

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.17153

三峡消落区鱼卵、仔稚鱼种类的鉴定及分布

阮瑞¹, 张燕², 沈子伟², 李燕³, 但言³, 李创举¹, 倪朝辉²

1. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 农业部淡水生物多样性保护重点实验室, 湖北 武汉 430223;
2. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 农业部长江中上游渔业资源环境重点野外科学观测试验站, 湖北 武汉 430223;
3. 重庆市水产科学研究所, 重庆 401121

摘要: 三峡库区水位从每年 3 月的 175 m 逐步降低至 6 月的 145 m, 水位下降时间与库区部分鱼类产卵同步, 对鱼类早期资源造成了严重的影响。本研究以距离大坝 150 km 至 330 km 范围的消落区为研究区域, 通过普查方法收集暴露于水面或残留于浅滩的鱼卵和仔稚鱼, 利用 DNA 条形码技术鉴定其种类, 初步分析其鱼类组成和分布。通过对收集的样本进行 mtCO I 序列比对分析, 可将其分为 14 种序列类型, 其中 10 种类型鉴定到种的水平。鲤(*Cyprinus carpio*)和鲫(*Carassius auratus*)占测序样本比例最大, 分别为 50.0%、24.6%, 且分布范围最广。在研究区域内, 干流上游样品数量和种类均比下游多, 另外, 在支流磨刀溪采集了 733 粒鱼卵和 108 尾仔稚鱼、鉴定到 9 种鱼类, 是本次研究中样品和种类最多的区域, 表明磨刀溪受三峡库区消落影响最严重, 间接暗示了该支流鱼类资源丰富, 应给予重点保护。本研究旨在为全面评估三峡库区消落对鱼类早期资源的影响奠定基础。

关键词: 三峡消落区; DNA 条形码; mtCO I; 鱼卵; 仔稚鱼; 分布特征

中图分类号: S93

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)06-1307-08

长江三峡大坝是开发和治理长江的关键性工程, 具有防洪、发电、旅游等综合经济和社会效益, 但对生态环境带来了巨大的改变和挑战^[1]。三峡大坝按照“冬蓄夏泄”的调度模式蓄水。每年冬季蓄水至高水位, 夏季水位降低, 形成“冬高夏低”的周期性水位变化。与建坝前水位涨落节律相反, 使原来适应长江水位节律变化的生态系统变得十分脆弱或消亡^[2]。

三峡水库消落区由库区消落带和消落缓冲带两部分组成。其中, 消落带是三峡水库蓄水后, 按 175 m-145 m-175 m 水位方案运行时形成的水位涨落区。三峡库区每年汛期 6—9 月底按防洪限制水位 145 m 运行, 10 月初开始蓄水, 库区水位逐步上升至 175 m; 在枯水期, 根据发电、坝下航运等需求, 水位逐步下降至 155 m, 6 月上旬末降至

145 m。根据 2008 年至 2016 年 3 月三峡库区典型断面水位特征分析表明, 三峡库区消落区主要分布在干流的寸滩以下干流河段, 以及乌江武隆以下河段。目前, 已有学者对三峡库区的两岸植被^[3-4]、渔业资源^[5-6]、群落结构^[7]、鱼类时空分布格局^[8]以及蓄水后的鱼类组成和群落结构变化^[9-10]等进行了研究。但是, 缺乏三峡水库消落对消落区鱼类产卵孵化影响的评估。Perera 等^[9]及杨志等^[10]对蓄水后库区鱼类种类组成和群落结构的时空分布研究表明, 靠近大坝的江段鱼类物种多样性与丰度最低, 远离大坝溯河而上至库尾江段, 鱼类种类数逐渐增加。特别是库区中游江段(云阳、万州区域)鱼类丰度相对较高, 其鱼类群落结构受到三峡大坝的影响也较大。因此, 本研究选择的消落区范围是, 从曲尺乡到燕山乡干流及其支流,

收稿日期: 2017-04-28; 修订日期: 2017-06-25.

基金项目: 农业部长江流域渔政管理办公室“三峡水库消落对消落区鱼类产卵孵化的影响调查与损失评估”项目.

作者简介: 阮瑞(1985-), 男, 博士, 从事鱼类分子遗传学研究. E-mail: ruan.rui@163.com

通信作者: 倪朝辉, 研究员, 主要从事渔业资源与环境保护研究. E-mail: nizhaoh@yfi.ac.cn

离大坝 150 km 到 330 km, 采用普查方法沿岸搜集暴露于水面或残留浅水滩的鱼卵和仔稚鱼。

由于鱼卵、仔稚鱼可用于鉴别的形态特征较少, 特别是鱼卵, 水位下降后暴露于空气中, 受精卵干涸变形, 更加不易通过外部形态辨识, 也不能通过孵化出苗来辨别。近年来, 随着鱼类 DNA 条形码技术的发展, 越来越多的国内外学者开始采用 DNA 条形码来解决鱼类(特别是鱼卵、仔稚鱼)种类鉴定和分类^[11-13]。因此, 本研究利用鱼类线粒体细胞色素 C 氧化酶 I 亚基编码基因(mtCO I)序列对三峡消落区鱼卵、仔稚鱼种类进行鉴定及其分布分析, 旨在评估三峡库区消落对消落区鱼类早期资源的影响提供参考。

1 材料与方法

1.1 调查江段、时间与样品保存

调查江段包括从三峡库区干流曲尺乡到燕山乡江段及其支流, 离大坝 150 km 到 330 km 范围

的消落区区域(图 1)。其中干流长度约为 180 km, 支流长度约为 205 km, 总长度为 385 km。调查时间为 2016 年 4 月 10 日至 6 月 10 日。采用普查方法沿岸搜集暴露于水面或残留浅水滩的鱼卵和仔稚鱼, 并在调查时间内进行循环收集样品。对于同一地点同一时间的样品, 根据鱼卵、仔稚鱼以及卵径大小等形态特征初步对其进行分类, 并将具有相同形态特征的样本保存于含有 95%酒精的 15 mL 无菌离心管作为一份样品。如果同一地点某一类别的样本数量超过 30, 则只保存 30 颗鱼卵或 30 尾仔鱼。

1.2 基因组 DNA 抽提

根据每份样品保存的鱼卵和仔稚鱼的个数, 随机抽取一定比例鱼卵和仔稚鱼。一份样品中含有鱼卵或仔稚鱼的个数大于 10 的样品, 随机挑取 3 个; 低于 10 的样品, 随机挑取 2 粒鱼卵或 2 尾仔鱼, 对随机选取的样品采用高盐法分别提取其全基因组 DNA, 以备后续 PCR 扩增与测序。

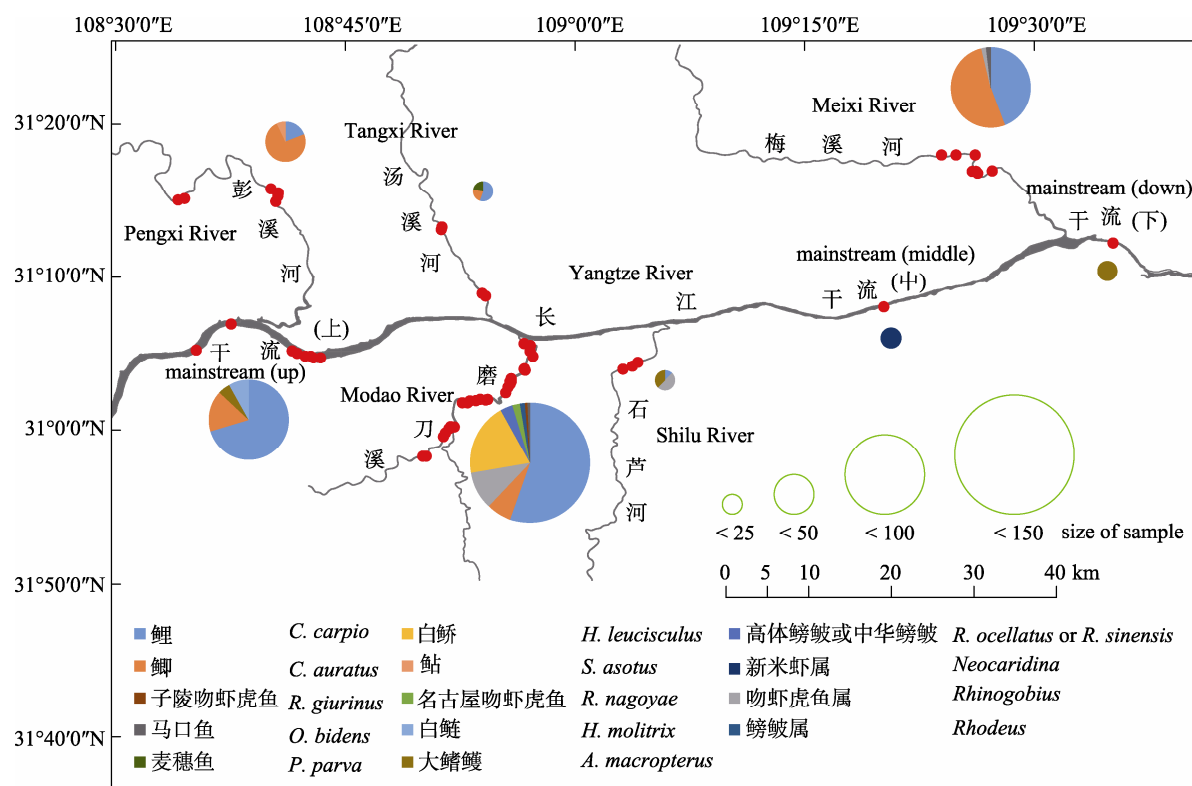


图 1 三峡消落区样品分布示意图

红色圆点表示样品采集位置, 其他彩色圆点大小表示该区域的样品数量, 不同颜色表示鱼的不同种类。

Fig. 1 Sampling distribution map in the water-level fluctuation zone of Three Gorges Reservoir

Red dots indicate sampling location. For other color dots, the size suggests the number of sample, and different colors show different fish species.

1.3 mtCO I 扩增与测序

根据已发表的鱼类 mtCO I 通用引物序列合成引物^[14], 引物信息如下: F: 5'-TCAACCAACC-ACAAAGACATTGGCAC-3'; R: 5'-TAGACTTC-TGGGTGGCCAAAGAATCA-3'。PCR 反应程序: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 56℃ 45 s, 72℃ 45 s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min。PCR 反应体系(25 μL): 2×PCR Master Mix 12.5 μL, 50 ng/μL DNA 0.5 μL, 10 μmol 上下游引物各 0.4 μL, ddH₂O 11.2 μL。PCR 产物大小约为 650 bp, 纯化回收后送上海生工生物工程技术有限公司进行测序。另外, 如果通过 mtCO I 扩增与测序发现该份样品中含有两种或两种以上鱼类, 则增加样本至 5 个。

1.4 数据整理与分析

为了确保所测 DNA 序列的可靠性, 所有测得的 DNA 序列用 BioEdit 软件将序列与测序峰图进行对比, 截取有效片段。通过 ClustalX 2.1 和 SEAVIEW 软件将所获得的 mtCO I 序列进行比对与修整。将经人工校正的 mtCO I 序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 序列类似性搜索, 根据序列相似性以及碱基差异个数确定鱼卵和仔稚鱼的种类。

2 结果与分析

2.1 样品采集与分布

根据样品分布位置, 把采样范围分为 8 个区域, 离三峡大坝由近及远分别为: 干流(下)、梅溪河、干流(中)、石芦河、磨刀溪、汤溪河、干流(上)和彭溪河。根据鱼卵和仔稚鱼采集时间地点及其形态特征, 在 385 km 范围的消落区中, 共收集了 132 份样品, 含有 1735 粒鱼卵和 150 尾仔稚鱼。其中, 在干流(上、中、下)共收集到 24 份样品, 支流收集到 108 份样品(表 1)。支流磨刀溪收集到的样品量最多, 且分布广, 59 份样品中含有 733 粒鱼卵和 108 尾仔稚鱼(图 1, 表 1)。但在干流(下)和干流(中)采样区域都只收集到一份样品, 分别含有 9 尾和 1 尾仔稚鱼, 没有搜集到鱼卵。样品采集地点如图 1 所示。

2.2 mtCO I 序列分析

按照采样方法从每一份样品中随机选取一定

表 1 三峡消落区采集样品数量及种类
Tab. 1 Taxon and abundance of fish eggs and larvae in the water-level fluctuation zone of Three Gorges Reservoir

采样区域 sampling location	样品份数 number of sample	样本数量 number of specimen		测序个数 number of sequence	鉴定种类 identification of species
		卵 egg	苗 larva		
干流(下) main stream (down)	1	0	9	4	1
梅溪河 Meixi River	25	336	3	52	4
干流(中) main stream (middle)	1	0	1	1	1
石芦河 Shilu River	3	0	20	8	3
磨刀溪 Modao River	59	733	108	148	9
汤溪河 Tangxi River	6	113	0	18	3
干流(上) main stream (up)	22	361	9	61	4
彭溪河 Pengxi River	15	192	0	42	3

数量的样本, 共抽提了 334 份基因组 DNA 样本。通过 mtCO I 引物 PCR 扩增、纯化、测序、人工校正、比对和修整, 共获得 334 条 mtCO I 序列, 有效序列长度为 624 bp, 可分为 14 种不同序列类型。

通过 NCBI BLAST 进行序列相似性比对, 以及根据上述种类鉴定的标准, 鉴定结果如表 2 所示。其中, 10 个类型鉴定到种, 分别为鲤(*Cyprinus carpio*)、鲫(*Carassius auratus*)、白鲢(*Hemiculter leucisculus*)、名古屋吻虾虎鱼(*Rhinogobius nago-yae*)、子陵吻虾虎鱼(*Rhinogobius giurinus*)、马口鱼(*Opsariichthys bidens*)、大鳍鲩(*Acheilognathus macropterus*)、麦穗鱼(*Pseudoras boraparva*)、白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)和鲢(*Silurus asotus*); 3 个类型鉴定到属, 分别为吻虾虎鱼属(*Rhinogobius*)、鲮属(*Rhodeus*)和新米虾属(*Neocari-dina*); 1 个类型的序列由于与 GenBank 数据库中中华鲮(*Rhodeus ocellatus*)和高体鲮(*R. sine-nsis*) mtCO I 序列完全一致, 无法区别。此外, 在干流(中)收集到仅有的 1 个样品, 经序列比对分析发现为新米虾属。

鉴定结果表明鲤、鲫不仅分布范围最广，分别在 6 个和 5 个区域中分布，而且占测序样品比例最大分别为 50.0%、24.6%(表 2)。磨刀溪区域鉴定种类类别最多，含有 9 种(表 1、表 2)。

3 讨论

3.1 DNA 条形码技术

DNA 条形码是指一段能够准确、快速鉴定物种的标准 DNA 序列。Hebert 等^[26]提出将 mtCO I 基因 5'端的 648 bp 片段作为动物界 DNA 条形码研究的标准基因。其中基于 mtCO I 基因部分序列的判定标准是分子鉴定物种中最重要的因素。

Ward 等^[24]通过分析澳大利亚 207 种海洋鱼类 mtCO I 基因的 655 bp 片段，发现其种内 mtCO I 基因序列的平均遗传距离为 0.39%，属内为 9.93%，科内为 15.46%；Chen 等^[25]对怒江 5 目、10 科、31 属的 46 种鱼类进行长度为 648 bp mtCO I 基因部分序列分析，表明种内平均遗传距离为 0.41%，属内为 2.14%，科内为 12.47%。以上研究结果表明 Ko 等^[27]利用 mtCO I 基因序列对台湾 100 种不同形态的仔稚鱼进行种类鉴定研究中，采用 mtCO I 序列相似度大于 99%为同一种鱼类，相似度在 92%~99%为同属不同种鱼类，相似度在 85%~92%为同一科鱼类的准则是合理的。

表 2 鱼卵和仔稚鱼 mtCO I 序列比对结果
Tab. 2 Alignment results of fish eggs and larvae mtCO I sequences

鉴定类型 species	鉴定样本数量 number of specimen	分布区域 distribution area	序列比对长度/bp length of sequence alignment	相似度/% similarity	GenBank
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	167	②④⑤⑥⑦⑧	624	99~100	AP017365.1 ^[17] KM492734.1* KR861880.1*
鲫 <i>Carassius auratus</i>	82	②⑤⑥⑦⑧	624	99~100	KM261767.1* KR861803.1* GU086396.1*
吻鰕虎鱼属 <i>Rhinogobius</i>	20	②④⑤	624	95	KX898434.1* KT357638.1* KP694000.1*
白鲃 <i>Hemiculter leucisculus</i>	29	⑤	624	99~100	KR862013.1* HQ536384.1* KF956522.1*
高体鲃或中华鲃 <i>Rhodeus ocellatus</i> or <i>Rhodeus sinensis</i>	5	⑤	624	99~100	KM610905.1 ^[15] KF533721.1 ^[18] KM610891.1 ^[15]
名古屋吻鰕虎鱼 <i>Rhinogobius nagoyae</i>	3	⑤	624	99	AB988770.1 ^[19]
鲃属 <i>Rhodeus</i>	2	⑤	624	93	KM610896.1 ^[15]
子陵吻鰕虎鱼 <i>Rhinogobius giurinus</i>	1	⑤	624	100	KF371534.1 ^[20] KP892753.1* KM610876.1 ^[15]
马口鱼 <i>Opsariichthys bidens</i>	2	②⑤	624	99	DQ367044.1 ^[21] KR862054.1*
大鳍鲃 <i>Acheilognathus macropterus</i>	10	①④⑦	624	99~100	EF483935.1 ^[22] KJ499466.1 ^[23] KR861749.1*
麦穗鱼 <i>Pseudoras boraparva</i>	4	⑥	624	99~100	JQ979166.1 ^[24] KM610815.1 ^[15]
白鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	5	⑦	624	100	KR862050.1* EU315941.1*
鲢 <i>Silurus asotus</i>	3	⑧	624	99~100	KP112439.1* JN116720.1 ^[25]

注：①代表干流(下)；②代表梅溪河；③代表干流(中)；④代表石芦河；⑤代表磨刀溪；⑥汤溪河；⑦代表干流(上)；⑧代表彭溪河。“*”表示数据已上传 GenBank，但未发表。
Note: ① means mainstream (down); ② means Meixi River; ③ means mainstream(middle); ④ means Shilu River; ⑤ means Modao River; ⑥ means Tangxi River; ⑦ means mainstream (up); ⑧ means Pengxi River. “*” means mtCO I sequence has been deposited in GenBank, but unpublished.

本研究采用 Ko 等^[27]的标准对三峡消落区的样本进行种类鉴定。鉴定结果如表 2 所示, 10 个类型鉴定到种, 3 个类型鉴定到属。本研究中鉴定到种的 mtCO I 基因序列与数据库中的序列相似性都超过了 99%, 并且只与一个物种匹配; 另外, 3 个类型鉴定到属的相似性分别为 93%、95%和 96%。除了 1 个类型与高体鳊和中华鳊的序列完全一致, 无法区分到种, 其他鉴定结果都能够准确区分物种类型。DNA 条形码在种内和种间遗传距离的差异是准确鉴别物种的关键基础。只有种间最小遗传距离大于相应的种内最大遗传距离, 才能够被有效区分和鉴别。因此, 结合传统形态分类学, 验证三峡库区或长江上游鱼类 mtDNA 条形码的有效性, 并建立完整的、准确的 mtCO I 基因序列条形码数据库; 针对 mtCO I 基因序列无法区分的种类开发了新的分子标记, 可为三峡消落区和长江上游鱼卵和仔稚鱼种类的快速、准确鉴定提供可靠依据。

3.2 三峡消落区早期鱼类资源分布特征

2015 年三峡库区鱼类资源调查结果表明(倪朝辉等, 未发表资料), 库区产黏(沉)性卵鱼类有 50 余种。根据产卵特性, 可将筑巢介质分为植物性介质(水草、树枝等)、砂砾石介质、空隙固体类介质以及动物性介质, 部分鱼类可以同时利用多种介质。三峡库区水位消落将导致这些黏附于介质上的卵暴露于水面, 导致孵化失败, 或仔稚鱼残留于浅水滩中, 最终干涸致死。而库区绝大部分产黏(沉)性卵鱼类的产卵时间集中在每年 4 到 6 月份。根据长江水文监测显示, 2015 年 2 月中旬库区水位开始明显降落, 至 6 月中下旬降至三峡坝前 145 m 的防洪水位, 8 月中下旬水库水位开始抬升, 至 10 月中下旬三峡坝前水位抬升至 174 m 以上。整个水库消落时段主要是 2 月中旬至 6 月中下旬。其中主降期是 4 月下旬至 6 月中下旬, 为期 2 个月。其主消落期也是大部分产黏(沉)性卵鱼类的排卵期。因此, 为评估三峡库区消落对消落区鱼类早期资源的影响, 本研究在 2016 年 4 月中旬至 6 月中旬, 既是三峡库区主消落期, 又是库区大部分产黏(沉)性卵鱼类集中产卵季节, 对离三峡大坝 150 km 到 330 km 干流及其附属 5

条支流进行普查采集鱼卵和仔稚鱼, 并通过 mtCO I 基因部分序列鉴定其种类。

样品收集结果表明, 在干流区域总体上采到的样品较少, 共计 24 份, 主要集中在干流(上), 而干流(中)和干流(下)仅各采集到一份样品。这种现象可能与干流两岸地貌特征相关, 因为干流多石壁、泥岸, 有水草的岸边较少^[28], 并且样品被采集地多为库汉, 干流(上)的库汉数量比干流(中)和干流(下)多。另外, 也可能与渔业资源相关, 因为研究表明云阳区域鱼类资源相比下游丰富^[9-10], 所以干流(上)区域受到消落的影响也相应严重, 收集到的样品比另外两个干流区域的多。

本研究中, 在干流(上)采集到的样品数量和鱼类种类都比干流(中)和干流(下)多, 暗示了三峡库区干流上游鱼类资源相比下游丰富。该结果与杨志等^[10]与 Perera 等^[9]对三峡库区鱼类分布格局研究结果一致。另外, 磨刀溪区域收集到的样本和鉴定到的鱼类种类不仅在 5 个支流中最多, 而且也是本次普查中最多的区域。表明磨刀溪在本次普查区域中受到的三峡库区消落影响最大, 但也间接反映了其鱼类资源相对丰富, 应在今后加强鱼类资源调查和保护研究。可通过设置漂浮性人工鱼巢来减轻三峡库区消落对其鱼类早期资源的影响。

参考文献:

- [1] Shen G Z, Xie Z Q. Three Gorges project: chance and challenge[J]. Science, 2004, 304(5671): 681.
- [2] New T, Xie Z Q. Impacts of large dams on riparian vegetation: applying global experience to the case of China's Three Gorges Dam[J]. Biodiv Conserv, 2008, 17(13): 3149-3163.
- [3] Bai B W, Wang H Y, Li X Y, et al. A comparative study of the plant community of the future water-level-fluctuating zone and the natural water-level-fluctuating zone in the Three Gorges Reservoir[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2005, 27(5): 684-679. [白宝伟, 王海洋, 李先源, 等. 三峡库区淹没区与自然消落区现存植被的比较[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2005, 27(5): 684-687.]
- [4] Shen J H, Zeng B, Lei S T, et al. Seed submergence tolerance of four annual species growing in the water-level-fluctuation zone of Three Gorges Reservoir, China, and effects of long-term submergence on their seed germination[J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2011, 35(3): 237-246. [申建

- 红, 曾波, 类淑桐, 等. 三峡水库消落区 4 种一年生植物种子的水淹耐受性及水淹对其种子萌发的影响[J]. 植物生态学报, 2011, 35(3): 237–246.]
- [5] Liu S P, Duan X B, Chen D Q, et al. Studies on status of fishery resources in the middle reach of the Yangtze River[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(6): 708–711. [刘绍平, 段辛斌, 陈大庆, 等. 长江中游渔业资源现状研究[J]. 水生生物学报, 2005, 29(6): 708–711.]
- [6] Wu Q, Duan X B, Xu S Y, et al. Studies on fishery resources in the Three Gorges Reservoir of the Yangtze River[J]. *Freshwater Fisheries*, 2007, 37(2): 70–75. [吴强, 段辛斌, 徐树英, 等. 长江三峡库区蓄水后鱼类资源现状[J]. 淡水渔业, 2007, 37(2): 70–75.]
- [7] Yang S R, Gao X, Li M Z, et al. Interannual variations of the fish assemblage in the transitional zone of the Three Gorges Reservoir: persistence and stability[J]. *Envir Biol Fish*, 2012, 93(2): 295–304.
- [8] Wang K, Li C, Duan X B, et al. Study on the fish distribution characteristic of the Three Gorges Reservoir before 175 m[J]. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(3): 23–27. [王珂, 李翀, 段辛斌, 等. 三峡水库 175 m 蓄水前鱼类分布特征研究[J]. 淡水渔业, 2012, 42(3): 23–27.]
- [9] Perera H, Li Z J, Silva S, et al. Effect of the distance from the dam on river fish community structure and compositional trends, with reference to the Three Gorges Dam, Yangtze River, China[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(3): 438–445. [Perera H, 李钟杰, Silva S, 等. 三峡水库不同区域对鱼类群落结构和鱼类组成动态的影响[J]. 水生生物学报, 2014(3): 438–445.]
- [10] Yang Z, Tang H Y, Zhu D, et al. Spatiotemporal patterns of fish community structures in the Three Gorges Reservoir and its upstream during the 175-m-deep impoundment[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(15): 5064–5075. [杨志, 唐会元, 朱迪, 等. 三峡水库 175 m 试验性蓄水期库区及其上游江段鱼类群落结构时空分布格局[J]. 生态学报, 2015, 35(15): 5064–5075.]
- [11] Perez J, Álvarez P, Martinez J L, et al. Genetic identification of hake and megrim eggs in formaldehyde-fixed plankton samples[J]. *Ices J Mar Sci*, 2005, 62(5): 908–914.
- [12] Pegg G G, Sinclair B, Briskey L, et al. MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia[J]. *Sci Mar*, 2006, 70(S2): 7–12.
- [13] Zhou M Y, Chen X, Yang S Y. Identification of several fish eggs and larvae by DNA barcoding in Xiamen Water[J]. *Marine Environmental Science*, 2015, 34(1): 120–125. [周美玉, 陈骁, 杨圣云. 采用 DNA 条形码技术对厦门海域鱼卵、仔稚鱼种类的鉴定[J]. 海洋环境科学, 2015, 34(1): 120–125.]
- [14] Mabuchi K. Complete mitochondrial genomes of five introduced strains of common carp (*Cyprinus carpio*) in Japan with 29 diagnostic SNPs distinguishable by restriction enzyme analysis[J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2016, 1(1): 261–263.
- [15] Yang X F, Ma Z H, Xie L P, et al. Complete mitochondrial genome of the Chinese bitterling *Rhodeus sinensis* (Cypriniformes: Cyprinidae)[J]. *Mitochondrial DNA*, 2015, 26(4): 647–648.
- [16] Yamasaki Y Y, Nishida M, Suzuki T, et al. Phylogeny, hybridization, and life history evolution of *Rhinogobius gobies* in Japan, inferred from multiple nuclear gene sequences[J]. *Molec Phylogen Evol*, 2015, 90: 20–33.
- [17] Xie L P, Yang X F, Ma Z H, et al. Complete mitochondrial genome of *Rhinogobius giurinus* (Perciformes: Gobiidae: Gobionellinae)[J]. *Mitochondrial DNA*, 2015, 26(2): 321–322.
- [18] Wang X Z, Wang J, He S P, et al. The complete mitochondrial genome of the Chinese hook snout carp *Opsariichthys bidens* (Actinopterygii: Cypriniformes) and an alternative pattern of mitogenomic evolution in vertebrate[J]. *Gene*, 2007, 399(1): 11–19.
- [19] Hwang D S, Lee W O, Lee J S. Complete mitochondrial genome of the freshwater fish, *Acanthorhodeus macropterus* (Cypriniformes, Cyprinidae)[J]. *Mitochondrial DNA*, 2014, 25(1): 11–12.
- [20] Zhu X P, Ma Z H, Yang X F, et al. Complete mitochondrial genome of the Chinese bitterling *Acheilognathus macrop-terus* (Cypriniformes: cyprinidae)[J]. *Mitochondrial DNA*, 2016, 27(1): 589.
- [21] Hättenschwiler S, Jørgensen H B. Two new species of the land-locked freshwater shrimps genus, *Neocaridina kubo*, 1938 (Decapoda: Caridea: Atyidae), from Taiwan, with notes on speciation on the island[J]. *Zoolog Stud*, 2007, 46(6): 680–694.
- [22] Keskin E, Ağdamar S, Tarkan A S. DNA barcoding common non-native freshwater fish species in Turkey: low genetic diversity but high population structuring[J]. *Mitochondrial DNA*, 2013, 24(3): 276–287.
- [23] Zeng Q, Wang Z J, Peng Z G. Mitochondrial genome of *Silurus asotus* (Teleostei: Siluriformes)[J]. *Mitochondrial DNA*, 2011, 22(5–6): 162–164.
- [24] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. *Phil T R Soc B*, 2005, 360(1462): 1847–1857.
- [25] 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]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17437.
- [26] Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *P Roy Soc B Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313–321.
- [27] Ko H L, Wang Y T, Chiu T S, et al. Evaluating the accuracy of morphological identification of larval fishes by applying DNA barcoding[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(1): e53451.
- [28] Bao Y H, Gao P, He X B. The water-level fluctuation zone of Three Gorges Reservoirs unique geomorphological unit[J]. *Earth-Sci Rev*, 2015, 150: 14–24.

Identification and distribution of fish eggs and larvae in the water-level fluctuation zone of Three Gorges Reservoir

RUAN Rui¹, ZHANG Yan², SHEN Ziwei², LI Yan³, DAN Yan³, LI Chuangju¹, NI Zhaohui²

1. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture of China; Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Wuhan 430223, China;
2. Fishery Resources and Environmental Science Experimental Station of The Upper-Middle Reaches of Yangtze River, Ministry of Agriculture of China; Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;
3. Chongqing Fishery Science Institute, Chongqing 401121, China

Abstract: Three Gorges Dam is a vital project in the development and harnessing of the Yangtze River. Water-level fluctuation zone of Three Gorges Reservoir, which refers to the area along the Three Gorges Reservoir banks bounded by minimum (145 m) and maximum (175 m) water levels of the Three Gorges Reservoir, has provoked a series of ecological problems, which included soil erosion, reduction in ecosystem types, decrease in biodiversity and so on. However, effect of water level fluctuating on fish of early life history stages in the water-level fluctuation zone was not yet reported. In this study, the research area was between 150 km and 330 km from Three Gorges Dam, where fish eggs and larvae, exposed to water or remained in shallows, were collected. Based on distribution of sampling places, the research area was divided into 8 regions, which were mainstream (down), Meixi River, mainstream (middle), Shilu River, Modaoxi River, Tangxi River, mainstream (up), and Pengxi River. According to sampling time and place, and morphological characters of fish eggs and larvae, 132 samples were preserved, including 1735 fish eggs and 150 larvae. Twenty-four samples were collected in mainstream. But only one sample in respective mainstream (middle) and mainstream (down) included respective one and nine larvae, in which no fish egg was found. In Modaoxi River, a tributary of Three Gorges Reservoir, there were the most samples in this study, and 59 samples were collected including 733 fish eggs and 108 larvae. Due to insufficient morphological diagnostic characters in kraurotic fish eggs and larvae, it is easy to misidentify in the genus or species level. So, this study was employed DNA barcoding technology to identify the samples. DNA barcoding technology could be used as a rapid tool to distinguish morphologically similar species, and survey many uncertain species and species composition. Previous researches have shown that only molecular identification could guarantee identification of fish eggs and larvae to the species level. Through mtCO I sequence alignment, and based on mtCO I sequences similarity values (species: >99%, genus: 92%–99%, family: 85%–92%), the samples were distinguished to 14 types, of which 10 types were identified to species: *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus*, *Hemiculter leuciscus*, *Rhinogobius nagoyae*, *Rhinogobius giurinus*, *Opsariichthys bidens*, *Acheilognathus macropterus*, *Pseudorasbora parva*, *Hypophthalmichthys molitrix*, and *Silurus asotus*; three types were identified to genus: *Rhinogobius*, *Rhodeus*, and *Neocaridina*; and one type mtCOI sequence was the same with *Rhodeus cellatus* and *Rhodeus sinensis*. If fish DNA barcode database of Yangtze River or Three Gorges Reservoir could be completely and accurately constructed, and new molecular markers could be developed for fishes that can be not distinguished by mtCO I barcode, it would help to further identify fish eggs and larvae in the water-level fluctuation zone and in-

investigate fish resources of the Yangtze River. *Cyprinus carpio* and *Carassius auratus* had the largest proportion in the samples, 50.0% and 24.6% respectively, and widely distributed. The number and species of samples in upstream of mainstream was more than downstream in the research area. It may be not only related to its topography, and also its fish resources. In Modaoxi River, the number and species of samples was the most in this research area, which contained nine fish species. The result showed that it was more affected from the water level fluctuating, at the same time, it also indicated that fish resource were rich in Modaoxi River, which should be got more attention in the future fish resources investigation and protection in Three Gorges Reservoir. This study employed DNA barcoding technology to identify fish eggs and larvae collected in partial water-level fluctuation zone, which would contribute to comprehensively assessing the effect of water level fluctuating on fish resources in water-level fluctuation zone of Three Gorges Reservoir.

Key words: water-level fluctuation zone of Three Gorges Reservoir; DNA barcoding; mtCO I; fish eggs; fish larvae; distribution characteristics

Corresponding author: NI Zhaohui. E-mail: nizhaoh@yfi.ac.cn