

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)黄、渤海 3个野生地理群遗传多样性的微卫星 DNA 分析*

刘萍 孟宪红 何玉英 孔杰 李健 王清印

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

提要 运用微卫星 DNA 技术,以中国对虾渤海湾群体(BH)、辽东湾群体(LD)和海州湾群体(HZ)的3个野生群共计60个个体为实验材料,进行了7个基因位点的遗传参数分析。同时对7对微卫星引物的多态性信息含量(PIC)进行了评估,EN0021位点提供的信息含量低于0.5,其他6对微卫星引物的PIC值均在0.5以上,适于应用于中国对虾的群体分析。结果表明,这7个微卫星位点在中国对虾3个地理群60个样品的分析中共获得了56个等位基因,对3个野生群体的7个基因位点共计21个群体位点进行了杂合度观测值(H_o)和杂合度期望值(H_e)计算;在Hardy-Weinberg平衡条件下,进行了P检验,发现BH和HZ各有1个群体位点发生平衡偏离,而LD有1个群体位点发生平衡偏离,还有2个群体位点已发生显著平衡偏离。但除此之外,对3个地理群间的遗传分化指数 F_{st} 值进行的计算结果表明,BH和LD之间遗传分化较弱,HZ与另2个地理群间则产生了中等程度的分化。从变异贡献率来看,有92.83%的遗传变异来自个体之间,只有7.17%的遗传变异来自群体之间。经过UPGMA聚类,发现BH群体和LD群体的亲缘关系较近,而HZ群体与前两者亲缘关系较远。

关键词 中国对虾,地理群体,微卫星DNA,多态性分析

中图分类号 Q347

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是黄、渤海的主要经济虾类,属冷水性虾类,分布范围局限于我国大陆周围的浅海水域(刘瑞玉,1959),多年的人工标志放流的回捕资料表明,黄、渤海区的中国对虾可分为两个独立的种群(张煜等,1965;邓景耀等,1983),主要为我国沿海的黄、渤海群体和朝鲜西海岸群体。真子渺等(1966,1969)曾根据对虾洄游先后到达顺序,认为黄、渤海群体可再分成先期来游群和后期来游群,将黄、渤海对虾分为三个种群。近年来,在韩国济州岛近岸发现中国对虾野生群体(个人通讯资料),但形成的来历尚不清楚。到20世纪90年代后期,人们从分子水平研究中国对虾种质资源状况,相建海等(1998)年采用同工酶技术对中国对虾黄、渤海群体和朝鲜西海岸群体以及不同虾类的遗传背景进

行了评估,石拓等(2001)运用RAPD技术对采自不同地点的中国对虾野生群体进行了分析,对遗传分化指数进行了计算。前人的工作主要针对中国对虾遗传变异水平进行了研究(石拓等,1999;Liu *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001),由于中国对虾具有洄游习性,且生殖洄游又回到其出生地,由此产生的地理群之间是否产生生殖隔离乃至遗传分化,尚未见进一步研究。

由于中国对虾野生资源的急剧减少,从1986年开始,我国每年在渤海、黄海北部和山东半岛南部进行人工培育苗种的放流,年放流规模在10—30亿尾。单纯从数量上来看,黄、渤海中国对虾群体几乎完全依赖于人工放流(邓景耀等,2001),由此加剧了中国对虾种质退化、遗传多样性降低。鉴于中国对虾在我国渔业生产中的重要

* 国家自然科学基金资助项目,30271038号;国家重点基础研究发展规划项目,1999012007号;国家“863”计划资助项目,2003AA603021号。刘萍,硕士,副研究员,E-mail:liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期:2003-10-19,收修改稿日期:2003-12-19

地位,本文中采用微卫星DNA技术对环黄、渤海沿岸3个不同地理区域的中国对虾进行遗传参数分析,探讨中国对虾的种质资源状况,以期为中国对虾种质资源的可持续利用和群体划分提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)各群体来源见表1。每个群体20尾,活体运回实验室,在超低温冰箱(-80℃)中保存备用。

表1 实验用中国对虾的样品资料

Tab.1 Samples information of *F. chinensis* used in the experiment

群体	采样地点(经纬度)	采样时间	样品数量
渤海湾群体(BH)	天津外海(118°E, 38°50'N)	2001年9月	20
辽东湾群体(LD)	营口外海(121°30'E, 40°20'N)	2001年9月	20
海州湾群体(HZ)	日照外海(120°E, 35°N)	2001年9月	20

1.2 方法

基因组DNA提取参照文献的(Liu *et al.*, 2000)方法,微卫星引物序列参照刘萍等(2004)的引物。

每个PCR反应总体积为25μl,包括100ng中国对虾基因组DNA、10×PCR缓冲液、2.5μl Mg²⁺(2.0mmol/L)、1U Tag酶、dNTP各0.1mmol/L,引物各0.2μmol/L。PCR条件为:94℃变性2min;94℃40s,退火1min,72℃1min,25个循环;72℃延伸5min。

PCR产物在8%的变性聚丙烯酰胺凝胶中分离,硝酸银染色。根据每个个体产生的条带位置确定其基因型,用TFPGA软件进行数据处理,分别完成聚类分析、群体间遗传距离和相似指数、Hardy-Weinberg平衡检验(P值)以及不同群体位点的杂合度值计算。

参照Botstein等(1980)的方法计算多态性信息含量(PIC, Polymorphism Information Content):

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

式中, P_i 、 P_j 分别为群体中第*i*和第*j*个等位基因频率, n 为等位基因数)

群体遗传分化指数(F_{st} 值)和遗传变异组分分析根据Arlequin软件的AMOVA分析计算完成。

2 结果

2.1 PCR扩增结果

7个微卫星的核心序列在GenBank中的注册号以及7对引物的退火温度见表2。应用7对引物对中国对虾3个地理群的60个个体进行了PCR扩增(RS1101位点的图谱见图1)。读取全部

表2 PCR反应条件以及中国对虾3个野生群体21个群体位点的杂合度值、P检验值

Tab.2 PCR reaction conditions, heterozygosity and P-values of 21 locus of three wild *F. chinensis* populations

克隆编号	EN0018	EN0021	EN0033	EN0201	RS0683	RS0859	RS1101	平均值	
GenBank注册号	AY132812	—	AY132813	AY132820	AY132823	AY132791	AY132811		
退火温度(℃)	66	62	64	64	64	52	52	60.6	
扩增片断长度(bp)	381	555	233	408	278	292	441	369.7	
检测样本数(尾)	60	60	60	60	60	60	60	60	
等位基因数	6	3	16	6	12	7	6	7.857	
PIC	0.5820	0.3174	0.6992	0.7595	0.8750	0.7754	0.5948	0.6433	
渤海湾群体(BH)	H_e	0.6795	0.3577	0.9333	0.7949	0.9077	0.8218	0.5962	0.7273
	H_o	0.5500	0.4500	0.8000	0.7500	0.8000	0.7500	0.8000	0.7000
	P	0.6770	0.5309	0.0947	0.7401	0.0247*	0.4649	0.3769	0.4156
辽东湾群体(LD)	H_e	0.6287	0.3372	0.9346	0.7603	0.8987	0.7897	0.6795	0.7184
	H_o	0.5000	0.4000	1.0000	0.4500	0.5500	0.4500	0.7500	0.5857
	P	0.6978	1.0000	0.5565	0.0211*	0.0002**	0.0001**	0.5738	0.4071
海州湾群体(HZ)	H_e	0.8359	0.3474	0.9077	0.8295	0.9038	0.8179	0.6449	0.7553
	H_o	0.7500	0.4000	0.9000	0.6500	0.8000	0.8500	0.5000	0.6929
	P	0.7154	1.0000	0.8628	0.0261*	0.2837	0.0826	0.1401	0.4444

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

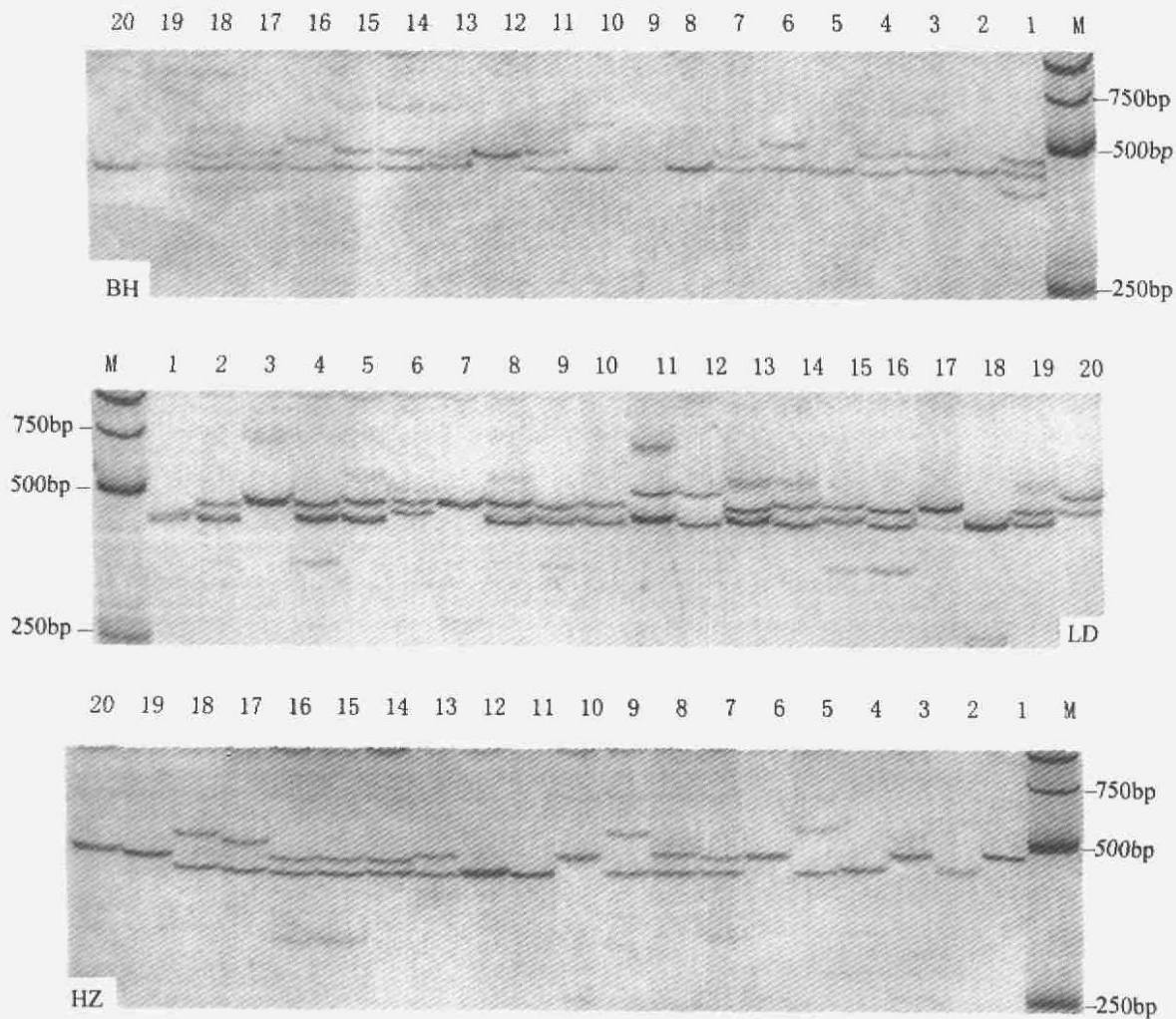


图 1 中国对虾 3 个野生群体 RS1101 位点的微卫星检测图谱

Fig. 1 Demonstration of microsatellite locus amplified by RS1101 primer pairs in three wild *F. chinensis* populations

基因型, 7 个基因位点获得了 56 个等位基因, 不同的引物获得的等位基因数为 3—16 个不等, EN0033 获得 16 个等位基因, 等位基因数最多; RS0683 次之, 为 12 个等位基因; RS0859 获得 7 个等位基因; EN0018、EN0201 和 RS1101 各获得 6 个等位基因; EN0021 只获得了 3 个等位基因。每个引物平均获得 7.625 个等位基因。通过基因产生的频率计算每个基因位点的多态性信息含量 (PIC), EN0021 位点提供的信息含量较低, 为 0.3174; 其他 6 个基因位点的 PIC 值均在 0.5 以上, 见表 2。

2.2 遗传多样性分析

用 7 对多态性微卫星引物对中国对虾 3 个地理群体进行遗传多样性分析。运用 TFGPA 分析软件, 对中国对虾进行群体遗传参数分析。计算出各群体位点的期望杂合度和观测杂合度以及

Hardy-Weinberg 平衡检验 P 值。发现 BH 和 HZ 各有 1 个群体位点发生平衡偏离, 而 LD 有 1 个群体位点发生平衡偏离, 还有 2 个群体位点已发生显著平衡偏离, 见表 2。

根据 Nei (1972) 的方法对 3 个地理群间的遗传距离和相似性指数计算 (表 3), 结果表明 BH 和 LD 间的遗传距离最小, 相似性最高, LD 和 HZ 两

表 3 中国对虾 3 个野生群体的遗传距离和相似性指数

Tab. 3 Genetic identity and genetic distance in three wild *F. chinensis* populations

群体	BH	LD	HZ
BH		0.1022	0.1351
LD	0.9028		0.1297
HZ	0.8736	0.8784	

注: 对角线以上数据为遗传距离, 对角线以下数据为相似性指数

地理群间次之,而BH与HZ的遗传距离相对较远。根据遗传距离值采用UPGMA聚类分析也可以反映出3个地理群间的关系,BH和LD遗传距离最小,亲缘关系最近,首先聚在一起;之后两者与HZ再进行聚合(图2)。

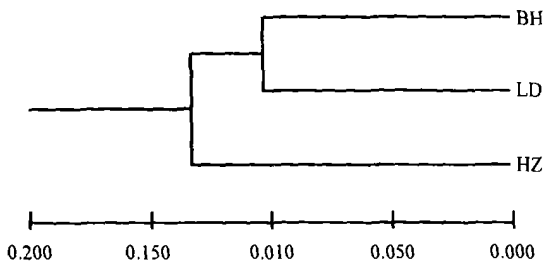


图2 中国对虾3个野生群体的UPGMA图

Fig.2 UPGMA dendrogram among three wild

F. chinensis populations

图下方的数值为遗传距离

2.3 群体变异分析

通过AMOVA分析中国对虾3个地理群间的遗传分化指数 F_{st} 值,见表4。从 F_{st} 值大小可以看出,BH和LD两地理群间最小,表明两群体的遗传分化最弱;HZ与另两个地理群间则产生了中等程度的分化。从变异贡献率来看,有92.83%的遗传变异是来自个体之间,只有7.17%的遗传变异是来自群体之间(表5)。

表4 中国对虾3个野生群体的遗传分化指数(F_{st})

Tab.4 Genetic diversity coefficient F_{st} among three wild

F. chinensis populations

群体	BH	LD	HZ
BH	0.0000		
LD	0.0422	0.0000	
HZ	0.1192	0.1250	0.0000

表5 中国对虾3个野生群体的遗传变异组分

Tab.5 Partitioning of genetic diversity of within and among three wild *F. chinensis* populations

变异来源	自由度	方差总和	变异组分	变异贡献率(%)
群体间	2	29.500	0.22384	7.17
群体内	57	330.400	2.89825	92.83
合计	59	359.900	3.12208	100

3 讨论与结语

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,且远低于无脊椎动物的平均水平,而人为干涉如过度捕捞、养殖个体逃逸、大规模不安全的人工放流以及产卵场环境条件的恶化等都有可能对对虾的遗传多样性产生影响。从20世纪80年代初期到90年代初期,年均渔获量已从最高峰的25448t下降到10543t,与60年代基本持平;自1990年以来,年捕捞量已不足3000t,现在年均渔获量则不足1000t。从1986年开始,我国每年在渤海、黄海北部和山东半岛南部放流人工繁育的对虾苗种10—30亿尾,黄、渤海沿岸中国对虾的补充群体已大多为人工放流群体(邓景耀等,2001),可能是中国对虾黄、渤海沿岸群遗传多样性水平较低的一个重要原因。本文对渤海沿岸3个不同地理区域的中国对虾进行微卫星DNA分析,探讨中国对虾的种质资源状况,对种群划分提供依据,通过本研究证实BH和LD间的遗传分化程度较弱,HZ与其他两地理群间的遗传分化均达中等水平程度。UPGMA聚类分析以及Nei氏遗传距离等验证了中国对虾各地理群间存在着不同程度的遗传分化。究其原因,可能是海洲湾地处黄海沿岸,与辽东湾和渤海湾之间存在水域差别,而栖息在不同水域的中国对虾在越冬洄游过程中完成交尾,不同水域区系间产生生殖屏障,阻断了基因交流,导致黄、渤海沿岸不同地理区系间的中国对虾产生了遗传分化。

由于微卫星序列具有高度可变的特性,所以无论在群体遗传学还是在个体识别以及亲子鉴定等方面都得到了广泛的应用。微卫星标记符合孟德尔遗传模式,呈共显性遗传,因此,可以根据某个微卫星标记区分纯合显性个体和杂合显性个体。根据微卫星核心序列的侧翼序列保守性进行引物设计,就可以在该物种甚至近缘物种中进行微卫星多态性的分析。Wolfus等(1997)使用一对微卫星标记对来自不同地区的5个种群的凡纳对虾(*Litopenaeus vannamei*)共312个个体进行了遗传分析,得到47个等位基因,获得了23个种群特异性标记,其中两个标记是家系特异性的。Sugaya等(2002)利用微卫星DNA标记对日本对虾(*Marsupenaeu japonicus*)的亲缘关系进行了分析。中国对虾微卫星DNA标记研究起步较晚,但近年

来已相继开展了这方面的工作(徐鹏等, 2003; 刘萍等, 2004),取得了一定的进展。本研究中的结果进一步验证了本实验室筛选微卫星 DNA 标记的多态性以及这些引物在应用过程中可提供的多态性信息含量,本实验使用的 EN0021 的 PIC 值低于 0.5,建议在应用过程中不予使用。其余 6 个标记显示的 PIC 值均大于 0.5,可用于群体分析等。通过各基因位点显示的等位基因数也可以间接反映其多态性信息含量,等位基因数越多,其多态性信息含量也就越多,反之亦然。

本研究结果还表明,中国对虾黄、渤海沿岸地理群间已经产生了一定程度的遗传分化。渤海沿岸的辽东湾群体存在杂合子缺失情况较之另外两个群较为严重,7 个基因位点中有 3 个位点发生了平衡偏离,其中有两个位点呈显著的偏离;渤海湾与海洲湾 2 各群体各有 1 个群体位点发生平衡偏离。但从总体来看,3 个群体的 P 检验的平均值均在 0.4000 以上,基本处于平衡状态。由此可见,从中国对虾资源开发和可持续利用的角度出发,必须根据群体的遗传结构制定科学的保护措施。加强野生原种遗传多样性的监测和评估,避免盲目地增殖放流以及过度捕捞,降低中国对虾野生遗传资源的稀释和衰退速度,防止种质退化和优良性状的丧失,从而保证中国对虾这一优良种质得以可持续利用和健康发展。

参 考 文 献

- 邓景耀,朱金声,1983. 渤海湾对虾产卵场调查. 海洋水产研究, 5: 17—23
- 邓景耀,庄志猛,2001. 渤海对虾补充量变动的分析及对策研究. 中国水产科学, 7(4): 125—128
- 石拓,孔杰,刘萍等,1999. 中国对虾遗传多样性的 RAPD 分析—朝鲜半岛西海岸群体的 DNA 多态性. 海洋与湖沼, 30(6): 609—615
- 石拓,庄志猛,孔杰等,2001. 中国对虾遗传多样性的 RAPD 分析. 自然科学进展, 11(5): 360—364
- 刘萍,孟宪红,孔杰等,2004. 中国对虾微卫星 DNA 多态性分析. 自然科学进展, 14(2): 150—155
- 刘瑞玉,1959. 黄海及东海经济虾类区系的特点. 海洋与湖沼, 2(1): 35—42
- 张煜,邓景耀,1965. 渤海对虾标志放流实验. 海洋水产研究丛刊, 20: 78—85
- 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
- 相建海,刘旭东,1998. 中国对虾种群生化遗传学研究. 见:曾呈奎,相建海主编. 海洋生物技术. 济南:山东科学技术出版社, 269—282
- 徐鹏,周令华,田丽萍,2003. 从中国对虾 ESTs 中筛选微卫星标记的研究. 水产学报, 27(3): 213—218
- 真子渺,中島國重,田川藤,1966. コウライエビの體長組成の變化について. 西水研報, 34: 1—10
- 真子渺,莊島悦子,1969. 標識放流によるコウライエビの移動と來游量の推定. 西水研報, 37: 35—50
- 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
- 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
- Liu Ping, Kong Jie, Shi Tuo *et al*, 2000. RAPD analysis of wild stock of Penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) in Chinese coastal waters of the Huanghai Sea and coastal waters of the Bohai Sea. Acta Oceanologica Sinica, 19(1): 119—126
- Nei, M, 1972. Genetic distance between populations. Am Nat, 106, 283—292
- Sugaya T, Jkeda M, Mori H *et al*, 2002. Inheritance mode of microsatellites DNA markers and their use for kinship estimation in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Fisheries Science, 68: 299—305
- Wang W J, Kong J, Bao Z M *et al*, 2001. Isozyme variation in four populations of *Fenneropenaeus chinensis* shrimp. Biodiversity Science, 9(3): 241
- Wolfus G M, Denise K Garcia, Acacia Alcivar-Warren, 1997. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. Aquaculture, 152: 35—47

GENETIC DIVERSITY IN THREE WILD POPULATIONS OF SHRIMP *FENNEROPENAEUS CHINENSIS* IN YELLOW AND BOHAI SEAS AS REVEALED BY MICROSATELLITE DNA

LIU Ping, MENG Xian-Hong, HE Yu-Ying, KONG Jie, LI Jian, WANG Qing-Yin
(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract The Microsatellite DNA technique was used to estimate genetic diversity and genetic differentiation in three wild populations of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*, three of which were collected from the Bohai Sea Bay (BH), Liaodong Bay (LD) and Haizhou Bay (HZ), respectively. Genomic DNA was extracted from 60 samples for the three wild populations. PCR was performed in a 25 μ l reaction and isolated by electrophoresis on a 8% denaturing polyacrylamide gel and visualized by silver staining. The purpose of the study was to provide theory basis for the continuous utilization of germplasm resources and population plot of *F. chinensis*.

Results showed: 7 polymorphic loci were screened electrophoretically for genetic variation of the three wild populations. PIC (Polymorphic Information Content) value per locus was more than 0.5 except for locus EN0021 (PIC = 0.3174) which was not the same with the analysis of population genetics and the construction of genetic linkage map. 56 alleles were acquired from the three geographical populations represented by 60 samples at 7 microsatellite DNA loci. The numbers of alleles in different loci ranged from 3 to 16, with on average 7.625, the highest numbers of alleles were from locus EN0033 (16) followed by RS0683 (12), RS0859 (7), locus EN0018, EN0201 and RS1101 acquired 6 alleles, respectively, locus EN0021 only acquired 3 alleles.

The observed heterozygosity (H_o) and the expected heterozygosity (H_e) were calculated based on frequencies of genotypes and alleles of each microsatellite locus, the average H_o value was the highest with BH ($H_o = 0.7000$, $H_e = 0.7273$) followed by HZ ($H_o = 0.6929$, $H_e = 0.7553$) and LD ($H_o = 0.5857$, $H_e = 0.7184$). In all populations, the average H_e value was higher than the average H_o value. The test of P values showed that 1 locus departed from the Hardy-Weinberg equilibrium in each population of the BH and HZ, 2 loci departed prominently from the Hardy-Weinberg equilibrium except that 1 locus departed from the Hardy-Weinberg equilibrium in the population of LD, but as a whole, the three wild populations were in a balanced condition according to the average value of P ($P > 0.4$).

Both genetic distance and genetic similarity evaluated between populations according to the method by Nei (1972) showed that BH and LD were of the shortest genetic distance, followed by LD and HZ, BH and HZ were of the longest genetic distance. Genetic diversity followed the same trend. Cluster analysis of the three wild populations performed with UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) confirmed the closer linkage between BH and LD than their individual distances to HZ.

The degree of population differentiation between the three wild populations using AMOVA model in ARLEQUIN showed that BH and LD have the lowest value of diversity coefficient (F_{st}) indicating only the slightest differentiation between the populations of BH and LD. The degree of population differentiation was moderate between HZ and one of the remaining two geographic populations ($F_{st} > 0.5$). For the three wild populations, variation was mostly due to within populations (92.83%) rather than among populations (7.17%) according to the contribution rate of variation.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*, Geographic populations, Microsatellite DNA, Polymorphic analysis