

文章编号: 1674-5566(2009)02-0212-06

智利竹筴鱼 3 群体遗传关系初步研究

张 敏¹, 许永久², 王成辉³, 谢 峰⁴

- (1. 上海海洋大学海洋科学学院, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090;
3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
4. 上海开创远洋渔业有限公司, 上海 200082)

摘 要: 2006—2007 年, 对东南太平洋智利外海智利经济区内、外采集的 3 批智利竹筴鱼群体的线粒体 DNA 细胞色素 b 基因 (Cytb) 的部分序列进行了测定, 对遗传关系进行了初步分析。在 39 个测序样本发现 11 个单倍型, 其中一个为 3 个群体的共享单倍型。在 730 bp 的分析序列长度中, 共有 26 个变异位点, 其中 2006、2007 年经济外群体分别有 3、22 个变异位点, 2006 年经济区内群体没有变异位点; 它们的单倍型多样性指数分别为 0.330 9、0.640 5、0.000 0; 核苷酸多样性指数分别为 0.000 5、0.004 3、0.000 0。AMOVA 分析表明: 3 个群体间不存在显著的遗传分化。邻接法 (NJ) 构建的系统关系树显示, 经济区外与经济区内群体的所有个体聚成一个簇群, 即经济区内、外的智利竹筴鱼来自于同一个种群。

关键词: 智利竹筴鱼; 经济区; 线粒体 cyt b 基因; 东南太平洋

中图分类号: S 917 **文献标识码:** A

Study on genetic relationship of three populations of chilean jack mackerel, *Trachurus murphyi* from the Southern Pacific

ZHANG Min¹, XU Yong-jiu², WANG Cheng-hui³, XIE Feng⁴

- (1. College of Marine Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
(2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Shanghai 200090, China;
(3. College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
4. Shanghai Kaichuang Deep-sea Fisheries Company Limited, Shanghai 200082, China)

Abstract: Mitochondrial cytb gene sequences with 730 bp were analyzed from chilean jack mackerel (*Trachurus murphyi*) of the Southeast Pacific collected in Chile out-economic zone in 2006 (OEZ2006), out-economic zone in 2007 (OEZ2007) and inter-economic zone in 2006 (IEZ2006). 11 haplotypes in 39 analyzed samples were observed and only one haplotype was shared among three populations with 23 polymorphic sites in analyzed 730 bp sequence. 3 and 22 polymorphic sites were detected in OEZ2006 and OEZ2007, respectively, and no sequence variation was found in IEZ2006. The haplotype diversities were 0.330 9, 0.640 5, 0.000 0, and nucleotide diversities were 0.000 5, 0.004 3, 0.000 0 in OEZ2006, OEZ2007, IEZ2006, respectively. AMOVA analysis indicated that no significant genetic divergence among

收稿日期: 2008-09-01

基金项目: 2006 年农业部公海渔业资源探捕调查项目“东南太平洋 (秘鲁外海) 竹筴鱼资源探捕”; 上海市捕捞学重点学科建设项目 (T1101); 大洋生物资源开发和利用上海市高校重点实验室资助项目

作者简介: 张 敏 (1961—), 男, 上海市人, 教授, 主要从事海洋渔业方面的研究。Tel: 021-61900288, E-mail: mzhang@shou.edu.cn

three populations NJ tree also showed that all individuals from three populations clustered into one clade. The results indicated that Chilean Jack mackerel in inter- and out-economic zone in Chile would be one population.

Key words: Chilean jack mackerel; EEZ; mitochondrial cytb gene; Southern Pacific

智利竹筴鱼 (*Trachurus murphyi*) 属脊索动物门 (Chordata)、硬骨鱼纲 (Osteichthyes)、鲈形目 (Perciformes)、鲹科 (Carangidae)、竹筴鱼属 (*Trachurus* rafinesque), 是世界上主要的海洋经济鱼类之一, 属大洋性中上层跨界鱼类^[1-2]。近年来, 随着对智利竹筴鱼深入开发, 各国学者涉及竹筴鱼分子遗传学结构分析研究逐渐增多^[3-6]。自从 20 世纪 80 年代初, 俄罗斯等国根据在智利外海 200 多次的调查, 提出了智利公海海域存在智利竹筴鱼沿岸亚种和大洋亚种以来, 关于东南太平洋智利竹筴鱼种属关系和分类地位一直存在争议, 至今未有解决。随着南太平洋地区渔业管理委员会 (SPRFMO) 加强对智利竹筴鱼养护和管理, 开展智利竹筴鱼的遗传结构、分类地位的研究非常有意义, 其对于我国参与谈判, 维护国家远洋渔业权益有深远意义。本研究通过对 2006 年和 2007 年采集于智利海域经济区内、外的 3 个竹筴鱼群体, 应用线粒体细胞色素 b 基因 (Cyt b) 序列分析, 探讨智利经济区内、外 3 个群体竹筴鱼分子遗传关系, 为我国参与开发、利用智利竹筴鱼资源谈判提供数据参考。

1 材料和方法

1.1 研究材料

经济区外竹筴鱼样本系上海远洋渔业公司智利外海生产船探捕时采集, 于 2006 年 11 月和 2007 年 11 月分别采集, 分装成 20 kg 于 -18°C 速冻保存, 返航后运回实验室, 转入 -20°C 冰箱备用。从前两批 20 kg 的袋中随机取出 22 条和 20 条竹筴鱼, 体重范围在 200~300 g 体长范围 20~30 cm, 放在常温下解冻。解冻后用灭过菌的试验刀剪依次剪取少量尾鳍, 放入标号的小试管中 (90% 无水乙醇固定, 放入 -20°C 冰箱保存以备使用)。经济区内竹筴鱼样本于 2006 年 11 月智利 Valparaiso 港取得, 随机取 4 条鱼的尾鳍, 晾干真空袋包装后带回国内。3 个群体分别依次标记为 OEZ2006, OEZ2007, IEZ2006, 具体采样位置见图 1。

1.2 基因组 DNA 提取

剪取相关鳍条 0.1 g 左右, 加入 400 μL STE 缓冲液 (30 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl)。混匀后加入浓度为 10% 的 SDS 90 μL 和 20 mg/mL 的蛋白酶 K 10 μL , 55°C 消化 8~10 h; 加入等体积饱和酚于转轮上缓慢转动 1 h, 10 000 r/min 离心 8 min, 吸取上清液加入等体积的混合液 (酚: 氯仿: 异戊醇 = 25:24:1); 缓慢转动 30 min, 10 000 r/min 离心 8 min, 取上清液加入等体积的氯仿和异戊醇混合液 (氯仿: 异戊醇 = 24:1), 缓慢转动 5 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液后, 加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA, 再用 70% 的乙醇洗涤, 干燥, 加入 300 μL 的 TE 液溶解备用。

1.3 PCR 扩增与产物测序

根据部分竹筴鱼属的 Cyt b 基因序列, 设计简并性引物为: Cyt b-F: $5'$ -TCC GTA AA(G)A CCC ACC CCA T-3'; Cyt b-R: $5'$ -AAC TGG TAT GCC GCC AAT TC-3'。PCR 反应体积为 50 μL 内含 5 μL PCR 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl pH 9.0, 50 mmol/L KCl, 30 mmol/L MgCl₂, 0.01% 的明胶), 2 μL dNTP 混合液 (每种 dNTP 0.1 mmol/L), 4 μL 的引物 (0.2 $\mu\text{mol/L}$), 2 μL 基因组 DNA (50 ng/ μL), 2 μL Taq 酶 (2 IU), 35 μL 的蒸馏水。扩增反应条件为 94°C 预变性 5 min, 接下来进行 30 个循环, 每个循环包括 94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 1 min, 40 个循环后, 72°C 延伸 5 min。

扩增的目的基因产物经纯化后, 直接交上海生工生物工程有限公司测序。

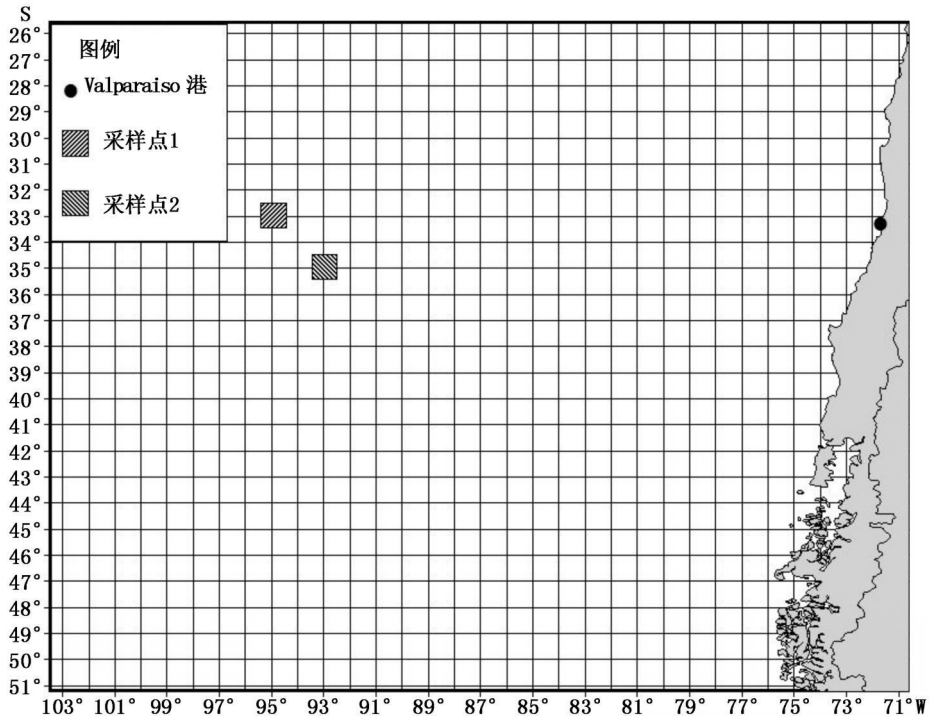


图 1 智利竹筴鱼三个群体采样点地理分布

Fig 1 Geographical origin of *Trachurus murphyi* populations sequenced in this study

1.4 数据分析

用 BioEdit 软件^[7]对测序结果进行编辑, ClustalW 软件^[8]进行序列重排和同源比较。用 Arlequin 3.01 软件^[9]计算群体的单倍型多样性 (h) 和核苷酸多样性 (π), 以及分子方差分析 (AMOVA) 和 Tajima's D 值检验^[10]; 用 MEGA 4 软件^[11]中计算群体内和群体间的遗传距离, 并用其中的 NJ 法 (邻接法) 构建所有个体和群体的分子系统树。

2 结果

2.1 序列变异

3 个群体总计 39 个样本, 即 OEZ2006 (2006 年经济区外) 群体 17 个, OEZ2007 (2007 年经济区外) 群体 18 个和 IEZ2006 (2006 年经济区内) 群体 4 个。其部分个体的 PCR 扩增图谱如图 2 所示。序列经对比后, 选用 730 bp 长度用于分析。结果发现, OEZ2006 群体只有 3 个变异位点, OEZ2007 群体有 22 个变异位点, IEZ2006 群体没有变异位点。所有这些变异位点可归结为 11 种单倍型, 其中 1 种单倍型为 3 个群体的共享单倍型。OEZ2007 的单倍型多样性 (h) 和核苷酸多样性 (π) 最高, 分别为 0.640 5 和 0.004 3, 而 IEZ2006 的 4 个样本由于没有在核苷酸变异位点, 其单倍型多样性 (h) 和核苷酸多样性 (π) 均为 0。Tajima's D 和 Fu's Test 值显示经济区外群体的均为显著性的负值 (表 1), 预示着经济区外智利竹筴鱼经历过种群扩张的历史。

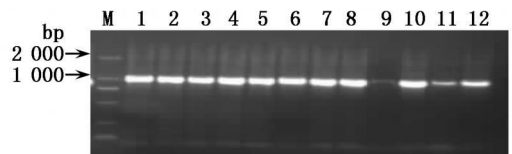


图 2 mDNA Cytb 基因部分个体的 PCR 扩增结果

Fig 2 PCR amplification of mitochondrial DNA Cytb gene in some individuals

所有这些变异位点可归结为 11 种单倍型, 其中 1 种单倍型为 3 个群体的共享单倍型。OEZ2007 的单倍型多样性 (h) 和核苷酸多样性 (π) 最高, 分别为 0.640 5 和 0.004 3, 而 IEZ2006 的 4 个样本由于没有在核苷酸变异位点, 其单倍型多样性 (h) 和核苷酸多样性 (π) 均为 0。Tajima's D 和 Fu's Test 值显示经济区外群体的均为显著性的负值 (表 1), 预示着经济区外智利竹筴鱼经历过种群扩张的历史。

表 1 智利竹筴鱼群体线粒体 Cyt b 基因的遗传多样性 (mean±SD)

Tab 1 Genetic diversities of mtDNA Cyt b sequences in three populations of *Trachurus murphyi* (mean±SD)

群体	单倍型多样性 (h)	核苷酸多样性 (π)	Tajima's D	Fu's Test
OEZ2006	0.3309±0.1426	0.0005±0.0005	-1.7057* P<0.05	-2.5266** P<0.01
OEZ2007	0.6405±0.1300	0.0043±0.0026	-2.3761** P<0.01	-0.9629
IEZ2006	0.0000±0.0000	0.0000±0.0000	0.0000	0.0000

注: * 表示差异显著; ** 表示差异极显著

2.2 分子方差分析

分子方差分析 (AMOVA) 表明, 群体间的方差比率和总的遗传分化指数为负值, 3 个群体间的方差组分占 -2.42%, 群体内的方差组分占 102.42% (表 2), 说明群体分化主要来自群体内部。OEZ2006、OEZ2007 和 IEZ2006 群体内遗传分化指数 (F_{st}) 分别为 0.0458, -0.1103, 0.0653; 群体间遗传分化指数 (F_{st}) OEZ2006-OEZ2007, OEZ2006-IEZ2006 和 OEZ2007-IEZ2006 分别为 0.0117, -0.1357 和 -0.1241, 遗传分化系数 (F_{st}) 是反映各群体间遗传分化的重要指标。OEZ2006 群体和 OEZ2007 群体的值为 0.0117, 而此两个群体与经济区内的群体间 F_{st} 均为负值, 说明 3 个群体之间遗传分化较小, 处于一个的种群水平范围内。

表 2 智利竹筴鱼群体线粒体 Cyt b 基因的 AMOVA 分析

Tab 2 AMOVA analysis of mtDNA Cyt b sequences in three populations of *Trachurus murphyi*

变异来源	自由度 df	平方和	方差组分	方差比率 (%)	总遗传分化 (Φ_{st})
群体间	2	1.206	-0.0196	-2.42	-0.0242
群体内	36	29.708	0.8269	102.42	
总和	38	30.974	0.8073		

2.3 遗传距离

群体内, 2007 年经济区外群体的遗传距离最大 (0.0034±0.0007), 其次是 2006 年经济区外群体 (0.0005±0.0003), 经济区内群体由于没有核苷酸变异位点, 其群体内的遗传距离为 0。

群体间, 2006 与 2007 两个年度间从经济区外采集的群体间遗传距离最大, 而在 2006 年从经济区内、外采集的群体间遗传距离最小 (表 3)。表明样本年度间稍有差异, 而同一年度从经济内外采集的竹筴鱼的遗传差异更小。根据群体内和群体间的方差检验分析, 3 群体之间距离均不存在显著性差异 ($P>0.05$)。

表 3 群体间遗传距离 (对角线下) 和遗传分化指数 (对角线上)

Tab 3 Genetic distance (below diagonal) and F_{st} value (above diagonal) between populations

	OEZ2006	OEZ2007	IEZ2006
OEZ2006		0.0117	-0.1357
OEZ2007	0.0019		-0.1241
IEZ2006	0.0002	0.0017	

2.4 系统关系

以同属的太平洋的竹筴鱼 (GenBank 序列号: AY526539) 为外群, 用邻接法 (NJ) 对所有 39 只样本构建的系统关系树 (图 3)。结果表明, 本文所分析的全部数个体形成一个大的聚集组, 只有来自 2006 年经济区外的一个样本 [2006(10)] 出现较大差异。去除个体差异, 用 NJ 法构建群体间遗传关系树表明, 3 个群体的系统关系较近。

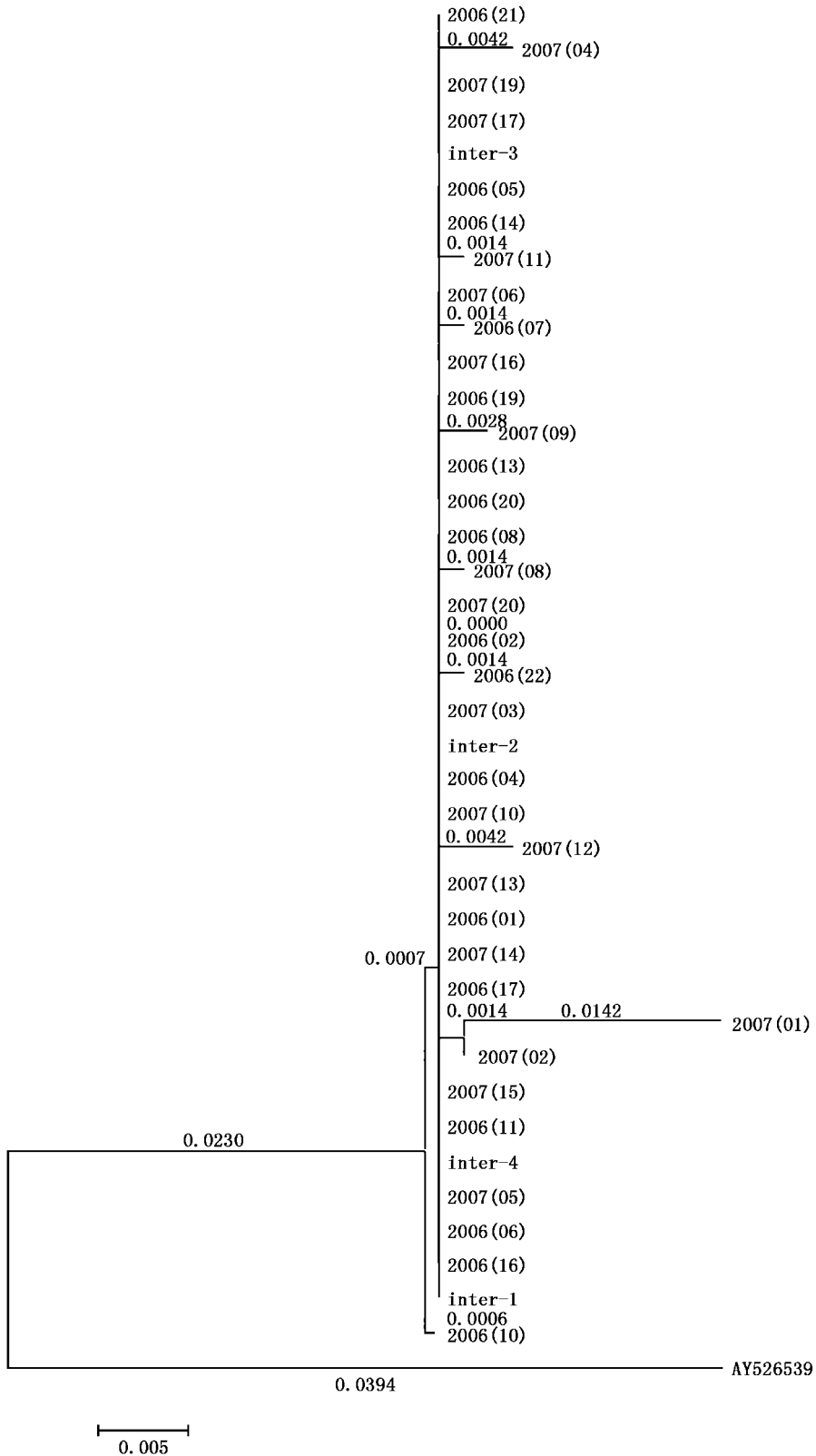


图 3 智利竹筴鱼群体个体的 NJ分子关系树

Fig 3 Phylogenetic tree among individuals of *Trachinus murphyi* based on NJ method

注: 2006, OEZ2006; 2007, OEZ2007; inter IEZ2006

3 讨论

3.1 遗传多样性和遗传分化

经济区内单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数均为 0,经济区外的群体遗传多样性明显高于经济区内的群体。一方面因为经济区内群体捕捞、环境压力大,区内大量养殖可能破坏自然选择的多样性;另一方面,遗传多样性和所选群体的大小有关,本次研究采集经济区内样本只有 4 条,经济区内的遗传多样性极低显然和样本大小有关。由于样本少,也不排除本研究中经济区内所采样本为极少亲本的后代,使得基因序列完全相同。为了更准确的研究竹筴鱼群体的遗传关系,还需要更多的样本进行分析。

年度差异对于遗传分化有一定影响^[3],2006 年经济区内外采样样本的遗传关系较近,而 2007 年样本则稍有差异,三者仍属一个种群,说明短时间对于群体遗传关系并不会产生很大影响,其差异可能生产海域水文环境的影响,由于海洋环境的复杂性,其对于遗传关系的影响需要更长时间数据分析。

3.2 系统发生分析

关于智利竹筴鱼的种群划分,很多学者进行过研究。俄罗斯等国根据在智利外海数 10 年的调查,提出了智利外海海域智利竹筴鱼存在沿岸和大洋两个亚种,两个亚种群体存在着相互联系,但群体的之间的相互作用程度尚不明确^[5-6],Evseenko 等^[13]也有相似的结论。Sera^[12]认为智利竹筴鱼向西一直洄游到智利外海西经 110°W,该种群包括沿岸和智利外海的一部分群体,春季向外海生殖栖息洄游,夏季沿岸索饵洄游。由于智利竹筴鱼是高度洄游性鱼类,其在经济区内分布是不平衡、相互依存的,但由于受到竹筴鱼带区域锋带、智利外海潮流的影响,竹筴鱼的群体分布呈现复杂结构。Leyla 等^[4]利用细胞色素 b 基因和 D-loop 测序方法研究了竹筴鱼群体间的关系,通过对智利沿岸的两个群体(Iquique 港和 Valdivia 港)和新西兰 Tauranga 港口 1 个群体遗传距离分析显示,两两之间没有遗传差异(0.00%),三者同属一个种群。本研究中,总的遗传分化为 0.0242,即 2.42% 的遗传变异来自群体间,102.42% 的遗传变异来自群体内,说明 3 个群体间不存在遗传分化,根据遗传距离分析也得到相同结论,因此本研究初步认为,经济区内外群体之间并没有按照空间分布形成明显独立的群体,他们极有可能为同一种群。

参考文献:

- [1] 张敏,邹晓荣,季星辉等. 东南太平洋公海水域智利竹筴鱼探捕及其商业开发前景探讨[J]. 水产学报, 2005, 29(3): 386-391.
- [2] 缪圣赐. 东南太平洋公海智利竹筴鱼的开发利用可行性分析[J]. 远洋渔业, 2000, (3): 19-26.
- [3] 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, 586-598.
- [4] Leyla C, Cristian E H, Elie P, et al. Origin diversification and historical biogeography of the genus *Trachurus* (Perciformes, Carangidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* [J]. 2005, 35, 496-507.
- [5] 陈瑞杰. 南太平洋竹筴鱼的资源特点及其开发前景[J]. 远洋渔业, 1992, 2, 67-69.
- [6] 沈汉祥,李善勋,唐小曼,等. 远洋渔业[M]. 北京:海洋出版社, 1987: 33-88.
- [7] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucl Acid Symp Ser* 1998, 41, 95-98.
- [8] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucl Acids Res* 1994, 22, 4673-4680.
- [9] Schneider S, Roessli D, Excoffier L, Arlequin: a software for population genetics data analysis. Vers 3.100 [G]. *Genetics and Biometry Lab, Dept of Anthropology, Univ of Geneva* 2005, 26-103.
- [10] Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations [J]. *Genetics* 1983, 105, 437-460.
- [11] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics* 2004, 5, 150-163.
- [12] Sera J R. Important life history aspects of the Chilean jack mackerel *Trachurus symmetricus murphyi* [J]. *Investigación Pesquera (Chile)* 1991, 36, 67-83.
- [13] Evseenko S A. On the reproduction of the Peruvian jack mackerel *Trachurus symmetricus murphyi* (Nichols), in the southern part of the Pacific Ocean [J]. *Voprosy Ikhtiologii* 1987, 27(2), 264-273.