

短沟对虾两个野生群体遗传多样性的 RAPD 分析

谭树华, 王桂忠*, 林琼武, 李少菁

(厦门大学海洋学系, 近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 利用 RAPD 标记技术检测了厦门和汕头沿海 2 个短沟对虾群体基因组 DNA 的多态性, 并对其遗传多样性进行了分析。从 40 条随机引物中筛选出 13 个 10bp 引物, 共扩增出 65 条清晰可重复的 DNA 片段, 片段长度为 100 ~ 2200 bp, 在 2 个群体间没有检测到特异的片段。厦门和汕头群体的多态片段比例分别为 87.69 % 和 89.23 %, 杂合度分别为 0.212 和 0.218, 遗传多样性指数分别为 0.2847 和 0.2913, 两群体间的遗传距离为 0.018, F_{ST} 值为 0.004。可见两野生群体种质资源仍然维持在良好水平, 遗传分化程度很低, 可能是同一种群, 具有进一步开发的潜力。

关键词: 短沟对虾; RAPD; 遗传多样性

文章编号: 1000-0933(2006)11-3907-05 中图分类号: Q143, Q968 文献标识码: A

Genetic diversity of two wild populations of *Penaeus semisulcatus* revealed by RAPD technique

TAN Shu-Hua, WANG Gui-Zhong, LIN Qiong-Wu, LI Shao-Jing (Department of Oceanography, State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China). Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(11): 3907 ~ 3911.

Abstract: The green tiger prawn, *Penaeus semisulcatus* is one of the biggest penaeid prawns and widely distributed in tropical and subtropical regions of the Indian Ocean and the West Pacific Ocean. The important economic shrimp species in the north of the South China Sea are *Penaeus semisulcatus*, *Penaeus monodon*, *Marsupenaeus japonicus* and *Fenneropenaeus penicillatus*. Although the disease-resistance of *Penaeus semisulcatus* is more effective than that of *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis*, the culturing technique in *Penaeus semisulcatus* is not as success as that in *Penaeus monodon* and *Fenneropenaeus penicillatus*. It is for this reason that its culturing production could be ignored and the market product of this species in China mainly come from the wild catch. In recent years the genetic diversity of this species has been threatened by overfishing, environmental stress and habitat destruction. This study reports the genetic diversity and genetic differentiation of two wild stocks of *Penaeus semisulcatus* collected from Xiamen and Shantou coastal waters using RAPD method. Amplification with 13 random primers generated 65 reproducible fragments ranging from 200 to 2200bp. No specific fragments were detected between these two stocks, and the mean proportions of polymorphic amplified bands of Xiamen and Shantou population were 87.69 % and 89.23 %, respectively. The mean heterozygosity of Xiamen stock and Shantou stock were 0.218 and 0.212, and the genetic diversity index were 0.2847 and 0.2913, respectively. The genetic distance was 0.0184 and F_{ST} was 0.004. All these results reveal that the germplasm resource of Xiamen and Shantou stocks is in good condition with higher genetic diversity and low genetic differentiation, and they may belong to one population and have a good exploitation potential.

Key words: *Penaeus semisulcatus*; RAPD; genetic diversity

短沟对虾 (*Penaeus semisulcatus*) 俗称花脚虾, 赤脚虾, 凤虾。主要分布于印度洋和西太平洋, 在我国分布于

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30471322)

收稿日期: 2005-07-24; 修订日期: 2006-04-27

作者简介: 谭树华 (1972 ~), 男, 湖南隆回人, 博士, 副教授, 从事水产生物技术研究。E-mail: hstan @126.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: gzwang @jingxian. xmu. edu. cn

Foundation item: The project was financially supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30471322)

Received date: 2005-07-24; **Accepted date:** 2006-04-27

Biography: TAN Shu Hua (1972 ~), Ph. D., Professor, mainly engaged in marine biotechnology. E-mail: hstan @126.com

福建以南沿海。成熟虾体长可达 13~20 cm, 体重 30~120 g, 属大型虾类之一。形态与斑节对虾相似, 具食性杂、生命力强和市场价格高等优点, 且耐低氧, 适盐范围宽, 抗病能力较现有的主要养殖品种如斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 等均要强, 是一种值得推广的优良养殖品种^[1]。目前, 在南方沿海省份均有池塘养殖, 但其相关研究尚少, 仅见在染色体数、人工育苗、基因克隆^[2~5]等方面有少量报道, 尚没有其种质资源的相关报道。在已报道的对虾遗传变异研究中, 同工酶方法是使用最多的方法, 但其检测的对虾遗传变异水平一般较低, 而 RAPD 方法检测的遗传变异则要高得多^[6,7]。RAPD 技术在我国已用于中国明对虾和日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 野生或养殖群体的遗传变异研究^[8~10]。本文采用 RAPD 技术对厦门和汕头的短沟对虾群体进行遗传结构及其遗传多样性水平的研究, 以期对这一资源的合理开发利用提供理论依据, 为避免在开发和养殖过程中可能出现的种质退化的发生提供研究基础。

1 材料

实验用短沟对虾系取自厦门 (XM, 24°29' N, 118°06' E) 和汕头 (ST, 23°22' N 116°59' E) 两海区的 2 个野生群体, 厦门群体于 2003 年 10 月捕捞自厦门近岸水域 (体长 (110.5 ± 11.5) mm, 体重 (35 ± 6.0) g), 汕头群体于 2003 年 11 月捕捞自汕头沿岸水域 (体长 (135.5 ± 12.5) mm, 体重 (45 ± 6.8) g), 2 群体数量均为 40 尾。所有个体采用活体运输运回实验室, 解剖取尾脊或腹部肌肉, 肌肉样品均分为两部分保存, 一部分保存于 -80 °C 超低温冰箱备用, 另一部分保存于 95% 乙醇中, 并置于 4 °C 冰箱中保存备查。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

从 40 个个体中随机选取 24 个个体用于 RAPD 分析, 取 95% 乙醇固定的肌肉约 100 mg, 用 TE (pH 8.0) 浸泡过夜。基因组 DNA 的制备参考萨姆布鲁克的《分子克隆实验指南》^[11]。

2.2 PCR 扩增

10-mer 随机引物由上海英骏生物技术有限公司合成。扩增反应条件参考 Williams^[12] 稍做修改。经优化后确定反应总体积为 25 μ L: 包括 10 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.3)、50 mmol/L KCl、2 mmol/L MgCl₂、0.001% 明胶、100 μ mol/L 的 dNTPs、0.2 μ mol/L 引物、25 ng DNA 模板和 1 U TaqDNA 聚合酶。扩增程序设置为: 预变性 94 °C 5 min, 接着 35 个循环, 包括 94 °C 15 s、36 °C 60 s 和 72 °C 90 s, 最后一个循环后在 72 °C 延伸 7 min。PCR 扩增产物在 1.6% 琼脂糖凝胶上电泳, 在含 0.05% 溴化乙锭 (EB) 的水溶液中染色 0.5 h, 于凝胶成像系统上检测和拍照。

2.3 数据处理

RAPD 扩增条带的记录和数据处理参考汪小荃等^[13] 的方法。统计各样品的 RAPD 标记数, 计算清晰和稳定的谱带。将扩增产物电泳图谱的有、无分别以 1、0 来记录, 应用 Popgene1.31 软件计算群体的多态位点比例 P 、群体间的遗传距离 D 、遗传一致性 I 、 F_{ST} 值和群体杂合度 H 。

3 结果

3.1 RAPD 图谱分析

本实验首先采用 40 个引物进行扩增, 筛选出 13 个扩增重复性好和结果清晰的引物用于结果分析。单一引物扩增条带数在 2~8 条之间, 扩增片段大小为 100~2200 bp。13 个引物共产生 65 个 DNA 片段 (表 1), 厦门和汕头群体扩增到的 DNA 片段数分别为 64 和 65 条, 即 BA0180 引物在厦门群体内扩增的片段数比汕头群体少 1 条, 平均每个引物分别扩增出 4.92 和 5.0 条带。2 个群体内个体间的扩增图谱变异较大, 没有在所有引物扩增结果中完全一致的个体, 也没有发现群体的特异性片段。图 1 是部分引物的扩增图谱。

3.2 群体的遗传多样性和遗传距离

在检测的 65 个标记中, 有 7 个标记 (10.8%) 在所有个体间表现出稳定的一致性。厦门和汕头群体的多态标记数分别为 57 和 58 个, 多态位点比例分别为 89.06% 和 89.23%, 多态标记的显性频率范围为 0.024

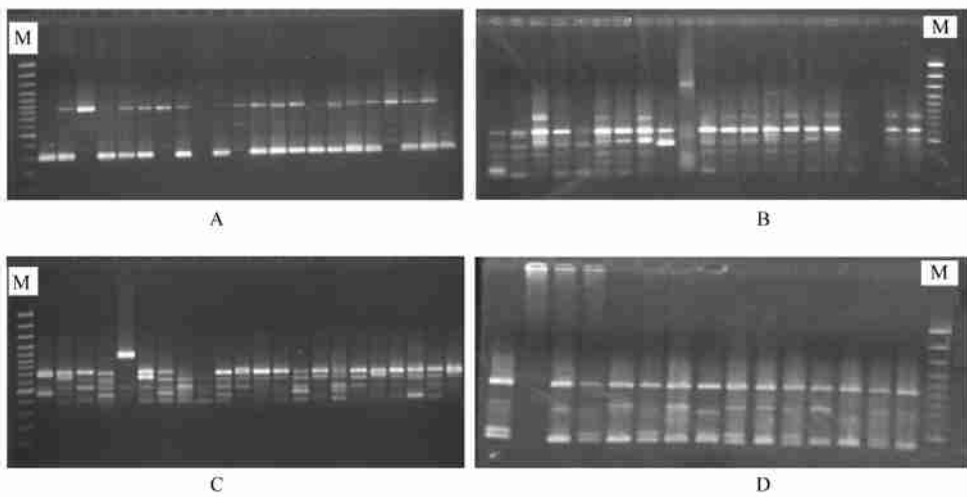


图1 用引物BA0021(A)、BA0025(B)、BA0172(C)和BA0173(D)扩增短沟对虾的RAPD图谱

Fig.1 Electrophoresis pattern of RAPD in *P. semisulcatus* using primers of BA0021(A)、BA0025(B)、BA0172(C) and BA0173(D)

M:分子量标准(100bp DNA Ladder marker)

~0.782,杂合度分别为0.212和0.218,多样性指数分别为0.285和0.291。根据 $Nei^{[16]}$ 的公式,得到两群体间的遗传距离为0.018, F_{ST} 为0.004,说明两群体间遗传分化程度很低。

4 讨论

4.1 短沟对虾的遗传多样性及遗传分化

20世纪90年代中期以前,同工酶是检测对虾群体遗传变异和种群地理分化的主要方法,但其检测的对虾遗传变异水平较低,而从基因组水平用RAPD和微卫星等方法检测的遗传变异水平则要高得多。斑节对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾、细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)等野生对虾种群同工酶检测的多态位点比例为0.022%~0.333%(平均0.179),观察杂合度 H_o 为0.006%~0.089%(平均为0.034%),而RAPD检测的对虾多态位点比例为0.242~1.000^[6]。Klinbunga等^[17]采用RAPD和mtDNA-RFLP方法对5个泰国对虾野生种群遗传多样性水平的研究也表明,RAPD得到的多态位点比例达46.7%~61.4%,远高于同工酶的检测结果。本文以RAPD方法得到厦门和汕头短沟对虾群体多态位点比例分别为87.69%和89.23%,杂合度分别为0.218和0.212,多态位点比例和杂合度均处于较高水平,这表明厦门和汕头短沟对虾种群的遗传变异较大,遗传多样性水平较高,种质资源保存较好。其原因可能与目前短沟对虾养殖规模不大和无过度捕捞等有关,因而保存了较高的遗传变异性。2个群体间的遗传距离为0.0184。同时, F_{ST} 值为0.004, F_{ST} 是用来测量群体之间遗传分化的指标,当 F_{ST} 接近于0时,则说明群体间的没有发生遗传分化,因此,厦门和汕头群体间遗传分化程度很低。从扩增图谱结果亦可以看出,二者差别不大,尚没有发现群体的特异片段。因此,厦门与汕头群体间不存在地理种群的遗传分化,可能为同一种群。这与厦门和汕头同处亚热带水域,地理距离较近的事实相符。

RAPD扩增条带的多寡,与遗传多样性水平有关,也与群体遗传纯度有一定相关性,近交水平和遗传纯度

表1 随机引物序列和RAPD检测的多态基因座位

Table 1 List of sequences of arbitrary primers and polymorphic loci detected by RAPD techniques

引物号 Primers	序列 5'-3' Sequence	标记总数 Nos. of markers	多态标记数 Nos. of polymorphism markers	多态位点比例 (%) Proportion of polymorphism loci
BA0021	CAGGCCCTTC	2	2	100
BA0025	AGGGGTCITG	6	6	100
BA0027	TCGGCGATAG	3	3	100
BA0028	GTGACGTAGG	7	7	100
BA0032	TCGGCGATAG	3	2	66.7
BA0163	CAGAA GCCCA	5	3	60.0
BA0164	CAGAA GCCCA	8	8	100
BA0169	TGGAGAGCAG	5	4	80.0
BA0172	AGAGGGCACA	6	6	100
BA0173	CTGGGGCTGA	3	2	66.7
BA0174	TGACGCGGT	7	6	85.7
BA0177	GGTGGTGATG	4	4	100
BA0180	AAAGTGCGGC	5~6	5~6	100

高时,因等位基因在一定程度上被固定,会导致不同条带数减少^[18]。邱高峰等^[19]用 RAPD 方法研究中国近海中国明对虾的遗传差异时,单一引物扩增获得的片段数仅为 4~7 条,平均 6 条。石拓等^[10]研究朝鲜半岛西海岸中国明对虾群体的 RAPD 多态性时,每个引物扩增获得的片段平均数也仅为 1~10 条,平均 5.25 条。但 Klinbunga 等^[17]研究 5 个泰国斑节对虾野生种群的遗传变异性时,每个 RAPD 引物扩增获得的片段数达到 13.7~15.3 条。这种扩增条带数的差异可能是群体近交程度和交配方式的反映,而近交程度与亲体数量大小密切相关。东南亚(泰国、马来西亚等地)是斑节对虾遗传多样性最高和数量最大的地区,因而在 RAPD 扩增结果上会表现为每个引物扩增获得的片段数较多。近年来,中国明对虾也面临着野生资源量急剧减少、亲体数量锐减和种质退化等问题^[8,10],由其引起的近交水平增加很可能片段数少的主要原因之一。在本研究中,单个引物扩增的片段数为 2~8 条,平均为 4.92~5.0 条,短沟对虾群体单个引物扩增的片段数较少,可能是对虾的繁殖方式为一种非随机交配的反映,与遗传多样性关系不大。

4.2 短沟对虾资源开发和保护

短沟对虾与斑节对虾、日本囊对虾同为我国南方沿海的大型对虾,且形成了一定的亲体数量,其生态分布和习性均有少量研究^[20]。作者在厦门近岸水域能捕获到短沟对虾的季节为 7~11 月份,个体头胸甲长 24~34mm,雌雄比接近 1:1。捕获的雄虾体重在 20g 左右,少数达到 40g 以上。20g 以上雄虾的精英呈乳白色,镜检存在形态完整的精子;在汕头近岸捕获的短沟对虾数量较大,在台湾海峡中部较深水域或东侧的较高温度水域则可能存在短沟对虾越冬和繁殖的场所。但至今对该对虾的种群分化和遗传多样性水平缺少应有的研究,养殖群体在经过人工定向选择和有限亲体的多代繁殖后,往往会导致等位基因的丧失和遗传变异的减少,因而遗传变异水平更低^[22,22]。因此,尽管短沟对虾目前尚保持了较高的遗传多样性,但从遗传选育和资源保护的角度出发,应加大对这一优质资源的种群分布、地理分化和遗传多样性水平的研究,在较大规模养殖来临之前做好遗传背景的研究工作。同时,应加强人工养殖研究,以减轻对野生资源的捕捞压力,以避免重蹈中国明对虾野生种群所面临的亲体数量锐减、种质退化、天然基因库萎缩及遗传污染等情况的覆辙。

References:

- [1] Zhang Y P, Chen R, Cu G C, et al. Preliminary discussion on the culture and feeding of *Penaeus semisulcatus*. Marine Science Bulletin, 1998, 17(5): 46~50.
- [2] Xiang J H, Zhou L H, Liu R R. The chromosomes of three shrimp *Penaeus penicillatus*, *P. semisulcatus* and *P. japonicus*. Marine Science, 1991, 4: 72~73.
- [3] Wang H R, Wang P. Report on the experiment of artificially raising the fry of *Penaeus semisulcatus*. Natural science J of Hainan University, 2000, 18(3): 273~274.
- [4] Ye X, Zheng Q M, Bai J J, et al. cDNA cloning and sequence analysis of prophenoloxidase in *Penaeus semisulcatus* and *Penaeus monodon*. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2003, 34(5): 533~540.
- [5] Zheng Q M, Ye X, Bai J J, et al. Cloning and sequencing of Lysozyme cDNAs of *Penaeus semisulcatus* and *Litopenaeus vannamei*. Journal of Agriculture Biotechnology. 2004, 12(4): 482~483.
- [6] Benzie J A H. Population genetic structure in penaeid prawns. Aquac Res, 2000, 31: 95~119.
- [7] Tassanakajon A, Pongsomboon S, Rimphanitchayakit V. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. Mol. Mar Biol Biotechnol. 1997, 6: 110~115.
- [8] Liu P, Kong J, Shi T, et al. RAPD analysis of wild stock of penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) in the China's coastal waters of Huanghai and Bohai Seas. Acta Oceanologia sinica. 2000, 20(5): 88~94.
- [9] Song L S, Xiang J H, Li C X, et al. Study of population genetic structure in *Penaeus japonicus* with RAPD markers. Oceanologia et Limnologia sinica. 1999, 30(3): 261~266.
- [10] Shi T, Kong J, Liu P, et al. Genetic diversity analysis on *Penaeus chinensis* by RAPD—the polymorphism of western coastal population of Korean peninsular.

福建省近内海资源组. 福建省近内海水产资源调查报告(1972~1977), 1977: 124~125.

谭树华, 王桂忠, 李少菁等. 厦门和汕头短沟对虾线粒体 16S rRNA 和控制区基因序列分析(待发表)

- 1999,30(6):609~615.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniaatis T. Molecular cloning: A laboratory Manual. 2th ed. Beijing Science Press. 2002.
- [12] Williams J G K, Kubelik A R, Livark KJ, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary markers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res, 1990, 18(22):6531~6535.
- [13] Wang X Q, Zou Y P, Zhang D M, et al. The genetic diversity of *Cathaya argyrophylla* by RAPD analysis. Science in China (Series C) 1996, 26, 436~441.
- [14] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting. Mol Biol Evol. 1990, 7:478~484.
- [15] Wang Z R. Plant allozyme analysis. Beijing Science Press, 1996. 95~112.
- [16] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 1978, 89:583~590.
- [17] Klinbunga S, Siludjai D, Wudthijinda W. Genetic heterogeneity of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and mitochondrial DNA RFLP analyses. Marine Biotechnology, 2001, 3(5):428~438.
- [18] Zhang H Y, Liu R Z, Liu X W, et al. Screening of RAPD primers and detection of the specific molecular markers for Grass carp and Common carp. J of Hunan Agriculture University, 1998, 22(2):168~173.
- [19] Qiu G F, Chang R L. Population genetic variation of Chinese shrimp *Penaeus chinensis* along the coast of China accessed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). J of Shanghai Fisheries University, 2001, 10(1):1~5.
- [20] Jiang B Y. Main economical prawn species in China. Bulletin of Biology, 1996, 31(6):12~13.
- [21] Sbordoni V, Mattheis E, Cobdlis et al. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). Aquaculture, 1986, 57:239~251.
- [22] Li J, Gao T X, Liu G D, et al. Isozyme analysis in cultured populations of *Fenneropenaeus chinensis*. Marine Fisheries Research, 2003, 24(2):1~8.

参考文献:

- [1] 张跃平, 陈然, 苏国成, 等. 短沟对虾养殖与投饵初探. 海洋通报, 1998, 17(5):46~50.
- [2] 相建海, 周令华, 刘瑞玉. 长毛对虾、短沟对虾和日本对虾的染色体研究. 海洋科学, 1991, 4:72~73.
- [3] 王红勇, 王鹏. 短沟对虾人工育苗试验报告. 海南大学学报, 2000, 18(3):273~274.
- [4] 叶星, 郑清梅. 短沟对虾与斑节对虾上对虾酚氧化酶原基因的克隆与序列分析. 海洋与湖沼, 2003, 34(5):533~540.
- [5] 郑清梅, 叶星, 白俊杰, 等. 短沟对虾和凡纳对虾溶菌酶 cDNA 的克隆与序列分析. 农业生物技术学报, 2004, 12(4):482~483.
- [8] 刘萍, 孔杰, 石拓, 等. 中国明对虾黄渤海沿岸地理群的 RAPD 分析. 海洋学报, 2000, 20(5):88~94.
- [9] 宋林生, 相建海, 李晨曦, 等. 日本囊对虾野生种群和养殖种群遗传结构的 RAPD 标记研究. 海洋与湖沼, 1999, 30(3):261~266.
- [10] 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. 海洋与湖沼, 1999, 30(6):609~615.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniaatis T. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京:科学出版社, 2002.
- [13] 汪小荃, 邹喻苹, 张大明, 等. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析. 中国科学(C 辑), 1996, 26(5):436~441.
- [15] 王中仁. 植物等位酶分析. 北京:科学出版社, 1996.
- [18] 章怀云, 刘荣宗, 刘学文, 等. 草鱼和鲤鱼群体遗传变异的 RAPD 指纹分析. 水生生物学报, 1998, 22(2):168~173.
- [19] 邱高峰, 常林瑞. 我国近海中国对虾种群遗传差异的 RAPD 分析. 上海水产大学学报, 2001, 10(1):1~5.
- [20] 江宝永. 我国主要经济对虾类. 生物学通报, 1996, 31(6):12~13.
- [22] 李健, 高天翔, 柳广东, 等. 中国明对虾人工选育群体的同工酶分析. 海洋水产研究, 2003, 24(2):1~8.