

基于线粒体 *ND2* 基因序列的少鳞鳢遗传多样性研究

郑德育, 郭易佳, 杨天燕, 高天翔, 郑瑶, 袁冬皓, 斯舒谨

(浙江海洋大学水产学院, 浙江舟山 316022)

摘要: 以莱州、胶南、舟山、厦门、汕头和北海 6 个群体 119 尾少鳞鳢 (*Sillago japonica*) 为研究对象, 采用 PCR 扩增测序获得长度为 450 bp 的线粒体 DNA NADH 脱氢酶亚基 2 (*ND2*) 基因片段, 共检测到 77 个变异位点, 其中简约信息位点 30 个, 单变异位点 28 个, 无碱基缺失。119 条序列定义了 61 个单倍型, 平均单倍型多样性 (H_d) 和核苷酸多样性 (π) 分别为 0.9453 ± 0.0155 和 0.009718 ± 0.005445 。6 个群体间的平均遗传距离为 0.0083, 遗传分化指数 F_{ST} 均小于 0.05, 各群体间无显著遗传分化。AMOVA 分析得出少鳞鳢的遗传变异主要来自于种群内个体间 (99.96%)。中性检验的 Tajima's D 和 Fu's F_s 统计值均为负值且显著偏离中性, 核苷酸不配对分布图呈现明显的单峰分布, 表明少鳞鳢历史上经历了群体扩张事件, 估算扩张时间大约在 (0.12~0.29) 百万年前的第四纪更新世晚期。

关键词: 少鳞鳢; *ND2* 基因; 遗传多样性; 群体扩张

中图分类号: S 913.4

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Genetic diversity analysis of *Sillago japonica* based on mitochondrial DNA *ND2* gene

ZHENG Deyu, GUO Yijia, YANG Tianyan, GAO Tianxiang, ZHENG Yao, YUAN Donghao, SI Shujin

(Fishery College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract: A total of 119 individuals of *Sillago japonica* were collected from six sampling sites (Laizhou, Jiaonan, Zhoushan, Xiamen, Shantou and Beihai). The length of 450 bp NADH dehydrogenase subunit 2 (*ND2*) gene fragment was amplified and sequenced. No base insertion or deletion mutations occurred and 77 mutation sites were detected, including 30 parsimony informative sites and 28 singleton polymorphic sites. Sixty-one haplotypes were defined in 119 sequences. The average haplotype diversity (H_d) and nucleotide diversity (π) were 0.9453 ± 0.0155 and 0.009718 ± 0.005445 , respectively. The average genetic distance among the six populations was 0.0083, and the genetic differentiation index F_{ST} value was less than 0.05, indicating no significant genetic differentiation among the populations. Analysis of molecular variance (AMOVA) shows that genetic variation of *S. japonica* mainly resided among individuals within populations (99.96%). The neutral tests (Tajima's D and Fu's F_s) were both negative and deviated from the neutral significantly. Besides, the nucleotide mismatches distribution showed a unimodal distribution, indicating that *S. japonica* had experienced population expansion in history. The estimated expansion time was about 0.12–0.29 million years ago in late Pleistocene.

Key words: *Sillago japonica*; NADH dehydrogenase subunit 2 gene; genetic diversity; population expansion

收稿日期: 2019-02-25; 修回日期: 2019-04-24

资助项目: 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划 (2018R411057); 国家自然科学基金项目 (31572227, 41776171); 浙江海洋大学 2016—2017 年度人才引进科研基金; 浙江海洋大学水产省一流学科大学生创新性科研项目

作者简介: 郑德育 (1998—), 男, 本科生, 从事海洋生物资源与环境研究。E-mail: 723259288@qq.com

通信作者: 杨天燕 (1982—), 女, 博士, 高级工程师, 从事鱼类种群遗传学研究。E-mail: hellojelly1130@163.com

少鳞鳢 (*Sillago japonica*) 是鲈形目、鳢科、鳢属的一种小型海洋经济鱼类, 主要分布在红海、印度洋、太平洋西部和南部, 盛产于我国南海和东海的浅水区或河口区^[1-2]。少鳞鳢肉质鲜美、营养丰富, 深受人们喜爱, 也是近岸渔业捕捞对象和游钓鱼种。20 世纪末开始, 日本学者围绕少鳞鳢渔业管理^[3]、繁殖发育学^[4-7]、组织胚胎学^[8-9] 和资源生物学^[10-11] 领域开展了大量基础性研究工作, 近年来国内有关其形态学和遗传学方面的研究主要集中在外部形态特征描述^[12]、耳石形态多元统计分析^[13]、分子系统学研究^[14-15]、线粒体控制区^[16] 和微卫星分子标记开发^[17]。遗传多样性反映了生物对环境变化的适应能力, 是物种多样性的基础和决定性因素, 体现在表型、染色体、蛋白质和 DNA 多个层次水平的变异上, 开展遗传多样性研究对于探讨物种的系统进化、遗传分化和资源保护都具有十分重要的意义^[18]。

线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 具有分子量小、结构简单、排列紧凑, 几乎不发生重组且遵循母系遗传的特性, 目前已广泛应用在鱼类分子系统学、生物地理学和种群遗传学等诸多领域^[19-20]。在 mtDNA 包含的 13 个蛋白质编码基因中, NADH 脱氢酶亚基 2 (NADH dehydrogenase subunit 2, *ND2*) 基因由于进化速率相对较快, 能较好地反映种内与群体间的遗传变异及系统分类地位, 正逐渐应用于鱼类系统发育和种群划分研究

中^[21-25]。本研究采集了中国沿海 6 个地理种群的少鳞鳢样本, 基于线粒体 *ND2* 基因序列开展其群体遗传多样性的研究, 以期少鳞鳢种质资源的保护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用少鳞鳢样本分别于 2017—2018 年间采自莱州 (LZ, 19 尾)、胶南 (JN, 20 尾)、舟山 (ZS, 20 尾)、厦门 (XM, 20 尾)、汕头 (ST, 20 尾)、北海 (BH, 20 尾), 共计 119 尾样品 (图 1)。所有样品取背部新鲜肌肉组织存放于 5 mL 离心管, 加入无水乙醇固定, 4 °C 保存备用。

1.2 基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

剪取适量已浸泡在无水乙醇中的背部肌肉组织, 采用传统的酚-氯仿法^[26] 提取少鳞鳢基因组 DNA, 用无水乙醇沉淀和 75% 乙醇润洗后经自然风干的 DNA 溶解于 100 μL 灭菌水中, 置于 4 °C 保存备用。

参考少鳞鳢线粒体基因组全序列 (GenBank 登录号 KR363149), 采用 Primer primer 6.0 软件设计扩增 *ND2* 基因的引物, 分别为上游引物 *ND2*-1F (5'-CACG AACGCCCTATACTCA-3') 和下游引物 *ND2*-1R (5'-CCTGGTAGGTTGTTAGGGGA-3')。PCR 总反应体系为 25 μL , 包括 0.25 μL 浓度为 5 U· μL^{-1} 的 *Taq* 酶, 各 1 μL 正反向引物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),

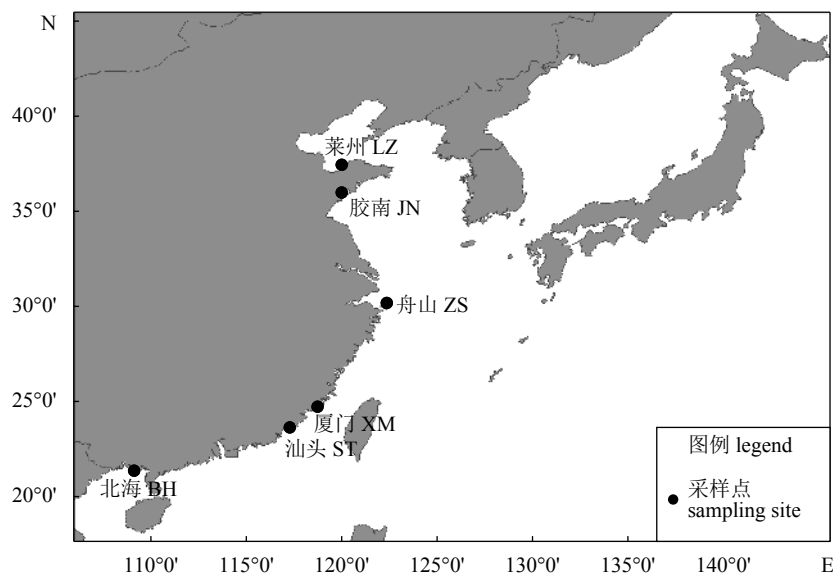


图1 少鳞鳢采样地点图

Fig.1 Sampling sites of *S. japonica*

2 μL 的 dNTPs (2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 2.5 μL 的 10 \times buffer 缓冲液 (含 Mg^{2+}), 1 μL 的模板 DNA (50~100 ng), 以及 17.25 μL 的灭菌双蒸水。PCR 反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 0.5 min, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 0.5 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 总计循环 35 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 凝胶成像系统拍照后, 挑选条带亮度较高的 PCR 产物送至上海美吉生物有限公司进行测序。

1.3 数据分析

所获序列均由 DNASTAR^[27] 软件包进行编辑、校对和排序; 采用 DnaSP 6.0^[28] 和 Arlequin^[29] 软件进行多态位点数目 (number of polymorphic sites)、单倍型数目 (number of haplotype)、核苷酸多样性 (nucleotide diversity) 和单倍型多样性 (haplotype diversity) 等计算; 使用 MEGA 7.0^[30] 软件基于 Kimura 2-parameter model 参数计算少鳞鱧群体间平均遗传距离、碱基组成和碱基转换/颠换, 并采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 基于 1 000 次 Bootstrap 重抽样构建单倍型系统发育树; 运用 Network 软件基于中间连接法 (median-joining) 绘制少鳞鱧单倍型网络图。使用 Arlequin^[29] 软件统计少鳞鱧群体间的遗传分化水平, 分子变异水平分析 (analysis of molecular variance analysis, AMOVA) 种群间遗传变异情况; 使用 Tajima's D 和 Fu's F_s 中性检验以及核苷酸不配对分布 (mismatch distribution) 来估算种群的历史动态变化。使用公式 $\tau=2ut$ ^[31] 估算种群扩张时间, 其中 τ 为扩张时间参数 (Tau), u 为进化速率, $u=\mu k$, 其中 μ 为每个碱基的变异速率, k 为所分析序列的长度, t 表示自扩张以来所经历的代数, 扩张时间 $T=t\times$ 代时, μ 参

考 Bermingham 和 Mccafferty^[32] 的研究, 采用每百万年 2% 的突变速率。

2 结果

2.1 序列变异及遗传多样性组成

使用 DNASTAR 软件包中 SeqMan 程序进行序列比对, 得到长度为 450 bp 的 $ND2$ 基因片段。119 尾少鳞鱧样本平均碱基组成为 $A=20.96\%$, $T=30.38\%$, $G=14.05\%$, $C=34.6\%$, $A+T$ 含量 (51.34%) 略高于 $G+C$ (48.66%), 其中 C 含量最高, G 含量最低, 碱基组成偏向于嘧啶碱基。所获得序列中多态位点数目 77 个, 占所获得序列长度的 19.84%, 没有发现碱基的插入和缺失。119 条序列共检测到 61 个单倍型, 从各群体所含单倍型分布来看, 厦门群体检测到的单倍型数量最多, 而莱州群体检测到的单倍型数量最少。遗传多样性参数显示, 厦门群体的单倍型多样性最高 (0.9842 ± 0.0205), 北海群体单倍型多样性最低 (0.9105 ± 0.0538); 汕头群体核苷酸多样性最高 (0.014225 ± 0.007953), 莱州群体核苷酸多样性最低 (0.005788 ± 0.003723 , 表 1)。

2.2 群体遗传结构和聚类分析

在 MEGA 软件中采用 Kimura 2-parameter 模型计算少鳞鱧 6 个群体间的遗传距离 (表 2), 种群间的遗传距离在 0.00685~0.01002, 其中厦门和汕头的遗传距离最大 (0.01002); 莱州和北海的遗传距离最小 (0.00685), 遗传分化尚未达到种级水平^[33]。

少鳞鱧不同群体间遗传多样性指数 (F_{ST}) 分析发现两两群体间的 F_{ST} 介于 -0.01416~0.04438,

表1 基于线粒体 $ND2$ 基因的少鳞鱧6个种群遗传多样性

Tab.1 Genetic diversity in seven *S. japonica* populations based on mtDNA $ND2$ gene

种群 population	样本数 number of individuals	单倍型数目 number of haplotypes	多态位点数目 number of polymorphic sites	单倍型多样性 H_d	核苷酸多样性 π
莱州 LZ	19	12	16	0.9240 \pm 0.0458	0.005788 \pm 0.003723
胶南 JN	20	13	17	0.9579 \pm 0.0255	0.007800 \pm 0.004739
舟山 ZS	20	13	34	0.9474 \pm 0.0323	0.013019 \pm 0.007349
厦门 XM	20	17	21	0.9842 \pm 0.0205	0.010282 \pm 0.005993
汕头 ST	20	14	48	0.9158 \pm 0.0546	0.014225 \pm 0.007953
北海 BH	20	13	19	0.9105 \pm 0.0538	0.007678 \pm 0.004677
总计 total	119	51	77	0.9453 \pm 0.0155	0.009718 \pm 0.005445

表2 少鳞鳢不同群体间平均遗传距离

Tab.2 Average genetic distances among different *S. japonica* populations

种群 population	北海 BH	胶南 JN	莱州 LZ	汕头 ST	厦门 XM
胶南 JN	0.007 74				
莱州 LZ	0.006 85	0.006 88			
汕头 ST	0.008 64	0.008 51	0.007 66		
厦门 XM	0.009 11	0.009 02	0.008 50	0.010 02	
舟山 ZS	0.008 04	0.007 95	0.007 42	0.008 98	0.009 17

除莱州和厦门、舟山群体之间差异显著外, 其余群体间 P 均大于 0.05 (表 3)。采用分子方差分析 (AMOVA) 对 6 个少鳞鳢群体遗传变异来源和结构进行统计 (表 4)。结果表明, 少鳞鳢遗传变异主要

来自群体内个体间 (99.96%), 其 P 检验也不显著 ($P=0.426\ 20\pm 0.015\ 26$), 表明少鳞鳢群体间存在广泛的基因交流, 使得遗传分化程度较低、遗传差异不显著。

表3 基于 *ND2* 序列单倍型频率的少鳞鳢群体 F_{ST} (对角线下) 和相应 P (对角线上)

Tab.3 F -Statistics (below diagonal) and F_{ST} P value (above diagonal) from haplotype frequencies of *S. japonica*

种群 population	北海 BH	胶南 JN	莱州 LZ	汕头 ST	厦门 XM	舟山 ZS
BH		0.625 00	0.201 17	0.898 44	0.535 16	0.564 45
JN	-0.008 44		0.434 57	0.693 36	0.457 03	0.517 58
LZ	0.000 93	0.012 84		0.638 67	0.018 55	0.021 48
ST	-0.005 06	-0.011 29	-0.002 92		0.355 47	0.654 30
XM	-0.001 54	-0.004 82	0.044 38	0.003 94		0.826 17
ZS	-0.002 41	-0.005 85	0.035 13	-0.013 66	-0.014 16	

表4 少鳞鳢群体线粒体 *ND2* 基因的 AMOVA 分析

Tab.4 AMOVA analysis of *S. japonica* populations based on mtDNA *ND2* gene

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 SS	方差分量 variance components	变异百分比 percentage of variation
种群间 among populations	5	9.720	0.000 78 ^{Va}	0.04
种群内 within populations	113	217.911	1.928 41 ^{Vb}	99.96
总计 total	118	227.630	1.929 19	
固定值 fixation index (F_{ST})			0.000 41	

注: Va. 组群间方差、Vb. 组群内群体间方差

Note: Va. variance between groups; Vb. variance between groups within the group

从 GenBank 数据库下载近缘种多鳞鳢 (*S. si-hama*, GenBank 登录号 KR363150) 和中国鳢 (*S. sinica*, GenBank 登录号 KR363151) 作为外群, 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树 (图 2), 聚类树中不同群体的个体相互交织, 没有形成明显的分支, 种群之间存在广泛的基因交流。

2.3 群体历史动态及分化时间

在 1 000 次模拟抽样的情况下, 用 Arlequin 软件对 6 个群体的少鳞鳢进行中性检验 (表 5 和表 6) 和核苷酸不配对分析 (图 3)。当 Tajima's D 为负, 且在统计学上达到显著水平, 表明种群分化偏离中性突变理论模型, 预示着群体在进化过程中不仅受

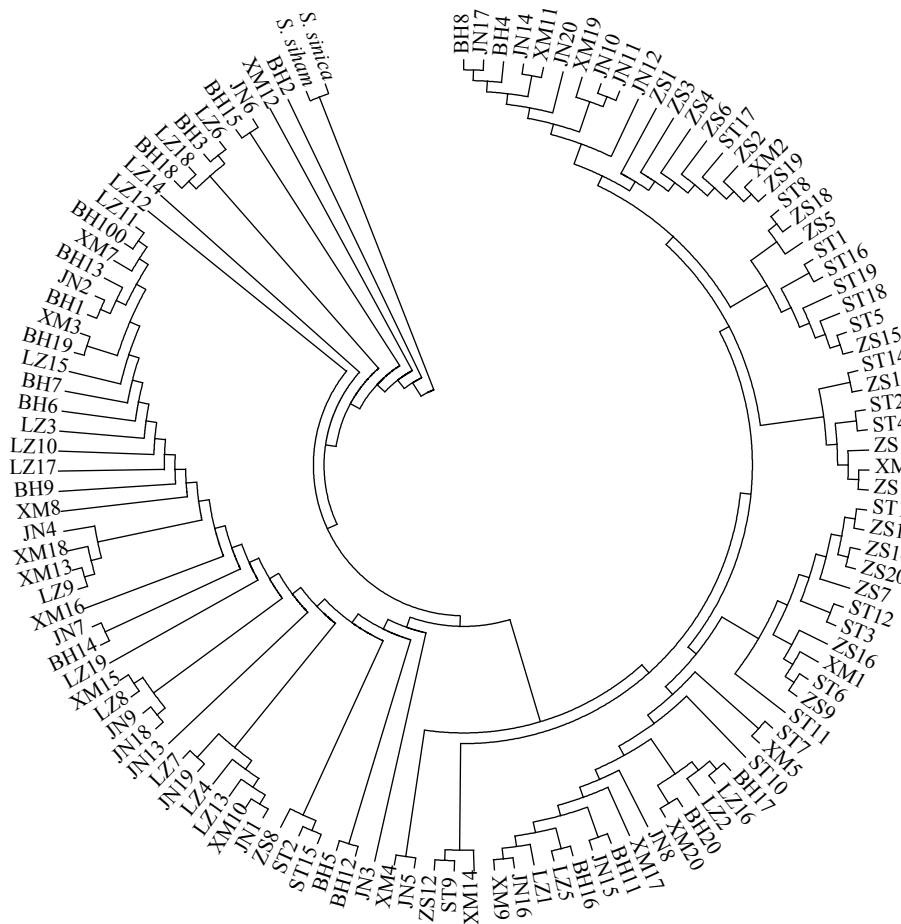


图2 基于ND2序列构建的少鳞鳢NJ树
外群为中国鳢和多鳞鳢

Fig.2 NJ phylogenetic tree of haplotypes based on ND2 sequences of *S. japonica*
S. sinica and *S. sihama* are selected as outgroups.

表5 少鳞鳢群体中性检验及分化时间

Tab.5 Neutral test and differentiation time of fit for *S. japonica*

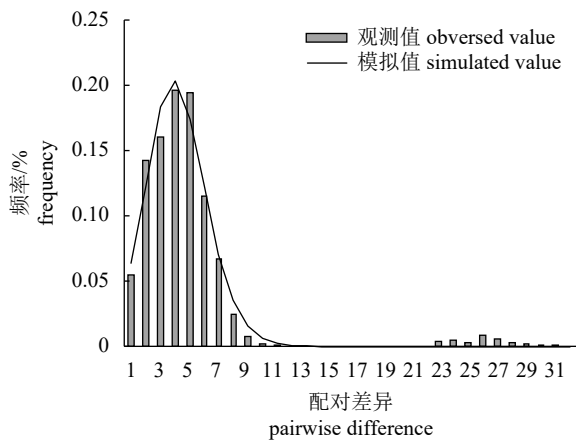
中性检验 neutral test	莱州 LZ	胶南 JN	舟山 ZS	厦门 XM	汕头 ST	北海 BH
Tajima's <i>D</i>	-1.918 06	-1.678 23	-0.721 48	-1.244 16	-2.098 64	-1.378 17
<i>P</i>	0.012 00	0.033 00	0.272 00	0.090 00	0.008 00	0.072 00
Fu's <i>F_s</i>	-7.368 12	-6.792 29	-3.610 54	-12.466 49	-4.380 38	-6.687 65
<i>P</i>	0.000 00	0.001 00	0.050 00	0.000 00	0.030 00	0.003 00
Tau	2.2	3.7	3.5	4.3	5.3	3.4
T (Mya)	0.12	0.21	0.19	0.24	0.29	0.18

表6 少鳞鳢种群中性检验

Tab.6 Neutral test of population for *S. japonica*

数量 number	Tajima's <i>D</i>		Fu's <i>F_s</i>		偏离方差 SSD	<i>R_g</i>
	<i>D</i>	<i>P</i>	<i>F_s</i>	<i>P</i>		
119	-2.223 54	0	-25.916 43	0	0.001 89	0.020 24

到随机漂变因素影响, 还有可能经历过大规模的群体扩张或受到过选择压力、瓶颈效应的影响^[34]。Fu's *F_s* 检验中, 如果 *F_s* 大于零, 表明种群趋于稳定, 反之则表明种群趋于扩张^[35]。结果表明, 无论是从群体还是个体角度来看, Tajima's *D* 和 Fu's *F_s* 均

图3 基于少鳞鳢*ND2*基因单倍型的核苷酸不配对分布图Fig.3 Mismatch distribution based on *ND2* gene haplotypes of *S. japonica*

为负值且显著偏离中性 ($P < 0.05$), 表明少鳞鳢在历史进化过程中经历过群体扩张事件。此外, 偏离方差 (SSD) 和 Raggedness index (R_g) 均较小, 统计检验不显著, 进一步表明群体扩增假说的成立^[29]。核苷酸不配对分布图呈单峰且中性检验差异显著, 表明少鳞鳢群体近期可能受到了瓶颈效应的打击。根据核苷酸不配对分布得到的 Tau, 少鳞鳢性成熟时间为 1 年, 代时取 1, 计算得到少鳞鳢群体发生扩张的时间大约在 (12~29) 万年前的第四纪更新世 (Pleistocene) 晚期。

3 讨论

单倍型多样性 (h) 和核苷酸多样性 (π) 是衡量物种遗传多样性丰富度的重要指标, 也是物种生存适应和发展进化的前提。物种的遗传多样性越高, 对环境的适应能力越强, 对变化也有更强的调整能力^[36]。本研究表明中国沿海少鳞鳢群体遗传多样性较高 ($h=0.9453$, $\pi=0.009718$), 与薛泰强等^[14]和王林燕^[17]分别采用控制区序列和微卫星分子标记对不同地理群体少鳞鳢遗传结构的分析结果相似, 都呈现出相对丰富的遗传多样性水平。这可能与 *ND2* 基因本身具有较高的突变速率有关, 另外种群的高单倍型多样性与种群的数量、所处环境的变化以及生活习性有密切联系^[37], 少鳞鳢种群繁殖时间较长, 单次后代产生数量大, 能够弥补因捕食、捕捞等带来的种群缺失, 使其存在较高的遗传多样性。

莱州群体核苷酸多样性指数最低, 且与厦门、

舟山群体间的遗传差异显著。由于莱州位于采样点最北端, 受渤海沿岸流和黄海冷水团的共同作用, 所处海域水温相对较低, 而浙闽沿岸受亚热带海洋性季风气候影响, 水温普遍偏高, 推测温度变化可能对少鳞鳢遗传变异产生一定影响。鱼类作为变温性动物, 温度变化对其分布和生长发育都具有重要影响。温度变化限制了鱼类成体的扩散并促进其适应局限的生存环境, 使得彼此间交流的概率大幅降低, 这种差异经长期积累并最终导致遗传分化。有文献资料表明, 一些海洋鱼类的遗传多样性分布受到温度和纬度变化的影响, 如王秀亮^[38]对西北太平洋玉筋鱼 (*Ammodytes personatus*) *Cyt b* 基因研究发现, 玉筋鱼单倍型频率在地理分布上与水温变化具有相关性, 因而推测水域环境温度的改变以及洋流系统对玉筋鱼种群扩散及种群地理分布格局可能有着重要影响; Xu 等^[39]对中日沿海 5 个群体褐菖鲉 (*Sebastes marmoratus*) *ATP6* 和 *Cyt b* 基因所编码的氨基酸替换率进行比较时发现, 温度可能是影响群体遗传结构和遗传分化的潜在环境因素。

遗传多样性指数 F_{ST} 是评价物种群体间遗传分化尺度的标准。Wright^[40]的研究发现, 若 $F_{ST} > 0.25$, 表明群体间存在高度分化, $0.15 < F_{ST} < 0.25$, 表示群体间存在中度分化, $0.05 < F_{ST} < 0.15$ 表示群体间存在低度分化, 而 $F_{ST} < 0.05$ 则表明群体间没有分化。本研究发现少鳞鳢各群体间 F_{ST} 均小于 0.05, 结合平均遗传距离的大小来看, 暗示群体间未发生明显的遗传分化, 这与 Gao 等^[16]的研究结果一致。推测少鳞鳢这类小型鱼类群体数量大、分布范围广, 加之早期营浮游生活时间长、本身具备较强迁移能力, 基因交流频繁造成遗传的同质化, 使得种群间遗传分化水平普遍偏低, 阻碍了种群的分化。此外, 基于邻接法构建的系统关系树显示来自不同群体的个体彼此相互交错分布, 没有呈现显著的谱系结构, 也反映了少鳞鳢遗传分化水平较低这一结论。

Hewitt^[41]通过研究证实, 更新世的剧烈气候波动对地球上动植物遗传多样性和分布格局产生了重要影响。基于线粒体控制区序列估算出中日韩不同地理种群少鳞鳢发生群体扩张的时间大约在 (0.423~1.06) 百万年前的晚更新世时期^[16], 本研究对 *ND2* 基因的核苷酸不配对分析得出少鳞鳢群体分化时间大约在 (0.12~0.29) 百万年前的第四纪冰

川期-间冰期旋回^[42]。尽管线粒体不同序列变异速率存在一定差异,但推算出扩张时间均处于第四纪更新世晚期,这一时期气候的急剧变化,全球性大幅度气温变冷,中高纬形成大面积冰盖,大气环流和洋流的变化直接影响动植物生长、演化和分布,导致大量生物种群的迁徙或者灭绝^[43],使得少鳞鳕等海洋鱼类的空间分布格局以及遗传结构发生了较大变化。

鱼类种群结构的时空分布和动态变化与其所处水域的环境因子有着密切关系,过度捕捞、水体污染、工程建设以及外来物种入侵等都会使鱼类资源和遗传多样性遭到破坏。基于线粒体 *ND2* 基因分析的结果显示,我国沿海少鳞鳕种群遗传多样性丰富程度较高,种质资源尚处于相对安全状态,具有一定的资源开发与利用潜力,但由于多遗传标记结合对于揭示种群进化历史和谱系地理格局的形成往往更全面、更准确。因此,在今后的渔业资源管理过程中,还需要综合采用多种分子生物学标记技术来监测少鳞鳕的遗传多样性水平,以实现其资源多样性的合理保护和可持续利用。

参考文献:

- [1] NELSON J S. Fishes of the world[M]. New Jersey: John Wiley & Sons, 2016: 503.
- [2] MCKAY R J. An annotated and illustrated catalogue of the sil-lago, smelt or Indo-Pacific whiting species known to date[R]. Rome: FAO, 1992: 1-83.
- [3] SANO J. Fisheries management by spawning per recruit analysis and yield per recruit analysis for *Sillago japonica* around the coastal waters of Itoshima [Japan] area[R]. Bulletin of Fukuoka Fisheries & Marine Technology Research Center, Fukuoka, 2004: 46-47.
- [4] SHIMASAKI Y, OSHIMA Y, INOUE S, et al. Effect of tributyltin on reproduction in Japanese whiting, *Sillago japonica*[J]. Mar Environ Res, 2006, 62(S): S245-S248.
- [5] OOZEKI Y, HWANG P P, HIRANO R. Larval development of the Japanese whiting, *Sillago japonica*[J]. Jpn J Ichthyol, 1992, 39(1): 59-66.
- [6] KASHIWAGI M, KONDO S, YOSHIDA W, et al. Effects of temperature and salinity on hatching success of Japanese whiting *Sillago japonica* eggs[J]. Suisan Zoshoku, 2000, 48(4): 637-642.
- [7] SULISTIONO S, WATANABE S, YOKOTA M. Reproduction of the Japanese whiting, *Sillago japonica*, in Tateyama Bay[J]. Aquacult Sci, 1999, 47(2): 209-214.
- [8] RAHMAN S M, MAJHI S K, SUZUKI T A, et al. Suitability of cryoprotectants and impregnation protocols for embryos of Japanese whiting *Sillago japonica*[J]. Cryobiology, 2008, 57(2): 170-174.
- [9] RAHMAN S M, STRUESSMANN C A, SUZUKI T, et al. Electroporation enhances permeation of cryoprotectant (dimethyl sulfoxide) into Japanese whiting (*Sillago japonica*) embryos[J]. Theriogenology, 2013, 79(5): 853-858.
- [10] SULISTIONO S, YOKOTA M, KITADA S, et al. Age and growth of Japanese whiting *Sillago japonica* in Tateyama Bay[J]. Fish Sci, 1999, 65(1): 117-122.
- [11] ARAYAMA K, IMAI H, KOHNO H, et al. Early life story of Japanese whiting *Sillago japonica* occurring in the surf zone of sandy beaches Tateyama Bay, central Japan[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 2003, 69(3): 359-367.
- [12] 杨亚峰, 宋娜, 肖家光, 等. 莱州湾少鳞鳕的形态特征描述 [J]. 齐鲁渔业, 2016, 33(10): 8-10.
- [13] 潘晓哲, 高天翔. 基于耳石形态的鳕属鱼类鉴别 [J]. 动物分类学报, 2010, 35(4): 799-805.
- [14] 薛泰强, 杜宁, 高天翔. 基于线粒体 COI 及 *Cytb* 基因的 4 种鳕科鱼类系统发育研究 [J]. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 2010, 40(S1): 91-98.
- [15] 肖家光. 基于线粒体基因组全序列的鳕属鱼类系统发育研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015: 44-53.
- [16] GAO T X, YANG T Y, YANAGIMOTO T, et al. Levels and patterns of genetic variation in Japanese whiting (*Sillago japonica*) based on mitochondrial DNA control region[J]. Mitochondrial DNA Pt A, 2019, 30(1): 172-183.
- [17] 王林燕. 基于微卫星标记的中国鳕和少鳞鳕群体遗传学研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014: 36-64.
- [18] VELLEND M, GEBER M A. Connections between species diversity and genetic diversity[J]. Ecol Lett, 2005, 8(7): 767-781.
- [19] JUAN Y, ZHONG Z Q, FEN L. Mitochondrial DNA and its application to the molecular population genetics of fish[J]. Ecol Sci, 2008, 27(4): 272-276.
- [20] WILSON A C, CANN R L, CARR S M, et al. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics[J]. Biol J Linn Soc, 2010, 26(4): 375-400.
- [21] 杨喜书, 章群, 余帆洋, 等. 华南 6 水系与澜沧江-湄公河攀鲈线粒体 *ND2* 基因的遗传多样性分析 [J]. 南方水产科学, 2017, 13(3): 43-50.
- [22] 阮燕如. 基于线粒体 *ND2* 基因序列的华南地区斑鳢遗传多样性研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2014: 52-53.
- [23] 伊西庆. 中国东部 6 个大型湖泊翘嘴鲈 (*Culter alburnus*) 遗传多样性的线粒体 *ND2* 基因序列分析 [D]. 广州: 暨南大学, 2009: 31-35.
- [24] GEORGE A L, CALDIERARO J B, CHARTRAND K M. Population genetics of the blue shiner, *Cyprinella caerulea*[J]. Southeast Nat, 2008, 7(4): 637-650.
- [25] VERISSIMO A, MCDOWELL J R, GRAVES J E. Genetic population structure and connectivity in a commercially exploited and wide-ranging deepwater shark, the leafscale gulper (*Centrophor-*

- us squamosus*)[J]. Mar Freshw Res, 2012, 63(6): 505-512.
- [26] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982: 76-82.
- [27] CLEWLEY J P. Macintosh sequence analysis software. DNA-Star's LaserGene[J]. Mol Biotechnol, 1995, 3(3): 221-224.
- [28] ROZAS J, FERRERMATA A, SÁNCHEZDELBARRIO J C, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets[J]. Mol Biol Evol, 2017, 34(12): 3299-3302.
- [29] 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]. Mol Ecol Resour, 2010, 10(3): 564-567.
- [30] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Mol Biol Evol, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [31] ROGERS A R, HARPENDING H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences[J]. Mol Biol Evol, 1992, 9(3): 552-569.
- [32] BERMINGHAM E S, MCCAFFERTY A. Molecular systematics of fishes[M]. New York: Academic Press, 1997: 113-126.
- [33] FERGUSON J H. On the use of genetic divergence for identifying species[J]. Biol J Linn Soc, 2015, 75(4): 509-516.
- [34] SKIBINSKI D F. DNA tests of neutral theory: applications in marine genetics[M]. Berlin: Springer Netherlands, 2000: 137-152.
- [35] FU Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection[J]. Genetics, 1997, 147(2): 915-925.
- [36] BONIN A, NICOLE F, POMPANON F, et al. Population adaptive index: a new method to help measure intraspecific genetic diversity and prioritize populations for conservation[J]. Conserv Biol, 2007, 21(3): 697-708.
- [37] NEI M. Molecular evolutionary genetics[M]. New York: Columbia University Press, 1987: 92-145.
- [38] 王秀亮. 玉筋鱼群体遗传多样性及其适应进化研究 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2017: 24-25.
- [39] XU S Y, SUN D R, SONG N, et al. Local adaptation shapes pattern of mitochondrial population structure in *Sebastes marmoratus*[J]. Environ Biol Fish, 2017, 100(7): 763-774.
- [40] WRIGHT S. Evolution and the genetics of populations[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1968: 76-79.
- [41] HEWITT G M. Genetic consequences of climatic oscillations in the quaternary[J]. Philos T R Soc B, 2004, 359(1442): 183-195.
- [42] 刘海松. 地貌学及第四纪地质学 [M]. 北京: 地质出版社, 2013: 10-11.
- [43] 沈浪, 陈小勇, 李媛媛. 生物冰期避难所与冰期后的重新扩散 [J]. 生态学报, 2002, 22(11): 1983-1990.