

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^{*}

杪雄^{1,2} 王颖汇¹ 王军¹ 庄轩¹ 苏永全^{1**} 尤颖哲³ 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

3. 漳州市水产技术推广站, 福建漳州 363000

摘要 石斑鱼因其种类繁多、分布广泛及缺乏显著的形体特征, 使其系统分类的研究颇为困难。为探讨中国近海石斑鱼类的系统进化关系, 通过 PCR 扩增获得了石斑鱼亚科 (Epinephelinae) 6 属 30 个种类的线粒体 16S rDNA 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 石斑鱼属的同源序列, 以多纹长尾鲷 (*Pronotoqrammus multifasciatus*) 和皮氏叫姑鱼 (*Johnius belengerii*) 为外群构建 NJ、MP 和 ML 系统树。根据所得分子依据并结合形态学特征, 推论如下: 1) 在本研究的 30 种石斑鱼中, 鳃棘鲷属 (*Plectropomus*) 最先分化, 并呈明显单系性; 九棘鲷属 (*Cephalopholis*) 是一个单系群, 并且较石斑鱼属 (*Epinephelus*) 原始; 侧牙鲷属 (*Variola*) 的进化地位介于鳃棘鲷属与九棘鲷属之间; 2) 宽额鲷 (*Promicrops lanceolatus*) 可以归入石斑鱼属, 而驼背鲷 (*Cromileptes altivelis*) 也与石斑鱼属有很近的亲缘关系, 甚至可能是石斑鱼属内的特化类群; 3) 石斑鱼属内部存在两个平行进化的姐妹分支, 分支内部种类组成与地理分布无关, 暗示了石斑鱼属早期的分化模式 [动物学报 52 (3): 504-513, 2006]。

关键词 石斑鱼亚科 16S rDNA 系统进化

Molecular phylogenetic relationships of 30 grouper species in China Seas based on 16S rDNA fragment sequences^{*}

DING Shao-Xiong^{1,2}, WANG Ying-Hui¹, WANG Jun¹, ZHUANG Xu-an¹, SU Yong-Quan^{1**}, YOU Ying-Zhe³, LI Qi-Fu²

1. Department of Oceanography and Institute of Subtropical Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China

2. Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005, China

3. Zhangzhou Aquaculture Technique Popularizing Department, Zhangzhou 363000, Fujian, China

Abstract The Subfamily Epinephelinae (Teleostei: Serranidae), commonly known as groupers comprises about 159 species of marine fishes in 15 genera. They are bottom-associated fishes found in tropical and subtropical waters. Most species occur on coral reefs, but some live in estuaries or on rocky reefs. Groupers are of considerable economic value, however, the classification and evolutionary relationships of them have always been hindered by the overwhelming number of species, global distribution, and the lack of morphological specializations traditionally used in ichthyological classification. The confusion and debates have brought much trouble not only to the study of the phylogenetic relationships among groupers, but also to the identification of fry and parent in grouper aquaculture. In this study, to evaluate the phylogenetic

2006-01-23 收稿, 2006-02-27 接受

^{*} 国家自然科学基金项目 (No. 40306023)、国家自然科学基金项目 (No. 40576064) 和中国高新技术研究计划 (No. 2001AA621010) 资助 [This research was founded by the grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 40306023 and No. 40576064), and High Technology and Development Programme of China (No. 2001AA621010)]

^{**} 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: yqsu@jngxian.xmu.edu.cn

© 2006 动物学报 Acta Zoologica Sinica

relationship of the groupers from the China Seas, the 16S ribosomal DNA of thirty grouper species within six genera of subfamily Epinephelinae were amplified using PCR techniques. 572 bp DNA fragments were obtained and the sequences were analyzed. The genetic information indexes including Kimura-2 parameter genetic distance and Ts/Tv ratios were generated using a suite of biology software. Of the 572 aligned base pairs, among which insertion or deletion of base pairs was evident, 373 were constant, 151 were parsimony informative, comprising 26.4% of the total base pairs. The maximum pairwise nucleotide divergence value among all taxa was 0.186 between *Epinephelus malabaricus* and *Plectropomus laevis* and the minimum value was 0.007 between *E. moara* and *E. bruneus*. The average pairwise nucleotide divergence value among all taxa was 0.079. Transitions were found to be more common than transversions. The average transition/transversion ratio among all pairwise comparisons was 1.7, suggesting that the sequences had not reached saturation. The sequence analysis also showed an obvious adenine bias on the 16S ribosomal DNA fragment and no anti-guanine bias was detected. With *Pronotogrammus multifasciatus* (No. AF297330) and *Johnius belengerii* (No. AY336727) as the designated outgroups and additional homologous sequences information of other *Cephalopis* and *Epinephelus* fishes invoked from GenBank, phylogenetic trees were constructed based on the neighbor-joining (NJ), maximum-parsimony (MP) and maximum-likelihood (ML) methods. Conclusions were drawn as follow: 1) all the phylogenetic trees suggested that genus *Plectropomus*, which obviously showed monophyly, is the most primitive group among the subfamily Epinephelinae in this study; genus *Cephalopis* is also recovered as a monophyletic group and is more primitive than genus *Epinephelus*; the evolutionary status of genus *Variola* is between genus *Cephalopis* and genus *Plectropomus*; 2) *Promicrops lanceolatus* should be included in genus *Epinephelus* because it emerged as a cluster within the clade of *Epinephelus* and had a close relationship with *E. coioides* and *E. malabaricus*; *Cromileptes altivelis* also showed close relationship with genus *Epinephelus*; perhaps a specialization group within genus *Epinephelus*; 3) genus *Epinephelus* was located at the top of the phylogenetic tree indicating that it is the most recently diverged species, which is in accordance with the fact that it is also the most flourishing genus in Epinephelinae. There are two parallel evolutionary sister clades existing (with high bootstrap value support) in genus *Epinephelus*. However the species-level differences within these clades are not clear due to the lack of high bootstrap values support. The species within this two clades seem to be irrelevant to their biogeographic distributions, which suggested that there were two parallel evolutionary ancestors existing in the early evolution stage of genus *Epinephelus* and their on-going divergence should be earlier than the existence of geographic floras of genus *Epinephelus* [*Acta Zoologica Sinica* 52 (3): 504–513, 2006].

Key words Epinephelinae, Molecular phylogeny, 16S ribosomal DNA

石斑鱼亚科 (Epinephelinae) 隶属鲈形目 (Perciformes), 鲷科 (Serranidae), 其种类繁多, 约有 159 个种分为 15 个属 (Heemstra et al., 1993), 广泛分布于全球热带、亚热带大陆沿海及岛礁海域, 是世界上最重要的海洋经济鱼类之一。几乎所有的石斑鱼类都为定居性岛礁鱼类, 生活环境的相似使其在外部及骨骼形态上都表现出较高的趋同性。石斑鱼的传统分类主要依据其体表的斑点、条纹、颜色等。但石斑鱼在不同的成长阶段、不同的生活环境及不同的应激状态下, 其外部斑纹都会有一定变化; 某些种类的幼鱼与成鱼之间也有显著差别。此外, 自然生境的改变 (人工养殖)、可能存在种间杂交等等因素也对石斑鱼的系统分类造成很大困难。因此, 石斑鱼的分类一直是鱼类系统分类学中的一个难题。分类上的混乱和争议不仅阻碍了石斑鱼类的系统进化研究, 也给养殖生产中种苗及亲本的引进和鉴定带来了困难。

通过现代分子生物学技术, 获得物种特定遗传标记的大量数据, 构建系统进化树, 是对传统分类的重要佐证以及补充或修正。线粒体 DNA 结构简单, 严格母系遗传, 正是研究物种起源进化及分析种间亲缘关系的理想研究对象。线粒体基因组包括 13 个蛋白质编码基因, 2 个 rDNA 基因, 22 个 tR-

NA 编码基因和一个非编码区。其中 16S rDNA 基因进化速度较为适中, 常用于种以上水平的系统进化研究。Craig et al. (2001) 利用 16S rDNA 序列首次较系统地研究了南北美洲沿岸 42 种石斑鱼的系统进化关系。但由于缺乏印度洋、西太平洋的石斑鱼种类, 仍不能对全球的石斑鱼类的系统演化关系进行完整的重建。本文通过对中国近海, 包括部分印度洋海域石斑鱼亚科 30 个种类的 16S rDNA 序列构建系统进化树, 为进一步完善全球石斑鱼类系统演化关系提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

样品于 2000—2005 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), 共 6 属 30 个种类。

1.2 总 DNA 的提取

样品取背部肌肉于 95% 乙醇中保存 (−20 °C 冻存)。基因组 DNA 的提取参考 Sambrook et al. (1989) 的酚/氯仿抽提法。

1.3 PCR 扩增与序列测定

进行 PCR 反应及测序的引物序列为 16S arL: 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3', 16S brh:

表 1 样品采集地及 Genbank 序列号

Table 1 Species of groupers in this study, sampling locations and GenBank accession number

种类 * Species *	采集地 Collection site	Genbank 序列号 GenBank accession number
石斑鱼属 <i>Epinephelus</i>		
点带石斑鱼 <i>E. malabaricus</i>	福建、海南 Fujian and Hainan	DQ067309
斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	福建、广东、海南 Fujian, Guangdong and Hainan	DQ154105
吻斑石斑鱼 <i>E. spilotoceps</i>	印度 India	DQ067311
褐石斑鱼 <i>E. bruneus</i>	福建、海南 Fujian and Hainan	DQ067314
褐点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	福建、广东、海南 Fujian, Guangdong and Hainan	DQ067312
纵带石斑鱼 <i>E. latifasciatus</i>	福建、海南 Fujian and Hainan	DQ088044
黑边石斑鱼 <i>E. fasciatus</i>	福建、海南 印度 Fujian, Hainan; India	DQ088039
布氏石斑鱼 <i>E. bleekeri</i>	福建、海南 Fujian and Hainan	DQ088042
鲑点石斑鱼 <i>E. fario</i>	福建、海南 Fujian and Hainan	DQ067307
玳瑁石斑鱼 <i>E. quoyanus</i>	福建、海南 Fujian and Hainan	DQ067313
宝石石斑鱼 <i>E. areolatus</i>	福建、海南 Fujian and Hainan	DQ088038
赤点石斑鱼 <i>E. akaara</i>	福建、广东、海南 Fujian, Guangdong and Hainan	DQ154107
网纹石斑鱼 <i>E. chlorostigma</i>	海南, 印度 Hainan; India	DQ088036
六带石斑鱼 <i>E. sexfasciatus</i>	海南, 印度 Hainan; India	DQ067310
双棘石斑鱼 <i>E. diacanthus</i>	海南, 印度 Hainan; India	DQ088043
青石斑鱼 <i>E. awoara</i>	福建、海南 Fujian and Hainan	DQ067308
电纹石斑鱼 <i>E. radiatus</i>	海南 Hainan	DQ067304
云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>	福建、广东、海南 Fujian, Guangdong and Hainan	DQ067303
镶点石斑鱼 <i>E. amblycephalus</i>	海南 Hainan	DQ067306
小点石斑鱼 <i>E. epistictus</i>	海南 Hainan	DQ067305
波纹石斑鱼 <i>E. undulosus</i>	海南, 印度 Hainan; India	DQ088041
宽额鲈属 <i>Promicrops</i>		
宽额鲈 <i>Pr. lanceolatus</i>	福建、海南 Fujian and Hainan	DQ067317
驼背鲈属 <i>Cromileptes</i>		
驼背鲈 <i>Cr. altivelis</i>	海南 Hainan	DQ067318
九棘鲈属 <i>Cephalopolis</i>		
台湾九棘鲈 <i>Ce. formosa</i>	印度 India	DQ088035
横带九棘鲈 <i>Ce. pachycentron</i>	福建、海南 Fujian and Hainan	DQ067316
斑点九棘鲈 <i>Ce. argus</i>	福建、海南 Fujian and Hainan	DQ067315
红九棘鲈 <i>Ce. sonnerati</i>	印度 India	DQ088037
侧牙鲈属 <i>Variola</i>		
侧牙鲈 <i>Va. louti</i>	福建、海南 Fujian and Hainan	DQ067319
鳃棘鲈属 <i>Plectropomus</i>		
横斑鳃棘鲈 <i>Pl. laevis</i>	海南 Hainan	DQ067320
豹纹鳃棘鲈 <i>Pl. leopardus</i>	福建、海南 Fujian and Hainan	DQ067321

* 分类单元依据成庆泰等 (1987)。

* Taxonomy according to Cheng et al. (1987).

5'-CCGGTCTGAAGTCAATCAGATCACGT-3' (Palumbi, 1996), 由上海生工生物工程公司合成。进行 PCR 反应体积为 50 μ l。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min (92 $^{\circ}$ C 45 s, 52 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min) \times 30 循环, 72 $^{\circ}$ C 7 min。PCR 产物经琼脂糖电泳检测, 胶回收纯化, 寄上海博亚生物公司测序。

1.4 序列分析

序列的多重比对由 CLUSTAL X 软件 (Thompson et al., 1997) 完成, 并辅以人工校对。DnaSP 软件 (Rozas and Rozas, 1999) 计算多态位点 (Polymorphic sites) 和多态简约信息位点数 (Parsimony informative polymorphic sites)。MEGA 软件 (Kumar et al., 2001) 统计序列的平均碱基组成 (Base composition) 和转换/颠换比率 (Ts/Tv ratios), 基于 Kimura-2 parameter 计算遗传距离 (Genetic distance)。

系统分析采用邻接法 (Neighbor-joining, NJ), 最大简约法 (Maximum-parsimony, MP) 和最大似然法 (Maximum-likelihood, ML) 构建分子系统树, 并以鳃科长尾鳃属多纹长尾鳃 (*Pronotogrammus multifasciatus*) (GenBank 登录号为: AF297330) 和石首鱼科叫姑鱼属的皮氏叫姑鱼 (*Johnius belengerii*) (GenBank 登录号为: AY336727) 的同源序列作为外类群。邻接法使用 MEGA 软件 (Kumar et al., 2001), 遗传距离模型选择 Kimura 双参数模型, 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致性加权, 对于序列中的插入/缺失位点则采用成对删除。最大简约法使用 PAUP4.0b10 软件 (Swofford, 2002) 中的简约法标准 (Parsimony criterion) 和启发式搜寻 (Heuristic search), 构树方法采用 TBR (Tree bisection reconnection), 逐步加入法随机加入序列 (1 000 random stepwise addition sequence replicates), 所有数据均未加权。系统发育树的描述 (CI, RI) 由 PAUP 提供的报告。当几个相同的简约树出现时, 最后结果将由严格一致树来表示。最大似然法同样使用 PAUP4.0b10 软件, 分析基于 HKY85 遗传距离, 使用 equal 分布, Shape 参数为 0.5, 转换/颠换比值设为 1.7, 似然分析采用启发式搜寻。除 ML 树外, 其他各树均采用重复抽样分析 (Bootstrap) 1 000 次检验分子系统树各分枝的置信度。

2 结果

2.1 碱基组成及序列变异

对所有石斑鱼个体的线粒体 16S rRNA 基因扩增片段进行测序, 所得序列经排序, 共获得 30 种石斑鱼类约 572 bp 的碱基序列, 序列存在插入缺失现象, 主要集中在 246—270 bp 和 407—437 bp 两个区域。所得序列共含单态位点数为 373 个, 多态简约信息位点为 151 个, 占整段序列的 26.4%。总体上看, 序列中的转换明显比颠换多, 平均为 1.7, 说明序列突变还未达到饱和, 其中 T-C 转换明显多于 A-G, A-C 和 A-T 颠换多于 C-G 和 T-G。A、T、G、C 的含量, 其平均值分别为 29.8%、23.5%、22.8% 和 23.9%, 其中 A + T 含量 (53.3%) 明显高于 C + G 含量 (46.7%), 序列表现出较明显的 A 偏倚, 而反 G 偏倚并不明显。基于 Kimura 双参数模型的遗传距离计算表明, 在所研究的 30 种石斑鱼类中, 种间遗传距离从 0.007 (褐石斑与云纹石斑) 到 0.186 (点带石斑与横斑鳃棘鲈), 平均种间遗传距离为 0.079。所得序列均已在 GenBank 上登录 (登录序列号见表 1)。

2.2 MP 树

以多纹长尾鳃和皮氏叫姑鱼作为外群, 按照简约法标准通过启发式搜索获得了 12 个最大简约树, 其严格一致树 (CI = 0.4072, RI = 0.4880) 见图 1。由于不同权重的转换/颠换比值未影响树的拓扑结构, 其平均值 1.7 被用于最终的建树过程。由图 1 中可见石斑鱼属以极高的置信度 (97%) 被分成两个类群, 其中电纹石斑鱼、小点石斑鱼、镶点石斑鱼和双棘石斑鱼聚为一群, 石斑鱼属内的其它种类与驼背鲈、宽额鲈聚为另一群。而两类群内部节点较低的支持率 (< 50% 未显示) 则表明类群内的种间关系难以肯定。此外, 鳃棘鲈属的两个种类形成一个单系群并位于系统树的基部。侧牙鲈属的侧牙鲈位于鳃棘鲈属与九棘鲈属之间, 为一独立分支。九棘鲈属的四个种类也以高置信度 (97%) 形成一个单系类群, 然其内部种间关系也未能获得较高的置信度支持。

2.3 ML 树

由于运算最大似然法需要巨大的数据量, 无法进行多次的 bootstrap 重复取样检查, 仅进行了 100 次的 bootstrap 重复取样。所得 ML 树拓扑结构与 MP 树大致相同 (图 2)。石斑鱼属同样被分成两个类群 (77% 置信度), 驼背鲈和宽额鲈均被划入石斑鱼属的其中一个分支内部。鳃棘鲈属在本研究中最原始单系类群。侧牙鲈属位于鳃棘鲈属与九棘鲈属之间。MP 树同样支持九棘鲈属为一个单系

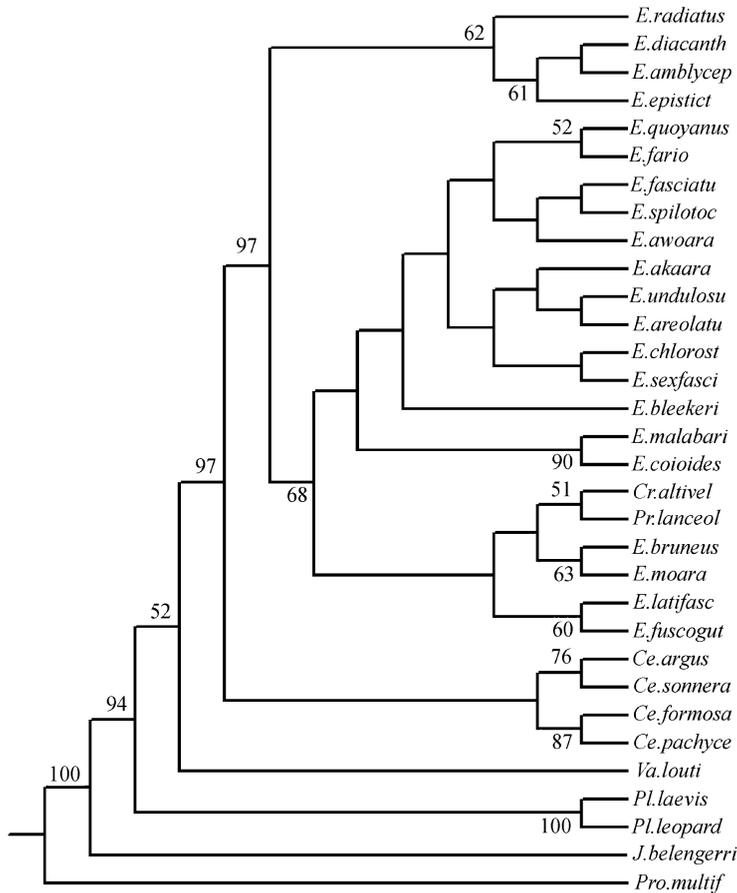


图 1 基于 30 种石斑鱼类 16S rDNA 序列的 MP 系统树

节点旁数据为 1 000 次 bootstrap 检验后置信度值 (%)。

Fig 1 MP phylogenetic tree among 30 species of Epinephelinae subfamily based on 16S rDNA sequence

Numbers at nodes represent bootstrap values (%) with 1 000 replicates.

类群 (90% 置信度), 其分化早于石斑鱼属。

2.4 NJ 树

邻接分析法所得系统树与 MP 树及 ML 树的拓扑结构略有差异 (图 3)。NJ 树同样以极高的置信度值 (100%) 将石斑鱼属分成两个类群, 其中电纹石斑鱼、小点石斑鱼、镶点石斑鱼与双棘石斑鱼聚为一群, 其它种类则与驼背鲈、宽额鲈聚为另一群。此外, NJ 树同样支持鳃棘鲈属较为原始的进化地位, 但侧牙鲈属的侧牙鲈则显示与其为姐妹群关系。对于九棘鲈属, NJ 树显示其为一个并系。

3 讨论

当前存在着多种通过分析分子数据的统计学方法来重建系统发育树, 最常用的有距离法、简约法和似然法。以 NJ 法为代表的距离法可以使种间的进化距离在度量树中得到直观的体现, 但由于无法避免将性状数据转化为距离时的信息丢失, 因此对

所建树的精确度量仍有所欠缺。最大似然法 (ML) 选择能够使观察结果最可能出现的解释, 因此往往能够得到正确的系统发育关系, 但其计算过于复杂, 对所分析的分类单元数量和序列长度都有所限制, 并且忽略了空位所携带的系统发育信息。最大简约法 (MP) 可以解决空位问题, 对进化过程假设较少, 但其基于最小进化原则的合理性仍存在争议。由于三种分析方法各有优缺点, 因此本文同时采用这三种方法构建石斑鱼类的系统树, 通过对这三种系统树拓扑结构的比较分析, 并参考前人由形态学及胚胎发育等信息构建的石斑鱼系统发育关系, 以保证获得更为真实的石斑鱼类的系统进化关系。

3.1 石斑鱼亚科中几个属的系统关系

对于鳃棘鲈属在石斑鱼亚科中的进化地位, MP 树、ML 树和 NJ 树显示的结果大致相同, 均表明鳃棘鲈属最早分化, 并呈明显单系性。形态学

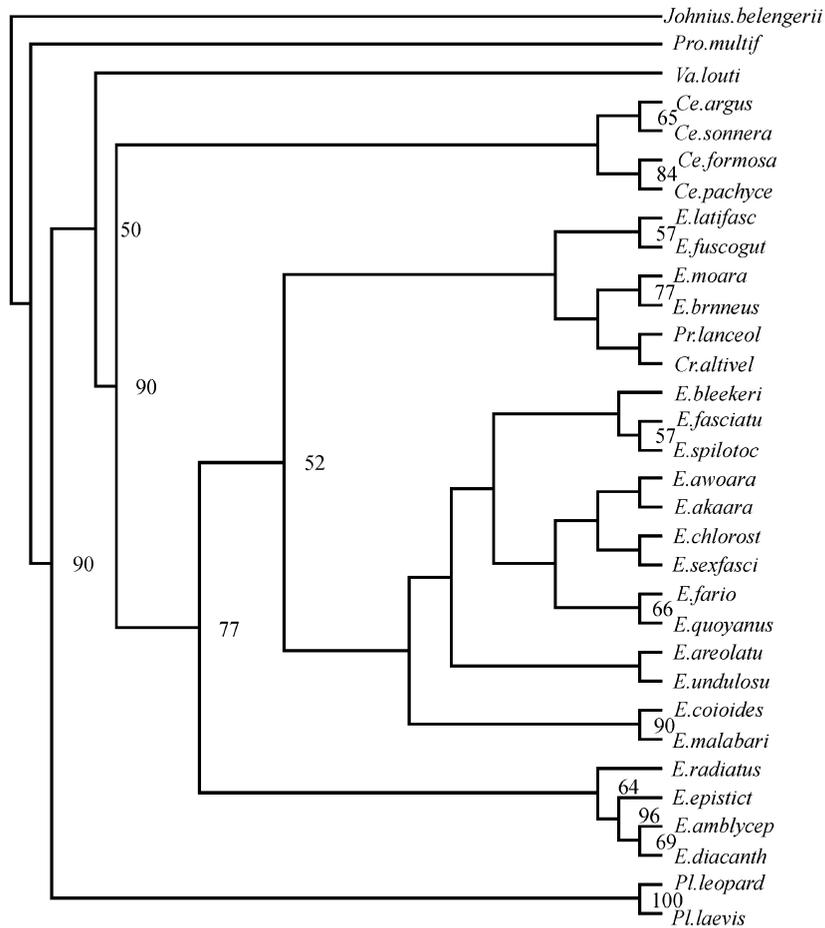


图 2 基于 30 种石斑鱼类 16S rDNA 序列的 ML 系统树

节点旁数据为 100 次 bootstrap 检验后置信度值 (%)。

Fig 2 ML phylogenetic tree among 30 species of Epinephelinae subfamily based on 16S rDNA sequence

Numbers at nodes represent bootstrap values (%) with 100 replicates.

上, 鳃棘鲈属具背鳍鳍棘 6—8 枚, 是石斑鱼亚科中鳍棘数最少的一个属。在幼体发育上, Leis (1986) 以鳃棘鲈属幼体的腹鳍鳍棘结构, 眶上和前鳃盖骨棘, 鳍条分支和色素变化这四大特征, 首次提出鳃棘鲈属是石斑鱼亚科其它鱼类的原始的姐妹群。而 Craig et al. (2001) 基于线粒体 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 et al. (2002) 利用核癌基因内含子 ETS2 对澳大利亚大堡礁几种石斑鱼类的研究结果同样表明鳃棘鲈属为单系群且比所研究的其它石斑鱼类原始。

对于侧牙鲈属的进化地位, 三种构树方法所得结构略有差异, 其中 MP 树和 ML 树均支持侧牙鲈属是介于鳃棘鲈属与九棘鲈属间的一个独立的分化类群, 而 NJ 树则认为侧牙鲈属与鳃棘鲈属有着更近的亲缘关系。本研究中, 侧牙鲈与九棘鲈属、鳃

棘鲈属和石斑鱼属的平均遗传距离依次为 0.136、0.136 和 0.152。而从形态学角度上讲, 侧牙鲈属与九棘鲈属都具有 9 条背鳍鳍棘这一同远态特征, 而鳃棘鲈属则仅有 6—8 条背鳍鳍棘。对于尾鳍形状, 侧牙鲈属特化为新月形的同近态性状。因此, 结合形态学方面的证据, 本文更倾向于支持 MP 树和 ML 树的划分, 即认为侧牙鲈属的分化晚于鳃棘鲈属而早于九棘鲈属, 且可能与九棘鲈属具有更近的亲缘关系。本课题组基于线粒体 *cyt b* 基因序列的分析同样证实了这一推论 (庄轩、丁少雄等, 2006)。

九棘鲈属在石斑鱼亚科中的分类地位学术界也曾有过争议。Smith (1981) 曾将九棘鲈属作为一个亚属归入石斑鱼属。Leis (1986) 的研究表明, 根据幼体发育不同时期腹鳍黑色素细胞的数目及位置的变动可以明确区分九棘鲈属和石斑鱼属。

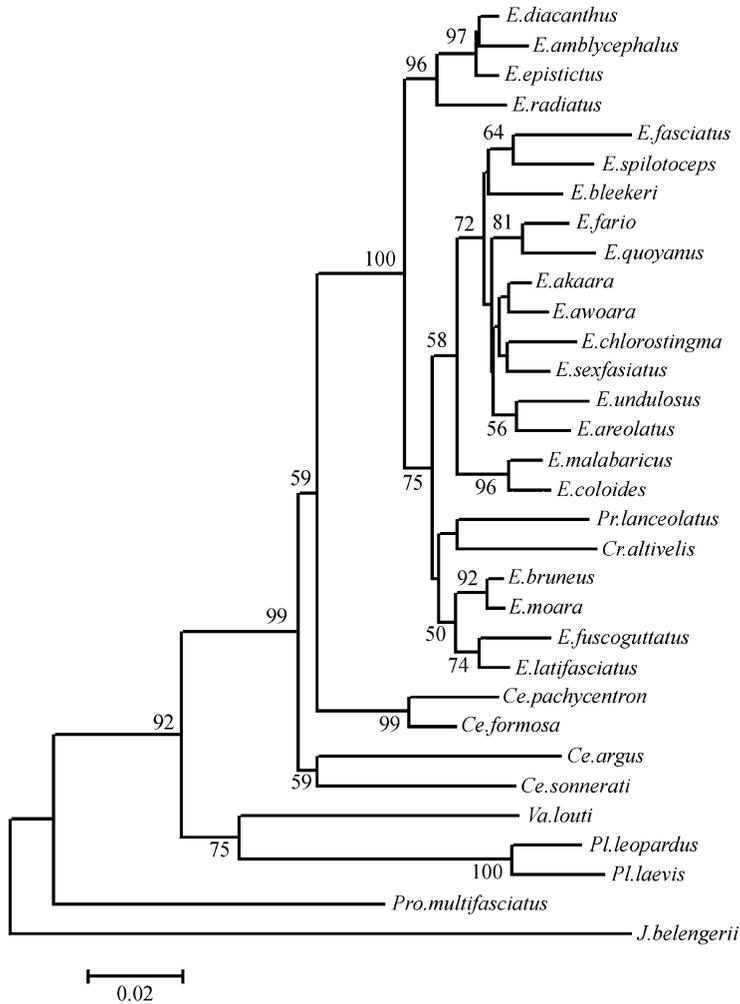


图3 基于30种石斑鱼类16S rDNA序列的NJ系统树
节点旁数据为1000次bootstrap检验后置信度值(%)。

Fig 3 NJ phylogenetic tree among 30 species of Epinephelinae subfamily based on 16S rDNA sequence
Numbers at nodes represent bootstrap values (%) with 1000 replicates.

Heemstra and Randall (1993) 应用放射自显影技术观察到九棘鲈属 21 个种类均有 3—6 条背鳍支鳍骨由三节组成, 而石斑鱼属 48 个种类的所有背鳍支鳍骨均只由两节组成。Baldwin and Johnson (1993) 提出三节支鳍骨可能是鱸科鱼类的一个自远态特征, 而在进化过程中某些类群的支鳍骨愈合为两节。而在本研究中, 三种构树方法对九棘鲈属进化地位的分析同样存在差异, 其中 MP 树和 ML 树均显示九棘鲈属为一单系类群, 而 NJ 树则支持其为并系。考虑到九棘鲈属可能取样种类较少的因素, 我们引用了 Genbank 上其它九棘鲈的 16S rDNA 序列并进行了 NJ 树和 MP 树的重构 (图 4), 两种树同样都以高置信度支持了九棘鲈属的单源性。因此本文认为九棘鲈属是一个单系群, 并且较石斑鱼属原始。

3.2 宽额鲈与驼背鲈的进化地位

对于宽额鲈在石斑鱼亚科中的分类地位, 国内外存在明显分歧。我国学者孟庆闻等 (1995) 及成庆泰和郑葆珊 (1987) 依据宽额鲈侧线管有分枝以及宽大的眼间隔特征将宽额鲈独立列为一属。而 Smith (1971) 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 and Randall (1993) 以点带石斑鱼和斜带石斑鱼的大型成鱼的前侧线管都具分枝为据进一步确认宽额鲈属与石斑鱼属其它鱼类的亲缘关系, 并将该属仅有的两个种正式命名为 *E. itajara* 和 *E. lanceolatus*。在 Craig et al. (2001) 对大西洋及东太平洋沿岸石斑鱼类所建立的分子系统树中, *E. itajara* 处于石斑鱼属内的一个分支中。本文对印度—西太平洋沿岸石斑鱼类进化关系

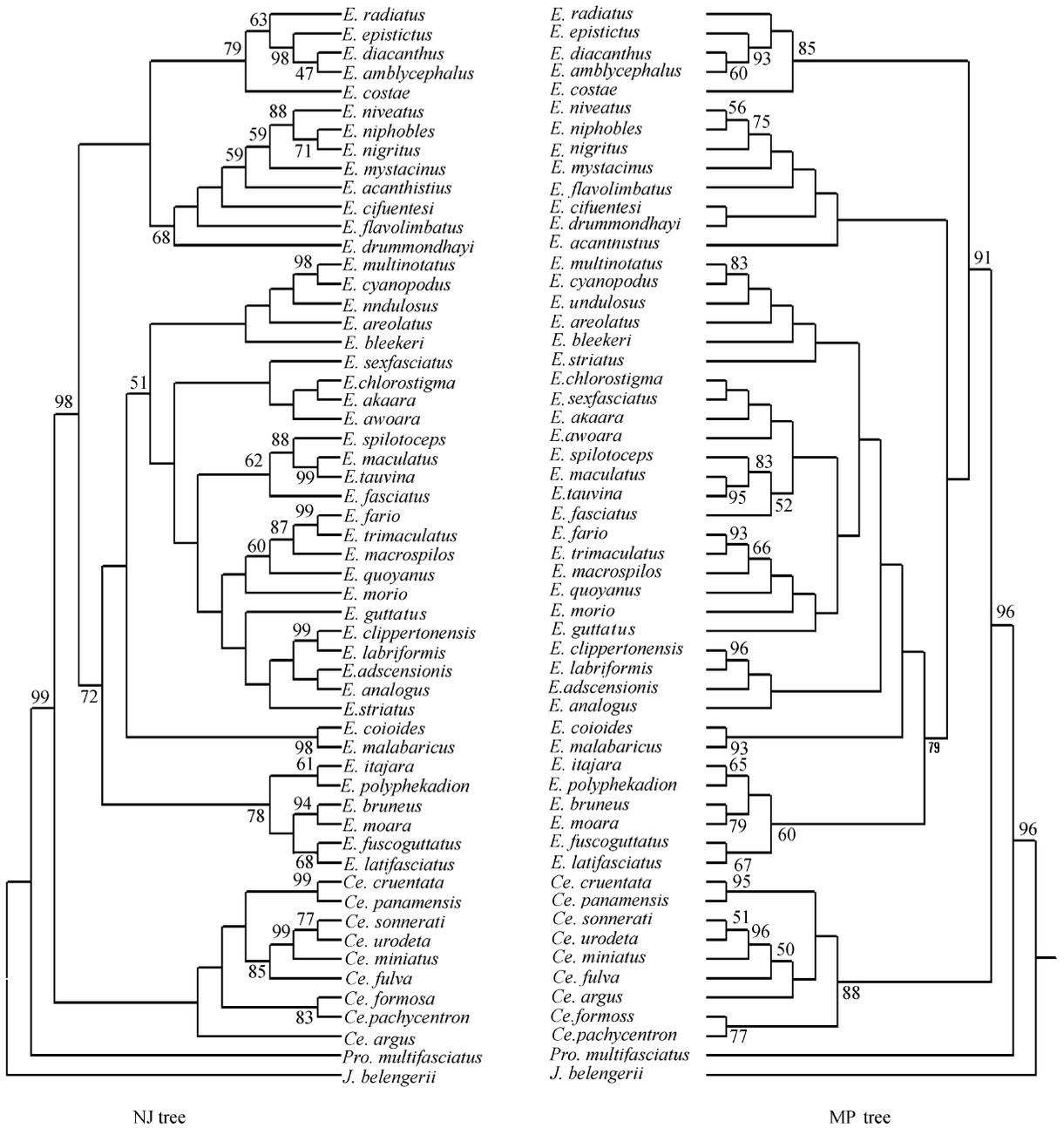


图 4 54 种九棘鲈属和石斑鱼属鱼类的 NJ 和 MP 系统树

节点旁数据为 1 000 次 bootstrap 检验后置信度值 (%)。

Fig 4 The NJ and MP phylogenetic tree among 54 grouper species (include genus *Epinephelus* and *Cephalopholis*) based upon 16S rDNA sequence

Numbers at nodes represent bootstrap values (%) with 1 000 replicates.

的研究结果同样表明, 宽额鲈 (*E. lanceolatus*) 处于石斑鱼属内的一个分支中, 并与点带石斑鱼和斜带石斑鱼有较近的亲缘关系。据此, 本文支持将宽额鲈属归入石斑鱼属。

驼背鲈具有显著区别于石斑鱼亚科其它鱼类的独特外形。其头背部凹陷, 背部呈驼背状隆起, 后鼻孔长裂缝状等特殊的形态学特征均为石斑鱼亚科

中所独有。因此, 国内外的分类系统都将驼背鲈单独列为一属。但目前驼背鲈与其它石斑鱼类的亲缘关系及其在石斑鱼亚科系统进化中的地位仍不清楚。在本研究中, 所构建的三种系统树均支持将驼背鲈划入石斑鱼属, 本实验室通过 *cyt b* 基因序列的分析也得出了相似的结果 (庄轩等, 2006)。因此, 我们确认驼背鲈与石斑鱼属有相当近的亲缘关

系, 应属于石斑鱼亚科中的晚分化类群。但驼背鲈是否是石斑鱼属内的一个特化类群, 亦或某一共同祖先平行演化的结果, 仍有待于对更多分子数据及其他骨骼学和发育生理学资料的分析。

3.3 石斑鱼属的进化地位及其种间进化关系

石斑鱼属是石斑鱼亚科中最重要的种属, 据 FAO 物种目录之《Groupers of the World》记载, 全世界石斑鱼属鱼类共有 98 种 (Heemstra and Randall, 1993), 约占石斑鱼亚科的 2/3。本研究中 MP、ML 和 NJ 三种系统树一致表明该属处于石斑鱼亚科系统进化树的顶端, 代表着最新演化的种类, 是亚科中最繁盛的一属, 也是目前系统发育的高峰。

石斑鱼属虽然种类繁多, 并广泛分布于全球热带及亚热带海域, 但尚无一种石斑鱼为全球分布, 这主要是由于石斑鱼为定居性鱼类, 无长距离洄游能力所致。目前石斑鱼分布存在两个明显的区系: 印度—西太平洋区系和大西洋—东太平洋区系, 两个区系的石斑鱼种类基本不重复。在本研究中, 三种分析方法均表明中国近海石斑鱼属内存在两个平行进化的类群, 并获得高置信度支持, 但类群内部的种间关系并不明朗。此结果与 Craig et al. (2001) 及 Maggio et al. (2005) 对大西洋—东太平洋区域的石斑鱼研究结果一致, 即石斑鱼属内的系统发生关系与其种类的地理分布并不相关。Maggio 等据此推测石斑鱼属可能是多系起源。为研究两个不同区系石斑鱼的系统关系, 我们结合 Craig 等的数据库重建了 NJ 树和 MP 树 (所引序列见附表), 结果表明, 两个平行进化的分支仍然存在于石斑鱼属内 (NJ 98%, MP 91%), 且各分支的种类组成与所属地理区系无关。这不仅暗示着早期存在两个平行进化的石斑鱼原始祖先, 并且它们的分化应远早于石斑鱼地理区系的形成。本实验室通过 *cyt b* 基因序列的分析也得出了相似的结果 (庄轩等, 2006)。

点带石斑鱼与斜带石斑鱼由于在外形与分布上的相似, 在分类上曾存在混淆和争议。如 Morgans (1982), Kyushin et al. (1982), Sainsbury et al. (1985) 都曾将斜带石斑鱼误定成点带石斑鱼, 《中国鱼类系统检索》里也仅有点带石斑鱼的记载 (成庆泰、郑葆珊, 1987)。但 Heemstra and Randall (1993) 根据幽门盲囊数的明显差异已明确将点带石斑鱼与斜带石斑鱼定为两个种。在本研究中它们之间的序列歧异度为 1.8%, 低于石斑鱼属内各种

间差异度的平均值 (4.6%), 但仍高于其它近缘种的石斑鱼, 如青石斑鱼与赤点石斑鱼 (0.014%)、双棘石斑鱼与小点石斑鱼 (0.011%) 等。证明了它们间确实存在非常相近的亲缘关系, 但分化已达种间水平。由于大陆和台湾地区常将两者混养, 我们通过序列分析并结合 AFLP 和 RAPD 检测, 已经证实两者间存在杂交现象。云纹石斑鱼与褐石斑鱼是另一对存在争议的石斑鱼, Heemstra and Randall (1993) 所著的《Groupers of the World》认为它们是同一物种的同种异名, 而我国学者成庆泰等所著《中国鱼类系统检索》中则认为褐石斑鱼和云纹石斑鱼是两个物种。在本研究中两种鱼间的序列歧异度为 0.7%, 表明它们具有特别相近的亲缘关系, 然而根据它们鳃盖骨和鳃耙上存在的差异, 我们仍倾向于支持褐石斑鱼和云纹石斑鱼为两个物种的观点。

附表 所引用的 GenBank 上石斑鱼属和九棘鲈属鱼类的序列号

Appendix Accession Numbers of *Epinephelus* and *Cephalopholis* species from GenBank

物种 Species	序列号 Accession numbers	物种 Species	序列号 Accession numbers
<i>E. acrosphilos</i>	AY731072	<i>E. morio</i>	AF297324
<i>E. guttatus</i>	AF297299	<i>E. striatus</i>	AF297311
<i>E. clippertonensis</i>	AY731077	<i>E. labriformis</i>	AF297296
<i>E. analogus</i>	AF297302	<i>E. adscensionis</i>	AF297314
<i>E. maculatus</i>	AY731068	<i>E. tauvina</i>	AY731067
<i>E. cyanopodus</i>	AY731074	<i>E. itajara</i>	AF297294
<i>E. multinotatus</i>	AY428594	<i>E. polyphkadion</i>	AY279663
<i>E. costae</i>	AY731176	<i>E. drummondhayi</i>	AF297308
<i>E. cifuentesi</i>	AF297295	<i>E. acanthistiis</i>	AF297318
<i>E. mystacinus</i>	AF297304	<i>Ce. urodeta</i>	AF297325
<i>Ce. panamensis</i>	AF297313	<i>Ce. miniatus</i>	AF297321
<i>Ce. fulva</i>	AF297292	<i>Ce. cruentata</i>	AF297323

参考文献 (References)

- Baldwin CC, Johnson GD, 1993. Phylogeny of the Epinephelinae (Teleostei: Serranidae). *Bull. Mar. Sci.* 52: 240–283.
- Cheng QT, Zheng BS, 1987. Systematic Synopsis of Chinese Fishes. Beijing: Science Press (In Chinese).
- Craig MT, Pondella DJ, Franck JPC, Hafner JC, 2001. On the status of the serranid fish genus *Epinephelus*: evidence for paraphyly based upon 16S rDNA sequence. *Mol. Phylogenet. Evol.* 19: 121–130.
- Heemstra PC, Randall JE, 1993. *Groupers of the World*. Rome:

- FAO Species Catalogue.
- Herwerden LV, Davies CR, Choat JH, 2002. Phylogenetic and evolutionary perspectives of the Indo-Pacific grouper *Plectropomus* species on the Great Barrier Reef. Australia; J. Fish Biol. 60: 1 591—1 596.
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2001. MEGA (Molecular evolutionary genetics analysis), Version 3. 0. USA; Arizona State University, Tempe, Arizona.
- Kyushin K, Amaoka K, Nakaya K, Ida H, Tanino Y, Senta T, 1982. Fishes of the South China Sea. Tokyo; Japan Marine Fishery Resource Research Center.
- Leis JM, 1986. 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. 38: 525—552.
- Maggio T, Andaloro F, Hemida F, 2005. A molecular analysis of some Eastern Atlantic grouper from the *Epinephelus* and *Myceteroperca* genus. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 321 (1): 83—92.
- Meng QW, Su JX, Miao XZ, 1995. Fish Taxology. Beijing; China Agriculture Press (In Chinese).
- Morgans JFC, 1982. Serranid fishes of Tanzania and Kenya. Ichthyol. Bull. J. L. B. Smith Inst. Ichthyol. 46: 1—44.
- Palumbi S, 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK ed. Molecular Systematics. MA: Sinauer, Sunderland.
- Rozas J, Rozas R, 1999. DnaSP (DNA Sequence Polymorphism) Version 4. 00, an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. Bioinformatics 15: 174—175.
- Sainsbury KJ, Kailok PJ, Leyland GG, 1985. Continental Shelf Fishes of Northern and North-Western Australia. An Illustrated Guide. Canberra, Australia.
- Sambrook J, Fitch E, Maniatis T, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edn. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Smith CL, 1971. A revision of the American groupers; *Epinephelus* and allied genera. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 146: 67—241.
- Smith CL, 1981. Family Serranidae. In: FAO Species Identification Sheets for Fisheries Purposes. Eastern Central Atlantic Fishing Area 34, 47 (in Part). Rome; Food and Agriculture Organization of the United Nations. Vols. 1—7.
- Swofford DL, 2002. PAUP* 4. 0610. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), beta version. Sinauer Associates, Sunderland.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewnia F, 1997. The clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. Nuc. Ac. Res. 25: 4 876—4 882.
- Zhuang X, Ding SX, Guo F, Wang J, Su YQ, Zhang QY, Li QF, 2006. Molecular phylogenetic relationships of China Seas groupers based on cytochrome b gene fragment sequences. Science in China (Series C: Life Sciences) 36 (1): 27—34 (In Chinese).
- 成庆泰, 郑葆珊, 1987. 中国鱼类系统检索 (上册). 北京: 科学出版社.
- 孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖, 1995. 鱼类分类学. 北京: 中国农业出版社.
- 庄 轩, 丁少雄, 郭 丰, 王 军, 苏永全, 张其永, 李祺福, 2006. 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: 生命科学) 36 (1): 27—34.