

DOI: 10.12264/JFSC2021-0060

基于线粒体 COI 基因的河南境内四水系日本沼虾种群遗传多样性

冯梦霞, 汤永涛, 刘如垚, 闫雪朦, 胡博, 聂国兴, 周传江

河南师范大学水产学院, 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 水产动物疾病控制河南省工程实验室,
河南 新乡 453007

摘要: 日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)是一种经济价值较高的淡水虾类, 广泛分布于我国各淡水水体, 其在河南境内各水系均有分布。随着水产养殖业的发展、水域生态环境的变化及人为因素的影响, 日本沼虾的种质资源也逐渐受到影响。为评估河南境内水系日本沼虾的种质资源现状及其遗传多样性, 本研究利用线粒体 COI 基因对河南境内 18 个地理群体 135 尾日本沼虾开展种群遗传学研究, 样品覆盖河南境内的长江、黄河、淮河和海河 4 个水系。结果显示, 河南境内日本沼虾 18 个地理群体共包含 27 个单倍型, 群体平均单倍型多样性(H_d)为 0.78574, 平均核苷酸多样性(π)为 0.01059, 其中淮河水系日本沼虾群体平均遗传多样性最低, 长江水系日本沼虾群体平均遗传多样性最高, 且各水系群体均显示出高 H_d 低 π 的特点。AMOVA 分析显示, 日本沼虾遗传变异主要来源于日本沼虾群体内(66.03%), 群体间遗传变异为 40.22%。系统发育树和单倍型网络均未显示出明显的水系分化。中性检验、错配分布及贝叶斯天际线分析表明, 日本沼虾群体近期没有发生种群扩张, 群体相对稳定。本研究可为河南境内日本沼虾种质资源的保护和合理开发利用提供参考。

关键词: 日本沼虾; COI; 遗传多样性; 种质资源; 长江; 黄河; 淮河; 海河; 河南境内

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2021)12–1548–11

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)俗称青虾、河虾、大眼贼, 隶属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、长臂虾科(Palaemonidae)、沼虾属(*Macrobrachium*)^[1], 广泛分布于我国各淡水水体, 是一种经济价值较高的经济虾类^[2]。随着水产养殖业的快速发展, 日本沼虾养殖群体逐渐面临种质资源退化、生长速率缓慢、抗病力下降、规格变小及性早熟等一系列问题; 此外, 由于过度开发利用及天然生境的变化等诸多因素的复合影响, 野生日本沼虾种质资源也逐渐衰竭、多样性降低^[3–4]。河南省地处中国南北交界处, 境内分布有长江、黄河、淮河和海河等四大水系, 水系丰富, 地形复杂, 日本沼虾资源

较为丰富; 此外, 继黄河鲤(*Cyprinus carpio*)、淇河鲫(*Carassius auratus*, in Qihe River)国家级水产种质资源保护区在 2007 年建设后, 日本沼虾资源比较丰富的信阳光山及漯河澧河也在 2008 年和 2015 年相继被列为国家级水产种质资源保护区, 日本沼虾种质资源保护得到了越来越多的关注^[5–6]。因此, 种质资源研究对于河南境内日本沼虾种质资源的保护和合理开发利用具有十分重要的现实意义。

目前, 通过 DNA 分子标记进行种群遗传多样性研究已经成为种质资源评价的主要手段之一。作为重要的经济虾类, 日本沼虾的遗传多样性研究相对其他淡水虾类较为丰富, 其中李新正等^[7]

收稿日期: 2021-02-22; **修订日期:** 2021-03-05.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31872199, U1504304); 河南省科技攻关重点项目(182102110007, 182102110046, 182102110237, 172102310751); 河南省创新型科技团队支持计划项目(CXTD2016043); 2019 年度河南省高等学校青年骨干教师培养计划项目(2019GGJS063).

作者简介: 冯梦霞(1995–), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类资源保护与利用. E-mail: 1198916804@qq.com

通信作者: 周传江, 博士, 副教授, 研究方向为鱼类资源保护与利用. E-mail: chuanjiang88@163.com

首先对我国长臂虾总科的系统发育关系进行了系统研究调查, 为后续日本沼虾相关研究奠定了基础, 此后冯建彬等^[8]、Yang 等^[9]利用线粒体细胞色素 C 氧化酶 I (cytochrome c oxidase subunit I, COI) 基因对五大湖、长江与澜沧江水系的日本沼虾开展了群体遗传多样性研究。此外, 基于随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术及简单重复序列中间区域 (ISSR) 标记技术对日本沼虾进行群体遗传学分析也有报道^[10-11]。我们对河南境内虾类资源调查的前期结果显示, 相对于其他淡水虾类而言, 日本沼虾在河南境内四大水系均有广泛分布, 且数量较大, 为显著优势物种, 但是其遗传多样性研究尚未开展。此外, 前人有关河南境内鱼类的种群遗传学研究表明, 四大水系的种群表现出不同程度的遗传分化^[12-13], 而河南境内的日本沼虾

遗传多样性情况以及不同水系间是否存在分化尚未见报道。

目前线粒体 COI 基因已被普遍应用于日本沼虾种群遗传学研究^[8-9], 本研究采集了河南境内 18 个野生日本沼虾群体, 基于常用的线粒体分子标记 COI 基因研究其遗传多样性和种群结构, 并评估河南境内日本沼虾种质资源现状, 为其种质资源的健康可持续发展和开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2012 年至 2020 年, 在进行河南境内虾类资源调查期间, 采集了大量日本沼虾样品, 选取其中 18 个地理群体 135 尾日本沼虾样本作为研究对象 (表 1), 样本覆盖河南境内长江、黄河、淮河和海

表 1 日本沼虾采样信息
Tab. 1 Sampling information of *Macrobrachium nipponense*

水系 basin	支流 tributary	种群 population	采样点 sampling location	采样日期 sampling date	样本数 sample size
长江水系 Yangtze River	唐白河-白河 Tangbai River-Baihe River	R14	南阳市鸭河水库	2019.07.18	9
	唐白河-白河 Tangbai River-Baihe River	R17	南阳市唐河县大方庄村	2019.07.18	12
	唐白河-白河 Tangbai River-Baihe River	R19	南阳市新野县公园两河口	2019.07.16	8
	汉江-丹江 Hanjiang-Danjiang	R20	南阳市淅川县丹江口石桥码头	2018.10.10	6
黄河水系 Yellow River	干流 main reach	B07	开封市祥符区刘店镇	2020.10.23	6
	洛河-伊河 Luohe River-Yihe River	C36	洛阳市汝阳县杜康新村杜康遗址	2019.08.12	5
	沁河 Qinhe River	H07	焦作市武陟县原马蓬村	2019.09.08	11
	洛河 Luohe River	M07	三门峡市陕州区九孔桥下游	2019.08.07	4
	洛河-涧河 Luohe River-Jianhe River	M08	三门峡市渑池县涧河生态公园	2019.08.07	6
淮河水系 Huaihe River	颍河 Yinghe River	A04	郑州市登封市白沙水库	2019.08.12	9
	颍河 Yinghe River	K08	许昌市襄城县烟城路常庄	2019.08.08	6
	淮河-汝河 Huaihe River-Ruhe River	Q18	驻马店市确山县滚河镇	2019.08.11	6
	涡河 Wohe River	P16	周口市鹿邑县穆店乡秦庄村	2019.07.16	13
海河水系 Haihe River	干流 main reach	S19	信阳市平桥区肖店乡大王营村	2020.05.31	6
	卫河-淇河 Weihe River-Qihe River	E10	安阳市安阳县善应镇三仓村小南海水库	2019.08.17	13
	卫河-淇河 Weihe River-Qihe River	E14	安阳市林州市石板岩镇南谷洞水库	2019.09.03	6
	卫河-沧河 Weihe River-Canghe River	G03	新乡市卫辉市狮豹头乡小店河村	2019.09.05	4
	卫河-沧河 Weihe River-Canghe River	G04	新乡市卫辉市塔岗水库	2019.09.08	5

河等四大水系(图 1)。采集的日本沼虾直接浸泡于 95% 的乙醇溶液中带回实验室保存备用。

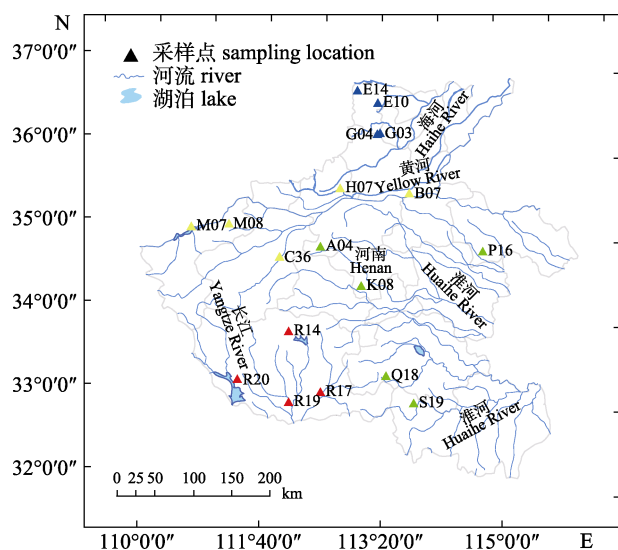


图 1 河南境内水系日本沼虾采样点位示意图
红色—长江水系; 黄色—黄河水系; 绿色—淮河水系;
蓝色—海河水系。

Fig. 1 Sampling locations of the *Macrobrachium nipponense* in Henan Province
red—the Yangtze River basin; yellow—the Yellow River basin;
green—the Huaihe River basin; blue—the Haihe River basin.

1.2 COI 基因序列获取

取约 0.01 g 日本沼虾腹部肌肉组织, 采用酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA^[14]。用 1% 琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 微量紫外分光光度计分别检测基因组 DNA 的质量与浓度, 并于 -20 °C 保存备用。

扩增线粒体 COI 基因引物为 LCO1490: 5'-GG-TCAACAAATCATAAAGATATTGG-3', HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'^[15], 引物由上海生工生物技术有限公司合成。PCR 反应体系为 30 μL, 包含: 2×Es Taq Master Mix 15 μL, 正反向引物各 1.5 μL, DNA 模板 1 μL (100 ng), 无菌双蒸水 11 μL。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 °C 终延伸 7 min, 4 °C 保存^[8]。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后送至上海生工生物工程有限公司进行单向测序(引物: LCO1490)。

1.3 数据分析

测序获得的 DNA 序列采用 Lasergene v7.1 软件包中的 SeqMan^[16] 软件进行人工核查、校正及

组装拼接。拼接完成的序列用 BioEdit^[17] 软件进行多重比对, 剪切掉冗余片段获得一致序列备用。用 DnaSP 5.0^[18] 软件计算 DNA 序列的单倍型个数(haplotypes number, h)、单倍型多样性(haplotype diversity, H_d)和核苷酸多样性(nucleotide diversity, π)等遗传多样性参数。用 MEGA 7.0^[19] 软件计算序列碱基组成、变异位点、简约信息位点及组内、组间遗传距离等参数; 根据长臂虾科的系统发育关系, 选取秀丽白虾(*Palaemon modestus*)为外类群^[7], 设置 bootstrap 值为 1000 检验置信度, 根据最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统进化树。

用 Arlequin 3.5^[20] 进行分子方差分析(analysis of molecular variance, AMOVA)以估算遗传变异在不同水系间的分布及遗传分化系数(F -statistics, F_{ST}), 进而评估不同水系日本沼虾群体的遗传分化程度; 为探究其种群历史动态, 进行 Fu's F_s 和 Tajima's D 中性检验(neutrality test)及错配分布分析(mismatch distribution analysis), 以评估其群体是否发生种群扩张。采用 Network 5.0^[21] 软件中的 Median-Joining 法构建日本沼虾的单倍型网络图, 以分析其单倍型演化关系。用 BEAST v1.7.4^[22] 软件进行 Bayesian Skyline Plot (BSP) 分析估算日本沼虾种群历史动态的变化, 采用 1.4% 的 COI 基因进化速率^[23], 由 Tracer v1.5^[24] 生成贝叶斯天际线点图(Bayesian skyline plot, BSP)。

2 结果与分析

2.1 COI 基因序列特征

本研究共测序获得 135 条 COI 序列, 去除冗余片段后, 得到长度 613 bp 的一致序列。经比对分析, 日本沼虾线粒体 COI 基因共包含变异位点(V) 45 个, 占总位点数的 7.3%, 其中简约信息位点(P_i) 27 个, 单变异位点(S) 18 个, 转换与颠换的比值为 4.34 : 1; 序列 T、C、A、G 碱基的平均含量分别为 29.1%、22.6%、29.3% 和 19.0%, 其中 (A+T)% 为 58.4%, (G+C)% 为 41.6%, 符合节肢动物门普遍 AT 含量较高的特点。

2.2 种群遗传多样性

日本沼虾群体的遗传多样性参数见表 2, 135 尾日本沼虾样品共包含 27 个单倍型, 其中 20 个

单倍型为单个群体独享, 7 个单倍型为共享单倍型, 其中单倍型 Hap1 是包含个体数最多的单倍型, 被 4 个水系 15 个群体 57 个个体所共享, 其次为单倍型 Hap2, 被 4 个水系 7 个群体 20 个个体所共享。日本沼虾各群体单倍型多样性范围在 0.00000~0.93333, 群体平均单倍型多样性为 0.78574, 其中 A04、E14、G04 群体单倍型多样性($H_d=0.00000$)最低, 各自均只有一个单倍型, B07 群体单倍型多样性($H_d=0.93333$)最高; 核苷酸多样性范围在 0.00000~0.01658, 群体平均核苷酸多样性为 0.01059, 其中 A04、E14、G04 群体核苷酸多样性($\pi=0.00000$)最低, R20 群体核苷酸多样性($\pi=0.01658$)最高(表 2)。分析结果显示, A04、E14 及 G04 群体无论单倍型多样性还是核苷酸多

样性均最低, B07、R20、K08 等群体则显示出相对较高的遗传多样性, 且整体而言, 长江水系显示出更高的遗传多样性, 且其平均单倍型多样性($H_d=0.74823$)及核苷酸多样性($\pi=0.01149$)均远高于其他 3 个水系。

2.3 种群遗传结构

通过 MEGA 7.0 软件对日本沼虾群体进行成对遗传距离的计算可知, 日本沼虾群体内遗传距离为 0.000~0.017, 其中 A04、E14、G04 群体组内遗传距离最小, 仅为 0.000, R20 群体组内遗传距离最大为 0.017; 两两群体间的遗传距离为 0.000~0.029, 其中 E14 与 G04 群体组间遗传距离最小, 为 0.000, A04 与 M08 群体组间遗传距离最大为 0.029。18 个日本沼虾群体中, A04、E14、G04 共

表 2 河南境内四水系日本沼虾群体的遗传多样性信息
Tab. 2 Genetic diversity of *Macrobrachium nipponense* populations from 4 river systems in Henan Province

水系 basin	种群 population	样本数 sample size	单倍型数 haplotype number	单倍型 haplotype	H_d	π	Tajima's D	Fu's F_s
长江水系 Yangtze River	R14	9	4	Hap1(5), Hap3(1), Hap8(2), Hap9(1)	0.69444	0.01191	0.23726	3.62030
	R17	12	6	Hap1(1), Hap2(7), Hap4(1), Hap5(1), Hap6(1), Hap10(1)	0.68182	0.00795	-0.96831	0.81555
	R19	8	4	Hap1(2), Hap2(4), Hap7(1), Hap11(1)	0.75000	0.00950	-0.22059	2.46210
	R20	6	4	Hap1(2), Hap5(1), Hap6(2), Hap7(1)	0.86667	0.01658	1.40701	2.50790
黄河水系 Yellow River	B07	6	5	Hap1(2), Hap2(1), Hap7(1), Hap12(1), Hap13(1)	0.93333	0.01361	-0.58900	0.43336
	C36	5	2	Hap7(3), Hap14(2)	0.60000	0.00926	1.77661	5.04223
	H07	11	4	Hap1(7), Hap2(2), Hap14(1), Hap15(1)	0.60000	0.00630	-1.02075	2.34625
	M07	4	2	Hap1(3), Hap2(1)	0.50000	0.00257	-0.75445	1.71605
淮河水系 Huaihe River	M08	6	3	Hap1(4), Hap16(1), Hap17(1)	0.60000	0.00114	-1.13197	-0.85842
	A04	9	1	Hap6(9)	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
	K08	6	5	Hap8(1), Hap14(2), Hap22(1), Hap23(1), Hap24(1)	0.93333	0.01487	-0.36101	0.58041
	Q18	6	3	Hap1(4), Hap14(1), Hap25(1)	0.60000	0.00400	-1.39031	1.31156
海河水系 Haihe River	P16	13	6	Hap1(8), Hap14(1), Hap18(1), Hap19(1), Hap20(1), Hap21(1)	0.64103	0.00409	-1.32292	-0.67801
	S19	6	4	Hap1(2), Hap2(2), Hap5(1), Hap7(1)	0.86667	0.00789	-0.75873	1.02106
	E10	13	5	Hap1(3), Hap2(3), Hap5(1), Hap7(4), Hap26(2)	0.83333	0.00981	1.10965	2.92322
	E14	6	1	Hap1(6)	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
	G03	4	2	Hap1(3), Hap27(1)	0.50000	0.00343	-0.78012	2.19722
	G04	5	1	Hap1(5)	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
总体平均数 average	18	135	27		0.78574	0.01059	-0.52984	-3.23400*

注: H_d 为单倍型多样性, π 为核苷酸多样性, Tajima's D 为 Tajima's D 中性检验值, Fu's F_s 为 Fu's F_s 中性检验值; “*”表示 Tajima's D 和 Fu's F_s 检验显著偏离中性检验模型。
Note: H_d , haplotype diversity; π , nucleotide diversity; Tajima's D , Tajima's D test; Fu's F_s , Fu's F_s test. “*”represents the Tajima's D and Fu's F_s tests significantly deviate from the standard neutral model.

3 个群体的组内遗传距离(0.0000)最小, 其中 A04 群体与其他群体之间的组间遗传距离均较大, 除与 R20 和 C36 群体组间遗传小于 0.02 外, 与其他各组组间遗传距离均大于等于 0.02; 其次是 C36 群体, 其与其他各群体的组间遗传距离也相对较大(表 3)。

日本沼虾群体间的遗传分化系数 F_{ST} (表 3) 为 -0.167~1.000, 对 F_{ST} 值进行差异显著性检验, 结果显示, A04、C36、R17、R19、B07 群体与其他多数群体都存在显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$) 的遗传差异, 其中 A04 群体与 P16、S19 群体外的所有群体均达高度遗传分化 ($F_{ST}>0.25$), 且遗传分化均达到极显著水平 ($P<0.01$), 而 C36 群体与 R19、R20、B07、K08、S19 和 E10 共 6 个群体外的其他群体均达高度遗传分化 ($F_{ST}>0.25$), 且遗传分化均达到极显著水平 ($P<0.01$)。遗传分化系数

F_{ST} 与成对遗传距离结果相一致, 均显示 A04 和 C36 群体与其他群体间存在较大的遗传分化。

对河南境内 4 个水系日本沼虾群体进行分子方差分析(AMOVA), 结果显示(表 4)日本沼虾的遗传变异主要来源于群体内个体间, 占总变异的 66.03%, 群体间遗传变异占 40.22%。

以秀丽白虾(*Palaemon modestus*) (GenBank 登录号: MK412768) 作为外类群, 用 MEGA 7.0 软件构建日本沼虾 18 个群体的 ML 系统进化树(图 2a), 结果显示日本沼虾不同群体间没有随地理和水系分布形成单独的分支, 群体间系统进化关系呈交叉式嵌套, 无明显水系和地理分化。

用 Network5.0 软件绘制单倍型网络图(图 2b), 由图可知, 日本沼虾群体各水系单倍型之间未形成明显的地理结构, 不同水系和群体间均存在单倍型共享的情况。除 Hap2、Hap6、Hap7、Hap14

表 3 河南境内四水系日本沼虾群体间遗传分化指数(F_{ST} , 对角下方)、群体内遗传距离(对角线, 粗体)和群体间遗传距离(对角上方)

Tab. 3 Pairwise F_{ST} (below diagonal), genetic distance within populations (diagonal bold) and genetic distance (above diagonal) among *Macrobrachium nipponense* populations from 4 river systems in Henan Province

种群 popula- tion	长江水系 Yangtze River				黄河水系 Yellow River					淮河水系 Huaihe River					海河水系 Haihe River			
	R14	R17	R19	R20	B07	C36	H07	M07	M08	A04	K08	Q18	P16	S19	E10	E14	G03	G04
R14	0.012	0.012	0.011	0.015	0.013	0.016	0.009	0.008	0.008	0.022	0.013	0.008	0.009	0.010	0.013	0.007	0.008	0.007
R17	0.154	0.008	0.008	0.013	0.011	0.012	0.009	0.008	0.009	0.020	0.012	0.009	0.009	0.008	0.009	0.009	0.009	0.009
R19	0.048	-0.068	0.010	0.013	0.011	0.012	0.008	0.007	0.009	0.020	0.012	0.009	0.008	0.008	0.009	0.008	0.008	0.008
R20	0.011	0.065	-0.025	0.017	0.015	0.014	0.014	0.013	0.014	0.016	0.016	0.014	0.014	0.013	0.013	0.014	0.014	0.014
B07	0.017	-0.005	-0.101	-0.029	0.014	0.013	0.010	0.009	0.010	0.023	0.013	0.010	0.010	0.010	0.011	0.010	0.010	0.010
C36	0.329*	0.293**	0.180	0.051	0.096	0.009	0.013	0.014	0.016	0.017	0.015	0.015	0.015	0.012	0.011	0.016	0.015	0.016
H07	0.012	0.158**	0.046	0.195*	0.016	0.441**	0.006	0.004	0.004	0.026	0.010	0.005	0.005	0.007	0.009	0.004	0.005	0.004
M07	-0.042	0.206	0.095	0.197	0.040	0.557**	-0.139	0.003	0.002	0.027	0.009	0.003	0.003	0.006	0.009	0.001	0.002	0.001
M08	0.070	0.425**	0.333*	0.037	0.263	0.698**	0.077	0.038	0.001	0.029	0.010	0.003	0.003	0.007	0.010	0.001	0.002	0.001
A04	0.726**	0.769**	0.775**	0.536**	0.756**	0.804**	0.861**	0.973**	0.984**	0.000	0.024	0.028	0.028	0.023	0.021	0.028	0.027	0.028
K08	-0.064	0.041	-0.036	-0.031	-0.096	0.173	-0.005	-0.015	0.176	0.735**	0.015	0.010	0.010	0.011	0.013	0.009	0.010	0.009
Q18	0.011	0.291**	0.185*	0.265	0.103	0.563**	-0.064	-0.167	0.000	0.943**	0.943	0.004	0.004	0.007	0.010	0.002	0.003	0.002
P16	0.080	0.304**	0.216**	0.352**	0.177**	0.612**	-0.031	-0.165	0.018	0.910	0.114*	-0.090	0.004	0.007	0.010	0.002	0.004	0.002
S19	0.023	-0.046	-0.129	0.035	-0.106	0.264	-0.308	0.016	0.313	0.861	-0.066	0.121	0.135	0.008	0.009	0.006	0.007	0.006
E10	0.126	0.040	-0.059	0.018	-0.053	0.092	0.122	0.179	0.358**	0.723**	0.037	0.243*	0.281**	-0.054	0.010	0.010	0.010	0.010
E14	0.070	0.437**	0.349*	0.383	0.279*	0.727**	0.074	0.111	0.000	1.000**	0.188	0.000	0.001	0.343	0.366**	0.000	0.002	0.000
G03	-0.033	0.262**	0.142	0.202	0.069	0.554**	-0.067	-0.167	0.051	0.964**	0.017	-0.090	-0.070	0.083	0.212*	0.111	0.003	0.002
G04	0.040	0.413**	0.316**	0.344	0.239*	0.700**	0.048	0.063	-0.034	1.000**	0.148	-0.034	-0.023	0.304	0.349**	0.000	0.063	0.000

注: “*”表示差异显著(0.01<P<0.05); “**”表示差异极显著(P<0.01)。
Note: “*”means significant differences (0.01<P<0.05); “**” means extremely significant differences (P<0.01).

表 4 河南境内四大水系日本沼虾群体 AMOVA 分析

Tab. 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) among *Macrobrachium nipponense* populations from 4 river systems in Henan Province

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	变异组成 variance component	变异百分比/% percentage of variation	固定系数 fixation index
组间 among groups	3	18.781	-0.19428Va	-6.24	$F_{CT}=-0.06245$
组内群体间 among populations within groups	14	154.708	1.25115Vb	40.22	$F_{SC}=0.37852^{**}$
群体内 within populations	117	240.348	2.05426Vc	66.03	$F_{ST}=0.33971^{**}$
合计 total	134	413.837	3.11113		

注: F_{ST} 为种群总变异; F_{SC} 为组内变异; F_{CT} 为组间变异; “*”表示差异显著($P<0.05$); “**”表示差异极显著($P<0.01$)。

Note: F_{ST} is total variation of population; F_{SC} is variation within groups; F_{CT} is variation among groups; “*”means significant differences ($P<0.05$); “**” means extremely significant differences ($P<0.01$).

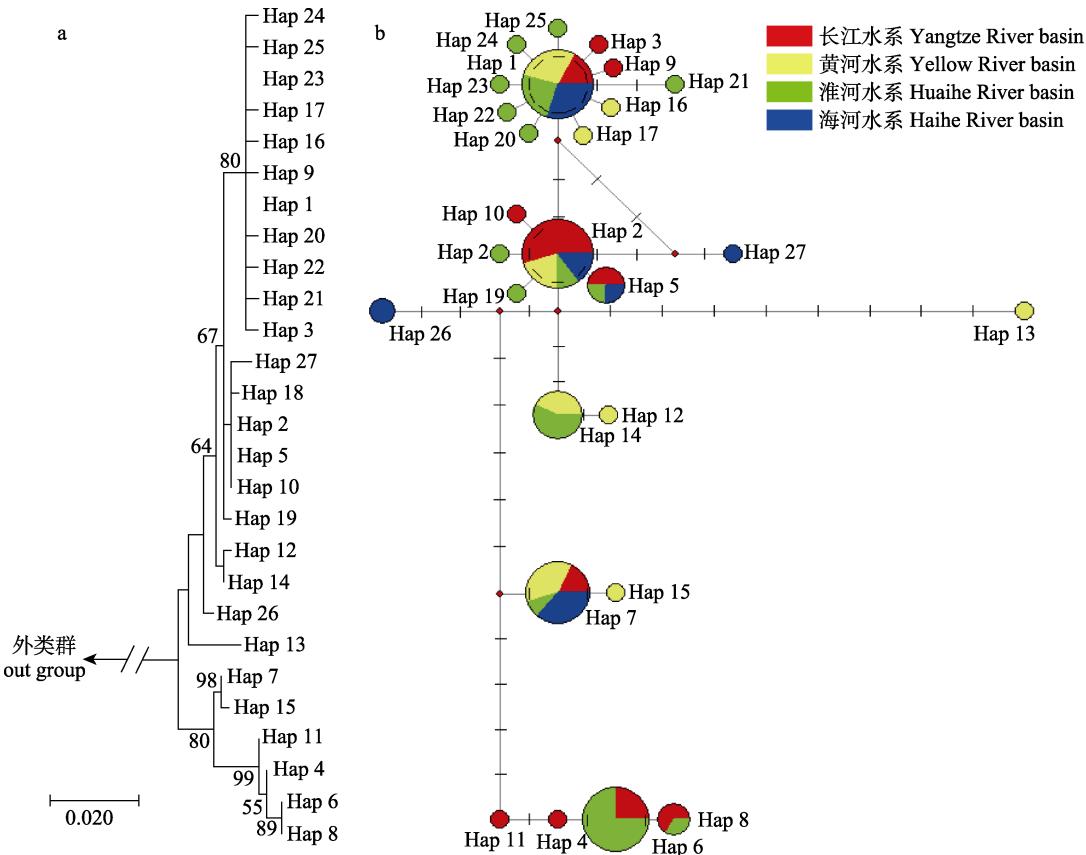


图 2 基于 COI 基因构建的河南境内四水系日本沼虾的 ML 系统进化树(a)及单倍型网络图(b)

Fig. 2 The ML maximum likelihood phylogenetic tree (a) and network of haplotype (b) of *Macrobrachium nipponense* from 4 river systems in Henan Province based on COI gene sequences

具有少量拓展单倍型外, 单倍型 Hap1 拓展单倍型最多, 推测单倍型 Hap1 可能为日本沼虾适应环境变化而形成的适应性较强、抵抗性较高的稳定群体。

2.4 日本沼虾群体的种群历史动态分析

研究采用中性检验、错配分布及 BSP 分析 3 种方法相结合, 对河南境内不同水系日本沼虾的

种群历史动态进行分析。中性检测结果(表 2)显示, 河南境内日本沼虾群体 Tajima’s D 检验为负值 (Tajima’s $D=-0.52984$), 但无显著差异, Fu’s F_s 检验为 3.234, 且呈现出显著差异($P<0.05$); 错配分布显示日本沼虾不同水系群体及整体的错配分布曲线均呈多峰型(图 3a~e), 故推测河南境内日本沼虾种群呈现相对稳定状态, 近期未发生过种群

扩张事件。为进一步估算日本沼虾群体的种群历史动态,用 BEAST 软件对其不同水系群体及整

体进行 BSP 分析,结果显示日本沼虾不同水系种群和群体整体均保持稳定的趋势(图 4a~e)。

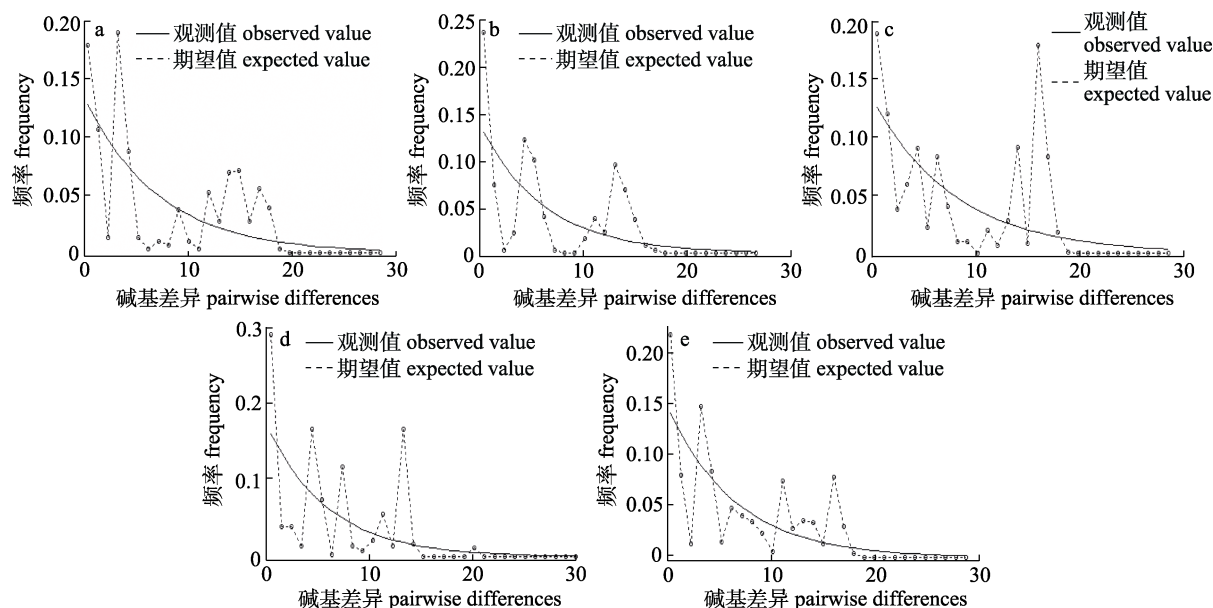


图 3 河南境内四水系日本沼虾种群错配分布分析

a: 长江水系; b: 黄河水系; c: 淮河水系; d: 海河水系; e: 总体。

Fig. 3 Mismatch distribution analysis of *Macrobrachium nipponense* populations from 4 river systems in Henan Province

a: Yangtze River; b: Yellow River; c: Huaihe River; d: Haihe River; e: total.

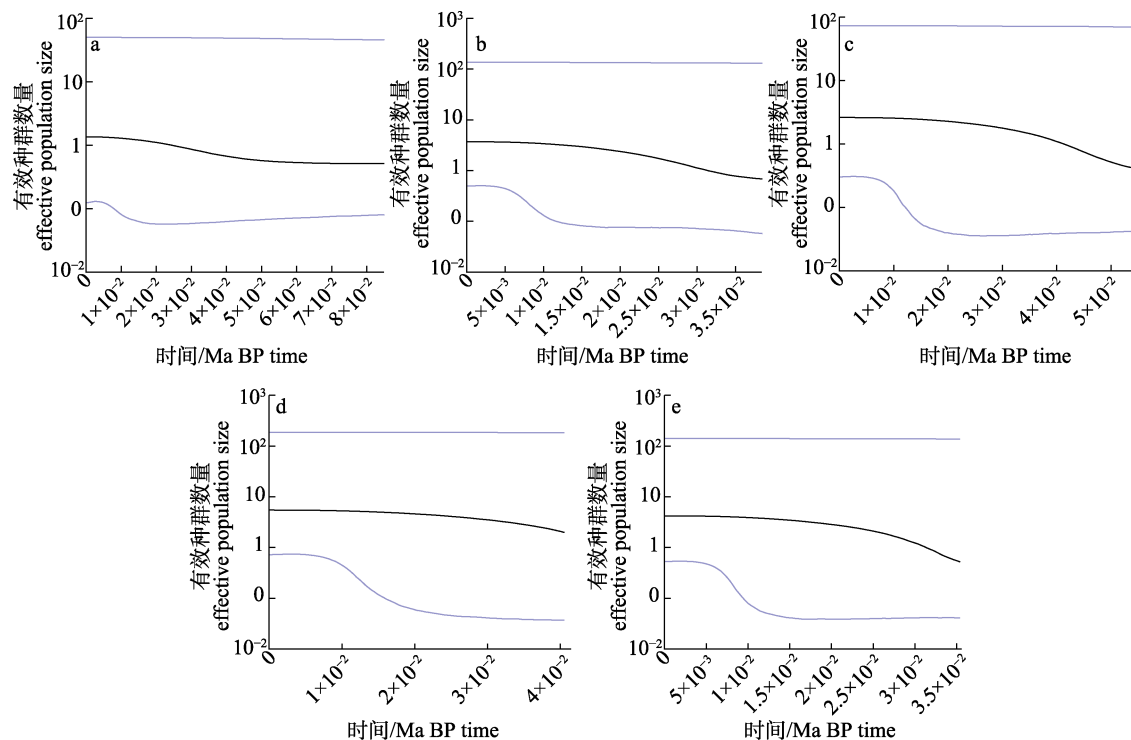


图 4 河南境内四水系日本沼虾群体贝叶斯天际线点图

a: 长江水系; b: 黄河水系; c: 淮河水系; d: 海河水系; e: 总体。黑线表示种群大小, 蓝色线包含区域表示 95% 置信区间。

Fig. 4 BSP (Bayesian skyline plots) of *Macrobrachium nipponense* populations from 4 river systems in Henan Province

a: Yangtze River; b: Yellow River; c: Huaihe River; d: Haihe River; e: total. The black line represents population size, and the blue line covering areas represent 95% confidence intervals.

3 讨论

3.1 河南境内日本沼虾的遗传多样性

遗传多样性是物种长期进化的产物, 可以反映生物群体发展进化的潜力大小以及对环境变化适应能力的强弱^[25]。作为遗传多样性的重要指标核苷酸多样性在一定程度上比单倍型多样性更能反映群体的遗传多样性^[26]。通过对河南境内 4 个水系 18 个地理群体日本沼虾 135 个样本的线粒体 COI 基因进行遗传多样性分析, 结果显示河南境内日本沼虾群体共包含 27 个单倍型, 其群体平均单倍型多样性($H_d=0.78574$)及核苷酸多样性($\pi=0.01059$)均低于我国五大湖($H_d=0.919$, $\pi=0.01253$)、长江和澜沧江日本沼虾群体($H_d=0.878$, $\pi=0.01744$)的平均值, 且整体而言, 河南境内日本沼虾群体表现出高 H_d 低 π 的特点, 这与其他日本沼虾群体的遗传多样性研究结果相一致^[8-9]。

日本沼虾 18 个群体 27 个单倍型中淮河水系 A04 群体、海河水系的 E14 及 G04 群体的单倍型多样性和核苷酸多样性均为最低($H_d=0.00000$, $\pi=0.00000$), 或因其生活环境为水库、人造湖、公园等半封闭式水体, 与外界基因交流相对较少; 长江水系 R20 群体($H_d=0.86667$, $\pi=0.01658$)、黄河水系 B07 群体($H_d=0.93333$, $\pi=0.01361$)及淮河水系 K08 群体($H_d=0.93333$, $\pi=0.01487$)的单倍型数和单倍型多样性均处在群体较高水平; 遗传多样性分析结果显示, 长江水系日本沼虾群体平均遗传多样性最高($H_d=0.74823$, $\pi=0.01149$), 表明长江水系日本沼虾群体目前还保持了比较高的遗传多样性, 这与 Yang 等^[9]和傅洪拓等^[27]的研究结果相一致, 黄河水系($H_d=0.64667$, $\pi=0.00663$)和海河水系($H_d=0.64827$, $\pi=0.00662$)次之, 淮河水系日本沼虾群体遗传多样性最低($H_d=0.60826$, $\pi=0.00617$), 这可能与该地域以日本沼虾作为重要经济水产品 and 食用产品而进行人工捕捞及开发利用有一定关系, 人为的干扰因素一定程度上导致了日本沼虾群体遗传多样性水平的衰退。

3.2 河南境内日本沼虾的遗传结构

对河南境内日本沼虾群体进行成对遗传距离和遗传分化指数计算, 结果显示, 淮河水系 A04 群体、海河水系的 E14 及 G04 群体组内遗传距离

为 0.000。但是该群体与其他群体之间组间遗传距离相对较大。此外黄河水系 C36 群体和其他群体也存在较大遗传分化, 推测可能由于生活环境较为封闭, 与外界基因交流存在一定阻隔, 导致日本沼虾遗传分化水平不高。 F_{ST} 值作为衡量群体遗传分化的重要指标显示, A04 群体为遗传分化最显著的群体, 达到高度遗传分化水平($F_{ST}>0.25$), 其次是 C36、E14、G04 群体, 其他各群体整体遗传分化水平不高。分子方差分析(AMOVA)结果表明, 日本沼虾的遗传变异主要来源于种群内, 群体内变异(66.03%)远大于群体间遗传变异(40.22%), 这与日本沼虾群体遗传分化系数 F_{ST} 相一致, 当群体内变异大于群体间变异时遗传分化系数 F_{ST} 则会呈现负值。

单倍型网络显示, 日本沼虾群体 27 个单倍型中 Hap1 和 Hap2 单倍型广泛分布于各个水系, 出现频率也较高, 分别为 57 次和 20 次, 说明该单倍型可能相对稳定且对外界环境的适应能力较强, 结果显示各单倍型在各个水系的分布亦无显著的地理和水系差别。河南境内日本沼虾群体 COI 基因的系统发育结果显示, 4 个水系日本沼虾群体呈交叉分布, 无显著水系分化。单倍型网络显示出与系统发育树相似的结果, 四大水系存在 7 个共享单倍型, 表明河南境内 4 个水系日本沼虾群体间存在一定的基因交流。据史料记载, 河南曾发生过黄河改道、水系变迁等地质事件, 且长江、黄河、淮河等流域均爆发过洪泛灾害。此外, 引黄济卫、南水北调等水系工程的建设 and 改造, 也加强了各大水系之间的沟通连接^[28-30]。因此, 河南境内不同水系日本沼虾种群可能因水系之间相互连通而存在一定基因交流, 从而未产生显著水系分化。此外, 作为重要经济物种, 人工养殖、引种驯化和人为因素等都会通过影响日本沼虾的生存环境、基因交流等方式间接影响到日本沼虾种群的遗传结构。

3.3 河南境内日本沼虾的种群历史动态

中性检测结果显示, 群体平均 F_u' F_s 值和 Tajima's D 值均为负值, 且 F_u' F_s 值达显著差异水平($P<0.05$); 错配分布显示错配分布图为多峰; BSP 分析结果显示日本沼虾群体整体上保持稳定

增加的趋势。综合以上 3 种方法分析, 结合其高单倍型多样性、低核苷酸多样性共存的特征, 推测河南境内日本沼虾种群整体相对比较稳定, 未经历过种群扩张。

综上所述, 作为广泛分布于我国各淡水水体、经济价值较高的淡水虾, 河南境内部分地区尤其是淮河水系日本沼虾群体的遗传多样性水平相对较低, 日本沼虾种质资源的保护有待进一步加强。物种演化在生物体长期的进化历程中受基因突变、自然选择等多种遗传因素影响, 此外地质变迁和气候波动等环境因素和人为因素对物种的遗传分化也会造成一定程度的影响^[31-33]。近年来人工养殖、过度捕捞、水环境污染及水利水坝工程的建设均对日本沼虾的生存环境造成了很大影响, 严重影响了日本沼虾的生存及演化。长江流域禁渔期制度及不断补充完善的禁捕措施的实施不仅为长江流域渔业资源的养护提供了保障, 更为河南省渔业资源的养护提供了参考。根据本研究结果, 建议除现有的两大国家级青虾保护区的设立外, 还应当进一步完善并加强日本沼虾种质资源的选育和生存环境的保护。

参考文献:

- [1] Liu R Y. *Palaemon* and *Macrobrachium*[J]. Bulletin of Biology, 1957(6): 14-23. [刘瑞玉. 长臂虾和沼虾[J]. 生物学通报, 1957(6): 14-23.]
- [2] Dong J, Li X Q. A study on biology of *Macrobrachium nipponense* at lake Dongping[J]. Modern Fisheries Information, 2010, 25(4): 7-9. [董俊, 李秀启. 东平湖日本沼虾的生物学研究[J]. 现代渔业信息, 2010, 25(4): 7-9.]
- [3] Feng J B, Li J L, Cheng X. Research progress on germplasm resources exploitation and protection of *Macrobrachium nipponense*[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2008, 17(3): 371-376. [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] Chen J, Song G T, He J X, et al. Genetic diversity analysis of *Macrobrachium nipponense* from 10 populations in Anhui province with microsatellite[J]. Freshwater Fisheries, 2018, 48(3): 7-12. [陈静, 宋光同, 何吉祥, 等. 安徽省 10 个日本沼虾群体遗传多样性微卫星分析[J]. 淡水渔业, 2018, 48(3): 7-12.]
- [5] Li J L, Nie S Z, Feng J B, et al. The comparison of growth and culture performance in cage for five stocks of Oriental river prawn from the midstream and downstream of Yangtze River[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2005, 14(3): 258-262. [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.]
- [6] Lv D, Fu H T, Qiao H, et al. Research progress on germplasm resource of *Macrobrachium nipponense*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(11): 97-102. [吕丁, 傅洪拓, 乔慧, 等. 青虾种质资源研究与保护进展[J]. 中国农学通报, 2012, 28(11): 97-102.]
- [7] Li X Z, Liu R Y, Liang X Q. The zoogeography of Chinese *Palaemonoidea fauna*[J]. Biodiversity Science, 2003, 11(5): 393-406. [李新正, 刘瑞玉, 梁象秋. 中国长臂虾总科的动物地理学特点[J]. 生物多样性, 2003, 11(5): 393-406.]
- [8] Feng J B, Sun Y N, Cheng X, et al. Sequence analysis of mitochondrial COI gene of *Macrobrachium nipponense* from the five largest freshwater lakes in China[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(4): 517-525. [冯建彬, 孙悦娜, 程熙, 等. 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.]
- [9] Yang P, Zhang H, Chen L Q, et al. 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. [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.]
- [10] Yang P, Chen L Q, Wang W, et al. ISSR Analysis of genetic diversity of *Macrobrachium nipponense*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(5): 913-921. [杨频, 陈立侨, 王伟, 等. 日本沼虾遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(5): 913-921.]
- [11] Ling L B. Studys on genetic diversity of different populations of *Macrobrachium nipponense*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2005. [凌立彬. 日本沼虾不同地方种群的遗传多样性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.]
- [12] Wang X, Zeng H L, Meng X L, et al. Genetic diversity of wild *Micropercops swinhonis* populations in Henan Province[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(1): 96-105. [汪曦, 曾会玲, 孟晓林, 等. 河南省小黄鲃鱼群体遗传多样性[J]. 中国水产科学, 2020, 27(1): 96-105.]
- [13] Liu H F, Zhang C, Wang J, et al. Genetic diversity of wild *Zacco platypus* populations among four river systems in Henan Province analyzed by mitochondrial COI gene[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(2): 269-277. [刘慧芬, 张超, 王静, 等. 河南境内四水系宽鳍鱮野生群体的遗传多样性[J]. 中国水产科学, 2018, 25(2): 269-277.]
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A

- Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1626.
- [15] Folmer O, Black M, Wr H, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, 3(5): 294-299.
- [16] Swindell S R, Plasterer T N. SEQMAN. Contig assembly[J]. Methods in Molecular Biology, 1997, 70(70): 75-89.
- [17] Tippiann H F. Analysis for free: Comparing programs for sequence analysis[J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(1): 82-87.
- [18] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [19] Sudhir K, Glen S, Koichiro T. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016(7): 1870.
- [20] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evolutionary Bioinformatics, 2005(1): 47-50.
- [21] Bandelt H J, Macaulay V, Richards M. Median Networks: speedy construction and greedy reduction, one simulation, and two case studies from human mtDNA[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2000, 16(1): 8-28.
- [22] Heled J, Drummond A J. Bayesian inference of species trees from multilocus data[J]. Molecular Biology and Evolution, 2010, 27(3): 570-580.
- [23] Knowlton N, Weigt L A. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 1998 265(1412): 2257-2263.
- [24] Rambaut A, Drummond A J. Tracer v1.5[Z]. 2007. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- [25] Ni S S, Yang Y, Liu S F, et al. Population-genetics analysis of the Japanese scallop *Patinopekten yessoensis* based on mitochondrial *Cyt b* gene[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(3): 432-439. [倪守胜, 杨钰, 柳淑芳, 等. 基于线粒体 *Cyt b* 基因的虾夷扇贝群体遗传结构分析[J]. 中国水产科学, 2017, 24(3): 432-439.]
- [26] Grant W, Bowen B. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. Journal of Heredity, 1998, 89: 415-426.
- [27] Fu H T, Qiao H, Li F J, et al. Genetic diversity of *Macrobrachium nipponense* on a regional scale in the Yangtze River[J]. Journal of Fisheries, 2010, 34(2): 204-211. [傅洪拓, 乔慧, 李法君, 等. 长江不同江段青虾的遗传多样性[J]. 水产学报, 2010, 34(2): 204-211.]
- [28] Chen Z Q. The deposition, breach and diversion in the lower Yellow River and their relationships with human activities during the historical period[J]. Progress in Geography, 2011, 20(1): 44-50. [陈志清. 历史时期黄河下游的淤积, 决口改道及其与人类活动的关系[J]. 地理科学进展, 2011, 20(1): 44-50.]
- [29] Niu Z X, Sun Z M. The relationship between the main river systems in the northern area of Henan Province and the influence by man's transformation[J]. Henan Sciences, 1985, 3(2): 106-115. [钮仲勋, 孙仲明. 历史时期豫北地区主要水系之间的关系及人类改造利用的影响[J]. 河南科学, 1985, 3(2): 106-115.]
- [30] Zhang Y Y, Li Z L, Liu X J. Evolution of interconnected river and lake networks in the Huai River Basin over the last millennium[J]. South-to-North Water Transfers and Water Science & Technology, 2016, 14(4): 77-83. [张永勇, 李宗礼, 刘晓洁. 近千年淮河流域河湖水系连通演变特征[J]. 南水北调与水利科技, 2016, 14(4): 77-83.]
- [31] Flanagan S P, Rose E, Jones A G. Population genomics reveals multiple drivers of population differentiation in a sex-role-reversed pipefish[J]. Molecular Ecology, 2016, 25(20): 5043-5072.
- [32] Günther T, Coop G. Robust identification of local adaptation from allele frequencies[J]. Genetics, 2013, 195(1): 205-220.
- [33] Yu D, Chen M, Tang Q Y, et al. Geological events and Pliocene climate fluctuations explain the phylogeographical pattern of the cold water fish *Rhynchocypris oxycephalus* (Cypriniformes: Cyprinidae) in China[J]. BMC Evolutionary Biology, 2014, 14: 225.

Genetic diversity of *Macrobrachium nipponense* in Henan Province assessed using mitochondrial COI gene

FENG Mengxia, TANG Yongtao, LIU Ruyao, YAN Xuemeng, HU Bo, NIE Guoxing, ZHOU Chuanjiang

College of Fisheries, Henan Normal University; Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation; Engineering Laboratory of Henan Province for Aquatic Animal Disease Control, Xinxiang 453007, China

Abstract: *Macrobrachium nipponense* is a freshwater prawn with high economic value. It is widely distributed in most freshwater water bodies and in all river systems of Henan Province. With the development of aquaculture, the change of ecological environment in the water area, and the influence of contrived factors, the germplasm resources of *M. nipponense* have also been gradually affected in recent years. To provide a reference for *M. nipponense* in Henan Province, we assess the germplasm resources and genetic diversity of *M. nipponense* in Henan Province. The mitochondrial COI gene was used as a marker to investigate population genetics of 135 *M. nipponense* samples from 18 populations in Henan Province. The samples covered four main water systems in Henan Province, including the Yangtze, Yellow, Huaihe, and Haihe Rivers. Results showed that the 18 populations of *M. nipponense* in Henan Province contained 27 haplotypes. The average haplotype diversity (H_d) and average nucleotide diversity (π) were 0.78574 and 0.01059, respectively. The Huaihe population had the lowest genetic diversity, and the Yangtze River population showed the highest genetic diversity. High H_d and low π were observed for the four rivers. AMOVA showed that major genetic variation (66.03%) occurred within the population, and 40.22% of the genetic variation existed among populations. There was no significant genetic differentiation for *M. nipponense* from the four water systems based on phylogenetic and haplotype network analyses. The demographic history analysis showed that *M. nipponense* of Henan province did not experience recent population expansion, maintaining a relatively stable population size. This study can provide basic guidance for protecting and reasonably utilizing the germplasm resource of *M. nipponense* in Henan Province, providing reference material for the whole of China.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; COI; genetic diversity; germplasm resource; Yangtze River; Yellow River; Huaihe River; Haihe River; Henan

Corresponding author: ZHOU Chuanjiang. E-mail: chuanjiang88@163.com