

斑节对虾两个野生亲虾种群遗传多样性*

谭树华^{1,2} 王桂忠^{2**} 李少菁²

(¹ 湖南科技大学生命科学院, 湖南湘潭 411201; ² 厦门大学海洋与环境学院, 福建厦门 361005)

摘要 采用 RAPD 和 mtDNA 16S rRNA 基因序列分析方法对海南和马来西亚斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 种群进行了遗传多样性和遗传分化研究。结果表明: 15 个 RAPD 随机引物共检测到 82 个位点, 海南和马来西亚种群的多态位点比例分别为 75.90% 和 76.83%, 杂合度分别为 0.199 和 0.218, 遗传多样性指数分别为 0.276 和 0.288, 种群间的遗传距离为 0.015; 16S rRNA 基因检测的种内遗传变异较低, 马来西亚和海南种群的核苷酸多样性分别为 0.011 和 0, 种群之间的遗传距离为 0.008; 马来西亚种群比海南种群的遗传变异水平要高得多, 且海南种群可能起源于马来西亚种群; 进行遗传选育时可考虑引进马来西亚亲虾作为奠基群体。

关键词 斑节对虾; RAPD; 16S rRNA; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号 S969 文献标识码 A 文章编号 1000-4890(2011)9-2002-05

Genetic diversity of two wild *Penaeus monodon* broodstock populations. TAN Shu-hua^{1,2}, WANG Gui-zhong^{2**}, LI Shao-jing² (¹ School of Life Sciences, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, Hunan, China; ² College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2011, **30**(9): 2002-2006.

Abstract: By using RAPD and mtDNA 16S rRNA gene sequence analysis, this paper studied the genetic diversity and differentiation of two *Penaeus monodon* wild broodstock populations collected from Hainan and Malaysia. Using 15 random primers, a total of 82 RAPD loci were detected. For the Hainan and Malaysia populations, the proportion of polymorphic loci was 75.90% and 76.83%, heterozygosity was 0.199 and 0.218, and genetic diversity index was 0.276 and 0.288, respectively, and the genetic distance between the two populations was 0.015. The genetic variation revealed by 16S rRNA gene sequence analysis was low. The nucleotide diversity of the Hainan and Malaysia populations was 0.011 and 0, respectively, and the genetic distance between the two populations was 0.008. Phylogeographic pattern analysis indicated that Malaysia population had a higher genetic diversity than Hainan population, and the Hainan population could be derived from Malaysia population. Therefore, the broodstock imported from Malaysia could be used as the founder in genetic breeding programs.

Key words: *Penaeus monodon*; RAPD; 16S rRNA; genetic diversity; genetic differentiation.

斑节对虾 (*Penaeus monodon* Fabricius) 俗名草虾、花虾、大虎虾, 是个体最大的对虾, 具有分布广、适盐范围宽、养殖产量高、肉味鲜美等特点, 是世界三大养殖虾类之一 (Benzie, 2000)。该虾在中国南海西北部、海南东部和南部水深 30~60 m 处存在野生亲虾资源和产卵场, 是中国南方沿海诸省的重要

养殖对象 (钟振如等, 1999)。但目前国内该虾亲虾资源来源多样, 部分亲虾来源于马来西亚、泰国等东南亚国家, 不仅来源困难, 价格昂贵, 而且容易带入病菌 (谭树华等, 2005)。目前, 国际上对斑节对虾分布海域内种群遗传多样性、种群分化、遗传图谱构建等方面均有大量研究 (Benzie, 2000)。国内对海南种群的种质资源也进行了一些研究 (周发林等, 2006; 2008; 苏天凤等, 2010), 但对于该种群与引进亲虾间的遗传差异研究尚少 (杜晓东等, 2004; 李康

* 国家自然科学基金项目 (30471322) 和湖南省教育厅资助科研项目 (08B024) 资助。

** 通讯作者 E-mail: gzwang@xmu.edu.cn

收稿日期: 2011-03-01 接受日期: 2011-05-19

等 2005) 研究现状不利于海南资源的合理开发和有效利用。20 世纪 90 年代中期以来, RAPD、AFLP、微卫星和线粒体 DNA 序列分析等分子标记方法因其灵敏度高而取代同工酶方法成为检测对虾遗传变异和种群分化的主要手段(Xu *et al.* 2001; Wilson *et al.* 2002)。本研究同时采用 RAPD 和 mtDNA 16S rRNA 基因序列分析技术对中国海南和马来西亚进口的斑节对虾亲虾的遗传多样性和分化进行研究, 以期为该种群种质资源管理、亲体利用、遗传选育等方面的研究提供资料。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

实验用的斑节对虾共 2 个样品: 海南样品(HN, 野生种) 来自海南三亚海域(体重(55 ± 6.5) g, 数量 20 尾); 境外斑节对虾亲虾(MS 野生种) 来自马来西亚吉打州北部沿岸海域(数量 20 尾, 体重 199.8 ~ 530.7 g)。所有个体取腹部肌肉保存于 95% 乙醇中, 并置于 4 °C 冰箱中保存。

1.2 实验方法

1.2.1 RAPD 扩增与检测 基因组 DNA 的制备参考《分子克隆实验指南》的方法(Sambrook *et al.* , 2002)。扩增反应条件参考 Williams 等(1990) 并进行优化, 优化后的 RAPD 反应总体积为 25 μ l: 包括 10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl (pH = 8.3), 50 mmol \cdot L⁻¹ KCl, 2 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂, 0.001% 明胶、100 μ mol \cdot L⁻¹ 的 dNTPs, 0.2 mol \cdot L⁻¹ 引物、25 ng DNA 模板、1U Taq 酶。扩增程序设置: 预变性 94 °C 5 min, 接着 35 个循环, 包括 94 °C 15 s, 36 °C 60 s, 72 °C 90 s; 72 °C 延伸 7 min, 最后 4 °C 保存。每次反应均设不含模板的空白对照。

电泳检测: PCR 扩增产物在 1.6% 琼脂糖凝胶上电泳 3 V \cdot cm⁻¹ 电泳 2 h, 在含 0.05% EB 的水溶液中染色 30 min, 在凝胶成像系统上检测和拍照。

1.2.2 16S rRNA 基因片段扩增与检测 16S rRNA 基因片段扩增的特异性引物序列为: 16Sar (5'-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3') 和 16Sbr (5'-CCG-GTCTGAACTCAGATCATGT-3') (Bouchon *et al.* , 1994), 由上海生工合成, 反应总体积为 50 μ l, 反应液含 10 mmol \cdot L⁻¹ Tris (pH 8.3), 50 mmol \cdot L⁻¹ KCl, 1.5 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂, 0.001% 的明胶, 0.2 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 两引物均为 0.2 mol \cdot L⁻¹, 50 ng DNA 模板, 2.5U Taq DNA 聚合酶。

扩增反应程序如下: 94 °C 预变性 3 min 后, 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 共运行 35 个循环, 最后一个循环结束后再 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物上样至 1.6% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭 0.5 μ g \cdot ml⁻¹) 电泳, 凝胶成像系统观察和拍照。

1.3 数据处理

RAPD 扩增条带的记录参考汪小全等(1996) 的方法, 记录清晰和稳定的谱带, 无论是共有的或是特异的片段都计入数据分析, 以 1 或 0 分别表示扩增片段的有或无, 然后采用 Popgene Version 1.31 软件对群体的遗传学参数进行计算, 以 Shannon 信息指数表示遗传多态性、多态位点比率和杂合度来对种群遗传结构进行评价和分析。

16S rRNA 序列用 ClustalX(1.83) 程序进行比对校准, 然后用 MEGA 3.0 分子进化遗传分析软件确定碱基组成、变异核苷酸位点, 转换与颠换值, 利用 Kimura-2-parameter 模型计算不同单倍型之间的遗传距离。DNASP 4.0 计算种群的核苷酸多样性。

2 结果与分析

2.1 RAPD 结果

在对 40 个寡核苷酸引物进行筛选的基础上(引物由上海英骏生物技术公司合成), 共有 24 个引物产生了扩增条带, 选取重复性好且带型清晰的 15 个引物用于 RAPD 分析, 共扩增出 82 个 RAPD 位点, 海南和马来西亚种群扩增到的 DNA 片段数分别为 80 和 82 条, 其片段长度为 200 ~ 2000 bp, 单个引物获得的标记数为 3 ~ 7 个。海南和马来西亚种群的多态位点数分别为 60 个和 63 个, 多态位点比例分别为 75.00% 和 76.83% (表 1), 杂合度分别为 0.199 和 0.218, 遗传多样性指数分别为 0.276 和 0.288。两种群间的遗传距离为 0.015, 遗传分化程度低。

在 15 个引物中, 仅 BA0173 在海南 20 个个体中扩增出分子量相同的 3 个条带, 表现为单态。引物 BA0171 和 BA0178 扩增片段长度 223 bp 和 420 bp, 只在马来西亚种群部分个体中出现, 出现率分别为 40% 和 65.7%。部分引物的扩增图谱见图 1。

2.2 16S rRNA 结果

每个种群随机选取 6 个样品进行经 PCR 扩增, 经双向测序, 除去引物及部分端部序列, 得到可清楚判读的碱基数为 472 bp。碱基 T、A、C、G 含量分别

表1 随机引物序列和 RAPD 检测的多态基因座位

Table 1 Primer sequences and polymorphic loci detected by RAPD method

引物号	序列 5'→3'	海南种群(HN)			马来西亚种群(MS)		
		标记总数	多态标记数	多态位点频率	标记总数	多态标记数	多态位点频率
BA0021	CAGGCCCTTC	6	5	0.833	6	5	0.833
BA0025	AGGGTCTTG	6	5	0.833	6	5	0.833
BA0027	TCGGCGATAG	7	6	0.857	7	6	0.875
BA0028	GTGACGTAGG	7	6	0.857	7	6	0.857
BA0032	TCGGCGATAG	6	5	0.833	5	4	0.833
BA0163	CAGAAGCCCA	4	3	0.750	4	3	0.800
BA0164	CAGAAGCCCA	7	6	0.857	7	6	0.857
BA0165	TGTTCCACGG	5	3	0.600	5	3	0.600
BA0169	TGGAGAGCAG	4	3	0.750	4	3	0.800
BA0170	ACAACGCGAG	5	4	0.800	5	4	0.800
BA0171	ACATGCCGTG	6	5	0.857	7	6	0.833
BA0172	AGAGGCACA	5	4	0.800	5	4	0.800
BA0173	CTGGGGCTGA	3	0	0.000	3	1	0.333
BA0174	TGACGGCGGT	4	1	0.250	4	1	0.400
BA0178	TGCCAGCCT	5	4	0.857	7	6	0.800

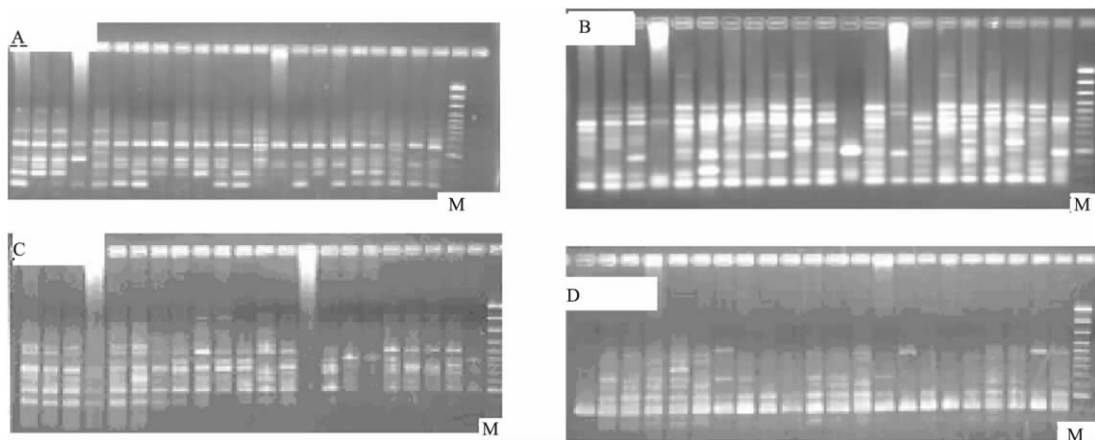


图1 用引物 BA0021 (A)、BA0028 (B)、BA0171 (C)和 BA0178 (D)的 RAPD 图谱

Fig.1 Electrophoresis pattern of RAPD in *P. monodon* using primers BA0178 (A), BA0176 (B), BA0175 (C), BA0174 (D)

为 34.0%、34.3%、12.5% 和 19.2%。A+T (68.3%) 含量远高于 G+C (31.7%)。同 Maggioni 等 (2001) 报道的 10 种对虾 16S rRNA 的碱基平均组成为 T=32.8%、A=32.9%、C=13.0%、G=21.3%、A+T=65.7% 一致 (Maggioni *et al.*, 2001), 也与果蝇、虾类、蟹类等无脊椎动物的 12S rRNA、16S rRNA 和 COI 等基因中 AT 含量高的碱基组成特点相似 (Simon *et al.*, 1994; Spicer, 1995)。

马来西亚种群 6 个个体共检测到 3 种单倍型 (GenBank 登录号: EU105471-EU105473), 3 种单倍型共存在 12 个多态核苷酸位点 (2.54%), 其中 7 个基因座位发生 A/G 转换, 1 个核苷酸位点发生 A/T 颠换, 2 个 T/C 转换, 转换与颠换之比为 9:1, 存在 2 个插入/缺失突变。三亚种群的 6 个个体未发

现碱基突变, 仅存在一种单倍型, 且与单倍型 3 (MS3) 一致。同时, 海南个体与来自香港的斑节对虾序列 (AF279829) 完全相同 (Lavery *et al.*, 2004)。

马来西亚种群的核苷酸多样性为 0.011, 不同单倍型间的遗传距离相差较大 (0.002 ~ 0.022) (表 2), 而三亚种群核苷酸多样性为 0, 两种群之间的遗传距离为 0.008。表明马来西亚种群比三亚种群的

表2 不同单倍型间的遗传距离

Table 2 Genetic distance between haplotypes

	MS1	MS2	MS3	AF279829
MS1				
MS2	0.020			
MS3	0.002	0.022		
AF279829	0.002	0.022	0.000	

遗传变异水平要高得多,存在较高的遗传多样性,与 RAPD 分析的结果一致。

3 讨论

3.1 种群遗传多样性

遗传背景研究是对虾遗传选育的前提和基础,而 RAPD 和 mtDNA 方法在对虾的遗传多样性研究中应用颇多。Garcia 等(1995)用 6 个 PARD 引物检测凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 4 个群体和家系,多态基因座位比例为 58.75%。Tassanakajon 等(1997)以 6 个引物对泰国斑节对虾野生群体的遗传多样性进行分析,检测到多态基因座位比例为 57%。Klinbunga 等(2001)采用 RAPD 和 mtDNA-RFLP 方法对 5 个泰国斑节对虾野生群体遗传多样性水平的研究也表明,RAPD 得到的多态位点比例达 46.7%~61.4%。海南斑节对虾种群的遗传多样性虽有一定的研究,但与进口亲虾的遗传差异比较研究仍很欠缺,不利于对虾的遗传选育。李康等(2005)以 10 个引物对海南和泰国斑节对虾的遗传多样性进行了分析,得到多态位点比例分别为 67.14%和 66.19%,遗传多样性指数分别为 0.234 和 0.267。我们检测的海南和马来西亚种群多态位点比例分别为 75.90%和 76.83%,和多样性指数分别为 0.276 和 0.288,位于已报道对虾 RAPD 检测的多态位点比例(0.242~1.000)范围之内(Benzie, 2000),但均稍高于上述报道,可能与我们采用的引物不同及数量要多有关。RAPD 和 16S rRNA 基因序列分析均表明,马来西亚种群遗传多样性更高,与东南亚(泰国、马来西亚等地)斑节对虾种群数量最大和遗传多样性最高的报道相符合(Benzie, 2000);亦与熊小飞等(2008)报道中国海域斑节对虾种群的基因多样性最低,西太平洋海域的基因多样性水平最高的结果一致。

3.2 种群间遗传分化

海南种群与进口亲虾间的遗传分化研究较少。杜晓东等(2004)以同工酶方法分析三亚和泰国纳颚岛斑节对虾群体间的遗传距离达到 0.062,检测到在 ALP-3、PGM-3 和 MDH-1 座位上出现了明显差异,基因分化系数达到了 27.12%,有可能存在亚种的分化。RAPD 分析亦显示 2 个种群间遗传差异明显。以 Hedgecock 等(1982)提出的同种生物不同群体间的遗传距离为 0.05~0.11 值为标准,海南与马来西亚种群间遗传分化程度很低。结果与 Forbes

等(1999)报道的西南印度洋 2000 km 的范围内 5 个斑节对虾种群间的 Nei 氏无偏遗传距离为 0.002 的结果类似,其原因应与该虾强的迁移能力和南海的水域环境特征相关。海南种群的天然产卵场位于海南岛的东部和南部水深 30~60 m 海区,与马来西亚种群地理距离相对较远,但海南和马来西亚同为南海的周围,存在强大的南海环流,与相邻大洋水体交换良好,水文环境相对稳定,温、盐等环境因子较为一致(管秉贤,1998;杨海军和刘秦玉,1998),环境的选择压力差异不明显,南海水域环境的稳定性应是种群间遗传分化低的主要原因之一。海南三亚种群与纳颚岛种群和马来西亚种群间不同的分化程度,则是与其地理位置密切相关的。纳颚岛种群位于印度洋,吉打州种群则位于西太平洋,处于斑节对虾种群遗传分化的交界处,已有研究报道,印度洋与西太平洋斑节对虾种群在马来西亚和印度尼西亚群岛边缘两侧基因频率差异明显(Benzie 2000)。

3.3 生物谱系地理分析

mtDNA 的分子数据的另一个应用是对物种形成过程中的进化历史事件,地理隔离、遗传分化原因进行推测。海南 6 个斑节对虾个体的 16S rRNA 基因序列完全相同,而马来西亚种群检测到 3 种单倍型,序列的多态核苷酸基因位点达到了 2.54%,海南和香港个体(AF279829)的单倍型与马来西亚的一种单倍型相同,因线粒体 DNA 具有严格的母系遗传特征,一个个体即可代表整个母系集团的情况。因此,海南种群有可能来源于马来西亚种群,今后可通过扩大采样范围和采用新的研究手段进行进一步研究;对多态核苷酸位点的检测也说明了马来西亚种群的遗传变异要高于三亚种群,海南种群低的遗传变异水平可能是受到奠基者效应(founder effect)和遗传漂变一定影响的结果。同时,已有的研究亦表明,泰国纳颚岛斑节对虾种群内的遗传多样性较三亚种群更丰富(杜晓东等,2004;李康等,2005)。生产中亦发现,从泰国、马来西亚等国家进口的亲虾具有个体较大,驯养成活率高,卵子成熟时间短、仔虾生长快等优点;而海南的成熟野生对虾个体较小,驯养成活率低,怀卵量少(李康等,2005;谭树华等,2005)。因此,海南斑节对虾较低的遗传变异水平可能是其亲虾质量较差和繁殖能力较低的主要原因之一,其相关性值得进一步深入研究。

参考文献

杜晓东,秦红贵,黄荣莲,等. 2004. 斑节对虾两个种群生

- 化遗传变异的研究. 海洋科学, **28**(6): 32-35.
- 管秉贤. 1998. 南海暖流研究回顾. 海洋与湖沼, **29**(3): 322-329.
- 李康, 杜晓东, 叶富良. 2005. 斑节对虾两个野生种群 RAPD 分析. 湛江海洋大学学报, **25**(3): 79-82.
- 苏天凤, 熊小飞, 江世贵, 等. 2010. 斑节对虾 7 个全同胞家系间亲缘关系的微卫星分析. 南方水产, (6): 1-7
- 谭树华, 王桂忠, 艾春香, 等. 2005. 斑节对虾养殖群体遗传多样性的同工酶和 RAPD 分析. 中国水产科学, **12**(6): 702-707.
- 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 等. 1996. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析. 中国科学(C 辑), **26**(5): 436-441.
- 熊小飞, 江世贵, 夏军红, 等. 2008. 中国南海海域斑节对虾群体与西印度洋、西太平洋群体种群遗传结构的比较分析. 水产学报, **32**(6): 855-863
- 杨海军, 刘秦玉. 1998. 南海海洋环流综述. 地球科学进展, **13**(4): 364-368.
- 钟振如, 李辉权, 张月平, 等. 1999. 南海西北部水域斑节对虾资源的调查研究. 热带海洋, **18**(3): 58-65.
- 周发林, 江世贵, 姜永杰, 等. 2006. 海南三亚斑节对虾野生种群 mtDNA 16S rRNA 和控制区序列的多态性. 南方水产, **2**(6): 13-18.
- 周发林, 江世贵, 姜永杰, 等. 2008. 南海野生斑节对虾的线粒体 16S rRNA 基因序列单倍型分析. 生态学杂志, **27**(11): 1955-1959
- Benzie JAH. 2000. Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquaculture Research*, **31**: 95-119.
- Bouchon D, Souty-Grosset C, Raimond R. 1994. Mitochondrial DNA variation and markers of species identity in two penaeid shrimp species: *Penaeus monodon* Fabricius and *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*, **127**: 131-144.
- Forbes AT, Demetriades NT, Benzie JAH. 1999. Allozyme frequencies indicate little geographic variation among stocks of giant tiger prawn *Penaeus monodon* in the South-West Indian Ocean. *South African Journal of Marine Science*, **21**: 271-277.
- Garcia DK, Benzie JAH. 1995. RAPD markers of potential use in penaeid prawn *Penaeus monodon* breeding programs. *Aquaculture*, **130**: 137-144.
- Hedgecock D, Tracey ML, Nelson K. 1982. The Biology of Crustacea, Embryology, Morphology and Genetics. vol. 2. New York: Academic Press: 283-403.
- Klinbunga S, Siludjai D, Wudthijinda W. 2001. Genetic heterogeneity of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and mitochondrial DNA RFLP analyses. *Marine Biotechnology*, **3**: 428-438.
- Lavery S, Chan TY, Tam YK, et al. 2004. Phylogenetic relationships and evolutionary history of the shrimp genus *Penaeus* s. l. derived from mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **31**: 39-49.
- Maggioni R, Rogers AD, Maclean N, et al. 2001. Molecular phylogeny of Western Atlantic *Farfantepenaeus* and *Litopenaeus* shrimp based on mitochondrial 16S partial sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **18**: 66-73.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 2002. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (2nd ed). Beijing: Science Press.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, et al. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of Entomological Society of America* **87**: 651-701.
- Spicer GB. 1995. Phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: Molecular evolution of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Journal of Molecular Evolution*, **41**: 749-759.
- Tassanakajon A, Pongsomboon S, Rimphanitchayakit V. 1997. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **6**: 110-115.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livark KJ, et al. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary markers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**: 6531-6535.
- Wilson K, Li YT, Whan V, et al. 2002. Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism. *Aquaculture*, **204**: 297-309.
- Xu ZK, Primavera JH, Leobert D. 2001. Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture*, **199**: 13-40.

作者简介 谭树华,男,1972年生,博士,副教授。主要从事甲壳动物繁殖生物学及遗传育种研究。E-mail: hstan@126.com
责任编辑 李凤芹