

凡纳滨对虾引进亲虾及其子一代的遗传多样性研究

李 锋, 林继辉, 刘楚吾

(湛江海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要: 采用 Operon 公司的 16 个引物对两个凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 引进亲本群体及其子一代对虾的基因组 DNA 多态性进行了检测。第一个亲虾群体对 16 个引物共获得 78 个位点, 其中多态位点数为 48 个, 占 61.54%; 其子代对虾共获得 89 个位点, 其中多态位点数为 50 个, 占 56.18%。第二个亲虾群体对 16 个引物共获得 97 个位点, 其中多态位点数为 49 个, 占 50.52%, 其子代对虾共获得 93 个位点, 多态位点数为 28 个, 占 30.11%。单个引物获得的标记数为 1~8 个。第一个亲本群体及其子代个体间的平均遗传距离分别是 $0.195\ 9 \pm 0.039\ 2$ 和 $0.143\ 5 \pm 0.026\ 8$; 第二个亲本群体及其子代个体间的平均遗传距离分别为 $0.092\ 2 \pm 0.018\ 9$ 和 $0.062\ 1 \pm 0.014\ 8$ 。两个亲本群体间的遗传距离为 $0.654\ 6 \pm 0.079\ 4$, 两个子代群体间的遗传距离为 $0.708\ 7 \pm 0.065\ 6$ 。在 OPF-09、OPZ-11 两个引物的扩增结果中, 发现两个亲本群体及其子代有差异标记。

关键词: 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*); 随机扩增多态性 DNA (RAPD); 遗传多样性

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2006)04-0064-05

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*), 又称南美白对虾 (Pacific white shrimp), 自然分布在东太平洋美洲沿岸, 1987 年引进中国。20 世纪 90 年代中期, 养殖对虾, 如斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 病害危害严重, 而凡纳滨对虾以其抗病力强, 生长迅速等优点成为中国重要的海水增养殖品种。近几年来, 随着凡纳滨对虾在中国养殖规模的扩大, 从业者盲目发展, 特别是在苗种生产中, 对亲虾的来源不加选择, 造成群体遗传性状的变异, 一些优良性状丢失, 品质下降, 生长缓慢, 抗病力也降低。在这种情况下, 有必要对引进品种的种质资源及引进后的遗传变异情况进行了解。随机扩增多态性 DNA (RAPD) 由 Williams^[1] 等首创, 它提供了一种快速分析不同个体间遗传差异的便利方法, 目前, RAPD 技术已经广泛地应用于鱼类及虾类等的遗传多样性研究中^[2-7]。作者报道了两个凡纳滨对虾引进亲本群体及其各自子一代的 RAPD 检测结果, 分析引进亲虾及其子代对虾的遗传多样性以及变异情况。

1 材料和方法

1.1 材料来源

亲虾自夏威夷引进, 子代为其自繁的子一代。第一个亲本群体和子代各取 13 和 25 尾; 第二个亲本群体和子代各取 20 和 40 尾。

1.2 试剂和仪器

所用随机引物购自 Operon 公司, TaqDNA 聚合酶及其配套试剂、dNTPs、PCR Markers 等为华美生物工程公司产品, PCR 扩增仪为 Hema 8000。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取及模板 DNA 的定量

基因组 DNA 的提取方法见文献[8], 并稍加改进, 主要过程有: (1) 取对虾肌肉约 200 mg, 匀浆后放入 1.5 mL 的 Eppendorf 管中, 加入 TE (10 mmol/L Tris·HCl, 100 mmol/L EDTA) 500 μ L; (2) 加入 10% SDS 溶液 50 μ L, 混匀; (3) 加入 6.0 μ L 2.5 g/L RNase 和 10 μ L 10 g/L 蛋白酶 K, 混匀, 55℃ 消化 3~4 h; (4) 抽提, 酚: 氯仿: 异戊醇 = 25: 24: 1 等体积抽提两次, 每次 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 再用氯仿抽提一次, 5 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清; (5) 加入两倍体积的无水乙醇, 沉淀 DNA 10 min,

收稿日期: 2003-05-26 修回日期: 2003-12-18

基金项目: 广东省重点科技攻关项目 (2KB05503N)

作者简介: 李 锋 (1978-), 男, 湖南湘乡人, 硕士, 从事水产经济动物繁殖生物学研究; 刘楚吾, 通讯作者, 教授, E-mail: swyjs@zjou.edu.cn

沉淀的 DNA 用 500 μL 70% 乙醇洗涤 1~2 次, 倒去乙醇, 室温放置 10~15 min, 使乙醇挥发, DNA 干燥, 加 TE (10 mmol/L Tris.HCl, 1 mmol/L EDTA) 溶解, 4℃ 保存备用。紫外分光光度计定量测定。

1.3.2 PCR 条件

PCR 反应体积为 25 μL , 加样量为: 模板 DNA 25 ng/ 反应体积, 10× Buffer (KCl 500 mmol/L; Tris.HCl 100 mmol/L, pH 9.0; Triton X-100, 1%) 2.5 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 1.5 μL , Taq 酶 (3 U/ μL) 0.4 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 1.0 μL , 引物 1.0 μL , 加 H_2O 至 25 μL 。RAPD 的反应程序为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 1 min, 36℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 40 个循环; 72℃ 延伸 10 min。扩增产物在 4℃ 保存。

1.3.3 电泳、观察

扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶 (含溴乙锭 0.5 mg/L) 上进行电泳, 电泳缓冲液为 0.5× TBE, 电压为 5 V/cm, 时间为 1.5 h。电泳结果在 Tanon GIS-2008 凝胶成像系统观察。

1.3.4 数据处理

随机扩增多态 DNA 片段的共享度依据 Nei^[9] 等的公式计算:

$$S = 2N_{xy} / (N_x + N_y), \quad P = 1 - S$$

式中, S 为相似系数, N_x , N_y 分别为第 x 和第 y 个体拥有的 RAPD 标记数, N_{xy} 为 x , y 两个个体共享的 RAPD 标记数。当 $S = 1$ 时, 扩增片段完全相同, 两者高度相似; 当 $S = 0$ 时, 扩增片段完全不同, 具有高度相异的遗传性。 P 为遗传距离。

表 1 随机引物及扩增结果

Tab.1 Random primers and their amplified results

引物	序列 (5' - 3')	第一个群体扩增条带数		第二个群体扩增条带数	
		亲本	子一代	亲本	子一代
OPA-10	GTGATCGCAG	1~3	2~5	1~3	1~4
OPA-18	AGGTGACCGT	3~6	4~6	4~7	6~7
OPC-01	TTGGAGCCAG	3~5	2~5	4~5	4~5
OPC-03	GTGAGGCGTC	4~6	2~6	3~7	6
OPF-03	CCTGATCACC	2~6	4~6	5~7	4~5
OPF-09	CCAAGCTTCC	1~4	3~6	3~6	6~7
OPP-08	ACATCGCCCA	1~6	3~6	6~8	6~7
OPP-09	GTGGTCCGCA	2~3	3~4	3~6	4~5
OPV-06	ACGCCCAGGT	2~3	1~3	2~5	4~5
OPV-15	CAGTCCCGGT	2~3	2~4	3~4	4~7
OPV-16	ACACCCACA	2~6	3~7	1~6	2~5
OPV-19	GGGTGTGCAG	3~4	2~4	5~7	7
OPY-11	AGACGATGGG	3~5	3~6	2~5	2~5
OPY-15	AGTCGCCCTT	2~6	2~6	4~7	3~7
OPZ-11	CTCAGTCGCA	1~2	3~5	4~8	2~4
OPZ-20	ACTTTGGCGG	4~5	4~5	5~6	6~7

2 结果

2.1 RAPD 扩增结果

试验使用 OPA, OPC, OPF, OPP, OPV, OPY, OPZ 7 组共 140 个随机引物进行筛选, 有 81 个引物呈阳性反应, 选用其中 16 个引物用于实验, 扩增结果如表 1。第一个亲本群体对 16 个引物共获得 78 个位点, 其中多态位点数为 48 个, 占 61.54%; 其子代对虾共获得 89 个位点, 其中多态位点数为 50 个, 占 56.18%。第二个亲本群体对 16 个引物共获得 97 个位点, 其中多态位点数为 49 个, 占 50.52%, 其子代对虾共获得 13 个位点, 多态位点数为 28, 占 30.11%。单个引物获得的标记数为 1~8 个。标记的分子质量在 200~2500 bp 之间。两个亲本群体及子代的扩增结果如表 1。

2.2 凡纳滨对虾亲虾及子一代的遗传多样性

根据扩增产物的有无建立二维矩阵, 使用 RAPDistance 软件计算出个体间遗传距离 P 值矩阵。凡纳滨对虾第一个亲本群体的遗传距离 P 值范围在 0.067 6~0.296 0 之间, 平均为 0.195 9±0.039 2, 其子代对虾的 P 值范围在 0.057 3~0.216 2, 平均为 0.143 5±0.026 8。第二个亲本群体的遗传距离 P 值范围在 0.044 8~0.144 3 之间, 平均为 0.092 2±0.018 9, 子代对虾的 P 值范围在 0.018 9~0.110 2 之间, 平均为 0.062 1±0.014 8。两个亲本群体间的遗传距离为 0.654 6±0.079 4, 两个子代群体间的遗传距离为 0.708 7±0.065 6。引物 OPF-09, OPZ-11 对亲本和子代对虾有差异标记。图 1 和图 2 分别表示引物 OPZ-11 和 OPF-09 对各群体的扩增结果。

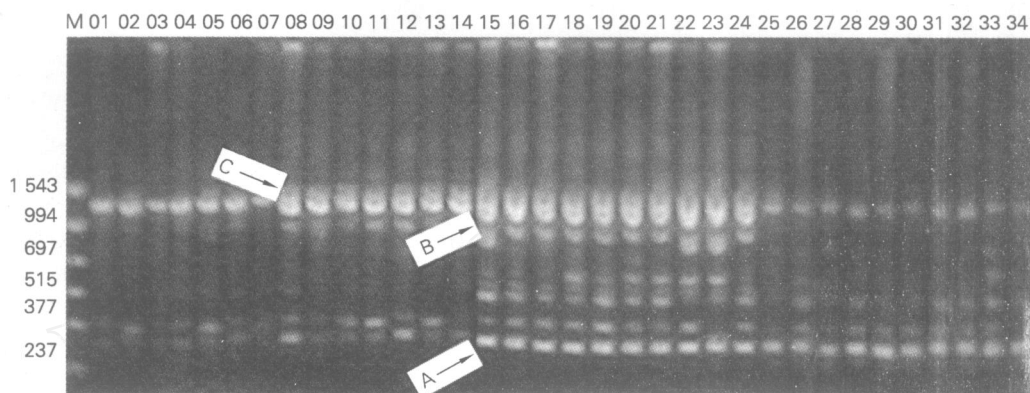


图 1 引物 OPZ - 11 对两个凡纳滨对虾亲本群体及各自子代的扩增结果

Fig. 1 The electrophoresis patterns of RAPDs of two groups of parent and their first filial generation of *Litopenaeus vannamei* amplified by primer OPZ - 11

M: PCR Markers; 01 ~ 07: 第一个亲本群体; 08 ~ 14: 第一批子一代; 15 ~ 24: 第二个亲本群体; 25 ~ 34: 第二批子一代; 箭头 A 指示两个群体之间差异的分子标记; 箭头 B 指示第二个亲本群体和其子代差异的分子标记; 箭头 C 指示第一个亲本群体和其子代差异的分子标记
M: PCR Markers; 01 ~ 07: the first group of primary parents; 08 ~ 14: descendants of the first group of shrimp; 15 ~ 24: the second group of primary parents; 25 ~ 34: descendants of the first second of shrimp. Arrow A: molecular markers between the two group of shrimp; Arrow B: molecular markers between the primary parent and their descendants of the second group of shrimp; Arrow C: molecular markers between the primary parents and their descendants of the first group of shrimp

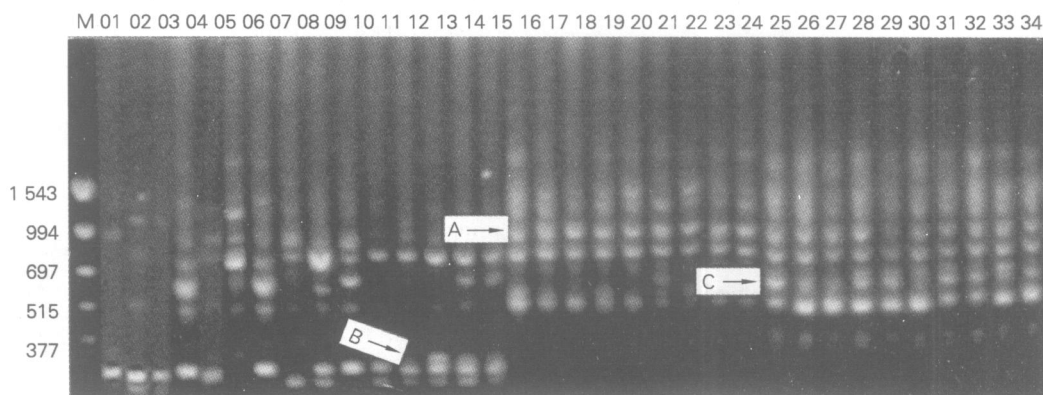


图 2 引物 OPF - 09 对两批凡纳滨对虾亲本及子代的扩增结果

Fig. 2 The electrophoresis patterns of RAPDs of two group of parent and their first filial generation of *Litopenaeus vannamei* amplified by primer OPF - 09

M: PCR Markers; 01 ~ 07: 第一个亲本群体; 08 ~ 15: 第一批子一代; 16 ~ 24: 第二个亲本群体; 25 ~ 34: 第二批子一代; 箭头 A 指示两个群体之间差异的分子标记; 箭头 B 指示第一个亲本群体和其子代差异的分子标记; 箭头 C 指示第二个亲本群体和其子代差异的分子标记
M: PCR Markers; 01 ~ 07: the first group of primary parents; 08 ~ 15: descendants of the first group of shrimp; 16 ~ 24: the second group of primary parents; 25 ~ 34: descendants of the first second of shrimp. Arrow A: molecular markers between the two groups of shrimp; Arrow B: molecular markers between the primary parent and their descendants of the first group of shrimp; Arrow C: molecular markers between the primary parents and their descendants of the second group of shrimp

3 讨论

凡纳滨对虾是分布在美洲太平洋沿岸的主要经济虾类,引进中国试养成功后,以其生长迅速,营养要

求低,抗病力强等优势成为中国海水养殖中重要的增殖品种。在我国,作为育苗用的凡纳滨对虾原种或良种亲虾主要来自夏威夷。凡纳滨对虾在我国大面积

养殖后,对种苗的需求日益巨大,由于亲虾来源困难,价格昂贵,在养殖育苗生产过程中,生产者为了降低成本,从养殖的凡纳滨对虾中挑取部分作为亲虾培育,用这种自己培育的亲虾进行育苗生产,从而导致养殖品种的遗传性状变化,部分优良性状丢失,表现在养殖生产中,生长缓慢,抗病力低。我们利用 RAPD 技术对两个凡纳滨对虾亲本群体和其各自的子一代对虾进行分析,在引物 OPF-09、OPZ-11 的扩增产物中,亲虾有区别子代的特异性标记,表明其发生了变异。试验得出的结果是凡纳滨对虾第一个引进亲本群体的遗传距离是 0.1959 ± 0.0392 ,子代对虾的遗传距离为 0.1435 ± 0.0268 ;第二个引进亲本群体的遗传距离是 0.0922 ± 0.0189 ,子代对虾的遗传距离为 0.0621 ± 0.0148 。两个亲本群体间的遗传距离为 0.6546 ± 0.0794 ,两个子代群体间的遗传距离为 0.7087 ± 0.0656 。从这些实验结果可以看到,两批对虾的遗传多样性存在较大的差异,第一个亲本群体的遗传距离是第二个亲本群体的两倍多,其子代的遗传距离也较第二个亲本群体要高,而且两个亲本群体和两个子代群体之间存在较大的遗传距离。这些结果的产生可能与亲本的引进有关,这两个亲本群体都是从夏威夷引进的 SPF 亲虾,而 SPF 亲虾的选育要经过数代,在选育的过程中,也会造成遗传变异,多样性降低,引进的批次不同,其遗传距离也会不同。两批亲本多态位点百分数分别为 61.54%,50.52%。Garcia 等^[5]用 6 个引物检测的凡纳对虾的 4 个种群和家系,所得多态位点百分数是 58.75%。本试验所得多态位点百分数与 Garcia 等的结果相当,而中国明对虾的多态位点百分数为 36.8%^[4],表明凡纳滨对虾亲本的遗传多样性相对丰富,但第二批亲本的后代对虾的多样性则较低,为 30.11%。从上面的实验结果可以看出亲本和子代间存在遗传变异,而且不同批次的引进亲本都存在较大的差异,这就说明即使是引进的亲本,也都具有优良的性状,如果再继续用这样的亲本产生的子代虾来作亲本,其后代可能更少变异,造成种质资源退化,品种生长缓慢,抗病力低等。郑国兴^[10]在对万氏对虾(即凡纳滨对虾)不同家系的抗病能力的研究中,得出不同家系的对虾的抗病力有显著差异,非同系婚配的后代,其抗病力和存活率远比同系婚配的后代要高,而且对两个家系,其抗病力和存活率也有显著区别。这一研究表明,对虾的抗病力与遗传因素

有密切的关系。本试验结果也说明凡纳滨对虾不同群体的遗传多样性存在明显的差异,这些基于遗传的差异是不同群体生长性状差异的原因之一。

对虾与自然界其他生物一样,近亲繁殖的后代,生命力弱,甚至会产生许多缺陷,远亲繁殖的后代,生命力强,能产生许多优势。为了改良和恢复凡纳滨对虾的种质,对其进行种质资源的调查,建立种质标准,科学的引进原种或良种对虾并在此基础上建立实行科学管理和良种选育是必要的。

致谢:

本实验的第一个亲本群体及子代由刘志刚副教授,华农公司提供;第二个亲本群体及子代由君安公司提供,在此表示感谢。

参考文献:

- [1] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18:6 531-6 535.
- [2] 石拓,孔杰,刘萍,等. 中国对虾遗传多样性的 RAPD 分析——朝鲜半岛西海岸群体的 DNA 多态性[J]. *海洋与湖沼*, 1999, 6(30): 609-614.
- [3] 张四明,邓怀,汪登强,等. 7 种鲷形目鱼类亲缘关系的随机扩增多态性 DNA 研究[J]. *自然科学进展*, 1999, 9(9): 818-82.
- [4] 刘萍,孔杰,石拓,等. 中国对虾黄、渤海沿岸地理群的 RAPD 分析[J]. *海洋学报*, 2000, 5(22): 88-93.
- [5] Garcia D K, Faggart M A, Rhoades L, *et al.* Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques [J]. *Molecular Mar Biotechnol*, 1994, 3(5): 270-280.
- [6] 夏德全,曹莹,吴婷婷,等. 用 RAPD 分析对罗非鱼遗传变异的研究及其对杂种优势的应用[J]. *水产学报*, 1999, 23(1): 27-32.
- [7] 梁利群,孙孝文,石连玉,等. 不同鲤鱼种间 DNA 遗传标记多态性[J]. *中国水产科学*, 2000, 7(2): 18-21.
- [8] 萨姆布鲁克丁,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁,黎孟枫,译. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 464-467.
- [9] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(10): 5 269-5 273.
- [10] 郑国兴. 不同家系的万氏对虾对对虾杆状病毒抗病力的差异[J]. *水产学报*, 1994, 18(2): 148-152.

Genetic diversity analysis of primary parent and the first filial generation of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*

LI Feng, LIN Ji - hui, LIU Chu - wu

(Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Received: May, 26, 2003.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; random amplified polymorphic DNA (RAPD); genetic diversity

Abstract: Two groups of primary parent of *Litopenaeus vannamei* from Hawaii and their first filial generation have been collected for this experiment. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was employed to detect the genetic variation of primary parent and their first filial generation from the population. 16 primers were useful according to the quantity, quality and reproducibility of loci. With the 16 primers, 78 loci of the first group of parent shrimp were obtained, in which 48 were polymorphic and the proportion of polymorphic loci was 61.54%; and with the 16 primers there are 89 loci of their first filial generation were obtained, in which 50 were polymorphic and the proportion of polymorphic loci was 56.18%. For the second group, parent had 97 loci with the 16 primers, 49 of which are polymorphic and the proportion of polymorphic loci is 50.52%; and their first filial generation had 93 loci, 28 of them were polymorphic and the proportion of polymorphic loci was 30.11%. The average genetic distances of the first group of parent shrimp and their first filial generation were 0.1959 ± 0.0392 , 0.1435 ± 0.0268 , respectively; and for the second group of shrimp those were 0.0922 ± 0.0189 , 0.0621 ± 0.0148 respectively. There were some different amplified results between the two groups of shrimp with primers OPF - 09, OPZ - 11.

(本文编辑:刘珊珊)