

凡纳对虾优良性状遗传标记的筛选*

沈 琪 任春华 胡超群 张吕平

(中国科学院南海海洋研究所)

凡纳对虾(*Litopenaeus vannamei*)是全球三大养殖对虾名优种类之一。我国从 1988 年开始试养,到 1998 年大量引进凡纳对虾亲虾和幼体后,华南地区兴起了养殖热潮。在 1999 年到 2000 年短短两年时间内,广东、海南、广西凡纳对虾的养殖面积已达 10×10^4 亩(1 亩 = 666.7m²),集约化防病养殖产量普遍达到 5~9t/hm²,年产量高达 10~20t/hm²,其养殖面积约占华南地区对虾养殖面积的 60%,普遍获得了比养殖斑节对虾更好的经济效益,成为我国继中国对虾、斑节对虾之后的又一养殖对虾种类。从凡纳对虾养殖业的长远发展战略来看,如何避免斑节对虾因病害而造成养殖业全面萎缩的情况在凡纳对虾养殖业中重演已成为重要研究内容。

美国夏威夷海洋研究所等单位利用遗传标记辅助选育种技术进行凡纳对虾良种选育和家系培养取得了很大的成效,培育出世界著名的无特异病原(SPF)凡纳对虾亲虾,在全球对虾养殖产量下滑的形势下仍然保持良好的增长趋势,其关键是种虾的选择和家系的培育。Garcia 等(1994)利用遗传标记技术进行了凡纳对虾种群的遗传标记研究,发现种群之间具有较高水平的遗传变异,因而有潜力进行凡纳对虾良种的人工选育。

本研究利用 RAPD 标记技术,对目前养殖凡纳对虾不同群体进行 DNA 多态性研究,筛选与优良性状有关的遗传标记,为凡纳对虾优质种苗的鉴定、选育和今后遗传标记辅助选育种提供了科学依据。

一、材料和方法

1. 实验材料

凡纳对虾两个样品(未发现对虾白斑杆状病毒和 Taura 病毒的正常样品和发现对虾白斑杆状病毒和 Taura 病毒的抗病样品)2000 年 10 月采自海南海富养殖场。样品采集后于 75%酒精中保存。

2. 实验方法

每个个体的总 DNA 的提取采用上海华舜生物工程有限公司的“小量柱离心组织 DNA 抽提试剂盒”(W6501)进行。取 25mg 左右的肌肉,用灭菌蒸馏水洗涤两次,按其提

* 中国科学院重大资助项目,B(K295-131-111)号;广东省重点科技资助项目(百项工程),2KB05503N 号。

收稿日期:2001 年 1 月 15 日。

供的程序提取总 DNA。

聚合酶链式反应(PCR)在 PTC-100 扩增仪(美国 MJ 公司)上进行,反应总体积为 50 μ l,其中含 10 倍浓缩缓冲液 5 μ l[Takara TaqTM R001A CA,购自宝生物工程(大连)有限公司],2.5mmol/L 脱氧三磷酸核苷酸(dNTP)混合液(Takara TaqTM)8.0 μ l, 10 μ mol/L 随机引物(OPERON 公司)2.0 μ l,25mmol/L MgCl₂ 2.0 μ l,总 DNA 2.0 μ l(25×10^{-9} g/ μ l),Taq 酶 0.3 μ l(5 酶活力单位/ μ l,Takara TaqTM)。PCR 扩增条件:变性 94 $^{\circ}$ C 1min,退火 35 $^{\circ}$ C 1min,延伸 72 $^{\circ}$ C 2min,共 40 个循环,最后延伸 72 $^{\circ}$ C 6min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖平板电泳,溴化乙锭染色,用凝胶图像及分析系统(法国 VL 公司)拍摄记录及分析结果。

二、结 果

20 条随机引物中有 8 条产生可重复的 PCR 片段(表 1),共有 14 个单态片段,23 个多态片段,多态片段百分率平均为 62.2%。

表 1 凡纳对虾 RAPD 分析所用引物和扩增片段

引物	单态片段	多态片段	多态比例(%)	抗病个体特异片段
OPX-01	1	3	75.0	OPX-01-1020
OPX-03	2	0	0.0	
OPX-12	2	3	60.0	
OPX-13	1	4	80.0	
OPX-14	2	2	50.0	OPX-14-530
OPX-17	2	5	71.4	OPX-17-940
OPX-19	1	2	66.7	
OPX-20	3	4	57.1	

引物 OPX-01 的单态片段为 OPX-01-1180;多态片段为 OPX-01-1600,OPX-01-1020 和 OPX-01-800,其中 OPX-01-1020 只在凡纳对虾抗病样品中的 3 个个体中出现(图 1)。引物 OPX-03 只有单态片段 OPX-03-1340 和 OPX-03-770。引物 OPX-12 的单态片段为 OPX-12-1180 和 OPX-12-750;多态片段为 OPX-12-1050,OPX-12-710,OPX-12-660 和 OPX-12-450。引物 OPX-13 的单态片段为 OPX-13-720;多态片段为 OPX-13-810,OPX-13-660,OPX-13-640 和 OPX-13-500。引物 OPX-14 的单态片段为 OPX-14-1220 和 OPX-14-960;多态片段为 OPX-14-1150 和 OPX-14-530,其中 OPX-14-530 只在凡纳对虾抗病样品中的 3 个个体中出现(图 2)。引物 OPX-17 的单态片段为 OPX-17-1200 和 OPX-17-1110;多态片段为 OPX-17-1750,OPX-17-1020,OPX-17-940,OPX-17-760,OPX-17-700 和 OPX-17-630,其中 OPX-17-940 为凡纳对虾抗病样品所特有(图 3)。引物 OPX-19 的单态片段为 OPX-19-970;多态片段为 OPX-19-1860 和 OPX-19-790。引物 OPX-20 的单态片段为 OPX-20-1330,OPX-20-730 和 OPX-20-450;

多态片段为 OPX-20-970, OPX-20-660, OPX-20-360 和 OPX-14-200。

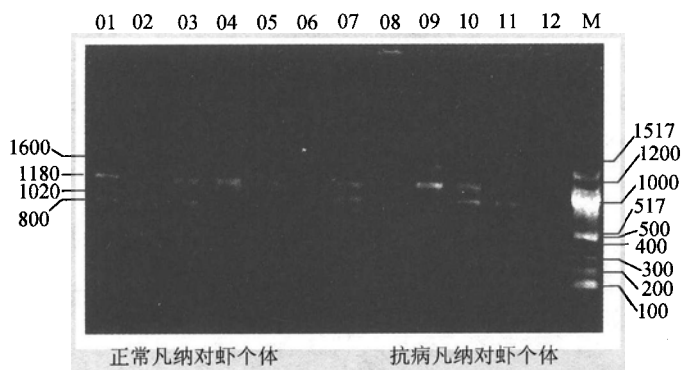


图1 凡纳对虾正常个体 *Litopenaeus vannamei* 和抗病个体 *L. vannamei* 的 RAPD 结果

引物 OPX-01; 正常个体 01-06; 抗病个体 07-12

M. DNA 标准(bp)分别为 1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 517, 500, 400, 300, 200, 100

左边数字表示扩增片段大小(bp)

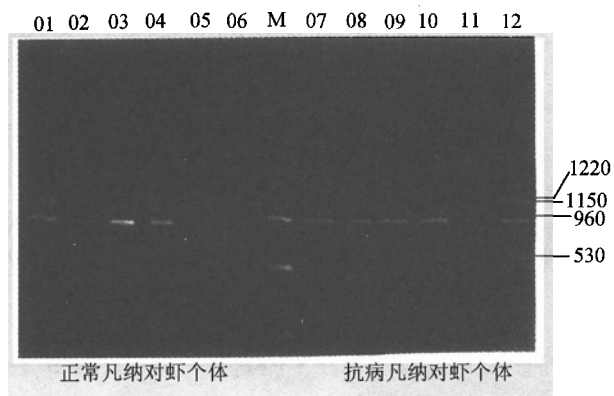


图2 凡纳对虾正常个体 *Litopenaeus vannamei* 和抗病个体 *L. vannamei* 的 RAPD 结果

引物 OPX-14; 正常个体 01-06; 抗病个体 07-12

M. DNA 标准(bp)分别为 1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 517, 500, 400, 300, 200, 100

右边数字表示扩增片段大小(bp)

三、讨 论

RAPD 技术最早由 Williams 等(1990)、Welsh 等(1990)创建,它是利用短序引物在非常低的退火温度下随机扩增基因组的片段。其优点是在没有任何基因组 DNA 序列资料的情况下能进行遗传变异的比较,比限制性内切酶酶切片段长度多态(RFLP)分析速度快而且经济(Penner *et al.*, 1993)。RAPD 技术已被用于鉴别分类单元(Hadrys *et al.*, 1992)、检测多种植物和动物的遗传变异(Devos *et al.*, 1992; Brummer *et al.*, 1995; Gwakisa *et al.*, 1994)以及筛选种群或家系的特异分子遗传标记(Baird *et al.*, 1992;

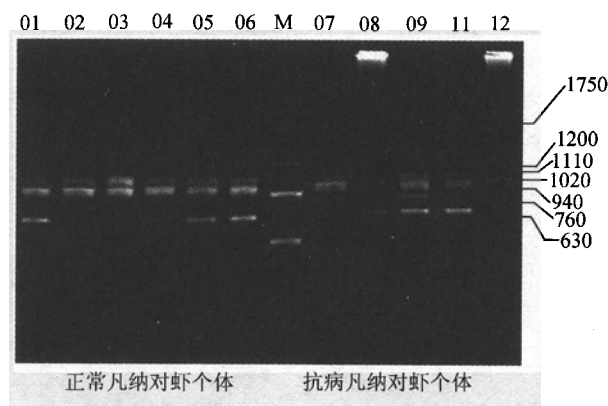


图3 凡纳对虾正常个体 *Litopenaeus vannamei* 和抗病个体 *L. vannamei* 的 RAPD 结果
引物 OPX-17; 正常个体 01-06; 抗病个体 07-11
M. DNA 标准(bp)分别为 1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 517, 500, 400, 300, 200, 100
右边数字表示扩增片段大小(bp)

Woodward *et al.*, 1992; Procunier *et al.*, 1993)。在甲壳动物研究中, Garcia 等(1994)利用 RAPD 技术比较了斑节对虾品系之间的遗传变异, 并获得了各品系特有的 RAPD 标记。Tassanakajon 等(1997)研究了泰国斑节对虾野生种群间的遗传多态性。宋林生等(1999)初步分析了日本对虾野生种群和养殖群体的遗传变异。在利用 RAPD 技术检测对虾种群的遗传变异的研究中, 科研人员都发现了它比同工酶技术高的变异水平。本研究也证实了这一点, 其多态比例高达 62.2%。

Garcia 等(1996)利用 RAPD 技术, 筛选得到了群体特异的 DNA 分子标记 B20, 并进行了克隆和序列分析, 发现了两个微卫星 DNA 位点, 正在用于特定分子标记的鉴别和数量性状遗传标记(QTL)的作图。作者从凡纳对虾正常群体和抗病群体的 RAPD 标记的比较中发现了 3 个抗病群体的 DNA 分子标记: OPX-01-1020, OPX-14-530 和 OPX-17-940。这一初步结果显示, 利用 RAPD 技术可以快速地筛选特定的分子标记, 目前, 我们还在筛选更多的与抗病和快速生长有关的分子标记, 并进行详细的分析。

参 考 文 献

- 宋林生, 1999, 对虾分子遗传标记, 海洋生物技术新进展(范晓等编著), 海洋出版社, 19~25。
- Baird, E., Cooper-Bland, S., Waugh, R., *et al.*, 1992, Molecular characterization of inter- and intra-specific somatic hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Molecular Genome and Genetics*, **233**:469~475.
- Brummer, E. C., Bouton J. H., and Kochert. G., 1995, Analysis of annual Medicago species using RAPD markers, *Genome*, **38**:362~367.
- Devos, K. M. and Gale M. D., 1992, The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat, *Theoretical Applied Genetics*, **84**:567~572.
- Garcia. D. K. and Benzie J. A. H., 1994, RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs, *Aquaculture*, **130**:137~144.
- Garcia, D. K. and Alcivar-Warren, A., 1996, Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*, *Molecular Marine Biology, and Biotechnology*, **5**(1):71~83.

- Gwakisa, P. S., Kemp S. J., and Teale, A. J., 1994, Characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers, *Animal Genetics*, **25**:89~94.
- Hadrys, H., Balick M., and Schierwater, B., 1992, Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology, *Molecular Ecology*, **1**:55~63.
- Penner, G. A. *et al.*, 1993, Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories, In: *PCR Methods and Applications*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 341~345.
- Procunier, J. D., Fernado M. A., and Barta, J. R., 1993, Species and strain differentiation of *Eimeria* spp. of the domestic fowl using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers, *Parasitological Research*, **79**:98~102.
- Tassanakajon, A. *et al.*, 1997, Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **6**(2): 110~115.
- Welsh, J. and McClelland, M., 1990, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucleic Acids Research*, **18**:7213~7218.
- Williams, J. G. K. *et al.*, 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research*, **18**:6531~6535.
- Woodward, S. R., Sudweeks J., and Teuscher, C., 1992, Random sequence oligonucleotide primers detect polymorphic DNA products which segregate in inbred strains of mice, *Mammalian Genome*, **3**:73~78.

IDENTIFICATION OF RAPD MARKERS FOR IMPORTANT TRAITS IN *LITOPENAEUS VANNAMEI*

Shen Qi, Ren Chunhua, Hu Chaoqun, Zhang luping

(South China Sea Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences)

ABSTRACT

The genome of *Litopenaeus vannamei* was analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis to identify DNA markers for important traits in *Litopenaeus vannamei* in the South China. A total of 20 ten-bases primers were screened, and eight positive primers giving highly reproducible RAPD patterns were selected for comparison between healthy and diseased populations of *Litopenaeus vannamei*. A total of 38 reproducible RAPD fragments ranging from 200 to 1750 base pairs were scored, and 24 fragments (62.2%) were polymorphic. Only three RAPD markers, OPX-01-1020, OPX-14-530 and OPX-17-940, were found in the diseased population of *Litopenaeus vannamei*, suggesting the potential use of them as DNA markers for helping broodstock management and selection for breeding.