



黄鳍棘鲷线粒体 D-loop 序列的遗传结构

何震晗^{1,2}, 肖 珊³, 王韶韶¹, 陈慧芳^{1,2}, 苏绍萍², 赵永贞²,
杨春玲², 曾地刚², 朱威霖², 陈秀荔², 马华威²,
蒋伟明², 刘青云², 李强勇², 彭 敏^{2*}

(1. 广西大学动物科学技术学院, 广西南宁 530005;

2. 广西壮族自治区水产科学研究院, 广西遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西南宁 530021;

3. 广西壮族自治区水产引育种中心, 广西南宁 530031)

摘要: 为探明分布于我国华南沿海的黄鳍棘鲷群体的遗传多样性与遗传分化状况, 实验采用线粒体控制区 (D-loop) 基因序列分析华南沿海的厦门、汕尾、阳江、海口、三亚、北海、钦州和防城港 8 个地理位置的黄鳍棘鲷群体的遗传多样性及群体遗传结构。结果显示, 黄鳍棘鲷 8 个群体 320 条 D-loop 序列全长为 947~958 bp。共检测到 29 个插入或缺失位点和 210 个变异位点, 其中简约信息位点 142 个, 单一变异位点 68 个; 总体的变异位点、单倍型数、单倍型多样性 (H_d)、平均核苷酸差异和核苷酸多样性 (π) 分别为 210、268、0.998 43、14.790 65 和 0.015 70。聚类分析结果显示, 8 个群体被聚类为以琼州海峡分隔的东和西两个组群; 8 个群体间的遗传分化系数 (F_{ST}) 为 -0.012 68~0.466 74, 基因流 (N_m) 为 0.571 26~ ∞ 。方差分析显示组群间、组群内群体间和群体内个体间的核苷酸遗传变异分别为 33.42%、0.32% 和 66.26%。中性检验显示 Tajima's D 为 -1.694 77, Fu's F_s 为 -23.683 39, 表明华南沿海黄鳍棘鲷经历了种群扩张事件。研究表明, 中国华南沿海黄鳍棘鲷群体遗传多样性比较丰富, 根据研究结果可以以琼州海峡为分界分为东组群和西组群 2 个管理单位进行种质保护。

关键词: 黄鳍棘鲷; D-loop 序列; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

黄鳍棘鲷 (*Acanthopagrus latus*) 隶属鲈形目 (Percoiformes) 鲷科 (Sparidae) 棘鲷属 (*Acanthopagrus*), 俗称黄墙、黄脚立和赤翅等^[1]。黄鳍棘鲷为浅海暖水性底层鱼类, 产于太平洋及印度洋的温带至热带海域, 广泛分布于中国、日本、朝鲜、菲律宾和科威特等地, 在我国主要分布于东南沿海^[2-3]。黄鳍棘鲷肉质鲜美、营养价值较高, 口感极佳, 是一种名贵的海洋经济鱼类,

也是我国海水和咸淡水养殖的重要对象^[4]。

线粒体 DNA D-loop, 又称线粒体 DNA 控制区, 是 mtDNA 的非编码区, 不受自然选择压力的影响, 具有较高的突变积累, 适用于进行种内、种群或个体间遗传多样性的研究^[5-6]。线粒体 DNA 与核 DNA 相比, 具有分子量小、结构简单、不同区域进化速率不同等特点, 是水产物进化遗传学、分子生态学、遗传多样性及其

收稿日期: 2019-12-25 修回日期: 2020-05-29

资助项目: 广西创新驱动发展专项 (桂科 AA17204088)

第一作者: 何震晗 (照片), 从事水生动物种质资源研究, E-mail: 120514259@qq.com

通信作者: 彭敏, E-mail: 837969487@qq.com



保护生物学等研究的重要标记^[7-8]。吕子君等^[9]基于线粒体 DNA D-loop 区对青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*) 遗传多样性进行分析, 研究表明东山湾青石斑鱼种群的遗传多样性处于中等水平; 傅建军等^[10]采用微卫星标记和线粒体 D-loop 部分序列对 3 种泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 进行群体遗传变异分析, 结果表明泥鳅和大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 在遗传结构上存在明显差异; Chan 等^[11]基于线粒体 DNA D-loop 序列对青藏高原软刺裸鲤 (*Gymnocypris dobula*) 进行了遗传多样性分析, 结果表明羊湖和拉萨群体具有较近的亲缘关系。学者们也对黄鳍棘鲷的遗传学进行了研究, 刘红艳等^[12]对海口、厦门和珠海 3 个地理群体海捕黄鳍棘鲷线粒体 D-loop 基因进行了多态性分析; Xia 等^[13]对中国水域黄鳍棘鲷 mtDNA 控制区的序列变异进行了遗传分析; 龚金波^[14]基于线粒体 DNA D-loop 控制区序列, 认为深圳、厦门和北海 3 个黄鳍棘鲷地理群体应为 2 个地理种群, 北海群体为一单独种群, 而厦门和深圳群体为另一种群。近年来, 鲜有黄鳍棘鲷遗传多样性的相关跟踪研究报道。受商业活动过度捕捞和增殖放流等人为因素的影响, 我国华南沿海黄鳍棘鲷群体遗传多样性受到严峻考验, 为了恢复与保护黄鳍棘鲷海洋资源, 对黄鳍棘鲷遗传结构变化的长期跟踪研究显得尤为重要。本研究拟基于线粒体 DNA D-loop

序列对我国华南沿海不同群体黄鳍棘鲷的遗传多样性进行分析, 并探讨其群体演化历史与分布动态, 评估我国黄鳍棘鲷种质资源状况, 为黄鳍棘鲷的资源保护与恢复、人工育种以及自然海区增殖放流工作等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象

黄鳍棘鲷样本于 2019 年采自华南沿海 8 个地点, 分别为厦门 (XM)、汕尾 (SW)、阳江 (YJ)、海口 (HK)、三亚 (SY)、北海涠洲岛 (BH)、钦州 (QZ) 和防城港 (FC), 共 320 尾。每尾取约 5 g 肌肉样本于 95% 酒精中固定保存备用。样本数量见表 1。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增与测序

取 50 mg 黄鳍棘鲷肌肉组织, 采用醋酸铵法^[15]提取总 DNA, 用微量核酸蛋白分析仪测量 DNA 浓度, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 经检测合格的 DNA 模板保存于 -20 °C 冰箱备用。根据黄鳍棘鲷线粒体 DNA 全长序列 (GenBank 登录号: EF506764.1) 设计巢式 PCR 引物, F1: 5'-TGCCTGTTGAAGAGCCCTAT-3', R1: 5'-CCACCCTTTACGCCGACT-3', F2: 5'-GGG ATTTCAACCCTTACT-3', R2: 5'-AGGGAAC

表 1 黄鳍棘鲷群体线粒体 D-loop 序列的遗传信息

Tab. 1 Genetic information of mtD-loop sequence of *A. latus*

群体 population	样本数/尾 sample number	变异位点 variable locus	单倍型数 haplotype numbers	单倍型多样性(H_d) haplotype diversity	平均核苷酸差异 mean nucleotide difference	核苷酸多样性(π) nucleotide diversity
北海 BH	40	83	40	1.000 00	13.617 95	0.014 46
防城港 FC	40	84	38	0.997 44	12.517 95	0.013 29
海口 HK	40	84	40	1.000 00	12.248 72	0.012 95
钦州 QZ	40	87	39	0.998 72	9.258 97	0.009 83
汕尾 SW	40	91	40	1.000 00	11.760 26	0.012 48
三亚 SY	40	85	39	0.998 72	11.647 44	0.012 36
厦门 XM	40	83	39	0.998 72	12.175 64	0.012 93
阳江 YJ	40	85	32	0.988 46	12.135 90	0.012 88
琼州海峡以西(WEST) West of Qiongzhou Strait (WEST)	120	146	107	0.997 62	12.015 41	0.012 76
琼州海峡以东(EAST) East of Qiongzhou Strait (EAST)	200	165	169	0.997 59	11.922 91	0.012 66
总计 total	320	210	268	0.998 43	14.790 65	0.015 70

TACAGGGCATT-3'; 首次 PCR 反应体系为 10.0 μL , 包括 2 \times Ex Taq Mastermix Buffer 5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上、下游引物 F1、R1 各 0.4 μL , 40 ng DNA 模板, ddH₂O 补足 10 μL , 退火温度为 63 $^{\circ}\text{C}$ 。巢式 PCR 反应体系 50.0 μL , 包括 2 \times Ex Taq Mastermix Buffer 25 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上、下游引物 F2、R2 各 2 μL , 稀释 50 倍的第 1 次 PCR 产物模板 2 μL , ddH₂O 补足 50 μL , 退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 。经琼脂糖凝胶电泳检测合格的 PCR 扩增产物送至深圳华大基因公司测序。

1.3 数据分析

序列分析 测序所获得的序列采用 Chromas 2.33 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) 程序进行人工编辑、校对峰图与碱基对应关系, 剪切非研究区域序列。编辑后的序列用 DNAstar 中的 SeqMan 7.1.0 程序 (<https://www.dnastar.com/>) 拼接, 获得 D-loop 全长序列, 采用 MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>) 软件分析序列的碱基组成及变异位点。

单倍型及遗传多样性分析 用 DnaSP 5.10 (<http://www.ub.edu/dnasp/>) 软件统计单倍型 (h)、 H_d 和 π 。

群体系统进化关系以黑棘鲷 (*A. schlegelii*) (GenBank 登录号: NC_018553.1) D-loop 序列作为外群, 利用 MEGA X 软件分析序列计算 Kimura 2-parameter 遗传距离并构建群体单倍型的 NJ (Neighbor-Joining) 系统进化树及群体间聚类分析。

群体遗传结构采用 3 种方法进行分析: ①采用遗传距离、基因流 (N_m) 和遗传分化指数 (F_{ST}) 评价两两群体间的遗传差异, 重复抽样 10 000 次以检验 F_{ST} 结果的显著性; ②根据样品来源, 将黄鳍棘鲷 8 个群体划分为琼州海峡东组群 (EAST, HK、SY、YJ、SW、XM) 和琼州海峡西组群 (WEST, FC、QZ、BH) 进行分子方差分析 (AMOVA), 估算遗传变异的分布, 10 000 次随机重复抽样后进行显著性分析; ③通过种群分化测试 (exact test of population differentiation) 进行随机交配群 (population panmixia) 假设, 即单倍型在群体间随机分布的检验。

群体历史动态采用 2 种方法进行检测: ①采用 Tajima's D ^[16] 检验和 Fu's F_s ^[17] 检验检测中性假说是否成立, 10 000 次随机重复抽样后进行差异显著性分析 ($P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著); ②根据公式 $t = T\tau/2u$ ^[18] 计算群体自扩

张到现在的时间 t 。式中, T 为世代时间, τ 为扩张时间参数 (在 Arlequin 软件中根据核苷酸错配分布计算获得); u 为序列的突变速率; $u = 2\mu k$; k 为序列长度, μ 为每个核苷酸位点的突变速率 (每百万年为 1.0%~2.5%^[19])。

2 结果

2.1 mtDNA D-loop 序列分析及遗传多样性分析

经比对, 获得的黄鳍棘鲷 8 个群体 320 条 D-loop 全长序列为 947~958 bp, 碱基 T、C、A 和 G 的平均含量分别为 31.8%、21.4%、32.0% 和 14.7%, 其中 A+T (63.8%) 高于 C+G (36.1%), 表现出较强的少 G 偏倚性, 符合脊椎动物线粒体 DNA 序列特征。黄鳍棘鲷 D-loop 全长序列有 29 个插入或缺失位点, 在不考虑插入、缺失和 Poly(T) 的条件下共检测到 210 个变异位点, 占总位点数的 22.32%, 其中简约信息位点 142 个, 单一变异位点 68 个; 8 个群体的多态性位点数量接近, 最多的为 SW 群体 (93 个), XM 和 BH 群体变异位点最少 (83 个)。其中 210 个替换中, 180 个为转换、15 个为颠换, 15 个既有转换又有颠换, 转颠换比 R 值为 6.5, 说明此基因序列突变未达到饱和状态, 受进化噪音的影响可能性较小。不计插入或缺失位点, 黄鳍棘鲷 8 个群体的 320 条 D-loop 基因序列定义 268 个单倍型, 没有明显的优势单倍型。238 个单倍型为群体独享, 30 个共享单倍型中, 24 个单倍型为 2 个群体共享, 3 个单倍型为 3 个群体共享, 另 3 个单倍型为 4 个群体共享, 没有 1 个单倍型为所有群体共享。30 个共享单倍型中, 16 个单倍型为琼州海峡以东的 EAST 组群共享, 6 个单倍型为琼州海峡以西的 WEST 组群共享, 8 个单倍型为琼州海峡两侧的 EAST 和 WEST 组群共享。

采用 DNASP 5.10 软件对黄鳍棘鲷 8 个群体进行单倍型多样性和核苷酸多样性分析 (表 1)。其中, 8 个群体的单倍型多样性为 0.988 46~1.000 00, BH、HK 和 SW 群体 H_d 指数最高, 为 1.000 00, 其次为 SY、XM 和 QZ 群体, 均为 0.998 72, YJ 群体最低, 为 0.988 46; π 为 0.009 83~0.014 46, 最高为 BH 群体, 为 0.014 46, 其次为 FC 群体和 HK 群体, 分别为 0.013 29 和 0.012 95, 最低为 QZ 群体 (0.009 83)。WEST 组群和 EAST 组群的单倍型多样性分别为 0.997 62 和 0.997 59, 核苷酸多样性分别为 0.012 76 和 0.012 66, 两个组

群差距不大。将所有样本作为一个整体进行数据分析， H_d 指数为 0.998 43， π 为 0.015 70。

2.2 群体系统进化关系

根据黄鳍棘鲷 D-loop 全序列，以黑棘鲷为外群，利用 MEGA X 软件，基于 Kimura 2-parameter 构建 NJ 关系树 (图 1)，结果显示，268 个单倍型分为关系极近的 4 支 (Group A、Group B、Group C 和 Group D)，大部分长支的支持率均小于 50%，只有极少数两两单倍型分支支持率超

过 50%。不同群体的单倍型没有按取样地点有规律地分布在关系树上，但大部分单倍型按琼州海峡东、西海域分布在关系树上。聚类分析结果也表明，黄鳍棘鲷 8 个群体被琼州海峡分隔为 2 个部分 (图 2)。Group D 所含个体数较少，由 1 个 WEST 组群个体和 6 个 EAST 组群个体组成，Group A 和 Group B 包含了 EAST 组群绝大部分个体，分别为 83.70% 和 94.37%，Group C 含有 86.92% 的 WEST 组群个体。



图 1 基于 UPGMA 的黄鳍棘鲷单倍型群体的聚类图

BH、QZ、FC、HK、SY、YJ、SW、XM、WEST 和 EAST 分别代表北海涠洲岛、钦州、防城港、海口、三亚、阳江、汕尾、厦门、琼州海峡以西群体和琼州海峡以东群体，Group A、Group B、Group C 和 Group D 分别代表单倍型类群 A、B、C 和 D，下同

Fig. 1 Sample collection and distribution of *A. latus* along South China coast

Haplotype system tree of *A. latus* populations is based on UPGMA. BH, QZ, FC, HK, SY, YJ, SW and XM represent Weizhou Island, Qinzhou, Fangcheng, Haikou, Sanya, Yangjiang, Shanwei, Xiamen, populations of west of Qiongzhou Strait, populations of east of Qiongzhou Strait; Group A, Group B, Group C and Group D represent haplotype group A, B, C and D. The same below

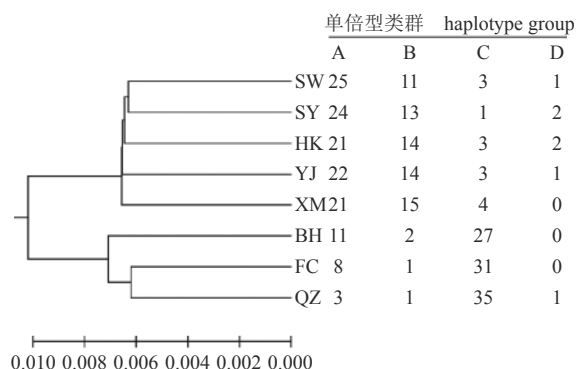


图 2 8 个群体聚类分析图

Fig. 2 Cluster analysis of 8 geographic groups

2.3 群体遗传结构

利用 MEGA X 软件分析测序获得的 320 尾样品的 mtDNA D-loop 序列, 得到 8 个群体间的

遗传距离 (表 2)。结果显示, 群体内遗传距离为 0.010 30~0.015 33, 依次为 BH>FC>HK>YJ>XM>SW>SY>QZ。QZ 群体和 SY 群体间的遗传距离最远, 为 0.022 26, 遗传距离最近的为 QZ 群体和 FC 群体 (0.012 40)。遗传分化指数和基因流分析结果显示, 8 个群体间的 F_{ST} 为 -0.012 68~0.466 74, QZ 与 SY 群体的遗传分化程度最大, 而 SY 与 HK 群体之间的遗传分化程度最小且为负值 (表 3), 在 EAST 组群中, F_{ST} 均小于 0.05, 且不显著, 在 WEST 组群中, 最大分化出现在 BH 与 QZ 群体 ($F_{ST}=0.062 04$, $P<0.01$), 而 WEST 与 EAST 组群间的两两群体间的遗传分化系数为 0.223 00~0.466 74。8 个群体间的基因流为 0.571 26~ ∞ 。相较组群内, 组群间的遗传距离和遗传分化指数较大、基因流值较小。

表 2 群体间 (对角线下方) 和群体内 (对角线) 的遗传距离

Tab. 2 Genetic distance between (lower-left) and within (diagonal) populations N_m (upper-right)

群体 population	FC	QZ	BH	HK	SY	YJ	SW	XM
FC	0.013 98							
QZ	0.012 40	0.010 30						
BH	0.014 63	0.013 70	0.015 33					
HK	0.020 16	0.021 66	0.018 89	0.013 31				
SY	0.020 54	0.022 26	0.019 17	0.012 86	0.012 76			
YJ	0.020 24	0.021 81	0.018 95	0.013 19	0.013 01	0.013 30		
SW	0.020 38	0.022 09	0.019 07	0.012 94	0.012 63	0.013 04	0.012 77	
XM	0.020 07	0.021 52	0.018 75	0.013 17	0.012 93	0.013 32	0.013 06	0.013 28

表 3 遗传分化指数 (对角线下方) 及其基因流 (对角线上方)

Tab. 3 F_{ST} value (lower-left) and N_m (upper-right)

群体 population	FC	QZ	BH	HK	SY	YJ	SW	XM
FC		23.138 54	∞	1.131 24	0.994 90	1.109 42	1.027 06	1.151 06
QZ	0.021 15		7.559 74	0.643 75	0.571 26	0.630 42	0.584 94	0.654 73
BH	-0.001 76	0.062 04**		1.679 22	1.450 43	1.645 11	1.497 58	1.742 18
HK	0.306 52**	0.437 16**	0.229 44**		∞	∞	∞	∞
SY	0.334 47**	0.466 74**	0.256 35**	-0.012 68		∞	∞	∞
YJ	0.310 67**	0.442 32**	0.233 09**	-0.008 53	-0.001 40		∞	207.927 63
SW	0.327 43**	0.460 86**	0.250 30**	-0.009 60	-0.012 50	-0.003 57		∞
XM	0.302 83**	0.433 00**	0.223 00**	-0.009 92	-0.006 79	0.002 40	-0.001 19	

注: * 差异显著 ($P<0.05$); ** 差异极显著 ($P<0.01$)。下同

Notes: *. significant difference ($P<0.05$), **. extremely significant difference ($P<0.01$), the same below

根据样品来源, 将 8 个黄鳍棘鲷群体划分为琼州海峡以东 EAST (HK、SY、YJ、SW、XM) 和琼州海峡以西 WEST (FC、QZ、BH) 2 个组群, 通过分子方差分析 (AMOVA) 计算遗传变异分布 (表 4), 结果显示组群间、组群内群体间和群体内个体间的核苷酸遗传变异分别为 33.42%、0.32% 和 66.26%, 且统计检验均显著 ($P < 0.05$), 进一步

表明 EAST 和 WEST 组群内群体间分化较小, 组群间由于地理隔离被限制了基因交流, 而 WEST 和 EAST 组群内群体基因的交流不受限制, 无群体分化。将所有黄鳍棘鲷个体按单倍型类群分为 4 部分 (Group A、Group B、Group C 和 Group D) 进行 AMOVA 分析, 结果显示 65.13% 的变异来自单倍型类群群体间。

表 4 AMOVA 分析

Tab. 4 Analysis of molecular variances (AMOVA)

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	变异组分 variance components	变异百分率 % percentage of variation	遗传分化指数 F_{ST}
组群间 among groups	1	457.863	3.005 03	33.42	0.334 23*
组群内群体间 among populations within groups	6	42.647	0.028 77	0.32	0.004 81**
群体内 within populations	312	1858.600	5.957 05	66.26	0.337 43**
总计 total	319	2359.109	8.990 85		
单倍型类群间 among haplotype groups	3	1314.622	6.172 84	65.13	0.651 27**
单倍型类群内 within haplotype groups	316	1044.487	3.305 34	34.87	
总计 total	319	2359.109	9.478 18		

Exact test 检验结果显示, 单倍型在群体间的随机交配假设检验水平出现不均匀, 其在 EAST 和 WEST 两个组群间为差异极显著 ($P < 0.001$), 不符合单倍型在组群内群体间是随机分布的假设, 而在 WEST 和 EAST 组群内差异不显著 ($P > 0.05$), 符合单倍型分别在 WEST 和 EAST 组群内群体间是随机分布的假设, 与分子方差分析结果一致。

2.4 群体动态分析

本研究采用无限突变位点模型的值 Tajima's D 和 Fu's F_s 、线粒体 DNA 单倍型错配分布等方

法同时调查黄鳍棘鲷的历史变动。4 个单倍型类群中, 除了 Group D 外, 其余个体数占绝大部分的 3 个单倍型类群的 Tajima's D 和 Fu's F_s 检验结果均为显著负值, 总体 Tajima's D 和 Fu's F_s 检验结果也为显著负值 (表 5)。核苷酸错配分析中, Group A、Group B 和 Group C 均为单峰分布, Group D 为双峰分布, 而总体呈多峰分布可能是多个单倍型类群叠加的结果 (图 3)。Tajima's D 和 Fu's F_s 检验以及核苷酸错配分析均表明中国华南沿海黄鳍棘鲷群体可能都经历了种群扩张事件。Arlequin 分析 Group A、Group B 和 Group

表 5 黄鳍棘鲷 D-loop 序列 Tajima's D 和 Fu's F_s 检验Tab. 5 Tajima's D and Fu's F_s test of *A. latus* mtRNA D-loop

类群 groups	个体数 numbers	Tajima's D 中性检验		Fu's F_s 中性检验		扩张时间 expansion time	
		Tajima's D	P 值 P value	Fu's F_s	P 值 P value	参数 τ	时间/百万年 time
Group A	135	-2.427 18	0.000 00	-25.466 30	0.000 00	4.750 00	0.025~0.083
Group B	71	-1.782 84	0.016 00	-24.682 67	0.000 00	7.031 25	0.037~0.123
Group C	107	-2.285 43	0.001 00	-24.838 35	0.000 00	6.673 83	0.035~0.117
Group D	7	-0.600 48	0.314 00	-2.515 26	0.049 00	—	—
总计 total	320	-1.694 77	0.010 00	-23.683 39	0.006 00		

注: —代表无扩张

Notes: — means no expansion

C, 所得扩张时间参数分别为 4.750 00、7.031 25 和 6.673 83, D-loop 的核苷酸进化速率采用 3%~10%/百万年进行计算, 由于黄鳍棘鲷存在性逆转现象, 1~2 龄雄性性腺发育成熟, 2~3 龄转变

为雌性^[4,20], 故本研究以生物学最小龄(2 年)作为其 1 个世代的时间跨度。根据公式 $\tau = 2ut$ 计算这 3 个单倍型类群大约的扩张时间为 0.025~0.123 百万年前, 为更新世晚期。而核苷酸歧义度(表 6) ($D_{xy}=0.190\sim0.318$) 以线粒体控制区变异速率 3%~10%/百万年, 估算出单倍型类群间分歧时间约为 0.399~0.073 百万年前, 为中—晚更新世。

3 讨论

3.1 黄鳍棘鲷的 D-loop 基因结构与遗传多样性分析

D-loop 基因是线粒体 DNA 的非编码区, 其碱基替换速率快, 变异速率为完整 mtDNA 或其他区域的 5~10 倍^[21], 一般认为是线粒体基因组中进化最快的部分, 被广泛应用于群体遗传变异及系统进化等研究中^[22-24]。本研究黄鳍棘鲷 8 个群体 320 条 D-loop 全长序列为 947~958 bp, 比刘红艳等^[12]获得的 24 尾黄鳍棘鲷 D-loop 序列长。碱基 T、C、A 和 G 的平均含量分别为 31.8%、21.4%、32.0% 和 14.7%, 其中 A+T (63.8%) 高于 C+G (36.1%), 表现出较强的少 G 偏倚性, 与刘红艳等^[12]的研究结果一致。

π 和线粒体 DNA 的 H_d ^[25] 是衡量 DNA 多态程度的两个重要指标。由于 π 考虑了各单倍型在群体中所占的比例, 因而较 H_d 更为可靠^[26]。刘红艳等^[12]对厦门、珠江口和北部湾 3 个群体 24 尾黄鳍棘鲷的线粒体控制区序列进行分析, 发现 H_d 为 0.952 00~0.972 00, π 为 0.013 00~0.017 00, 北部湾最高、珠江口最低; 龚金波^[14]对厦门、深圳和北海 3 个群体 122 尾黄鳍棘鲷的线粒体控制区序列进行分析, 发现 H_d 为 0.992 90~0.995 20, π 为 0.012 50~0.018 70, 厦门群体最高, 北海群体最低; Xia 等^[13]对厦门、深圳、阳江、海口及北海 5 个群体 145 尾黄鳍棘鲷的分析发现, H_d 为 0.884 00~0.995 00, π 为 0.023 00~0.026 00, 阳江群体最高, 深圳和北海群体最低。从上述结果来看, 2004—2008 年我国华南沿海的黄鳍棘鲷遗传多样性呈现上升趋势。而本研究中防城港、钦州、北海、海口、三亚、阳江、汕尾和厦门 8 个群体 320 尾黄鳍棘鲷基于线粒体控制区序列的 H_d 为 0.988 46~1.000 00, π 为 0.009 83~0.014 46, 与 2008 年相反, 呈现下降趋势。与同样以 D-loop 为分子标记的同一海域的其他鱼类遗传多样

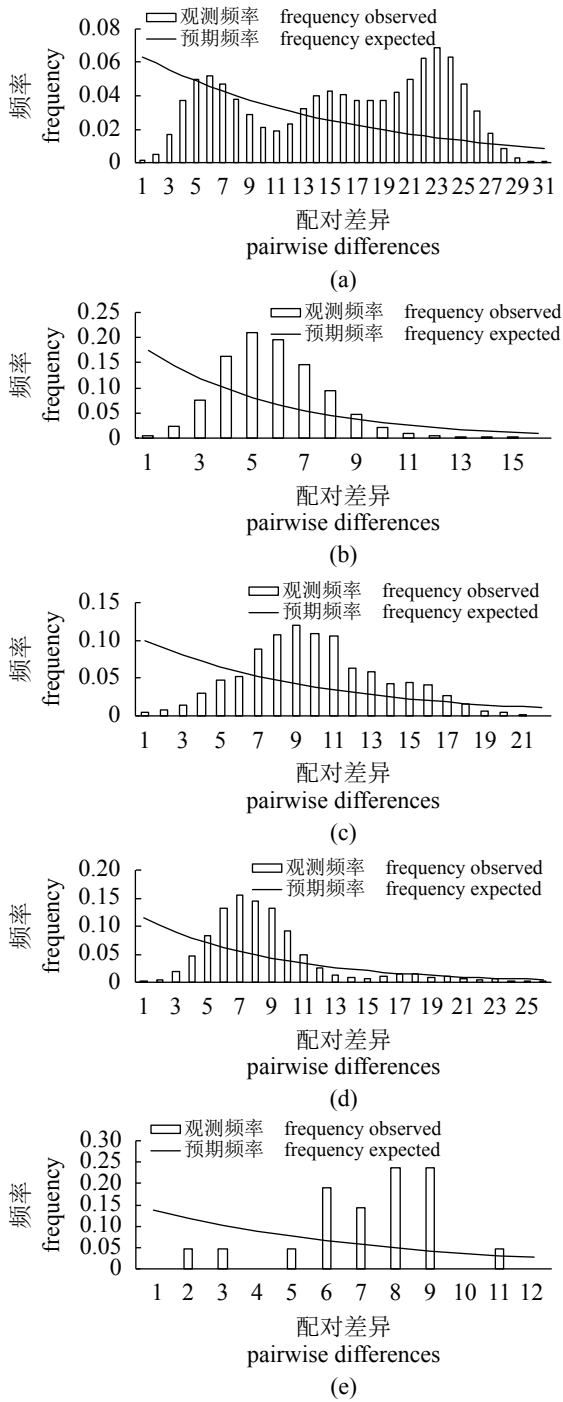


图 3 核苷酸错配分布图

(a) 总计, (b) Group A, (c) Group B, (d) Group C, (e) Group D

Fig. 3 Nucleotide mismatch map

(a) total, (b) Group A, (c) Group B, (d) Group C, (e) Group D

表 6 单倍型类群间核苷酸歧义度(对角线下方)及分歧时间(对角线上方, 百万年)

类群 groups	Group A	Group B	Group C	Group D
Group A		0.073~0.244	0.120~0.399	0.125~0.416
Group B	0.014 68		0.098~0.328	0.113~0.376
Group C	0.023 94	0.019 65		0.112~0.372
Group D	0.024 96	0.022 53	0.022 30	

性相比较, 单倍型多样性接近于短尾大眼鲷 (*Priacanthus macracanthus*)^[27] ($H_d=0.980\ 50\sim 0.997\ 10$)、黑棘鲷^[28] ($H_d=0.986\ 00\sim 1.000\ 00$) 和褐菖鲉 (*Sebastes marmoratus*)^[29] ($H_d=0.940\ 00\sim 1.000\ 00$); 核苷酸多样性高于黑棘鲷^[30] ($\pi=0.006\ 80\sim 0.009\ 01$)、黄斑篮子鱼 (*Siganus oramin*)^[31] ($\pi=0.005\ 09\sim 0.006\ 60$) 和多齿蛇鲻 (*Saurida tumbil*)^[32] ($\pi=0.006\ 56\sim 0.009\ 27$), 低于褐篮子鱼 (*S. fuscescens*)^[33] ($\pi=0.007\ 00\sim 0.022\ 00$) 和真鲷 (*Pagrus major*)^[13] ($\pi=0.021\ 00\sim 0.023\ 00$), 与二长棘梨齿鲷 (*Evynnis cardinalis*)^[14] ($H_d=0.976\ 40\sim 1.000\ 00$, $\pi=0.012\ 00\sim 0.014\ 40$) 相近。尽管黄鳍棘鲷与同海域的其他鱼类的多样性相比, 具有相似的单倍型多样性 (H_d) 和中等的核苷酸多样性 (π), 但相较 10 年前的黄鳍棘鲷群体, 多样性有所下降, 可能是捕捞量过大或者野生黄鳍棘鲷生存环境不理想造成, 应引起足够的重视。

3.2 黄鳍棘鲷的遗传分化和历史动态分析

群体遗传学研究认为, F_{ST} 值可以表示群体间的分化程度, 若 F_{ST} 为 0~0.05, 表明群体间分化较小; 若 F_{ST} 为 0.05~0.15, 则群体间存在中等程度的分化; 而 F_{ST} 为 0.15~0.25, 群体间就表现为较高的分化^[34]。本研究 8 个群体间的遗传分化系数为 -0.012 68~0.466 74, 以琼州海峡为分界表现出明显的分化特征, WEST 和 EAST 组群间, 两两群体间的遗传分化系数为 0.223 00~0.466 74, 表现为较高的遗传分化; EAST 和 WEST 组群内群体间分化较弱。一般来说, 当 $N_m > 5$ 时, 群体间能维持均一的基因库^[35]。本研究 EAST 和 WEST 组群内 N_m 均大于 5, 存在频繁的基因交流, 而组群间 N_m 值均小于 5, 说明以琼州海峡为分界的东、西两个组的群体间基因交流较为匮乏。Xia 等^[13] 研究结果中, 46.10% 的变异来自于组群间, 52.76% 来自于群体内个体间, 仅 1.14% 的变异来自于组群内群体间; 而本研究中, 33.42% 的变异来自于组群间, 66.26% 的变异来

自于群体内个体间, 0.32% 的变异发生在组群内群体间, 由此可见, 发生在群体间的变异百分率在降低, 而发生在群体内个体间的变异百分率在升高。Xia 等^[13] 的研究中, 琼州海峡以西组群中, 93.3% 的个体来自于同一谱系, 琼州海峡以东组群中, 97.1% 的个体出现在另一谱系。而本研究中, 琼州海峡以东组群中, 90% 的个体出现在 Group A 与 Group B 中, 琼州海峡以西组群中, 77.5% 的个体来自于 Group C, 其中钦州群体中的 87.5% 个体出现在 Group C 中, 而防城港群体中 22.5% 的个体以及北海群体中 32.5% 的个体来自于 Group A 与 Group B, 因此造成琼州海峡以西组群中防城港、北海与钦州群体有一定程度的遗传分化, 与琼州海峡以东组群各群体有一定的基因交流。在琼州海峡以西组群中, 北海和防城港的遗传多样性指数在 8 个群体中都最高, 而钦州群体最低, 估计是增殖放流时, 琼州海峡以东组群为亲本的黄鳍棘鲷苗种投入到了野生黄鳍棘鲷生存海域, 虽提高了多样性, 但也造成了一定程度的基因交流, 而钦州处于内湾, 受影响相对较小。

种群历史演化通常通过 2 种方法来检测^[36]: 中性选择分析(如 Tajima's D 检验)和碱基不配对分析, 若 Tajima's D 值显著偏离中性检验, 而且核苷酸错配曲线呈现单峰分布, 则表明群体在过去经受了扩张; 反之, 群体保持稳定^[37]。Tajima^[16] 认为, 如果 Tajima's D 与 Fu's F_s 值呈负值, 且在统计学上达到显著标准, 则说明序列中含有比中性进化模型更多的核苷酸位点变化, 可能预示着被研究种群曾经历过一个扩张的历史。本研究中黄鳍棘鲷个体按单倍型类群分为 Group A、Group B、Group C 和 Group D 4 部分。4 个单倍型类群除了 Group D 外, 其余 3 个单倍型类群的 Tajima's D 和 Fu's F_s 检验结果均为显著负值, 且显著性检验 $P < 0.05$; 核苷酸错配分析中, Group A、Group B 和 Group C 均为单峰

分布, 表明 Group A、Group B 和 Group C 类群可能都经历了种群扩张事件。Arlequin 分析表明, 扩张的大致时间为 0.025~0.123 百万年前, 为更新世晚期。根据核苷酸歧义度估算出单倍型类群间分歧时间约为 0.399~0.073 百万年前, 为中一晚更新世。黄鳍棘鲷在气候恶劣的中更新世发生分歧, 到后更新世期间, 因气候回暖, 营养物质丰富, 大大促进了黄鳍棘鲷的种群扩张, 黄鳍棘鲷分歧后形成不同系群的种群, 经扩张后二次接触造成了高 H_d 和高 π 的多样性类型。

3.3 黄鳍棘鲷种质资源的保护

mtDNA 控制区单倍型系统发育关系分析显示, 我国华南沿海黄鳍棘鲷群体之间并没有形成多个单系群, 因此可将中国华南沿海黄鳍棘鲷群体视为 1 个进化显著单位 (evolutionarily significant units, ESUs), 两两群体间的 F_{ST} 值提示, 应将琼州海峡以东及以西的黄鳍棘鲷群体作为 2 个管理单位 (management units, MUs) 进行管理。为了恢复逐渐衰退的海洋渔业资源, 自 20 世纪 90 年代以来, 我国华南沿海各省均开展了黄鳍棘鲷的增殖放流工作, 已获得一定的生态效益和社会效益, 但也人为增加了不同地区黄鳍棘鲷的基因交流, 对野生种群结构的影响不容忽视。与同海域其他鱼类相比, 我国华南沿海黄鳍棘鲷群体总体上仍保持着较好的遗传多样性, 但较 10 年前的研究结果, 遗传多样性呈下降趋势, 应引起足够重视。为了实现黄鳍棘鲷野生资源的保护与合理利用, 需制订更为科学的渔业资源保护措施, 在不损害野生资源的前提下, 增加整个种群规模和产量, 以优化渔业资源结构。由于采样范围的限制, 上述研究结果不能排除未采样地区存在新的 ESUs 或 MUs 的可能。另外由于线粒体各基因以及核基因有着不同的进化特点, 因此有必要进一步采用更多分子标记技术分析黄鳍棘鲷群体遗传多样性与遗传结构, 为黄鳍棘鲷资源的保护和开发利用提供更详尽的信息。

参考文献 (References):

- [1] 李希国, 李加儿, 区又君. 黄鳍棘鲷主要消化酶活性在消化道不同部位的比较研究[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(5): 34-38.
Li X G, Li J E, Ou Y J. Comparative studies on the

digestive enzymes activity in different parts of the alimentary canal in yellowfin black porgy *Sparus latus* Houuttuyn[J]. Marine Fisheries Research, 2005, 26(5): 34-38(in Chinese).

- [2] 樊冀蓉, 吴仁协, 赵元君, 等. 中国鲷科鱼类分类和系统发育研究进展[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 472-480.
Fan J R, Wu R X, Zhao Y J, et al. Progresses on taxonomy and phylogeny of family Sparidae from China[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 472-480(in Chinese).
- [3] Hong W S, Zhang Q Y. Review of captive bred species and fry production of marine fish in China[J]. *Aquaculture*, 2003, 227(1-4): 305-318.
- [4] 施晓峰, 史会来, 楼宝, 等. 黄鳍棘鲷生物学特性及人工繁育现状[J]. *河北渔业*, 2012(1): 52-55.
Shi X F, Shi H L, Lou B, et al. Biological characteristics and artificial propagation, culture technique for *Sparus latus* (Houuttuyn)[J]. *Hebei Fisheries*, 2012(1): 52-55(in Chinese).
- [5] Thacker C E. Molecular phylogeny of the gobioid fishes (Teleostei: Perciformes: Gobioidae)[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 26(3): 354-368.
- [6] 郝君, 杨蕾, 鲍迪, 等. 6种鱼mtDNA D-loop及其邻近区段的序列比较分析[J]. *大连海洋大学学报*, 2013, 28(2): 160-165.
Hao J, Yang Q, Bao D, et al. The sequence comparison of mtDNA D-loop and adjacent regions in six fish species[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2013, 28(2): 160-165(in Chinese).
- [7] 岳丽佳, 熊良伟, 王帅兵, 等. 基于线粒体Cytb序列的3个宽体金线蛭群体遗传多样性分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2020, 29(1): 9-16.
Yue L J, Xiong L W, Wang S B, et al. Genetic diversity analysis of three populations of *Whitmania pigra* Whitman based on mitochondrial Cytb gene[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(1): 9-16(in Chinese).
- [8] 郭新红, 刘少军, 刘巧, 等. 鱼类线粒体DNA研究新进展[J]. *遗传学报*, 2004, 31(9): 983-1000.
Guo X H, Liu S J, Liu Q, et al. New progresses on mitochondrial DNA in fish[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(9): 983-1000(in Chinese).

- [9] 吕子君, 陈金涛, 王超, 等. 东山湾青石斑鱼线粒体 DNA D-loop区遗传多样性分析[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1270-1276.
Lv Z J, Chen J T, Wang C, *et al.* Analysis of mitochondrial DNA D-loop genetic diversity of *Epinephelus awoara* in Dongshan Bay[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1270-1276(in Chinese).
- [10] 傅建军, 徐如卫, 薛婷, 等. 3种泥鳅微卫星标记和D-Loop部分序列遗传变异分析[J]. 水产学报, 2015, 39(4): 465-474.
Fu J J, Xu R W, Xie T, *et al.* Genetic analysis of three stocks of loach with microsatellite markers and D-Loop partial sequences[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(4): 465-474(in Chinese).
- [11] Chan J L, Li W W, Hu X X, *et al.* Genetic diversity and population structure analysis of Qinghai-Tibetan plateau schizothoracine fish (*Gymnocypris dobula*) based on mtDNA D-loop sequences[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2016, 69: 152-160.
- [12] 刘红艳, 江世贵, 苏天凤, 等. 3个水域黄鳍鲷线粒体 DNA D-loop基因序列多态性研究[J]. 水产学报, 2004, 28(4): 371-374.
Liu H Y, Jiang S G, Su T F, *et al.* Polymorphism study of the mitochondrial DNA D-loop gene sequences from *Sparus latus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(4): 371-374(in Chinese).
- [13] Xia J H, Huang J H, Gong J B, *et al.* Significant population genetic structure of yellowfin seabream *Acanthopagrus latus* in China[J]. *Journal of Fish Biology*, 2008, 73(8): 1979-1992.
- [14] 龚金波. 中国近海两种鲷科鱼类遗传结构及遗传多样性分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
Gong J B. Genetic structure and genetic diversity of two Sparidae species in Chinese coastal waters[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006 (in Chinese).
- [15] 彭敏, 陈秀荔, 蒋伟明, 等. 醋酸铵法提取卵形鲳鲹基因组DNA[J]. *天津农业科学*, 2011, 17(1): 114-117.
Peng M, Chen X L, Jiang W M, *et al.* Ammonium acetate method to isolate high quality genomic DNA of *Trachinotus ovatus*[J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2011, 17(1): 114-117(in Chinese).
- [16] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. *Genetics*, 1989, 123(3): 585-595.
- [17] Fu Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection[J]. *Genetics*, 1997, 147(2): 915-925.
- [18] Rogers A R, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1992, 9(3): 552-569.
- [19] Kocher T D, Stepien C A. Molecular systematics of fishes[M]. New York: Academic Press, 1997: 113-128.
- [20] 洪万树, 张其永, 郑建峰, 等. 港养黄鳍鲷性腺发育和性转变研究[J]. 台湾海峡, 1991, 10(3): 221-228.
Hong W S, Zhang Q Y, Zheng J F, *et al.* Studies on gonadal development and sex inversion of yellowfin seabream (*Sparus latus*)[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 1991, 10(3): 221-228(in Chinese).
- [21] Brown W M. The mitochondrial genome of animals[M]//MacIntyre R J. Molecular evolutionary genetics. New York: Plenum Press, 1985: 95-130.
- [22] Tang Q Y, Liu H Z, Mayden R, *et al.* Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome *b* gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes)[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, 39(2): 347-357.
- [23] Rosel P, Dizon A E, Haygood M G. Variability of the mitochondrial control region in populations of the harbour porpoise, *Phocoena*, on interoceanic and regional scales[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1995, 52(6): 1210-1219.
- [24] Xiao Y S, Zhang Y, Gao T X, *et al.* Genetic diversity in the mtDNA control region and population structure in the small yellow croaker *Larimichthys polyactis*[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2009, 85(4): 303-314.
- [25] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(10): 5269-5273.
- [26] 周慧, 李迪强, 张于光, 等. 藏羚羊mtDNA D-loop区遗传多样性研究[J]. *遗传*, 2006, 28(3): 299-305.
Zhou H, Li D Q, Zhang Y G, *et al.* Study on mitochondrial DNA genetic diversity of Tibetan antelope[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2006, 28(3): 299-305(in Chinese).

- [27] 熊丹, 李敏, 陈作志, 等. 南海短尾大眼鲷的种群遗传结构分析[J]. 南方水产科学, 2015, 11(2): 27-34.
Xiong D, Li M, Chen Z Z, *et al.* Genetic structure of *Priacanthus macracanthus* population from the South China Sea[J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(2): 27-34(in Chinese).
- [28] 曹艳. 基于线粒体控制区序列的中国沿海 3 种鲷科鱼类遗传多样性分析 [D]. 广州: 暨南大学, 2016.
Cao Y. Genetic diversity of 3 Sparid species in coastal waters of China based on mitochondrial control region sequences[D]. Guangzhou: Jinan University, 2016 (in Chinese).
- [29] 张辉. 西北太平洋两种卵胎生鱼类 (许氏平鲉和褐菖鲉) 的分子系统地理学研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
Zhang H. Molecular phylogeography of two marine ovoviviparous fishes in Northwestern Pacific[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013 (in Chinese).
- [30] 施晓峰, 苏永全, 王文成, 等. 基于 mtDNA 控制区序列的 3 个黑棘鲷群体遗传结构特性研究[J]. 热带海洋学报, 2015, 34(1): 56-63.
Shi X F, Su Y Q, Wang W C, *et al.* Population genetic structure of three stocks of *Acanthopagrus schlegelii* based on mtDNA control region sequences[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2015, 34(1): 56-63(in Chinese).
- [31] 黄小林, 李文俊, 林黑着, 等. 基于线粒体 DNA D-loop 序列的黄斑篮子鱼群体遗传多样性分析[J]. 热带海洋学报, 2018, 37(4): 45-51.
Huang X L, Li W J, Lin H Z, *et al.* Genetic variations among *Siganus oramin* populations in coastal waters of southeast China based on mtDNA control region sequences[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2018, 37(4): 45-51(in Chinese).
- [32] 孙冬芳. 南海北部陆架区多齿蛇鲻 *Saurida tumbil* 的种群分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2010.
Sun D F. Population genetic structure of *Saurida tumbil* in the continental shelf of the northern South China Sea[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2010 (in Chinese).
- [33] 陈璐. 基于线粒体控制区序列的中国沿海褐篮子鱼遗传多样性分析 [D]. 广州: 暨南大学, 2017.
Chen L. Genetic diversity of *Siganus fuscescens* in coastal waters of China based on mitochondrial control region sequences[D]. Guangzhou: Jinan University, 2017 (in Chinese).
- [34] Wright S. The genetical structure of populations[J]. *Annals of Eugenics*, 1949, 15(1): 323-354.
- [35] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations[J]. *Science*, 1987, 236(4803): 787-792.
- [36] Chen S Y, Su Y H, Wu S F, *et al.* Mitochondrial diversity and phylogeographic structure of Chinese domestic goats[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005, 37(3): 804-814.
- [37] De Oliveira-Neto J F, Pie M R, Chammas M A, *et al.* Phylogeography of the blue land crab, *Cardisoma guanhumi* (Decapoda: Gecarcinidae) along the Brazilian coast[J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2008, 88(7): 1417-1423.

Genetic structure of D-loop sequence in *Acanthopagrus latus*

HE Zhenhan^{1,2}, XIAO Shan³, WANG Shaoshao¹, CHEN Huifang^{1,2}, SU Shaoping²,
ZHAO Yongzhen², YANG Chunling², ZENG Digang², ZHU Weilin², CHEN Xiuli²,
MA Huawei², JIANG Weiming², LIU Qingyun², LI Qiangyong², PENG Min^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture,
Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning 530021, China;

3. Guangxi Aquatic Species Introduction and Breeding Center, Nanning 530031, China)

Abstract: *Acanthopagrus latus* is a valuable marine fish and an important economic fish for marine aquaculture along the South China coast. In order to ascertain the genetic diversity and genetic differentiation status of *A. latus* populations distributed along the South China coast, in this study, the mitochondrial control region (D-loop) gene sequences were used to analyze the genetic diversity and population genetic structure of eight *A. latus* populations from the South China coast, including Xiamen, Shanwei, Yangjiang, Haikou, Sanya, and Beihai, Qinzhou, Qinzhou and Fangcheng. The results showed that 320 D-loop sequences from the eight *A. latus* populations were 947-958 bp in length. Totally, 29 insertion or deletion sites and 210 mutation sites (including 142 parsimony information sites and 68 single mutation sites) were detected in the D-loop sequences; overall mutation sites, haplotype number, and haplotype diversity (H_d), average nucleotide difference and nucleotide diversity (π) were 210, 268, 0.998 43, 14.790 65 and 0.015 70, respectively. The results of cluster analysis showed that all populations were clustered into two groups, east and west separated by Qiongzhou Strait. The genetic differentiation coefficient (F_{ST}) between the eight populations was -0.012 68-0.466 74, and gene flow (N_m) was 0.571 26~∞. The variance analysis showed that the genetic variation between groups, between populations within groups, and between individuals within populations were 33.42%, 0.32%, and 66.26%, respectively. Neutral tests showed that Tajima's D was -1.694 77 ($P = 0.010 00$) and F_u 's F_s was -23.683 39 ($P = 0.006 00$), indicating that *A. latus* along the South China coast experienced a population expansion event. This study indicated that the genetic diversity of *A. latus* populations along the South China coast was relatively rich. This study suggested that *A. latus* populations can be divided into two management units by the Qiongzhou Strait, the east group and the west group for germplasm protection. Based on such monitoring results, some countermeasures and suggestions for the future restoration strategy were proposed so as to provide a theoretical basis for restoring and protecting the *A. latus* populations, and meanwhile it can also provide some scientific guidance for artificial breeding and value-added release in natural sea area.

Key words: *Acanthopagrus latus*; D-loop sequence; genetic diversity; genetic differentiation

Corresponding author: PENG Min. E-mail: 837969487@qq.com

Funding projects: Guangxi Innovation-driven Development Special Fund Project(Guike AA17204088)