

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*

庄 轩^{①†} 丁少雄^{①②***} 郭 丰^① 王 军^① 苏永全^①
张其永^① 李祺福^②

(① 厦门大学海洋学系 亚热带海洋研究所, 厦门 361005; ② 厦门大学生物学系, 厦门 361005)

摘要 石斑鱼的分类一直是鱼类系统分类学中的一个难题. 为探讨中国近海石斑鱼类系统进化关系, 通过 PCR 扩增获得了石斑鱼亚科(Epinephelinae)6 属 28 个种类的线粒体细胞色素 *b* 基因片段序列. 采用多个生物软件对序列变异和碱基组成进行分析, 计算了 Kimura 2-parameter 遗传距离、转换/颠换比等遗传信息指数, 并结合 GenBank 上石斑鱼属的同源序列, 以东洋鲈(*Niphon spinosus*)、真鲷(*Pagrus major*)等为外群构建 NJ, MP, ML 和 ME 系统树. 从分子系统学的角度并结合形态学特征得出了如下结果: (i) 鳃棘鲈属(*Plectropomus*)最先分化, 是石斑鱼亚科中原始类群; (ii) 侧牙鲈属(*Variola*)与九棘鲈属(*Cephalopholis*)具有较近的亲缘关系; (iii) 九棘鲈属是一个单系群, 并且较石斑鱼属(*Epinephelus*)原始; (iv) 宽额鲈(*Promicrops lanceolatus*)和驼背鲈(*Cromileptes altivelis*)可以归入石斑鱼属; (v) 石斑鱼属内部存在两个平行进化的姐妹分支.

关键词 石斑鱼亚科 分子系统学 细胞色素 *b* 基因 线粒体 DNA

石斑鱼亚科(Epinephelinae)隶属于鲈形目(Perciformes), 鲈亚目(Percoidei), 鲷科(Serranidae), 其种类繁多, 广泛分布于全球热带、亚热带大陆沿岸及岛礁海域^[1], 其中许多种类是世界上重要的海洋经济鱼类. 由于石斑鱼类为定居性鱼类, 长期以来相似生活环境造成的平行演化使得它们在外形及骨骼形态上都表现出较高趋同性, 许多石斑鱼类之间缺乏

可用于比较的同源性状, 分类上多以条纹、斑点及体色作为主要依据. 然而, 在不同生理条件下, 尤其在应激状态下, 许多石斑鱼类的体色花纹往往会发生明显变化, 某些种类的幼鱼与成鱼之间也有显著差别, 常由此引起一些种类鉴定上的失误和系统分类学上的争议. 因此, 石斑鱼类的分类一直是鱼类系统分类学中的一个难题. 目前, 石斑鱼中存在同种异名和

收稿日期: 2005-05-29; 接受日期: 2005-10-19

* 国家自然科学基金项目(批准号: 40306023)、福建省重大科技项目(批准号: 2002N009)和中国高新技术研究计划(批准号: 2001AA621010)资助
† 同等贡献

** 联系人, E-mail: sxding@xmu.edu.cn

同名异种的分类混乱,不同作者所编的分类系统也由于个人观点不同存在较大差异.如国内外在宽额鲈的归属问题,褐石斑鱼和云纹石斑鱼是否为两个独立的物种等问题上都存在分歧. Heemstra 等人^[1]所著联合国粮农组织(FAO)物种目录之《Groupers of the World》则将宽额鲈归入石斑鱼属,而孟庆闻等人^[2]所著《鱼类分类学》将其单独列为一属.成庆泰等人^[3]所著《中国鱼类系统检索》中认为褐石斑鱼和云纹石斑鱼是两个物种,而《Groupers of the World》则认为它们是同一物种^[1].分类上的混乱和争议不仅使石斑鱼类的系统进化研究受到很大影响,也给养殖生产中种苗及亲本的引进和鉴定带来了一定困难,尤其是用于人工繁育的石斑鱼亲本,物种鉴定上的失误将可能使得繁育过程出现杂交现象而导致人工繁育的失败.

近年来,分子生物学技术的飞速发展,尤其是 DNA 测序技术的完善,使得分子系统学已被广泛应用到鱼类的系统进化研究.动物线粒体 DNA(mtDNA)由于结构简单、严格的母系遗传、几乎不发生重组、进化速度快且不同区域进化速度存在差异等特点,已成为研究动物起源进化、群体遗传、系统发育等的重要标记.其中,细胞色素 *b*(cytochrome *b*, 简称 Cyt *b*)基因的结构和功能在 mtDNA 的 13 个蛋白质编码基因中被了解的最清楚^[4],且进化速度适中,尤其适合种属水平的系统发育关系的研究,被认为是解决分类及系统进化问题最可信的分子标记之一^[5],也是目前为止在鱼类分子进化研究中最常用的标记之一^[6-8]. Craig 等人^[9]曾利用线粒体 16S rDNA 基因序列首次较系统地研究了南北美洲沿岸 42 种石斑鱼类的系统进化关系,而后 Maggio 等人^[10]补充了东大西洋 8 种石斑鱼的 16S rDNA 和 Cyt *b* 基因的序列数据,但仍缺乏印度西太平洋石斑鱼类的相关分子数据来对全球石斑鱼类的系统关系进行重建.本文通过对中国近海石斑鱼亚科 28 个种类的线粒体 Cyt *b* 基因片段的序列分析,构建它们的分子系统树,为石斑鱼类分类系统和进化关系提供了更多的分子系统学依据,补充了 GenBank 中石斑鱼类的基因序列数据.

1 材料与方法

1.1 样品采集和 DNA 提取

用于本研究的石斑鱼亚科 6 属 28 个种类于 2000~2004 年分别从中国福建、广东、海南和印度南部 Chennai 的渔市场、渔港码头和养殖网箱采集(表 1).所有样品均以 95%酒精保存.取鱼体背部肌肉约 50 mg,参照 Sambrook 等人^[11]的酚/氯仿抽提方法稍加改进提取总 DNA.

1.2 PCR 扩增及序列测定

引物序列为: 28-For 5'-CGAACGTTGATATGAAAACCATCGTTG-3'^[12]和 34-Rev 5'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCTCA-3'^[13].PCR 反应使用大约 100 ng 基因组 DNA 作为模板.反应体积为 50 μ L,其中 dNTPs 0.2 mmol/L,引物 1 μ mol/L, MgCl₂ 2.0 mmol/L, 10 \times 缓冲液 5.0 μ L, *Ex Taq* 酶 2 U.反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 30 个循环,每个包括 92 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s; 再 72 $^{\circ}$ C 链延伸 7 min. PCR 产物经电泳检测纯化后由上海博亚生物公司测序.

1.3 序列排定和系统发育分析

每个个体测得的正反链序列用 GeneDoc 软件^[14]进行拼接,序列的多重排定由 CLUSTAL X 软件^[15]完成,并辅以人工校对;用 DnaSP 软件^[16]计算多态位点和多态简约信息位点数;以 MEGA 软件^[17]统计序列的平均碱基组成和转换/颠换比率(Ts/Tv),基于 Kimura-2 parameter 计算遗传距离.

系统分析采用邻接法(neighbor-joining, NJ)、最大简约法(maximum-parsimony, MP)、最大似然法(maximum-likelihood, ML)和最小进化法(minimum-evolution, ME)构建分子系统树,并以鲈亚目鲷科东洋鲈(*Niphon spinosus*)、鲷科真鲷(*Pagrus major*)和红斑鲷(*Pagrus auriga*)的同源序列(GenBank 登录号分别为: AB108493, NC003196 和 NC005146)作为外类群. NJ 法和 ME 法使用 MEGA 软件^[17],遗传距离模型分别选择 Kimura 双参数模型和 *p*-distance,将序列中的转换和颠换位点均视为信息位点并对所有位点一

表 1 样品种类、采集地及序列在 GenBank 中的登录号

种类及其类别 ^{a)}	采集地	GenBank 登录号
石斑鱼属 <i>Epinephelus</i>		
点带石斑鱼 <i>E. malabaricus</i>	福建、海南	AY738244
斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	福建、广东、海南	AY738240
褐石斑鱼 <i>E. bruneus</i>	福建、海南	AY950700
褐点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	福建、广东、海南	AY950695
纵带石斑鱼 <i>E. latifasciatus</i>	福建、海南	AY738243
长棘石斑鱼 <i>E. longispinis</i>	海南、印度	AY950697
布氏石斑鱼 <i>E. bleekeri</i>	福建、海南	AY738238
鲑点石斑鱼 <i>E. fario</i>	福建、海南	AY738242
玳瑁石斑鱼 <i>E. quoyanus</i>	福建、海南	AY950702
宝石石斑鱼 <i>E. areolatus</i>	福建、海南	AY950696
赤点石斑鱼 <i>E. akaara</i>	福建、广东、海南	AY738235
网纹石斑鱼 <i>E. chlorostigma</i>	海南	AY738239
六带石斑鱼 <i>E. sexfasciatus</i>	海南、印度	AY738248
双棘石斑鱼 <i>E. diacanthus</i>	海南、印度	AY950699
青石斑鱼 <i>E. awoara</i>	福建、海南	AY738237
电纹石斑鱼 <i>E. radiatus</i>	海南	AY950701
云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>	福建、广东、海南	AY738247
镶点石斑鱼 <i>E. amblycephalus</i>	海南	AY738236
小点石斑鱼 <i>E. epistictus</i>	海南	AY738241
波纹石斑鱼 <i>E. undulosus</i>	海南、印度	AY950698
宽额鲈属 <i>Promicrops</i>		
宽额鲈 <i>Pr. lanceolatus</i>	福建、海南	AY738249
驼背鲈属 <i>Cromileptes</i>		
驼背鲈 <i>Cr. altivelis</i>	海南	AY738234
九棘鲈属 <i>Cephalopholis</i>		
台湾九棘鲈 <i>C. formosa</i>	印度	AY950691
横带九棘鲈 <i>C. pachycentron</i>	海南	AY738232
斑点九棘鲈 <i>C. argus</i>	福建、海南	AY738233
侧牙鲈属 <i>Variola</i>		
侧牙鲈 <i>V. louti</i>	福建、海南	AY950694
鳃棘鲈属 <i>Plectropomus</i>		
豹纹鳃棘鲈 <i>P. leopardus</i>	福建、海南	AY950692
横斑鳃棘鲈 <i>P. laevis</i>	海南	AY950693

a) 属级分类阶元依据文献[3]

致性加权, 对于序列中的插入/缺失位点则采用成对删除. MP法使用 PAUP4.0b10 软件^[18]中的简约法标准和启发式搜寻, 构树方法采用 TBR (tree bisection reconnection), 逐步加入法随机加入序列, 所有数据均未加权. ML 法 PHYLIP-3.63 软件包^[19]中的 dnaml 程序, Ts/Tv 设为 2.7, 再由 consense 程序得到一个多数原则合意树. 各树均采用重复抽样分析 1000 次检验分子系统树各分枝的置信度.

2 结果

2.1 序列变异及碱基组成

经对位排序, 获得 28 种石斑鱼类大小约为 430 bp 的碱基序列, 并在 GenBank 数据库登录, 登录号见表 1. 其中包括 *Cyt b* 编码基因片段 402 bp, 无碱基的插入或缺失; *Cyt b* 编码基因之前有一长度为 19~28 bp 的变异区, 包含线粒体上 tRNA^{Glu} 及其与 *Cyt b* 编

码基因之间的非编码区. 变异区长度在属间显示出明显的差别, 其中侧牙鲈属最长, 鳃棘鲈属最短. 所得序列共含单态位点 248 个, 多态位点 174, 其中多态简约信息位点为 153 个, 占整段序列的 35.6%. Cyt *b* 基因序列的变异主要发生在三联密码子的第三个碱基上, 符合蛋白质编码基因密码子第三位点进化最快的一般规律. 总的来看, 序列中的转换明显比颠换多, $Ts/Tv=2.7$, 说明序列突变还未达到饱和, 其中 T-C 转换多于 A-G, A-C 和 A-T 颠换多于 C-G 和 T-G. A, T, G 和 C 的含量平均值分别为 25.9%, 29.5%, 15.3% 和 29.3%, 其中 A+T 含量(55.4%)明显高于 C+G 含量(44.6%), 并表现出很强的反 G 偏倚, 即 G 的含量明显低于其他 3 种碱基的含量, 这些都与脊椎动物线粒体 DNA 的特点相一致^[20].

2.2 系统发育分析与系统进化树的构建

系统发育分析得到 28 种石斑鱼亚科鱼类的 NJ, ME 和 ML 系统树(图 1), 各树的拓扑结构总体趋势相似. 从石斑鱼属内种间系统进化看, 各树均以较高的置信度值将其分成两个类群, 其中电纹石斑鱼、小点石斑鱼和镶点石斑鱼聚为一群, 石斑鱼属内的其他种类与驼背鲈、宽额鲈聚为另一群. 石斑鱼亚科 6 个属分为 3 大支系: 第一支系包括石斑鱼属、宽额鲈属和驼背鲈属, 宽额鲈和驼背鲈均聚入石斑鱼属内部; 第二支系由九棘鲈属的 3 个种类所组成的单系群与侧牙鲈属组成; 第三支系为鳃棘鲈属的 2 个种类组成的单系群. 第一支系先与第二支系聚类, 第三支系鳃棘鲈属在系统树的最基部, 为 6 个属中最原始的一类群.

3 讨论

结果中各系统树的拓扑结构总体趋势一致显示了, 在所研究的中国近海石斑鱼亚科中, 鳃棘鲈属最先分化, 其次是侧牙鲈属和九棘鲈属, 石斑鱼属处于系统进化树的顶端, 代表着最新演化的种类, 是石斑鱼亚科中最繁盛的一属, 也是目前系统发育的高峰, 与 Craig 等人^[9]利用线粒体 16S rDNA 基因序列对南北美洲沿岸 42 种石斑鱼类系统进化的研究和 Herwerden 等人^[21]利用核基因组内含子 ETS2 对澳大利亚大堡礁几种石斑鱼类的研究结果相似.

3.1 鳃棘鲈属、九棘鲈属和侧牙鲈属的系统进化地位

各树都显示所研究石斑鱼亚科的 6 个属中, 鳃棘鲈属最先分化出来, 呈明显的单系性. 在幼体发育上, 鳃棘鲈属是石斑鱼亚科鱼类中相当原始的一类群^[22], 基于核基因片段的研究也表明鳃棘鲈属为单系群且比所研究的其他石斑鱼原始^[21]. 九棘鲈属的 3 个种类也自成一簇, 是比石斑鱼属原始的一个单系群, 与基于 16S rDNA 基因序列的研究一致^[9], 也符合 Smith^[23], Leis^[22]和 Heemstra 等人^[1]根据幼体发育和骨骼系统的研究结果. 此外, NJ, ME 和 ML 树均表明侧牙鲈与九棘鲈属亲缘关系最近, 与石斑鱼亚科的其他几个属相比, 可能有较近的共同祖先. 侧牙鲈与九棘鲈属、石斑鱼属和鳃棘鲈属的遗传距离依次为 0.229, 0.263 和 0.291. 但在 Herwerden^[21]利用核基因片段构建的 NJ 树中, 侧牙鲈则先与石斑鱼属聚为一枝, 然后再与九棘鲈属聚合. 从形态学角度上讲, 侧牙鲈属与九棘鲈属都具有 9 条背鳍鳍棘, 而石斑鱼属一般具有 11 条背鳍鳍棘. 侧牙鲈属的尾鳍新月形在石斑鱼亚科中具有种属特异性. 因此, 结合形态学方面的证据, 本文倾向于认为侧牙鲈属与九棘鲈属具有较近的亲缘关系, 甚至可能是比九棘鲈属和石斑鱼属更为原始的分化类群.

3.2 宽额鲈和驼背鲈的归属问题

在本研究中, 虽然宽额鲈和驼背鲈的系统分化地位在不同系统树中的具体分支不尽相同, 但均显示与点带石斑鱼、斜带石斑鱼、云纹石斑鱼和褐石斑鱼有较近的亲缘关系, 成为石斑鱼属内部分支的一簇, 显示了宽额鲈和驼背鲈与石斑鱼属种类分化程度不高.

宽额鲈在系统分类学中的位置至今混淆不清, 孟庆闻等人^[2]所著《鱼类分类学》根据侧线管有分枝以及头颅在眼间隔处特别宽大的特征将宽额鲈独立列为一属; 成庆泰等人^[3]所著《中国鱼类系统检索》也将宽额鲈作为一个属; 而 Smith^[24]根据骨骼发育特征将宽额鲈属(包括 *Pr. itajara* 和 *Pr. lanceolatus*)作为一个亚属归入石斑鱼属; Heemstra 等人^[1]以宽额鲈、点带石斑鱼和斜带石斑鱼的大型成鱼的前侧线管都

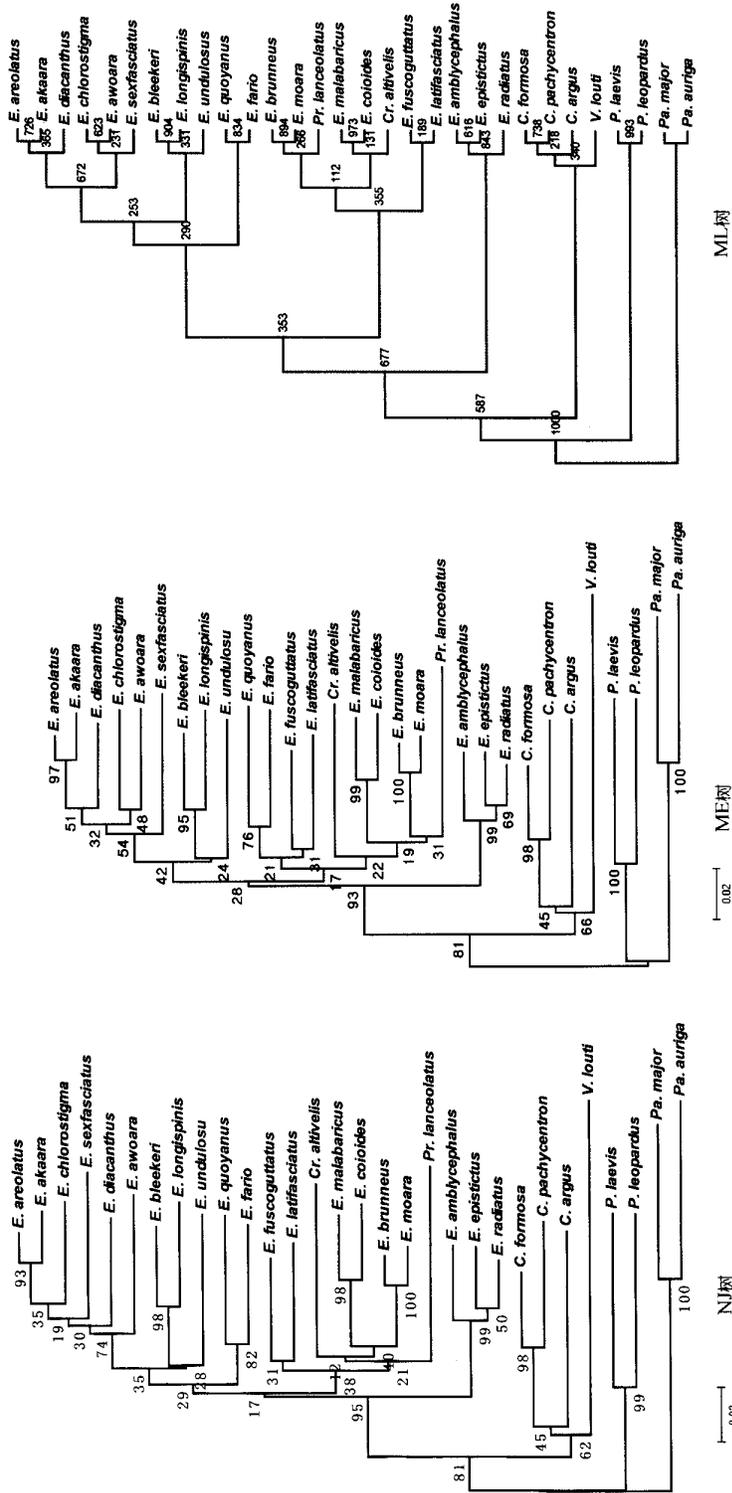


图 1 基于 28 种石斑鱼亚科鱼类 Cyt *b* 基因的 NJ, ME 和 ML 系统树

节点旁数据为 1000 次 bootstrap 检验后置信度值(%)

具分枝为据支持 Smith 的分类方法. 在 Craig 等人^[12]基于 16S rDNA 基因所建立的系统树中, 宽额鲈也落于石斑鱼属内的一个分支中. 本文研究结果也表明, 在 Cyt *b* 序列上, 宽额鲈与点带石斑鱼和斜带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, 也倾向于应将宽额鲈归入石斑鱼属.

驼背鲈以其背部驼背状隆起、后鼻孔长裂缝状等特殊的形态学特征明显区别于石斑鱼亚科中的其他属种. 据此, 国内外的分类系统都将驼背鲈单独列为一属. 但本研究所构建的名系统树中驼背鲈均聚入石斑鱼属内部深层分支中, 本实验室通过 16S rDNA 序列的分析也得出了相似的结果(待发表), 与传统形

态分类有较大出入. Heemstra 等人^[1]指出, 目前驼背鲈在石斑鱼亚科系统进化中的地位还不甚明确. Herwerden 等人^[21]利用核基因片段对几种石斑鱼类的研究表明驼背鲈与石斑鱼属的亲缘关系最近. 据此, 本文推论驼背鲈外部形态与分子水平的差异可能是由于表型的进化与基因组的进化不等速, 表型进化出现趋异现象所致, 而仅以形态特征来建立石斑鱼类的系统进化关系有时是不尽人意的^[10,25]. 虽然上述基于不同序列的分子系统研究结果都揭示了驼背鲈与石斑鱼属之间有相当密切的亲缘关系, 但驼背鲈在系统分类中的正确位置的确认还有待于更深入地研究.

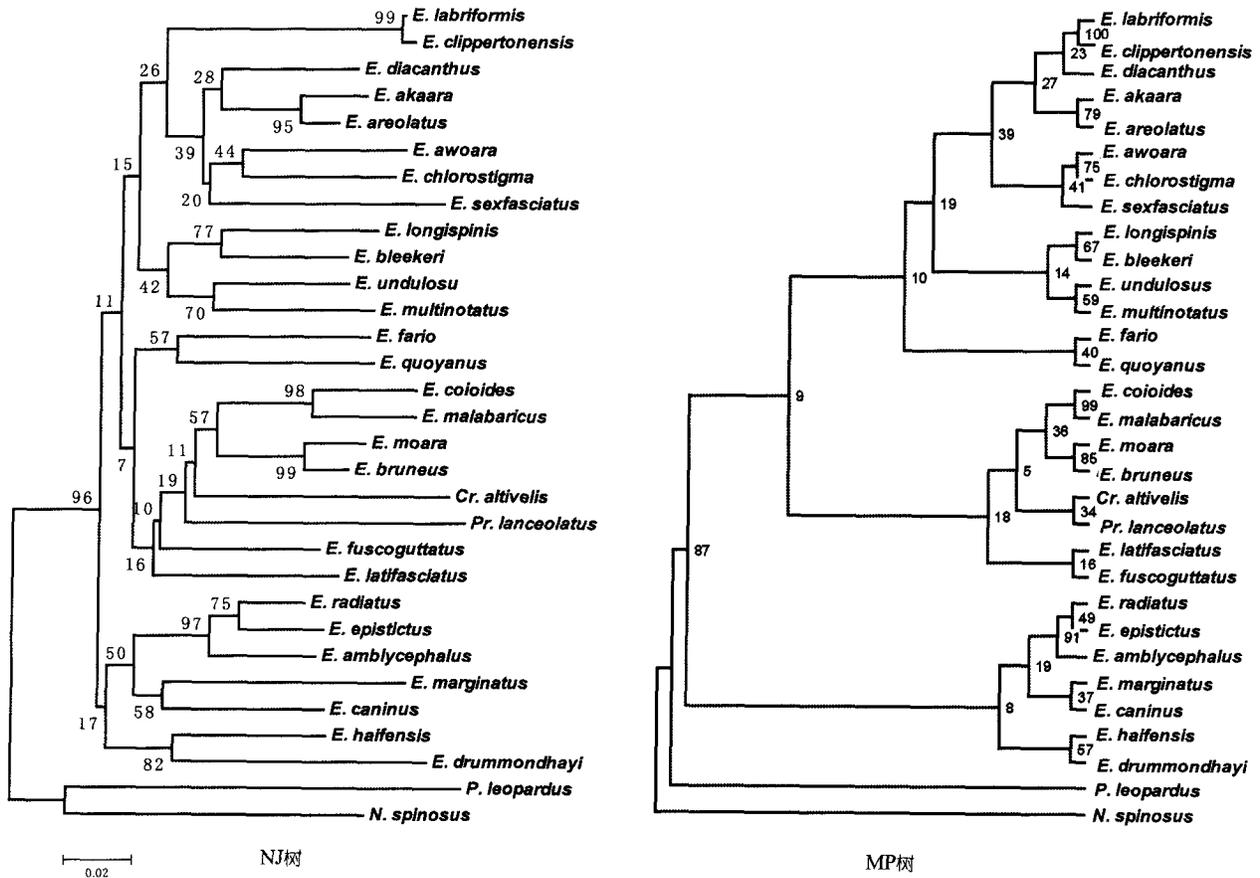


图 2 基于石斑鱼属鱼类(包括宽额鲈和驼背鲈)Cyt *b* 基因的 NJ 和 MP 系统树

节点旁数据为 1000 次 bootstrap 检验后置信度值(%); 加入分析的 GenBank 中石斑鱼属序列登录号: *E. caninus* AJ420204, *E. clippertonensis* AY728098, *E. drummondhayi* AY313997, *E. haifensis* AJ420207, *E. labriformis* AY728136, *E. marginatus* AB179760, *E. multinotatus* AY426254

3.3 石斑鱼属种间系统发生关系

本文所建各系统树均表明, 如果将宽额鲈和驼背鲈都归入石斑鱼属, 中国近海石斑鱼属是一个有共同祖先的单系群, 属内存在两个平行进化的分支(NJ 树和 ME 树置信度分别为 95% 和 93%), 但两类群内部较深分支的拓扑结构未取得较高置信度的支持, 也即类群内部各种间的系统分化关系并不太明确, 这说明了两类群内种间分化时间的间隔非常短, 也暗示了许多近缘石斑鱼可能是在一段较短的时期内快速分化成的. Craig 等人^[9]对美洲沿岸石斑鱼的研究同样表明其属内存在两个分支(NJ 树和 MP 树置信度分别为 100% 和 87%), 群内分化并不明确. 而后 Maggio 等人^[10]又研究了东大西洋 8 种石斑鱼, 并综合 Craig 等人的数据重建系统树, 结果也发现新增的几个种类分别聚入这两大分支中, 但东大西洋、东太平洋和美洲石斑鱼基于 16S rDNA 的系统发生关系与它们的地理分布并不相关. 据此, Maggio 等人推测石斑鱼属可能是多系起源的. 本研究将 GenBank 数据库中石斑鱼属的同源序列加入后重建的 NJ 树和 MP 树(图 2)也表明, 这些不同地理来源的石斑鱼依然以很高的置信度(NJ 树 96%, MP 树 87%)形成与地理分布无关的两大分支. 这是否暗示石斑鱼属这一单系群的共同原始祖先在演化初期首先分化为两大支系, 继而辐射分布全球及进一步的种间分化? 这一推理还有待获得更多的分子依据及生物地理学方面的考证支持.

点带石斑鱼与斜带石斑鱼在分类上一直存在混淆和争议. 由于它们外形相似且分布范围也基本一致, Morgans, Kyushin 等人和 Sainsbury 等人都曾将斜带石斑鱼误定成点带石斑鱼^[1], 《中国鱼类系统检索》^[3]里也仅有点带石斑鱼的记载. 直至目前, 两种石斑鱼的鉴定在水产业中仍然十分混淆, 大陆和台湾地区常将两者混养, 并通称为“青斑”. 本研究中这两种石斑鱼的种间核苷酸差异度为 5.6%, 虽低于石斑鱼属内各种间差异度的平均值(12%), 但仍显著高于斜带石斑鱼不同地理种群之间的差异度(0.8%) (另文发表), 也高于其他近缘种的石斑鱼, 如宝石石斑鱼与赤点石斑鱼(3.3%)、电纹石斑鱼与小点石

斑鱼(4.5%)等. 因此本文认为点带石斑鱼与斜带石斑鱼的分化已达到种间水平, 应属不同种的石斑鱼, 但其亲缘关系仍较为接近, 分化时间较短. 另外, 本实验室通过 Cyt *b* 基因序列与 RAPD, AFLP 分析结合, 还发现点带石斑鱼与斜带石斑鱼之间存在杂交现象(另文发表), 类似的杂交现象在九棘鲈属^[26]和鳃棘鲈属^[21]内也有报道, 近缘种之间易于发生杂交可能是导致石斑鱼类分类混乱的原因之一, 同时这也说明了石斑鱼亚科内种间亲缘关系非常近.

致谢 衷心感谢 Upadhyay S K 协助采集印度洋样品.

参 考 文 献

- 1 Heemstra P C, Randall J E. Groupers of the World. Rome: FAO Species Catalogue, 1993
- 2 孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学. 北京: 中国农业出版社, 1995
- 3 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索(上册). 北京: 科学出版社, 1987
- 4 Irwin D M, Kocher T D, Wilson A C. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *J Mol Evol*, 1991, 32: 128-144
- 5 Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance mitochondrial protein coding genes in resolving relationship among Vertebrates. *Mol Biol Evol*, 1996, 13: 933-942
- 6 何舜平, 刘焕章, 陈宜瑜, 等. 基于细胞色素 *b* 基因序列的鲤科鱼类系统发育研究(鱼纲: 鲤形目). *中国科学, C 辑*, 2004, 34 (1): 96-104
- 7 Song C B, Near T J, Page L M. Phylogenetic Relations among Percid Fishes as Inferred from Mitochondrial Cytochrome *b* DNA Sequence Data. *Mol Phylogenet Evol*, 1998, 10(3): 343-353
- 8 Caldara F, Bargelloni L, Ostellari L, et al. Molecular phylogeny of grey mullets based on mitochondrial DNA sequence analysis: Evidence of a differential rate of evolution at the intrafamily level. *Mol Phylogenet Evol*, 1996, 6(3): 416-424
- 9 Craig M T, Pondalla D L, Franck J P C, et al. On the status of the Serranid Fish genus *Epinephelus*: Evidence for paraphyly based upon 16S rDNA sequence. *Mol Phylogenet Evol*, 2001, 19: 121-130
- 10 Maggio T, Andaloro F, Hemida F. A molecular analysis of some Eastern Atlantic grouper from the *Epinephelus* and *Mycteroperca* genus. *J Exp Mar Biol Ecol*, 321(1): 83-92
- 11 Sambrook J, Fitch E, Maniatis T. *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 12 Meyer A, Kocher T D, Basasibwaki P, et al. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequence. *Nature*, 1990, 347: 550-553

- 13 Cantatore P, Roberti M, Pesole G, et al. Evolutionary analysis of cytochrome *b* sequence in some Perciformes: Evidence for a slower rate of evolution than in mammals. *J Mol Evol*, 1994, 39: 589-597.
- 14 Nicholas K B, Nicholas H B. Jr, Deerfield D W II. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW News*, 1997, 4: 14
- 15 Thompson J D, Gibson T J, Plewnia F. The Clustal_X windows interface: Flexible strategies ed for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. *Nuc Aci Res*, 1997, 25: 4876-4882
- 16 Rozas J, Rozas R. DnaSP (DNA Sequence Polymorphism), Version 4.00. An integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 1999, 15: 174-175
- 17 Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA (Molecular evolutionary genetics analysis), Version 3.0. Tempe: Arizona State University, 2001
- 18 Swofford D L. PAUP* 4.0610: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods), beta version. Sunderland: Sinauer Associates, 2002
- 19 Felsenstein J. PHYLIP (phylogeny inference package), Version 3.63. Washington: University of Washington, 1993
- 20 Hochachka P W, Mommsen T. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes: Environmental and Ecological Biochemistry*, Vol 2. London: Elsevier Science, 1993. 1-38
- 21 Herwerden L V, Davies C R, Choat J H. Phylogenetic and evolutionary perspectives of the Indo-Pacific grouper *Plectropomus* species on the Great Barrier Reef, Australia. *J Fish Biol*, 2002, 60: 1591-1596
- 22 Leis J M. Larval development in four species of Indo-Pacific coral trout *Plectropomus* (Pisces, Serranidae: Epinephelinae) with an analysis of the relationships of the genus. *Bull Mar Sci*, 1986, 38: 525-552
- 23 Smith C L. Family Serranidae. In: Fisher W, ed. "FAO Species Identification Sheets for Fisheries Purposes, Eastern Central Atlantic Fishing Area 34, 47 (in Part).", Vols. 1-7. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1981
- 24 Smith C L. A revision of the American Groupers: *Epinephelus* and allied genera. *Bull Am Mus Nat Hist*, 1971, 146: 67-241
- 25 Chow S, Kishino H. Phylogenetic relationships between tuna species of the genus *Thunnus* (Scombridae, Teleostei): Inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes. *J Mol Evol*, 1995, 41: 741-748
- 26 Bostrom M A, Collette B B, Luckhurst B E, et al. Hybridization between two serranids, the coney (*Cephalopholis fulva*) and the creole-fish (*Paranthias furcifer*), at Bermuda. *Fish Bull*, 2002, 100(4): 651-661