

文章编号: 1674 - 5566(2011)01 - 0022 - 05

东南太平洋智利竹筴鱼 RAPD 遗传多样性研究

张伟¹, 张敏^{1,2,3}, 邹晓荣^{1,2,3}, 许强华^{1,2,3}, 谢峰⁴, 吴昔磊⁴

(1. 上海海洋大学 海洋科学学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 大洋渔业资源可持续开发省部共建教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 大洋生物资源开发和利用上海市高校重点实验室, 上海 201306; 4. 上海开创远洋渔业有限公司, 上海 200090)

摘要: 根据 2009 年 7 - 12 月我国大型拖网渔船在东南太平洋海域(34°S ~ 37°S, 90°W ~ 110°W) 作业期间采集的样本, 选取 17 个站点 146 尾智利竹筴鱼肌肉样本进行随机扩增多态性 DNA 分析。结果显示扩增条带中共检测到 52 个位点, 其中多态性位点为 51 个, 多态位点占有扩增位点的 98.08%。群体的 Shannon's 多样性指数为 0.5202 ± 0.1813 , Nei's 基因多态性指数为 0.3500 ± 0.1440 , 种群间遗传分化指数 G_{ST} 为 0.0311。结果表明该海域智利竹筴鱼群体的遗传多态性较高, 但群体间不存在显著的遗传分化。

智利竹筴鱼 (*Trachurus murphyi*) 隶属于鲈科竹筴鱼属, 是一种高度洄游的跨界中上层鱼类, 广泛分布在南太平洋水域^[1]。我国对智利竹筴鱼资源的利用始于 2000 年, 目前已形成了一定规模的商业性生产^[2]。近年来, 国内学者从生物学^[3-4]、渔场学^[5-7]、渔具渔法学^[8-10] 等方面对智利竹筴鱼开展了研究, 随着智利竹筴鱼资源开发力度的加强, 国际上对智利竹筴鱼的种群结构存在很大的争议, 各国学者在竹筴鱼遗传关系方面的研究逐渐增多^[11-14], 如张敏等^[13] 运用线粒体细胞色素 b 序列对智利沿岸(33°S)、太平洋区域(33°S, 95°W 和 35°S, 93°W) 等 3 个站点的智利竹筴鱼群体进行了遗传关系分析。CARDENAS 等^[14] 运用微卫星技术对智利沿岸(20°S, 33°S 和 39°S)、新西兰区域(37°S, 178°E) 以及太平洋区域(32°S, 91°W) 等 5 个站点的智利竹筴鱼进行

研究亮点: 运用 RAPD 技术对东南太平洋智利竹筴鱼种群结构进行研究。在采样区域方面, 国内外研究中大洋性采样区域在 90°W ~ 95°W 之间, 且采样站点少, 缺少对 (34°S ~ 37°S, 95°W ~ 110°W) 区域内竹筴鱼群体的研究, 这些使得本次研究具有重要的意义。

关键词: 智利竹筴鱼; 种群遗传结构; RAPD; 东南太平洋

中图分类号: S 917

文献标识码: A

研究, 但是他们的研究中大洋性采样区域在 90°W ~ 95°W 之间, 缺少对 (34°S ~ 37°S, 95°W ~ 110°W) 区域内竹筴鱼群体的研究。目前国内尚未出现运用 RAPD 技术对东南太平洋智利竹筴鱼种群结构的研究, 这些使得本次研究具有重要的意义。

本文对 2009 年 7 - 12 月我国大型拖网渔船在东南太平洋区域(34°S ~ 37°S, 90°W ~ 110°W) 作业期间采集的 17 个站点 291 尾智利竹筴鱼肌肉样本, 根据智利竹筴鱼渔场分布情况划分成 90°W ~ 95°W (pop1)、100°W ~ 105°W (pop2) 和 105°W ~ 110°W (pop3) 等 3 个区域, 运用 RAPD 方法研究 3 个区域智利竹筴鱼群体间的遗传多样性, 探讨智利竹筴鱼的遗传结构及系统进化关系, 为开发和管理智利竹筴鱼资源提供参考。

收稿日期: 2010-04-24 修回日期: 2010-05-24

基金项目: 上海市重点学科建设项目(S30702); 大洋生物资源开发和利用上海市高校重点实验室(上海海洋大学)开放基金(S30702)

作者简介: 张伟(1983-), 男, 硕士研究生, 专业方向为远洋渔业资源开发与利用。E-mail: lianhuazhidie@126.com

通讯作者: 邹晓荣, Tel: 021-61900312, E-mail: xrzou@shou.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料来源

根据 2009 年 7-12 月我国大型拖网渔船在东南太平洋区域调查的结果,在 17 个站点中共采集智利竹筴鱼肌肉样本 291 尾(表 1),其叉长范围为 160~540 mm,平均叉长为 373.53 mm,采集的肌肉样本置于 -18 °C 冷库中保存,返航后转入 -20 °C 冰箱备用。根据智利竹筴鱼渔场分布,在经度上划分为 90°W~95°W、100°W~105°W 和 105°W~110°W 等 3 个区域(图 1),选取其中

146 尾智利竹筴鱼肌肉样本进行 RAPD 分析。

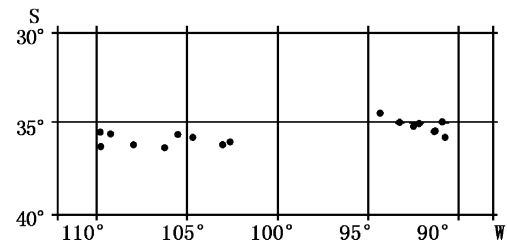


图 1 东南太平洋智利竹筴鱼采样站点

Fig. 1 Sampling sites of *Trachurus murphyi* in the southeast Pacific

表 1 东南太平洋智利竹筴鱼肌肉样本取样时间、地点、样本尾数以及分析的样本尾数

Tab. 1 Sampling sites, sampling dates, total numbers and the numbers used for RAPD analysis of *Trachurus murphyi* in the southeast Pacific

取样时间	站点名称	纬度	经度	取样尾数	RAPD 分析尾数
2009-8-17	1	36°12'S	103°03'W	20	17
2009-8-18	2	36°02'S	102°38'W	20	11
2009-8-20	3	35°47'S	104°41'W	20	15
2009-8-21	4	35°37'S	105°31'W	20	14
2009-8-25	5	36°21'S	106°15'W	20	12
2009-8-28	6	36°12'S	107°58'W	16	12
2009-8-30	7	36°18'S	109°47'W	16	5
2009-9-3	8	35°36'S	109°14'W	16	10
2009-9-3	9	35°30'S	109°48'W	16	5
2009-9-18	10	34°26'S	94°21'W	16	8
2009-9-19	11	34°57'S	93°15'W	10	5
2009-9-21	12	35°01'S	92°11'W	16	4
2009-9-22	13	35°26'S	91°18'W	16	5
2009-9-23	14	34°55'S	90°55'W	16	10
2009-9-24	15	34°35'S	90°29'W	17	5
2009-9-27	16	35°27'S	91°22'W	18	3
2009-9-29	17	35°11'S	92°31'W	18	5
总计				291	146

1.2 实验方法和数据处理

1.2.1 基因组 DNA 的提取和检测

取肌肉样本 20~30mg,使用基因组 DNA 提取试剂盒(KP301-01,诺维森生物科技有限公司生产)提取基因组 DNA。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量,放置于 -20 °C 冰箱中保存。

1.2.2 RAPD 扩增反应及电泳

RAPD 所采用的随机引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。反应体积为 10 μ L,内含 5 μ L 2 \times Taq PCR MasterMix(诺维森生物科技有限公司生产),1 μ L 基因组 DNA (50~100 ng/ μ L),1 μ L 随机引物(Sangon 公司生产),3 μ L ddH₂O。扩增反应条件为 94 °C 预变性 5 min,

接着 30 个循环,每个循环包括 94 °C 30 s,41 °C 30 s,72 °C 1 min,最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色,凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司生产)观察、拍照并记录。

1.2.3 数据处理

选取 250~2 000 bp 之间的扩增条带进行统计,有条带的记为“1”,无扩增带的记为“0”,构建原始数据。利用 Popgene32 软件计算不同站点智利竹筴鱼样本的遗传相似度(S)和遗传距离(D)^[15],遗传分化指数(GST),即为种群间的遗传多样性占种群多样性的比例,计算公式为:

$$G_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T} \quad (1)$$

式中： H_S 是各群体内遗传多态性平均值指数； H_T 是总群体的遗传多态性指数^[16]。根据遗传距离矩阵，采用 UPGMA 法，进行聚类分析，构建群体聚类系统树。

2 结果

2.1 RAPD 扩增结果

RAPD 实验过程中从 6 条随机引物^[17] 中选取扩增条带清晰、重复性好的 4 条引物进行分析，引物扩增的条带数在 3 ~ 11 之间，片段大小在 250 ~ 2 000 bp 之间。其中多态性条带为 51 条，多态位点占有所有扩增位点的 98.08%。对 pop1、pop2 和 pop3 等 3 个群体扩增结果进行统计，其中 pop2 群体的多态位点比例最高，为 96.15%；pop3 群体的多态位点比例最低，为 84.54% (表 2)。

表 2 多态位点数目与多态位点比例
Tab.2 Number of polymorphic loci and percentage of polymorphic loci

群体	多态位点数	多态位点比例	样本总数
pop1	47	90.38	45
pop2	50	96.15	43
pop3	45	84.54	58
pop(1+2+3)	51	98.08	146

2.2 群体遗传多样性和遗传分化

在 3 个研究区域中，Shannon's 多样性指数和 Nei's 基因多态性指数都显示 pop2 区域的最高，分别为 0.533 5 和 0.361 8。Shannon's 多样性指数最低的是 pop3 区域，为 0.477 2；Nei's 基因多态性指数最低的是 pop1 区域，为 0.321 5 (表 3)。

表 3 Shannon's 多样性信息指数和 Nei's 基因多态性数值
Tab.3 Shannon's information index and the Nei's gene diversity

群体	Shannon's 多样性指数	Nei's 多态性指数
pop1	0.479 8 ± 0.216 1	0.321 5 ± 0.159 3
pop2	0.533 5 ± 0.180 2	0.361 8 ± 0.138 4
pop3	0.477 2 ± 0.242 0	0.324 4 ± 0.177 3
pop(1+2+3)	0.520 2 ± 0.181 3	0.350 0 ± 0.144 0

从表中 3 中发现 3 个区域中群体遗传多态性指数 H_T 为 0.350 8 ± 0.020 1，各个群体内遗传多态性平均指数 H_S 为 0.339 9 ± 0.019 8，得出种群间遗传分化指数 G_{ST} 为 0.031 1，即 3.11% 的遗传变异来自于种群间，而 96.89% 来自于种群内，这说明这 3 个区域群体之间不存在显著的遗传分化，属于同一个种群。

2.3 聚类分析

从表 4 中看出，pop2 和 pop3 的遗传相似性最大而遗传距离最小，分别为 0.978 4 和 0.021 8。pop1 和 pop2 的遗传相似性最小而遗传距离最大，分别为 0.973 1 和 0.027 3。根据 3 个群体之间的 Nei's 遗传距离 (表 4)，用 UPGMA 方法对群体进行聚类分析，从图 2 中看出，各站点没有按照划分的 3 个区域聚类在一起，而是相互交错。

表 4 群体间的遗传相似性和遗传距离
Tab.4 Genetic identity and genetic distance

群体	pop1	pop2	pop3
pop1		0.9731	0.9755
pop2	0.0273		0.9784
pop3	0.0248	0.0218	

注：对角线下方数据表示遗传距离；对角线上方数据表示遗传相似性指数。

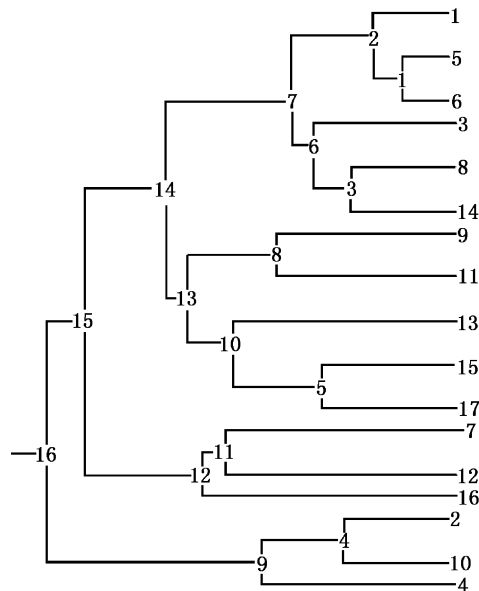


图 2 智利竹筴鱼 3 个区域群体基于 Nei's (1972) 遗传距离的聚类分析

Fig.2 UPGMA dendrogram of the three *Trachurus murphyi* populations based on Nei's genetic distance

3 讨论

实验过程中使用 4 条随机引物,结果共扩增出 52 个条带,其中多态性条带为 51 条,多态位点占有扩增位点的 98.08%。3 个区域的遗传距离为 0.021 8 ~ 0.027 3,遗传相似度为 0.973 1 ~ 0.978 4,说明 3 个区域竹筴鱼群体的遗传距离较小,遗传相似度较高。3 个区域智利竹筴鱼群体的 Shannon's 多样性指数为 $0.520 2 \pm 0.181 3$, Nei's 基因多态性指数为 $0.350 0 \pm 0.144 0$,这说明群体遗传多态性较高。种群间遗传分化指数 G_{ST} 为 0.0311,这说明竹筴鱼群体之间不存在显著的遗传分化。

张敏等^[13]对智利专属经济区内、外 3 个群体竹筴鱼群体,应用线粒体细胞色素 b 序列分析竹筴鱼群体遗传关系,研究表明群体间遗传距离在 0.000 2 ~ 0.001 9,总的遗传分化为 -0.024 2,单倍体多样性指数分别为 0.330 9、0.640 5、0,说明智利经济区内、外 3 个群体间不存显著的在遗传分化,来自于同一个种群;CARDENAS 等^[14]运用微卫星对智利经济区内外以及新西兰 5 个站点的智利竹筴鱼群体,进行遗传关系的研究,发现 5 个站点竹筴鱼基因多样性指数在 $0.15 \pm 0.09 \sim 0.51 \pm 0.11$ 之间,遗传分化指数很低(-2.18 ~ 7.29),认为在南太平洋水域存在一个竹筴鱼种群,这与本文研究结果相互印证。此外,实验中在大洋性(34°S ~ 37°S、95°W ~ 110°W)站点取得的结果与国内外的研究结果也互相补充。

本文中研究中弥补了其它研究中站点少、样品采集量小的缺点。在技术方面,RAPD 分子标记与线粒体细胞色素 b 分子标记以及微卫星标记相比,具有技术简单,检测速度快,成本较低的优点,只要采用适当的分析方法,可以在研究竹筴鱼种群结构及探讨其进化关系等方面发挥重要的作用。

在 RAPD 实验结果处理过程中发现存在以下不足:(1)由于随机引物数量少的原因,造成扩增的条带数只有 52 个条带,建议在今后的实验中增加随机引物的数量;(2)由于时间的限制,缺少上半年的数据;(3)因渔场的季节变化,未能在 90°W ~ 110°W 区域采集到竹筴鱼肌肉组织样品,希望以后采集样品过程中能得以补充。

感谢上海开创远洋渔业有限公司及“开富轮”大型拖网加工船全体船员对采样工作提供的支持和帮助。

参考文献:

- [1] ARANCIBIA H, CUBILLOS L, ARCOS D. The fishery of hours mackerel (*Trachurus symmetricus murphyi*) in the South Pacific Ocean, with notes on the fishery off central - southern Chile[J]. *Sci Mar*, 1995, 59(3-4): 589-596.
- [2] 邵帼瑛,张敏. 东南太平洋智利竹筴鱼渔场分布及其与海表温关系的研究[J]. *水产学报*, 2006, 15(4): 468-472.
- [3] 李显森,陈聚法,周立凯,等. 东南太平洋智利竹筴鱼渔业生物学的初步调查研究[J]. *海洋水产研究*, 2002, 23(2): 19-24.
- [4] 张敏,邹晓荣,张祖良. 智利竹筴鱼生物学初步研究[C]//黄锡昌. 中国水产捕捞学术研讨会论文集(四). 上海:上海科学技术文献出版社, 2001: 56-61.
- [5] 邵帼瑛,张敏. 东南太平洋智利竹筴鱼渔场分布及其与表温关系的研究[J]. *上海水产大学学报*, 2006, 15(4): 468-472.
- [6] 李显森,戴芳群,赵俊,等. 智利外海渔场竹筴鱼资源分布特征[J]. *海洋水产研究*, 2004, 25(1): 20-27.
- [7] 黄洪亮,沈新强. 智利竹筴鱼渔场与海洋环境因子的关系分析[J]. *海洋渔业*, 2003, 25(1): 15-18.
- [8] 邹晓荣,张敏. 智利竹筴鱼拖网最适网囊网目尺寸探讨[J]. *上海水产大学学报*, 2001, 10(2): 123-126.
- [9] 黄洪亮,陈学忠. 东南太平洋智利竹筴鱼中层拖网捕捞技术[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(1): 99-103.
- [10] 许永久,张敏,邹晓荣,等. 我国竹筴鱼中层拖网网具性能分析[J]. *上海水产大学学报*, 2008, 17(2): 215-221.
- [11] STEPIEN C A, ROSENBLATT R H. Genetic divergence in antitropical pelagic marine fishes (*Trachurus*, *Merluccius* and *Scomber*) between North and South America[J]. *Copeia*, 1996(3): 586-598.
- [12] LEYLA C, CRISTIAN E H, ELIE P, et al. Origin diversification and historical biogeography of the genus *Trachurus* (Perciformes: Carangidae) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005, 35(2): 496-507.
- [13] 张敏,许永久,王成辉,等. 智利竹筴鱼 3 群体遗传关系初步研究[J]. *上海海洋大学学报*, 2009, 18(2): 212-217.
- [14] CARDENASA L, SILVAA A X, MAGOULASB A, et al. Genetic population structure in the Chilean jack mackerel, *Trachurus murphyi* (Nichols) across the South - eastern Pacific Ocean[J]. *Fisheries Research*, 2009, 100(2): 109-115.
- [15] NEI M. Genetic distance between population[J]. *Am Nat*, 1972, 106(949): 283-292.
- [16] NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 1973, 70(12): 3321-3323.
- [17] MURAKAMI K, JAMES S A, RANDALL J E, et al. Two Hybrids of Carangid fishes of the Genus *Caranx*, *Caranx ignobilis*

x Caranx melampygus and *Caranx melampygus x Caranx sexfasciatus*, from the Hawaiian Islands [J]. Zoological

Studies, 2007,46(2):186-193.

Genetic diversity of Chile jack mackerel (*Trachurus murphyi*) in the southeast Pacific by RAPD analysis

ZHANG Wei¹, ZHANG Min^{1,2,3}, ZOU Xiao-rong^{1,2,3}, XU Qiang-hua^{1,2,3}, XIE Feng⁴, WU Xi-lei⁴

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Laboratory of Shanghai Education Commission for Oceanic Fisheries Resources Exploitation, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. Shanghai Kaichuang Deep Sea Co Ltd, Shanghai 200090, China)

Abstract: According to the Chile jack mackerel (*Trachurus murphyi*) samples in the southeast Pacific Ocean (34°S ~ 37°S, 90°W - 110°W) collected by Chinese trawler fishing vessel during July and December 2009, 146 muscle samples collected from 17 sites were used for population genetic structure identification by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. 52 loci were detected and 51 of these loci were polymorphic, which accounted for 98.08% of the total loci. The Shannon's index was 0.5202 ± 0.1813 , the Nei's genetic diversity index was 0.3500 ± 0.1440 , and the GST values was 0.0311. The results indicated that the genetic diversity of the *Trachurus murphyi* was comparably high, and genetic differentiation was not significant among populations.

Key words: *Trachurus murphyi*; population genetic structure; RAPD; southeast Pacific