

# 基于 COI 和 D-Loop 序列豫北虾 虎鱼分子系统分析

张毅, 周传江, 顾钱洪, 孟晓林, 聂国兴, 李学军, 孔祥会

(河南师范大学 水产学院; 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 河南 新乡 453007)

**摘要:** 虾虎鱼在河南省北部广泛分布,但其系统分类和多样性未有报道.从豫北原阳黄寺、安阳小南海、淇县淇河、长垣孙东闸、林州弓上水库等地采集虾虎鱼样本共计 23 尾,成都岷江样本 6 尾,分别扩增了线粒体 COI 基因和 D-Loop 序列.联合 GenBank 下载虾虎鱼的 COI 序列和 D-Loop 序列,构建了虾虎鱼的系统进化树.结果显示,采自黄寺、小南海、淇县、岷江地区的子陵吻虾虎鱼(*Rhinogobius giurinus*)聚为一个分支,而采自孙东闸和弓上水库的褐吻虾虎鱼(*Rhinogobius brunneus*)聚为一个单系群;这两种虾虎鱼遗传分化主要来自群体间.系统发育结果支持子陵吻虾虎鱼的韩国群体与中国群体构成姐妹群关系,中国不同地理种群间则相互交叉.

**关键词:** 吻虾虎鱼; 细胞色素 C 氧化酶亚基; D-环区; 系统分类分析

**中图分类号:** S93

**文献标志码:** A

虾虎鱼亚目现存物种 2200 多种<sup>[1]</sup>,统称为虾虎鱼,是鲈形目中种类最多的亚目,分属于 9 科,约 270 属.虾虎鱼广泛分布在淡水和海水,在全世界范围内均有分布,亚洲分布包括东部的俄罗斯、中国、韩国以及西太平洋岛屿的日本、菲律宾和中国台湾等<sup>[2-3]</sup>.虾虎鱼物种众多,形态和生态变化各异,因此,虾虎鱼受到了生态学家和进化学家的广泛关注<sup>[4]</sup>.

线粒体控制区(control region)又称 D-环区(D-Loop),其结构特殊,被认为是线粒体基因组中进化速度最快的区域,是研究近缘种间的进化关系和种群多样性的重要分子标记<sup>[5]</sup>,也是研究鱼类系统分类的重要工具<sup>[6-9]</sup>.COI 基因是线粒体上蛋白编码基因,进化速度适中富含系统发育信息,因此在物种鉴定尤其是鱼类物种鉴定中,通常选择 COI 基因作为条形码标准基因鉴定物种<sup>[10]</sup>.因此,线粒体 COI 和 D-Loop 序列已成为研究物种分类和系统发育的重要工具. Agorreta 在欧洲虾虎鱼分子系统进化的研究中提出吻虾虎鱼属属于刺虾虎鱼系<sup>[11]</sup>,而 Thacker 则提出吻虾虎鱼属属于鲮虾虎鱼系<sup>[12]</sup>.侯新远等<sup>[13]</sup>利用 D-Loop 分析我国 5 种虾虎鱼的系统发育关系,得出河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)的进化关系,于亚男等<sup>[14]</sup>根据 COI 基因研究长江口虾虎鱼科系统分类,利用 COI 基因序列确定了孔虾虎鱼(*Trypauchen ocellicauda*)和拉氏狼牙虾虎(*Odontamblyopus lacepedii*)的分类地位.

虾虎鱼在其环境适应进化过程中,形态变化多样,单纯靠形态学特征进行物种鉴定存在一定困难,很多分类结果存在着争议<sup>[15]</sup>.据《河南鱼类志》记载,河南仅有两种虾虎鱼分布<sup>[16]</sup>.豫北地区水域复杂,河流、水库和山间溪流中均有虾虎鱼分布.通过河南省鱼类资源调查,本文作者发现豫北的虾虎鱼形态存在较大分化,在体斑、体色、花纹等形态特点上存在差异.本研究以线粒体 COI 基因和 D-Loop 序列作为分子标记,以采自河南北部地区虾虎鱼为研究对象,通过序列分析、遗传距离计算和系统发育树重建,以初步了解河南北部虾虎鱼物种系统分类及其多样性状况.

收稿日期:2016-03-30;修回日期:2016-08-01.

基金项目:河南省科技攻关重点项目(142102110144;142102110057;122102110049;122102310357);国家自然科学基金(31401964).

第 1 作者简介:张毅(1990-),男,河南新乡人,河南师范大学在读硕士研究生,主要从事鱼类生物学研究,E-mail:zyworship@163.com.

通信作者:孔祥会,教授,博士,E-mail:xhkong@htu.cn.

## 1 材料方法

### 1.1 实验材料

所涉及的虾虎鱼分别采自河南省黄河流域、海河流域、并与岷江流域虾虎鱼进行比较,具体采集信息请参看表1.取新鲜组织块放入无水乙醇,于-20℃保存,用于提取基因组DNA并进行COI基因和D-Loop序列扩增.其余序列来自GenBank数据库,详细信息请参看表1.

表1 样品信息及数据来源

物种	群体	样本数量	采集地	水系	数据来源
子陵吻虾虎鱼 <i>Rhinogobius giurinus</i>	Rg_HS	5	河南原阳黄寺村	黄河	本研究
	Rg_XNH	6	安阳小南海水库	海河	本研究
	Rg_QH	4	淇县淇河	海河	本研究
	Rg_MR	6	成都岷江	长江	本研究
褐吻虾虎鱼 <i>Rhinogobius brunneus</i>	Rg_TW	6	中国台湾	—	Genbank
	Rg_SK	10	韩国	—	Genbank
	Rb_GS	3	林州弓上水库	海河	本研究
斑带吻虾虎鱼 <i>Rhinogobius macula fasciatus</i>	Rb_SD	5	长垣孙东村孙东闸	黄河	本研究
	Rb_SK	8	韩国	—	Genbank
黄鳍刺虾虎鱼 <i>Acanthogobius flavimanus</i>	Rm_TW	1/10	中国台湾	—	Genbank
双带缟虾虎鱼 <i>Tridentiger bifasciatus</i>	Af	5/5	日本	—	Genbank
大口裸头虾虎鱼 <i>Chaenogobius gulosus</i>	Tb	13/1	浙江舟山	—	Genbank
日本裸身虾虎鱼 <i>Gymnogobius petschiliensis</i>	Cg	2	韩国	—	Genbank
阿部氏鳃虾虎鱼 <i>Mugilogobius abei</i>	Gp	2	韩国	—	Genbank
	Ma	1/6	中国台湾	—	Genbank

注:个体数量表示来自不同个体的COI/D-Loop序列数或GenBank下载序列数.

### 1.2 DNA 提取

每个样品取0.1g固定保存的肌肉组织,使用标准酚氯仿法<sup>[17]</sup>提取DNA,干燥后溶解于灭菌蒸馏水中,用于COI和D-Loop序列扩增.

### 1.3 D-loop 与 COI 序列扩增与测定

依据已发表的虾虎鱼科D-Loop保守序列,设计PCR引物为:正向引物D-Loop F:5'-TCTTAA-CATCTTCAGTGTTATGCTTT-3',反向引物D-Loop R:5'-CTTGTAARCCGGCCGCSGGAGGTTAAA-3';虾虎鱼COI序列扩增采用鱼类通用引物<sup>[18]</sup>,引物序列为:正向引物COI F:5'-TCTCAACCAACCATAAA-GACATTGG-3',反向引物COI R:5'-TATACTTCTGGGTGCCCAAAGAATCA-3'.扩增COI和D-Loop序列PCR体系为25 μL,含10x PCR Buffer 2.5 μL(含Mg<sup>2+</sup> 25 mmol/L),dNTPs(2.5 mmol/L)1 μL, Taq DNA Polymerase(5 U/μL)0.5 μL,正反向引物各1 μL,DNA模板1 μL,使用无菌水补足至25 μL.PCR反应试剂购自康为世纪公司.PCR反应条件为:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,扩增35个循环,最后72℃终延伸10 min,反应产物4℃保存.COI基因的PCR产物直接送商业公司双向测序.D-Loop序列的PCR产物经1%琼脂糖电泳后,切下目的条带,使用胶回收试剂盒(Omega Com)回收.然后采用PMD 19-T连接,转化到大肠杆菌,挑取阳性克隆,送公司测序.

### 1.4 数据分析

扩增获得的COI基因和D-Loop序列,通过NCBI网站BLAST比对验证,使用DNASTAR中的Seqman进行序列组装并辅以人工校对,使用BioEdit7<sup>[19]</sup>软件进行序列同源性比对<sup>[20]</sup>.使用MEGA 5.0<sup>[21]</sup>计算序列

间的保守位点、变异位点、简约信息位点、单态位点、转换/颠换值. 使用 DnaSp 5.0 计算各群体的单倍型 ( $h$ )、单倍型多态性 ( $H_d$ )、平均核苷酸差异数 ( $\pi$ )、核苷酸多样性指数 ( $k$ )<sup>[22]</sup>. 采用 Arlequin 3.5 软件进行 AMOVA 分析<sup>[23]</sup>. 选择阿部氏鲮虾虎鱼为外类群, 基于 K2P 模型, 分别计算 D-Loop 序列和 COI 序列遗传距离. 采用 MEGA 5.0 软件构建 Neighbor-Joining(NJ)树和(ML)树; 利用贝叶斯法(BI)采用 GTR+I+G 模型构建系统发育树<sup>[24]</sup>; 利用 SequenceMatrix 软件进行序列合并, 然后采用 PhyML 软件构建系统发育树<sup>[25]</sup>.

## 2 结果

### 2.1 D-Loop 序列变异和遗传多样性的初步分析

本研究扩增得到 COI 基因 26 条长度为 683-687 bp, D-Loop 序列 30 条序列长度为 874-877 bp, COI 和 D-Loop 序列的碱基组成如表 2. 子陵吻虾虎鱼 (*Rhinogobius giurinus*) 与褐吻虾虎鱼 (*Rhinogobius brunneus*) D-Loop 序列及 COI 序列 A+T 含量均高于 G+C 含量(表 2).

表 2 子陵吻虾虎鱼和褐吻虾虎鱼 COI 和 D-Loop 的序列组成

物种	A		T		C		G	
	COI	D-Loop	COI	D-Loop	COI	D-Loop	COI	D-Loop
子陵吻虾虎鱼 <i>Rhinogobius giurinus</i>	23.2	29.9	28.4	31.2	29.6	21.9	18.9	17.0
褐吻虾虎鱼 <i>Rhinogobius brunneus</i>	22.3	29.5	28.9	29.6	30.1	23.5	18.8	17.4

扩增得到的序列采用 DnaSP 分析遗传多样性(表 3). 研究中子陵吻虾虎鱼有 5 个群体, 分别为 Rg\_HS, Rg\_XNH, Rg\_QH, Rg\_MR, Rg\_TW. 褐吻虾虎鱼孙东闸群体 Rb\_SD 和弓上水库群体 Rb\_GS, 两个群体均只有一个单倍型, 而且群体内核苷酸没有变异位点.

子陵吻虾虎鱼群体和褐吻虾虎鱼群体 D-Loop 序列的 AMOVA 分析(表 4), 结果显示, 群体间变异是总变异的主要来源,  $F_{ST} = 0.588\ 03 (P < 0.05)$ . 采用 MEGA5.0 分析遗传距离, 8 种虾虎鱼种间遗传距离为 0.184, 种内遗传距离平均值为 0.0026.

表 3 基于 D-Loop 序列和 COI 序列子陵吻虾虎鱼和褐吻虾虎鱼群体遗传多样性参数

群体	D-Loop						COI					
	样本数	变异位点	单倍型	单倍型多样性	核苷酸多样性	平均核苷酸差异数	样本数	变异位点	单倍型	单倍型多样性	核苷酸多样性	平均核苷酸差异数
Rg_HS	5	8	4	0.900	0.003 82	3.200	5	8	3	0.700	0.004 97	3.400
Rg_XNH	6	6	4	0.867	0.003 98	3.333	6	8	2	0.533	0.006 24	4.267
Rg_QH	4	1	2	0.500	0.000 59	0.005 0	—	—	—	—	—	—
Rg_MR	7	9	5	0.857	0.003 40	2.857	6	22	6	1.000	0.011 57	7.867
Rg_TW	6	8	6	1.000	0.004 68	3.933	—	—	—	—	—	—
Rg_SK	—	—	—	—	—	—	10	8	4	0.533	0.002 95	1.600
Rb_SD	5	0	1	0	0	0	5	0	1	0	0	0
Rb_GS	3	0	1	0	0	0	4	1	2	0.500	0.000 73	0.500
Rb_SK	—	—	—	—	—	—	8	20	4	0.740	0.014 72	9.714

表 4 基于 D-Loop 序列对子陵吻虾虎鱼群体的 AMOVA 分析

遗传差异来源	df	平方和	方差组分	各方差所占比例
群体间	4	53.502	2.076 30 Va	58.80
群体内	24	34.912	1.454 66 Vb	41.20
总计	28	88.414	3.530 96	—

### 2.2 基于 COI 序列变异和遗传多样性初步分析

吻虾虎鱼 COI 序列碱基含量表现出 A+T(51.7%)含量高于 G+C 含量. 在序列比对中, 子陵吻虾虎鱼序列存在 26 个变异位点, 其中简约信息位点为 14 个, 平均转换/颠换值为 5.82. 褐吻虾虎鱼序列中变异位点为 23 个, 简约信息位点为 20 个, 平均转换/颠换值为 4.85.

子陵吻虾虎鱼群体为 Rg\_HS, Rg\_XNH, Rg\_SK, Rg\_MR(表 3).

表 5 基于 COI 序列对子陵吻虾虎鱼群体和褐吻虾虎鱼群体的 AMOVA 分析

遗传差异来源	自由度		平方和		方差组分		各方差所占比例/%	
	Rg	Rb	Rg	Rb	Rg	Rb	Rg	Rb
种群间	3	2	29.992	37.015	1.438 03 Va	2.961 18 Va	59.88	54.40
种群内	22	14	21.200	34.750	0.963 64 Vb	2.482 14 Vb	40.12	45.60
总计	25	16	51.192	71.765	2.401 67	5.443 32	—	—

基于 K2P 模型,8 种虾虎鱼 COI 序列的平均遗传距离为 0.147,种内遗传距离平均值为 0.008,种间遗传距离是种内遗传距离的 18 倍。

表 6 基于 D-Loop(左下)和 COI(右上)序列虾虎鱼群体间遗传距离

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	—	0.003	0.005	0.144	0.144	0.239	0.209	0.209	0.223	0.220	0.234
2	0.004	—	0.006	0.145	0.145	0.239	0.207	0.210	0.223	0.219	0.234
3	0.004	0.004	—	0.146	0.146	0.240	0.206	0.210	0.223	0.219	0.234
4	0.114	0.116	0.116	—	0.001	0.211	0.206	0.210	0.213	0.198	0.219
5	0.114	0.116	0.116	0.000	—	0.212	0.206	0.210	0.214	0.197	0.220
6	0.112	0.111	0.112	0.097	0.097	—	0.233	0.253	0.259	0.243	0.272
7	0.310	0.310	0.311	0.319	0.319	0.308	—	0.201	0.164	0.227	0.196
8	0.361	0.360	0.358	0.363	0.363	0.361	0.381	—	0.227	0.238	0.230
9	0.310	0.309	0.308	0.327	0.327	0.326	0.175	0.377	—	0.243	0.196
10	0.347	0.347	0.348	0.330	0.330	0.328	0.381	0.396	0.394	—	0.244
11	0.253	0.251	0.252	0.275	0.275	0.254	0.346	0.391	0.337	0.388	—

注:1:Rg\_MR; 2: Rg\_HS; 3: Rg\_XNH; 4: Rb\_GS; 5: Rb\_SD; 6: Rm\_TW; 7: Cg; 8: Tb; 9: Gp; 10: Af; 11:Ma.

### 2.3 统发育分析

分别基于 D-Loop 和 COI 序列,分别采用 NJ 法,ML 法,贝叶斯法构建系统发育树;采用 SequenceMatrix 合并序列后,使用 PhyML 构建系统发育树(图 1)。基于 D-loop 序列构树的结果与联合构树的结果,节点处数字显示为 NJ,ML,BI,PhyML 法的支持率。基于 COI 序列的系统发育树的拓扑关系与 D-Loop 和合并分析结果存在差异。但分子系统发育关系分析显示,吻虾虎属聚为一支,双带缟虾虎鱼与黄鳍刺虾虎鱼构成姐妹群,大口裸头虾虎鱼和日本裸身虾虎鱼为姐妹群关系。吻虾虎属于子陵吻虾虎鱼、褐吻虾虎鱼、斑带吻虾虎鱼聚为一个分支,系统发育结果支持该属的单系性。

## 3 讨 论

### 3.1 子陵吻虾虎鱼和褐吻虾虎鱼 D-Loop 和 COI 序列特征分析

本研究中,子陵吻虾虎鱼和褐吻虾虎鱼线粒体 D-Loop 和 COI 基因序列 A+T 含量高于 G+C 含量,与斑带吻虾虎鱼等碱基组成比例接近<sup>[26-28]</sup>,与其他鱼类 D-Loop 核苷酸组成比例也相近<sup>[26]</sup>。子陵吻虾虎鱼和褐吻虾虎鱼 D-Loop 序列和 COI 基因序列变异位点差异较小,与台湾丝虾虎鱼和双带缟虾虎鱼等鱼中相应序列<sup>[26]</sup>高度相似。

### 3.2 基于 D-Loop 和 COI 序列的遗传多样性分析

核苷酸多样性( $\pi$ ),平均遗传距离,单倍型多样性(Hd)是衡量群体遗传多样性的重要指标<sup>[29]</sup>。同一群体 D-Loop 单倍型多样性均较高,核苷酸多样性较小,而 COI 基因的单倍型多样性较低,核苷酸多样性较高。研究中也发现,中国斑尾复虾虎鱼(*Synechogobius ommaturus*)具有相同的现象<sup>[30]</sup>。研究中的豫北地区子陵吻虾虎鱼具有较高的单倍型多样性,而核苷酸多样性处于中度水平。褐吻虾虎鱼 D-Loop 序列单倍型和核苷酸多样性没有变化,COI 基因核苷酸多样性和单倍型多样性较低。AMOVA 分析显示,子陵吻虾虎鱼和褐吻虾虎鱼遗传变异主要来自于群体间的遗传变异,其中子陵吻虾虎鱼群体具有一定的遗传多样性。

子陵吻虾虎鱼属于底栖鱼类,不属于经济鱼类,因而人为对其捕捞较少,自然和人为的选择压力较小,自然环境可能是造成该遗传结构的主要原因。而采自豫北地区与岷江地区的子陵吻虾虎鱼生活环境存在差异,地理环境差异是造成豫北与岷江地区遗传多样性差异的原因。研究中涉及到子陵吻虾虎鱼和褐吻虾虎鱼样



鱼的韩国群体与中国大陆子陵吻虾虎鱼区分开,但是中国大陆的地理种群并没有各自聚在一起.其中,豫北黄寺群体、小南海群体等没有分开,同时与岷江地区个体也相互交错,而中国大陆群体与中国台湾群体可以分开.日本学者研究发现,日本吻虾虎鱼属中鱼类核基因和线粒体基因存在较大分化,推测其在若干年前存在大范围的种间和种内的杂交而导致线粒体基因的杂交<sup>[31]</sup>. Hebert<sup>[32-33]</sup>指出,有效利用COI基因序列鉴别物种的关键是种间遗传距离必须大于种内遗传距离,并且距离差异应大于10倍以上.本研究中利用COI基因和D-Loop序列计算遗传距离差异分别为18倍和70倍.

吻虾虎鱼近缘种形态较为相似,单纯依靠形态鉴别近缘种存在较大难度,因此也采用分子鉴定的方法进行辅助鉴别<sup>[34]</sup>.本研究结果显示D-Loop序列通过构建系统发育树,能够清晰的识别吻虾虎鱼属内的物种.COI是物种识别的DNA条形码基因,形态学特征表明发现研究中所用的虾虎鱼样本虽然在体色、体斑等方面表现出多样性,但在COI序列和D-Loop序列分支树中聚为两个单系群.推测虾虎鱼的形态可塑性较强,虽然线粒体DNA序列差异很小,但形态特征却因生存环境、基因调控表达及个体不同发育阶段的影响<sup>[35]</sup>表现出显著差异.黄鳍刺虾虎鱼在COI序列分支树中的位置与其在D-loop序列以及联合分析的系统树的位置存在差异.这可能是因为COI基因是蛋白质编码基因,而D-Loop序列为非编码序列,两个基因进化速率不一致.为了能够全面反映物种间的进化关系,系统发育中可以使用多个基因联合进行系统发育分析.

## 4 结 论

依据线粒体COI基因序列与D-Loop序列的分子系统发育结果显示,吻虾虎属是一个单系类群,其中,子陵吻虾虎鱼和褐吻虾虎鱼的单系性也得到支持.同时,本研究中采集褐吻虾虎鱼为河南北部地区虾虎鱼新记录种.

## 参 考 文 献

- [1] Nelson J S. Fisher of world[M]. 4th ed. New York: John Wiley and Sons,2006.
- [2] 伍汉霖,钟俊生.中国动物志硬骨鱼纲虾虎鱼亚目[M].北京:科学出版社,2008:2-5.
- [3] 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]. Ichthyological Research,2005,52(4):410-413.
- [4] Yamada T, Sugiyama T. Adaptive radiation of gobies in the interstitial habitats of gravel beaches accompanied by body elongation and excessive vertebral segmentation[J]. BMC Evolutionary Biology,2009,145(9),doi: 10.1186/1471-2148-9-145.
- [5] 郑冰蓉,张亚平,肖 衡,等.鲤属鱼类 mtDNA 控制区(D-环区)序列的变异性分析[J].水产学报,2002,26(4):289-294.
- [6] 张四明,吴清江,张亚平,等.从线粒体DNA控制区核苷酸序列论达式鲟、亚洲和北美洲中吻鲟的分类地位[J].动物学报,2001,47(6):632-639.
- [7] 张 静,白俊杰,叶 星,等.用线粒体DNAD-loop区序列探讨盘丽鱼属鱼类系统分类[J].上海海洋大学学报,2006,15(1):17-20.
- [8] 王 伟,何舜平,陈宜瑜.线粒体DNAd-loop序列变异与鳅亚科鱼类系统发育[J].自然科学进展,2002,12(1):33-36.
- [9] 胡文革,段子渊,王金富,等.新疆3种雅罗鱼线粒体DNA控制区序列的差异和系统进化关系[J].遗传学报(英文版),2004,31(9):970-975.
- [10] Zhang J B, Hanner R. DNA barcoding is a useful tool for the identification of marine fishes from Japan[J]. Biochemical Systematics & Ecology,2011,39(1):31-42.
- [11] Agorreta A, San M D, Schlieven U, et al. Molecular phylogenetics of Gobioidi and phylogenetic placement of European gobies[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,2013,69(3):619-633.
- [12] Thacker C E. Phylogenetic placement of the European sand gobies in Gobionellidae and characterization of gobionellid lineages (Gobiiformes: Gobioidi)[J]. Zootaxa,2013,3619(3):369-382.
- [13] 侯新远,祝 斐,张丽娟,等.基于线粒体D-loop基因序列研究我国5种虾虎鱼类的系统进化关系[J].海洋渔业,2013,35(1):1-7.
- [14] 于亚男,宋 超,侯俊利,等.基于线粒体COI基因部分序列的长江口虾虎鱼科鱼类系统分类[J].淡水渔业,2014,44(5):3-8.
- [15] Thacker C E. Molecular phylogeny of the gobioid fishes (Teleost: Perciformes: Gobioidi)[J]. Molecular Phylogenetic & Evolution,2003,26(3):354-368.
- [16] 新乡师院生物系.河南鱼类志[M].郑州:河南科技出版社,1984:177-179.
- [17] 张维铭.现代分子生物学实验手册[M].北京:科学出版社,2007:70-78.
- [18] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species. [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London,2005,360(1462):1847-1857.
- [19] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for window 95/98/NT [J]. Nucleic Acids

Symposium Series,1998,41:95-98.

- [20] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*,2007,23(21):2947-2948.
- [21] 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*,2011,28(10):2731-2739.
- [22] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messenguier X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods[J]. *Bioinformatics*, 2003,19(18):2496-2597.
- [23] 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[J]. *Molecular Ecology Resources*,2010,10(3):564-567.
- [24] Drummond A J, Suchard M A. Bayesian random local clocks, or one rate to rule them all[J]. *BMC Biology*,2010,114(8),doi:10.1186/1741-7007-8-114.
- [25] Guindon S, Dufayard J F, Lefort V, et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0[J]. *Systematic Biology*,2010,59(3):307-321.
- [26] 金道道,孙悦娜,王日昕,等. 虾虎鱼类线粒体全基因组序列结构特征分析及系统发育关系探讨[J]. *遗传*,2013,35(12):1391-1402.
- [27] Neilson M E, Wilson 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*,2005,296(1):197-208.
- [28] Oh J, Kim T W, Kim S. The complete mitochondrial genome of *Chaenogobius gulosus* (Gobiidae, Perciformes) from the South Sea, Korea[J]. *Mitochondrial DNA*,2015:1-2.
- [29] 郑文娟,杜一超,林洁,等. 基于线粒体 DNAD-Loop 区部分序列分析舟山海域带鱼种群遗传结构[J]. *水生生物学报*,2015,39(2):408-413.
- [30] Song N, Zhang X M, Sun X F, et al. Population genetic structure and larval dispersal potential of spottedtail goby *Synechogobius omaturus* in the north-west Pacific[J]. *Journal of Fish Biology*,2010,77(2):388-402.
- [31] Yamasaki Y Y, Nishida M, Suzuki T, et al. Phylogeny, hybridization, and life history evolution of *Rhinogobius gobies* in Japan, inferred from multiple nuclear gene sequences[J]. *Molecular Phylogenetics & Evolution*,2015,90:20-33.
- [32] Hebert P D N, Gregory T R. The promise of DNA barcoding for taxonomy[J]. *Systematic Biology*,2005,54(5):852-859.
- [33] Wong L L, Peatman E, Lu J, et al. DNA Barcoding of Catfish: Species Authentication and Phylogenetic Assessment[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(3): e17812. doi:10.1371/journal.pone.0017812.
- [34] Jeon H B, Choi S H, Suk H Y. Exploring the utility of partial cytochrome c oxidase subunit 1 for DNA barcoding of Gobies[J]. *Animal Systematics Evolution & Diversity*,2012,28(4):269-278.
- [35] Padial J M, Miralles A, Dela R I, et al. The integrative future of taxonomy[J]. *Frontiers in Zoology*,2010,7(1):1-16.

## Molecular Phylogenetic Analysis of Gobies in the North of Henan Based on COI and D-Loop Sequences

ZHANG Yi, ZHOU ChuanJiang, GU QianHong, MENG Xiaolin,  
NIE Guoxing, LI Xuejun, KONG Xianghui

(College of Fisheries; Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** Gobies are widely distributed in the northern regions of Henan, phylogenetic classify and genetic diversity of which haven't been reported. Based on the sequences of COI and D-Loop of the obtained 23 specimen from the northern regions of Henan (Huangsi village of Yuanyang county, Qihe River of Qi County, Sundongzha of Changyuan county, Xiaonanhai Reservoir of Anyang city, Gongshang Reservoir of LinZhou city) and 6 specimen from Min River (ChengDu, Sichuan province), and the sequences download from GeneBank, phylogenetics tree was constructed. The results indicate that the gobies from Huangsi, Xiaonanhai, Qihe, Minjiang are *Rhinogobius giurinus*, which clades a monophyletic group, and the gobies from Sundong and Gongshang reservoir are *Rhinogobius brunneus*, which clades into a monophyletic group. The main sequence differentiation is between the two species. The phylogenetic tree indicates that *R. giurinus* from South Korea, constitutes a sister group with the population from China, and the different geographic populations from China are shown to be nested.

**Keywords:** gobies; cytochrome oxidase subunit (COI); D-Loop region; molecular phylogenetics