

## 东山湾青石斑鱼线粒体 DNA D-loop 区遗传多样性分析

吕子君<sup>1</sup>, 陈金涛<sup>1,2</sup>, 王超<sup>1</sup>, 谢少林<sup>1</sup>, 邹记兴<sup>1\*</sup>

(1. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642;

2. 清远市北江水产科学研究所, 广东 清远 511510)

**摘要:** 为研究青石斑鱼种群遗传结构以实现资源保护和可持续利用, 实验采用 PCR 技术对东山湾水域 53 尾青石斑鱼种群的线粒体 DNA (mtDNA) D-loop 区全序列进行扩增并测序, 序列长度为 956 ~ 1 230 bp, 变异很大, 这可能是由于 5' 端含有数目不等的重复序列单元 (repeat sequence unit, RSU) 或者由于碱基的插入和缺失造成的。按照 RSU 数目的不同, 把 53 个青石斑鱼样本分为 3 大类: 2RSU 类 (占 11.3%)、3RSU 类 (占 77.4%)、4RSU 类 (占 11.3%)。采用 MEGA (version 3.0) 和 DnaSP (version 4.0) 软件对序列进行分析, 结果显示, 53 条序列的 T、C、A 和 G 碱基平均含量分别为 33.4%、17.3%、35.4% 和 13.9%, 共发现 53 种单倍型, 包括 179 个多态位点, 单倍型间平均遗传距离为 0.019 7, 单倍型多态性 ( $H_d$ ) 为 1.000, 核苷酸多态性 ( $\pi$ ) 值为 0.017 2。研究表明, 东山湾青石斑鱼种群的遗传多样性处于中等水平。

**关键词:** 青石斑鱼; 线粒体 DNA; D-loop; 遗传多样性; 东山湾

**中图分类号:** Q 347; S 917.4

**文献标志码:** A

青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*) 隶属于鲷形目 (Perciforme), 鲷科 (Serranidae), 石斑鱼亚科 (Epinephelinae), 石斑鱼属 (*Epinephelus*)<sup>[1-2]</sup>, 俗称青斑或土斑, 为我国海产名贵经济鱼类。由于过度捕捞, 青石斑鱼资源日益衰退, 主要表现为雌雄比例失调、捕捞数量减少、种群规模降低、种群年龄结构呈负增长型等, 尤其是大个体的雄鱼极难获得<sup>[3-4]</sup>。目前, 青石斑鱼人工繁殖大多在遗传背景不明的情况下无序发展, 导致我国对青石斑鱼种质资源和遗传多样性的研究发展缓慢。同时, 人们对青石斑鱼遗传背景也缺乏深入的了解, 造成了亲鱼的误选、误配, 以致种间混交<sup>[5]</sup>, 从而在亲鱼选配时造成近亲繁殖, 降低了种苗的遗传多样性, 影响了其适应性与生活力。当前国内外对青石斑鱼的研究主要方向是生物学特性和生态习性、人工繁育、配合饵料、病害以及增养殖学等<sup>[3,6-9]</sup>。对于青石斑鱼种群遗传结构方面的研

究至今未见报道, 本实验选取我国盛产青石斑鱼地区之一<sup>[10]</sup>的东山湾海域的青石斑鱼种群, 对研究东山湾的种质资源及其遗传多样性具有代表意义。

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 中的 D-loop 区 (控制区) 不编码蛋白质, 受到的选择压力较小, 进化速率远高于其他区域, 普遍应用于种群遗传学分析<sup>[11-14]</sup>。本实验通过测定东山湾青石斑鱼种群的 mtDNA D-loop 区全长序列, 分析其种群遗传结构, 为青石斑鱼的遗传育种以及长期可持续利用提供基础数据和理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

青石斑鱼采集于福建东山岛和漳浦间的东山湾海域, 租用游钓船垂钓得到野生种群, 共获得

收稿日期: 2014-05-03 修回日期: 2014-07-07

资助项目: 国家科技支撑计划 (2013BAD10B04-1)

通信作者: 邹记兴, E-mail: zoujixing@scau.edu.cn

53 尾青石斑鱼。取实验鱼肌肉组织并用 95% 乙醇固定后,运回实验室保存。

## 1.2 实验方法

**基因组 DNA 提取和 PCR 扩增** 采用苯酚/氯仿抽提法<sup>[5]</sup>提取 53 尾鱼的肌肉基因组 DNA。以提取后的 DNA 为模板,利用 mtDNA 的 D-loop 区引物进行扩增,引物为 DLF1: 5'-AGAGCGCCGGTCTTGTAAC-3' 和 DLR1: 5'-GTGCCTGATACCAGCTCCTT-3'。PCR 反应的模板 DNA 约为 100 ng,反应体系总体积为 50  $\mu\text{L}$ ,含有 10  $\times$  Ex Taq Buffer 5  $\mu\text{L}$ ,dNTPs 2  $\mu\text{L}$ (各 2.5 mmol/L),上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ (20  $\mu\text{mol/L}$ ),Ex Taq 酶 0.3  $\mu\text{L}$ (5U/ $\mu\text{L}$ ),双蒸水补至 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 的反应条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s,52  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,35 个循环,最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min,扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

经电泳割胶回收 PCR 产物后用试剂盒(上海申能)纯化,然后与 pUCm-T 载体(上海生工)连接,转化感受态细胞 DH $\alpha$ 5,筛选出阳性克隆子,经扩大培养后提取质粒,用 M13 引物在自动测序仪(Applied Biosystems 3730,上海英俊)进行正反双向测序。

**数据处理及分析** 以 GenBank 中其他鲷形目鱼类的 mtDNA 全序列为参考,以 tRNA<sup>Pro</sup> 结束和 tRNA<sup>Phe</sup> 起点找到 D-loop 区序列的起点和终点,得到 D-loop 区序列后使用 Clustal X 软件<sup>[15]</sup>进行对位排列,并在 SEAVIEW 程序<sup>[16]</sup>中对序列辅以人工校正。用 MEGA(version 3.0)计算碱基组成并应用 Kimura 双参数法计算遗传距离<sup>[17]</sup>。利用 DnaSP(version 4.0)软件统计单倍型及多态位点( $S$ )、计算单倍型多样性( $H_d$ )、平均核苷酸差异数( $k$ )及核苷酸多样性( $\pi$ ),计算类群间及整个种群的固定指数( $F_{st}$ )<sup>[18]</sup>,再按照 Wright 的  $F_{st}$  法计算反映基因流强度的类群每代迁移数( $N_m$ )<sup>[19]</sup>,计算公式:

$$F_{st} = 1/(1 + 4N_m), N_m(W) = (1 - F_{st})/4F_{st}。$$

## 2 结果

### 2.1 东山湾青石斑鱼种群的 mtDNA D-loop 区全序列特征

青石斑鱼种群的 mtDNA D-loop 区经 PCR 扩

增、回收、克隆、测序,得到的序列提交至 GenBank,获得的序列号为 EU236540 ~ EU236592。本实验 53 个样本的 mtDNA D-loop 区全序列为 956 ~ 1 230 bp,序列长度变异很大,主要因其 mtDNA D-loop 区 5'端包含数目不等的重复序列单元(repeat sequence unit,RSU)以及有碱基的插入和缺失所致。T、C、A 和 G 碱基平均含量分别为 33.4%、17.3%、35.4%、13.9%,其中 A + T 的含量(68.8%)明显高于 G + C 含量(31.2%),说明青石斑鱼的 mtDNA D-loop 区碱基组成具有较为明显的偏倚。

### 2.2 重复序列

青石斑鱼种群的 mtDNA D-loop 区序列的 5'端包含数目不等的 RSU,而且不同个体所包含的 RSU 数目有所不同,53 个青石斑鱼样本按照 RSU 数目的不同分为 3 大类:含有 2RSU 的青石斑鱼样本 6 个(占 11.3%),3RSU 为 41 个(占 77.4%),4RSU 为 6 个(占 11.3%)。对重复序列分析发现,在同一个个体的 RSU 中,除了最后一个 RSU 变异相对较大,其余 RSU 之间基本无变异,不同个体之间的 RSU 变异较小。通过用 RNAstructure version 4.3<sup>[20]</sup>对其重复序列单元的二级结构进行分析,发现其能形成茎环结构,稳定性强。

### 2.3 青石斑鱼种群遗传多样性分析

为了避免 RSU 对遗传多样性的分析结果产生偏差,实验对青石斑鱼种群遗传多样性分析按照 RSU 数目把种群分为三大类群:2RSU 类、3RSU 类和 4RSU 类,经 DnaSP(version 4.0)软件检测,三大类群的单倍型多样性( $H_d$ )均为 1.000,53 尾青石斑鱼属于不同的单倍型。多态位点( $S$ )因类群而异,其中以 3RSU 类最高、2RSU 类最低,平均核苷酸差异数( $k$ )及核苷酸多样性指数( $\pi$ )均为 4RSU > 3RSU > 2RSU(表 1)。在采集的青石斑鱼 mtDNA D-loop 区序列中,53 个样本共检测出 179 个变异位点,占全部序列的 14.27%。各类群内的遗传距离为 0.013 0 ~ 0.018 2(表 2)。青石斑鱼各种群间平均遗传距离最大的是 4RSU 类和 3RSU 类,为 0.028 7。整个东山湾青石斑鱼种群的平均  $F_{st}$  和  $N_m$  值分别为 0.248 和 2.215(表 3)。

表1 东山湾青石斑鱼种群 mtDNA D-loop 区序列的遗传多样性参数  
Tab.1 Genetic diversity parameters of sequences of D-loop region in *E. awoara* population

类群 group	样本数 sample number	单倍型数 number of haplotypes ( $h$ )	单倍型多样性 haplotype diversity ( $H_d$ )	多态位点 number of polymorphic sites ( $S$ )	平均核苷酸差异数 average number of nucleotide differences ( $k$ )	核苷酸多样性指数 nucleotide diversity ( $\pi$ )
2RSU	6	6	1.000	32	11.333	0.011 9
3RSU	41	41	1.000	138	16.579	0.015 4
4RSU	6	6	1.000	54	22.667	0.018 5
合计 total	53	53	1.000	179	16.269	0.017 2

表2 东山湾青石斑鱼种群类群内和类群间的遗传距离

Tab.2 Genetic distance within and between *E. awoara* groups

类群 group	2RSU	3RSU	4RSU
2RSU	0.013 0		
3RSU	0.021 9	0.016 2	
4RSU	0.025 0	0.028 7	0.018 2

表3 东山湾青石斑鱼类群间的  $F_{st}$  (左下角) 和  $N_m$  值 (右上角)

Tab.3 The value of  $F_{st}$  (below diagonal) and  $N_m$  (above diagonal) between *E. awoara* groups

类群 group	2RSU	3RSU	4RSU
2RSU		0.505	0.424
3RSU	0.331		5.717
4RSU	0.371	0.041 9	

### 3 讨论

#### 3.1 青石斑鱼种群 mtDNA D-loop 区重复序列的意义

青石斑鱼种群的 mtDNA D-loop 区序列的 5' 端包含数目不等的 RSU, 2 RSU 类群与其他两个类群的基因交流都比较贫乏 ( $N_m < 1$ ), 初步推测, 含有 2 个 RSU 可能是 mtDNA D-loop 区重复序列的一种较原始形式, 其他 RSU 都可能是通过基因重排演化而来。关于鱼类 mtDNA D-loop 区研究已有不少的例子, 如小鲤 (*Cyprinella spiloptera*)<sup>[21]</sup>、鲮鲈属<sup>[22]</sup>、鲟形目<sup>[23]</sup>、粘鲈 (*Perca fluviatilis*)<sup>[24]</sup>、亚洲龙鱼 (*Scleropages formosus*)<sup>[25]</sup>、鲟属<sup>[26]</sup>等, 重复片段一般介于几十 bp 到几百 bp 之间, 而一般 mtDNA D-loop 区序列差异主要源于数目不等的 RSU, 唐文乔等<sup>[26]</sup>研究鲟属中的短颌鲟 (*Coilia brachygnathus*)、刀鲟 (*Coilia nasus*) 和湖鲟 (*Coilia nasus taihuensis*) 三种鱼的线粒体控制区, 其序列差异主要源于以 38

bp 为基本单位的 RSU, 三者之间的遗传距离较小, 仅为 0.011 ~ 0.020。

因为 mtDNA D-loop 区是一个不编码蛋白质的序列, 所以该区域受进化的压力较小, 积累的突变较多。mtDNA D-loop 区基因存在串联重复序列而产生的异质性, 可弥补由于遗传漂变和选择造成的遗传多样性丧失, 对维持物种的生存有一定的作用<sup>[27]</sup>。本研究青石斑鱼种群中出现数目不等的 RSU 从而造成了青石斑鱼的异质, 这种异质现象是青石斑鱼遗传变异的一种方式, 不仅可以增加青石斑鱼的遗传多样性, 而且可为青石斑鱼的起源、进化和分布格局的研究奠定基础。

#### 3.2 东山湾青石斑鱼种群的遗传多样性水平

从遗传和进化角度看, 一个物种的遗传多样性与其适应能力、生存能力和进化潜力等密切相关<sup>[28]</sup>, 通过遗传多样性的研究能从本质上揭示物种的起源、变异和进化。在遗传多样性分析中, 采样的空间和数目对遗传多样性参数估算有着重要影响, 样品覆盖面积占整个群体分布面积的比例越大和取样数目越多, 对遗传参数估算引起的偏差越小<sup>[29]</sup>。本研究中的青石斑鱼样本均采集于东山湾海域, 从取样地点和样本数量看, 本研究结果对评估东山湾野生青石斑鱼种群的遗传多样性具有较高的可信度。

单倍型间的核苷酸多态性 ( $\pi$ ) 和平均遗传距离是衡量一个种群 mtDNA 遗传变异的两个重要指标<sup>[30]</sup>。从数值上看, 东山青石斑鱼种群的  $\pi$  值 (0.017 2) 比我国东部水系 (黑龙江地区、长白山地区、古黄河地区) 的细鳞鲑 (*Brachymystax lenok*) (0.000 5 ~ 0.004 6)<sup>[31]</sup> 和滇池金线鲃 (*Sinocyclocheilus grahami*) 种群鱼 (0.010 41)<sup>[32]</sup> 的高, 比黄海蓝点马鲛种群 (0.027 1)<sup>[33]</sup> 低, 介于中间值状态。上述结果与种群动态密切相关, 细鳞鲑、青海湖裸鲤 (0.008 23)<sup>[34]</sup> 处于较为封闭的水体, 基因交流相对贫乏。东山湾位于台湾海峡

的南部,繁殖温度适宜,鱼类种群交流可能比黄海频繁。从分布范围和交流程度上分析,东山湾青石斑鱼的遗传多样性应比黄海蓝点马鲛高,但由于资源的开发,导致了种群相对缩小。加之人工放流或逃逸出来的“人工苗”基因通过遗传渐渗,又相对降低了遗传多样性。所以,从  $\pi$  值来看,东山青石斑鱼遗传多样性比滇池金线鲃高,而比黄海蓝点马鲛低。另外,由 3RSU 类群和 4RSU 类群的较低  $F_{st}$  (0.041 9) 和较高  $N_m$  值 (5.717) 得出结论,这两类群间的遗传分化很低,存在较大的基因交流。

从遗传距离来分析,相比青海湖裸鲤 (0.01 ~ 0.02),黄海蓝点马鲛 (0.002 ~ 0.059) 而言,东山湾青石斑鱼种群各样本间 *D-loop* 基因的遗传距离 (0.001 ~ 0.044) 介于中间值状态。Rhodes 等<sup>[35]</sup> 基于 3 个多态微卫星位点对中西部太平洋的 5 000 km 范围的清水石斑鱼 (*E. polyphkadion*) 种群遗传结构进行研究,其遗传距离为 0.022 9 ~ 0.123 3; Antoro 等<sup>[36]</sup> 基于 4 个多态微卫星位点对泰国和印度尼西亚海域的 6 个种群 250 尾斜带石斑鱼 (*E. coioides*) 的遗传多样性进行研究,发现斜带石斑鱼的遗传多样性指数较低,其遗传距离为 0.016 ~ 0.086; 蒙子宁等<sup>[37]</sup> 利用 RAPD 技术分析了斜带石斑鱼亲本以及 2001 年、2004 年孵育的 2 批子代群体的遗传多样性,发现人工养殖不仅使斜带石斑鱼遗传多样性逐年下降,而且群体间的遗传距离也较小 (0.015 4 ~ 0.034 7)。由此可见,东山湾青石斑鱼种群遗传距离值比人工养殖的斜带石斑鱼略高,而相对其他两种野生的石斑鱼的遗传距离值偏低。董秋芬等<sup>[38]</sup> 利用 13 个青石斑鱼微卫星分子标记对我国南海海域 9 种石斑鱼进行了遗传多样性的研究,认为青石斑鱼的遗传多样性处于中等水平。鉴于以上核苷酸多态性 ( $\pi$ ) 和遗传距离值的比较,本实验的东山湾青石斑鱼种群遗传多样性应为中等水平。

### 3.3 青石斑鱼的物种保护

以往对青石斑鱼种群的遗传多样性参数评估较少,所以本实验所得的东山湾青石斑鱼种群遗传多样性参数缺少一定的参照,也难以判断近年来因过度捕捞以及人工放流对青石斑鱼遗传多样性的影响程度。由于大量未性成熟的青石斑鱼被捕捞、有效种群规模日益减小、雌雄比例的失调以

及近亲繁殖等原因,青石斑鱼种群遗传多样性下降,如不及时实施保护很可能像大黄鱼野生种群一样最终几乎绝迹。根据《2007 年世界自然保护联盟濒危物种红色名录》,青石斑鱼已被列入其中,但其濒危等级为数据缺乏,所以加紧对青石斑鱼的资源调查与遗传评估等方面的研究刻不容缓。本研究所得到的青石斑鱼种群的遗传结构特征对青石斑鱼自然种群的保护和遗传多样性的监测,以及人工繁育(引种、人工繁殖、杂交等)有重要的指导意义。

### 参考文献:

- [1] Cheng Q T, Zheng B S. Systematic synopsis of chinese fishes [M]. Beijing: Science Press, 1987: 287 - 295. [成庆泰,郑葆珊. 中国鱼类系统检索. 北京: 科学出版社, 1987: 287 - 295.]
- [2] Wu H L, Shao G Z, Lai C F. Latin-chinese dictionary of fishes names [M]. Taipei: The Shuichan Press, 1999: 321. [伍汉霖,邵广昭,赖春福. 拉汉世界鱼类名典. 台北: 水产出版社, 1999: 321.]
- [3] Zou J X, Hu C Q, Xiao Y X, et al. Studies on the techniques of sex control and rearing in *Epinephelus* [J]. Reservoir Fisheries, 2000, 20(2): 1 - 3. [邹记兴,胡超群,肖耀兴,等. 石斑鱼性控技术与育苗现状及产业化概述. 水利渔业, 2000, 20(2), 1 - 3.]
- [4] Yin S W, Huang H, Zhang B, et al. Advancements in research on genetic diversity in groupers [J]. Fisheries Science, 2005, 24(8): 46 - 49. [尹绍武, 黄海, 张本, 等. 石斑鱼遗传多样性的研究进展. 水产科学, 2005, 24(8): 46 - 49.]
- [5] Zhu S H, Yang Y C, Zheng W J, et al. Molecular phylogenetic relationships of *Epinephelus* based on sequences of MtDNA Cyt *b* [J]. Acta Hydrobiological Sinica, 2006, 30(4): 432 - 438. [朱世华, 杨迎春, 郑文娟, 等. 从细胞色素 *b* 部分序列探讨石斑鱼属的分子系统发育关系. 水生生物学报, 2006, 30(4): 432 - 438.]
- [6] Zhou W X, Bo Z L, Xin J, et al. Food conditions of larvae, fry and juvenile of *E. awoara* in artificial culture [J]. Journal of Zhejiang College of Fisheries, 1994, 13(2): 86 - 92. [周婉霞, 薄治礼, 辛俭, 等. 人工培育青石斑鱼 *E. awoara* 仔、稚、幼鱼的饵料系列. 浙江水产学院学报, 1994, 13(2): 86 - 92.]
- [7] Hong H X, Lin L M, Chen X H, et al. The study on culturing *E. awoara* with the artificial diets [J]. Journal of Xiamen Fisheries College, 1996, 18(1): 16 - 20. [洪惠馨, 林利民, 陈学豪, 等. 配合饵料饲

- 养青石斑鱼的研究. 厦门水产学院学报, 1996, 18 (1): 16 - 20. ]
- [ 8 ] Qin Y X, Chi X C, Su Y Q, *et al.* The pathogeny of ulcer disease in *E. awoara* [ J ]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28 (3): 297 - 302. [ 覃映雪, 池信才, 苏永全, 等. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原. 水产学报, 2004, 28 (3): 297 - 302. ]
- [ 9 ] Chen B, Luo H Z, Fu R B. Biological characteristics and artificial breeding technique of *E. awoara* [ J ]. Shandong Fisheries, 2007, 24 (2): 36 - 38. [ 陈波, 罗海忠, 付荣兵. 青石斑鱼生物学特性及其人工繁育技术. 齐鲁渔业, 2007, 24 (2): 36 - 38. ]
- [ 10 ] Huang Y. Species Composition and seasond variations of fishes in Dongshan Bay [ J ]. Journal of Fujian Fisheries, 1999 (2): 55 - 61. [ 黄轶. 东山湾鱼类组成及其季节变动. 福建水产, 1999 (2): 55 - 61. ]
- [ 11 ] Tang Q Y, Liu H Z, Yang X P, *et al.* Studies on the structure of the mitochondrial DNA control region and phylogenetic relationships of the subfamily Botiinae [ J ]. Acta Hydrobiological Sinica, 2005, 29 (6): 645 - 653. [ 唐琼英, 刘焕章, 杨秀平, 等. 沙鳅亚科鱼类线粒体 DNA 控制区结构分析及系统发育关系的研究. 水生生物学报, 2005, 29 (6): 645 - 653. ]
- [ 12 ] Hao J, Yang Q, Bao D, *et al.* The sequence comparison of mtDNA D-loop and adjacent regions in six fish species [ J ]. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28 (2): 160 - 165. [ 郝君, 杨蕾, 鲍迪, 等. 6 种鱼 mtDNA D-loop 及其邻近区段的序列比较分析. 大连海洋大学学报, 2013, 28 (2): 160 - 165. ]
- [ 13 ] Agnesea J F, Zentze F, Legrosd O, *et al.* Phylogenetic relationships and phylogeography of the Killifish species of the subgenus *Chromaphyosemion* ( Radda, 1971 ) in West Africa, inferred from mitochondrial DNA sequences [ J ]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2006, 40 (2): 332 - 346.
- [ 14 ] Liu R Y, Yang G S, Lei C Z. The genetic diversity of mtDNA D-loop and the origin of chinese goats [ J ]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33 (5): 420 - 428.
- [ 15 ] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [ J ]. Nucleic Acids Research, 1997, 25 (24): 4876 - 4882.
- [ 16 ] Galtier N, Gouy M, Gautier C. Seaview and phylo-
- win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny [ J ]. Computer Applications in Biosciences, 1996, 12 (6): 543 - 548.
- [ 17 ] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: molecular evolutionary genetic analysis software for microcomputers [ J ]. Computer Applications in Biosciences, 1994, 10 (2): 189 - 191.
- [ 18 ] Rozas J, Sanchez-Delbarrio JC, Messeguer X, *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [ J ]. Bioinformatics, 2003, 19 (18): 2496 - 2497.
- [ 19 ] Hudson R R, Slatkin M, Maddison W P. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data [ J ]. Genetics, 1992, 132 (2): 583 - 589.
- [ 20 ] Mathews D H, Disney M D, Childs J L, *et al.* Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure [ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2004, 101 (19): 7287 - 7292.
- [ 21 ] Broughton R E, Dowling T E. Length variation in mitochondrial DNA of the minow *Cyprinella spiloptera* [ J ]. Genetics, 1994, 138 (1): 179 - 190.
- [ 22 ] Faber J E, Stepien C A. Tandemlyrepeated sequences in the mitochondrial DNA control region and phylogeography of the pike-perches *Stizostedion* [ J ]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1998, 10 (3): 310 - 322.
- [ 23 ] Zhang S M, Wu Q J, Zhang Y P. Tandem repeats of chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) and related species and its significance in evolution [ J ]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 16 (4): 458 - 461. [ 张四明, 吴清江, 张亚平. 中华鲟及相关种类的 mtDNA 控制区串联重复序列及其进化意义. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16 (4): 458 - 461. ]
- [ 24 ] Nesbo C L, Arab M O, Jakobsen K S. Heteroplasmy, length and sequence variation in the mtDNA control regions of three percid fish species (*Perca fluviatilis*, *Acerina cernua*, *Stizostedion lucioperca*) [ J ]. Genetics, 1998, 148 (4): 1907 - 1919.
- [ 25 ] Yue G H, Liew W C, Orban L. The complete mitochondrial genome of a basal teleost, the Asian arowana (*Scleropages formosus*, *Osteoglossidae*) [ J ]. BMC Genomics, 2006, 7: 242.
- [ 26 ] Tang W Q, Hu X L, Yang J Q. Species validities of *C. brachygnathus* and *C. nasus taihuensis* based on sequence variations of complete mtDNA control

- region[J]. Biodiversity Science, 2007, 15(3): 224 - 231. [唐文乔, 胡雪莲, 杨金权. 从线粒体控制区全序列变异看短颌鲚和湖鲚的物种有效性. 生物多样性, 2007, 15(3): 224 - 231.]
- [27] Zhang S M, Deng H, Wang D Q, *et al.* Mitochondrial DNA length variation and heteroplasmy in chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) [J]. Acta Genetica Sinica, 1999, 26(5): 489 - 496. [张四明, 邓怀, 汪登强, 等. 中华鲟(*Acipenser sinensis*)间的长度变异与个体内的长度异质性. 遗传学报, 1999, 26(5): 489 - 496.]
- [28] Chen Z, Zhong S, Luo D J, *et al.* Genetic diversity evaluation by the comparative analysis on mitochondrial D-loop area between wild and cultured populations of *Hapalogenys nitens* [J]. Acta Hydrobiological Sinica, 2011, 35(5): 761 - 767. [陈竹, 钟山, 罗大极, 等. 基于线粒体 D-loop 区比较分析野生与养殖斜带髯鲷种群的遗传多样性. 水生生物学报, 2011, 35(5): 761 - 767.]
- [29] Ding S X, Wang J, Guo F, *et al.* Genetic structure of *E. coioides* in Taiwan Sea area by allozyme analysis [J]. Journal of Xiamen University: Natural Sciences, 2003, 42(5): 648 - 651. [丁少雄, 王军, 郭丰, 等. 台湾海区斜带石斑鱼群体遗传学的等位酶研究. 厦门大学学报: 自然科学版 2003, 42(5): 648 - 651.]
- [30] Zhou H, Li D Q, Zhang Y G, *et al.* Study on mitochondrial DNA genetic diversity of Tibetan antelope [J]. Hereditas, 2006, 28(3): 299 - 305. [周慧, 李迪强, 张于光, 等. 藏羚羊 mtDNA D-loop 区遗传多样性研究. 遗传, 2006, 28(3): 299 - 305.]
- [31] Xia Y Z, Sheng Y, Chen Y Y. DNA sequence variation in the mitochondrial control region of lenok (*Brachymystax lenok*) populations in China [J]. Biodiversity Science, 2006, 14(1): 48 - 54. [夏颖哲, 盛岩, 陈宜瑜. 利用线粒体 DNA 控制区序列分析细鳞鲑种群的遗传结构. 生物多样性, 2006, 14(1): 48 - 54.]
- [32] Feng J G. Studies on polymorphism of D-loop sequence from mitochondrial DNA of seven populations of *Sinocyclocheilus grahami* [D]. Kunming: Yunnan University, 2002. [冯建国. 滇池金线鲃七个群体的 mtDNA D-loop 区遗传多样性研究. 昆明: 云南大学, 2002.]
- [33] Jiang Y Y, Kong X Y, Yu Z N, *et al.* Genetic diversity of *S. niphonius* in the Yellow Sea revealed by mtDNA D-loop sequence [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(3): 177 - 183. [姜艳艳, 孔晓瑜, 喻子牛, 等. 黄海蓝点马鲛 mtDNA D-loop 序列变异分析等. 中国水产科学, 2003, 10(3): 177 - 183.]
- [34] Chen D Q, Zhang C L, Lu C, *et al.* Polymorphism of D-loop sequence from mitochondrial genomes of different brood-stocks of *G. przewalskii* (Kessler) [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(5): 800 - 806. [陈大庆, 张春霖, 鲁成, 等. 青海湖裸鲤繁殖群体线粒体基因组 D-loop 区序列多态性. 中国水产科学, 2006, 13(5): 800 - 806.]
- [35] Rhodes K L, Lewis R I, Chapman RW, Sadovy Y. Genetic structure of camouflage grouper, *Epinephelus polyphekadion* (Pisces: Serranidae), in the western central Pacific [J]. Marine Biology, 2003, 142(4): 771 - 776.
- [36] Antoro S, Na-Nakorn U, Koedprang W. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers [J]. Marine Biotechnology, 2006, 8(1): 17 - 26.
- [37] Meng Z N, Yang L P, Wu F, *et al.* Analysis of RAPD and mitochondrial Cyt *b* gene sequences of *Epinephelus coioides* and *E. akaara* [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2007, 46(1): 75 - 80. [蒙子宁, 杨丽萍, 吴丰, 等. 斜带石斑鱼、赤点石斑鱼 RAPD 和线粒体 Cyt *b* 基因序列变异分析. 中山大学学报: 自然科学版, 2007, 46(1): 75 - 80.]
- [38] Dong Q F, Liu C W, Guo Y S, *et al.* Microsatellite analysis of genetic diversity and phylogenetic relationship of nine species of grouper in genus *Epinephelus* [J]. Hereditas, 2007, 29(7): 837 - 843. [董秋芬, 刘楚吾, 郭昱嵩, 等. 9 种石斑鱼遗传多样性和系统发生关系的微卫星分析. 遗传, 2007, 29(7): 837 - 843.]

## Analysis of mitochondrial DNA D-loop genetic diversity of *Epinephelus awoara* in Dongshan Bay

LV Zijun<sup>1</sup>, CHEN Jintao<sup>1,2</sup>, WANG Chao<sup>1</sup>, XIE Shaolin<sup>1</sup>, ZOU Jixing<sup>1\*</sup>  
(1. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;  
2. Qingyuan North River Fishery Science Institute, Qingyuan 511510, China)

**Abstract:** This experiment was to study the genetic structure of *E. awoara*, which could realize effective resource conservation and sustainable use of this species. PCR was used to amplify the complete sequences of the mitochondrial DNA (mtDNA) D-loop region of 53 individuals of *E. awoara* collected from Dongshan Bay. Because 5' end contained different numbers of repeat sequence units (RSU) and D-loop region had base insertion or deletion, sequences length of 53 *E. awoara* individuals ranged from 956 bp to 1 230 bp. 53 *E. awoara* individuals were divided into three groups: 2RSU (11.3%), 3RSU (77.4%), 4RSU (11.3%). Sequences were analyzed with the MEGA (version 3.0) and DnaSP (version 4.0) softwares. The results showed as follows: The average content of T, C, A and G was 33.4%, 17.3%, 35.4% and 13.9%, respectively. 179 polymorphic sites were detected yielding 53 haplotypes. The average genetic distance of haplotypes is 0.0197. The haplotype diversity was 1.000 ( $H_d$ ). The nucleotide diversity was 0.0172 ( $\pi$ ). It is concluded that the genetic diversity of the *E. awoara* population in Dongshan Bay was at a medium level in mitochondrial DNA control region sequences.

**Key words:** *Epinephelus awoara*; mitochondrial DNA; D-loop; genetic diversity; Dongshan Bay

**Corresponding author:** ZOU Jixing. E-mail: zouxixing@scau.edu.cn

### 《水产科技情报》2015 年征订启事

《水产科技情报》是由上海市水产研究所、上海市水产学会主办的水产技术类杂志,是中文核心期刊、中国期刊方阵双效期刊、华东地区优秀期刊、上海市优秀科技期刊。本刊坚持“以技术性为主,兼容学术性、普及性和动态、信息性”的办刊方针以及“立足上海、服务全国、面向市场,积极参与国际间渔业科技和信息交流”的办刊目标,注重学科的前瞻性,技术的先进性,动态信息的及时性,市场的导向性以及文字的可读性,把普及与提高结合起来,较好地适应了水产界多层次读者的需求,发行面遍及全国(包括港台地区),并涉足东南亚地区。主要栏目:综述、海水养殖、淡水养殖、水产饲料、病害防治、渔业环境、专题讲座(以特种水产养殖为主)、观赏鱼和水族生态、渔业简讯等。

本刊为双月刊,逢单月 20 号出版,国际标准大 16 开,每册定价:6.00 元,全年订费:36.00 元。本刊国内统一刊号:CN 31-1250,国际标准刊号:ISSN 1001-1994,邮发代号:4-204。读者可向当地邮局办理订阅手续,也可直接汇款至编辑部订阅。欢迎来电来函垂询。

编辑部地址:上海市佳木斯路 265 号 上海市水产研究所 邮编:200433

电话:021-65483215-658,65489796(直线) 联系人:任文玲

传真:021-65508504

E-mail: fishmaga@163.com, fishmaga@126.com

网址: http://www.shfishery.net