

脊尾白虾 3 个野生群体遗传多样性的微卫星分析

贾舒雯^{1,2}, 刘 萍^{2*}, 李 健², 李吉涛², 高保全², 陈 萍², 潘鲁青¹

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 利用 12 对微卫星标记分析了莱州湾(LZ)、海州湾(HZ)、象山(XS)脊尾白虾野生群体的遗传多样性。12 个位点在 3 个群体中均表现出高度的多态性。12 个微卫星位点共得到 115 个等位基因, 各个位点的等位基因数介于 6~14, 平均每个位点上的等位基因数为 9.583 3 个; 各个位点的平均期望杂合度(H_e)、平均观测杂合度(H_o)、平均多态信息含量(PIC)分别为 0.827 8、0.517 5、0.705 1, 表明 3 个脊尾白虾野生群体均有良好的多态性。经 F -统计分析, 各个群体间的遗传分化指数均值为 0.093 0 ($0.05 < F_{st} < 0.15$), 呈中等水平分化。基于 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类分析显示莱州湾群体与象山群体距离最近, 聚为一类, 海州群体单独聚为一类。

关键词: 脊尾白虾; 野生群体; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)隶属节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、游泳亚目(Natantia)、长臂虾科(Palaemonidae)、白虾属(*Exopalamon*), 其产量仅次于中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)和中国毛虾, 是我国重要的海水养殖虾类之一^[1], 广泛分布于中国大陆沿岸和朝鲜半岛西岸的浅海低盐水域, 以渤海和黄海数量最大^[2]。脊尾白虾具有繁殖能力强、生长速度快、生长季节长和环境适应性广等优点^[1, 3]。然而近年来由于环境污染和过度捕捞, 野生脊尾白虾资源受到一定的影响^[4-7]。研究脊尾白虾遗传结构及其遗传多样性现状, 对于保护及合理地开发利用脊尾白虾资源具有重要的意义。

微卫星(microsatellite)已经普遍应用于遗传图谱构建^[8-10], 遗传多样性分析^[11-17]等方面。近年来, 微卫星技术越来越多地应用在水产动物的遗传多样性分析上^[13-17], 但是关于脊尾白虾遗传多样性分析的报道较少。

本研究利用本实验室开发的 12 对微卫星引物

对采自渤海的莱州湾、黄海的海州湾和东海的象山脊尾白虾群体的遗传多样性进行分析, 为保护脊尾白虾种质资源提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 样品来源及 DNA 提取

实验用脊尾白虾于 2010 年 5 月分别采自渤海的莱州湾(LZ)、黄海的海州湾(HZ)和东海的象山(XS), 各 200 尾左右, 活虾运回实验室后-80 °C 保存。从每个群体分别随机选取 30 尾用于本实验。采用酚-氯仿方法提取脊尾白虾腹部肌肉组织 DNA, -20 °C 保存。

1.2 引物设计与合成

本研究所利用的 12 对微卫星引物, 均为本实验室通过磁珠富集法开发的脊尾白虾微卫星引物, 由生工生物工程(上海)有限公司合成。微卫星引物序列见表 1。

1.3 微卫星检测

PCR 为 20 μ L 反应体系: 2.0 μ L 10 \times PCR Buffer, 1.6 μ L dNTP(各 2.5 mmol/L), 1.2 μ L MgCl₂(25 mmol/L),

收稿日期: 2011-12-25

修回日期: 2012-09-10

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AAA100809); 山东省科技发展计划项目(2011GHY11526)

通讯作者: 刘 萍, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

表 1 脊尾白虾微卫星引物的序列
 Tab. 1 Sequences of SSR primers of *Exopalaemon carinicauda*

位点 locus	登录号 accession number	核心重复序列 repeat motif	上下游引物(5'-3') primer sequence	退火温度/℃ annealing temperature
EC1018	JF912425	(CT) ₃₆	F: TCCTCCACCATTATTACC R: CCATCCCATTATCTGTTC	51
EC1210	JF912426	(AG) ₂₄	F: TCAGCAGGTGTCTGGAGT R: TCACCGTCCTTGTCTTG	60
EC1212	JF912427	(CT) ₁₀ CC(CT) ₂₈	F: AACCAAGTTCAACATAAAGGACAT R: TAAAGGAGAAAATGACAGTATGCG	54
EC1109	JF912428	(TC) ₂₅	F: TTTGACGGACGGAAACAC R: CAGGCATGACAGTGACGATA	58
EC1020	JF912430	(AG) ₂₂ G(GA) ₁₃	F: TCTACTTACCTTCTATCG R: TGTGAAATCATTATAAC	47
EC703	JF912431	(TC) ₂₆	F: GCCAGGACTAATGGGATGACTA R: CGCTTTAGCAGAGTTAGGTGTG	60
EC137	JF912432	(CT) ₂₈	F: ATACCAAAGCGGACAGAT R: CAACTAAATTCCATTGATGATT	51
EC814	JF912421	(TC) ₅ C(CT) ₂₅	F: TCTTACGGACATCGTTGCCTTA R: GCACTGTCAAGTCTTGCCAGAT	61
EC135	JF912435	(GA) ₁₇ GG(GA) ₉	F: ATTCTTTGCCTTGTGTTG R: CTAATGCTTGACCCACAT	55
EC1211	JF912436	(TC) ₂₆	F: GGAAATGGTAACTCAGACCCAA R: CGGCGAACTCAATTACTGC	60
EC819	JF912439	(AG) ₂₅	F: GGCAAATAATAGTCATAAAAAC R: TATCAAACAACCTTACATCACAT	54
EC1122	JF912441	(TC) ₅ TG(TC) ₂₃	F: CTGACCATCAAGGTGTAA R: GCCCAGGAAGGAGAAATA	58

上下游引物各 0.5 μL 引物(100 μmol/L), 0.2 μL *Taq* 酶(5 U/μL), 模板 1.5 μL, ddH₂O 补至 20 μL。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 45 s, 47~61 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 25 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

PCR 扩增产物经过 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 硝酸银染色, 碳酸钠显色。Marker 采用 pBR322DNA/*Msp*I 和 pBR322/*Bsu*R I Marker。

1.4 数据统计与分析

用 POPGENE 32 和 Botstein 等^[18]的公式计算等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)和检验 Hardy-Weinberg 平衡、*F*-分析、遗传距离(*D*)、和微卫星位点多态信息含量(*PIC*)。根据遗传距离(*D*), 使用 MEGA 3.0 构建 UPGMA 系统树。

2 结果

2.1 群体遗传多样性

12 对微卫星引物均能在 3 个脊尾白虾群体中扩增出清晰的条带, 图 1 为微卫星位点 EC1109 的扩增图。12 个微卫星位点的等位基因数和多态信息见表 2。12 个位点的等位基因数介于 6~14, 共得到 115 个等位基因, 平均每个位点上的等位基因数为 9.583 3 个, 其中位点 EC1109 的等位基因数最多, 为 14 个; 而位点 EC1122 和 EC819 最少, 仅为 6 个。各位点的期望杂合度介于 0.765 3~0.866 0, 其中 EC1020 的期望杂合度最低为 0.765 3; EC1018 的期望杂合度最高为 0.866 0。*PIC* 值介于 0.728 9~0.845 2。

在 3 个野生群体中遗传多样性差距不大(表 3)。

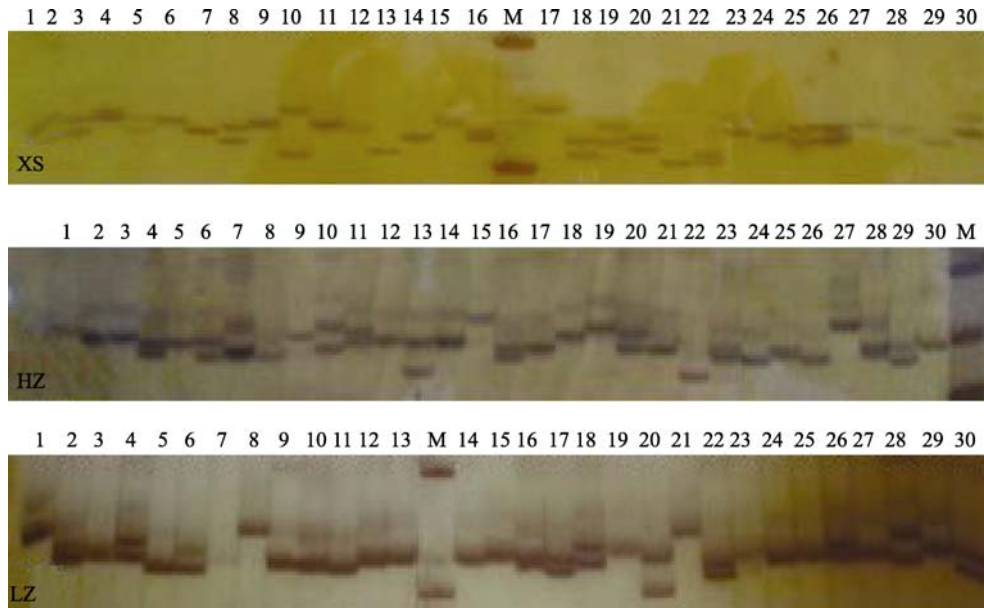


图 1 引物 EC1109 在 3 个脊尾白虾群体扩增的电泳图谱
 Fig. 1 Electrophoretogram of locus EC1109 of 3 stocks of *E. carinicauda*

表 2 脊尾白虾 12 个微卫星位点有效等位基因数、杂合度及多态信息含量
 Tab. 2 N_e, H_e, H_o and PIC for 12 microsatellite loci of *E. carinicauda*

位点 locus	等位基 因数 N_a	有效等位 基因数 N_e	期望杂 合度 H_e	观测杂 合度 H_o	多态信 息含量 PIC
EC1020	8	4.1617	0.7653	0.2464	0.7289
EC1210	12	6.7356	0.8578	0.5735	0.8347
EC703	9	5.1100	0.8111	0.2167	0.7787
EC1211	10	5.8290	0.8333	0.7176	0.8066
EC1122	6	4.9549	0.8037	0.3836	0.7670
EC1109	14	6.1866	0.8436	0.4125	0.8198
EC819	6	4.7324	0.7934	0.5714	0.7566
EC1212	11	6.8832	0.8597	0.6628	0.8389
EC137	11	5.7245	0.8308	0.5921	0.8027
EC1018	10	7.1488	0.8660	0.6486	0.8452
EC135	8	4.9991	0.8055	0.6986	0.7723
EC814	10	7.0295	0.8636	0.4865	0.8421
mean	9.5833	5.7913	0.8278	0.5175	0.7051

平均等位基因数介于 5.666 7~6.166 7; 平均观测杂合度介于 0.426 7~0.570 1; 平均期望杂合度介于 0.749 6~0.775 9; 平均 PIC 值在 0.678 0~0.725 8。象山群体的平均等位基因最多(6.166 7), 莱州群体的最小(5.666 7)。莱州群体的平均观测杂合度(0.570 1)最大, 海州湾群体最小(0.426 7)。

2.2 Hardy-Weinberg 平衡状态

利用 χ^2 检验对每个群体中每个位点是否符合

Hardy-Weinberg 定律进行检验(表 3), 显著性标准经 Bonferroni 法校正($P < 0.001$)后, 莱州湾群体有 2 个位点极显著地偏离 Hardy-Weinberg 定律, 象山群体 5 个位点极显著偏离, 海州湾有 7 个位点极显著偏离。在各个位点中固定指数 F_{is} 均大于零, 说明各个位点存在不同程度的杂合子缺失。

2.3 群体遗传分化

利用遗传分化指数(F_{st})与基因流(N_m), 分析 3 个群体间的遗传分化情况(表 4)。Wright^[19]提出, 遗传分化指数 F_{st} 介于 0~0.05 的种群遗传分化很弱, 0.05~0.15 的种群遗传分化中等, 0.15~0.25 的种群遗传分化很大, 大于 0.25 表明种群遗传分化极大。在 12 个基因座中有 4 个基因座(33.33%)的遗传分化指数处在群体间无遗传分化的标准范围内; 6 个基因座(50.00%)处于中等的种群遗传分化; 2 个基因座(EC703, EC1212)种群遗传分化很大, 各基因座的遗传分化指数均值为 0.093 0, 基因流的均值为 2.439 2。

根据等位基因频率计算出 3 群体间的脊尾白虾 Nei's 遗传距离和遗传相似度如表 5 所示, 遗传距离介于 0.493 1~0.711 0, 遗传相似度介于 0.491 2~0.610 7。象山群体与莱州湾群体遗传距离最近(0.493 1); 象山与海州湾群体遗传距离最远(0.711 0)。基于遗传距离, 利用 UPGMA 法构建的聚类图 2。象山群体与莱州湾群体聚为一类, 海州湾群体单独聚为一类。

表 4 12 个微卫星位点在脊尾白虾 3 个群体中的 F -分析

Tab. 4 F -statistics for 3 populations of *E. carinicauda* at 12 microsatellite loci

位点 locus	遗传分化指数 F_{st}	基因流 N_m^*
EC1020	0.0612	3.8355
EC1210	0.1059	2.1117
EC703	0.1567	1.3454
EC1211	0.0650	3.5967
EC1122	0.0465	5.1274
EC1109	0.0605	3.8824
EC819	0.0933	2.4286
EC1212	0.1833	1.1139
EC137	0.0649	3.6029
EC1018	0.0649	1.0543
EC135	0.0338	7.1366
EC814	0.0338	5.5152
mean	0.0930	2.4392

注: N_m 基因流估计值, $N_m = 0.25(1 - F_{st})/F_{st}$ 。

Notes: N_m represents gene flow estimated from $0.25(1 - F_{st})/F_{st}$.

表 5 3 个脊尾白虾群体间的遗传距离(D , 对角线下)及遗传相似性系数(I , 对角线上)

Tab. 5 Nei's genetic distance (D , below diagonal) and genetic identity (I , above diagonal) among *E. carinicauda* stocks

pop ID	象山 XS	海州 HZ	莱州 LZ
象山 XS		0.4912	0.6107
海州 HZ	0.7110		0.5456
莱州 LZ	0.4931	0.6059	

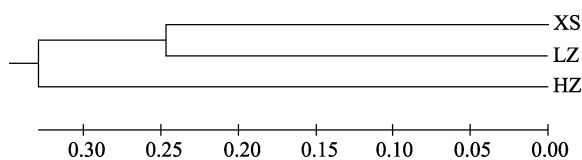


图 2 基于 D 遗传距离的 UPGMA 聚类树

Fig. 2 UPGMA clustering tree based on D genetic distance

3 讨论

3.1 遗传多样性

遗传多样性是生物多样性的重要组成部分, 包括种内不同群体之间或同一群体内不同个体的遗传变异的总和。遗传变异是物种适应环境变化和自身进化的动力, 也能够给种群带来适合度方面的优势, 并且有利于人工育种^[20]。遗传变异越丰富, 杂合度越高, 遗传多样性越高, 对其群体进行种质资源保护和良种选育的潜力也就越大。 A , H_o , H_e

和 PIC 等是衡量遗传多样性的几个重要参数, 能从多方面反映群体的遗传多样性。在本研究中, 3 个群体的平均期望杂合度(H_e)为 0.761 4, 高于吴勤超等^[21]分析 4 个黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 野生群体($H_e = 0.580 4$)的结果, 与洪泽湖日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*)($H_e = 0.698 2 \sim 0.804 4$)^[15], 澳大利亚罗氏沼虾(*M. rosenbergii*)($H_e = 0.66 \sim 0.90$)^[22]相近。说明 3 个野生脊尾白虾的杂合度较高, 群体内变异丰富。

从 PIC 值结果来看, 3 个群体的均值为 0.701 1, 其中莱州湾群体最高(0.725 8), 象山群体最低(0.678 0), 均具有较高的遗传多样性水平($PIC > 0.5$)。贾智英等^[23]利用微卫星分析凡纳滨对虾的遗传多样性, PIC 为 0.243 2~0.794 8, 冯建彬等^[15]分析洪泽湖日本沼虾, PIC 为 0.564 6~0.931 8。凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) PIC 值略低于本实验, 可能是因为凡纳滨对虾是引进种, 来源较为单纯。而日本沼虾和脊尾白虾均为本土野生群体, 所以 PIC 值相近, 并且高于凡纳滨对虾。

遗传多样性高, 遗传变异丰富, 从而群体的适应性强, 繁殖能力高, 生长性能好, 有利于群体的发展和进化。从本研究的结果来看, 3 个脊尾白虾群体的遗传多样性丰富、遗传潜力较高, 对于良种的选育、种质资源的保护十分有利。

3.2 遗传平衡

遗传平衡定律对群体中基因频率和基因型频率的本质关系做了阐述, 为研究生物群体的遗传稳定性提供理论基础, 为了解群体遗传结构提供方便^[24]。本研究的结果表明, 在这 12 个位点上, 3 个群体不同程度地偏离了 Hardy-Weinberg 平衡, Bonferroni 校正后, 仍至少有 2 个位点极显著偏离了 Hardy-Weinberg 平衡, 表现出杂合子缺失, 但是在大多数位点上符合 Hardy-Weinberg 平衡。杂合子缺失可能与无效基因、样本数量大小有关、还可能与种群退化、性别比例不均衡、亲缘近交和人为干扰程度大等引起的稀有碱基的丢失有关^[25]。部分位点偏离了 Hardy-Weinberg 平衡可能是由于环境变化、人为干扰, 对基因频率产生了影响导致这些位点偏离了 Hardy-Weinberg 平衡。脊尾白虾群体偏离 Hardy-Weinberg 平衡可能是由于近年来环境变化或在不同水域的捕捞和养殖使脊尾白虾被迫迁移所导致。

3.3 遗传结构

遗传分化指数(F_{st})和遗传距离(D)是反映物种遗传结构的两个重要参数。从本研究结果来看,群体间的 F_{st} 均值为 0.093 0, 根据 Wright^[19]的研究,呈中等分化水平($0.05 < F_{st} < 0.15$)。脊尾白虾群体分化较大可能是由于海州湾,莱州湾,象山之间的距离较远,而脊尾白虾不善于长距离游泳,扩散能力较弱。因此,脊尾白虾群体间基因交流可能存在一定的困难,导致群体间出现较大的遗传分化。Wright^[19]认为随着地理距离的增加物种遗传分化的程度增大。但是也有学者认为遗传分化程度除了与地理距离有关,还与物种生物学特性密切相关^[26]。在吴勤超等^[21]利用微卫星对黄颡鱼遗传结构的分析中,黄颡鱼的遗传距离除了与地理距离有关还与生存环境密切相关,导致洞庭离乐山(约 900 km)比赤水离乐山(约 300 km)要远,但遗传距离与赤水相比却更近。在本研究中,象山与莱州湾距离最远,但是遗传距离却更近。这可能与近些年这些海域的环境变化对脊尾白虾群体有一定的影响或沿岸脊尾白虾养殖发展导致脊尾白虾群体的迁移有关。

参考文献:

- [1] 王兴强, 阎斌伦, 马牲, 等. 脊尾白虾生物学及养殖生态学研究进展[J]. 齐鲁渔业, 2005, 22(8): 21-23.
- [2] 李新正, 刘瑞玉, 梁象秋. 中国长臂虾总科的动物地理学特点[J]. 生物多样性, 2003, 11(5): 393-406.
- [3] 时冬晴, 叶建生. 脊尾白虾的生物学特性及健康养殖技术[J]. 渔业经济研究, 2007 (5): 40-42.
- [4] 郎晓辉, 李悦, 孔范, 等. 莱州湾环境存在的问题及保护对策[J]. 现代农业科技, 2011 (3): 296-297.
- [5] 范留邦, 陈志远, 信锦鸿. 海州湾环境现状评价[J]. 环境工程, 2010, 28: 303-332.
- [6] 张存勇, 陈斌林. 海州湾水质模糊综合评价及其演变分析[J]. 海洋环境科学, 2010, 29(3): 411-414.
- [7] 秦晓光, 程祥圣, 刘富平. 东海海洋大气颗粒物中重金属的来源及入海通量[J]. 环境科学, 2011, (8): 2193-2196.
- [8] 孙效文, 张晓锋, 赵莹莹, 等. 水产生物微卫星标记技术研究进展及其应用[J]. 中国水产科学, 2008, 15(4): 689-70.
- [9] Kocher R T D, Lee W J, Sobolewska H, et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Genetics, 1998, 148(3): 1225-1232.
- [10] Lee BY, Lee W J, Streefman J T, et al. A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis spp.*)[J]. Genetics, 2005, 170(1): 237-244.
- [11] 吴晓雷, 贺超英, 陈受宜, 等. 用 SSR 分子标记研究大豆属种间亲缘进化关系[J]. 遗传学报, 2001, 28(4): 359-366.
- [12] 廖小林, 俞小牧, 谭德清, 等. 长江水系草鱼遗传多样性的微卫星 DNA 分析[J]. 水生生物学报, 2005, 29: 113-119.
- [13] Yu H, Li Q, Yu R H. Genetic differentiation between Zhe oyster *Crassostrea plicatula* and Pacific oyster *Crassostrea gigas* populations in China assessed by microsatellite analysis[J]. Japanese Society of Fisheries Science, 2008, 74: 88-97.
- [14] Li Q, Yu H, Yu R H. Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China[J]. Aquaculture, 2006, (259): 95-102.
- [15] 冯建彬, 吴春林, 丁怀宇, 等. 洪泽湖日本沼虾 9 个野生群体遗传多样性微卫星分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 218-227.
- [16] 熊美华, 史方, 徐念, 等. 微卫星标记分析乌江流域白甲鱼群体的遗传多样性[J]. 水生态学杂志, 2(2): 122-125.
- [17] 孙昭宁, 刘萍, 李健, 等. 微卫星 DNA 技术用于中国对虾家系构建中的系谱认证中[J]. 中国水产科学, 2005, 6(12): 694-701.
- [18] Botstein D, White R L, Skolnick K M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32: 314-331.
- [19] Wright S. Evolution in mendelian populations [J]. Genetics, 1931, 16: 97-159.
- [20] 张桂玲, 黎中宝, 谢德华. 羊鲍野生群体遗传多样性与分化的研究[J]. 海洋科学, 2011, 35(3): 12-16.
- [21] 吴勤超, 梁宏伟, 李忠, 等. 黄颡鱼微卫星标记的筛选及三个野生群体的遗传结构分析[J]. 生物技术通报, 2010, (3): 154-159, 163.
- [22] Chand V, De bruyn M, Mather P B, et al. Microsatellite loci in the eastern form of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)[J]. Molecular Ecology Resources, 2005, 5 (2): 308-310.
- [23] 贾智英, 全迎春, 梁利群, 等. 凡纳滨对虾微卫星 DNA 的筛选及其特性的研究[J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(1): 11-15.
- [24] 苏从成, 张海容. 遗传平衡定律的推广形式及其应用[J]. 畜牧兽医杂志, 2009, 28(6): 24-26.
- [25] Antoro S, Na-nakom U, Koedrrang W. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers[J]. Marine Biotechnology, 2006, 8(1): 17-26.
- [26] Avise J C. Phylogeography: the history and formation of species[J]. Cambridge: Harvard University Press, 2002.

Microsatellite analysis of genetic diversity in 3 wild populations of *Exopalaemon carinicauda*

JIA Shu-wen^{1, 2}, LIU Ping^{2*}, LI Jian², LI Ji-tao², GAO Bao-quan², CHEN Ping², PAN Lu-qing¹

(1. Fisheries of College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The *Exopalaemon carinicauda*, subordinated to Decapoda, Palaemonidae, is an endemic shrimp species in China and is widely distributed in the coastal waters of China and west coast of the Korean Peninsula, especially in the Yellow Sea and Bohai Sea. So far, the *E. carinicauda*, has been studied on aquaculture, biology and ecology, but few reports were about population genetics. Fisheries management and conservation of this important marine species rely on a better understanding of its population genetics. So in this study, genetic diversity of 3 wild stocks, collected from Laizhuo Bay(LZ), Haizhuo Bay(HZ), Xiangshang(XS), were investigated using 12 microsatellite loci. A total of 115 alleles were detected in 12 microsatellite loci and the number of alleles ranged from 6 to 14(mean 9.583 3). The expected and observed heterozygosities in 12 loci ranged from 0.765 3 to 0.866 0 (mean 0.827 8) and from 0.216 7 to 0.717 6 (mean 0.517 5), respectively. The average polymorphic information content of 12 loci was 0.7051. Mean coefficient of gene differentiation for loci(F_{st}) was 0.093 0($0.05 < F_{st} < 0.15$) by F -statistics. UPGMA clustering tree based on D genetic distance showed that Laizhuo Bay stock was more closely related to Xiangshang stock and Haizhuo Bay stock was farthest related to Xiangshang stock.

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; wild populations; microsatellite; genetic diversity

Corresponding author: LIU Ping. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn