

文章编号 :1000 - 0615(2006)05 - 0707 - 06

·研究简报·

## 湛江沿海五种石斑鱼线粒体 DNA 的 RFLP 分析

杨少闻, 刘楚吾

(广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025)

关键词: 石斑鱼; 限制性片段长度多态性; 线粒体 DNA; 遗传多样性; 分子聚类图

中图分类号: S 917 文献标识码: A

### Genetic diversity of the five species of *Epinephelus* spp.

YANG Shao-wen, LIU Chu-wu

(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

**Abstract:** In this paper, genetic diversity of intraspecies, and genetic relationship of interspecies in *Epinephelus* spp. (*E. merra*, *E. fario*, *E. awoara*, *E. akaara* and *E. septemfasciatus*) were assessed by using mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms (mtDNA RFLPs). The samples were collected from the coastal area of Zhanjiang, Guangdong province. MtDNA was extracted from the fresh liver tissue by applying a difference centrifugation procedures. Using 17 restriction enzymes with 5- or 6-bp recognition sites, the purified mtDNA was cleaved by single enzymes. These enzymes included *Bam*H I, *Bgl* I, *Bgl* II, *Dra* I, *Eco*R I, *Eco*R V, *Hind* III, *Kpn* I, *Mlu* I, *Pst* I, *Pvu* II, *Sal* I, *Sca* I, *Sma* I, *Sty* I, *Xba* I and *Xho* I. The phylogenetic analysis was done using the Neighbor-joining (NJ) method and Unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) method. Genetic diversity indices such as haplotype diversity ( $h$ ), average genetic distance between haplotypes ( $P$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) were calculated using Nei and Li's segment method to quantify the genetic diversity within species. There were 8, 5, 8, 5 and 2 haplotypes detected within *E. merra*, *E. fario*, *E. awoara*, *E. akaara* and *E. septemfasciatus*, respectively. The haplotype diversity ( $h$ ) was 0.8943, 0.6186, 0.9242, 0.6927 and 0.1820, respectively. The average genetic distance between haplotypes ( $P$ ) was  $0.62\% \pm 0.31\%$ ,  $0.64\% \pm 0.37\%$ ,  $1.12\% \pm 0.55\%$ ,  $0.72\% \pm 0.42\%$  and  $0.45\%$ , respectively. And the nucleotide diversity ( $\pi$ ) was 0.22%, 0.13%, 0.46%, 0.17% and 0.04%, respectively. The wild groupers in the Zhanjiang Coastal Area exhibited a relative higher level of genetic diversity. The net genetic distance between species ( $P_{net}$ ) was 0.0694 (*E. merra* - *E. fario*) 0.1337 (*E. merra* - *E. awoara*) 0.1090 (*E. merra* - *E. akaara*) 0.1286 (*E. merra* - *E. septemfasciatus*), 0.1590 (*E. fario* - *E. awoara*) 0.0825 (*E. fario* - *E. akaara*) 0.1153 (*E. fario* - *E. septemfasciatus*) 0.1131 (*E. awoara* - *E. akaara*), 0.0724 (*E. awoara* - *E. septemfasciatus*) and 0.1336 (*E. akaara* - *E. septemfasciatus*). Both NJ and UPGMA methods yielded an identical phylogenetic tree for the five species. The *E. merra* and *E. fario* first clustered together, then joined with *E. akaara*, and finally clustered with *E. awoara* and *E. septemfasciatus*.

**Key words:** *Epinephelus* spp.; restriction fragment length polymorphism (RFLP); mtDNA; genetic diversity; phylogenetic tree

石斑鱼隶属于鲈形目 (Perciformes) 鮨科 (Serranidae) 石斑鱼亚科 (Epinephelinae) 石斑鱼属

(*Epinephelus* Bloch)<sup>[1]</sup>, 为分布于热带和亚热带海域的大型鱼类, 少数可见于温带海域。我国有 36 种, 大多产于南

收稿日期: 2005-05-31

资助项目: 广东省重大科技兴海项目 (A200099A01); 湛江市科技攻关项目 [湛财企 (2000) 121]

作者简介: 杨少闻 (1974 - ), 女, 河北唐山人, 硕士, 主要从事水产经济动物繁育生物学研究, Tel: 0759 - 2383133, E-mail: yangsw@gdou.edu.cn

通讯作者: 刘楚吾, E-mail: swyjs@gdou.edu.cn

海、东海,为名贵食用鱼类。由于石斑鱼的市场经济价值高,致使一些地区对其进行过度捕捞;同时,近海海洋生态环境正在遭到不同程度的破坏,石斑鱼的遗传多样性正在遭受威胁,现已有将近44%被列为严重遭受威胁的种类<sup>[2]</sup>。

mtDNA酶切技术在国外已被遗传学家用于鱼类种群遗传结构及品种鉴定的研究<sup>[3]</sup>。mtDNA由于具有结构简单、呈母系遗传、进化速度快等特点,对于调查动物群体遗传多样性、研究近缘种及种内群体间的遗传差异、分析种内及种间的遗传分化特别有效<sup>[4]</sup>。国内对mtDNA的研究起步较晚,对其酶切图谱、基因定位、片段克隆和结构分析已有一些研究,而且大多在于mtDNA限制性内切酶酶谱分析,涉及到应用于鱼类种群遗传结构的报道极少。近几年才逐渐有一些利用mtDNA进行遗传多样性研究的报道。而对这五种石斑鱼遗传多样性的评估仅见郑莲

等<sup>[5]</sup>采用RAPD方法对蜂巢石斑鱼的研究。

为了保护 and 合理利用石斑鱼这些优良养殖鱼种,避免种质退化、资源枯竭,需对其基因库进行分析,弄清湛江沿海海域石斑鱼种群的遗传多样性和亲缘关系。本文应用RFLP技术对南海海域石斑鱼属五个常见种类进行了研究,分析它们的种内遗传多样性、种间亲缘关系和系统分化,以期为保护和持续利用这一海洋渔业资源提供一定的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

实验所用蜂巢石斑鱼、鲑点石斑鱼、青石斑鱼、赤点石斑鱼和七带石斑鱼从湛江海域采集(表1),取新鲜肝脏用于制备mtDNA。

表1 样本信息表

Tab.1 The information of samples

|                                 | 蜂巢石斑鱼<br><i>E. merra</i>   | 鲑点石斑鱼<br><i>E. fario</i>   | 青石斑鱼<br><i>E. awoara</i>   | 赤点石斑鱼<br><i>E. akaara</i>  | 七带石斑鱼<br><i>E. septemfasciatus</i> |
|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| 采集时间<br>time of collection      | 2003-03-04 -<br>2003-08-06 | 2003-04-01 -<br>2003-08-12 | 2003-02-24 -<br>2003-09-28 | 2003-05-30 -<br>2003-10-29 | 2003-10-13 -<br>2003-11-27         |
| 样本数(尾)<br>number of individuals | 12                         | 11                         | 12                         | 13                         | 11                                 |

### 1.2 实验方法

试剂 琼脂糖、核酸酶、DNA Markers、限制性内切酶等为华美生物工程公司产品,其他试剂均为国产分析纯。

mtDNA的制备 mtDNA的分离和纯化依照戴建华<sup>[6]</sup>等描述的方法进行。

mtDNA的单酶切 酶切反应条件参照 Sambrook 等描述的方法<sup>[7]</sup>。

结果检查 将酶解产物在0.7%琼脂糖凝胶(含 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  EB)中电泳。用 $\lambda\text{DNA}/\text{Hind III}$ 和 $\lambda\text{DNA}/\text{EcoR I} + \text{Hind III}$  Marker作为相对分子量标准。电泳缓冲液为 $0.5 \times \text{TBE}$  电压为 $5 \text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,常温下电泳2 h。用Tanon GIS-2008型凝胶成像仪观察并拍照。

数据分析 利用Gelpro 32软件计算各酶切片段的大小。按Nei和Li<sup>[8]</sup>提出的片段法计算单倍型间的遗传距离( $P$ )、基因多样性指数( $h$ )、群体核苷酸多样性指数( $\pi$ )和任意两种群间的净遗传距离( $P_{\text{net}}$ )。

利用MEGA2.1软件中的NJ法(Neighbor-joining method)和UPGMA法(Unweighted pair-group method with arithmetic mean)分别构建系统树。

## 2 结果

### 2.1 种内遗传多样性

mtDNA经17种限制性内切酶,即BamH I, Bgl I, Bgl II, Dra I, EcoR I, EcoR V, Hind III, Kpn I, Mlu I, Pst I, Pvu II, Sal I, Sca I, Sma I, Sty I, Xba I和Xho I酶切后,在蜂巢石斑鱼有4种酶:BamH I、Kpn I、Pvu II和Sma I检测到多态;在鲑点石斑鱼有4种酶:Bgl I、Kpn I、Mlu I和Pvu II检测到多态;在青石斑鱼有4种酶:Bgl I、EcoR I、Pvu II和Sca I检测到多态;在赤点石斑鱼有4种酶:EcoR I、EcoR V、Pst I和Pvu II检测到多态;在七带石斑鱼有Sma I检测到多态(表2)。

除Dra I、Hind III和Sty I这三种酶有较多切点难以统计外,其它14种酶在五个种间均存在酶切位点变异。根据单酶切电泳结果(图1),在蜂巢石斑鱼、鲑点石斑鱼、青石斑鱼、赤点石斑鱼和七带石斑鱼群体内分别检出了8、5、8、5和2种限制性单倍型(表3)。

按Nei和Li<sup>[8]</sup>片段法计算蜂巢石斑鱼、鲑点石斑鱼、青石斑鱼、赤点石斑鱼和七带石斑鱼各种群内单倍型间平均遗传距离( $P$ )分别为 $0.62\% \pm 0.31\%$ 、 $0.64\% \pm 0.37\%$ 、

1.12% ± 0.55%、0.72% ± 0.42% 和 0.45% 基因多样性指数(  $h$  )分别为 0.8943、0.6186、0.9242、0.6927 和 0.1820 ;核苷酸多样性指数(  $\pi$  )分别为 0.22%、0.13%、0.46%、0.17% 和 0.04%。

表 2 5 种石斑鱼 mtDNA 的单酶切结果

Tab.2 Restriction fragments length of mtDNA from five species of groupers digested by single enzyme

| 内切酶<br>enzyme               | 蜂巢石斑鱼<br><i>E. merra</i>                           | 鲑点石斑鱼<br><i>E. fario</i>           | 青石斑鱼<br><i>E. awoara</i>   | 赤点石斑鱼<br><i>E. akaara</i>            | 七带石斑鱼<br><i>E. septemfasciatus</i> |
|-----------------------------|--|------------------------------------|--|--------------------------------------|------------------------------------|
| <i>Bam</i> H I              | A 0. B 18.33.<br>C 15.80 2.53.<br>D 9.42 6.22 2.73 | A 0                                | A 0  | E 14.38 4.27                         | A 0                                |
| <i>Bgl</i> I                | A 18.86  | B 13.80 4.46.<br>C 14.22 3.57 0.78 | D : 13.03 4.03 ;<br>1.11. E 10.33 ;<br>4.20 2.68 1.33.<br>F : 12.56 3.92 ;<br>1.17 0.60 0.52 | G 3.45 3.32 2.80 ;<br>1.65 1.38 0.87 | H 16.24 2.30                       |
| <i>Bgl</i> II               | A 14.04 4.54                                       | B 3.19 5.46 4.58                   | C 18.47  | D 12.93 2.93 2.63                    | C 18.21                            |
| <i>Dra</i> I                | A n  | A n                                | A n  | A n                                  | A n                                |
| <i>Eco</i> R I              | A 16.76 1.53                                       | B 10.79 3.19                       | C 18.80.<br>D : 17.22 1.06   | C 18.84. B :11.22 ;<br>7.60          | C 18.21                            |
| <i>Eco</i> R V              | A 9.42 4.80 4.04                                   | B 9.21 7.37 1.76                   | C 18.47  | C 18.42. D :12.85 ;<br>5.51          | E 16.80 1.47                       |
| <i>Hind</i> III             | A n  | A n                                | A n  | A n                                  | A n                                |
| <i>Kpn</i> I                | A 0. B 18.86                                       | A 0. B 18.33                       | A 0  | A 0                                  | B 18.21                            |
| <i>Mlu</i> I                | A 0  | A 0. B 18.33                       | B 18.47  | A 0                                  | A 0                                |
| <i>Pst</i> I                | A 12.48 6.15                                       | A 12.16 6.12                       | B 17.57 0.92   | C 10.45 3.45. D 3.<br>41 6.24 3.81   | E 10.66 4.69 2.97                  |
| <i>Pvu</i> II               | A 0.<br>B 9.07 3.18 2.58 ;<br>2.29 0.79 0.66       | A 0. C 12.16 3.74 ;<br>2.57        | A 0.<br>D 16.55 2.20   | A 0.<br>E 15.43 3.03                 | F 9.87 6.99 1.46                   |
| <i>Sal</i> I                | A 18.86  | B 0                                | B 0  | B 0                                  | B 0                                |
| <i>Sca</i> I                | A 10.45 4.69 3.47                                  | B 14.22 4.47                       | C 11.61 3.49 1.73 ;<br>0.97 0.83. D 6.03 ;<br>5.15 3.60 1.90 1.<br>00 0.86                   | E 15.43 3.37                         | F 9.14 4.03 3.31 ;<br>1.98         |
| <i>Sma</i> I                | A 18.33. B :13.88 ;<br>4.69                        | A 18.33                            | C 15.34 3.36   | A 18.42                              | A 18.49. C :15.63 ;<br>3.06        |
| <i>Sty</i> I                | A n  | A n                                | A n  | A n                                  | A n                                |
| <i>Xba</i> I                | A 6.15 4.69 3.24 ;<br>2.77 1.39                    | B 3.60 2.61 2.16                   | C 11.88 4.74 2.18  | D 5.33 4.47 3.60 ;<br>3.03 1.14      | E n                                |
| <i>Xho</i> I                | A 16.76 1.85                                       | B 10.10 3.40                       | C 0  | A 16.57 1.77                         | D : 18.21                          |
| mtDNA 平均值<br>( kb )<br>mean | 18.52 ± 0.21                                       | 18.44 ± 0.21                       | 18.56 ± 0.18   | 18.57 ± 0.19                         | 18.36 ± 0.11                       |

注 “ 0 ”表示没有切点；“ n ”表示有较多片段，难以统计

Notes :mtDNA not being digested are marked with “ 0 ”. The fragments not being detected completely are marked with “ n ”

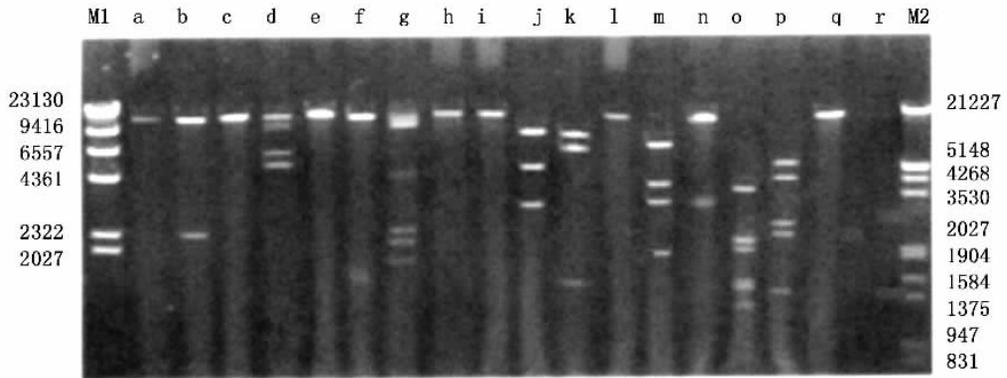


图 1 七带石斑鱼第一种限制性单倍型

Fig.1 The first haplotype of *E. septemfasciatus*

M1 :λDNA/ *Hind* III ; a. *Bam*H I ; b. *Bgl* I ; c. *Bgl* II ; d. *Dra* I ; e. *Eco*R I ; f. *Eco*R V ; g. *Hind* III ; h. *Kpn* I ; i. *Mlu* I ; j. *Pst* I ; k. *Pvu* II ; l. *Sal* I ; m. *Scn* I ; n. *Sma* I ; o. *Sty* I ; p. *Xba* I ; q. *Xho* I ; r. 空白对照 ; M2 : λDNA/ *Eco*R I + *Hind* III

表 3 5 种石斑鱼限制性单倍型特征

Tab.3 mtDNA haplotypes of five species of groupers

| 限制性单倍型<br>haplotype  | 蜂巢石斑鱼<br><i>E. merra</i> | 鲑点石斑鱼<br><i>E. fario</i> | 青石斑鱼<br><i>E. awoara</i> | 赤点石斑鱼<br><i>E. akaara</i> | 七带石斑鱼<br><i>E. septemfasciatus</i> |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| 1. DAAAABAAAAABAA    | 1( 8.3% )                |                          |                          |                           |                                    |
| 2. CAAAABAABAABAA    | 1( 8.3% )                |                          |                          |                           |                                    |
| 3. BAAAAAAAAAAAAA    | 1( 8.3% )                |                          |                          |                           |                                    |
| 4. CAAAAAAAAAAAAABAA | 1( 8.3% )                |                          |                          |                           |                                    |
| 5. CAAAABAAAAA       | 2( 16.7% )               |                          |                          |                           |                                    |
| 6. BAAAAAAAAAAAAABAA | 1( 8.3% )                |                          |                          |                           |                                    |
| 7. CAAAABAAAAABAA    | 4( 33.3% )               |                          |                          |                           |                                    |
| 8. AAAAAABAAAAABAA   | 1( 8.3% )                |                          |                          |                           |                                    |
| 9. ACBBBBBACBBABB    |                          | 1( 9.1% )                |                          |                           |                                    |
| 10. ACBBBBBAABBABB   |                          | 7( 63.6% )               |                          |                           |                                    |
| 11. ABBBBBBAABBABB   |                          | 1( 9.1% )                |                          |                           |                                    |
| 12. ACBBBAAAABBABB   |                          | 1( 9.1% )                |                          |                           |                                    |
| 13. ACBBBBAABBABB    |                          | 1( 9.1% )                |                          |                           |                                    |
| 14. ADCCABDBCCCC     |                          |                          | 1( 8.3% )                |                           |                                    |
| 15. AEC CABDBCCCC    |                          |                          | 3( 25.0% )               |                           |                                    |
| 16. AECDCABDBCCCC    |                          |                          | 1( 8.3% )                |                           |                                    |
| 17. AECDCABBABCCCC   |                          |                          | 2( 16.7% )               |                           |                                    |
| 18. ADCCABABCCCC     |                          |                          | 1( 8.3% )                |                           |                                    |
| 19. AFCCABABCCCC     |                          |                          | 2( 16.7% )               |                           |                                    |
| 20. AFCCABABDCCC     |                          |                          | 1( 8.3% )                |                           |                                    |
| 21. AFCDCABDBCCCC    |                          |                          | 1( 8.3% )                |                           |                                    |
| 22. EGDCCA ADEBEADA  |                          |                          |                          | 7( 53.8% )                |                                    |
| 23. EGD BDA ADEBEADA |                          |                          |                          | 1( 7.7% )                 |                                    |
| 24. EGDCCA ACEBEADA  |                          |                          |                          | 3( 23.1% )                |                                    |
| 25. EGDCCA ACABEADA  |                          |                          |                          | 1( 7.7% )                 |                                    |
| 26. EGDCCA ADABEADA  |                          |                          |                          | 1( 7.7% )                 |                                    |
| 27. AHCCEBAEFBFCED   |                          |                          |                          |                           | 10( 90.9% )                        |
| 28. AHCCEBAEFBFAED   |                          |                          |                          |                           | 1( 9.1% )                          |
| 合计个体数 total          | 12                       | 11                       | 12                       | 13                        | 11                                 |

注：“( )”内数字表示某种限制性单倍型出现的频率。酶的排列顺序是：*Bam*H I、*Bgl* I、*Bgl* II、*Eco*R I、*Eco*R V、*Kpn* I、*Mlu* I、*Pst* I、*Pvu* II、*Sal* I、*Scn* I、*Sma* I、*Xba* I、*Xho* I

Notes: The haplotype's frequency in population is showed in“( )”. The order of the enzymes in the haplotypes is: *Bam*H I, *Bgl* I, *Bgl* II, *Eco*R I, *Eco*R V, *Kpn* I, *Mlu* I, *Pst* I, *Pvu* II, *Sal* I, *Scn* I, *Sma* I, *Xba* I, *Xho* I

## 2.2 种间关系

按 Nei 和 Li<sup>[8]</sup>提出的片段法计算出了 5 种石斑鱼种间的净遗传距离( $P_{net}$ ) 结果见表 4。

## 2.3 分子聚类图的构建

根据种间的净遗传距离,利用 MEGA2.1 软件中的 UPGMA 法和 NJ 法分别构建系统树(图 2)。

表 4 5 种石斑鱼的净遗传距离  $P_{net}$  值

Tab.4 Genetic distances( $P_{net}$ ) among 5 species of groupers

|                                    | 蜂巢石斑鱼<br><i>E. merra</i> | 鲑点石斑鱼<br><i>E. fario</i> | 青石斑鱼<br><i>E. awoara</i> | 赤点石斑鱼<br><i>E. akaara</i> | 七带石斑鱼<br><i>E. septemfasciatus</i> |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| 蜂巢石斑鱼<br><i>E. merra</i>           |                          |                          |                          |                           |                                    |
| 鲑点石斑鱼<br><i>E. fario</i>           | 0.0694                   |                          |                          |                           |                                    |
| 青石斑鱼<br><i>E. awoara</i>           | 0.1337                   | 0.1590                   |                          |                           |                                    |
| 赤点石斑鱼<br><i>E. akaara</i>          | 0.1090                   | 0.0825                   | 0.1131                   |                           |                                    |
| 七带石斑鱼<br><i>E. septemfasciatus</i> | 0.1286                   | 0.1153                   | 0.0724                   | 0.1336                    |                                    |

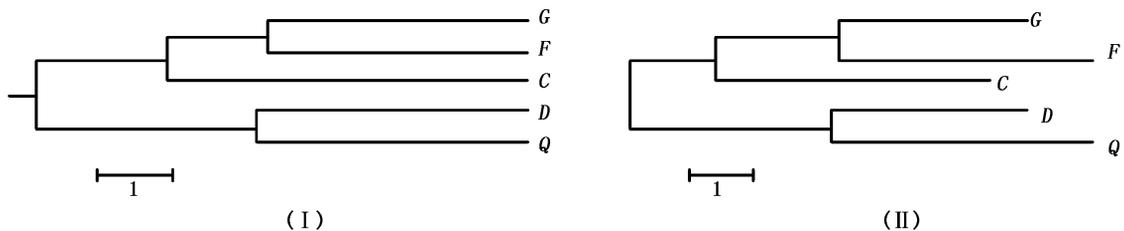


图 2 5 种石斑鱼的分子聚类图

Fig.2 Phylogenetic trees of five species of groupers

F:蜂巢石斑鱼;G:鲑点石斑鱼;Q:青石斑鱼;C:赤点石斑鱼;D:七带石斑鱼 (I):UPGMA 法建立 (II):NJ 法建立  
F:*E. merra*;G:*E. fario*;Q:*E. awoara*;C:*E. akaara*;D:*E. septemfasciatus*。(I):UPGMA tree (II):NJ tree

## 3 讨论

在蜂巢石斑鱼 12 个个体、鲑点石斑鱼 11 个个体、青石斑鱼 12 个个体、赤点石斑鱼 13 个个体和七带石斑鱼 11 个个体内分别检出了 8 种、5 种、8 种、5 种和 2 种限制性单倍型,前 4 种石斑鱼在比较少的个体中就检出了较多的单倍型,可看出这 4 种石斑鱼种内具有较丰富的遗传变异。在这 5 个种中未发现共同的单倍型,说明在同一个海区不同种的石斑鱼在生殖上彼此间是隔离的,在短期内未发生基因交流。

本文采用了单倍型间基因多样性指数( $h$ )、单倍型间的平均遗传距离( $P$ )和核苷酸多样性指数( $\pi$ )等对群体内的遗传多样性进行了描述。蜂巢石斑鱼、鲑点石斑鱼、青石斑鱼、赤点石斑鱼和七带石斑鱼种群内单倍型间的基因多样性指数( $h$ )分别为 0.8943、0.6186、0.9242、0.6927 和 0.1820。其中,以青石斑鱼的  $h$  值最高。而七带石斑鱼只检测到两种限制性单倍型, $h$  值远低于其它四个种。虽然七带石斑鱼的采样时间前后仅一个多月,远远少于其它四个种的采样时间,但由于石斑鱼无论是幼鱼或成鱼,均不

作长距离移动,其栖息有明显的地域性<sup>[9,10]</sup>,所以七带石斑鱼的  $h$  值低与采样时间短无关。mtDNA 为母性遗传,其有效种群大小仅为核基因组的四分之一,易受遗传漂变(genetic drift)的影响,进化速度快,其奠基群体的大小对后代种群核苷酸多样性有很大的影响<sup>[11]</sup>。所以七带石斑鱼的  $H$  值低可能是受到遗传漂变的影响;或是由于在历史上经历了遗传瓶颈(genetic neck)效应,由一个相对较小的群体演化而来。除去七带石斑鱼,其它 4 个种的基因多样性指数均高于瓯江彩鲤(0.7517)<sup>[12]</sup>、银鲫(0.4417)、彭泽鲫(0.1895)和野鲫(0.6177)<sup>[13]</sup>,也高于鳙(0.584)及草鱼(0.231)<sup>[14]</sup>,表明这 4 种石斑鱼的 mtDNA 多态程度较高。

蜂巢石斑鱼限制性单倍型间的遗传距离为 0.11% ~ 1.53%,平均为 0.62% ± 0.31%;鲑点石斑鱼限制性单倍型间的遗传距离为 0.14% ~ 1.19%,平均为 0.64% ± 0.37%;青石斑鱼限制性单倍型间的遗传距离为 0.26% ~ 2.32%,平均为 1.12% ± 0.55%;赤点石斑鱼限制性单倍型间的遗传距离为 0.25% ~ 1.59%,平均为 0.72% ± 0.42%;七带石斑鱼两种限制性单倍型间的遗传距离为 0.45%。在这五种石斑鱼中,青石斑鱼的变异程度最

高,七带石斑鱼的变异程度最低。与其它海水鱼类如南非无须鳕(2.2%)、深水无须鳕(0.9%)、*Arius felis*(Hardhead sea catfish)(0.8%)、海鲢(0.6%)、毒棘豹蟾鱼(0.9%)、湾鳃孔蟾鱼(0.6%)、大西洋鲱(0.2%~4.4%)、太平洋鲱(0.2%~1.8%)、鳊(0.6%)和 *Hpolostethus atlanticus*(Orange roughy)(0.2%)<sup>[15]</sup>等的限制性单倍型间遗传距离相比,5种石斑鱼的 mtDNA 的变异程度较高。核苷酸多样性指数( $\pi$ )越小,多态程度越低。由于 $\pi$ 值考虑了各种 mtDNA 单倍型在群体中所占的比例,因而在衡量一个群体的 mtDNA 多态程度时,比单纯的遗传距离平均值  $P$  要精确<sup>[16]</sup>。本文中,五种石斑鱼的核苷酸多样性指数分别为 0.22%、0.13%、0.46%、0.17% 和 0.04%。由此可见,青石斑鱼的变异程度最高,七带石斑鱼最低。与其它鱼类如兴国红鳊(1.18%)、玻璃红鳊(0.86%)、荷包红鳊(1.47%)、瓯江彩鳊(2.86%)<sup>[12]</sup>、银鳊(0.249%)、彭泽鳊(0.047%)、野鳊(0.539%)<sup>[13]</sup>、云南不同地区鲫鱼高背型(0.059%)和低背型(0.057%)<sup>[17]</sup>、鲢(0.681%)、鳙(0.584%)、草鱼(0.002%)和青鱼(0.011%)<sup>[14]</sup>等的核苷酸多样性指数相比,五种石斑鱼的 mtDNA 的变异程度处于中等水平。而且就已报道鱼类的歧化值来看,淡水鱼类遗传变异要比海水鱼类大,这同淡水鱼类栖息水体的分隔程度较大有关<sup>[18]</sup>。所以总体来看,除七带石斑鱼外,其它四种石斑鱼的遗传变异程度较高,说明湛江沿海石斑鱼群体的遗传多样性比较丰富,没有因为捕捞或其它因素而降低,种质资源状况尚保持在较好状态。这与郑莲等<sup>[5]</sup>用 RAPD 方法对蜂巢石斑鱼遗传多样性的研究结果相一致。青石斑鱼和赤点石斑鱼是我国网箱养殖石斑鱼的重点对象,从本研究的结果来看,在五种石斑鱼中青石斑鱼的遗传变异程度处于最高水平,赤点石斑鱼遗传变异程度处于中等水平,说明这两种石斑鱼野生种群的遗传多样性没有因为人工养殖的影响而降低。这也和石斑鱼人工繁殖技术尚未成熟,养殖苗种基本上靠捕捞天然鱼苗有关<sup>[19]</sup>。

目前,分子生物学数据在陆地生物的分类和系统演化研究中已得到广泛应用,在微生物、植物、动物分类鉴定中取得了大量研究成果,其在近缘种及种以下水平生物的分类鉴定中十分有效。一般认为,在研究亲缘关系较近的类群的进化关系时,mtDNA 得到的进化谱系比常染色体分析得到的进化谱系更接近于真实物种树(species tree)<sup>[20]</sup>。区分物种的亲缘关系,建立类群系统发育关系对于生物多样性测度和保护目标的确定非常重要<sup>[21]</sup>。本实验研究了5种石斑鱼相互之间的净遗传距离,依据种间的净遗传距离,应用 MEGA 2.1 程序中的 NJ 法和 UPGMA 法分别构建了 NJ 系统树和 UPGMA 系统树(图 2),两种系统树具有相同的拓扑结构。其中,蜂巢石斑鱼和鲢点石斑鱼、青石斑鱼和七带石斑鱼的遗传距离较小,亲缘关系密切;鲢点石

斑鱼和青石斑鱼的遗传距离最大,亲缘关系最远。蜂巢石斑鱼和鲢点石斑鱼首先聚在一起,然后和赤点石斑鱼聚类,最后再与青石斑鱼和七带石斑鱼相聚。

### 参考文献:

- [1] 成庆泰,郑葆珊(编).中国鱼类系统检索(上、下册)[M].北京:科学出版社,1997.289-293.
- [2] Morris A V, Roberts C M, Hawkins J P. The threatened status of groupers (*Epinephelus*) [J]. Biodiversity and Conservation, 2000, 9: 919-942.
- [3] Brown W M. Evolution of animal mitochondrial DNA [A]. Nei M, Koehler editors. Evolution of genes and proteins [C]. Sunderland: Sinauer Associates Inc, 62-85.
- [4] 夏德全,王文君.动物 mtDNA 研究及在鱼类种群遗传结构研究中的应用[J].水产学报,1998,22(4):364-370.
- [5] 郑莲,刘楚吾.蜂巢石斑鱼随机扩增多态性 DNA 的初步研究[J].湛江海洋大学学报,2002,22(4):14-18.
- [6] 戴建华,殷文莉,杨代淑,等.鲈鱼 mtDNA 的酶切图谱[J].水产学报,1994,18(4):312-313.
- [7] 葛颂,洪德元.遗传多样性及检测方法[M].北京:中国科学技术出版社,1994.123-140.
- [8] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(10):5269-5273.
- [9] Kevinl R, Yvonne S. Temporal and spatial trends in spawning aggregation of camouflage grouper, *Epinephelus ployphkadion*, in Pohnpei, Micronesia [J]. Kluwer Academic Publishers, 2002, 63(1):27-39.
- [10] 薄治礼,周婉霞.石斑鱼增殖放流研究[J].浙江海洋学院学报(自然科学版),2002,21(4):321-326.
- [11] Robert D W, Peter M G. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries [J]. Rev Fish Biol Fish, 1994, 4: 300-325.
- [12] 王成辉,李思发,徐志彬,等.瓯江彩鳊 mtDNA 的限制性内切酶分析[J].上海水产大学学报,2002,11(1):14-18.
- [13] 张辉,董新红,叶玉珍,等.三个三倍体鲫鱼品系及野鲫 mtDNA 的比较[J].遗传学报,1998,25(4):330-336.
- [14] 李思发,吕国庆, Louis B. 长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析[J].动物学报,1998,44(1):82-93.
- [15] Billington N, Hebert P D N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1991, 48(suppl.):80-94.
- [16] 李祥龙,张亚平,陈圣偶,等.山羊 mtDNA 多态性及其起源分化研究[J].畜牧兽医学报,1999,30(4):313-319.
- [17] 罗静,张亚平,朱春玲,等.鲫鱼遗传多样性的初步研究[J].遗传学报,1999,26(1):36-38.
- [18] 吕国庆,李思发.鱼类 mtDNA 多态研究和应用进展[J].中国水产科学,1998,15(3):94-103.
- [19] 谢志明.牙鲆、石斑鱼养殖技术[M].北京:中国农业出版社,1999.182-183.
- [20] Moore W S. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees [J]. Evolution, 1995, 49(4):718-726.
- [21] 杨玉慧,李义明.分子生态学研究与动物多样性保护[J].生物多样性,2001,3(3):284-293.