

文章编号: 1004 - 7271(2008)05 - 0620 - 05

· 研究简报 ·

太湖日本沼虾的遗传多样性分析

吴 滢¹, 傅洪拓^{1,2}, 李家乐³, 龚永生¹, 李明爽²

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传育种和

养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;

2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

3. 上海海洋大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要:利用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术对太湖湖区不同水域(无锡、宜兴、苏州及湖州水域)野生日本沼虾群体进行基因组 DNA 的遗传多样性分析。在事先优化的条件下, 试验从选用的 50 个随机引物中筛选出 16 个有效引物, 共检测到 117 个清晰稳定的位点, 大小为 200 bp ~ 2 000 bp, 其中 92 个位点具有多态性。四个群体的多态位点比例分别为 49.57%、60.68%、53.85%、57.26%, 杂合度为 0.207 7 ~ 0.216 3, Shannon 信息指数为 0.296 7 ~ 0.305 3, 群体间遗传分化指数 Gst 值为 0.164 4 ~ 0.200 2。AMOVA 分析结果显示, 群体的遗传变异有 16.67% 是由群体间遗传变异引起的, 显著性检验表明群体间遗传变异对总遗传变异影响显著。遗传距离显示四个群体有一定遗传分化, 其中苏州和宜兴群体间遗传距离最大(0.148 1), 无锡与宜兴群体间遗传距离最小(0.114 1)。利用 UPGMA 进行聚类分析表明, 无锡与宜兴群体首先聚在一起, 湖州与苏州群体随后聚在一起, 再与无锡、宜兴群体聚在一起。

关键词:日本沼虾; 太湖水域; 遗传多样性; RAPD 分析

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Research on genetic diversity of *Macrobrachium nipponense* in Taihu Lake

WU Yan¹, FU Hong-tuo^{1,2}, LI Jia-le³, GONG Yong-sheng¹, LI Ming-shuang²

(1. Key Open Laboratory of the Ministry of Agriculture Aquatic Animal Genetics and Reproduction and Aquaculture Biology, Freshwater Fisheries Research Center of the Chinese Academy

of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. Wuxi Fisheries College NAU, Wuxi 214081, China;

3. The Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

Abstract: RAPD (Random Amplified Polymorphic) analysis was applied to detect the genetic diversity of four populations of *Macrobrachium nipponense* sampled from Huzhou, Suzhou, Wuxi, Yixing around the Taihu Lake. Under the pre-optimized conditions, 16 effective primers were selected from 50 random primers. 117

收稿日期: 2008-01-18

基金项目: 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室开放课题基金 (KFT2006-8); 国家“十一五”科技支撑计划 (2006BAD01A13)

作者简介: 吴 滢 (1977-), 女, 江苏无锡人, 助理研究员, 主要从事水产遗传育种方面的研究。E-mail: wuy@ffrc.cn

通讯作者: 傅洪拓, E-mail: fuht@ffrc.cn

clearly and stable loci, with 92 polymorphic loci, ranging from 200bp to 2000bp in length, were detected. The percentages of polymorphic loci of four populations were 49.57%, 60.68%, 53.85%, 57.26%. Their mean expected heterozygosity ranged from 0.2077 to 0.2163, and their Shannon information index ranged from 0.2967 to 0.3053. Index of genetic diversity G_{st} ranged from 0.1644 to 0.2002. Analysis of molecular variation (AMOVA) revealed that 16.67% of the variances were from inter-population, Pst analysis indicated that the variance of inter-population significantly affected the total variance. The genetic distance indicated that genetic divergence existed between four populations. The maximum genetic distance occurred between Suzhou and Yixing populations (0.1481), and the minimum between Wuxi and Yixing populations (0.1141). Results of cluster analysis based on UPGMA indicated that the closest relationship was found between Wuxi and Yixing populations, then was Huzhou and Suzhou populations.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; Taihu Lake; Genetic diversity; RAPD

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*), 俗称青虾, 广泛分布于我国各地的江河、湖泊、水库、池塘及沟渠中, 是我国野生淡水虾类中的重要种类, 也是我国重要的淡水养殖虾类之一。太湖是我国第三大淡水湖, 日本沼虾资源丰富, 品质优良。但近年来, 因水质污染、过度捕捞、大面积围网养殖等因素, 该水域日本沼虾种质资源面临威胁, 对其种质资源现状进行研究是必要的。本文拟采用 RAPD 技术对太湖湖区不同水域野生日本沼虾群体进行遗传多样性分析, 为太湖日本沼虾的保护和合理开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

野生日本沼虾样品沿太湖东、西、南、北四个方位分别选取苏州、宜兴、湖州和无锡四个点采集, 各点样品 30 尾, 活体采集后直接用 95% 的酒精保存, 运回实验室置 4 °C 冰箱备用。

1.2 试剂和仪器

实验所用随机引物均为上海生工生物工程公司产品, Marker、*Taq* DNA 聚合酶及其配套的 dNTP 等均采用上海申能博彩生物科技有限公司产品。

PCR 扩增仪系 PE 公司生产的 Gene Amp PCR system 9600。

1.3 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取参照《分子克隆实验指南》^[1] 的方法, 并稍做修改。

1.4 RAPD-PCR 反应

在事先优化的 PCR 扩增、电泳条件下, 选择 RAPD 反应总体积为 25 μ L, 其中包括 10 \times PCR 反应缓冲液 2.5 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 2.0 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 引物 (10 μ mol/L) 2.0 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 1.0 μ L, 基因组 DNA (20 μ g/mL) 1.0 μ L, 用 ddH₂O 补足体积。

优化后的 PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 10 min 后进行 40 个循环, 每个循环包括 94 °C 变性 1 min, 36 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 最后于 72 °C 延伸 10 min, 反应结束后 4 °C 保存。

电泳观察: 取扩增产物 7.5 μ L 在 1.2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分离 (1 \times TAE, 4 V/cm, 约 1 h), EB 染色, UV-200 紫外透射分析仪上观察和拍照。

1.5 数据处理

经电泳获得的 RAPD 产物中, 将相同迁移距离的条带看作同一位点。扩增条带有且清晰记为 1, 否则记为 0, 构建原始数据表征矩阵, 据此统计位点总数和多态位点比例, 分析和计算群体的遗传多样性参数。

假设群体处于 Hardy-Weinberg 平衡,用 PopGen1.32 软件对群体的遗传学参数进行分析和计算。其中:

多态位点比例: $P = \text{多态位点数} / \text{位点总数} \times 100\%$;

遗传杂合度 $h = 1 - \sum P_i^2$ (P_i 位点 i 在某一群体中的出现频率);

Shannon 信息指数: $I = - \sum P_i \ln P_i$;

遗传分化指数: $G_{st} = (\sum J_i / s - J_i) / (1 - J_i)$, s 为种群数目, J_i 是第 i 个种群内的基因的一致性;

基因流: $N_m = 0.5(1 - G_{st}) / G_{st}$, m 为迁移率;

Ne_i [2] 氏遗传相似度: $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, $D = 1 - F$ (N_x 和 N_y 分别为种 x 和 y 的位点总数, N_{xy} 为两群体间共享位点数, D 为遗传距离), 并根据遗传距离值, 采用 UPGMA 方法对群体进行聚类分析。

应用 Arlequin 软件中分子方差分析 (AMOVA) 进行群体遗传变异来源分析。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

在供筛选的 50 个随机引物中, 按照重复性好, 谱带清楚, 位点数量适中的原则, 共选出 16 个有效引物, 引物编号及序列详见表 1。

表 1 筛选出的 RAPD 随机引物及其序列

Tab.1 Selected RAPD random primers and their sequences

引物	序列	扩增带数	引物	序列	扩增带数
OPP01	GTAGCACTCC	5	OPP17	TGACCCGCCT	12
OPP02	TCGGCAGCA	9	OPX08	CAGGGGTGGA	7
OPP03	CTGATACGCC	6	OPX10	CCCTAGACTG	5
OPP07	GTCCATGCCA	8	OPX11	GGAGCCTCAG	6
OPP09	GTGGTCCGCA	6	OPX17	AGCACGACC	6
OPP11	AACGCGTCGG	7	OPX18	GACTAGGTGG	10
OPP12	AAGGGCGACT	8	OPK02	GTCTCCGCAA	5
OPP16	CCAAGCTGCC	7	OPK06	CACCTITCCC	10

在使用的 16 个引物中, 未发现不同群体间有差异的扩增条带, 即没有体现群体间特异性的引物。

2.2 遗传多样性

用以上 16 个引物对湖州、苏州、无锡、宜兴四个水域日本沼虾进行 RAPD 分析, 共扩增出 117 个清晰稳定的位点, 平均每个引物产生 7 个位点, 片段大小在 200 bp ~ 2 000 bp 之间。其中多态位点共计 92 个, 多态位点比例为 78.63%, 各品种的多态位点数为 58 ~ 71 不等, 多态位点比例分别为 49.57%、60.68%、53.85%、57.26%。宜兴湖区的野生日本沼虾的遗传杂合度最高, 为 0.216 3; 无锡最低, 为 0.207 7; 四个群体的平均遗传杂合度为 0.185 4。宜兴湖区的野生日本沼虾 Shannon 信息指数最高, 为 0.305 3; 无锡最低, 为 0.296 7。具体结果见表 2。

表 2 太湖日本沼虾 4 个群体的多态位点比例、遗传杂合度及 Shannon 信息指数

Tab.2 Percentages of polymorphic loci, heterozygosity and Shannon information index of four populations of *Macrobrachium nipponense* in Taihu Lake

	位点数	多态位点数	多态位点比例 (%)	遗传杂合度	Shannon 信息指数
湖州(南太湖)	105	58	49.57	0.212 3	0.300 8
苏州(东太湖)	111	71	60.68	0.213 5	0.300 8
无锡(北太湖)	108	63	53.85	0.207 7	0.296 7
宜兴(西太湖)	109	67	57.26	0.216 3	0.305 3

2.3 遗传分化指数 G_{st}

太湖日本沼虾 4 个群体的两两地理群体间遗传分化指数 G_{st} 值在 0.164 4~0.200 2 之间,总遗传分化指数 G_{sto} 值为 0.254 7。群体间 N_m 值在 1.997 0~2.540 5 之间,总 N_m 值为 1.463 4(表 3)。

表 3 太湖日本沼虾 4 个群体的遗传分化指数 G_{st} 值和 N_m 值
Tab. 3 Inter-population G_{st} and N_m of four populations of *Macrobrachium nipponense* in Taihu Lake

群体	湖州(南太湖)	苏州(东太湖)	无锡(北太湖)	宜兴(西太湖)
湖州(南太湖)	-	2.400 5	1.997 0	2.054 6
苏州(东太湖)	0.172 4	-	2.075 1	2.185 0
无锡(北太湖)	0.200 2	0.194 2	-	2.540 5
宜兴(西太湖)	0.195 7	0.186 2	0.164 4	-

注:对角线上方为 N_m 值,下方为遗传分化指数。

2.4 AMOVA 分析群体遗传变异来源

用 AMOVA 进行遗传变异方差分析,将四个群体分为一组,分别计算群体内和群体间变异对总遗传变异的贡献率,有 83.33% 的变异来自于群体内个体间,16.67% 变异来自于群体之间; P_{st} 值为 0.167 (表 4)。

表 4 太湖日本沼虾 4 个群体的 RAPD 数据的 AMOVA 分析结果
Tab. 4 AMOVA analysis of RAPD data from four populations of *Macrobrachium nipponense* in Taihu Lake

变异来源	自由度	平方和	变异组分	变异贡献率	P_{st}
群体间	3	96.208 3	2.9157 4	16.67%	0.167
群体内	20	291.500	14.575 0	83.33%	-
合计	23	387.708	17.490 7		

2.5 遗传相似度和遗传距离

选取的太湖水域四个水域野生日本沼虾群体之间的遗传相似指数在 0.862 3~0.892 1 之间(表 5),其中无锡和宜兴群体间的遗传相似性最大(0.892 1),遗传距离最小(0.114 1);苏州和宜兴群体间的遗传相似性最小(0.862 3),遗传距离最大(0.148 1)。

表 5 太湖日本沼虾 4 个群体的遗传相似度和遗传距离
Tab. 5 Genetic identity and genetic distance of four populations of *Macrobrachium nipponense* in Taihu Lake

群体	湖州(南太湖)	苏州(东太湖)	无锡(北太湖)	宜兴(西太湖)
湖州(南太湖)	-	0.888 1	0.877 8	0.872 8
苏州(东太湖)	0.118 7	-	0.864 2	0.862 3
无锡(北太湖)	0.130 4	0.146 0	-	0.892 1
宜兴(西太湖)	0.136 0	0.148 1	0.114 1	-

注:上三角为群体间相似性指数;下三角为遗传距离。

2.6 聚类分析

根据遗传距离指数,用非加权的组平均法(UPGMA)进行聚类分析,构建谱系关系图(图 1)。

由上图所示,无锡和宜兴群体间遗传距离最近,首先聚在一起,湖州与苏州群体随后聚在一起,再与无锡、宜兴群体聚在一起。

3 讨论

迄今,日本沼虾野生群体的基因组多态性研究报道较少,蒋速飞等^[3]对安徽六安、龙感湖、淮南、江苏高淳四个地理群体的日本沼虾进行遗传多样性分析,遗传距离显示日本沼虾群体间有一定遗传分化,

其中高淳群体和龙感湖群体之间遗传距离最大(0.1712),六安群体和淮南群体之间最小(0.1146)。杨频等^[4]利用 COI 基因序列分析长江与澜沧江水系日本沼虾群体的遗传结构,发现群体间的遗传变异占总遗传变异的 9.66%,而 90.4% 的遗传变异源于群体内。孙悦娜等^[5]通过对日本沼虾 3 个群体线粒体 DNA16SrRNA 基因片段进行扩增和测定,发现其种内变异很小,其碱基 AT 含量明显高于 GC 含量。至今未见对太湖日本沼虾遗传多样性的研究报道。

本文利用 RAPD 方法对太湖水域四地野生日本沼虾进行种内遗传差异研究,结果显示,宜兴湖区的日本沼虾基因多样性指数最大,苏州次之,湖州再次之,无锡最小,平均多样性指数为 0.1854。马春艳等^[6]对辽东湾、渤海湾、海州湾、乳山湾及海洋岛 5 个地理群体的中国对虾进行了遗传多样性分析,其遗传多态度为 0.1621。黄渤海海域 6 个地理群的中国对虾遗传多态度在 0.1476~0.1852 之间^[7]。罗氏沼虾缅甸野生群体^[8]遗传多态度为 0.0940。太湖日本沼虾与其他地区野生虾类比较,其遗传杂合度还处于较高水平,群体的遗传变异较大,遗传多样性水平较丰富,种质资源保存较好。

遗传分化指数(G_{st})是指群体间或个体间的遗传变异占总的遗传变异的大小。Wright^[9]认为 G_{st} 值在 0.15~0.25 之间,表示群体遗传分化较大;当 G_{st} 值大于 0.25 时,表示分化极大。本文所得到的各群体间的遗传分化指数 G_{st} 均大于 0.15,但都没有超过 0.25,说明太湖日本沼虾四个群体间已经出现较大的分化。基因流 N_m 代表基因之间的交流程度,根据 Wright 的界定,当 N_m 在 1~5 之间时,表示群体间发生重要分化,太湖四个日本沼虾群体间 N_m 值在 1.9970~2.5405 之间,同样表明群体间已经发生较大的重要分化。AMOVA 分析结果显示,遗传变异有 16.67% 是由群体间的遗传变异引起的,83.33% 的变异来自于群体内个体间,显著性检验表明群体间的遗传变异对总遗传变异的影响显著($P > 0.15$)。本文研究也表明,即使是同一个湖泊,不同区域之间的日本沼虾也可存在明显的遗传分化,这可能与日本沼虾活动范围较小,较少进行长距离迁徙有关。

太湖作为我国第三大淡水湖,具有丰富野生日本沼虾资源,同时也是养殖青虾亲本的主要来源之一。尽管本研究表明,太湖水域日本沼虾野生群体目前尚保持了较高的遗传多样性,但环境污染和不合理的捕捞方式都可导致遗传多样性的降低。本文首次对同一湖泊不同水域日本沼虾野生群体的遗传多样性进行分析,可为太湖日本沼虾种质资源的保护和开发利用提供参考。

参考文献:

- [1] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a Laboratory Manual[M]. Beijing: Science Press, 1996: 463-469.
- [2] Nei M. The theory of genetic distance and evolution of human races [J]. Human Genetics, 1978, 23(4): 341-369.
- [3] 蒋速飞,傅洪拓,熊贻伟,等. 日本沼虾 4 个地理群体遗传变异的 RAPD 分析[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2006, 3(2): 179-182.
- [4] 杨 频,张 浩,陈立侨,等. 利用 COI 基因序列分析长江与澜沧江水系日本沼虾群体的遗传结构[J]. 动物学研究, 2007, 28(2): 113-118.
- [5] 孙悦娜,冯建彬,李家乐,等. 日本沼虾三群体线粒体 16S rRNA 基因片段序列的差异与系统进化[J]. 动物学杂志, 2007, 42(1): 59-66.
- [6] 马春艳,孔 杰,孟宪红,等. 中国对虾 5 个地理群体的 RAPD 分析[J]. 水产学报, 2004, 28(3): 245-249.
- [7] 孟宪红,马春燕,刘 萍,等. 黄渤海中国对虾 6 个地理群的遗传结构及其遗传分化[J]. 高技术通讯, 2004, 14(4): 97-102.
- [8] 张海琪,何中央,徐晓林,等. 罗氏沼虾缅甸野生群体和浙江养殖群体的遗传多样性比较[J]. 中国水产科学, 2004, 11(6): 506-511.
- [9] Wright S. Evolution and the Genetics of Populations. Variability within and among natural population [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978: 79-103.

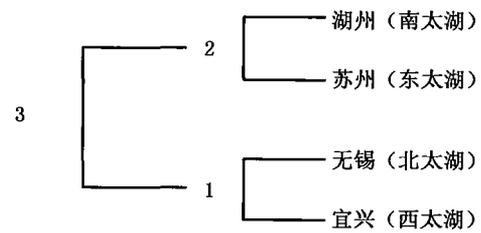


图 1 太湖日本沼虾 4 个群体的 UPGMA 聚类分析
Fig. 1 UPGMA dendrogram of 4 populations of *Macrobrachium nipponense* in Taihu Lake