

•研究报告•

短吻红舌鲷鱼卵、仔鱼的DNA 条形码和形态学鉴定

周晓梦¹ 郭书新¹ 宋娜¹ 张秀梅^{1,2*}¹ (中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东青岛 266003)² (青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东青岛 266072)

摘要: 为了准确鉴定2015年7–10月青岛崂山青山湾鱼类浮游生物调查中采集的依形态学初步鉴定为某种舌鲷属的鱼卵、仔鱼样本, 本实验同时采集青岛胶州湾短吻红舌鲷(*Cynoglossus joyneri*)和长吻红舌鲷(*C. lighti*)的成鱼样本为参照, 通过线粒体COI基因测序分析, 以及同山东半岛海域分布的6种舌鲷属鱼类的COI基因序列比对, 开展了该舌鲷属鱼卵、仔鱼种类的鉴别分析, 以期为今后舌鲷属鱼类的分类及其鱼卵、仔鱼的鉴别提供参考资料。形态学研究结果显示: 鱼卵为圆球形浮性卵, 直径0.68–0.87 mm (0.73 ± 0.03 mm, $n = 50$), 卵膜单层, 较薄、光滑透明, 卵周隙较大, 卵膜及卵黄囊均无特殊构造, 油球6–15个, 直径0.04–0.10 mm (0.07 ± 0.01 mm, $n = 50$), 圆形, 大小不一, 多位于卵黄囊中与胚体相对的一侧, 既有聚集分布也有分散分布; 仔鱼的2条冠状幼鳍及右眼移位过程中体长、色素分布等的特征和变化是此鱼种仔鱼鉴别的最明显特征。遗传学分析结果显示: 该种舌鲷属样品(*Cynoglossus* sp.)与短吻红舌鲷和长吻红舌鲷的遗传距离最为接近, 三者K2P遗传距离为0.006–0.009; 短吻三线舌鲷(*C. abbreviatus*)与紫斑舌鲷(*C. purpureomaculatus*)亲缘关系最近, 两者K2P遗传距离仅为0.002。以带纹条鲷(*Zebrias zebra*)为外类群构建的NJ系统发育树显示, 该种舌鲷属样品与短吻红舌鲷和长吻红舌鲷以及短吻三线舌鲷与紫斑舌鲷分别聚为一支, 其他种类各聚为一支。综合形态特征和COI基因比对结果, 确定该舌鲷属鱼卵、仔鱼样品为短吻红舌鲷。

关键词: 舌鲷属; 同种异名; 鱼类浮游生物; COI; 鉴别

Identification of *Cynoglossus joyneri* eggs and larvae by DNA barcoding and morphological method

Xiaomeng Zhou¹, Shuxin Guo¹, Na Song¹, Xiumei Zhang^{1,2*}¹ Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003² Functional Laboratory of Marine Fisheries Science and Food Production Process, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao, Shandong 266072

Abstract: This study was designed to accurately identify *Cynoglossus* eggs and larvae (*Cynoglossus* sp.), and to accumulate base data for further study on the taxonomy and early identification of *Cynoglossus* fishes. *Cynoglossus* sp. samples were collected in Qingshan Bay, Qingdao, between May and October 2015. Three eggs, 3 larvae and a total of 5 individuals from 2 species (*C. joyneri* and *C. lighti*) in the Jiaozhou Bay area were barcoded using COI, sequenced, and compared with 6 *Cynoglossus* species found in the Shandong Peninsula and recorded in GenBank. Under a light microscope, the egg had a circular shape and floated within a wider perivitelline space; eggs ranged in diameter from 0.68 to 0.87 mm with a mean diameter of 0.73 ± 0.03 mm; eggs had a single layer membrane and were smooth and transparent; the oil globules were located opposite the yolk sac, ranged from 6 to 15 in number, and diameter ranged from 0.04 to 0.10 mm (mean diameter: 0.07 ± 0.01 mm); there were obvious characteristics including the 2 dorsal fin rays and pigmentation and body length changes in the period of metamorphosis for larvae identification. Results of

收稿日期: 2017-03-23; 接受日期: 2017-06-19

基金项目: 国家自然科学基金(31572227, 41676153); 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ01)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: xiumei1227@163.com

genetic analysis showed that the average K2P distances pairwise-species in *Cynoglossus* sp., *C. joyneri* and *C. lighti* ranged from 0.006 to 0.009, and was 0.002 for *C. abbreviatus* and *C. purpureomaculatus*. The two groups were placed in two different clades with the support of a high bootstrap value and had a close genetic relationship, separately. The neighbor-joining (NJ) phylogenetic trees were constructed for COI gene sequences of 8 species using MEGA 6.0, and *Zebrias zebra* was included as an outgroup. The above analysis and results showed that the *Cynoglossus* sp. is *C. joyneri*.

Key words: *Cynoglossus*; synonym; ichthyoplankton; COI; identification

舌鳎属(*Cynoglossus*)鱼类为广泛分布于我国近海的底层鱼类, 据报道, 仅山东半岛海域分布的舌鳎属鱼类就有短吻红舌鳎(*C. joyneri*)、长吻红舌鳎(*C. lighti*)、宽体舌鳎(*C. robustus*)、窄体舌鳎(*C. gracilis*)半滑舌鳎(*C. semilaevis*)、紫斑舌鳎(*C. purpureomaculatus*)和短吻三线舌鳎(*C. abbreviatus*)7种, 均具有较高的经济价值(周才武和成庆泰, 1997; 倪海儿和郑忠明, 2002)。由于舌鳎属鱼类在同一海区的繁殖期有所重叠, 加之鱼卵的结构特征具有一定的相似性, 使得舌鳎属鱼卵准确鉴定到种存在一定困难。虽然上世纪国内外学者已对舌鳎属鱼类开展了广泛研究, 但在种类鉴定及系统发育关系方面仍存在一定的混乱和争议(李思忠和王惠民, 1995; Carpenter & Niem, 2001)。1822年, Hamiton划分了舌鳎属鱼类, 但随着属内新种不断被发现, 根据有眼侧侧线条数及左侧鼻孔的多少, 众学者又将舌鳎属重新分列为7个属, 分别为舌鳎属、无孔舌鳎属(*Icania*)、单孔舌鳎属(*Trulla*)、一线舌鳎属(*Dollfusichthys*)、双线舌鳎属(*Arelia*)、三线舌鳎属(*Areliscus*)和拟舌鳎属(*Cynoglossoides*)(苗宪广等, 2013)。Menon (1977)认为以上分类标准并不是各类群的标志性性状, 并综合侧线间鳞数和鳞片类型等鱼体形态特征把这些属合并为舌鳎属的6个种组; 李思忠和王惠民(1995)则在分类中将这属统归为舌鳎属下的亚属阶元。近年来的研究虽倾向于单独保留舌鳎属, 但也有研究发现属内不同种之间的形态差异和分化程度大小不一(Carpenter & Niem, 2001; 苗宪广等, 2013)。Menon (1977)在对舌鳎属鱼类的形态学研究中率先提出长吻红舌鳎与短吻红舌鳎为同种异名, 近年来多位学者也曾在后续的研究中利用分子生物学方法证明了此观点(徐晖等, 2008; 柳淑芳等, 2010a; Sharina & Kartavtsev, 2010; 宋超等, 2014), 但迄今仍未形成一致性结论。Yagi等(2009)在对长吻红舌鳎和短吻三线舌鳎的早期生

活史研究中, 通过与Minami (1983)关于短吻红舌鳎仔鱼形态特征的对比, 认为短吻红舌鳎和长吻红舌鳎应该是两个物种而非同种异名。在短吻红舌鳎鱼卵、仔鱼研究方面, 杨东莱等(1983)、Gu等(2009)和胡海生(2015)^①也曾分别对其形态特征进行了描述。但单一的形态学特征依然不能为确定短吻红舌鳎和长吻红舌鳎之间的关系提供足够的证据。近年来, 随着DNA条形码技术(DNA barcoding)在鱼类鉴别中的广泛应用, 为舌鳎属鱼类有效分类地位的确定和鱼卵的准确鉴别提供了可能(Hebert et al, 2003; Ward et al, 2005; 卞晓东等, 2007; 周美玉等, 2015)。

Hebert等(2003)率先提出了DNA条形码的概念, 并指出线粒体DNA中的细胞色素C氧化酶第一亚基(COI)基因能够作为全球动物的识别码。由于COI基因进化速度适中等特性, 随后在物种分析鉴别和种群水平差异检测中得到了广泛应用(Ball et al, 2005)。在鱼类研究应用方面, Ward等(2005)采用COI基因成功区分了澳大利亚地区的207种海水鱼类, 并结合系统发育关系比较, 进一步验证了COI基因在鱼类分类中应用的可行性; 国内学者利用COI基因在南海常见硬骨鱼类、石首鱼科、鲷科等鱼类的鉴定和群体遗传结构研究中也均取得较好成效(王中锋等, 2009; 柳淑芳等, 2010b; 陈咏霞等, 2015); 利用COI基因, 高东奎等(2015)和周美玉等(2015)分别完成了对少鳞鳕(*Sillago japonica*)鱼卵和厦门海域鱼类浮游生物的鉴定。

本实验以2015年7-10月于青岛崂山青山湾鱼类浮游生物调查中采集的, 依据形态特征初步鉴定为舌鳎属(*Cynoglossus*)的鱼卵、仔鱼为研究对象, 进行了线粒体DNA COI基因序列的分析测定, 并与山东海域分布的舌鳎属鱼类的序列进行比对, 结合该种鱼卵、仔鱼的形态学特征, 确定该舌鳎属样品

^① 胡海生 (2015) 海州湾春夏季习见鱼卵、仔稚鱼形态学研究. 硕士学位论文, 中国海洋大学, 青岛.

所属种类, 进一步分析DNA条形码技术在舌鲷属鱼类种类鉴定中的有效性, 以期为舌鲷属鱼类早期个体的种类鉴定积累资料, 同时也为其他鱼卵、仔鱼或微量生物样本DNA的提取提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 样品采集与鉴定

鱼卵、仔鱼为于2015年7–10月采集于青岛崂山青山湾(36.1152°–36.1696° N, 120.6887°–120.7165° E)的鱼类浮游生物调查样品, 参照国家海洋调查规范(中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局和中国国家标准化委员会, 2007)使用浅水I型浮游生物拖网(网长1.45 m, 网口内径0.5 m, 网口面积0.2 m²)进行拖曳采集。短吻红舌鲷和长吻红舌鲷成鱼样本采自青岛胶州湾近岸海域拖网渔获物。所有样本于实验室内进行常规生物学测定, 测定结果与《中国动物志》(李思忠和王惠民, 1995)、《山东鱼类志》(周才武和成庆泰, 1997)和《日本産魚類検索》(Nakabo, 2000)中对于短吻红舌鲷和长吻红舌鲷的研究和记录进行对比。重点对比的形态特征包括: 上、中侧线间鳞数(scales between upper and middle lateral line)、体长/体高(body length/body depth, BL/BD)、头长/头高(head length/head depth, HL/HD)等, 共测量分析短吻红舌鲷21尾、长吻红舌鲷34尾。取肌肉组织用70%乙醇固定备用。

1.2 实验方法

1.2.1 鱼卵、仔鱼DNA提取

DNA的提取采用Chelex 100树脂(Bio-Rad Laboratories, US) (Walsh et al, 1991), 用灭菌后的dd H₂O配制6% Chelex树脂, 利用吸管将鱼卵、仔鱼用95%乙醇吹打洗净放入离心管, 并用无菌牙签将卵膜挑破, 加入25 μ L 6% Chelex树脂及0.5 μ L蛋白酶K (20 mg/mL, 正常工作浓度50–100 μ g/mL), 树脂加入时应放在磁力搅拌器上, 确保有树脂颗粒的加入。离心管放入60℃水浴锅水浴3 h, 每0.5 h晃动一次, (待卵膜溶解)然后85℃水浴10 min, 离心, 取上清液, –20℃保存备用。由于样本量充足, 每批次分别选取5–10个鱼卵、仔鱼进行DNA提取, 成功提取鱼卵、仔鱼各2–3个样本时终止实验, 共计消耗鱼卵20个, 仔鱼15尾。

1.2.2 成鱼DNA提取

参考《分子克隆实验指南》(Sambrook et al, 1989)

的酚/氯仿法抽提, –20℃保存备用。每种成鱼随机选取2–3尾样本。

1.2.3 PCR分析

用于扩增COI片段的引物为(Hebert et al, 2003): F1: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGC-AC-3'; R1: 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAA TCA-3'。

PCR反应体系为25 μ L: 0.15 μ L *Taq* DNA聚合酶, 2.5 μ L dNTP (2 mM), 2 μ L 10 \times *Taq* buffer(含Mg²⁺), 正反引物各1 μ L (2 mM), DNA模板1 μ L, 其余dd H₂O补足。反应条件为: 95℃预变性5 min; 94℃变性45 s, 52℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 35个循环; 72℃延伸10 min。取2.5 μ L PCR扩增产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测(U = 5 V/cm), 对符合测序浓度的PCR产物送生物公司进行纯化和序列双向测定。

1.2.4 鱼卵、仔鱼形态学特征

使用Nikon SMZ 1000光学显微镜对鱼卵、仔鱼样品进行观察和拍照, 并利用ImageJ软件测定各测量指标、Illustrator CS6描绘。形态学观测指标包括鱼卵浮沉性、形状和直径, 卵膜层数和性质, 卵周隙, 卵黄形态, 油球形状、数量和直径, 胚体形态, 色素分布等; 仔鱼特征包括该体长对应的各鳍发育、卵黄囊消耗、色素分布、肌节数、脊索弯曲情况等。

1.3 数据处理

结合本研究及从GenBank中下载的山东海域分布的6种舌鲷属鱼类(窄体舌鲷无COI序列信息)的COI同源序列, 全部使用LaserGene软件包中的Seqman和Megalign软件进行拼接、比对, 并辅以人工校正。使用MEGA 6.0分析种内和种间变异位点数、简约信息位点数、核苷酸组成等, 另外选取鲷科条鲷属(*Zebrias*)带纹条鲷(*Z. zebra*)的COI基因序列为外群, 计算遗传进化距离, 构建NJ系统发育树。

2 结果

2.1 短吻红舌鲷、长吻红舌鲷成鱼形态特征

由于短吻红舌鲷与长吻红舌鲷两种成鱼形态特征极其相似, 本研究综合分析相关文献中有关此两种成鱼的形态学分类指标进行检测分类(表1)。虽然以上文献资料中分类指标的具体数值存在一定差异, 但一致认为短吻红舌鲷上、中侧线间鳞数多于长吻红舌鲷, 而体长/体高的值小于后者。另外本

研究中发现两种鱼类头长/头高的值分布界限模糊,并不能够有效区分此两种鱼类。故本研究主要以上、中侧线鳞间鳞数和体长/体高的值作为分类依据,其中体长/体高的值取以上3种文献资料数值范围的交集,即定义上、中侧线鳞间鳞数12–13、体长/体高的值3.4–4.0的为短吻红舌鲷;上、中侧线鳞间鳞数10–11、体长/体高的值4.2–5.0的为长吻红舌鲷。

2.2 线粒体DNA COI基因序列特征

本研究共获得6个舌鲷属样品(3个鱼卵、3尾初孵仔鱼)和3尾短吻红舌鲷及2尾长吻红舌鲷成鱼个体的COI基因部分片段,片段长度约为650 bp。对本研究所测11个COI基因序列和17个GenBank中下载的舌鲷科鱼类COI同源序列进行聚类 and 排序分析,保留共有序列,得到28条长度为572 bp的分析用同

源序列(表2)。所有序列间均无碱基插入或缺失。

所分析的8个种类28条COI基因序列,共检测到变异位点197个,变异比率为34.4%。其中单一信息位点8个,占1.4%;简约信息位点189个,占33.0%。各COI基因序列4种核苷酸平均频率分别为25.6% (A)、31.3% (T)、26.5% (C)、16.6% (G),平均AT含量明显高于GC含量(56.9% vs. 43.1%)。对所研究的28个COI基因片段而言,密码子第1位点GC含量显著高于密码子第2和第3位点。T、C、A、G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3)。各COI基因片段的平均GC含量为40.8–48.4%(表4),其中密码子第1位点的GC含量均较高,第2密码子的GC含量基本恒定,而第3密码子位点的GC含量变化范围最大

表 1 中外相关文献中短吻红舌鲷和长吻红舌鲷的形态学数据记录的比较
Table 1 Comparative counts and distribution of *Cynoglossus joyneri* and *C. lighti* in different records

形态特征 Morphological characters	短吻红舌鲷 <i>C. joyneri</i>			长吻红舌鲷 <i>C. lighti</i>		
	Li & Wang, 1995	Zhou & Cheng, 1997	Nakabo, 2000	Li & Wang, 1995	Zhou & Cheng, 1997	Nakabo, 2000
上、中侧线鳞间鳞数 Scales between upper and middle lateral line	12–13	11–12	/	10–11	10–11	/
体长/体高 Body length/body depth	3.6–4.4	3.8–4.0	3.4–4.1	3.8–4.5	4.2–5.0	3.8–4.5
头长/头高 Head length/head depth	≤1	/	/	>1	/	/

表 2 样品与 COI 基因序列信息
Table 2 Information of *Cynoglossus* samples and COI gene sequences

编号 Number	种类 Species	序列编号 Sequence numbers	序列来源 Sources of sequences
1	舌鲷属样品 <i>Cynoglossus</i> sp.	egg.1–egg.3; lar.1–lar.3	本研究 This study
2	短吻红舌鲷 <i>C. joyneri</i>	joy.1–joy.5	本研究(1–3); JQ738430.1; KF979127.1
3	长吻红舌鲷 <i>C. lighti</i>	lig.1–lig.4	本研究(1–2); DQ116752.1; HQ711865.1
4	宽体舌鲷 <i>C. robustus</i>	rob.1–rob.3	KT718591.1; HM180552.1; HM180553.1
5	半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>	sem.1–sem.3	JN242742.1; JN242743.1; JN242744.1
6	紫斑舌鲷 <i>C. purpureomaculatus</i>	pur.1–pur.3	DQ116749.1; JQ738570.1; JQ738571.1
7	短吻三线舌鲷 <i>C. abbreviatus</i>	abb.1	DQ116750.1
8	带纹条鲷 <i>Zebrias zebra</i>	zeb.1–zeb.3	JQ738566.1; JQ738567.1; JQ738568.1

表 3 COI 基因部分序列中各碱基平均分布概率(%)
Table 3 Average nucleotide frequencies (%) of COI partial sequence of eight 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	31.3	18.0	43.8	32.1
C	26.5	24.5	28.1	27.1
A	25.6	27.4	14.5	34.8
G	16.6	30.1	13.6	6.0
A+T	56.9	45.4	58.3	66.9
G+C	43.1	54.6	41.7	33.1

表 4 8 种鱼类 COI 基因密码子位点 GC 含量
Table 4 The GC content of COI partial sequence for eight species in all codon positions

种类 Species	样本量 Sample size	平均 GC 含量 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
1 舌鲷属样品 <i>Cynoglossus</i> sp.	6	42.9	57.2	42	29.5
2 短吻红舌鲷 <i>C. joyneri</i>	5	43	56.9	42	29.9
3 长吻红舌鲷 <i>C. lighti</i>	4	43	57.3	42	29.9
4 宽体舌鲷 <i>C. robustus</i>	3	42.5	53.3	42	31.9
5 半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>	3	40.8	52.4	42	28.2
6 紫斑舌鲷 <i>C. purpureomaculatus</i>	3	43.1	52.3	42	34.9
7 短吻三线舌鲷 <i>C. abbreviatus</i>	1	42.9	51.8	42	34.9
8 带纹条鲷 <i>Zebrias zebra</i>	3	48.4	53.9	42.5	49.0

(28.2–49.0%), 这是由该密码子位点具有很强的简并性决定的。对舌鲷属 7 种鱼类和条鲷属的带纹条鲷共 8 个种类的比较发现, 舌鲷属样品与短吻红舌鲷、长吻红舌鲷的平均 GC 含量最为相近; 紫斑舌鲷和短吻三线舌鲷最为相近。

2.3 种间及种内的遗传距离

采用 MEGA 6.0, 基于 Kimura 2-parameter 模型计算 8 种鱼类的种间和种内遗传距离(表 5)。8 种鱼类 86% 的种间遗传距离大于 0.100, 而种内遗传距离均小于 0.010。另外, 8 种鱼类的种间遗传距离平均值为 0.198, 种内不同个体间遗传距离平均值为 0.004, 种间遗传距离为种内遗传距离的 49.5 倍, 具有较大的种间差异。带纹条鲷与舌鲷属鱼类的亲缘关系最远, 这与各种类形态学分类地位相一致。7 种舌鲷属鱼类中, 宽体舌鲷与短吻红舌鲷和长吻红舌鲷的种间遗传距离最大, 均为 0.240; 短吻三线舌鲷和紫斑舌鲷, 舌鲷属样品和短吻红舌鲷及长吻红舌鲷之间的遗传距离极小, 分别为 0.002 和 0.006–0.009, 均低

于种内遗传分化的水平(约为 2.0%)。此分析结果与前述 COI 基因序列核苷酸对比结果一致。

2.4 各组群系统发育分析

以带纹条鲷为外类群, 利用 COI 基因序列, 基于 K2P 核苷酸替代模型构建 NJ 系统发育树(图 1)。8 个种类共聚为 5 支, 其中, 舌鲷属样品(鱼卵、仔鱼)、短吻红舌鲷和长吻红舌鲷明显聚为一支, 紫斑舌鲷和短吻三线舌鲷聚为一支, 其余 3 个种类各聚为一支, 从而验证了前述 COI 基因序列核苷酸和遗传距离的相关分析结果, 表明该舌鲷属样品与短吻红舌鲷、长吻红舌鲷可能属于同一物种, 而 GenBank 中的紫斑舌鲷和短吻三线舌鲷可能为同种异名。

2.5 鱼卵、仔鱼形态学描述

本研究所采集的舌鲷属样品多数为处于胚体发育期的鱼卵, 少数为仔鱼。鱼卵为分离的圆球形浮性卵, 直径 0.68–0.87 mm (0.73 ± 0.03 mm, $n = 50$); 卵膜单层, 较薄, 表面光滑透明, 无特殊构造; 卵周隙较大, 卵黄囊无特殊构造; 油球 6–15 个, 大小

表 5 8 种鱼类的种间遗传距离和种内遗传距离
Table 5 Genetic distance pairwise-species and within-species of eight species

种间 Pairwise-species	1	2	3	4	5	6	7	8
1 舌鲷属样品 <i>Cynoglossus</i> sp.	0.009							
2 短吻红舌鲷 <i>C. joyneri</i>	0.009	0.008						
3 长吻红舌鲷 <i>C. lighti</i>	0.008	0.006	0.004					
4 宽体舌鲷 <i>C. robustus</i>	0.236	0.240	0.240	0.002				
5 半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>	0.189	0.192	0.190	0.208	0.000			
6 紫斑舌鲷 <i>C. purpureomaculatus</i>	0.181	0.182	0.181	0.200	0.113	0.000		
7 短吻三线舌鲷 <i>C. abbreviatus</i>	0.182	0.185	0.184	0.203	0.116	0.002	n/c	
8 带纹条鲷 <i>Zebrias zebra</i>	0.245	0.245	0.244	0.277	0.278	0.302	0.304	0.002

n/c 表示未分类。n/c means unclassified.

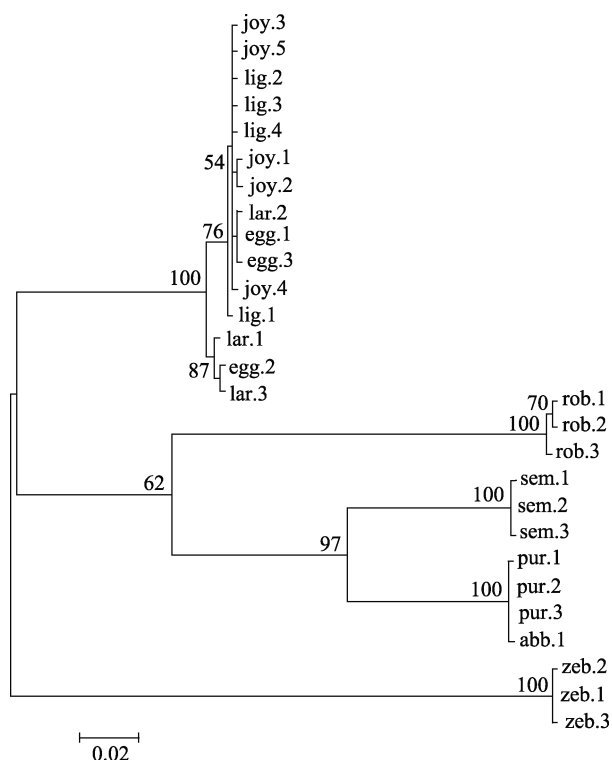


图1 基于K2P进化距离构建的各种NJ进化树。节点处的数字为1,000次bootstrap自展检验支持率(只显示大于50%的数值)。图中序列编号同表2。

Fig. 1 Neighbor-joining tree constructed using the K2P model for COI gene sequences of eight species. The numbers indicate the percentages of bootstrap values (>50%) supporting each node from 1,000 replicates. The Sequence numbers are the same to Table 2.

不一, 直径0.04–0.10 mm (0.07 ± 0.01 mm, $n = 50$), 圆形, 多位于卵黄囊中与胚体相对的一侧, 既有聚集分布也有分散分布。

图2a所示为胚胎绕卵黄囊1/2时期的鱼卵,此时鱼卵原口已关闭,胚体完全形成,环绕卵黄囊约1/2,胚体前端形成头部,吻端较圆钝;神经管沿胚体中轴分布,发育较为完善,后端闭合,向前延伸至吻端,在头部膨大形成具有分化的脑部,脑的后端较中部粗大,在脑的两侧出现视囊,视晶体位于中心,未出现黑色素沉淀;视囊后方形成长椭圆形听囊,左右各1个,耳石未形成;胚体中部形成肌节25~27对;胚体后段形成尾部,且已离开卵黄囊,尾芽已形成;仅胚体躯干部至尾部出现透明鳍膜,且已相连通;胚体已具点状黑色素,主要集中在背部,沿脑及神经索分布。油球数量无变化。

图2b所示为初孵仔鱼, 体长1.07–1.21 mm (1.14 ± 0.03 mm, $n = 30$), 卵黄囊近于圆形, 其长径0.64–0.74 mm (0.66 ± 0.02 mm, $n = 30$), 短径0.51–0.58 mm

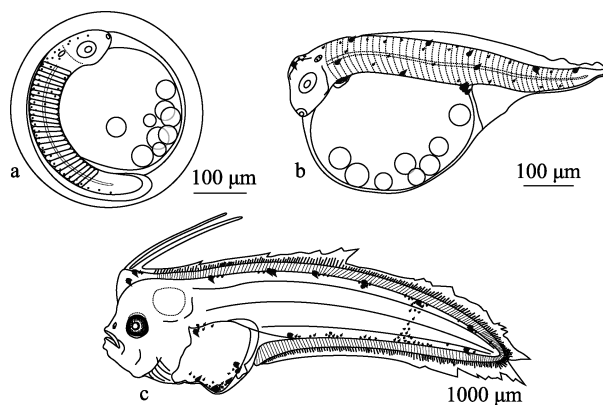


图 2 舌鲷属样品(*Cynoglossus* sp.)鱼卵及仔鱼的形态结构。(a)胚胎绕卵黄囊 1/2; (b)初孵仔鱼, 体长 1.16 mm; (c)后期仔鱼, 体长 6.21 mm。

Fig. 2 Morphological characters of egg and larva of *Cynoglossus* sp. (a) Embryo ring 1/2 epiboly; (b) 1.16 mm BL newly hatched larva; (c) 6.21 mm BL post-metamorphosis larva.

(0.54 ± 0.02 mm, $n = 30$), 口、咽、消化道已相通, 吻略突出, 视晶体仍未出现黑色沉淀, 耳石已形成, 延脑后出现冠状幼鳍原基, 颅顶背部微微隆起。腹腔内仍有油球, 但油球数量有所减少, 肌节43对; 鱼体各鳍鳍膜透明、相连, 黑色素数量增加且呈小星状, 分布范围延伸至腹部, 但仍以背部居多。

图2c所示为后期仔鱼, 其体长6.21 mm, 体高1.67 mm, 侧扁, 体长为体高的3.72倍, 口稍上位, 较圆钝, 口裂0.32 mm, 上、下颌及鳃盖骨形成, 卵黄囊仍未完全消失。视晶体已具黑色素, 右眼已经开始向上移动。肌节9+39对, 肠管末端位于第9肌节下方, 此时冠状幼鳍已形成, 其具有两根游离的鳍条, 长为1.83 mm, 背鳍、尾鳍和臀鳍鳍条已形成, 边缘胚胎性鳍膜正在蜕去。黑色素增多呈花斑状, 冠状幼鳍和胸鳍基部也均有分布, 在鱼体中后部形成一横向黑色素条带。

3 讨论

3.1 鱼卵DNA提取及线粒体DNA COI基因在鱼类系统发育分析中的有效性

基于分子生物学的鱼类物种鉴定多采用成鱼样品,运用传统的DNA分离和提纯方法,如酚/氯仿法(Sambrook et al, 1989)、磁珠法等,但由于鱼类发育早期特别是胚胎发育阶段的遗传物质含量较低且提取困难,使得用传统方法无法成功提取鱼卵样品中的DNA。本研究采用蛋白酶K-Chelex 100法成功提取了直径为0.68–0.87 mm短吻红舌𩚰鱼卵的

DNA。此外,利用Chelex 100提取DNA的过程较传统方法更为简单,且不涉及有机试剂、不需要在多个离心管之间转移,从而有效减少了样品间的交叉污染,保证了生物材料DNA的高效提取。为进一步提高鱼卵DNA的提取效率,也可预先人工挑破或去除鱼卵卵膜。

DNA条形码不仅可以用于物种的鉴定,而且还可以获得丰富的系统进化信息(宋超等, 2014)。本研究对舌鲷属鱼卵、仔鱼样品和其余6种舌鲷属鱼类的COI基因序列分析表明: (1)舌鲷属鱼卵、仔鱼样品与短吻红舌鲷和长吻红舌鲷可能属于同一物种,即短吻红舌鲷和长吻红舌鲷存在同种异名的可能。这与苗宪广等(2013)利用成鱼COI基因对9种舌鲷科鱼类系统发育的研究结果一致,支持长吻红舌鲷与短吻红舌鲷可能存在同种异名的观点。(2)紫斑舌鲷与短吻三线舌鲷可能存在同种异名现象,与徐晖等(2008)利用核糖体ITS1序列的分析结果一致。但考虑到GenBank中此两种鱼类COI序列信息均来自同一上传者,序列上传者也许会存在形态鉴定分类的混淆,因此该结果仍需进一步验证。柳淑芳等(2010a)用线粒体16S rRNA和Cyt b分子标记技术的研究同样支持上述结论,且上述有关舌鲷属鱼类分类地位的遗传学研究结果,也与Menon (1977)关于形态学研究的结论相一致,即短吻红舌鲷与长吻红舌鲷可能存在同种异名。本研究同时运用了鱼卵、仔鱼和成鱼的COI基因,进一步证实了COI基因种类鉴别的有效性,也说明由于线粒体DNA的稳定性,鱼卵、仔鱼和成鱼的COI基因序列可同时应用于鱼类系统发生的研究(高东奎, 2015)。

3.2 舌鲷属鱼卵、仔鱼的种类鉴定

山东半岛海域分布的舌鲷属鱼类的鱼卵均为可分离的浮性卵,圆球形,卵膜透明光滑,卵膜和卵黄无特殊结构,油球多个,圆形(万瑞景和姜言伟, 2000; 万瑞景等, 2004),结合本研究中所采集鱼卵样品的形态特征,初步判断该鱼卵隶属于舌鲷属种类。而根据现有文献报道,舌鲷属的短吻红舌鲷、宽体舌鲷、半滑舌鲷和短吻三线舌鲷的鱼卵直径范围(分别为0.76–0.90 mm、0.85–0.90 mm、1.18–1.31 mm、1.02–1.12 mm)、油球直径范围(分别为0.04–0.06 mm、0.05–0.08 mm、0.04–0.11 mm、0.07–0.10 mm)和油球个数(分别为6–30个、5–15个、97–125个、30–50个)等特征各种类同种之间并未完全吻合,且各种

类的繁殖期存在一定程度的重叠,使得无法单纯依靠以上形态特征将该鱼卵鉴定到种的水平(杨东莱等, 1983; 万瑞景和姜言伟, 2000; 万瑞景等, 2004)。通常要借助于扫描电镜或分子生物学方法,才能完成鱼卵所属种类的准确鉴别。

本研究通过COI基因序列确认了所采集的舌鲷属样品的种类,并对其鱼卵和仔鱼的形态特征进行了详细描述。研究发现,该种鱼卵样品的直径和油球个数均略小于杨东莱等(1983)有关短吻红舌鲷的研究结果(卵径0.76–0.90 mm,油球6–30个),油球上限偏少可能与本研究未采集到早期发育阶段的鱼卵有关;鱼卵直径偏小推测可能与调查年代、月份和海域环境等因素相关联(李秀梅等, 2016),但也不能排除以往研究中混杂了其他舌鲷属鱼卵的可能性(万瑞景等, 2004),具体原因有待进一步探究。另外,本研究采集的仔鱼样品具有2条冠状幼鳍,而宽体舌鲷、半滑舌鲷和短吻三线舌鲷均具有1条冠状幼鳍,该特征能够作为仔鱼种类鉴别的关键依据。

Yaji等(2009)在对长吻红舌鲷早期生活史研究中,通过与Minami (1983)关于短吻红舌鲷仔鱼形态特征的对比,认为仔鱼眼睛移位过程中长吻红舌鲷较短吻红舌鲷的体长小,且鱼体中线附近有黑色素分布,由此认为二者是两个物种而非同种异名。但本研究发现,处于眼睛移位过程中的舌鲷属仔鱼体长范围与杨东莱等(1983)对短吻红舌鲷的研究结果相似,均远小于Minami描述的短吻红舌鲷仔鱼的体长。仔鱼形态特征方面,本研究舌鲷属仔鱼鱼体中后部具横向黑色素条带,既与Yaji等(2009)报道的长吻红舌鲷仔鱼相似,也与杨东莱(1983)等报道的短吻红舌鲷仔鱼43–48肌节处具丛状黑色素的描述一致,且三者之间针对仔鱼其他形态特征的描述亦基本相同。推测认为Minami (1983)研究中的短吻红舌鲷仔鱼并非经过连续培养得到(浮游生物网采),且数量极少,也可能与仔鱼采集海域水温、饵料丰富度等因素有关,从而出现变态过程中仔鱼体长明显偏大的情况。而Yaji等(2009)仅根据长吻红舌鲷仔鱼形态特征与短吻红舌鲷的文献比对,认为长吻红舌鲷和短吻红舌鲷为两个不同种的结论仍有待商榷。根据仔鱼形态特征,结合COI基因序列分析结果,笔者更支持两者为同一物种的结论。

另外,以上文献及本研究之间有关仔鱼肌节的描述均不相同。分析认为,由于观察时期不同而胚

胎、仔稚鱼肌节数目仍在变化。另外,随着仔稚鱼的生长,单纯依靠肉眼和显微镜等的观察难以准确计数。有报道称将仔稚鱼样品经清洗后染色或者X光拍照的方法,能够实现样品分节特征、骨骼特征等的准确观测(Ahlstrom & Moser, 1976; Pasco-Viel, 2010),建议今后的研究中能够更多地运用此类方法,以便补充和完善仔稚鱼分节特征数据,使仔稚鱼的鉴别更加系统、准确。

综合形态、COI基因序列和遗传距离分析,本研究支持短吻红舌鲷和长吻红舌鲷应为同一物种的观点(Menon, 1977; 柳淑芳等, 2010a; 苗宪广等, 2013; 宋超等, 2014)。因两物种的命名分别为短吻红舌鲷(*C. joyneri* Günther, 1878)和长吻红舌鲷(*C. lighti* Norman, 1925),根据生物命名法优先律(苏锦祥, 1995),故认为长吻红舌鲷是短吻红舌鲷的同种异名,本研究中的舌鲷属鱼卵、仔鱼样品为短吻红舌鲷。

参考文献

- Ahlstrom EH, Moser HG (1976) Eggs and larvae of fishes and their role in systematic investigations and in fisheries. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 40, 379–398.
- Ball SL, Hebert PDN, Burian SK, Webb JM (2005) Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *Journal of the North American Benthological Society*, 24, 508–524.
- Bian XD, Zhang XM, Xiao YS, Gao TX, Wan RJ (2007) Identification of fish eggs of Japanese halfbeak (*Hyporhamphus sajori*) using mtDNA sequencing. *Periodical of Ocean University of China*, 37(S1), 111–116. (in Chinese with English abstract) [卞晓东, 张秀梅, 肖永双, 高天翔, 万瑞景 (2007) 线粒体DNA序列在沙氏下鱚鱼鱼卵鉴别上的应用. 中国海洋大学学报(自然科学版), 37(S1), 111–116.]
- Carpenter KE, Niem VH (2001) *FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes: The Living Marine Resources of the Western Central Pacific*, pp. 3890–3891. FAO, Rome.
- Chen YX, Wu RX, Liang N, Liu J (2015) Phylogenetic relationship in family Sparidae of China in mitochondrial COI gene sequence. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 46, 611–619. (in Chinese with English abstract) [陈咏霞, 吴仁协, 梁娜, 刘静 (2015) 基于线粒体COI基因序列的中国鲷科鱼类系统进化关系. 海洋与湖沼, 46, 611–619.]
- Gao DK (2015) *Applying Basic Research on the Morphological and Molecular Approaches to Identifying the Ichthyoplankton*. PhD dissertation, Ocean University of China, Qingdao. (in Chinese with English abstract) [高东奎 (2015) 鱼类浮游生物形态及分子鉴定方法的应用基础研究. 博士学位论文, 中国海洋大学, 青岛.]
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of China, Standardization Administration of China (2007) *Specifications for Oceanographic Survey—Part 6: Marine Biological Survey*. China Standards Press, Beijing. (in Chinese) [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会 (2007) 海洋调查规范第6部分: 海洋生物调查. 中国标准出版社, 北京.]
- Gu SO, Hwang HJ, Kim JK (2009) Morphological description of *Cynoglossus joyneri* larvae collected from the Yellow Sea. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42, 725–728. (in Korean with English abstract)
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, 313–321.
- Li SZ, Wang HM (1995) *Fauna Sinica: Osteichthyes. Pleuronectiformes*. Science Press, Beijing. (in Chinese) [李思忠, 王惠民 (1995) 中国动物志 硬骨鱼纲 鲽形目. 科学出版社, 北京.]
- Li XM, Ye ZJ, Li ZG, Hu HS, Zou Q (2016) Spatial and temporal changes of the egg size changes of Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) inhabiting the near shore spawning ground of central Yellow Sea. *Periodical of Ocean University of China*, 46(2), 54–60. (in Chinese with English abstract) [李秀梅, 叶振江, 李增光, 胡海生, 邹全 (2016) 黄海中部近岸产卵场日本鳀卵子大小的时空变化. 中国海洋大学学报(自然科学版), 46(2), 54–60.]
- Liu SF, Liu JX, Zhuang ZM, Gao TX, Han ZQ, Chen DG (2010a) Monophyletic origin and synonymic phenomena in the sub-family Cynoglossinae inferred from mitochondrial DNA sequences. *Biodiversity Science*, 18, 275–282. (in Chinese with English abstract) [柳淑芳, 刘进贤, 庄志猛, 高天翔, 韩志强, 陈大刚 (2010a) 舌鲷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, 275–282.]
- Liu SF, Chen LL, Dai FQ, Zhuang ZM (2010b) Application of DNA barcoding gene COI for classifying family Sciaenidae. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 41, 223–232. (in Chinese with English abstract) [柳淑芳, 陈亮亮, 戴芳群, 庄志猛 (2010b) 基于线粒体COI基因的DNA条形码在石首鱼科(Sciaenidae)鱼类系统分类中的应用. 海洋与湖沼, 41, 223–232.]
- Menon AGK (1977) *A Systematic Monograph of the Tongue Soles of the Genus Cynoglossus* Hamilton-Buchanan (Pisces, Cynoglossidae). Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Miao XG, Jiang JX, Shi W, Wang ZM, Wang SY (2013) Phylogenetic relationship of Cynoglossinae based on COI barcoding marker. *Journal of Tropical Oceanography*, 32(5), 85–92. (in Chinese with English abstract) [苗宪广, 江金霞, 时伟, 王忠明, 王淑英 (2013) 舌鲷亚科Cynoglossinae鱼类基于COI条形码的系统发育关系. 热带海洋学报, 32(5), 85–92.]

- Minami T (1983) The early life history of a tongue fish *Cynoglossus joyneri*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 49, 719–724. (in Japanese with English abstract)
- Nakabo T (2000) Fishes of Japan with Pictorial Keys to the Species, 2nd ed. Tokai University Press, Tokyo. (in Japanese)
- Ni HE, Zheng ZM (2002) Comparison of shapes and growth features of three species in *Cynoglossus*. Marine Sciences, 26(12), 61–64. (in Chinese with English abstract) [倪海儿, 郑忠明 (2002) 几种舌鲷的形态和生长特性的比较. 海洋科学, 26(12), 61–64.]
- Pasco-Viel E, Charles C, Chevret P, Semon M, Tafforeau P, Viriot L, Laudet V (2010) Evolutionary trends of the pharyngeal dentition in Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi). PLoS ONE, 5, e11293.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sharina SN, Kartavtsev YP (2010) Phylogenetic and taxonomic analysis of flatfish species (Teleostei, Pleuronectiformes) inferred from the primary nucleotide sequence of cytochrome oxidase 1 gene (Co-1). Russian Journal of Genetics, 46, 356–361.
- Song C, Yu YN, Zhang T, Yang G, Zhang LZ (2014) Phylogenetic analysis of Cynoglossidae in the Yangtze Estuary based on partial sequence of mitochondrial COI. Chinese Journal of Zoology, 49, 716–726. (in Chinese with English abstract) [宋超, 于亚男, 张涛, 杨刚, 章龙珍 (2014) 基于线粒体COI基因部分序列的长江口舌鲷科鱼类系统分类研究. 动物学杂志, 49, 716–726.]
- Su JX (1995) Fish and Marine Fish Culture, 2nd ed. China Agriculture Press, Beijing. (in Chinese) [苏锦祥 (1995) 鱼类学与海水鱼类养殖, 第二版. 中国农业出版社, 北京.]
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques, 10, 506–513.
- Wan RJ, Jiang YW (2000) The species and biological characteristics of the eggs and larvae of osteichthyes in the Bohai and Yellow Sea. Journal of Shanghai Fisheries University, 9, 290–297. (in Chinese with English abstract) [万瑞景, 姜言伟 (2000) 渤、黄海硬骨鱼类鱼卵与仔稚鱼种类组成及其生物学特征. 上海水产大学学报, 9, 290–297.]
- Wan RJ, Jiang YW, Zhuang ZM (2004) Morphological and developmental characters at the early stages of the tongue-fish *Cynoglossus semilaevis*. Acta Zoologica Sinica, 50, 91–102. (in Chinese with English abstract) [万瑞景, 姜言伟, 庄志猛 (2004) 半滑舌鲷早期形态及发育特征. 动物学报, 50, 91–102.]
- Wang ZD, Guo YS, Chen RL, He XY, Liu CW, Liu Y (2009) COI barcoding sequences of teleosts in the South China Sea. Oceanologia et Limnologia Sinica, 40, 608–614. (in Chinese with English abstract) [王中锋, 郭昱嵩, 陈荣玲, 何晓莹, 刘楚吾, 刘筠 (2009) 南海常见硬骨鱼类COI条码序列. 海洋与湖沼, 40, 608–614.]
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD (2005) DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 360, 1847–1857.
- Xu H, Li J, Kong XY, Xiao ZZ, Li YL, Zhang YC, Shi W, Wei ZP, Yu ZN (2008) Phylogenetic relationship and length variation in the first ribosomal internal transcribed spacer of Cynoglossinae species. Oceanologia et Limnologia Sinica, 39, 35–41. (in Chinese with English abstract) [徐晖, 李军, 孔晓瑜, 肖志忠, 李玉龙, 张艳春, 时伟, 位正鹏, 喻子牛 (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, 35–41.]
- Yagi Y, Kinoshita I, Fujita S, Ueda H, Aoyama D (2009) Comparison of the early life histories of two *Cynoglossus* species in the inner estuary of Ariake Bay, Japan. Ichthyological Research, 56, 363–371.
- Yang DL, Wu GZ, Pang HY (1983) The morphology of the early stage of longuefishes, *Cynoglossus semilaevis* Günther and *C. joyneri* Günther, in the Bohai Bay. Marine Sciences, 7(2), 29–32. (in Chinese with English abstract) [杨东莱, 吴光宗, 庞红艳 (1983) 渤海半滑舌鲷及焦氏舌鲷的鱼卵和仔稚鱼的形态. 海洋科学, 7(2), 29–32.]
- Zhou CW, Cheng QT (1997) Ichthyography of Shandong. Shandong Science and Technology Press, Ji'nan. (in Chinese) [周才武, 成庆泰 (1997) 山东鱼类志. 山东科学技术出版社, 济南.]
- Zhou MY, Chen X, Yang SY (2015) Identification of several fish eggs and larvae by DNA barcoding in Xiamen Water. Marine Environmental Science, 34(1), 120–125, 135. (in Chinese with English abstract) [周美玉, 陈骁, 杨圣云 (2015) 采用DNA条形码技术对厦门海域鱼卵、仔稚鱼种类的鉴定. 海洋环境科学, 34(1), 120–125, 135.]

(责任编辑: 高天翔 责任编辑: 时意专)