

文章编号: 1674 - 5566(2012)02 - 0167 - 09

## 淮河安徽段日本沼虾野生群体遗传结构的微卫星分析

姜虎成<sup>1</sup>, 冯建彬<sup>1,2</sup>, 丁怀宇<sup>2</sup>, 汪桂玲<sup>1</sup>, 李家乐<sup>1</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 201306; 2. 淮阴师范学院 江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏 淮安 223300 )

**摘要:** 利用日本沼虾 13 对中高多态性的微卫星位点分析了淮河安徽段日本沼虾野生群体的遗传结构。结果表明: 11 个群体中共有 118 个位点经 Bonferroni 校正后显示杂合不足且显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡; 群体平均期望杂合度均小于 0.658, 显示出较低的遗传多样性水平, 其中瓦埠湖、焦岗湖群体遗传多样性相对较高, 高塘湖群体相对较低; 淮河安徽段日本沼虾群体偏离了突变-漂移平衡, 呈现出遗传多样性下降的趋势, 说明群体即将或曾经经历瓶颈效应; 群体间 AMOVA 分析表明, 群体间遗传分化程度较低 ( $F_{ST} = 0.0116$ ), 且没有形成显著的遗传结构, 在种质资源保护和管理上可视为一个单元, 这为日本沼虾种质资源保护和合理开发利用提供了基础资料。

**研究亮点:** 日本沼虾是我国重要的淡水经济虾类, 本研究分析了淮河安徽段日本沼虾野生群体的遗传结构, 发现淮河安徽段日本沼虾野生群体遗传多样性及群体间遗传分化程度均较低, 且没有形成明显的遗传结构, 提出在种质资源保护和利用上可视为一个单元进行操作。

**关键词:** 日本沼虾; 淮河安徽段; 微卫星; 遗传结构

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 是我国重要的淡水经济虾类, 广泛分布于我国各淡水水体, 其中长江和淮河流域产量较高<sup>[1-4]</sup>。近年来, 淮河水系日本沼虾的栖息环境受到人为干扰、破坏和有序开发, 使得其群体结构遭到破坏, 种质纯度降低, 资源量锐减。目前, 有关淮河水系日本沼虾的研究, 仅见野生资源量的调查研究<sup>[5]</sup>, 以及淮河下游洪泽湖、高邮湖、白马湖野生群体的种质资源状况分析<sup>[6-7]</sup>, 至今仍未见对淮河安徽段日本沼虾种质资源现状的报道。充分了解淮河水系的日本沼虾种质资源现状, 对其野生资源的有效保护和合理利用具有重要的理论与应用价值。

微卫星标记作为高多态性、共显性的标记,

已广泛应用于虾类群体遗传学、种质鉴定等研究<sup>[8-10]</sup>, 国内外也已采用微卫星标记分析了长江中下游及其附属湖泊日本沼虾群体的遗传结构<sup>[11-14]</sup>。本研究通过微卫星标记方法分析淮河安徽段日本沼虾野生群体的遗传结构和种质资源现状, 以期日本沼虾种质资源保护及遗传育种研究提供参考资料。

### 1 材料与方法

#### 1.1 样本来源及 DNA 提取

2010 年 8 月, 采集了淮河安徽段干、支流 11 个野生群体(表 1), 无水乙醇固定虾体后带回实验室, 苯酚/氯仿法<sup>[15]</sup>提取基因组 DNA, TE (pH 8.0) 溶解, 测定质量后, -20 °C 保存备用。

收稿日期: 2011-10-24 修回日期: 2011-12-04

基金项目: 国家自然科学基金(31001111); 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室项目(KFT2008-3); 江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室开放课题(HZHL0803); 江苏省苏北科技发展计划项目(BN2009036)

作者简介: 姜虎成(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与遗传育种。E-mail: hcjiang@163.com

通讯作者: 冯建彬, E-mail: jbfeng@shou.edu.cn

表 1 日本沼虾样本采集位置及数目

Tab. 1 Sample sites and number of *M. nipponense*

群体	采集地	地理位置	样本数
半岗 BG	阜阳市颍上县半岗镇	32°50' N 116°20' E	45
城东湖 CD	六安市霍邱县新店镇	32°18' N 116°20' E	45
正阳关 ZY	六安市寿县正阳关镇	32°28' N 116°31' E	45
焦岗湖 JC	淮南市凤台县焦岗乡	32°61' N 116°63' E	45
花家湖 HJ	淮南市凤台县岳张集镇	32°42' N 116°39' E	45
瓦埠湖 WB	六安市寿县陶店回族乡	32°31' N 116°54' E	45
高塘湖 GT	淮南市上窑镇	32°43' N 117°08' E	45
茨河 QH	蚌埠市怀远县荆茨乡	32°56' N 116°59' E	45
天河 TH	蚌埠市怀远县马城镇	32°53' N 117°13' E	45
花园湖 HY	滁州市凤阳县枣巷渔业乡	33°01' N 117°51' E	45
五河 WH	蚌埠市五河县城关镇	33°08' N 117°53' E	45

## 1.2 微卫星反应

选用 13 对微卫星引物(表 2)进行 PCR 扩增,反应体系为 10  $\mu$ L,包括:1  $\times$  PCR buffer,1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ ,200  $\mu$ mol/L dNTP,200  $\mu$ mol/L 上下游引物,0.1 U *Taq* 酶,100 ng 模板。

采取半降落 PCR (Semi-touchdown PCR) 方法,反应条件为:95  $^{\circ}$ C 4 min;94  $^{\circ}$ C 30 s;(T<sub>m</sub>+4)

$^{\circ}$ C 30 s,递降 1  $^{\circ}$ C 至 T<sub>m</sub> $^{\circ}$ C;72  $^{\circ}$ C 30s;(T<sub>m</sub>+4)  $^{\circ}$ C ~ (T<sub>m</sub>+1)  $^{\circ}$ C 各 4 个循环,T<sub>m</sub> $^{\circ}$ C 时 30 个循环;72  $^{\circ}$ C 8 min;4  $^{\circ}$ C 保存。

产物经 1.5% 琼脂糖电泳检验合格后,用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,标准分子量为 Marker I DNA/*Msp* I,快速银染法染色<sup>[16]</sup>,扫描后观察分析。

表 2 日本沼虾 13 对微卫星引物

Tab. 2 Sequences of microsatellite primers of *M. nipponense*

位点	核心序列	引物序列(5'-3')	复性温度/ $^{\circ}$ C	GenBank 登录号
<i>Mni</i> 01	(CA) <sub>11</sub>	F: TTACAGCGTTTCCCTTTACCT R: GAATCCTCAACACAGCAAATCT	55.0	EU130924
<i>Mni</i> 30	(AC) <sub>11</sub>	F: TGCTGTTATCGTTGGCTGAG R: ACCCGTGTGTGTGAAGTGA	55.0	GQ257527
<i>Mni</i> 34	(AC) <sub>11</sub>	F: TGCAGAGAGTGGAGTGATGAA R: TCACCCATCAACCTAAAGC	56.0	GQ257531
<i>Mni</i> 45	(TG) <sub>14</sub>	F: AGTATGCTTGCTTACCTCA R: CATGAACGACACTTTTTCG	47.0	GQ257542
<i>Mni</i> 51	(CA) <sub>10</sub> ...(AC) <sub>18</sub>	F: GATCTCAAGGCTTTGTAT R: ATGCTTTTCATCTTTTCAG	51.5	GQ257548
<i>Mni</i> 52	(TG) <sub>22</sub> ...(GA) <sub>27</sub>	F: CTCGTTCTTGCCACTCTT R: TGACCCGTCTATGTTCCGT	55.5	GQ257549
<i>Mni</i> 55	(AG) <sub>27</sub> ...(GA) <sub>9</sub>	F: ATACATCACCCCTCAATAGC R: TATAAAGCCACATTGTCC	57.0	GQ257552
<i>Mni</i> 76	(AG) <sub>10</sub> ...(AG) <sub>11</sub>	F: GTTCTCAGCCTTCTCCAT R: CTTTATCGCTTTATTAGTCC	55.0	GQ257573
<i>Mni</i> 86	(AC) <sub>11</sub> ...(AC) <sub>5</sub>	F: TACTAACACCGAAGCTATGC R: AACAGTCACAACCGAACC	59.0	GQ257583
<i>Mni</i> 93	(TG) <sub>4</sub> ...(TG) <sub>15</sub>	F: TCACAGCAGGAGATAACA R: TGCCGATTCTGCACTTTA	53.0	GQ257590
<i>Mni</i> 115	(TG) <sub>15</sub> ...(GA) <sub>22</sub>	F: AACAGTAAACGGAGTAGAAA R: TGTACAGCGCGAAATAAA	53.5	GQ257611
<i>Mni</i> 122	(GA) <sub>31</sub>	F: TGGTTTCTCAGCCTTTTTA R: ACAACGTGCATGTTTACTT	52.0	HM210577
<i>Mni</i> 179	(TG) <sub>22</sub>	F: CTCTGCCTCAATTTTGTGA R: GTATTATTTCTGTTATCCA	45.0	HM210634

注:F 为正向引物;R 为反向引物。

### 1.3 数据分析

根据条带位置确定基因型,用 GENEPOP 4.0<sup>[17]</sup> 软件计算群体的等位基因数 (number of Allele,  $A$ )、观测杂合度 (observed heterozygosity,  $H_0$ ) 和期望杂合度 (expected heterozygosity,  $H_E$ ), 利用马尔可夫链 (Markov chain) 方法进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,杂合缺失或过度采用 Bonferroni 方法校正的显著性标准,根据  $P$  值判断。用 BOTSTEIN 等<sup>[18]</sup> 的公式计算微卫星位点多态信息含量 (polymorphism information content,  $C_{PI}$ )。

根据各位点等位基因频率,基于逐步突变模型 (step-wise mutation model, SMM)、无限等位基因模型 (infinite allele model, IAM) 和双相突变模型 (two-phased model of mutation, TPM), 用 BOTTLENECK 3.4<sup>[19]</sup> 计算符号检验 (sign test) 和 Wilcoxon 符号秩次检验 (Wilcoxon sign-rank test) 下的平均期望杂合度 (expected average heterozygosity,  $H_{E0}$ ), 1 000 次重复,分析杂合过度

是否显著,并通过分析群体突变-漂移平衡来估计群体数量动态变化。

用 ARLEQUIN 3.1<sup>[20]</sup> 计算群体遗传分化的  $F$ -统计量 ( $F$ -statistics,  $F_{ST}$ ) 及分子方差分析 (AMOVA)。利用 DISPAN 计算群体间 Nei's 遗传距离 (genetic distance,  $D_A$ )<sup>[21]</sup>, 并基于  $D_A$  遗传距离用 Mega 4.0 构建 UPGMA 系统树<sup>[22]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 群体遗传多样性

13 对微卫星引物在 11 个群体中的扩增结果如表 3 所示,等位基因数介于 5 ~ 18 之间;有效等位基因数介于 1.98 ~ 12.96 之间;观测杂合度介于 0.099 ~ 0.483 之间;期望杂合度介于 0.495 ~ 0.924 之间;多态信息含量介于 0.440 ~ 0.918 之间;除 *Mni01*、*Mni51*、*Mni86*、*Mni93*、*Mni179* 为中度多态位点外,其余均为高度多态位点 ( $C_{PI} > 0.5$ )<sup>[23]</sup>。

表 3 日本沼虾 13 个微卫星位点有效等位基因数、杂合度及多态信息含量  
Tab.3 Statistics of number of effective alleles, expected and observed heterozygosity and polymorphism information content for 13 microsatellite loci of *M. nipponense*

位点	等位基因数	有效等位基因数 $N_E$	观测杂合度 $H_0$	期望杂合度 $H_E$	多态信息含量 $C_{PI}$
<i>Mni01</i>	6	2.09	0.483	0.522	0.474
<i>Mni30</i>	6	2.55	0.292	0.609	0.537
<i>Mni34</i>	5	2.87	0.099	0.653	0.610
<i>Mni45</i>	5	2.36	0.291	0.578	0.506
<i>Mni51</i>	6	2.07	0.130	0.518	0.479
<i>Mni52</i>	18	12.96	0.268	0.924	0.918
<i>Mni55</i>	9	5.27	0.319	0.811	0.787
<i>Mni76</i>	5	3.25	0.282	0.693	0.635
<i>Mni86</i>	5	2.03	0.448	0.507	0.476
<i>Mni93</i>	6	1.98	0.191	0.495	0.440
<i>Mni115</i>	18	11.88	0.288	0.917	0.910
<i>Mni122</i>	7	3.14	0.200	0.683	0.652
<i>Mni179</i>	5	2.35	0.482	0.575	0.499
平均	7.77	4.22	0.290	0.653	0.609

11 个群体的遗传多样性如表 4 所示,瓦埠湖群体平均等位基因数最多 ( $A = 6.92$ ), 其次为焦岗湖与花园湖群体 ( $A = 6.69$ ), 茨河群体最少 ( $A = 6.00$ ); 瓦埠湖与茨河群体的期望杂合度平均值最大 ( $H_E = 0.658$ ), 其次为焦岗湖群体 ( $H_E = 0.656$ ), 高塘湖群体最小 ( $H_E = 0.614$ ), 其它群体的平均期望杂合度差异不明显; 11 个群体的平均观测杂合度均小于平均期望杂合度。总体上,瓦埠湖、焦岗湖群体遗传多样性相对较高,

高塘湖群体相对较低。

### 2.2 Hardy-Weinberg 平衡分析

11 个群体各位点的 Hardy-Weinberg 平衡检验结果如表 4 所示,显著性标准经 Bonferroni 校正后,各群体仍至少有 10 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡;在杂合过度位点中,仅半岗群体的 *Mni51* 位点和焦岗湖及天河群体的 *Mni01*、*Mni179* 位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡;在杂合不足位点中,11 个群体共有 118 个位点显著偏

离 Hardy-Weinberg 平衡, 占杂合不足位点的 88.72%。每个位点至少在 2 个群体中显著偏离了 Hardy-Weinberg 平衡, 除 *Mni01*、*Mni86*、*Mni93* 和

*Mni179* 位点外, 其余位点在 11 个群体中均显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。

表 4 日本沼虾群体微卫星遗传多样性

Tab. 4 Summary statistics of genetic diversity in *M. nipponense* populations

位点	<i>Mni01</i>	<i>Mni30</i>	<i>Mni34</i>	<i>Mni45</i>	<i>Mni51</i>	<i>Mni52</i>	<i>Mni55</i>	<i>Mni76</i>	<i>Mni86</i>	<i>Mni93</i>	<i>Mni115</i>	<i>Mni122</i>	<i>Mni179</i>	平均
A	4	4	5	3	5	15	8	4	5	4	16	6	4	6.38
BG $H_O$	0.290*	0.118*	0.046*	0.235*	0.054*	0.342*	0.460*	0.514*	0.395	0.189*	0.472*	0.474*	0.553	0.318
$H_E$	0.457	0.548	0.652	0.456	0.491	0.925	0.833	0.660	0.531	0.399	0.901	0.678	0.624	0.627
CD A	4	5	4	4	5	15	8	4	5	4	15	7	4	6.46
$H_O$	0.511	0.333*	0.105*	0.422*	0.022*	0.378*	0.067*	0.244*	0.364*	0.409	0.356*	0.262*	0.156*	0.279
$H_E$	0.571	0.674	0.508	0.566	0.505	0.922	0.715	0.716	0.471	0.533	0.899	0.717	0.451	0.634
ZY A	5	6	4	5	5	15	6	4	5	3	14	5	5	6.31
$H_O$	0.465	0.465*	0.087*	0.222*	0.133*	0.222*	0.178*	0.244*	0.311	0.133*	0.250*	0.186*	0.578	0.267
$H_E$	0.438	0.625	0.689	0.600	0.409	0.876	0.782	0.704	0.397	0.368	0.888	0.706	0.592	0.621
JG A	4	4	5	5	6	15	7	4	5	5	15	7	5	6.69
$H_O$	0.467*	0.227*	0.120*	0.311*	0.200*	0.333*	0.500*	0.386*	0.533	0.250*	0.209*	0.114*	0.644	0.330
$H_E$	0.450	0.570	0.735	0.637	0.503	0.913	0.764	0.637	0.531	0.544	0.881	0.729	0.637	0.656
HJ A	5	4	4	4	5	15	7	4	5	4	12	6	5	6.15
$H_O$	0.489	0.178*	0.115*	0.256*	0.182*	0.350*	0.333*	0.156*	0.489	0.133*	0.296*	0.119*	0.511*	0.277
$H_E$	0.476	0.564	0.599	0.561	0.451	0.906	0.814	0.663	0.469	0.531	0.884	0.723	0.541	0.629
WB A	3	6	5	4	6	17	9	5	5	5	15	6	4	6.92
$H_O$	0.556	0.205*	0.154*	0.356*	0.159*	0.156*	0.422*	0.238*	0.444	0.046*	0.341*	0.220*	0.578	0.298
$H_E$	0.587	0.611	0.643	0.560	0.627	0.913	0.761	0.661	0.511	0.424	0.924	0.752	0.578	0.658
GT A	4	5	5	3	4	16	8	4	5	3	15	5	4	6.23
$H_O$	0.444	0.333*	0.039*	0.083*	0.044*	0.268*	0.068*	0.333*	0.489	0.089*	0.222*	0.070*	0.400*	0.222
$H_E$	0.434	0.625	0.607	0.579	0.367	0.909	0.771	0.701	0.503	0.416	0.847	0.656	0.567	0.614
QH A	5	4	4	3	5	12	7	4	4	5	14	7	4	6.00
$H_O$	0.488	0.364*	0.077*	0.267*	0.114*	0.289*	0.511*	0.356*	0.500	0.289*	0.227*	0.233*	0.442	0.320
$H_E$	0.509	0.639	0.649	0.583	0.579	0.860	0.816	0.711	0.552	0.644	0.897	0.578	0.536	0.658
TH A	5	5	5	4	5	15	9	4	5	4	12	6	5	6.46
$H_O$	0.636*	0.444*	0.174*	0.244*	0.089*	0.273*	0.349*	0.156*	0.511	0.222*	0.244*	0.244*	0.600*	0.322
$H_E$	0.635	0.626	0.666	0.561	0.565	0.901	0.740	0.684	0.535	0.516	0.877	0.596	0.540	0.649
HY A	4	6	4	5	6	16	9	4	5	4	14	6	4	6.69
$H_O$	0.556*	0.289*	0.095*	0.432*	0.178*	0.289*	0.546*	0.244*	0.356*	0.182*	0.267*	0.114*	0.467*	0.309
$H_E$	0.557	0.633	0.524	0.565	0.479	0.901	0.818	0.703	0.546	0.543	0.911	0.582	0.663	0.648
WH A	5	4	4	4	5	16	8	4	5	4	15	7	4	6.54
$H_O$	0.386	0.222*	0.074*	0.296*	0.244*	0.068*	0.095*	0.273*	0.533	0.159*	0.311*	0.205*	0.381*	0.250
$H_E$	0.553	0.543	0.646	0.570	0.656	0.930	0.846	0.708	0.535	0.446	0.933	0.645	0.481	0.653

注: \* 表示经 Bonferroni 校正后仍显著偏离 Hardy-Weinberg ( $P < 0.005$ )。

### 2.3 瓶颈效应分析

11 个群体在 3 种突变模型假设下的平均期望杂合度 ( $H_{EQ}$ ) 如表 5 所示, IAM 假设下所有位点  $H_E$  均高于  $H_{EQ}$ , 且在 *Mni55*、*Mni76* 位点差异显著, 在 *Mni52*、*Mni115* 位点差异极显著; TPM 假设下, *Mni01*、*Mni51* 和 *Mni93* 位点  $H_E$  低于  $H_{EQ}$ , 其余位点  $H_E$  均高于  $H_{EQ}$ , 且在 *Mni52*、*Mni115* 位点差异极显著; SMM 假设下, 仅 5 个位点  $H_E$  高于  $H_{EQ}$ , 其余位点  $H_E$  均低于  $H_{EQ}$ , 且在 *Mni01*、*Mni51* 和 *Mni93* 位点差异显著。

符号检验和 Wilcoxon 符号秩次检验的结果如表 6 所示, IAM 模型下, 符号检验中除城东湖、正阳关、花家湖和高塘湖群体外, 其它群体显著或极显著偏离了突变-漂移平衡, Wilcoxon 符号秩次检验中, 除正阳关群体外所有群体均表现出极显著偏离突变-漂移平衡, 淮河安徽段日本沼虾群体杂合极显著过度; TPM 模型下, 所有群体均表现出不显著偏离突变-漂移平衡, 且只有正阳关群体表现出杂合不足, 其它群体均表现出杂合过度, 淮河安徽段日本沼虾群体杂合显著过度;

SMM 模型下,符号检验中仅有茨河和五河群体不显著偏离突变-漂移平衡,其它群体均显著或极显著偏离突变-漂移平衡,Wilcoxon 符号秩次检验中

仅城东湖、焦岗湖、高塘湖和天河群体显著或极显著偏离突变-漂移平衡,且所有群体均表现出杂合不足。

表 5 日本沼虾群体微卫星位点瓶颈效应分析

Tab. 5 Bottleneck test by locus in *M. nipponense* populations

位点	$H_E$	IAM			TPM			ISMM		
		$H_{EQ}$	DH/sd	$P$	$H_{EQ}$	DH/sd	$P$	$H_{EQ}$	DH/sd	$P$
Mni01	0.522	0.450	0.375	0.450	0.573	-0.377	0.301	0.694	-2.190	0.036*
Mni30	0.609	0.441	0.865	0.240	0.576	0.252	0.479	0.698	-1.216	0.119
Mni34	0.653	0.410	1.261	0.099	0.529	0.850	0.210	0.648	0.061	0.441
Mni45	0.578	0.393	0.931	0.205	0.517	0.417	0.397	0.637	-0.658	0.224
Mni51	0.518	0.455	0.335	0.449	0.575	-0.424	0.272	0.698	-2.477	0.023*
Mni52	0.924	0.761	1.748	0**	0.855	1.919	0.001**	0.903	0.561	0.129
Mni55	0.811	0.566	1.499	0.012*	0.702	1.196	0.060	0.800	0.257	0.479
Mni76	0.693	0.390	1.569	0.025*	0.499	1.242	0.058	0.636	0.583	0.343
Mni86	0.507	0.393	0.569	0.373	0.502	0.033	0.411	0.632	-1.281	0.108
Mni93	0.495	0.445	0.263	0.483	0.576	-0.628	0.206	0.693	-2.553	0.022*
Mni115	0.917	0.765	1.563	0**	0.854	1.662	0.003**	0.904	0.744	0.254
Mni122	0.683	0.492	1.091	0.133	0.630	0.459	0.387	0.739	-0.882	0.138
Mni179	0.575	0.388	0.947	0.205	0.503	0.461	0.386	0.630	-0.575	0.214

注:DH/sd 表示  $H_E$  与  $H_{EQ}$  的差与标准偏差之比; \* 表示  $H_E$  与  $H_{EQ}$  差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\* 表示  $H_E$  与  $H_{EQ}$  差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

表 6 日本沼虾群体突变-漂移平衡分析

Tab. 6 Departures from mutation-drift equilibrium in *M. nipponense* populations

群体	符号检验						Wilcoxon 检验		
	IAM		TPM		SMM		IAM	TPM	SMM
	$H_E/H_D$	$P$	$H_E/H_D$	$P$	$H_E/H_D$	$P$	$P$	$P$	$P$
BG	11/2	0.041*	9/4	0.310	4/9	0.035*	0.002**	0.414	0.094
CD	10/3	0.124	8/5	0.567	3/10	0.010**	0.002**	0.497	0.040*
ZY	10/3	0.142	5/8	0.117	4/9	0.034*	0.068	0.787	0.068
JG	12/1	0.009**	9/4	0.340	3/10	0.010**	0.001**	0.455	0.040*
HJ	10/3	0.131	9/4	0.335	4/9	0.039*	0.004**	0.636	0.146
WB	11/2	0.044*	8/5	0.545	3/10	0.009**	0.002**	0.497	0.080
GT	10/3	0.115	8/5	0.531	2/11	0.001**	0.003**	0.685	0.040*
QH	11/2	0.037*	10/3	0.147	6/7	0.239	0.001**	0.094	0.636
TH	13/0	0.001**	8/5	0.545	2/11	0.002**	0.000**	0.588	0.005**
HY	12/1	0.008**	7/6	0.439	3/10	0.009**	0.003**	0.542	0.068
WH	13/0	0.001**	8/5	0.547	5/8	0.108	0.000**	0.168	0.497
合计	13/0	0.001**	10/3	0.143	5/8	0.108	0.000**	0.040*	0.057

注: $H_E/H_D$  表示杂合过度与不足位点数之比; \* 表示显著偏离平衡 ( $P < 0.05$ ); \*\* 表示极显著偏离平衡 ( $P < 0.01$ )。

## 2.4 群体遗传分化

群体间遗传分化分析见表 7,焦岗湖和花家湖群体间遗传固定指数最小 ( $F_{ST} = 0.005$ ),半岗和高塘湖群体间遗传固定指数最大 ( $F_{ST} = 0.032$ ),正阳关和焦岗湖、花家湖、高塘湖群体,焦岗湖和花家湖、高塘湖、茨河、花园湖群体,花家湖和高塘湖、花园湖、五河群体,天河和瓦埠湖、茨河群体,五河和半岗、城东湖、茨河、天河群

体间遗传分化均显著 ( $P < 0.05$ )。

群体的遗传距离如表 7 所示,半岗与花家湖群体间遗传距离最大 ( $D_A = 0.081$ ),花家湖与高塘湖群体遗传距离最小 ( $D_A = 0.039$ );用 UPGMA 法构建聚类分析图(图 1),显示群体间没有形成明显的分化。群体遗传分化指数介于 0.005~0.032 之间,表明这 11 个群体的遗传分化属于轻微程度的分化 ( $F_{ST} < 0.05$ )。AMOVA

分析如表 8 所示,98.84% 遗传变异存在于群体内,仅有 1.16% 的遗传变异来自于群体间。

表 7 日本沼虾群体间  $F_{ST}$  统计量 ( $F_{ST}$ , 对角线下) 和遗传距离 ( $D_A$ , 对角线上)  
**Tab.7 Pairwise  $F_{ST}$  estimates ( $F_{ST}$ , below diagonal) and genetic distance ( $D_A$ , above diagonal) among *M. nipponense* populations**

群体	BG	CD	ZY	JG	HJ	WB	GT	QH	TH	HY	WH
BG		0.071	0.069	0.073	0.081	0.063	0.081	0.076	0.067	0.077	0.069
CD	0.025		0.064	0.068	0.068	0.059	0.066	0.067	0.063	0.066	0.055
ZY	0.015	0.021		0.048	0.063	0.057	0.053	0.052	0.059	0.069	0.046
JG	0.020	0.016	0.011*		0.040	0.051	0.049	0.056	0.044	0.050	0.050
HJ	0.025	0.017	0.011*	0.005*		0.059	0.039	0.069	0.059	0.056	0.057
WB	0.026	0.025	0.022	0.015	0.020		0.059	0.059	0.054	0.072	0.043
GT	0.032	0.028	0.010*	0.013*	0.010*	0.024		0.058	0.050	0.054	0.064
QH	0.020	0.020	0.020	0.012*	0.022	0.021	0.026		0.052	0.085	0.046
TH	0.026	0.027	0.024	0.016	0.021	0.009*	0.027	0.011*		0.047	0.056
HY	0.019	0.022	0.015	0.006*	0.013*	0.018	0.020	0.015	0.010*		0.070
WH	0.011*	0.014*	0.018	0.014	0.013*	0.015	0.023	0.006*	0.013*	0.014	

注: \* 表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

表 8 日本沼虾群体分子方差分析  
**Tab.8 AMOVA analysis among *M. nipponense* populations**

变异来源	自由度	平方和	方差组分	方差比例 /%
群体间	10	88.728	0.040 70	1.16
群体内个体间	477	2 510.118	1.798 67	51.33
个体内	488	812.500	1.664 96	47.51
总变异	975	3 411.346	3.504 33	

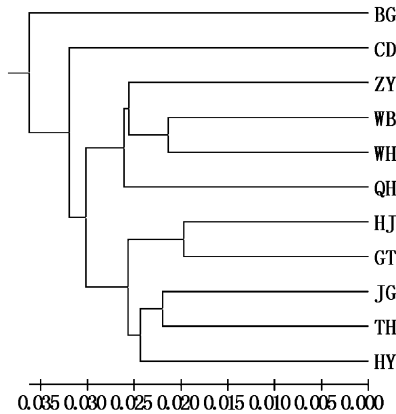


图 1 基于  $D_A$  遗传距离的 UPGMA 聚类树  
**Fig.1 UPGMA clustering tree based on  $D_A$  genetic distance**

### 3 讨论

#### 3.1 群体遗传多样性分析

本研究所用的 13 个微卫星位点均为中高度多态位点,因此可较好地分析遗传结构和多样性。杂合度能反映各群体在多个位点上的遗传变异,是

度量群体遗传变异的最适参数之一<sup>[24]</sup>。研究中 11 个日本沼虾群体期望杂合度的平均值介于 0.614 ~ 0.658 之间,低于洪泽湖群体 ( $H_E$  为 0.698 ~ 0.804)<sup>[7]</sup>、太湖群体 ( $H_E$  为 0.893 7 ~ 0.934 4)<sup>[25]</sup> 和钱塘江群体 ( $H_E$  为 0.830 ~ 0.880)<sup>[13]</sup>。可见淮河安徽段日本沼虾群体遗传多样性相对较低,且差异不显著。主要原因是这 11 个群体同处于安徽省北部,地理跨度较小,彼此间生境差异不大。

11 个群体中共有 121 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡,每个群体至少有 10 个位点显示出显著的杂合不足,可见淮河安徽段日本沼虾群体显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡,群体呈现出遗传多样性下降的趋势。这主要和淮河水污染时间较长及捕捞压力的不断增加所引起资源量日益减少有关<sup>[26-28]</sup>,因此应当采取有效的措施,划定种质资源保护区,建立休渔制度,充分避免过度和无序采捕,从而尽可能地减少杂合度缺失,以恢复淮河安徽段天然日本沼虾的种质特性。

#### 3.2 瓶颈效应分析

研究结果显示, IAM 模型下,所有群体均表现出杂合过度,符号检验中除城东湖、正阳关、花家湖和高塘湖群体外,其它群体均显著或极显著偏离了突变-漂移平衡, Wilcoxon 符号秩次检验中,除正阳关群体外所有群体均表现出极显著偏离突变-漂移平衡,淮河安徽段整个日本沼虾群体杂合极显著过度; TPM 模型下,所有群体均表现出不显著偏离突变-漂移平衡,只有正阳关群体表

现出杂合不足,其它群体均表现出杂合过度。整个群体表现出杂合显著过度。由于 TPM 模型综合了 IAM 和 SMM 模型,因此认为淮河安徽段日本沼虾群体偏离了突变-漂移平衡,表明群体近期经历了瓶颈效应,群体数量曾经下降。瓶颈效应的发生,一方面与淮河安徽段水体生态环境波动较大有关<sup>[29]</sup>,直接或间接地引起群体数量下降和瓶颈效应的发生;另一方面与过度捕捞有关,由于目前大部分养殖生产中所用亲本为野生个体,过度捕捞等现象严重,使得野生资源量急剧下降,从而引发瓶颈效应。因而针对经历瓶颈效应的淮河安徽段日本沼虾野生群体,急需进一步采取保护措施,以期恢复淮河日本沼虾的种质资源遗传多样性。

### 3.3 群体间遗传分化

研究结果显示,11 个群体间的遗传距离介于 0.039 ~ 0.081 之间,远远小于物种间遗传距离的临界值( $0.2 < D_A < 0.8$ )<sup>[30]</sup>。UPGMA 聚类图显示出,淮河安徽段日本沼虾群体没有形成明显的遗传分化。仅有 1.16% 的变异来自于群体间,其它变异均来自于群体内,各群体间仅存在微弱的遗传分化<sup>[31]</sup>,可见整个淮河安徽段日本沼虾没有形成明显的遗传结构 ( $F_{ST} < 0.05$ ),主要原因是淮河安徽段各支流均为平原型河流<sup>[32]</sup>,表现为源近流短且流域面上又无植被覆盖,因此汛期洪水凶猛,而洪水一过又极易断流甚至干枯见底。加上淮河中游安徽段行蓄洪区是淮河防洪体系的重要组成部分,起着蓄滞和分泄洪水的作用,淮河干流安徽段现有行蓄洪区 20 处<sup>[33]</sup>。这些特殊的生态环境,以及近些年的几次特大洪水<sup>[29]</sup>,大大增加了不同水域间水体的交换。日本沼虾繁殖期为春夏季,淮河汛期也多发于这一时期。日本沼虾蚤状幼体浮游阶段可随着水体的交换在各个水域内随机扩散,引起日本沼虾在不同水域间的频繁基因交流,直接导致了淮河安徽段日本沼虾群体遗传分化程度微弱,没有显著的遗传结构。群体的地理分布形式在很大程度上决定了群体的遗传分化式样,目前已经提出了几种与群体分布型相关的遗传结构模型<sup>[34-35]</sup>,淮河安徽段可视为连续分布模型即个体在生境一致的地区内均匀分布,个体间随机交配,存在广泛的基因交流,遗传分化不显著。所以在其种质资源保护和管理上可将整个淮河安徽段视作一个单元

进行操作。

通过以上分析,揭示了淮河安徽段日本沼虾的遗传多样性现状,弄清了淮河安徽段日本沼虾的群体遗传结构,这些结果可为淮河安徽段日本沼虾种质资源的深入研究提供一定的参考,特别是为其良种选育中亲本的选择工作奠定了一定的理论基础。

### 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] 任启清. 青虾池塘高产高效养殖技术 [J]. 安徽农学通报, 2010, 16 (16): 43-50.
- [3] 冯建彬,李家乐,程熙. 日本沼虾种质资源挖掘和保护研究进展 [J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(3): 371-376.
- [4] 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 [J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(3): 258-262.
- [5] 任百洲,吴美安. 南水北调东线第一期工程对沿线湖泊水生生物影响的预测分析 [J]. 治淮, 1986(6): 131-147.
- [6] 冯建彬,吴春林,丁怀宇,等. 洪泽湖日本沼虾 9 个野生群体遗传多样性微卫星分析 [J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 218-227.
- [7] 吴春林. 江苏主要湖泊日本沼虾遗传多样性及系统进化研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2010.
- [8] BROOKER A L, BENZIE J A H, BLAIR D, et al. Population structure of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, in Australian waters using microsatellite markers [J]. Marine Biology, 2000, 136(1): 149-157.
- [9] KANCEE C, SUPAWADEE P, UTHAIRAT N, et al. Genetic diversity of hatchery stocks of giant freshwater prawn (*Macrobrachium nipponense*) in Thailand [J]. Aquaculture, 2007, 271: 121-129.
- [10] 李瀚声,冯建彬,谢楠,等. 日本沼虾太湖和鄱阳湖群体及其  $F_1$  的遗传结构分析 [J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(3): 321-327.
- [11] YANG P, ZHANG H, CHEN L Q. Genetic Structure of the Oriental River Prawn (*Macrobrachium nipponense*) from the Yangtze and Lancang Rivers, Inferred from COI Gene Sequence [J]. Zoological Research, 2007, 28(2): 113-118.
- [12] 冯建彬. 我国日本沼虾分子遗传多样性及系统进化研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2008.
- [13] 马克异,冯建彬,谢楠,等. 钱塘江日本沼虾野生群体遗传变异的 SSR 分析 [J]. 动物学研究, 2011, 32(4): 363-370.

- [14] 苏翔, 汪桂玲, 冯建彬, 等. 鄱阳湖日本沼虾 15 个群体遗传多样性的微卫星分析 [J]. 生态学杂志, 2011, 30(9): 2007-2013.
- [15] SAMBROOK J, RUSSELL D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 3rd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [16] BASSAM B J, CAETANO-ANOLL S G, GRESSHOFF P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. *Analytical Biochemistry*, 1991, 196(1): 80-83.
- [17] ROUSSET F. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8:103-106.
- [18] BOTSSTEIN D, WHITE R L, SKONICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *The American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [19] WEBER J L. Informativeness of human  $(dC-dT)_n \cdot (dG-dT)_n$  polymorphisms [J]. *Genomics*, 1990, 7(4): 524-530.
- [20] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, 1: 47-50.
- [21] NEI M, JAJIMA F, TATENYO Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1983, 19(2): 153-170.
- [22] CORNUET J M, LUIKART G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data [J]. *Genetics*, 1997, 144(4): 2001-2014.
- [23] FENG J B, LI J L. Twelve polymorphic microsatellites in Oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(5): 986-988.
- [24] NEI M, MARUYAMA T, CHAKRABORTY R. The bottleneck effect and genetic variability in populations [J]. *Evolution*, 1975, 29: 1-10.
- [25] 冯建彬, 吴春林, 马克异, 等. 太湖日本沼虾野生群体遗传结构的微卫星分析 [J]. *应用生态学报*, 2011, 22(6): 1606-1614.
- [26] 赵志泉. 2001-2010 年淮河干流蚌埠段水质污染及环境污染治理现状分析 [J]. *现代农业科技*, 2011(5): 269-270, 273.
- [27] 肖明松, 王松, 鲍方印, 等. 淮河蚌埠段采样点鱼虾贝类重金属的富集 [J]. *环境科学研究*, 2011, 24(8): 942-948.
- [28] 肖中新, 孙世群. 淮河干流安徽段水环境质量评价 [J]. *安徽农业大学学报*, 2007, 34(3): 456-460.
- [29] 邹敬涵. 浅议“淮河洪水” [J]. *治淮*, 2010(11): 3-5.
- [30] THORP J P. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation, and systematic [J]. *Annual Review of Ecology Systematics*, 1982, 13(1): 139-168.
- [31] BALLOUX F, LUGON-MOULIN N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers [J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11(2): 155-165.
- [32] 吴立, 刘红叶, 张智玲. 淮河流域水资源环境与可持续利用 [J]. *资源与环境*, 2008, 24(3): 270-271.
- [33] 虞邦义, 杨兴菊, 倪晋. 淮河中游河道特性及治理对策探讨 [J]. *江淮水利科技*, 2009(6): 15-24.
- [34] HARRISON R. Molecular changes at speciation [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1991, 22: 281-308.
- [35] MORITZ C, PATTON L, SCHNEIDER C J, et al. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 2000, 31: 533-563.



## Genetic structure analysis of natural *Macrobrachium nipponense* populations in Anhui section of Huaihe River based on microsatellite

JIANG Hu-cheng<sup>1</sup>, FENG Jian-bin<sup>1,2</sup>, DING Huai-yu<sup>2</sup>, WANG Gui-ling<sup>1</sup>, LI Jia-le<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Aquatic Germplasm Enhancement and Utilization, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for Eco-Agricultural Biotechnology Around Hongze Lake, Huaiyin Normal College, Huai'an 223300, Jiangsu, China)

**Abstract:** By using thirteen moderate and high polymorphic microsatellite DNA loci, this paper analyzed the genetic structure of wild *Macrobrachium nipponense* populations in Anhui section of Huaihe River. For the 11 *M. nipponense* populations, there were 118 loci presenting heterozygosity deficiency and obvious deviation from Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction. The mean expected heterozygosity values of the 11 populations were all below 0.658, displaying a low genetic diversity, while higher genetic diversity appeared in WB and JG populations, and lower in GT populations. The 11 populations departed from mutation-drift equilibrium, suggesting that the population structure had experienced bottleneck effect and the population amount had declined. The AMOVA analysis across all the populations showed that the genetic divergence among the 11 populations was at a lower level ( $F_{ST} = 0.0116$ ). 98.84% of the genetic variation came from intra-population, and 1.16% came from inter-population, suggesting that all the *M. nipponense* populations in Anhui section of Huaihe River could be protected and managed as a single unit, which provides basic material for development and utilization of germplasm resources of *M. nipponense*.

**Key words:** *Macrobrachium nipponense*; Anhui section of Huaihe River; microsatellite; genetic structure