



## 斑尾刺虾虎鱼和黄鳍刺虾虎鱼的形态学、遗传学比较

孙志成<sup>1</sup>, 李亚东<sup>1</sup>, 宋晨雨<sup>1</sup>, 陈健<sup>2</sup>, 宋娜<sup>1\*</sup>

(1. 中国海洋大学, 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 浙江海洋大学海洋科学学院, 浙江 舟山 316022)

**摘要:** 利用传统形态学、耳石形态学和线粒体DNA(mtDNA)部分片段作为标记方法, 研究了斑尾刺虾虎鱼和黄鳍刺虾虎鱼的种间差异。结果显示, 两种间的第二背鳍棘数、第二背鳍鳍条数、臀鳍棘数、臀鳍鳍条数和脊椎骨数无交叠现象; 量度特征的主成分分析的结果显示第一主成分的贡献率达到52.101%, 主要反映了鱼体体型的比例, 其中与躯干后部特征的相关性最高; 依据判别函数的综合判别准确率为100.0%; 单因素方差分析显示两种虾虎鱼除吻长、上颌长等头前部指标和与尾部长度相关的指标之间的差异不显著外, 其余各指标均存在显著性差异。耳石傅立叶分析的结果与量度特征分析的结果类似, 主成分分析的结果显示第一主成分贡献率为12.181%, 主要反映了耳石背侧和前后缘的形状特征; 依据判别函数的群体综合判别准确率为100.0%。对两种虾虎鱼线粒体DNA的D-loop、COI、16S rRNA、12S rRNA 4个片段序列进行比较分析, 基于K-2P模型计算得到两种虾虎鱼种间遗传距离均显著大于种内遗传距离; 以六丝钝尾虾虎鱼作为外群, 结合GenBank上下载的刺虾虎鱼属其他鱼类的同源序列构建的系统树均显示两种虾虎鱼分别聚类, 遗传差异显著。

**关键词:** 斑尾刺虾虎鱼; 黄鳍刺虾虎鱼; 形态学; 耳石傅立叶分析; 遗传学

**中图分类号:**

**文献标志码:** A

斑尾刺虾虎鱼(*Acanthogobius ommaturus*)与黄鳍刺虾虎鱼(*A. flavimanus*)同属于鲈形目(Perciformes), 虾虎鱼亚目(Gobioidei), 虾虎鱼科(Gobiidae), 刺虾虎鱼属(*Acanthogobius*)<sup>[1]</sup>。斑尾刺虾虎鱼为暖温型近岸底层大型鱼类, 多栖息于沿岸、港湾及河口咸、淡水交汇处的泥底或沙底水域, 广泛分布于中国、朝鲜、日本和印度尼西亚沿海<sup>[1]</sup>。黄鳍刺虾虎鱼则为冷温型近岸底层中小型鱼类, 栖息于河口、港湾及沿岸砂质或泥底的浅水区, 分布于中国渤海、黄海、东海及朝鲜和日本沿海<sup>[1]</sup>。

近年来, 随着渔业资源的衰退, 虾虎鱼类因其逐渐凸显的经济价值越来越受到人们的关

注。斑尾刺虾虎鱼在渔业资源调查中常常作为优势种出现<sup>[2]</sup>, 黄鳍刺虾虎鱼虽无食用价值, 但由于其既是多种仔稚鱼和虾蟹类幼体的捕食者<sup>[3]</sup>, 又是多种经济鱼类的重要天然饵料, 因而在整个近海生态系统中同样占据重要地位<sup>[4]</sup>。目前我国斑尾刺虾虎鱼的研究主要集中在群体形态学和遗传学比较分析<sup>[5-8]</sup>、耳石分析<sup>[9-10]</sup>、食性特征研究<sup>[11]</sup>等方面, 黄鳍刺虾虎鱼的研究则是国外较多, 包括入侵<sup>[12-15]</sup>、生长成熟的影响因子<sup>[16]</sup>、生存环境<sup>[17]</sup>等方面, 但国内目前对黄鳍刺虾虎鱼的研究比较缺乏, 仅有幼体摄食行为研究的报道<sup>[3]</sup>。这两种虾虎鱼在幼鱼时形态极为相似, 分布区也有一定的重叠, 不容易区分, 因此需要清晰

收稿日期: 2019-06-28 修回日期: 2020-01-03

资助项目: 国家自然科学基金(41776171); 中央高校基本科研业务费(201964002)

通信作者: 宋娜, E-mail: songna624@163.com

地描述二者的差别。

形态学研究方法仍是鱼类分类研究的主要手段,通过形态可量、可数性状的观察和统计分析,可在短时间将物种进行分类<sup>[18]</sup>。鱼类耳石的形态结构相当稳定,且形状具有高度的物种特异性,备受分类学家、生物学家甚至考古学家的关注<sup>[19]</sup>,鱼类耳石的形态差异亦常被用于种间或者群体水平的差异研究<sup>[20]</sup>。目前形态学研究及耳石形态结构的分析已不仅局限于传统的分析方法,聚类分析、判别分析、主成分分析等多元分析方法的引入,使得研究结果更具准确性<sup>[21]</sup>。鱼类线粒体DNA(mtDNA)同其他脊椎动物一样,具有排列紧密、进化速率快、严格母系遗传等特征,在海洋鱼类的遗传多样性研究中发挥越来越重要的作用。其中,12S rRNA和16S rRNA片段进化速率相对较慢,适合于种间遗传差异的检测<sup>[22]</sup>,COI等编码基因进化速率适中,能较好地反映系统发育信息,常用作DNA条形码<sup>[23]</sup>,控制区(D-loop)的进化速率比其他片段快,适合种内群体间遗传多样性和群体遗传结构的分析,亦可用于不同物种间的分析比较<sup>[24]</sup>。

本研究拟采用传统形态学、耳石形态学、线粒体DNA 3种标记方法对斑尾刺虾虎鱼与黄鳍刺虾虎鱼的形态学和遗传学差异进行分析,研究结果可为两种鱼类的形态差异和遗传学研究提供基础性材料,也可以为其他鱼类的分类鉴定提供参考。

## 1 材料与与方法

### 1.1 实验材料

实验所用斑尾刺虾虎鱼(图1)分别于2018—2019年采集自东营、烟台,黄鳍刺虾虎鱼(图1)分别于2018—2019年采集自青岛(样品信息见表1)。对样品进行鉴定后开展形态学测定,取出左、右耳石并及剪取背部肌肉,肌肉组织于-20℃保存。

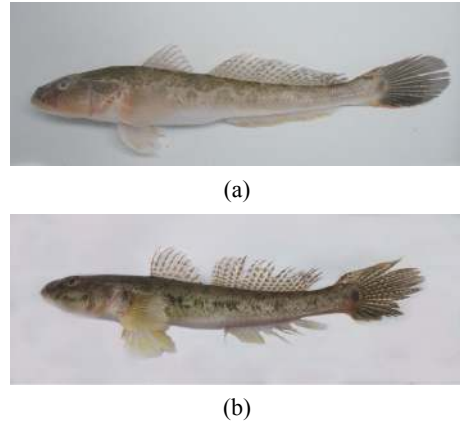


图1 斑尾刺虾虎鱼((a)和**黄鳍刺虾虎鱼(b)**  
Fig. 1 *Acanthogobius ommaturus*(above) and *A. flavimanus* (below)

### 1.2 实验方法

**形态学方法** 对斑尾刺虾虎鱼和黄鳍刺虾虎鱼用电子天平称重,精确到0.1 g。对10个可数性状(第一背鳍棘数、第二背鳍棘数、第二背鳍鳍条数、胸鳍鳍条数、腹鳍棘数、腹鳍鳍条数、臀鳍棘数、臀鳍鳍条数、鳃耙数、脊椎骨数)进行直接计数。量度特征包括传统形态学可量数据和框架数据。对传统形态学15个可量性状体长(BL)、头长(HL)、吻长(SL)、眼径(OD)、眼间隔(IW)、眼后头长(PL)、上颌长(UGL)、体高(BD)、尾柄长(LCP)、尾柄高(CPD)、第一背鳍基长(FDL)、第二背鳍基长(SDL)、胸鳍基长(LP)、腹鳍基长(QP)、臀鳍基长(SA)数据进行测量。对框架法D1-2(吻前端到第一背鳍起点)、D1-3(吻前端到腹鳍起点)、D2-3(第一背鳍起点到腹鳍起点)、D2-4(第一背鳍起点到第二背鳍起点)、D2-5(第一背鳍起点到臀鳍起点)、D3-4(腹鳍起点到第二背鳍起点)、D3-5(腹鳍起点到臀鳍起点)、D4-5(第二背鳍起点到臀鳍起点)、D4-7(第二背鳍起点到臀鳍末端)、D5-6(臀鳍起点到第二背鳍末端)、D6-7(第二背鳍末端到臀鳍末

表1 两种虾虎鱼的样品采集信息

Tab. 1 Sample information for two *Acanthogobius* species

物种 species	采集地 sampling site	采样时间 date	数量/个 sample size	体长范围/mm length range	体质量范围/g weight range	左耳石数量/个 sample size
斑尾刺虾虎鱼 <i>A. ommaturus</i>	东营 Dongying	2018-11	30	114.9~215.4	17.6~112.6	30
	烟台 Yantai	2019-04	24	166.2~290.4	38.3~132.1	24
黄鳍刺虾虎鱼 <i>A. flavimanus</i>	青岛 Qingdao	2018-11	25	71.9~128.5	4.0~29.1	24
	青岛 Qingdao	2019-04	28	97.9~139.7	9.3~27.0	27

端)、D6-8(第二背鳍末端到尾鳍背部起点)、D6-9(第二背鳍末端到尾鳍腹部起点)、D7-8(臀鳍末端到尾鳍背部起点)、D7-9(臀鳍末端到尾鳍腹部起点)、D8-9(尾鳍背部起点到尾鳍腹部起点)16个数据进行测量。其中, 全长和体长用直尺测量, 精确到0.1 mm, 其他可量形状用游标卡尺测量, 精确到0.02 mm。

耳石在1.5 mL离心管中用蒸馏水浸泡24 h, 然后置于超声波清洗器(KQ3200)中清洗30 min, 清除耳石外部的软膜组织。再放入55 °C烘箱内干燥至恒重。用与解剖镜相连的数码相机Nikon SMZ 1000对所有耳石外侧面进行拍照, 依次使用Chaincoder, CHC2NEF, PrinComp软件计算得到耳石轮廓的77个椭圆傅里叶参数。对数据文件进行处理, 消除傅里叶形态特征值对耳石图形位置、大小和方向等的干扰, 取前20组傅里叶谐波值, 每一组谐波值由4个形态变量An、Bn、Cn和Dn表示, 所得出的谐波值经过标准化后, 耳石图形的大小、位置、旋转角度和测量基点对傅里叶谐波值已无影响<sup>[25]</sup>。经过标准化处理后, 前3个系数为常数(A1=1, B1=C1=0)。最终每个耳石外部轮廓由77个系数组成, 用于后续主成分及判别分析。

**遗传学方法** 使用传统的酚-氯仿抽提法从两种虾虎鱼肌肉样品中提取基因组DNA, 将乙醇沉淀后的基因组DNA溶解于100 μL蒸馏水中, 4 °C保存备用。D-loop序列的扩增采用正向引物dl-x和反向引物dl-h<sup>[8]</sup>。COI序列的PCR扩增采用正向引物COI-F和反向引物COI-R<sup>[26]</sup>。12S rRNA序列的PCR扩增采用正向引物MiniFish-UF和反向引物MiniFish-UR<sup>[27]</sup>。16S rRNA序列的PCR扩增采用正向引物16S-AF和反向引物16S-BR<sup>[28]</sup>。

PCR总反应体系共25 μL, 反应条件参考已发表文献<sup>[29]</sup>, 以上反应均设阴性对照以排除DNA污染的情况。取2 μL PCR扩增产物进行1%琼脂糖凝胶电泳检测(U=5 V/cm), 用UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒进行目的片段的回收纯化, 送上海派森诺生物科技有限公司进行双向测序。

### 1.3 数据处理

**形态学分析** 采用主成分分析、判别分析、单因素方差分析3种方法, 对所得传统形态学指标以及耳石的傅里叶谐波值进行统计分析, 比较两种虾虎鱼的形态学差异。为消除个体大小对各指标的影响, 将头部指标除以头长, 其余各指标除以体长。运用SPSS 19.0软件对各指

标进行主成分分析, 得到各主成分的特征值和贡献率, 并根据得分情况绘制第一、二主成分的散点图。运用SPSS 19.0软件进行单因素方差分析, 采用LSD法(方差齐性)和Tamhane's T2法(方差非齐性)分析两种间差异。运用SPSS 19.0软件, 依据各量度特征建立两种虾虎鱼的判别公式, 并计算判别准确率和综合判别率:

判别准确率 $P(\%) = (\text{样本中判别正确的个数} / \text{样本总数}) \times 100\%$ 。

$$\text{综合判别率} = \sum_{i=1}^n A_i / \sum_{i=1}^n B_i$$

式中,  $A_i$ 为第*i*个群体中判别正确的个体数,  $B_i$ 为第*i*个群体的样本总数,  $n$ 为物种总数。

**线粒体DNA多态分析** 使用DNASTar软件(DNASTAR, Inc)对序列进行比对, 并辅以人工校正; 利用Arlequin 3.1软件计算分子多样性参数, 如多态位点个数、转换颠换比例以及插入缺失位点数; 以六丝钝尾虾虎鱼(*Amblychaeturichthys hexanema*)作为外群, 从GenBank中下载刺虾虎鱼属鱼类相关序列(表2)进行分析, 利用MEGA5.0的Kimura双参数法计算两种间的净遗传距离, 并分别用邻接法(Neighbour-Joining, NJ)和最小进化法(Minimum Evolution, ME)构建系统发育树<sup>[6]</sup>。

表2 本研究所用GenBank序列信息

Tab. 2 GenBank sequence information used in this study

物种名 species	线粒体DNA片段 mitochondrial DNA fragment	GenBank序列号 GenBank number
六丝钝尾虾虎鱼 <i>A. hexanema</i>	COI	KT781104
	D-loop	KT781104
	12S	KT781104
	16S	KT781104
长体刺虾虎鱼 <i>Acanthogobius elongata</i>	COI	JX679021
	12S	KM030429
乳色刺虾虎鱼 <i>A. lactipes</i>	COI	JX679023
	12S	LC385140
棕刺虾虎鱼 <i>A. luridus</i>	COI	JX679024
	12S	KM030432

## 2 结果

### 2.1 形态学结果

分节特征 斑尾刺虾虎鱼和黄鳍刺虾虎

鱼的腹鳍棘数为定值1, 腹鳍条数为定值5, 鳃耙数为3+9, 均不存在差异; 斑尾刺虾虎鱼的第二背鳍和臀鳍均无鳍棘, 而黄鳍刺虾虎鱼的第二背鳍和臀鳍均有一鳍棘, 可作为明显的区分特征; 其余可数指标中除胸鳍条数有一定

程度重叠, 其他指标均无重叠。因此, 两种虾虎鱼在分节特征上存在一定分化, 包括第一背鳍棘数、第二背鳍条数、胸鳍条数、臀鳍条数、脊椎骨数等均差异显著( $P=0.000$ )(表3)。

表3 斑尾刺虾虎鱼和黄鳍刺虾虎鱼的分节特征(括号内为平均值)

分节特征 meristic count		斑尾刺虾虎鱼 <i>A. ommaturus</i>	黄鳍刺虾虎鱼 <i>A. flavimanus</i>	<i>P</i>
第一背鳍棘数	first dorsal fin spine	8-0(9.1)	8(8.0)	0.000
第二背鳍棘数	second dorsal fin spine	0(0.0)	1(1.0)	
第二背鳍条数	second dorsal fin ray	20-22(21.1)	13-15(14.3)	0.000
胸鳍条数	pectoral fin ray	19-21(20.6)	17-21(19.2)	0.000
腹鳍棘数	pelvic fin spine	1(1.0)	1(1.0)	
腹鳍条数	pelvic fin spine	5(5.0)	5(5.0)	
臀鳍棘数	anal fin spine	0(0.0)	1(1.0)	
臀鳍条数	anal fin ray	17-19(17.8)	12-14(12.5)	0.000
鳃耙数	gill raker	3+9	3+9	
脊椎骨数	vertebra	41-43(42.5)	32-33(32.2)	0.000

**主成分分析** 对两种虾虎鱼标准化后的30组量度特征变量进行主成分分析, 第一主成分的贡献率达到52.101%, 第二个主成分的贡献率分别为15.797%(表4)。其中, 第一主成分中A、G、I、K、L、M、N、O、P、Q、T、V、W、X、Y、AD的载荷值较高, 主要反映了鱼体体型的比例, 与躯干后部特征的相关性最高; 第二主成分中C、D、E、H、AA、AB、AC的载荷值较高, 主要反映了头部和尾部的特征; 从第一、第二主成分散点图图2(a)中可以看出, 两种虾虎鱼区分明显, 无个体交叉。

对77个耳石傅立叶谐值进行主成分分析, 得到特征值大于1的主成分共22个, 累积贡献率达到84.265%; 其中, 第一主成分贡献率为12.181%, 第二主成分为9.211%, 第一主成分主要反映了耳石背侧和前后缘的形状特征, 第二主成分主要反映了耳石前后缘的形状特征。由第一、第二主成分散点图可以看出, 两种虾虎鱼有少量个体交叉, 差异较明显(图2(b))。

**判别分析** 对斑尾刺虾虎鱼53个个体和黄鳍刺虾虎鱼51个个体的A-AD共30个指标进行判别分析, 判别正确率为100.0%。从A-AD共30个指标中选取贡献率最大的8个指标建立斑尾刺虾虎鱼和黄鳍刺虾虎鱼的判别公式:

斑尾刺虾虎鱼:

$$Y = 1\ 103.838A + 4\ 507.565H + 4\ 644.734I + 4\ 246.031O + 2\ 653.006U + 5\ 372.686W - 5\ 034.51Y + 1511.159AC - 2\ 650.57$$

黄鳍刺虾虎鱼:

$$Y = 1\ 183.151A + 4\ 610.053H + 4\ 743.277I + 4\ 137.811O + 2\ 545.995U + 5\ 280.1W - 4\ 498.417Y + 1\ 576.365AC - 2\ 656.924$$

对斑尾刺虾虎鱼53个左耳石和黄鳍刺虾虎鱼51个左耳石进行耳石傅立叶进行判别分析, 判别正确率亦为100.0%。依据Wilks' Lambda法<sup>[30]</sup>对77项傅立叶谐值指标进行筛选, 最终选择B15、A16、D17、B18、D18、B20、C20、D20这8项傅里叶谐值对两种虾虎鱼类进行分类, 其判别方程:

斑尾刺虾虎鱼:

$$Y = -59.256B15 + 45.89A16 - 38.491D17 + 68.5B18 - 19.548D18 - 117.074B20 + 72.986C20 + 18.12D20 - 0.764$$

黄鳍刺虾虎鱼:

$$Y = -32.26B15 - 23.346A16 - 49.844D17 + 22.169B18 + 46.377D18 - 125.856B20 - 30.573C20 + 103.525D20 - 0.753$$

**单因素方差分析** 本研究中的斑尾刺虾虎鱼与黄鳍刺虾虎鱼两种群均来自正态分布的

表 4 斑尾刺虾虎鱼和黄鳍刺虾虎鱼 30 个可量性状主成分分析的因子载荷值

Tab. 4 Factor loadings of principal components extracted from 30 morphological characters between *A. ommaturus* and *A. flavimanus*

量度特征 morphological characters	主成分1 PC1	主成分2 PC2	主成分3 PC3	主成分4 PC4
HL/BL A	0.901	0.002	-0.306	-0.075
SL/HL B	-0.142	0.095	-0.463	0.751
OD/HL C	0.284	0.676	-0.156	-0.331
IW/HL D	-0.473	-0.736	0.184	0.086
PL/HL E	0.057	-0.680	0.349	-0.097
UGL/HL F	-0.427	0.217	-0.590	0.052
BD/BL G	0.826	0.171	0.163	0.027
LCP/BL H	-0.500	0.676	0.297	0.205
CPD/BL I	0.909	0.290	-0.052	-0.041
FDL/BL J	0.736	0.095	-0.042	0.340
SDL/BL K	-0.906	-0.280	-0.051	-0.053
LP/BL L	-0.855	-0.161	-0.221	-0.064
QP/BL M	0.862	-0.011	-0.170	-0.206
SA/BL N	0.824	-0.265	-0.071	-0.139
D1-2/BL O	0.943	-0.017	-0.186	-0.082
D1-3/BL P	0.874	0.214	-0.259	-0.010
D2-3/BL Q	0.890	0.104	0.041	0.020
D2-4/BL R	0.461	-0.028	0.146	0.323
D2-5/BL S	0.498	-0.165	0.449	0.030
D3-4/BL T	0.885	-0.199	0.146	0.018
D3-5/BL U	0.574	-0.505	0.434	0.159
D4-5/BL V	0.916	0.185	0.105	0.006
D4-7/BL W	-0.903	-0.120	-0.133	-0.086
D5-6/BL X	-0.841	0.010	-0.232	-0.140
D6-7/BL Y	0.874	0.397	-0.064	-0.022
D6-8/BL Z	-0.686	0.508	0.153	-0.080
D6-9/BL AA	-0.371	0.754	0.300	0.053
D7-8/BL AB	-0.324	0.773	0.309	-0.028
D7-9/BL AC	-0.578	0.630	0.321	0.047
D8-9/BL AD	0.920	0.246	-0.029	-0.007

总体, 适合单因子方差分析。对斑尾刺虾虎鱼和黄鳍刺虾虎鱼的 30 个量度特征变量进行单因素方差分析, 结果显示, 吻长、上颌长等头部指标和与尾部长度相关的指标在两种间差异不显著, 其余各指标均存在显著性差异。

## 2.2 遗传学结果

线粒体 DNA 4 个片段的序列分析 去除引物及 Pro-tRNA 序列后, 得到斑尾刺虾虎鱼和黄鳍刺虾虎鱼 D-loop、COI、12S rRNA、16S rRNA

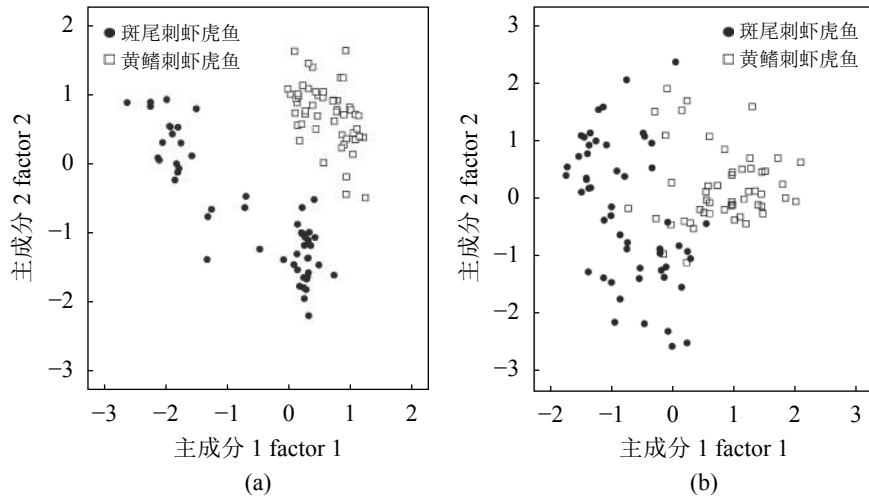


图2 斑尾刺虾虎鱼、黄鳍刺虾虎鱼形态指标

(a)和耳石形态指标(b)第一、二主成分散点图

Fig. 2 Scatter plot of the first and second principle components from PCA based on morphological characteristics

(a) and morphological characteristics of otolith (b) between *A. ommaturus* and *A. flavimanus*

片段长度分别均为503、610、167和575 bp。两种虾虎鱼的碱基组成含量相似，除16S rRNA外，其余3个片段的A+T含量均明显高于C+G含量。斑尾刺虾虎鱼个体的D-loop序列共检测到9个变异位点，7个单倍型；黄鳍刺虾虎鱼个体的D-loop序列共检测到7个变异位点，5个单倍型；将D-loop序列合并分析，共检测到80个变异位点，斑尾刺虾虎鱼个体的COI序列共检测到10个变异位点，9个单倍型；黄鳍刺虾虎鱼个体的COI序列检测到1个变异位点，3个单倍型；将两种虾虎鱼的COI序列合并分析，共检测到86个变异位点。斑尾刺虾虎鱼个体的12S rRNA序列共检测到3个变异位点，4个单倍型；黄鳍刺虾虎鱼个体的12S rRNA未检测到变异位点，仅1个单倍型；12S rRNA合并分析序列共检测到10个变异位点。斑尾刺虾虎鱼个体的16S rRNA序列未检测

到变异位点，仅1个单倍型；黄鳍刺虾虎鱼个体的16S rRNA序列检测到4个变异位点，4个单倍型；16S rRNA序列合并分析检测到31个变异位点(表5，表6)。两种鱼类在4个片段上均无共享单倍型。

基于两种虾虎鱼控制区、COI序列计算所得遗传多样性参数中，除控制区序列的单倍型多样性略低于黄鳍刺虾虎鱼外，其他遗传多样性指数斑尾刺虾虎鱼均高于黄鳍刺虾虎鱼(表5，表6)。基于两种虾虎鱼的4个片段(COI、D-loop、16S、12S)计算得到种间净遗传距离为分别为0.178 0、0.178 4、0.053 4、0.057 5，显著高于种内遗传距离。以六丝钝尾虾虎鱼为外群，以D-loop(单倍型)、COI(单倍型)、12S rRNA、16S rRNA 4个片段构建NJ关系树(图3)和ME树(ME树结果与NJ树结果基本一致)。其中，COI序列与12S序列分析

表5 基于COI、D-loop、16S rRNA、12S rRNA基因片段的斑尾刺虾虎鱼遗传多样性参数

Tab. 5 Parameters of genetic diversity in *A. ommaturus* based on COI, D-loop, 16S rRNA and 12S rRNA

斑尾刺虾虎鱼 <i>A. ommaturus</i>	COI	D-loop	16S rRNA	12S rRNA
样本数 number	18	20	6	8
变异位点 variable sites	10	9	0	3
单倍型数 haplotype number	9	7	1	4
单倍型多样性 haplotype diversity	0.758 2±0.105 6	0.710 5±0.088 9	0.000 0	0.642 9±0.184 1
核苷酸多样性 nucleotide diversity	0.002 4±0.001 7	0.003 3±0.002 3	0.000 0	0.004 4±0.004 1
种内遗传距离 intraspecific genetic distance	0.002 7	0.003 4	0.000 0	0.004 6

表 6 COI、D-loop、16S rRNA、12S rRNA基因片段的黄鳍刺虾虎鱼遗传多样性参数

Tab. 6 Parameters of genetic diversity in *A. flavimanus* based onCOI, D-loop, 16S rRNA and12S rRNA

黄鳍刺虾虎鱼 <i>A. flavimanus</i>		COI	D-loop	16S rRNA	12S rRNA
样本数	number	24	25	6	8
变异位点	variable sites	1	7	4	0
单倍型数	haplotype number	3	5	4	1
单倍型多样性	haplotype diversity	0.358 7±0.109 6	0.730 0±0.047 9	0.800 0±0.172 1	0.000 0
核苷酸多样性	nucleotide diversity	0.000 7±0.000 6	0.002 9±0.002 0	0.002 7±0.002 1	0.000 0
种内遗传距离	intraspecific genetic distance	0.001 3	0.002 7	0.002 7	0.000 0

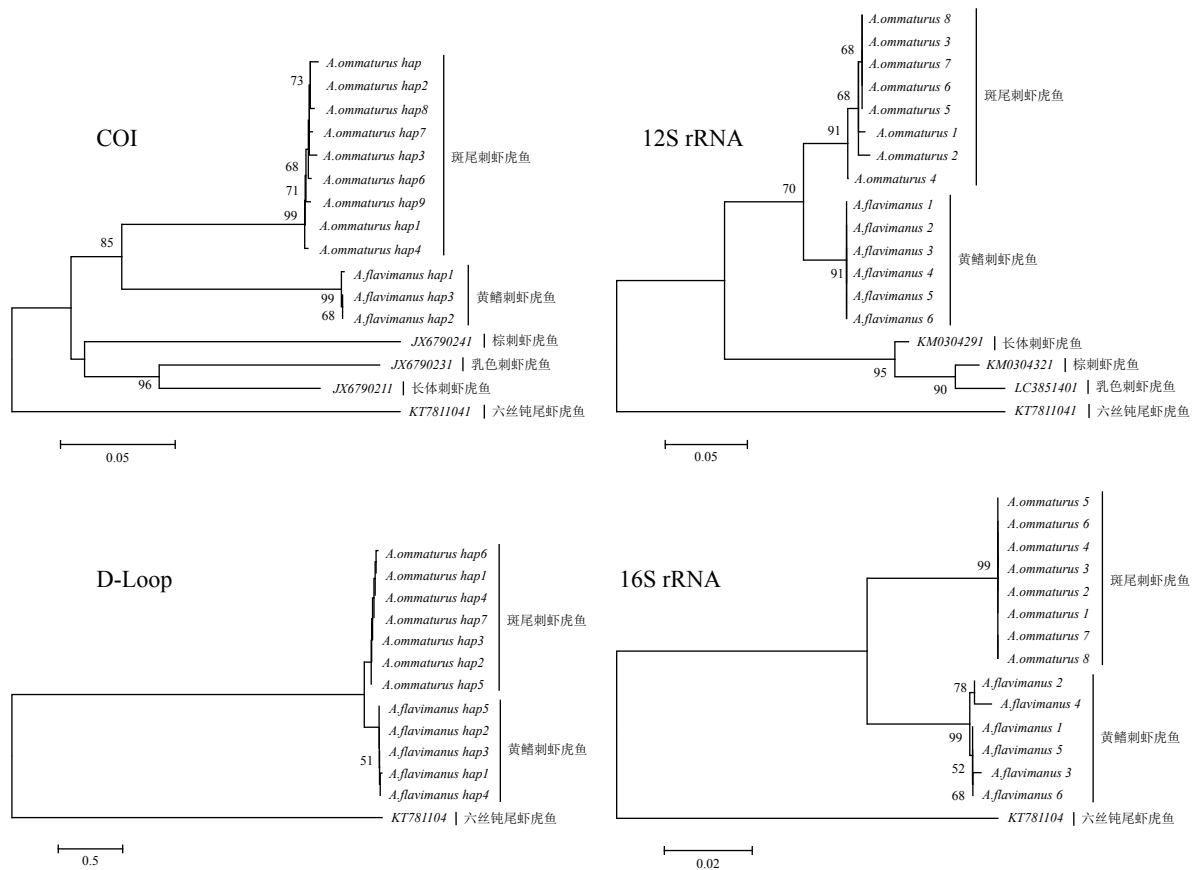


图 3 以六丝钝尾虾虎鱼为外群构建斑尾刺虾虎鱼和黄鳍刺虾虎鱼的NJ关系树

各分支上的数字为重抽样分析得到的大于50%的支持率

Fig. 3 Neighbor-joining tree for *A. ommaturus* and *A. flavimanus* with an outgroup *A. hexanema*

Bootstrap supports of >50% in 1 000 replicates

加入NCBI基因库中下载的刺虾虎鱼属中长体刺虾虎鱼(*A. elongata*)、乳色刺虾虎鱼(*A. lactipes*)和棕刺虾虎鱼(*A. luridus*)(表2)进行构树。

4个片段构建的NJ树均显示斑尾刺虾虎鱼与黄鳍刺虾虎鱼种群各自聚类, 能明显区分两种虾虎鱼; 基于COI和12S片段构建的NJ树显示刺虾虎鱼属中黄鳍刺虾虎鱼与斑尾刺虾虎鱼先聚

类到一支, 亲缘关系较近, 乳色刺虾虎鱼、长体刺虾虎鱼和棕刺虾虎鱼亲缘关系比较近, 聚类到另外一支。

### 3 讨论

分节特征是传统形态学方法中研究鱼类分类研究的主要手段, 两种虾虎鱼的分节特征存

在一定程度上的分化：第二背鳍棘数、臀鳍棘数均为定值且不相等，可作为明显区分依据；而腹鳍棘数、腹鳍条数、鳃耙数相等，不能作为区分依据；第二背鳍条数、臀鳍条数、脊椎骨数在两种间无交叠现象，且差异极显著；而第一背鳍棘数、胸鳍条数在两种间有交叠，不存在明显差异。

主成分分析是一种有效的多变量分析方法，能直观地反映个体之间的相似程度，目前已经在发现新物种以及鱼类群体遗传分化研究领域应用广泛<sup>[31-33]</sup>。对两种虾虎鱼耳石形状的傅立叶谐波值进行主成分分析，得到特征值大于1的主成分共22个，累积贡献率达到84.265%，小于临界值85%；30个量度特征进行主成分分析得到特征值大于1的4个主成分。第一、二主成分累计贡献率为67.897%，小于临界值85%，因此两种虾虎鱼在量度特征上的差异不能够单独依靠少数指标来判断<sup>[32]</sup>。判别分析主要依据测量的若干变量值判断如何对研究对象进行分类，是一种实用性很强的统计方法，并被各个研究领域的学者广泛应用<sup>[18,34]</sup>。对两种虾虎鱼耳石特征与量度特征进行判别分析，综合判别率高达100.0%，表明可以通过判别公式对两种虾虎鱼进行区分。单因子方差分析是一种定性的多元统计方法，主要是用来检验单一因素影响的多个独立的群组是否来自正态分布的总体<sup>[18,35]</sup>。单因素方差分析结果表明两种虾虎鱼在吻长和尾柄长等指标上差异不显著，其他量度特征均差异显著，说明两种间躯干部比例差异较大，而头前部、尾部差异较小。量度特征的多种分析方法所得结果基本一致，两种虾虎鱼躯干部的差异最为显著，而头部、尾部差异较小。

值得注意的是，幼鱼时期的斑尾刺虾虎鱼与黄鳍刺虾虎鱼在形态上常难以分辨，但到成鱼时期，斑尾刺虾虎鱼体型变化较大，除体长较长外，鱼体各部位比例会发生改变，区分两种虾虎鱼较为容易。斑尾刺虾虎鱼的曾用名包括斑尾复虾虎鱼、矛尾复虾虎鱼等，而斑尾复虾虎鱼与矛尾复虾虎鱼曾被认为是两个有效种，其依据主要为尾柄长/尾柄高的不同<sup>[36-38]</sup>。但近年来有学者对矛尾复虾虎鱼物种命名的有效性进行了探讨<sup>[29]</sup>，结果认为二者是同一物种，其尾柄长和尾柄高的比值是随着整个鱼体的体长变化而变化的，尤其是繁殖后雌鱼的尾柄较长。本

研究中斑尾刺虾虎鱼包括采于11月份的幼鱼与4月份的成鱼，因此主成分分析的散点图中显示斑尾刺虾虎鱼样品的测量指标也形成了两个相对集中的组，且11月份的幼鱼在第一主成分上与黄鳍刺虾虎鱼更为接近，也证实这一结论。

对两种虾虎鱼的D-loop、COI、12S rRNA、16S rRNA序列进行比对分析，发现在4种片段上两种鱼类差异显著，可以将两种虾虎鱼进行有效区分。Hebert等<sup>[39]</sup>首次提出DNA条形码的概念，即利用线粒体COI基因片段序列作为物种快速鉴定的标记，并以此建立DNA序列和生物物种之间一一对应的关系。Meyer等<sup>[40]</sup>认为，理想DNA条形码检测到的同属内种间遗传差异应该明显大于种内遗传差异，并在二者之间形成一个明显的间隔区，称作barding gap，在COI基因片段上，种内差异很少超过2%，一般都低于1%，而种间差异大于2%。本研究中斑尾刺虾虎鱼种内的遗传距离范围为0.000 0~0.004 6，黄鳍刺虾虎鱼种内遗传距离范围为0.000 0~0.002 7，两种间的净遗传距离范围为0.053 4~0.178 4，种间平均遗传距离明显高于种内的遗传距离，说明COI序列可作为两种鱼类的DNA条形码序列。2008年伍汉霖等出版的《中国动物志〈虾虎鱼亚目〉》中将复虾虎鱼属重新划归刺虾虎鱼属<sup>[1]</sup>，而本研究中的系统发育关系分析表明黄鳍刺虾虎鱼与斑尾刺虾虎鱼存在较近的亲缘关系，因此也支持这一结论。

在线粒体基因组中4种核苷酸的分布是不均的，这是动物线粒体基因组的共同特性<sup>[24]</sup>。本研究得到的两种虾虎鱼4种基因片段的核苷酸组成中，除黄鳍刺虾虎鱼16S rRNA序列的A+T含量与C+G含量几乎相等外，两种虾虎鱼的其他片段A+T含量均高于C+G含量，说明两种虾虎鱼的4种基因片段富含A+T，同其他鱼类A+T含量高，G+C含量低的特点相似<sup>[41]</sup>，并且两种虾虎鱼的碱基含量不存在明显差异。4种基因片段检测出的种间差异远大于种内差异，同时控制区和COI序列检测出两种间的差异位点比例约为15%，12S rRNA和16S rRNA序列检测出两种间的差异位点比例约为6%，这主要是因为不同序列片段的进化速率不同。本研究的结果表明线粒体DNA的D-loop、COI、12S rRNA、16S rRNA序列片段均可以作为鉴别两种虾虎鱼的有效分子标记手段。

综上，部分分节特征以及形态特征和耳石



特征的多元统计分析均可以对两种虾虎鱼进行有效区分, 同时线粒体DNA的4个片段均可以作为辅助手段对两种虾虎鱼进行鉴定。本研究对两种鱼类的形态学和遗传学差异进行比较分析, 结果可为虾虎鱼类的区分提供参考, 对海洋鱼类分类学研究具有重要参考意义。

#### 参考文献:

- [1] 伍汉霖, 钟俊生. 中国动物志-五, 硬骨鱼纲, 鲈形目, 虾虎鱼亚目[M]. 北京: 科学出版社, 2008.  
Wu H L, Zhong J S. Fauna Sinica-V, Ostichthyes, Perciformes, Gobioidae[M]. Beijing: Science Press, 2008(in Chinese).
- [2] 张衡, 朱国平. 长江河口潮间带鱼类群落的时空变化[J]. 应用生态学报, 2009, 20(10): 2519-2526.  
Zhang H, Zhu G P. Spatiotemporal changes of fish community in Yangtze estuary intertidal zone[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2009, 20(10): 2519-2526(in Chinese).
- [3] 龚艳丽, 孟田湘, 万瑞景. 黄鳍刺虾虎鱼(*Acanthogobius flavimanus*)前期幼鱼摄食习性和摄食率的初步研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(4): 609-613.  
Gong Y L, Meng T X, Wan R J. Study on the feeding habit and feeding rhythm of juvenile *Acanthogobius flavimanus*[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2000, 30(4): 609-613(in Chinese).
- [4] 刘群, 苏振明, 曾晓起, 等. 渤海虎鱼类的生物学调查——关于区系分布与生态学基础的研究[J]. 中国海洋大学学报, 1997, 27(2): 157-165.  
Liu Q, Su Z M, Zeng X Q, et al. Studies on ichthyofauna and ecology of goby fishes in the Bohai sea[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1997, 27(2): 157-165(in Chinese).
- [5] 高天翔, 孙希福, 宋娜. 斑尾复虾虎鱼群体的形态学比较[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(1): 35-42.  
Gao T X, Sun X F, Song N. Morphological variation analysis of seven populations of *Synechogobius ommaturus*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2009, 39(1): 35-42(in Chinese).
- [6] 宋娜, 宋林, 高天翔, 等. 斑尾复虾虎鱼群体遗传多样性比较分析[J]. 水产学报, 2011, 35(3): 321-326.  
Song N, Song L, Gao T X, et al. Comparative analysis of genetic diversity of *Synechogobius ommaturus* based on the mitochondrial DNA control region[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(3): 321-326(in Chinese).
- [7] Song N, Zhang X M, Gao T X. Genetic diversity and population structure of spottedtail goby (*Synechogobius ommaturus*) based on AFLP analysis[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010, 38(6): 1089-1095.
- [8] Song N, Zhang X M, Sun X F, et al. Population genetic structure and larval dispersal potential of spottedtail goby *Synechogobius ommaturus* in the north - west Pacific[J]. *Journal of Fish Biology*, 2010, 77(2): 388-402.
- [9] Wang Y J, Ye Z J, Liu Q, et al. Otolith chemical signatures of spottedtail goby *Synechogobius ommaturus* in coastal waters of China[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2011, 29(3): 640-646.
- [10] Wang Y J, Ye Z J, Liu Q, et al. Stock discrimination of spottedtail goby (*Synechogobius ommaturus*) in the Yellow Sea by analysis of otolith shape[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2011, 29(1): 192-198.
- [11] 叶锦玉, 张衡, 张瑛瑛, 等. 长江口盐沼植被生境内斑尾刺虾虎鱼食性特征[J]. 生态学报, 2018, 38(17): 6217-6227.  
Ye J Y, Zhang H, Zhang Y Y, et al. Feeding habits of *Acanthogobius ommaturus* in the salt marsh in the Yangtze Estuary[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(17): 6217-6227(in Chinese).
- [12] Neilson M E, Wilson Jr R R. mtDNA singletons as evidence of a post-invasion genetic bottleneck in yellowfin goby *Acanthogobius flavimanus* from San Francisco Bay, California[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2005, 296: 197-208.
- [13] Rowe D, Moore A, Giorgetti A, et al. Review of the impacts of gambusia, redbfin perch, tench, roach, yellowfin goby and streaked goby in Australia[Z]. Australian: Australian Government Department of the Environment, 2008.
- [14] Hirase S, Chambers S, Hassell K, et al. Phylogeography of the yellowfin goby *Acanthogobius flavimanus* in native and non-native distributions[J]. *Marine Biology*, 2017, 164(5): 106.
- [15] Bell J D, Steffe A S, Talbot R B. The oriental goby, *Acanthogobius flavimanus*, colonizes a third estuary in New South Wales, Australia[J]. *Japanese Journal of Ichthyology*, 1987, 34(2): 227-230.
- [16] Suzuki N, Sakurai N, Sugihara T. Effect of water tem-

- perature on the maturation of the oriental goby *Acanthogobius flavimanus*[J]. *Aquaculture Science*, 1989, 37(4): 267-274.
- [17] Kwak S N, Huh S H, Kim H W. Growth and estimated production of *Acanthogobius flavimanus* in an eelgrass (*Zostera Marina*) bed and unvegetated tidal flat of dongdae bay[J]. *Animal Cells and Systems*, 2009, 13(3): 315-321.
- [18] 高天翔, 韩刚, 马国强, 等. 黑鳃梅童鱼和棘头梅童鱼的形态学比较研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2013, 43(1): 27-33.
- Gao T X, Han G, Ma G Q, *et al.* Morphological variation analysis of *C. lucidus* and *C. niveatus*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2013, 43(1): 27-33(in Chinese).
- [19] Gaemers P A M. Taxonomic position of the Cichlidae (Pisces, Perciformes) as demonstrated by the morphology of their otoliths[J]. *Netherlands Journal of Zoology*, 1983, 34(4): 566-595.
- [20] 于鑫. 鱼类耳石形态和微化学分析方法及其在群体识别中的实证研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2014.
- Yu X. Methodology and case studies of fish otolith morphology and microchemistry analysis in stock discrimination[D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2014(in Chinese).
- [21] 李思发, 李晨虹, 李家乐. 尼罗罗非鱼品系间形态差异分析[J]. *动物学报*, 1998, 44(4): 450-457.
- Li S F, Li C H, Li J L. Analysis of morphological variations among strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1998, 44(4): 450-457(in Chinese).
- [22] 卞光明, 王娜冷, 胡泽辉, 等. 基于线粒体CO I 和16S rRNA基因序列比较分析东海带鱼群体遗传多样性[J]. *水生生物学报*, 2019, 43(2): 282-290.
- Bian G M, Wang N L, Hu Z H, *et al.* A Comparative analysis on the genetic diversity of *Trichiurus Lepturus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(2): 282-290(in Chinese).
- [23] 贺亮, 林斌全, 刘丽, 等. 海陵岛近岸2种虾虎鱼线粒体CO I 基因和D-loop区序列变异及遗传分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(1): 81-89.
- He L, Lin B Q, Liu L, *et al.* Sequence variation and genetic analysis of mitochondrial CO I gene and D-loop region of 2 species of goby from nearshore of Hailing Island[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(1): 81-89(in Chinese).
- [24] 李琳. 方氏云鳎和云鳎的形态学与遗传学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- Li L. Study on morphology and genetics of *Pholis fangi* and *P. nebulosa*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013(in Chinese).
- [25] 王英俊. 傅里叶分析在鱼类耳石形态学中的应用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- Wang Y J. The application of Fourier analysis in the research of otolith morphology[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010(in Chinese).
- [26] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, *et al.* DNA barcoding Australia's fish species[J]. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [27] Miya M, Sato Y, Fukunaga T, *et al.* MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species[J]. *Royal Society Open Science*, 2015, 2(7): 150088.
- [28] Palumbi S. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction[M]//Hillis D M, Moritz C, Mable B K. *Molecular Systematics*. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1996: 205-247.
- [29] 宋娜, 高天翔, 孙希福, 等. 矛尾复虾虎鱼物种命名有效性探讨[J]. *动物分类学报*, 2010, 35(2): 352-359.
- Song N, Gao T X, Sun X F, *et al.* Study on species validation for *Synechogobius hasta*[J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2010, 35(2): 352-359(in Chinese).
- [30] 苏杭, 方舟, 陈新军. 基于两种形态学方法的柔鱼类耳石判别比较[J]. *海洋渔业*, 2015, 37(4): 293-301.
- Su H, Fang Z, Chen X J. Comparative study of Ommastrephidae species identification based on statolith shape[J]. *Marine Fisheries*, 2015, 37(4): 293-301(in Chinese).
- [31] Gibson A R, Baker A J, Moeed A. Morphometric variation in introduced populations of the common myna (*Acridotheres tristis*): An application of the jackknife to principal component analysis[J]. *Systematic Zoology*, 1984, 33(4): 408-421.
- [32] Voss R S, Marcus L F, Escalante P P. Morphological evolution in muroid rodents I. Conservative patterns of craniometric covariance and their ontogenetic basis in 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- the Neotropical genus *Zygodontomys*[J]. [Evolution](#), 1990, 44(6): 1568-1587.
- [33] Eisenhour D J. Systematics of *Macrhybopsis tetranema* (Cypriniformes: Cyprinidae)[J]. [Copeia](#), 1999, 1999(4): 969-980.
- [34] 韩真, 肖永双, 高天翔. 中国近海9个小黄鱼群体的形态学比较研究[J]. [南方水产科学](#), 2012, 8(3): 25-33.  
Han Z, Xiao Y S, Gao T X. Comparison of morphological characteristics of 9 *Larimichthys polyactis* populations in China[J]. [South China Fisheries Science](#), 2012, 8(3): 25-33(in Chinese).
- [35] 高天翔, 杨天燕. 中、日青鳞小沙丁鱼形态学比较分析[J]. [中国海洋大学学报](#), 2008, 38(2): 201-206, 210.  
Gao T X, Yang T Y. Comparison of morphological characteristics of Japanese *Sardinella sardinella zunasi* in China and Japan[J]. [Periodical of Ocean University of China](#), 2008, 38(2): 201-206, 210(in Chinese).
- [36] 朱元鼎. 东海鱼类志[M]. 北京: 科学出版社, 1963: 433-455.  
Zhu Y D. Fishes of East China Sea[M]. Beijing: Science Press, 1963: 433-455(in Chinese).
- [37] 朱元鼎. 福建鱼类志[M]. 福建: 科学技术出版社, 1965: 357-365.  
Zhu Y D. Fishes of Fujian Province[M]. Fujian: Science Technology Press, 1965: 357-365(in Chinese).
- [38] 伍汉霖. 中国鱼类系统检索[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 429-436.  
Wu H L. Systematic Synopsis of Chinese Fishes[M]. Beijing: Science Press, 1987: 429-436(in Chinese).
- [39] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes[J]. [Proceedings of the Royal Society B](#), 2003, 270(1512): 313-321.
- [40] Meyer C P, Paulay G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling[J]. [PLoS Biology](#), 2005, 3(12): e422.
- [41] Liu H Z, Tzeng C S, Teng H Y. Sequence variations in the mitochondrial DNA control region and their implications for the phylogeny of the Cypriniformes[J]. [Canadian Journal of Zoology](#), 2002, 80(3): 569-581.

## Comparative studies on morphology and genetics between *Acanthogobius ommaturus* and *Acanthogobius flavimanus*

SUN Zhicheng<sup>1</sup>, LI Yadong<sup>1</sup>, SONG Chenyu<sup>1</sup>, CHEN Jian<sup>2</sup>, SONG Na<sup>1\*</sup>

(1. Ocean University of China, Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Qingdao 266003, China;

2. Marine Science School, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

**Abstract:** In this study, morphological analysis, Fourier analysis of otolith and fragments of mitochondrial DNA (mtDNA) were used to detect the species differences between *Acanthogobius ommaturus* and *Acanthogobius flavimanus*. The results showed that there was no overlap among the number of second dorsal fin spines, the number of second dorsal fin rays, the number of gluteal fin spines, the number of gluteal fin rays and the number of vertebrae. The results of the principal component analysis showed that the contribution rate of the first principal component was 52.101%, which mainly reflected the proportion of the body shape of the fish. The contribution rate related to the characteristics of the rear part of the trunk was the highest. The comprehensive discrimination accuracy based on the discriminant function was 100.0%. One-way analysis of variance showed that there was no significant difference between the head front indexes (such as the length of snout and the length of the upper jaw) and the indexes related to the length of the tail of two species. There are significant differences in other indicators except for the difference between them. The results of the Fourier analysis of otoliths were similar to that of the measurement characteristic analysis. The result of principal component analysis showed that the contribution rate of the first principal component was 12.181% which mainly reflected the shape characteristics of the dorsal and anterior edges of otolith. The discrimination accuracy based on, the discriminant function was 100.0%. The four fragment sequences of D-loop, COI, 16S rRNA and 12S rRNA in the mtDNA of the two species were compared and analyzed. The result showed that the distance between species significantly higher than that within species based on the K-2P model... The phylogenetic systematic tree constructed by combining the homologous sequences of other gobies in *Acanthogobius* downloaded from Genbank showed that the two species were clustered respectively. And the genetic difference was significant.

**Key words:** *Acanthogobius ommaturus*; *Acanthogobius flavimanus*; morphology; otolith fourier analysis; genetics

**Corresponding author:** SONG Na. E-mail: songna624@163.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China(41776171); Fundamental Research Funds for the Central Universities (201964002)