

应用微卫星标记分析野生中国明对虾的亲权关系

王鸿霞 张晓军 李富花 相建海

(中国科学院海洋研究所,实验海洋生物学重点实验室,青岛 266071)

摘要:利用5个高度多态性的微卫星座位(*Fc04*、*Fc06*、*Fc18*、*Fc24*、*Fc27*),分析了不同年份中建立的10个野生中国明对虾家系中的雌性亲虾及其后代基因型分离的情况,表明每个家系中只有一个雄性野生中国明对虾对子代的遗传有贡献。从其中3个家系的雌性亲虾纳精囊中提取了雄虾精子DNA,微卫星标记显示各家系的子代个体均有一个等位基因与雄性亲虾的基因型相符,且符合孟德尔遗传规律,这为野生中国明对虾雌虾在繁殖季节一对一的繁殖行为提供了遗传学的证据。用UPMGA的方法随机对3个家系的40尾子代个体进行聚类分析,每个家系都能被单独聚成一类。上述工作表明微卫星标记在对虾育种中作为一种有效的亲子关系分析工具,在种群的遗传结构、亲缘关系、繁殖行为等方面具有广阔的应用前景。

关键词:微卫星;中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*);亲权分析

中图分类号:Q344⁺.5 文献标识码:A 文章编号:1000-3207(2008)01-0042-05

在研究动物求偶、交配与繁殖等行为时,系谱或个体之间亲缘关系靠野外观察或物理标记的方法往往难以确定。随着以PCR为基础的DNA分子技术的兴起,微卫星标记因具有多态性丰富、符合孟德尔遗传规律等优点使得明确个体间亲缘关系、确认正确系谱成为可能^[1]。微卫星标记已经广泛应用于各物种的基因定位克隆、亲权分析、遗传图谱的构建以及系统进化研究等各个领域,这项技术在水生生物中也逐渐得到了广泛的应用。近几年来在中国明对虾中也开发了大量的微卫星标记并且应用于种群遗传结构的分析等方面^[2-4]。中国明对虾是我国重要的经济虾类,野生对虾的交配行为受到其生活环境的限制很难进行观察。高洪绪^[5]、王清印^[6]等通过对池养中国明对虾的观察,发现其交配一般发生在秋季雌虾最后一次脱皮之后、甲壳尚未完全硬化之前进行。交配后的雌虾不再蜕皮,直到翌年春天成熟产卵。此外中国明对虾交配后在纳精囊开口处形成“受精栓”结构。一般认为中国明对虾雌虾在繁殖季节中只能交配一次的观点就是根据中国明对虾的这些行为和结构特征提出来的,但目前还缺乏相关的遗传学证据。最近利用微卫星标记对不同物种进行遗传分析发现自然界中许多野生动物存在多个配

偶的现象。如长翼鱿鱼(*Loligo pealeii*)^[7]、玉黍螺(*Littorina obtusata*)^[8]、草虾(*Palaemonetes pugio*)^[9]、海龟(*Chelonia mydas*)^[10]等。微卫星应用于野生中国明对虾繁殖行为等方面的研究鲜有报道。我们利用筛选到的5个中国明对虾多态性EST-SSR标记对不同年份建立的10个中国明对虾家系进行亲权分析,通过分析子代个体中不同基因座等位基因的分离情况,推断野生中国明对虾雌虾的交配模式。

1 材料与方法

1.1 家系的构建 三批野生中国明对虾样品,分别于2003年、2004年、2005年4月购于山东海阳近海,暂养于中国科学院海洋研究所培育楼。这些雌性亲虾均已交配过,2003年以4只健康的中国雌虾分别构建4个家系(03-1#、03-2#、03-3#、03-4#)。2004年以3只健康的中国雌虾分别构建3个家系(04-1#、04-2#、04-3#)。2005年以3只健康的中国雌虾分别构建3个家系(05-1#、05-2#、05-3#)。每个家系仔虾的数量>10 000。

1.2 SSR引物 使用的5个多态性SSR序列是我实验室构建的中国明对虾EST数据库中筛选到的(表1)。引物序列由上海生工生物技术服务公司

收稿日期:2006-01-23;修订日期:2007-01-11

基金项目:国家自然基金(40706048);国家高技术发展计划(863)(2006AA10A406)资助

作者简介:王鸿霞(1975—),女,汉族,山东龙口人;博士后;研究方向为海洋动物分子遗传学。E-mail:hongxiawang007@yahoo.com.cn

通讯作者:相建海(1946—),男,汉族,山西永济人;研究员,博士生导师;E-mail:jhxian@ms.qdio.ac.cn

合成,上游引物5'端加FAM荧光标记。

1.3 模板DNA的制备 雌性亲虾取尾节肌肉,仔虾取整虾,从产卵后的雌虾纳精囊中抽取精子获得05-1#、05-2#、05-3#雄性亲虾的材料,采用常规的酚/氯仿抽提,乙醇沉淀的方法提取DNA。使用前经紫外分光光度计(BECKMAN DU650)检测浓度,-20℃保存备用。

1.4 PCR扩增与检测 PCR反应体系(20μL)包

括的基因组DNA 20ng,引物 10pmol,1×buffer,MgCl₂ 2.5μmol,dNTPs 0.2μmol,Taq DNA聚合酶1U。PCR反应条件为:94℃60s预变性之后94℃40s,适宜退火温度40s,72℃延长40s,一共35个循环,72℃10min,4℃保温。各对引物的最适退火温度通过梯度PCR结果确定(表1)。取PCR反应产物1μL,用ABI 310自动测序仪的GeneScan程序进行分析。

表1 中国明对虾5个微卫星基因座的特征

Tab. 1 Characterization of 5 microsatellite loci in *F. chinensis*

基因座 Locus	引物序列 Primer sequences	重复类型 Repeat type	退火温度 T _m
<i>Fc04</i>	TGCTTTAATGGTGCTG TACCAAGAATGGAGTG	(TTA) ₁₄	55
<i>Fc06</i>	ACAAACATAGCCAAAGCAC TATTCCTGTTGCTATTG	(TAA) ₁₆	55
<i>Fc18</i>	TCACATTAAACGAACAA AAATGTITATCGITAGGGAA	(CA) ₇ A(TA) ₂₂	54
<i>Fc24</i>	ATATGGAAAGTTCCTTTG CTATGCTTATGATCTGTC	(TG) ₄₀	55
<i>Fc27</i>	CGACCATTTCGGTGTC CCTCCGATAATTGAGACG	(AG) ₃₇	53

1.5 亲权分析 随机对10个家系的25—45个子代个体,以及构建家系的亲本在5个微卫星座位上的基因型进行分析。²检验是否符合孟德尔分离比例。用CERVUS(Version 2.0)^[11]软件分析家系中位点等位基因的数目、等位基因的频率、平均期望杂合度H_e、平均多态性

信息含量PIC等参数。根据基因型识别的结果,随机从表2家系05-1#中随机取16个,家系05-2#中取14个,家系05-3#中取10个体,使用软件Populations 1.2中DAS(Shared allele distance)^[12]的方法计算个体之间的遗传距离。用UPGMA的方法进行聚类分析。

表2 三个家系5个微卫星座位中子代基因型的分离情况

Tab. 2 Genotypes segregation of offspring at 5 loci in each family

家系 Family	基因座 Locus	亲本基因型 Parental genotype	子代基因型 Genotype (observed number offspring)				p	
			父本 Sire	母本 Dam				
05-1#	<i>Fc04</i>	196/229	196/223	229/196(10)	229/223(7)	196/196(5)	223/196(6)	0.57
	<i>Fc06</i>	203/215	203/227	203/227(10)	203/215(8)	215/227(5)	203/203(5)	0.46
	<i>Fc18</i>	151/166	174/180	151/174(7)	151/180(7)	166/174(8)	166/180(6)	0.96
	<i>Fc24</i>	211/231	207/231	231/231(4)	211/207(8)	211/231(9)	231/207(7)	0.57
	<i>Fc27</i>	201/237	201/231	201/201(5)	201/237(6)	201/231(6)	231/237(11)	0.37
05-2#	<i>Fc04</i>	196/226	196/214	196/214(9)	196/196(11)	196/226(7)	214/226(7)	0.73
	<i>Fc06</i>	197/209	197/209	197/197(11)	197/209(15)	209/209(8)		0.61
	<i>Fc18</i>	170/170	166/191	166/170(14)	191/170(20)			0.30
	<i>Fc24</i>	237/247	219/247	219/237(9)	219/247(8)	247/237(11)	247/247(6)	0.67
	<i>Fc27</i>	187/237	187/237	187/187(12)	187/237(16)	237/237(6)		0.36
05-3#	<i>Fc04</i>	217/229	205/217	205/217(9)	229/205(5)	217/217(9)	217/229(7)	0.69
	<i>Fc06</i>	197/215	203/215	197/203(6)	197/215(10)	215/215(7)	203/215(7)	0.75
	<i>Fc18</i>	191/151	166/217	191/166(5)	191/217(8)	151/166(11)	151/217(6)	0.42
	<i>Fc24</i>	219/207	237/211	219/237(7)	219/211(9)	207/237(9)	207/211(5)	0.69
	<i>Fc27</i>	187/191	231/231	187/231(12)	191/231(18)			0.27

2 结 果

2.1 微卫星座位的特征

5 个微卫星座位除了在个别家系中表现为纯合的基因座位外,在多数家系中均表现为共显性遗传。*Fc04*、*Fc06*、*Fc18*、*Fc24*、*Fc27* 在 10 个家系的双亲和子代中分别检测到 12、9、10、10、9 个等位基因,40、30、37、38、35、34 种基因型。其中 03 - 1 #、03 - 2 #、03 - 3 #、03 - 4 #、04 - 1 #、04 - 2 #、04 - 3 # 7 个家系中雄性亲虾的基因型是根据雌性亲虾和子代的基因型推测出来的,05 - 1 #、05 - 2 #、05 - 3 # 三个家系中雄性亲虾的基因型是通过检验相应的雌虾纳精囊中的精子实测到的。在两种情况下各微卫星座位均符合孟德尔遗传规律。5 个微卫星座位在 10 个家系的亲本(10 个雌性亲虾、05 - 1 #、05 - 2 #、05 - 3 # 3 个雄性亲虾)中共检出 47 个等位基因,平均每个微卫星座位等位基因的数目为 9.4,平均期望杂合度为 0.889,平均多态信息含量(PIC)为 0.839,等位基因频率在 0.0385—0.2692 之间。另外有 3 个等位基因存在于 03 - 1 #、03 - 2 #、03 - 3 #、03 - 4 #、04 - 1 #、04 - 2 #、04 - 3 # 7 个家系的雄性构建者中。

2.2 亲权分析

在 03 - 1 #、03 - 2 #、03 - 3 #、03 - 4 #、04 - 1 #、04 - 2 #、04 - 3 # 7 个家系中根据母本和子代的等位基因的类型可以推测出父本的相关信息,初步证实了一雌一雄的繁殖模式。在 2005 年建立的 3 个家系中,尝试提取了野生海捕雌虾纳精囊中的精子,5 个多态性微卫星标记对 05 - 1 #、05 - 2 #、05 - 3 # 3 个家系的雌性亲本和相应的雄性精子样本进行个体识别。除了 *Fc18* 在 05 - 2 # 精子, *Fc27* 在 05 - 3 # 雌性亲虾中表现为纯合外,其他个体在各基因座上都表现为共显性。家系 05 - 1 # 的 *Fc18*、家系 05 - 2 # 的 *Fc18*、家系 05 - 3 # 的 *Fc18*、*Fc24*、*Fc27* 基因座中的精子与雌虾的基因型完全不同,排除了从雌虾纳精囊中抽取的雄虾的精子被雌虾污染的可能。因此雄虾精子样本的基因型可以代表家系中父本的基因型。随机对家系 05 - 1 # 的 28 个子代个体、家系 05 - 2 # 的 34 个子代个体、家系 05 - 3 # 的 30 个子代个体不同基因座的基因型进行分析。结果表明每个家系中子代等位基因全部来自构建家系的雌性亲虾和对应的父本,在所有的子代中没有检测到与父本基因型不同的等位基因存在,也就是说,没有另外的雄虾参与授精。各微卫星座

位中等位基因的分离符合孟德尔遗传规律(表 2),支持了野生中国明对虾一对一的繁殖模式。

2.3 聚类分析

随机从表 2 家系 05 - 1 # 中随机取 16 个,家系 05 - 2 # 中取 14 个,家系 05 - 3 # 中取 10 个体,根据个体基因型的数据,用 Populations 软件计算出个体之间的遗传距离。从表 3 中可以看出家系内成员间平均遗传距离的范围为 0.425—0.542 明显低于家系之间的平均遗传距离的范围 0.788—0.864。用 UPGMA 的方法根据个体间遗传距离将 3 个家系的 40 个个体分别聚成三类,同一家系的个体均被单独聚成一类(图 1)。

表 3 05 - 1 #、05 - 2 #、05 - 3 # 3 个家系之间和家系内个体间的平均遗传距离

Tab. 3 Average value of genetic distances among individuals within and between families 05 - 1 #, 05 - 2 #, 05 - 3 #

	05 - 1 #	05 - 2 #	05 - 3 #
05 - 1 #	0.495 ± 0.153		
05 - 2 #	0.864 ± 0.101	0.425 ± 0.118	
05 - 3 #	0.858 ± 0.103	0.788 ± 0.100	0.542 ± 0.168

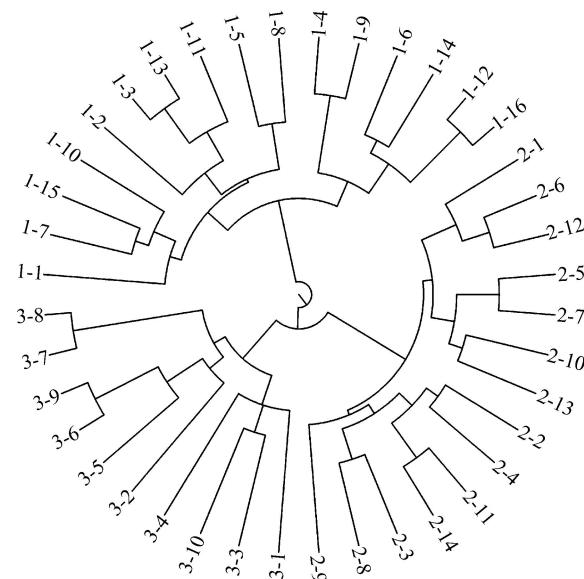


图 1 对 05 - 1 #、05 - 2 #、05 - 3 # 3 个家系的 40 个个体的遗传距离进行 UPGMA 聚类分析

Fig. 1 UPGMA dendrogram created from the genetic relatedness among

40 individuals of 3 families (05 - 1 #, 05 - 2 #, 05 - 3 #)

1-1 表示 05 - 1 # 家系中的 1 # 子代个体 1 - 1 means the 1 #

offspring of 05 - 1 # family

3 讨 论

微卫星标记因具有符合孟德尔遗传模式,呈共显性遗传,检测容易,重复性好,省时,适于进行自动

化分析,且位点突变发生率较低,平均为 10^{-4} — 10^{-5} ,所以无论在群体遗传还是在基因连锁分析、个体识别(包括亲子鉴定)、交配系统等方面都得到了广泛的应用。一般多态性基因座的定义是其最频繁出现的等位基因不超过0.95,这时相应的杂合度和多态性信息含量不小于0.1。我们在实验中选用的5个微卫星基因座位在10个家系中的多态性信息含量为0.839,显示了较高的多态性水平,符合个体识别的要求。虽然微卫星具有上述优点但也有不够完美的地方,其中无效等位基因的存在是一个比较普遍的现象^[13—15]。一般是认为由于在与引物3端配对的碱基发生替代,插入或缺失等突变而导致特定等位基因无法扩增的现象^[13,14]。在群体遗传分析中无效等位基因的存在常常会导致杂合子的缺失^[16],而且会影响亲子鉴定的正确性^[17]。因此在实验中我们从9个微卫星座位^[18]中进一步筛选了5个微卫星基因座位,它们基本满足了在需要检测的10个家系中呈共显性的要求。

中国明对虾的繁殖方式比较特殊:在自然环境条件下,中国明对虾雌雄虾的成熟期是不同的;雄虾当年就可达性成熟,而雌虾需到翌年4、5月才能成熟;雄虾成熟后,约在10月中旬至11月初与雌虾交配;交配时是在雌虾脱皮后新的甲壳未变硬前由雄虾将精英送入雌虾的纳精囊内,交配后的雄虾大部分死亡,精子在纳精囊中保存至第二年春天雌虾产卵同时释放。因此在3月份利用海捕野生中国明对虾构建家系,父本个体通常是无法获得的。吴长功等对中国明对虾纳精囊的形态结构的研究表明,中国明对虾的纳精囊为封闭式纳精囊,整个纳精囊为甲壳质的体壁内陷特化而形成,无明显的细胞结构,未发现纳精囊与雌虾体内有通道相连^[19]。在本实验中,微卫星个体识别技术也证实了中国明对虾纳精囊这种独特的结构能够确保雄虾精子DNA不被雌虾组织污染,使我们得到了父本的DNA。通过微卫星分析父本的基因型和构建家系,从分子生物学角度初步证实了中国明对虾一对一的繁殖模式,也就是说对一只雌虾来说只有一只雄虾对其授精。

参考文献:

- [1] Gao A B, Wu D J. Microsatellite markers for paternity testing of Liangshan semi-fine wool sheep [J]. *Hereditas* (Beijing), 2005, 27 (1): 85—90 [高爱保, 吴登俊. 利用微卫星标记进行凉山半细毛羊亲权鉴定的研究. 遗传, 2005, 27(1): 85—90]
- [2] Xu P, Zhou L H, Xiang J H. Isolating microsatellite DNA of Chinese shrimp *Penaeus Chinensis* [J]. *Oceanologica et Limnologia Sinica*, 2001, 32(3): 255—259 [徐鹏, 周岭华, 相建海. 中国对虾微卫星DNA的筛选. 海洋与湖沼, 2001, 32(3): 255—259]
- [3] Liu P, Meng X H, He Y Y, et al. Genetic diversity in three wild populations of shrimp *Fenneropenaeus Chinensis* in Yellow and Bohai seas as revealed by microsatellite DNA [J]. *Oceanologica et Limnologia Sinica*, 2004, 35 (3): 252—256 [刘萍, 孟宪红, 何玉英, 等. 中国对虾(*Fenneropenaeus Chinensis*)黄、渤海3个野生地理群体遗传多样性的微卫星DNA分析. 海洋与湖沼, 2004, 35 (3): 252—256]
- [4] Zhang T S, Wang Q Y, Liu P, et al. Genetic diversity analysis on selected populations of shrimp *Fenneropenaeus Chinensis* by microsatellites [J]. *Oceanologica et Limnologia Sinica*, 2005, 36 (1): 72—80 [张天时, 王清印, 刘萍, 等. 中国对虾(*Fenneropenaeus Chinensis*)人工选育群体不同世代的微卫星分析. 海洋与湖沼, 2005, 36(1): 72—80]
- [5] Gao H X. Primary observation of *Penaeus Chinensis* behavior in mating season [J]. *Marine Sciences*, 1980, 3: 5—7 [高洪绪. 中国对虾交配期的初步观察. 海洋科学, 1980, 3: 5—7]
- [6] Wang Q Y, Li J, Sun X T, et al. Studies on the mating ability and spermatophore regeneration in marine shrimp *Penaeus Chinensis* [J]. *Oceanologica et Limnologia Sinica*, 1998, 29(1): 22—28 [王清印, 李健, 孙修涛, 等. 中国对虾雄对虾交配能力和精英再生的研究. 海洋与湖沼, 1998, 29(1): 22—28]
- [7] Buresch K M, Hanlon R T, Maxwell M R, et al. Microsatellite DNA markers indicate a high frequency of multiple paternity within individual field-collecting egg capsules of the squid *Loligo pealeii* [J]. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 2001, 210: 161—165
- [8] Paterson I G, Partridge V, Buckland-Nicks J. Multiple paternity in *Littorina obtusata* (Gastropoda, Littorinidae) revealed by microsatellite analysis [J]. *Biol. Bull.*, 2001, 20: 261—267
- [9] Baragona M A, Haig - Ladewig L A, Wang S Y. Multiple paternity in the grass shrimp *Palaemonetes pugio* [J]. *Am. Zool.*, 2000, 40: 935
- [10] Ireland J S, Broderick A C, Gen F, et al. Multiple paternity assessed using microsatellite markers, in green turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) of Ascension Island, South Atlantic [J]. *J. Exper. Mar. Biol. Ecol.*, 2003, 291: 149—160
- [11] Marshall T C, Slate J, Kruuk L. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations [J]. *Mol. Ecol.*, 1998, 7(5): 639—655.
- [12] Jin L, Chakraborty R. Estimation of genetic distance and coefficient of gene diversity from single-probe multilocus DNA fingerprinting data [J]. *Mol. Biol. Evol.*, 1993, 11(1): 120—127
- [13] Jones A G, Stockwell C A, Walker A, et al. The molecular basis of a microsatellite null allele from the white sands pupfish [J]. *J. Hered.*, 1999, 89: 339—342
- [14] Banks M A, Blouin M S, Baldwin B A, et al. Isolation and inheritance of novel microsatellites in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J]. *J. Hered.*, 1999, 90: 281—288
- [15] Callen D F, Thompson A D, Shen Y, et al. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers [J]. *Am. J. Hum. Genet.*, 1993, 52: 922—927

- [16] Ball A O,Leonard S,Chapman R W. Characterization of (GT) ,microsatellites from native white shrimp *Penaeus setiferus* [J]. *Mol. Ecol.* ,1998 ,7:1251 —1253
- [17] Wang H X,Wu C G,Zhang L S , et al. The application of microsatellite markers for parentage determination in selective breeding of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Hereditas* (Beijing) ,2006 ,28:179 —183 [王鸿霞,吴长功,张留所,等.微卫星标记应用于凡纳滨对虾家系鉴别的研究.遗传 28:179 —183]
- [18] Wang H X,Li F H ,Xiang J H. Polymorphic EST-SSR markers and their mode of inheritance in *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Aquaculture* ,2005 ,249:107 —114
- [19] Wu C G,Zhou L H,Xiang J H , et al. Morphology and Structure of thelycum in *Trachypenaeus Curvirostris* and *Penaeus Chinensis* [J]. *Journal of Fisheries of China* ,1999 ,23(3) :223 —228 [吴长功,周令华,相建海,等.鹰爪虾与中国对虾雌虾纳精囊的形态结构.水产学报,1999 ,23(3) :223 —228]

KINSHIP ANALYSIS IN THE CHINESE SHRIMP (*FENNEROPENAEUS CHINENSIS*) BASE ON MICROSATELLITE DNA MARKERS

WANG Hong-Xia ,ZANG Xiao-Jun ,LI Fur Hua and XIANG Jian-Hai

(Experimental Marine Biology Laboratory , Institute of Oceanology , Chinese Academy of Sciences , Qingdao 266071)

Abstract :The mating mode of Chinese shrimp (*F. chinensis*) is supposed to be pair mating from observation of their mating habits. However ,this suggestion has not been confirmed genetically yet. In this study ,five microsatellite loci (*Fc04* ,*Fc06* ,*Fc18* ,*Fc24* and *Fc27*) were used to survey the mating mode of the wild Chinese shrimp in ten families which were built in different years. The male 's genotypes could be determined from those of a female and her offspring at every locus. Only one combination of male genotypes was observed in each family. Farther ,the sperm DNA of wild male was extracted from copulated wild female thelycum in three families of the ten. The result of microsatellite markers showed that the sperm DNA of wild males were not contaminated by female genome DNA. At each locus ,every progeny had one allele found in the male genotype. The distributions of genotypes in offspring of the ten families were consistent with the Mendelian segregation. All of these suggested that one female copulated to one male and supported that the mating mode of this prawn is pair-mating. The cluster analysis based on UPMGA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) between individual within/ among families was also examined and showed that each family formed single cluster ,respectively. Microsatellite markers as an effective tool for kinship analysis could be widely used to reveal the population structure ,mating mode ,etc. in breeding programs.

Key words : Microsatellite ; *Fenneropenaeus chinensis* ; Kinship analysis