

文章编号: 1674-7054(2023)02-0203-11



# 基于线粒体控制区的海南岛3种弹涂鱼的遗传多样性

柯宏基<sup>1,2</sup>, 陈傅晓<sup>1,2</sup>, 李向民<sup>2</sup>, 樊佳伟<sup>2</sup>, 王永波<sup>1,2</sup>, 符书源<sup>1,2</sup>, 谭围<sup>1,2</sup>

(1. 海南热带海洋学院/热带海洋生物资源利用与保护教育部重点实验室, 海南 三亚 572022;

2. 海南省海洋与渔业科学院/海南省热带海水养殖工程技术研究中心, 海口 571126)

**摘要:** 采集中国海南岛3种弹涂鱼群体并进行遗传多样性研究, 通过使用线粒体控制区基因部分序列作为遗传标记, 获得3种弹涂鱼共195个长度为836 bp的D-loop基因片段序列, 分析其群体的遗传多样性、遗传分化、种群历史动态。结果表明: (1) 弹涂鱼多样性最为丰富, 大鳍弹涂鱼次之, 大弹涂鱼较为缺乏。(2) 遗传分化指数( $F_{st}$ )表明海南岛弹涂鱼群体中三亚的与临高、东方、乐东的存在中等程度分化, 分子方差分析(AMOVA)结果表明总体不存在遗传分化; 大弹涂鱼群体 $F_{st}$ 表明文昌和东方的群体存在分化, AMOVA分析结果表明总体存在中等程度分化; 弹涂鱼与大鳍弹涂鱼亲缘关系较近, 通过线粒体控制区基因标记可将它们较好地地区分。(3) 中性检验和不配对分布结果表明大弹涂鱼文昌群体经历过扩张。综合分析结果表明, 大弹涂鱼应该作为优先保护的种类。

**关键词:** 弹涂鱼; 大弹涂鱼; 大鳍弹涂鱼; 海南岛; 控制区; 遗传多样性

**中图分类号:** Q349 **文献标志码:** A

**引用格式:** 柯宏基, 陈傅晓, 李向民, 等. 基于线粒体控制区的海南岛3种弹涂鱼的遗传多样性[J]. 热带生物学报, 2023, 14(2): 203-213. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2023.02.010

弹涂鱼类栖息于海边滩涂处及红树林等区域<sup>[1]</sup>, 其肉质细嫩, 味道鲜美, 营养价值丰富<sup>[2]</sup>, 不仅有着较高的经济价值, 作为沿海滩涂特色小型鱼类, 还有着独特的生态研究价值。近年来由于海域环境的恶化, 弹涂鱼的生存环境受到影响, 资源数量下降, 因此, 保护弹涂鱼类资源势在必行。有关弹涂鱼类的群体研究一直是国内外研究热点, 研究方法较多, 如随机扩增多态性(RAPD)<sup>[3]</sup>、同工酶<sup>[4]</sup>、AFLP技术<sup>[5]</sup>、线粒体基因片段<sup>[6]</sup>等, 国外先后报道了银线弹涂鱼(*Periophthalmus argentilineatus*)、卡路弹涂鱼(*Periophthalmus kalolo*)、澳氏弹涂鱼(*Periophthalmus waltoni*)等鱼类的群体研究<sup>[7-8]</sup>, 国内研究对象主要集中在弹涂鱼(*P. modestus*)、大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)、大鳍弹涂鱼(*P. magnuspinnatus*)等<sup>[9-13]</sup>。

大弹涂鱼因为其食用价值较高而倍受关注<sup>[14-16]</sup>; 大鳍弹涂鱼因体型外貌与弹涂鱼相似而常被误认为弹涂鱼<sup>[1]</sup>。近年来, 线粒体基因应用范围越来越广泛, 不仅在遗传多样性方面, 也可应用于鉴别不同物种<sup>[17]</sup>, 王正琦等<sup>[18]</sup>通过 *cyt b* 基因序列建树区分出了大鳍弹涂鱼和弹涂鱼。线粒体控制区(Control Region, D-loop)是进化最快的部分, 其基因变化速度比细胞核DNA和其他细胞器的基因快5倍。不同区段的进化速度不同, 应用于不同级别的系统发育分析研究, 是探讨近缘种间和种内遗传变异的良好指标<sup>[19-23]</sup>, 在弹涂鱼类研究上有了了一定程度的应用。王丛涛<sup>[16]</sup>基于控制区研究我国大弹涂鱼群体, 发现北海与其他群体存在分化, 其余群体间基因交流频繁。张顺<sup>[9]</sup>基于D-loop对雷州半岛弹涂鱼类进行分析, 结果表明, 东

收稿日期: 2022-03-14

修回日期: 2022-05-30

基金项目: 热带海洋生物资源利用与保护教育部重点实验室开放课题(UCTMB202011); 海南省本级部门预算项目(2020); 现代农业产业技术体系(CARS-47-Z18)

第一作者: 柯宏基(1994-), 男, 硕士. E-mail: 503006351@qq.com

通信作者: 谭围(1982-), 研究员. 研究方向: 水产经济动物繁殖生物学. E-mail: tanwei2599@163.com

西半岛的大弹涂鱼、弹涂鱼群体基因交流频繁,大鳍弹涂鱼基因交流少,存在遗传分化。国内关于海南岛弹涂鱼类的相关研究较少<sup>[11-12]</sup>,目前还未见有关于利用线粒体控制区开展海南岛弹涂鱼类遗传多样性方面的研究报道。笔者以在海南岛采集到的弹涂鱼、大弹涂鱼和大鳍弹涂鱼为研究对象,通过 *D-loop* 标记,研究 3 种弹涂鱼群体的遗传多样性程度、地理群体间遗传分化差异及种群历史动态,旨在为今后更好利用开发海南岛弹涂鱼资源及制定保护政策提供基础资料。

## 1 材料与方法

1.1 样品来源及扩增测序 2018-12-06—2019-10-16,分别在海口(HK)、文昌(WC)、澄迈(CM)、临高(LG)、儋州(DZ)、昌江(CJ)、东方

(DF)、乐东(LD)、三亚(SY)野外人工捕捉弹涂鱼类群体(表 1)。样本活体运输至海南省海洋与渔业科学院琼海科研基地,取背部肌肉组织,于 75% 的乙醇中保存 24 h,更换为 95% 乙醇保存 24 h,最后于无水乙醇中常温保存。采用 TAKARA DNA 提取试剂盒提取 DNA。DNA 样品经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,保存于-20 °C 冰箱中备用。线粒体控制区基因扩增所用引物序列<sup>[9]</sup>, *D-loop* F1: 5'-AGC TCCCAAAGCTAGC ATTCT-3'; *D-loop* R1: 5'-TTTCTAGGGCCCATCTTAACA-3'。扩增程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s、58 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经电泳检测后,送至广州艾基生物技术有限公司进行双向测序。

表 1 3 种弹涂鱼采样情况

种群	采集地点	数量/个	时间	坐标
弹涂鱼 <i>P. modestus</i>	海口(HK)	15	2019年7月	110°32'49"E, 20°0'37"N
	澄迈(CM)	17	2019年5月	110°2'9"E, 19°56'35"N
	临高(LG)	17	2018年12月	109°49'6"E, 19°56'35"N
	儋州(DZ)	17	2019年4月	109°15'47"E, 19°43'18"N
	昌江(CJ)	17	2019年4月	108°41'12"E, 19°19'57"N
	东方(DF)	17	2019年4月	108°38'25"E, 18°51'54"N
	乐东(LD)	16	2019年4月	108°43'9"E, 18°30'12"N
	三亚(SY)	17	2019年6月	109°7'49"E, 18°21'38"N
合计		133		
大弹涂鱼 <i>B. pectinirostris</i>	文昌(WC)	16	2019年7月	110°37'12"E, 20°0'32"N
	儋州(DZ)	8	2019年4月	109°15'47"E, 19°43'18"N
	东方(DF)	10	2019年4月	108°38'25"E, 18°51'54"N
	合计		34	
大鳍弹涂鱼 <i>P. magnuspinnatus</i>	文昌(WC)	28	2019年10月	110°50'27"E, 19°34'44"N

1.2 数据分析 测序完成后,用 SeqMan 拼装校对线粒体控制区基因序列。通过 MEGA7.0 软件对测序结果进行比对分析。采用软件 DNASP6.0 计算序列变异位点数、单倍型数目、单倍型多样性和核苷酸多样性等遗传参数;利用 MEGA7.0 软件分析序列的碱基组成,基于 Kimura 2-parameter 模型计算群体内及群体间的遗传距离,采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建弹涂鱼序列邻接关系

进化树<sup>[24]</sup>,节点支持率采用 Bootstrap 1000 次重复检验置信度;利用 Arlequin3.11 软件计算两两群体间的遗传分化指数 ( $F_{st}$ ),并进行分子方差分析(Analysis of molecular variance, AMOVA),用于遗传变异和地理结构特点研究;使用核苷酸不配对分析(mismatch distribution)和中性检验(neutrality tests)来检测海南弹涂鱼的种群历史动态,利用 Network5.0 软件构建单倍型网络图,分析单倍型

之间的进化关系。种群扩张时间( $T$ ) 利用公式  $\tau = 2ut$  进行估算。式中  $t$  表示种群扩张至今所经历的代数;  $T = t \times$ 代时, 代时为研究对象的生殖周期;  $\tau$  为扩张时间参数;  $u = \mu k$ ,  $\mu$  为线粒体控制区基因变异速率,  $k$  表示序列长度。

## 2 结果与分析

**2.1 序列分析** 本研究获得的 *D-loop* 基因片段长度为 836 bp, 总变异位点 244 个。共获得 195 个弹涂鱼类目的基因片段, 即弹涂鱼 133 个、大弹涂鱼 34 个、大鳍弹涂鱼 28 个。分析结果表明, 弹涂鱼序列组成显示平均 A、T、G、C 碱基含量分别为 30.8%、33.3%、22.8%、14.1%, A+T(64.1%) 含量高于 G+C(36.9%) 的含量。共检测到 125 个单倍型, 发现 134 个变异位点(占总位点数的 16.0%), 其中 50 个为单变异位点, 而另外 84 个为简约信息位点。大弹涂鱼序列组成显示平均 A、T、G、C 碱基含量分别为 31.1%、34.3%、21.6%、13.0%, A+T(65.4%) 含量高于 G+C(34.6%) 的含量。共检测到 28 个单倍型, 发现 58 个变异位点(占总位点数的 6.9%), 其中 36 个为单变异位点,

而另外 22 个为简约信息位点。大鳍弹涂鱼序列组成显示平均 A、T、G、C 碱基含量分别为 31.9%、34.3%、20.7%、13.1%, A+T(66.2%) 含量高于 G+C(33.8%) 的含量, 共检测到 21 个单倍型, 发现 52 个变异位点(占总位点数的 6.2%), 17 个为单变异位点, 而另外 35 个为简约信息位点。

**2.2 遗传多样性** 3 种弹涂鱼的相关多样性数据见表 2。弹涂鱼群体单倍型多样性在 0.992 ~ 1.000 之间, 核苷酸多样性在 0.014 09 ~ 0.023 84 之间。平均核苷酸差异数为 11.184 ~ 18.831, 其在 LG 群体中最多为 18.831 个, 在 SY 群体中最少为 11.184 个。总体单倍型多样性为 0.998 7, 由单倍型参数可知, HK、CM、LG、DZ、CJ、DF 6 个群体单倍型多样性皆为 1.000, 同为最丰富群体; LD 和 SY 群体单倍型多样性相比较低, 为 0.992 和 0.993。8 个群体的单倍型多样性水平大于 0.5, 属于高水平。总体核苷酸多样性为 0.020 57, 8 个群体中最为丰富的 LG 群体的核苷酸多样性为 0.023 84, 核苷酸多样性最低的为 SY 群体(0.014 09), 8 个群体核苷酸多样均大于 0.005, 属于高水平。8 个群体均具有较高的遗传多样性, 其中 LG 群体

表 2 3 种弹涂鱼的采样点、数目及遗传多样性

采样点	序列数	变异位点	单倍型多样性	核苷酸多样性	平均核苷酸差异数	单倍型数
弹涂鱼						
海口(HK)	15	56	1.000	0.020 08	15.943	15
澄迈(CM)	17	62	1.000	0.019 18	15.228	17
临高(LG)	17	69	1.000	0.023 84	18.831	17
儋州(DZ)	17	56	1.000	0.018 12	14.368	17
昌江(CJ)	17	63	1.000	0.020 79	16.507	17
东方(DF)	17	64	1.000	0.022 77	18.037	17
乐东(LD)	16	60	0.992	0.022 14	17.533	15
三亚(SY)	17	53	0.993	0.014 09	11.184	16
合计	133	134	0.998 7	0.020 27	15.912	125
大弹涂鱼						
文昌(WC)	16	36	0.992	0.011 09	8.442	15
儋州(DZ)	8	19	0.964	0.008 25	6.286	7
东方(DF)	10	31	0.933	0.010 99	8.356	8
合计	34	58	0.979	0.011 09	8.415	28
大鳍弹涂鱼						
文昌(WC)	28	52	0.971	0.016 08	12.783	21

遗传多样性最丰富, SY 群体遗传多样性较缺乏。大弹涂鱼群体单倍型多样性在 0.933 ~ 0.992 之间, 核苷酸多样性在 0.008 25 ~ 0.011 09 之间。平均核苷酸差异数为 6.286 ~ 8.442; WC 群体中最多, 为 8.442 个; DZ 群体中最少, 为 6.286 个。总体单倍型多样性为 0.979。由单倍型参数可知, WC 群体最丰富, 为 0.992; DZ 群体最低, 为 0.933; 3 个群体的数值都在 0.5 之上, 属高水平群体。总体核苷酸多样性为 0.011 09, 其中 WC 群体多样性最丰富, 为 0.011 09; DZ 群体最低, 为 0.008 25, 3 个群体核苷酸多样均大于 0.005, 属于高水平。3 个群体中, WC 群体遗传多样性最为丰富, DZ 群体遗传多样性较缺乏。大鳍弹涂鱼单倍型多样性数值为 0.971, 大于 0.5, 属于高水平; 核苷酸多样性数值为 0.016 08, 大于 0.005, 属于高水平。平均核苷酸差异数为 12.783。

**2.3 单倍型在群体中的分布** 在 8 个弹涂鱼群体中, 共有单倍型 125 个, 5 个共享单倍型, 独有单倍型 120 个。Hap24 为 3 个群体共享(CM、LG、SY), Hap50、53 为 2 个群体共享(DZ、CJ), Hap67 为 2 个群体共享(CJ、DF), Hap84 为 2 个群体所共享(DF、SY)。在独有单倍型中 HK 群体有 15 个(Hap1 ~ 15), CM 群体有 16 个(Hap16 ~ Hap23、Hap25 ~ Hap32), LG 群体有 16 个(Hap33 ~ Hap48), DZ 群体有 15 个(Hap49、Hap51 ~ Hap52、Hap54 ~ Hap65), CJ 群体有 14 个(Hap66、Hap68 ~ Hap80), DF 群体有 15 个(Hap81 ~ Hap83、Hap85 ~ Hap96), LD 群体有 15 个(Hap97 ~ Hap111), SY 群体有 14 个(Hap112 ~ Hap125)。3 个大弹涂鱼群体中共有单倍型 28 个, 共享单倍型 2 个, 为 Hap19、Hap20(DZ、DF 2 个群体共享); 独有单倍型 26 个。在独有单倍型中 WC 群体有 15 个(Hap1 ~ Hap15), DZ 群体有 5 个(Hap16 ~ Hap18、Hap21 ~ Hap22), DF 群体有 6 个(Hap23 ~ Hap28)。

**2.4 遗传分化** 弹涂鱼单倍型网络图(图 1)由 Network 软件分析得出: 没有按照地理群体而形成独立的分支, 共享单倍型约占所有单倍型的 4.0%(5/125)。大弹涂鱼单倍型之间的进化关系显示 WC 群体较为聚在一起, 共享单倍型约占所有单倍型的 7.1%(4/24)(图 2)。

基于线粒体控制区序列构建的 NJ 树(图 3-a)结果表明弹涂鱼各群体杂乱地聚在一起, 没有按

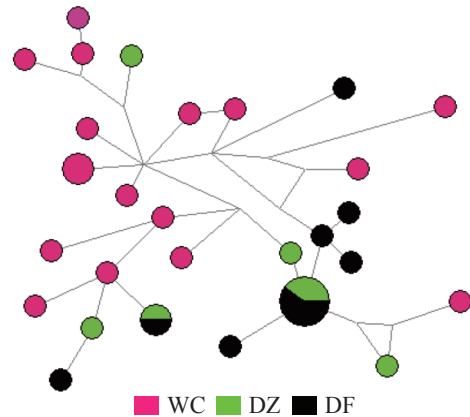


图 1 弹涂鱼线粒体控制区单倍型网络结构图

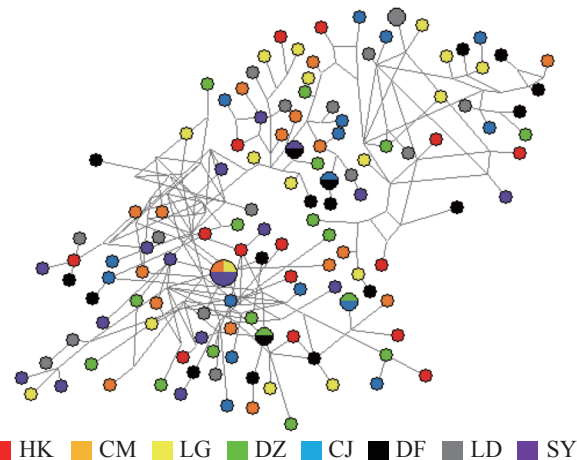


图 2 大弹涂鱼线粒体控制区单倍型网络结构图

采样的地理位置聚集, 大弹涂鱼序列 NJ 树结果表明 WC 群体较为聚在一起(图 3-b)。选取 33 条弹涂鱼(TT)、34 条大弹涂鱼(DT)、28 条大鳍弹涂鱼(DQ)序列建树, 结果表明 3 个物种之间界限明确, 不同种之间的序列可各自聚成单系, 支持率较高, 表明弹涂鱼先与大鳍弹涂鱼分离, 再和大弹涂鱼分离(图 3-c)。

8 个弹涂鱼群体的遗传距离见表 3。表 3 结果表明, 弹涂鱼群体内的遗传距离为 0.014 ~ 0.025, 群体间的遗传距离为 0.016 ~ 0.024, LG 和 DF 群体的遗传距离最大(0.024), 其余群体之间的遗传距离在 0.016 ~ 0.023 之间。大弹涂鱼群体内的遗传距离为 0.008 ~ 0.011, 群体间的遗传距离为 0.010 ~ 0.013, WC 和 DF 群体的遗传距离最大, 为 0.013(表 4)。

3 种弹涂鱼中, 弹涂鱼与大鳍弹涂鱼群体遗传距离最小有着较近的亲缘关系, 为 0.097, 大弹涂鱼与弹涂鱼和大鳍弹涂鱼遗传距离分别为 0.344 和 0.357(表 5)。



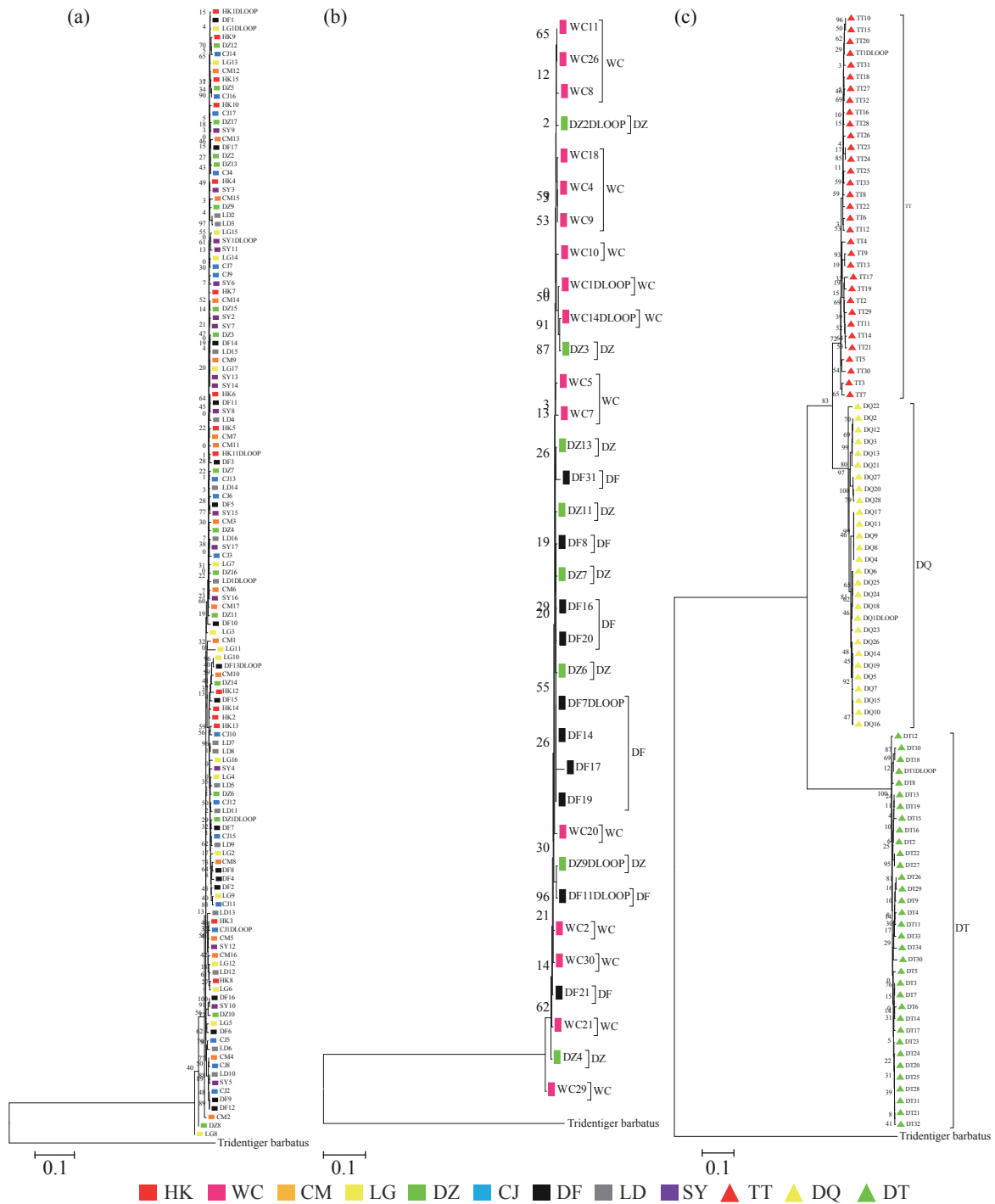


图 3 弹涂鱼(a)、大弹涂鱼(b)及 3 种弹涂鱼(c)线粒体控制区序列邻接系统发育树

群体间  $F_{st}$  分析结果显示: 8 个弹涂鱼两两群体间的  $F_{st}$  值在  $-0.03222 \sim 0.09757$  之间(表 6), LG 和 SY 群体  $F_{st}$  为  $0.09201 (P < 0.05)$ , DF 和 SY 群体  $F_{st}$  为  $0.09757 (P < 0.05)$ , LD 和 SY 群体  $F_{st}$  为  $0.05712 (P < 0.05)$ , 其余群体间  $F_{st}$  均小于  $0.05 (P > 0.05)$ 。大弹涂鱼两两群体间的  $F_{st}$  值在  $0.01579 \sim 0.15270$  之间(表 7), WC 和 DF 的  $F_{st}$  为  $0.15270 (P < 0.01)$ , 其余群体间的  $F_{st}$  为

$0.01579$  和  $0.09775 (P > 0.05)$ 。弹涂鱼与大弹涂鱼  $F_{st}$  为  $0.83211 (P < 0.01)$ , 弹涂鱼与大弹涂鱼  $F_{st}$  为  $0.97460 (P < 0.01)$ , 大弹涂鱼与大弹涂鱼  $F_{st}$  为  $0.98209 (P < 0.01)$ (表 8)。

弹涂鱼地理群体 AMOVA 分析结果(表 9)表明群体间的遗传变异占  $0.48\%$ , 比例极小; 群体内部变异占  $99.52\%$ , 比例大。不存在明显的遗传分化, 群体间基因交流频繁。大弹涂鱼群体间变异

表 3 基于线粒体控制区基因序列的弹涂鱼群体遗传距离

群体	1HK	2CM	3LG	4DZ	5CJ	6DF	7LD	8SY
1HK	0.021							
2CM	0.02	0.02						
3LG	0.023	0.022	0.025					
4DZ	0.019	0.019	0.022	0.018				
5CJ	0.021	0.02	0.023	0.02	0.021			
6DF	0.022	0.022	0.024	0.022	0.022	0.023		
7LD	0.021	0.021	0.023	0.021	0.021	0.023	0.023	
8SY	0.017	0.017	0.021	0.016	0.018	0.021	0.02	0.014

注: 对角线表示群体内遗传距离, 对角线下为群体间遗传距离, 以下同。

表 4 基于线粒体控制区基因序列的大弹涂鱼群体遗传距离

群体	1WC	2DZ	3DF
1WC	0.011		
2DZ	0.010	0.008	
3DF	0.013	0.011	0.011

表 5 基于线粒体控制区基因序列的 3 种弹涂鱼群体遗传距离

群体	TT	DQ	DT
TT			
DQ	0.097		
DT	0.344	0.357	

表 6 弹涂鱼遗传分化指数

群体	1HK	2CM	3LG	4DZ	5CJ	6DF	7LD	8SY
1HK								
2CM	-0.02203							
3LG	-0.00184	0.00442						
4DZ	-0.01816	-0.01321	0.03514					
5CJ	-0.02594	-0.02312	-0.01580	-0.01263				
6DF	0.01567	0.02242	-0.03138	0.04243	-0.01212			
7LD	-0.01578	-0.00596	-0.03222	0.01608	-0.03082	-0.02335		
8SY	0.00250	0.00144	0.09201*	-0.00155	0.02015	0.09757*	0.05712*	

注: \*表示差异显著( $P < 0.05$ ), 以下同。

表 7 大弹涂鱼遗传分化指数

群体	1WC	2DZ	3DF
1WC			
2DZ	0.01579		
3DF	0.15270**	0.09775	

表 8 3 种弹涂鱼遗传分化指数

群体	TT	DQ	DT
TT			
DQ	0.83211**		
DT	0.97460**	0.98209**	

表 9 3 种弹涂鱼的分子方差分析

分组	项目	群体间	群体内	总计	固定指数
弹涂鱼	自由度	7	125	132	
	平方和	69.429	1 148.403	1 217.832	
	变异组分	0.043 99 Va	9.187 22 Vb	9.231 22	$F_{st}=0.004 77$
	变异百分比	0.48	99.52		
大弹涂鱼	自由度	2	31	33	
	平方和	20.442	143.830	164.273	
	变异组分	0.5156 8 Va	4.6396 8 Vb	5.155 37	$F_{st}=0.100 03^{**}$
	变异百分比	10.00	90.00		
3种弹涂鱼	自由度	2	192	194	
	平方和	14 755.729	1 172.173	1 5927.902	
	变异组分	156.283 22 Va	6.105 07 Vb	162.388 29	$F_{st}=0.962 40^{**}$
	变异百分比	96.24	3.76		

注: Va为群体间方差组分, Vb为群体内方差组分。

占 10%, 具有一定比例, 群体内部变异占 90%,  $F_{st}$  为 0.100 03 ( $P < 0.01$ ), 存在中等程度遗传分化。3 种弹涂鱼种群间的遗传变异占所有遗传变异的 96.24%, 种群内的遗传变异仅为 3.76%。

**2.5 种群历史动态** 中性检验结果(表 10)表明, 弹涂鱼全部群体 Tajima's  $D$  值均为负值, 不显著。Fu's  $F_s$  值均为负值, 除 LD 群体外其余群体  $P < 0.05$ 。基于 Arlequin 不配对分布结果(图 4, 表 11)表明, 全部群体都不是单峰状。CM、CJ 群

体的 SSD 统计检验显著, 其余群体不显著; 全部群体  $r$  统计检验不显著。大弹涂鱼全部群体 Tajima's  $D$  值均为负值, 不显著。Fu's  $F_s$  值 WC 群体  $P < 0.01$ , 另外 2 个群体负值不显著。基于 Arlequin 不配对分布结果表明 WC 群体单峰状, 其余群体不为单峰状。SSD 和  $r$  这 2 个统计检验不显著。大鳍弹涂鱼 Tajima's  $D$  和 Fu's  $F_s$  值负值, 不显著, 未呈单峰分布。

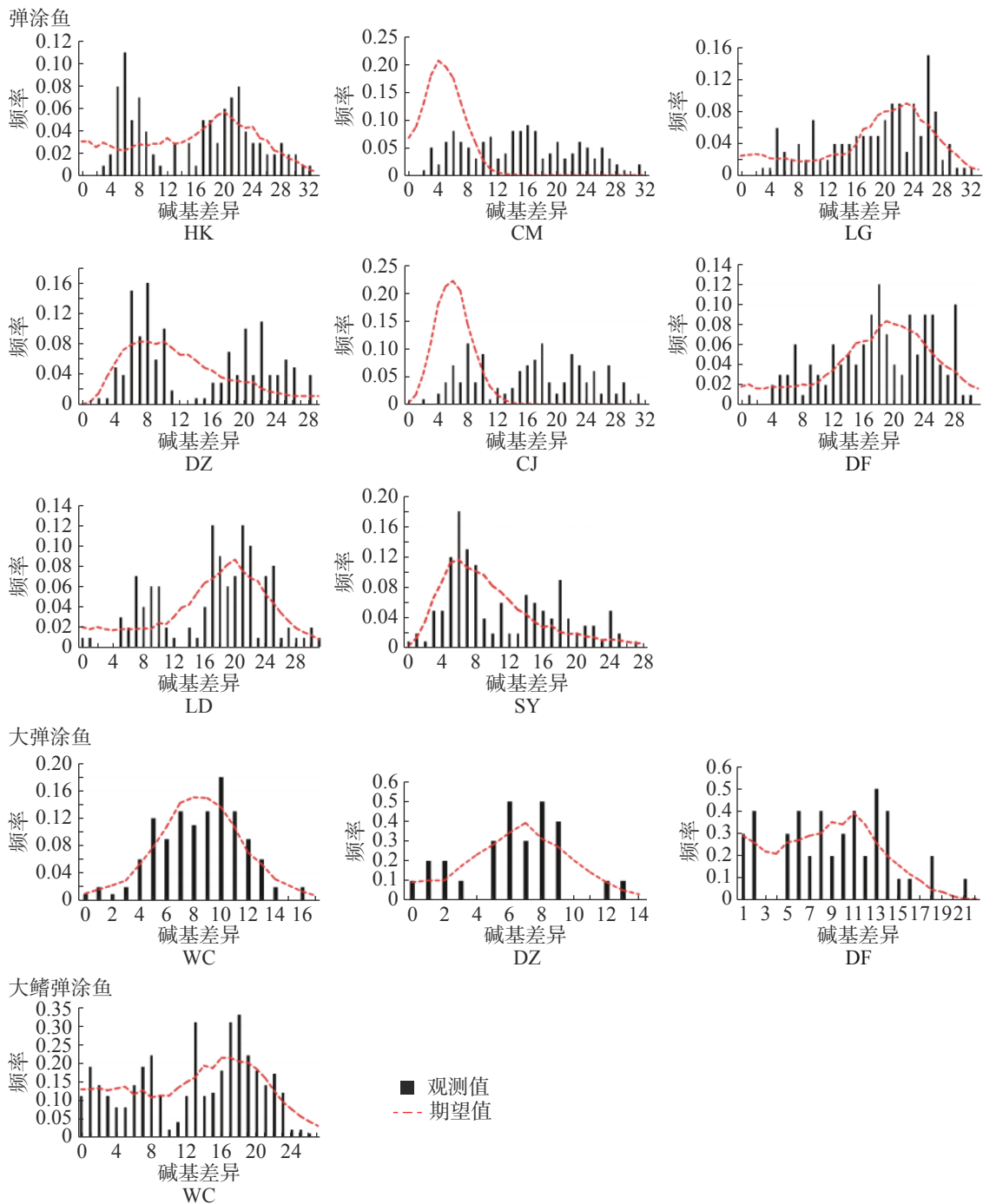


图 4 3 种弹涂鱼群体的核苷酸不配对分析图

表 10 3 种弹涂鱼中性检验结果

采样点	序列数	Tajima's <i>D</i>	Fu's <i>F<sub>s</sub></i>
弹涂鱼			
HK	15	-0.28227	-5.21487**
CM	17	-0.70706	-6.86047**
LG	17	-0.32625	-5.72342**
DZ	17	-0.51965	-7.14285**
CJ	17	-0.48025	-6.36357**
DF	17	-0.19874	-5.92702**
LD	16	-0.11711	-3.37335
SY	17	-1.19875	-6.00342**
大弹涂鱼			
WC	16	-0.92690	-6.72266**
DZ	8	-0.73834	-1.39192
DF	10	-1.14200	-0.71113
大鳍弹涂鱼			
WC	28	-0.16389	-4.28724

注: \*表示差异显著( $P<0.05$ ); \*\*表示差异极显著( $P<0.01$ )。

表 11 3 种弹涂鱼吻合度检验结果

采样点	平方和 SSD	显著性 <i>P</i>	粗糙指数 HRI	显著性 <i>P</i>
弹涂鱼				
HK	0.018 753 78	0.600 000 00	0.016 870 75	0.890 000 00
CM	0.089 922 26	0.010 000 00	0.009 083 04	0.990 000 00
LG	0.010 6 117 6	0.620 000 00	0.021 301 90	0.400 000 00
DZ	0.023 780 06	0.170 000 00	0.036 224 05	0.130 000 00
CJ	0.096 850 53	0	0.023 464 53	0.450 000 00
DF	0.010 212 10	0.470 000 00	0.019 247 40	0.490 000 00
LD	0.015 832 57	0.320 000 00	0.025 347 22	0.380 000 00
SY	0.013 031 19	0.560 000 00	0.018 112 02	0.480 000 00
大弹涂鱼				
WC	0.005 484 07	0.700 000 00	0.013 263 89	0.830 000 00
DZ	0.026 649 96	0.610 000 00	0.054 846 94	0.670 000 00
DF	0.016 099 86	0.830 000 00	0.037 037 04	0.800 000 00
大鳍弹涂鱼				
WC	0.007 667 46	0.780 000 00	0.012 114 72	0.740 000 00

### 3 讨论

遗传多样性与物种的适应能力、进化能力密切相关,本研究对海南岛的弹涂鱼类进行了全面调查,对采集到的 3 种弹涂鱼共 12 个群体进行分析。结果表明,弹涂鱼群体的单倍型多样性指数在 0.992 ~ 1.000 之间,核苷酸多样性指数在 0.014 09 ~ 0.023 84 之间,总体单倍型多样性指数为 0.998 7,核苷酸多样性指数为 0.020 57。根据 Grant 和 Bowen<sup>[25]</sup> 提出的 4 种模式,海南岛 8 个弹涂鱼群体为单倍型多样性及核苷酸多样性高类

型。说明是一个大型稳定的群体,具有长期的进化历史或者和其他支系发生过 2 次交流。8 个群体中三亚群体的遗传多样性最低,笔者推测相比于其他群体,三亚群体最大的区别在于受周围环境胁迫压力较大,海岸线的开发及人类活动影响使弹涂鱼栖息地范围减小,几近消失,而遗传多样性比较丰富的临高群体则受人类活动影响明显较小。海南岛群体总体与广东群体<sup>[10]</sup> 对比结果表明:单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数均高于广东群体。

大弹涂鱼群体的单倍型多样性指数在



0.933 ~ 0.992 之间, 核苷酸多样性指数在 0.008 25 ~ 0.011 09 之间, 总体单倍型多样性为 0.979, 总体核苷酸多样性为 0.011 09。属于高单倍型多样性、高核苷酸多样性类型。大弹涂鱼 3 个群体中, 儋州群体遗传多样性最低, 笔者推测相比于另外两个采样点, 儋州群体采样点附近受人类活动影响较为频繁, 而遗传多样性较为丰富的文昌群体位于东寨港红树林保护区, 受人为活动的干扰较少。但与江苏连云港群体、上海九段沙群体、浙江慈溪群体、浙江舟山群体、福建霞浦群体、广东雷州半岛群体、广西北海群体<sup>[10,16]</sup>相比较, 属于较低水平。

大鳍弹涂鱼单倍型多样性指数为 0.971, 核苷酸多样性指数为 0.016 08。属于高单倍型多样性、高核苷酸多样性类型。与雷州半岛群体<sup>[9]</sup>相比属于较高水平。将 3 种弹涂鱼与同处于南海的卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*)<sup>[26]</sup>、圆舵鲹 (*Auxis tapeinosoma* Bleeker)<sup>[27]</sup>、鰺 (*Therapon theraps*)<sup>[21]</sup>相比, 弹涂鱼属于中上水平, 大弹涂鱼属于低水平, 大鳍弹涂鱼属于中下水平。3 种弹涂鱼相互对比, 弹涂鱼最为丰富, 大鳍弹涂鱼次之, 大弹涂鱼最为匮乏, 应优先对大弹涂鱼进行保护。

$F_{st}$  是评价遗传分化的指标,  $F_{st}$  大于 0.25 表示分化程度非常高,  $F_{st}$  在 0.15 ~ 0.25 表示高度分化,  $F_{st}$  在 0.05 ~ 0.15 表示中等分化,  $F_{st}$  小于 0.05 表示未分化<sup>[28]</sup>。本研究群体间  $F_{st}$  分析结果表明, 8 个弹涂鱼两两群体间的  $F_{st}$  值在 -0.032, 22 ~ 0.097 57 之间, LG 和 SY 群体  $F_{st}$  为 0.092 01 ( $P < 0.05$ ), DF 和 SY 群体  $F_{st}$  为 0.097 57 ( $P < 0.05$ ), LD 和 SY 群体  $F_{st}$  为 0.057 12 ( $P < 0.05$ ), 其余群体间  $F_{st}$  均小于 0.05 ( $P > 0.05$ )。表明三亚与临高、东方、乐东存在中等程度分化, 推测三亚群体受人类活动干扰及栖息地地形阻隔阻碍了其与其他群体的正常交流。AMOVA 分析得出群体间的遗传变异占 0.48%, 比例极小; 群体内部变异占 99.52%, 占据相当大的比例, 不存在明显的遗传分化, 与之前使用 CO I 作为标记得出的结果相似<sup>[12]</sup>。

大弹涂鱼两两群体间的  $F_{st}$  值在 0.015 79 ~ 0.152 70 之间, WC 和 DF 的  $F_{st}$  为 0.152 70 ( $P < 0.01$ ), 其余群体间的  $F_{st}$  为 0.015 79 和 0.097 75 ( $P > 0.05$ ), WC 和 DF 群体存在高度分化。AMOVA 分析结果表明, 3 个大弹涂鱼群体间变异占 10%, 具

有一定比例, 群体内部变异占 90%,  $F_{st}$  为 0.100 03 ( $P < 0.01$ ), 存在中等程度遗传分化, 根据之前  $F_{st}$  数据推测, 主要的分化差异来自于 WC 和 DF 群体之间。张顺<sup>[9]</sup>对雷州半岛 4 个大弹涂鱼群体进行分析得出  $F_{st}$  值在 0 ~ 0.05 之间。王从涛<sup>[16]</sup>对中国沿海大弹涂鱼群体研究得出无显著遗传分化, 北海群体同其他群体存在中等程度分化。本研究结果可能与采样地理位置有关, WC 采样点处于港湾内部较封闭区域, 加上琼州海峡阻隔洋流阻隔, 在一定程度上影响了该群体与其他群体的基因交流。

通过构建邻接系统发育树显示出 3 个物种之间界限明确, 不同种之间的序列可各自聚成单系, 支持率较高, 可看出弹涂鱼先与大鳍弹涂鱼分离, 再和大弹涂鱼分离。弹涂鱼与大鳍弹涂鱼距离最小为 0.097, 大弹涂鱼与弹涂鱼和大鳍弹涂鱼距离分别为 0.344 和 0.357。可得出 3 种弹涂鱼中弹涂鱼与大鳍弹涂鱼亲缘关系较近, 与分类上弹涂鱼与大鳍弹涂鱼处同一属相一致, 弹涂鱼与大鳍弹涂鱼  $F_{st}$  为 0.832 11 ( $P < 0.01$ ), 弹涂鱼与大弹涂鱼  $F_{st}$  为 0.974 60 ( $P < 0.01$ ), 大鳍弹涂鱼与大弹涂鱼  $F_{st}$  为 0.982 09 ( $P < 0.01$ ), AMOVA 显示 3 种弹涂鱼种群间的遗传变异占有所有遗传变异的 92.41%, 种群内的遗传变异仅为 7.59%。3 种弹涂鱼交流受阻, 存在隔离。长期以来, 弹涂鱼和大鳍弹涂鱼被混在一起, 韩国学者证实其实它们是 2 种不同的鱼类<sup>[1]</sup>。王正琦等<sup>[18]</sup>通过 *cyt b* 基因序列建树发现大鳍弹涂鱼和弹涂鱼分别聚在相近分支, 本研究通过 NJ 树可将大鳍弹涂鱼和弹涂鱼相区分开来, 与王正琦等<sup>[18]</sup>的分析结果一致。

中性检验结果表明, 弹涂鱼全部群体 Tajima's  $D$  值均为负值, 不显著。Fu's  $F_s$  值均为负值, 除 LD 群体外其余群体  $P < 0.05$ 。基于 Arlequin 不配对分布表明全部群体都不是单峰状。CM、CJ 群体的 SSD 统计检验显著, 其余群体不显著; 全部群体  $r$  统计检验不显著。以此, 本研究推测海南岛弹涂鱼未经历过扩张。大弹涂鱼全部群体 Tajima's  $D$  值均为负值, 不显著。Fu's  $F_s$  值 WC 群体  $P < 0.01$ , 另外 2 个群体负值不显著。基于 Arlequin 不配对分布表明 WC 群体单峰状, 其余群体不为单峰状。SSD 和  $r$  这 2 个统计检验不显著。大弹涂鱼的性成熟年龄为 1 龄<sup>[29]</sup>,  $D$ -loop 进化速率参

考值为每百万年 3%~12%<sup>[16]</sup>, 推测大弹涂鱼 WC 群体在 17.9~4.5 万年前经历过扩张。大鳍弹涂鱼群体 Tajima's *D* 值和 Fu's *F<sub>s</sub>* 值均为负值, 且不显著。基于 Arlequin 不配对分布表明不为单峰状, 据此推测大鳍弹涂鱼未经历过扩张。17.9~4.5 万年前在第四纪, 第四纪的冰期和间冰期的交替变化会造成海平面的下降和上升由此带来的变化可能会对弹涂鱼类产生影响, 从而发生扩张<sup>[30]</sup>。

本研究对海南岛进行了系统的采样调查, 采样地点覆盖范围较广, 但对比中国动物志等<sup>[1]</sup> 文献的记载发现, 资料上的许多地点已没有弹涂鱼类的活动踪迹, 比如陵水新村、英州等地。从弹涂鱼和大弹涂鱼的遗传多样性分析结果可看出: 采样点的栖息环境与遗传多样性丰富程度存在一定程度的关联。根据本研究调查发现, 弹涂鱼类不是海南的主要经济鱼种, 所以对于海南岛弹涂鱼类来说影响其多样性的主要原因不是过度捕捉, 海岸线过度开发、环境恶化及人类活动频繁是导致弹涂鱼栖息地退化、多样性减少的主要原因。加强弹涂鱼资源保护, 倡导人与自然和谐共处, 有利于海南岛生态岛的建设。对此建议采取以下措施保护弹涂鱼类资源: (1) 严格控制污水排放和滩涂畜禽养殖, 减少在弹涂鱼栖息地的人为活动; (2) 加强弹涂鱼繁殖生物学基础理论研究, 定期监测生态环境以及弹涂鱼生物资源, 对资源衰退严重区域可通过人工增殖放流恢复弹涂鱼资源。(3) 对分布有弹涂鱼资源的河口、滩涂地区景观工程改造需充分考虑弹涂鱼生活习性, 为弹涂鱼保留适当栖息场所。(4) 作为弹涂鱼栖息地的红树林滩涂区, 存在着利用不合理等问题, 下一步需要加强对红树林的保护, 为红树林生态系统的发展提供空间。

## 参考文献:

- [1] 伍汉霖, 钟俊生. 中国动物志硬骨鱼纲鲈形目(五) 虾虎鱼亚目[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [2] 王军, 苏永全. 三种弹涂鱼的生化组成及能值分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1994, 33(1): 96-99.
- [3] 金春华, 钟爱华, 黄福勇, 等. 大弹涂鱼自然种群遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 海洋科学, 2004, 28(12): 26-30.
- [4] 张春丹, 李明云, 黄福勇, 等. 灞浦大弹涂鱼群体生化遗传分析[J]. 海洋科学, 2008, 32(2): 47-50+68.
- [5] 陈维, 洪万树, 陈仕玺, 等. 西北太平洋大弹涂鱼群体遗传结构的 AFLP 分析[J]. 中国水产科学, 2014, 21(5): 1020-1028.
- [6] MIN P T, HAN M G, MOHD H N, et al. Genetic diversity of the Pearse's Mudskipper *Periophthalmus novemradiatus* (Perciformes: Gobiidae) and characterization of its complete mitochondrial genome [J]. *Thalassas*, 2020, 36(1): 103-113.
- [7] POLGAR G, ZANE L, BABBUCCI M, BARBISAN F, et al. Phylogeography and demographic history of two widespread Indo-Pacific mudskippers (Gobiidae: Periophthalmus) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2014, 73: 161-176.
- [8] GHANBARIFARDI M, ALIABADIAN M, ESMAEILI H R. Phylogeography of Walton's Mudskipper, *Periophthalmus waltoni* Koumans, 1941 (Perciformes: Gobiidae), from the Persian Gulf and Gulf of Oman [J]. *Zoology in the Middle East*, 2018, 64(3): 207-218.
- [9] 张顺. 雷州半岛红树林区弹涂鱼类种群生物学特征与遗传多样性的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2017.
- [10] 廖健, 贺亮, 张顺, 等. 基于 *cox1* 和 D-loop 区序列雷州半岛红树林海区 2 种野生弹涂鱼的遗传变异[J]. *广东海洋大学学报*, 2016, 36(4): 6-11.
- [11] HE L J, MUKIA T, CHU K H, et al. Biogeographical role of the Kuroshio current in the amphibious Mudskipper *Periophthalmus modestus* indicated by mitochondrial DNA data [J]. *Scientific Reports*, 2015(5): 1-12.
- [12] 柯宏基, 李向民, 陈傅晓, 等. 基于 *CO I* 序列的海南岛 8 个弹涂鱼群体遗传多样性研究[J]. *海洋渔业*, 2020, 42(2): 138-148.
- [13] 杨帆, 何利军, 雷光春, 等. 中国东南沿海弹涂鱼科常见鱼类的遗传多样性和 DNA 条形码[J]. *生态学杂志*, 2012, 31(3): 676-683.
- [14] 刘至治, 杨金权, 王正琦, 等. 长江口及其南部邻近地区大弹涂鱼种群遗传结构及种群历史分析[J]. *动物学研究*, 2009, 30(1): 1-10.
- [15] 陈卉. 西北太平洋边缘海大弹涂鱼的亲缘地理研究[D]. 上海: 复旦大学, 2010.
- [16] 王从涛. 中国沿海大弹涂鱼群体的亲缘地理与种群遗传结构分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- [17] 李尚琪, 李炯棠, 张研, 孙晓晴, 柳淑芳, 庄志猛. 中国渔业生物 DNA 条形码信息平台构建及应用[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(4): 705-713.
- [18] 王正琦, 杨金权, 唐文乔. 一种长期被误鉴的中国新纪录鱼类—大鳍弹涂鱼[J]. *动物分类学报*, 2006(4): 906-911.
- [19] 李玉龙, 王彬, 王爱勇, 等. 辽宁沿海日本海马线粒体控制区序列变异及其在海龙科鱼类系统分析中的应用[J]. *水产学报*, 2017, 41(7): 1073-1082.
- [20] 马波, 孙家贤, 姜作发. 黑龙江上游 3 种茴鱼分类地位的线粒体 D-loop 序列变异分析[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(2): 314-321.
- [21] 薛丹, 章群, 郜星辰, 等. 基于线粒体控制区序列的南海北部近岸鳊的遗传多样性[J]. *中国水产科学*, 2015,

- 22(4): 749 – 756.
- [22] 海萨·艾也力汗, 郭焱, 孟玮, 等. 基于线粒体控制区序列的塔里木裂腹鱼遗传多样性及种群分化分析[J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 944 – 954.
- [23] 佟广香, 匡友谊, 尹家胜, 等. 根据 mtDNA 控制区序列分析野生唇鲮的种群遗传结构[J]. 中国水产科学, 2011, 18(3): 500 – 507.
- [24] 薛庆中, 陈辰, 陈晓龙, 等. DNA 和蛋白质序列数据分析工具 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2012: 107.
- [25] GRANT W S, BOWEN B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation [J]. *Journal of Heredity*, 1998, 89(5): 415 – 426.
- [26] 吕金磊, 章群, 杨喜书, 等. 基于线粒体控制区的中国南海海域卵形鲳鲹遗传多样性[J]. *海洋渔业*, 2017, 39(3): 241 – 248.
- [27] 李敏, 李玉芳, 张鹏, 等. 基于线粒体控制区序列的南海圆舵鲷种群遗传结构分析[J]. *南方水产科学*, 2016, 12(4): 88 – 95.
- [28] 程起群, 吕浩, 逢娇慧, 等. 长江流域 4 个野生大眼鲈群体的遗传多样性分析[J]. *中国水产科学*, 2019, 26(4): 774 – 782.
- [29] 张其永, 沈曙光, 张文胜. 大弹涂鱼的年龄、生长和生殖力研究[J]. *水产学报*, 1990, 14(3): 179 – 188.
- [30] 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: 88 – 89.

## Analysis of genetic diversity of three Mudskipper populations in Hainan Island based on mitochondrial control region sequences

KE Hongji<sup>1,2</sup>, CHEN Fuxiao<sup>1,2</sup>, LI Xiangmin<sup>2</sup>,

FAN Jiawei<sup>2</sup>, WANG Yongbo<sup>1,2</sup>, FU Shuyuan<sup>1,2</sup>, TAN Wei<sup>1,2</sup>

(1. College of Tropical Ocean/ Ministry of Education Key Laboratory for Utilization and Conservation of Tropical Marine Bioresources, Hainan University, Sanya, Hainan 572022; 2. Hainan Academy of Marine and Fishery Sciences/ Hainan Engineering and Technology Research Center for Tropical Marine Aquaculture, Haikou, Hainan 571126, China)

**Abstract:** Mudskipper is a fish of goby family with high economic and ecological value. Markers of mitochondrial control region were used to analyze genetic diversity, genetic structure, and demographic history among nine populations of three mudskipper species, such as *Periophthalmus modestus*, *Boleophthalmus pectinirostris* and *Periophthalmus magnuspinnatus*, for better conservation of Mudskipper resources. All samples were separately collected from nine localities (Haikou, Wenchang, Chengmai, Lingao, Danzhou, Changjiang, Dongfang, Ledong and Sanya) in Hainan Island. As a result, we have obtained 195 *D-Loop* gene sequences of with a length of 836 bp from all the Mudskipper samples. The analysis showed that *P. modestus* is highest in genetic diversity with *B. pectinirostris* being the lowest among the three mudskipper species. The genetic differentiation indexes ( $F_{st}$ ) of *P. modestus* indicated that there are moderate genetic differentiations between Sanya and each of Lingao, Dongfang and Ledong populations. The analysis of molecular variance (AMOVA) of *P. modestus* suggested the absence of genetic variation within populations. The  $F_{st}$  of *B. pectinirostris* showed that there is a high genetic differentiation between Wenchang and Dongfang populations, and the AMOVA of *B. pectinirostris* suggested the existence of moderate difference within populations. The genetic distance analysis of the three mudskipper species showed that *P. modestus* and *P. magnuspinnatus* populations had the closest relationship and could be distinguished by *D-Loop* gene sequences. The neutrality test and mismatch distribution analysis showed that the Wenchang population of *B. pectinirostris* was obviously expanded in its evolution. All the results showed that genetic resources of *B. pectinirostris* among three mudskippers populations should be conserved as a priority.

**Keywords:** Hainan Island; *Periophthalmus modestus*; *Boleophthalmus pectinirostris*; *Periophthalmus magnuspinnatus*; mitochondrial control region; genetic diversity