

日本对虾野生种群和养殖种群遗传结构的 RAPD 标记研究*

宋林生 相建海 李晨曦 周岭华 刘保忠 刘瑞玉

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 于1997年4月在福建和山东青岛分别采集日本对虾野生种群和养殖群体的样品,采用 RAPD 标记技术对其遗传结构进行初步研究。用 20 个随机引物在野生种群和养殖群体中分别扩增出 157 和 153 条 DNA 片段,其中多态性片段数分别为 85 和 58 条,多态性片段的比例分别为 54.14% 和 37.91%,平均杂合度分别为 0.251 7 和 0.134 3。野生种群的多态性位点比例和杂合度明显高于养殖群体,说明中国的日本对虾野生种质资源状况较好,应加以合理保护。与野生种群相比,养殖群体的杂合度有所下降,提示在日本对虾的育苗育种过程中应引进标记辅助选择等技术手段。

关键词 日本对虾 RAPD 群体遗传

学科分类号 S968.2

日本对虾分布于中国南部沿海,是具有重要经济价值的水产资源,因此日益受到重视。中国已开始加强对日本对虾资源的开发利用和保护,在大力发展养殖业的同时,开始进行人工放流,对野生种群进行补充。但目前对日本对虾野生种群和养殖群体的遗传结构以及遗传变异水平则缺乏深入研究。本文报告日本对虾野生种群和养殖种群遗传结构的随机扩增多态性 DNA (RAPD) 标记研究结果,并对中国的日本对虾资源状况进行评估,以期为其合理开发利用和保护提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用的日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 野生个体于 1997 年 4 月采自福建沿海,在取样地点将新鲜样品置于液氮中速冻,运回实验室进行核 DNA 提取或 -20°C 保存。养殖个体同期购于青岛农贸市场,为人工养殖 2 代以上。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 野生种群和养殖群体各取 20 尾,在每个个体的尾部取 100mg 肌肉组织剪碎,加入 500 μl 匀浆缓冲液 (10mmol / L Tris-HCl, pH = 8.0; 100mmol / L EDTA, pH = 8.0), 混匀后加入终浓度为 1% 的十二烷基硫酸钠 (SDS) 和

* 国家自然科学基金资助项目,39470141号;国家攀登计划B资助项目,PD B-6-5-3号;中国科学院院长基金资助项目,963054号。宋林生,男,出生于1966年1月,博士,研究员,E-mail: xbyc@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 1998-03-26, 收修改稿日期: 1998-08-18

100 μ g/ml 的蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 消化 3h, 然后分别用等体积的酚:酚:氯仿(1:1)、氯仿:异戊醇(24:1)抽提, 2 倍体积乙醇沉淀 DNA, T.E 溶解, 置于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 随机引物 实验所用的 20 个随机引物, 即 OPV-01—OPV-20, 购自 Operon 公司。

1.2.3 PCR 反应 RAPD 反应条件与 Williams 等(1990)基本相似。基因组 DNA 在 PCR 扩增仪上经 94 $^{\circ}$ C 变性 5min 后进行 45 个扩增循环, 每一循环包括 94 $^{\circ}$ C 1min、36 $^{\circ}$ C 1min、72 $^{\circ}$ C 2min, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, E.B 染色, 紫外灯下观察, 拍照。

1.2.4 RAPD 标记作为等位基因的分析 将 RAPD 标记作为等位基因进行多态性研究, 通常有 4 种假设(Apostol *et al.*, 1996): (1) RAPD 产物为显性等位基因, 符合孟德尔遗传; (2) RAPD 座位上的基因频率符合 Hardy-Winberg 平衡; (3) 纯合隐性个体的等位基因是完全一致的 (identical in state, *iis*) (即它们来自相同的突变); (4) 显性等位基因, 即扩增出的 RAPD 产物也是完全一致的 (*iis*)。以纯合隐性个体频率的平方根来计算隐性等位基因 a 的基因频率 q , 显性基因 A 的基因频率 $p = 1 - q$ 。

多态位点比例 $P = \text{多态性扩增片段数} / \text{扩增片段总数}$

$$\text{群体的平均杂合度 } H = \sum_{i=1}^n (1 - \sum p_i) / n$$

其中, p_i 是第 i 个等位基因的频率, n 为个体数 (Nei *et al.*, 1974; Nei, 1978)。

2 结果

2.1 RAPD 图谱

本实验采用 20 个随机引物进行扩增, 在野生种群中共得到 157 条清晰可统计的 DNA 扩增片段, 在养殖群体中得到 153 条扩增片段。不同的引物所得到的扩增片段的数量各不相同, 同时, 不同的引物所揭示的多态性也不尽相同。图 1a、b 是用 OPV-15 引物在野生种群和养殖群体中的扩增结果, 大部分扩增片段是单态。图 1c、d 分别显示引物 OPV-14 在养殖群体和引物 OPV-10 在野生种群中的扩增效果, 与 OPV-15 相比, 其所揭示的多态位点较多。具有多态性的片段在野生种群中为 85 条, 在养殖群体中为 58 条。

2.2 数据分析

根据 $P = \text{多态性扩增片段数} / \text{扩增片段总数}$, 计算出野生种群和养殖群体的多态性位点比例 (表 1)。针对每一条扩增片段, 先统计出群体中未出现该扩增片段的个体数, 然后根据显性和隐性等位基因的频率计算群体的平均杂合度 (表 1)。

表 1 日本对虾野生种群和养殖群体 RAPD 标记分析

Tab.1 Analysis of RAPD markers in the natural population and hatchery stock of *P. japonicus*

	扩增片段总数(条)	多态片段数(条)	多态比例(%)	遗传杂合度
野生种群	157	85	54.14	0.215 7
养殖群体	153	58	37.91	0.134 3

3 讨论

生物群体的遗传变异水平是评估生物资源状况的一个重要标准, 许多研究表明, 遗传

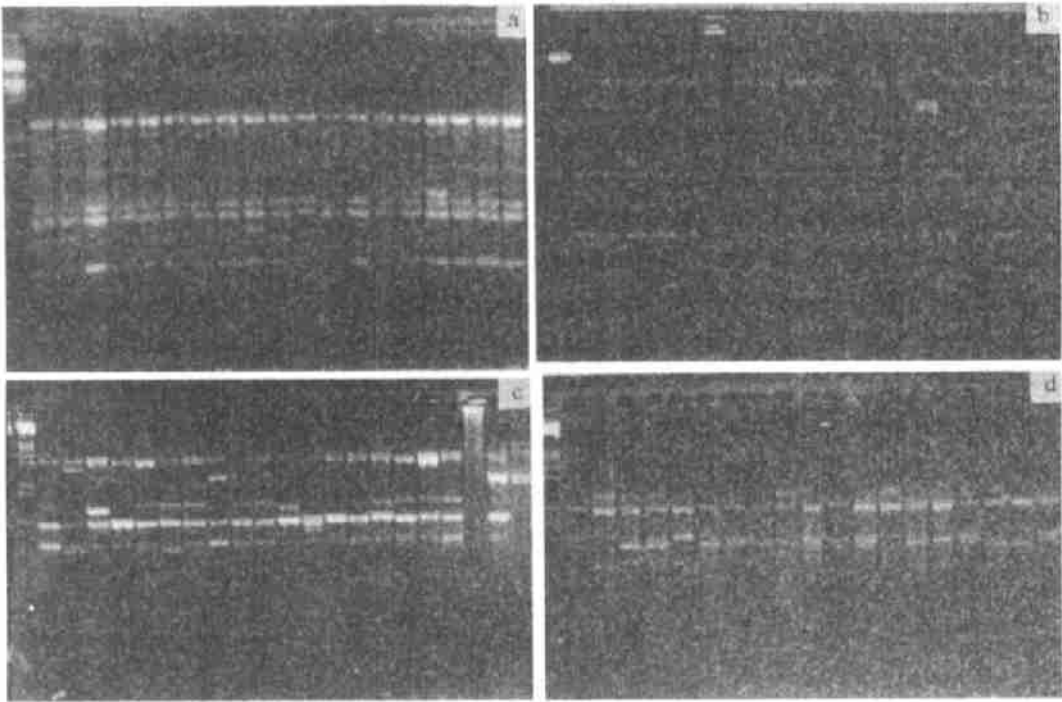


图 1 用随机引物 OPV-10(d)、OPV-14(c)和 OPV-15(a, b)在日本对虾野生种群(a, c)和养殖群体(b, d)中基因组 DNA 的扩增结果电泳图

Fig.1 The electrophoresis patterns of RAPD from genomic DNA of the natural population (a, c) and hatchery stock (b, d) of *P. japonicus* after random amplified with primers OPV-10(d), OPV-14(c) and OPV-15(a, b)

变异水平与生物的生长速度、抗病能力等生产性状密切相关 (Ferguson *et al.*, 1990; Nevo *et al.*, 1986; Chevassus *et al.*, 1990; Carr *et al.*, 1994)。因此, 监测群体的遗传变异水平对选择育种十分必要。迄今为止, 已有多种技术可用于监测遗传变异水平, 其中包括同工酶电泳技术和近年来发展起来的以 DNA 分子为基础的分子遗传标记技术。同工酶电泳技术检测遗传变异的灵敏度较低, 可以检测的多态位点较少 (Karl *et al.*, 1992), 而用线粒体 DNA 和核 DNA 的 RFLP 技术 (Sunden *et al.*, 1991)、特定 DNA 片段碱基序列测定技术 (Palumbi *et al.*, 1991)、RAPD 技术 (Garcia *et al.*, 1994a, b) 以及其它 DNA 标记技术则可以检测到较多的遗传变异。

目前, 海产虾类遗传变异的检测大都通过检测同工酶的变异来进行, 所揭示的同工酶的多态性相对较低 (Hedgecock, 1977; Harris *et al.*, 1990; Lester, 1983; Mulley *et al.*, 1980; Sunden *et al.*, 1991)。据 Lester (1983) 的研究报道, 四个野生对虾种的遗传变异水平都较低, 几乎没有地理分化, 其中凡纳对虾 (*P. vannamei*) 的多态比例为 16%, 红额角对虾 (*P. stylirostris*) 的为 26%, 桃红对虾 (*P. aztecus*) 的为 33%, 北美白对虾 (*P. setiferus*) 的为 29%。Garcia 等 (1994a, b) 以及 Alcivar-Warren 等 (1997) 在高健康 (High Health Shrimp, HHS) 和无特异病原 (Specific-Pathogen-Free, SPF) 凡纳对虾的培育中, 用 RAPD 技术对凡纳对虾的野生种群以及不同的家系进行了监测和分析, 发现其多态位点的比例为 50%

左右,其中一个家系的多态性位点比例高达 77%。

由表 1 可知,本研究用 RAPD 标记在日本对虾野生种群中所揭示的多态位点的比例为 54.14%,与以前用同工酶电泳技术在其它一些对虾中所揭示的多态位点比例(Hedgecock, 1977; Harris *et al*, 1990; Lester, 1983; Mulley *et al*, 1980; Sunden *et al*, 1991)相比,相对较高。该结果与 RAPD 能检测到较多遗传变异这一特性相吻合,也与近年来一些作者用 RAPD 技术对其它种类的对虾所做的研究结果(Garcia *et al*, 1994a, b; Alcivar-Warren *et al*, 1997)相一致。RAPD 技术作为一种新颖的分子标记技术在陆地生物各领域的广泛应用已显示出其先进性和广阔的应用前景。目前,许多国家和地区已开始将该技术应用于海洋生物的研究,并取得了一定的进展。美国科学家在凡纳对虾高健康和无特异病原虾品系的培育中运用了 RAPD 技术,对各品系的群体遗传变异水平进行了检测,并成功地筛选出了一些特异性标记(Garcia *et al*, 1996; Alcivar-Warren *et al*, 1997)。中国海洋动物分子遗传标记技术的研究目前刚刚起步,关于对虾分子遗传标记的研究尚未见报道。本文将 RAPD 技术应用于日本对虾的研究,可望有助于发展中国海洋动物分子遗传标记技术,调查和评估中国的日本对虾种质资源的现状。

4 结语

本文对日本对虾野生种群和养殖群体的遗传结构和遗传变异进行了研究,结果表明,日本对虾野生种群无论是多态位点比例还是杂合度都明显高于养殖群体。与 Garcia(1994a, b)和 Alcivar-Warren等(1997)用 RAPD 技术对凡纳对虾的研究结果相比,中国的日本对虾野生种群的多态位点比例尚处于较高的水平,说明中国的日本对虾野生种群遗传变异水平较高,野生种质资源处于较好状态,为更好地开发利用这一资源,必须制定一系列的渔业生产和管理措施来维持这一状况。养殖群体的多态位点比例和杂合度均低于野生种群,这与养殖群体规模小、近交机会增加有关。而多态位点比例和杂合度的下降往往会导致抗病能力和生长速度等生产性状的衰退。将 RAPD 以及其它分子遗传标记技术应用于海洋动物的育苗育种中,进行标记辅助选育,可望有力保证海洋动物增养殖产业的健康发展。

参 考 文 献

- Alcivar-Warren A, Overstreet R M, Dhar A K *et al*, 1997. Genetic susceptibility of cultured 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
- Apostol B L, Black W C, Reiter P *et al*, 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers: The breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*, 76(4): 325—334
- Carr W, Sweeney J, Swingle J, 1994. The Oceanic Institute's SPF Shrimp Breeding Program Status. In: USMSFP 10th Anniversary Review. GCRL Special Publication, 1: 47—54
- Chevassus B, Dorson M, 1990. Genetics of resistance to disease in fishes. *Aquaculture*, 85: 83—107
- Ferguson M M, Drahuschak L R, 1990. Disease resistance and enzyme heterozygosity in rainbow trout. *Heredity*, 64: 413—417
- Garcia D K, Benzie J A H, 1994a. The use of RAPD markers on *Penaeus* prawn breeding program. *Aquaculture*, 130: 137—144
- Garcia D K, Faggart M A, Rhodes L *et al*, 1994b. Genetics diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp

using three molecular genetic techniques. *Mol Mar Biol Biotech*, 3: 270—280

Garcia 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

Harris S E G, Dillion R T Jr, Sandifer P A *et al*, 1990. Electrophoresis of isozyme in cultured *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 85(1-4): 330—338

Hedgecock D, 1977. Biochemical genetic markers for brood-stock identification in aquaculture. *Proc World Maricult Soc*, 8: 523—532

Karl S A, Avise J C, 1992. Blancing selection at allozyme loci in oyster: implication for nuclear RFLPs. *Science*, 256: 100—102

Lester L J, 1983. Developing a selective breeding program for Penaeid shrimp mariculture. *Aquaculture*, 33: 41—50

Mulley J C, Latter B D, 1980. Genetic variation and evolutionary relationships within a group of thirteen species of Penaeid prawns. *Evolution*, 34: 904—916

Nei M, Roychoudhury A K, 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 76(2): 379—390

Nei M, 1978. The theory of genetic distance and evolution of human races. *J Human Genetics*, 23(4): 341—369

Nevo E, Noy R, Lavie B *et al*, 1986. Genetic diversity and resistance to marine pollution. *Biol J Linn Soc*, 29: 139—144

Palumbi S R, Benzie J A H, 1991. Large mitochondrial DNA differences between morphological similar Penaeid shrimp. *Mol Mar Biol Biotech*, 1: 27—34

Sudden S L F, Davis S K, 1991. Evolution of genetic variation in a domestic population of *Penaeus vannamei* (Boone): a comparison with three natural populations. *Aquaculture*, 97: 131—142

Williams J G K, Kubelik A R, Livark K J *et al*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res*, 18(22): 6 531—6 535

STUDY OF POPULATION GENETIC STRUCTURE IN *PENAEUS JAPONICUS* WITH RAPD MARKERS

SONG Lin-sheng, XIANG Jian-hai, LI Chen-xi, ZHOU Ling-hua,
LIU Bao-zhong, LIU Rui-yu

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

Abstract In April 1997, samples of natural population and hatchery stock of *Penaeus japonicus* were collected from Fujian Province and Qingdao, Shandong Province respectively. The RAPD (random amplified polymorphic DNA) technique was applied to the examination of the genetic structure of the natural population and hatchery stock of *Penaeus japonicus*. Genomic DNA was extracted from 20 individuals for natural population and hatchery stock. Amplification with 20 random primers under predetermined optimal reaction conditions (samples were first heated at 94°C for 5min, and followed by 45 cycles of 1min. at 94°C, 1min. at 36°C, and 2min. at 72°C, then held at 72°C for 10min. after 45 cycles) generated 157 and 153 fragments in natural population and hatchery stock, respectively. The polymorphic fragments were 85 and 58, and the mean proportions of polymorphic amplified fragments of natural population and hatchery stock were 54.14% and 37.91%, respectively. The value of average heterozygosity for natural population and hatchery stock were 0.2517 and 0.1343, respectively. The higher value of the average heterozygosity of natural population indicates that the natural resource of *Penaeus japonicus* was in good condition with higher genetic variability, and effective measure should be carried out to maintain the good status. The lower heterozygosity in the hatchery stock suggests that the approaches such as marker assisted selection should be induced into the shrimp breeding programs.

Key words *Penaeus japonicus* RAPD Population genetics

Subject classification number S968.2