

DOI: 10.5846/stxb201805081022

陈佳琪, 李潮, 张雯君, 李炜, 高天扬, 赵俊. 海南岛宽额鳢 (*Channa gachua*) 的群体遗传变异与生物地理过程. 生态学报, 2019, 39(7): - .

Chen J Q, Li C, Zhang W J, Li W, Gao T Y, Zhao J. Genetic variation and phylogeography of *Channa gachua* in Hainan Island. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(7): - .

海南岛宽额鳢 (*Channa gachua*) 的群体遗传变异与生物地理过程

陈佳琪, 李 潮, 张雯君, 李 炜, 高天扬, 赵 俊*

广州市亚热带生物多样性与环境生物监测重点实验室, 广东省水产健康安全养殖重点实验室, 广东省水产优质环保养殖工程技术研究中心, 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631

摘要: 为了解海南岛宽额鳢 (*Channa gachua*) 的群体遗传分化和亲缘生物地理过程, 采集了云南元江和海南岛 5 个水系 (昌化江、陵水河、藤桥河、万泉河及南渡江) 共 6 个种群 168 个宽额鳢个体, 基于线粒体细胞色素 *b* (Cyt *b*) 基因全序列 (1142 bp) 对其遗传多样性和遗传分化程度进行了评估, 并探讨了地质和气候等因素如何塑造了这一物种的亲缘地理结构及演化历史。基于 Cyt *b* 序列构建的系统树结果将所有个体分成两个主要谱系 (A 和 B), 谱系 A 包括海南岛所有种群, 其中, 部分昌化江个体形成独立的亚支 (A2), 其余个体聚为另一亚支 (A1), 谱系 B 为云南元江的全部个体, 各谱系间的遗传分化指数均较高。种群历史动态分析表明, 各谱系均没有发生种群扩张, 但 A1 亚支与谱系 B 曾在约 1 万年前发生过有效种群数量减小的事件。根据研究结果推测, 更新世冰期期间, 北部湾因海平面下降而暴露, 大陆和海南岛的水系发生接触, 越南北部水系 (包括元江/红河) 通过一条联系雷州半岛和海南岛的古河道流入南海, 因而冰期期间宽额鳢有机会从元江 (红河) 扩散至海南岛西南部, 随后在海南岛内部, 宽额鳢进一步扩散, 并以五指山为种群间基因交流的重要地理障碍, 各水系间种群发生基因交流和遗传分化。

关键词: 海南岛; 云南元江 (红河); 宽额鳢; 细胞色素 *b* 基因; 遗传多样性; 种群历史动态; 生物地理过程

Genetic variation and phylogeography of *Channa gachua* in Hainan Island

CHEN Jiaqi, LI Chao, ZHANG Wenjun, LI Wei, GAO Tianyang, ZHAO Jun*

Guangzhou Key Laboratory of Subtropical Biodiversity and Biomonitoring, Guangdong Provincial Key Laboratory for Healthy and Safe Aquaculture, Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center for Environmentally-friendly Aquaculture, School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract: The small air-breathing fish, *Channa gachua*, is distributed in the shallow regions of the streams and rivers of Yunnan Province and Hainan Island in China. At present, there are limited studies on the genetic differentiation and phylogeography of *C. gachua*. To understand the genetic diversity of *C. gachua* and determine how the geological events and climatic changes have influenced the phylogeographic structures and evolutionary history of this species, 168 specimens were collected from 6 populations in 6 drainages (Changhua, Lingshui, Tengqiao, Wanquan, Nandu, and Red rivers) in Hainan Island and Yunnan province, using the mitochondrial DNA cytochrome *b* gene (1,142 bp) as a molecular marker. The phylogenetic tree showed two major lineages (A and B). Lineage A included all samples from Hainan Island. Among them, some samples of the Changhua River fell into an independent subclade (A2), and the remaining samples were clustered into another subclade (A1); Lineage B contained all samples from the Red River. The genetic differentiation index of *C. gachua* among the different lineages was high. The demographic history indicated that the total populations,

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31772430); 国家科技基础条件平台工作重点项目 (2005DKA21402)

收稿日期: 2018-05-08; **网络出版日期:** 2018-00-00

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

lineage A1, A2, and B have not undergone recent expansion. Bayesian skyline plots showed that the effective population size of lineage A1 and B declined at 0.01 millions of years ago. According to our research, during Pleistocene glaciations, the Gulf of Tonkin was exposed owing to a drop in sea level. The drainages in the mainland and Hainan Island were in contact. Drainages in northern Vietnam (including the Red River) flowed into the South China Sea by a paleochannel connecting the Leizhou Peninsula and Hainan Island. At this time, the exposure of the Gulf of Tonkin gave *C. gachua* a chance for population dispersion between the Red River and southwestern Hainan Island drainage, and subsequently enhanced gene flow between populations in the Hainan Island drainages.

Key Words: Hainan Island; Red River; *Channa gachua*; Cytochrome *b* gene; genetic diversity; demographic history; phylogeography processes

海南岛是我国纬度最低、面积最大的热带岛屿,该岛北以琼州海峡与广东划界,西临北部湾与越南遥望。由于火山作用和海平面上升,海南岛最初在大约 2—2.5 百万年前从大陆中分离出来^[1-2],而地质证据表明,在更新世冰期期间,海南岛与大陆有数次的连接与分离^[3-4]。海南岛的地形复杂,以五指山和鹦哥岭两座山脉为隆起核心,从中部和南部地区陡峭上升,并向北延伸到一个宽阔的平原,水系从中部山区向周围延伸组成辐射状水系。南渡江为最大河系,向北流入琼州海峡,万泉河与陵水河则向东流入南海,昌化江向西流入北部湾,藤桥河向南经三亚藤桥港独立入海。随着 DNA 序列测定技术和生物信息学的发展,近年来学界陆续涉足了海南岛淡水鱼类生物地理与种群遗传的研究,研究表明海南岛受到地理屏障影响的淡水鱼类在种群遗传上普遍存在一定分化,如细尾白甲鱼 (*Onychostoma lepturum*)^[5]、东方墨头鱼 (*Garra orientalis*)^[6] 和拟平鳅 (*Liniparhomaloptera disparis*)^[7] 等。对于海南岛这一大陆性岛屿进行生物地理学研究,可帮助了解生物类群在大陆与岛屿间分布的演化历史,也可以协助了解该岛屿的地质与气候变化历史。

元江(红河)发源于我国云南省,在越南境内自北部湾入海,近年来的古地磁学研究表明,海南岛原属于广西和越南北部^[8-9],从中生代晚期到新生代早期,海南岛沿红河断裂带向东南方向移动和旋转到现在的位置^[10-11],且在 1986 年出版的《海南岛淡水及河口鱼类志》^[12] 中记述了海南岛淡水鱼类与元江及红河水系相同的有 62 种,所以,元江及其与海南岛西南部水系在地质历史上可能存在某种联系,添加元江样本作为本研究的外类群可帮助了解海南岛淡水鱼类的生物地理过程。

宽额鲢 (*Channa gachua* Hamilton, 1822) 亦称南鲢或白边鲢,隶属于鲈形目 (Perciformes) 鲢科 (Channidae) 鲢属 (*Channa*),常在溪流和河沟的浅水区域生活。国内主要分布于海南岛各水系^[12]、云南各江河及其支流等^[13],国外主要分布于印度及东南亚各地^[12]。目前,国内外学者主要对宽额鲢的毒理学^[14-15]、生理学^[16-17]、染色体组型分析^[18]、同工酶^[19] 以及宽额鲢与同属鱼类的亲缘关系^[20-21] 等方面开展了一些研究。

遗传变异和种群遗传结构的量化对于改善自然种群的管理和保护至关重要^[22],但是对于宽额鲢这一物种内的遗传分化和亲缘地理的研究,目前为止国内仅有一篇关于宽额鲢遗传变异的报道^[23],该文章主要测定了云南澜沧江和海南岛南渡江、万泉河与昌化江 4 个水系宽额鲢的线粒体控制区序列,结果表明云南组群和海南组群间高度分化。然而,该研究对于海南岛种群的地理覆盖范围相对缺乏,仅选取了三个水系,且在与海南岛淡水鱼类的亲缘关系上,云南元江相比澜沧江更能说明海南岛的历史生物地理过程。此外,鱼类 Cyt *b* 基因的长度为 1140 bp 左右,它的结构与功能在 mtDNA 的 13 个蛋白质编码基因中被了解得最清楚,而且进化速率适中,被认为是解决分类和系统进化问题最可信的分子标记之一^[24]。因此,本研究旨在通过线粒体 Cyt *b* 序列的测定和分析,解决如下科学问题:(1) 了解海南岛内宽额鲢的谱系分化和遗传多样性现状,试图阐述海南岛内宽额鲢经历的历史生物地理过程。(2) 推断可能影响海南岛宽额鲢的遗传多样性和生物地理过程的历史过程或事件。(3) 检验海南岛与元江水系宽额鲢之间的亲缘地理关系,重点检验昌化江与元江的关系,以期对未来海南岛淡水鱼类保护区的规划和建设提供理论支持,为我国鱼类的生物多样性保护和管理提供借鉴依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

于 2017 年 7 月、10 月,在海南岛及云南的 12 个采样点采集 168 条宽额鳢个体(样品体长范围为 3.9—13.5 cm),将所采集个体按采样的水系进行种群划分,即用水系名称对种群进行命名。各具体采样点及样品信息见表 1,样品分布地图见图 1。采集后的样本立即取其新鲜肌肉并用 95%的乙醇固定,带回实验室置于 -20℃ 低温冰箱作长期保存。样本存放在华南师范大学生命科学学院鱼类标本室。

表 1 宽额鳢样品信息
Table 1 Sampling information of *C. gachua*

种群 Population	采样点代码 Codes	采样点 (个体数) Sampling locations (number of individuals)	经纬度 Longitude and latitude	样品数 Sample size
昌化江 (CH)	CH01	海南琼中县什运乡 (5)	18°59'N, 109°36'E	24
	CH02	海南五指山市毛道乡 (7)	18°47'N, 109°24'E	
	CH03	海南五指山市畅好乡 (3)	18°44'N, 109°28'E	
	CH04	海南五指山市水满乡 (9)	18°52'N, 109°39'E	
陵水河 (LS)	LS01	海南保亭县七仙岭 (6)	18°41'N, 109°39'E	26
	LS02	海南保亭县什玲镇 (20)	18°42'N, 109°45'E	
藤桥河 (TQ)	TQ	海南保亭县响水镇 (31)	18°35'N, 109°36'E	31
万泉河 (WQ)	WQ01	海南琼海市石壁镇 (25)	19°09'N, 110°18'E	28
	WQ02	海南琼中县湾岭镇 (3)	19°08'N, 109°53'E	
南渡江 (ND)	ND01	海南白沙县南开乡 (21)	19°09'N, 109°25'E	34
	ND02	海南白沙县牙叉镇 (13)	19°11'N, 109°21'E	
元江 (YJ)	YJ	云南元阳县 (25)	23°16'N, 102°42'E	25
合计 Total				168

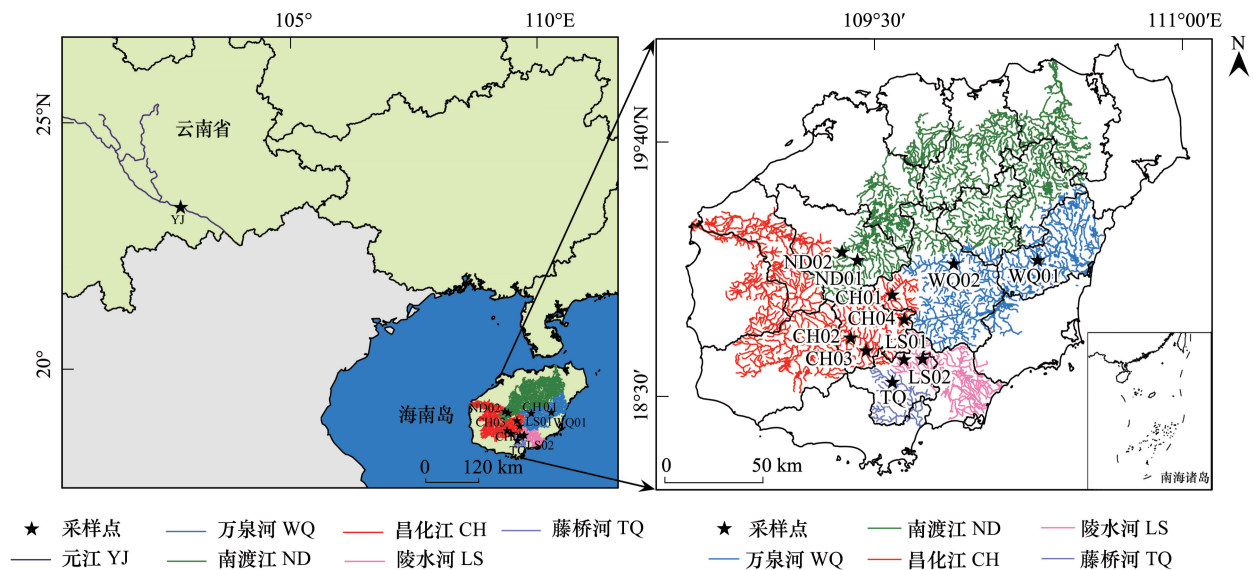


图 1 宽额鳢样品分布图
Fig.1 Sampling locations for *C. gachua*
各采样点信息及水系代码见表 1

1.2 DNA 的提取及测序

基因组 DNA 的提取主要使用从上海生工生物工程技术有限公司购买的 Ezup 柱式动物基因组 DNA

抽提试剂盒所示方法,略有改动。所提取的总 DNA 溶于 TE 溶液, -20°C 长期保存。使用通用引物 L14724 (5'-GACTTGAAAAACACCGTTG-3') 和 H15915 (5'-CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC-3')^[25] 扩增 Cyt *b* 片段, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 扩增在 25 μL 反应体系中进行, 包括 2 $\times$ Taq PCR Master Mix (诺唯赞) 12.5 μL 、上下游引物各 1.0 μL (浓度为 0.01 mmol/L)、DNA 模板 1.0 μL 、ddH₂O 9.5 μL , 每一次反应都包括阴性对照。具体的反应程序为: 94°C 预变性 4 min, 94°C 变性 30 s, 49°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后在 72°C 下延伸 8 min。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检验目的片段的扩增情况后, 送往上海生工生物工程技术有限公司纯化并进行双向测序。

1.3 序列比对及遗传多样性分析

利用 DNASTAR 软件包的 SeqMan 程序对序列进行正反链拼接, 再将拼接文件导入 Clustal X 2.1 程序进行序列比对, 比对结果通过 MEGA 7.0 软件^[26] 再进一步进行人工校对, 并计算序列的碱基组成、可变位点数等。利用 DnaSP v5.0 软件计算单倍型数及单倍型在各种群的分布情况, 并利用单倍型多样性 (Haplotype diversity, h)^[27] 和核苷酸多样性 (Current genetic diversity estimates, θ_{π} 及 Historical genetic diversity estimates, θ_{ω})^[28] 指数评估种群遗传多样性水平。当前遗传多样性 (θ_{π}) 是基于序列之间的成对变异进行估算, 而历史遗传多样性 (θ_{ω}) 是基于序列中分离位点的数量进行估算^[28], 通过比较当前遗传多样性 (θ_{π}) 和历史遗传多样性 (θ_{ω}), 可以深入了解近代进化史的种群动态^[29]。

1.4 系统发育分析

利用 MEGA7.0 软件基于 Kimura's two-parameter 模型计算遗传距离, 并基于邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 构建 NJ 树。基于最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 构建的 ML 树, 采用在线软件 PhyML 3.0 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) 构建, 并通过 SMS^[30] 采取 Akaike 信息量准则 (Akaike Information Criterion, AIC) 得出最佳核苷酸替换模型为 GTR+G+I; 利用 MrBayes 3.1.2 进行贝叶斯推断 (Bayesian inference, BI) 分析, 用 Treeview 显示拓扑结构图。

1.5 种群历史动态及遗传分化分析

为检验各谱系是否发生过扩张, 利用 DnaSP v5.0 软件对各谱系进行 Tajima's D 、Fu' F_s 检验及核苷酸错配分布 (Mismatch-distribution) 分析。使用 Network 5 软件基于 Median-joining 法构建单倍型亲缘关系网络图。利用 Arlequin 3.5 软件^[31] 进行分子方差分析 (AMOVA), 估算遗传变异在群体间和群体内的分布, 并计算群体间遗传分化指数 (F_{ST}) 及其 P 值。使用 DnaSP 计算两个遗传分化指数 G_{ST} 和 N_{ST} , 检查系统地理结构的存在。通过 BEAUti v1.7.5 设置参数, 将进化替代模型设为 GTR+G+I, 将生成的文件导入 BEAST v1.7.5 中计算节点的分化时间, 而后再通过 Tracer 采用 Coalescent: Bayesian Skyline, 对每个谱系进行了有效种群大小的历史动态反演, 其结果以贝叶斯天际线 (Bayesian skyline plots, BSP) 方式呈现。

2 结果与分析

本研究中, 6 个种群的 168 个序列共获得 36 个单倍型 (序列全长 1142bp, 可变位点 125 个), A、C、T、G 平均含量分别为 30.4%、13.8%、25.3% 和 30.5%。

2.1 系统发育分析

为更好地了解宽额鳊种群之间的亲缘关系, 采用不同方法 (NJ, ML 和 BI) 对 36 个单倍型构建分子系统发育树, 由 3 种方法得出的拓扑结构相似, 因此把 3 种方法构建的系统树合为一致树 (图 2)。从系统发育树中可以看出, 36 个单倍型分为两大支系 (A 支和 B 支)。A 支包含海南岛 5 个种群的全部单倍型, B 支为云南元江种群。其中, A 支中可以分为两个亚支, 一个是 A1 亚支, 包括海南岛 5 个种群 (CH、LS、TQ、WQ 及 ND) 的大部分单倍型, 另一支为 A2 亚支, 包括昌化江的两个采样点即畅好乡和水满乡的全部单倍型。

在单倍型网络图 (图 3) 中, 3 个主要分支结构与系统发育树结果一致, 谱系 B 与 A1、A2 亚支至少有 40 个突变步数。系统发生的结果支持云南元江种群在亲缘关系上与海南岛的 5 个种群相距较远, 且最先分化出

来,处于最为古老的分支地位,接着是昌化江的部分个体分化出来,而后其余的海南岛各种群相互聚为一支。

2.2 种群遗传多样性

表 2 显示了宽额鳢各种群的遗传多样性。6 个种群的平均单倍型多样性为 0.677(范围:0.299—0.872)。除藤桥河种群的单倍型多样性较低(0.299)外,其他种群的单倍型多样性均较高,南渡江种群的单倍型多样性最高(0.872)。对每个种群当前(θ_π)和历史(θ_ω)遗传多样性的计算表明各种群的 θ_ω 几乎均趋近于 θ_π ,说明各种群在历史上维持着相对稳定的状态,几乎无发生种群扩张。

各种群单倍型数目在 4—9 个之间,每个种群都具有各自的单倍型。特有单倍型共 35 个,占单倍型总数的 97.22%;共享单倍型仅 1 个,分布在昌化江种群与万泉河种群中,占单倍型总数的 2.78%。

2.3 谱系间遗传距离及遗传分化

表 3 为宽额鳢基于系统发育树的 3 个谱系之间的遗传距离和遗传分化指数。结果表明,云南宽额鳢的谱系 B 的遗传距离与海南岛宽额鳢中的两个亚支 A1 和 A2 的遗传距离均较大(分别为 0.0659, 0.0537),表明谱系 B 与其余两个谱系的关系都较远,但相对 A2 亚支较近。遗传分化指数 F_{ST} 值也呈现出高度的分化(范围在 0.9045—0.9596)。

固定指数 N_{ST} 和 G_{ST} 的比较显示, N_{ST} 大于 G_{ST} (分别为 0.8184 和 0.2858)。这一结果表明种群间存在明显的谱系地理结构。

2.4 分子方差分析(AMOVA)

利用分子方差分析方法 AMOVA (Analysis of Molecular Variance) 可以对研究的种群进行不同层次的归类与划分,估计出组群之间、组群内以及个体之间不同层次表现出的变异占总变异的多少,从而了解变异的

分布模式。根据系统树得到的谱系将宽额鳢种群分成 3 个组群,进行分子方差分析(AMOVA)。其中云南元江水系为一个组群;海南岛诸水系为一个组群,包括昌化江的部分种群、陵水河、藤桥河、万泉河及南渡江;海南岛内昌化江的两个采样点即畅好乡和水满乡为一个组群。结果表明,绝大部分变异发生在组群间(74.73%),而种群内很小(5.87%) (表 4),说明宽额鳢种群的变异主要来源于组群间。

2.5 种群动态分析

对各个谱系进行中性检验分析,结果表明,A1 亚支和 A2 亚支的 Tajima's D 和 Fu's F_s 值均呈现负值,但不显著($P>0.05$),表明其在历史上均未发生过明显的种群扩张。单系群 B 的 Tajima's D 和 Fu's F_s 值均为正值(0.25163, 2.93079),表明云南元江种群亦未发生过种群扩张(表 5)。且核苷酸错配分布分析发现,各谱系动态均呈多峰分布(图 4),其中 A2 亚支的峰形虽接近单峰,但因其顶峰处于边缘临界点,且顶峰过后发生过转折,再加上 A2 亚支的个体数相对较少,这在核苷酸错配分布分析中会产生一定的影响,结合 A2 在中性检

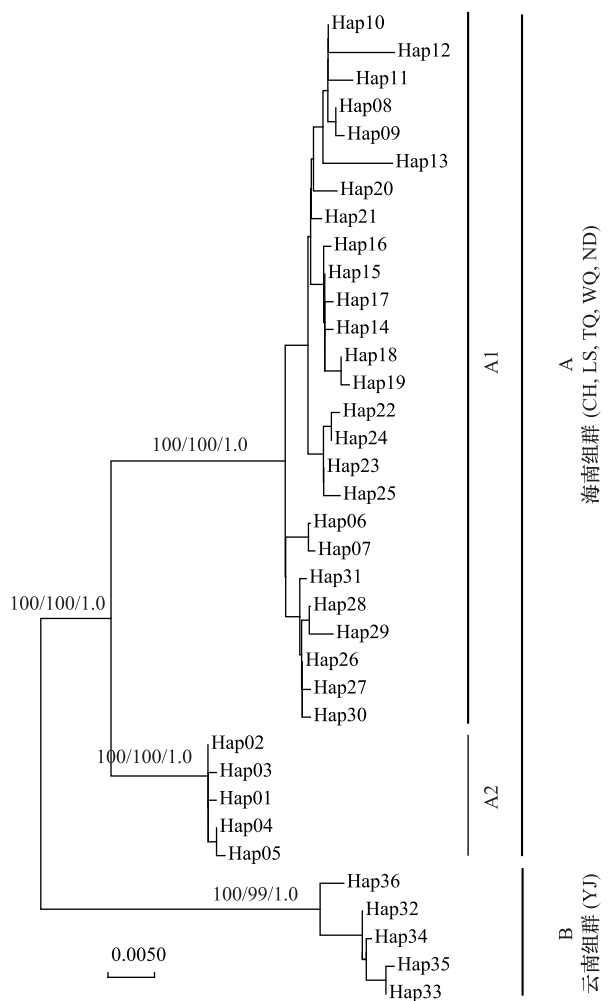


图 2 基于 Cyt b 序列单倍型构建的宽额鳢群体 NJ, ML 和 BI 树
Fig.2 Neighbor-joining, Maximum likelihood and Bayesian inference tree of *C. gachua* based on Cyt b gene haplotypes

NJ 树:邻接树, Neighbor-joining tree; ML 树:最大似然树, Maximum likelihood tree; BI 树:贝叶斯推断树, Bayesian inference tree; 图中的 A 与 B 分别表示宽额鳢海南岛与云南组群的谱系, A1 与 A2 分别为谱系 A 的亚支; 分支节点数字分别表示 NJ, ML 和 BI 树的支持率; Hap: 单倍型, Haplotype

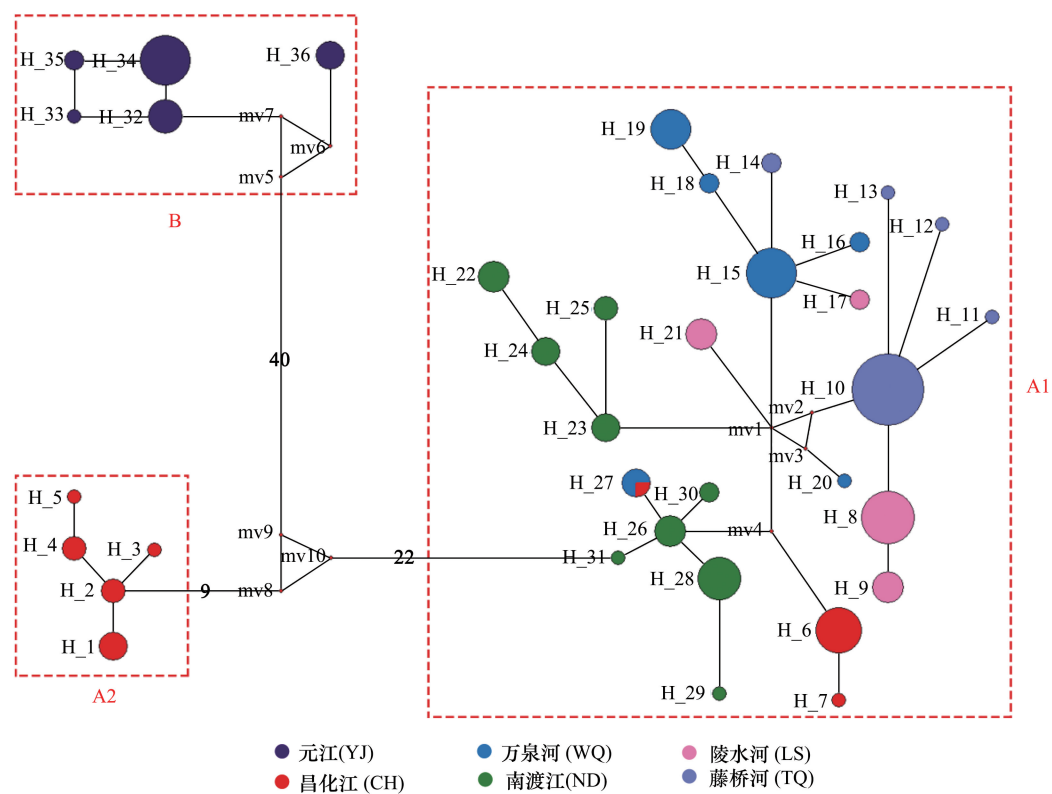


图 3 基于 Cyt *b* 基因构建的宽额鳢单倍型网络图

Fig.3 The haplotype network of *C. gachua* based on Cyt *b* gene haplotypes

图中 A1、A2、B 分别为宽额鳢系统树中的 A1 亚支、A2 亚支、谱系 B；数字和虚线框代表不同谱系单倍型间的核苷酸替换数目；每个圆圈代表一个单倍型，圆的面积与单倍型频率成正比

表 2 基于 Cyt *b* 基因的遗传多样性分析

Table 2 Genetic diversity of *C. gachua* based on Cyt *b* gene

种群 Population	样品数 Sample size	单倍型数 Number of haplotypes	单倍型 (个体数) Haplotype (number of individuals)	单倍型多样性 Haplotype diversity (<i>h</i>)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity	
					$\theta_{\pi}/\%$	$\theta_{\omega}/\%$
昌化江 (CH)	24	8	H1 (4)、H2 (3)、H3 (1)、H4 (3)、H5 (1)、H6 (10)、H7 (1)、H27 (1)	0.793	0.01685	0.00985
陵水河 (LS)	26	4	H8 (14)、H9 (5)、H17 (2)、H21 (5)	0.655	0.00203	0.00184
藤桥河 (TQ)	31	5	H10 (26)、H11 (1)、H12 (1)、H13 (1)、H14 (2)	0.299	0.00167	0.00526
万泉河 (WQ)	28	6	H15 (12)、H16 (2)、H18 (2)、H19 (8)、H20 (1)、H27 (3)	0.738	0.00300	0.00338
南渡江 (ND)	34	9	H22 (5)、H23 (4)、H24 (4)、H25 (3)、H26 (5)、H28 (9)、H29 (1)、H30 (2)、H31 (1)	0.872	0.00465	0.00343
元江 (YJ)	25	5	H32 (6)、H33 (1)、H34 (12)、H35 (2)、H36 (4)	0.707	0.00299	0.00278
合计 Total	168	36		0.946	0.02263	0.02044

θ_{π} : 当前核苷酸多样性指数,即成对序列间核苷酸变异数的平均数,the average number of nucleotide differences per site between two sequences; θ_{ω} : 历史核苷酸多样性指数,即序列中分离位点的数目,the number of segregating sites among the sequences

表 3 宽额鳢谱系间的遗传距离(对角线下方)和遗传分化指数 F_{ST} (对角线上方)Table 3 Genetic distance (below diagonal) and genetic differentiation index F_{ST} (above diagonal) of *C. gachua* lineages

谱系 Lineage	A1	A2	B
A1		0.9045	0.9334
A2	0.0347		0.9596
B	0.0659	0.0537	

表中 A1、A2、B 分别为宽额鳢系统树中的 A1 亚支、A2 亚支、谱系 B

表 4 宽额鳢群体分子方差分析

Table 4 AMOVA analysis of *C. gachua* based on Cyt *b* gene

变异来源 Source of variation	自由度 <i>d. f.</i>	平方和 Sum of squares	变异组成 Variance components	变异百分比 Percentage of variation
组群间 Among groups	2	1388.523	19.42722	74.73
组群内种群间 Among populations within groups	4	523.588	5.04389	19.40
种群内 Within populations	161	245.865	1.52711	5.87
合计 Total	167	2157.976	25.99821	100.00

表 5 基于 Cyt *b* 的宽额鳢 Tajima's *D* 和 Fu's *F_s* 检验Table 5 Tajima's *D* and Fu's *F_s* tests of *C. gachua* based on Cyt *b* gene

谱系 Lineage	Tajima's <i>D</i>	<i>P</i>	Fu's <i>F_s</i>	<i>P</i>
A1	-1.10019	0.12500	-2.99040	0.24500
A2	-0.05716	0.49500	-1.24181	0.13700
B	0.25163	0.65300	2.93079	0.91700
均值 Mean	-0.30191	0.42433	-0.43381	0.43300

验中负值不显著的结果,可确定为多峰分布。这都表明了 3 个谱系在历史进化的过程中处于相对稳定的状态,基本无经历过种群扩张。贝叶斯天际线分析(Bayesian skyline plots, BSP)显示 A1 亚支与单系群 B 在约 1 万年前时有效种群数量趋于减小,A2 亚支则未发现种群扩张或减小的趋势(图 5)。

3 讨论

3.1 宽额鳢种群遗传多样性及遗传结构

种群遗传多样性是生物多样性的的重要组成部分,体现了物种对不同环境的适应能力的潜力,遗传多样性水平、形成机制和分布格局可揭示物种起源与进化历程,是物种进化潜能的保证,也是物种保护工作的基础^[32]。本研究采集了海南岛与云南不同水系 6 个种群共计 168 个野生宽额鳢样本,共检测出 36 个线粒体单倍型,平均单倍型多样性(*h*)为 0.6773,显示出高单倍型多样性。而核苷酸多样性的积累时间比单倍型多样性的积累时间更漫长,在一定程度上核苷酸多样性比单倍型多样性更能反映群体遗传多样性^[33],所以可作为衡量一个种群线粒体 DNA 遗传变异与种群历史动态的重要指标。本研究中,海南岛与云南各种群的历史遗传多样性(θ_w)几乎均趋近于当前遗传多样性(θ_π),说明各种群在历史上相对稳定,并未因种群扩张或减小而造成 θ_w 急剧升高或降低。此外,核苷酸多样性普遍较小这一结果,与东南亚地区关于鳢属鱼类的研究结果^[34-36]十分相似,然而却远低于海南岛其他物种的核苷酸多样性^[5-6, 37-38]。这就说明,并不是环境压力或瓶颈效应而造成宽额鳢的核苷酸多样性剧烈下降,如果存在瓶颈效应,则相同的地质事件或气候动荡会对相同分布的物种有相似的影响。对于宽额鳢这一鳢属鱼类核苷酸多样性较低的解释是,该物种属于热带、亚热带暖水性淡水鱼类,常栖息于河沟及溪流的浅水区域中^[39],生活环境单一,所受外界环境刺激相对较小,故这一物种对于适应环境的要求没有很高,遗传物质发生突变的几率便小了许多,突变没那么容易被保留下来,导致宽额鳢核苷酸多样性水平贫乏。

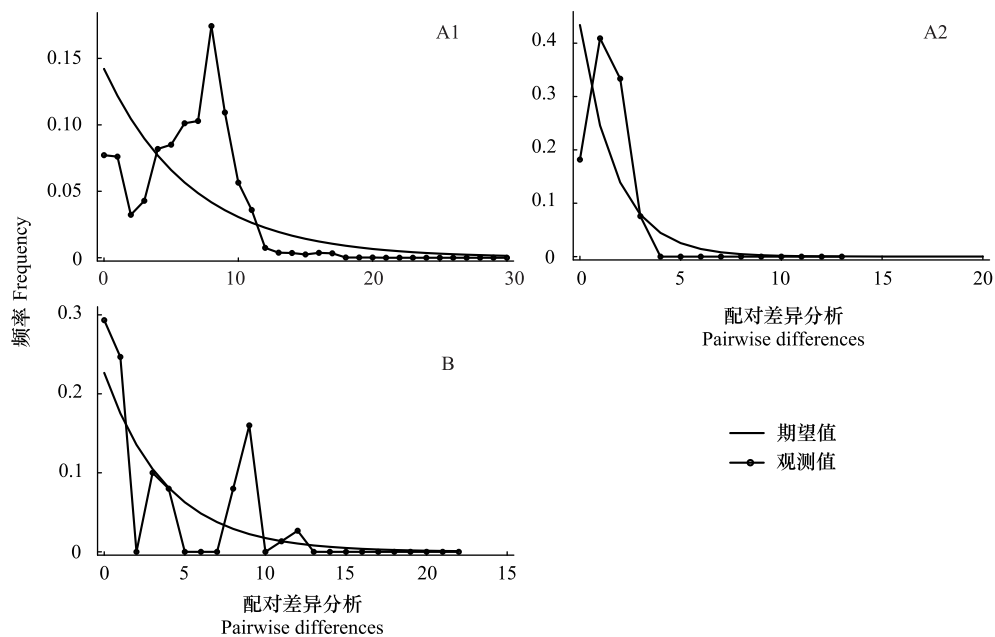


图 4 基于 *Cyt b* 构建的宽额鳢 3 个谱系的核苷酸错配分布分析

Fig.4 Mismatch-distribution of *C. gachua* in three lineages based on *Cyt b* gene

实线代表期望值,带有圆环的虚线代表观测值

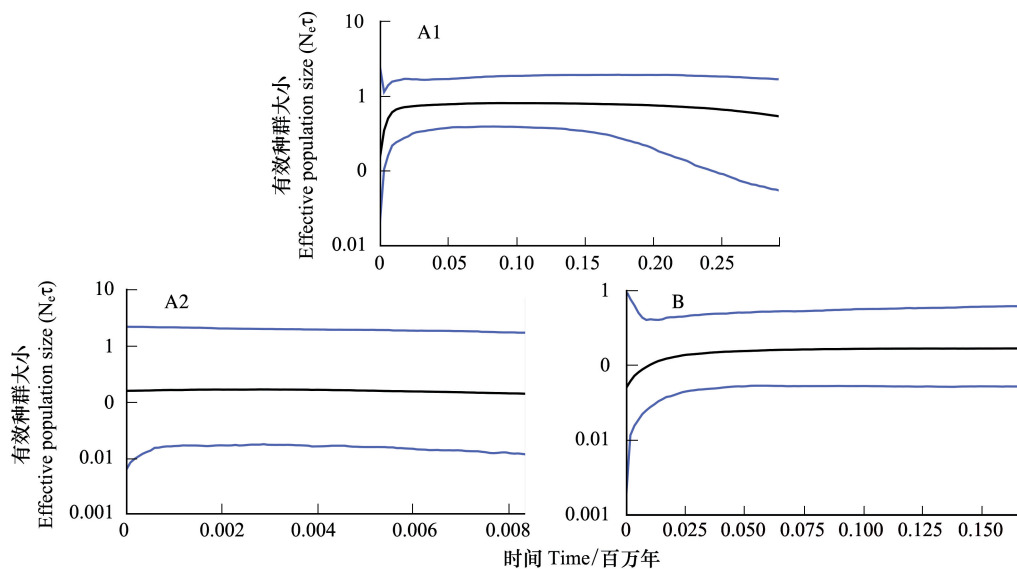


图 5 基于 *Cyt b* 构建的宽额鳢 3 个谱系的贝叶斯天际线图

Fig.5 Bayesian skyline plots of *C. gachua* in three lineages based on *Cyt b* gene

N_e 代表有效种群大小, τ 代表生物体的世代时间; 黑线表示中值种群大小, 彩色线包含区域表示 95% 置信区间

分子方差分析(AMOVA)中,根据系统树的分支结果进行了分组,确定了种群内 5.87% 的变异,组群内种群间 19.40% 的变异以及组群间 74.73% 的变异(表 4),说明宽额鳢种群变异主要来源于组群间,即各谱系间的变异最为明显。谱系间的遗传距离和遗传分化指数 F_{ST} 结果(表 3)也表明,谱系 B(元江种群)与其他两个谱系 A 亚支的遗传距离均较大(分别为 0.0659, 0.0537),且各谱系间的 F_{ST} 值均大于 0.9,说明 6 条水系宽额鳢 *Cyt b* 序列的遗传分化主要是由于山脉或水系的隔离导致,海南岛在与大陆分离后,海南岛水系与云南水系不再发生联系,故海南岛和云南的宽额鳢种群发生了较大的遗传变异,而在海南岛的内部水系中,位于昌化江

海拔较高两个地点(畅好乡和水满乡)的宽额鳢由于地势原因,与海南岛平原地区种群缺乏基因交流,从而发生了明显的遗传分化。

3.2 宽额鳢的种群历史动态

中国南方较为温和的更新世气候和多样的地形为宽额鳢这一热带物种提供了许多适宜的栖息地。本研究的中性检验及核苷酸错配分布结果证明了 3 个谱系均不存在种群扩张的现象。BSP 结果表明, A2 亚支在历史上没有发生过相对剧烈的种群波动,而 A1 亚支与谱系 B 都呈现了约 1 万年前的有效种群数量减小,但其幅度不大。推测这是由于更新世冰期期间,宽额鳢种群不可避免地受到了温度变化和海平面变化的影响而发生一定程度的有效种群数量减小,而 A2 亚支群体的栖息地(畅好乡和水满乡)由于位于五指山山势较高(1000 m 左右)的河流上,受冰河时期温度影响较小,所以可能保持了相对稳定的生态位,并没有经历剧烈的种群波动。

同时,对于相似纬度热带与温带上淡水鱼类没有发生种群扩张这一现象,同属鱼类及其他类群亦均有类似的报道,如暹罗单吻鱼(*Henicorhynchus siamensis*)^[40], 曼谷吻棘(*Macrogathus siamensis*)^[41], 线鳢(*Channa striata*)^[42]及鰕(*Hemiculter leucisculus*)^[43]等,这进一步说明南方受冰河时期影响相对较小,故南方种群没有出现明显的扩张信号。

3.3 宽额鳢的亲缘地理过程

亲缘地理学是生物地理学的研究核心^[44],其关注生物遗传变异与地理之间的关系。揭示某一地区物种在历史上经历的生物地理过程,有助于我们在制定保护规划和措施的时候做到有的放矢。在本研究中,根据 NJ, ML 及 BI 系统树、单倍型分布的特征及单倍型网络图,可证实基于 Cyt b 序列的宽额鳢主要存在两个谱系(A、B),两个谱系均显示出高度的地理结构。谱系 A 进一步分为两个亚支,其中 A1 亚支的成员来源于海南岛 5 个水系的大部分个体, A2 亚支的成员仅限于昌化江上游地势较高的 2 个地区(畅好乡和水满乡),而薛丹等^[23]基于宽额鳢群体与 Zhou 等^[5]基于细尾白甲鱼群体的系统地理学研究结果亦均表明昌化江存在 2 个谱系,这与本研究结果基本一致,证实了昌化江确实存在两个谱系。推测这是由于在海南岛内,宽额鳢的祖先种群最先从岛外定居至昌化江,伴随着五指山和鹦哥岭的隆起,部分祖先种群向东扩散至陵水河、藤桥河,向西扩散至南渡江进而进入万泉河,且由于陵水河、藤桥河、南渡江和万泉河的大部分江河均位于平原,宽额鳢种群间能发生基因交流的机会较大,故这 4 个种群在系统树上并没有各自形成明显的谱系,即系统树海南组群中的 A1 亚支,但 4 个种群依旧在山脉和地理隔离的影响下,均发生了一定程度的分化;而扩散至昌化江上游的宽额鳢祖先种群在山脉隆起过程中,栖息于地势较高(如水满乡、畅好乡等)的河沟等浅水区域中,其中,水满乡是海南岛地理位置最高的乡镇,畅好乡的地势也较高,故推测这一部分祖先种群所在水系由于地势原因而与平原地区的水系发生了隔离,与其他种群之间鲜有交流,从而保留了海南岛中古老的祖先种群的遗传特性,此即为系统树海南组群中,最先分化出来的 A2 亚支。谱系 B 的成员均为云南元江种群,且从系统树来看,元江种群处于最为古老的分支地位,为最先分化出来的种群,这也为海南岛种群可能起源于元江(红河)种群提供了证据。

近年来的古地磁学研究表明,海南岛原属于广西和越南北部,而后沿红河断裂带向东南方向移动和旋转到现在的位置,所以海南岛西南部水系与元江(红河)水系在历史上可能存在一定的联系。更新世期间,冰川和冰川消融以及随着海平面的降低和升高已经极大地影响了东南亚的陆地结构和动植物分布^[3]。冰期期间,北部湾因海平面下降而暴露,北部湾和海南岛在内的整个地区成为亚洲大陆沿海平原的一部分,并且,越南北部水系(包括元江/红河)通过雷州半岛和海南岛西南部流入南海,这有助于鱼类的迁移扩散^[5]。相关地质证据和生物学研究也表明,海南岛和越南北部的种群之间存在密切的进化关系^[37, 45-46]。

据此,我们推断,在中更新世冰期期间,大陆和岛屿的水系因海平面下降而发生接触,越南北部水系通过雷州半岛和海南岛流入南海,因此元江(红河)和海南岛西南部的昌化江可能存在一条能够联系的古河道,宽额鳢借此进行了由元江(红河)至昌化江的种群扩散。后来的间冰期,北部湾海平面上升,海南岛与大陆隔

离,元江(红河)与海南岛西南部水系的基因交流被中断,海南岛和元江(红河)的宽额鳢分成两个分支并随后发生分化。海南岛内部水系亦因五指山鹦哥岭山脉的隆起而产生地理隔离,从而昌化江、南渡江、万泉河、陵水河及藤桥河均发生一定程度的分化。这与 Lin 等人^[47]关于蜡皮蜥(*Leiolepis reevesii*)的种群遗传结构研究中提出的扩散路线:蜡皮蜥从越南沿海扩散到海南,然后从海南向北扩散至中国大陆的结果十分相似,进一步支持海南岛淡水鱼类与越南北部水系(包括元江/红河)的鱼类关系更为密切。在未来的研究中,需要更多来自中国云南其他水系和越南沿海独立水系的宽额鳢样本,以进一步完整确定其何时何地以及如何迁移至海南岛。

3.4 宽额鳢保护对策的探讨

本研究探讨了宽额鳢海南岛各水系与云南元江的遗传变异与系统地理结构,通过 Cyt *b* 基因对宽额鳢的研究结果显示,宽额鳢 6 个种群在 Cyt *b* 的谱系上呈现了 2 个主要谱系的关系。其中,云南元江种群无论是遗传分化指数、AMOVA 还是遗传距离等都表现出与其他海南地区种群的遗传分化程度最高,存在一定程度的隔离,因此本研究认为云南元江种群很可能已经进化为一个独特的进化显著单元(Evolutionarily Significant Unit, ESU);在海南组群中,昌化江的部分种群作为独立亚支最先分化了出来,遗传分化指数也较高,故也应作为独特的进化显著单元。而根据系统发育关系、单倍型网络图,并且结合水系地理区域,本文认为 6 个宽额鳢种群可以划分为 3 个管理单元(Management Unit, MUs)进行保护,即云南元江种群为一个管理单元;海南组群划分为两个管理单元,一个为昌化江种群,另一个为海南其余种群。

致谢:台湾台南第一高级中学的林弘都老师给予数据分析支持,特此致谢。

参考文献(References):

- [1] 曾昭璇, 曾宪中. 海南岛自然地理. 北京: 科学出版社, 1989: 60-110.
- [2] 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.
- [3] Voris H K. Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations. Journal of Biogeography, 2000, 27(5): 1153-1167.
- [4] 施雅风. 中国第四纪冰期划分改进建议. 冰川冻土, 2002, 24(6): 687-692.
- [5] Zhou T Q, Lin H D, Hsu K C, Kuo P H, Wang W K, Tang W Q, Liu D, Yang J Q. Spatial genetic structure of the cyprinid fish *Onychostoma lepturum* on Hainan Island. Mitochondrial DNA. Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis, 2017, 28(6): 901-908.
- [6] Yang J Q, Hsu K C, Liu Z Z, Su L W, Kuo P H, Tang W Q, Zhou Z C, Liu D, Bao B L, Lin H D. The population history of *Garra orientalis* (Teleostei: Cyprinidae) using mitochondrial DNA and microsatellite data with approximate Bayesian computation. BMC Evolutionary Biology, 2016, 16: 73.
- [7] 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.
- [8] 莫宴情, 施央申. 海南岛地体及其毗邻陆缘晚中生代-新生代古地磁研究和构造演化. 南京大学学报, 1987, 23(3): 521-532.
- [9] 梁光河. 海南岛从中国北部湾分离旋转漂移出去的 8 大证据. 地质学报, 2013, 87(S1): 73-76.
- [10] Rangin C, Klein M, Roques D, Pichon X L, Van Trong L. The Red River fault system in the Tonkin Gulf, Vietnam. Tectonophysics, 1995, 243(3/4): 209-222.
- [11] Liu Y Y, Morinaga H. Cretaceous palaeomagnetic results from Hainan Island in South China supporting the extrusion model of Southeast Asia. Tectonophysics, 1999, 301(1/2): 133-144.
- [12] 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 上海水产大学, 中国水产科学研究院东海水产研究所, 广东省水产学校. 海南岛淡水及河口鱼类志. 广州: 广东科技出版社, 1986.
- [13] 褚新洛, 陈银瑞. 云南鱼类志: 下册. 北京: 科学出版社, 1990: 267-268.
- [14] Kawade S J, Khillare Y K. Toxicity of Zinc on the biochemical contents of certain tissues of freshwater fish, *Channa gachua* (Ham.). International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, 2012, 3(3): 242-251.
- [15] Waghmare S Y. Confidor and Bavistin induced effects on total glycogen content in liver and gonads of Snakeheaded Fish, *Channa gachua*. The Pharma Innovation Journal, 2017, 6(4): 41-43.
- [16] Ghanbahadur A G, Ghanbahadur G R, Ganeshwade R, Khillare Y K. Study of gonadosomatic index of fresh water fish *Channa gachua*. Science

- Research Reporter, 2013, 3(1): 7-8.
- [17] James M, Bhat A A, Haniffa M A, Hussain S A, Rather I A, Al-Anazi K M, Hailan W A Q, Farah M A. Ovarian development and histological observations of threatened dwarf snakehead fish, *Channa gachua* (Hamilton, 1822). Saudi Journal of Biological Sciences, 2018, 25(1): 149-153.
- [18] 王金星, 周才武. 我国五种鳢科鱼类的染色体组型研究. 海洋湖沼通报, 1986, (1): 47-52.
- [19] 王金星, 周才武. 中国鳢科鱼类的乳酸脱氢酶和酯酶同工酶的比较研究. 海洋与湖沼, 1987, 18(1): 64-69.
- [20] Serrao N R, Steinke D, Hanner R H. Calibrating snakehead diversity with DNA barcodes: expanding taxonomic coverage to enable identification of potential and established invasive species. PLoS One, 2014, 9(6): e99546.
- [21] Dahrudin H, Utama A, Busson F, Sauri S, Hanner R, Keith P, Hadiaty R, Hubert N. Revisiting the ichthyodiversity of Java and Bali through DNA barcodes: taxonomic coverage, identification accuracy, cryptic diversity and identification of exotic species. Molecular Ecology Resources, 2017, 17(2): 288-299.
- [22] Marmi J, López-Giráldez F, Macdonald D W, Calafell F, Zholnerovskaya E, Domingo-Roura X. Mitochondrial DNA reveals a strong phylogeographic structure in the badger across Eurasia. Molecular Ecology, 2006, 15(4): 1007-1020.
- [23] 薛丹, 章群, 郜星辰, 宫亚运, 曹艳. 基于线粒体控制区的云南澜沧江和海南岛主要水系宽额鳢遗传变异分析. 水生生物学报, 2015, 39(6): 1107-1116.
- [24] Zardoya R Z, Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. Molecular Biology and Evolution, 1996, 13(7): 933-942.
- [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. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 18(2): 163-173.
- [26] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [27] Nei M, Tajima F. Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions from restriction sites data. Genetics, 1983, 105(1): 207-217.
- [28] Buhay J E, Crandall K A. Subterranean phylogeography of freshwater crayfishes shows extensive gene flow and surprisingly large population sizes. Molecular Ecology, 2005, 14(14): 4259-4273.
- [29] Templeton A R. The 'Eve' hypotheses: a genetic critique and reanalysis. American Anthropologist, 1993, 95(1): 51-72.
- [30] Lefort V, Longueville J E, Gascuel O. SMS: smart model selection in PhyML. Molecular Biology and Evolution, 2017, 34(9): 2422-2424.
- [31] Excoffier L, Lischer H E L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources, 2010, 10(3): 564-567.
- [32] 王太, 杜岩岩, 杨濯羽, 张艳萍, 娄忠玉, 焦文龙. 基于线粒体控制区的嘉陵裸裂尻鱼种群遗传结构分析. 生态学报, 2017, 37(22): 7741-7749.
- [33] Grant W A S, Bowen B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. Journal of Heredity, 1998, 89(5): 415-426.
- [34] Habib M, Lakra W S, Mohindra V, Khare P, Barman A S, Singh A, Lal K K, Punia P, Khan A A. Evaluation of cytochrome *b* mtDNA sequences in genetic diversity studies of *Channa marulius* (Channidae; Perciformes). Molecular Biology Reports, 2011, 38(2): 841-846.
- [35] Rahim M H A, Ismail P, Alias R, Muhammad N, Jais A M M. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA cytochrome *b* gene among Haruan (*Channa striatus*) in Malaysia. Gene, 2012, 494(1): 1-10.
- [36] Baisvar V S, Kumar R, Singh M, Singh A K, Chauhan U K, Mishra A K, Kushwaha B. Genetic diversity analyses for population structuring in *Channa striata* using mitochondrial and microsatellite DNA regions with implication to their conservation in Indian waters. Meta Gene, 2018, 16: 28-38.
- [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(SA): 75-93.
- [38] Yang J Q, Hsu K C, Kuo P H, Li L L, Tang W Q, Liu D, Lin H D. Mitochondrial and nuclear genetic structure in *Rhodeus ocellatus* (Teleostei: Cyprinidae) with approximate Bayesian computation. Environmental Biology of Fishes, 2018, 101(5): 829-841.
- [39] De Silva K H G M. Population ecology of the paddy field-dwelling fish *Channa gachua* (Günther) (Perciformes, Channidae) in Sri Lanka. Journal of Fish Biology, 1991, 38(4): 497-508.
- [40] Adamson E A S, Hurwood D A, Baker A M, Mather P B. Population subdivision in Siamese mud carp *Henicorhynchus siamensis* in the Mekong River basin: implications for management. Journal of Fish Biology, 2009, 75(6): 1371-1392.
- [41] Takagi A P, Ishikawa S, Nao T, Song S L, Hort S, Thammavong K, Saphakdy B, Phomsouvanhm A, Nishida M, Kurokura H. Genetic

- differentiation of *Macronathus siamensis* within the Mekong River between Laos and Cambodia. *Journal of Applied Ichthyology*, 2011, 27(5): 1150-1154.
- [42] Adamson E A S, Hurwood D A, Mather P B. Insights into historical drainage evolution based on the phylogeography of the chevron snakehead fish (*Channa striata*) in the Mekong Basin. *Freshwater Biology*, 2012, 57(11): 2211-2229.
- [43] Chen W T, Zhong Z X, Dai W, Fan Q, He S P. Phylogeographic structure, cryptic speciation and demographic history of the sharpbelly (*Hemiculter leucisculus*), a freshwater habitat generalist from southern China. *BMC Evolutionary Biology*, 2017, 17: 216.
- [44] Rissler L J. Union of phylogeography and landscape genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(29): 8079-8086.
- [45] He D K, Chen Y F. Biogeography and molecular phylogeny of the genus *Schizothorax* (Teleostei: Cyprinidae) in China inferred from cytochrome *b* sequences. *Journal of Biogeography*, 2006, 33(8): 1448-1460.
- [46] 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.
- [47] Lin L H, Ji X, Diong C H, Du Y, Lin C X. Phylogeography and population structure of the Reeves's Butterfly Lizard (*Leiolepis reevesii*) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010, 56(2): 601-607.