

文章编号: 1674 - 5566(2010)06 - 0739 - 05

4 个不同世代凡纳滨对虾群体 AFLP 遗传多样性分析

王豪杰, 蔡生力, 叶斐菲, 刘 红

(上海海洋大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 201306)

摘 要: 利用 AFLP(amplified fragment length polymorphism) 技术对 4 个不同世代的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 群体进行遗传分析, 探讨亲本、 F_1 、 F_2 和 F_n 4 个世代群体间的遗传差异。选取 10 对 AFLP 引物组合对 4 个世代凡纳滨对虾群体共 80 尾个体进行比较分析, 共扩增出 483 个位点, 其中 348 个为多态位点; 4 个群体的多态位点比例为: 61.90%、49.28%、50.52%、46.38%; 4 个群体的 Shannon 多样性指数分别为: 0.313 4、0.262 1、0.259 4、0.226 2; 结果表明亲本与 F_1 、 F_2 与 F_n 相互间遗传距离更为紧密。通过对 4 个不同世代群体的遗传多样性研究, 为下一步进行杂交选育提供理论支持。

关键词: 凡纳滨对虾; AFLP; 遗传多样性; 世代

中图分类号: S 917 文献标识码: A

AFLP analysis on genetic diversity of four different generations of *Litopenaeus vannamei*

WANG Hao-jie, CAI Sheng-li, YE Fei-fei, LIU Hong

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aqua-cultural Ecosystem Certified by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The AFLP technique was used to analyze the genetic diversity of 4 different generation groups of *Litopenaeus vannamei*, which were primary parent, F_1 generation, F_2 generation and F_n generation. 10 pair AFLP selective primer scanned 20 samples from each generation and 483 loci were amplified, 348 loci were polymorphic loci. The proportions of polymorphic loci among the 4 generation samples were 61.90%, 49.28%, 50.52% and 46.38% respectively. The genetic diversities of the 4 different generations quantified by Shannon index were 0.313 4, 0.262 1, 0.259 4 and 0.226 2 respectively. The result shows that the genetic distance between primary parent and F_1 generation sample is closer than that between F_2 and F_n generation samples. The research of genetic diversity among 4 different generations could provide theoretical support for future study on hybrid selective breeding.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; AFLP; genetic diversity; different generation groups

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 又称南美白对虾, 原产于美洲太平洋沿岸水域, 1988 年

收稿日期: 2010-04-21

基金项目: 上海市教育委员会重点学科建设项目(J50701)

作者简介: 王豪杰(1985 -), 男, 硕士研究生, 专业方向为水产动物繁殖与发育生物学。E-mail: wanghaojie_8888@126.com

通讯作者: 刘 红, E-mail: hliu@shou.edu.cn

由中国科学院海洋研究所从美国夏威夷引进,是中国重要的水产养殖品种,但是近几年由于养殖规模不断扩大,对虾苗的需求量也日益增加,尤其是优质虾苗更是广大养殖者的热切期望。可是目前国内虾苗市场上鱼龙混杂,许多从业者为了降低成本,采用廉价亲虾培育苗种,导致凡纳滨对虾种质资源的不断退化,一些优良性状丢失,品质下降,病害频发^[1],给养殖户造成了重大的损失。近些年我国一些企业和从业者开始从美国等地引进经过选育的凡纳滨对虾亲虾,并且用引进亲虾所生产的子代为亲本进行再生产,在一定程度上改善了对虾苗种的供应情况,而随着在国内繁殖世代的增加,原有的优良性状是否能继续保持,成了相关科技人员和养殖生产者最为关心的问题^[2-4]。因此,有必要对引进品种的种质资源及引进后在国内繁殖的不同世代的对虾遗传品质进行分析研究,比较他们之间遗传多样性差异,从而为生产者选择优质亲虾资源、培育健康合格的虾苗提供参考依据。

AFLP (amplified fragment length polymorphism) 技术首先由荷兰科学家 Zabeau 等^[5]提出,随后 Vos 等^[6]对其进行发展。AFLP 技术具有信息量大、灵敏度高和多态性丰富等优点,可以利用少量引物检测到大量的有效位点进行分析^[7]。目前,应用 AFLP 技术已经构建中国对虾遗传图谱^[8-10],安丽等^[11]和颀晓勇等^[12]分别分析中国对虾不同世代间的遗传多样性和对 6 个不同群体的凡纳滨对虾进行遗传多样性分析,都证明了 AFLP 技术对群体间的遗传多样性是一种很有效的工具。本文主要利用 AFLP 技术对凡纳滨对虾 4 个不同世代群体进行遗传多样性探讨,目的是从分子水平上分析不同世代凡纳滨对虾的遗传变异情况,进一步了解凡纳滨对虾选育群体遗传结构,为下一步凡纳滨对虾的人工选育、种质资源保护和遗传改良提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

凡纳滨对虾 4 种样品来源分别为亲本(QB):于 2008 年采自海南文昌禄泰水产种苗基地引进的美国佛罗里达州迈阿密无特定病原凡纳滨对虾

(SPF) 原种,20 尾;F₁: 上述原种所生产的第一代凡纳滨对虾虾苗,于 2008 年采集;F₂: 以 F₁ 为亲虾所生产的第二代凡纳滨对虾虾苗,于 2009 年采集,20 尾;F_n: 于 2008 年采自广州湛江星一饲料厂选育的已在中国养殖多代的凡纳滨对虾(亲本来源混杂,至少三代以上)为亲本培育的子代,共 20 尾,总计 80 尾,于无水乙醇中固定保存。

1.2 AFLP 实验步骤

总 DNA 提取参考《分子克隆实验指南》^[13],取 50 mg 酒精固定的肌肉,剪碎,待酒精完全挥发后,用蛋白酶 K(20 mg/mL) 56 °C 消化过夜(约 12 h),酚-氯仿法提取总 DNA。AFLP 试验方法参照 VOS 等。选用 *EcoR* I 和 *Mse* I 限制性内切酶,内切酶购自 New England Biolab 公司。引物及接头序列由上海捷瑞生物工程有限公司合成,连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司,选择性扩增使用了 8 种 *EcoR* I 引物和 8 种 *Mse* I 引物共 64 个引物组合,根据预实验结果,从中筛选出重复性好、多态性高的 6 对引物组合进行正式扩增反应。扩增产物在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上进行 80 W 恒功率电泳。染色程序参考《分子克隆实验指南》银染方法。然后显色终止、漂洗、拍照、记录分析。

1.3 数据统计与分析

首先按电泳图谱中扩增条带的有无,每个 DNA 片段视为一个分子标记,在同一位点,当 AFLP 谱带存在时赋值为“1”,不存在时赋值为“0”,将整个分子标记图谱转化成“0”和“1”的数字矩阵。利用 POPGENE Version 1.31 软件^[14],计算多态位点百分率(PPL)、观察等位基因平均数(N_o)、有效等位基因数(N_e)、Nei's 基因多样性指数(H)、Shannon 信息指数(I_o)以及 Nei 的遗传距离(D)和遗传相似度(I)。

用 Arlequin 3.01^[15] 软件进行了样本间遗传变异的分子方差分析(AMOVA),并分析各采集样本的遗传分化指数 F_{ST} 。

用 MEGA 3.0 软件^[16]基于 Kimura 2-parameter 模型进行群体间、群体内遗传距离以及所有个体间的平均遗传距离的计算,并进行聚类分析,各分支结点上的数字均为 1 000 次重复检验(bootstrap test)得到的该结点的支持率。

2 结果

2.1 10对组合扩增结果引物

从每个群体中取部分样品模版 DNA,使用 64 对引物组合进行预扩增实验。然后,选择条带清晰、多态性高的 10 对引物组合 E-ACG/M-AAC、E-ACG/M-AAT、E-AGG/M-AAC、E-AGG/M-CAA、E-AGG/M-AAT、E-ATC/M-CAG、E-AAT/M-CGA、

E-AAG/M-AAC、E-AAG/M-CGA、E-AAG/M-AAT 进行扩增。

10 对引物在 80 尾凡纳滨对虾中共扩增出 483 条带。其中,多态性带为 348 条,多态比例为 72.05%。E-AGG/M-AAT 组合扩增出的条带最多,64 条,并且多态性条带也最多,为 49 条。

4 代凡纳滨对虾群体中没有发现特异性标记带。

表 1 10 对 AFLP 引物组合的检测结果

Tab.1 Amplification results of ten AFLP primer combination sets

引物组合	总带数	多态性条带数	多态性百分数(%)
E-ACG/M-AAC	49	38	77.55
E-ACG/M-AAT	29	20	68.97
E-AGG/M-AAC	36	20	55.56
E-AGG/M-CAA	55	44	80.00
E-AGG/M-AAT	64	49	76.56
E-ATC/M-CAG	54	39	72.22
E-AAT/M-CGA	42	29	69.05
E-AAG/M-AAC	54	43	79.63
E-AAG/M-CGA	62	46	74.19
E-AAG/M-AAT	38	20	52.63
合计	483	348	72.05

2.2 4个群体的遗传多样性

通过 10 对 AFLP 引物扩增图谱分析,得到凡纳滨对虾 4 个群体的遗传多样性指数(见表 2)。多态位点百分数 $QB(61.90\%) > F_2(50.52\%) > F_1(49.28\%) > F_n(46.38\%)$ 。平均多样性指数 $QB(0.2093) > F_1(0.1768) > F_2(0.1730) > F_n(0.1496)$ 。Shannon 多样性指数为 $QB(0.3134) > F_1(0.2621) > F_2(0.2594) > F_n(0.2262)$ 。

表 2 凡纳滨对虾 4 个群体的遗传多样性

Tab.2 Genetic diversity of the four *L. vannamei* stocks

种类	多态位点百分数	平均基因多样性	Shannon 多样性指数
QB	61.90%	0.2093 ± 0.2012	0.3134 ± 0.2854
F ₁	49.28%	0.1768 ± 0.2055	0.2621 ± 0.2923
F ₂	50.52%	0.1730 ± 0.1988	0.2594 ± 0.2844
F _n	46.38%	0.1496 ± 0.1913	0.2262 ± 0.2748

2.3 4个群体间遗传相似性和遗传距离

根据 Nei 计算所得群体间遗传相似性系数和遗传距离,偏差校正后,不同群体间的遗传相似系数和遗传距离见表 3。

表 3 偏差校正后 Nei's 遗传相似系数(对角线上方)及遗传距离(对角线下方)

Tab.3 Nei's unbiased measures of genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) of the four *L. vannamei* stocks

	QB	F ₁	F ₂	F _n
QB	-	0.9387	0.9219	0.8860
F ₁	0.0632	-	0.9094	0.8827
F ₂	0.0813	0.0950	-	0.9492
F _n	0.1210	0.1248	0.0521	-

2.4 4个群体间的遗传分化

分子方差分析(AMOVA)结果表明,群体间方差占总方差的 25.47%,而群体内方差占总方差的 74.53%(表 4)。

表 4 凡纳滨对虾 4 个种群群体间遗传差异的分子方差分析

Tab.4 Analysis of molecular variance (AMOVA) in four *L. vannamei* stocks

变异来源	自由度	平方和	变异组分	方差比例/%
群体间	3	1 009.088	14.6715	25.47
群体内	76	3 262.850	42.9322	74.53
总变异	79	4 271.938	57.6037	

2.5 UPGMA 树

依据遗传距离,对 4 个凡纳滨对虾群体的 AFLP 数据构建 UPGMA 系统树更为直观清晰地表明, QB 与 F_1 为一支, F_2 与 F_n 为另一支(图 1)。

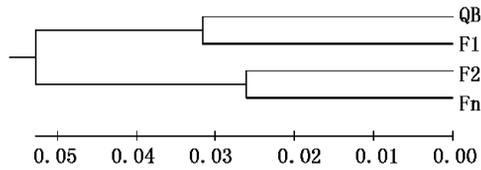


图 1 凡纳滨对虾 4 个群体的 UPGMA 树

Fig. 1 UPGMA tree of the *L. vannamei* stocks

3 讨论

凡纳滨对虾引进中国试养成功后,已成为我国海水养殖中重要的增养殖品种。目前引进的一些经过选育的凡纳滨对虾优良品系主要来自美国。市场上供应的虾苗主要有进口亲虾繁育的虾苗,简称 F_1 或者一代苗,这类虾苗的特点是:生长快,个体大小齐,但成本高,而且成活率偏低^[17],本实验室张俊^[18]用与此实验同一批凡纳滨对虾养殖得出相同的结论;另一类是由 F_1 为亲本所生产的虾苗,简称 F_2 或二代苗,亲虾成本较低,来源广泛,因此苗种产量比较大,价格要比 F_1 低很多;还有一种就是在我国已养殖多代,来源混杂的亲虾所培育的虾苗,简称 F_n ,这类虾苗由于国内养殖多代,近亲繁殖严重,一些优良性状已逐渐失去,导致生长缓慢,大小不齐,发病率高。国内虽然已有不少科研院所已着手进行凡纳滨对虾的选育工作,但迄今为止尚未真正成功培育出凡纳滨对虾成熟品系,多数厂家为改善虾苗品质仍然依赖进口。

采用 AFLP 技术对不同世代凡纳滨对虾遗传多样性进行研究的文献之前报道较少。本文利用 AFLP 技术对凡纳滨对虾 4 个不同世代群体进行遗传多样性分析,发现平均基因多样性指数不同群体间大小顺序为 $QB > F_1 > F_2 > F_n$, Shannon 多样性指数大小顺序和平均多样性指数相同。平均基因多样性指数和 Shannon 多样性指数随着世代的增加而降低,表明凡纳滨对虾养殖群体随着世代的增加,遗传多样性逐渐降低,这一结果支持了童馨等^[19]2009 年所得的研究结果。除多态位点百数顺序略有差异外,本研究中, QB 与

F_1 、 F_2 、 F_n 的遗传相似系数(0.886 0 ~ 0.938 7),随着世代的增加而降低;遗传距离(0.063 2 ~ 0.121 0)随着世代的增加而增加,具明显的规律性,与 Patricia 等^[20]、李峰等^[21]、颀晓勇等^[12] 相关研究结果相似。从图 1 中可以看出亲本与 F_1 、 F_2 与 F_n 的相互遗传关系更为接近, F_1 虾苗在我国并没有出现很大遗传变异,还保留着进口亲代的优良基因,但是随着世代的增加,特别是由 F_1 作为亲虾所培育的 F_2 ,其遗传变异程度比较大,有着明显的分界线。

在 AMOVA 分析中发现,相对于 4 个群体间的遗传变异(25.47%),群体内的变异更大,为 74.53%(表 4),表明同一采样群体遗传差异主要来自群体内部,童馨等^[19]的研究结果也有类似现象。不同世代的群体内或群体间的变异都会导致引进 SPF 亲虾原有优良性状的丢失。我国目前尚未经过多代选育,遗传变异相对稳定的凡纳滨对虾优良品系,所以亲虾来源受制于美国等国家,这对我国这样的对虾主要养殖国相当不利,亟待解决。

姚雪梅等^[22]在对凡纳滨对虾 F_1 、 F_2 生长存活比较中发现, F_1 的生长速度明显快于 F_2 ,但是成活率明显小于 F_2 ,张俊^[18]在对 F_1 、 F_2 、 F_n 3 个世代凡纳滨对虾养殖效果发现,在温度、盐度突变的条件下, F_n 组比 F_1 及 F_2 组表现出较强的耐受性。这说明虽然进口群体具有生长快,周期短等特点,但是还需要一个本地化的过程才能在我国展现出养殖的优势。如何让进口群体本地化并且保持原有的优良性状,是摆在我们面前的一个难题。现代杂交优势理论认为:杂交优势的大小在一定程度取决于亲本间遗传差异的大小,遗传距离愈大所产生的杂交优势愈大。所以可选择遗传距离较大而又具有良好性状的凡纳滨对虾进行杂交实验,并评估最优杂交组合,培养优良新品种。姚雪梅等^[23]以引进 SPF 凡纳滨对虾群体建立自交系 F_1 和 F_2 ,并与海南经过若干代养殖后选育的健康凡纳滨对虾建立杂交系发现,凡纳滨对虾杂交代具有生长快和存活率高等优势。为了让我国凡纳滨对虾养殖业走可持续发展的道路,不被国外一些种虾企业对我国亲虾市场的垄断,我们必须培养不仅具有适应我国养殖环境,又具有原种优良性状的凡纳滨对虾,杂交选育技术是未来解决我国优质亲虾资源不足的

途径之一。

参考文献:

- [1] Briggs M, Funge S S, Subasinghe R, *et al.* Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific [M] // Briggs M. Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific. Bangkok: RAP Publication, 2004: 1 - 120.
- [2] 李峰, 林继辉, 刘楚吾. 凡纳滨对虾引进亲虾及其子一代的遗传多样性研究 [J]. 海洋科学, 2006, 30(9): 63 - 68.
- [3] 王武, 黄凯. 南美白对虾国外养殖发展概况及我国养殖现状、存在的问题与对策 [J]. 内陆水产, 2002, 8: 41 - 43.
- [4] 张留所, 相建海. 凡纳滨对虾微卫星位点在两个选育家系中遗传的初步研究 [J]. 遗传, 2005, 27(6): 919 - 924.
- [5] Zabeau M, Vos P. Elective restriction fragment amplication: a general method for DNA fingerprinting [P]. Eur Patent application Number. 92402629, 1993207.
- [6] Vos P, Hoger S R, Bleeker M, *et al.* AFLP a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4407 - 4414.
- [7] 岳志芹, 王继伟, 孔杰, 等. 用 AFLP 方法分析中国对虾抗病选育群体的遗传变异 [J]. 水产学报, 2005, 29(1): 13 - 19.
- [8] 岳志芹, 王伟继, 孔杰, 等. AFLP 分子标记构建中国对虾遗传连锁图谱的初步研究 [J]. 高技术通讯, 2004, (4): 88 - 93.
- [9] 田蕊, 孔杰, 王继伟. 中国对虾遗传连锁图谱的构建 [J]. 科学通报, 2008, 53(5): 544 - 555.
- [10] 李健, 刘萍, 王清印. 中国对虾遗传连锁图谱的构建 [J]. 水产学报, 2008, 32(2): 161 - 173.
- [11] 安丽, 刘萍, 李健, 等. “黄海 1 号”中国对虾不同世代间的 AFLP 分析 [J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(6): 921 - 926.
- [12] 颜晓勇, 苏天凤, 陈文, 等. 凡纳滨对虾 6 个养殖群体遗传多样性的比较分析 [J]. 南方水产, 2008, 4(6): 42 - 49.
- [13] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社. 2002.
- [14] Yeh J C, Yang R, Boyle T. POPGENE version 1.31: Microsoft window-based freeware for population genetic analysis [P]. Edmonton: University of Alberta, 1999.
- [15] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin: a software for population genetics data analysis. Vers. 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology [M]. Univ. of Geneva. 2000.
- [16] Kumar S, Tamura K, Neim. MEGA3: Integrated soft-ware for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment briefings [J]. Bioinformatics, 2004, 5: 150 - 163.
- [17] Argue B J, Arce S M, Lotz J M, *et al.* Selective breed-ing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus [J]. Aquaculture, 2002, 204(3 - 4): 447 - 460.
- [18] 张俊. 不同亲本来源凡纳滨对虾子代养殖效果的比较 [D]. 上海: 上海海洋大学. 2009.
- [19] 童馨, 龚世圆, 喻达辉, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 不同世代养殖群体的遗传多样性分析 [J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(2): 214 - 220.
- [20] Patricia D D F, Pedrom G J. Assessment of the genetic diversity in five generations of a commercial broodstock line of *Litopenaeus vannamei* shrimp [J]. African J Biotechnol, 2005, 4(12): 1362 - 1367.
- [21] 李峰, 刘楚吾, 黄雅丽. 凡纳滨对虾引进亲本及其子代 RFLP 分析 [J]. 海洋通报. 2005, 24(1): 31 - 34.
- [22] 姚雪梅, 黄勃, 张继涛. SPF 凡纳滨对虾 F₁ 代、F₂ 代养殖性状比较研究 [J]. 水产科学, 2007, 26(1): 39 - 41.
- [23] 姚雪梅, 黄勃, 张继涛, 等. SPF 凡纳滨对虾 F₁、F₂ 及杂交代生长和存活比较研究 [J]. 中国水产科学, 2007, 14(2): 326 - 330.