

牙鲆 3 个养殖群体遗传结构的微卫星分析

邵长伟^{1,2} 廖小林² 田永胜² 陈松林^{2*}

(¹中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

(²农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘要 采用微卫星标记分析技术, 用 5 个多态性的微卫星标记对来自 3 个不同国家(中国、日本和韩国)的牙鲆养殖群体进行了遗传多样性研究。研究结果表明, 3 个牙鲆群体平均等位基因在 4.8~5.6 之间, 平均观测杂合度(H_o) 在 0.391 7~0.564 3 之间, 平均期望杂合度(H_E) 在 0.598 1~0.626 4 之间。有多个位点在不同的群体中偏离哈代-温伯格平衡。遗传距离分析表明, 中国群体与日本群体遗传距离最近, 韩国群体与日本群体遗传距离最远。分子方差分析(AMOVA)表明, 群体内遗传变异与群体间遗传变异分别占总遗传变异的 92.44% 和 7.56%, 固定系数(F_{st}) 为 0.075 2 ($P < 0.001$), 表明牙鲆 3 个养殖群体遗传分化显著。

关键词 牙鲆 养殖群体 微卫星标记 遗传多样性

中图分类号 Q347; Q959.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)01-0041-06

Microsatellite marker analysis of genetic structures of three populations of cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*

SHAO Chang-wei^{1,2} LIAO Xiao-lin² TIAN Yong-sheng² CHEN Song-lin^{2*}

(¹School of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(²Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT The genetic diversity of cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* from three countries (China, Japan and Korea) was studied by using five microsatellite markers. The results showed that the average number of alleles per population ranged between 4.8~5.6, and the mean observed heterozygosity (H_o) was 0.391 7~0.564 3, while the mean expected heterozygosity (H_E) was 0.598 1~0.626 4. Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) test revealed several loci in some populations deviated significantly from HWE balance. Genetic distance analysis showed that the smallest distance was between Chinese and Japanese populations and the largest distance was between Korean and Japanese populations. The F_{st} values between populations indicated that there was significant genetic differentiation among the three cultured populations.

国家 863 项目(2006AA10A404), 国家科技支撑计划项目(2006BAD01A12011) 和国家自然科学基金项目(30413240) 共同资助

* 通讯作者。E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2007-12-07; 接受日期: 2008-01-22

作者简介: 邵长伟(1982-), 男, 硕士研究生, 主要从事鱼类分子遗传研究。E-mail: shaochangwei303@163.com, Tel: (0532)85844606

KEY WORDS *Paralichthys olivaceus* Cultured population Microsatellite marker
Genetic diversity

牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 主要分布于我国渤海、黄海、东海、南海及韩国、日本、俄罗斯远东沿岸海区,是东亚国家如中国、日本和韩国的主要海水养殖鱼类。通常认为牙鲆成鱼的运动能力是比较有限的,因此,长达 25~50 d 的卵及仔稚幼鱼期随海浪漂浮可能是造成其广泛分布的原因(Ochiai *et al.* 1997)。有研究表明,由于地理隔离造成牙鲆在形态上和生物学特性方面发生了一些变化,例如仔稚幼鱼期时背部放射线数目不同(Kinoshita *et al.* 2000)以及生长速度和繁殖力不同(Minami 1997)。在遗传结构方面,Masashi 等(2001)利用微卫星标记分析了牙鲆日本 7 个不同地理群体的遗传结构,认为不同地理群体之间遗传结构水平不同。刘云国等(2005)分析了牙鲆中国养殖群体的遗传结构,其遗传多样性明显低于自然群体(Sekino *et al.* 2001),这主要是由于人工养殖条件下的封闭群体比自然群体更容易发生瓶颈效应和近交衰退现象而加速种质的同质化,从而降低了群体的遗传多样性。为了保持牙鲆资源的可持续利用以及防止近交衰退,阐明牙鲆不同群体的遗传结构与遗传多样性是迫切需要的。在本研究中,作者从 Sekino 等(2000)开发的牙鲆微卫星标记中选择了 5 个多态位点,用以分析来自中国、日本和韩国的 3 个国家牙鲆养殖群体的遗传结构与遗传多样性,以期揭示目前东亚国家的牙鲆遗传结构现状,为牙鲆自然资源的保护以及育种提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

牙鲆中国(CF)、日本(JF)与韩国群体(KF)均取自山东省海阳黄海水产有限公司,体长 6~10cm,平均体重约 9.5g。其中日本群体为从日本千叶地区引进野生群体的子一代个体,韩国群体为从韩国济州岛引进野生群体的子一代个体,中国群体为黄海野生群体的子一代个体。每个群体各取 30 尾鱼,每尾鱼取少量鳍条组织分别保存于无水乙醇中。

1.2 方法

1.2.1 牙鲆基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 主要通过高盐法提取(Liao *et al.* 2007),略有改动。取约 100mg 组织,然后用剪刀尽量剪碎,加入 400 μ l TNES 裂解液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 400 mmol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, 0.6% SDS)和 5 μ l 蛋白酶 K(20mg/ml)。混匀后至于 55 $^{\circ}$ C 水浴消化直至组织消化完全,期间需不时振动。然后加入 120 μ l 6mol/L NaCl,混匀后 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 30min。取上清加入两倍体积-20 $^{\circ}$ C 预冷的无水乙醇沉淀,然后用枪头将絮状沉淀挑出,用 70%酒精洗涤两次。待酒精挥发完全后,用 100 μ l TE(10 mmol/L Tris-HCl, 1.0 mmol/L EDTA, pH 8.0)溶解。

1.2.2 牙鲆基因组 DNA 的微卫星分析

从 Sekino 等(2000)开发的微卫星标记中选择了 5 个多态位点,由上海博亚公司合成(表 1)。25 μ l PCR 反应体系中,含 40ng 基因组 DNA, 10pmol 引物, 100 μ mol/L dNTPs, 1.5mmol/L 的 Mg^{2+} , 1 \times PCR 缓冲液, 1 U 的 *Taq* DNA 聚合酶。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 54~58 $^{\circ}$ C 退火 40s(表 1), 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。反应在基因扩增仪(PTC-200)上进行。

PCR 反应结束后,加入 12 μ l 的甲酰胺变性剂(98%甲酰胺, 10mmol/L EDTA, 0.05%二甲苯青, 0.05%溴酚兰)于 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 然后立即冰浴。变性产物经 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,通过与 DNA 分子量标准(pBR322DNA/*Msp*I)比较来判读等位基因大小。参考 Caetano-Anolles 等(1997)报道的方法银染显色。

1.2.3 数据统计分析

表 1 5 对微卫星引物及其 PCR 反应条件
Table 1 Primers of five microsatellite DNA markers and conditions of PCR

| 位点 Locus | 重复单元 Repeat motif | 引物序列(5'-3') Primer sequence | 退火温度(°C) Annealing temperature | 等位基因大小 范围(bp) Size range | Genebank 登录号 Genebank accession no. |
|-------------|---|---|-----------------------------------|--------------------------------|--|
| Po33 | (TG) ₅ T ₂ (TG) ₁₀ | F-GTTGGTTTAACTGATTCATCTGCAG R-TTACATATCCCACAATGCTTCACTC | 55 | 260~290 | AB046752 |
| Po35 | (CA) ₇ | F-TGGTTCTAGTGTGTTGTCTGGTGA R-CCTACAGCACAGATATGACCTTT | 54 | 286~310 | AB046753 |
| Po48 | (CACG) ₄ (CA) ₅ | F-GCCTCCAGAAACATTTATGGGG R-TGTCTTGCTCTGGTCCTTCTT | 55 | 130~142 | AB046755 |
| Po83 | (CA) ₅ AG ₂ (CG) ₂ (TG) ₃ (CG) ₂ (CA) ₁₅ | F-TGCGGTCATCATGTCTTTAAAATA R-AGCAAATGTTTGCTTTTGGATACA | 56 | 254~290 | AB046759 |
| Po89 | TA ₃ (CA) ₇ | F-ATCAGAAGTCATCCATGCCTGGCAC R-AGCTACTTATCCACAGGTGTCGACGG | 58 | 250~300 | AB046760 |

利用 Popgene 软件计算各群体多态位点等位基因数(A)、有效等位基因数(A_e)、预期杂合度(H_E)、观测杂合度(H_O)、基因型数(G)以及平均 F_s 值,同时利用该软件测试了每个群体各个位点的哈代-温伯格平衡(Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE)。利用分子方差分析(Analysis of Molecular Variance, AMOVA)方法(Excoffier *et al.*, 1993)计算群体遗传结构,其中总遗传变异被分成群体内遗传变异和群体间遗传变异。用 Arlequin 计算固定系数 F_s、平均基因多样性指数以及 Nei's 遗传距离,并根据 Nei's 遗传距离用 MEGA(Version 3.1)构建了 UPGMA(Unweighted Pair Group Method using arithmetic Average)系统树(图 1)。

2 结果

2.1 牙鲆 3 个养殖群体微卫星位点的遗传多态性

5 个微卫星位点共扩增出 29 个等位基因,平均每个位点扩增出约 6 个等位基因。3 个牙鲆群体平均等位基因数在 4.8~5.6 之间。Po48 位点扩增出的等位基因数最少(2 个),而 Po83 位点扩增出的等位基因数最多(8 个),等位基因的大小在 130~310bp 之间。平均等位基因数目最多的位点是 Po89,为 5.50 个;平均等位基因数最少的位点是 Po48,为 1.34 个。基因型数最少的位点是 Po48,为两个;最多的位点是 Po83 和 Po89,均为 14 个。3 个牙鲆群体的平均 F_s 值都显著的偏离平衡 0(P<0.05),有 3 个位点(Po33、Po48 和 Po89)检测到了杂合子缺失,两个位点(Po35 和 Po83)检测为杂合子过剩(表 2)。

2.2 群体内和群体间遗传变异

通常认为遗传杂合度和等位基因多样性(每个位点的等位基因数目)是度量群体内遗传变异的重要参数,其值的大小反映群体遗传多样性的高低(潭杰等 2007)。由表 3 可知,每个群体的平均有效等位基因在 2.75~3.28 之间,平均观测杂合度(H_O) 在 0.3917~0.5643 之间,平均期望杂合度(H_E) 在 0.5981~0.6264 之间。位点 Po33 和 Po48 在所有 3 个牙鲆群体中均符合 HWE(P>0.05)。位点 Po89 在牙鲆中国群体和韩国群体符合 HWE(P>0.05),在日本群体中偏离 HWE。位点 Po83 在韩国群体中符合 HWE(P>0.05),而

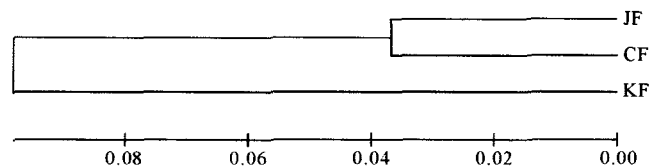


图 1 基于 Nei's 遗传距离构建的 3 个牙鲆养殖群体的 UPGMA 树
Fig. 1 UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance for three populations of Japanese flounder

在其他两个群体中偏离 HWE。位点 Po35 在 3 个群体中均不符合 HWE ($P < 0.05$)。基于平均基因多样性指数, 韩国群体最高 ($KF = 0.6046 \pm 0.3542$), 而中国群体最低 ($CF = 0.5815 \pm 0.3572$) (表 3)。AMOVA 分析结果显示, 群体内的遗传变异占总遗传变异的 92.44%, 这表明所分析的牙鲆 3 个不同养殖群体绝大部分遗传变异是由群体内的遗传变异提供的。

表 2 3 个牙鲆养殖群体的 5 个微卫星位点上的统计分析结果

Table 2 The analysis of five microsatellite loci in three populations of Japanese flounder

| 种群 Stock | 参数 Parameter | Po33 | Po35 | Po48 | Po83 | Po89 | 平均值 Mean |
|-------------|-----------------|---------|--------|---------|--------|---------|-------------|
| JF | n | 30 | 30 | 29 | 30 | 29 | 29.6 |
| | A | 4 | 6 | 2 | 7 | 5 | 4.8 |
| | A_e | 1.81 | 3.56 | 1.82 | 3.89 | 2.70 | 2.75 |
| | G | 6 | 9 | 3 | 11 | 7 | 7.2 |
| | H_E | 0.4461 | 0.7194 | 0.4518 | 0.7428 | 0.6302 | 0.5981 |
| | H_O | 0.5463 | 0.2684 | 0.5402 | 0.2446 | 0.3587 | 0.3917 |
| | P | 0.9556 | 0.0000 | 0.0542 | 0.0004 | 0.0016 | |
| | F_{is} | -0.1208 | 0.2587 | -0.3737 | 0.3269 | -0.3132 | -0.0442 |
| CF | n | 30 | 30 | 30 | 30 | 28 | 29.6 |
| | A | 4 | 6 | 2 | 7 | 7 | 5.2 |
| | A_e | 2.11 | 4.26 | 1.34 | 3.87 | 4.80 | 3.28 |
| | G | 5 | 10 | 2 | 9 | 13 | 7.8 |
| | H_E | 0.5339 | 0.7785 | 0.2593 | 0.7542 | 0.8058 | 0.6264 |
| | H_O | 0.5667 | 0.6667 | 0.3000 | 0.4667 | 0.8214 | 0.5643 |
| | P | 0.4468 | 0.0000 | 0.3655 | 0.0000 | 0.4033 | |
| | F_{is} | -0.0794 | 0.1292 | -0.1765 | 0.3708 | -0.0379 | 0.4124 |
| KF | n | 30 | 30 | 30 | 30 | 29 | 29.8 |
| | A | 5 | 5 | 3 | 8 | 7 | 5.6 |
| | A_e | 1.97 | 1.79 | 1.97 | 4.60 | 5.50 | 3.17 |
| | G | 6 | 6 | 5 | 14 | 14 | 9 |
| | H_E | 0.5006 | 0.4480 | 0.5011 | 0.7960 | 0.8324 | 0.6156 |
| | H_O | 0.5667 | 0.2000 | 0.5333 | 0.7667 | 0.6897 | 0.5513 |
| | P | 0.7240 | 0.0000 | 0.9625 | 0.0833 | 0.1573 | |
| | F_{is} | -0.1512 | 0.5460 | -0.0823 | 0.0206 | 0.1570 | 0.0980 |

注: n 为每个群体个数; A 为等位基因; A_e 为有效等位基因; G 为基因型数; H_E 为预期杂合度; H_O 表示观测杂合度; P 值表示对 Hardy-Weinberg 平衡的显著性检验; F_{is} 表示近交系数

研究表明, 遗传距离是衡量群体间遗传变异程度的可靠参数。群体间亲缘关系越近, 则遗传变异性越低, 相似系数值越大, 遗传距离越小 (Plosky *et al.* 1993)。牙鲆 3 个养殖群体间的遗传距离见表 4。其中, 群体间遗传距离最大的为日本群体与韩国群体 (0.1982), 说明这两个群体间遗传差异最大; 中国群体与日本群体的遗传距离最小 (0.0734)。图 1 是基于 Nei's 遗传距离构建的 UPGMA 树, 其中中国群体与日本群体首先聚在一起, 然后才与韩国群体聚在一起。AMOVA 分析结果表明, 群体间的遗传变异占总遗传变异的 7.56% (表 5), 牙鲆 3 个群体固定系数 (F_x) 为 0.0752 ($P < 0.001$), 其中牙鲆中国群体和日本群体固定系数 (F_x) 最小为 0.0349 ($P < 0.001$), 说明群体间分化程度显著 (表 4)。

表 3 牙鲆 3 个养殖群体的遗传变异
Table 3 Genetic variation in three populations of Japanese flounder

| 群体 Population | 平均观测杂合度 H_O | 平均期望杂合度 H_E | 平均有效等位基因 Average no. of alleles | 平均基因多样性指数 Average gene diversity |
|------------------|------------------|------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| JF | 0.391 7 | 0.598 1 | 2.75 | 0.593 9±0.349 0 |
| CF | 0.564 3 | 0.626 4 | 3.28 | 0.581 5±0.357 2 |
| KF | 0.551 3 | 0.615 6 | 3.17 | 0.604 6±0.354 2 |

注: JF 为日本群体;CF 为中国群体;KF 为韩国群体

表 4 牙鲆每两个群体之间的 Nei's 遗传距离和固定系数 (F_{ST})

Table 4 Nei's genetic distances and F_{ST} between populations of Japanese flounder

| 群体 Population | JF | CF | KF |
|------------------|----------|-----------|-----------|
| JF | | 0.034 9** | 0.096 7** |
| CF | 0.073 4* | | 0.091 4** |
| KF | 0.198 2 | 0.193 9 | |

注:数字矩阵对角线以下的数表示群体间的遗传距离,其中 * 表示为表中的遗传距离的最小值;数字矩阵对角线以上的数表示群体间的固定系数,** 表示 $P < 0.001$

3 讨论

杂合度作为一个反映群体遗传变异的重要参数,其大小可以反映群体遗传变异的高低,从遗传学的角度来讲,遗传瓶颈的发生首先就表现为等位基因尤其是稀有等位基因的消失,随着“瓶颈”的加剧就会表现出平均杂合度的降低,继而会造成物种生长速度和抗病力的下降(王伟等 2004)。本研究中的 3 个牙鲆群体间的平均观测、期望杂合度相差不大,但日本群体、中国群体与韩国群体的平均等位基因数目分别为 4.8 个、5.2 个和 5.6 个,明显低于 Sekino 等(2001)报道的 16.5 个,这可能跟所检测的个体数量较少有关,但最主要原因可能跟牙鲆养殖群体经历了严格的人工选择,有效亲本数量较少,导致了稀有等位基因的丢失,遗传多样性降低。日本群体的平均等位基因数目最少,这可能与日本对牙鲆进行长期高强度的遗传选育有关,长期多代的人工选择过程导致了牙鲆的部分等位基因逐渐丢失。在 5 个微卫星位点中,位点 Po83 和 Po89 至少在 1 个群体中偏离 HW,而位点 Po35 在 3 个群体中均不符合 HW。造成这种现象的原因有很多,通常认为有人工选择、随机突变和迁移等原因(Shao *et al.* 2008)。平均基因多样性指数是衡量遗传多样性的重要指标之一。在 3 个群体的平均基因多样性指数中,韩国群体平均基因多样性指数要高于中国群体平均多样性指数和日本群体平均多样性指数,说明牙鲆韩国群体多样性水平优于中国群体和日本群体,蕴涵着比较丰富的育种和遗传改良能力(鲁双庆等 2005)。

表 5 牙鲆 3 个养殖群体的 AMOVA 分析结果
Table 5 AMOVA analysis of three populations of Japanese flounder

| 变异来源 Source of variation | 自由度 Degree of freedom | 平方和 Sum of squares | 变异组成 Variance components | 变异百分数 Percentage of variation |
|------------------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| 群体间 Among populations | 2 | 17.98 | 0.123 | 7.56 |
| 群体内个体间 Within populations | 177 | 276.1 | 1.505 | 92.44 |
| 合计 Total | 179 | 284.1 | 1.628 | |

聚类先后顺序反映了种群间亲缘关系的远近(邢荣莲等 2003;孙昭宁等 2007)。牙鲆中国群体与日本群体首先聚成一支,然后才与韩国群体聚在一起,这说明牙鲆中国群体与日本群体亲缘关系最近,而与韩国群

体关系较远。牙鲆3个群体固定系数(F_{st})为0.0752($P < 0.001$),表明群体间分化程度显著,其中中国群体和日本群体固定系数(F_{st})最小为0.0349($P < 0.001$),说明中国群体和日本群体遗传分化最小,这与聚类分析结果一致。总体来说,牙鲆3个养殖群体的遗传多样性水平和遗传变异能力相对自然群体都有所降低(Sekino *et al.* 2001)。因此,在实际生产中,为了避免牙鲆遗传多样性的降低,不仅要从繁殖策略上入手,如提高有效亲本的数量、防止人工繁育过程中遗传背景相似品系交配等,而且有必要引进国外野生群体,提高牙鲆遗传多样性,对牙鲆养殖产业持续发展具有重要意义。

参 考 文 献

- 王伟, 尤 锋, 高天翔, 张培军. 2004. 山东近海牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)自然和养殖群体10个微卫星基因座位的遗传多态性分析. 海洋与湖沼, 35(6):530~537
- 孙昭宁, 刘 萍, 李 健, 何玉英, 张秀梅. 2007. 微卫星 DNA 标记用于中国对虾亲子关系的鉴定. 海洋水产研究, 28(3):8~14
- 刘云国, 陈松林, 李八方. 2005. 牙鲆养殖群体遗传变异的微卫星标记研究. 海洋水产研究, 26(5):27~33
- 邢荣莲, 丁 君, 滕利平, 常亚青, 宋林生. 2003. 3种鲍基因组 DNA 多态性的 RAPD 分析. 大连水产学院学报, 18(3):191~196
- 鲁双庆, 刘 臻, 刘红玉, 肖调义, 苏建明. 2005. 鲫鱼4群体基因组 DNA 遗传多样性及亲缘关系的微卫星分析. 中国水产科学, 12(4):371~376
- 谭 杰, 孙慧玲, 刘 萍, 杨爱国, 燕敬平, 刘志鸿, 周丽青. 2007. 仿刺参自然群体和养殖群体间遗传变异的微卫星标记研究. 海洋水产研究, 28(3):38~43
- Caetano-Anolles, G., Gustav, C. A., and Bassam, B. J. 1997. DNA silver staining. *Biotechnology Advances*, 15(1):175
- Excoffier, L., Smouse, P. E., and Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131:479~491
- Kinoshita, I., Seikai, T., Tanaka, M., and Kuwamura, K. 2000. Geographic variations in dorsal and anal ray counts of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* in the Japan Sea. *Environmental Biology of Fishes*, 57:305~313
- Liao, X., Wang, D., Yu, X., Li, W., Cheng, L., Wang, J., and Tong, J. 2007. Characterization of novel microsatellite loci in rare minnow (*Gobio cypris rarus*) and amplification in closely related species in Gobioninae. *Conservation Genetics*, 8:1 003~1 007
- Masashi, S., and Motoyuki, H. 2001. Application of microsatellite markers to population genetics studies of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Marine Biotechnology*, 3:572~589
- Minami, T. 1997. Life history of Japanese flounder. In: *Biology and Population Enhancement of Japanese Flounder*. Tokyo: Koseishakoseikaku, 9~24 (in Japanese)
- Ochiai, A., and Tanaka, T. 1986. Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. In: *Ichthyology*. Tokyo: Koseisha-koseikaku, 1 075~1 080 (in Japanese)
- Plosky, Y., Cahner, A., and Haberfeld, A. 1993. DNA Fingerprint bands applied to linkage analysis with quantitative trait loci in chickens. *Animal Genetics*, 24:105~110
- Sekino, M., and Hara, M. 2001. Inheritance characteristics of microsatellite DNA loci in experimental families of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Marine Biotechnology*, 3:310~315
- Sekino, M., and Hara, M. 2000. Isolation and characterization of microsatellite DNA loci in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Molecular Ecology*, 9:2 200~2 202
- Shao, C. W., Liao, X., and Chen, S. L. 2008. Isolation and characterization of microsatellite DNA loci from the southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Molecular Ecology Resources*, 8:381~383