

洪泽湖日本沼虾 9 个野生群体遗传多样性微卫星分析

冯建彬^{1,2}, 吴春林¹, 丁怀宇², 华雪铭¹, 李应森¹, 李家乐^{1,3}

(1. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 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; 3. 上海市高校水产养殖学 E 研究院, 上海 201306)

摘要: 利用微卫星标记分析了洪泽湖避风港、蒋坝、鲍集等 9 个日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*) 野生群体的遗传多样性。结果表明, 8 个微卫星位点呈现高度多态性; 每个群体中至少有 5 个位点显示杂合不足, 显著偏离了 Hardy-Weinberg 平衡; 9 个日本沼虾野生群体均表现出较高的遗传多样性水平, 洪泽湖中、东部避风港和蒋坝等群体遗传多样性高于西部鲍集和界集群体。突变-漂移平衡分析表明, 洪泽湖日本沼虾群体部分位点杂合显著过剩, 表明洪泽湖日本沼虾群体部分位点偏离了突变-漂移平衡, 但近期没有经历过瓶颈效应, 群体数量也没有下降。群体间 F -统计量及 AMOVA 分析表明, 群体遗传分化极显著($F_{ST}=0.0643$, $P<0.01$); 基于 D_A 遗传距离构建的 NJ 和 UPGMA 聚类树均显示, 地理位置相邻的群体聚在一起。结论认为, 洪泽湖日本沼虾群体具有丰富的遗传多样性, 在洪泽湖地区建立日本沼虾种质资源自然保护区, 可以更好地有效保护洪泽湖水域的日本沼虾种质资源。[中国水产科学, 2010, 17(2): 218-227]

关键词: 洪泽湖; 日本沼虾; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号: S96

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)02-0218-10

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*) 自然分布于中国和日本, 是中国重要的淡水经济养殖虾类。它广泛分布于中国淡水水域, 尤以五大淡水湖泊(鄱阳湖、洞庭湖、太湖、洪泽湖和巢湖) 资源分布量大, 也是中国的日本沼虾主要产区^[1]。洪泽湖是中国第四大淡水湖, 产于该湖的日本沼虾以个体大、生长快、品质好等优点而闻名, 但近几年洪泽湖中包括日本沼虾在内的水产动物资源量与 20 世纪 80 年代初期相比呈下降趋势^[2]。2007 年 12 月, 洪泽湖被中国政府列为国家级日本沼虾种质资源保护区。因此, 充分了解洪泽湖水域日本沼虾的群体遗传多样性, 对于洪泽湖日本沼虾种质资源的保护和合理挖掘利用具有重要的意义。

微卫星是广泛分布于真核生物基因组中的一

种中度重复序列, 具有多态性高、共显性遗传、重复性高和易检测等优点, 已广泛应用于动植物遗传多样性、遗传图谱构建、遗传育种计划等研究领域^[3], 近年来也越来越多地应用到虾类的群体遗传分析、育种计划等研究中^[4-7]。国内外有关日本沼虾遗传多样性的研究, 仅见采用线粒体 COI^[8-9] 和 16S rRNA^[10] 序列片段变异方法分析了长江和五大淡水湖野生日本沼虾群体遗传多样性和系统进化, 以及采用 RAPD^[11-14] 方法分析了长江、龙感湖、太湖等野生群体遗传多样性, 而未见利用微卫星标记技术分析日本沼虾遗传多样性, 对包括洪泽湖在内的某一特定水域的日本沼虾种质资源现状还未见详细的研究报道。本研究通过微卫星变异分析洪泽湖日本沼虾野生群体的遗传多样性, 探讨洪泽湖日本沼

收稿日期: 2009-07-14; 修订日期: 2009-09-09.

基金项目: 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室开放课题(KFT20083); 上海市科委重点科技攻关计划项目(073205111); 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); 上海海洋大学博士科研启动基金资助项目(B-8201-08-0279); 上海市水产养殖重点学科计划项目(Y1101).

作者简介: 冯建彬(1978-), 男, 博士, 讲师, 从事水产动物种质资源与遗传育种研究. E-mail: jbfeng@shou.edu.cn

通讯作者: 李家乐. Tel: 021-61900401; E-mail: jlli2009@126.com

虾群体遗传结构及群体数量变化,以期为洪泽湖日本沼虾种质资源保护和合理挖掘利用以及良种选育提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 样本来源及 DNA 提取

2008 年 8–10 月,在洪泽湖区(图 1、表 1)随机采集日本沼虾 9 个野生群体各 60 尾,无水乙醇固定后带回实验室,苯酚–氯仿法^[15]提取腹部肌肉组织基因组 DNA, TE (pH 8.0)溶解后测定浓度和纯度,–20 ℃保存备用。

表 1 洪泽湖日本沼虾样本采集位置及数目
Tab. 1 Sample sites of *M. nipponense* in Hongze Lake

群体 Stock	采集地 Sampling site	样本数 Sample nos.
高良涧 GLJ	洪泽县高良涧镇	60
蒋坝镇 JB	洪泽县蒋坝镇	60
老子山 LZS	洪泽县老子山镇	60
鲍集 BJ	盱眙县鲍集镇	60
临淮 LH	泗洪县临淮镇	60
半城 BC	泗洪县半城镇	60
成河 CH	泗洪县成河镇	60
界集 JJ	泗洪县界集镇	60
避风港 BFG	湖中 1 号避风港	60

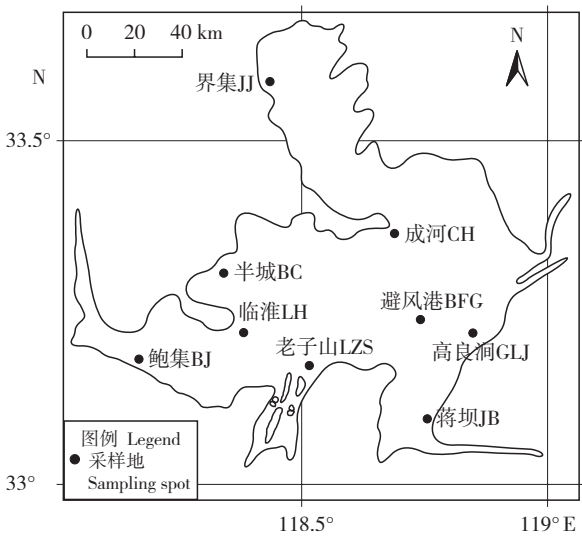


图 1 洪泽湖流域 9 个日本沼虾群体的采样地点
Fig. 1 Sample sites of 9 *M. nipponense* stocks in Hongze Lake

1.2 微卫星反应

8 对微卫星引物为自行开发(表 2)^[16]。PCR 反应体系为 10 μL, 包括: 1 × PCRbuffer, 1.5 mmol Mg²⁺, 200 μmol dNTP, 200 μmol 上下游引物, 0.1 U Taq 酶, 100 ng 模板, 灭菌去离子水补齐。

PCR 反应采取改良后的半降落 PCR 方法 (Semi-touchdown PCR), 以减少非特异性条带产生, 反应条件为: (1) 95 ℃ 4 min; (2) 94 ℃ 30 s; (3) (T_m +4) 30 s, 递减 1 ℃至 T_m ; (4) 72 ℃ 30 s; (T_m +4) 至 (T_m +1) 各 4 个循环, T_m 时 30 个循环; (5) 72 ℃ 8 min; (6) 4 ℃ 保存。

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳初检合格后, 用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 用 pBR322 DNA/*Msp*I 作为标准分子量, 电泳电压 8 V/cm, 快速银染法染色^[17], 扫描后观察分析。

1.3 数据分析

根据条带位置确定基因型, 利用 GENPOP 4.0^[18] 进行群体遗传分析, 计算等位基因数 (Number of Allele, A)、观测杂合度 (Observed heterozygosity, H_o) 和期望杂合度 (Expected heterozygosity, H_e), 利用 U 检验进行 Hardy-Weinberg 平衡, 采用 Bonferroni 方法校正的显著性标准, 根据 P 值判断杂合缺失或过剩。用 Botstein 等^[19] 的公式计算微卫星位点多态信息含量 (Polymorphism information content, PIC)。

利用 ARLEQUIN 3.1^[20] 计算群体遗传分化的 F -统计量 (F -statistics, F_{ST}) 及方差分析 (AMOVA)。利用 DISPAN 计算群体间 Nei's 遗传距离 (Genetic distance, D_A)^[21], 基于 D_A 分别构建 NJ 和 UPGMA 系统树, 并进行 Bootstrap 检验。

根据各位点等位基因频率, 基于无限等位基因模型 (Infinite allele model, IAM)、逐步突变模型 (Step-wise mutation model, SMM) 和双相突变模型 (Two-phased model of mutation, TPM), 利用 BOTTLENECK 3.4^[22] 计算平均期望杂合度 (Expected average heterozygosity, H_{EQ}), 重复为 1 000 个, 并通过符号检验 (Sign test) 和 Wilcoxon 符号秩次检验 (Wilcoxon sign rank test) 分析杂合过度是否显著, 以通过分析群体突变–漂移平衡来估计群体数量动态变化。

表 2 日本沼虾微卫星引物的序列
Tab. 2 Sequences of SSR primers of *M. nipponense*

位点 Locus	引物序列 (5'-3') Primer (5'-3')	重复单元 Repeat motif	序列号 GenBank accession No.
<i>Mni01</i>	F: TTACAGCGTTTCCCTTTACCT R: GAATCCTCAACACAGCAAATCT	(CA) ₁₁	EU130924
<i>Mni03</i>	F: TCCCTGTTTCACTTACCTTCTA R: TTGATTGCATTATATCTACCACATTA	(AC) ₁₂	EU130925
<i>Mni04</i>	F: CATTAATATCGTTGCACTGTCCA R: AGCGGCTGTACTTCCTCAC	(CA) ₉	EU130926
<i>Mni06</i>	F: GGCTATAAAGCGACCCTGAAT R: CCCAGCCCTGTGATATTTTAC	(AC) ₁₁	EU130928
<i>Mni07</i>	F: TCCCGCTTTCAACGAGAC R: AAGCCGCCAGATAGACAGACAG	(TC) ₁₁	EU130929
<i>Mni09</i>	F: GGTGGCTCTTCTCTTGTCTCTT R: CATCGCTGCCATGATAATCTAT	(GA) ₂₀	EU130930
<i>Mni10</i>	F: CAGCGAGGAAAATTATGTTG R: ATTTCTCTTTCTGGAAGTGACTAC	(GA) ₂₉	EU130931
<i>Mni13</i>	F: TAGATGCAGCAGTAAAGCAAATGA R: TTCACACTTCCCCATCAGTATCTC	(GA) ₂₀	EU130932

注: F-正向引物; R-反向引物。
Note: F-forward primer, R-reverse primer.

2 结果与分析

2.1 群体遗传多样性

8 对微卫星引物在 9 个日本沼虾群体中均得到了较好的扩增,图 2 为 *Mni01* 引物在 9 个群体的扩增。各位点等位基因数及座位多态信息含量如表 3 所示,8 个微卫星座位等位基因数介于 8~24 个之间,多态信息含量 PIC 介于 0.564 6~0.931 8 之间,

多态性较高,可有效进行后续分析。
9 个野生群体的遗传多样性参数如表 4 所示,在 9 个群体中,蒋坝群体平均等位基因数最大 ($A=10.50$),界集群体最小 ($A=8.75$);避风港群体平均多态信息含量 ($PIC=0.773\ 2$) 和平均期望杂合度 ($H_e=0.804\ 4$) 最大,鲍集群体最小 ($PIC=0.657\ 2$, $H_e=0.698\ 2$)。由此可知,避风港、蒋坝群体遗传多样性较高,而鲍集、界集群体相对较低。

表 3 洪泽湖日本沼虾 8 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 Statistic number of effective alleles, expected and observed heterozygosity and polymorphism information content for 8 microsatellite loci of *M. nipponense* in Hongze Lake

位点 Loci	等位基因数 Number of alleles, A	有效等位基因数 Number of effective alleles, N_e	期望杂合度 Expected heterozygosity, H_e	观测杂合度 Observed heterozygosity, H_o	多态信息含量 Polymorphism information content, PIC
<i>Mni01</i>	10	4.212	0.7633	0.5167	0.7350
<i>Mni03</i>	8	2.507	0.6017	0.4926	0.5646
<i>Mni04</i>	23	7.968	0.8753	0.4222	0.8625
<i>Mni06</i>	16	4.927	0.7978	0.1296	0.7747
<i>Mni07</i>	15	3.958	0.7480	0.1222	0.7141
<i>Mni09</i>	13	5.040	0.8023	0.2630	0.7753
<i>Mni10</i>	24	13.820	0.9285	0.6833	0.9229
<i>Mni13</i>	21	15.515	0.9364	0.4333	0.9318

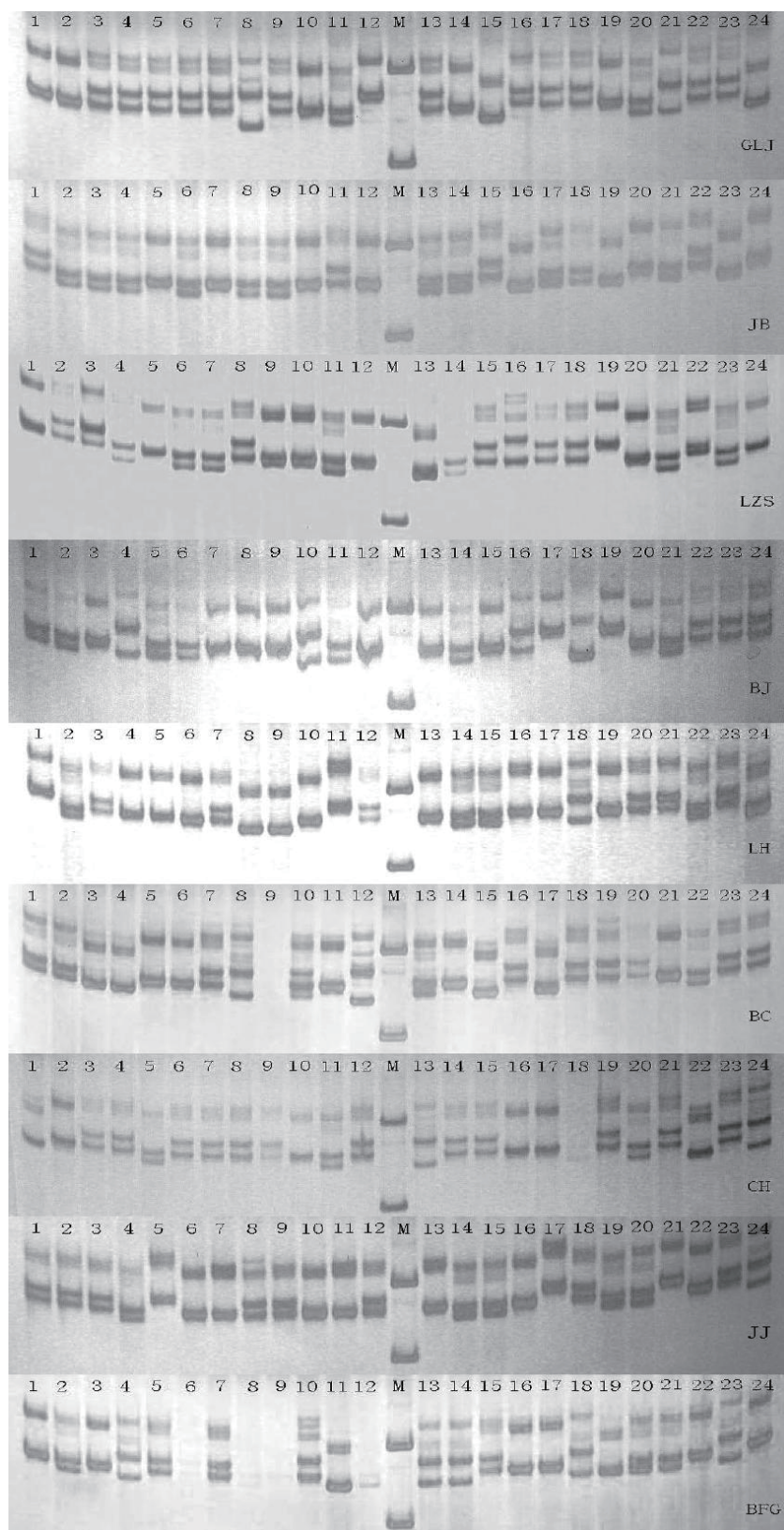


图2 引物 *Mni01* 在9个日本沼虾群体扩增的电泳图谱

M: 分子量标准; 1-24: 24个个体样本, 分别取自9个群体.

Fig. 2 Electrophoretogram of locus *Mni01* of 9 stocks of *M. nipponense*

M: Molecular maker; 1-24: 24 individuals from 9 stocks respectively.

2.2 Hardy-Weinberg 平衡分析

利用 Hardy-Weinberg 定律对每个群体中每个位点基因平衡状态进行检验(表 4),显著性标准经 Bonferroni 法校正 ($P < 0.005$) 后,各群体至少有 5

个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡,其中鲍集群体有 5 个位点,高良涧、蒋坝、老子山、临淮和成河群体有 6 个位点,避风港群体有 7 个位点,半城和界集群体有 8 个位点。

表 4 洪泽湖 9 个日本沼虾群体微卫星遗传多样性
Tab. 4 Summary statistics analysis of genetic diversity in 9 *M. niponense* stocks in Hongze Lake

种群 Stock	指数 Index	位点 Locus								合计 Total
		<i>Mni01</i>	<i>Mni03</i>	<i>Mni04</i>	<i>Mni06</i>	<i>Mni07</i>	<i>Mni09</i>	<i>Mni10</i>	<i>Mni13</i>	
GLJ	A	7	3	12	6	7	8	18	16	9.63
	H_o	0.6167	0.2667	0.3667*	0.1167*	0.1500*	0.2833*	0.7000*	0.4000*	0.3625
	H_e	0.7770	0.2616	0.8798	0.7901	0.7564	0.7671	0.9165	0.9076	0.7570
JB	A	6	4	13	8	8	11	19	15	10.50
	H_o	0.5000*	0.5667	0.4167*	0.1167*	0.0500*	0.4000*	0.8667	0.4500*	0.4208
	H_e	0.7979	0.5552	0.8611	0.7591	0.6892	0.8189	0.9102	0.9034	0.7869
BFG	A	9	6	17	7	10	7	14	11	10.13
	H_o	0.6167	0.6000	0.5500*	0.1667*	0.2000*	0.2000*	0.3333*	0.3833*	0.3813
	H_e	0.7798	0.6296	0.8800	0.7997	0.7730	0.7728	0.9211	0.8794	0.8044
LZS	A	4	4	12	7	10	8	16	16	9.63
	H_o	0.4833	0.5833	0.5833*	0.1333*	0.0667*	0.2833*	0.7167*	0.2667*	0.3896
	H_e	0.5599	0.4696	0.8326	0.6937	0.7265	0.8129	0.9066	0.9248	0.7408
BJ	A	6	5	9	7	5	8	18	14	9.00
	H_o	0.4667*	0.2667	0.1000*	0.2167	0.0833*	0.1500*	0.8167	0.3333*	0.3042
	H_e	0.7534	0.2968	0.6800	0.5847	0.6699	0.7710	0.9102	0.9196	0.6982
BC	A	6	5	12	4	6	10	17	13	9.13
	H_o	0.4167	0.4167*	0.4500*	0.0500*	0.2000*	0.2167*	0.6000*	0.5833*	0.3667
	H_e	0.7046	0.5891	0.7975	0.5704	0.6724	0.7791	0.9273	0.9034	0.7430
LH	A	7	4	10	8	9	8	16	15	9.63
	H_o	0.5667*	0.5167	0.4833*	0.1333*	0.1000*	0.2667*	0.7333*	0.3167*	0.3896
	H_e	0.7430	0.4332	0.8120	0.6913	0.8263	0.7791	0.9111	0.9252*	0.7652
CH	A	5	7	10	4	9	8	21	16	10.00
	H_o	0.6000	0.8667	0.3833*	0.1500*	0.1833*	0.2167*	0.6500*	0.6333*	0.4604
	H_e	0.7108	0.7148	0.8231	0.5584	0.7153	0.7724	0.9347	0.9258	0.7694
JJ	A	5	6	7	8	5	9	17	13	8.75
	H_o	0.3833	0.3500*	0.4667*	0.0833*	0.0667*	0.3500*	0.7333*	0.5333*	0.3708
	H_e	0.6054	0.6769	0.7634	0.7532	0.5766	0.8064	0.9235	0.9052	0.7512

注: * 经 Bonferroni 校正后仍显著偏离 Hardy-Weinberg ($P < 0.005$), 且位点表现为杂合不足。

Note: * Extremely significant deviations of Hardy-Weinberg expectations after Bonferroni correction ($P < 0.005$), locus showing heterozygote deficiency.

2.3 瓶颈效应分析

基于 IAM、TPM 和 SMM 的假设,得到洪泽湖日本沼虾群体在 3 种突变模型下的平均期望杂合度 H_{EQ} (表 5)。在 IAM 假设下,9 个群体各位点 H_E 均高于 H_{EQ} ,其中 *Mni10* 和 *Mni13* 位点 H_E 与 H_{EQ} 差

异极显著;在 TPM 假设下, *Mni01*、*Mni09*、*Mni10* 和 *Mni13* 位点 H_E 高于 H_{EQ} ,其中 *Mni10* 位点 H_E 与 H_{EQ} 差异显著, *Mni13* 位点 H_E 与 H_{EQ} 差异极显著;在 SMM 假设下, *Mni10* 和 *Mni13* 位点 H_E 高于 H_{EQ} ,其中 *Mni03* 和 *Mni09* 位点 H_E 与 H_{EQ} 差异显著,

Mni04、*Mni06* 和 *Mni07* 位点 H_E 与 H_{EQ} 差异极显著。

符号检验和 Wilcoxon 符号秩次检验的结果见表 6, 在 IAM 假设下, 除鲍集群体外, 其他群体均偏离了突变-漂移平衡, 表现出杂合显著过剩; 洪泽湖整个日本沼虾群体杂合显著或极显著过剩。在 TPM 假设下, Wilcoxon 符号秩次检验结果显示高良

涧、临淮和成河群体显著偏离了突变-漂移平衡, 界集群体极显著偏离了突变-漂移平衡, 表现出杂合显著或极显著过剩。在 SMM 假设下, 符号检验结果显示蒋坝群体显著偏离了突变-漂移平衡, 表现出杂合显著过剩; Wilcoxon 符号秩次检验结果显示洪泽湖整个日本沼虾群体杂合显著过剩。

表 5 洪泽湖 9 个日本沼虾群体微卫星位点瓶颈效应分析
Tab. 5 Bottleneck test by locus in 9 *M. nipponense* stocks in Hongze Lake

位点 Locus	H_E	IAM			TPM			SMM		
		H_{EQ}	DH/SD	P	H_{EQ}	DH/SD	P	H_{EQ}	DH/SD	P
<i>Mni01</i>	0.763	0.598	1.052	0.106	0.728	0.427	0.402	0.821	-1.461	0.071
<i>Mni03</i>	0.602	0.529	0.410	0.432	0.661	-0.532	0.248	0.774	-3.289	0.016*
<i>Mni04</i>	0.875	0.805	0.919	0.124	0.887	-0.397	0.279	0.926	-3.866	0.007**
<i>Mni06</i>	0.798	0.725	0.655	0.274	0.835	-0.864	0.175	0.891	-4.638	0.001**
<i>Mni07</i>	0.748	0.705	0.377	0.435	0.821	-1.437	0.083	0.882	-6.018	0.001**
<i>Mni09</i>	0.802	0.668	1.046	0.098	0.789	0.217	0.515	0.865	-2.318	0.038*
<i>Mni10</i>	0.929	0.811	1.655	0.000**	0.893	1.385	0.033*	0.928	0.018	0.459
<i>Mni13</i>	0.936	0.788	1.841	0.000**	0.876	1.975	0.000**	0.917	0.553	0.072

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 ($P<0.01$)。
Note: DH/SD means Ratio of deviation to the standard deviation of H_E and H_{EQ} . “*” means significant difference ($P<0.05$); “**” means extremely significant difference ($P<0.01$).

表 6 洪泽湖 9 个日本沼虾群体突变-漂移平衡分析
Tab. 6 Departures from mutation-drift equilibrium in 9 *M. nipponense* stocks in Hongze Lake

群体 Stock	Sign test						Wilcoxon sign-rank		
	IAM		TPM		SMM		IAM	TPM	SMM
	H_e/H_d	P	H_e/H_d	P	H_e/H_d	P	P	P	P
GLJ	7/1	0.091	7/1	0.096	4/4	0.435	0.008**	0.012*	0.945
JB	8/0	0.016*	7/1	0.100	1/7	0.011*	0.004**	0.055	0.055
BFG	8/0	0.017*	5/3	0.594	4/4	0.441	0.004**	0.074	0.461
LZS	8/0	0.014*	5/3	0.570	3/5	0.193	0.004**	0.383	0.195
BJ	5/3	0.586	5/3	0.568	3/5	0.186	0.250	0.945	0.195
BC	8/0	0.015*	6/2	0.300	2/6	0.054	0.004**	0.195	0.250
LH	8/0	0.015*	6/2	0.288	3/5	0.201	0.004**	0.039*	0.313
CH	8/0	0.015*	7/1	0.101	3/5	0.190	0.004**	0.039*	0.230
JJ	8/0	0.014*	7/1	0.100	3/5	0.189	0.004**	0.008**	0.461
Total	8/0	0.018*	4/4	0.435	2/6	0.059	0.004**	1.000	0.020*

注: H_e/H_d 表示杂合过剩与不足位点数之比; “*” 表示显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ($P<0.05$)。
Note: H_e/H_d means Ratio of loci number with heterozygosity excess to deficiency; “*” means Significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.05$).

2.4 群体遗传分化

基于等位基因频率计算出各群体间的日本沼虾 Nei's 遗传距离如表 7 所示, 高良涧与界集群体间遗传距离最远 ($D_A=0.2885$), 临淮和老子山群体

间遗传距离最近 ($D_A=0.1297$); 9 个野生群体在 8 个座位上平均的配对 F_{ST} 如表 7 所示, 老子山和临淮群体遗传固定指数最小 ($F_{ST}=0.0308$), 界集和高良涧群体之间遗传固定指数最大 ($F_{ST}=0.1065$), 且

9 个群体间遗传固定指数差异极显著 ($P<0.01$)。9 群体间遗传变异占总变异量的 6.43%,且达到极显著水平 ($P<0.01$)。个群体间遗传变异的 AMOVA 分析结果如表 8 所示,

表 7 日本沼虾群体间 F -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* stocks

群体 Stock	GLJ	JB	BFG	LZS	BJ	BC	LH	CH	JJ
GLJ		0.1533	0.2076	0.1408	0.1812	0.2284	0.1884	0.2306	0.2855
JB	0.0466		0.1521	0.1561	0.1744	0.1990	0.1722	0.1664	0.2240
BFG	0.0515	0.0362		0.2290	0.2141	0.2245	0.1939	0.2320	0.1879
LZS	0.0405	0.0532	0.0766		0.1710	0.1754	0.1297	0.1811	0.1942
BJ	0.0660	0.0719	0.0833	0.0593		0.1584	0.1924	0.2166	0.1835
BC	0.0768	0.0739	0.0827	0.0550	0.0491		0.1887	0.1991	0.1619
LH	0.0443	0.0509	0.0648	0.0308	0.0647	0.0588		0.1675	0.2003
CH	0.1006	0.0754	0.0888	0.0755	0.0975	0.0670	0.0717		0.2094
JJ	0.1065	0.0869	0.0690	0.0701	0.0887	0.0622	0.0756	0.0712	

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

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 stocks	8	236.947	0.20890 V_a	6.43
群体内个体间 Among individual within stock	531	2416.500	1.50968 V_b	46.45
个体间 Within individuals	540	827.000	1.53148 V_c	47.12
总变异 Total variation	1099	3480.447	3.25006	

基于 D_A 遗传距离分析,用 NJ 和 UPGMA 法构建的聚类图结果一致(图 3,仅列 UPGMA 图),地理位置相邻的群体聚在一起,即蒋坝、避风港群体聚在一起,老子山、临淮群体聚在一起,界集、成河群体聚在一起,半城和鲍集群体聚在一起,而高良涧群体与老子山、临淮群体聚在一起。

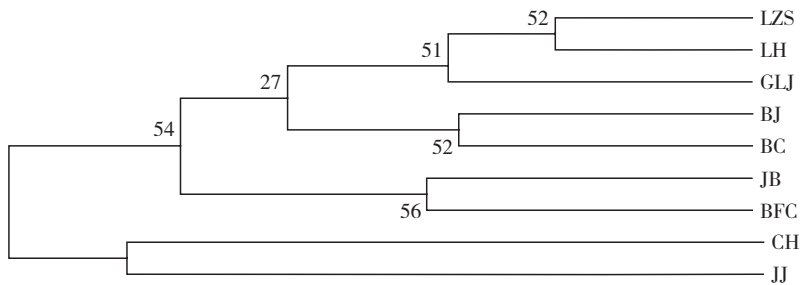


图 3 基于 D_A 遗传距离的 UPGMA 聚类树(数字表示 Bootstrap 的置信度)
Fig. 3 UPGMA clustering tree based on D_A genetic distance (Number indicating bootstrap confidence values)

3 讨论

本研究采用的 8 个微卫星位点多态信息含量 PIC 介于 0.564 6 ~ 0.931 8 之间,根据 Botstein 等^[19]

提出的标准,属于高度多态性 ($PIC>0.5$),因此这些标记用于遗传多样性分析效果较好。

洪泽湖日本沼虾 9 个野生群体平均期望杂合度介于 0.698 2 ~ 0.804 4 之间,比泰国罗氏沼虾

(*M. rosenbergii*) ($H_e = 0.64 \sim 0.73$)^[6]高,与澳大利亚罗氏沼虾($H_e = 0.66 \sim 0.90$)^[7]相近。因此可以判断,洪泽湖日本沼虾群体杂合度相对较高,群体内遗传变异较大,群体近交程度弱,具有丰富的遗传多样性。在洪泽湖地区建立日本沼虾种质资源自然保护区,可以更好地有效保护洪泽湖水域的日本沼虾野生种质资源。

洪泽湖日本沼虾9个野生群体中,中、东部的避风港和蒋坝等群体遗传多样性高于西部的鲍集和界集等群体,其原因可能是由于洪泽湖不同水域日本沼虾的生存环境不同造成的,洪泽湖是一个过水性湖泊,水环境变化易受西部上游淮河、濉河等河流来水控制,东部为湖水出湖口^[23],上游水域环境不稳定或枯水季节的水位下降等对洪泽湖西部日本沼虾等水生动物生存环境的影响高于中部及东部,因而上游西部群体表现出较低的遗传多样性。

从9个群体间 D_A 遗传距离以及遗传固定指数 F_{ST} 来看,群体间遗传分化指数介于 $0.0308 \sim 0.1065$ 之间,属于中等程度以下的分化($0.05 < F_{ST} < 0.15$)^[24],洪泽湖日本沼虾群体间遗传固定指数 F_{ST} 为 0.0643 ($P < 0.01$),属中等分化。洪泽湖各群体分化显著,可能是与其生活习性相关,即日本沼虾游泳能力较弱,只能作短距离的游动,多数时间攀附于水草或其他水中物体上,仅在幼苗时期随水流或者人为携带而被动扩散^[9]。

当群体处于Hardy-Weinberg平衡时,各等位基因在群体中分布频率应该是相对稳定,观察杂合度和期望杂合度之间没有显著的差异。本研究结果表明,9个日本沼虾群体大多数微卫星位点表现出杂合不足,且经Bonferroni校正后,仍至少有5个位点显著偏离了Hardy-Weinberg平衡,表现出杂合不足。由此可见,洪泽湖日本沼虾群体微卫星多数位点偏离Hardy-Weinberg平衡。群体处于Hardy-Weinberg平衡的基本条件应是群体足够大,随机交配,同时没有选择、突变、迁移和遗传漂变等现象,而洪泽湖日本沼虾微卫星大多数位点偏离Hardy-Weinberg平衡,这也可能是由于日本沼虾在不同湖区间被动移动所导致,这种移动可能来自西部上游日本沼虾在

幼体浮游阶段随水流漂浮到中部或东部下游水域,还可能来自于渔民在不同水域捕虾活动而被动移动,这些移动都可以引起不同湖区间的日本沼虾基因流动,进而引起洪泽湖区日本沼虾偏离了Hardy-Weinberg平衡。

杂合过剩作为群体数量下降的瞬态效应,只是在IAM进化模式下得到证实^[25],而在SMM进化模式下并不一定都能观察到,也只有少数微卫星位点完全符合一步的逐步突变模型^[22]。因此本研究中的微卫星数据使用IAM和TPM2种进化模式相对比较合适。瓶颈效应分析结果显示,在IAM的假设下,洪泽湖区9个日本沼虾群体在所有位点表现为杂合过剩,有2个位点的 H_E 与 H_{EQ} 差异极显著;在TPM的假设下,各有4个位点表现为杂合过剩和杂合不足,有2个杂合过剩位点的 H_E 与 H_{EQ} 差异显著或极显著。TPM进化模式是SMM与IAM的中间模型,微卫星数据已被证明更符合TPM模型,并用于群体数量瓶颈效应分析^[26]。因此,微卫星变异情况反映了洪泽湖日本沼虾群体部分位点已经偏离了突变-漂移平衡。

从符号检验和Wilcoxon符号秩次检验的结果来看,在IAM进化模式下2种检验表明,洪泽湖日本沼虾群体显著或极显著具有杂合过剩位点,但在TPM进化模式下,2种检验表明,洪泽湖日本沼虾不具有显著的杂合过剩位点。一般认为Wilcoxon符号秩次检验比符号检验的统计效率相对较高,并可用于4个位点以上任意样本数群体的分析^[22]。因此,本研究结果表明洪泽湖日本沼虾群体在近期没有经历过瓶颈效应,群体数量没有下降。

参考文献:

- [1] 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,2008,15(3): 371-376.
- [2] 王欣,张胜宇. 洪泽湖渔业发展与生态环境保护的基本途径[J]. 现代渔业信息,2008,23(3): 19-23.
- [3] 孙效文,张晓锋,赵莹莹,等. 水产生物微卫星标记技术研究进展及其应用[J]. 中国水产科学,2008,15(4): 689-703.
- [4] 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]. Mar Biol, 2000, 136 (1) : 149–157.
- [5] Wolfus G M, Garcia D K, Alcivar-Warren, et al. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs [J]. Aquaculture, 1997, 152: 35–47.
- [6] Kancee C, Supawadee P, Uthairat N, et al. Genetic diversity of hatchery stocks of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Thailand [J]. Aquaculture, 2007, 271: 121–129.
- [7] Chand V, de Bruyn M, Mather P B. Microsatellite loci in the eastern form of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) [J]. Molec Ecol Not, 2005, (5) : 308–310.
- [8] 杨频, 张浩, 陈立侨, 等. 利用 COI 基因序列分析长江与澜沧江水系日本沼虾群体的遗传结构 [J]. 动物学研究, 2007, 28 (2) : 113–118.
- [9] 冯建彬, 孙悦娜, 李家乐. 我国五大湖青虾线粒体 COI 基因片段序列比较研究 [J]. 水产学报, 2008, 32 (4) : 517–525.
- [10] 孙悦娜, 冯建彬, 李家乐, 等. 日本沼虾三群体线粒体 16S rRNA 基因片段序列的差异与系统进化 [J]. 动物学杂志, 2007, 42 (1) : 59–66.
- [11] 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: 自然科学版, 2006, 3 (2) : 179–182.
- [12] 吴滢, 傅洪拓, 李家乐, 等. 太湖日本沼虾的遗传多样性分析 [J]. 上海水产大学学报, 2008, 17 (5) : 620–624.
- [13] 朱银安, 单红, 王庆, 等. 长江、高邮湖、太湖日本沼虾遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 水产养殖, 2008, (1) : 5–7.
- [14] 陈婵娟, 张鑫, 许志强, 等. 江苏地区日本沼虾种质资源的 RAPD 分析 [J]. 江苏农业科学, 2008 (2) : 62–65.
- [15] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001.
- [16] Feng J B, Li J L. Twelve polymorphic microsatellites in oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* [J]. Molec Ecol Res, 2008, 8 (5) : 986–988.
- [17] Bassam B J, Caetano-Anoll é s G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. Analyt Biochemist, 1991, 196: 80–83.
- [18] Francois Rousset. GENEPOP' 007: a complete e-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux [J]. Molec Ecol Res, 2008, 8: 103–106.
- [19] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Gen, 1980, 32 (3) : 31–34.
- [20] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. Evolut Bioinform Online, 2005, 1: 47–50.
- [21] Nei M, Tajima F, Tateno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data [J]. J Molec Evol, 1983, 19 (3) : 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: 2001–2014.
- [23] 李波, 濮培民. 淮河流域及洪泽湖水质的演变趋势分析 [J]. 长江流域资源与环境, 2003, 12 (1) : 67–73.
- [24] Hartl D L, Clark A G. Principles of Population Genetics, 3rd edn [M]. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA, 1997.
- [25] Maruyama T, Fuerst P A. Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck [J]. Genetics, 1985, 111: 675–689.
- [26] Di Rienzo A, Peterson A C, Garza J C. Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1994, 91: 3166–3170.

Microsatellite analysis of genetic diversity in 9 wild stocks of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* in Hongze Lake

FENG Jianbin^{1,2}, WU Chunlin¹, DING Huaiyu², HUA Xueming¹, LI Yingsen¹, LI Jiale^{1,3}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for Eco-Agricultural Biotechnology around Hongze lake, Huaiyin Nomal College, Huaian 223300, China; 3. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai 201306, China)

Abstract: Genetic diversity of 9 wild stocks of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* in Hongze Lake, i.e. 9 stocks of Bi-feng-gang (BFG), Jiang-ba (JB), Gao-liang-jian (GLJ), Bao-ji (BJ), Lao-zi-shan (LZS), Lin-huai (LH), Ban-cheng (BC), Cheng-he (CH) and Jie-ji (JJ), were investigated using 8 microsatellite DNA loci. The allele numbers, effective allele numbers, observed heterozygosity and expected heterozygosity under Hardy-Weinberg equilibrium were estimated to characterize genetic diversity. Tests to detect excess heterozygosity in a population at mutation-drift equilibrium were analyzed. The results showed that all the 8 loci were highly polymorphic. Tests of departures from Hardy-Weinberg equilibrium indicated at least 5 loci in each stock were with significant heterozygosity deficiency. There was significant deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium in all stocks. All of the 9 stocks in Hongze Lake showed high genetic diversities, and the genetic diversities of stocks in eastern and central Hongze Lake such as BFJ and JB were higher than those in the western lake including BJ and JJ. The oriental river prawn stocks in Hongze Lake were partly different from mutation-drift equilibrium with partly heterozygote excesses, which might indicate that the stock, did not suffer bottleneck effects in the past as well as the recent stock decline. F_{ST} and AMOVA analysis across all stocks and loci indicated that there was medium level of divergence among the 9 stocks. NJ and UPGMA clustering tree based on D_A genetic distance demonstrated that the stocks of adjacent geographical position clustered together. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (2) : 218–227]

Key words: Hongze Lake; *Macrobrachium nipponense*; microsatellite; genetic diversity

Corresponding author: LI Jiale. E-mail: jlli2009@126.com