

中国南方沿海 13 种石斑鱼类的分子系统进化关系分析*

陈兴汉^{1,2}, 郭 梁², 李明明², 蒙子宁², 林浩然²

(1. 阳江职业技术学院生命科学与技术系, 广东 阳江 529566;

2. 中山大学水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 石斑鱼类 (Groupers) 是世界性海洋经济鱼类, 也是中国南方沿海省份重要的海水增殖对象, 其种类繁多, 由于缺乏明显的种间外部形态区别特征, 石斑鱼的分类一直是鱼类系统分类学的一个难题, 存在着较多的争议和混淆。为了从分子水平揭示石斑鱼类的系统进化关系, 应用线粒体细胞色素 b 基因 (Cyt b) 及两个核糖体 RNA 基因 (16S 和 12S) 序列联合构建系统进化树对中国近海石斑鱼亚科 3 属 13 种进行种类鉴定及亲缘关系分析, 探讨了石斑鱼类的分子系统进化。结果表明: ①线粒体基因序列在石斑鱼类种间存在较大的变异, 种内变异极小, 是进行石斑鱼类种类鉴定较为适宜的分子标记; ②所研究的 3 属 13 种石斑鱼类中, 石斑鱼属与九棘鲈属的亲缘关系较近, 与鳃棘鲈属的较远; ③赤点石斑鱼和青石斑鱼、蜂巢石斑鱼与鲑点石斑鱼、斜带石斑鱼与棕斑石斑鱼两两间具有较近的亲缘关系。

关键词: 石斑鱼类; Cyt b; 16S rRNA; 12S rRNA; 分子系统进化

中图分类号: Q959.483 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2014) 04-0123-08

The Molecular Phylogenetic Relationships of 13 Epinepheline Species in Southern Coastal Provinces of China

CHEN Xinghan^{1,2}, GUO Liang², LI Mingming², MENG Zining², LIN Haoran²

(1. Life Science and Technology Department, Yangjiang Vocational and Technical College, Yangjiang 529566, China;

2. Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animal, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The groupers are commercially important marine species over the world, and they are also the important mariculture species of the coastal provinces in south China. The great variety of the species and the lack of morphological characteristics led to much confusion and disputation in their phylogenetic relationships and species identification. In the present study, we try to reveal the phylogenetic relationships of groupers on molecular level. The partial mitochondrial cytochrome b (Cyt b) gene and two ribosomal genes (16S and 12S) were combined and applied to species identification and relationship analysis of 13 Epinepheline species from 3 genera distributed in coastal waters of south China. The results showed that: ①The mitochondrial genes are appropriate as molecular markers for Epinepheline species identification because considerably high sequence difference among species and very low within species were found in

* 收稿日期: 2014-02-24

基金项目: 农业部公益性行业科研专项资助项目 (201403008); 国家自然科学基金资助项目 (31370047, 31001112); 广东省教育科研“十二五”规划资助项目 (2012JK312)

作者简介: 陈兴汉 (1978 年生), 男; 研究方向: 水产经济动物繁育及分子生物学研究; 通讯作者: 蒙子宁; E-mail: mengzn@mail.sysu.edu.cn

these 3 genera; ② *Epinephelus* was more closely related to *Cephalopholis* than to *Plectropomus*; ③ The genetic relationship was very close between *E. akaara* and *E. awoara*, *E. merra* and *E. longispinis*, *E. coioides* and *E. corallicola*.

Key words: Epinepheline; Cyt b; 16S rRNA; 12S rRNA; molecular phylogeny

石斑鱼类在分类学上隶属于鲈形目 (Perciformes)、鲈亚目 (Percoidei)、鲷科 (Serranidae)、石斑鱼亚科 (Epinephelinae)。俗称的石斑鱼是石斑鱼亚科鱼类的统称。石斑鱼除少数种类生活在河口, 多数栖息于热带或亚热带的珊瑚礁水域, 主要以小型鱼类、底栖甲壳类和头足类等为食, 是珊瑚礁生态系统的主要掠食者^[1]。石斑鱼为世界性名贵海产经济鱼类, 也是我国南方沿海省份 (广东、海南、福建、广西) 重要的海水增殖对象。然而近年来受过度捕捞、养殖群体近亲繁殖、珊瑚礁破坏、海洋环境污染等因素影响, 加之石斑鱼本身有性逆转的特性, 致使资源日渐衰退, 部分种类已被国际自然保护联盟 (IUCN, International Union for Conservation of Nature) 列为濒危或近危^[2]。

石斑鱼除资源状况堪忧外, 还存在着种类鉴定上的难题^[3]。石斑鱼的种类较多, 全世界范围内已记录的有 100 多种, 我国已记录的有 50 多种。石斑鱼种类鉴定通常是依据体色、身体和头部形态、鳍的结构和数量^[1], 而进一步的系统进化研究则主要是依据一些骨学特征以及幼体发育过程中仔鱼的形态特征^[4-7]。然而, 由于石斑鱼种类繁多、形态特征类似且体色和斑纹多变, 因此, 仅依据这些形态特征往往难以准确的鉴别, 并导致了石斑鱼分类学上的混淆以及重建进化关系研究上的困难, 至今石斑鱼的分类依然是鱼类分类学的难题。目前依据 Nelson^[8] 的鱼类分类系统, 将鲷科分为鲷亚科、花鲈亚科和石斑鱼亚科 3 个亚科, 共 63 属 449 种。其中石斑鱼亚科又可细分为 5 个族: 石斑鱼族、东洋鲈族、鲈族、长鲈族和黄鱼族。

近年来分子生物学的快速发展, 使得在分子水平上进行鱼类的分类鉴定和系统进化研究成为现实。分子系统学 (Molecular Phylogeny) 通过检测生物大分子的遗传信息, 因其含有信息量大, 且趋同效应弱, 因而其结论相对于经典的形态系统分类更具客观性和可比性。其中线粒体 DNA 由于其结构简单、无重组、多数母性遗传等特点, 已成为群体遗传分析和系统进化研究的有力工具^[9-11]。线粒体特定基因序列分析, 已经成功的应用于许多种鱼类系统进化的研究, 如圆罩鱼 (*Cyclothone*)、南乳鱼 (*Galaxias*)、突吻鲷 (*Coryphaenoides*)

等^[12-14]。Craig 等^[15]最先研究报道了南北美洲 42 种石斑鱼类的分子系统进化关系。国内学者仅见丁少雄等^[16]针对中国近海 30 种石斑鱼类, 进行了基于 16S rDNA 的分子系统进化研究。

文章中应用线粒体细胞色素 b 基因 (Cyt b) 以及两个核糖体 RNA 基因 (16S 和 12S) 序列对中国近海石斑鱼亚科的 3 个属: 石斑鱼属 (*Epinephelus*)、九棘鲈属 (*Cephalopholis*) 和鳃棘鲈属 (*Plectropomus*) 共 13 个种的种类鉴定及亲缘关系进行分析, 采用了线粒体基因组不同区域的多组序列数据 (Cyt b、16S rRNA、12S rRNA) 的联合分析, 联合构建系统进化树, 以探讨石斑鱼类的分子系统进化关系。

1 材料和方法

1.1 材料

文章中的石斑鱼亚科 3 个属 13 个种共 61 个个体为采自中国南方沿海省份广东 (广州、深圳、珠海、惠州、湛江) 和海南 (海口) 沿海的科研基地、养殖场和鲜鱼市场 (见表 1)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 剪取鱼体尾部组织约 50 mg, 参照 Sambrook 等^[17]方法进行基因组 DNA 提取。

1.2.2 线粒体 Cyt b、16S rRNA 以及 12S rRNA 基因扩增及测序 所用引物序列见表 2 (上海生工合成)。PCR 反应总体积为 25 μ L, 包括 2.0 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 μ mol/L 每种引物, 1 U Taq plus DNA 聚合酶 (MBI), 1 \times Taq 聚合酶缓冲液以及 30 ng 基因组 DNA。反应条件为 94 $^{\circ}C$ 预变性 2 min 后经过 30 个循环, 每个循环包括 94 $^{\circ}C$ 45 s, 50 $^{\circ}C$ 1 min, 72 $^{\circ}C$ 1 min, 最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。PCR 产物用 UNIQ-5 (上海生工) 柱式纯化试剂盒纯化后, 在 ABI377 型自动测序仪 (PE) 上进行双向测序。

1.2.3 序列分析 采用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序对测序所得到的正向序列和反向序列进行拼接, 使用 Clustalx1.8 进行对位排序, 应用 Genedoc 软件进行人工校正。用 DNASP3.51 软件计算变异位点、简约信息位点数、核苷酸多样性、平均核苷酸差异数、种间平均每位点核苷酸替代数。

表 1 样品来源
Table1 Origin of the samples

属名	种名	样品量	采样地点	
石斑鱼属	赤点石斑鱼 (<i>E. akaara</i>)	12	深圳、惠州	
	青石斑鱼 (<i>E. awoara</i>)	2	海口	
	黑边石斑鱼 (<i>E. fasciatus</i>)	2	广州	
	蜂巢石斑鱼 (<i>E. merra</i>)	4	海口	
	鲑点石斑鱼 (<i>E. longispinis</i>)	2	海口	
	布氏石斑鱼 (<i>E. bleekeri</i>)	2	广州、海口	
	褐点石斑鱼 (<i>E. fuscoguttatus</i>)	4	珠海	
	鞍带石斑鱼 (<i>E. lanceolatus</i>)	12	深圳	
	斜带石斑鱼 (<i>E. coioides</i>)	12	深圳、惠州、 湛江	
	棕斑石斑鱼 (<i>E. corallicola</i>)	2	珠海	
	九棘鲈属 (<i>Cephalopholis</i>)	红九棘鲈 (<i>C. sonnerati</i>)	2	珠海
	鳃棘鲈属 (<i>Plectropomus</i>)	斑鳃棘鲈 (<i>P. maculatus</i>)	2	广州
豹纹鳃棘鲈 (<i>P. leopardus</i>)		3	广州、珠海	

表 2 引物及其序列
Table 2 Primers and their sequences

基因	引物名称	引物序列
Cyt b	L14724	5' ~ CGA AGCTTGATATGAAAAACC ATCGTTG ~ 3'
	H15149	5' ~ AAAGTGCAGCCCCTCAGAATG ATATTTGTCCTCA ~ 3'
16S rRNA	16Sar L	5' ~ CGCCTGTTTATCAAAAACAT ~ 3'
	16Sar H	5' ~ CCGGTCTGAAGTACAGATCACGT ~ 3'
12S rRNA	L1091	5' ~ AAAAAGCTTCAAACTGGGATT AGATACCCCACTAT ~ 3'
	H1478	5' ~ TGAAGTGCAGAGGGTGACGGG CGGTGTGT ~ 3'

1. 2. 4 聚类分析 利用 MEGA3.1 软件并根据 Kimura 双参数模型计算遗传距离，对 3 段基因序列分别构建邻接 (Neighbor-joining, NJ) 和最大简约 (Maximum - parsimony, MP) 系统树，之后用 3

段基因序列的联合基因序列 (Combined genes) 构建 NJ 和 MP 系统树，采用 Bootstrap1000 检验分枝的置信值。

2 结果

2.1 序列及变异

测序所得 13 种石斑鱼类的 Cyt b 基因片段长 423 bp，无插入和缺失，转换/颠换之比为 2.5。共存在 25 种单倍型序列，序列间共有 153 个变异位点，其中简约信息位点 139 个。核苷酸多样性指数为 0.14，平均核苷酸差异数达 59.84 (表 3)。从种内变异来看，序列差异较小。青石斑鱼、黑边石斑鱼、鲑点石斑鱼、布氏石斑鱼、棕斑石斑鱼和斑鳃棘鲈种内序列相同，其余石斑鱼种内存在变异位点 1~8 个 (表 4)。

去除 7 个插入/缺失，测序所得 13 种石斑鱼类的 16S rRNA 基因片段长 592 bp，转换/颠换之比为 2.2。共存在 21 种单倍型序列，序列间共有 139 个变异位点，其中简约信息位点 119 个。核苷酸多样性指数为 0.08，平均核苷酸差异数达 46.62 (表 3)。种内序列差异较小，青石斑鱼、鲑点石斑鱼、布氏石斑鱼、棕斑石斑鱼、红九棘鲈和斑鳃棘鲈种内序列相同，其余石斑鱼种内存在变异位点 1~3 个 (表 4)。

13 种石斑鱼类的 12S rRNA 基因片段存在 5 个插入/缺失，去除后为 434 bp，转换/颠换之比为 2.2。共存在 14 种单倍型序列，序列间共有 87 个变异位点，其中简约信息位点 70 个。核苷酸多样性指数为 0.08，平均核苷酸差异数达 34.74 (表 3)。种内变异极小 (变异位点 1 个、单倍型序列 14 种)，除豹纹鳃棘鲈种内存在 1 个位点差异外，其余石斑鱼种内序列相同 (表 4)。

表 3 13 种石斑鱼类线粒体基因序列的遗传信息指数
Table 3 Genetic informative indices of the mitochondrial genes of 13 Epinepheline species

遗传信息指数	Cyt b	16S	12S
位点总数	423	592	434
插入和缺失	0	7	5
转换/颠换之比	2.5	2.2	2.2
变异位点数	153	139	87
简约信息位点	139	119	70
单倍型数	25	21	14
核苷酸多样性	0.14	0.08	0.08
平均核苷酸差异数	59.84	46.62	34.74

表 4 13 种石斑鱼类的种内遗传差异
Table 4 Intraspecies genetic variations of 13 Epinepheline species

种类		Cyt b		16S		12S	
		变异位点	单倍型数	变异位点	单倍型数	变异位点	单倍型数
赤点石斑鱼	<i>E. akaara</i>	1	2	1	2	0	1
青石斑鱼	<i>E. awoara</i>	0	1	0	1	0	1
黑边石斑鱼	<i>E. fasciatus</i>	0	1	2	2	0	1
蜂巢石斑鱼	<i>E. merra</i>	2	3	1	2	0	1
鲑点石斑鱼	<i>E. longispinis</i>	0	1	0	1	0	1
布氏石斑鱼	<i>E. bleekeri</i>	0	1	0	1	0	1
褐点石斑鱼	<i>E. fuscoguttatus</i>	2	3	2	3	0	1
鞍带石斑鱼	<i>E. lanceolatus</i>	2	3	1	2	0	1
斜带石斑鱼	<i>E. coioides</i>	4	3	1	2	0	1
棕斑石斑鱼	<i>E. corallicola</i>	0	1	0	1	0	1
红九棘鲈	<i>C. sonnerati</i>	1	2	0	1	0	1
斑鳃棘鲈	<i>P. maculatus</i>	0	1	0	1	0	1
豹纹鳃棘鲈	<i>P. leopardus</i>	8	3	3	3	1	2

2.2 聚类分析

从属水平来看, 线粒体 3 个基因以及联合基因序列计算的遗传距离均为石斑鱼属与九棘鲈属的最小, 与鳃棘鲈属的最大, 表明石斑鱼属与九棘鲈属有较近的亲缘关系 (表 5)。

从种水平来看, 不同基因序列得出的种间遗传距离不同: 13 种石斑鱼类种间遗传距离最大的分别为黑边石斑鱼与斑鳃棘鲈 (Cyt b、联合基因)、棕斑石斑鱼与斑鳃棘鲈 (16S)、鲑点石斑鱼与斑鳃棘鲈 (12S); 最小的分别为豹纹鳃棘鲈与斑鳃棘鲈 (Cyt b、12S、联合基因)、赤点石斑鱼与青石斑鱼 (16S) (表 6)。

另一方面, 就石斑鱼属 9 个种而言, 遗传距离最大的为鞍带石斑鱼与青石斑鱼 (Cyt b)、鞍带石斑鱼与黑边石斑鱼 (16S、联合基因)、褐点石斑鱼与黑边石斑鱼 (12S); 遗传距离最小的均为赤点石斑鱼与青石斑鱼。

根据线粒体 Cyt b 基因序列构建 NJ 和 MP 系统树 (图 1), 均表明 13 种石斑鱼类分别按所属的石斑鱼属、九棘鲈属和鳃棘鲈属各自聚类, 形成 3 个单系的聚类群。石斑鱼属与九棘鲈属亲缘关系较近, 首先聚类; 鳃棘鲈处于系统树的最基部。在 NJ 系统树, 石斑鱼属形成两个聚类群 (为方便描述起见, 简称为 A 群和 B 群), A 群由赤点石斑鱼、青石斑鱼、黑边石斑鱼、蜂巢石斑鱼、鲑点石斑鱼以及布氏石斑鱼组成, B 群则包含褐点石斑鱼、

表 5 13 种石斑鱼类属间的遗传距离

Table 5 Intergeneric genetic distance of 13 Epinepheline species

	E	C	P
E	----		
C	0.184 98	----	
P	0.228 45	0.201 04	----
a. Intergeneric genetic distance—Cyt b			
	E	C	P
E	----		
C	0.105 77	----	
P	0.164 28	0.162 70	----
b. Intergeneric genetic distance—16S			
	E	C	P
E	----		
C	0.067 68	----	
P	0.141 62	0.113 40	----
c. Intergeneric genetic distance—12S			
	E	C	P
E	----		
C	0.115 70	----	
P	0.176 40	0.158 20	----
d. Intergeneric genetic distance—combined genes			

(注: E = *Epinephelus*, C = *Cephalopholis*, P = *Plectropomus*)

表 6 13 种石斑鱼类种间的遗传距离
Table 6 Interspecies genetic distance of 13 Epinepheline species

种名	<i>E. lanceolatus</i>	<i>E. fuscoguttatus</i>	<i>E. coioides</i>	<i>E. corallicola</i>	<i>E. akaara</i>	<i>E. awoara</i>	<i>E. fasciatus</i>	<i>E. bleekeri</i>	<i>E. merra</i>	<i>E. longispinis</i>	<i>C. sonnerati</i>	<i>P. leopardus</i>
<i>E. lanceolatus</i>	----											
<i>E. fuscoguttatus</i>	0.120 33	----										
<i>E. coioides</i>	0.144 19	0.126 53	----									
<i>E. corallicola</i>	0.148 64	0.124 69	0.103 80	----								
<i>E. akaara</i>	0.159 51	0.123 28	0.150 40	0.167 87	----							
<i>E. awoara</i>	0.191 86	0.131 99	0.134 74	0.170 72	0.101 16	----						
<i>E. fasciatus</i>	0.189 06	0.161 36	0.191 00	0.174 50	0.181 42	0.155 38	----					
<i>E. bleekeri</i>	0.146 67	0.123 03	0.150 07	0.142 05	0.127 10	0.129 82	0.162 34	----				
<i>E. merra</i>	0.171 62	0.117 88	0.143 59	0.176 89	0.141 41	0.138 05	0.181 42	0.126 53	----			
<i>E. longispinis</i>	0.149 46	0.109 11	0.168 75	0.132 55	0.138 35	0.166 27	0.172 37	0.123 54	0.110 12	----		
<i>C. sonnerati</i>	0.196 32	0.168 08	0.177 77	0.201 28	0.184 47	0.174 60	0.233 76	0.162 10	0.183 90	0.174 35	----	
<i>P. leopardus</i>	0.223 47	0.201 77	0.214 20	0.211 42	0.237 76	0.224 31	0.229 71	0.204 30	0.226 84	0.230 25	0.185 64	----

a. Interspecies genetic distance—Cyt b

种名	<i>E. lanceolatus</i>	<i>E. corallicola</i>	<i>E. fuscoguttatus</i>	<i>E. merra</i>	<i>E. longispinis</i>	<i>E. akaara</i>	<i>E. awoara</i>	<i>E. fasciatus</i>	<i>E. bleekeri</i>	<i>E. coioides</i>	<i>C. sonnerati</i>	<i>P. leopardus</i>
<i>E. lanceolatus</i>	----											
<i>E. corallicola</i>	0.038 43	----										
<i>E. fuscoguttatus</i>	0.045 68	0.029 37	----									
<i>E. merra</i>	0.071 78	0.054 81	0.060 21	----								
<i>E. longispinis</i>	0.062 32	0.049 18	0.056 54	0.025 89	----							
<i>E. akaara</i>	0.056 75	0.040 10	0.045 51	0.029 48	0.024 12	----						
<i>E. awoara</i>	0.058 72	0.043 79	0.047 40	0.031 23	0.029 48	0.010 22	----					
<i>E. fasciatus</i>	0.081 51	0.067 86	0.067 77	0.062 32	0.051 15	0.043 85	0.042 08	----				
<i>E. bleekeri</i>	0.060 36	0.049 13	0.049 08	0.045 56	0.040 14	0.029 40	0.034 82	0.056 83	----			
<i>E. coioides</i>	0.047 59	0.031 27	0.040 14	0.047 29	0.040 06	0.031 12	0.029 37	0.058 41	0.047 29	----		
<i>C. sonnerati</i>	0.106 41	0.102 48	0.096 15	0.114 47	0.110 49	0.098 45	0.098 57	0.125 21	0.098 24	0.100 46	----	
<i>P. leopardus</i>	0.154 74	0.170 37	0.159 11	0.170 03	0.165 42	0.170 03	0.167 96	0.174 52	0.161 46	0.158 96	0.161 63	----

b. Interspecies genetic distance—16S

种名	<i>E. awoara</i>	<i>E. akaara</i>	<i>E. bleekeri</i>	<i>E. fasciatus</i>	<i>E. merra</i>	<i>E. longispinis</i>	<i>E. fuscoguttatus</i>	<i>E. coioides</i>	<i>E. lanceolatus</i>	<i>E. corallicola</i>	<i>C. sonnerati</i>	<i>P. leopardus</i>
<i>E. awoara</i>	----											
<i>E. akaara</i>	0.018 71	----										
<i>E. bleekeri</i>	0.050 47	0.038 13	----									
<i>E. fasciatus</i>	0.050 31	0.040 47	0.050 31	----								
<i>E. merra</i>	0.037 94	0.028 28	0.043 02	0.045 25	----							
<i>E. longispinis</i>	0.057 90	0.047 95	0.058 10	0.055 21	0.023 54	----						
<i>E. fuscoguttatus</i>	0.073 73	0.063 25	0.076 08	0.086 47	0.076 23	0.078 74	----					
<i>E. coioides</i>	0.070 82	0.065 61	0.078 47	0.078 23	0.068 10	0.067 99	0.033 20	----				
<i>E. lanceolatus</i>	0.078 60	0.068 10	0.080 99	0.078 13	0.075 83	0.075 71	0.040 53	0.035 60	----			
<i>E. corallicola</i>	0.073 32	0.065 51	0.078 34	0.070 49	0.073 20	0.073 09	0.038 06	0.028 28	0.028 33	----		
<i>C. sonnerati</i>	0.080 99	0.075 71	0.083 65	0.083 20	0.078 23	0.086 06	0.052 91	0.047 87	0.042 82	0.045 31	----	
<i>P. leopardus</i>	0.149 61	0.140 37	0.158 13	0.151 35	0.157 47	0.163 26	0.117 90	0.129 20	0.117 77	0.123 37	0.112 48	----

c. Interspecies genetic distance—12S

种名	<i>E. lanceolatus</i>	<i>E. fuscoguttatus</i>	<i>E. coioides</i>	<i>E. corallicola</i>	<i>E. akaara</i>	<i>E. awoara</i>	<i>E. fasciatus</i>	<i>E. bleekeri</i>	<i>E. merra</i>	<i>E. longispinis</i>	<i>C. sonnerati</i>	<i>P. leopardus</i>
<i>E. lanceolatus</i>	----											
<i>E. fuscoguttatus</i>	0.064 90	----										
<i>E. coioides</i>	0.070 37	0.061 83	----									
<i>E. corallicola</i>	0.065 09	0.058 08	0.050 50	----								
<i>E. akaara</i>	0.088 42	0.072 57	0.074 07	0.082 16	----							
<i>E. awoara</i>	0.100 74	0.078 91	0.070 93	0.087 00	0.037 83	----						
<i>E. fasciatus</i>	0.109 94	0.099 41	0.100 23	0.097 81	0.079 66	0.075 61	----					
<i>E. bleekeri</i>	0.090 61	0.077 91	0.085 01	0.083 53	0.058 85	0.065 75	0.083 62	----				
<i>E. merra</i>	0.100 45	0.081 26	0.080 21	0.093 36	0.059 55	0.062 50	0.089 09	0.067 20	----			
<i>E. longispinis</i>	0.090 61	0.078 07	0.083 40	0.079 54	0.062 57	0.075 02	0.085 14	0.068 76	0.048 32	----		
<i>C. sonnerati</i>	0.111 00	0.102 78	0.105 42	0.111 29	0.115 28	0.114 44	0.141 49	0.111 78	0.122 63	0.120 93	----	
<i>P. leopardus</i>	0.162 54	0.158 47	0.165 42	0.167 42	0.179 86	0.178 30	0.183 02	0.172 70	0.182 30	0.183 09	0.153 30	----

d. Intergeneric genetic distance—combined genes

鞍带石斑鱼、斜带石斑鱼以及棕斑石斑鱼。MP 系统树支持了 B 群的聚类, 而 A 群中的种类则表现为阶梯式的姐妹枝。在两种系统树中, 两两相聚且有相对较高的置信值 (>50) 有: 赤点石斑鱼和青石斑鱼、蜂巢石斑鱼与鲑点石斑鱼、斜带石斑鱼与棕斑石斑鱼, 表明它们具有较近的亲缘关系。

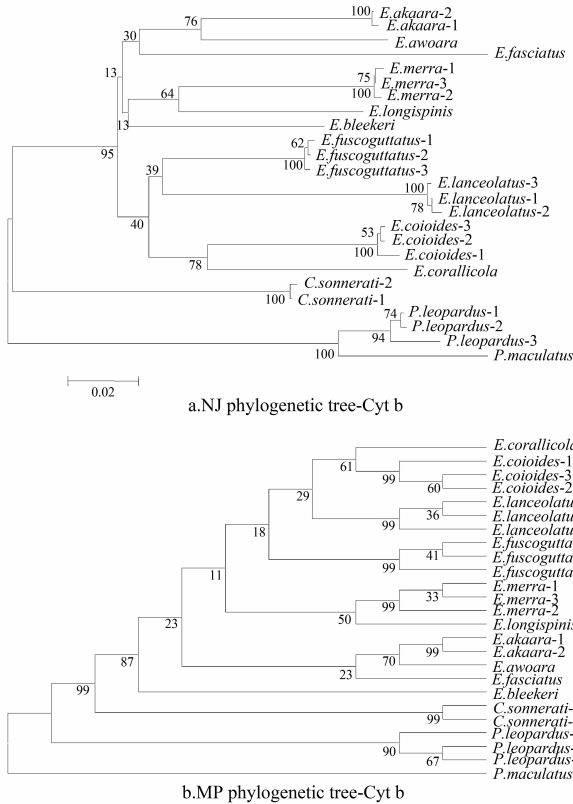


图 1 基于 13 种石斑鱼类 Cyt b 基因序列的 NJ 和 MP 系统树

Fig. 1 NJ and MP phylogenetic trees based on Cyt b gene sequences of 13 Epinepheline species

基于 16S 和 12S rRNA 基因序列构建的 NJ 和 MP 系统树 (图 2, 3) 的拓扑结构与线粒体 Cyt b 基因的相似, 如 13 个种各自按所属聚类形成 3 个单系群, 三个属在系统树所处的位置以及石斑鱼属形成的两个聚类群等。不同之处在于石斑鱼属中一些种所处的位置, 如在 16S - NJ 系统树中, 斜带石斑鱼与 A 群相聚 (而在 Cyt b/12S - NJ 系统树中斜带石斑鱼归类于 B 群); 此外 16S 和 12S - MP 系统树支持的是 A 群的聚类, 而 B 群中的种类则表现为阶梯式的姐妹枝; 16S 和 12S 系统树均不支持斜带石斑鱼与棕斑石斑鱼具有较近的亲缘关系。

相比较与上述单个基因所构建的系统树, 联合基因序列的系统树明显具有更好的一致性 (NJ 和

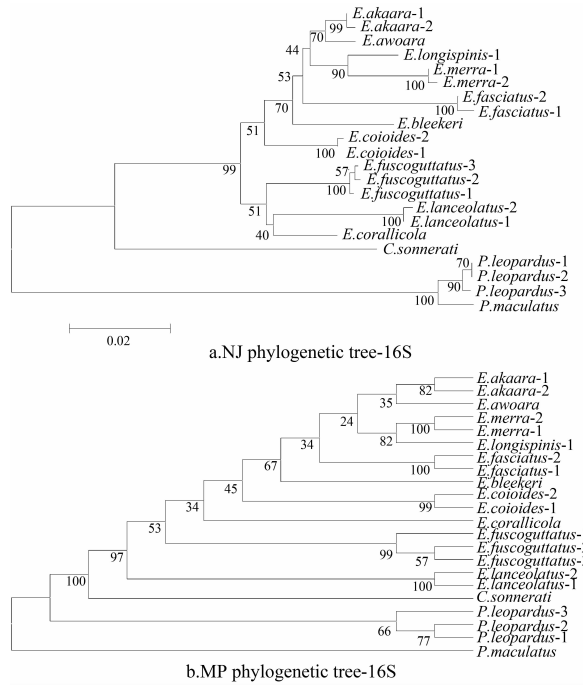


图 2 基于 13 种石斑鱼类 16S rRNA 基因序列的 NJ 和 MP 系统树

Fig. 2 NJ and MP phylogenetic trees based on 16S rRNA gene sequences of 13 Epinepheline species

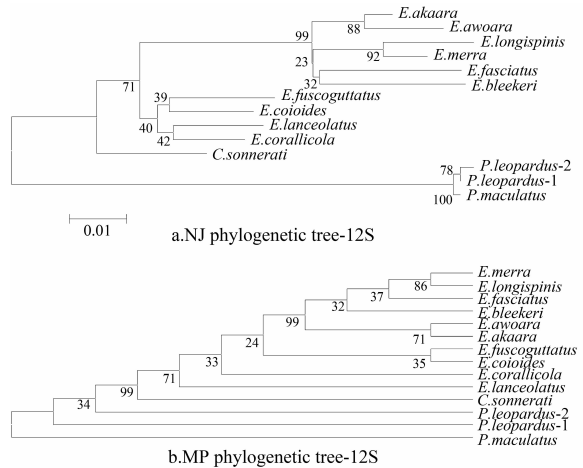


图 3 基于 13 种石斑鱼类 12S rRNA 基因序列的 NJ 和 MP 系统树

Fig. 3 NJ and MP phylogenetic trees based on 12S rRNA gene sequences of 13 Epinepheline species

MP 的拓扑结构基本一致) 和更高的置信度 (系统树分枝的置信值高) (图 4)。联合基因系统树不仅支持 13 个种各自按所属聚类形成 3 个单系群以及 3 个属在系统树所处的位置, 而且以极高的置信值 (100) 支持石斑鱼属的两个聚类群。此外它还支持了 Cyt b 系统树分析得到的赤点石斑鱼和青石斑鱼、蜂巢石斑鱼与鲑点石斑鱼、斜带石斑鱼与棕斑

石斑鱼具有较近的亲缘关系的结论。

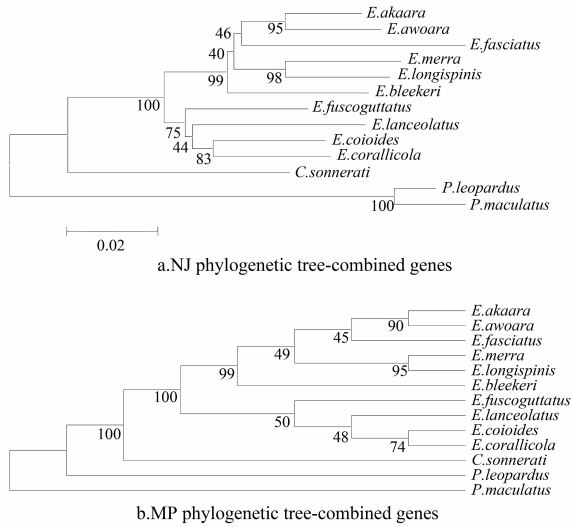


图 4 基于 13 种石斑鱼类联合基因序列的 NJ 和 MP 系统树

Fig. 4 NJ and MP phylogenetic trees based on combined gene sequences of 13 Epinepheline species

3 讨论

3.1 线粒体基因序列变异与石斑鱼类的种类鉴定

准确鉴定石斑鱼类的种类是进一步研究其分类关系和系统演化过程的基础；在生产实践中，对石斑鱼类的产品交易、鱼类自然资源的保护和利用也有着重要的意义。鱼类分类学家 Heemstra 和 Randall^[1]在编著的《Groupers of the world》引言的第一段即指出：“准确种类鉴定的重要性对于每一个生物学家是显而易见的，将得到养殖者和分类学家的重视，同时对正确管理该物种的渔业资源也极为重要”。然而，由于石斑鱼类的种类繁多、形态类似、体色易变等，使得基于形态特征的传统种类鉴定较为复杂困难，并出现了许多鉴定错误的事例。分子标记（如线粒体基因序列）反映的是物种内在的遗传差异，不受外在形态的影响，故已经成为鱼类种类鉴定的有力工具^[18-19]。

文章中对 13 种石斑鱼类的线粒体 Cyt b、16S rRNA 以及 12S rRNA 基因的部分片段进行了扩增和测序，结果表明：石斑鱼类种间基因序列存在较大的变异，如 Cyt b 基因片段的变异位点高达 153 个，更为保守的 rRNA 基因也存在 139（16S）和 88（12S）个变异位点；另一方面，13 种石斑鱼类种内基因序列的变异较小，在 Cyt b 和 16S rRNA 基因中均有近半数（6~7 种）石斑鱼类种内序列

完全相同，而其余种类通常只有 1~3 个变异位点。12S rRNA 基因种内变异极小，除一种石斑鱼（豹纹鳃棘鲈）种内存在 1 个位点差异外，其余石斑鱼种内序列相同。显然，种间较大的遗传差异以及极小的种内变异使得这些线粒体基因十分适合用于石斑鱼类的鉴定。通过线粒体基因的变异位点，就可以非常准确的鉴别这 13 种石斑鱼类。

通过计算变异位点数、简约信息位点数、核苷酸多样性、平均核苷酸差异数等遗传信息指数，可知 12S 基因的保守性最大，16S 次之，而 Cyt b 基因保守性最小。Cyt b 基因相对较小的保守性使其能提供更多用于种类鉴定的变异位点，因而作为鉴定标记较 rRNA 基因更为准确。但这并不表明保守性越小的基因就更适合用于石斑鱼类的种类鉴定。

3.2 13 种石斑鱼类的系统进化及亲缘关系分析

近年来，许多鱼类学者已经从单纯的分类区系研究转向鱼类系统进化方面。他们综合利用形态学、生物化学、分子生物学等方法来辨别和分析祖征和离征，藉以探求鱼类系谱，探索共同起源，真正反映出彼此间的亲缘关系^[20]。

文章中根据所测定的 13 种石斑鱼类的线粒体 Cyt b、16S rRNA 以及 12S rRNA 基因的部分片段，计算遗传距离并构建 NJ 和 MP 系统树进行亲缘关系分析。结果表明，3 个基因构建的系统树拓扑结构大体一致，如石斑鱼属、九棘鲈属和鳃棘鲈属在系统树所处的位置以及石斑鱼属形成的两个聚类群等。但在石斑鱼属中，一些种类在系统树中所处的位置随基因的不同或建树方法的不同而改变，且分枝节点的置信值较低。

单个基因（特别是保守性较高的基因）能提供的遗传信息往往较为有限^[21]。在无其它背景资料的情况下，为了获得较为客观的系统树，不少学者主张线粒体基因组不同区域的多组序列数据的联合分析^[22]。Miller 等^[23]研究发现，多基因联合比单独进行分析得到的系统树分辨率及置信值更高，且被形态性状所支持，即使基因间的进化速率差异较大。随后更多研究发现同样现象，支持了将同样样本所有具有系统发育信息的基因合并在一起进行分析，可以获得更真实系统进化关系^[24-25]。

文章中将所测序的线粒体 3 个基因进行联合分析。相比较单个基因，联合基因序列构建的系统树明显具有更好的一致性（NJ 和 MP 的拓扑结构基本一致）和更高的置信度（系统树分枝的置信值高）。结合本文的结果与上述其他学者的研究结果，作者认为基因联合分析所得到的石斑鱼类系统

进化关系可信度更高, 现描述如下: 13 种石斑鱼类分别按所属的石斑鱼属、九棘鲈属和鳃棘鲈属各自聚类, 形成 3 个单系的聚类群。石斑鱼属与九棘鲈属亲缘关系较近, 首先聚类。石斑鱼属处于系统树的顶端, 表明其最近分化的进化地位; 鳃棘鲈处于系统树的最基部, 表明其为较为原始的种类。石斑鱼属形成两个聚类群, 一枝由赤点石斑鱼、青石斑鱼、黑边石斑鱼、蜂巢石斑鱼、鲑点石斑鱼以及布氏石斑鱼组成, 另一枝则包含褐点石斑鱼、鞍带石斑鱼、斜带石斑鱼以及棕斑石斑鱼。其中, 赤点石斑鱼和青石斑鱼、蜂巢石斑鱼与鲑点石斑鱼、斜带石斑鱼与棕斑石斑鱼两两相聚且有相对较高的置信值, 表明它们具有较近的亲缘关系。

参考文献:

- [1] HEEMSTRA P C, RANDALL J E. Groupers of the world (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae): An annotated and illustrated catalogue of the grouper, rock cod, hind, coral grouper and lyretail species known to date [M]. FAO Fisheries Synopsis, No 125, Vol 16. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1993.
- [2] IUCN. IUCN Red List Categories and Criteria [M]. Ver 3.1. Gland and Cambridge: IUCN Species Survival Commission, 2001.
- [3] 蒙子宁, 杨丽萍, 吴丰, 等. 斜带石斑鱼、赤点石斑鱼 RAPD 和线粒体 Cyt b 基因序列变异分析 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2007, 1(46): 75 - 80.
- [4] SMITH C L. A revision of the American Groupers: *Epinephelus* and allied genera [J]. Bull Am Mus Nat Hist, 1971, 146(2): 67 - 242.
- [5] RANDALL J E, BEN-TUVIA A. A review of the groupers (Pisces: Serranidae: Epinephelinae) of the Red Sea, with description of a new species of *Cephalopholis* [J]. Bulletin of marine Science, 1983, 33(2): 373 - 426.
- [6] JOHNSON G D. *Nippon spinosus*, a primitive epinepheline serranid: corroborative evidence from the larvae [J]. Japanese Journal of Ichthyology, 1988, 35(1): 7 - 18.
- [7] BALDWIN C C, JOHNSON D G. Phylogeny of the Epinephelinae (Teleostei: Serranidae) [J]. Bulletin of Marine Science, 1993, 52(1): 240 - 283.
- [8] NELSON J S. Fishes of the World [M]. 4th ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 2006.
- [9] LIU Z J, CORDES J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics [J]. Aquaculture, 2004, 238(4): 1 - 37.
- [10] 杨慧荣, 赵会宏, 蒙子宁, 等. 赤眼鳟线粒体 D-loop 和 Cyt b 基因序列的对比分析 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2012, (51)5: 100 - 107.
- [11] 高天翔, 毕潇潇, 赵林林, 等. 基于线粒体 Cyt b 基因全序列的松江鲈群体遗传结构分析 [J]. 水生生物学学报, 2013, 37(2): 199 - 207.
- [12] MIYA M, NISHIDA M. Molecular phylogenetic perspective on the evolution of the deep-sea fish genus *Cyclothone* (Stomiiformes: Gonostomatidae) [J]. Ichthyological Research, 1996, 43(4): 375 - 398.
- [13] MORITA T. Molecular Phylogenetic Relationships of the Deep-Sea Fish Genus *Coryphaenoides* (Gadiformes: Macrouridae) Based on Mitochondrial DNA [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1999, 13(3): 447 - 454.
- [14] WATERS J M, WALLIS G P. Mitochondrial DNA phylogenetics of the *Galaxias vulgaris* complex from South Island, New Zealand: rapid radiation of a species flock [J]. Journal of Fish Biology, 2001, 58(4): 1166 - 1180.
- [15] CRAIG M T, PONDALLA D J, FRANCK J P C, et al. On the status of the serranid fish genus *Epinephelus*: evidence for paraphyly based upon 16S rDNA sequence [J]. Mol Phylogenet, 2001, 19: 121 - 130.
- [16] 丁少雄, 王颖汇, 王军, 等. 基于 16S rDNA 部分序列探讨中国近海 30 种石斑鱼类的分子系统进化关系 [J]. 动物学报, 2006, 52(3): 504 - 513.
- [17] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning [M]. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989.
- [18] SUNEETHA K B, DAHLE G, NÆVDAL G. Analysis of mitochondrial DNA sequences from two Maurolicus taxa: evidence for separate species? [J]. Journal of fish biology, 2000, 57(6): 1605 - 1609.
- [19] HAN Z Q, GAO T X, YANAGIMOTO L, et al. Genetic population structure of *Nibea albiflora* in the yellow and east China seas [J]. Fisheries Science, 2008, 74(3): 544 - 552.
- [20] 孟庆文, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [21] CAO Y, SORENSON M D, KUMAZAWA Y, et al. Phylogenetic position of turtles among amniotes: evidence from mitochondrial and nuclear genes [J]. Gene, 2000, 259(1): 139 - 148.
- [22] WIENS J J, REEDER T W. Combining data sets with different numbers of taxa for phylogenetic analysis [J]. Systematic Biology, 1995, 44(4): 548 - 558.
- [23] MILLER J S, BROWER A V, DESALLE R. Phylogeny of the neotropical moth tribe Josiini (Notodontidae: Dioptiinae): comparing and combining evidence from DNA sequences and morphology [J]. Biological Journal of the Linnean Society, 1997, 60(2): 297 - 316.
- [24] WIENS J J. Combining data sets with different phylogenetic histories [J]. Systematic Biology, 1998, 47(4): 568 - 581.
- [25] OBERMILLER L E, PFEILER E. Phylogenetic relationships of elopomorph fishes inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 26(2): 202 - 214.