代表差异极显著; **Bonferroni校正后仍显著
Note: * $P<0.001$ means significant pairwise differences;
** represents significant differences after Bonferroni correction

时间约0.2MY。

基于微卫星位点分析的多态信息含量(PIC)指标的数值, 可间接性地反映遗传多样性的高低。一般认为PIC可分3个等级: 若 $PIC<0.25$, 则表明群体

呈低度多态性; 若 PIC 在0.25—0.5, 则表明群体的多态性呈中度多态; 若 $PIC>0.5$, 则表明群体呈高度多态性^[28]。本文中秦岭细鳞鲑类群的 PIC 为0.2919, 尖吻和钝吻细鳞鲑类群的 PIC 分别为0.4399和0.4334, 这3个类群的 PIC 数值都在0.25—0.5, 因而秦岭细鳞鲑、尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑类群的遗传多样性均处于中度多态水平。从濒危物种资源保护的角度来说, 其多样性存在进一步降低的潜在风险(尤其是秦岭细鳞鲑), 可通过增加保护力度防止生境破碎化、选择遗传差异较大的野生亲鱼作为人工放流群体的亲本来源等方式避免遗传多样性进一步降低。

3.2 细鳞鲑类群间遗传分化及秦岭细鳞鲑物种有效性

遗传分化系数(F_{ST})和类群间遗传距离可反映群体间的遗传分化程度。据报道, 当 $F_{ST}<0.05$ 时, 群体间遗传分化程度很低; 当 F_{ST} 在0.05—0.15, 则群体间的遗传分化程度接近中等水平; 当 F_{ST} 在0.15—0.25, 说明群体间的遗传分化程度比较高; 当 F_{ST} 值超过0.25时, 群体间的遗传分化程度极高^[29]。本试验基于线粒体D-loop和多态性微卫星位点分析得到的 F_{ST} 都远高于0.25, 表明3个类群间有极高的遗传分化。分子遗传距离也可作为判定物种分化的

表 6 基于线粒体D-Loop序列和微卫星标记的3个细鳞鲑类群的分子方差分析

Tab. 6 Molecular variance (AMOVA) analysis for three *Brachymystax* groups based on mtDNA D-loop and microsatellite loci

分子标记 Molecular marker	变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	变异百分率 Percentage of variation (%)	固定系数 F_{ST} Fixation index	<i>P</i> -value
D-loop区 mtDNA D-loop	类群间Among groups	2	5798.867	42.75754	66.57	0.66565	0.0000*
	类群内Within groups	214	4595.953	21.47642	33.43		
	总计 Total	216	10394.820	64.23396			
微卫星标记 Microsatellite loci	类群间Among groups	2	946.142	3.80785	57.13	$F_{IS}=0.32745$	0.00000*
						$F_{ST}=0.57128$	0.00000*
						$F_{IT}=0.71167$	0.00000*
	类群内样本间 Among individuals within groups	189	716.939	0.93573	14.04		
	样本内 Within individuals	192	369.00	1.92188	28.83		
	总计 Total	383	2032.081	6.66545			

注: * $P<0.001$ 代表差异极显著
Note: * $P<0.001$ means significant pairwise differences

表 7 基于 14 个多态性微卫星位点的3个细鳞鲑类群的遗传多样性分析结果

Tab. 7 Results of genetic diversity analysis based on fourteen polymorphism microsatellite loci in three *Brachymystax* groups

多态性位点 Polymorphic locus	参数 Parameters	类群Group		
		秦岭细鳞鲑 <i>B. lenok</i> <i>tsinlingensis</i> (<i>N</i> =81)	尖吻细鳞鲑 <i>B. lenok</i> (<i>N</i> =40)	钝吻细鳞鲑 <i>B. tumensis</i> (<i>N</i> =71)
14	N_a	3.0714	7.1429	5.8571
	N_e	1.9389	3.0806	3.3276
	I	0.6055	1.0806	1.0153
	H_o	0.2055	0.2679	0.3571
	H_e	0.3245	0.4619	0.4709
	PIC	0.2919	0.4399	0.4334
	F_{IS}	0.36823	0.42322	0.24285

注: 等位基因数(N_a); 有效等位基因数(N_e); 香农信息指数(I); 观测杂合度(H_o); 期望杂合度(H_e); 多态信息含量(PIC); 平均近交系数(F_{IS})
Note: N_a . Observed number of alleles; N_e . Effective number of alleles; I . Shannon's Information index; H_o . observed heterozygosity; H_e . Expected heterozygosity; PIC. polymorphism information content; F_{IS} . Fixation indices

重要参考数据,如Serrano 等^[30]利用mtDNA分析来自美国、巴西等地121尾溪脂鲤属(*Characidium*)鱼类样本,发现除*C. zebra*外种间遗传距离均高于0.02,并结合系统发育分析、单倍型网络分析和形态学分析将三个*C. zebra*地理群体归为一个物种,并将*C. alipioi*划分为两个物种。本研究中基于线粒体控制区计算的遗传距离中,尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑之间的值最小(0.0273),而秦岭细鳞鲑与前二者的遗传距离(分别为0.0375和0.0374)均大于前二者之间的遗传距离。马波和姜作发^[12]基于10个多态性微卫星位点计算出尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑的遗传距离为0.9393,判定两者的遗传分化程度

已达种水平,而本试验中秦岭类群与尖吻类群(3.6978),与钝吻类群的遗传距离(3.8246)远大于尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑之间的平均遗传距离(1.4075)。此外,三个细鳞鲑类群的基因流计算结果均小于1,证明三个类群之间的基因流也受到阻碍^[31]。以上证据表明秦岭细鳞鲑与另外两者的分化可能已达种水平。

先前的一些研究也曾探讨细鳞鲑不同群体的遗传分化,例如夏颖哲等^[32]通过比对835 bp 的D-loop部分序列差异,发现黑龙江、长白山地区和古黄河地区的细鳞鲑存在高度遗传分化,无共享单倍型;杜岩岩等^[15]野外采集25尾甘肃秦岭细鳞鲑样品,以598 bp mtDNA控制区序列分析得到3个单倍型,与GenBank黑龙江的尖吻细鳞鲑与钝吻细鳞鲑数据进行比对,系统进化树显示秦岭细鳞鲑单独成一支,支持秦岭细鳞鲑亚种分类地位。Xing等^[16]除对细鳞鲑属不同种类的形态差异进行详细描述外,还比对GenBank 中细鳞鲑Cyt *b*基因数据,发现秦岭细鳞鲑类群在系统发育树上呈一个单系群,与尖吻细鳞鲑构成一个分支,从而认为秦岭细鳞鲑为一个有效的独立物种。以上文献均未发现共享单倍型,但系统发育树略微不同,结论也不尽相同。造成这种现象的可能原因是mtDNA不同基因或同一基因不同片段的变异程度不同,或仅用某一短片段进行小样本遗传多样性分析时往往存在偏差。本研究中线粒体D-loop区段长度大于1000 bp,并结合核基因的微卫星分子标记分析超过200尾样本的分子差异,所反映的信息更加全面。

能否正确识别和定义物种对于生物多样性保护尤为重要,如果不能正确划分物种,就很有可能发生偏差:应受到保护的物种没有得到合理保护,

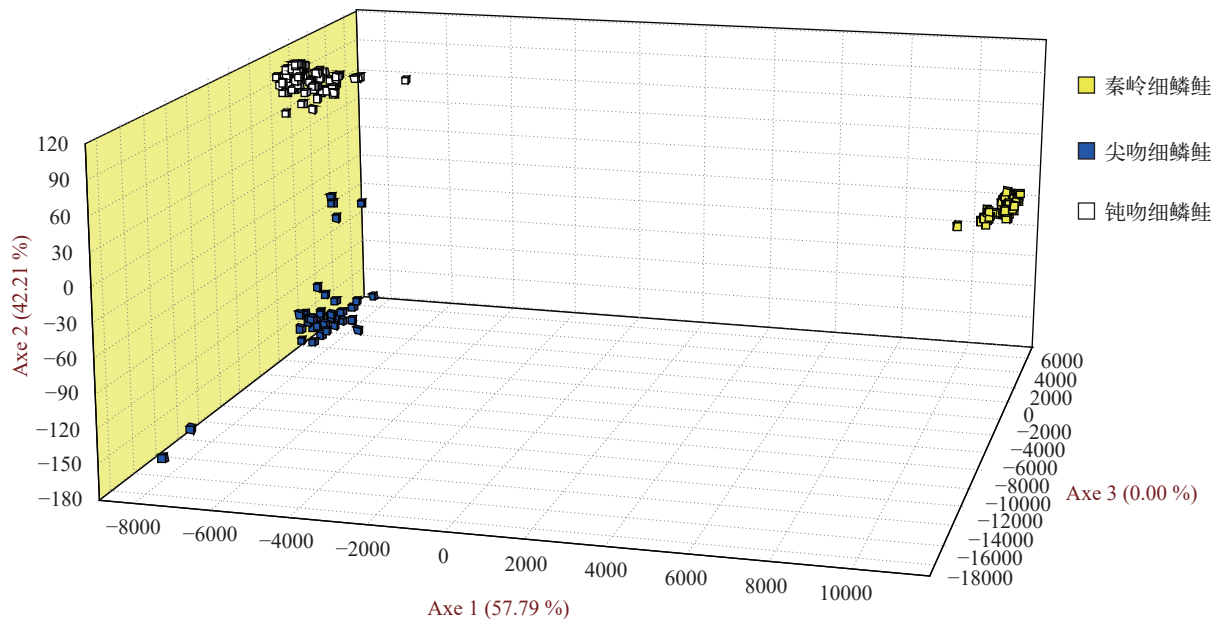


图3 基于14个多态性微卫星位点的三个细鳞鲑类群的三维因子对应分析图

Fig. 3 Three dimensional factorial correspondence analysis (3D-FCA) showing relationships among three *Brachymystax* groups based on fourteen polymorphism microsatellite loci

不该被保护的却得以保护。目前广泛认可的生物学物种界限是“生殖隔离”，然而实际操作中很难实施，很多鱼类世代周期长达几年甚至十几年，实验室养殖及传代过程死亡率高，“杂种不育”的检验标准因费时费力、代价高昂也被鱼类分类学家摒弃；随着分子生物学技术的迅速发展，进化物种概念逐渐被广泛接受。

进化物种概念将物种界定的重心转移到物种进化过程中的谱系识别和分化程度上。Miralles等^[33]对一个未经证实的候选物种(Unconfirmed candidate species)提出以下几个方面的界定标准：(1)形态学：至少有一个固定的可诊断的差异特征(可数性状或可量性状)^[34]；(2)mtDNA或nDNA：所选基因或序列构建分子进化树，各分支上的Bootstrap置信检验支持率在95%以上^[35]；(3)单倍型(mtDNA或nDNA)：目的类群与所讨论的其他进化分支间无共享单倍型^[36]。若是形态学和分子生物学分析结果满足以上3个条件中任意1项，则将候选物种判为亚种；若满足以上3个条件中任意2项或全部符合，则将候选物种判为物种。

参照以上物种分类界定标准，结合本团队前期发表的形态学差异结果^[17, 37]，秦岭细鳞鲑分类地位的研究结果契合以下候选物种的界定标准：(1)三个细鳞鲑类群在32项比例性状和5项可数性状(如鳃耙数、侧线鳞数、幽门盲囊数等)上存在极显著差异($P < 0.01$)；(2)基于mtDNA D-loop区单倍型构建的系统发育树显示三个类群各自聚为一支，且每

个分支的Bootstrap检验支持率90%以上；(3)在mtDNA D-loop区序列的遗传分析中，秦岭细鳞鲑在某些微卫星位点上存在特有等位基因型且与另外两个类群无共享单倍型，它与尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑分布的黑龙江流域长期地理隔离造成基因流中断，而由地理隔离、生态位分化或生物学差异造成的基因流停止是成种的必要条件^[38]，因而本文基于秦岭与黑龙江流域地理隔离已久的事实和以上形态与分子差异的分析结果，初步认为候选物种秦岭细鳞鲑为独立物种，并建议今后以*Brachymystax tsinlingensis* Li, 1966为其拉丁学名。同时，本研究建议将秦岭细鳞鲑作为独立单元进行种质资源保护，避免人为引种或杂交等因素造成与尖吻细鳞鲑或钝吻细鳞鲑之间的基因交流，从而导致其生物多样性遭到破坏。

参考文献:

- [1] Yue P Q, Chen Y Y. China Red Data Book of Endangered Animals: Pisces [M]. Beijing: Science Press, 1998: 35-37. [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: 35-37.]
- [2] Zhao Y H, Zhang C G. Threatened fishes of the world: *Brachymystax lenok tsinlingensis* Li, 1966 (Salmonidae) [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2009(86): 11-12.
- [3] Li S Z. Discussion on the geographical distribution of salmonidae in China [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1984(1): 34-37. [李思忠. 中国鲑科鱼类地理分布的探讨 [J]. 动物学杂志, 1984(1): 34-37.]
- [4] Huang H F, Luo Z T, Liu M X. *Brachymystax lenok* (Pallas) found in Shaanxi [J]. *Chinese Journal of Zoology*,

- 1964(5): 220. [黄洪富, 罗志腾, 刘美侠. 细鳞鱼 *Brachymystax lenok* (Pallas) 在陕西的发现 [J]. 动物学杂志, 1964(5): 220.]
- [5] Li S Z. On a new subspecies of fresh-water trout, *Brachymystax lenok tsinlingensis*, from Taibaishan, Shannxi, China [J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 1966, **3**(1): 92-94. [李思忠. 陕西太白山细鳞鲑的一新亚种 [J]. 动物分类学报, 1966, **3**(1): 92-94.]
- [6] Li G L. Discussion on the freshwater fish fauna of Hebei Province [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1986(4): 4-9+12. [李国良. 关于河北省淡水鱼类区系的探讨 [J]. 动物学杂志, 1986(4): 4-9+12.]
- [7] Qin S Z, Wang S A. Studies on the subspecies of *Brachymystax lenok* (Pallas), China [J]. *Salmon Fishery*, 1989, **2**(1): 52-61. [秦树臻, 王所安. 细鳞鱼亚种问题的研究 [J]. 鲑鳟渔业, 1989, **2**(1): 52-61.]
- [8] Song S L, Fang S M. Discussion of the subspecies of Salmonidae fishes, *Brachymystax lenok tsinlingensis* Li, from Shaanxi, China [J]. *Journal of Lanzhou University (Natural Sciences)*, 1984, **20**(4): 92-95. [宋世良, 方树森. 秦岭细鳞鲑 *Brachymystax lenok tsinlingensis* Li 亚种问题的商榷 [J]. 兰州大学学报(自然科学版), 1984, **20**(4): 92-95.]
- [9] Wang H Y. Research of *Brachymystax* and *B. lenok* (Pallas) from northern area of Hebei [J]. *Salmon Fishery*, 1988, **1**(1): 16-25. [王鸿媛. 细鳞鱼属的研究和河北北部的细鳞鱼 [J]. 鲑鳟渔业, 1988, **1**(1): 16-25.]
- [10] Ma B, Yin J S, Li J P. Comparative studies on morphology and taxonomic position of two species of lenok [J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2005, **30**(2): 257-260. [马波, 尹家胜, 李景鹏. 黑龙江流域两种细鳞鲑的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.]
- [11] Mou Z B, Liu W, Xu G F. Study on comparative biology of two species lenok (*Brachymystax lenok*) in Ussuri River [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2006, **19**(2): 1-8. [牟振波, 刘伟, 徐革锋. 乌苏里江二种细鳞鱼生物学比较研究 [J]. 水产学杂志, 2006, **19**(2): 1-8.]
- [12] Ma B, Jiang Z F. Genetic diversity and relationship between two species of *Brachymystax* in Wusuli River revealed by microsatellites [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, **14**(1): 39-45. [马波, 姜作发. 乌苏里江 2 种细鳞鲑种群遗传多样性及亲缘关系的微卫星分析 [J]. 中国水产科学, 2007, **14**(1): 39-45.]
- [13] Ma B, Jiang Z F, Huo T B. Study on the taxonomic status of species of *Brachymystax* in Heilongjiang River and Tumen River systems based on mitochondrial control region sequence [J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2009, **34**(3): 499-506. [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.]
- [14] Wang F. Research progress of *Brachymystax lenok tsinlingensis* Li [J]. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 2011, **57**(5): 181-183. [王丰. 秦岭细鳞鲑的研究进展 [J]. 陕西农业科学, 2011, **57**(5): 181-183.]
- [15] Du Y Y, Wang T, Yang S W, et al. Discussion on species validity of *Brachymystax lenok tsinlingensis* in Qinling Mountains [J]. *Gansu Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2016, **46**(11): 122-126. [杜岩岩, 王太, 杨顺文, 等. 秦岭细鳞鲑物种有效性的探讨 [J]. 甘肃畜牧兽医, 2016, **46**(11): 122-126.]
- [16] Xing Y C, Lv B B, Ye E Q, et al. Revalidation and redescription of *Brachymystax tsinlingensis* Li, 1966 (Salmoniformes: Salmonidae) from China [J]. *Zootaxa*, 2015, **3962**(1): 191-205.
- [17] Meng Y X, Wang G H, Xiong D M, et al. The validity of subspecies of *Brachymystax lenok tsinlingensis* Li based on morphological difference analysis [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, **42**(3): 550-560. [蒙彦晓, 王桂华, 熊冬梅, 等. 基于形态学差异探讨秦岭细鳞鲑亚种有效性问题 [J]. 水生生物学报, 2018, **42**(3): 550-560.]
- [18] Uiblein F, Jagsch A, Honsig-Erlenburg W, et al. Status, habitat use, and vulnerability of the European grayling in Austrian waters [J]. *Journal of Fish Biology*, 2001, **59**(sa): 223-247.
- [19] 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.
- [20] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, **30**(12): 2725-2729.
- [21] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, 2009, **25**(11): 1451-1452.
- [22] Excoffier L, Lischer H E L. 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.
- [23] Yeh F C, Yang R C, Boyle T, et al. POPGENE, the User-friendly Shareware for Population Genetic Analysis [M]. Canada: University of Alberta Press, 1997(10): 295-301.
- [24] 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.
- [25] Cooper M, Lebart L, Morineau A, et al. Multivariate descriptive statistical analysis: correspondence analysis and related techniques for large matrices [J]. *Journal of Marketing Research*, 1985, **22**(2): 225-226.
- [26] Grant W, Bowen B. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation [J]. *Journal of Heredity*, 1998, **89**(5): 415-426.
- [27] Shao J, Xiong D, Chu Z, et al. Population differentiation and genetic diversity of endangered *Brachymystax tsinlingensis* Li between Yangtze River and Yellow River in China based on mtDNA [J]. *Mitochondrial DNA Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 2019, **30**(5): 695-701.
- [28] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, **32**(3): 314-331.
- [29] Wright S. Evolution and the Genetics of Populations: a Treatise in Four Volumes: Vol. 4 Variability Within and

- Among Natural Populations [M]. Chicago: The University of Chicago Press, 1978.
- [30] Serrano É A, Melo B F, Freitas-Souza D, *et al.* Species delimitation in Neotropical fishes of the genus *Characidium* (Teleostei, Characiformes) [J]. *Zoologica Scripta*, 2019, **48**(1): 69-80.
- [31] Wright S. Evolution in Mendelian populations [J]. *Genetics*, 1931, **16**(2): 97-159.
- [32] Xia Y Z, Sheng Y, Chen Y Y. DNA sequence variation in the mitochondrial control region of lenok (*Brachymystax lenok*) populations in China [J]. *Biodiversity Science*, 2006, **14**(1): 48-54. [夏颖哲, 盛岩, 陈宜瑜. 利用线粒体DNA控制区序列分析细鳞鲑种群的遗传结构 [J]. *生物多样性*, 2006, **14**(1): 48-54.]
- [33] Miralles A, Vasconcelos R, Perera A, *et al.* An integrative taxonomic revision of the Cape Verdean skinks (Squamata, Scincidae) [J]. *Zoologica Scripta*, 2011, **40**(1): 16-44.
- [34] Hart M W, Sunday J. Things fall apart: biological species form unconnected parsimony networks [J]. *Biology Letters*, 2007, **3**(5): 509-512.
- [35] Monaghan M T, Wild R, Elliot M, *et al.* Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation [J]. *Systematic Biology*, 2009, **58**(3): 298-311.
- [36] Wiens J J, Servedio M R. Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species [J]. *Proceedings Biological Sciences*, 2000, **267**(1444): 631-636.
- [37] Meng Y X, Wang G H, Xiong D M, *et al.* Geometric morphometric analysis of the morphological variation among three lenoks of genus *Brachymystax* in China [J]. *Pakistan Journal of Zoology*, 2018, **50**(3): 885-895.
- [38] Cassel A, Tammaru T. Allozyme variability in central, peripheral and isolated populations of the scarce heath (*Coenonympha hero*: Lepidoptera, Nymphalidae): implications for conservation [J]. *Conservation Genetics*, 2003, **4**(1): 83-93.

THE VALIDITY OF SPECIES OF *BRACHYMYSTAX TSINLINGENSIS* LI BASED ON MITOCHONDRIA CONTROL REGION AND MICROSATELLITE

XIONG Dong-Mei¹, MENG Yan-Xiao¹, ZHANG Xin-Miao¹, WANG Ji-Long², FENG Guang-Peng³,
SHAO Jian⁴ and WANG Li-Xin¹

(1. Department of Fisheries Science, College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; 2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 3. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China; 4. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Qinling lenok (*Brachymystax tsinlingensis* Li), a national Class II aquatic protected animal, is in urgent need of germplasm conservation due to the obvious decline of its wild population, however, since its subspecies was named in 1966, the status of its subspecies/species has been controversial until now. The unclear classification status seriously hinders the effective development of conservation work. Based on the mitochondrial control region gene sequence and microsatellite markers, we compared the molecular genetic differences between Qinling lenok and Heilongjiang lenok (*Brachymystax lenok* Pallas and *Brachymystax tumensis* Mori), to provide molecular evidence for clarifying the taxonomic status of Qinling lenok. The results showed as follows: (1) A total of 45 haplotypes were obtained by amplified mtDNA D-loop sequences of 217 samples, and no haplotypes were shared among above three groups. Phylogenetic tree based on haplotypes showed that each of the three groups of lenok was an independent clade. (2) The results of genetic differentiation based on 14 polymorphic loci showed that the genetic distance between Qinling lenok and *B. lenok*, Qinling lenok and *B. tumensis* was greater than the value between *B. lenok* and *B. tumensis*. (3) The genetic differentiation coefficient (F_{ST}) based on mitochondrial D-loop and polymorphic microsatellite loci analysis was higher than 0.25, indicating a high degree of genetic differentiation among the three groups. In the present study, a high degree of genetic differentiation among three groups were found. Combined with the previous results of obvious morphological differentiation between Qinling lenok and Heilongjiang lenok, which published by our team and the status of geographical isolation between Qinling and Heilongjiang rivers for a long time, we preliminarily determined that Qinling lenok is an independent species with Latin name *Brachymystax tsinlingensis* Li. It is suggested that Qinling lenok should be protected as an independent unit to avoid the destruction of germplasm resources caused by artificial introduction or hybridization.

Key words: Mitochondria control region; Microsatellite marker; *Brachymystax tsinlingensis* Li; *Brachymystax lenok* Pallas; *Brachymystax tumensis* Mori