

GenBank 中裂腹鱼类 CO I 基因序列的分子标记有效性

袁晓倩¹, 迪丽娜·茹斯坦木¹, 张琪², 韩洁^{1,2}

1. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046;

2. 北京师范大学生命科学学院, 生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 北京 100875

摘要: 裂腹鱼类(Schizothoracids)分布有复杂的水系格局, 在形态学鉴定时有些鱼种容易混淆。线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I(CO I)基因是动物学研究中常用的物种分子条形码, 分析 GenBank 数据库中裂腹鱼类 CO I 作为分子标记的有效性, 可以加深理解和认识前人用这些数据所做的研究工作, 也为今后更合理地使用这些数据提供参考依据。本研究对 GenBank 数据库中裂腹鱼类 CO I 基因的分子标记有效性进行分析评估, 通过同源性比对、参考序列间遗传分歧的估算和系统发育关系重建等方法, 判断 GenBank 数据库中裂腹鱼类 CO I 基因序列的同源性、序列所属鱼种鉴定的准确性, 以及序列信息对系统发育关系的解析力。通过对下载的 1431 条序列进行多重比对发现, 有 3 条序列与其他序列存在显著差异, 同源性存疑, 数据信息经 BLAST 相似性搜索和核查确认为, 以 CO I 基因的互补链形式提交的序列, 比对前应先进行互补链转换。全部序列的比对结果显示, GenBank 数据库中裂腹鱼类的 CO I 基因片段序列均为该基因近 5' 端至中部的序列。权衡序列的数量和长度后, 舍弃较短的 35 条序列, 保留长度为 527 bp 的 1396 条序列进行分析, 结果共定义了 228 个单倍型, 在有多条序列的鱼种中, 普遍存在种内共享单倍型, 还有 41 个单倍型为种间共享。裂腹鱼类 CO I 单倍型的平均 *p*-距离为 9.5%, 与鱼类的属级水平相当, 原始、特化和高度特化类群各自的平均 *p*-距离值更低, 体现近期辐射演化的特征, 可能与它们随着青藏高原演化成种的历史较短有关。GenBank 中一些裂腹鱼类 CO I 基因序列的鱼种鉴定存在错误, 在使用时应先与参考序列对比, 或从系统发育分析的角度做出判断。总体来看, CO I 基因序列能够有力解析裂腹鱼类各演化等级裂腹鱼类之间的亲缘关系, 可用于分类和演化的初步分析。结合形态学、生态学、线粒体和核基因的多样性及系统发育关系等进行综合分析, 将有助于更准确地界定裂腹鱼种类, 同时也为深入探讨杂交和成种过程等问题奠定基础。

关键词: 裂腹鱼类; CO I; 分子标记有效性; GenBank

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)07-1073-18

裂腹鱼类(Schizothoracids)隶属于鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae), 目前记录有 12 属 90 种和亚种, 因其在臀鳍基部和肛门两侧具有特化的臀鳞, 并在两列臀鳞之间的腹中线上形成一条裂缝而得名^[1]。它们是亚洲中部高原地区特有的鱼类, 以青藏高原为中心辐射分布, 常被用于研究青藏及周边高原地区的生物演化和适应^[1-3]。根据裂腹鱼类对高原的适应程度, 将其划分为原始、特化和高度特化 3 个演化等级^[3]。裂

腹鱼类分布有复杂的水系格局, 可能存在相同鱼种在不同水域间迁移和同一水域内种间杂交的现象, 导致在形态上有些鱼种之间相似而种内差异却较大, 增加了从形态学角度开展研究的难度^[4-5]。

对用传统方法鉴别有困难的生物种类, 采用 DNA 分子标记的鉴定方法具有明显的优势^[6-9]。Bartlett 等^[10]率先采用线粒体 DNA 序列进行了鱼类的物种鉴别, 用细胞色素 b 的编码基因序列成功区分了 4 种金枪鱼(*Thunnus* spp.)。Avise^[11]在研

收稿日期: 2021-10-11; 修订日期: 2021-12-01.

基金项目: 科技部国家科技基础资源调查专项(2019FY101700); 生物多样性与生态工程教育部重点实验室自主课题.

作者简介: 袁晓倩(1993-), 女, 硕士研究生, 从事水生动物分子演化研究. E-mail: yxq@stu.xju.edu.cn

通信作者: 韩洁, 教授, 从事水生动物分子与演化生态学研究. E-mail: jiehan@bnu.edu.cn

究中发现, 动物线粒体基因序列的种内差异很少超过 2%, 大多数小于 1%。Hebert 等^[7]于 2003 年提出, 以线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (CO I) 基因多样性为基础, 建立动物 DNA 条形码系统, 因为 CO I 基因近 5' 端的核苷酸序列多样性信息能够将动物种类明确地归入恰当的门和目等较高的分类阶元。紧接着 Hebert 等^[8]又报道了对大量动物种类的 CO I 基因序列的研究结果, 发现同属物种之间也存在着非常显著的差异, 98% 以上的物种之间的 CO I 序列差异都超过 2% 以上, 足以将它们区分开来; 由于 CO I 基因编码线粒体呼吸链上的部分终止酶, 所以在相同种内趋于保守, 变异较低。之后, CO I 基因序列被广泛地应用于动物种类的分子鉴定和演化生物学的研究^[12]。因此促成了生命条形码数据系统(the Barcode of Life Data System, BOLD)的建立^[13], GenBank 核苷酸序列数据库中的 CO I 基因序列数据也随之迅猛增加^[14]。以建立全球鱼类条型码数据库为目标的国际合作研究项目——The Fish Barcode of Life Campaign (Flsh-BOL)于 2005 年启动, 加速了全球鱼类 CO I 基因参考序列的收集和利用^[12,15]。

GenBank 核苷酸序列数据库由美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)建立, 目前已有全世界的科学工作者提交的近 26 万种生物的核苷酸序列, 供用户免费使用^[16]。但由于数据为自由提交, 生物多样性又十分复杂, 所以很难确保所有的数据信息均客观准确, 在使用前有必要进行慎重的检查和甄别^[8,17-20]。笔者在利用 GenBank 数据库中的线粒体基因序列数据对裂腹鱼类进行研究时发现, 多重比对结果中存在个别同源性存疑的序列, 还有一些不同鱼种共享单倍型的现象。由于 DNA 分子标记在近缘种之间存在差异性过低的可能, 因此对其用于生物学条形码来区分近缘物种的有效性提出怀疑^[21]。该问题在对裂腹鱼类进行研究时也值得进一步探究。

本研究对 GenBank 数据库中裂腹鱼类的 CO I 基因序列进行全面分析, 查找同源性存疑的序列与其他序列不同的原因, 探讨这些数据作为分子标记在鱼种鉴定和分子演化分析中的有效性。加

深理解和认识前人以这些数据为基础所做的研究工作, 为今后科学合理地使用这些数据提供参考。

1 材料与方法

1.1 数据来源与整理

依据《中国动物志》^[22]和相关研究^[23-26], 裂腹鱼类共 12 属 90 种和亚种, 在 GenBank 数据库中分别输入它们的拉丁学名进行检索, 下载所有的 CO I 基因片段序列, 对其中具有线粒体基因组序列数据的鱼种, 下载线粒体基因组中的 CO I 基因作为参考序列。下载截至日期为 2021 年 7 月 20 日。

利用 CLUSTAL X 1.8^[27]对上述下载的序列进行 Alignment 多重比对, 将比对结果中差异显著的同源性存疑序列, 在 GenBank 中进行 BLAST 相似性检索, 并核查数据的提交信息, 若有不准确的序列则进行剔除, 若为互补链序列则进行互补转换。再次对数据进行 Alignment 比对, 为尽可能保留数据中的变异信息, 在数据数量和长度间权衡, 舍弃长度较短的序列, 建立数据集。

1.2 单倍型和遗传差异分析

利用 DnaSP 6.1^[28]对 CO I 基因序列数据集进行单倍型分析, 并利用所定义的单倍型建立单倍型数据集。

利用 MEGA 7.0^[29]计算所有单倍型两两之间的 p -距离($p=n_d/n_t$, 其中 n_d 为两条序列之间不同的碱基的数目, n_t 为所比较序列的长度), 计算全部单倍型之间的平均 p -距离, 以及各演化等级内单倍型之间的平均 p -距离。

1.3 系统发育分析

以波比氏鲃(*Barbus pobeguini*, GenBank 登录号: NC_033914.1)和赫尔氏鲃(*Barbus hulstaerti*, GenBank 登录号: NC_031530.1)为外类群, 用三种方法重建单倍型系统发育树。第一种是邻接法(Neighbor-Joining, NJ), 在 MEGA 7.0 中进行, 分子演化模型采用 Kimura 双参数模型(Kimura 2-parameters)。第二种是最大似然法(maximum likelihood, ML), 在 IQ-TREE 2^[30]中进行, 分子演化模型采用在 ModelFinder 模块用贪婪算法估计的最优核苷酸替代模型 TN93+G+I+G4。以上两种

方法均进行1000次自举检验(bootstrap=1000)。第三种采用贝叶斯推断法(Baysian inference, BI)建树,在MrBayes v.3.2.6^[31]中进行,核苷酸替代模型选用GTR+G+I+G4,以随机树为起始树,进行100000代马尔可夫链蒙特卡罗模拟(Markov Chain Monte Carlo, MCMC),每100代取样一次,采用4条马尔可夫链同时运行,其中3条热链1条冷链(ngen=4)。一致性树在250代后(Burnin=250)整合,分支节点的可信度以后验概率(posterior probability, PP)为参考^[32]。所有的系统发育树用FigTree v.1.4.2^[33]查看并导出。

2 结果与分析

2.1 序列比对及结果整理

经检索,截至2021年7月20日,GenBank中发表的裂腹鱼类CO I基因片段序列有1431条,涵盖11属66种和亚种,其中58种鱼具有线粒体基因组序列。下载以上全部CO I基因片段序列,同时下载58种线粒体基因组中的CO I基因序列作为参考序列(表1)。Aligment多重比对结果显示,有1条尼泊尔裂腹鱼(*Schizothorax nepalensis*)的序列(GenBank登录号: MN178262.1)和2条横口裂腹鱼(*Schizothorax plagiostomus*)的序列(GenBank

登录号: MN178265.1 和 KJ183111.1)与其他大多数序列相比,存在大片段的插入缺失,差异十分显著,不像裂腹鱼类的CO I同源基因。但以BLAST相似性搜索来判断,这3条序列都是裂腹鱼类的CO I基因序列,进一步核查序列提交信息发现,它们以CO I基因的互补链序列形式提交至GenBank。将以上3条序列进行互补链转换后,再次对数据进行Aligment比对,结果显示,所有序列均为CO I基因同源序列,且片段序列均为CO I基因的近5'端至中部序列,大多数序列的比对长度为527 bp,截取该长度序列,并舍弃35条较短的序列,即来自23条理氏裂腹鱼(*Schizothorax richardsonii*, GenBank登录号: JX485929.1-50.1, MK785037.1)、6条前裂腹鱼(*Schizothorax progastus*, GenBank登录号: MK784997.1-99.1, JQ692870.1, JQ692872.1, JQ692873.1)、4条拉萨裂腹鱼(*Schizothorax waltoni*, GenBank登录号: MN991975.1-78.1)的序列,以及来自横口裂腹鱼(GenBank登录号: KJ183111.1)和短须裂腹鱼(*Schizothorax wangchiachii*, GenBank登录号: HQ235943.1)的序列各1条,由此建立的数据集共包含1396条CO I基因序列,涵盖11属66种和亚种,每种鱼的序列数目在1~312条之间不等(表2)。

表1 裂腹鱼类线粒体基因组参考序列及其CO I基因在本研究中定义的单倍型
Tab. 1 Reference sequences of Schizothoracids mitochondrial genomes from GenBank and their CO I haplotypes defined in this study

物种 species	演化等级 grade	GenBank 登录号 GenBank accession no.	单倍型 haplotype
扁吻鱼 <i>Aspiorhynchus laticeps</i>	原始 primitive	NC_022855.1	Hap1
塔里木裂腹鱼 <i>Schizothorax biddulphi</i>	原始 primitive	NC_017873.1	Hap1
骨唇黄河鱼 <i>Chuanchia labiosa</i>	高度特化 highly specialized	NC_029181.1	Hap4
黄河裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis pylzovi</i>	高度特化 highly specialized	NC_026206.1	Hap4
软刺裸鲤 <i>Gymnocypris dobula</i>	高度特化 highly specialized	NC_021419.1	Hap9
花斑裸鲤 <i>Gymnocypris eckloni</i>	高度特化 highly specialized	NC_019605.1	Hap17
青海湖裸鲤 <i>Gymnocypris przewalskii</i>	高度特化 highly specialized	NC_008661.1	Hap17
甘孜河裸鲤 <i>Gymnocypris przewalskii ganzihonensis</i>	高度特化 highly specialized	NC_019604.1	Hap17
松潘裸鲤 <i>Gymnocypris potanini</i>	高度特化 highly specialized	NC_031813.1	Hap23
新疆裸重唇鱼 <i>Gymnodipterus dybowskii</i>	特化 specialized	NC_028544.1	Hap27
厚唇裸重唇鱼 <i>Gymnodipterus pachycheilus</i>	特化 specialized	NC_023793.1	Hap28
斯氏尖裸鲤 <i>Oxygymnocypris stewartii</i>	高度特化 highly specialized	NC_022718.1	Hap34
高原裸鲤 <i>Gymnocypris waddellii</i>	高度特化 highly specialized	NC_047410.1	Hap34

(待续 to be continued)

(续表1 Tab. 1 continued)

物种 species	演化等级 grade	GenBank 登录号 GenBank accession no.	单倍型 haplotype
极边扁咽齿鱼 <i>Platypharodon extremus</i>	高度特化 highly specialized	NC_029171.1	Hap37
双须叶须鱼 <i>Ptychobarbus dipogon</i>	特化 specialized	NC_024537.1	Hap44
裸腹叶须鱼 <i>Ptychobarbus kaznakovi</i>	特化 specialized	NC_025303.1	Hap55
黑身准裂腹鱼 <i>Schizopyge niger</i>	原始 primitive	NC_022866.1	Hap56
嘉陵裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis kialingensis</i>	高度特化 highly specialized	KM879226.1	Hap63
大渡裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis malacanthus chengi</i>	高度特化 highly specialized	KT270484.1	Hap64
硬刺裸鲤 <i>Gymnocypris firmispinatus</i>	高度特化 highly specialized	MW222391.1	Hap66
软刺裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis malacanthus</i>	高度特化 highly specialized	NC_024880.1	Hap71
温泉裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis thermalis</i>	高度特化 highly specialized	NC_021421.1	Hap75
纳木错裸鲤 <i>Gymnocypris namensis</i>	高度特化 highly specialized	NC_021420.1	Hap75
色林错裸鲤 <i>Gymnocypris selincuoensis</i>	高度特化 highly specialized	MF787293.1	Hap75
宽口裂腹鱼 <i>Schizothorax eurystomus</i>	原始 primitive	NC_036933.1	Hap94
四川裂腹鱼 <i>Schizothorax kozlovi</i>	原始 primitive	NC_027670.1	Hap99
细鳞裂腹鱼 <i>Schizothorax chongi</i>	原始 primitive	NC_024621.1	Hap99
重口裂腹鱼 <i>Schizothorax davidi</i>	原始 primitive	NC_026205.1	Hap106
昆明裂腹鱼 <i>Schizothorax grahami</i>	原始 primitive	NC_029708.1	Hap106
全唇裂腹鱼 <i>Schizothorax labiatus</i>	原始 primitive	NC_023365.1	Hap113
前裂腹鱼 <i>Schizothorax progastus</i>	原始 primitive	NC_023366.1	Hap113
怒江裂腹鱼 <i>Schizothorax nukiangensis</i>	原始 primitive	NC_027940.1	Hap115
光唇裂腹鱼 <i>Schizothorax lissolabiatus</i>	原始 primitive	NC_027162.1	Hap116
长丝裂腹鱼 <i>Schizopyge dolichonema</i>	原始 primitive	NC_023979.1	Hap116
完唇裂腹鱼 <i>Schizothorax integrilabiatus</i>	原始 primitive	NC_036746.1	Hap117
墨脱裂腹鱼 <i>Schizothorax molesworthi</i>	原始 primitive	NC_037183.1	Hap117
巨须裂腹鱼 <i>Schizothorax macropogon</i>	原始 primitive	NC_020339.1	Hap130
异齿裂腹鱼 <i>Schizothorax oconnori</i>	原始 primitive	NC_020781.1	Hap143
短须裂腹鱼 <i>Schizothorax wangchiachii</i>	原始 primitive	NC_020360.1	Hap143
齐口裂腹鱼 <i>Schizothorax prenanti</i>	原始 primitive	NC_023829.1	Hap172
理氏裂腹鱼 <i>Schizothorax richardsonii</i>	原始 primitive	NC_021448.1	Hap176
拉萨裂腹鱼 <i>Schizothorax waltoni</i>	原始 primitive	NC_020606.1	Hap191
保山裂腹鱼 <i>Schizothorax yunnanensis paoshanensis</i>	原始 primitive	KR780749.1	Hap199
澜沧裂腹鱼 <i>Schizothorax lantsangensis</i>	原始 primitive	NC_026294.1	Hap203
中甸叶须鱼 <i>Ptychobarbus chungtienensis</i>	特化 specialized	NC_034230.1	Hap211
斑重唇鱼 <i>Diptychus maculatus</i>	特化 specialized	NC_025650.1	Hap215
中华裂腹鱼 <i>Schizothorax sinensis</i>	原始 primitive	MW191514.1:	Hap216
伊犁裂腹鱼 <i>Schizothorax pseudoaktsaiensis</i>	原始 primitive	NC_024833.1	Hap217
横口裂腹鱼 <i>Schizothorax plagiostomus</i>	原始 primitive	NC_023531.1	Hap218
尼泊尔裂腹鱼 <i>Schizothorax nepalensis</i>	原始 primitive	NC_031537.1	Hap219
扁嘴裂腹鱼 <i>Schizothorax esocinus</i>	原始 primitive	NC_022867.1	Hap220
弧唇裂腹鱼 <i>Schizothorax curvilabiatus</i>	原始 primitive	NC_035994.1	Hap221
拉萨裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis younghusbandi</i>	高度特化 highly specialized	NC_021409.1	Hap222
高原裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis stoliczkae</i>	高度特化 highly specialized	NC_032398.1	Hap223
柴达木裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis kessleri</i>	高度特化 highly specialized	NC_045935.1	Hap224
前腹裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis anteroventris</i>	高度特化 highly specialized	NC_029190.1	Hap225
贡山裂腹鱼 <i>Schizopyge gongshanensis</i>	原始 primitive	NC_031803.1	Hap226
小头高原鱼 <i>Herzensteinia microcephalus</i>	高度特化 highly specialized	NC_033403.1	Hap227

2.2 单倍型组成与遗传差异

DnaSP 对裂腹鱼类的 CO I 基因序列共定义了 228 个单倍型, 在具有多条序列的鱼种中, 普遍存在种内共享单倍型的现象(表 2)。其中还有 41 个单倍型为种间共享, 涉及 795 条序列, 47 个种和亚种。在 41 个种间共享单倍型中, 有 9 个同时包含着 2 种鱼的参考序列, 还有 2 个同时包含着 3 种鱼的参考序列, 约占所有参考序列的 41% (表 1, 表 2)。种间共享单倍型中, 2 种鱼共享的最多, 有 26 个, 约占 63%; 其次为 3 种鱼共享的单倍型, 有 9 个, 约占 22%; 4 种和 5 种鱼共享的单倍型分别有 1 个(Hap34)和 4 个(Hap4、Hap106、Hap113 和 Hap116), 还有 1 个单倍型(Hap75)竟有 6 种鱼共享。值得注意的是, Hap4 由属于特化等级的裸腹叶须鱼(*Ptychobarbus kaznakovi*, GenBank 登录号: MH464921.1)与高度特化等级的骨唇黄河鱼(*Chuanchia labiosa*)、黄河裸裂尻鱼(*Schizopygopsis pylzovi*)、柴达木裸裂尻鱼(*Schizopygopsis kessleri*)和花斑裸鲤共享, Hap4 同时也是骨唇黄河鱼和黄河裸裂尻鱼的参考序列; Hap78 由属于高度特化等级的软刺裸裂尻鱼(*Schizopygopsis malacanthus*, GenBank 登录号: MH464951.1)与 49 条原始等级的短须裂腹鱼共享。单倍型数量最多的是横口裂腹鱼, 达 28 个; 其次是理氏裂腹鱼和软刺裸裂尻

鱼, 都是 16 个; 数量较多的还有花斑裸鲤(*Gymnocypris ecklonii*)、裸腹叶须鱼、拉萨裸裂尻鱼(*Schizopygopsis younghusbandi*)、前裂腹鱼和怒江裂腹鱼(*Schizothorax nukiangensis*), 都有 10 个(表 2)。

在 228 个单倍型构成的 25878 个单倍型数据对中, 平均 *p*-距离为(9.5±5.0)% , 原始、特化和高度特化等级各自的平均 *p*-距离分别为(4.1±2.0)%、(6.8±5.0)% 和(3.7±2.0)%。属于高度特化等级软刺裸鲤(*Gymnocypris dobula*)的 Hap14 和属于原始等级光唇裂腹鱼(*Schizothorax lissolabiatus*)的 Hap127 之间的 *p*-距离最大, 达 19.8%, 也就是说裂腹鱼种之间的 CO I 序列差异范围在 0.0% (种间共享)~19.8%。值得一提的是, 除了 8 种没有参考序列的鱼种外, 在 228 个单倍型中, 与各自鱼种的参考序列的差异大于 2.0% 的单倍型有 66 个, 涉及 17 种鱼 328 条序列; 与各自鱼种的参考序列的差异大于 1.0% 并小于等于 2.0% 的单倍型有 19 个, 涉及 9 种鱼 89 条序列(表 2); 横口裂腹鱼以 CO I 片段序列定义的 27 个单倍型均与其参考序列的差异大于 1.5%, 其中有 22 个大于 2.1%; 软刺裸裂尻鱼以 CO I 片段序列定义的 15 个单倍型中, 有 6 个与参考序列差异大于 1.5%, 本研究中与参考序列差异最大的单倍型就出现在该鱼种中, 即 Hap78 与其参考序列 Hap71 的差异达 13.7% (表 2)。

表 2 GenBank 中裂腹鱼类 CO I 基因序列的单倍型及其与参考序列间的 *p*-距离

Tab. 2 Haplotypes of Schizothoracids CO I from GenBank and the *p*-distances between them and references

单倍型 haplotype	序列数目 sequence number	鱼种 species	演化等级 grade	<i>p</i> -距离 <i>p</i> -distance
Hap1	3	扁吻鱼 <i>Aspiorhynchus laticeps</i>	原始 primitive	0.000
	1	塔里木裂腹鱼 <i>Schizothorax biddulphi</i>	原始 primitive	0.000
Hap2	1	扁吻鱼 <i>A. laticeps</i>	原始 primitive	0.002
Hap3	1	骨唇黄河鱼 <i>Chuanchia labiosa</i>	高度特化 highly specialized	0.002
	1	黄河裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis pylzovi</i>	高度特化 highly specialized	0.002
	1	花斑裸鲤 <i>Gymnocypris ecklonii</i>	高度特化 highly specialized	0.046
Hap4	3	骨唇黄河鱼 <i>C. labiosa</i>	高度特化 highly specialized	0.000
	5	黄河裸裂尻鱼 <i>S. pylzovi</i>	高度特化 highly specialized	0.000
	1	花斑裸鲤 <i>G. ecklonii</i>	高度特化 highly specialized	0.044
	1	柴达木裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis kessleri</i>	高度特化 highly specialized	0.008
	1	裸腹叶须鱼 <i>Ptychobarbus kaznakovi</i>	特化 specialized	0.088
Hap5	1	骨唇黄河鱼 <i>C. labiosa</i>	高度特化 highly specialized	0.004
	1	黄河裸裂尻鱼 <i>S. pylzovi</i>	高度特化 highly specialized	0.004

(待续 to be continued)

(续表2 Tab. 2 continued)

单倍型 haplotype	序列数目 sequence number	鱼种 species	演化等级 grade	p-距离 p-distance
Hap6	1	骨唇黄河鱼 <i>C. labiosa</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap7	2	骨唇黄河鱼 <i>C. labiosa</i>	高度特化 highly specialized	0.002
	1	黄河裸裂尻鱼 <i>S. pylzovi</i>	高度特化 highly specialized	0.002
	1	花斑裸鲤 <i>G. eckloni</i>	高度特化 highly specialized	0.042
Hap8	1	斑重唇鱼 <i>Diptychus maculatus</i>	特化 specialized	0.021
Hap9	15	软刺裸鲤 <i>Gymnocypris dobula</i>	高度特化 highly specialized	0.000
	5	温泉裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis thermalis</i>	高度特化 highly specialized	0.002
	3	拉萨裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis younghusbandi</i>	高度特化 highly specialized	0.006
Hap10	2	软刺裸鲤 <i>G. dobula</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap11	1	软刺裸鲤 <i>G. dobula</i>	高度特化 highly specialized	0.004
Hap12	1	软刺裸鲤 <i>G. dobula</i>	高度特化 highly specialized	0.004
Hap13	1	软刺裸鲤 <i>G. dobula</i>	高度特化 highly specialized	0.004
Hap14	1	软刺裸鲤 <i>G. dobula</i>	高度特化 highly specialized	0.048
Hap15	1	软刺裸鲤 <i>G. dobula</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap16	1	花斑裸鲤 <i>G. eckloni</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap17	3	花斑裸鲤 <i>G. eckloni</i>	高度特化 highly specialized	0.000
	4	青海湖裸鲤 <i>Gymnocypris przewalskii</i>	高度特化 highly specialized	0.000
	1	甘孜河裸鲤 <i>Gymnocypris przewalskii ganzihonensis</i>	高度特化 highly specialized	0.000
Hap18	2	花斑裸鲤 <i>G. eckloni</i>	高度特化 highly specialized	0.004
Hap19	2	花斑裸鲤 <i>G. eckloni</i>	高度特化 highly specialized	0.002
	1	青海湖裸鲤 <i>G. przewalskii</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap20	1	花斑裸鲤 <i>G. eckloni</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap21	1	花斑裸鲤 <i>G. eckloni</i>	高度特化 highly specialized	0.006
Hap22	37	硬刺裸鲤 <i>Gymnocypris firmispinatus</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap23	11	松潘裸鲤 <i>Gymnocypris potanini</i>	高度特化 highly specialized	0.000
Hap24	1	青海湖裸鲤 <i>G. przewalskii</i>	高度特化 highly specialized	0.002
	1	甘孜河裸鲤 <i>G. p. ganzihonensis</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap25	1	青海湖裸鲤 <i>G. przewalskii</i>	高度特化 highly specialized	0.002
	1	甘孜河裸鲤 <i>G. p. ganzihonensis</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap26	1	青海湖裸鲤 <i>G. przewalskii</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap27	2	新疆裸重唇鱼 <i>Gymnoptychus dybowskii</i>	特化 specialized	0.000
Hap28	5	厚唇裸重唇鱼 <i>Gymnoptychus pachycheilus</i>	特化 specialized	0.000
Hap29	1	厚唇裸重唇鱼 <i>G. pachycheilus</i>	特化 specialized	0.002
Hap30	2	小头高原鱼 <i>Herzensteinia microcephalus</i>	高度特化 highly specialized	0.017
Hap31	4	小头高原鱼 <i>H. microcephalus</i>	高度特化 highly specialized	0.015
	1	软刺裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis malacanthus</i>	高度特化 highly specialized	0.015
Hap32	1	小头高原鱼 <i>H. microcephalus</i>	高度特化 highly specialized	0.015
Hap33	2	斯氏尖裸鲤 <i>Oxygymnocypris stewartii</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap34	8	斯氏尖裸鲤 <i>O. stewartii</i>	高度特化 highly specialized	0.000
	3	软刺裸裂尻鱼 <i>S. malacanthus</i>	高度特化 highly specialized	0.073
	2	拉萨裸裂尻鱼 <i>S. younghusbandi</i>	高度特化 highly specialized	0.084
	1	高原裸鲤 <i>Gymnocypris waddellii</i>	高度特化 highly specialized	0.000
Hap35	3	极边扁咽齿鱼 <i>Platypharodon extremus</i>	高度特化 highly specialized	0.002

(待续 to be continued)

(续表 2 Tab. 2 continued)

单倍型 haplotype	序列数目 sequence number	鱼种 species	演化等级 grade	p-距离 p-distance
Hap36	1	极边扁咽齿鱼 <i>P. extremus</i>	高度特化 highly specialized	0.004
Hap37	3	极边扁咽齿鱼 <i>P. extremus</i>	高度特化 highly specialized	0.000
Hap38	1	极边扁咽齿鱼 <i>P. extremus</i>	高度特化 highly specialized	0.008
Hap39	1	双须叶须鱼 <i>Ptychobarbus dipogon</i>	特化 specialized	0.006
Hap40	1	双须叶须鱼 <i>P. dipogon</i>	特化 specialized	0.002
Hap41	1	双须叶须鱼 <i>P. dipogon</i>	特化 specialized	0.006
Hap42	1	双须叶须鱼 <i>P. dipogon</i>	特化 specialized	0.002
Hap43	1	双须叶须鱼 <i>P. dipogon</i>	特化 specialized	0.006
Hap44	3	双须叶须鱼 <i>P. dipogon</i>	特化 specialized	0.000
Hap45	1	双须叶须鱼 <i>P. dipogon</i>	特化 specialized	0.006
Hap46	5	双须叶须鱼 <i>P. dipogon</i>	特化 specialized	0.002
Hap47	2	双须叶须鱼 <i>P. dipogon</i>	特化 specialized	0.006
Hap48	2	裸腹叶须鱼 <i>P. kaznakovi</i>	特化 specialized	0.021
Hap49	1	裸腹叶须鱼 <i>P. kaznakovi</i>	特化 specialized	0.011
Hap50	1	裸腹叶须鱼 <i>P. kaznakovi</i>	特化 specialized	0.002
Hap51	1	裸腹叶须鱼 <i>P. kaznakovi</i>	特化 specialized	0.002
Hap52	1	裸腹叶须鱼 <i>P. kaznakovi</i>	特化 specialized	0.011
Hap53	4	裸腹叶须鱼 <i>P. kaznakovi</i>	特化 specialized	0.010
Hap54	1	裸腹叶须鱼 <i>P. kaznakovi</i>	特化 specialized	0.002
Hap55	2	裸腹叶须鱼 <i>P. kaznakovi</i>	特化 specialized	0.000
	1	格咱叶须鱼 <i>Ptychobarbus chungtienensis gezaensis</i>	特化 specialized	无参
Hap56	6	黑身准裂腹鱼 <i>Schizopyge niger</i>	原始 primitive	0.000
	5	横口裂腹鱼 <i>Schizothorax plagiostomus</i>	原始 primitive	0.048
Hap57	1	黑身准裂腹鱼 <i>S. niger</i>	原始 primitive	0.010
Hap58	1	黑身准裂腹鱼 <i>S. niger</i>	原始 primitive	0.011
Hap59	2	黑身准裂腹鱼 <i>S. niger</i>	原始 primitive	0.011
Hap60	2	前腹裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis anteroventris</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap61	1	前腹裸裂尻鱼 <i>S. anteroventris</i>	高度特化 highly specialized	0.006
Hap62	1	黄河裸裂尻鱼 <i>S. pylzovi</i>	高度特化 highly specialized	0.002
	1	柴达木裸裂尻鱼 <i>S. kessleri</i>	高度特化 highly specialized	0.010
Hap63	3	嘉陵裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis kialingensis</i>	高度特化 highly specialized	0.000
Hap64	4	大渡裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis malacanthus chengi</i>	高度特化 highly specialized	0.000
Hap65	1	大渡裸裂尻鱼 <i>S. m. chengi</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap66	26	软刺裸裂尻鱼 <i>S. malacanthus</i>	高度特化 highly specialized	0.021
	1	硬刺裸鲤 <i>G. firmispinatus</i>	高度特化 highly specialized	0.000
Hap67	3	软刺裸裂尻鱼 <i>S. malacanthus</i>	高度特化 highly specialized	0.019
Hap68	45	软刺裸裂尻鱼 <i>S. malacanthus</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap69	24	软刺裸裂尻鱼 <i>S. malacanthus</i>	高度特化 highly specialized	0.004
Hap70	3	软刺裸裂尻鱼 <i>S. malacanthus</i>	高度特化 highly specialized	0.023
Hap71	6	软刺裸裂尻鱼 <i>S. malacanthus</i>	高度特化 highly specialized	0.000
Hap72	2	软刺裸裂尻鱼 <i>S. malacanthus</i>	高度特化 highly specialized	0.004
Hap73	1	软刺裸裂尻鱼 <i>S. malacanthus</i>	高度特化 highly specialized	0.004
Hap74	13	软刺裸裂尻鱼 <i>S. malacanthus</i>	高度特化 highly specialized	0.032

(待续 to be continued)

(续表2 Tab. 2 continued)

单倍型 haplotype	序列数目 sequence number	鱼种 species	演化等级 grade	p-距离 p-distance
Hap75	3	拉萨裸裂尻鱼 <i>S. younghusbandi</i>	高度特化 highly specialized	0.002
	4	温泉裸裂尻鱼 <i>S. thermalis</i>	高度特化 highly specialized	0.000
	2	纳木错裸鲤 <i>Gymnocypris namensis</i>	高度特化 highly specialized	0.000
	1	色林错裸鲤 <i>Gymnocypris selincuoensis</i>	高度特化 highly specialized	0.000
	1	拉萨裸裂尻鱼 <i>S. younghusbandi</i>	高度特化 highly specialized	0.004
	27	软刺裸裂尻鱼 <i>S. malacanthus</i>	高度特化 highly specialized	0.031
Hap76	1	高原裸鲤 <i>G. waddellii</i>	高度特化 highly specialized	0.080
	1	软刺裸裂尻鱼 <i>S. malacanthus</i>	高度特化 highly specialized	0.032
Hap77	1	软刺裸裂尻鱼 <i>S. malacanthus</i>	高度特化 highly specialized	0.006
Hap78	49	短须裂腹鱼 <i>Schizothorax wangchiachii</i>	原始 primitive	0.044
	1	软刺裸裂尻鱼 <i>S. malacanthus</i>	高度特化 highly specialized	0.137
Hap79	1	黄河裸裂尻鱼 <i>S. pylzovi</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap80	1	色林错裸鲤 <i>G. selincuoensis</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap81	1	色林错裸鲤 <i>G. selincuoensis</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap82	1	色林错裸鲤 <i>G. selincuoensis</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap83	1	色林错裸鲤 <i>G. selincuoensis</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap84	2	班公湖裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis stoliczkai bangongensis</i>	高度特化 highly specialized	无参
Hap85	1	温泉裸裂尻鱼 <i>S. thermalis</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap86	1	温泉裸裂尻鱼 <i>S. thermalis</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap87	1	拉萨裸裂尻鱼 <i>S. younghusbandi</i>	高度特化 highly specialized	0.006
Hap88	1	拉萨裸裂尻鱼 <i>S. younghusbandi</i>	高度特化 highly specialized	0.008
Hap89	1	拉萨裸裂尻鱼 <i>S. younghusbandi</i>	高度特化 highly specialized	0.004
Hap90	1	拉萨裸裂尻鱼 <i>S. younghusbandi</i>	高度特化 highly specialized	0.006
Hap91	2	拉萨裸裂尻鱼 <i>S. younghusbandi</i>	高度特化 highly specialized	0.006
Hap92	2	银色裂腹鱼 <i>Schizothorax argentatus</i>	原始 primitive	无参
Hap93	1	银色裂腹鱼 <i>S. argentatus</i>	原始 primitive	无参
	2	伊犁裂腹鱼 <i>Schizothorax pseudoaksaiensis</i>	原始 primitive	0.046
Hap94	1	宽口裂腹鱼 <i>Schizothorax eurystomus</i>	原始 primitive	0.000
	1	塔里木裂腹鱼 <i>S. biddulphi</i>	原始 primitive	0.059
Hap95	1	宽口裂腹鱼 <i>S. eurystomus</i>	原始 primitive	0.002
	2	塔里木裂腹鱼 <i>S. biddulphi</i>	原始 primitive	0.057
Hap96	1	塔里木裂腹鱼 <i>S. biddulphi</i>	原始 primitive	0.059
Hap97	1	塔里木裂腹鱼 <i>S. biddulphi</i>	原始 primitive	0.059
Hap98	5	细鳞裂腹鱼 <i>Schizothorax chongi</i>	原始 primitive	0.004
Hap99	18	四川裂腹鱼 <i>Schizothorax kozlovi</i>	原始 primitive	0.000
	57	长丝裂腹鱼 <i>Schizopyge dolichonema</i>	原始 primitive	0.011
Hap100	4	细鳞裂腹鱼 <i>S. chongi</i>	原始 primitive	0.000
	1	细鳞裂腹鱼 <i>S. chongi</i>	原始 primitive	0.002
Hap101	1	细鳞裂腹鱼 <i>S. chongi</i>	原始 primitive	0.004
Hap102	1	细鳞裂腹鱼 <i>S. chongi</i>	原始 primitive	0.004
Hap103	7	赫氏裂腹鱼 <i>Schizothorax curvifrons</i>	原始 primitive	无参
Hap104	3	弧唇裂腹鱼 <i>Schizothorax curviliabiatus</i>	原始 primitive	0.004

(待续 to be continued)

(续表 2 Tab. 2 continued)

单倍型 haplotype	序列数目 sequence number	鱼种 species	演化等级 grade	p-距离 p-distance
	1	拉萨裂腹鱼 <i>Schizothorax waltoni</i>	原始 primitive	0.013
Hap105	2	弧唇裂腹鱼 <i>S. curvifrons</i>	原始 primitive	0.002
Hap106	11	重口裂腹鱼 <i>Schizothorax davidi</i>	原始 primitive	0.000
	1	昆明裂腹鱼 <i>Schizothorax grahami</i>	原始 primitive	0.000
	9	长丝裂腹鱼 <i>S. dolichonema</i>	原始 primitive	0.006
	3	齐口裂腹鱼 <i>Schizothorax prenanti</i>	原始 primitive	0.002
	2	中华裂腹鱼 <i>Schizothorax sinensis</i>	原始 primitive	0.002
Hap107	1	重口裂腹鱼 <i>S. davidi</i>	原始 primitive	0.002
Hap108	4	长丝裂腹鱼 <i>S. dolichonema</i>	原始 primitive	0.013
Hap109	1	长丝裂腹鱼 <i>S. dolichonema</i>	原始 primitive	0.008
Hap110	3	长丝裂腹鱼 <i>S. dolichonema</i>	原始 primitive	0.008
Hap111	1	长丝裂腹鱼 <i>S. dolichonema</i>	原始 primitive	0.008
Hap112	2	扁嘴裂腹鱼 <i>Schizothorax esocinus</i>	原始 primitive	0.006
	1	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.025
	1	全唇裂腹鱼 <i>Schizothorax labiatus</i>	原始 primitive	0.002
Hap113	2	全唇裂腹鱼 <i>S. labiatus</i>	原始 primitive	0.000
	6	前裂腹鱼 <i>Schizothorax progastus</i>	原始 primitive	0.000
	5	扁嘴裂腹鱼 <i>S. esocinus</i>	原始 primitive	0.004
	17	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.023
	35	理氏裂腹鱼 <i>Schizothorax richardsonii</i>	原始 primitive	0.002
Hap114	1	贡山裂腹鱼 <i>Schizopyge gongshanensis</i>	原始 primitive	0.010
Hap115	17	贡山裂腹鱼 <i>S. gongshanensis</i>	原始 primitive	0.002
	35	光唇裂腹鱼 <i>Schizothorax lissolabiatus</i>	原始 primitive	0.034
	198	怒江裂腹鱼 <i>Schizothorax nukiangensis</i>	原始 primitive	0.000
Hap116	1	光唇裂腹鱼 <i>S. lissolabiatus</i>	原始 primitive	0.000
	1	长丝裂腹鱼 <i>S. dolichonema</i>	原始 primitive	0.000
	24	昆明裂腹鱼 <i>S. grahami</i>	原始 primitive	0.006
	1	齐口裂腹鱼 <i>S. prenanti</i>	原始 primitive	0.008
	15	短须裂腹鱼 <i>S. wangchiachii</i>	原始 primitive	0.042
Hap117	6	完唇裂腹鱼 <i>Schizothorax integrilabiatus</i>	原始 primitive	0.000
	6	墨脱裂腹鱼 <i>Schizothorax molesworthi</i>	原始 primitive	0.000
Hap118	1	四川裂腹鱼 <i>S. kozlovi</i>	原始 primitive	0.002
Hap119	1	四川裂腹鱼 <i>S. kozlovi</i>	原始 primitive	0.010
Hap120	5	全唇裂腹鱼 <i>S. labiatus</i>	原始 primitive	0.011
Hap121	1	全唇裂腹鱼 <i>S. labiatus</i>	原始 primitive	0.008
Hap122	1	全唇裂腹鱼 <i>S. labiatus</i>	原始 primitive	0.004
	1	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.027
Hap123	1	澜沧裂腹鱼 <i>Schizothorax lantsangensis</i>	原始 primitive	0.050
Hap124	1	澜沧裂腹鱼 <i>S. lantsangensis</i>	原始 primitive	0.046
Hap125	1	光唇裂腹鱼 <i>S. lissolabiatus</i>	原始 primitive	0.034
Hap126	3	光唇裂腹鱼 <i>S. lissolabiatus</i>	原始 primitive	0.029
	1	云南裂腹鱼 <i>Schizothorax yunnanensis</i>	原始 primitive	无参
Hap127	1	光唇裂腹鱼 <i>S. lissolabiatus</i>	原始 primitive	0.055

(待续 to be continued)

(续表2 Tab. 2 continued)

单倍型 haplotype	序列数目 sequence number	鱼种 species	演化等级 grade	p-距离 p-distance
Hap128	2	光唇裂腹鱼 <i>S. lissolabiatus</i>	原始 primitive	0.036
Hap129	1	巨须裂腹鱼 <i>Schizothorax macropogon</i>	原始 primitive	0.002
Hap130	10	巨须裂腹鱼 <i>S. macropogon</i>	原始 primitive	0.000
Hap131	1	巨须裂腹鱼 <i>S. macropogon</i>	原始 primitive	0.004
Hap132	1	墨脱裂腹鱼 <i>S. molesworthi</i>	原始 primitive	0.027
Hap133	1	墨脱裂腹鱼 <i>S. molesworthi</i>	原始 primitive	0.002
Hap134	9	怒江裂腹鱼 <i>S. nukiangensis</i>	原始 primitive	0.002
Hap135	65	怒江裂腹鱼 <i>S. nukiangensis</i>	原始 primitive	0.002
Hap136	19	怒江裂腹鱼 <i>S. nukiangensis</i>	原始 primitive	0.002
Hap137	2	怒江裂腹鱼 <i>S. nukiangensis</i>	原始 primitive	0.002
Hap138	2	怒江裂腹鱼 <i>S. nukiangensis</i>	原始 primitive	0.002
Hap139	10	怒江裂腹鱼 <i>S. nukiangensis</i>	原始 primitive	0.002
Hap140	2	怒江裂腹鱼 <i>S. nukiangensis</i>	原始 primitive	0.002
Hap141	2	怒江裂腹鱼 <i>S. nukiangensis</i>	原始 primitive	0.002
Hap142	3	怒江裂腹鱼 <i>S. nukiangensis</i>	原始 primitive	0.002
Hap143	14	异齿裂腹鱼 <i>Schizothorax oconnori</i>	原始 primitive	0.000
	2	短须裂腹鱼 <i>S. wangchiachii</i>	原始 primitive	0.000
Hap144	4	异齿裂腹鱼 <i>S. oconnori</i>	原始 primitive	0.002
Hap145	1	异齿裂腹鱼 <i>S. oconnori</i>	原始 primitive	0.002
Hap146	1	异齿裂腹鱼 <i>S. oconnori</i>	原始 primitive	0.002
Hap147	1	异齿裂腹鱼 <i>S. oconnori</i>	原始 primitive	0.002
Hap148	1	佩氏裂腹鱼 <i>Schizothorax pelzami</i>	原始 primitive	无参
Hap149	1	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.031
Hap150	2	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.059
	3	理氏裂腹鱼 <i>S. richardsonii</i>	原始 primitive	0.046
Hap151	3	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.021
	1	前裂腹鱼 <i>S. progastus</i>	原始 primitive	0.002
Hap152	1	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.025
	2	前裂腹鱼 <i>S. progastus</i>	原始 primitive	0.002
Hap153	6	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.025
Hap154	2	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.023
Hap155	1	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.025
Hap156	1	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.015
Hap157	2	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.029
Hap158	1	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.017
Hap159	1	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.017
Hap160	1	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.017
Hap161	1	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.017
Hap162	1	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.031
Hap163	1	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.031
Hap164	1	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.031
Hap165	1	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.025
Hap166	3	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.029

(待续 to be continued)

(续表 2 Tab. 2 continued)

单倍型 haplotype	序列数目 sequence number	鱼种 species	演化等级 grade	p-距离 p-distance
Hap167	4	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.027
	8	前裂腹鱼 <i>S. progastus</i>	原始 primitive	0.004
	5	理氏裂腹鱼 <i>S. richardsonii</i>	原始 primitive	0.006
Hap168	2	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.023
	9	理氏裂腹鱼 <i>S. richardsonii</i>	原始 primitive	0.006
Hap169	4	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.025
	7	前裂腹鱼 <i>S. progastus</i>	原始 primitive	0.002
	1	理氏裂腹鱼 <i>S. richardsonii</i>	原始 primitive	0.004
Hap170	3	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.027
Hap171	1	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.025
Hap172	9	齐口裂腹鱼 <i>S. prenanti</i>	原始 primitive	0.000
Hap173	2	齐口裂腹鱼 <i>S. prenanti</i>	原始 primitive	0.002
Hap174	6	前裂腹鱼 <i>S. progastus</i>	原始 primitive	0.004
Hap175	1	前裂腹鱼 <i>S. progastus</i>	原始 primitive	0.052
Hap176	1	理氏裂腹鱼 <i>S. richardsonii</i>	原始 primitive	0.000
	1	前裂腹鱼 <i>S. progastus</i>	原始 primitive	0.002
Hap177	1	前裂腹鱼 <i>S. progastus</i>	原始 primitive	0.006
Hap178	1	前裂腹鱼 <i>S. progastus</i>	原始 primitive	0.002
Hap179	5	理氏裂腹鱼 <i>S. richardsonii</i>	原始 primitive	0.048
Hap180	1	理氏裂腹鱼 <i>S. richardsonii</i>	原始 primitive	0.090
Hap181	1	理氏裂腹鱼 <i>S. richardsonii</i>	原始 primitive	0.004
Hap182	1	理氏裂腹鱼 <i>S. richardsonii</i>	原始 primitive	0.004
Hap183	1	理氏裂腹鱼 <i>S. richardsonii</i>	原始 primitive	0.002
Hap184	1	理氏裂腹鱼 <i>S. richardsonii</i>	原始 primitive	0.004
Hap185	1	理氏裂腹鱼 <i>S. richardsonii</i>	原始 primitive	0.004
Hap186	2	理氏裂腹鱼 <i>S. richardsonii</i>	原始 primitive	0.006
Hap187	1	理氏裂腹鱼 <i>S. richardsonii</i>	原始 primitive	0.008
Hap188	1	理氏裂腹鱼 <i>S. richardsonii</i>	原始 primitive	0.004
Hap189	2	中华裂腹鱼 <i>S. sinensis</i>	原始 primitive	0.006
Hap190	1	中华裂腹鱼 <i>S. sinensis</i>	原始 primitive	0.006
Hap191	10	拉萨裂腹鱼 <i>S. waltoni</i>	原始 primitive	0.000
Hap192	1	拉萨裂腹鱼 <i>S. waltoni</i>	原始 primitive	0.002
Hap193	3	短须裂腹鱼 <i>S. wangchiachii</i>	原始 primitive	0.048
Hap194	5	短须裂腹鱼 <i>S. wangchiachii</i>	原始 primitive	0.042
Hap195	9	短须裂腹鱼 <i>S. wangchiachii</i>	原始 primitive	0.046
Hap196	8	短须裂腹鱼 <i>S. wangchiachii</i>	原始 primitive	0.046
Hap197	25	短须裂腹鱼 <i>S. wangchiachii</i>	原始 primitive	0.050
Hap198	1	短须裂腹鱼 <i>S. wangchiachii</i>	原始 primitive	0.042
Hap199	24	保山裂腹鱼 <i>Schizothorax yunnanensis paoshanensis</i>	原始 primitive	0.000
Hap200	10	保山裂腹鱼 <i>S. y. paoshanensis</i>	原始 primitive	0.002
Hap201	1	中华裂腹鱼 <i>S. sinensis</i>	原始 primitive	0.004
Hap202	1	佩氏裂腹鱼 <i>S. pelzami</i>	原始 primitive	无参
Hap203	2	澜沧裂腹鱼 <i>S. lantsangensis</i>	原始 primitive	0.000

(待续 to be continued)

(续表 2 Tab. 2 continued)

单倍型 haplotype	序列数目 sequence number	鱼种 species	演化等级 grade	p-距离 p-distance
Hap204	1	四川裂腹鱼 <i>S. kozlovi</i>	原始 primitive	0.010
Hap205	1	扁嘴裂腹鱼 <i>S. esocinus</i>	原始 primitive	0.010
Hap206	1	隐鳞裂腹鱼 <i>Schizothorax cryptolepis</i>	原始 primitive	无参
Hap207	1	塔里木裂腹鱼 <i>S. biddulphi</i>	原始 primitive	0.057
Hap208	1	高原裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis stoliczkae</i>	高度特化 highly specialized	0.013
Hap209	1	色林裸裂鲤 <i>G. selincuoensis</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap210	1	软刺裸裂尻鱼 <i>S. malacanthus</i>	高度特化 highly specialized	0.046
Hap211	1	格咱叶须鱼 <i>S. c. gezaensis</i>	特化 specialized	无参
	2	中甸叶须鱼 <i>Styphobarbus chungtienensis</i>	特化 specialized	0.000
Hap212	1	新疆裸重唇鱼 <i>G. dybowskii</i>	高度特化 highly specialized	0.067
Hap213	1	花斑裸鲤 <i>G. eckloni</i>	高度特化 highly specialized	0.002
Hap214	1	斜口裸鲤 <i>Gymnocypris eckloni scoliostomus</i>	高度特化 highly specialized	无参
Hap215	2	斑重唇鱼 <i>D. maculatus</i>	特化 specialized	0.000
Hap216	1	中华裂腹鱼 <i>S. sinensis</i>	原始 primitive	0.000
Hap217	1	伊犁裂腹鱼 <i>S. pseudoaktsaiensis</i>	原始 primitive	0.000
Hap218	1	横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	原始 primitive	0.000
Hap219	1	尼泊尔裂腹鱼 <i>Schizothorax nepalensis</i>	原始 primitive	0.000
Hap220	1	扁嘴裂腹鱼 <i>S. esocinus</i>	原始 primitive	0.000
Hap221	1	弧唇裂腹鱼 <i>S. curviflabiatus</i>	原始 primitive	0.000
Hap222	1	拉萨裸裂尻鱼 <i>S. younghusbandi</i>	高度特化 highly specialized	0.000
Hap223	1	高原裸裂尻鱼 <i>S. stoliczkae</i>	高度特化 highly specialized	0.000
Hap224	1	柴达木裸裂尻鱼 <i>S. kessleri</i>	高度特化 highly specialized	0.000
Hap225	1	前腹裸裂尻鱼 <i>S. anteroventris</i>	高度特化 highly specialized	0.000
Hap226	1	贡山裂腹鱼 <i>S. gongshanensis</i>	高度特化 highly specialized	0.000
Hap227	1	小头高原鱼 <i>H. microcephalus</i>	高度特化 highly specialized	0.000
Hap228	1	尼泊尔裂腹鱼 <i>S. nepalensis</i>	原始 primitive	0.002

2.3 系统发育分析

以邻接法、最大似然法和贝叶斯推断法构建的 CO I 基因的单倍型系统发育树的拓扑结构几乎完全一致, 显示裂腹鱼类为两个并系群, 原始等级的裂腹鱼类聚为一支, 特化和高度特化等级的裂腹鱼形成另一演化支, 部分特化等级的裂腹鱼位于后一支的基部, 而其他特化等级的裂腹鱼与高度特化等级的裂腹鱼具有最近共同祖先(图 1)。原始等级和特化等级裂腹鱼的属级聚类明确, 而高度特化类群的聚类出现了不同属种交错聚类的复杂的情形。单倍型 Hap4 属于高度特化类群, Hap78 则归入原始类群。在系统树上, 种内具有多个单倍型的鱼种, 在参考序列与分歧较大的倍型之间, 往往夹杂着其他近缘鱼种的单倍型(图 1)。

3 讨论

3.1 GenBank 中裂腹鱼类的 CO I 基因序列的同源性

在使用 DNA 序列进行分析时, 若数据中掺有非同源序列, 将造成分析结果错误, 所以在使用数据库中的 DNA 序列时, 为了保证分析结果的可靠性, 首先应当通过序列比对来判断数据的同源性^[34]。本研究对 GenBank 中的裂腹鱼类 CO I 基因序列的比对结果显示, 有 3 条序列出现大片段的插入缺失, 它们与其他裂腹鱼类 CO I 基因明显不同, 通过 BLAST 相似性检索和核查序列提交信息发现, 这 3 条是以 CO I 基因的互补链形式提交的序列, 将它们进行互补链转换之后, 再与其他 CO I 序列进行比对, 结果显示, 所有序列均

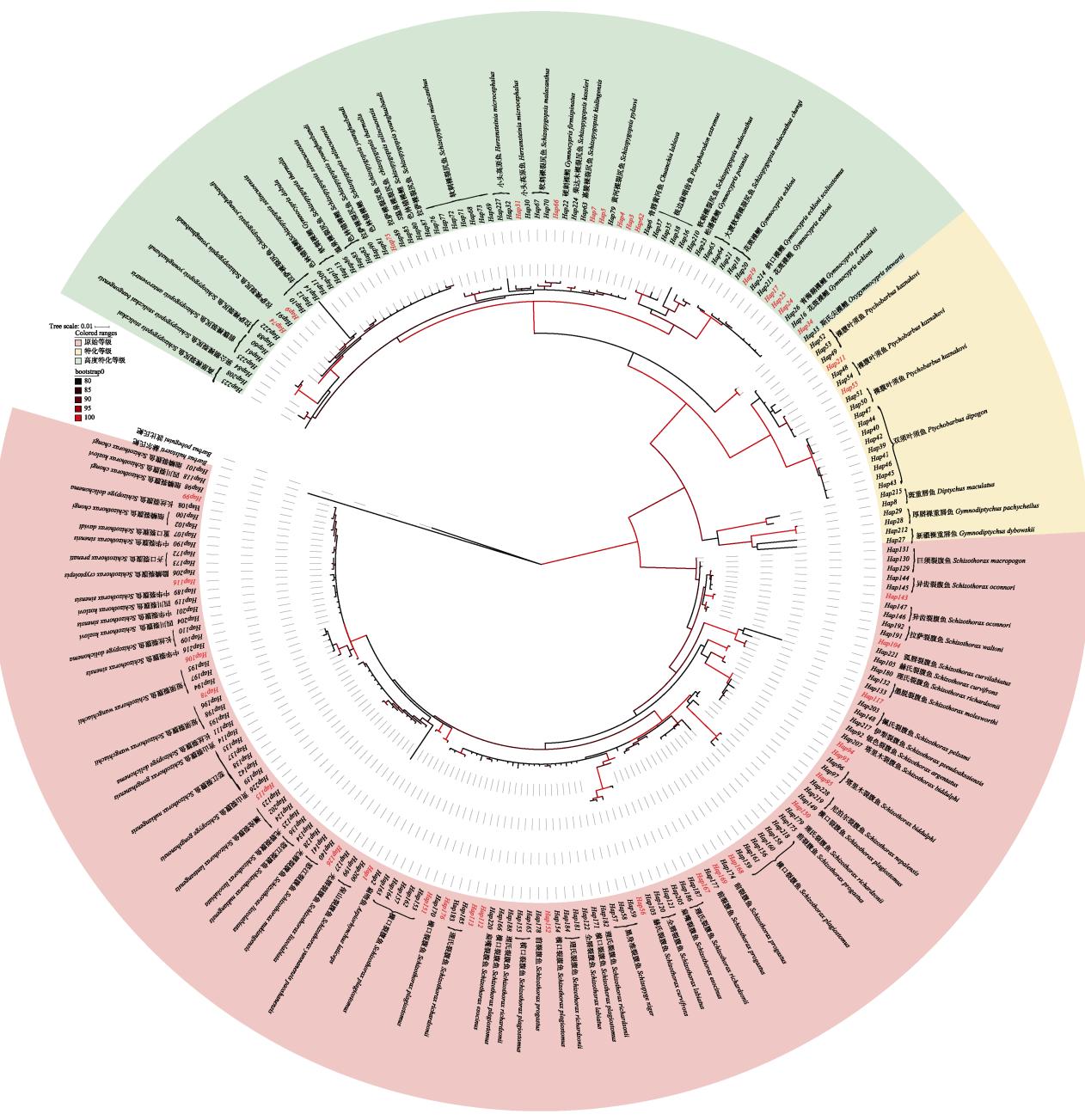


图 1 裂腹鱼线粒体 CO I 基因单倍型的 ML 树
Fig. 1 ML tree of Schizothoracids reconstructed using CO I haplotypes

为裂腹鱼类的 CO I 基因序列。建议今后在对数据库中的 DNA 序列进行同源性分析时, 若发现比对差异显著的同源性存疑序列, 不要简单剔除, 而是进一步分析核查造成差异的原因, 以便最大限度地有效利用数据。从比对结果来看, GenBank 数据库中的裂腹鱼类 CO I 基因片段均为该基因近 5' 端至中部的序列, 这大概与将这段序列做为动物分子条形码的主张有关^[8-9]。此外, Folmer 等^[35]设

计的适用性非常广的 CO I 近 5' 端至中部的 PCR 扩增通用引物，也更容易获得动物种类的这段 DNA 序列。本研究为了使序列数据含有更多的变异信息位点，舍弃了 35 条长度较短序列，保留了比对长度为 527 bp 的序列用于后续分析。

3.2 GenBank 中裂腹鱼类的 CO I 基因单倍型与遗传分歧

本研究利用裂腹鱼类 11 属 66 种和亚种的

1396 条 5' 端 CO I 基因序列变异信息, 共定义出了 228 个单倍型(表 2)。与其他动物种类相似, 在具有多条序列的鱼种中, 普遍存在种内共享单倍型的现象, 说明 CO I 基因序列在裂腹鱼类的种内也是趋于保守的^[8]。与此同时, 研究结果中还出现了 41 个种间共享单倍型, 涉及 795 条序列, 47 个种和亚种。这些种间共享单倍型中, 有 9 个同时包含着 2 种鱼的参考序列, 还有 2 个包含了 3 种鱼的参考序列, 占参考序列数目的 41% (表 1, 表 2)。种间杂交和渐渗(hybridization and introgression)、物种的近期辐射演化(recent radiation), 以及物种识别错误均会导致种间共享单倍型^[8-9]。纵观自然界, 硬骨鱼类由于杂交而导致 CO I 基因共享单倍型的情况比较少见^[36-38], 而且种间杂交和渐渗基本不影响 CO I 基因作为鱼类分子条形码的使用^[9]。裂腹鱼类分布有复杂的水系格局, 可能存在同一水域内种间杂交的现象^[4], 由于 CO I 是母系遗传的线粒体基因, 从杂交个体所测得的序列是其母系亲本的序列, 若杂交个体被鉴定为其父本鱼种, 就造成两个鱼种共享单倍型的假象。对于杂交个体, 可通过亲本物种特异的核基因来辨别^[8-9]。从目前的研究结果来看, 同一水系内裂腹鱼类种间共享线粒体基因单倍型的现象比较普遍, 近期辐射演化和鱼种鉴定错误可能是主要的原因^[39-42]。本研究中, CO I 基因参考序列为同一单倍型的鱼种的亲缘关系都很近^[2], 支持是近期辐射演化的结果, 可能因为这些鱼种在相似环境中的分化历史较短, 尚未在本研究所分析的 CO I 序列片段上留下变异位点信号, 以致无法以这段序列做为分子标记来区分它们^[6,8,21]。在 228 个单倍型构成的 25878 个单倍型数据对中, 平均 p -距离为 9.5%, 与鱼类属的水平相当^[9], 原始、特化和高度特化等級各自的单倍型数据对平均 p -距离均明显小于全部数据对的平均值, 表明各等级裂腹鱼类演化成种的历史较短, 差异较低。早在分子条形码概念刚提出时^[7-8], Mallet 等^[21]曾对用 CO I 基因序列作为区分近缘物种的分子条形码提出过质疑, 认为 DNA 分子序列在近缘种之间可能会太过相似而难以区分。在这种情况下, 尤其是当前生物技术快速进步和序列测定成本大幅降低的条件下, 借

助于基因组数据区分物种和解析物种的系统发育关系是更为有效的途径^[2,43]。

Hebert 等^[8]通过对大量动物种类的 CO I 基因序列研究发现, 98%以上的物种之间的序列差异都在 2%以上。本研究定义的 228 个单倍型中, 与各自鱼种的参考序列的差异大于 2.0% 的单倍型有 66 个, 涉及 17 种鱼 328 条序列。对于成种时间相对较短的裂腹鱼类, 种内差异如此之大, 极有可能是分类错误造成的。特别是拥有 Hap4 的特化等级的裸腹叶须鱼(GenBank 登录号: MH464921.1)和拥有 Hap78 的高度特化等级的软刺裸裂尻鱼(GenBank 登录号: MH464951.1)与其参考序列 Hap55 和 Hap71 的差异分别达 8.8% 和 13.7% (表 2), 远远超出特化等级和高度特化等级裂腹鱼类各自的平均 p -距离, 进一步说明这两条鱼的鉴种有误。许多研究报道过 GenBank 中核苷酸序列所属物种存在鉴定错误^[8,17-18], 因此在使用这些数据时, 应该先与参考序列比对, 或从系统发育分析的角度对其物种鉴定的准确性做出判断。从此研究结果也可以看出, 在实际工作中裂腹鱼类的鱼种鉴定难度较大^[4,5,42]。随着生命条形码数据库(BOLD)和鱼类条形码数据库(FISH-BOL)的不断充实和完善, 鱼类的分子鉴定将具备更多更可靠的参考依据^[13]。

一般来看, 自然界动物种内的线粒体基因差异极少超过 2%, 大多数都低于 1%^[8-9,11]。本研究的 228 个单倍型中, 与各自鱼种参考序列的差异值大于 1.0% 并小于等于 2.0% 的单倍型有 19 个, 涉及 9 种鱼 89 条序列(表 2)。地理隔离和定种的不确定可能会引起较高的种内差异^[8,44], 裂腹鱼类有些鱼种分布的水域较广, 如本研究中定义单倍型最多的横口裂腹鱼, 不仅分布在我国西藏地区, 在阿富汗等地也有分布^[22]; 还有些鱼种的分类也存在较多的争议, 还在不断修正^[45]。Hebert 等^[46]提议, 若样本显示超出种内 CO I 平均遗传距离的 10 倍, 可暂定为新种。所以在使用这一部分数据时, 还应客观分析其与参考序列之间差异较大的原因。

3.3 CO I 基因的系统发育

本研究用 228 个裂腹鱼类的 CO I 基因单倍型

数据构建的邻接树、最大似然树和贝叶斯推断树的拓扑结构几乎完全一致, 种内具有多个单倍型的鱼种, 在其单倍型之间往往夹杂着其他近缘鱼种的单倍型(图 1)。理论上, CO I 基因做为动物物种的分子条形码, 在其系统发育树上, 相同物种的单倍型应聚为一簇, 但不完全谱系分选、杂交和鉴种错误均会导致同一物种与其他物种交错分布^[8-9,11,44]。裂腹鱼类具有显著的近期辐射演化的特征^[2,39-42], 近缘种之间甚至会共享 CO I 单倍型, 也完全可能因为不完全谱系分选造成近缘种在系统树上交错分布。例如同域分布在新疆塔里木河水系的塔里木裂腹鱼(*Schizothorax biddulphi*)和扁吻鱼(*Aspiorhynchus laticeps*), 它们的亲缘关系很近, 综合 CO I 基因序列和形态学特征的研究认为, 这 2 种鱼未达到属级的差别, 扁吻鱼可能为裂腹鱼属内部特化物种^[2, 23, 47]。所以同为塔里木裂腹鱼和扁吻鱼参考序列的 Hap1 与扁吻鱼的第二个单倍型 Hap2 在系统树上的聚类关系(图 1), 极有可能是不完全谱系分选的结果。由于同域分布的近缘裂腹鱼类也可能存在种间杂交^[4], 要进一步解析这些近缘种之间的演化关系, 还需要增大种群水平的样本量, 从形态学和基因组学等角度做更深入的分析^[2,42]。值得注意的是, 在系统树上, 塔里木裂腹鱼的另外 5 个 CO I 单倍型(Hap94~97, Hap207), 与其参考序列位于完全不同的演化支上。研究表明, 不同地理种群的单倍型之间可能会存在遗传分歧, 从而造成它们在系统发育树上分布于不同的演化支, 但硬骨鱼类不同地理种群的 CO I 序列分歧至多达到 0.5%, 较高的遗传分歧则预示着鉴种错误^[8-9,42]。塔里木裂腹鱼 CO I 的 Hap94~97 和 Hap207 与其参考单倍型间的 *p*-距离达到 5.7%~5.9%, 提示这些序列的鱼种鉴定错误。事实上, 本研究中与参考序列差异大于 2% 的 CO I 单倍型, 在系统发育树上普遍与参考序列单倍型位于不同的演化支上, 如定义为 Hap3 的花斑裸鲤 CO I 序列, 与其参考单倍型 Hap17 的 *p*-距离达 4.6%, 在系统发育树上的位置也相隔很远(图 1)。鉴种错误造成同一鱼种的单倍型分布于系统发育树不同演化支上的假象, 严重干扰了对物种系统发育关系的解读。

总体来看, 裂腹鱼类 CO I 基因的单倍型系统发育树可以清晰解析其 3 个演化等级, 原始等级的裂腹鱼聚为一大演化支, 特化和高度特化等级的裂腹鱼聚为另一支, 二者形成并系群; 部分特化等级的裂腹鱼与高度特化等级的裂腹鱼具有最近共同祖先; 原始等级和特化等级裂腹鱼的属级聚类明确, 而高度特化类群的聚类出现了不同属种交错聚类的复杂的情形。这与采用线粒体基因组数据分析得到的裂腹鱼类系统发育关系也一致^[2]。在系统发育树上, 裂腹鱼在演化等级上的错误划分很容易识别, 如 Hap4 明确属于高度特化类群, 而 Hap78 则归入原始类群(图 1), 也进一步证明将 GenBank 登录号为 MH464921.1 和 MH464951.1 的两尾鱼鉴定为裸腹叶须鱼和软刺裸裂尻鱼是错误的。

迪丽娜等^[2]在采用线粒体基因组数据的研究中, 对各演化等级中裂腹鱼的演化地位及成种过程做了较为深入的讨论, 在本研究的系统发育树中, 若忽略与参考序列分歧较高的单倍型的影响, 其鱼种之间的亲缘关系与用线粒体基因组数据分析所得的结果基本一致。所以 CO I 基因序列能够有力解析裂腹鱼类各演化等级之间的亲缘关系, 可用于分类和演化的初步分析, 但在使用 GenBank 中的数据时, 应与参考序列对比, 或从系统发育分析的角度做出判断, 以排除鉴种错误序列的干扰。结合形态学、生态学、线粒体和核基因多样性分析和系统发育关系等进行综合研究, 将有助于更准确地界定裂腹鱼种类, 同时也为深入探讨杂交和成种过程等问题奠定基础^[9,15]。

4 结论

GenBank 数据库中, 裂腹鱼类 CO I 基因序列均为近 5'端至中部的序列, 有个别序列是以互补链形式提交, 比对前应进行互补链转换。在序列数量和长度之间权衡后, GenBank 数据库中的 CO I 基因序列可作为分子标记用于演化生物学的初步分析。裂腹鱼类 CO I 基因的平均差异程度仅相当于鱼类的属级水平, 体现出近期辐射演化的特征。一些裂腹鱼类 CO I 基因序列的鱼种鉴定存在错误, 在使用时应先与参考序列对比, 或从系统

发育分析的角度做出判断。CO I 基因能够有力解析各演化等级裂腹鱼类之间的亲缘关系。结合形态学、生态学、线粒体和核基因的多样性及系统发育关系等进行综合分析，将有助于更准确地界定裂腹鱼种类，同时也为深入探讨杂交和成种过程等问题奠定基础。

参考文献：

- [1] Dai Y G, Xiao H. Review of studies on the germplasm resources of the Schizothoracinae fishes[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(32): 38-46. [代应贵, 肖海. 裂腹鱼类种质多样性研究综述[J]. 中国农学通报, 2011, 27(32): 38-46.]
- [2] Rustam D, Yuan X Q, Zhang Q, et al. Study on the phylogeny of Schizothoracids based on complete mitochondrial genome[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(6): 781-791. [迪丽娜·茹斯坦木, 袁晓倩, 张琪, 等. 基于线粒体基因组数据的裂腹鱼类系统发育研究[J]. 中国水产科学, 2022, 29(6): 781-791]
- [3] Deng T, Wang X M, Wang S Q, et al. Evolution of the Chinese Neogene mammalian faunas and its relationship to uplift of the Tibetan Plateau[J]. Advances in Earth Science, 2015, 30(4): 407-415. [邓涛, 王晓鸣, 王世骐, 等. 中国新近纪哺乳动物群的演化与青藏高原隆升的关系[J]. 地球科学进展, 2015, 30(4): 407-415.]
- [4] Zhou J S, Zhang C, Liu H P, et al. Studies on identification of Schizothoracinae population in Tibet water system by DNA barcode[J]. Freshwater Fisheries, 2019, 49(1): 33-41. [周建设, 张驰, 刘海平, 等. DNA 条形码在西藏水系裂腹鱼亚科鱼类鉴定中的研究[J]. 淡水渔业, 2019, 49(1): 33-41.]
- [5] Chan J L, Jiang H P, Liu Y M, et al. Application of CO I and 16S rRNA gene for identification of Tibetan Plateau Schizothorax species[J]. Journal of Hydroecology, 2015, 36(4): 98-104. [严久林, 姜华鹏, 刘一萌, 等. CO I 和 16S rRNA 基因在高原裂腹鱼物种鉴定中的应用[J]. 水生态学杂志, 2015, 36(4): 98-104.]
- [6] Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. A plea for DNA taxonomy[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2003, 18(2): 70-74.
- [7] Hebert P D N, Cywinski A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [8] 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.
- [9] Ward R D, Hanner R, Hebert P D N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL[J]. Journal of Fish Biology, 2009, 74(2): 329-356.
- [10] Bartlett S E, Davidson W S. FINS (forensically informative nucleotide sequencing): A procedure for identifying the animal origin of biological specimens[J]. BioTechniques, 1992, 13(4): 518.
- [11] Avise J C. Phylogeography. The history and formation of species[M]. Cambridge, MA: Harvard University Press, 2000.
- [12] Waugh J. DNA barcoding in animal species: Progress, potential and pitfalls[J]. BioEssays, 2007, 29(2): 188-197.
- [13] Ratnasingham S, Hebert P D N. Bold: the barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>)[J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7(3), 355-364.
- [14] Coissac E, Hollingsworth P M, Lavergne S, et al. From barcodes to genomes: Extending the concept of DNA barcoding[J]. Molecular Ecology, 2016, 25(7): 1423-1428.
- [15] Hanner R, Desalle R, Ward R D, et al. The Fish Barcode of Life (FISH-BOL) special issue[J]. Mitochondrial DNA, 2011, 22(sup1): 1-2.
- [16] Sayers E W, Bolton E E, Brister J R, et al. Database resources of the national center for biotechnology information[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 50(D1): D20-D26.
- [17] Harris D J. Can you bank on GenBank?[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2003, 18(7): 317-319.
- [18] Mitchell A. DNA barcoding demystified[J]. Australian Journal of Entomology, 2008, 47(3): 169-173.
- [19] Pleijel F, Jondelius U, Norlinder E, et al. Phylogenies without roots? A plea for the use of vouchers in molecular phylogenetic studies[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2008, 48(1): 369-371.
- [20] Ruedas L A, Salazar-Bravo J, Dragoo J W, et al. The importance of being earnest: What, if anything, constitutes a "specimen examined?"[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2000, 17(1): 129-132.
- [21] Mallet J, Willmott K. Taxonomy: renaissance or tower of babel?[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2003, 18(2): 57-59.
- [22] Le P Q, Cheng Y F, Cao W X, et al. Fauna Sinica, Osteichthyes, Cypriniformes (III)[M]. Beijing: Science Press, 2000. [乐佩琦, 陈毅峰, 曹文宣, 等. 中国动物志 硬骨鱼纲 鲤形目(下卷)[M]. 北京: 科学出版社, 2000.]
- [23] Ayelhan H, Guo Y, Meng W, et al. Phylogeny and divergence time estimation of Schizothoracinae fishes in Xinjiang[J]. Hereditas (Beijing), 2014, 36(10): 1013-1020. [海萨·艾力汗, 郭焱, 孟玮, 等. 新疆裂腹鱼类的系统发生关系及物种分化时间[J]. 遗传, 2014, 36(10): 1013-1020.]
- [24] Tong C, Fei T, Zhang C F, et al. Comprehensive transcriptomic analysis of Tibetan Schizothoracinae fish *Gymnocy-*

- pris przewalskii* reveals how it adapts to a high altitude aquatic life[J]. BMC Evolutionary Biology, 2017, 17(1): 74.
- [25] Wang T, Qi D S, Sun S H, et al. DNA barcodes and their characteristic diagnostic sites analysis of Schizothoracinae fishes in Qinghai Province[J]. Mitochondrial DNA Part A, 2019, 30(4): 592-601.
- [26] He D K, Chen Y F. Molecular phylogeny and biogeography of highly-specialized of Schizothoracine fishes[J]. Chinese Science Bulletin, 2007, 52(3): 303-312. [何德奎, 陈毅峰. 高度特化等级裂腹鱼类分子系统发育与生物地理学[J]. 科学通报, 2007, 52(3): 303-312.]
- [27] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [28] Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio J C, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2017, 34(12): 3299-3302.
- [29] 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.
- [30] Minh B Q, Schmidt H A, Chernomor O, et al. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era[J]. Molecular Biology and Evolution, 2020, 37(5): 1530-1534.
- [31] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. Bioinformatics, 2003, 19(12): 1572-1574.
- [32] Bromham L, Duchêne S, Hua X, et al. Bayesian molecular dating: Opening up the black box[J]. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 2018, 93(2): 1165-1191.
- [33] Rambaut A. FigTree v1.4.4, a graphical viewer of phylogenetic trees[CP/OL]. 2018. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- [34] Mount D W. Bioinformatics: sequence and genome analysis[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [35] 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 and Biotechnology, 1994, 3(5): 294-299.
- [36] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [37] Yaakub S M, Bellwood D R, van Herwerden L, et al. Hybridization in coral reef fishes: Introgression and bi-directional gene exchange in *Thalassoma* (Family Labridae)[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2006, 40(1): 84-100.
- [38] Hubert N, Hanner R, Holm E, et al. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes[J]. PLoS ONE, 2008, 3(6): e2490.
- [39] He D K, Chen Y F. Biogeography and molecular phylogeny of the genus *Schizothorax* (Teleostei: Cyprinidae) in China inferred from cytochrome b sequences[J]. Journal of Biogeography, 2006, 33(8): 1448-1460.
- [40] Yang J, Yang J X, Chen X Y. A re-examination of the molecular phylogeny and biogeography of the genus *Schizothorax* (Teleostei: Cyprinidae) through enhanced sampling, with emphasis on the species in the Yunnan-Guizhou Plateau, China[J]. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 2012, 50(3): 184-191.
- [41] Dimmick W W, Edds D R. Evolutionary genetics of the endemic Schizorathicine (Cypriniformes: Cyprinidae) fishes of lake Rara, Nepal[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2002, 30(10): 919-929.
- [42] Chen W T, Ma X H, Shen Y J, et al. The fish diversity in the upper reaches of the Salween River, Nujiang River, revealed by DNA barcoding[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 17437.
- [43] Boore J L. The use of genome-level characters for phylogenetic reconstruction[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2006, 21(8): 439-446.
- [44] Avise J C, Walker D. Species realities and numbers in sexual vertebrates: Perspectives from an asexually transmitted genome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(3): 992-995.
- [45] Chen X Y. Checklist of fishes of Yunnan[J]. Zoological Research, 2013, 34(4): 281-337. [陈小勇. 云南鱼类名录[J]. 动物学研究, 2013, 34(4): 281-337.]
- [46] 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.
- [47] Yang T Y, Zhang R M, Guo Y, et al. Comparative study on partial mitochondrial CO Igene of *Aspiorhynchus laticeps* and *Schizothorax biddulphi*[J]. Journal of Hydroecology, 2011, 32(1): 45-50. [杨天燕, 张人铭, 郭焱, 等. 扁吻鱼和塔里木裂腹鱼线粒体 CO I 基因片段的比较研究[J]. 水生态学杂志, 2011, 32(1): 45-50.]

Validity of the CO I sequences from Schizothoracids in GenBank as a molecular marker

YUAN Xiaoqian¹, RUSTAM Delara¹, ZHANG Qi², HAN Jie^{1,2}

1. College of life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China;

2. Ministry of Education Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering, College of life sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Abstract: The validity of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I (CO I) sequences from Schizothoracids in GenBank as a molecular marker was determined in this study. Multiple sequence alignment, divergence from reference sequence assessment, and phylogenetic reconstruction were employed to evaluate the sequence homology, species diagnosis, and phylogenetic resolution of CO I sequences from Schizothoracids in GenBank. The primary alignment result for 1431 downloaded sequences revealed three sequences with significantly large indels; however, their homologous status was questionable. BLAST search and sequence information in GenBank confirmed that these sequences were Schizothoracid CO I sequences that were submitted as complements. Accordingly, prior to alignment, complement transition of these sequences should be carried out. Complete multiple sequence alignment revealed that all Schizothoracid CO I fragments in the GenBank nucleotide database were from near the 5' end to the middle of this coding gene. To retain more variation information, 35 short sequences were eliminated from the dataset. As a result, 1,396 sequences with 527 bp were analyzed, and 228 CO I haplotypes were defined. Intra-specific sharing haplotypes were common in species with multiple available sequences. However, 41 inter-specific sharing haplotypes were shared by more than one species. The average pairwise *p-distance* within the Schizothoracid CO I haplotypes was 9.5%, which is comparable with the cogeneric species level in fish. The average pairwise *p*-distances within the primitive, specialized, and highly specialized Schizothoracids were even shorter, a character of recent radiation that may reflect a short speciation history mainly driven by the elevation of the Qinghai-Tibet Plateau. Specimen misidentification was found in some Schizothoracid CO I sequences in GenBank, suggesting confirmation steps before use, such as comparison with reference sequences or inference from the phylogenetic reconstruction. Generally, the CO I sequence is a good molecular marker for Schizothoracids identification and primary evolutionary analysis, and the phylogenetic relationships among the three evolutionary grades of Schizothoracids are well resolved using this marker. Integrative analyses, including morphology, ecology, mitochondrial and nuclear DNA diversity, and phylogeny, would aid in taxonomic resolution and further investigation of hybridization and speciation in Schizothoracids.

Key words: Schizothoracids; CO I; molecular marker validity; GenBank

Corresponding author: HAN Jie. E-mail: jiehan@bnu.edu.cn