

6 种舌鳎亚科鱼类 ITS1 序列长度多态性 及系统分析*

徐 晖² 李 军³ 孔晓瑜¹① 肖志忠³ 李玉龙²
张艳春² 时 伟² 位正鹏² 喻子牛¹

(1. 中国科学院南海海洋研究所 广州 510301; 2. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003;
3. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 利用核糖体第一内转录间隔区(ITS1)对舌鳎亚科(Cynoglossinae) 6 种鱼类进行系统分析, 发现舌鳎亚科 ITS1 区具有明显的序列长度多态性(404—744bp), 序列长度分为三种类型, 分别为 404—405bp、462—463bp 以及 741—744bp, 同一长度类型的不同种类间序列高度相似, 平均遗传距离分别为 0.00248、0.00217 和 0.00169, 而不同类型间序列差异显著, 平均遗传距离最小为 0.38453。分析表明, 序列长度多态性可能与物种分化时间有关。采用 NJ(neighbour-joining)法及 MP(maximum parsimony)法构建分子系统树, 结合形态学特征及 GenBank 中的线粒体 DNA 序列进行分析, 表明紫斑舌鳎(*Cynoglossus purpureomaculatus*)与短吻三线舌鳎(*C. abbreviatus*)可能为同物异名。另外, 舌鳎属(*Cynoglossus*)的中华舌鳎(*C. sinicus*)与须鳎属(*Paraplagusia*)的日本须鳎(*Paraplagusia japonica*)聚为一支, 舌鳎属中三线舌鳎亚属(*Areliscus*)的长吻红舌鳎(*C. lighti*)与拟舌鳎亚属(*Cynoglossoides*)的少鳞舌鳎(*C. oligolepis*)聚为一支, 与形态分类学的观点不一致, 值得进一步研究。

关键词 舌鳎亚科, ITS1, 长度多态性, 系统发生关系

中图分类号 Q953

第一内转录间隔区(first ribosomal internal transcribed spacers, ITS1)位于核糖体 18S rRNA 与 5.8S rRNA 基因之间, 为多拷贝基因, 在脊椎动物中一般为几百个重复(Reed *et al.*, 2000)。由于协同进化(concerted evolution)或分子驱动(molecular drive)作用, 重复序列间基本保持一致(Brown *et al.*, 1972; Dover, 1986), 因此这一片段被广泛应用于动物种类鉴定及系统发生关系研究。在有些生物类群中 ITS1 片段具有种间序列长度多态性, 一般长度变异幅度较窄, 主要是由于微卫星重复数不同而产生(Huyse *et al.*, 2004), 微卫星序列通过复制滑移使序列产生插入或缺失(Schlotterer *et al.*, 1992)。个别生物类群中则具有明显的种间序列长度多态性, 插入或缺失的片段较长且无规律, 甚至同一个属的不同种类间也存在这

种现象(Chu *et al.*, 2001; Mukha *et al.*, 2002; Schulenburg *et al.*, 2001), 目前对其产生的原因与机理知之甚少。序列长度多态性可能限制核糖体 ITS1 片段的应用, 但这一片段仍被成功地应用于多种鱼类系统发生关系与进化研究(Booton *et al.*, 1999; Chow *et al.*, 2006; Crespi *et al.*, 2004; Domanico *et al.*, 1997; Jansen *et al.*, 2006; Pleyte *et al.*, 1992; Presa *et al.*, 2002; Redenbach *et al.*, 2002; Susnik *et al.*, 2004), 解决了一些长期有争议的分类学问题。

舌鳎亚科鱼类大约有 72 种, 主要分布在西太平洋及印度洋, 目前, 其物种分类鉴定以及系统发生关系研究主要依据形态学数据, 因此有必要寻找合适的分子生物学标记对形态学分类结果进行补充, 以便对舌鳎亚科鱼类系统发生关系有一个更加全面准

* 山东省科技计划项目, 2005GG3205071 号; 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室开放课题资助, 200606 号。徐 晖, E-mail: xuhui5163@tom.com

① 通讯作者: 孔晓瑜, 教授, 博士生导师, E-mail: carlzyu@ouc.edu.cn

收稿日期: 2006-10-28, 收修改稿日期: 2007-01-09

确的认识。本文作者对 6 种舌鳎亚科鱼类 ITS1 片段特点进行分析, 探讨这一片段在舌鳎亚科鱼类系统及演化中的应用。

1 材料与方法

研究所用 6 种舌鳎亚科鱼类样品均采自东海(表 1), 样品用冰盒带回实验室, 鉴定后取肌肉组织于 -70°C 保存, 采用常规的酚/氯仿法提取基因组 DNA (Ausubel *et al.*, 1987)。扩增引物序列均为: ITS1F 5'-GGTTTCTGTAGGTGAACCTGC-3' 和 ITS1R 5'-CT-GCGTTCCTTCATCGACCC-3'; 反应总体积为 25 μl , 其中包括 2.5 μl 10 \times 缓冲液, 2 μl MgCl_2 (25mmol/L), 2 μl dNTP (分别为 2.5mmol/L), 每个引物 0.5 μl (10 $\mu\text{mol/L}$), 1 μl 模板 DNA(0.02 g/L), 0.2 μl *Taq* 聚合酶(5U/ μl), 灭菌双蒸水补足至 25 μl ; 使用 Eppendorf AG 型 PCR 仪进行扩增, 反应程序为: 94°C 预变性 2min, 94°C 变性 1min, 49°C 退火 1min, 72°C 延伸 1min, 进行 35 个循环后 72°C 延伸 10min。扩增产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 经琼脂糖胶 DNA 纯化试剂盒 Ver.2.0 回收后与 pMD18-T 载体连接, 转化至大肠杆菌 DH5 α , 每个样品挑取 2—4 个单克隆测序(上海英骏有限公司)。以上所用 PCR 反应溶液, DNA 回收试剂盒, 载体等均购自大连宝生物有限公司。

测定的 ITS1 序列进行 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>)检索, 确定序列为目的片段。应用 CLUSTAL X 1.8 软件(Hompson *et al.*, 1997)及 Genebee 在线分析系统 AliBee-Multiple Alignment 对序列进行比对及相似性分析。通过 MEGA 3.0(Kumar *et al.*, 2004)¹⁾统计碱基含量、变异位点和简约信息位点, 采用 Kimura 双参数模型计算遗传距离。以鲑科的虹鳟

(*Oncorhynchus mykiss*, AF308735) 为外类群利用 MEGA 3.0 软件构建 NJ(Neighbour-joining)系统树, 同时用 PAUP 4.0 构建 MP(maximum parsimony)系统发育树, 均采用 Bootstrap1000 检验分子系统树各分支的置信度。

2 结果

结果显示舌鳎亚科鱼类核糖体 ITS1 片段具有明显的序列长度多态性, 变异幅度较大, 去掉两侧 18S rRNA 与 5.8S rRNA 基因序列, ITS1 长度为 404—744bp。6 种舌鳎亚科鱼类可分为 3 种不同的片段类型, 类型 I 为紫斑舌鳎与短吻三线舌鳎, 片段长度为 404—405bp, 中华舌鳎与日本须鳎属于类型 II, 长度为 462—463bp; 类型 III 为长吻红舌鳎与少鳞舌鳎, 长度为 741—744bp。同一个体的不同单克隆比对, 发现这 6 种舌鳎亚科鱼均存在较低水平的个体内序列多态性(表 2), 所有变异位点中 9 个为转换且全部为 T—C 或 A—G 转换, 仅一个颠换位点(A—T)。同一类型中的不同单克隆间多态性水平比较低, 其中少鳞舌鳎与长吻红舌鳎共享一核酸型(ribotype), 甚至舌鳎属的中华舌鳎与须鳎属的日本须鳎也共享一核酸型。将 6 种鱼 ITS1 序列所有单克隆进行比对, 共 756 个位点, 变异位点为 286 个, 其中 285 个位点为简约信息位点。不同长度序列间变异较大(图 1), 保守区一般较短($\leq 6\text{bp}$), 有一较长保守区(ACCCAACCTCC)存在于所有序列中(见图 1 画线处), 该区域可能与核糖体 rRNA 前体的剪切与加工有关(Mukha *et al.*, 2002)。将三种序列长度类型两两比对, 发现类型 I 与类型 II 之间, 除了大量的插入或缺失区域, 序列的其他部分具有较高的相似性。

表 1 研究所用鱼类材料或 DNA 序列来源
Tab.1 Sources of Cynoglossinae fish samples or DNA sequence data

形态分类	种 类	样品或序列来源
舌鳎属 <i>Cynoglossus</i>		
拟舌鳎亚属 <i>Cynoglossoides</i>	少鳞舌鳎 <i>Cynoglossus oligolepis</i>	东海
舌鳎亚属 <i>Cynoglossus</i>	中华舌鳎 <i>C. sinicus</i>	东海
三线舌鳎亚属 <i>Areliscus</i>	紫斑舌鳎 <i>C. purpureomaculatus</i>	东海
	短吻三线舌鳎 <i>C. abbreviatus</i>	东海
	长吻红舌鳎 <i>C. lighti</i>	东海
须鳎属 <i>Paraplagusia</i>		
吻须鳎亚属 <i>Rhinoplagusia</i>	日本须鳎 <i>Paraplagusia japonica</i>	东海
鲑科 Salmonidae	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	GenBank(AF308735)

1) Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment. <http://www.megasoftware.net/>



图 1 类型 I 、类型 II 与类型 III 序列比对

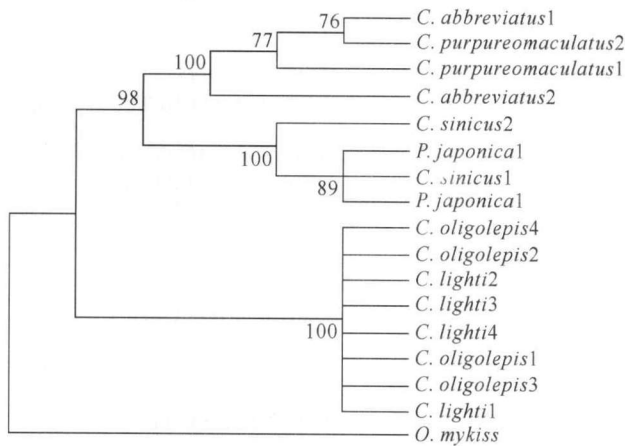
Fig.1 Comparison of the nucleotide sequences in ITS1 of three groups

注: 类型 I 以 *C. purpureomaculatus* 1 为代表, 类型 II 以 *P. japonica* 1 为代表, 类型 III 以 *C. lighti* 1 为代表, “+” 表示所有碱基相同, “.” 表示有两个碱基相同, “-” 表示核苷酸插入或缺失

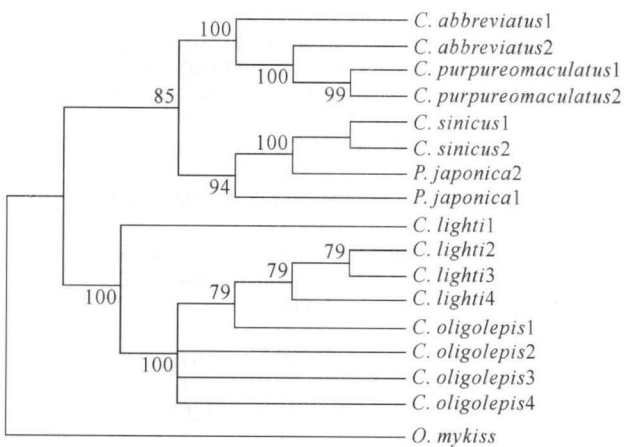
表 2 ITS1 碱基组成、GC 含量、序列长度、克隆数及个体内变异

Tab.2 The base composition, GC contents, length variation, the number of clone, and intraindividual variation of ITS1

种类	A(%)	T(%)	C(%)	G(%)	GC(%)	长度(bp)	克隆数目	个体内变异
少鳞舌鳎	13.5—13.6	20.2—20.3	37.7—37.8	28.5	66.2—66.3	743	4	3个变异位点
中华舌鳎	17.3	13.2	37.1	32.4	69.5	463	2	2个变异位点
紫斑舌鳎	19.8	12.3—12.6	36.3—36.5	31.4	67.7—67.9	405	2	1个变异位点
短吻三线舌鳎	19.6—19.8	12.4—12.6	36.4—36.6	31.2—31.4	67.8—67.9	404	2	2个变异位点, 1个插失位点
长吻红舌鳎	13.4—13.5	20.1—20.3	37.6—37.8	28.5—28.6	66.2—66.4	741—744	4	2个变异位点, 2个插失位点
日本须鳎	17.3	13.2	37.0—37.1	32.4—32.5	69.5	462—463	2	1个插失位点
平均值	15.3	17.5	37.4	29.8	67.2	588.3	—	—



NJ树



MP树

图 2 NJ 法与 MP 法构建的舌鳎亚科鱼类系统进化树

Fig.2 Neighbor-joining (NJ) tree and maximum parsimony (MP) tree for ribosomal ITS1 sequences of six Cynoglossinae species
注: 虹鳎为外类群, 枝旁数字为 Bootstrap1000 个循环的置信度, 种名后数字为序列编号

碱基百分含量见表 2, 6 种鱼平均 A、T、C、G 含量分别为 15.3%(13.4%—19.8%)、17.5%(12.3%—20.3%)、37.4%(36.3%—37.8%)、29.8%(28.5%—32.5%)。GC 含量均比较高(66.2%—69.5%), 平均 GC

含量为 67.2%, 类型 II 的 GC 含量最高(69.5%), 其次为类型 I (67.7%—67.9%), 类型 III 最低(66.2%—66.4%)。同一类型不同种间平均遗传距离较小, 三种类型分别为 0.00248、0.00217 和 0.00169, 表明同一类群中的种类可能是最近分化形成。类型间平均遗传距离较大, 其中类型 I 与类型 II 之间平均遗传距离最小为 0.38453, 显示这两种长度类型间亲缘关系较近, 类型 I 与类型 III 之间为 0.86845, 类型 II 与类型 III 之间为 0.90879。

分子系统树拓扑结构见图 2, 具有同一片序列长度类型的种类聚为一支, 三个分支的置信度均大于 90%, 三线舌鳎亚属的短吻三线舌鳎与紫斑舌鳎聚为一个分支, 三线舌鳎亚属的长吻红舌鳎与拟舌鳎亚属的少鳞舌鳎聚为一支, 舌鳎属舌鳎亚属的中华舌鳎与须鳎属的日本须鳎聚为一支, NJ 树与 MP 树的拓扑结构图总体趋势相一致, 但与形态学分类结果不完全相同。在 NJ 树中同一分支内不同种类的单克隆混合在一起, 利用 ITS1 序列, 不能将同一类群中的两个种完全分开。

3 讨论

3.1 舌鳎亚科 ITS1 序列分析

ITS1 序列长度多态性在其他鱼类中已有报道, 例如塘虱鱼科(Clariidae)种类间序列长度范围为 368—567bp (Jansen *et al.*, 2006), 长臂虾虎鱼属(*Pomatoschistus*)的虾虎鱼为 694—819bp (Huyse *et al.*, 2004), 重复序列的重复次数不同是长度多态性产生的主要原因。舌鳎亚科鱼类核糖体 ITS1 序列的主要特点是存在明显的种间序列长度多态性, 并且长度变化范围较大, 为 404—744bp, 甚至隶属于同一亚属的不同种类间序列长度差异显著, 插入或缺失区域很少位于重复区, 碱基组成无规律, 只有个别较长的

插入或缺失区域内部含有微卫星序列, 因此, 不能仅仅用重复序列来解释舌鲷亚科鱼类序列长度多态性产生的原因。Schulenburg 等(2001)在研究瓢虫科(Coccinellidae) ITS1 序列长度多态性中认为这种现象也应归因于重复序列, 瓢虫科 ITS1 序列进化快, 产生大量较长的重复片段, 同时在重复区又具有较高的进化速率。核糖体 ITS1 序列为内含子区, 所受选择压力小, 因而进化速度快, 但在慈鲷科(Cichlidae)等生物类群间 ITS1 序列比较保守, 系统关系研究中提供的信息位点数较少(Booton *et al.*, 1999)。本研究中具有同一序列长度类型的种类间 ITS1 序列非常保守, 舌鲷属的中华舌鲷与须鲷属的日本须鲷, 三线舌鲷亚属的长吻红舌鲷与拟舌鲷亚属的少鳞舌鲷, 它们在形态上差异比较明显, 表明已经经历了一定时间的分化, 而核糖体 ITS1 片段似乎没有发生分化, 表明舌鲷亚科鱼类可能属于 ITS1 进化速度较慢的类群。关系相近的生物类群中, ITS1 序列在有些种类间具有明显的长度多态性, 而在有些种类间则非常保守, 这种现象在卤虫属(*Artemia*)和蜚蠊目(*Blattodea*)等生物类群中也有所体现(Baxevanis *et al.*, 2006; Mukha *et al.*, 2002), 但对其产生的原因未作详细论述。

本研究中, 6 种舌鲷亚科鱼类核糖体 ITS1 片段 GC 含量均比较高, 而 GC 含量较高被认为是一原始特征(Rodríguez-Trelles *et al.*, 2000), 表明舌鲷亚科鱼类比较原始, 而且已有的化石资料也证明舌鲷亚科鱼类是一较古老的类群, 其起源与分化都很早, 因此推测舌鲷亚科种间明显的序列长度多态性是在漫长的进化历史中积累形成的, 而序列变异较小的种类可能分化较晚, 进化时间短, ITS1 序列在舌鲷亚科鱼类中进化速度又比较慢, 所以未积累足够的变异位点, 序列仍为祖先类型。

3.2 系统分析

用于系统分析的分子标记应尽量避免序列碱基组成不均匀及长度多态性(Álvarez *et al.*, 2003), 但核糖体 ITS1 片段仍被成功地应用于各种生物系统发生关系分析(潘宝平等, 2006), 作者利用 ITS1 片段对 6 种舌鲷亚科鱼类进行系统进化关系分析, 结果显示, 6 种鱼被分为三个类群, 类群 I 中三线舌鲷亚属的短吻三线舌鲷与紫斑舌鲷平均遗传距离非常小(0.00248), 利用 ITS1 片段构建 NJ 树与 MP 树, 两个种聚为一支, 置信度均为 100%, 说明两者遗传关系很近。李思忠等(1995)根据上、中侧线间鳞片的行数

来区分这两个种(短吻三线舌鲷: 19—20; 紫斑舌鲷: 16—18), Menon(1977)认为两者为同物异名, 形态学特征分析显示, 除上述特征以外, 其他特征均不能将它们区分开。对本实验室测得的短吻三线舌鲷与紫斑舌鲷的线粒体 16S rRNA 基因及细胞色素氧化酶 I(COI)基因部分片段进行比较(GenBank 登录号为: DQ112680、DQ112681、DQ116749 和 DQ116750), 两个片段都只有一个变异位点。综上所述, 利用 ITS1 片段并结合形态学特征及线粒体 DNA 序列对类群 I 进行分析, 认为短吻三线舌鲷与紫斑舌鲷很可能为同物异名, 是否可以将上、中侧线间鳞片的行数作为划分种的标准值得进一步研究。

舌鲷属的中华舌鲷与须鲷属的日本须鲷聚为一支, 三线舌鲷亚属的长吻红舌鲷未与同一亚属的其他种类聚为一支, 而与拟舌鲷亚属的少鳞舌鲷聚为一支, 结果与形态学分类观点不完全一致。李思忠等(1995)根据上下唇是否有须状唇突将舌鲷亚科划分为舌鲷属与须鲷属, 根据侧线及鼻孔的多少将舌鲷属划分为不同的亚属。中华舌鲷与日本须鲷形态差异显著, 但根据 ITS1 片段构建的 NJ 树与 MP 树显示两者聚为一支, 置信度分别为 100%与 94%, 表明中华舌鲷与日本须鲷的进化关系较近。长吻红舌鲷与同一亚属的类群 I 种类序列差异显著, 具有明显的序列长度多态性(404—744bp), 与拟舌鲷亚属的少鳞舌鲷 ITS1 序列高度相似(平均遗传距离为 0.00169), 表明长吻红舌鲷与类型 I 种类分化时间较早, 且与少鳞舌鲷最近发生分化。上述分析表明, 目前舌鲷亚科鱼类根据形态学特征划分的结果可能并不一定代表其真正的系统进化关系, 有待利用更多的分子标记开展进一步研究。

利用核糖体 ITS1 序列分析舌鲷亚科鱼类系统发生关系也具有一定的局限性, 具有个体内变异及同一类型不同种间序列变异较小, 限制了其解决同一类型中不同种类间的系统发生关系, 但结合形态学特征及其他分子标记, 这一片段将有助于研究者对舌鲷亚科鱼类系统进化关系有一较全面的认识。

参 考 文 献

- 李思忠, 王惠民, 1995. 中国动物志 硬骨鱼纲 鲷形目. 北京: 科学出版社, 325—377
- 潘宝平, 吴琪, 张素萍等, 2006. 文蛤属(*Meretrix*)16S rRNA 基因及 ITS1 序列的系统学分析. 海洋与湖沼, 37(4): 342—347
- Álvarez I, Wendel J F, 2003. Ribosomal ITS sequence and plant

- phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol*, 29: 417—434
- Baxevanis A D, Kappas I, Abatzopoulos T J, 2006. Molecular phylogenetics and asexuality in the brine shrimp *Artemia*. *Mol Phylogenet Evol*, 40(3): 724—738
- Booton G C, Kaufman L, Chandler M *et al*, 1999. Evolution of the ribosomal RNA internal transcribed spacer one (ITS-1) in cichlid fishes of the Lake Victoria region. *Mol Phylogenet Evol*, 11(2): 273—282
- Brown D D, Wensink P C, Jordan E, 1972. A comparison of the ribosomal DNA's of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem gene. *J Mol Biol*, 63: 57—73
- Chow S, Nakagawa T, Suzuki N *et al*, 2006. Phylogenetic relationships among *Thunnus* species inferred from rDNA ITS sequence. *Journal of Fish Biology*, 68(Supplement A): 24—35
- Chu K H, Li P C, Ho Y H, 2001. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic and population analyses in crustacea. *Mar Biotechnol*, 3: 355—361
- Crespi B J, Fulton M J, 2004. Molecular systematics of Salmonidae: combined nuclear data yields a robust phylogeny. *Mol Phylogenet Evol*, 31: 658—679
- Domanico M J, Phillips R B, Oakley T H, 1997. Phylogenetic analysis of Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*) using nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Can J Fish Aquat*, 54: 1865—1872
- Dover G A, 1986. Molecular drive in multigene families, how biological novelties arise, spread and assimilated. *Trends in Genetics*, 2: 159—165
- Huyse T, Houdt J V, Volckaert A M, 2004. Paleoclimatic history and vicariant speciation in the "sand goby" group (Gobiidae, Teleostei). *Mol Phylogenet Evol*, 32: 324—336
- Hompson J D, Gibson T J, Plewniak F *et al*, 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 24: 4876—4882
- Jansen G, Devaere S, Weekers P H H *et al*, 2006. Phylogenetic relationships and divergence time estimate of African anguilliform catfish (Siluriformes: Clariidae) inferred from ribosomal gene and spacer sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 38: 65—78
- Menon A G K, 1977. A systematic monograph of the tongue soles of the genus *Cynoglossus* Hamilton-Buchanan (Pisces: Cynoglossidae) Smithson. *Contr Zool*, 238: 1—129
- Mukha D, Wiegmann B M, Schal C, 2002. Evolution and phylogenetic information content of the ribosomal DNA repeat unit in the Blattodea (Insecta). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 951—960
- Pleyte K A, Duncan S D, Phillips R B, 1992. Evolutionary relationships of the salmonid fish genus *Salvelinus* inferred from DNA sequences of the first internal transcribed spacer (ITS1) of ribosomal DNA. *Mol Phylogenet Evol*, 1: 223—230
- Presa P, Pardo B G, Martinez P *et al*, 2002. Phylogeographic Congruence Between mtDNA and rDNA ITS Markers in Brown Trout. *Mol Biol Evol*, 19(12): 2161—2175
- Redenbach Z, Taylor E B, 2002. Evidence for historical introgression along a contact zone between two species of char (Pisces: Salmonidae) in northwestern north America. *Evolution*, 56(5): 1021—1035
- Reed K M, Hackett J D, Phillips R B, 2000. Comparative analysis of intra-individual and inter-species DNA sequence variation in salmonid ribosomal DNA cistrons. *Gene*, 249: 115—125
- Rodríguez-Trelles F, Tarrío R, Ayala F J, 2000. Evidence for a high ancestral GC content in *Drosophila*. *Mol Biol Evol*, 17: 1710—1717
- Schlotterer C, Tautz D, 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res*, 20: 211—215
- Schulenburg J H G, Hancock J M, Pagnamenta A *et al*, 2001. Extreme length and length variation in the first ribosomal internal transcribed spacer of ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae). *Mol Biol Evol*, 18(4): 648—660
- Susnik S, Schoffmann J, Snoj A, 2004. Phylogenetic position of *Salmo (Platysalmo) platycephalus* Behnke 1968 from south-central Turkey, evidenced by genetic data. *Journal of Fish Biology*, 64: 947—960

PHYLOGENETIC RELATIONSHIP AND LENGTH VARIATION IN THE FIRST RIBOSOMAL INTERNAL TRANSCRIBED SPACER OF CYNOGLOSSINAE SPECIES

XU Hui², LI Jun³, KONG Xiao-Yu¹, XIAO Zhi-Zhong³, LI Yu-Long², ZHANG Yan-Chun², SHI Wei²,
WEI Zheng-Peng², YU Zi-Niu¹

(1. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510301;

2. The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao, 266003;

3. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract Previous studies on phylogenetic relationship of Cynoglossinae fish species relied mostly on morphological data. However, the morphology-based phylogeny and classification of them remain controversial. Recently, combined with morphological data, large advancement has been made on molecular level and has yielded interesting results in regard to tonguefish taxa. In this study, the first ribosomal internal transcribed spacers (ITS1) of nuclear ribosomal DNA from six species of the subfamily Cynoglossinae were used for phylogenetic analysis. The significant length variation of ITS1 region was observed, with range of 404—744bp in length. Clade were established of three well-morphologically-defined groups. The first group, including *C. purpleomaculatus* and *C. abbreviatus*, was 404—405bp long; *C. sinicus* and *P. japonica* was, as the second group, in length of 462—463bp; and *C. oligolepis* and *C. lighti*, the last group, was 741—744bp long. The alignment length of ITS1 was 756 long, with variable sites of 286, of which 285 were parsimony informative. High variability was detected in the ITS1 region, and the conserved motifs were very short except for the motif (ACCCAACCTCTCC), which was common for all species. The sequences contained relatively high GC content (from 66.2% to 69.5%), averaging 67.2%. The mean intra-group distance was 0.00248, 0.00217 and 0.00169 respectively, and the mean in-ter-group distance between Groups I and II was 0.3845, between II and III was 0.9088, and between I and III was 0.8685. The intra-group distances were very smaller than those of inter-group, suggesting that the species in the same group have very close relationship in evolution. The DNA data of these fishes were processed using neighbor-joining (NJ) and maximum parsimony (MP) methods to build phylogenetic relationships within the subfamily of them. Based on morphological, nuclear DNA and mitochondrial DNA data available so far, it is regarded that *C. abbreviatus* and *C. purpleomaculatus* could be the same species with different morphs. Different from morphological taxonomy, *C. sinicus* of genus *Cynoglossus* and *P. japonica* (the only one species under genus *Paraplagusia*) were placed in a same clade with support of a high bootstrap value, and *C. oligolepis* and *C. lighti* were grouped in a clade together. More in-depth researches on more samples are suggested to further clarify the position of the fish taxonomy.

Key words Cynoglossinae, ITS1, Length variation, Phylogenetic relationship