

中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 与生长性状相关 SCAR 标记的筛选*

何玉英 刘萍 李健^① 王清印

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

提要 采用 RAPD 技术对“黄海 1 号”中国对虾快速生长选育群体第 6 代大个体群体 (CP-a) 和小个体群体 (CP-b) 以及野生群体 (WP) 为对照组的各 50 尾个体进行扩增, 获得可能与生长性状相关的 9 个 RAPD 遗传标记。对获得的标记进行克隆、测序并根据序列设计特异性引物对 3 个群体进行 SCAR 标记分析。其中 6 对引物 (SCAR1、SCAR2、SCAR3、SCAR4、SCAR5 和 SCAR6) 在 3 个群体中有扩增产物, 前 4 对引物在 3 个群体共 150 尾个体中的扩增产物无多态性。SCAR5 和 SCAR6 在 3 个群体中的扩增产物具有多态性。依据扩增产物在群体中出现的频率和变化规律进行分析表明, SCAR5 扩增的多态片段在 3 个群体中的组成比例分别为 78%、52% 和 54%, 差异显著 ($P < 0.05$); SCAR6 扩增的多态片段经电泳后产生 3 个等位基因, 6 种基因型, 只有 CP-b 含有等位基因 A。这 2 个标记可以作为与中国对虾生长性状相关的候选标记, 为在生产实践中实行分子标记辅助育种奠定理论基础。

关键词 SCAR, RAPD, 中国对虾, 生长性状

中图分类号 Q78

中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 是黄、渤海的主要经济虾类, 具有较高的经济价值。在养虾业发展盛期 (1990 年前后) 曾占到我国对虾养殖产量的 70%。1993 年以后, 由于品种、病害和环境等因素的影响, 养殖产量急剧下降, 只占全国对虾养殖产量的 1/3。由于缺乏良种, 对虾养殖的苗种繁育只得依赖野生亲体。随着养殖世代的增加, 出现了遗传多样性减少、生长速度减缓、抗逆能力下降等问题。培育生长速度快、抗逆能力强的新品种成为目前对虾养殖业急需解决的问题。目前中国对虾的选择育种大多是从形态及表型性状进行选择, 但形态及表型是遗传因素和环境因素相互作用的综合结果, 表型的变异并不能完全或真实地反映遗传变异, 因此可信度不高。目前最可靠的方法是运用分子遗传标记的方法进行标记辅助选择 (Marker Assisted Se-

lection, MAS)。MAS 不受微环境变化的影响, 也可以在生物的早期发育阶段进行选择, 从而增加了选择的准确性并缩短时间间隔。

SCAR (Sequence-Characterized Amplified Regions) 分子标记是由 Paran 等 (1993) 提出并应用的, 是根据 RAPD 分子标记的序列分析结果设计较长的特异性引物 (一般为 22—28 个碱基) 进行 PCR 扩增得到的, 因此特异性和重复性较好。SCAR 分子标记另一个优点是其标记可能是共显性的 (Paran *et al.*, 1993)。目前 SCAR 分子标记已广泛应用于鱼类不同品种的鉴别 (Bardakci *et al.*, 1999)、昆虫的分类学及群体生物学 (Damodar *et al.*, 2003) 以及农作物的种质资源鉴定 (Behura *et al.*, 1999) 等, 但在对虾研究领域尚未见报道。本试验中作者开展了将中国对虾的 RAPD 标记转换为 SCAR 标记的研究工作, 以期筛选与生长性

* 国家自然科学基金项目资助, 30271038 号; 山东省自然科学基金项目资助, Y2002D02 号; 国家科技攻关项目资助, 2004BA526B0101 号。何玉英, 助理研究员, E-mail: heyu@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2005-09-22, 收修改稿日期: 2005-12-12

状相关的遗传标记为今后生产实践中实现标记辅助选择奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验动物来自本所选育的快速生长群体“黄海 1 号”中国对虾的第 6 代群体。根据建立的中国对虾体长正态分布图,淘汰 90% 中间类型,将生长高值和低值两种极端表型的个体区分开来,分成两个群体。其中体长 15cm 以上的个体为 CP-a 群体;体长 11cm 以下的个体为 CP-b 群体。同时以海捕的野生群体(WP)为对照组(体长在 10—14cm 之间),进行研究。每个群体各取 50 尾,在取样地点将新鲜样品速冻,运回实验室后 -70℃ 保存。

1.2 基因组 DNA 的提取

DNA 提取和定量的方法参照刘萍等(2000)。

1.3 基因组 DNA 的 RAPD 分析

分别将 3 个群体的单个 DNA 样品等量混合组成 DNA 池(DNA pools)。首先以 DNA 池为模板对 3 个群体进行分析,然后对在混合模板分析中产生特异性条带的引物做群体分析,通过计算特异性条带在群体中的比例来判断其与中国对虾生长性状的相关性。作者采用 S 系列的 240 个引物(S101—S280 及 S401—S460)对中国对虾的 3 个群体进行扩增。

PCR 扩增反应的总体积为 25 μ l,其中:模板 DNA (10ng/ μ l) 2 μ l; 10 \times Buffer (KCl, 500mmol/ μ l, Tris-HCl, 100mmol/ μ l, pH 9.0; Tritonx-100, 1%) 2 μ l; MgCl₂ (Mg²⁺ 浓度为 15mmol/ μ l) 2 μ l; dNTP (分别为 2.5mmol/ μ l) 2 μ l; 引物 (15pmol/ μ l) 1 μ l; Taq DNA 聚合酶(上海生工公司生产) 1U;用双蒸水补充至 25 μ l。

每个反应过程为 45 个循环,一个循环包括 94℃ 1min, 37℃ 1min, 72℃ 2min。首次循环前先在 94℃ 预变性 5min, 最终在 72℃ 充分延伸 10min。每次反应均设置不含模板 DNA 的空白对照。RAPD 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭(EB, 浓度为 0.5 μ g/ml) 染色,紫外灯下观察拍照。

1.4 特异性条带的提纯、克隆及测序

将获得的 RAPD 遗传标记采用上海生工公司生产的 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒进行回收和提纯,交由上海博亚公司进行克隆测序。

1.5 特异性引物的设计及 PCR 反应

根据测序序列利用引物设计软件 Primer Premier 5 设计引物,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,对 3 个群体进行扩增。

PCR 扩增反应的总体积为 25 μ l:模板 DNA (50ng/ μ l), 2 μ l; 10 \times Buffer (KCl, 500mmol/ μ l, Tris-HCl, 100mmol/ μ l, pH 9.0; Tritonx-100, 1%), 2.5 μ l; Mg²⁺ (15mmol/ μ l), 2 μ l; dNTP (分别为 2.5mmol/ μ l), 2 μ l; 引物 (10pmol/ μ l) 各 2 μ l; Taq 酶(5 U/ μ l), 0.2 μ l;用双蒸水补充至 25 μ l。

每个反应过程为 30 个循环,一个循环包括 94℃ 40s, 退火 1min, 72℃ 1min。首次循环前先在 94℃ 预变性 5min, 最终在 72℃ 充分延伸 5min。产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离。EB 染色后,紫外灯下观察拍照。

2 结果

2.1 中国对虾的 RAPD 遗传标记

通过对混合模板的分析(图 1),筛选出可能与生长性状相关的特异性扩增带 65 个,其中正相关 a 的扩增带 55 个,负相关的扩增带 10 个。

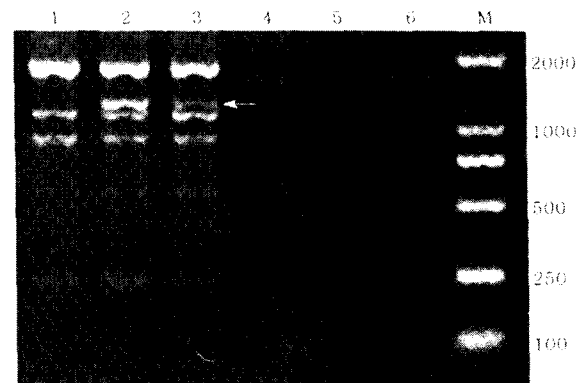


图 1 引物 S186 和 S187 对混合模板的扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoretograms of S186 and S187 from mixed templates

注:箭头所示为筛选的特异性扩增带。单位为 bp。泳道 1、2、3 为 S186 扩增电泳图;泳道 4、5、6 为 S187 扩增电泳图。泳道 1 和 4 采用的混合模板来自 WP, 2 和 5 来自 CP-b, 3 和 6 来自 CP-a。M 为 Marker DL-2000

对筛选出的 RAPD 引物做群体分析(图 2), 找到 9 个可能与生长性状相关的遗传标记,其中正相关标记 7 个,负相关标记 2 个。遗传标记的分子量范围在 500—1500bp 之间。表 1 给出了 9 个标记在 3 个群体中的组成比例。

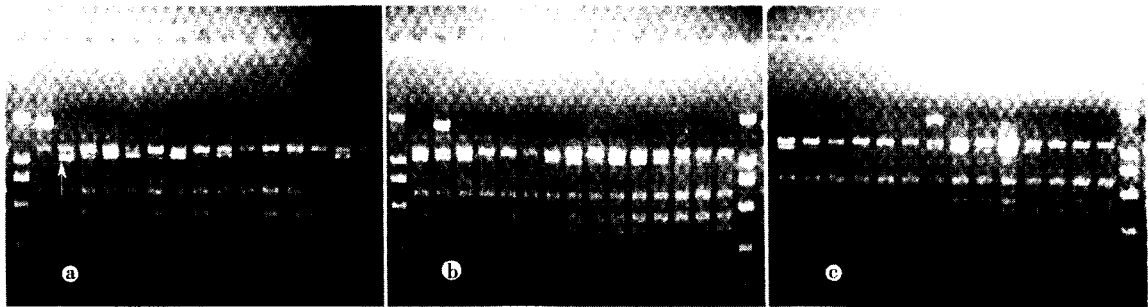


图2 引物 S173 在 CP-a、CP-b 和 WP 的扩增电泳图谱

Fig. 2 Electrophoretograms of S173 in CP-a, CP-b and WP of *F. chinensis*
a: CP-a; b: CP-b; c: WP. 箭头所示为 RAPD 遗传标记。单位为 bp

表1 9 个标记在 3 群体中的多态比例

Tab. 1 Polymorphic proportions of nine markers in CP-a, CP-b and WP

引物	特异性扩增带在 3 群体中比例 (%)		
	CP-a	CP-b	WP
S105	80.0	33.3	36.7
S124	60.0	26.7	33.3
S157	73.0	53.3	40.0
S159	33.3	46.7	33.3
S173	86.7	66.7	46.7
S203	42.6	33.3	26.7
S203	56.7	93.3	60.0
S214	33.3	13.3	16.5
S265	53.3	33.3	40.0

2.2 RAPD 标记的克隆、测序

得到的 9 个 RAPD 标记经回收和提纯后,由上海博亚公司克隆测序。测序结果表明,除引物

S159 扩增的特异片段不能被克隆、测序以外,其他 8 个 RAPD 标记均获得完整的序列,获得的序列片段长度在 558—1024bp 之间(表 2)。

表2 RAPD 标记的引物及序列长度

Tab. 2 Primers and sequence length of RAPD markers

引物	序列长度 (bp)	引物	序列长度 (bp)
S105	755	S203	736
S124	823	S203	558
S157	996	S214	1024
S173	1007	S265	860

2.3 SCAR 标记的筛选

根据 8 个标记的测序序列,分别运用软件 Primer Premier 5 设计特异性引物,运用合成的引

物,对 CP-a、CP-b 和 WP 各 50 个个体进行 SCAR 标记分析。扩增结果表明,在设计 8 对引物中,根据 RAPD 引物 S173 和 S214 获得的标记合

成的 2 对引物在 3 个群体中产生的条带弱,特异性较差,故不再继续进行试验。其他 6 对引物在 3 个群体中均获得了特异性强且稳定的条带(表 3),其中引物 SCAR1、SCAR2、SCAR3 和 SCAR4 获得的特异性条带在 3 群体共 150 个个体中均有扩增产物,故无多态性。引物 SCAR5 和 SCAR6 在 3 个群体中获得的特异性条带具有多态性。

引物 SCAR5 对 CP-a、CP-b 和 WP 3 个群体进行扩增,获得一条长约 500bp 的多态性片段(图 3)。其中在 CP-a 中有 39 个个体扩增出多态片段,CP-b 中有 26 个个体扩增出多态片段,而 WP 的 50 个个体中有 27 个个体扩增出多态片段,多态片段在 3 个群体中的组成比例分别为 78%、52% 和 54%,在 CP-a 中出现的频率最高。卡方(χ^2)检验表明,多态片段在 CP-a 和 WP 之间的组成比例差异显著($P < 0.05$),可作为对中国

对虾生长性状进行选择的候选遗传标记。

引物 SCAR6 对 CP-a、CP-b 和 WP 3 个群体进行扩增,扩增产物经电泳后,共产生 3 个等位基因,6 种基因型(图 4),将最长的特异片段定为等位基因 A,较长片段定为等位基因 B,最短片段定为等位基因 C,3 个群体的基因型和基因频率见表 4。

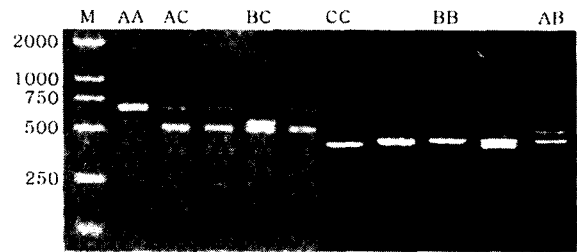


图 4 SCAR6 在 CP-b 中的扩增电泳图谱

Fig. 4 Electrophoretograms of SCAR6 in population CP-b
单位为 pb

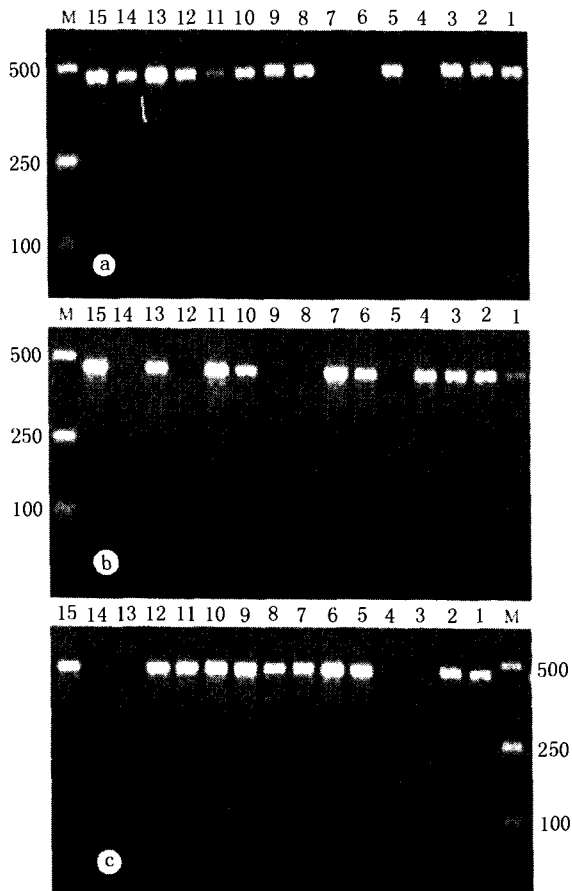


图 3 引物 SCAR5 在 3 群体中的扩增结果

Fig. 3 Electrophoretograms of differential fragment by SCAR5 in three populations

a: CP-a; b: CP-b; c: WP。单位为 bp

由表 4 可以看出,WP 和 CP-a 两个群体不存在等位基因 A,只有 CP-b 存在等位基因 A,CP-b 是“黄海 1 号”中国对虾选育第 6 代的小个体群体,因此,等位基因 A 可能与个体生长速度有关,可作为对中国对虾生长性状进行选择的候选遗传标记。

3 讨论

标记辅助选择是根据与某一性状或基因紧密连锁的标记的出现来推断该基因或性状从而进行选育的方法。MAS 不受环境变化的影响,直接从分子水平进行研究,是对基因型选择最为重要的方法,尤其适用于遗传力低的性状。借助分子标记,通过影响选择的时间、选择的强度及选择的准确性,来间接控制选择某些性状的数量性状座位(QTL),而找到与 QTL 相连锁的分子遗传标记是实现 MAS 的关键。目前标记辅助选择技术已广泛应用于畜牧业(Montgomery *et al*, 1993; Otsu *et al*, 1992; Georges *et al*, 1993),在鱼类方面的研究也有报道(Palti *et al*, 2003; 李志忠等, 2000)。

对虾养殖是我国海水养殖业中最具有代表性的一个产业,对虾养殖业的发展方向是在原有品种的基础上进行遗传改良和培育新的优良品种。但在选育过程中传统的遗传选育和改良技术存在许多缺陷,如选育效果低、所需周期长等。

表 3 试验所用 6 个 SCAR 标记的引物序列及退火温度
Tab. 3 Annealing temperature and primers sequences of the six SCAR primers

RAPD 引物	特异性引物编号	退火温度(°C)	引物序列(5'—3')
S124	SCAR1	56	F-'GAAAGAATACGGCAGAATA' R-'TTTGACATCGTGCCTTAC'
S157	SCAR2	50	F-'CTCATCCCTGCGGCTTAT' R-'GAGTAATGGAGGAAACGA'
S203	SCAR3	56	F-'TATGGAAGAGCATTGTGGC' R-'TCCCTGGATTATCTCCTACT'
S265	SCAR4	55	F-'AGGATGAGGGGAAGAAAGA' R-'AACTCCTCAACTCGCAGAA'
S105	SCAR5	56	F-'CTTACATTTTCGTTTCATTC' R-'AGTGTGCTTGGAGATTGG'
S203	SCAR6	60	F-'CAGGCGTTCAGTGTCTCAGG' R-'CAGGCGTTCAGTGTCTCAGG'

表 4 3 个群体在该位点的基因型和基因频率
Tab. 4 Genotype frequency and gene frequency at the locus in three populations

群体	样品数	基因型频率						基因频率		
		AA	BB	CC	AB	AC	BC	A	B	C
CP-a	50		0.34	0.2			0.46	0	0.57	0.43
CP-b	50	0.04	0.22	0.18	0.08	0.1	0.38	0.13	0.45	0.42
WP	50		0.42	0.22			0.36	0	0.6	0.4

分子标记辅助育种技术可明显提高选育的进度,尤其是对那些通过表型难以度量的性状。目前对养殖对虾主要经济性状的分子标记研究已取得一定的进展。法国海洋开发研究院(IFREMER)从蓝对虾(*Litopenaeus stylirostris*)种群中找到 10 个微卫星标记,从斑节对虾(*Penaeus monodon*)中找到 3 个微卫星标记,这些标记对识别混养家系发挥了一定的作用。澳大利亚联邦科学和工业研究院(CSIRO)从日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)中找到 3 个可能与生长表现相关的基因位点,并有可能进一步开发为可预测生长的基因标记(王清印等,2001)。美国运用 RAPD 技术从凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中成功地筛选出一些特异性标记(Carcia *et al.*, 1996; Alcivar-Warren *et al.*, 1997)。对中国对虾遗传标记的研究仅限于种群或群体遗传多样性的研究(孟宪红等,2004;马春艳等,2004;何玉英等,2004;张天时等,2005),针对某一性状的特异性标记的研究报道较少(刘萍等,2002;沈琪等,2002)。

本试验中,引物 SCAR5 对 CP-a、CP-b 和 WP 进行扩增获得的多态片段在 3 个群体中的组成比例分别为 78%、52% 和 54%,多态片段在中国对虾大个体群体中出现的频率最高,与对照组野生群体相比,两者差异显著($P < 0.05$),在生产中可作为对中国对虾快速生长性状进行选择的首选标记。同时说明经过连续 6 代的选育,中国对虾的遗传结构已发生了一定程度的变化,与生长性状紧密连锁的有利基因不断“富集”。这些变化在表型上表现为个体间的生长性状如体长的差异。引物 SCAR6 对 CP-a、CP-b 和 WP 3 个群体进行扩增共产生 3 个等位基因,6 种基因型,对其基因型和基因频率的分析结果表明,WP 和 CP-a 均不含有等位基因 A,而只有对照群体 CP-b 含有等位基因 A,这说明该位点可能与抑制中国对虾生长性状的基因相关或连锁。WP 不含等位基因 A 的原因一方面可能是 WP 群体在该位点上只存在等位基因 B 和等位基因 C,不存在 A 基因。另一方面可能是在取样过程中,随机取样所取的 50

个个体中恰好不含等位基因 A。下一步将加大样本的数量结合中国对虾的生长记录做进一步的相关性分析,对找到的 2 个标记进行验证,为在生产实践中实现标记辅助育种提供理论依据。

参 考 文 献

- 马春艳,孔 杰,孟宪红等,2004. 中国对虾 5 个地理群体的 RAPD 分析. 水产学报,28(3):245—249
- 王清印,李 健,杨爱国,2001. 海水养殖生物的新品种选育,海水养殖生物病害发生与控制. 北京:海洋出版社,137—144
- 刘 萍,孔 杰,石 拓等,2000. 中国对虾黄、渤海沿岸地理群的 RAPD 分析. 海洋学报,22(5):88—93
- 刘 萍,孟宪红,孔 杰等,2002. 对虾抗病性状遗传标记的 RAPD 分析. 水产学报,26(3):270—274
- 何玉英,刘 萍,李 健等,2004. 中国对虾第一代和第六代人工选育群体的遗传结构分析. 中国水产科学,11(6):572—575
- 李志忠,吴婷婷,杨 弘,2000. 奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼的遗传标记. 甘肃农业大学学报,35(1):29—32
- 沈 琪,任春华,胡超群等,2002. 凡纳对虾优良性状遗传标记的筛选. 海洋科学集刊,44:134—138
- 张天时,王清印,刘 萍等,2005. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)人工选育群体不同世代的微卫星分析. 海洋与湖沼,36(1):72—80
- 孟宪红,马春艳,刘 萍等,2004. 黄渤海中国对虾 6 个地理群的遗传结构及其遗传分化. 高技术通讯,4:97—102
- Alcivar-Warren A, Overstreet R M, Dhar A K, 1997. Genetic susceptibility of cultures shrimp (*Penaeus vannamei*) to infection hypodermal and hematopoietic necrosis virus and *Baculovirus penaei*; Possible relationship with growth and metabolic gene expression. J Invertebr Pathol, 70(3):190—197
- Bardakci F, Skibinski D O, 1999. A polymorphic SCAR-RAPD marker between species of tilapia (Pisces: Cichidae). Anim Genet, 30(1):78—79
- Behura S K, Sahu S C, Rajamani S et al, 1999. Differentiation of Asian rice gall midge, *Orseolia oryzae* (Wood-Mason), biotypes by sequence characterized amplified regions (SCARs). Insect Mol Biol, 8:391—397
- Carcia D K, Dhar A K, Alcivar-Warren A, 1996. Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveal two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. Mol Mar Biol Biotech, 5(1):71—83
- Damodar R, David B, Tim R et al, 2003. Development of SCAR markers for the DNA-based detection of the Asian long-horned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky). Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 52:193—204
- Georges M, Dietz A B, Mishra A et al, 1993. Microsatellite mapping of the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus. Proc Natl Acad Sci U S A, 90(3):1058—1062
- Montgomery G W, Crawford A M, Penty J M et al, 1993. The ovine Booroola fecundity gene (FecB) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. Nat Genet, 4(4):410—414
- Otsu K, Phillips M S, Khanna V K et al, 1992. Refinement of diagnostic assays for a probable causal mutation for porcine and human malignant hyperthermia. Genomics, 13(3):835—837
- Palti Y, Danzmann R G, Rexroad C E, 2003. Characterization and mapping of 19 polymorphic microsatellite markers for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Anim Genet, 34(2):153—156
- Paran I, Michelmore R W, 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor Appl Genet, 85:985—993

GROWTH TRAITS RELATED SCAR MARKERS IN *FENNEROPENAEUS CHINENSIS*

HE Yu-Ying, LIU Ping, LI Jian, WANG Qing-Yin

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract Overfishing for *Fenneropenaeus chinensis* (Chinese prawn) in recent years has caused serious problems in the great shortage of supply of quality breeds, which has become a serious issue holding the aquaculture from sustainable developing. For the solution, fast-growing and strong anti-disease breeds should be sought. We conducted this research in November 2002 by sampling 150 individuals of the species for Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) study from three groups of 50; and the lab working began in January 2003. Among the three groups, two were taken from the 6th generation of Huanghai-I cultured *F. chinensis*, including the two extremes of size: large group in length > 15cm (CP-a) and small one in lengths < 11cm (CP-b), and the third group were combined by wild ones in size between 11 and 14cm (WP). For each group, 240 random primers were screened for mixed templates. 65 growth trait correlated differential fragments were obtained, 55 positive and 10 negative. Population analysis for the screened primers from 240 RAPD primers showed 9 RAPD primers were correlated to the growth traits, 7 positive and 2 negative. After cloning and sequencing, 8 sequences in length from 500bp to 1000bp were obtained except the marker amplified by S159. Using Premier 5 for designing specific primers and Sequence-Characterized Amplified Regions (SCAR) technique, growth traits markers of *F. chinensis* were determined. 6 SCARs (SCAR1—6) were amplifiable, among which the first four could not differentiate among the three populations, and the latter two could amplify polymorphic fragments in band frequency and variety rule shown in the samples. The number of polymorphic fragments amplified by primer SCAR5 in CP-a, CP-b and WP was 39, 26 and 27, respectively, and the band frequency was 78%, 52% and 54%, respectively. χ^2 test of polymorphic fragments in CP-a and WP populations showed significantly difference ($P < 0.05$), indicating that the polymorphic fragment can be used as positive marker candidate. 3 alleles and 6 genotypes were found in three populations amplified by primer SCAR6, while in CP-b allele A only, showing that locus A was probably related to certain genes that can restrain the growth of the prawn. The results are useful in breed-selection for production enhancement of *F. chinensis* applying marker-assisted selection (MAS) procedure.

Key words SCAR, RAPD, *Fenneropenaeus chinensis*, Growth traits