

## 四个舌鳎育种群体表型性状及线粒体 *CO I* 和 *Cyt b* 基因比较分析

田永胜<sup>1\*</sup>, 齐文山<sup>1,2</sup>, 田敬云<sup>3</sup>, 廖小林<sup>1</sup>, 陈松林<sup>1\*</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,农业部海洋渔业可持续发展重点实验室,山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306;

3. 青岛国家海洋科学研究中心,山东 青岛 266071)

**摘要:** 对半滑舌鳎、黑鳃舌鳎和短吻三线舌鳎 2 个自然群体 (Ca1 和 Ca2) 的 21 个可量性状进行了测定,利用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和 Student-Newman-Keuls 多重比较法,对 21 个可量性状进行分析和比较。结果发现,短吻三线舌鳎 2 个群体之间无显著性差异性状达 71.43%,半滑舌鳎与短吻三线舌鳎具有显著性差异性状达 71.43%,黑鳃舌鳎与短吻三线舌鳎具有显著性差异性状达 66.67%~71.43%,半滑舌鳎与黑鳃舌鳎具有显著性差异性状达 57.14%。对 4 个舌鳎群体线粒体 (mtDNA) 细胞色素氧化酶 I 亚基 (*CO I*) 和细胞色素 b (*Cyt b*) 基因进行克隆,在 GenBank 上未发现与黑鳃舌鳎同缘的 *CO I* 和 *Cyt b* 序列,说明黑鳃舌鳎 *CO I* 和 *Cyt b* 基因是首次被克隆,登录号分别为 JQ937270 and JQ937271。3 种舌鳎的 *CO I* 和 *Cyt b* 基因碱基含量分析显示,G 含量最低,T 含量均为最高,并且 AT 含量要高于 GC。利用 *CO I* 和 *Cyt b* 序列分别检测舌鳎 4 个群体种内、种外遗传距离,并构建的 NJ 系统进化树,结果显示:半滑舌鳎与黑鳃舌鳎遗传距离分别为 0.047~0.050 和 0.045,半滑舌鳎与短吻三线舌鳎分别为 0.129~0.132 和 0.161~0.166,黑鳃舌鳎与短吻三线舌鳎分别为 0.123~0.126 和 0.162~0.172,短吻三线舌鳎种内外遗传距离分别为 0.002 和 0.002~0.004,半滑舌鳎与黑鳃舌鳎亲缘关系较近,它们与短吻三线舌鳎的亲缘关系较远,短吻三线舌鳎种内分化未达到种群分化的程度。研究表明,*CO I* 和 *Cyt b* 基因完全可作为 3 种舌鳎种质鉴定的 DNA 条形码。

**关键词:** 半滑舌鳎; 黑鳃舌鳎; 短吻三线舌鳎; 可量性状; *CO I*; *Cyt b*

**中图分类号:** Q 785; S 965

**文献标志码:** A

世界上舌鳎科 (Cynoglossidae) 鱼类约有 3 属 113 种,中国已知约有 32 种,主要为西太平洋及印度洋热带和暖温带底层鱼类,少数生活于淡水内<sup>[1]</sup>,在我国主要分布于黄渤海和东南沿海,是海水鱼类种质资源库中重要的组成部分,其中半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)、黑鳃舌鳎 (*Cynoglossus roulei*) 分别是我国北方和南方特有的鱼类品种,半滑舌鳎经过十多年的人工驯化和繁殖研究,逐步开发成为工厂化养殖的

新品种,但对于黑鳃舌鳎和短吻三线舌鳎 (*Cynoglossus abbreviatus*) 种质资源利用研究较少,仍然处于天然捕捞状态。半滑舌鳎养殖业在市场的推动下迅速发展,目前已成为我国海水养殖的主要鱼类之一。但是随着半滑舌鳎养殖业的不断扩大和发展,一些限制产业发展的问题相继出现,如半滑舌鳎人工繁殖苗种雌性率低、雄性生长慢,多代近亲繁殖导致种质逐渐退化、生长变慢、病害频发等,已经成为限制半

收稿日期:2014-12-21 修回日期:2015-02-05

资助项目:国家自然科学基金(31372510,30972244);国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A408);山东省泰山学者建设工程专项

通信作者:田永胜,E-mail:tianys@ysfri.ac.cn; 陈松林,E-mail:chensl@ysfri.ac.cn

滑舌鳎产业发展的瓶颈。因此利用我国丰富的舌鳎种质资源进行育种研究,培育适合在南北广大地区养殖的舌鳎新品种,对于推动海水养殖产业的发展具有重要的作用。

在半滑舌鳎的遗传育种研究方面,近年来进行了半滑舌鳎雌核发育技术研究<sup>[2-4]</sup>, AFLP 分子标记的筛选及遗传性别的鉴定<sup>[5]</sup>, 遗传连锁图谱的构建<sup>[6]</sup>, 半滑舌鳎家系建立和抗病性能的测定<sup>[7]</sup>, 温度对半滑舌鳎家系生长及性别影响等方面的研究<sup>[8]</sup>, 但是目前还没有专门研究黑鳃舌鳎的任何报道, 对短吻三线舌鳎的报道也仅限于种质资源的鉴定方面, 利用多个舌鳎群体资源进行育种研究也未见报道。在舌鳎种质资源的鉴别方面, 对黄海、渤海半滑舌鳎两个群体的同工酶组织特异性进行了分析<sup>[9]</sup>, 利用线粒体 DNA 的 16S rRNA 和 Cyt *b* 基因对中国沿海 14 种舌鳎亚科 (Cynoglossinae) 鱼类进行了分类研究<sup>[10]</sup>, 但同时利用形态学方法和线粒体 DNA 对舌鳎属 (*Cynoglossus*) 内相近的种群种质进行分析和判别, 还未见报道。

鱼类线粒体 DNA (mtDNA) 具有母系遗传、进化速度快、分子结构简单、几乎不发生重组及不同群体存在进化差异等优良特点<sup>[11]</sup>。其中细胞色素氧化酶 I 亚基 (cytochrome oxidase subunit I, CO I) 和细胞色素 *b* 基因 (cytochrome *b*, Cyt *b*) 的进化速率适中, 是鱼类种、属系统进化研究的优良标记<sup>[12]</sup>。为了改良和培育舌鳎养殖新品种, 近年来从沿海养殖公司和自然环境中收集了半滑舌鳎养殖群体 (Cs)、黑鳃舌鳎 (Cr) 及短吻三线舌鳎的两个自然群体 (Ca1 和 Ca2), 3 种舌鳎均属于鲽形目 (Pleuronectiformes)、舌鳎科、舌鳎属、三线舌鳎亚属 (*Areliscus*), 在形态上具有很多相似性, 直观地进行区分有一定困难, 而且在分类上半滑舌鳎与短吻三线舌鳎存在同种异名现象<sup>[13]</sup>, 同时短吻三线舌鳎种群内在体色和鳞片颜色上也具有差异。为此, 本实验利用以上舌鳎群体大量的可量性状测定分析, 并结合线粒体 CO I 和 Cyt *b* 基因测序分析方法对以上舌鳎群体进行了种质鉴定和判别, 一方面为鉴别以上舌鳎种群寻找可靠的 DNA 条码, 另一方面为种质资源的利用和养殖新品种的培育提供可靠的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 舌鳎群体的收集和测量

从山东省海阳市黄海水产有限公司收集半滑舌鳎 74 尾, 其中包括孵化后 65 d 到 2<sup>+</sup> 龄不同阶段的鱼苗和成鱼 (表 1 中 Cs 群体)。从福建省宁德市沿海收集野生舌鳎 1 000 余尾, 由于当时无法确定其分类地位, 依据外形特征 (体色、侧线、鳃盖有无黑斑和尾部形态) 将其初步区分为 3 个群体, 如表 1 中 Cr、Ca1、Ca2 群体。对 4 个舌鳎群体的 21 个可量和可数性状进行了测量和记录。可量性状包括: 体长、体质量、体长/体宽、体长/头长、头长/眼径、头长/眼间距、头长/背鳍条长、头长/腹鳍条长、头长/臀鳍条长、头长/尾鳍条长。可数性状包括: 中侧线鳞、中侧线鳞前支 (中侧线头部侧线鳞数)、上侧线外侧鳞 (体最宽部上侧线和背鳍基之间鳞片数)、上中侧线间鳞 (体最宽部上侧线和中侧线之间鳞片数)、中下侧线间鳞 (体最宽部中侧线和下侧线之间鳞片数)、下侧线外侧鳞 (体最宽部下侧线和臀鳍基部之间鳞片数)、背鳍条数、腹鳍条数、臀鳍条数、尾鳍条数、脊椎骨。4 个群体分别测量 74、51、14 和 16 尾个体。

### 1.2 表型性状数据分析

首先利用 Excel 工具对每个测量个体数量性状之间的比例进行计算, 然后再利用 SPSS 程序中 One-Way ANOVA 进行方差分析, 利用 Student-Newman-Keuls 方法对结果进行多重比较, 在  $P=0.05$  水平上分析其差异性, 比较结果用字母 (a, b, c, d) 标记法, 在同一性状上字母相同表示差异不显著 ( $P>0.05$ ), 字母不同表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

### 1.3 DNA 样本的采集

实验所用 10 尾半滑舌鳎采自山东省海阳黄海水产有限公司, 10 尾黑鳃舌鳎与 10 尾短吻三线舌鳎 2 个群体 (各 5 尾) 均采自福建宁德沿海, 样本经过显微镜观测年轮, 鉴定年龄为 2<sup>+</sup> 龄。取其鳍条或肌肉组织于无水乙醇中保存。

### 1.4 DNA 提取、扩增及测序

采集的鳍条或肌肉组织利用常规的苯酚/氯仿法提取基因组 DNA, 提取的 DNA 溶于双蒸水后于 -20 °C 保存。扩增所用引物为 CO I F4: 5'-CGAGCAGAACTAAGCCAACC-3', CO I R4: 5'-CAGCAGCTAAGACAGGTAAGGA-3', Cyt *b* L1:

5'-TAGCCACTGCTTT CGTTG-3', *Cyt b* H1: 5'-GTTATTGAGCGGTGTTT-3'。每个 PCR 反应总体积为 50  $\mu\text{L}$ , 其中 5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PCR 缓冲液 (TIANGEN, 含  $\text{Mg}^{2+}$ )、1.25  $\mu\text{L}$  dNTP (CW BIO, 2.5 mmol/L)、上下游引物各 1.25  $\mu\text{L}$  (金斯瑞生物公司合成, 10 mmol/L)、0.5  $\mu\text{L}$  Taq DNA 聚合酶 (TIANGEN, 5 U/ $\mu\text{L}$ )、2  $\mu\text{L}$  模板 DNA、用灭菌的双蒸水补充至 50  $\mu\text{L}$ 。在 PCR 仪 (AB, Alpha-SE) 上进行 PCR 反应, 反应程序为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 35 个循环 (95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 57  $^{\circ}\text{C}$  *CO I* 退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min 或 54  $^{\circ}\text{C}$  *Cyt b* 退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min), 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.5 PCR 产物测序及数据分析

PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 溴化乙锭 (EB) 染色, 凝胶成像系统 (BIO-RAD, GelDoc 200) 观察拍照后回收纯化。纯化后, 送至华大基因在 ABI 3730 全自动基因测序分析仪上进行测序, 测序所用引物为扩增引物。测序结果利用 Clustal X<sup>[14]</sup> 软件进行比对、校正, 之后利用 MEGA 3.1<sup>[15]</sup> 软件对比对、校正后的测序结果进行碱基组成、变异位点、简约信息位点进行统计分

析, 利用 Kimura 双参数模型<sup>[16]</sup> 计算遗传距离, 并利用邻接法<sup>[17]</sup> (Neighbor-Joining) 构建系统进化树, 与 GenBank 上的牙鲆线粒体 *CO I* 和 *Cyt b* 基因进行分析, 对所得系统树进行重复次数为 1 000 次的自展检验。

## 2 结果

### 2.1 四个舌鲷群体外型特征

半滑舌鲷 (Cs) 体长 2.1 ~ 59.9 cm, 体左侧呈黄褐色, 腹部白色或具不规则黑斑, 体色均匀, 鳃盖后缘半圆形, 尾部较细长。沿体中线和两侧有 3 条侧线, 3 条侧线在吻端和尾部汇合, 在鳃盖前缘有一垂直线将 3 条侧线连在一起。Cr 群体体长 21.7 ~ 40.0 cm, 鳃盖部具大黑斑, 体背侧具数个不规则小黑斑。鳃盖后缘较平直。体梭形, 尾较粗短, 侧线形态与半滑舌鲷相似。Ca1 群体体长 8.7 ~ 28.1 cm, 较以上群体短小, 体黄褐色, 鳃盖部体色较暗, 鳃盖内侧黑色, 尾鳍条灰黑色, 体背具三条侧线。Ca2 群体体长 17.4 ~ 30.7 cm, 主要特征为鳃盖部色暗, 鳃盖内侧黑色, 每个鳞片边缘为黑色, 尾鳍条深黑色, 体背具三条侧线。

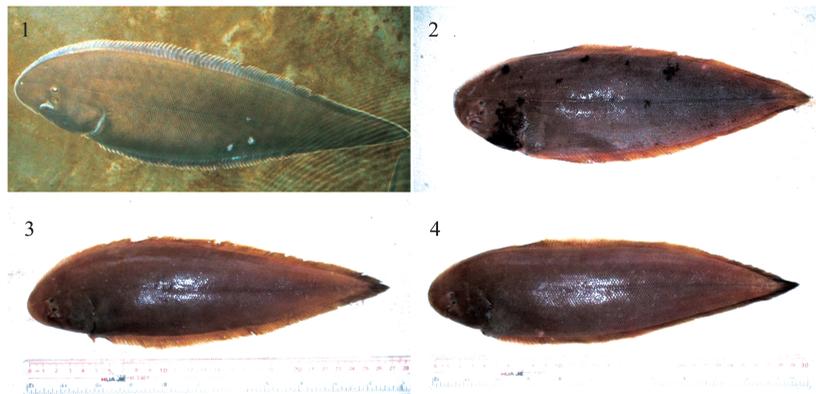


图 1 四种舌鲷形态

Fig. 1 Forms of the four tongue sole populations

1. 半滑舌鲷 *C. semilaevis* (Cs), 2. 黑鳃舌鲷 *C. roulei* (Cr), 3. 短吻三线舌鲷 *C. abbreviatus* (Ca1), 4. 短吻三线舌鲷 *C. abbreviatus* (Ca2)

### 2.2 四个舌鲷群体表型性状比较

4 个舌鲷群体采集样本中 Cr 群体体长和体质量最大, Cs 次之, Ca1 和 Ca2 较小。从表 1 分析可以看出, 半滑舌鲷 (Cs) 和黑鳃舌鲷 (Cr) 在体长/体宽、头长/眼间距、头长/各鳍条长、臀鳍条数、中下侧线间鳞几个性状上具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。黑鳃舌鲷 (Cr) 和短吻三线舌鲷 (Ca1 和 Ca2) 在体长/体宽、体长/头长、头长/眼径、头长/各鳍条长、中侧线鳞前支、上下侧线外侧

鳞、上中下侧线间鳞、背鳍条数、臀鳍条数、尾鳍条数个性状上具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。21 个可量性状中除腹鳍条数、脊椎骨数、体长和体质量之外, 半滑舌鲷 (Cs) 和短吻三线舌鲷 (Ca1 和 Ca2) 在其他可量性状上都具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。综合分析得出, Ca1 和 Ca2 群体在 15 个性状上无显著性差异, 无显著性差异性状达 71.43%, 可以认为 Ca1 和 Ca2 为同一种群。Cs 和 Ca1 有 15 个性状存在显著性差异, Cs 和 Ca2

也具有 15 个性状存在显著性差异,显著性差异性状占 71.43%,可以说明 Cs 群体与 Ca1、Ca2 存在较大的差异,Cs 为另一不同的种群。Cs 和 Cr 有 12 个性状存在显著性差异,显著性差异性状占 57.14%。Cr 和 Ca1 有 14 个性状存在显著性差

异,Cr 和 Ca2 有 15 个性状存在显著性差异,显著性差异性状占 66.67%~71.43%,可以说明 Cr 群体与 Ca1 和 Ca2 完全不同,属于另一个种群。从可量和可数性状方面将收集的半滑舌鳎育种群体分为 3 个明显不同的种群。

表 1 半滑舌鳎、黑鳃舌鳎、短吻三线舌鳎 2 个群体可数性状比较分析  
Tab. 1 The comparative analysis of measurable characters of four tongue sole groups

性状 character	种群 group	样本量 <i>n</i>	均值 ± 标准差 mean ± SD	95% 置信度 confidence interval for mean		最小值 minimum	最大值 maximum
				下限 lower bound	上限 upper bound		
体长/cm body length	Cs	74	19.199 ± 18.079 <sup>b</sup>	15.010	23.387	2.10	59.90
	Cr	14	34.729 ± 6.103 <sup>a</sup>	31.205	38.252	21.70	40.00
	Ca1	51	17.216 ± 6.031 <sup>b</sup>	15.519	18.912	8.70	28.10
	Ca2	16	25.313 ± 3.969 <sup>b</sup>	23.197	27.428	17.40	30.70
体质量/g body weight	Cs	74	186.933 ± 373.623 <sup>ab</sup>	100.371	273.494	0.08	1399.80
	Cr	11	354.636 ± 151.894 <sup>a</sup>	252.593	456.680	64.00	496.00
	Ca1	31	54.261 ± 32.464 <sup>b</sup>	42.353	66.169	8.00	136.00
	Ca2	16	101.125 ± 50.604 <sup>b</sup>	74.160	128.089	30.60	190.20
体长/体宽 body length/ body width	Cs	64	3.895 ± 0.355 <sup>b</sup>	3.806	3.983	3.21	5.45
	Cr	14	3.468 ± 0.170 <sup>c</sup>	3.369	3.566	3.15	3.81
	Ca1	50	4.156 ± 0.388 <sup>a</sup>	4.045	4.266	3.33	6.04
	Ca2	16	4.071 ± 0.179 <sup>ab</sup>	3.975	4.166	3.68	4.35
体长/头长 body length/ head length	Cs	64	4.559 ± 0.263 <sup>c</sup>	4.494	4.625	3.79	5.20
	Cr	14	4.501 ± 0.103 <sup>c</sup>	4.442	4.561	4.35	4.64
	Ca1	51	5.189 ± 0.319 <sup>b</sup>	5.099	5.279	4.47	5.85
	Ca2	16	5.453 ± 0.273 <sup>a</sup>	5.308	5.599	4.76	5.88
头长/眼径 head length/ eye diameter	Cs	64	14.039 ± 2.277 <sup>a</sup>	13.471	14.608	10.00	18.50
	Cr	14	13.972 ± 2.067 <sup>a</sup>	12.778	15.165	11.75	18.40
	Ca1	51	11.781 ± 1.854 <sup>b</sup>	11.259	12.303	7.75	17.00
	Ca2	16	11.935 ± 1.726 <sup>b</sup>	11.016	12.855	10.00	16.50
头长/眼间距 head length/ eye spacing	Cs	64	17.2289 ± 3.601 <sup>a</sup>	16.329	18.128	11.00	28.00
	Cr	14	13.589 ± 2.042 <sup>b</sup>	12.411	14.769	10.00	17.00
	Ca1	51	13.657 ± 3.081 <sup>b</sup>	12.790	14.524	8.00	25.00
	Ca2	16	13.016 ± 1.903 <sup>b</sup>	12.002	14.031	10.00	16.50
头长/背鳍条长 head length/ dorsal fin length	Cs	64	6.504 ± 0.913 <sup>a</sup>	6.276	6.732	4.50	9.33
	Cr	14	4.848 ± 0.658 <sup>b</sup>	4.468	5.228	3.92	6.57
	Ca1	50	4.124 ± 0.368 <sup>c</sup>	4.019	4.229	3.33	5.00
	Ca2	16	3.908 ± 0.409 <sup>c</sup>	3.689	4.1264	3.36	4.71
头长/腹鳍条长 head length/ pelvic fins length	Cs	59	6.804 ± 0.883 <sup>a</sup>	6.574	7.034	4.50	9.50
	Cr	14	6.000 ± 1.175 <sup>b</sup>	5.322	6.678	4.67	9.20
	Ca1	49	4.683 ± 0.626 <sup>c</sup>	4.503	4.863	2.47	6.71
	Ca2	16	4.536 ± 0.482 <sup>c</sup>	4.279	4.793	3.87	5.50
头长/臀鳍条长 head length/ anal fin length	Cs	64	5.779 ± 0.623 <sup>a</sup>	5.623	5.934	4.50	7.00
	Cr	14	4.461 ± 0.869 <sup>b</sup>	3.959	4.963	3.64	7.08
	Ca1	50	3.814 ± 0.378 <sup>c</sup>	3.707	3.922	2.87	4.70
	Ca2	16	3.651 ± 0.359 <sup>c</sup>	3.460	3.843	3.13	4.25

续表 1

性状 character	种群 group	样本量 <i>n</i>	均值 ± 标准差 mean ± SD	95% 置信度 95%		最小值 minimum	最大值 maximum
				confidence interval for mean			
				下限 lower bound	上限 upper bound		
头长/尾鳍条长 head length/ tail fin length	Cs	61	4.135 ± 1.048 <sup>b</sup>	3.867	4.404	2.75	7.29
	Cr	5	5.136 ± 1.789 <sup>a</sup>	2.914	7.358	3.74	7.55
	Ca1	30	3.338 ± 0.444 <sup>c</sup>	3.172	3.504	2.50	4.30
	Ca2	10	3.193 ± 0.322 <sup>c</sup>	2.962	3.423	2.89	3.86
中侧线鳞 middle lateral line scales	Cs	34	129.941 ± 8.279	127.053	132.829	97.00	141.00
	Cr	10	127.400 ± 6.501	122.749	132.051	116.00	137.00
	Ca1	10	123.100 ± 7.460	117.763	128.437	110.00	132.00
	Ca2	9	122.111 ± 4.807	118.416	125.806	115.00	128.00
中侧线鳞前支 anterior branch of the middle lateral line scales	Cs	34	41.706 ± 4.261 <sup>a</sup>	40.219	43.193	30.00	54.00
	Cr	9	42.222 ± 4.658 <sup>a</sup>	38.642	45.803	34.00	48.00
	Ca1	7	33.714 ± 3.7291 <sup>b</sup>	30.266	37.163	28.00	39.00
	Ca2	9	30.556 ± 3.504 <sup>b</sup>	27.862	33.249	25.00	35.00
上侧线外侧鳞 scales above the upper lateral line	Cs	34	9.177 ± 0.758 <sup>a</sup>	8.912	9.441	8.00	11.00
	Cr	11	9.546 ± 0.688 <sup>a</sup>	9.084	10.007	9.00	11.00
	Ca1	10	6.300 ± 1.059 <sup>b</sup>	5.542	7.058	5.00	8.00
	Ca2	9	6.222 ± 0.441 <sup>b</sup>	5.883	6.561	6.00	7.00
上中侧线间鳞 scales between upper and middle lateral line	Cs	34	24.118 ± 1.665 <sup>a</sup>	23.537	24.699	20.00	27.00
	Cr	11	23.909 ± 1.446 <sup>a</sup>	22.938	24.881	22.00	27.00
	Ca1	10	18.300 ± 1.567 <sup>b</sup>	17.179	19.421	17.00	21.00
	Ca2	9	18.667 ± 1.118 <sup>b</sup>	17.807	19.526	16.00	20.00
中下侧线间鳞 scales between middle and under lateral line	Cs	34	29.706 ± 2.990 <sup>a</sup>	28.663	30.749	23.00	36.00
	Cr	11	25.636 ± 1.362 <sup>b</sup>	24.722	26.551	23.00	27.00
	Ca1	9	18.333 ± 1.732 <sup>d</sup>	17.002	19.665	16.00	21.00
	Ca2	9	21.667 ± 1.658 <sup>c</sup>	20.392	22.941	18.00	24.00
下侧线外侧鳞 scales below the under lateral line	Cs	34	10.677 ± 1.224 <sup>a</sup>	10.249	11.104	9.00	14.00
	Cr	11	10.364 ± 0.674 <sup>a</sup>	9.911	10.817	9.00	11.00
	Ca1	10	6.300 ± 1.0594 <sup>b</sup>	5.542	7.058	5.00	8.00
	Ca2	9	6.667 ± 0.707 <sup>b</sup>	6.123	7.210	5.00	7.00
背鳍条数 number of dorsal fins	Cs	34	117.500 ± 4.487 <sup>b</sup>	115.934	119.066	109.00	127.00
	Cr	9	118.778 ± 4.353 <sup>ab</sup>	115.432	122.123	110.00	125.00
	Ca1	10	121.900 ± 4.483 <sup>ab</sup>	118.693	125.107	116.00	129.00
	Ca2	9	122.778 ± 4.711 <sup>a</sup>	119.157	126.399	116.00	128.00
腹鳍条数 number of pelvic fins	Cs	34	4.000 ± 0.000	4.000	4.000	4.00	4.00
	Cr	11	4.000 ± 0.000	4.000	4.000	4.00	4.00
	Ca1	9	4.000 ± 0.000	4.000	4.000	4.00	4.00
	Ca2	9	4.000 ± 0.000	4.000	4.000	4.00	4.00
臀鳍条数 number of anal fins	Cs	34	89.059 ± 3.015 <sup>c</sup>	88.007	90.111	81.00	97.00
	Cr	9	94.333 ± 3.808 <sup>b</sup>	91.406	97.260	85.00	97.00
	Ca1	10	98.900 ± 3.348 <sup>a</sup>	96.505	101.295	94.00	103.00
	Ca2	9	98.222 ± 4.353 <sup>a</sup>	94.877	101.568	90.00	103.00
尾鳍条数 number of caudal fins	Cs	31	9.548 ± 0.888 <sup>ab</sup>	9.223	9.874	8.00	12.00
	Cr	8	10.000 ± 1.069 <sup>a</sup>	9.106	10.894	9.00	12.00
	Ca1	7	8.288 ± 0.951 <sup>c</sup>	7.406	9.165	7.00	10.00
	Ca2	7	8.857 ± 0.690 <sup>bc</sup>	8.219	9.495	8.00	10.00
脊椎骨 number of spines	Cs	10	57.400 ± 0.966 <sup>b</sup>	56.709	58.091	56.00	59.00
	Cr	6	58.167 ± 0.408 <sup>ab</sup>	57.738	58.595	58.00	59.00
	Ca1	6	57.667 ± 2.251 <sup>b</sup>	55.305	60.029	54.00	60.00
	Ca2	10	59.500 ± 1.179 <sup>a</sup>	58.657	60.343	58.00	61.00

注:Cs. 半滑舌鳎, Ca. 黑鳃舌鳎, Ca1. 短吻三线舌鳎群体 1, Ca2. 短吻三线舌鳎群体 2

Notes: *C. semilaevis* (Cs), *C. roulei* (Ca), *C. abbreviatus* (Ca1), *C. abbreviatus* (Ca2)

将以上外形特征和数量特征与中国鱼类志中三线舌鳎亚属的特征进行比较<sup>[1]</sup>,发现来自福建宁德的舌鳎与半滑舌鳎特征明显不同。Ca1 和 Ca2 为同一群体,其特征与短吻三线舌鳎相似。Cr 群体特征与黑鳃舌鳎特征相似。

### 2.3 三种舌鳎 CO I 和 Cyt b 基因片段序列分析

利用设计的 2 对引物分别对半滑舌鳎、黑鳃舌鳎和短吻三线舌鳎 2 个群体的线粒体 DNA 上的 CO I 基因和 Cyt b 基因片段进行了扩增,分别扩增出了约 480 bp 和 550 bp 的片段,其电泳结果(部分,图 2)与预期片段长度一致,将序列两端引物及部分序列截去后分别得到 443 bp 和 508 bp 的基因片段。将所得序列 Blast 分析比较后得知:半滑舌鳎 CO I 基因和 Cyt b 基因片段与 GenBank 上半滑舌鳎(登录号:GQ380409.1)的基因片段同源性分别为 99% 和

100%。短吻三线舌鳎 CO I 基因和 Cyt b 基因与 GenBank 上短吻三线舌鳎(登录号:GQ380410.1)相关基因片段一致,但结果同时显示短吻三线舌鳎 CO I 基因与 GenBank 上紫斑舌鳎(*Cynoglossus purpureomaculatus* 登录号:DQ116749.1)同源性也达到了 100%,短吻三线舌鳎 Cyt b 基因与 GenBank 上中华舌鳎(*Cynoglossus sinicus* 登录号:GQ267815.1)相关基因仅有 1 个位点存在差异。将黑鳃舌鳎的 CO I 基因和 Cyt b 基因片段分别上传到 GenBank,登录号分别为 JQ937270 and JQ937271,在 GenBank 上没有找到与此同缘的基因序列。利用 CO I 基因片段扩增,得到半滑舌鳎、黑鳃舌鳎和短吻三线舌鳎的单倍型数量分别为 3、1 和 2 个。利用 Cyt b 基因片段扩增,得到 3 种舌鳎的单倍型数量分别为 1、2 和 5 个。

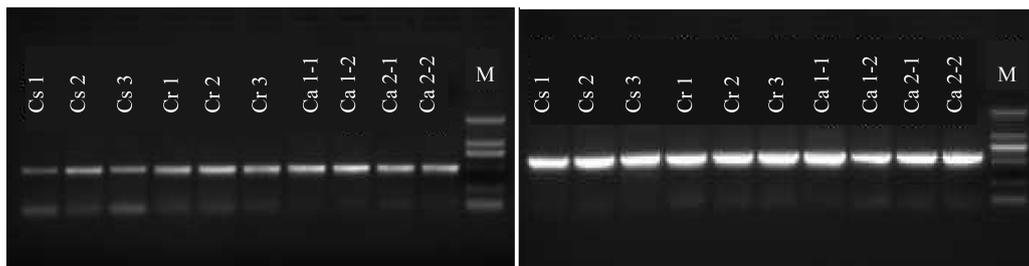


图 2 三种舌鳎 CO I 基因(左图)和 Cyt b 基因扩增结果电泳图(右图)

Cs. 半滑舌鳎; Cr. 黑鳃舌鳎; Ca. 短吻三线舌鳎; M. DL2000 mark

Fig. 2 The amplification map of mtDNA CO I gene fragments(left) and Cyt b gene fragment(right) of the three tongue sole populations

Cs. *C. semilaevis*; Cr. *C. roulei*; Ca. *C. abbreviatus*; M. DL2000 mark

三种舌鳎 CO I 基因片段序列分析 利用 MEGA 3.1 软件对 3 种舌鳎的 CO I 基因片段的 A、T、G、C 平均含量(表 2)进行统计,3 种舌鳎 CO I 基因片段中的 G 含量最低,T 含量最高,且 AT 含量要高于 GC 含量。

表 2 三种舌鳎 CO I 基因片段 A、T、G、C 平均含量  
Tab. 2 The average A, T, G, C contents of the three tongue sole populations

	A	C	G	T	AT	GC
Cs	0.245	0.269	0.159	0.327	0.572	0.428
Cr	0.251	0.264	0.156	0.330	0.581	0.419
Ca1	0.253	0.253	0.156	0.338	0.591	0.409
Ca2	0.253	0.253	0.156	0.339	0.592	0.409

注:Cs. 半滑舌鳎; Cr. 黑鳃舌鳎; Ca1. 短吻三线舌鳎; Ca2. 短吻三线舌鳎

Notes: Cs. *C. semilaevis*; Cr. *C. roulei*; Ca. *C. abbreviatus*

3 种舌鳎 CO I 序列共有 62 个变异位点,约占总片段的 14.0%,其中有一个简约信息位点,定义了 63 个核苷酸替代。其中转换(transition) 56 个,颠换(transversion) 7 个,转换颠换比 Ts/Tv 为 8,没有碱基的插入与缺失现象。黑鳃舌鳎种内未出现碱基的差异现象。半滑舌鳎种内共出现 2 处碱基的转换,短吻三线舌鳎种内在 347 位点有一个碱基 T-C 转换。半滑舌鳎 10 个个体共检测到 3 个单倍型(Cs I, Cs II 和 Cs III),比率分别为 5/10、4/10 和 1/10,黑鳃舌鳎的 10 个个体共享 1 个单倍型(Cr),短吻三线舌鳎的 2 个群体共检测到 2 个单倍型(Ca I 和 Ca II),2 个群体共享单倍型 Ca I,比率分别为 4/5 和 5/5,单倍型 Ca II 只出现在 Ca I 群体中,比率为 1/5(图 3)。

半滑舌鳎和短吻三线舌鳎的种间遗传距离最大,为 0.129 ~ 0.132,半滑舌鳎和黑鳃舌鳎的种间遗传距离最小,为 0.047 ~ 0.050,黑鳃舌鳎和

短吻三线舌鳎的种间遗传距离为 0.123 ~ 0.126,半滑舌鳎种内遗传距离为 0.002 ~ 0.005,短吻三线舌鳎种内遗传距离为 0.002。

```

1111111 1111111122 2222222233 3333333333 3333333344 44
134445557 7991223455 7778899902 3445669900 0112223345 5666789911 23
2751473691 4586587056 4790214764 6251033626 8170395870 3358100203 51
#Cs I TTTTCCTACG TCGCCCTTT TTACGCAAGT TGAATGCCCG CATACTCCCC TGGTACTACC TC
#Cs II .....G.....
#Cs III .....C.....
#Cr ...C...T...TA.T...A...C...A.GGA. CA..C...T...G...T... ..A.G...T...
#Ca I CAC.TT.GTA C.ATTTTC.C C.GT.T...C CA.TCATTTA TCCGGCTTTA CAAG.TCGTT CT
#Ca II CAC.TT.GTA C.ATTTTC.C C.GT.T...C CA.TCATTTA TCCGGCTT.A CAAG.TCGTT CT
    
```

图 3 三种舌鳎 mtDNA CO I 基因序列变异位点

Cs. 半滑舌鳎; Cr. 黑鳃舌鳎; Ca. 短吻三线舌鳎

Fig. 3 Variable sites of mitochondrial CO I gene segments in *C. semilaevis*, *C. roulei* and *C. abbreviatus*

Cs. *C. semilaevis*; Cr. *C. roulei*; Ca. *C. abbreviatus*

表 3 三种舌鳎 mtDNA CO I 基因遗传距离 (对角线下) 和转换/颠换数 (对角线上)

Tab. 3 Genetic distance (below the diagonal) and substitution (above the diagonal) among 3 *Cynoglossus* species for mtDNA COI

	Cs I	Cs II	Cs III	Cr	Ca I	Ca II
Cs I		1/0	1/0	19/1	45/6	44/6
Cs II	0.002		2/0	20/1	46/6	45/6
Cs III	0.002	0.005		20/1	46/6	45/6
Cr	0.047	0.050	0.050		43/7	42/7
Ca I	0.129	0.132	0.132	0.126		1/0
Ca II	0.126	0.129	0.129	0.123	0.002	

注: Cs. 半滑舌鳎; Cr. 黑鳃舌鳎; Ca. 短吻三线舌鳎

Notes: Cs. *C. semilaevis*; Cr. *C. roulei*; Ca. *C. abbreviatus*

三种舌鳎 Cyt b 基因片段序列分析 利用 MEGA 3.1 软件分析 3 种舌鳎的 Cyt b 基因片段的 A、T、G、C 含量 (表 4), 结果表明在该基因片段上, G 含量最低, T 含量最高, AT 含量约为 GC 含量的 1.5 倍。

表 4 三种舌鳎的 Cyt b 基因片段 A、T、G、C 含量

Tab. 4 A, T, G, C contents of three kinds of tongue sole Cyt b gene fragments

	T	C	A	G	AT	GC
Cs	0.310	0.286	0.292	0.112	0.602	0.398
Cr	0.316	0.278	0.292	0.114	0.608	0.392
Ca1	0.341	0.253	0.266	0.140	0.607	0.393
Ca2	0.342	0.252	0.267	0.140	0.609	0.391

注: Cs. 半滑舌鳎; Cr. 黑鳃舌鳎; Ca. 短吻三线舌鳎

Notes: Cs. *C. semilaevis*; Cr. *C. roulei*; Ca. *C. abbreviatus*

3 种舌鳎 Cyt b 序列共有 86 个变异位点, 约占总片段的 19.6%, 其中简约信息位点 2 个, 定义了 88 个核苷酸替换, 其中转换 (transition) 75 个, 颠换 (transversion) 13 个, 转换颠换比 Ts/Tv 为 5.8。各有一个位点出现碱基的插入 (T) 与碱基的缺失 (A) 现象。半滑舌鳎和黑鳃舌鳎种内个体变异较小, 短吻三线舌鳎相对较大, 半滑舌鳎未出现碱基的差异, 黑鳃舌鳎出现 1 个位点碱基缺失现象, 短吻三线舌鳎的 2 个群体共出现 1 个位点碱基的缺失和 1 个位点碱基的插入, 3 个位点的核苷酸发生替代。半滑舌鳎的 10 个个体共享 1 个单倍型 (Cs), 黑鳃舌鳎的 10 个个体检测到 2 个单倍型 (Cr I 和 Cr II), 2 种单倍型的比率分别为 8/10 和 2/10, 短吻三线舌鳎的 2 个群体共检测到 5 个单倍型 (Ca I, Ca II, Ca III, Ca IV 和 Ca V), 2 个群体共享单倍型 Ca I, 比率分别为 3/5 和 2/5, 单倍型 Ca II 在 Ca1 中的比率为 2/5, 单倍型 Ca III、Ca IV 和 Ca V 在 Ca2 中的均为 1/5 (图 4)。

黑鳃舌鳎和短吻三线舌鳎的种间遗传距离最大, 为 0.162 ~ 0.172, 半滑舌鳎和黑鳃舌鳎的种间遗传距离最小, 为 0.045, 半滑舌鳎和短吻三线舌鳎的种间遗传距离为 0.161 ~ 0.166, 短吻三线舌鳎种内遗传距离为 0.002 ~ 0.004 (表 5)。

```

11111 1111111111 1111122222 2222222222 3333333333
112345556 6778911333 4444556777 8889902224 4556777899 0122334557
9784981573 6281348058 1247393148 0692812380 9588369212 1018695142
#Cs AC-TTACTTC GTCATCACGA TACCCACATC CAACCCACAC CTCATCAAC CTCCCACCTA
#Cr I ...G..C. A..... ..TT..... .....G.. ..CTG.T... ..TT.G.TA.
#Cr II -...G..C. A..... ..TT..... .....G.. ..CTG.T... ..TT.G.TA.
#Ca I .T-CCCTA.T ACTGCTGTAG CG.TGG.GCT AGTTTTTGT TA...CTTTA TC.TT.T.GC
#Ca II -T-CCCTA.T ACTGCTGTAG CG.TGG.GCT AGTTTTTGT TA...CTTTA TC.TT.T.GC
#Ca III .TTCCCTA.T ACTGCTGTAG CG.TGG.G.T AGTTTTTGT TA...CTTTA TC.TT.T.GC
#Ca IV .T-CCCTA.T ACTGCTGTAG CG.TGG.GCT AGTTTTTGT TA...CTTTA TC.TT.T.GC
#Ca V .T-CCCTA.T ACTGCTGTAG CG.TGGTGT AGTTTTTGT TA...CTTTA TC.TT.T.GC

3334444444 4444444444 444444
8990011223 4555566788 889999
1362314362 7036968445 670568
#Cs CAGTCATTCC AACTCTCTAC AAATCG
#Cr I ..AC..C... ..T...T ...C.A
#Cr II ..AC..C... ..T...T ...C.A
#Ca I TGA.TG.CTT GGTC.CTCGT GGGCTA
#Ca II TGA.TG.CTT GGTC.CTCGT GGGCTA
#Ca III TGA.TG.CTT GGTC.CTCGT GGGCTA
#Ca IV TGA.TG.CTT GGTC.CTCGT GGGCTA
#Ca V TGA.TG.CTT GGTC.CTCGT GGGCTA
    
```

图 4 三种舌鲷 mtDNA Cyt b 基因片段部分序列

Cs. 半滑舌鲷; Cr. 黑鳃舌鲷; Ca. 短吻三线舌鲷

Fig. 4 Variable sites of mitochondrial Cyt b gene segments in *C. semilaevis*, *C. roulei*, and *C. abbreviatus*

Cs. *C. semilaevis*; Cr. *C. roulei*; Ca. *C. abbreviatus*

表 5 三种舌鲷 mtDNA Cyt b 基因遗传距离(对角线下)和转换/颠换数(对角线上)

Tab. 5 Genetic distance (below the diagonal) and substitution (above the diagonal) among 3 *Cynoglossus* species for mtDNA Cyt b

	Cs	Cr I	Cr II	Ca I	Ca II	Ca III	Ca IV	Ca V
Cs		21/1	21/1	61/11	61/11	60/11	60/11	62/11
Cr I	0.045		0/0	64/10	64/10	63/10	63/10	65/10
Cr II	0.045	0.000		64/10	64/10	63/10	63/10	65/10
Ca I	0.164	0.169	0.169		0/0	1/0	1/0	1/0
Ca II	0.164	0.169	0.169	0.000		1/0	1/0	1/0
Ca III	0.161	0.167	0.167	0.002	0.002		2/0	2/0
Ca IV	0.161	0.167	0.167	0.002	0.002	0.004		2/0
Ca V	0.166	0.162	0.172	0.002	0.002	0.004	0.004	

注:Cs. 半滑舌鲷; Cr. 黑鳃舌鲷; Ca. 短吻三线舌鲷

Notes: Cs. *C. semilaevis*; Cr. *C. roulei*; Ca. *C. abbreviatus*

### 2.4 三种舌鲷的 CO I 和 Cyt b 基因系统进化树建立

以牙鲆 (*Caralichthys olivaceus*) 为外群 (Po), 建立 3 种舌鲷的 NJ 系统进化树 (图 5, 图 6)。由 NJ 树显示, 10 个舌鲷样本明显分为 3 大支, 形成 3 个群体, 半滑舌鲷和黑鳃舌鲷首先聚为一支, 最后再与短吻三线舌鲷聚为一支, 基于线粒体 DNA CO I 基因片段和 Cyt b 基因片段构建的 2 个 NJ 系统进化树总体趋势基本一致, 置信度均在 99% 以上。

### 3 讨论

半滑舌鲷主要分布在我国黄海和渤海, 生活

水温为 4 ~ 27 °C, 最适生长温度为 20 ~ 25 °C, 繁殖水温 22 ~ 23 °C, 为暖温带大型鱼类, 在黄渤海域的自然繁殖时间一般在 7—9 月。本实验采集 74 尾 1 ~ 3<sup>+</sup> 的半滑舌鲷数据, 体长为 2.1 ~ 59.9 cm, 体质量为 0.08 ~ 1 399.8 g。黑鳃舌鲷分布于海南、广西、广东到舟山群岛以南的近海, 生活在暖温带沿海和河口区, 为我国东南沿海较大型特产鱼类之一, 体长 23.8 cm 雌鱼卵巢达 II 期<sup>[1]</sup>。本实验从福建宁德沿海区采集的 14 尾黑鳃舌鲷年龄为 2 ~ 3<sup>+</sup> 龄, 体长达 21.7 ~ 40.0 cm, 体质量达 64.0 ~ 496.0 g, 生活水温在 8.89 ~ 29.0 °C, 目前未见其相关生长繁殖温度报道。短吻三线舌鲷

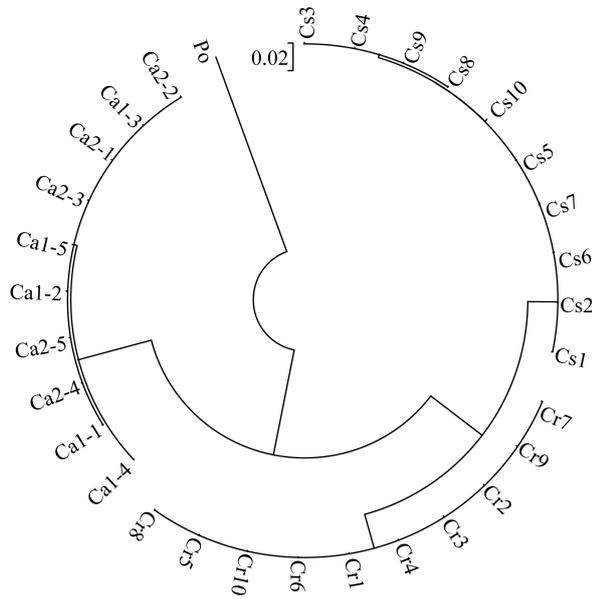


图5 基于线粒体 DNA *CO I* 基因片段构建的 NJ 系统进化树

Cs. 半滑舌鳎; Cr. 黑鳃舌鳎; Ca1、Ca2 分别为短吻三线舌鳎群体 1 和 2; Po. 牙鲆

Fig. 5 NJ trees based on *CO I* sequences of the three *Cynoglossus* species

Cs. *C. semilaevis*; Cr. *C. roulei*; Ca. *C. abbreviatus*; Po. *P. olivaceus*

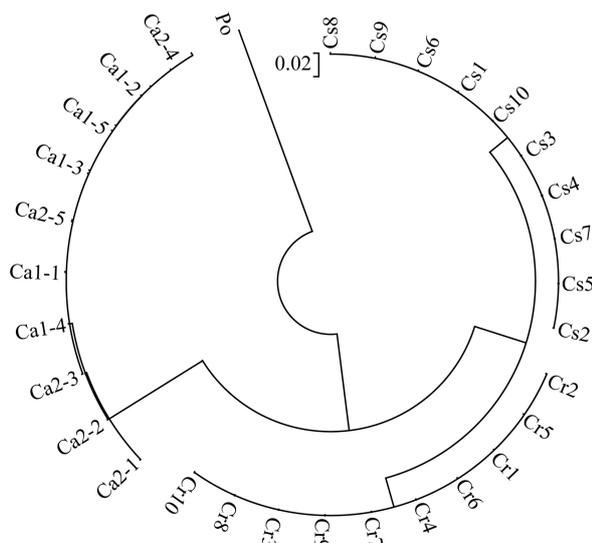


图6 基于线粒体 DNA *Cyt b* 基因片段构建的 NJ 系统进化树

Cs. 半滑舌鳎; Cr. 黑鳃舌鳎; Ca1、Ca2 分别为短吻三线舌鳎群体 1 和 2; Po. 牙鲆

Fig. 6 NJ trees based on *Cyt b* sequences of the three *Cynoglossus* species

Cs. *C. semilaevis*; Cr. *C. roulei*; Ca. *C. abbreviatus*; Po. *P. olivaceus*

为我国暖温带浅海较大型鱼类,体长可达 38 cm,在自然环境中以小虾蟹等为食,主要分布在东海、黄海到渤海,少数可达珠江口附近,体长 26.4 cm 雌鱼卵巢可达 IV 期<sup>[1]</sup>。本实验采集了 67 尾短吻三线舌鳎数据,年龄为 2 ~ 2<sup>+</sup> 龄,体长为 8.7 ~ 30.7 cm,体质量为 8.0 ~ 190.0 g。半滑舌鳎和黑鳃舌鳎都为大型鱼类,而短吻三线舌鳎体型相对较小。3 种舌鳎鱼在生态分布上明显不同,半滑舌鳎主要在北方海域,黑鳃舌鳎在南方海域,而短吻三线舌鳎从北方到南方海域都有分布,地理分布上的差异和对不同水域温度的适应性,可为培育适应温度范围广、生长速度快的舌鳎养殖新品种提供丰富的遗传资源。

半滑舌鳎由于生长快、肉质鲜美受到人们的青睐,从 1993 年开始进行野生亲鱼驯化和苗种培育研究<sup>[18]</sup>,至 2002 年可以进行大量苗种培育,目前半滑舌鳎已经发展成为我国海水工厂化养殖的主要鱼类之一,但是半滑舌鳎仅适宜在我国北方养殖,当水温超过 27 °C 会大量死亡<sup>[19]</sup>。国内外对于黑鳃舌鳎的研究未见报道,日本对短吻三线舌鳎的早期发育进行了研究<sup>[20]</sup>,国内对半滑舌鳎、宽体舌鳎(*Cynoglossus robustus*)、短吻三线舌鳎的全长、体宽、体厚和体质量进行了比较<sup>[21]</sup>。本实验利用 21 个可量和可数性状对 3 种舌鳎共 4 个群体进行了比较分析,短吻三线舌鳎两个群体 21 个可量性状中无显著性差异性状达 71.43%,半滑舌鳎与短吻三线舌鳎之间具有显著性差异的性状达 71.43%,黑鳃舌鳎与短吻三线舌鳎之间具有显著性差异的性状达 66.67% ~ 71.43%。半滑舌鳎与黑鳃舌鳎之间具有显著性差异性状达 57.14%。分析结果显示,半滑舌鳎与黑鳃舌鳎亲缘关系较近,它们与短吻三线舌鳎的亲缘关系较远。利用 *CO I* 和 *Cyt b* 基因分别检测 4 个舌鳎群体遗传距离,发现半滑舌鳎与黑鳃舌鳎遗传距离较近,与短吻三线舌鳎的遗传距离较远,短吻三线舌鳎种内遗传距离仅为 0.002 ~ 0.004。NJ 系统进化树直观地显示了 4 个舌鳎群体之间的进化关系,在鳞片和体色上具有差异的短吻三线舌鳎聚为一支,形态和遗传研究结果都证明,短吻三线舌鳎种内出现了一定分化,但未达到群体划分的程度,说明 2 个群体为一个种。另外,从具有显著性差异的可量性状可以得出:体长/体宽、头长/眼间距、头长/各鳍条长、臀鳍条数、中下侧线间鳞可

以作为区分半滑舌鳎和黑鳎舌鳎的主要性状。体长/体宽、体长/头长、头长/眼径、头长/各鳍条长、中侧线鳞前支、上下侧线外侧鳞、上中下侧线间鳞、背鳍条数、臀鳍条数、尾鳍条数可以作为区分黑鳎舌鳎和短吻三线舌鳎的主要性状。21 个可量性状中除腹鳍条数、脊椎骨数、体长和体质量之外,其他可量性状都可作为区分半滑舌鳎和短吻三线舌鳎的主要性状。

建立在粒体细胞色素氧化酶 I 亚基(*CO I*)和细胞色素 *b*(*Cyt b*)基因序列基础上的 DNA 条形码是最有前途的准确鉴定物种的技术之一,目前世界上已经有 5 000 种鱼类具有 DNA 条形码<sup>[22]</sup>。利用 DNA 条形码对国际上 172 种商业化的观赏鲤科鱼类进行了品种鉴定,发现 DNA 条形码与形态鉴别的一致性达到 90%~99%<sup>[23]</sup>。利用 *CO I* 序列对 67 种金枪鱼进行了分类分析<sup>[24]</sup>,发现个别种的 *CO I* 序列具有极高的相似性。另外,可以利用 *CO I* 基因和 *Cyt b* 基因信息,进行物种种群内及种间的遗传进化研究<sup>[25]</sup>。

本实验利用 mtDNA 的 *CO I* 和 *Cyt b* 基因对半滑舌鳎、黑鳎舌鳎、短吻三线舌鳎 2 个群体的遗传特征进行分析,并与 GenBank 上近缘物种序列进行对比,所测定黑鳎舌鳎两基因序列经 Blast 后,与已测定舌鳎属相关序列同源性均在 80% 以上,但未发现与黑鳎舌鳎同缘的 *CO I* 和 *Cyt b* 序列,说明黑鳎舌鳎 *CO I* 和 *Cyt b* 基因是首次被克隆。从福建宁德沿海采集短吻三线舌鳎在鳞片颜色上存在差异,将鳞片无黑边和有黑边的个体按照 2 个群体进行分析,依据形态学及 *CO I* 和 *Cyt b* 基因分析结果,发现人为划分的 2 个群体的 21 个可量性状中有 15 个性状没有达到显著性差异( $P > 0.05$ ),同时发现 2 个群体的 *CO I* 和 *Cyt b* 基因序列完全相同,因此,可以说明短吻三线舌鳎的种内分化未达到分化成 2 个群体的程度。短吻三线舌鳎个别性状出现分化的原因可能与核基因有关,或与外部环境变化有关。将本实验测定的短吻三线舌鳎序列在 NCBI 上 Blast 后发现,与已知的短吻三线舌鳎和紫斑舌鳎(*Cynoglossus purpureomaculatus*)相关序列同源性均在 99% 以上,说明短吻三线舌鳎和紫斑舌鳎存在同种异名现象,这一点在徐晖<sup>[26]</sup>和柳淑芳<sup>[10]</sup>的研究中得到相似的结果。另外,短吻三线舌鳎 *Cyt b* 基因序列与 GenBank 上中华舌鳎(*Cynoglossus*

*sinicus*) (登录号:GQ267815.1) 相关基因仅有 1 个位点存在差异,这 2 种舌鳎分属于三线舌鳎亚属和舌鳎亚属(*Cynoglossus*),在形态上存在明显的差异,但在 *Cyt b* 基因序列分析中是否存在同种异名现象有待进一步考证。本实验克隆的半滑舌鳎 *CO I* 和 *Cyt b* 基因序列与 GenBank 已知序列相同(登录号:GQ380409.1)。

3 种舌鳎的 *CO I* 和 *Cyt b* 基因碱基(G, T, AT 和 GC)含量与文昌鱼<sup>[27]</sup>,印度石首鱼<sup>[28]</sup>,鳎属<sup>[29]</sup>及加拿大太平洋沿海多种海洋鱼类<sup>[30]</sup>的研究结果相似,表明 AT 含量高于 GC 含量是鱼类 mtDNA *CO I* 和 *Cyt b* 基因中存在的普遍现象。在 3 个舌鳎群体中 *CO I* 和 *Cyt b* 基因出现了不同的变异,从 3 个种群比较而言,*CO I* 基因相对保守,而 *Cyt b* 基因的进化速度较快,说明 *CO I* 基因可做为舌鳎种间鉴定的 DNA 条形码,*Cyt b* 基因更适合于进行种内变异的检测。本实验中短吻三线舌鳎 *Cyt b* 基因的种内变异与形态特征的变异相对应,但 *Cyt b* 基因的种内变异是否直接导致形态特征的变异,有待进一步研究。

本实验将传统的形态特征分类与基于 *CO I* 和 *Cyt b* 基因的 DNA 条形码鉴定技术结合起来,对收集的 4 个舌鳎育种群体进行种质鉴定,解决了短吻三线舌鳎种内分化的疑问,同时从形态和遗传上证明短吻三线舌鳎种内变异还未达到群体分化的程度。实验也证明,*CO I* 和 *Cyt b* 基因完全可以作为以上 3 种舌鳎鱼类种质鉴定的 DNA 条形码。形态特征和遗传特征同时显示了半滑舌鳎和黑鳎舌鳎遗传距离较近,两者与短吻三线舌鳎遗传距离较远。这一结果为这 3 种鱼类的杂交和选择育种提供了清晰的遗传背景。

#### 参考文献:

- [1] Li S Z, Wang H M. Fauna sinica, Ostichthyes: Pleuronectiformes[M]. Beijing: Science Press, 1995: 342-395. [李思忠,王惠民. 中国动物志,硬骨鱼纲: 鲽形目. 北京: 科学出版社, 1995: 342-395.]
- [2] Tian Y S, Chen S L, Shao C W, et al. Embryonic development of *Cynoglossus semilaevis* induced by frozen sperm of *Lateolabrax japonicus* [J]. Marine Fisheries Research, 2008, 29(2): 1-9. [田永胜,陈松林,邵长伟,等. 鲈鱼冷冻精子诱导半滑舌鳎胚胎发育. 海洋水产研究, 2008, 29(2): 1-9.]
- [3] Chen S L, Tian Y S, Yang J F, et al. Artificial gynogenesis and sex determination in Half-smooth

- tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Marine Biotechnology, 2009, 11(2): 243 - 251.
- [4] Ji X S, Tian Y S, Yang J F, et al. Artificial gynogenesis in *Cynoglossus semilaevis* with homologous sperm and its verification using microsatellite markers [J]. Aquaculture Research, 2010, 41(6): 913 - 920.
- [5] Chen S L, Li J, Deng S P, et al. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Marine Biotechnology, 2007, 9(2): 273 - 280.
- [6] Liao X L, Ma H Y, Xu G B, et al. Construction of a genetic linkage map and mapping of a female-specific DNA marker in Half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Marine Biotechnology, 2009, 11: 699 - 709.
- [7] Chen S L, Du M, Yang J F, et al. Development and characterization for growth rate and disease resistance of families in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(12): 1789 - 1795. [陈松林, 杜民, 杨景峰, 等. 半滑舌鳎家系建立及其生长和抗病性能测定. 水产学报, 2010, 34(12): 1789 - 1795.]
- [8] Tian Y S, Wang D, Xu Y, et al. Effects of rearing temperature on growth and sex determination in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(2): 176 - 183. [田永胜, 汪娣, 徐莹, 等. 温度对半滑舌鳎家系生长及性别的影响. 水产学报, 2011, 35(2): 176 - 183.]
- [9] Zhuang Z M, Han Z Q, Ma A J, et al. Genetic diversities in the tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) as revealed by isozyme analysis [J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(2): 10 - 17. [庄志猛, 韩志强, 马爱军, 等. 黄、渤海半滑舌鳎种群遗传结构的同工酶分析. 海洋水产研究, 2006, 27(2): 10 - 17.]
- [10] Liu S F, Liu J X, Zhuang Z M, et al. Monophyletic origin and synonymic phenomena in the sub-family Cynoglossinae inferred from mitochondrial DNA sequences [J]. Biodiversity Science, 2010, 18(3): 275 - 282. [柳淑芳, 刘进贤, 庄志猛, 等. 舌鳎亚科鱼类单系起源和同种异名的线粒体 DNA 证据. 生物多样性, 2010, 18(3): 275 - 282.]
- [11] Xiao W H, Zhang Y P. Genetics and evolution of mitochondrial DNA in fish [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2000, 24(4): 384 - 391. [肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化. 水生生物学报, 2000, 24(4): 384 - 391.]
- [12] Lu G Q, Li S F. Advances in the study and application of fish mitochondrial DNA polymorphism [J]. Journal of Fisheries Science of China, 1998, 5(3): 94 - 103. [吕国庆, 李思发. 鱼类线粒体 DNA 多态研究和应用进展. 中国水产科学, 1998, 5(3): 94 - 103.]
- [13] Ochiai A. Fauna Japonica: Soleina (Pisces), Biographical Society of Japan [M]. Tokyo: Japan, 1963: 1 - 114.
- [14] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876 - 4882.
- [15] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150 - 163.
- [16] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16(2): 111 - 120.
- [17] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406 - 425.
- [18] Jiang Y W, Wang Y J, Chen R S. Artificial breeding technology of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) of Bohai Sea [J]. Marine Fisheries Research, 1993, 14: 25 - 33. [姜言伟, 万瑞景, 陈瑞胜. 渤海半滑舌鳎人工育苗工艺技术的研究. 海洋水产研究, 1993, 14: 25 - 33.]
- [19] Wang D, Tian Y S, Chen S L. Effect of water temperature on gonadal development in half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 36(2): 262 - 272. [汪娣, 田永胜, 陈松林. 水温对半滑舌鳎性腺组织发育的影响. 水产学报, 2011, 36(2): 262 - 272.]
- [20] Yagi Y, Kinoshita I, Fujita S, et al. Comparison of the early life histories of two *Cynoglossus* species in the inner estuary of Ariake Bay, Japan [J]. Ichthyological Research, 2009, 56(4): 363 - 371.
- [21] Ni H E, Zheng Z M. Comparison of shapes and growth features of three species in *Cynoglossus* [J].

- Marine Science, 2002, 26(12): 61 - 64. [倪海儿, 郑忠明. 几种舌鳎的形态和生长特性的比较. 海洋科学, 2002, 26(12): 61 - 64. ]
- [22] Ward R D, Hanner R, Hebert P D. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL [J]. Journal of Fish Biology, 2009, 74(2): 329 - 356.
- [23] Collins R A, Armstrong K F, Meier R, *et al.* Barcoding and border biosecurity: Identifying cyprinid fishes in the aquarium trade [J]. PLoS ONE, 2012, 7: e28381.
- [24] Hanner R, Floyd R, Bernard A, *et al.* DNA barcoding of billfishes [J]. Mitochondrial DNA, 2011, 22(1): 27 - 36.
- [25] Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates [J]. Molecular Biology and Evolution, 1996, 13(7): 933 - 942.
- [26] Xu H, Li J, Kong X Y, *et al.* Phylogenetic relationship and length variation in the first ribosomal internal transcribed spacer of Cynoglossinae species [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2008, 39(1): 35 - 41. [徐晖, 李军, 孔晓瑜, 等. 6种舌鳎亚科鱼类 ITS1 序列长度多态性及系统分析. 海洋与湖沼, 2008, 39(1): 35 - 41. ]
- [27] Luo J C, Xiao Y S, Song L, *et al.* Phylogenetic separation of lancelets in China revealed by mitochondrial CO I and Cyt b gene analysis [J]. South China Fisheries Science, 2007, 3(2): 8 - 14. [罗家聪, 肖永双, 宋林, 高天翔, 张岩. 中国文昌鱼系统分类的线粒体 CO I 和 Cyt b 基因片段分析. 南方水产, 2007, 3(2): 8 - 14. ]
- [28] Wazir S, Lakra M, Gopalakrishnan A. Molecular identification and phylogenetic relationships of seven Indian Sciaenids ( Pisces: Perciformes, Sciaenidae ) based on 16SrRNA and cytochrome c oxidase subunit I mitochondrial genes [J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36(5): 831 - 839.
- [29] Zhang F Y, Ma L B, Shi Z H, *et al.* Studies on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I fragments of two genera of Sparus fish [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2006, 15(4): 403 - 408. [张凤英, 马凌波, 施兆鸿, 等. 两种鲷属鱼类线粒体 CO I 基因片段序列的比较. 上海水产大学学报, 2006, 15(4): 403 - 408. ]
- [30] Steinke D, Zemlak T S, Boutilier J A, *et al.* DNA barcoding of Pacific Canada's fishes [J]. Marine Biology, 2009, 156(12): 2641 - 2647.

## Comparative analysis of phenotypic characteristics and mtDNA (*CO I* and *Cyt b*) for four tongue sole populations

TIAN Yongsheng<sup>1\*</sup>, QI Wenshan<sup>1,2</sup>, TIAN Jingyun<sup>3</sup>, LIAO Xiaolin<sup>1</sup>, CHEN Songlin<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

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

3. National Oceanographic Center, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** The *Cynoglossidae* fish is an important resource of germplasm in marine fish. In this study, 21 measurable characters of four groups of *Cynoglossus* fish including one cultured population of Half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* (Günther, 1873) (Group Cs), one wild population of Roule's tongue sole *Cynoglossus roulei* (Wu, 1932) (Group Cr) and two wild populations of Three-lined tongue sole *Cynoglossus abbreviatus* (Gray, 1832) (Group Cas, which was divided into Group Ca1 and Group Ca2) were compared using One-way ANOVA and Student-Newman-Keuls multiple comparison method. The results showed that there is no significant difference between Group Ca1 and Group Ca2, while significant difference existed between any other two groups. Furthermore, the gene fragments of cytochrome oxidation enzyme I subunits (*CO I*) and the cytochrome b (*Cyt b*) in mitochondria (mtDNA) were cloned and analyzed from the four tongue sole groups respectively. The intraspecific and interspecific genetic distances of the four tongue sole groups were further analyzed based on the *CO I* and *Cyt b* genes. Both morphological and phylogenetic analysis proved that Half-smooth tongue sole and Roule's tongue sole had a closer relationship, while it was far from Three-lined tongue sole. N-J phylogenetic evolutionary analysis indicated that *CO I* and *Cyt b* genes can be used as DNA barcoding in germplasm identification of these three tongue sole species. This study provided a clear genetic background for cross breeding, selective breeding and system development research for the three species of tongue sole fish.

**Key words:** *Cynoglossus semilaevis*; *Cynoglossus roulei*; *Cynoglossus abbreviatus*; measurable character; *CO I*; *Cyt b*

**Corresponding author:** TIAN Yongsheng. E-mail: tianys@ysfri.ac.cn;

CHEN Songlin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn