

大口鲮线粒体 DNA 控制区结构和鲾形目鱼类的系统进化初步研究

张艳春¹, 孔晓瑜², 王忠明²

(1. 中国海洋大学教育部海水养殖研究重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 中国科学院南海海洋研究所海洋生物资源可持续利用重点实验室/热带海洋生物标本馆, 广东 广州 510301)

摘要: 测定大口鲮 *Psettoodes erumei* 线粒体控制区全序列, 并与其他 7 种鲾形目鱼类控制区结构进行比较分析。结果表明, 大口鲮线粒体控制区全长大约 1601bp, 5'端和 3'端分别存在 56bp 和 8bp 的串联重复序列。除此之外, 其控制区结构和其他种类相似, 分为终止相关序列区(TAS)、中央保守区(CSB-D、CSB-E、CSB-F)、保守序列区(CSB-1、CSB-2、CSB-3), 同时在 CSB-D 后还识别出鲾形目保守的 Poly-T 结构。比较了 8 种鲾形目鱼类控制区全序列和去除重复序列后控制区序列的碱基组成变化, 结果显示前者的种间差异明显大于后者, 变异系数约是后者的两倍。这种差异主要是由于重复序列的异质性如长度及其拷贝数不同、碱基组成不同所造成的。基于控制区部分序列对鲾形目 12 种鱼类进行系统分析, 结果显示, 在鲾形目内部大口鲮分类地位最原始; 鲾亚目先与鲾亚目聚在一起, 后与鲾亚目聚在一起, 这个结果与基于形态特征的系统关系相符。

关键词: 线粒体 DNA; 控制区; 大口鲮 *Psettoodes erumei*; 系统发生; 鲾形目

中图分类号: Q178.53; Q953 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2010)06-0071-08

Characterization of mitochondrial control region sequence of *Psettoodes erumei* and phylogenetic analysis of Pleuronectiformes

ZHANG Yan-chun¹, KONG Xiao-yu², WANG Zhong-ming²

(1. The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, South China Sea Institute of Oceanology, CAS, Guangzhou 510301, China)

Abstract: Complete control region (CR) of *Psettoodes erumei* mitochondrial genome was determined. Its size is 1,601 bp in length, with a 56 bp tandem repeat at 5' end and a 8 bp one at 3' end. Based on the alignment of CR sequences in this species and seven other flatfishes, three domains (the termination associated sequence domain, TAS; the central conserved domains, CSB-F, CSB-E, CSB-D and the conserved sequence block domains, CSB-1, CSB-2, CSB-3) and a Poly-T tract are identified. The difference of base composition of complete CR sequences is greater than that of CR sequence without repeated regions among eight flatfishes, and the variation coefficient of the former is about twice of the latter, which is mainly due to the heterogeneity as length, base composition and copy numbers of repeated regions. With *Carangoides armatus* as the outgroup, the molecular phylogenetic relationship of 12 flatfishes was analyzed using the ML and BI methods. The results showed that *P. erumei* is the most primitive species among the flatfishes. Soleoidei and Pleuronectoidei are clustered into one clade, and then Psettoidae merges to it. These results are consistent with that based on the morphological analyses.

Key words: mitochondrial DNA; control region; *Psettoodes erumei*; phylogenesis; Pleuronectiformes

大口鲮 *Psettoodes erumei* 隶属于鲾形目(Pleuronectiformes)、鲾亚目(Psettoidae)、鲾科(Psettodidae)、

鲾属(*Psettoodes*), 该亚目仅 1 属 3 种, 我国只有 1 种大口鲮, 分布于海南、广西到福建及台湾海域, 为南海沿

收稿日期: 2009-01-23; 修订日期: 2009-05-27。刘学东编辑

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30870283)

作者简介: 张艳春(1984—), 女, 吉林省吉林市人, 硕士, 主要从事鱼类分子生物研究。E-mail: zhangyc_601@yahoo.com.cn

通信作者: 孔晓瑜。E-mail: xykong@scsio.ac.cn

岸重要的食用经济海鱼之一。

鲷形目鱼类身体最显著的特征是左右不对称,如两眼位于头的一侧,两侧鳞、侧线、偶鳍及前部头骨也常不对称。一般属种的两眼位于左侧还是右侧是比较稳定的,故有“左鲷、右鲷、左舌鲷、右鲷”的说法。但是鲷亚目鱼类两眼位左侧或右侧均常见,兼有鲷和鲷的形态特征,为鲷形目内较原始的一个亚目^[1-2]。

在线粒体 DNA(mtDNA)中,控制区(control region, CR)即 D-loop 区为非编码区,长度约 1—2kb,包含与 DNA 复制和转录相关的序列^[3],是 mtDNA 中变化最复杂的区域,受进化压力较小,其进化速率是 mtDNA 其他区段的 5—10 倍^[4]。目前,已测得 11 种鲷形目鱼类的控制区全序列,其结构与已发表鱼类的控制区结构相似,分为终止相关序列(TAS)、中央保守区(CSB-F、CSB-E、CSB-D),以及保守序列区(CSB-1、CSB-2、CSB-3)。除此之外鲷形目鱼类控制区普遍存在重复序列^[5-9],在以往的研究中,有很多鱼类在 5'端也发现有串联重复序列^[10-15],且 5'端的重复片段中大多有 TACAT 以及反向互补序列 ATGTA 的核心序列,并能形成发夹结构。控制区的结构研究将有助于了解 DNA 复制、转录的机制和进化规律^[3,16-17],同时控制区序列进化速率快,能积累更丰富的信息位点,已作为常用的分子标记成为鱼类系统发育和群体遗传研究的手段^[18-23]。

本研究通过扩增得到大口鲷的 mtDNA 控制区全序列,并与已有的 7 种鲷形目鱼类的控制区相比较,对其遗传结构特性进行分析。并基于该片段部

分序列构建了 12 种鲷形目鱼类的分子系统树,对鲷形目内部的系统发育关系进行了探讨,为今后鲷形目鱼类的系统发生及进化提供理论基础。

1 材料方法

1.1 材料方法

大口鲷样品采自南海,鉴定后保存于-20℃。取尾部肌肉组织按常规酚/氯仿抽提方法提取 DNA^[24],并进行 PCR 扩增和序列测定。扩增控制区的引物序列为: L-pro TTCCACCTCTAACTCCCAAAGCTAG; H-12S CTTGGGCCTCTCGTATAACC。PCR 反应体积为 25μL,其中包括 2.5μL 10×缓冲液,2μL MgCl₂ (25mmol·L⁻¹), 2μL dNTP (2.5mmol·L⁻¹), 每个引物 0.5μL (10μmol·L⁻¹), 0.2μL Taq 聚合酶(5U·μL⁻¹), 1μL 模板 DNA (0.02g·L⁻¹), 灭菌双蒸水补足至 25μL; 使用 Eppendorf AG 型 PCR 仪进行扩增,反应程序为: 96℃ 预变性 3min, 32 个循环包括 96℃ 2min、47℃ 1min、72℃ 2min, 最后 72℃ 延伸 8min。PCR 扩增后的产物,用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒纯化后测序(上海英骏)。

1.2 数据分析

应用软件 BioEdit(<http://www.mbio.ncsu.edu/Bio-Edit/bioedit.html>)对大口鲷控制区测序结果进行拼接和人工校正,并从 GenBank 下载了 11 种鲷形目鱼类和鲈形目甲若鲷 *Carangoides armatus* 的控制区序列(表 1)。用 Tandem Repeats Finder 软件进行重复序列的查找,并对其控制区序列中的多个串联重复区域特性进行分析。利用 ClustalX1.83 进行序列比对,采用 MEGA4^[25]统计碱基含量,SPSS 计算碱基含量

表 1 用于研究的鲷形目鱼类线粒体控制区相关信息

Tab. 1 Information of related species of Pleuronectiformes used in this study

目	科	属	种	拉丁名	缩写	Accession No.
鲷亚目	鲷科	鲷属	大口鲷	<i>Psettodes erumei</i>	<i>P. eru</i>	本研究
鲷亚目	鲷科	牙鲷属	牙鲷	<i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>P. oli</i>	NC_002386
		马舌鲷属	马舌鲷	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	<i>R. hip</i>	NC_009711
		拟庸鲷属	拟庸鲷	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	<i>H. pla</i>	HPU12059
		庸鲷属	庸鲷	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	<i>H. hip</i>	NC_009709
			狭鳞庸鲷	<i>Hippoglossus stenolepis</i>	<i>H. ste</i>	NC_009710
		星鲷属	圆斑星鲷	<i>Verasper variegatus</i>	<i>V. var</i>	NC_007939
			条斑星鲷	<i>Verasper moseri</i>	<i>V. mos</i>	NC_008461
		木叶鲷属	木叶鲷	<i>Pleuronichthys cornutus</i>	<i>P. cor</i>	DQ679539
		江鲷属	星突江鲷	<i>Platichthys stellatus</i>	<i>P. stel</i>	NC_010966
鲷亚目	鲷科	鲷属	塞内加尔鲷	<i>Solea senegalensis</i>	<i>S. sen</i>	NC_008327
			砂鲷	<i>Solea lascaris</i>	<i>S. las</i>	AB271693
鲈亚目	鲈科	若鲷属	甲若鲷	<i>Carangoides armatus</i>	<i>C. arm</i>	NC_004405

的变异系数。用 RNA Structure Version 4.3^[26]对大口鲮重复序列单元的二级结构进行预测。Modeltext3.7^[27]选择最适进化模型,采用 Phym1^[28]软件进行 ML (Maximum likelihood)系统发育分析,构建系统树时使用自展法(Bootstrap analysis)检验,自展次数为 1000 次。利用 MrBayes^[29]软件进行 BI(Bayesian inference)系统树构建:BI 分析中采用 MCMC^[30-31](Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo)算法(参数为 ngen=1000000; nchains=4; savebrlens=yes)。

2 结果

2.1 大口鲮 mtDNA 控制区的结构特性

本研究获得大口鲮 mtDNA 控制区序列全长 1,601bp,序列分析发现控制区的 5'端和 3'端均存在串联重复序列。5'端的重复单元为 56bp,重复次数为 8.7 次;3'端的串联重复单元为 8bp,序列为 AATATAAT;重复次数为 23 次。把大口鲮与已知的 7 种鲮形目鱼类的控制区相比较分析,识别了其控制区的结构,如图 1 所示。大口鲮控制区包含终止相关序列(TAS)、中央保守区序列(CSB-F、CSB-E、CSB-D)、保守序列区序列(CSB-1、CSB-2、CSB-3)以及 Poly-T 结构。

2.1.1 终止序列区

终止序列区是控制区变异最大的区域,包含与控制区 DNA 复制终止相关的序列。鲮形目鱼类的终止序列区长度约在 250—400bp 左右,大口鲮的该区域长度却为 686bp,主要是由于 5'端存在 56bp × 8.7 的串联重复,重复单元序列为 TTTATATTAACCAT AACATATATGATTAAATACATATATGTAATATATAA CCATTAA。在此重复序列识别到终止相关序列,其中包括核心序列 TACAT 以及反向互补序列 ATGTA,用 RNA Structure Version 4.3 对其重复单元的二级结构进行分析,能形成稳定的二级茎环结构(图 2)。

2.1.2 中央保守区

中央保守区是控制区最为保守的区域,几乎在所有的种类中都十分保守^[32]。Lee 对众多鱼类的序列进行比较时,只能识别 CSB-D 的存在^[33]。Liu^[34]以鳊鱼为例,重新识别了鱼类保守区序列。本研究对比 7 种鲮形目鱼类中央保守区序列,识别出大口鲮的 CSB-F、E、D。鲮形目鱼类中,CSB-F 序列变异最大,大口鲮与其他鲮形目鱼类差异最显著,其 CSB-F 序列为:ATGAGACGAGAGACCACCAACCGG。CSB-F 后为 CSB-E,这在鲮形目中较为保守,

含有 GTGGG-box^[33],大口鲮的 CSB-E 序列为 AAGGACAGAAATTGTGGGGG。鲮形目鱼类的 CSB-D 序列与已研究过的其他鱼类的序列相似^[33],大口鲮的 CSB-D 序列为 TATTCCTGGCATTGTTTCCTA。在 CSB-D 后面还发现鲮形目共有的保守片段 Poly-T,大口鲮的该序列为 TTCTCTTTTTTTTATTTCCTTT。

2.1.3 保守序列区

哺乳动物的保守序列区中一般都存在保守序列 CSB-1,不一定存在 CSB-2 和 CSB-3^[32,16]。但是,鱼类保守序列区中 CSB-1 的存在不具有普遍性^[33,35]。识别鲮形目鱼类保守序列区时,虽然没有找到以往研究中所描述的 CSB-1 特征序列(GACATA),但参考鳊科鱼类 CSB-1 的特征序列(GAGCATA)^[36],识别出鲮形目的特征相似序列为(G-GCATA),大口鲮的该序列为 ATTAGGGATATCACGGGCATAA。相对 CSB-1 而言,鲮形目鱼类的 CSB-2 和 CSB-3 比较保守:鲮形目 CSB-2 含有以 TA 间隔的两段 6 个串联的 C,大口鲮的该序列为 AAACCCCCCTACCC CCC;鲮形目鱼类除大口鲮和牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 存在较大变异外,其余种类的 CSB-3 序列较为保守,大口鲮的该序列为 TTAATACTTCTTAA AAACACAA。

2.2 大口鲮 mtDNA 控制区碱基含量

鲮形目鱼类控制区普遍存在串联重复序列,具有序列和长度的异质性^[7]。在分析 8 种鲮形目鱼类控制区碱基组成时分为两组数据来比较,一组为控制区全序列,另一组为只保留单个重复单元的控制区序列。

8 种鲮形目鱼类控制区全序列的碱基含量如表 2 所示,大口鲮的碱基组成为: T 33.9%, C 16.9%, A 38.9%, G 10.3%, A+T 的含量高达 72.8%。碱基含量在 8 种鲮形目鱼类之间存在较大变异: C 的含量最大值是 29.5%, 28.2%, 分别为星突江鲮 *Platichthys stellatus* 和庸鲮 *Hippoglossus hippoglossus*。最小值为 15.5%, 16.9%, 分别是木叶鲮 *Pleuronichthys cornutus* 和大口鲮。其他种类位于两者之间; T 含量超过 30%的种类只有木叶鲮、塞内加尔鲷 *Solea senegalensis* 和大口鲮; A 的含量在大口鲮最大,为 38.9%,其余的种类该值都很小;碱基 G 的含量种间的差异较小。

8 种鲮形目鱼类的只含有单拷贝重复单元的控制区碱基含量如表 2 所示,大口鲮的碱基组成为: T 30.3%, C 22.5%, A 32.2%, G 15%, A+T 的含量为

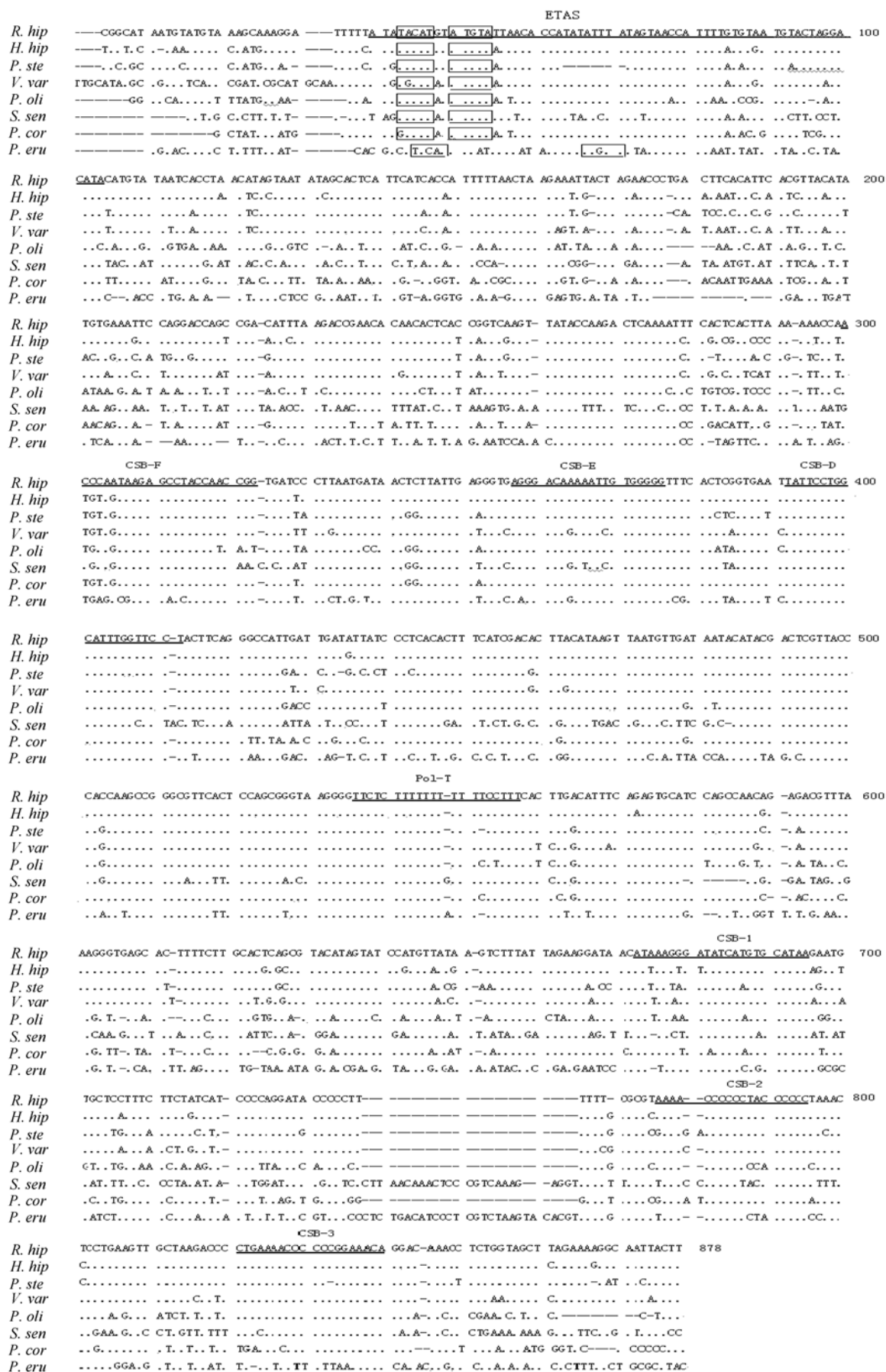


图 1 8 种鲽形目鱼类控制区的结构特征比较

Fig. 1 Comparison of characteristic of the mitochondrial CR in eight flatfishes

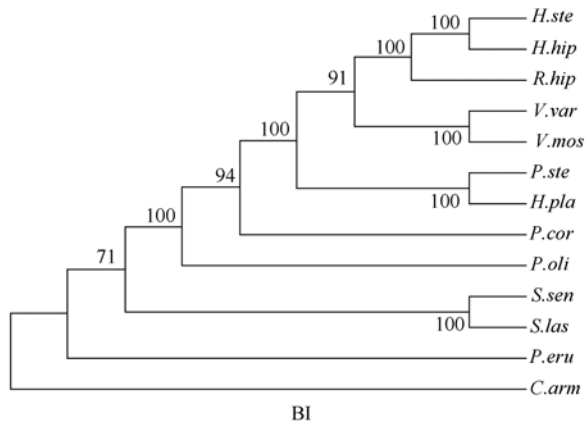


图4 基于控制区部分序列用BI法构建的12种鲷形目鱼类系统进化树

Fig. 4 BI phylogenetic tree based on partial CR sequences in twelve faldfishes

内部按特化程度高低认为鲷亚目最低, 鲷亚目高于鲷亚目。两个树型的区别在于角木叶鲷和牙鲆的分类地位上的不同。ML 建树得到的结果是角木叶鲷比牙鲆的分类地位低, 而 BI 法建树得到的结果却相反。

3 讨论与结果

鲷形目鱼类的 mtDNA 控制区普遍存在重复序列, 多数种类存在于 3'端, 按照重复单元的长短可分为两种类型, 一种为可形成二级结构的大片段序列, 如马舌鲷 *Reinhardtius hippoglossoides*、圆斑星鲷 *Verasper variegatus*、条斑星鲷 *Verasper moseri*^[8]、庸鲷和狭鳞庸鲷 *Hippoglossus stenolepis*^[9]的 61bp 重复单元, 牙鲆^[5]的 74bp 重复单元, 星突江鲷和欧川鲷 *Platichthys flesus*^[6]的 120bp 重复单元; 另一种为富含 TA 的小片段序列, 如木叶鲷、塞内加尔鲷、砂鲷 *Solea lascaris*^[7]和大口鲷的 8—13bp 重复单元。迄今为止, 鲷形目鱼类中只发现欧川鲷和大口鲷在控制区的 5'端和 3'端均存在重复序列, 而相比大口鲷 5'端的 56bp 重复单元, 欧川鲷 5'端 24bp 重复单元并没有包含 TACAT 以及反向互补序列 ATGTA 的核心序列, 无法形成二级结构。Fumagalli 等^[3]认为在控制区的 5'端的重复序列一般比较保守, 而在 3'端的保守性就不明显。Broughton 等^[17]认为控制区 5'端的重复序列更加原始, 正是 5'端的重复序列的产生而加速了 3'端重复序列的产生, 并认为两端重复序列所产生的机制是相似的, 有学者把这种现象称为“边缘效应”。大口鲷是鲷形目最原始的种类, 控制区两端都存在重复序列, 因此本研究推测原始鲷形目鱼类控制区两端都存在重复序列, 大部分种类随着进化其中一端逐渐丢失或全部丢失, 如欧川鲷

可能是逐渐丢失 5'端重复序列的中间态种类, 而牙鲆等鲷形目鱼类可能是完全丢失 5'端重复序列的种类。关于鲷形目控制区重复序列演化, 还有待于获取更多物种控制区数据, 进一步研究。

对比 8 种鲷形目鱼类控制区全序列和只含有单拷贝重复单元的控制区碱基组成, 发现前者在种间的变异明显大于后者。同时比较两者的碱基组成变异系数, 前者约是后者的 2 倍。两者的碱基组成及其变异系数的差异主要是由于不同种类线粒体控制区存在的重复序列碱基组成、长度和拷贝数不同引起的。控制区重复序列的出现很复杂, 同属内不同种类个体重复类型和拷贝数目可能不同, 如鲷属的塞内加尔鲷 8bp 重复单元和沙鲷 13bp 重复单元, 重复数分别为 3 和 23^[7]; 同种不同个体的重复序列的拷贝数目也可能不同, 如圆斑星鲷 61bp 重复单元的重复数为 5—8^[8]。刘海等^[38]在研究中国大陆梅花鹿群体的控制区变异时, 计算整个控制区(包含重复序列)的群体间核苷酸歧异度最高值大于 6.7%, 而去除重复序列后群体核苷酸歧异度最高值仅为 5.4%。4.7%—6.7%被认为是鹿科动物种间差异的范围, 由于控制区重复序列的存在, 会将群体间的差异扩大到超过种间水平, 对鉴定的准确性产生影响。结合本研究数据和其他学者的结果, 建议在计算控制区序列或整个线粒体全序列碱基组成、进行碱基差异比较及系统分析时, 首先要考虑是否存在重复序列, 对于存在重复序列的控制区, 去除多个重复, 只采用单个拷贝用于分析, 以减小对结果的偏差。

本实验基于线粒体控制区部分序列, 应用 ML 和 BI 两种方法构建鲷形目鱼类系统发育树, 鲷亚目和鲷亚目首先聚在一起, 后与大口鲷聚在一起。隶属于鲷亚目的大口鲷为鲷形目内最原始的物种, 与形态特征分析的结果基本相符^[39-41]。李思忠等^[1]依据 106 项特征按特化程度高低及相互关系做统计得出, 鲷形目各科的起源和分化都很早, 现有的科属都代表各演化枝系的顶端; 鲷亚目最原始, 鲷亚目特化程度最高。近些年随着分子生物学的发展, 线粒体 12SrRNA^[42]、16SrRNA^[42-44]和 Cytb^[45]序列已应用到鲷形目系统树的构建上。如: Azevedo 等^[42]用 12S+16S 构建鲷形目的系统树中, 得出鲷科分类地位最原始, 牙鲆科, 鲆科, 棘鲆科其次, 其余种类依次为无臂鲷科, 冠鲷科等。综上, 形态和分子数据都支持大口鲷是鲷形目最原始种类, 其分类地位的确定, 将有助于进一步探讨鲷形目的起源及系统演化。

参考文献

- [1] 李思忠, 王惠民. 中国动物志——硬骨鱼纲 鲮形目 [M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [2] 孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [3] FUMAGALLI L, TABERLET P, FAVRE L, et al. Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews [J]. *Mol Biol Evol*, 1996, 13(1): 31–46.
- [4] 郭新红, 刘少军, 刘巧, 等. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展 [J]. *遗传学报*, 2004, 31(9): 983–1000.
- [5] SAITOH K, HAYASHIZAKI K, YOKOYAMA Y, et al. Complete nucleotide sequence of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) mitochondrial genome: structural properties and cue for resolving teleostean relationships [J]. *J Hered*, 2000, 91(4): 271–278.
- [6] HOARAU G, HOLLA S, LESCASSE R, et al. Heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the flatfish *Platichthys flesus* [J]. *Mol Biol Evol*, 2002, 19(12): 2261–2264.
- [7] MANCHADO M, CATANESE G, PONCE M, et al. The complete mitochondrial genome of the *Senegal sole*, *Solea senegalensis* Kaup. Comparative analysis of tandem repeats in the control region among soles [J]. *DNA Sequence*, 2007, 18: 169–175.
- [8] HE CHONGBO, HAN JIABO, GE LONGLI, et al. Sequence and organization of the complete mitochondrial genomes of spotted halibut (*Verasper variegatus*) and barfin flounder (*Verasper moseri*) [J]. *DNA Seq*, 2008, 19(3): 246–255.
- [9] MJELLE K A, KARLSEN B O, JORGENSEN T E, et al. Halibut mitochondrial genomes contain extensive heteroplasmic tandem repeat arrays involved in DNA recombination [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(10): 1–11.
- [10] FABER J E, STEPIEN C A. Tandemly Repeated sequences in the mitochondrial DNA control region and phylogeography of the pike-perches *Stizostedion* [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1998, 10(3): 310–322.
- [11] NESBO C L, ARAB M O, JAKOBSEN K S. Heteroplasmy, length and sequence variation in the mtDNA control regions of three percid fish species (*Perca fluviatilis*, *Acerina cernua*, *Stizostedion lucioperca*) [J]. *Genetics*, 1998, 148: 1907–1919.
- [12] 张四明, 吴清江, 张亚平. 中华鲟(*Acipenser sinensis*)及相关种类的 mtDNA 控制区串联重复序列及其进化意义[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, 16(4): 458–461.
- [13] SELL J, SPIRKOVSKI Z. Mitochondrial DNA differentiation between two forms of trout *Salmo letnica*, endemic to the Balkan Lake Ohrid reflects their reproductive isolation [J]. *Molecular Ecology*, 2004, 13: 3633–3644.
- [14] YUE GENHUA, LIEW W C, ORBAN L. The complete mitochondrial genome of a basal teleost, the Asian arowana (*Scleropages formosus*, Osteoglossidae) [J]. *BMC Genomics*, 2006, 7(242): 1–13.
- [15] 唐文乔, 胡雪莲, 杨金权. 从线粒体控制区全序列变异看短颌鲚和湖鲚的物种有效性[J]. *生物多样性*, 2007, 15(3): 224–231.
- [16] SBISA E, TANZARIELLO F, REYES A, et al. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: Identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications [J]. *Gene*, 1997, 205: 125–140.
- [17] BROUGHTON R E, DOWLING T E. Length variation in mitochondrial DNA of the minnow *Cyprinella spiloptera* [J]. *Genetics*, 1994, 138(1): 179–190.
- [18] LEE J S, MIYA M, LEE Y S, et al. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the self-fertilizing fish *Rivulus marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) and the first description of duplication of a control region in fish [J]. *Gene*, 2001, 280: 1–7.
- [19] GRUNWALD C, STABILE J, WALDMAN J R, et al. Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences [J]. *Mol Ecol*, 2002, 11(10): 1885–1898.
- [20] RAVAGO R G, MONJE V D, JUINIO-MENEZ M A. Length and sequence variability in mitochondrial control region of the *Milkfish*, *Chanos chanos* [J]. *Mar Biotechnol*, 2002, 4: 40–50.
- [21] ABBOT C L, DOUBLE M C, TRUEMAN J W H, et al. An unusual source of apparent mitochondrial heteroplasmy: duplicate mitochondrial control regions in *Thalassarche albatrosses* [J]. *Mol Ecol*, 2005, 14: 3605–3613.
- [22] ZHAO JINLIANG, WANG WEIWEI, LI SIFA, et al. Structure of the mitochondrial DNA control region of the sinipercine fishes and their phylogenetic relationship [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(9): 793–799.
- [23] 谢振宇, 杜继曾, 陈学群, 等. 线粒体控制区在鱼类种内遗传分化中的意义[J]. *遗传*, 2006, 28(3): 362–368.
- [24] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning [M]//A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [25] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol. Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [26] MATHEWS D H, DISNEY M D, CHILDS J L, et al. Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary

- structure [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2004, 10: 7287–7292.
- [27] POSADA D, CRANDALL K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, 1998, 14: 817–818.
- [28] GUINDON S, GASCUEL O. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood [J]. *Syst Biol*, 2003, 52(5): 696–704.
- [29] RONQUIST F, HUELSENBECK J P. Mrbayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19: 1572–1574.
- [30] METROPOLIS N, ROSENBLUTH A W, ROSENBLUTH M N, et al. Equations of state calculations by fast computing machines [J]. *Chem Phys*, 1953, 21(6): 1087–1091.
- [31] HASTINGS W K. Monte carlo sampling methods using Markov chains and their applications [J]. *Biometrika*, 1970, 57(1): 97–109.
- [32] SACCONI C, PESOLE G, SBISA E. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: Structure-function model and evolutionary pattern [J]. *J Mol Evol*, 1991, 33: 83–91.
- [33] LEE W J, CONROY J, HOWELL W H, et al. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions [J]. *J Mol Evol*, 1995, 41(1): 54–66.
- [34] 刘焕章. 鱼类线粒体 DNA 控制区的结构与进化: 以鲚鱼类为例 [J]. *自然科学进展*, 2002, 12(3): 266–270.
- [35] WANG WEI, HE SHUNPING, CHEN YIYU. Mitochondrial d-loop sequence variation and phylogeny of gobiobotine fishes [J]. *Progress Nat Sci*, 2002, 12(11): 866–868.
- [36] 朱世华, 郑文娟, 邹记兴, 等. 鲮科鱼类线粒体 DNA 控制区结构及系统发育关系 [J]. *动物学研究*, 2007, 28(6): 606–614.
- [37] MIYA M, KAWAGUCHI A, NISHIDA M. Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: A case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences [J]. *Mol Biol Evol*, 2001, 18(11): 1993–2009.
- [38] 刘海, 杨光, 魏辅文, 等. 中国大陆梅花鹿 mtDNA 控制区序列变异及种群遗传结构分析 [J]. *动物学报*, 2003, 49(1): 53–60.
- [39] NORMAN J R. A systematic monograph of the flatfishes (Heterosomata), 1. Psettodidae, Bothidae, Pleuronectidae [M]. London: British Museum Natural History, 1934.
- [40] CHAPLEAU F. Pleuronectiform relationships: A cladistic reassessment [J]. *Bull Mar Sci*, 1993, 52: 516–540.
- [41] AHLSTROM E H, AMAOKA A K, HENSLEY D A, et al. Pleuronectiformes development [M]// MOSER H G, RICHARDS W J, COHEN D M, et al. *Ontogeny and Systematic of Fishes. Special Publication n. 1. American Society of Ichthyology and Herpetology*, Lawrence, 1984: 640–670.
- [42] AZEVEDO M F C, OLIVEIRA C, PARDO B G, et al. Phylogenetic analysis of the order Pleuronectiformes (Teleostei) based on sequences of 12S and 16S mitochondrial genes [J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2008, 31(1): 284–292.
- [43] YOU FENG, LIU JING, ZHANG PEIJUN, et al. Preliminary study on mitochondrial 16S rRNA gene sequences and phylogeny of flatfishes (Pleuronectiformes) [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2005, 23(3): 335–339.
- [44] PARDO B, MACHORDOM A, FORESTI F, et al. Phylogenetic analysis of flatfish (Order Pleuronectiformes) based on mitochondrial 16S rDNA sequences [J]. *SCI MAR*, 2005, 69(4): 531–543.
- [45] KARTAVTSEV Y P, PARK T J, VINNIKOV K A, et al. Cytochrome b (Cyt-b) gene sequence analysis in six flatfish species (Teleostei, Pleuronectidae), with phylogenetic and taxonomic insights [J]. *Mar Biol*, 2007, 152: 757–773.