

# 似鮡(*Pseudogobio vaillanti*)的分子生物地理学分析\*

夏曦中<sup>1,2</sup> 张训蒲<sup>2</sup> 刘焕章<sup>1\*\*</sup>

1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070

**摘要** 似鮡(*Pseudogobio vaillanti*)是广布于中国淡水水体中的一种小型鲤科鱼类。通过分析线粒体细胞色素 *b* (*cyt b*) 基因序列变异, 探讨似鮡不同地理种群的相互关系, 研究似鮡的生物地理学过程, 并讨论其物种分化的现状。收集了来自辽河、长江(赣江、信江等)、富春江、珠江、万泉河等水系的样品。在获得的似鮡 61 个样本的线粒体 *cyt b* 基因全序列(1140 bp)中, 共检测出了 45 个单倍型。线粒体单倍型的网络分析发现 45 个单倍型不形成一个网络图, 而是分成 9 个单元群。邻接树的结果显示, 这些单倍型形成 5 个大的分支, 基本上与地理分布相对应, 分别是长江 1、珠江、海南、长江 2 和辽河等水系。综合分析似鮡单倍型的相互关系和地理分布及分子钟的计算显示这一分布格局形成于 5 Ma 前—3 Ma 前, 其后的 200 多万年中没有地理种群间的交流。尽管似鮡不同地理种群的分子差异很大, 但从形态上这些隔离的地理种群之间没有明显的差异, 我们认为这反映出似鮡进化较保守。与似鮡一样在中国东部广布的种类很多, 它们的地理分布格局的形成过程多被解释为第四纪冰期的扩散。与它们相比, 似鮡的地理格局的形成时间和物种分化状态是一个特例。

**关键词** 似鮡 生物地理学 *cyt b* 基因 物种分化

地球上的生物之所以表现出多种多样的差异, 其主要原因是它们以不同的物种形式存在。因而物种的差异、物种的分化构成了生物多样性的核心。研究物种分化的过程即成为探究生物多样性起源的重要组成部分。

物种形成的方式有很多, 其中最普遍的是地理隔离导致的物种分化<sup>[1]</sup>。以地理分布为基础, 采用系统发育分析的方法, 研究物种及物种内不同种群形成现有分布格局的历史原因和演化过程已成为一门新的学科, 即系统发育生物地理学(phylogeography)。由于综合了多门学科的信息, 系统发育生物地理学可以精确地分析区域类群在时间和空间上的发展变化, 从而重建生物区系的历史<sup>[2,3]</sup>。系统发育生物地理学的创始人 Avise 将其称作是研究物种形成历史的科学。近年来, 分子生物学技术及种群遗传学等方法和原理的运用, 使得分子系统发育生

物地理学可以进一步从种内水平上描述种群地理格局的形成过程, 探讨种群分化的历史, 推测种群现有分布格局形成的原因, 例如是否经历过气候变化、地质活动等历史事件, 以及迁移、扩散、集群、甚至灭绝等<sup>[4]</sup>。

近年来, 利用线粒体 DNA(mtDNA)作为分子标记在动植物领域进行分子系统发育生物地理学研究已成为热点, 尤其在淡水鱼类。这是因为淡水鱼类的分布受到水系的严格限制, 地理隔离广泛存在<sup>[5]</sup>, mtDNA 单倍型的变异呈现明显的地理差异, 可以清楚地揭示鱼类物种地理分布格局的形成历史。

似鮡(*Pseudogobio vaillanti*)隶属于鲤形目(Cypriniformes)鲤科(Cyprinidae)鮡亚科(Gobiininae)似鮡属(*Pseudogobio*), 为小型、流水性底栖鱼类。似鮡在海南、灵江、北江、闽江、富春江、长江、淮河、黄河、辽河等水系均有分布<sup>[6,7]</sup>。《中

2005-01-24 收稿, 2005-03-23 收修改稿

\* 中国科学院创新方向性项目(KZCX3-SW-126)及国家自然科学基金(批准号: 40432003)资助

\*\* 通讯作者, E-mail: hzliu@ihb.ac.cn

国动物志》<sup>[6]</sup>将我国的似鮡属鱼类划分为两个种，似鮡和桂林似鮡(*Pseudogobio guilinensis*)，桂林似鮡仅分布于西江水系。近年来，一些研究对它们的形态变异、物种有效性等问题进行了分析。RAPD分析未显示划分为桂林似鮡和似鮡的样本之间有生殖隔离<sup>[8]</sup>。杨秀平等<sup>[9]</sup>发现作为区别似鮡和桂林似鮡的重要特征胸鳍末端是否超过腹鳍起点及尾柄高与尾柄长的比例等相互之间有一定的相关性，有较大的重叠，并没有明确的界限。分子和形态学数据显示了似鮡属仅似鮡一个有效种。但是似鮡不同地理种群是如何隔离分化的尚不清楚。本研究采用线粒体 *cyt b* 基因序列来分析似鮡不同地理种群间的相互关系，研究似鮡的生物地理学过程，并讨论其物种的分化现状。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

共检测了采自长江中游、珠江水系、辽河水系、富春江、海南的 61 尾似鮡标本(见表 1)。所有标本保存于 95%酒精中。

### 1.2 基因组 DNA 的提取、PCR 扩增和序列测定

总 DNA 从 95%乙醇保存的肌肉样中提取。DNA 的提取和 PCR 扩增均采用常规方法<sup>[10]</sup>。扩增和测序所用引物为 L14724 (5'-GACTT-GAAAACCACCGT-3') 和 H15915 (5'-CTC-CGATCTCCGATTACAAGAC-3')<sup>[11]</sup>。PCR 反应的总体积为 60  $\mu$ L，大约用 50 ng 的基因组 DNA 作为模板。PCR 反应条件为：94℃ 预变性 3 min，然后循环包括：94℃ 变性 30 s，50—58℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 70 s，共 35 个循环，最后在 72℃ 延伸 8 min。PCR 产物的回收和 DNA 序列测定由测序公

司完成。

### 1.3 数据分析

DNA 序列的比对使用 Clustal X 软件<sup>[12]</sup>并在 Seaview<sup>[13]</sup>中辅以手工校正。以 GenBank 中蛇鮡(*Saurogobio dabryi*)的 *cyt b* 基因全序列(序列号为 AY245091)为参照，找出序列的起始密码子(ATG)，删除起始密码子前的碱基。所有序列送交 GenBank，登录号为(A Y882863—AY882923)。分支系统树的生成使用 Mega 2.1 软件<sup>[14]</sup>中的 Neighbor Joining(NJ)法，其分支的置信度采用重复抽样分析(bootstrap analysis)，进行 1000 次重复抽样。序列中各碱基的含量及变异情况用 Mega 中的 Statistic 命令进行分析。线粒体单倍型之间的网络关系分析用 TCS 1.18<sup>[15]</sup>软件。

## 2 结果

### 2.1 似鮡细胞色素 *b* 基因序列及变异

实验共获得 5 个水系，11 个支流 15 个采样点的 61 尾似鮡标本的线粒体 *cyt b* 基因全序列(1140 bp)，与 GenBank 中蛇鮡的 *cyt b* 基因全序列进行序列比对，生成供系统发育分析的序列矩阵。在 61 个个体中共检测出 45 个单倍型(见表 1)。61 个个体中 *cyt b* 基因片段中 T, C, A, G 碱基平均含量分别为 28.7%，27.2%，28.4%，15.6%。其中 A + T 含量(57.1%)明显高于 C + G 含量(42.8%)。序列中的转换明显比颠换多，平均的转换发生频率是颠换的 4.6 倍。在 1140 个位点中，保守位点 858 个，变异位点 282 个，其中简约信息位点 232 个。外类群蛇鮡与内类群序列的遗传距离(*P*-distance)在 15.7%和 18.7%之间。似鮡种群单倍型之间的遗传距离在 0.09%和 12.0%之间。

表 1 本研究中样本的编号、采集地、水系、标本数、单倍型数及 GenBank 登录号

编号	采集地	水系	标本数	单倍型	GenBank 登录号
G1—G5YS, G12YS	阳朔 (YS)	珠江 (西江)	6	4	AY882893, AY882889—AY882890, AY882897—AY882899
G9—G11LZ	柳州 (LZ)		3	2	AY882900—AY882901, AY882891
G6—G8GX, 18GX	广西 (GX)		4	2	AY882892, AY882894—AY882896
S1—S2SX	陕西 (SX)	长江 (汉江)	2	2	AY882884—AY882885
S50GF, S62—S63GF	广丰 (GF)	长江 (信江)	3	3	AY882916, AY882905, AY882919

续表

编号	采集地	水系	标本数	单倍型	GenBank 登录号
S24SR, S26SR, S40SR, S57—S60SR	上饶 (SR)		7	5	AY882879, AY882902, AY882904, AY882910, AY882913, AY882911, AY882881
S44—S45YT, S51—S56YT, S61YT	鹰潭 (YT)		9	7	AY882908, AY882920, AY882912, AY882917—AY882918, AY882921, AY882903, AY882914, AY882906
23WY, 24WY, S41—S42WY	婺源 (WY)		4	3	AY882922, AY882907, AY882882, AY882909
S46—S47YH	宜黄 (YH)	长江 (赣江)	2	2	AY882880, AY882883
S38PY	鄱阳湖 (PY)	长江 (鄱阳湖)	1	1	AY882915
S9—S21KY	开原 (KY)	辽河	13	8	AY882863—AY882875
S22—S23BL	碧流河 (BL)	辽河 (碧流河)	2	2	AY882876—AY882877
S7—S8WQ	万泉河 (WQ)	海南 (万泉河)	2	1	AY882886—AY882887
S49LT	龙塘 (LT)	海南 (南渡江)	1	1	AY882888
S5—S6FC	富春江 (FC)	浙江 (富春江)	2	2	AY882923, AY882878

## 2.2 TCS 分析和分子系统树

TCS 网络关系分析表明似鮡的 45 个单倍型不形成一个网络, 而是被分成 9 个单元群(A—I)(未示出)。

图 1 显示基于线粒体 *cyt b* 基因的 NJ 系统树。在 NJ 树中, 这些单倍型形成 5 个大的分支, 并基本上与不同的地理分布相对应, 分别为长江 1、珠江、海南、长江 2 和辽河。长江 1 种群包括了长江水系和富春江的个体。珠江种群为采自珠江(阳朔和柳州)水系的似鮡。海南种群主要采自万泉河和南渡江。长江 2 种群包括了长江水系和富春江的个体。辽河种群为辽河水系的样本, 包括采自开原和碧流河的个体。从 NJ 树中可以看到, 辽河种群与长江 2 种群形成姐妹群, 再与海南种群聚在一起, 它们又与珠江种群形成姐妹群,

最后与长江 1 种群聚在一起形成姐妹群。

## 2.3 不同分支之间的分歧时间

依据 NJ 系统树上的 5 大分支, 并依据水系将 61 个个体归为 5 个种群, 计算它们之间的遗传距离, 得出长江 2 种群与辽河种群的遗传距离最小(5.985%), 珠江种群与辽河种群的遗传距离最大(10.529%)。水系内似鮡种群的遗传距离显著小于水系之间的, 除长江水系的似鮡种群外, 其他水系似鮡种群的差异都在 1.2% 以下。在长江水系的似鮡种群内部, 其平均遗传距离是 4.81%。按照鱼类线粒体 DNA 编码蛋白基因序列进化速率为每百万年 1%<sup>[16]</sup> 计算, 各种群的分歧时间在 5.26 Ma 前—3 Ma 前之间(表 2)。

表 2 不同地理种群之间遗传距离的比较和分歧时间估计

不同地理种群之 间比较	遗传距离/%		分歧时间/Ma
	范围	平均值	平均值
长江 1/珠江	8.858—10.629	10.019	5.01
长江 1/海南	8.864—10.009	9.326	4.68
长江 1/长江 2	8.603—11.435	9.402	4.70
长江 1/辽河	8.659—10.516	9.239	4.62
珠江/海南	9.883—11.125	10.198	5.10
珠江/长江 2	8.906—11.243	10.078	5.04
珠江/辽河	10.002—11.954	10.529	5.26
海南/长江 2	8.718—9.671	9.095	4.50
海南/辽河	8.490—9.416	8.835	4.42
长江 2/辽河	5.257—7.111	5.985	3.00

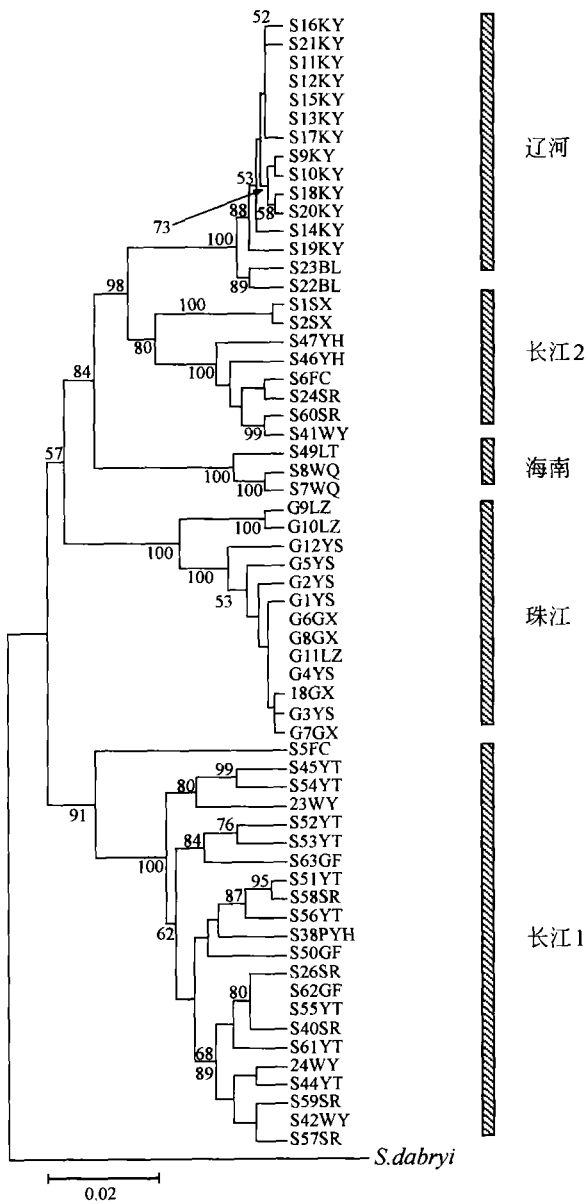


图1 基于 Kimura's 2-parameter 模型构建的 NJ 树  
 枝长表示分歧度, 枝上的数值为  
 1000 次重复抽样检验得到的大于 50% 的支持率

### 3 讨论

#### 3.1 分子生物地理学分析

综合分析似鮡单倍型的相互关系和地理分布及分子钟的计算显示这一分布格局形成于 5 Ma 前—3 Ma 前, 这一时间段处于地质历史时期第三纪的上新世。在上新世, 我国地貌进入一个崭新的发展阶段, 地势出现了大规模的高低分异, 水系的具体流

路发生重大的改变与调整<sup>[17]</sup>。我国的一些大河, 如长江、黄河、珠江、黑龙江等在上新世末更新世初的强烈构造变动过程中, 由于地面的构造变形, 具体流路才相对固定下来。现今河系的具体流路, 就其总的平面结构来说, 是经过一个阶段的剧烈变动和调整才演变成现代水系的, 其形成时代在绝大多数河段只能追溯到上新世晚期。目前长江的一些支流, 如汉江、湘江、赣江等都不完全与目前的河道吻合。长江整个水系的平面结构, 其形成还在晚第三纪。西江水系的平面结构, 是经过第三纪以来的一再变动、调整才形成的。在全国范围内, 不仅改造了或破坏了原先的地貌, 而且产生了若干新的地貌, 这些地貌种类多半一直保留到现在。由于这些地势和水系的变化改变了似鮡的地理分布并形成长江 1、珠江、海南、长江 2 和辽河这些不同的地理种群(图 2), 因此, 似鮡的地理分布范围是由于上新世地质运动而被动发生变化的。分子钟的计算显示似鮡在其后的 200 多万年中没有地理种群的交流。

与似鮡类似的地理分布格局在许多类群中都有发现, 它们的形成过程多被解释为冰期的生物扩散。李思忠等<sup>[18]</sup>在对四大家鱼地理分布的研究中指出四大家鱼可能是冰川期海平面较现在低 100 多米和台湾海峡为低平原时进行水系之间的扩散的。杨金权等<sup>[19]</sup>在分析鲢形目鱼类的地理分化时指出, 黄颡鱼因其具有很强的适应性和扩散能力, 基因交流在水系之间广泛进行。肖武汉<sup>[20]</sup>等分析银鲴自然群体线粒体 DNA 的遗传分化时指出, 部分地理种群单倍型在 NJ 树上有交叉可能与第四纪冰期以来长江中下游频繁发生洪水泛滥和河流袭夺有关。似鮡不同地理种群之间的分子差异很大, TCS 分析甚至不能纳入一个网络图, 说明有长时间的隔离, 各地理种群长期没有相互之间的交流。同其他类群相比, 似鮡的地理格局形成时间早, 各地方种群长期保持了它原有的分布格局, 这也许反映了似鮡这种鱼类的扩散迁徙能力较差。似鮡的这种生物地理学过程是中国东部广布类群中的一个特例。

#### 3.2 似鮡的物种分化现状

系统发育生物地理学的创始人 Avise 将这一学科称作是研究物种形成历史的科学。依据这一学科

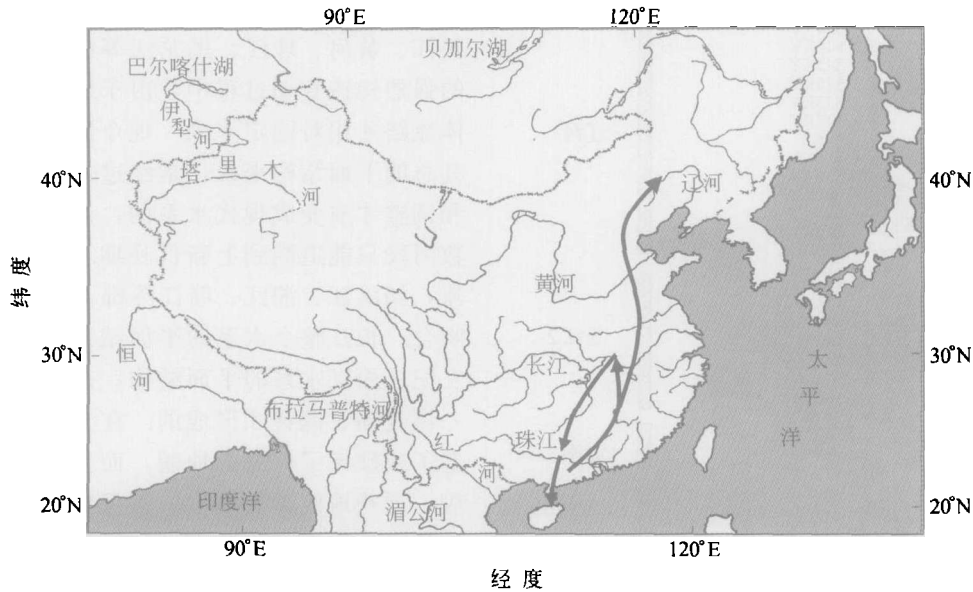


图2 基于 *cyt b* 基因变异推断的似鮡不同地理种群分布区的变化过程

的方法, 可以将不同的样本, 不同种群之间的相互关系表示为二分歧的分支图。但是, 要界定这些分支是否为同一物种或不同物种则需要综合各方面的信息。

许多人利用遗传差异的大小界定不同的物种。但是, 有人研究了脊椎动物种间的遗传差异, 发现不同的物种差别可能很大<sup>[21]</sup>。Meyer等<sup>[22]</sup>发现非洲湖泊中 cichlid 鱼种间遗传差异很小, 但可以将它们分成不同的种。Avise等<sup>[23]</sup>研究发现鱼类物种之间的遗传差异可以在 0—40% 之间变化。Bond等<sup>[24]</sup>在研究曾被认为包括有 30 个种的 *Aptostichus* 属时, 从形态上分辨它们都是一个种, 基于线粒体 16S rRNA 基因的分子数据分析得出不同种群间的遗传距离在 6%—12%。由此可以得出, 仅用遗传差异的大小不能界定物种<sup>[25]</sup>。

另外值得注意的是, 北极熊起源于棕熊中的一个种群, 在北极熊被划分为一个物种后, 构成棕熊的这些种群不形成一个单系, 但是它们仍然属于同一物种<sup>[26]</sup>。因此, 物种的划分也不能简单以分支关系来处理, 而需要综合各方面的因素。

似鮡不同地理种群之间的遗传距离在 5.985%—10.529% (见表 2)。种群内部的差异也较大, 最大可达 10.887%, 大于淡水鱼类同种个体间线粒体遗传变异的峰值 10%<sup>[27]</sup>。分支系统树也显

示存在 5 个大的分支。但是, 从形态上这些隔离的地理种群之间没有明显的差异。本研究所检测的样本有些形态性状趋于动物志中所描述的似鮡, 有些则趋于桂林似鮡。区别似鮡和桂林似鮡的重要特征为胸鳍末端是否超过腹鳍起点及尾柄高与尾柄长的比例变化。本研究的多数样本在这两个特征上有一定的相关性, 但是没有截然的界限, 而是有较大的重叠。这一点与杨秀平等的研究结果是相同的, 难以将这些样本划分为不同的物种。

因此, 从分支关系上看似鮡存在不同的遗传单元, 也许可以划分为不同的地理种或生态类型。但由于形态上缺乏清晰的鉴定特征, 我们将它们作为同一物种处理。

**致谢** 张敏莹、唐琼英、杨金权、胡华明、张亮等协助收集标本, 特此致谢。

## 参 考 文 献

- 1 郑乐怡. 动物分类原理与方法. 北京: 高等教育出版社, 1987. 40—53
- 2 Avise J C. Toward a regional conservation genetic perspective: Phylogeography of faunas in southeastern United States. In: Conservation Genetics: Case Histories from Nature. New York: Chapman & Hall, 1996, 431—470
- 3 Avise J C. The history and purview of phylogeography: A per-

- sonal reflection. *Molecular Ecology*, 1998, 7(4): 371—379
- 4 王 静, 李 明, 魏辅文, 等. 分子系统地理学及其应用. *动物分类学报*, 2001, 26(4): 431—439
  - 5 肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化. *水生生物学报*, 2000, 24(4): 384—391
  - 6 陈宜瑜, 褚新洛, 罗云林, 等. 中国动物志, 硬骨鱼纲, 鲤形目, 中卷. 北京: 科学出版社, 1998. 375—378
  - 7 伍献文, 林人端, 陈景星, 等. 中国鲤科鱼类志, 下卷. 上海: 上海科学技术出版社, 1982, 512—516
  - 8 张敏莹, 杨秀平, 刘焕章. 中国似鲃鱼类遗传多样性的 RAPD 分析及种的划分问题. *水生生物学报*, 2003, 27(3): 314—317
  - 9 杨秀平, 张敏莹, 刘焕章. 中国似鲃鱼类的形态变异及地理分化研究. *水生生物学报*, 2002, 26(3): 281—285
  - 10 Sambrook J, Russell D W, 著. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 分子克隆实验室指南, 第三版. 北京: 科学出版社, 2002, 463—618
  - 11 Anderson S, Bankier A T, Barrell B G, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981, 290(4): 465—475
  - 12 Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(4): 4876—4882
  - 13 Galtier N, Gouy M, Gautier C. SEAVIEW and PHYLO \_ WIN; Two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Applic Biosci*, 1996, 12(6): 543—548
  - 14 Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics*, 2001, 17(12): 1244—1245
  - 15 Clement M, Posada D, Crandall K A. TCS: A computer programme to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 2000, 9(10): 1657—1660
  - 16 Durand J, Tsigenopoulos C, Ünlü E, et al. Phylogeny and biogeography of the family cyprinidae in the Middle East inferred from cytochrome b DNA-evolutionary significance of this region. *Mol Phylogent Evol*, 2002, 22(1): 91—100
  - 17 中国科学院《中国自然地理》编辑委员会. 中国自然地理·地貌. 北京: 科学出版社, 1980, 366—377
  - 18 李思忠, 方 芳. 鲢、鳙、青、草鱼地理分布的研究. *动物学报*, 1990, 36(3): 244—250
  - 19 杨金权, 刘焕章. 两种鲮科鱼类在长江和珠江流域 Cyt b 基因序列变异性分析. *水生生物学报*, 2003, 27(3): 253—257
  - 20 肖武汉, 张亚平. 银鲴自然群体线粒体 DNA 的遗传分化. *水生生物学报*, 2000, 24(1): 1—10
  - 21 Tegelström H, Gelter H P. Haldane's rule and sex biased gene flow between two hybridizing flycatcher species (*Ficedula bicoloris* and *F. hypoleuca*, Aves: Muscicapidae). *Evolution*, 1990, 44(5): 2012—2021
  - 22 Meyer A, Kocher T D, Basasibwaki P, et al. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, 1990, 347: 550—553.
  - 23 Avise J C, Walker D, Johns G C. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 1998, 265: 1707—1712
  - 24 Bond J E, Hedin M C, Ramirez M C, et al. Deep molecular divergence in the absence of morphological and ecological change in the Californian coastal dune endemic trapdoor spider *Aptostichus simus*. *Molecular Ecology*, 2001, 10(4): 899—910
  - 25 Willem J, Ferguson H. On the use of genetic divergence for identifying species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2002, 75: 509—516
  - 26 Shields G F, Adams D, Garner G, et al. Phylogeography of mitochondrial DNA variation in brown bears and polar bears. *Mol Phylogent Evol*, 2000, 15(2): 319—326
  - 27 Billington N, Hebert P D N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implication for introductions. *Can J Fish Aquat Sci*, 1991, 48 (suppl. 1): 80—94