DOI: 10.5846/stxb201303030334

刘连为,陈新军,许强华,李伟文.北太平洋柔鱼微卫星标记的筛选及遗传多样性.生态学报,2014,34(23):6847-6854. Liu L W, Chen X J, Xu Q H, Li W W.Isolation and genetic diversity of microsatellite DNA of *Ommastrephes bartramii* in the North Pcific Ocean. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(23):6847-6854.

北太平洋柔鱼微卫星标记的筛选及遗传多样性

刘连为1,陈新军1,2,3,*,许强华1,2,3,李伟文1

(1. 上海海洋大学海洋科学学院,上海 201306; 2. 国家远洋渔业工程技术研究中心,上海 201306;
3. 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)

摘要:采用(AC)₁₂、(AG)₁₂两种生物素探针,通过磁珠富集法构建了柔鱼部分基因组微卫星富集文库。68个阳性克隆中有60个含有微卫星序列,重复次数在10次以上的占86.84%,最高重复次数为33次。其中,完美型微卫星占60.53%,非完美型微卫星占36.84%,混合型微卫星占2.63%。除探针使用的AC/TG、AG/TC重复外,还得到ACAG、AGAC重复序列。利用筛选出的8个微卫星位点对北太平洋柔鱼6个群体的遗传多样性及遗传结构进行分析。结果表明,8个微卫星位点均为高度多态性位点(*PIC*=0.787—0.987),位点Bo103与位点Bo105极显著偏离Hardy-Weinberg平衡(*P*<0.01)。6个地理位置的柔鱼群体显示出较高的遗传多样性水平(*H*。=0.672—0.761,*H*。=0.808—0.851)。两两群体间的*F*。值以及AMOVA分析结果均表明,群体间遗传分化不显著(*F*。=0.00559,*P*>0.05),遗传差异主要来自于个体间。基于Nei's遗传距离的UPGMA聚类树显示,北太平洋东北部2个柔鱼群体(NE1、NE3)聚为一类,西北部3个群体(NW1、NW2、NW3)与东北部1个群体(NE2)另聚为一类,且群体NW1与群体NE2亲缘关系最近,遗传距离与地理距离线性相关分析没有呈现出正相关性(*R*=0.175,*P*>0.05)。遗传结构分析结果推断北太平洋柔鱼存在1个理论群。柔鱼个体具有较强的游泳能力,在海流的作用下,群体之间存在较强的基因交流。建议今后在柔鱼资源开发利用过程中将北太平洋柔鱼看作1个管理单元。

关键词:柔鱼;微卫星标记;遗传多样性;遗传结构

Isolation and genetic diversity of microsatellite DNA of *Ommastrephes bartramii* in the North Pcific Ocean

LIU Lianwei¹, CHEN Xinjun^{1,2,3,*}, XU Qianghua^{1,2,3}, LI Weiwen¹

1 College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 National Distant-water Fisheries Engineering Research Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3 Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The neon flying squid *Ommastrephes bartramii* is found circumglobally in subtropical and temperate waters in the world and supports important fisheries in the North Pacific Ocean. The population of the North Pacific *O. bartramii* comprises a fall spawning cohort and a winter-spring spawning cohort. Most of the fall cohort occurs east of $170^{\circ}E$, whereas the winter-spring cohort is widely distributed across the North Pacific Ocean. Two spawning cohorts can be further subdivided into four stocks: a central and an eastern stock of the fall cohort separated near $160^{\circ}W$, and a western and a central-eastern stock of the winter-spring cohort separated near $170^{\circ}E$ in which the fall cohort was the target of a driftnet fishery before 1993 while the west stock of winter-spring cohort became main fishing target of an international jigging fishery. Being a short-lived ecological opportunist, neon flying squid exhibits large fluctuations in stock abundance and distribution

基金项目:国家自然科学基金(41276156);国家 863 计划(2012AA092303);国家发改委产业化专项(2159999);上海市科技创新行动计划 (12231203900)

收稿日期:2013-03-03; 网络出版日期:2014-03-18

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: xjchen@ shou.edu.cn

http://www.ecologica.cn

on the feeding grounds and large fluctuating recruitment on the spawning grounds in response to environmental variability. In order to improve our understanding of population structure, the genetic diversity of O. bartramii populations in the North Pacific Ocean was examined using microsatellite markers. Two types of biotin-labeled oligos [(AC)₁₂ and (AG)₁₂] were employed and part of microsatellite-enhanced genomic library of O. bartramii was constructed by the method of streptavidin magnetic beads. Sixty of 68 positive clones comprised microsatellite sequences and repeat number of more than 10 accounted for 86.84% with the largest one of 33. Of these were 60.53% perfect, 36.84% were imperfect, and the rest were compound type (2.63%). Repeats including $(ACAG)_n$ and $(AGAC)_n$ were also detected except that of AC/TG and AG/TC. Microsatellite markers were isolated and screened, and 8 of them were then used for the analysis of genetic diversity and genetic structure of six populations of O. bartramii in the North Pcific Ocean. Results showed that all the 8 loci were highly polymorphic (PIC=0.787-0.987), and locus Bo103 and locus Bo105 were extremely significant deviated from Hardy-Weinberg equilibrium (P < 0.01). All of the 6 different geographic populations showed high genetic diversities (H_0 = 0.672-0.761, H_{a} = 0.808-0.851). Pairwise F test and AMOVA analysis detected no significant genetic differentiations among populations, and genetic differences mainly came from individuals. UPGMA clustering tree based on Nei's genetic distance demonstrated that two stocks (NE1 and NE3) in the northeast of the North Pcific Ocean clustered together, while the three stocks (NW1, NW2 and NW3) in the western part as well as one stock (NE2) in the eastern part clustered together, and the genetic distance between NW1 and NE2 was closer. Relations between genetic distance and geographic distance did not show positive correlation (R=0.175, P>0.05), indicating that different populations of O. Bartramii could mingle together. Genetic structure simulation analyses suggested that there was only one logic population of all individuals, and extensive gene exchange might occur among the populations, which could be attributed to the influence of ocean currents and swimming ability of O. bartramii individuals. The North Pacific O. bartramii should be considered as a single stock in their assessment and management.

Key Words: Ommastrephes bartramii; microsatellite marker; genetic diversity; genetic structure

柔鱼(Ommastrephes bartramii)广泛分布于全球 温带、副热带海域,目前被规模性开发利用的海域主 要在北太平洋^[1-2]。根据不同的产卵季节与地理位 置,北太平洋柔鱼被划分为冬春生西部群体、冬春生 中东部群体、秋生中部群体与秋生东部群体[3]。其 中,冬春生西部群体为我国大陆鱿钓船的传统捕捞 对象,而秋生群体主要为原流刺网作业海域捕捞对 象。柔鱼资源量丰富,且在海洋生态系统中占据重 要的地位,被认为是最重要的大洋性柔鱼类之一[4]。 国内外学者对柔鱼渔业生物学[5-6]、资源评估[7-8]等 方面进行深入的研究,有关其群体遗传学的研究体 现在不同的研究方法上。Katugin^[9]运用蛋白质电泳 技术检测出北太平洋柔鱼东西部群体由于等位基因 频率不连续分布产生的遗传差异。而刘连为等[10] 基于线粒体 DNA 标记研究了北太平洋柔鱼种群遗 传结构,认为柔鱼冬春生群体与秋生群体以及不同 的地理群体之间不存在显著的遗传分化。作为渔业 管理的基本单元,柔鱼各群体间是否存在显著的遗

传变异有待进一步研究。

微卫星 DNA 是一种广泛分布于真核生物基因 组中的串状重复序列,又称简单序列重复(simple sequence repeat,SSR)。SSR 标记具有高度多态性、 共显性、实验操作相对简单等优点,使得它在群体遗 传学分析、基因克隆、育种改良以及连锁图谱构建等 领域得到广泛的应用^[11]。目前,头足类很多种类的 微卫星标记已被分离、筛选,并应用到群体遗传多样 性与种群遗传结构研究中^[12-13]。而柔鱼微卫星 DNA 的分离在国内外尚未见报道,本研究采用磁珠 富集法筛选柔鱼微卫星标记,并应用于群体遗传多 样性检测,以期为柔鱼资源的可持续利用和科学管 理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

柔鱼样本按照地理位置划分为西北群体和东北 群体,存放于船舱冷库中并运回至实验室。取套膜 肌肉组织,置于 95%乙醇中,保存于-20 ℃冰箱内。 西北群体和东北群体分别由 3 个部分组成,命名为 西北群体 1(northwest population 1,NW1)、西北群体 2(northwest population 2,NW2)、西北群体 3 (northwest population 3,NW3) 与东北群体 1 (northeast population 1,NE1)、东北群体 2(northeast population 2,NE2)、东北群体 3(northeast population 3,NE3)。利用耳石微结构获得的日龄数据并结合 捕捞日期推算孵化时间,划分出冬春生群体(NW1、NW2、NE1)和秋生群体(NW3、NE2、NE3)(表1)。 限制性内切酶 Sau3AI、T4 DNA 连接酶、pMD19-T 载体、大肠杆菌 DH5α购自宝生物工程(大连)有限公司。Biospin Gel Extraction Kit购自杭州博日科技有限公司, Dynabeads M-280 Streptavidin 为 Invitrogen Dynal AS 产品。探针(AG)₁₂、(AC)₁₂、接头引物及 微卫星引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

表1 柔鱼样本采集信息

Table 1	Sampling information of Ommastrephes bartrami	
		_

采样地点 Sampling locations		产卵群体	采样时间	平均胴长/cm	平均体质量/g	样本数量	
群体 Population	经度 Longitude	纬度 Latitude	Spawning cohort	Sampling date	Mean mantle length	Mean body weight	No. of samples
NW1	149°29'E	40°41′N	冬春生群体	2010-11-12	32.03 ± 2.12	1 028.88 ± 206.91	42
NW2	159°05'E	39°17′N	冬春生群体	2011-07-21	24.15 ± 1.65	417.77 ± 151.44	25
NW3	166°32'E	39°25′N	秋生群体	2011-06-28	38.71 ± 1.56	1 700.99 ± 223.13	20
NE1	174°53'E	$40^{\circ}04'N$	冬春生群体	2012-07-16	24.77 ± 1.28	406.96 ± 66.08	40
NE2	$178^{\circ}02'W$	38°52′N	秋生群体	2011-06-05	36.29 ± 1.65	$1\ 400.34\ \pm\ 169.66$	36
NE3	172°21′W	39°41′N	秋生群体	2012-06-05	36.13 ± 2.26	1 364.06 ± 275.07	33

NW1; 西北群体 1, NW2; 西北群体 2, NW3; 西北群体 3, NE1; 东北群体 1, NE2; 东北群体, NE3: 东北群体 3

1.2 基因组 DNA 的提取

采用组织/细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒 (北京艾德莱生物科技有限公司)提取 DNA,洗脱缓 冲液 EB 溶解,-20 ℃保存备用。用 1%琼脂糖凝胶 电泳检测 DNA 质量,紫外分光光度计检测 DNA 浓度。

1.3 微卫星富集文库的构建及微卫星标记的筛选

微卫星富集文库的构建主要参考孙效文等^[14] 方法。限制性内切酶 *Sau*3AI 对基因组 DNA 进行酶 切, Biospin Gel Extraction Kit 回收 250—1000 bp 大 小片段。基因组 DNA 片段与 Brown 接头连接:

A:5'-GATCGTCGACGGTACCGAATTCT

B:5'-GTCAAGAATTCGGTACCGTCGAC

最后将富集的微卫星 DNA 片段经 pMD19-T 载 体连接并转化到大肠杆菌 DH5α 中,从而建立柔鱼 部分基因组文库。挑选含有微卫星片段的阳性克隆 进行测序,根据其核心序列两端保守的侧翼序列,用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计。PCR 扩增筛 选具有较高特异性与多态性的微卫星标记。

1.4 微卫星 PCR 扩增

PCR 反应总体积为 25 µL,其中 10×PCR Buffer 2.5 µL、Taq DNA polymerase(5 U/µL)0.2 µL、dNTP

(各 2.5 mmol/L) 2 μL、上下游引物(10 μmol/L)各 0.6 μL、DNA 模板 20 ng、ddH₂O 补足体积。PCR 扩 增反应程序为:94 ℃预变性 2 min;94 ℃变性 30 s, 退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,35 个循环;72 ℃最后延伸 2 min。PCR 产物经过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离、 Biospin Gel Extraction Kit 纯化后,送至上海迈浦生物 科技有限公司,通过 ABI3730XL 全自动 DNA 测序仪 分析,以 ROX-500 为分子量内标,通过 Genemapper Version 3.5 软件读取微卫星扩增产物的分子量 数据。

1.5 数据统计与分析

根据分子量数据确定个体各位点基因型,利用 POPGEN 3.2^[15]进行群体遗传学分析,计算等位基因 数(N_a),有效等位基因数(N_e),观测杂合度(H_o),期 望杂合度(H_e)与 Shannon 多样性指数(Shannon's information index, I)。多态信息含量(*PIC*)由 CERVUS 3.0^[16]软件计算,并采用马尔科夫链 (Markov Chain)方法进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。 利用 ARLEQUIN 3.5^[17]计算群体遗传分化的 *F*-统计 量(*F*-statistics, F_{st})及分子方差分析(AMOVA)。利 用 POPGEN 3.2 计算群体间的 Nei's 遗传距离,并基 于该遗传距离用 MEGA 5.0^[18]构建 UPGMA 系统发 生树。根据遗传距离及地理距离数据在 Excel 中作 线性相关图,其中两地理坐标间直线距离计算方法 参照韩忠民^[19]的方法。利用 STRUCTURE 2.3^[20]进 行群体遗传结构分析,分析最佳 K 值,即群体遗传结 构的理论群体数。

2 结果

2.1 微卫星序列特征

随机挑取 800 个菌落,经菌落 PCR 检测后,共有 68 个阳性克隆,阳性克隆率为 8.5%。对所有的阳性

克隆进行测序,有60个(88.24%)克隆含有微卫星序 列(部分微卫星序列已提交到 Genbank,Genbank 登 录号为:KC855227—KC855255)。重复次数在11— 20次间的34个(44.74%),重复20次以上的微卫星 32个(42.10%),最高重复次数为33次。其中,完美 型微卫星46个(60.53%),非完美型微卫星28个 (36.84%),混合型微卫星2个(2.63%)(表2)。除 探针使用的AC/TG、AG/TC 重复外,还得到ACAG、 AGAC 重复序列。

Table 2	Percentage of different	reneat sequence	type of microsatellite in	Ommastrenhes hartramii
Table 2	rercentage of unterent	repeat sequence	type of interosatenite in	Ommusirepnes varirami

微卫星数量及百分比	完美型 Porfoot	非完美型	混合型	重复数 Repeat number				
of SSR	repeats	repeats	repeats	5—10	11—20	21—30	31—40	
数量 Number	46	28	2	10	34	28	4	
百分比 Percentage/%	60.53	36.84	2.63	13.16	44.74	36.84	5.26	

SSR: simple sequence repeat

2.2 微卫星位点的多态性及群体的遗传多样性

选择合成的 20 对微卫星引物对柔鱼 30 个个体 进行 PCR 扩增,结果有 12 对能扩增出特异条带,其 中 8 对具有多态性,并应用于 6 个不同地理位置的 柔鱼群体遗传学分析,引物的核心序列、产物大小及 退火温度等情况如表 3 所示。各位点在所有群体中 的扩增结果见表 4,等位基因数(N_a)为 44—52 个, 有效等位基因数(N_e)介于 4.11—30.15 之间;观测 杂合度(H_e)介于 0.640—0.840 之间,期望杂合度 (H_e)介于 0.747—0.969 之间;多态信息含量(*PIC*) 介于 0.787—0.987 之间,均为高度多态性位点(*PIC* >0.5),Shannon 多样性指数(*I*)介于 1.772—3.638 之间。位点 Bo103 与位点 Bo105 极显著偏离 HardyWeinberg 平衡(P < 0.01)。

6 个不同地理位置的柔鱼群体遗传多样性如表 5 所示。NW1 群体的平均等位基因数最多(N_a = 25.13),NW3 群体最少(N_a = 15.00);NW2 群体的平 均有效等位基因数最多(N_e = 9.91),NW3 群体最少 (N_e = 7.96);NE2 群体的平均观测杂合度最高(H_o = 0.761),NW3 群体最低(H_o = 0.672);NW1 群体的平 均期望杂合度最高(H_e = 0.851),NE1 群体最低 (H_e = 0.808);NW1 群体的多态性息含量最高(*PIC* = 0.918),NE3 群体最低(*PIC* = 0.779)。NW1 群体的 Shannon 多样性指数最高(I = 2.571),NW3 群体最少 (I = 2.215)。总体上,6个不同地理位置的柔鱼群体 均具有较高的遗传多样性。

	Table 3	Characteristics of 8 pairs of microsatellite primers from	m Ommastrephes bartra	mii
位点 Locus	核心重复序列 Repeat motif	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	产物大小(bp) Size range	复性温度/℃ Znnealing temperature
Bo101	(AG) ₈ (G) ₄ (AG) ₂₁	F:GACACTACGTCGTTCAATGCGC R:GCTGAAGCATCATATGGTGGGC	188—274	55.0
Bo102	(AG) ₂₇ CG(AG) ₃	F:GCCATTACAAGGAAGGAGGTG R:CTTTGTCTCTGCCTCTGTCTC	145—338	51.0
Bo103	(CT) ₁₈ (AC) ₁₅	F:CTCCCCACGATACAGCGATA R:CCAATGCACAAATGCTTGCAC	126—319	55.0
Bo104	(AC) ₈ (AG) ₂ (AC) ₁₉	F : TGGCTCAATCTTGGTAGGGTCA R : AGTTGGAGTTGGGGTTGGGT	115—204	49.6

表 3 柔鱼 8 对微卫星引物特征

/+ --

				
位点 Locus	核心重复序列 Repeat motif	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	产物大小(bp) Size range	复性温度/℃ Znnealing temperature
Bo105	$(AC)_6 \cdots (AC)_{12} TC(AC)_3$	F:ATTGACCGGGCTTGACGTTG R:CCAAACCCTATAAAAAGCGCCG	106—268	49.6
Bo106	(AC) ₂₄	F : CAATTTAGTTTCACCCGAC R : GACGGTCAAGAACTTGAAATC	134—233	48.4
Bo107	(AC) ₁₅	F : GTGAACGAGCGACTATGATA R : GCATTAGTTTAGGCTTCTGG	125—392	51.0
Bo108	(AG) ₃₀	F:ATCATCTGACAAGATAGGG B·CACACGAGGGTAGTTACACG	100—190	49.6

表4 柔鱼8个微卫星位点多态性

	Table 4 Polymorphism of eight microsatellite loci from Ommastrephes bartramii								
位点 Locus	N_{a}	$N_{ m e}$	$H_{ m o}$	H_{e}	PIC	Ι			
Bo101	52	30.15	0.829	0.969	0.975	3.638			
Bo102	52	8.87	0.734	0.887	0.968	2.544			
Bo103	48	18.75	0.821 **	0.946	0.892	3.030			
Bo104	52	8.82	0.825	0.884	0.787	2.604			
Bo105	44	18.14	0.837 **	0.944	0.883	2.890			
Bo106	52	27.66	0.840	0.966	0.969	3.621			
Bo107	52	4.11	0.640	0.747	0.987	1.772			
Bo108	52	16.13	0.747	0.939	0.976	3.053			
均值 Average	50.50	17.08	0.802	0.942	0.930	2.894			

 * *表示极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡(P<0.01); N_a:等位基因数 Number of alleles, N_e:有效等位基因数 Number of effective alleles, H_o:
 观测杂合度 Observed heterozygosity, H_e: 期望杂合度 Expected heterozygosity, PIC: 多态信息含量 Polymorphism information content, I: Shannon 多样 性指数 Shannon's information index

	Table 5 Genetic dive	rsity in 6 differen	t fishing areas of O	mmastrephes bartra	mii populations	
群体			指数	文 Index		
Population	N_{a}	$N_{\rm e}$	$H_{\rm o}$	H_{e}	PIC	Ι
NW1	25.13	9.71	0.732	0.851	0.918	2.571
NW2	19.75	9.91	0.757	0.844	0.909	2.447
NW3	15.00	7.96	0.672	0.829	0.892	2.215
NE1	23.14	9.42	0.681	0.808	0.805	2.411
NE2	22.00	9.55	0.761	0.826	0.896	2.413
NE3	20.86	9.85	0.748	0.824	0.779	2.338

表 5 6 个不同地理位置的柔鱼群体遗传多样性

NW1 为西北群体 1, NW2 为西北群体 2, NW3 为西北群体 3, NE1 为东北群体 1, NE2 为东北群体, NE3 为东北群体 3。 N_a 为等位基因数 (number of alleles), N_e 为有效等位基因数(number of effective alleles), H_o 为观测杂合度(observed heterozygosity), H_e 为期望杂合度(expected heterozygosity), *PIC* 为多态信息含量(polymorphism information content), *I* 为 Shannon 多样性指数(Shannon's information index)

2.3 群体遗传分化与遗传结构分析

AMOVA 分析显示群体间遗传差异主要来自于 个体间, 仅有 0.56% 的遗传差异来自于群体间, 遗传 变异不显著(表 6)。NW1 群体与 NE2 群体间遗传 分化系数 *F*_{st}为负值, 说明两群体间无遗传分化。其 余群体间遗传分化系数介于 0.0016—0.0244 之间, 属于轻微程度的分化(*F*_{st}<0.05), 且统计检验不显 著, 进一步表明群体间不存在显著的遗传差异。基 于 Nei's 遗传距离(表 7)的 UPGMA 聚类树显示, NE1 群体与 NE3 群体聚为一族群,其余 4 个群体聚 为一族群,且 NW1 群体与 NE2 群体首先聚在一起 (图 1)。群体间的遗传距离与地理距离相关性分析 结果如图 2 所示,二者没有呈现出正相关性(*R* = 0.175,*P*>0.05)。STRUCTURE 2.3 软件执行 2—6 的假设 *K* 值,重复次数为 10 次,根据 *K* 值对应参数 的趋势分析,推断本研究所有参试个体最佳分组为

1个理论群。

Table 6 AMOVA analysis among Ommastrephes bartramii populations							
变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of squares	变异组分 Variance components	变异百分数 Percentage of variation	F _{st}		
群体间 Among populations	5	16.746	0.012 72Va	0.56	0.005 59 (<i>P</i> >0.05)		
群体内个体间 Among individuals within populations	190	480.206	0.264 98Vb	11.65			
个体间 Within individuals	196	391.500	1.997 45Vc	87.79			
总计 Total	391	888.452	2.275 15				

表6 柔鱼群体分子方差分析

表 7	柔鱼群体间 Nei's	遗传距离(D)	,对角线以下)) 及 F 统计值(F _{at}	,对角线以上)
-----	-------------	---------	---------	---------------------------	---------

 Table 7
 Nei's genetic distance (D_A , below diagonal) and pairwise F_{st} estimates (F_{st} , above diagonal) among Ommastrephes

bariramii populations						
群体 Population	NW1	NW2	NW3	NE1	NE2	NE3
NW1		0.005 2	0.005 6	0.005 4	-0.001 0	0.011 6
NW2	0.092 3		0.009 0	0.012 8	0.002 6	0.017 5
NW3	0.080 7	0.107 5		0.016 8	0.006 4	0.024 4
NE1	0.173 2	0.154 1	0.193 0		0.003 3	0.001 6
NE2	0.060 3	0.088 6	0.059 4	0.183 3		0.006 4
NE3	0.303 3	0.232 8	0.311 5	0.097 8	0.269 9	

NW1: 西北群体 1, NW2: 西北群体 2, NW3: 西北群体 3, NE1: 东北群体 1, NE2: 东北群体, NE3: 东北群体 3



图 1 基于 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类树







3 讨论与分析

本文以北太平洋传统作业渔场柔鱼为样本对分 离的微卫星位点进行多态性检测,筛选出8个多态 性位点(H_o=0.754),所有样本均扩增出条带。应用 这些微卫星位点对北太平洋6个不同地理位置的柔 鱼群体进行遗传多样性分析,平均每个微卫星位点 获得 50.5 个等位基因与 17.08 个有效等位基因,多 态性信息含量均较高(PIC>0.5),适用于柔鱼群体遗 传学分析。位点 Bo103 与位点 Bo105 对 NE1 群体及 NE3 群体扩增时,部分样本未扩增出条带,个别样本 仅显现小片段等位基因的条带,造成该位点纯合体 个体过剩。Hardy-Weinberg 平衡检验结果显示这 2 个位点极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡,因此,2个 位点很可能存在无效等位基因。无效等位基因产生 的原因主要为微卫星侧翼序列变异,从而导致该位 点无法正常扩增[21]。而大片段等位基因丢失也会 造成无效等位基因,这些在实验结果中均体现 出^[22]。无效等位基因会对遗传学相关研究结果造 成显著影响,在以后的实验中可通过重新设计微卫 星引物或者估算无效等位基因频率进行群体遗传学 研究。

6个不同地理位置的柔鱼群体平均观察杂合度 介于 0.672—0.761,平均期望杂合度介于 0.808— 0.851,与太平洋褶柔鱼(Todarodes pacificus)和阿根 廷滑柔鱼(Illex argentinus)的杂合度相近,分别为 $H_0: 0.200 - 0.950, H_e: 0.644 - 0.950; H_0: 0.59 - 0.59$ 0.93, He: 0.62-0.96^[23-24]。因此,各群体显示出较 高的杂合性。Katugin^[9]利用 18 个蛋白酶位点检测 北太平洋柔鱼东西部 2 个群体的遗传变异水平,只 有1个蛋白酶位点显示出明显的遗传差异及较高的 杂合度(H₀=0.294, H₂=0.322)。东西部群体平均 观察杂合度分别为: 0.060 ± 0.021 与 0.043 ± 0.022,平均期望杂合度分别为 0.056 ± 0.020 与 0.043 ± 0.022, 远远低于微卫星位点检测的杂合度 水平。蛋白质标记为基因表达的产物,所检测到的 遗传差异水平很容易受到周围环境的影响。刘连为 等[10]利用线粒体标记检测出北太平洋柔鱼2个产 卵季节群体具有较低的核苷酸多样性水平。由此可 见,微卫星标记应用于物种群体遗传变异水平研究 较其它分子遗传标记有一定的优越性。

本研究所取样本为东西部 2 个不同产卵群体, 其中 NW1、NW2、NE1 群体为冬春生群体, NW3、 NE2、NE3 群体为秋生群体。两两群体间的 F_{st}值与 AMOVA 分析结果显示,群体间的遗传分化程度较 低,未达到显著性水平,遗传差异主要存在于个体 间。6个群体 UPGMA 聚类分析显示, NE1 群体和 NE3 群体亲缘关系最近,聚为一类,而地理位置相距 较远的 NW1 群体与 NE2 群体亲缘关系最近,另聚为 一类,而且它们属于不同的产卵季节群体。群体间 的遗传距离与地理距离相关性结果进一步说明了不 同地理群体间的亲缘关系远近与地理距离不成正相 关性。北太平洋海域缺乏显著的地理障碍,而且柔 鱼个体具有较强的游泳能力,在海流的作用下,群体 之间存在较强的基因交流^[25]。Chen 等^[26]基于胴长 与耳石轮纹半径的线性关系在东北太平洋和西北太 平洋柔鱼群体间的差异,推测两部分大型雌性群体 (胴长>350 mm)可能来自于同一群体,这与利用 STRUCTURE 2.3 软件推断的北太平洋柔鱼存在 1 个理论群相一致。

柔鱼资源量丰富,已有研究认为传统作业渔场 最大可持续产量为8×10⁴—10×10⁴ t^[7],而原流刺网 作业海域柔鱼资源量则超过 30×10⁴t^[8]。但作为短 生命周期种类,柔鱼种群资源量的大小很容易受到 环境变化的影响而发生波动^[27]。2009 年 8—10 月 旺汛期间由于水温变动,传统作业渔场柔鱼产量出 现大幅度下降,其日产量仅为正常年份的一半^[28]。 2010—2012 年本课题组对原流刺网作业海域柔鱼资 源量进行探捕调查,取得了较高的产量。因此,在对 北太平洋柔鱼资源进行评估与管理时,为了更加合 理地开发、利用与保护该渔业资源,建议将不同的产 卵季节—地理群体看作 1 个管理单元。

References :

- Murata M. Oceanic resources of squids. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 1990, 18(1): 19-71.
- [2] Araya H. Fishery, biology and stock assessment of Ommastrephes bartramii in the North Pacific Ocean. Memoirs of the National Museum Victoria, 1983, 44: 269-283.
- [3] Yatsu A, Midorikawa S, Shimada T, Uozumi Y. Age and growth of the neon flying squid, *Ommastrephes bartramii*, in the North Pacific Ocean. Fisheries Research, 1997, 29(3): 257-270.
- [4] Coll M, Navarro J, Olson R J, Christensen V. Assessing the trophic position and ecological role of squids in marine ecosystems by means of food-web models. Deep-Sea Research II, Topical Studies in Oceanography, (2012-08-23) [2013-03-01]. http:// dx.doi.org/10.1016/j.dsr2.2012.08.020.
- [5] Ma J, Chen X J, Liu B L, Tian S Q, Cao J. Review of fisheries biology of neon flying squid *Ommastrephes bartramii* in the North Pacific Ocean. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20 (4): 563-567.
- [6] Chen X J, Tian S Q, Chen Y. Fisheries Biology of the Neon Flying Squid, Ommastrephes Bartramii in the North Pacific Ocean. Beijing: Science Press, 2011: 1-3.
- [7] Chen X J, Chen Y, Tian S Q, Liu B L, Qian W G. An assessment of the west winter-spring cohort of neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) in the Northwest Pacific Ocean. Fisheries Research, 2008, 92(2/3): 221-230.
- [8] Ichii T, Mahapatra K, Okamura H. Stock assessment of the autumn cohort of neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) in the North Pacific based on past large-scale high seas driftnet fishery data. Fisheries Research, 2006, 78(2/3): 286-297.
- [9] Katugin O N. Patterns of genetic variability and population structure in the North Pacific squids Ommastrephes bartramii, Todarodes pacificus, and Berryteuthis magister. Bulletin of Marine Science, 2002, 71(1): 383-420.
- [10] Liu L W, Xu Q H, Chen X J. Population genetic structure of Ommastrephes bartramii in the North Pacific Ocean based on the COI and Cytb gene sequences analysis. Journal of Fisheries of

China, 2012, 36(11): 1675-1684.

- [11] Liu Y G. DNA Molecular Marker Technology in Aquatic Organisms. Beijing: Science Press, 2009: 59-62.
- [12] Dillane E, Galvin P, Coughlan J, Lipinsiki M, Cross T F. Genetic variation in the lesser flying squid *Todaropsis eblanae* (Cephalopoda, Ommastrephidae) in east Atlantic and Mediterranean waters. Marine Ecology Progress Series, 2005, 292: 225-232.
- [13] Doubleday Z A, Semmens J M, Smolenski A J, Shaw P W. Microsatellite DNA markers and morphometrics reveal a complex population structure in a merobenthic octopus species (*Octopus maorum*) in south-east Australia and New Zealand. Marine Biology, 2009, 156(6): 1183-1192.
- [14] Wen X X, Sun X W. Isolation and screening of microsatellite markers from Argus snakehead fish *Ophiocephalus argus*. Journal of Dalian Ocean University, 2010, 25(3): 260-264.
- [15] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 1978, 89(3): 583-590.
- [16] Kalinowski T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular Ecology, 2007, 16 (5): 1099-1106.
- [17] Excoffier L, Lischer H E. Arlequin suite ver3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources, 2010, 10(3): 564-567.
- [18] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Ecology and Evolution, 2011, 28 (10): 2731-2739.
- [19] Han Z M. Exact calculation of the distance between two points according to longitude and latitude. Applied Technology, 2011 (11): 196, 174-174.
- [20] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 2000, 155 (2): 945-959.
- [21] Lehmann T, Hawley W A, Collins F H. An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. Genetics, 1996, 144(3): 1155-1163.
- [22] Wattier R, Engel C R, Saumitou-Laprade P, Valero M. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in Gracilaria gracilis (Rhodo-phyta). Molecular Ecology,

1998, 7(11): 1569-1573.

- [23] Iwata Y, Lian C L, Sakuri Y. Development of microsatellite markers in the Japanese common squid *Todarodes pacificus* (Ommastrephidae). Molecular Ecology Resources, 2008, 8(2): 466-468.
- [24] Adcock G J, Shaw P W, Rodhouse P G, Carvalho G R. Microsatellite analysis of genetic diversity in the squid *Illex* argentinus during a period of intensive fishing. Marine Ecology Progress Series, 1999, 187: 171-178.
- [25] Tanaka H. Tracking the neon flying squid by the biotelemetry system in the central North Pacific Ocean. Aquabiology, 2001, 23 (6): 533-539.
- [26] Chen C S, Chiu T S. Variations of life history parameters in two geographical groups of the neon flying squid, Onmastrephes bartramii, from the North Pacific. Fisheries Research, 2003, 63 (3): 349-366.
- [27] O'Dor R K, Dawe E G. Illex illecebrosus // Rodhouse P G, Dawe E G, O'Dor R K, eds. Squid Recruitment
 - Dynamics: The Genus Illex as a Model, the Commercial Illex Species and Influences on Variability. Rome: FAO, 1998: 77-104.
- [28] Chen F, Chen X J, Qian W G, Liu B L, Tian S Q. Influence of variability of temperature on decline of catch for *Ommastrephes bartramii* in the Northwestern Pacific Ocean in 2009. Journal of Guangdong Ocean University, 2010, 30(1): 65-71.

参考文献:

- [5] 马金,陈新军,刘必林,田思泉,李思亮,曹杰.北太平洋柔 鱼渔业生物学研究进展.上海海洋大学学报,2011,20(4); 563-567.
- [6] 陈新军,田思泉,陈勇.北太平洋柔鱼渔业生物学.北京:科学出版社,2011:1-3.
- [10] 刘连为, 许强华, 陈新军. 基于线粒体 COI 和 Cytb 基因序列 的北太平洋柔鱼种群遗传结构研究. 水产学报, 2012, 36 (11): 1675-1684.
- [11] 刘云国. 水产生物 DNA 分子标记技术. 北京: 科学出版社, 2009: 59-62.
- [14] 温晓曦, 孙效文. 乌鳢微卫星 DNA 分子标记的分离及筛选. 大连海洋大学学报, 2010, 25(3): 260-264.
- [19] 韩忠民. 知经纬度计算两点精确距离. 科技传播, 2011(11): 196, 174-174.
- [28] 陈锋,陈新军,钱卫国,刘必林,田思泉.水温变动对2009年
 西北太平洋柔鱼产量下降的影响.广东海洋大学学报,2010,30(1):65-71.