

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)近交系 3 个家系 33 个微卫星座位的遗传分析*

王日芳^{1,2} 李 健^{2,3①} 李吉涛² 王佳佳² 刘 萍^{2,3}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 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; 3. 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)

摘要 本研究以人工控制条件下采用兄妹交配方式建立的脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)近交系为实验材料,利用 33 个微卫星座位对近交系 3 个家系进行了遗传检测。统计各家系的等位基因组成,计算等位基因数(N)、杂合度(H)、多态信息含量(PIC)、平均基因纯合率等遗传参数,利用基因频率计算家系间的遗传距离,并进行聚类分析。结果显示,33 个微卫星基因座上共检测到 72 个等位基因,总群体平均 N 、 H 、 PIC 分别为 2.758、0.294、0.272; 3 个家系的平均 N 、 H 、 PIC 分别为 2.258、0.226、0.214; 2.469、0.283、0.300; 2.219、0.268、0.207; 可作为 3 个家系特异标志位点的基因座分别有 2 个、4 个和 1 个。聚类分析表明, A 系和 B 系先聚为一支,然后与 H 系聚在一起。研究结果揭示了脊尾白虾 3 个近交系在 33 个微卫星基因座上的遗传变异规律,表明近交家系已达到一定的近交程度;发现各家系潜在的标志基因座,各家系均已构成独立遗传群体。

关键词 脊尾白虾; 近交系; 微卫星; 遗传变异

中图分类号 Q341 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)04-0078-09

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)是我国近海一种重要的中小型经济虾类,其自身的一些生物学特点使其具备作为甲壳类实验动物的潜力,如成虾个体小,体色透明,生长快速,繁殖力强,环境适应性强等。我国从 20 世纪 90 年代开始对脊尾白虾进行了大量的研究,目前,关于脊尾白虾的研究主要集中于养殖技术(王兴强等, 2008; 于天基等, 2014)、病害诊治(Xu *et al.*, 2010)、繁殖生物学(王绪峨, 1987; 梁俊平等, 2012)、微卫星引物筛选(Jia *et al.*, 2013; 朱晓宇等, 2012¹⁾)、功能基因克隆(王有昆等, 2015)和野生群体遗

传多样性分析(马朋等, 2011; 贾舒雯等, 2012)等方面,而关于其近交系的研究尚未见报道。中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖与生态研究室自 2009 年开始采用兄妹交配方式培育脊尾白虾近交家系,现已传至第 10 代,但由于长期的近交繁殖,出现了近交衰退现象,从第 8 代起,抱卵亲虾死亡率升高,亲虾抱卵量下降,卵成活率降低,传代速度和质量受到影响。因此,了解其遗传背景和遗传纯度是建立脊尾白虾近交系的首要问题。

微卫星标记在近交系检测中是一种非常有效的

* 国家虾产业技术体系(CARS-47)、泰山产业领军人才工程项目(LJNY2015002)、国家自然科学基金(31472275)和青岛市产业培育计划科技惠民专项(17-3-3-62-nsh)共同资助[This work was supported by the Earmarked Fund for Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-47), Taishan Industrial Leader Talent Project of Shandong Province (LJNY2015002), National Natural Science Foundation of China (31472275), and Qingdao Industrial Development Program Science and Technology Benefit Special Project (17-3-3-62-nsh)]. 王日芳, E-mail: wrfchina@163.com

① 通讯作者: 李 健, 研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-03-28, 收修改稿日期: 2016-04-27

1) Zhu XY. Isolation and genetic diversity analysis of microsatellite in *Exopalaemon carinicauda*. Master's Thesis of Zhejiang University, 2010 [朱晓宇. 脊尾白虾微卫星分离及其遗传多样性分析. 浙江大学硕士研究生学位论文, 2010]

遗传质量控制手段(Tautz *et al*, 1989)。李凯等(2009)利用14对微卫星引物分析五指山猪3个不同家系F₁₄-F₁₈的遗传规律, 结果显示, 3个近交群体已各自成为独立家系, 且近交程度不完全一致, 基因纯合度也不相同。本研究利用33个微卫星基因座对脊尾白虾近交系3个家系进行了遗传学检测, 检测它的遗传变异程度及近交程度, 评价脊尾白虾近交群体的遗传结构, 为开展脊尾白虾近交系遗传质量检测和遗传质量控制提供基础资料, 并为其实验动物化提供基础数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 脊尾白虾近交系样本于2015年12月均取自中国水产科学研究院黄海水产研究所海

水养殖与生态研究室建立的近交系, 3个家系最初亲本均来自胶州湾, 家系之间无明确关系, A系F₇、F₈、F₉各30尾, B系F₇、F₈各30尾, H系F₆30尾, -80℃保存。

1.1.2 引物 本研究涉及的33对微卫星引物均为本实验室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。

1.1.3 试剂 10×PCR Buffer、dNTP和*Taq*酶均购自天根公司。

1.1.4 主要仪器和设备 PCR扩增仪; 电泳仪; 分光光度仪。

1.2 方法

1.2.1 DNA的提取 参考刘萍等(2000)改进后的

表1 脊尾白虾微卫星引物的序列
Tab.1 Microsatellite markers of *E. carinicauda* used in this study

位点 Loci	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 (°C)
EC01	KU289138	(ATT) ₆ ...(TTA) ₆ ... (TTA) ₅ ...(TTG) ₅	F:TGAACACTATTGGGAAACCTG R:CTCATGCTTTAAGACGAACGT	47
EC02	KU289139	(AC) ₁₄	F:TTTTGGTGTCTCCGTGCCT R:CCAGGCGAACTACGACAGAT	59
EC03	KU289140	(AG) ₁₆	F:GAGGTTGGTCGGTCTGTTTAT R:ATTCGTTGGCATCCTTCAG	56
EC04	KU289141	(AGT) ₁₆	F:GAATAGAGGAGGTGGCTGAG R:CACTTCTGAGGAGTAGGGAG	60
EC05	KU289142	(CTT) ₁₂	F:TCCGTAGTTAGGACGCTTGTT R:TTTATTCAGCCTTAGCCATCAG	56
EC06	KU289143	(CTT) ₂₃	F:GTCCAAACTCCGAGTGAAAAT R:ATCGCAACACCGACAGAC	60
EC07	KU289144	(GAT) ₁₀	F:TGATCAGGGGTAGATGGTTT R:GGCAAAAGGGATTTCTAATG	56
EC08	KU289145	(TCA) ₁₀	F:ACACAAGGGCCAACAGTCT R:GCCGTGATTCTCCTTTT	56
EC09	KU289146	(TCT) ₁₀	F:CGAGCCACAAAAGACACAT R:CAAAGACGTGGACGAAATT	53
EC10	KU289147	(TGAT) ₅	F:AATCCTTCGGGAATCTAGTC R:CAGAATAGCACCTTCCAGA	51
EC11	KU289148	(CA) ₆	F:TTTCCAAGCCGTAACATA R:AGGTGTGGAGACAGTGCC	53
EC12	KU289149	(TA) ₆	F:TGGAATCCTCTCCTGCAT R:CACTGATTGACTTTGGGC	57
EC13	KU289150	(CT) ₂₈	F:CCTCTGGGCTGTAGGATGT R:GGTACATGACAGGGTCCGT	55
EC14	KU289151	(AG) ₇	F:GCAGCAGCACTTAGGTTAG R:CTTGTGGAGCAAATAGGC	53
EC15	KU289152	(TC) ₁₀	F:ATGGAGTCTCCGAGGATG R:TGTAGGTGCTGGTGCTTG	50
EC16	KU289153	(CT) ₃₂	F:ATGGAGTCTCCGAGGATG R:TGTAGGTGCTGGTGCTTG	55

续表 1

位点 Loci	登录号 Accession Number	核心重复序列 Repeat motif	引物(5'-3') Primer sequence	退火温度 Annealing temperature (°C)
EC17	KU289154	(TACA) ₇	F:AAATCCGTGTCTGCTGCG R:AGGAAAGCAAGGCTGGTG	50
EC18	KU289155	(CTAT) ₈	F:CAATGACGACCAGAACGAT R:GAAAGCAACACTTGAAACG	49
EC19	KU289156	(AGGGTT) ₅	F:AGGCTGGGTTGACAAATAC R:CAAAGAGTGTGCAAAAAGG	56
EC20	KU289157	(GGGTTA) ₅	F:CGTATCATTGTGTGCTTGTG R:ACATCTACCTGGCGACATAT	53
EC21	KU289158	(ACCCTA) ₁₁	F:GCATGTTGGCGTTTTGTAT R:AAGGGGGTCTTATTTGAGC	49
EC22	KU289159	(ATAA) ₅	F:CACGAGAACACTGTCCACTG R:GCCCTGCTGTCTACATCCTT	50
EC23	KU289160	(AGT) ₁₆	F:GAATAGAGGAGGTGGCGTAG R:TTTCACTTCTGAGGAGTAGGGAG	53
EC24	KU289161	(GGA) ₁₄	F:AGGACATTGCGTCTGCTCA R:CTGCCCTCATAATCCAGTGTG	50
EC25	KU289162	(AAT) ₆	F:TGATGCAAGGAGAGCGTG R:AAGGAATGCCTGCCTACTAT	56
EC26	KU289163	(AT) ₇	F:AGAAATACGCTATGGAAGACC R:TTTACCAGCCCAATGAGT	56
EC27	KU289164	(TC) ₂₈	F:ATCGGAACCTCTCTAAATGCC R:GTGTGCTGGTGCCTGAAA	60
EC28	KU289165	(AG) ₂₀	F:GCGAAGTGAACATCAAAG R:GGACAGAACCAGAAGCAG	60
EC29	KU289166	(AAG) ₇	F:GAACGCTGGTCAGAAACA R:CTCATGGAAATCAATGTGGT	60
EC30	KU289167	(TC) ₁₃	F:TTCTCTCATTCGTTGGCATC R:CAGAGAACATTGGCGAGAG	59
EC31	KU289168	(CT) ₃₀	F:CTCCGAGGATGGACTAAAA R:TAGGTGCTGGTGCCTTAAA	59
EC32	KU289169	(CATA) ₅	F:ATTGACGCCCATGAGAT R:TCATTTGTTGATGTCGGC	59
EC33	KU289170	(GA) ₂₉	F:ACCTTATGTCGCCAGTCC R:CGCACCCATTACAGATTG	59

酚氯仿抽提法,将提取的 DNA 溶于灭菌水中, -20℃ 保存。用琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白质分析仪双重检测 DNA 的纯度和浓度,然后稀释到 50 ng/μl 备用。

1.2.2 PCR 扩增 反应体系 20 μl,其中, DNA 模板 70-100 ng, 2.0 μl 10×PCR Buffer, 1.6 μl dNTP (2.5 mmol/L), 引物上下游各 1 μl, 0.2 μl *Taq* 酶 (5 U/μl)。PCR 反应程序为 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 40 s, 47-63℃ 退火温度 40 s (因座位而异), 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.2.3 电泳结果及记录 8% 聚丙烯酰胺凝胶 500 V 电泳 2 h, 银染显色, 照相。每个微卫星座位根据电泳迁移率计算不同扩增片段的分子量,并确定个体基因型。无扩增条带则为无效等位基因,扩增带 1 条为纯合子,扩增带 2 条为杂合子。

1.2.4 数据统计与分析 用 POPGENE 32 和 Botstein 等(1980)的公式计算各家系等位基因数(N)、有效等位基因数(N_e)、期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)、遗传距离(D)和多态信息含量(PIC),计算各家系在 33 个微卫星座位的平均基因纯合率(个体样本为纯合子的基因位点数与全部基因位点数的比率)并计算各家系间 Nei 氏标准遗传距离(1972)进行系统聚类分析。

2 结果

2.1 总群体的遗传变异

脊尾白虾近交系 3 个家系 4 个世代总群体的遗传多样性见表 2。从表 2 可以看出,脊尾白虾近交系群

表2 脊尾白虾近交群体的遗传多样性
Tab.2 Genetic diversity of inbred *E. carinicauda*

位点 Loci	等位基 因数 N	有效等位 基因数 N_e	杂合度 H	多态信息 含量 PIC
EC01	2	1.267	0.239	0.188
EC02	7	1.788	0.414	0.415
EC03	3	2.130	0.804	0.449
EC04	2	1.093	0.034	0.081
EC05	3	1.423	0.331	0.257
EC06	4	2.818	0.708	0.578
EC07	4	2.531	0.467	0.539
EC08	3	2.517	0.611	0.518
EC09	4	1.867	0.368	0.397
EC10	3	1.911	0.226	0.428
EC11	2	1.014	0.000	0.013
EC12	2	1.610	0.137	0.307
EC13	1	1.000	0	0.000
EC14	3	1.330	0.223	0.229
EC15	1	1.000	0	0.000
EC16	4	1.271	0.174	0.206
EC17	2	1.722	0.599	0.331
EC18	2	1.056	0.054	0.051
EC19	3	1.840	0.599	0.404
EC20	2	1.723	0.570	0.331
EC21	2	1.041	0.040	0.038
EC22	3	1.751	0.603	0.348
EC23	2	1.202	0.185	0.154
EC24	2	1.989	0.057	0.374
EC25	3	1.042	0.008	0.040
EC26	4	2.087	0.079	0.424
EC27	3	1.836	0.583	0.412
EC28	2	1.918	0.448	0.364
EC29	4	1.799	0.277	0.382
EC30	2	1.328	0.049	0.217
EC31	1	1.000	0	0.000
EC32	2	1.056	0.055	0.052
EC33	4	2.215	0.757	0.450
平均 Average	2.758	1.611	0.294	0.272

体在33个微卫星基因座上的等位基因数(N)最多为7个(EC02),最少为1个(EC13、EC15、EC31),平均每个基因座2.758个;有效等位基因数(N_e)介于1.000–2.818,平均值为1.611。总群体的杂合度 H 的范围是0–0.804,其中,4个基因座的 H 为0,另外有9个在0.570–0.804之间,其余20个在0.008–0.467之间。总群体的平均PIC为0.272。

此外,3个家系在33个微卫星座位共发现72个

等位基因,A、B和H系分别具有40、53、56个等位基因,其中,32个等位基因为各家系所共有。

2.2 家系间的遗传变异

根据个体基因型分别计算3个家系的 N 、 H 和PIC等指数见表3。从表3可以看出,A系中,除EC27、EC28表现为无效等位基因外,其他都表现出多态性,且有5个基因座(EC13、EC15、EC16、EC18、EC31)表现为单一位点;B系中,EC31表现为无效等位基因,7个基因座(EC11、EC12、EC13、EC15、EC21、EC30、EC32)表现为单一位点;H系中,EC30表现为无效等位基因,5个基因座(EC13、EC15、EC19、EC31、EC32)表现为单一位点。在所有表现纯合的基因座中,有2个基因座(EC13、EC15)在3个家系中都表现纯合,A系特有的纯合基因座有2个(EC16、EC18),B系特有的纯合基因座有4个(EC11、EC12、EC21、EC30),H系特有的纯合基因座只有1个(EC19)。由于这些特有的纯合基因座只在某一近交系中表现单一性,而在其他近交系中仍然表现多态性,故特有纯合基因座可能作为近交系的标志基因座,用来区分不同的近交系。图1为EC30基因座分别在A系、B系和H系中的电泳图,该位点仅在B系中表现为直带,故可作为B系标志基因座。

从表3中还可以看出,A、B和H系的平均 N 、 H 和PIC分别为2.258、0.226、0.214,2.469、0.283、0.300和2.219、0.268、0.207,与野生群体(6.697、0.716、0.668)(Wang *et al.*, 2016)相比,已有了大幅度的降低。A、B、H家系中分别有23、19、24个基因座仅拥有2个或3个等位基因,且3个近交系的平均PIC均小于0.5,属中度或低度多态,基因分化系数为0.118。从这些指数的差异来看,3个家系间已经呈现分化的趋势,正向着与本系相关等位基因纯合的方向选育。3个家系在EC13、EC15基因座上表现为纯合,即只有一个等位基因,但在EC03、EC06、EC08、EC17、EC22、EC33基因座上却表现出高度多态性,每个家系均存在2个以上等位基因,并且拥有较高的杂合度($H > 0.5$)。结果显示,虽然近交的推进使其向着不同家系方向分化,但各自均保持脊尾白虾某些共同的种质特性。

2.3 近交程度

基因纯合率是每个个体的纯合座位占总检测座位的比率(牛荣等,2001)。3个近交家系在全部基因座上的平均基因纯合率见表4。从表4可以看出,脊尾白虾近交系A系F₇的平均基因纯合率为68.34%,

表3 33个微卫星基因座在脊尾白虾3个近交家系中的遗传变异
Tab.3 Genetic variation of 33 microsatellites in three inbred families of *E. carinicauda*

位点 Loci	A家系 Lineage A			B家系 Lineage B			H家系 Lineage H		
	等位基 因数 N	杂合度 H	多态信息 含量 PIC	等位基 因数 N	杂合度 H	多态信息 含量 PIC	等位基 因数 N	杂合度 H	多态信息 含量 PIC
EC01	2	0.049	0.047	2	0.509	0.307	2	0.076	0.070
EC02	3	0.047	0.056	7	1.000	0.707	3	0.036	0.052
EC03	2	0.690	0.350	3	1.000	0.549	4	1.000	0.375
EC04	2	0.022	0.022	2	0.054	0.161	2	0.033	0.032
EC05	3	0.529	0.326	2	0.035	0.095	3	0.614	0.355
EC06	2	0.517	0.375	4	1.000	0.666	2	0.579	0.375
EC07	4	0.567	0.578	2	0.317	0.375	4	0.550	0.560
EC08	3	0.589	0.499	3	0.644	0.515	3	0.683	0.550
EC09	4	0.429	0.432	3	0.283	0.341	4	0.552	0.478
EC10	3	0.247	0.282	3	0.188	0.544	3	0.368	0.379
EC11	2	0.000	0.023	1	0.000	0.000	2	0.000	0.034
EC12	2	0.239	0.372	1	0.000	0.000	2	0.362	0.252
EC13	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000
EC14	2	0.000	0.045	3	0.574	0.418	2	0.000	0.068
EC15	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000
EC16	1	0.000	0.000	4	0.480	0.463	2	0.214	0.137
EC17	2	0.625	0.337	2	0.551	0.320	2	0.741	0.358
EC18	1	0.000	0.000	2	0.133	0.117	3	0.054	0.087
EC19	2	0.357	0.250	3	0.948	0.541	1	0.000	0.000
EC20	2	0.349	0.267	2	0.911	0.373	2	0.517	0.329
EC21	2	0.066	0.062	1	0.000	0.000	2	0.100	0.091
EC22	3	0.511	0.330	2	0.741	0.358	3	0.533	0.324
EC23	2	0.035	0.033	2	0.407	0.272	2	0.035	0.033
EC24	2	0.014	0.375	2	0.125	0.359	2	0.426	0.279
EC25	3	0.000	0.051	2	0.022	0.022	3	0.000	0.075
EC26	3	0.000	0.393	4	0.204	0.430	2	0.000	0.369
EC27	*	*	*	3	0.583	0.412	3	0.296	0.255
EC28	*	*	*	2	0.448	0.364	2	0.138	0.120
EC29	2	0.000	0.289	4	0.684	0.495	2	0.000	0.346
EC30	2	0.085	0.305	1	0.000	0.000	*	*	*
EC31	1	0.000	0.000	*	*	*	1	0.000	0.000
EC32	2	0.093	0.085	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000
EC33	4	0.955	0.465	4	0.423	0.409	3	0.931	0.464
平均 Average	2.258	0.226	0.214	2.469	0.283	0.300	2.219	0.268	0.207
总群体平均杂合度(H_t) Mean heterozygosity for the whole groups			各家系内平均杂合度(H_s) Mean heterozygosity for each lineage			基因分化系数($Gst=1-H_s/H_t$) Coefficient of gene differentiation			
0.294			0.259			0.118			

*为无效等位基因

* indicated null allele loci

F_8 为 67.11%，稍有下降，但到 F_9 时，平均基因纯合率为 77.59%，相比 F_7 、 F_8 有了显著的提高。通过计算得出，A、B、H 家系的平均基因纯合率分别为

71.01%、57.01%和 61.34%，存在一定的差异，即各家系基因纯合的速度不同，A 系最快，H 系次之，B 系最慢，且各家系基因纯合的程度也不相同。近交使

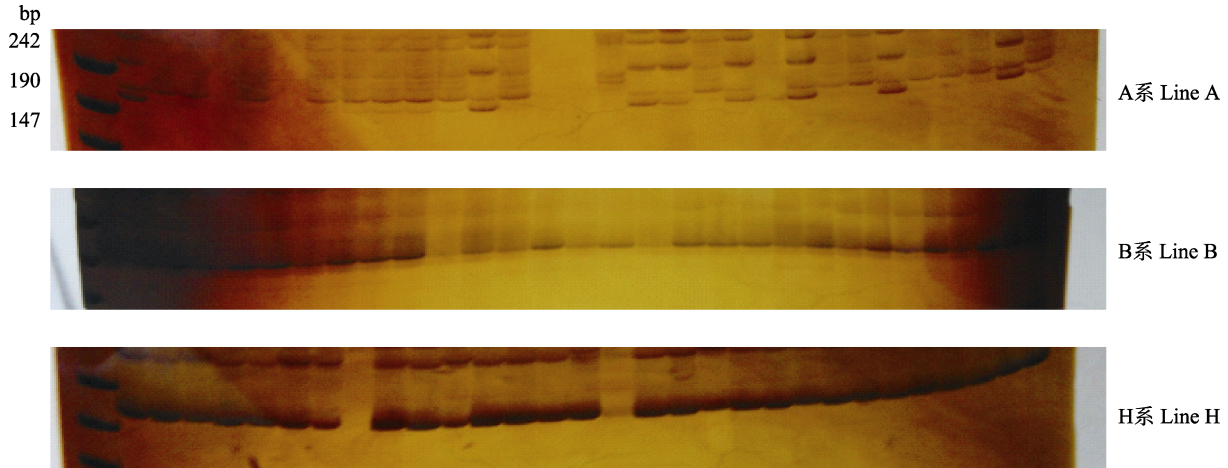


图 1 EC30 分别在 A 系、B 系和 H 系中的电泳
Fig.1 The electrophoretogram of EC30 on A, B, H inbred lines respectively

表 4 脊尾白虾近交系 3 家系 33 个微卫星座位平均基因纯合率

Tab.4 Mean rate of homozygote at 33 microsatellite loci in 3 lineages of *E. carinicauda* inbred line (%)

世代 Generation	A 系 Lineage A	B 系 Lineage B	H 系 Lineage H
F ₆ 6th generation			61.34
F ₇ 7th generation	68.34	56.21	
F ₈ 8th generation	67.11	57.80	
F ₉ 9th generation	77.59		

基因趋向纯合, 因此, 平均基因纯合率可以在很大程度上代表一个群体的近交程度, 本研究结果显示, 脊尾白虾近交系经过人工控制交配已达到了一定的近交程度。

2.4 遗传距离及系统聚类

根据等位基因频率计算出脊尾白虾 3 个近交系间的 Nei 氏标准遗传距离和遗传相似度见表 5。从表 5 可以看出, 遗传距离介于 0.178–0.352, 遗传相似度介于 0.653–0.837。A 系和 B 系的遗传距离最近(0.178), A 系和 H 系的遗传距离最远(0.352)。利用 UPGMA 法构建的聚类见图 2。从图 2 可以看出, A 系和 B 系先聚为一支, 再与 H 系聚在一起。推测可能与近交系最初亲本之间亲缘关系远近有关, 也可能跟建系过程有关。

3 讨论

3.1 脊尾白虾近交群体的遗传分析

通常用来检验近交系遗传多样性的指标有 N 、 H 、PIC、基因分化系数(G_{st})和平均基因纯合率等。从各家系的等位基因组成可以评价其遗传背景。33 个微

表 5 3 个脊尾白虾近交系间的遗传距离(D , 对角线下)及遗传相似性(I , 对角线上)

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

	A 系 Lineage A	B 系 Lineage B	H 系 Lineage H
A 系 Lineage A	**	0.837	0.653
B 系 Lineage B	0.178	**	0.695
H 系 Lineage H	0.352	0.315	**

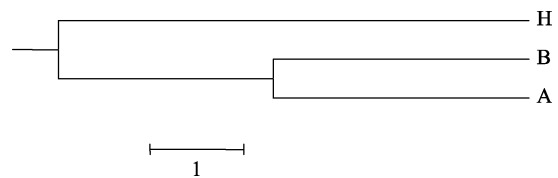


图 2 基于 D 遗传距离的 UPGMA 聚类
Fig.2 UPGMA clustering tree based on D genetic distance

卫星座位在脊尾白虾 3 个家系中共检测到 72 个等位基因, 等位基因数在 1–7 个不等, 平均每个位点 2.180 个, 而这 33 个位点在江苏野生群体上检测到的等位基因数范围为 3–11 个, 平均每个位点等位基因数为 6.69 个(Wang *et al*, 2016), 由此可见, 近交系的等位基因数远远少于野生群体。但这一结果与李霞等(2004)对剑尾鱼(*Xiphophorus hellerii*) RW-H 系 F₈ 的结果(平均等位基因数 2.600 个)相似。等位基因最多的位点为 EC02, 共发现 7 个等位基因; 最少的位点仅有 1 个等位基因(EC13 和 EC15), 即在 3 个家系所有个体中均为同一等位基因。该结果说明, 近交使大量等位基因丢失。3 个家系都拥有的等位基因有 32 个, 占有所有等位基因的 44.40%, 另外, 40 个等位基

因则在各家系间表现出不同程度的差别,说明在近交过程中,脊尾白虾各近交家系发生了严重分化,各家系均已成为独立遗传群体。

杂合度又称基因多样性,是度量群体遗传变异的最适参数之一。利用 33 个微卫星座位测得脊尾白虾 3 个近交家系的总群体平均杂合度为 0.294,各家系内平均杂合度为 0.259,该值远远低于脊尾白虾野生群体的平均杂合度(0.689),略高于近交至 F_7 时的广西巴马小型猪近交群体(0.277)(叶香尘, 2006)¹⁾。脊尾白虾近交群体由于长期的近交和人工选育产生近交分化,群体中不断淘汰不利基因,纯化有利基因,使群体基因型趋于一致和纯合,而导致了遗传基因多样性的低水平。

PIC 是衡量位点多态性的指标。当 $PIC > 0.5$ 时,该座位为高度多态座位, $0.25 < PIC < 0.5$ 时为中度多态性座位, $PIC < 0.25$ 时为低度多态座位(战爱斌等, 2006)。本研究所用的 33 个微卫星位点用于野生群体的检验时,有 27 个表现为高度多态,5 个为中度多态,1 个为低度多态。用于近交系群体的检验时,A 系、B 系和 H 系分别有 16、11 和 17 个低度多态位点,且其平均 PIC 分别为 0.214、0.300、0.207,均小于 0.5,属中度或低度多态。本研究的总群体 PIC 为 0.272,远低于野生群体的 PIC (0.668)和近交至 F_7 时小型猪近交群体(叶香尘, 2006)¹⁾,却与近交至 F_3 时的广西巴马小型猪近交群体(0.278)(牛荣, 2004)接近。表明长期近交和人工选育已经产生了基因分离,即脊尾白虾已分化成多个家系,且在该过程中大量等位基因丢失, PIC 降低。

基因分化系数(G_{st})是衡量群体间在多个座位上遗传分化的指标,为总群体平均杂合度(H_t)和各亚群内平均杂合度(H_s)的函数,即: $G_{st} = 1 - H_s / H_t$ 。本研究中 3 个家系总群体平均杂合度为 0.294,各家系内平均杂合度为 0.259,基因分化系数为 0.118。各家系内平均杂合度比较低,表明大多数为纯合位点,但并未达到近交系动物的水平,即群体内平均杂合度为 0,故仍然存在进一步分化的可能。遗传分化系数是衡量基因分化相对量的一个较好的指标,脊尾白虾近交系 3 家系的基因分化系数为 0.118,表明群体间的遗传变异占总群体遗传变异的 11.80%,表明脊尾白虾近

交系 3 个家系间的差异已经比较大,均已成为独立品系。

平均基因纯合率在很大程度上代表一个群体的近交程度。本研究近交系 H 系 F_6 的平均基因纯合率为 61.34%,与三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) 2 个近交系 F_4 的平均基因纯合率分别 55.87%和 56.69%(韩智科等, 2011)²⁾高出 5%左右。A 系 F_9 的平均基因纯合率为 77.59%,与版纳小耳猪 807 近交系 F_{10} 的平均基因纯合率(75%)(牛荣等, 2001)值大小相近。通过以上数据推测,在长期的近交过程中,基因不断被淘汰,最后趋向纯合,导致平均基因纯合率提高。

3.2 近交系的标志位点

近交系动物中微卫星长度变化发生率很低,微卫星位点的等位基因可能是某一近交系动物的恒定参数(Tascon *et al*, 2000)。可以用来鉴别不同的近交系动物。刘宇飞等(2007)用 20 个微卫星位点检测剑尾鱼 RW-H 近交系 F_{15} 遗传结构,发现有 17 个位点表现为纯合,可作为 RW-H 系的标志基因位点。本研究得出脊尾白虾近交 A 系特有的纯合基因座有 2 个(EC16、EC18),B 系特有的纯合基因座有 4 个(EC11、EC12、EC21、EC30),H 系特有的纯合基因座只有 1 个(EC19),可分别作为各自近交系的潜在特异标志基因用于遗传监测。

参 考 文 献

- Botstein D, White RL, Skolnick M, *et al*. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314
- Jia SW, Liu P, Li J, *et al*. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Genetics and Molecular Research*, 2013, 12(3): 2816–2820
- Jia SW, Liu P, Li J, *et al*. Microsatellite analysis of genetic diversity in 3 wild populations of *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(12): 1819–1825 [贾舒雯, 刘萍, 李健, 等. 脊尾白虾 3 个野生群体遗传多样性的微卫星分析. *水产学报*, 2012, 36(12): 1819–1825]
- Li K, Feng ST, Mou YL, *et al*. Study on genetic regulation of microsatellite loci gene of three inbred families of

1) Ye XC. Genetic analysis of 21 microsatellite loci in 5 lineages of Guangxi Bama mini-pig inbred line. Master's Thesis of Guangxi University, 2006, 31–55 [叶香尘. 应用 21 个微卫星座位对广西巴马小型猪五个近交系群体的遗传学分析. 广西大学硕士研究生学位论文, 2006, 31–55]

2) Han ZK. The genetic variation analysis of Inbred *Portunus trituberculatus*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2011, 30–53 [韩智科. 三疣梭子蟹近交家系遗传变异分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2011, 30–53]

- Wuzhishan Miniature pig. *Scientia Agriculture Sinica*, 2009, 42(5): 1751–1760 [李凯, 冯书堂, 牟玉莲, 等. 五指山猪3个近交家系内微卫星等位基因的遗传变化. *中国农业科学*, 2009, 42(5): 1751–1760]
- Li X, Bai JJ, Wu SQ, *et al.* Genetic structure analysis of *Xiphophorus helleri* RW-H inbred strain. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(4): 365–370 [李霞, 白俊杰, 吴淑勤, 等. 剑尾鱼RW-H近交系的遗传结构分析. *水产学报*, 2004, 28(4): 365–370]
- Liang JP, Li J, Liu P, *et al.* Research progress of biological characteristics and artificial breeding of ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(17): 109–116 [梁俊平, 李健, 刘萍, 等. 脊尾白虾生物学特性与人工繁育的研究进展. *中国农学通报*, 2012, 28(17): 109–116]
- Liu P, Xu HS, Kong J, *et al.* RAPD analysis of wild stock of penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) in the China's coastal waters of Huanghai and Bohai seas. *Acta Oceanologica Sinica*, 2000, 22(5): 89–93 [刘萍, 徐怀恕, 孔杰, 等. 中国对虾黄, 渤海沿岸地理群的RAPD分析. *海洋学报*, 2000, 22(5): 89–93]
- Liu YF, Bai JJ, Li KB, *et al.* Genetic structure of 20 microsatellite loci in RW-H swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) inbred strain. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(4): 602–607 [刘宇飞, 白俊杰, 李凯彬, 等. 剑尾鱼RW-H近交系20个微卫星位点的遗传结构. *中国水产科学*, 2007, 14(4): 602–607]
- Ma P, Liu P, Li J, *et al.* The genetic diversity and phylogenetic analysis of COI gene in mitochondrial DNA of three populations of *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(6): 50–56 [马朋, 刘萍, 李健, 等. 脊尾白虾3个野生群体线粒体COI基因的遗传多样性及其系统发育分析. *渔业科学进展*, 2011, 32(6): 50–56]
- Niu R, Huang ZB, Wei H, *et al.* Genetic analysis of 12 microsatellite loci in Xishuangbanna miniature pig inbred. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2004, 11(1): 42–45 [牛荣, 黄中波, 魏泓, 等. 用12对微卫星引物对版纳小耳猪近交系的遗传学分析. *中国实验动物学报*, 2004, 11(1): 42–45]
- Niu R, Zeng YZ, Shang HT, *et al.* Genetic analysis of 35 microsatellite loci in 5 lineages of Xishuangbanna miniature pig inbred line. *Acta Genetic Sinica*, 2001, 28(6): 518–526 [牛荣, 曾养志, 商海涛, 等. 版纳小耳猪近交系5家系35个微卫星座位的遗传分析. *遗传学报*, 2001, 28(6): 518–526]
- Tacson CD, Littlejohn RP, Almeida AR, *et al.* Genetic variation within the Merino sheep breed: Analysis of closely related populations using microsatellites. *Animal Genetics*, 2000, 31: 243–251
- Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(16): 6463–6471
- Wang XE. Preliminary observation of *Exopalaemon carinicauda* breeding biology. *Chinese Journal of Zoology*, 1987, 22(1): 7–10 [王绪峨. 脊尾白虾繁殖生物学的初步观察. *动物学杂志*, 1987, 22(1): 7–10]
- Wang XQ, Cao M, Yan BF, *et al.* The aquaculture technology research of *Exopalaemon carinicauda*. *Fisheries Science and Technology Information*, 2008, 35(6): 265–269 [王兴强, 曹梅, 阎斌伦, 等. 脊尾白虾养殖技术研究. *水产科技情报*, 2008, 35(6): 265–269]
- Wang YK, Liu P, Duan YF, *et al.* The cloning and expression of Alpha2-Macroglobulin gene of *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(2): 63–71 [王有昆, 刘萍, 段亚飞, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) a2-巨球蛋白cDNA全长的克隆和表达分析. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 63–71]
- Wang RF, Li J, Li JT, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite markers in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Conservation Genetics Resources*, 2016, 8(1): 43–81
- Xu WJ, Xie JJ, Shi H, *et al.* Hematodinium infections in cultured ridgetail white prawns, *Exopalaemon carinicauda*, in eastern China. *Aquaculture*, 2010, 300(1–4): 25–31
- Yu TJ, Li J, Li JT, *et al.* The growth and reproduction characteristic of ridgetail white prawn (*Exopalaemon carinicauda*) cultured in ponds. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2014, 4(2): 16–25 [于天基, 李健, 李吉涛, 等. 池养脊尾白虾的生长与繁殖特性. *中国渔业质量与标准*. 2014, 4(2): 16–25]
- Zhan AB, Bao ZM, Lu Wei, *et al.* Microsatellite markers of *Aposthopus japonicas*. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(2): 192–196 [战爱斌, 包振民, 陆维, 等. 仿刺参的微卫星标记. *水产学报*, 2006, 30(2): 192–196]

(编辑 陈严)

Genetic Analysis of 33 Microsatellite Loci in 3 Families of *Exopalaemon carinicauda* Inbred Line

WANG Rifang^{1,2}, LI Jian^{2,3①}, LI Jitao², WANG Jiajia², LIU Ping^{2,3}

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

Abstract To analyze the genetic effects and inbred degrees of 3 families of *Exopalaemon carinicauda* inbred line, 33 microsatellite loci were selected for genetic analysis. Composition of alleles of each line was analyzed. Number of allele (N), heterozygosity (H), polymorphism information content (PIC), and mean rate of homozygote were calculated. According to gene frequencies of 33 microsatellites, genetic distances between these lines were estimated. In addition, the dendrograms were obtained based on genetic distances. The results indicated that 72 alleles were detected at the 33 loci with an average number of allele of 2.758. The estimation of average N , H and PIC of the whole population was 2.758, 0.294, 0.272, respectively. The average N in three families were 2.258, 0.226, 0.214, respectively. The average H in three families were 0.2469, 0.283, 0.300, respectively. The average PIC in three families were 0.219, 0.268, 0.207, respectively. And 7 loci could be used as special gene loci for genetic detection. Cluster analysis showed that Line A and B were gathered first, and then merged with Line H. In conclusion, this study revealed the pattern of genetic variation at 33 microsatellite loci in three inbred families of *E. carinicauda*. And the results indicated that inbred families have reached a certain degree of inbreeding. Some loci could be used as special gene loci for genetic detection and identification of independent genetic groups. This study provided important information for genetic analysis and germplasm conservation in *E. carinicauda*.

Key words *Exopalaemon carinicauda*; Inbred lines; Microsatellite; Genetic variation

① Corresponding author: LI Jian, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn