

文章编号: 1004-7271(2006)02-0144-06

## 三个群体罗氏沼虾线粒体 *COI* 基因的遗传多样性分析

杨学明<sup>1</sup>, 郭亚芬<sup>2</sup>, 蒋钦杨<sup>2</sup>, 陈福艳<sup>1</sup>, 梁万文<sup>1</sup>, 蒋和生<sup>2</sup>

(1. 广西水产研究所, 广西南宁 530021;  
2. 广西大学动物科技学院, 广西南宁 530005)

**摘要:** 运用 PCR 方法, 扩增罗氏沼虾缅甸原种  $F_1$  代、广西选育群体和江苏养殖群体的线粒体 DNA 上的细胞色素氧化酶(Cytochrome oxidase subunit I, *COI*) 基因, 在此基础上选用 10 种限制性内切酶对扩增产物进行限制性片段长度多态(RFLP)分析。三个群体共发现 2 个多态位点, 11 种酶切图谱, 3 种基因型。三群体的多态座位比例、平均杂合度和基因型多样性指数分别为: 缅甸原种  $F_1$  22.2%、0.0556、0.0472, 广西选育群体 22.2%、0.0400、0.0398, 江苏养殖群体 11.1%、0.0106 和 0.0083, 群体间遗传差异未见显著。根据群体间遗传距离构建 UPGMA 聚类关系图, 显示广西选育群体和江苏养殖群体间的遗传关系较近, 而与原种  $F_1$  群体的遗传关系较远。

**关键词:** 罗氏沼虾; *COI* 基因; 限制性片段长度多态; 遗传多样性

中图分类号: S 917 文献标识码: A

## The genetic diversity of *COI* gene in mitochondrial DNA of three populations of *Macrobrachium rosenbergii*

YANG Xue-ming<sup>1</sup>, GUO Ya-fen<sup>2</sup>, JIANG Qin-yang<sup>2</sup>, CHEN Fu-yan<sup>1</sup>, LIANG Wan-wen<sup>1</sup>, JIANG He-sheng<sup>2</sup>

(1. Guangxi Fisheries Institute, Nanning 530021, China;

2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

**Abstract:** With the method of PCR, the Cytochrome oxidase subunit I (*COI*) gene is amplified to investigate the genetic diversity and genetic difference of three populations of *Macrobrachium rosenbergii*, including  $F_1$  of wild population from Burma, breeding population from Guangxi local farm and cultured population from Jiangsu Province, 10 endonucleases (*ApaI*, *Acc65I*, *Fnu4HI*, *BsrFI*, *BsrI*, *KpnI*, *HphI*, *FokI*, *BanI*, *TaqI*) are applied to digest the PCR products of *COI* gene from 30 samples, 10 samples per population. The digested DNA fragments are shown with 3% agarose gel. The electrophoresis patterns indicate that in *COI* gene, these three populations have 2 polymorphic loci, 11 kinds of endonuclease patterns and 3 kinds of genotypes. The proportion of polymorphic loci, mean heterozygosity, genotype diversity respectively are: 22.2%, 0.0556 and 0.0472 in  $F_1$  of wild population; 22.2%, 0.0400 and 0.0398 in breeding population; 11.1%, 0.0106 and 0.0083 in cultured population, which shows that  $F_1$  of wild population and breeding population have higher genetic diversity than cultured population, while genetic difference among these three populations is not significant by *t*-test ( $P > 0.10$ ). The UPGMA clustering

收稿日期: 2005-05-11

基金项目: 广西科学基金项目(桂科基 0342006-1)

作者简介: 杨学明(1969-), 男, 四川射洪人, 博士, 主要从事水产生物技术及遗传育种方面的研究 E-mail: myxm@sina.com

phenogram indicates that the breeding population from Guangxi has a closer relationship with cultured population from Jiangsu than that with  $F_1$  of wild population from Burma, and to some degree reveals the effectiveness and limitation of artificial breeding in *Macrobrachium rosenbergii*.

**Key words:** *Macrobrachium rosenbergii*; *COI* gene; RFLP; genetic diversity

罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 是目前国内主要的淡水养殖虾类品种, 在水产养殖结构中占有重要地位。自从二十世纪 70 年代从日本引进我国以来, 经过近 30 年的人工养殖, 种质衰退现象比较明显。主要表现在生长速度减慢, 抗病力差, 性成熟提前, 个体变小。可以说种质问题已成为制约罗氏沼虾养殖业持续健康发展的瓶颈。有鉴于此, 我们开展了罗氏沼虾的良种选育, 一方面利用国内现有养殖群体开展人工选育和提纯复壮, 另一方面引进缅甸罗氏沼虾原种子一代, 进行杂交选育。本文对罗氏沼虾原种  $F_1$  代、广西选育群体和江苏养殖群体进行线粒体 DNA 上 *COI* 基因限制性酶切多态位点分析, 目的是了解它们的遗传现状及其遗传差异, 为更好地进行罗氏沼虾良种选育提供指导。目前国内针对罗氏沼虾群体遗传变异和种质的研究较少, 甘西等<sup>[1]</sup>进行了国内养殖群体的 RAPD 遗传多样性研究; 李明云等<sup>[2]</sup>进行了缅甸自然群体和浙江养殖群体的 RAPD 遗传分析, 张海琪等<sup>[3]</sup>用同工酶进行了缅甸自然群体和浙江养殖群体的生化遗传变异研究。本文应用 PCR-RFLP 方法对罗氏沼虾种群遗传多样性进行了研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样本来源和采集

缅甸原种  $F_1$  (称 MDP): 2004 年 7 月采自广西水产研究所那马中试基地。来自浙江省南太湖淡水水产种业有限公司从缅甸引进的原种罗氏沼虾繁殖的子一代虾苗, 在该所那马中试基地养成。随机采样 30 尾, 活体取肌肉 3~5 g, 立即冻存于 -20 °C 冰箱。

江苏养殖群体 (称 JSP): 2004 年 8 月采自苏州市水产养殖场内塘分场。由江苏本地亲虾繁殖的后代养成。随机采样 30 尾, 活体取肌肉 3~5 g, 95% 酒精固定, 常温保存。

广西选育群体 (称 GXP): 2004 年 7 月采自广西水产研究所那马中试基地。是以广西本地养殖的罗氏沼虾为亲本材料人工选育的第二代。随机采样 50 尾, 活体取肌肉 3~5 g, 立即冻存于 -20 °C 冰箱。

### 1.2 试剂和药品

10 种限制性内切酶 *Apa*I、*Acc*65I、*Fnu*4hI、*Bsr*fI、*Bsr*I、*Kpn*I、*Hph*I、*Fok*I、*Ban*I、*Taq*I 购自纽英伦 (New England Bio-Lab) 公司, *Taq* 酶、4 种 dNTPs 和 Marker (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus) 购自大连宝生物 (Takara) 公司, PCR 引物由上海生工 (Sangon) 合成。其它试剂均为国产分析纯。

### 1.3 试验方法

总 DNA 抽提: 每个群体随机取 16 个虾的样品, 取肌肉 0.1~0.2 g, 剪碎, 振荡匀浆, 用含蛋白酶 K 的裂解液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0, 1% SDS), 55 °C 消化过夜。然后用 Tris-饱和酚、氯仿/异戊醇 (24:1) 提取、纯化 DNA, 用 -20 °C 冷冻的无水乙醇沉淀 DNA, 自然干燥, 溶解于 30~50  $\mu$ L 灭菌 ddH<sub>2</sub>O 中, 4 °C 保存备用。

PCR 扩增和扩增产物鉴定: 在 PTC-100™ PCR 仪进行 *COI* 基因扩增。引物序列为: P1: 5' - ATT GTC ACT GCC CAC GCA TT; P2: 5' - TGT TCG TAG AGG ATC GGG TC。反应体系成份为: 总 DNA 2  $\mu$ L, 10 $\times$  PCR buffer (MgCl<sub>2</sub>) 2.5  $\mu$ L, dNTPs 1  $\mu$ L, 引物各 0.5  $\mu$ L, *Taq* 酶 0.2  $\mu$ L (1U), 加灭菌 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 25  $\mu$ L。反应条件为: 94 °C 预变性 5 min, 1 个循环; 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 30 个循环; 72 °C 后延伸 10 min, 1 个循环。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳鉴定, TBE 缓冲液, 电压 4~5 V/cm, EB 染色, 紫外灯下观察, 拍照。

扩增产物限制性酶切及酶切产物电泳:每个群体取 10 个样本的 PCR 产物进行酶切和电泳。限制性酶切反应使用厂家提供的缓冲液及推荐的反应体系和反应条件。酶切产物在 2.5% 或 3% 的琼脂糖平板凝胶上电泳, TBE 缓冲液, 电压 5~6 V/cm, 电泳时间视不同酶类, 1 h 左右不等, EB 染色, 紫外灯下观察, Bio-Rad 凝胶成像系统拍照。

#### 1.4 数据分析和处理

用字母如 A、B、C 等命名内切酶的酶谱, 由所有内切酶的酶谱构成样本的基因型。群体的基因型多样性指数用种群遗传分析软件 Arlequin ver 2.000 计算<sup>[4,5]</sup>。

一个群体的基因变异用多态座位比例(P)和每个座位的平均杂合度(H)来度量。P = 多态座位数/总座位数,  $H = \sum(1 - \sum X_i^2) / n$ , 其中:  $X_i$  为等位基因  $i$  的频率,  $n$  为所测定的座位总数。

群体间的基因变异用遗传距离(D)来度量, 采用 Nei<sup>[6]</sup>公式,  $D = -\ln I$ ,  $I = \sum X_i Y_i / (\sum X_i^2 Y_i^2)^{1/2}$ , 其中:  $X_i$  为群体 X 第  $i$  个等位基因的频率,  $Y_i$  为群体 Y 第  $i$  个等位基因的频率。根据计算出的遗传距离, 用 Clustal V 软件的 UPGMA 程序构建群体聚类分析图。

## 2 结果

### 2.1 COI 基因的 PCR 扩增结果

在所有取样的三个群体共 30 个样品中, 都扩增到了单一谱带的 COI 基因片段, 片段长度约为 536 bp, 带型清晰, 重复性好。取 1 份 PCR 产物送往 Takara 公司测序, 经比较, 序列结果与 GenBank 上公布的罗氏沼虾 COI 基因序列(序列号: AF614578)同源性达 98%。说明扩增结果正确。COI 基因的琼脂糖电泳图谱见图 1。

### 2.2 罗氏沼虾三群体的遗传多样性

用 10 种限制酶 *Apa*I、*Acc*65I、*Fnu*4hI、*Bsr*fI、*Bsr*I、*Kpn*I、*Hph*I、*Fok*I、*Ban*I、*Taq*I 对罗氏沼虾缅甸原种 F<sub>1</sub>、广西选育群体和江苏养殖群体的共 30 尾虾的 COI 基因产物进行酶切电泳。其中, *Hph*I 酶没有切点, 其结果不用于分析。其余 9 种酶分别有 1 或 2 个酶切位点, 共有酶谱 11 种, 2 种基因型(Genotype)或限制性类型(Haplotype), 其中 *Acc*65I 和 *Bsr*fI 为多态性酶。*Acc*65I 酶切在三个群体间和群体内均存在多态, *Bsr*fI 酶切在缅甸原种 F<sub>1</sub> 代和广西选育群体内存在多态, 在江苏养殖群体内未发现多态, 其它 7 种酶 *Apa*I、*Fnu*4hI、*Bsr*I、*Kpn*I、*Fok*I、*Ban*I、*Taq*I 在三个群体间和群体内均未检出多态。为简便起见, 这里仅给出 *Acc*65I(1 个切点)和 *Taq*I(2 个切点)酶切产物的部分电泳图谱(图 2 和图 3)。9 种酶的酶切类型及在样本中的分布见表 1。

根据酶切结果可计算各群体的各项遗传变异参数。统计结果见表 2。

从表 2 可以得知, 三个群体中缅甸原种 F<sub>1</sub> 代各项遗传参数指标最高, 表明其群体遗传多样性最大, 广西选育群体次之, 而江苏养殖群体由于只检出 1 个多态位点, 其基因型多样性指数、多态座位比例和平均杂合度都是最低, 群体遗传变异最小, 可简单表示为: 缅甸原种 F<sub>1</sub> > 广西选育群体 > 江苏养殖群体。从表 1 看, 观察多态位点在群体内的样本分布, 对于多态位点 *Bsr*fI, 缅甸原种 F<sub>1</sub> 和广西选育群体仅有 1 个个体(占样本数的 10%)检出, 江苏养殖群体无个体未检出; 对于 *Acc*65I, 三个群体分别有 4 个、2 个和 1 个个体(占各自样本数的 40%、20%、10%)检出多态, 说明群体内的遗传差异也比较小。

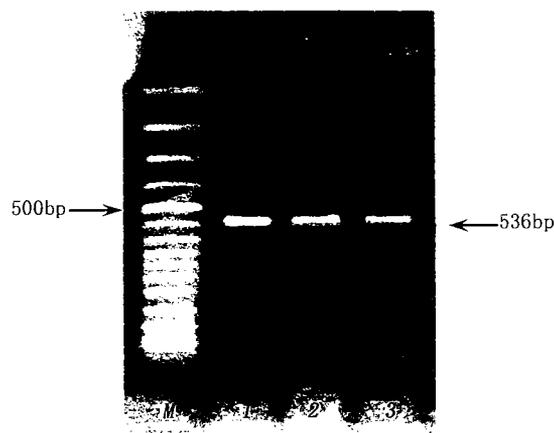


图 1 罗氏沼虾线粒体 COI 基因的琼脂糖电泳结果  
Fig. 1 The electrophoresis pattern of mtDNA COI gene from *Macrobrachium rosenbergii*  
M: DNA marker; 1: MDP; 2: GXP; 3: JSP

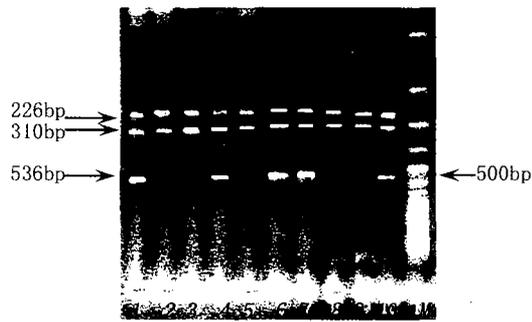


图2 限制性内切酶 *Acc65I* 对 *COI* 基因片段的酶切电泳图谱

Fig.2 The electrophoresis pattern of *COI* gene digested with *Acc65I*

1 - 4: MDP; 5 - 7: GXP; 8 - 10: JSP; M: DNA marker

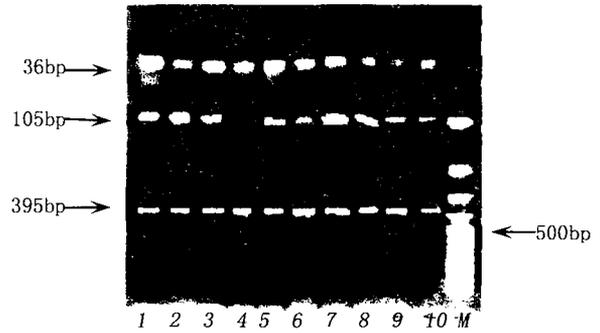


图3 限制性内切酶 *TaqI* 对 *COI* 基因片段的酶切电泳图谱

Fig.3 The electrophoresis pattern of *COI* gene digested with *TaqI*

1 - 4: MDP; 5 - 7: GXP; 8 - 10: JSP; M: DNA marker

表 1 9 种酶对三种罗氏沼虾线粒体 *COI* 基因的酶切类型及其样本分布

Tab.1 The restriction type of *COI* gene and its distribution in all samples of three populations

内切酶	类型	片段长度(bp)			样本分布 (MDP/GXP/JSP)	类型	片段长度(bp)			样本分布 (MDP/GXP/JSP)
<i>BsrI</i>	A	300	236		1/1/0	B	536			9/9/10
<i>Acc65I</i>	A	310	226		6/8/9	B	310	226	536	4/2/1
<i>ApaI</i>	A	460	76		10/10/10					
<i>Fnu4HI</i>	A	295	241	536	10/10/10					
<i>BsrI</i>	A	450	86	536	10/10/10					
<i>KpnI</i>	A	286	250		10/10/10					
<i>FokI</i>	A	230	180	126	10/10/10					
<i>BanI</i>	A	290	246		10/10/10					
<i>TaqI</i>	A	395	105	36	10/10/10					

表 2 罗氏沼虾三个群体的遗传多样性

Tab.2 The genetic diversity index of three populations of *Macrobrachium rosenbergii*

种群	酶谱	基因型	基因型多样性指数	多态座位比例(P)	平均杂合度(H)
缅甸原种 F <sub>1</sub>	11	3	0.0472	22.2%	0.0556
广西选育群体	11	3	0.0398	22.2%	0.0400
江苏养殖群体	10	1	0.0083	11.1%	0.0106

### 2.3 罗氏沼虾不同群体间的遗传差异及系统聚类分析

根据不同的酶切结果可计算罗氏沼虾缅甸原种 F<sub>1</sub> 代、广西选育群体和江苏养殖群体之间的遗传距离,列入表 3。根据遗传距离值用 Clustal V 软件构建这三个群体间的 UPGMA 聚类关系图(图 4)。从图 4 中可见,广西选育群体与江苏养殖群体的遗传距离较近,而与缅甸原种 F<sub>1</sub> 群体的遗传距离较远。经 *t* 检验,  $P > 0.10$ , 群体间的遗传差异不显著。

表 3 罗氏沼虾三个不同群体间的遗传距离

Tab.3 The genetic distance among three populations of *Macrobrachium rosenbergii*

种 群	缅甸原种 F <sub>1</sub>	广西选育群体	江苏养殖群体
缅甸原种 F <sub>1</sub>	0.000 0		
广西选育群体	0.005 4	0.000 0	
江苏养殖群体	0.012 2	0.004 3	0.000 0

### 3 讨论

#### 3.1 PCR-RFLP 与 RAPD 分析结果的比较

国内李明云等<sup>[2]</sup>和张海琪等<sup>[3]</sup>分别用 RAPD 和同工酶两种不同的遗传标记方法进行了罗氏沼虾缅甸野生群体和浙江本地养殖群体的遗传多样性比较研究,得出的结论都是野生种群的遗传多样性高于养殖群体。这一结论与本文的分析结果,即缅甸原种 F<sub>1</sub> 代的遗传多样性高于江苏养殖群体,是基本一致的;从具体数值看,本文得出的这两个群体遗传多样性参数的数值均低于 RAPD 结果,群体间的遗传

差异亦不显著。本文缅甸原种 F<sub>1</sub> 和江苏养殖群体的多态座位比例分别为 22.2% 和 11.1%, 平均遗传杂合度分别为 0.058 6 和 0.040 0, 二者间的遗传距离为 0.012 2; 用 RAPD 方法得到的缅甸野生群体和浙江养殖群体的多态座位比例分别是 33.81% 和 30.22%, 平均杂合度分别为 0.288 8 和 0.264 6, 群体间的遗传距离为 0.184 5。都明显大于本文的结果。分析这两种结果差异的原因,我们认为,如果不考虑江苏养殖群体和浙江养殖群体二者间的遗传差异(地理位置接近,亲本同源性高),一方面,野生种经繁殖一代以后,遗传变异必然有所降低,使子一代与养殖群体间的遗传距离变小;另一方面,主要是 PCR-RFLP 和 RAPD 这两种遗传标记方法本身的不同造成的。本文所应用的 PCR-RFLP 方法,其优点是针对性强,其局限性是仅能对扩增得到的有限长度的基因序列进行分析,如本文的线粒体 *COI* 基因,所得结果也仅仅反映出单个基因或某一段 DNA 序列上存在的碱基变异,不包括基因组其他序列上的变异。而 RAPD 方法的分析范围是覆盖整个基因组的,包括线粒体 DNA 和核 DNA,它能够检出比 PCR-RFLP 方法多得多的、存在于种群整个基因组上广泛的遗传变异。从这一点看,在研究生物种群遗传多样性时,结合使用 RFLP 和 RAPD 这两种不同的技术方法是较好的选择。

#### 3.2 *COI* 基因在评估罗氏沼虾群体遗传变异方面的作用

细胞色素氧化酶基因进化速度比较快,是检测群体遗传变异的有效探针,在鱼类已有应用<sup>[7]</sup>。Mather 等<sup>[8]</sup>发现,在罗氏沼虾同一个地理种群内,*COI* 基因的平均序列差异达到了 15%~16%,在不同的地理种群之间其序列差异更高。从本文结果看,在所检测的 9 个基因位点中,仅发现了 2 个多态位点,多态位点比例较低。估计是与酶切位点比较集中有关。从表 1 可以看出,9 个限制性酶中有 8 个酶的切点集中在 *COI* 序列的 300 bp 和 450 bp 附近,只有 *FokI* 的切点在其它位置,因此能够检测到的多态位点比较少。从这点看还有必要选用更多的限制性酶做进一步的酶切研究。

#### 3.3 对罗氏沼虾引种和良种选育的指导意义

其一,引进的缅甸原种 F<sub>1</sub> 代的遗传多样性最为丰富,说明将其作为选育的原始材料是可行和有潜力的;其二,选育群体和养殖群体的基因型多样性和位点杂合度都比原种 F<sub>1</sub> 代的要低,主要原因就是多年的近亲繁殖,以及单纯追求育苗产量、忽视亲虾选择,从而造成它们遗传多样性的丧失,生长性能和抗病力下降;第三,广西选育群体由于仅选育了两代,从聚类关系看,其与养殖群体的遗传关系接近,因此还必须进一步加大力度,进行持续不断的选育。

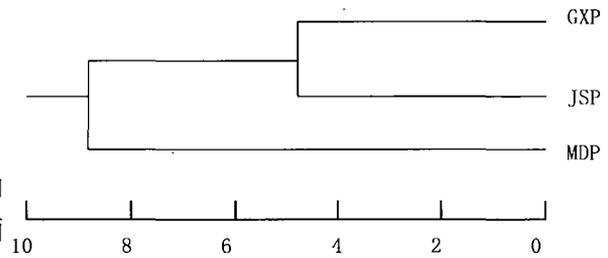


图 4 罗氏沼虾三个不同群体间的聚类关系图

Fig.4 The UPGMA phylogenetic tree of three populations of *Macrobrachium rosenbergii*

苏州大学凌去非博士协助采样,上海水产大学赵金良副研究员协助处理部分试验数据,谨致谢忱。

#### 参考文献:

- [1] 甘 西,邓凤娇,陈晓汉,等.罗氏沼虾遗传多样性的 RAPD 研究[J].武汉大学学报(自然科学版),2000,46(2):215-218.
- [2] 李明云,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[J].水产学报,2004,28(4):360-364.
- [3] 张海琪,何中央,徐晓林,等.罗氏沼虾不同群体生化遗传变异的比较分析[J].西南农业大学学报(自然科学版),2004,26(5):632-639.
- [4] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin: a software for population genetics data analysis [R]. Genetics and Biometry Lab. Dept. of Anthropology, Univ. of Geneva. 2000.
- [5] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application of human mitochondrial DNA restriction data[J]. Genetics, 1992, 131:479-491.
- [6] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics, 1978, 89:583-590.
- [7] 王成辉,李思发.中国红鲤线粒体 *COI* 基因的遗传变异和亲缘关系[J].遗传学报,2004,31(11):1226-1331.
- [8] Mather P B, Bruyn M. Genetic diversity in wild stocks of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): Implications for aquaculture and conservation[J]. NAGA, WorldFish Center Quarterly, 2003, 26(4):4-7.

#### 会议预告

### 第二届亚洲网箱水产养殖国际大会

2006年7月3-8日第二届亚洲网箱水产养殖国际大会将在浙江杭州大学国际会议中心举行。本次大会主题为:“网箱水产养殖与海洋和水产渔业经济发展”。大会将围绕这一主题,就“海洋水产资源与网箱养殖及健康养殖;海洋与水产渔业经济及政府政策和管理”等进行广泛的学术交流与讨论。其主要内容为:

- (1)网箱养殖的现状与发展趋势;
- (2)网箱设计、制造工艺与材料;
- (3)养殖品种选择;
- (4)营养、饲料与管理;
- (5)疾病预防与健康养殖;
- (6)养殖技术与养殖模式;
- (7)环境、生态与可持续性发展;
- (8)海洋与水产渔业经济和市场;
- (9)政府政策与管理等。

联系人:王 利 电话:0571-86971171, E-mail: paper\_zju2006@yahoo.com.cn

徐海圣 电话:0571-86971834, E-mail: hsxu@zju.edu.cn

杨受保 电话:0571-86971171