

星斑川鲷、石鲷及其杂交一代(星斑川鲷♀×石鲷♂) 的线粒体 DNA 序列比较分析*

李 青^{1,2} 郑风荣¹ 关洪斌² 倪世俊³ 王 波^{1①}

(1. 国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266061;

2. 山东大学海洋学院 威海 264209; 3. 乳山渔政监督管理站 乳山 264500)

摘要 本研究以线粒体基因细胞色素 b (Cytochrome b, *Cytb*)和细胞色素 C 氧化酶 I (Cytochrome oxidase subunit I, *COI*)为研究对象,探究比较了星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)、石鲷(*Kareius bicoloratus*)以及杂交 F₁代(星斑川鲷♀×石鲷♂)的种质遗传特性。结果显示,杂交子代与亲本的碱基(A+T)含量均高于(C+G)含量,且杂交 F₁代与母本星斑川鲷的(C+G)相同。基于 mtDNA *Cytb* 和 *COI* 序列结果显示,石鲷与星斑川鲷遗传距离分别为 0.085 和 0.045;杂交 F₁代与石鲷遗传距离分别为 0.076 和 0.045。基于 mtDNA *Cytb* 序列显示,杂交 F₁代与星斑川鲷遗传距离很小,仅 0.009,而两者在 *COI* 基因序列上完全一致。基于 Kimura 2-parameter 模型的 NJ 分子系统树均显示,星斑川鲷和杂交 F₁代聚为一支,石鲷单独聚为一支。以上结果均可得出,杂交后代在线粒体 DNA 上呈现明显的母系遗传。杂交后代中出现左右眼的分化,且在 *COI* 的 NJ 系统树中,杂交 F₁代与母本星斑川鲷形成的一大支又分为两支:母本星斑川鲷与杂交 F₁代中外观显示左眼的聚为一支,杂交 F₁代中外观显示右眼的单独聚为一小支。表明线粒体基因 *COI* 与杂交 F₁代左右眼的分化有一定关系,为进一步研究星斑川鲷♀×石鲷♂提供了参考数据。

关键词 星斑川鲷; 石鲷; 杂交; 线粒体 DNA

中图分类号 Q321 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)02-0040-10

星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)隶属鲷形目、鲷科、川鲷属(王波等,2010),主要分布在 33°–73°N 和 105°W–127°E 的太平洋和北冰洋海域以及附近的河流(Miao *et al*, 2009)。星斑川鲷鱼体扁平形,体较高,两眼突出,养殖群体中大约有 95%–97%的个体两眼位于体左侧,右侧仅占 3%–5%(王波,2010)¹⁾。石鲷(*Kareius bicoloratus*)隶属鲷形目、鲷科、石鲷属,主要

分布于我国东海、黄海、渤海以及日本和朝鲜近海(张少华等,2004)。石鲷体呈椭圆形,侧扁,两眼位于头的右侧(刘曼红等,2009)。星斑川鲷和石鲷营养成分高、肉质鲜美,是我国重要的渔业资源和养殖对象。杂交育种是一种常用的育种方式(Hashimoto *et al*, 2012),杂交后代具有亲鱼双方的遗传物质(Purdom *et al*, 1974; Šimková *et al*, 2015),甚至可以表现出比亲鱼还

* 国家高技术发展计划(863 项目) (2012AA10413-4)和国家海洋公益性行业科研专项 (201305005; 201405010)共同资助 [This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2012AA10413-4), and National Marine Public Welfare Industry Research Special (201305005, 201405010)]. 李 青, E-mail: liqingshdwh@163.com

① 通讯作者: 王 波, 研究员, E-mail: ousun@fio.org.cn

收稿日期: 2015-12-03, 收修改稿日期: 2016-01-10

1) Wang B. Study on the biological characteristics and healthy breeding technology of *Platichthys stellatus*. Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010 [王波. 星斑川鲷的生物学及健康养殖技术研究. 中国农业科学院硕士研究生学位论文, 2010]

优良的性状(Garrett, 2005), 比如生活能力强、适应范围广、抗逆性强和竞争能力强等。在海洋鱼类杂交实验中, 经常研究的是鲆鲽鱼类(Garrett *et al*, 2009)。

细胞色素 b 基因(*Cytb*)和细胞色素 C 氧化酶 I (*COI*)具有比线粒体 rDNA 和非编码区更容易排序、进化速率适中、易扩增和测序及富含系统发育信息等优点(俞建中, 2004¹⁾; 张迪等, 2012)。基于这些特点, 线粒体基因 *Cytb* 和 *COI* 常常被作为分子标记应用于种群遗传结构和遗传多样性的研究(Harrison, 1989; Kartavtsev *et al*, 2008; 彭博等, 2010)。而且同一线粒体引物在邻近种间也可以很好地扩增, 因此, 在杂交实验中也常常被用来评估杂交子代间的遗传分化程度, 以验证杂交子代偏母遗传特性(肖永双等, 2014b)。鲆鲽鱼类由于形态相似, 很难根据一般的形态分类法对其分类, 这就给渔业资源保护和管理带来一定困难。由于线粒体基因自然状态下单倍体和母系遗传的特性, 相比核基因标记, 线粒体基因是一种更好的分子标记。国外学者早已将线粒体基因 *Cytb* 用于鲆鲽类的鉴定(Céspedes *et al*, 1999; Sanjuan *et al*, 2002), *Cytb* 基因片段和 *D-loop* 区基因片段也曾用于鉴别鲆鲽的杂交亲子代[欧洲川鲷(*Platichthys flesus*)×欧鲽(*Pleuronectes platessa*)], *Cytb* 鉴定结果与形态鉴定结果一致, *D-loop* 区显示出不同长度的多态性(Kijewska *et al*, 2009)。本研究针对星斑川鲷、石鲷以及杂交一代(星斑川鲷♀×石鲷♂)线粒体 DNA 的 *Cytb* 和 *COI* 基因片段的遗传特性展开研究, 可为星斑川鲷和石鲷的线粒体遗传效应的研究提供理论依据, 同时为星斑川鲷和石鲷运用杂交育苗手段选育优良品种提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

将取自山东日照海洋水产资源增殖站的星斑川鲷雌性亲鱼和取自日照近海的野生石鲷雄性亲鱼于 2015 年 4 月在烟台蓬莱宗哲养殖公司进行同步促熟培养, 人工授精杂交, 获得受精卵并进行孵化培养。2015 年 8 月于日照海洋水产资源增殖站采集星斑川鲷 24 尾(包含亲本)、石鲷 24 尾(包含亲本); 于烟台蓬莱宗哲养殖有限公司取 30 尾平均体长为 24 mm 的

杂交幼苗, 包括左眼杂交幼苗 15 尾和右眼杂交幼苗 15 尾。所有成鱼于活体状态下取小部分尾鳍后放养。杂交幼苗取其肌肉, 在 95% 的酒精中 4℃ 保存, 回实验室后, 无菌条件下洗去酒精, 并存放于 -80℃ 以备基因组提取。

1.2 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增

取每个样本的尾鳍约 30 mg, 采用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN)提取, 并溶于 130 μl TE 中, 于 -20℃ 保存。水浴时不断摇晃, 使样品细胞充分裂解以释放出 DNA; 加 TE 溶解前, 充分晾干使酒精挥发完全, 以免影响后续实验。星斑川鲷中用于扩增线粒体 *Cytb* 基因的引物(张岩等, 2009): 上游引物 *Cytb* F(5'-AACCACCGTTGTTATTCAACT-3'); 下游引物 *Cytb* R(5'-CTCAGAATGACATTTGTCCTCA-3')。用于扩增线粒体 *COI* 基因的引物(肖永双等, 2014a): 上游引物 *COI* F(5'-CACAAAGACATTGGCACCCT-3'); 下游引物 *COI* R(5'-CCTCCTGCAGGGTCAAAGAA-3')。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 退火温度退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 34 个循环; 最后 72℃ 总延伸 10 min。扩增 *Cytb* 基因的引物退火温度为 53℃, *COI* 的退火温度为 55℃。所有的 PCR 反应体系均为 50 μl: DNA 模板 1.5 μl (15 ng/μl), 上下游引物各 2 μl (10 μmol/L), 2×Reaction Mix 25 μl, ddH₂O 18.9 μl, *Taq* DNA 聚合酶 0.6 μl (2.5 U/μl)(东盛生物)。PCR 反应在 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice 上进行。取 5 μl PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(U=5 V/cm)。将含有目的条带的 PCR 产物送北京美吉桑格生物医药科技有限公司用 ABI3730XL 自动测序仪进行单向测序, 测序反应采用与之相对应的正向引物。

1.3 序列分析

测序结果经 Dnastar 软件包(DNASTAR, Inc., 美国)校对后人工截取有效片段, GenBank 登录号: 日照星斑川鲷 KT920092-KT920114, KT920069-KT920091; 日照石鲷 KT920136-KT920157, KT920115-KT920135; 子一代 KU097360-KU097415。软件 DNA Sequence Polymorphism 5.0(DnaSP 5)(Librado *et al*, 2005)计算各个群体单倍型数(h)、单倍型多样性(Hd)(Nei, 1987)、核苷酸多样性(λ)以及平均核苷酸差异

1) Yu JZ. Pilot study of phylogeny and molecular evolution, in Pleuronectiformes of Yellow Sea. Master's Thesis of the Ocean University of China, 2004 [俞建中. 黄海鲆形目鱼类系统发生与分子进化的初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2004]

数(k)(Tajima, 1983);软件 MEGA 6.0(Tamura *et al*, 2013) 计算碱基组成、碱基替换, 基于 Kimura 2-parameter 公式计算种间种内遗传距离, 采用(Neighbor-joining, NJ)法(设 Interior-branch test 次数是 1000)构建系统发育树, 进行系统分化分析。

2 实验结果

2.1 mtDNA *Cytb* 序列分析结果

2.1.1 *Cytb* 部分基因序列碱基组成分析 将测序结果与 GenBank 中注册的星斑川鲮和石鲮的 mtDNA *Cytb* 基因序列进行比对, 确定所得片段序列为目的片段。经 Dnastar 比对后, 截取得到有效片段为 356 bp, 应用 MEGA 6.0 中 Sequence Date Explore 分别计算星斑川鲮、石鲮以及 F_1 代群体的碱基组成频率, 结果见表 1。由表 1 可见, 3 种鲮类中(A+T)含量均高于(C+G)含量, 表现出与其他鱼类相似的碱基组成偏向性(唐文乔等, 2010)。总体来说, 3 种鲮类的碱基组成差异不大, 星斑川鲮、石鲮、杂交 F_1 代的(A+T)分别为 53.4%、53.5%、53.4%, (C+G)含量分别为 46.6%、46.5%、46.6%, F_1 代(C+G)含量与母本(C+G)含量相同。从 3 个位点分别比较发现, 星斑川鲮和杂交 F_1 代没有差异, 但二者与石鲮在第 2 位点和第 3 位点有轻微差异, 从总体分析 3 个位点, 发现第 1 位点富含 T, 第 2 位点富含 C, 且严重缺少 G, 第 3 位点较均一, 这表明密码子的碱基使用频率存在明显的偏性, 张艳云等(2011)在乌龟的研究中也发现了类似情况。

表 2 显示, 3 个鲮类群体共检测到 30 个变异位点(8.42%), 其中含有 29 个简约信息位点; 星斑川鲮(♀)与杂交 F_1 代之间仅有 2 个变异位点, 全部为简约信息位点; 石鲮(♂)与杂交 F_1 代之间共 30 个变异位点, 其中 29 个为简约信息位点。可见杂交 F_1 代与母

本之间差异性远远小于杂交 F_1 代与父本之间的差异性, 这也印证了线粒体母系遗传这一事实。用软件 DnaSP 检测到 3 个群体间含有 8 个单倍型, 单倍型多样性为 0.792, 平均核苷酸差异数为 12.679。如表 3 所示, 3 个群体的 356 个碱基中共有不变位点 341 个, 转换位点 13 个, 颠换位点 2 个, 转换与颠换位点的比值为 6.5, 转换明显大于颠换, 这与 Green 等(2012)得出的脊椎动物的数值是一致的。

2.1.2 3 种鲮科鱼类群体内和群体间的多样性

从表 4 可以看出, 星斑川鲮、石鲮和杂交 F_1 代各个群体个体间的序列差异均很小。父本与母本及父本与子代之间序列差异均较大, 远远大于母本与子代之间的差异, 遗传距离所反映的遗传变异关系与序列差异所反映的一致, 即线粒体基因 *Cytb* 严格遵守母系遗传。

2.1.3 分子系统树 将星斑川鲮(PSTR1-PSTR3)、石鲮(KBTS1-KBTS3)、其杂交 F_1 代(左眼 PKZY1-PKZY3, 右眼 PKZY24-PKZY26)的 *Cytb* 基因核苷酸序列随机各取 3 条, 用 MEGA 6.0 采用 NJ 法构建分子系统进化树(图 1)。星斑川鲮 KF445179.1 和石鲮 AB987795.1 分别为在 GenBank 中与星斑川鲮和石鲮 *Cytb* 序列(登录号分别为 PSTR4 和 KBTS4)相似度最高的序列。由图 1 可看出, NJ 树形成明显的两大支, 石鲮单独聚为一大支, 星斑川鲮和杂交 F_1 代聚为一支, 而且杂交 F_1 代左右眼并没有分支, 而是聚为一小支后与母本星斑川鲮聚为一大支。

2.2 mtDNA *COI* 序列分析结果

2.2.1 *COI* 部分基因序列碱基组成分析 对亲子代个体 *COI* 基因片段扩增后所获得序列人工拼接后得到 557 bp, 用软件 MEGA 6.0 中 Sequence Date Explore 分别计算星斑川鲮、石鲮以及 F_1 代群体的碱基组成频率, 结果见表 5。结果显示, 亲子代碱基使用情况差

表 1 *Cytb* 基因片段序列的碱基组成

Tab.1 Base composition of *Cytb* partial sequence

实验样品 Experimental samples	总碱基频率				第 1 位点				第 2 位点				第 3 位点			
	Total base frequency (%)				First site(%)				Second site(%)				Third site(%)			
	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
星斑川鲮 <i>P.stellatus</i>	31.7	28.1	21.7	18.5	39.0	22.7	19.3	19.3	28.0	41.2	22.7	8.4	29.0	20.3	22.9	28.0
石鲮 <i>K.bicoloratus</i>	32.0	28.1	21.5	18.4	39.0	22.7	19.3	19.3	29.0	41.2	22.2	8.1	29.0	20.3	22.9	28.0
杂交一代 <i>P.stellatus</i> ♀× <i>K.bicoloratus</i> ♂	31.7	28.1	21.7	18.5	39.0	22.7	19.3	19.3	28.0	41.2	22.7	8.4	29.0	20.3	22.9	28.0

表 2 *Cytb* 基因片段平均位点分析

Tab.2 The analysis of average sites of *Cytb* gene sequence

实验样品 Experimental samples	保守位点(C) Conserved sites	变异位点(V) Variable sites	简约信息位点(Pi) Parsim-info sites	自裔位点(Si) Singleton sites	0 倍简并位点 0-fold Degenerate sites	2 倍简并位点 2-fold Degenerate sites	4 倍简并位点 4-fold Degenerate sites	单倍型 Haplotypes (h)	单倍型多样性 Haplotype diversity (Hd)	平均核苷酸差异数 Mean number of nucleotide differences (k)
星斑川鲈和 F ₁ 代 <i>P.stellatus</i> and hybrids	354	2	2	0	227	60	65	2	0.509	1.017
石鲈和 F ₁ 代 <i>K.bicoloratus</i> , and hybrids	326	30	29	1	222	46	57	6	0.659	14.113
星斑川鲈和石鲈 <i>P.stellatus</i> , and <i>K.bicoloratus</i>	328	28	27	1	222	47	58	6	0.684	13.248
星斑川鲈、石鲈、杂交一代 <i>P.stellatus</i> , <i>K.bicoloratus</i> and hybrids	326	30	29	1	222	46	57	8	0.792	12.679

表 3 *Cytb* 基因序列碱基替换统计

Tab.3 The base substitution of *Cytb* gene sequence

统计内容 Statistical content	不变位点 Identical Pairs (ii)	转换位点 Transitional Pairs (si)	颠换位点 Transversional Pairs (sv)	转换与颠换位点的比值(si/sv)	统计所包括的位点 All sites
星斑川鲈和 F ₁ 代 <i>P. stellatus</i> and hybrids	355	1	0	—	356
石鲈和 F ₁ 代 <i>K.bicoloratus</i> and hybrids	341	13	2	6.5	356
星斑川鲈和石鲈 <i>P. stellatus</i> and <i>K.bicoloratus</i>	342	12	2	6.0	356
星斑川鲈、石鲈、杂交一代 <i>P. stellatus</i> , <i>K.bicoloratus</i> and hybrids	341	13	2	6.5	356

表 4 基于 Kimura 2-parameter 模型 3 个群体的 *Cytb* 序列的遗传距离

Tab.4 Genetic distances of *Cytb* sequences based on the Kimura 2-parameter model of three groups

	星斑川鲈 <i>P.stellatus</i>	石鲈 <i>K.bicoloratus</i>	杂交一代 <i>P.stellatus</i> ♀× <i>K.bicoloratus</i> ♂
星斑川鲈 <i>P.stellatus</i>	0.001		
石鲈 <i>K.bicoloratus</i>	0.085	0.005	
杂交一代 <i>P. stellatus</i> ♀× <i>K.bicoloratus</i> ♂	0.009	0.076	0

注: Kimura 2-parameter distance 双参数模型对角线以下是种群间遗传距离, 对角线以上是种群内遗传距离。表 8 同

Note: Using Kimura 2-parameter distance model. Data below the diagonal were pairwise distances, and data above the diagonal were genetic distances within one population. The same in Table 8

别不大, 其中, 星斑川鲈和杂交 F₁ 代完全一致, 每个位点间也一致, 再次证明线粒体基因 *COI* 具有明显的母系遗传特性。在总碱基频率使用方面, 星斑川鲈和杂交 F₁ 代(A+T)含量为 52.4%, (C+G)含量为 47.6%; 石鲈(A+T)含量为 52.1%, (C+G)含量为 48.0%。

在 557 bp 的 *COI* 基因片段中, 3 个鲈科种群共

检测到 26 个变异位点(4.8%)(表 6), 其中, 25 个为简约信息位点。母本星斑川鲈和杂交 F₁ 代间全部为保守位点, 未检测到变异位点, 再次有力地说明了线粒体基因母系遗传这一特性; 石鲈与杂交 F₁ 代间的变异位点和星斑川鲈与石鲈间的变异位点完全一致。如表 7 所示, 用 MEGA 6.0 检测, 发现亲子代 3 种鲈科

群体间共有 12 个转换位点, 1 个颠换位点, 转换远大于颠换; 星斑川鲮和杂交 F₁ 代间全部为保守位点。

2.2.2 3 种鲮科鱼类群体内和群体间的多样性

基于 Kimura 2-parameter 模型对 3 个群体的 COI

基因序列计算遗传距离, 结果如表 8 所示。星斑川鲮、石鲮、杂交 F₁ 代群体内部的遗传距离, 杂交 F₁ 代间与母本星斑川鲮的遗传距离, 几乎没有差别, 杂交 F₁ 代与父本石鲮间的遗传距离远远大于子代与母本间的遗传距离。

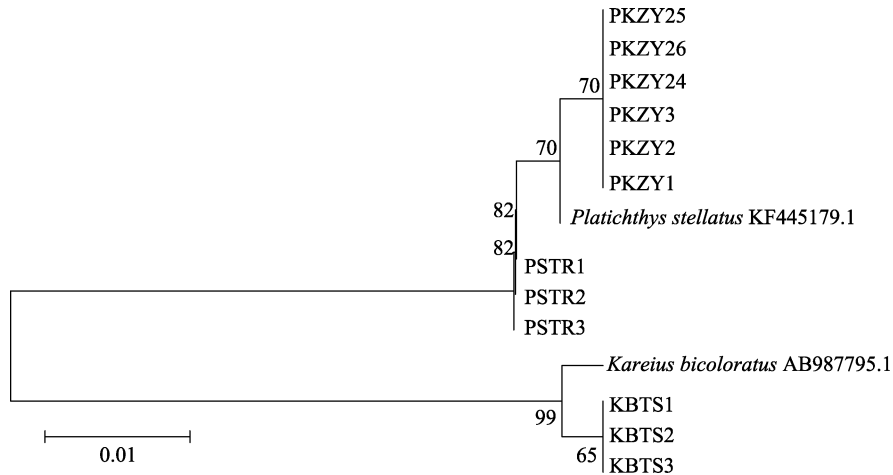


图 1 基于 Kimura 2-parameter 模型建立的邻近关系系统发育树
Fig.1 Neighbor-joining(NJ) phylogeny based on the Kimura 2-parameter model

表 5 COI 基因片段序列的碱基组成频率

Tab.5 Base composition of partial sequence of COI

实验样品 Experimental samples	总碱基频率 Total base frequency (%)				第 1 位点 First site(%)				第 2 位点 Second site(%)				第 3 位点 Third site(%)			
	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
星斑川鲮 <i>P. stellatus</i>	27.6	29.3	24.8	18.3	44	28.5	14.5	12.9	23	33.9	30.6	12.4	16	25.4	29.2	29.7
石鲮 <i>K. bicoloratus</i>	27.7	29.1	24.4	18.9	44	28.5	14.5	12.9	23	33.3	29.5	14.0	16	25.4	29.2	29.7
杂交一代 <i>P. stellatus</i> ♀× <i>K. bicoloratus</i> ♂	27.6	29.3	24.8	18.3	44	28.5	14.5	12.9	23	33.9	30.6	12.4	16	25.4	29.2	29.7

表 6 COI 基因片段平均位点分析

Tab.6 The analysis of average sites of COI gene sequence

实验样品 Experimental samples	保守位点(C) Conserved sites	变异位点(V) Variable sites	简约信息位点(Pi) Parsim-info sites	自裔位点(Si) Singleton sites	0 倍简并位点 Degenerate sites	2 倍简并位点 Degenerate sites	4 倍简并位点 Degenerate sites	单倍型 Haplotypes (h)	单倍型多样性 Haplotype diversity (Hd)	平均核苷酸差异数 Mean number of nucleotide differences (k)
星斑川鲮和 F ₁ 代 <i>P. stellatus</i> and hybrids	557	0	0	0	365	108	82	1	0.000	0.000
石鲮和 F ₁ 代 <i>K. bicoloratus</i> and hybrids	531	26	25	1	362	93	77	6	0.564	11.959
星斑川鲮和石鲮 <i>P. stellatus</i> and <i>K. bicoloratus</i>	531	26	25	1	362	93	77	6	0.605	12.382
星斑川鲮、石鲮、杂交一代 <i>P. stellatus</i> , <i>K. bicoloratus</i> and hybrids	531	26	25	1	362	93	77	6	0.445	9.946

2.2.3 分子系统树 将星斑川鲮(PSTRI1-PSTRI3)、石鲮(KBTSI1-KBTSI3)、杂交 F₁代(左眼 PKZ1-PKZ3, 右眼 PKZ24-PKZ26)的 COI 基因核苷酸序列随机各取 3 条,MEGA6.0 采用 NJ 法构建分子系统进化树(图 2)。

星斑川鲮 EU266365.1 和石鲮 JQ738484.1 分别为在 GenBank 中与星斑川鲮和石鲮 COI 基因序列(GenBank 登录号分别为 PSTRI4、KBTSI4)相似度最高的序列。NJ 树显示, 3 种鲮科鱼分为明显的两支, 星斑川鲮和杂交 F₁代聚为一支, 石鲮独自聚为一支, 即父本石鲮单独聚成一支, 母本与杂交子代聚成一

支。杂交 F₁代与母本星斑川鲮形成的那一支中, 又分为两支: 母本星斑川鲮与杂交 F₁代中外观显示左眼的聚为一支, 杂交 F₁代中外观显示右眼的单独聚为一小支。

3 讨论

杂交育苗是鱼类品种改良的重要手段, 为了获得具有优良品质的品种, 在许多鲮科鱼类中进行了杂交实验(You *et al*, 2009; 王新成等, 2003; 刘振华等, 2009; 肖永双等, 2014b)。虽然日本学者早已开始研究

表 7 COI 基因序列碱基替换统计
Tab.7 The base substitution of COI gene sequence

统计内容 Statistical content	不变位点 Identical Pairs(ii)	转换位点 Transitional Pairs(si)	颠换位点 Transversional Pairs(sv)	转换与颠换位点的比值(si/sv)	统计所包括的位点 All sites
星斑川鲮和 F ₁ 代 <i>P. stellatus</i> and hybrids	557	0	0	/	557
石鲮和 F ₁ 代 <i>K. bicoloratus</i> and hybrids	544	11	1	12	556
星斑川鲮和石鲮 <i>P. stellatus</i> and <i>K. bicoloratus</i>	544	12	1	12	557
星斑川鲮、石鲮、杂交一代 <i>P. stellatus</i> , <i>K. bicoloratus</i> and hybrids	544	12	1	12	557

表 8 基于 Kimura 2-parameter 模型 3 个群体的 COI 序列的遗传距离
Tab.8 Genetic distances of COI sequences based on the Kimura 2-parameter model of three groups

实验样品 Experimental samples	星斑川鲮 <i>P. stellatus</i>	石鲮 <i>K. bicoloratus</i>	杂交一代 <i>P. stellatus</i> ♀× <i>K. bicoloratus</i> ♂
星斑川鲮 <i>P. stellatus</i>	0		
石鲮 <i>K. bicoloratus</i>	0.045	0.001	
杂交一代 <i>P. stellatus</i> ♀× <i>K. bicoloratus</i> ♂	0	0.045	0

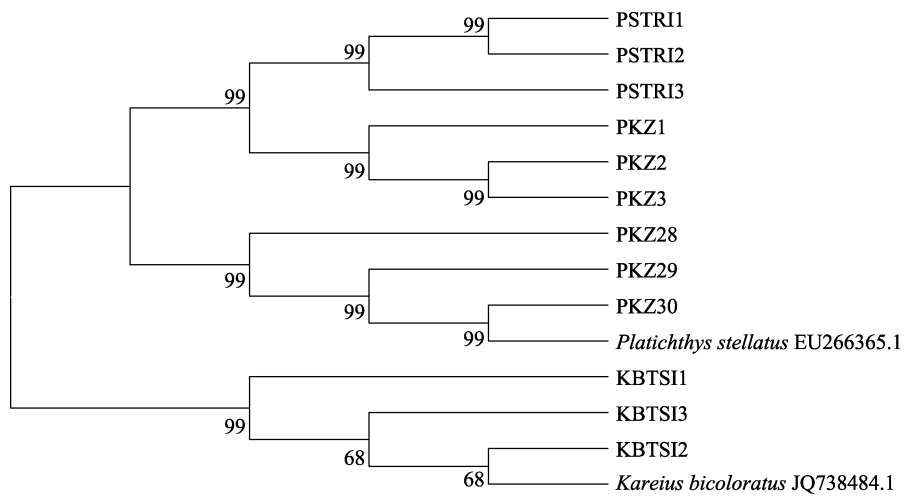


图 2 基于 Kimura 2-parameter 模型建立的邻近关系系统发育树
Fig.2 Neighbor-joining (NJ) phylogeny based on the Kimura 2-parameter model

星斑川鲷和石鲷的杂交育苗,但研究主要集中在星斑川鲷、石鲷和杂交子代的形态学(Kosaka, 1989)、淡水适应性(Takeda *et al.*, 2007);遗传方面的研究手段也仅为同工酶(Park *et al.*, 1991)。运用线粒体基因 *COI* 和 *Cytb* 探究星斑川鲷、石鲷和杂交子代之间遗传关系的中外报道至今还少有见到。通过线粒体 DNA 序列变异可以评估物种间的遗传分化程度、遗传距离以及分子系统发育情况(徐冬冬等, 2010),是一种常用于探究物种间亲缘关系的分子标记手段。本研究通过线粒体基因 *COI* 和 *Cytb* 在星斑川鲷、石鲷以及杂交 F_1 代间的序列差异、遗传距离、分子系统树等方面,得出杂交 F_1 代线粒体基因具有明显的母系遗传倾向,这也与其他物种的研究结果相一致。基于线粒体基因 *COI* 得出的杂交 F_1 代与母本星斑川鲷的遗传距离为 0 的发现与星斑川鲷和大菱鲆(星斑川鲷♀×大菱鲆♂)的杂交实验结果相一致(肖永双等, 2014b)。周翰林等(2012)比较了 2 种杂交石斑鱼子一代与亲本间 *COI* 基因序列的差异,表明 2 种杂交后代在线粒体基因 *COI* 序列上都严格遵循母系遗传规律。

NJ 树是根据遗传距离建立的分子发育树,其建树思想是先假定一棵无根星状树,再两两比较,将亲缘关系近的聚成聚合分类群,然后再将这聚合分类群看作一个整体与另外的再进行聚合分类,这样重复下去,直至构出完整的 NJ 树。在本研究中,根据 *Cytb* 基因和 *COI* 基因建立的 NJ 树都分为两大支,均为石鲷单独聚为一支。但在基因 *COI* 的 NJ 树中,母本星斑川鲷与杂交 F_1 代又分为明显的两支:其中,外形表现为左眼的子代与星斑川鲷聚为一小支,而后与右眼杂交 F_1 代聚为一支,而在基因 *Cytb* 基因的 NJ 树中没有这种分化。推测线粒体基因 *COI* 可能参与鲆鲷杂交 F_1 代的左右眼移位。

鲆鲷左右眼移位的现象早就引起人们的关注,曾有研究调查显示,养殖的星斑川鲷两眼位于体左侧占 95%–97%(王波, 2010)¹⁾,且有资料显示,在“日本海域 100%为左眼型,东北太平洋的北美洲沿岸左右眼型各占 50%”(肖志忠等, 2008)。关于左右眼移位发生的内在机制,也有不少研究者做了探究。研究发现,鲆鲷发育过程中有一段变态期,其体尺比例在这一期间发生巨大变化(Seikai *et al.*, 1986),包含大量的形态上和功能上的变化,也包含眼睛移位这一变化(Inui *et al.*, 1995)。不少学者认为,鲆鲷发育过程中眼睛移

位与一些基因相关,但一直没有得到证明(Bao *et al.*, 2005; Tagawa *et al.*, 2005; Hildahl *et al.*, 2007)。关于鲆鲷杂交子代中出现左右眼分化的现象,也曾经出现在牙鲆(♀)×石鲷(♂)的子代中,左右眼分别占 44%、56%(Wang *et al.*, 2003)。针对这一现象,Chen 等(2009)采用 DD-RT-PCR 和 cDNA-RDA 两种方法,针对两个重要的基因——肌酸激酶基因(*CK*)和胰蛋白酶原-2 前体基因(*TR2P*)进行了研究,发现右眼的杂交子代中 *TR2P* 与父本石鲷相似性高达 96%,而和母本牙鲆仅达 66%,但并没有证明这 2 个基因与鲆鲷类的左右眼移位有关。结合本研究和前人的研究来看,可以推测出鲆鲷及鲆鲷杂交子代出现的左右眼移位这一现象不是偶然的,而是在其变态期,通过一系列复杂的基因调控产生的,并初步得出线粒体基因 *COI* 也参与这一复杂过程。

4 展望

星斑川鲷和石鲷是我国重要的经济鱼类,虽然星斑川鲷的养殖已经规模化、产业化,但养殖的石鲷皆为捕捞的野生幼鱼,养殖成活率较低。为此,星斑川鲷和石鲷杂交为改变石鲷养殖成活率低这一难题起到了积极作用。本杂交实验证明,杂交后代成活率很高,而且在杂交后代中出现了左右眼各半的现象。利用线粒体基因 *COI* 建立的 NJ 树也表明,基因 *COI* 与左右眼移位发生有关,为进一步研究鲆鲷左右眼的分化提供了新线索。

参 考 文 献

- Bao B, Yang G, Liu Z, *et al.* Isolation of SFRS3 gene and its differential expression during metamorphosis involving eye migration of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2005, 1725(1): 64–70
- Céspedes A, García T, Carrera E, *et al.* Application of polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) to identification of flatfish species. *Central European Journal of Medicine*, 1999, 82(4): 903–907
- Chen Y, Zhang Q, Qi J, *et al.* Screening of eye-position related genes with DD-RT-PCR and RDA in the hybrids between Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and stone flounder *Kareius bicoloratus*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009, 27(1): 92–99

1) Wang B. Study on the biological characteristics and healthy breeding technology of *Platichthys stellatus*. Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010 [王波. 星斑川鲷的生物学及健康养殖技术研究. 中国农业科学院硕士学位论文, 2010]

- Garrett DL. A new intergeneric hybrid flatfish (Pleuronectiformes: Pleuronectidae) from Puget Sound and adjacent waters. *Copeia*, 2005(3): 673–677
- Garrett DL, Pietsch TW, Utter FM, *et al.* The hybrid sole *Inopsetta ischyra* (Teleostei: Pleuronectiformes: Pleuronectidae): Hybrid or biological species? *Transactions of the American Fisheries Society*, 2009, 136(2): 460–468
- Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2010
- Harrison RG. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 1989, 4(1): 6–11
- Hashimoto DT, Senhorini JA, Foresti F, *et al.* Interspecific fish hybrids in Brazil: Management of genetic resources for sustainable use. *Reviews in Aquaculture*, 2012, 4(2): 108–118
- Hildahl J, Galay-Burgos M, Sweeney G, *et al.* Identification of two isoforms of Atlantic halibut insulin-like growth factor-I receptor genes and quantitative gene expression during metamorphosis. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 147(3): 395–401
- Inui Y, Yamano K, Miwa S. The role of thyroid hormone in tissue development in metamorphosing flounder. *Aquaculture*, 1995, 135(1): 87–98
- Kartavtsev YP, Park TJ, Lee JS, *et al.* Phylogenetic inferences introduced on cytochrome b gene sequences data for six flatfish species (Teleostei, Pleuronectidae) and species synonymy between representatives of genera *Pseudopleuronectes* and *Hippoglossoides* from far eastern seas. *Russian Journal of Genetics*, 2008, 44(4): 524–531
- Kijewska A, Burzyński A, Wenne R. Molecular identification of European flounder (*Platichthys flesus*) and its hybrids with European plaice (*Pleuronectes platessa*). *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil: fsp*, 2009, 110
- Kosaka M. Morphological study of hybrid flatfish: *Kareius bicoloratus*×*Platichthys stellatus* in Sendai Bay [Japan]. *Journal of the Faculty of Marine Science and Technology Tokai University*, 1989, 13: 161–166
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2005, 25(11): 1451–1452
- Liu MH, Yu HX, Ma YK, *et al.* Morphological observation of wildlife economical fishes *Verasper variegates* and *Kareius bicoloratus*. *Journal of Northeast Forestry University*, 2009(9): 110–111 [刘曼红, 于洪贤, 马玉堃, 等. 两种野生经济鱼类圆斑星鲷和石鲷的最新形态观测. *东北林业大学学报*, 2009(9): 110–111]
- Liu ZH, Wang B, Xu ZP, *et al.* A brief report on cross-breeding of starry flounder and other flounder. *Fisheries Science & Technology Information*, 2009(6): 267–270 [刘振华, 王波, 徐中平, 等. 星斑川鲷与其他鲷类杂交研究简报. *水产科技情报*, 2009(6): 267–270]
- Miao GD, Shao CW, Liao XL, *et al.* Development of polymorphic microsatellite markers from barfin flounder (*Verasper moseri*) and their cross-species amplification. *Conservation Genetics*, 2009, 10(3): 701–703
- Nei M. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, 1987
- Park JY, Kijima A. Genetic variability and differentiation within and between the stone flounder (*Kareius bicoloratus*) and the starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 1991, 41(3–4): 69–82
- Peng B, Zhang Q, Zhao S, *et al.* Genetic diversity analysis of *Larimichthys polyactis* in coastal waters of China based on cytochrome b gene. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2010(2): 131–135 [彭博, 章群, 赵爽, 等. 中国近海小黄鱼遗传变异的细胞色素 b 序列分析. *广东农业科学*, 2010(2): 131–135]
- Purdom C, Lincoln R. *Gynogenesis in hybrids within the Pleuronectidae. The early life history of fish*, Springer: 1974, 537–544
- Sanjuan A, Comesaña AS. Molecular identification of nine commercial flatfish species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a segment of the cytochrome b region. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(6): 1016–1023
- Seikai T, Tanangonan J, Tanaka M. Temperature influence on larval growth and metamorphosis of the Japanese flounder *Palalichthys olivaceus* in the laboratory. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1986, 52(6): 977–982
- Šimková A, Vojtek L, Halačka K, *et al.* The effect of hybridization on fish physiology, immunity and blood biochemistry: A case study in hybridizing *Cyprinus carpio* and *Carassius gibelio* (Cyprinidae). *Aquaculture*, 435: 381–389
- Tagawa M, Aritaki M. Production of symmetrical flatfish by controlling the timing of thyroid hormone treatment in spotted halibut *Verasper variegatus*. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 141(2): 184–189
- Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 1983, 105(2): 437–460
- Takeda Y, Tanaka M. Freshwater adaptation during larval, juvenile and immature periods of starry flounder *Platichthys stellatus*, stone flounder *Kareius bicoloratus* and their reciprocal hybrids. *Journal of Fish Biology*, 2007, 70(5): 1470–1483
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725–2729

- Tang WJ, Hu XL, Yang JQ. Species validities of *Coilia brachygnathus* and *C. nasus taihuensis* based on sequence variations of complete mtDNA control regio N. Biodiversity Science, 2010, 15(3): 224–231 [唐文乔, 胡雪莲, 杨金权. 从线粒体控制区全序列变异看短颌鲢和湖鲢的物种有效性. 生物多样性, 2010, 15(3): 224–231]
- Wang B, Sun P, Fang HH, et al. Morphological characteristics and parameters measurement of starry flounder (*platichthys stellatus* Pallas). Acta Oceanologica Sinica, 2010(2): 139–147 [王波, 孙萍, 方华华, 等. 星斑川鲷形态特征及相关参数的观测. 海洋学报, 2010(2): 139–147]
- Wang XC, You F, Ni GT, et al. Hybridization between Stone flounder *Kareius bicoloratus* and Olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Marine Sciences, 2003, 27(1): 1–4 [王新成, 尤锋, 倪高田, 等. 石鲷与牙鲆人工杂交的研究. 海洋科学, 2003, 27(1): 1–4]
- Wang Z, Wang X, Zhang Q. Interfamilial hybridization between *Paralichthys olivaceus* and *Kareius bicoloratus*-Early development and growth characters. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(7): 30–37
- Xiao YS, Xiao ZZ, Liu QH, et al. Comparative analysis of genetic variability of mtDNA sequence in *Platichthys stellatus*, *Scophthalmus maximus* and their hybrids. Marine Sciences, 2014a, 38(6): 5–9 [肖永双, 肖志忠, 刘清华, 等. 星斑川鲷、大菱鲆及其杂交后代的线粒体 DNA 序列比较分析. 海洋科学, 2014a, 38(6): 5–9]
- Xiao YS, Zhang Y, Gao TX. Study of the relationship between genera *Kareius bicoloratus* and *Platichthys stellatus* by mtDNA sequence. Periodical of Ocean University of China, 2014b, 40(6): 69–76 [肖永双, 张岩, 高天翔. 基于线粒体 DNA 部分片段探讨石鲷与星斑川鲷的亲缘关系. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2014b, 40(6): 69–76]
- Xiao ZZ, Wang B, Liu ZH. Morphological and anatomical studies on *Platichthys stellatus*. New Advances in Mariculture Research. Beijing: China Ocean Press, 2008, 260–269 [肖志忠, 王波, 刘振华. 星斑川鲷形态与解剖学研究. 海水养殖研究新进展. 北京: 海洋出版社, 2008, 260–269]
- Xu DD, You F, Lou B, et al. Analysis of correlation between pairwise genetic distance of eight flatfishes and hybrid fitness. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(2): 178–184 [徐冬冬, 尤锋, 楼宝, 等. 8 种鲆鲷鱼种间遗传距离与杂交亲和性的相关性分析. 水产学报, 2010, 34(2): 178–184]
- You F, Wang W, Xu DD, et al. Hybrids between olive flounder *Paralichthys olivaceus* and stone flounder *Kareius bicoloratus*: Karyotype, allozyme and RAPD analyses. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2009, 27(2): 135–141
- Zhang D, Lei GC, Gong C, et al. Genetic diversity of *Neosalanx taihuensis* based on mitochondrial COI sequences. Journal of Lake Sciences, 2012, 24(2): 299–306 [张迪, 雷光春, 龚成, 等. 基于 COI 基因序列的太湖新银鱼遗传多样性. 湖泊科学, 2012, 24(2): 299–306]
- Zhang SH, Zhang XL, Sun AF, et al. Pellet culture technology of stone flounder. Shandong Fisheries, 2004, 21(5): 6–7 [张少华, 张秀丽, 孙爱凤, 等. 石鲷池塘养殖技术. 齐鲁渔业, 2004, 21(5): 6–7]
- Zhang Y, Xiao YS, Gao TX, et al. Comparative analysis of mtDNA gene sequences between two species of *Pleuronectes*. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(2): 201–207 [张岩, 肖永双, 高天翔, 等. 两种黄盖鲆线粒体 DNA 部分片段比较分析. 水产学报, 2009, 33(2): 201–207]
- Zhang YY, Bi TT, Song JL, et al. Phylogenetic evolution of hinged turtles in China based on the complete mitochondrial cytochrome b gene sequences. Journal of Biology, 2011, 28(1): 22–26 [张艳云, 毕婷婷, 宋娇莲, 等. 基于线粒体 Cytb 基因的全长序列探讨闭壳龟类的系统进化. 生物学杂志, 2011, 28(1): 22–26]
- Zhou HL, Zhang Y, Qi X, et al. SSR analysis of the heterosis in the two grouper hybrids. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(2): 161–168 [周翰林, 张勇, 齐鑫, 等. 两种杂交石斑鱼子一代杂种优势的微卫星标记分析. 水产学报, 2012, 36(2): 161–168]

(编辑 冯小花)

Comparative Analysis of Genetic Variability of mtDNA Sequences in *Platichthys stellatus*, *Kareius bicoloratus* and Their Hybrid (*P. stellatus*♀×*K. bicoloratus*♂)

LI Qing^{1,2}, ZHENG Fengrong¹, GUAN Hongbin², NI Shijun³, WANG Bo^{1①}

(1. First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061;

2. Marine College of Shandong University, Weihai 264209;

3. Fishery Supervision Station, Rushan 264500)

Abstract *Platichthys stellatus* and *Kareius bicoloratus* are two common Pleuronectidae species that are highly valuable in the aquaculture industry. *P. stellatus* is endowed with high meat content and delicious taste while *K. bicoloratus* is highly resistant to diseases. Characteristics of their hybrids, however, were rarely reported. In this study, we explored the genetic variability of mtDNA sequences of *P. stellatus*, *K. bicoloratus* and their hybrid (*P. stellatus*♀×*K. bicoloratus*♂), using 24 *P. stellatus*, 24 *K. bicoloratus* and 40 hybrids as samples. We found that the content of A+T base pairs was higher than that of the C+G base pairs in all 3 groups, and that the content of A+T base pairs in the hybrids was the same as in *P. stellatus*. The analysis of mtDNA *Cytb* gene and *COI* fragments suggested that the genetic distances between *K. bicoloratus* and *P. stellatus* were 0.085 and 0.045 respectively, and that the genetic distances between the hybrids and *K. bicoloratus* were 0.076 and 0.045 separately. Moreover, there was a very small differentiation (0.009) between the hybrids and *P. stellatus* based on the mtDNA *Cytb* sequence analysis, and there was no genetic differentiation between the 2 groups based on the mtDNA *COI* gene sequence analysis. The neighbor-joining (NJ) phylogeny trees constructed with the Kimura 2-parameter model showed that *P. stellatus* and the hybrid could be clustered into one branch, while *K. bicoloratus* belonged to another branch. In the NJ phylogenetic tree based on gene *COI*, the big branch including F₁ hybrid and *P. stellatus* could be further divided into two small branches. One was *P. stellatus* and F₁ hybrid with the left eyes, and the other was the F₁ hybrid with the right eyes. These data strongly suggested that characteristics of the hybrid of *P. stellatus* and *K. bicoloratus* (*P. stellatus*♀×*K. bicoloratus*♂) were maternally inherited. This study provided helpful information for the future research on the hybridization of the two species.

Key words *Platichthys stellatus*; *Kareius bicoloratus*; Hybridization; Mitochondrial DNA

① Corresponding author: WANG Bo, E-mail: ousun@fio.org.cn