

## 基于线粒体 *Cyt b* 基因的黄鳍马面鲀种群分析

李玉芳<sup>1,2</sup>, 李永振<sup>3\*</sup>, 陈国宝<sup>1</sup>, 孙典荣<sup>1</sup>, 于杰<sup>1</sup>, 崔科<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 农业部南海区渔政局, 广东 广州 510080)

**摘要:** 采用线粒体细胞色素 b (cytochrome b, *Cyt b*) 基因片段为遗传标记, 分析了南海北部陆架和南沙西南部陆架海域 5 个黄鳍马面鲀群体的遗传结构, 以判定南海北部不同海域之间及南海北部与南沙西南部陆架海域黄鳍马面鲀的种群归属。结果表明, 在 156 个个体的 779 bp *Cyt b* 同源序列中共检测到 56 个变异位点和 58 种单倍型, 5 个群体间遗传距离为 0.002 95 ~ 0.004 15, 遗传分化性呈现出高单倍型多样性 (0.820 1 ~ 0.980 4) 和低核苷酸多样性 (0.002 62 ~ 0.004 69) 的特点; 分子方差分析和遗传分化指数显示, 黄鳍马面鲀的遗传变异来自群体内个体间, 群体间无显著遗传分化; 单倍型网络结构图和群体系统发育树结构均未出现明显的以地方群体为单位的家系式分支或者聚簇。比较 5 个不同地理群体间的遗传发育关系并结合种属界定标准判定, 南海北部和南沙西南部陆架 5 个黄鳍马面鲀群体属于同一个种群。

**关键词:** 黄鳍马面鲀; 种群分析; 线粒体细胞色素 b 基因; 遗传分化; 南海

**中图分类号:** Q 347; S 931.5

**文献标志码:** A

黄鳍马面鲀 (*Thamnaconus hypargyreus* Cope, 1871) 属鲀形目 (Tetraodontiformes)、单角鲀科 (Monacanthidae)、马面鲀属, 为暖水性中下层鱼类, 主要分布于印度—西太平洋边缘的朝鲜、日本和中国东海、南海以及澳大利亚西北部海域<sup>[1]</sup>。南海黄鳍马面鲀主要分布于北部陆架水深 50 ~ 90 m 和西南部陆架海域, 作为底拖网的主要捕捞对象, 曾经是南海最大宗的高产鱼种, 但渔获量年际波动幅度很大, 资源不稳定<sup>[2]</sup>。在 20 世纪 60 年代, 南海黄鳍马面鲀产量最高达 4 万 t; 70 年代初期逐渐上升, 到 1976 年达到历史最高产量 20 万 t, 之后逐年下降, 90 年代中期曾回升到 15 万 t 左右; 目前基本维持在 6 万 t 左右的水平<sup>[3]</sup>。近年来, 南海北部的黄鳍马面鲀产量波动较大, 但总体呈降低趋势, 有观点认为主要原因是南沙西南部陆架海域的黄鳍马面鲀种群向北洄游的数量减少——这种看法明显地是把南海北部和南沙西

南部陆架海域的黄鳍马面鲀当作同一种群<sup>[4]</sup>。

鱼类种群是渔业资源研究和管理的基本单位, 鱼类种群分析是鱼类资源评估及其数量变动规律研究的基础和首先要解决的基本问题<sup>[5]</sup>。近年来, 众多专家主要针对中国海域黄鳍马面鲀的资源评估、数量分布、生物特征和种群组成等<sup>[6-7]</sup>进行了一些报道。国内关于黄鳍马面鲀的种群研究, 目前仅见有南海和东海的黄鳍马面鲀分属两个不同种群的报道<sup>[6,8]</sup>, 但南海北部不同海域之间以及南海北部同南沙西南部两个陆架海域的黄鳍马面鲀是否为同一种群还未见有文献报道。

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<sup>[9-10]</sup>。线粒体细胞色素 b 基因进化速度适中,

收稿日期: 2013-08-19 修回日期: 2013-11-07

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2013ZD03); 国家农业财政项目 (2009-2013); 广东省科技计划项目 (2010B030800008)

通信作者: 李永振, E-mail: y. z. li@ qq. com

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得较为清楚的蛋白编码基因。因此,Cyt b 被认为是研究种质资源状况和群体遗传结构的理想工具,近年来已成为研究鱼类种群遗传分化、种群分类及进化等最常用的分子标记之一<sup>[11-12]</sup>。

本实验以南海北部陆架和南沙西南部陆架海域 5 个不同地理来源的黄鳍马面鲷群体为研究对象,利用 Cyt b 基因序列开展其种群遗传结构分析,判别其种群归属,以期对南海黄鳍马面鲷资源开发和管理提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

5 个黄鳍马面鲷群体分别于 2012 年 11 月至 2013 年 4 月采自南海北部和南沙西南部陆架海域,共 156 个样本,采集地点见图 1,详细采集情况见表 1。为叙述方便,南沙西南陆架海域以 NS 代表;南海北部陆架包括 4 个地理群体,其中 BH 代表北部湾群体,YX 代表粤西茂名近海群体,ZJ 代表珠江口近海群体,YD 代表粤东汕头近海群体。采集过程中,根据形态学特征进行鉴定后,每

个个体分别剪取尾部肌肉或尾鳍末端作为分子分析样本浸入 95% 的酒精中固定和保存,运回实验室后于 -20 ℃ 冰箱中保存备用。

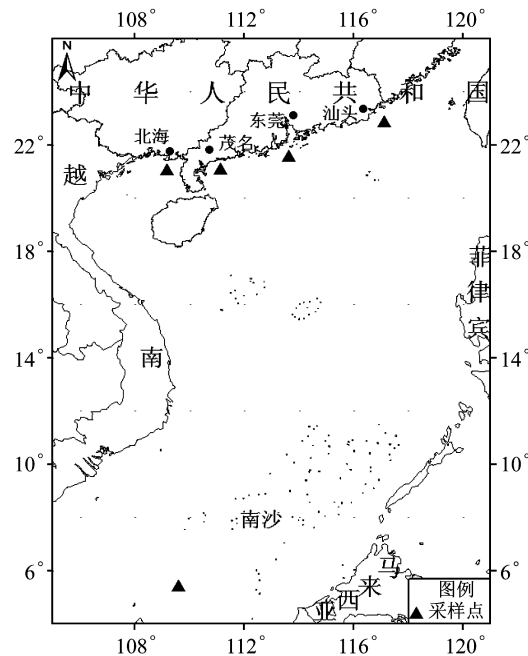


图 1 黄鳍马面鲷样本采集地点示意图

Fig. 1 A sketch map of sampling sites of *T. hypargyreus*

表 1 黄鳍马面鲷样本采集信息  
Tab. 1 Sampling data of *T. hypargyreus*

群体名称 group	采集地点 sampling location	采集日期 sampling time	采集数量/尾 number of the samples
NS	南沙西南陆架海域	2013-03	33
BH	北部湾海域	2012-11	20
YX	粤西茂名近海海域	2013-03	34
ZJ	珠江口近海海域	2013-03	35
YD	粤东汕头近海海域	2013-04	34
总计 total			156

### 1.2 实验方法

**DNA 的提取与检测** 从每个肌肉或尾鳍样本中取 30 mg 左右,置于 1.5 mL 离心管内剪碎,室温放置晾干,至酒精挥发完全。使用广州真知生物科技公司的海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(DP324-02)进行 DNA 提取,提取步骤参照试剂盒说明,并略有改动,用 100 μL TE 溶解。从每个样本的 DNA 溶液中取出 5 μL 在 1% TBE 琼脂糖凝胶中进行电泳检测,经 GelRed 染色后用凝胶成像系统扫描观察并拍照保存,根据

DNA 条带的位置检测其 DNA 片段完整性和 DNA 纯度。剩余样本置于 -20 ℃ 冰箱内保存备用。

**PCR 扩增与测序** 扩增 Cyt b 基因片段的引物根据 GenBank 中与黄鳍马面鲷同属的绿鳍马面鲷(*T. modestus*)相应的同源序列比较后设计,引物序列为 C1 (TGA CTA ATC CGC AAC CTC) 和 C2 (AAG TAG AGG ACT GAG GCA AT)。反应体积为 50 μL,其中 Taq PCR Master Mix(2 ×, blue dye) 25 μL,包括 Taq DNA 聚合

酶、dNTP、PCR Buffer、PCR stabilizers、gel loading 和核酸染液;模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ ,引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ ,加灭菌超纯水至总体积 50  $\mu\text{L}$ 。上述所有用品均购自生工生物工程(上海)有限公司。反应程序为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,53  $^{\circ}\text{C}$  复性 50 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min;进行 35 个循环,最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。另外,每次反应均设立不含 DNA 模板的空白对照。所有 PCR 均在 Mastercycler pro 梯度 PCR 仪(德国 Eppendorf 股份公司)上完成。PCR 产物用 1% TBE 琼脂糖凝胶电泳分离, GelRed 染色,凝胶成像系统观察得到唯一目的条带。将 PCR 产物送生工生物工程(上海)有限公司进行双向测序。

**数据处理及分析** 所有测得序列,比对 GenBank 中其它鲷形目鱼类的线粒体 *Cyt b* 基因全序列,使用 Clustal X 软件<sup>[13]</sup>进行同源序列拼接、排列及手动校正。用 MEGA 4.0<sup>[14]</sup>计算序列碱基组成,变异位点数,转换与颠换值等。利用 DnaSP (ver 5.0)<sup>[15]</sup>软件统计单倍型、单倍型多样性( $h$ )、平均核苷酸差异数( $K$ )及核苷酸多样性( $P_i$ )和群体间的基因流( $N_m$ )。以绿鳍马面鲷(GenBank 登录号:AP009185.1)和美尾棘鲷(*Amnases scopas*) (GenBank 登录号:AP009214.1)作为外群,应用 MEGA 4.0 的邻近距离法(NJ)和最大简约法(MP)构建亲缘关系树,自引导(Bootstrap)检验估计系统树中结点的置信度(重复次数为 1 000 次)。黄鳍马面鲷和绿鳍马面鲷的净遗传距离应用 Kimura 双参数法<sup>[16]</sup>计算,用以估算其分化时间。用 Network 4.5 程序<sup>[17]</sup>构建黄鳍马面鲷单倍型的中介网络图,调查群体单倍型间的进化关系。应用 Arlequin 3.0<sup>[18]</sup>软件中的分子变异分析(AMOVA)方法来评估群体间遗传变异,通过 1 000 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 1 000 次重抽样来检验两两群体间  $F_{st}$  的显著性。采用中性检验来检测黄鳍马面鲷的群体历史动态,以检验黄鳍马面鲷序列是否符合中性变异,计算 Tajima's  $D$  值<sup>[19]</sup>和 Fu's  $F_s$  值<sup>[20]</sup>,评估黄鳍马面鲷种群历史。

## 2 结果

### 2.1 序列变异特征分析

对 5 个群体 156 个个体的线粒体 *Cyt b* 基因进

行了序列测定,通过比对并经过人工校正后获得 779 bp 的片段。其中 5 个群体的 T、C、A 和 G 平均含量分别为 26.88%、32.17%、23.4% 和 17.55% (表 2),A+T 的含量(50.28%)略高于 C+G 的含量(49.72%),*Cyt b* 基因组成具有较大的偏向性,G 的含量(17.6%)显著低于其它碱基含量,表现出明显的反 G 偏倚,这与 Rogers 等<sup>[21]</sup>研究得到的鱼类线粒体 *Cyt b* 基因的共有特征相符。

表 2 5 个黄鳍马面鲷群体 *Cyt b* 基因碱基频率  
Tab.2 Base frequencies among 5 groups of *T. hypargyreus*

群体 group	T/%	C/%	A/%	G/%
NS	26.89	32.16	23.39	17.56
BH	26.89	32.16	23.38	17.57
YX	26.87	32.19	23.40	17.55
ZJ	26.85	32.20	23.41	17.54
YD	26.89	32.15	23.40	17.55
总计 total	26.88	32.17	23.40	17.55

在全部 156 个个体的 779 bp 的序列中,共检测到 56 个变异位点,约占总序列长度的 7.19%,其中简约信息位点 28 个,单一变异位点 28 个。这些变异位点共定义 58 个核苷酸替代(40 个转换和 18 个颠换),转换/颠换比在嘌呤中  $k_1$  为 13.98,在嘧啶中  $k_2$  为 7.04,转换/颠换的偏向值是 4.889。转换明显大于颠换,没有检测到插入、缺失现象。

### 2.2 单倍型在群体中的分布

利用 DnaSP 4.0 软件计算各个群体的单倍型(表 3),156 个个体中共检测到 58 单倍型,即 H1~H58,其中 45 个独享单倍型,占 77.58%;13 个共享单倍型,分别为 H1~H10、H13、H19、H26 和 H27。单倍型 H1 分布最广,所有群体均有出现,频率也最高,为 21.15%(33/156);其次为 H2,所有群体均有出现,频率为 9.61%。H19 在除了 NS 外的其余 4 个群体中都有出现,频率为 10.90%,推测其为黄鳍马面鲷在南海北部陆架新出现的单倍型。利用 Network 软件的 Median-joining 方法构建单倍型网络结构图,显示出 5 个群体单倍型星状的分布态势,没有将 58 个单倍型区分为对应不同地理区域或者地理种群的单系群。单倍型 H1 位于星状图的中心,其它单倍型则经过一步或者几步突变与其相连(图 2),由此推测 H1 为黄鳍马面鲷群体的原始单倍型。

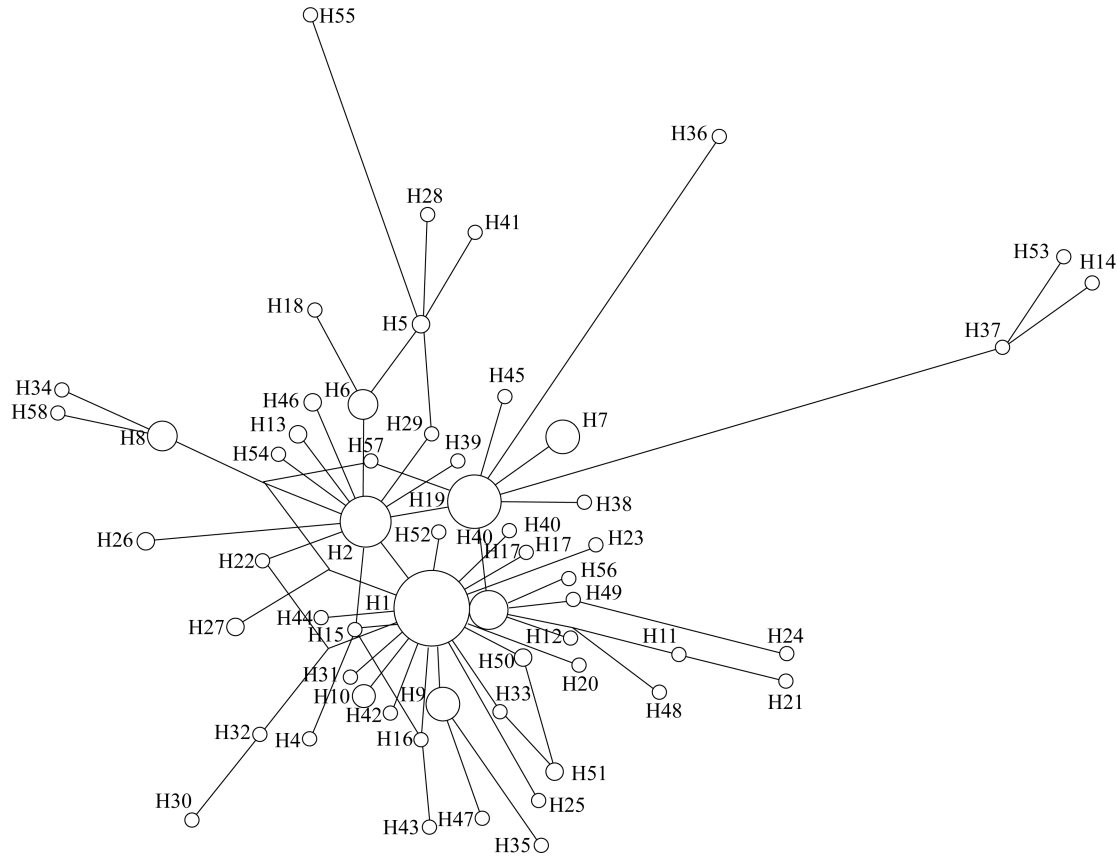


图 2 黄鳍马面鲷单倍型的 MJ 网络图(圆圈面积表示单倍型的频率)

Fig. 2 Median-joining network of the 58 haplotypes of *T. hypargyreus* (Size of circle was proportional to haplotype frequency)

### 2.3 群体遗传多态性参数统计

利用 DnaSP 4.0 软件计算各个群体的单倍型多样性  $h$ 、核苷酸多样性  $P_i$  和平均核苷酸差异数  $K$ (表 3)。5 个群体的  $h$  整体较高,而  $P_i$  相对较低。YX、ZJ 和 YD 群体的  $h$  较高,均达 0.9 以上,其中 YX 群体  $h$  最高,为 0.980 4;NS 和 BH 群体

相对较低,而 NS 群体  $h$  最低,为 0.820 1。YX 群体的  $P_i$  最高(0.004 69),BH 群体  $P_i$  最低(0.002 62)。将所有个体作为一个大群体进行数据分析,单倍型多样性为 0.928 0,核苷酸多样性为 0.003 63。从衡量种群遗传水平的  $K$  值来看, YX 群体明显高于其它群体,达 3.654。

表 3 不同群体黄鳍马面鲷的遗传多样性参数

Tab. 3 Parameters of genetic diversity among different *T. hypargyreus* groups

群体 group	样本数 number of samples	单倍型数 number of haplotypes	单倍型比例/% percentage of haplotype	单倍型多样性 haplotypes diversity	核苷酸多样性 nucleotide diversity	平均核苷酸差异数 mean number of pairwise differences
NS	33	14	42.4	0.820 1 ± 0.057 9	0.003 37 ± 0.002 05	2.623 ± 1.438
BH	20	11	55.0	0.884 2 ± 0.053 5	0.002 62 ± 0.001 71	2.040 ± 1.195
YX	34	26	76.4	0.980 4 ± 0.013 0	0.004 69 ± 0.002 71	3.654 ± 1.897
ZJ	35	20	57.1	0.951 3 ± 0.019 0	0.003 71 ± 0.002 22	2.893 ± 1.557
YD	34	15	44.1	0.910 9 ± 0.027 4	0.003 40 ± 0.002 07	2.651 ± 1.450
总计 total	156	58	37.1	0.928 0 ± 0.012 6	0.003 63 ± 0.002 13	2.830 ± 1.500

## 2.4 种群群体遗传结构

生物间亲缘关系的远近可利用种群间的序列差异进行分析。从黄鳍马面鲀5个群体的遗传距离来看(表4),群体内的遗传距离为0.002 62~0.004 69,群体间为0.002 95~0.004 15。5个群体中两两群体之间的群体遗传分化指数 $F_{st}$ 值显示,YD与NS群体和YD与ZJ群体的 $F_{st}$ 值为正,分别是0.001 61和0.000 95( $P > 0.05$ ),而其余群体间的 $F_{st}$ 值均为负( $P > 0.05$ ),说明这些群体间没有存在遗传分化。将5个群体归为一组,1 000次单倍型重复随机抽样进行分子变异分析(AMOVA),群体内存在较高的遗传变异(100.53%),而群体间的 $F_{st}$ 为-0.005 3(表5),

$F_{st}$ 为负值暗示群体个体内的变异大于个体间,分子遗传变异主要来自各个群体内。统计整个黄鳍马面鲀群体的遗传分化指数和基因流分别为 $F_{st} = -0.005 33$ 、 $N_m = 94.308$ ,说明群体间存在基因交流。基于Kimura双参数模型计算得到的5个黄鳍马面鲀群体与绿鳍马面鲀的净遗传距离为0.083 2——以线粒体Cyt b基因序列2%每百万年的核苷酸分化速率计算<sup>[22]</sup>,得到黄鳍马面鲀和绿鳍马面鲀的分歧时间大约在416万年前的上新世早期。黄鳍马面鲀南海北部4个群体和南沙海域群体的净遗传距离为0.003 53,得出南海北部群体和南沙群体的分歧为17.6万年前的更新世冰河期。

表4 黄鳍马面鲀群体内遗传距离(对角线)及两两群体间遗传距离(对角线下)和遗传分化系数 $F_{st}$ (对角线上)

Tab. 4 Pairwise genetic distances within (diagonal) groups, and genetic distance (below diagonal), fixation index  $F_{st}$  (above diagonal) between every two groups of *T. hypargyreus*

群体 group	NS	BH	YX	ZJ	YD
NS	0.003 37	-0.017 79	-0.005 49	-0.001 35	0.001 61
BH	0.002 95	0.002 62	-0.009 72	-0.002 19	-0.000 61
YX	0.004 01	0.003 64	0.004 69	-0.011 87	-0.008 62
ZJ	0.003 54	0.003 17	0.004 15	0.003 71	0.000 95
YD	0.003 39	0.003 02	0.004 01	0.003 56	0.003 40

表5 不同群体黄鳍马面鲀遗传差异的AMOVA分析

Tab. 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) among different groups of *T. hypargyreus*

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	变异组成 variance components	变异百分比/% percentage of variation
群体间 among groups	4	4.751	-0.007 53 Va	-0.53
群体内 within groups	151	214.548	1.420 85 Vb	100.53
总计 total	155	219.299	1.413 32	

## 2.5 种群历史动态

利用无限突变位点模型的中性检验Tajima's  $D$ 和Fu's  $F_s$ 两种方法同时调查黄鳍马面鲀种群历史变动(表6)。5个群体Tajima's  $D$ 均为负值, $D$ 值为-2.007 8~-1.433 6。其中,除了NS和YX群体 $D$ 值为-2.007 8,达到极显著水平外( $P < 0.01$ ),其它几个群体也均达到显著水平( $P < 0.05$ )。Fu's  $F_s$ 值为-24.050~-5.850 0,所有群体 $F_s$ 值均为负值。故将黄鳍马面鲀5个群体全部个体作为一个整体进行中性检验,其Tajima's  $D$  ( $D = -2.197 8$ )和Fu's  $F_s$  ( $F_s = -26.498$ )检测均达到很高的显著性( $P < 0.01$ )。

## 2.6 系统发育进化树

以绿鳍马面鲀和美尾棘鲀作为外群,应用MEGA 4.0的邻近距离法(NJ)、最大简约法

(MP)构建黄鳍马面鲀种群的亲缘关系树,利用两种方法所得系统发育关系基本一致(图3)。结果显示黄鳍马面鲀各群体之间没有明显的地理遗传结构,5个群体自成一支,不存在显著的系统地理格局。

表6 5个黄鳍马面鲀地理群体间的中性检验

Tab. 6 The neutrality tests of 5 groups of *T. hypargyreus*

群体 group	Tajima's $D$ Test		Fu's $F_s$ Test	
	$D$	$P$	$F_s$	$P$
NS	-1.505 8	0.005 8	-5.850 0	0.003
BH	-1.433 6	0.047 0	-5.990 6	0.000
YX	-2.007 8	0.004 0	-24.050	0.000
ZJ	-1.575 9	0.050 0	-13.880	0.000
YD	-1.752 3	0.022 0	-6.9110	0.001
总计 total	-2.197 8	0.001 0	-26.498	0.000

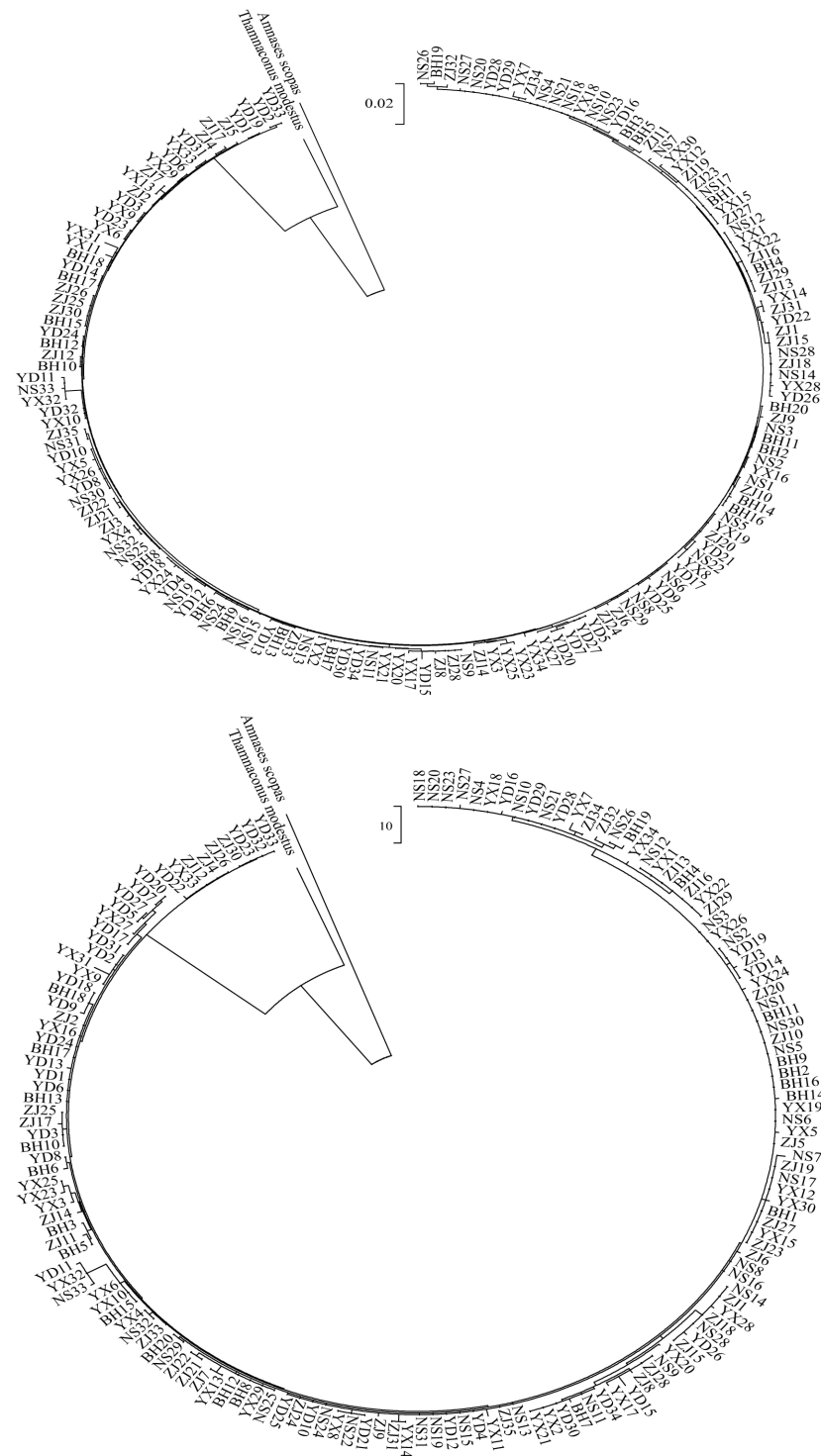


图 3 基于 NJ(上)和 MP(下)法构建的黄鳍马面鲀系统进化树

Fig. 3 NJ(upper) and MP(lower) phylogenetic trees of *T. hypargyreus* based on mitochondrial *Cyt b* gene fragment

### 3 讨论

遗传多样性不仅是形成生物多样性的基础,也是物种进化潜能的保证。通过遗传多样性研究,可以从本质上揭示物种多样性起源、变异和进

化<sup>[23]</sup>。遗传多样性降低或丧失,会使物种适应能力降低、有害隐性基因表达增加以及经济性状衰退等现象发生,并最终导致物种退化,这对于生活在多变环境中的野生群体是一个极大的威胁<sup>[24]</sup>。为探讨黄鳍马面鲀资源利用现状、群体分布等情

况,对其5个不同地理群体 Cyt b 基因的 779 bp 序列进行综合分析,各个群体序列在 A、T、C、G 4 个碱基含量大小不一,但群体间差异十分微小,其中 G 在黄鳍马面鲷 Cyt b 序列中含量最低,这与其它鲷鱼类中 Cyt b 序列碱基含量特征报道相一致<sup>[25]</sup>。Avisé<sup>[26]</sup>认为4种核苷酸在线粒体基因组中分布不均一是动物线粒体基因组的共性特征。线粒体基因组核苷酸组成的不均一性可能是由于蛋白质编码基因的核苷酸突变在密码子第三位点上受到的自然选择压力较小且突变后易固定的特点造成的<sup>[27]</sup>。

衡量群体多态程度和群体遗传分化的两个重要指标分别是单倍型多样性和核苷酸多样性<sup>[11]</sup>。单倍型多样性指样本中随机抽取到两个不同单倍型的频率,单倍型多样性高的群体其遗传多样性高,遗传资源丰富;核苷酸多样性则表示各种 mtDNA 单倍型在种群中所占的比例。实验中发现,黄鳍马面鲷 5 个不同群体的线粒体 Cyt b 基因序列中共有 56 个变异位点、58 个单倍型,表明黄鳍马面鲷群体中存在着丰富的 mtDNA 多态性,具有较高水平的遗传多样性和环境适应能力。单倍型多样性高达 0.928 0,呈现出较高的遗传多样性;核苷酸多样性则较低,为 0.003 63。这符合 Grant 等<sup>[28]</sup>提出的海水鱼类不同单倍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 ( $h > 0.5$ ) 和较低的核苷酸多样性 ( $P_i < 0.005$ )。由此推测,黄鳍马面鲷群体间没有达到种间的遗传分化,可能是黄鳍马面鲷在短时间内由一个较小的有效群体快速成长为一个大的群体;随着群体数量的增加,尽管变异在群体中会导致单倍型多样性积累,但没有足够时间使得核苷酸序列的多样化同样达到积累<sup>[29]</sup>。黄鳍马面鲷这种“高单倍型、低核苷酸”的特点,在其它一些鱼类中也有类似情况<sup>[30]</sup>。近年来,南海北部近海黄鳍马面鲷资源衰退,但仍然保持了较高的遗传多样性,说明黄鳍马面鲷具备了较强适应环境的能力和自我恢复能力。

种群间的遗传距离以及种群分化指数是衡量种群多态程度的重要指标,两者的值越大,种群多态性程度越高<sup>[31]</sup>。从遗传距离上来讲, Kartavtsev 等<sup>[32-33]</sup>认为 Cyt b 基因遗传距离在同种群间为 0.005 6 ~ 0.015 5,在有生殖隔离的近似种间为 0.013 4 ~ 0.055 2。本实验中黄鳍马面

鲷 5 个群体的群体间遗传距离在 0.002 95 ~ 0.004 15 之间,小于 0.005 6,尚未达到种间距离水平;同时说明 YX 群体与其他群体的亲缘关系较远,但整体上各个群体间未出现遗传分化。遗传分化指数  $F_{st}$  是反映各亚群间遗传分化的另一重要指标。根据 Freeland<sup>[34]</sup>的解释,  $F_{st}$  为 0 ~ 0.05 表示低度遗传分化,为 0.05 ~ 0.15 表示中度遗传分化,为 0.15 ~ 0.25 则表示遗传分化比较大,大于 0.25,则达到一般接受的群体遗传分化标准。YD 与 NS 群体的  $F_{st}$  值最大为 0.001 61 ( $P > 0.05$ ),落在 0 ~ 0.05 区间,表明其各地理群间的分化程度低,与群体间遗传距离分析结果一致。

过度捕捞、环境污染和海洋工程等可能是导致黄鳍马面鲷资源明显衰退的重要原因,研究群体遗传结构能够为其资源保护和管理提供重要依据。近年来,许多海洋鱼类的分子系统发育地理学研究表明,海洋环境屏障及鱼类自身生活史特征等因素都可能成为鱼类群体交流的障碍,从而造成其显著的群体遗传结构<sup>[35]</sup>。本实验的 AMOVA 分析结果、系统发育树和单倍型网络关系图等均表明,黄鳍马面鲷 5 个不同群体间没有明显的遗传分化,聚类分析也表明并未形成相应的地理群体支系。这一结论说明黄鳍马面鲷的种群扩散能力很强,其在群体间基因交流所遇地理阻隔很小,可能具有在南海北部及南沙西南陆架海域之间长距离扩散机制,从而没有形成遗传异质。

更新世(又称冰川期)以来的冰期造成的海平面反复升降和海流分布格局使海洋生物遗传结构发生改变在许多物种中已有报道<sup>[36-37]</sup>。更新世冰期全球气候发生了剧烈变化,冰盛期海平面下降了 120 ~ 140 m,黄鳍马面鲷在其分布范围内可能大范围灭绝,只在一些避难所残存下来;随着间冰期气温回升和海平面上升,残存于不同避难所的黄鳍马面鲷可能重新混合,从而发生群体扩张事件<sup>[35]</sup>;从中性检验结果 ( $D = -2.197 8, P < 0.01; F_s = -26.498, P < 0.01$ ) 推测,黄鳍马面鲷可能经历了近期的群体扩张事件。南海北部及南沙西南陆架海域之间黄鳍马面鲷各个群体并未因此形成显著遗传差异,推测有以下几个原因:首先,黄鳍马面鲷虽然在群体历史动态分析中表现出显著的种群扩张,但是群体可能缺乏足够的时

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<sup>[38-39]</sup>;其次,在南海黄鳍马面鲷主要分布在 18°00'~21°45'N 的陆架近海,主要产卵场位于沙堤至珠江口一带近海海域,产卵期为 12 月至翌年 7 月(3—6 月为盛期)<sup>[6]</sup>,这一阶段海流的输送作用使不同地理群体的基因交流机会增加,从而使遗传分化程度降低;再者,末次盛冰期南海南部海域表层出现高生产力,而冰盛期后南海北部海域表层出现高生产力<sup>[40-41]</sup>,黄鳍马面鲷在南海北部和南海南部不同区域摄食,温盐等环境因素对其构成的选择压力不大,因此不同地理群体间遗传差异较小。

本实验仅对黄鳍马面鲷线粒体基因 Cyt b 片段进行了序列测定分析,确定南海北部陆架和南沙西南部陆架不同群体间没有明显的遗传差异,属于同一个种群。黄鳍马面鲷作为在南海捕捞业历史上曾经创造过高产纪录的重要经济种类,近年来捕捞产量下降,资源状况不容乐观<sup>[42]</sup>。本实验只是阐明了南海北部不同海域之间以及南海北部与南沙西南部陆架海域黄鳍马面鲷的种群归属问题。既然南海北部和南沙西南部陆架海域的黄鳍马面鲷属于同一个种群,那么分布在这两个海域的黄鳍马面鲷群体之间肯定存在着基因交流,进而两个海域之间的黄鳍马面鲷资源自然也就存在着相互影响。从过去对主要经济种类生态学的认识来看,南海绝大多数鱼种并不进行长距离洄游,南海北部和南沙西南部陆架海域相距较远,因此,这两个海域黄鳍马面鲷相互影响程度到底有多大,还需要今后进一步研究其洄游情况。

承蒙北海、湛江、茂名、东莞和汕头等 6 市的海洋与渔业环境监测站等单位帮助采集黄鳍马面鲷样本,中国水产科学研究院南海水产研究所黄梓荣副研究员、张鹏副研究员和梁沛文研究员等各位老师帮助样本鉴定,李敏博士、孙冬芳硕士和董丽娜硕士等协助指导实验,在此一并表示感谢。

#### 参考文献:

- [1] Huang L M, Yu H. Analysis of stock assessment and sustainable use of navodon tessellates resource in China[J]. Journal of Fujian Fisheries, 2003(2): 10-14. [黄良敏,于浩. 我国黄鳍马面鲷的资源评估与可持续利用初探. 福建水产, 2003(2): 10-14.]
- [2] Chen Z C, Liu J X. The South China Sea fishes [M]. Guangzhou: Guangdong science and Technology Press, 1982: 261-266. [陈再超,刘继兴. 南海经济鱼类. 广州: 广东科技出版社, 1982: 261-266.]
- [3] Xu Y M, Pu Z S. Application of Beverton-Holt mathematical model analysis of the characteristics of puffer resources filefish and maximum allowable catch[C] // Proceedings of Navodon septentrionalis in East China Sea. Shanghai: Academia Press, 1987: 123-125. [许永明,浦仲生. 应用 Beverton-Holt 数理模式分析马面鲷资源特征和最大可捕量 // 东海绿鳍马面鲷论文集. 上海: 学林出版社, 1987: 123-125.]
- [4] Sun D F, Zhu W C, Li Y Z, et al. Taxonomic diversity of fish species in Beibu Gulf [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2010(6): 4-7. [孙冬芳,朱文聪,李永振,等. 北部湾海域鱼类物种分类多样性研究. 广东农业科学, 2010(6): 4-7.]
- [5] Sun D F, Li Y Z, Dong L N. Application of AFLP in the analysis of fish population [J]. South China Fisheries Science, 2009, 5(6): 71-75. [孙冬芳,李永振,董丽娜. AFLP 技术在鱼类种群分析中的应用. 南方水产, 2009, 5(6): 71-75.]
- [6] Qian S Q. The biological characteristics and resource status of the yellow-fin filefish in the East China Sea [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1998, 5(3): 25-28. [钱世勤. 东海黄鳍马面鲷生物学特性和资源利用状况. 中国水产科学, 1998, 5(3): 25-28.]
- [7] Wang Y Z, Sun D R, Jia X P, et al. Influence of fishing pressure and climate change on filefish catches in East China Sea [J]. South China Fisheries Science, 2013, 9(1): 9-14. [王跃中,孙典荣,贾晓平,等. 捕捞压力和气候变化对东海马面鲷渔获量的影响. 南方水产科学, 2013, 9(1): 9-14.]
- [8] Zheng Y J, Li S F, Mi C D, et al. Study on the populations of *Thamnaconus hypargyreus* in the East China Sea and the South China Sea [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2001, 8(1): 47-52. [郑元甲,李圣法,宓崇道,等. 东海与南海的黄鳍马面鲷种群研究. 中国水产科学, 2001, 8(1): 47-52.]
- [9] Liu Z J, Cordes J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics [J]. Aquaculture, 2004, 238(1-4): 1-37.
- [10] 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.
- [ 11 ] Sun P, Yin F, Peng S M, *et al.* Genetic variation of *CO I* and *Cyt b* sequences in *Oplegnathus fasciatus* [ J ]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35 ( 3 ) : 327 – 333. [ 孙鹏, 尹飞, 彭士明, 等. 条石鲷线粒体 *CO I* 和 *Cyt b* 序列的遗传变异分析. 水产学报, 2011, 35(3) : 327 – 333. ]
- [ 12 ] Dong L N, Huang Z R, Li Y Z, *et al.* Sequence analysis of mitochondrial *CO I* and *Cyt b* gene of *Nemipterus* species in South China Sea [ J ]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19 ( 2 ) : 355 – 363. [ 董丽娜, 黄梓荣, 李永振, 等. 南海金线鱼属 *Nemipterus* 鱼类 *CO I* 和 *Cyt b* 基因片段的比较分析. 中国水产科学, 2012, 19(2) : 355 – 363. ]
- [ 13 ] 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.
- [ 14 ] 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.
- [ 15 ] Rozas J, Sanchez-Delbarrio C J, Messeguer X, *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [ J ]. *Bioinformatics*, 2003, 19(18) : 2496 – 2497.
- [ 16 ] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: molecular evolutionary genetic: Analysis software for microcomputers [ J ]. *Computer Applications in the Biosciences*, 1994, 10(2) : 189 – 191.
- [ 17 ] Bandelt H J, Forster P, Rohl A. Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies [ J ]. *Molecular Biology Evolution*, 1999, 16(1) : 37 – 48.
- [ 18 ] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ( version 3. 0 ) : an integrated software package for population genetics data analysis [ J ]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2007(1) : 47 – 50.
- [ 19 ] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [ J ]. *Genetics*, 1989, 123(3) : 585 – 595.
- [ 20 ] Fu Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitch hiking and background selection [ J ]. *Genetics*, 1997, 147 ( 2 ) : 915 – 925.
- [ 21 ] Rogers A R, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences [ J ]. *Molecular Biology Evolution*, 1992, 9 ( 3 ) : 552 – 569.
- [ 22 ] Kocher T D, Stepien C A. *Molecular systematics of fishes* [ M ]. San Diego, California: Academic Press, 1997: 113 – 126.
- [ 23 ] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. *Introduction to conservation genetics* [ M ]. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- [ 24 ] 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 ) : 322 – 324. [ 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. 水产学报, 2011, 35 ( 3 ) : 322 – 324. ]
- [ 25 ] Chen W B, Lin S H, Shao B Y, *et al.* Partial DNA sequence analysis of *Cyt b* gene in puffer fish [ J ]. *Food Science*, 2012, 33(20) : 227 – 232. [ 陈文炳, 林少华, 邵碧英, 等. 河豚鱼 *Cyt b* 基因部分 DNA 序列分析与应用. 食品科学, 2012, 33 ( 20 ) : 227 – 232. ]
- [ 26 ] Avise J C. *Phylogeography: the history and formation of species* [ M ]. Cambridge, Massachusetts London, England: Harvard University Press, 2000: 1 – 36.
- [ 27 ] Meyer A. *Evolution of mitochondrial DNA in fishes* [ M ]. Amsterdam: Elsevier Press, 1993: 1 – 36.
- [ 28 ] 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.
- [ 29 ] 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.
- [ 30 ] Dong L N, Huang Z R, Ai H, *et al.* Sequence analysis of mitochondrial *CO I* gene in three *Nemipterus* species from Beibu Gulf [ J ]. *Journal of Fishery Sciences of China*. 2011, 18(3) : 508 – 514. [ 董丽娜, 黄梓荣, 艾红, 等. 北部湾 3 种金线鱼属鱼类 *CO I* 基因序列的比较分析. 中国水产科学, 2011, 18(3) : 508 – 514. ]
- [ 31 ] Chen D Q, Zhang C L, Lu C, *et al.* Polymorphism of D-loop sequence from mitochondrial genomes of different brood-stocks of *Gymnocypris przewalskii* ( kessler ) [ J ]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(5) : 800 – 806. [ 陈大庆, 张春霖, 鲁成, 等. 青海湖裸鲤繁殖种群线粒体 D-loop 基因组区

- 序列多态性. 中国水产科学, 2006, 13 (5): 800 - 806. ]
- [32] Kartavtsev Y P, Lee J S. Analysis of nucleotide diversity at the cytochrome b and cytochrome oxidase I genes at the population, species, and genus levels [J]. Russian Journal of Genetics, 2006, 42 (4): 347 - 362.
- [33] Kartavtsev Y P. Divergence at Cyt-b and Co-I mtDNA genes on different taxonomic levels and genetics of speciation in animals [J]. Mitochondrial DNA, 2011, 22(3): 55 - 65.
- [34] Freeland J R. Molecular ecology [M]. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2005: 112 - 116.
- [35] Liu J X, Gao T X, Wu S F, et al. Pleistocene isolation in the Northwest Pacific marginal seas and limited dispersal in a marine fish, *Chelon haematocheilus* (Temminck & Schlegel, 1845) [J]. Molecular Ecology, 2007, 16(2): 275 - 288.
- [36] Han Z Q, Li Y Z, Chen G B, et al. Population genetic structure of coral reef species *Plectorhinchus flavomaculatus* in South China Sea [J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(11): 1774 - 1781.
- [37] 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.
- [38] Liu X J, 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]. Periodical of Ocean University of China, 2007, 37 (6): 931 - 938. [刘进贤, 高天翔, 吴世芳, 等. 梭鱼的分子系统地理学研究——晚更新世西北太平洋边缘海隔离分化及其有限的扩散能力. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2007, 37(6): 931 - 938. ]
- [39] Slatkin M. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations [J]. Evolution, 1993, 47 (1): 264 - 279.
- [40] Zhao Q H, Wang P X. Progress in quaternary paleoceanography of the south china sea; a review [J]. Quaternary Sciences, 1999 (6): 482 - 492. [赵泉鸿, 汪品先. 南海第四纪古海洋学研究进展. 第四纪研究, 1999(6): 482 - 492. ]
- [41] Hou H M. Evolution of sunda shelf since last glacial and its influence on paleoenvironment changes of Nansha islands sea area [J]. Journal of Tropical Oceanography, 2001, 20(2): 29 - 34. [侯红明. 末次冰期以来巽他陆架的演变及其对南沙群岛海区古环境的影响. 热带海洋学报, 2001, 20 (2): 29 - 34. ]
- [42] Jia X P, Li Y Z, Qiu Y S, et al. Environment and fishery resources in the exclusive economic zone and the continental shelf of South China Sea [M]. Beijing: Science Press, 2003: 529 - 533. [贾晓平, 李永振, 邱永松, 等. 南海专属经济区和大陆架渔业生态环境与渔业资源. 北京: 科学出版社, 2003: 529 - 533. ]

## Population analysis of *Thamnaconus hypargyreus* based on the mitochondrial *Cyt b* sequence

LI Yufang<sup>1,2</sup>, LI Yongzhen<sup>3\*</sup>, CHEN Guobao<sup>1</sup>, SUN Dianrong<sup>1</sup>, YU Jie<sup>1</sup>, CUI Ke<sup>1</sup>

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Regional Bureau of South China Sea Fishery Management, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** Lesser-spotted leatherjacket *Thamnaconus hypargyreus* is an economically important fish species in the South China Sea. It is necessary to study its genetic structure for the exploitation and management of the fishery resources. Fish specimens (totally 156 individuals) used in this study were collected from 5 sampling locations in the north of the South China Sea and the southwest of Nansha. The results were as follows: the mitochondrial cytochrome b (*Cyt b*) gene sequences of the fish was amplified by polymerase chain reaction (PCR) technology. Both 56 mutations of nucleotide acids without inserting or deleting one and 58 haplotypes were found among the examined 779 base-pair nucleotide sequences of *Cyt b* fragment. The ranges and the level of average genetic distance were 0.002 95 – 0.004 15 for *T. hypargyreus* between groups. All 5 groups were characterized with high haplotype diversity (0.820 1 – 0.980 4) and relatively low nucleotide diversity (0.002 62 – 0.004 69). Analysis of molecular variance (AMOVA) and the fixation indices ( $F_{st}$ ) of 5 groups showed that the genetic variance mainly came from individuals within groups, and there was no genetic differentiation between groups. With high gene flow, this group could be developed and managed as an evolutionary significant unit. The median-joining (MJ) network and phylogenetic tree proved no phylogeographic differentiation structure in 5 groups. According to the criteria distinguishing different populations, species and genera given by scholar Kartavtsev, the five groups should be merged to the same population, which implied *T. hypargyreus* in the North and South-West Continental Shelf of the South China Sea belongs to one population. The findings would provide a scientific basis for the study of migration of *T. hypargyreus* between the two Continental Shelves and management of its stock.

**Key words:** *Thamnaconus hypargyreus*; population analysis; mitochondrial cytochrome b; genetic differentiation; South China Sea

**Corresponding author:** LI Yongzhen. E-mail: y. z. li@qq. com