

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*

石拓 孔杰 刘萍 韩玲玲[†] 庄志猛 邓景耀

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

[†](青岛海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

提要 1997年4月自黄海越冬场采集中国对虾朝鲜半岛西海岸群体样品。采用RAPD技术对该群体共33个个体的基因组DNA多态性进行了检测。利用20个随机寡核苷酸引物共检测105个位点,其中多态位点41个,占39%。单个引物获得的标记为1—10个,分子量为180—2200bp。个体间的平均遗传距离为0.093,群体的平均杂合度为0.2176。表明该对虾群体的遗传多样性较低。低水平的遗传多样性一方面使中国对虾的生存情况更加危险,同时其本身也可能是对虾对病害、恶劣环境等不利因素的抵抗力下降,从而导致资源衰退的原因之一。研究结果证实:在检测种群遗传变异度大小方面,RAPD具有比同工酶更高的灵敏度和分辨率。

关键词 中国对虾 RAPD 遗传多样性 多态位点

学科分类号 Q789

中国对虾是中国重要的经济虾类和海水增养殖品种,由于各种自然和人为的原因,其野生种质资源的遗传结构已经受到一定程度的影响,这可能是导致近几年来对虾资源数量急剧下降的原因之一。在过去的几十年里,对中国对虾的研究主要集中于形态、发育、养殖、渔业捕捞和增殖放流等方面(邓景耀等,1990;刘瑞玉,1955),对于野生分隔的群体,尚未探讨种内基因的变化情况。因此,迫切需要查明中国对虾的遗传相似指数、平均杂合度及不同群体间遗传距离等基本参数,正确地评定生物的遗传多样性,以便采取合理、科学、有效的保护措施。随机扩增多态DNA(RAPD)技术提供了一种快速分析不同个体间遗传差异的便利方法(Harlward *et al*, 1992)。目前,RAPD技术已经应用在藻类(Dutcher *et al*, 1993)、鱼类(Bardakci *et al*, 1994)、贝类(Patwary *et al*, 1994)及虾类(Garcia *et al*, 1994)的遗传多样性研究中。本文报告中国对虾一个地理群体DNA多态性的RAPD检测结果,以期分析各种人为活动对对虾种质资源的遗传影响,为制定合理的保护措施提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料来源

* 国家自然科学基金重点资助项目, 39630260号。石拓,男,出生于1969年3月,博士,助理研究员,E-mail:biogene@public.qd.sd.cn

收稿日期:1997-12-28,收修改稿日期:1998-07-02

野生中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 朝鲜半岛西海岸群体样品于 1997 年 4 月捕自黄海越冬场 (34°45' N, 124°45' E), 活体运回实验室, 于液氮中保存。

1.2 基因组 DNA 提取和浓度测定

基因组 DNA 的提取采用本实验室改进的 Sambrook 等 (1989) 的方法。取 50mg 对虾肌肉, 剪碎, 加入 400 μ l TE 缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl, pH = 8.0, 100mmol/L EDTA), 稍加研磨, 加入终浓度分别为 0.5% 的 SDS 和 200 μ g / mL 的蛋白酶 K, 56 $^{\circ}$ C 消化约 2h, 至溶液澄清透明后经酚 / 氯仿抽提、酒精沉淀。提取的 DNA 溶于适当体积 TE 缓冲液 (10mmol / L Tris-HCl, pH = 8.0, 1mmol / L EDTA)。DNA 浓度通过紫外分光光度计和电泳-EB 染色的荧光强度双重测定。

1.3 PCR 反应及 RAPD 产物的分离

表 1 列出了 20 种用于 RAPD 分析的引物 (Operon Technologies 公司出品)。RAPD 扩增反应条件与 Williams 等 (1990) 报道的相似。反应混合物中含 10mmol / L Tris-HCl, pH = 9.0, 50mmol / L KCl, 2mmol / L MgCl₂, 0.001% 明胶, 0.1mmol / L 每种 dNTP, 0.2 μ mol / L 引物, 25ng 基因组 DNA, 1U Taq DNA 聚合酶 (购于中国科学院遗传研究所), 反应总体积为 25 μ l。每个反应过程为 45 个循环, 一个循环包括 94 $^{\circ}$ C 1min, 36 $^{\circ}$ C

1min, 72 $^{\circ}$ C 2min。首次循环前先在 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 最终在 72 $^{\circ}$ C 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% 琼脂糖凝胶电泳分离, 溴化乙锭染色后于紫外光下观察拍照。

1.4 遗传多样性分析

1.4.1 谱带记录与数据处理 参照已有文献记录 DNA 条带和进行数据处理 (汪小全等, 1996)。电泳图谱中的每一条带 (DNA 片段) 均为一个分子标记 (Marker), 并代表一个引物结合位点。只记录那些电泳后条带清晰的 RAPD 标记。当某一扩增带出现 (显性) 时计为 1, 不存在 (隐性) 时计为 0, 据此统计得出所有位点的原始谱带矩阵。

1.4.2 遗传结构分析 采用多态位点百分率、遗传距离 (P) 和遗传相似系数 (F)、平均杂合度 (H_c) 等参数评估种群遗传结构。

任意两个个体间遗传距离 (P) 根据两个个体的共享 RAPD 标记来计算 (Nei *et al.*, 1979):

表1 随机引物及其扩增情况

Tab.1 Random primers and their amplifications

引物	5' —3' 序列	RAPD标记数	
		总数	可变数
OPX1	CTGGGCACGA	6	3
OPX2	TTCGCCACC	10	4
OPX3	TGGCGCAGTG	7	3
OPX4	CCGCTACCGA	5	1
OPX5	CCTTTCCCTC	1	0
OPX6	ACGCCAGAGG	8	3
OPX7	GAGCGAGGCT	7	2
OPX8	CAGGGGTGGA	—	—
OPX9	GGTCTGGTTG	9	4
OPX10	CCCTAGACTG	—	—
OPX11	GGAGCCTCAG	5	3
OPX12	TCGCCAGCCA	8	4
OPX13	ACGGGAGCAA	5	1
OPX14	ACAGGTGCTG	7	3
OPX15	CAGACAAGCC	5	1
OPX16	CTCTGTTCGG	—	—
OPX17	GACACGGACC	10	4
OPX18	GACTAGGTGG	—	—
OPX19	TGGCAAGGCA	9	3
OPX20	CCCAGCTAGA	3	2
总计		105	41

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

$$P = 1 - F$$

N_x 和 N_y 分别为第 X 和 Y 个体拥有的 RAPD 标记数, N_{xy} 是 X, Y 两个个体共享的 RAPD 标记数。当 $F = 1$ 时, 物种 X 和物种 Y 的扩增片段完全相同, 二者高度相似; 当 $F = 0$ 时, 二物种的扩增片段完全不同, 具有高度相异的遗传性。

群体的平均杂合度参照等位酶分析 (Nei, 1978) 的方法: $H_e = \sum_{i=1}^n (1 - \sum X_i^2) / n$, 式

中, X_i 为第 i 个等位基因的频率, n 为所测位点总数。

2 结果

2.1 个体水平的 DNA 多态性

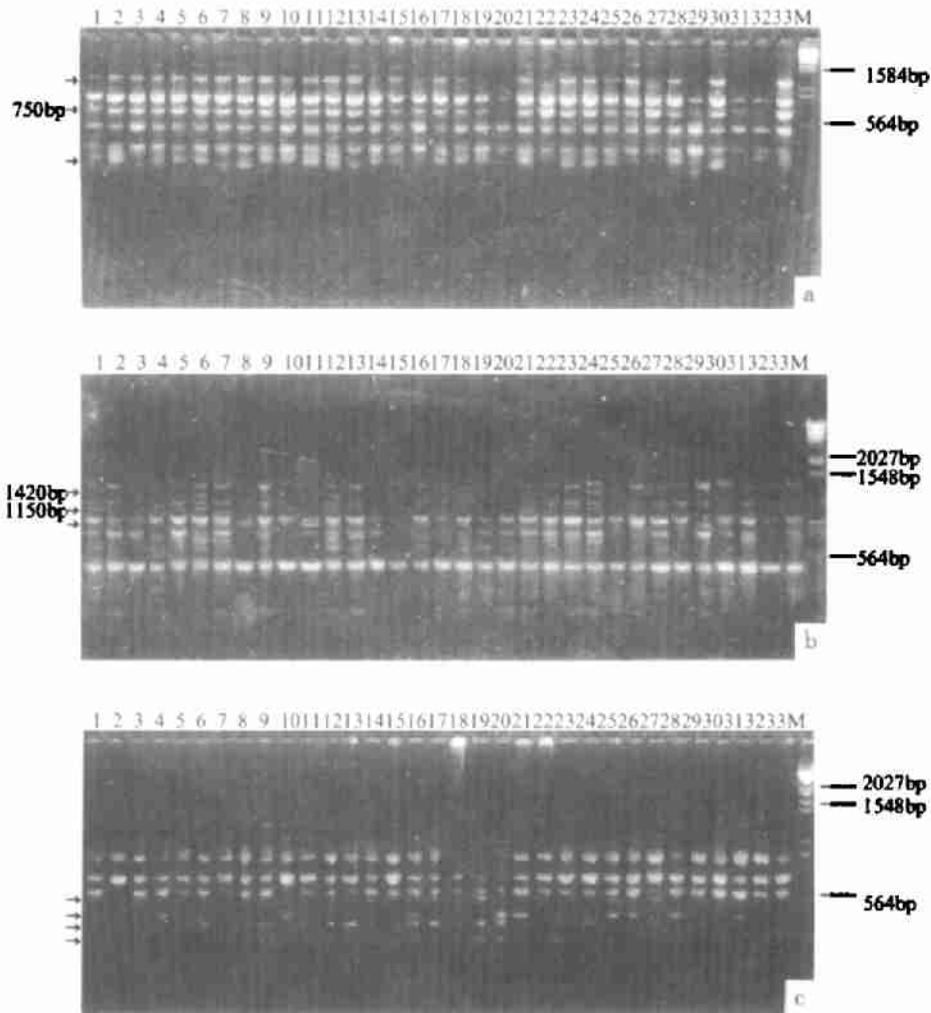


图 1 引物 OPX1、OPX6 和 OPX12 对中国对虾 33 个样品的 RAPD 扩增结果

Fig.1 RAPD results of 33 individuals in *Penaeus chinensis* with primers OPX1, OPX6 and OPX12

a, b, c 分别为引物 OPX1、OPX6、OPX12 的扩增产物电泳图谱; 图中编号为样品号;

M 为 λ DNA / EcoR I-Hind III 标准分子量标记; 箭头示多态位点

所用的 20 个引物中, OPX8、OPX10、OPX16 和 OPX18 四个引物无明显扩增谱带, 其余 16 个对所有受试个体的每次 RAPD 检测均能产生重复性好的特定扩增产物。在扩增产物中选取那些电泳后清晰的 DNA 片段作进一步的分析。16 个引物共检测 105 个位点, 其中 41 个是多态标记, 占 39%。每个引物可扩增 1—10 个 DNA 片段, 提供平均 6.6 个标记的信息, 标记的分子量范围为 180—2 200。其中引物 OPX5 在所有个体中只扩增出分子量相同的一条带, 表现为单态 (Monomorphic), 另外 15 个引物则产生了不同程度的多态 (polymorphic) RAPD 标记 (表 1)。图 1 列举了 OPX1、OPX6 和 OPX12 三种引物扩增产物的电泳结果。

根据扩增产物有无建立的二维数据矩阵, 借助 RAPDistance 软件得到 33 个个体的遗传距离矩阵。任意两个个体的 P 值为 0.039 5—0.153 6, 绝大多数为 0.070 0—0.110 0。

单一引物的某些扩增谱带往往为大多数个体所共有, 但对 16 个引物的全部扩增产物进行统计, 没有发现任何两例个体拥有完全相同的遗传标记, 显示出 RAPD 技术良好的分辨率。由于随机引物原则上可以任意增加, 因此理论上有可能找到任何一个个体的特异 RAPD 标记, 从而将所有个体区别开, 表明 RAPD 技术在找寻遗传标记方面有着巨大的潜力。

2.2 群体水平的 DNA 多态性

中国对虾朝鲜半岛西海岸群体的 RAPD 扩增谱带变异不大。16 个引物中有 1 个引物 OPX5 的扩增带型在 33 个受试样品中均没有变化, 4 个引物 OPX4、OPX6、OPX13 和 OPX15 变化不大; 在检测到的 105 个 RAPD 标记中, 有 64 个标记 (61%) 在整个群体的 33 个个体间表现稳定的一致性, 它们是进化中较为保守的区域。如果随机选择两个个体, 则约有 90 条扩增谱带 (85.7%) 都相同。

根据位点显性频率和个体间的随机扩增多态 DNA 片段共享度, 计算了群体的平均杂合度 H_c 和平均遗传距离 P 。 H_c 和 P 是监测种群遗传分化和基因交流的重要指标。中国对虾朝鲜半岛西海岸群体的平均杂合度 H_c 为 0.2176, P 平均值为相对较低的 0.093。

朝鲜半岛西海岸群体的 41 个多态位点的显性频率范围为 0.061—0.939, 表明该地理小群体易受遗传漂变的影响而导致基因的随机丧失和固定。其中, 6 个位点的显性频率为 0.061—0.182, 7 个位点的为 0.878—0.939。上述 13 个位点的显性频率非低即高, 按文献 (汪小全等, 1996) 推断, 点突变可能在形成中国对虾种群体内个体遗传分化中起了重要作用, 即因少数几个个体的点突变导致引物结合位点数的增加或减少, 如图 1 中引物 OPX6 扩增产物的 142 0bp 和 115 0bp 位点以及 OPX1 的 750bp 位点。

3 讨论

中国对虾主要分布在黄、渤海海区。根据多年的人工标志放流及回捕资料, 黄、渤海海区的中国对虾被普遍认为可分为两个独立的地理群体, 一个是在黄海东岸即朝鲜半岛西海岸海域出生的朝鲜半岛西海岸群体, 另一个是在渤海和黄海西岸海域出生的中国黄、渤海沿岸群体 (邓景耀等, 1990)。本文通过随机扩增基因组 DNA 对其中的一个群体——朝鲜西海岸群体的遗传多样性进行了检测, 根据 RAPD 数据分析得出这一群体中国对虾的分子杂合度较低的结论。因为样品为随机捕自其天然栖息的海域, 从分布地域和越冬雌虾平均体长来看均与朝鲜半岛西海岸群体相符, 由此基本可以推断野生中国对虾朝鲜

半岛西海岸群体的遗传多样性贫乏。

生物多样性是物种资源适应多变的生存环境而得以维系生存、发展和进化的基础。保护生物多样性的核心就是保护种质资源,其实质是保存种群的基因组体系(郑向忠等,1997),最大限度地维持种内的遗传多样性水平,确保种质资源的持续利用。本文所测得的中国对虾朝鲜半岛西海岸地理群体的多态位点百分率为 39%,个体间平均遗传距离为 0.093。Garcia 等(1994)检测了南美白对虾(*P. vannamei*)的不同群体和家系,得到的多态位点百分率为 39%—77%。中国对虾朝鲜半岛西海岸群体的多态位点百分率明显低于同科同属的南美白对虾,群体内平均遗传距离 P 仅比濒危滇金丝猴的 0.052(兰宏等,1996)略高,说明这一地理群体的遗传变异度较低。相应地,缺少适应环境变化的基因变异库的物种必然成为自然选择中最脆弱的资源。从这一角度看,更应加强对对虾资源的管理与保护。

群体的瓶颈效应、随机遗传漂变、大多数位点突变的选择性丧失是整个海洋甲壳类,特别是虾类遗传变异水平低的主要原因(Mulley *et al*, 1980; Nelson *et al*, 1980; Hedgecock *et al*, 1982)。本文所揭示的中国对虾低水平遗传多样性在一定程度上可能也与过度捕捞、劣质苗种的人工放流以及养殖个体大规模的逃逸等人为不合理的干预有关。

20 多年来,同工酶(或蛋白质)电泳技术几乎是检测水产种质资源遗传变异的唯一简单、有效、实用的方法,建立在 DNA 水平上的分子遗传标记技术只是最近几年才发展起来。同工酶技术考察的是不同基因位点或等位基因编码的蛋白质或多肽的表达特性,在很大程度上低估了整个基因组的遗传变异水平。刘旭东¹⁾分析了中国对虾黄渤海海区两个地理群体的 13 种同工酶的 20 个基因座位,多态性分别为 15% 和 20%,平均杂合性分别为 0.016 3 和 0.025 6; Garcia 等(1994)的研究发现南美白对虾两个家系的 30 个同工酶基因座位没有明显分化,自然种群内的多态性为 16.67%,家系内仅为 6.67% 和 3.33%。本文的结果证实:16 个引物共检测 105 个位点,多态性为 39%,平均杂合度为 0.217 6,已将所有受检个体区别开,没有发现任何两个个体拥有完全相同的 RAPD 标记。由于由同工酶表达所揭示的种内水平上的遗传变异水平非常低,RAPD 有可能作为比同工酶更加灵敏的遗传标记,而在虾类种质资源遗传学研究中有着很好的应用前景。

参 考 文 献

- 邓景耀,叶昌臣,刘永昌,1990. 渤黄海的对虾及其资源管理. 北京:海洋出版社,36—39
- 兰 宏,张文艳,王 文等,1996. 滇金丝猴的随机扩增多态 DNA 与遗传多样性分析. 中国科学(C辑),26(3): 244—249
- 刘瑞玉,1955. 中国北部的经济虾类. 北京:科学出版社,8—60
- 汪小全,邹喻苹,张大明等,1996. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析. 中国科学(C辑),26(5):436—441
- 郑向忠,徐宏发,陆厚基,1997. 动物种群遗传异质性研究进展. 生物多样性,5(3):210—216
- Bardacki F, Skibinski D O F, 1994. Application of the RAPD technique in talapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, 73(2):117—123
- Dutcher J A, Kapraun D F, 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) identification of genetic

1) 刘旭东,1995. 黄渤海中国对虾种群生化遗传学和七种虾类同工酶遗传标记的研究. 中国科学院海洋研究所博士学位论文

variation in three species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *J Appl Phycol*, 6(3):267—273

Garcia D K, Faggart M A, Rhoades L *et al*, 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Molecular Mar Biol Biotechn*, 3(5):270—280

Harward T M, Stalker H T, Larue E A *et al*, 1992. Use of single-primer DNA amplification in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Molecular Biology*, 18:315—325

Hedgecock D, Nelson K, Tracey M L, 1982. Genetics. In Abele L D editor-in-chief. *The Biology of Crustacean*, Vol 2. New York: Academic Press, 283—403

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, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89:583—590

Nei M, Li W-H, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:5 269—5 273

Nelson K, Hedgecock D, 1980. Enzyme polymorphism and adaptive strategy in the decapod Crustacea. *American Naturalist*, 116:238—280

Patwary M U, Kenchington E L, Bird C J *et al*, 1994. The use of random amplified polymorphic DNA markers in genetic studies of the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791). *J Shellfish Res*, 13(2): 547—553

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al*, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 464—467

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

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS ON *PENAEUS CHINENSIS* BY RAPD—THE DNA POLYMORPHISM OF WESTERN COASTAL POPULATION OF KOREAN PENINSULAR

SHI Tuo, KONG Jie, LIU Ping, HAN Ling-ling[†],
ZHUANG Zhi-meng, DENG Jing-yao

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

[†] (College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao, 266003)

Abstract Specimen of Penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) of the wild population in the western coastal waters of Korean Peninsular were collected in April 1997 from the overwintering waters in Yellow Sea (34° 45' N, 124° 45' E). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was employed to detect the genetic variation of 33 individuals from the population. The reactions were performed by 45 cycles of 94°C denaturation for 1 min, 36°C annealing for 1 min and 72°C polymerization for 2 min. Complete extension was done by 72°C for 10 min. Each primer used for the detection could produce 1—10 molecular markers. Amplification with 20 primers produced 105 distinctive and reproducible fingerprints varying in length from 180—2 200bp, 41 of which were polymorphic and the proportion of polymorphic loci was 39%. The amplified fragments were scored as present (1) or absent (0) for each DNA sample and an index of degree of band sharing (F) was calculated by using Nei and Li's matching coefficient method. The average genetic distance ($1 - F$) and mean heterozygosity (H_e) used to evaluate population genetic structure were 0.093 and 0.217 6, respectively, indicating a low genetic diversity in wild Korean Peninsula population of *P. chinensis*. Lack of genetic diversity not only challenged the existence fate of *P. chinensis*, but also was one of the reasons of why *P. chinensis* had low resistance against disease and adverse environment. Furthermore, on the basis of the experiment RAPD had higher sensitivity and resolution than allozyme as far as examining genetic variations in natural populations is concerned.

Key words *Penaeus chinensis* RAPD Genetic diversity Polymorphic loci

Subject classification number Q789