

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190703002

http://www.yykxjz.cn/

陆键萍, 姚琳, 信红梅, 曲梦, 江艳华, 李凤铃, 郭莹莹, 王联珠, 许加超. 线粒体 *CO I*、*Cyt b* 和 16S rRNA 基因在 6 种金枪鱼鉴定中的适用性分析. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 73–81

Lu JP, Yao L, Xin HM, Qu M, Jiang YH, Li FL, Guo YY, Wang LZ, Xu JC. Applicability analysis of mitochondrial *CO I*, *Cyt b* and 16S rRNA genes in identification of six tuna species. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 73–81

线粒体 *CO I*、*Cyt b* 和 16S rRNA 基因在 6 种金枪鱼鉴定中的适用性分析*

陆键萍^{1,2} 姚琳² 信红梅^{2,3} 曲梦² 江艳华²
李凤铃² 郭莹莹² 王联珠^{2①} 许加超^{1①}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院 青岛 266000; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部水产品质量安全检测与评价重点实验室 青岛 266071; 3. 大连工业大学 大连 116000)

摘要 探讨细胞色素氧化酶亚基 I 基因(*CO I*)、细胞色素 b 基因(*Cyt b*)及 16S rRNA 基因对主要渔获区的蓝鳍金枪鱼(*Thunnus thynnus*)、马苏金枪鱼(*Thunnus maccoyii*)、黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)、大目金枪鱼(*Thunnus obesus*)、长鳍金枪鱼(*Thunnus alalunga*)和正鲣(*Katsuwonus pelamis*) 6 种重要的生食金枪鱼及其易混品种的物种鉴定和进化分析的适用性。采用 3 对通用引物对 6 种金枪鱼共 63 个样品的 *CO I*、*Cyt b* 和 16S rRNA 3 种序列片段进行 PCR 扩增、测序,并运用 DnaSP 5.10、Mega 7.0 等软件进行了 DNA 序列分析、遗传差异分析和进化树分析。结果显示, 16S rRNA 较为保守,不能很好区分 6 种金枪鱼,且不能对同一物种不同地理群体进行聚类分析;*Cyt b* 和 *CO I* 配合使用能很好区分 6 种金枪鱼,且存在一定同一物种地理群体聚类的趋势。建议 *CO I* 与 *Cyt b* 基因联合用于上述 6 种金枪鱼的分子鉴别研究。本研究为生食金枪鱼及其制品的物种鉴定及金枪鱼产业的健康发展提供了技术支撑。

关键词 金枪鱼; 分子鉴定; *CO I*; *Cyt b*; 16S rRNA

中图分类号 TS254.7; S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0009-09

金枪鱼是栖息在大洋上层的大型鱼类,具有高度洄游的特性,在世界渔业中占有重要的地位(戴小杰等, 2007)。从渔业利用角度讲,金枪鱼一般指经济价值较大的蓝鳍金枪鱼(*Thunnus thynnus*)、马苏金枪鱼(*Thunnus maccoyii*)、黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)、大目金枪鱼(*Thunnus obesus*)、长鳍金枪鱼(*Thunnus alalunga*)和正鲣(*Katsuwonus pelamis*)等(徐坤华等, 2014),其中,蓝鳍、马苏、黄鳍和大目金枪鱼等主

要用于生鱼片的加工,长鳍金枪鱼和正鲣等小型金枪鱼主要作为金枪鱼罐头和日本“木鱼”(Katsuobushi)原料(方健民等, 2006)。不同品种金枪鱼价格差异很大,尤其是其去头去皮的销售方式,导致金枪鱼市场上标签错乱和以次充好的问题尤为严重,损害了消费者利益,破坏了正常的经营秩序;由于市售金枪鱼及其制品均缺少主要的形态学鉴定特征,因此,金枪鱼及其制品的分子鉴定方法成为国内外的研究热点。

* 国家重点研发计划(2016YFF0201805)资助 [This work was supported by the National Key Research and Development Plan of China (2016YFF0201805)]. 陆键萍, E-mail: lujianping2014@foxmail.com

① 通讯作者: 王联珠, 研究员, E-mail: wanglz@ysfri.ac.cn; 许加超, 教授, E-mail: xujia@ouc.edu.cn

收稿日期: 2019-07-03, 收修改稿日期: 2019-07-26

DNA 条形码是物种分子鉴定研究中的重要方法,美国 FDA(Food and Drug Administration)也将其作为食品标签认证的方法(王敏等, 2015; Karim *et al.*, 2016), 弥补了传统形态学鉴定方法的不足。Barrett 等(2005)最早提出 DNA 条形码的定义, 且最先以细胞色素氧化酶亚基 I 基因(CO I)为研究对象。CO I 基因具有足够的遗传变异信息, 广泛用于鱼类的鉴定和分类(Hanner *et al.*, 2011; Khedkar *et al.*, 2014)。随着基因条形码技术的发展, 除了 CO I 基因序列作为标准条形码外, 作为重要条形码的细胞色素 b 基因(Cyt b)、16S rRNA 和线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 II 基因(CO II)等, 近年也越来越多地被应用于物种鉴定和遗传多样性分析(Chapela *et al.*, 2005; 崔文涛等, 2013)。Cyt b 能在同一物种内表现出稳定的遗传性, 却在不同物种间具有明显的遗传差异, 因此, 被用于物种种属鉴定(Becker *et al.*, 2015); 线粒体 16S rRNA 既含有高度保守的序列区域, 又有中度保守和高度变化的序列区域, 已成为广泛应用于水生动物群体遗传多样性和系统进化分析研究的分子标记(孙超等, 2014; 陈文炳等, 2017)。

本研究以主要生食金枪鱼及其易混品种(蓝鳍、马苏、黄鳍、大目、长鳍金枪鱼和正鲣)为研究对象, 利用 CO I、Cyt b 和 16S rRNA 基因对其进行 DNA 条形码研究、遗传差异分析和进化树分析, 探讨 3 种基因在金枪鱼分子鉴定研究中的适用性, 为生食金枪鱼的物种鉴定及金枪鱼产业的健康发展提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 长鳍金枪鱼(组编号: CQ, 下同)、黄鳍金枪鱼(HQ)、蓝鳍金枪鱼(LQ)、马苏金枪鱼(MS)、大目金枪鱼(DM)、正鲣(JY)肌肉组织共 63 份, 每份均来自于捕捞地点、外形特征明确的金枪鱼个体, 如表 1 所示, 由本实验室收集保存。

表 1 样品信息及编号
Tab.1 Sample information and number

样品 Samples	组号 Group No.	捕捞地点 Sampling location	样品号 Sample No.	样品数 Sample quantity
长鳍金枪鱼 <i>Thunnus alalunga</i>	CQ	南太平洋 Southern Pacific Ocean	chq	5
		北太平洋 Northern Pacific Ocean	cm	5
大目金枪鱼 <i>Thunnus obesus</i>	DM	大西洋 Atlantic Ocean	dd	4
		太平洋 Pacific Ocean	dt	4
		印度洋 India Ocean	dy	4
黄鳍金枪鱼 <i>Thunnus albacares</i>	HQ	太平洋 Pacific Ocean	hu	4
		大西洋 Atlantic Ocean	hud	3
		印度洋 India Ocean	huy	4
蓝鳍金枪鱼 <i>Thunnus thynnus</i>	LQ	大西洋 Atlantic Ocean	lq	10
马苏金枪鱼 <i>Thunnus maccoyii</i>	MS	太平洋 Pacific Ocean	ms	5
		印度洋 India Ocean	my	5
鲣鱼 <i>Katsuwonus pelamis</i>	JY	印度洋 India Ocean	jy	10

1.1.2 试剂与仪器 TIANGEN 海洋动物组织 DNA 提取试剂盒、2×Taq PCR Master Mix 和 DL2000 DNA marker 购自天根生化科技(北京)有限公司; 其他试剂为国产分析纯; 引物合成及序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成; PCR 仪为 T1 常规 PCR 仪(德国 Whatman Biomerra 公司), 凝胶成像分析系统 Infinity 3000(法国 Vilber Lourmat 公司), 核酸蛋白测定仪 NanoPhotometer Pearl(德国 Implen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及 PCR 扩增 取 30 mg 鱼肉, 剪碎后置于离心管中, 按照试剂盒说明书提取 DNA, 用核酸蛋白测定仪测定 DNA 浓度和纯度, -20℃ 保存。本实验选取引物见表 2, PCR 反应体系见表 3。

表 2 引物信息
Tab.2 Information of primers

引物 Primer	序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	参考文献 Reference
CO I FiF2	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	52	Ward 等(2009)
CO I FiR2	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA		
Cyt b-1	CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA	53	Marko 等(2004)
Cyt b-2	CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA		
16S-AR	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	52	Inoue 等(2001)
16S-BR	CCGGTCTGAACTCAGATCACG		

表 3 PCR 扩增体系

Tab.3 PCR amplification system

试剂 Reagent	浓度 Concentration	加样量 Sampling volume (μ l)
PCR master mix	2 \times	25
上游引物 Forward primer	10.0 μ mol/L	1.0
下游引物 Reverse primer	10.0 μ mol/L	1.0
模板 Template	约 100 ng/ μ l	1.0
去离子水 ddH ₂ O	—	22.0

PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 52 $^{\circ}$ C 或 53 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

将 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统下观察并记录实验结果; PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。

1.2.2 序列比对与建树分析 测序结果经人工校对后去除引物区, 在 NCBI 网站上通过 BLAST 分析将测序结果与 GenBank 中参考序列比对分析, 其中, *CO I* 基因采用 BOLD(Barcode of Life Data System 生命条形码数据系统 www.boldsystems.org) 进行分析; 通过 DnaSP 5.10 软件计算其二者序列的单倍型数

(*h*)、单倍型多样性指数(*H_d*)、平均核苷酸差异数(*k*)、核苷酸多样性指数(π)等遗传多样性参数。运用 Mega 7.0 软件, 统计序列碱基组成, 计算序列保守位点(C-conserved sites)、简约信息位点(PI-parsimony-informative sites)和变异位点(V-variable sites), 并采用邻接法(Neighbor joining, NJ)法, 自展检验 1000 次, 采用 Kimura 2-parameter 模型, 以牛(*Bos grunniens*, GenBank: KM233416)线粒体 DNA(mtDNA, 包含 *CO I*、*Cyt b* 和 16S rRNA 基因)作为外类群, 同时在 NCBI 网站选取 6 种金枪鱼 mtDNA(*T. alalunga* GenBank: AB101291; *T. albacares* GenBank: JN086153; *T. maccoyii* GenBank: KF925362; *T. obesus* GenBank: GU256525; *T. thynnus* GenBank: KF906720; *K. pelamis* GenBank: KM605252) 作为标准基因, 构建系统发育进化树。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

长鳍金枪鱼等 63 个实验样本均扩增出单一的片段, 未发现其片段长度多态性, 测序得到片段大小分别为 *CO I* 652 bp、*Cyt b* 307 bp、16S rRNA 576 bp(图 1), 与预期一致。

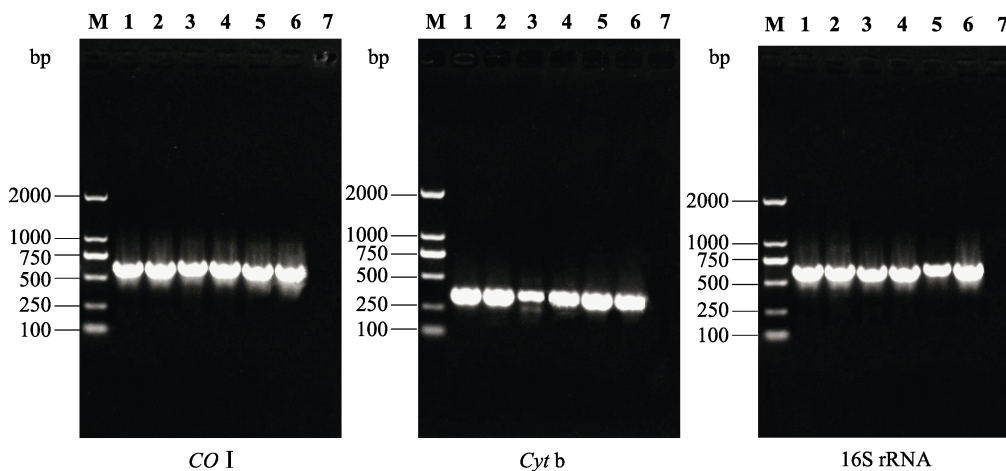


图 1 部分样品 3 种基因 PCR 产物电泳图

Fig.1 Electrophoresis map of three gene PCR products

M: DNA marker; 1: 长鳍金枪鱼; 2: 蓝鳍金枪鱼; 3: 大目金枪鱼;

4: 黄鳍金枪鱼; 5: 马苏金枪鱼; 6: 鲣鱼; 7: 空白对照

M: DNA marker; 1: *T. alalunga*; 2: *T. thynnus*; 3: *T. obesus*; 4: *T. albacares*; 5: *T. maccoyii*; 6: *K. pelamis*; 7: Blank control

2.2 基因序列

3 种基因扩增产物序列经 GenBank 数据库比对, 确定位于 mtDNA 16S rRNA、*CO I*、*Cyt b* 区域, BLAST 结果和 BOLD 比对结果与各样本来源鱼形态学鉴定结果一致。

经人工校正去除上下游引物, 得到 *CO I*、*Cyt b* 和 16S rRNA 基因片段中 T、C、A 和 G 平均含量(表 4), 其中, 16S rRNA 基因中 A+T 平均含量为 52.7%, 稍高于 G+C 平均含量(47.3%), 且 6 种金枪鱼的 GC 含量差异不大; 其中, *CO I* 基因中 A+T 平均含量为 53.0%, 稍高于 G+C 平均含量(47.0%), 且 6 种金枪鱼的 GC 含量差异

表4 6种金枪鱼 CO I、Cyt b 和 16S rRNA 基因碱基组成
Tab.4 Base composition of CO I, Cyt b and 16S rRNA genes in six tuna species

组编号 Group number	16S rRNA 碱基含量 16S rRNA base content (%)				CO I 碱基含量 CO I base content (%)				Cyt b 碱基含量 Cyt b base content (%)			
	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
CQ	22.9	24.3	29.7	23.1	28.8	28.2	24.1	18.8	30.0	31.6	21.5	16.9
DM	22.7	24.5	29.9	22.9	28.6	28.4	24.1	19.0	29.7	31.2	22.4	16.7
HQ	22.7	24.5	29.9	22.9	28.7	28.4	24.1	18.9	29.2	32.0	21.8	16.9
JY	23.4	24.5	29.3	22.7	30.6	27.3	23.3	18.7	29.5	31.7	22.8	16.0
LQ	22.7	24.5	30.0	22.7	28.7	28.4	24.1	18.9	30.0	31.3	21.8	16.9
MS	22.7	24.5	30.0	22.7	28.7	28.4	24.0	18.9	30.0	31.3	22.4	16.4
平均 Average	22.9	24.5	29.8	22.9	29.0	28.2	23.9	18.9	29.7	31.5	22.1	16.6

不大;其中,Cyt b 基因 A+T 平均含量为 51.9%,稍高于 G+C 平均含量(48.1%),且 6 种金枪鱼相互间的 GC 含量差异也不大。3 种基因的 GC 含量在 47.0%~48.1%之间,其中,Cyt b 基因 GC 含量最高(48.1%)。

各项遗传多样性参数统计如表 5 所示。基于 16S rRNA 序列的金枪鱼各物种变异位点(V)为 12,变异率仅为 2.08%,远小于 CO I (11.35%)、Cyt b(15.96%)。16S rRNA 序列转换/颠换比(R)为 1.49,也小于 CO I (2.50)和 Cyt b(2.48)。从平均核苷酸差异数(k)和核苷酸多样性指数(π)来看,16S rRNA 是 3 种基因中最小的,而保守位点所占比率为 97.92%,是 3 种基因中

最保守的,说明了该核苷酸变异程度较低,表明了遗传物质的稳定性。

基于 Cyt b 序列的金枪鱼各物种的变异位点(V)为 49,小于 CO I (71),但其变异率为 15.96%,高于 CO I 变异率(11.35%)。Cyt b 序列的单倍型多样性指数(H_d)低于 CO I,平均核苷酸差异数(k)低于 CO I,而核苷酸多样性指数(π)却是 3 种基因片段中最高的,说明较之 16S rRNA 和 CO I 序列,Cyt b 序列核苷酸变异程度最高,遗传多样性较高,分化程度要比其余二者高,但其遗传多样性没有 CO I 序列高,CO I 序列遗传资源较丰富。

表5 3种基因片段的遗传多样性参数
Tab.5 Genetic diversity parameters of three gene fragments

基因 Gene	序列长度 Sequence length	遗传多样性参数 Genetic diversity parameters							
		C	PI	V	R	h	H_d	k	π
16S rRNA	576	564	12	12	1.49	4	0.653±0.054	3.074	0.00534±0.00138
CO I	652	578	71	74	2.50	21	0.941±0.016	17.020	0.02610±0.00637
Cyt b	307	258	47	49	2.48	15	0.902±0.024	11.621	0.03785±0.00834

注: C: 保守位点; PI: 简约信息位点; V: 变异位点; R: 转换/颠换比; h: 单倍型数; H_d : 单倍型多样性指数; k: 平均核苷酸差异数; π : 核苷酸多样性指数

Note: C: Conserved sites; PI: Parsimony-informative sites; V: Variable sites; R: Transitions/transversions ratio; h: Number of haplotypes; H_d : Haplotype diversity; k: Average number of nucleoside difference; π : Nucleotide diversity

2.3 系统进化树

2.3.1 16S rRNA 基于 16S rRNA 基因构建的 NJ 系统进化树见图 2。图 2 显示,6 种金枪鱼分为 4 大支,黄鳍金枪鱼(HQ)与大目金枪鱼(DM)聚为一支。蓝鳍金枪鱼(LQ)与马苏金枪鱼(MS)聚为一支,其中 3 条标准序列 *T. albacares* (JN086153), *T. thynnus* (KF906720)和 *T. obesus* (GU256525)聚为一小支,与 *T. maccoyii* (KF925362)共同在这一大支下。长鳍金枪鱼(CQ)和 *T. alalunga* (AB101291)的遗传差异与上述 4 种金枪鱼较大,单独聚为一支。鲣鱼(JY)和 *K. pelamis* (KM605252)单独归为一支,且和上述 5 种金枪鱼

属遗传距离最远,亲缘关系也最远。这一结果表明,16S rRNA 基因只能单独区分出长鳍金枪鱼和鲣鱼,不能很好区分黄鳍、大目、蓝鳍与马苏金枪鱼,而且不能对同一物种不同地理群体进行聚类分析。16S rRNA 基因序列相对较为保守,6 种金枪鱼的遗传距离较为接近,遗传差异较小。

2.3.2 CO I 基于 CO I 基因构建的 NJ 系统进化树见图 3。图 3 显示,6 种金枪鱼分为 6 大支,大西洋大目(dd)、太平洋大目(dt)和印度洋大目(dy)以及 *T. obesus* (GU256525)归为一支,虽然可以看出有地理群体聚类的趋势(dd-21、dd-25 和 dd-27 聚为一小支等),但也存在混杂不同地理群体大目金枪鱼的问题

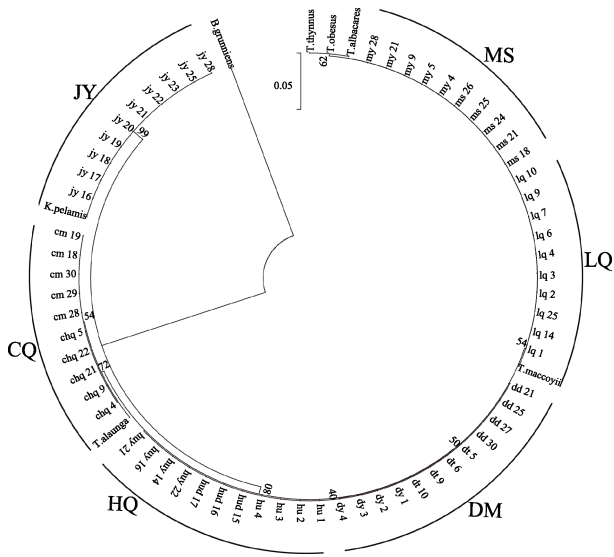


图 2 6 种金枪鱼基于 16S rRNA 基因的系统进化树
Fig.2 Phylogenetic tree of 16S rRNA in six species of tuna gene

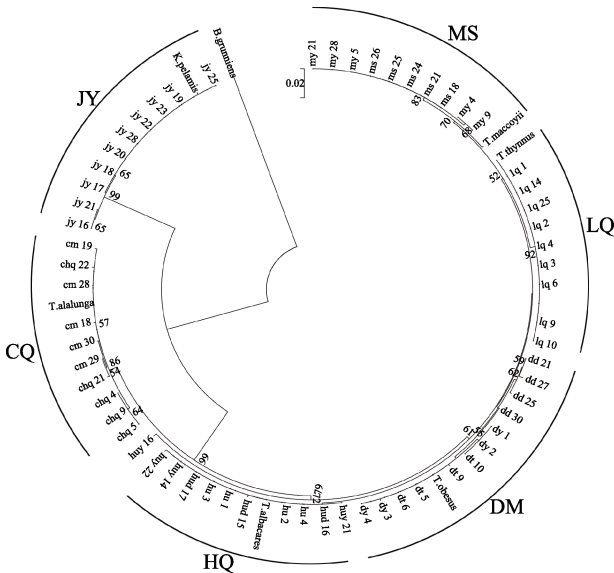


图 3 6 种金枪鱼基于 CO I 基因的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of CO I gene in six species of tuna

(dy 和 dt 相互参杂, dd-30 与它们在同一分支下)。虽然蓝鳍金枪鱼(LQ)和 *T. thynnus* (KF906720)与马苏金枪鱼(MS)遗传距离较为接近,但明显单独成为一支。印度洋马苏(my)和养殖马苏(ms)以及 *T. maccoyii* (KF925362)归为马苏金枪鱼(MS)一大支,但无法从进化树当中明显看出二者因地理位置导致的遗传差异。除了 huy-16 的其他印度洋黄鳍(huy)、大西洋黄鳍(hud)和太平洋黄鳍(hu)以及 *T. albacares* (JN086153)归为黄鳍金枪鱼(HU)一大支,三者同样无法从进化树当中看出明显的因地理位置导致的遗传差异。huy-16 进化分支地位与 HQ、DM、MS 和 LQ 四者并列,这一个体

单独成一支。南太平洋长鳍(chq)和美国长鳍(cm)以及 *T.alalunga* (AB101291)归为长鳍金枪鱼(CQ)一大支,同样无法从进化树明显看出二者因地理位置导致的遗传差异。鲣鱼(JY)和 *K.pelamis* (KM605252)单独归为一大支,且和上述 5 种金枪鱼遗传距离最远,亲缘关系也最远。结果表明,CO I 基因能较好区别 6 种金枪鱼,其进化速率与 16S rRNA 基因相比较快,遗传信息较为丰富。

2.3.3 Cyt b 基于 *Cyt b* 基因构建的 NJ 系统进化树见图 4,其建树结果与 CO I 建树结果大体一致。不同的是,样品 huy-16 在 *Cyt b* 建树结果中归为黄鳍金枪鱼(HU)一大支,且 *Cyt b* 基因建树结果存在一定程度的地理群体聚类的趋势(dd-21、dd-25 和 dd-27 聚为一小支等),但总体而言,无法从进化树中明显看出同种金枪鱼因地理位置导致的遗传差异。结果表明,相比于 16S rRNA 和 CO I 基因,*Cyt b* 基因对于 6 种金枪鱼的区分最为准确,基因分化程度较高,区分度较好。

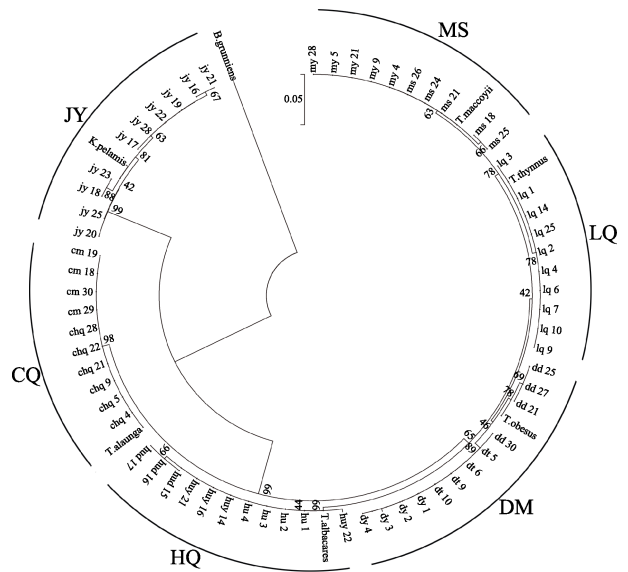


图 4 6 种金枪鱼基于 Cyt b 基因的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of Cyt b gene in six species of tuna

3 讨论

随着现代分子生物技术的快速发展,物种鉴定的研究方法已从形态学、生理生化水平发展到分子水平,鉴定的依据从形状、大小、颜色和解剖特征等方面,发展到 DNA、RNA 和蛋白质等生物大分子层面(蒋守富等, 2014; 柳淑芳等, 2016)。基于 DNA 开发的多种分子鉴定方法,已广泛应用于金枪鱼及其易混物种的鉴定中。Liu 等(2016)采用实时荧光 PCR 技术成

功鉴定了马苏、大目、黄鳍、长鳍和正鲣等金枪鱼; Lin 等(2008)建立了多重 PCR 方法, 用来区分鲣(*Euthynnus pelamis*)、圆舵鲣(*Auxis rochei*)、扁舵鲣(*Auxis thazard*)、东方狐鲣(*Sarda orientalis*)和鲐(*Euthynnus affinis*)等 5 种小型金枪鱼; Abdullah 等(2016)运用单链构象多态性(Single-strand conformation polymorphism, SSCP)方法将圆舵鲣从金枪鱼属中鉴定出来。近年来, 微卫星(Simple sequence repeats, SSRs)分子标记技术越来越多地应用于物种的鉴定和遗传多样性研究, 邱凡等(2008)运用 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA 标记)和微卫星技术对比分析了太平洋蓝鳍金枪鱼野生群体的遗传多样性, 发现微卫星与 RAPD 相比能更好更完善地揭示群体的遗传多样性; Riccioni 等(2010)采用微卫星技术分析了大西洋蓝鳍金枪鱼从 20 世纪初到 2007 年的遗传差异, 发现大西洋蓝鳍金枪鱼在空间和时间上保留了高水平的遗传多样性, 为蓝鳍金枪鱼的鉴定研究奠定基础。上述技术手段能对特定范围内的金枪鱼进行鉴定, 但也在不同程度上存在操作繁琐、鉴定时间长、成本较高等不足。

DNA 条形码是分子鉴定研究中的主要方法, 具有很多优点: 基本不受样品组织形态的影响; 不受样品生命周期的限制; 通过基因测序鉴定, 准确性高; 操作简便, 成本低; 效率高, 可快速鉴定大量样本; 可帮助无专业分类学知识的人获得物种信息(律迎春等, 2011)。理想的标准 DNA 条形码片段并不局限于 CO I 基因序列, 能有效鉴定物种的 DNA 片段都可以应用。此外, 多基因遗传信息的组合使用, 能获得更理想的物种系统进化分析结果(Aoyama *et al*, 2001)。针对金枪鱼采用多基因片段组合使用的鉴定方法已成为目前的关注重点, Neils 等(2015)利用 CO I 和 ITS1(内转录间隔 1 区)基因成功识别了地中海的 3 个产卵区的蓝鳍金枪鱼幼体; Lowenstein 等(2009)采用多条 CO I 基因引物鉴定 68 种金枪鱼寿司样本, 其中的 22 个样本商品标签与实际物种信息不符, 显示了多基因组合使用的思路在金枪鱼物种分子鉴定领域中的广泛应用。邻接法、最大似然法(Maximum likelihood, ML)和最大简约法(Maximum parsimony, MP)是目前构建系统进化树的主要方法。其中, NJ 法是基于最小进化原理常用的一种算法, 具有重建的树相对准确、假设少、计算速度快等优点。故 NJ 法适用于进化距离不大, 信息位点少的短序列, 广泛用于鲐鱼、鲣鱼和银鱼等遗传进化分析。

本研究以主要渔获海域的 6 种金枪鱼及其易混种为研究对象, 采用 CO I、Cyt b 和 16S rRNA 基因

序列作为 DNA 条形码进行进化分析, 探讨多基因条形码在金枪鱼鉴定研究中的适用性。从实验数据来看, 16S rRNA 基因序列变异率仅为 2.08%, 远小于 CO I (11.35%)、Cyt b (15.96%), 且其他遗传多样性参数也是 3 种序列中最小的; 从建树结果来看, 16S rRNA 基因并不能完全区分出 6 种金枪鱼, 只能鉴定出长鳍金枪鱼和鲣鱼, 不能区分黄鳍和大目金枪鱼, 也不能区分蓝鳍与马苏金枪鱼, 更不能获得同一物种因地理位置导致的遗传差异。结果表明, CO I 和 Cyt b 基因的进化速率较 16S rRNA 基因快, 16S rRNA 则相对保守, 这在狭鳕(*Theragra chalcogramma*)、太平洋鳕(*Gadus macrocephalus*)等 4 种鳕鱼的遗传分析上也有类似结果(毕潇潇等, 2009)。

单倍型多样性指数、核苷酸多样性指数是衡量一个物种群体多样性的非常重要的指标(Vrijenhoek, 1994)。单倍型多样性指数是群体变异程度的重要指标, 单倍型多样度高的群体说明其遗传多样性高, 遗传资源丰富; 而核苷酸多样性指数小, 说明核苷酸变异程度较低, 表明了遗传物质的稳定性。Cyt b 序列的单倍型多样性指数(H_d)和平均核苷酸差异数(k)均低于 CO I, 而核苷酸多样性指数(π)却高于 CO I, 说明金枪鱼中 Cyt b 基因较 CO I 基因序列变异速率快, 这与鲳属(*Pampus*)鱼类、波纹唇鱼(*Cheilinus undulatus*)和大银鱼(*Protosalanx hyalocranium*)中的规律相似(孙鹏等, 2011; 胡静等, 2014; 李大命等, 2017)。相比之下, CO I 基因序列进化速率较慢, 且比 Cyt b 拥有更多系统发育信息, 更适合解析亲缘关系密切的分类类群(莫帮辉等, 2008)。相比而言, Cyt b 进化速度适中, 可以用于分析物种种内, 甚至种属科间的进化遗传信息, 有较强的适用性(辛翠娜等, 2009)。从建树结果来看, 针对 huy-16 样本, Cyt b 序列建树结果将 huy-16 归为黄鳍金枪鱼(HQ)这一大支; 而 CO I 序列建树结果显示, 该样本单独归为一支, 独立于黄鳍、马苏、蓝鳍和大目金枪鱼之外, 无法成功鉴定该样品。关于样品 huy-16, 16S rRNA 和 Cyt b 序列建树结果都显示为黄鳍金枪鱼, 而该样本来源经形态学鉴定, 确属黄鳍金枪鱼, 而从 CO I 序列建树结果并未得出这一结论, 所以从该角度来看, Cyt b 序列建树结果要比 CO I 序列建树结果要准确。CO I、Cyt b 和 16S rRNA 3 种基因都无法从进化树中看出同种金枪鱼因地理位置导致的遗传差异, 无法进行同一物种不同地理群体的聚类分析, 但 CO I 与 Cyt b 在一定程度上体现了地理聚类趋势, 可作为群体遗传进化研究的辅助参考。

目前, 国内外研究多采用 CO I 基因作为鱼类分

子鉴定及进化分析的目标基因,也有学者认为,如果仅以一种基因作为参考序列,有可能导致鉴定结果发生偏差,因此,建议同时使用多种基因进行研究(Page *et al*, 2010; Krück *et al*, 2013),这一观点已在石斑鱼和河鲀中得到证实(陈双雅等, 2012; 李楠等, 2018)。本研究结果进一步表明,对金枪鱼这种大洋性鱼类,不宜单独使用单一基因作为鉴定依据,建议 *CO I* 序列与 *Cyt b* 序列联合用于金枪鱼及其制品的物种鉴定研究。

参 考 文 献

- Abdullah A, Rehbein H. The differentiation of tuna (family: Scombridae) products through the PCR-based analysis of the Cytochrome b gene and parvalbumin introns. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(2): 456–464
- Aoyama J, Nishida M, Tsukamoto K. Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eel, *Genus anguilla*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 20(3): 450–459
- Barrett RDH, Hebert PDN. Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 2005, 83(3): 481–491
- Becker RA, Sales NG, Santos GM, *et al*. DNA barcoding and morphological identification of neotropical ichthyoplankton from the Upper Paraná and São Francisco. *Journal of Fish Biology*, 2015, 87(1): 159–168
- Bi XX, Gao TX, Xiao YS, *et al*. Sequence comparison of mtDNA 16S rRNA, *CO I* and *Cyt b* gene fragments in four species of Gadidae fish. *South China Fisheries Science*, 2009, 5(3): 46–52 [毕潇潇, 高天翔, 肖永双, 等. 4 种鳕鱼线粒体 16S rRNA、*CO I* 和 *Cyt b* 基因片段序列的比较研究. 南方水产, 2009, 5(3): 46–52]
- Chapela MJ, Sotelo CG, Calo-Mata P, *et al*. Identification of cephalopod species (Ommastrephidae and Loliginidae) in seafood products by forensically informative nucleotide sequencing (FINS). *Food Sciences*, 2002, 67(5): 1672–1676
- Chen SY, Wang JH, Chen WL, *et al*. Application of 16S rRNA gene and *CO I* gene sequence analysis in species identification of grouper. *Biotechnology Bulletin*, 2012(10): 124–130 [陈双雅, 王嘉鹤, 陈伟玲, 等. 16S rRNA 基因和 *CO I* 基因序列分析在石斑鱼物种鉴定中的应用. 生物技术通报, 2012(10): 124–130]
- Chen WB, Yan TY, Peng J, *et al*. Identification of *Anguilla rostrata*, *Anguilla anguilla* and *Anguilla japonica* using DNA barcoding based on 16S rRNA gene. *Food Science*, 2017, 38(4): 283–289 [陈文炳, 缪婷玉, 彭娟, 等. 基于 16S rRNA 基因 DNA 条形码鉴定美洲鳗、欧洲鳗、日本鳗. 食品科学, 2017, 38(4): 283–289]
- Cui WT, Liu LQ, Li HM, *et al*. Phylogenetic study of Octopodinae in the China Seas based on *CO II* partial sequences. *Progress in Fishery Science*, 2013, 34(3): 21–28 [崔文涛, 刘立芹, 李红梅, 等. 基于 *CO II* 基因序列的中国近海 12 种蛸亚科动物的分子系统进化研究. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 21–28]
- Dai XJ, Xu LX. The primary color map of the world tuna fishery catch species. Beijing: Ocean Press, 2007 [戴小杰, 许柳雄. 世界金枪鱼渔业渔获物物种原色图鉴. 北京: 海洋出版社, 2007]
- Fang JM, Huang FX, Zheng ZX, *et al*. Nutritional value and processing of tuna. *Fisheries Science and Technology*, 2006(2): 8–13 [方健民, 黄富雄, 郑钟新, 等. 金枪鱼的营养价值和加工利用. 水产科技, 2006(2): 8–13]
- Hanner R, Becker S, Ivanova NV, *et al*. FISH-BOL and seafood identification: Geographically dispersed case studies reveal systemic market substitution across Canada. *Mitochondrial DNA*, 2011, 22(S1): 106–122
- Hu J, Hou XY, Yin SW, *et al*. Genetic diversity and divergence of *Cheilinus undulatus* of different geographic populations of the South China Sea revealed by *CO I* and *Cytb* gene analyses. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(6): 1008–1016 [胡静, 侯新远, 尹绍武, 等. 基于 mtDNA *CO I* 和 *Cytb* 基因序列对南中国海不同海域波纹唇鱼群体遗传多样性的研究. 水生生物学报, 2014, 38(6): 1008–1016]
- Inoue J, Miya M, Tsukamoto K, *et al*. A mitogenomic perspective on the basal teleostean phylogeny: Resolving higher-level relationships with longer DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 20(2): 275–285
- Jiang SF, Zhang XP, He YY. Application progress on rapid detection technology of parasites in food. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2014, 26(1): 95–100 [蒋守富, 张小萍, 何艳燕. 食品寄生虫快速检测技术的应用进展. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(1): 95–100]
- Karim A, Iqbal A, Akhtar R, *et al*. Barcoding of fresh water fishes from Pakistan. *DNA Sequence*, 2016, 27(4): 2685–2688
- Khedkar GD, Jamdade R, Naik S, *et al*. DNA barcodes for the fishes of the Narmada, one of India's longest rivers. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101460
- Li DM, Li K, Zhang TQ, *et al*. Genetic polymorphism analysis of *Cyt b* and *CO I* gene sequences of *Protosalanx hyalocranius* in the Hongze Lake. *Progress in Fishery Science*, 2017, 38(6): 25–31 [李大命, 李康, 张彤晴, 等. 洪泽湖大银鱼 (*Protosalanx hyalocranius*) *Cyt b* 和 *CO I* 基因序列多态性分析. 渔业科学进展, 2017, 38(6): 25–31]
- Li N, Wang JH, Han CH, *et al*. Application of *CO I* and *Cyt b* gene in species identification of pufferfish. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2018, 30(1): 6–11 [李楠, 王佳慧, 韩春卉, 等. *CO I* 及 *Cyt b* 基因对河鲀鱼种鉴定的适用性研究. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(1): 6–11]
- Lin WF, Hwang DF. A multiplex PCR assay for species identification of raw and cooked bonito. *Food Control*, 2008,

- 19(9): 879–885
- Liu S, Xu K, Wu Z, *et al.* Identification of five highly priced tuna species by quantitative real-time polymerase chain reaction. *DNA Sequence*, 2016, 27(5): 1–10
- Liu SF, Li XR, Du TF, *et al.* DNA barcoding and electronic microarray for common fish species in Shandong coastal waters. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(4): 777–790 [柳淑芳, 李献儒, 杜腾飞, 等. 山东近海习见鱼类 DNA 条形码及其电子芯片分析. *中国水产科学*, 2016, 23(4): 777–790]
- Lowenstein JH, Amato G, Kolokotronis SO. The real maccoyii: Identifying tuna sushi with DNA barcodes – Contrasting characteristic attributes and genetic distances. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7866
- Lü YC, Zuo T, Tang QJ, *et al.* Construction and application of DNA barcoding in sea cucumber Holothurians. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(4): 782–789 [律迎春, 左涛, 唐庆娟, 等. 海参 DNA 条形码的构建及应用. *中国水产科学*, 2011, 18(4): 782–789]
- Marko PB, Lee SC, Rice AM. Fisheries: Mislabeling of a depleted reef fish. *Nature*, 2004, 430(6997): 309–310
- Mo BH, Qu L, Han S, *et al.* DNA barcoding identification I. Research progress and applied perspective of DNA barcoding. *Sichuan Journal of Zoology*, 2008, 27(2): 303–306 [莫帮辉, 屈莉, 韩松, 等. DNA 条形码识别 I. DNA 条形码研究进展及应用前景. *四川动物*, 2008, 27(2): 303–306]
- Neils PG, Haritz A, Francisco A, *et al.* Molecular identification of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*, Scombridae) larvae and development of a DNA character-based identification key for Mediterranean scombrids. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0130407
- Krück NC, Tibbetts IR, Ward RD, *et al.* Multi-gene barcoding to discriminate sibling species within a morphologically difficult fish genus (*Sillago*). *Fisheries Research*, 2013, 143: 39–46
- Qiu F, Su YQ, Fu MN, *et al.* Primary research of genetic diversity of the natural stock of Pacific bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2008(4): 585–590 [邱凡, 苏永全, 傅蒙娜, 等. 太平洋蓝鳍金枪鱼野生群体遗传多样性的初步研究. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2008(4): 585–590]
- Riccioni G, Landi M, Ferrara G, *et al.* Spatio-temporal population structuring and genetic diversity retention in depleted Atlantic bluefin tuna of the Mediterranean Sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(5): 2100–2107
- Sun C, Liu ZH, Yang AG, *et al.* Genetic analysis of mitochondrial *CO I* and 16S rRNA gene fragments in four *Potamocorbula* species. *Progress in Fishery Science*, 2014, 35(1): 82–90 [孙超, 刘志鸿, 杨爱国, 等. 4 种河蓝蛤线粒体 *CO I* 和 16S rRNA 基因序列的种间遗传分析. *渔业科学进展*, 2014, 35(1): 82–90]
- Sun P, Peng SM, Yin F, *et al.* Population genetic structure of three *Pampus* species from East China Sea inferred by *CO I* and *Cyt b* sequences. *Marine Fisheries*, 2011, 33(4): 398–404 [孙鹏, 彭士明, 尹飞, 等. 利用 *CO I* 和 *Cyt b* 序列探讨东海区 3 种鲷属鱼类的种群遗传结构. *海洋渔业*, 2011, 33(4): 398–404]
- Page TJ, Hughes JM. Comparing the performance of multiple mitochondrial genes in the analysis of Australian freshwater fishes. *Journal of Fish Biology*, 2010, 77(9): 2093–2122
- Vrijenhoek RC. Genetic diversity and fitness in small populations. *Conservation Genetics*, 1994, 68: 37–53
- Wang M, Liu W, Huang H, *et al.* Identifying fish products in Shenzhen through DNA barcoding. *Food Science*, 2015, 36(20): 247–251 [王敏, 刘荃, 黄海, 等. DNA 条形码技术在深圳鱼肉制品鉴定中的应用. *食品科学*, 2015, 36(20): 247–251]
- Ward RD, Hanner R, Hebert PDN. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 2009, 74(2): 329–356
- Xin CN, Peng JJ, Wang Y, *et al.* Application of *Cyt b* gene as a molecular marker in species identification. *Chinese Journal of Wildlife*, 2009, 30(4): 217–221 [辛翠娜, 彭建军, 王莹, 等. *Cyt b* 分子标记技术在物种鉴定中的应用. *野生动物杂志*, 2009, 30(4): 217–221]
- Xu KH, Zhao QL, Liao MT, *et al.* Research of relationship between texture and sensory evaluation of tuna. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(12): 190–197 [徐坤华, 赵巧灵, 廖明涛, 等. 金枪鱼质构特性与感官评价相关性研究. *中国食品学报*, 2014, 14(12): 190–197]

(编辑 冯小花)

Applicability Analysis of Mitochondrial *CO I*, *Cyt b* and 16S rRNA Genes in Identification of Six Tuna Species

LU Jianping^{1,2}, YAO Lin², XIN Hongmei^{2,3}, QU Meng², JIANG Yanhua²,
LI Fengling², GUO Yingying², WANG Lianzhu^{2①}, XU Jiachao^{1①}

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266000;

2. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs;
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

3. School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116000)

Abstract Tuna is rich in nutrients and one of three major fish recommended by the International Nutrition Society. Large tuna such as *Thunnus albacares*, *T. maccoyii*, *T. obesus*, and *T. thynnus* are used as top-grade aquatic products, mainly in the form of sushi or other fresh fish products. Small tuna such as *T. alalunga* and *Katsuwonus pelamis* are mainly used in canned tuna and processed katsuobushi. The price of different species of tuna varies greatly, especially because selling tuna without the head or skin can lead to mislabeling and substandard products, which harms the interests of consumers and undermines market functions. This study was aimed at the identification *T. albacares*, *T. maccoyii*, *T. obesus*, *T. thynnus*, *T. alalunga*, and *K. pelamis*. Using tuna DNA as a template, three pairs of universal primers were used to amplify and sequence the DNA fragments of three genes (16S rRNA, *Cyt b*, and *CO I*) from six species of tuna. The sequencing results were manually corrected to remove the primer regions, which were compared with reference sequences in GenBank by BLAST analysis on the National Center for Biotechnology Information website. The *CO I* gene was analyzed by the Barcode of Life Data System (www.boldsystems.org). As a result, DNA sequences of 16S rRNA (576 bp), *Cyt b* (652 bp) and *CO I* (307 bp) were obtained from 63 samples of six species of tuna. Genetic diversity parameters such as Number of Haplotypes (*h*), Haplotype diversity (H_d), Average number of nucleoside difference (*k*), and Nucleotide diversity (π) were calculated by DnaSP 5.10 software. C-conserved sites, PI-parsimony-informative sites, and V-variable sites were calculated using Mega 7.0 software, which performed 1000 bootstrap tests with neighbor joining. The Kimura 2-parameter model was used to construct a phylogenetic evolutionary tree. The experimental results showed that 16S rRNA was relatively conservative and could not distinguish among the six tuna species. *Cyt b* and *CO I* could be used to identify the species. However, it is possible that *CO I* and *Cyt b* sequences can be used together as a DNA barcode for tuna research. A multi-gene DNA-barcode species-identification method that provides technical support for the identification of tuna and its fish products would be of great significance in promoting the accurate identification and healthy development of aquatic products.

Key words Tuna; Molecular identification; *CO I*; *Cyt b*; 16S rRNA

① Corresponding author: WANG Lianzhu, E-mail: wanglz@ysfri.ac.cn; XU Jiachao, E-mail: xujia@ouc.edu.cn