

10 种石斑鱼系统发育的线粒体细胞色素 b 基因序列分析

陈艺燕, 章 群, 任 岗, 钱开诚, 陈 迪, 许忠能

(暨南大学 水生生物研究所, 广东 广州 510632)

摘要:为探讨石斑鱼亚科鱼类的系统发育关系,测定了此亚科中具有代表性的石斑鱼属、鳃棘鲈属、九棘鲈属、驼背鲈属和白线光腭鲈属等 5 个属 10 种石斑鱼的细胞色素 b 基因全序列,分析了这些序列的特性,运用 Kimura 2-parameter 模型,以邻接法构建了分子系统树。结果表明,九棘鲈属与鳃棘鲈属位于系统进化树的基部,与石斑鱼类其它类群亲缘关系较远;驼背鲈属与白线光腭鲈属网结于石斑鱼属构成的分支中。

关键词:石斑鱼类;细胞色素 b 基因;分子系统学

中图分类号:Q959.483

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2006)06-0012-04

石斑鱼类(groupers)隶属鲈形目(Perciformes)鲈科(Serranidae)石斑鱼亚科(Epinephelinae)^[1],广泛分布于全世界的热带至温带海域,是珊瑚礁中的重要捕食者(prominent predators),在海洋生态中占据重要地位。石斑鱼类多为名贵的食用鱼,近年来成为重要的养殖对象,具有相当大的市场潜力^[2]。石斑鱼类较大的个体习惯形成生殖集群,易于遭受过度捕捞的危险^[3],部分种类已被世界自然保护联盟(The World Conservation Union,简称 IUCN)收录到《濒危物种红皮书》(IUCN Red List)中,驼背鲈(*Cromileptes altivelis*)等被列为濒危物种^[4,5]。因此,对石斑鱼类合理开发和资源保护已迫在眉睫。

石斑鱼类分布范围广,种类繁多,仅中国就有 10 个属 50 余种,其中石斑属(*Epinephelus*)的种类占大部分^[1]。石斑鱼类形态保守,传统分类缺乏统一使用的分化特征,在幼体期主要依据延长的背鳍第二棘以及腹鳍棘、尾柄上的黑色素细胞等,对成体则依赖体形、体色、牙齿、骨骼等性状^[6~9];由于不同生境中以及不同发育阶段的个体在色泽、斑纹上存在明显差异,种类鉴定非常困难,种间及属间的分类及系统发育关系存在很多问题,给生物多样性研究和渔业资源的合理利用与保护都带来困难和不便。随着分子生物技术的发展,近年来 16S rDNA 和 RAPD 指纹等分子标记也被应用到石斑鱼类的系统学分析中,然而研究对象仅是宝石石斑(*Epinephelus areolatus*)、网纹石斑(*Epinephelus chlorostigma*)、斜带石斑(*Epinephelus coioides*)、巨石斑(*Epinephelus tauvina*)等有限的种类^[10,11],因此石斑鱼亚科鱼类的系统发育关系的确定还需要进行更多的研究。

线粒体 DNA 母系遗传,几乎没有异质性,进化速度快,是生物系统发育研究的理想标记^[12]。细胞色素 b(cytochrome b, *Cytb*)基因是目前线粒体中结构和功能了解得最为透彻的基因,进化速度适中,因而将其作为分子系统学研究的分子标记,被广泛应用于解决不同分类阶元的系统发育分析^[13],但目前国内外仍未见石斑鱼类 *Cytb* 研究的报道。本文分析石斑鱼亚科中部分属种的 *Cytb* 序列,以期从分子水平初步探讨我国沿海石斑鱼亚科,特别是石斑鱼属的系统发育关系,为渔业管理部门制定石斑鱼类的资源保护和合理开发利用措施提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用鱼类样品于 2003 年至 2005 年采集,用 95%酒精保存。作者分析了石斑鱼属 6 种,鳃棘鲈属(*Plectropomus*)、九棘鲈属(*Cephalopholis*)、白线光腭鲈属(*Amyperodon*)、驼背鲈属各 1 种,其中每种鱼各取 1 尾。样品形态分类、编号、生物学性状、采集地点等信息见表 1。

收稿日期:2006-01-06;修回日期:2006-04-02

基金项目:国家自然科学基金资助项目(40106014);教育部留学归国人员科研启动基金(2005);广东省自然科学基金(000760)

作者简介:陈艺燕(1980-),女,广东英德人,硕士研究生,主要从事鱼类分类学与分子系统学研究,E-mail:chen_yiyan@126.com;章群(1968-),通讯作者,副教授,博士,主要从事水生生物分子生态学研究,E-mail:tqzhang@jnu.edu.cn

表 1 10 种石斑鱼类的标本信息及其 Cytb 基因的 GenBank 登录号

Tab. 1 Specimens information and GenBank accession numbers of Cytb gene sequences analyzed in this study

种 名	标本号	体长(cm)	体质量(g)	采集地点	序列号
黑斑石斑(<i>Epinephelus tukula</i>)	ETHS1	26.6	367.1	广州黄沙水产市场	A Y986973
纵带石斑(<i>Epinephelus latifasciatus</i>)	SY1	17.3	81.8	广东阳江闸坡	A Y986974
青石斑(<i>Epinephelus awoara</i>)	EAWDX1	17.3	100.9	广西东兴	A Y986975
双棘石斑(<i>Epinephelus diacanthus</i>)	A64	12.9	50.3	广州黄沙水产市场	A Y960584
橙点石斑(<i>Epinephelus bleekeri</i>)	EBDX1	22.2	198.2	广西东兴	A Y963558
花点石斑(<i>Epinephelus maculatus</i>)	A78	20.5	209.1	广州黄沙水产市场	DQ088680
横带九棘鲈(<i>Cephalopholis boenack</i>)	A31	12.6	47.6	广州黄沙水产市场	A Y986972
横斑鳃棘鲈(<i>Plectropomus laevis</i>)	A17	26.4	280.1	广州黄沙水产市场	A Y963554
白线光腭鲈(<i>Anyperodon leucogrammicus</i>)	SHAL	22.2	148.8	广州黄沙水产市场	A Y963557
驼背鲈	A1	21.2	295.1	广州黄沙水产市场	A Y960586

注:表中的体长和体质量数据是用 95 %酒精把标本浸泡后所测量的

1.2 总 DNA 的提取

取背部肌肉 0.5 g,使用标准的酚/氯仿方法提取总 DNA。

1.3 PCR 扩增与序列测定

自行设计的 PCR 扩增及测序的引物为 EpiCytbF: 5'-ACCGA GACCAATGACTTGAARAACCACCGTTG 和 EpiCytbR:5'-GCTTTGGGAGTTAGGGGTGGGAG,由英俊生物技术有限公司合成。PCR 反应总体积为 50 μ L,其中 10 $\times$ Buffer 5 μ L,MgCl₂ (25 mmol/L) 4 μ L,dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L,正反向引物 (20 mmol/L) 各 0.5 μ L,Taq 酶 (MBI) 2.0 U,模板 DNA 约 10 ng。PCR 反应的程序为:95 预变性 3 min,然后 95 变性 45 s,56 退火 1 min,72 延伸 1 min,29 个循环,最后 72 延伸 10 min。利用未加模板 DNA 的反应液作为空白对照,以检查是否存在污染。PCR 产物用 1 %琼脂糖凝胶电泳,检测结果于 BioRad 凝胶成像系统中观察。PCR 产物经 QIA-GENE 公司 QIAquick PCR 纯化试剂盒纯化,送至英俊生物技术有限公司在 ABI 3730 自动测序仪上进行双向测序。

1.4 序列拼接、比对和分子系统学分析

双向测序后正反两条链用 ContigExpress (Informax, Inc.) 软件拼接,并经人工校对后,用 ClustalX1.83^[14]进行比对。应用 Mega 3.1^[15]统计各序列的碱基频率和序列间的碱基替代,以 Kimura-2-parameter 模型计算遗传距离,以在内类群中与其他内类群亲缘关系较远的鳃棘鲈作为其他石斑鱼类的外

类群,采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树,系统树各分枝的置信度自举检测 (bootstrap) 1 000 次。

2 结果

本研究获得 PCR 扩增产物长 1 314 bp,其中 Cytb 基因全序列长度为 1 141 bp,其序列的 Genbank 登陆号见表 1。

2.1 序列特征分析

所有被分析序列的相对碱基频率为 T(U) = 29.6%,C = 30.7%,A = 24.8%,G = 14.9%。这些序列的 A,C,G,T 频率在密码子第 1 位没有较大偏差,第 2 位富含 T,第 3 位富含 C,而且 G 的含量仅有 3.4%~9.5%。

在碱基替代中,变异位点 435 个,其中 108 个变异发生在第三位点,平均碱基转换位点 132 个,颠换位点 57 个,转换高于颠换。碱基替换大部分发生在密码子的第 3 位点,第 2 位点最保守。密码子不同位点的碱基转换/颠换比不同,第一位点 3.6 最高,第二位点最低为 1.4,所有碱基的两两比较的平均转换/颠换比为 2.3。

2.2 石斑鱼类 NJ 树的构建

石斑鱼类 NJ 树见图 1。从图中可看出,鳃棘鲈和九棘鲈位于分子系统树的根部,石斑属 6 个种、白线光腭鲈和驼背鲈等组成了一个自展数据支持率高达 100 %的分支。

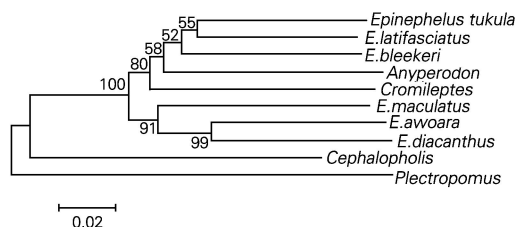


图1 用 Kimura 双参数模型构建的 NJ 树

Fig. 1 Neighbour-Joining tree constructed with Kimura 2-parameter model from *Cytb* gene sequences
节点上的数值表示 1 000 次重复抽样检查后得到的支持率,标尺为基于 Kimura 双参数模型计算的相对遗传距离
Numbers around branches are percentage of bootstrap values by 1 000 replicates, scale bar is relative evolutionary distance calculated by Kimura 2-parameter method

3 讨论

3.1 关于外类群

外类群的选择在构建分子系统树时具有十分重要的意义^[16]。外类群的选择原则是尽可能选择与内类群亲缘关系较近的类群,最好是内类群的姐妹群。在选择外类群时,若内类群的姐妹类群不确定,或外类群与内类群亲缘关系太远,而造成共有的性状太少,会影响分子系统树的正确构建。在此情况下,如能确定内类群中最早与其它成员分开的类群,也可用它作为研究其它成员系统发育关系的外类群^[17]。由于已有的研究未能明确石斑鱼类近缘类群^[6,9~11],本文没有选用非石斑鱼类的外类群。从石斑鱼类两两序列遗传差异及无根树(未发表)的结果看,鳃棘鲈位于石斑鱼类分子系统树的根部,与其它石斑鱼类差异相对较大,为尽可能提高石斑鱼类分子系统树的解析度,本研究中将鳃棘鲈作为研究其它石斑鱼类相互关系的外类群。

3.2 石斑鱼类系统发育分析

从石斑鱼类 *cytb* 的序列特征分析结果看,本文所分析的 5 属 10 种石斑鱼类细胞色素 b 基因碱基特征符合其他鱼类的共同特征^[7~9];所有碱基的平均转换/颠换比 > 2,表明这些序列碱基替代还没有达到饱和点,适合进行系统发育分析^[18]。

3.2.1 石斑鱼类的单系性

虽然白线光腭鲈因腭骨无齿、体形比较延长这两个特征与石斑属区分开来,独立成为单型属^[19],但白线光腭鲈与石斑属背鳍却有不少相似之处,如背鳍棘的数目相同以及都缺少三节的支鳍骨等特征相同,在 NJ 树中,白线光腭鲈与橙点石斑等 3 种石斑

鱼亲缘关系较近,该结果与上述形态特征相吻合。虽然 Craig 等^[10]对 16SrDNA 部分序列分析的研究显示,白线光腭鲈属跟红鲈 (*Mycteroperca*) 聚在一起。但值得注意的是,二者聚类的自展数据支持率并不高 (< 50 %),且都网结于石斑鱼属分支中,表明该研究与作者的结果并不矛盾。

从形态上看,驼背鲈后鼻孔呈裂缝状,头背后缘突然隆起成驼背,背鳍棘为 10 而石斑属鱼类颇为不同^[20],但在分子水平,驼背鲈与石斑属鱼类的 *Cytb* 基因序列相似性很高,两者的遗传差异甚至小于石斑属部分种类间的差异,该结果亦与 Craig 等的研究相一致,均表明驼背鲈属与石斑属亲缘关系密切。

在 *Cytb* 和 16S rRNA 分子系统树上,白线光腭鲈和驼背鲈与石斑属一起构成了一个自展数据支持率很高的单系类群,表明 3 属亲缘关系很近。分子数据与形态研究的不一致,质疑白线光腭鲈和驼背鲈作为单型属的合理性。如果白线光腭鲈、驼背鲈和红鲈确能单独成属,则可认为石斑属为多系类群;作者推测,石斑鱼类一些种类外形保守,内部结构已发生较大变化;而一些种类如驼背鲈和白线光腭鲈外部形态发生了很大变化,而遗传变异却很小,很可能是近期对特殊生境或食性适应的结果,具体原因将进一步研究。

3.2.2 九棘鲈、鳃棘鲈与石斑属的系统发育关系

Leis^[8]根据印度 - 太平洋 4 种鳃棘鲈背鳍棘的形成过程、体侧黑色素细胞的分布及迁移、背鳍前骨骼的数目等幼体发育性状的比较,证明九棘鲈属不是石斑属的一个亚属而是独立于石斑属的有效属,认为鳃棘鲈属是比九棘鲈属、石斑属更原始的类群。在分子系统树上,石斑鱼亚科 5 个属 10 种鱼中鳃棘鲈与其他类群的系统位置较远,位于分子系统树的根部,表明其分类地位原始,支持 Leis 的研究结果。

4 结论与展望

总体而言,作者从 *Cytb* 基因序列对石斑鱼类的系统分析和 Craig 等用 16S rDNA 对石斑鱼类的研究结果基本上一致。但是石斑鱼亚科属种众多,具有 14 个属,仅石斑属种类就近达 100 种^[16],作者仅报道 5 个属共 10 种鱼类 *Cytb* 基因全序列, Craig 也只报道了 8 属 38 种鱼类的 16S rDNA 部分序列。石斑鱼亚科鱼类的幼体与成体在形态上差别很大,目前为止对石斑属、九棘鲈属、鳃棘鲈属等的个体发育研究比较多^[7,8],但未见有驼背鲈以及白线光腭鲈的相关报道;驼背鲈、白线光腭鲈与石斑鱼属之间分类与进化关系的解决还有赖于传统上对驼背鲈与白线光腭鲈

个体发育等研究以及更多的分子证据。对于石斑鱼亚科各属内属间、特别是石斑鱼属内的种间关系及单系性问题,还有待更全面深入的研究。

参考文献:

- [1] 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索(上册)[M]. 北京:科学出版社, 1987. 287-292.
- [2] Mackie M. Reproductive biology of the halfmoon grouper, *Epinephelus rivulatus* at Ningaloo Reef, Western Australia[J]. **Environmental Biology of Fishes**, 2000, 57: 363-376.
- [3] Dulvy N K, Sadovy Y, Reynolds J D. Extinction vulnerability in marine populations[J]. **Fish and Fisheries**, 2003, 4:25-64.
- [4] Morris A V, Roberts C M, Hwakins J P. The threatened status of groupers (Epinephelinae) [J]. **Biodiversity and Conservation**, 2000, 9:919-942.
- [5] IUCN 2004. 2004 IUCN Red List of Threatened Species [EB/OL]. <http://www.iucnredlist.org/>, 2004-12-04.
- [6] Johnson G D. Nippon spinosus: a primitive Epinepheline serranid, with comments on the monophyly and intrarelationships of the Serranidae [J]. **Copeia**, 1983, 3:777-787.
- [7] Johnson G D, Keener P. Aid to identification of American grouper larvae [J]. **Bulletin of Marine Science**, 1984, 34(1):106-134.
- [8] Leis J M. Larval development in four species of Indo-Pacific trout *Plectropomus* (Pisces: Serranidae, Epinephelinae) with an analysis of the relationships of the genus [J]. **Bulletin of Marine Science**, 1986, 38(3): 525-552.
- [9] Baldwin C C, Johnson G D. Phylogeny of the epinephelinae (Teleostei: Serranidae) [J]. **Bulletin of Marine Science**, 1993, 52(1): 240-283.
- [10] Craig M T, Pondella D J, Franck J P C, *et al.* On the status of the serranid fish genus *Epinephelus*: Evidence for paraphyly based upon 16S RNA sequence [J]. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 2001, 19(1): 121-130.
- [11] Govindaraju G S, Jayasankar P. Taxonomic relationship among seven species of groupers (genus *Epinephelus*: family Serranidae) as revealed by RAPD fingerprinting [J]. **Marine Biotechnology**, 2004, 6: 229-237.
- [12] Castro J A, Picornell A, Ramon M. Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies [J]. **International Microbiology**, 1998, 1:327-332.
- [13] Farias I P, Ortl G, Sampaio I, *et al.* The Cytochrome b Gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes[J]. **Journal of Molecular Evolution**, 2001, 53: 89-103.
- [14] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. **Nucleic Acids Research**, 1997, 25:4 876-4 882.
- [15] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. **Briefings in Bioinformatics**, 2004, 5:150-163.
- [16] Brown W M. Evolution of animal mitochondrial DNA[A]. Nei M, Koehml R K. Evolution of genes and proteins[C]. New York: Sinauer Association Inc Press, 1983. 62-88.
- [17] 钟扬, 唐先华, 施苏华, 等. 外类群对构建基因树的影响[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(1): 124-127.
- [18] Maddison W P, Donoghue M J, Maddison D R. Out-group analysis and parsimony[J]. **Systematic Zoology**, 1984, 33:83-103.
- [19] Nelson J S. Fishes of the World, 3rd ed[M]. New York: John Wiley & Sons, INC, 1994. 335-337.
- [20] 孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学[J]. 北京: 中国农业出版社, 1995. 606-622.

(下转第 34 页)

Molecular phylogeny of 10 species of groupers(Serranidae : Epinephelinae) based on mitochondrial cytochrome b gene sequences

CHEN Yi-yan , ZHANG Qun , REN Gang , QIAN Kai-cheng , CHEN Di , XU Zhong-neng
(Institute of Hydrobiology , Jinan University , Guangzhou 510632 , China)

Received : Jan. , 6 , 2006

Key words : Epinephelinae ; mitochondrial cytochrome b gene ; molecular phylogeny

Abstract : Groupers are edible fish of highly economic values. Owing to enormous number of the subfamily Epinephelinae and the lack of unified morphologic speciation characters , species identification for groupers is very difficult , and phylogenetic relationships among some taxa are not yet determined , playing negative effects on the sustainable exploitation and conservation of groupers. In this study sequences of mitochondrial cytochrome b gene of 10 species from genera *Epinephelus* , *Cephalopholis* , *Plectropomus* , *Comileptes* and *Anyperodon* were analyzed to infer phylogenetic relationships within the subfamily Epinephelinae. Neighbour-Joining unrooted tree based on the Kimura 2-parameter model indicated that *Epinephelus* was paraphyletic with the inclusion of two morphologically distinct monotypic genus slender grouper *Anyperodon* and humpback hind *Cromileptes*. Compared to other groupers , *Cromileptes* had slot nostrils , humpbacked body and the unique number of dorsal spines , nevertheless the Cytb gene sequence similarity between *Cromileptes* and *Epinephelus* was so high that their genetic distance was even closer than those between some *Epinephelus* fish. More molecular data and additional ontogenic development investigations are required to confirm phylogenetic status of *Cromileptes*. Unlike other groupers , *Anyperodon* lacked palatine teeth ; whereas *Anyperodon* shared 11 dorsal spines with *Epinephelus* , indicating that the moving of *A. leucogrammicus* to the *Epinephelus* clade was not unexpected. *Cephalopholis* and *Plectropomus* were basal in the NJ tree , revealing their primitivity in the Epinephelinae , which was consistent with former researches on Epinephelinae larvae.

(本文编辑 :刘珊珊)