

メカジキ (*Xiphias gladius*) の吻内部に見られる2型の生物学的検討 及び大西洋南北系群間の遺伝的差異

野原健司*¹, 岡村 寛*², 中立元樹*^{2,3}, 平松一彦*², 鈴木伸明*^{2,3}, 岡崎 誠*⁴, 張 成年*²

Biological investigation on two types of bill internal structure of swordfish (*Xiphias gladius*) and genetic differentiation between the North and South Atlantic stocks

Kenji NOHARA*¹, Hiroshi OKAMURA*², Motoki NAKADATE*^{2,3}, Kazuhiko HIRAMATSU*², Nobuaki SUZUKI*^{2,3}, Makoto OKAZAKI*⁴ and Seinen CHOW*²

Abstract It has been claimed that the frequencies of two distinct bill internal structures (chamber and channel types) of swordfish (*Xiphias gladius*) may vary among localities and be an index for the stock structure. Genetic analyses have revealed stock structuring in this species, and genetic variation at calmodulin gene locus (*CaM*) indicated presence of two genetically separated stocks (north and south) in the Atlantic. In this study, frequency of the bill types was compared between localities, sexes and body size classes, and genetic variation in nuclear and mitochondrial gene loci were compared between the bill types, and genetic differentiation in these loci within and between local samples were investigated. There was no significant difference in the frequency of two bill types among samples from Atlantic, Indian and Pacific Oceans as well as between sexes. No genetic difference between chamber and channel types was observed in all gene loci. In all samples, chamber type was more frequently observed in smaller size class than in larger size class. These suggest that the frequency of the two types is independent of stock structure and sex. Considerably large genetic differentiation at *CaM* locus was observed between north (north of 20°N) and south (south of 10°N) Atlantic samples. On the other hand, differentiation among samples within locality was very little among years (1990 to 1998 in north, and 1994 to 1999 in south). The results of genetic analysis indicated that the north and south Atlantic stocks of swordfish were genetically isolated with little gene flow and migration.

Key words: swordfish, bill internal structure, genetic stock structure

カジキ類は大きく2科 (メカジキ科, マカジキ科) に分けられる (Nakamura, 1983)。そのうちメカジキ (*Xiphias gladius* Linnaeus) は1科1属1種であり, その分布は非常に広く地中海を含む全大洋の熱帯域か

ら亜寒帯域まで生息する。本種は水産上非常に重要な魚種のひとつであり, FAO統計によれば2000年の総漁獲量は105,000トンである。メカジキ資源の管理は大洋ごとに行われているが, 大洋内でも南北半球や東西に

2002年10月15日受理 (Received on October 15, 2002)

水産総合研究センター業績 A 第33号 (Contribution No. A 33 from the Fisheries Research Agency.)

*¹ 東海大学海洋学部 〒424-8610 静岡県清水市折戸3-20-1 (Faculty of Marine Science, Tokai University, 3-20-1, Orido, Shimizu, Shizuoka 424-8610, Japan)

*² 遠洋水産研究所 〒424-8633 静岡県清水市折戸5-7-1 (National Research Institute of Far Seas Fisheries, 5-7-1, Orido, Shimizu, Shizuoka 424-8633, Japan)

*³ 重点研究支援協力員 (科学技術振興事業団)

*⁴ 農林水産研究計算センター 〒305-0856 茨城県つくば市観音台2-1-2 (Computer Center for Agriculture, Forestry & Fisheries Research, 2-1-2, Kannon-dai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan)

区分して資源評価を行う場合もみられる (Bartoo and Coan, 1989; Miyake and Rey 1989; Skillman, 1989)。しかしながら, このような管理単位には, 明確に独立した変動単位としての系群といった集団を扱っているという裏づけはなく便宜上の区分である場合が多い。管理単位を本質的なものとするため回遊範囲の把握や系群を認識することを目的とした標識放流調査や異なる海域で漁獲された個体の寄生虫相の比較及び集団遺伝学的調査が行われてきた。

1993年に米国東岸及び北西大西洋で標識放流された1,317個体のメカジキのうち42個体が再捕されたがこれらは全て北大西洋からのものであった (Jones *et al.*, 1995)。Castro *et al.* (1998) は北西と南東大西洋のメカジキ個体の寄生虫相を比較し, これら2海域標本間で寄生虫組成が大きく異なることを報告している。ミトコンドリアDNA (mtDNA) 多型を用いた遺伝学的調査では, 地中海個体群が遺伝的に孤立した集団であること, 大西洋とインド太平洋標本間で遺伝子頻度に有意な差異があること, が明らかにされている (Kotoulas *et al.*, 1995; Rosel and Block, 1995; Alvarado-Bremer *et al.*, 1996; Chow *et al.*, 1997; Chow and Takeyama, 2000)。さらに, 大西洋内では北緯20度以北と北緯10度以南の標本間で大きな遺伝的差異を示す多型的核DNAマーカーが発見されている (Chow and Takeyama, 2000)。この核DNAマーカーはカルモデュリン遺伝子 (*CaM*) の第4イントロンにおける一塩基多型 (SNP) によるものであり, 大西洋北部標本では対立遺伝子A及びBの頻度がそれぞれ約50%である一方, 南部標本ではAの頻度が約90%という大きな差異を示すものである。このように, 標識放流, 寄生虫相及び遺伝学的分析から大西洋のメカジキには2つの系群が南北に存在することが示されたが, これら系群の境界と交流程度, そして異なる系群からの個体の回遊範囲を把握する必要がある。そのためには, 海域内および海域間での長期間にわたる遺伝子頻度の変動と安定性について検討しなければならない。

一方, 形態学的変異を系群識別に応用する試みも行われてきた。メカジキには他のカジキ類とは異なる特徴が多く見られる。本種に特徴的な形態としては体表に鱗を持たないことや腹鰭がないことなどが挙げられる。また, メカジキの吻は長く, そして著しく縦扁しているのに対し, マカジキ科カジキ類の吻は短く円筒状を呈している。この長く扁平化している形態は, 摂餌行動の際に吻を左右に振って餌を切りつけるのに適していると想定されている (富永, 1967; Scott and Tibbo, 1968)。メカジキ吻の内部構造には, 腔洞のあるものと腔洞のないものといった形態的に顕著な2型

があることが古くから漁業関係者に知られてきた。Carey (私信) は太平洋メキシコ沿岸と大西洋のニューヨーク沖で漁獲されたメカジキ標本の吻の内部構造の観察からこれら2型の出現頻度が海域によって異なる可能性を示唆し, 系群識別のための形態的指標となる可能性があると考え, より広い海域標本に基づく調査をよびかけてきた。矢富 (1988) はインド洋, 北西太平洋及び南太平洋で漁獲されたメカジキ標本の吻を調査し, これら2型が性特異的に出現する形質ではないが雌における2型頻度分布には海域差がある可能性を示唆している。また, 2型間での成長様式には差異がないことを報告している。Di Natale *et al.* (1996) は地中海メカジキの吻を調査し, 2型が性と関連する形質ではないこと, 2型間で形態学的な差異は無いことを報告している。しかしながら, これらの研究に用いた標本数は限られており太平洋, 大西洋, インド洋といった広範囲な海域標本を用いた検討及び2型間での遺伝学的分析は行われていない。

本研究では乗船科学オブザーバー調査によって新たに得られた大西洋と太平洋メカジキ標本を用いて, 吻内部の2型の出現頻度が海域間や雌雄間及び体長区分で差異があるかどうか, 2型間に遺伝学的な差があるかどうかについて検討するとともに, 大西洋の南北標本間で発見された遺伝的差異が長い期間にわたって安定しているかどうかについて解析した結果を報告する。

材料と方法

メカジキ標本

本研究で分析に供したメカジキ標本は, 1998年4月から1999年8月までに, 北西大西洋, 中部北大西洋及び南西太平洋で操業した延縄船に乗船した科学オブザーバーにより採集されたものである (Table 1)。船上で漁獲位置, 雌雄, 体長 (眼窩長: 眼窩後縁から尾叉) を記録した後, 個体ごとに吻及び筋肉標本が採取され凍結された。輸送の簡便化のため吻標本の多くは吻中央部付近から前後約10cm計20cmにわたって切り出されたものであり, 一部は吻基部から先端までの全体標本であった。冷凍されている吻を2~3時間室温で放置し解凍した後, 正中線に沿って切断して内部構造を観察し腔洞の有無で2型に分類した。吻と筋肉標本が揃っている場合がほとんどであったが筋肉標本が欠けている場合は吻断面内部の外縁に沿って通る導管から血液を採取した。

DNAの抽出と分析

筋肉及び血液からのtotal DNAの粗抽出は市販のDNA抽出キット (Sepa Gene, 三光純薬) を用いて行っ

Table 1. Catch locality and date of swordfish samples used in this study

Locality	Latitude	Longitude	Date	Sample size
Atlantic				
Northwest (NWA98)	35.6~42.9N	45.6~71.1W	1998.4.26~1998.7.30	61
Tropical north (TNA99)	2.8~10.2N	21.2~33.0W	1999.1.8~1999.4.8	90
Pacific				
Southwest (SWP99)	36.4~42.9S	152.9~159.3E	1999.5.13~1999.8.2	120

た。抽出したDNA標本を用いて、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の *D-loop* を含む領域、核DNA (nDNA) のカルモデュリン (*CaM*) 遺伝子の第4イントロン、クレアチンキナーゼ (*CK*) 遺伝子の第6イントロンの計3遺伝子座をPCR法によって増幅した。PCR増幅に用いたプライマーは、Palumbi *et al.* (1991) によるCB3R-Lと12SAR-H (*D-loop*)、Chow (1998) と Chow and Takeyama (2000) によるCaLMex4FとCaLMex5R (*CaM*)、及びChow and Takeyama (1998) によるCKSWFとCKSWR (*CK*) である。*D-loop* 遺伝子座に対しては制限酵素 *Alu* I, *Rsa* Iを、*CaM* 遺伝子座に対しては *Bst* UIを用いて制限酵素切断片長多型 (RFLP) 分析を行った。*CK* 遺伝子座ではPCR増幅産物に長さ多型が報告されている (Chow and Takeyama, 1998)。制限酵素処理した *D-loop* 及び *CK* 増幅断片の電気泳動には2.5%のBioGel (Bio101), 制限酵素処理した *CaM* 断片には1%のAgarose (GIBCO BRL) を用いてエチジウムブロマイドを含む0.5×TBE緩衝液中で2~4時間泳動した。泳動像を撮影した後に遺伝子型を決定した。

統計解析

標本間での吻2型頻度の比較及び吻2型間での *D-loop* 遺伝子頻度の比較には、いくつかのセルの期待度数が小さい場合があるためモンテカルロシミュレーション (1,000回) による χ^2 test (Roff and Bentzen, 1989) を用いた。比較のために矢富 (1988) によるインド洋と太平洋標本の2型出現頻度データを用いた。2型間での *CaM* と *CK* 遺伝子頻度の同質性検定にはPOPGENE Version1.31 (Yeh *et al.*, 1997) による χ^2 testを用いた。

集団遺伝学的解析については、今回の分析結果とChow *et al.* (1997) とChow and Takeyama (2000) による *D-loop* と *CaM* 遺伝子座のデータを統合し、海域内標本及び海域標本の遺伝子頻度を時空間的に比較した。*D-loop* と *CaM* 遺伝子座に対してそれぞれ χ^2 test を用いて解析した。

有意水準は5%としたが、多重検定の場合には組み合わせ数の逆数を5%に乗じた有意水準 (Bonferroni補正) とした (Rice, 1989)。

結 果

吻の内部構造

矢富 (1988), Di Natale *et al.* (1996), Fierstine and Voigt (1996) による観察結果と同様に、吻内部には腔洞があるものと腔洞の無いものという顕著な2型が確認された (Fig. 1)。2型には共通して外縁に沿って通る導管が見られた。矢富 (1988) は、腔洞がある型について"不定型の腔所", 腔洞が無い型については"中央にやや細い導管がある"という特徴を指摘しており、本研究ではそれに従ってそれぞれ腔所型 (chamber type) 及び導管型 (channel type) と呼ぶこととする。典型的な腔所型は吻の付け根から先端にいたるまで、連続的な腔所が整然と並んでおり、その中にはゼラチン状の物質が観察された (Fig. 2)。また、腔所の形態は一樣ではなく円形のものから、方形に近いもの、不定形のもの、複数の腔所が繋がっているものまで幅広い形態の変異が見られた。ごく小さな腔所がわずかに点在する型も観察されたが、少数であったため分析からは除外し、典型的な2型のみを用いた。

海域間での2型頻度の比較

各海域標本における吻2型出現頻度をTable 2に示した。矢富 (1988) の南西 (New Zealand) 及び南東太平洋のデータはプールし南太平洋標本 (SP) として扱った。腔所型の出現率は最低でインド洋の29.7%から最高で北西太平洋の50%までの範囲であった。全海域標本で腔所型の出現率が低い傾向が見られたが、2型の出現頻度に関して海域標本間で統計的に有意な異質性はみられなかった ($P=0.562$)。

雌雄間での吻2型頻度の比較

本研究で用いた北西大西洋 (NWA98), 熱帯北大西

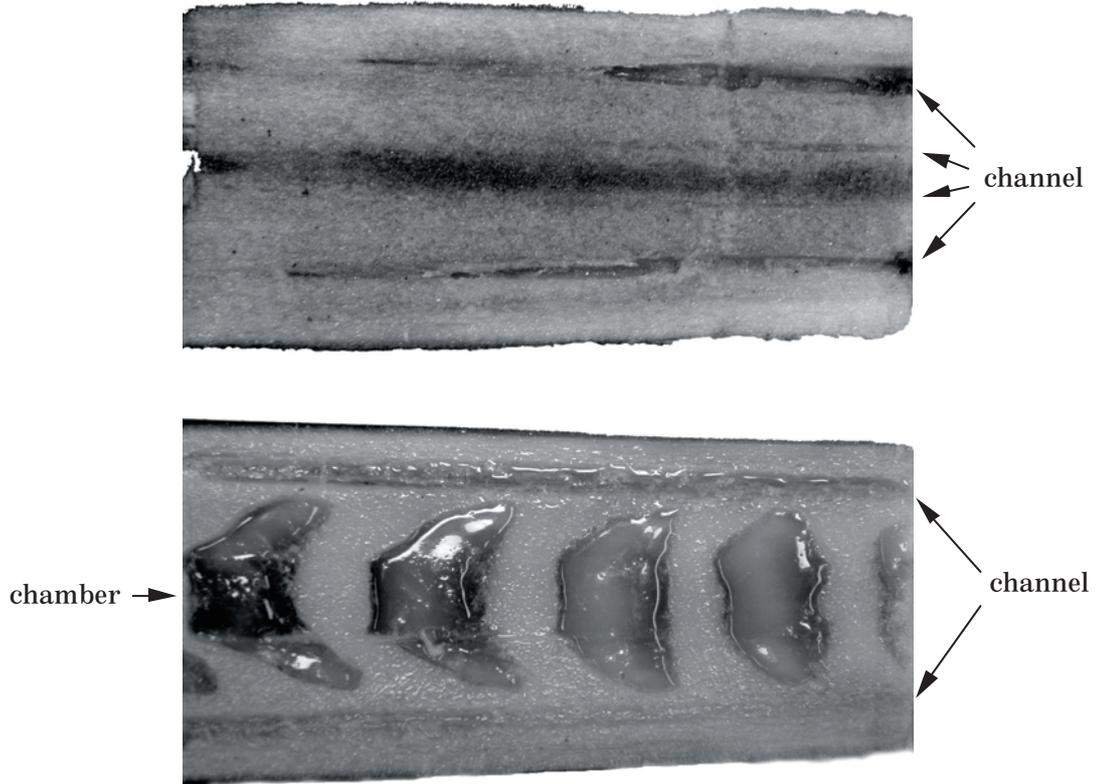


Fig. 1. Horizontal transverse section of central part of the swordfish bill, showing channel type (top) and chamber type (bottom)

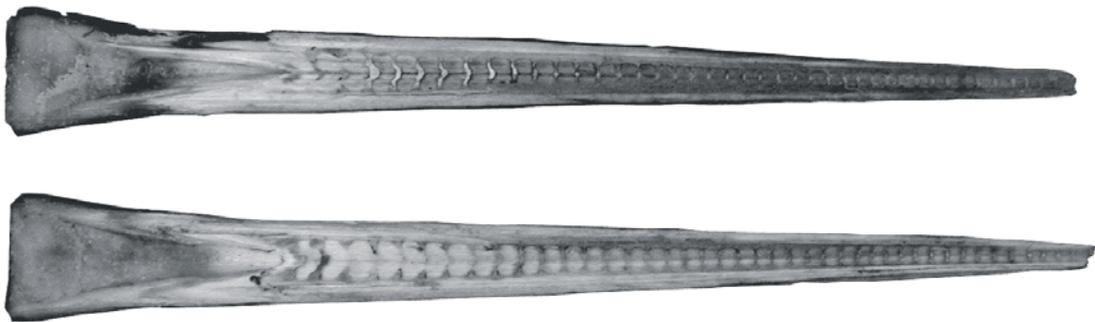


Fig. 2. Horizontal transverse section throughout entire length of chamber type bill of the swordfish

Table 2. Frequency of two types of bill internal structure of six swordfish samples

Type	Atlantic		Indian		Pacific	
	NWA98	TNA99	Indian*	NWP*	SWP99	SP*
Chamber	25 (41.0)	38 (42.2)	11 (29.7)	21 (50.0)	46 (38.3)	12 (36.4)
Channel	36 (59.0)	52 (57.8)	26 (70.3)	21 (50.0)	74 (61.7)	21 (63.6)
Total	61	90	37	42	120	33

* Data were derived from Yatomi (1988). Parentheses represent % frequency.

洋 (TNA99), 南西太平洋 (SWP99) 及び雌雄データがある矢富 (1988) のインド洋 (Indian) 及び南太平洋 (SP) 標本データを用いた (Table 3)。性別不明の標本があるため Table 3 の個体数は Table 2 のものより少ない。各海域標本内では雌雄間での 2 型出現頻度に差異は見られなかった ($P > 0.2$)。さらに海域標本間で吻 2 型頻度に差異が観察されなかったため、全海域標本をプールしたところ雄での腔所型出現率は 34.6%, 雌では 38.1% であり、雌雄間で吻 2 型の出現頻度において有意な異質性は見られなかった ($P = 0.731$)。

体長階級間での吻 2 型頻度の比較

北西大西洋 (NWA98), 熱帯北大西洋 (TNA99), 南西太平洋 (SWP99) の 3 海域標本を用いて、人為的に体長階級を設定し体長階級間での吻 2 型出現頻度の比較を行った。体長はメカジキの大部分が性成熟に達するといわれる 150cm を境に 2 階級に分けた場合とさらに細かく 130cm 未満, 130cm 以上 170cm 未満, 170cm 以上の 3 階級に分けた場合について、体長階級間での吻 2 型頻度について比較した。全ての海域標本で体長が小さい階級で腔所型の出現率が高い傾向が見られたが、階級間で有意な異質性は見られなかった。海域間及び雌雄間で吻 2 型の出現頻度に差異はないことから、3 海域標本をプールした (Table 4)。3 階級に分けた場合では階級間で有意な異質性が見られなかったが ($P =$

0.34), 2 階級に分けた場合においては 150cm 未満の体長階級での腔所型の出現率が高い傾向が見られた ($P = 0.067$)。

吻 2 型間での遺伝子頻度の比較

mtDNA の *D-loop* 領域の制限酵素切断型類別は Chow *et al.* (1997) に従った。Alu I, Rsa I 処理及びこれら 2 酵素による切断型を組み合わせさせた場合について、北西大西洋 (NWA98), 熱帯北大西洋 (TNA99), 南西太平洋 (SWP99) の 3 海域標本における吻 2 型の遺伝子頻度を Table 5 に示した。いずれの海域標本においても吻 2 型間の遺伝子頻度に有意差は見られなかった ($P > 0.6$)。

核 DNA の *CaM* 及び *CK* 遺伝子座における海域標本ごとの吻 2 型の遺伝子型及び遺伝子頻度を Table 6 に示した。太平洋標本の *CaM* 遺伝子座には変異が見られず、分析した 95 個体全てが AA のホモ接合体であったことが報告されているため (Chow and Takeyama, 2000), 北西大西洋 (NWA98) および熱帯北大西洋 (TNA99) の 2 海域標本を分析した。Chow and Takeyama (1998, 2000) と同様に *CaM* 及び *CK* 遺伝子座それぞれにおいて 2 種類の対立遺伝子が観察された。*CaM* 遺伝子座における対立遺伝子 A の頻度は北西大西洋標本で 0.456~0.591, 中部北大西洋標本で 0.89~0.912 と海域差が大きいが、それぞれの海域標本においては吻 2 型間

Table 3. Comparison of number of chamber and channel type individuals between male (M) and female (F)

	Atlantic		Indian		Pacific		Total					
	NWA98		TNA99		Indian*		SWP99		SP*			
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F		
Chamber	1 (33.3)	15 (35.7)	6 (42.9)	28 (41.2)	2 (28.6)	8 (32.0)	7 (46.7)	17 (37.0)	2 (15.4)	6 (46.2)	18 (34.6)	74 (38.1)
Channel	2 (66.7)	27 (64.3)	8 (57.1)	40 (58.8)	5 (71.4)	17 (68.0)	8 (53.3)	29 (63.0)	11 (84.6)	7 (53.8)	34 (65.4)	120 (61.9)
<i>P</i>	1		1		1		0.562		0.204		0.731	

* Data were derived from Yatomi (1988). Parentheses represent % frequency.

Table 4. Comparison of number of chamber and channel type individuals among body size classes

Size class	chamber	channel	total	Size class	chamber	channel	total
<150cm	69 (46.3)	80 (53.7)	149	<130cm	43 (47.3)	48 (52.7)	91
≥150cm	37 (34.6)	70 (65.4)	107	130cm ≤ <170cm	39 (39.8)	59 (60.2)	98
				≥170cm	24 (35.8)	43 (64.2)	67
<i>P</i>	0.067				0.34		

Parentheses represent % frequency

Table 5. Mitochondrial DNA *D-loop* genotype frequencies between chamber and channel types within local samples of swordfish

Genotype	NWA98		TNA99		SWP99	
	Chamber	Channel	Chamber	Channel	Chamber	Channel
<i>Alu I</i>						
<i>A</i>	11 (50.0)	13 (36.1)	11 (39.3)	19 (48.7)	18 (64.3)	34 (63.0)
<i>B</i>	3 (13.6)	3 (8.3)	3 (10.7)	3 (7.7)	4 (14.3)	8 (14.8)
<i>C</i>	7 (31.8)	18 (50.0)	12 (42.9)	13 (33.3)	5 (17.8)	11 (20.4)
<i>D</i>	1 (4.6)	2 (5.6)	2 (7.1)	4 (10.3)	1 (3.6)	1 (1.9)
Sample size	22	36	28	39	28	54
<i>P</i>	0.634		0.768		1	
<i>Rsa I</i>						
<i>A</i>	8 (36.4)	15 (42.9)	10 (33.3)	16 (36.4)	13 (44.8)	26 (48.2)
<i>B</i>	2 (9.1)	1 (2.9)	0 (0.0)	2 (4.6)	0 (0.0)	2 (3.7)
<i>C</i>	10 (45.3)	16 (45.5)	16 (53.4)	22 (49.9)	13 (44.8)	18 (33.3)
<i>D</i>	0 (0.0)	1 (2.9)	1 (3.3)	0 (0.0)	1 (3.5)	4 (7.4)
<i>E</i>	1 (4.6)	1 (2.9)	3 (10.0)	4 (9.1)	2 (6.9)	4 (7.4)
<i>F</i>	0 (0.0)	1 (2.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>G</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>H</i>	1 (4.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Sample size	22	35	30	44	29	54
<i>P</i>	0.844		0.637		0.703	
<i>Alu I/Rsa I</i>						
<i>AA</i>	5 (22.5)	7 (20.0)	4 (14.8)	4 (10.8)	5 (17.9)	16 (30.0)
<i>AB</i>	1 (4.6)	1 (2.9)	0 (0.0)	1 (2.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>AC</i>	4 (18.2)	4 (11.4)	6 (22.2)	12 (32.5)	11 (39.3)	14 (26.4)
<i>AE</i>	1 (4.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.7)	2 (7.1)	3 (5.7)
<i>AF</i>	0 (0.0)	1 (2.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>BA</i>	1 (4.6)	2 (5.7)	2 (7.4)	2 (5.4)	2 (7.1)	5 (9.4)
<i>BC</i>	1 (4.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.7)	2 (7.1)	2 (3.8)
<i>BD</i>	0 (0.0)	1 (2.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>BE</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (3.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.9)
<i>BH</i>	1 (4.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>CA</i>	1 (4.6)	5 (14.3)	3 (11.1)	6 (16.2)	4 (14.3)	3 (5.7)
<i>CB</i>	1 (4.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (3.8)
<i>CC</i>	5 (22.5)	11 (31.2)	7 (26.0)	6 (16.2)	0 (0.0)	2 (3.8)
<i>CD</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (3.7)	0 (0.0)	1 (3.6)	4 (7.6)
<i>CE</i>	0 (0.0)	1 (2.9)	1 (3.7)	1 (2.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>DA</i>	1 (4.6)	1 (2.9)	1 (3.7)	2 (5.4)	1 (3.6)	1 (1.9)
<i>DC</i>	0 (0.0)	1 (2.9)	1 (3.7)	1 (2.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
Sample size	22	35	27	37	28	53
<i>P</i>	0.973		0.901		0.629	

Parentheses represent % frequency

Table 6. Comparison of genotype¹ and allele² frequencies at *CaM* and *CK* gene loci between chamber and channel types of swordfish

Locus	NWA98		TNA99		SWP99	
	Chamber	Channel	Chamber	Channel	Chamber	Channel
CaM						
AA ¹	7 (31.8)	8 (23.5)	28 (82.3)	40 (80.0)		
AB	12 (54.6)	15 (44.1)	6 (17.7)	9 (18.0)		
BB	3 (13.6)	11 (32.4)	0 (0.0)	1 (2.0)		
Sample size	22	34	34	50		
A ²	0.591	0.456	0.912	0.890		
B	0.409	0.544	0.088	0.110		
P	0.163		0.646			
CK						
AA ¹	2 (9.5)	3 (8.6)	6 (15.0)	8 (18.2)	4 (9.0)	9 (12.5)
AB	10 (47.6)	19 (54.3)	20 (50.0)	16 (36.4)	20 (45.5)	37 (51.4)
BB	9 (42.9)	13 (37.1)	14 (35.0)	20 (45.4)	20 (45.5)	26 (36.1)
Sample size	21	35	40	44	44	72
A ²	0.333	0.357	0.400	0.363	0.318	0.382
B	0.667	0.643	0.600	0.636	0.682	0.618
P	0.798		0.628		0.326	

Parentheses represent % frequency

の遺伝子頻度に有意差は見られなかった ($P>0.1$)。CK 遺伝子座では北北大西洋 (NWA98), 熱帯北大西洋 (TNA99), 南西太平洋 (SWP99) の3地域標本の対立遺伝子Aの頻度は0.318~0.4の範囲で大きな地域間差はみられず, またいずれの地域標本においても吻2型間の遺伝子頻度に有意差は見られなかった ($P>0.3$)。

海域内標本間及び地域標本間の遺伝的分化

Chow *et al.* (1997) と Chow and Takeyama (2000) によるmtDNA *D-loop*及び*CaM*遺伝子座における多型を用いたメカジキの遺伝学的解析結果と今回分析した標本のデータを統合し, 地域内標本間及び地域標本間での遺伝子頻度の時空間的変動について検討した。標本の区分は大西洋北緯20度以北, 大西洋北緯10度以南, インド洋, 太平洋とした。

1) mtDNA *D-loop*遺伝子座

大西洋北緯20度以北では1990年から1998年の4標本間, 大西洋北緯10度以南では1994年から1999年の5標本間, インド洋では1992年から1997年の3標本間, 太平洋では1991年から1999年の7標本間でそれぞれ*D-loop*遺伝子頻度に異質性は見られなかった ($P>0.08$) (Table 7)。そのため, 各地域ごとで全ての年度標本データをプールし, 北大西洋 (NA), 南大西洋 (SA), インド洋 (I), 太平洋 (P) の4地域標本データセットを作成した (Table 8)。4地域間の異質性は極めて

高いことが示された ($P<0.001$) が, ペアワイズでの比較では北大西洋標本間 ($P>0.24$) 及びインド太平洋標本間 ($P>0.027$) では異質性は検出されなかった。*Rsa* I消化による遺伝子頻度比較でインド洋と南大西洋標本間で有意差が見られなかったケース ($P=0.25$) 以外, 大西洋標本とインド太平洋標本間には大きな異質性が見られた ($P<0.004$)。

2) *CaM*遺伝子座

大西洋北緯20度以北では1990年から1998年にわたる4標本, 大西洋北緯10度以南では1994年から1999年の5標本の全てはそれぞれHardy-Weinberg平衡にあった。全9標本の遺伝子頻度はかなり異質であることが示されたが ($P<0.001$), 大西洋北緯20度以北4年度標本間, 大西洋北緯10度以南の5年度標本間にはそれぞれ異質性は見られなかった ($P>0.121$) (Table 9)。そのため, それぞれの標本をプールし, 北緯20度以北の北大西洋 (NA), 北緯10度以南の南大西洋 (SA) の2地域標本とし, 参考のためChow and Takeyama (2000) による地中海 (MED) とインド太平洋のデータ (I-P) を加えたデータセットをTable 10に示した。これら統合データそれぞれでは遺伝子型頻度観察値の分布はHardy-Weinberg比による期待値とよく一致していた ($P>0.6$)。対立遺伝子頻度に関しては, 地中海標本ではAの頻度が0.347, 北大西洋標本では0.507である一方, 南大西洋標本では0.886そしてインド太平洋で

Table 7. Genotype frequencies at mtDNA *D-loop* locus of 19 samples of swordfish (*Xiphias gladius*)

Genotype	North Atlantic (north of 20°N)				South Atlantic (south of 10°N)				
	NWA98 35~43N 45~71W	NWA97 37~41N 48~67W	NWA93 20~30N 57~90W	NWA90 38~40N 59~72W	TNA99 2~10N 21~33W	TNA97 5~8N 8~21W	TSA97 5~11S 2E~8W	Brazil96 20~33S 28~46W	Brazil94 20~30S 35~50W
	<i>Alu I</i>								
<i>A</i>	27	6	8	8	30	6	24	25	30
<i>B</i>	7	0	3	1	6	4	5	4	3
<i>C</i>	29	10	18	15	25	18	19	23	25
<i>D</i>	3	1	0	3	6	0	2	0	1
Sample size	66	17	29	27	67	28	50	52	59
<i>P</i>	0.443				0.084				
<i>Rsa I</i>									
<i>A</i>	25	2	7	4	26	6	13	16	20
<i>B</i>	3	0	2	0	2	2	0	1	2
<i>C</i>	32	15	18	21	38	18	30	29	32
<i>D</i>	1	1	0	0	1	2	1	1	3
<i>E</i>	2	0	1	2	7	0	1	4	5
<i>F</i>	1	1	0	0	0	0	3	0	1
<i>G</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>H</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Sample size	65	19	29	27	74	28	48	51	63
<i>P</i>	0.186				0.242				
<i>Alu I /Rsa I</i>									
<i>AA</i>	13	0	3	2	8	2	5	9	12
<i>AB</i>	2	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>AC</i>	10	5	5	5	18	4	16	11	16
<i>AD</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>AE</i>	1	0	0	0	1	0	0	3	1
<i>AF</i>	1	1	0	0	0	0	2	0	1
<i>BA</i>	4	0	3	1	4	1	4	4	2
<i>BB</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0
<i>BC</i>	1	0	0	0	1	1	0	0	1
<i>BD</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>BE</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>BH</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>CA</i>	6	0	1	1	9	3	3	3	5
<i>CB</i>	1	0	2	0	0	0	0	1	1
<i>CC</i>	20	9	13	12	13	13	13	17	12
<i>CD</i>	0	1	0	0	1	2	1	1	3
<i>CE</i>	1	0	1	2	2	0	1	1	4
<i>CF</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>CG</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>CH</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>DA</i>	2	1	0	0	3	0	1	0	0
<i>DB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>DC</i>	1	0	0	3	3	0	1	0	0
<i>DD</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sample size	65	17	29	26	65	28	48	50	59
<i>P</i>	0.28				0.095				

Table 7. (continued)

Indian Ocean			Pacific						
Seychel 1997 n/a	Sjava95 16~17S 118~119E	SriLanka 1992 n/a	SWP99 36~43S 153~159E	SWP94 30~38S 154~179E	Japan 24~35N 144~154E	Hawaii 0~12N 165W	Mexico 24~27N 113-115W	Ecuador 1N 79W	Peru 8~18S 84~124W
15	24	16	54	19	26	30	21	13	34
1	4	4	13	6	9	8	10	1	8
4	9	5	19	6	9	13	4	7	9
0	0	3	3	0	1	0	0	0	2
20	35	28	89	31	45	51	35	21	53
0.238			0.734						
6	16	8	43	15	17	20	15	7	19
2	1	0	3	2	3	6	3	2	2
11	15	17	32	10	23	20	15	6	20
0	1	0	5	2	0	2	2	3	4
1	4	1	6	1	1	3	0	2	7
0	0	1	0	1	1	0	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
20	37	28	89	31	45	51	35	21	53
0.45			0.449						
5	8	4	23	9	10	9	8	6	9
2	0	0	0	2	2	2	2	1	2
7	11	11	25	6	12	16	10	4	18
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	3	0	5	1	1	3	0	2	4
0	0	1	0	1	1	0	0	0	1
0	4	1	8	3	3	7	4	0	6
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1	0	3	4	3	5	1	4	1	0
0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0	2
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	4	2	7	3	3	4	2	1	4
0	1	0	3	0	0	4	1	1	0
2	3	1	3	1	6	3	1	1	2
0	0	0	6	2	0	2	0	3	2
0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	3	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
20	36	27	88	31	45	51	34	21	53
0.283			0.08						

Table 8. Genotype frequency at mtDNA *D-loop* locus of four swordfish samples and pair-wise *P* values between samples

Genotype	Atlantic		Indian	Pacific	Pair-wise <i>P</i>		
	NA	SA	I	P	NA	SA	I
<i>Alu I</i>							
<i>A</i>	43 (35.3)	115 (44.9)	55 (64.7)	197 (60.6)	SA	0.339	
<i>B</i>	11 (9.0)	22 (8.6)	9 (10.6)	55 (16.9)	I	<0.001	0.004
<i>C</i>	62 (50.8)	110 (43.0)	18 (21.2)	67 (20.6)	P	<0.001	<0.001
<i>D</i>	6 (4.9)	9 (3.5)	3 (3.5)	6 (1.9)			0.461
Sample size	122	256	85	325			
<i>Rsa I</i>							
<i>A</i>	36 (29.8)	81 (30.7)	30 (34.9)	136 (41.8)	SA	0.323	
<i>B</i>	5 (4.1)	7 (2.7)	3 (3.5)	21 (6.5)	I	<0.001	0.25
<i>C</i>	71 (58.8)	147 (55.7)	43 (49.9)	126 (38.8)	P	<0.001	<0.001
<i>D</i>	1 (0.8)	8 (3.0)	1 (1.2)	18 (5.5)			0.027
<i>E</i>	5 (4.1)	17 (6.4)	6 (7.0)	20 (6.2)			
<i>F</i>	1 (0.8)	4 (1.5)	1 (1.2)	4 (1.2)			
<i>G</i>	1 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)			
<i>H</i>	1 (0.8)	0 (0.0)	2 (2.3)	0 (0.0)			
Sample size	121	264	86	325			
<i>Alu I / Rsa I</i>							
<i>AA</i>	18 (13.1)	27 (13.5)	17 (20.2)	74 (22.9)	SA	0.24	
<i>AB</i>	2 (1.5)	1 (0.5)	2 (2.4)	11 (3.4)	I	<0.001	<0.001
<i>AC</i>	25 (18.3)	54 (27.0)	29 (34.4)	91 (28.3)	P	<0.001	<0.001
<i>AD</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.2)	0 (0.0)			0.045
<i>AE</i>	1 (0.7)	2 (1.0)	4 (4.8)	16 (5.0)			
<i>AF</i>	2 (1.5)	3 (1.5)	1 (1.2)	3 (0.9)			
<i>BA</i>	8 (5.8)	11 (5.5)	5 (6.0)	31 (9.6)			
<i>BB</i>	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.3)			
<i>BC</i>	1 (0.7)	3 (1.5)	4 (4.8)	18 (5.6)			
<i>BD</i>	1 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)			
<i>BE</i>	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	3 (0.9)			
<i>BH</i>	1 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)			
<i>CA</i>	8 (5.8)	20 (10.0)	7 (8.3)	24 (7.4)			
<i>CB</i>	3 (2.2)	1 (0.5)	1 (1.2)	9 (2.8)			
<i>CC</i>	54 (39.6)	51 (25.5)	6 (7.1)	17 (5.3)			
<i>CD</i>	1 (0.7)	7 (3.5)	0 (0.0)	15 (4.6)			
<i>CF</i>	0 (0.0)	1 (0.5)	2 (2.4)	1 (0.3)			
<i>CE</i>	4 (2.9)	7 (3.5)	0 (0.0)	1 (0.3)			
<i>CG</i>	1 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)			
<i>CH</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.4)	0 (0.0)			
<i>DA</i>	3 (2.2)	4 (2.0)	1 (1.2)	4 (1.2)			
<i>DB</i>	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)			
<i>DC</i>	4 (2.9)	4 (2.0)	2 (2.4)	0 (0.0)			
<i>DD</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)			
Sample size	137	200	84	323			

Parentheses represent % frequency

Table 9. Genotype¹ and allele² frequencies at *CaM* locus in eight Atlantic swordfish samples

	North Atlantic (north of 20°N)				Tropical to south Atlantic (south of 10°N)				
	NWA98	NWA97	NWA93	NWA90	TNA99	TNA97	TSA97	Brazil96	Brazil94
<i>AA</i> ¹	18 (28.1)	5 (31.3)	8 (27.6)	5 (17.9)	68 (81.0)	25 (83.3)	34 (72.3)	42 (70.0)	59 (86.7)
<i>AB</i>	31 (48.4)	6 (37.4)	14 (48.3)	16 (57.1)	15 (17.8)	5 (16.7)	11 (23.4)	17 (28.3)	8 (11.8)
<i>BB</i>	15 (23.5)	5 (31.3)	7 (24.1)	7 (25.0)	1 (1.2)	0 (0.0)	2 (4.3)	1 (1.7)	1 (1.5)
Sample size	64	16	29	28	84	30	47	60	68
<i>A</i> ²	0.523	0.5	0.517	0.464	0.899	0.917	0.84	0.842	0.926
<i>B</i>	0.477	0.5	0.483	0.536	0.101	0.083	0.16	0.158	0.074
<i>P</i>	0.902				0.121				

Parentheses represent % frequency

Table 10. Genotype¹ and allele² frequencies at *CaM* locus of four local swordfish samples and pair-wise *P* values between samples

	MED	NA	SA	I-P	Pair-wise <i>P</i>		
					MED	NA	SA
<i>AA</i> ¹	10(13.9)	36(26.3)	228(78.9)	178(99.4)			
<i>AB</i>	30(41.7)	67(48.9)	56(14.9)	1(0.6)	NA	0.002	
<i>BB</i>	32(44.4)	34(24.8)	5(1.7)	0(0.0)	SA	<0.001	<0.001
Sample size	72	137	289	179	I-P	<0.001	<0.001
<i>A</i> ²	0.347	0.507	0.886	0.997			
<i>B</i>	0.653	0.493	0.114	0.003			

MED: Mediterranean (from Chow and Takeyama, 2000)

NA: pooled north Atlantic sample (north of 20°N)

SA: pooled south Atlantic sample (south of 10°N)

I-P: pooled Indo-Pacific sample

Parentheses represent % frequency

は0.997という大きな差異が見られ、4標本の全ての組み合わせにおいて遺伝子頻度は有意に異なっていた ($P < 0.002$)。これらの結果は、Chow and Takeyama (2000) が示唆したメカジキの4系群を支持するとともに、大西洋の南北に遺伝的に大きく異なる系群が存在し、しかもその差異が10年近くもの期間安定して維持されていることを示している。

考 察

本研究において、メカジキの吻内部に見られる2型の出現頻度が海域や雌雄で異なるものではないことが明らかになった。また、吻2型間には遺伝的差異は見られず、これら2型が遺伝的に異なる集団に由来するものではないことが示唆された。一方、小型個体で腔所型が比較的多く出現する傾向が示されたことは、成

長や吻の再生という生理的現象に伴う形態的変異である可能性を示唆している。本研究では除外したが、小型の腔所がわずかに点在する標本も観察されており (Carey, 私信; 矢富, 1988; Di Natale *et al.*, 1996)、しかも腔所の形態にはかなり大きな変異がみられたこともこの可能性を支持している。腔所型と導管型は双方に移行しうる形態的変異であるという仮定は、異なる系群や海域、雌雄間で吻2型の出現頻度に差異が見られず、また2型間で遺伝的な差異も見られないという本研究の結果と矛盾しない。

過去に行われたChow *et al.* (1997)、Chow and Takeyama (2000) のmtDNA *D-loop*及び核の*CaM*遺伝子座の分析により、メカジキには少なくとも4つの系群 (地中海、北西大西洋、中-南部大西洋、インド-太平洋) があることが示されている。本研究で新たに採集された北西大西洋 (NWA98)、熱帯北大西洋

(TNA99) 標本を加えて検討したところ, Chow and Takeyama (2000) の結果をほぼ裏付けるとともに, 大西洋南北系群間の遺伝的分化が比較的長い期間安定して維持されていることが明らかになった。mtDNA *D-loop* 領域における塩基配列やRFLP分析による海域標本の比較では高度な多型が検出されるものの, 大西洋南北系群間では差異が検出できない (Alvarado-Bremer *et al.*, 1996; Chow *et al.*, 1997; Chow and Takeyama, 2000; 本研究)。CaM遺伝子座の多型は2対立遺伝子による単純なものでありかつその頻度が南北標本間で大きく異なるため, 大西洋内の南北系群間の遺伝的差異を検出するうえでmtDNA解析よりはるかに優れている。また, 標本の採集位置から, 南北系群間の境界は北緯10度~20度付近にあることが示唆された。現在のところ, 大西洋におけるメカジキの管理は北緯5度で南北系群に分けて行われている (Miyake and Rey, 1989)。また近年, 南大西洋でのメバチが不漁傾向にあり日本漁船が北側に操業シフトし始めた。このことにより, 北大西洋におけるメカジキの漁獲割り当てを超過するようになったため2000年2月より水産庁は北緯5度以北のメカジキについては全量投棄とする通達を行った (魚住, 私信)。しかしながら, 本研究で示されたように, 北緯10度以南の個体は明らかに南系群に属すると考えられるため, 管理海域区分を再検討する必要があるものと考えられる。

本研究及び過去の研究 (Chow and Takeyama, 2000) で示されたような, 大西洋メカジキ南北系群間の遺伝的差異が維持されるためには, 繁殖海域が異なっているだけでなく, 個体の移動回遊範囲が限られていることが必要である。しかし, 他の高度回遊性魚種であるメバチやクロカジキにおいては大西洋内の南北標本間で遺伝的な差異は検出されておらず大西洋内では単一系群が存在するものと考えられている (Buonaccorsi *et al.*, 1999, 2001; Chow *et al.*, 2000)。標識放流調査においても, キハダ, クロカジキやニシマカジキでは赤道を越える再捕が報告されているが, メカジキでは現在のところそのような報告は無い (Jones *et al.*, 1995)。それゆえ, メカジキにおいては南北間で個体の移動がかなり少ないものと考えられるが, 南北系群間の隔離要因に関しては今のところ不明である。

今後, 南北系群間の境界を詳細に検討するためには大西洋北部北緯10度から20度あるいは30度にかけて東西に幅広くメカジキ標本を採集し分析するとともに, 標識放流特に記録型標識による放流実験の実施が望まれる。また, 南北系群の個体間の遺伝的差異についてさらに調査する必要がある。

謝 辞

本研究に使用したメカジキ標本は水産庁委託事業「国際資源調査等推進対策委託事業」の一環として収集されたものである。科学オブザーバーの乗船調査に関して日本鯨鮪漁業組合連合会及び当会所属のまぐろはえ縄船には多大なる便宜を図っていただいた。また, 生物データの収集と整理に関しては遠洋水産研究所浮魚資源部伊藤智幸及び松本隆之研究員に負うところが大きい。本論文の執筆に際し, 遠洋水産研究所浮魚資源部長鈴木治郎博士及び近海かつお・まぐろ資源部長魚住雄二博士から貴重な助言とコメントをいただいた。これら関係各位に対して深くお礼を申し上げる。

引用文献

- Alvarado-Bremer J. R., Mejuto J., Greig T. W., and Ely B., 1996: Global population structure of the swordfish (*Xiphias gladius* L.) as revealed by analysis of the mitochondrial DNA control region. *J. Mar. Biol. Ecol.*, **197**, 295-310.
- Bartoo N. and Coan A. L. Jr., 1989: An assessment of the Pacific swordfish resource, in: "Planning the Future of Billfishes" (ed. by Stroud, R. H.), Part 1, National Coalition for Marine Conservation Incorporation, Athens, Georgia, pp.137-151.
- Buonaccorsi V. P., Reece K. S., Morgan L. W., and Graves J. E., 1999: Geographic distribution of molecular markers within the blue marlin (*Makaira nigricans*): a hierarchical analysis of allozyme, single copy nuclear DNA and mitochondrial DNA markers. *Evolution*, **53**, 568-579.
- Buonaccorsi V. P., McDowell J.R., and Graves J. E., 2001: Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*). *Mol. Ecol.*, **10**, 1179-1196.
- Castro J., Mejuto J., Arias C., and Estevez J. M., 1998: Selection of parasites of the Atlantic swordfish (*Xiphias gladius*, L. 1758) as biological tags. *ICCAT SCRS*, **98**, 103.
- Chow S., Okamoto H., Uozumi Y., Takeuchi Y., and Takeyama H., 1997: Genetic stock structure of the swordfish (*Xiphias gladius*)

- inferred by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Mar. Biol.*, **127**, 359-367.
- Chow S., 1998: Universal PCR primer for calmodulin gene intron in fish. *Fish. Sci.*, **64**, 999-1000.
- Chow S. and Takeyama H., 1998: Intron length variation observed in the creatine kinase and ribosomal protein genes of the swordfish *Xiphias gladius*. *Fish. Sci.*, **64**, 397-402.
- Chow S. and Takeyama H., 2000: Nuclear and mitochondrial DNA analyses reveal four genetically separated breeding units of the swordfish. *J. Fish Biol.*, **56**, 1087-1098.
- Di Natale A., Carey F., Longo M., Navarra E., Schimmenti G., and Valastro M., 1996: Osservazioni sulla morfologia interna del rostro del pescespada (*Xiphias gladius* L., 1758). *Biologia Marina Mediterranea, Period. Soc. Ital. Biol. Mar.*, **3**, 370-376.
- Fierstine H. L. and Voigt N. L., 1996: Use of rostral characters for identifying adult billfishes (Teleostei: Perciformes: Istiophoridae and Xiphiidae). *Copeia*, **1996**, 148-161.
- Jones C. D., Judge M. T., Ortiz M. A., Rosenthal D. S., and Prince E. D., 1995: Cooperative tagging center annual newsletter: 1993. NOAA Tech. Mem. NMFS-SEFSC-364.
- Kotoulas G., Magoulas A., Tsimenides N., and Zouros E., 1995: Marked mitochondrial DNA differences between Mediterranean and Atlantic populations of the swordfish, *Xiphias gladius*. *Mol. Ecol.*, **4**, 473-481.
- Miyake P. M. and Rey J. C., 1989: Status of Atlantic broadbill swordfish stocks, in "Planning the Future of Billfishes" (ed. by Stroud, R. H.), Part 1, National Coalition for Marine Conservation Incorporation, Athens, Georgia, pp.115-136.
- Nakamura I., 1983: Systematics of the billfishes (Xiphiidae and Istiophoridae). *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, **28**, 255-396.
- Palumbi S. R., Martin A., Romano S., McMillan W. O., Stice L., and Grabowski G., 1991: A simple fool's guide to PCR, version 2.0, University of Hawaii, Honolulu, pp.1-23.
- Rice W. R., 1989: Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223-225.
- Roff D. A. and Bentzen P., 1989: The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: X^2 and the problem of small sample. *Mol. Biol. Evol.*, **6**, 539-545.
- Rosel P. E. and Block B. A., 1995: Mitochondrial control region variability and global population structure in the swordfish, *Xiphias gladius*. *Mar. Biol.*, **125**, 11-22.
- Scott W. B. and Tibbo S. N., 1968: Food and feeding habits of swordfish, *Xiphias gladius*, in the western North Atlantic. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **25**, 903-919.
- Skillman R. A., 1989: Status of Pacific billfish stocks, in "Planning the Future of Billfishes" (ed. by Stroud, R. H.), Part 1, National Coalition for Marine Conservation Incorporation, Athens, Georgia, pp.179-195.
- 富永盛治朗, 1967: 五百種魚体解剖図説 (一) (澁澤敬三監修), 角川書店, pp.266-267.
- 矢富洋道, 1988: メカジキの吻の内部形態について, 昭和62年度マグロ漁業研究協議会報告書, 水産庁遠洋水産研究所, 清水, pp.127-138.
- Yeh F. C., Yang R.-C., Boyle T. B. J., Ye Z.-H., and Mao J. X., 1997: POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis, Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.