

DOI: 10.1360/yc-007-0837

## 9 种石斑鱼遗传多样性和系统发生关系的微卫星分析

董秋芬, 刘楚吾, 郭昱嵩, 刘丽, 吴勇

广东海洋大学水产学院, 湛江 524025

**摘要:** 利用实验室克隆的 13 个青石斑鱼微卫星分子标记, 对中国南海海域 9 种石斑鱼(青石斑鱼、蜂巢石斑鱼、鲑点石斑鱼、黑边石斑鱼、鞍带石斑鱼、赤点石斑鱼、七带石斑鱼、斜带石斑鱼和棕点石斑鱼)进行了遗传多样性和系统发生关系的分析。研究结果显示, 13 个微卫星标记共检测到了 84 个等位基因, 9 种石斑鱼中的平均等位基因数、平均多态信息含量(PIC)、平均观测杂合度( $H_o$ )、平均期望杂合度( $H_e$ )和平均 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数( $D$ )分别在 2.69~5.38、0.1976~0.4267、0.4615~0.6239、0.3510~0.4754 和 0.1097~0.2836 之间变动, 说明 9 种石斑鱼的遗传多样性都处于中等水平。用 NJ 法进行聚类分析的结果将 9 种石斑鱼分为 3 个支系: 斜带石斑鱼、棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼为第 1 支; 青石斑鱼、赤点石斑鱼和七带石斑鱼为第 2 支系; 蜂巢石斑鱼、黑边石斑鱼和鲑点石斑鱼为第 3 支系, 该支系与第 2 支系的关系较近。本研究支持将宽额鲈(鞍带石斑鱼)归入石斑鱼属。

**关键词:** 石斑鱼; 微卫星标记; 遗传多样性; 系统发生关系

## Microsatellite analysis of genetic diversity and phylogenetic relationship of nine species of grouper in genus *Epinephelus*

DONG Qiu-Fen, LIU Chu-Wu, GUO Yu-Song, LIU Li, WU Yong

Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China

**Abstract:** Thirteen microsatellite markers of *Epinephelus awoara* previously discovered by our lab were selected to analyze the genetic diversity and phylogenetic relationship of nine species of grouper (*E. awoara*, *E. merra*, *E. fario*, *E. fasciatus*, *E. lanceolatus*, *E. akaara*, *E. septemfasciatus*, *E. coioides* and *E. fuscoguttatus*) from South China Sea. The results showed that the number of total alleles of these 13 microsatellite loci was 84 in these fishes, the mean number of alleles ranged from 2.69 to 5.38, mean polymorphism information content (PIC) ranged from 0.1976 to 0.4267, mean observed heterozygosity ( $H_o$ ) from 0.4615 to 0.6239, mean expected heterozygosity ( $H_e$ ) from 0.3510 to 0.4754 and mean Hardy-Weinberg departure value ( $D$ ) from 0.1097 to 0.2836, respectively. All of these indicated that genetic diversity of the nine species of grouper was at a medium level. Two NJ dendrograms showed that *E. coioides*, *E. fuscoguttatus* and *E. lanceolatus* were grouped together, while *E. awoara*, *E. akaara* and *E. septemfasciatus* were in a second group, and *E. merra*, *E. fasciatus* and *E. fario* were in a third group which had a relatively closed relationship with the second group. The dendrograms could also support a conclusion that *Promicrops lanceolatus* (*E. lanceolatus*) should be included in genus *Epinephelus*.

收稿日期: 2006-10-17; 修回日期: 2007-01-18

基金项目: 广东省重大科技兴海项目(编号: A200099A01)和湛江市 988 科技攻关项目(编号: 2000-121-17)资助[Supported by the Important Scientific Project of Ocean Development of Guangdong Bureau of Ocean and Fishery (No. A200099A01) and the Target-oriented Key Project of Zhanjiang Council of Science and Technology (No. 2000-121-17)]

作者简介: 董秋芬(1981-), 男, 广东省韶关人, 硕士研究生, 研究方向: 水产经济动物繁殖生物学。Tel: 0759-2613472; E-mail: sbdnw@163.com

通讯作者: 刘楚吾(1952-), 男, 湖南省湘乡人, 教授, 湖南师范大学博士生导师、广东海洋大学硕士生导师, 研究方向: 水产经济动物繁殖生物学。Tel: 0759-2382044; E-mail: swjjs@gdou.edu.cn

**Keywords:** *Epinephelus*; microsatellite markers; genetic diversity; phylogenetic relationship

石斑鱼是鲈形目(Perciformes)、科(Erranidae)、石斑鱼亚科(Epinephelinae)、石斑鱼属(*Epinephelus*)鱼类的统称<sup>[1]</sup>, 世界上约有 100 种, 我国记录有 46 种。石斑鱼主要分布于印度洋和太平洋的热带和亚热带海域, 少数在温带水域, 我国主要分布于南海和东海南部<sup>[2]</sup>。石斑鱼为重要的世界性海洋经济鱼类, 也是最名贵的海水养殖鱼类之一, 在我国科技兴海战略中, 石斑鱼的养殖业发挥极其重要的作用。但由于石斑鱼个体发育中存在“先雌后雄”的性转变过程, 目前石斑鱼人工繁殖技术尚未完全攻克, 自然苗种无法满足日益扩大的养殖规模的需求, 导致养殖业对石斑鱼的自然资源造成极其严重的压力与破坏。由于人类的过度捕捞, 近年来石斑鱼的资源出现衰退<sup>[3]</sup>, 主要表现为雌雄比例不平衡、个体变小、捕捞数量减少和种群规模缩小等方面。已有 21 种石斑鱼被列入《2006 年世界自然保护联盟濒危物种红色名录》<sup>[4]</sup>(其中包括本研究中的 5 种石斑鱼, 见表 1), 加紧对石斑鱼的资源调查与遗传评估等方面的研究、保护石斑鱼的资源是紧迫而又必要的。但是目前对石斑鱼遗传多样性的研究还不全面<sup>[5]</sup>, 在物种资源保护和人工育种方面的工作做得还不够。同时石斑鱼类的分类一直是鱼类系统分类学中的一个难题。因为石斑鱼类属定居性鱼类, 长期相似的生活环境造成的平行演化使得它们在外部及骨骼形态上都表现出较高趋同性, 而这些性状恰恰是石斑

鱼类分类上的重要依据。许多石斑鱼类之间因为缺乏用于比较的同源性状, 而造成一些种类鉴定上的失误和系统分类上的争议<sup>[6]</sup>。例如本研究中的鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*) 在属的分类阶元上, 一部分学者认为其应归于石斑鱼属<sup>[7]</sup>, 而另一部分学者认为应归于宽额鲈属, 称为宽额鲈(*Promicrops lanceolatus*)<sup>[1]</sup>。分类上的分歧使得石斑鱼类在系统进化和人工繁育的研究上受到不利的影响, 甚至因为物种鉴定上的失误, 而造成引种错误和人工繁育过程中出现杂交现象。利用现代分子生物学技术, 分析并获得物种遗传特征的大量数据, 通过构建系统进化树探讨物种的分类, 是对传统分类的重要佐证以及补充或修正。目前在分子水平上对石斑鱼进行分析的主要有 RAPD<sup>[8,9]</sup>、RFLP<sup>[10]</sup>、16S rDNA<sup>[6]</sup>、*Cyt b*<sup>[9,11]</sup> 基因序列测定和微卫星(SSR)标记<sup>[12]</sup>等技术, 但至今还没有利用微卫星标记技术对多种石斑鱼的遗传多样性和系统进化关系进行综合研究的报道。

本论文利用本实验室提交至 GenBank 中的 27 对青石斑鱼引物对中国南海海域 9 种石斑鱼的种内和种间遗传多样性、种间亲缘关系和系统分化进行综合分析并建立分子遗传标记, 为合理利用和保护石斑鱼资源、科学进行石斑鱼的人工繁育和遗传育种工作提供科学依据与借鉴, 并为石斑鱼类分类系统和进化关系提供分子系统学依据。

表 1 9 种石斑鱼的序号、名称、受威胁等级和采集地点

Table 1 Codes, names, threatened categories and sampling locations of 9 species of grouper

序号 Code	物种 Species	濒危等级 <sup>[4]</sup> Threatened categories	采集地点 Sampling location
E1	青石斑鱼 <i>E. awoara</i>	数据缺乏 DD, Data Deficient	广东湛江 Zhanjiang, Guangdong
E2	蜂巢石斑鱼 <i>E. merra</i>	-	广东湛江 Zhanjiang, Guangdong
E3	鲑点石斑鱼 <i>E. fario</i>	-	广东湛江 Shenzhen, Guangdong
E4	黑边石斑鱼 <i>E. fasciatus</i>	-	广东湛江 Zhanjiang, Guangdong
E5	鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i> <sup>[7]</sup> 或宽额鲈 <i>P. lanceolatus</i> <sup>[1]</sup>	易危 VU, Vulnerable	海南三亚 Sanya, Hainan
E6	赤点石斑鱼 <i>E. akaara</i>	濒危 EN, Endangered	广东湛江 Zhanjiang, Guangdong
E7	七带石斑鱼 <i>E. septemfasciatus</i>	-	广东湛江 Zhanjiang, Guangdong
E8	斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	近危 NT, Near Threatened	海南三亚 Sanya, Hainan
E9	棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	近危 NT, Near Threatened	福建福州 Fuzhou, Fujian

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

分批从中国南海海域采集 9 种石斑鱼的野生种各 20 尾, 每种石斑鱼的采集地点见表 1。鉴定<sup>[1,7]</sup>后取背部肌肉或尾鳍, 95%乙醇溶液保存。实验所用的 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、PCR Markers、*PBR* 322/*Msp* DNA Markers 购自北京华美生物工程公司, 27 对微卫星引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 实验所用的其他试剂均为分析纯。Hema 8000 PCR 仪购自珠海黑马公司, Tanon GIS-2008 型凝胶成像分析系统购自天能科技(上海)有限公司, DYY-6B 型稳压电泳仪、DYY-34A 型琼脂糖水平电泳槽和 DYY-21A 型双垂直电泳槽等购自北京六一仪器厂。

### 1.2 基因组 DNA 的提取及检测

按《分子克隆实验指南》的方法<sup>[13]</sup>从组织样品中提取基因组 DNA。经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 用紫外灯观察, 估算 DNA 的浓度与纯度。

### 1.3 微卫星标记的筛选及 PCR 多态性扩增

利用合成的引物对 9 种石斑鱼基因组 DNA 进行 PCR 扩增分析, PCR 反应体积为 15  $\mu$ L, 其中含 10  $\times$ buffer 1.5  $\mu$ L, dNTPs (2 mmol/L) 1  $\mu$ L,  $Mg^{2+}$  (25 mmol/L) 0.9  $\mu$ L, 30  $\mu$ mol/L 的 5 和 3 端引物各 1.5  $\mu$ L, *Taq* 酶 0.2  $\mu$ L, 模板 DNA (40~50 ng/ $\mu$ L) 0.8  $\mu$ L, 无菌水 7.6  $\mu$ L。反应程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后进入循环体系, 94  $^{\circ}$ C 变性 42 s, 45~60  $^{\circ}$ C 复性 50 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 30 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物用 8% 非变性凝胶聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测, 硝酸银染色法显色, 拍照保存。

### 1.4 数据统计分析

根据每个个体产生的条带的位置确定基因型, 利用 GENPOP Version 3.4 计算等位基因数、观测杂合度 (observed heterozygosity,  $H_o$ ) 和期望杂合度 (expected heterozygosity,  $H_e$ ), 并进行多态性信息含量 (polymorphism information content,  $PIC$ ) 和 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 (Hardy-Weinberg departure value,  $D$ ) 的计算<sup>[14]</sup>。

用 DISPAN 软件根据 Nei 的方法计算 Nei 氏标准遗传距离 (standard genetic distance,  $D_s$ )<sup>[15]</sup> 和遗传

距离 (genetic distance,  $D_A$ )<sup>[16]</sup>, 采用邻近法 (neighbor-joining method, NJ) 构建系统发生树<sup>[17]</sup>, 并利用 bootstrap test 检验所得聚类结果的可靠性。

## 2 结果与分析

### 2.1 微卫星标记的筛选

本实验中的 27 对引物只有 13 对能在 9 种石斑鱼中同时得到清晰且重复性好的多态性产物。13 对引物的相关信息见表 2。

### 2.2 种内遗传多样性

13 个微卫星标记在 9 种石斑鱼中共检测到了 84 个等位基因, 大多集中在 100~300 bp 之间(表 2)。不同座位上的等位基因数在 2~19 个之间, 其中 D496 座位上出现的等位基因数最多为 19 个, 表现出高度的多态性, 平均每个座位上等位基因数为 6.46 个。青石斑鱼(E1)的等位基因总数最多为 44 个, 最少的则是赤点石斑鱼(E6)为 22 个。

9 种石斑鱼的相关遗传参数见表 3。由表 3 可看出, 9 种鱼的遗传变异差别不大, 平均等位基因数在 2.69~5.38 间, 平均多态信息含量 ( $PIC$ ) 不高, 在 0.1976~0.4267 间变动, 赤点石斑鱼平均  $PIC$  最低为 0.1976, 而鲑点石斑鱼、斜带石斑鱼和棕点石斑鱼 3 种鱼的  $PIC$  差别不明显, 都接近 3.800。9 种石斑鱼的杂合度值都在 0.3~0.7 之间, 其中鲑点石斑鱼的观测杂合度 ( $H_o$ ) 与期望杂合度 ( $H_e$ ) 都为最高 (分别是 0.6239、0.4754), 而赤点石斑鱼的都为最低 (分别是 0.4615、0.3510)。对于平均 Hardy-Weinberg 平衡指数 ( $D$ ), 9 种鱼的都不高, 鲑点石斑鱼的最高 (0.2836), 七带石斑鱼的最低 (0.1097)。

### 2.3 种间的遗传距离

用 DISPAN 软件计算了 9 种石斑鱼间的奈氏遗传距离 ( $D_A$ ) 和奈氏标准遗传距离 ( $D_s$ ), 结果见表 4。从表 4 可见, 9 种石斑鱼的  $D_A$  在 0.1557~0.6971 间,  $D_s$  在 0.2613~1.3610 之间。斜带石斑鱼和棕点石斑鱼有着最小的遗传距离:  $D_A=0.1557$ ,  $D_s=0.2613$ 。从  $D_A$  看来, 最大的遗传距离出现在棕点石斑鱼和黑边石斑鱼之间: 0.6971, 而在  $D_s$  中, 七带石斑鱼和斜带石斑鱼的遗传距离最大: 1.3610。从总体水平看,  $D_s$  普遍比  $D_A$  大, 青石斑与其他石斑鱼的距离都比较近, 而七带石斑鱼与其他石斑鱼的距离都较远。

表 2 9 种石斑鱼 13 对微卫星引物的特征

Table 2 Characteristics of 13 pairs of microsatellite primers of 9 species of grouper

微卫星标记 MS markers	引物序列 Primer sequences (5' → 3')	扩增类型 Repeat motif	复性温度 Tm (°C)	等位基因大小 Allele size range(bp)	等位基因数 No. of alleles	登录号 Accession No.
D10	F: ACTAGTAATATGTTACAT R: GCAGGAGTGAAACTTATC	(CA) <sub>2</sub> G(CA) <sub>6</sub>	48	185~200	4	DQ914892
D160	F: CAATCTGTGACACGGAGT R: CTTATTGGGTGTTTGTAG	(AC) <sub>5</sub>	53	250~291	5	DQ914894
D161	F: TAGTCCAGAAAGCAA R: CCAGGGGATAATGTCA	(CA) <sub>4</sub> T(CA) <sub>15</sub>	51	118~180	9	DQ914895
D260	F: TCACCTCGTCTACTGTCTT R: GTTCATCGTCCAGTTAGG	(CA) <sub>14</sub> (CG) <sub>5</sub>	49	212~271	5	DQ914897
D316	F: GAGCCTAAAGACCCAAAT R: ATCGAAAACCATCAAACA	(CA) <sub>8</sub>	52	219~265	5	DQ914898
D463-1	F: GAGCCACGACGACTGTTT R: GTCTGCACTACTCTTTCTGTT	(CA) <sub>3</sub> AA(AC) <sub>2</sub> - AT(AC)	53	95~124	7	DQ914902
D463-2	F: CGACTCCCAATCAACT R: CGACTCCCTACACTACCAA	(GT) <sub>3</sub> GA(GT) <sub>4</sub>	49	189~207	3	DQ914902
D463-3	F: TTTGGTAGTGTAGGGAGT R: TTGGAAAGTTGTAGTCGT	(CA) <sub>5</sub> CT(CA)	51	83~91	2	DQ914902
D469	F: ACCGAGATTAACCACAAA R: TTTCGACGAACCGACATA	(AC) <sub>27</sub>	49	193~220	4	DQ914904
D493	F: TAATTGGGGATATGTGAC R: CATTCTTCTTGCTTCG	(CACAGA) <sub>2</sub> (CA) <sub>10</sub>	48	92~120	8	DQ914901
D496	F: TTACTGGCAGCAATGGAC R: GATGTATGACTACGAATGG	(CT) <sub>3</sub> (CA) <sub>24</sub> CC(TG) <sub>3</sub>	50	143~230	19	DQ914905
D545	F: TGCTGGCTCACTGTTACTC R: CGTCTGCCTCCCATCTAA	(CA) <sub>20</sub>	55	330~369	4	DQ914909
D548-1	F: ACCAGATAACAAGATGCC R: GTAAAATGAAATACAGCTCA	(TG) <sub>2</sub> AG(TG) <sub>5</sub>	53	65~90	9	DQ914910

表 3 9 种石斑鱼 13 个微卫星座位的平均等位基因数、平均多态信息含量、平均观测杂合度、平均期望杂合度和平均 Hardy-Weinberg 平衡指数

Table 3 The mean number of alleles, mean polymorphism information content (PIC), mean observed heterozygosity (Ho), mean expected heterozygosity (He) and mean Hardy-Weinberg departure value (D) of the 13 microsatellites in the 9 species of grouper

物种 Species	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
平均等位基因数 Mean alleles No.	5.38	4.31	4.46	4.92	3.85	2.69	3.15	4.77	3.23
PIC 平均值 Mean PIC	0.3468	0.3691	0.3892	0.4267	0.2690	0.1976	0.2664	0.3896	0.3793
Ho 平均值 Mean Ho	0.4931	0.5556	0.6239	0.5385	0.5372	0.4615	0.4701	0.5128	0.5898
He 平均值 Mean He	0.4208	0.4338	0.4754	0.4679	0.4391	0.3510	0.4049	0.4391	0.4728
D 平均值 Mean D	0.1119	0.2127	0.2836	0.0843	0.2105	0.2427	0.1097	0.1507	0.2328

注: 各物种代码见表 1。

Note: See Table 1 for species codes.

## 2.4 种间的聚类分析

根据  $D_A$  和  $D_S$  两种遗传距离采用 NJ 法构建系统发生树。由图 1 和图 2 可知以两种参数做出的聚类图是一致的。9 种石斑鱼共分为 3 大支系: 斜带石

斑鱼、棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼为第 1 支; 青石斑鱼、赤点石斑鱼和七带石斑鱼为第 2 支系; 蜂巢石斑鱼、黑边石斑鱼和鲑点石斑鱼为第 3 支系。其中第 2 支系与第 3 支系的关系较近, 第 1 支系与第 3 支系关系较远。

表 4 9 种石斑鱼间的奈氏遗传距离(上三角)和奈氏标准遗传距离(下三角)

Table 4 Nei's genetic distance (above diagonal) and Nei's standard genetic distance (below diagonal) between the 9 species of grouper

物种 Species	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
E1		0.3529	0.4884	0.3688	0.5188	0.2974	0.4514	0.4413	0.5173
E2	0.4735		0.2857	0.1955	0.5083	0.5325	0.5698	0.6360	0.6429
E3	0.7344	0.3323		0.3828	0.5797	0.6125	0.6031	0.6397	0.6338
E4	0.4361	0.1700	0.5024		0.5835	0.4322	0.5308	0.6908	0.6971
E5	0.7202	0.5617	0.7225	0.6840		0.6507	0.6383	0.2909	0.2968
E6	0.2944	0.6803	0.9657	0.5349	1.0168		0.5763	0.5323	0.5990
E7	0.7461	0.9885	1.0080	0.9296	1.1900	1.0719		0.6391	0.6640
E8	0.6396	0.9849	0.8833	1.0256	0.3582	0.7411	1.3610		0.1557
E9	0.6710	0.9680	0.8659	1.0234	0.3245	0.8554	1.2708	0.2613	

注: 各物种代码见表 1。

Note: See Table 1 for species codes.

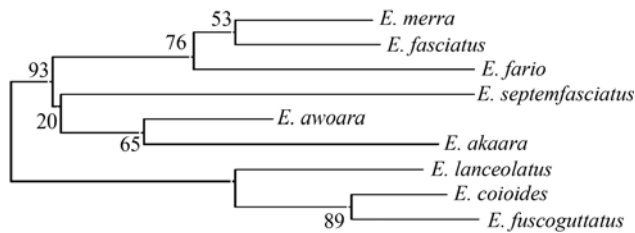


图 1 基于奈氏遗传距离( $D_A$ )值的 9 种石斑鱼的 NJ 聚类图  
枝点处的数字是 1,000 次 bootstrap 抽样检验的重复百分比。

Fig. 1 NJ dendrogram of 9 species of grouper based on Nei's genetic distance

The numbers at nodes are the percent occurrence in 1,000 bootstrap replicates.

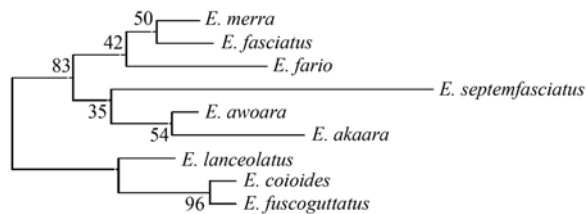


图 2 基于奈氏标准遗传距离( $D_S$ )值的 9 种石斑鱼的 NJ 聚类图  
枝点处的数字是 1,000 次 bootstrap 抽样检验的重复百分比。

Fig. 2 NJ dendrogram of 9 species of grouper based on Nei's standard genetic distance

The numbers at nodes are the percent occurrence in 1,000 bootstrap replicates.

### 3 讨论

#### 3.1 种内遗传多样性

多态信息含量( $PIC$ )是指一个后代所获得的某个等位基因标记来自于它亲代的同一个等位标记的可能性大小, 平均  $PIC$  是衡量等位基因片段多态性的理想指标。当  $PIC$  大于 0.5 时, 为高度多态位点;  $0.25 < PIC < 0.5$  时为中度多态位点;  $PIC$  小于 0.25 时为低度多态位点<sup>[18]</sup>。在本研究中, 9 种石斑鱼各自在 13

个微卫星位点中的平均  $PIC$  都不高, 除赤点石斑鱼 (0.1976) 小于 0.25 外, 其他石斑鱼均在 0.25~0.5 之间, 这表明这 9 种鱼的遗传多态性并非特别丰富。

遗传杂合度( $H$ )又称基因多样性, 可反映各群体在多个位点上的遗传变异, 即可反映群体的遗传一致性的程度。群体  $H$  越低, 表明该群体的遗传一致性越高, 群体的遗传变异越少, 群体遗传多样性越低。用微卫星标记计算出的群体杂合度值一般在 0.3~0.8 之间。9 种石斑鱼的观测杂合度( $H_o$ )和期望杂合度( $H_e$ )比较接近, 分析结果较为一致, 数值都在 0.3~0.8 之间。其中鲑点石斑鱼的  $H_o$  与  $H_e$  都为最高(分别是 0.6239、0.4754), 而赤点石斑鱼的都为最低(分别是 0.4615、0.3510), 表明鲑点石斑鱼的遗传多样性最高, 而赤点石斑鱼的为最低。

Hardy-Weinberg 遗传偏离指数( $D$ )也叫做固定指数( $F$ ), 反映了  $H_o$  和  $H_e$  两者之间的平衡关系,  $D$  值越接近 0, 基因型的分布越接近于平衡状态,  $D$  值为正时反映杂合子过剩,  $D$  值为负时则处于杂合子缺失状态。本研究结果显示 9 种石斑鱼总体都存在杂合子过剩的情况, 这与种群本身的结构有密切的关系, 可能是由于过度捕捞等人为干扰使其种群结构和性别比例受到影响而产生的。

以上的遗传参数一致表明 9 种石斑鱼的遗传多样性处于中等略偏下的水平, 该结果与吴勇<sup>[9]</sup>用 RAPD 和 mtDNA *Cytb* 基因全序列方法得出的结果是一致的, 都表明中国南海海域的这 9 种石斑鱼在某种程度上受到了人为的干扰。赤点石斑鱼的多态信息含量和杂合度都为最低, 说明该种石斑鱼的遗传多样性水平最低, 在本研究中的 5 种被列入《2006 年世界自然保护联盟濒危物种红色名录》的石斑鱼中, 该石斑鱼受威胁等级最高(为濒危)<sup>[4]</sup>, 与本研究成果一致。必须采取紧急而科学的措施来保护石斑

鱼的自然资源,以保证该资源的可持续开发利用。建议首先要通过政府立法和提高全民环保意识切实地减少对海洋环境的污染与破坏、限制渔业对各种石斑鱼的捕捞手段与捕捞量,保护石斑鱼赖以生存与繁衍的珊瑚礁,从而保护好石斑鱼的自然生态系统和石斑鱼物种的多样性。同时要加快对石斑鱼性控、繁殖与种苗培育技术的研究,发展和推广名贵石斑鱼的养殖,减少养殖与市场对海洋石斑鱼资源的压力,以期实现对一些濒危的石斑鱼物种进行人工放流。此外,还应加强对各海域不同石斑鱼种群遗传多样性的综合研究,了解多个海域石斑鱼遗传资源的特点,为石斑鱼资源的保护与合理利用、管理法规的完善提供理论依据。

### 3.2 种间遗传距离与系统发生关系

遗传距离是研究物种遗传多样性的基础,一般认为群体分化时间越短,遗传距离越小。Crawford 等<sup>[19]</sup>指出由微卫星得出的遗传距离更能反映分化时间的长短,能客观地反映品种间的遗传变异和分化。本研究中的青石斑与其他石斑鱼的距离普遍较近,七带石斑鱼与其他石斑鱼的距离都较远。斜带石斑鱼和棕点石斑鱼的遗传距离最近( $D_A=0.1557$ ,  $D_S=0.2613$ ),而遗传距离相对最远的是棕点石斑鱼和黑边石斑鱼( $D_A=0.6971$ )、七带石斑鱼和斜带石斑鱼( $D_S=1.3610$ ),这提示在遗传育种工作中可利用它们的杂交优势进行人工繁殖和培育。现代杂种优势理论认为杂种优势的大小在一定程度上取决于亲本间遗传差异的大小,遗传距离愈大所产生的杂种优势愈大。用 DNA 多态性预测杂种优势比较准确,其中由微卫星计算所得的遗传距离的长短还可用于预测杂交组合的优劣性,使实际杂交实验避免盲目性<sup>[20]</sup>。所以可选择遗传距离较大而又具有良好性状的石斑鱼进行杂交实验,并评估最优杂交组合,培养优良新品种。如青石斑鱼的肌肉氨基酸组成与人类氨基酸组成较为接近,鞍带石斑鱼的体型巨大,都可尝试与七带石斑鱼进行杂交实验培育新品种。

目前最常用于聚类分析的方法有 UPGMA 法和 NJ 法,前者适合对亲缘关系较近的群体进行聚类分析,后者则考虑到进化分支上每代基因突变发生率可能不等。因此,本文采用了 NJ 法对 9 种石斑鱼聚类。以  $D_A$  和  $D_S$  为参数得到的聚类图均显示,9 种石斑鱼共分为 3 大支系,第 2 支系与第 3 支系的关系较近,第 1 支系与第 3 支系关系较远。这与吴勇<sup>[9]</sup>用 *Cyt b* 基因全序列测定法得出的结论基本一致。不

同之处在于在吴勇的 NJ 法聚类图中七带石斑鱼单独聚为一支,而在本研究中七带石斑鱼与青石斑鱼和赤点石斑鱼的亲缘关系较近而聚为一支。这可能是两种方法本身的特点造成的,吴勇分析的是线粒体 DNA,而本文研究的微卫星属于基因组 DNA,基因组 DNA 与线粒体 DNA 的进化速度可能存在一定的差异。另外在研究过程中七带石斑鱼对 27 对引物的适用性不如其他 8 种鱼,在 PCR 扩增结果中也存在无效基因现象(即无特异性的扩增产物)<sup>[21]</sup>,而无效基因对基因频率及其它统计指标的计算都会产生影响。本研究的结果表明石斑鱼内的系统发生与其种类的地理分布并不相关,与 Maggio 等<sup>[22]</sup>、丁少雄等<sup>[6]</sup>、庄轩等<sup>[11]</sup>的研究结果一致。

### 3.3 宽额鲈(鞍带石斑鱼)的归属问题

宽额鲈(鞍带石斑鱼)在系统分类学中的位置至今还没有确定。根据侧线管的有分枝以及头颅在眼间隔处特别宽大的特征将宽额鲈独列为一属<sup>[1]</sup>,而根据骨骼的发育特征将宽额鲈归入石斑鱼属<sup>[7]</sup>。对宽额鲈分子水平上的研究都倾向于将其归入石斑鱼属。Craig 等<sup>[23]</sup>基于 16S rRNA 基因所建立的系统树中,鞍带石斑鱼(宽额鲈)落于石斑鱼属内的一个分支中。庄轩等<sup>[11]</sup>利用 *Cytb* 基因部分序列研究石斑鱼亚科 6 属 28 种的系统进化关系,结果表明宽额鲈、棕点石斑鱼和云纹石斑鱼有较近的亲缘关系,都包含在石斑鱼属内的同一分支中。丁少雄等<sup>[6]</sup>利用 16S rRNA 基因部分序列研究石斑鱼亚科 6 属 30 种的系统进化关系,结果也证实了庄轩等的观点。吴勇<sup>[9]</sup>用 RAPD 和 *Cytb* 型基因全序列测定两种分子遗传标记方法得出的分子系统树表明鞍带石斑鱼聚在石斑鱼属的内部,与石斑鱼属的鱼类分化程度不高。本研究所得的聚类图中鞍带石斑鱼(宽额鲈)与斜带石斑鱼和棕点石斑鱼聚在石斑鱼属内部,与上述结论一致,支持将鞍带石斑鱼(宽额鲈)归入石斑鱼属。

### 参考文献(References):

- [1] CHENG Qing-Tai, ZHENG Bao-Shan. Systematic Synopsis of Chinese Fishes (Vol. 1 and Vol. 2). Beijing: Science Press, 1987, 287-293, 1035-1047.  
成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索(上、下册). 北京: 科学出版社, 1987, 287-293, 1035-1047.
- [2] ZHU Qian. A List of Marine Fishes in the China Seas. Beijing: Academy Press, 1998, 86-89.  
祝茜. 中国海海洋鱼类种类名录. 北京: 学苑出版社, 1998, 86-89.

- [3] YIN Shao-Wu, HUANG Hai, ZHANG Ben, CHEN Guo-Hua. Advancements in research on genetic diversity in groupers. *Fisheries Science*, 2005, 24(8): 46–49.  
尹绍武, 黄海, 张本, 陈国华. 石斑鱼遗传多样性的研究进展. *水产科学*, 2005, 24(8): 46–49.
- [4] IUCN 2006. 2006 IUCN red list of threatened species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 09 October 2006.
- [5] MA Cheng-Lin, ZOU Ji-Xing. Marine biodiversity and its conservation in China seas. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2003(2): 41–47.  
马程琳, 邹记兴. 我国的海洋生物多样性及其保护. *海洋湖沼通报*, 2003(2): 41–47.
- [6] DING Shao-Xiong, WANG Ying-Hui, WANG Jun, ZHUANG Xuan, SU Yong-Quan, YOU Ying-Zhe, LI Qi-Fu. Molecular phylogenetic relationships of 30 grouper species in China seas based on 16S rDNA fragment sequence. *Acta Zoologica Sinica*, 2006, 52(3): 61–68.  
丁少雄, 王颖汇, 王军, 庄轩, 苏永全, 尤颖哲, 李祺福. 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(3): 61–68.
- [7] Smith CL. A revision of the American grouper: *Epinephelus* and allied genera. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 1971, 146: 67–241.
- [8] ZHENG Lian, LIU Chu-Wu. RAPD analysis of four grouper species. *Fisheries Science*, 2005, 23(11): 16–20.  
郑莲, 刘楚吾. 4 种石斑鱼亲缘关系的 RAPD 分析. *水产科学*, 2005, 23(11): 16–20.
- [9] WU Yong. Comparative Studies on RAPD and mtDNA Cytochrome *b* Gene in Five Species of Grouper, *Epinephelus*. Guangdong: Guangdong Ocean University Library, 2006, 41–51.  
吴勇. 5 种石斑鱼的 RAPD 和 mtDNA *Cytb* 基因全序列分析. 广东: 广东海洋大学图书馆, 2006, 41–51.
- [10] YANG Shao-Wen, LIU Chu-Wu. Physical maps of mtDNAs of five species in genus *Epinephelus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(3): 344–351.  
杨少闻, 刘楚吾. 5 种常见石斑鱼的线粒体 DNA 酶切物理图谱. *中国水产科学*, 2006, 13(3): 344–351.
- [11] ZHUANG Xuan, DING Shao-Xiong, GUO Feng, WANG Jun, SU Yong-Quan, ZHANG Qi-Yong, LI Qi-Fu. Molecular phylogenetic relationships of grouper species in China seas based on Cytochrome *b* gene fragment sequence. *Science in China(Ser. C)*, 2006, 36(1): 27–34.  
庄轩, 丁少雄, 郭丰, 王军, 苏永全, 张其永, 李祺福. 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(1): 27–34.
- [12] Innocentiis S De, Sola L, Cataudella S, Bentzen P. Allozyme and microsatellite loci provide discordant estimates of population differentiation in the endangered dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) within the mediterranean sea. *Molecular Ecology*, 2001, 10(9): 2163–2175.
- [13] Sambrook J, Russell DW (Translated by HUANG Pei-Tang). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002, 461–471.  
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW (黄培堂译). *分子克隆实验指南* (第 3 版). 北京: 科学出版社, 2002, 461–471.
- [14] GENG Bo, SUN Xiao-Wen, LIANG Li-Qun, OUYANG Hong-Sheng, TONG Jin-Gou. Microsatellite analysis of genetic diversity of *Aristichthys bobilis* in China. *Hereditas (Beijing)*, 2006, 28(6): 683–688.  
耿波, 孙效文, 梁利群, 欧阳洪生, 童金苟. 利用 17 个微卫星标记分析鱮鱼的遗传多样性. *遗传*, 2006, 28(6): 683–688.
- [15] Nei M. Genetic distance between populations. *American Nature*, 1972, 106(949): 283–292.
- [16] Nei M, Tajima F, Tateno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 1983, 19(3): 153–170.
- [17] Takezaki M, Nei M. Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, 1996, 144(1): 389–399.
- [18] Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314–331.
- [19] Crawford AM, Littlejohn RP. The use of DNA marker in deciding conservation priorities in sheep and other livestock. *Animal Genetic Resources Information*, 1998, 23(1): 21–26.
- [20] SUN Shao-Hua, SANG Run-Zi, SHI Shou-Kun, JIA Qing, LI Yun-Qi, LI Xue-Mei, TIAN Shu-Jun, GAO Ju-Shan, YAN Guo-Zhi, DING YU-Chen, HUANG Ya-Xin. Prediction and evaluation of heterosis of beef cattle and their application. *Acta Genetica Sinica*, 2000, 27 (7): 580 - 589.  
孙少华, 桑润滋, 师守, 贾青, 李运起, 李雪梅, 田树军, 高聚山, 闫国志, 丁玉臣, 黄亚新. 肉牛杂交优势预测、评估及其应用研究. *遗传学报*, 2000, 27(7): 580–589.
- [21] CHEN Wei, ZHANG Quan-Qi, YU Hai-Yang, HU Jing-Jie, QI Jie, BAO Zhen-Min. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(6): 682–687.  
陈微, 张全启, 于海洋, 胡景杰, 齐杰, 包振民. 牙鲆微卫星标记的筛选及群体多态性分析. *中国水产科学*, 2005, 12(6): 682–687.
- [22] Maggio T, Andaloro F, Hemida F. A molecular analysis of some Eastern Atlantic grouper from the *Epinephelus* and *Mycteroperca* genus. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, 321(1): 83–92.
- [23] Craig MT, Pondalla DL, Franck JPC, Hafner JC. On the status of the Serranid fish genus *Epinephelus*: Evidence for paraphyly based upon 16S rDNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 19(1): 121–130.