

刘红艳,蔡金,谢仲桂,等. 鳅科鱼类DNA条形码鉴定及系统进化研究[J]. 江西农业大学学报, 2020, 42(4): 766-777.



鳅科鱼类DNA条形码鉴定及系统进化研究

刘红艳^{1,2,3}, 蔡金^{1,2}, 谢仲桂⁴, 熊飞^{1,2,3*}, 王莹^{1,2},
王沁^{1,2}, 喻记新^{1,2}, 翟东东^{1,2}, 夏明^{1,2}, 陈元元^{1,2}

(1. 江汉大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430056; 2. 湖北省汉江流域特色生物资源保护开发与利用工程技术研究中心, 湖北 武汉 430056; 3. 持久性有毒污染物环境与健康危害湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430056; 4. 湖南生物机电职业技术学院, 湖南 长沙 410127)

摘要:【目的】为了探讨线粒体 *COI* 基因作为 DNA 条形码在鳅科鱼类物种鉴定中的有效性及在系统进化关系分析中的适用性, 对鳅科鱼类 3 亚科 18 属 61 种共 358 条线粒体 *COI* 基因序列进行了分析。【结果】61 种鳅科鱼类的种内和种间的平均遗传距离分别为 0.010 和 0.162, 种间平均遗传距离是种内平均遗传距离的 16.2 倍。鳅科鱼类遗传距离在种内、种间重叠较少, 能形成一定的 DNA 条形码间隙。ABGD 分类把 61 个物种划分为 66 个 OTUs, OTUs 的划分与距离法基本一致。系统聚类中, 有 6 组鱼类物种个体间相互混杂, 不能按各自的物种聚类, 有 4 个物种分化成明显的两支, 46 个物种能按各自的形态学分类分别聚成单支。南鳅属、花鳅属、似鳞头鳅属、瘦身鳅属和泥鳅属中部分物种没有按其形态学分类的属聚在一起。沙鳅亚科能形成单系, 但条鳅亚科和花鳅亚科不能形成单系。在研究中, *COI* 条形码可以鉴定鳅科鱼类 75.41% 的物种, 另外, *COI* 条形码也能够明确大多鳅科鱼类属和亚科的分属地位, 研究结果可为鳅科鱼类的物种鉴定和系统分类提供参考。

关键词: 鳅科; *COI* 基因; DNA 条形码; 物种鉴定

中图分类号: S917.4 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2020)04-0766-12

DNA Barcodes for Species Identification and Systematic Evolution of *Cobitidae* Fish

LIU Hong-yan^{1,2,3}, CAI Jin^{1,2}, XIE Zhong-gui⁴, XIONG Fei^{1,2,3*}, WANG Ying^{1,2},
WANG Qin^{1,2}, YU Ji-xin^{1,2}, ZHAI Dong-dong^{1,2}, XIA Ming^{1,2}, CHEN Yuan-yuan^{1,2}

(1. School of Life Sciences, Jiangnan University, Wuhan 430056, China; 2. Hubei Engineering Research Center for Protection and Utilization of Special Biological Resources in the Hanjiang River Basin, Wuhan 430056, China; 3. Hubei Key Laboratory of Environmental and Health Effects of Persistent Toxic Substances, Wuhan 430056, China; 4. Hunan Biological and Electromechanical Polytechnic, Changsha 410127, China)

Abstract: In order to study the validity of mitochondrial *COI* gene as a DNA barcoding in identification of species and the applicability of phylogenetic framework for *Cobitidae* fish, 358 mitochondrial *COI* gene sequences of 61 morphological species belonging to 18 genera and 3 subfamilies were studied. In this study, the

收稿日期: 2019-12-16 修回日期: 2020-02-22

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0900903)和国家自然科学基金项目(51779105, 51979123)

Project supported by National Key R & D Program of China (2018YFD0900903) and National Natural Science Foundation of China (51779105, 51979123)

作者简介: 刘红艳, orcid.org/0000-0001-5566-3491, lhy9603@126.com; *通信作者: 熊飞, 教授, 主要从事鱼类分子遗传研究, orcid.org/0000-0002-0692-6862, xf9603@163.com。

average genetic distances of intraspecific and interspecific species were 0.010 and 0.162, respectively. The average genetic distance of interspecific species was 16.2 times that of the average intraspecific species. DNA barcode was an efficient method for the identification of *Cobitidae* fish by the presence of barcode gaps. ABGD results defined 61 species as 66 operational taxonomic units (OTUs), which was roughly consistent with the distance method. In the systematic clustering, the members of 6 groups of fish species mixed with each other and could not assembled into their own taxa, four species differentiated into two branches, respectively, and the members of 46 species could grouped into one single branches according to their morphological classification. Some species in *Schistura*, *Cobitis*, *Lepidocephalichthys*, *Canthophrys* and *Misgurnus* were did not group together according to their morphologic genus. *Botiinae* could form monophyletic system, but *Nemacheilinae* and *Cobitinae* could not form monophyletic system. In this study, 75.41% species of *Cobitidae* could be successfully identified. In addition, *COI* gene barcode could clarified taxon status of most genera and subfamilies. These results will provide a reference for identification and phylogenetic framework for *Cobitidae* fish.

Keywords: *Cobitidae*; *COI* gene; DNA barcode; species identification

【研究意义】鳅科(*Cobitidae*)鱼类为鲤形目中一个较大的类群,种类多、形态差异大,分布广泛,分类关系较为复杂^[1-4]。一直以来,鳅科鱼类主要以可数性状和可量性状等形态特征以及一些内部特征为依据进行分类鉴定。【前人研究进展】陈景星^[5]通过颊部鳞片有无和眼下刺是否分叉等特征对沙鳅亚科鱼类进行分类。赵铁桥^[6]通过鳃、肠、脊椎骨等特征对条鳅属鱼类的分类关系进行了探讨。Kottelat^[7]基于骨骼学特征对鳅科进行了系统性的整理,将鳅科分为3个主要的类群。然而传统的鱼类分类需要对大量标本的可量和可数性状进行统计和测量,但是由于个体差异、性别差异和地理环境差异等因素的影响,在形态分类鉴定时容易造成相似种的混淆^[8-9]。在实际操作中,也往往会遇到标本量较少以及样本保存不完整等问题,给传统的物种分类和鉴定研究带来较大的困难。因而,单一的形态学鉴定已经无法满足鱼类物种鉴定的需求,选择一种更为有效、便捷的鱼类鉴定方法,并将其用于物种鉴定、分类和进化研究是非常必要的。DNA条形码是指生物体内能够代表该物种的、有足够变异的、标准的、易扩增并且相对较短的DNA片段,可以快速、准确的进行物种鉴定^[10]。DNA条形码自2003年由Hebert等^[11]提出后就得到了飞速发展。线粒体DNA的*COI*基因具有长度适中、进化速率适中,引物通用性好和易于扩增的特点,已经成为了对物种进行快速而准确鉴定的一个标准分子标签^[12]。目前,基于*COI*基因的DNA条形码技术在鱼类的分类鉴定及系统进化中得到了广泛的应用^[13],如对银鲴进行物种识别^[14]和对石首鱼科鱼类系统分类地位的探讨^[15]。

【本研究切入点】鳅科是鱼类系统中的一个重要分类单元,近年来,一些研究者以线粒体*Cytb*基因片段和控制区以及*ND4*和*ND5*基因分析了部分鳅科鱼类的系统分类关系^[16-17],但一些鳅科鱼类的系统发育关系仍未得到一致结论。Li等^[18]用线粒体的*COI*基因条形码对高原鳅属鱼类进行鉴定,但涉及鳅科的种类较少,仅包含高原鳅属鱼类。在鳅科鱼类中,利用线粒体*COI*基因作为DNA条形码对鳅科鱼类进行分类鉴定的研究还比较匮乏。【拟解决的关键问题】本研究通过对鳅科鱼类3亚科18属61种鱼类线粒体*COI*基因的序列进行分析,分析基于*COI*基因的DNA条形码在鳅科鱼类中作为物种鉴定的有效性,探讨其系统进化关系,以期对鳅科鱼类的物种鉴定和系统分类提供科学参考。

1 材料和方法

1.1 研究材料

2016—2018年长江上游江段采集了红尾副鳅、横纹南鳅、长薄鳅、小眼薄鳅、红唇薄鳅、中华沙鳅6种鳅科鱼类样本126尾。每个样品取其肌肉组织保存于体积分数为95%乙醇中用于DNA条形码分析。物种形态学鉴定主要依据《中国淡水鱼类检索》^[19]、《四川鱼类志》^[20]和《云南鱼类志》^[21]。另外,从GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)下载了55种鳅科鱼类的*COI*基因序列232条。总共包含了鳅科鱼类的3亚科18属61种,共358尾鱼类标本(表1)。

表 1 研究所用样本名录及相关信息
Tab.1 The samples used in the study and related information

分类阶元 Taxonomic category	物种 Species	数量 Sample number	Genbank 登录号 Genbank No.
条鳅亚科 Nemacheilinae			
副鳅属 <i>Paracobitis</i>	红尾副鳅 <i>Paracobitis variegatus</i>	10	本研究 This study
南鳅属 <i>Schistura</i>	横纹南鳅 <i>Schistura fasciolatus</i>	12	本研究 This study
	密纹南鳅 <i>Schistura vinciguerrae</i>	5	KM611023-KM611027
高原鳅属 <i>Triplophysa</i>	斯氏高原鳅 <i>Triplophysa stoliczkae</i>	5	KU558115-KU558119
	拟鲢高原鳅 <i>Triplophysa siluroides</i>	5	KU558062-KU558066
	硬刺高原鳅 <i>Triplophysa scleroptera</i>	5	KU558067-KU558071
	墨曲高原鳅 <i>Triplophysa moquensis</i>	5	KU557995、KU558002-KU558005
	前鳍高原鳅 <i>Triplophysa anterodorsalis</i>	2	KU557896-KU557897
	大桥高原鳅 <i>Triplophysa daqiaoensis</i>	2	KU557970-KU557971
	阿里高原鳅 <i>Triplophysa aliensis</i>	2	KU557894-KU557895
	软口高原鳅 <i>Triplophysa chondrostoma</i>	2	KU557963-KU557964
	达里湖高原鳅 <i>Triplophysa dalaica</i>	2	KU557967-KU557968
	黑背高原鳅 <i>Triplophysa dorsalis</i>	2	KU557972-KU557973
	麻尔柯河高原鳅 <i>Triplophysa markehenensis</i>	2	KU557984-KU557985
	小眼高原鳅 <i>Triplophysa microps</i>	1	KU557986
	南盘江高原鳅 <i>Triplophysa nanpanjiangensis</i>	1	KU558006
	东方高原鳅 <i>Triplophysa orientalis</i>	2	KU558036-KU558037
	黑斑高原鳅 <i>Triplophysa strauchii</i>	2	KU558121-KU558122
	西藏高原鳅 <i>Triplophysa tibetana</i>	1	KU558124
	武威高原鳅 <i>Triplophysa wuweiensis</i>	1	KU558125
	粗壮高原鳅 <i>Triplophysa robusta</i>	2	KU558059-KU558060
	贝氏高原鳅 <i>Trilophysa bleekeri</i>	3	KU557931, KU557932, KU557942
须鳅属 <i>Barbatula</i>	北方须鳅 <i>Barbatula barbatula</i>	6	MF172069-MF172074
沙鳅亚科 Botiinae			
薄鳅属 <i>Leptobotia</i>	长薄鳅 <i>Leptobotia elongata</i>	32	本研究 This study
	小眼薄鳅 <i>Leptobotia microphthalrna</i>	12	本研究 This study
	红唇薄鳅 <i>Leptobotia rubrilabris</i>	11	本研究 This study
	白氏薄鳅 <i>Leptobotia pellegrini</i>	2	KC871141、JN177223
	紫薄鳅 <i>Leptobotia taeniops</i>	12	MF122433-MF122436、KC871151- KC871156、JN177224、JN177236
	天台薄鳅 <i>Leptobotia tientaiensis</i>	2	MF122437-MF122438
副沙鳅属 <i>Parabotia</i>	武昌副沙鳅 <i>Parabotia banarescui</i>	3	KC871157-KC871158、JN177221
	双斑副沙鳅 <i>Parabotia bimaculata</i>	5	JN177220、KC871159、MF122599- MF122601
	花斑副沙鳅 <i>Parabotia fasciatus</i>	9	MF122602、KC871161-KC871166、 KC871168、AP011437
	漓江副沙鳅 <i>Parabotia lijiangensis</i>	1	JN177222
中华沙鳅属 <i>Sinibotia</i>	美丽沙鳅 <i>Sinibotia pulchra</i>	2	NC033950、AP012125
	宽体沙鳅 <i>Sinibotia reevesae</i>	8	MF123167-MF123174
	壮体沙鳅 <i>Sinibotia robusta</i>	3	KC871170、JN177235、AP011436

续表 1

分类阶元 Taxonomic category	物种 Species	数量 Sample number	Genbank 登录号 Genbank No.
沙鳅属 <i>Botia</i>	中华沙鳅 <i>Sinibotia superciliaris</i>	49	本研究 This study
	条纹沙鳅 <i>Botia striata</i>	7	KX946598-KX946600、KU568774- KU568775、MG018973、KX575850 KU568770-KU568773、MH087044、
	巴基斯坦沙鳅 <i>Botia lohachata</i>	10	KY867674、KY172981、KT781505、 KX455912、KF742423
缨须鳅属 <i>Syncrossus</i>	沼生缨须鳅 <i>Syncrossus helodes</i>	6	JN896645-JN896648、JQ661352、 JQ661353
多纪鳅属 <i>Yasuhikotakia</i>	缅甸缨须鳅 <i>Syncrossus bermorei</i>	5	KX245124-KX245128
	莫尔多纪鳅 <i>Yasuhikotakia morleti</i>	3	KU569085、JQ661342、JQ661343 KT781501、JQ661357、JQ661358、 JQ346170、KT781501
	橙鳍多纪鳅 <i>Yasuhikotakia modesta</i>	5	
花鳅亚科 <i>Cobitinae</i>			
花鳅属 <i>Cobitis</i>	大斑花鳅 <i>Cobitis macrostigma</i>	1	MF122127
	中华花鳅 <i>Cobitis sinensis</i>	2	JN177238、AY526868
	花鳅 <i>Cobitis taenia</i>	11	KM286526-KM286531、KR477174- KR477176、KJ128459、KJ128460
	条纹花鳅 <i>Cobitis striata</i>	1	AP013311
	长鳅 <i>Cobitise longata</i>	6	HQ961002、KR477016-KR477018、 KR477172、KR477173
	瘤鳅 <i>Cobitis strumicae</i>	4	HQ600713-HQ600716
	黑龙江鳅 <i>Cobitis lutheri</i>	3	HQ536324-HQ536326
	短命鳅 <i>Cobitis vardarensis</i>	5	HQ600717-HQ600718、KJ553250、 KJ553280、KJ553085
	小刺眼鳅属 <i>Acantopsis</i>	马头小刺眼鳅 <i>Acantopsis choirorhynchos</i>	10
苍带小刺眼鳅 <i>Acantopsis dialuzona</i>		6	MF509911-MF509912、MF509923- MF509926 MF122498-MF122502、KX224170、
泥鳅属 <i>Misgurnus</i>	泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	11	KX224173、JN027250、KM610772- KM610774
马头鳅属 <i>Acanthopsoides</i>	细拟长鳅 <i>Acanthopsoides gracilentus</i>	2	AP013298、NC029438
瘦身鳅属 <i>Canthophrys</i>	瘦身鳅 <i>Canthophrys gongota</i>	7	MH087035、KY172980、KJ909451- KJ909455
高丽鳅属 <i>Koreocobitis</i>	白吻鳅 <i>Koreocobitis rotundicaudata</i>	4	MK560670、HQ536390、HQ536391、 AP011339
柯氏鳅属 <i>Kottelatlimia</i>	锉柯氏鳅 <i>Kottelatlimia pristes</i>	2	NC031597、AP011343
似鳞头鳅属 <i>Lepidocephalichthys</i>	冈特似鳞头鳅 <i>Lepidocephalichthys guntea</i>	5	KX946694-KX946695、KU043346- KU043348
	赫氏似鳞头鳅 <i>Lepidocephalichthys hasselti</i>	5	KU692589-KU692591、KU692593、 AP013334
	温泉鳞头鳅 <i>Lepidocephalichthys thermalis</i>	6	KX266825、KU948307-KU948309、 KX946696、KX946697

1.2 DNA提取、PCR扩增和序列测定

基因组DNA采用GENEray细胞/组织基因组试剂盒法提取,获得的DNA用TE缓冲液溶解保存于-20℃备用。

PCR扩增引物采用鱼类COI序列通用引物FishF1/FishR1。

FishF1:5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'

FishR1:5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'

PCR反应体系为50 μL:上下游引物各为1.0 μL(浓度为10 μmol/L),基因组DNA模板总量约为20 ng,2×PCRMixture溶液25.0 μL,其余补足灭菌蒸馏水。PCR扩增程序为94℃预变性5 min,接着进行35个循环:94℃变性30 s,56℃退火45 s,72℃延伸45 s,最后再72℃延伸10 min,反应在PTC100型PCR仪上进行。PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测,确定PCR产物为目的条带后,送至武汉擎科生物技术有限公司进行双向测序。

1.3 数据分析

采用DNASTAR 8.0软件(DNASTAR Inc.Madison, WI, USA)中的SeqMan程序查看测序波峰图,手工去除序列两端峰型不规则的部分,保留峰型规则的序列,然后将两条单向序列拼接成一条双向序列。使用MEGA7.0软件^[22]中的Muscle程序对所有的序列进行同源比对,进行序列的编辑剪切,得到COI基因538 bp的同源序列矩阵用于随后的遗传分析。利用MEGA7.0软件统计变异位点、碱基组成情况,基于Kimura2-parameter双参数模型对种内、种间,属内、属间和亚科内、亚科间的遗传距离进行计算。利用网络版ABGD软件^[23]确定物种的可操作单元,参数采取默认设置,距离矩阵模型选取K2P模型,计算物种的OTUs数。利用RAxMLv8.1.17软件^[24]依据GTR+I+G模型构建贝叶斯(Bayesian)系统进化树,运行2 000 000代重复。

2 结果

2.1 COI序列信息

本研究获取鳅科鱼类358条序列,同源比对后538 bp的线粒体COI基因序列用于条形码分析,包含鳅科鱼类3亚科,18属,61个物种,所有序列都没有发现缺失、插入。A、T、C、G平均碱基组成分别为A23.5%、T30.9%、C28.2%、G17.4%,平均碱基含量A+T(54.4%)高于C+G(45.6%),显示明显的碱基组成偏倚性,与其他硬骨鱼类线粒体COI基因碱基组成基本一致^[25]。在538 pb序列位点中,有457个不变位点和81个变异位点,变异位点中有52个转换位点,29个颠换位点,转换与颠换比(R)为1.79。

2.2 遗传距离分析

基于K2P计算鳅科物种之间的遗传距离关系,种内、属内和亚科内的平均遗传距离分别为0.010、0.054和0.163,随着分类阶元的升高,遗传距离增大。亚科内的遗传距离为0.107~0.158,条鳅亚科内的遗传距离最小,花鳅亚科内的遗传距离最大。亚科间的遗传距离相差不大,为0.175~0.182。条鳅亚科与沙鳅亚科遗传距离相对较小,花鳅亚科与沙鳅亚科遗传距离相对较大(表2)。

表2 鳅科鱼类的亚科内遗传距离和亚科间遗传距离

Tab.2 Genetic distance within subfamily and between subfamily of Cobitidae fishes

亚科名称 Name of subfamily	1	2	3	亚科内平均遗传距离 Average distance within subfamily
1 条鳅亚科 Nemacheilinae				0.107
2 沙鳅亚科 Botiinae	0.175			0.114
3 花鳅亚科 Cobitinae	0.177	0.182		0.158

对角线下为两两亚科间遗传距离

The pairwise genetic distance of subfamilies was below diagonal

鳅科属内和属间遗传距离如表3,其中7个属只有1个物种,不计算属内遗传距离,其余11个属的属内遗传距离为0.013~0.112,平均值为0.054。其中中华沙鳅属属内遗传距离最小(0.013),似鳞头鳅属属

内遗传距离最大(0.112)。属间遗传距离为 0.092~0.210, 其中副沙鳅属与薄鳅属遗传距离最小(0.092), 须鳅属与马头鳅属(0.210)、瘦身鳅属与沙鳅属(0.210)遗传距离最大。

表 3 鳅科鱼类属内遗传距离和属间遗传距离
Tab.3 Genetic distance within genera and between genera of *Cobitidae* fishes

属名 Name of genera	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	属内距离 Within genus
1 副鳅属 <i>Paracobitis</i>																			NA
2 南鳅属 <i>Schistura</i>	0.119																		0.068
3 高原鳅属 <i>Triplophysa</i>	0.150	0.145																	0.074
4 须鳅属 <i>Barbatula</i>	0.184	0.165	0.170																NA
5 薄鳅属 <i>Leptobotia</i>	0.169	0.169	0.176	0.192															0.037
6 副沙鳅属 <i>Parabotia</i>	0.164	0.161	0.156	0.170	0.092														0.037
7 中华沙鳅属 <i>Sinibotia</i>	0.196	0.177	0.185	0.196	0.158	0.160													0.013
8 沙鳅属 <i>Botia</i>	0.174	0.173	0.167	0.198	0.149	0.152	0.143												0.042
9 缨须鳅属 <i>Syncrossus</i>	0.179	0.170	0.194	0.203	0.155	0.164	0.134	0.145											0.045
10 多纪鳅属 <i>Yasuhikotakia</i>	0.182	0.182	0.192	0.195	0.167	0.163	0.125	0.160	0.132										0.050
11 花鳅属 <i>Cobitis</i>	0.170	0.160	0.168	0.184	0.176	0.164	0.188	0.171	0.192	0.186									0.092
12 小刺眼鳅属 <i>Acantopsis</i>	0.184	0.180	0.187	0.202	0.177	0.160	0.170	0.181	0.193	0.196	0.177								0.026
13 泥鳅属 <i>Misgurnus</i>	0.162	0.169	0.171	0.186	0.188	0.173	0.177	0.186	0.197	0.183	0.127	0.170							NA
14 马头鳅属 <i>Acanthopsoides</i>	0.162	0.179	0.189	0.210	0.176	0.186	0.167	0.176	0.201	0.189	0.182	0.138	0.180						NA
15 瘦身鳅属 <i>Canthophrys</i>	0.201	0.194	0.188	0.209	0.173	0.175	0.208	0.210	0.197	0.202	0.198	0.171	0.198	0.166					NA
16 高丽鳅属 <i>Koreocobitis</i>	0.171	0.159	0.172	0.203	0.178	0.163	0.182	0.172	0.188	0.194	0.151	0.185	0.156	0.168	0.192				NA
17 柯氏鳅属 <i>Kottelatlimia</i>	0.158	0.169	0.178	0.194	0.196	0.189	0.189	0.180	0.200	0.184	0.173	0.170	0.183	0.151	0.208	0.184			NA
18 似鳞头鳅属 <i>Lepidocephalichthys</i>	0.184	0.180	0.185	0.210	0.177	0.174	0.191	0.177	0.202	0.196	0.175	0.167	0.186	0.172	0.169	0.183	0.161		0.112

对角线下为两两属间遗传距离;NA 表示只有一个物种的属, 不计算属内遗传距离

The pairwise genetic distance of genera was below diagonal, NA indicated that there was only one species in the genus, and we did not compute the genetic distance within the genus

7 个物种只有 1 个个体, 不计算种内遗传距离, 其余 54 种鳅科鱼类种内遗传距离为 0~0.130, 平均值为 0.010。除北方须鳅(0.022)、马头小刺眼鳅(0.026)、温泉似鳞头鳅(0.030)、泥鳅(0.031)、赫氏似鳞头鳅(0.032)、中华花鳅(0.090)、冈特似鳞头鳅(0.095)和瘤鳅(0.130) 8 个物种的种内遗传距离大于 0.02 外, 其余 46 个物种的种内遗传距离明显小于 Hebert 等^[11]提出的种内遗传距离小于 0.02 的标准, 其中有 18 个物种的种内遗传距离为 0。种间遗传距离为 0.001~0.219, 平均值为 0.162, 种间平均遗传距离是种内平均遗传距离的 16.2 倍, 种间平均遗传距离大于种内平均遗传距离的 10 倍以上。软口高原鳅与黑背高原鳅的种间遗传距离最小, 为 0.001, 北方须鳅与冈特似鳞头鳅种间遗传距离最大, 为 0.219。有 7 组鱼类种间遗传距离小于 0.02, 它们是: 软口高原鳅与黑背高原鳅(0.001)、小眼薄鳅与红唇薄鳅(0.002)、麻尔柯河高原鳅与硬刺高原鳅(0.002)、天台薄鳅与小眼薄鳅(0.002)、天台薄鳅与红唇薄鳅(0.002)、宽体沙鳅与中华沙鳅(0.004)、麻尔柯河高原鳅与贝氏高原鳅(0.009)。除软口高原鳅与黑背高原鳅的种间遗传距离(0.001)小于软口高原鳅种内遗传距离(0.003)外, 其余 53 种鳅科鱼类的种内遗传距离均小于其种间遗传距离。鳅科鱼类遗传距离在种内、种间重叠较少, 能形成一定的 DNA 条形码间隙(图 1)。

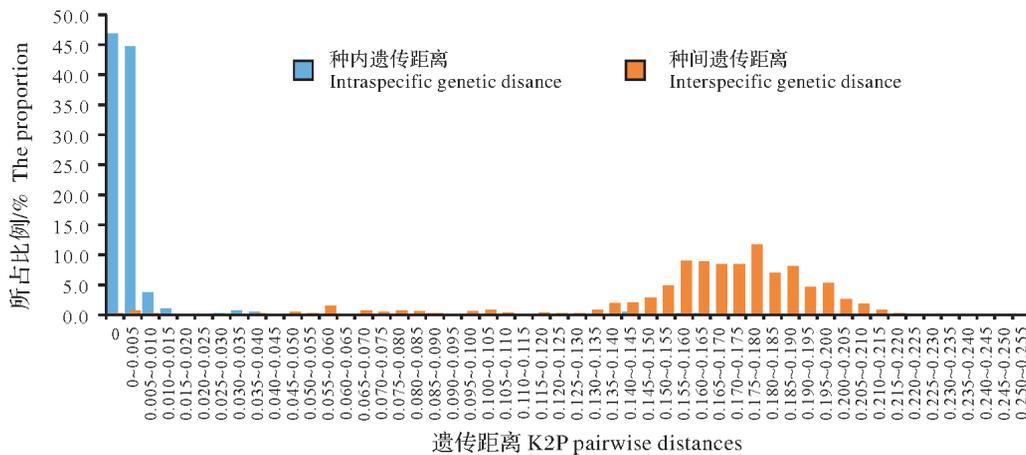


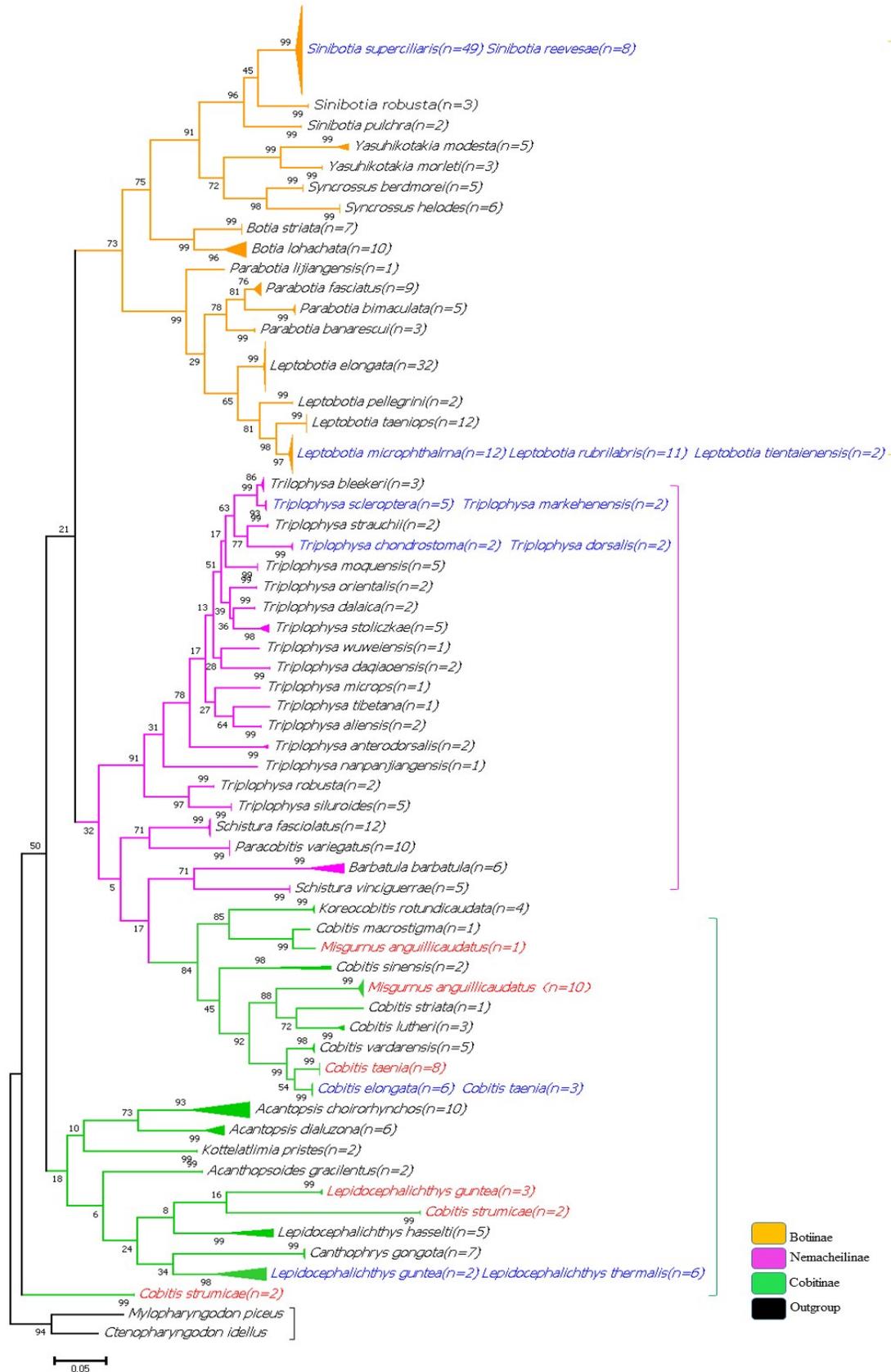
图 1 种内和种间遗传距离直方图

Fig.1 Histogram of genetic distance within species and between species

2.3 分子系统树及 OTUs 分析

基于 GTR+I+G 模型构建的 Bayesian 系统进化树如图 2, 以鲤科的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)和青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)作为外群时, 整个鳅科鱼类形成一个单系。在物种水平上, 有 6 组鱼类彼此的个体相互混杂, 不能按各自的物种聚类, 它们分别是: 中华沙鳅与宽体沙鳅、小眼薄鳅与红唇薄鳅和天台薄鳅、硬刺高原鳅与麻尔柯高原鳅、软口高原鳅与黑背高原鳅、花鳅与长鳅、冈特似鳞头鳅与温泉鳞头鳅。有 4 种鱼类分成明显的两支, 它们是花鳅、冈特似鳞头鳅、泥鳅、瘤鳅。其余 46 种鳅科鱼类均能按照各自的形态学分类分别聚成单支。在属的水平上, 泥鳅属的泥鳅与花鳅属鱼类聚在一起, 瘦身鳅属的瘦身鳅和花鳅属的瘤鳅与似鳞头鳅属鱼类聚在一起, 南鳅属的 2 个物种分别与副鳅属和须鳅属鱼类聚在一起, 其它属的鳅科鱼类均能按各自的属进行聚类。在亚科的水平上, 沙鳅亚科的鱼类聚成一大支, 条鳅亚科的全部种类与花鳅亚科的白吻鳅、泥鳅及花鳅属(除瘤鳅外)鱼类聚成第二大支, 花鳅亚科的小刺眼鳅属、马头鳅属、瘦身鳅属、柯氏鳅属、似鳞头鳅属与花鳅属的瘤鳅聚成第三大支。值得注意的是, 有 2 个瘤鳅个体处于整个鳅科鱼类聚类的根部位置。

ABGD 分析结果显示(图 3), 当先验种内遗传距离在 0.001 0~0.035 9 时, 划分了 66 个操作分类单元(OTUs), 多于形态学分类的物种。北方须鳅、花鳅、中华花鳅、泥鳅、冈特似鳞头鳅、瘤鳅分为 2 个 OTUs, 马头小刺眼鳅、赫氏似鳞头鳅分为了 3 个 OTUs。OTUs 的划分大体与距离法一致, 被分为多个 OTUs 的物种, 其种内遗传距离大多大于 0.02 的分类标准。



蓝色文字表示多个物种聚成一支, 红色文字表示明显分成两支的物种
 The blue text indicates several species clustered into one branch, and the red text indicates species that were clearly divided into two branches

图 2 COI 基因基于 GTR+I+G 模型构建的鳅科鱼类 Bayesian 系统树
 Fig.2 Bayesian phylogenetic tree of Cobitidae based on COI gene using GTR+I+G model

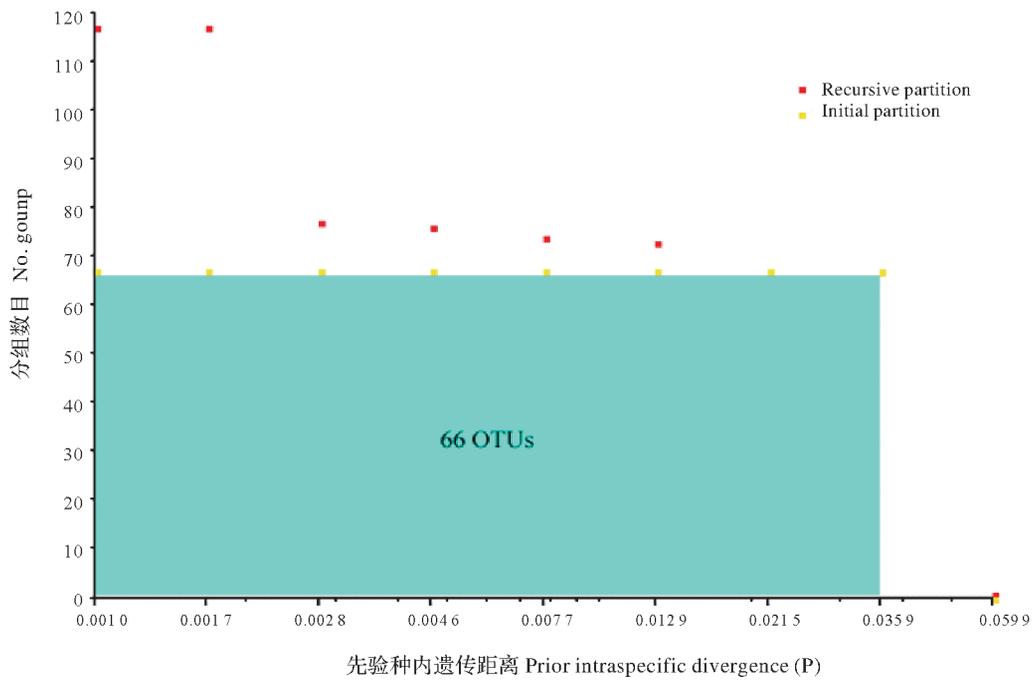


图3 ABGD划分的鳅科鱼类操作分类单元

Fig.3 Operational taxonomic units of Cobitidae defined by ABGD analysis

3 讨论

在 DNA 序列分析中,不同物种的种内和种间遗传距离大小是物种鉴定的一个重要判别标准。Hellberg 等^[26]利用线粒体 *COI* 基因作为条形码对动物物种鉴别时,认为种内的遗传距离不大于 0.02,且种间的遗传距离大于种内距离 10 倍以上可有效判别物种。本研究中,种内平均遗传距离为 0.010,种间平均遗传距离为 0.162,种间平均遗传距离是种内平均遗传距离的 16.2 倍,说明 *COI* 基因序列的遗传差异为鉴定鳅科鱼类提供了良好的基础。本研究中,除软口高原鳅与黑背高原鳅的种间遗传距离小于软口高原鳅种内遗传距离外,其余鳅科鱼类的种内遗传距离均小于其种间遗传距离,形成了一定的条形码间隙。

本研究中,鳅科鱼类的种内平均遗传距离(0.010)稍高于已报道的几种鱼类的条形码遗传距离,如大西洋邻加拿大水域的海水鱼类^[27]、长江中游的鲤科鱼类^[28]。较高的平均种内遗传距离主要是由于北方须鳅、马头小刺眼鳅、温泉似鳞头鳅、泥鳅、赫氏似鳞头鳅、中华花鳅、冈特似鳞头鳅、瘤鳅等鱼类中较高的种内遗传距离导致的。同一物种出现较高水平的种内遗传距离可能是由于原始物种错误鉴定,也可能是由于不同隐存的或是没有被发现的成种事件造成的^[29]。目前,已有不少分子数据证明鱼类存在数量巨大的隐存种^[30-31]。如唐琼英^[32]认为形态特征上比较相似的一些花鳅物种均被划分到中华花鳅这一物种中,中华花鳅可能是包含很多种类的一个复合类群。由于隐存种形态十分相似,根据外形特征不能把它们区分开,但在分子水平上表现出差异性,因此条形码相对于传统生物鉴定的优势在于可以揭示隐存种的存在。本研究中,北方须鳅、花鳅、中华花鳅、泥鳅、冈特似鳞头鳅、瘤鳅分为 2 个 OTUs,马头小刺眼鳅、赫氏似鳞头鳅分为了 3 个 OTUs。另外,聚类分析中,花鳅、冈特似鳞头鳅、泥鳅、瘤鳅在聚类上已经形成了两个明显的分支。这些结果显示,可能有隐存种的存在。另外,值得注意的是,有 2 个瘤鳅个体处于整个鳅科鱼类的根部位置,与另外 2 个正常聚类到花鳅亚科的瘤鳅个体的遗传距离差异相当大,但是这 4 个个体均来源于同一地理位置,因此,笔者推测处于鳅科根部位置的 2 个瘤鳅个体可能是原始种的错误鉴定造成的。

一般认为,鳅科中的沙鳅亚科是分类关系相对明确的一个类群,而条鳅亚科和花鳅亚科种类繁多,分类关系复杂。先前的学者支持沙鳅亚科为一个单系类群,但关于条鳅亚科和花鳅亚科单系性的问题

争议则较大^[17,32-34]。本研究中,沙鳅亚科的所有个体分别按各自的属聚类,然后各属聚为一大支,研究结果也支持沙鳅亚科为一单系类群,并且各属之间关系明确。唐琼英^[32]认为条鳅亚科包含大量形态上极为相似的物种,支持该亚科为一单系类群,但Nalbant^[33]认为条鳅亚科为多系起源。本研究结果中,花鳅亚科的一些物种与条鳅亚科的物种聚在一起,因此,条鳅亚科并不能形成单系。Liu等^[35]认为花鳅亚科物种的多样性最为丰富也最为复杂,认为花鳅亚科分为两支,一支由花鳅属、后鳍花鳅属、副泥鳅属和泥鳅属构成,另一支由小刺眼鳅属、瘦身鳅属和潘鳅属构成,不能形成单系。本研究中花鳅亚科的一些种类虽然与Liu等^[35]研究的种类有些差异,但本研究结果与Liu等的观点大体相同,花鳅亚科分为两支,支持花鳅为多系起源。

在鳅科中,Hora^[36]将沙鳅属从薄鳅属和副沙鳅属中分离出来成为一个独立的属,Fang^[37]又将沙鳅属分为沙鳅亚属(*botia*)、中华沙鳅亚属(*Sinibotia*)和鳃膜沙鳅亚属(*Hymenophysa*)。后来的一些学者在分类的时候并没有把这3个属进行细分,而是统一把它们归为沙鳅属^[20,32,35]。本研究的材料中,只包含有沙鳅亚属和中华沙鳅亚属的种类,但在聚类关系中,这2个亚属的物种分别聚类,各自形成单系,与沙鳅亚科其它属的物种形成平行分支,并且这2个属的遗传距离较远,本研究结果支持把这2个亚属上升到属的地位,分别为沙鳅属和中华沙鳅属。Bananescu等^[38]认为南鳅属包含了形态上差异极大的几个类群,是较为复杂的一个多系起源类群。本研究中包括了南鳅属的2个物种,2个南鳅属鱼类并没有聚在一起,横纹南鳅与副鳅属鱼类聚成在一起,密纹南鳅与须鳅属鱼类聚在一起,因此南鳅属物种分类关系还需要明确。陈景星等^[1]指出花鳅属是分化最为明显的一个属。本研究中,花鳅属物种的聚类比较分散,花鳅属鱼类并没有聚在一起,而是分别与花鳅亚科的其它属物种聚在一起,这表明了花鳅属的分类还存在较大的问题,对其物种的归属问题还需进一步的整理和细化。

DNA条形码最重要的作用就是对物种进行准确鉴别,弥补传统形态学鉴定方法的不足,明确鱼类的种类和系统进化过程^[39]。在本研究中,综合遗传距离、聚类分析和OTUs的结果,61种鳅科鱼类中有46个物种能利用COI条形码进行有效的鉴别,占总物种数的75.41%,另外,COI条形码在鳅科的属及亚科分类上也有一定的参考价值,能够明确大多数属和亚科物种的分类归属问题。

参考文献:

- [1] 陈景星,朱松泉.鳅科鱼类亚科的划分及其宗系发生的相互关系[J].动物分类学报,1984,9(2):201-208.
Chen J X, Zhu S Q. Phylogenetic relationships of the subfamilies in the loach family Cobitidae. (Pisces) [J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 1984, 9(2): 201-208.
- [2] 丁瑞华.四川西部高原鳅属鱼类两新种(鲤形目:鳅科)[J].动物分类学报,1993,18(2):247-252.
Ding R H. Two new species of the genus *triplophysa* from western Sichuan [J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 1993, 18(2): 247-252.
- [3] 杨军山,陈毅峰.副沙鳅属系统发育分析[J].动物分类学报,2004,29(2):173-180.
Yang J S, Chen Y F. Phylogenetic analysis of *Parabotia loaches* (Pisces, Cypriniformes, Cobitidae) [J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 2004, 29(2): 173-180.
- [4] Cao L, Zhang E, Cao L, et al. *Schistura alboguttata*, a new loach species of the family Nemacheilidae (Pisces: Cypriniformes) from the Pearl River basin in Guangxi, South China [J]. Zootaxa, 2018, 4471(1): 125-136.
- [5] 陈景星.中国沙鳅亚科鱼类系统分类的研究[J].动物学研究,1980,1(1):3-20.
Chen J X. Systematic taxonomic on the subfamily loach from China [J]. Zoological Research, 1980, 1(1): 3-20.
- [6] 赵铁桥.几种条鳅属(*Nemachilus*)鱼类的分类问题[J].动物学研究,1984,5(4):341-346.
Zhao T Q. Taxonomic problems of some *Nemachilus* fishes [J]. Zoological Research, 1984, 5(4): 341-346.
- [7] Kottelat M. diagnoses of a genus and 64 new species of fishes from Laos (Teleostei: Cyprinidae, Balitoridae, Bagridae, Synnathidae, Chaudhuriidae and Tetraodontidae) [J]. J South Asian Nat Hist, 2000, 5(1): 37-82.
- [8] Dahrudin H, Hutama A, Busson F, et al. Revisiting the ichthyodiversity of Java and Bali through DNA barcodes: taxonomic coverage, identification accuracy, cryptic diversity and identification of exotic species [J]. Molecular Ecology Resources,

- 2017, 17(2): 288-299.
- [9] 易啸, 王攀攀, 王军, 等. 基于线粒体 COI 的 DNA 条形码在对虾科种类鉴定中的研究[J]. 水产学报, 2018, 42(1): 1-9.
Yi X, Wang P P, Wang J, et al. The research of COI-based DNA barcoding in Penaeidae's identification[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(1): 1-9.
- [10] 吴波, 罗光明, 李永波, 等. 基于 DNA 条形码的我国吴茱萸主要栽培种遗传分析和分子鉴别研究[J]. 江西农业大学学报, 2016, 38(2): 381-385.
Wu B, Luo G M, Li Y B, et al. A study on genetic relationship analysis and molecular identification based on DNA barcoding of the main cultivated species of *Evodia rutaecarpa* in China[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2016, 38(2): 381-385.
- [11] Hebert P D N, Ratnasingham S, Waard J R. Barcoding animal life: cytochrome C oxidase subunit I divergences among closely related species[J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 2003, 270(1): 96-99.
- [12] Baisvar V S, Kumar R, Singh M, et al. Cytochrome C oxidase I gene based genetic divergence and molecular phylogeny among the species of fish genus *Channa*[J]. Proc Natl Acad of Sci, 2019, 10.1007/s40011-018-01070-w.
- [13] Bank F V D. A DNA barcoding study of seven cichlid species from southern Africa reveals their phylogenetic relationships [J]. African Journal of Aquatic Science, 2019, 44(3): 1-4.
- [14] 李渊, 宋娜, Khan Fozia Siyal, 等. 银鲳形态特征与 DNA 条形码研究[J]. 水产学报, 2013, 37(11): 1601-1608.
Li Y, Song N, Khan F S, et al. New evidence of morphological characters and DNA barcoding of *Pampus argenteus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(11): 1601-1608.
- [15] 徐春燕, 刘勇, 马超, 等. 基于 COI 基因的 DNA 条形码技术在石首鱼科鱼类系统分类中的应用[J]. 渔业研究, 2019, 41(5): 359-365.
Xu C Y, Liu Y, Ma C, et al. Application of DNA barcoding based on COI gene in phylogenetic classification of Sciaenidae [J]. Journal of Fisheries Research, 2019, 41(5): 359-365.
- [16] Tang Q, Xiong B, Yang X, et al. Phylogeny of the east Asian botiine loaches (Cypriniformes, Botiidae) inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences[J]. Hydrobiologia, 2005, 544(1): 249-258.
- [17] 刘思情, 张家波, 唐琼英, 等. 基于 ND4 和 ND5 基因序列分析的鳅超科鱼类系统发育关系[J]. 动物学研究, 2010, 31(3): 221-229.
Liu S Q, Zhang J B, Tang Q Y, et al. Phylogenetic relationships among Cobitoidea based on mitochondrial ND4 and ND5 gene sequences[J]. Zoological Research, 2010, 31(3): 221-229.
- [18] Li J, Wang Y, Jin H, et al. Identification of Triplophysa species from the Qinghai-Tibetan Plateau (QTP) and its adjacent regions through DNA barcodes[J]. Gene Amsterdam, 2017, 605(1): 12-19.
- [19] 朱松泉. 中国淡水鱼类检索[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1995.
Zhu S Q. Synopsis of Freshwater Fishes of China[M]. Nanjing: Jiangsu Science and Technology Publishing House, 1995.
- [20] 丁瑞华. 四川鱼类志[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994.
Ding R H. The Fishes of Sichuan[M]. Chengdu: Sichuan Sci Technol, 1994.
- [21] 褚新洛, 陈银瑞. 云南鱼类志(下册). 北京: 科学出版社, 1990.
Chu X L, Chen Y R. The fishes of Yunnan, China, part II [M]. Beijing: Science Press, 1990.
- [22] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [23] Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, et al. ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation[J]. Mol Ecol, 2012, 21(8): 1864-1877.
- [24] Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies[J]. Bioinformatics, 2014, 30(9): 1312-1313.
- [25] 梁宏伟, 孟彦, 罗相忠, 等. 线粒体 COI 基因条形码在鳢科鱼类物种鉴定中的应用[J]. 中国水产科学, 2018, 25(4): 772-782.
Liang H W, Meng Y, Luo X Z, et al. Species identification of DNA barcoding based on COI gene sequences in Bagridae catfishes[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(4): 772-782.

- [26] Hellberg R S, Kawalek M D, Van K T, et al. Comparison of DNA extraction and PCR setup methods for use in highthroughput DNA barcoding of fish species[J]. *Food Analytical Methods*, 2014, 7(10): 1950-1959.
- [27] Mccusker M R, Denti D, Van Guelpen L, et al. Barcoding Atlantic Canada's commonly encountered marine fishes[J]. *Mol Ecol Resour*, 2013, 13(2): 177-188.
- [28] Shen Y, Guan L, Wang D. DNA barcoding and evaluation of genetic diversity in Cyprinidae fish in the midstream of the Yangtze River[J]. *Ecology and Evolution*, 2016, 6(9): 2702-2713.
- [29] Puckridge M, Andreakis N, Appleyard S A, et al. Cryptic diversity in flathead fishes (Scorpaeniformes: Platycephalidae) across the Indo-West Pacific uncovered by DNA barcoding[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2013, 13(1): 32-42.
- [30] Rosso J J, Mabragana E M, González-Castro M, et al. DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina[J]. *Molecular Ecology Resources*. 2012, 12(6): 999-1011.
- [31] Gomes L C, Pessali T C, Sales N G, et al. Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin[J]. *Genetica*, 2015, 143(5): 581-588.
- [32] 唐琼英. 鳅超科鱼类分子系统发育研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
Tang Q Y. Molecular phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes) [D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2005.
- [33] Nalbant T T. Sixty million years of evolution. Part one: family botiidae (Pisces: Ostariophysi: Cobitoidea) [J]. *Trav Mus Nat "Gr antipa"*, 2002, 44: 343-379.
- [34] Nelson J S, Grande T, Wilson M. *Fishes of the World* [M]. Fifth Edition. New York: John Wiley & Sons, 2006.
- [35] Liu S, Mayden R L, Zhang J, et al. Phylogenetic relationships of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes) inferred from mitochondrial and nuclear genes with analyses of gene evolution[J]. *Gene*, 2012, 508(1): 60-72.
- [36] Hora S L. Classification, bionomics and evolution of homalopterid fishes [J]. *Mem India and Mus*, 1932, 12: 263-330.
- [37] Fang P W. *Study on the Botoid fishes of China* [M]. Sinensia, 1936.
- [38] Bananescu P M, Nalbant T T. A general classification of Nemacheilinae with description of two new genera (Teleostei: Cypriniformes: Cobitidae) [J]. *Trav Mus Histnat "Gr. antipa"*, 1995, 35: 429-496.
- [39] 陈信忠, 郭书林, 龚艳清. 鱼类DNA条形码技术的应用进展[J]. *水产科学*, 2017, 36(6): 834-842.
Chen X Z, Guo S L, Gong Y Q. Progression application of fish DNA barcoding: a review [J]. *Fisheries Science*, 2017, 36(6): 834-842.