

罗氏沼虾缅甸野生原种 rDNA-ITS 区序列特征

陈雪峰^{①②} 杨国梁^{①②*} 王军毅^{①②} 高强^{①②} 官金华^② 叶少群^② 张海鹏^②

① 浙江省淡水水产研究所 湖州 313001; ② 浙江南太湖淡水水产种业有限公司 湖州 313001

摘要: 对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)全序列特征进行了分析。罗氏沼虾 ITS1 长度为 1 070~1 150 bp, GC 含量为 51.4%~52.7%; 5.8S 长度一致为 163 bp, GC 含量为 55.2%; ITS2 长度为 484~545 bp, GC 含量为 53.4%~54.6%。序列比对显示, ITS1 存在 61 处 SNPs, 其中 C/T 转换为 28 处(占 45.9%), A/G 转换为 23 处(占 37.7%), A/T 颠换为 1 处(占 1.6%), T/G 颠换为 3 处(占 4.9%), C/G 颠换为 4 处(占 6.6%), A/C 颠换为 2 处(占 3.3%); ITS2 存在 15 处 SNPs, 其中 C/T 转换为 6 处(占 40%), A/G 转换为 5 处(占 33.3%), A/T 颠换为 1 处(占 6.7%), T/G 颠换为 2 处(占 13.3%), C/G 颠换为 1 处(占 6.7%)。整个 ITS 中微卫星序列(SSR)共有 20 处, 其中 ITS1 中有 14 处, 以 (AG)_n 类型最多; ITS2 中有 6 处, 以 (GA)_n 类型最多。人工查找结果发现, 罗氏沼虾 ITS1 在 181、390 和 781 位点存在 3 处 59 bp 正向重复单元。个体内差异分析表明, 罗氏沼虾 ITS 由于 SSR 重复数不同, 而存在个体内差异。同源性分析表明, 罗氏沼虾 ITS1 与海南沼虾(*M. hainanense*)同源性最高, 为 50.64%, 而与脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)同源性最低, 为 45.39%; 5.8S 与其他甲壳动物有着极高的同源性, 其中与日本沼虾(*M. nipponense*)同源性达到 100%; ITS2 与日本沼虾同源性最高, 为 53.46%, 而与克氏原螯虾(*Procambarus clark*)的同源性最低, 为 42.53%。基于 ITS 构建的 NJ 树显示, 罗氏沼虾与同属的日本沼虾聚为一支, 与传统分类相符。

关键词: 罗氏沼虾; 内转录间隔区; 序列特征

中图分类号: Q523+.8; S917 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2011)03-19-09

Analysis on Sequences of Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers of *Macrobrachium rosenbergii*

CHEN Xue-Feng^{①②} YANG Guo-Liang^{①②*} WANG Jun-Yi^{①②} GAO Qiang^{①②}
GONG Jin-Hua^② YE Shao-Qun^② ZHANG Hai-Peng^②

① Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001;

② Zhejiang South Tailake Freshwater Fish Breeding Co., Ltd, Huzhou 313001, China

Abstract: Internal transcribed spacers in ribosomal DNA were often used as molecular sequence in phylogenetic study. The complete sequence of internal transcribed spacers of *Macrobrachium rosenbergii* was isolated by PCR. The length of ITS1 was 1 070–1 150 bp with a GC content of 51.4%–52.7%, and the length of 5.8S was 163 bp with a GC content of 55.2%. Compared to ITS1, the length of ITS2 (484–545 bp) was shorter while GC content (53.4%–54.6%) was higher. By comparison of sequence from different individuals, 61 SNP loci were found in ITS1, including 28 C/T transitions (45.9%), 23 A/G transitions (37.7%), 1 A/T

基金项目 浙江省重大科技专项项目(No. 2007C12059), 科技部农业科技成果转化资金项目(No. 2007GB2C 200124);

* 通讯作者, E-mail: nthfish@163.com;

第一作者介绍 陈雪峰, 男, 硕士; 研究方向: 水产动物遗传育种; E-mail: chenfenghailan@126.com。

收稿日期: 2010-10-14, 修回日期: 2011-03-02

transversions (1.6%), 3 T/G transversions (4.9%), 4 C/G transversions (6.6%), and 2 A/C transversions (3.3%); 15 SNP loci were found in ITS2, including 6 C/T transitions (40%), 5 A/G transitions (33.3%), 1 A/T transversions (6.7%), 2 T/G transversions (13.3%), and 1 C/G transversions (6.7%). SSR loci were searched by the SSRHunter software, and the results showed that the SSR loci in ITS1 and ITS2 were 14 and 6 respectively, the type of (AG)_n was rich in ITS1 and the type of (GA)_n was rich in ITS2. There were three repeat units with a length of 59 bp in ITS1, and the loci were 181, 390 and 781, respectively. The results of ITS intravariations analysis demonstrated that clones from the same individual were different in length because of SSR. Furthermore, homology comparison of ITS sequence indicated that the similarity of each ITS1 was 45.39% - 50.64%, and the highest occurred between *M. rosenbergii* and *M. hainanense*, while the lowest occurred between *M. rosenbergii* and *Exopalaemon carinicauda*. 5.8S showed very high similarity with other crustaceans, and the homology was 100% between *M. rosenbergii* and *M. nipponense*. The similarity of each ITS2 was 42.53% - 53.46%, and the highest occurred between *M. rosenbergii* and *M. nipponense*, while the lowest occurred between *M. rosenbergii* and *Procambarus clark*. Phylogenetic tree based on the ITS was constructed by Neighbor-joining method, and the results showed that the relationship between *M. rosenbergii* and *M. nipponense* was the closest, which accorded with morphology classification.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; Internal transcribed spacers (ITS); Sequence analysis

罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 隶属长臂虾科沼虾属, 又名马来西亚大虾、淡水长臂虾、金钱虾、大河虾, 为世界最大淡水虾类。由于该虾食性广、病害少、生长快、营养价值高, 因此具有重要的经济价值^[1]。1976 年中国农业科学院从日本引进该虾, 由广东省水产研究所 (现为水产科学研究所珠江水产研究所) 试养, 并于 1977 年繁殖出虾苗 79 600 尾, 随后向全国 14 省、市的 40 多个单位推广养殖。30 多年以来, 伴随罗氏沼虾人工育苗技术的突破与养殖技术的改进, 罗氏沼虾产业快速发展, 同时也加剧了苗种混杂与种质衰退, 主要表现为生长速度缓慢、抗病抗逆能力下降、性成熟时间提早^[2-3]。因此合理利用罗氏沼虾种质资源, 保护其遗传多样性水平, 是今后罗氏沼虾品种改良的前提, 更是维持罗氏沼虾产业健康可持续发展的基础与保障。

真核生物 rDNA 基因为多拷贝基因^[4], 由于协同进化 (concerted evolution) 或分子驱动作用 (molecular drive), 重复序列高度一致^[5], 使得该基因常被用作种的鉴定标记^[6]。其中分隔 18S、5.8S 和 28S 的内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 由于不参加功能基因编

码, 所受选择压力小, 进化速率快, 因而该区可以研究属间、种间甚至种群间的关系^[7-8], 包括系统发育、亲缘鉴定、种质鉴定和遗传多样性水平等^[9]。植物^[10]、昆虫^[11]、微生物^[12] 等物种中, ITS 的研究比较系统深入, 而在水产动物中, ITS 的研究主要集中于贝类和鱼类^[13], 虾类 ITS 的研究工作相对较少, 虽然在 GenBank 中登录了一些虾类的 ITS 部分或全序列, 但成文的报道不多, 就沼虾属而言, 仅见对日本沼虾 (*M. nipponense*) 和海南沼虾 (*M. hainanense*) ITS1 的序列特征研究^[14-15]。关于罗氏沼虾分子遗传学方面的研究, 国内外学者已经从 RAPD、SRAP、微卫星、线粒体 CO I 基因片段、线粒体 D-loop 区和 16S RNA 基因等角度分析了罗氏沼虾的遗传差异以及使用 SNP 标记进行生长关联分析^[16-22], 但有关 ITS 的研究尚未有报道。本文通过分离罗氏沼虾 ITS, 分析该区序列特征, 以期今后运用该区序列来获得罗氏沼虾遗传多样性数据和系统分类资料, 进而为罗氏沼虾种质资源评估和良种选育提供科学参数。

1 材料与方法

1.1 材料 实验用罗氏沼虾为采自缅甸野生

群体,该群体由浙江省淡水水产研究所于 2002 年从缅甸引进,随机取 18 尾成虾(MD1 ~ MD18),活体冷冻于 -80°C 冰箱中,保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采集虾肌肉 100 mg 放入 1.5 ml 离心管内,酚-氯仿法抽提基因组 DNA^[23]。提取的 DNA 用 TE 溶解,1% 琼脂糖电泳检测确定质量,紫外分光光度计(eppondorf)测定 OD 值,确定浓度,使用液稀释为 50 ng/ μl 。

1.2.2 PCR 扩增及产物纯化和克隆测序 通过分析 GenBank 中已经登录的其他虾类 18S 和 28S 保守区设计特异性引物来扩增罗氏沼虾 ITS。引物序列为, F: 5'-TCG TAA CAA GGT TTC CGT AGG TGA-3' 和 R: 5'-TAT TTA GCC TTA GAT GGA GTT TAC-3'。PCR 反应总体积为 25 μl ,模板为基因组 DNA 50 ng,使用含 GC Buffer I 的 LA *Taq* 酶(TakaRa)(扩增效果优于普通 *Taq* 酶)进行 PCR 扩增,其余组分按照说明书要求。PCR 反应条件为: 94°C 2 min; 94°C 30 s, 55°C 45 s, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min; 4°C 保存。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EB)电泳分离,切下目的条带,用胶回收试剂盒(TaKaRa)纯化,与 pMD18-T 载体(TaKaRa)连接, 16°C 过夜,转化到 DH5 α 感受态细胞中,采用蓝白斑挑选阳性克隆,使用 *EcoR* I、*Hind* III(TaKaRa)双酶切验证,阳性克隆送上海捷瑞生物公司测序。

1.2.3 数据处理 用 DNASTar 软件包中的 EditSeq 进行序列拼接,将拼接好的序列用 NCBI 服务器上的 Blast 软件进行同源性检索,确定 ITS 区序列的边界及长度。Clustalw 1.83 软件进行序列比对,辅以手工校正。SSRHunter 3.1 软件查找简单重复序列,手工比对查找长片段重复单元。Mega 4.0 分析序列碱基含量,确定 SNP 位点。邻接法 Neighbore-Joining(NJ)构建分子系统进化树,置信度用自举分析(Bootstrap)进行 1 000 次重复检验。

2 结 果

2.1 罗氏沼虾 ITS 序列长度与 GC 含量

PCR 扩增后,将产物进行克隆、测序,共测通 23 条罗氏沼虾 ITS 序列。去除两端部分 18S 与 28S 序列,得到 ITS 全序列,选择其中一条序列提交 GenBank,登陆号为 HM590579。Mega 4.0 软件分析表明,罗氏沼虾整个 ITS 区长度为 1 722 ~ 1 818 bp, ITS1 长度长于 ITS2,各部分的 GC 含量较高,都在 50% 以上。其中 ITS1 长度为 1 070 ~ 1 150 bp, GC 含量为 51.4% ~ 52.7%; 5.8S 长度一致为 163 bp, GC 含量为 55.2%; ITS2 长度为 484 ~ 545 bp, GC 含量为 53.4% ~ 54.6%。18 个个体 23 条序列的长度与 GC 含量信息见表 1。

2.2 罗氏沼虾 ITS 中 SNPs 位点 通过比对 23 条罗氏沼虾 ITS 序列,共筛选到 76 处单核苷酸多态位点(SNPs)。罗氏沼虾 ITS1 存在 61 处 SNPs,根据 SNPs 位点数与 ITS1 序列长度之比,得出 ITS1 中 SNPs 出现频率为 5.5%,即平均 100 bp 片段中出现 5.5 个 SNPs 位点。ITS1 的 61 处 SNPs 中 C/T 转换为 28 处(占 45.9%), A/G 转换为 23 处(占 37.7%), A/T 颠换为 1 处(占 1.6%), T/G 颠换为 3 处(占 4.9%), C/G 颠换为 4 处(占 6.6%), A/C 颠换为 2 处(占 3.28%)(图 1); 5.8S 序列高度一致,不存在 SNPs 位点; ITS2 存在 15 处 SNPs, SNPs 出现的频率较 ITS1 低,为 2.9%,即平均 100 bp 片段中出现 2.9 个 SNPs 位点。ITS2 的 15 处 SNPs 中 C/T 转换为 6 处(占 40%), A/G 转换为 5 处(占 33.3%), A/T 颠换为 1 处(占 6.7%), T/G 颠换为 2 处(占 13.3%), C/G 颠换为 1 处(占 6.7%)(图 1)。整个 ITS 部分所有 SNPs 中,转换位点高于颠换位点。

2.3 罗氏沼虾 ITS 区 SSR 位点和正向重复单元 微卫星序列(SSR)是由 1 ~ 6 bp 为重复单位串联组成的高度重复序列。本文通过 SSRHunter 3.1 软件查找罗氏沼虾 ITS 区序列中 SSR 位点,结果显示,整个 ITS 区序列中,重复数为 3 ~ 40 的简单重复序列共 20 处(表 2)。

表 1 ITS 各部分的长度和 GC 含量
Table 1 The lengths and GC contents of different regions of ITS

个体 Individual	不同克隆 Different clones	ITS1		5.8S		ITS2	
		长度 Length (bp)	GC 含量 GC content (%)	长度 Length (bp)	GC 含量 GC content (%)	长度 Length (bp)	GC 含量 GC content (%)
	MD1-1	1 113	52.1	163	55.2	497	53.9
MD1	MD1-2	1 106	52.1	163	55.2	497	54.1
	MD1-3	1 101	51.6	163	55.2	500	54.0
MD2	MD2-1	1 098	52.1	163	55.2	545	53.8
	MD2-2	1 110	51.4	163	55.2	504	53.7
	MD3-1	1 098	52.2	163	55.2	517	54.0
MD3	MD3-2	1 148	52.0	163	55.2	507	53.6
	MD3-3	1 108	52.0	163	55.2	489	53.8
MD4		1 093	51.7	163	55.2	511	53.4
MD5		1 140	52.1	163	55.2	488	53.7
MD6		1 092	51.9	163	55.2	505	54.1
MD7		1 115	51.6	163	55.2	503	54.1
MD8		1 088	52.3	163	55.2	487	54.6
MD9		1 124	52.2	163	55.2	500	53.6
MD10		1 117	52.0	163	55.2	507	54.0
MD11		1 126	52.2	163	55.2	501	54.1
MD12		1 117	52.1	163	55.2	500	54.2
MD13		1 095	52.0	163	55.2	500	54.2
MD14		1 085	52.7	163	55.2	502	53.8
MD15		1 070	52.4	163	55.2	489	54.0
MD16		1 085	52.4	163	55.2	484	53.7
MD17		1 150	52.1	163	55.2	490	54.1
MD18		1 125	52.3	163	55.2	492	54.2
平均 Average		1 108.9	52.07	163	55.2	500.7	53.94

ITS1 中有 14 处,它们出现位点分别为 20、30、43、105、134、160、333、394、575、642、758、768、884、1 028。ITS1 中 SSR 包括 9 种重复序列类型,分别为 (GA)_n、(AC)_n、(AG)_n、(GT)_n、(GC)_n、(TG)_n、(TAT)_n、(CTG)_n、(GGT)_n,其中以 (AG)_n 类型最多,ITS1 中 SSR 出现比例为 1.27%。ITS2 中有 6 处,它们的等位基因数分别为 60、178、234、306、336、349。ITS2 中 SSR 包括 3 种类型 (GA)_n、(AG)_n、(CGC)_n,其中以 (GA)_n 类型最多,SSR 出现频率为 1.17%。

人工查找发现罗氏沼虾 ITS1 在 181、390 和 781 该 3 个位点存在 59 bp 正向重复单元,序列为 ACG TCT C(A/G)A AAG CGA A(G/C)A GCC TAT GCT CGG GCA AC(C/T)GAG

(T/C)A(A/T)GCT(C/G)AACTG GCG GTG GT,仅在 6 个位点存在差异(图 2)。

2.4 罗氏沼虾 ITS 个体内差异 通过测定 MD1 个体内 3 个克隆、MD2 个体内 2 个克隆、MD3 个体内 3 个克隆的序列,发现罗氏沼虾 ITS 存在个体内差异,同一个体不同克隆的序列长度和 GC 含量存在差异(表 1)。将同一个体不同克隆序列比对之后,结果表明产生个体内差异的主要原因是罗氏沼虾 ITS 中的 SSR 重复数不同(图 3)。

2.5 同源性与系统发育分析 序列同源性分析表明,罗氏沼虾 ITS1 和 ITS2 与其他甲壳动物的 ITS1 同源性不高,ITS1 与其他甲壳动物的同源性为 45.39% ~ 50.64%,其中与海南沼虾

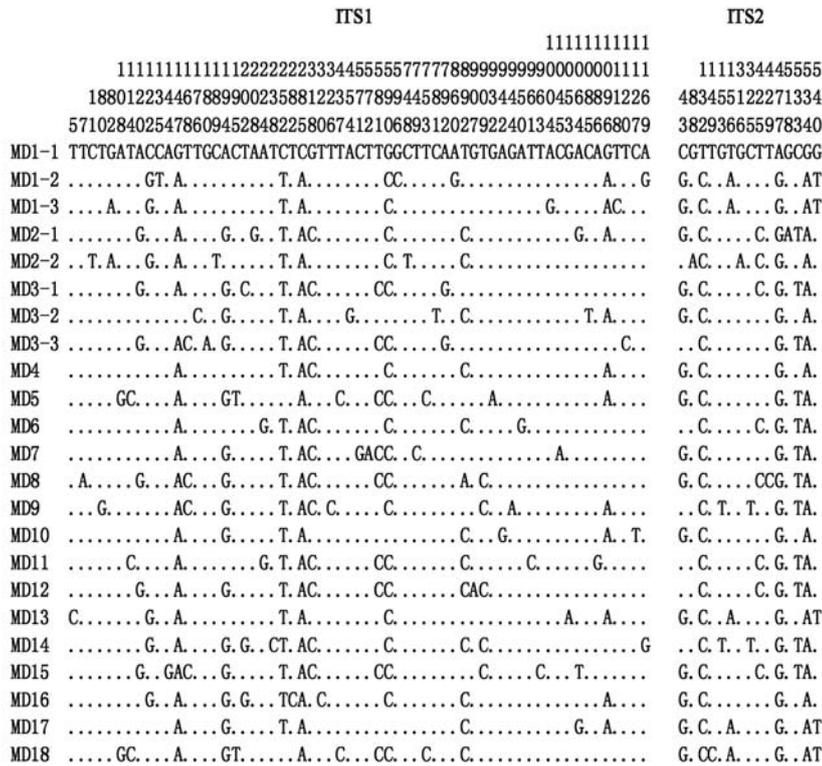


图 1 罗氏沼虾 ITS 中 SNPs 位点

Fig. 1 SNPs in ITS sequence of *Macrobrachium rosenbergii*

“.”表示与第一行序列碱基相同。Dots indicate identity with the top sequence.

表 2 罗氏沼虾 ITS 不同部位 SSR 位点

Table 2 SSR loci in different regions of *Macrobrachium rosenbergii* ITS

区域	位点	类型	重复数
Region	Locus	Type of SSR	Repeat number
ITS1	20	(GA) _n	4, 5, 6
	30	(AC) _n	3, 4, 5
	43	(AG) _n	4, 5, 6, 7, 8, 15
	105	(TAT) _n	3
	134	(AG) _n	3, 4
	160	(GT) _n	3
	333	(CTG) _n	3, 4, 5
	394	(TG) _n	4
	575	(AG) _n	5, 6, 7, 8, 9
	642	(AG) _n	19, 21, 24, 25, 29, 30, 31, 33, 36, 40
	758	(GC) _n	3
	768	(AG) _n	4
	884	(GGT) _n	3
	1028	(GA) _n	5
	ITS2	60	(GA) _n
178		(AG) _n	6, 7, 8
234		(GA) _n	4
306		(CGCA) _n	3, 4, 5
336		(GA) _n	4
349		(GA) _n	8, 9, 10, 13, 20, 31

同源性最高, 为 50.64%, 而与脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 同源性最低, 为 45.39%, ITS2 与其他甲壳动物的同源性为 42.53% ~ 53.46%, 其中与日本沼虾同源性最高, 为 53.46%, 而与克氏原螯虾 (*Procambarus clark*) 的同源性最低, 为 42.53%。相对于 ITS1 和 ITS2, 罗氏沼虾的 5.8S 与其他甲壳动物的同源性较高, 为 84.23% ~ 100%, 其中与日本沼虾同源性达到 100% (表 3)。

利用 ITS 构建罗氏沼虾、日本沼虾、秀丽白虾 (*E. modestus*)、脊尾白虾、克氏原螯虾 (GQ369797) 以及中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 系统发育树, 数据来源见表 3, 结果表明系统树可以分为三大支, 罗氏沼虾与日本沼虾亲缘关系最近聚为一支, 秀丽白虾与脊尾白虾聚为一支, 克氏原螯虾与中华绒螯蟹聚为一支, 与传统分类结果相符 (图 4)。

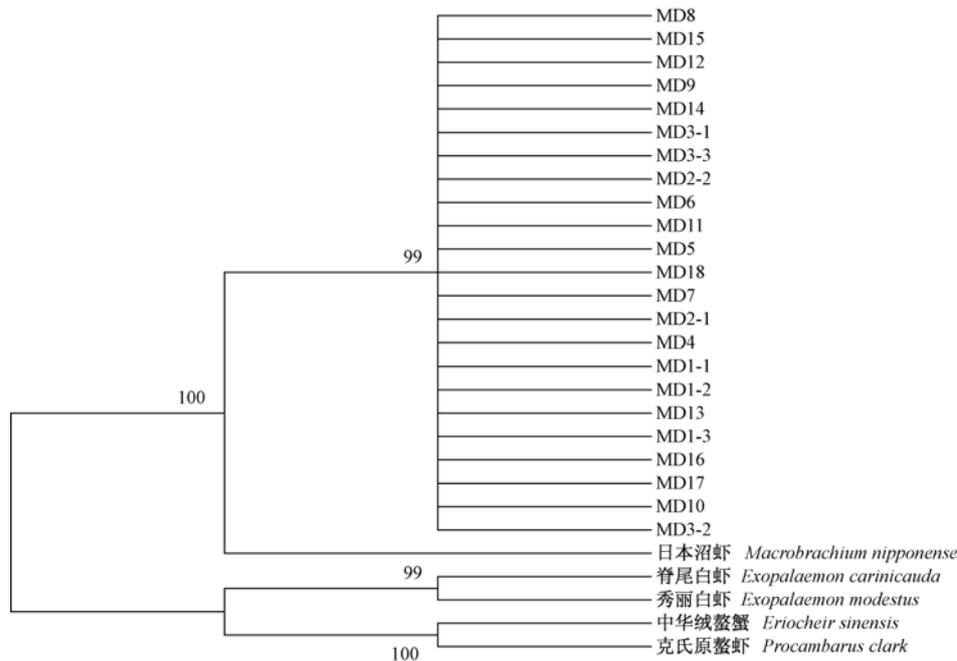


图 4 基于 ITS1-5.8S-ITS2 序列构建的 NJ 树

Fig. 4 Phylogenetic tree reconstructed using NJ methods based on ITS sequence data

图中数字为自举置信水平 (BCL) 值。

The values of bootstrap confidence level (BCL) of the nodes are indicated above the branch (1 000 replications).

3 讨论

本文分离了罗氏沼虾缅甸野生原种 ITS 全序列,序列长度分析表明罗氏沼虾 ITS1 与 ITS2 均短于同属的日本沼虾^[15],而 5.8S 的长度与同属日本沼虾一致。罗氏沼虾 ITS GC 含量平均为 53.7%,显著低于脊尾白虾(63.7%) (GenBank accession number: GQ36994),高于日本沼虾(41.53%) (GenBank accession number: GQ36976)。有研究表明,GC 含量是一个比较原始的特征,它与 DNA 分子结构稳定性有关,GC 含量越高,分子结构越稳定^[24]。俞菊华等^[25]根据 GC 含量高低,得出中华绒螯蟹 rDNA 稳定性高于果蝇 (*Drosophila melanogaster*),低于鲤 (*Cyprinus carpio*)。因此,我们认为,罗氏沼虾的 ITS 结构稳定性高于日本沼虾,低于脊尾白虾。稳定性是否与物种进化程度有关有待进一步考查更多物种的 ITS。

SNPs 是指基因组序列单个核苷酸变异(转

换、颠换)而引起的遗传多态性。SNPs 以其多态性丰富、稳定遗传等优点成为继 RFLP 和微卫星标记之后第三代分子标记,已成功应用于 QTL 定位、分子标记辅助育种等方面^[26]。本文通过直接测序法,获得了罗氏沼虾 ITS 中的 SNPs 位点,碱基转换位点数高于颠换位点数,这与日本沼虾 ITS1 中的研究结果一致^[15]。本文罗氏沼虾 ITS1 中 SNPs 频率为 5.5%,与帘蛤科 4 种蛤 ITS1 中 SNPs 频率(0.17%)^[27]和同属的日本沼虾 ITS1 中 SNPs 频率(1.26%)^[15]相比,罗氏沼虾 ITS1 存在较多的 SNPs 位点和较高的 SNPs 频率,由于 ITS 本身容易发生较多变异,再加上本文研究的对象为缅甸野生群体罗氏沼虾,具有丰富的遗传多样性,二者共同作用使然。本文获得的 SNPs 可为今后罗氏沼虾遗传育种提供新的分子标记和手段。

ITS 序列长度多态性在其他甲壳动物的研究中已有报道,如克氏原螯虾、海南沼虾、日本沼虾、中华绒螯蟹等^[14-15, 25],SSR 序列重复数

不同是导致长度多态性的主要原因。罗氏沼虾 ITS 也存在由于 SSR 序列重复数不同而导致的序列长度多态性,本文在罗氏沼虾 ITS 中共发现 10 种类型的 SSR 序列,其中 ITS1 中有 9 种类型(表 2)。已有研究表明,日本沼虾 ITS1 中存在 (GA)_n 和 (AGC)_n 2 种类型 SSR 序列^[15],海南沼虾 ITS1 中存在 (AG)_n 和 (GA)_n 2 种类型 SSR 序列^[14],与其相比,罗氏沼虾 ITS1 中 SSR 序列类型丰富多样, (AC)_n、(GT)_n、(GC)_n、(TG)_n、(TAT)_n、(CTG)_n、(GGT)_n 7 种类型 SSR 序列为罗氏沼虾特有。SSR 序列由于 DNA 复制过程中的滑动容易产生变异,因此推测罗氏沼虾 ITS1 序列比日本沼虾和海南沼虾存在更多变异。人工查找结果表明,罗氏沼虾 ITS1 中 3 处存在 59 bp 正向重复单元,在同属物种海南沼虾^[14]与日本沼虾 (GenBank accession number: GQ369796) 的 ITS1 中,也存在这样的正向重复单元,片段长度为 51 bp,海南沼虾在 624 和 1 043 位点,而日本沼虾在 382 和 818 位点,二者重复单元序列与罗氏沼虾不同,都为 GGT GGA CTG GTA TCA GTG TGG GAC GTC TCG AAA GCG AAG AGC CAA TGT TT,虽然三者的 ITS1 同源性不高,但都存在正向重复单元结构,可能暗示三者的 ITS1 具有相同的进化机制。这样的正向重复单元结构是否是沼虾属的特性,有待进一步考察沼虾属内更多沼虾种的 ITS1。值得一提的是,虽然罗氏沼虾 ITS1 中的正向重复单元有别于海南沼虾和日本沼虾 ITS1 中的正向重复单元,但都存在一段 21 bp 保守序列 (ACG TCT CGA AAG CGA AGA GCC),这与在蚶科 4 种贝类 ITS2 中发现 75 bp 保守序列的研究结果类似^[28],推测重复单元中 21 bp 保守序列可能与 3 种沼虾 ITS 某种功能有关。

rDNA 由于在真核生物体内具有多拷贝性以及协同进化,因而序列高度一致,个体内差异不被注意,研究过程中也不考察同一个体不同克隆的具体信息。但随着研究的广泛和深入,个体内差异在较多生物发现,如地中海三角涡虫 (*Dugesia mediterranea*) 基因组中存在 2 种

类型的 18S^[29],俞菊华等^[25]发现了中华绒螯蟹存在 2 种类型 ITS2,并认为利用 ITS2 研究中华绒螯蟹系统发育时有必要分析多条克隆序列。本文测定同一个体不同克隆结果显示,罗氏沼虾 ITS 存在个体内差异,导致个体内差异的主要原因是 SSR 序列重复数不同,这与中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、墨吉明对虾 (*F. merguensis*)、南亚明对虾 (*F. silasi*) 中的研究结果一致^[30],后三者也是由于 ITS 中存在 SSR 序列而导致个体内差异,因此我们推测,ITS 中含有大段 SSR 序列的物种可能都应注意个体内差异。本文结果提示,今后使用 ITS 进行罗氏沼虾系统发育方面的研究时有必要测定同一个体不同克隆,以摒弃个体内差异。

同源性分析结果表明,罗氏沼虾的 ITS1 及 ITS2 与同属物种和不同属物种的同源性都很低,而 5.8S 不仅与同属物种高度相似,与非同属物种同源性也极高,这是由于 5.8S 参与功能基因的编码,因而进化过程比较保守,而 ITS1 和 ITS2 不参与功能基因编码,进化速率快,因而容易积累较大变异。本文基于 ITS 全序列构建系统树,较之单一 ITS1 或 ITS2 片段,ITS 全序列片段可为分析系统演化关系提供较多的信息量,得到具较高分辨率的结果。但目前 GenBank 数据库中沼虾属 ITS 序列数据还比较欠缺,今后有必要对更多的沼虾种进行测定,结合形态学特征及其他分子标记,有助于研究者对沼虾属系统进化关系有更全面的认识。

参 考 文 献

- [1] 杨国梁,罗坤,孔杰,等. 罗氏沼虾不同养殖条件下的生长和存活率相关分析. 海洋水产研究, 2008, 29(3): 74-79.
- [2] 史建华,肖雨,徐琴英. 罗氏沼虾引种复壮技术的研究. 水产科技情报, 2001, 28(2): 64-67.
- [3] 陈宗永. 罗氏沼虾抱卵亲虾质量差和数量不足的成因与对策探讨. 广西水产科技, 2000, (8): 26-28.
- [4] Reed K M, Haekett J D, Phillips R B. Comparative analysis of intra-individual and inter-species DNA sequence variation in salmonid ribosomal DNA cistrons. Gene, 2000, 249: 115-125.
- [5] Dover G A. Molecular drive in multigene families, how

- biological novelties arise spread and assimilated. Trends in Genetics, 1986, 2: 159 - 165.
- [6] Vogler A P, De Salle R. Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*. Mol Biol Evol, 1994, 11: 393 - 405.
- [7] Navajas M, Lagnel J, Gutierrez J, et al. Species wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial CO I polymorphism. Heredity, 1998, 80 (6): 742 - 752.
- [8] Fabry S, Kohler A, Coleman A W. Intraspecies analysis: comparison on ITS sequence data and gene intron sequence data with breeding data for a worldwide collection of *Gonium pectorale*. J Mol Evol, 1999, 17: 368 - 376.
- [9] 唐伯平,周开亚,宋大祥. 核 rDNA-ITS 区在无脊椎动物分子系统学研究中的应用. 动物学杂志, 2002, 37 (4): 67 - 73.
- [10] 刘忠权,郝明干. 白花蛇舌草的 rDNA ITS 序列鉴定. 陕西中医, 2005, 26(2): 167 - 169.
- [11] 耿金虎,李正西,沈佐锐. 诊断引物用于我国三种重要赤眼蜂分子鉴定的研究. 昆虫学报, 2004, 47(5): 639 - 644.
- [12] 许超德,李绍兰. 核酸分子系统学方法在酵母菌分类中的应用进展. 微生物学通报, 2004, 31(3): 126 - 129.
- [13] 王庆,傅洪拓. 核 rDNA ITS 区序列在水产动物研究中的应用. 中国农学通报, 2007, 13(11): 99 - 101.
- [14] 姚建华,傅洪拓,龚永生,等. 海南沼虾 ITS-1 序列分析. 中国农学通报, 2009, 25(13): 273 - 277.
- [15] 张洪伟,傅洪拓,吴滢,等. 日本沼虾 ITS1 序列分析及 SNPs 位点的筛选. 水生生物学报, 2010, 34(1): 72 - 77.
- [16] 李多云,张海琪,朱俊杰,等. 罗氏沼虾浙江养殖群体与缅甸自然群体遗传差异的 RAPD 分析. 水产学报, 2004, 28(4): 360 - 364.
- [17] 周劲松,曹哲明,杨国梁,等. 罗氏沼虾缅甸引进种和浙江本地种及其杂交种的生长性能与 SRAP 分析. 中国水产科学, 2006, 13(4): 667 - 673.
- [18] Divu D, Khushiramani R, Malathi S, et al. Isolation, characterization and evaluation of microsatellite DNA makers in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, from South India. Aquaculture, 2008, 284: 281 - 284.
- [19] 杨学明,郭亚芬,陈福艳,等. 罗氏沼虾 3 个群体线粒体 CO I 基因的序列差异和遗传标记研究. 遗传, 2006, 28(5): 540 - 544.
- [20] 姚茜,杨频,陈立桥,等. 罗氏沼虾三群体线粒体 D-loop 基因序列差异的初步研究. 水产学报, 2007, 31: 18 - 22.
- [21] 杨学明,黄光华,蒋钦杨,等. 罗氏沼虾不同群体线粒体 16S rRNA 基因的序列变异及其保守性分析. 西南农业学报, 2007, 20(6): 1373 - 1376.
- [22] Thanh N M, Barnes A C, Mather P B, et al. Single nucleotide polymorphisms in the actin and crustacean hyperglycemic hormone genes and their correlation with individual growth performance in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture, 2010, 301: 7 - 15.
- [23] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. New York: Cold Springs Harbor Laboratory Press, 1989.
- [24] Yakovchuk P, Protozanova E, Frank-Kamenetskii M D. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. Nucleic Acids Res, 2006, 34(2): 564 - 574.
- [25] 俞菊华,李红霞,戈贤平,等. 中华绒螯蟹核糖体 DNA 全序列分析. 水产学报, 2010, 34(5): 696 - 703.
- [26] Syvanen A C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. Nat Rev Genet, 2001, 2: 930 - 942.
- [27] 程汉良,夏德全,吴婷婷,等. 帘蛤科贝类 rDNA 内转间隔区序列研究. 遗传学报, 2006, 33(8): 702 - 710.
- [28] 陈琳琳,孔晓瑜,周立石,等. 魁蚶核糖体 DNA 基因转录间隔区的序列特征. 中国水产科学, 2005, 12(1): 104 - 108.
- [29] Carrann S, Giribet G, Ribera C, et al. Evidence that two types of 18S rDNA coexist in the genome of *Dugesia (Schmidtea) mediterranea* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida). Mol Biol Evol, 1996, 13: 824 - 832.
- [30] 李玉龙,孔晓瑜,时伟,等. 中国明对虾核糖体 ITS1 序列分析及其在对虾科系统分析中的应用. 中国海洋大学学报, 2010, 40(3): 29 - 36.