

斑尾复虾虎鱼群体遗传多样性比较分析

宋娜¹, 宋林², 高天翔^{1*}, 孙希福³

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;

2. 辽东学院实验中心, 辽宁 丹东 118001;

3. 南京市渔政渔港监督管理处, 江苏 南京 210036)

摘要: 基于线粒体 DNA 控制区序列比较分析了斑尾复虾虎鱼丹东和天津群体的遗传多样性及其遗传结构现状。研究结果显示, 在长度为 478 bp 的线粒体 DNA 控制区序列上, 两群体间存在一定程度的差异。丹东群体的单倍型多样性、核苷酸多样性以及两两序列比较的平均碱基差异数分别为 (0.0063 ± 0.0038) , (0.8895 ± 0.0508) 和 (3.0000 ± 1.6343) , 均大于天津群体。基于控制区单倍型序列构建的邻接关系树可以看出, 两群体个体相互混杂, 没有明显的分支与之相对应。两个群体之间遗传分化指数 F_{ST} 值为 0.2395 ($P=0.000$), 表明两群体之间存在较大的遗传分化, 并且确切 P 检验的结果表明两群体不存在随机交配现象。核苷酸不配对分布呈单峰类型, $Fu's F_s$ 和 $Tajima'D$ 中性检验的结果也提示斑尾复虾虎鱼经历过近期群体扩张事件。基于核苷酸不配对分布的峰值 τ 计算得到斑尾复虾虎鱼发生群体扩张事件的时间在 52 400 ~ 104 900 年前。

关键词: 斑尾复虾虎鱼; 线粒体 DNA 控制区; 遗传结构; 遗传多样性; 群体历史动态

中图分类号: S 917

文献标识码: A

斑尾复虾虎鱼 (*Synechogobius ommaturus*) 俗称光鱼, 隶属于鲈形目 (Perciformes)、虾虎鱼科 (Gobiidae)、复虾虎鱼属 (*Synechogobius*), 是暖温性近岸底层中大型虾虎鱼类, 主要分布在中国、朝鲜、日本以及印度尼西亚等地区的沿海、港湾及河口的咸、淡水混合处, 多栖息于底质为淤泥或者泥沙的水域^[1-2]。近年来随着渔业资源的衰退, 斑尾复虾虎鱼由于生长迅速、肉质鲜美, 越来越受到人们的关注, 承受的捕捞压力也逐渐增大。开展斑尾复虾虎鱼的种质资源及遗传多样性现状的研究, 对合理保护及开发斑尾复虾虎鱼这一重要的渔业资源具有极其重要的意义。到目前为止, 对斑尾复虾虎鱼的研究主要集中在其生长、繁殖力、染色体等方面^[2-5], 仅有 SONG 等^[6] 基于线粒体 DNA 控制区部分片段研究了斑尾复虾虎鱼 10 个群体的遗传多样性及遗传结构现状。迄今, 未见其他关于斑尾复虾虎鱼遗传学相关研究的报道。

分子标记是一种有效检测物种遗传多样性和遗传结构的方法^[7-8]。在所有的分子标记中, 线粒体 DNA 具有严格遵守母系遗传、几乎不发生重组、进化速度快等特征^[9], 而线粒体 DNA 控制区的进化速率约是线粒体 DNA 蛋白质编码基因的 2 ~ 5 倍, 具有很高的核苷酸替换速率, 是研究群体水平遗传多样性比较理想的分子标记^[10]。到目前为止, 线粒体 DNA 控制区序列被证实对海洋鱼类群体遗传结构的检测非常有效^[11], 已经成功应用于花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)、日本鳀 (*Engraulis japonicus*)、小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*) 等海洋鱼类的遗传多样性和遗传结构的研究^[12-14]。除此之外, DNA 序列中的多态数量和分布模式也可为推测种群历史提供信息, 进而探讨产生和维持这些多态的机制^[15]。在更新世冰期全球的气候发生了剧烈的变化, 伴随着海平面的下降, 海洋鱼类可能在其分布范围内大量

收稿日期: 2010-10-17 修回日期: 2011-01-05

资助项目: 国家海洋局海洋公益性行业科研项目 (200905019-02)

通讯作者: 高天翔, E-mail: gaotianxiang@ouc.edu.cn

灭绝,仅有部分残留在冰期避难所,而在间冰期,随着气温的回升以及海平面的上升,残留个体可以由冰期避难所发生重新殖化事件。因此可以预期海洋鱼类的分布受到了冰期的强烈影响^[16-18]。

斑尾复虾虎鱼为一年生鱼类,因其在巢穴中产卵的习性及营底栖生活的特征^[2],造成了其卵和成鱼活动范围非常有限。其不同地理群体间是否存在基因交流是值得探讨的一个问题。本研究采用线粒体 DNA 控制区分子标记对来自中国丹东沿海的斑尾复虾虎鱼群体进行分析,并与 GenBank 中注册号为 HQ235657-HQ235674 的斑尾复虾虎鱼天津群体的同源序列片段进行比较,旨在阐明斑尾复虾虎鱼的种群遗传多样性及不同地理群体间的遗传差异,探讨产生和维持种群遗传结构的原因,以期为斑尾复虾虎鱼渔业资源保护及合理的资源开发提供基础资料和科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与保存

20 个斑尾复虾虎鱼个体于 2007 年 8 月份采自中国丹东沿海,经过形态鉴定以后,取样品背部肌肉于 95% 的酒精中保存备用。从 GenBank 上下载序列号为 HQ235657-HQ235674 的斑尾复虾虎鱼天津群体,并选择黄鳍刺虾虎鱼 (*Acanthogobius flavimanus*) 作为外群进行分析。

1.2 DNA 提取与 PCR 扩增

取斑尾复虾虎鱼肌肉组织约 100 mg,采用标准的酚-氯仿方法提取基因组 DNA,将乙醇沉淀后的基因组 DNA 溶解于 100 μ L 双蒸水溶液中,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

斑尾复虾虎鱼控制区序列扩增引物为 dl-x: 5'-CCCATCTCTAGCTCCCAAAGC-3' 和 dl-h: 5'-CTGTAGAGTGAACGCTTGCCATG-3'^[6], PCR 反应体系总体积为 50 μ L,其中:10 \times Buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP 200 μ mol/L, 引物各 0.2 μ mol/L, Taq 酶 1.25 U, 模板 DNA 1 μ L, 加去离子水至 25 μ L。PCR 在 Biometra 热循环仪上进行,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。以上反应均设阴性对照以排除 DNA 污染的情况。取 2 μ L PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 ($U = 5$ V/cm)。

用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海华舜)进行目的片段的回收纯化。在 ABI 公司的 3700 型全自动 DNA 序列分析仪上进行双向测序,测序反应采用与 PCR 反应相同的引物。

1.3 数据分析

对两个群体的序列用 DNASTar (DNASTAR, Inc) 软件进行比对,并辅以人工校正;用 Arlequin 3.0 软件分析两群体的碱基组成、变异位点、转换/颠换值;运用 PAUP 和 Modeltest 软件计算得到适合斑尾复虾虎鱼控制区片段的核苷酸最佳替换模型;采用 Arlequin 3.0 软件进行两群体间遗传分化指数 F_{ST} 的计算并进行确切 P 检验;以黄鳍刺虾虎鱼为外群,用 MEGA 3.0 软件构建系统树。

2 结果

对斑尾复虾虎鱼丹东群体共 20 个个体进行 PCR 扩增得到长度为 504 bp 的序列片段,包括 26 bp 的转运 RNA 和 478 bp 的控制区的第一高变区片段,在 26 bp 的转运 RNA 片段上,并未检测到变异位点,与天津群体经过比对以及人工校正后,截取同源片段 478 bp。本研究是基于控制区 478 bp 长度的两个群体的比较分析。

在长度为 478 bp 的线粒体 DNA 控制区序列上,斑尾复虾虎鱼丹东群体和天津群体存在一定程度的差异。丹东群体 20 个个体共有 14 个变异位点,转换 13 个,颠换 1 个,共定义了 10 个单倍型,天津群体 18 个个体共有 7 个变异位点,转换 7 个,共定义了 7 个单倍型,丹东群体的单倍型多样性、核苷酸多样性以及两两序列比较的平均碱基差异数分别为 (0.0063 ± 0.0038) , (0.8895 ± 0.0508) 和 (3.0000 ± 1.6343) ,均大于天津群体(表 1)。两个群体 A+T 碱基含量(66.7%)都明显大于 C+G 含量(33.3%),且无明显差异。通过 PAUP 和 Modeltest 软件计算得到适合斑尾复虾虎鱼控制区片段的核苷酸最佳替换模型为 TIM+I ($I=0.7636$) (表 1)。

以黄鳍刺虾虎鱼为外群,基于斑尾复虾虎鱼丹东和天津群体控制区单倍型序列构建的邻接关系树可以看出,丹东群体与天津群体个体相互混杂,且有共享单倍型,两群体的单倍型都广泛地分布在单倍型的邻接关系树上,没有明显的分支与之相对应。斑尾复虾虎鱼与黄鳍刺虾虎鱼亲缘关系较远(图 1)。

表 1 本研究中斑尾复虾虎鱼群体遗传多样性信息
Tab. 1 Molecular diversity indices for *S. ommaturus* in this study

控制区 D-loop	丹东 Dandong	天津 Tianjin	总计 total
个体数 number of individuals	20	18	38
序列长度 sequence length	478 bp	478 bp	478 bp
变异位点 variable sites	14	7	18
转换/颠换 transitions/transversions	13/1	7/0	17/1
单倍型 haplotype numbers	10	7	16
核苷酸多样性 nucleotide diversity	0.006 3 ± 0.003 8	0.003 7 ± 0.002 5	0.005 9 ± 0.003 5
单倍型多样性 haplotype diversity	0.889 5 ± 0.050 8	0.764 7 ± 0.073 5	0.889 0 ± 0.032 5
两两序列比较的平均碱基差异数 mean pairwise nucleotide differences	3.000 0 ± 1.634 3	1.777 8 ± 1.07 83	2.813 7 ± 1.518 4

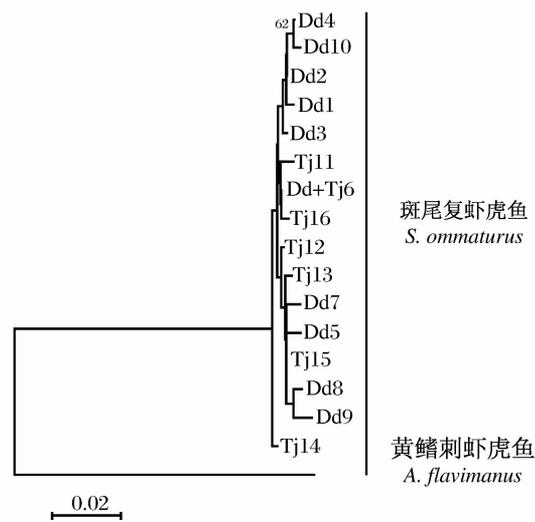


图 1 控制区单倍型序列邻接关系树

分支上的数字为 1 000 次重抽样分析得到的大于 60% 的支持率。

Fig. 1 Neighbor-Joining tree for control region haplotypes

Bootstrap supports of >60% in 1 000 replicates are shown.

两个群体之间遗传分化指数 F_{ST} 值为 0.239 5, 统计检验 P 值为极显著 ($P=0.000$), 表明丹东群体和天津群体之间存在较大的遗传分化, 并且确切 P 检验的结果表明两群体不存在随机交配现象。

核苷酸不配对分布分析的结果表明, 斑尾复虾虎鱼核苷酸不配对分布呈单峰类型 (图 2), 且观测值没有明显偏离模拟值 ($H_{ri}=0.063 5, P=0.190$), F_s 和 D 中性检验的结果与核苷酸不配对分布分析的结果也是一致的 ($Tajima's D=-1.131 2, P=0.131$; $F_s=-7.040 9, P=0.001$), F_s 值显著偏离中性, 这一结果提示斑尾复虾虎鱼经历过近期群体扩张事件。核苷酸不配

对分布的峰值 τ 提供了一个估算群体大致发生扩张的时间, 将每百万年 5% ~ 10% 的斑尾复虾虎鱼控制区进化速率应用于本研究, 基于核苷酸不配对分布的 τ 值为 2.508 计算得到斑尾复虾虎鱼发生群体扩张事件的时间在 52 400 ~ 104 900 年前。

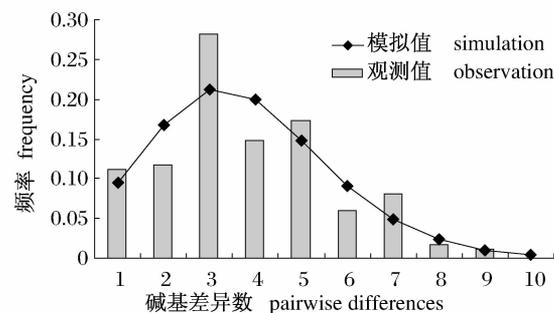


图 2 斑尾复虾虎鱼控制区单倍型的核苷酸不配对分布图

柱形为观测值, 曲线为群体扩张模型下的预期分布。

Fig. 2 The mismatch distributions for the control region haplotypes in *S. ommaturus*

The bars are observed pairwise differences and the solid line is the expected mismatch distributions under the sudden expansion model.

3 讨论

物种的遗传多样性是长期进化的产物, 是其生存适应和发展进化的前提^[19], 物种遗传多样性越高或遗传变异越丰富, 对环境变化的适应能力就越强^[20]; 反之, 具有较低遗传多样性的物种则更容易受到环境变化的影响。因此对物种遗传多样性的研究, 除了可以研究物种的进化历史, 也可以为分析物种的进化潜力和预测物种发展动向提供重要的依据。与已研究报道的鱼类相比^[12-14],

斑尾复虾虎鱼的丹东群体单倍型多样性处于中等水平。AVISE 等^[21]认为,高有效种群尺度是维持物种高水平遗传多样性的原因,因此,与 SONG 等^[6]得到的结果相比较,从遗传学角度来看,斑尾复虾虎鱼现在的资源状况不容乐观。

对遗传结构的研究能够为物种的保护和管理提供重要的依据,可以提供物种分布范围内是否为随机交配群体的信息,明确物种的管理单元,否则可能会出现局域性的过度捕捞以至资源严重衰退的后果^[22]。传统观点认为,海洋大环境中由于不存在明显的物理障碍以及海洋环流对海洋鱼类卵、浮游幼体和成体的输送作用,海洋鱼类通常不存在显著的遗传结构^[19,23],但近年来对许多海洋鱼类的分子系统地理学研究表明,温度或者海沟等环境屏障也可以成为海洋鱼类交流的屏障,从而造成其显著的群体遗传结构,如梭鱼(*Chelon haematocheilus*)、白姑鱼(*Pennahia argentata*)等^[24-25]。斑尾复虾虎鱼丹东群体和天津群体的遗传分化指数 F_{ST} 值为 0.239 5,表明两群体之间存在较大的遗传分化。将这一结果与 SONG 等^[6]对斑尾复虾虎鱼 10 个群体的遗传学的研究结果相比较,丹东群体和天津群体虽然距离很近,但是遗传分化相对较大,这一结果表明斑尾复虾虎鱼的幼体虽然具有一定的扩散能力,但在丹东群体和天津群体之间,确实存在某种障碍,阻碍了其群体间的基因交流。这一结论也提示我们,在对斑尾复虾虎鱼进行管理时,不能将其作为一个单一种群制定管理策略,至于真正阻碍斑尾复虾虎鱼群体之间基因交流的障碍,需要更进一步的研究。

更新世冰期剧烈的气候变化对很多物种的分布范围造成了巨大的影响^[7-9],冰盛期海平面下降了 120 ~ 140 m,渤海的浅海陆架区也因海平面下降而成为陆地,斑尾复虾虎鱼在其分布范围内可能大范围的灭绝,只是在冰期的避难所有所残留,而随着间冰期的气温回升和海平面上升,斑尾复虾虎鱼可能由冰期避难所发生群体扩张事件,核苷酸不配对分布的单峰类型提示斑尾复虾虎鱼可能经历了近期的群体扩张事件,中性检验的结果也支持这一结论。斑尾复虾虎鱼发生群体扩张事件的时间在 52 400 ~ 104 900 万年前,这一时间处于晚更新世冰期,由此可以推断,更新世冰期的气候变化对斑尾复虾虎鱼的数量和分布可能产生

过巨大的影响。

总之,斑尾复虾虎鱼的遗传多样性现状和遗传结构的形成与更新世冰期有着密切的联系,并且在群体发生殖化事件以后,物理海洋环境条件的影响是维持斑尾复虾虎鱼现有遗传结构的重要因素。

参考文献:

- [1] 成庆泰,郑葆珊. 中国鱼类系统检索[M]. 北京: 科学出版社,1987:429-436.
- [2] 陈大刚. 鱼港内斑尾复虾虎鱼生物学的初步调查[J]. 动物学杂志,1978,1:12-15.
- [3] 王金星,赵小凡. 斑尾复虾虎鱼的染色体研究[J]. 海洋科学,1994,4:47-50.
- [4] 谭肖英,李晓东,罗智,等. 矛尾复虾虎鱼繁殖前营养组成的研究[J]. 大连水产学报,2007,4(22):306-310.
- [5] 孙帼英,陈建国,吴引忠. 斑尾复虾虎鱼的成熟与产卵[J]. 水产科技情报,1996,23(3):99-107.
- [6] SONG N, ZHANG X M, SUN X F, et al. Population genetic structure and larval dispersal potential of spottedtail goby *Synechogobius ommaturus* of the Northwest Pacific[J]. Journal of Fish Biology, 2010, 77(2):388-402.
- [7] ENGBRECHT C C, FREYHOF J, NOLTE A, et al. Phylogeography of the bullhead *Cottus gobio* (Pisces: Teleostei: Cottidae) suggests a pre-Pleistocene origin of the major central European populations[J]. Molecular Ecology, 2000, 9(6):709-722.
- [8] WHITEHEAD A, ANDERSON S L, KUIVILA K M, et al. Genetic variation among interconnected populations of *Catostomus occidentalis*: implications for distinguishing impacts of contaminants from biogeographical structuring[J]. Molecular Ecology, 2003,12(10):2817-2833.
- [9] MEYER A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes[M]// HOCHACHKA P W, MOMMSEN T P eds. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Amsterdam:Elsevier,1993:1-38.
- [10] CANN R, BROWN W, WILSON A. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA[J]. Genetics, 1984, 106(3):479-499.
- [11] BUONNACORSI V P, MCDOWELL J R, Graves J E. Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in

- blue marlin (*Makaira nigricans*) [J]. *Molecular Ecology*, 2001, 10(5): 1179–1196.
- [12] 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.
- [13] LIU J X, GAO T X, ZHUANG Z M, *et al.* Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis australis*) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, 40(3): 712–723.
- [14] 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.
- [15] ROCHA L A, BASS A L, ROBERTSON D R, *et al.* Adult habitat preferences, larval dispersal, and the comparative phylogeography of three Atlantic surgeonfishes (Teleostei: Acanthuridae) [J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11(2): 243–252.
- [16] AVISE J C. *Phylogeography: the history and formation of species* [M]. Cambridge: Harvard University Press, 2000.
- [17] HEWITT G M. The genetic legacy of the Quaternary ice ages [J]. *Nature*, 2000, 405(6789): 907–913.
- [18] IMBRIE J, BOYLE E A, CLEMENS S C, *et al.* On the structure and origin of major glaciation cycles, 1. Linear responses to Milankovitch forcing [J]. *Paleoceanography*, 1992, 7(6): 701–738.
- [19] SOLTIS P S, SOLTIS D E. Genetic variation in endemic and widespread plant species examples from Saxifragaceae and Polystichum [J]. *Aliso*, 1991, 13(1): 215–223.
- [20] HUENNEKE L F. Ecological implications of genetic variation in plant populations [M] // FALK D A, HOLSINGER K E, eds. *Genetics and conservation of rare plants*. New York: Oxford University Press, 1991: 31–44.
- [21] AVISE J C, ARNOLD J, BALL R M, *et al.* Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1987, 18: 489–522.
- [22] WAPLES R S. Separating wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species [J]. *Journal of Heredity*, 1998(5), 89: 438–450.
- [23] XIAO Y S, GAO T X, ZHANG Y, *et al.* Demographic history and population structure of blackfin flounder (*Glyptocephalus stelleri*) in Japan revealed by mitochondrial control region sequences [J]. *Biochemical Genetics*, 2010, 48(5–6): 402–417.
- [24] LIU J X, GAO T X, WU S F, *et al.* Pleistocene isolation in the Northwestern Pacific marginal seas and limited dispersal in a marine fish, *Chelon haematocheilus* (Temminck & Schlegel, 1845) [J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(2): 275–288.
- [25] HAN Z Q, GAO T X, YANAGIMOTO T, *et al.* Deep phylogeographic break among white croaker *Pennahia argentata* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Northwestern Pacific [J]. *Fishery Science*, 2008, 74(4): 770–780.

Comparative analysis of genetic diversity of *Synechogobius ommaturus* based on the mitochondrial DNA control region

SONG Na¹, SONG Lin², GAO Tian-xiang^{1*}, SUN Xi-fu³

(1. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Experimental Center, Eastern Liaoning University, Dandong 118001, China;

3. Bureau of Fishery and Fishing Harbor Supervision of Nanjing, Nanjing 210036, China)

Abstract: The spottedtail goby, *Synechogobius ommaturus* (Richardson) is a large, commercially important, benthic fish in the family Gobiidae, which inhabits Asian inshore waters of the Northwestern Pacific, from Japan and China to Indonesia. With the development of fishery resource, *S. ommaturus* is becoming an important marine food and will face higher fishing pressure. It is, therefore, very important to investigate the genetic variance and population structure of this species in order to provide the background information for the management of the species. Until now studies on *S. ommaturus* mainly focused on the biology and chromosome, and there are no genetic investigations for this fish. In the present study, genetic diversity of *S. ommaturus* and genetic differentiation between two geographical populations were analyzed. A 478 base pair (bp) fragment of the hypervariable portion of the mtDNA control region was sequenced and sequences were edited and aligned by DNA Star software. Genetic diversity indices such as number of haplotypes, polymorphic sites, transitions, transversions, indels, haplotype diversity, nucleotide diversity and the mean number of pair-wise differences were obtained using the program Arlequin version 3.0. A Neighbour-Joining (NJ) tree of the control region haplotypes was constructed using MEGA 3.0 and evaluated with 1 000 bootstrap replicates, and *Acanthogobius flavimanus* was served as the out-group. Genetic differentiation between two populations was evaluated with the pairwise fixation index F_{ST} by Arlequin version 3.0. Historical demography of *S. ommaturus* was examined by neutrality tests and mismatch distribution analysis. The results of present study showed that haplotype diversity (0.0063 ± 0.0038), nucleotide diversity (0.8895 ± 0.0508) and the mean number of pairwise differences (3.0000 ± 1.6343) of Dandong population were higher than those of Tianjin population. The topology of the NJ tree rooted with the out-group *A. flavimanus* was shallow, and there were no significant genealogical branches or clusters corresponding to sampling localities. The pairwise fixation index F_{ST} (0.2395) revealed significant genetic differentiation between these two populations. The exact test of population differentiation (non-differentiation exact P values) following sequential Bonferroni correction showed significant differences ($P < 0.01$) among two populations, which rejected null hypothesis. Both mismatch distribution analysis and neutrality tests showed that *S. ommaturus* has experienced a recent population expansion. The observed value of the age expansion parameter (τ) was 2.508 and the time since population expansion was estimated to be 52 400 – 104 900 years ago. During the glacial period, with the decline in sea level, most of the Chinese continental shelf was exposed and the distribution of *S. ommaturus* would have been displaced to the south. These surviving individuals may have reclustered north with the rise in temperature. The results suggested that the Pleistocene ice ages had a major effect on the present genetic structure of *S. ommaturus*. Apart from historical events, environmental factors were believed to be the important factors for shaping the contemporary phylogeographic pattern of *S. ommaturus* and there are some barriers to prevent gene flow between Dandong and Tianjin populations.

Key words: *Synechogobius ommaturus*; control region; genetic structure; genetic diversity; demographic history

Corresponding author: GAO Tian-xiang. E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn