

## 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

冯建彬<sup>1</sup>, 孙悦娜<sup>1</sup>, 程 熙<sup>1</sup>, 李家乐<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学省部共建水产种质资源创新与利用重点实验室, 上海 200090;

2. 上海高校水产养殖学 E-研究院, 上海 200090)

**摘要:** 对我国五大淡水湖日本沼虾 100 个野生个体的线粒体细胞色素氧化酶亚基 I(COI) 部分序列进行了测定和分析, 经比对获得 578 bp 核苷酸片段, 发现 49 个变异位点, 得到 35 个单倍型, 包括 7 个共享单倍型, 各群体都具有较好的单倍型多态性和核苷酸多态性, 其中鄱阳湖群体遗传多样性相对最高。AMOVA 分析表明, 五群体间总遗传分化系数  $F_{st} = 0.3187 (P < 0.05)$ , 群体间具有较高的遗传分化。MEGA 3.1 软件计算五群体的 Kimura 2-parameter 遗传距离, 洞庭湖群体和巢湖群体之间的遗传距离最远为 0.0191, 巢湖群体和洪泽湖群体之间的遗传距离最近为 0.0051。以同属胖掌沼虾(*Macrobrachium inflatum*) 为外群分别构建了 NJ 和 UPGMA 系统树, 结果显示洞庭湖和鄱阳湖为一族群, 太湖、巢湖和洪泽湖为一族群。

**关键词:** 日本沼虾; 细胞色素氧化酶亚基 I; 遗传多样性; 中国五大淡水湖

**中图分类号:** Q 785; S 917

**文献标识码:** A

日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*), 俗称青虾、河虾, 隶属于甲壳纲十足目 (Decapoda)、长臂虾科 (Palaemonidae)、沼虾属 (*Macrobrachium*), 自然分布于中国、日本、朝鲜半岛、越南以及缅甸等<sup>[1-3]</sup>。在我国, 日本沼虾广泛分布于全国各地的江、河、湖、沼及水库中, 是我国重要淡水经济养殖虾类<sup>[1]</sup>, 2004 年始日本沼虾的养殖产量已超过 20 多万吨<sup>[4]</sup>。目前, 在日本沼虾养殖过程中由于长期捕大留小、忽视良种选育以及过度捕捞野生资源, 使得日本沼虾野生资源逐渐衰竭, 养殖日本沼虾出现了个体小型化、性早熟以及生长速率慢等种质退化现象<sup>[5]</sup>。因此, 日本沼虾的良种选育和种质资源研究, 对于保护日本沼虾野生资源以及促进我国淡水养虾业的健康可持续发展都具有重要的现实意义。

多细胞动物中除刺细胞动物和等脚类外的线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 是一个环形 DNA 分子<sup>[6-7]</sup>, 序列长度在 14~17 kb 碱基

之间<sup>[8]</sup>, 由于它具有母性遗传、进化速度快、核苷酸替代率高等特点, mtDNA 已成为分子系统学特别是群体遗传学以及系统发育等研究的有效遗传标记<sup>[9]</sup>。mtDNA 细胞色素 C 氧化酶亚基 I (cytochrome c oxidase subunit I, COI) 序列作为 mtDNA 的主要标记之一, 在虾类分子系统学中已有较多应用, 例如: Vassilios 等<sup>[10]</sup>研究了分布于欧洲和美洲的欧洲龙虾 (*Homarus gammarus*) 的系统进化关系, Carini 等<sup>[11]</sup>研究了分布于澳大利亚西昆士兰地区水域的澳洲沼虾 (*M. australien*) 遗传结构, 杨学明等<sup>[12]</sup>研究了三个群体的罗氏沼虾 (*M. rosenbergii*) 遗传多样性。国内外有关日本沼虾种质资源学研究主要集中在细胞遗传学<sup>[13-14]</sup>、生化遗传学<sup>[15-17]</sup>等方面, 但有关日本沼虾分子遗传多样性方面的研究较少, 仅见蒋速飞<sup>[18]</sup>采用 RAPD 方法对局部少数地区的分子遗传多样性进行了分析研究。本研究通过分析我国五大淡水湖野生日本沼虾 mtDNA COI 基因

收稿日期: 2007-07-09

资助项目: 上海市科委基础重大项目 (06DJ14003); 上海市水产办项目 (2005-06); 上海市重点学科建设项目 (Y1101)

作者简介: 冯建彬 (1978-), 男, 山东嘉祥人, 博士研究生, 从事水产动物种质资源与种苗工程的研究。E-mail: jbinfeng@163.com

通讯作者: 李家乐, Tel: 021-65710216, E-mail: jlli@shou.edu.cn

片段序列的多态性,为进一步开展日本沼虾群体分子遗传多样性分析、种质资源的研究及遗传育种提供基础资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

本研究用野生日本沼虾于 2005 年 12 月至 2006 年 3 月采自我国五大淡水湖区,其中鄱阳湖群体(PY)采自江西省都昌县都昌镇(29°14'N, 116°10'E),洞庭湖群体(DT)采自湖南省岳阳市岳阳楼区湖滨镇(29°19'N, 113°03'E),太湖群体(TH)采自浙江省长兴县夹浦镇(30°58'N, 120°03'E),洪泽湖群体(HZ)采自江苏省洪泽县蒋坝镇(33°17'N, 118°49'E),巢湖群体(CH)采自安徽省巢湖市散兵镇(31°35'N, 117°48'E)。各群体随机采取 1 000 尾,无水乙醇固定带回实验室, -20 °C 保存备用。

### 1.2 实验方法

**基因组 DNA 的提取** 参照《分子克隆实验指南》<sup>[19]</sup>,采用苯酚-氯仿法提取基因组 DNA。各群体随机挑选日本沼虾雌雄个体各 10 尾,共 20 尾,取 0.01 g 腹部肌肉组织,剪碎后加入 500  $\mu$ L 组织匀浆缓冲液(10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.0; 50 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, pH 8.0),混匀后加入终浓度为 1% 的 SDS 和 200  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 的蛋白酶 K, 55 °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 1 次,70%乙醇洗涤两次,冷冻无水乙醇沉淀,TE 溶解。Eppendorf Biophotometer 6131 核酸蛋白测定仪测定样品 DNA 的浓度和纯度, -20 °C 保存备用。

**PCR 扩增和产物鉴定** COI 引物为 LCO1490: 5' - GGTC AACAAATCATAAAGATATTGG - 3', HCO2198: 5' - TAA ACTTCAGGGT-GACCAAAAATCA - 3'<sup>[20]</sup>。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

PCR 反应体系总体积为 50  $\mu$ L,包括:模板 DNA 50 ~ 100 ng, 10  $\times$  Buffer 5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol·L<sup>-1</sup>, 4 种 dNTP 各 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>, 上、下游引物各 0.2  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>, Taq DNA 聚合酶 2 U。

PCR 反应在 Eppendorf Mastercycler 5333 型 PCR 仪上进行。反应程序为:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸

45 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。每次反应都设不含模板的空白对照。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,电泳缓冲液为 0.5  $\times$  TBE (pH 8.0),电压为 5 V·cm<sup>-1</sup>,常温电泳,EB 染色,凝胶成像系统下观察并拍照记录。

**DNA 序列测定** 将 PCR 产物送至上海生工生物技术有限公司,经纯化后再进行测序反应,测序仪为 ABI 3730 基因分析仪,测序引物为 LCO1490。

**统计分析** DNA 序列用 Bioedit 7.0<sup>[21]</sup> 进行编辑并辅以人工核查,用 Clustal X 1.81<sup>[22]</sup> 进行同源排序比对,并确定序列长度。用 DNASP 4.0<sup>[23]</sup> 单倍型多样性(haplotype diversity)和核苷酸多样性(nucleotide diversity)等。

用 MEGA 3.1<sup>[24]</sup> 计算不同序列间的碱基组成、变异位点、简约信息位点和不同地理种群的 Kimura 2-parameter 遗传距离。采用 Kimura 2-parameter 距离矩阵,以沼虾属的胖掌沼虾(*M. inflatum*) (Genebank: AB235263) 为外群,采用邻接法(NJ)以及非加权配对算数平均法(UPGMA)构建单倍型分子系统树,系统树中节点的自举置信水平应用自引导(bootstrap)估计,共 1 000 次循环。

用 ARLEQUIN 3.1<sup>[25]</sup> 中的分子变异分析(AMOVA)分析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,  $F_{st}$ ),并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)。

## 2 结果

### 2.1 序列特性

对我国五大淡水湖日本沼虾群体的 mtDNA COI 序列排序分析后,得到 578 bp 的同源基因序列,序列组成如表 1 所示。在研究的所有序列中,A、T、C、G 碱基的平均含量为 29.24%、29.54%、23.35% 和 17.87%。A + T 的含量为 58.78%,明显高于 G + C 的含量 41.22%。在所测碱基序列中共发现 49 个变异位点,占位点总数的 8.48%,这些变异位点包括 39 个转换(transition)和 10 个颠换(transversion),转换与颠换的比值为 3.9:1,没有插入或丢失位点,其中简约信息位点 34 个,占 5.88%。

从 49 个 COI 序列碱基变异位点中共定义了



表 3 五大淡水湖日本沼虾群体的遗传多样性参数

Tab. 3 Parameter summary of genetic diversity of *M. nipponense* from the five largest freshwater lakes in China

群 体 population	单倍型数 number of haplotypes	单倍型多样性 haplotype diversity	多态位点数 number of polymorphic sites	核苷酸多样性 nucleotide diversity
洞庭湖 DT	5	0.716 ± 0.087	22	0.011 51 ± 0.002 39
太 湖 TH	9	0.853 ± 0.053	16	0.006 49 ± 0.000 85
巢 湖 CH	9	0.795 ± 0.087	13	0.004 94 ± 0.000 89
鄱阳湖 PY	16	0.963 ± 0.033	39	0.017 45 ± 0.001 77
洪泽湖 HZ	8	0.858 ± 0.045	9	0.005 18 ± 0.000 42
总 和 total	35	0.919 ± 0.014	49	0.012 53 ± 0.000 92

## 2.2 群体遗传变异和遗传结构

五大淡水湖日本沼虾群体 mtDNA *COI* 序列的遗传差异 AMOVA 分析结果如表 4 所示,群体间遗传分化系数  $F_{st} = 0.3187 (P < 0.05)$ ,表明在整个遗传变异中群体间占 31.87%,其余的遗传变异来自于群体内,群体间具有程度较高的遗传分化。五大淡水湖群体间,洞庭湖和巢湖之间的遗传分化系数最高 ( $F_{st} = 0.5616$ ),其次是洞庭湖和洪泽湖之间的遗传分化系数其次 ( $F_{st} = 0.5516$ ),洪泽湖和太湖群体间

的遗传分化系数最低 ( $F_{st} = -0.0057$ );5 群体中太湖、巢湖和洪泽湖 3 群体中两两之间没有显著的遗传分化 ( $P > 0.05$ ),其它群体之间均存在着显著 ( $P < 0.05$ )或极显著 ( $P < 0.01$ )的遗传分化。

五大淡水湖日本沼虾群体的遗传距离如表 5 所示,从中可知,五大淡水湖群体间的遗传距离在 0.0051~0.0191,洞庭湖和巢湖之间的遗传距离最大为 0.0191,巢湖和洪泽湖之间的遗传距离最近为 0.0051。

表 4 五大淡水湖日本沼虾群体间遗传差异的分子方差分析表(AMOVA)

Tab. 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) among populations of *M. nipponense* from the five largest freshwater lakes in China

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 of variance
群体间 among populations	5	110.884	1.252 22 Va	31.87
群体内 within populations	95	254.271	2.676 54 Vb	68.13
总变异 total variation	99	365.155	3.928 76	

注:遗传分化系数( $F_{st}$ ) = 0.3187 ( $P < 0.05$ )

Notes: Genetic fixations index( $F_{st}$ ) = 0.3187 ( $P < 0.05$ )

表 5 五大淡水湖日本沼虾群体间的相对遗传距离(对角线下)和遗传分化系数( $F_{st}$ )(对角线上)

Tab. 5 Genetic distances (below diagonal) and genetic fixations index (above the diagonal) between and within populations of *M. nipponense* from the five largest freshwater lakes in China

群体 population	鄱阳湖 PY	洞庭湖 DT	太 湖 TH	巢 湖 CH	洪泽湖 HZ
鄱阳湖 PY		0.1311 **	0.1893 ***	0.2499 **	0.2164 ***
洞庭湖 DT	0.0170		0.5171 **	0.5616 **	0.5516 ***
太 湖 TH	0.0150	0.0189		0.0523 *	-0.0057 *
巢 湖 CH	0.0152	0.0191	0.0061		0.0104 *
洪泽湖 HZ	0.0147	0.0189	0.0058	0.0051	

注: \* 示差异不显著 ( $P > 0.05$ ); \*\* 示差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\*\* 示差异极显著 ( $P < 0.01$ )

Notes: \* means no significant ( $P > 0.05$ ); \*\* means significant ( $P < 0.05$ ); \*\*\* means great significant ( $P < 0.01$ )

### 2.3 分子系统发育树

分别采用 UPGMA 法和 NJ 方法构建了五大淡水湖日本沼虾群体的 35 个单倍型的系统树,并对各分支均进行 1 000 次的重复检验,

如图 1 所示,35 个单倍型被分为 A、B 两个族群,A 族群包括太湖、洪泽湖和巢湖 3 群体,B 族群包括鄱阳湖和洞庭湖 2 个群体。两种系统树结果相同。

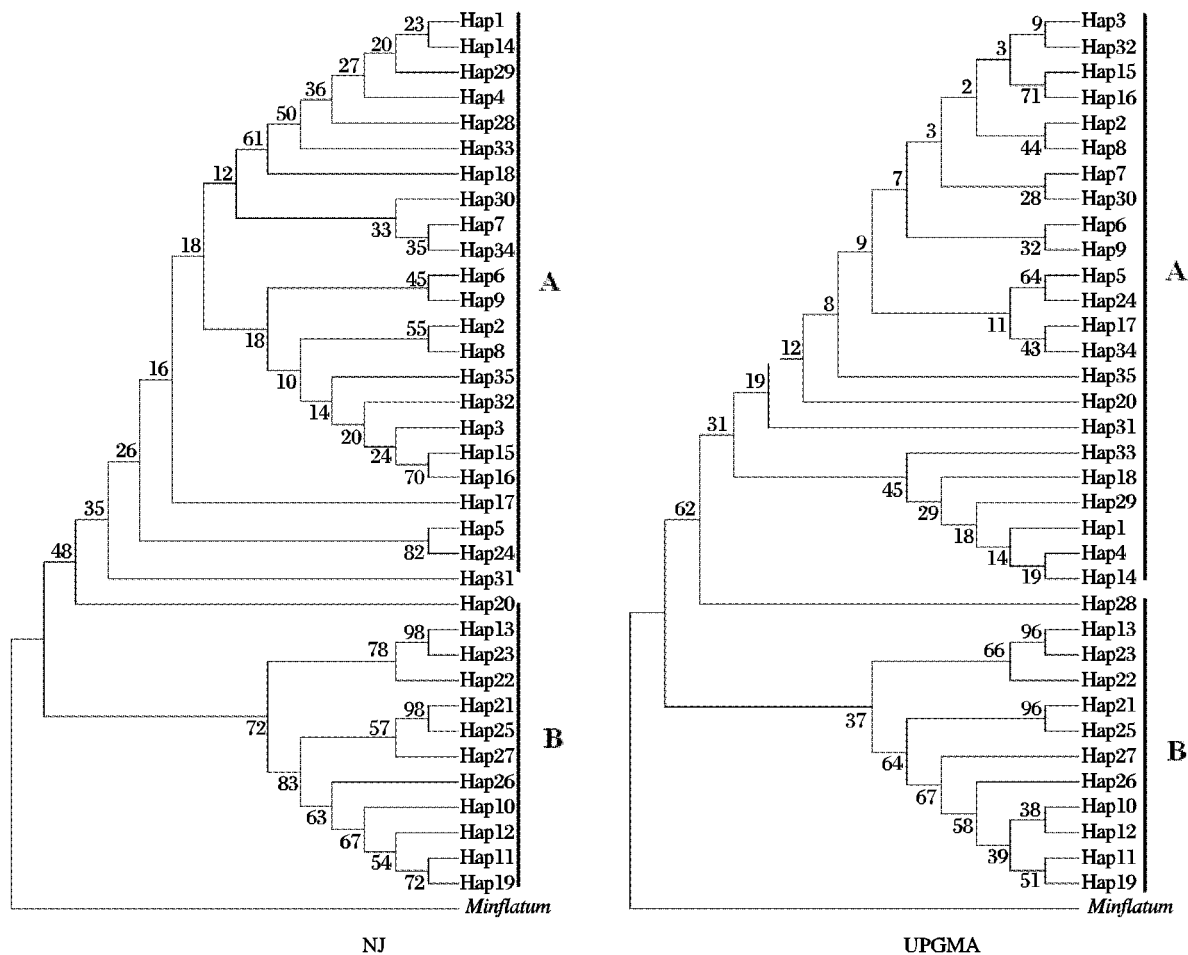


图 1 五大淡水湖日本沼虾群体 COI 序列 35 个单倍型的 NJ 和 UPGMA 分子系统树

A. 太湖,洪泽湖和巢湖群体; B. 鄱阳湖和洞庭湖群体

Fig. 1 NJ and UPGMA trees among 35 haplotypes of COI sequence of *M. nipponense* from the five largest freshwater lakes in China

A. including TH, HZ and CH populations; B. including PY and DT populations

## 3 讨论

### 3.1 遗传多样性

本研究中日本沼虾 mtDNA COI 碱基序列中 AT 含量为 58.78%,明显高于 GC 含量,AT 含量低于 Quan 等<sup>[26]</sup>研究的对虾属 12 种对虾类 AT 碱基含量的平均值 63.3%,以及 Liu 等<sup>[27]</sup>研究的沼虾属 34 种沼虾类 AT 碱基含量的平均值 59.3%,序列碱基组成的百分比也印证了碱基 G

的相对缺乏,AT 含量高是节肢动物 mtDNA 碱基组成中普遍存在的现象。

在线粒体序列变异中,变异位点的转换较易在近亲种间较频繁地发生,而颠换在较远缘种间逐渐明显;在同种动物中,转换往往在数量上远超过颠换<sup>[28]</sup>。本研究中,mtDNA COI 序列转换与颠换的比值为 3.9:1,高于 Liu 等<sup>[27]</sup>研究的沼虾属 34 种沼虾类种间转换与颠换比平均值 2.2:1,与 Serena 等<sup>[29]</sup>研究的白螯龙虾 (*Austropotamobius italicus*)

COI 序列转换与颠换比相同,这与核苷酸的替换主要以转换为主,转换多于颠换,表现较高的转换偏向<sup>[30]</sup>的规律相符。由此可知,五大淡水湖日本沼虾的线粒体变异仍为种内变异,并未发现种内近亲交配和亚种分化。

五大淡水湖日本沼虾群体平均单倍型多态性为 $(0.919 \pm 0.014)$ ,低于 Carini 等<sup>[11]</sup>研究的澳洲沼虾 COI 基因片段平均单倍型多态性指数 $(0.923 \pm 0.0075)$ ,高于 Klinbunga 等<sup>[31-32]</sup>用 RFLP 研究斑节对虾(*Penaeus monodoni*) mtDNA 得出的单倍型多态性指数 $(0.864 \pm 0.000)$ ;五大湖日本沼虾群体平均核苷酸多态性为 $(0.01253 \pm 0.00092)$ ,高于 Quan 等<sup>[26]</sup>研究的中国对虾(*P. chinensis*) COI 基因片段平均核苷酸多样性指数 0.0004,以及 Gusmao 等<sup>[33]</sup>研究的小褐美对虾(*P. subtilis*)、保罗美对虾(*P. paulensis*)、巴西美对虾(*Farfantepenaeus brasiliensis*)和南方滨对虾(*P. schmitti*)四种虾的 COI 基因片段的平均核苷酸指数,分别为 0.0025,0.0000,0.0004 和 0.0047。由此可见我国五大淡水湖日本沼虾的遗传多样性相对比较丰富。五大淡水湖中,鄱阳湖日本沼虾群体单倍型数、单倍型多态性和平均核苷酸多态性均为最高,可知鄱阳湖日本沼虾遗传多样性最高,这与李家乐等<sup>[34]</sup>、汪桂玲等<sup>[35]</sup>分别用 RAPD 和 SSR 标记对我国五大淡水湖中三角帆蚌的研究中鄱阳湖三角帆蚌群体遗传多样性最高的相一致,更进一步彰显了鄱阳湖水生生物遗传多样性具有较高的丰度。

### 3.2 系统发育关系

$F_{st}$ 是用来测量群体之间遗传分化的指标,当  $F_{st}$  接近于 0 时,则说明群体间的没有发生遗传分化。本研究中鄱阳湖和洞庭湖分别与其他三个湖泊群体间的  $F_{st}$  达到了显著( $P < 0.05$ )或极显著( $P < 0.01$ ),说明鄱阳湖和洞庭湖分别与其他三个湖泊群体之间发生了显著或极显著的群体遗传分化。而洪泽湖与太湖之间的  $F_{st}$  为负值,说明洪泽湖与太湖之间几乎没有遗传分化,洪泽湖与巢湖之间的也仅为 0.0104,说明洪泽湖与巢湖之间遗传分化也较小,两者之间遗传分化不显著( $P > 0.05$ )。另外群体间的相对遗传距离能反映群体间的亲缘关系,本研究中五大淡水湖日本沼虾群体间的遗传距离在 0.0051~0.0191,洞庭湖群体与鄱阳湖遗传距离较近,两者与其它三个群体间

的遗传距离相对较远,而太湖、洪泽湖和巢湖三群体之间的遗传距离较近。由 NJ 和 UPGMA 法构建的分子系统进化树也显示出同样的结果,五大淡水湖 100 个日本沼虾个体产生的 35 个单倍型被分为 A、B 两个族群,A 族群包括太湖、洪泽湖和巢湖 3 群体,B 族群包括鄱阳湖和洞庭湖 2 个群体。五大淡水湖日本沼虾群体的系统发育关系在一定程度上是由五大淡水湖群体地理位置分布情况决定的,即群体间地理位置越近其亲缘关系也越近,反之则较远,五大淡水湖中除洪泽湖属于淮河水系外,其它四个湖泊都属于长江中下游水系,其中洞庭湖位于长江中游,鄱阳湖位于长江中下游交界处,而太湖和巢湖则位于长江下游。

洪泽湖与太湖、巢湖分属淮河和长江水系,但洪泽湖与太湖、巢湖两群体日本沼虾的遗传距离较近且遗传分化不显著,这可能与五大淡水湖历史形成相关。地质资料显示,长江中下游水系及其湖泊都是在第三纪燕山运动、喜马拉雅运动以及第四纪潮湿气候来临时形成的。而洪泽湖是 800 多年前黄河南泛而冲击和破坏了淮河入海故道,黄淮河漫溢而使下游洪泽湖由小变大,湖底淤积越来越高,因此淮河被迫改道向南,经长江入海。在 18 世纪中期黄淮河同时发洪,使得洪泽湖南大堤决口,从而将洪泽湖通过三河与长江相通。由此可见洪泽湖发育在淮河中游的冲积平原上,是一个自然调蓄的淡水浅水湖,加之历史上洪泽湖曾几度干涸,也曾经有黄、淮河及长江洪水注入过,另外还有京杭运河使洪泽湖、长江、太湖相通。洪水泛滥以及过往船只的活动都有洪水或船只携带日本沼虾幼体或成体的可能性。由于日本沼虾的对温度、盐度、碱度等环境条件的变化具有较强的适应性,因而较容易适应新的环境,现已发现被引入至新加坡、菲律宾、乌兹别克斯坦、伊拉克南部以及俄罗斯、摩尔多瓦、哈萨克斯坦、伊朗等地<sup>[36]</sup>,并形成一定规模的群体,因此日本沼虾一旦被引入很容易适应并生存繁衍下来。但由于日本沼虾定居性较强,多行攀爬活动,游泳能力较弱,仅作短距离游泳<sup>[37]</sup>,因此洪水发生时可以躲避在水体深处的洞穴内,因此这种可能性不太强。最有可能的是近几十年来,洪泽湖周边地区各地频繁的引种移植,使得日本沼虾从太湖被引入而成,例如洪泽湖在 20 世纪 60 年代以及 90 年代初都曾经濒临干旱,太湖日本沼虾从 20 世纪 90 年

代中期开始已经被移植到洪泽湖及其周围水域,并在池塘内繁殖成功<sup>[38-39]</sup>。由此可以推测洪泽湖日本沼虾最大可能是太湖群体引入并繁殖后,人工放流或自然逃逸到洪泽湖中并定居下来。

#### 参考文献:

- [1] 刘瑞玉, 梁象秋, 严生良. 中国长臂虾亚科的研究 1. 沼虾属、瘦虾属和拟瘦虾属[C]// 中国甲壳动物学会: 甲壳动物学论文集(第二辑), 北京: 科学出版社, 1990: 111-112.
- [2] Cai Y, Dai A Y. Freshwater shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea) from the Xishuangbanna region of Yunnan Province, southern China [J]. *Hydrobiologia*, 1999, 400: 211-241.
- [3] Cai Y, Ng P K L. The freshwater palaemonid prawns of Myanmar (Crustacea: Decapoda: Caridea) [J]. *Hydrobiologia*, 2002, 487: 59-83.
- [4] Fishery statistics aquaculture production [R]. FAO yearbook, Roma, 2006, 89.
- [5] 李家乐, 聂式忠, 冯建彬, 等. 长江中下游五个日本沼虾群体网箱生长和养殖性能比较[J]. *上海海洋大学学报*, 2005, 9(14): 258-262.
- [6] Warrior R, Gall J. The mitochondrial DNA of *Hydra attenuata* and *Hydra littoralis* consists of two linear molecules [J]. *Arch Sci Geneva*, 1985, 38: 439-445.
- [7] Raimond R, Marcade I, Bouchon D, *et al.* Organization of the large mitochondrial genome in the isopod *Armadillidium vulgare* [J]. *Genetics*, 1999, 151: 203-210.
- [8] Wolstenholme D R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution [J]. *Int Rev Cytol*, 1992, 141: 173-216.
- [9] Hallerman E M. Population genetics: principle and applications for fisheries scientist [J]. *American Fisheries Society*, 2003, 59-100.
- [10] Vassilios K, Apostolos A, Alexandros T, *et al.* Development of mitochondrial DNA primers for use with *Homarid Lobsters* [J]. *Mar Biotechnol*, 2003, 5: 469-479.
- [11] Carini G, Hughes J M. Population structure of *Macrobrachium australiense* (Decapoda: Palaemonidae) in Western Queensland, Australia: the role of contemporary and historical processes [J]. *Heredity*, 2004, 93: 350-363.
- [12] 杨学明, 郭亚芬, 蒋钦杨, 等. 三个群体罗氏沼虾线粒体 COI 基因的遗传多样性分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2006, 15(2): 144-149.
- [13] 邱高峰, 堵南山, 赖伟. 日本沼虾染色体及其核型的研究 [J]. *海洋与湖沼*, 1994, 25 (5): 493-498.
- [14] 驹形伸之, 铃木淳志, 漆户登宇世, 等. テナガエビ科 2 属 6 種の染色体数 [J]. *日本甲壳类学会ニエス*, 1989, 12: 5.
- [15] 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 [J]. *水生生物学报*, 2004, 28(3): 327-329.
- [16] 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 [J]. *中国水产科学*, 2002, 9(3): 203-206.
- [17] 潘伟槐, 祝尧荣, 黄文光, 等. 日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 成体组织三种同工酶的研究 [J]. *绍兴文理学院学报*, 2001, 21(4): 43-45.
- [18] 蒋速飞, 傅洪拓, 熊贻伟, 等. 日本沼虾 4 个地理群体遗传变异的 RAPD 分析 [J]. *长江大学学报(自科版)*, 2006, 3(2): 179-182.
- [19] 黄培堂(译). 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 461-469.
- [20] Folmer O, Black M, Hoeh W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, 3: 294-299.
- [21] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95 /98 /NT [M]. *Nucl Acid Symp Ser*, 1998, 41, 95-98.
- [22] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 4876-4882.
- [23] Rozas J, Sanche-delBarrio J C, Messenguer X, *et al.* DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19: 2496-2497.
- [24] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5: 150-163.
- [25] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, 1: 47-50.

- 
- [26] Quan J X, Zhuang Z M, Deng J Y, *et al.* Low genetic variation of *Penaeus chinensis* as revealed by mitochondrial DNA COI and 16S RNA gene sequences [J]. *Biochem Genet*, 2004, 39: 279 – 284.
- [27] Liu M Y, Cai Y X, Tzeng C S. Molecular systematic of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) inferred from mtDNA sequences, with emphasis on east asian species [J]. *Zool Stu*, 2007, 46(3): 272 – 289.
- [28] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, *et al.* Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86:6196 – 6200.
- [29] Serena Z, Fabrizio S, Giuseppe C. Diversity of mitochondrial DNA of the endangered white-clawed crayfish (*Austropotamobius italicus*) in the Po River catchments [J]. *Freshwater Biol*, 2005, 50 (7):1262 – 1272.
- [30] Stephen A K, Dawn S W. Phylogeography and systematics of the mud turtle, *Kinosternon baurii* [J]. *Copeia*, 2001, 3: 797 – 801.
- [31] Klinbunga S, Siludjai D, Wudthijinda W, *et al.* Genetic heterogeneity of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and mitochondrial DNA RFLP analyses [J]. *Mar Biotechnol*, 2001, 3: 428 – 438.
- [32] Klinbunga S, Penman D J, McAndrew B J, *et al.* Mitochondrial DNA diversity in three populations of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Mar Biotechnol*, 1999, 1:113 – 121.
- [33] Gusm o J, Lazoski C, Sol-Cava A M. A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses [J]. *Mar Biol*, 2000, 137:435 – 446.
- [34] 李家乐, 钱荣华, 鲍宝龙, 等. 中国五大淡水湖三角帆蚌遗传多样性的 RAPD 分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2005, 14(1):1 – 5.
- [35] 汪桂玲, 袁一鸣, 李家乐. 中国五大淡水湖三角帆蚌群体遗传多样性及亲缘关系的 SSR 分析[J]. *水产学报*, 2007, 31(2):152 – 158.
- [36] Sammy D G, Ahmad G. The establishment of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* (de Haan, 1849) in Anzali Lagoon, Iran [J]. *Aquatic Invasions*, 2006, 1(4):204 – 208.
- [37] 王克行. 虾蟹类增养殖学[M]. 北京:中国农业出版社, 1997: 251 – 254.
- [38] 陆全平, 费志良, 蔡永祥, 等. 不同水系青虾交配苗种繁育及成虾养殖试验[J]. *水产养殖*, 2006, 27 (2):18 – 19.
- [39] 胡 强. 太湖青虾在苏北淮阴批量繁育成功[J]. *水产科技情报*, 1996, 23(6):279.



---

## Sequence analysis of mitochondrial *COI* gene of *Macrobrachium nipponense* from the five largest freshwater lakes in China

FENG Jian-bin<sup>1</sup>, SUN Yue-na<sup>1</sup>, CHENG Xi<sup>1</sup>, LI Jia-le<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Aquatic Germplasm Enhancement and Utilization, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China;

2. Aquaculture Division of E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** Oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* is natively distributed in brackish and fresh waters, and can be found in the most parts of China, Japan, Korea, Vietnam and Myanmar. In China, the resource quantity of this species is very large in lower and middle reaches of the Yangtze River, especially in the five largest freshwater lakes. This species is a commercially important freshwater prawn species in China and Japan. But in recent years, the natural populations genetics and resource quantity of *M. nipponense* have declined rapidly due to overfishing, degradation and fragmentation of its natural habitats. Studying the distribution of genetic diversity and genetic structure in wild and culture stocks is important for developing conservation strategies. As an important and useful polymorphic DNA marker, mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*COI*) gene was used to analyze the genetic diversity and genetic structure of five natural populations of *M. nipponense*, each of from the five largest freshwater lakes of China, i. e. Poyang Lake (PY), Dongting Lake (DT), Taihu Lake (TH), Chaohu Lake (CH) and Hongze Lake (HZ). Total gene DNA was extracted from the telson of the 20 individuals from each of five populations. A fragment of the *COI* gene was amplified using the general primers LCO1492 and HCO 2198, and sequenced on the ABI3730 sequencer. The result shows that forty nine variable nucleotide positions are detected in analyzed 578 bp *COI* sequences, and 35 haplotypes are defined among five populations, but only seven shared haplotypes are observed. Each population has good haplotypic diversity and nucleotide diversity, and among them PY shows the best genetic diversity. The fixation indices ( $F_{st}$ ) analyzed by AMOVA of ARLEQUIN Version 3.1 totalled to 0.3187 ( $P < 0.05$ ), which shows significant genetic fixation among the five populations. The Kimura 2-parameter genetic distance calculated by the MEGA version 3.1 between the population of PY and CH is highest, up to 0.0191, while that between the population of HZ and CH is the lowest to 0.0051. This study chose *M. inflatum* as out-group, and constructed the Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree and the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic (UPGMA) phylogenetic tree based on the haplotypes from the five populations of *M. nipponense*, the result shows that the population of PY and DT might have originated from one clade, while population of TH, HZ and CH might have originated from another. All these results of the study would be very important and useful for making scientific strategy for the natural resource protection and genetic breeding of this species.

**Key words:** *Macrobrachium nipponense*; cytochrome oxidase subunit I; genetic diversity; the five largest freshwater lakes in China