

DOI: 10.5846/stxb201411042169

蓝昭军, 范明君, 黄小林, 赵俊. 基于线粒体 Cyt *b* 基因的中国南方唇鲮 (*Hemibarbus labeo*) 和间鲮 (*Hemibarbus medius*) 种群分化及亲缘地理研究. 生态学报, 2016, 36(19): 6091-6102.

Lan Z J, Fan M J, Huang X L, Zhao J. Population diversity and phylogeography of *Hemibarbus labeo* and *Hemibarbus medius* in South China. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(19): 6091-6102.

基于线粒体 Cyt *b* 基因的中国南方唇鲮 (*Hemibarbus labeo*) 和间鲮 (*Hemibarbus medius*) 种群分化及亲缘地理研究

蓝昭军^{1,2}, 范明君^{1,3}, 黄小林^{1,4}, 赵 俊^{1,*}

1 广东省水产健康安全养殖重点实验室, 广东省高等学校生态与环境科学重点实验室, 广州市亚热带生物多样性与环境生物监测重点实验室, 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631

2 韶关市水产研究所, 韶关 512006

3 深圳华大水产科技有限公司, 深圳 518083

4 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510300

摘要: 为了解中国南方唇鲮 (*Hemibarbus labeo*) 和间鲮 (*Hemibarbus medius*) 的种群分化、亲缘地理格局及物种有效性, 作者对唇鲮 8 个水系及间鲮 9 个水系共 148 尾样本的 Cyt *b* 基因全序列进行了测定。在有序列中, 共有 128 个变异位点, 共检测出了 41 个单倍型, 单倍型多样性为 0.954, 核苷酸多样性为 0.02153。基于 Cyt *b* 基因全序列构建的 NJ 树显示, 中国南方的唇鲮与间鲮合聚为两大支, 其中韩江和九龙江的全部唇鲮样本组成了 I 支, 而其他水系的唇鲮和间鲮样本则组成了 II 支。两支系间的遗传距离为 5.1%, 而唇鲮和间鲮之间的遗传距离为 3.2%。现有证据不支持间鲮与唇鲮达到种一级的分化。单倍型网络图显示, 韩江、九龙江种群和其他水系的种群分化较大; 海南岛三大水系种群和漠阳江种群的单倍型分支与代表珠江水系单倍型的分支之间的亲缘关系较近, 与其他地理区间种群的亲缘关系则相对较远; 西江可能为珠江水系、漠阳江水系和海南岛三大水系间鲮种群的扩散中心, 其中一支往东向北江和东江扩散; 另一支往南向海南岛扩散, 海南岛三大水系种群尔后在冰期海退时向北扩散至漠阳江水系及珠江水系。AMOVA 分析表明, 唇鲮和间鲮地理区之间变异约占 54.50%, 地理区内种群间变异约占 18.64%, 种群内的变异占 26.86%, 这说明, 唇鲮和间鲮种群 Cyt *b* 的遗传分化主要是来自地理区之间。错配分析及中性检验显示, 全部种群、唇鲮种群、间鲮种群在历史上均没有发生过明显的扩张, 两个 mtDNA 支系亦未发生过扩张, 而海南岛的昌化江种群曾发生过种群扩张。

关键词: 唇鲮; 间鲮; 种群分化; 亲缘地理; 细胞色素 *b* 基因; 中国南方

Population diversity and phylogeography of *Hemibarbus labeo* and *Hemibarbus medius* in South China

LAN Zhaojun^{1,2}, FAN Mingjun^{1,3}, HUANG Xiaolin^{1,4}, ZHAO Jun^{1,*}

1 Guangdong Provincial Key Laboratory for Healthy and Safe Aquaculture, Key Laboratory of Ecology and Environment Science in Guangdong Higher Education, Guangzhou Key Laboratory of Subtropical Biodiversity and Biomonitor, School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

2 Shaoguan Fisheries Research Institute, Shaoguan 512006, China

3 Shenzhen BGI Fisheries Science & Technology corporation, Ltd., Shenzhen 518083, China

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31372178); 公益性行业 (农业) 科研专项经费资助 (201303048); 广东省科技计划项目 (2015A070706009)

收稿日期: 2014-11-04; **网络出版日期:** 2016-01-15

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhaojun@scnu.edu.cn

4 South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China

Abstract: *Hemibarbus labeo* and *Hemibarbus medius* (Cypriniformes; Cyprinidae; Gobioninae; *Hemibarbus*) are primary freshwater fish species, and their wide distribution makes them ideal models for phylogeographical studies. In this study, variations in the population genetics and phylogeographical patterns of 148 specimens belonging to 8 populations of *H. labeo* and 9 populations of *H. medius* collected from 17 drainage systems in south China were investigated using the nucleotide sequences of the mtDNA Cytochrome *b* gene (1140 bp). The results reveal 128 variable sites (11.23%) within the gene sequences of *H. labeo* and *H. medius*. A total of 41 haplotypes were identified, with the haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) being 0.954 and 0.02153, respectively. This indicates a high level of genetic diversity and evolutionary potential in both species. The results of the neighbor-joining tree demonstrate that *H. labeo* and *H. medius* individuals fall into two major clades (clade I and clade II): clade I is composed of all specimens collected from the Hanjiang and Jiulongjiang Rivers, all of which were identified as *H. labeo*. Meanwhile, all remaining populations fell into clade II, which includes specimens of both *H. labeo* and *H. medius*. The genetic distance between clade I and clade II was 5.1%, while that between *H. labeo* and *H. medius* was 3.2%. Our results indicate that the specimens collected from these sampling localities may not be differentiated into two or more subspecies. The haplotype network indicates that the populations of the Hanjiang and Jiulongjiang Rivers exhibit a relatively high level of genetic variation compared to that of the rest of the rivers in the region, and that the populations from Hainan Island and Moyangjiang River were genetically close to those from the Pearl River System, but not to those from the Yangtze River System, Hanjiang River, Jiulongjiang River, Minjiang River, Oujiang River and Qiantangjiang River. The *H. medius* populations of south China seem to have originated from the Xijiang River and reached south China by one of two routes: one route may be through the Xijiang River to the Beijing and Dongjiang rivers; and the other may be through the southern Guangxi drainages to Hainan Island, and then to the Moyangjiang and Beijing rivers through the Qiongzhou Strait. According to the neighbor-joining tree and the haplotype network, five regions of genetic distribution were defined: Hainan Island and the Moyangjiang River region; the Pearl River region; the Yangtze River region; the Hanjiang and Jiulongjiang river region; and the Minjiang, Oujiang, and Qiantangjiang river region. An analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the genetic variation of populations among regions was 54.50%; conversely, the genetic variation among populations within regions was 18.64%, and that within the populations of different regions was 26.86%. This indicates that the greatest genetic variation is found among the populations of the different regions. Mismatch distribution and tests of neutrality taking populations of *H. labeo* and *H. medius* into account both together and separately were all multimodal types, and the value of F_u , L_i 's D , and Tajima's D for all comparisons were all negative but non-significant or positive. The results reveal relatively stable populations of *H. labeo* and *H. medius*. Mismatch distribution and tests of neutrality also showed that both clade I and clade II were relatively stable; however, the population of the Changhuajiang River has undergone an obvious population expansion.

Key Words: *Hemibarbus labeo*; *Hemibarbus medius*; population diversity; phylogeography; Cytochrome *b* gene; South China

亲缘地理学,又称谱系生物地理学,是研究有密切亲缘关系的种间和种内支系现有的地理分布格局的形成过程和形成机制的学科。生物在漫长的演化过程中,受各种因素(地质因素、气候因素等)的影响,都会在其演化的过程中留下印迹,如影响生物的地理隔离、迁移、区域扩张和灭绝等,而生物的这些活动都会具有影响一定区域内物种基因流的作用,改变遗传变异的分布,从而产生新的物种进化模式^[1]。尤其是,地质地貌的格局对于种群基因流的改变和分化往往起着重要的作用^[2-6]。而分子亲缘地理学是采用分子生物技术,在分子水平上探讨物种的系统地理格局的形成机制,进一步阐述其起源进化历史,分析区域类群在时间上和空间上的发展变化,从而重建生物区系的进化历史过程^[7]。

唇鲮(*Hemibarbus labeo*)和间鲮(*Hemibarbus medius*)均隶属于鲤形目(Cypriniformes),鲤科(Cyprinidae),鲮亚科(Gobioninae),鲮属(*Hemibarbus*)^[8-9],两者为近缘种。间鲮是在原唇鲮种群中划分出的一个种^[8],在此之前,一直被归为唇鲮^[10-14]。1995年,乐佩琦对我国鲮属鱼类进行分类整理后认为,唇鲮华南地区及西南部分地区的种群与唇鲮其他地方种群的差别已经达到了物种级的水平,并以海南岛的12尾标本作为模式标本,将华南及西南部分地区的唇鲮种群描述为一新种——间鲮(*H. medius* Yue),并指出其与唇鲮的鉴别特征主要为吻长较短,唇稍薄,不甚发达,下唇侧叶稍狭窄,无皱褶,背鳍刺较细弱及鳃耙数较少等^[8]。1998年,乐佩琦等较为详细地记载唇鲮和间鲮的地理分布,其中唇鲮分布于我国台湾各水系和闽江、钱塘江、长江、黄河等直至黑龙江水系;间鲮分布于华南、西南部分地区各水系^[9]。

然而,目前不同学者对于两者的分布区域与乐佩琦等的观点不尽相同^[15-18]。唇鲮和间鲮之间的鉴别特征较为模糊,且某些性状可能存在连续变化,不易区分。因此,造成对两者分布区描述差异的原因可能为物种鉴定存在偏差。此外,两者的分布均较为广泛,是研究亲缘地理的理想素材。有关唇鲮和间鲮的亲缘地理的研究,目前已有林宗键^[17]及Lin等^[18]基于线粒体控制区序列对唇鲮的报道,但该研究并未涉及珠江等水系的种群。因此,作者在中国南方唇鲮和间鲮的分布区,采集不同地理种群的样本,对其线粒体细胞色素*b*(Cyt *b*)基因序列进行了测定与分析,旨在澄清二者物种有效性的前提下,探讨其种群分化和分布特征,推测其种群演化历史及亲缘地理模式。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究所用样品均为2009年9月—2010年8月采自贵州省、广西壮族自治区、广东省、海南省、福建省、江西省和浙江省等地,所有样本根据乐佩琦等提出的分类鉴定特征^[8-9]进行鉴定,其中间鲮样本共92尾;唇鲮样本56尾。将所有个体按所采样的水系进行种群划分,即用水系名称对种群进行命名。具体的样品信息及采样点见表1。

1.2 DNA的提取及测序

基因组DNA的提取参考庆宁等^[19]的方法,即采用从上海生工生物工程技术有限公司购买的“基因组DNA抽提试剂盒”所示方法,略有改动。PCR反应体系:反应体系约25 μ L,按顺序分别将PCR Master Mix 12.5 μ L、Primer1 3 μ L、Primer2 3 μ L、模板DNA 4 μ L及灭菌双蒸水 2.5 μ L混合,每一次反应都用ddH₂O代替模板DNA做阴性对照。反应在PTC100或PTC200型PCR仪上进行,具体扩增程序如下:A:95 $^{\circ}$ C预变性4min,B:94 $^{\circ}$ C变性40sec,C:58 $^{\circ}$ C退火45sec,D:72 $^{\circ}$ C延伸1min,E:重复步骤B—D45次;F:最后72 $^{\circ}$ C延伸10min。PCR及测序所用引物均为通用引物L14724和H15915,由上海英骏生物技术有限公司合成,其序列分别为:L14724:5'-GACTTG AAA AACCAC CGTTG-3';H15915:5'-CTCCGATCTCCGATTACAAGAC-3'。PCR产物用1%琼脂糖电泳检验目的片段后,将PCR产物送上海生工生物工程技术有限公司纯化并测序。

1.3 数据分析

对测得的序列使用Clustal X 1.81软件进行排序比对并辅以人工校对。用软件MEGA 5.0^[20]计算所分析序列的碱基组成。采用Kimura's two-parameter模型计算遗传距离,并采用该软件中的邻接法(Neighbor-joining method, NJ),以似鲮(*Pseudogobio vaillanti*)作为外类群,构建分支系统树。用软件DNAsp 5.0^[21]对各种种群序列的多样性进行分析,统计核苷酸多样性(Nucleotide diversity, π)与单倍型多样性(Haplotype diversity, h),并以此估计不同水系种群的遗传多样性;并利用该软件进行错配分布(Mismatch-distribution)分析及Tajima's D和Fu and Li's检验,以检验种群是否发生过扩张。使用Network 4.6软件,以Median-joining法构建各单倍型之间网络关系图,并对图中各个单倍型进行群体对应关系分析。利用Arlequin Ver 2000^[22]软件进行分子变异分析(AMOVA),测试种群间与地理区间遗传变异程度。

2 结果与分析

2.1 Cyt *b* 基因的序列变异

本研究共得到 148 尾唇鲮与间鲮的 Cyt *b* 基因全序列,序列长 1140bp,无碱基的插入或缺失,Cyt *b* 基因所有序列中,共 128 个变异位点,占全序列的 11.23%,其中 14 个为单个多态位点,114 个为简约信息位点。大多数的变异发生在密码子第 3 位(82.81%),第 1 位(14.02%)和第 2 位(3.12%)的变异较低。唇鲮与间鲮在 Cyt *b* 序列中 A、C、T、G 平均含量分别为 27.5%、28.4%、28.4%和 15.6%,G 的含量明显低于其他 3 种碱基含量,表现出很强的碱基组成偏向性。其中 A+T 的含量 55.9%,G+C 的含量为 44.0%,A+T 的含量明显高于 G+C 的含量。

2.2 Cyt *b* 基因的单倍型多样性和遗传多样性

在唇鲮 56 尾样本中,检测出 19 个单倍型,其中 17 个为特有单倍型,2 个为与间鲮共享的单倍型;间鲮 92 尾样本,检测出 24 个单倍型,其中 22 个为独有单倍型,2 个为与唇鲮共享的单倍型(表 1)。在全部 148 尾样本中,共检测出了 41 个单倍型,单倍型多样性为 0.954。

在一些不同的种群中,存在共享单倍型,表明这些种群的亲缘关系十分密切。其中海南岛三大水系之一南渡江(NAN)、广东西部独立入海水系漠阳江(MOY)及珠江水系第二大支流北江(BEI)的种群共享单倍型 NAN1-MOY1-BEI5;西江支流桂江(GUI)和柳江(LIU)的间鲮种群与长江水系支流湘江(XIA)的唇鲮种群共享单倍型 GUI1-LIU1-XIA1。

单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(π)分析表明(表 1),148 尾唇鲮和间鲮样本的单倍型多样性为 0.954,核苷酸多样性为 0.02153,遗传多样性较高。核苷酸多样性(π)分析表明(表 1),湘江、桂江、北江、东江、九龙江、闽江种群的核苷酸遗传多样性较高,均在 0.002 以上。

2.3 种群间遗传距离及遗传分化

统计表明,唇鲮和间鲮之间的遗传距离为 3.2%,两者遗传差异不大。表 2 分别显示了不同水系的唇鲮与间鲮基于 Cyt *b* 基因的遗传距离和遗传分化指数。由表 2 可知,在各地地理区(如海南岛地区、东南地区等)和水系内部(如长江水系和珠江水系)的遗传距离、遗传分化指数较低;珠江水系和长江水系的遗传距离、遗传分化指数亦较低。在唇鲮和间鲮各个种群之间,韩江、九龙江和闽江种群与其他各种群的遗传距离较大,遗传分化指数较高,而余下各种群之间的遗传距离和遗传分化指数则较低。

2.4 系统发育分析

为更好地了解中国南方地区唇鲮与间鲮各种群之间的亲缘关系,以似鲃为外类群,对 148 尾样品的 Cyt *b* 基因中的 41 个单倍型进行系统发育分析,利用最大邻接法(NJ)构建分子系统发育树(图 1)。

在我国南方的唇鲮与间鲮种群间,聚成 I 和 II 两支。韩江和九龙江的全部样本组成了 I 支,而其他水系的样本则组成了 II 支,支系 I 和 II 之间的遗传距离为 5.1%,这说明韩江和九龙江种群已和其他种群发生了一定程度的遗传分化。在 II 支中,又可分为 A 和 B 个两姐妹群。A 群包含了海南岛三大水系、漠阳江、柳江、贺江、北江、钱塘江和瓯江的全部样本及桂江、东江、湘江和闽江的部分样本;B 群则包含了沅江的全部样本及桂江、湘江和闽江的部分样本。在支系 II 的 A 群中,又可分为 A1 和 A2 两个姐妹群。A1 有两个分支,分别为海南岛三大水系、漠阳江的全部样本和北江水系一尾样本组成一个分支,说明海南岛三大水系种群与漠阳江水系种群的亲缘关系较近;而贺江、柳江的全部标本及湘江、北江和东江的部分样本组成另一支,这则说明珠江水系三大支流之间的遗传差异不大,而珠江水系与湘江水系之间的遗传差异亦较低。A2 则包含了钱塘江、瓯江的全部样本及闽江部分样本和东江的一尾样本。

就唇鲮与间鲮这两个物种而言,除了支系 I 全部为唇鲮、A1 其中的一个分支全部为间鲮之外,其余均含有唇鲮与间鲮两个物种,这也说明两者间遗传差异不大。

2.5 单倍型网络分析

图 2 显示了中国南方唇鲮和间鲮基于 Cyt *b* 基因的单倍型网络亲缘关系,大多数单倍型之间的变异为

表 1 唇鲮与间鲮的样品信息及基于 Cyt b 基因的遗传多样性分析
Table 1 Sampling localities, Numbers and Genetic Diversity of Cyt b gene of *H. labeo* and *H. medius* in different areas

物种 Species	水系 River systems	采集地 Sample locations	样品数 Sample size	单倍型(个体数) Haplotypes (number of individuals)	变异位点数 Number of polymorphic sites (S)	单倍型数 Number of haplotypes	单倍型多样性 Haplotype diversity (<i>h</i>)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity (π)
间 鲮 <i>H. medius</i>	昌化江(CHJ)	五指山	10	CHJ1(3)、CHJ2(2)、CHJ3(1)、CHJ4(1)、CHJ5(2)	4	5	0.867	0.00121
	南渡江(NAN)	屯昌	9	NAN1-MOY1-BE15*(9)	0	1	0.000	0.00000
	万泉河(WAN)	琼海	9	WAN1(7)、WAN2(2)	1	2	0.389	0.00034
	漠阳江(MOY)	阳春	11	NAN1-MOY1-BE15(10)、MOY2(1)	1	2	0.182	0.00016
	东江(DON)	河源	10	DON1(1)、DON2(1)、DON3(5)、DON4-HEJ1(3)*、	29	4	0.711	0.00532
	北江(BEI)	连州	9	BEI1(1)、BEI2(10)、BEI3(1)、BEI4(1)、	17	5	0.506	0.00224
		始兴	5	NAN1-MOY1-BE15(1)				
	贺江(HEJ)	贺州	11	DON4-HEJ1(4)、HEJ2(7)	1	2	0.509	0.00045
	桂江(GUI)	桂林	6	GUI1-LIU1-XIA1(4)*、GUI2-XIA2(1)*、GUI3(2)、	30	5	0.806	0.00614
		荔浦	3	GUI4-LIU2(1)*、GUI5(1)				
	柳江(LIU)	从江	3	GUI1-LIU1-XIA1(3)、GUI4-LIU2(2)、LIU3(4)	4	3	0.667	0.00137
		永福	6					
	韩江(HAN)	上杭	10	HAN1(8)、HAN2(1)、HAN3(1)	3	3	0.378	0.00053
	九龙江(JIU)	漳平	5	JIU1(2)、JIU2(3)	1	2	0.600	0.03072
	闽江(MIN)	邵武	9	MIN1(2)、MIN 2(1)、MIN 3(1)、MIN 4(2)、MIN 5(3)	42	5	0.861	0.01652
	湘江(XIA)	全州	9	GUI1-LIU1-XIA1(6)、GUI2-XIA2(3)	27	2	0.500	0.01184
唇 鲮 <i>H. labeo</i>	沅江(YUA)	锦屏	7	YUA1(7)	0	1	0.000	0.00000
	信江(XIN)	上饶	3	XIN1(2)、XIN2(1)	1	2	0.667	0.00058
	瓯江(OUJ)	丽水	9	OUJ1(4)、OUJ2(5)	2	2	0.500	0.00088
	钱塘江(QIA)	开化	4	QIA1(3)、QIA2(1)	1	2	0.500	0.00044
	合计 Total		148	—	128	41	0.954	0.02153

* 表示此单倍型为不同河流共享单倍型

表 2 不同水系的唇鲮与间鲮 Cyt b 基因遗传距离(对角线下方)和遗传分化指数(% 对角线上方)

Table 2 Genetic Distance(below diagonal) and genetic variation value (above diagonal) of Cyt b of <i>H.labeo</i> and <i>H.medius</i> between different drainage systems																	
地域种群 Population	昌化江 CHJ	万泉河 WAN	南渡江 NAN	漠阳江 MOY	柳江 LIU	桂江 GUI	贺江 HEJ	北江 BEI	东江 DON	湘江 XIA	沅江 YUA	信江 XIN	韩江 HAN	九龙江 JIU	闽江 MIN	瓯江 OUJ	钱塘江 QIA
昌化江 CHJ	—	0.915	0.949	0.92	0.884	0.681	0.929	0.756	0.662	0.456	0.978	0.967	0.972	0.98	0.665	0.951	0.96
万泉河 WAN	0.014	—	0.857	0.75	0.831	0.532	0.917	0.604	0.544	0.263	0.984	0.968	0.973	0.982	0.601	0.951	0.962
南渡江 NAN	0.014	0.003	—	0	0.882	0.582	0.96	0.643	0.586	0.308	1	0.984	0.981	0.991	0.623	0.968	0.981
漠阳江 MOY	0.014	0.004	0.000	—	0.845	0.563	0.923	0.612	0.569	0.3	0.984	0.969	0.972	0.982	0.613	0.952	0.963
柳江 LIU	0.016	0.010	0.010	0.010	—	-0.062	0.421	0.033	0.089	-0.023	0.955	0.933	0.957	0.967	0.542	0.913	0.917
桂江 GUI	0.019	0.013	0.013	0.013	0.006	—	0.165	-0.026	-0.023	-0.39	0.746	0.768	0.865	0.876	0.318	0.75	0.728
贺江 HEJ	0.016	0.011	0.011	0.012	0.003	0.007	—	0.216	0.031	0.067	0.983	0.964	0.972	0.982	0.581	0.945	0.957
北江 BEI	0.015	0.008	0.008	0.008	0.005	0.009	0.005	—	0.057	-0.069	0.882	0.863	0.917	0.927	0.486	0.844	0.835
东江 DON	0.021	0.015	0.016	0.016	0.008	0.012	0.007	0.010	—	-0.114	0.762	0.644	0.855	0.863	0.332	0.673	0.627
湘江 XIA	0.023	0.017	0.017	0.018	0.013	0.013	0.013	0.014	0.017	—	0.129	0.541	0.707	0.72	-0.116	0.532	0.491
沅江 YUA	0.033	0.027	0.028	0.028	0.027	0.021	0.026	0.026	0.027	0.014	—	0.986	0.979	0.989	0.389	0.974	0.986
信江 XIN	0.035	0.028	0.028	0.029	0.024	0.026	0.025	0.026	0.019	0.027	0.033	—	0.977	0.984	0.525	0.919	0.929
韩江 HAN	0.059	0.051	0.049	0.050	0.050	0.048	0.050	0.049	0.052	0.045	0.043	0.059	—	0.857	0.766	0.968	0.976
九龙江 JIU	0.059	0.051	0.050	0.050	0.050	0.048	0.050	0.050	0.052	0.046	0.043	0.058	0.009	—	0.776	0.976	0.984
闽江 MIN	0.030	0.024	0.025	0.025	0.022	0.021	0.022	0.023	0.023	0.019	0.019	0.023	0.049	0.049	—	0.566	0.529
瓯江 OUJ	0.033	0.027	0.028	0.028	0.024	0.025	0.025	0.026	0.023	0.028	0.034	0.016	0.058	0.056	0.026	—	0.8
钱塘江 QIA	0.029	0.023	0.024	0.024	0.020	0.022	0.020	0.022	0.018	0.025	0.032	0.012	0.057	0.056	0.023	0.007	—

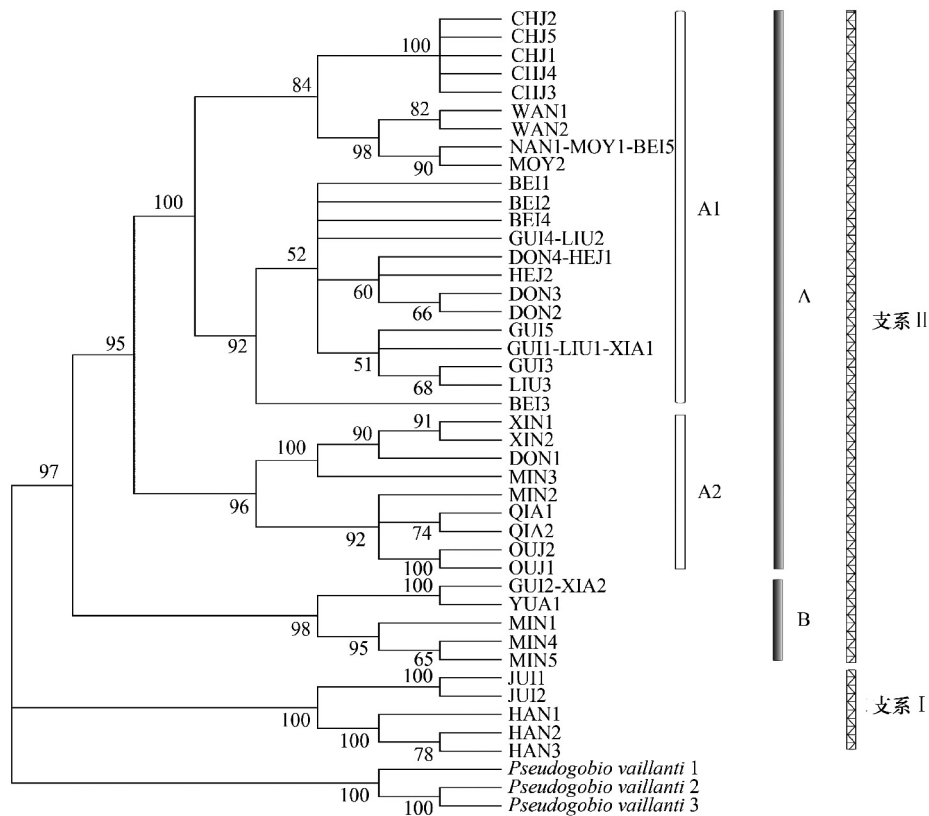


图1 唇鲮与间鲮中国南方种群基于 Cyt b 基因的最大邻接 NJ 树

Fig.1 Neighbor-joining tree of *H. laeo* and *H. medius* populations of south China based on Cyt b gene

1—7 步,遗传差异不大。但是桂江和湘江种群的共享单倍型 GUI2-XIA2 与韩江和九龙江种群之间的变异近 40 步;桂江与钱塘江、瓯江与闽江种群的变异达约 20 步,表明这些种群的单倍型间存在一定的遗传分化。

单倍型网络图还揭示,桂江及柳江水系种群与长江水系支流湘江水系种群的亲缘关系十分密切,两者具有共享单倍型且各个单倍型之间的变异不大;海南岛三大水系的种群与漠阳江种群的亲缘关系比较密切;钱塘江、瓯江及闽江种群的亲缘关系亦较为密切;韩江与九龙江种群的亲缘关系较近;而我国东南部水系闽江的种群不仅与长江水系支流湘江、沅江的关系较近,且与珠江水系支流东江、长江水系支流信江种群的关系亦较密切。这与 NJ 树的结果相似。从单倍型网络图推测,西江可能为珠江水系、漠阳江水系和海南岛水系间鲮种群的扩散中心,其中一支往东向北江和东江扩散;另一支往南向海南岛扩散,海南岛种群尔后在第四纪冰期海退时向北扩散至漠阳江水系及珠江水系。

2.6 分子变异分析(AMOVA)

为了解唇鲮和间鲮种群分子变异的分布模式,根据系统发育分析及单倍型网络分析的结果,将唇鲮和间鲮 17 个水系的种群分成 5 个地理区,进行分子变异分析(AMOVA)。地理区的划分主要根据各种种群亲缘关系的亲疏及地理位置,其中海南岛的南渡江、万泉河、昌化江和漠阳江为一地理区;珠江水系为一地理区,包括西江支流柳江、桂江、贺江、珠江另外两条支流北江及东江;长江水系为一地理区,包括湘江、沅江及信江;韩江和九龙江为一地理区;闽江、瓯江和钱塘江为一个地理区。AMOVA 分析分析表明,唇鲮和间鲮地理区之间变异约占 54.50%,地理区内种群间约占 18.64%,种群内的变异占 26.86%(表 3)。这说明,唇鲮和间鲮种群 Cyt b 的遗传分化主要是来自地理区之间。

2.7 种群动态分析

除了昌化江、桂江、北江、东江、闽江等种群外,其他种群的单倍型数目未达到 4,故无法计算 Fu and Li's D 和 Tajima's D 值。对唇鲮和间鲮的全部种群、唇鲮种群和间鲮种群进行错配分析发现,全部种群、唇鲮及间

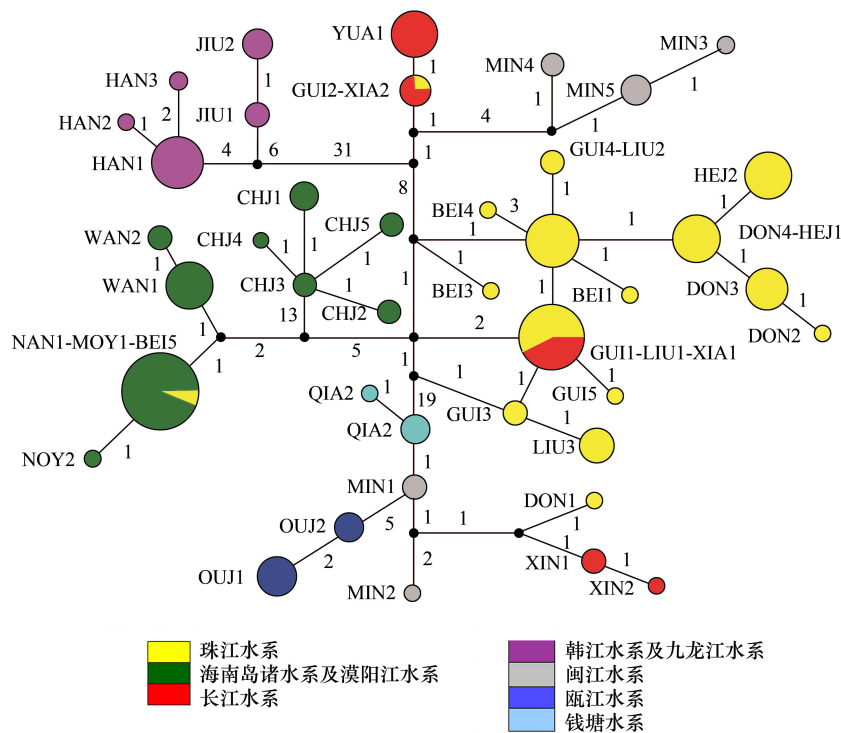


图 2 唇鲮与间鲮中国南方种群基于 Cyt *b* 基因的单倍型网络图

Fig.2 Minimum spanning network of Cyt *b* sequences of *H.labeo* and *H.medius* populations of south China

鲮种群均呈现多峰分布,说明其均没有发生过明显的扩张。而中性检验也显示,全部种群、唇鲮及间鲮种群的 Fu and Li's D 和 Tajima's D 值均没有呈现显著的负值,表明其在历史上均没有发生过明显的扩张(表 4)。表 4 还表明,两个支系的 Fu and Li's D 和 Tajima's D 值均没有呈现显著的负值,这说明两个支系亦未发生过扩张。

表 3 唇鲮和间鲮分子变异分析

Table 3 Analysis of molecular variance among populations of <i>H.labeo</i> and <i>H.medius</i>				
变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	平方和 Sum of squares	变异组成 Variance components	变异百分比 Percentage of variation
地理区间 Among regions	4	360.707	8.63241	54.50
地理区内种群间 Among populations within regions	12	146.648	2.95234	18.64
种群内 Within populations	31	131.917	4.25538	26.86
合计 Total	47	639.271	15.84012	100.00

表 4 唇鲮与间鲮种群基于 Cyt *b* 基因的 Tajima's D 和 Fu and Li's D 检验

Table 4 Tajima's D and Fu and Li's D test of <i>H.labeo</i> and <i>H.medius</i> populations based on Cyt <i>b</i> gene			
群体 Group		Tajima 氏 D 检验统计量 Tajima's D test statistic	Fu 和 Li 氏 D 检验统计量 Fu and Li's D test statistic
物种 Species	唇鲮 <i>Hemibarbus labeo</i>	0.99262 ($P>0.10$)	0.84816 ($P>0.10$)
	间鲮 <i>Hemibarbus medius</i>	-2.06328 ($0.10>P>0.05$)	-1.31500 ($P>0.10$)
支系 Clade	支系 I Clade I	-0.21221 ($P>0.10$)	-0.01561 ($P>0.10$)
	支系 II Clade II	-0.14875 ($P>0.10$)	0.88451 ($P>0.10$)
种群 Populations	昌化江 CHJ	-0.09820 ($P>0.10$)	-3.57770 ($P<0.05$)
	桂江 GUI	-1.14229 ($0.10>P>0.05$)	-0.08014 ($P>0.10$)
	北江 BEI	-1.04473 ($P>0.10$)	-0.83231 ($P>0.10$)
	东江 DON	-0.86098 ($P>0.05$)	0.75912 ($P>0.10$)
	闽江 MIN	0.93385 ($P>0.10$)	0.69285 ($P>0.10$)
	总体 Total	-0.14875 ($P>0.10$)	0.35374 ($P>0.10$)

就各个水系的种群而言,桂江、北江、东江、闽江等种群的 F_u and L_i 's D 和 Tajima's D 均不为显著的负值,说明这几个种群亦相对稳定,没有发生过扩张;而昌化江(CHJ)的 F_u and L_i 's D 为显著的负值,而 Tajima's D 则不显著,但其错配分析图为单峰分布(图 3),所以可以推测昌化江种群曾发生过种群扩张。

3 讨论

3.1 间鲮物种有效性

在本研究中,遗传距离分析表明,唇鲮和间鲮之间的遗传距离为 3.2%,低于唇鲮种内各种群间的最大遗传距离(韩江与信江,5.9%)。系统分析显示,间鲮并未形成单系群,而是与部分唇鲮种群组成一支,而韩江和九龙江的唇鲮组成了另一支。单倍型分布分析显示,湘江唇鲮种群的所有单倍型均与桂江或柳江的间鲮种群共享,湘江、桂江和柳江种群的遗传差异极小。系统发育分析及单倍型网络图还显示,除了唇鲮的湘江、沅江种群与间鲮的桂江、柳江种群的亲缘关系较近外,唇鲮的信江和闽江种群与间鲮的东江种群亦有着较近的亲缘关系。此外,蓝昭军基于多变量形态度量学的研究亦表明,唇鲮和间鲮存在一定的形态差异,但各个种群间存在梯度变异,差异并不显著,无法截然分开^[23];而林龙峰基于线粒体 CO I 和 ND5 基因分

别对中国南方唇鲮与间鲮的种群遗传分化进行了研究,结果均表明间鲮与唇鲮之间的遗传差异较小,两者存在共享单倍型,且间鲮不能单独构成单系群,而是与唇鲮部分样本构成一个分支^[24]。因此,综合考虑基于线粒体 Cyt b、CO I 和 ND5 基因和多变量形态度量学的分析结果,我们认为唇鲮和间鲮之间的遗传差异未达到种级水平,间鲮应为唇鲮的次定同物异名。

3.2 韩江、九龙江种群与其他种群间的遗传分化

系统发育分析显示,在我国南方的唇鲮与间鲮种群间,可以分成 I 和 II 两支。韩江和九龙江种群遗传差异不大,两条江的全部样本组成了 I 支,而其他种群的样本则组成了 II 支,两支系之间的遗传距离为 5.1%,这说明韩江和九龙江种群已和其他种群发生了一定程度的遗传分化。林弘都^[25]和梁晓旭等^[26]对部分淡水鱼类的研究亦表明,华南大陆东部的莲花山脉是粤东地区的一个重要地理屏障,而庆宁等^[27]对华南地区黑眶蟾蜍(*Bufo Melanostictus*)的研究亦得出了相似的结果。

韩江是广东省东部地区的最大河流,其有东西两源,东源称梅江,发源于莲花山脉北麓;西源称汀江,发源于武夷山南麓。莲花山脉位于广东省东北部,其山势由粤北部的大埔向西南一直延伸到香港附近,最高峰为铜鼓障,高 1559 m;整个山脉高度基本在 980—1 170 m 之间^[28]。九龙江为福建省第二大水系,发源于福建玳瑁山南麓。由此可知,韩江和九龙江被莲花山、武夷山、玳瑁山等较高的山脉环绕,将其与珠江水系、长江水系及闽江水系隔离。据此,我们推测:一方面,由于莲花山、武夷山、玳瑁山等山脉的隔离,韩江和九龙江的种群无法与其他种群进行基因交流,因而产生了相对较大的遗传分化;另一方面,韩江和九龙江在冰期海退时,可能曾发生过连接,使得两种群之间得以基因交流,因而遗传差异不显著。

3.3 珠江及长江种群间的遗传分化

分子系统发育分析显示,除湘江与桂江和柳江种群的亲缘关系较近以及东江少数样本与信江、闽江种群的亲缘关系较近外,唇鲮和间鲮剩下的绝大部分单倍型则分别归入了不同的分支之内。这表明,在唇鲮和间鲮分布区之间,可能存在地理障壁,造成其不同的分布范围,而这一地理障壁可能为长江水系和珠江水系的分水岭之一——南岭山脉。南岭山脉由越城岭、都庞岭、萌渚岭、骑田岭和大庾岭 5 条主要山岭所组成。其横

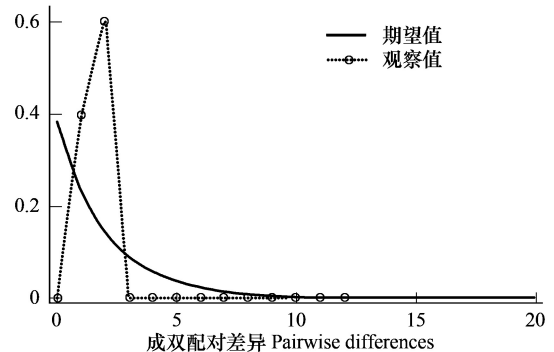


图 3 昌化江种群的歧点分布分析图(其中实线代表期望值,虚线代表观察值)

Fig.3 Mismatch-distribution analysis of *H. medius* of Changhuajiang population of mtDNA haplotype sequences (solid lines represent the distribution expected under constant population size, and dotted lines represent the observed distribution)

亘在湘桂、湘粤、赣粤之间,向东延伸至闽南,东西长约 600km,南北宽约 200km。广义的南岭还包括苗儿山、海洋山、九嶷山、香花岭、瑶山、九连山等。有研究表明,南岭山脉在 11.06—8.04 百万年前已经形成^[29],但在隆起初期,其高度相对较低,可能不足以阻隔两侧的淡水鱼类的基因交流。而在青藏高原隆起的时期,南岭山脉也呈加速隆起之势^[25]。南岭的加速隆起,可能使其成为了南岭以北水系与南岭以南水系间的地理障壁,因而限制了南北两侧水系种群的基因交流,使得其两侧的种群产生了遗传分化,进而形态上也发生了一定程度的分化。

在本研究中,多种分析结果亦显示,长江水系支流湘江、沅江及信江的唇鲮种群与珠江水系间鲮种群的亲缘关系较近,其中湘江与沅江的种群在系统发育树中与桂江和柳江的亲缘关系均较近;而东江的部分样本则与信江种群的亲缘关系较近。在 Li 等对马口鱼(*Opsariichthys bidens*)的研究^[30]及 Yang 等对大鳍鱬(*Hemibagrus macropterus*)的研究^[31]中,其结果均显示珠江水系的种群与长江水系的种群亲缘关系较近。

我们推测,造成这种情况的原因可能有二,一是由于地壳运动、洪水泛滥等原因,使长江水系和珠江水系在历史上曾发生过袭夺事件或连接事件,使长江南部支流上游的部分支流被珠江袭夺或与珠江水系支流相连接,从而使两水系种群得以基因交流;二是水利枢纽工程的影响,在湘江水系与桂江水系上游,有一条建成已有 2200 多年人工运河——灵渠将两江联通^[32],这也可能促进长江水系与珠江水系种群的基因交流。

3.4 海南岛种群的起源、扩散及隔离

从唇鲮和间鲮单倍型的分布可知,海南岛的南渡江水系、广东西部水系漠阳江及北江水系共享一个单倍型,表明三种群间亲缘关系较近。在单倍型网络图中,单倍型 WAN1 与桂江、柳江和湘江的共享单倍型 GUI1-LIU1-XIA1 及桂江的单倍型 GUI3 之间的变异均较小,约为 10 步,表明这些单倍型间有着较近的亲缘关系;万泉河的单倍型 WAN1 与南渡江、漠阳江和北江的共享单倍型 NAN1-MOY1-BEI5 只有 3 步,两者之间亦有着很近的亲缘关系。此外,单倍型网络图还显示,海南岛中部山脉以东的南渡江和万泉河种群与西边的昌化江种群之间关系相对较远(16 步)。

有关华南沿海地质构造的研究显示,在第四纪时,琼州海峡至少经历过 4 次海侵与海退^[33];而在第四纪冰期,由于海平面下降,华南沿海的海岸线在海南岛以南,海南岛北部均为辽阔的滨海平原^[34];在更新世,在海南岛和越南之间是一片陆地,其间有一条联系西江、广西、越南沿海和海南岛诸水系的古河道^[35]。有鉴于此,结合本研究系统发育分析及单倍型网络图等研究结果,海南岛的间鲮种群有可能为西江水系的种群沿着上述这一古河道扩散而来,然后进一步在海南岛内扩散。随后,由于海平面的上升,海南岛与大陆隔离,因而使海南岛种群与大陆种群的基因交流受到了限制,发生了遗传分化。而到了晚更新世冰期时,由于海退等原因,雷州半岛与海南岛连成一片山地丘陵^[36],这使得海南岛的种群得以向北扩散,到达雷州半岛,进而扩散至漠阳江水系,并重新回到珠江水系。间鲮的这一扩散途径,与海南纹胸鮡(*Glyptothorax hainanensis*)^[37]及中间黄颡鱼(*Pelteobagrus intermedius*)^[38]有相似之处。

在林宗键和 Lin 等对唇鲮的亲缘地理研究中,基于线粒体控制区序列的分析结果显示,海南岛昌化江种群(实为间鲮)与长江中游种群的亲缘关系较其与广东东部水系榕江种群的关系近,而昌化江与长江的距离远大于其与榕江的距离,他们认为其原因是长江和海南岛的水系曾通过古红河水系发生过连接^[17-18]。值得指出的是,在 Lin 等的研究中,并没有采集珠江水系的样本,而海南岛也只有昌化江水系的样本。在本研究中,也发现海南岛三大水系种群与长江水系种群的亲缘关系近于其与韩江和九龙江水系种群的亲缘关系。由于韩江与榕江的地理位置很近,故此该结果与 Lin 等的相似。可以认为,造成本研究及 Lin 等所述之结果的另一重要原因是海南岛的种群由西江水系种群沿着古河道扩散而来,而西江曾与长江水系发生过袭夺或连接事件,其种群与长江水系种群亲缘关系较近。因此,这一现象进一步印证了我们对海南岛种群来源及扩散之推测。

另一方面,在海南岛内部,单倍型网络图显示昌化江种群与万泉河及南渡江种群的变异达到 16 步,说明昌化江种群与其他两种群之间,发生了一定的遗传分化。地质研究表明,在第三纪末期,海南岛中部山地已经

形成,在多雨山区发源的河流也四散分流,独自入海,不相联系汇合^[39]。在间鲮扩散至海南岛各主要水系后,可能由于海南岛中部山地,如五指山等的隆起,将海南岛西部的昌化江种群与东部的万泉河及南渡江种群隔离,进而使昌化江种群产生了分化。而左艳玲等基于线粒体 DNA 控制区序列对拟平鳅(*Liniparhomaloptera disparis*)的研究也表明:拟平鳅的昌化江种群与南渡江和万泉河的种群亦存在较大的遗传分化^[40]。因此,本研究的结果进一步说明了海南岛中部山脉可能对海南岛的淡水鱼类存在着较为广泛的隔离。

致谢:华南师范大学陈湘舜教授和庆宁教授帮助实验方案设计及修改,林弘都博士和张雄同学参与了部分样品的采集,Radhakrishnan 博士帮助写作,特此致谢。

参考文献(References):

- [1] Hewitt G. The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature*, 2000, 405(6789): 907-913.
- [2] Angers B, Magnan P, Plante M, Bernatchez L. Canonical correspondence analysis for estimating spatial and environmental effects on microsatellite gene diversity in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Molecular Ecology*, 1999, 8(6): 1043-1053.
- [3] Keyghobadi N, Roland J, Strobeck C. Influence of landscape on the population genetic structure of the alpine butterfly *Parnassius smintheus* (Papilionidae). *Molecular Ecology*, 1999, 8(9): 1481-1495.
- [4] Castric V, Bonney F, Bernatchez L. Landscape structure and hierarchical genetic diversity in the brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Evolution*, 2001, 55(5): 1016-1028.
- [5] Cassel A, Tammaru T. Allozyme variability in central, peripheral and isolated populations of the scarce heath (*Coenonympha hero*; Lepidoptera, Nymphalidae); implications for conservation. *Conservation Genetics*, 2003, 4(1): 83-93.
- [6] Costello A B, Down T E, Pollard S M, Pacas C J, Taylor E B. The influence of history and contemporary stream hydrology on the evolution of genetic diversity within species: an examination of microsatellite DNA variation in bull trout, *Salvelinus confluentus* (Pisces: Salmonidae). *Evolution*, 2003, 57(2): 328-344.
- [7] Hewitt G M. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1996, 58: 247-276.
- [8] 乐佩琦. 鲮和间鲮属鱼类的分类整理(鲤形目: 鲤科). *动物分类学报*, 1995, 20(1): 116-123.
- [9] 陈宜瑜. 中国动物志硬骨鱼纲鲤形目(中卷). 北京: 科学出版社, 1998: 239-241.
- [10] 伍献文. 中国鲤科鱼类志(下卷). 上海: 上海人民出版社, 1977: 439-537.
- [11] 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. 南宁: 广西人民出版社, 1981: 112-113.
- [12] 中国水产科学研究院珠江水产研究所等. 海南岛淡水及河口鱼类志. 广州: 广东科学技术出版社, 1986: 93-94.
- [13] 郑慈英. 珠江鱼类志. 北京: 科学出版社, 1989: 119-121.
- [14] 中国水产科学研究院珠江水产研究所等. 广东淡水鱼类志. 广州: 广东科技出版社, 1991.
- [15] Yang J Q, He S P, Freyhof J, Witte K, Liu H Z. The Phylogenetic Relationships of the Gobioninae (Teleostei: Cyprinidae) Inferred from Mitochondrial Cytochrome b Gene Sequences. *Hydrobiologia*, 2006, 553(1): 255-266.
- [16] 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(第二版). 南宁: 广西人民出版社, 2006: 193-195.
- [17] 林宗键. 唇鲮和间鲮的亲缘地理研究. 台湾: 国立成功大学, 2009.
- [18] Lin C J, Lin H D, Wang J P, Chao S C, Chiang T Y. Phylogeography of *Hemibarbus labeo* (Cyprinidae): secondary contact of ancient lineages of mtDNA. *Zoologica Scripta*, 2010, 39(1): 23-35.
- [19] 庆宁, 丘城锋, 廖伟群, 马天峰, 梁晓旭, 列金妮. 华南沿海西部美丽小条鳅基于线粒体控制区的种群遗传变异及亲缘地理格局. *生态学报*, 2010, 30(1): 258-264.
- [20] Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 2008, 9(4): 299-306.
- [21] Librado P, Rozas J. DNASP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [22] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 1992, 131(2): 479-491.
- [23] 蓝昭军. 中国南方唇鲮和间鲮的种群分化、亲缘地理及间鲮的生物学特征[D]. 广州: 华南师范大学, 2011.
- [24] 林龙峰. 基于 COI 和 ND5 序列的中国南方唇鲮和间鲮种群遗传变异与亲缘地理分析[D]. 广州: 华南师范大学, 2014.
- [25] 林弘都. 台湾与中国大陆地区鲤科鱼类之亲缘地理研究[D]. 台湾: 国立成功大学, 2008.

- [26] 梁晓旭, 庆宁, 杨柯林, 万彩霞, 赵俊, 陈湘舜. 广东地区宽鳍鱮种群遗传变异和亲缘地理. 水生生物学报, 2010, 34(4): 806-814.
- [27] 庆宁, 马天峰, 梁晓旭, 林弘都, 卢文华, 盐司槽. 华南地区黑眶蟾蜍的遗传变异和地理分化. 动物分类学报, 2011, 36(2): 356-367.
- [28] 曾昭璇, 黄伟峰. 广东自然地理. 广州: 广东人民出版社, 2001.
- [29] 地质矿产部《南岭项目》构造专题组. 南岭区域构造特征及控岩控矿构造研究. 北京: 地质出版社, 1988.
- [30] Li G Y, Wang X Z, Zhao Y H, Zhang J, Zhang C G, He S P. Speciation and phylogeography of *Opsariichthys bidens* (Pisces: Cypriniformes: Cyprinidae) in China: analysis of the cytochrome b gene of mtDNA from diverse populations. Zoological Studies, 2009, 48(4): 569-583.
- [31] Yang L, Mayden R L, He S P. Population genetic structure and geographical differentiation of the Chinese catfish *Hemibagrus macropterus* (Siluriformes, Bagridae): evidence for altered drainage patterns. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2009, 51(2): 405-411.
- [32] 宗凤书. 灵渠地质地貌初步研究. 中国岩溶, 1990, 9(1): 88-93.
- [33] 赵焕庭, 王丽荣, 袁家义. 琼州海峡成因与时代. 海洋地质与第四纪地质, 2007, 27(2): 33-40.
- [34] 张虎男, 陈伟光. 华南沿海新构造运动与地质环境. 北京: 地震出版社, 1990.
- [35] Harold K V. Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations. Journal of Biogeography, 2000, 27(5): 1153-1167.
- [36] 中国科学院南海海洋研究所海洋地质研究室. 华南沿海第四纪地质. 北京: 科学出版社, 1978.
- [37] Chen X L, Chiang T Y, Lin H D, Zheng H S, Shao K T, Zhang Q, Hsu K C. Mitochondrial DNA phylogeography of *Glyptothorax fokiensis* and *Glyptothorax hainanensis* in Asia. Journal of Fish Biology, 2007, 70(S): 75-93.
- [38] 庆宁, 吕凤义, 廖伟群, 赵俊, 丘城锋. 中间黄颡鱼群体遗传变异与亲缘生物地理. 动物学报, 2007, 53(5): 845-852.
- [39] 曾昭璇, 曾宪中. 海南岛自然地理. 北京: 科学出版社, 1989.
- [40] 左艳玲, 林岳光, 梁晓旭, 马天峰, 庆宁. 基于 mtDNA 控制区序列的拟平鳅遗传变异和种群分化. 水产学报, 2009, 33(6): 925-931.