

脊尾白虾 3 个野生群体 ITS1 序列分析及其亲缘关系分析

马 朋^{1,2}, 刘 萍^{1*}, 李 健¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 对脊尾白虾的莱州湾、海洲湾、象山湾 3 个野生群体共计 62 个个体的核糖体 RNA 转录单元内间隔区 ITS1 基因片段进行克隆和测序, 对序列特点进行分析, 并结合 GenBank 数据库中已有的长臂虾亚科 ITS1 同源序列虾类进行系统分析。结果显示, 脊尾白虾的 ITS1 序列具有长度多态性, 其长度为 345~384 bp, 62 条序列 GC 的平均含量显著高于 AT 含量; 共检测到 79 个变异位点, 39 种单倍型, 多态位点比例为 21.7%; 海洲湾群体遗传多样性指数最高, 象山湾群体次之, 莱州湾群体最低。在脊尾白虾 ITS1 序列中发现微卫星序列共有 8 处, 重复序列类型为 (GC)_n、(AG)_n、(GGC)_n、(GGA)_n、(AT)_n、(GA)_n, 以 (GA)_n 类型最多。AMOVA 分析结果显示 3 个群体间的遗传分化较弱或只有中度分化。另外用 MEGA4.0 软件中的 NJ 法构建分子进化树, 探讨长臂虾亚科几个种的系统进化关系, 系统树显示同种的不同个体、同属的不同种聚在一起, 与形态学的分类吻合。

关键词: 脊尾白虾; ITS1; 遗传多样性; 系统进化

中图分类号: Q 347; S 917.4

文献标志码: A

脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 又名白虾、绒虾、迎春虾等, 隶属于甲壳纲, 十足目, 游泳亚目, 长臂虾科, 白虾属, 广泛分布于黄海、东海与南海。脊尾白虾是一种广温、广盐、杂食性和繁殖能力强的中型经济虾类^[1]。近年来, 由于海洋渔业资源结构变化, 脊尾白虾自然资源有所衰退, 商品价值直线上升, 人工养殖迅速升温, 因此研究脊尾白虾的种质资源情况及其遗传多样性现状, 对于促进这一重要的经济虾类的健康可持续发展具有重要意义。

真核生物的核糖体 RNA 基因 (rDNA) 以串联重复方式存在于细胞核中, 其中 18S、5.8S 和 28S rRNA 基因组成一个转录元。第 1 转录间隔区 (internal transcribed spacer 1, ITS-1) 是 rDNA 中位于 18S 和 5.8S rRNA 基因之间的非编码间隔区, 第 2 转录间隔区 (internal transcribed spacer 2, ITS-2) 是

介于 5.8S 和 28S rRNA 基因之间的非编码间隔区^[2]。核基因组的 ITS 区 (包括 ITS1 和 ITS2) 由于不加入成熟核糖体, 受的选择压力较小, 进化速率较快, 人们可以从不太长的序列中获得较多的遗传信息, 因此 ITS 区日益成为近亲分类群间的亲缘关系、系统发育关系和遗传多样性等研究中的优良分子遗传标记, 其中尤以中度保守序列的 ITS1 的应用最为广泛^[3-5]。

目前 ITS 的研究多集中于贝类和鱼类^[6-8], 虾类方面的研究主要集中于线粒体基因方面, 如线粒体基因片段 16S rRNA、COI 等^[9-10], 对 ITS 部分的研究较少。关于脊尾白虾的研究主要集中在生物学特性、生活习性、养殖繁殖技术和繁殖生物学学习性^[11-14]等方面, 从分子遗传学方面的研究较少, 利用 ITS1 对其进行遗传多样性分析尚未见报道, 本研究对来自 3 个不同地理群体的 62 尾脊尾白虾个

收稿日期: 2012-01-04 修回日期: 2012-02-26

资助项目: 国家“八六三”“高新技术研究发展计划(2012AA10A409); 国家虾产业技术体系(CARS-47); 山东省科技发展计划项目(2011GHY11526)

通讯作者: 刘 萍, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

体的 ITS1 序列特点进行分析,旨在揭示群体的遗传多样性水平,为脊尾白虾种质资源的保护和利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用野生脊尾白虾分别采自渤海的莱州湾、黄海的海洲湾和东海的象山湾(图 1,表 1),活体带回实验室于-80 °C冰箱中保存备用。

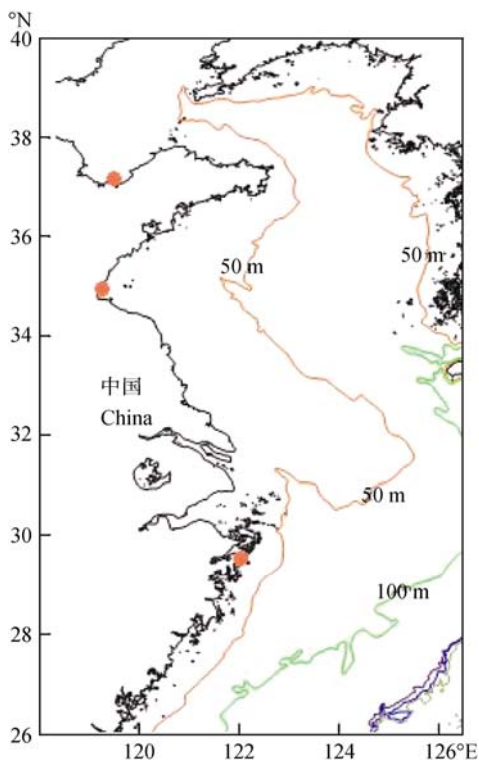


图 1 脊尾白虾样本分布示意图

● 为样本采集点。

Fig. 1 The distributional range of *E. carinicauda*

● represents sampling sites.

表 1 脊尾白虾各群体样本数和采集地资料

Tab. 1 Sample numbers and sampling sites of *E. carinicauda*

群体 population	个体数 numbers	经纬度 longitude and latitude
海洲湾 HZ	18	E 119° 30'33.360" N 37° 10'26.600"
莱州湾 LZ	22	E 119° 16'32.880" N 3° 54'26.020"
象山湾 XS	22	E 122° 3'19.320" N 29° 31'41.040"

1.2 实验方法

基因组 DNA 的提取与检测 每个群体中随

机抽取 18~22 个个体,每个个体取约 100 mg 腹部肌肉,剪碎组织,加入 475 μL 组织匀浆缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH=8.0; 50 mmol/L EDTA, pH=8.0),充分混匀,依次加入终浓度为 10%的 SDS 和 20 μg/mL 的蛋白酶 K, 55 °C 裂解至澄清,用酚:酚:氯仿(1:1)和氯仿各抽提 1 次。用 DNA 定量仪测定样品 DNA 的浓度和纯度,1%琼脂糖凝胶电泳检测,全自动凝胶成像系统拍照,-20 °C 保存备用。

PCR 扩增 根据 GenBank 数据库中已有脊尾白虾 18S 和 5.8S rRNA 基因序列设计引物为 ITS1F: 5'-GTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3', ITS1R: 5'-TTGCTGCGGTCTTCATCG-3'。由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 45 s, 48 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 反应总体积体系为 25 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, dNTPs 0.2 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, Taq 酶 1 U, 上、下游引物各 0.12 μmol/L, 模板 DNA 50~100 ng。PCR 扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶检测,电泳缓冲液为 1×TBE(pH=8.0),电压为 4 V/cm, Gene-finder 染色,用凝胶成像系统观察并拍照记录。

扩增产物纯化和克隆测序 取 PCR 扩增产物 2 μL 在 1.5%的琼脂糖凝胶电泳验证扩增结果后,按琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒操作说明纯化回收 PCR 特异性扩增产物,并连接至 pMD-18T 载体,重组质粒转化至大肠杆菌 Top10,阳性克隆经菌落 PCR 初步鉴定后由上海生工生物工程技术有限公司测序。

序列分析 将测得的序列用 Bioedit 软件进行编辑并辅以人工核查,用 ClustalX1.83 软件比对,并确定序列长度。用 DnaSp5.0 软件计算各个群体的单倍型,单倍型多态性,多态位点数,平均核苷酸差异数,核苷酸多样性指数,用 SSRHunter3.1 软件查找简单重复序列,用 ARLEQUIN3.1^[15]中的分子变异分析 (AMOVA)方法估算遗传变异在群体内和群体间的分布及遗传分化系数(F-statistics, F_{st}),计算并用排列测验法(permutation test)检验 F_{st} 的显著性(重复次数为 1 000)。MEGA 4.0 软件计算序列的碱基组成、变异位点、简约信息位点、转换/颠换、不同群体间的 Kimura2-paramter 遗传距离,用邻接法(NJ)构建系统树,系统树各节点的支持率以

序列数据集 1 000 次重复抽样检验的自引导值 (Bootstrap value) 表示。

2 结果

2.1 目的片段的序列分析

脊尾白虾的核糖体 RNA 转录单元内间隔区 ITS1 序列表现出长度多态性, 但变异幅度不大, 去掉两侧 18S rRNA 与 5.8S rRNA 基因序列, 海洲湾群体、莱州湾群体和象山湾群体的 ITS1 长度分别为 345~380 bp、362~384 bp、362~381 bp。利用 MEGA 4.0 软件计算 62 个样品 ITS1 序列碱基组成 (表 2), 各群体的碱基含量之间的差距不大, GC 含量显著高于 AT 含量。3 个群体共检测到 79 个变异位点, 多态位点比例为 21.7%, 79 个变异位点中 C/T 转换为 30 个, A/G 转换为 28 个, A/T 颠换为 8 个, T/G 颠换为 2 个, C/G 颠换为 5 个, A/C 颠换为 4 个, A/C/T 颠换位点 1 个, A/T/G 转换颠换同时存在位点 1 个, ITS1 变异位点中转换位点高于颠换位点。从 GenBank 数据库中提取目前已有的 ITS1 序列的长臂虾亚科 3 种虾 9 条序列, 长臂虾亚科 ITS1 序列具有明显的长度多态性, 长度为 345~1485 bp, 4 种虾的 GC 含量差距较大为 40.5%~63.1%, 除日

本沼虾 GC 含量低于 AT 含量外, 其余几种 GC 含量都高于 AT 含量(表 3)。

微卫星序列(SSR)是由 1~6 个核苷酸的串联重复片段构成, 通过 SSRHunter3.1 软件查找脊尾白虾 ITS1 序列中 SSR 位点, 结果显示, 3 个群体 ITS1 序列中发现多种重复序列类型, 分别为(GC)₃、(AG)₃、(GGC)₃、(GGA)₃、(AT)₃、(GA)_(3-4, 6-11)。重复次数为 3~11 的简单重复序列共 8 处, 它们出现的位点分别为(32)、(36、157)、(171)、(297)、(346)、(158、263)。

表 2 三个野生群体脊尾白虾 ITS1 序列的碱基组成
Tab. 2 Nucleotide composition of ITS1 sequences of *E. carinicauda* from three wild populations

群体 population	T%	C%	A%	G%	C+G%	序列长度/bp length
HZ	18.8	23.1	18.5	39.5	62.7	345~380
LZ	18.8	22.8	18.6	39.8	62.6	362~384
XS	18.9	23.0	18.5	39.6	62.6	362~381

利用 DnaSp5.0 计算群体遗传多样性参数见表 4, 共检测到 39 种单倍型, 多态位点的分布见图 2, Haplotype4 为 3 个群体共享, Haplotype6 为象山湾

表 3 外源序列物种名称、来源、微卫星类型和长度

Tab. 3 Origin, length, microsatellite type and abbreviations of outgroup sequences

种名 species	属名 genus	登录号 locus	片段长度/bp length of fragments	微卫星类型 type of SSR	(C+G)%
日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	沼虾属 <i>Macrobrachium</i>	GQ369796、EU346851、 EU118285	1 427~1 485	(GT) _n 、(CA) _n 、(AG) _n 、(TG) _n 、(GA) _n 、 (AC) _n 、(CAG) _n 、(CATC) _n 、(ATC) _n 、 (CAGT) _n 、(GCA) _n 、(TGTC) _n 、 (AGC) _n 、(GAGAT) _n	40.5
罗氏沼虾 <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	沼虾属 <i>Macrobrachium</i>	HM804252、HM590579、 GQ369795、EU118286	1 088~1 150	(AC) _n 、(AG) _n 、(TG) _n 、(TAT) _n 、 (GC) _n 、(GGT) _n 、(GT) _n 、(GA) _n 、(CTG) _n	52.1
秀丽白虾 <i>Exopalaemon modestus</i>	白虾属 <i>Exopalamon</i>	GQ369793、EU373484	547~550	(CGG) _n 、(AG) _n 、(AAG) _n 、 (GA) _n	63.1

表 4 脊尾白虾 3 个野生群体 ITS1 基因片段的遗传多样性参数

Tab. 4 Genetic diversity parameter of ITS1 gene fragments among 3 wild populations of *E. carinicauda*

群体 populations	样本数 N	单倍型多态性 H _d	平均核苷酸差异数 K	核苷酸多样性指数 P _i
HZ	18	0.954	5.294	0.01609
LZ	22	0.905	5.130	0.01429
XS	22	0.957	5.221	0.01458
总计 total	62	0.913	4.539	0.01376

Notes: H, number of haplotypes; H_d, haplotype diversity; K, average number of nucleotide differences; P_i, nucleotide diversity.

核苷酸 多态位点 nucleotide polymorphism	111111 1111111112 222222222 222222223 333333333 333333333 333333333	群体单倍型数总计	total number-haplotypes		
	2333344667 7888022234 5556777790 1113444456 6677889990 1111112223 3444455666 67777789		HZ	LZ	XS
Hap_1	CCACGATGAG GGT-ATGATT CTAACGGCTG GTCCCTAGT GAGGACCGCG CGCGCCGTTT CGAGACACTG TGAA-ATTG		0	0	1
Hap_2C...C.....		1	0	0
Hap_3C.....A.....		1	0	0
Hap_4C.....		4	8	6
Hap_5G.....C.....G.....		1	0	0
Hap_6G.....C.....		1	0	1
Hap_7G.....C.....		0	0	1
Hap_8G.....C.....A...TA.....A...C...C.		1	0	0
Hap_9C.....C.....		0	0	1
Hap_10C.....C.....		1	0	0
Hap_11C...C.....		1	1	0
Hap_12CA.....A		0	1	0
Hap_13A.....C.....A...T.....C.....		0	1	0
Hap_14	..G.....A.....C...C...A.....		0	1	0
Hap_15A.....C.....A...C...T.....		0	1	0
Hap_16A.....C.....A...T.....G...A		0	0	1
Hap_17A.....C.....A...T.....A		0	1	1
Hap_18C...C.....A...T.....A		1	0	0
Hap_19G.....C.....A...A...T.....A		1	0	0
Hap_20A...A.....C.....A...T.....G.....A		0	0	1
Hap_21A...A.....C.....A...T.....A		0	2	1
Hap_22A...A.....C.....A...T.....A...A...A		0	1	0
Hap_23A...A...G...A...C.....A...T.....A		0	0	1
Hap_24A...A.....CC.....A...T.....A		0	0	1
Hap_25A...A.....C.....A...T.....		2	0	0
Hap_26A.....C.....C...A...T.....G...		0	0	1
Hap_27A...A.....C.....T.....		0	0	1
Hap_28A.....CC.....G...A...A...A...CC.....		1	0	0
Hap_29	T.....A...A...C...T...CTT...T...A...A...A...C...		1	0	0
Hap_30A.....C.....A-T.....A.....		0	0	1
Hap_31A.....C.....A.....		0	0	1
Hap_32G...A.....C.....A.....		0	0	1
Hap_33A.....C.....GT.....		0	1	0
Hap_34A.....C.....T.....GT.....		0	1	0
Hap_35T....A.....C.....T.....GT.....		0	1	0
Hap_36	.T.A....A...C....AT...CT....A...AT....A....T.T...		0	1	0
Hap_37	.T.A.C....-G...C....AT...CT....A...AT....A....T.T...		0	1	0
Hap_38	.T.A.C....T...C.T.G....A.CT....A...AT.A....A...T...T...T.C...		0	0	1
Hap_39	...GA....C....AT...CT.A.C...A...A....T...		1	0	0

图 2 ITS1 基因核苷酸多态位点及各单倍型在群体中的分布

“.”表示与第一行序列碱基相同。

Fig. 2 ITS1 nucleotide polymorphic sites and the haplotype distribution in the population

Dots indicate identity with the top sequence.

群体和海洲湾群体共享, Haplotype11 为莱州湾群体和海洲湾群体共享, Haplotype17、21 为莱州湾群体和象山湾群体共享, 其余单倍体为各群体所特有。

为了证实脊尾白虾同一个体的不同单克隆片段是否具有长度多态性的现象, 本研究对脊尾白

虾 3 个群体共取了 4 个个体测定了 14 个单克隆序列, 结果显示脊尾白虾同一个体也存在较低的长度多态性(表 5), 长度范围为 371~385 bp, 共检测到 26 个变异位点, 将脊尾白虾 ITS1 序列 14 个单克隆进行比对, 共 389 个位点, 可变位点为 39 个, 包括 13 个多态位点和 26 个插入/缺失位点, 同一个

体的不同单克隆核苷酸歧异为0%~0.8%, 共9种单倍型, 其中 LZ2 的 2 个单克隆共享同一单倍型, LZ1 的 3 个单克隆共享同一单倍型。

表 5 脊尾白虾材料来源及 ITS1 序列特性
Tab. 5 Sources of *E. carinicauda* samples and the values of length variation, GC content, number of clones, and intraindividual variation of ITS1

样品 sample	长度/bp length variation	(C+G)/ % GC content	克隆数目 no. of clones	个体内变异(变异/插入 或缺失位点) intraindividual variation (variable and I/D sites)
XS1	376~385	62.9	4	5/17
HZ1	373	62.8	2	3/4
LZ1	371~378	62.9	4	2/10
LZ2	376~379	63.0	4	3/3

2.2 群体间的遗传差异分析

将 3 个群体作为一组进行 AMOVA 分析, 具体结果见表 6, AMOVA 分析结果显示群体间的分子变异显著($F_{st} = 4.44, P < 0.05$), 表明在整个遗传变异中群体间的变异占 4.44%, 95.56% 的遗传变异来自于群体内部。3 群体间的遗传分化系数见表 7, 莱州湾群体与海洲湾群体之间的遗传分化系数最高为 0.094 53, 其次是莱州湾群体与象山湾群体之间的遗传分化系数为 0.053 11, 象山湾群体与海洲湾群体之间的遗传分化系数最低为 -0.017 47。

表 6 群体间的遗传变异的分子变异等级分析

Tab. 6 Analysis of molecular variance

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	方差组分 variance components	方差比例/% percentage variation
群体间 among population	2	27.505	0.32660VA	4.44
群体内 within population	59	414.833	7.03107Vb	95.56
总变异 total variance	61	442.339	7.35767	

表 7 群体间的相对遗传距离(左下方)和 F_{ST} (右上方)

Tab. 7 Genetic distances (lower left) and population pairwise F_{ST} (upper right)

群体 population	海洲湾 HZ	莱州湾 LZ	象山湾 XS
HZ		0.094 53	-0.017 47
LZ	0.015 00		0.053 11
XS	0.014 00	0.013 00	

2.3 长臂虾亚科聚类分析

将扩增获得的脊尾白虾 ITS1 序列 39 种单倍型序列结合 GenBank 中检索到的日本沼虾、罗氏沼虾、秀丽白虾 3 种虾的 9 条 ITS1 序列, 利用 MEGA4.0 软件中的 NJ 法构建聚类图(图 3), 同种的不同个体、同属的不同种聚在一起, 物种间的界限非常明晰, 符合形态学的分类关系, 但是同一群体的不同个体没有聚在一起。

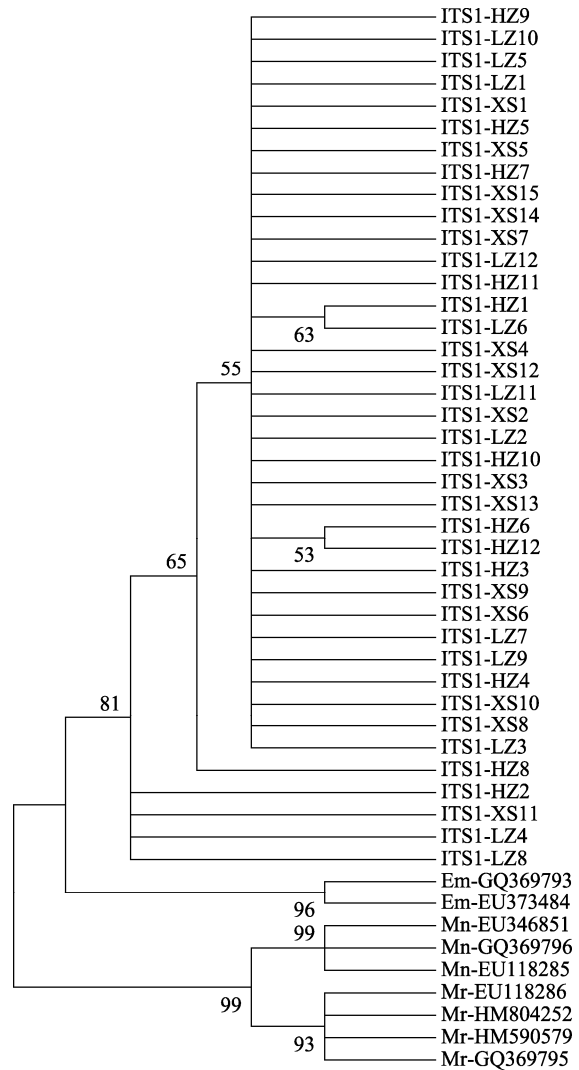


图 3 利用 NJ 法建立的聚类图

Fig. 3 Cluster dendrogram based on NJ method

3 讨论

3.1 目的片段序列分析

本研究所测脊尾白虾 RNA 转录单元内间隔区 ITS1 序列具有长度多态性, 长度的变化范围并不大, 为 345~384 bp, 但结合 GenBank 数据库中提取的长臂虾亚科其它几个种, 结果发现隶属于同一

属不同种间的序列长度差异显著,白虾属长度范围为 345~384 bp,沼虾属为 1 088~1 485 bp。李玉龙等^[16]在研究对虾科的 ITS1 序列长度多态性中认为这种现象主要是重复序列重复次数不同造成的,在本研究中,由于序列中插入缺失很少位于重复序列区,只有较长的插入缺失位于重复序列区,所以长臂虾亚科虾类长度多态性的原因不能仅用重复序列来解释,徐晖等^[17]在研究舌鳎亚科 6 种鱼类 ITS1 序列长度多态性时也得出同样的结论。核糖体 RNA 转录单元内间隔区 ITS1 序列为内含子区,所受选择压力小,因而进化速度快,这也是种内和种间表现出明显的长度多态性的原因之一。

在果蝇的研究中表明高 GC 含量是 1 个比较原始的特征^[17],本研究中 3 群体 GC 平均含量约为 66.6%,同为白虾属的秀丽白虾 GC 含量也很高为 63.1%,可以推测白虾属的两个种是比较原始的种类,其起源和分化可能较早,沼虾属的两个种 GC 含量相对较低,可能分化时间较晚,进化时间较短。在所测脊尾白虾 62 个个体的 ITS1 序列中发现多种重复序列类型,共有(GC)_n、(AG)_n、(GGC)_n、(GGA)_n、(AT)_n、(GA)_n6 种,另外,已有研究表明,日本沼虾 ITS1 中存在 14 种微卫星位点,罗氏沼虾 ITS1 中存在 9 种微卫星位点,秀丽白虾 ITS1 中存在 4 种微卫星位点。(GGC)_n、(GGA)_n、(AT)_n3 种微卫星位点为脊尾白虾特有,对于这些种特有的位点能否作为鉴别种的分子标记、(GA)_n能否作为鉴别长臂虾亚科的分子标记还需要更多的数据加以证实。

Chu 等^[18]发现甲壳动物的 ITS1 片段具有个体内多态性,李玉龙等^[16]在研究中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、孟学平等^[19]在研究西施舌(*Coelomacra antiqua*)和陈雪峰等^[20]在研究罗氏沼虾的 ITS1 片段序列变异时也发现同一个体的不同单克隆片段具有多态性,本文的实验结果也证实了这点。对同一个体的不同克隆序列比对,结果发现个体内多态性主要是由于微卫星重复数的不同造成的,然而核糖体 RNA 基因簇间通过不等交换(unequal crossing-over)和基因转变(gene conversion)而经历快速的协同进化(concerted evolution),导致重复单位在基因组中的一致性^[21-22]。所以个体内多态性很可能是由于 ITS1 序列存在协同进化不完全现象造成的。另外由于 ITS1 存在个体内变异,在

不同的研究类群中,可能会有不同的结果,但就本实验的结果看,同一个体的不同单克隆核苷酸歧异为 0%~0.8%,可见仅存在较低水平的个体内序列多态性,不会影响实验结果。

三群体遗传多样性由高到低的顺序是海洲湾群体、象山湾群体、莱州湾群体,莱州湾群体各遗传多样性指标均小于其它两个群体的遗传多样性指标,平均核苷酸差异数低于缙蛭野生群体与养殖群体的相应指标(8.2307~10.5428),核苷酸多样性指数和单倍型多态性均高于吴琪等^[23]研究的硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)养殖群体核苷酸多样性指数(0.0030)、单倍型多态性(0.4),且每大多数个体具有自己的单倍型,所以本实验研究结果表明脊尾白虾三个群体的遗传多样性指数相对较高。

3.2 遗传分化和聚类分析

群体遗传学认为, F_{st} 值可以表示群体间的遗传分化程度, F_{st} 值为 0.00~0.05,表示分化较弱,在 0.25 以上表示遗传分化极大,从表 7 可见,本研究 3 个群体间的遗传分化较弱或只有中度分化。象山湾与其它两个群体的地理位置相对较远,如果单从地理位置上正常推理应该是象山湾群体和其它两个群体的基因流最小,遗传分化最大,然而在本研究中遗传分化系数最大的是地理位置相对较近的海洲湾群体和莱州湾群体,分析其原因,莱州湾群体生活于封闭性强的渤海,脊尾白虾不善于长距离游泳,扩散能力较弱,所以导致莱州湾群体与其它两群体间很难产生基因交流,从而与其它两个群体间产生了较大的遗传分化。象山湾群体和其它两个群体遗传分化系数较小,孟学平等^[19]在研究西施舌 5 个地理群体之间的遗传分化也遇到了类似的问题:广西北海地理位置相对封闭,北部湾与黄海间有南海、东海相隔,但北海群体与黄海的 3 个群体的遗传分化却很弱。

分子系统学的一个重要目的就是通过 DNA 分子的碱基差异来构建系统树,以期阐明不同类群的物种、物种的不同种群之间的关系,本文利用 ITS1 片段对 2 属 4 种虾进行聚类分析,结果显示,系统树中同种的不同个体,同属的不同种各自聚支,与形态学分类基本吻合。但不同群体的个体并没有聚在一起,李玉龙等^[16]研究的中国明对虾所构建的系统树也出现同样的情况,但这对聚类分析并不影响。

从本研究对脊尾白虾 3 个群体的多样性分析可知, 目前 3 个野生群体资源的遗传多样性保存尚且完好, 暂未受到人类活动的较大干扰。但从脊尾白虾的可持续开发利用角度出发, 必须制定合理的保护措施, 建立有效的监控体系, 加强野生群体遗传多样性监测, 防止盲目的人工移植和引种导致的种质退化和优良性状的丧失, 保证脊尾白虾野生种质资源得到有效保护和合理的利用, 另外, 长臂虾亚科的 ITS1 序列具有丰富的核苷酸变异位点, 较快的核苷酸进化速率, 适合于属间、属内种间的系统学研究和遗传多样性的分析, 但目前 GenBank 数据库中长臂虾亚科的数据比较欠缺, 所以应该对长臂虾科的其它种进行 ITS 序列测定, 结合形态学分类特征以及其它的分子标记, 帮助研究者对其分类和系统进化关系有一个更全面的认识。

参考文献:

- [1] 刘瑞玉. 中国北部经济虾类[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 48-49.
- [2] 何毛贤, 黄良民. 长耳珠母贝核 rRNA 基因 ITS-2 序列分析[J]. 热带海洋学报, 2004, 23(5): 81-84.
- [3] Benjamin K D, Robert D A. Intraspecific variation in *Cryptocaryon irritans* [J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 1997, 44(1): 25-32.
- [4] Pletye K A, Duncan S D, Phillips R D. Evolution relationships of the salmonid fish genus *Salvelinus* inferred from DNA sequences of the first internal transcribed spacer(ITS1)of rDNA[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1992, 1(3): 223-230.
- [5] Schlotterer C, Hauser M T, Haeseler A, et al. Comparative evolutionary analysis of rDNA its regions in *Drosophila*[J]. Molecular Biology and Evolution, 1994, 11(3): 513-52.
- [6] 李太武, 张安国, 苏秀榕, 等. 不同花纹文蛤 (*Meretrix meretrix*)的 ITS2 分析[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(2): 132-137.
- [7] 丁雪娟, 李安兴, 张剑英, 等. 海水鱼类寄生本尼登虫的 ITS1 序列[J]. 华南师范大学学报, 2003, 2(1): 85-90.
- [8] 凌去非, 李思发, 张海军, 等. 丁鲷不同群体 ITS1 区序列分析[J]. 水利渔业, 2006, 26(6): 24-25.
- [9] 窦红霞, 张彤晴, 许志强, 等. 长臂虾亚科 9 个种系统发育关系的 16S rDNA 序列分析[J]. 淡水渔业, 2008, 38(1): 40-43.
- [10] 冯建彬, 孙悦娜, 程熙. 我国五大淡水湖日本沼虾线粒体 COI 基因部分片段序列比较[J]. 水产学报, 2008, 32(4): 517-525.
- [11] 王兴强, 阎斌伦, 董双林, 等. 脊尾白虾生物学及养殖生态学研究进展[J]. 齐鲁渔业, 2005, 22(8): 21-24.
- [12] 王绪娥. 脊尾白虾繁殖生物学的初步观察[J]. 动物学杂志, 1987, 22(1): 7-10.
- [13] 刘重斌, 吴博. 脊尾白虾生理性体温调节的初步观察[J]. 四川动物, 2009, 28(4): 558-564.
- [14] 梁象秋, 李亚娟, 周昭曼. 脊尾白虾的幼体发育[J]. 水产学报, 1988, 12(2): 157-168.
- [15] Excoffier L, Laval G, Schneider S, et al. 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evolutionar Bioinformatics Online, 2005, 1: 47-50.
- [16] 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[J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(3): 029-036.
- [17] 徐晖, 李军, 孔晓瑜, 等. 6 种舌鳎亚科鱼类 ITS1 序列长度多态性及系统分析[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(1): 35-41.
- [18] Chu K H, Li P C, Ho Y H. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic and population analyses in crustacea[J]. Marine Biotechnology, 2001, 3(4): 355-361.
- [19] 孟学平, 高如承, 申欣, 等. 西施舌 5 个地理群体 ITS1 序列变异及系统发生分析[J]. 生态学报, 2010, 30(20): 5556-5561.
- [20] 陈雪峰, 杨国梁, 王军毅, 等. 罗氏沼虾缅甸野生原种 rDNA-ITS 区序列特征[J]. 动物学杂志, 2011, 46(3): 19-27.
- [21] Dover G A. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution[J]. Nature, 1982, 299: 111-117.
- [22] Hillis M D M, Davis S K. Ribosomal D N A: Intraspecific polymorphism, concerted evolution and phylogeny reconstruction[J]. Systematic Zoology, 1988, 37(1): 63-66.
- [23] 吴琪, 潘鹤婷, 潘宝平. 帘蛤科两种经济贝类种群的 ITS-1 序列遗传多样性分析[J]. 天津师范大学学报, 2007, 27(1): 20-23.

The genetic diversity and phylogenetic analysis of ITS1 in mitochondrial DNA of three populations of *Exopalaemon carinicauda*

MA Peng^{1,2}, LIU Ping^{1*}, LI Jian¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Sciences, Ocean University of Dalian, Dalian 116023, China)

Abstract: The ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 (ITS1) of three wild populations of *Exopalaemon carinicauda* was cloned and sequenced. The phylogenetic relationship among Palaemoninae was discussed using ITS1 from GenBank database. The results show that the length of the ITS1 ranged from 345 to 384 bp. The mean contents of GC were higher than AT; 79 variation sites and 39 haplotypes were obtained in ITS1; Nucleotide diversity and average number of nucleotide differences were calculated to analyze the gene sequence variation. Eight kinds of microsatellites were found in *E. carinicauda*. The type of (GA)_n was rich in ITS1. AMOVA analysis results show that the genetic differentiation of the three groups was weak or only moderately differentiated. The molecular phylogenetic tree was constructed with NJ method using software MEGA 4.0 to study several species of the Palaemoninae molecular phylogeny. According to the NJ tree, different individuals of the same species, different species of the same genera were grouped together, in consistence with the morphological taxonomy.

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; ITS1; genetics diversity; phylogenetic

Corresponding author: LIU Ping. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn