

我国东南沿海日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)4 个养殖群体遗传分化及其遗传结构分析*

徐田军 王日昕 孙悦娜 申望 廖智 赵匡慈

(浙江海洋学院海洋科学学院 舟山 316000)

摘要 对我国东南沿海日本囊对虾的 4 个养殖群体广东群体(GD)、台湾群体(TW)、福建群体(FJ)和浙江群体(ZJ)的线粒体细胞色素 *b* 基因片段进行 PCR 扩增,对产物进行测序后分析。经比对获得 552bp 的核苷酸序列,发现了 52 个变异位点,得到了 50 种单倍型。广东、台湾、福建和浙江群体的核苷酸多样性依次分别为 0.0082、0.0044、0.0137、0.0045,各群体均存在较好的单倍型多态性和核苷酸多态性。群体遗传分化分析表明各群体间保持着一定的遗传差异,其中福建群体与其它群体之间存在明显的遗传分化。采用 MEGA 软件计算了群体间的遗传距离,福建群体与广东群体间的遗传距离最远 0.012,台湾群体与浙江群体间的遗传距离最小为 0.005。以其它 4 种对虾为外群构建了 4 个群体的 NJ 系统进化树,结果显示台湾群体与浙江群体最先聚为一组群。

关键词 日本囊对虾,细胞色素 *b*,遗传多样性,群体,遗传分化

中图分类号 Q785

日本囊对虾属于对虾科、囊对虾属,广泛分布于日本沿海、我国东南沿海及东南亚沿海等海域。在我国对虾养殖品种中,日本囊对虾能适应低溶解氧而具有适宜长途活运的能力,并且经济价值在对虾品种中位于榜首,是我国东南沿海重要的对虾增养殖品种之一(宋林生等,1999;庄志猛等,2001),主要养殖海域包括浙江、福建、广东及台湾等省份,并且 20 世纪 90 年代中后期以来,黄渤海海域也进行了日本囊对虾苗种的引进及增养殖(庄志猛等,2001)。随着海洋资源的日益枯竭及日本囊对虾养殖苗种的大量推广,在我国海域采集到野生的日本囊对虾亲本已经很困难。水产品种可持续健康发展的最重要的因素是保证苗种的质量,如何对现有的各养殖海域的日本囊对虾苗种进行可靠科学的遗传评估,分析其遗传背景及育种潜力就变得非常重要。准确评价各海域

日本囊对虾群体的遗传多样性指标及遗传分化信息,可以为种质资源保护、优良亲本的筛选、家系选育、分子标记辅助育种及增养殖方案的正确制定提供科学理论依据。

由于动物线粒体 DNA(mtDNA)具有绝大多数母系遗传、进化速度快、结构简单等优点,已经广泛应用于研究动物的遗传多样性及系统进化。在水产动物中,进化速度适中的 16S rRNA、COI、COII、*cytb* 等线粒体基因序列被广泛应用于分析其遗传结构和探讨物种间及群体间的系统发生关系。日本囊对虾作为我国的主要养殖对虾品种之一,对其遗传结构的评估却鲜有报道(宋林生等,1999;庄志猛等,2000,2001),而利用线粒体 DNA 分析其遗传背景,仅有郑连明等(2005)扩增了日本囊对虾的 COI 部分序列。本研究拟利用中度遗传进化的线粒体 *cytb* 基因序列的

* 浙江省重大科技专项重点项目,2006C12010 号;国家科技支撑计划项目,2007BAD43B08;浙江省重大科技专项重大项目,2007C02001 号。徐田军,博士,讲师,tianjunxu@163.com

通讯作者:王日昕,教授,E-mail:wangrixin1123@126.com

收稿日期:2008-12-20,收修改稿日期:2009-02-16

变异来评估东海及南海海域日本囊对虾 4 个主要养殖群体的遗传多样性水平, 探讨其遗传进化并对各群体的遗传结构进行分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)4 个养殖群体的样本分别采于我国东南沿海的浙江(ZJ)、福建(FJ)、广东(GD)及台湾(TW)沿海, 新鲜样品低温冰冻后长期保存。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采取常规苯酚氯仿提取法, 每个样本取 100mg 左右的尾部肌肉, 剪碎后加入 500 μ l 组织匀浆缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 50mmol/L EDTA, pH 8.0), 混匀后加入终浓度为 1%的 SDS 和 200 μ g/ml 的蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 水浴 3h。等体积的 Tris-饱和酚、Tris-饱和酚 : 氯仿 : 异戊醇 (25 : 24 : 1)、氯仿 : 异戊醇(24 : 1)各抽提一次。无水乙醇沉淀, 70%乙醇洗涤两次, TE 溶解。紫外分光光度计测定样品 DNA 的 OD_{260} 、 OD_{280} 值, 确定其浓度和纯度, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增和产物鉴定 用于扩增 *cytb* 基因片段的引物为 L10985: 5'-TGAGGAGGTTTCGCAGTA-3'和 H11563: 5'-AGATGAGGGTGAGTGGGT-3', 引物由上海生工生物公司合成。PCR 反应体系为 50 μ l, 包括: 模板 DNA50—100ng, 10 \times Buffer 5 μ l, dNTP 各 0.2mmol/L, 上、下游引物各 0.2 μ mol/L, *Taq* plus DNA 聚合酶 2U, $MgCl_2$ 1.5mmol/L。反应在 Bio-Rad Mycycler PCR 仪上进行。反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 50 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45s。经

30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。每次反应都设不含模板的空白对照。PCR 扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳缓冲液为 0.5 \times TBE (pH 8.0), 电压为 5V/cm, 常温电泳, EB 染色, Bio-Rad GD2000 型凝胶成像系统下观察并拍照记录。

1.2.3 DNA 序列测定 将 PCR 产物送往上海生工生物工程技术有限公司, 纯化后在 ABI 3730 测序仪上进行测序, 测序引物为 L10985。每个群体的测序样本数在 15—24 个之间。

1.2.4 序列的数据处理与遗传结构变异分析 获得的序列经过人工校正后通过 NCBI 中 BLAST 同源检索后确认所得的基因片段, 并从 GenBank 数据库中下载其它对虾物种的 *cytb* 序列以用于系统发生关系的分析。利用 MEGA3.1 软件分析 DNA 序列和氨基酸序列的变异位点, 计算碱基组成比例和遗传距离并构建系统进化树; 利用 DnaSP4.0 软件进行多态性指标、群体分化指数及基因流的计算; 利用 DAMBE 软件计算核苷酸变异指数。

2 结果

2.1 日本囊对虾 *cytb* 基因序列特征及变异分析

对所有测得的日本囊对虾 4 群体的 *cytb* 基因序列进行比对后, 共得到了 552bp 用于进行分析的基因序列, 与 GenBank 数据库中的序列比对后发现与对虾科的其它虾类具有很高的同源性, 说明序列正确并可进行下一步的分析。序列组成如表 1 所示, 从表 1 中可以看出, T、C、A、G 碱基在日本囊对虾所有样本中的平均含量分别为 36.6%、23.7%、27.1%、12.7%, 碱基分布在不同种群间没有明显的差异, A+T 平均含量为 63.6%, 明显高于 G+C 的含量

表 1 5 种对虾 mtDNA-*cytb* 基因序列的碱基组成
Tab.1 The base composition of *cytb* gene sequences in five penaeidae species

物种	T(%)	C(%)	A(%)	G(%)	A+T(%)	G+C(%)	总长(bp)
<i>M. japonicus</i> (GD)	36.6	23.7	27.1	12.6	63.7	36.3	552
<i>M. japonicus</i> (TW)	36.6	23.7	27.1	12.5	63.7	36.2	552
<i>M. japonicus</i> (FJ)	36.4	23.6	26.9	13.0	63.3	36.6	552
<i>M. japonicus</i> (ZJ)	36.6	23.7	27.2	12.5	63.8	36.2	552
<i>M. japonicus</i> (平均值)	36.6	23.7	27.1	12.7	63.6	36.3	552
<i>Litopenaeus vannamei</i>	39.1	23.4	24.8	12.7	63.9	36.1	552
<i>Litopenaeus stylirostris</i>	38.2	23.2	26.1	12.5	64.3	35.7	552
<i>Penaeus monodon</i>	39.9	19.2	28.1	12.9	68.0	32.1	552
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	39.9	21.9	27.0	11.2	66.9	33.1	552
平均值	37.9	22.8	26.8	12.5	64.7	35.3	552

36.3%。其它 4 种对虾也具有类似的碱基分布, 都是 A+T 含量明显高于 G+C 含量。这一特征和在其它物种中观察到的 mtDNA 序列的碱基分布具有相同的结论(郭天慧等, 2004; 高天翔等, 2003; 庆宁等, 2002; Quan *et al*, 2004; Liu *et al*, 2007)。

从所有的变异序列中定义了 50 种单倍型, 命名为 Maja-hap_1—Maja-hap_50, 单倍型及其变异位点如表 2 所示。日本囊对虾 4 个群体的遗传多样性参数如表 3 所示, 福建群体具有最高的遗传多样性水平, 其单倍型多样性及核苷酸多样性分别为 1.0 和 0.0137, 遗传多样性水平最低的浙江群体其单倍型多样性及核苷酸多样性分别为 0.874 和 0.0045, 综合各项参数可知, 日本囊对虾 4 个地理群体遗传多样性水平从高到低分别是福建群体、广东群体、台湾群体和浙江群体。所测序列经过人工校正后共发现 52 个变异位点,

占分析位点总数的 9.42%, 各变异位点的核苷酸变异指数为 0.014—0.198, 在变异位点中包括 38 个简约信息位点。这些变异位点中包括 39 个转换位点和 14 个颠换位点(表 3), 没有插入及缺失位点, 其中多样性水平最高的福建群体所分析序列的转换和颠换数分别达到了 30 个和 12 个。

利用 MEGA 软件计算了日本囊对虾 *cytb* 基因中的同义替代率(d_S)和非同义替代率(d_N), 全部序列的 d_N/d_S 为 0.130 (表 3)。采用单尾的 Z 检验进行负选择 ($d_N < d_S$) 检验, 由于同义替换明显高于非同义替换, 检验得到的 $P < 0.01$, 达到了极显著水平, 说明日本囊对虾在进化过程中 mtDNA-*cytb* 基因受到负选择的影响。

2.2 群体遗传分化及遗传结构分析

利用 MEGA 软件计算了群体间的遗传距离并统计了群体间的变异位点数(表 4), 由表 4 可知, 4 个群

表 2 日本囊对虾 *cytb* 序列核苷酸多态位点及其各单倍型
Tab.2 Nucleotide polymorphic sites and haplotypes in *cytb* gene sequences of *M. japonicus*

单倍型	11111111222222233333333344444444445555555 12358800568899011445691512344679012335678890122335 6907641425920359403198072581628959010586776787668342
Maja-hap_1	GCCATTAATAAAGTTCACAGGCGGTGAGGACTGTATGTAATCAGGAATTCAA
Maja-hap_2	... C. A. A. T.
Maja-hap_3	... C. A. AA. A. . A. G. T.
Maja-hap_4	A. . C. G. A. T. A.
Maja-hap_5	... C. A. AA. . G. A. G. T.
Maja-hap_6	... C. A. A. A. T.
Maja-hap_7	... C. A. A. A. . C. T.
Maja-hap_8	... C. . G. . A. A. A. . A. T.
Maja-hap_9	... C. G. A. A. A. T.
Maja-hap_10	... C. A. A. A. T.
Maja-hap_11	... C. A. AA. A. G. T.
Maja-hap_12	... CC. G. G. . A. A. A. T.
Maja-hap_13	... C. A. A. A. G. T.
Maja-hap_14	. T. . C. A. A. A. T.
Maja-hap_15	... C. . . G. TAC. A. A. T.
Maja-hap_16	A. . . C. G. A. A. A. T.
Maja-hap_17	... C. A. A. AG. T. . G. .
Maja-hap_18	... C. AC. A. A. A. T.
Maja-hap_19	A. . . C. G. A. G. A. A. A. T.
Maja-hap_20	... C. A. . A. G. A. G. T. . G. G.
Maja-hap_21	... C. . G. . . A. G. A. . A. G. T.
Maja-hap_22	... C. A. A. A. T. . G. .
Maja-hap_23	. . G. C. A. . A. . C. G. A. G. GC. . . GTG.
Maja-hap_24	... C. A. TA. C. A. TG.
Maja-hap_25	. T. . C. A. AA. A. G. T.

续表

单倍型	11111111222222223333333333444444444455555555 12358800568899011445691512344679012335678890122335 6907641425920359403198072581628959010586776787668342
Maja-hap_26	.. G. C. A. A. G. A. GC. ... GTG.
Maja-hap_27	.. G. C. A. A. A. G. A. G. A. T. . G. .
Maja-hap_28 C. A. A. T.
Maja-hap_29 G. G. G. . GC
Maja-hap_30 C. A. GTGA. GG. G. .
Maja-hap_31 C. A. AC. TG.
Maja-hap_32 C. A. A. T. . G. .
Maja-hap_33 C. A. A. T. A. G. G. G.
Maja-hap_34	A. . C. G. A. . AG. G. A. GG. C. . G. G. G.
Maja-hap_35 C. A. A. . A. . A. G. T. . G. .
Maja-hap_36	A. . C. A. G. A. T. . G. .
Maja-hap_37 C. A. . T. A. T. . G. .
Maja-hap_38 C. A. A. A. A. T.
Maja-hap_39 C. A. C. G. A. C. . G. .
Maja-hap_40 C. . C. . A. A. A. T. A. T.
Maja-hap_41 C. A. C. A. A. T.
Maja-hap_42 C. A. A. . A. . A. T.
Maja-hap_43 C. . G. . A. A. A. T.
Maja-hap_44	.. GC. A. A. A. C. A. T.
Maja-hap_45 C. A. A. A. T. . G. .
Maja-hap_46 C. A. A. . A. . A. T. . G. T. .
Maja-hap_47 C. A. A. T. A. A. . G. T. . G. .
Maja-hap_48 C. G. A. AA. A. . G. T.
Maja-hap_49 C. A. A. A. A. T.
Maja-hap_50 C. A. A. A. G. . T.

表 3 日本囊对虾 4 个群体的遗传多样性参数
Tab.3 Parameters of genetic diversity of *M. japonicus* from four stocks

群体	单倍型多样性 (<i>H</i>)	核苷酸多样性 (<i>P_i</i>)	核苷酸变异数 (<i>K</i>)	转换/颠换 (<i>T_s/T_v</i>)	非同义替代(<i>d_N</i>)	同义替代(<i>d_S</i>)	<i>d_N/d_S</i>
GD	0.964	0.0082	4.536	12/1	0.002	0.028	0.071
TW	0.895	0.0044	2.476	12/1	0.001	0.016	0.063
FJ	1.000	0.0137	7.533	30/12	0.006	0.032	0.188
ZJ	0.874	0.0045	2.485	18/3	0.001	0.013	0.077
平均值	0.953	0.0090	4.955	39/14	0.003	0.023	0.130

体间的遗传距离在 0.004—0.012 之间, 其中福建群体与广东群体遗传距离最大为 0.012, 台湾群体与浙江群体的遗传距离最小为 0.005, 所有个体间的平均遗传距离为 0.009。并计算了各群体内个体间的遗传距离, 广东、台湾、福建和浙江群体内的遗传距离分别为 0.008、0.005、0.014 和 0.005, 这与表 4 中各群体的遗传多样性水平具有类似的结论。表 4 中列出的群体间变异位点数显示福建群体与其它群体间存在较

表 4 日本囊对虾 4 群体间的相对遗传距离(对角线下)和变异位点数(对角线上, 共有变异位点/总变异位点)

Tab.4 Genetic distance (below the diagonal) and variation sites (above the diagonal) among four stocks of *M. japonicus*

群体	GD	TW	FJ	ZJ
GD	—	4/22	11/44	6/28
TW	0.007	—	10/45	7/27
FJ	0.012	0.011	—	15/48
ZJ	0.007	0.005	0.011	—

多的变异位点, 存在较大的遗传分化。

从计算得到的 4 个群体间的遗传分化系数及基因流数据(表 5)可以看出, 台湾群体与浙江群体间存在轻度遗传分化($F_{st} < 0.05$), 台湾群体与福建群体、浙江群体与福建群体之间存在高度的遗传分化($F_{st} > 0.15$), 其它群体之间均存在着中度的遗传分化($0.05 < F_{st} < 0.15$)。平均遗传分化系数为 0.1004, 表明约 10% 的遗传分化来自于群体之间, 约 90% 的遗传分化来自于群体内。基因流(N_m)越大表明遗传分化程度越低, 因此同样说明各群体之间的遗传分化水平。

表 5 日本囊对虾 4 群体间的群体遗传分化系数 F_{st} (对角线下)和基因流 N_m (对角线上)

Tab.5 Pairwise genetic fixation index (below the diagonal) and gene flow (above the diagonal) for four stocks of *M. japonicus*

群体	GD	TW	FJ	ZJ
GD	—	2.90	1.93	4.55
TW	0.0794	—	1.11	13.15
FJ	0.1143	0.1833	—	1.37
ZJ	0.0524	0.0185	0.1545	—

2.3 分子系统进化分析

利用 DAMBE 软件评测了遗传距离与对应的转换和颠换数的关系, 根据对核苷酸变异的预测, 所分析序列的核苷酸转换和颠换数随着遗传距离的增加而呈线性增加关系(表 6)。

表 6 *Cytb* 基因序列变异位点的核苷酸转换(S)和颠换(V)与遗传距离的相关性

Tab.6 Transition (S) and transversion (V) versus genetic distance among *cytb* gene sequences

遗传距离	0.0011	0.0059	0.1060	0.0154	0.0201	0.0249	0.0297
转换与颠换比例	0.000	0.003	0.007	0.010	0.013	0.017	0.020

利用 NJ 法构建了日本囊对虾 4 个群体及另外其它 4 种对虾同源序列的分子系统树, 如图 1 所示台湾群体和浙江群体遗传距离最近, 首先聚为一枝, 而后与福建群体和广东群体聚在一起形成日本囊对虾独立的一枝, 在对虾科的聚类关系中, 5 种对虾分为两大枝, 日本囊对虾、斑节对虾及中国对虾聚为一枝, 而凡纳滨对虾与细角滨对虾聚为一枝。

3 讨论

由于线粒体 *cytb* 基因的进化特性, 国内学者已经广泛应用线粒体 *cytb* 基因进行水产动物群体遗传

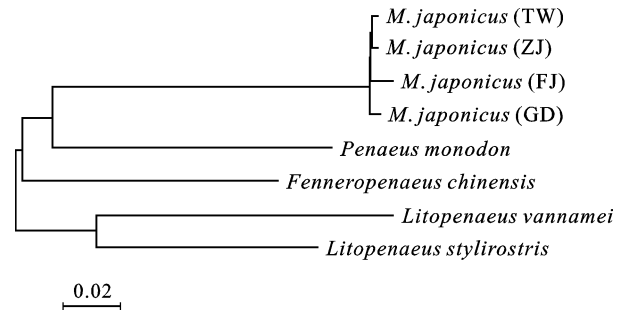


图 1 NJ 法构建的 5 种对虾的分子系统树

Fig.1 Molecular phylogenetic tree of five species of penaeidae shrimp

多样性和系统进化分析。例如朱世华等(2006)利用 *cytb* 部分序列探讨了 14 种石斑鱼的分子系统进化关系, 并认为 *cytb* 基因没有达到突变饱和; 张祖兴等(2006)克隆了大黄鱼 *cytb* 部分序列, 并利用这一序列探讨了大黄鱼的分类地位; 叶星等(2002)获得了剑尾鱼的 *cytb* 全序列, 根据 DNA 序列建立的进化树符合传统的分类地位, 说明 *cytb* 适宜进行遗传进化分析; 牟希东等(2007)利用 *cytb* 分析了金鱼不同品种间的遗传变异分化。

在本研究中, 日本囊对虾 *cytb* 序列 AT 含量(63.6%)显著高于 CG 含量(36.3%), 这样的结果符合其他学者利用线粒体序列研究虾类得到的结论(冯建彬等, 2008)。而在石斑鱼中 *cytb* 基因序列的 AT 含量与 GC 含量差别不是太大(朱世华等, 2006), 说明不同物种间具有 mtDNA 序列的碱基分布差异性。在线粒体序列中, 为了维持基因功能的相对保守性, 变异大多为转换位点。在同物种的线粒体序列变异中, 转换数往往会超过颠换数(Kocher *et al.*, 1989), 在本文中 mtDNA-*cytb* 序列的转换位点与颠换位点的比值为 2.79, 核苷酸的替换主要以转换为主, 转换多于颠换, 这与其他学者得到的结论一致(冯建彬等, 2008), 这也说明 4 个地理群体的日本囊对虾线粒体的变异仍然是种内变异。另外利用 DNA 序列进行物种自然选择机制的探讨已经成为生物学家的关注热点, 常见的检测方法包括 d_N / d_S 和 MK 检验, 在本研究中全部序列的 d_N / d_S 为 0.130, 表明在日本囊对虾的线粒体进化过程中存在着负选择(纯化选择), 这与其他学者得到鱼类线粒体的选择机制一致(张凤英等, 2008)。

经过人工校正后共得到了 50 种单倍型, 获得如此多的单倍型一方面说明日本囊对虾的遗传资源还比较丰富, 同时也说明 *cytb* 是一个进化速度较快的基因, 适宜进行遗传进化分析的研究。从表 3 中看出,

福建群体的各种遗传多样性指数都是最高的, 说明在采集的 4 个群体中福建群体是最具有良好遗传选育基础的, 遗传资源相对来说最为丰富, 具有遗传选育的潜力。在之后的日本囊对虾育种中可以考虑利用此群体进行优良亲本的选择和家系的选育, 因为只有具有遗传差异的基础群体才可以获得较好的选育效果。在 4 个群体中浙江群体和台湾群体具有较低的遗传多样性指数, 很可能与这些海域的日本囊对虾养殖业非常发达, 亲本已经过高强度的选择并且不断近亲交配导致近交衰退有关, 从而导致遗传多样性水平较低, 同时也可能是由于样本采集的局限性不能反映出真实的遗传多样性水平。

群体遗传分化系数 F_{st} 是利用遗传信息反映群体之间遗传分化的指标, 数值越大表明两群体间的遗传分化水平越高。在本研究中, 4 个群体之间大部分存在中度的遗传分化, 说明群体之间都有遗传上的差异存在, 台湾群体与浙江群体间存在轻度遗传分化, 基因流最高也说明这两个群体经过了广泛的遗传交换, 这也可能与这些地区养殖业的发达有关。台湾群体与福建群体、浙江群体与福建群体之间存在高度的遗传分化, 说明这些群体之间存在显著的遗传差异。平均遗传分化系数在 0.1 左右说明遗传分化主要来自于群体之间。

DNA 序列在核苷酸替换饱和后系统发生的信息可能丧失, 这样的序列不再适合进行系统发生关系的分析, 一般认为随着遗传距离的增加转换和颠换数达到一个平衡, 则这样的序列不适合进行分析。利用 *cytb* 基因进行节肢动物群体遗传进化分析的报道较少, 是否可以利用 *cytb* 基因的多态性来进行日本囊对虾不同地理种群或者与其它物种亲缘关系的分析, 本研究利用软件对遗传距离与转换和颠换数的相关性进行了预测, 结果显示所分析的 *cytb* 基因片段的转换和颠换数随着遗传距离的增加而呈线性增加关系。本研究同时发现 *cytb* 基因的转换位点与颠换位点的比值为 2.79, 还没有达到突变饱和, 因此日本囊对虾的 *cytb* 基因序列可以应用于群体间或物种间的系统发生关系分析。利用 NJ 法构建的系统数显示, 日本囊对虾的 4 个群体聚在一起, 显示了各群体的物种同源性。5 种对虾聚为两大枝, 日本囊对虾与斑节对虾首先聚在一起, 而后与中国对虾聚成一大枝, 而同属滨对虾属的凡那滨对虾和细角滨对虾聚为另一枝。系统树清晰的显示了各群体的地理遗传关系, 台湾群体与浙江群体遗传距离最近聚为一枝, 而后与

福建群体和广东群体聚在一起。尽管目前日本囊对虾养殖业非常发达, 群体间仍然存在遗传分化并具有一定的差异是非常有利于进行日本囊对虾的选择育种, 因为只有遗传上存在差异才可能筛选到优良的品系。本研究探讨了 4 群体的遗传分化和遗传多样性水平, 发现存在明显的群体间遗传分化并保持了一定的遗传距离, 在对虾大量育苗及养殖业发达的今天仍然保持了较好的遗传多样性水平对于以后的遗传选育是一件值得庆幸的事情, 本论文为其后日本囊对虾的家系选育、亲本选择及优良品系的筛选奠定了理论基础。

参 考 文 献

- 叶 星, 白俊杰, 劳海华等, 2002. 剑尾鱼线粒体细胞色素 *b* 基因的序列分析. 中国实验动物学报, 10(3): 131—134
- 冯建彬, 孙悦娜, 程 熙等, 2008. 中国五大淡水湖日本沼虾线粒体 COI 基因部分片段序列比较. 水产学报, 32(4): 517—525
- 朱世华, 杨迎春, 郑文娟等, 2006. 从细胞色素 *b* 部分序列探讨石斑鱼属的分子系统发育关系. 水生生物学报, 30(4): 432—438
- 庄志猛, 孔 杰, 石 拓等, 2001. 日本对虾野生与养殖群体遗传多样性的 RAPD 分析. 自然科学进展, 11(3): 250—255
- 庄志猛, 孟宪红, 权洁霞等, 2000. 日本对虾野生种群和养殖群体的同工酶遗传变异(英文). 动物学研究, 21(4): 323—326
- 庆 宁, 林岳光, 2002. 墨吉对虾 *Penaeus merguensis* 线粒体 16S rRNA 基因序列分析. 华南师范大学学报(自然科学版), 3: 63—67
- 牟希东, 白俊杰, 叶 星等, 2007. 金鱼线粒体 DNA *cytb* 基因序列分析及与鲫鱼亲缘关系探讨. 南方水产, 3(1): 26—30
- 宋林生, 相建海, 李晨曦等, 1999. 日本对虾野生种群和养殖种群遗传结构的 RAPD 标记研究. 海洋与湖沼, 30(3): 261—266
- 张凤英, 马凌波, 施兆鸿等, 2008. 3 种鲷属鱼类线粒体 COI 基因序列变异及系统进化. 中国水产科学, 15(3): 393—399
- 张祖兴, 李明云, 朱俊杰, 2006. 大黄鱼 mtDNA ND5 和 *cytb* 基因的克隆与序列分析. 水产科学, 25(12): 626—631
- 郑连明, 曹文清, 方旅平等, 2005. 日本囊对虾线粒体 DNA COI 基因片段序列分析. 厦门大学学报(自然科学版), 44(6): 821—826
- 高天翔, 李 健, 王清印等, 2003. 中国对虾线粒体 16S rRNA 基因序列分析. 中国水产科学, 10(5): 359—364
- 郭天慧, 孔晓瑜, 陈四清等, 2004. 三疣梭子蟹线粒体 DNA 16S rRNA 和 COI 基因片段序列的比较研究. 中国海洋大学学报, 34(1): 22—28
- Kocher T D, Thomas W K, Meyer A *et al*, 1989. Dynamics of

- mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 6196—6200
- Liu M Y, Cai Y X, Tzeng C S, 2007. Molecular systematic of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) inferred from mtDNA sequences, with emphasis on east Asian species. *Zool Stu*, 46(3): 272—289
- Quan J X, Zhuang Z M, Deng J Y *et al*, 2004. Low genetic variation of *Penaeus chinensis* as revealed by mitochondrial DNA COI and 16S RNA gene sequences. *Biochem Genet*, 39: 279—284

GENETIC DIFFERENTIATION AND STRUCTURE OF FOUR CULTURED STOCK OF *MARSUPENAEUS JAPONICUS* IN CHINA

XU Tian-Jun, WANG Ri-Xin, SUN Yue-Na, SHEN Wang, LIAO Zhi, ZHAO Kuang-Ci
(School of Marine Science, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316000)

Abstract To investigate the variation of mitochondrial *cytb* sequence and assess the genetic structure and polymorphism of four cultured stocks of *Marsupenaeus japonicus*, *M. japonicus* were sampled in South China Guangdong (GD), Taiwan (TW), Fujian (FJ), and Zhejiang (ZJ) provinces. With PCR technique, we amplified the mt-DNA *cytb* gene fragment among the four stocks. 552bp nucleotide sequences of partial *cytb* were obtained, of which 52 variable sites and 50 haplotypes were detected. Nucleotide diversities in GD, TW, FJ, and ZJ stocks were 0.0082, 0.0044, 0.0137, and 0.0045 respectively. All the stocks showed high diversity in nucleotide and haplotype. Genetic difference in all the four stocks was found, of which the one between FJ stock and other three stocks was significant, shown by F_{st} analysis. The Kimura-2-paramter genetic distance calculated by MEGA software between FJ and GD stocks is the greatest at 0.012, while that between ZJ and TW ones is the smallest at 0.005. A NJ phylogenetic tree was constructed using four penaeidae shrimp as out group. These results shall be very important and useful for making scientific strategy for the family selective breeding with molecular marker assistance.

Key words *Marsupenaeus japonicus*, *cytb*, Polymorphism, Stock, Genetic differentiation