

基于线粒体 CO I 基因部分序列的长江口舌鳎科鱼类系统分类研究

宋超^① 于亚男^{①②} 张涛^① 杨刚^① 章龙珍^{①*}

① 中国水产科学研究院东海水产研究所农业部东海与长江口渔业资源环境科学观测实验站
上海 200090; ② 南京农业大学渔业学院 南京 210095

摘要: 为了确定线粒体 CO I 基因在长江口舌鳎科鱼类系统分类及物种鉴定中的作用, 本实验采用线粒体 CO I 基因特异扩增测序及 GenBank 已有序列联合配对分析的方法, 对长江口舌鳎科 2 属 9 种鱼类 39 个 CO I 基因片段的序列进行比较和系统进化研究。采用 MEGA 5.0 软件进行统计分析, 舌鳎科鱼类该片段的平均 AT 含量高于 GC 含量, 第 1 密码子位点含量最高(51.8% ~ 57.3%, 平均 53.8%), 第 2 密码子的含量稳定, 均为 42.0%, 第 3 密码子变化范围最大(28.1% ~ 37.8%, 平均 32.4%)。依据 Kimura-2-parameter 模型, 9 种舌鳎科鱼类种间遗传距离平均值为 0.191, 种内为 0.003, 种间遗传距离是种内的 63.7 倍。采用最大简约法(MP)和邻接法(NJ)构建系统发育树, 显示长江口舌鳎科鱼类为明显的单系群, 但舌鳎科鱼类内部的系统发育关系与形态分类划分的亚属并不完全一致, 其中须鳎属的日本须鳎(*Paraplagusia japonica*)与拟舌鳎亚属的宽体舌鳎(*Cynoglossus robustus*)聚为一支。虽然三线舌鳎亚属的种类均可聚为独立的分支, 但短吻三线舌鳎(*C. abbreviatus*)与紫斑舌鳎(*C. purpleomaculatus*)、长吻红舌鳎(*C. lighti*)与短吻红舌鳎(*C. joyneri*), 两组间种间遗传距离分别为 0.002 和 0.007, 两组物种间均存在同种异名现象。本研究表明, 线粒体 CO I 基因作为分子标记除了能筛选出同种异名种类外, 还能够对舌鳎科鱼类进行有效的物种鉴定和系统进化分析, 线粒体 CO I 基因作为分类条形码是可行的。

关键词: 舌鳎科; CO I; DNA 条形码; 分子系统分类

中图分类号: Q959.4 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2014)05-716-11

Phylogenetic Analysis of Cynoglossidae in the Yangtze Estuary Based on Partial Sequence of Mitochondrial CO I

SONG Chao^① YU Ya-Nan^{①②} ZHANG Tao^① YANG Gang^① ZHANG Long-Zhen^{①*}

① East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Scientific Observing and Experimental Station of Fisheries Resources and Environment of East China Sea and Yangtze Estuary, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090; ② Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Objective: To determine the role of mitochondrial CO I gene in classification and identification of species, a total of 39 single individuals from 9 species pertaining to 2 genera of Cynoglossidae in the Yangtze Estuary were barcoded by CO I, sequenced and compared with that of other Cynoglossidae species recorded in

基金项目 长江水环境教育部重点实验室开放课题(No. YRWEE201106), 公益性行业(农业)科研专项(No. 201203065), 长江口中华鲟自然保护区专项(No. 2012), 青草沙水库邻近水域生态修复专项;

* 通讯作者, E-mail: longzhen2885@hotmail.com;

第一作者介绍 宋超, 男, 博士; 研究方向: 水生生物种质资源与保护; E-mail: songchao_2006@163.com。

收稿日期: 2013-12-03, 修回日期: 2014-03-25

the GenBank (Table 1). Methods: Total genomic DNA was extracted from each scale sample using the classic phenol/chloroform extraction method. 650 bp CO I fragments were amplified using the primers, i. e., F1: 5'-TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3', R1: 5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA-3'. Each PCR amplification was performed in a total volume of 50 μ l of PCR mixture. PCR products were purified and then sequenced in both forward and reverse directions using an ABI PRISM™ 3730 XL Automated Sequencer. DNA sequences were aligned with ClustalW using default parameters. Base composition, variable and parsimony informative sites were determined using MEGA 5.0. Neighbor-joining (NJ) and Maximum parsimony (MP) phylogenetic trees were constructed for CO I haplotypes (Kimura 2 Parameter substitution model, K2P; 1 000 bootstraps pseudoreplications) using MEGA 5.0. Results: Using the MEGA 5.0 software for statistical analysis, the averaged AT content was higher than the GC content (Table 2). The GC content of codon position 1 averaged 53.8% (51.8% - 57.3%), that of position 2 for 42.0%, and that of position 3 ranged from 28.1% to 37.8% in average of 32.4% (Table 4). The transitional pairs (*si*) was slightly more than the transversional pairs (*sv*), and the ratio ($R = si/sv$) was 1.45 (Table 3). Analysis of the frequency of amino acids in CO I gene encoding protein showed that the highest frequency of amino acid was leucine, and the lowest frequency of amino acid was tryptophan (Table 5). The average K2P distances pairwise-species and within-species were 0.191 and 0.003, respectively (Table 6). The K2P distance pairwise-species was 63.7 times of that within-species. According to the MP and NJ trees for all 39 sequences, it was demonstrated that Cynoglossinae in the Yangtze Estuary was a monophyletic group (Fig. 1). However, the phylogenetic relationships revealed by the CO I sequence analyses were not consistent with those inferred from morphological classification. In contrast with morphological classification, *Paraplagusia japonica* of *Rhinoplagusia* and *Cynoglossus robustus* of *Cynoglossoides* were placed in a same clade with support of a high bootstrap value (Fig. 1). The species in the sub-genera of *Areliscus* clustered on an independent branch. But synonymic phenomena existed in the following two groups of species: *C. abbreviatus* and *C. purpureomaculatus*, *C. lighti* and *C. joyner*, with the pairwise-species of 0.002 and 0.007, respectively (Table 6). Conclusions: Our results highlight that the information from CO I sequences not only can filter out the synonym of the same species, but also be able used to carry out effective identification for Cynoglossidae species, which further shows that mitochondrial CO I is feasible as the classification barcode.

Key words: Cynoglossidae; CO I; DNA barcodes; Molecular systematics

舌鳎科 (Cynoglossidae) 鱼类是鲽形目 (Pleuronectiformes) 中特化程度最高的一个类群 (柳淑芳等 2010)。根据形态学特征, 舌鳎科分为 3 个属, 舌鳎属 (*Cynoglossus*)、须鳎属 (*Paraplagusia*) 和无线鳎属 (*Symphuru*), 其中, 舌鳎属为种类最丰富的属, 在世界范围内广布于西太平洋及印度洋热带及亚热带海域, 少数生活于淡水流域。中国已知约 25 种, 分为 5 亚属 (李思忠等 1995), 分布在我国近海的底层水域, 在长江口广泛分布的主要是三线舌鳎亚属 (*Areliscus*) 和拟舌鳎亚属 (*Cynoglossoides*) (成庆泰等 1987, 倪海儿等 2002)。由于舌鳎

科鱼类形态特征的特殊性, 该科鱼类的种类鉴定及系统发育关系存在一定的模糊和争议, 尤其是其中存在多种同种异名种类 (李思忠等 1995, 徐晖等 2008, 柳淑芳等 2010)。为了进一步对长江口分布的舌鳎科鱼类进行分类鉴定, 本研究采用目前新兴的 DNA 条形码 (DNA barcodes) 技术 (Hebert et al. 2003a, b, Vences et al. 2005, Ward et al. 2005, Witt et al. 2006), 来弥补传统形态分类中的不足, 解决长江口舌鳎科鱼类系统分类的问题。在 DNA 条形码技术的应用中, 通常选取线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的细胞色素氧化

酶 I 亚基 (cytochrome oxidase subunit I, CO I) 基因作为分子标记 (关申民等 2008), 由于其长度适宜、进化速率适中且富含系统发育信号, 大多数动物的 CO I 基因能被通用引物所扩增, 其已成为动物界物种鉴定 (范京安等 2009, 柳淑芳等 2010, 裴男才 2012, 王建艳等 2013) 和遗传结构 (牛东红等 2010, 张合彩等 2011, 姜虎成等 2012) 研究中最常使用的 DNA 条形码。

本研究利用线粒体 CO I 基因部分序列作为 DNA 条形码, 对分布在长江口的 9 种舌鳎科鱼类进行了分子鉴定并对舌鳎科属内及种间的系统发育关系进行了比较, 以期进一步确认长江口舌鳎科鱼类间存在的同种异名现象, 为长江口舌鳎科鱼类鉴定提供分子资料, 弥补形态学鉴定的不足, 同时对长江口舌鳎科鱼类野生资源的种质资源收集和保护提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 样品采集 本研究所用的窄体舌鳎 (*Cynoglossus gracilis*)、半滑舌鳎 (*C. semilaevis*)、短吻红舌鳎 (*C. joyneri*) 和日本须鳎 (*Paraplagusia japonica*) 这 2 属 4 种舌鳎科鱼类共计 15 尾个体, 均采自长江口水域, 取背部肌肉组织样品现场液氮处理后, -80°C 保存。

1.2 DNA 提取 采用经典的酚/氯仿抽提法 (萨姆布鲁克等 1992), 提取并纯化基因组 DNA, -20°C 保存备用。具体操作如下: 取约 0.5 g 肌肉放入 1.5 ml 离心管中, 加入 500 μl STE 裂解液, 剪碎, 再加入终质量分数为 0.5% SDS 和 200 mg/L 的蛋白酶 K, 56°C 恒温水浴锅消化 3 h, 消化物经酚/氯仿、氯仿抽提, 2 倍体积无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤, 室温干燥后溶于 ddH₂O 中, 4°C 冰箱保存备用。

1.3 引物合成和 PCR 扩增 引物参照 Ward 等 (2005) 的设计, 两对鱼类通用引物 F1/R1 和 F2/R2 均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物序列为: F1: 5'-TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3', R1: 5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA-3'; F2: 5'-TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC-

3', R2: 5'-ACT TCA GGG TGA CCG AAG AAT CAG AA-3'。

稀释引物至 20 $\mu\text{mol/L}$, F1 与 R1 和 F2 与 R2 分别等体积混匀后, -20°C 保存备用。PCR 反应总体积为 50 μl , 其中包括 25 μl Premix *Taq* (1.25 U, Takara)。引物 F1 与 R1 (或 F2 与 R2) 的等体积混合物 2 μl , 根据 DNA 的纯度和质量加入适量的 DNA 模板, 最后补加双蒸水至 50 μl 。PCR 反应体系反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s; 55°C 退火 30 s; 72°C 延伸 1 min; 30 个循环; 72°C 延伸 10 min; PCR 产物 4°C 保存备用。每次反应设置不含 DNA 模板的空白对照。

1.4 DNA 测序和序列下载 将阳性 PCR 产物经纯化后送至上海桑尼生物科技有限公司, 用 ABI PRISM™ 3730 XL DNA Analyzer 测序仪, 分别以 F1 与 R1 (或 F2 与 R2) 作为测序引物, 进行双向测序。

从 GenBank 下载舌鳎科其他鱼类 CO I 基因序列, 与本研究所检测的序列, 共计 2 属 9 种 39 个体的 CO I 基因进行同源序列分析, 选择同目鳎科的带纹条鳎 (*Zebrias zebra*)、蝶科的木叶蝶 (*Pleuronichthys cornutus*) 和牙鲆科的褐牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 共 6 个同源序列作外群。所分析物种的 CO I 基因及其相关信息见表 1。

1.5 序列分析 所得测序结果用 NCBI 的 Blast 工具进行相似性检索, 确认实验所得序列为目的片段。利用 ClustalW 软件对本研究所得序列和 GenBank 下载的相关序列进行编辑、校对和排序, 并辅以手工校正 (Kumar et al. 2004)。用 MEGA 5.0 软件统计序列的平均碱基组成、变异位点、简约信息位点、单态位点、转换与颠换的比例, 进行系统发育分析 (Kumar et al. 2004)。采用 Kimura-2-parameter 模型 (Kimura 1980) 计算种内和种间遗传距离, 分别采用最大简约法 (maximum parsimony, MP) 和邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建亲缘关系分析分子图谱, 进行 1 000 次重复抽样估计亲缘关系分子图谱中各节点的支持率。

表 1 舌鳎科 9 种鱼类的 CO I 基因信息
Table 1 Information of CO I genes of 9 Cynoglossidae species

物种 Species	分类地位 Taxonomy	样本量 Samples size	样品来源 Source of samples
内群 Ingroup			
窄体舌鳎 <i>Cynoglossus gracilis</i>	三线舌鳎亚属 <i>Areliscus</i>	4	本研究(1-4)
紫斑舌鳎 <i>C. purpureomaculatus</i>	三线舌鳎亚属 <i>Areliscus</i>	3	JQ738570(1), JQ738571(2), DQ116749(3)
短吻三线舌鳎 <i>C. abbreviatus</i>	三线舌鳎亚属 <i>Areliscus</i>	1	DQ116750
半滑舌鳎 <i>C. semilaevis</i>	三线舌鳎亚属 <i>Areliscus</i>	2	本研究(1), DQ116751(2)
短吻红舌鳎 <i>C. joyneri</i>	三线舌鳎亚属 <i>Areliscus</i>	13	本研究(1~7), JQ738602(8), JQ738468(9), JQ738613(10), JQ738456(11), JQ738430(12), GU479053(13)
长吻红舌鳎 <i>C. lighti</i>	三线舌鳎亚属 <i>Areliscus</i>	2	HQ711865(1), DQ116752(2)
断线舌鳎 <i>C. interruptus</i>	三线舌鳎亚属 <i>Areliscus</i>	2	JF952713(1), JF952714(2)
宽体舌鳎 <i>C. robustus</i>	拟舌鳎亚属 <i>Cynoglossoides</i>	2	HM180552(1), HM180553(2)
日本须鳎 <i>Paraplagusia japonica</i>	须鳎亚属 <i>Rhinoplagusia</i>	4	本研究(1~3), DQ116754(4)
外群 Outgroup			
带纹条鳎 <i>Zebrias zebra</i>	鳎科 Soleidae	2	JQ738567(1), JQ738568(2)
木叶鲽 <i>Pleuronichthys cornutus</i>	鲽科 Pleuronectidae	2	HM180796(1), JN204309(2)
褐牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	牙鲆科 Paralichthyidae	2	JF952803(1), JQ738445(2)

样品来源中样品后面的数字表示同种类中该样品的编号。

The number behind the samples indicate the No. of samples in the same species.

2 结 果

2.1 舌鳎科鱼类 CO I 基因序列特征 本研究所使用的引物位于 CO I 基因的 5' 端, 采用上游引物 F1 及 F2 与下游引物 R1 及 R2 对总 DNA 进行 PCR, 均可以获取 4 种舌鳎科鱼类共 15 个体的线粒体 CO I 基因部分片段, 片段长度约为 650 bp, CO I 基因通用引物在舌鳎科中具有普遍的适用性。

采用 ClustalW 对本研究所测 15 个 CO I 部分序列和 24 个 GenBank 中下载的舌鳎科鱼类 CO I 同源序列进行聚类 and 排序分析, 保留共有序列, 长度为 578 bp, 编码 192 个氨基酸。用 MEGA 5.0 计算这 39 条序列的碱基组成, 平均 AT 含量高于 GC 含量(表 2)。对所研究的 9 种舌鳎科鱼类 39 个 CO I 基因片段而言, 第 1 密码子位点 GC 含量显著高于第 2 和第 3

密码子位点。A、T、G、C 在 1、2、3 位点的平均含量差别很大, 密码子的碱基使用频率存在明显的偏向性(表 2)。

表 3 所示为所有个体序列核苷酸变异情况, 其中不变位点在第 2 密码子位点最多; 而转换位点和颠换位点均属第 3 密码子位点最多。在全部位点中保守位点有 332 个, 变异位点 246 个, 简约信息位点 230 个, 单独位点 16 个。单倍型的个数为 353 个, 双倍型个数为 57 个, 四倍型个数为 84 个。全部位点的转换位点略多于颠换位点。9 种舌鳎科鱼类的 CO I 基因片段的平均 GC 含量为 40.8% ~ 44.2%, 其中第 1 密码子的 GC 含量均较高, 第 2 密码子的 GC 含量恒定, 而第 3 密码子的 GC 含量变化范围最大, 这是由于密码子第三位具有很强的简并性。9 种舌鳎相比, 断线舌鳎 CO I 基因片段的 GC 含量最高, 窄体舌鳎的 GC 含量

表 2 舌鲷科 9 种鱼类的 CO I 基因部分序列中各碱基平均分布频率 (%)

Table 2 Average nucleotide frequencies of CO I partial sequence of 9 Cynoglossidae species (%)

碱基 Base	总频率 Total	密码子第 1 位点 The first position of codon	密码子第 2 位点 The second position of codon	密码子第 3 位点 The third position of codon
T	31.4	17.4	43.5	33.3
C	26.6	24.8	28.2	27.0
A	25.2	27.6	14.4	33.7
G	16.7	30.1	13.9	6.12
A+T	56.6	45.1	58.0	66.9
G+C	43.4	54.9	42.0	33.1

表 3 舌鲷科 9 种鱼类 CO I 基因部分序列各密码子碱基变异情况

Table 3 Sequences variation of CO I partial sequence of 9 Cynoglossidae species

密码子位点 Codon position	不变位点 Identical pairs	转换位点(<i>si</i>) Transitional pairs	颠换位点(<i>sv</i>) Transversional pairs	转换位点/颠换位点 $R=si/sv$
第 1 位点 The first position	181	10	2	5.68
第 2 位点 The second position	192	0	1	0.17
第 3 位点 The third position	114	44	34	1.28
全部位点 Total positions	487	54	37	1.45

表 4 舌鲷科 9 种鱼类 CO I 基因密码子位点 GC 含量

Table 4 The GC content of CO I partial sequence for 9 Cynoglossidae species in all codon position

种类 Species	样本量 Samples size	平均GC含量 The average GC content (%)			
		全部位点 Total positions	第 1 位点 The first position	第 2 位点 The second position	第 3 位点 The third position
窄体舌鲷 <i>Cynoglossus gracilis</i>	4	40.8	52.3	42.0	28.1
紫斑舌鲷 <i>C. purpureomaculatus</i>	3	43.1	52.3	42.0	34.9
短吻三线舌鲷 <i>C. abbreviatus</i>	1	42.9	51.8	42.0	34.9
半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>	2	43.9	53.4	42.0	36.2
短吻红舌鲷 <i>C. joyneri</i>	13	42.9	57.1	42.0	29.6
长吻红舌鲷 <i>C. lighti</i>	2	43.0	57.3	42.0	29.7
断线舌鲷 <i>C. interruptus</i>	2	44.2	52.8	42.0	37.8
宽体舌鲷 <i>C. robustus</i>	2	42.5	53.4	42.0	32.0
日本须鲷 <i>Paraplagusia japonica</i>	4	41.4	53.9	42.0	28.4

最低。在舌鲷科的 2 个属中，舌鲷属种内 GC 含量变化较大的为短吻红舌鲷，其变化范围为 42.7% ~ 43.3%，须鲷属的日本须鲷种内 GC

含量的变化范围为 41.3% ~ 41.7% (表 4)。

2.2 舌鲷科鱼类 CO I 基因编码蛋白质中氨基酸使用频率 用软件 MEGA 5.0 计算得到 9

表 5 舌鲷科 9 种鱼类 CO I 基因编码蛋白质氨基酸的使用频率 (%)

Table 5 The amino acid frequency of CO I gene encoding protein for 9 Cynoglossidae species (%)

氨基酸 Amino acid	窄体舌鲷 <i>Cynoglossus gracilis</i>	紫斑舌鲷 <i>C. purpureomaculatus</i>	短吻三线 舌鲷 <i>C. abbreviatus</i>	半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>	宽体舌 鲷 <i>C. robustus</i>	短吻红 舌鲷 <i>C. joyneri</i>	长吻红 舌鲷 <i>C. lighti</i>	断线舌鲷 <i>C. interruptus</i>	日本须鲷 <i>Paraplagusia japonica</i>
丙氨酸 Ala	11.17	11.17	11.17	11.17	10.64	11.13	11.17	11.11	10.64
半胱氨酸 Cys	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
天冬氨酸 Asp	3.19	3.19	3.19	3.19	3.19	3.19	3.19	3.17	3.19
谷氨酸 Glu	1.60	1.06	0.53	1.60	1.60	1.60	1.60	1.59	1.60
苯丙氨酸 Phe	6.91	6.91	6.91	6.91	6.91	6.39	6.38	6.88	6.91
甘氨酸 Gly	7.98	7.98	7.98	7.98	7.98	7.98	7.98	7.94	7.98
组氨酸 His	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.59	1.60
异亮氨酸 Ile	13.83	14.36	14.36	14.10	13.83	12.20	12.23	12.70	12.77
赖氨酸 Lys	0.53	1.06	1.60	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53
亮氨酸 Leu	16.49	16.49	16.49	16.49	17.02	17.03	17.02	16.40	17.02
甲硫氨酸 Met	1.06	0.53	0.53	0.27	0.53	1.56	1.60	2.65	1.60
天冬酰胺 Asn	4.79	4.79	4.79	4.79	4.79	4.79	4.79	4.76	4.79
脯氨酸 Pro	6.91	6.91	6.91	6.91	6.91	6.92	6.91	6.88	6.91
谷氨酰胺 Gln	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.59	1.60
精氨酸 Arg	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.59	1.60
丝氨酸 Ser	6.38	6.91	6.91	6.91	6.91	6.39	6.38	6.35	6.38
苏氨酸 Thr	6.38	5.85	5.85	5.85	6.38	6.43	6.38	6.35	6.91
缬氨酸 Val	6.38	6.38	6.38	6.91	6.38	7.49	7.45	5.82	6.38
色氨酸 Trp	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.53	0.00
酪氨酸 Tyr	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.59	1.60

种舌鳎科鱼类的共有序列编码 192 个氨基酸 (表 5), 其中有 39 个发生变异, 约占 20.31%。在氨基酸的使用频率中, 使用最高的为亮氨酸, 其在短吻红舌鳎中使用频率最高, 而在断线舌鳎中使用频率最低。其次, 使用频率较高的有异亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸, 而使用频率最低的为色氨酸, 其仅在紫斑舌鳎中出现, 而半胱氨酸在 9 种舌鳎中均未出现, 反应了 CO I 序列编码的蛋白质在氨基酸使用上的偏向性。本研究舌鳎科鱼类 CO I 基因编码的 9 种氨基酸 Asp、Gly、His、Asn、Pro、Glu、Arg、Trp、Tyr 在除断线舌鳎外的其余 8 种舌鳎中的同义密码子使用频率完全一致。

2.3 种间及种内的遗传距离 采用 MEGA 5.0, 用 Kimura-2-parameter 模型计算 9 种舌鳎科鱼类的种间和种内遗传距离 (表 6)。舌鳎科

的种间遗传距离平均值为 0.191, 种内遗传距离平均值为 0.003, 种间遗传距离为种内遗传距离的 63.7 倍。9 种舌鳎科鱼类的平均种间遗传距离大于 0.020, 其中 94% 以上的种间平均遗传距离大于 0.100, 而种内遗传距离均小于 0.010。宽体舌鳎与断线舌鳎的种间遗传距离最大; 而紫斑舌鳎和短吻三线舌鳎, 短吻红舌鳎和长吻红舌鳎之间的遗传距离较小。

2.4 舌鳎科鱼类的亲缘关系分析 采用 MP 法和 NJ 法, 对舌鳎科 2 属 9 种 39 个 CO I 基因序列构建亲缘关系分子图谱 (图 1), 两种方法得到的结果具有相似的拓扑结构, 并且都具有较高的节点支持率。采用带纹条鳎、木叶蝶和褐牙鲆作为外群构建的系统发育关系显示, 长江口舌鳎科鱼类聚为一个明显的单系群, 且具有很高的自展置信值。在分子进化图谱中除

表 6 舌鳎科 9 种鱼类的种间遗传距离和种内遗传距离

Table 6 Genetic distance pairwise-species and within-species in 9 Cynoglossidae species

种间 Pairwise-species	窄体舌鳎 <i>C. gracilis</i>	半滑舌鳎 <i>C. semilaevis</i>	长吻红舌鳎 <i>C. lighti</i>	短吻红舌鳎 <i>C. joyneri</i>	短吻三线舌鳎 <i>C. abbreviatus</i>	断线舌鳎 <i>C. interruptus</i>	宽体舌鳎 <i>C. robustus</i>	日本须鳎 <i>P. japonica</i>	种内 Within-species
窄体舌鳎 <i>Cynoglossus gracilis</i>									0.000
半滑舌鳎 <i>C. semilaevis</i>	0.142								0.002
长吻红舌鳎 <i>C. lighti</i>	0.191	0.192							0.005
短吻红舌鳎 <i>C. joyneri</i>	0.190	0.194	0.007						0.009
短吻三线舌鳎 <i>C. abbreviatus</i>	0.116	0.138	0.184	0.184					n/c
断线舌鳎 <i>C. interruptus</i>	0.240	0.263	0.222	0.224	0.241				0.005
宽体舌鳎 <i>C. robustus</i>	0.208	0.230	0.241	0.236	0.202	0.267			0.002
日本须鳎 <i>Paraplagusia japonica</i>	0.193	0.211	0.196	0.196	0.226	0.259	0.193		0.002
紫斑舌鳎 <i>C. purpureomaculatus</i>	0.113	0.136	0.181	0.182	0.002	0.239	0.200	0.224	0.000

n/c 表示未分类的。n/c means unclassified.

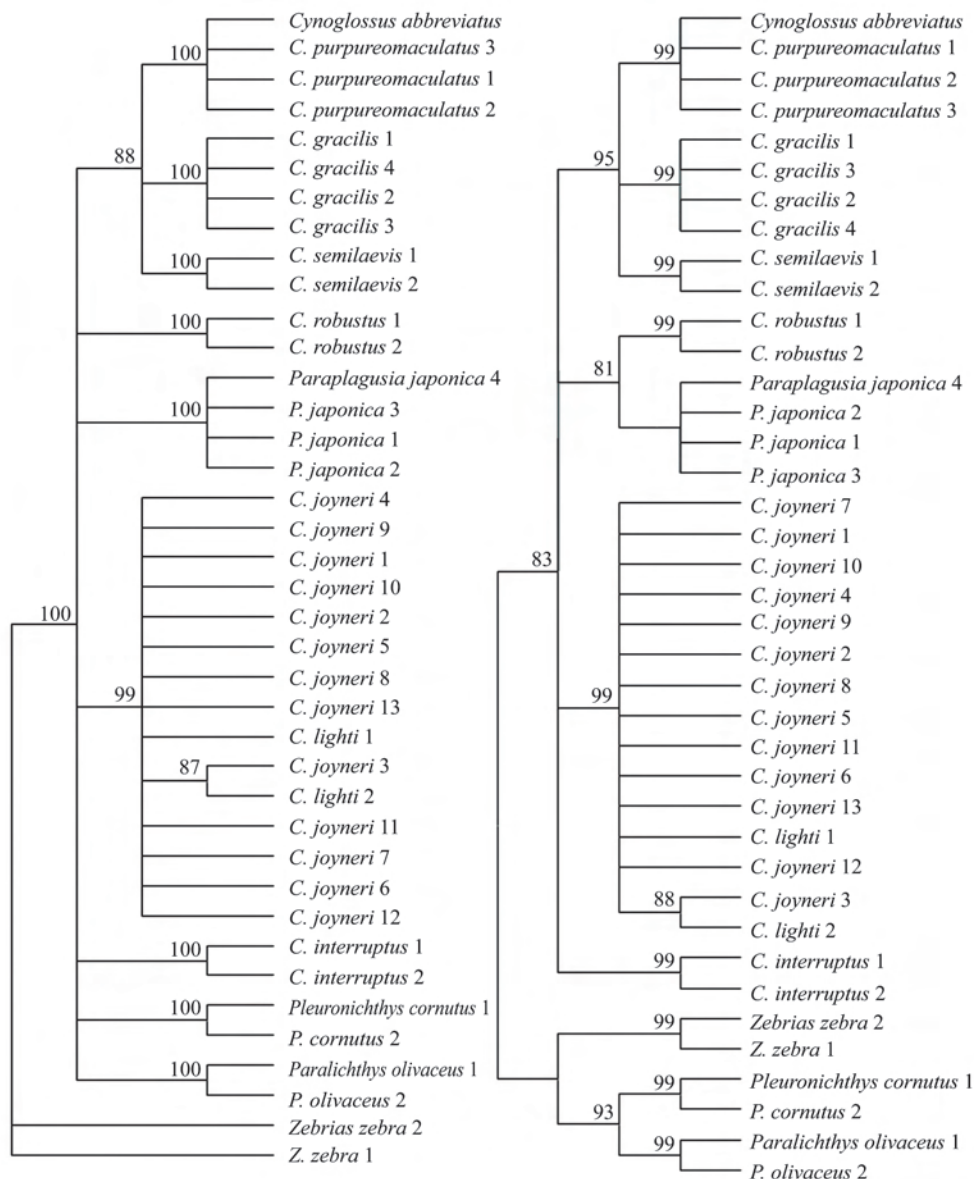


图 1 MP 法(左)和 NJ 法(右)构建的舌鲷科鱼类亲缘关系分子图谱

Fig. 1 MP (left) and NJ (right) tree resulting from analysis of CO I gene data of 9 Cynoglossidae species

Cynoglossus abbreviatus. 短吻三线舌鲷; *C. purpureomaculatus*. 紫斑舌鲷; *C. gracilis*. 窄体舌鲷; *C. semilaevis*. 半滑舌鲷; *C. robustus*. 宽体舌鲷; *C. joyneri*. 短吻红舌鲷; *C. lighti*. 长吻红舌鲷; *C. interruptus*. 断线舌鲷; *Paraplagusia japonica*. 日本须鲷; *Pleuronichthys cornutus*. 木叶鲽; *Paralichthys olivaceus*. 褐牙鲆; *Zebrias zebra*. 带纹条鲷。

节点处的数字为 1 000 次 bootstrap 检验的支持率。样品拉丁名后面的数字表示样品的编号, 与表 1 样品来源中样品的编号一致。

The numbers indicate the percentages of bootstrap values supporting each node from 1 000 replicas; the numbers behind the Latin name of sample indicate the No. of samples, which is consistent with the numbers in "Source of samples" of Table 1.

紫斑舌鳎和短吻三线舌鳎聚在一起,短吻红舌鳎和长吻红舌鳎聚在一起外,其他5种舌鳎科鱼类的同一种鱼的不同个体均可聚在同一分支内,9种舌鳎均可形成单系,但2个属内不同种类个体不能聚为独立的分支(图1)。在NJ分子进化图谱上,还表现出一些与传统形态学分类不一致的结果,拟舌鳎亚属的宽体舌鳎与须鳎属的日本须鳎聚在一个分支内,两者间呈现出比较近的亲缘关系。

3 讨论

线粒体CO I基因进化速度适中,可用于种群水平差异的检测,也可用于种间分析和鉴定,Ward等(2005)通过分析澳大利亚207种鱼类的CO I基因序列,发现143种硬骨鱼类的GC含量平均为47.1%,高于61种软骨鱼类42.2%的GC平均含量,本研究中9种舌鳎科鱼类的GC平均含量高于42.2%,符合硬骨鱼类的范畴。彭居俐等(2009)也报道了鲤科鲃属4种鱼类32个CO I基因序列的第1密码子位点GC含量最高,其次是第2密码子,第3密码子位点的GC含量最低。本研究中,9种舌鳎科鱼类的CO I基因序列GC含量在三个密码子间依次降低,该结果与上述研究中GC含量在不同密码子位点的分配规律一致。在分析的9种舌鳎科鱼类中,第2密码子位点的GC含量均为42.0%,这是否为舌鳎科鱼类的特有现象,还有待进一步分析验证。

较大的种间序列差异是对物种进行准确鉴定的先决条件(彭居俐等2009)。根据Hebert等(2003a, b)提出的利用CO I基因序列有效鉴别物种的关键点是种间的遗传距离必须大于种内的遗传距离,并且距离差异大约10倍,而本研究的9种舌鳎科鱼类种间遗传距离为种内遗传距离的63.7倍。本研究中紫斑舌鳎与短吻三线舌鳎间的遗传距离为0.002,长吻红舌鳎和短吻红舌鳎间的遗传距离为0.007,明显的小于Hebert等(2003a)推荐的物种鉴定最小种间遗传距离为0.020的标准,推测上述两组物种间存在同种异名现象。Hebert等(2003a)对动物界11个动物门13320个物种进行分析得出物种内的遗传距离很少有大于0.020的,大部分的种内遗传距离小于0.010。在分析的

9种舌鳎科鱼类中,除了紫斑舌鳎与短吻三线舌鳎间和长吻红舌鳎与短吻红舌鳎间的遗传距离较小,存在明显的同种异名现象外,其他种类间的种间遗传距离均大于0.100,种内遗传距离均小于0.010,根据种间和种内遗传距离的大小把同科鱼类鉴定到不同的种,可见CO I基因序列除了能有效筛选出同种异名种类外,还能够对舌鳎科鱼类进行有效的物种鉴定。

本研究构建的9种舌鳎科鱼类的2种亲缘关系分析分子图谱的拓扑结构基本一致,其中三线舌鳎亚属的短吻三线舌鳎和紫斑舌鳎聚在一起,然后与窄体舌鳎和半滑舌鳎聚为一支,可见,这4种舌鳎间的亲缘关系相对较近。在早期的研究中,通过形态特征对比,甚至认为半滑舌鳎是短吻三线舌鳎的异名,半滑舌鳎与窄体舌鳎间存在同种异名现象(Matsubara 1955, Ochiai 1963),但在本研究中通过线粒体CO I基因序列分析发现,半滑舌鳎与短吻三线舌鳎以及半滑舌鳎与窄体舌鳎间的遗传距离分别为0.138和0.142,均大于0.100,说明半滑舌鳎、短吻三线舌鳎、窄体舌鳎为不同的种,虽然三者的形态特征相近,在分子进化图谱上也聚在一起,这只能说明三者间的亲缘关系较近,但还不足以说明其间存在同物异名现象。短吻三线舌鳎与紫斑舌鳎在形态上极为相似,主要区别体现在上中侧线间横列鳞的行数不同,前者的上中侧线间横列鳞行数为19~20,而后者上中侧线间横列鳞行数为17~18(姜大为2001)。分子进化图谱也显示,紫斑舌鳎与短吻三线舌鳎聚在同一个分支内,其节点支持率达99%以上,它们之间的种间遗传距离仅为0.002,遗传变异尚未达到种的分化水平,再次说明短吻三线舌鳎与紫斑舌鳎存在同种异名现象,该结果与用核糖体ITS1、线粒体16S rRNA、Cyt b的研究结果一致,均支持短吻三线舌鳎与紫斑舌鳎为同种异名的观点(徐晖2007,柳淑芳等2010,杨凡2010)。另外,三线舌鳎亚属的短吻红舌鳎和长吻红舌鳎在形态上也极为相似,区别主要体现在前者上中侧线横列鳞为12~13行,而后者上中侧线横列鳞为10~11行(姜大为2001)。在亲缘关系分析图谱上两者聚在同一个分支内,两者间的遗传

距离为 0.007, 小于 Hebert 等 (2003a) 推荐的物种鉴定最小种间遗传距离为 0.020 的标准, 故推断短吻三线舌鳎与长吻三线舌鳎间也存在同种异名现象, 进一步证实这 2 种舌鳎可能为同一个种的不同形态型, 该结果与柳淑芳等 (2010) 用 16S rRNA 和 Cyt *b* 两个基因的部分序列作为分子标记研究的结果一致。另外, 在 NJ 系统进化图谱上拟舌鳎亚属的宽体舌鳎与须鳎属的日本须鳎聚为一支, 可见两种舌鳎的亲缘关系也较近, 这与传统的分类结果有一定的差异, 两者的关系还有待进一步研究。三线舌鳎亚属的断线舌鳎与其他几种舌鳎属的分歧较大, 特别是与短吻三线舌鳎、紫斑舌鳎、窄体舌鳎、半滑舌鳎这 4 种三线舌鳎亚属种类间的亲缘关系较远, 这与传统分类结果分歧较大, 造成断线舌鳎与其他三线舌鳎亚属鱼类间的亲缘关系相对较远的原因也有待进一步分析。

DNA 条形码不仅可以建立生物分类系统, 而且通过 DNA 条形码研究还可以获得丰富的系统进化信息。许多学者已利用 CO I 基因部分序列对多种物种进行了种间系统进化关系研究 (彭居刚 2007, 孙希福 2009)。基于 CO I 基因构建的舌鳎科亲缘关系分子图谱显示, 除了紫斑舌鳎与短吻三线舌鳎聚在一起, 短吻红舌鳎和长吻红舌鳎聚在一起, 存在明显的同种异名现象外, 同一种鱼的不同个体均可聚在同一分支内, 表现出明显的单系性。总体来讲, 基于线粒体 CO I 基因构建的舌鳎科鱼类分类系统与形态学的分类单元划分基本一致, 该基因可以用来探讨舌鳎科属、种分类单元的系统发育问题, 线粒体 CO I 基因作为分子标记获得的分类结果与用核糖体 ITS1、线粒体 16S rRNA 和 Cyt *b* (徐晖 2007, 柳淑芳等 2010, 杨凡 2010) 几种分子标记方法获得的结果一致, 进一步说明线粒体 CO I 基因作为分类条形码是可行的。

参 考 文 献

Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, 270(1512): 313–321.

Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal*

Society B, 270(Suppl 1): 96–99.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2): 111–120.

Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA₃: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5(2): 150–163.

Matsubara K. 1955. *Fish Morphology and Hierarchy*. Tokyo: Ishizaki-Shoten, 1217–1291.

Ochiai A. 1963. *Fauna Japonica: Soleina (Pisces)*. Tokyo: Biogeographical Society of Japan, 1–114.

Vences M, Thomas M, Bonett R M, et al. 2005. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360(1462): 1859–1868.

Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360(1462): 1847–1857.

Witt J D S, Threlloff D L, Hebert P D N. 2006. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Molecular Ecology*, 15(10): 3073–3082.

成庆泰, 郑葆珊. 1987. 中国鱼类系统检索. 北京: 科学出版社, 508–513.

范京安, 顾海丰, 陈世界, 等. 2009. DNA 条形码识别 VI: 基于微型 DNA 条形码的果实蝇物种鉴定. *应用与环境生物学报*, 15(2): 215–219.

关申民, 高邦权. 2008. CO I 序列: 影响动物分类学与生态学的 DNA barcode. *生态学杂志*, 27(8): 1406–1412.

姜大为. 2001. 中国北方海水鱼及海兽彩色图集. 沈阳: 辽宁人民出版社, 259–264.

姜虎成, 冯建彬, 丁怀宇, 等. 2012. 淮河水系日本沼虾群体遗传结构和系统演化的线粒体 CO I 序列分析. *动物学杂志*, 47(2): 73–84.

李思忠, 王惠民. 1995. 中国动物志: 硬骨鱼纲 鲈形目. 北京: 科学出版社, 72–80.

柳淑芳, 刘进贤, 庄志猛, 等. 2010. 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*, 18(3): 275–282.

倪海儿, 郑忠明. 2002. 几种舌鳎的形态和生长特性的比较. *海洋科学*, 26(12): 61–64.

牛东红, 陈慧, 王树亮, 等. 2010. 我国沿海缢蛏群体遗传结构的 mtDNA-CO I 分析. *动物学杂志*, 45(2): 11–18.

裴男才. 2012. 利用 DNA 条形码技术识别植物物种. *应用生态学报*, 23(5): 1240–1246.

彭居刚. 2007. 东亚特有鲤科类群的 DNA 条形码研究及其系统发育分析. 北京: 中国科学院研究生院硕士学位论文, 36–71.

彭居刚, 王绪祯, 王丁, 等. 2009. 基于线粒体 CO I 基因序列的 DNA 条形码在鲤科鲈属鱼类物种鉴定中的应用. *水生生物学报*, 33(2): 271–276.

萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T(美): 金冬雁, 黎孟枫, 译. 1992. 分子克隆实验指南. 2 版. 北京: 科学出版社, 954 - 962.

孙希福. 2009. 基于形态学和分子生物学资料探讨中国沿海 10 种虾虎鱼类的系统发育关系. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 41 - 57.

王建艳, 甄毓, 王国善, 等. 2013. 基于 mt-16S rDNA 和 mt-CO I 基因的海月水母分子生物学鉴定方法和检测技术. 应用生态学报, 24(3): 847 - 852.

徐晖. 2007. 褐牙鲷(♀)×夏鲷(♂)的分子遗传学研究以及

18 种蝶形目鱼类的系统关系分析. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 41 - 55.

徐晖, 李军, 孔晓瑜, 等. 2008. 6 种舌鲷亚科鱼类 ITS1 序列长度多态性及系统分析. 海洋与湖沼, 39(1): 35 - 41.

杨凡. 2010. 中国蝶形目鱼类的 DNA 分子条形码及褐牙鲷的遗传多样性研究. 广州: 暨南大学硕士学位论文, 28 - 39.

张合彩, 陈广文, 孙健, 等. 2011. 云南省日本三角涡虫不同地理种群 mtDNA CO I 基因序列分析及其系统发育. 动物学杂志, 46(3): 131 - 135.

DOI: 10.13859/j.cjz.201405022

拉萨国家级自然保护区拉鲁湿地发现牛蛙

The Bullfrogs (*Rana catesbeiana*) Found in Lhasa Wetland of National Reserve of Tibet Autonomous Region, China

原产于美国落基山脉以东地区的牛蛙(*Rana catesbeiana*)是一种非常危险的外来物种,被世界保护联盟列为全球 100 种最危险的入侵物种之一(IUCN 2003),也是中华人民共和国国务院办公厅(2003)公布的第一批外来入侵物种名单中唯一的脊椎动物(王彦平等 2006)。

2014 年 6 月 14 ~ 24 日在拉萨市国家级自然保护区拉鲁湿地内发现牛蛙成体和幼体(图 1),并拍摄到不同时辰、不同地域湿地中的牛蛙个体照片。牛蛙最初被作为食物引入到拉萨市场,据湿地周边工作人员介绍,部分牛蛙个体被佛教信徒放生到拉鲁湿地,这可能是促成湿地出现牛蛙的主要原因。建议借助政府、知名宗教人士、媒介等力量,以制度、呼吁、宣传等有效渠道,尽快解决湿地放生牛蛙的问题,以降低湿地现有牛蛙的种群增长及栖息地的进一步扩大。



图 1 牛蛙成体(左)和幼体(右)

致谢 感谢中国科学院成都生物研究所江建平老师在物种鉴定方面所给予的指导和帮助。

米玛旺堆^① 卓嘎^②* 单增卓嘎^① 白玛^① 仁增^① 白单^① 次仁曲珍^①
 ① 西藏大学生命科学系 拉萨 850000; ② 拉萨师范高等专科学校 拉萨 850000

* 通讯作者, E-mail: zhuogar@126.com;
 第一作者介绍 米玛旺堆, 男, 副教授; 研究方向: 高山哺乳动物和两栖动物生态学; E-mail: migmarwangdwei@gmail.com。
 收稿日期: 2014-07-01, 修回日期: 2014-08-02