

日本囊对虾人工诱变子一代遗传变异的 RAPD 分析

刘 波¹, 陈清西¹, 柯才焕^{2*}, 王德祥², 卢小宁³, 翁忠钊³

(1. 厦门大学生命科学学院, 2. 厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005;

3. 厦门市水产技术推广站, 福建 厦门 361005)

摘要:以性腺成熟的日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 作为亲代, 进行不同剂量的 ⁶⁰Co- 射线照射. 采用 RAPD 技术对诱变子一代的无节幼体基因组 DNA 多态性进行了检测. 从 20 个随机寡核苷酸引物共检测 177 个位点, 其中多态位点 152 个, 占 85.9%. 单个引物获得的标记为 6~12 个, 平均 8.85 个, 分子量在 150~2 500 bp 之间. 遗传相似系数用 Nei 的计算方法进行计算, 遗传距离则用 Lynch 的计算方法进行计算. 实验数据表明: 诱变子代与正常对照组相比, 遗传多样性水平较高, 诱变产生了较为显著的变异. 研究结果证实: 在对虾大规模养殖, 种质质量严重退化的情况下, 人工诱变能够促进基因组更加广泛的变异, 为新品种的选育打下坚实的基础; 同时证明 RAPD 技术在检测遗传差异方面具有较高的灵敏度和分辨率.

关键词:日本囊对虾; 人工诱变; 遗传多样性; RAPD

中图分类号: Q 341

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006) S-0172-05

对虾养殖是我国海水养殖业中最具代表性的一项产业, 自 20 世纪 80 年代以来, 对虾养殖业在东南亚地区已成为年产几十亿美元的产业. 据 1994 年 FAO 统计, 我国对虾养殖年总产量已经达到世界对虾总产量的 7%^[1]. 但是, 自 90 年代我国北方养殖的中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 发生白斑综合症病毒 (WSSV) 病后, 我国对虾养殖产量开始下降, 而日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 和引进的凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 逐渐成为我国的主要养殖品种^[2]. 因为使用的苗种基本上没有经过系统的人工选育, 主要以野生对虾为亲本进行苗种培育, 在生长速度、抗病能力等方面都不稳定, 一旦有高毒力的病原出现, 仍可能发生大面积死亡. 众所周知, 生物对病害的易感染性和低下的生活力与其较低的遗传变异水平有密切关系^[3], 而人工诱变能够引起基因组广泛的变异并在短时间内获得大量变异品种直接应用于选择育种^[4]. 人工诱变, 特别是其中的 ⁶⁰Co- 射线辐射育种技术已经在各种农作物育种中得到广泛的应用^[5], 但在水产动物育种领域还未展开研究. 随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术提供了一种快速分析不同群体间遗传差异的便利方法^[6], 已经广泛应用于藻类^[7]、鱼类^[8]、贝类^[9]、虾类^[10, 11] 的遗传作图、基因定位以及群体遗传变异的研究中. 本文通过 ⁶⁰Co- 射线照射日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*), 将人工诱变应用于水产动物

这一领域作一初步尝试, 利用 RAPD 技术对诱变子一代与对照子一代进行遗传差异的检测, 以期从分子水平上分析各种不同诱变剂量对日本囊对虾基因组的变异情况的影响, 为人工诱变育种进一步应用于生产提供科学依据, 促进对虾人工诱变育种中的分子标记辅助选育工作的开展.

1 材料与方法

1.1 材料

从福建南部自然海区采集性腺成熟雌虾 75 尾, 经过手术剪除眼柄后分 5 组, 每组 15 尾, 1 组为对照, 其余 4 组分别以 50cGy, 100cGy, 1 000cGy, 1 500cGy 不同剂量的 ⁶⁰Co- 射线照射. 产卵孵化后立即收集各组的无节幼体, 分别设置 3 个平行实验组, 每组约 100 只无节幼体. 蒸馏水洗涤后进行 DNA 提取.

钴 60 治疗机为国产 GWGP80 型; PCR 仪为 Bionet 公司的 T3 型; 紫外分光光度计为 Cary 50 型; 电泳仪为 BD-RAD 公司的 PowerPac 300 型; 全自动凝胶成像系统为 GENE GENUS 型. Taq 聚合酶、10xPCR 缓冲液、MgCl₂、dNTP、引物等试剂购自 Operon Technologies 公司.

1.2 方法

(1) 基因组模板 DNA 的制备

基因组 DNA 的提取采用上海华舜生物工程有限公司的组织/细胞 DNA (小量) 抽提试剂盒, 按试剂盒的步骤提取各组无节幼体 DNA, 提取出来的 DNA 通过紫外分光光度计测定 DNA 浓度, 将各组 DNA 浓度

收稿日期: 2005-12-30

基金项目: 厦门市海洋与渔业局科技计划资助

作者简介: 刘波 (1980 -), 男, 硕士研究生.

* 通讯作者: chke@jingxian.xmu.edu.cn

用超纯水稀释成 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合模板 DNA;通过琼脂糖凝胶电泳,EB 染色检测 DNA,条带模糊的样品进行重提(为减少误差,每组各提取 3 份模板 DNA)。

(2) RAPD 反应

RAPD 扩增反应条件与刘萍等^[2]报道的相同。RAPD 反应总体积为 25 μL ,包括 10xPCR 反应缓冲液 2.5 μL (成分:100 mmol/L Tris-Cl,500 mmol/L KCl,15 mmol/L MgCl_2 ,1.315 mg/mL BSA,0.01% Gelatin,pH 8.4);基因组 DNA (10 $\mu\text{g/mL}$) 2 μL ;Taq 酶 1U;dNTP (1mmol/L) 2.5 μL ;各引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL ;用超纯水补足体积至 25 μL 。样品在 PCR 扩增仪上进行扩增:94 变性 5 min;94 1 min,36 1 min,72 2 min,45 个循环;延伸 10 min;4 保存。取扩增产物 5 μL 在 1.4%琼脂糖凝胶上进行电泳分离,EB 染色,全自动凝胶成像系统进行分析。

(3) 数据分析

当某一扩增片段出现时记为 1,不出现时记为 0,将 RAPD 指纹图谱转换成数字矩阵,根据 Nei 和 Lynch 的计算公式,利用设计的遗传分析软件计算各诱变组与正常对照组之间的相似系数^[12]和遗传距离^[13],得到遗传距离矩阵,通过扩增位点的数量、多态率等参数评估诱变组与对照组之间的遗传结构。遗传距离等数据的有关计算公式如下:

$$\text{相似系数 } S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$$

$$\text{遗传距离 } D = -\ln S$$

$$\text{多态率 } p = x/r$$

式中 N_{ij} 为群体 i 与 j 共有的片段数量, N_i 、 N_j 分别为群体 i 与 j 各自具有的片段数量; S 为相似系数; x 为具有多态性的位点, r 为扩增出来的总位点数。扩增片段的分子量通过全自动凝胶成像分析系统及其附带软件根据相对迁移率大小进行计算。

2 结 果

2.1 RAPD 扩增结果

本研究共使用 20 个随机寡核苷酸引物对 5 组 15 份模板 DNA 进行 RAPD 扩增,每个引物均能扩增出重复性良好的特定扩增产物,表现出较高度数的多态性。20 个引物共检测出 177 位点,其中多态位点 152 个,占 85.9%。单个引物扩增的位点数为 6~12 个,平均 8.85 个,分子质量在 150~2500 bp 之间。表 1 列出了 20 种随机引物及其扩增情况。PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳后的电泳结果如图 1 所示。

2.2 各诱变组与对照组的相似系数及遗传距离分析结果

根据各位点扩增产物的有无按 1、0 进行统计,建

立数据矩阵,通过设计的遗传分析软件计算遗传相似系数,其变化范围从 0.6616(诱变组与对照组之间的遗传相似系数)一直到 0.9004(对照组内的遗传相似系数)。这些数据充分表明诱变子代与正常对照组相比 ($p < 0.01$),遗传多样性较高。表 2 列出了对照组和各诱变组组内及组间的相似系数与遗传距离的平均值(所有的数据均经过单因素方差分析检测其显著性差异)。

表 1 各引物序列及其扩增情况

引物	序列 (5' - 3')	RAPD 扩增情况	
		总位点数	多态位点数
AK-1	TCTGCTACGG	9	9
AK-2	CCATCGGAGG	7	5
AK-3	GGTCTACCA	9	8
AK-4	AGGGTCGGTC	11	8
AK-5	GATGGCAGTC	10	9
AK-6	TCACGTCCCT	11	10
AK-7	CTTGGGGGAC	6	5
AK-8	CCGAA GGGTG	11	9
AK-9	AGGTCGCGGT	7	5
AK-10	CAAGCGTCAC	9	9
AK-11	CAGTGTGCTC	8	8
AK-12	AGTGTA GCCC	7	7
AK-13	TCCCACGAGT	6	6
AK-14	CTGICATGCC	7	6
AK-15	ACCTGCCGTT	7	7
AK-16	CTGCGTGCTC	10	10
AK-17	CAGCGGTCAC	12	8
AK-18	ACCCGAAAC	9	9
AK-19	TCGACGCGAG	12	7
AK-20	TGATGGCGTC	9	7
合计		177	152

3 讨 论

在分子生物学技术迅猛发展的今天,特别是 DNA 分子标记技术的广泛应用,使我们能从分子水平上反映物种遗传物质的差异,揭示物种自身固有的特征,而随机引物扩增多态性 DNA 技术 (RAPD) 由于其快速、方便和多态性较高等特点已经在海洋经济虾类遗传多样性及遗传育种研究领域得到广泛应用^[14~16]。由于对虾无节幼体个体小,收集简便,而且在无节幼体阶段依靠自身卵黄营养进行发育,在材料的收集过程中可以排除藻类、丰年虫等因素的干扰,可以方便、准确的应用于群体间的遗传差异分析。

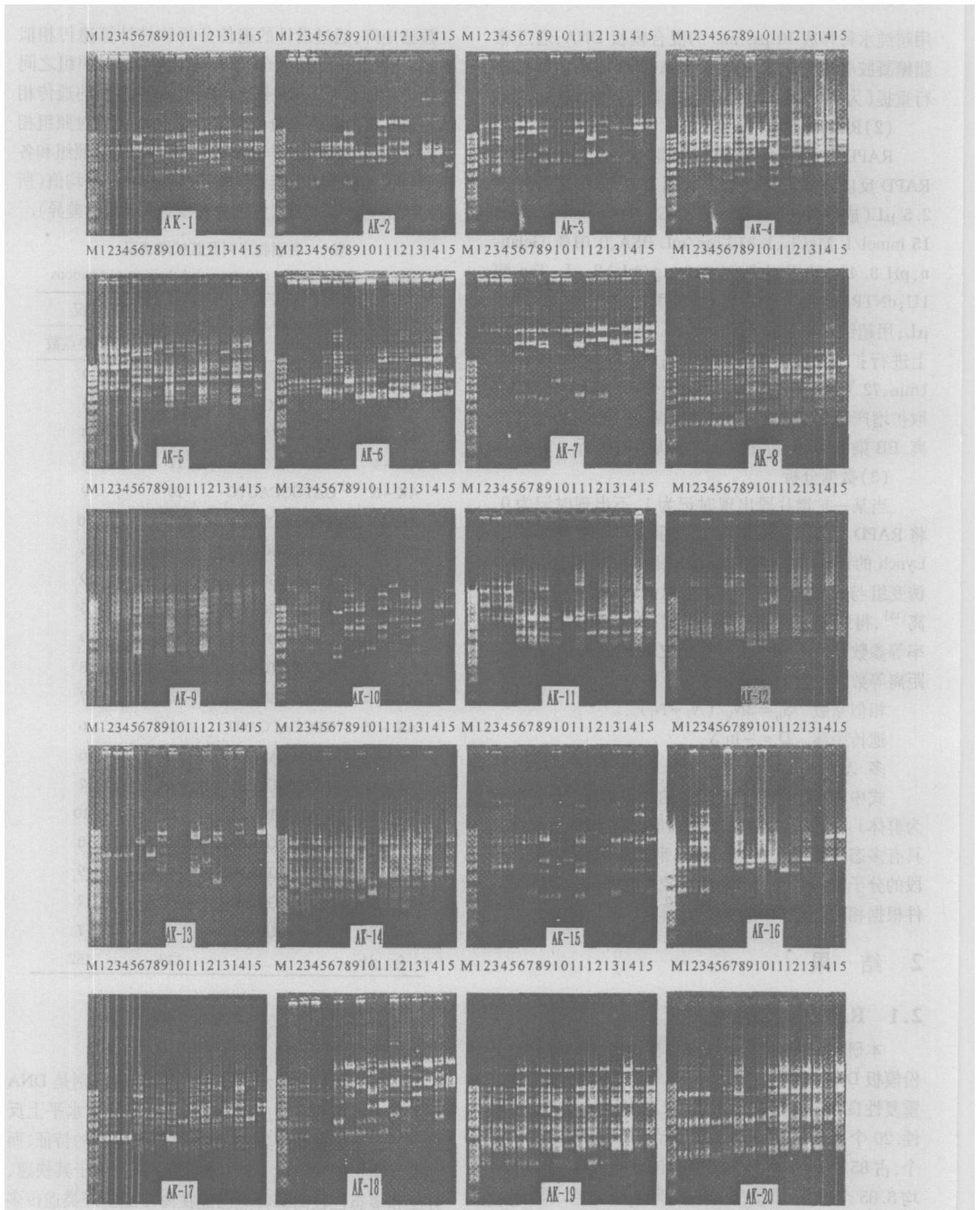


图 1 20个随机引物与日本囊对虾对照组和诱变组无节幼体 DNA 的 RAPD 扩增结果

Fig 1 The RAPD amplifications of normal and irradiated nauplii DNA in *Marsupenaeus japonicus* with 20 random primers AK-1至 AK-20分别为部门 Operon Technologies公司 20个随机寡核苷酸引物的扩增结果;
 M: 50 bp DNA Ladder, 1~3:正常对照组, 4~6:诱变组, 7~9:诱变组, 10~12:诱变组, 13~15:诱变组

表 2 诱变组与对照组群体组内及组间的相似系数(上三角)和遗传距离(下三角)

Tab 2 Similarities (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) within and between control and irradiated groups

	对照组	诱变组 (50cGy)	诱变组 (100cGy)	诱变组 (1000cGy)	诱变组 (1500cGy)
对照组	0.9004 (0.1049)	0.7579	0.6616	0.6696	0.6980
诱变组 (50cGy)	0.2772	0.7380 (0.3038)	0.6997	0.7214	0.7315
诱变组 (100cGy)	0.4131	0.3575	0.7025 (0.3531)	0.7130	0.7071
诱变组 (1000cGy)	0.4011	0.3266	0.3383	0.7381 (0.3037)	0.7490
诱变组 (1500cGy)	0.3595	0.3127	0.3466	0.2890	0.7331 (0.3105)

注:对角线为各组组内遗传相似系数与遗传距离,括号内数据为遗传距离。

本文运用 RAPD 技术对经过 ^{60}Co - 射线照射的日本囊对虾人工诱变子代无节幼体进行遗传多样性检测:将 4 个诱变组以及 1 个对照组置于相同的养殖环境下进行培养,排除关于环境的影响因素,可以认为遗传因素是决定变异的主导因素,根据不同的辐射剂量对样本进行聚类,每组设置 3 个平行样本,对各组进行检测。从扩增图谱来看,RAPD 虽不能区分某一座位扩增出的 DNA 片段是纯合的还是杂合的,但可见其检测多态性的效率很高,是研究遗传多样性极好的工具,可以从分子水平上进行遗传变异的检测。实验中共扩增出了 177 个片段,多态率高达 85.9%。诱变组内的遗传相似系数(0.738 0, 0.702 5, 0.738 1, 0.733 1)和对照组内的遗传相似系数(0.900 4)相比,具有较为显著的差异($p < 0.01$)。这组实验数据显示: ^{60}Co - 射线可能引起了这些诱变组相应的遗传变异。令人感兴趣的是,诱变组(100cGy)相关的遗传相似系数同各组相比都是最低的。这一实验现象可由生物的自我修复系统在诱变达到一定的剂量范围后才开始作用进行解释^[17]:尽管电离射线对 DNA 的诱变是非定向诱变:即 ^{60}Co - 射线可以在 DNA 任意区域引起不同程度的变异,造成物种各种不同方向、不同程度的变异,而剂量的大小只会增大或减少射线对 DNA 作用引起变异的概率^[18]。由于在高剂量下射线对 DNA 产生的损伤,影响到 DNA 正常的复制及转录等生理功能的实现,引发 DNA 的自我修复系统在进行较高剂量的照射(1000cGy 和 1500cGy)时对基因组 DNA 进行了一定程度的修复,而在进行较低剂量的照射(50cGy 和 100cGy)时,可能 DNA 依然可以进行正常的生理作用,而未引发 DNA 的自我修复系统进行相关的修复。所以,我们的假说是:当诱变剂量达到某种程度的阈值时,为了维持机体在环境中基本的生存能力,机体内基

因组的自我修复系统将会开始进行启动,并与人工诱变产生的遗传变异形成一种动态的平衡。总之,所有这些实验数据都直接或间接证实了通过 ^{60}Co - 射线照射处理后,诱变组基因已经发生了广泛的变异。

生物遗传多样性是物种资源适应多变的环境以维系生存、发展和进化的基础,而群体的瓶颈效应、随机遗传漂变、大多数位点突变的选择性丧失是整个海洋甲壳类,特别是虾类遗传变异水平低的主要原因^[19]。本文的研究证实人工诱变技术完全可以应用于日本囊对虾的养殖过程中,产生各种不同变异方向的日本囊对虾,为日本囊对虾的人工选育提供丰富的种质材料;本研究为人工诱变技术应用于海洋经济虾类这一新领域的探索性工作,为增加各经济虾类的遗传多样性,使物种在自然选择中保持活力提供了一种可能的解决途径。如果通过现代分子生物学等辅助手段进行人工选育,可以淘汰掉各种不利于对虾生产养殖的性状以及各种可能出现衰退的性状,进而保留有利于对虾养殖的优良性状,从而为对虾养殖提供各种具有优良品质的新品种。从本文中的实验结果可以看出,直接利用 ^{60}Co - 射线人工诱变的手段可以引起群体基因组广泛的不定向变异,提高群体的遗传多样性水平,为丰富生物种质资源,补充现有种质资源库提供简便快捷的技术手段,为下一步人工筛选优良表型,定向选育打下了坚实的基础,本文为此提供了充分的分子生物学证据。诱变子代成虾的生长发育及其遗传多样性的分析工作、在生产上能否产生某些优良性状以及这些性状的分子标记都尚需做进一步研究。

参考文献:

- [1] 蔡生力. 东南亚地区对虾养殖业的现状及未来研究之重点 [J]. 现代渔业信息, 1997, 12(2): 19 - 24
- [2] 刘萍, 孟宪红, 庄志猛, 等. 三种对虾种间 RAPD 遗传标记

- [J]. 海洋水产研究, 2002, 23(2): 1 - 6
- [3] Carr W V, Sweeney J, Swingle J. The Oceanic institute SPF shrimp breeding program status[C]. USMSFP (US Marine Shrimp Farming) 10th Anniversary Review. GCRL Special Publication, 1994, (1) 1: 47 - 54
- [4] Schappi, Georg F. Adaptability reaction of black drosophila reduced by low dose X ray[J]. Institute J Radiation Biology, 1994, 65(4): 427 - 435.
- [5] 王元东, 赵久然, 郭景伦, 等. 诱变育种在创造玉米新种质中的应用 [J]. 北京农业科学, 1999, 17(2): 12 - 16
- [6] Haward TM, Stalker H T, Larue EA, et al Use of single - primer DNA amplification in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea*) [J]. Plant Molecular Biology, 1992, 18: 315 - 325.
- [7] Dutcher J A, Kapraun D F. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) identification of genetic variation in three species of Pophyra (Bangiales, Rhodophyta) [J]. J. Appl Phycol, 1993, 6(3): 267 - 273.
- [8] Bardakci F, Skibinski D O F. Application of the RAPD technique in talapia fish: species and subspecies identification[J]. Heredity, 1994, 73(2): 117 - 123.
- [9] Patway M U, Kenchington EL, Bird C J, et al The use of random amplified polymorphic DNA markers in genetic studies of the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791) [J]. J. Shellfish Res, 1994, 13(2): 547 - 553.
- [10] Garcia D K, Faggart M A, Rhoades L, et al Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques [J]. Molecular Mar Biol Biotechnol, 1994, 3(5): 270 - 280.
- [11] 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 多样性 [J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 509 - 615.
- [12] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269 - 5273.
- [13] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. Mol Biol Evol, 1990, 7: 478 - 484.
- [14] Garcia D K, Benzie J AH, et al RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs [J]. Aquaculture, 1995, 130: 137.
- [15] 宋林生, 相建海, 李晨曦, 等. 用 RAPD 标记研究对虾属 6 个种间的亲缘关系 [J]. 动物学报, 1998: 353 - 359.
- [16] 庄志猛, 孔杰, 石拓, 等. 日本囊对虾野生和养殖群体遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 自然科学进展, 2001, 11(3): 250 - 255.
- [17] Camel M, Fiona L, Alba M, et al Effect of low doses of ionizing radiation on cells cultured from the Hematopoietic tissue of the dubin bay Prawn, *Nephrops norvegicus* [J]. Radiation Research, 2001, 156: 241 - 250.
- [18] 阿西莫夫, 杜布赞斯基. 辐射对遗传的影响 [M]. 陈只, 译. 北京: 原子能出版社, 1982
- [19] Mulley J C, Latter B D. Genetic variation and evolutionary relationships within a group of thirteen species of penaeid prawns [J]. Evolution, 1980, 34: 904 - 916

Genetic Diversity Analysis on the First Generation of Radiation - induced *Marsupenaeus japonicus* by RAPD

LIU Bo¹, CHEN Qing-xi¹, KE Cai-huan^{2*}, WANG De-xiang²,
LU Xiao-ning³, WENG Zhong-chai³

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, 2. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Station of Aquatic Technology Popularity, Xiamen 361005, China)

Abstract: Matured kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*, were divided into four different groups and irradiated by ⁶⁰Co- rays at different doses before spawning. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) method was employed to detect the genetic variation within or between all these groups. Amplification with 20 random primers produced 177 distinctive and reproducible fingerprints. These fingerprints acquired by single primer ranged from 6 to 12 were 8.85 on average and varying in length from 150 ~ 2 500 bp, 152 of which were polymorphic and the proportion of polymorphic loci was 85.9%. The genetic similarity coefficient was calculated by Nei's matching coefficient method with designed computer program, and the correspondingly average genetic distance (D) was also calculated by Lynch's method to evaluate genetic structure. All these calculated data had indicated high genetic variations within radiation - induced populations. Our research had proved that irradiation might cause so extensive variance in genome that might be the basis of further work of breeding. Furthermore, data are presented with regard to RAPD technique that had comparatively high sensitivity for genetic variations assessment at molecular level.

Key words: *Marsupenaeus japonicus*; radiation; genetic variations; RAPD