

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15273

增殖放流对日本囊对虾群体遗传多样性的影响评估

魏鸿擎^{1,2}, 张凤英¹, 蒋科技¹, 姜亚洲¹, 孟永永^{1,2}, 宋炜¹, 马春艳¹,
程家骅¹, 马凌波¹

1. 农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室, 中国水产科学研究院 东海水产研究所, 上海 200090;
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 为评估增殖放流对日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)群体遗传多样性的影响, 本研究分析了放流前捕捞渔获群体(FLQ)、放流后捕捞渔获群体(FLH)以及放流虾苗群体(FLXX)的遗传多样性水平。3 个群体共测定了 135 尾日本囊对虾的线粒体 D-loop 序列, 经比对分析确定测得的序列长度为 938 bp, 检测到 237 个变异位点, 177 个简约信息位点, 定义了 100 种单倍型。经分析, 核苷酸多样性指数由大到小依次为 FLQ、FLH、FLXX, 单倍型多样性指数大小为 FLQ=FLH>FLXX。AMOVA 分析表明 FLQ 和 FLH 群体的遗传分化系数(F_{st})值为 0.00629, 其小于 0.05, 表明变异主要来自于群体内, 且群体间无分化。FLH 与 FLXX 的 F_{st} 值为 0.08151($P<0.01$), 其大于 0.05, 表明遗传变异大多发生在群体内, 但群体间呈低度分化。Tajima's D 和 Fu's F_s 中性检验结果均为负值, 表明这 3 个群体偏离了中性模式, 可能受到群体扩张和自然选择的作用。综上所述, 增殖放流前后日本囊对虾群体均保持较高的遗传多样性水平, 变异不存在显著性差异, 且群体间无分化, 说明增殖放流是目前维持日本囊对虾种质资源量较为有效的措施之一。

关键词: 日本囊对虾; 线粒体 D-loop 区; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)03-0530-08

日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)隶属于甲壳纲(Crustacea), 十足目(Decapoda), 对虾科(Penaeidae), 囊对虾属(*Marsupenaeus*), 自然分布于日本沿海、中国东南沿海及东南亚沿海等海域^[1-2], 经济价值在对虾品种中位于榜首, 在中国水产养殖中具有重要地位。由于近年来的过度捕捞, 其资源不断衰退。渔业资源增殖放流是目前重要的保护手段之一^[3-6], 20 世纪 80 年代初, 中国开始对日本囊对虾实施增殖放流活动^[7-8], 但到目前为止, 学者们只是对物种的资源量和持续产量^[9]、放流苗种存活率、回捕率、渔获量^[10-11]、生长状况^[12]和生态风险^[13]进行了研究和评价, 还

未有从分子遗传学的角度对其放流前后的遗传多样性进行评价的研究。

在群体遗传结构分析中, 通常选择线粒体 DNA (mtDNA) 作为分子标记。线粒体基因具有母系遗传、进化速度快、基因结构相对简单、无组织特异性、无遗传重组等优点, 因此被广泛应用于动物的遗传多样性及系统进化研究。mtDNA 全序列或部分基因片段已广泛应用于物种进化和群体遗传结构分析中^[14-16]。本研究选用日本囊对虾的线粒体 DNA 控制区(D-loop)作为目标基因, D-loop 为线粒体非编码区序列, 进化速率比较大, 是线粒体全基因组中其他片段的 3~5 倍, 受到的

收稿日期: 2015-07-09; 修订日期: 2015-11-02.

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303047); 中央级公益性科研院所基本科研业务费资金专项(东 2012T05); 水产种质资源平台(2015DKA30470); 科技基础性工作专项(2013FY110700); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2013A11).

作者简介: 魏鸿擎(1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事水生生物遗传多样性研究. E-mail: whqtoday@126.com

通信作者: 马凌波, 研究员. E-mail: malingbo@vip.sina.com

进化压力小,在线粒体全基因组中多态性最高,这些特点使D-loop基因成为分析种群内遗传多样性和种群间遗传分化的优良标记^[17-21]。本研究初步对放流前野生群体、养殖群体及放流后群体的D-loop序列进行了测定和分析,首次探究了它们的遗传结构和遗传多样性,旨在规范日本囊对虾的增殖放流及对遗传育种做出科学的指导与评估,同时为日本囊对虾资源保护、现状评价和合理增殖放流提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集

本研究分为放流前样本、放流后样本和增殖放流虾苗样本共3个调查群体。调查作业网具为桁杆拖虾网,桁杆长度为7 m,囊网网目尺寸为13 mm,航速为1.8 km/h,每站拖曳0.5 h。共采集日本囊对虾样本135尾,放流前捕捞渔获群体(FLQ)50尾,于2014年6月下旬采集于苍南大渔湾(27°22'N, 120°36'E)和象山港水域(29°38'N, 121°51'E);放流后捕捞渔获群体(FLH)50尾,于2014年8月中旬采集于象山港同一水域;放流虾苗群体(FLXX)35尾,于2014年6月采集于舟山和乐清湾养殖基地,为东海海域捕捞亲本子一代(F_1)。取其肌肉,放在-80℃冰箱里保存备用。根据历年调查研究结果,对放流后对日本囊对虾渔获群体的体长频率变化趋势进行动态分析,得出放流个体无法在象山港完成整个生活史的相关结论^[10]。另外,郭靖等^[22]通过逐月调查发现,象山港日本囊对虾终年仅仅在象山港港湾底部分布,可排除其他日本囊对虾放流群体通过港湾中口部混入象山港野生种群的可能。于2014年7月上旬对浙江象山港海域进行增殖放流活动,当年10月上旬的调查显示增殖苗种资源量锐减^[10],次年采样基本是野生群体。本研究在6月份捕捞的渔获物基本都是野生群体;8月份捕捞渔获物为野生和增殖放流混合群体,根据日本囊对虾早期发育周期快的特点^[23-24],采用“世代”分析法区分野生群体和增殖放流群体^[25],为客观评价放流前后

遗传多样性水平,笔者又从鉴定的回捕群体中重新随机取样。

1.2 基因组DNA提取和mtDNA控制区片段扩增及序列测定

基因组DNA的提取采用TIANamp Marine Animals DNA Kit方法,对放流前渔获群体、放流后渔获群体和放流虾苗群体的日本囊对虾样本各自取约30 mg的肌肉组织,最后将洗涤沉淀得到的全基因组DNA溶解于100 μ L TE缓冲液中,经琼脂糖凝胶电泳检测基因组的完整性,并用分光光度法测定DNA的浓度和纯度,于-20℃保存。

根据GenBank中日本囊对虾线粒体全基因组序列(GenBank 登录号 AP006346.1),选择位于D-loop基因两端保守性较强的序列设计上下游引物,分别为D-loop F: 5'-GCCAGGATAAACTTT GCTAC-3'和D-loop R: 5'-AAGGAGATAATGAA GGTAAGGC-3',引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,进行PCR扩增。PCR反应体系为50 μ L,其中包括10 $\times$ PCR buffer (Mg^{2+}) 5.0 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 4.0 μ L, 10 μ mol/L上下游引物各2.0 μ L, 5 U/ μ L *Taq* DNA聚合酶0.5 μ L, 50 ng/ μ L DNA模板2 μ L,加双蒸水至总体积为50 μ L。在Eppendorf PCR仪上进行PCR扩增,反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,50℃退火30 s,72℃延伸1 min,共30个循环;循环结束后进行72℃延伸8 min。PCR产物用1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测,经成像系统拍照记录,选择条带清晰的PCR产物送至上海杰李生物技术有限公司进行双向测序,测序引物同为PCR扩增引物,测序后进行双向序列拼接。

1.3 数据分析

将测序所得的135个样本的D-loop序列用DNASTAR Inc软件拼接及人工校正后,将双向拼接的全序列在NCBI中进行BLASTn同源性分析确定为线粒体D-loop序列。然后用MEGA 5.1软件比对校正并分析序列特征,计算其变异位点、简约信息位点数、转换/颠换比值、碱基含量;并用MEGA 5.1中的Kimura双参数模型(Kimura-2-Parameter, K-2-P)分组计算群体间遗传距离及

群体内遗传距离,另外基于 K-2-P 群体间遗传距离用 Neighbor-joining 方法构建群体间遗传距离进化树。利用 DNAsp 5.1 计算样本单倍型数目、单倍型多样性、多态位点数、核苷酸多样性等。利用 Arlequin 3.1 软件中的 AMOVA 计算两两群体间的遗传分化指数和群体内及群体间的遗传变异分布及遗传分化系数 F_{st} 值,利用 1000 次重抽样分析来检验统计学显著性。采用 Tajima's D 法和 Fu's F_s 法进行中性检验计算其 D 值和 F_s 值。

2 结果与分析

2.1 基因序列特征

日本囊对虾所有个体的线粒体 D-loop 序列均可被稳定清晰地扩增,PCR 扩增产物经凝胶电泳,均显示为一明亮清晰的条带,大小为 1000 bp 左右,PCR 扩增产物经试剂盒纯化回收后测序。将测序所得到的序列通过 BLAST 比对,发现其与 GenBank 数据库中的日本囊对虾线粒体全基因组序列(GenBank 登录 AP006346.1)的线粒体控制区序列相似度很高,同源性为 90%以上,初步确认测得序列为日本囊对虾的 D-loop 区。经比对和校正最后用于群体数据分析的 D-loop 序列长为 938 bp。D-loop 基因序列中,变异位点 237 个,占总位点

数的 25.27%;其中简约性信息位点 177 个,单变异位点 60 个;转换和颠换比为 9.57,此数值说明这些被研究的群体满足系统发育分析序列未饱和变异的要求,其中转换位点中 38.32%为 A-G 之间的转换,35.39%为 C-T 之间的转换。序列平均碱基含量分别为 A(37.4%)、T(44.4%)、G(9.3%)、C(8.9%),A+T(81.8%)的含量明显高于 G+C(18.2%),表现出较强的碱基组成偏向性。

2.2 遗传多样性和单倍型分布

在放流前捕捞渔获群体(FLQ)、放流后捕捞渔获群体(FLH)以及放流虾苗(FLXX)共计 135 尾日本囊对虾样本中检测出 100 个(占所测样本的 74.1%)在这 3 个群体中均各自出现较多的独享单倍型。对日本囊对虾 3 个群体的遗传多样性分析表明(表 1),135 个样本的平均核苷酸多样性为 0.02421,单倍型多样性为 0.9956,整体来看单倍型多样性水平比较高。比较 3 个群体可知,FLQ 的核苷酸多样性(0.02480)和单倍型多样性(0.993)均高于 FLXX 的核苷酸多样性(0.02125)和单倍型多样性(0.960),同时略高于 FLH 的核苷酸多样性(0.02394),与 FLH 单倍型多样性(0.993)相同。结果说明,FLQ 的遗传多样性最高,FLH 次之,FLXX 的遗传多样性最低。

表 1 不同群体日本囊对虾的遗传多样性参数
Tab. 1 Genetic diversity of different populations of *Marsupenaeus japonicus*

群体 population	采样地点 site of sample	样本 数 N	单倍型数 number of haplotype	单倍型多样性 haplotype diversity($\bar{x} \pm SD$)	多态位点数 number of polymorphic sites	核苷酸多样性 nucleotide diversity
放流前捕捞渔 获群体(FLQ)	苍南大渔湾	20	16	0.979±0.021	114	0.02473
	象山港	30	26	0.991±0.011	138	0.02464
	合计 sum	50	42	0.993±0.005	175	0.02480
放流后捕捞渔 获群体(FLH)	象山港	50	42	0.993±0.005	161	0.02394
	合计 sum	50	42	0.993±0.005	161	0.02394
放流虾苗群体 (FLXX)	舟山养殖场	20	11	0.947±0.025	83	0.02494
	乐清湾养殖场	15	5	0.857±0.039	38	0.01627
	合计 sum	35	16	0.960±0.012	94	0.02125
总合计 total		135	100	0.996±0.001	237	0.02421

2.3 遗传结构

通过 MEGA 5.1 软件基于 Kimura 双参数模型计算群体间及群体内的遗传距离(表 2)。结果显示,FLQ、FLH 和 FLXX 群体内遗传距离分别为 0.02598、0.02216 和 0.02504;FLXX 与 FLQ 群体

间遗传距离最大,为 0.02582;FLXX 与 FLH 群体间遗传距离最小,为 0.02524;放流前捕捞渔获群体与放流后捕捞渔获群体间遗传距离为 0.02567。用 Arlequin 3.11 软件分析两两群体间的遗传分化指数见表 2。结果显示,FLQ 与 FLH 群体间有较

低的遗传分化指数(0.00633), 而 FLXX 与 FLQ 及 FLH 群体间有相对较高的遗传分化系数, 分别为 0.06480 和 0.06195, 数值均大于 0.05, 说明 FLXX 与 FLQ、FLH 群体间均存在一定程度的分化。另外, 基于 K-2-P 群体间的遗传距离用 Neighbor-joining 方法构建的群体间遗传距离进化树如图 1 所示, FLXX 与 FLH 群体为姊妹群, 然后与 FLQ 群体聚为一支。

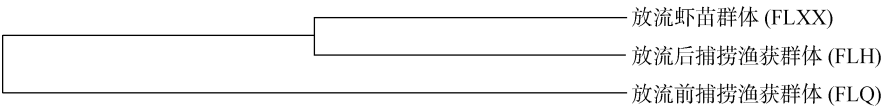


图 1 基于 K-2-P 群体间遗传距离构建的 3 个日本囊对虾群体的 N-J 树
Fig. 1 N-J tree of 3 *Marsupenaesus japonicus* populations constructed based on K-2-P genetic distance

AMOVA 分子方差分析结果显示(表 3, 表 4)。FLQ 与 FLH 群体的分析显示, 群体间遗传变异占 0.63%, 群体内遗传变异占 99.37%, F_{st} 值为 0.00629, 其小于 0.05, 表明变异主要来自于群体

表 2 3 个日本囊对虾群体内遗传距离(对角线)及两两群体间遗传距离(对角线上)和遗传分化系数(F_{st})(对角线下)
Tab. 2 Pairwise genetic distances within population (diagonal), and genetic distance (above diagonal), fixation index (F_{st}) (below diagonal) among 3 populations of *Marsupenaesus japonicus*

群体 population	FLQ	FLH	FLXX
FLQ	0.02598	0.02567	0.02582
FLH	0.00633	0.02216	0.02524
FLXX	0.06480	0.06195	0.02504

内, 且群体间无分化。FLXX 与 FLH 群体的 F_{st} 值为 0.08151 ($P<0.01$), 群体间遗传变异占总变异的 8.15%, 群体内遗传变异占总变异的 91.85%, 表明遗传变异大多发生在群体内, 但群体间呈低度分化。

表 3 日本囊对虾放流前捕捞渔获和放流后捕捞渔获群体遗传差异的 AMOVA 分析
Tab. 3 Analysis of molecular variance (AMOVA) between before-releasing and after-releasing populations of *Marsupenaesus japonicus*

变异来源 source of variation	自由度 degree of freedom	平方和 sum of squares	方差组分 variance component	变异百分比/% percentage of variance	固定指数 fixation index	P
群体间 among populations	1	15.525	0.07464	0.63	0.00629	0.09580
群体内 within populations	98	1155.683	11.79268	99.37		
总变异 total variance	99	1171.207	11.86732			

表 4 日本囊对虾放流虾苗和放流后捕捞渔获群体遗传差异的 AMOVA 分析
Tab. 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) between releasing postlarvae and after-releasing populations of *Marsupenaesus japonicus*

变异来源 source of variation	自由度 degree of freedom	平方和 sum of squares	方差组分 variance component	变异百分比/% percentage of variance	固定指数 fixation index	P
群体间 among populations	1	52.271	0.93823	8.15	0.08151	0.00206
群体内 within populations	88	930.340	10.57205	91.85		
总变异 total variance	89	982.611	11.51207			

2.4 中性检验

依据中性检验的理论模型, 采用 Tajima's D 检验和 Fu's F_s 检验方法对 3 个群体的线粒体控制区 DNA 多样性信息进行中性检验(表 5), 这 3 个群体的 Tajima's D 和 Fu's F_s 均为负值, 表明群体偏离了中性模式, 可能受到群体扩张和自然选择的作用。FLQ 和 FLH 群体的 Tajima's D 和 Fu's F_s 值均达到显著性差异($P<0.05$), FLXX 群体的 Tajima's D 和 Fu's

F_s 值均未达到统计学上的显著差异($P>0.05$)。

表 5 日本囊对虾线粒体 D-loop 区的中性检验
Tab. 5 Neutrality tests of mitochondrial D-loop gene of *Marsupenaesus japonicus*

群体 population	Tajima's D	Fu's F_s
FLQ	-1.45692*	-1.96195*
FLH	-1.34963*	-1.50737*
FLXX	-0.47264	-0.40377

注: *表示差异显著($P<0.05$).
Note: * denotes significant difference ($P<0.05$).

3 讨论

遗传多样性是生物多样性的核心基础,其多样性水平的高低对物种的环境适应力、进化潜能和生存能力至关重要^[26-28],遗传多样性的丰富程度越大,生物对环境的适应能力越好,同样,进化潜能和生存能力也相对较强。相反,遗传多样性的下降会导致物种对环境的适应力下降。一般认为,人工养殖对群体的自然特征、遗传多样性等会造成一些不可避免的抑制和缺失影响,使得养殖群体的遗传多样性小于天然野生群体^[29-31],增殖放流的初衷是出于对种质资源的保护和生态平衡的维护及修复,可以借助分子技术对其放流效果进行评估,以作出科学的增殖放流规划。

象山港地处浙江省中部沿海,早在 20 世纪 90 年代就有学者对其良好的港域生态环境和丰富的饵料生物等做了调查研究,而且作为一个狭长型半封闭港湾,象山港更是渔业生物良好的产卵、育幼场所^[32],是增殖放流研究中一个较为理想的水域。在本研究中,针对象山港增殖放流活动,笔者运用 D-loop 基因对日本囊对虾的放流前捕捞渔获、放流后捕捞渔获以及放流虾苗群体进行遗传多样性分析。结果与预期相同,放流前捕捞渔获群体的遗传多样性最为丰富,放流虾苗群体的遗传多样性最低,而放流后捕捞渔获群体的遗传多样性介于放流虾苗与放流前捕捞渔获群体之间。另外,群体间遗传距离的进化树显示,放流虾苗与放流后捕捞渔获群体为姊妹群,然后与放流前捕捞渔获群体聚为一支,推测这是由于日本囊对虾增殖放流资源量远远大于自然资源量^[10],以至于随机回捕的样品中增殖放流个体所占比例较大所致。因此,采用 D-loop 作为分子标记来评估日本囊对虾放流前后遗传多样性是可行的。基于对线粒体 D-loop 区的分析,日本囊对虾的核苷酸多样性与其他甲壳类动物,如三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)(核苷酸多样性 0.0212~0.0236)^[33]和中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)(核苷酸多样性 0.0106)^[34]的遗传多样性相比,放流前后捕捞渔获群体均具有较为丰富的遗传多样性,这

说明增殖放流对日本囊对虾没有产生不良影响,确保了遗传多样性的丰富度,较好地维护了日本囊对虾种质资源和生态平衡。

群体遗传分化系数 F_{st} 是利用遗传信息反映群体之间遗传分化的指标,数值越大表明两群体间的遗传分化水平越高。当 $F_{st} < 0.05$ 时,说明群体间无分化;当 $0.05 < F_{st} < 0.15$ 时,说明群体间呈低度分化;当 $F_{st} > 0.15$ 时,说明群体间呈高度分化^[35]。在本研究中,两两群体间存在一定程度的分化,放流虾苗群体与放流前捕捞渔获群体间分化程度最高,可能在养殖过程中导致了放流虾苗的遗传多样性水平降低,并出现种群间遗传分化的现象,提示应引入更多的野生群体作为育种亲本,以避免遗传多样性的瓶颈效应、近亲杂交等带来的不利影响,提高养殖群体的遗传多样性,防止与自然群体更大程度的分化。同时,放流前捕捞渔获群体与放流后捕捞渔获群体的遗传分化指数小于 0.05 (0.00633),分化主要来自于群体内变异,但不存在显著性差异($P > 0.05$)。这提示增殖放流在保证日本囊对虾资源量的前提下,很好地维持了野生日本囊对虾的遗传多样性和遗传结构,但需要对每年进行的增殖放流策略进行长期的追踪分析,及时做出科学的放流规划。因此需要注意,在选择投放苗种时应选取野生日本囊对虾杂交后代,避免造成对野生水系日本囊对虾遗传结构的破坏,有必要长期对日本囊对虾群体遗传多样性进行监测以便维持自然种群的遗传结构。

为了分析种群间或种群内部在分子水平上是否存在群体扩张和自然选择作用,本研究选取常用的 Tajima's D 检验和 Fu's F_s 检验方法^[36-37],结果显示,放流前捕捞渔获、放流后捕捞渔获及放流虾苗群体的 Tajima's D 和 Fu's F_s 均为负值,表明群体偏离了中性模式,可能受到群体扩张和自然选择的作用。同时结合单倍型检测结果,在这 3 个群体的 135 尾日本囊对虾样本中检测出 100 个单倍型,在放流前捕捞渔获、放流后捕捞渔获及放流虾苗群体中均各自出现较多的独享单倍型,这可能与 D-loop 变异较大有关,也可能与群体扩张和自然选择有一定的关系,使得单倍型多样性

在不同群体间出现较大的差异。

综上所述,日本囊对虾资源在增殖放流政策的实施下,其遗传多样性得到了有效的保护,体现在放流后群体保持较高的遗传多样性水平,但若长远地维持日本囊对虾种质资源和生态平衡,还需要对其遗传多样性进行持续检测,规范放流并制定科学的操作规程;此外,放流苗种的亲虾应坚持选择遗传多样性较高的野生日本囊对虾,以降低放流对自然群体遗传多样性的影响。当然,由于样本的随机采集和有限的样本数量,可能难免造成结果差异,因此,需要进一步利用如 AFLP、SSR 和 RAPD 等分子标记技术更加详细系统的分析,为日本囊对虾的科学养殖和资源保护提供有力的理论依据。

参考文献:

- [1] Liu R Y, Zhong Z R. Hainan Penaeid Prawns[M]. Beijing: Agricultural Press, 1988: 184–187. [刘瑞玉, 钟振如. 海南对虾类[M]. 北京: 农业出版社, 1988: 184–187.]
- [2] Li Y L. Genetic diversity of *Fenneropenaeus chinensis* and *Marsupenaeus japonicus* and molecular phylogeny of penaeidae[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009: 56–71. [李玉龙. 中国明对虾和日本囊对虾遗传多样性及对虾科系统学初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009: 56–71.]
- [3] Grimes C B. Marine stock enhancement: sound management or techno-arrogance[J]. Fisheries, 1998, 23(9): 18–23.
- [4] Bell J D, Leber K M, Blankenship H L, et al. A new era for restocking, stock enhancement and sea ranching of coastal fisheries resources[J]. Rev Fish Sci, 2008, 16(1–3): 1–9.
- [5] Lorenzen K, Leber K M, Blankenship H L. Responsible approach to marine stock enhancement: an update[J]. Rev Fish Sci, 2010, 18(2): 189–210.
- [6] Bartley D M, Bell J D. Restocking, stock enhancement and sea ranching: arenas of progress[J]. Rev Fish Sci, 2008, 16(1–3): 357–365.
- [7] Wu Q S. Discussion on large shrimp populations resource restoration and protection in South China Sea[J]. Fisheries Science & Technology, 2010, (1): 25–28. [吴琴瑟. 南海大型对虾种群资源修复与保护的探讨[J]. 水产科技, 2010, (1): 25–28.]
- [8] Deng J Y. Studies on the enhancement and release of shrimp[J]. Marine Fisheries, 1997, 19(1): 1–6. [邓景耀. 对虾放流增殖的研究[J]. 海洋渔业, 1997, 19(1): 1–6.]
- [9] Lu Z H, Xue L J, Zhang Y Z, et al. Assessment of shrimp stock biomass in continental shelf waters of the East China Sea[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(5): 855–862. [卢占晖, 薛利建, 张亚洲, 等. 东海大陆架虾类资源量评估[J]. 水生生物学报, 2013, 37(5): 855–862.]
- [10] Jiang Y Z, Ling J Z, Li S F, et al. Stocking effectiveness of hatchery-released kuruma prawn *Penaeus japonicus* in the Xiangshan Bay, China[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(9): 2651–2658. [姜亚洲, 凌建忠, 李圣法, 等. 象山港日本对虾增殖放流的效果评价[J]. 生态学报, 2012, 32(9): 2651–2658.]
- [11] Li Z Y, Jin X S, Wu Q, et al. Studies on the *Fenneropenaeus chinensis* released in the Aoshan Bay[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(3): 410–416. [李忠义, 金显仕, 吴强, 等. 鳌山湾增殖放流中国明对虾的研究[J]. 水产学报, 2014, 38(3): 410–416.]
- [12] Zhang B, Jin X S, Xie Z Q, et al. Enhancement and release of Chinese shrimp in Laizhou Bay[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(3): 361–370. [张波, 金显仕, 谢周全, 等. 莱州湾中国明对虾增殖放流策略研究[J]. 中国水产科学, 2015, 22(3): 361–370.]
- [13] Jiang Y Z, Lin N, Cheng J H, et al. The ecological risk of stock enhancement and the measures for pre-vention and control[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(2): 413–422. [姜亚洲, 林楠, 程家骅, 等. 渔业资源增殖放流的生态风险及其防控措施[J]. 中国水产科学, 2014, 21(2): 413–422.]
- [14] Gyensten U, Wharton D, Josesson A. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice[J]. Nature, 1991, 352(6332): 255–257.
- [15] Cano R, Brown W M, Wilson A C. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondria DNA[J]. Genetics, 1984, 106: 479–499.
- [16] Avise J C, Amod J, Ba R M, et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics[J]. Annu Rev Ecol Syst, 1987, 18: 489–522.
- [17] Ishiguro N, Miya M, Nishida M. Complete mitochondrial DNA sequence of ayu *Plecoglossus altivelis*[J]. Fish Sci, 2001, 67(3): 474–481.
- [18] Xiao W H, Zhang Y P. Genetics and evolution of mitochondrial DNA in fish[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2000, 24(4): 384–391. [肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化[J]. 水生生物学报, 2000, 24(4): 384–391.]
- [19] Yang K, Ma C Y, Ma L B, et al. PCR-RFLP analysis of imported and cultured stocks of *Litopenaeus vannamei*[J]. Marine Fisheries, 2010, 32(1): 16–23. [杨柯, 马春艳, 马凌

- 波, 等. 凡纳滨对虾引进群体和养殖群体的 PCR-RFLP 分析[J]. 海洋渔业, 2010, 32(1): 16–23.]
- [20] Nagata J, Masuda R, Tamate H B, et al. Two genetically distinct lineages of the sika deer, *Cervus nippon*, in Japanese islands: comparison of mitochondrial D-loop region sequences[J]. Mol Phylogenet Evol, 1999, 13: 511–519.
- [21] 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.
- [22] Guo J, Jiang Y Z, Lin N, et al. Spatio-temporal patterns in shrimp assemblage structure in the Xiangshan Bay[J]. Marine Fisheries, 2013, 35(2): 143–151. [郭靖, 姜亚洲, 林楠, 等. 象山港水域虾类群聚结构特征[J]. 海洋渔业, 2013, 35(2): 143–151.]
- [23] Liang Y F, Lin Y, Geng H W, et al. The growth characteristics of *Penaeus japonicus* released in Fuzhou Bay[J]. Fish Sci, 1999, 18(4): 21–24.
- [24] Su Z M, Wang K X, Zhang C Y, et al. Growth of *Penaeus japonicus* transplanted into the Yellow Sea[J]. Journal of Fisheries of China, 1996, 20 (1): 25–30. [苏振明, 王克行, 张存义, 等. 黄海增殖日本对虾的生长特性[J]. 水产学报, 1996, 20(1): 25–30.]
- [25] Song H T, Yu C G, Xue L J, et al. Commercial Crab and Shrimp of East China Sea[M]. Beijing: China Ocean Press, 2006: 32–34. [宋海棠, 俞存根, 薛利建, 等. 东海经济虾蟹类[M]. 北京: 海洋出版社, 2006: 32–34.]
- [26] Chen X, Yang S Y, Pan C. Genetic polymorphism of mitochondrial control region in *Chiloscyllium plagiosum* from coastal waters of southern China[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2008, 30(6): 115–121. [陈骁, 杨圣云, 潘聪. 我国南部海域条纹斑竹鲨线粒体 DNA 控制区遗传多态性研究[J]. 海洋学报, 2008, 30(6): 115–121.]
- [27] Allendorf F W, Leary R F. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals[M]//Soule M E. Conservation Biology: the Science of Scarcity and Diversity. Sunderland: Sinauer Associates, 1986: 57–76.
- [28] Chamber S M. Genetic principles for managers[M]//Schonewald-cox C M, Chamber S M, MacBryde B, et al. Genetics and Conservation. Menlo Park: BenJamin/Cummings, 1983: 40–46.
- [29] Song L S, Xiang J H, Li C X, et al. Study of population genetic structure in *Penaeus japonicas* with RAPD markers[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1999, 30(3): 261–266. [宋林生, 相建海, 李晨曦, 等. 日本对虾野生种群和养殖种群遗传结构的 RAPD 标记研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 261–266.]
- [30] Liu S P, Qiu S L, Chen D Q, et al. Protection and rational utilization of the germplasm resources of the four major Chinese carps in the Yangtze River system[J]. Resources and Environment in the Yangtze Valley, 1997, 6(2): 127–131. [刘绍平, 邱顺林, 陈大庆, 等. 长江水系四大家鱼种质资源的保护和合理利用[J]. 长江流域资源与环境, 1997, 6(2): 127–131.]
- [31] Liu Q, Liu H, Wu X Y, et al. Genetic variation of wild and cultured populations of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* from the Yangtze, Huanghe, and Liaohe River Basins using microsatellite marker[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(4): 958–968. [刘青, 刘皓, 吴旭干, 等. 长江、黄河和辽河水系中华绒螯蟹野生和养殖群体遗传变异的微卫星分析[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(4): 958–968.]
- [32] Liu Z L, Ning X R, Cai Y M, et al. Phytoplankton's standing crop and primary productivity in shrimp restocking area in the Xiangshan Bay, China[J]. Acta Oceanologica Sinica, 1997, 19(6): 109–115. [刘子琳, 宁修仁, 蔡昱明, 等. 象山港对虾增殖放流区浮游植物现存量 and 初级生产力[J]. 海洋学报, 1997, 19(6): 109–115.]
- [33] Yang S, Song N, Zhang X M, et al. Genetic diversity of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) from four brood-stock populations in stock enhancement inferred from mitochondrial control region[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(8): 1089–1096. [杨爽, 宋娜, 张秀梅, 等. 基于线粒体控制区序列的三疣梭子蟹增殖放流亲蟹遗传多样性研究[J]. 水产学报, 2014, 38(8): 1089–1096.]
- [34] Zhang H, Gao T X, Zhuang Z M, et al. Comparative analysis of the mitochondrial control region between the cultured and wild populations of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(8): 1149–1155. [张辉, 高天翔, 庄志猛, 等. 中国对虾养殖群体与野生群体线粒体控制区序列的比较[J]. 水产学报, 2010, 34(8): 1149–1155.]
- [35] Hamada H, Pitirino M, Kakunaga T. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79: 6466–6469.
- [36] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. Genetics, 1989, 123(3): 585–595.
- [37] Fu Y X, Li W X. Statistical tests of neutrality of mutations[J]. Genetics, 1993, 133(3): 693–709.

Genetic diversity analysis of *Marsupenaeus japonicus* population for reproduction and release

WEI Hongqing^{1,2}, ZHANG Fengying¹, JIANG Keji¹, JIANG Yazhou¹, MENG Yongyong^{1,2}, SONG Wei¹, MA Chunyan¹, CHENG Jiahua¹, MA Lingbo¹

1. Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture; East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
2. College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: *Marsupenaeus japonicus*, the most valuable prawn species, plays an important role in aquaculture in China, so protective measures must be taken to ensure its normal reproduction. In this study, we measured the genetic diversity and genetic structure of 135 individuals collected from a before-release population (FLQ), an after-release population (FLH), and hatchery postlarvae population (FLXX) by sequencing the 938 bp mitochondrial D-loop. D-loop is a non-coding sequence which locates in the noncoding region of the mitochondrial genome. Overall, we detected 237 variable sites, 177 parsimony-informative sites, and 100 haplotypes. The nucleotide diversity index (0.02480) and haplotype diversity index (0.993) of the before-release population were higher than the nucleotide diversity (0.02125) and haplotype diversity (0.960) of the hatchery postlarvae, and slightly lower than the nucleotide diversity index (0.02394) and haplotype diversity index (0.993) of the after-release population. The genetic distances within population of the three groups were 0.02598, 0.02504, and 0.02216, respectively. The genetic distance between the released postlarval and before-release populations was 0.02582; that between the released postlarval and after-release populations was 0.2524; and that between the before-release and after-release populations was 0.02567. Analysis of molecular variance showed that F_{st} for the before-release population and after-release population was 0.00629 ($P>0.05$), so that most variation was within each population, although the finding was not significant. Between the hatchery postlarvae and the after-release population, $F_{st} = 0.08151$ ($P<0.01$), so the genetic variation coefficient between groups was 8.15% and the genetic variation within the populations accounted for 91.85%, indicating that most genetic variation occurred within the populations, and the genetic differentiation among the populations was low. In neutrality tests, the values of Tajima's D and Fu's F_s were negative, with deviations from the neutral mode, indicating that *M. japonicus* has been subject to population expansion and natural selection. In summary, proliferation activity not only maintains resources, but also the genetic structure of a population, which ensures that the after-release population retains a high level of genetic diversity.

Key words: *Marsupenaeus japonicus*; mitochondrial D-loop; genetic diversity; genetic structure

Corresponding author: MA Lingbo. E-mail: malingbo@vip.sina.com