

文章编号: 1004-7271(2001)01-0001-05

我国近海中国对虾种群遗传差异的 RAPD 分析

邱高峰¹, 常林瑞²

(1. 上海水产大学渔业学院, 上海 200090; 2. 烟台师范学院生物学系, 山东烟台 264025)

摘要:应用随机扩增多态 DNA(RAPD)技术对取自我国近海烟台、长岛、青岛、宁波等 4 个地方的 20 只中国对虾进行了种群内和种群间遗传差异分析。在使用的 50 个随机引物中,有 9 个引物扩增出条带清晰的多态性片段。烟台、长岛、青岛、宁波等 4 个地理种群内的遗传距离分别为 0.0154、0.0370、0.0462、0.0550,种群之间的遗传距离分别为 0.0793、0.1139、0.0988、0.1485、0.0880、0.1260。UPGMA 和 NJ 法构建的种群间分子系统树基本一致,结果表明不同地理种群之间存在一定程度的遗传差异。

关键词:中国对虾;随机扩增多态 DNA;种群;遗传差异

中图分类号:S917 文献标识码:A

Population genetic variation of Chinese shrimp *Penaeus chinensis* along the coast of China assessed by random amplified polymorphic DNA(RAPD)

QIU Gao-feng¹, CHANG Lin-rui²

(1. Fisheries College, SFU, Shanghai 200090, China; 2. Department of Biology, Yantai Teachers College, Yantai 264025, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were used to detected 4 populations genetic variation of 20 Chinese shrimps (*Penaeus chinensis*) along the coast of China, 5 from each of samples caught off Yantai, Changdao, Qingdao, and also for 5 individuals from a cultured sample collected off Ningbo. 9 primers screen from 50 random primers generated 54 RAPD bands, among which 36 were varied. The intra-population genetic distances among those 4 populations (Yantai, Changdao, Qingdao, Ningbo) were 0.0154, 0.0370, 0.0462, 0.0550, respectively. The inter-population genetic distances among them were 0.0793, 0.1139, 0.0988, 0.1485, 0.0880, 0.1260, respectively. Molecular phylogenetic tree constructed by UPGMA and NJ method suggested that there were some genetic variation among different geographic population.

Key words: *Penaeus chinensis*; random amplified polymorphic DNA; population; genetic variation

RAPD 技术,即随机扩增多态 DNA(Random Amplified Polymorphic DNA)技术,是 Williams 等^[1]和 Welsh 等^[2]两个研究小组在 PCR 技术的基础上同时发展起来的,用于检测基因组 DNA 多态性。由于该技术采用的引物为一系列 10bp 随机排列的寡聚核苷酸单引物,通过 PCR 扩增后,便可获得多态 DNA 片段(RAPDs),检测多态性的范围可覆盖整个基因组,具有简便、快速、灵敏的优点,已被广泛应用于群体遗传学、分类学以及进化生物学等研究。在对虾类,Garcia 和 Benzie^[3]首次对斑节对虾(*Penaeus monodon*)

收稿日期:2000-08-29

基金项目:上海市教委高校跨世纪人才培养基金——“曙光计划”项目(编号:96SG18)的部分内容

第一作者:邱高峰(1965-),男,福建长汀人,理学博士,副教授,主要从事水产动物遗传育种与生物技术、生殖生物学研究。

的亲本和子代基因组 DNA 进行了 RAPD 分析,证实了 RAPDs 符合孟德尔遗传规律,国内宋林生等^[4]利用该技术分析了六种海产虾的种间遗传差异及演化关系,不同地理群体的虾类种内遗传差异的 RAPD 分析在国内外均不见报道。本研究对我国近海三个不同海区中国对虾群体遗传差异进行了 RAPD 分析,可为中国对虾的种质资源保护、群体遗传研究提供分子遗传学基础。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 标本于 1997 年 4-5 月分别采自烟台 (YT)、长岛 (CD)、青岛 (QD)、宁波 (NB),所有活体标本浸泡于 80%~100% 的酒精中于 4℃ 冰箱保存备用。

1.2 总 DNA 提取

随机选取烟台、长岛、青岛、宁波的对虾标本各 5 只,进行总 DNA 提取,剪取每只对虾腹部肌肉约 100mg,切成碎片,研磨至粉末状,用含蛋白酶 K 的裂解液 (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 2mM EDTA, 1% SDS) 于 37℃ 消化过夜。次日分别以饱和酚、饱和酚/异戊醇/氯仿 (25/24/1)、氯仿/异戊醇 (24/1) 提取、纯化总 DNA,随后以 100% 冰乙醇 (-20℃) 沉淀 DNA,干燥后溶于 TE 中,置 4℃ 冰箱保存备用。

1.3 PCR 扩增

用于 PCR 基因扩增的随机引物 (10bp) 共 50 个 (S1-S50),购自上海生工生物工程有限公司,使用华美生物工程公司生产的 PCR 扩增仪,反应总体积为 25 μ L,其中包括 2.5 μ L 10 \times Buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 30mM MgCl₂, 500mM KCl) 2.5 μ L dNTP (2 μ M), 2.5 μ L 引物 (5 μ M)、1 μ L Taq DNA 聚合酶。1 μ L 模板 DNA,补足灭菌双蒸水至终体积,其上滴加 2 滴消毒石蜡油,扩增反应程序如下:94℃ 预变性,1min 后;94℃ 变性 60sec,50℃ 复性 60sec,72℃ 延伸 90sec,共运作 35 个循环,最后一个循环结束后再延伸 5min。PCR 扩增产物上样至 1.4% 琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭 0.5 μ g/mL) 电泳,于紫外灯下检测、拍照。

1.4 数据处理

根据 Nei 和 Li^[5] 的公式 $[F = 2N_{xy}/(N_x + N_y)]$ 计算个体间的 RAPDs 相似系数 F (N_{xy} 为个体 X 和个体 Y 共有的 DNA 扩增片段数, N_x 、 N_y 分别为样本 X、样本 Y 各自的 DNA 条带数,然后根据 Lynch^[6] 的公式 $[S = 1 + S_{ij} - 1/2(S_i + S_j)]$ 计算种群间的相似系数 S (S_{ij} 为种群 i 和种群 j 间所有配对个体间相似系数的平均值; S_i 、 S_j 分别为种群 i 和种群 j 内所有个体间相似系数的平均值),种群间的遗传距离 (D) 通过公式 $D = 1 - S$ 计算。最后采用 MEGA^[7] 软件中的非加权组平均法 (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average, UPGMA) 和 NJ (Neighbour-Join) 法进行聚类分析,构建聚类关系树。

2 结果

2.1 不同地理种群中国对虾 RAPD 指纹图谱特征

本研究采用 50 个 10bp 随机引物对取自烟台、长岛、青岛和宁波等 4 个不同海区的 20 只中国对虾进行了 RAPD 分析,共筛选出 9 个随机引物能扩增出条带较为清晰的多态 DNA 片段 (RAPDs),检测到 RAPDs 数目合计 54 条,其中 36 条显现出多态性 (表 1),多态百分率为 66.7%。单一引物扩增的 RAPDs 数目在 4~7 条之间,RAPDs 的分子量大小在 200~2300bp 之间。各地理种群平均每一引物扩增的条带数为:烟台 4.00,长岛 3.89,青岛 3.59,宁波 4.11。图 1 显示了 S24、S25、S42、S43 引物扩增的不同种群中国对虾的 RAPD 图谱。

2.2 种群内与种群间的遗传相似系数及遗传距离

通过统计各种群 20 个个体间共有的 RAPDs,计算得到种群内和种群间的遗传相似系数和遗传距离。如表 2 所示,种群内的遗传相似系数 (0.9450-0.9846) 明显大于种群间的遗传相似系数 (0.8515-

表 1 能够扩增出中国对虾种群 DNA 多态性条带的随机引物序列及其扩增的条带数

Tab.1 Random oligonucleotide primer sequences and the number of amplified polymorphic DNA fragments of populations in Chinese shrimp *P. chinensis*

编号	引物序列(5'-3')	扩增的总条带数	可变条带数	不同种群扩增的条带数				多态百分率(%)
				烟台	长岛	青岛	宁波	
S1	GTTTCGCTCC	7	6	3	4	2	6	85.7
S3	CATCCCCCTG	6	4	4	5	3	2	66.7
S6	TGCTCTGCC	4	4	3	4	●	4	100
S10	CTGCTGGGAC	7	5	5	5	5	5	71.4
S11	GATGACCCGT	6	5	3	4	3	2	83.3
S24	AATCGGGCTG	7	3	7	5	7	5	42.9
S25	AGGGGTCTTG	7	4	4	2	5	3	57.1
S42	GGACCCAACC	5	2	3	3	4	5	40.0
S43	CTCCCCCTCA	5	3	4	3	4	5	60.0
总和		54	36	36	35	33	37	66.7
平均条带数		6	4	4.00	3.89	3.56	4.11	

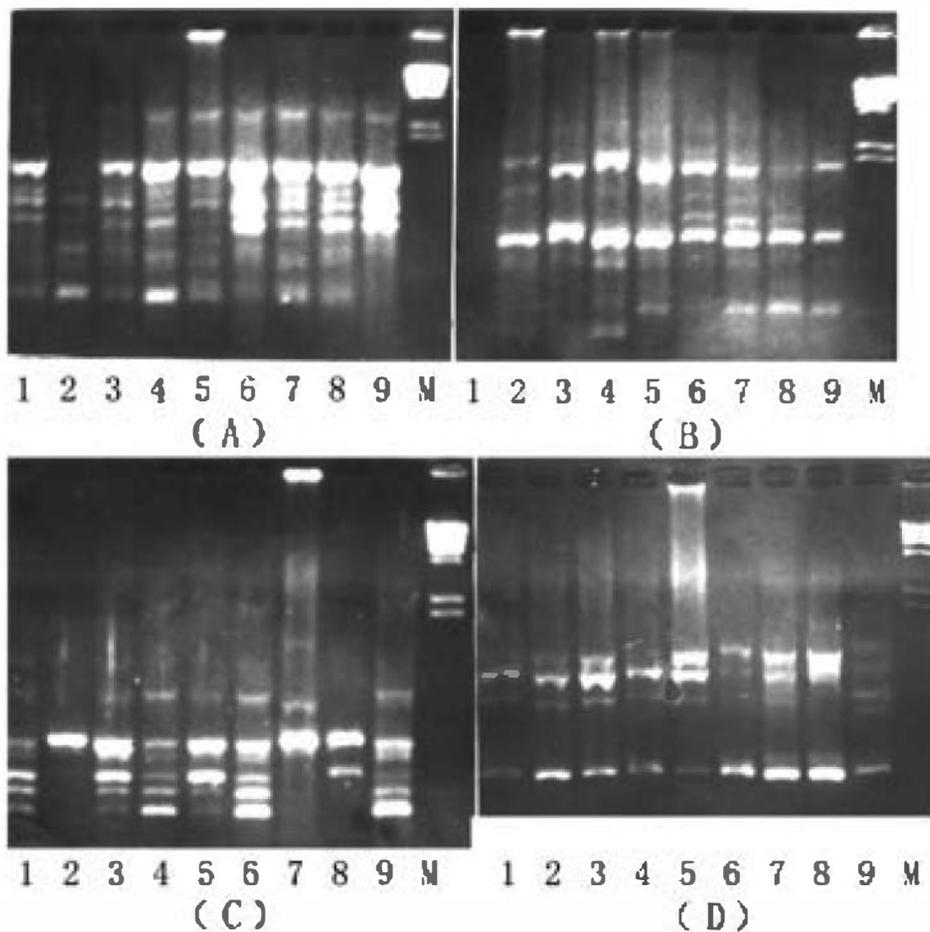


图 1 用引物 S24(A)、S25(B)、S42(C)、S43(D)扩增的不同种群中国对虾的 RAPD 图谱

Fig.1 RAPD patterns of different populations of *P. chinensis* using primers S24(A), S25(B), S42(C), and S43(D)

(A)、(C)、(D): 1-2, 长岛, 3-4, 烟台, 5-6, 青岛, 7-9, 宁波; (B): 1, 阴性对照, 2-3, 长岛, 4-5, 烟台, 6-7, 青岛, 8-9, 宁波; M: 分子量标记 λ DNA/HindIII。

0.9207),即种群间的遗传差异大于种群内的遗传差异。与其它种群相比,青岛种群内的遗传变异程度较大,其次是宁波种群,而烟台和长岛种群内的变异度较小。烟台与长岛、青岛、宁波种群间的遗传距离分别为 0.0793、0.1139、0.0880,长岛与青岛、宁波种群间的遗传距离为 0.1485、0.0988,青岛与宁波种群间的遗传距离为 0.1260。

2.3 分子系统树

根据种群间遗传距离应用 UPGMA 和 NJ 法构建的分子系统结果一致(图 2,3)。烟台与长岛种群遗传关系较近,首先聚在一起,其次是宁波和青岛种群。

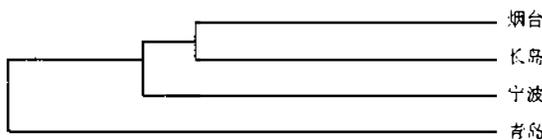


图 2 应用 UPGMA 法构建的分子系统树

Fig.2 Molecular phylogenetic tree constructed by the UPGMA method

表 2 中国对虾种群内和种群间的遗传相似系数/遗传距离
Tab.2 Intra-and inter-population fragments sharing/genetic distances of *P. chinensis*

	烟台	长岛	青岛	宁波
烟台	0.9846/0.0154			
长岛	0.9207/0.0793	0.9630/0.0370		
青岛	0.8861/0.1139	0.8515/0.1485	0.9538/0.0462	
宁波	0.9120/0.0880	0.9012/0.0988	0.8740/0.1260	0.9450/0.0550

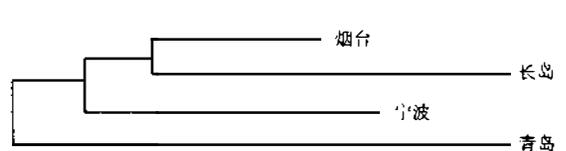


图 3 应用 NJ 法构建的分子系统树

Fig.3 Molecular phylogenetic tree constructed by the NJ method

3 讨论

20 世纪 70 年代以来,蛋白质、同工酶等生化遗传标记技术在鱼类、贝类、虾类种群遗传结构研究中得到广泛应用^[8-11]。Lester^[12]应用同工酶电泳技术研究了美国墨西哥湾褐对虾、白对虾和桃红对虾 3 种不同种群的遗传结构,Mulley 和 Latter^[13]则用同样的技术分析了澳大利亚产的 6 种新对虾和 7 种对虾的种群遗传结构,但结果均发现对虾种群遗传杂合度较低,用同工酶等生化标记较难把不同种群区分开来。

随着分子生物学技术的发展,以 RFLP(限制性片段长度多态性)为代表的第一代分子标记技术,使遗传变异的检测从传统的基因产物(蛋白质等)水平发展到直接检测 DNA 序列本身,灵敏度极高,但由于 RFLP 技术成本昂贵,通常需要同位素标记的 DNA 探针,操作较复杂,需经 Southern 印迹和分子杂交等过程,因此对于目前分子遗传背景不清及无 DNA 探针可言的中国对虾要建立种群分子标记,RFLP 技术的应用受到很大的限制,且费时费力,因此本研究选用新一代分子标记技术——RAPD 技术,不仅具有 RFLP 的优点,而且随机引物容易获得(市上可购),方法简便迅速,无需使用同位素,省去了分子杂交过程,适于进行更为广泛的遗传多态性分析,本研究结果表明,RAPD 技术对于缺乏 DNA 探针及杂合度低的对虾类特别适用。

应用 UPGMA 和 NJ 法进行聚类分析,构建的分子系统树基本一致(图 2,3),结果显示,我国近海不同海区中国对虾种群存在一定程度遗传分化,取自 3 个不同海区的 4 个地方的样品可分为 3 个组,与其样品来源的 3 个海区恰好相对应,取自渤海同一海区烟台、长岛两个不同地方样品之间的遗传距离较小,首先聚在一组,其次分别是东海海区的宁波种群和黄海海区的青岛种群。从地理位置来看,渤海与黄海相毗邻,而与东海相隔较远,因此,在理论上渤海种群与黄海种群遗传关系应该较近,而与东海种群较远,但本研究结果却与之相反,主要是由于东海的中国对虾自然分布较少,大多为人工放流后形成的群体,即来源于渤海或黄海,用于本研究的宁波样品为养殖种类,其亲本虽然为东海近海的海捕虾,但其

来源可能系从渤海海区通过人工移植至东海形成的群体后代,从而出现地理位置远的种群之间遗传关系反而较近的现象,这一研究结果与我们以前应用线粒体 DNA 16s rRNA 基因序列多态性分析的结果相一致。^[14]。

中国对虾是我国特有的珍贵海洋生物资源,在生理、生化、繁殖、养殖和倍性育种等方面研究均取得了很大进展,但对其种群遗传结构和系统演化等研究尚不见。近年来由于人为的过度捕捞、海洋生态环境的严重污染以及对虾流行疾病的蔓延,使得中国对虾资源面临种质衰退的危险。本研究结果表明,我国近海不同海区中国对虾种群间的遗传相似率较大(80%以上),如果人为的过度捕捞和生态环境的污染得不到有效控制,势必造成种群数量的下降,从而导致遗传多样性的进一步下降乃至丧失;另一方面也提醒我们在将来的中国对虾选择良种过程中,选择的有效群体数量必须足够大,避免遗传种质退化,同时可利用分子标记进行优良性状的选择,因此,研究种群分子标记,对于选择培育中国对虾优良养殖品系均具有重要意义。

实验样品采集得到青岛海洋大学水产学院董双林教授、卢敬让博士;烟台市水产学校韩茂森副教授;宁波大学水产学院徐善良老师的大力支持和协助,本校生物技术专业 1995 级本科生徐巧婷、方雄英参加部分实验工作,谨致谢忱。

参考文献:

- [1] Williams J G K, Kubelik A, Livak K, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22):6531 - 6535.
- [2] Welsh J, Petersen C, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22):7213 - 7218.
- [3] Garcia D K, Benzie J A H. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs [J]. *Aquac*, 1995, 130:137 - 144.
- [4] 宋林生, 相建海, 周岭华, 等. 六种海产虾类基因组 DNA 的 RAPD 标记研究[J]. *海洋与湖沼*, 1999, 30(1):62 - 67.
- [5] Nei M, Li W M. Mathematical model for studying genetic distance in terms of restriction endonuclease [J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 1979, 76(5):269 - 273.
- [6] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. *Mol Biol Evol*, 1990, 7:478 - 484.
- [7] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis, Version 1.01 [C]. *Pennsylvania State University Press*, 1993.
- [8] 邱高峰. 分析基因组 DNA 多态性的 RAPD 技术在水产生物技术研究中的应用前景[J]. *上海水产大学学报*, 1996, 5(2):101 - 106.
- [9] 邱高峰. 虾蟹类遗传育种学研究[J]. *水产学报*, 1998, 22(3):265 - 274.
- [10] Realford J A, Hedgecock D, Nelson K, et al. Low heterozygosities in tropical marine crustaceans of Australia and the trophic stability hypothesis [J]. *Mar Biol Lett*, 1981, 1:303 - 313.
- [11] Tam Y K, Chu K. Electrophoretic study on the phylogenetic relations of some species of *Penaeus* and *Metaplenacus* (Decapoda: Penaeidae) from the south China Sea [J]. *J Crust Biol*, 1993, 13(4):697 - 705.
- [12] Lester L J. Population genetics of penaeid shrimp from the Gulf of Mexico [J]. *J Heredity*, 1979, 70:175 - 180.
- [13] Mulley J C, Latser B. Genetic variation and evolutionary relationships within a group of thirteen species of penaeid prawns [J]. *Evolution*, 1980, 34:904 - 916.
- [14] 邱高峰, 常林瑞, 徐巧婷, 等. 中国对虾 16s rRNA 基因序列多态性的研究[J]. *动物学杂志*, 2000, 21(1):35 - 40.