

基于形态学和分子系统学数据分析 河南省鱼类新纪录种—北鳅

聂国兴,汪曦,周传江,孟晓林,张建新

(河南师范大学 水产学院;河南省水产动物养殖工程技术研究中心;
新乡市水生生物资源保护与开发利用重点实验室,河南 新乡 453007)

摘要:2016 年 4 月至 2017 年 10 月,河南省鱼类资源调查队在河南省鱼类资源普查时,分别在林州、辉县、汝州等地采集到 14 尾鲤形目条鳅亚科鱼类,综合采用传统形态学结合分子系统学方法确定其为北鳅 *Lefua costata*,为河南省新纪录种,标本保存于河南师范大学水产学院鱼类标本室.对该鱼的主要形态鉴定特征、分布区域、生存环境及生活习性等方面做了初步分析.该鱼在我国内蒙古、辽河、黑龙江水系、河北、山东济南等地均有相关记录.此次河南省境内采集到北鳅,扩大了该鱼在我国分布范围,也为后续基础研究提供了重要依据.

关键词:鲤形目;北鳅;新纪录;河南省

中图分类号:Q959

文献标志码:A

北鳅(*Lefua costata*)隶属脊索动物门硬骨鱼纲(Osteichthyes)鲤形目(Cypriniformes)平鳍鳅科(Balitoridae)条鳅亚科(Nemacheilinae)北鳅属(*Lefua*)^[1],又名八须泥鳅^[2],纵带平鳅^[3],须鼻鳅^[4].根据资料记载,北鳅属(*Lefua*)鱼类目前共 4 种已知种,分别为短体北鳅(*Lefua nikkonis*)、斑北鳅(*Lefua echigonia*)、史氏北鳅(*Lefua pleskei*)和北鳅(*Lefua costata*).主要分布于与我国黑龙江省相邻的朝鲜、日本、俄罗斯以及我国北部,我国仅有 1 种分布,即北鳅属(*Lefua*)的北鳅(*Lefua costata*).我国北部的内蒙古、辽河、黑龙江水系、河北、山东济南等地均有关于北鳅的相关记录.其喜生活于浅水及拥有茂密水草的河汉、湖沼等静水或缓流中,杂食性鱼类食物多为藻类、水生昆虫及其幼虫等浮游动植物以及植物碎屑,为小型淡水底栖鱼类.关于北鳅属研究较少,仅涉及生态习性、系统地理学、系统发育等方面^[5-11],而关于北鳅的研究更少,仅限于染色体组型^[12-13]、资源零星报道^[14].

2016 年 4 月至 2017 年 10 月,河南省鱼类资源调查队进行鱼类资源普查时,采集到 14 尾鲤形目鱼类,综合采用形态学和分子系统学的方法确定其为北鳅,本种系河南省新纪录种,标本保存于河南师范大学水产学院鱼类标本室.结合采集标本情况和样点生境,初步分析了该鱼的形态鉴定特征、分布区域、生存环境及生活习性等方面.

1 材料与方法

1.1 材料

14 尾实验鱼采自河南省分别在林州、辉县、汝州等地,经地笼诱捕获得,初步鉴定后进行拍照并取其鳃部及右侧胸鳍鳍条保存于装有酒精 100% 的 1.5 mL 离心管中,用于后期实验室分子数据分析.6 尾乙醇 100%

收稿日期:2019-04-09;修回日期:2019-06-20.

基金项目:国家自然科学基金(31401964;31872199);河南省科技攻关重点项目(142102110144;142102110057;162102310443;182102110007;182102110046;182102110237;172102310751);河南省高校科技创新团队支持计划(14IRTSTHN013);河南省水产学重点学科(5102190411001)支持.

作者简介(通信作者):聂国兴(1971-),男,河南长垣人,河南师范大学教授,博士,主要从事鱼类资源挖掘与利用,
E-mail:niegx@htu.cn.

和8尾体积分数10%甲醛溶液整体固定,带回实验室进行测量和后续实验.甲醛固定标本用于后期形态数据测量及描述.

1.2 形态学测量

对8尾甲醛固定样本分别用电子天平称量其体重(Body weight, BH),用精度为0.01 mm的电子数显游标卡尺测量全长(Total length, TL),体长(Body length, BL),腹鳍基末端至臀鳍基起点(Length between the pectoral and ventral fin, PV),腹鳍起点到肛门的距离(Length between the Pelvic and anus, PA),头长(Head length, HL),体宽(body width, BW),吻长(Snout length, SNL),眼径(Orbit diameter, OD),眼间距(Interorbital width, IW),体高(Body depth, BD),尾柄长(Caudal peduncle length, CPL),尾柄高(Caudal peduncle depth, CPD),背鳍前长(dorsal fin length, DL),胸鳍长(Pectora fin length, PFL)腹鳍长(Pelvic fin length, PVL),臀鳍长(Anal fin length, AL)(参考《中国动物志.硬骨鱼纲.鲤形目》中鱼类分类性术语说明)等17项形态学指标并利用体视镜(OPTEC)分别对样本的背鳍,臀鳍,胸鳍,腹鳍鳍条数进行计数.

1.3 分子生物学及分子系统学方法鉴定

1.3.1 基因组 DNA 提取

将1.1材料中酒精固定肌肉组织,取出0.2 g左右置于1.5 mL离心管中,烘干(56 °C)其酒精残余,基因组DNA的提取采用酚-氯仿提取法,具体步骤如下:将烘干的组织加入400 μL DNA提取液[1 mol \cdot L⁻¹的Tris-HCl, 0.5 mol \cdot L⁻¹的EDTA, 5%的(g/V)SDS]和4 μL 的蛋白酶K(20 mg \cdot mL⁻¹),之后放于56 °C恒温水浴锅中消化6~8 h,期间上下晃动至组织消化完全呈透明状.加入400 μL 饱和平衡酚溶液,充分颠倒混合后静置10 min,常温下高速离心10 min(10 000 r \cdot min⁻¹),转移上清液至一新离心管中重复本步骤;上清液中加入400 μL 的氯仿:异戊醇(24:1)溶液,充分颠倒混合后静置10 min后,离心10 min(10 000 r \cdot min⁻¹),吸取上清液后重复该步骤;上清液中加入40 μL 醋酸钠(3 mol \cdot L⁻¹)溶液,充分混合后加入800 μL -20 °C保存的100%乙醇溶液,静置10 min后,离心5 min(10 000 r \cdot min⁻¹);弃去上清液,体积分数70%冷乙醇溶液洗涤两次,室温晾干后加入50 μL 双蒸水溶解.分别用1%琼脂糖凝胶电泳与紫外分光光度计检测DNA质量与浓度,将合格的基因组DNA置于-20 °C冰箱中备用.

1.3.2 PCR 扩增获得目的基因

用于PCR扩增线粒体COI基因的引物对参考文献[15-16]的序列.PCR总反应体系30 μL :包含15 μL mix酶,上游及下游引物各1 μL ,基因组DNA模板1 μL ,灭菌双蒸水12 μL .PCR反应程序为94 °C预变性5 min;30次循环,每个循环包含:94 °C变性30 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸30 s.最终,72 °C延伸7 min.4 °C保存,产物利用1%琼脂糖凝胶电泳检测,将合格产物由商业公司进行双向测序,测序引物同PCR引物.

1.4 数据分析

将从测序公司返回的峰图文件,用Lesergene软件包中Seqman软件进行组装,并进行手工校对,获得的序列与NCBI数据库中的序列进行BLAST比对(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),确定是否为目的基因COI片段,并对该数据进行检索找到相似度较高的数据,同时从NCBI下载鳅科及其近缘种的COI基因序列共26条,详见表1.将组装好的数据结合数据库中下载的数据利用MEGA 7.0^[17]软件进行多重序列比对获得一致序列用于后续分析,基于Kimura双参(K2P)模型,1 000次重复抽样,其他参数均为默认设置,构建分子系统发育关系树.根据系统发育树所呈现结果将聚集在同一支上的个体分为一组(group),分别计算组内遗传距离以及组间遗传距离,以此评价实验所获的分子数据同物种之间的关系.

2 结果

2.1 形态学分析结果形态鉴定

甲醛固定标本8尾,主要形态学鉴别特征与北鳅相吻合:身体呈侧扁并向后延伸,前鼻孔向前延伸形成管状突起的须,眼小,侧上位,下位口,下颌呈匙状,身体被有小鳞,无侧线.背鳍边缘呈圆弧形且背鳍基位于身体的后1/2处,腹鳍起点的位置在背鳍起点之前,并且向后不达肛门,尾鳍呈圆弧形,并且在尾柄的上下端形成锯齿状缺刻,头部扁平状,背部宽平,活体中鱼背部呈现灰褐色,腹部为白色,体侧中部有一条宽度约等

于眼径,贯穿首尾的黑褐色纵带,背鳍与尾鳍上有不规则褐色小点散布,主要的形态特征详见图 1.

各鳍条数目:背鳍:Ⅲ-6,臀鳍:Ⅲ-5,胸鳍:Ⅰ-9,腹鳍:Ⅰ-5,尾鳍:15.

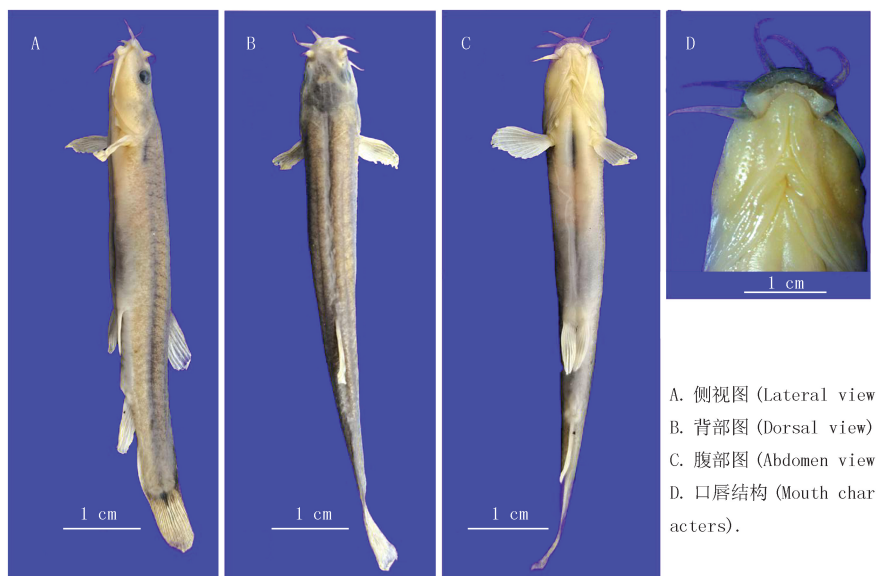
表 1 本研究中涉及样品信息

Tab.1 Information of specimen in this study

物种名称	NCBI 登录号或样品编号	数据来源
北鳅 <i>Lefua costata</i>	W20, W22-W24, 403668-403669	本研究
短体北鳅 <i>Lefua nikkonis</i>	AP011300	Miya et al.2015 ^[18]
史氏北鳅 <i>Lefua pleskei</i>	KX039655	Freyhof et al.2016 ^[19]
斑北鳅 <i>Lefua echigonia</i>	AB054126	Saitoh et al.2003 ^[20]
小七孔岭鳅 <i>Oreonectes daqikongensis</i>	NC_039131	Unpublished
平头岭鳅 <i>Oreonectes platycephalus</i>	NC_031579	Unpublished
	AP011296	Unpublished
	JN177215	Liu et al.2012 ^[21]
美丽小条鳅 <i>Micronemacheilus pulcher</i>	JN177214	Liu et al.2012 ^[21]
乌江荷马条鳅 <i>Homatula wujiangensis</i>	JN177216	Liu et al.2012 ^[21]
横纹南鳅 <i>Schistura fasciolata</i>	JN177233	Liu et al.2012 ^[21]
背纹南鳅 <i>Schistura balteata</i>	NC_008679	Saitoh et al.2006 ^[22]
达里湖高原鳅 <i>Triplophysa dalaica</i>	KU557969	Li et al.2017 ^[23]
须鳅 <i>Barbatula toni</i>	NC_008670	Saitoh et al.2006 ^[22]
中华花鳅 <i>Cobitis sinensis</i>	JN177238	Liu et al.2012 ^[21]
俄罗斯泥鳅 <i>Misgurnus nikolskyi</i>	NC_008678	Saitoh et al.2006 ^[22]
泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	JN177217	Liu et al.2012 ^[21]
马头鳅 <i>Acantopsis choirorhynchos</i>	JN177219	Liu et al.2012 ^[21]
双孔鱼 <i>Gyrinocheilus aymonieri</i>	NC_008672	Saitoh et al.2006 ^[22]
北鳅 <i>Lefua costata</i>	EU670788	Unpublished
北鳅 <i>Lefua costata</i>	KT943751	Unpublished

2.2 分子生物学及分子系统学结果

本实验通过 PCR 扩增共获得北鳅线粒体 COI 基因序列 6 条,与 NCBI 数据库中下载近缘种 COI 基因序列比对后获得的一致序列长度为 643 bp,其中简约信息位点 444 个,保守位点 561 个, T, C, A, G 含量分别为 31.0%、26.8%、23.9%、18.3%,从碱基组成来看, A+T(54.9%)的含量高于 C+G(45.1%)的含量,表明北鳅 COI 基因碱基组成



A. 侧视图 (Lateral view);
B. 背部图 (Dorsal view);
C. 腹部图 (Abdomen view);
D. 口唇结构 (Mouth characters).

图 1 北鳅的主要形态鉴别特征

Fig.1 The main diagnostic morphological characteristics of *Lefua costata*

存在偏倚现象,具有 A、T 碱基偏向性.该结果与其他鲤科鱼类的 COI 基因研究结果相一致.研究人员通过大量实验数据表明大多数脊椎动物物种间遗传距离普遍采取的 0.02 阈值^[24],根据 26 条序列构建的 NJ 树结果显示,实验所获得的序列与数据库中下载的北鳅数据为单独的一支,构成支持率为 100% 的单系类群(见图 2).根据 NJ 树结果可以判断组的划分是可靠的,同种个体均聚在一支且组内遗传距离小于 0.02.其他不同物种之间遗传距离均大于 0.02,结合形态学数据结果可确认该批采集标本为北鳅.

表 2 北鳅形态学数据(单位:mm 或 g)

Tab.2 Morphological measurement data of *Lefua costata* (unit:mm or g)

测量指标	BH	TL	BL	PV	PA	HL	BW	SNL	OD	IW	BD	CPL	CPD	DL	PFL	PVL	AL
1	1.47	60.58	53.40	9.32	6.56	11.08	5.91	3.96	1.77	4.88	6.51	8.86	4.87	7.90	6.98	5.24	6.56
2	0.99	52.40	45.11	8.76	6.87	9.46	5.53	3.43	1.61	4.01	5.65	7.47	3.69	7.41	6.79	4.98	5.52
3	1.14	63.00	53.94	9.95	8.44	11.07	5.54	4.26	1.67	4.30	5.26	7.03	3.29	8.36	7.73	5.36	6.84
4	1.59	67.38	58.01	11.42	9.14	11.19	6.14	4.40	2.02	5.03	5.81	8.65	4.25	8.20	6.67	5.11	7.07
5	0.72	51.87	43.58	7.24	5.85	10.05	5.21	3.75	1.67	4.02	4.29	7.10	3.25	7.27	6.65	4.33	5.08
6	0.64	46.06	39.55	6.99	5.58	9.17	4.48	2.65	1.55	4.06	4.28	6.67	3.20	5.58	5.38	4.17	4.60
7	1.89	66.38	55.94	11.98	8.26	11.76	4.84	3.82	1.77	4.96	8.48	9.75	4.66	7.62	5.59	6.52	6.39
8	3.20	73.59	59.78	12.84	9.19	11.88	6.33	3.81	2.63	6.58	10.37	9.20	5.25	8.69	8.91	5.47	5.94
平均值	1.46±0.77	60.16±8.71	51.16±6.94	9.08±2.01	7.49±1.36	10.71±0.96	5.50±0.59	3.76±0.51	1.84±0.33	4.73±0.81	6.33±1.98	8.09±1.08	4.06±0.76	7.63±0.90	6.84±1.05	5.15±0.68	6.00±0.82

注:体重 BH,全长 TL,体长 BL,体高 BD,体宽 BW,头长 HL,吻长 SNL,腹鳍基末端至臀鳍基起点 PV,眼径 OD,眼间距 IW,尾柄长 CPL,尾柄高 CPD,背鳍长 DL,胸鳍长 PFL,腹鳍长 PVL,臀鳍长 AL,腹鳍起点到肛门的距离(PA).

3 讨论

3.1 河南省北鳅的物种有效性

北鳅属(*Lefua*)鱼类目前共有 4 种已知种,分别是分布于日本的短体北鳅(*Lefua nikkonis*)和斑北鳅(*Lefua echigonia*)、俄罗斯的史氏北鳅(*Lefua pleskei*)、和分布最为广泛北鳅(*Lefua costata*),通过与文献记载的相关形态学特征描述比对,本次河南省采集到的北鳅鱼类形态特征与其基本吻合.结合系统发育研究,本研究标本单独聚为一支,组内的遗传距离小于 0.02,与目前已知的三种北鳅属的鱼类的遗传距离均超过了 0.02 的遗传距离阈值,结合形态特征可确定该批采集标本为北鳅.

3.2 北鳅的分布范围、生境情况

根据朱松泉《中国条鳅志》^[1]中记载北鳅主要分布于黑龙江省相邻的朝鲜、日本、俄罗斯以及我国北部.据多个地方鱼类志及河流鱼类统计北鳅在我国的分布区域涉及山东济南,达里湖,列福河、河北、北京(北平)、山西、辽河、内蒙古东部(旧热河)、图们江、辽宁鸭绿江、吉林以及黑龙江水系的兴凯湖、牡丹江、嫩江、松花江、乌苏里江等水体里^[1-4],喜欢生活于静水缓流河段.在河南省鱼类资源调查工作过程中,在多个地区的水体里发现了北鳅的存在,将北鳅分布范围进一步扩大,在本次调查过程中我们分别在淮河水系及海河水系发现该鱼,说明该鱼在中国有一定的分布.根据在实际采样过程中发现,该鱼喜欢生活在水质清澈,且流速相对较低的浅水区域,且为砂石底,水中有一定数量的水草,常躲藏于石块底部与水草丛中,水温一般较低.

3.3 北鳅的资源现状及保护

在对河南省鱼类资源调查中,在不同水系的多个采样点发现了北鳅,且形成了较小种群,而在调查队员对发现该鱼的区域内附近居民以及相关的管理人员进行问卷调查时,均表示没有发现此鱼.在查阅相关的地方志、渔业区划等材料时也没有相关文字记载,而且调查实际中发现该鱼一般都分布于很小的支流之中,体型较小,不具有经济价值,易与泥鳅小型个体混淆而被人们忽略.1984 年版的《河南鱼类志》^[25]中也未对该鱼记载,可能是由于当时交通工具、道路状况以及采捕工具的限制,导致其未被采集到.此后在不同季节中抽样对采集地水域进行复查,均获得了少量样本,且有一定数量鱼苗的获得,说明北鳅适应采集地生境条件能

够正常生长繁殖。调查中发现北鳅种群数量较小,对于该鱼的种质资源保护应从其基础生物研究,遗传多样性评价,加强生境原位保护,建立水产种质资源保护区等方面开展。

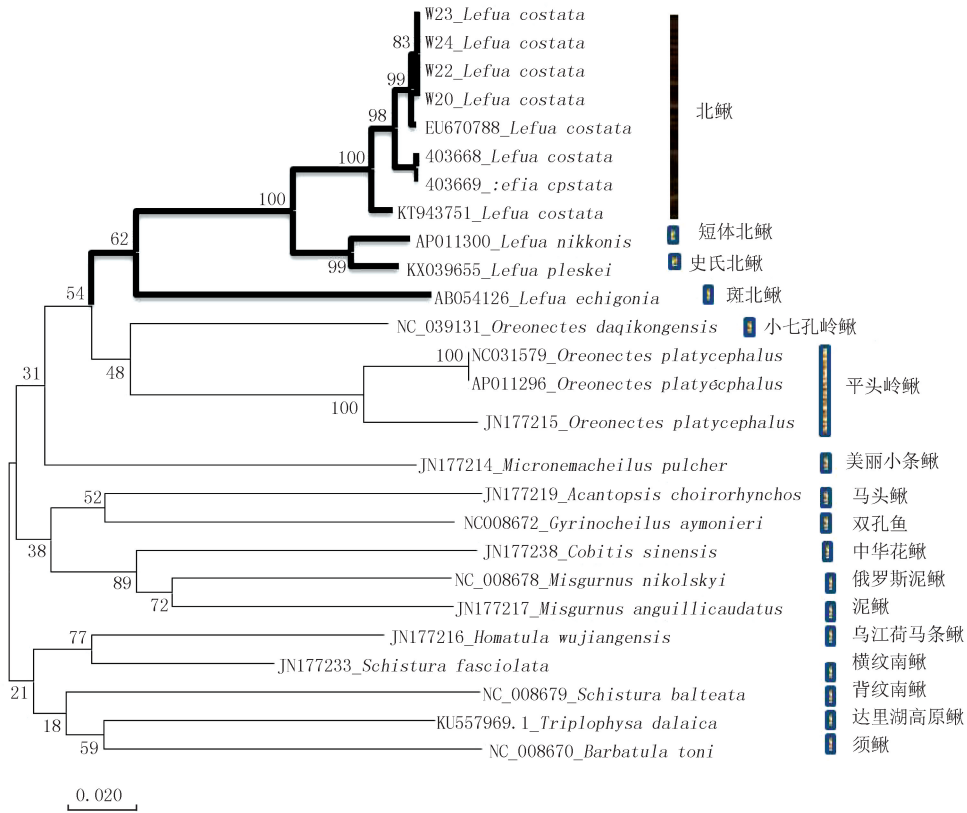


图 2 基于线粒体 *COI* 基因鳅科鱼类邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 系统发育关系

Fig.2 Cobitidae phylogenetic relationship based on mitochondrial *COI* gene by neighbor-joining method

参 考 文 献

- [1] 朱松泉.中国条鳅志[M].南京:江苏科学技术出版社,1989.
- [2] 张春霖.中国系统鲤类志[M].北京:高等教育出版社,1959.
- [3] 郑葆珊.图们江鱼类[M].长春:吉林人民出版社,1980.
- [4] 李思忠.中国淡水鱼类的分布区划[M].北京:科学出版社,1981.
- [5] Aoyama S, Doi T, Baba K. Spawning habits of the fluvial eight-barbel loach *Lefua sp.* observed in captivity[J]. Ichthyological Research, 2005, 52(3): 237-242.
- [6] Mihara M, Sakai T, Nakao K, et al. Phylogeography of loaches of the genus *Lefua* (Balitoridae, Cypriniformes) inferred from mitochondrial DNA sequences[J]. Zoological Science, 2005, 22(2): 157-168.
- [7] Sakai T, Mihara M, Shitara H, et al. Phylogenetic relationships and intraspecific variations of loaches of the Genus *Lefua* (Balitoridae, Cypriniformes)[J]. Zoological Science, 2003, 20(4): 501-514.
- [8] Shedko S V, Miroshnichenko I L, Nemkova G A. On the systematics and phylogeography of eight-barbel loaches of the genus *Lefua* (Cobitoidea, Nemacheilidae): mtDNA typing of *L. pleskei*[J]. Genetika, 2008, 44(7): 938-947.
- [9] Miyazaki J I, Nakao K, Mihara M, et al. Incongruence between mtDNA phylogeny and morphological and ecological characters in loaches of the Genus *Lefua* (Balitoridae, Cypriniformes)[J]. Zoological Science, 2007, 24(7): 666-675.
- [10] Mitsuo Y, Tsunoda H, Ohira M, et al. Threatened fishes of the world: *Lefua echigonia* (Jordan and Richardson 1907) (Balitoridae)[J]. Environmental Biology of Fishes, 2009, 86(2): 307-308.
- [11] Ina H, Kuramoto N. The habitat of an endangered species, *Lefua echigonia*, in a small irrigation stream during irrigation and non-irrigation periods in Machida city, Tokyo[J]. Journal of the Japanese Institute of Landscape Architecture, 2002, 66(5): 627-630.

- [12] 马涛.北鳅的染色体组型研究[J].动物学杂志,1994,29(3):17-18.
- [13] 王军萍,戴秀君,韩希福.河北省三种鳅科鱼类的染色体组型[J].河北大学学报(自然科学版),1993,13(3):51-54.
- [14] 赵肯堂.呼和浩特的鱼类调查[J].内蒙古大学学报(自然科学版),1963(1):63-69.
- [15] Folmer O,Black M,Hoeh W,et al.DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J].Molecular Marine Biology & Biotechnology,1994(3):294-299.
- [16] 周传江,顾钱洪,孟晓林,等.基于多来源数据分析河南省刺鱼目新纪录种—中华多刺鱼[J].四川动物,2018,37(1):67-73.
- [17] Kumar S,Stecher G,Tamura K.MEGA7:molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J].Molecular Biology & Evolution,2016(33):1870-1874.
- [18] Miya M,Sato Y,Fukunaga T,et al.MiFish,a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes:detection of more than 230 subtropical marine species[J].Royal Society Open Science,2015,2(7):150088.
- [19] JÖRG F,Geiger M F,Golzarianpour K,et al.*Sasanidus*,a new generic name for *Noemacheilus kermanshahensis* Bănărescu & Nalbant, with discussion of *Ilammemacheilus* and *Schistura* (Teleostei; Nemacheilidae)[J].Zootaxa,2016,4107(1):65-80.
- [20] Saitoh K,Miya M,Inoue J G,et al.Mitochondrial genomics of ostariophysan fishes:perspectives on phylogeny and biogeography[J].Journal of Molecular Evolution,2003,56(4):464-472.
- [21] Liu S Q,Mayden R L,Zhang J B,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.
- [22] Saitoh K,Sado T,Mayden R L,et al.Mitogenomic evolution and interrelationships of the Cypriniformes (Actinopterygii;Ostariophysi): the first evidence toward resolution of higher-level relationships of the world's largest freshwater fish clade based on 59 whole mitogenome sequences[J].Journal of Molecular Evolution,2006,63(6):826-841.
- [23] 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,2017,605:12-19.
- [24] 彭居俐.东亚特有鲤科类群的 DNA 条形码研究及其系统发育分析[D].武汉:中国科学院水生生物研究所,2007.
- [25] 新乡师院生物系.河南鱼类志[M].郑州:河南科技出版社,1984.

Analysis of new fish record of *lefua costata* in Henan province based on morphological and molecular systematic data

Nie Guoxing,Wang Xi,Zhou Chuanjiang,Meng Xiaolin,Zhangjianxin

(College of Fisheries;Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation;Key Laboratory of Protection and Development Utilization of Aquatic Biological Resources,Henan Normal University,Xinxiang 453007,China)

Abstract:In October 2017, total of 14 Cypriniformes fishes were collected when an investigation on fish resources in Linzhou of Anyang city, Huixian of Xixiang city and Ruzhou of Pingdingshan city. The specimens were identified as *Lefua costata* by using integrated application of traditional morphological data and molecular systematic method, as new fish records in Henan province. The collected specimens are preserved in Fish Herbarium of College of Fisheries, Henan Normal University. The main morphological characteristics, distribution area, living environment and living habits of the fish were analyzed. This fish has been recorded in Inner Mongolia, Liaohe, Heilongjiang River, Hebei province, Jinan city of Shandong province and other places in northern China. This record of the *Lefua costata* in Henan province expanded the distribution area of this fish in China and provided an important basis for subsequent basic research.

Keywords:Cypriniformes;*Lefua costata*;new record;Henan province

[责任编辑 王凤产 杨浦]