

文章编号: 1000-0615(2004)03-0245-05

中国对虾 5 个地理群体的 RAPD 分析

马春艳^{1,2}, 孔杰¹, 孟宪红¹, 刘萍¹, 张秀梅²

(1. 中国水产科学院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 采用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术对取自辽东湾、渤海湾、海州湾、乳山湾及海洋岛 5 个群体的中国对虾共 95 个个体的遗传多样性进行分析。14 个随机引物共检测出 103 个位点 (200~2500bp), 各群体的多态位点比例在 31.07%~34.95% 之间。遗传距离显示中国对虾群体间有一定遗传分化, 其中辽东湾和乳山湾群体间的遗传距离最大 (0.0742), 而辽东湾和渤海湾群体间的遗传距离最小 (为 0.0243), 群体间的遗传分化系数为 0.2083。整体来看, 中国对虾的遗传变异水平较低, 遗传多态度为 0.1621。用 UPGMA 对 5 个群体进行聚类分析, 构建谱系关系图。

关键词: 中国对虾; 地理群体; 随机扩增多态 DNA; 遗传多样性

中图分类号: S917 文献标识码: A

RAPD analysis of five geographic stocks of *Fenneropenaeus chinensis*

MA Chun-yan^{1,2}, KONG Jie¹, MENG Xian-hong¹, LIU Ping¹, ZHANG Xiu-mei²

(1. Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Fishery College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract RAPD (random amplified polymorphic DNA) was employed to detect the genetic variation of *Fenneropenaeus chinensis*. Samples were collected from Liaodong Bay, Bohai Bay, Haizhou Bay, Rushan Bay and Haiyangdao). Fourteen 10bp RAPD primers were used for DNA amplification and 19 samples of each stock were analysed. Totally 103 markers were detected in a range of 200–2500bp. Percentage of polymorphic loci of each stock was from 31.07% to 34.95% and genetic diversity was from 0.1056 to 0.1192. Genetic distance between stocks was from 0.0243 to 0.0742 and the index of genetic diversity of the stock was 0.2083, which indicated that stocks differentiated from each other genetically. Clustering of the stocks was analysed by UPGMA. The RAPD revealed that the overall genetic diversity of *F. chinensis* was low.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; geographic stock; random amplified polymorphic DNA (RAPD); genetic diversity

中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 是我国重要的经济虾类和海水增养殖种类, 主要分布在我国黄渤海海域, 分两个地理群, 即黄渤海沿岸群和朝鲜

半岛西海岸群, 我国黄渤海沿岸的中国对虾产卵场和索饵场分布甚广, 北及鸭绿江口环渤海沿岸南至海州湾, 产卵场和索饵场的物理、营养环境差异较

收稿日期: 2003-01-28

资助项目: 国家“863”计划资助项目 (2001AA621050) 和国家 973 资助项目 (G1999012007)

作者简介: 马春艳 (1978 -), 女, 山东德州人, 硕士研究生, 主要从事分子遗传学研究。

通讯作者: 孔杰 (1963 -), 男, 山东高密人, 研究员, 博士生导师, E-mail: kongjie@sina.com

大^[1]。

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方面^[1,2],关于其遗传背景的研究始于 20 世纪 80 年代,同工酶^[3]、RAPD^[4,5]等技术被应用于其遗传多样性的研究,并取得了一定的进展,但相比之下,我国对中国对虾遗传背景还缺乏深入的了解,因此,有必要对中国对虾的遗传多样性进行进一步的研究。RAPD 技术具有简便、快速、灵敏度高等特点,被广泛应用于多种动植物的系统进化、种质鉴定、群体遗传变异分析、目标性状的分子标记以及遗传

图谱的快速构建等领域^[6]。因此,本研究采用 RAPD 技术对取自辽东湾、渤海湾、海州湾、乳山湾以及海洋岛 5 个海区的中国对虾样品的遗传多样性进行检测,以期查明不同产卵场的虾群之间存在多大的遗传差异,从而对中国对虾种质资源的保护和开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

中国对虾野生群体样品取样资料见表 1。样品采集后,低温运回实验室后于-70℃保存。

表 1 用于遗传分析的中国对虾野生群体

Tab. 1 Details of shrimp sampled

群体 stock	采样地点 sampling site	采样时间 sampling time	样本量(尾) sample size
辽东湾群体 Liaodong Bay stock(LD)	营口 Yingkou(123°E, 40.5°N)	2001-07	19
渤海湾群体 Bohai Bay stock(BH)	天津 Tianjing(118°E, 38.5°N)	2001-07	19
海州湾群体 Haizhou Bay stock(HZ)	日照 Rizhao(120°E, 35°N)	2001-09	19
乳山湾群体 Rushan Bay stock(RS)	乳山湾 Rushan(122°E, 37°N)	2001-08	19
海洋岛群体 Haiyangdao stock(HYD)	海洋岛 Haiyangdao(123°E, 39.5°N)	2001-08	19

1.2 方法

模板 DNA 的制备 基因组 DNA 的提取参照《分子克隆实验指南》^[7]的方法,并有所改进。主要过程为:取对虾肌肉组织适量放入 1.5mL 的离心管中,加入 450μL 的 TE 缓冲液(10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH8.0, 100 mmol·L⁻¹ EDTA), 剪碎,再加入终浓度分别为 0.5% 的 SDS 和 200ng·μL⁻¹ 的蛋白酶 K。上述混合物于 55℃ 消化 2h 左右至溶液澄清透明后,加入 1μL 的 RNA 酶于 37℃ 消化 30min, 消化物经酚/氯仿抽提,酒精沉淀。提取的 DNA 经 70% 的乙醇洗涤,室温干燥后,溶于适量 ddH₂O 中。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。

RAPD 反应条件 RAPD 反应总体积为 25μL,其中包括 10×PCR 反应缓冲液 2.5μL(成分:100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 500 mmol·L⁻¹ KCl, 2.0 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 1.3mg·mL⁻¹ BSA, 0.01% Gelatin, pH 8.4);基因组 DNA(10μg·mL⁻¹) 2μL; Taq 酶(Promega, 5u·μL⁻¹) 0.2μL; dNTP(各 2.5 mmol·L⁻¹) 1μL; RAPD 引物(10μmol·L⁻¹) 1μL;用 ddH₂O 补足体积。PCR 反应在 PTC-200 扩增仪上进行,94℃ 预变性 7min 后进行 45 个循环,每个循环包括 94℃ 1min、37℃ 1min、72℃ 2min,最后于 72℃ 延伸 10min。反应结束后,4℃ 保存。每次反应

均设不含模板的空白对照。

电泳检测 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色,经凝胶成像系统(Gel Doc 1000)观察记录。

数据分析 根据观察结果,扩增条带有且清晰记为 1,否则记为 0,构建原始数据表征矩阵,并据此统计位点总数和多态位点比例,分析和计算遗传多态度和遗传距离。其中:多态位点比例 $P = n_p / n_t \times 100\%$ (n_p 多态位点数, n_t 总位点数) 遗传相似度(I)和遗传距离(D)根据 Nei^[8]的公式计算:

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

(N_x 和 N_y 分别为群体 x 和 y 的扩增多态 DNA 片段数; N_{xy} 为两群体间相同的片段数), $D = 1 - I$

群体的遗传多态度(H)根据香农多样性指数计算:

$$H = - \sum X_i \ln X_i \quad (X_i \text{ 为第 } i \text{ 个等位基因的频率})$$

聚类分析及群体分化系数(G_{st})的计算均由 POPGENE 软件完成, N_m 值根据公式 $N_m = 0.5(1 - G_{st}) / G_{st}$ (N_m 为参与群体繁殖的有效群体数, m 为迁移率)计算。

2 结果

筛选的 14 个 10bp 的寡核苷酸随机引物均得到重复性好且带型清晰的扩增谱带(表 2)。共产

生 103 个位点, 其分子量在 200~ 2500bp 之间(图 1), 其中 45 个表现为多态, 多态位点比例为 43. 69%, 遗传多态度为 0. 1621。各群体的多态位点数为 32~ 36 个不等, 多态位点比例为 31. 07%~ 34. 95%, 遗传多态度为 0. 1056~ 0. 1192(表 3), 群体间的遗传距离和遗传相似度如表 4 所示, 遗传距离最大值表现在乳山湾和辽东湾群体之间, 最小在辽东湾和渤海湾之间。

表 2 随机引物编号及序列

Tab. 2 Random primers and their sequences

引物 primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')	引物 primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')
S261	CTCAGTGTCC	S271	CTGATGCCGTG
S262	ACCCCGCCAA	S272	TGGCAGAAG
S263	GTCGGAGTG	S273	CACAGCGACA
S264	CAGAAGCGGA	S275	ACA CCGGAAC
S266	AGGCCGATG	S277	GTCCTGGGTT
S267	CTGGACGTC	S278	TTCAGGCAC
S269	GTGACCGAGT	S279	CA AAGCGCTC

根据遗传距离指数, 用非加权的组平均法(UPGMA)进行聚类分析, 构建谱系关系图(图 2)。通过聚类分析图可以看出: 辽东湾群体和渤海湾群体遗传距离最近, 首先聚到一起, 二者然后与海州湾群体聚类, 再与乳山湾群体相聚, 海洋岛群体与以上四个群体之间产生的遗传分化最大, 最后与它们聚在一起。计算 5 个地理群体间的遗传分化系数 G_{st} 和 N_m 值。5 个群体两两之间的 G_{st} 和 N_m 值分别在 0. 0839~ 0. 2247 和 1. 7264~ 5. 4559(表 5)。

3 讨论

生物群体的遗传多样性是评价生物资源状况的一个重要依据, 它是物种适应多变的环境条件、维持长期生存和进化的遗传基础。目前检测水产种质资源遗传多样性的手段主要有同工酶电泳技术和分子遗传标记技术。同工酶电泳技术是对不同基因位点或等位基因编码的蛋白质或多肽的多样性进行检测, 所分析的仅仅是整个基因组相当少的一部分, 在很大程度上低估了整个基因组的遗传变异水平; 而 RAPD 技术直接从基因的分子水平出发, 可以覆盖整个 DNA 分子, 其揭示的多态性位点也远高于同工酶技术。Garcia 等^[9] 采用同工酶电泳和 RAPD 技术检测美洲白对虾(*P. vannamei*) 的一个野生种群及多个家系表明, 同工酶电泳技术所

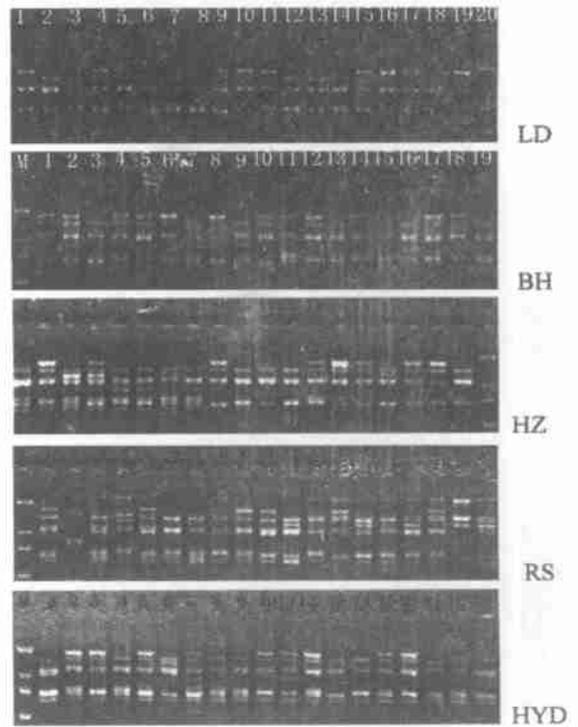


图 1 引物 S266 对 5 个群体的扩增结果

Fig. 1 Amplification of genomic DNA from five stocks of *F. chinensis* with primer S266

揭示的多态位点比例(7%~ 17%)仅为 RAPD 技术检测结果(39%~ 77%)的 20% 左右。刘旭东^[10] 分析了中国对虾黄渤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%, 本实验应用 RAPD 技术, 选用 14 个随机引物共检测到 103 个位点, 多态性为 31. 07%~ 34. 95%, 可见, 利用 RAPD 技术对虾类基因组进行研究, 可以检测到较为丰富的遗传变异。

20 世纪 80 年代以来, 中国在大力发展中国对虾池塘养殖业的同时, 开始进行大规模的人工放流, 对野生群体进行补充, 这些人因因素对野生群体的遗传多样性的影响早已引起许多学者的关注。刘旭东^[10]、Wang 等^[3] 利用同工酶电泳技术, 石拓^[4]、刘萍^[5, 11]、宋林生^[12] 等采用 RAPD 技术对其遗传多样性进行调查, 不同方法和学者的研究结果均表明, 中国对虾遗传多样性水平低于无脊椎动物的平均水平。中国对虾 5 个地理群体间的 RAPD 分析结果也印证了上述结论, 同时也佐证了 Mulley 等^[13] 所做的推论, 即连续分布的且在不同生活史阶段所处的栖息地环境变化幅度较大的种类往往表现出较低的遗传多态性。

表 3 中国对虾 5 个群体的 RAPD 标记分析

Tab. 3 The results of RAPD in five stocks of *F. chinensis*

群体 stock	扩增谱带总数 no. of amplified bands	多态谱带数 no. of polymorphic bands	多态座位比例(%) percentage of polymorphic bands	遗传多态度 genetic diversity
LD	101	32	31.07	0.1056
BH	100	36	34.95	0.1166
HZ	99	34	33.01	0.1192
RS	101	33	32.04	0.1142
HYD	99	33	32.04	0.1062

表 4 遗传距离与遗传相似度

Tab. 4 Genetic distance and genetic similarity

群体 stock	LD	BH	HZ	RS	HYD
LD		0.9760	0.9677	0.9285	0.9431
BH	0.0243		0.9755	0.9524	0.9576
HZ	0.0329	0.0248		0.9575	0.9654
RS	0.0742	0.0488	0.0434		0.9604
HYD	0.0585	0.0433	0.0352	0.0404	

注: 上三角为相似性指数, 下三角为遗传距离

Notes: up-triangle means genetic identification, down-triangle means genetic distance

表 5 中国对虾 5 个地理各体间的遗传分化值

Tab. 5 The genetic difference value in five geographic stocks of *F. chinensis*

群体 stock	LD	BH	HZ	RS	HYD
LD		0.0876	0.1133	0.2247	0.1935
BH	5.2085		0.0839	0.1544	0.1446
HZ	3.9142	5.4559		0.1385	0.1200
RS	1.7264	2.7376	3.1108		0.1380
HYD	2.0836	2.9580	3.6669	3.1242	

注: 上三角为 Q_{st} 值, 下三角为 N_m 值

Notes: up-triangle means Q_{st} , down-triangle means N_m

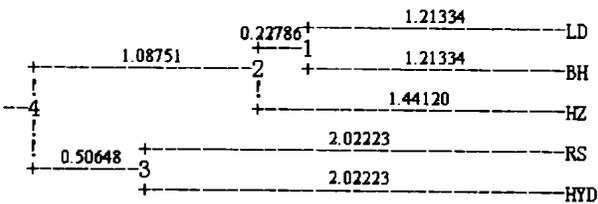


图 2 中国对虾 5 个群体的 UPGMA 聚类谱系

Fig. 2 Clustering pedigree by UPGMA of five stocks of *F. chinensis*

试验用中国对虾样品取样地点北自辽东湾, 南至海州湾, 5 个群体之间的遗传距离最大在辽东湾和乳山湾群体间, 为 0.0742; 最小在辽东湾和渤海湾群体间, 为 0.0243, 遗传距离显示中国对虾群体间有一定遗传分化。 N_m 分析结果显示: 渤海湾与辽东湾和海州湾群体间的 N_m 值大于 5, 有一定的遗传分化; 其余的 N_m 值在 1~5 范围内, 群体间发生了重大分化。 由此结果可以认为, 由于地理位置和生活海区的营养和物理状况等原因, 中国对虾 5 个群体之间有不同程度的遗传分化。

参考文献:

- [1] Deng J Y, Ye C C, Liu Y Y. *Penaeus chinensis* in the Bohai and Yellow Seas: its biology and management [M]. Beijing: Ocean Press, 1990. 36- 40. [邓景耀, 叶昌臣, 刘永昌. 渤海湾的对虾及其资源管理[M]. 北京: 海洋出版社, 1990. 36- 40.]
- [2] Liu R Y. *Penaeoid shrimp of north China* [M]. Beijing: Science Press, 1955. 36- 39. [刘瑞玉. 中国北部的经济虾类[M]. 北京: 科学出版社, 1955. 36- 39.]
- [3] Wang W J, Kong J, Bao Z M, et al. Genetic variation in *Penaeus chinensis* shrimp by isozyme analysis[J]. Chinese Biodiversity, 2001, 9(3): 241- 246.
- [4] Shi T, Kong J, Liu P, et al. Genetic diversity analysis on *Penaeus chinensis* by RAPD the DNA polymorphism of western coastal population of Korean peninsula [J]. Oceanol et Limnol Sin, 1999, 30(6): 609- 615. [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[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 609- 615.]
- [5] 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 [J]. Acta Oceanologica sinica, 2000, 22(5): 86- 93. [刘萍, 孔杰, 石拓, 等. 中国对虾黄、渤海

- 沿岸地理群的 RAPD 分析[J]. 海洋学报, 2000, 22(5): 86-93.]
- [6] Qiu F, Fu J M, Jin M D, *et al.* The molecular detection of genetic diversity[J]. Genetic biodiversity, 1998, 6(2): 143-150. [邱 芳, 伏建民, 金德敏, 等. 遗传多样性的分子检测生物多样性[J]. 生物多样性, 1998, 6(2): 143-150.]
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a Laboratory Manual[M]. Beijing: Science Press, 1996. 464-468. [萨姆布鲁克, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1996. 464-468.]
- [8] Nei M. The theory of genetic distance and evolution of human races [J]. Human Genetics, 1978, 23(4): 341-369
- [9] Garcia D K, Faggart M A, Rhoades L, *et al.* Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques [J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, 3(5): 270-280.
- [10] Liu X D. Study on the biochemical genetics of the *Penaeus chinensis* in the Huanghai and Bohai Seas and genetic markers of isozyme analysis of seven shrimp species [D]. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, 1995. [刘旭东. 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[D]. 中国科学院海洋研究所学位论文, 1995.]
- [11] Liu P, Kong J, Shi T, *et al.* RAPD analysis of genetic diversity in two Huang-bo Sea stock families of *Penaeus chinensis*[J]. Marine Fisheries Research, 2000, 21(1): 13-21. [刘 萍, 孔 杰, 石 拓, 等. 中国对虾黄渤海沿岸群亲本及子一代 RAPD 分析[J]. 海洋水产研究, 2000. 21(1): 13-21.]
- [12] Song L S, Xiang J H, Li C X, *et al.* Study of population genetic structure in *Penaeus japonicus* with RAPD markers[J]. Oceanol et Limnol Sin, 1999, 30(5): 261-266. [宋林生, 相建海, 李晨曦, 等. 日本对虾野生种群和养殖种群遗传结构的 RAPD 标记研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(5): 261-266.]
- [13] Mulley J C, Later B D H. Genetic variation and evolutionary relationships within a group of thirteen species of penaeid prawns [J]. Evolution, 1980, 34(5): 904-916.