

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170227001

http://www.yykxjz.cn/

王军, 王清印, 孔杰, 孟宪红, 曹家旺, 王明珠, 冯亚萍, 吕丁. 中国明对虾人工选育群体与野生群体遗传多样性的 SSR 分析. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 104–111

Wang J, Wang QY, Kong J, Meng XH, Cao JW, Wang MZ, Feng YP, Lü D. SSR analysis on genetic diversity in breeding and wild populations of *Fenneropenaeus chinensis*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 104–111

中国明对虾人工选育群体与野生群体 遗传多样性的 SSR 分析*

王 军^{1,4} 王清印^{1,2①} 孔 杰^{1,2} 孟宪红^{1,2}
曹家旺^{1,4} 王明珠^{1,4} 冯亚萍^{1,4} 吕 丁³

- (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. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
3. 南京农业大学 南京 210095; 4. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 利用微卫星标记技术分析了中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)野生群体(Wild Population, WP)和“黄海 2 号”第 10 代选育群体(Breeding Population, BP)的遗传多样性,以检测累代人工选育对中国明对虾群体遗传结构的影响。结果显示,15 个微卫星位点共检测到 462 个等位基因,微卫星位点等位基因数(N_a)和有效等位基因数(N_e)分别为 3~44 个和 2~29 个,多态信息含量(PIC)为 0.518~0.964。野生群体和选育群体的平均观测杂合度分别为 0.852 和 0.810,15 个微卫星位点的等位基因频率在 2 个群体发生了显著的变化。通过计算 P 值确定位点 Hardy-Weinberg 平衡偏离情况, F_{is} 结果显示,共有 11 个群体位点表现为杂合子过剩,Shannon 指数(H)分别为 2.786 和 2.399。2 个群体的 Nei's 无偏遗传距离(uD)和无偏遗传相似度(uI)分别为 0.177 和 0.838,遗传分化指数为 0.017($P=0.001$),表明群体发生了弱遗传分化。遗传变异来源分析显示,只有 7.50% 的变异来自于群体间,其余遗传变异均来自于个体间。结果表明,人工选育的中国明对虾“黄海 2 号”第 10 代群体具有较高的遗传多样性,仍具有很大的选育潜力,可以继续作为选育材料。

关键词 中国明对虾“黄海 2 号”;野生群体;微卫星;遗传多样性

中图分类号 S937.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0104-08

中国明对虾亦称中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*),主要分布在太平洋西北海岸的黄海和渤海海区的山东、河北、辽宁、天津及江苏近海(王清印,2014)。20 世纪 80 年代,中国对虾养殖技术得到突破,中国对虾的养殖产量迅速增加,到 1991 年年产量达

到 20 万 t,成为我国最重要的对虾养殖品种(李健等,2015)。然而,高速发展的中国对虾养殖业遇到诸多问题的挑战,尤其是 1993 年白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)的出现,使中国对虾的养殖业迅速衰退。新品种的培育为中国对虾养殖业走

* 中国水产科学研究院基本科研业务费专项国际合作项目(2016GH06)、国家自然科学基金面上项目(41676148)、山东省农业良种工程项目“多性状新品种的选育与产业化”和现代农业产业技术体系专项资金(CARS-48)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2016GH06), the National Natural Science Foundation of China (41676148), the Taishan Scholar Program for Seed Industry, and China Agriculture Research System (CARS-48)]. 王 军, E-mail: 1290702603@qq.com

① 通讯作者:王清印,研究员, E-mail: wangqy@ysfri.ac.cn

收稿日期:2017-02-27, 收修改稿日期:2017-03-15

出困境提供了希望(Wang *et al.*, 2003)。中国对虾“黄海 2 号”在连续多代的选育过程中, 为了保持选育群体的遗传多样性水平, 近交一直被控制在小于 1% 的水平(罗坤等, 2014)。但累代人工选育是否会降低中国对虾的遗传多样性, 影响中国对虾的选育效果, 尚缺少实际检测数据的支撑。

微卫星又称简单重复序列(Simple Sequence Repeat, SSR), 具有反应快速、技术简单、多态性高、共显性且符合孟德尔遗传等特点, 现广泛应用于水生生物的遗传多样性分析。刘连为等(2014)利用筛选的 8 个微卫星位点对北太平洋柔鱼(*Ommastrephes bartramii*)6 个群体的遗传多样性及遗传结构进行分析, 显示具有较高的遗传多样性水平; Wang 等(2016)利用 8 个微卫星位点分析了中国对虾亲本和回捕群体的遗传多样性, 显示 2 个群体均具有较高的遗传多样性; 毛守康等(2016)利用 14 个微卫星位点分析了梭鱼(*Liza haematocheila*)4 个野生地理群体的遗传多样性。

为进一步做好中国对虾的选育工作, 本研究利用

筛选的 15 对微卫星引物对韩国西海岸捕获的中国对虾野生群体和“黄海 2 号”人工选育第 10 代群体进行遗传多样性分析, 以期深入了解累代人工选育条件下中国对虾遗传多样性水平和群体遗传结构的变化, 为后续的人工选育、遗传改良和种质资源保护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中国对虾野生群体是 2013 年从韩国西海岸(34°30'N, 127°30'E)捕获。人工选育群体为中国对虾“黄海 2 号”连续选育第 10 代群体。野生群体和人工选育群体各随机取 40 尾, 取肌肉组织于-80℃保存, 用于 DNA 的提取。

微卫星引物: 利用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术筛选多态性高的 SSR 引物, 共获得 15 对多态性高、反应好的中国对虾 SSR 引物。对正向引物的 5'端进行荧光标记, 荧光标记种类为 FAM、HEX、TAMRA

表 1 中国对虾 15 个微卫星位点的引物序列及其特征

Tab.1 Primers and characteristics of 15 microsatellites of *F. chinensis*

位点 Locus	GenBank 登录号 GenBank accession No.	引物序列 Primer sequences (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	荧光标记 Marker
RS1101	AY132811	F: CGAGTGGCAGCGAGTCCT R: TATTCACGCTCTTGTC	52	FAM
EN0033	AY132813	F: CCTTGACACGGCATTGATTGG R: TACGTTGTGCAAACGCAAGC	64	HEX
BX06-2	/	F: CCTTCGTCGTCCTCTTACTA R: TGGAAGAACTAAGAGAGCA	55	FAM
BX0130	AY132826	F: CTTTATCTACACACAAACCGC R: TGATACCAAAGGCTGTAGAGG	55	TAMRA
IOPC14	/	F: CGACCATTTTCGGTGTTTC R: GCTGCGATAATTGAGACG	55	HEX
Hrd4292	EF580117	F: AAGGGATGACAGGACATTTGC R: GACGCCATTTCTTCTCTTTCTG	58	HEX
FCKR013	JQ650353	F: GCACATATAAGCACAAACGCTC R: CTCTCTCGCAATCTCTCCAAC	55	ROX
SX201	AF525779	F: TATCGTTGAGGTTTCGTCATGC R: TCGCACTTCGTGTCAAGTACC	60	FAM
RS0683	AY132823	F: AACTCACTTATGTCACACTGC R: TACACACCAACTCAATCTCC	64	ROX
RS062	AY132778	F: TGCTGAAGCTACACTACCTTCG R: TGATGAAACGCAAGCAAAGGC	63	FAM
BM29561	BM295611	F: AACAGACCACATACGGGAC R: TTTTCGGAAGTAACATCACA	53	HEX
BX916	/	F: AAGTGCTGATAGTGGAAAGG R: TCTGGACAGATGTGTTTGACGC	58	TAMRA
Hrd4353	EF580118	F: AGACTGTGAGGCAAATCCCCG R: AGGCACTTCATTTTCGCTTACAG	57	TAMRA
FCKR002	JQ650349	F: CTCAACCCTCACCTCAGGAACA R: AATTGTGGAGGCGACTAAGTTC	60	ROX
113(B)	AY132816	F: TGTC AAGAGAGCGAGAGGGAGG R: ATGCTTGTGACTTAGTGTAGGC	66	ROX

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用醋酸铵法提取中国对虾尾节肌肉全基因组 DNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后 (GeneFinder 染色), 凝胶成像系统显示 DNA 无降解, 利用 Biodropsis2000 超微量紫外分光光度计定量, 用灭菌水将 DNA 浓度稀释到 50 ng/ μ l, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.2 PCR 扩增和基因测序 PCR 反应体系总体积为 25 μ l: 模板 DNA 2.0 μ l (100 ng), 2 \times TSINGKETM Master Mix 12.5 μ l (北京擎科新业生物技术有限公司), 正向和反向引物各 0.5 μ l, 灭菌超纯水 9.5 μ l。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 30 s (各引物的退火温度见表 1), 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物的基因测序工作在生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

2 数据分析

利用 Cervus 3.0.7 软件计算 15 个微卫星位点的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和多态信息含量(PIC)。利用 GenALEx 6.502 软件进行 Hardy-Weinberg 平衡检验、Shannon 指数(H)分析并计算群体 F 统计值、Nei's 无偏遗传距离(uD)、无偏遗传相似度(uI)及基因流(N_m)。

$$\text{有效等位基因 } N_e = 1 / \sum p_i^2$$

式中, p_i 为位点第 i 个等位基因的频率, i 为等位基因的个数。

$$\text{Shannon 指数 } H = -1 \times \sum (p_i \ln p_i)$$

式中, p_i 为第 i 个等位基因在群体中出现的频率, i 为等位基因的个数。

$$\text{群体遗传多样性 } H_{sp} = -1 \times \sum [p_i M \ln(p_i M)]$$

式中, $p_i M$ 为位点在 n 个群体中的综合表型频率, n 为研究群体的数量。

$$\text{群体内的遗传多样性 } H_{pop} = \sum H / n$$

式中, H 为位点在某个群体中的 Shannon 指数, n 为研究群体的数量。

群体内遗传多样性所占的比例为 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 结果与分析

3.1 微卫星多态性

15 个微卫星位点在 2 个群体共检测到 462 个等位基因, 位点等位基因数(N_a)为 3~44, 有效等位基因

数(N_e)为 2~29, 观测杂合度(H_o)和期望观测杂合度(H_e)分别为 0.385~1.000 和 0.518~0.977, 多态信息含量(PIC)为 0.611~0.964。对野生群体和选育群体的各项参数进行分析, 可以看出野生群体的等位基因各参数都在一定程度上高于选育群体(WP: $N_a=26$, $N_e=15$, $H_o=0.852$, $H_e=0.909$, PIC=0.886; BP: $N_a=18$, $N_e=9$, $H_o=0.810$, $H_e=0.875$, PIC=0.848), 说明野生群体的遗传多样性水平高于选育群体。Hardy-Weinberg 平衡检验显示, 野生群体有 4 个位点未偏离, 其余位点均在一定程度上偏离; 而选育群体大部分(11 个)位点未偏离平衡, 只有少数位点偏离。15 个微卫星位点的遗传多态性见表 2。

3.2 野生群体和选育群体中等位基因的数量及频率变化

以微卫星位点 RS1101 和 IOPC14 为例, 其在野生和选育群体中的等位基因频率如表 3 所示。

位点 RS1101 在野生和选育群体中的主要等位基因均为 414、447 和 455, 但这 3 个等位基因在野生和选育群体中的比例分别为 29%、19%、16% 和 36%、29%、24%。位点 RS1101 在野生和选育群体中的等位基因数(N_a)分别为 19 和 8。位点 IOPC14 的等位基因 209 和 235 在野生群体中的比例分别为 11% 和 14%, 但在选育群体中的比例全部为 0; 相反, 等位基因 211 和 229, 选育群体所占的比例分别为 14% 和 16%, 而在野生群体中所占的比例分别为 4% 和 5%, 说明连续 10 代的人工选育导致了基因数量和比例的变化, 其他微卫星位点在 2 个群体中也有类似特点。

3.3 遗传多样性分析

观测杂合度(H_o)和 Shannon 指数(H)是判定群体遗传多样性水平的重要指标。利用 Cervus 3.0.7 和 GenALEx 6.502 对中国对虾野生群体和选育群体各 40 尾样品的分析结果显示, 野生群体的平均观测杂合度为 0.852, 略高于选育群体的平均观测杂合度 0.810(表 2), 二者之间无显著性差异($P=0.556$)。野生群体和选育群体的 Shannon 指数(H)分别为 2.786 和 2.399(表 4), 也无显著性差异($P=0.088$)。说明选育采用的技术策略并未导致选育群体的遗传多样性发生显著变化。

3.4 遗传变异和分化

基因流(N_m)是基因从一个种群到另一个种群的转移。 $N_m < 1$, 表明由于遗传漂变发生了分化; $N_m > 1$, 表明遗传分化较小; $N_m > 4$, 表明种群间的基因交流更充分, 遗传分化更小。本研究获得的中国对虾野生

表 2 15 个微卫星位点在野生和人工选育群体中的遗传多样性
Tab.2 Genetic diversity at 15 microsatellite loci in wild and breeding populations

位点 Locus	野生群体(WP)						选育群体(BP)							
	N_a	N_e	H_o	H_e	PIC	P	Sig	N_a	N_e	H_o	H_e	PIC	P	Sig
RS1101	19	6	0.750	0.851	0.824	0.000	***	8	4	0.525	0.736	0.679	0.053	ns
EN0033	40	24	0.875	0.970	0.956	0.000	***	23	12	0.821	0.926	0.908	0.000	***
RS062	28	20	0.850	0.961	0.947	0.000	***	21	11	0.850	0.924	0.907	0.065	ns
RS0683	29	12	0.975	0.929	0.913	0.867	ns	22	8	0.825	0.882	0.864	0.707	ns
FCR002	18	13	1.000	0.933	0.916	0.000	***	18	12	1.000	0.929	0.912	0.390	ns
FCR013	31	22	0.950	0.967	0.953	0.001	**	24	14	0.825	0.940	0.924	0.018	*
BX06-2	22	7	0.385	0.862	0.842	0.000	***	16	7	0.385	0.870	0.844	0.000	***
BX0130	34	24	0.925	0.970	0.957	0.144	ns	19	12	0.925	0.926	0.908	0.169	ns
IOPC14	26	15	1.000	0.945	0.929	0.003	**	19	11	1.000	0.921	0.903	0.298	ns
HRD4353	30	21	0.974	0.966	0.951	0.000	***	24	11	0.900	0.927	0.906	0.155	ns
HRD4292	28	13	0.975	0.937	0.920	0.000	***	17	9	1.000	0.901	0.880	0.748	ns
113B	12	5	0.711	0.809	0.775	0.779	ns	14	5	0.692	0.810	0.780	0.011	*
SX201	44	29	1.000	0.977	0.964	0.319	ns	22	15	0.950	0.943	0.927	0.912	ns
BM295611	24	14	0.950	0.939	0.923	0.007	**	18	7	0.875	0.878	0.854	0.964	ns
BX916	3	3	0.455	0.612	0.521	0.002	**	5	2	0.577	0.611	0.518	0.627	ns
Mean	26	15	0.852	0.909	0.886			18	9	0.810	0.875	0.848		

注: P 为 Hardy-Weinberg 平衡检验值; Sig 表示 Hardy-Weinberg 平衡显著性, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns 表示不显著

Note: P was Hardy-Weinberg equilibrium test value; Sig indicated the Hardy-Weinberg significance, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns indicated no significance

表 3 位点 RS1101 和 IOPC14 在野生和选育群体中等位基因频率
Tab.3 The allele frequency of RS1101 and IOPC14 in wild and breeding populations

位点 Locus	群体 Population	等位基因及频率 Alleles and allele frequency																		
		411	413	414	418	419	422	423	435	442	443	447	448	455	459	486	491	523	527	528
RS1101	野生 WP	0.00	0.01	0.29	0.05	0.03	0.01	0.09	0.01	0.01	0.01	0.19	0.03	0.16	0.01	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01
	选育 BP	0.03	0.00	0.36	0.00	0.00	0.01	0.03	0.00	0.00	0.00	0.29	0.01	0.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00
IOPC14	野生 WP	0.189	0.197	0.201	0.203	0.205	0.207	0.209	0.211	0.213	0.215	0.217	0.219	0.221	0.229	0.231	0.233	0.235	0.237	0.239
	选育 BP	0.03	0.01	0.03	0.04	0.05	0.11	0.04	0.06	0.11	0.04	0.06	0.11	0.04	0.00	0.01	0.03	0.14	0.03	0.00
Mean	野生 WP	0.05	0.00	0.01	0.03	0.03	0.04	0.00	0.14	0.11	0.11	0.01	0.04	0.05	0.16	0.01	0.05	0.00	0.04	0.08
	选育 BP	0.05	0.00	0.01	0.03	0.03	0.04	0.00	0.14	0.11	0.11	0.01	0.04	0.05	0.16	0.01	0.05	0.00	0.04	0.08

群体与第 10 代选育群体间的基因流(N_m)为 17.997, 说明这 2 个群体间的遗传分化还相当小。 F 统计显示, 群体间遗传分化指数 F_{st} 为 0.017($P=0.001$)。根据对 F_{st} 的划分($0 < F_{st} < 0.05$, 遗传分化较弱; $0.05 < F_{st} < 0.15$, 遗传分化中等; $0.15 < F_{st} < 0.25$, 遗传分化较大; $F_{st} > 0.25$, 遗传分化极大), 表明野生群体和选育群体之间发生了弱遗传分化。遗传变异来源分析的结果显示, 只有 7.50% 的遗传变异来源于群体之间, 而 92.50% 的遗传变异来源于个体之间。 $Nei's$ 无偏遗传距离和遗传相似度分别为 0.177 和 0.838。 $F_{is} < 0$, 表明存在杂合子过剩现象, 选育群体有 4 个位点显示杂合子过剩, 而野生群体有 7 个位点显示杂合子过剩。野生群体和选育群体在位点 FCKR002、IOPC14、HRD4292 以及 SX201 都出现杂合子过剩现象。中国对虾 15 个微卫星位点的 F 统计分析以及野生和选育群体的遗传多样性分布见表 4。

4 讨论

4.1 SSR 在中国对虾野生和选育群体中的多态性

利用微卫星等分子生物学手段对中国对虾野生群体和选育群体的遗传背景进行研究, 分析累代人工选育对群体遗传多样性及遗传结构的影响, 不仅有利于进一步的人工选育, 更有利于对中国对虾基因库的长期利用和保护。本研究利用 15 对微卫星引物共筛选到 462 个等位基因, 每个位点的等位基因数为 3~44 不等, 平均每个位点检测到 31 个等位基因。根据 Barker(1994)对微卫星选择的标准, 至少有 4 个等位基因的微卫星方能较好地用于遗传多样性分析。本研究显示, 野生和选育群体在 15 个微卫星位点几乎都存在大量的无效等位基因($N_e < N_a$), 最主要的原因可能是微卫星位点的侧翼序列发生突变, 导致基因无法合成(Lehmann *et al.*, 1996), 而大片段等位基因的丢失也会造成无效等位基因的存在(Wattier *et al.*, 1998)。针对无效等位基因, 可以通过重新设计引物, 从而避开发生变异的侧翼序列或者估计无效等位基因频率进行研究(刘连为等, 2014)。韩国西海岸的中国对虾野生群体有 11 个位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 而选育群体仅有 4 个位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 大部分位点都在 Hardy-Weinberg 平衡中。可能的原因是人工放流在一定程度上打破了野生群体的 Hardy-Weinberg 平衡, 而人工选育群体大部分位点处在 Hardy-Weinberg 平衡中, 可能与中国对虾的累代选育有很大关系。中国对虾育苗期间都会保留数量较大的群体作为种虾, 虽然

在人工受精时按照计划定向交配, 但庞大的亲本群体会减小定向交配带来的影响。

4.2 等位基因在 2 个群体中的变化

和野生群体相比, 中国对虾“黄海 2 号”第 10 代选育群体各位点等位基因发生了变化。结果显示, 选育群体的主要等位基因发生了富集现象, 而其他等位基因在不同程度上发生了缩减。缩减的原因一方面可能是无效等位基因的存在, 也可能是由于样本数量较少, 稀有等位基因无法检测到。选择育种本身不能产生新的基因, 但可以通过选育提高目标性状基因或有利基因的频率, 降低非目标性状基因或不利基因的频率, 通过不断积累有利基因, 以达到提高选育目标性状的目的。中国对虾“黄海 2 号”在选育过程中针对生长和抗病性状采用了定向选择育种的方式, 在每代的选育过程中, 选择生长快、抗病力强的家系和个体作为亲本繁育下一代, 使生长和抗病相关基因不断积累强化, 从而实现了提高养殖产量和成活率的目的。

4.3 遗传多样性与遗传分化

中国对虾“黄海 2 号”选育群体的观测杂合度($H_o=0.810$)和 Shannon 指数($H=2.399$)与韩国西海岸野生群体的参数相近($H_o=0.852$, $H=2.786$), 二者均没有显著差异, 表明中国对虾“黄海 2 号”人工选育群体在连续选育 10 代后遗传多样性并没有显著性降低。张天时等(2005)利用微卫星技术分析了中国对虾人工选育群体第 1 代和第 6 代的遗传多样性, 结果显示, 两代之间没有显著性差异($H_{o1}=0.6400$, $H_1=1.7382$; $H_{o6}=0.6300$, $H_6=1.6830$)。张辉等(2010)分析了中国对虾养殖群体与野生群体 mtDNA 控制区序列, 结果显示野生群体的基因多样性为 0.9672, 略高于养殖群体的 0.9380。本研究数据是 PCR 产物经 ABI3730 测序后获得, 同样的微卫星位点会获得更多的等位基因, 因此, 微卫星杂合度和 Shannon 指数偏大。

中国对虾“黄海 2 号”选育 10 代后仍具有较高的遗传多样性, 这与选育采用的技术路线有很大关系。每代选育严格控制近交水平, 且每代留作繁育的对虾亲本数量大, 这些措施在一定程度上保证了中国对虾选育群体的遗传稳定性, 使得中国对虾在繁育多代后仍保持较高的遗传多样性。遗传多样性是生物适应环境和遗传变异的关键, 高遗传多样性的群体也是进行遗传育种的基础。本研究的“黄海 2 号”第 10 代选育群体遗传多样性高, 在继续纯化现有品种的同时, 可以继续对潜在基因进行挖掘和利用, 从而为更

表 4 中国对虾 15 个微卫星位点的 F-分析及野生和选育群体的遗传多样性分布

Tab.4 F-statistics and partitioning of genetic diversity of wild and breeding populations in *F. chinensis* at 15 microsatellite loci

位点 Locus	F_{is}		F_{it}	F_{st}	H		H_{sp}	H_{pop}	H_{pop}/H_{sp}	$(H_{sp}-H_{pop})/$ H_{sp}
	野生 WP	选育 BP			野生 WP	选育 BP				
RS1101	0.119	0.287	0.179	0.010	2.241	1.485	1.974	1.863	0.943	0.056
EN0033	0.098	0.113	0.113	0.021	3.413	2.734	3.429	3.074	0.897	0.104
RS062	0.116	0.080	0.100	0.014	3.136	2.718	3.217	2.927	0.910	0.090
RS0683	-0.050	0.065	0.014	0.020	2.897	2.589	2.992	2.743	0.917	0.083
FCKR002	-0.072	-0.076	-0.081	0.008	2.636	2.623	2.722	2.630	0.966	0.034
FCKR013	0.018	0.122	0.070	0.014	3.254	2.867	3.269	3.061	0.936	0.064
BX06-2	0.553	0.558	0.569	0.042	2.422	2.224	2.604	2.323	0.892	0.108
BX0130	0.046	0.001	0.029	0.018	3.331	2.656	3.295	2.993	0.908	0.092
IOPC14	-0.058	-0.086	-0.065	0.019	2.957	2.623	3.019	2.790	0.924	0.076
HRD4353	-0.008	0.029	0.012	0.017	3.226	2.755	3.337	2.990	0.896	0.104
HRD4292	-0.041	-0.110	-0.082	0.006	2.926	2.434	2.783	2.680	0.963	0.037
113B	0.121	0.146	0.136	0.014	1.935	2.016	2.060	1.976	0.959	0.041
SX201	-0.024	-0.007	-0.016	0.012	3.571	2.848	3.514	3.209	0.913	0.087
BM295611	-0.012	0.003	0.005	0.022	2.857	2.339	2.874	2.598	0.904	0.096
BX916	0.257	0.056	0.155	0.015	0.990	1.068	1.088	1.029	0.946	0.054
Mean	0.071	0.079	0.076	0.017	2.786	2.399	2.811	2.592	0.925	0.075

多新品种的培育提供可能。韩国西海岸中国对虾野生群体和“黄海 2 号”选育群体的遗传分化指数 F_{st} 为 0.017 ($P=0.001$), 为弱的遗传分化。该结果与王伟继等(2005)利用 AFLP 技术分析中国对虾韩国南海群体与养殖群体遗传差异的结果相近(Nei's 遗传距离为 0.9899, 遗传相似度为 0.0102, 表明群体间无显著的遗传分化), 但小于安丽等(2008)利用 AFLP 估计野生群体和中国对虾“黄海 1 号”选育 10 代的群体的遗传变异系数(0.070), 也与张辉等(2010)基于 K-2P 模型计算得到中国对虾野生群体和养殖群体间的 F_{st} (0.0698, $P=0.00$)有一定差别。这可能与使用的分子标记和研究的对虾群体不同有关。在其他物种的遗传结构分析中也有类似的结论, 肖炜等(2015)利用 mtDNA D-loop 序列差异分析技术, 对埃及品系尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的 3 个选育世代群体共 80 尾开展世代间遗传结构变异分析, 结果显示, 在目前选育方式下埃及品系尼罗罗非鱼世代间遗传信息较为稳定, 选育并没有对罗非鱼选育群体的遗传结构造成大的影响。关建义等(2010)利用 8 个 ISSR 分子标记对 4 个黄河鲤(*Cyprinus carpio*)群体(2 个野生群体和 2 个选育群体)的 120 尾个体的遗传多样性进行了分析, 结果显示, 这些群体间发生了较弱的遗传分化, 表明人工选育群体的遗传结构尚未发生明显变化。

本研究获得的 Nei's 无偏遗传距离和遗传相似度分别为 0.838 和 0.177, 2 个群体遗传变异只有 7.50%

来自于群体之间, 其余都来自于个体之间。李朝霞等(2006)利用 AFLP 分析了连续选育 5 代的中国对虾群体的遗传变异, 显示有 92.89% 的变异是来源于群体内, 只有 7.11% 是来源于群体间。表明中国对虾“黄海 2 号”第 10 代选育群体与韩国西海岸野生群体之间并未发生显著的遗传分化。研究发现, 十足目甲壳动物遗传变异型较低(李思发, 1988)。原因一方面可能是中国对虾生命周期较短, 发生变异的机率较小; 另一方面, 中国对虾“黄海 2 号”在累代繁育过程中会引进野生群体, 使繁育群体与野生群体间存在基因交流, 这在很大程度上降低了选育群体与野生群体在遗传上的差异。

参 考 文 献

- An L, Liu P, Li J, et al. AFLP analysis on selected populations of shrimp *Fenneropenaeus chinensis* named “Yellow Sea No.1”. *Journal of Ocean University of China (Natural Science)*, 2008, 38(6): 921-926 [安丽, 刘萍, 李健, 等. “黄海 1 号”中国对虾不同时代间的 AFLP 分析. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2008, 38(6): 921-926]
- Barker JSF. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breed: *Proceedings of the 5th World Congress on genetics applied to livestock production*, Canada: University of Guelph, 1994, 21: 501-508
- Guan JY, Zhang Q, Qu CY, et al. Genetic diversity of wild and artificial selecting *Cyprinus cappio haematopterus* by

- ISSR analysis. *Journal of Henan Normal University (Natural Science)*, 2010, 38(4): 128–131 [关建义, 张芹, 屈长义, 等. 野生和人工选育黄河鲤遗传多样性的 ISSR 分析. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 38(4): 128–131]
- Lehmann T, Hawley WA, Collins FH. An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. *Genetics*, 1996, 144(3): 1155–1163
- Li J, He Y, Wang QY, *et al.* Selective breeding of fast-growing and ammonia toxicity-resistant Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(1): 61–66 [李健, 何玉英, 王清印, 等. 中国对虾“黄海 3 号”新品种的培育. *渔业科学进展*, 2015, 36(1): 61–66]
- Li SF. Conservation of the genetic performance of fish breeding population. *Journal of Fisheries of China*, 1988, 12(3): 283–290 [李思发. 鱼类繁育群体遗传性能的保护. *水产学报*, 1988, 12(3): 283–290]
- Li ZX, Li J, He YY, *et al.* AFLP analysis on selected fast growth populations of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Chinese High Technology Letters*, 2006, 16(4): 435–440 [李朝霞, 李健, 何玉英, 等. 中国对虾人工选育快速生长群体不同世代间的 AFLP 分析. *高技术通讯*, 2006, 16(4): 435–440]
- Liu LW, Chen XJ, Xu QH, *et al.* Isolation and genetic diversity of microsatellite DNA of *Ommastrephes bartramii* in the North Pacific Ocean. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(32): 6848–6854 [刘连为, 陈新军, 许强华, 等. 北太平洋柔鱼微卫星标记的筛选及遗传多样性. *生态学报*, 2014, 34(32): 6848–6854]
- Luo K, Kong J, Luan S, *et al.* Comparison of growth and survival between selected population and inbreeding population at different growing stage in *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Ocean University of China (Natural Science)*, 2014, 44(7): 51–57 [罗坤, 孔杰, 孛生, 等. 中国对虾选育群体与近交群体不同生长时期的生长性状和存活率的比较. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2014, 44(7): 51–57]
- Mao SK, Ma AJ, Ding FH, *et al.* Analysis of genetic structures of four wild geographic populations of mullet *Liza haematocheila* by using microsatellite marker technique. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 68–75 [毛守康, 马爱军, 丁福红, 等. 梭鱼(*Liza haematocheila*)4 个野生地理群体遗传多样性的微卫星分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 68–75]
- Wang MS, Wang WJ, Xiao GX, *et al.* Genetic diversity analysis of spawner and recaptured populations of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) during stock enhancement in the Bohai Bay based on an SSR marker. *Acta Oceanologica Sinica*, 2016, 35(8): 51–56
- Wang QY, Li J, Kong J, *et al.* Seeking better growth and disease resistance for Chinese shrimp. *Asian Aquaculture Magazine*, 2003, 19–21
- Wang QY. From wild to domestication: The development of Chinese shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis* farming industry in China. *Progress of Shrimp and Prawn Aquaculture in China*, 2014, 149–180 [王清印. 从野生到家养—中国对虾养殖发展评述. *中国海水养殖科技进展*, 2014, 149–180]
- Wang WJ, Gao H, Kong J, *et al.* Genetic variation between Chinese shrimp populations from Korean South Sea and from Chinese cultured detected by AFLP markers. *Chinese High Technology Letters*, 2005, 15(9): 81–86 [王伟继, 高焕, 孔杰, 等. 利用 AFLP 技术分析中国明对虾的韩国南海种群和养殖群体的遗传差异. *高技术通讯*, 2005, 15(9): 81–86]
- Wattier R, Engel CR, Saumitou-Laprade P, *et al.* Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: Experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology*, 1998, 7(11): 1569–1573
- Xiao W, Wang T, Li DY, *et al.* Genetic variation of mitochondrial DNA D-loop region in different generations of Egyptian strain of *Oreochromis niloticus*. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(3): 29–34 [肖炜, 王腾, 李大宇, 等. 埃及品系尼罗罗非鱼不同选育世代 mtDNA D-loop 区遗传多样性分析. *南方水产科学*, 2015, 11(3): 29–34]
- Zhang H, Gao TX, Zhuang ZM, *et al.* Comparative analysis of the mitochondrial control region between the cultured and wild populations of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Journal of Fisheries of China*, 2010, 38(8): 1150–1155 [张辉, 高天翔, 庄志猛, 等. 中国对虾养殖群体与野生群体线粒体控制区序列的比较. *水产学报*, 2010, 38(8): 1150–1155]
- Zhang TS, Liu P, Li J, *et al.* Genetic diversity of cultured populations of *Fenneropenaeus chinensis* shrimp using microsatellites. *Journal of Fisheries of China*. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(1): 7–12 [张天时, 刘萍, 李健, 等. 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*, 2005, 29(1): 7–12]

(编辑 冯小花)

SSR Analysis on Genetic Diversity in Breeding and Wild Populations of *Fenneropenaeus chinensis*

WANG Jun^{1,4}, WANG Qingyin^{1,2①}, KONG Jie^{1,2}, MENG Xianhong^{1,2},
CAO Jiawang^{1,4}, WANG Mingzhu^{1,4}, FENG Yaping^{1,4}, LÜ Ding³

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries and Aquaculture, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; 4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Studies were conducted for further understanding the level of genetic diversity and population genetic structure of *Fenneropenaeus chinensis* under artificial breeding conditions. Fifteen fluorescence labeled microsatellite primers were used to analyze the genetic diversity and genetic differentiation in wild population (WP) and breeding population (BP) of *F. chinensis*. The wild population was collected from the western coast of Korean Peninsula (34°30'N, 127°30'E), and the breeding population was obtained after selection for successive ten generations. In each population, 40 samples were used for DNA extraction according to the protocol provided by the manufacturer. PCR was performed in a 25 μ l reaction and the PCR products were sequenced by Sangon Biotech(Shanghai) Co., Ltd. Allele data was analyzed by Cervus 3.0.7 and GenALEx 6.502.

The results showed that a total of 462 alleles were identified at 15 microsatellite loci, the numbers of alleles (N_a) and effective alleles (N_e) were 3~44 and 2~29 in WP and BP, respectively. The polymorphism information content (PIC) ranged from 0.518 to 0.964, and the observed heterozygosity (H_o) values of WP and BP were 0.518 and 0.964, respectively. P -values were calculated to confirm whether the 15 loci deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium or not. Of the 30 population loci, there were 11 population loci was heterozygote excess. The Shannon genetic diversity index (H) in WP and BP were 2.786 and 2.399, respectively. The Nei's unbiased genetic Distance (uD), as well as unbiased genetic Identity (uI) was 0.17 and 0.838, respectively. The Gene Flow (N_m) and F_{st} value of the two populations were 17.997 and 0.017 ($P=0.001$), respectively, indicating that there was a low genetic differentiation. Partitioning of the genetic variation revealed that only 7.50% of the genetic variation was among the populations, and the other genetic variation was within the populations. This study showed that the 'Huanghai No.2' still has high genetic diversity after selection for successive ten generations, and it also has potential value for further breeding materials.

Key words *Fenneropenaeus chinensis* "Huanghai No.2"; Wild population; Microsatellite; Genetic diversity

① Corresponding author: WANG Qingyin, E-mail: wangqy@ysfri.ac.cn