

·研究简报·

中国明对虾第一代和第六代人工选育群体的遗传结构分析

何玉英, 刘 萍, 李 健, 孔 杰, 王清印

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:采用 RAPD 技术对中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 第一代和第六代人工选育群体的遗传结构及其分化进行了分析。在 20 个 10 bp 随机引物中筛选出 16 个引物, 共扩增出 89 条 DNA 片段, 其中多态性片段分别为 34 和 30 条, 多态位点比例分别为 38.2% 和 33.71%。对 2 群体的遗传学参数计算结果表明: 2 群体间遗传分化指数为 0.1408, 属中等程度分化; 群体间的遗传变异平均为 0.197, 由此可见, 80% 的遗传变异来自于群体内, 而近 20% 的变异则是来自于群体间; 第六代群体的多态位点比例和遗传多态度均低于第一代群体, 这可能与人工定向选育过程中注重经济性状有关。

关键词:中国明对虾; 选育群体; 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-(2004)06-0572-04

中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 主要分布于我国黄、渤海沿岸以及朝鲜半岛沿海, 是我国重要的经济虾类和海水增养殖品种。但从 1993 年以来出现的大规模对虾流行病的暴发对我国的对虾养殖业造成了严重的影响。中国对虾养殖业的发展方向是选育新的优良品种, 但它必须建立在丰富的遗传多样性的基础上。许多研究表明遗传变异水平与生物的生长速度、抗病能力等生产性状密切相关^[1-2]。本文报告中国对虾第一代和第六代人工选育群体遗传多样性的 RAPD 标记的研究结果, 对于了解选育过程中中国明对虾遗传多样性水平的变化以便采取合理的选育手段以及标记辅助选择计划的制定具有重要的理论指导意义。

1 材料和方法

1.1 材料

中国明对虾人工选育群体取自山东省日照市水产研究所。从子一代起每年从养成的交尾雌虾中选择个体最大的进行越冬, 选择强度控制在 1%~3%。分冬、春两次选择, 每年 11 月份结合出池进行初选, 选出 3 000~4 000 尾虾越冬, 第 2 年 3 月中旬再从越冬存活的个体中选出 500~1 000 尾亲虾用于苗种培育。每个群体各取 20 尾, 在取样地点将新鲜样品速冻, 运回实验室后 -70℃ 保存。

1.2 方法

具体的实验方法参照刘萍等^[3]。

1.3 数据统计与分析

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, 分析和计算群体的遗传多样性参数。

多态位点比例 $P = \text{多态位点数} / \text{位点总数} \times 100\%$;

以 Shannon 多样性指数来量化遗传多样性^[4]:

$$\text{群体的遗传多态度 } H_0 = - \sum P_i \log_2 P_i \quad (1)$$

P_i 为位点 i 在某一群体内的表型频率;

$$\text{不同群体遗传多态度 } H_{\text{pop}} = (\sum H_0) / N \quad (2)$$

N 为所研究的群体数;

$$\text{总群体遗传多态度 } H_{\text{sp}} = - \sum P \ln P \quad (3)$$

P 为 i 位点在 N 个群体内的总表型频率;

式(2)和式(3)计算和比较群体内和群体间的遗传变异比例, 分别为 H_{pop}/H_0 和 $(H_{\text{sp}} - H_{\text{pop}})/H_{\text{sp}}$ 。

遗传分化指数 $G_{st} = (\sum J_i/s - J_i)/(1 - J_i)$, 其中 s 为种群的数目, J_i 是第 i 个种群内的基因一致性。

2 结果

2.1 RAPD 扩增结果

在 S 系列 20 个 10 bp 引物中筛选出 16 个扩增效果较好的引物对 2 群体进行扩增, 共检测 89 个位点, 每个引物可扩增 3~9 条谱带, 标记的分子片段长度在 250~2 000 bp 间。每个引物均扩增出多态片段, 多态位点的比例 (20%~100%) 因引物的不同而有差异 (表 1)。中国明对虾第一代群体中的多态片段数为 34 条, 多态位点比例为 38.20%, 中国对虾第六代群体的多态片段数为 30 条, 多态位点比例为

收稿日期: 2003-08-08; 修订日期: 2004-02-16。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30271038); 山东省自然科学基金项目 (Y2002D02); 国家“863”高技术研究发展项目 (2001AA620105)。

作者简介: 何玉英 (1974-), 女, 研究实习员, 从事健康养殖技术研究。

通讯作者: 李 健, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

33.71%。根据 Nei 指数^[5]估算的中国对虾的第一代选育群体和第六代选育群体的遗传分化指数(G_u)为 0.140 8。

通过对 16 个引物所检测到的中国对虾第一代和第六代人工选育群体的遗传多样性分析(表 2)表明,第一代人工选育群体的遗传多态度(H_0)为 0.212,第六代人工选育群体的遗传多态度(H_0)为 0.184,略低与第一代。2 个群体的平均

遗传多态度(H_{pop})为 0.198。由 H_{pop}/H_0 比值可以看出,群体内的遗传变异(H_{pop}/H_0)均值为 0.803,而群体间的遗传变异($H_0 - H_{pop}/H_0$)平均为 0.197。由此可见,80%的遗传变异存在于群体内,而近 20%的变异则是在群体间检测到的。

表 1 实验用的 16 个随机引物及其扩增情况

Table 1 Sixteen random primers used in the study and their amplifications

引物 Primer	5' - 3'序列 5' - 3' sequences	总位点数 Total loci number	共享位 点数 Share loci number	扩增产物数量 Amplified product number				检测多 态性/% Polymorphism
				第一代 The first generation		第六代 The sixth generation		
				位点数 Loci number	变异位点数 Variance loci number	位点数 loci number	变异位点数 Variance loci number	
S121	ACGGATCCTG	5	3	5	2	5	2	40.0
S122	GAGGATCCCT	3	1	3	2	3	1	100.0
S123	CCTGATCACC	5	4	5	1	5	1	20.0
S124	GGTGATCAGG	6	4	6	2	6	2	33.3
S125	CCGAATTCCC	6	3	6	3	6	3	50.0
S126	GGGAATTCCG	7	5	6	0	7	2	28.6
S127	CCGATATCCC	9	5	9	4	9	3	33.3
S128	GGGATATCGG	5	2	5	3	5	0	60.0
S129	CCAAGCTTCC	6	3	6	2	5	2	33.3
S130	GGAAGCTTGG	7	4	7	0	7	3	42.9
S132	ACGGTACCAG	4	2	4	1	4	2	50.0
S133	GGCTGCAGAA	7	4	7	3	6	2	42.9
S134	TGCTGCAGGT	5	2	5	3	5	2	60.0
S135	CCAGTACTCC	4	2	4	2	4	1	50.0
S136	GGAGTACTGG	7	2	7	5	7	4	71.4
S138	TTCCCGGGTT	3	2	3	1	2	0	33.3

表 2 中国明对虾第一代和第六代人工选育群体群体内和群体间的遗传多样性

Table 2 Genetic diversity within and among cultured stocks of *F. chinensis*

引物 Primer	H_0		H_{sp}	H_{pop}	H_{pop}/H_0	$(H_0 - H_{pop})/H_0$
	第一代	第六代				
	The first generation	The sixth generation				
S121	0.241	0.255	0.301	0.248	0.824	0.176
S122	0.216	0.091	0.207	0.153	0.739	0.261
S123	0.098	0.121	0.190	0.109	0.574	0.426
S124	0.211	0.218	0.285	0.214	0.751	0.249
S125	0.249	0.237	0.291	0.243	0.835	0.165
S126	0.000	0.137	0.107	0.068	0.635	0.364
S127	0.243	0.205	0.285	0.224	0.786	0.214
S128	0.409	0.000	0.180	0.204	1.133	-0.133
S129	0.166	0.188	0.250	0.177	0.708	0.292
S130	0.00	0.273	0.158	0.136	0.861	0.139
S132	0.169	0.291	0.287	0.230	0.801	0.199
S133	0.275	0.193	0.295	0.234	0.793	0.207
S134	0.307	0.193	0.293	0.250	0.853	0.147
S135	0.244	0.164	0.269	0.204	0.758	0.242
S136	0.456	0.373	0.358	0.414	1.156	-0.156
S138	0.112	0.000	0.087	0.056	0.644	0.356
平均值 Mean value	0.212	0.184	0.240	0.198	0.803	0.197

3 讨论

目前检测对虾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。Wang 等^[6]研究了中国对虾两个养殖群体的同工酶遗传多样性,多态性比例分别为 10% 和 20%,平均杂合度分别为 0.01 和 0.033。本研究用 RAPD 技术揭示中国对虾第一代和第六代人工选育群体的多态位点比例和遗传多态度分别为 38.20%、33.71% 和 0.212、0.184。可以看出本实验的研究结果比用同工酶技术检测的结果稍高,主要是由于同工酶电泳技术检测遗传变异的灵敏度较低,可以检测的多态位点较少有关^[7]。Garcia 等^[8]分别采用同工酶电泳技术和 RAPD 技术对凡纳对虾的一个野生种群及多个家系进行检测,结果表明同工酶电泳技术所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。和日本对虾的野生种群和养殖群体的遗传多样性相比^[9],中国对虾的遗传多样性相对较低,这一结果与 Mulley 等^[10]利用同工酶电泳技术调查对虾科 13 种虾类的遗传变异差异所做的推论一致。本实验采用的中国明对虾样品源自黄渤海沿岸地理群的亲虾,属于地方性温水种类,集群性强且做长距离洄游,在黄渤海呈连续分布,因此其遗传多样性水平与属于暖水种类,呈不连续分布的日本对虾的遗传多样性水平相比相对较低。

与中国明对虾人工选育的第一代群体相比,第六代群体的多态性比例和遗传多态度均有所下降。可能与在人工累代选育过程中进行人工定向选育,过分注重经济性性状(生长快和抗逆性)有关。经过连续 6 代的选育,历代选育群体的体长比对照平均增长 8.4%,体重增长可达 26.86%。根据 Wright^[11]对遗传分化系数的大小与分化程度的关系的规定,分化系数在 0.05~0.15 表示群体之间出现中等分化,表明中国明对虾人工选育第一代群体和第六代群体之间已出现了一定程度的分化($G_{st}=0.1408$),这说明通过人工选育已经对中国对虾的遗传多样性造成了影响。人工选育过程中影响遗传多样性的“瓶颈”效应、近亲杂交和遗传漂变等因

素以及选育过程中某些位点选择性的丧失是造成选育群体遗传多样性水平下降的主要原因。因此,在今后的选育工作中,应采取群体选育和标记辅助选择相结合的手段,以保证中国明对虾养殖的可持续发展。

参考文献:

- [1] Ferguson M M, Drahushchak I R. Disease resistance and enzyme heterozygosity in rainbow trout[J]. *Heredity*, 1990, 64: 413-417.
- [2] 宋林生,李俊强,李红蕾,等.用 RAPD 技术对我国栉孔扇贝第一代群体与养殖群体的遗传结构及其遗传分化的研究[J]. *高技术通讯*, 2002, 12(7): 83-87.
- [3] 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): 88-93.
- [4] Wachira F N, Waugh R, Hackett C A, et al. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers[J]. *Genome*, 1995, 38 (2): 201-210.
- [5] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. *Genetics*, 1978, 89: 583-590.
- [6] Wang W J, Kong J, Bao Z M, et al. Isozyme variation in four population of *Fenneropenaeus chinensis* shrimp[J]. *Biodiversity Science*, 2001, 9 (3): 241-246.
- [7] Karl S A, Avise J C. Blanking selection at allozyme loci in oyster; implication for nuclear RFLPs[J]. *Science*, 1992, 256: 100-102.
- [8] Garcia D K, Benzie J A H. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding program[J]. *Aquaculture*, 1995, 130: 137-144.
- [9] 石拓,孔杰.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]. *海洋与湖泊*, 1999, 30 (6): 609-615.
- [10] 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.
- [11] Wright S. The genetical structure of population[J]. *Annals of Eugenics*, 1951, 15: 323-334.

Analysis of genetic structure in the first cultured stock and the sixth cultured stock of *Fenneropenaeus chinensis*

HE Yu-ying, LIU Ping, LI Jian, KONG Jie, WANG Qin-yin

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

Abstract: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) technique was used to analyze the genetic structure and genetic differentiation of the first generation of cultured stock and the sixth generation of cultured stock of *Fenneropenaeus chinensis*. Genomic DNA was extracted from 40 samples for the two cultured stocks, and PCR was performed in a 25 μ L reaction mixture containing 20 ng genomic DNA, 2.5 μ L 10 PCR Buffer, 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 1 unit *Taq* DNA polymerase, 0.2 mmol/L of each dNTP, and 0.6 mmol/L primer. PCR cycles were as follows: initial one step of 5 min at 94 $^{\circ}C$; subsequent 45 cycles of 1 min at 94 $^{\circ}C$, 1 min at 37 $^{\circ}C$, and 2 min at 72 $^{\circ}C$; followed by one final step of primer extension for 10 min at 72 $^{\circ}C$. One negative control (absence of template DNA) was performed for each set of amplifications. PCR products were kept at 4 $^{\circ}C$ and isolated by electrophoresis on a 1.5% agar gel. The purpose of the study was to know the changes of genetic diversity in the successive cultured stocks of *Fenneropenaeus chinensis* in order to take effective measures such as marker-assisted selection to enable the sustainable development of the mariculture. Sixteen primers screened from 20 10-base primers yield 89 reproducible amplified fragments scored as present (1) or absent (0) for each DNA sample. Each primer used for the detection could produce 3–9 molecular markers varying in length from 250 bp to 2 000 bp. The polymorphic fragments of the first generation of cultured stock and the sixth generation of cultured stock were 34 and 30, respectively, and the proportions of polymorphic loci were 38.20% and 33.71% correspondingly. Genetic differentiation estimated using Nei's index between the first stock and the sixth stock was 0.140 8, and the degree of genetic differentiation was moderate. The genetic diversities (H_0) of the first generation of cultured stock and the six generations of cultured stock quantified by Shannon index were 0.212 and 0.184, respectively, indicating a low genetic diversity in the six generation of cultured stock. The ratio of H_{pp}/H_p showed that the average genetic variability within stocks was 0.803, while the average genetic variability among stocks was 0.197 that indicated 80% of genetic variability was from intra-stocks while about 20% of genetic variability was from inter-stocks. The lower value of genetic diversity and proportions of polymorphic loci in the sixth generation of the cultured stock may result from the selection based on the economic traits (e.g. better growth and disease resistance). After selective breeding of six generations, the average body size and body weight of *Fenneropenaeus chinensis* in the cultured stocks increased significantly compared with control group. For example, compared with control the body size and body weight of *Fenneropenaeus chinensis* in the sixth generation of cultured stock increased by 8.40% and 28.60%, respectively.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; cultured stock; RAPD; genetic diversity

Corresponding author: LI Jian. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn