

# 中国南方海域 4 种石斑鱼的遗传多样性 及分子系统发生关系的分析

吕锋骅<sup>①</sup> 韩洁<sup>①\*</sup> 董颖<sup>①③</sup> 蔡厚才<sup>②</sup>

(<sup>①</sup> 生物多样性与生态工程教育部重点实验室 北京师范大学生命科学院 北京 100875;

<sup>②</sup> 南麂列岛国家级海洋自然保护区 温州 325014; <sup>③</sup> 北京市水产科学研究所 北京 100068)

**摘要:**对中国南方海域的青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*)、赤点石斑鱼 (*E. akaara*)、橙点石斑鱼 (*E. bleekeri*) 及蜂巢石斑鱼 (*E. merra*) 进行了遗传多样性和分子系统发生关系的分析。对 9 个微卫星 DNA 标记的基因型测定结果进行计算,发现这 4 个地理分布重叠且形态相似的石斑鱼均具有较丰富的遗传多样性,其平均等位基因数、平均多态信息含量 (PIC)、平均观测杂合度 ( $H_o$ ) 及平均期望杂合度 ( $H_e$ ) 的取值范围分别为  $(8.22 \pm 5.02) \sim (18.67 \pm 9.38)$ 、 $(0.56 \pm 0.21) \sim (0.83 \pm 0.13)$ 、 $(0.62 \pm 0.03) \sim (0.85 \pm 0.02)$  和  $(0.60 \pm 0.07) \sim (0.86 \pm 0.04)$ 。经哈迪-温伯格平衡 (HWE) 检验,除橙点石斑鱼外,其他 3 种鱼的微卫星 DNA 位点都基本符合平衡。利用微卫星 DNA 标记和线粒体细胞色素 *b* 基因对这 4 种鱼重建的分子系统树均显示,青石斑鱼与赤点石斑鱼的亲缘关系较近。以微卫星 DNA 标记对所研究石斑鱼的全部个体进行贝叶斯聚类分析的结果表明 4 个鱼物种之间的分化关系明确。

**关键词:**石斑鱼;微卫星;细胞色素 *b* 基因;遗传多样性;分子系统发生

中图分类号:Q953 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2010)06-09-10

## Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships of Four Grouper Species in Genus *Epinephelus* Sampled from Sea Area of Southern China

LÜ Feng-Hua<sup>①</sup> HAN Jie<sup>①\*</sup> DONG Ying<sup>①③</sup> CAI Hou-Cai<sup>②</sup>

(<sup>①</sup> Ministry of Education Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering, College of Life Sciences,

Beijing Normal University, Beijing 100875; <sup>②</sup> Nanji Islands National Marine Natural Reserve Administration, Wenzhou 325014;

<sup>③</sup> Beijing Fisheries Research Institute, Beijing 100068, China)

**Abstract:** Genetic diversity and phylogenetic relationships of four morphologically similar and sympatric grouper species, namely Yellow grouper (*Epinephelus awoara*), Hongkong grouper (*E. akaara*), Duskytail grouper (*E. bleekeri*) and Honeycomb grouper (*E. merra*) were investigated. Specimens were sampled from sea area of southern China. Calculation based on genotypes of nine microsatellite DNA loci showed that the genetic diversity of the four grouper species was high with the mean number of alleles, average polymorphic informative content (PIC), average observed heterozygosity ( $H_o$ ) and average expected heterozygosity ( $H_e$ ) being from  $8.22 \pm 5.02$  to  $18.67 \pm 9.38$ , from  $0.56 \pm 0.21$  to  $0.83 \pm 0.13$ , from  $0.62 \pm 0.03$  to  $0.85 \pm 0.02$ , and from  $0.60 \pm$

基金项目 浙江省温州市科技局研究项目 (No. S20070055), 北京师范大学博士学位论文培育基金项目 (No. 10420801);

\* 通讯作者, E-mail: jiehan@bnu.edu.cn;

第一作者介绍 吕锋骅,男,博士研究生;研究方向:海洋动物种群遗传学;E-mail: fenghualvbnu@gmail.com。

收稿日期:2010-04-30, 修回日期:2010-09-02

0.07 to  $0.86 \pm 0.04$ , respectively. Tests of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) demonstrated that, except for those of Duskytail grouper, most loci of the rest three grouper species were under equilibrium conditions. Phylogenetic trees reconstructed from both genotypes of microsatellite DNA loci and partial mitochondrial cytochrome *b* gene (mtDNA Cyt *b*) sequences indicated that Yellow grouper and Hongkong grouper were more closely related among the four species. Furthermore, Bayesian cluster on the genotypes of nine microsatellite DNA loci for all individuals of the four grouper species supported their genetic distinctiveness.

**Key words:** Grouper; Microsatellite; mtDNA Cyt *b*; Genetic diversity; Molecular phylogeny

石斑鱼是世界上最重要的海洋经济鱼类之一,它们广泛栖息于全球热带和亚热带的岛礁海域,在中国记录有 46 种,主要分布在南海和东海南部<sup>[1]</sup>。人类活动造成的海洋环境污染及过度捕捞已危及石斑鱼的生存<sup>[2-3]</sup>。石斑鱼的生活习性和生活环境高度相似,使它们在外形上呈现趋同性,而传统形态学分类所依据的斑带、条纹和颜色等都具有较大的变异性,这在一定程度上造成了分类鉴定的混乱,并给石斑鱼人工养殖生产中种苗的引进带来了困难<sup>[2-4]</sup>,同时也给自然资源的保护增加了难度。针对以上问题,我们以在中国南方海域有重叠分布区且形态接近的 4 个鱼种,即青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*)、赤点石斑鱼 (*E. akaara*)、橙点石斑鱼 (*E. bleekeri*) 和蜂巢石斑鱼 (*E. merra*) 作为研究对象,探讨其遗传多样性和分子系统发生关系,以期为合理地利用和保护石斑鱼自然资源、有效地开展人工繁育等提供基础资料。

## 1 材料与方法

**1.1 样品采集、形态鉴定和基因组 DNA 的提取** 4 种石斑鱼分别采自福建省东山县和海南省三亚市及西沙永兴岛(表 1),首先依据形态学特征进行鱼种鉴定<sup>[5]</sup>,而后剪取每尾鱼背鳍约 500 mg,室温保存于 95% 的乙醇中,24 h 内更换乙醇一次。在实验室采用有机法提取基因组 DNA<sup>[6]</sup>。

**1.2 样品的分子鉴定** 随机选取形态学上鉴定为青石斑鱼、赤点石斑鱼和橙点石斑鱼的个体各一尾,以在其他硬骨鱼中成功扩增线粒体细胞色素 *b* (mtDNA Cyt *b*) 基因部分序列的正

向引物 L14724 (5'-CGAACGTTGATATGAA-AAACCATCGTTG-3')<sup>[7]</sup> 和反向引物 H15149 (5'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3')<sup>[8]</sup> 对其基因组 DNA 进行 PCR 扩增。反应体系为 40  $\mu$ l,其中包括模板 DNA 120 ng,正反向引物各 0.15  $\mu$ mol/L,1  $\times$  buffer、MgCl<sub>2</sub> 2.0 mmol/L,4 种 dNTP 各 0.2 mmol/L、*rTaq* 酶 6 U(大连宝生物工程有限公司)。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;92 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 退火 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,循环 35 次;72 $^{\circ}$ C 后延伸 7 min。随机选取形态学上鉴定为蜂巢石斑鱼的个体 3 尾,以在斜带石斑鱼 (*E. coioides*) 和赤点石斑鱼中成功使用过的 mtDNA Cyt *b* 基因部分序列的 PCR 正向引物 L13573-ND (5'-AAAYATRCTYGGCTTYTCCCMATAAT-3') 和反向引物 H15090-Cyt *b* (5'-TAWGAAAAGTAKG-GGTGGAAGGA-3')<sup>[9]</sup> 对其基因组 DNA 进行扩增,引物中 Y、R、M、W 和 K 为兼并碱基代码,其中 Y = C/T, R = A/G, M = A/C, W = A/T, K = G/T。反应体系为 40  $\mu$ l,其中包括模板 DNA 80 ng,正反向引物各 0.10  $\mu$ mol/L,1  $\times$  buffer、MgCl<sub>2</sub> 2.0 mmol/L,4 种 dNTP 各 0.2 mmol/L, *ExTaq* 酶 6 U(大连宝生物工程有限公司)。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,53 $^{\circ}$ C 退火 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,循环 35 次;72 $^{\circ}$ C 后延伸 7 min。本研究所述 PCR 反应均在 PTC-200 Peltier Thermal Cycler 型 PCR 仪 (MJ Research Inc., USA) 上进行。反应产物经 1% 琼脂糖 (Biowest, Spain) 凝胶电泳检测后,利用胶回收试剂盒 (Omega Bio-tek, Inc.) 进行纯化回收,并双向序列测定(上海生工生物工程有限公司),测序反应引物与 PCR 反应所用一致。

通过美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 网站的 BLAST 程序对所获 mtDNA Cyt *b* 基因部分

序列在数据库中进行相似性搜索,核实形态学的鉴定结果。

表 1 4 种石斑鱼的样品采集信息及分布区域

Table 1 Sampling information and distribution rang of four grouper species

物种 Species	样本数量 Sample size	采集时间 (年-月) Collection time (Year-month)	采集地点 Collection site	分布区域 <sup>[5]</sup> Rang of distribution
青石斑鱼 <i>Epinephelus awoara</i>	44	2008-12	福建东山	12° ~ 39°N, 110° ~ 143°E
赤点石斑鱼 <i>E. akaara</i>	41	2008-12	福建东山	20° ~ 39°N, 109° ~ 143°E
橙点石斑鱼 <i>E. bleekeri</i>	40	2008-01	海南三亚	32°N ~ 17°S, 48° ~ 136°E
蜂巢石斑鱼 <i>E. merra</i>	36	2008-01	海南西沙永兴岛	33°N ~ 31°S, 28°E ~ 129°W

### 1.3 微卫星 DNA 标记的筛选、基因型测定

利用已筛选出的赤点石斑鱼的 12 个多态微卫星 DNA 位点的 PCR 扩增引物 (表 2)<sup>[10]</sup>, 分别对其他 3 种石斑鱼的 3 ~ 5 尾个体的基因组 DNA 进行扩增。反应体系为 40  $\mu$ l, 其中包括模板 DNA 80 ng, 引物各 0.15  $\mu$ mol/L, 1  $\times$  buffer、MgCl<sub>2</sub> 2.0 mmol/L, 4 种 dNTP 各 0.2 mmol/L, rTaq 酶 6 U (大连宝生物工程有限公司)。反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 45 ~ 60℃ 退火 (表 2) 30 s 和 72℃ 延伸 45 s, 循环 30 次; 72℃ 后延伸 7 min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖 (Biowest, Spain) 凝胶电泳检测后, 利用胶回收试剂盒 (Omega Bio-tek, Inc.) 进行纯化回收, 然后以 pMD18-T 载体 (大连宝生物工程有限公司) 进行连接、克隆, 最后以 M13 正向引物进行 DNA 序列测定 (上海生工生物工程有限公司), 核实微卫星 DNA 的序列特征。

对 4 种石斑鱼的微卫星 DNA 位点的正向引物进行荧光标记, 以 10  $\mu$ l 的反应体系和上述微卫星 DNA 位点的 PCR 反应程序对所有样本的基因组 DNA 进行扩增, 10  $\mu$ l 的反应体系包括模板 DNA 20 ng, 引物各 0.15  $\mu$ mol/L, 1  $\times$  buffer、MgCl<sub>2</sub> 2.0 mmol/L, 4 种 dNTP 各 0.2 mmol/L 和 rTaq 酶 1.5 U (大连宝生物工程有限公司), PCR 反应完成后, 利用 ABI PRISM3100 型遗传分析仪 (Applied Biosystems, USA) 对扩增片段进行基因型测定。

1.4 数据分析 应用 Genepop 3.4<sup>[11]</sup> 软件计算各多态微卫星 DNA 位点的等位基因数

(number of alleles)、多态信息含量 (polymorphism information content, PIC)、观测杂合度 (observed heterozygosities, *Ho*) 和期望杂合度 (expected heterozygosities, *He*), 对各位点进行哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) 检验, 对检验结果进行邦佛伦尼校正 (Bonferroni correction)<sup>[12]</sup>, 在位点之间进行基因型连锁不平衡 (linkage disequilibrium, LD) 检验; 同时用 Dispan<sup>[13]</sup> 软件以邻接法 (neighbor-joining, NJ) 对 4 种鱼种间的奈氏标准遗传距离 (Nei's standard genetic distance, *Ds*) 重建系统发生树<sup>[14]</sup>, 以自举检验 (bootstrap test) 检测聚类结果的可靠性; 用 Structure<sup>[15]</sup> 软件将 4 种鱼的全部个体随机分为 *K* = 1 ~ 4 类群, 各重复运行程序 10 次, 每次运行的 burn-in time 设定为 200 000, 重复次数设定为 2 000 000, 以判断个体聚类情况。

对用于石斑鱼分子鉴定的 6 条 mtDNA Cyt *b* 基因部分序列, 利用 MEGA 4.0<sup>[16]</sup> 软件以邻接法和最大简约法 (maximum parsimony, MP) 重建系统发生树; 在利用软件 Modeltest<sup>[17]</sup> 与 Mrmodeltest<sup>[18]</sup> 选择核苷酸替换的最适合模型基础上, 分别用 PAUP 4b10<sup>[19]</sup> 和 MrBayes<sup>[20]</sup> 以最大似然法 (maximum likelihood, ML) 与贝叶斯法 (Bayesian method) 重建系统发生树; 在用 mtDNA Cyt *b* 基因部分序列建树时, 以豹纹鳃棘鲈 (*Plectropomus leopardus*, GenBank accession no. AY950692) 和横斑鳃棘鲈 (*P. laevis*, GenBank accession no. AY950693) 作为外类群。

表 2 赤点石斑鱼 12 个多态微卫星 DNA 位点及其 PCR 扩增引物序列和退火温度<sup>[10]</sup>

Table 2 Twelve polymorphic microsatellite DNA loci in Hongkong grouper, their PCR primer sequences and annealing temperatures

位点 Locus	GenBank 登录号 GenBank accession no.	引物序列 Primer sequence (5' - 3')	重复序列结构 Repeat motif	退火温度(℃) Annealing temperature
CA2	EU117129	F: GACTTGATTGAGCAAAAATAAAGATG R: AGAGACGGTGCCACTAAATGAA	(CA) <sub>12</sub>	55.0
CA3	EU117130	F: ATGTGACACCTTGACAGGCAAGT R: GACCTTGATATTTTCATTGCTTG	(CA) <sub>18</sub>	45.0
CA6	EU117131	F: GTGTTGCTGGGGTTACTAATGAAG R: TTAGACACATTGTCACGATGGTCC	(CA) <sub>7</sub>	50.0
CT1	EU117132	F: AGCAAGAGCACAATAGCCAGAA R: CCATATGACAAAATGAGACATAAG	(TC) <sub>6</sub>	56.2
PM02	EU117133	F: GATCAGCCTGTTAGCCCTGGATAA R: CCCCTGGCCAAAGTCACAG	(CA) <sub>7</sub>	55.0
PM12	EU117134	F: AGAAAAAGCTCCACAACACAACAA R: GAGCCCCAGTCCCAAATATTG	(TG) <sub>9</sub>	55.0
RH_CA_001	EU117135	F: CGAGATAAGCCCTGGTGAAG R: AGTCCCGATGTGGTAACGAG	(CA) <sub>8</sub>	60.0
RH_CA_002	EU117136	F: CTCGTTACCACATCGGGACT R: AACACTGGCTGGTTGCACT	(AC) <sub>27</sub>	60.0
RH_CA_004	EU117137	F: GAGAACGACATTCCAGCACA R: TGTGTGACCAGAAACCAGGA	(CA) <sub>15</sub>	57.0
RH_CA_007	EU117138	F: CAGAAACATCTCCCCAAAA R: CTGGCAGAGCAATTAGAGCC	(AC) <sub>14</sub>	60.0
RH_CA_008	EU117139	F: AGTTGCCAGGTTACACGAG R: TTGGGTCCTGGCATTAGAG	(CA) <sub>18</sub>	57.0
RH_GATA_003	EU117140	F: GGGCAATTTGTTCTTCACA R: TGTCAATGCCACAGGATACA	(GATA) <sub>13</sub>	57.0

## 2 结果与分析

**2.1 鱼种的鉴定** 对测得的 4 种石斑鱼的 6 条 mtDNA *Cyt b* 基因部分序列进行比对,获得的序列长度均为 399 bp,无碱基插入或缺失现象,序列中共出现了 86 个变异位点,其中包括 39 个单一多态位点 (singleton polymorphic site) 47 个简约信息位点 (parsimony informative polymorphic site) (图 1)。在 NCBI 的数据库内进行相似性搜索的结果显示,4 种鱼的 mtDNA *Cyt b* 基因部分序列均与数据库内相同物种的对应序列为最佳匹配,证明对它们的形态学鉴定准确。

**2.2 微卫星 DNA 标记的筛选及遗传多样性分析** 在 12 对赤点石斑鱼的微卫星 DNA 位点的引物中,有 10 对在其余 3 种石斑鱼的基因组

DNA 中均能扩增出清晰的条带,位点 CA3 与 CT1 的引物在蜂巢石斑鱼中不能扩增。测序结果显示,扩增产物中均包含与赤点石斑鱼一致的微卫星 DNA 重复序列结构 (表 2);基因型测定结果显示,位点 PM12 在橙点石斑鱼种内无多态性。故在数据分析时,只采用了 9 个在 4 种石斑鱼中均能成功扩增并表现有多态性的微卫星 DNA 位点。

计算结果表明,这 9 个微卫星位点在 4 种石斑鱼中表现出遗传多样性的差异,其中多态信息含量、观测杂合度和期望杂合度都是以赤点石斑鱼最低,蜂巢石斑鱼最高 (表 3)。HWE 检验结果经邦佛伦尼校正后,橙点石斑鱼仍有 6 个位点显著偏离平衡 ( $P < 0.05$ ) 赤点石斑鱼则在所有位点均符合平衡 ( $P > 0.05$ ) (表 3);位点间基因型 LD 检验的结果显示,赤点石斑

表 3 4 种石斑鱼 9 个微卫星 DNA 位点的特征分析

Table 3 Characteristics of nine microsatellite DNA loci in the four grouper species

物种 Species	位点 Locus	等位基因 Allele		多态信息含量 Polymorphism information content (PIC)	观测杂合度 Observed heterozygosity ( <i>H<sub>o</sub></i> )	期望杂合度 Expected heterozygosity ( <i>H<sub>e</sub></i> )	<i>P</i>
		数目 Number	范围 (bp) Rang of size				
青石斑鱼 <i>Epinephelus awoara</i>	CA2	25	238 ~ 313	0.92	0.89	0.94	0.00*
	CA6	4	290 ~ 310	0.27	0.21	0.30	0.09
	PM02	6	170 ~ 180	0.64	0.73	0.70	0.78
	RH_CA_001	15	362 ~ 406	0.82	0.89	0.85	0.33
	RH_CA_002	27	129 ~ 187	0.94	0.93	0.96	0.20
	RH_CA_004	18	202 ~ 240	0.86	0.82	0.88	0.59
	RH_CA_007	16	311 ~ 351	0.87	0.96	0.89	0.91
	RH_CA_008	30	197 ~ 263	0.95	0.86	0.96	0.00*
	RH_GATA_003	27	204 ~ 292	0.95	0.84	0.96	0.15
	Mean ± SD	18.67 ± 9.38			0.80 ± 0.22	0.79 ± 0.02	0.83 ± 0.07
赤点石斑鱼 <i>E. akaara</i>	CA2	6	243 ~ 253	0.64	0.68	0.70	0.30
	CA6	2	290 ~ 300	0.16	0.20	0.18	1.00
	PM02	5	166 ~ 180	0.56	0.63	0.63	0.94
	RH_CA_001	8	384 ~ 404	0.30	0.32	0.31	0.76
	RH_CA_002	20	123 ~ 189	0.89	0.88	0.91	0.06
	RH_CA_004	6	198 ~ 210	0.63	0.73	0.68	0.09
	RH_CA_007	9	317 ~ 335	0.69	0.88	0.74	0.58
	RH_CA_008	10	203 ~ 225	0.59	0.54	0.62	0.08
	RH_GATA_003	8	208 ~ 236	0.58	0.68	0.64	0.08
	Mean ± SD	8.22 ± 5.02			0.56 ± 0.21	0.62 ± 0.03	0.60 ± 0.07
橙点石斑鱼 <i>E. bleekeri</i>	CA2	8	238 ~ 263	0.63	0.45	0.69	0.00*
	CA6	17	290 ~ 340	0.84	0.83	0.87	0.22
	PM02	4	172 ~ 180	0.45	1.00	0.55	0.00*
	RH_CA_001	13	384 ~ 420	0.47	0.38	0.49	0.00*
	RH_CA_002	8	111 ~ 137	0.70	0.59	0.75	0.01*
	RH_CA_004	9	196 ~ 220	0.58	0.85	0.65	0.00*
	RH_CA_007	20	309 ~ 361	0.88	0.87	0.90	0.55
	RH_CA_008	3	213 ~ 235	0.19	0.23	0.21	1.00
	RH_GATA_003	4	208 ~ 220	0.41	1.00	0.5311	0.00*
	Mean ± SD	9.56 ± 5.98			0.57 ± 0.22	0.69 ± 0.02	0.62 ± 0.07
蜂巢石斑鱼 <i>E. merra</i>	CA2	23	241 ~ 295	0.93	0.94	0.95	0.34
	CA6	23	242 ~ 358	0.94	0.89	0.96	0.01*
	PM02	6	175 ~ 197	0.72	0.86	0.77	0.93
	RH_CA_001	25	372 ~ 426	0.93	0.89	0.94	0.10
	RH_CA_002	18	113 ~ 145	0.91	0.86	0.93	0.09
	RH_CA_004	16	192 ~ 240	0.86	0.78	0.88	0.24
	RH_CA_007	7	299 ~ 317	0.55	0.67	0.63	0.25
	RH_CA_008	15	197 ~ 241	0.83	0.89	0.86	0.55
	RH_GATA_003	16	192 ~ 264	0.79	0.92	0.81	0.95
	Mean ± SD	16.56 ± 6.73			0.83 ± 0.13	0.85 ± 0.02	0.86 ± 0.04

*P* 为哈迪-温伯格平衡 (HWE) 检验时以马尔可夫链方法计算得到的概率值, \* 表示该位点经邦佛伦尼校正后仍显著偏离 HWE ( $P < 0.05$ )。

*P*: Probability values by the Markov chain method for the Hardy-Weinberg equilibrium test (HWE); \*: Locus showed significant deviation from the HWE after Bonferroni correction ( $P < 0.05$ ).

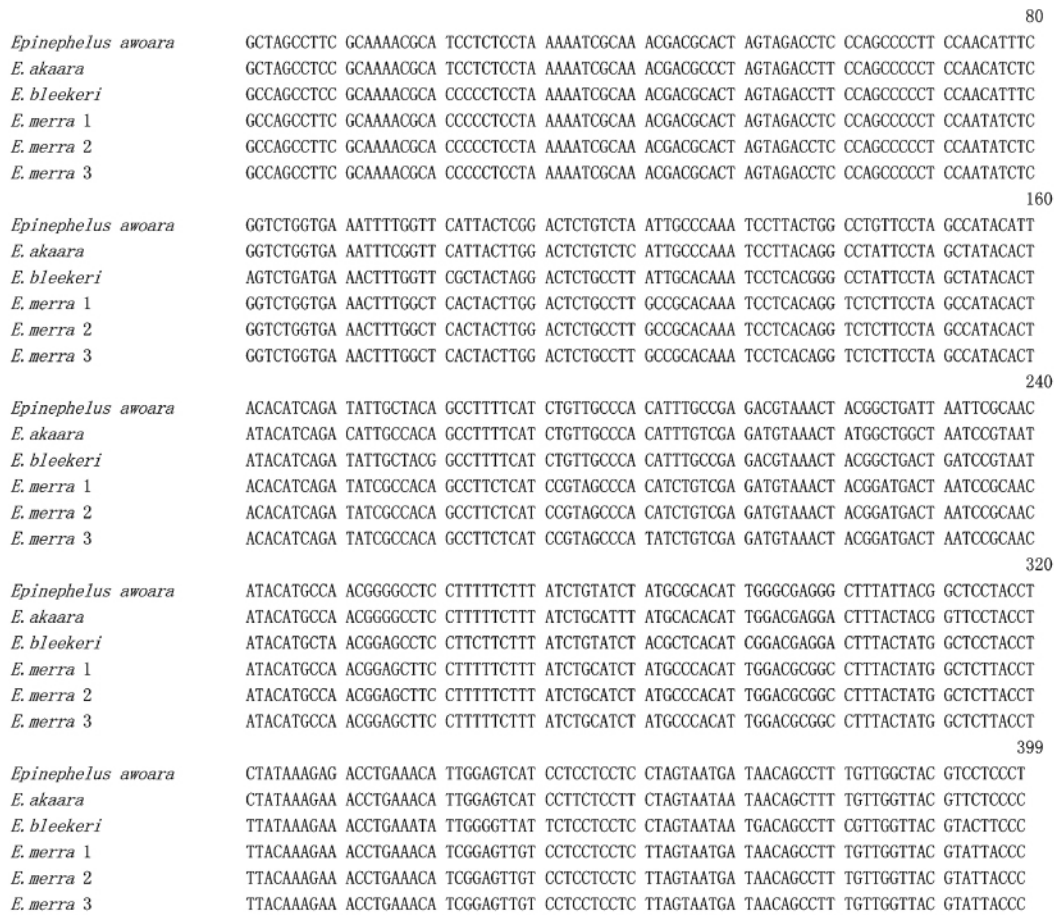


图 1 4 种石斑鱼的 mtDNA Cyt b 基因部分序列比对

Fig. 1 Alignment of partial mtDNA Cyt b sequences of four grouper species

*Epinephelus awoara*: 青石斑鱼; *E. akaara*: 赤点石斑鱼; *E. bleekeri*: 橙点石斑鱼; *E. merra*: 蜂巢石斑鱼。

鱼和蜂巢石斑鱼在 RH\_CA\_001 和 RH\_CA\_002 位点之间均处于连锁不平衡状态, 橙点石斑鱼在 PM02 和 RH\_GATA\_003 以及 RH\_CA\_004 和 RH\_CA\_008 位点之间连锁不平衡, 而青石斑鱼在所有位点间均为连锁平衡。

2.3 分子系统发生关系的重建 在以  $D_s$  (表 4) 对多态微卫星 DNA 位点基因型数据重建的 NJ 树中, 青石斑鱼与赤点石斑鱼聚为一枝, 与蜂巢石斑鱼和橙点石斑鱼的关系则相对较远 (图 2)。

表 4 4 种石斑鱼之间的奈氏标准遗传距离 ( $D_s$ )

Table 4 Nei's standard genetic distances ( $D_s$ ) among the four grouper species

物种 Species	青石斑鱼 <i>Epinephelus awoara</i>	赤点石斑鱼 <i>E. akaara</i>	橙点石斑鱼 <i>E. bleekeri</i>	蜂巢石斑鱼 <i>E. merra</i>
青石斑鱼 <i>Epinephelus awoara</i>				
赤点石斑鱼 <i>E. akaara</i>	0. 616 006			
橙点石斑鱼 <i>E. bleekeri</i>	1. 767 839	0. 921 782		
蜂巢石斑鱼 <i>E. merra</i>	1. 146 952	1. 821 739	1. 186 511	

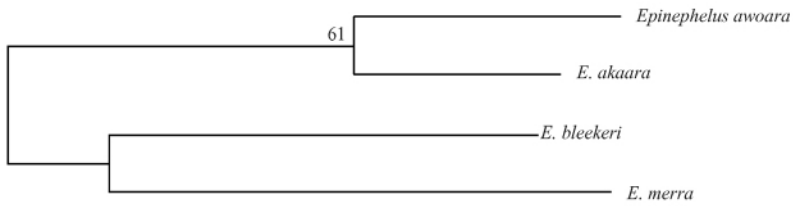


图 2 以 4 种石斑鱼之间的奈氏标准遗传距离 ( $D_s$ ) 重建的 NJ 树

Fig. 2 Phylogenetic NJ tree reconstructed by Nei's standard genetic distances among the four grouper species

*Epinephelus awoara*: 青石斑鱼; *E. akaara*: 赤点石斑鱼; *E. bleekeri*: 橙点石斑鱼; *E. merra*: 蜂巢石斑鱼。

枝点处数字为 1 000 次自举检验的百分比。The number above the branch represents bootstrap value (%) with 1 000 replicates.

对 mtDNA *Cyt b* 基因部分序列进行系统发育树重建时, NJ 法选择 Kimura 双参数模型<sup>[21]</sup> 作为核苷酸替换模型, ML 法采用最适合的 HKY + G 模型, gamma 分布的形状参数为

0.110 8<sup>[17]</sup>, 贝叶斯法用最合适的 GTR + G 模型。以 NJ 法、MP 法、ML 法和贝叶斯法重建的系统树中青石斑鱼与赤点石斑鱼均先聚为一枝 (图 3)。

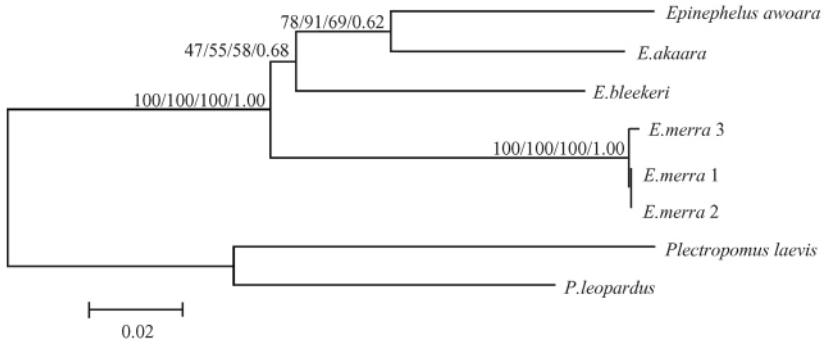


图 3 基于 4 种石斑鱼 mtDNA *Cyt b* 基因部分序列重建的系统树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 4 grouper species reconstructed based on partial mtDNA *Cyt b* sequences

*Epinephelus awoara*: 青石斑鱼; *E. akaara*: 赤点石斑鱼; *E. bleekeri*: 橙点石斑鱼; *E. merra*: 蜂巢石斑鱼; *Plectropomus leopardus*:

豹纹鳃棘鲈, GenBank accession no. AY950692; *P. laevis*: 横斑鳃棘鲈, GenBank accession no. AY950693。

枝点处的 4 个数字依次为最大似然法 (ML)、邻接法 (NJ) 和最大简约法 (MP) 1 000 次自举检验的百分比及贝叶斯法的后验概率。

The 4 numbers above the branch represent bootstrap values (%) with 1 000 replicates for ML, NJ,

MP and posterior probability for Bayesian method in order.

对所有石斑鱼个体多态微卫星 DNA 位点基因型数据的贝叶斯聚类分析结果显示, 当  $K = 4$  时的聚类结果最为可靠, 4 种石斑鱼被明确的归为 4 个类群, 种间的分化清晰 (图 4)。

### 3 讨论

对中国沿海石斑鱼及其近缘属物种种内及种间的遗传多样性和遗传分化关系已有不少研究<sup>[2-4, 22]</sup>, 其中许多都涉及到了赤点石斑鱼和青石斑鱼, 但鲜有对橙点石斑鱼和蜂巢石斑鱼的研究报道。

每个基因位点上等位基因的平均数也称为等位基因多样性, 是用来描述遗传多样性的重要指标。本研究 4 种石斑鱼 9 个微卫星 DNA 位点的等位基因数在 2 ~ 30 个之间, 平均等位基因数在 8.22 ~ 18.67 之间。多态信息含量是等位基因频率和数目变化的函数, 其取值范围在 0 ~ 1 之间, 当某一基因位点上只有一个等位基因时, 取值为 0, 而有无数个等位基因时, 取值为 1, 故常用于衡量微卫星 DNA 位点的变异程度<sup>[23]</sup>。本研究 4 种石斑鱼 9 个微卫星 DNA 位点中, 平均多态信息含量为 0.56 ~ 0.83 之

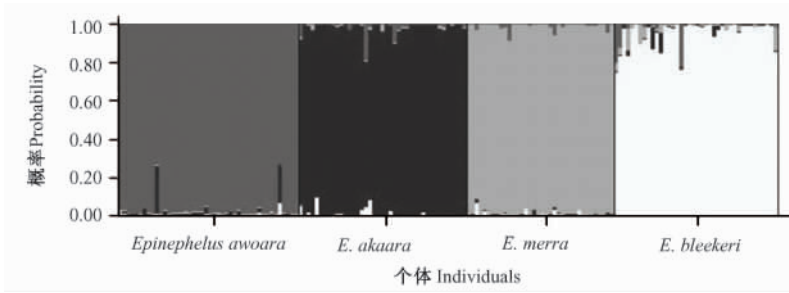


图 4 4 种石斑鱼的所有个体在 9 个微卫星位点的贝叶斯聚类分析结果

Fig. 4 Bayesian cluster of all individuals of the four grouper species by the nine microsatellite loci

*Epinephelus awoara*: 青石斑鱼; *E. akaara*: 赤点石斑鱼; *E. merra*: 蜂巢石斑鱼;

*E. bleekeri*: 橙点石斑鱼。垂直线的颜色和长度表示该个体可归为以相同颜色表示的鱼种的概率。

The segment lengths of the vertical line with different color show the probabilities of each individual assigned to species represented by the same color.

间。观测杂合度是一个基因位点上的杂合子数除以观察个体总数,与期望杂合度相比,它更易受样本大小因素的影响。期望杂合度是假定各基因座在符合 HWE 的前提下估算出的杂合度。种群的平均期望杂合度,又称种群基因多样性,它受样本取样的影响较小,常用它来度量群体的遗传多样性。本研究中 4 种石斑鱼各微卫星 DNA 位点的平均期望杂合度在 0.60 ~ 0.86 之间。综合来看,这 4 种石斑鱼的遗传多样性都较为丰富,其中青石斑鱼、赤点石斑鱼和蜂巢石斑鱼的多样性均高于对湛江海域同类种群的研究结果<sup>[2]</sup>。这首先可归因于样品的不同地理来源,本研究中赤点石斑鱼和青石斑鱼均来自于东海与南海分界处的福建省漳州市东山县,与位于南海的湛江市之间的直线距离超过 780 km,蜂巢石斑鱼来自于西沙永兴岛,不同的环境影响可能造成不同地理种群在遗传多样性方面的差异;其次,可能与样本量大小有关,本研究所采集的青石斑鱼、赤点石斑鱼和蜂巢石斑鱼样品是湛江海域研究<sup>[2,24]</sup>的两倍多;第三,本研究采用的微卫星 DNA 位点也与湛江海域的研究<sup>[2]</sup>不同。在本研究中,赤点石斑鱼的遗传多样性最低,这与同类研究结果相吻合<sup>[2-3]</sup>,该物种在《世界自然保护联盟濒危物种红色名录》<sup>[25]</sup>中已被列为濒危等级。应该特别指出的是,虽然本研究中 4 种石斑鱼种群目前的遗传多样性水平较高,但如果过度捕捞和环

境污染的状况得不到改善,一定会对其产生不良影响。

判断微卫星 DNA 位点是否符合 HWE,是通过检验观测杂合度与期望杂合度的差异显著性来实现的。4 种鱼在 9 个微卫星 DNA 位点上的表现各有不同,尤其是橙点石斑鱼在多数基因座上都处于不平衡状态,这与种群形成的历史有关。种群曾经历过瓶颈效应或奠基者效应而产生小种群非随机交配现象,将会使其在遗传结构上偏离 HWE;此外,由于人为破坏或种群衰退等因素而使种群数量变小,小种群的随机遗传漂变作用的增强将导致等位基因的丢失,也导致种群偏离 HWE<sup>[26]</sup>。

连锁平衡(linkage equilibrium, LE)是指种群内两个基因位点的等位基因组合的频率等于组成组合的等位基因各自频率的积,即不存在优势组合;而不同位点等位基因间的非随机性组合关系称 LD。本研究在赤点石斑鱼、橙点石斑鱼及蜂巢石斑鱼种群内均有个别位点间呈现 LD 现象,这需从位点间的物理连锁情况、种群的历史动态及重组率等<sup>[27]</sup>方面探讨成因。

在进行系统发生关系分析时,对于微卫星数据采用适用于种间进化关系研究的  $D_s$ <sup>[15,27]</sup>重建 NJ 树(表 4,图 2),结果显示在 4 种鱼中青石斑鱼与赤点石斑鱼的进化关系较为接近。mtDNA Cyt *b* 基因是解决物种分类及其系统进化问题最常用分子标记之一,对 4 种鱼的



mtDNA Cyt *b* 基因部分序列重建的 NJ 树、MP 树、ML 树和贝叶斯树拓扑结构一致,也是青石斑鱼与赤点石斑鱼先聚为一枝(图 3)。同类研究也都发现这两种鱼的亲缘关系较近<sup>[2-4, 22]</sup>。在扩增 4 种鱼的 mtDNA Cyt *b* 基因部分序列时,引物 L14724 和 H15149 对青石斑鱼、赤点石斑鱼和橙点石斑鱼的基因组 DNA 能够扩增,而对蜂巢石斑鱼的基因组 DNA 则不能扩增,暗示该种鱼与前 3 种的亲缘关系较远。

已有关于赤点石斑鱼与其他石斑鱼在人工条件下成功杂交的报道<sup>[28-29]</sup>,但对自然界中这些同域分布的石斑鱼是否存在杂交现象尚不清楚。从本研究结果来看(图 4) 4 种石斑鱼自然种群的分化界限清晰,由于青石斑鱼和赤点石斑鱼是采自同一海域,而且已发现它们在 mtDNA 控制区存在完全不同的 VNTR 结构<sup>[30]</sup>,可以断定二者之间不存在杂交现象。

## 参 考 文 献

- [1] 祝茜. 中国海洋鱼类种类名录. 北京: 学苑出版社, 1998, 86-89.
- [2] 董秋芬, 刘楚吾, 郭昱嵩, 等. 9 种石斑鱼遗传多样性和系统发生关系的微卫星分析. 遗传, 2007, 29(7): 837-843.
- [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. 厦门大学学报, 2007, 46(1): 75-79.
- [4] 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. 动物学报, 2006, 52: 504-513.
- [5] Heemstra P C, Randall J E. FAO Species Catalogue. v. 16: Groupers of the World (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). Rome: Food Agriculture Organization of the United Nations, 1993, 106-166.
- [6] 奥斯伯 F M, 金斯顿 R E, 赛德曼 J G, 等. 精编分子生物学实验指南(4 版). 北京: 科学出版社, 2005.
- [7] Meyer A, Kocher T D, Basasibwaki P, et al. Monophyletic origin of lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial-DNA sequences. Nature, 1990, 347: 550-553.
- [8] Cantatore P, Roberti M, Pesole G, et al. Evolutionary analysis of Cytochrome-*b* sequences in some perciformes-evidence for a slower rate of evolution than in mammals. Journal of Molecular Evolution, 1994, 39: 589-597.
- [9] Zhuang X, Ding S, Wang J, et al. A set of 16 consensus primer pairs amplifying the complete mitochondrial genomes of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) and Hong Kong grouper (*Epinephelus akaara*). Molecular Ecology Resources, 2009, 9: 1551-1553.
- [10] 董颖, 韩洁, 蔡厚才. 对赤点石斑鱼多态性微卫星位点的跨种扩增和特征分析. 北京师范大学学报: 自然科学版, 2008, 44(5): 511-514.
- [11] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism. Journal of Heredity, 1995, 86: 248-249.
- [12] Rice W R. Analyzing tables of statistical tests. Evolution, 1989, 43: 223-225.
- [13] Ota T. Dispan: Genetic distance and phylogenetic analysis. University Park, PA: Pennsylvania State University, 1993.
- [14] Nei M. Genetic distance between populations. The American Naturalist, 1972, 106: 283-292.
- [15] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 2000, 155: 945-959.
- [16] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24: 1596-1599.
- [17] Posada D, Crandall K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics, 1998, 14: 817-818.
- [18] Nylander J A A. MrModeltest v2. Program Distributed by the Author. Uppsala: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004.
- [19] Swofford D L. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods). Version 4b10. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer, 2002.
- [20] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, 2003, 19: 1572-1574.
- [21] Kimura M A. Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16: 111-120.
- [22] 庄轩, 丁少雄, 郭丰, 等. 基于细胞色素 *b* 基因片段序列研究中国近海石斑鱼类系统进化关系. 中国科学: C 辑, 2006, 36: 27-34.
- [23] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.

- [24] 刘丽,刘楚吾,郭昱嵩,等. 青石斑鱼微卫星 DNA 标记的筛选及群体遗传多样性分析. *中国水产科学*, 2008, 15: 22 - 29.
- [25] Cornish A. 2003. *Epinephelus akaara* // IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010. 2. [EB/OL]. [2010-08-25]. www.iucnredlist.org.
- [26] Daniel L H, Andrew G C. Principles of population genetics (4th ed.). Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc, 2007.
- [27] Nei M, Tajima F, Tatenos Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular-data II. Gene-frequency data. *Journal of Molecular Evolution*, 1983, 19: 153 - 170.
- [28] Tseng W Y, Poon C T. Hybridization of *Epinephelus* species. *Aquaculture*, 1983, 34(1/2): 177 - 182.
- [29] 刘付永忠,赵会宏,刘晓春,等. 赤点石斑鱼♂与斜带石斑鱼♀杂交的初步研究. *中山大学学报*, 2007, 46(3): 72 - 75.
- [30] Han J, Lv F H, Cai H C. Detection of species-specific long VNTRs in mitochondrial control region and their application to identifying sympatric Hong Kong grouper (*Epinephelus akaara*) and Yellow grouper (*Epinephelus awoara*). *Molecular Ecology Resources*, 2010, (已接受).