

文章编号: 1000-0615(2008)06-0855-09

中国南海海域斑节对虾群体与西印度洋、西太平洋群体 种群遗传结构的比较分析

熊小飞^{1,2}, 江世贵¹, 夏军红¹, 苏天凤¹, 龚世园²

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;

2. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 采用聚合酶链式反应(PCR)技术对海南三亚、深圳、湛江、北海 4 个斑节对虾群体共 95 个个体的延伸因子 1-*alpha* 内含子序列进行了扩增, 对扩增产物进行克隆转化, 并将阳性克隆产物进行序列测定, 最终获得了大小约 216 bp 的可供分析的核苷酸序列。将获得的序列与从 Genbank 上下载的西太平洋、西印度洋种群的序列进行比较分析, 结果表明, 中国海域种群的基因多样性最低, 西太平洋海域的基因多样性水平最高; 通过对遗传分化指数 F_{ST} 的分析, 发现西太平洋群体和西印度洋群体之间以及两者与中国海域群体间遗传分化具有极显著性差异 ($P < 0.001$)。UPGMA 系统树显示, 10 个斑节对虾群体形成两大分支, 一支由西太平洋群体和中国海域群体组成, 另一支由西印度洋群体单独组成; 中国海域群体中北海群体单独聚成一支。序列差异的分析结果表明, 中国海域群体与西印度洋群体之间的亲缘关系最远, 与西太平洋群体之间的亲缘关系较近; 中国海域内部各群体之间, 北海群体与海南、深圳、湛江群体之间的亲缘关系较远, 形成一个独特的地理种群。

关键词: 斑节对虾; 延伸因子 1-*alpha* 内含子序列; 种群结构; 遗传多样性

中图分类号: S 917 **文献标识码:** A

斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 是个体最大的对虾种, 广泛分布于印度洋和西太平洋的大部分海区, 是世界上最主要的养殖对虾之一, 养殖面积和产量均位居世界前列, 也是中国南方沿海诸省的重要养殖对象。国内有关斑节对虾的研究主要集中在养殖、病毒防治、遗传育种、营养饲料等方面^[1-4]。有关其分子水平研究, 国内一些学者也做了相关的研究, 如谭树华等^[5]运用同工酶和 RAPD 技术对不同斑节对虾养殖群体的遗传多样性进行了研究。邹志华和黎中宝^[6]应用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 对斑节对虾的养殖群体进行了 8 种等位酶的电泳检测和谱带遗传分析。沈琪

等^[7]采用随机引物扩增 DNA 多态性 (RAPD) 技术分析比较了凡纳对虾、细角对虾和斑节对虾的分子标记。杜晓东等^[8]对两个斑节对虾种群的生化遗传变异进行了研究。姜永杰等^[9]对深圳海域斑节对虾野生种群线粒体控制区序列的多态性进行了探讨。周发林等^[10]对海南三亚斑节对虾野生种群 mtDNA 16S rRNA 基因和控制区序列的多态性进行了研究。国外也有对斑节对虾的野生种群的遗传结构和遗传变异水平的相关报道。Sugama 等^[11]对印度尼西亚的斑节对虾的遗传多样性和种群结构进行了研究。Tassanakajon 等^[12-13]分离了斑节对虾的微卫星标记并且运用

收稿日期: 2007-11-12

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2006AA10A406); 国家科技支撑计划 (2006BAD01AB-2; 2007BAD29B01-9); 国家科技基础平台项目 (2005DICA30470-007); 农业结构调整项目 (06-05-01B); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (2007TS05); 广东省科技计划项目 (2005B20301001; 2007A020400001)

作者简介: 熊小飞, (1980-), 男, 硕士研究生, 从事海洋生物遗传育种研究。E-mail: xiongxiaofei124@126.com

通讯作者: 江世贵, E-mail: jiangsg@21cn.com

RAPD 技术分析了野生种群的基因多样性水平。Supungul 等^[14]研究了泰国附近海域斑节对虾的种群结构和遗传多样性水平。Pan 等^[15]筛选了 23 对多态性较高的微卫星标记用于斑节对虾的遗传多样性和种群结构的分析。Duda 和 Palumbi^[16]研究了西太平洋、西印度洋斑节对虾的种群结构。Wuthisuthimethaveea 等^[17]分离了多个微卫星标记。Xu 等^[18]运用微卫星标记技术研究了菲律宾野生和养殖的斑节对虾群体的遗传多样性水平。但是,有关中国海域斑节对虾内部各群体以及与西太平洋、西印度洋群体之间的群体遗传多样性、遗传结构、群体间的基因流状况等一系列问题的相关报道还没有见到。为了弄清楚中国海域斑节对虾的遗传多样性和遗传结构与西太平洋、西印度洋群体之间的关系,从一个非常大的角度和范围探讨了群体遗传结构及遗传多样性、基因流及可能原因,这对于斑节对虾的种群分类、管理和应用都具有重要的意义,因此有必要进行进一步的研究,为斑节对虾的遗传育种提供依据。

本研究用延伸因子 1-*alpha* 内含子序列克隆测序技术对中国南海斑节对虾群体的种群结构、遗传多样性进行分析,同时将获得的中国海域斑节对虾延伸因子 1-*alpha* 内含子序列与 Genbank 中西太平洋、西印度洋群体的延伸因子 1-*alpha* 内含子序列进行比较分析,探讨西太平洋、西印度洋不同海域特别是中国南海斑节对虾的种群遗传结构和遗传多样性水平及基因交流情况。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

野生斑节对虾样品分别采自深圳、北海、三亚、湛江、附近海域,现场用 75% 的酒精保存,运回实验室保存待用。

1.2 基因组 DNA 的提取

每尾取肌肉约 0.1 g 剪碎,使其酒精完全挥发,加入 500 μL TEN9 细胞裂解缓冲液(Tris-Cl 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 9.0; EDTA 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; NaCl 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),终浓度为 2% 的 SDS 和 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的蛋白酶 K,混匀后,56 $^{\circ}\text{C}$ 消化至透明。等体积饱和酚抽提一次,等体积混合液(酚、氯仿、异戊醇体积比为 25:24:1)抽提 2 次或多次

直至无蛋白质中间相,氯仿抽提一次后加入 1/10 体积 NaAC (pH 5.0),2 倍体积无水乙醇沉淀 DNA,70% 的乙醇洗涤 2 次,将管倒立,室温下自然干燥,加入 100 μL 超纯水溶解, - 20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 PCR 扩增

所用延伸因子 1-*alpha* 内含子引物序列参照 Duda 和 Palumbi 的引物^[16] (EF3s: 5' - GACAAGGCCCTCCGTCTTCC - 3' ; EF4s: 5' - GGGCACTGTTCCAATACCTCC - 3')。扩增反应总体积为 50 μL , 10 \times ExTaq buffer 5 μL , 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 混合液 4 μL , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物各 1 μL , 1 μL DNA 模板(20 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), Ex Taq(5U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.25 μL , 补足超纯水至终体积 50 μL 。扩增参数:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 共运行 34 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物用 2% 的 Agrose 胶电泳分离(1 \times TBE, 130 V, 20 min), EB 染色,凝胶成像系统观察。

1.4 克隆转化

将扩增产物按照 Marchuk 等^[19]的方法进行克隆转化,挑取白色的阳性克隆进行菌液鉴定,菌液鉴定的 PCR 反应体系:10 \times buffer 2.5 μL , 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP Mixture 2.5 μL , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物各 0.5 μL , 菌液 1 μL , pfu 酶 0.5 μL , 补足超纯水至终体积 25 μL 。扩增参数:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 共运行 34 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物用 2% 的 Agrose 胶电泳分离(1 \times TBE, 130 V, 20 min), EB 染色,凝胶成像系统观察。选阳性产物送上海英俊生物技术有限公司进行双向测序。

1.5 数据处理

将所得到的序列与 Duda 和 Palumbi^[16] 用同样实验方法所得到的西太平洋、西印度洋斑节对虾群体的序列(Genbank 序列号: AF133939 到 AF134050)进行比较分析。用 Clustral X 进行多重比对分析,用 DNASP4.0^[20] 进行 K 值、 P_i 值、多态位点数和单倍型的分布分析。种群间的种群遗传分化的 F 统计量(F -statistics, F_{ST})的计算用 Arlequin2.0^[21] 软件完成。种群间的基因流根据 Nei^[22] 的方法计算得出。根据 Excoffier 等^[23] 的方法进行种群遗传变异的分子变异等级分析

(AMOVA)。用 MEGA2.0^[24] 软件计算群体间的 Nei's 遗传距离,并根据群体间的 Nei's 遗传距离利用非加权组平均法(UPGMA)进行聚类分析,构建聚类关系树,采用 Bootstrap(重复数为 1000)检验分子系统树各分支的置信度。

2 结果与分析

2.1 中国海域群体的序列多样性

中国海域斑节对虾群体的扩增产物的大小大约是 200 bp,中国群体共有 95 个个体,分别来自深圳(20 个)、海南(9)、湛江(35 个)、北海(31 个),在总共 95 个个体中共产生了 71 个核苷酸变异位点,其中有插入缺失位点 29 个,多态性位点数 42 个。核苷酸多样性指数 $P_i = 0.03604$,平均核苷酸差异数 $K = 6.739$ 。单倍型数 $H = 44$ (图 1),单倍型基因多样性指数 $H_d = 0.952$ 。

表 1 中国海域斑节对虾各群体的遗传多样性参数比较

Tab. 1 Genetic diversity among populations of the black tiger prawn from the south China Sea

项目 item	<i>n</i>	<i>H</i>	H_d	<i>S</i>	<i>K</i>	P_i
海南 Hainan	9	7	0.944	17	7.722	0.03940
北海 Beihai	31	18	0.935	27	6.622	0.03503
湛江 Zhanjiang	35	22	0.963	28	7.193	0.03786
深圳 Shenzhen	20	15	0.963	25	7.589	0.03953

注: n —个体数; H —单倍型数; H_d —单倍型多样性指数; S —多态性位点数; K —平均核苷酸差异数; P_i —核苷酸多样性指数; 表 2 同此

Notes: n —number of individuals; H —number of Haplotypes; H_d —Haplotype diversity index; S —Number of polymorphic sites; K —Average number of nucleotide differences; P_i —Nucleotide diversity. the same as the Tab. 2

将扩增得到的序列与西太平洋、西印度洋的序列进行比较分析,在总共 207 个个体中共产生了 188 个核苷酸变异位点,其中有插入缺失位点 67 个,多态性位点数 121 个。核苷酸多样性指数 $P_i = 0.36427$,平均核苷酸差异数 $K = 54.227$ 。单倍型数 $H = 89$,单倍型基因多样性指数 $H_d = 0.975$ 。

2.2 中国海域、西太平洋、西印度洋群体内的遗传多样性分析

对 10 个群体分别进行比较分析,发现印度尼西亚多态性位点比例最高,为 87.1%,菲律宾和马来西亚其次,海南群体多态性位点比例最低,为 45.9%,从整体趋势上来看,西太平洋高于西印度洋,中国海域最低。毛里求斯单倍型多样性指数最小(0.865),其次为马达加斯加(0.895),最大为印度尼西亚(0.967)。西太平洋群体平均核苷酸多样性指数为 0.338 82,西印度洋群体平均核苷酸多样性指数为 0.126 44,中国海域平均核苷酸多样性指数为 0.0379 6。总的看来,西太平洋群体的遗传多样性较高,西印度洋群体的遗传多样性居于中间,中国南海群体的遗传多样性最低(表 2)。

表 2 斑节对虾各群体的遗传多样性参数比较

Tab. 2 Genetic diversity among populations of the black tiger prawn

项目 item	<i>n</i>	<i>H</i>	H_d	<i>S</i>	<i>K</i>	P_i
中国海域 China sea aera	95	44	0.952	42	6.739	0.03604
印度尼西亚 Indonesia	18	14	0.967	149	50.745	0.26157
菲律宾 Philippines	19	12	0.936	146	70.860	0.36715
马来西亚 Malaysia	17	11	0.941	141	73.669	0.38773
马达加斯加 Madagascar	18	10	0.895	52	17.902	0.09573
毛里求斯 Mauritius	29	10	0.865	60	26.057	0.14239
坦桑尼亚 Tanzania	11	8	0.927	50	26.545	0.14120

2.3 遗传分化指数(F_{ST})、遗传距离和聚类分析

由表 3 可以看出,西印度洋马达加斯加、毛里求斯和坦桑尼亚的斑节对虾群体与中国海域的斑节对虾群体的遗传距离最大(0.9),坦桑尼亚与印度尼西亚之间的遗传距离也达到了最大值(0.9),中国海域斑节对虾群体之间的遗传距离最小(0.0)。从两两群体间的遗传分化指数 F_{ST} 看,毛里求斯群体与坦桑尼亚群体之间的遗传分化指数 F_{ST} 最小(-0.048),北海群体与马达加斯加群体之间的遗传分化指数 F_{ST} 最大(0.868)。其中西

太平洋群体和西印度洋群体与中国海域群体间遗传分化具有极显著性差异($P < 0.001$),同时西印

度洋群体和西太平洋群体之间的遗传分化也具有极显著性差异($P < 0.001$)。

表3 斑节对虾各群体间的遗传距离(对角线上方)及遗传分化指数 F_{ST} (对角线下方)
Tab. 3 Genetic distance (upper diagonal) and population pairwise F_{ST} values (below diagonal) of the different populations of the black tiger prawn

种群 population	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 海南 Haian	—	0.1	0.0	0.1	0.7	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9
2 北海 Beihai	-0.034	—	0.1	0.1	0.7	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9
3 湛江 Zhanjiang	-0.025	-0.021	—	0.0	0.7	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9
4 深圳 Shenzhen	-0.014	-0.010	-0.022	—	0.7	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9
5 印度尼西亚 Indonesia	0.652**	0.730**	0.734**	0.702**	—	0.6	0.6	0.8	0.9	0.9
6 菲律宾 Philippines	0.528**	0.637**	0.644**	0.595**	0.045	—	0.6	0.8	0.8	0.8
7 马来西亚 Malaysia	0.521**	0.637**	0.645**	0.594**	0.055	-0.038	—	0.8	0.8	0.8
8 马达加斯加 Madagascar	0.862**	0.868**	0.866**	0.865**	0.664**	0.547**	0.529**	—	0.2	0.2
9 毛里求斯 Mauritius	0.805**	0.829**	0.829**	0.819**	0.639**	0.539**	0.521**	0.086	—	0.2
10 坦桑尼亚 Tanzania	0.826**	0.850**	0.849**	0.841**	0.604**	0.477**	0.455**	0.062	-0.048	—

Notes: ** $P < 0.001$

从表4中 AMOVA 分析数据可知,64.82%来源于群体间的遗传变异,群体内个体间的遗传变异为总遗传变异的35.18%。群体间遗传分化显著($F_{ST} = 0.648$; $P < 0.0001$)。

表4 斑节对虾10个群体遗传变异的分子变异等级分析(AMOVA)

Tab. 4 AMOVA analysis of genetic variation in tiger prawn populations

变异来源 source of variation	自由度 df	方差总和 sum of squares	变异组分 variance components	所占比例(%) percentage of variation
群体间 among populations	9	5908.416	31.414	64.82
群体内 within populations	197	3359.923	17.053	35.18
总计 total	206	9267.923	48.467	100

2.4 群体间的亲缘关系及聚类分析

用 MEGA2 软件算出了10个种群间的遗传距离,并以这10个地理种群遗传距离构建 UPGMA 系统树(图2)。UPGMA 系统树显示,10个斑节对虾群体形成两大分支,一支由西太平洋群体和中国海域群体组成,另一支由西印度洋群体单独组成。

3 讨论

3.1 种群结构

中国海域斑节对虾种群内结构 由中国海域斑节对虾群体的 F_{ST} 得出它们的基因流值(N_m),其中海南群体与深圳群体的 N_m 值最大(35.84),北海群体与深圳群体的 N_m 最低(9.38),说明它们各个群体之间存在着一定程度的基因交流。单独将中国海域各个群体进行分析,用 Mega 软件计算出4个地理种群之间的遗

	CCTTCAGGTA	AGAATCCACA	GATTGCTCAG	ATGTTGGTTA	CAATA---AT	---TATGTAGT	60
Z1
Z2	C.....	ATTG.	---A.....
Z3	CATG.	---.....
Z4	C.....	ATTG.	---A.....
Z5	C.....	ATT---	A.....
Z6	C.....	ATTG.	TA.....
Z7	ATTG.	---A.....
Z8	AATG.	---A.....
Z9	C.....	ATTG.	TA.....
Z10	C.....	ATTG.	TA.....
Z11	ATTG.	---.....
Z12	C.....	ATTG.	---A.....
Z13	C.....	ATTG.	---A.....
B1	ATTG.	---.....
B2	C.....	A.....	ATTG.	TA.....
B3	C.....	A.....	T.....	ATTG.	TA.....
B4	C.....	C.....	ATTG.	---A.....
B5	C.....	ATTG.	TA.....
B6	C.....	ATTG.	TA.....
B7	C.....	ATTG.	TA.....
B8	C.....	ATTG.	TA.....
B9	C.....	ATTG.	---A.....
B10	C.....	ATTG.	---A.....
B11	C.....	ATTG.	TA.....
B12	C.....	ATTG.	TA.....
B13	C.....	ATTG.	TA.....
B14	T.....	---
S1	C.....	ATTG.	TA.....
S2	C.....	ATTG.	TA.....
S3	ATTG.	---A.....
S4	A.....	C.....	ATTG.	TA.....
S5	C.....	ATTG.	---A.....
S6	C.....	T.....	ATT.	---A.....
S7	C.....	C.....	ATT.	---A.....
S8	C.....	ATTG.	TA.....
S9	A.....	ATTG.	---A.....
S10	C.....	ATTG.	TA.....
S11	ATTG.	---A.....
H1	C.....	ATTG.	TA.....
H2	C.....	ATTG.	TA.....
H3	ATTG.	---A.....
H4	ATTG.	---A.....
H5	C.....	ATTG.	TA.....
H6	C.....	ATTG.	TA.....
Z1	CGATATGTTA	TATAGTCAAT	ATTTTTTCAG	TGTATGGTTA	AGTATGTTGA	GCAGGAGTGA	120
Z2
Z3
Z4
Z5	A.....
Z6	T.....	G.....	TG.....
Z7
Z8
Z9	A.....	T.....	G.....	TG.....
Z10	T.....	G.....
Z11	C.....
Z12
Z13
B1
B2	T.....	G.....	TG.....
B3	T.....	G.....	TG.....
B4
B5	T.....	G.....	TG.....
B6	A.....	T.....	G.....	TG.....
B7	A.....	T.....	G.....	TG.....
B8	A.....	T.....	G.....	TG.....
B9
B10	G.....
B11	A.....	T.....	G.....	TG.....
B12
B13	T.....	G.....	TG.....
B14
S1	A.....	T.....	G.....	TG.....
S2	A.....	T.....	G.....	TG.....
S3	CC.....
S4	A.....	T.....	G.....	TG.....
S5
S6	A.....
S7	A.....
S8	A.....	A.....	T.....	G.....	TG.....
S9
S10	A.....	T.....	G.....	TG.....
S11
H1	A.....	T.....	G.....	TG.....
H2	A.....	T.....	G.....	TG.....
H3
H4
H5	T.....	G.....	TG.....
H6	A.....	T.....	G.....	TG.....

						180
Z1	TTGCAGTGCA	GGGGTGAAGG	AGAAA-AGTA	CGAACGAAGT	GAATTTATTT	GTTCTTAATT
Z2	C.....	AA..T.....	GA.....A
Z3
Z4	C.....	A..A.....
Z5	A.....
Z6	C.....	A.....	GA.....A
Z7	G.....	A.....
Z8	-G.....	A.....	GA.....
Z9	C.....	A.....	GA.....T.....A
Z10	C.....	A..T.....	GA.....
Z11
Z12	C.....	G.....	A.....	GA.....
Z13	C.....	A.....	GA.....
B1
B2	C.....	A.....	GA.....A
B3	C.....	A.....	GA.....G..A
B4	C.....	A.....	GA.....A
B5	C.....	A..T.....	G..GA.....
B6	A.....	GA.....T.....A
B7	A.....	GA.....T.....A
B8	C.....	A.....	GA.....A
B9	C.....	A.....	GA.....
B10	C.....	A.....	GA.....
B11	C.....	A.....	GA.....A
B12	A.....
B13	C.....	A.....	GA.....A
B14	A.....
S1	C.....	A.....	GA.....A.....A
S2	C.....	A.....
S3	A..A.....
S4	C.....	A.....	GA.....A
S5	C.....	A.....	GA.....A
S6	C.....	A.....	GA.....
S7	C.....	A.....	GA.....
S8	C.....	A.....	GA.....T.....A
S9	A.....
S10	C.....	A.....	GA.....
S11	A..T.....
H1	C.....	T.....	A.....	GA.....A
H2	C.....	A..A.....	GA.....A
H3	A..A.....
H4	A.....
H5	C.....	A..T.....	GA.....
H6	C.....A	A.....	GA.....A
216						
Z1	TT-GATTTTC	TCCTCCCACA	GGACGTCTAC	AAGATT		
Z2		
Z3		
Z4		
Z5		
Z6	G.....		
Z7		
Z8		
Z9		
Z10	-A.....		
Z11		
Z12	A.....	A.....		
Z13	T.....	A.....		
B1		
B2		
B3		
B4		
B5	-A.....		
B6	T.....		
B7		
B8		
B9	A.....		
B10	A.....		
B11	C.....		
B12		
B13		
B14		
S1		
S2		
S3		
S4		
S5		
S6		
S7	-A.....		
S8	C.....		
S9		
S10	A.....		
S11		
H1		
H2		
H3		
H4		
H5	-A.....		
H6	A.....	C.....		

图1 中国海域斑节对虾样品延伸因子 1-alpha 内含子序列的单倍型

Fig. 1 Haplotypes of elongation factor 1-alpha intron sequences region in China sea area *Penaeus monodon* individuals

传距离;北海群体与另外 3 个群体之间的遗传距离均为 0.1,而深圳群体、湛江群体和三亚群体之间的遗传距离则均为 0.0,这说明深圳群体、湛江群体和三亚群体之间的基因交流比北海与这三个群体之间的基因交流频繁。用 MEGA 构建 UPGMA 分子聚类关系树,分子聚类关系树形成明显的两支,北海群体为单独的一支,而湛江群体、海南群体和深圳群体聚成另一支,这与姜永杰等^[9]、周发林等^[10]的研究结果一致。海南,湛江与深圳三个群体所在的海域之间没有什么陆地隔离,两种群间的斑节对虾可以自由迁徙,幼体、幼虾可以自由扩散,促使了三个种群的遗传差异减小,基因流加大。雷洲半岛和海南岛阻碍了北海种群与海南、湛江、深圳种群中的对虾之间的迁徙,幼体、幼虾的相互扩散,使北海种群与海南、湛江、深圳种群之间的基因流较小。

西印度洋、西太平洋和中国海域群体的种群结构 用 UPGMA 法对三个地理区域的 10 个斑节对虾群体进行聚类(图 2),西太平洋和西印

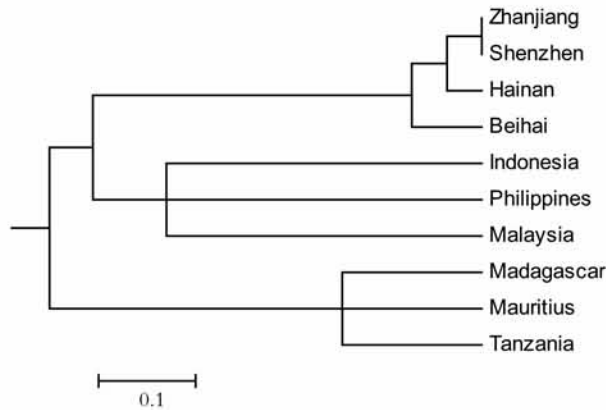


图 2 斑节对虾 10 个地理种群的 UPGMA 系统树

Fig. 2 UPGMA tree of ten stocks of the black tiger prawn

度洋群体的聚类结果与 Duda 和 Palumbi^[16]的研究结果一致。Duda 和 Palumbi 采用聚合酶链式反应(PCR)技术对西太平洋、西印度洋 6 个斑节对虾地理群体的延伸因子 1-*alpha* 内含子序列进行了扩增,发现西太平洋和西印度洋群体在种群结构上有极其显著的差异,这两个大的地理群体之间没有共享的单倍型,在系统发育树上形成独立的两支。西太平洋内部各地理群体之间基因交流频繁,而西印度洋内部各群体之间的交流则

受到一定程度的制约,这种制约在马达加斯加和坦桑尼亚之间的交流上表现得很明显。西太平洋和西印度洋内部各群体的分布从地理位置的远近上来说基本上是相似的,Duda 和 Palumbi^[16]认为西太平洋和西印度洋这两个大的地理群体之间的差异可能是由群体交流上的地理阻碍所导致,也可能是农业经营活动中人为因素造成的。西印度洋和西太平洋群体在地理位置上来说相隔很远,这种地理位置上的差异使得两个地理区域内的种群交流受到限制,在遗传多样性水平上就呈现出显著的差异。西太平洋和中国海域群体在地理位置上相比来说相隔较近,中间虽有岛屿海峡隔离,但还是存在一定程度的基因交流,但这种交流不可能使得西太平洋三个地理群体特征完全和在中国海域群体融合在一起。

3.2 基因多样性

西太平洋群体的核苷酸多样性显著地大于西印度洋群体和中国南海群体(表 2)。而在这三个地理区域中,每个地理区域内的每个群体之间的核苷酸多样性相差不大。Duda 和 Palumbi^[16]认为它们在基因多样性和分子系统发育树上的这种差别可能是由其独特发育史或者其他生物学因素(如传播潜力)造成,也可能是由其他的生态学因素(如首选栖息地)造成的。同时,从表 2 中我们也可以看出,西太平洋和西印度洋群体的基因多样性在地理位置上有从西向东逐步增加的趋势,这与 Benzie 等^[25]发现澳大利亚西海岸的斑节对虾 mtDNA 多样性较东海岸群体低的趋势相一致。基因多样性之间的差异可以归咎于种群地理位置的差异,过渡捕捞,人类的生产活动等因素也可能引起这种差异。

参考文献:

- [1] 刘建勇,傅学丽. 斑节对虾室内育苗与室外育苗的比较[J]. 水产养殖,2002,3:3-5.
- [2] 梁广耀. 斑节对虾疾病及防治技术[J]. 水产养殖,1996,1:13-14.
- [3] 方民杰,杜琦,林丽亚,等. 斑节对虾工厂化健康养殖试验[J]. 福建水产,2004,25(2):41-44.
- [4] 陈木,周宸,林克冰,等. 斑节对虾防病养殖模式的研究[J]. 中山大学学报(自然科学版),2000,39(3):16-19.
- [5] 谭树华,王桂忠,艾春香,等. 斑节对虾养殖群体遗传多样性的同工酶和 RAPD 分析[J]. 中国水产科

- 学,2005,12(06):702-707.
- [6] 邹志华,黎中宝.斑节对虾等位酶遗传分析[J].水产养殖,2002,6:31-33.
- [7] 沈琪,任春华,胡超群,等.凡纳对虾、细角对虾和斑节对虾的RAPD鉴定标记[J].热带海洋学报,2002,21(4):45-48.
- [8] 杜晓东,秦红贵,黄荣莲,等.斑节对虾两个种群生化遗传变异的研究[J].海洋科学,2004,28(6):32-36.
- [9] 姜永杰,周发林,黄建华,等.深圳海域斑节对虾野生种群线粒体控制区序列的多态性研究[J].南方水产,2006,2(1):54-57.
- [10] 周发林,江世贵,姜永杰,等.海南三亚斑节对虾野生种群mtDNA 16S rRNA基因和控制区序列的多态性[J].南方水产,2006,6(2):13-18.
- [11] Sugama K, Haryanti, Benzie J A H, *et al.* Genetic variation and population structure of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, in Indonesia [J]. Aquaculture, 2002; 37-48.
- [12] Tassanakajon A, Tiptawonnukul A, Supungul P, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon* [J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1998, 7(1): 55-61.
- [13] Tassanakajon A, Pongsomboon S, Jarayabhand P, *et al.* Genetic structure in wild populations of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using randomly amplified polymorphic DNA analysis [J]. Marine Biotechnology, 1998, 6(4): 249-254.
- [14] Supungul P, Sootanan P, Klinbunga S, *et al.* Microsatellite polymorphism and the population structure of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand [J]. Marine Biotechnology, 2000, 2(4): 339-347.
- [15] Pan Y W, Chou H H, You E M, *et al.* Isolation and characterization of 23 polymorphic microsatellite markers for diversity and stock analysis in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Molecular Ecology Notes, 2004, 4: 345-347.
- [16] Duda T F, Palumbi S R. Population structure of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, among western Indian Ocean and western Pacific populations [J]. Marine Biology, 1999, 134: 705-710.
- [17] Wuthisuthimethaveea S, Lumubol P, Vanavichit A, *et al.* Development of microsatellite markers in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) [J]. Aquaculture, 2003, 224: 39-50.
- [18] Xu Z, Primavera J H, Pena L D, *et al.* Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites [J]. Aquaculture, 2001, 199: 13-40.
- [19] Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products [J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19: 1154.
- [20] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguer X, *et al.* DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. Bioinformatics, 2003, 19(18):2496-2497.
- [21] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. ARLEQUIN, Version 2: a Software for Population Genetics Data Analysis [M]. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 2000
- [22] Nei M. Evolution of human races at the gene level [M]// Bonne2 Tamir B, Cohen T, Goodman RM ed. Human Genetics, Part A: The Unfolding Genome. New York: Alan R. Liss, 1982: 167-181.
- [23] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data [J]. Genetics, 1992, 131: 479-497.
- [24] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, *et al.* MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software [J]. Bioinformatics, 2001, 17(12): 1244-1245.
- [25] Benzie J A H, Ballment E, Frusher S. Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: concordant results from mtDNA and allozymes [J]. Aquaculture, 1993, 111: 89-93.

Population structure of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, among the south China Sea, western Pacific and western Indian Ocean populations

XIONG Xiao-fei^{1,2}, JIANG Shi-gui¹, XIA Jun-hong¹, SU Tian-feng¹, GONG Shi-yuan²
(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
2. Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Polymerase chain reaction (PCR) technique was used to amplify the elongation factor 1- α intron sequences region for 95 wild individuals of *Penaeus monodon* caught from sea waters of Sanya of Hainan, Shenzhen, Zhanjiang and Beihai in the south China Sea. The PCR products were cloned. The electropositive cloned products were sequenced. As a result, about 216 bp nucleotide sequences that could be analysed were obtained (the primer and some of the marginal sequences were excluded). The nucleotide sequences of the black tiger prawn from China combined with the sequences of the western Indian Ocean and western Pacific populations (from Genbank) were analysed. By using Clustal X to align and compare the sequences of the 207 individuals with each other, 188 variation sites were observed, of which there were 67 insertion sites or deletions, and 121 polymorphic sites. 89 haplotypes were detected from the elongation factor 1- α intron sequences, the Haplod diversity (H_d) was 0.975. The results showed that gene diversity of the China population was minimum, gene diversity of the western Indian Ocean population was the greatest. By analyzing population pairwise F_{ST} -valules, it indicated very strong differentiation between populations from the western Pacific Ocean and western Indian Ocean ($P < 0.001$), this differentiation was also detected among the south China Sea, western Indian Ocean and western Pacific populations. In the molecular phylogenetic tree constructed by the method of UPGMA, the western Pacific Ocean and China populations aggregated into a branch, the western Indian Ocean population aggregated another branch. Judged by sequence difference analysis, the distance related between the China and western Indian population was farther than the distance related between China and western Pacific population; among four populations of the south China Sea, Beihai population was more distantly related with Shenzhen, Hainan and Zhanjiang populations, while Shenzhen, Zhanjiang and Hainan populations were more closely related.

Key words: *Penaeus monodon*; elongation factor 1- α intron sequence; population structure; genetic diversity