

斑节对虾养殖群体遗传多样性的同工酶和 RAPD 分析

谭树华, 王桂忠, 艾春香, 林琼武, 李少菁, 管卫兵

(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:采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和 RAPD 方法对厦门养殖斑节对虾(*Penaeus monodon* Fabricius)群体的遗传多样性进行分析。9种同工酶共检测到21个座位, 其中多态座位13个, 多态座位比例为61.90%, 预期杂合度0.151, 观察杂合度0.120, Hardy-Weinberg 遗传偏离指数(d)为-0.208, 存在杂合子缺失。经 χ^2 拟合度检验, 多数座位偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 表明群体未达到随机交配。14个10 bp 引物共获得了83个标记, 单个引物获得的标记数为2~11个, 平均每个引物扩增出5.93个座位, 其中多态标记数68个, 多态位点比例为81.93%, 杂合度为0.246。基因多样性为0.260, Shannon's 信息指数为0.397。两种方法均表明该斑节对虾养殖群体的遗传多样性水平较高, 但可能已有近交衰退发生。

关键词:斑节对虾; 养殖群体; 同工酶; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: Q959.223 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)06-0702-06

斑节对虾(*Penaeus monodon* Fabricius)俗名草虾、花虾、黑虎虾、鬼虾, 是个体最大的对虾种, 广泛分布于印度洋和西太平洋的大部分海区, 从日本南部、韩国、菲律宾、印度尼西亚、澳大利亚、泰国、印度至非洲东部沿岸均有分布, 是世界上最主要的养殖对虾之一, 养殖面积和产量均位居世界前列^[1]。中国从南海到东海(北至浙江普陀山附近海区)也有分布, 以南海西北部水域(海南东部和南部水深30~60 m处)分布较多, 为中国南方沿海诸省的重要养殖对象^[2]。目前, 中国内地的亲虾大部分依靠从泰国、马来西亚等东南亚国家进口, 不仅来源困难, 价格昂贵, 而且容易带入病菌。同时, 养殖个体已出现了抗病力下降、个体偏小、病害频发等问题, 影响了对虾养殖业的持续健康发展。国际上对斑节对虾的群体遗传背景和育种工作开展较早, 对野生种群的地理分化和遗传分化、养殖群体的遗传多样性水平和近交衰退等均有较多研究^[1,3-6], 国内对其资源调查、病害、育苗和肝胰腺 cDNA 表达文库的构建等亦有报道^[7-10], 但有关斑节对虾野生和养殖群体的遗传多样性的研究很少, 仅见杜晓东等^[11]对三亚和泰国纳颌岛斑节对虾群体进行了生化遗传结构的分析。本研究采用同工酶和 RAPD 技术对亲本

来自马来西亚的斑节对虾养殖群体的遗传多样性进行分析, 以期亲本引进、人工育苗、种质资源的开发利用等工作提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

养殖斑节对虾来自厦门海沧对虾养殖场, 为子一代个体, 其亲本来源于马来西亚西部沿岸海域, 体重 (40.0 ± 5.5) g, 共40尾。所有个体均分两部分保存, 一部分取尾脊或腹部肌肉保存于95%乙醇中, 并置于4℃冰箱中保存, 用于RAPD分析; 另一部分取尾脊或腹部肌肉和肝胰腺, 保存于-80℃超低温冰箱备用, 用于同工酶分析。

1.2 实验方法

1.2.1 同工酶电泳 取出-80℃超低温冰箱的肝胰腺和肌肉样品, 在5倍0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 PBS(pH 7.0)中冰浴匀浆, 14 000 r/min 下, 4℃离心15 min, 肝胰腺样离心两次, 取上清液与甘油-溴酚蓝加样缓冲液混合, 立即电泳或-20℃保存, 24 h内电泳检测。电泳采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳, 使用的3种电极缓冲系统为: TG, Tris-甘氨酸, pH 8.3; EBT, EDTA-硼酸-Tris,

收稿日期: 2005-01-24; 修订日期: 2005-05-19。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30471322)。

作者简介: 谭树华(1972-), 男, 博士, 从事水产生物技术研究。现在湖南科技大学生命科学学院, 湖南 湘潭 411201。E-mail: hstao@126.com

通讯作者: 王桂忠。E-mail: gwzhang@xmu.edu.cn

pH 9.0; TC, Tris-柠檬酸 pH 8.0。除酯酶采用的分离胶和浓缩胶分别为 8.0% 和 3.0% 外,其余酶的分离胶和浓缩胶分别为 7.5% 和 2.5%,电泳条件、染色方法和酶谱识别参照熊全沫、吴鹤龄和王中仁的方法^[12-14]。

1.2.2 RAPD 分析 从 40 个个体中随机选取 24 个个体用于 RAPD 分析,基因组 DNA 的制备参考萨姆布鲁克的《分子克隆实验指南》^[15]。扩增反应条件参考 Williams^[16]并稍做修改,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 $MgCl_2$, 0.001% 明胶, 100 μ mol/L 的 dNTPs, 0.2 μ mol/L 引物, 25 ng DNA 模板, 1U TaqDNA 聚合酶。扩增程序设置为: 预变性 94 $^{\circ}C$ 5 min, 接着 35 个循环, 包括 94 $^{\circ}C$ 15 s, 36 $^{\circ}C$ 60 s, 72 $^{\circ}C$ 90 s; 最后一个循环后在 72 $^{\circ}C$ 延伸 7 min。PCR 扩增产物在 1.6% 琼脂糖凝胶上电泳, 在含 0.05% EB 的水溶液中染色半小时, 于凝胶成像系统上检测和拍照。

1.3 数据处理

同工酶的数据分析处理主要参考王中仁^[14]和徐成^[17]的方法,并对多态座位等位基因频率与 Hardy-Weinberg 平衡的 χ^2 拟合度进行检验。RAPD 扩增条带的记录参考汪小荃^[18]的方法。统计各样品的 RAPD 标记数, 计算清晰和稳定的谱带, 以 Shannon 信息指数、基因多样性、多态座位比率和杂合度来对群体遗传结构进行评价和分析。

2 结果与分析

2.1 同工酶电泳分析

在对 15 种同工酶进行了筛选的基础上, 选出在 3 种缓冲系统中稳定且清晰可辨的 9 种同工酶进行遗传结构分析(表 1)。另 5 种检测不出或酶带模糊的同工酶为山梨醇脱氢酶(SDH)、过氧化物酶(PER)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH)、异柠檬酸脱氢酶(IDH)和葡萄糖磷酸变化酶(PGM)。

表 1 分析的 9 种同工酶及其电泳系统
Tab.1 Nine isozymes analyzed and their electrophoretic system

酶名称 Iszyme	国际编号 Enzyme code	组织 Tissue	缓冲系统 Buffer
酯酶 EST	E.C.3.2.1.-	肝脏 Liver	TG
酸性磷酸酶 ACP	E.C.3.1.3.2	肝脏 Liver	TG
碱性磷酸酶 ALP	E.C.3.1.3.1	肝脏 Liver	TG
乳酸脱氢酶 LDH	E.C.1.1.1.27	肌肉 Muscle	TG
苹果酸脱氢酶 MDH	E.C.1.1.1.37	肌肉 Muscle	TC
苹果酸酶 ME	E.C.1.1.1.40	肌肉 Muscle	TC
乙醇脱氢酶 ADH	E.C.1.1.1.1	肝脏 Liver	EBT
超氧化物歧化酶 SOD	E.C.1.15.1.1	肌肉 Muscle	TG
谷氨酸脱氢酶 GDH	E.C.1.4.1.2	肌肉 Muscle	TG

实验得到的电泳图谱见图 1, EST、ADH 检测到的座位数分别为 5 个和 4 个, ACP、ALP、ME、MDH 和 SOD 检测到 2 个座位, 其中 ACP 和 ALP 的酶谱相同, LDH 和 GDH 检测到 1 个座位, 总共记录了 21 个座位, 其中多态座位 14 个(表 2), 多态座位比例为 61.90%, 群体的预期杂合度为 0.151, 观察杂

合度为 0.120, Hardy-Weinberg 遗传偏离指数(d)为 -0.208, 存在杂合子缺失。经 χ^2 拟合度检验, 除 Mdh-2 和 Me-2 与 Hardy-Weinberg 平衡相吻合外, 其他座位均 $P < 0.05$, 说明不符合 Hardy-Weinberg 平衡, 表明群体未达到随机交配。

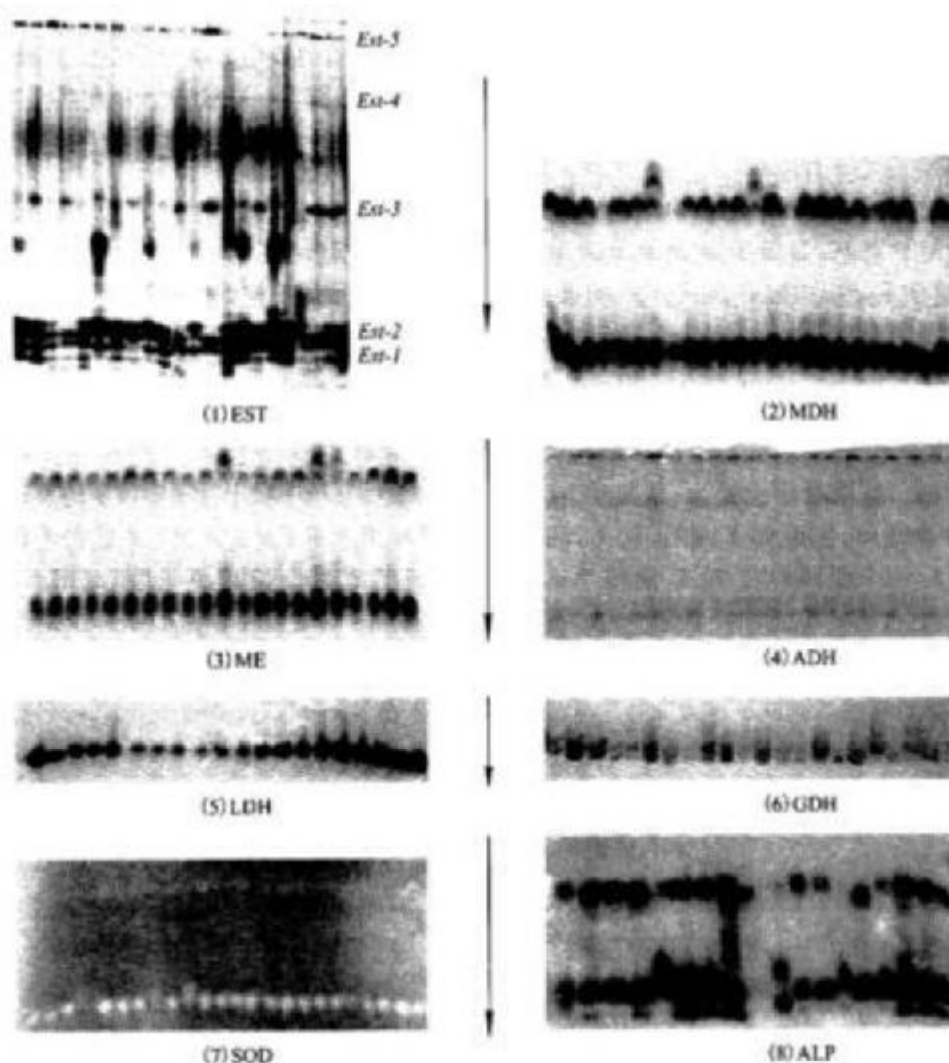


图1 斑节对虾同工酶的电泳图谱(箭头为阳极方向)

Fig.1 Electrophoretic patterns of isozymes in *Penaeus monodon* (Arrows show positive direction)

表2 养殖群体多态座位的等位基因频率

Tab.2 Allele frequencies at polymorphic loci in *Penaeus monodon* cultured stock

座位 Locus	等位基因 Allele	频率 Frequency	座位 Locus	等位基因 Allele	频率 Frequency
<i>Est-1</i>	a	0.250	<i>Acp-2 (Alp-2)</i>	c	0.031
	b	0.250		a	0.167
	c	0.500		b	0.833
<i>Est-2</i>	a	0.542	<i>Mdh-2</i>	a	0.958
	b	0.354		b	0.042
	c	0.104	<i>Me-2</i>	a	0.918
<i>Est-3</i>	a	0.875	<i>Sod-1</i>	b	0.082
	b	0.125		a	0.875
<i>Est-4</i>	a	0.917	<i>Gdh</i>	b	0.125
	b	0.083		a	0.542
<i>Acp-1 (Alp-1)</i>	a	0.415		b	0.458
	b	0.554			

2.2 RAPD 分析

用 40 个 10 bp 的寡核苷酸引物对 24 个个体的基因组进行扩增,共有 26 个引物产生了扩增条带。经多次扩增后选取重复性好的 14 个引物用于 RAPD 分析,共获得清晰的标记 83 个。单个引物获得的标记数为 2~11 个,平均每个引物扩增出 5.93 个标记。片段长度在 200~2 000 bp。除引物 BA0032 和 BA0166 在 24 个个体中分别扩增出分子

量相同的 2 条和 4 条带,表现为单态外,其余 12 个引物扩增得到的带型差异较大,获得的多态标记的比例为 40%~100%,其中有 5 个引物得到的多态座位比例为 100%,多态标记的显性频率范围为 0.021~0.799。83 个标记中共有多态标记数 68 个,多态位点比例为 81.93%(表 3)。群体杂合度为 0.246,Shannon 信息指数为 0.397,基因多样性为 0.260。部分引物的扩增图谱见图 2。

表 3 随机引物序列和 RAPD 检测的多态座位

Tab.3 List of sequences of arbitrary primers and polymorphic loci detected by RAPD technique

引物号 Primer	序列 5'-3' Sequence	标记总数 Nos. of markers	多态标记数 Nos. of polymorphism markers	多态座位频率 Frequency of polymorphism locus
BA0025	AGGGGTCTTG	8	7	0.875
BA0032	TCGGCGATAG	2	0	0.000
BA0163	CAGAAGCCCA	9	7	0.778
BA0164	CAGAAGCCCA	5	2	0.400
BA0166	CCGCCTAGTC	4	0	0.000
BA0168	TTTGCCCGGT	5	5	1.000
BA0170	ACAACGCGAG	5	5	1.000
BA0172	AGAGGGCACA	6	6	1.000
BA0173	CTGGGGCTGA	5	5	1.000
BA0174	TGACGGCGGT	7	6	0.857
BA0175	TCATCCGAGG	11	10	0.910
BA0176	TCTCCGCCCT	8	8	1.000
BA0177	GGTGGTGATG	4	4	1.000
BA0178	TGCCAGCCT	4	3	0.750

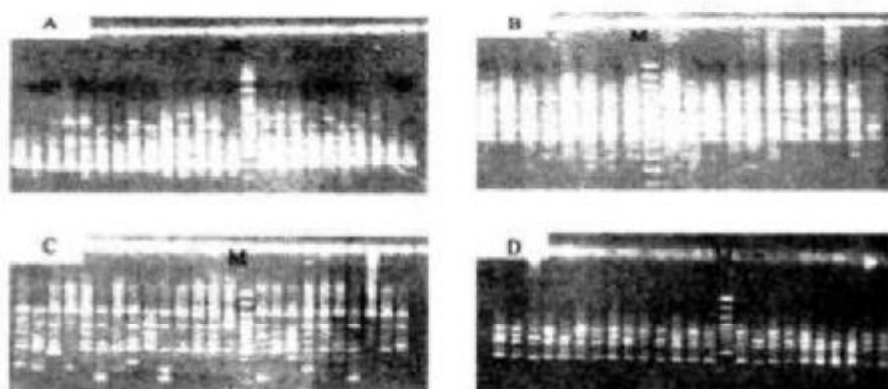


图 2 用引物 BA0178(A)、BA0176(B)、BA0175(C)、BA0174(D)扩增斑节对虾的 RAPD 图谱

M: 分子量标准

Fig.2 Electrophoresis pattern of RAPD in *P. monodon* using primers BA0178(A), BA0176(B), BA0175(C) and BA0174(D)

M: 100 bp DNA ladder marker

3 讨论

同工酶检测的对虾种群群体遗传变异水平一般较低,而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。已有的研究报告表明:斑节对虾、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)养殖群体同工酶检测的多态座位比例为0.167—0.387(平均0.277),观察杂合度 H_o 为0.011—0.118(平均为0.043)^[1]。庄志猛等^[19]对福建沿海日本囊对虾野生和养殖群体的遗传变异研究表明,野生和养殖群体的多态座位比例为18.2%和4.5%,杂合性分别为0.009 1和0.001 5,均表现为很低的水平,认为过度捕捞和海水养殖是造成野生群体遗传多样性水平降低的主要原因。李健等^[20]对中国对虾人工选育子一代、子四代、子五代群体和黄、渤海野生群体遗传变异进行了同工酶的比较分析,表明人工选育群体的遗传多样性已有所降低。本研究中同工酶分析的斑节对虾养殖群体多态座位比例为61.90%,平均杂合度为0.120。同时,以RAPD方法检测该养殖群体的杂合度为0.246,多态座位比例为81.93%,基因多样性为0.260,而RAPD对斑节对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾和细角滨对虾多态座位比例的检测值为0.242—1.000^[1]。因此,与同工酶方法相比,RAPD检测的遗传变异水平要高,提高了对斑节对虾遗传变异性的检测。但二者的结果均表明,所检测的斑节对虾养殖群体的多态座位比例和杂合度都处于一个较高水平,反映群体的遗传变异性较大,遗传多样性仍维持了较高水平。其原因可能有:首先该养殖群体的亲体来自马来西亚西部海域的野生种群,而东南亚的斑节对虾群虾种群的遗传多样性最高^[1];其次,目前斑节对虾全人工繁殖亲虾繁殖性能较差,池养条件下不容易性成熟,仍需要进行眼柄摘除以促进性腺发育^[21],故亲虾一般直接来源于野生种群,没有长时间多代的定向选择和近亲繁殖,子一代遗传变异的丧失并不明显。但Hardy-Weinberg遗传偏离指数(d)为-0.208,存在杂合子缺失现象,与其他报道对虾养殖群体的杂合子缺失是一致的^[1,11],且大多数座位偏离Hardy-

Weinberg平衡,表明群体未达到随机交配,可能已有近交衰退发生,也与实际生产中采用的亲虾数目普遍偏少的事实是相符的。因此,为避免经多代养殖后可能出现的性状分离和种质退化,从遗传选育和良种化的要求出发,对养殖群体遗传变化水平进行有效监测是必不可少的。

参考文献:

- [1] Benzie J A H. Population genetic structure in pond prawns [J]. *Aquac Res*, 2000, 31: 95—119.
- [2] 钟振如,李辉权,张月平,等.南海西北部水域斑节对虾资源的调查研究[J]. *热带海洋*, 1999, 18(3): 58—65.
- [3] 谭树华,王强忠.斑节对虾遗传育种研究进展[J]. *福建水产*, 2002(4): 7—15.
- [4] Benzie J A H. Penaeid genetics and biotechnology [J]. *Aquaculture*, 1998, 164: 23—47.
- [5] Shoroni V, De Matthaeis E, Cobelli-shoroni M, et al. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda) [J]. *Aquaculture*, 1986, 57: 239—251.
- [6] Sugama K, Haeryanti, Benzie J A H, et al. Genetic variation and population structure of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, in Indonesia [J]. *Aquaculture*, 2000, 205: 37—48.
- [7] 罗田,徐海.斑节对虾肝胰腺全长cDNA表达文库的构建[J]. *海洋学报* 2003, 25(Sup 2): 116—121.
- [8] 邓敏,何建国,吕玲,等.斑节对虾白斑综合症病毒部分基因组文库及核酸探针检测法[J]. *水产学报*, 2000, 24(2): 161—166.
- [9] 海保华,胡超群,任春华.斑节对虾弧菌病的病理学研究[J]. *热带海洋学报*, 2001, 20(3): 47—53.
- [10] 赖秋明,钟际伟.三趾产斑节对虾亲虾产卵量的测定[J]. *现代渔业信息*, 1999, 14(4): 5—10.
- [11] 杜晓东,秦红贵,黄荣莲,等.斑节对虾两个种群生化遗传变异的研究[J]. *海洋科学*, 2004, 28(6): 32—35.
- [12] 熊全林.鱼类同工酶谱分析(上)[J]. *遗传*, 1992, 14(2): 41—44.
- [13] 吴鹤龄,林锦湖.遗传学实验方法及技术[M].北京:高等教育出版社,1983. 260—275.
- [14] 王中仁.植物等位酶分析[M].北京:科学出版社,1996.
- [15] 萨姆布鲁克.分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,1996.
- [16] Williams J G K, Kubelik A R, Livark K J, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary markers are useful as genetic markers [J]. *Nucl Acids Res*, 1990, 18(22): 6 531—6 535.
- [17] 徐成,王可玲,张培军.鲈鱼群体生化遗传学研究Ⅱ.种群生化遗传结构及变异[J]. *海洋与湖沼*, 2001, 32(3): 248—254.
- [18] 汪小荃,邹喻华,张大明,等.银鲈遗传多样性的RAPD分析

- [J]. 中国科学(C), 1996, 26(5): 436-441.
- [19] 庄志猛, 孟克红. 日本囊对虾野生种群和养殖群体的同工酶遗传变异[J]. 动物学研究, 2000, 21(4): 323-326.
- [20] 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[J]. 海洋水产研究, 2003, 24(2): 1-8.
- [21] Benzie J A H. A review of the genetics and environment on the maturation and larval quality of the giant prawn *Penaeus monodon* [J]. Aquaculture, 1997, 155: 69-85.

Genetic diversity of reared *Penaeus monodon* stock revealed by isozyme and RAPD

TAN Shu-hua, WANG Gui-zhong, AI Chun-xiang, LIN Qiong-wu, LI Shao-jing, GUAN Wei-bing

(Department of Oceanography, State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Isozyme and RAPD methods were used to detect the genetic diversity of cultured *Penaeus monodon* obtained from Haichuang in Xiamen. All 40 individuals used were the offspring of wild broodstock imported from the coast waters near Sibul, Malaysia. Among the 21 loci in 9 isozymes examined, 13 were polymorphic. Mean proportion of polymorphic loci was 61.90% and the observed heterozygosity was 0.120. The expected heterozygosity was 0.151. The genetic deviation index (d value) was 0.208. The Chi-Square test showed that all polymorphic loci except *Mdh-2* and *Me-2* were not in Hardy-Weinberg equilibrium and existed heterozygote deficiency. Using 14 decamer random primers, 83 RAPD sites were detected, of which 68 were polymorphic (81.93%). The average heterozygosity was 0.246, and gene diversity was 0.260. Shannon's information index was 0.397. Compared with isozyme method, RAPD can provide more informative sites and reveal higher genetic diversity. All these results show that the cultured population of *Penaeus monodon* in Xiamen has a relatively high genetic diversity, but inbreeding may have occurred.

Key words: *Penaeus monodon*; cultured population; isozyme; RAPD; genetic diversity

Corresponding author: WANG Gui-zhong. E-mail: gzwang@xmu.edu.cn