

## 乌江干流中下游鱼类 DNA 条形码研究\*

张钰<sup>1</sup>, 李若剑<sup>2</sup>, 程如丽<sup>1</sup>, 王梦<sup>1</sup>, 刘智皓<sup>1</sup>, 陈启亮<sup>1</sup>, 李英文<sup>1</sup>, 沈彦君<sup>1</sup>

(1. 重庆师范大学 生命科学学院 重庆市高校动物生物学重点实验室, 重庆 401331;

2. 息烽县养龙司镇农业综合服务中心, 贵州 息烽 551106)

**摘要:**【目的】调查乌江干流中下游鱼类资源状况并初步构建乌江流域鱼类 DNA 条形码数据库。【方法】以 COI 基因作为 DNA 条形码,通过条形码缝隙(Barcode gap)分析、ABGD(Automatic barcode gap discovery)分析和邻接(Neighbor-joining, NJ)树构建等方法对乌江干流 647 尾鱼类样本进行了分子鉴定。【结果】1) 通过形态学鉴定,共鉴定出鱼类 3 目 8 科 35 属 47 种,其中鲤形目(Cypriniformes)、鲇形目(Siluriformes)和鲈形目(Perciformes)的种类数分别占全部种类数的 70.21%, 19.15% 和 10.64%。2) 非单样本物种中仅蛇鮈(*Saurogobio dabryi*)与银鮈(*Squalidus argentatus*)间不存在条形码缝隙。3) NJ 树分析结果显示 47 个物种均各自聚为 1 支,ABGD 分析结果显示 647 尾鱼类样本可划分为 49 个 OTU,与 NJ 树分析结果相近。4) DNA 条形码分子鉴定结果与形态鉴定结果一致。【结论】DNA 条形码在乌江鱼类中的鉴定成功率为 97.22%;初步构建的乌江流域鱼类 DNA 条形码数据库为乌江流域鱼类生物多样性保护提供了一定的科学依据和数据支持。

**关键词:** 乌江;DNA 条形码;COI 基因;鱼类资源

**中图分类号:** Q953

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-6693(2022)05-0029-11

乌江是长江上游南岸最大支流,发源于贵州省威宁县香炉山,在重庆市涪陵区汇入长江,全长 1 037 km,流域面积达 87 920 km<sup>2</sup>;六冲河汇口以上为乌江上游,六冲河汇口至思南为乌江中游,思南以下为乌江下游<sup>[1]</sup>。乌江流域内为喀斯特地貌发育,在长期的发育过程中形成了高山、河谷、溶洞等丰富的自然景观<sup>[2]</sup>。独特的地理环境和复杂的水文条件孕育出乌江流域丰富的鱼类资源。有研究显示,乌江北源六冲河共有鱼类 38 种(含亚种),而在它的南源三岔河仅发现鱼类 12 种<sup>[3-4]</sup>。根据 1989 年出版的《贵州鱼类志》<sup>[5]</sup>记载,贵州省境内乌江流域的鱼类有 106 种。此后,陆续有学者对乌江流域鱼类资源进行了补充调查<sup>[6-8]</sup>。综合上述研究资料可知:目前乌江流域内共有鱼类 7 目 18 科 163 种,其中鲤形目(Cypriniformes)种类最为丰富,达 103 种;鲤形目中又以鲤科(Cyprinidae)鱼类最多,共 89 种。

从 20 世纪 70 年代乌江渡水电站兴建至今,乌江干流上已陆续建成普定水电站、引子渡水电站、洪家渡水电站等 11 座水电站,它们共同构成的乌江水电站基地已成为中国 13 个大水电基地之一<sup>[9-10]</sup>。水利工程建设实现了供水、发电、防洪等功能,促进了社会经济增长,但也不可避免地引发了诸多生态问题。梯级水电不仅影响了原有河流生境的连续性从而使不同亚生境鱼类的基因交流减少<sup>[11]</sup>,而且改变并减少了河流水文情势类型,使河流的亚生境呈现同一化趋势<sup>[12]</sup>。长此以往,会带来鱼类资源衰减、鱼类组成改变、遗传多样性降低、河流生态系统退化等一系列问题<sup>[1,13-15]</sup>。研究表明,目前乌江流域局部地区已经出现鱼类资源衰减、鱼类群落结构改变、遗传多样性降低和遗传分化等现象<sup>[1,3,7,16-19]</sup>。因此,对于乌江鱼类资源及生物多样性的保护已刻不容缓。

DNA 条形码(DNA barcoding)是利用一段标准 DNA 序列对生物体进行物种区分的分子鉴定技术,在动物类群中通常以线粒体 COI 基因作为 DNA 条形码。DNA 条形码由于具有不依赖个体形态、不受生长发育阶段和性别影响、只需要少量生物体组织便可完成快速鉴别等优点,因而逐渐成为物种鉴定的重要手段<sup>[20-23]</sup>。随着对 DNA 条形码技术的不断研究和发展,且物种鉴定的生物信息学平台也不断完善,目前人们已建立了 BOLD 数

\* 收稿日期:2021-12-28 修回日期:2022-06-07 网络出版时间:2022-09-22 12:08

资助项目:国家自然科学基金(No. 31901183);重庆市自然科学基金面上项目(No. cstc2019jcyj-msxmX0157);重庆师范大学校立博士启动基金(No. 18XLB007)

第一作者简介:张钰,男,研究方向为鱼类分子生态学,E-mail: zhang.yv@qq.com;通信作者:沈彦君,男,讲师,博士,E-mail:shenyanjun@cqu.edu.cn.

网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20220919.1814.011.html

据库(<http://www.barcodinglife.org/>)、针对鱼类类群的 FISH-BOL 数据库(<http://www.Fishbol.org/>)等平台。专业准确的数据库建立使 DNA 条形码在生态学、保护生物学、海关、法医鉴定、检疫、医药鉴定等相关领域与行业中得到进一步的研究与应用,而针对鱼类 DNA 条形码研究的专业数据库建设还对鱼类资源监测、种群遗传监测、濒危动物保护、环境 DNA 检测等更是有着重要意义<sup>[24-26]</sup>。

基于上述研究背景,本研究采用 DNA 条形码技术对乌江干流中下游鱼类资源状况进行调查,通过采集干流鱼类样本,测定样本的 COI 基因,并分析条形码缝隙(Barcode gap)、遗传距离、ABGD(Automatic barcode gap discovery)和构建邻接(Neighbor-joining, NJ)树等来评估乌江鱼类 DNA 条形码有效性和物种多样性,并初步构建乌江流域渔业生物的 DNA 条形码数据库及分析鉴定系统,以便为当地鱼类生物多样性保护提供科学依据和数据支持。

## 1 材料方法

### 1.1 样本采集

本研究所用样本共 674 尾,于 2019 年 1 月—2020 年 8 月在乌江干流共 9 个采样点(图 1)采集获取,采集方式主要包括地笼、垂钓、向当地渔民购买等。鱼类样本首先参考《中国动物志》<sup>[27-29]</sup>进行形态鉴定分类,随后取样本背部肌肉和鳍条样品浸泡于无水乙醇中固定保存用于 DNA 提取,其余样本浸泡于体积分数为 10% 的甲醛溶液中保存,并存放于重庆师范大学标本库。

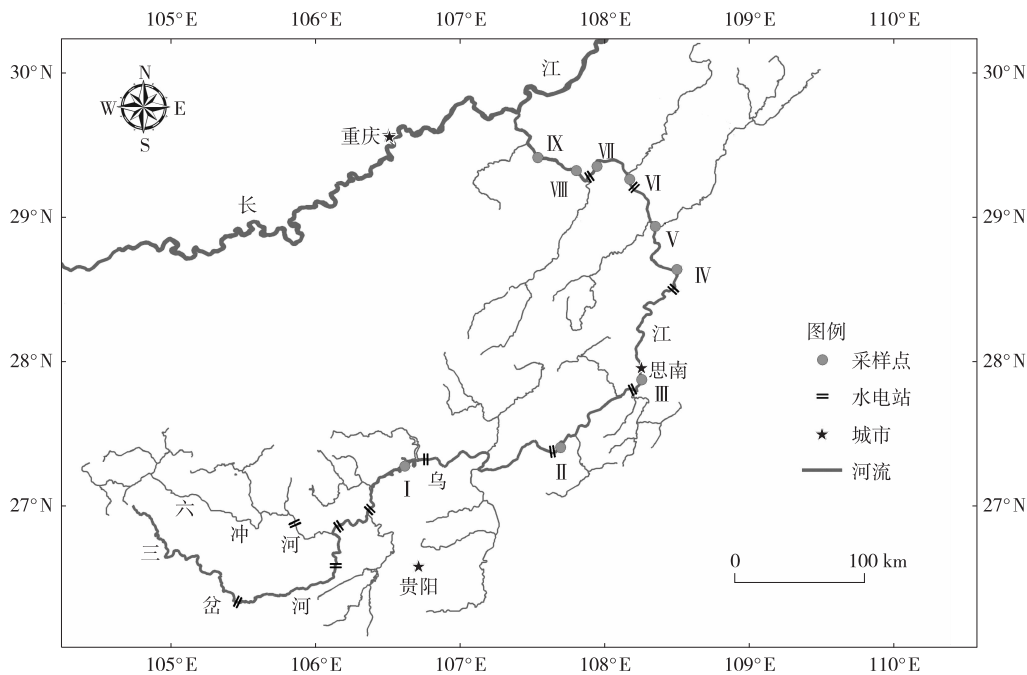


图 1 乌江中下游采样点位置

Fig. 1 Sampling sites in the middle and lower of Wujiang river

### 1.2 DNA 提取及序列扩增

使用 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒提取鱼类样本 DNA,实验流程按照试剂盒说明完成。提取到的模板 DNA 使用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,并进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 30  $\mu$ L,其中包括 Es Taq MasterMix 15  $\mu$ L,上下游引物各 1.2  $\mu$ L,模板 DNA 4.8  $\mu$ L,双蒸水 7.8  $\mu$ L。COI 基因条形码上下游引物如下: Fish-F1: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'; Fish-R1: 5'-TAGACTTCTGGGTGGC-CAAAGAATCA-3'<sup>[30]</sup>。PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 25~35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 终延伸 2 min。PCR 产物使用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,检测合格的产物送往生物公司完成测序。

### 1.3 数据分析

测序结果使用 DNASTAR 软件包基于测序峰图手动检测。检测合格后将所有序列文件整合为一个

FASTA 文件,使用 MEGA 7.0<sup>[31]</sup>对所有序列进行比对。随后基于比对后的序列使用 MEGA 7.0 构建 NJ 树,采用 Kimura 2-parameter(K2P)遗传距离模型<sup>[32]</sup>,进行 1 000 次重复,其余参数采用默认参数。以 NJ 树进化支为单位,对形态物种使用 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 BOLD 数据库进行检索比对,以 3% 作为阈值,当序列相似度大于或等于 97% 时,将它们视为同一物种<sup>[33]</sup>。检索完成后将所有 COI 基因条形码序列上传至 BOLD 数据库并同步到 NCBI 数据库。

使用 BOLD 在线分析系统计算所有 DNA 条形码序列的序列组成,并基于 K2P 模型分析遗传距离和条形码缝隙。另外,基于 RESL<sup>[34]</sup>方法将单个物种的所有样本列为 1 个操作分类单元(Operational taxonomic units, OTU)。将所有 DNA 条形码序列作为数据集,利用 ABGD<sup>[35]</sup>(<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>)在线分析网站估算 OTU 数量,距离矩阵使用 Jukes-Cantor (JC69)、Kimura (K80) TS/TV 和 Simple Distance 模型分别进行分析,相对间隙宽度(Relative gap width, X)、 $P_{\min}$ 、 $P_{\max}$  等其余参数选择默认值。

## 2 结果

### 2.1 鉴定结果与样品信息

表 1 显示:从 674 尾样本中共鉴定出鱼类 3 目 8 科 35 属 47 种;鲤形目(Cypriniformes)鱼类共计 33 种,占全部种数的 70.21%,而其中鲤科(Cyprinidae)鱼类共计 11 亚科 26 属 32 种,鳅科(Cobitidae)鱼类仅 1 种,这可能与本研究的采集方式有较密切的关联;鲇形目(Siluriformes)鱼类共计 2 科 5 属 9 种,占全部种类数的 19.15%;鲈形目(Perciformes)鱼类共计 4 科 4 属 5 种,占全部种类数的 10.64%。利用 NCBI 和 BOLD 数据库对各形态物种的 DNA 条形码进行检索,结果与形态鉴定结果基本一致。在所有种类中,仅 1 种鳊属物种(*Rhodeus* sp.)相似度低于 97%,仅能匹配到属水平。另外,各物种平均个体数为 14 尾,其中物种个体数最高的是鳊(*Hemiculter leucisculus*),共 161 尾;其次是银鮡(*Squalidus argentatus*),共 132 尾;其余物种个体数为 1~51 尾不等。

### 2.2 DNA 条形码序列特征

本研究共获得 COI 基因 DNA 条形码序列 674 条,序列长度为 585 bp。表 2 显示了这些样本序列中 A、T、C、G 等 4 种碱基的平均含量,A+T 含量(55.16%)高于 G+C 含量(44.84%),表现出后生动物典型的 A-T 偏好性。各序列间 G+C 含量相差较大,绝大多数为 44% 左右。在序列密码子中,位点 1 与位点 2 的 G+C 含量相对稳定;而位点 3 的 G+C 含量相差很大。此外序列分析结果还显示:在上述 DNA 条形码中,保守位点有 341 个(占比为 58.29%),变异位点有 244 个(占比为 41.71%),简约变异信息位点有 232 个(占比为 39.66%)。

### 2.3 DNA 条形码分析结果

由表 3 可知,分类阶元越高,相对应的平均遗传距离越大。表 4 显示了物种的平均遗传距离,其中最大的是泥鳅,为 17.57%,个体数仅有 2 尾。另外,个体数为 2 且平均遗传距离较高的种类还有飘鱼和波氏吻鰕虎鱼,平均遗传距离分别为 3.75% 和 4.54%;个体数大于 2 且平均遗传距离较高的有高体鳊和蛇鮡,平均遗传距离分别为 3.10% 和 4.95%;其余物种的平均遗传距离为 0 到 0.88%。对个体数为 1 的物种而言,此分析不适用。

目前,基于遗传距离的距离法(Distance-based)和基于系统发育树的系统树法(Monophyly-based)是主要的 DNA 条形码技术分析方法之一<sup>[25]</sup>。在距离法分析方法中,条形码缝隙是重要的指标之一,即种内最大遗传距离要小于种间最小遗传距离,两者差异越大则条形码缝隙越明显<sup>[25,33]</sup>。本研究条形码缝隙分析结果显示(表 4),47 个物种中仅蛇鮡不存在条形码缝隙。另外,46 个存在条形码缝隙的物种中泥鳅和银鮡两物种的条形码缝隙较小,其余物种均具有明显的条形码缝隙。

基于各样本 COI 基因 DNA 条形码序列构建的 NJ 树显示(图 2),所有鱼类样本共形成 47 个分类单元,各物种均各自聚集为 1 支;另外鲤形目、鲈形目和鲇形目物种各自聚集为 1 个单系支,NJ 树各节点的支持率均为 100%。

ABGD 分析结果如表 5 所示,DNA 条形码序列数据集基于 3 种距离模型分析共产生 49 到 195 个 OTU, $P$  值为 0.001 0 至 0.059 9。其中 Simple Distance 模型递减的初始划分和回归划分均为 61 到 49 个 OTU;Jukes-Cantor(JC69)和 Kimura(K80) TS/TV 模型的初始划分和回归划分的 OUT 数目均为 195 到 49 个。当  $P=0.035 9$  或  $P=0.059 9$  时,3 种模型的初始划分与回归划分均具有最小差异值,且 OTU 数目均为 49,与 NJ 树的集群结果也最为接近。



表 2 样本序列碱基组成

Tab. 2 The base composition of the sample sequence

%

碱基类型	最小含量	平均含量	最大含量	标准误	碱基类型	最小含量	平均含量	最大含量	标准误
G	14.53	16.73	18.29	0.03	G+C	40.00	44.84	49.06	0.06
C	25.30	28.11	30.77	0.04	G+C(位点 1)	50.77	54.58	55.90	0.05
A	22.05	25.14	27.86	0.04	G+C(位点 2)	42.05	43.20	44.10	0.01
T	27.69	30.02	33.68	0.04	G+C(位点 3)	26.67	36.75	49.74	0.17

表 3 各分类学水平的序列差异分布

Tab. 3 The distribution of sequence divergence at each taxonomic level

分类学水平	比对数/个	最小遗传距离/%	平均遗传距离/%	最大遗传距离/%	标准误/%
种内	25 389	0.00	0.52	17.57	0.00
属内	5 487	1.65	7.17	16.24	0.00
科内	83 068	2.22	15.84	24.66	0.00

### 3 讨论

据 Hebert 等人研究发现,鉴别大多数物种时通常可以采取 2% 的遗传距离阈值,即当个体间遗传距离小于 2% 时为同一物种,反之为不同物种;另外,Hebert 等人还提出 10 倍种内平均遗传距离(“10×rule”)的鉴别标准,即种间平均遗传距离大于种内平均遗传距离的 10 倍<sup>[22,37]</sup>。在本研究调查的 47 种鱼类中,10 种个体数为 1 的鱼类不适用于种内遗传距离分析,其余 37 种鱼类中种内最大遗传距离大于 2% 的有 10 种——其中又有 5 种鱼类与近缘物种的种间平均遗传距离为它们的种内平均遗传距离的 10 倍有余,符合“10×rule”鉴别标准,其余 5 种鱼类则分别为种内最大遗传距离较大的泥鳅、波氏吻鰕虎鱼、瓢鱼、高体鳊鲂和蛇鮈(表 4)。距离法鉴别物种的成功率主要取决于条形码缝隙,即种内最大遗传距离与种间最小遗传距离的间隔大小<sup>[38]</sup>。泥鳅、波氏吻鰕虎鱼、瓢鱼和高体鳊鲂尽管不符合 2% 阈值和“10×rule”的鉴别标准,但它们的种内最大遗传距离依然小于与近缘物种的种间最小遗传距离,存在 DNA 条形码缝隙(表 4)。此外,蛇鮈的最大遗传距离为 14.93%,与银鮈的最小遗传距离为 9.56%,两物种间不存在条形码缝隙;然而在 NJ 树分析中两物种间不仅可以明确区分开,且亲缘关系较远。综上所述,本研究除蛇鮈和样本个体数为 1 的物种外,其余 36 个物种均存在 DNA 条形码缝隙,DNA 条形码鉴定成功率为 97.30%,高于加拿大淡水鱼类 93% 和北美淡水鱼类 90% 的成功率<sup>[39-40]</sup>。

由于各物种种群大小、突变率以及物种形成时间的不同,导致各物种种内遗传距离和种间遗传距离各不相同,因此没有一个标准的阈值能适用于所有的物种<sup>[41]</sup>。通过 ABGD 分析对所有样本的 OTU 数目评估结果显示,当  $P=0.0359$  或  $P=0.0599$  时 OTU 数目与 NJ 树集群结果更为接近,因此本研究中样本的 DNA 条形码的遗传距离可取 3%~6% 作为物种区分的阈值<sup>[42]</sup>。在本研究中,除泥鳅和蛇鮈外,其余非单样本物种均符合 ABGD 预估的距离阈值。

在 10 种种内遗传距离大于 2% 的鱼类中,瓢鱼、高体鳊鲂、蛇鮈、银鮈、乐山小鳊和黑鳍鳊均为江河湖泊中的小型鱼类,栖息于静水或缓水环境。受梯级水电的影响,各库区间的鱼类栖息地是非连续性的,这可能会导致同一物种的不同库区种群间存在不同程度的遗传分化<sup>[43]</sup>。阮惠婷等人<sup>[44]</sup>对珠江流域 5 个水库的瓢鱼的遗传变异分析结果表明,该鱼种的种群间与种群内均存在低程度的遗传分化。刘玉莹<sup>[45]</sup>对嘉陵江干流蛇鮈的种群遗传研究结果显示,该鱼种的下游种群与中上游种群间遗传分化普遍较大。王喆等人<sup>[46]</sup>则发现,长江中上游银鮈群体存在明显的遗传分化。

泥鳅主要栖息在各水体的淤泥底部,迁徙能力较弱。本研究中泥鳅样本仅有 2 尾,分别采自乌江渡库区和武隆县白马镇,两地河道距离相隔数百公里、内含 5 个库区,因而两地的泥鳅可能由于长期缺乏基因交流导致两地种群遗传距离较大。Yi 等人<sup>[47]</sup>对长江流域的泥鳅的种群遗传分化进行考察,结果显示各群体间普遍存在遗传分化,尤其在上游与中下游之间;且乌江干流内的两个群体间也存在高程度的遗传分化。

表 4 各物种 COI 基因平均种内遗传距离、种内最大遗传距离和种间最小遗传距离

Tab. 4 The mean intra-specific distance, the max intra-specific distance and the nearest neighbour distance of COI gene in each species

物种	<i>n</i>	平均种内遗传距离	最大种内遗传距离	最近邻物种	最近邻个体 BOLD 查询号	种间最小遗传距离
月鳢	1		0	银鮠	WJCOI539-21	19.83
齐氏罗非鱼	4	0	0	银鮠	WJCOI663-21	19.15
泥鳅	2	17.57	17.57	鲢	WJCOI222-21	17.86
厚唇光唇鱼	1		0	云南光唇鱼	WJCOI003-21	10.18
宽口光唇鱼	1		0	云南光唇鱼	WJCOI003-21	7.18
云南光唇鱼	1		0	宽口光唇鱼	WJCOI002-21	7.18
鲫	9	0.1	0.18	中华倒刺鲃	WJCOI529-21	10.72
草鱼	1		0	黄尾鲮	WJCOI671-21	8.79
鲤	8	0.18	0.36	中华倒刺鲃	WJCOI529-21	11.44
贝氏鲮	26	0.27	0.72	半鲮	WJCOI220-21	5.93
鲮	161	0.3	1.47	张氏鲮	WJCOI215-21	2.78
张氏鲮	2	0	0	鲮	WJCOI180-21	2.78
半鲮	5	0.25	0.55	鲮	WJCOI172-21	5.11
鲢	3	0.36	0.55	赤眼鲮	WJCOI668-21	9.35
乐山小鳊	21	0.61	2.22	蛇鮠	WJCOI457-21	11.68
青鱼	1		0	赤眼鲮	WJCOI668-21	9.29
白甲鱼	1		0	云南光唇鱼	WJCOI003-21	7.62
马口鱼	11	0	0	宽鳍鱲	WJCOI674-21	9.22
似鳊	2	0	0	黄尾鲮	WJCOI671-21	9.2
泉水鱼	1		0	鲤	WJCOI023-21	12.26
飘鱼	2	3.75	3.75	半鲮	WJCOI218-21	9.67
麦穗鱼	4	0.09	0.18	银鲮	WJCOI669-21	16.34
圆筒吻鮠	5	0	0	吻鮠	WJCOI352-21	3.35
吻鮠	7	0.09	0.18	圆筒吻鮠	WJCOI348-21	3.35
高体鲮	13	3.1	5.99	银鮠	WJCOI536-21	17.46
黑鳍鲮	5	0.88	2.22	银鮠	WJCOI536-21	14.64
蛇鮠	13	4.95	14.93	银鮠	WJCOI592-21	9.56
大眼华鳊	17	0.02	0.18	贝氏鲮	WJCOI043-21	8.66
中华倒刺鲃	7	0.21	0.55	鲫	WJCOI005-21	10.72
银鮠	132	0.85	9.23	蛇鮠	WJCOI457-21	9.56
赤眼鲮	1		0	黄尾鲮	WJCOI671-21	8.86
黄尾鲮	2	0	0	银鲮	WJCOI669-21	1.65
银鲮	1		0	黄尾鲮	WJCOI671-21	1.65
宽鳍鱲	3	0	0	马口鱼	WJCOI290-21	9.22
波氏吻鰕虎鱼	2	4.54	4.54	子陵吻鰕虎鱼	WJCOI390-21	14.82
子陵吻鰕虎鱼	51	0.68	2.41	波氏吻鰕虎鱼	WJCOI357-21	14.82
大眼鳊	41	0.06	0.36	瓦氏黄颡鱼	WJCOI318-21	20
大鳍鱮	27	0.24	0.73	瓦氏黄颡鱼	WJCOI311-21	14.43
长吻鲢	2	0.18	0.18	粗唇鲢	WJCOI225-21	2.22
粗唇鲢	4	0.27	0.55	长吻鲢	WJCOI228-21	2.22
黄颡鱼	8	0.1	0.18	长吻鲢	WJCOI228-21	10.68
光泽黄颡鱼	7	0.16	0.36	瓦氏黄颡鱼	WJCOI325-21	5.32
切尾拟鲮	5	0.07	0.18	光泽黄颡鱼	WJCOI302-21	7.01
瓦氏黄颡鱼	23	0.62	1.66	光泽黄颡鱼	WJCOI302-21	5.32
鲇	11	0.61	3.16	南方鲇	WJCOI469-21	8.15
南方鲇	2	0.73	0.73	鲇	WJCOI461-21	8.15

注:表中物种的拉丁学名见表 1

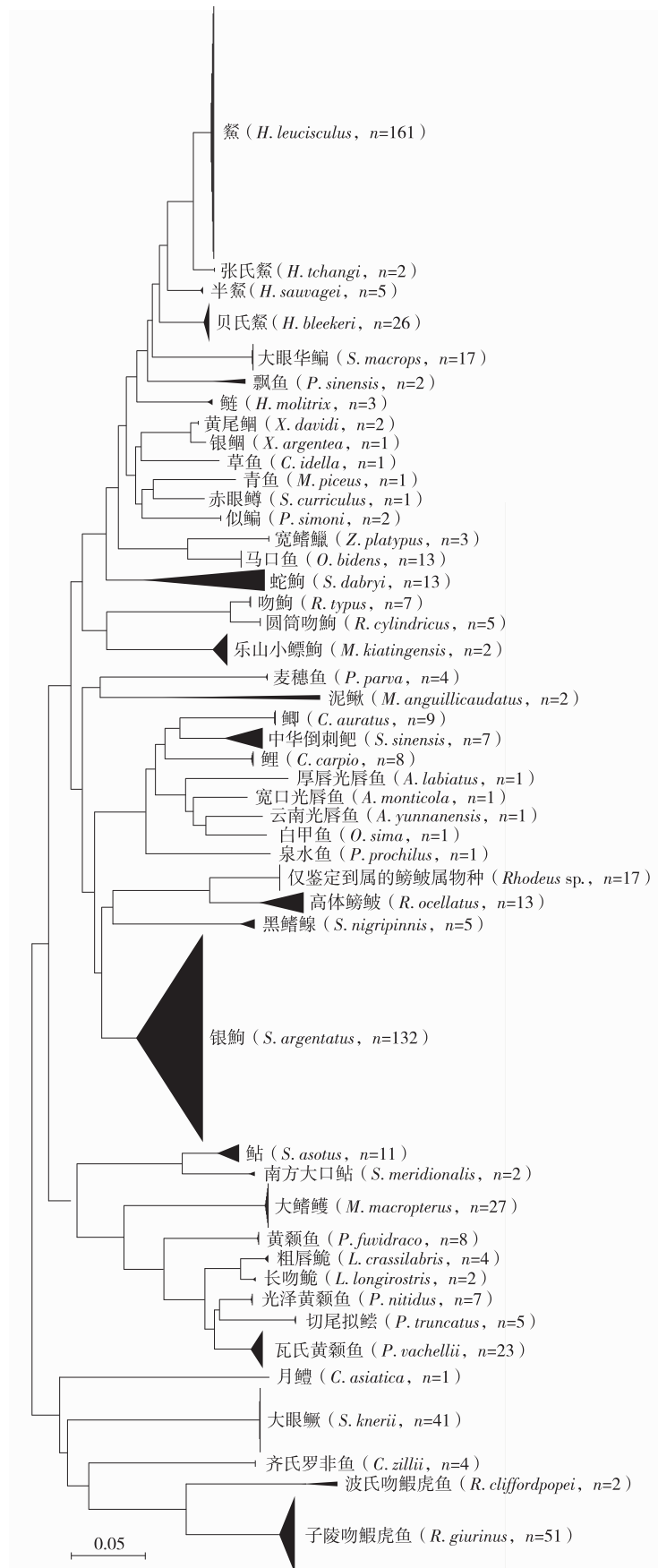


图 2 乌江中下游鱼类 DNA 条形码邻接树

Fig. 2 Neighbor-joining trees of fish DNA barcodes in the middle and lower of Wujiang river

表 5 基于 3 种模型的条形码 ABGD 分析结果

Tab. 5 The ABGD analysis results of the DNA Barcoding based on three models

距离模型	相对间隙宽度(X)	划分	先验种内差异(P)								
			0.001 0	0.001 7	0.002 8	0.004 6	0.007 7	0.012 9	0.021 5	0.035 9	0.059 9
Simple Distance	1.5	初始划分	61	61	61	49	49	49	49	49	49
		回归划分	61	61	61	55	53	51	51	49	49
Jukes-Cantor (JC69)	1.5	初始划分	195	195	51	51	51	51	49	49	49
		回归划分	195	195	75	61	59	58	53	49	49
Kimura (K80)TS/TV	1.5	初始划分	195	195	59	59	49	49	49	49	49
		回归划分	195	195	74	60	58	57	53	49	49

鲇适应性强、分布广泛,是重要的经济鱼类。王庆容等人<sup>[48]</sup>对不同地理种群鲇的遗传多样性进行了分析,发现该鱼种的各种群间亲缘关系较远,乌江种群存在遗传差异较大的个体。由于鲇在中国被广泛养殖,因此它的野生种群可能因养殖逃逸的影响而受到基因污染<sup>[49]</sup>。子陵吻鰕虎鱼和波氏吻鰕虎鱼是小型淡水底栖鱼类,同样具有很强的适应性和广泛分布。Ju 等人<sup>[50]</sup>对东亚地区子陵吻鰕虎鱼的种群结构进行研究,发现该鱼种存在较高的迁移潜力,且系统发育分析显示乌江种群不为单系,而单倍型分析显示乌江种群的单倍型间由台湾和海南种群的单倍型连接,因而乌江流域的子陵吻鰕虎鱼可能存在较大遗传距离。另外,颜岳辉等人<sup>[51]</sup>对珠江流域的波氏吻鰕虎鱼进行调查,发现不同水库的波氏吻鰕虎鱼种群间存在较大的遗传距离。

乌江是长江上游南岸最大的支流,贵州省最大水系,鱼类资源丰富。然而,长期以来由于水利工程、过度捕捞、环境污染等人类活动影响,乌江流域鱼类资源已明显减少。由于鱼类资源对于经济发展和生态建设有着重要的意义,因而对于乌江鱼类生物多样性的保护刻不容缓。作为鉴定物种的有效工具,DNA 条形码技术对于野生动植物保护而言意义重大<sup>[52-53]</sup>。基于本研究初步构建的乌江鱼类 DNA 条形码数据库,可以实现对当地鱼类个体或生物组织的快速准确鉴定,并有助于防治外来入侵物种、打击非法捕捞及走私、实现环境 DNA 监测等。同时,该数据库的构建也是对物种遗传信息的一种保存手段,对鱼类生物多样性保护和鱼类资源监测均有着重要作用。

#### 参考文献:

- [1] 杨志,陈小娟,唐会元,等. 乌江银盘水电站蓄水前后坝上和坝下江段的鱼类资源及其变动特征[J]. 三峡生态环境监测,2019,4(4):70-81.  
YANG Z, CHEN X J, TANG H Y, et al. Fish resources and their variation characteristics in the upstream and downstream of Yinpan dam in Wujiang river before and after the impoundment of the reservoir[J]. Ecology and Environmental Monitoring of Three Gorges, 2019, 4(4): 70-81.
- [2] 奚世军,安裕伦,李阳兵,等. 基于景观格局的喀斯特山区流域生态风险评估:以贵州省乌江流域为例[J]. 长江流域资源与环境,2019,28(3):712-721.  
XI S J, AN Y L, LI Y B, et al. Ecological risk assessment of karst mountain watershed based on landscape pattern: a case study of Wujiang river basin in Guizhou province[J]. Resources and Environment in the Yangtze Basin, 2019, 28(3): 712-721.
- [3] 詹会祥,晏宏,安全平,等. 六冲河鱼类资源衰退的原因与对策建议[J]. 水生态学杂志,2009,30(1):147-149.  
ZHAN H X, YAN H, AN Q P, et al. Suggestion on reasons and countermeasures for fishery resources to decline of Liuchong river[J]. Journal of Hydroecology, 2009, 30(1): 147-149.
- [4] 张晋芳,余涛,王菊. 乌江三岔河引子渡水电站水生生物现状及评价[J]. 贵州农业科学,1999,27(6):13-17.  
ZHANG J F, YU T, WANG J. Present situation and evaluation on hydrobios in reservoir of Sanchahe, Yinzidu hydroelectric power station of Wujiang river[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 1999, 27(6): 13-17.
- [5] 伍律. 贵州鱼类志[M]. 贵阳:贵州人民出版社,1989.  
WU L. The fishes of Guizhou[M]. Guiyang: Guizhou People's Publishing House, 1989.
- [6] 于晓东,罗天宏,周红章. 长江流域鱼类物种多样性大尺度格局研究[J]. 生物多样性,2005,13(6):473-495.  
YU X D, LUO T H, ZHOU H Z. Large-scale patterns in species diversity of fishes in the Yangtze river basin[J]. Biodiversity

- Science, 2005, 13(6): 473-495.
- [7] 肖琼, 杨志, 唐会元, 等. 乌江下游干流鱼类物种多样性及其资源保护[J]. 生物多样性, 2015, 23(4): 499-506.  
XIAO Q, YANG Z, TANG H Y, et al. Species diversity of fish and its conservation in the mainstream of the lower reaches of Wu river[J]. Biodiversity Science, 2015, 23(4): 499-506.
- [8] 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 Science and Technology Press, 1994.
- [9] 周金江, 高英. 乌江干流保障生态流量方式研究及应用[J]. 红水河, 2021, 40(1): 26-28.  
ZHOU J J, GAO Y. Research and application on the way of ensuring ecological flow in the main stream of Wujiang river[J]. Hongshui River, 2021, 40(1): 26-28.
- [10] 何光宏. 乌江流域梯级自动发电控制研究与应用[J]. 水电与新能源, 2014(7): 1-4.  
HE G H. Study on automatic generation control and its application in cascade hydropower stations in Wujiang river[J]. Hydropower and New Energy, 2014(7): 1-4.
- [11] SHEN Y J, GUAN L H, WANG D Q, et al. 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.
- [12] POFF N L, HART D D. How dams vary and why it matters for the emerging science of dam removal[J]. Bioscience, 2002, 52(8): 659-668.
- [13] 张爱民. 梯级水电开发对长江干流生态水文情势影响研究[D]. 郑州: 华北水利水电大学, 2018.  
ZHANG A M. Research on the influence of cascade hydropower development on the eco-hydrological regimes of the Yangtze river[D]. Zhengzhou: North China University of Water Resources and Electric Power, 2018.
- [14] WEBB P W. The impact of changes in water level and human development on forage fish assemblages in Great lakes coastal marshes[J]. Journal of Great Lakes Research, 2008, 34(4): 615-630.
- [15] FAN X G, WEI Q W, CHANG J B, et al. A review on conservation issues in the upper Yangtze river—a last chance for a big challenge: can Chinese paddlefish (*Psephurus gladius*), Dabry's sturgeon, (*Acipenser dabryanus*) and other fish species still be saved?[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2006, 22(1): 32-39.
- [16] 熊美华, 史方, 徐念, 等. 微卫星标记分析乌江流域白甲鱼群体的遗传多样性[J]. 水生态学杂志, 2009, 30(2): 122-125.  
XIONG M H, SHI F, XU N, et al. A preliminary analysis of genetic diversity of population of *Onychostoma sima* in Wujiang river with microsatellite markers[J]. Journal of Hydroecology, 2009, 30(2): 122-125.
- [17] 史方, 徐念, 熊美华, 等. 利用微卫星标记评估乌江彭水水电站对泉水鱼的遗传多样性影响[J]. 水生态学杂志, 2009, 30(2): 117-121.  
SHI F, XU N, XIONG M H, et al. Using microsatellite markers to assess the impacts by Pengshui hydropower station on Wujiang river on population genetic diversity in *Pseudogyrincheilus procheilus*[J]. Journal of Hydroecology, 2009, 30(2): 117-121.
- [18] 代应贵, 邹习俊, 肖海. 四川裂腹鱼乌江种群 mtDNA 控制区序列的遗传多样性分析[J]. 四川动物, 2010, 29(4): 505-509.  
DAI Y G, ZHOU X J, XIAO H. Genetic diversity of the mtDNA D-loop in the population of *Schizothorax kozlovi* from the Wujiang river[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2010, 29(4): 505-509.
- [19] ZHU D, YANG Z. Effects of reservoir impoundment on fish assemblages in the Wujiang river of China[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2016, 39: 012022.
- [20] 程希婷, 王爱民, 顾志峰, 等. DNA 条形码研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(6): 748-758.  
CHENG X T, WANG A M, GU Z F, et al. Current progress of DNA barcoding[J]. Genomics and Applied Biology, 2011, 30(6): 748-758.
- [21] BEGUM S, PANSE P, CHONG C. Species identification through DNA barcodes[EB/OL]. [2021-12-28]. <http://dspace.lib.sp.edu.sg/xmlui/handle/get/6074>.
- [22] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [23] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, deWAARD J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings Biological Sciences, 2003, 270(Suppl 1): S96-S99.
- [24] SHADRIN D M. DNA Barcoding: applications[J]. Russian Journal of Genetics, 2021, 57(4): 489-497.
- [25] 杨倩倩, 刘苏汶, 俞晓平. DNA 条形码分析方法研究进展[J]. 应用生态学报, 2018, 29(3): 1006-1014.  
YANG Q Q, LIU S W, YU X P. Research progress on DNA barcoding analysis methods[J]. Chinese Journal of Applied

- Ecology, 2018, 29(3): 1006-1014.
- [26] 邵星晨, 姜伟. 三峡库区常见鱼类 DNA 条形码本地 BLAST 数据库的构建和应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 40(Z1): 1952-1960.  
GAO X C, JIANG W. The construction and application of BLAST database of DNA barcode for common fish in the Three Gorges reservoir[J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 40(Z1): 1952-1960.
- [27] 陈宜瑜. 中国动物志-硬骨鱼纲-鲤形目[M]. 北京: 科学出版社, 1994.  
CHEN Y Y. Fauna Sinica (Osteichthyes): Cypriniformes II[M]. Science Press, Beijing, 1994.
- [28] 褚新洛, 郑葆珊, 戴定远. 中国动物志-硬骨鱼纲-鲇形目[M]. 北京: 科学出版社, 1999.  
CHU X L, ZHENG B S, DAI D Y. Fauna Sinica (Osteichthyes): Siluriformes[M]. Beijing: Science Press, 1999.
- [29] 伍汉霖, 钟俊生. 中国动物志-硬骨鱼纲-鲈形目[M]. 北京: 科学出版社, 2007.  
WU H L, ZHONG J S. Fauna Sinica, Osteichthyes: Perciformes V: Gobioidae[M]. Beijing: Science Press, 2007.
- [30] WARD R D, ZEMLAK T S, INNES B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [31] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology & Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [32] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16(2): 111-120.
- [33] WONG E H-K, HANNER R H. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood[J]. Food Research International, 2008, 41(8): 828-837.
- [34] RATNASINGHAM S, HEBERT P D N. A DNA-based registry for all animal species: the barcode index number (BIN) system [J]. PloS one, 2013, 8(7): e66213.
- [35] PULLANDRE N, LAMBERT A, BROUILLET S, et al. ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation[J]. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 1864-1877.
- [36] ČANDEK K, KUNTNER M. DNA barcoding gap: reliable species identification over morphological and geographical scales[J]. Molecular Ecology Resources, 2015, 15(2): 268-277.
- [37] HEBERT P D N, STOECKLE M Y, ZEMLAK T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes[J]. PloS Biology, 2004, 2(10): e312.
- [38] MEYER C P, PAULAY G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling[J]. PloS Biology, 2005, 3(12): e422.
- [39] APRIL J, MAYDEN R L, HANNER R H, et al. Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(26): 10602-10607.
- [40] HUBERT N, HANNER R, HOLM E, et al. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes[J]. PLoS One, 2008, 3(6): e2490.
- [41] COLLINS R A, CRUICKSHANK R H. The seven deadly sins of DNA barcoding[J]. Molecular Ecology Resources, 2013, 13(6): 969-975.
- [42] 余海军, 王茜. 探讨 DNA 条形码对摇蚊属物种界定的有效性[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(5): 144-148.  
YU H J, WANG Q. Exploring the utility of DNA barcoding in species identification of *Chironomus* [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2021, 60(5): 144-148.
- [43] 李陈. 长江上游梯级水电开发对鱼类生物多样性影响的初探[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.  
LI C. A preliminary analysis of the impacts of the cascade hydropower development on the fish biodiversity in the upper reach of the Yangtze river[D]. Wuhan: Huazhong University of Science & Technology, 2012.
- [44] 阮惠婷, 徐姗姗, 李敏, 等. 飘鱼微卫星位点的筛选及珠江流域 5 个地理群体的遗传多样性分析[J]. 水生生物学报, 2020, 44(3): 501-508.  
RUAN H T, XU S N, LI M, et al. Microsatellite primers screening and genetic diversity analysis of five geographical populations of *Pseudolaubuca sinensis* in the Pearl river basin[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(3): 501-508.
- [45] 刘玉莹. 嘉陵江干流蛇鮈和斑点蛇鮈的种群遗传学研究[D]. 南充: 西华师范大学, 2020.  
LIU Y Y. Population genetic analysis of *Saurogobio dabryi* and *S. punctatus* in the Jialing river[D]. Nanchong: China West Normal University, 2020.
- [46] 王喆, 汪登强, 段辛斌, 等. 长江中上游银鮈线粒体 DNA 遗传多样性分析[J]. 动物学杂志, 2018, 53(4): 615-621.  
WANG Z, WANG D Q, DUAN X B, et al. Genetic diversity of *Squalidus argentatus* in the middle and upper reaches of the

- Yangtze river inferred from mitochondrial DNA sequences[J]. Chinese Journal of Zoology, 2018, 53(4): 615-621.
- [47] YI S K, WANG W M, ZHOU X Y. Genomic evidence for the population genetic differentiation of *Misgurnus anguillicaudatus* in the Yangtze river basin of China[J]. Genomics, 2019, 111(3): 367-374.
- [48] 王庆容, 李黛. 鲇细胞色素 b 基因序列差异及遗传多样性分析[J]. 水生生态学杂志, 2009, 30(1): 40-44.
- WANG Q R, LI D. Genetic diversity of *Silurus asotus* on mitochondrial cytochrome b gene sequence [J]. Journal of Hydroecology, 2009, 30(1): 40-44.
- [49] 高勤峰, 张恭, 董双林. 网箱养殖生态学研究进展[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2019, 49(3): 7-17.
- GAO Q F, ZHANG G, DONG S L. Reviews on cage-culture ecology[J]. Periodical of Ocean University of China, 2019, 49(3): 7-17.
- [50] JU Y M, WU J H, KUO P H, et al. Mitochondrial genetic diversity of *Rhinogobius giurinus* (Teleostei: Gobiidae) in East Asia [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2016, 69: 60-66.
- [51] 颜岳辉, 丁雪梅, 李强, 等. 珠江源头入侵种波氏吻虾虎的遗传多样性分析[J]. 四川动物, 2019, 38(3): 263-270.
- YAN Y H, DING X M, LI Q, et al. Genetic diversity of invasive species *Rhinogobius cliffordpopei* at the source of the Pearl river[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2019, 38(3): 263-270.
- [52] LAHAYE R, van der BANK M, BOGARIN D, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(8): 2923-2928.
- [53] GEIGER M F, HERDER F, MONAGHAN M F, et al. Spatial heterogeneity in the Mediterranean biodiversity hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes[J]. Molecular Ecology Resources, 2015, 14(6): 1210-1221.

## Animal Sciences

### DNA Barcoding of Fishes in the Middle and Lower Reaches of Wujiang River

ZHANG Yu<sup>1</sup>, LI Ruojian<sup>2</sup>, CHENG Ruli<sup>1</sup>, WANG Meng<sup>1</sup>,  
LIU Zhihao, CHEN Qiliang, LI Yingwen<sup>1</sup>, SHEN Yanjun<sup>1</sup>

(1. Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331;  
2. Agricultural Integrated Service Center, Yanglongsi, Xifeng, Xifeng Guizhou 551106, China)

**Abstract:** [Purposes] In order to investigate the fish resources in the middle and lower reaches of the Wujiang river, and initially construct the fish DNA barcoding database in the Wujiang river basin. [Methods] Based on the *COI* gene as DNA barcode, the molecular identification of 647 fish samples from the main stream of Wujiang river was carried out by the barcode gap analysis, ABGD (Automatic barcode gap discovery) analysis and neighbor-joining phylogenetic tree. [Findings] 1) A total of 47 fish species were identified by morphological identification, belonging to 3 orders, 8 families and 35 genera. 2) The barcode gap analysis showed that there was no barcode gap between *Saurogobio dabryi* and *Squalidus argentatus* among non-single sample species. 3) The constructed NJ phylogenetic tree showed that 47 species were respectively clustered into individual branches. The results of ABGD analysis showed that the 647 fish samples could be divided into 49 OTU, which was similar to the results of NJ phylogenetic tree. 4) The results of DNA barcoding were consistent with those of morphological identification. [Conclusions] Overall, the success rate of DNA barcodes identification was 97.22%. This study preliminarily constructed the fish DNA Barcoding database in the Wujiang river basin, which provided some scientific basis and data support for the conservation of fish biodiversity in the Wujiang river basin.

**Keywords:** Wujiang river; DNA barcoding; *COI* gene; fish resources

(责任编辑 方兴)