

# 青藏高原裸裂尻属鱼类两个疑难种的分子系统学\*

祁得林 郭松长 赵新全\*\*

中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001

**摘要** 裸裂尻鱼属 [*Schizopygopsis* (Steindachner)] 鱼类广泛分布于青藏高原各河流上游干支流及其湖泊之中, 由于其广泛的分布域和特殊的生态环境而被生物学家视为青藏高原隆升过程中淡水鱼类物种起源、进化的模式物种。然而, 该属鱼类种间具有非常相似的形态特征, 致使大渡软刺裸裂尻鱼 (*Sp. malacanthus chengi*) 和前腹裸裂尻鱼 (*Sp. anteroventris*) 的分类学地位一直存在争议。本文采用聚合酶链式反应 (PCR) 和直接测序的方法, 获得了裸裂尻鱼属两个分类疑难种和 5 个指名种 ( $n=17$ ) 以及 5 个近缘种 ( $n=5$ ) 共 23 个个体的细胞色素 *b* (Cyt *b*) 基因的全序列 (1 140 bp), 并以同亚科的齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*) 作为外群构建了 ML、MP 和 Bayesian 进化树。序列差异和分子系统学分析表明, *Sp. malacanthus chengi* 和软刺裸裂尻鱼 (*Sp. malacanthus*) 间存在较大的差异 (2.06%), 两者并不聚在同一枝上; *Sp. anteroventris* 独立成一枝, 与其它指名裸裂尻鱼间显示出较大差异 (4.38% - 5.53%), 综合其它形态差异共同提示, *Sp. malacanthus chengi* 应提升为独立种, 沿用 *Sp. chengi* 的种名, 而 *Sp. anteroventris* 应该是裸裂尻鱼属的一个独立种 [动物学报 52 (6): 1058 - 1066, 2006]。

**关键词** 裸裂尻鱼属 裂腹鱼亚科鱼类 线粒体细胞色素 *b* 基因 分类 分子系统学 青藏高原

## Molecular systematics of two enigmatic fishes in the genus *Schizopygopsis* in the Qinghai-Tibetan Plateau\*

QI De-Lin, GUO Song-Chang, ZHAO Xin-Quan\*\*

Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Science, Xining 810001, China

**Abstract** The genus *Schizopygopsis* (Steindachner) is widely distributed in the upper reaches of almost all the main rivers and lakes in the Qinghai-Tibetan Plateau. The wide distribution range and the peculiar ecological specializations of these fishes are of biological interest. The *Schizopygopsis*, therefore, is an ideal model with which to investigate the speciation, diversification and evolution of freshwater fish endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau. Although special attention was given to the biology of the genus *Schizopygopsis* in the past, the taxonomy of *Sp. malacanthus chengi* (Fang) and *Sp. anteroventris* (Wu, Tsao, Zhu and Chen) remain controversial owing to their morphological similarity (for example, arrangement of pharyngeal teeth, sheath morphology of the lower jaw, character state of the pharyngeal bone, and gill rakers). In the present study, the complete sequences of the mitochondrial Cyt *b* gene from seventeen individuals represented *Sp. malacanthus chengi*, *Sp. anteroventris* and other five species of *Schizopygopsis* as well as five closed species in the same subfamily Schizothoracinae were sequenced. The sequences were subjected to maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and Bayesian analyses. The molecular phylogenetic analyses showed that *Sp. malacanthus chengi* and *Sp. malacanthus* didn't cluster together and there was a relatively high (2.06%) divergence between them. *Sp. anteroventris* was placed in a clade genetically distant from the other species of *Schizopygopsis*. Results from the molecular data, coupled with other morphological characters suggest that *Sp. malacanthus chengi* should be elevated to specific status, keeping the species name of *Sp. chengi*, while *Sp. anteroventris* should be retained as a distinct species in the genus *Schizopygopsis* [Acta Zoologica Sinica 52 (6): 1058 - 1066, 2006].

**Key words** *Schizopygopsis*, Schizothoracinae, Mitochondrial cytochrome *b* gene, Taxonomic classification, Molecular phylogenetics, Qinghai-Tibetan Plateau

2006-07-10 收稿, 2006-08-23 接受

\* 国家重点基础研究发展计划项目 (No. 2005CB422005) 资助 [This research was funded by the grant from National Basic Research Project of China]

\*\* 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: xqzhao@nwipb.ac.cn

© 2006 动物学报 Acta Zoologica Sinica

裸裂尻鱼属 [ *Schizopygopsis* (Steindachner) ], 属裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae) 鱼类, 是一类广泛分布于青藏高原各河流上游干支流及其湖泊之中的淡水鱼。由于其广泛的分布域和独特的生态环境而倍受生物学家们的关注, 曾一度视为青藏高原隆升过程中淡水鱼类物种起源、进化的模式物种 (武云飞、吴翠珍, 1991)。过去几年中, 生物学家针对裸裂尻鱼属鱼类的外形特征、解剖特征及其生物学特性进行了广泛的研究 (伍献文, 1964; 曹文宣等, 1981; 武云飞, 1984; 武云飞、吴翠珍, 1991; 乐佩琦, 2000), 为该属鱼类物种的界定积累了大量的资料。然而, 该属鱼类大多数都有着相似的生活方式, 生活在江河性水域中, 营刮食底栖或着生藻类生活, 适应性进化的趋同性致使这类鱼类在外形形态特征上也十分相似。常用的分类学特征如下颌角质化特征、下咽齿和下咽骨的形状、背腹鳍位置和鳍条数目等变异较大, 给传统分类研究带来了一定的困难, 致使该属鱼类两个种——大渡软刺裸裂尻鱼 [ *Schizopygopsis malacanthus chengi* (Fang) ] 和前腹裸裂尻鱼 [ *Schizopygopsis anteroventri* (Wu, Tsao, Zhu and Chen) ] 的分类地位一直存在争议 (Fang, 1936; 武云飞、吴翠珍, 1991; 乐佩琦, 2000)。

*Sp. malacanthus chengi* 分布于青藏高原东部大渡河水系上游干支流, 如支流麻柯河和龙卡河。Fang (1936) 首次描述了采集于四川松潘的标本, 并将其作为一独立种而归于裸裂尻鱼属中, 之后得到武云飞和吴翠珍 (1991) 的认可。但是, 在最近裂腹鱼亚科鱼类分类系统中, 乐佩琦 (2000) 将其视为软刺裸裂尻鱼 (*Sp. malacanthus*) 的一个亚种而归 *Sp. malacanthus* 之下。武云飞和吴翠珍 (1991) 报道了 *Sp. anteroventris*, 因其具有腹鳍起点相对于背鳍第一分枝鳍条的显著特征而视为独立种归于裸裂尻鱼属中。随后, 武云飞和吴翠珍 (1991) 利用 12 个外形及骨骼等特征对裸裂尻鱼属进行了种间系统发生关系的研究, 指出 *Sp. anteroventris* 的栖息地仅局限于澜沧江上游干流水域, 并再次肯定该种的有效性。但是, 在乐佩琦 (2000) 的分类系统中并未提及分布于澜沧江上游干流水域的裸裂尻鱼属鱼类, 似乎又否定了 *Sp. anteroventris* 种名的有效性。鉴于此, 采用一种更客观、更可靠的方法澄清上述可疑种的分类学地位势在必行。

现代生物学的发展使得基因测序工作更为快

捷、方便, 而线粒体 DNA (mtDNA) 的环形结构, 以及其碱基替换率高、几乎不发生重组、典型的母系遗传等分子特点 (Avice and Saunders, 1984) 使其在物种分类、系统发生和遗传多样性方面的应用越来越广泛 (Burrige, 1999; Xiao et al., 2001; Reed et al., 2002; Xiao et al., 2005; Carranza and Amat, 2005)。在诸多线粒体基因中, 线粒体细胞色素 *b* 基因 (Cyt *b*) 已被成功应用在鱼类分类和系统发生研究中, 一些传统分类方法很难界定的物种, 由此而得到了解决 (Lovejoy and Araujo, 2000; Xiao et al., 2001; Crespi and Fulton, 2004; 王义权等, 2004)。因此, 本文利用 PCR 扩增和直接测序方法测定了裸裂尻鱼属两个分类疑难种及其近缘种的 Cyt *b* 基因序列, 通过同源序列差异分析和种间系统发生关系的研究, 旨在解决大渡软刺裸裂尻鱼和前腹裸裂尻鱼的分类学地位。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

物种的鉴定和命名采用武云飞和吴翠珍 (1991) 及乐佩琦 (2000) 所提出的分类系统。大渡软刺裸裂尻鱼 (*Sp. malacanthus chengi*) 采集于大渡河上游支流麻柯河, 前腹裸裂尻鱼 (*Sp. anteroventris*) 采集于澜沧江上游扎曲河, 以裂腹鱼属 (*Schizothorax*) 的齐口裂腹鱼 (*S. prenanti*) 作为外群构建系统进化树。为确保结果的正确性, 分析中包括裂腹鱼亚科鱼类其它 4 个属的 5 个种。所有物种均采集于其分布地 (表 1 和图 1), 野外采样时, 取肌肉或鳍组织暂时保存于 - 20 °C 车载冰箱或液氮中, 带回实验室后保存在 - 70 °C 备用。

### 1.2 DNA 提取、扩增及测序

#### 1.2.1 基因组 DNA 提取

取保存备用的肌肉或鳍组织 20 mg, 置于干净灭菌的玻璃板上切碎 (肌肉) 或置于有液氮的研钵中研磨 (鳍组织), 然后转入到 1.5 ml EP 管中后, 用常规 SDS/ 蛋白酶 K 消化、酚 - 氯仿抽提、乙醇沉淀总 DNA, 获得的 DNA 经空气干燥后加入适量无菌 ddH<sub>2</sub>O 溶解, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 估计 DNA 浓度后 4 °C 保存备用。

1.2.2 mtDNA 细胞色素 *b* 的 PCR 扩增及测序  
采用聚合酶链式反应 (PCR) 技术和一对通用引物 L14724, 5'-GACTTGAAAACCCACCGTTG-3' 和

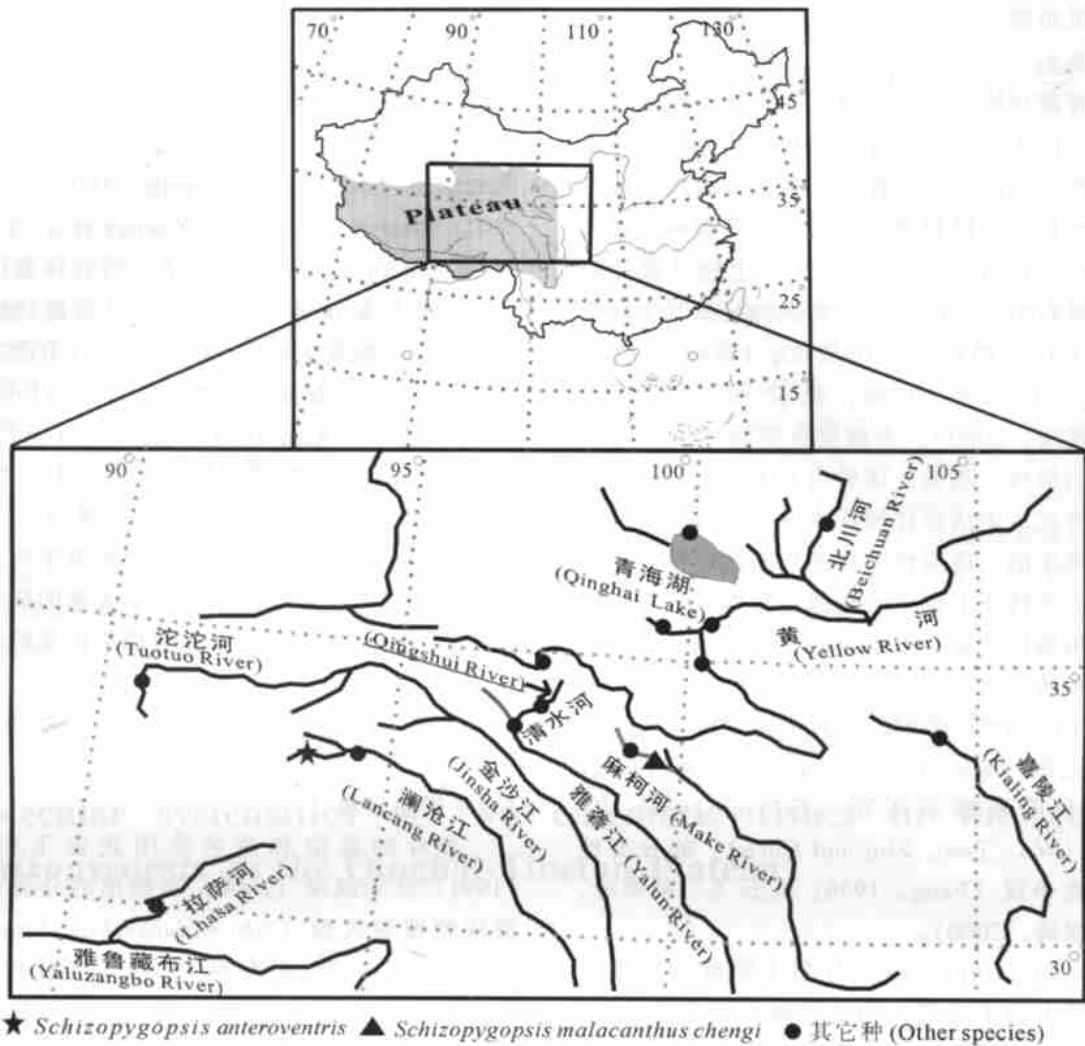


图 1 裸裂尻鱼属鱼类两个分类疑难种及其同亚科其它鱼类的采样地

上述中国地图来自 <http://www.guang.org/map.htm>

Fig. 1 Sampling localities for the two enigmatic species in the genus *Schizopygopsis* and species from the other genera in the Schizothoracinae

The map from <http://www.guang.org/map.htm>

H15915, 5'-CTCCGATCTCCGGATTACAAAGAC-3' (Xiao et al., 2001, 上海生工合成) 对 mtDNA Cyt *b* 基因全序列进行了扩增。PCR 扩增反应体系 30  $\mu$ l, 其中包括 1.0 u Ta KaRa EX *Taq* (Ta KaRa), 1  $\mu$ l dNTPs (2.5 mmol/L), 3.0  $\mu$ l 10  $\times$  *Taq* buffer (Ta KaRa, 含  $Mg^{2+}$ ), 两条引物 (10 mmol/L) 各 0.5  $\mu$ l, 0.2  $\mu$ g 模板 DNA。

PCR 扩增程序: 94 预变性 4 min, 94 变性 1 min, 50 退火 1 min, 72 延伸 1 min, 共 35 循环, 最后一循环 72 续延伸 5 min。PCR 扩增结束后, 取 2  $\mu$ l 扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶中点样进行电泳, EB 染色, 紫外凝胶成像仪观察并照相记录。扩增结束后, 依据厂商提供的操作指

南, 扩增产物采用 PCR Purification a CASpure PCR Purification Kit (Casarray, 上海) 进行纯化。纯化产物经 DYEnamic Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences Corporation) 试剂盒在 Tpersonal Thermocycler (Biometra) 上进行测序反应。反应体系 10  $\mu$ l, 含 DYEnamic Dye Terminator (Amersham Inc.) 2  $\mu$ l, 引物 5 pmol, 模板 25 - 50 ng, 灭菌超纯水补齐至 10  $\mu$ l。测序反应参数设置如下: 95 预变性 8 s, 95 15 s, 50 15 s, 60 90 s, 31 循环后, 60 90 s, 4 5 min。测序反应产物采用无水乙醇/醋酸铵法纯化后, 在 Megabase 500 自动测序仪 (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) 上进行测序。为确保测序的准确性,

表 1 鱼样的采集地点、水系、样本量及 mtDNA 单倍型数目

Table 1 Sampling locality, drainages, sample size and mtDNA haplotypes

种名 Species	采集地点 Collection location	水系 Drainage	样本量 Sample size	单倍型 Haplotype
齐口裂腹鱼 <i>Schizothorax prenanti</i> Tchang, 1930	青海省班玛县 Banma, Qinghai	麻柯河 Make River	1	<i>S. prenanti</i>
裸腹叶须鱼 <i>Ptychobarbus kaznakovi</i> Nikol'sky, 1903	青海省杂多县 Zadoi, Qinghai	澜沧江 Lancang River	1	<i>Pt. kaznakovi</i>
厚唇裸重鱼 <i>Gymnodiptychus pachycheilus</i> Herzenstein, 1892	青海省兴海县 Xinghai, Qinghai	黄河 Yellow River	1	<i>Gd. pachycheilus</i>
花斑裸鲤 <i>Gymnocypris eckloni</i> Herzenstein, 1891	青海省贵南县 Guinan, Qinghai	黄河 Yellow River	1	<i>G. eckloni</i>
青海湖裸鲤 <i>Gymnocypris przewalskii</i> Kessler, 1876	青海省共和县 Gonghe, Qinghai	青海湖 Qinghai Lake	1	<i>G. przewalskii</i>
极边扁咽齿鱼 <i>Platypharodon extremus</i> Herzenstein, 1891	青海省玛多县 Madoi, Qinghai	黄河 Yellow River	1	<i>Pl. extremus</i>
嘉陵裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis kialingensis</i> Tsao and Tun, 1962	四川省柳木寺 Langmusi, Sichuan	嘉陵江 Kialing River	1	<i>Sp. kialingensis</i>
拉萨裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis younghusbandi</i> Regan, 1905	西藏拉萨 Lhasa, Tibet	拉萨河 Lhasa River	3	<i>Sp. younghusbandi</i> 1 - 2
小头裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis microcephalus</i> Herzenstein, 1891	青海省格尔木 Geermu, Qinghai	沱沱河 Tuotuo River	4	<i>Sp. microcephalus</i> 1 - 2
软刺裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis malacanthus</i> Herzenstein, 1891	青海省称多县 Chengdoi, Qinghai	雅砻江 Yalun River	2	<i>Sp. malacanthus</i> 1
	青海省称多县 Chengdoi, Qinghai	清水河 Qingshui River	1	<i>Sp. malacanthus</i> 2
黄河裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis pylzovi</i> Kessler, 1876	青海省兴海县 Xinghai, Qinghai	黄河 Yellow River	1	<i>Sp. pylzovi</i> 1
	青海省大通县 Datong, Qinghai	北川河 Beichuan River	2	<i>Sp. pylzovi</i> 2
大渡软刺裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis malacanthus chengi</i> (Fang, 1936)	青海省班玛县 Banma, Qinghai	麻柯河 Make River	2	<i>Sp. m. chengi</i>
前腹裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis anteroventris</i> (Wu, Tsao, Zhu and Chen, 1979)	青海省杂多县 Zadoi, Qinghai	扎曲河 Zhaqu River	1	<i>Sp. anteroventris</i>

本研究以扩增引物 L14724、H15915 和一对内部引物 L15138 (5'-ATGATGACCGCCTTCGTGGGC-TA-3')、H15560 (5'-GCGTAGGCAATA GGAAG-TATC-3') (Xiao et al., 2001, 上海生工合成) 作为测序引物, 对所有个体 Cyt *b* 基因进行分段、正反链双向测序。

1.2.3 DNA 序列数据的处理 序列的比对排序采用 CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) 和 DNA STAR 软件包的 Editseq 5.0 及 MegAlign 5.0 软件

(DNASTAR Inc.)。用 MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004) 软件分析核苷酸的组成、变异位点, 并计算基于 Kumira 双参数模型的序列差异。排序后的序列利用 PAUP \* 4.0b10 (Swofford, 2000) 和 Mr Bayes 3.0 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) 软件分别构建最大似然 (Maximum likelihood, ML)、最大简约 (Maximum parsimony, MP) 和贝叶斯 (Bayesian) 进化树。

在 ML 分析中, 采用 Modeltest 3.06 (Posada

and Crandall, 1998) 所确定的最佳模型, 选择启发式搜索算法 (Heuristic search) 和简单叠加序列 (Simple addition sequence) 及 TBR (Tree-bisection-reconnection) 分支交换选项构建进化树。在 MP 分析中, 使用启发式搜索算法和逐步随机叠加序列 (Random-addition-sequence) 及 TBR 分支交换选项构建进化树。由于 MrBayes 3.0 中无法补充最佳模型, Bayesian 分析采用常用模型 GTR + I +  $\gamma$ 。同时应用自举检验 (Bootstrap test) 估计系统树中节点的支持率, ML、MP 重复次数分别为 100 和 1 000 次。

## 2 结果

### 2.1 序列变异特征

本研究 23 个个体均获得 mtDNA Cyt *b* 基因的全序列 (1 140 bp), 共检测出 17 个单倍型。在 17 个单倍型的 1 140 个位点中, 存在 376 个变异位点 (32.98%), 其中包括 202 个简约性位点和 174 个单突变位点。简约性位点在第一、二、三位密码子中的分布表现出明显的偏倚, 即第三位分布有 87.62% (177 个) 的简约性位点, 而第一和二位

分别只有 10.40% (21 个) 和 1.98% (4 个) 的简约性位点。本研究中裂腹鱼亚科鱼类碱基组成分析显示, A、T、C 和 G 碱基平均含量分别为 25.7%、30.5%、26.8% 和 17.0%, 其中 A + T 含量 (56.2%) 明显高于 G + C 含量 (43.8%), 表现出明显的反 G 偏倚, 显示 Cyt *b* 基因的共同特征 (Cantatore et al., 1994)。

### 2.2 序列差异

基于 Kumira 双参数模型的序列差异分析显示, 裸裂尻鱼属鱼类 5 个指名种间的序列差异在 1.33% - 5.34% 之间, 其最大值出现在 *Sp. kialingensis* 与 *Sp. younghusbandi*1 之间, 最小值出现在 *Sp. kialingensis* 与 *Sp. pylzovi*2 之间。采集于大渡河支流麻柯河的 *Sp. malacanthus chengi* 与其它裸裂尻鱼之间的序列差异为 0.35% - 4.38%, 与 *Sp. younghusbandi*1 具有最大的序列差异, 而与 *Sp. pylzovi*2 表现出最小差异。采集于澜沧江上游干支流的 *Sp. anteroventris* 与其它裸裂尻鱼之间的序列差异为 4.38% - 5.53%, 与 *Sp. kialingensis* 表现出最大的序列差异, 而与 *Sp. younghusbandi*1 表现出最小的差异 (表 2)。

表 2 各单倍型基于 mtDNA Cyt *b* 基因的序列差异百分度 (Kimura 双参数)

Table 2 Percent sequence divergence among haplotypes (Kimura's two-parameter distances) based on the complete sequence of cytochrome *b* gene

单倍型 Haplotype	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 <i>S. prenanti</i>																	
2 <i>Pt. kaznakovi</i>	20.34																
3 <i>Gd. pachycheilus</i>	23.37	18.26															
4 <i>G. eckloni</i>	20.97	14.23	17.52														
5 <i>G. przewalskii</i>	20.97	14.23	17.85	0.79													
6 <i>Pl. extremus</i>	21.77	15.49	18.84	6.40	6.30												
7 <i>Sp. kialingensis</i>	20.84	15.15	17.83	7.48	8.18	7.27											
8 <i>Sp. younghusbandi</i> 1	20.24	14.37	18.33	6.10	6.60	7.40	5.34										
9 <i>Sp. younghusbandi</i> 2	20.11	14.48	18.21	6.20	6.69	7.40	5.24	0.26									
10 <i>Sp. pylzovi</i> 1	21.08	15.60	18.20	7.19	7.88	7.18	1.51	4.76	4.67								
11 <i>Sp. microcephalus</i> 2	21.15	15.32	17.92	7.07	7.76	7.16	2.60	5.23	5.13	2.24							
12 <i>Sp. microcephalus</i> 1	20.80	15.00	17.35	6.78	7.47	6.88	2.42	5.04	4.95	2.06	0.53						
13 <i>Sp. pylzovi</i> 2	20.57	15.13	17.72	6.79	7.48	6.78	1.33	4.57	4.48	0.35	2.05	1.87					
14 <i>Sp. malacanthus</i> 1	20.48	15.13	17.98	6.69	7.18	7.18	2.88	4.86	4.76	2.70	2.97	2.79	2.51				
15 <i>Sp. malacanthus</i> 2	20.10	14.79	17.63	6.59	7.28	7.08	2.60	4.38	4.28	2.24	2.51	2.33	2.06	0.44			
16 <i>Sp. malacanthus chengi</i> 1	20.83	15.13	17.72	6.99	7.68	6.98	1.33	4.38	4.28	0.53	2.05	1.87	0.35	2.33	1.87		
17 <i>Sp. malacanthus chengi</i> 2	20.70	15.02	17.61	6.69	7.38	6.68	1.60	4.09	4.00	0.80	2.14	1.96	0.62	2.24	1.78	0.26	
18 <i>Sp. anteroventris</i>	20.62	14.05	17.26	6.79	7.29	7.60	5.53	4.68	4.58	4.96	5.04	4.85	4.76	4.86	4.38	4.38	4.09

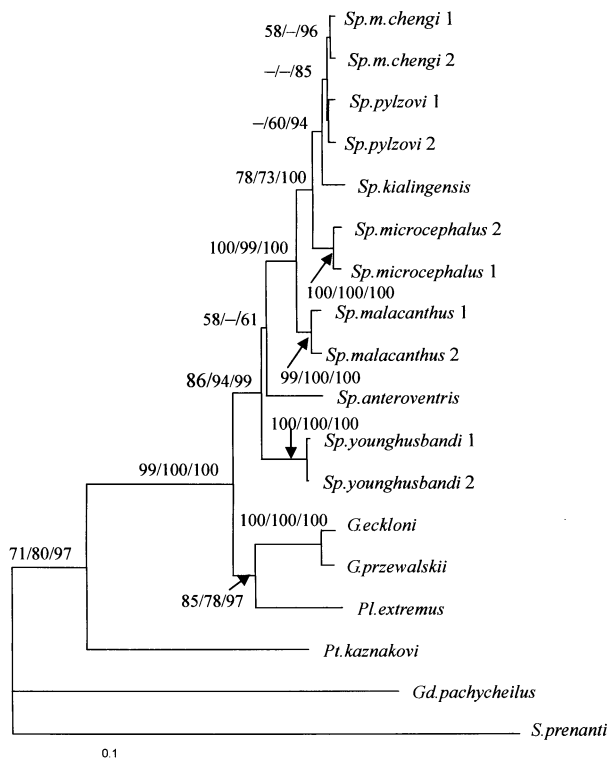


图2 青藏高原裸裂尻鱼属鱼类两个分类疑难种及其近缘种基于 Cyt b 基因的系统进化树

A. 基于最佳模型 TrN + G 构建的 ML 树 (- lnL 4 367.47)。B. 用 MP 法构建的进化树 (Tree length = 619, CI = 0.5958, RI = 0.6723)。C. 50% 严格一致 Bayesian 树。节点上数据从左到右依次为 ML、MP 的 BP 值 (%) 和 Bayesian 的 PP 值 (%)。“-”表示低支持率 (<50%)。

Fig. 2 Phylogenetic trees for two enigmatic species in the genus *Schizopygopsis* and species from the other genera in the Schizothoracinae based on mitochondrial cytochrome b sequences

A. Maximum likelihood tree (- lnL = 4 367.47) based on Likelihood settings from the best-fit model (TrN + G) selected by hLRT in Modeltest 3.06. B. The single-most parsimonious phylogenetic tree (length = 619, CI = 0.5958, RI = 0.6723). C. Fifty percent majority consensus tree derived from Bayesian analysis based on the common model GTR + I + . Numbers at nodes indicate bootstrap values (BP, %) from maximum-parsimony (left) and neighbor-joining (center), and posterior probabilities (PP, %) from Bayesian (right) methods. Dashes (-) at nodes denote low statistical support (<50% bootstrap).

### 2.3 系统发育关系

利用 ModelTest 3.06 (Posada and Crandall, 1998) 软件测试获得的最佳模型为 TrN + G。其参数设置如下: Base = (0.2596 0.2907 0.1589) Nst = 6 Rmat = (1.0000 21.0559 1.0000 1.0000 7.1203) Rates = gamma Shape = 0.2586 Pinvar = 0。

根据其模型在 PAUP \* 4.0b10 (Swofford, 2000) 软件中启发式搜索获得了一棵 ML 进化树 (- lnL 4367.47) (图2)。在该拓扑结构中, *Sp. malacanthus chengi* 的两个单倍型首先和 *Sp. pylzovi* 的两个单倍型聚在一起, 然后和 *Sp. kialingensis*、*Sp. microcephalus*、*Sp. malacanthus*、*Sp. youngusbandi* 及 *Sp. anteroventris* 共同组成一个支持率很高的单系群 (ML 和 MP 的 BP 分别为 86 和 94, Bayesian 的 PP 为 99), 形成由裸鲤属 (*Gymnocypris*) 的两个种 (花斑裸鲤和青海湖裸鲤) 和极边扁咽齿鱼 (*Pl. extremus*) 组成的单系群的姐妹群 (Sister group)。

最大简约性分析法获得了惟一的一棵 MP 进化树, 树长 (Tree length) 619, 一致性系数 (Consistency index, CI) 0.5958, 衰减系数 (Retention index, RI) 0.6723。ML 和 MP 法获得的系统进化树与 50% 严格一致的 Bayesian 树具有完全一致的拓扑结构, 区别在于有些节点的支持率有所不同 (图2)。

## 3 讨论

### 3.1 序列差异

近年来动物 Cyt b 基因研究表明, 种内个体间的序列差异一般在 0% - 4.06% 之间, 差异超过 6% 的个体间已有明显的亚种或种的分化 (杨学干等, 2001; Yang et al., 2002; 王义权等, 2004)。本研究中 5 种指名裸裂尻鱼属鱼类 (*Sp. pylzovi*, *Sp. kialingensis*, *Sp. microcephalus*, *Sp. malacanthus*, *Sp. youngusbandi*) 种间基于 Kimura 双参数的序列差异为 1.33% - 5.34% (平均为 3.08%), 而同亚科裂腹鱼属 (*Schizothorax*) 鱼类种间序列差异为 2.51% - 9.80% (平均 10.10%)、叶须鱼属 (*Ptychobarbus*) 鱼类种间序列差异为 5.23% - 7.60% (平均 6.41%) (待发表数据)。裸裂尻鱼属鱼类种间明显偏低的序列差异, 可能暗示裸裂尻鱼属鱼类的分化较晚, 即本属物种的形成时间不够长, 致使物种间在 Cyt b 基因上未能积累丰富的碱基变异。序列差异分析显示, 采自大渡河支流麻柯河的两个单倍型 (*Sp. malacanthus chengi* 1 - 2) 与其它裸裂尻鱼属鱼类间的序列差异在 0.35% - 4.38% 之间, 最小值出现在 *Sp. malacanthus chengi* 1 与 *Sp. pylzovi* 2 之间, 最大值出现在 *Sp. malacanthus chengi* 1 与 *Sp. youngusbandi* 1 之间, 而 *Sp. malacanthus chengi* 与 *Sp. malacanthus*

之间的平均序列差异高达 2.06 %; 而采自澜沧江上游扎曲河的 *Sp. anteroventris* 与其它裸裂尻鱼属鱼类间的序列差异在 4.38 % - 5.53 % 之间, 最小值出现在 *Sp. anteroventris* 与 *Sp. younghusbandi* 之间, 最大值出现在 *Sp. anteroventris* 与 *Sp. kialingensis* 之间。由此看来, 这种序列差异水平符合青藏高原裸裂尻鱼属鱼类种间 Cyt *b* 基因序列差异的观察值, *Sp. malacanthus chengi* 和 *Sp. anteroventris* 可能是裸裂尻鱼属的两个独立种。

### 3.2 系统进化关系

本研究中, 采用三种方法(最大简约法、最大似然法和邻接法)获得的系统进化树具有较高的一致性, 表明用 Cyt *b* 基因构建裸裂尻鱼属鱼类的聚类树能较客观地反映这些物种的系统发生关系。图 2 显示, *Sp. malacanthus chengi* 的两个单倍型首先和 *Sp. pylzovi* 的两个单倍型聚在一起, 然后和 *Sp. kialingensis*、*Sp. microcephalus* 及 *Sp. malacanthus* 共同组成一个支持率很高的单系群(ML 和 MP 的 BP 分别为 100 和 99, Bayesian 的 PP 为 100)。这种系统发生关系表明, 分布于大渡河支流麻柯河的 *Sp. malacanthus chengi* 与分布于雅砻江上游的 *Sp. malacanthus* 并非有着密切关系, 该结果不支持乐佩琦(2000)将 *Sp. malacanthus chengi* 列为 *Sp. malacanthus* 的亚种的观点。

武云飞等和吴翠珍(1991)依据形态差异, 将广泛分布于西藏昌都、青海囊谦和杂多等澜沧江上游干支流的一种裂腹鱼亚科鱼类定名为前腹裸裂尻鱼(*Sp. anteroventris*), 并作为一独立种列入裸裂尻鱼属, 之后得到武云飞和吴翠珍(1991)的认可。但是, 在乐佩琦(2000)提出的裂腹鱼亚科鱼类的分类系统中, 却废弃了前腹裸裂尻鱼这一种名, 并未提及分布于西藏昌都、青海囊谦和杂多等澜沧江上游干支流的裸裂尻鱼属鱼类。本研究中, 采集于澜沧江上游支流扎曲河的 *Sp. anteroventris* 在系统发育树上形成独立的一枝, 并与其它裸裂尻鱼属鱼类共同组成支持率较高的单系群, 这种关系表明, *Sp. anteroventris* 可能是一独立种而存在于裸裂尻鱼属中。

### 3.3 裸裂尻鱼属鱼类两个疑难种的分类学地位建议

青藏高原的隆起与演化对自身环境的变迁和现代水系格局的形成产生了深刻的影响(李吉均、方小敏, 1999; 李吉均等, 2001; 李长安等, 1998,

1999), 从而促进了该地区特有淡水鱼类的物种形成(He et al., 2001; Peng et al., 2004; Guo et al., 2005)。现代地质研究表明, 青藏高原的强烈隆升开始于 3.4 百万年前(李吉均、方小敏, 1999; Yu et al., 2000), 而始于 1.1 百万年的昆仑-黄河运动和其后发生的共和运动(0.15 百万年)对现代水系的发育和演化起到了决定性的作用(李吉均等, 1996; 李长安等, 1998, 1999)。*Sp. malacanthus chengi* 和 *Sp. malacanthus* 分别分布于大渡河和雅砻江上游, 虽然两河流同属长江支流, 但是两支流间地理隔离的形成历史悠久, 即使 *Sp. malacanthus chengi* 属于 *Sp. malacanthus* 的亚种, 则由于两种群的栖息场所仅局限于不同支流上游而种群间的基因交流受到长期的抑制。进一步比较两者的形态特征不难看出, *Sp. malacanthus chengi* 背鳍最后不分枝枝条软, 后缘两边锯齿不明显或有细少锯齿, 并且其下咽骨细狭; 而 *Sp. malacanthus* 虽然也有背鳍最后不分枝枝条较软的特征, 但其下半部较硬, 且其后缘锯齿非常明显, 下咽骨比较宽阔。由此看来, *Sp. malacanthus chengi* 和 *Sp. malacanthus* 均在外形形态特征方面表现出了对不同环境的适应性变异, 结合上述序列差异分析和系统发生关系的研究可以肯定, *Sp. malacanthus chengi* 不应该作为一个亚种而归属于 *Sp. malacanthus*。本研究支持武云飞和吴翠珍(1991)将 *Sp. malacanthus chengi* 视为独立种的建议, 而其有效种名仍以 *Sp. chengi* (Fang) 较为合适。

*Sp. anteroventris* 因其腹鳍起点相对于背鳍第一分枝鳍条, 与其它裸裂尻鱼属鱼类相比较, 其腹鳍相对接近胸鳍而获得前腹裸裂尻鱼的种名。武云飞和吴翠珍(1991)描述了其形态特征, 并将其作为一独立种而归入裸裂尻鱼属中。随后, 武云飞和吴翠珍(1991)通过比较诸多形态及解剖特征进一步认可了该种名的有效性, 并指出 *Sp. anteroventris* 只分布于澜沧江上游干流水域。然而, 近期提出的裂腹鱼亚科鱼类分类系统中却废弃了该种名, 并未描述澜沧江上游干流水域的裸裂尻鱼属鱼类(乐佩琦, 2000)。本研究支持武云飞和吴翠珍(1991)的观点, 即沿用前腹裸裂尻鱼(*Sp. anteroventris*)的种名, 将其作为一独立种而归属于裸裂尻鱼属中, 其理由在于: 1) *Sp. anteroventris* 具有与其它裸裂尻鱼属鱼类的共同特征, 如口下位, 下颌前缘具锐利角质, 全身无

鳞片而几乎裸露，下咽齿 2 行，主食底栖藻类；2) *Sp. anteroventris* 具有腹鳍起点相对于背鳍第一分枝鳍条的特征而又区别与其它裸裂尻鱼；3) *Sp. anteroventris* 的栖息地仅局限在澜沧江上游水域而不同于其它裸裂尻鱼；4) *Sp. anteroventris* 与其它指名裸裂尻鱼间的序列差异以及物种间系统发生关系符合裸裂尻鱼属鱼类物种界定的范围。

线粒体 DNA 序列在进化过程中表现为选择中性，由此建立的种间系统关系能够有效的解决传统形态分类方法难以界定的物种，如趋同进化或平行进化所产生的形态相似种 (Xiao et al., 2001; Bernard and Michael, 2004; Guo et al., 2005)。但是，线粒体 DNA 作为一种核外遗传物质，所含的遗传信息量有限、碱基转换在进化中容易达到饱和、易受进化噪音影响，在远缘物种的分类研究中要慎重对待。

**致谢** 感谢青海省渔业环境监测站唐文家同志在采样过程中给予的支持和帮助。

## 参考文献 (References)

- Avise JC, Saunders NC, 1984. Hybridization and introgression among species of sunfish (*Lepomis*) analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers. *Genetics* 108: 237 - 255.
- Bernard JC, Michael JF, 2004. Molecular systematics of Salmonidae: combined nuclear data yields a robust phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 658 - 679.
- Burridge CP, 1999. Molecular phylogeny of *Nemadactylus* and *Acantholatris* (Perciformes: Cirrhitoides: Cheilodactylidae), with implications for taxonomy and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 93 - 109.
- Cantatore P, Roberti M, Pesole G, Ludovico A, Milella F, Gadaleta MN, Saccone C, 1994. Evolutionary analysis of cytochrome b sequences in some perciformes: evidence for a slower rate of evolution than in mammals. *J. Molecular Evolution* 39: 589 - 597.
- Cao WX, Chen YY, Wu YF, Zhu SQ, 1981. Origin and evolution of schizothoracine fishes in relation to the upheaval of Qinghai-Xizang Plateau. In: The Team of the Comprehensive Scientific Expedition to the Qinghai-Xizang Plateau, Chinese Academy of Science ed. *Studies on the Period, Amplitude and Type of the Uplift of the Qinghai-Tibetan Plateau* Beijing: Science Press, 118 - 130 (In Chinese).
- Carranza S, Amat F, 2005. Taxonomy, biogeography and evolution of *Euproctus* (Amphibia: Salamandridae), with the resurrection of the genus *Calotriton* and the description of a new endemic species from the Iberian Peninsula. *Zool. J. Linnean Soc.* 145: 555 - 582.
- Crespi BJ, Fulton MJ, 2004. Molecular systematics of Salmonidae: combined nuclear data yields a robust phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 658 - 679.
- Fang PW, 1936. On some Schizothoracinae fishes from the western China preserved in the National Research Institute of Biology, Academy Sinica. *Sinensia* 7 (4): 421 - 458.
- Guo XG, He SP, Zhang YG, 2005. Phylogeny and biogeography of Chinese sisorid catfishes re-examined using mitochondrial cytochrome b and 16S rRNA gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 344 - 362.
- He SP, Cao WX, Chen YY, 2001. The uplift of Qinghai-Xizang (Tibet) Plateau and the vicariance speciation of glyptosternoid fishes (Siluriformes: Sisoridae). *Science in China (Series C)* 44: 644 - 651.
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150 - 163.
- Li CA, Yin HF, Yu QW, 1999. Evolution of drainage systems and its developing trend in connection with tectonic uplift of Eastern Kunlun Mt. *Chinese Science Bulletin (Chinese version)* 44 (2): 211 - 214 (In Chinese).
- Li CA, Yin HF, Yu QW, Huang CS, 1998. Tectonic uplift, water system response and environment evolution in the eastern part of the Kunlun mountains. *Science-Journal of China University of Geosciences* 23: 456 - 459 (In Chinese).
- Li JJ, Fang XM, Ma HZ, Zhu JJ, Pan BT, Chen HL, 1996. Geomorphologic and environmental evolution in upper reaches of Yellow River during the late Cenozoic. *Science in China (Series D, Chinese Version)* 26 (4): 316 - 322 (In Chinese).
- Li JJ, Fang XM, 1999. Uplift of the Tibetan Plateau and the environmental changes. *Chinese Science Bulletin* 43 (15): 1569 - 1574 (In Chinese).
- Li JJ, Fang XM, Pan BT, Zhao Z, Chen YG. 2001. Late cenozoic intensive uplift of Qinghai-Xizang Plateau and its impacts on environments in surrounding area. *Quaternary Science* 21 (5): 381 - 390 (In Chinese).
- Lovejoy NR, DE Araujo LG, 2000. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. *Molecular Ecology* 9: 259 - 268.
- Peng ZG, He SP, Zhang YG, 2004. Phylogenetic relationships of glyptosternoid fishes (Siluriformes: Sisoridae) inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 979 - 987.
- Posada D, Crandall KA, 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817 - 818.
- Reed DL, Carpenter KE, deGravelle MJ, 2002. Molecular systematics of the Jacks (Perciformes: Carangidae) based on mitochondrial cytochrome b sequences using parsimony, likelihood, and Bayesian approaches. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 523 - 524.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under missed models. *Bioinformatics* 19: 1572 - 1574.
- Swofford DL, 2000. PAUP\*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and Other Methods)*. Version 4. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewinak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876 - 4882.
- Wang YQ, Xu QS, Peng XX, Zhou HT, 2004. Taxonomic status of amphioxus *Branchiostoma belcheri* in Xiamen Beach estimated by homologous sequence of Cyt b gene. *Acta Zool. Sinica* 50 (2): 202 - 208 (In Chinese).
- Wu XW, 1964. *The fauna of Chinese Cyprinidea in China*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press (In Chinese).
- Wu YF, 1984. Systematics and taxonomy of the Schizothoracine fishes in China. *Acta Biologica Plateau Sinica* 3: 119 - 139 (In Chinese).
- Wu YF, Wu CZ, 1991. *The fishes of the Qinghai-Xizang plateau*. Chengdu: Science and Technology Press (In Chinese).
- Xiao H, Chen SY, Liu ZM, Zhang RD, Li WX, Zan RG, Zhang YP, 2005. Molecular phylogeny of *Sinoocycheilus* (Cypriniformes: Cyprinidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 67 - 77.
- Xiao W, Zhang Y, Liu H, 2001. Molecular systematics of *Xenocyprinae* (Teleostei: Cyprinidae): taxonomy, biogeography, and co-evolution of a Special group restricted in East Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 163 - 173.
- Yang XG, Wang YQ, Zhou KY, Liu ZQ, 2001. Phylogenetic relation-



- ships of Chinese brown frogs *Rana* based on sequence of mitochondrial cytochrome *b* gene. *Zool. Research* 22 (5): 345 - 350 (In Chinese).
- Yang XG, Wang YQ, Zhou KY, Liu ZQ, 2002. The authentication of *Oviductus Ranae* and their original animals by using molecular marker. *Bio. Pharm. Bull.* 25 (8): 1 035 - 1 039.
- Yu N, Zheng C, Zhang YP, Li WH, 2000. Molecular systematics of pikas (genus *Ochotona*) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16: 85 - 95.
- Yue PQ, 2000. The Fauna of Animal in China-Teleostei, Cyprinidae. Beijing: Beijing Science and Technology Press (In Chinese).
- 曹文宣, 陈宜瑜, 武云飞, 朱松泉, 1981. 裂腹鱼类的起源和演化及其与青藏高原的隆起关系. 见: 中国科学院青藏高原综合科学考察队编. 青藏高原隆起的时代、幅度和形式问题. 北京: 科学出版社, 118 - 130.
- 李长安, 殷鸿福, 于庆文, 1999. 东昆仑山构造隆升与水系演化及其发展趋势. *科学通报* 44 (2): 211 - 214.
- 李长安, 殷鸿福, 于庆文, 黄长生, 1998. 昆仑山东段的构造隆升、水系相应与环境变化. *地球科学—中国地质大学学报* 23 (5): 456 - 459.
- 李吉均, 方小敏, 1999. 青藏高原隆起与环境变化研究. *科学通报* 43 (15): 1 569 - 1 574.
- 李吉均, 方小敏, 马海洲, 朱俊杰, 潘保田, 陈怀录, 1996. 晚新生代黄河上游地貌演化与青藏高原隆起. *中国科学 (D 辑)* 26 (4): 316 - 322.
- 李吉均, 方小敏, 潘保田, 赵志军, 宋友桂, 2001. 新生代晚期青藏高原强烈隆起及其对周边环境的影响. *第四纪研究* 21 (5): 381 - 390.
- 王义权, 许群山, 彭宣宪, 周涵韬, 2004. 通过 *Cyt b* 基因同源序列比较评估厦门文昌鱼的分类学地位. *动物学报* 50 (2): 202 - 208.
- 伍献文, 1964. 中国鲤科鱼类志. 上海: 上海科学技术出版社.
- 武云飞, 1984. 中国裂腹鱼亚科鱼类分类与系统关系研究. *高原生物学报* 3: 119 - 139.
- 武云飞, 吴翠珍, 1991. 青藏高原鱼类. 成都: 四川科学技术出版社.
- 杨学干, 王义权, 周开亚, 刘中权, 2001. 从细胞色素 *b* 基因序列探讨我国林蛙属动物的系统发生关系. *动物学研究* 22 (5): 345 - 350.
- 乐佩琦, 2000. 中国动物志 硬骨鱼纲 鲤形目 (下卷). 北京: 科学出版社.

www.cnki.net