

几种优良养殖对虾杂合性的比较研究*

黎中宝 吴仲庆

(集美大学水产学院 厦门 361021)

提要 应用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术研究了南美白对虾 (*Penaeus vannamei*)、日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、新对虾 (*Metapenaeus ensis*) 养殖群体杂合体缺乏及过量。结果表明南美白对虾在 *Est* - 2 ($F = 0.705$), *Ant* - 2 ($F = 1.000$) 两个位点上存在杂合子缺乏, 在 *Adh* - 3 ($F = -1.000$), *Sdh* - 2 ($F = -1.000$), *Mlh* - 4 ($F = -1.000$) 三个位点上存在杂合子过量; 日本对虾在 *Est* - 1 ($F = 0.258$), *Sod* - 1 ($F = 0.467$) 两个位点上存在杂合子缺乏; 斑节对虾在 *Est* - 1 ($F = 0.254$), *Sdh* - 3 ($F = 1.000$) 两个位点上存在杂合子缺乏; 新对虾在 *Ant* - 1 ($F = 1.000$) 位点上存在杂合子缺乏, 在 *Est* - 1 ($F = -0.158$), *Sod* - 1 ($F = -1.000$), *Mh* - 4 ($F = 1.000$) 三个位点上存在杂合子过量。导致杂合子缺乏的主要原因可能是自然选择、近交、Wahlund 效应等。杂合子缺乏会导致某些基因从基因库中消失, 造成种群遗传多样性的降低, 从而降低物种适应环境的能力。

关键词 南美白对虾 (*Penaeus vannamei*), 日本对虾 (*Penaeus japonicus*), 斑节对虾 (*Penaeus monodon*), 新对虾 (*Metapenaeus ensis*), 杂合子缺乏, 杂合子过量

近年来, 我国日本对虾 (*Penaeus japonicus*)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、南美白对虾 (*Penaeus vannamei*)、新对虾 (*Metapenaeus ensis*) 养殖发展迅猛, 已成为我国海水养殖新的经济增长点, 但随着养殖规模的扩大、集约化程度的不断提高及养殖环境的日趋恶化, 对虾种质严重下降, 已成为对虾健康养殖、持续生产的重要制约因素, 越来越受到人们的关注。关于这 4 种养殖对虾群体的遗传多样性 (另文) 及南美白对虾的遗传控制^[1]已做了详细研究, 本文报道了这 4 种对虾养殖群体杂合体缺乏及过量的状况, 以期对遗传育种等研究提供基础资料。

1 材料和方法

日本对虾、斑节对虾、南美白对虾、新对虾采自厦门、杏林地区的养殖群体, 每种群随机采样 26 个, 所有样本皆为成虾。样本迅速携至实验室内处理, 活体解剖, 取肌肉, 在 -80°C 冷冻贮藏备用。取冰冻的 4 种

* 福建省重大科技项目: 对虾抗病良种选育 99Z7 号。
第一作者: 黎中宝, 出生于 1966 年, 博士, 副教授, 现在厦门大学海洋与环境学院博士后流动站工作。E-mail: Lizhongbao@jmu.edu.cn

收稿日期: 2001-11-27; 修回日期: 2002-08-18

对虾步足肌肉,分别用蒸馏水融化并洗涤3次,加2~3倍体积的 Tris - HCl 缓冲液 (pH7.0) 冰浴研磨,4℃离心 15 min(12 000 r/min),取上清液直接电泳或低温保存备用。

电泳采用垂直板型不连续聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳。本实验共检测 15 个酶系统,可供分析的有 8 个酶,它们是天冬氨酸转氨酶 (AAT, E.C.2.6.1.1)、酯酶 (EST, E.C.3.1.1.-)、乙醇脱氢酶 (ADH, E.C.1.1.1.1)、苹果酸酶 (ME, E.C.1.1.1.40)、苹果酸脱氢酶 (MDH, E.C.1.1.1.37)、超氧化物歧化酶 (SOD, E.C.1.15.1.1)、乳酸脱氢酶 (LDH, E.C.1.1.1.27)、山梨醇脱氢酶 (SDH, E.C.1.1.1.6)。电泳条件参照莽克强等^[2],染色方法参照 Harris 等、曾呈奎等和王中仁的方法^[3-5],等位酶的命名参照 Shaklee 等的方法^[6],酶谱判译参照王中仁的方法^[4]。数据处理采用 BIOSYS-1 软件^[7]。

2 结果

根据 Hardy - Weinberg 平衡标准进行 χ^2 检验和杂合子缺乏或过量系数 (F , 也叫多态位点的固定指数) 研究。结果表明:在被研究的南美白对虾种群多态位点中,没有位点符合 H W 平衡标准 ($P = 0.000$),而位点 *Est*2, *Adlr*3, *Sdlr*2, *Aat*2, *Mlir*4 均非常显著偏离 H W 平衡 ($P < 0.01$),另外位点 *Est*2 表现出杂合子缺失 ($F > 0$, $F = 0.705$),位点 *Aat*2 表现出杂合子完全缺失,即全部纯合体 ($F > 0$, $F =$

1.000),位点 *Adlr*3, *Sdlr*2, *Mlir*4 均表现为全部杂合 ($F = -1.000$, $F < 0$),见表 1。

在被研究的日本对虾种群多态位点中,只有位点 *Est*1 符合 H W 平衡标准 ($P > 0.05$),而位点 *Sod*1 非常显著偏离 H W 平衡 ($P < 0.01$),而位点 *Est*1, *Sod*1 均表现出杂合子缺失 ($F > 0$),见表 2。

在被研究的斑节对虾种群多态位点中,位点 *Est*1, *Aat*1, *Aat*2 符合 H W 平衡标准 ($P > 0.05$),而位点 *Sdlr*3 非常显著偏离 H W 平衡 ($P < 0.01$),另外位点 *Est*1 表现出杂合子缺失 ($F > 0$, $F = 0.254$),位点 *Sdlr*3 表现出杂合体完全缺失,即全部纯合体 ($F > 0$, $F = 1.000$),位点 *Aat*1, *Aat*2 均表现为 F 接近于 0 ($F = -0.02$),见表 3。

在被研究的新对虾种群多态位点中,位点 *Est*1 符合 H W 平衡标准 ($P > 0.05$),而位点 *Sod*1, *M-4*, *Aat*1 均非常显著偏离 H W 平衡 ($P < 0.01$),另外位点 *Aat*1 表现出杂合体完全缺失,即全部纯合体 ($F > 0$, $F = 1.000$),位点 *Est*1 均表现为杂合体过量 ($F = -0.158$, $F < 0$),位点 *Sod*1, *M-4* 杂合体过量,均表现为全部杂合 ($F = -1.000$, $F < 0$),见表 4。

3 讨论

本实验结果表明日本对虾的 *Est*1 位点符合 H W 平衡标准 ($P > 0.05$);斑节对虾的 *Est*1, *Aat*1, *Aat*2 位点符合 H W 平衡标准 ($P > 0.05$);新对虾的

表 1 南美白对虾的 F 和 P

Tab.1 Coefficients for heterozygote deficiency or excess (F) and test results of Hardy - Weinberg equilibrium (P) of *P. vannamei*

位点	杂合体观察数	杂合体期望数	F	P
<i>Est</i> 2	2	6.902	0.705	0.000**
<i>Adlr</i> 3	26	13.255	-1.000	0.000**
<i>Sdlr</i> 2	26	13.255	-1.000	0.000**
<i>Aat</i> 2	0	1.961	1.000	0.000**
<i>Mlir</i> 4	26	13.255	-1.000	0.000**

注: ** 为 $P < 0.01$, 差异非常显著。

表 2 日本对虾的 F 和 P

Tab.2 Coefficients for heterozygote deficiency or excess (F) and test results of Hardy - Weinberg equilibrium (P) of *P. japonicus*

位点	杂合体观察数	杂合体期望数	F	P
<i>Est</i> - 1	10	13.745	0.258	0.354
<i>Sod</i> - 1	2	3.824	0.467	0.001**

注: ** 为 $P < 0.01$, 差异非常显著。

表 3 斑节对虾的 *F* 和 *P*
Tab.3 Coefficients for heterozygote deficiency or excess (*F*) and test results of Hardy Weinberg equilibrium (*P*) of *P. monodon*

位点	杂合体观察数	杂合体期望数	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>Est</i> 1	9	12.294	0.254	0.162
<i>Sdlr</i> 3	0	1.961	1.000	0.000* *
<i>Aat</i> 1	1	1.000	- 0.020	1.000
<i>Aat</i> 2	1	1.000	- 0.020	1.000

注: * * 为 $P < 0.01$, 差异非常显著。

表 4 新对虾的 *F* 和 *P*
Tab.4 Coefficients for heterozygote deficiency or excess (*F*) and test results of Hardy Weinberg equilibrium (*P*) of *M. ensis*

位点	杂合体观察数	杂合体期望数	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>Est</i> 1	13	11.468	- 0.158	0.585
<i>Sod</i> 1	24	12.255	- 1.000	0.000* *
<i>Me</i> -4	24	12.255	- 1.000	0.000* *
<i>Aat</i> 1	0	3.745	1.000	0.000* *

注: * * 为 $P < 0.01$, 差异非常显著。

*Est*1 位点符合 H W 平衡标准 ($P > 0.05$)。但在一个非随机交配的种群中, 观察杂合度 (*H*) 不等于期望杂合度 (*H*), 实际的等位基因频率就会偏离 H W 平衡。南美白对虾的 *Est*2, *Adlr*3, *Sdlr*2, *Aat*2, *Milr*4 位点均非常显著偏离 H W 平衡 ($P < 0.01$); 日本对虾的 *Sod*1 位点非常显著偏离 H W 平衡 ($P < 0.01$); 斑节对虾的 *Sdlr*3 位点非常显著偏离 H W 平衡 ($P < 0.01$); 新对虾的 *Sod*1, *Me*-4, *Aat*1 位点非常显著偏离 H W 平衡 ($P < 0.01$), 说明这些位点的繁殖方式不是随机交配的, 或者是基因成分发生了变化, 主要是杂合体缺失或纯合体过量、或最常见基因纯合体、常见/稀有杂合体、稀有纯合体和其它杂合体的比例失调所致。

若杂合体缺乏, 纯合体过多, $F > 0$, 杂合体完全缺失(全部为纯合体)时 $F = 1$; 反之, $F < 0$ 或 $F = -1$; 若 $F = 0$ 说明符合 H W 平衡, 该种群是随机交配的; 所以, *F* 值的变动可在 +1 和 -1 之间。杂合体缺失, 对养殖业的可持续发展极为不利, 尤其是杂合体完全缺失将导致有些基因从基因库中消失, 造成种群遗传多样性的降低, 从而降低物种适应环境的能力。关于杂合体缺失的原因争论很大^[8], 主要有自然选择、种群内交、Wahlund 效应、沉默等位基因和性连锁座位等。造成几种优良养殖对虾相应位点上杂合体完全缺失的主要原因可能是自然选择、种群内交和 Wahlund 效应。一般认为某种或某种方式的自然选择是造成杂合体缺失可能原因^[8]; 种群内交是使某些位点上等位基因纯合加快的主要原因之一; 目前, 我国人工养殖

对虾用的苗种基本上没有经过系统的人工选育, 其遗传基础还是野生型的, 尚未实现养殖品系, 样本来自两个以上等位基因频率不同的种群(亚种群)能产生杂合体缺失, 产生 Wahlund 效应。

如何维持种群的有效大小 (*N*), 是对虾增养殖中急需解决的问题。我们可以通过等位酶技术测出等位基因频率, 由等位基因频率计算出杂合体缺乏或过量系数 (*F*), 根据公式 ($N = N / (1 + F)$) 就可以计算种群的有效大小。Malecha 计算了美国对虾养殖场的 *N* 值, 结果均很小。对虾养殖均采用半封闭型或封闭型养殖, 人为作用等能对遗传结构产生影响。为了避免稀有等位基因在养殖种群中丢失, 在人工育苗时注意种群的有效大小。在养殖的过程中, 要检测遗传结构的变化, 保护几种优良养殖对虾的自然资源。

参考文献

1 黎中宝. 南美白对虾等位酶的遗传控制. 见: 张本编. 虾类养殖研究. 北京: 海洋出版社, 2002. 335 ~ 338
2 莽克强、徐乃正、方荣祥. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京: 科学出版社, 1975. 26 ~ 47
3 曾呈奎、相建海. 海洋生物技术. 济南: 山东科技出版社, 1998. 269 ~ 282
4 王中仁. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社, 1996. 77 ~ 119
5 Harris H., Hopkinson D. A.. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human genetics. Amsterdam, Oxford: North Holland Publishing Com., 1976. 80 ~ 220
6 Shaklee J. B., Allendorf F. W., Morizot D. C. et al.. Genetic

研究报告 *REPORTS*

- nomenclature for protein - coding loci in fish, *Trans. Amer. Fish. Soci.*, 1990, 119: 2 ~ 15
- 7 Swofford D. L., Selander P. K.. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics, *J. Hered.*, 1989, 72: 281 ~ 283
- 8 Zouros E., Foltz D. W.. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks, *Molluscolgia*, 1984, 25(2): 583 ~ 591

THE COMPARISON STUDY ON HETEROZYGOSITY IN FOUR SPECIES OF SHRIMPS

LI Zhong-bao WU Zhong-qing

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021)

Received: Nov., 27, 2001

Key Words: *Penaeus vannamei*, *Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon*, *Metapenaeus ensis*, Heterozygote deficiency, Heterozygote excess

Abstract

Heterozygosity was investigated using the assay of vertical slab polyacrylamide gel electrophoresis in 4 species of shrimps: *Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon*, *Penaeus vannamei* and *Metapenaeus ensis*. The results showed that there is heterozygote deficiency in *Est-2* ($F = 0.705$), *Ant-2* ($F = 1.000$), and heterozygote excess in *Adlr-3* ($F = -1.000$), *Sdlr-2* ($F = -1.000$), *Mllr-4* ($F = -1.000$) in *P. vannamei*; there is heterozygote deficiency in *Est-1* ($F = 0.258$), *Sod-1* ($F = 0.467$) in *P. japonicus*; there is heterozygote deficiency in *Est-1* ($F = 0.254$), *Sdlr-3* ($F = 1.000$) in *P. monodon*; and there was heterozygote deficiency in *Ant-1* ($F = 1.000$), and heterozygote excess in *Est-1* ($F = -0.158$), *Sod-1* ($F = -1.000$), *Me-4* ($F = 1.000$) in *M. ensis*. The main causes of heterozygote deficiency were nature selection incross Wahlund effect and so on. The heterozygote deficiency would result in allele disappear, the lower genetic diversity and the lower ability of adaptation. (本文编辑:刘珊珊)