

## 日本沼虾不同地理种群的遗传多样性研究

蒋速飞,傅洪拓,熊贻伟,吴滢,龚永生

(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)

**摘要:**笔者采用随机扩增多态 DNA(RAPD)技术对 6 个地理种群(微山湖、洪泽湖、太湖、龙感湖、洪湖、珠江)的日本沼虾各 30 个个体进行了遗传多样性分析。在筛选出的 18 个引物中共检测到 201 个位点,大小在 100~2000bp 之间。多态位点 141 个,多态位点比例 70.15%;各种群的多态位点数为 30~99 不等,多态位点比例为 21.13%~55.93%。日本沼虾中国不同地理种群的平均遗传杂合度为 0.2446,各种群内平均遗传杂合度为 0.1132~0.2071。Shannon 信息指数(I)为 0.1695~0.2950。日本沼虾 6 个地理种群的两两地理种群间遗传分化指数 Gst 值在 0.2116~0.4442 之间,种群间总的遗传分化指数 Gst0 值为 0.4858, Nm 值在 0.6257~1.8628 之间,表明日本沼虾种群间已经发生显著或重要分化。同时发现 OPX-830bp、OPI-360bp 为珠江种群区别于其他种群的特征标记。聚类分析结果表明,洪湖种群与龙感湖种群,洪泽湖种群与微山湖种群分别先聚在一起,再与太湖种群聚类,最后与珠江种群聚合在一起。

**关键词:**日本沼虾;地理种群;遗传多样性;RAPD

中图分类号:Q75,Q959.223.63 文献标识码:A

### Studies on Genetic Diversity of *Macrobrachium Nipponense* of Different Geographic Populations

Jiang Sufei, Fu Hongtuo, Xiong Yiwei, Wu Yan, Gong Yongsheng

(Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key laboratory of Genetic Breeding  
of Aquatic Animal & Aquaculture Biology Ministry of Agriculture, Wuxi Jiangsu 214081)

**Abstract:** Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was applied to investigate the genetic diversity of six geographic populations of *Macrobrachium nipponense*, which were collected from the Weishan Lake(WL), Hongze Lake (HzL), Taihu Lake (TL), Longgan Lake(LL), Honghu Lake (HL) and Pearl River(PR). Under optimal conditions, 18 random primers from OPI, OPM, OPP, OPX, were chosen to analyze their genomic DNA (30 individuals of each population). A total of 201 RAPD fragments ranged 100bp~2000bp were obtained, 141 of which were polymorphic (70.15%). For different populations, the proportions of polymorphic loci were 21.13%~55.93%, mean expected heterozygosity varied from 0.1132 to 0.2071, and the Shannon index (I) varied from 0.1695 to 0.2950. Index of genetic diversity Gst ranged from 0.2116 to 0.4442 for different populations, and index of genetic diversity Gst0 was 0.4461. Nm ranged from 0.6257 to 1.8628. Results indicated that notable genetic divergence emerged between populations. Clustering of the stocks was analyzed by UPG-MA, the results showed that Hongze Lake and Weishan Lake populations, Honghu Lake and Longgan Lake population clustered first respectively, then they clustered with Taihu Lake population, the last did Pearl River population.

**Key words:** *Macrobrachium nipponense*, geographic population, genetic diversity, RAPD

**资助项目:** 资助项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD01A13, 2006BAD03B07-02); 江苏省高技术研究项目(BG2007328)。

**第一作者简介:** 蒋速飞, 男, 1980 年出生, 江苏金坛人, 研究实习生, 从事水产遗传育种研究。通信地址: 214081 江苏无锡山水东路 9 号淡水渔业研究中心育种室。Tel: 0510-85558835, E-mail: jiangsf@ffrc.cn。

**通讯作者:** 傅洪拓, 男, 1964 年出生, 湖南长沙人, 研究员, 博士生导师, 研究方向为: 水生生物遗传育种。通信地址: 214081 江苏无锡山水东路 9 号淡水渔业研究中心育种室。Tel: 0510-85558835, E-mail: fuht@ffrc.cn。

**收稿日期:** 2008-07-04, 修回日期: 2008-08-01。

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*), 俗称青虾、河虾, 在中国分布很广, 是目前淡水养殖业中最有发展前途的品种之一。但近年来, 养殖的日本沼虾性状出现了严重退化, 影响了日本沼虾养殖业的经济效益。可见对日本沼虾遗传多样性及其变化情况进行研究, 评估日本沼虾资源质量以及建立科学规范日本沼虾人工繁殖基础工作已极为必要。傅洪拓等(2003)对青虾资源和多态性进行调查, 结果表明不同水系间和同一水系不同地区的青虾的形态特征、体型模式等都存在显著差异<sup>[1]</sup>。蒋速飞等(2006)对华东地区 4 个日本种群进行遗传多样性分析, 结果显示华东地区日本沼虾种群存在一定的遗传分化<sup>[2]</sup>。赵晓勤等(2006)对取自洪泽湖、太湖、广西 3 地自然水域和浙江德清人工养殖池塘的 4 个种群日本沼虾进行形态差异分析, 结果认为 4 种群日本沼虾在形态上已产生一定程度的差异, 且集中表现在头胸甲部的性状上, 但所有差异均未达到亚种水平<sup>[3]</sup>。

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)技术能快速有效地进行基因组 DNA 多样性检测, 近年来已在系统分类<sup>[4]</sup>、种质鉴定<sup>[5]</sup>、基因定位<sup>[6]</sup>、资源评估<sup>[7]</sup>、分子标记辅助育种<sup>[8]</sup>等方面取得了广泛的应用。本文拟运用 RAPD 技术, 对取自太湖、洪泽湖、微山湖、龙感湖、洪湖以及珠江 6 个地区的日本沼虾种群进行分析, 以期在更大范围内调查日本沼虾的遗传多样性, 为日本沼虾种质资源保护和利用以及品种改良提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

日本沼虾野生种群样品采样情况见表 1。鲜活样品采集后, 直接用 95% 的酒精浸泡, 并密封保存, 运回实验室(表 1)。

表 1 用于遗传分析的日本沼虾野生种群

种群	采样地点	采样时间	样本数量
太湖	太湖	2005-04	30
微山湖	微山湖	2005-04	30
洪泽湖	洪泽湖	2005-04	30
龙感湖	龙感湖	2005-04	30
洪湖	洪湖	2005-04	30
珠江	珠江	2005-04	30

### 1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 制备 基因组 DNA 的提取参照《分子克隆实验指南》<sup>[9]</sup>的方法, 并有所改进。取虾肌肉组织消化后经酚 / 氯仿(1/1)、氯仿 / 异戊醇(24/1)抽提, 冰酒精沉淀。电泳-EB 染色检测。

1.2.2 RAPD-PCR 反应 DNA 扩增按 Williams 等<sup>[10]</sup>方法略作修改。PCR 反应体系包括 10mmol/L Tris-HCl (PH 8.0)、50mmol/L KCl、2mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.1mmol/L dNTP、0.1mmol/L 引物、25μg 基因组 DNA、1U Taq DNA 聚合酶。扩增程序为: 94℃ 预变性 10min; 94℃ 变性 1min、36℃ 退火 1min、72℃ 延伸 2min, 共 40 个循环; 72℃ 延伸 10min。1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, UV-200 紫外透射分析仪上观察和拍照。

1.2.3 随机引物 试验所用随机引物采用 Operon 公司 OPI-1~20、OPM-1~20、OPP-1~20、OPX-1~20 共 4 个系列 80 个引物中筛选出的 18 个引物(表 2)。

1.2.4 数据处理 根据观察结果, 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, 并据此统计位点总数和多态位点比例, 分析和计算种群的遗传多样性参数, 采用 DNAdistance 对种群的遗传学参数进行计算:

表 2 随机引物编号及序列

引物	序列 5' -3'	扩增带数	引物	序列 5' -3'	扩增带数
OPP-07	GTCCATGCCA	7	OPI-13	CTGGGGCTGA	8
OPP-11	AACGCGTCGG	9	OPX-05	CCTTCCCTC	18
OPP-15	CCAGCCGAAC	6	OPX-10	ACGCCAGAGG	13
OPP-16	GGAAGCCAAC	11	OPX-07	CCCTAGACTG	11
OPM-09	GTCTTGCGGA	18	OPX-08	CAGGGGTGGA	10
OPM-12	GGGACGTTGG	12	OPX-09	GGTCTGGTTG	9
OPI-01	ACCTGGACAC	11	OPX-11	GGAGCCTCAG	9
OPI-03	CAGAAGCCCA	13	OPX-17	GACACGGACC	12
OPI-07	CAGCGACAAG	12	OPX-18	GACTAGGTGG	12

DNA 片段大小的算: 根据 DNA 在电场中的迁移率(d)与分子量的对数成反比, 以 PCR Markers 作为分子量大小的标记物, 通过 SPSS 软件中曲线估计程序进行计算;

多态位点比例:

$$P = \text{多态位点数} / \text{位点数} \times (100)\%$$

种群平均遗传杂合度 (Nei & Roychoudhury<sup>[11]</sup>, 1974; Nei, 1978<sup>[12]</sup>):

$$H = \sum (1 - \sum P_i^2) / n$$

P<sub>i</sub> 为位点 i 在某一种群中的出现频率, n 为所检测到的位点数;

Shannon 信息指数:

$$I = - \sum P_i \ln P_i$$

P<sub>i</sub> 为位点 i 在某一种群中的出现频率;

遗传分化指数:

$$G_{st} = (\sum J_i / s - J_i) / (1 - J_i)$$

s 为种群数目, J<sub>i</sub> 是第 i 个种群内的基因的一致性;

N<sub>m</sub> 为参与种群繁殖的有效种群数:

$$N_m = 0.5(1 - G_{st}) / G_{st}$$

m 为迁移率;

遗传相似度(Nei&Li, 1979)<sup>[13]</sup>

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

$$D = 1 - F$$

N<sub>x</sub> 和 N<sub>y</sub> 分别为种 x 和 y 的位点总数, N<sub>xy</sub> 为两种群间共享位点数, D 为遗传距离。并根据遗传距离值, 采用 NTSYS 方法对种群进行聚类分析。

## 2 结果

### 2.1 RAPD 扩增结果

研究共使用了 OPI、OPM、OPP、OPX 4 个系列共 80 个引物, 按照重复性好, 谱带清楚, 位点数量适中的原则, 对 80 个引物进行筛选, 共选出适合于日本沼虾的 18 个引物, 其扩增结果如表 2。18 个引物共扩增出 201 个位点 (平均每个引物扩增位点数为 11.2 个), 其中 60 个位点(29.85%) 在 6 个种群的所有个体间表现稳定的一致性, 141 个位点(70.15%) 呈多态性。DNA 片段大小在 100~2000bp 之间。平均遗传杂合度为 0.2446。各种群内的多态位点数为 30~99 不等, 多态位点比例为 21.13%~55.93%, 平均遗传杂合度为 0.1132~0.2071 (表 3)。

表 3 日本沼虾 6 个地理种群的多态位点百分率及平均遗传杂合度

	位点数	多态位点数	多态位点比例/%	Shannon信息指数	平均遗传杂合度
太湖	149	61	40.94	0.2536	0.1747
微山湖	148	37	25.00	0.2110	0.1444
洪泽湖	147	44	29.93	0.2355	0.1626
龙感湖	145	32	22.07	0.2070	0.1425
洪湖	142	30	21.13	0.1695	0.1132
珠江	177	99	55.93	0.2950	0.2071

表 4 日本沼虾 6 个地理种群间的遗传分化指数 G<sub>st</sub> 值和 N<sub>m</sub> 值

	太湖	微山湖	洪泽湖	龙感湖	洪湖	珠江
太湖	****	1.0867	1.2950	0.8176	0.7460	1.2502
微山湖	0.3151	****	1.8628	0.8143	0.6850	0.7461
洪泽湖	0.2785	0.2116	****	0.7492	0.6257	0.8139
龙感湖	0.3795	0.3804	0.4068	****	1.5104	0.7995
洪湖	0.4013	0.4219	0.4442	0.2487	****	0.7774
珠江	0.2857	0.4013	0.3805	0.3848	0.3914	****

注: 对角线上方为 N<sub>m</sub> 值, 下方为遗传分化指数。

### 2.2 日本沼虾不同地理种群遗传结构分析

2.2.1 遗传分化指数 G<sub>st</sub> 由表 4 可以看出, 日本沼虾 6 个地理种群的两两地理种群间遗传分化指数 G<sub>st</sub> 值在 0.2116~0.4442 之间, 种群间总的遗传分化指数 G<sub>st</sub> 值为 0.4858; N<sub>m</sub> 值在 0.6257~1.8628 之间, 种群间总的 N<sub>m</sub> 值为 0.5293, 说明日本沼虾地理种群之间已经发生了较大的分化。

2.2.2 遗传相似度 F、遗传距离 P 以及 NTSYS 聚类分析 利用 POPGen1.32 软件计算的各地理种群间的遗

传相似度 F 值和无偏差遗传距离 D 值的结果 (表 5)。其中珠江种群和微山湖种群之间遗传距离最大, 相似性系数最小; 龙感湖种群和洪湖种群之间最小, 相似性系数最大。

根据遗传距离值采用 NTSYS 聚类分析能更清楚地反映出日本沼虾 6 个地理种群间的关系(图 1)。龙感湖种群和洪湖种群之间遗传距离最小, 首先聚在一起, 珠江种群和微山湖种群之间的遗传距离最大, 最后聚集。

表 5 6 个不同地理种群间的遗传相似系数以及种群间的遗传距离

	太湖	微山湖	洪泽湖	龙感湖	洪湖	珠江
太湖	*****	0.9254	0.9319	0.9031	0.9008	0.8828
微山湖	0.0775	*****	0.9552	0.9275	0.9255	0.8426
洪泽湖	0.0705	0.0458	*****	0.9056	0.9035	0.8558
龙感湖	0.1019	0.0753	0.0991	*****	0.9711	0.8524
洪湖	0.1045	0.0774	0.1015	0.0293	*****	0.8434
珠江	0.1247	0.1713	0.1558	0.1597	0.1703	*****

注:对角线右上方为种群间的遗传相似系数,左下方为遗传距离。

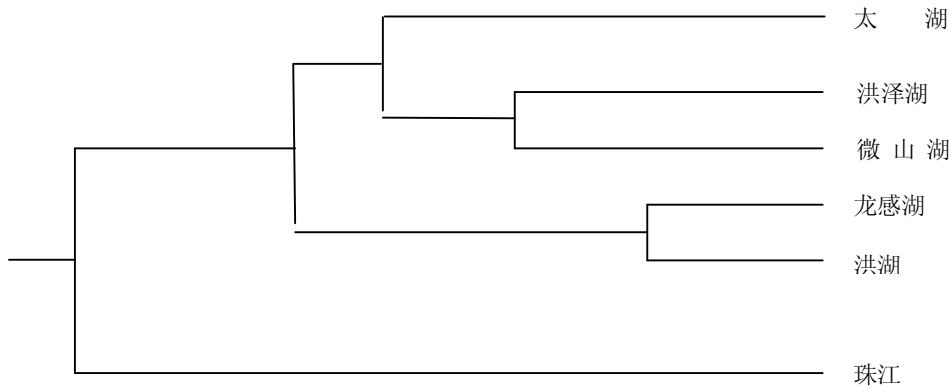


图 1 NTSYS 聚类分析法构建不同种群日本沼虾的谱系关系图

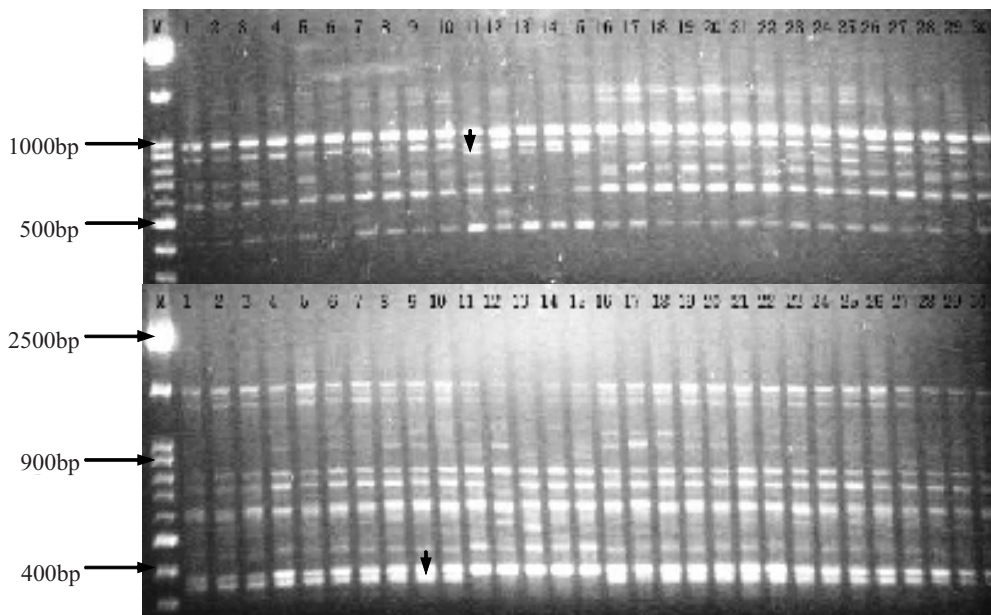


图 2 引物 OPX-08、OPI-03 对 6 个不同地理种群日本沼虾基因组的 RAPD 图谱

2.2.3 种群间特异性标记 笔者还筛选出一些特征性片段,可分别作为特征性遗传标记。对引物 OPX-08,珠江种群有一条 830bp 的条带,而其它种群没有,对引物 OPI-03,太湖种群,洪泽湖种群,微山湖种群,洪湖种群和龙感湖种群都有 360bp 大小的条带,而珠江种群没有,因此,通过这两个引物可以将珠江种群与其它五个种群区分开(图 2)。

### 3 讨论

从遗传学角度,一个物种的遗传多样性水平的高

低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关。遗传多样性的降低可导致其适应能力降低、有害隐性基因表达几率增加及经济性状衰退,最终导致物种退化。丰富的遗传多样性则意味着比较高的适应生存能力,蕴涵着比较大的进化潜能以及比较丰富的育种和遗传改良能力。保护生物多样性的核心是保护种质资源,其实是保存种群的基因组体系。因此,最大限度地维持种内遗传多样性水平,是持续利用种质资源的前提和基础。



遗传分化指数(Gst)是指种群间或个体间的遗传变异占总的遗传变异的大小。种群间遗传分化指数越大,表明种群间分化越明显,种群间的遗传差异也就越大。Wright(1978)<sup>[14]</sup>认为 Gst 值在 0~0.05 之间,种群遗传分化较弱;0.05~0.15 之间,种群遗传分化中等;0.15~0.25 之间,表示种群遗传分化较大;当 Gst 值大于 0.25 时,表示分化极大。笔者所得到的遗传分化指数 Gst 均大于 0.15,且除了龙感湖种群和洪湖种群(0.2487)、微山湖种群和洪泽湖种群(0.2116)之外,其他两种群间的遗传分化指数均在 0.25 以上,说明该试验所选择的 6 个地理种群的日本沼虾两两种群之间已经出现极大的分化。此外,在符合 Hardy—Weinberg 平衡的种群中,当 Nm 值小于 1 时,表示种群间发生显著分化;Nm 在 1~5 之间时,表示种群间发生重要分化;Nm 值大于 5 时,则表示分化不明显。试验结果显示:6 个地理种群间 Nm 值在 0.6850~1.8628 之间,也表明地理环境的差异已经造成物种遗传物质上较大的变化,日本沼虾种群间已经发生显著或重要分化,说明这 6 个日本沼虾种群内部保持了较高的遗传变异,应该属于相互独立的地理种群,为中国日本沼虾种内杂交育种提供了条件。

日本沼虾各地理种群外部形态特征相似,给从形态学角度区分各种群带来了困难。研究找到了日本沼虾珠江种群的 RAPD 标记,引物 OPX-08 扩增的 830bp 的条带仅在珠江种群中出现,其它五个种群没有;而引物 OPI-03 扩增的 360bp 的条带在太湖、洪泽湖、微山湖、洪湖及龙感湖种群中出现,在珠江种群中没有。说明日本沼虾珠江种群确实与其它 5 个地理种群的日本沼虾存在着明显的遗传差异。笔者将对这两条片段进行克隆分析,后续结果将另文报道。

笔者从 DNA 水平研究了日本沼虾遗传多样性,对其遗传资源进行评估,并首次发现了地方种群特异性分子标记,不仅具有学术价值,而且可为日本沼虾的种质资源保护和合理开发利用提供依据。笔者的研究

结果显示,日本沼虾整体遗传多样性水平较高,已经产生了遗传分化,为日本沼虾遗传改良和育种素材的选择提供了参考,将对日本沼虾的遗传育种研究起到促进作用。

### 参考文献

- [1] 傅洪拓,龚永生,吴滢,等.青虾的多态性研究[J].可持续水产养殖,2003:33-40.
- [2] 蒋速飞,傅洪拓,熊贻伟,等.日本沼虾 4 个地理种群遗传变异的 RAPD 分析[J].长江大学学报农学卷,2006:3(2):179-182.
- [3] 赵晓勤,倪娟,陈立侨,等.日本沼虾 4 种群的形态差异分析[J].中国水产科学,2006,13(2):224-229.
- [4] 宋林生,相建海,李晨曦,等.用 RAPD 标记研究对虾属六个种间的亲缘关系[J].动物学报,1998,44(3):353-359.
- [5] 陈洪,杨靖,薛国雄,等.RAPD 技术在异精激发方正银鲫比较研究中的应用[J].科学通报,1994,39(7):621-623.
- [6] 王新望,赖菁茹,姚大年,等.中国春 Ph1 基因的 RAPD 标记鉴定[J].农业生物技术学报,1999,(1):1-8.
- [7] 张四明,邓怀,晏勇,等.中华鲟随机扩增多态性 DNA 遗传多样性研究[J].海洋与湖沼,2000,31(1):1-7.
- [8] 陆朝福,朱立煌.植物育种中的分子标记的辅助选择[J].生物工程进展,1995,15(4):245-252.
- [9] Gray E M DNA fingerprints reveals look of genetic variation. Northern populations of the western pond turtle (*Clemmys marmorata*)[J]. Conservation Biology, 1995, 9(5):1244-1255.
- [10] Williams J. G. K, Kubelik A. R. and Livak K.J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18:6531-6535.
- [11] Nei M. and Roychoudhury A.K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. Genetics, 1974, 76(2):379-390.
- [12] Nei M. The theory of genetic distance and evolution of human races[J]. Human Genetics, 1978, 23(4):341-369.
- [13] Nei M. and Li W. H. Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonucleases. Process of Natural Academic Science, 1979, 76(10):5269-5273.
- [14] Wright S. Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural population[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978.