



## 基于线粒体基因组的东方鲀属系统发育学及群体遗传学

周志雄<sup>1</sup>, 刘波<sup>2</sup>, 官杰<sup>1</sup>, 白玉麟<sup>1</sup>, 阳俊逸<sup>1</sup>, 徐鹏<sup>1\*</sup>

(1. 厦门大学海洋与地球学院, 福建省海洋生物遗传育种重点实验室, 福建 厦门 361102;

2. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361000)

**摘要:** 为了探究东方鲀属内系统发育关系, 本研究首次基于群体尺度对东方鲀属物种进行系统发育分析。利用线粒体基因组, 在包含 10 个种的 124 尾东方鲀中, 挖掘了 1 488 个单核苷酸多态性 (SNP) 位点和 4 个插入缺失 (INDEL), 使用这些遗传变异位点进行了系统发育及群体遗传学分析。发现网纹东方鲀与铅点东方鲀可能是同种异名, 且二者形成的姊妹群位于东方鲀属基部; 暗纹东方鲀与红鳍东方鲀、菊黄东方鲀与双斑东方鲀各自亲缘关系较近。此外, 实验发现了 4 尾可疑的双斑东方鲀和菊黄东方鲀杂交个体, 以及 2 尾可疑的横纹东方鲀杂交个体。遗传多样性方面, 弓斑东方鲀遗传多样性最低。此外, 实验在 10 种东方鲀中共找到 595 个种间特异性 SNP 位点。*Ka/Ks* 分析表明, *nd6* 基因的 *Ka/Ks* 最高 (平均为 1.19), 说明在东方鲀属中 *nd6* 可能经历了正选择, 而 ATP 合成酶基因可能在东方鲀适应淡水环境中受到选择。研究表明, 东方鲀属内系统发育关系较为复杂, 且在野生环境下东方鲀物种间广泛存在自然杂交现象, 该研究为东方鲀物种快速鉴定提供可靠的分子标记, 加速东方鲀属系统发育研究进展, 并为东方鲀野生种质资源保护提供了理论依据。

**关键词:** 东方鲀; 线粒体基因组; 单核苷酸多态性标记; 系统发育; *Ka/Ks*

中图分类号: Q 347; S 931.1

文献标志码: A

东方鲀属 (*Takifugu*) 隶属鲀形目 (Tetraodontiformes), 鲀科 (Tetraodontidae), 主要分布区域为太平洋西岸, 部分种类可以分布至印度洋, 是一种肉食广盐性鱼类<sup>[1]</sup>。1962 年出版的《南海鱼类志》中, “东方鲀属”最早被用作 *Takifugu* 的中文名称, 我国台湾学者早期使用“东方鲀属”作为中文名, 而后却在文献资料中多使用“多纪鲀属”<sup>[2]</sup>。东方鲀属鱼类在东亚地区具有悠久的食用历史, 其肉质鲜美, 虽然大多数东方鲀都含有河鲀毒素 (tetrodotoxin, TTX), 但仍深受我国及日、韩等地区消费者喜爱。根据 fishbase (<https://www.fishbase.de/>) 数据库统计, 东方鲀属包括 27 个有效种, 主要分布在河口及近海沿岸区域, 只有

极少数生活在深海区域, 部分物种 [如暗纹东方鲀 (*T. fasciatus*)、弓斑东方鲀 (*T. ocellatus*) 等] 会在春季上溯洄游至湖泊产卵繁殖, 最远可至长江中游江段<sup>[3-4]</sup>。

作为典型的适应性辐射物种, 东方鲀属是由同一祖先种在短时间内快速分化为众多的适应各自生存环境的新物种<sup>[5]</sup>。这些新物种间广泛存在体型、体色花纹及热耐受性分化现象, 使其成为探究海洋环境中新物种形成的绝佳模式物种<sup>[6]</sup>。另一方面, 由于具有相对“紧凑”的基因组 (400 Mb 左右), 东方鲀成为了基因组学研究的热点, 目前已有红鳍东方鲀 (*T. rubripes*)、菊黄东方鲀 (*T. flavidus*)、双斑东方鲀 (*T. bimaculatus*) 3 个

收稿日期: 2019-12-23 修回日期: 2020-02-23

资助项目: 福建省东方鲀种业创新与产业化工程 (2017FJSCZY03)

通信作者: 徐鹏, E-mail: xupeng77@xmu.edu.cn

物种的全基因组草图绘制完成<sup>[7-9]</sup>。此外, 在 NCBI 数据库中已有 17 个东方鲀属物种的线粒体基因组得到了破译, 这些丰富的基因组资源为东方鲀属系统发育及群体遗传学分析奠定了坚实的基础。

近年来, 随着测序技术及分子系统发育研究的不断进步, 东方鲀属种间系统发育研究已经从传统的形态学层面快速进入了基因组层面<sup>[1,3,10-11]</sup>。鱼类线粒体基因组由于其结构简单, 基因组小, 序列进化速率快等特点, 被认为是研究分子系统发育关系和群体遗传结构的理想工具<sup>[12]</sup>。近年来, 线粒体基因组已经广泛应用于东方鲀系统发育学分析。Song 等<sup>[13]</sup>利用 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 和 16S RNA 对 5 种东方鲀进行了系统发育学关系和群体遗传结构解析。张玉波等<sup>[1,3]</sup>利用线粒体细胞色素 b (*cytb*)、12S RNA 基因和线粒体 D-loop 区域系统研究了东方鲀属内部的系统发育学关系。Yamanoue 等<sup>[5]</sup>利用线粒体基因组序列对 15 个东方鲀属物种和 10 个外群物种进行了系统发育分析, 研究结果表明东方鲀属物种在大约 1.8~5.3 百万年前发生了爆炸性的物种分化。

虽然, 东方鲀属内物种间的系统发育学关

系已经基本理清, 但是由于东方鲀物种间亲缘关系较近, 各物种间遗传距离较小, 使得基于单个个体的线粒体基因组分析很难准确地反映东方鲀属内的物种进化关系<sup>[14]</sup>。因此, 实验利用线粒体基因组, 对囊括我国沿海 10 个种的 124 尾东方鲀进行群体尺度上的种间系统发育关系及群体遗传结构研究, 进一步讨论东方鲀属内的分类学现状, 评估我国沿海东方鲀种群遗传多样性, 系统分析东方鲀线粒体基因组的选择压力和分子标记。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集与鉴定

本研究中共采集了 9 种东方鲀属鱼类, 具体的样本种类、数量、采集地信息见表 1。其中 72 尾野生个体 (包括 9 个种) 采集的鳍条样本用无水乙醇保存于室温环境下。相关的物种鉴定均依照世界鱼类数据库 (FishBase) 的命名及分类标准。此外, 本研究中还使用了 NCBI 数据库中的 52 尾东方鲀全基因组重测序数据及 17 种东方鲀的线粒体基因组数据 (表 2, 表 3)。

表 1 采样信息统计

Tab. 1 Statistics of sample size and collection location

种名 species	种名缩写 species abbreviation	样本数量/个 sample no.	采集地点 locality
暗纹东方鲀 <i>T. fasciatus</i>	Tfa	7	南通 Nantong
双斑东方鲀 <i>T. bimaculatus</i>	Tb	10	漳浦 Zhangpu
红鳍东方鲀 <i>T. rubripes</i>	Tr	10	威海 Weihai
菊黄东方鲀 <i>T. flavidus</i>	Tf	10	上海 Shanghai
横纹东方鲀 <i>T. oblongus</i>	Tob	8	福州 Fuzhou
弓斑东方鲀 <i>T. ocellatus</i>	Toc	12	宁德 Ningde
网纹东方鲀 <i>T. poechilonotus</i>	Tp	2	宁德 Ningde
铅点东方鲀 <i>T. alboblunbeus</i>	Ta	4	漳州 Zhangzhou
黄鳍东方鲀 <i>T. xanthopterus</i>	Tx	9	福州 Fuzhou

表 2 NCBI 数据库下载数据

Tab. 2 Sequencing data from NCBI database

种名 species	简称 abbreviation	样本数量/个 sample number	NCBI 登录号 NCBI accession no.
星点东方鲀 <i>T. niphobles</i>	Tn	15	PRJNA522329
暗纹东方鲀 <i>T. fasciatus</i>	Tfa	12	PRJNA522329
双斑东方鲀 <i>T. bimaculatus</i>	Tb	8	PRJNA522329
菊黄东方鲀 <i>T. flavidus</i>	Tf	8	PRJNA522329
红鳍东方鲀 <i>T. rubripes</i>	Tr	9	PRJNA522329

表 3 线粒体参考基因组来源  
Tab. 3 GenBank accession number of  
mitochondrial reference genome

种名 species	GenBank 登录号 GenBank accession no.
横纹东方鲀 <i>T. oblongus</i>	NC_011634.1
星点东方鲀 <i>T. niphobles</i>	NC_011625.1
潮际东方鲀 <i>T. snyderi</i>	NC_011630.1
密点东方鲀 <i>T. stictonotus</i>	NC_011629.1
弓斑东方鲀 <i>T. ocellatus</i>	NC_011635.1
豹纹东方鲀 <i>T. pardails</i>	NC_011627.1
痣斑东方鲀 <i>T. chrysops</i>	NC_011624.1
黄鳍东方鲀 <i>T. xanthopterus</i>	NC_011632.1
双斑东方鲀 <i>T. bimaculatus</i>	KP973944.1
紫色东方鲀 <i>T. porphyreus</i>	NC_011628.1
暗纹东方鲀 <i>T. fasciatus</i>	GQ409967.1
红鳍东方鲀 <i>T. rubripes</i>	NC_004299.1
菊黄东方鲀 <i>T. flavidus</i>	NC_025939.1
假睛东方鲀 <i>T. pseudommu</i>	NC_011633.1
虫纹东方鲀 <i>T. vermicularis</i>	NC_011631.1
虫斑东方鲀 <i>T. exascurus</i>	NC_011622.1
网纹东方鲀 <i>T. poechilonotus</i>	NC_011621.1

## 1.2 DNA 提取、文库构建及测序

采用标准的酚仿法对 72 尾野生个体进行基因组 DNA 提取<sup>[15]</sup>, 使用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳及 Qubit 4 核酸/蛋白质定量荧光计 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 进行 DNA 完整度检测和精确浓度定量。使用 Tn5 转座酶法构建全基因组重测序文库, 具体流程: 首先使用 Tn5-DNAseq 建库试剂盒 (AT4102-02, 开泰生物, 杭州) 对 10 ng 基因组 DNA 进行片段化, 终止反应后使用 VATHS DNA Clean Beads (N411-01, 诺唯赞, 南京) 进行产物纯化。随后, 每个个体使用通用正向引物及带有特异性 Index 的反向引物进行 12 个循环的 PCR 扩增。PCR 扩增体系含有 25.8 μL 的 DNA 片段、10 μL 的 PCR 缓冲液、4 μL 的 dNTP 混合液, 引物各 5 μL, Taq 酶 2.0 U。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用 VATHS DNA Clean Beads 进行片段筛选, 具体步骤: 首先使用 0.7 X 磁珠将 450 bp 以上的大片段 PCR 产物吸附在磁珠上, 然后再使用 0.1 X 磁珠将上清

液中 250 bp 以下的小片段产物及引物清洗干净。最终构建的文库经过 Agilent Bioanalyzer 2100 检测合格后使用 Hi-seq X Ten 平台测序, 文库平均插入片段长度约为 230 bp, 文库总长度分布范围为 250~450 bp。

## 1.3 东方鲀属线粒体基因组组装及基因分型

对 17 个东方鲀属线粒体基因组使用 Muscle (version 3.8.31) 软件进行比对, 生成整合后的东方鲀线粒体基因组 (*Takifugu\_MT*), 并使用 MITOS 线粒体在线注释平台 (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>) 完成东方鲀属线粒体基因组的注释。随后以整合后的东方鲀属线粒体基因组作为参考基因组, 使用 BWA<sup>[16]</sup> (version 0.7.17) 软件对全基因组重测序数据进行比对。再使用 samtools (version 1.8) 和 GATK (version 4.0.2.1) 软件进行线粒体基因分型。利用 vcftools<sup>[17]</sup> (version 0.1.13) 软件进行单核苷酸多态性位点 (SNP) 及插入缺失位点 (INDEL) 的过滤 (过滤参数: --mac 2; --max-alleles 2; --max-missing-count 2; --min-alleles 2)。同时, 使用 NOVOPlasty<sup>[18]</sup> 软件进行线粒体基因组组装。

## 1.4 系统发育和群体遗传结构分析

使用 ClustalW2<sup>[19]</sup> 对组装的东方鲀线粒体基因组进行序列比对, 外类群黑青斑河鲀 (*Tetraodon nigroviridis*) 的线粒体基因组也一起用于系统发育分析。此外根据 Wiens 等<sup>[20]</sup> 的建议, 从 GenBank 上下载的部分东方鲀线粒体基因组同时被包括在系统发育分析中。系统发育分析使用最大似然法 (Maximum likelihood; ML) 和贝叶斯法 (Bayesian) 来构建系统发育树, 其中 ML 进化树根据 Modeltest (version 3.7) 的评估结果, 使用 GTR+G+I 模型, 由 RAxML<sup>[21]</sup> (version 8.2.12) 软件构建, 采用 1 000 次重复抽样的自展值分析 (Bootstraps) 对分枝树的可靠性进行检验。使用 GATK (4.0.2.1) 软件, 根据 124 尾东方鲀的 SNP 位点进行主成分分析 (PCA)。使用 Arlequin 3.5 软件<sup>[22]</sup> 计算不同种东方鲀间的群体固定系数 (fixation index;  $F_{st}$ ), 而不同种之间的遗传距离使用 MEGA (version 7.0.26) 软件计算。计算  $F_{st}$  及  $d_i$  统计变量来表征各物种相对其他物种的分化程度<sup>[23]</sup>, 其计算公式:

$$F_{st} = \frac{H_T - H_S}{H_T}, \quad d_i = \sum_{j \neq i} \frac{F_{st}^{ij} - E[F_{st}^{ij}]}{sd[F_{st}^{ij}]}$$

式中,  $H_T$  表示所有群体中的杂合度,  $H_S$  表示物

种群杂合度的平均值,  $F_{st}^{ij}$  指物种  $i$  和物种  $j$  之间的群体固定系数,  $E[F_{st}^{ij}]$  和  $sd[F_{st}^{ij}]$  分别表示物种  $i$  和其余物种的群体固定系数期望和标准差。 $d_i$  是基于成对物种间  $F_{st}$  的无偏估计来评估物种间的特异性差异统计值, 该值越大表示该物种与其他物种分化程度越高。利用 Admixture (1.3.0) 软件进行群体结构分析, K 值范围为 1~20, 选择交叉熵最小的 K 值作为最佳分群。

### 1.5 遗传多样性及线粒体基因组选择压力分析

使用 vcfTools 计算核苷酸多样性位点及插入缺失位点的种间群体固定系数 ( $F_{st}$ ), 定位种间特异性遗传位点。使用 DnaSP 5.0 [24] 和 vcfTools 软件来计算不同群体的核苷酸多样性 ( $\pi$ ) 和平均核

苷酸变异数 (K)。13 个线粒体蛋白编码基因的非同义突变和同义突变比率 ( $Ka/Ks$ ) 使用 DnaSP 5.0 软件计算。

## 2 结果

### 2.1 线粒体组装及遗传变异位点挖掘

17 个东方鲀物种整合的 *Takifugu\_MT* 线粒体基因组全长 16 502 bp, GC 含量为 44.49%, 其包含 13 个蛋白编码基因、2 个核糖体 RNA (rRNA) 和 22 个转运 RNA (tRNA) (图 1)。以其为参考基因组, 124 尾东方鲀的重测序数据平均比对效率及测序深度分别为 0.3% 和 1 169.42 X; 使用 NOVO-Plasty 分别组装的 124 尾东方鲀的线粒体基因组,

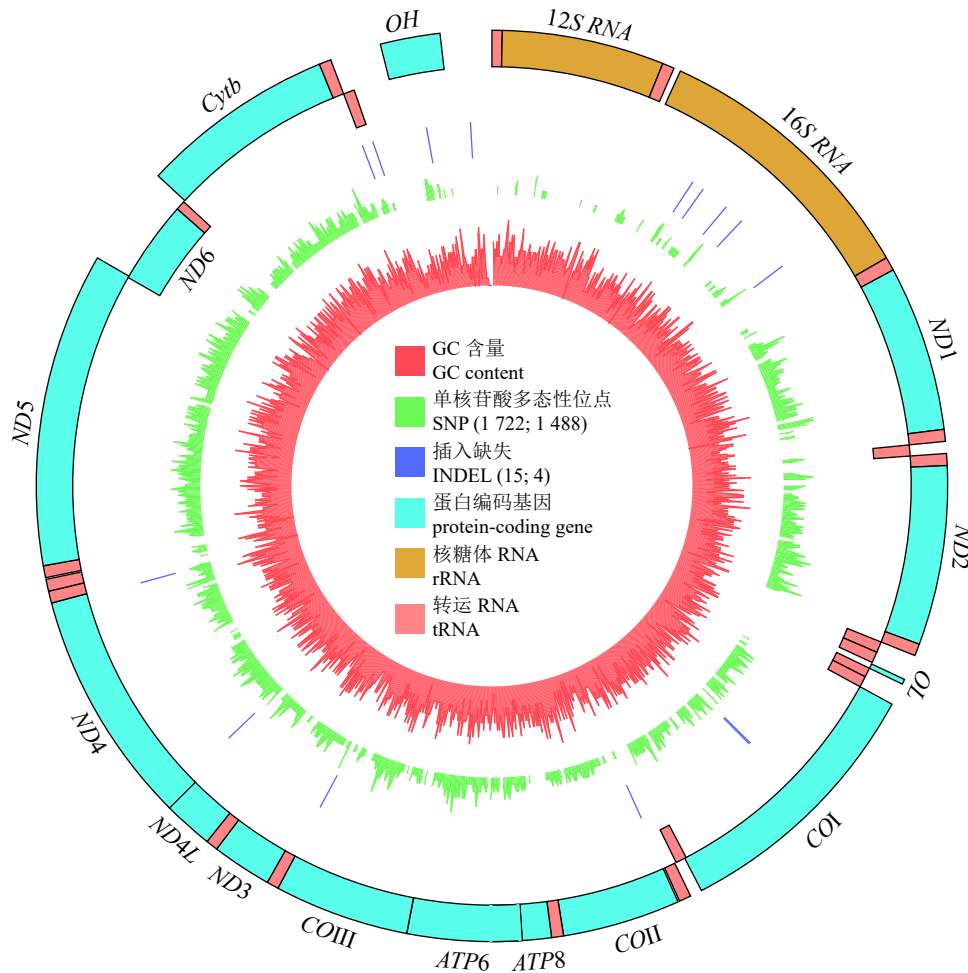


图 1 东方鲀属物种线粒体基因组示意图

单核苷酸多态性位点 (SNP) 及插入缺失位点 (INDEL) 后标注了分子标记数量 (红色) 及蛋白编码区域分子标记数量 (蓝色)

Fig. 1 Structure of *Takifugu* mitochondrial genome

The number of molecule markers (red) and the number of molecule markers in protein coding region (blue) are listed after SNP and INDEL

其平均长度为 16 445 bp。通过变异位点挖掘，在 124 尾东方鲀中共定位到了 1 722 个 SNP 位点和 15 个 INDEL 位点，其中 1 488 个 SNP 位点和 4 个 INDEL 位点位于 13 个蛋白编码基因内 (图 1)。

### 2.2 东方鲀系统发育分析

本研究中，用于进化树构建的线粒体基因组包括了 19 个种 142 尾个体 [包含外类群：1 尾

黑青斑河鲀，属鲀形目，四齿鲀亚目 (Tetraodontoidei)，四齿鲀科 (Tetraodontidae)，鲀属 ]，经 muscle 比对后，选择检出率为 100% 的 SNP 位点拼接为 1 417 bp 的序列进行系统发育树构建。ML 进化树表明 (图 2)，虫纹东方鲀位于东方鲀属鱼类系统发育最基部；铅点东方鲀、网纹东方鲀测序个体同虫斑东方鲀组成一个单独的姊妹群；其余物种中广泛栖息于日本海沿岸<sup>[6]</sup>的潮

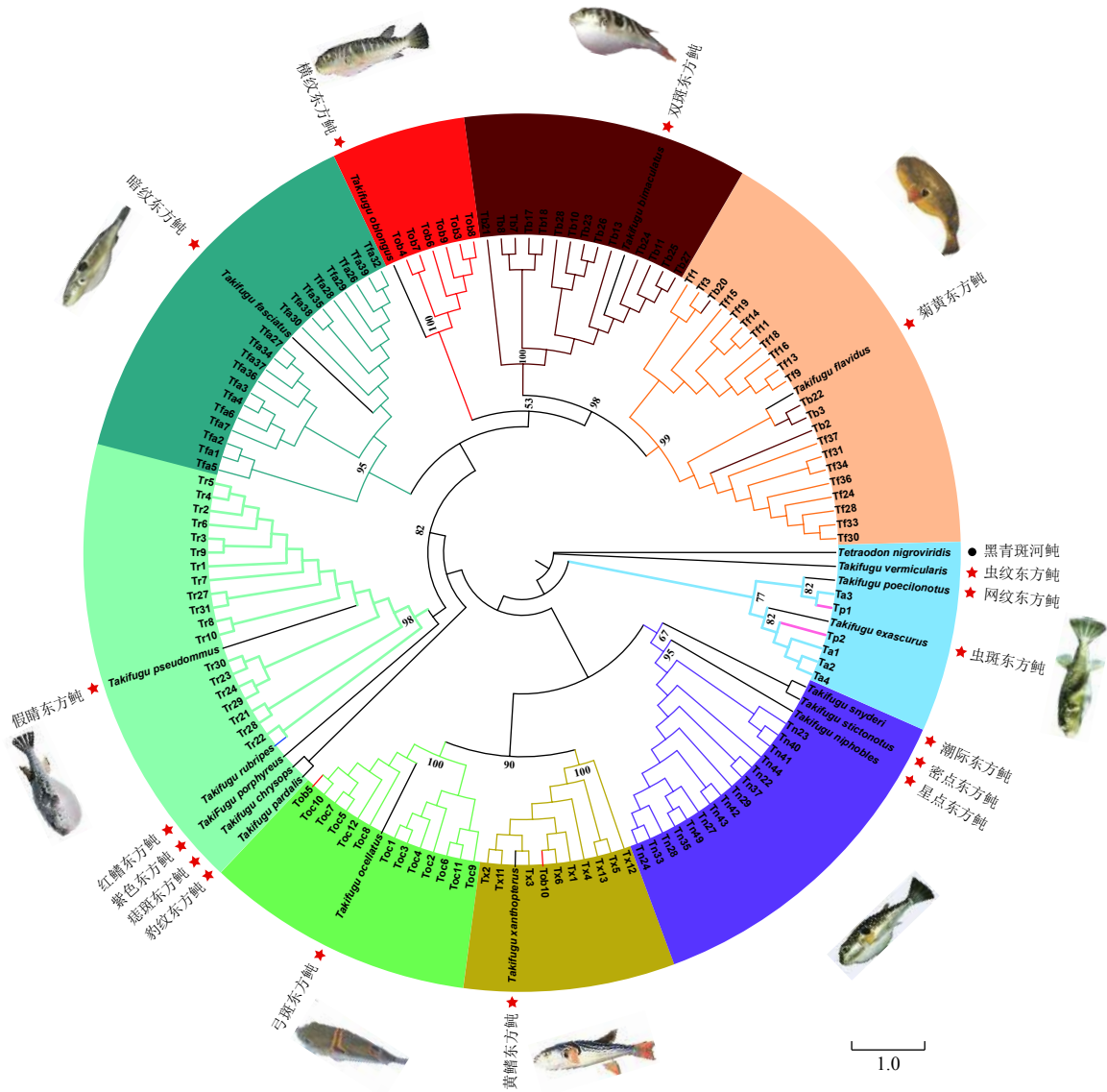


图 2 基于线粒体基因组构建的东方鲀物种系统发育进化树

红色星号表示 GenBank 数据库下载的线粒体序列；黑色圆圈表示外群物种；树上数值为自展值；Ta. 铅点东方鲀 (4 尾)；Tp. 网纹东方鲀 (2 尾)；Tn. 星点东方鲀 (15 尾)；Tx. 黄鳍东方鲀 (9 尾)；Toc. 弓斑东方鲀 (12 尾)；Tr. 红鳍东方鲀 (19 尾)；Tfa. 暗纹东方鲀 (19 尾)；Tob. 横纹东方鲀 (8 尾)；Tb. 双斑东方鲀 (18 尾)；Tf. 菊黄东方鲀 (18 尾)。图 5 同

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Takifugu* species based on mitochondrial genome

The red asterisk represents the mitochondrial sequence downloaded from GenBank database; the black circle represents the outgroup species, the values in the tree are Bootstrap estimates; Ta. *T. alboplumbeus* (4), Tp. *T. poeichilonotus* (2), Tn. *T. niphobles* (15), Tx. *T. xanthopterus* (9), Toc. *T. ocellatus* (12), Tr. *T. rubripes* (19), Tfa. *T. fasciatus* (19), Tob. *T. oblongus* (8), Tb. *T. bimaculatus* (18), Tf. *T. flavidus* (18). The same as Fig. 5

际东方鲀、密点东方鲀与星点东方鲀测序个体聚为一个姊妹群; 黄鳍东方鲀与弓斑东方鲀个体各自单独形成一个姊妹群; 红鳍东方鲀测序个体与假睛东方鲀和紫色东方鲀形成姊妹群, 而豹纹东方鲀和痣斑东方鲀聚为一支, 位于该姊妹群外部; 暗纹东方鲀和横纹东方鲀个体各自单独聚为一支; 菊黄东方鲀和双斑东方鲀各自单独形成一支后聚为一个姊妹群。此外, 研究发现 4 尾双斑东方鲀与菊黄东方鲀亲缘关系更近, 2 尾横纹东方鲀分别与弓斑东方鲀和黄鳍东方鲀亲缘关系更近, 推测这可能是自然环境下不同种东方鲀之间杂交导致的。

基于 124 尾东方鲀挖掘的 SNP 位点进行的 PCA 分析结果表明, PC1 至 PC4 的变异解释率

依次为 40.21%、33.39%、26.77% 和 23.05%; 根据 PC1 与 PC2, 发现菊黄东方鲀与双斑东方鲀、红鳍东方鲀与暗纹东方鲀、网纹东方鲀与铅点东方鲀各自聚为一支, 其余各物种单独聚为一支, 而 2 尾可疑的杂交横纹东方鲀分别与弓斑东方鲀和黄鳍东方鲀聚为一支; 根据 PC3 和 PC4, 双斑东方鲀与菊黄东方鲀分为两群, 但 4 尾可疑的杂交双斑东方鲀个体与菊黄东方鲀聚为一支, 2 尾可疑的杂交横纹东方鲀分别与弓斑东方鲀和黄鳍东方鲀聚为一支; 综合 4 个主成分的分析结果, 表明暗纹东方鲀与红鳍东方鲀、菊黄东方鲀与双斑东方鲀、网纹东方鲀与铅点东方鲀各自亲缘关系较近, 6 尾可疑的杂交个体分类情况与进化树证据一致 (图 3)。

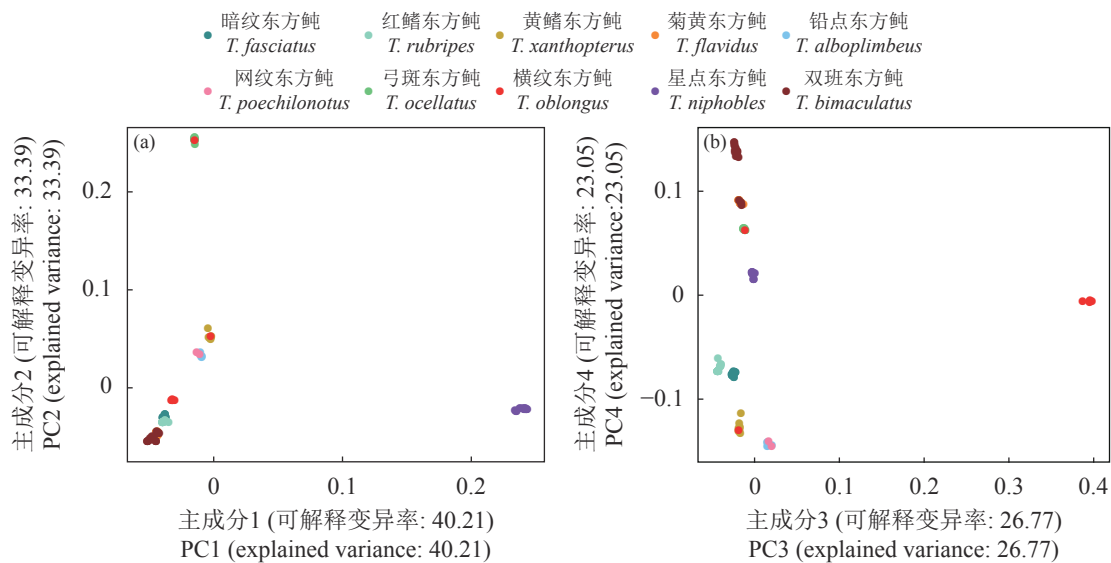


图 3 东方鲀物种主成分分析 (PCA) 散点图

Fig. 3 Scatter plots of principal component analysis (PCA) in *Takifugu* species

### 2.3 东方鲀群体遗传结构分析

为了评估不同东方鲀之间的物种分化程度, 首先基于线粒体基因组计算不同物种之间的群体固定系数和遗传距离, 为了保证可疑杂交个体不会影响物种分化程度的计算, 将其剔除出后续分析。东方鲀属鱼类物种间的遗传距离为 0.006 (网纹东方鲀与铅点东方鲀) 到 0.050 (星点东方鲀与横纹东方鲀) 之间,  $F_{st}$  值为 -0.137 (网纹东方鲀与铅点东方鲀) 到 0.984 (弓斑东方鲀与横纹东方鲀) (表 4)。系统发育分析显示的亲缘关系较近的几个东方鲀物种间对应的遗传距离和  $F_{st}$  值均较低。例如菊黄东方鲀与双斑东方鲀之间

的遗传距离为 0.018,  $F_{st}$  值为 0.830; 暗纹东方鲀与红鳍东方鲀之间的遗传距离为 0.024,  $F_{st}$  值为 0.921。根据两两物种间  $F_{st}$  值统计的  $d_i$  变量表征了各东方鲀的物种分化程度相对于其余东方鲀的种间分化偏差, 结果表明弓斑东方鲀与其他各物种整体分化偏差最高 ( $d_i = -1.123$ ), 而铅点东方鲀与其他物种的整体分化偏差最低 ( $d_i = 0.016$ )。

Admixture 分析进一步揭示了东方鲀种间及种内群体遗传结构, 选择交叉熵最小的  $K=14$  作为最佳分群 (图 4)。结果表明, 菊黄东方鲀与双斑东方鲀物种内部各自分为两个群体, 其中 4 尾可疑的杂交个体线粒体遗传结构与菊黄东方鲀

表 4 东方鲀属两两物种间的遗传距离(上半角)和群体固定系数(下半角)

Tab. 4 Pairwise Kimura 2-parameter distance (above diagonal) and  $F_{st}$  (below diagonal) between *Takifugu* species estimates of pairwise  $F_{st}$

物种 species	<i>Tfa</i>	<i>Toc</i>	<i>Tr</i>	<i>Tob</i>	<i>Tf</i>	<i>Ta</i>	<i>Tb</i>	<i>Tp</i>	<i>Tn</i>	<i>Tx</i>	<i>d<sub>i</sub></i>
<i>Tfa</i>	1.000	0.039	0.024	0.037	0.026	0.034	0.030	0.034	0.040	0.033	-0.674
<i>Toc</i>	0.951	1.000	0.039	0.048	0.038	0.041	0.042	0.041	0.047	0.038	-1.123
<i>Tr</i>	0.921	0.978	1.000	0.038	0.025	0.034	0.030	0.034	0.040	0.033	0.150
<i>Tob</i>	0.937	0.984	0.972	1.000	0.035	0.043	0.039	0.043	0.050	0.043	0.193
<i>Tf</i>	0.894	0.950	0.924	0.933	1.000	0.033	0.018	0.034	0.040	0.032	0.460
<i>Ta'</i>	0.906	0.957	0.946	0.932	0.902	1.000	0.037	0.006	0.043	0.034	0.016
<i>Tb</i>	0.898	0.948	0.929	0.928	0.830	0.892	1.000	0.037	0.043	0.036	0.080
<i>Tp</i>	0.905	0.963	0.951	0.935	0.901	-0.137	0.887	1.000	0.044	0.034	-0.065
<i>Tn</i>	0.937	0.965	0.958	0.958	0.935	0.929	0.932	0.930	1.000	0.041	-0.612
<i>Tx</i>	0.926	0.969	0.960	0.630	0.923	0.912	0.920	0.914	0.946	1.000	0.103

一致，这与之前的系统发育分析结果一致；暗纹东方鲀线粒体遗传群体结构单一；红鳍东方鲀分为 3 个群体，且不同群体间存在基因交流；横纹东方鲀除 2 尾可疑的杂交个体外，其余个体线粒体遗传结构单一，而 2 尾杂交个体线粒体遗传结构分别与黄鳍东方鲀和弓斑东方鲀一致；

铅点东方鲀与网纹东方鲀遗传结构则完全一致，这进一步证明了这两个物种之间分化程度最低，说明二者可能是同种异名；黄鳍东方鲀和弓斑东方鲀遗传结构均较为单一，但弓斑东方鲀向黄鳍东方鲀有轻微的基因渗入迹象；星点东方鲀与其余物种遗传结构完全分化，而其内部则

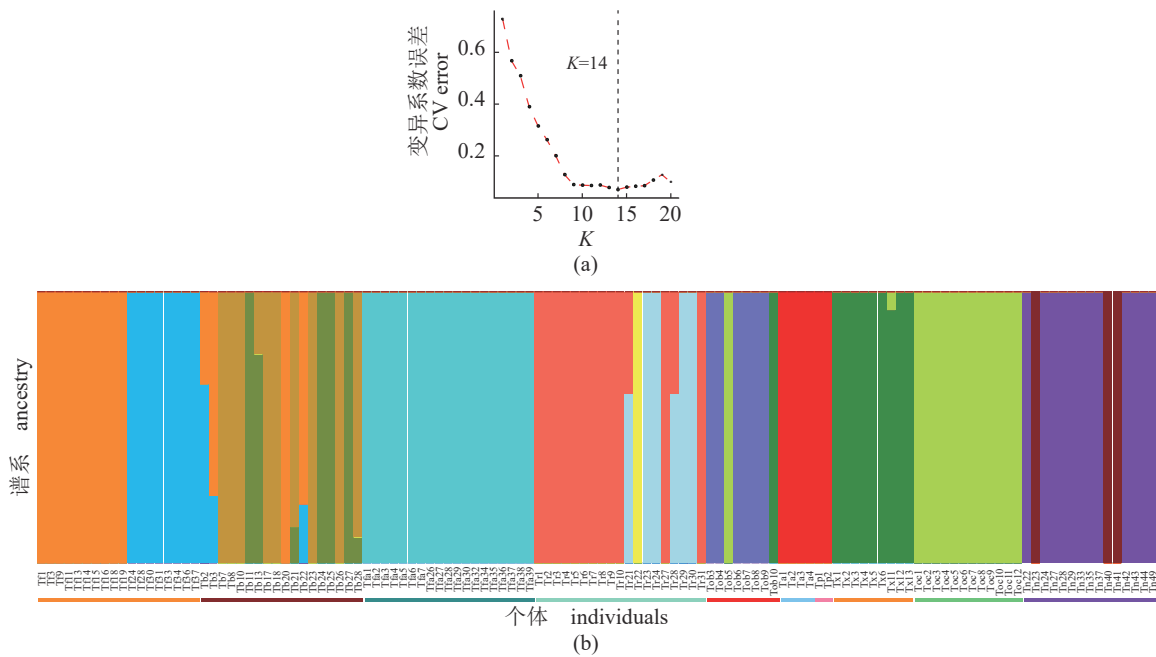


图 4 东方鲀物种 Structure 分析

(a) 为 K 值选取范围折线图，最终选择 14 作为最优 K 值

Fig. 4 Structure analysis of *Takifugu* species

(a) is a CV error line chart of K value. Finally, we choose K=14 as the optimal K value

分为两个不同的群体。

### 2.4 东方鲀遗传多样性分析

经统计, 除网纹东方鲀只有 2 个个体不具有统计学意义外, 双斑东方鲀群体的遗传变异位点数量最多, 共包含 139 个 SNP 和 5 个 INDEL, 其核苷酸多样性为  $2.16 \times 10^{-4}$ ; 弓斑东方鲀的遗传变异位点数量最少, 只有 19 个 SNP 和 2 个 INDEL, 其核苷酸多样性最低 ( $3.71 \times 10^{-5}$ ); 菊黄东方鲀的平均最小等位基因频率最高 ( $Freq=0.32$ ), 黄鳍东方鲀的平均最小等位基因频率最低 ( $Freq=0.12$ )

(表 5)。除此之外, 还进行了各东方鲀种间的线粒体特异性 SNP 位点挖掘, 结果发现在 10 个东方鲀物种中, 星点东方鲀、横纹东方鲀和弓斑东方鲀的种间特异性位点最多 ( $N_s$  分别为 140、124 和 108); 铅点东方鲀和网纹东方鲀并未找到种间特异性 SNP 位点, 这可能与 2 个种亲缘关系极近有关; 在遗传结构分析中, 亲缘关系较近的菊黄东方鲀和双斑东方鲀, 二者的种间特异性位点分别为 16 和 43 个, 均低于总体平均值 (59.5 个), 该结果进一步佐证了双斑东方鲀和菊黄东方鲀间具有相对较近的亲缘关系。

表 5 东方鲀属物种遗传多样性统计评估

Tab. 5 Evaluation of genetic diversity in *Takifugu* species

物种 species	<i>S</i>	<i>Ni</i>	<i>Freq</i>	<i>SD</i>	<i>Ns</i>	$\pi$	<i>K</i>
<i>Tfa</i>	86	2	0.23	0.12	56	$1.67 \times 10^{-4}$	4.53
<i>Tb</i>	139	5	0.17	0.11	43	$2.16 \times 10^{-4}$	9.92
<i>Tr</i>	90	2	0.13	0.12	49	$1.09 \times 10^{-4}$	4.74
<i>Tf</i>	76	1	0.32	0.17	16	$1.70 \times 10^{-4}$	4.22
<i>Tob</i>	29	3	0.24	0.13	124	$5.92 \times 10^{-5}$	3.63
<i>Toc</i>	19	2	0.24	0.13	108	$3.71 \times 10^{-5}$	1.58
<i>Ta</i>	132	1	0.24	0.13	0	$3.34 \times 10^{-4}$	33.00
<i>Tx</i>	90	1	0.12	0.07	59	$1.76 \times 10^{-4}$	10.00
<i>Tp</i>	123	1	0.5	0.5	0	$4.78 \times 10^{-4}$	61.5
<i>Tn</i>	95	4	0.17	0.08	140	$1.56 \times 10^{-4}$	6.33
平均 mean	87.9	2.2	0.24	0.16	59.50	$1.90 \times 10^{-4}$	13.95

注: *S*. 核苷酸多态性位点数量; *Ni*. 插入缺失位点数量; *Freq*. 平均核苷酸多态性位点最小等位基因频率; *SD*. 核苷酸多态性位点最小等位基因频率标准差; *Ns*. 物种特异性位点数量;  $\pi$ : 核苷酸多样性; *K*. 平均核苷酸变异数

Notes: *S*. the number of SNPs; *Ni*. the number of INDEL; *Freq*. the average minor allele frequency of SNPs; *SD*. the standard deviation of minor allele frequency of SNPs; *Ns*. the number of Species-specific SNPs;  $\pi$ . nucleotide diversity; *K*. mean number of mean nucleotide variant sites

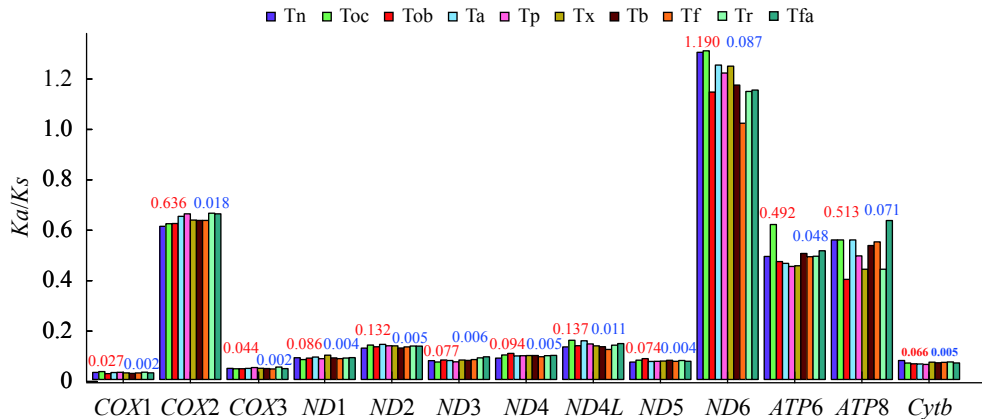


图 5 东方鲀物种线粒体基因选择压力分析

Fig. 5 Selection pressure analysis of mitochondrial genes in *Takifugu* species



## 2.5 东方鲀线粒体基因组选择压力分析

在东方鲀属中, *cox1* 基因的 *Ka/Ks* 最低(平均为 0.027), 其次为 *cox3*、*cytb*、*nd5*、*nd3*、*nd1* 和 *nd4* (*Ka/Ks* 分别为 0.044、0.066、0.074、0.077、0.086 和 0.094), 说明在东方鲀属中, 这些基因的选择压力较高; 而 *nd6* 基因的 *Ka/Ks* 最高(平均为 1.19), 说明在东方鲀属中该基因可能经历了正选择, 其次为 *cox2*、*atp6* 和 *atp8* (*Ka/Ks* 分别为 0.636、0.513 和 0.492), 说明在东方鲀属中上述基因受到的选择压力较小。13 个基因中 *nd6* 的 *Ka/Ks* 标准差最高(0.087), 其次为 *atp8*、*atp6* 和 *cox2* (*Ka/Ks* 分别为 0.071、0.048 和 0.018), 说明东方鲀物种中这些基因存在明显的种间选择压力差异; *cox1* 和 *cox3* 的 *Ka/Ks* 标准差最低(0.002), 其次为 *nd1*、*nd5*、*nd4*、*cytb* 和 *nd3* (*Ka/Ks* 分别为 0.004、0.004、0.005、0.005 和 0.006), 说明这些基因的种间选择压力差异较小。

## 3 讨论

### 3.1 东方鲀属鱼类系统发育关系

东方鲀是典型的适应性辐射物种, 该属物种在大约 180~530 万年前快速分化形成<sup>[5]</sup>, 随后在短时间内形成了适应不同生态位的多个近缘种, 这些近缘种的体形极其相似, 形态学上一般通过体色、花纹及腹部的皮刺分布来进行区分<sup>[25]</sup>。而东方鲀属鱼类多变的花色往往使人容易混淆, 这也造成了东方鲀属鱼类在分类学上存在有多个同种异名的案例<sup>[26]</sup>。因此有必要利用分子手段在群体尺度上进行细致的系统发育分析。本研究利用 10 个种的 124 尾东方鲀线粒体基因组、公共数据库中的 17 个东方鲀物种线粒体基因组及外类群黑青斑河鲀线粒体基因组进行了系统发育进化树构建及群体结构分析。本研究中铅点东方鲀位于系统发育树基部, 这与前人基于线粒体 D-loop 区域的研究结果一致<sup>[1]</sup>。但不同的是, 本研究中横纹东方鲀并未与铅点东方鲀形成姊妹群, 而是与双斑东方鲀和菊黄东方鲀形成的姊妹群聚为一支, 这与 Yamanoue<sup>[5]</sup> 基于 12S *rRNA* 和 *cytb* 构建的系统发育关系一致。此外, 星点东方鲀与密点东方鲀和潮际东方鲀形成姊妹群, 这 3 种东方鲀在形态学上全部具有体表遍布白色圆点的特点, 而与该姊妹群相邻分

支上的铅点东方鲀和网纹东方鲀在体表则具有不规则的白色斑块, 因此推测星点东方鲀、潮际东方鲀和密点东方鲀的共同祖先已经形成了体表密布的白色圆点。另外, 本研究中发现假睛东方鲀与红鳍东方鲀群体不能区分开, 这与崔建洲等<sup>[27]</sup> 基于微卫星以及刘振辉等<sup>[28]</sup> 基于 RAPD 技术的研究结果一致, 说明二者应该是同种异名。最后, 铅点东方鲀和网纹东方鲀在本研究中亲缘关系密切, 这与郜星晨<sup>[29]</sup> 的研究结果一致, 说明这两个物种的命名可能是同种异名。

### 3.2 东方鲀属鱼类线粒体基因选择压力

本研究中, 选择压力分析显示, *nd6* 基因在东方鲀属物种中 *Ka/Ks* > 1, 说明该基因受正选择影响较大, 而其他基因 *Ka/Ks* 均小于 1, 说明其余 12 个基因受负选择影响较大。而在其他硬骨鱼类线粒体基因组的研究中, *nd6* 一般都呈现正选择趋势, 例如, 在鳃科 (Engraulidae) 鱼类的线粒体基因选择压力分析中, 发现只有 *nd6* 基因呈现正选择趋势, 而其余 12 个蛋白质编码基因全部受到负选择的作用<sup>[30-31]</sup>。另外, 发现在 2 种具有淡水洄游性质的东方鲀线粒体基因中, 均有基因呈现出高于其他物种的受选择信号。在暗纹东方鲀中, *atp8* 基因 *Ka/Ks* 为 0.63, 高于其他 9 个东方鲀物种; 而在弓斑东方鲀中, *atp6* 基因 *Ka/Ks* 为 0.61, 同样远高于其他 9 个东方鲀物种。这说明 ATP 合成酶可能在二者从近岸半咸水环境向淡水环境适应性辐射的过程中受到了一定的选择作用。众所周知, 真核生物中的钠钾泵 ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP 酶) 是高等真核生物维持细胞离子的水泵和渗透压平衡的关键跨膜蛋白复合物<sup>[32]</sup>, 而弓斑东方鲀和暗纹东方鲀为了适应淡水环境, 分别在线粒体的两个不同的 ATP 合成酶基因上具有选择信号, 说明弓斑东方鲀和暗纹东方鲀在适应淡水环境之前已经形成物种分化。

### 3.3 自然条件下东方鲀的种间杂交

东方鲀属下物种由于遗传分化较小, 亲缘关系较近, 在自然环境下部分种之间广泛存在着杂交现象, 并且这种频繁的杂交事件加速了东方鲀物种的适应性辐射扩散和新物种形成<sup>[3]</sup>。尹璐等<sup>[33]</sup> 从东海自然海区中采集到的 15 尾外形相似的东方鲀属鱼类, 其中有 11 尾的斑纹兼具条状与点状, 利用线粒体 *COI* 基因以及和基因

组内含子序列对这些个体进行分析, 结果表明东海海区的东方鲀属鱼类存在天然杂交现象。Takahashi 等<sup>[6]</sup>使用 AFLP 技术和 mtDNA 标记在日本海的潮际东方鲀和密点东方鲀群体中发现大量的杂交个体, 且二者杂交的亲本配组呈现出不平衡性。

本研究中, 在 124 尾个体中检测到了 6 尾可疑的杂交个体, 其中 4 尾可疑的双斑东方鲀杂交个体线粒体基因组与菊黄东方鲀亲缘关系更近, 2 尾可疑的横纹东方鲀杂交个体分别与黄鳍东方鲀和弓斑东方鲀亲缘关系更近, 进一步的检测结果需要后续基于这些个体的全基因组重测序遗传变异位点进行甄别。本研究的系统发育结果也表明双斑东方鲀与菊黄东方鲀的亲缘关系较近, 二者在我国东海及黄海南部海域均属于广布种, 并且钟建兴等<sup>[34]</sup>在人工条件下已经实现了菊黄东方鲀和双斑东方鲀的正反杂交。此外尹璐等<sup>[33]</sup>针对东海杂交东方鲀的研究推测, 在自然条件下菊黄东方鲀极可能与双斑东方鲀存在杂交现象, 这说明在野生环境下, 二者在我国东海海域存在自然杂交现象。

综上所述, 本研究基于线粒体基因组, 在群体尺度上对 10 个东方鲀属物种的 124 尾个体进行系统发育分析, 结果表明东方鲀属内系统发育关系较为复杂, 且在野生环境下存在种间自然杂交现象, 该研究为东方鲀种间快速鉴定提供大量可靠的分子标记, 奠定了今后东方鲀属系统发育研究的坚实基础, 并为东方鲀野生种质资源保护提供了理论依据。

#### 参考文献 (References):

- [1] 张玉波, 甘小妮, 何舜平. 线粒体D-loop序列变异与东方鲀属鱼类系统发育[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(4): 656-663.  
Zhang Y B, Gan X N, He S P. Phylogenetic relationships of the genus *Takifugu* (Tetraodontiformes, Tetraodontidae) tested by mtDNA D-Loop region sequence variations[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(4): 656-663(in Chinese).
- [2] 王奎旗, 陈梅, 高天翔. 东方鲀属鱼类的分类与区系分布研究[J]. *青岛海洋大学学报*, 2001, 31(6): 855-860.  
Wang K Q, Chen M, Gao T X. Study on taxonomy and fauna of *Takifugu*[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2001, 31(6): 855-860(in Chinese).
- [3] 张玉波, 何舜平. 细胞色素b和12S rRNA基因序列变异与东方鲀属鱼类系统发育[J]. *科学通报*, 2008, 53(2): 233-244.  
Zhang Y B, He S P. Investigations into the perplexing interrelationship of the Genus *Takifugu* Abe, 1949 (Tetraodontiformes, Tetraodontidae)[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2008, 53(2): 233-244.
- [4] 孙莎莎, 唐文乔, 郭弘艺, 等. 长江靖江段沿岸水域的江海洄游性鱼类[C]//中国海洋湖沼学会、中国动物学会鱼类学分会 2012 年学术研讨会论文集. 兰州: 中国海洋湖沼学会, 中国动物学会, 2012: 67-68.  
Sun S S, Tang W Q, Guo H Y, *et al.* River-sea migratory fish in the coastal of the Jingjiang section of the Yangtze River[C]//Chinese Society for Oceanology and Limnology, Ichthyology Branch; China Zoological Society, Ichthyology Branch, Summary of 2012 Symposium Papers. Lanzhou: Chinese Society for Oceanology and Limnology, China Zoological Society, 2012: 67-68 (in Chinese).
- [5] Yamanoue Y, Miya M, Matsuura K, *et al.* Explosive speciation of *Takifugu*: another use of fugu as a model system for evolutionary biology[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2009, 26(3): 623-629.
- [6] Takahashi H, Toyoda A, Yamazaki T, *et al.* Asymmetric hybridization and introgression between sibling species of the pufferfish *Takifugu* that have undergone explosive speciation[J]. *Marine Biology*, 2017, 164(4): 90.
- [7] Aparicio S, Chapman J, Stupka E, *et al.* Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*[J]. *Science*, 2002, 297(5585): 1301-1310.
- [8] Gao Y, Gao Q, Zhang H, *et al.* Draft sequencing and analysis of the genome of pufferfish *Takifugu flavidus*[J]. *DNA Research*, 2014, 21(6): 627-637.
- [9] Zhou Z X, Liu B, Chen B H, *et al.* The sequence and de novo assembly of *Takifugu bimaculatus* genome using PacBio and Hi-C technologies[J]. *Scientific Data*, 2019, 6: 187.
- [10] 成庆泰, 王存信, 田明诚, 等. 中国东方鲀属鱼类分类研究[J]. *动物学报*, 1975, 21(4): 359-378, 398-399.  
Cheng Q T, Wang C X, Tian M C, *et al.* Studies on the Chinese Tetraodonoid fishes of the genus *fugu*[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1975, 21(4): 359-378, 398-399(in Chinese).
- [11] 王可玲, 张培军, 尹青. 东方鲀属鱼类肌浆蛋白的种间差异及其聚类的分析[J]. *海洋与湖沼*, 1984, 15(5): 493-

- 500.
- Wang K L, Zhang P J, Yin Q. Studies on the interspecific differences of myogen and cluster of the genus *fugu*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1984, 15(5): 493-500(in Chinese).
- [12] 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).
- [13] Song L S, Liu B Z, Xiang J H, *et al.* Molecular Phylogeny and species identification of pufferfish of the Genus *Takifugu* (Tetraodontiformes, Tetraodontidae)[J]. *Marine Biotechnology*, 2001, 3(4): 398-406.
- [14] 张玉波. 鲀形目(硬骨鱼纲, 鲀形目)鱼类若干类群的分子系统发育及分化时间估算 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2007.
- Zhang Y B. Molecular phylogenetics and divergence time estimations of several groups of Tetraodontiformes (Teleostei: Tetraodontiformes)[D]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2007 (in Chinese).
- [15] Zhou Z X, Han K H, Wu Y D, *et al.* Genome-wide association study of growth and body-shape-related traits in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) using ddRAD sequencing[J]. *Marine Biotechnology*, 2019, 21(5): 655-670.
- [16] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [17] Danecek P, Auton A, Abecasis G, *et al.* The variant call format and VCFtools[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(15): 2156-2158.
- [18] Dierckxsens N, Mardulyn P, Smits G. NOVOPlasty: *De novo* assembly of organelle genomes from whole genome data[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(4): e18.
- [19] Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX[J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2003(1): 2.3.1-2.3.22.
- [20] Wiens J J, Reeder T W. Combining data sets with different numbers of taxa for phylogenetic analysis[J]. *Systematic Biology*, 1995, 44(4): 548-558.
- [21] Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(9): 1312-1313.
- [22] Excoffier L, Lischer H E. 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.
- [23] Akey J M, Ruhe A L, Akey D T, *et al.* Tracking footprints of artificial selection in the dog genome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(3): 1160-1165.
- [24] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [25] Kato A, Doi H, Nakada T, *et al.* *Takifugu obscurus* is a euryhaline *fugu* species very close to *Takifugu rubripes* and suitable for studying osmoregulation[J]. *BMC Physiology*, 2005, 5(1): 18.
- [26] Liu Y F, Zhou Q, Liu H J, *et al.* The complete mitochondrial genome sequence of *Takifugu flavidus* (Tetraodontiformes: Tetraodontidae)[J]. *Mitochondrial DNA Part A-DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 2016, 27(1): 613-614.
- [27] 崔建洲, 申雪艳, 杨官品, 等. 红鳍东方鲀与假睛东方鲀的微卫星DNA多态性分析[J]. *高技术通讯*, 2005, 15(12): 90-96.
- Cui J Z, Shen X Y, Yang P G, *et al.* Genetic diversities of *T. rubripes* and *T. pseudommus* determined by microsatellites DNA variations[J]. *Chinese High Technology Letters*, 2005, 15(12): 90-96(in Chinese).
- [28] 刘振辉, 石拓, 柳学周, 等. RAPD标记鉴别红鳍东方鲀和假睛东方鲀种群的初步研究[J]. *海洋湖沼通报*, 1999(4): 38-42.
- Liu Z H, Shi T, Liu X Z, *et al.* Identification of three populations (Chinese *Fugu rubripes*, Japanese *Fugu rubripes* and *Fugu Pseudommus*) using RAPD markers[J]. *Transaction of Oceanology and Limnology*, 1999(4): 38-42(in Chinese).
- [29] 郜星辰. 基于线粒体 COI 序列的中国沿海鲀形目鱼类 DNA 条形码研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2015.
- Gao X C. DNA barcoding of Tetraodontiformes in coastal waters of China[D]. Guangzhou: Jinan University, 2015 (in Chinese).
- [30] 张丽丽. 基于线粒体序列分析长江刀鲚胭脂鱼的遗传结构及鲉科亚口鱼科的系统进化 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- Zhang L L. Genetic structure of *Coilia ectenes* and

- myxocyprinus asiaticus in Yangtze river and phylogeny of engraulidae and catostomidae fishes based on mitochondrial DNA sequences[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011 (in Chinese).
- [31] 张丽丽, 程起群. 鲷科鱼类线粒体全基因组序列结构特征及系统发育信息分析[J]. *海洋渔业*, 2012, 34(1): 7-14.
- Zhang L L, Cheng Q Q. Mitochondrial genome characteristics and phylogenetic information of family Engraulidae (Clupeiformes: Clupeoidei) fishes[J]. *Marine Fisheries*, 2012, 34(1): 7-14(in Chinese).
- [32] Alevizopoulos K, Calogeropoulou T, Lang F, *et al.* Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase inhibitors in cancer[J]. *Current Drug Targets*, 2014, 15(10): 988-1000.
- [33] 尹璐, 龚小玲, 鲍宝龙. 东海海区东方鲀属鱼类的杂交现象[J]. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(3): 359-366.
- Yin L, Gong X L, Bao B L. Occurrence of hybrid among *Takifugu* in East China Sea[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(3): 359-366(in Chinese).
- [34] 钟建兴, 钟然, 杨盛昌. 菊黄东方鲀和双斑东方鲀及其种间杂交子代的ISSR分析[J]. *台湾海峡*, 2008, 27(2): 152-155.
- Zhong J X, Zhong R, Yang C S. ISSR analysis on two species of *fugu* and their hybrid descendants[J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2008, 27(2): 152-155(in Chinese).

## Phylogeny and population genetics of species in *Takifugu* genus based on mitochondrial genome

ZHOU Zhixiong<sup>1</sup>, LIU Bo<sup>2</sup>, GONG Jie<sup>1</sup>, BAI Yulin<sup>1</sup>, YANG Junyi<sup>1</sup>, XU Peng<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Biology Genetics and Breeding, Xiamen University, Xiamen 361102, China;

2. Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361000, China)

**Abstract:** *Takifugu*, belonging to Tetraodontidae in Tetraodontiformes, is the typical adaptive radiation species, and there were about twenty *Takifugu* species along the coast of China. In this study, phylogeny and population genetics of *Takifugu* species were analyzed based on population scale for the first time. Using mitochondrial genome, we obtained 1, 488 SNPs and 4 INDELS in 124 individuals of 10 *Takifugu* species. The phylogeny and population genetics analysis showed that *T. poechilonotus* and *T. alboplumbeus* could be synonymous, and the sister group of these two species was located at the base of phylogeny tree. Besides, we found that the relationships between *T. rubripes* and *T. fasciatus*, *T. flavidus* and *T. bimaculatus* were close. In addition, we detected 4 *T. bimaculatus* individuals which possibly were the hybrid progenies with *T. flavidus*, and 2 hybrid suspect *T. oblongus* individuals. For genetic diversity, we found that *T. alboplumbeus* has the lowest diversity. Moreover, we identified 595 species-specific SNPs in 10 *Takifugu* species. The *Ka/Ks* analysis showed that *cox1* had the lowest *Ka/Ks*, and the *Ka/Ks* of *nd6* was 1.19, which indicated that *nd6* possibly has undergone positive selection. Besides, the ATP synthetase might be under selection in the process of adapting to fresh water of *T. ocalletus* and *T. fasciatus*. This study showed that the phylogenetic relationship of *Takifugu* was complicated. Although the natural hybridization between species was common in the wild, this study can provide reliable molecular markers for the rapid identification of *Takifugu* species, and provide a solid foundation for the study of the *Takifugu* phylogeny in the future.

**Key words:** *Takifugu*; mitochondrial genome; SNP; phylogeny; *Ka/Ks*

**Corresponding author:** XU Peng. E-mail: xupeng77@xmu.edu.cn

**Funding projects:** Innovation and Industrialization Project of Takifugu Breeding Industry, Fujian Province (2017FJSCZY03)