

doi: 10.7541/2013.5

基于线粒体 *Cytb* 基因全序列的松江鲈 群体遗传结构分析

高天翔¹ 毕潇潇¹ 赵林林¹ 李创举²

(1. 中国海洋大学海洋生物多样性与进化研究所, 青岛 266003;

2. 中国水产科学院长江水产研究所, 荆州 434000)

摘要: 对松江鲈(*Trachidermus fasciatus* Heckel)中国沿海 7 个群体和日本有明海群体的线粒体 *Cytb* 基因全序列进行了测定、分析。结果显示: 47 个个体共检测到 31 个单倍型, 8 个群体均呈现出较高的单倍型多样性(0.60—1.00)和较低的核苷酸多样性(0.0005—0.0041)的特点。AMOVA 分析结果及单倍型邻接关系树和单倍型网络关系图均显示松江鲈分为中国和日本两个世系, 而中国世系的 7 个群体未呈现出明显的地理遗传结构。基于核苷酸 Kimura 双参数替代模型计算得出的中国和日本两个世系的净遗传距离, 再参照其他硬骨鱼类线粒体 *Cytb* 基因 2%/Ma(百万年)的分歧速率, 推测松江鲈中日两个世系间分化时间约为 41 万年前。对中国世系进行群体历史动态分析, 中性检验结果均为负值且显著, 核苷酸不配对分布呈单峰型, 表明松江鲈中国世系曾发生过群体扩张, 其扩张时间大约为 12 万年前。

关键词: 松江鲈; *Cytb* 基因; 全序列; 遗传结构; 群体扩张

中图分类号: Q347 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)02-0199-09

松江鲈(*Trachidermus fasciatus* Heckel)隶属于鲈形目(Scorpaeniformes)、杜父鱼科(Cottidae)、松江鲈属(*Trachidermus*), 俗称四鳃鲈、花鼓鱼、媳妇鱼等。松江鲈是一年生肉食性降河洄游鱼类, 其营养价值和药用价值高^[1], 与黄河鲤鱼、松花江鲑鱼、黑龙江兴凯湖鲈并列列为“中国四大淡水名鱼”。松江鲈为西北太平洋所特有, 仅分布于中国、朝鲜半岛和日本南部, 我国分布于黄渤海和东海沿岸以及沿岸诸河下游及河口^[2, 3]。近年来, 由于工业有害污水及农药化肥等对江河口和沿海的严重污染, 松江鲈数量急剧下降; 与此同时, 拦河建坝、水闸等水利设施的大量兴建, 截断了松江鲈的洄游通道, 导致其数量急剧下降, 进入内陆水域的松江鲈鱼苗数量大为减少, 严重影响了其资源的恢复, 在一些原有分布记录的水域已难觅其踪迹。松江鲈现为我国野生动物重点保护二级水生动物^[4], 2004 年被列入中国物

种红色名录。

线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)结构简单, 呈母性遗传, 进化速度快且不发生重组, 是一种应用较广的分子标记, 其中一些基因已被广泛用于鱼类群体遗传学和系统发育关系研究^[5-7]。细胞色素 *b* (Cytochrome *b*, *Cytb*)基因进化速度适中, 不仅容易使用通用引物扩增和测序, 而且它还是 mtDNA 上唯一的结构和功能被了解的较为清楚的蛋白编码基因^[8, 9]。*Cytb* 被认为是了解种质资源状况和群体遗传结构的理想工具, 近年来已成为鱼类遗传多样性研究中常用的标记之一^[7]。

目前对松江鲈鱼的报道多集中在资源调查与保护、繁育及生理生态等方面^[3, 10-12], 关于遗传多样性的研究相对较少。王金秋等^[13]、徐建荣等^[14, 15]、刘海林等^[16]分别用同工酶、AFLP、SSR 和线粒体控制区标记对我国黄渤海松江鲈群体的遗传多样性进

收稿日期: 2011-12-28; 修订日期: 2012-10-29

基金项目: 海洋公益项目(201105005); 中国水产科学院长江水产研究所开放课题(LFBCU0713)资助

作者简介: 高天翔(1962—), 辽宁辽阳人; 博士; 主要从事渔业资源生物学及群体遗传学研究。E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn

通信作者: 李创举, E-mail: lcj@yfi.ac.cn

行了初步研究,但样品分布点均较少。本研究基于线粒体 *Cytb* 基因全序列分析了日本有明海和中国渤海、黄海及东海近海松江鲈群体的遗传结构,旨在为松江鲈种质资源的保护和管理提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

松江鲈样品于 2007 至 2010 年采自于日本有明海(Ariake Sea)、大连(DL)、丹东(DD)、秦皇岛(QHD)、东营(DY)、荣成(RC)、文登(WD)、杭州湾(HZB)8 个地点(图 1)。除日本有明海松江鲈样本数为 12 尾外,其他群体均为 5 尾,共计 47 尾。样品经形态学鉴定后,均用 95%乙醇固定,于-20℃冰箱中保存。

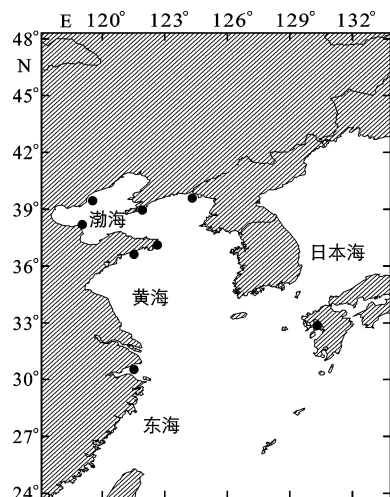


图 1 松江鲈采样地点
Fig. 1 Sampling sites of *T. fasciatus*

1.2 实验方法

基因组 DNA 的提取 取松江鲈肌肉组织约 100 mg, 采用标准的酚-氯仿方法提取基因组 DNA, 将乙醇沉淀后的基因组 DNA 于 100 μL 超纯水溶解, 4℃保存备用。

目的片段的 PCR 扩增 根据 GenBank 中报道的相近种 *Cytb* 全序列及现有的通用引物^[17], 共采用了 3 对引物对松江鲈线粒体 *Cytb* 基因全序列进行扩增, 引物分别为:

L14734-F: (5'-AACCACCGTTGTTATTCAACT-3')

Cytb-R: (5'-CTCAGAATGACATTTGTCCTCA-3')

S14730-F: (5'-ACGTGGAATATCGGAGTTG-3')

S15250-R: (5'-CCGTTGCTTTGATGTGTGTA-3')

S15190-F: (5'-GCATACGCTATTCTTCGAT-3')

S15761-R: (5'-CCCATTACATGTACTTAAC-3')

PCR 反应体系总体积为 50 μL, 其中: 10×PCR 缓冲液(200 mmol/L Tris-HCl, pH 8.4; 200 mmol/L KCl; 100 mmol/L (NH₄)₂SO₄; 15 mmol/L MgCl₂) 5 μL, dNTP 200 μmol/L, 引物各 0.2 μmol/L, Taq 酶 1.25 U

(大连宝生物公司), 模板 DNA 20 ng, 加水至 50 μL。应用 Eppendorf 热循环仪进行 PCR 反应, 反应条件如下: 首先 94℃预变性 5min, 之后进行 35 个循环, 每个循环包括 94℃变性 45s、50℃退火 45s、72℃延伸 45s, 最后 72℃延伸 10 min。以上反应均设阴性对照以排除 DNA 污染的情况。用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 凝胶成像系统拍照。

纯化回收及测序 PCR 产物经 1%TAE 琼脂糖凝胶电泳检测, 产物电泳后于紫外灯下切割目的条带, 用 DNA 胶回收试剂盒进行产物的纯化回收。纯化产物送上海桑尼生物有限公司进行双向测序, 测序反应采用与 PCR 反应一致的引物。

1.3 数据分析

序列分析 所有序列均由 Dnastar 软件包进行编辑、校对和排序, 并对排序结果进行分析和手工校正。利用 Arlequin3.1^[18]软件计算碱基组成、变异位点数、单倍型数、平均核苷酸差异数、单倍型多样性和核苷酸多样性。

群体结构分析 应用 Modeltest3.7^[19]对线粒体 *Cytb* 基因全序列进行最佳替换模型筛选, 并估计相关参数。根据筛选的模型和相关参数, 利用 Paup4.0^[20]构建单倍型邻接关系树来探讨单倍型的遗传结构。利用 Mega4.0^[22]软件基于 Kimura 双参数模型计算中国世系和日本世系之间的净遗传距离以估算中日松江鲈的分化时间。使用分子变异分析(AMOVA)来评估群体间遗传变异, 通过 1000 次重抽样来检验不同遗传结构水平上协方差的显著性。采用分化固定指数(F_{st})来评价两两群体间的遗传差异, 通过 1000 次重抽样来检验两两群体间 F_{st} 的显著性。通过设定两种 AMOVA 分析来检验松江鲈的群体遗传结构: 一是将 8 个群体都划分为一个组群以验证群体间是否具有显著的遗传分化; 二是按样品的地理来源将松江鲈 8 个群体划分为 2 个组群, 分别对应不同的海区以验证是否存在显著的地理结构, 日本有明海群体划分为日本组群, 其余 7 个群体划分为中国组群。

群体历史动态分析 在 Arlequin3.1^[18]软件中, 采用中性检验和核苷酸不配对分布两种方法来检测松江鲈的群体历史动态。首先由 Tajima's D ^[23]检验和 Fu's F_s ^[24]检验来进行中性检验, 其次进行核苷酸不配对分布检测。采用最小方差法来检验核苷酸不配对的观测值和群体扩张模型下的预期分布之

间是否一致, 采用广义非线性最小方差法来估算扩张参数 τ 。根据公式 $\tau = 2ut$ 计算实际的扩张时间, 其中 u 为所研究的整个序列长度的突变速率, t 是自群体扩张开始到现在的时间。参照其他硬骨鱼类的线粒体 *Cytb* 基因 2%/Ma(百万年)的分歧速率^[25, 26]来估算松江鲈群体扩张时间。

2 结果

2.1 序列变异及遗传多样性

所分析的 8 个群体、47 尾松江鲈个体的线粒体 *Cytb* 基因全序列的长度均为 1141 bp, 其中 C、T、A 和 G 含量分别为 30.0%、28.2%、23.0%和 16.8%, A+T 的含量(51.2%)略高于 C+T 的含量(48.8%), *Cytb* 基因组成具有较大的偏向性, G 的含量较低。在所有 47 个个体的 1141 bp 的序列中, 共检测到 38 个变异位点, 约占总序列长度的 3.33%, 简约信息位点 30 个, 单一变异位点 8 个。这些变异位点共定义 39 个核苷酸替代(37 个转换和 2 个颠换), 未发现插入、缺失现象(图 2)。47 个个体中共检测到 31 单倍型, 所有单倍型已经提交到 GenBank, 登录号为 JX079997-JX080027。在所有单倍型中, 2 个单倍型为共享单倍型, 其他 29 个单倍型均为群体特有单倍型; 共享单倍型中, Hap1 为东营、大连和杭州湾三个群体共享, Hap16 为文登和丹东两个群体共享。

单倍型多样性指数整体较高, 而核苷酸多样性指数相对较低(表 1)。其中, HZW、WD、QHD 和 DD 群体的单倍型多样性指数最高, 均为 1.00, RC 和 DY 群体最低, 均为 0.6; WD 群体的核苷酸多样性指最高, 为 0.0041, DY 群体最低, 为 0.0005。所有样本作为一个群体进行数据分析, 单倍型多样性指数 0.97, 核苷酸多样性指数为 0.0059。

2.2 群体遗传结构

从松江鲈 8 个地理群体的遗传距离(表 2)来看, 群体内的遗传距离为 0.0005—0.0041, 中国组群各群体间遗传距离为 0.0014—0.0058, 日本群体和中国各群体间的遗传距离 0.0095—0.0120(表 2)。此结果表明, 松江鲈日本群体和中国各群体间的遗传距离明显大于中国各群体间的遗传距离, 中国各群体间的遗传距离与群体内的遗传距离处于同一水平, 无明显遗传分化。两两群体之间的 F_{st} 值(表 2)显示, 日本群体和中国各群体之间的 F_{st} 值为 0.8008—0.8922, 统计检验均显著($P < 0.05$); 而中国各群体之

		1111111	
	11123	3344444577	7788888899 90000001
	4567835680	2400589705	6912357703 82234561
	2268734886	4825698459	8808183999 10685784
Hap1	GCTCAAGGGA	CAAAAGGGGA	TACTACACAG CCCACGCG
Hap2			.G..... .TTG...
Hap3	...G....	.GG..AAA..	C...GTG...
Hap4	...G....	.GG..AA...	C...TG...
Hap5	...G....	.GG..AA...	C...GTG...
Hap6	...G.A...	.GG..AA...	C...GTG...
Hap7			A..... T.....
Hap8	..C.....		 A...
Hap9	AT....C..	G	.G..... .TTG...
Hap10	AT....C..		 A
Hap11		T.....	 A.....
Hap12		T.....	
Hap13		...G.....	 A
Hap14		A..	
Hap15	..C.....		G.....
Hap16			..T.....
Hap17	..T.....		..T.....
Hap18	AT....C..		..T.....
Hap19		A.....	
Hap20		...GG.....	 A..
Hap21	...GG....	.GG..AA...	C...TG...
Hap22	...GG....	.GG..AAA..	C...GTG...
Hap23		A.....	 T.....
Hap24			...C.....
Hap25		...G.....	 T.
Hap26			...G.....
Hap27			 TG.....
Hap28	...T.....		 A
Hap29		G	
Hap30			...G.....
Hap31		...G..A...	C...T...

图 2 松江鲈线粒体 *Cytb* 基因序列变异位点

Fig. 2 Variable sites of mitochondrial *Cytb* gene in *T. fasciatus*

间的 F_{st} 值为 0.0736—0.3984, 统计检验均不显著($P > 0.05$); 中国组群和日本组群之间的 F_{st} 值为 0.7499, 统计检验显著($P < 0.05$)。AMOVA 分析结果显示松江鲈中国组群和日本组群之间已经产生一定程度的遗传分化, 而中国各群体内不存在显著的遗传结构。基于 Kimura 双参数模型计算得到的松江鲈中国组群和日本组群间净遗传距离为 0.082, 以线粒体 *Cytb* 基因序列 2%/百万年的核苷酸分化速率计算^[25, 26], 中国组群和日本组群的分化年代大约在 41 万年前。

以图们江杜父鱼(*Cottus hangiongensis*)和赖氏杜父鱼(*Cottus reinii*)(GenBank 登录号分别为 NC_

表 1 松江鲈各群体的样品信息和遗传多样性参数
Tab. 1 Sample information and genetic diversity parameters in different populations of *T. fasciatus*

群体 Population	样品数 Number of samples	单倍型数 Number of haplotypes	平均核苷酸差异数 Mean pairwise difference	单倍型多样性 Haplotype diversity	核苷酸多样性 Nucleotide diversity
杭州湾 HZB	5	5	2.01 ± 1.35	1.00 ± 0.126	0.0018 ± 0.0014
文登 WD	5	5	4.64 ± 2.74	1.00 ± 0.126	0.0041 ± 0.0028
荣成 RC	5	2	4.27 ± 2.54	0.60 ± 0.175	0.0037 ± 0.0026
东营 DY	5	2	0.60 ± 0.56	0.60 ± 0.175	0.0005 ± 0.0005
秦皇岛 QHD	5	5	4.24 ± 2.52	1.00 ± 0.126	0.0037 ± 0.0026
大连 DL	5	4	1.81 ± 1.24	0.90 ± 0.161	0.0016 ± 0.0013
丹东 DD	5	5	2.41 ± 1.56	1.00 ± 0.126	0.0021 ± 0.0016
有明海 Ariake Sea	12	6	1.42 ± 0.93	0.85 ± 0.074	0.0012 ± 0.0009
总共 Total	47	31	6.71 ± 3.22	0.97 ± 0.011	0.0059 ± 0.0031

表 2 松江鲈群体内遗传距离(对角线)及两两群体间遗传距离(上对角线)和遗传分化系数(F_{st})(下对角线)
Tab. 2 Pairwise genetic distances within (diagonal) population, and genetic distance (below diagonal), fixation index (F_{st}) (above diagonal) between populations of *T. fasciatus*

群体 Population	杭州湾 HZB	文登 WD	荣成 RC	东营 DY	秦皇岛 QHD	大连 DL	丹东 DD	有明海 Ariake Sea
杭州湾 HZB	0.0018	0.0044	0.0040	0.0016	0.0032	0.0019	0.0023	0.0100
文登 WD	0.3412	0.0041	0.0058	0.0036	0.0055	0.0042	0.0044	0.0120
荣成 RC	0.3253	0.3299	0.0037	0.0035	0.0045	0.0037	0.0042	0.0120
东营 DY	0.2783	0.3559	0.3984	0.0005	0.0026	0.0014	0.0018	0.0095
秦皇岛 QHD	0.1389	0.2921	0.1722	0.1992	0.0037	0.0028	0.0032	0.0098
大连 DL	0.1543	0.3344	0.2777	0.2511	0.0934	0.0016	0.0021	0.0098
丹东 DD	0.1371	0.2957	0.3116	0.2501	0.0736	0.1253	0.0021	0.0102
有明海 Ariake Sea	0.8631	0.8386	0.8291	0.8922	0.8008	0.8553	0.8658	0.0012

014851、NC_004404)为外群, 基于最适模型进行 1000 次自展检验, 利用 PAUP4.0 构建邻接系统树(图 3)。结果显示松江鲈群体明显分为中国和日本两个世系, 而中国各群体之间没有明显的地理遗传结构。基于简化的中介网络法构建的松江鲈单倍型网络关系图(图 4)亦明显分为中国和日本两个世系, 其中中国世系内单倍型 Hap1 位于网络图中心, 其他单倍型均经过一步或几步突变连接到 Hap1, 由此推测 Hap1 为中国群体的原始单倍型。

2.3 群体历史动态

松江鲈中国世系内不存在明显的遗传分化, 将其看作一个群体进行历史动态分析; 中性检验表明(表 2), Tajima’s D 和 Fu ’s F_s 值均为负值, 并且统计检验均达显著水平($P < 0.05$), 单倍型核苷酸不配对分布成单峰形, 与群体扩张下的预期相符合(图 5), 提示松江鲈经历了群体历史扩张事件。采用最小方

差法对核苷酸不配对的观测值和群体扩张模型下的预期值之间的一致性进行拟合优度检验, 结果显示 SSD 值和 Raggedness 指数均较小, 统计检验均不显著($P > 0.05$)(表 3), 表明所观测的核苷酸不配对分布没有显著偏离群体扩张模型。采用广义非线性最小方差法估算松江鲈中国世系扩张参数 τ 值为 2.793 (95% CI: 1.947—5.178), 据此推算松江鲈的群体扩张时间约为 12 万年前(95%CI: 7.9 万年—22.7 万年)。

3 讨论

松江鲈 8 个群体的线粒体 *Cytb* 基因全序列中, 共有 38 个变异位点、31 单倍型, 单倍型多样性为 0.97, 呈现出较高的遗传多样性, 但其核苷酸多样性仅为 0.0059, 处于一个较低水平, 与刘海林等^[16]对黄渤海松江鲈控制区序列研究的结果相一致, 这也符合 Grant 和 Bowen^[27]提出的海水鱼类不同单倍

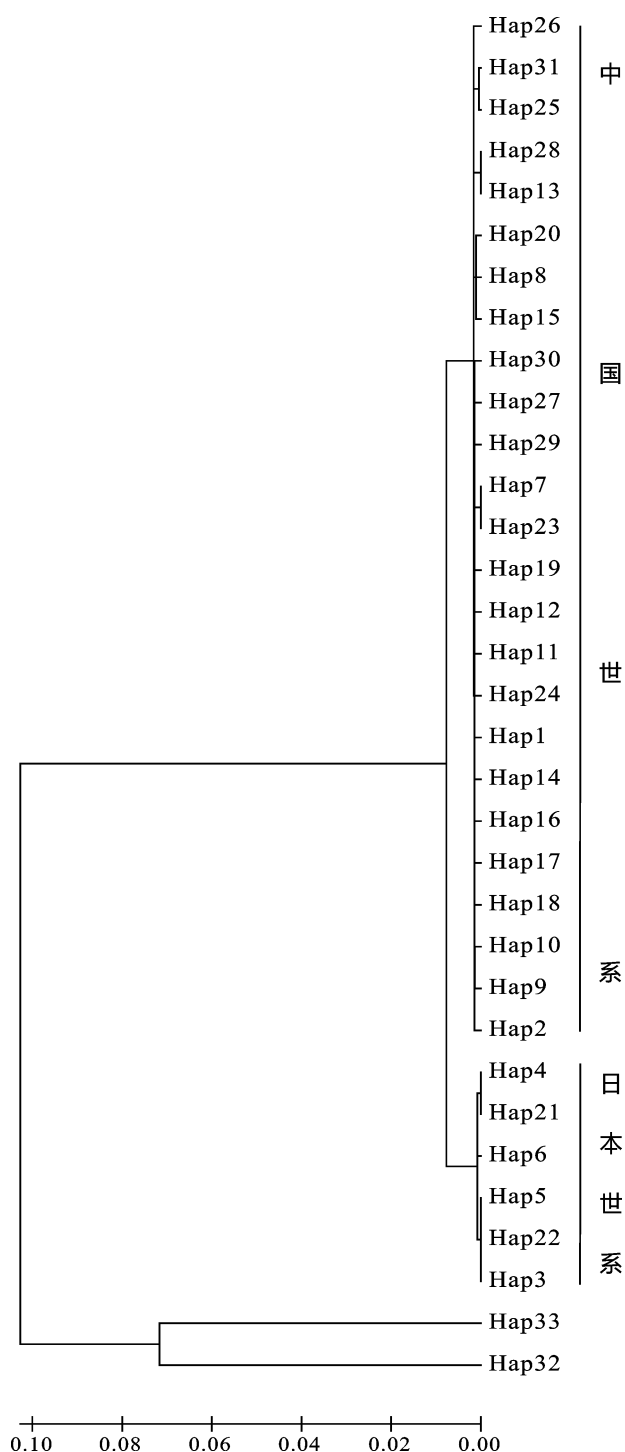


图 3 基于 *Cytb* 基因全序列构建的松江鲈邻接系统树(外群为图们江杜父鱼和赖氏杜父鱼)

Fig. 3 NJ phylogenetic trees based on *Cytb* gene complete sequences of *T. fasciatus* (*C. Hangionensis* and *C. Reinii* as outgroup)

型多样性和核苷酸多样性间的第二种类型, 即较高的单倍型多样性和较低的核苷酸多样性。西北太平洋区域有些鱼类如黄姑鱼^[28]、花鲈^[29]和银鲈^[30]也具

有这种类型的遗传多样性模式, 显示该类型鱼类群体可能经历过历史扩张事件, 即由一个较小的有效群体在短时间内快速成长为一个大的群体。在群体扩张的过程中, 随着群体数量的增加, 单倍型多样性会有所提高, 但没有足够的时间来积累核苷酸产生的变异, 因此会造成单倍型多样性较高而核苷酸多样性较低的遗传多样性模式^[26]。

生物地理群之间基因流的阻隔和环境因子之间的差异可导致不同群体之间遗传结构的显著差异, 当群体间存在较大的基因流时, 其遗传分化不明显。然而不同地区的生境差异是产生和保持地理群体间遗传结构差异的重要因素^[31]。在本研究中, AMOVA 分析结果、单倍型邻接树和单倍型网络关系图均表明松江鲈中国沿海各群体和日本有明海群体间的遗传差异显著, 可明显分为中国和日本两大世系, 其结果与白姑鱼^[32]研究结果相似。基于核苷酸 Kimura 双参数替代模型计算的松江鲈中国和日本两个世系的净遗传距离达 0.082, 表明中日两个世系分歧时间约为 41 万年以前, 其分化可能是受到更新世冰期的影响。很多研究者发现更新世冰期对于海洋鱼类的群体遗传结构产生了巨大的影响^[29, 33]。第四纪末期, 全球气候经历了一系列冰期-间冰期的变化, 在过去的约 80 万年里, 气候波动主要以一个约为 10 万年的周期进行^[34]。第五次冰期结束时间大约为 42 万年前^[35], 与松江鲈中日世系的分化时间相吻合。伴随着第五次冰盛期的到来, 海平面下降约 120—140 m, 松江鲈中国和日本群体可能会被隔离在相应边缘海的避难所里; 冰期过后, 随海平面上升, 被隔离的群体重新扩张, 但中日之间长距离的地理隔离和松江鲈幼体有限的扩散能力等原因导致其基因交流中断, 随着时间的推移, 中国松江鲈群体和日本群体逐渐分化成两个不同的世系。然而, 中国世系的松江鲈各群体之间没有明显的地理遗传结构, 即各群体不存在显著的遗传差异, 与之前关于松江鲈 ISSR、AFLP 和线粒体控制区的研究结果^[13-16]相一致。分析可能有以下原因: 松江鲈在中国沿海群体扩张的时间尚较晚, 群体缺乏足够的时间在迁移和漂变之间取得平衡, 因此其各群体之间不存在显著的遗传分化^[36]; 松江鲈繁殖和幼鱼成长阶段均在河口近海完成, 从 2 月到 6 月持续将近五

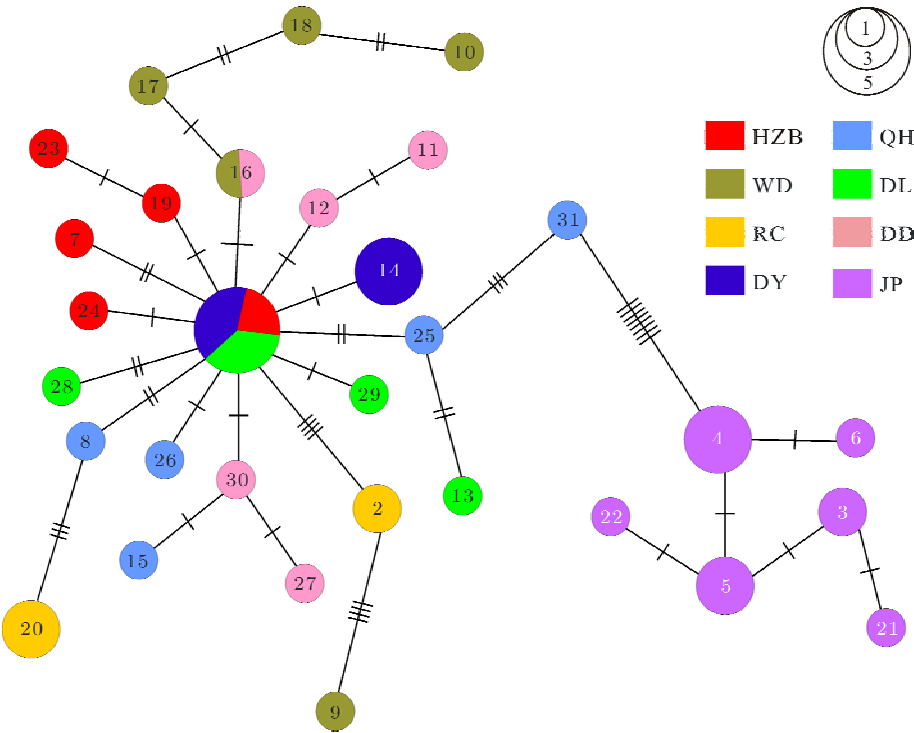


图 4 基于简约法构建的松江鲈单倍型网络关系图

Fig. 4 Median-networks showing genetic relationship among haplotypes of *T. fasciatus* based on parsimony method

个月^[1], 此阶段有可能随海洋沿岸流被动扩散, 使不同群体基因交流的机会增加, 遗传分化程度降低; 其次, 松江鲈大都生活在河流至河口近海区域, 其生活的地理构架和环境因子相似, 且松江鲈属广温广盐性种类, 不同地区的温度和盐度对其构成的选择压力不大, 因此其群体间的遗传差异较小; 此外, 松江鲈为一年生鱼种, 近年来的增养殖也可能造成群体间的基因交流。将中国世系当作一个大的群体进行群体历史动态分析, 中性检验的结果均为负值且显著, 核苷酸不配对分布呈单峰型, 表明此群体历史上曾经发生过群体扩张, 计算得到松江鲈中国世系的扩张时间大约为 12 万年前。可能是末次冰期结束以后, 海平面上升后, 松江鲈的栖息地发生了大面积扩张, 导致其群体发生了扩张。

遗传多样性不仅是生物多样性的基础和核心,

也是生物物种进化潜能的保证^[37], 遗传多样性的降低将导致物种对环境适应能力的下降, 复杂多变的生存环境将对其群体的生存产生重大的威胁。松江鲈的遗传多样性总体水平较高, 说明其资源量虽然锐减可能并未影响到遗传多样性, 若及时采取有效的保护策略, 其资源量恢复的潜在能力较大。研究结果显示松江鲈中国群体和日本群体已经产生了一定的遗传分化, 在不同研究结果难以获得参比的情况下, 中国沿海的松江鲈是否作为一个随机交配的群体进行管理需要谨慎对待。今后, 有必要采用其他分子标记 (如 SSR、AFLP、SNP 等) 对松江鲈群体结构及其遗传多样性

状况进行全面研究, 促进其资源的保护和可持续发展。

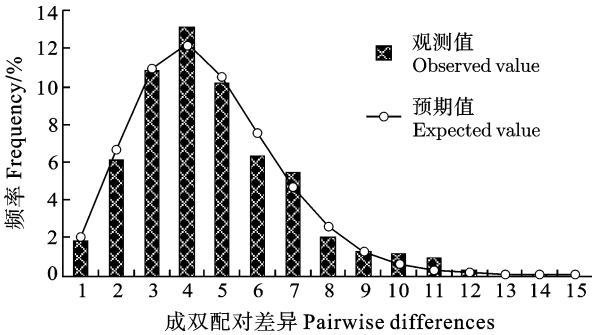


图 5 松江鲈中国世系的核苷酸不配对分布图(柱状图显示观测值, 曲线为群体扩张模型下的预期分布)

Fig. 5 Nucleotide mismatch distribution of *T. fasciatus* in Chinese lineage (Bars are the observed pairwise differences and solid line represents the expected mismatch distributions under the sudden expansion model)

表 3 松江鲈中国群体中性检验、核苷酸不配对分布及拟合优度检验

Tab. 3 Neutral test, mismatch distribution of Nucleotide and test of goodness of fit of *T. fasciatus* populations in China

中性检验 Neutral test				核苷酸不配对分布 Mismatch distribution of nucleotide			拟合优度检验 Test of goodness			
<i>D</i>	<i>P</i>	<i>F_s</i>	<i>P</i>	τ (95%CI)	θ_0	θ_1	<i>SSD</i>	<i>P</i>	Raggedness	<i>P</i>
-1.728	0.029	-20.764	0.000	2.793(1.947—5.178)	0.773	99999	0.001	0.708	0.023	0.641

致谢:

吴建新、国宝富、郭栋、王茂林、宋林及日本九州大学鬼谷德雄博士等帮助采集松江鲈样品, 在此表示感谢。

参考文献:

- [1] Wang J Q. Advance in studies on the ecology and reproductive biology of *Trachidermus fasciatus* Heckel [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, **23**(6): 729—734 [王金秋. 松江鲈的生态学和繁殖生物学研究进展. 水生生物学报, 1999, **23**(6): 729—734]
- [2] Wang Y H. Notes on the scientific name, type-locality and geographical distribution of roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus* Heckel 1840) [J]. *Marine Fisheries*, 2006, **28**(4): 209—303 [王幼槐. 关于松江鲈学名和模式产地以及地理分布之探讨. 海洋渔业, 2006, **28**(4): 209—303]
- [3] Wang J Q, Cheng G, Tang Z P. The distribution of roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus* Heckel) in Yalu River Basin, China [J]. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 2001, **4**(5): 471—475 [王金秋, 成功, 唐作鹏. 鸭绿江流域中国境内松江鲈的分布. 复旦学报(自然科学版), 2001, **4**(5): 471—475]
- [4] Yue P Q, Chen Y Y. China Red Data Book of Endangered Animals—Fish [M]. Beijing: Academic Press. 1998, 240—243 [乐佩琦, 陈宜瑜. 中国濒危动物红皮书—鱼类. 北京: 科学出版社. 1998, 240—243]
- [5] 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 [郭立, 李隽, 王忠锁, 等. 基于四个线粒体基因片段的银鱼科鱼类系统发育. 水生生物学报, 2011, **35**(3): 449—459]
- [6] Liu Z J, Cordes J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics [J]. *Aquaculture*, 2004, **238**(1—4): 1—37
- [7] Xiao W H, Zhang Y P. Genetics and evolution of mitochondrial DNA in fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(4): 384—391 [肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化. 水生生物学报, 2000, **24**(4): 384—391]
- [8] Zardoyar R, Meyer A. Phylogenetic performance mitochondrial protein coding genes in resolving relationship among vertebrates [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1996, **13**(7): 933—942
- [9] Lwin D W, Kocher T D, Wilson A C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1991, **32**(2): 128—144
- [10] Wang J Q, Pan L D, Liang T H, *et al.* Preliminary study on embryonic development of the roughskin sculpin, *Trachidermus fasciatus* (Scorpaeniformes: Cottidae) [J]. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 2004, **43**(2): 250—254 [王金秋, 潘连德, 梁天红, 等. 松江鲈鱼(*Trachidermus fasciatus*)胚胎发育的初步观察. 复旦学报(自然科学版), 2004, **43**(2): 250—254]
- [11] Takeshita N, Onikura N, Matsui S, *et al.* Embryonic, larval and juvenile development of the roughskin sculpin, *Trachidermus fasciatus* (Scorpaeniformes, Cottidae) [J]. *Ichthyological Research*, 1997, **44**(3): 257—265
- [12] Norio O, Naohiko T, Seiichi M, *et al.* Estimation of the frequency of maturity and sexual differences in the maturation period of the roughskin sculpin *Trachidermus fasciatus* [J]. *Fisheries Science*, 2007, **73**(3): 735—737
- [13] Wang J Q, Shi C, Cheng G. Isozyme Analysis for a wild population of roughskin sculpin, *Trachidermus fasciatus*, from the Yalu River Basin in China [J]. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 2002, **41**(6): 688—693 [王金秋, 石椿, 成功. 鸭绿江流域中国境内松江鲈鱼(*Trachidermus fasciatus*)天然群体的同工酶分析. 复旦学报(自然科学版), 2002, **41**(6): 688—693]
- [14] Xu J R, Han X L, Li N, *et al.* Analysis of genetic diversity in roughskin sculpin *Trachidermus fasciatus* by AFLP markers [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2008, **23**(6): 437—441 [徐建荣, 韩晓磊, 李宁, 等. 松江鲈群体遗传多样性的 AFLP 分析. 大连水产学院学报, 2008, **23**(6): 437—441]
- [15] Xu J R, Han X L, Yu J F, *et al.* Analysis of genetic diversity of *Trachidermus fasciatus* by ISSR [J]. *Freshwater Fisheries*, 2009, **139**(11): 21—24 [徐建荣, 韩晓磊, 郁建锋, 等. 松江鲈群体遗传多样性的 ISSR 分析. 淡水渔业, 2009, **139**(11): 21—24]
- [16] Liu H L, Zhang Q, Tang Y L, *et al.* Structure and genetic diversity of mtDNA D-Loop sequences among *Trachidermus fasciatus* stocks in Yellow Sea and Bohai Sea of China [J]. *Marine Science Bulletin*, 2010, **29**(3): 283—288 [刘海林, 章群, 唐优良, 等. 黄渤海松江鲈鱼线粒体控制区结构与序列多态性分析. 海洋通报, 2010, **29**(3): 283—288]
- [17] Xiao W H, Zhang Y P, Liu H Z. Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): taxonomy, biogeography and coevolution of a special group restricted in East Asia [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, **18**(2): 163—173
- [18] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evolutionary Bioinformatics*, 2005, **1**: 47—50
- [19] Posada D, Crandall K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, 1998, **14**(9): 817—818
- [20] Swofford D L. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods), Version 4 [Z]. Sunderland: Sinauer Associates, MA. 2002
- [21] Bandelt H J, Macaulay V A, Richards M, *et al.* Median networks: speedy construction and greedy reduction, one simulation, and two case studies from human mtDNA [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2000, **16**(1): 8—28

- [22] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**(8): 1596—1599
- [23] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, 1989, **123**(3): 585—595
- [24] Fu Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitch hiking and background selection [J]. *Genetics*, 1997, **147**(2): 915—925
- [25] Bermingham E S, McCafferty A, Martin P. Molecular Systematics of Fishes [M]. New York: Academic Press. 1997, 113—128
- [26] Bowen B W, Bass A L, Rocha L A, *et al.* Phylogeography of the trumpetfishes (*Aulostomus*): ring species complex on a global scale [J]. *Evolution*, 2001, **55**(5): 1029—1039
- [27] 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
- [28] Han Z Q, Gao T X, Yanagimoto T, *et al.* Genetic population structure of *Nibea albiflora* in the Yellow and East China seas [J]. *Fisheries Science*, 2008, **74**(3): 544—552
- [29] Liu J X, Gao T X, Yokogawa K, *et al.* Differential population structuring and demographic history of two closely related fish species, Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) and spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) in Northwestern Pacific [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, **39**(3): 799—811
- [30] Zhao F, Zhuang P, Zhang L Z, *et al.* Population genetic structure of *Pampus argenteus* in the South Yellow Sea and East China Sea based on the mitochondrial *Cytb* sequence [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(5): 746—752 [赵峰, 庄平, 章龙珍, 等. 基于线粒体 *Cytb* 基因的黄海南部和东海银鲳群体遗传结构分析. 水生生物学报, 2011, **35**(5): 746—752]
- [31] Levinton J S, Suchanek T H. Geographic variation, niche breadth and genetic differentiation at different geographic scales in the mussels *Mytilus californianus* and *M. edulis* [J]. *Marine Biology*, 1978, **49**(4): 363—375
- [32] Han Z Q, Gao T X, Yanagimoto T, *et al.* Deep phylogeographic break among *Pennahia argentata* (Sciaenidae, Perciformes) populations in the Northwestern Pacific [J]. *Fisheries Science*, 2008, **74**(4): 770—780
- [33] Liu J X, Gao T X, Zhuang Z M, *et al.* Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis australis*) [J]. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 2006, **40**(3): 712—723
- [34] Lambeck K, Esat T M, Potter E K. Links between climate and sea levels for the past three million years [J]. *Nature*, 2002, **419**: 199—206
- [35] Petit J R, Jouzel J, Raynaud D, *et al.* Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica [J]. *Nature*, 1999, **399**: 429—436
- [36] Slatkin M. Isolation by distance in equilibrium and non equilibrium populations [J]. *Evolution*, 1993, **47**(1): 264—279
- [37] Loeschcke V, Tomiuk J, Jian S K, *et al.* Conservation Genetics [M]. Basel: Birkhauser Verlag. 1994, 37—53

POPULATION GENETIC STRUCTURE OF ROUGHSKIN SCULPIN *TRACHIDERMUS FASCIATUS* BASED ON THE MITOCHONDRIAL *CYTb* SEQUENCE

GAO Tian-Xiang¹, BI Xiao-Xiao¹, ZHAO Lin-Lin¹ and LI Chuang-Ju²

(1. Institute of Evolution & Marine Biodiversity, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China)

Abstract: Roughskin sculpin, *Trachidermus fasciatus* is a catadromous fish, and it is distributed along the coast of Northwest Pacific. The fish population has been greatly decreased in recent years due to degradation of habitats, water pollution and dam construction. In order to protect the fish population, it is necessary to study genetic structure of the fish population, which is very important for fishery management and conservation. Forty seven individuals used in this study were collected from 8 sampling locations in the coast of China and Japan, i.e., Hangzhou Bay (HZB), Wendeng (WD), Rongcheng (RC), Dongying (DY), Qinhuangdao (QHD), Dalian (DL), Dandong (DD) and Ariake Sea. The mitochondrial cytochrome *b* (*Cytb*) gene sequence of *T. fasciatus* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) technology and sequenced on an automatic sequencer with both forward and reverse primers. The sequences were analyzed by using some software, which included Dnastar, Arlequin3.1, Mega4.0, Modeltest3.7 and Paup4.0. The results were as follows: the *Cytb* sequence of each specimen was 1141 bp and used for genetic diversity analysis. There was neither insertion nor deletion found among 38 mutations of nucleotide acids and 31 haplotypes were found among 47 individuals from 8 sampling sites. All 8 populations were characterized by high haplotype diversity (0.60—1.00) and low nucleotide diversity (0.0005—0.0041). The analysis result of molecular variance (AMOVA), median-networks and NJ phylogenetic trees showed that there was large genetic differentiation between those two regions, while there was no genetic variance among populations of the Chinese lineage. Net average genetic distance between two lineages was 0.82%. Applying divergence rate of *Cytb* gene sequence, the divergence of lineage China and Japan occurred about 410000 years ago. The mismatch distribution of pairwise nucleotide and the negatively selective neutrality test suggest that a recent population expansion had occurred in Chinese lineages, and the time was estimated to be about 120000 years before present (during the late Pleistocene). Two distinct lineages found in *T. fasciatus* were probably related to the Pleistocene coastal glaciations and the long geographical distance. Dispersal ability, coastal currents and the population expansion may be responsible for the homogeneity among the Chinese populations.

Key words: *Trachidermus fasciatus*; *Cytb* gene; Complete sequence; Genetic structure; Population expansion