

# 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)人工选育群体不同世代的微卫星分析\*

张天时 王清印<sup>1)</sup> 刘萍 李健 孔杰

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**提要** 采用微卫星 DNA 技术对中国对虾人工选育快速生长基础群体和 4 个连续世代共计 100 个个体进行了遗传分析。对 8 个基因位点进行了扩增,共得到 71 个等位基因。每个位点的等位基因数从 6 到 16 不等,其大小在 159—600bp 之间, $PIC$ (Polymorphism Information Content) 值为 0.6628—0.9051,基因型数为 17—67。5 个世代群体的平均杂合度分别为 0.7188、0.5687、0.6188、0.6438、0.66937。从  $F$ -检验的数据来看,配对比较  $F_{st}$  值表明 5 个世代群体间的遗传分化程度较弱。 $F_{is}$  值的计算结果表明,有 5 个群体位点杂合度处于过剩状态,但对整个群体而言,5 个世代群体均表现为一定程度的杂合子缺失。通过计算每个位点的等位基因数( $na$ )、有效等位基因数( $a_e$ )、基因型数目( $G$ )、最高频率等位基因的频率( $F$ ),以及基于基因型的  $P$  值,比较了 5 个群体的遗传变化。另外,5 个世代群体间的相似性系数以及彼此间的遗传距离,体现出人工选育群体间的遗传分化程度较低,说明 5 个世代群体间的遗传分化程度较低,还有较大的选育潜力,可以继续保持遗传响应。

**关键词** 中国对虾,微卫星,遗传变异,选择育种

**中图分类号** Q346;S968.22

近年来,中国对虾的自然资源迅速衰减,尤其自 1993 年虾病爆发以来,中国对虾养殖业受到重挫,虾病的流行使抗病品系选育成为必要和需要解决的问题。自 1997 年起,中国水产科学研究院黄海水产研究所开始进行中国对虾人工选育计划。为了获得高健康中国对虾幼体,对中国对虾快速生长性状和抗病性进行了人工选育(李健等, 2000),到 2002 年底,经筛选的对虾种群已繁育了 6 代,显示了良好的生长优势和抗逆能力,现已经在山东省日照、胶南和即墨等地进行了养殖示范。但是伴随人工选育过程,有可能增加近交机率、有效群体数不断减少等情况发生,进而导致遗传变异程度降低和遗传多样性相应减少。因此,有必要对其遗传变异进行检测,了解其遗传结构的变化,以

制订相应的科学措施保证育种工作顺利进行。

有关中国对虾群体遗传变异的同工酶分析(李健等, 2003; 王伟继等, 2001; 张子平等, 1994)、RAPD 分析(刘萍等, 2000)和线粒体 DNA 序列分析(邱高峰等, 2000)等已有研究,尚未有中国对虾人工选育群体微卫星技术(又称“简单序列重复”, Simple Sequence Repeat, SSR)分析的报道。本研究拟利用 SSR 技术分析对选育群体的 5 个世代跟踪其遗传变异的变化,分析选育过程对其遗传结构的影响,为分子标记辅助育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的收集

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)人工选育

\* 国家自然科学基金资助项目,30271038 号;山东省自然科学基金资助项目,Y2002D02 号;国家重点基础研究发展规划“973”课题资助项目,1999012009 号;国家“863”项目资助,2003AA603021 号。张天时,硕士,E-mail: zhtianshen@yahoo.com.cn

1) 通讯作者,王清印,E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

收稿日期:2004-03-08,收修改稿日期:2004-07-07

的基础群体 (Founder Population, FP) 系 1997 年自山东日照市近海域采捕的野生中国对虾。后代苗种于对虾养殖池中养成, 连续 6 年从生长快的个体中选留亲虾进行选育, 具体方法见李健等

(2000)。每个世代的样品从筛选的大个体越冬亲虾中随机采集, 分别命名为 CP3、CP4、CP5、CP6, 样本数均为 20。取样资料见表 1。活体运回后保存在  $-80^{\circ}\text{C}$  下以备用。

表 1 所用样本的体长及采样时间和地点

Tab. 1 Body length, collection time and location of samples

样本	采集时间(年. 月)	采集地点	体长(cm)
基础群体(FP)	1997. 11	日照市近海	11. 0—16. 4
第 3 代养殖群体(CP3)	1999. 11	胶南养殖池	11. 8—16. 2
第 4 代养殖群体(CP4)	2000. 11	日照养殖池	11. 8—15. 2
第 5 代养殖群体(CP5)	2001. 11	即墨养殖池	12. 0—15. 6
第 6 代养殖群体(CP6)	2002. 11	日照养殖池	15. 1—18. 2

## 1.2 微卫星位点的扩增

基因组 DNA 浓度由 GENEQUANT<sub>pro</sub> (Pharmacia Biotech Ltd) RNA/DNA 分析定量仪和琼脂糖凝

胶电泳 EB 染色定量。根据 DNA 序列(刘萍等, 2004) 筛选并设计了 8 个微卫星位点的引物, 其序列和优化的退火温度见表 2。

表 2 中国对虾 8 个微卫星位点的特征

Tab. 2 Characteristics of eight microsatellite loci tested in *F. chinensis*

位点	引物序列(5'→3')	核心序列	GenBank 登录号	退火温度(°C)
EN0018	F: TTT CGT CCT CAC ACC TAC C R: TAA GTC ACC TCA CTA ATT CG	(CT) <sub>3</sub> C	AY132812	66
EN0033	专利(申请号 02135714.5)	(GA)GT(GA) <sub>3</sub> AT(GA) <sub>3</sub> GT(GGGAGAGT) <sub>6</sub> (GA) <sub>4</sub>	AY132813	64
RS062	F: TGC TGA AGC TAC ACT ACC TTC G R: TGA TGA AAC GCA AGC AAA GGC	(GC) <sub>2</sub> C(GC) <sub>2</sub> ···(GTCT) <sub>20</sub> GAGT(GTCT) <sub>4</sub>	AY132778	66
RS0622	F: TCA GTC CGT AGT TCA TAC TTG G R: CAC ATG CCT TTG TGT GAA AAC G	(GTCT) <sub>20</sub> GAGT(GTCT) <sub>4</sub>	AY132778	66
RS0653	F: TTC AGT TGT TTC AGA ATC GC R: ACA CGG AGT AAT GGA GAC C	(AC) <sub>18</sub> (AT) <sub>3</sub> (AC) <sub>2</sub> A	AY132779	61
RS0683	专利(申请号 02135713.7)	CCGCTACCGC C (TACCCGC) <sub>13</sub> TACC C	AY132823	64
RS0859	F: ATC AGT AGC AGT AGT AGT TG R: TGT TAG GAA TGC TTA TGA	(ATC)(ATTATC)CTC(ATC)(ATT) <sub>3</sub> ATA (ATT) <sub>2</sub> (ATC)CT(TA) <sub>2</sub> (ATT)ACI(ATT) ATAACC(ATT) <sub>3</sub> IT(ATT) <sub>4</sub> GNC(ATTATC) <sub>10</sub> (ATT)AA C(ATTATC) <sub>5</sub> (ATT) <sub>2</sub> ATCTTCATC (ATTATC)CCC(ATTAGC) <sub>2</sub> ATTACTATC(ATT) <sub>2</sub> TTTACT(ATTATC)(ATC) <sub>2</sub> (AT T)AT (AG) <sub>3</sub> AA(AG) <sub>29</sub> AA(AG) <sub>3</sub> (AG) <sub>3</sub>	AY132791	52
RS0956	F: ACG CAT TAT GTC TCA TTC GC R: GAT TCC GCA TCA AAT ATG TCC G	(AG) <sub>32</sub>	AY132800	66

注: RS062 位点和 RS0622 位点有相同的 GenBank 登录号, 属于相同的位点只是核心序列大小(bp)不同。F: 正向引物; R: 反向引物。

PCR 反应体系包括: 10mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50mmol/L KCl, 2.0mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2mmol/L dNTPs, 0.8μmol/L 引物, 1.0U Taq 酶, 100ng 模板 DNA, 总反应体积为 25μL。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5min, 之后进行 25 个循环。每一个循环包括 94℃ 40s, 退火 1min, 72℃ 1min, 最后于 72℃ 延伸 5min。扩增完毕后, 在扩增产物中加入等体积上样缓冲液[98% 甲酰胺, 10mmol/L EDTA(pH 8.0), 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青], 于 95℃ 中变性 5min 置于冰上放置。制备 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶(加 7mol/L 的尿素), 以 15W 恒定功率电泳 45—60min。电泳完毕后取下凝胶放入 1.0L 固定液(10% 冰乙酸)中浸泡 30min, 用双蒸水漂洗转移至 1.0L 染色液(1g/L AgNO<sub>3</sub>, 0.056% Formaldehyde)中染色 30min, 双蒸水漂洗, 放入 1.0L 显色液(3.0% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.056% formaldehyde)中待条带充分显现后, 将回收的 1.0L 固定液倒入其中, 15min 后取出干燥。用 DL2000(Marker) 指示其大小(bp)。

### 1.3 数据统计与分析

为了获得微卫星位点和群体的多态性变化, 通过计算每个位点的多态信息含量(PIC) (Botstein *et al.*, 1980)、等位基因数( $n_a$ )、有效等位基因数( $a_e$ ) (Crow *et al.*, 1965)、基因型数目( $G$ )、多态位点杂合度( $H$ ) (Beardmore *et al.*, 1997) 以及  $F_{is}$ 、 $F_{st}$  值的  $F$ -分析和基于基因型的  $P$  值 (Levene, 1949) 等, 进行遗传多样性分析。 $F_{st}$  值在 0—0.05 之间, 群体遗传分化较弱; 0.05—0.15 之间, 群体遗传分化中等; 0.15—0.25 之间, 表示群体遗传分化较大; 当  $F_{st}$  值大于 0.25 时, 表示分化极大。

微卫星位点和群体遗传变异的度量参数及其计算如下:

群体多态位点比例:  $P = \text{多态位点数} / \text{位点总数}$

多态信息含量 PIC

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m 2P_i P_j^2$$

式中,  $P_i$ 、 $P_j$  分别为群体中第  $i$  和第  $j$  个等位基因频率,  $m$  为等位基因数。

有效等位基因数( $a_e$ ):  $a_e = 1 / \sum P_i$ ,  $P_i$  为该位点上第  $i$  个等位基因的频率

多态位点杂合度(观测值):  $H_o = \text{杂合子观察}$

数/观察个体总数

多态位点杂合度(期望值):  $H_e = 1 - \sum P_i^2$ ,  $P_i$  为该位点上第  $i$  个等位基因的频率

群体平均杂合度(观测值):  $H_a = \text{多态位点杂合度观测值} / \text{观测位点总和}$

固定指数( $F_{is}$ ):  $F_{is} = 1 - (H_o/H_e)$

$F$ -统计量( $F_{st}$ ):  $F_{st} = \sigma^2 P / P(1 - P)$ ,  $P$  为某等位基因在整个群体中的平均频率;  $\sigma^2 P$  为该等位基因在分群体之间的方差。

Nei (1972) 群体间的相似性系数:  $I = \sum (X_i Y_i) / \{ \sum (X_i)^2 \sum (Y_i)^2 \}^{1/2}$ ,  $X_i$ 、 $Y_i$  分别为 X 和 Y 群体第  $i$  个位点的等位基因频率。

Nei (1972) 群体间遗传距离:  $D_A = -\ln I$ , 加上偏差校正后为 (Nei, 1978):

$$I = (2n - 1) \sum (X_i Y_i) / \{ \sum (2n(X_i)^2 - 1) \sum (2n(Y_i)^2 - 1) \}^{1/2}$$
,  $X_i$ 、 $Y_i$  分别为 X 和 Y 群体第  $i$  个位点的等位基因频率。

## 2 结果

### 2.1 各个基因位点的遗传多态性

对中国对虾进行了 8 个多态性位点的 PCR 扩增, 共得到 71 个等位基因。每个位点得到的等位基因数从 6 到 16 不等, 产物片段大小在 159—600bp 之间, 图 1 所示为中国对虾快速生长群体 FP、CP3 和 CP5 在 RS0622 位点的扩增图谱。各个位点 PIC 值从 0.6628 到 0.9051。通过计算每个位点的等位基因数( $n_a$ )、有效等位基因数( $a_e$ )、基因型数目( $G$ )、最高频率等位基因的频率( $F$ ) 等的变化, 来确定位点多态性变化规律。5 个群体的平均杂合度分别为 0.7188、0.5687、0.6188、0.6438、0.66937, 其中除第 1 代群体在位点 RS0859、第 4 代群体在位点 RS0018、第 5 代群体在位点 RS06539 和第 6 代群体在位点 EN0033 以外的 7 个位点期望杂合度值都比观察杂合度值大。通过计算基因型的  $P$  值检验, 中国对虾的 5 个世代的 Hardy-Weinberg 平衡偏离常数均发生了不同程度的偏离, 结果见表 3, 偏离极其显著的群体位点用星号表示。FP 有 3 个群体位点偏离极其显著; CP3 有 5 个群体位点偏离极其显著; CP4 有 3 个群体位点偏离极其显著; CP5 有 2 个相同的群体位点偏离极其显著; CP6 仅有 1 个群体位点偏离极其显著。

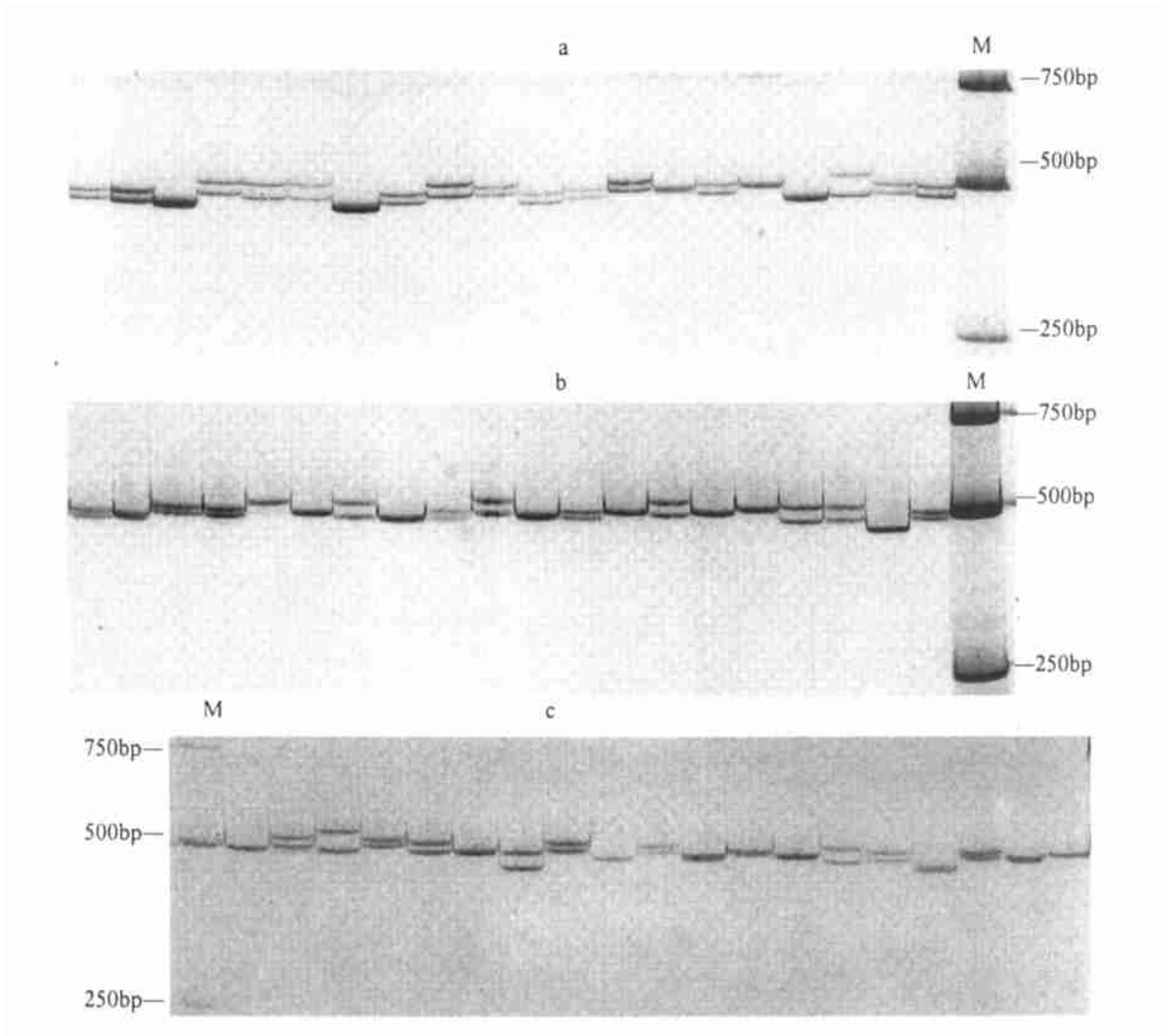


图 1 中国对虾 3 个群体 RS0622 位点的扩增图谱

Fig 1 Demonstration of microsatellite locus amplified by RS0622 primer pairs in the three populations of *F. chinensis*  
a: FP; b: CP3; c: CP5. M: Marker (DL2000)

表 3 中国对虾 5 个群体在 8 个微卫星位点的遗传多态性

Tab. 3 Allelic variability for five populations of *F. chinensis* at eight microsatellite loci

项目	位 点								平均值
	EN0018	EN0033	RS062	RS0622	RS0653	RS0683	RS0859	RS0956	
FP									
$P_{IC}$	0.7678	0.8986	0.7957	0.7844	0.7036	0.8756	0.7139	0.7882	
$n_a$	6.0000	15.0000	6.0000	7.0000	5.0000	13.0000	5.0000	7.0000	8.0000
$\alpha_e$	4.6243	10.2564	5.2288	4.9689	3.6199	8.4211	3.7915	5.0000	5.7389
$F$	0.3250	0.1750	0.3000	0.3000	0.4250	0.2000	0.3500	0.3500	
$G$	12.0000	16.0000	11.0000	11.0000	8.0000	17.0000	10.0000	13.0000	
$H_o$	0.5000	0.8500	0.8000	0.8000	0.6000	0.7500	0.8000	0.6500	0.7188
$H_e$	0.8038	0.9256	0.8295	0.8192	0.7423	0.9038	0.7551	0.8205	0.8250
$P$	0.000001*	0.360332	0.016760	0.037464	0.000609*	0.040456	0.880801	0.003351*	

续表

项目	位 点								平均值
	EN0018	EN0033	RS062	RS0622	RS0653	RS0683	RS0859	RS0956	
CP3									
<i>PIC</i>	0.7809	0.9032	0.7686	0.7874	0.7230	0.9051	0.7650	0.7597	
<i>na</i>	6.0000	15.0000	6.0000	7.0000	6.0000	14.0000	7.0000	7.0000	8.5000
$\alpha_e$	4.9080	10.6667	4.6512	5.0314	3.9024	10.9589	4.5198	4.8193	6.1822
<i>F</i>	0.2500	0.1500	0.3000	0.3000	0.3000	0.1250	0.3750	0.3250	
<i>G</i>	11.0000	18.0000	11.0000	15.0000	10.0000	17.0000	13.0000	11.0000	
<i>H<sub>o</sub></i>	0.7000	0.9000	0.5500	0.5500	0.5000	0.4500	0.6000	0.3000	0.5687
<i>H<sub>e</sub></i>	0.8167	0.9295	0.8051	0.8218	0.7628	0.9321	0.7987	0.8128	0.8349
<i>P</i>	0.005246*	0.105691	0.001461*	0.000058*	0.192847	0.000000*	0.051064	0.000014*	
CP4									
<i>PIC</i>	0.7619	0.8945	0.7386	0.7613	0.7183	0.8972	0.7448	0.7938	
<i>na</i>	6.0000	13.0000	6.0000	6.0000	5.0000	15.0000	6.0000	6.0000	7.8750
$\alpha_e$	4.4944	9.8765	4.1451	4.5198	3.8462	10.1266	4.2328	5.1948	5.8045
<i>F</i>	0.3500	0.1750	0.3000	0.3000	0.3500	0.1500	0.3000	0.2750	
<i>G</i>	10.0000	19.0000	12.0000	11.0000	9.0000	17.0000	11.0000	12.0000	
<i>H<sub>o</sub></i>	0.8000	0.8500	0.7000	0.4500	0.6500	0.6000	0.4500	0.4500	0.6188
<i>H<sub>e</sub></i>	0.7974	0.9218	0.7782	0.7987	0.7590	0.9244	0.7833	0.8282	0.8239
<i>P</i>	0.160666	0.488343	0.803751	0.034652	0.299699	0.000005*	0.003660*	0.000090*	
CP5									
<i>PIC</i>	0.7692	0.8958	0.7414	0.6631	0.7837	0.8877	0.7531	0.6810	
<i>na</i>	6.0000	14.0000	7.0000	7.0000	6.0000	14.0000	7.0000	7.0000	8.5000
$\alpha_e$	4.6512	10.0000	4.1885	3.1746	4.9383	9.3023	4.3716	3.4632	5.5112
<i>F</i>	0.3000	0.1750	0.2750	0.4750	0.3250	0.1500	0.3000	0.4250	
<i>G</i>	12.0000	18.0000	10.0000	10.0000	12.0000	17.0000	13.0000	11.0000	
<i>H<sub>o</sub></i>	0.6500	0.9000	0.5500	0.5000	0.9000	0.5500	0.6500	0.4500	0.6438
<i>H<sub>e</sub></i>	0.8051	0.9231	0.7808	0.7026	0.8179	0.9154	0.7910	0.7295	0.8082
<i>P</i>	0.174952	0.294460	0.445341	0.630396	0.361938	0.000000*	0.448449	0.003129*	
CP6									
<i>PIC</i>	0.7921	0.8864	0.7982	0.7723	0.6628	0.9015	0.7871	0.7487	
<i>na</i>	6.0000	13.0000	6.0000	7.0000	5.0000	15.0000	7.0000	6.0000	8.1250
$\alpha_e$	5.1613	9.1954	5.0955	4.7337	2.6936	10.5263	5.0314	4.2553	5.8366
<i>F</i>	0.2750	0.1750	0.2500	0.2750	0.5500	0.2000	0.3000	0.3750	
<i>G</i>	14.0000	16.0000	13.0000	12.0000	8.0000	18.0000	13.0000	12.0000	
<i>H<sub>o</sub></i>	0.8000	0.9500	0.5500	0.5500	0.5000	0.8500	0.8000	0.5500	0.6937
<i>H<sub>e</sub></i>	0.8269	0.9141	0.8244	0.8090	0.6449	0.9282	0.8218	0.7846	0.8192
<i>P</i>	0.573566	0.633667	0.128799	0.000046*	0.039334	0.040630	0.664422	0.050213	
所有群体									
<i>na</i>	6.0000	16.0000	7.0000	7.0000	6.0000	15.0000	7.0000	7.0000	8.8750
$\alpha_e$	5.3576	12.9534	5.2192	5.0352	4.3659	12.4533	5.3376	5.9119	7.0793
<i>F</i>	0.2500	0.1150	0.2350	0.2700	0.2850	0.1200	0.2400	0.2100	
<i>G</i>	21.0000	67.0000	22.0000	23.0000	17.0000	59.0000	23.0000	24.0000	

注: \* 表示差异极其显著 ( $P < 0.01$ )。

## 2.2 世代间群体遗传变化

从  $F$ -检验的数据来看(表 4、表 5), 配对比较  $F_{st}$  值( $F_{st} < 0.05$ ) 表明 5 个世代群体间遗传分化程度较弱, 而 5 个世代群体内有 3 个位点遗传分化中等。另外, 对  $F_{is}$  值的计算表明, 有 5 个群体位点杂合子处于过剩状态, 对整个群体而言, 5 个

世代群体均表现为一定程度的杂合子缺失。FP 有 6 个群体位点处于杂合子缺失状态, CP3 群体位点都处于杂合子缺失状态, CP4 有 7 个群体位点处于杂合子缺失状态, CP5 有 7 个群体位点处于杂合子缺失状态, CP6 有 7 个群体位点处于杂合子缺失状态。

表 4 中国对虾 5 个群体 8 个微卫星位点的  $F$ -分析

Tab. 4  $F$ -statistics for five populations of *F. chinensis* at eight microsatellite loci

位点	$F_{is}$					$F_{st}$	
	FP	CP3	CP4	CP5	CP6	CP3, CP4, CP5, CP6	所有群体
EN0018	0.3620	0.1209	- 0.0289	0.1720	0.0078	0.0312	0.0290
EN0033	0.0582	0.0069	0.0542	0.0000	- 0.0659	0.0242	0.0250
RS062	0.0108	0.2994	0.0774	0.2775	0.3157	0.0256	0.0308
RS0622	- 0.0016	0.3136	0.4222	0.2701	0.3027	0.0434	0.0386
RS0653	0.1710	0.3277	0.1216	- 0.1285	0.2048	0.0558	0.0573
RS0683	0.1489	0.5048	0.3343	0.3838	0.0608	0.0190	0.0239
RS0859	- 0.0866	0.2295	0.4108	0.1572	0.0016	0.0538	0.0522
RS0956	0.1875	0.6215	0.4427	0.3673	0.2810	0.0697	0.0669
平均值	0.1064	0.3013	0.2297	0.1830	0.1315	0.0397	0.0399

表 5 中国对虾不同群体间 8 个微卫星位点配对比较的  $F_{st}$  值

Tab. 5  $F_{st}$  values of pairwise comparison among different populations of *F. chinensis* at eight microsatellite loci

群体	FP	CP3	CP4	CP5	CP6
FP	—	0.0211	0.0166	0.0325	0.0220
CP3		—	0.0215	0.0301	0.0254
CP4			—	0.0338	0.0255
CP5				—	0.0248
CP6					—

表 6 中国对虾 5 个群体的 Nei 相似性系数(对角线以上)及遗传距离

Tab. 6 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance in five populations of *F. chinensis*

群体	Nei (1972) 相似性系数					Nei (1978) 相似性系数				
	FP	CP3	CP4	CP5	CP6	FP	CP3	CP4	CP5	CP6
FP	—	0.2013	0.1487	0.3032	0.2007	—	0.0861	0.0377	0.1975	0.0913
CP3	0.8176	—	0.2046	0.2851	0.2440	0.9175	—	0.0898	0.1755	0.1308
CP4	0.8618	0.8149	—	0.3170	0.2362	0.9630	0.9141	—	0.2116	0.1273
CP5	0.7384	0.7519	0.7283	—	0.2171	0.8208	0.8390	0.8093	—	0.1134
CP6	0.8182	0.7835	0.7896	0.8048	—	0.9128	0.8774	0.8805	0.8928	—

采用 Nei (1972, 1978) 的方法计算群体间的相似性系数和遗传距离(表 6)。不同世代群体间的相似性系数(Nei, 1972) 为 0.7283—0.8618, 加上偏差校正后相似性系数(Nei, 1978) 为 0.8093—0.9630。不同的计算方法所得彼此间的遗传距离数值略有不同, 但 2 种不同计算方法的结果都表明 5 个世代群体间的遗传分化程度较低。

## 3 讨论

### 3.1 微卫星位点的高度多态性

一个分子遗传标记多态性程度的大小与其在

群体中能够检测出来的类型多少直接有关,类似于群体遗传多态性。衡量的标准有两个:一是杂合度,它实际上是在群体随机交配的情况下,一个个体的两个等位基因处于杂合状态的概率;另一个常用的指标是多态信息含量(PIC),它是在给定一个后代基因型时,能够判断一个亲本将其某一个等位基因传递给后代的概率。一般多态性基因的定义是其最频繁出现的等位基因不超过0.95,这时相应的杂合度和多态信息含量不小于0.1,这也可以作为一个基因多态性的衡量标准。由表3可看出,8个微卫星位点多态信息含量值从0.6628到0.9051,这充分说明本实验所用分离群体群内遗传变异大,信息含量高,符合标记-QTL连锁分析的基本设计要求,也符合对虾养殖的实际状况。

在本实验中,每个位点的等位基因数从6到16不等,与同工酶(李健等,2003;王伟继等,2001)检测到的等位基因数(1—5)相比是比较多的。杂合度(5个群体的平均杂合度分别为0.7188、0.5687、0.6188、0.6438、0.6937)也比同工酶所报道的高。与同工酶等技术相比,微卫星位点的高度多态性,以及遗传标记以孟德尔方式共显性遗传等优点,决定了SSR标记被广泛应用于生物学研究的各个领域,尤其是亲缘关系相近的或地理位置相近的群体,SSR标记也是在育种计划中运用分子标记辅助育种进行家系确定的独特工具(Moore *et al.*, 1999; Wolfus *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 1994)。

### 3.2 杂合子缺失和哑等位基因

在所有群体中,都有杂合子的缺失,暗示出哑等位基因的存在,并且作者把这种情况当作纯合子而不是杂合子。基于哑等位基因的数据设定,作者还进行了基因型对Hardy-Weinberg平衡的偏离程度检验,发现在群体内杂合子过剩的微卫星位点偏离Hardy-Weinberg平衡,因此,哑等位基因在一些微卫星位点是可能出现的,但这些位点却被忽略了。Ball等(1998)发现哑等位基因是作为解释杂合子缺失现象不可缺少的因素之一。

### 3.3 养殖群体的遗传变化

长期的选育工作需要保持足够的遗传变异水平及一定的遗传响应。由于人工选育是一个复杂的过程,每一代的外部环境及人工选择压力会造成群体遗传变异水平的波动。在日本对虾引入意

大利后,Sbordoni等(1986)利用同工酶技术跟踪养殖群体遗传多样性变化,发现第1代至第6代的平均杂合度从0.102持续下降至0.039。分析原因,可能是人工选育过程中,有效群体过小,导致近交机率增加,引起种群遗传多样性水平下降。为了避免上述现象发生,本实验在对中国对虾选育过程中采取了一定的措施。首先,留取了足够数目的亲虾,每一代的亲虾数量在1000尾以上;其次,在收集虾卵时分批次进行而不是集中采集,因为虾类是高生殖力的生物,这样可以避免由于产卵时间的不同步性而造成的实际有效亲本数量太少;另外,严格控制交尾,选留后代覆盖面广。这些措施都有助于保持有效亲本数量,是育种过程中避免近交衰退的有效手段。

在人工控制条件下,通过选择、人工诱变、杂交等手段可破坏遗传平衡,从而使基因和基因型频率发生改变,群体内的遗传特性也会随之发生改变,这也是目前动、植物育种工作的重要手段。作者的研究结果表明,中国对虾经过了6个世代的选育后,群体内的遗传结构已经发生了变化,表现在微卫星图谱中某些位点的基因频率和基因型频率在5个群体中存在差异。由于遗传学实验中 $P$ 值常以0.05为标准, $P > 0.05$ 说明“差异不显著”, $P < 0.05$ 说明“差异显著”, $P < 0.01$ 说明“差异极其显著”。根据表3的资料,某些位点的基因型频率观察值与理论值差异极其显著( $P < 0.01$ ,已在表3标出),说明群体内的基因型频率发生了改变。本实验中,5个群体的遗传相似度为0.8093—0.9630(Nei, 1978),彼此的遗传距离( $D$ )为0.0377—0.2116。另外,根据 $F_{st}$ 值和配对比较 $F_{st}$ 值对5个世代群体遗传分化程度进行了检验,结果表明,绝大部分的遗传变异是在群体内检测到的,体现出群体间的遗传分化程度较低。

十足目甲壳动物遗传变异性较低是其系统发生的一个基本特征(李思发,1988),Hedgecock等(1982)在总结了65种虾蟹类的平均杂合度后也得出相同的结论。较短的生活史造成的瓶颈效应及缺乏随机漂变被认为是甲壳类遗传变异较低的主要原因,而人为干涉如过度开发、大规模不安全的人工放流等都有可能对对虾的遗传多样性产生影响。根据本研究结果,选育初期平均杂合度世代间呈现递减趋势不明显,第3代平均杂合度有略微的下降,而第4代平均杂合度有略微的上升,这可能是由于实验中取样误差导致实验结果发生

波动, 第 5 和第 6 代比前几代偏离减小, 预示在这些群体中, 近交及瓶颈效应发生的可能性不大, 遗传结构的改变主要是由人工选择压力造成的。这首先与选育的世代比较短有关, 另外, 也与选育过程中采取的措施密不可分。总之, 结果说明 5 个世代群体间的遗传分化程度较低, 还有较大的选育潜力, 可以继续保持遗传响应, 保证最终选种育种工作的成功。

### 参 考 文 献

王伟继, 孔 杰, 包振民等, 2001. 中国对虾 4 个种群的同工酶遗传变异. 生物多样性, 9(3): 241—246 [Wang W J, Kong J, Bao Z M *et al*, 2001. Isozyme variation in four populations of *Penaeus chinensis* shrimp. Biodiversity Science, 9(3): 241—246]

刘 萍, 孔 杰, 石 拓等, 2000. 中国对虾黄渤海沿岸群亲本及子一代 RAPD 分析. 海洋水产研究, 21(1): 13—21 [Liu P, Kong J, Shi T *et al*, 2000. RAPD analysis of genetic diversity in two Huang-Bo Sea stock families of *Penaeus chinensis*. Marine Fisheries Research, 21(1): 13—21]

刘 萍, 孟宪红, 孔 杰等, 2004. 中国对虾部分基因组文库构建和微卫星 DNA 的筛选. 高技术通讯, 14(2): 89—90 [Liu P, Meng X H, Kong J *et al*, 2004. Constructing fractional genomic libraries and screening microsatellites DNA of *Fenneropenaeus chinensis*. High Technology Letters, 14(2): 89—90]

李 健, 牟乃海, 孙修涛等, 2000. 无特定病原中国对虾种群选育的研究. 海洋科学, 25(12): 30—33 [Li J, Mu N H, Sun X T *et al*, 2000. Study on breeding of *Penaeus chinensis* group free of special pathogen. Marine Science, 25(12): 30—33]

李 健, 高天翔, 刘广东等, 2003. 中国对虾人工选育群体的同工酶分析. 海洋水产研究, 24(2): 1—8 [Li J, Gao T X, Liu G D *et al*, 2003. Isozyme analysis in cultured population of *Fenneropenaeus chinensis*. Marine Fisheries Research, 24(2): 1—8]

李思发, 1988. 鱼类选育群体遗传性能的保护. 水产学报, 12(3): 283—290 [Li S F, 1988. Conservation of the genetic performance of fish breeding population. J Fish China, 12(3): 283—290]

邱高峰, 常林瑞, 徐巧婷等, 2000. 中国对虾 16S rRNA 基

因序列多态性的研究. 动物学研究, 21(1): 35—40 [Qiu G F, Chang L R, Xu Q T *et al*, 2000. Intraspecific DNA sequence polymorphism in the mitochondrial 16S rRNA gene of the chinese shrimp, *Penaeus chinensis*. Zoological Research, 21(1): 35—40]

张子平, 王艺磊, 1994. 中国对虾两个种群的 F<sub>1</sub> 的 LDH 和 MDH 同工酶初步分析. 热带海洋, 13(1): 87—90 [Zhang Z P, Wang Y L, 1994. Preliminary studies on LDH and MDH isozymes of two penaeus orientalis species groups. Topic Oceanology, 13(1): 87—90]

Ball A O, Leonard S, Chapman R W, 1998. Characterization of (GT)<sub>n</sub> microsatellites from native white shrimp *Penaeus setiferus*. Mol Ecol, 7: 1251—1253

Beardmore J A, Mair G C, Lewis R I, 1997. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. Aquacult Res, 28: 829—839

Botstein D, White R L, 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Animal Genetics, 32: 314—331

Crow A J, Kimura M, 1965. Evolution in sexual and asexual population. Am Nat, 99: 439—450

Hedgecock D, Tracey M L, Nelson K, 1982. Genetic. In: Abele L G ed. The Biology of Crustacea. Vol. 2. New York: Academic Press, 284—403

Levene H, 1949. On a matching problem in genetics. Ann Math Stat, 20: 91—94

Moore S S, Whan V, Davis G P *et al*, 1999. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Aquaculture, 173: 19—32

Nei M, 1972. Genetic distance between populations. Am Nat, 106: 283—292

Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583—590

Sbordoni V, De Matthaeis E, Cobolli Sbordoni M *et al*, 1986. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). Aquaculture, 57: 239—251

Wolfus G, Garcia D K, Alcivar-Warren A, 1997. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. Aquaculture, 152: 3547—3554

Wright J M, Bertzen P, 1994. Microsatellites: genetic markers for the future. Rev Fish Biol Fish, 4: 384—388



## GENETIC DIVERSITY ANALYSIS ON SELECTED POPULATIONS OF SHRIMP *FENNEROPENAEUS CHINENSIS* BY MICROSATELLITES

ZHANG Tian-Shi, WANG Qing-Yin, LIU Ping, LI Jian, KONG Jie

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

**Abstract** Selective breeding on growth character of shrimp *Fenneropenaeus chinensis* has been conducted since 1997, and six successively bred stocks were produced between 1997 and 2002 at breeding base of the Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao, China. Samples of FP, CP3, CP4, CP5 and CP6, were randomly collected throughout the indicated pond area. Tail muscle tissue from shrimp mostly adults and sub-adults was collected. Samples were stored frozen ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) until transported to Yellow Sea Fisheries Research Institute where they were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until genetic analysis was performed.

Total DNA was extracted from tail muscle. DNA quality controls were performed using agarose gel electrophoresis and only samples with good DNA quality were used for microsatellite analysis. Eight microsatellite primers were designed according to small-size fractionated genomic libraries of *F. chinensis*. Optimal results were obtained by optimizing quantity of reagents and reaction conditions. Under the optimal conditions, PCR was performed for analyzing the genetic diversity of different selected populations. All samples were run next to a known sequence in order to determine the size. To avoid inaccuracy in scoring due to differences in gels, a control DNA sample was included in each set of samples for each gel.

Eight microsatellites were used to analyse the genetic diversity of different selected populations of shrimp *F. chinensis*. All eight microsatellite loci were polymorphic. A total of 71 alleles were found over all the loci. The number of alleles per locus ranged from 6 to 16, with allele size ranging from 159bp to 600bp. PIC (Polymorphism Information Content) per locus ranged from 0.6628 to 0.9051. The number of genotypes per locus ranged from 17 to 67. The average heterozygosity of the founder, 3rd, 4th, 5th and 6th generation were 0.7188, 0.5687, 0.6188, 0.6438 and 0.66937, respectively. Pair-wise  $F_{st}$  values among five populations were also low ( $F_{st} < 0.05$ ) suggesting low genetic differentiation between each two populations. Furthermore, five cases of observed heterozygosity excess ( $F_{is} < 0$ ) were observed in all populations. As far as the total population was concerned, the results based on the 'null allele' data set showed that observed heterozygosity deficiency occurred at all of the loci tested. Genetic differences among the five populations were also detected based on the number of alleles per locus ( $n_a$ ), the effective number of alleles ( $\alpha_e$ ), number of genotypes of per locus ( $G$ ), frequency of the most common allele ( $F$ ), and perform chi-square ( $\chi^2$ ) tests to estimate the probability ( $P$ ) of significant deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE). In addition, Nei's genetic distance (Nei, 1972, 1978) genetic distance among five populations (FP, CP3, CP4, CP5 and CP6) were calculated.  $F_{st}$  values and pairwise  $F_{st}$  values showed that the genetic structure has changed within populations due to artificial selection and genetic differentiation index indicated there was not obvious differentiation among the five populations. In summary, data showed that genetic differentiation among the five selected generations was weaker, and there is potentiality for further selection.

**Key words** *Fenneropenaeus chinensis*, Microsatellites, Genetic diversity, Selective breeding