

doi: 10.7541/2014.10

西北太平洋海岸带大弹涂鱼复合体的隐存种与进化历史

陈卉¹ Gianluca Polgar² 殷维¹ 傅萃长¹

(1. 复旦大学生物多样性科学研究所, 生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 上海 200433;

2. Biology Programme, Universiti Brunei Darussalam, Bandar Seri Begawan, Gadong, Negara Brunei Darussalam)

摘要: 大弹涂鱼 *Boleophthalmus pectinirostris* 间断分布于西太平洋海岸带东亚与马来西亚马六甲海峡, 但马来西亚种群的分属地位尚存争议。研究使用线粒体 *ND5* 基因序列(718 bp)与核位点 *Rag1* 基因序列(1395 bp)对西北太平洋海岸带 11 个地点的 45 尾大弹涂鱼属鱼类进行系统发育关系重建, 结果表明大弹涂鱼包括东亚与马来西亚两个单系群, 两者形成姊妹群关系。GMYC 分析、*BEAST 物种树支持大弹涂鱼东亚谱系和马来西亚谱系是不同种。分子测定年龄分析表明大弹涂鱼东亚谱系与马来西亚谱系之间的分化时间为 2.73 百万年。因此, 西北太平洋海岸带大弹涂鱼是复合体, 包括两个物种: 东亚种群是大弹涂鱼 *Boleophthalmus pectinirostris sensu stricto*, 而马来西亚种群是隐存种 *Boleophthalmus* sp.。大弹涂鱼与隐存种之间的物种分化可能是晚上新世冰期海平面下降产生的地理隔离以及间冰期洋流对基因交流的阻碍两方面相互作用的结果。

关键词: 虾虎鱼科; 大弹涂鱼; 系统发育; 物种界定; 西北太平洋

中图分类号: Q111 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2014)01-0075-12

大弹涂鱼属(*Boleophthalmus* Valenciennes, 1837) 鱼类是一群生活在太平洋和印度洋沿岸潮间带淤泥质滩上的小型鱼类, 隶属于鲈形目 Perciformes、虾虎鱼亚目 Gobioidae、虾虎鱼科 Gobiidae、背眼虾虎鱼亚科 Oxudercinae^[1]。该属包括 5 种鱼类: 北澳洲大弹涂鱼 *Boleophthalmus birdsong* Murdy, 1989、薄氏大弹涂鱼 *B. boddarti*(Pallas, 1770)、绿斑大弹涂鱼 *B. caeruleomaculatus* McCulloch & Waite, 1918、杜氏大弹涂鱼 *B. dussumieri* Valenciennes, 1837 和大弹涂鱼 *B. pectinirostris*(Linnaeus, 1758)。依据 Fish Base^[2]与 the Catalog of Fishes^[3]数据库的记录, 分布于西北太平洋的大弹涂鱼属鱼类包括两种: 薄氏大弹涂鱼与大弹涂鱼。其中, 薄氏大弹涂鱼主要分布于南中国海北部湾以南, 而大弹涂鱼则间断分布于东亚(南中国海北部湾以北)与马来西亚的马六甲海峡^[1, 4-9]。大弹涂鱼东亚种群的体长一般不超过 135 mm^[4], 而马来西亚种群的体长可达 175 mm^[9]。

Murdy^[1]对大弹涂鱼属鱼类进行分类校订后认为大弹涂鱼马来西亚种群可能是一个隐存种(Cryptic species)。分子证据已在鱼类分类与系统学研究中广泛运用^[10, 11], 其中线粒体 *ND5* 与核位点 *Rag1* 基因是虾虎鱼科鱼类分类与系统学研究中常用的分子标记之一^[12, 13]。因此, 本研究选择 *ND5* 与 *Rag1* 基因作为分子标记, 使用分子证据探讨大弹涂鱼马来西亚种群的物种状态。

西北太平洋的一个独特地形特点是具有南中国海、东中国海、黄海和日本海等一系列相互连接的边缘海^[14]。上新世和更新世的冰期及间冰期旋回导致的海平面涨落对边缘海的面积和结构造成了剧烈影响^[14]。基于分子证据的系统发育研究揭示在晚上新世和更新世冰期阶段海平面下降导致连接边缘海的海峡形成陆桥成为地理障碍, 导致近海鱼类谱系分化和物种形成^[12, 15]; 间冰期阶段海平面上升, 边缘海重新连接形成复杂的水文情况^[16], 中国海沿岸

收稿日期: 2012-06-04; 修订日期: 2013-04-12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2013CB430404); 国家自然科学基金(30970338; 31172062); 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-10-0342)资助

作者简介: 陈卉(1984—), 女, 湖北武汉人; 硕士研究生; 主要从事鱼类生态与进化研究。E-mail: leaflesschen@163.com

通信作者: 傅萃长, 教授, 博士生导师; E-mail: czfu@fudan.edu.cn

流、黑潮(Kuroshio Current)、南中国海暖流亦能成为自然屏障阻碍种群间的基因流,促进鱼类谱系分化与物种形成^[17,18]。因此,本研究假设冰期阶段海平面下降马六甲海峡成为陆桥以及间冰期阶段复杂的洋流系统可能在西北太平洋海岸带大弹涂鱼属鱼类的遗传分化过程中扮演了重要角色。本研究目的是通过沿西北太平洋海岸带进行广泛取样,基于线粒体与核基因证据来揭示西北太平洋海岸带大弹涂鱼东亚种群与马来西亚种群的间断分布格局的进化历史。

1 材料与方法

1.1 取样和分子标记

西北太平洋地区大弹涂鱼属鱼类标本包括来自我国广西党江、广东湛江、福建泉州、浙江温州、

上海崇明、韩国顺天(Suncheon)和日本六角川(Rokkaku River)7个地点的大弹涂鱼东亚种群 19 尾(图 1),来自马来西亚龟咯岛(Pulau Kukup, PK)和丹戎比艾(Tanjung Piai, TP)2个地点的大弹涂鱼马来西亚种群 11 尾,来自马来西亚龟咯岛、丹戎比艾、凯莉岛(Carey Island)和双溪槟榔(Sungai Pinang)4个地点的薄氏大弹涂鱼 15 尾(图 1)。外类群选择拉氏狼牙虾虎鱼 *Odontamblyopus lacepedii* 2 尾、里贝卡狼牙虾虎鱼 *Odontamblyopus rebecca*、弹涂鱼 *Periophthalmus modestus* 和大鳍弹涂鱼 *Periophthalmus magnuspinnatus* 各 1 尾(表 1)。采集标本的肌肉用 95%乙醇固定保存。选择线粒体 NADH 脱氢酶亚基 5 基因(*ND5*)与核位点重组激活基因 1(*Rag1*)作为分子标记。

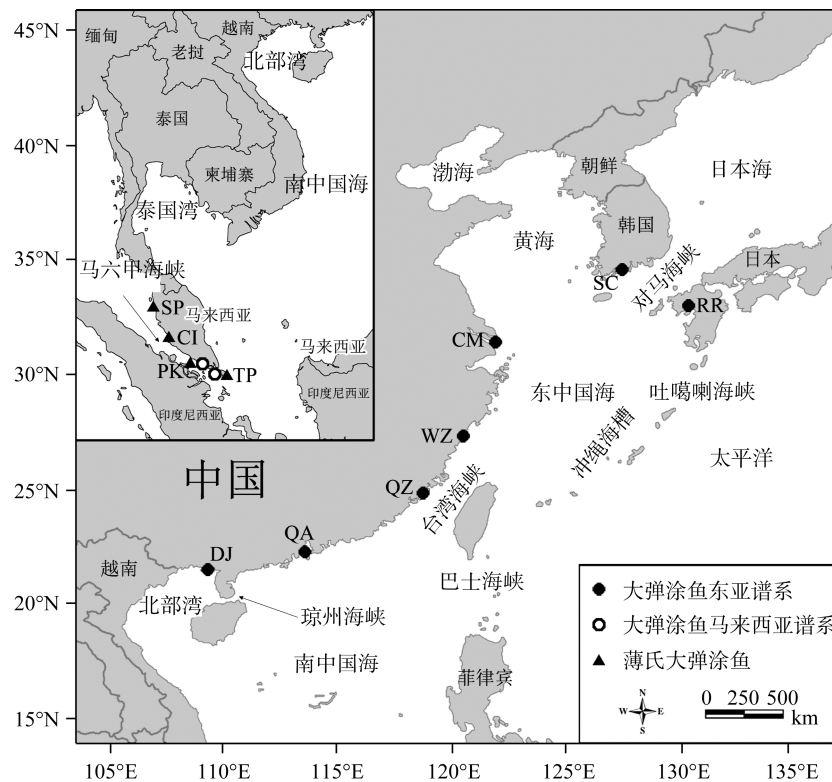


图 1 西北太平洋海岸带大弹涂鱼属鱼类的采样地点

Fig. 1 Sample sites of *Boleophthalmus* fishes along the northwestern Pacific coast
缩写见表 1

Abbreviation as in Tab. 1

1.2 DNA 提取、PCR 扩增与产物测序

采用高盐法从鱼体肌肉组织中提取全基因组 DNA。扩增 *ND5* 基因的引物为 L12321(5'-GGTCTT AGGAACCAAAA ACTCTTGTTGCAA-3')与 H13396 (5'-CCTATTTTTCGGATGTCTTG-3')^[19]; PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5min; 94°C 变性 35s, 55°C 退火

35s, 72°C 延伸 40s; 循环 35 次; 72°C 终末延伸 8min。扩增 *Rag1* 基因片段的方案为巢式 PCR。第一轮使用的引物为 RAG1F1(5'-CTGAGCTGCAGTCAG TACCATAAGATGT-3')和 RAG1R1(5'-CTGAGTCC TTGTGAGCTTCCATRAAYTT-3')^[20], 第二轮使用本研究设计的引物 GOBRAG1F1(5'-GCCAGATCTT

表 1 种名、采样地点、个体编号、单倍型及 GenBank 登录号
 Tab. 1 Species, sampling localities, codes, haplotypes and GenBank accession numbers

采样地点 Locality	编号 Code	ND5		Rag1		ND5 + Rag1
		单倍型 Haplotype	GenBank 登录号 GenBank No.	单倍型 Haplotype	GenBank 登录号 GenBank No.	单倍型 Haplotype
大弹涂鱼 <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> (n = 30)						
广西党江 DJ	DJDT1	HN01	JX003004	HR01	JX003054	H01
	DJDT2	HN01	JX003005	HR01	JX003055	H01
	DJDT3	HN02	JX003006	HR02	JX003056	H02
广东淇澳岛 QA	QADT1	HN03	JX003007	HR03	JX003057	H03
				HR04	JX003058	H04
	QADT2	HN04	JX003008	HR05	JX003059	H05
	QADT3	HN05	JX003009	HR06	JX003060	H06
				HR07	JX003061	H07
福建泉州 QZ	QZDT1	HN06	JX003010	HR08	JX003062	H08
				HR09	JX003063	H09
浙江温州 WZ	WZDT1	HN07	JX003011	HR10	JX003064	H10
	WZDT2	HN08	JX003012	HR11	JX003065	H11
	WZDT3	HN09	JX003013	HR10	JX003066	H12
上海崇明 CM				HR12	JX003067	H13
	CMDT1	HN07	JX003014	HR13	JX003068	H14
	CMDT2	HN01	JX003015	HR01	JX003069	H01
韩国顺天 SC	CMDT3	HN09	JX003016	HR11	JX003070	H15
	SCDT1	HN10	JX003017	HR01	JX003071	H16
				HR14	JX003072	H17
日本六角川 RR	SCDT2	HN10	JX003018	HR14	JX003073	H17
	SCDT3	HN10	JX003019	HR01	JX003074	H16
	RRDT1	HN11	JX003020	HR01	JX003075	H18
马来西亚龟咯岛 PK	RRDT2	HN11	JX003021	HR01	JX003076	H18
	RRDT3	HN11	JX003022	HR01	JX003077	H18
	PKDT1	HN12	JX003023	HR15	JX003078	H19
马来西亚丹戎比艾 TP				HR16	JX003079	H20
	PKDT2	HN12	JX003024	HR17	JX003080	H21
				HR18	JX003081	H22
	TPDT1	HN13	JX003025	HR15	JX003082	H23
	TPDT2	HN13	JX003026	HR15	JX003083	H23
				HR16	JX003084	H24
	TPDT3	HN12	JX003027	HR18	JX003085	H22
	TPDT4	HN14	JX003028	HR15	JX003086	H25
	TPDT5	HN15	JX003029	HR19	JX003087	H26
			HR20	JX003088	H27	
			HR21	JX003089	H28	
			HR22	JX003090	H29	
			HR23	JX003091	H30	
			HR15	JX003092	H19	
			HR18	JX003093	H31	

续表

采样地点 Locality	编号 Code	ND5		Rag1		ND5 + Rag1
		单倍型 Haplotype	GenBank 登录号 GenBank No.	单倍型 Haplotype	GenBank 登录号 GenBank No.	单倍型 Haplotype
薄氏大弹涂鱼 <i>Boleophthalmus boddarti</i> (n = 15)						
马来西亚龟咯岛 PK	PKBS1	HN17	JX003034	HR24	JX003094	H32
				HR25	JX003095	H33
马来西亚丹戎比艾 TP	PKBS2	HN17	JX003035	HR26	JX003096	H34
				HR27	JX003097	H35
		HN17	JX003036	HR24	JX003098	H32
		HN18	JX003037	HR26	JX003099	H36
马来西亚凯莉岛 CI	TPBS1	HN19	JX003038	HR24	JX003100	H37
		HN20	JX003039	HR25	JX003101	H38
				HR26	JX003102	H39
		HN21	JX003040	HR26	JX003103	H40
马来西亚双溪槟榔 SP	SPBS1	HN17	JX003041	HR24	JX003104	H32
		HN22	JX003042	HR26	JX003105	H41
			HR28	JX003106	H42	
	SPBS3	HN19	JX003043	HR26	JX003107	H43
				HR27	JX003108	H44
	SPBS4	HN18	JX003044	HR26	JX003109	H36
		HN23	JX003045	HR29	JX003110	H45
	SPBS5			HR30	JX003111	H46
HN17		JX003046	HR24	JX003112	H32	
拉氏狼牙虾虎鱼 <i>Odontamblyopus lacepedii</i>	SPBS6			HR26	JX003113	H34
		HN19	JX003047	HR24	JX003114	H37
		HN17	JX003048	HR24	JX003115	H32
				HR31	JX003116	H47
山东胶州 JZ	JZLY1	HN24	JX003049	HR32	JX003117	H48
				HR33	JX003118	H49
浙江温州 WZ	WZLY1	HN25	JX003050	HR34	JX003119	H50
里贝卡狼牙虾虎鱼 <i>Odontamblyopus rebecca</i>						
广东淇澳岛 QA	QALB1	HN26	JX003051	HR35	JX003120	H51
				HR36	JX003121	H52
弹涂鱼 <i>Periophthalmus modestus</i>						
广西山口 SK	SKTT1	HN27	JX003052	HR37	JX003122	H53
大鳍弹涂鱼 <i>Periophthalmus magnuspinnatus</i>						
福建漳州 ZZ	ZZDQ1	HN28	JX003053	HR38	JX003123	H54

CCAGCCTCT-3')和 XRAG1R(5'-TACTTGGADGTG TAGAGCC-3'); PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 35s, 55℃ 退火 40s, 72℃ 延伸 40s; 循环 35 次; 72℃ 终末延伸 8min。PCR 产物经 2.0% 琼脂糖电

泳凝胶纯化, 使用第二轮扩增引物在 ABI 3730 DNA 测序仪中进行测序。

1.3 单倍型网络图与系统发育关系重建

使用 CLUSTAL X version 1.83 软件^[21], 采用默

认参数对 *ND5* 和 *Rag1* 基因序列进行对位。使用 DnaSP version 4.20 软件选择 *ND5* 基因的单倍型^[22]。使用 Phase version 2.1 软件^[23, 24], 设置后验概率阈值为 0.6, 选择 *Rag1* 基因的单倍型。一些个体的 *Rag1* 基因具有两个单倍型(表 1)。使用 Network version 4.6 软件^[25]构建 Median-Joining 单倍型网络图, 并采用最大简约(Maximum parsimony)过程^[26]确定单倍型之间的连接。

使用 MrBayes version 3.2 软件^[27]与 RAxML version 7.2.6 软件^[28], 基于密码子分区构建贝叶斯(Bayesian)和最大似然(Maximum likelihood)树。使用 jModeltest version 0.1.1 软件^[29]选择各分区的最适碱基替换模型。贝叶斯分析基于马可夫蒙特卡罗(Markov chain Monte Carlo)进行 1.2×10^7 代运算, 每 1000 代对系统树进行 1 次抽样。抛弃前 3000 棵抽样树, 构建 50% 的多数原则一致树, 并计算每个节点的后验概率值(Bayesian Posterior Probability, BPP)。最大似然分析使用快速登山算法(Rapid-hill-climbing algorithm), 在 GTRGAMMA 模型下进行 100 次重复找出分值最高的最大似然树(Best-scoring ML tree)。再进行 1000 次自展(Bootstrap)分析, 从而估计节点的自展支持度(Bootstrap support, BS)。

1.4 物种界定与基因流

基于 *ND5* + *Rag1* 联合基因序列, 使用 General Mixed Yule-Coalescent(GMYC)方法确定进化显著性

单元(Evolutionary Significant Units, ESU)。GMYC 方法结合种间分化的 Yule 过程和种内分化的溯祖过程, 通过确定两个过程之间的转换点, 为物种界定提供依据^[30]。首先, 使用 BEAST version 1.7.2 软件^[31]构建超度量树(Ultrametric tree), 种群动态模型设置为稳定大小模型(Constant-size model), 突变率设置为平均值为 1 的对数正态分布(Lognormal distribution)。运行 4 个重复, 每个重复运行 5×10^7 代, 每 1000 代取样一次, burnin 为 1/10。接着, 4 个重复的结果用 BEAST 软件包中的 LogCombiner version 1.7.2 合并, 利用 Tracer version 1.5 软件^[32]查看有效取样大小(Effective Sampling Size, ESS)值(ESS 大于 200), 在 BEAST 软件包中的 TreeAnnotator version 1.7.2 中生成最大谱系置信树(Maximum Clade Credibility Tree)。最后, 在 R 环境^[33]中使用 SPLITS 软件包^[34]进行单阈值(Single-threshold)的 GMYC 方法分析。

使用 IMA2 软件^[35, 36]在隔离迁移(Isolation with migration, IM)模型下估算物种间的基因流。在 Hasegawa-Kishino-Yano(HKY)进化模型下运行 MCMC 链 5×10^7 代, 舍弃前 5×10^6 代之后保证 ESS 值大于 200, 参数间的自相关(Parameter autocorrelations)小于 0.05。运算过程中未指定具体的突变率 u 时, IMA2 可估计种群突变率(Population mutation rates, θ)和每突变迁移率(Migration rates per mutation, M)。而有

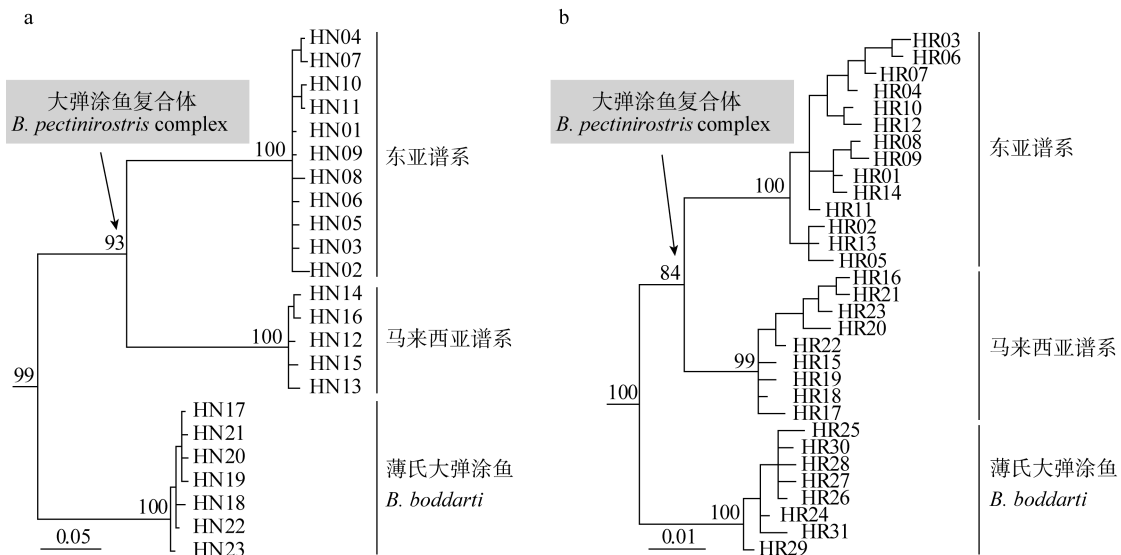


图 2 基于 *ND5* 基因(a)与 *Rag1* 基因(b)构建的贝叶斯 50%多数原则一致树

Fig. 2 The Bayesian 50% major rule consensus tree based on *ND5* (a) gene and *Rag1* (b) gene
节点上方为贝叶斯后验概率, 单倍型信息见表 1

Above nodes are Bayesian posterior probabilities, and information of haplotypes as in Tab. 1

效种群大小(Effective population size) $N = \theta/4u$, 每世代迁移率(Migration rates per generation) $m = Mu$, 故而每世代基因迁移有效数目(Effective numbers of gene migrants per generation) $2Nm = 2 \times \theta/4u \times Mu = \theta M/2$ 。

1.5 遗传距离、物种树与分化时间

使用 MEGA version 5.05 软件^[37]计算物种间的成对 Kimura 双参数(K2P)平均遗传距离。使用 *BEAST version 1.7.2 软件^[31, 38]构建物种树(Species

tree)。分子钟采用对数正态分布的松散钟, 先验树(Tree prior)设置为 Yule 过程。共运行了 4 个重复, 每个重复运行 5×10^7 代, 每 1000 代取样一次, burnin 为 1/10。使用 LogCombiner 软件合并 4 重复的结果, 利用 Tracer 软件检验其 ESS 值。在 TreeAnnotator 软件中生成最大谱系置信树。由于缺乏虾虎鱼科鱼类化石, 本研究使用 Mukai, *et al.*^[39]估算的吻虾虎鱼属鱼类 *ND5* 基因的突变率, 每百万年每谱系每位点 $(1.95 \pm 0.17)\%$ 估算分化时间。

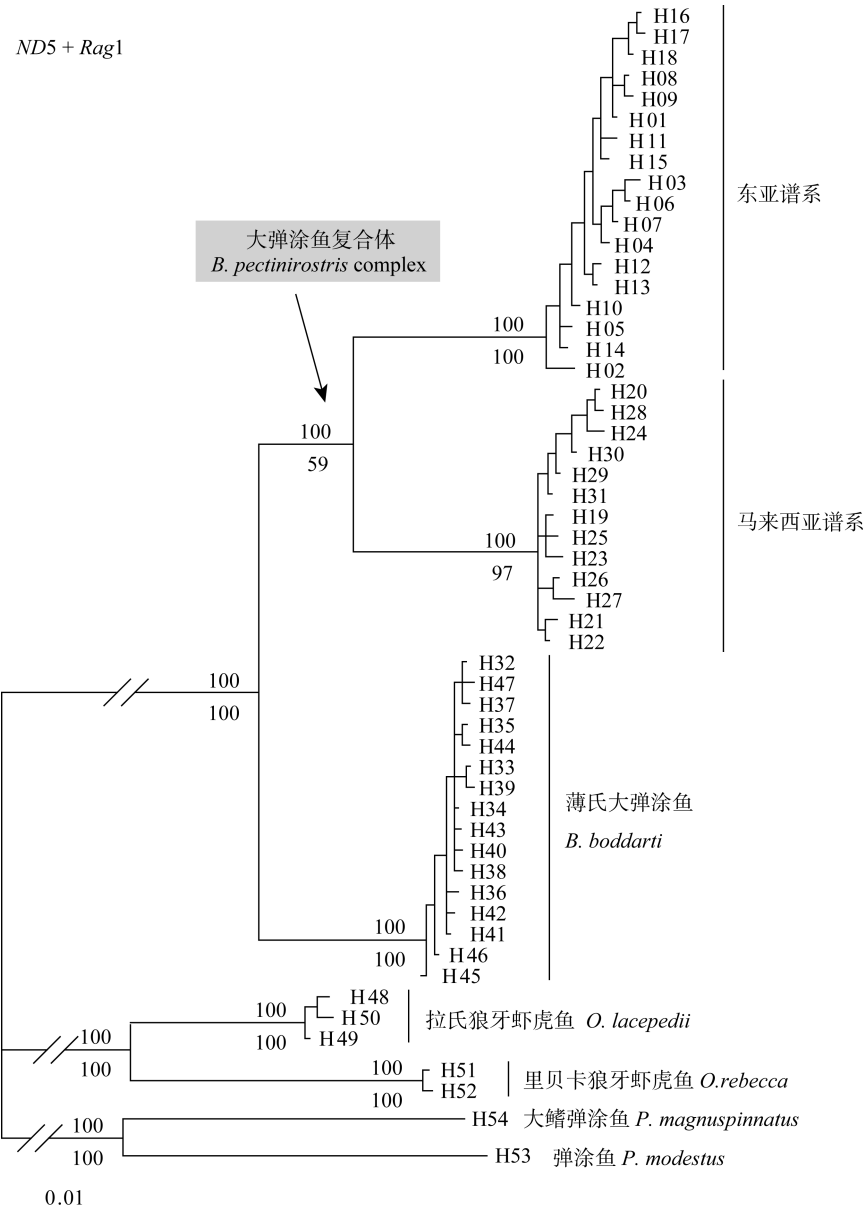


图 3 基于 *ND5* 和 *Rag1* 基因联合数据构建的贝叶斯一致树

Fig. 3 The Bayesian consensus tree based on combined data of *ND5* and *Rag1* genes
节点上方为贝叶斯后验概率, 下方为最大似然法的自展支持度。单倍型信息见表 1

Above nodes are Bayesian posterior probabilities and below nodes are bootstrap confidences. Information of haplotypes as in Tab. 1

2 结果

2.1 序列特征

ND5 基因部分序列长度 718 bp, 可变位点 117 个、简约信息位点 109 个, *Rag1* 基因部分序列长度 1395 bp, 可变位点 51 个、简约信息位点 40 个。取样的 45 尾大弹涂鱼属鱼类包括 23 个 *ND5* 基因单倍型和 31 个 *Rag1* 基因单倍型。GenBank 登录号信息见表 1。

2.2 系统发育关系与单倍型网络图

ND5、*Rag1* 单基因贝叶斯分析(图 2)以及联合基因的贝叶斯和最大似然法分析(图 3)得到了一致

的拓扑结构。这些分析显示大弹涂鱼与薄氏大弹涂鱼是单系群(后验概率 BPP = 84%—100%, 自展支持度 BS = 100%); 大弹涂鱼东亚与马来西亚种群分别是单系群并形成姊妹群关系(BPP = 97%—100%; 自展支持度 BS = 100%), 以下称为东亚谱系与马来西亚谱系(图 2、3)。单倍型网络图进一步显示大弹涂鱼东亚谱系、马来西亚谱系与薄氏大弹涂鱼之间具有明显的遗传分化(图 4)。*ND5* 基因单倍型网络图显示大弹涂鱼东亚谱系与马来西亚谱系之间具有 64 步突变, 两谱系与薄氏大弹涂鱼之间具有 73 步突变, 而谱系内相互连接单倍型之间不超过 5 步突变(图

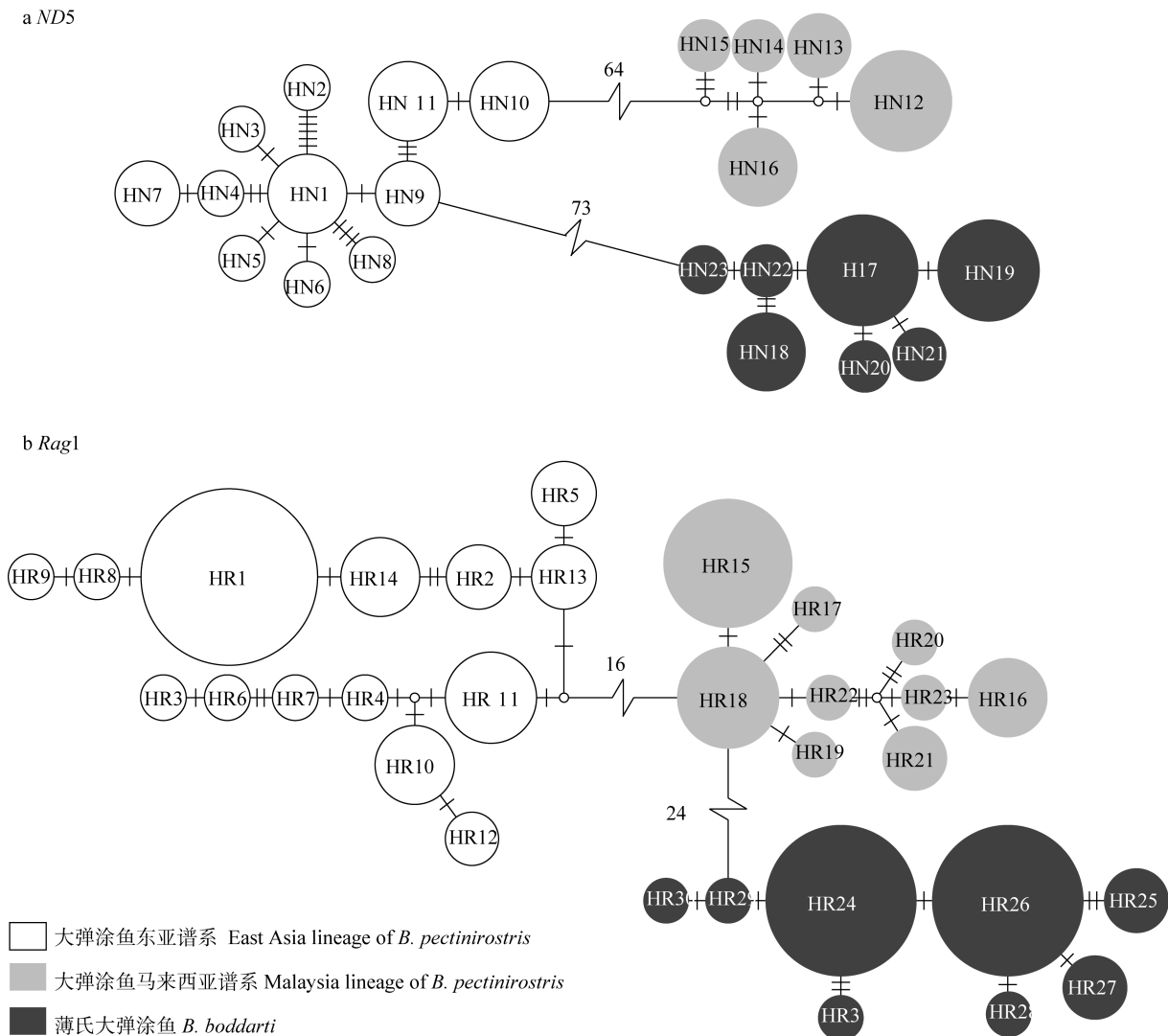


图 4 西北太平洋大弹涂鱼属鱼类单倍型的 Median-Joining 网络图

Fig. 4 Haplotype Median-Joining network of *Boleophthalmus* fishes in the northwestern Pacific
 圆的面积与单倍型频率成正比, 空心圆为丢失单倍型。连线指单倍型之间的进化路线, 垂直于连线的竖线或连线上的数字代表单倍型之间的突变步数

The area of circles is proportional to the haplotype frequencies, and empty circles are missing haplotypes. Lines linking haplotypes indicate the evolutionary paths among haplotypes, vertical bars or numbers on the linking lines represent mutation steps between haplotypes

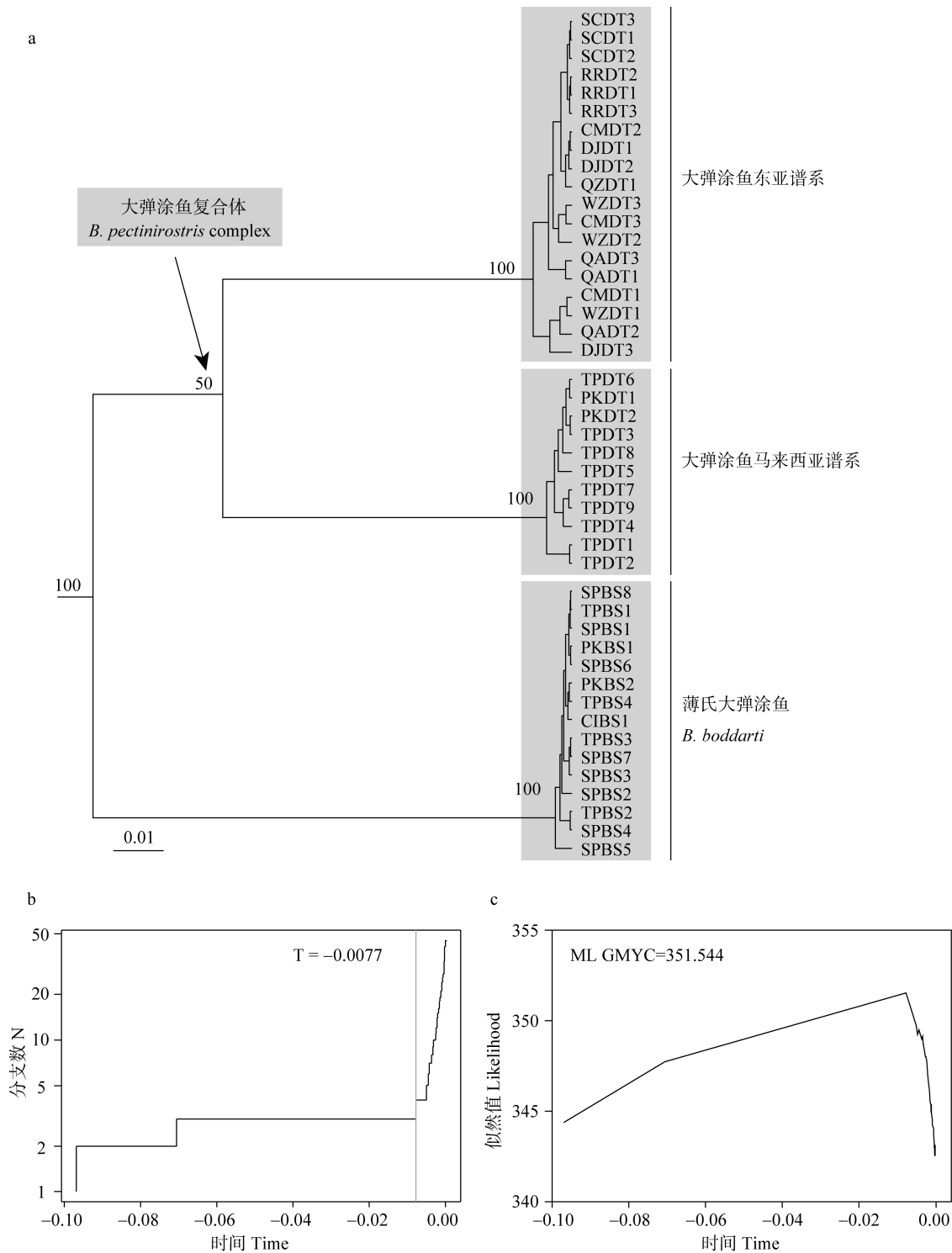


图 5 基于 *ND5* 和 *Rag1* 基因联合数据在 BEAST 中构建的超度量树(a)、时间和谱系间的关系(b)以及似然值和时间的变化曲线(c)

Fig. 5 The ultrametric tree implemented with BEAST (a), relationship between time and lineage (b), and relationship between time and likelihood value (c) based on combined data of *ND5* and *Rag1* genes

节点上方为后验概率值, 阴影部分显示 GMYC 方法划分的进化显著性单元(a), 灰色线指出了 GMYC 的转换点(b)

Above nodes are posterior probabilities and the gray areas indicate three ESUs divided by GMYC method (a), gray line indicates the transition point suggested by GMYC (b)

4a), *Rag1* 基因单倍型网络图显示大弹涂鱼东亚谱系与马来西亚谱系之间具有 16 步突变, 两谱系与薄氏

大弹涂鱼之间具有 24 步突变, 而谱系内相互连接单倍型之间不超过 2 步突变(图 4b)。

2.3 GMYC 分析、物种树与基因流

基于 *ND5* + *Rag1* 基因联合数据的 GMYC 分析 (图 5) 显示西北太平洋大弹涂属鱼类包括三个进化显著性单元, 分别对应于大弹涂鱼东亚谱系、马来西亚谱系与薄氏大弹涂鱼。种间或谱系间属于种间分化之 Yule 过程, 种内或谱系内属于种内分化的溯祖过程, 大弹涂鱼东亚谱系、马来西亚谱系与薄氏大弹涂鱼应界定为三个物种 (图 5)。*BEAST 物种树 (图 6) 进一步支持基于 GMYC 分析的物种划分并具有强的统计支持 (BPP = 100%)。隔离迁移模型估计亦显示大弹涂鱼东亚谱系、马来西亚谱系与薄氏大弹涂鱼之间基因流非常小, 每世代基因迁移有效数

目接近于零 (图 7)。

2.4 遗传距离和分化时间

基于 *ND5* 基因序列计算的大弹涂鱼东亚谱系、马来西亚谱系与薄氏大弹涂鱼种间或谱系间 K2P 遗传距离为 10.41%—11.87%, 种内或谱系内 K2P 遗传距离为 0.32%—0.57% (表 2)。基于 *Rag1* 基因序列计算的大弹涂鱼东亚谱系、马来西亚谱系与薄氏大弹涂鱼种间或谱系间 K2P 遗传距离为 1.50%—1.80%, 种内或谱系内 K2P 遗传距离为 0.18%—0.30%。分子测定年龄结果表明大弹涂鱼东亚谱系与马来西亚谱系之间的分化时间为 2.73 百万年, 两谱系与薄氏大弹涂鱼之间的分化时间为 3.865 百万年 (图 6)。

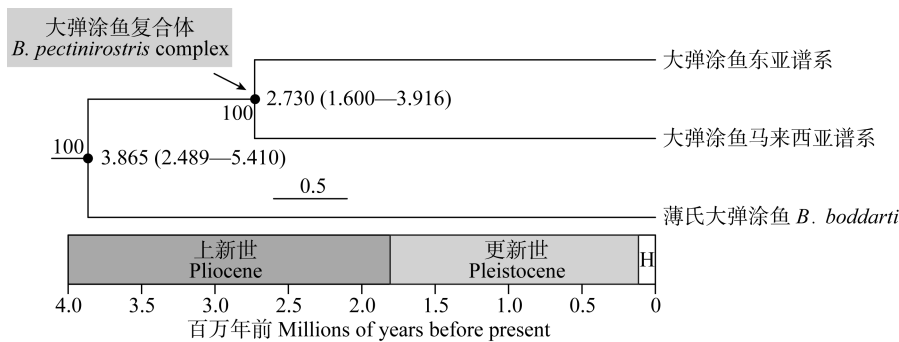


图 6 基于 *ND5* 和 *Rag1* 基因联合数据的 *BEAST 物种树与时间树

Fig. 6 *BEAST species tree and time tree based on combined data of *ND5* and *Rag1* genes

节点下方为后验概率值, 右方为分化时间及其 95% 置信区间 (百万年前), 时间轴上的 H 指全新世

Below nodes are posterior probabilities and the right side of nodes is divergence time with 95% confident intervals (Ma), H on the time axis indicates the Holocene

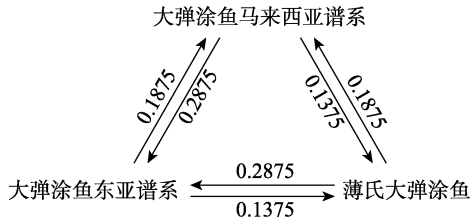


图 7 基于 IM 模型估算的大弹涂鱼东亚谱系、马来西亚谱系和薄氏大弹涂鱼之间的基因流

Fig. 7 Gene flows among East Asia lineage and Malaysia lineage of *Boleophthalmus pectinirostris* and *B. boddarti* estimated by the IM model

数字代表每世代基因迁移的有效数目

The number represents the effective number of gene migrants per generation

3 讨论

3.1 物种界定与隐存种

近年来, 分子证据揭示虾虎鱼科鱼类中发现隐存种的现象十分普遍^[12, 39–43]。本研究基于线粒体与核基因分子标记的系统发育重建显示大弹涂鱼东亚种群和马来西亚种群均是单系群, 并形成姊妹群关

表 2 大弹涂鱼属鱼类种内和种间的 Kimura 双参数 (K2P) 遗传距离

Tab. 2 Intra-specific and inter-specific Kimura 2-parameter genetic distance (K2P) of *Boleophthalmus* fishes

基因 Gene	物种/谱系 Species/Lineage	Kimura 双参数平均遗传距离 Mean Kimura 2-parameter genetic distance		
		BPE	BPM	BB
<i>ND5</i>	大弹涂鱼东亚谱系 BPE	0.57%		
	大弹涂鱼马来西亚谱系 BPM	10.41%	0.53%	
	薄氏大弹涂鱼 BB	11.52%	11.87%	0.32%
<i>Rag1</i>	大弹涂鱼东亚谱系 BPE	0.30%		
	大弹涂鱼马来西亚谱系 BPM	1.50%	0.27%	
	薄氏大弹涂鱼 BB	1.80%	1.70%	0.18%

系。物种的谱系概念认为物种可看作是系统发育分析中一个单系群所代表的一组群体^[44, 45]。根据这个标准, 大弹涂鱼东亚谱系和马来西亚谱系能被界定为 2 个种。GMYC 分析、*BEAST 物种树重建以及基因流估算亦表明大弹涂鱼东亚谱系和马来西亚谱

系是不同种。从遗传距离的角度看, 线粒体基因的种间分化水平一般比种内分化水平大 10 倍^[46, 47]。大弹涂鱼东亚谱系和马来西亚谱系 *ND5* 基因谱系间分化是谱系内分化的 18—19 倍, 因而也支持两物种的界定。基于大弹涂鱼模式产地在我国^[1, 4], 因此, 可推断大弹涂鱼东亚谱系是大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris sensu stricto*), 大弹涂鱼马来西亚谱系是隐存种 (*Boleophthalmus* sp.)。这个发现扩展了对西太平洋大弹涂鱼属鱼类的认识, 并把大弹涂鱼的分布范围限定在东亚(南中国海北部湾以北), 而隐存种 (*Boleophthalmus* sp.) 目前局限于马六甲海峡。

3.2 进化历史

晚上新世和更新世最大冰期的海平面比现今海平面低 120—140 m^[48], 当时黄、渤海整个区域及南中国和海东中国海的部分区域都露出了水面^[14]。先前的研究表明晚上新世海平面最低时期台湾海峡、对马海峡露出水面造成的东中国海与南中国海之间、东中国海与日本海之间的隔离导致了西北太平洋近岸狼牙虾虎鱼属 (*Odontamblyopus*) 鱼类与鲷属 (*Mugil*) 鱼类的物种形成^[12, 18]。本研究发现大弹涂鱼(东亚谱系)和隐存种(马来西亚谱系)的分化时间估计为 2.73 百万年。因此, 晚上新世海平面最低时期马六甲海峡露出水面造成的南中国海与印度洋之间的隔离可能导致大弹涂鱼和隐存种分化为姊妹群。

另一方面, 南中国海及其邻近海域复杂的水文特征对物种的扩散和分布也有重大的影响^[49, 50]。大弹涂鱼生活史中适合进行长距离迁徙的只有其幼鱼的浮游阶段, 该阶段持续约 35d^[51]。大弹涂鱼在每年的 4—9 月间进行繁殖, 而该时期南中国海暖流沿越南中部—海南岛—广东这一路线向西北方向流动, 同时, 在南中国海暖流的南方, 南中国海环流则在夏季季风的影响下向东南方向流动^[52]。这两个方向相反的洋流只可能将大弹涂鱼与隐存种的浮游幼体向相反的方向输送, 使它们之间的基因交流受到强烈的隔离, 从而进一步促进物种形成。最近的一些研究亦推断间冰期洋流作用引起的生物地理障碍是导致西北太平洋海洋生物物种形成的原因之一^[18, 53—57]。

综上所述, 西北太平洋海岸带大弹涂鱼是复合体, 包括两个物种: 东亚种群是大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris sensu stricto*), 而马来西亚种

群是隐存种 (*Boleophthalmus* sp.)。大弹涂鱼与隐存种之间的物种分化可能是晚上新世冰期海平面下降产生的地理隔离以及间冰期洋流对基因交流的阻碍两方面相互作用的结果。为了揭示这两个种分化的机制, 还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Murdy E O. A taxonomic revision and cladistic analysis of the oxudercine gobies (Gobiidae: Oxudercinae) [J]. *Records of the Australian Museum Supplement*, 1989, **11**: 1—93
- [2] Froese R, Pauly D (Eds.), Fish Base. World Wide Web electronic publication. <http://www.fishbase.org>, version (04/2012)
- [3] Fricke R, Eschmeyer W N (Eds.), Catalog of Fishes, Electronic version. <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/>(accessed 06.01.12)
- [4] Ni Y. *Boleophthalmus* Valenciennes, 1837 [A]. In: Wu H L, Zhong J S (Eds.), Fauna Sinica, Ostichthyes, Perciformes (V), Gobioidae [C]. Beijing: Science Press. 2008, 693—698 [倪勇. 大弹涂鱼属. 见: 伍汉霖, 钟俊生, 中国动物志硬骨鱼纲鲈形目(五) 虾虎鱼亚目. 北京: 科学出版社. 2008, 693—698]
- [5] Cantor T. Catalog of Malayan fishes [J]. *Journal of the Asiatic Society of Bengal*, 1849, **18**: 983—1443
- [6] Koumans F P. Gobioidae [A]. In: Weber M, de Beaufort L F (Eds.) Fishes of the Indo-Australian archipelago [C]. Leiden, EJ Brill. 1953, 1—423
- [7] Takita T, Agusnimar, Ali A B. Distribution and habitat requirements of oxudercine gobies (Gobiidae: Oxudercinae) along the Straits of Malacca [J]. *Ichthyological Research*, 1999, **46**(2): 131—138
- [8] Polgar G, Khaironizam M Z. First record of *Periophthalmus walailakae* (Gobiidae: Oxudercinae) from Peninsular Malaysia [J]. *Cybium*, 2008, **32**(4): 349—351
- [9] Polgar G, Crosa G. Multivariate characterisation of the habitats of seven species of Malayan mudskippers (Gobiidae: Oxudercinae) [J]. *Marine Biology*, 2009, **156**(7): 1475—1486
- [10] Wang L, Wang X Z, He S P. Phylogenetic relationships of seven barred species of *Acrossocheilus* based on sequences of the mitochondrial DNA ND4 gene, with doubt on the taxonomic status of *Acrossocheilus hemispinus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(6): 1218—1222
- [11] Guo L, Li J, Wang Z S, et al. Phylogenetic relationships of noodle-fishes (Osmeriformes: Salangidae) based on four mitochondrial genes. [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(3): 449—459
- [12] Tang W X, Ishimatsu A, Fu C Z, et al. Cryptic species and historical biogeography of eel gobies (Gobioidae: Odontamblyopus) along the Northwestern Pacific coast [J]. *Zoological Science*, 2010, **27**(1): 8—13
- [13] Tornabene L, Chen Y J, Pezold F. Gobies are deeply divided: phylogenetic evidence from nuclear DNA (Teleostei: Gobioidae: Gobiidae). [J]. *Systematics and Biodiversity*, 2013, DOI: 10.1080/14772000.2013.818589

- [14] Wang P X. Response of Western Pacific marginal seas to glacial cycles: paleoceanographic and sedimentological features [J]. *Marine Geology*, 1999, **156**(1-4): 5—39
- [15] Liu J X, Gao T X, Wu S F, *et al.* Pleistocene isolation in the Northwestern Pacific marginal seas and limited dispersal in a marine fish, *Chelon haematocheilus* (Temminck & Schlegel, 1845) [J]. *Molecular Ecology*, 2007, **16**(2): 275—288
- [16] Zheng Q A, Fang G H, Song Y T. Introduction to special section: dynamics and circulation of the Yellow, East and South China Seas [J]. *Journal of Geophysical Research*, 2006, **111**(C11): C11S01
- [17] Hua X, Wang W, Yin W, *et al.* Phylogeographical analysis of an estuarine fish, *Salanx ariakensis* (Osmeridae: Salanginae) in the north-western Pacific [J]. *Journal of Fish Biology*, 2009, **75**(2): 354—367
- [18] Shen K N, Jamandre B W, Hsu C C, *et al.* Plio-Pleistocene sea level and temperature fluctuations in the northwestern Pacific promoted speciation in the globally-distributed flathead mullet *Mugil cephalus* [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2011, **11**: 83
- [19] Miya M, Nishida M. Use of mitogenomic information in Teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2000, **17**(3): 437—455
- [20] López J A, Chen W J, Ortí G. Esociform Phylogeny [J]. *Copeia*, 2004, **3**: 449—464
- [21] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**(24): 4876—4882
- [22] Rozas J, Sánchez-Delbarrio J C, Messeguer X, *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. *Bioinformatics*, 2003, **19**(18): 2496—2497
- [23] Stephens M, Smith N J, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data [J]. *American Journal of Human Genetics*, 2001, **68**(4): 978—989
- [24] Stephens M, Scheet P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation [J]. *American Journal of Human Genetics*, 2005, **76**(3): 449—462
- [25] Bandelt H J, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, **16**(1): 37—48
- [26] Polzin T, Daneschmand S V. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs [J]. *Operations Research Letters*, 2003, **31**(1): 12—20
- [27] 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
- [28] Stamatakis A. RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2006, **22**(21): 2688—2690
- [29] Posada A. jModelTest: phylogenetic model averaging [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, **25**(7): 1253—1256
- [30] Pons J, Barraclough T G, Gomez-Zurita J, *et al.* Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed inserts [J]. *Systematic Biology*, 2006, **55**(4): 595—609
- [31] Drummond A J, Suchard M A, Xie D, *et al.* Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2012, **29**(8): 1969—1973
- [32] Rambaut A, Drummond A J. Tracer v1.4. 2007. Available at <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- [33] R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2009. Available at: <http://www.R-project.org>
- [34] Ezard T, Fujisawa T, Barraclough T G. Splits: Species' limits by Threshold Statistics, R package version 1.0. Available at <http://R-Forge.R-project.org/projects/splits>
- [35] Hey J. Isolation with migration models for more than two populations [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2010, **27**(4): 905—920
- [36] Hey J. The divergence of *Chimpanzee* species and subspecies as revealed in multipopulation isolation-with-migration analysis [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2010, **27**(4): 921—933
- [37] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2010, **28**(10): 2731—2739
- [38] Heled J, Drummond A J. Bayesian inference of species trees from multilocus data [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2010, **27**(3): 570—580
- [39] Mukai T, Nakamura S, Suzuki T, *et al.* Mitochondrial DNA divergence in yoshinobori gobies (*Rhinogobius* species complex) between the Bonin Islands and the Japan-Ryukyu Archipelago [J]. *Ichthyol Ogical Research*, 2005, **52**(4): 410—413
- [40] Lima D, Freitas J E P, Araujo M E, *et al.* Genetic detection of cryptic species in the frillfin goby *Bathygobius soporator* [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, **320**(2): 211—223
- [41] Sota T, Mukai T, Shinozaki T, *et al.* Genetic differentiation of the gobies *Gymnogobius castaneus* and *G. taranetzi* in the region surrounding the sea of Japan as inferred from a mitochondrial gene genealogy [J]. *Zoological Science*, 2005, **22**(1): 87—93
- [42] Kon T, Yoshino T, Mukai T, *et al.* DNA sequences identify numerous cryptic species of the vertebrate: a lesson from the gobioid fish *Schindleria* [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, **44**(1): 53—62
- [43] Neilson M E, Stepien C A. Evolution and phylogeography of tubenose goby genus *Proterorhinus* (Gobiidae: Teleostei): evidence for new cryptic species [J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2009, **96**(3): 664—684
- [44] de Queiroz K. Species concepts and species delimitation [J]. *Systematic Biology*, 2007, **56**(6): 879—886

- [45] Wiens J J. Species delimitation: new approaches for discovering diversity [J]. *Systematic Biology*, 2007, **56**(6): 875—878
- [46] Hebert P D N, Penton E H, Burns J M, *et al.* Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, **101**(41): 14812—14817
- [47] Hickerson M J, Meyer C P, Moritz C. DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space [J]. *Systematic Biology*, 2006, **55**(5): 729—739
- [48] Lambeck K, Esat T M, Potter E K. Links between climate and sea levels for the past three million years [J]. *Nature*, 2002, **419**(6903): 199—206
- [49] Gordon A L, Fine R A. Pathways of water between the Pacific and Indian oceans in the Indonesian seas [J]. *Nature*, 1996, **379**(6561): 146—149
- [50] Guan B, Fang G. Winter counter-wind currents off the southeastern China coast: a review [J]. *Journal of Oceanography*, 2006, **62**(1): 1—24
- [51] Takegaki T. Threatened fishes of the world: *Boleophthalmus pectinirostris* (Linnaeus 1758) (Gobiidae) [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2008, **81**(4): 373—374
- [52] Li L, Sun X P. The circulation in the South China Sea [A]. In: Su J L, Yuan Y L (Eds.), *Hydrology of China seas* [C]. Beijing: Ocean Press, 2005, 263—272 [李立, 孙湘平. 南海环流. 见: 苏纪兰, 袁业立, 中国近海水文. 北京: 海洋出版社, 2005, 263—272]
- [53] Kojima S, Kamimura S, Kimura T, *et al.* Phylogenetic relationships between the tideland snails *Batillaria flectosiphonata* in the Ryukyu Islands and *B. multiformis* in the Japanese Islands [J]. *Zoological Science*, 2003, **20**(11): 1423—1433
- [54] Kojima S, Hayashi I, Kim D, *et al.* Phylogeography of an intertidal direct-developing gastropod *Batillaria cumingi* around the Japanese Islands [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2004, **276**: 161—172
- [55] Liu S Y V, Kokita T, Dai C F. Population genetic structure of the neon damselfish (*Pomacentrus coelestis*) in the northwestern Pacific Ocean [J]. *Marine Biology*, 2008, **154**(4): 745—753
- [56] Tsang L M, Chan B K K, Ma K Y, *et al.* Genetic differentiation, hybridization and adaptive divergence in two subspecies of the acorn barnacle *Tetraclita japonica* in the northwestern Pacific [J]. *Molecular Ecology*, 2008, **17**(18): 4151—4163
- [57] Yin W, Fu C Z, Guo L, *et al.* Species delimitation and historical biogeography in the genus *Helice* (Brachyura: Varunidae) in the Northwestern Pacific [J]. *Zoological Science*, 2009, **26**(7): 467—475

CRYPTIC SPECIES AND EVOLUTIONARY HISTORY OF *BOLEOPHTHALMUS PECTINIROSTRIS* COMPLEX ALONG THE NORTHWESTERN PACIFIC COAST

CHEN Hui¹, POLGAR Gianluca², YIN Wei¹ and FU Cui-Zhang¹

(1. Ministry of Education Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering, Institute of Biodiversity Science, Fudan University, Shanghai 200433, China; 2. Biology Programme, Universiti Brunei Darussalam, Bandar Seri Begawan, Gadong, Negara Brunei Darussalam)

Abstract: The species range of *Boleophthalmus pectinirostris sensu lato* includes two disjunctive areas, i.e., East Asia and Strait of Malacca in Malaysia along the northwestern Pacific coast. However, the species status of Malaysian populations remains disputed. Mitochondrial *ND5* gene (718 bp) and nuclear *Rag1* gene (1395 bp) were used to reconstruct phylogenetic relationships among *Boleophthalmus pectinirostris* fishes by sampling 45 specimens from 11 locations in the northwestern Pacific. The results showed that *Boleophthalmus pectinirostris* fishes could be divided into two major monophyletic groups, i.e., East Asian lineage and Malaysian lineage, and which together formed the sister-group relationship. Species delineation using the analyses of GMYC and *Beast species tree supports that East Asian lineage and Malaysian lineage of *Boleophthalmus pectinirostris sensu lato* should be placed into two different species. Molecular dating revealed that the divergence time between East Asian lineage and Malaysian lineage of *Boleophthalmus pectinirostris sensu lato* was 2.73 Ma. We concluded that *Boleophthalmus pectinirostris sensu lato* was a complex, including two species. The East Asian populations is *Boleophthalmus pectinirostris sensu stricto*, and the Malaysian populations is a cryptic species (*Boleophthalmus* sp.). Our findings suggested that species split between *Boleophthalmus pectinirostris sensu stricto* and *Boleophthalmus* sp. was attributed to geographical isolation during lowing sea levels of ice ages and the barrier of gene flow induced by ocean currents during interglacial period in the late Pliocene.

Key words: Gobiidae; *Boleophthalmus*; Phylogeny; Species delineation; Northwestern Pacific