

## 用微卫星标记分析不同形态变异类型 日本囊对虾的遗传多样性

何永琴, 苏永全, 毛勇, 王军\*

(厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 选用9个多态性微卫星分子标记,分析我国近海浙江舟山(ZS)、福建厦门(XM)、广东惠来(HLQ及HLB)、海南陵水(LS)及广西北海(BH)日本囊对虾6个群体2种形态变异类型群体间的遗传变异,探讨了日本囊对虾的种质资源状况。结果显示,9个位点在6个日本囊对虾群体中均为高度多态( $PIC > 0.5$ ),共检测出235个等位基因;6个群体平均等位基因数在13.2~17.7; $PIC$ 平均值在0.8512~0.9035;平均观测杂合度( $H_o$ ) 在0.7296~0.7889,平均期望杂合度( $H_e$ ) 在0.8805~0.9251;表明群体遗传多样性水平较高。Hardy-Weinberg平衡检测显示,6个群体普遍存在杂合子缺失现象。分子变异方差分析(AMOVA)结果表明,遗传变异6.94%来自群体间,93.06%来自群体内。由ZS、XM和HLQ群体组成的形态变异类型I与由HLB、LS和BH群体组成的形态变异类型II之间的 $F_{st}$ 均大于0.05,发生了中等程度的遗传分化;相同形态变异类型各群体间的 $F_{st}$ 均小于0.05,遗传分化不明显。日本囊对虾群体间的遗传距离( $D_A$ )为0.1785~0.6218;UPGMA聚类分析表明,聚类关系符合距离隔离模式,BH群体和LS群体遗传距离最小,亲缘关系最近,它们首先聚在一起,然后与HLB群体聚为一支;XM群体和HLQ群体先聚在一起,再与ZS群体聚为另一支。

**关键词:** 日本囊对虾;不同形态变异类型;微卫星标记;遗传多样性

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)是我国重要的经济养殖虾类。近年来,疾病暴发,过度捕捞,环境污染等因素导致其种质资源不断衰竭<sup>[1]</sup>。日本囊对虾广泛分布于印度、澳大利亚、红海、坦桑尼亚、菲律宾到日本的东南沿海海域。Tsoi等<sup>[2]</sup>根据日本囊对虾头胸甲花纹的不同,将其分为2个形态变异类型,头胸甲侧面的花纹延伸至头部腹面的为形态变异类型I(variety I),延伸至头胸甲侧面中部的为形态变异类型II(variety II)。

随后,Tsoi等<sup>[3]</sup>利用2个微卫星分子标记分析了西太平洋海域及地中海海域2个形态变异类型日本囊对虾的遗传多样性。郭慧等<sup>[4]</sup>和栾生<sup>[5]</sup>分别对我国东南沿海日本囊对虾的遗传多样性进行了分析,但均没有涉及2个形态变异类

型之间的遗传差异。本实验以浙江舟山(ZS)、福建厦门(XM)、广东惠来(HLQ和HLB)、海南陵水(LS)及广西北海(BH)6个群体日本囊对虾为实验对象,用9对微卫星引物对我国东南沿海日本囊对虾野生群体的遗传结构和群体分化特征进行分析。一方面是对已有的研究结果进行补充,进一步探讨日本囊对虾种的分化和变异程度,为日本囊对虾种或亚种的界定提供依据;另一方面也为我国近海日本囊对虾野生群体的遗传多样性评估、种质资源的保护开发和利用、养殖群体的种质改良和良种选育提供相关信息和理论依据。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 实验材料

以浙江舟山、福建厦门、广东惠来、海南陵水及

收稿日期:2012-03-07 修回日期:2012-07-05

资助项目:现代农业产业技术体系建设专项(CARS-47);国家“八六三”高新技术研究发展计划(2012AA10A409)

通讯作者:王军,E-mail: junw@xmu.edu.cn

广西北海 6 个地理群体的日本囊对虾为实验对象, 采样地点见图 1。根据 Tsoi 等<sup>[2]</sup>的研究结果发现采集的样本中, 舟山(ZS, 30 尾)和厦门(XM, 30 尾)群体所有对虾头胸甲花纹都延伸至头部腹部, 均为形态变异类型 I; 陵水(LS, 33 尾)和北海(BH, 30 尾)群体所有对虾头胸甲花纹都延伸至头胸甲侧面中部, 均为形态变异类型 II; 惠来群体头胸甲花纹延伸至头部腹部(HLQ)及延伸至头胸甲侧面中部(HLB)的日本囊对虾各 32 尾, 分别为形态变异类型 I 和形态变异类型 II。

### 1.2 DNA 的提取

采用试剂盒提取法提取基因组 DNA, 试剂盒由碧云天生物技术有限公司提供。从提取的 DNA 产物中, 取 4  $\mu\text{L}$  的 DNA 经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 剩下的 DNA 产物置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  中保存备用。

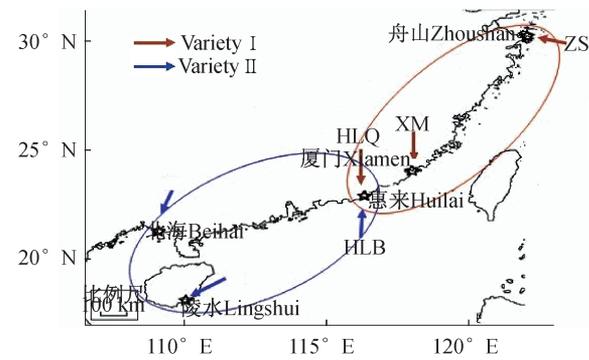


图 1 采样点地理位置

Fig. 1 Sampling sites

### 1.3 多态性检测

采用 Moore 等<sup>[6]</sup>开发的 12 对 SSR 引物进行等位基因的扩增, 筛选其中多态性较好的 9 对引物用于本实验的研究(表 1)。

表 1 9 对微卫星引物及其退火温度

Tab. 1 Sequences of 9 microsatellite markers and their specific annealing temperature (AT) of PCR

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence	重复序列 repeat motif	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ annealing temperature
CSPJ002	F: CTC TTT TCA TTT CGG ATA CTC R: CGA TGT GAA CTA TCT CAG AGG	(GA) <sub>22</sub>	55
CSPJ003	F: ACC ACC ATG ACA AAA TTT GTA AC R: GGC TTC ATG ATC AGG ACT TTC	(GAA) <sub>15</sub>	55
CSPJ005	F: AGG TTC ATA CTC CCT AAC CC R: GGC TAT CAG GAA GAG TGG AG	(CTG) <sub>10</sub> (CTT) <sub>24</sub>	52
CSPJ008	F: GTA GAC GAA GTA AAC CCT TCC C R: GCA TTT GTC TTT GGT CGA TTG	(CA) <sub>8</sub> TA(CA) <sub>14</sub> TA(CA) <sub>6</sub> CT(CA) <sub>2</sub>	55
CSPJ010	F: TTC TCC CTC TCC TTT CCA CC R: TGT GAC GCA CTG TCA TCA AAG	(GAA) <sub>14</sub> GCA(GAA) <sub>2</sub>	52
CSPJ011	F: GCA GCT ATG AAC AAC ACT ATT C R: GAC AGA TTG ATT GAG AAC GTG	G(A) <sub>5</sub> (GAA) <sub>9</sub> GAG(A) <sub>8</sub>	52
CSPJ012	F: CGG CAT CGT GTC TTT CCA TTA GG R: ACA GCG AGT TCG AGG CAT CTA TG	(CTT) <sub>2</sub> CCT(CTT) <sub>9</sub> CAT(CTT) <sub>2</sub>	55
CSPJ014	F: CAC CCA AAG TGA ACA CCA AG R: CAT GTT TTC TAG CCC TTC GG	GAAAA(GAA) <sub>10</sub> GAAAA	55
CSPJ015	F: CCC TGG TTT CTC CGT CTC TC R: GAT TTG CAT ATC CGC ATG AG	(CTT) <sub>12</sub>	55

PCR 扩增采用 25  $\mu\text{L}$  的反应体系: 含基因组 DNA 2  $\mu\text{L}$  (约 100 ng), 10  $\times$  PCR 缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ , 正反向引物 (10 pmol/L) 各 2  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L 的 dNTP 混合液 0.5  $\mu\text{L}$ , (2.5 U/ $\mu\text{L}$ ) *Taq* DNA 聚合酶 0.4  $\mu\text{L}$ , 去离子水 15.6  $\mu\text{L}$ 。

PCR 反应程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min; 50 ~ 60  $^{\circ}\text{C}$  (根据引物的退火温度进行调

整) 退火 1 min; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min; 27 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。

PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染, 显影。利用 Gelpro 4.0 软件包分析每个扩增条带的大小, 将不同大小的条带作为基因座位的 1 个等位基因。

#### 1.4 统计分析

多态信息含量( $PIC$ )、等位基因频率( $P_i$ )、多态位点百分比、观测杂合度( $H_o$ )和期望杂合度( $H_e$ )的计算通过 MS-TOOL 软件完成; Genepop 4.0 计算近交系数( $F_{is}$ )和群体间遗传分化指数( $F_{st}$ ); Population 1.2.30 计算群体间的遗传距离( $D_A$ ); Arlequin 3.5.1.2 计算等位基因数目( $N_a$ )、Hardy-Weinberg 平衡检验( $P$ 值)及进行分子方差分析(AMOVA); MEGA 4.0 软件构建 UPGMA 聚类图。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增结果

度量群体遗传变异大小的一个重要指标是总等位基因数,它反映了基因座等位基因间的相互作用。用筛选出的 9 对微卫星引物对日本囊对虾 6 个地理群体进行 PCR 扩增,均能扩增出相应的产物(图 2),多态位点百分比为 100%。9 个基因座位共检测出 235 个等位基因,平均每个位点检测出 26.1 个等位基因。9 个微卫星位点等位基因数为 16~39,其中 CSPJ008 获得 39 个等位基因,等位基因数最多; CSPJ15 获得 16 个等位基因,等位基因数最少。

9 个位点的  $PIC$  介于 0.870 6~0.966 1,其中 CSPJ08 位点最高, CSPJ15 位点最低,均大于 0.5,为高度多态位点,表明这些位点均能够在分子水平上准确反映出各地理群体间和群体内的遗传关系,可用于遗传多样性分析。

### 2.2 群体的遗传多样性分析

通过对 6 个日本囊对虾群体在 9 个微卫星基因座上的等位基因频率统计结果,计算了各群体的遗传多样性指标(表 2)。不同群体同一微卫星位点的等位基因数  $N_a$  存在差别,6 个群体的平均等位基因数为 13.2~17.7,以 HLQ 群体最高(17.7),BH 群体最低(13.2)。

6 个群体的  $PIC$  平均值均大于 0.5,其中 HLQ 群体的  $PIC$  最高(0.903 5),BH 群体最低(0.851 2),均为高度多态性。平均观测杂合度( $H_o$ )为 0.729 6~0.788 9, BH 群体最高(0.788 9),XM 群体最低(0.729 6)。平均期望杂合度( $H_e$ )HLQ 群体最高(0.925 1),BH 群体最低(0.880 5)。平均观察杂合度均小于平均期望杂合度,表明群体中普遍存在杂合子缺失情况,

可能是由于近交或自交所致。日本囊对虾各群体平均近交系数  $F_{is}$  为 0.101 7~0.188 2,平均杂合度的遗传偏离指数  $D$  值为 -0.189 3~-0.104 1,均表明 6 个群体都有不同程度的杂合子缺失状态。根据 H-W 平衡标准对 6 个日本囊对虾群体进行  $\chi^2$  检验的概率值( $P$ )的分析结果经过 Bonferroni 校正( $P < 0.005 6$ )后,每个群体都有位点不同程度的偏离 Hardy-Weinberg 平衡。经对 6 个群体共 54 个座位的分析发现,只有 30 个座位符合 Hardy-Weinberg 平衡( $P > 0.005 6$ ),有 23 个座位均由于杂合子缺失( $D < 0, F_{is} > 0$ )导致偏离 Hardy-Weinberg 平衡( $P < 0.005 6$ )。

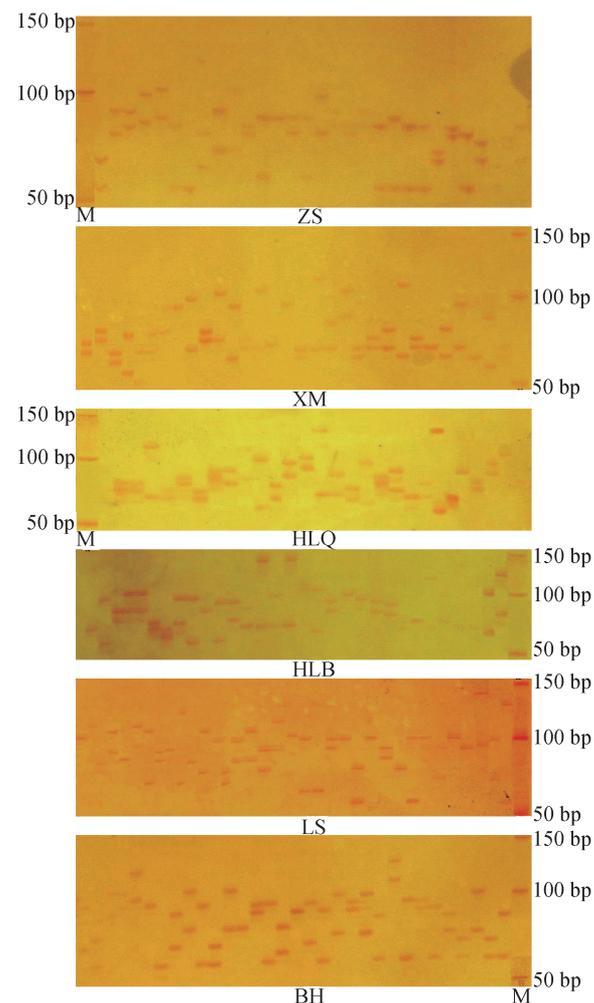


图 2 日本囊对虾 6 个群体在位点 CSPJ010 的扩增图谱  
Fig. 2 Demonstration of microsatellite alleles amplified by CSPJ010 primer pairs in the six stocks of *M. japonicus*

M. 50 bp DNA ladder marker.

表 2 9 对微卫星位点在日本囊对虾 6 个地理群体的遗传特性  
 Tab. 2 Genetic characters of 9 microsatellite loci in 6 stocks of *M. japonicus*

位点 locus	参数 parameter	舟山 ZS	厦门 XM	惠来( I ) HLQ	惠来( II ) HLB	陵水 LS	北海 BH	平均值 mean	所有群体 all populations
CSPJ002	$N_a$	17	16	20	20	19	17	18.2	31
	$H_o$	0.933 3	0.600 0	0.812 5	0.812 5	0.878 8	0.866 7	0.817 3	0.818 2
	$H_e$	0.929 9	0.935 0	0.946 4	0.928 1	0.944 5	0.927 7	0.935 3	0.956 6
	$PIC$	0.908 2	0.913 7	0.927 5	0.907 5	0.926 0	0.905 7	0.914 8	0.952 1
	$F_{is}$	-0.003 7	0.362 3	0.143 5	0.126 3	0.070 6	0.066 8	0.127 6	0.127 2
	$P$	0.164 3	0.000 0**	0.000 0**	0.108 4	0.222 4	0.142 2		
	$D$	0.003 6	-0.358 3	-0.141 5	-0.124 5	-0.069 6	-0.065 8	-0.126 0	-0.144 7
CSPJ003	$N_a$	17	13	15	14	11	10	13.3	23
	$H_o$	0.433 3	0.800 0	0.718 8	0.781 3	0.757 6	0.833 3	0.720 7	0.721 9
	$H_e$	0.930 5	0.913 0	0.895 8	0.908 2	0.901 2	0.878 5	0.904 5	0.940 6
	$PIC$	0.909 0	0.888 7	0.871 1	0.885 1	0.876 6	0.849 1	0.879 9	0.934 6
	$F_{is}$	0.538 6	0.125 6	0.200 2	0.141 8	0.161 4	0.052 3	0.203 3	0.204 5
	$P$	0.000 0**	0.022 4	0.002 4**	0.005 1**	0.013 1	0.337 2		
	$D$	-0.534 3	-0.123 8	-0.197 7	-0.139 8	-0.159 3	-0.051 4	-0.201 1	-0.232 5
CSPJ005	$N_a$	21	21	28	18	19	16	20.5	34
	$H_o$	0.800 0	0.866 7	0.718 8	0.968 8	0.848 5	0.700 0	0.817 1	0.818 2
	$H_e$	0.911 9	0.948 0	0.964 3	0.925 6	0.930 5	0.917 5	0.933 0	0.962 9
	$PIC$	0.889 4	0.928 2	0.946 9	0.904 9	0.910 9	0.894 3	0.912 4	0.958 8
	$F_{is}$	0.124 5	0.087 2	0.257 7	-0.047 4	0.089 4	0.240 2	0.125 3	0.125 0
	$P$	0.018 6	0.059 7	0.002 9**	0.064 5	0.155 8	0.000 5**		
	$D$	-0.122 7	-0.085 8	-0.254 6	0.046 6	-0.088 2	-0.237 1	-0.123 6	-0.150 3
CSPJ008	$N_a$	23	23	18	23	23	21	21.8	39
	$H_o$	0.533 3	0.600 0	0.312 5	0.687 5	0.787 9	0.666 7	0.598 0	0.598 9
	$H_e$	0.952 5	0.950 8	0.947 4	0.952 9	0.949 7	0.958 8	0.952 0	0.969 7
	$PIC$	0.933 1	0.931 6	0.928 5	0.934 6	0.931 6	0.939 7	0.933 2	0.966 1
	$F_{is}$	0.444 3	0.373 0	0.673 7	0.281 7	0.172 6	0.308 3	0.375 6	0.374 7
	$P$	0.000 0**	0.000 0**	0.000 0**	0.005 9	0.039 0	0.000 0**		
	$D$	-0.440 1	-0.369 0	-0.670 2	-0.278 5	-0.170 3	-0.304 7	-0.372 1	-0.382 4
CSPJ010	$N_a$	13	16	21	17	19	14	16.7	27
	$H_o$	0.733 3	0.933 3	0.875 0	0.687 5	0.727 3	0.933 3	0.815 0	0.812 8
	$H_e$	0.846 3	0.855 4	0.944 4	0.919 6	0.938 0	0.893 2	0.899 5	0.944 1
	$PIC$	0.813 0	0.825 8	0.925 3	0.897 7	0.918 7	0.866 9	0.874 6	0.938 5
	$F_{is}$	0.135 5	-0.092 9	0.074 6	0.255 5	0.227 4	-0.045 7	0.092 4	0.099 2
	$P$	0.037 1	0.868 8	0.020 1	0.000 0**	0.076 9	0.079 4		
	$D$	-0.133 5	0.091 1	-0.073 5	-0.252 4	-0.224 7	0.044 9	-0.091 3	-0.139 0
CSPJ011	$N_a$	15	16	16	15	12	12	14.3	23
	$H_o$	0.766 7	0.533 3	0.750 0	0.625 0	0.727 3	0.966 7	0.728 2	0.727 3
	$H_e$	0.914 1	0.923 2	0.934 0	0.913 2	0.840 1	0.866 1	0.898 5	0.929 3
	$PIC$	0.890 6	0.900 5	0.913 7	0.890 4	0.807 8	0.835 8	0.873 1	0.922 3
	$F_{is}$	0.163 6	0.426 5	0.199 6	0.319 1	0.136 1	-0.118 4	0.187 7	0.192 7
	$P$	0.009 0	0.000 0**	0.000 0**	0.000 0**	0.154 7	0.151 4		
	$D$	-0.161 3	-0.422 3	-0.197 0	-0.315 6	-0.134 3	0.116 1	-0.185 7	-0.217 4

续表 2

位点 locus	参数 parameter	舟山 ZS	厦门 XM	惠来(I) HLQ	惠来(II) HLB	陵水 LS	北海 BH	平均值 mean	所有群体 all populations
CSPJ012	$N_a$	17	22	20	14	11	14	16.3	25
	$H_o$	0.766 7	0.733 3	0.875 0	0.875 0	0.727 3	0.833 3	0.801 8	0.802 1
	$H_e$	0.929 9	0.942 4	0.924 1	0.901 3	0.859 2	0.863 8	0.903 5	0.941 9
	$PIC$	0.908 2	0.922 2	0.904 0	0.876 6	0.829 2	0.832 8	0.878 8	0.936 1
	$F_{is}$	0.178 1	0.200 0	0.054 0	0.029 6	0.155 6	0.035 9	0.108 9	0.108 6
	$P$	0.022 4	0.001 9**	0.188 3	0.000 0**	0.073 7	0.328 9		
	$D$	-0.175 6	-0.221 8	-0.053 1	-0.029 2	-0.153 6	-0.035 3	-0.111 4	-0.148 4
CSPJ014	$N_a$	7	8	11	9	10	9	9.0	17
	$H_o$	0.933 3	0.766 7	0.750 0	0.812 5	0.545 5	0.533 3	0.723 5	0.721 9
	$H_e$	0.738 4	0.824 3	0.893 8	0.877 5	0.869 9	0.856 5	0.843 4	0.904 2
	$PIC$	0.681 5	0.784 2	0.867 9	0.848 4	0.840 3	0.823 0	0.807 6	0.893 4
	$F_{is}$	-0.269 7	0.071 0	0.163 1	0.075 2	0.376 6	0.381 3	0.132 9	0.147 5
	$P$	0.004 2**	0.008 9	0.467 6	0.131 4	0.000 0**	0.000 0**		
	$D$	0.264 0	-0.069 9	-0.160 9	-0.074 1	-0.373 0	-0.377 3	-0.131 9	-0.201 6
CSPJ015	$N_a$	8	7	10	11	7	6	8.2	16
	$H_o$	0.866 7	0.733 3	0.937 5	0.812 5	0.969 7	0.766 7	0.847 7	0.850 3
	$H_e$	0.805 6	0.748 0	0.875 5	0.829 4	0.745 5	0.762 7	0.794 4	0.884 1
	$PIC$	0.764 6	0.702 7	0.846 4	0.793 6	0.691 7	0.713 1	0.752 0	0.870 6
	$F_{is}$	-0.077 1	0.020 0	-0.072 1	0.020 7	-0.307 0	-0.005 3	-0.070 1	-0.070 9
	$P$	0.006 1	0.930 4	0.000 0**	0.004 1**	0.002 2**	0.000 7**		
	$D$	0.075 7	-0.019 6	0.070 8	-0.020 3	0.300 8	0.005 2	0.068 8	-0.038 2
Mean	$N_a$	15.3	15.8	17.7	15.7	14.6	13.2	15.4	26.1
	$H_o$	0.751 9	0.729 6	0.750 0	0.784 7	0.774 4	0.788 9	0.763 3	0.763 5
	$H_e$	0.884 4	0.893 3	0.925 1	0.906 2	0.886 5	0.880 5	0.896 0	0.937 0
	$PIC$	0.855 3	0.866 4	0.903 5	0.882 1	0.859 2	0.851 2	0.869 6	0.930 3
	$F_{is}$	0.137 1	0.174 7	0.188 2	0.133 6	0.120 3	0.101 7	0.142 6	0.145 4
	$D$	-0.149 8	-0.183 3	-0.189 3	-0.134 0	-0.126 4	-0.104 1	-0.148 2	-0.185 2

注: \* 为经 Bonferroni 校正后仍显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡; \*\* 为经 Bonferroni 校正后仍极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。

Notes: \* means the loci still showed significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction; \*\* means the loci still showed extremely significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction.

### 2.3 群体变异分析

由于惠来群体兼有形态变异类型 I 和形态变异类型 II, 因此将 2 个形态变异类型分别作为一个群体(HLQ 和 HLB), 探讨不同形态变异类型之间的遗传分化。Genepop 4.0 分析得出日本囊对虾 6 个地理群体间的遗传分化指数  $F_{st}$  值(表 3)。从  $F_{st}$  值的大小可以看出, HLB 和 LS 群体间的  $F_{st}$  最小( $F_{st} = 0.010 6$ ), 遗传分化最弱; BH 和 LS 群体间的  $F_{st}$  次之( $F_{st} = 0.011 8$ ); ZS 和 BH 群体间的  $F_{st}$  最大( $F_{st} = 0.091 1$ ), 遗传分化最明显。另外, 不同形态变异类型群体间(形态变异类型 I: ZS、XM 和 HLQ 群体; 形态变异类型 II: HLB、LS 和 BH 群体)的  $F_{st}$  均大于 0.05, 发生了中等程

度的遗传分化; 相同形态变异类型各群体间的  $F_{st}$  均小于 0.05, 遗传分化不明显。从变异的贡献率来看, 有 93.06% 的遗传变异是来自个体间, 只有 6.94% 的变异是来自群体间(表 4)。

根据 Nei 等<sup>[7]</sup>的方法计算 6 个地理群体间的遗传距离( $D_A$ )(表 5), 结果表明 ZS 和 BH 群体间的遗传距离最大(0.621 8), LS 与 BH 遗传距离最小(0.178 5)。根据  $D_A$  遗传距离采用 UPGMA 聚类分析(图 3)显示, BH 群体和 LS 群体遗传距离最小, 亲缘关系最近, 它们首先聚在一起, 然后与 HLB 群体聚为一支; XM 群体和 HLQ 群体先聚在一起, 再与 ZS 群体聚为另一支。

表 3 日本囊对虾群体间的遗传分化指数  $F_{st}$   
Tab.3 The pair-wise genetic differentiation ( $F_{st}$ ) of 6 stocks of *M. japonicus*

群体 stock	ZS	XM	HLQ	HLB	LS	BH
ZS						
XM	0.029 7					
HLQ	0.038 3	0.019 2				
HLB	0.070 8	0.058 6	0.051 7			
LS	0.080 8	0.068 3	0.054 8	0.010 6		
BH	0.091 1	0.073 9	0.057 7	0.017 9	0.011 8	

注:ZS 为舟山群体, XM 为厦门群体, HLQ 为惠来形态变异类型 I 群体, HLB 为形态变异类型 II 群体, LS 为陵水群体, BH 为北海群体。以下同此。

Notes: ZS was abbreviated from Zhoushan stock in Zhejiang province, XM was abbreviated from Xiamen stock in Fujian province, HLQ and HLB were abbreviated respectively from variety I and variety II stock in Huilai, Guangdong province, LS was abbreviated from Lingshui stock in Hainan province and BH was abbreviated from Beihai stock in Guangxi province. The same as the following.

表 4 日本囊对虾 6 个地理群体的遗传变异组分分析  
Tab.4 AMOVA analysis among 6 stocks of *M. japonicus*

变异来源 source of variation	方差总和 sum of variation squares	变异组分 variance components	变异贡献率 variation percentage
组间 among groups	48.136	0.203 36	4.69
组内群体间 among stocks within groups	40.43	0.097 51	2.25
群体内 within stocks	1 484.242	4.033 27	93.06
总计 total	1 572.807	4.334 13	

表 5 6 个日本囊对虾群体的遗传距离

Tab.5 Genetic distances on 6 stocks of *M. japonicus*

群体 stock	ZS	XM	HLQ	HLB	LS	BH
ZS						
XM	0.268 9					
HLQ	0.332 4	0.195 3				
HLB	0.568 9	0.499 1	0.523 1			
LS	0.570 3	0.502 2	0.501 3	0.191 4		
BH	0.621 8	0.517 8	0.516 6	0.212 6	0.178 5	

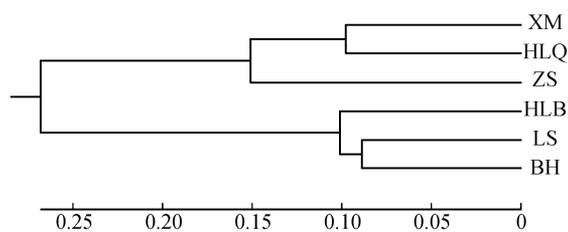


图 3 基于  $D_A$  遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig.3 UPGMA clustering tree based on  $D_A$  genetic distance

### 3 讨论

#### 3.1 群体遗传多样性

本研究中的 9 个微卫星位点的  $PIC$  都大于 0.5, 均为高度多态位点。9 个位点对 6 个地理群体日本囊对虾进行遗传分析, 共得到 235 个等位基因, 平均每个位点获得 26.1 个等位基因, 每个位点检测到的等位基因数为 16 ~ 39 个。6 个群体的  $PIC$  为 0.851 2 ~ 0.903 5, 平均观测杂合度 ( $H_o$ ) 为 0.729 6 ~ 0.788 9, 平均期望杂合度 ( $H_e$ ) 为 0.880 5 ~ 0.925 1, 由此表明, 6 个日本囊对野生群体的遗传多样性丰富。这与 Tsoi 等<sup>[3]</sup> 报道西太平洋日本囊对虾种复合体遗传多样性很高的结果相符。原因可能有二, 一是所采的日本囊对虾样品并不属一个单系种, Tsoi 等<sup>[2]</sup> 报道日本囊对虾存在 2 个形态相似的形态变异类型 (形态变异类型 I 和形态变异类型 II), 本研究中的 ZS、XM 和 HLQ 群体属于形态变异类型 I, HLB、LS 和 BH 群体属于形态变异类型 II; 二是 Hewitt<sup>[8]</sup> 认为当温度大幅度地迅速升降时, 由于受群体的收缩和迁移扩散的影响, 处于物种分布区南北两边缘的群体的遗传多样性损失最高。日本囊对虾从澳大利亚海域到日本海域均有分布, 中国东南沿海处于相对中部的的位置可能使得该海域日本囊对虾在第四纪以来的全球性冰期气候波动中受到的影响相对较小, 因此可以保留较高的遗传多样性<sup>[9]</sup>。相比栾生<sup>[5]</sup> ( $N_a = 6 \sim 23$ ,  $PIC = 0.71 \sim 0.81$ ,  $H_o = 0.372 3 \sim 0.505 5$ ,  $H_e = 0.744 1 \sim 0.826 3$ ) 及郭慧等<sup>[4]</sup> ( $N_a = 3 \sim 5$ ,  $PIC = 0.556 9 \sim 0.650 7$ ,  $H_o = 0.466 1 \sim 0.624 3$ ,  $H_e = 0.618 9 \sim 0.719 3$ ) 的研究结果, 本研究中的群体表现出更丰富的遗传多样性, 原因可能与本实验检测样品数更多及所采用的微卫星位点具有更丰富的多态性有关。在相关的对虾科微卫星遗传变异分析中, 检测到得微卫星位点等位基因数都相对较高。栾生<sup>[5]</sup> 统计过, 泰国、澳大利亚和菲律宾的斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 遗传多样性的微卫星分析表明, 每个位点能够检测到得等位基因范围分别为 6 ~ 54、14 ~ 28、34 ~ 84; 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 微卫星分析中检测到的等位基因数的变化范围为 21 ~ 47。Wolfus 等<sup>[10]</sup> 使用一对微卫星标记对来自不同地区的 5 个凡纳滨对虾群体共 312 个个体进行了遗传分析, 共得

到47个等位基因。Supungul等<sup>[11]</sup>用5对微卫星引物对5个地理位置斑节对虾的遗传多样性进行了分析,每个位点的等位基因为19~30。冯建彬等<sup>[12]</sup>用12对微卫星引物对吴江、滨湖、宜兴和吴兴4个群体的日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)的遗传多样性进行了分析,每个位点获得的等位基因范围在16~46。这表明,在对虾中,微卫星位点可能具有较高的进化速率,因此能迅速积累相当丰富的遗传变异。由此可见,微卫星标记是虾类遗传多样性研究中有效的工具。

### 3.2 Hardy-Weinberg 平衡

本研究中,Hardy-Weinberg平衡分析显示,所有位点经Bonferroni校正( $P < 0.0056$ )后,仍有42.6%的日本囊对虾位点表现为显著偏离Hardy-Weinberg平衡。同时,81.5%的群体位点的遗传偏离指数 $D$ 小于0,近交系数 $F_{is}$ 大于0,说明群体中普遍存在杂合子缺失现象。但是,6个群体的杂合度很高,含有的多态位点仍较丰富。造成这种现象的原因,我们认为可能是当前日本囊对虾的野生资源已受人工增殖放流、过渡捕捞,环境污染等人为因素的破坏,造成了群体中大量杂合子缺失的现象,虽然群体中仍存在较多的等位基因,但群体的遗传结构已经比较脆弱。因此,日本囊对虾种质资源保护迫在眉睫,如果不及及时地加以保护,日本囊对虾种质资源将面临巨大的威胁。再者,人工繁育养殖品种的逃逸等也可能影响野生群体遗传结构。

### 3.3 群体间遗传分化

遗传分化指数 $F_{st}$ 是间接评价群体间遗传分化状况的重要参数, $F_{st}$ 在0~0.05时,群体间无显著分化; $F_{st}$ 在0.05~0.15时,群体间分化程度中等<sup>[13]</sup>。本研究中,BH和LS群体间的 $F_{st}$ 最小( $F_{st} = 0.0118$ ),遗传分化不显著;ZS和BH群体间的 $F_{st}$ 最大( $F_{st} = 0.0911$ ),发生中等程度遗传分化;以广东惠来为界,南北海域的日本囊对虾群体间(即不同形态变异类型群体间)存在中等程度的分化( $0.05 < F_{st} < 0.15$ ),而同处于南方海域(形态变异类型I)或北方海域(形态变异类型II)的不同地理群体具有相似的遗传结构,群体间无明显的遗传分化( $F_{st} < 0.05$ )。分子变异方差分析(AMOVA)结果表明,遗传变异只有小部分(5.94%)来自群体间,绝大部分(94.06%)来自群体内。

Tsoi等<sup>[2-3]</sup>根据日本囊对虾头胸甲花纹类型的不同将日本囊对虾分为2个形态变异类型(I和II),形态变异类型I主要分布在日本海、中国东海和南海北部,而形态变异类型II则广泛分布于东南亚、地中海和澳大利亚,这2种形态变异个体在形态上无显著差异,但在基因上存在一定差异,并综合一系列生物地理学、分类学知识建议将2种形态变异体定为日本囊对虾的2个亚种。本实验所研究的6个群体,ZS、XM和HLQ群体属于形态变异类型I,HLB、BH和LS群体属于形态变异类型II。曾凡荣等<sup>[14]</sup>结合Cyt b和CO I 2个基因片段分析了福建厦门、广东惠来、海南陵水和广西北海等4个地理群体的遗传结构和群体分化,发现日本囊对虾4个群体存在较大的遗传分化,NJ树聚类情况和单倍型网络图谱均显示厦门群体与部分惠来群体聚为1支,其他群体聚为另1支,这2个类群的遗传距离为5.17%(Cyt b)和6.92%(CO I),分化接近亚种水平,因此建议将我国东南沿海的日本囊对虾分为2个种群,2个种群的分布区域在广东惠来海域附近存在重叠。本实验所研究的6个群体中的2个分化类群的地理分布与Tsoi等<sup>[2]</sup>的2个类型相吻合,且以广东惠来为界,南北海域的日本囊对虾群体间存在中等程度的分化。另外,日本囊对虾6个群体的聚类关系与曾凡荣等<sup>[14]</sup>的研究结果基本符合,也与它们各自地理位置的远近基本相吻合,即符合距离隔离模型。由于日本囊对虾属于暖水种,不具有长距离洄游习性,成体的迁移距离有限,幼体阶段随海流运动而扩散应是其基因流动的主要模式。因此,不同海域海流的特征与日本囊对虾群体的遗传结构密切相关。我国东南沿海的主要流系有南海暖流、黑潮暖流、南海沿岸流和浙闽沿岸流等<sup>[15]</sup>,这些交汇的海洋环流可能是造成ZS、XM和HLQ群体间的遗传分化不明显的主要原因。而HLB、BH和LS群体则可能在北部湾沿岸流、越南沿岸流和粤西沿岸流的影响下获得较强的基因交流。但2种形态变异体的分布以广东惠来为界,除了受地理隔离以外,南海东北部复杂的水系交汇特性<sup>[16-17]</sup>及珠江径流的影响<sup>[18]</sup>,也可能一方面阻止了部分来自舟山和厦门沿岸日本囊对虾沿海流扩散至陵水和北海海域,另一方面使南北海域的日本囊对虾种群在惠来海域附近出现重叠。同处惠来海域的两个形态变异类型间存在

中等程度的遗传分化,原因可能是尽管 2 个形态类型日本囊对虾群体生活在同一片海域,他们占据着不同的水域,两者之间可能存在一定的空间隔离,阻碍了彼此间的基因交流。今后的工作,应把重心放在日本囊对虾 2 个形态变异体间遗传变异产生机制的研究上,以期为本囊对虾种或亚种的划分提供更科学的理论依据。实践证明,HLB、BH 和 LS 群体(形态变异类型 II)日本囊对虾的生长较慢,个体较小,但是耐温性较好,ZS、XM 和 HLQ 群体(形态变异类型 I)的日本囊对虾生长较快,个体较大,但是耐温性不如 BH 和 LS 群体。若将日本囊对虾 2 个形态变异体进行杂交,杂交后代将有望出现生长快,个体大,耐高温等优良性状,这对今后日本囊对虾的杂交育种,良种选育具有重要的指导意义。

#### 参考文献:

- [1] 李玉龙. 中国明对虾和日本囊对虾遗传多样性及对虾科系统学初步研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2009.
- [2] Tsoi K H, Wang Z Y, Chu K H. Genetic divergence between two morphologically similar varieties of the kuruma shrimp *Penaeus japonicus* [J]. *Marine Biology*, 2005, 147(2): 367 - 379.
- [3] Tsoi K H, Wang Z Y, Chu K H. Molecular population structure of the kuruma shrimp *Penaeus japonicus* species complex in western Pacific [J]. *Marine Biology*, 2007, 150(6): 1345 - 1364.
- [4] 郭慧,申玉春. 三个野生群体日本囊对虾遗传多样性的 SSR 分析[J]. *生物技术通报*, 2011(3): 130 - 135.
- [5] 栾生. 日本囊对虾基因组串联重复序列分析及微卫星标记的开发与应用[D]. 青岛:中国海洋大学,2006.
- [6] Moore S S, Whan V, Davis G P, et al. The development and application of genetic markers for the kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Aquaculture*, 1999, 173(1): 19 - 32.
- [7] Nei M, Tajima F, Tatenno Y. Accuracy of estimated phylogenetic tree from molecular data[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1983, 19(2): 153 - 170.
- [8] Hewitt G M. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation [J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1996, 58(3): 247 - 276.
- [9] 张丽艳,苏永全,丁少雄,等. 福建近海蓝圆鲂种群遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *水产学报*, 2010, 34(5): 680 - 686.
- [10] Wolfus G M, Garcia D K, Alcivar-Warren A. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs [J]. *Aquaculture*, 1997, 152(1): 35 - 47.
- [11] 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.
- [12] 冯建彬,马克异,李家乐,等. 日本沼虾微卫星引物筛选及群体遗传多样性分析[J]. *水产学报*, 2010, 34(5): 688 - 695.
- [13] Wright S. *Evolution and the genetics of population* [M]. Chicago: The University of Chicago Press, 1978: 1 - 30.
- [14] 曾凡荣,王军,周孔霖,等. 基于线粒体 Cytb 基因探讨我国日本囊对虾 4 个地理群体的遗传结构及种群分化[J]. *厦门大学学报:自然科学版*, 2010, 49(5): 701 - 706.
- [15] 李乃胜,赵松龄,(俄)鲍·瓦西里耶夫. 西北太平洋边缘海地质[M]. 哈尔滨:黑龙江教育出版社, 2000: 53 - 56, 435 - 472.
- [16] 管秉贤. 南海暖流研究回顾[J]. *海洋与湖沼*, 1998, 29(3): 322 - 32.
- [17] 李立. 南海中尺度海洋现象研究概述[J]. *台湾海峡*, 2002, 21(2): 265 - 274.
- [18] 崔伟中. 珠江口水环境时空变异对河口生态系统的影响[J]. *水科学进展*, 2004, 15(4): 472 - 478.

## Genetic diversity analysis of microsatellite DNA in different varieties of *Marsupenaneus japonicus*

HE Yong-qin, SU Yong-quan, MAO Yong, WANG Jun\*

(College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** *Marsupenaneus japonicus* is one of the important species in shrimp fisheries and aquaculture in China. Two morphologically similar varieties ( I and II ) with distinct color banding patterns on the carapace are recognized from the South China Sea. In the present study, 9 pairs of microsatellite markers were used to detect the genetic diversities from two varieties of 6 wild stocks of *M. japonicus*, i. e. Zhoushan ( ZS ) stock in Zhejiang province, Xiamen ( XM ) stock in Fujian province, Huilai ( HLQ and HLB ) stock in Guangdong province, Lingshui ( LS ) stock in Hainan province and Beihai ( BH ) stock in Guangxi province. The results indicated: a total of 235 alleles were obtained from 9 markers in the 6 stocks. Polymorphic information content ( PIC ) value per locus was more than 0.5, indicating the 9 loci seemed highly polymorphic. Basic data statistics showed that the mean observed alleles in each stock were 13.2 – 17.7. The mean observed heterozygosity (  $H_o$  ) ranged from 0.7296 to 0.7889 and the mean expected heterozygosity (  $H_e$  ) ranged from 0.8805 to 0.9251. Average polymorphism information content ( PIC ) was 0.8512 – 0.9035, which explained high level of genetic diversity in 6 wild stocks. 42.6% of stock loci showed significant deviation from the Hardy-Weinberg balance, and there was heterozygosity deficiency in all stocks. The pair-wise genetic differentiation (  $F_{st}$  ) in 6 *M. japonicus* stocks ranged from 0.0118 to 0.0911, indicating significant genetic differentiation among the 6 stocks. Analysis of molecular variance ( AMOVA ) revealed that the variation within stocks was 93.06%, whereas the variation among stocks accounted for 6.94% of the total variation. The genetic distance among stocks ranged from 0.1785 to 0.6218. Cluster analysis based on  $D_A$  indicated that HLB, BH and LS stocks were clustered as one group while ZS, XM and HLQ were gathered in another group.

**Key words:** *Marsupenaneus japonicus*; different variety microsatellite; genetic diversity

**Corresponding author:** WANG Jun. E-mail: junw@xmu.edu.cn