

日本对虾养殖群体两个世代遗传结构的微卫星分析

胡龙洋^{1,2} 栾生¹ 毛勇³ 钟声平³ 孔杰^{1*}

(¹农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

(³厦门大学海洋与地球学院, 厦门 361005)

摘要 利用 8 对微卫星引物对日本对虾养殖群体两个世代的遗传结构进行了分析, 共检测到 108 个等位基因, 等位基因长度为 196 – 528 bp, 各位点等位基因数为 6 – 23 个。亲本和子代群体每个位点平均等位基因数目分别为 8.5 个和 11.5 个, 平均观测杂合度分别为 0.721 和 0.632, 平均期望杂合度分别为 0.775 和 0.764, 平均多态信息含量分别为 0.732 和 0.729。根据标记信息, 利用最大似然法对两个世代的个体分别进行系谱结构推断, 亲本群体划分为 6 个群体, 群体间遗传距离为 0.277 – 2.356, 均值为 1.510; 子代群体划分为 17 个群体, 群体间遗传距离为 0 – 2.593, 均值为 1.113。亲本和子代分群体间的遗传距离变化范围为 0 – 3.089, 均值为 1.238。根据各分群体间的 Nei's 遗传距离, 用非加权组平均法 (UPGMA) 构建了日本对虾两个世代的遗传进化树。其中 18 个分群体 (4 个亲本群体和 14 个子群体) 经过聚类后形成 3 个分支, 其余 5 个分群体 (两个亲本群体和 3 个子群体) 明显偏离于主支。研究发现, 子代的观测杂合度明显低于亲本, 说明子代在继承亲本遗传信息的过程中已经丢失了一定的杂合性。

关键词 日本对虾; 世代; 遗传结构; 遗传多样性; 微卫星

中图分类号 S917.4 文献标志码 A 文章编号 1000-7075(2014)02-0074-09

Genetic structure analysis between two generations of cultured *Marsupenaeus japonicus* by microsatellite markers

HU Long-yang^{1,2} LUAN Sheng¹ MAO Yong³

ZHONG Sheng-ping³ KONG Jie^{1*}

(¹Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

(³College of Ocean & Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005)

ABSTRACT The genetic structure for two generations of cultured *Marsupenaeus japonicus* was investigated using eight pairs of microsatellite primers. In this study, a total of 108 alleles were tested,

科技部 863 项目“主要养殖甲壳类良种培育”(2012AA10A409)资助

* 通讯作者。E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85823291

收稿日期: 2013-08-24; 接受日期: 2013-10-25

作者简介: 胡龙洋(1987-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: hu0004@163.com, Tel: 15165208959

and the length of the alleles ranged from 196 bp to 528 bp; the number of alleles per locus ranged from 6 to 23 with an average of 13.5. For the parents and offspring populations, the average number of alleles was 8.5 and 11.5, respectively; the observed heterozygosity was 0.721 and 0.632, respectively; the average expected heterozygosity was 0.775 and 0.764, respectively; and the average polymorphism information content was 0.732 and 0.729, respectively. The pedigree structure for the parents and progeny populations was inferred by maximum likelihood method according to the microsatellite marker information. The parent population was divided into six groups, and the genetic distance among them ranged from 0.277 to 2.356 with an average of 1.510. The offspring population was divided into 17 groups, and the genetic distance among them ranged from 0 to 2.593 with an average of 1.113. The genetic distance between parents and offspring sub-groups ranged from 0 to 3.089 with an average of 1.238. An evolutionary tree for the 23 sub-group populations was drawn by unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) according to Nei's genetic distance. Eighteen sub-groups aggregated into the main stretch after forming three sub-stretches. However, five sub-groups (O15, O12, O13, P21 and P18) were obviously away from the main stretch. In this study, the heterozygosity and polymorphism of the offspring population were lower than their parents. The result showed that the heterozygosity of the parents have partially lost during the genetic inbreeding.

KEY WORDS *Marsupenaeus japonicas*; Generation; Genetic structure; Genetic diversity; Microsatellite

日本对虾 *Marsupenaeus japonicus* 隶属对虾科 Penaeidae、囊对虾属 *Marsupenaeus*, 为暖水性种类, 自然分布很广, 在我国主要分布于南海、黄海南部、东海、台湾沿岸, 具有个体大、花纹艳丽、肉质细嫩鲜美、耐干运等特点, 2011年养殖产量达 50 991 t (2011年全国渔业统计情况综述), 是我国重要的养殖经济虾类之一 (郭慧等 2011; 柴鹏程等 2013; 张许光等 2013)。日本对虾产卵量大, 随着日本对虾养殖规模的扩大和野生资源数量逐渐减少, 难免造成因近交而产生遗传多样性丧失、抗逆性减弱、生长减慢、个体小型化等种质退化的现象 (孔杰等 2009; 武耀等 2012), 势必不利于日本对虾养殖的可持续发展 (张天时等 2005)。因此保持和保护日本对虾的遗传多样性对该种质资源的遗传改良等具有重要的意义。

微卫星标记具有多态性高、检测快速方便、符合孟德尔式遗传以及共显性等优点 (O'Connell *et al.* 1997), 是目前进行遗传分化研究、遗传多样性评估、亲缘关系分析及家系鉴别等较为理想的分子标记 (Ben Naceur *et al.* 2012; Balloux *et al.* 1998)。在主要的 4 种海水养殖对虾中, 已经有不少研究用微卫星 DNA 标记对比分析了中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* (刘萍等 2004; 孟宪红等 2008; 张天时等 2005)、凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* (Cruz *et al.* 2004; Pérez *et al.* 2005; Ben Naceur *et al.* 2012; 颀晓勇等 2008; 王霞等 2009; 谢丽等 2009)、斑节对虾 *Penaeus monodon* (Xu *et al.* 2001; Wuthisuthim *et al.* 2003; Pan *et al.* 2004; 苏天凤等 2008) 和日本对虾 (Moore *et al.* 1999; Luan *et al.* 2006; 郭慧等 2011; 孔沛球等 2011; 何永琴等 2012) 的野生、养殖和选育群体的遗传多样性。这方面的研究在中国对虾和南美白对虾中较为全面, 但就日本对虾而言, 相关的研究多为不同地理群体间的比较, Luan 等 (2006) 比较了野生群体和养殖群体间的遗传多样性, 而尚未见到用微卫星分子标记分析不同养殖群体间遗传多样性的报道。本研究采用微卫星标记技术分析人工养殖的两个世代日本对虾群体的遗传结构, 以期微卫星标记辅助构建日本对虾家系和保种选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用虾取自福建省东山县杏陈镇东兴粮行养殖场,亲本为由野生日本对虾繁殖的G1代个体,子代为G2代个体,繁殖方式为自然交尾,养殖方式为混合养殖,亲本在产卵后处死并冷冻保存。2012年10月从保存的亲本样本中随机选取61尾,从120 d龄幼虾中随机取150尾作为实验材料,空运至青岛。2012年10-12月在中国水产科学研究院黄海水产研究所完成实验。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA的提取

参照Wang等(2006)的方法提取样本的基因组DNA,用0.8%琼脂糖凝胶电泳检验其完整性,利用GENEQUANT pro(Pharmacia Biotech Ltd) RNA/DNA分析定量仪检测其浓度和纯度。样本DNA浓度稀释至50-100 ng/ μ l作为模板,4℃保存备用。

1.2.2 引物合成及PCR扩增

本研究用8对微卫星标记由中国水产科学研究院黄海水产研究所开发(栾生等,2006),在上海生物工程技术有限公司合成,并分别在正向引物5'末端进行荧光修饰,修饰的荧光染料包括HEX、FAM和ROX。为了节约成本和提高效率,本研究将具有不同荧光标记的PCR扩增产物混合后在ABI 3130xl遗传分析仪上进行分型,8对微卫星引物信息及混样的分组情况见表1。

PCR反应采用25 μ l体系,其中包含正反向引物各2 μ l、DNA模板2 μ l、12.5 μ l的2 \times Taq PCR MasterMix(包含Taq酶、镁离子、dNTPs和Buffer,由博迈德生物公司生产),用ddH₂O补足体积。反应程序为:94℃ 5 min; 94℃ 40 s,退火1 min,72℃ 1 min,28个循环;72℃ 5 min,4℃保存。

表1 日本对虾微卫星引物信息及扩增产物分组情况
Table 1 Information of primers and grouping of amplification products

组号 Group	引物编号 Primers	引物序列 Primer sequence	重复基序 Motif	最佳 T _m (℃)	预期片段长度 Length(bp)	荧光种类 Fluorescence
1	MpSSR012	5'-CCATCCTGCGGAACATAC-3' 5'-CTCCACTTGCTACCCCTCC-3'	(TTCTTCTTA) ₇	54.0	325	FAM
	MpSSR031	5'-AAGACAGACACGCCCTAA-3' 5'-CGTATGCGTGCGTGTATGAG-3'	(TGT)14(TCA) ₁₅	51.5	216	HEX
2	MpSSR006	5'-CTCTCCTCTACCACAGTTCCC-3' 5'-CACCTATCCTTCAAATAAGTTCGT-3'	(CACG) ₈	54.0	237	ROX
	MpSSR034	5'-CGTATGCGTGCGTGTATGAG-3' 5'-CTGACGCCGTGCCAACAT-3'	(AAAAAT) ₆	56.0	292	FAM
	MsSSR076	5'-CTAGCAATCAGAAGCAGAA-3' 5'-GTGCAAACGGTGTTCATCTG-3'	(TTAG) ₁₅	50.0	337	HEX
3	MpSSR039	5'-TACCTGACGGTTTCCTTACG-3' 5'-GACGGTTCCTGAGAAGTTGAT-3'	(AC) ₄₄	53.0	313	HEX
	MpSSR064	5'-GACAACTCCTCCTGGTATG-3' 5'-CTCCATCTTTTCCTTCTCTT-3'	(GA) ₄₄	54.0	237	FAM
	MpSSR084	5'-TGAGCAGTCCTCCTCGGT-3' 5'-GTTGGTTATACAGACATGGCTAGTG-3'	(CA) ₄₈	54.5	441	ROX

1.2.3 基因分型

使用 ABI 公司生产的 3730xl 测序仪进行毛细管电泳,用 Peak scanner 软件进行数据采集,根据扩增片段的长度大小实现等位基因分型。

1.2.4 数据分析

根据微卫星等位基因分型的数据,用 Cervus 3.0 软件分析等位基因频率、观测杂合度 (Observed Heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (Expected Heterozygosity, H_e)、多态信息含量 (Polymorphism Information Content, PIC) 和 Hardy-Weinberg 平衡显著性。用 Colony 软件对两个世代进行系谱重构。用 Popgene 软件计算群体间的 Nei's 遗传距离。用 Mega 5.1 构建基于 UPGMA 法的系统进化树。

2 结果

2.1 8 个微卫星位点扩增结果及多态性

本研究通过读取 8 个微卫星位点的峰图来实现基因分型,在这 8 个位点中,检测到的等位基因大小在 196 - 528 bp 之间。等位基因数为 6 - 23 个,平均为 13.5 个。期望杂合度为 0.651 - 0.901,平均为 0.807。观测杂合度为 0.274 - 0.944,平均为 0.661。8 个微卫星位点的多态信息含量为 0.582 - 0.890,平均为 0.781。亲本和子代每个位点平均等位基因数目分别为 8.5 个和 11.5 个,平均有效个体数目分别为 59 和 149.75,平均观测杂合度分别为 0.721 和 0.632,平均期望杂合度分别为 0.775 和 0.764,平均多态信息含量分别为 0.732 和 0.729。各个位点的基因型信息见表 2。

表 2 日本对虾养殖群体 8 个微卫星位点的基因型信息
Table 2 Genotype information of the eight SSR loci in cultured *M. japonicas*

位点 Locus	群体类型 Type	等位基因数 Allele	有效个体数 Valid individual	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量 PIC	Hardy-Weinberg 平衡 HW
MpSSR064	全部 All	14	197	0.787	0.876	0.861	*
	亲本 Parent	11	47	0.638	0.828	0.797	ND
	子代 Offspring	13	150	0.833	0.867	0.850	NS
MpSSR084	全部 All	16	211	0.749	0.842	0.822	***
	亲本 Parent	9	61	0.672	0.754	0.714	NS
	子代 Offspring	15	150	0.780	0.831	0.807	***
MpSSR076	全部 All	16	210	0.457	0.865	0.850	***
	亲本 Parent	9	61	0.623	0.790	0.751	NS
	子代 Offspring	12	149	0.389	0.808	0.786	***
MpSSR031	全部 All	15	211	0.725	0.824	0.800	***
	亲本 Parent	8	61	0.705	0.746	0.700	NS
	子代 Offspring	13	150	0.733	0.790	0.762	NS
MpSSR034	全部 All	11	210	0.943	0.829	0.805	***
	亲本 Parent	8	60	0.983	0.814	0.779	ND
	子代 Offspring	9	150	0.927	0.790	0.755	***
MpSSR039	全部 All	23	209	0.933	0.901	0.890	NS
	亲本 Parent	13	60	1.000	0.844	0.816	ND
	子代 Offspring	18	149	0.906	0.849	0.828	***
MpSSR012	全部 All	7	211	0.275	0.675	0.638	***
	亲本 Parent	6	61	0.361	0.755	0.706	***
	子代 Offspring	6	150	0.24	0.571	0.521	***

续表 2

位点 Locus	群体类型 Type	等位基因数 Allele	有效个体数 Valid individual	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量 PIC	Hardy-Weinberg 平衡 HW
MpSSR006	全部 All	6.0	211.00	0.403	0.652	0.582	***
	亲本 Parent	4.0	61.00	0.787	0.667	0.589	NS
	子代 Offspring	6.0	150.00	0.247	0.602	0.520	***
平均值 Average	全部 All	13.50	208.75	0.659	0.808	0.781	
	亲本 Parent	8.5	59	0.721	0.775	0.732	
	子代 Offspring	11.5	149.75	0.632	0.764	0.729	

注:ND 表示没有进行 Hardy-Weinberg 平衡显著性分析,NS 表示 Hardy-Weinberg 平衡分析不显著,* 表示 Hardy-Weinberg 平衡分析显著 ($P < 0.05$),*** 表示 Hardy-Weinberg 平衡分析极显著 ($P < 0.01$)

Note: ND indicates that Hardy-Weinberg analysis was not done, NS indicates that Hardy-Weinberg analysis is not significant, the asterisk indicates significant differences at $P < 0.05$, and triple-asterisk indicate significant differences at $P < 0.01$

2.2 聚类分析和进化树的构建

对亲本和子代分别进行家系推断,子代分为 17 个群体,每个群体有 1 - 76 个个体,群体间遗传距离为 0 - 2.593,平均为 1.113。亲本分为 6 个群体,每个群体有 1 - 46 个个体,群体间遗传距离为 0.277 - 2.356,平均为 1.510。两个世代群体间的遗传距离范围为 0 - 3.089,平均为 1.238。各个群体的个体数目和群体间的遗传距离分别见表 3 和表 4。根据各群体间的 Nei's 遗传距离,构建了基于 UPGMA 法的系统进化树(图 1),发现大多数分群体经过聚类后形成 3 个较大的分支,然后又汇为 1 个总支,其余的分群体 O15、O12、O13、

表 3 日本对虾群体对应的个体数目

Table 3 Number of individuals in different populations of *M. japonicas*

子代群体编号 ID of offspring	对虾数量 Number of shrimp	亲本群体编号 ID of parent	对虾数量 Number of shrimp
O1	5	P18	1
O2	9	P19	2
O3	21	P20	1
O4	2	P21	1
O5	4	P22	10
O6	2	P23	46
O7	5	-	-
O8	10	-	-
O9	3	-	-
O10	3	-	-
O11	3	-	-
O12	1	-	-
O13	1	-	-
O14	2	-	-
O15	1	-	-
O16	2	-	-
O17	76	-	-

P21 和 P18 虽然最终也与它们聚为一支,但却明显偏离于由这些大多数分群体构成的主支。

3 讨论

3.1 两个世代的遗传多样性

依据 Botstein 等(1980)对 PIC 的划分标准, $PIC > 0.50$ 时,该基因座位为高度多态性; $0.25 < PIC < 0.50$ 时,为中度多态基因座; $PIC < 0.25$ 时,为低度多态性。本研究采用的 8 对引物的 PIC 均大于 0.5,表明这些位点都为高度多态性,适合日本对虾遗传多样性分析和亲子鉴定的研究。这 8 个位点呈现高度多态性除了位点自身的原因,另外在一定程度上也跟使用了毛细管电泳技术有关,这种分型技术相比传统的聚丙烯酰胺凝胶电泳,减少了人为操作造成的误差(武祥伟等 2011)。其中位点 MpSSR064 有 14 个样品基因型缺失,缺失率达 6.5%,该对引物在所有样品中的 PCR 产物产量均呈现较低水平,推测数据缺失的样品可能是因为扩增量没有

表 4 各群体间的 Nei's 遗传距离(下三角)和遗传相似性系数(上三角)

Table 4 Nei's genetic distance (lower triangular) and genetic identification (upper triangular) among groups

群体 ID	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
01	****	0.555	0.337	0.317	0.392	0.600	0.425	0.391	0.597	0.445	0.369	0.084	0.593	0.410	0.096	0.514	0.571	0.467	0.300	0.306	0.060	0.233	0.444
02	0.589	****	0.336	0.386	0.377	0.567	0.304	0.280	0.436	0.556	0.282	0.120	0.329	0.514	0.089	0.398	0.523	0.281	0.196	0.206	0.110	0.261	0.239
03	1.088	1.091	****	0.444	0.356	0.547	0.375	0.396	0.291	0.522	0.184	0.204	0.215	0.375	0.141	0.514	0.449	0.426	0.420	0.217	0.277	0.251	0.386
04	1.149	0.953	0.811	****	0.302	0.446	0.858	0.515	0.450	0.621	0.185	0.253	0.213	0.324	0.140	0.158	0.353	0.249	0.368	0.551	0.449	0.276	0.351
05	0.936	0.974	1.033	1.196	****	0.399	0.223	0.344	0.282	0.400	0.328	0.168	0.193	0.653	0.245	0.364	0.615	0.288	0.362	0.106	0.153	0.750	0.290
06	0.510	0.567	0.604	0.807	0.919	****	0.340	0.374	0.415	0.660	0.361	0.160	0.302	0.568	0.106	0.466	0.575	0.295	0.398	0.307	0.106	0.179	0.378
07	0.856	1.190	0.981	1.153	1.500	1.080	****	0.510	0.535	0.613	0.262	0.214	0.297	0.259	0.075	0.090	0.394	0.344	0.320	0.513	0.427	0.256	0.414
08	0.938	1.272	0.927	0.664	1.068	0.984	0.674	****	0.466	0.505	0.535	0.297	0.2289	0.407	0.155	0.507	0.499	0.373	0.323	0.455	0.4590	0.425	0.462
09	0.516	0.830	1.256	0.799	1.267	0.879	0.626	0.764	****	0.373	0.279	0.169	0.380	0.477	0.225	0.316	0.419	0.375	0.351	0.347	0.263	0.167	0.363
10	0.810	0.587	0.65	0.476	0.916	0.415	0.490	0.684	0.987	****	0.445	0.233	0.268	0.562	0.212	0.297	0.521	0.282	0.343	0.391	0.254	0.257	0.361
11	0.998	1.267	1.693	1.690	1.115	1.019	1.339	0.626	1.275	0.811	****	0.123	0.078	0.379	0.287	0.417	0.629	0.046	0.333	0.257	0.164	0.315	0.373
12	2.475	2.211	1.591	1.375	1.783	1.835	1.543	1.213	1.778	1.458	2.094	****	0	0.135	0	0.164	0.210	0.052	0.263	0.162	0.422	0.202	0.169
13	0.522	1.111	1.539	1.546	1.643	1.195	1.213	1.474	0.968	1.318	2.553	0	****	0.240	0.059	0.333	0.267	0.329	0.148	0.274	0	0.128	0.382
14	0.893	0.666	0.980	1.126	0.426	0.566	1.351	0.900	0.741	0.577	0.970	2.000	1.429	****	0.108	0.417	0.760	0.210	0.338	0.281	0.108	0.427	0.323
15	2.341	2.419	1.959	1.963	1.408	2.241	2.593	1.864	1.491	1.553	1.247	0	2.825	2.223	****	0.263	0.165	0.052	0.146	0.162	0.047	0.221	0.091
16	0.665	0.920	0.665	1.849	1.010	0.764	2.409	0.678	1.153	1.216	0.874	1.806	1.101	0.87	1.336	****	0.486	0.292	0.369	0.266	0.197	0.199	0.471
17	0.561	0.648	0.800	1.041	0.486	0.553	0.932	0.696	0.870	0.652	0.464	1.561	1.322	0.275	1.803	0.721	****	0.273	0.325	0.223	0.174	0.547	0.343
18	0.762	1.269	0.854	1.389	1.244	1.221	1.068	0.986	0.982	1.267	3.089	2.956	1.112	1.560	2.957	1.232	1.297	****	0.195	0.120	0.104	0.189	0.311
19	1.204	1.628	0.867	1.000	1.015	0.921	1.140	1.132	1.047	1.070	1.100	1.335	1.911	1.086	1.923	0.998	1.124	1.637	****	0.27	0.234	0.177	0.758
20	1.186	1.582	1.528	0.596	2.245	1.181	0.634	0.787	1.059	0.939	1.440	1.818	1.295	1.269	1.818	1.326	1.503	2.120	1.309	****	0.325	0.095	0.382
21	2.811	2.211	1.285	0.800	1.878	2.241	0.85	0.779*	1.337	1.371	1.807	0.863	0	2.223	3.060	1.624	1.749	2.263	1.453	1.125	****	0.246	0.205
22	1.456	1.343	1.385	1.287	0.288	1.720	1.362	0.856	1.791	1.361	1.155	1.599	2.057	0.852	1.510	1.614	0.603	1.665	1.730	2.356	1.401	****	0.204
23	0.813	1.431	0.953	1.048	1.237	0.973	0.882	0.772	1.014	1.018	0.986	1.779	0.961	1.130	2.396	0.753	1.071	1.169	0.277	0.963	1.586	1.591	****

达到可识别的水平。39号引物中有两个样品基因型缺失,34号和76号引物分别有1个样品基因型缺失,可能是偶然因素造成的,鉴于数量较少,不影响整体分析,因此对这些个别样品基因型缺失产生的影响可以忽略(董世瑞等 2008)。在MpSSR034和MpSSR039两个位点上 H_o 大于 H_e ,表明杂合子过剩。剩下的位点上均表现为 H_e 大于 H_o ,表明纯合子过剩(李伟亚等 2012),尤其是MpSSR006和MpSSR012两个位点上杂合子的比例分别达到了60%和72.6%。Pemberton等(1995)认为,为了减少误差,只有杂合子才可以用来研究。本研究没有采用这样极端的观点,因为在这两个位点并未出现基因型缺失并且峰图都清晰可辨,高纯合率可能是群体自身的特性。从表2可以看到,本研究中亲本的平均等位基因数和平均有效个体数少于子代,平均 PIC 略高于子代,平均 H_o 则明显高于子代。亲本本身的个体数远少于子代和繁殖过程中亲本丢失的原因造成其有效个体数少于子代,这也导致了亲本的等位基因数少于子代。两个世代之间的 PIC 差异不明显,说明子代继承了亲本的绝大多数等位基因。亲本的 H_o 高于子代,暗示了子代在继承亲本遗传信息的过程中已经丢失了一定的杂合性。

3.2 Hardy-Weinberg 平衡分析

本研究中所有位点经 Bonferroni 校正后,仍有大多数显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。作者认为,造成这种现象的原因主要在于实验群体遗传结构的不稳定性。实验材料是混养家系,由于真实的系谱情况已经无从得知,因此本研究使用了 Colony 软件根据个体的微卫星基因型信息用最大似然法推断其系谱信息。从表3可以看出,子代群体可以被分为17个系别,群体的个体数目为1-76,群体数量多且群体间个体数目差异大,复杂的系谱信息导致了群体显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。由两个世代所有个体组成的群体,同样因为复杂的遗传结构而导致在多个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。亲本在一些位点的基因型不同程度的缺失导致了这些位点样本数过少而无法进行 Hardy-Weinberg 平衡分析,因此亲本群体的 Hardy-Weinberg 平衡不予讨论。推测世代内不同系别间数量悬殊的原因之一为家系之间在母本产卵量、孵化率、存活率以及家系间的竞争力等方面存在差异,这些因素的累积造成了家系间数量的差异。另一个原因可能是数量较多的系别实际上是两个以上家系的组合,由于使用 Colony 软件进行运算时容忍 1% 的输入误差,因此亲缘关系较近的家系可能被归为一个系别。

3.3 遗传距离分析

从结果来看,各群体之间的遗传距离均较大,平均值大于郭慧等(2011)和何永琴等(2012)用微卫星计算的日本对虾不同地理群体间的遗传距离,更远大于孔沛球等(2011)得出的不同地理种群间的微卫星遗传距离。这一方面和各研究所采用的微卫星位点不同有关(Naceur *et al.* 2012),另一方面说明,本研究中的研究

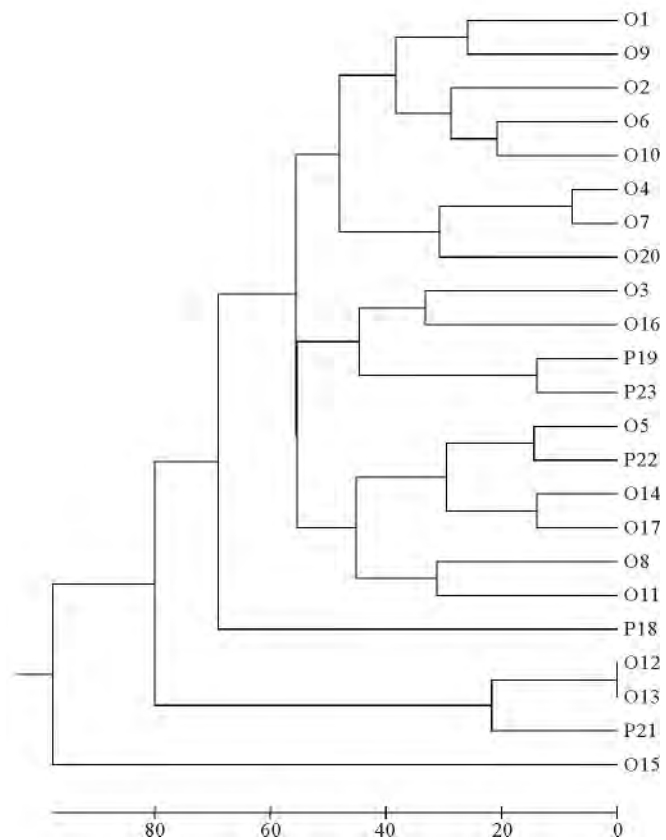


图1 日本对虾两个世代23个分群体的系统进化树

Fig.1 Evolutionary tree for the 23 populations of two generations of *M. japonicas*

对象可能来自亲缘关系较远的亲本(赵斌丽等 2009)。其中出现了 O12 与 O13、O15、O15 与 P21 群体之间在 8 个位点均没有共同的等位基因的情况,表明它们之间的遗传关系可能会更远(毛永江等 2008)。

为了更加直观地展现各分群体之间的亲缘关系并对其进行进一步分析,作者构建了系统进化树(图 1)。图 1 中的进化分支由最外侧向内依次是 O15、O12、O13 和 P21、P18 群体,这些群体明显偏离于其他群体,另外它们有一个共同的特点就是每个群体只包含 1 个个体,这可能是由于这类与主群体亲缘关系较远的群体在竞争中处于劣势地位造成的,如果不加以干涉,接下来可能会发生遗传漂变,进而导致一部分遗传多样性的丧失(Lande 1976)。其他大多数群体汇成 1 个总支,这个总支由 3 个较大的分支组成。在组成这 3 个较大的分支的基础群体中,有亲本群体与亲本群体聚成第 1 个支的,如 P19 和 P23;有亲本群体与子代群体聚成第 1 个支的,如 O5 与 P22;有子代群体与子代群体聚成第 1 个支,又与亲本群体聚成第 2 个支的,如 O4、O7 和 P20;有子代群体与子代群体聚成第一个支,又与子代群体或其他分支聚成第 2 个支的,如其余的子代群体。这些分支呈现出的复杂的聚合类型揭示了各分群体之间不同远近的亲缘关系,同时也暗示了它们具有不同的近祖。同时,亲本群体与子代群体的交联聚合现象并没有超出预期,这是因为两者是亲子关系而不是完全独立的两个群体。

实验数据表明,本研究采用的日本对虾群体的杂合度较高,具有较大的选育潜力,但子代群体之间的平均遗传距离明显低于父本群体之间的遗传距离,这在某种程度上说明存在近交现象。无计划的混合养殖使不同家系间的个体数目相差悬殊,并可能使竞争力弱的家系最终消失,这显然不利于保持日本对虾的遗传多样性。对于育种工作来说,家系单独养殖和有条件的混合养殖将有助于解决这个问题。

参 考 文 献

- 马朋,刘萍,李健,李吉涛,陈萍. 2011. 脊尾白虾 3 个野生群体线粒体 COI 基因的遗传多样性及其系统发育分析. 渔业科学进展, 32(6):50-56
- 王霞,刘小林,张继泉,张成松,黄皓,相建海. 2009. 微卫星用于凡纳滨对虾育种过程中亲权分析及遗传多样性的变化监测. 水产学报, 33(5):832-839
- 毛永江,常洪,杨章平,张柳,许明,常国斌,孙伟,宋光明. 2008. 遗传距离与利用微卫星进行系统树构建初探. 畜牧兽医学报, 39(2):129-135
- 孔杰,金武,栾生,田焱,张天时,罗坤. 2009. 水产动物选择育种的近交分析. 自然科学进展, 19(9):917-923
- 孔沛球,申玉春,刘堃. 2011. 不同地理群体日本囊对虾遗传多样性微卫星 DNA 分析. 水产科学, 30(7):409-414
- 刘萍,孟宪红,孔杰,庄志猛,马春艳,王清印. 2004. 中国对虾微卫星 DNA 多态性分析. 自然科学进展, 14(3):333-338
- 苏天凤,江世贵,熊小飞,夏军红. 2008. 斑节对虾人工选育群体不同家系微卫星遗传分析. 见:第五届广东、湖南、江西、湖北四省动物学学术研讨会论文集摘要汇编
- 李伟亚,王伟继,孔杰,金显仕,阮晓红,罗坤. 2012. 中国对虾微卫星四重 PCR 技术的建立及其在模拟放流效果评估方面的应用. 海洋学报, 34(5):213-220
- 李忠义,王俊,赵振良,周军,吕振波,董婧,刘茂利,金显仕. 2012. 渤海中国对虾资源增殖调查. 渔业科学进展, 33(3):1-7
- 李建林,唐永凯,李红霞,俞菊华. 2012. 利用微卫星标记进行 6 个建群家系遗传结构分析和家系鉴定. 江苏农业学报, 28(4):917-920
- 何永琴,苏永全,毛勇,王军. 2012. 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. 水产学报, 36(10):1520-1528
- 张许光,赵培,王国成,王秀华,潘鲁青,黄捷. 2013. 不同放苗密度凡纳滨对虾生物絮团养殖的环境和产出效应. 渔业科学进展, 34(3):111-119
- 张天时,刘萍,李健,孔杰,王清印. 2005. 用微卫星 DNA 技术对中国对虾人工选育群体遗传多样性的研究. 水产学报, 29(1):6-12
- 武祥伟,刘贤德,王志勇. 2011. ISSR 分析技术的建立及在大黄鱼(*Larimichthys crocea*) 亲子鉴定中的应用. 海洋通报, 30(4):419-424
- 武耀,贾智英,李池陶,葛会争,石连玉. 2012. 筛选杂交鲤亲子鉴定的微卫星标记. 农业生物技术学报, 20(5):549-559
- 孟宪红,孔杰,王清印,刘萍. 2008. 微卫星技术对黄渤海海域 7 个不同地理群体中国对虾的遗传结构和遗传分化研究. 海洋水产研究, 29(5):1-10
- 赵斌丽,黎中宝,陈锦,雷光高,张桂玲,王展林. 2009. 日本囊对虾野生群体杂合性的研究. 集美大学学报(自然科学版), 14(2):115-119
- 栾生. 2006. 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. 见:中国海洋大学博士研究生学位论文
- 高焕,赖晓芳,王伟继,孟宪红,孔杰. 2012. 中国对虾不同凝集素基因应答 WSSV 侵染的表达差异. 渔业科学进展, 33(5):53-58
- 柴鹏程,宋晓玲. 2013. 饲料中添加芽孢杆菌 PC 对凡纳滨对虾生长和 STAT 基因表达的影响. 渔业科学进展, 34(3):97-103
- 郭慧,申玉春. 2011. 三个野生群体日本囊对虾遗传多样性的 SSR 分析. 生物技术通报, (3):130-134, 145
- 董世瑞,孔杰,张天时,孟宪红,王如才. 2008. 中国对虾微卫星家系鉴定的模拟分析与应用. 水生生物学报, 32(1):96-101
- 谢丽,陈国良,叶富良,栗志民. 2009. 凡纳滨对虾 4 个选育群体遗传多样性的 SSR 分析. 广东海洋大学学报, 29(4):5-9
- Balloux F, Goudet J, Perrin N. 1998. Breeding system and genetic variance in the monogamous, semi-social shrew, *Crocidura russula*. Evolution 52(4):

1230 – 1235

- Ben Naceur A , Chaabane R , El-Falen C and 5 others. 2012. Genetic diversity analysis of North Africa's barley using SSR markers. *J Gen Eng Biol* 10(1) : 13 – 21
- Botstein D , White RL , Skolnick M and 1 other. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Human Gen* 32(3) : 314 – 331
- Cruz P , Ibarra AM , Mejia-Ruiz H and 2 others. 2004. Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Mar Biotechnol* 6(2) : 157 – 164
- Jerry DR , Preston NP , Crocos PJ and 3 others. 2004. Parentage determination of Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* using microsatellite markers (Bate). *Aquaculture* 235(1 – 4) : 237 – 247
- Lande R. 1976. Natural selection and random genetic drift in phenotypic evolution. *Evol* 30(2) : 314 – 334
- Luan S , Kong J , Wang QY. 2006. Genetic variation of wild and cultured populations of the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Bate 1888) using microsatellites. *Aquaculture Res* 37(8) : 785 – 792
- Moore SS , Whan V , Davis GP and 3 others. 1999. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). *Aquaculture* 173(1) : 19 – 32
- Naceur AB , Chaabane R , El-Faleh C and 5 others. 2012. Genetic diversity analysis of North Africa's barley using SSR markers. *J Gen Eng Biotechnol* 10(1) : 13 – 21
- OConnell M , Wright JM. 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Rev Fish Biol Fish* 7(3) : 331 – 363
- Pan YW , Chou HH , You EM and 1 other. 2004. Isolation and characterization of 23 polymorphic microsatellite markers for diversity and stock analysis in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Mol Ecol Notes* 4(3) : 345 – 347
- Pérez F , Ortiz J , Zhinaula M and 3 others. 2005. Development of EST-SSR markers by data mining in three species of shrimp: *Litopenaeus vannamei* , *Litopenaeus stylirostris* , and *Trachypenaeus biridy*. *Mar Biotechnol* 7(5) : 554 – 569
- Pemberton J , Slate J , Bancroft D and 1 other. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol Ecol* 4(2) : 249 – 252
- Wang WJ , Kong J , Dong SR and 3 others. 2006. Genetic mapping of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* using AFLP markers. *Curr Zool* (formerly *Acta Zoologica Sinica*) 52(3) : 575 – 584
- Wuthisuthime TS , Lumubol P , Vanavichit A. 2003. Development of microsatellite markers in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Aquaculture* 224(1) : 39 – 50
- Xu ZK , Primavera JH , Pena LD and 3 others. 2001. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture* 199(1) : 13 – 40