



## 基于线粒体DNA控制区序列的短棘鲷群体遗传学

高天翔<sup>1</sup>, 高兵兵<sup>2</sup>, 李忠炉<sup>3</sup>, 单斌斌<sup>2</sup>, 宋娜<sup>2\*</sup>

(1. 浙江海洋大学水产学院, 浙江 舟山 316022;

2. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

3. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088)

**摘要:** 物种的遗传结构对推断群体历史动态如有效群体大小、地理分布变迁、基因流、遗传分化等具有重要意义。本实验采用线粒体DNA控制区高变区序列对采自我国海南和台湾的3个短棘鲷群体进行了遗传学比较研究。结果显示, 92尾个体共检测到32个单倍型, 其中共享单倍型7个; 单倍型多样性指数的范围为 $0.61 \pm 0.12 \sim 0.86 \pm 0.05$ ; 核苷酸多样性指数的范围为 $0.0033 \pm 0.0024 \sim 0.0053 \pm 0.0034$ ; 32个单倍型构建的邻接关系树和最小跨度树均可分为2个单倍型类群, 单倍型类群A共有22个单倍型, 全部由海南文昌和三亚新村群体构成, 单倍型类群B共有10个单倍型, 除Hap13外, 其余全部由台湾新竹群体构成; 台湾新竹群体与海南2个群体之间存在显著差异, 但海南文昌群体和三亚新村群体之间无显著差异; 中性检验与核苷酸不配对分布分析的结果均显示, 短棘鲷2个单倍型类群可能发生了群体扩张事件, 扩张时间分别为52 500~105 000和67 600~135 200年前。

**关键词:** 短棘鲷; 控制区; 遗传多样性; 群体遗传结构; 隔离

**中图分类号:** Q 347; S 931.5

**文献标志码:** A

鲷科(Leiognathidae)鱼类隶属于辐鳍鱼纲(Actinopterygii)、鲈形目(Perciformes)、鲈亚目(Percoidei), 是广泛分布于印度—西太平洋海域沿岸浅水区和河口区的一种体型侧扁的小型食用鱼类<sup>[1-3]</sup>。短棘鲷(*Leiognathus equulus*)属于鲷科、鲷属<sup>[4]</sup>, 是鲷科鱼类中体型最大的鱼类之一<sup>[5]</sup>, 全长可达到24 cm, 我国仅东海和南海有分布<sup>[6-9]</sup>。短棘鲷为食用经济鱼类, 肉质细嫩; 喜聚集结群, 以小型甲壳类和多毛类等底栖动物为食, 主要栖息在泥沙底质的近海和港湾, 也可进入河口区<sup>[9]</sup>。

物种的遗传结构反映了种群在漫长的进化过程中产生的地理、生态适应性分化, 是推断群体历史动态如有效群体大小、地理分布变迁、

基因流、遗传分化等的重要依据, 对于指导物种的保护及合理开发利用具有重要意义<sup>[10]</sup>。自二十世纪70年代中期开始, 随着分子生物学实验技术的成熟, 群体遗传学的研究得到了迅速的发展, 越来越多的分子标记被用来研究鱼类群体遗传学和系统发育关系<sup>[11-13]</sup>。作为非编码序列区, 线粒体DNA控制区受到的自然选择压力小, 比线粒体DNA其他编码序列区片段的突变和进化速率快, 是一种有效的种内遗传学研究的标记片段<sup>[13]</sup>。目前线粒体DNA控制区序列已经在海洋鱼类群体遗传学等方面的研究中得到广泛使用<sup>[14-15]</sup>。

目前, 国内外学者对短棘鲷的研究多集中于资源状况及数量分布<sup>[16-19]</sup>、分类学<sup>[4, 20]</sup>、繁殖生物学<sup>[21]</sup>和个体发生学及行为学等方面<sup>[5, 22]</sup>, 至

收稿日期: 2019-04-12 修回日期: 2019-06-10

资助项目: 国家自然科学基金(41776171)

通信作者: 宋娜, E-mail: songna624@163.com

今未发现其群体遗传学方面的相关研究报道。本实验基于线粒体DNA控制区高变区序列对采自我国海南和台湾的3个短棘鲷群体进行了遗传学比较研究,揭示短棘鲷群体的遗传多样性和遗传结构现状,旨在为短棘鲷资源的合理利用和管理保护提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

实验所用短棘鲷样品于2015年4月—2016年12月分别采自我国台湾新竹、海南文昌和海南三亚新村(图1,表1)。所有样品皆为成鱼,取其背部肌肉用95%酒精固定,以便DNA提取。

表1 短棘鲷各群体的采样信息和遗传多样性参数

Tab. 1 Sample information and genetic diversity parameters in different populations of *L. equulus*

群体 population	缩写 ID	采样日期 date of collection	样品数/个 number of samples	单倍型数/个 number of haplotypes	平均核苷酸差异数/个 mean pairwise difference	单倍型多样性 haplotype diversity	核苷酸多样性 nucleotide diversity
新竹 Xinzhu	XZ	2015-12-12	22	9	1.29±0.84	0.61±0.12	0.003 3±0.002 4
文昌 Wenchang	WC	2015-04-26	35	14	1.54±0.94	0.80±0.06	0.003 9±0.002 7
新村 Xincun	XC	2016-12-24	35	16	2.09±1.20	0.86±0.05	0.005 3±0.003 4

### 1.2 DNA提取与序列测定

采用标准的酚/氯仿抽提法<sup>[23]</sup>从约100 mg样品肌肉组织中提取每个样品的基因组DNA,加入100 μL TE溶液溶解风干后的DNA,4 °C保存备用。采用正向引物为5'-CCCACCACTA ACTC CCAAAGC-3'和反向引物为5'-CTGGAAAGAACG CCCGGCATG-3'对控制区序列进行扩增<sup>[24]</sup>。

PCR反应体积为25 μL,其中包括50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris·HCl, pH 8.3, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L, 各种dNTP 200 μmol/L, Ex Taq酶1.25 U, 每个引物各0.2 mmol/L, 模板DNA 1 μL, 加灭菌蒸馏水至25 μL。在郎基扩增仪上进行PCR反应: 94 °C变性5 min; 94 °C 45 s, 50 °C 45 s, 72 °C 45 s, 35个循环; 72 °C延伸10 min。

为防止模板污染,设置对照实验。扩增产物送至擎科生物科技有限公司青岛分公司进行双向测序(3700型全自动序列分析仪,ABI,美国)。

### 1.3 数据分析

应用Dnastar软件包(DNASTAR, Inc., Madison, USA)对测序得到的序列片段进行编辑和排序校对。使用软件DnaSP 5.0<sup>[25]</sup>和Arlequin 3.5<sup>[26]</sup>计算短

<http://www.scxuebao.cn>

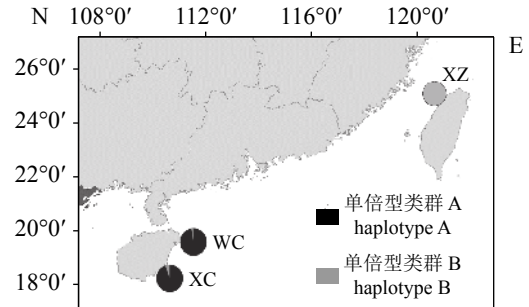


图1 短棘鲷的采样地点和单倍型类群分布频率

XZ. 台湾新竹, WC. 海南文昌, XC. 海南三亚新村

Fig. 1 Sample sites and haplotype clade frequencies for three populations of *L. equulus*

XZ. Xinzhu, WC. Wenchang, XC. Xincun

棘鲷群体遗传学参数。基于Modeltest 3.7软件<sup>[27]</sup>模型筛选得到的核苷酸最佳替换模型,使用MEGA 7.0软件<sup>[28]</sup>构建单倍型邻接关系树(图2)<sup>[29]</sup>,其可靠性使用1 000次重复抽样进行评估<sup>[30]</sup>。利用Arlequin 3.5<sup>[26]</sup>软件计算出的单倍型关系和核苷酸差异数,手工构建单倍型网络图(图3)。

采用Arlequin 3.5<sup>[26]</sup>软件计算短棘鲷两两群体间的遗传分化指数 $F_{st}$ 值,并用10 000次重复抽样检测其显著性。使用分子方差分析AMOVA进一步检测短棘鲷的群体遗传结构<sup>[31]</sup>。

在软件Arlequin 3.5中,使用中性检验和核苷酸不配对分布检验来推测短棘鲷的群体历史动态,中性检验具体为Tajima's  $D$ 检验<sup>[32]</sup>和Fu's  $F_s$ 检验<sup>[33]</sup>;用广义非线性最小方差法对群体扩张指数 $\theta_0$ 、 $\theta_1$ 和 $\tau$ 模拟估计,参数 $\tau$ 通过 $\tau=2\mu t$ 得到,估算短棘鲷的扩张时间,其中 $\mu$ 是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。

## 2 结果

实验扩增的3个群体、92尾短棘鲷个体的控制区高变区的长度均为393 bp。92尾个体中共有32个

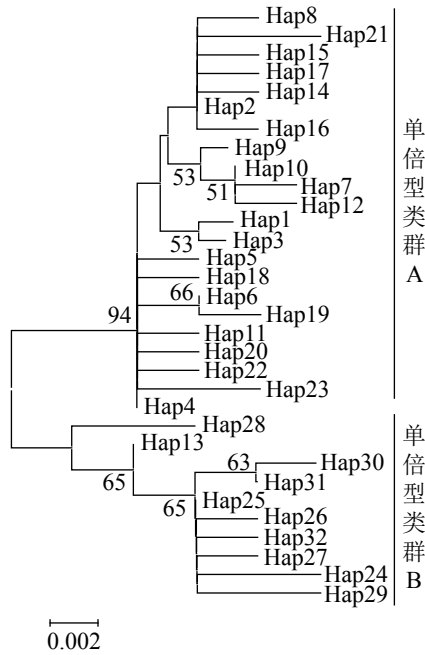


图 2 短棘鲷控制区单倍型邻接关系树  
 Fig. 2 Neighbor-joining tree of control region haplotypes for *L. equulus*

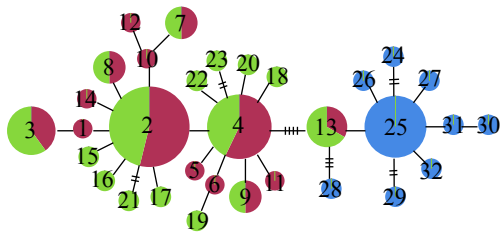


图 3 短棘鲷控制区单倍型网络图  
 Fig. 3 Median-networks showing genetic relationship among control region haplotypes for *L. equulus*

单倍型, 其中共享单倍型7个(表2), 单倍型序列已上传至GenBank数据库, 序列号为MN017135~MN017166。主体单倍型有Hap2、Hap4和Hap25, 其中Hap2和Hap4为文昌和三亚新村共有, Hap25为台湾新竹独有。单倍型多样性指数的范围为0.61±0.12~0.86±0.05; 核苷酸多样性指数的范围为0.003 3±0.002 4~0.005 3±0.003 4(表1)。台湾新竹的单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数均小于海南文昌和三亚新村。

短棘鲷32个单倍型构建的邻接关系树和最小跨度树均检测到2个单倍型类群: 单倍型类群A和B(图3), 2者通过4步突变连接。单倍型类群A共有22个单倍型, 全部由海南文昌和三亚新村群体构成; 单倍型类群B共有10个单倍型, 除Hap13外, 其余全部由台湾新竹群体构成。单倍

型类群A中的样品个体都分布在海南岛东部沿海, 单倍型类群B的个体大多分布在台湾岛西部沿海(图2)。

群体分化指数 $F_{st}$ 显示, 台湾新竹群体与海南文昌和三亚新村群体之间存在显著差异( $P < 0.05$ ), 但海南文昌群体和三亚新村群体之间无显著差异( $P > 0.05$ )(表3)。AMOVA分析结果显示, 作为一个组群进行分析时, 群体内的遗传变异占37.56%, 群体间变异占62.44%, 并且统计检验极显著( $P = 0.000 0$ )(表4)。依据地理位置分布进行种群细分, 短棘鲷群体可以分为两个组群: 台湾组群(XZ)和海南组群(WC和XC)。

表 2 短棘鲷三个群体的单倍型分布

Tab. 2 Distributions of haplotypes among three populations

单倍型 haplotype	新竹 XZ	文昌 WC	新村 XC	单倍型 haplotype	新竹 XZ	文昌 WC	新村 XC
Hap1		1		Hap17			1
Hap2		14	12	Hap18			1
Hap3		2	3	Hap19			1
Hap4		8	6	Hap20			1
Hap5		1		Hap21			1
Hap6		1		Hap22			1
Hap7		1	1	Hap23			1
Hap8		1	1	Hap24	1		
Hap9		1	1	Hap25	14		
Hap10		1		Hap26	1		
Hap11		1		Hap27	1		
Hap12		1		Hap28	1		
Hap13		1	2	Hap29	1		
Hap14		1		Hap30	1		
Hap15			1	Hap31	1		
Hap16			1	Hap32	1		

表 3 短棘鲷群体间的遗传分化指数(下对角线)和确切P值(上对角线)

Tab. 3 Pairwise  $F_{st}$  (below diagonal) and exact  $P$  values (above diagonal) among *L. equulus* populations

群体 populations	XZ	WC	XC
XZ		0.000 0	0.000 0
WC	0.783 6*		0.985 0
XC	0.733 7*	-0.016 4	

AMOVA分析显示, 组间遗传变异为75.37%( $P=0.3099$ ), 群体内变异为25.01%( $P=0.0000$ )。

单倍型类群A的单倍型多样度和核苷酸多样度分别为 $0.81\pm 0.04$ 和 $0.0037\pm 0.0025$ , 单倍型类群B的单倍型多样度和核苷酸多样度分别为 $0.69\pm 0.10$ 和 $0.0033\pm 0.0024$ (表5), 可以看出前者的遗传多样性大于后者。中性检验结果显示, 单倍型类群A的Tajima's  $D$ 值为 $-2.057$ ( $P=0.004$ ), Fu's  $F_s$ 值为 $-20.868$ ( $P=0.000$ ); 单倍型类群B的Tajima's  $D$ 值为 $-2.126$ ( $P=0.004$ ), Fu's  $F_s$ 值为

$-5.956$ ( $P=0.000$ )(表5)。结果表明, 短棘鲷2个单倍型类群均显著偏离中性, 暗示可能发生了群体扩张事件。核苷酸不配对分布结果显示, 短棘鲷两个单倍型类群均呈单峰分布, 也揭示其可能发生群体扩张事件。短棘鲷单倍型类群A和B的扩张参数 $\tau$ 值分别为2.064和2.656, 按照5%/百万年~10%/百万年的线粒体控制区突变速率估算, 单倍型类群A的扩张时间为52500~105000年前, 单倍型类群B的扩张时间为67600~135200年前。

表4 短棘鲷控制区序列的分子方差分析

Tab. 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) for the control region of *L. equulus*

变异来源 source of variation	df	方差总数 sum of squares	方差分量 variance components	变异百分比/% percentage of variation	$P$
<b>一个基因池 one gene pool</b>					
群体间 among populations	2	86.204	1.406 00 Va	62.44	0.000 0
群体内 within populations	89	75.262	0.845 64 Vb	37.56	0.000 0
总计 total	91	161.466	2.251 63	100	
<b>两个基因池 (XZ) (WC, XC) two gene pools</b>					
组群间 among groups	1	85.810	2.547 57 Va	75.37	0.309 9
组群内群体间 among populations within groups	1	0.394	-0.012 90 Vb	-0.38	0.939 4
群体内 within populations	89	75.262	0.845 64 Vc	25.01	0.000 0
总计 total	91	161.466	3.380 30	100	

表5 短棘鲷两个单倍型类群的遗传参数及中性检验结果和 $\tau$ 值

Tab. 5 Genetic parameters, results of neutral test and  $\tau$  values for two haplotype clades of *L. equulus*

类群 types	样品数/个 number of samples	单倍型/个 number of haplotypes	平均核苷酸 差异数/个 mean pairwise difference	单倍型多样性 haplotype diversity	核苷酸多样性 nucleotide diversity	中性检验 neutral test				$\tau$
						Tajima's $D$	$P$	Fu's $F_s$	$P$	
单倍型类群A haplotype A	67	22	1.45 $\pm$ 0.89	0.81 $\pm$ 0.04	0.0037 $\pm$ 0.0025	-2.057	0.004	-20.868	0.000	2.064
单倍型类群B haplotype B	25	10	1.31 $\pm$ 0.85	0.69 $\pm$ 0.10	0.0033 $\pm$ 0.0024	-2.126	0.004	-5.956	0.000	2.656

### 3 讨论

在本研究中, 3个短棘鲷群体的单倍型多样性范围为0.61~0.86, 核苷酸多样性范围为0.0033到0.0053, 整体呈现出高单倍型多样度和低核苷酸多样度的现状。依据Grant等<sup>[34]</sup>提出的4个群体扩张事件类型, 本研究结果符合第二个群体扩张事件类型, 即经历了瓶颈效应之后又产生了快速的群体扩张和核苷酸突变的积累。在晚更新世期间, 冰期造成海平面降低, 短棘鲷栖息地范围可能急剧缩小; 冰期结束, 海平面上

升, 群体可能会重新扩张<sup>[35-38]</sup>, 群体数量快速增长, 但由于时间较短没有积攒出足够多的核苷酸突变, 从而短棘鲷呈现出高单倍型多样度和低核苷酸多样度的情况。

依据最小跨度树中的主体单倍型及其地理分布, 本研究把所有单倍型分为2个单倍型类群: 单倍型类群A全部分布在海南岛东部沿海, 单倍型类群B大部分分布在台湾岛西部沿海。短棘鲷的谱系结构表明, 单倍型类群A和单倍型类群B可能是由2个独立线粒体系群发生群体扩张

事件而产生的。在更新世冰期事件中, 海平面的下降导致台湾岛与大陆之间形成了陆桥<sup>[39-40]</sup>, 陆桥的隔离使短棘鲷群体可能被迫分布在不同的边缘海避难所中产生遗传差异。单倍型类群A的个体来自于海南岛东部沿海, 说明该类群冰期的避难所可能位于南海; 单倍型类群B的个体大部分是台湾新竹群体, 所以避难所可能位于东海海盆。冰期过后, 随着全球气候变暖, 海平面逐渐上升, 2个隔离的类群重新混合。中性检验和核苷酸不配对的结果均暗示短棘鲷两个单倍型类群可能发生了群体扩张事件。这可能与更新世的剧烈气候变化有关。

新竹与海南2个群体间的 $F_{st}$ 值远远大于海南2个群体间的 $F_{st}$ 值, 且统计检验显著( $P=0.0000$ ), 表明新竹与海南2个群体间的遗传分化显著。确切 $P$ 检验显示, 新竹与海南2个群体间为非随机交配。AMOVA分析结果也显示, 台湾组群和海南组群间存在显著的遗传结构。短棘鲷为小型底层近海鱼类, 游泳能力较弱, 可能不会主动进行远距离的洄游, 并且由于2个群体距离较远, 可能无法进行充分有效的基因交流, 所以台湾组群和海南组群之间存在显著的遗传结构。虽然控制区的分析结果不能得出2个群体已达到亚种分化的结论, 但强烈的遗传分化也提示台湾组群和海南组群应为不同的遗传管理单元。

综上所述, 短棘鲷群体现有系统地理格局形成的主要原因可能是历史因素与现有因素的综合作用, 更新世冰期陆桥的隔离作用使不同避难所的群体产生了遗传分化, 而后海平面上升又重新发生了殖化(recolonization)现象, 隔离的群体发生了二次连接, 而短棘鲷较弱的扩散能力及较远的地理距离阻碍了基因交流, 形成了短棘鲷群体现有的分布格局。

#### 参考文献:

- [1] McFall-Ngai M J, Dunlap P V. External and internal sexual dimorphism in leiognathid fishes: morphological evidence for sex-specific bioluminescent signaling[J]. *Journal of Morphology*, 1984, 182(1): 71-83.
- [2] Woodland D J, Premcharoen S, Cabanban A S. Leiognathidae Slipmouths (ponyfishes)[M]//Carpenter K E, Niem V H. Species identification guide for fishery purposes: the living marine resources of the western central pacific. Rome: FAO, 2001: 2792-2823.
- [3] Abraham K J, Joshi K K, Murty V S R. Taxonomy of the fishes of the family Leiognathidae (Pisces, Teleostei) from the west coast of India[J]. *Zootaxa*, 2011, 2886(1): 1-18.
- [4] Chakrabarty P, Sparks J S. Diagnoses for *Leiognathus* Lacepède 1802, *Equula* Cuvier 1815, *Equulites* Fowler 1904, *Eubleekeria* Fowler 1904, and a new ponyfish genus (Teleostei: Leiognathidae)[J]. *American Museum Novitates*, 2008, 3623: 1-11.
- [5] Soars N A, Leis J M. Larval development of the common ponyfish, *Leiognathus equulus* (Teleostei: Leiognathidae)[J]. *Ichthyological Research*, 2010, 57(3): 263-271.
- [6] 郑文莲. 鲷科[M]//朱元鼎, 张春霖, 成庆泰. 南海鱼类志. 北京: 科学出版社, 1962: 438-454.
- Zheng W L. Family Leiognathidae[M]//Zhu Y D, Zhang C L, Cheng Q T. Fishes of South China Sea. Beijing: Science Press, 1962: 438-454(in Chinese).
- [7] 沈世杰. 鲷科[M]//沈世杰. 台湾鱼类志. 中国台北: 台湾大学出版社, 1993: 342-346.
- Shen S C. Family leiognathidae[M]//Shen S C. Fishes of Taiwan. Taipei, China: Taiwan University Press, 1993: 342-346(in Chinese).
- [8] 陈大刚, 张美昭. 鲷科[M]//陈大刚, 张美昭. 中国海洋鱼类. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2016: 1114-1123.
- Chen D G, Zhang M Z. Family leiognathidae[M]//Chen D G, Zhang M Z. Marine fishes of China. Qingdao: China Ocean University Press, 2016: 1114-1123(in Chinese).
- [9] 刘静, 吴仁协, 康斌, 等. 鲷科. 北部湾鱼类图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 2016: 158-166.
- Liu J, Wu R X, Kang B, et al. Family Leiognathidae. Fishes of Beibu Gulf[M]. Beijing: Science Press, 2016: 158-166(in Chinese).
- [10] Crandall K A, Posada D, Vasco D. Effective population sizes: missing measures and missing concepts[J]. *Animal Conservation*, 1999, 2(4): 317-319.
- [11] 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[J]. 水生生物学报, 2011, 35(3): 449-459.
- 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(in Chinese).

- [12] Liu Z J, Cordes J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics[J]. *Aquaculture*, 2004, 238(1-4): 1-37.
- [13] 肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体DNA的遗传与进化[J]. *水生生物学报*, 2000, 24(4): 384-391.  
Xiao W H, Zhang Y P. Genetics and evolution of mitochondrial DNA in fish[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(4): 384-391(in Chinese).
- [14] 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.
- [15] Shamblin B M, Bagley D A, Ehrhart L M, *et al.* Genetic structure of Florida green turtle rookeries as indicated by mitochondrial DNA control region sequences[J]. *Conservation Genetics*, 2015, 16(3): 673-685.
- [16] Staunton-Smith J, Blaber S J M, Greenwood J G. Interspecific differences in the distribution of adult and juvenile ponyfish (Leiognathidae) in the Gulf of Carpentaria, Australia[J]. *Marine and Freshwater Research*, 1999, 50(7): 643-653.
- [17] 李渊, 张静, 张然, 等. 南沙群岛西南部和北部湾口海域鱼类物种多样性[J]. *生物多样性*, 2016, 24(2): 166-174.  
Li Y, Zhang J, Zhang R, *et al.* Fish diversity in southwestern seas of Nansha Islands and the mouth of Beibu Bay[J]. *Biodiversity Science*, 2016, 24(2): 166-174(in Chinese).
- [18] 晏磊, 谭永光, 杨吝, 等. 珠江口水域秋季刺网的渔获组成及多样性分析[J]. *南方水产科学*, 2016, 12(1): 111-119.  
Yan L, Tan Y G, Yang L, *et al.* Catch composition and diversity of gillnet fishery in the Pearl River Estuary coastal waters of the South China Sea in autumn[J]. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(1): 111-119(in Chinese).
- [19] 袁华荣, 陈丕茂, 秦传新, 等. 南海柘林湾鱼类群落结构季节变动的研究[J]. *南方水产科学*, 2017, 13(2): 26-35.  
Yuan H R, Chen P M, Qin C X, *et al.* Seasonal variation of fish community structure in Zhelin Bay, the South China Sea[J]. *South China Fisheries Science*, 2017, 13(2): 26-35(in Chinese).
- [20] Chakrabarty P, Sparks J S, Ho H C. Taxonomic review of the ponyfishes (Perciformes: Leiognathidae) of Taiwan[J]. *Marine Biodiversity*, 2010, 40(2): 107-121.
- [21] Lee C F, Liu K M, Su W C, *et al.* Reproductive biology of the common ponyfish *Leiognathus equulus* in the south-western waters off Taiwan[J]. *Fisheries Science*, 2005, 71(3): 551-562.
- [22] Leis J M, Piola R F, Hay A C, *et al.* Ontogeny of behaviour relevant to dispersal and connectivity in the larvae of two non-reef demersal, tropical fish species[J]. *Marine and Freshwater Research*, 2009, 60(3): 211-223.
- [23] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*[M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [24] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, *et al.* Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(16): 6196-6200.
- [25] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [26] 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.
- [27] Posada D, Crandall K A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution[J]. *Bioinformatics*, 1998, 14(9): 817-818.
- [28] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [29] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [30] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. *Evolution*, 1985, 39(4): 783-791.
- [31] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data[J]. *Genetics*, 1992, 131(2): 479-491.

- [32] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. *Genetics*, 1989, 123(3): 585-595.
- [33] Fu Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection[J]. *Genetics*, 1997, 147(2): 915-925.
- [34] Grant W A 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.
- [35] 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.
- [36] Han Z Q, Gao T X, Yanagimoto T, *et al.* Genetic population structure of *Nibea albiflora* in Yellow Sea and East China Sea[J]. *Fisheries Science*, 2008, 74(3): 544-552.
- [37] Song N, Ma G Q, Zhang X M, *et al.* Genetic structure and historical demography of *Collichthys lucidus* inferred from mtDNA sequence analysis[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2014, 97(1): 69-77.
- [38] 赵峰, 庄平, 章龙珍, 等. 基于线粒体Cyt *b*基因的黄海南部和东海银鲷群体遗传结构分析[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(5): 745-752.
- 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 Cyt *b* sequence[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(5): 745-752(in Chinese).
- [39] 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.
- [40] Voris H K. Maps of Pleistocene sea levels in southeast Asia: Shorelines, river systems and time durations[J]. *Journal of Biogeography*, 2000, 27(5): 1153-1167.

## Population genetics study of *Leiognathus equulus* based on the control region fragment of mitochondrial DNA

GAO Tianxiang<sup>1</sup>, GAO Bingbing<sup>2</sup>, LI Zhonglu<sup>3</sup>, SHAN Binbin<sup>2</sup>, SONG Na<sup>2\*</sup>

(1. Fishery College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

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

3. Fishery College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

**Abstract:** The genetic structure of species plays an important role in inferring population dynamics such as effective population size, geographical distribution, gene flow and population genetic differentiation. In order to reveal the genetic diversity level and genetic structure of *Leiognathus equulus* populations, a total of 92 individuals from 3 populations were collected and analyzed by control region fragments. The length of the control region fragment was 393 bp. A total of 32 haplotypes were detected for 92 individuals and 7 haplotypes were shared. The haplotype and nucleotide diversity of Xinzhu population was lower than that of two populations from Hainan. The whole haplotype and nucleotide diversity was  $0.61 \pm 0.12$  to  $0.86 \pm 0.05$  and  $0.0033 \pm 0.0024$  to  $0.0053 \pm 0.0034$ , respectively. Two clades (Clade A and Clade B) were obtained in the neighbor-joining tree and median-networks. Clade A consisted of 22 haplotypes, which all were from Hainan populations; Clade B consisted of 10 haplotypes, which all are from Taiwan except Hap13. The haplotype and nucleotide diversity of Clade A was  $0.81 \pm 0.04$  and  $0.0037 \pm 0.0025$ , and the haplotype and nucleotide diversity of Clade B was  $0.69 \pm 0.10$  and  $0.0033 \pm 0.0024$ . Significant genetic differentiation was detected between Xinzhu population and the other two populations. The results of AMOVA showed that most genetic variation occurred among groups, which account for 75.37%. Tajima's  $D$  and Fu's  $F_s$  statistics for two clades were significantly negative for these two clades, which rejected the hypothesis of selective neutrality. The mismatch distribution of *L. equulus* appeared to be unimodal for two clades, and closely matched the expected distributions under the sudden-expansion model. The expanding time may be nearly 52 500-105 000 and 67 600-135 200 years ago in the late Pleistocene for two clades. The present phylogeographic pattern of *L. equulus* populations may be the combination of historical factors and current factors. The isolation of the Pleistocene glacial land bridge resulted in genetic differentiation of the populations and the isolated population had a secondary connection. Geographical distance hinders gene exchange and promotes the formation of the existing distribution pattern of *L. equulus* populations.

**Key words:** *Leiognathus equulus*; control region; genetic diversity; population genetic structure; isolation

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

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (41776171)