

DOI: 10.11964/jfc.20220613521

沙鳅科鱼类的起源演化

徐荣荣¹, 刘世英¹, 王永明^{1,2}, 李燕平², 谢碧文², 彭作刚^{1*}

1. 西南大学生命科学学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715; 2. 内江师范学院生命科学学院, 长江上游鱼类资源保护与利用四川省重点实验室, 四川内江 641100

摘要:

【目的】厘清沙鳅科鱼类的系统发育关系和起源演化。

【方法】本实验通过 PCR 扩增和公共数据库搜集, 共获得 240 条序列, 涵盖了 8 属 20 种沙鳅科鱼类, 采用 2 个线粒体基因 (*CO I*、*Cytb*) 和 3 个核基因 (*IRBP*、*RAG1* 和 *RH*) 联合的方法, 进行了系统发育树重建、分化时间和生物地理学分析。

【结果】基于不同数据集构建的最大似然树 (Maximum Likelihood, ML) 和贝叶斯树 (Bayesian Inference, BI) 的拓扑结构一致, 沙鳅科及各属均为单系类群, 沙鳅科分为沙鳅亚科和薄鳅亚科 2 大支, 其中, 沙鳅亚科包括华鳅属、安巴鳅属、安彦鳅属、缨须鳅属、沙鳅属和色鳅属, 薄鳅亚科包括副沙鳅属和薄鳅属, 且基于不同数据集构建的 ML 和 BI 树均有较高的支持度。

【结论】沙鳅科鱼类在渐新世 [约 28.85 百万年前] 起源于东南亚地区, 中新世 (约 24.15 百万年前) 各属开始分化, 中新世和上新世 (约 17.17 百万年—3.79 百万年前) 属内种的分化明显; 随着喜马拉雅山脉的运动, 沙鳅科鱼类从东南亚地区向西和向北扩散和演化。其中, 沙鳅属向西进入南亚地区, 薄鳅属、副沙鳅属和华鳅属向北进入我国长江、珠江流域, 这说明沙鳅科鱼类的物种分化和喜马拉雅山脉的运动有着密切的关系。本研究为进一步研究鳅超科鱼类起源演化提供参考资料。

关键词: 沙鳅科; 多基因联合; 系统发育; 分子钟; 生物地理学

沙鳅科 (Botiidae) 隶属于辐鳍鱼纲 (Actinopteri) 鲤形目 (Cypriniformes)。沙鳅科是一类美丽的中小型鱼类, 栖息于水体的中下层, 广泛分布于东南亚、东亚和南亚地区, 在我国长江以南、泰国、缅甸、老挝及印度北部的多样性最为丰富^[1-2]。随着越来越多新种的发现, 迄今为止, Fishbase (www.fishbase.org) 描述的沙鳅科鱼类共有 8 属, 62 种^[3]。

线粒体基因组具有结构简单、拷贝数高、易扩增、进化速率快等特点, 是广泛使用的分子标记之一, 对分子系统学、分子群体遗传学、保护生物学等的研究具有重要意义^[4-6]。核基因遗传信息丰富, 可选基

第一作者: 徐荣荣, 从事鱼类系统演化研究, E-mail: xrr15670508120@163.com



通信作者: 彭作刚, 从事鱼类多样性与演化研究, E-mail: pzg@swu.edu.cn



资助项目: 国家自然科学基金 (32170457); 内江师范学院创新团队项目 (2021TD03)

收稿日期: 2022-06-02

修回日期: 2022-11-21

文章编号:

1000-0615(2025)02-029116-15

中图分类号: P 935; S 917.4

文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)

Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)



因种类繁多, 且决定了生物的大多数性状, 也是用于解析物种间系统发育关系的重要分子标记物之一^[7-8]。线粒体与核基因序列联合分析可有效解决某些物种间仅基于线粒体或核基因得到的拓扑关系不一致的问题, 且得到的结果可信度更高^[9-11]。

国内外学者最开始利用形态学特征对沙鳅科鱼类进行简单的分类, 沙鳅科鱼类的系统发育关系并不明确, 部分属的有效性存在一定的争议。Fang^[12]根据眼下刺、须和凶门等特征对我国的 13 种沙鳅鱼类进行了系统分类, 将沙鳅科分为沙鳅属 (*Botia*) 和薄鳅属 (*Leptobotia*)。陈景星^[2]通过对我国的 22 个种和 2 个亚种的形态特征进行描述, 恢复副沙鳅属 (*Parabotia*) 作为一个有效属, 认为我国的沙鳅科由沙鳅属、副沙鳅属和薄鳅属组成。Nalbant^[13]将沙鳅科分为 2 个族 (tribe): *Leptobotiini* 和 *Botiini*, 并将华鳅亚属提升为华鳅属 (*Sinibotia*)。Kottelat^[14]首次建立安彦鳅属 (*Yasuhikotakia*), 并将 *Hymenpphysa* 更名为纓须鳅属 (*Syncrossus*)。随后, 越来越多的沙鳅科物种被重新定义, 且沙鳅科物种间的系统发育关系也被广泛研究, 如 Sember 等^[15]基于线粒体基因 *Cytb* 和核基因 *RAG1*、*IRBP* 对沙鳅科鱼类进行了系统发育关系的重建, 认为沙鳅科鱼类分为两支: 沙鳅亚科 (*Botiinae*) 和薄鳅亚科 (*Leptobotiinae*), 沙鳅亚科中的华鳅属和安彦鳅属互为姐妹类群, 沙鳅属和色鳅属 (*Chromobotia*) 互为姐妹类群, 薄鳅亚科中的薄鳅属和副沙鳅属互为姐妹类群, 且各属均为单系类群。但是, Šlechtová 等^[16]利用线粒体 *Cytb* 和 12S RNA 重建沙鳅科鱼类的系统发育树, 认为安彦鳅属并非单系类群。结合形态学和分子系统学的工作, 沙鳅科鱼类部分属的有效性, 属的单系性及属间的系统发育关系仍没有得到明确解决。另外, 陈景星等^[1]曾根据形态特征推测鳅科鱼类起源于大巽他群岛、泰国和缅甸, 随后向北和向西扩散和演化, 但并未有分子生物学方面的证据。

因此, 本实验对 8 种沙鳅科鱼类进行 Sanger 测序, 并下载了 12 种沙鳅科鱼类在 NCBI 上公布的基因序列, 利用线粒体基因 (*CO I*、*Cytb*) 和核基因 (*IRBP*、*RAG1*、*RH*) 序列进行综合分析。采用最大似然法 (Maximum Likelihood method, ML) 和贝叶斯推断法 (Bayesian Inference, BI) 构

建相应的 ML 和 BI 系统发育树, 进而探讨沙鳅科鱼类的系统发育关系, 同时对沙鳅科鱼类的分化时间和生物地理学进行初步研究, 为该类群的演化过程提供分子基础。

1 材料与方法

1.1 样本采集

本研究涉及了沙鳅科鱼类的 8 属 20 种, 共 51 个个体, 其中, 从 GenBank 下载了 12 个物种的基因序列 (至少包含 4 个本研究所用基因)。鱼类标本的采集及分类工作参照《广西淡水鱼类志》^[17]《珠江鱼类志》^[18]和《中国淡水鱼类原色图集》^[19-20](表 1)。根据伍献文等^[21]和 Siebert^[22]对鲤形目鱼类系统发育关系的描述, 实验选择了 12 种花鳅科 (*Cobitidae*) 鱼类作为外类群。采集鱼类样本中的肌肉或鳍条, 放置于装有 95% 乙醇的 5 mL 冻存管中, 并存放于 -20°C 冰箱内, 所有的标本保存于西南大学淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室标本室。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增和测序

本研究多数样本采用高盐浓度抽提法^[23]提取基因组 DNA。当样本量较少或高盐浓度抽提法结果不是很好时, 采用 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, 德国) 试剂盒提取基因组 DNA, 试剂盒的使用步骤参照使用说明书。提取的 DNA 置于 -20°C 冰箱保存备用。

进行 PCR 扩增时, 线粒体基因标记和核基因标记所需要的引物信息见表 2。PCR 反应总体积为 25 μL : 2.5 μL $10\times$ buffer, 1.5 μL MgCl_2 (50 mmol/L), 2.0 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 0.2 μL *rTaq* DNA 聚合酶 [10 U, 宝生物工程 (大连) 有限公司], 正反向引物各 1.0 μL , 2.0~4.0 μL 的 DNA 模板 (100 ng/ μL), 加双蒸水至 25 μL 。不同基因进行 PCR 扩增时的退火温度和延伸时间会有所不同, 具体反应程序和温度设置见表 3。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 选取目标条带单一、明亮的 PCR 产物送至华大基因纯化后进行双向测序。

1.3 数据分析

序列拼接和比对 测序返回的双向序列用 ContigExpress (Vector NTI Advance) 软件进行

表 1 本研究涉及的沙鳅科鱼类样本及分子标记测序情况

Tab. 1 Specimens of Botiidae used in the present study and the sequencing of five molecular markers

种 species	采集地 locality	编号 label	分子标记测序情况 molecular marker sequencing status					
			CO I	Cytb	IRBP	RAG1	RH	
美丽华鳅 <i>S. pulchra</i>	广西柳州	Liuzhou, Guangxi	SP-LZ01	MH027658	MH027697	MH027730	MH027768	MH027806
美丽华鳅 <i>S. pulchra</i>	广西柳州	Liuzhou, Guangxi	SP-LZ02	MH027659	MH027698	MH027731	MH027769	MH027807
美丽华鳅 <i>S. pulchra</i>	广西柳州	Liuzhou, Guangxi	SP-LZ03	MH027660	MH027699	MH027732	MH027770	MH027808
美丽华鳅 <i>S. pulchra</i>	广西柳州	Liuzhou, Guangxi	SP-LZ04	MH027661	MH027700	—	MH027771	MH027809
美丽华鳅 <i>S. pulchra</i>	广西柳州	Liuzhou, Guangxi	SP-LZ05	MH027662	MH027701	MH027733	MH027772	MH027810
宽体华鳅 <i>S. reevesae</i>	四川资中	Zizhong, Sichuan	SR-ZZ01	MH027673	MH027712	MH027744	MH027782	MH027821
宽体华鳅 <i>S. reevesae</i>	四川资中	Zizhong, Sichuan	SR-ZZ02	MH027674	MH027713	MH027745	MH027783	MH027822
宽体华鳅 <i>S. reevesae</i>	四川资中	Zizhong, Sichuan	SR-ZZ03	MH027675	MH027714	MH027746	MH027784	MH027823
宽体华鳅 <i>S. reevesae</i>	四川资中	Zizhong, Sichuan	SR-ZZ04	MH027676	MH027715	MH027747	MH027785	MH027824
宽体华鳅 <i>S. reevesae</i>	四川资中	Zizhong, Sichuan	SR-ZZ05	MH027677	MH027716	MH027748	MH027786	MH027825
宽体华鳅 <i>S. reevesae</i>	重庆武隆	Wulong, Chongqing	SR-WL01	MH027671	MH027710	MH027742	MH027780	MH027819
宽体华鳅 <i>S. reevesae</i>	重庆武隆	Wulong, Chongqing	SR-WL02	MH027672	MH027711	MH027743	MH027781	MH027820
壮体华鳅 <i>S. robusta</i>	广西柳州	Liuzhou, Guangxi	SRo-LZ01	MH027663	MH027702	MH027734	MH027773	MH027811
壮体华鳅 <i>S. robusta</i>	广西柳州	Liuzhou, Guangxi	SRo-LZ02	MH027664	MH027703	MH027735	MH027774	MH027812
壮体华鳅 <i>S. robusta</i>	广西柳州	Liuzhou, Guangxi	SRo-LZ03	MH027665	MH027704	MH027736	MH027775	MH027813
壮体华鳅 <i>S. robusta</i>	广西柳州	Liuzhou, Guangxi	SRo-LZ04	MH027666	MH027705	MH027737	MH027776	MH027814
壮体华鳅 <i>S. robusta</i>	广西运江	Yunjiang, Guangxi	SRo-YJ01	MH027667	MH027706	MH027738	MH027777	MH027815
壮体华鳅 <i>S. robusta</i>	广西运江	Yunjiang, Guangxi	SRo-YJ02	MH027668	MH027707	MH027739	MH027778	MH027816
壮体华鳅 <i>S. robusta</i>	广西运江	Yunjiang, Guangxi	SRo-YJ03	MH027669	MH027708	MH027740	—	MH027817
壮体华鳅 <i>S. robusta</i>	广西运江	Yunjiang, Guangxi	SRo-YJ04	MH027670	MH027709	MH027741	MH027779	MH027818
中华华鳅 <i>S. superciliaris</i>	四川资中	Zizhong, Sichuan	SS-ZZ01	MH027678	MH027717	MH027749	MH027787	MH027826
中华华鳅 <i>S. superciliaris</i>	四川资中	Zizhong, Sichuan	SS-ZZ02	MH027679	MH027718	MH027750	MH027788	MH027827
中华华鳅 <i>S. superciliaris</i>	四川资中	Zizhong, Sichuan	SS-ZZ03	MH027680	MH027719	MH027751	MH027789	MH027828
中华华鳅 <i>S. superciliaris</i>	四川资中	Zizhong, Sichuan	SS-ZZ04	MH027681	MH027720	MH027752	MH027790	MH027829
中华华鳅 <i>S. superciliaris</i>	四川资中	Zizhong, Sichuan	SS-ZZ05	MH027682	MH027721	MH027753	MH027791	MH027830
斑纹华鳅 <i>S. zebra</i>	广西柳州	Liuzhou, Guangxi	SZ-LZ01	MH027687	MH027726	MH027758	MH027796	MH027835
斑纹华鳅 <i>S. zebra</i>	广西柳州	Liuzhou, Guangxi	SZ-LZ02	MH027688	MH027727	MH027759	MH027797	MH027836
斑纹华鳅 <i>S. zebra</i>	广西柳州	Liuzhou, Guangxi	SZ-LZ03	MH027689	MH027728	MH027760	MH027798	MH027837
斑纹华鳅 <i>S. zebra</i>	广西柳州	Liuzhou, Guangxi	SZ-LZ04	MH027690	MH027729	MH027761	MH027799	MH027838
斑纹华鳅 <i>S. zebra</i>	广西荔浦	Lipu, Guangxi	SZ-LP01	MH027683	MH027722	MH027754	MH027792	MH027831
斑纹华鳅 <i>S. zebra</i>	广西荔浦	Lipu, Guangxi	SZ-LP02	MH027684	MH027723	MH027755	MH027793	MH027832
斑纹华鳅 <i>S. zebra</i>	广西荔浦	Lipu, Guangxi	SZ-LP03	MH027685	MH027724	MH027756	MH027794	MH027833
斑纹华鳅 <i>S. zebra</i>	广西荔浦	Lipu, Guangxi	SZ-LP04	MH027686	MH027725	MH027757	MH027795	MH027834
小眼薄鳅 <i>L. microphthalrna</i>	四川犍为	Qianwei, Sichuan		MH027652	MH027691	—	MH027762	MH027800
小眼薄鳅 <i>L. microphthalrna</i>	四川犍为	Qianwei, Sichuan		MH027653	MH027692	—	MH027763	MH027801
双斑副沙鳅 <i>P. bimaculata</i>	重庆珞璜	Luohuang, Chongqing		MH027654	MH027693	—	MH027764	MH027802
双斑副沙鳅 <i>P. bimaculata</i>	重庆珞璜	Luohuang, Chongqing		MH027655	MH027694	—	MH027765	MH027803
花斑副沙鳅 <i>P. fasciatus</i>	重庆珞璜	Luohuang, Chongqing		MH027656	MH027695	—	MH027766	MH027804
花斑副沙鳅 <i>P. fasciatus</i>	重庆珞璜	Luohuang, Chongqing		MH027657	MH027696	—	MH027767	MH027805
漓江副沙鳅 <i>P. lijiangensis</i>				JN177222*	AY625713*	JN177289*	JN177199*	JN177213*

· 续表 1 ·

种 species	采集地 locality	编号 label	分子标记测序情况 molecular marker sequencing status				
			<i>CO I</i>	<i>Cytb</i>	<i>IRBP</i>	<i>RAG1</i>	<i>RH</i>
西氏安巴鳅 <i>Ambastaiia sidhimunki</i>			AP011348*	AY887849*	KY356472*	KU517025*	—
条纹沙鳅 <i>B. striata</i>			KX946600*	KY497066*	KY356477*	KU517029*	—
巴基斯坦沙鳅 <i>B. lohachata</i>			MK572072*	KU517085*	KY356476*	KY356509*	—
大刺色鳅 <i>C. macracanthus</i>			KU568785*	EU282330*	JN177266*	KU517030*	FJ197037*
白氏薄鳅 <i>L. pellegrini</i>			JN177223*	MT747371*	EU409672*	KU517050*	KP695765*
紫薄鳅 <i>L. taeniops</i>			MF122436*	MT747359*	—	KU517053*	KP695766*
武昌副沙鳅 <i>P. banarescui</i>			KC871158*	AY625711*	—	KU517054*	JN177210*
斑鳍须鳅 <i>S. beauforti</i>			MK116360*	GQ174359*	KP695104*	FP695640*	FJ650470*
湄公河安彦鳅 <i>Y. morleti</i>			KU569085*	GQ174375*	FJ650483*	KU517083*	FJ650471*
橙鳍安彦鳅 <i>Y. modesta</i>			JQ661358*	GQ174361*	KP695105*	KP695641*	KP695767*
勒氏安彦鳅 <i>Y. lecontei</i>			JQ661363*	KU517131*	KP695106*	KU517081*	—
泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>			MF122502*	AB473407*	JN177287*	AB531306*	AB531362*
似长鳅 <i>Cobitis elongatoides</i>			AP011344	EF012715*	—	EF672423*	KJ885739*
后鳍花鳅 <i>Niwaella delicata</i>			AP009308*	AP009308*	—	AB531285*	AB531346*
条纹鳅 <i>Cobitis striata</i>			AB054125*	AB054125*	AB531281*	EF458303*	AB531387*
乔氏鳅 <i>Cobitis choii</i>			EU333980*	EU333980*	KM818240*	EU670833*	—
黑龙江花鳅 <i>Cobitis lutheri</i>			HQ536326*	KF661563*	MK023464*	EU670830*	—
俄罗斯泥鳅 <i>Misgurnus nikolskyi</i>			AB242171*	AB242171*	—	EU711140*	FJ197040*
大鳞副泥鳅 <i>Paramisgurnus dabryanus</i>			MH107300*	AB473408*	KP695114*	KP695644*	—
圆尾高丽鳅 <i>Koreocobitis rotundicaudata</i>			HQ536391*	KX265421*	KP695112*	EU670841*	KP695770*
洛东江高丽鳅 <i>Koreocobitis naktongensis</i>			HM535625*	JN607252*	KM818226*	EU670840*	—
高鳅 <i>Cobitis takatsuenis</i>			AP009306*	AP009306*	—	EU409616*	EU409643*
马头小刺眼鳅 <i>Acantopsis choirorhynchus</i>			AB242161*	AB242161*	JN177288*	AB531314*	FJ197039*

注：“*”表示从GenBank下载的序列，“—”表示序列缺失。

Notes: "*" indicates sequences downloaded from GenBank, "-" indicates missing sequence.

表 2 分子标记扩增和测序的引物信息

Tab. 2 Primers used for amplification and sequencing of the molecular makers in the present study

基因 genes	序列(5'-3') sequences	参考文献 references
<i>CO I</i>	F-TCTCAACCAACCACAAAGACATTGG	[24]
	R-GACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	
<i>Cytb</i>	F14724-GACTTGAAA AACCACCGTTG	[25]
	R15915-CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC	
<i>IRBP</i>	F2-CTTRTTGTGGATATGGCAAAAAT	[26]
	R2-TGGTGGWCTTYAGGCACTTGT	
<i>RAG1</i>	F2848-GCTGCAGTCAGTACCACAAGATGT	[27]
	R4420-GATACTTGGAGGTGTAGAGCCAGT	
<i>RH</i>	F1-AAACGCTCATGTCCAAGTGG	[28]
	R1-TGATCCAAGCAGAAGTACTTG	

拼接, 对于不确定的碱基, 基于原始波峰进行人工矫正。拼接后的分子标记数据集在 MAFFT v7.4.1 软件^[29]中进行比对, 随后在 Gblocks v0.91b 软件^[30]中进行保守区选择。获得的线粒体基因和核基因序列在 NCBI 的 GenBank 中进行 Blast 验证后, 用 MEGA X 软件^[31]计算基因序列的分子特征。

系统发育分析 将目标类群的线粒体基因和核基因序列进行联合 (concatenate)。通过 PhyloSuite v1.2.2 软件^[32]将线粒体基因 *CO I*、*Cytb* 联合为 mit 数据集, 再将核基因 *IRBP*、*RAG1*、*RH* 联合为 nuclear 数据集, 最后将以上的全部基因联合为 all 数据集, 共得到 mit、nuclear 和 all 这 3 个数据集, 对于部分个体缺失的基因序列与未缺失的基因序列数据处理方式

表 3 本研究中 PCR 反应程序和温度设置

Tab. 3 PCR reaction procedures and temperature settings in the present study

反应程序 reaction program	基因 gene				
	<i>Cytb</i>	<i>CO I</i>	<i>RH</i>	<i>IRBP</i>	<i>RAG1</i>
预变性 pre-denaturation	94 °C, 3 min	95 °C, 4 min	94 °C, 3 min	95 °C, 4 min	94 °C, 4 min
变性 denaturation	94 °C, 30 s	94 °C, 50 s	94 °C, 30 s	95 °C, 40 s	94 °C, 30 s
退火(50~56 °C) annealing	45 s	50 s	45 s	40 s	40 s
延伸 extension	72 °C, 1 min	72 °C, 1 min 20 s	72 °C, 1 min	72 °C, 1 min	72 °C, 1 min 30 s
	变性-退火-延伸, 3个步骤, 循环34次				
终延伸 final extension	72 °C 8 min, 4 °C保存				

相同。用 DAMBE v5.2.73 软件^[33] 对数据集进行碱基饱和度分析。研究选用花鳅科鱼类作为外类群, 使用软件 PartitionFinder v2.1.1^[34] 基于 BIC (Bayesian Information Criterion) 准则, 筛选出 3 个数据集系统发育分析所需的最佳替代模型。对 3 个数据集分别进行 ML 树和 BI 树的构建。使用 RAxML 7.2.6 软件^[35] 采用不分区的 GTR+G 模型构建系统发育树, 快速自展抽样算法重复运行 5 000 次来检验各分支的自展值 (Bootstrap)。mit、nuclear 和 all 数据集的最佳替代模型分别为 GTR+I+G、TRNEF+I+G 和 TRNEF+I+G 与 GTR+I+G 混合模型。通过 MrBayes 3.2.6 软件^[36] 对以上数据集分别进行贝叶斯分析, 基于马尔科夫链蒙特卡洛法 (Markov Chain Monte Carlo process, MCMC) 进行 2×10^6 代运算, 每 100 代进行 1 次抽样检查, 保证分离频率平均标准偏差小于 0.01。运行完成后, 舍弃前 25% 老化样本后得到一致树 (consensus tree), 遵循 50% 多数决定原则得到每个节点的后验概率 (posterior probability, PP)。

分化时间估算 利用 all 数据集在 Beast v2.6.6 软件^[37] 中估算沙鳅科鱼类的分化时间。首先采用似然比检验 (Likelihood Ratio Test, LRT) 判断该分子数据是否符合分子钟假说, 结果显示, 该数据集符合分子钟假设, 故使用严格分子钟模型 (strict clock) 对该数据进行分析。采用不分区策略, GTR 替代模型和 Yule 模型进行分析。选用了 2 个化石记录作为校正点估算沙鳅科鱼类的起源与分化时间: 一个化石校正点是花鳅属化石记录为 13.8 百万年—15.9 百万年前^[38]; 另一个化石校正点是花鳅科化石记录为 28.1 百万年—33.9 百万年前^[39]。在 Beast 软件中通过 2 次独立的 MCMC 分析, 分别运行 10^7 代, 每 1 000 代取样 1 次。为了保证结果的

收敛性, 前 10% 的迭代 burn-in, 产生的 log 结果文件用 Tracer v1.7 软件^[40] 对有效样本大小 (effective sample size, ESS) 进行评估和收敛性检验, 保证每个参数的 ESS 值都大于 200 即满足收敛性, 运用 TreeAnnotator v2.6.6 软件进行总结并用软件 FigTree v1.4.3 查看分析结果。

生物地理学分析 根据研究中涉及的沙鳅科鱼类的地理分布和亚洲的地理区域分布, 在祖先地理构建 (AAR) 中将沙鳅科鱼类的分布划分为 7 个地理区系: (A) 东南亚地区、(B) 南亚地区、(C) 亚洲东部地区 (日本、韩国、朝鲜等地区)、(D) 西亚地区、(E) 亚洲北部地区 (长江以北、蒙古国、俄罗斯等地区)、(F) 长江水系及 (G) 珠江水系。在 RASP v4.2 软件^[41] 中对 6 种祖先地理范围估算模型进行分析, 6 种模型分别为 Dispersal-extinction cladogenesis (DEC)^[42]、Dispersal-extinction cladogenesis with jump (DEC+J)、Dispersal-vicariance analysis (DIVALIKE)^[43]、Dispersal-vicariance analysis with jump (DIVALIKE+J)、BI for discrete areas (BAYAREALIKE)^[44] 和 BI for discrete areas with jump (BAYAPEALIKE+J), 所有的参数均为默认值。

2 结果

2.1 序列分析

本研究获得沙鳅科鱼类及外类群序列共 294 条, 其中 *CO I*、*Cytb*、*IRBP*、*RAG1* 和 *RH* 基因序列条数分别为 63、63、50、63 和 55 条。以上 5 个分子标记和联合数据集的碱基组成及简约信息位点情况统计见表 4。其中, 单个基因片段长度分别为 *CO I* 576 bp、*Cytb* 987 bp、*IRBP* 558 bp、*RAG1* 888 bp、*RH* 442 bp, 串联后的基因片段长度分别为 mit 1 563 bp、nuclear 1 888 bp、all 3 451 bp。简约信息位点中, 线粒

体基因包含的简约信息位点高于核基因, 其中, *Cytb* 基因中的简约信息位点比例最高, *RH* 基

因最少。利用 DAMBE 软件分析的碱基替代饱和度和结果显示, 所有数据集均未出现突变饱和现象。

表 4 各数据集的碱基组成、简约信息位点数统计

Tab. 4 Average base frequencies, parsimony information sites

基因 genes	碱基频率 base frequency				长度/bp size	变异位点数/bp variable sites	简约信息位点数/bp parsimony informative sites
	A	T	C	G			
<i>CO I</i>	24.0	30.9	28.2	16.9	576	226 (39.2%)	208 (36.1%)
<i>Cytb</i>	28.4	28.5	28.4	14.6	987	406 (41.1%)	375 (38.0%)
<i>IRBP</i>	26.6	26.0	23.7	23.6	558	166 (29.7%)	120 (21.5%)
<i>RAG1</i>	24.9	24.0	23.7	27.4	888	394 (44.4%)	237 (26.7%)
<i>RH</i>	18.9	30.1	26.4	24.5	442	86 (19.5%)	64 (14.5%)
mit	26.8	29.4	28.3	15.5	1 563	632 (40.4%)	583 (37.3%)
nuclear	23.3	26.3	24.4	26.9	1 888	530 (28.1%)	392 (20.8%)
all	25.0	27.8	25.0	21.0	3 451	1 162 (33.7%)	975 (28.3%)

注: 括号中的数字是变异位点数或简约信息位点数所占各基因序列的百分比。

Notes: The numbers in brackets are the percentage of variant site or parsimony information site in each gene sequence.

2.2 沙鳅科鱼类的系统发育分析

依据 mit、nuclear 和 all 数据集构建的系统发育树分别如图 1、图 2 和图 3。基于最大似然法和贝叶斯推断法构建的 ML 树与 BI 树的拓扑结构一致, 仅在部分节点的支持率存在差异。

以 12 种花鳅科鱼类作为外类群, 基于 3 种数据集, 都强烈支持沙鳅科鱼类构成一个单系, 沙鳅科中的各个属也均为单系类群。沙鳅科分为两大支 (薄鳅亚科和沙鳅亚科), 二者互为姐妹类群, 在 3 种不同的数据集中, 都得到了较高的支持率。薄鳅亚科包括薄鳅属和副沙鳅属, 二者互为姐妹类群; 沙鳅亚科包括华鳅属、安巴鳅属、安彦鳅属、缨须鳅属、沙鳅属和色鳅属, 其中, 华鳅属和安巴鳅属互为姐妹类群, 安彦鳅属和缨须鳅属互为姐妹类群, 二者共同构成姐妹类群, 沙鳅属和色鳅属互为姐妹类群, 位于沙鳅亚科的基部。华鳅属中, 美丽华鳅与斑纹华鳅聚为一支, 共同与宽体华鳅和中华华鳅聚为一支, 壮体华鳅位于基部。

2.3 沙鳅科鱼类的分化时间估算和生物地理学分析

沙鳅科鱼类各属的分化时间见图 4。经 Tracer 检测, ESS 值远大于 200, 以保证结果的可信性。推测花鳅科和沙鳅科鱼类的共同祖先追溯到渐新世 28.85 百万年前 (95% highest posterior density, HPD: 26.47 百万年—31.25 百万

年前)。沙鳅科属间的分化时间: 沙鳅亚科和薄鳅亚科的分化时间为 24.15 百万年前 (95% HPD: 23.05 百万年—25.77 百万年前); 副沙鳅属和薄鳅属的分化时间为 11.81 百万年前 (95% HPD: 10.46 百万年—12.82 百万年前); 沙鳅属和色鳅属的分化时间为 17.17 百万年前 (95% HPD: 16.25 百万年—17.93 百万年前); 缨须鳅属和安彦鳅属的分化时间为 13.74 百万年前 (95% HPD: 12.63 百万年—14.88 百万年前); 安巴鳅属和华鳅属在 12.61 百万年前 (95% HPD: 9.49 百万年—11.76 百万年前) 开始分化。沙鳅科鱼类起源于渐新世 (约 28.85 百万年前), 中新世 (约 24.15 百万年前) 沙鳅科鱼类的属开始分化, 中新世和上新世 (约 17.17 百万年—3.79 百万年前), 属内种间分化较为明显。

地理祖先重建中, 通过对 6 个模型的得分进行比较发现, DEC 为最佳模型, 适用于重建沙鳅科鱼类的生物地理演化过程。沙鳅科鱼类的历史生物地理重建结果显示, 沙鳅科鱼类的共同祖先可能起源于东南亚, 副沙鳅属和薄鳅属的共同祖先可能起源于长江水系, 沙鳅属和色鳅属的共同祖先可能起源于东南亚地区, 安彦鳅属和缨须鳅属的共同祖先可能起源于东南亚地区, 安巴鳅属和华鳅属的共同祖先可能起源于东南亚地区 (图 5), 以上的结果都得到了强烈的支持。

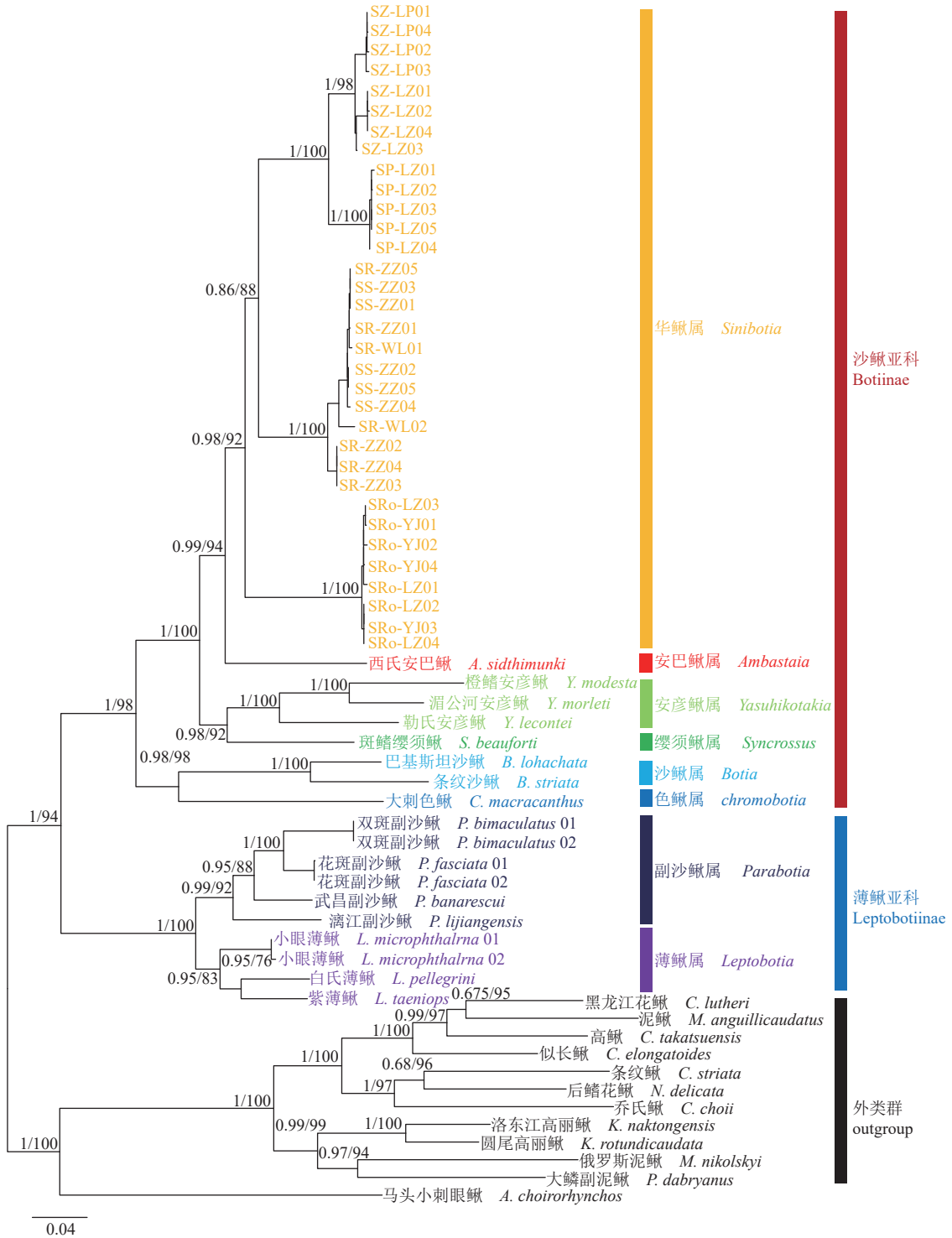


图 1 基于线粒体基因 *CO I* 和 *Cytb* 串联数据集构建的沙鳅科系统发育树

节点上数字依次为 BI 的后验概率和 ML 支持率; 下同。

Fig. 1 Phylogenetic tree of Botiidae obtained from the combined dataset of mitochondrial genes *CO I* and *Cytb*

The numbers at the nodes represent the posterior probabilities of BI and the bootstrap value of ML, respectively; the same below.

3 讨论

基于不同数据集和两种构树方法重建了沙

鳅科鱼类的系统发生树, 结果支持沙鳅科鱼类构成一个单系群, 沙鳅科各属也各自构成单系, 与前人的研究结果基本一致^[2, 45-46]。本研究结果

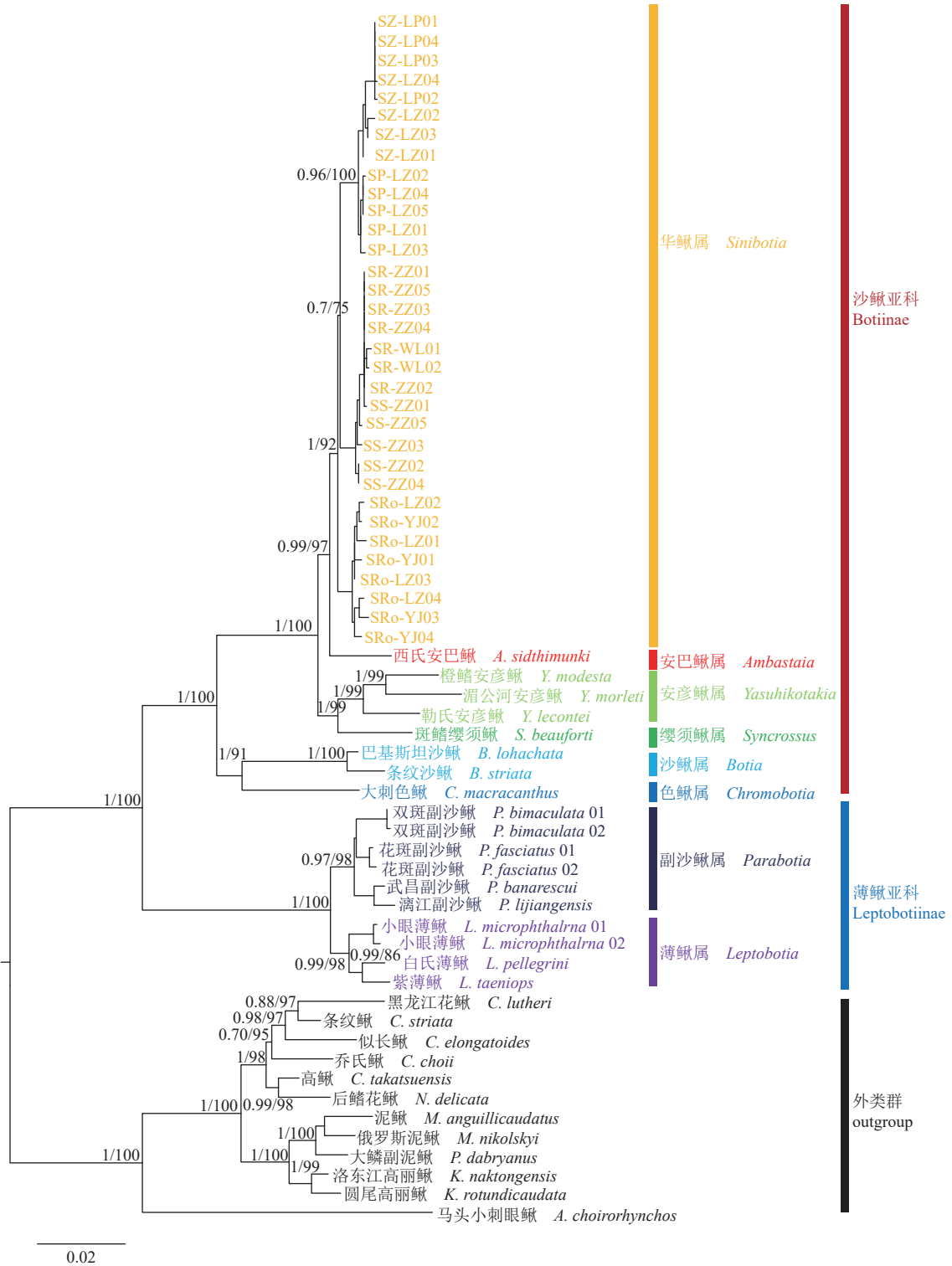


图 2 基于核基因 *IRBP*、*RAG1* 和 *RH* 串联数据集构建的沙鳅科系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of Botiidae obtained from the combined dataset of nuclear genes *IRBP*, *RAG1* and *RH*

显示, 沙鳅科分为沙鳅亚科和薄鳅亚科两大支, 其中, 沙鳅亚科包括华鳅属、安巴鳅属、安彦鳅属、缨须鳅属、沙鳅属和色鳅属, 薄鳅亚科包括副沙鳅属和薄鳅属。Suzuki 等^[47] 对 16 个沙

鳅科鱼类的染色体分化机制的研究中发现, 沙鳅亚科和薄鳅亚科在细胞遗传上存在明显差异, 沙鳅亚科的染色体数目为 2n= 98/100, 薄鳅亚科的染色体数目为 2n=50。综上, 沙鳅科中的

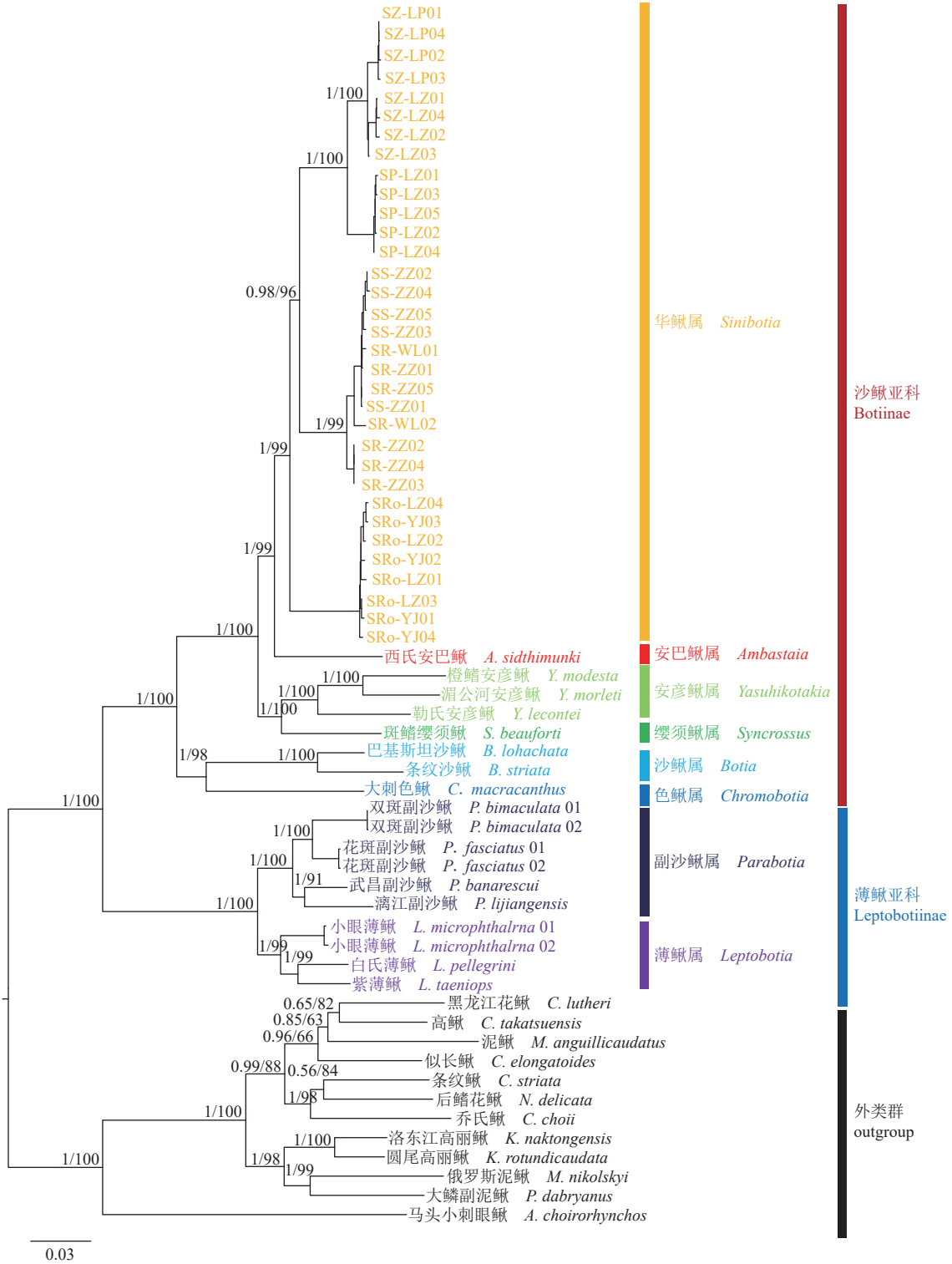


图 3 基于线粒体基因 (CO I、Cytb) 和核基因 (IRBP、RAG1 和 RH) 串联数据集构建的沙鳅科系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of Botiidae obtained from the combined dataset of mitochondrial and nuclear genes

薄鳅亚科和沙鳅亚科互为姐妹类群, 其中, 薄鳅亚科中的副沙鳅属和薄鳅属互为姐妹类群, 沙鳅亚科中的华鳅属和安巴鳅属互为姐妹类群, 安彦鳅属与缨须鳅属互为姐妹类群, 共同与位

于沙鳅亚科基部的沙鳅属和色鳅属构成姐妹类群, 该结果与毛云涛等^[46]基于线粒体 CO I 基因构建的沙鳅科鱼类分子系统发育树的研究结果基本一致。Fang^[12]将沙鳅类分为沙鳅属和薄

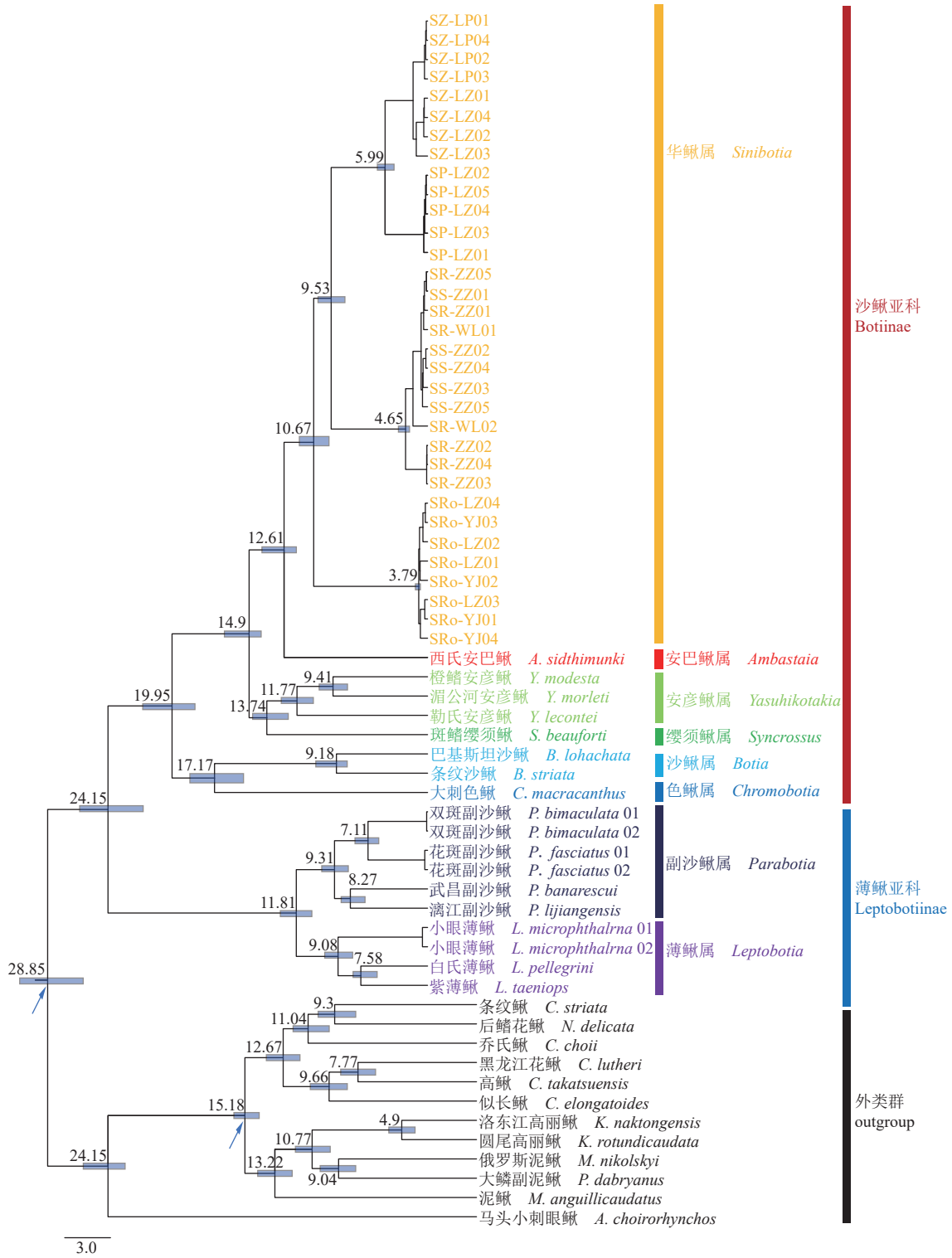


图 4 沙鳅科鱼类的分化时间

节点处数字表示分化时间“百万年前”，蓝色条状表示 95% 置信区间，箭头为化石点标定位置。

Fig. 4 Time of differentiation of the Botiidae

The numbers at the nodes indicate the time of differentiation (Ma, million years ago), the blue bars indicate the 95% confidence interval, and the arrow is the position of the fossil point calibration.

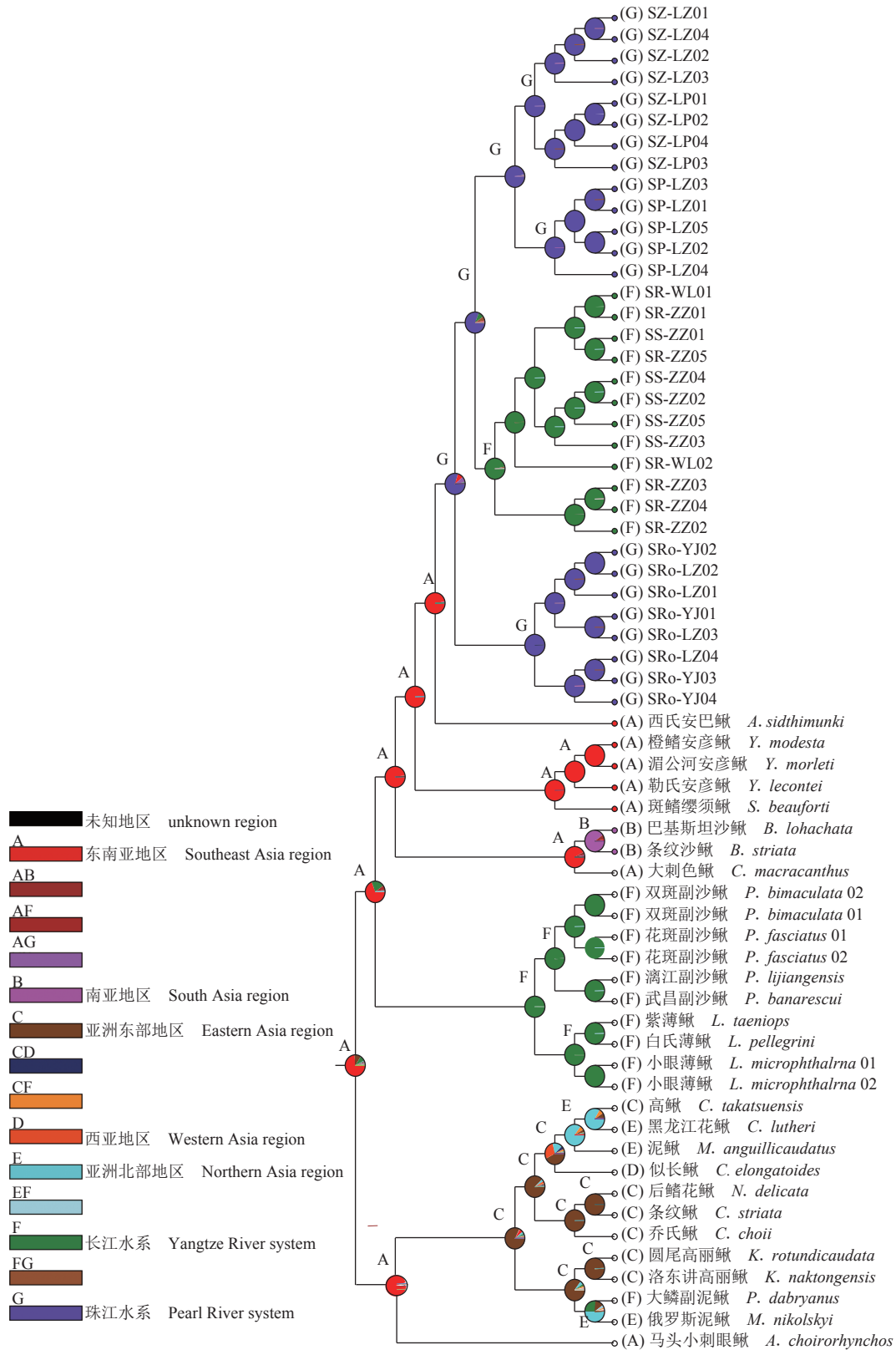


图 5 基于 DEC 模型利用 BioGeoBEARS 对其祖先区域进行推测

节点上的字母显示可能的祖先分布区域。

Fig. 5 Ancestral regions were inferred based on the DEC model using BioGeoBEARS

The letters at the nodes show the possible ancestral distribution regions.

鳅属, 认为副沙鳅属为沙鳅属的一个亚属(膜鳃沙鳅亚属的同物异名), 但之后的形态学和分子证据都显示副沙鳅属为有效属, 副沙鳅属的有效性在本研究也得到了证明。Šlechtová等^[16]的研究结果显示安彦鳅属非单系群, 但在讨论中指出可能是由于线粒体基因渐渗, 应该结合形态学特征和核基因分子标记讨论安彦鳅属的单系性。华鳅属中壮体华鳅位于系统发育树的基部, 为单系, 美丽华鳅和斑纹华鳅也为单系, 中华华鳅和宽体华鳅则相互交叉聚为一支。黄燕^[48]在长江上游特有鱼类 DNA 条形码研究中也表明中华华鳅和宽体华鳅聚为一支。中华华鳅和宽体华鳅在分子水平上的分歧很小, 用以上的分子标记无法区分, 二者在形态上也极为相似, 这两个物种可能存在一定的基因流动, 还需更深入地研究。

沙鳅科鱼类的化石资料匮乏, 关于沙鳅科的起源时间及其相关类群分化时间的研究较少, 故本研究选择已报道的两个花鳅科鱼类化石记录作为时间校正点。分化时间分析结果发现, 沙鳅科起源于 28.85 百万年前 (95% HPD: 26.47 百万年—31.25 百万年前) (图 4)。Wang 等^[49]利用线粒体基因组推测出沙鳅亚科和薄鳅亚科的分化时间约在 25 百万年前, 本研究推测出二者的分化时间为 24.15 百万年前 (95% HPD: 23.05 百万年—25.77 百万年前), 二者结果一致。此外, Sember 等^[15]指出沙鳅亚科和薄鳅亚科的分化时间约在 25 百万年前, 也在此置信区间内。陈景星等^[1]依据形态特征, 认为鳅科鱼类可能起源于大巽他群岛、泰国和缅甸, 后因喜马拉雅山脉的隆起, 沙鳅科中的沙鳅属向西扩散至印度和巴基斯坦; 另一支往北扩散至珠江、长江, 远至黑龙江和日本, 演变为现今的副沙鳅属和薄鳅属。本研究地理祖先重建分析中, 沙鳅科鱼类起源于东南亚地区, 即泰国、缅甸、马来西亚和苏门答腊岛。始新世大陆碰撞后引起了喜马拉雅运动, 从而导致高原隆升, 构成了全球环境演化中最突出的事件^[50-51]。在随后 37 百万年—22 百万年期间有相对稳定的构造环境, 藏南地区的气候变得湿热, 森林茂盛, 从而促进了生物多样性的增加^[24]。在这一时期, 沙鳅科鱼类起源于东南亚地区, 并逐渐分化为沙鳅亚科和薄鳅亚科。新近纪时期, 古长江开始分段发育, 薄鳅亚科鱼类进入长江流域, 并

分化为薄鳅属和副沙鳅属。在中新世和上新世之间发生了喜马拉雅山脉的二期运动 (22 百万年—17 百万年前), 其间色鳅属和沙鳅属发生了分化, 其中沙鳅属进入南亚地区, 即印度、尼泊尔、孟加拉国和巴基斯坦。缨须鳅属、安彦鳅属和安巴鳅属分布于东南亚地区, 即泰国、缅甸、老挝和柬埔寨。中新世晚期, 华鳅属进入珠江水系并分化。随着喜马拉雅山脉的第三期运动 (3.6 百万年—1.7 百万年前), 形成如今的华鳅属分布格局。基于以上结果, 本实验推测出的沙鳅科鱼类起源分化过程与陈景星等^[1]结果基本一致, 本研究为其提供了分子生物学方面的证据。

参考文献 (References):

- [1] 陈景星, 朱松泉. 鳅科鱼类亚科的划分及其宗系发生的相互关系 [J]. 动物分类学报, 1984, 9(2): 201-208.
Chen J X, Zhu S Q. Phylogenetic relationships of the subfamilies in the loach family cobitidae (Pisces)[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 1984, 9(2): 201-208 (in Chinese).
- [2] 陈景星. 中国沙鳅亚科鱼类系统分类的研究 [J]. 动物学研究, 1980, 1(1): 3-20.
Chen J X. A study on the classification of the Botoid fishes of China[J]. Zoological Research, 1980, 1(1): 3-20 (in Chinese).
- [3] Froese R, Pauly D. FishBase[EB/OL]. (2021-10-01)[2022-01-01]. <http://www.fishbase.org>.
- [4] Mueller R L. Evolutionary rates, divergence dates, and the performance of mitochondrial genes in Bayesian phylogenetic analysis[J]. *Systematic Biology*, 2006, 55(2): 289-300.
- [5] Larizza A, Pesole G, Reyes A, et al. Lineage specificity of the evolutionary dynamics of the mtDNA D-loop region in rodents[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2002, 54(2): 145-155.
- [6] Silva-Pinheiro P, Minczuk M. The potential of mitochondrial genome engineering[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2022, 23(4): 199-214.
- [7] Zhang L N, Ma P F, Zhang Y X, et al. Using nuclear loci and allelic variation to disentangle the phylogeny of *Phyllostachys* (Poaceae, Bambusoideae)[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2019, 137: 222-235.
- [8] Hodel R G J, Zimmer E, Wen J. A phylogenomic approach resolves the backbone of *Prunus* (Rosaceae) and identifies signals of hybridization and allopolyploidy[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2021, 160: 107118.
- [9] Gippner S, Travers S L, Scherz M D, et al. A comprehensive

- phylogeny of dwarf geckos of the genus *Lygodactylus*, with insights into their systematics and morphological variation[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2021, 165: 107311.
- [10] Rodríguez S M, Amin O M, Heckmann R A, *et al.* Phylogeny and life cycles of the archiacanthocephala with a note on the validity of *Mediorhynchus gallinarum*[J]. *Acta Parasitologica*, 2022, 67(1): 369-379.
- [11] Bogarín D, Pérez-Escobar O A, Groenenberg D, *et al.* Anchored hybrid enrichment generated nuclear, plastid and mitochondrial markers resolve the *Lepanthes horrida* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) species complex[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2018, 129: 27-47.
- [12] Fang P W. Study on botoid fishes of China[J]. *Sinensia*, 1936, 7: 1-49.
- [13] Nalbant T T. Sixty million years of evolution. Part one: family Botiidae (Pisces: Ostariophysii: Cobitoidea)[J]. *Travaux du Muséum National d' Histoire Naturelle "Grigore Antipa"*, 2002, 44: 309-333.
- [14] Kottelat M. *Botia kubotai*, a new species of loach (Teleostei: Cobitidae) from the Ataran River basin (Myanmar), with comments on botiine nomenclature and diagnosis of a new genus[J]. *Zootaxa*, 2004, 401(1): 1-18.
- [15] Sember A, Bohlen J, Šlechtová V, *et al.* Dynamics of tandemly repeated DNA sequences during evolution of diploid and tetraploid botiid loaches (Teleostei: Cobitoidea: Botiidae)[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0195054.
- [16] Šlechtová V, Bohlen J, Freyhof J, *et al.* Molecular phylogeny of the southeast Asian freshwater fish family Botiidae (Teleostei: Cobitoidea) and the origin of polyploidy in their evolution[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, 39(2): 529-541.
- [17] 广西壮族自治区水产研究所, 中国科学院动物研究所. 广西淡水鱼类志 [M]. 第 2 版. 南宁: 广西人民出版社, 2006. Guangxi Zhuang Autonomous Region Fisheries Research Institute, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences. Freshwater fishes of Guangxi, China[M]. 2nd ed. Nanning: Guangxi People's Publishing House, 2006 (in Chinese).
- [18] 郑慈英. 珠江鱼类志 [M]. 北京: 科学出版社, 1989. Zheng C Y. The fishes of the Pearl River[M]. Beijing: Science Press, 1989 (in Chinese).
- [19] 农牧渔业部水产局, 中国科学院水生生物研究所, 上海自然博物馆. 中国淡水鱼类原色图集 (第二集)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1988. Fisheries Bureau of the Ministry of Agriculture, Animal Husbandry and Fisheries, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai Natural History Museum. The freshwater fishes of China in coloured illustrations (2nd ed.)[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1988 (in Chinese).
- [20] 农业部水产司, 中国科学院水生生物研究所. 中国淡水鱼类原色图集 (第三集)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences. The freshwater fishes of China in coloured illustrations (3rd ed.)[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1993 (in Chinese).
- [21] 伍献文, 陈宜瑜, 陈湘舜, 等. 鲤亚目鱼类分科的系统和科间系统发育的相互关系 [J]. 中国科学, 1981(3): 369-376. Wu X W, Chen Y Y, Chen X L, *et al.* Phylogenetic and interfamily phylogenetic interrelationships in the subfamily Cypriniformes[J]. *Science China*, 1981(3): 369-376 (in Chinese).
- [22] Siebert D J. Interrelationships among families of the order Cypriniformes (Teleostei)[D]. New York: City University of New York, 1987.
- [23] 彭作刚. 欧亚大陆鲴形目鱼类系统发育与骨鲈下区鱼类分化时间估计及其起源与演化过程研究 [D]. 武汉: 中国科学院研究生院 (水生生物研究所), 2005. Peng Z G. Phylogenetic relationships of Eurasian catfishes (Otocephala: Siluriformes) and divergence time estimates for major otocephalan clades[D]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2005 (in Chinese).
- [24] 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.
- [25] Xiao W H, Zhang Y P, Liu H Z. Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): Taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in east Asia[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 18(2): 163-173.
- [26] 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.
- [27] Chen W J, Miya M, Saitoh K, *et al.* Phylogenetic utility of two existing and four novel nuclear gene loci in reconstructing tree of life of ray-finned fishes: the order Cypriniformes (Ostariophysii) as a case study[J]. *Gene*, 2008, 423(2): 125-134.
- [28] 闫咏柳. 高原鳅属鱼类 (鲤形目: 条鳅科) 洞穴类群的起源演化研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2017. Yan Y L. The origin and evolution of cave-dwelling group of *Triplophysa* fishes (Teleostei, Cypriniformes, Nemacheilidae) [D]. Chongqing: Southwest University, 2017 (in Chinese).
- [29] Katoh K, Standley D M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability

- lity[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(4): 772-780.
- [30] Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17(4): 540-552.
- [31] Kumar S, Stecher G, Li M, *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [32] Zhang D, Gao F L, Jakovlić I, *et al.* PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2020, 20(1): 348-355.
- [33] Xia X H. DAMBE5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(7): 1720-1728.
- [34] Lanfear R, Frandsen P B, Wright A M, *et al.* PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34(3): 772-773.
- [35] Stamatakis A, Aberer A J, Goll C, *et al.* RAxML-Light: a tool for computing terabyte phylogenies[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(15): 2064-2066.
- [36] Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space[J]. *Systematic Biology*, 2012, 61(3): 539-542.
- [37] Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, *et al.* BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis[J]. *PLoS Computational Biology*, 2014, 10(4): e1003537.
- [38] 周家健. 山东山旺中新世鲈科化石 [J]. *古脊椎动物学报*, 1992, 30(1): 71-76.
- Zhou J J. A new cobitid from the middle Miocene of Shanwang, Shandong[J]. *Vertebrata Palasiatica*, 1992, 30(1): 71-76.
- [39] Chen G J, Liao W, Lei X Q. First fossil cobitid (Teleostei: Cypriniformes) from Early-Middle Oligocene deposits of South China[J]. *Vertebrata Palasiatica*, 2015, 53(4): 299-309.
- [40] Rambaut A, Drummond A J, Xie D, *et al.* Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using tracer 1.7[J]. *Systematic Biology*, 2018, 67(5): 901-904.
- [41] Yu Y, Blair C, He X J. RASP 4: ancestral state reconstruction tool for multiple genes and characters[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2020, 37(2): 604-606.
- [42] Ree R H, Smith S A. Maximum likelihood inference of geographic range evolution by dispersal, local extinction, and cladogenesis[J]. *Systematic Biology*, 2008, 57(1): 4-14.
- [43] Ronquist F. Dispersal-vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography[J]. *Systematic Biology*, 1997, 46(1): 195-203.
- [44] Landis M J, Matzke N J, Moore B R, *et al.* Bayesian analysis of biogeography when the number of areas is large[J]. *Systematic Biology*, 2013, 62(6): 789-804.
- [45] 唐琼英, 刘焕章, 杨秀平, 等. 沙鲈亚科鱼类线粒体 DNA 控制区结构分析及系统发育关系的研究 [J]. *水生生物学报*, 2005, 29(6): 645-653.
- Tang Q Y, Liu H Z, Yang X P, *et al.* Studies on the structure of the mitochondrial DNA control region and phylogenetic relationships of the subfamily Botiinae[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(6): 645-653 (in Chinese).
- [46] 毛云涛, 甘小妮, 王绪祯. 基于线粒体 CO I 基因的沙鲈亚科鱼类 DNA 条形码及其分子系统发育研究 [J]. *水生生物学报*, 2014, 38(4): 737-744.
- Mao Y T, Gan X N, Wang X Z. DNA barcodes and molecular phylogeny of Botiinae fishes based on the mitochondrial CO I gene[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(4): 737-744 (in Chinese).
- [47] Suzuki A, Taki Y. Tetraploidization in the cobitid subfamily Botiinae (Pisces, Cypriniformes)[J]. *Cytobios*, 1996, 85(343): 229-245.
- [48] 黄燕. 长江上游特有鱼类 DNA 条形码研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- Huang Y. DNA barcoding of the endemic fishes from the upper Yangtze River Basin[D]. Chongqing: Southwest University, 2014 (in Chinese).
- [49] Wang Y, Shen Y J, Feng C G, *et al.* Mitogenomic perspectives on the origin of Tibetan loaches and their adaptation to high altitude[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 29690.
- [50] 张兰生, 方修琦. 中国古地理: 中国自然环境的形成 [M]. 北京: 科学出版社, 2012.
- Zhang L S, Fang X Q. Chinese paleogeography: the formation of China's natural environment[M]. Beijing: Science Press, 2012 (in Chinese).
- [51] 崔之久, 高全洲, 刘耕年, 等. 夷平面、古岩溶与青藏高原隆升 [J]. *中国科学 (D 辑)*, 1996, 26(4): 378-386.
- Cui Z J, Gao Q Z, Liu K N, *et al.* Ebony planes, ancient karst and uplift of the Tibetan Plateau[J]. *Chinese Science (Series D: Earth Sciences)*, 1996, 26(4): 378-386 (in Chinese).

Origin and evolution of botiid loaches (Teleostei: Cypriniformes: Botiidae)

XU Rongrong¹, LIU Shiyang¹, WANG Yongming^{1,2}, LI Yanping²,
XIE Biwen², PENG Zuogang^{1*}

1. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education,
School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Key Laboratory of Sichuan Province for Fish Conservation and Utilization in the Upper Reaches of the Yangtze River,
College of Life Sciences, Neijiang Normal University, Neijiang 641100, China

Abstract: Botiidae (Actinopterygii: Cypriniformes) is a group of small and medium-sized fish with eight genera and 62 species, which is widely distributed in Southeast Asia, East Asia and South Asia. A total of 240 sequences were obtained by PCR amplification and downloading from GenBank, covering eight genera and 20 species of Botiidae to clarify the phylogenetic relationships and the origin evolution of the family Botiidae. In this study, phylogenetic tree reconstruction, divergence time estimation and biogeographic analysis were performed using the combination of two mitochondrial genes (*CO I*, *Cytb*) and three nuclear genes (*IRBP*, *RAG1*, *RH*). The topology of Maximum Likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) trees based on different datasets consistently showed that the family Botiidae was a monophyletic taxa and all genera were also monophyletic taxa. The family Botiidae was divided into two major branches of the subfamily Botiinae and Leptobotiinae, of which Botiinae included *Sinibotia*, *Ambastaia*, *Yasuhikotakia*, *Syncrossus*, *Botia* and *Chromobotia* and Leptobotiinae included *Parabotia* and *Leptobotia*. The above results were well supported. The results of divergence time and geographic ancestral reconstruction indicated that the family Botiidae originated in Southeast Asia in the Early Oligocene (about 28.85 million years ago), and the genera began to diverge in the Miocene (about 24.25 million years ago), with obvious divergence of species within genera in the Late Miocene and Pliocene (about 17.17-3.79 million years ago). With the movement of the Himalayas, the family Botiidae spread and evolved westward and northward from Southeast Asia, among which the genus *Botia* entered the South Asian region westward, and the genera of *Leptobotia*, *Parabotia*, and *Sinibotia* entered the Yangtze River and Pearl River basin in China to the north. The differentiation of the family Botiidae was closely related to the movement of the Himalayas. This research has important implications for the phylogenetic relationships and evolutionary processes in the origin of Botiidae.

Key words: Botiidae; multigene analysis; phylogeny; molecular clock; biogeography

Corresponding author: PENG Zuogang. E-mail: pzg@swu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32170457); Innovative Research Team in Neijiang Normal University (2021TD03)