

6个虾种基因组 DNA多态性分析*

许玉德¹ 孙 晟²

(¹ 厦门大学生命科学学院 361005)

(² 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 采用 RAPD 方法检测了罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)、绿须虾 (*Aristeus trilineatus*)、长毛对虾 (*Penaeus penicillatus*)、日本对虾 (*P. japonicus*)、斑节对虾 (*P. monodon*) 和周氏新对虾 (*Metapenaeus jyneni*) 等 6 个虾种的基因组 DNA 的多态性。用 20 个随机引物扩增得到 492 个 DNA 片段, 根据这些片段的共享度计算出遗传距离并构建系统树。所得结果从 DNA 水平上反映出虾类在科属种不同分类阶元亲缘关系的远近, 并为虾类现行的分类系统提供了分子生物学依据。

关键词 虾类, 基因组 DNA, 随机扩增多态性 DNA

随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术是以检测物种基因组 DNA 多态性为目的, 能够高效、准确地提供许多个体基因组的许多位点的 DNA 序列多态性数据, 并且可以此作为分子遗传标记, 研究物种间的亲缘关系和系统进化, 在生物的遗传多样性、物种的分类和遗传育种研究等方面已经得到了广泛的应用, 取得了可喜的进展^[1]。作者用 RAPD 技术研究十足目中分属于 3 个科 4 个属的 6 个虾种的基因组 DNA 的多态性, 从 DNA 分子水平上分析虾类在不同分类阶元的遗传差异和分子标记, 为虾类资源的分类鉴定和系统进化研究提供分子遗传学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 试验用虾购自福建省厦门市同安区养虾场和水产交易市场, 共 6 种: 罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*), 绿须虾 (*Aristeus trilineatus*), 长毛对虾 (*Penaeus penicillatus*), 日本对虾 (*P. japonicus*),

斑节对虾 (*P. monodon*) 和周氏新对虾 (*Metapenaeus jyneni*)。

1.1.2 主要试剂 随机引物购自 Operon 公司, Taq 酶购自 Promega 公司, 琼脂糖为 Sigma 公司产品, 其余均为国产分析纯试剂^[1]。

1.1.3 仪器 PCR 仪为美国 PE 公司产品, 型号 Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler 480。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和纯化 每种虾取 6 尾, 从其尾部取等量肌肉组织剪碎混合, PBS 液漂洗, 取 2 g 样品加 2 ml TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA, pH 8.0), 冷冻匀浆, 加 1/10 体积 10% SDS 混匀, 70 °C 水浴 20 min, 离心, 取上清, 用等

* 福建省厦门市同安区水产局高级工程师张庆勉协助实验材料的采集和鉴定工作, 特此致衷心感谢。

收稿日期: 2000-09-18; 修回日期: 2000-11-08

体积酚/氯仿抽提,取上清,2倍乙醇沉淀DNA,70%乙醇漂洗后,溶于TE缓冲液,加RNase A至终浓度为40 μg/ml,37℃保温1.5 h,加蛋白酶K 20 μg,50℃保温3 h,等体积酚/氯仿抽提,2倍体积无水乙醇漂洗,风干后溶于20 μl超纯水,4℃保存。

1.2.2 RAPD反应 扩增反应总体积为25 μl,其中含有10 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 20 mmol/L KCl, 0.1% Triton X100, 2 mmol/L MgCl₂, dATP, dCTP, dTTP, dGTP各0.1 mmol/L, 1.2 ng/μl引物,约25 ng DNA, 1.5 U Tag酶。扩增反应在Perkin Elmer Cetus DNA扩增仪上进行。反应程序为94℃, 3 min; 94℃, 1 min, 36℃, 1 min, 72℃, 2 min, 35个循环; 72℃延伸5 min。扩增产物经1.4%琼脂糖凝胶电泳分离,经EB染色后在紫外灯下观察结果。

1.2.3 数据处理 随机引物的扩增产物根据Nei等1979年的公式计算:

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

其中F值为共享度(也称遗传相似指数), N_{xy} 是x, y两物种共有的扩增带, N_x 和 N_y 是物种x和y分别拥有的扩增带。当F=1时,两物种的扩增带完全相同,即两者有高度相同的DNA序列;当F=0时,两物种的扩增带完全不同,此时两者具有高度相异的遗传性。两物种间的遗传距离为1-F。

2 结果分析

用20个随机引物对6个虾种基因组DNA进行扩增反应,都产生出明显扩增带,每个引物产生的扩增片段在1~11条之间,不同引物对不同虾种DNA的扩增产物各不相同。图1为不同虾种基因组DNA用随机引物OPU08, OPZ14和OPY01经PCR扩增后的电泳结果。

统计20个引物在6种虾基因组DNA的扩增带数目,并按Nei氏公式计算其在6个虾种之间的扩增产物共享度列于表1。

表1显示,6个虾种间扩增产物的共享度各不相同,同属内种间的共享度大,同科内属间的共享度较小,不同科间的共享度最小。

将表1数据矩阵输入计算机,用PSBAPC2统计软件,采用最近距离法对6个虾种进行聚类分析,得图2。从图中可以看出对虾属内3种虾最先聚类在一起,再与同科的新对虾属相聚,不同科虾种相聚在最后。它们的聚类顺序从一个方面反映出其间的亲缘关系远近。

3 讨论

多年来,人们以表型特征为依据,对甲壳纲十足目虾类的分类和进化进行了系统的研究并基本确定

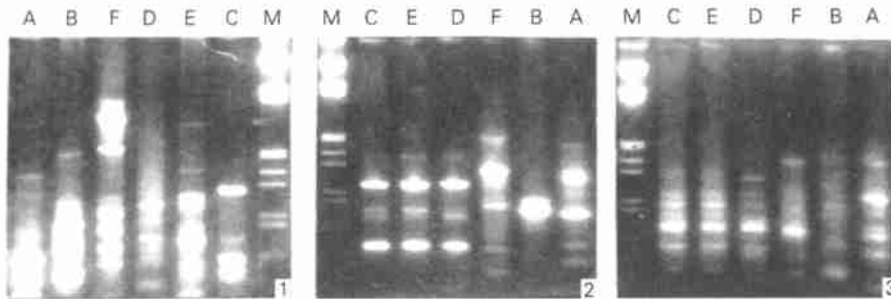


图1 部分随机引物对6种虾基因组DNA的扩增电泳

1: OPU08; 2: OPZ14; 3: OPY01; M: Marker; A: 罗氏沼虾; B: 绿须虾; C: 长毛对虾; D: 日本对虾; E: 斑节对虾; F: 周氏新对虾

Fig.1 The electrophoresis patterns of RAPDs of six species of shrimp amplified by some primers

表1 6个虾种随机扩增多态性DNA片段共享度(F)

Tab.1 The proportion of RAPD fragments shared (F) by six species of genus

	长毛对虾	斑节对虾	日本对虾	周氏新对虾	绿须虾	罗氏沼虾
长毛对虾	1.000 0					
斑节对虾	0.705 9	1.000 0				
日本对虾	0.649 0	0.612 2	1.000 0			
周氏新对虾	0.352 9	0.340 1	0.339 4	1.000 0		
绿须虾	0.385 1	0.256 7	0.277 1	0.260 9	1.000 0	
罗氏沼虾	0.344 4	0.349 4	0.402 2	0.231 3	0.294 9	1.000 0

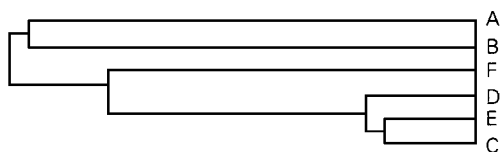


图2 根据最短距离得到的系统树

A: 罗氏沼虾, B: 绿须虾, C: 长毛对虾, D: 日本对虾,
E: 斑节对虾, F: 周氏新对虾

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the genetic distance method

了它们的分类学地位。但是从 DNA 分子水平上研究虾类的分类学地位、亲缘关系和系统进化,在国内外只有少量的报道。本文应用 RAPD 方法检测须虾科 (Aristeidae) 1 个种 (绿须虾 *Aristeus tilis*)、长臂虾科 (Palaeomonidae) 1 个种 (罗氏沼虾 *Macrobrachium rosenbergii*) 和对虾科 (Penaeidae) 2 个属 4 个种 (长毛对虾 *Penaeus penicillatus*, 日本对虾 *P. japonicus*, 斑节对虾 *P. monodon* 和周氏新对虾 *Metapenaeus pyrenis*) 的基因组 DNA, 获得虾类种属分类和亲缘关系鉴别的分子遗传标记。在 20 个引物对 6 个虾种基因组 DNA 扩增所得到的 492 个 DNA 片段中, 所有虾种共同具有的扩增片段有 6 个, 占 1.22%, 5 个虾种共同具有的扩增片段有 30 个, 占 6.10%, 4 个虾种共同具有的扩增片段有 72 个, 占 14.63%, 3 个虾种共同具有的扩增片段有 117 个, 占 23.78%, 2 个虾种共同具有的扩增片段有 132 个, 占 26.83%。这表明, 物种越多, 基因组 DNA 的多态性数据越高, 物种的遗传多样性越丰富。在所应用的 20 个随机引物中还可看到, 在 3 个科的 6 个虾种中, 只有引物 OP05 扩增得到 6 个共有的 DNA 片段, 占该引物扩增产物的 20.70%, 占所用引物总数的 5%。在对虾科的 2 个属 4 个虾种中, 有 OP05, OP06, OPY01, OPY15 和 OPZ04 等 5 个引物扩增得到 72 个共有的 DNA 片段, 占该引物扩增产物的 57.14%, 占所用引物总数 25%。在对虾属内的 3 个虾种中, 有 OP05, OP06, OPY01, OPY15, OPY16, OPZ04, OPZ14 和 OPZ18 等 9 个引物扩增得到 117 个共有的 DNA 片段, 占该引物扩增产物的 42.70%, 占所用引物总数 45%。不同科间各物种的共有扩增片段最少, 所占比例最低。同属内种间共有扩增片段数最多, 所占比例最高。异属间共有扩增片段的数量和比例比科间多但比种间少。科属种间共有片段的数量差异程度明确反映出各分类阶元的遗传差异大小。从聚类图看, 对虾属中长毛对虾、斑节对虾和日本对虾的遗传距离最小, 亲缘关系最近, 首先聚类在一起。新对虾属的周氏新对虾与对虾属的 3

个种的遗传距离较大, 关系较远, 二者相聚在其次, 而生活于淡水中的长臂虾科沼虾属的罗氏沼虾和生活于海水中的须虾科须虾属的绿须虾及对虾科的虾类的遗传距离更大, 亲缘关系更远, 虽然长臂虾科与须虾科所处生态环境差异较大, 但它们还是先行聚类, 最后才和对虾科聚类在一起。总体表现为同属内种间亲缘关系最近, 同科内属间亲缘关系比不同科的属间亲缘关系来得近, 不同科间的亲缘关系最远, 聚类的先后顺序同样揭示出科属种不同分类阶元的亲缘关系的远近。

根据 Nei 等 1979 年的公式计算, 对虾属 3 个虾种间的基因组 DNA 扩增产物的共享度较高, 在 0.4348 ~ 0.7059 之间, 其中长毛对虾与斑节对虾为 0.7059, 长毛对虾与日本对虾为 0.4895, 斑节对虾与日本对虾为 0.4348, 与我国学者宋林生等人^[2]报道的实验数据有很大差别。由于两者采用的随机引物和扩增条件不相同, 对之加以比较似有不妥, 但其结果都表明了这样一个事实: 对虾属内不同虾种之间存在着程度不同遗传差异, 日本对虾在同属虾种中有较大的遗传变异性。根据形态学观察, 日本对虾的雌性交接器是对虾属内最具独特的一种, 它呈囊状且在前方横向开口, 与开放型纳精囊的其余种类不相同, 因此, Tirmizi 于 1971 年的报道认为应将其列为囊对虾亚属 (Subgenus *Metapenaeus*), 这也和本文的 RAPD 分析相吻合。至于对虾科异属虾种间的共享度, 要比同科同属来得低, 仅为 0.3394 ~ 0.3444, 而不同科虾种间共享度则更低, 其中对虾科与须虾科的共享度为 0.1609 ~ 0.2851, 对虾科与长臂虾科间的共享度为 0.2313 ~ 0.3529, 须虾科与长臂虾科间的共享度为 0.2149。显然, 用 RAPD 方法所得随机扩增多态 DNA 片段的共享度把物种间的亲缘关系和系统进化以可度量形式表达了出来。应该指出, RAPD 反应是一个复杂的生物化学反应, 反应过程中各种成分之间的动态相互作用直接决定着扩增产物的质量和数量。在研究中作者发现, 如果改变 RAPD 反应的条件, 对同一种材料使用同一随机引物, 扩增的产物会有出入。所以, 在对物种进行遗传多样性和系统进化研究时, 实验条件必须保持一致, 选用适宜的随机引物和固定的扩增条件尤其重要。

十足目虾种繁多, 仅对虾属就有 28 种之多, 现行的以形态结构为标准的分类系统很难对表型特征相近的种类进行分类定位和亲缘关系远近鉴定。用 RAPD 方法检测虾类基因组 DNA 多态性, 辅以适当统计学处理, 不仅可以对现行的以外形结构特点为依据

(下转 46 页)

(上接 11 页)

的分类系统加以验证,而且可从 DNA 分子水平上构建物种的系统进化关系,为各物种的分类地位和亲缘关系提供准确可靠的分子标记。

参考文献

- 1 许玉德,钟建兴,郑森林等。厦门大学学报(自然科学版),1999,38(5):793~796
- 2 宋林生,相建海,李晨曦等。动物学报,1998,44(3):353~359
- 3 沈 曦,周开亚,王义权。动物学报,1999,45(1):40~48

ANALYSIS OF GENOMIC DNA POLYMORPHISMS IN SHRI MP GROUP

XU Yur de¹ SUN Sheng²

(¹College of Life Science, Xiamen University, 361005)

(²Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Sep. 18, 2000

Key Words: Shri mp group, Genomic DNA, Randomly amplified polymorphic DNA

Abstract

Genomic DNA polymorphisms in six species shri mp (*Microbichium rosenbergii*, *Aisteus aialis*, *Penaeus penicillatus*, *P. japonicus*, *P. monodon* and *Metapenaeus japonicus*) were detected using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method. Amplifications with 20 primers gave 492 reproducible fragments. Index of genetic similarity (F) was calculated. The value of $(1 - F)$ was used to evaluate genetic distances between species and to construct phylogenetic tree. These RAPD analysis is consistent with extant taxonomic system of shri mp group. Therefore, overall results revealed phylogenetic relationship of differential taxonomic class of shri mp group on genomic DNA. (本文编辑:刘珊珊)