

日本沼虾三群体线粒体 16S rRNA 基因片段序列的差异与系统进化

孙悦娜^① 冯建彬^① 李家乐^{①*} 聂式忠^②

(^①上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室 上海 200090;

^②浙江省长兴县水产技术推广站 浙江 长兴 313100)

摘要:通过对日本沼虾 *Macrobrachium nipponense* 3 个群体线粒体 DNA 16S rRNA 基因片段进行扩增和测定,得到长度为 495 bp 的片段,其碱基 A、T、G 和 C 的平均含量分别为 28.6%、36.1%、22.7% 和 12.5%, AT 含量明显高于 GC 含量。通过对日本沼虾 16S rRNA 基因片段遗传特征的研究发现其种内变异很小,在 3 个群体中只有 5 个位点发生转换。另外,利用其 454 bp 的同源序列,以中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 为外群探讨了沼虾属日本沼虾、罗氏沼虾 (*M. rosenbergii*) 等 8 种沼虾的系统进化关系。用 MEGA 3.1 软件中的 NJ 法构建的分子进化树,日本沼虾 3 个群体先聚在一起后与海南沼虾聚在一起;另外,罗氏沼虾与马氏沼虾、短腕沼虾与贪食沼虾亲缘关系较近先聚在一起,然后再与大臂沼虾和等齿沼虾聚在一起,最后才与外群中国明对虾聚在一起。

关键词:日本沼虾;16S rRNA 基因;系统进化;沼虾属

中图分类号:Q953 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2007)01-59-08

Sequence Analysis and Molecular Phylogeny of Mitochondrial 16S rRNA Gene Fragments in Three Populations of *Macrobrachium nipponense*

SUN Yue-Na^① FENG Jian-Bin^① LI Jia-Le^{①*} NIE Shi-Zhong^②

(^① *The Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090;*

^② *Changxing Fisheries Technology Station, Changxing Zhejiang 313100, China*)

Abstract: Mitochondrial 16S rRNA gene fragments of wild *Macrobrachium nipponense* were amplified with PCR, then the PCR products were purified and sequenced, and 495 bp nucleotide sequences were obtained. The A, T, G and C contents in this fragment were 28.6%, 36.1%, 22.7% and 12.5%, respectively; the AT content was higher than the GC content. Little sequence variation was observed in 16S rRNA gene fragments within species, and transition in only 5 loci was revealed in three populations. Furthermore, 454 bp fragment of the sequence was used to discuss the phylogenetic relationship among *M. nipponense*, *M. rosenbergii*, *M. hainanense*, *M. malcolmsonii*, *M. lar*, *M. latimanus*, *M. carcinus* and *M. equidens* using *Fenneropenaeus chinensis* as the out-group. The molecular phylogenetic tree was constructed by NJ method using software MEGA 3.1, and three populations of *M. nipponense* were clustered

基金项目 浙江省科技攻关计划项目(No. 2004C32054)和上海市水产办项目(No. 2005-06), 上海市重点学科建设项目资助(No. Y1101);

* 通讯作者, E-mail: jlli@shfu.edu.cn;

第一作者介绍 孙悦娜,女,硕士研究生,研究方向:水产动物种质资源与种苗工程, E-mail: yuenasun@163.com

收稿日期 2006-05-19, 修回日期 2006-11-05

first and then clustered with *M. hainanense*; *M. rosenbergii* and *M. malcolmsonii*, as well as *M. lar* and *M. latimanus* had a closer genetic relationship and were clustered first, then they were clustered with *M. carcinus* and *M. equidens*, and finally with *Fenneropenaeus chinensis*.

Key words : *Macrobrachium nipponense*; 16S rRNA gene; Molecular phylogeny; *Macrobrachium*

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*), 俗称青虾、河虾。属于甲壳纲(Crustacea), 十足目(Decapoda), 长臂虾科(Palaemonidae), 沼虾属(*Macrobrachium*)。自然分布于中国、日本和东南亚。在我国, 广泛分布于南北各地的江河湖泊中, 是主要淡水养殖虾类, 也是主要淡水名特优养殖品种之一。由于长期的地理隔离形成了不同的种群, 主要有太湖种群、鄱阳湖种群、洞庭湖种群等。其中, 尤以太湖地区日本沼虾产量最高、品质最优^[1]。目前, 我国日本沼虾养殖过程中种质退化现象比较严重, 开展我国日本沼虾的良种选育, 培育高品质的日本沼虾品种, 对于保障日本沼虾的种苗生产质量, 促进我国淡水养虾业的健康可持续发展具有重要意义。而种质资源研究是开展良种选育的基础, 因此, 对不同水系日本沼虾的遗传特征和种质差异的研究对目前养殖业来说是当务之急。

以前从形态学、养殖学、生化遗传学^[2-5]等方面曾对日本沼虾种质资源做过报道。但分子遗传学的研究报道较少, 而对线粒体的研究则未见报道。本文以太湖、鄱阳湖和洞庭湖的日本沼虾为研究对象, 对其线粒体 DNA 16S rRNA 基因进行了初步分析, 并结合 GenBank 中沼虾属另外 7 种沼虾的同源序列初步分析了它们的系统进化关系, 以期日本沼虾种质资源的管理、保护和利用提供理论上的依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 实验用日本沼虾于 2005 年 10 月至 2006 年 5 月采集, 太湖群体(TH)采自江苏省吴江市, 洞庭湖群体(DTH)采自湖南省岳阳市, 鄱阳湖群体(PYH)采自江西省九江市。每个群体取 5 个个体, 经形态学鉴定后, 无水乙醇固定保存待用。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采取常规苯酚氯仿提取法, 并略有改进, 每个样本取 100 mg 左右的尾部肌肉, 剪碎后, 加入 500 μ l 组织匀浆缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 50 mmol/L EDTA, pH 8.0), 混匀后加入终浓度为 1% 的 SDS 和 200 μ g/ml 的蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 水浴过夜。Tris-饱和酚、Tris-饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、氯仿:异戊醇(24:1)各抽提一次。无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤两次, TE 溶解。紫外分光光度计测定样品 DNA 的 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 值, 确定其浓度和纯度, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增和产物鉴定 用于扩增的引物分别为 16SA 5'CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT 3'; 16SB :5' CCG GTT GAA CTC AGA TCA 3'^[6], 引物由上海生工生物工程有限公司合成。反应在 Eppendorf Mastercycler 5333 型 PCR 仪上进行。反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min; 52 $^{\circ}$ C 退火 1 min; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增反应为 25 μ l 的反应体积, 其中含 10 \times Buffer 2.5 μ l, dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 各 0.2 mmol/L, 上、下游引物各 0.2 μ mol/L, 模板 DNA 50 ~ 100 ng, Taq plus DNA 聚合酶 1 U(Tiagen), MgCl₂ 1.5 mmol/L。每次反应都设不含模板的空白实验。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶检测, 电泳缓冲液为 0.5 \times TBE(pH 8.0), 电压为 5 V/cm, 常温电泳, EB 染色, 于凝胶成像系统下观察并拍照记录。

1.2.3 DNA 序列测定 将 PCR 产物送往上海生工生物工程有限公司, 纯化后直接进行测序反应, 测序引物为 16SA/16SB。

1.2.4 数据分析 测得的序列通过 DNA Star 软件包的 SeqMan、Megalign 软件进行序列拼接、比对, 并经人工核查。利用 MEGA 3.1 软件进行所测序列的编辑、排序、系统进化和遗传学分析。采用 Kimura 双参数模型计算遗传距离, 以

中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) (AF310157) 为外群, 用 NJ 法构建系统树, 进化树各分支的置信度由 Bootstrap 1 000 循环检验。另从 GenBank 中查找沼虾属的罗氏沼虾 (*M. rosenbergii*) (AY439522)、海南沼虾 (*M. hainanense*) (AY377841)、马氏沼虾 (*M. malcolmsonii*) (AY730050)、贪食沼虾 (*M. lar*) (AY203922)、短腕沼虾 (*M. latimanus*) (AY282765)、大臂沼虾 (*M. carcinus*)

(AY282779) 和等齿沼虾 (*M. equidens*) (AY282773) 的 16S rRNA 基因片段序列, 作为比较资料。

2 结果

2.1 日本沼虾 16S rRNA 基因片段扩增结果

经 PCR 优化条件后, 扩增出 16S rRNA 的基因片段, 如图 1 所示, 从图中可以看出扩增片段为单一明亮清晰的条带, 大小在 500 bp 左右。

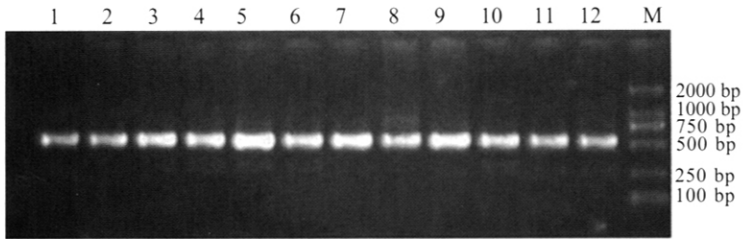


图 1 由引物 16SA 和 16SB 扩增出的 mtDNA 的 16S rRNA 基因片段

Fig.1 mtDNA 16S rRNA gene fragment of *Macrobrachium nipponense* amplified by primer 16SA and 16SB

M: D2000 DNA 分子量标准; 1~4: 太湖群体; 5~8: 鄱阳湖群体; 9~12: 洞庭湖群体。

M: D2000 DNA ladder marker; 1~4: Tai Lake population; 5~8: Po-yang Lake population; 9~12: Dong-ting Lake population.

2.2 日本沼虾 16S rRNA 基因序列与碱基组成

PCR 产物纯化后经过测序, 得到了大约 500 bp 的序列, 与 GenBank 中的序列进行同源性比对, 将两端测序时出现的错误碱基剪切, 最后得到了 495 bp 的 16S rRNA 基因序列 (图 2)。与数据库中的序列进行比对后发现与沼虾属的虾类的 16S rRNA 有很高的同源性, 说明测得的序列为日本沼虾的 16S rRNA 基因片段, 适合进行

分析。3 个群体中一共有 3 种单倍型, 其中发生转换突变的位点数为 5 个 (1.01%), 没有碱基颠换, 群体间的碱基差异很小。将每个群体的一个单倍型序列提交 GenBank, 经过数据库注释后获得序列登录号, 分别为太湖 (DQ462406)、鄱阳湖 (DQ462407)、洞庭湖 (DQ462408)。

```

1 aagtctagcc tgcccactga ttgatttaaa gggccgcggt aatttgaccg tgccaaggta
61 gcatagtcag tagtctttta attgaaggct tgaatgaaag gttggacgag ggatgagctg
121 tctcctttac gtaatttgaa ttttaactttt gagtgaaaag gctcaaatta tttagtggga
181 cgataagacc ctataaaact ttatataagt ttaatttggc ttacaatttg agtgaaaagt
241 agctttatta ggcttatatt tcgctgggga gatgtagata taatgtgtaa ctgtctgttt
301 aatttaataa ttataattag tgtgtgatcc ttctttgtgg attaaaagta taagttactt
361 tagggataac agcgtgattt tctttgagag ttcttatcga caagagtagt tgcgacctcg
421 atgttgtaatt aaaatttcag ttaggtgtag ccgtctagct ggtaggtctg ttcgaccttt
481 aaaattttac atgat

```

图 2 日本沼虾太湖群体 16S rRNA 基因片段核苷酸序列 (495 bp)

Fig.2 The nucleotide sequence of 16S rRNA gene fragment of *M. nipponense* of Tai Lake (495 bp)

利用 BLAST 在 GenBank 中进行同源序列查找, 查得沼虾属另外 7 种沼虾线粒体 DNA 16S rRNA 基因片段, 经序列比对后取其 454 bp 的同源片段与本研究的日本沼虾进行分析, 表 1 是 8 种沼虾的 16S rRNA 基因片段的碱基组成。从表中可以看出, A、T、G、C 4 种碱基的含量在不同种群间变化不大。G + C 含量不高于

40%, 相应的 A + T 含量不低于 60%, 8 种沼虾的 AT 含量大部分在 64% 左右, 只有罗氏沼虾和海南沼虾分别为 62.6% 和 67.3%, 由此可见, 8 种沼虾的 AT 明显高于 GC 含量。这一结果与在甲壳类、双壳贝类等的 16S rRNA、12S rRNA 和 COI 等线粒体基因片段中的观察结果相似^[7-12]。

表 1 8 种沼虾 16S rRNA 基因片段的碱基组成

Table 1 Base composition of 16S rRNA gene fragments of eight species of *Macrobrachium* shrimp

物种 Specieses	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	A + T (%)	G + C (%)	总片段 Total(bp)
<i>M. nipponense</i> (TH)	36.0	12.5	28.7	22.8	64.7	35.3	495
<i>M. nipponense</i> (PYH)	36.2	12.7	28.5	22.6	64.7	35.3	495
<i>M. nipponense</i> (DTH)	36.2	12.3	28.7	22.8	64.9	35.1	495
<i>M. latimanus</i>	35.8	10.8	30.0	23.4	65.8	34.2	456
<i>M. carcinus</i>	35.8	12.2	27.0	25.0	62.8	37.2	456
<i>M. equidens</i>	34.8	11.2	29.7	24.3	64.5	35.5	476
<i>M. hainanense</i>	36.7	10.0	30.6	22.7	67.3	32.7	454
<i>M. lar</i>	34.7	12.4	27.9	25.0	64.6	35.4	476
<i>M. rosenbergii</i>	34.7	11.9	27.7	25.7	62.6	37.4	476
<i>M. malcolmsonii</i>	34.9	11.9	28.8	25.0	63.7	36.3	476
平均值 Avg.	35.6	11.4	29.7	24.1	65.3	34.7	

TH :日本沼虾太湖群体 ;PYH :日本沼虾鄱阳湖群体 ;DTH :日本沼虾洞庭湖群体。

TH :*M. nipponense* of Tai Lake ;PYH :*M. nipponense* of Po-yang Lake ;DTH :*M. nipponense* of Dong-ting Lake .

8 种沼虾的 16S rRNA 基因序列变异位点见图 3。从图 3 可以看出在分析的日本沼虾 3 群体 16S rRNA 454 bp 的基因片段序列中没有出现碱基插入、缺失、颠换或重排等遗传变异信息, 只有 3 个位点发生转换 (A/G, C/T)。8 种沼虾一共有 110 个变异位点, 其中单突变子位点 48 个, 信息位点 6 个, 插入和缺失位点 1 个。从变异位点可以看出这些差异主要集中在所分析序列的中间。

2.3 基于 16S rRNA 序列计算出的 8 种沼虾的相对遗传距离 基于所测得的序列, 利用 MEGA 3.1 软件中的 Kimura 双参数模型 (转换加颠换、转换比颠换), 分别计算 8 种沼虾间的相对遗传距离 (表 2)。从表 2 中可以看到, 8 种沼虾间的遗传距离在 0.055 6 ~ 0.133 9 之间, 其中罗氏沼虾与马氏沼虾的遗传距离最小, 为 0.055 6, 等齿沼虾与贪食沼虾的遗传距离最大, 为 0.133 9, 8 种沼虾的平均遗传距离为 0.098 8。此外, 8 种沼虾之间序列碱基转换与颠

换比平均为 1.740, 一般认为转换颠换比值小于 2.0 时, 则此基因序列突变已经达到饱和状态, 受进化噪音的影响可能性较大, 由此可见, 本研究 8 种沼虾的 16S rRNA 基因片段是相对比较保守的序列。

2.4 基于 16S rRNA 基因序列的 8 种沼虾的系统进化关系 以中国明对虾为外群, 用 MEGA 3.1 软件中的 NJ 法构建分子进化树 (图 4), 进化树各分支的置信度由 Bootstrap 1 000 循环检验。从图中可以看出进化树主要分为两大支: 日本沼虾 3 个群体先聚在一起后与海南沼虾聚成一支; 另外, 罗氏沼虾与马氏沼虾先聚为一小支再与大臂沼虾聚在一起, 然后短腕沼虾与贪食沼虾与以上分支聚在一起后再与等齿沼虾构成一大支, 最后中国明对虾作为外群出现在进化树的最外层。从进化树中可以直观地看出罗氏沼虾与马氏沼虾、短腕沼虾与贪食沼虾、日本沼虾与海南沼虾之间的亲缘关系较近, 而日本沼虾、海南沼虾与罗氏沼虾的亲缘关系较远。

	11	1111111111	1111111111	1111111222	2222222222	2222222222
	667889900	0001024444	5578888888	9999999000	0001111122	2222222333
	1195780115	6890170678	0282345678	0134569013	4670578901	2346789012
<i>M. nipponense</i> (TH)	TAAAGGTGCA	CTAATGCATT	ATTTAAGTTT	ATTGGCACAT	TGAGGAGCTT	TATAGGCTTA
<i>M. nipponense</i> (PYH) T T T T T T
<i>M. nipponense</i> (DTH) T T T T T T
<i>M. latimanus</i>	A..T..A..	T..G.ATG..	..A.GTAC.G	G..AAT.TG.	AA.....T.A	..CT..T.C.
<i>M. carcinus</i>	.GTT..CAT.	.GG.....	..C.G...G	G.CAATGTG.	..T...T...T.	..T..TC.G
<i>M. equidens</i>A..ATG	..GG...TC.	..A.....A	..G.ATGTG.	.C.A.G.TCC	.T..A.T...
<i>M. hainanense</i>AT.	T..G...G.	..G.....	A-A..T..	A...TT..	A.GG.TT...
<i>M. lar</i>	...T...A.G	...T.AT...	..A.G...C.G	G...ATGTG.	G.G.A..T..	..CT..T.CG
<i>M. rosenbergii</i>	.G.T.A.A..	.GTG...G.C	GGG...T.G	G..AA.G.GG	G.....T.C	.G.C..T...
<i>M. malcolmsonii</i>	.G.T..CA..	.GTGC....	.AG...T.CG	.C..A.GTG.	...A..TC.	.G.T..T...
	2222222222	2222222222	2223333333	3333333333	3344444444	3344444444
	1122222567	7788112233	4434455566	7777788888	8899900111	8899900111
	5612367301	6701585712	1386901201	1235691267	8937808012	8937808012
<i>M. nipponense</i> (TH)	CATGTATGCT	GTTTAAATTA	TTGGTTT-TG	AAATAGTTGA	AGCTTGTCAG	AGCTTGTCAG
<i>M. nipponense</i> (PYH) A A A A A A
<i>M. nipponense</i> (DTH) A A A A A A
<i>M. latimanus</i>AT..	A.....GT	..TT...-AA	..A.....	..C...TG.	..C...TG.
<i>M. carcinus</i>	TCCA...A.	ACA.A.G.GT	..TT...-G	.G.A..CC.	G..C...TG.	G..C...TG.
<i>M. equidens</i>T.	AAACA...C.	..T.GAGA..	G..AGA...	..TC...TG.	..TC...TG.
<i>M. hainanense</i>	T.....T.	AAA.....	..A.....	..A.....	..CC...T.T	..CC...T.T
<i>M. lar</i>AGGA.C	AGG...C.GT	...T..G-A.	..GA.A..CC	.A.C.CCTG.	.A.C.CCTG.
<i>M. rosenbergii</i>A.....	...TGAAT	CAAT...-A.	.G.AT....	...C...T..	...C...T..
<i>M. malcolmsonii</i>A.....	A.G..TG.AT	AAT...-A.	.GGA.....	...C...TG.	...C...TG.

图 3 8 种沼虾 16S rRNA 基因序列(454 bp)的变异位点

Fig. 3 Variation sites in 454 bp fragment of 16S RNA gene among eight *Macrobrachium* shrimp species

TH: 日本沼虾太湖群体; PYH: 日本沼虾鄱阳湖群体; DTH: 日本沼虾洞庭湖群体。

TH: *M. nipponense* of Tai Lake; PYH: *M. nipponense* of Po-yang Lake; DTH: *M. nipponense* of Dong-ting Lake.

表 2 用 Kimura 双参数法计算 8 种沼虾的相对遗传距离

Table 2 Genetic distance calculated among eight species of *Macrobrachium* shrimp by Kimura's two parameter method

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>M. nipponense</i> (TH)	-	2/0	3/0	1.810	2.301	2.142	2.204	1.605	1.094	1.488
2. <i>M. nipponense</i> (PYH)	0.004 4	-	1/0	1.650	2.301	2.143	1.962	1.605	1.205	1.488
3. <i>M. nipponense</i> (DTH)	0.006 7	0.002 2	-	1.570	2.552	2.218	1.842	1.605	1.149	1.421
4. <i>M. latimanus</i>	0.089 8	0.084 7	0.082 1	-	2.011	1.300	0.883	1.335	1.795	1.915
5. <i>M. carcinus</i>	0.110 7	0.110 7	0.113 4	0.110 4	-	1.916	1.363	1.786	1.721	2.124
6. <i>M. equidens</i>	0.105 4	0.105 4	0.102 7	0.117 7	0.120 8	-	1.688	1.618	1.015	1.242
7. <i>M. hainanense</i>	0.065 1	0.060 1	0.057 7	0.091 8	0.115 1	0.092 2	-	1.444	0.803	1.093
8. <i>M. lar</i>	0.120 6	0.120 6	0.120 6	0.074 6	0.115 5	0.133 9	0.131 0	-	2.048	1.992
9. <i>M. rosenbergii</i>	0.096 9	0.102 1	0.099 5	0.102 5	0.112 8	0.133 2	0.114 6	0.126 3	-	3.393
10. <i>M. malcolmsonii</i>	0.097 2	0.097 2	0.094 6	0.100 0	0.092 4	0.120 2	0.107 1	0.102 6	0.055 6	-

TH: 日本沼虾太湖群体; PYH: 日本沼虾鄱阳湖群体; DTH: 日本沼虾洞庭湖群体; 对角线以下是转换加颠换, 对角线以上是转换比颠换。

TH: *M. nipponense* of Tai Lake; PYH: *M. nipponense* of Po-yang Lake; DTH: *M. nipponense* of Dong-ting Lake; below diagonal, transition + transversion, above diagonal, transition/transversion.

3 讨论

3.1 线粒体 DNA 16S rRNA 基因序列在水产动物研究中的应用

线粒体 DNA 是核外遗传

物质, 由于通过细胞质将信息传递给后代, 所以大多数表现为母系遗传。由于其具有结构简单、易于分离、进化较快等特点, 在动物种群遗传结构分析、物种及品系鉴定方面得到了广泛

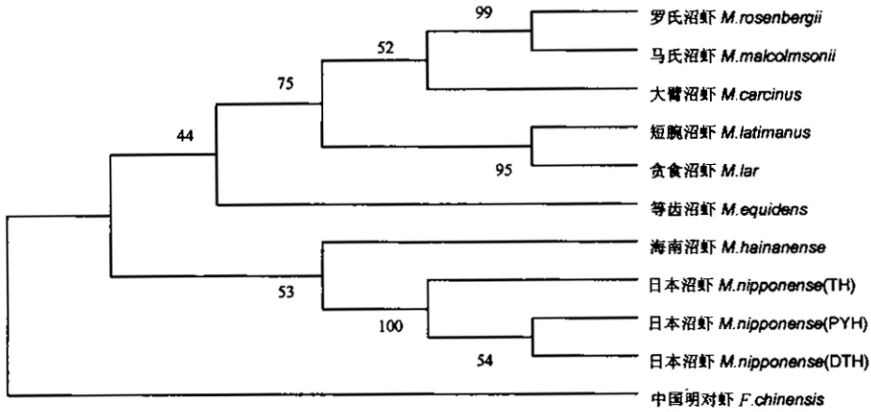


图 4 用 NJ 法计算的 8 种沼虾的分子系统树

Fig. 4 NJ method molecular phylogenetic tree of eight species of *Macrobrachium* shrimp

TH: 日本沼虾太湖群体; PYH: 日本沼虾鄱阳湖群体; DTH: 日本沼虾洞庭湖群体。

TH: *M. nipponense* of Tai Lake; PYH: *M. nipponense* of Po-yang Lake; DTH: *M. nipponense* of Dong-ting Lake.

的应用。线粒体 DNA 基因片段中的碱基 AT 含量很高,序列较为保守,适合于种内或种间群体的遗传分析。因为不论个体还是群体,任何遗传变异或多态最终都是 DNA 序列的差异;DNA 序列分析可以检测到碱基替换、插入和缺失等变异信息,从而在分子水平检测个体、群体及种间的多态及遗传差异,因此线粒体 DNA 序列分析是 DNA 多态性分析技术中最有效的方法之一,通过线粒体 DNA 的多态性,可以开展对生物的遗传结构变异和遗传多样性的研究,如邱高峰等^[13]对烟台、长岛、青岛近海和宁波养殖的共 17 只中国明对虾的 16S rRNA 基因片段进行分析,检测到了丰富的遗传多样性。Garcia-Machado 等^[14]用 16S rRNA 基因片段检测出美菲对虾 (*Penaeus notialis*) 和南方白对虾 (*P. schmitti*) 之间存在较明显的差异, Boulding 等^[15]用 16S rRNA 基因序列分析了虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 1 个养殖群体和 2 个野生群体的多样性,检测到了丰富的遗传变异位点,高天翔等^[10]对野生群体和人工培育的第一代、第四代、第五代和第六代中国明对虾 16S rRNA 基因片段的分析表明,其遗传多样性水平很低,个体间没有遗传分化。庆宁等^[11]对墨吉对虾 (*P. merguensis*) 16S rRNA 基因序列的分析表明,广东的 3 个群体与澳洲或新加坡群体之

间不存在遗传差异。刘亚军等^[16]利用 16S rRNA 基因片段序列对 4 个不同自然分布区的栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 的多态性进行研究,发现 4 个自然分布区的栉孔扇贝未出现明显的遗传分化,检测的遗传多样性水平偏低,杨建敏等^[17]对 3 种鲍 (盘鲍 *Haliotis discus*、皱纹盘鲍 *H. discus hannai* 和大鲍 *H. gigantea*) 的 16S rRNA 基因片段序列进行比较研究后认为,16S rRNA 基因在鲍属内表现出很高的保守性。这些研究结果均表明线粒体 DNA 16S rRNA 基因应用是十分广泛的。

3.2 日本沼虾三群体间差异及沼虾属系统进化研究 本研究通过对 3 个群体日本沼虾 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增和序列测定,得到了长度为 495 bp 的目的片段,日本沼虾 3 个群体间只有 5 个位点发生变异,种内差异不明显,未出现明显的遗传变异,由于线粒体 16S rRNA 基因较为保守,本研究的结果不足以区分这 3 个群体之间的遗传差异,因而关于日本沼虾这 3 个群体的变异程度有待于利用其他标记进一步分析。另外,通过 GenBank 查找到其他 7 种沼虾的 16S rRNA 片段的同源序列,并对这 8 种沼虾 16S rRNA 基因中长度为 454 bp 同源片段进行序列对比发现,这 8 种沼虾该基因片段的差异主要集中在所分析序列的中间,通过对 8 种

沼虾的 16S rRNA 基因序列的分析,笔者认为尽管 16S rRNA 这一相对保守片段不能很好地分析种内个体的变异,但是该片段能较好地分析沼虾属内种类间的遗传差异及进化关系。

有关沼虾属种类的分子遗传学研究起步较晚,而且研究对象也仅限于罗氏沼虾、日本沼虾、海南沼虾等有较高经济价值的物种。Miller 等^[18]测得了罗氏沼虾线粒体 DNA 全序列的长度为 15 772 bp,其基因的排列顺序除基因 tRNA_{Leu}(UUR)外,与假定古节肢动物模式生物鲎相符。彭巧玲等^[19]采用 PCR 技术扩增了罗氏沼虾 3 个 Dmrt 基因的序列,获得了 Dmrt 基因家族的 3 个成员,与其他动物相关的 Dmrt 基因进行分析的结果表明,序列存在高度的同源性。Chand^[20]用微卫星标记技术分析罗氏沼虾表明,等位基因数从 12 ~ 18 不等,杂合度在 0.66 ~ 0.90 之间,显示了罗氏沼虾较高的遗传多样性。

本研究计算的遗传距离和系统进化树表明,在沼虾属 8 种沼虾中海南沼虾和罗氏沼虾亲缘关系最远,而罗氏沼虾和马氏沼虾、日本沼虾和海南沼虾亲缘关系较近,而其他沼虾相互之间的遗传距离大部分维持在 0.1 左右属内种间分化的水平,而这样的结果与邱涛等^[21]通过 SRFA-DNA 指纹技术构建了罗氏沼虾、日本沼虾、海南沼虾和粗糙沼虾(*M. asperulum*) 4 种沼虾之间的谱系关系图,发现日本沼虾和海南沼虾在遗传上比较接近,属于同一“支序”的这一结果有同义之处。本研究利用 16S rRNA 序列对 8 种沼虾系统进化关系进行了初步分析得出了以上结论,但目前沼虾属的系统进化关系的研究较少,尚未检索到对沼虾属较大范围系统进化的研究报道,因此沼虾属种间确切的系统位置还有待于利用更多的数据和更多的统计方法来证明。

3.3 利用分子标记对沼虾属进行辅助育种的探讨 遗传距离的大小在一定程度上反映了物种间的亲缘关系,有利于进行系统进化的分析,同时在实际应用上有利于为杂交育种等提供一些理论依据。沼虾类大部分不能进行种间自然

杂交,但在少数非常近缘的种之间可以自行交配。沼虾属中已报道的能进行自然杂交的组合有:罗氏沼虾与马氏沼虾、粗糙沼虾与 *M. shokitai* 及台湾沼虾(*M. formosense*)与日本沼虾^[22]。傅洪拓等^[23]曾报道了日本沼虾和海南沼虾人工种间杂交成功的例子,得到了 F₁ 代,并表现出一定的杂种优势。从本研究得到的系统进化树可以看到,日本沼虾与海南沼虾处于一个分支中,遗传距离较近;罗氏沼虾与马氏沼虾聚在一起,遗传距离也较近。王鹭晓等^[24]曾提出遗传距离越近则杂交受精率越高,遗传距离越远则杂交的受精率越低,可以认为遗传距离越近杂交成功的可能性更大一些。因此对沼虾属系统进化和遗传距离的研究不仅具有学术价值,而且对以后沼虾属物种的遗传育种和品质改良也具有应用价值。

线粒体 DNA 不同区域变异率存在差异,遗传变异的解析能力也有差别。本研究中,虽然发现这 3 个群体日本沼虾存在一定的差异,但是由于变异位点较少,不足以区分这 3 个群体的日本沼虾的遗传特性,有待于从线粒体其他变异较大的基因(如 COI、Cyt b、D-loop)上进一步分析,以得到更多的信息。另外,还可以把线粒体 DNA 序列数据与 RFLP、AFLP、SSR 等核 DNA 标记结合起来,在方法上相互补充,则能更客观、全面地反映遗传变异的水平。

参 考 文 献

- [1] 李家乐,聂式忠,冯建彬等.长江中下游五个青虾群体网箱生长和养殖性能比较.上海水产大学学报,2005,9(14):258~262.
- [2] 洪一江,张立明,胡成钰,鄱阳湖日本沼虾幼体发育及其同工酶研究.中国水产科学,2002,9(3):203~206.
- [3] 赵晓勤,倪娟,陈立桥等.日本沼虾 4 种群的形态差异分析.中国水产科学,2006,13(2):224~229.
- [4] Wang W N, Liang H, Wang A L, et al. Effect of pH and Zn²⁺ on subcultured muscle cells from *Macrobrachium nipponense*. *Methods in Cell Science*, 2001, 22: 277~284.
- [5] 杨严鸥,向华云,姚峰.长湖青虾形态参数关系的初步研究.湖北农学院学报,1998,18(2):139~141.
- [6] Ui W H, Chan J P, Tai S S, et al. One-step PCR amplification of complete arthropod mitochondrial genomes. *Molecular*

- Phylogenetics and Evolution*, 2001, **19**(3):345~352.
- [7] 郭天慧,孔晓瑜,陈四清等.三疣梭子蟹线粒体 DNA 16S rRNA 和 COI 基因片段序列的比较研究.中国海洋大学学报,2004, **34**(1):22~28.
- [8] 王玉江,高天翔,韩志强等.中国和越南青蟹线粒体 16S rRNA 基因序列分析.中国海洋大学学报,2005, **35**(4):554~558.
- [9] 张凤英,马凌,长江,辽河,瓯江三水系中华绒螯蟹 mtDNA 12S rRNA 片段序列的比较.海洋渔业,2004, **26**(2):147~151.
- [10] 高天翔,李健,王清印等.中国对虾线粒体 16S rRNA 基因序列分析.中国水产科学,2003, **10**(5):359~364.
- [11] 庆宁,林岳光,墨吉对虾 *Penaeus merguensis* 线粒体 16S rRNA 基因序列分析.华南师范大学学报(自然科学版),2002(3):63~67.
- [12] 高天翔,王溪宏,张秀梅.日本绒螯蟹放流群体 12S rRNA 序列研究.海洋湖沼通报,2000(1):47~51.
- [13] 邱高峰,常林瑞.中国对虾 16S rRNA 基因序列多态性的研究.动物学研究,2000, **21**(1):35~40.
- [14] 孔晓瑜,姜艳艳,相建海等.魁蚶线粒体 16S rRNA 和 COI 基因片段序列测定及其应用前景.海洋科学,2001, **25**(12):46~48.
- [15] Boulding E G, Boom J, Beekenbaeh A T. Genetic variation in one bottlenecked and two wild populations of scallops: parameter estimates from coding regions of mtDNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1993, **50**:147~157.
- [16] 刘亚军,喻子牛,姜艳艳等.栉孔扇贝 16S rRNA 基因片段序列的多态性研究.海洋与湖沼,2002, **33**(5):477~483.
- [17] 杨建敏,郑小东,王如才等.3 种鲍 16S rRNA 基因片段序列的初步研究.青岛海洋大学学报,2003, **33**(1):36~40.
- [18] Miller A D, Murphy N P, Burrige C P, *et al.* Complete mitochondrial DNA sequences of the decapod crustaceans *Pseudocarcinus gigas* (Menippidae) and *Macrobrachium rosenbergii* (Palaemonidae). *Marine Biotechnology*, 2005, **7**:339~349.
- [19] 彭巧玲,蒲友光,程子华等.罗氏沼虾 3 个 Dmrt 基因的序列分析.中国水产科学,2005, **12**(1):5~9.
- [20] Chand V, Sbruyun M D, Mather P, *et al.* Microsatellite loci in the eastern form of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Molecular Ecology Notes*, 2005, **5**:308~310.
- [21] 邱涛,陆仁后,项超美等.4 种沼虾的 SRFA 指纹研究.中国水产科学,1999, **6**(1):1~4.
- [22] 邱高峰.虾蟹类遗传育种学研究.水产学报,1998, **22**(3):265~274.
- [23] 傅洪拓,龚永生,吴滢等.日本沼虾与海南沼虾的人工种间杂交及其同工酶分析.水生生物学报,2004, **28**(3):327~329.
- [24] 王鸷骁,柯才焕,王志勇等.中国沿海几种鲍线粒体 16S rRNA 基因片段比较及鲍属系统发育.中国水产科学,2006, **13**(2):167~173.