

文章编号: 1000- 0615(2005)01- 0006- 07

## 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

张天时<sup>1,2</sup>, 刘 萍<sup>1</sup>, 李 健<sup>1</sup>, 孔 杰<sup>1</sup>, 王清印<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 利用微卫星技术对中国对虾人工选育群体第 1 代和第 6 代群体的遗传多样性进行了分析。对 10 个微卫星位点进行了扩增, 共产生 74 个等位基因, 每个位点产生的等位基因数从 3 到 13 不等。在两个群体中, 所观察到的等位基因数都比有效等位基因数多。多态信息含量 PIC 值 0.5567~ 0.8877, 说明这 10 个微卫星位点在中国对虾中具有较高的信息含量。两个群体的平均杂合度分别为 0.6400(CP1)、0.6300(CP6), 并通过计算基因型的 P 值, 确定了对 Hardy-Weinberg 平衡的偏离情况。对  $F_{is}$  值的计算表明两个群体内共有 5 个微卫星位点存在杂合度观察值过剩的现象。两个群体的 Shannon 多样性指数分别为 1.6830、1.7382, 整个选育群体 (两个群体作为一个群体) 的遗传多样性指数为 1.7742。从遗传多样性所占的比例来看, 96.415% 的遗传变异是来自群体内, 只有 3.585% 的遗传变异是来自群体间。两个群体间的相似性系数高达 0.9187, 彼此间的遗传距离仅为 0.0848, 体现出人工选育群体的遗传分化程度较低。结果均说明第 6 代群体还有较大的选育潜力, 可以继续保持遗传效应, 最终保证选种育种工作的成功。

关键词: 中国对虾; 微卫星; 遗传变异; 杂合度

中图分类号: S917; S961.2

文献标识码: A

## Genetic diversity of cultured populations of *Fenneropenaeus chinensis* shrimp using microsatellites

ZHANG Tian<sup>1,2</sup>, LIU Ping<sup>1</sup>, LI Jian<sup>1</sup>, KONG Jie<sup>1</sup>, WANG Qingyin<sup>1</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Selective breeding on growth character and disease-resistant trait 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, Shandong Province, China. Challenge Test has shown their better growth rate and disease-resistant performance than controlled shrimp. Samples of CP1 and CP6 were randomly collected. Tail muscle tissue from shrimp of mostly adults and subadults was collected. 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. Microsatellite technique was used to investigate the genetic variation between the cultured populations (CP1 and CP6) of *F. chinensis*. Ten 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 the two selected populations. PCR products were electrophoresed through 8% polyacrylamide gels. Samples were heated to 95 °C for 5 min

收稿日期: 20031020

资助项目: 国家自然科学基金项目(30271038); 山东省自然科学基金项目(Y2002D02); 国家重点基础研究发展规划/9730 课题(1999012009); 国家/8630 项目(2003AA603021)

作者简介: 张天时(1976-), 男, 山东青州人, 硕士, 主要从事水产养殖基础生物学和遗传育种研究。Tel: 0532- 5823291, E-mail: zhtianshen@yahoo.com.cn

通讯作者: 王清印, Tel: 0532- 5822959, E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

before being loaded onto the polyacrylamide gels. The gels then were silver-stained. All samples were run next to a known sequence in order to determine 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. To analyze the variation in microsatellite loci in the two populations, number of alleles per locus ( $n_a$ ), Polymorphism Information Content (PIC), number of genotypes per locus ( $G$ ) effective number of alleles ( $A_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ) and expected heterozygosity ( $H_e$ ) were estimated for each population at each locus. Allele frequencies for each population at each locus were calculated based on the number of alleles provided by the computer software TFGA. A total of 74 different alleles were found over all ten loci. The total number of alleles per locus ranged from 3 to 13. In the two populations, the effective number of alleles was lower than the observed number. PIC per locus ranged from 0.5567 to 0.8877. The average heterozygosity of the first and sixth selected generation was 0.6400 and 0.6300, respectively. To assess departures from HWE,  $P^2$  values of genotypic frequencies were calculated. Furthermore, five cases of observed heterozygosity excess ( $F_{is} < 0$ ) were observed in the two populations. Shannon genetic diversity index revealed that the average variation level of the two populations was 1.7742, and the variation level of them was 1.6830 and 1.7382, respectively. Partitioning of the genetic variation revealed that 96.415% is distributed within populations and 3.585% among populations. Nei's genetic identity and genetic distance between the two populations were 0.9187 and 0.0848, respectively. In summary, data showed low genetic diversity of *F. chinensis* and difference over the levels of genetic variation between the two populations. There was great potential of selective breeding for the sixth generation.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; microsatellite; genetic variation; heterozygosity

中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 主要分布于我国黄海、渤海以及朝鲜半岛沿海, 是我国北方重要的渔业对象及海水养殖虾类<sup>[1]</sup>。在养虾业发展的盛期 1989 到 1992 年, 养殖规模达 15 @ 10<sup>4</sup>hm<sup>2</sup>, 年产对虾 20 多万吨<sup>[2]</sup>。但自从 1993 年虾病爆发以来, 中国对虾的池塘养殖业严重受挫一蹶不振, 迄今未见恢复迹象。因此, 培育优质高产抗逆的品种, 是对虾养殖业迫切需要解决的问题。

自 1997 年起我所开始人工选育计划<sup>[3]</sup>, 进行了中国对虾人工选育工作。中国对虾人工选育群体是自山东日照市近海附近海域采捕的中国对虾, 后代苗种放于对虾养殖池中, 连续六年从染病 (WSSV) 存活的个体中选留大的个体作为亲虾进行选育。在选育过程中, 与海捕个体较大的野生群体进行混养。至 2002 年已进行了六代选育, 其生长速度快、发病率低。但是在人工选育过程, 经常发生不确定因素, 如近交几率增加, 有效群体数目减少等, 有可能导致遗传多样性降低, 从而降低遗传效应。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从而保证育种工作进行顺利。

微卫星技术, 亦称简单重复序列标记 (Simple Sequence Repeats, SSR), 作为一种新型的分子标记, 其优点是技术简便、快速, 稳定性好, 检测获得的多态性位点多, 遗传变异信息量大, 并且遗传标记以孟德尔方式共显性遗传。SSR 标记被广泛应用于生物学研究的各个领域。虽然已有其他技术如同工酶<sup>[4, 5]</sup>、线粒体 DNA<sup>[6]</sup>、RAPD<sup>[7]</sup> 技术应用到中国对虾的多态性研究, 尚未有中国对虾人工

选育群体微卫星分析的报道。本研究利用 SSR 技术分析选育的两个群体, 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。此外, 从中国对虾人工选育群体的遗传分析中寻找与其性状相关分子标记并进行深入分析, 可以为分子标记辅助育种奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

以海捕中国对虾作为亲虾培育出的苗种进行养殖的群体 (CP1) 以及通过世代连续选育的第六代群体 (CP6) 样品, 每个群体各为 20 尾, 全部雌性, 体长 15.1~18.2cm。活体取样后, 在实验室超低温 (-80℃) 冰柜保存。

### 1.2 SSR 引物

采用我们实验室自行设计和筛选的 SSR 引物 (引物由上海生工公司合成)。微卫星位点的引物序列、GenBank 注册号、核心序列及 PCR 反应条件见表 1。

### 1.3 方法

**模板 DNA 的制备** 模板 DNA 提取自中国对虾尾节肌肉, 采用常规方法酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 具体操作参照石拓等<sup>[7]</sup>的方法。基因组 DNA 浓度经由 GENEQUANTpro (Pharmacia Biotech Ltd) RNA/DNA 分析定量仪和琼脂糖凝胶电泳 EB 染色定量。用灭菌水稀释成 50 μg/mL 的模板 DNA, -20℃ 备用。

**PCR 扩增与电泳检测** PCR 反应体系总体积为 25 μL, 包括 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3),

表 1 10 个中国对虾微卫星位点的特征

Tab. 1 Characteristics of *F. chinensis* loci tested

克隆编号 (位点) no. clone( locus)	引物序列 ( 5. y 3. ) primer sequences ( 5. y 3. )	微卫星核心区序列 core sequences	GenBank 登录号 GenBank accession#	退火温度 ( e ) annealing temperature
EN0018	F: ACAGACACTATGTCA CACC R: CCGAGATACAGAAAAGATGGGC	(CT) <sub>32</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 GCG	(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 TIG 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
RS0676	F: ACG ATG CTT ATT AGC TGC G R: TGT GGA GCT TGA TGG TTG C	(AC) <sub>16</sub> GC(AC) <sub>11</sub>	AF526880	63
RS0683	专利( 申请号 02135713. 7)	CCGCTACGCG C (TACCGC) <sub>13</sub> TACC C (ATC)(ATTATC)CTC(ATC)(ATT) <sub>3</sub> ATA(ATT) <sub>2</sub> (ATC)CT(TA) <sub>2</sub> (ATT)ACT(ATT) ATAACC(ATT) <sub>3</sub> TT(ATT) <sub>4</sub> GNC(ATTATC) <sub>10</sub> (ATT)AAC(ATTATC) <sub>3</sub> (ATT) <sub>2</sub> ATCTTCATC (ATTATC)CCC(ATTAGC) <sub>2</sub> ATTACTATC (ATT) <sub>2</sub> TTTACT(ATTATC)(ATC) <sub>2</sub> (ATT)AT	AY132823	64
RS0859	F: ATC AGT AGC AGT AGT AGT TG R: TGT TAG GAA TGC TTA TGA	(AG) <sub>3</sub> AA(AG) <sub>20</sub> AA(AG) <sub>3</sub> (AG) <sub>3</sub> (AG) <sub>32</sub>	AY132791	52
RS0956	F: ACG CAT TAT GTC TCA TTC GC R: GAT TCC GCA TCA AAT ATG TCC G	G(GAGT) <sub>2</sub> GAGC(GAGT)GAATGC(GTGA) <sub>5</sub> GCGA(GTGA)ATGC(GTGA) <sub>3</sub> G, (GAGT)AAT (GTGA)GCCT(GGTT) <sub>2</sub> CATT(GAGT), (AAG) <sub>2</sub>	AY132800	66
RS1101	F: CGA GTG GCA GCG AGT CCT R: TAT TCC CAC GCT CTT GTC	TA TGTT(AGT) <sub>2</sub> , (GAGT)GATT(GAGT) <sub>2</sub> G, (GTGA) <sub>3</sub> GCGA(GTGA)ATGC(GTGA) <sub>4</sub> , ATGAAT(GC) <sub>3</sub> (GTGA) <sub>3</sub> GCGA(GTGA), (GTGA) <sub>2</sub> C(GAGT), (GTGA) <sub>6</sub> , (GAGT) GA(ATT) <sub>2</sub> GT(GTGA)ATGAATG	AY132811	52

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片段大小(bp)不同。F: 正向引物; R: 反向引物

Notes: RS062 and RS0622 loci having the same GenBank accession#, the same locus with different allele size. F: forward primer; R: reverse primer

50 mmol#L<sup>-1</sup> KCl, 2.0 mmol#L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol#L<sup>-1</sup> dNTPs, 0.8 Lmo#L<sup>-1</sup> 引物, 1.0 U Taq 酶, 100 ng 模板 DNA。反应在 PT200 扩增仪上进行。PCR 反应程序为: 94 e 预变性 5 min; 每一个循环包括 94 e 40 s, 退火 1 min, 72 e 1 min, 进行 25 个循环; 72 e 延伸 5 min, 4 e 保温。扩增完毕后, 扩增产物通过 8% (w/v) 聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸银染色检验其多态性。待凝胶干燥后使用扫描仪记录电泳图谱。

**数据统计与分析** 根据每个个体产生的条带位置确定其基因型, 用 TFGA 软件进行数据处理。通过计算每个位点的多态信息含量 (polymorphism information content, PIC)<sup>[8]</sup>、等位基因数 (na)、有效等位基因数 (Ae)<sup>[9]</sup>、Shannon. s 多态性指数 (Hc)<sup>[10]</sup>、基因型数目 (G)、多态位点杂

合度 (H)<sup>[11]</sup>, 以及 F<sub>is</sub>、F<sub>it</sub>、F<sub>st</sub> 值的 F- 检验<sup>[12]</sup> 和基于基因型的 P 值<sup>[13]</sup> 等, 进行遗传多样性分析。F<sub>st</sub> 值在 0~ 0.05 时, 群体遗传分化较弱; 0.05~ 0.15 时, 群体遗传分化中等; 0.15~ 0.25 时, 表示群体遗传分化较大; 当 F<sub>st</sub> 值大于 0.25 时, 表示分化极大。

(1) 有关微卫星位点和群体遗传变异的度量参数及其计算

$$\text{多态信息含量 PIC} = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=1}^m 2P_i^2 P_j^2$$

式中: P<sub>i</sub>, P<sub>j</sub> 分别为群体中第 i, j 个等位基因频率, m 为等位基因数。

有效等位基因数 (Ae): Ae = 1 / ∑ P<sub>i</sub>, P<sub>i</sub> 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):  $H_o = \text{杂合子观察数} / \text{观察个体总数}$ 。

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。

(2) 以 Shannon 多样性指数量化分析遗传多样性<sup>[10]</sup>

$H_c = - \sum X_i \ln X_i$ ,  $X_i$  为位点  $i$  在某一群体中的出现频率。

$n$  个不同群体内的平均多样性:  $H_{POP} = H_c / n$ ,  $n$  为研究的群体数。

群体多样性:  $H_{SP} = - \sum X \ln X$ ,  $X$  为  $n$  个群体中的综合表型频率。

根据此计算: 群体内遗传多样性所占的比例表示为  $H_{POP} / H_{SP}$ ; 群体间遗传多样性所占的比例为  $(H_{SP} - H_{POP}) / H_{SP}$ 。

(3) 遗传相似度和遗传距离

群体间的相似性系数<sup>[14]</sup>:  $I = \sum E(X_i Y_i) / \{ \sum$

$$(X_i)^2 E(Y_i)^2 \}^{1/2}$$

加上偏差校正后<sup>[15]</sup>:  $I = (2n - 1) E(X_i Y_i) / \{ E(2n(X_i)^2 - 1) E(2n(Y_i)^2 - 1) \}^{1/2}$   
 $X_i, Y_i$  分别为  $X$  和  $Y$  群体第  $i$  个位点的等位基因频率

群体间遗传距离<sup>[14]</sup>:  $D = - \ln I$

## 2 结果

### 2.1 各个基因位点的遗传多态性

本研究对中国对虾人工选育的两个群体 40 个个体进行 10 个微卫星位点扩增, 共产生 74 个等位基因。每个位点产生的等位基因数从 3 到 13 不等, 产物片段大小为 0.1~1.5 kb。图 1 和图 2 分别表示了 中国对虾人工选育的第六代选育群体和第一代养殖群体在 RS0622 和 RS0683 位点的扩增图谱。

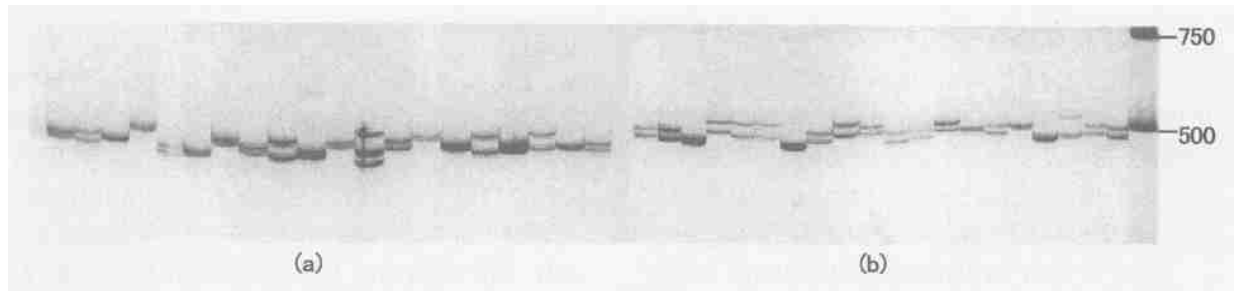


图 1 中国对虾在位点 RS0622 的 SSR 电泳图 (a: CP6; b: CP1)

Fig. 1 Demonstration of microsatellite locus amplified by RS0622 primer pairs in the two populations (a: CP6; b: CP1)

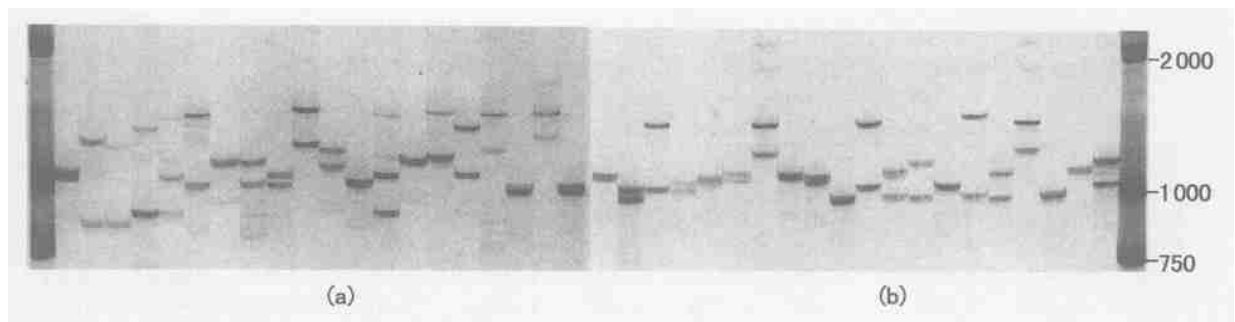


图 2 中国对虾在位点 RS0683 的 SSR 电泳图 (a: CP6; b: CP1)

Fig. 2 Demonstration of microsatellite locus amplified by RS0683 primer pairs in the two populations (a: CP6; b: CP1)

各微卫星位点的多态信息含量 (PIC)、等位基因数 ( $n_a$ )、有效等位基因数 ( $A_e$ )、基因型数目 ( $G$ )、多态位点杂合度(观测值  $H_o$ ; 期望值  $H_e$ ) 及

基于基因型的  $P$  值结果见表 2。从表 2 的数据可以看出, 在两个群体中, 所观察到的等位基因数都比有效等位基因数多。PIC 值从 0.5567 到

0.8877。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( $G$ )等的变化,来确定位点多态性变化规律。其中基因型数从4到18不等变化,例如在位点EN0033不同群体基因型数不同,两个群体分别为14(CP1),17

(CP6)。两个群体的平均杂合度分别为0.6400(CP1),0.6300(CP6),并通过计算基因型的 $P$ 值,确定了对Hardy-Weinberg平衡的偏离情况,其中发生极其显著偏离的群体位点用粗体在表中表示,其结果见表2。

表2 中国对虾两个群体10个微卫星位点的遗传多态性  
Tab. 2 Genetic variability at ten microsatellite loci in *F. chinensis*

位点 locus	CP1							CP6						
	PIC	$n_a$	$A_e$	$G$	$H_o$	$H_e$	$P$	PIC	$n_a$	$A_e$	$G$	$H_o$	$H_e$	$P$
EN0018	0.6900	4.00	3.5242	8.00	0.3500	0.7346	0.00011	0.7582	5.00	4.4693	12.00	0.8000	0.7962	0.16660
EN0033	0.8569	11.00	8.4211	14.00	0.8000	0.9038	0.05239	0.8877	13.00	9.3023	17.00	0.8500	0.9154	0.02760
RS062	0.8519	8.00	7.1429	12.00	0.8000	0.8821	0.00021	0.8097	6.00	5.5556	14.00	0.6000	0.8410	0.21455
RS0622	0.7968	7.00	5.2632	12.00	0.7500	0.8308	0.00003	0.7255	6.00	3.9216	12.00	0.4000	0.7641	0.00305
RS0653	0.7503	7.00	4.2553	10.00	0.7000	0.7846	0.02747	0.7717	7.00	4.7059	10.00	0.5000	0.8077	0.00089
RS0676	0.7480	6.00	4.2781	11.00	0.6500	0.7859	0.02497	0.7721	7.00	6.1069	10.00	0.3000	0.8577	0.00000
RS0683	0.8318	9.00	6.2992	13.00	0.7000	0.8628	0.03051	0.8862	11.00	9.1954	18.00	0.7500	0.9141	0.08554
RS0859	0.5713	6.00	4.2553	10.00	0.8000	0.7846	0.34133	0.7331	6.00	4.0000	10.00	0.8500	0.7692	0.15149
RS0956	0.7950	6.00	5.2288	10.00	0.2000	0.8295	0.00000	0.8116	7.00	5.6738	13.00	0.5500	0.8449	0.00159
RS1101	0.7357	3.00	2.5974	5.00	0.6500	0.6308	0.90888	0.5567	3.00	2.4465	4.00	0.7000	0.6064	0.22534
平均值 mean	0.7628	6.70	5.1265	10.50	0.6400	0.8029	0.13859	0.7713	7.10	5.5377	12.00	0.6300	0.8117	0.08766

## 2.2 两个群体的遗传变化

从表3可知,  $F_{is} < 0.05$ 表明两个群体遗传分化程度较弱。 $F_{is} < 0$ 表明有5个观察杂合度过剩的现象,其中在位点RS1101和RS0859两个群体都发生了观察杂合度过剩的现象。但对整个群体而言,两个群体均表现为一定程度的杂合子缺失。

通过对10个微卫星位点所检测到的表型频率进行遗传多样性计算分析(表3),结果表明,两个群体的Shannon多样性指数分别为1.6830、1.7382,整个选育群体(两个群体作为一个群体)

的遗传多样性指数为1.7742。从 $H_{pp}/H_p$ 比值来看,在位点RS1101和RS0676分别检测出群体内的最大和最小遗传多样性( $H_{pp}/H_p$ 分别为0.99132和0.93277),群体内遗传多样性均值为0.96415;而群体间的遗传多样性均值为0.03585,可见绝大部分的遗传变异是在群体内检测到的。此外,两个群体间加上偏差校正后相似性系数( $I$ )高达0.9187,彼此的遗传距离( $D$ )仅为0.0848(表4)。

表3 中国对虾在10个微卫星位点的 $F$ -分析及在两个群体间和群体内的遗传多样性分布

Tab. 3  $F_2$  statistics and Partitioning of genetic diversity of within and among two populations of *F. chinensis* at the ten microsatellite loci

位点 locus	$F_{is}$		$F_{it}$	$F_{st}$	$H^c$		$H_{sp}$	$H_{pp}$	$H_{pp}/H_{sp}$	$(H_{sp}^2 H_{pp})/H_p$
	CP6	CP1			CP6	CP1				
EN0018	-0.0306	0.5113	0.2349	0.0071	1.3145	1.5481	1.4719	1.4313	0.97215	0.02785
EN0033	0.0476	0.0922	0.0782	0.0091	2.2439	2.3670	2.3640	2.30545	0.97523	0.02477
RS062	0.4631	0.0741	0.2710	0.0143	1.7741	1.5242	1.7066	1.64915	0.96633	0.03367
RS0622	0.2683	0.0698	0.1780	0.0136	2.0205	1.7464	1.9721	1.88345	0.96633	0.03367
RS0653	0.3651	0.0850	0.2429	0.0205	1.6067	1.6761	1.7063	1.6414	0.96196	0.03804
RS0676	0.6413	0.1517	0.4255	0.0310	1.5717	1.8620	1.8406	1.71685	0.93277	0.06723
RS0683	0.1585	0.1679	0.1764	0.0160	1.9869	2.2960	2.2411	2.14145	0.95553	0.04447
RS0859	-0.1333	-0.0458	-0.0594	0.0273	1.5849	1.5661	1.6212	1.5755	0.97181	0.02819
RS0956	0.3323	0.7527	0.5475	0.0151	1.7165	1.8073	1.8099	1.7619	0.97347	0.02653
RS1101	-0.1839	-0.0569	-0.1071	0.0108	1.0104	0.9889	1.0084	0.99965	0.99132	0.00868
平均值 mean	0.2039	0.1825	0.2066	0.0166	1.6830	1.7382	1.7742	1.7106	0.96415	0.03585

表 4 中国对虾两个群体的 Nei 遗传距离及相似性系数

Tab. 4 Nei's genetic identity and genetic distance in the two populations of *F. chinensis*

	Nei (1972)		Nei (1978)	
	CP6	CP1	CP6	CP1
CP6		0.8757		0.9187
CP1	0.1327		0.0848	

注: 对角线以下为遗传距离, 对角线以上为相似性系数

Notes: Genetic identity (below diagonal) and genetic distance (above diagonal)

### 3 讨论

#### 3.1 中国对虾微卫星位点的高度多态性

衡量一个分子遗传标记的多态性程度的大小与其在群体中能够检测出来类型的多少直接有关, 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那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它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<sup>[16]</sup>。

在本实验中, 由表 2 可看出 10 个微卫星位点多态信息含量在 0.5567~0.8877 之间, 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情况。每个位点所有等位基因数从 3 到 13 不等, 比同工酶检测到等位基因数多。杂合度(两个群体的平均杂合度分别为 0.6400, 0.6300)也比同工酶所报道的高。与同工酶等技术相比微卫星位点具有高度多态, 共显性遗传等优点, 因此 SSR 标记被广泛应用于生物学研究的各个领域。

#### 3.2 杂合缺失和无效等位基因

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; 在两个选育群体中, 都有杂合度的缺失, 暗示出无效等位基因的存在, 并且我们把这种情况当作纯合子而不是杂合子。另外, 在聚合酶链式反应中聚合酶连续重复拷贝模板中的某种核苷酸的现象即口吃现象<sup>[15]</sup>引起的两个等位基因重叠, 应为杂合基因型而被错误的作为纯合基因型的现

象, 是引起基因型对 Hardy-Weinberg 平衡的偏离另一个因素。基于无效等位基因的数据设定, 我们还进行了基因型对 Hardy-Weinberg 平衡的偏离程度检验, 发现在群体内杂合度过剩的微卫星位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡。因此, 可能是无效等位基因在一些微卫星位点是出现的, 而在这些位点被忽略了。Ball 等<sup>[16]</sup>发现无效等位基因是作为解释杂合度缺失现象不可缺少的因素之一。杂合度的缺失或过剩但未偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 可能是由于人工选育过程中, 选择压力造成的结果, 但家系混养也可能是出现这种现象的根本原因<sup>[17]</sup>。

#### 3.3 两个群体的遗传变化

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<sup>[18]</sup>, Hedgecock 等<sup>[19]</sup>在总结了 65 种虾蟹类的平均杂合度后也得出相同的结论。根据本研究结果, 中国对虾第六代选育群体的平均杂合度(0.6300)比第一代养殖群体的平均杂合度(0.6400)略低, 本研究的结果与王伟继等<sup>[4]</sup>的结果相似。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性较低的主要原因, 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。

本实验中, 两群体间的遗传相似度为 0.9187, 彼此间的遗传距离仅为 0.0848, 这与两群体的遗传多样性分析中遗传多样性差异百分比(1.6830/1.7382)、群体内遗传多样性均值为 0.96415, 而群体间的遗传多样性均值为 0.03585 基本吻合, 亦即有 96.415% 的遗传多样性是来自群体内, 只有 3.585% 的遗传多样性来自群体间, 这表明, 绝大部分的遗传多样性是在群体内检测到的, 体现出人工选育群体的遗传多样性没有显著降低。另外, 根据  $F_{it}$  和  $F_{st}$  值对 2 个世代群体遗传分化程度进行了检验, 结果表明 2 个世代群体遗传分化程度较低。它们都说明在选育过程中, 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。在选育过程中,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;同时,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。总之,结果均说明第六代群体还有较大的选育潜力,可以继续保持遗传效应,最终保证选种育种工作的成功。

#### 参考文献:

- [1] 邓景耀,叶昌臣,刘永昌. 渤海的对虾及其资源管理 [C]. 北京:海洋出版社, 1990. 36- 164.
- [2] 岑 丰. 我国水产养殖业的回顾与展望 [J]. 现代渔业信息, 1993, 8(1):2- 6.
- [3] 李 健,牟乃海,孙修涛,等. 无特定病原中国对虾种群选育的研究 [J]. 海洋科学, 2000, 25(12): 30- 33.
- [4] 王伟继,孔 杰,包振民,等. 中国对虾 4 个种群的同工酶遗传变异 [J]. 生物多样性, 2001, 9(3):241- 246.
- [5] 张子平,王艺磊. 中国对虾两个种群的 F1 的 LDH 和 MDH 同工酶初步分析 [J]. 热带海洋, 1994, 13(1): 87- 90.
- [6] 邱高峰,常林瑞,徐巧婷,等. 中国对虾 16SrRNA 基因序列多态性的研究 [J]. 动物学研究, 2000, 21(1): 35- 40.
- [7] 石 拓,孔 杰,刘 萍,等. 用 RAPD 技术对中国对虾遗传多样性分析- 朝鲜半岛西海岸群体的 DNA 多态性 [J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 609- 616.
- [8] Botstein D, White R L. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Animal Genetics, 1980, 32: 314- 331.
- [9] Crow A J, Kimura M. Evolution in sexual and asexual population [J]. Am Nat, 1965, 99: 439- 450.
- [10] King L M, Schaal B A. Ribosomal DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis* [J]. Evolution, 1989, 42: 1117- 1119.
- [11] Beardmore J A, Mair G C, Lewis R I. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture [J]. Aquac Res, 1997, 28: 829- 839.
- [12] Wright S. Variability within and among natural populations [M]. Chicago, The Univ. of Chicago Press, 1978.
- [13] Levene H. On a matching problem in genetics [J]. Ann Math Stat, 1949, 20: 91- 94.
- [14] Nei M. Genetic distance between populations [J]. Am Nat, 1972, 106: 283- 292.
- [15] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. Genetics, 1978, 89: 583- 590.
- [16] Ball A O, Leonard S, Chapman R W. Characterization of (GT)<sub>n</sub> microsatellites from native white shrimp *Penaeus setiferus* [J]. Mol Ecol, 1998, 7: 1251- 1253.
- [17] Zhen K X, Jurgene H P, Leobert D, et al. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines using microsatellites [J]. Aquac, 2001, 199: 13- 40.
- [18] 李思发. 鱼类选育群体遗传性能的保护 [J]. 水产学报, 1988, 12(3):283- 290.
- [19] Hedgecock D, Tracey M L, Nelson K. Genetic. The biology of crustacea [M]. New York: Academic Press, 1982: 284- 403.