

## 太湖日本沼虾野生群体遗传结构的微卫星分析\*

冯建彬<sup>1</sup> 吴春林<sup>1</sup> 马克异<sup>1</sup> 丁怀宇<sup>2</sup> 华雪铭<sup>1</sup> 李家乐<sup>1,3\*\*</sup><sup>(1)</sup>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; <sup>(2)</sup>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; <sup>(3)</sup>上海高校水产养殖学 E-研究院,上海 201306)

**摘要** 利用 8 个高度多态性的微卫星位点分析了太湖日本沼虾野生群体的遗传结构。结果表明:在 15 个群体中至少有 3 个位点经 Bonferroni 校正后显示杂合不足,显著偏离了 Hardy-Weinberg 平衡;15 个群体中观测杂合度均大于 0.683,显示出较高的遗传多样性水平,但其波动明显,如太湖东、南部的渡口和陆巷等群体的遗传多样性高于西、北部的华庄和洋渚等群体;突变-漂移平衡分析结果显示,15 个群体中部分位点杂合显著过剩,偏离了突变-漂移平衡,且近期曾经历过瓶颈效应,群体数量曾经下降;群体间 AMOVA 分析表明,太湖日本沼虾群体间遗传分化程度较低( $F_{ST}=0.011$ ),98.9% 的遗传变异来自群体内,1.1% 来自群体间,并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;华庄与吴塘门群体间  $D_A$  遗传距离达到 0.206,已接近种间分类界限,故太湖日本沼虾种质资源可持续利用工作仍须深入的研究。

**关键词** 日本沼虾 太湖 微卫星 遗传结构**文章编号** 1001-9332(2011)06-1606-09 **中图分类号** Q346.5; S917.4 **文献标识码** A

**Genetic structure of wild *Macrobrachium nipponense* populations in Taihu Lake based on microsatellite analysis.** FENG Jian-bin<sup>1</sup>, WU Chun-lin<sup>1</sup>, MA Ke-yi<sup>1</sup>, DING Huai-yu<sup>2</sup>, HUA Xue-ming<sup>1</sup>, LI Jia-le<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>Ministry of Education Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; <sup>2</sup>Jiangsu Province Key Laboratory for Eco-Agricultural Biotechnology around Hongze Lake, Huai'an 223300, Jiangsu, China; <sup>3</sup>Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai 201306, China). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2011, 22(6): 1606-1614.

**Abstract:** By using eight highly polymorphic microsatellite DNA loci, this paper analyzed the genetic structure of wild *Macrobrachium nipponense* populations in Taihu Lake. For the 15 *M. nipponense* populations in the Lake, there were at least three of the loci presenting heterozygosity deficiency and obvious deviation from Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction. The observed heterozygosity values of the 15 populations were all above 0.683, displaying a high genetic diversity, but the diversity varied obviously with site. For example, the genetic diversity of the eastern and southern populations at Dukou and Luxiang was higher than that of the western and northern populations at Huazhuang and Yangzhu. For the 15 populations, parts of the loci showed heterozygote excess and departure 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 and loci showed that the genetic divergence among the 15 populations was at a lower level ( $F_{ST}=0.011$ ). 98.9% of the genetic variation came from intra-population, and 1.1% came from inter-population, suggesting that all the *M. nipponense* populations in the Lake could be protected and managed as a single unit in genetic resource. However, the genetic distance between Huazhuang and Wutangmen populations reached 0.206, being close to the delimitation of species identification. Further studies would be needed for the sustainable utilization of the genetic resource of *M. nipponense* in Taihu Lake.

**Key words:** *Macrobrachium nipponense*; Taihu Lake; microsatellite; genetic structure.

\* 国家自然科学基金项目(31001111)、上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金项目(SSC08004)、上海市科委重点科技攻关计划项目(073205111)和江苏省苏北科技发展计划项目(BN2009036)资助。

\*\* 通讯作者. E-mail: jlli2009@126.com

2010-11-10 收稿, 2011-03-28 接受。

日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 俗称青虾、河虾,是我国分布范围较广的重要淡水经济虾类<sup>[1-2]</sup>. 日本沼虾是我国第三大淡水湖泊——太湖水域的重要虾类之一,在 20 世纪 80 年代初太湖日本沼虾产量占渔产量的 4%~5%<sup>[3]</sup>,占虾类产量的 28.7%<sup>[4]</sup>,但近些年太湖水域生境的频繁变化、不合理的捕捞方式和过高的捕捞强度使日本沼虾野生资源略有下降,虾类捕捞产量占渔获物总量的比例已由 1952 年的 15.1% 下降至 2003 年的 2.2%<sup>[5]</sup>. 目前太湖流域已成为我国日本沼虾的主要养殖区之一,充分了解太湖日本沼虾野生群体遗传结构,对太湖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.

微卫星标记具有多态性高、共显性等优点,已广泛应用于群体遗传学、种质鉴定及 QTL 定位等研究领域<sup>[6-9]</sup>. 目前,主要采用线粒体 COI<sup>[10-11]</sup> 和 16S rRNA<sup>[12]</sup> 序列片段变异分析了长江、澜沧江、五大淡水湖泊日本沼虾野生群体的遗传多样性和系统进化,采用 RAPD<sup>[13-16]</sup> 方法分析了长江、龙感湖、高邮湖等水域日本沼虾野生群体的遗传多样性,以及采用微卫星标记对洪泽湖<sup>[17]</sup>、长江中下游<sup>[18]</sup> 群体进行遗传多样性分析. 有关太湖日本沼虾种质资源研究仅见采用 RAPD 标记分析了太湖 1~4 个野生群体的遗传多样性<sup>[14-15]</sup>. 由于太湖是一个大型浅水湖泊,湖荡及岛屿较多,因而仅对太湖日本沼虾少数几个群体的遗传多样性进行研究,并不能全面详尽地诠释其遗传结构. 本研究在太湖湖区周边、湖汊及岛屿附近等不同类型的水域采集了日本沼虾的 15

个野生群体,采用微卫星标记全面深入地探讨太湖日本沼虾群体遗传结构及遗传多样性,以期为其种质资源保护和利用及良种选育提供科学理论参考.

## 1 材料与方法

### 1.1 样本来源及 DNA 提取

2009 年 8 月下旬,在太湖湖区周边及湖汊、湖中岛屿附近水域(图 1、表 1)用虾笼随机采集 15 个野生群体日本沼虾各 60 尾,无水乙醇固定后带回实验室,苯酚-氯仿法<sup>[19]</sup> 提取腹部第四、五腹节肌肉组织基因组 DNA,TE (pH 8.0) 溶解后测定浓度和纯度,-20 °C 保存备用.

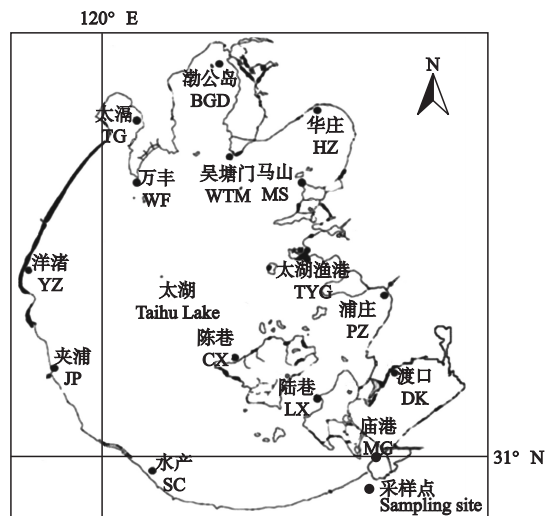


图 1 太湖日本沼虾野生群体采样点

Fig. 1 Sampling localities of *Macrobrachium nipponense* in Taihu Lake.

表 1 日本沼虾样本采集位置及数目

Table 1 Sample sites and number of *Macrobrachium nipponense* in Taihu Lake

群体 Population	采集地 Sampled site	样本数 Sample number
庙港 Miaogang (MG)	吴江市七都镇庙港村 Miaogang Village, Qidu Town, Wujiang City	60
渡口 Dukou (DK)	苏州市吴中区临湖镇渡口村 Dukou Village, Linhu Town, Wuzhong District, Suzhou City	60
陆巷 Luxiang (LX)	苏州市吴中区东山镇陆巷村 Luxiang Village, Dongshan Town, Wuzhong District, Suzhou City	60
浦庄 Puzhuang (PZ)	苏州市吴中区胥口镇浦庄村 Puzhuang Village, Xukou Town, Wuzhong District, Suzhou City	60
陈巷 Chenxiang (CX)	苏州市吴中区西山镇陈巷村 Chenxiang Village, Xishan Town, Wuzhong District, Suzhou City	60
太湖渔港 Taihuyugang (TYG)	苏州市吴中区光福镇太湖渔港村 Taihuyugang Village, Guangfu Town, Wuzhong District, Suzhou City	60
马山 Mashan (MS)	苏州市吴中区镇湖镇马山村 Mashan Village, Zhenhu Town, Wuzhong District, Suzhou City	60
华庄 Huazhuang (HZ)	无锡市滨湖区华庄街道 Huazhuang Village, Binhu District, Wuxi City	60
吴塘门 Wutangmen (WTM)	无锡市滨湖区吴塘门村 Wutangmen Village, Binhu District, Wuxi City	60
渤公岛 Bogongdao (BGD)	无锡市滨湖区渤公岛 Bogong Island, Binhu District, Wuxi City	60
万丰 Wanfeng (WF)	无锡市滨湖区马山镇万丰村 Wanfeng Village, Mashan Town, Binhu District, Wuxi City	60
太滆 Taige (TG)	常州市武进区雪堰镇太滆村 Taige Village, Xueyan Town, Wujin District, Changzhou City	60
洋渚 Yangzhu (YZ)	宜兴市丁蜀镇洋渚村 Yangzhu Village, Dingshu Town, Yixing City	60
夹浦 Jiapu (JP)	长兴县夹浦镇夹浦村 Jiapu Village, Jiapu Town, Changxing County	60
水产 Shuichan (SC)	湖州市吴兴区白雀水产村 Shuichan Village, Wuxing District, Huzhou City	60

## 1.2 微卫星反应

所用8对多态性较好的微卫星引物(表2)来自于实验室自行开发的105对微卫星引物,PCR反应体系为10  $\mu\text{L}$ ,包括:1 $\times$ PCR缓冲液,1.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Mg}^{2+}$ ,200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP,200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 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:95  $^{\circ}\text{C}$  4 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s;复性温度(renaturation temperature,  $T_m$ )+4  $^{\circ}\text{C}$  30 s,递减1  $^{\circ}\text{C}$ 至 $T_m$ ;72  $^{\circ}\text{C}$  30 s; $T_m \sim (T_m+1)$ 各4个循环, $T_m$  30个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  8 min;4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

PCR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pUC18 DNA/*Msp*I,电泳电压8  $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,快速银染法染色<sup>[20]</sup>,扫描后观察分析。

## 1.3 数据处理

根据条带位置确定基因型,利用GENPOP 4.0<sup>[21]</sup>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平衡检验,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<sup>[22]</sup>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<sup>[23]</sup>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,  $D_A$ )<sup>[24]</sup>。

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<sup>[25]</sup>计算平均期望杂合度(expected average heterozygosity,  $H_{EQ}$ ),重复为1000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。

## 2 结果与分析

### 2.1 群体遗传多样性

8对微卫星引物在15个群体中均得到了较好的扩增,8个位点相关参数如表3所示,等位基因数介于16~35个之间,有效等位基因数介于9.56~26.04之间,多态信息含量PIC介于0.888~0.960之间,均为高度多态基因位点,可有效进行后续分析。

15个群体的遗传多样性参数如表4所示,从中可以看出,万丰群体平均等位基因数最大( $A=23.75$ ),陆巷、太湖渔港群体其次( $A=23.63$ ),太湖群体最小( $A=19.88$ );吴塘门群体观测杂合度( $H_o=0.835$ )最大,其次分别为陆巷群体( $H_o=0.831$ )和浦庄群体( $H_o=0.821$ ),华庄群体最小( $H_o=0.683$ )。由此可知,15个群体遗传多样性水平波动明显,万丰、陆巷群体遗传多样性较高,太湖和华庄群体相对较低。

表2 日本沼虾8对微卫星引物

Table 2 Sequences of microsatellite primers of *Macrobrachium nipponense*

位点 Locus	核心序列 Motif	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	复性温度 $T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	GenBank 序列号 GenBank accession No.
<i>Mni</i> 34	(AC) <sub>11</sub>	F: TGCAGAGAGTGGAGTGATGAA R: TCACCCCATCAACCTAAAGC	62	GQ257531
<i>Mni</i> 45	(TG) <sub>14</sub>	F: AGTATGCTTGCTTACCTCA R: CATGAACGACACTTTTCG	56	GQ257542
<i>Mni</i> 51	(CA) <sub>10</sub> ... (AC) <sub>18</sub>	F: GATCTCAAGGCTTTGTAT R: ATCCTTTTCATCTTTCAG	51	GQ257548
<i>Mni</i> 52	(TG) <sub>22</sub> ... (GA) <sub>27</sub>	F: CTCGTTCTTGCCACTCTT R: TGACCCGTCTATGTTGCT	56	GQ257549
<i>Mni</i> 55	(AG) <sub>27</sub> ... (GA) <sub>9</sub>	F: ATACATCACCTCAATAGC R: TATAAAGCCACATTGTC	58	GQ257552
<i>Mni</i> 56	(CA) <sub>13</sub> ... (CA) <sub>5</sub>	F: TATTGGGGCAGCACCTAA R: TCATCGGCTTCAACAGAG	63	GQ257553
<i>Mni</i> 93	(TG) <sub>4</sub> ... (TG) <sub>15</sub>	F: TCACAGCAGGATAACA R: TGCCGATTCTGGACTTAA	55	GQ257590
<i>Mni</i> 115	(TG) <sub>15</sub> ... (GA) <sub>22</sub>	F: AACAGTAAACGGAGTAGAAA R: TGTCACGGCCGAATAAA	58	GQ257611

表 3 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

Table 3 Number of effective alleles, expected and observed heterozygosity and polymorphism information content for 8 microsatellite loci of *Macrobrachium nipponense*

位点 Locus	等位基因数 A	有效等位 基因数 $N_e$	观测杂合度 $H_o$	期望杂 合度 $H_e$	多态信息 含量 PIC
Mni34	28	11.33	0.943	0.912	0.906
Mni45	23	12.00	0.979	0.917	0.911
Mni51	16	9.56	0.521	0.896	0.888
Mni52	33	18.40	0.828	0.946	0.943
Mni55	33	26.04	0.647	0.962	0.960
Mni56	28	18.08	0.892	0.945	0.942
Mni93	35	13.59	0.667	0.927	0.922
Mni115	28	20.27	0.649	0.951	0.948
合计 Total	28.00	16.16	0.766	0.932	0.928

表 4 日本沼虾群体微卫星遗传多样性

Table 4 Summary statistics analysis of genetic diversity in *Macrobrachium nipponense* populations

群体 Population		Mni34	Mni45	Mni51	Mni52	Mni55	Mni56	Mni93	Mni115	合计 Total
庙港 MG	A	23	20	12	26	29	23	17	21	21.38
	$H_o$	0.967 *	0.983	0.500 *	0.817 *	0.617 *	0.833	0.467 *	0.450 *	0.704
	$H_e$	0.943	0.922	0.869	0.921	0.960	0.938	0.923	0.917	0.924
渡口 DK	A	24	19	14	24	30	24	27	23	23.13
	$H_o$	0.867 *	0.950	0.583 *	0.750	0.733 *	0.983 *	0.867 *	0.700 *	0.804
	$H_e$	0.919	0.902	0.872	0.927	0.959	0.949	0.929	0.942	0.925
陆巷 LX	A	22	19	15	27	30	25	28	23	23.63
	$H_o$	0.933 *	0.967	0.600 *	0.800	0.750 *	0.967	0.883	0.750	0.831
	$H_e$	0.918	0.903	0.891	0.932	0.962	0.944	0.958	0.949	0.932
浦庄 PZ	A	24	19	13	27	30	26	25	24	23.50
	$H_o$	0.883 *	0.967	0.600 *	0.900	0.667 *	0.983	0.817 *	0.750 *	0.821
	$H_e$	0.933	0.927	0.871	0.947	0.961	0.952	0.942	0.945	0.934
陈巷 CX	A	22	18	15	26	29	26	26	26	23.50
	$H_o$	0.867	0.967 *	0.567 *	0.683	0.667 *	0.933	0.817 *	0.917 *	0.802
	$H_e$	0.923	0.912	0.896	0.934	0.964	0.948	0.919	0.952	0.931
太湖渔港 TYG	A	23	20	14	31	29	24	23	25	23.63
	$H_o$	0.967 *	1.000	0.467 *	0.933	0.517 *	0.933	0.700 *	0.767 *	0.785
	$H_e$	0.863	0.923	0.876	0.952	0.953	0.944	0.854	0.948	0.914
马山 MS	A	21	21	16	28	28	24	24	26	23.50
	$H_o$	0.950 *	0.983	0.567 *	0.867	0.567 *	0.950 *	0.733	0.700 *	0.790
	$H_e$	0.886	0.921	0.896	0.945	0.952	0.947	0.932	0.948	0.928
华庄 HZ	A	21	17	13	25	28	26	16	26	21.50
	$H_o$	0.950 *	1.000	0.333 *	0.817	0.500 *	0.717 *	0.500 *	0.650 *	0.683
	$H_e$	0.892	0.904	0.821	0.932	0.959	0.928	0.764	0.951	0.894
吴塘门 WTM	A	22	21	16	26	30	25	20	25	23.13
	$H_o$	1.000 *	1.000	0.667 *	0.967	0.650 *	0.867 *	0.833	0.700 *	0.835
	$H_e$	0.912	0.931	0.922	0.946	0.959	0.935	0.907	0.944	0.932
渤公岛 BGD	A	20	22	14	22	27	22	19	25	21.38
	$H_o$	0.917 *	0.933 *	0.483 *	0.767	0.633 *	0.933 *	0.717	0.883	0.783
	$H_e$	0.915	0.928	0.904	0.928	0.949	0.940	0.905	0.942	0.926
万丰 WF	A	24	17	16	32	31	26	22	22	23.75
	$H_o$	0.983 *	0.983 *	0.433 *	0.950	0.717 *	0.900	0.700 *	0.533 *	0.775
	$H_e$	0.895	0.916	0.885	0.961	0.964	0.934	0.879	0.938	0.922
太滂 TG	A	17	16	13	24	29	19	19	22	19.88
	$H_o$	0.917 *	0.983 *	0.533 *	0.900	0.617 *	0.900 *	0.467 *	0.417 *	0.717
	$H_e$	0.835	0.906	0.834	0.938	0.947	0.920	0.913	0.940	0.904
洋渚 YZ	A	19	16	13	26	30	23	25	22	21.76
	$H_o$	1.000 *	1.000	0.417 *	0.683	0.583 *	0.733 *	0.500 *	0.550 *	0.683
	$H_e$	0.911	0.874	0.904	0.931	0.957	0.944	0.914	0.945	0.923
夹浦 JP	A	21	21	14	22	30	22	16	23	21.13
	$H_o$	0.983 *	1.000	0.600 *	0.733 *	0.783 *	0.983 *	0.500 *	0.550 *	0.767
	$H_e$	0.903	0.910	0.872	0.933	0.963	0.943	0.880	0.948	0.919
水产 SC	A	24	18	13	24	25	21	20	25	21.25
	$H_o$	0.967 *	0.967	0.467 *	0.850	0.700 *	0.767 *	0.500 *	0.417 *	0.704
	$H_e$	0.902	0.913	0.849	0.930	0.953	0.928	0.909	0.952	0.917

\* 经 Bonferroni 校正后仍显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium ( $P < 0.003$ ) after Bonferroni correction.

## 2.2 Hardy-Weinberg 平衡分析

15 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 法校正 ( $P < 0.003$ ) 后, 各群体仍至少有 3 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 其中陆巷群体有 3 个位点, 浦庄、陈巷、太湖渔港、马山、吴塘门、渤公岛群体有 5 个位点, 庙港、渡口、华庄、万丰、洋渚、水产群体有 6 个位点, 太滂和夹浦群体有 7 个位点. Mni51 和 Mni55 位点在 15 个群体中均显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡.

## 2.3 瓶颈效应分析

15 个群体在 IAM、TPM 和 SMM 3 种突变模型假设下的平均期望杂合度  $H_{EQ}$  如表 5 所示. 在 IAM

假设下,15个群体各位点  $H_E$  均高于  $H_{EQ}$ ,且差异显著或极显著;在 TPM 假设下,除 *Mni93* 位点外,其他位点的  $H_E$  均高于  $H_{EQ}$ ,其中 *Mni52* 位点  $H_E$  与  $H_{EQ}$  差异显著,*Mni51*、*Mni55*、*Mni56* 和 *Mni115* 位点  $H_E$  与  $H_{EQ}$  差异极显著;在 SMM 假设下,*Mni51*、*Mni55*、*Mni56* 和 *Mni115* 位点  $H_E$  高于  $H_{EQ}$ ,其中仅 *Mni55* 位点差异显著;其余位点  $H_E$  低于  $H_{EQ}$ ,其中 *Mni34* 和 *Mni93* 位点  $H_E$  与  $H_{EQ}$  差异显著,*Mni45* 和 *Mni52* 位点  $H_E$  与  $H_{EQ}$  差异不显著。

符号检验和 Wilcoxon 符号秩次检验的结果见表 6。在 IAM 假设下,符号检验中除太湖渔港、华庄、万丰和太滂群体外,其他群体均偏离了突变-漂移平衡,表现出杂合显著过剩;Wilcoxon 符号秩次检验中除华庄群体外,其他群体均偏离了突变-漂移平衡,表现出杂合显著或极显著过剩;太湖整个日本沼虾

群体杂合显著或极显著过剩。在 TPM 假设下,符号检验中浦庄和渤公岛群体偏离了突变-漂移平衡,表现出杂合显著过剩;Wilcoxon 符号秩次检验中陆巷、浦庄、陈巷、吴塘门和渤公岛群体偏离了突变-漂移平衡,表现出杂合显著或极显著过剩;太湖整个日本沼虾群体杂合过剩极显著。在 SMM 假设下,符号检验中华庄、太滂和水产群体显著偏离了突变-漂移平衡,表现出杂合显著过剩;Wilcoxon 符号秩次检验中仅华庄和太滂群体偏离了突变-漂移平衡,表现出杂合显著过剩;太湖整个日本沼虾群体杂合不过剩。

## 2.4 群体遗传分化

15个群体间的  $D_A$  遗传距离如表 7 所示, $D_A$  在华庄与吴塘门群体间最大( $D_A = 0.206$ ),在陈巷和浦庄群体间最小( $D_A = 0.102$ );8个位点上群体间遗传分化分析如表 8 所示,遗传固定指数  $F_{ST}$  在渡口和

表 5 日本沼虾群体微卫星位点瓶颈效应分析

Table 5 Bottleneck test by locus in *Macrobrachium nipponense* populations

位点 Locus	$H_E$	IAM			TPM			SMM		
		$H_{EQ}$	DH/sd	$P$	$H_{EQ}$	DH/sd	$P$	$H_{EQ}$	DH/sd	$P$
<i>Mni34</i>	0.912	0.822	1.272	0.014 *	0.906	0.299	0.460	0.937	-1.010	0.032 *
<i>Mni45</i>	0.917	0.785	1.522	0.000 **	0.882	1.224	0.063	0.924	-0.478	0.266
<i>Mni51</i>	0.896	0.695	1.600	0.000 **	0.823	1.467	0.008 **	0.888	0.348	0.472
<i>Mni52</i>	0.946	0.850	1.726	0.000 **	0.922	1.452	0.031 *	0.946	-0.011	0.394
<i>Mni55</i>	0.962	0.850	2.026	0.000 **	0.923	2.386	0.000 **	0.945	0.507	0.013 *
<i>Mni56</i>	0.945	0.825	1.791	0.000 **	0.906	1.615	0.001 **	0.938	0.440	0.323
<i>Mni93</i>	0.927	0.860	1.234	0.012 *	0.928	-0.093	0.419	0.949	-1.090	0.042 *
<i>Mni115</i>	0.951	0.824	1.923	0.000 **	0.905	1.985	0.000 **	0.937	0.614	0.088

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ . 下同 The same below. DH/sd:  $H_E$  与  $H_{EQ}$  的差与标准偏差之比 Ratio of deviation to the standard deviation of  $H_E$  and  $H_{EQ}$ .

表 6 日本沼虾群体突变-漂移平衡分析

Table 6 Departures from mutation-drift equilibrium in *Macrobrachium nipponense* populations

群体 Population	符号检验 Sign test						Wilcoxon 符号秩次检验 Wilcoxon sign-rank		
	IAM		TPM		SMM		IAM	TPM	SMM
	$H_e/H_d$	$P$	$H_e/H_d$	$P$	$H_e/H_d$	$P$	$P$	$P$	$P$
庙港 MG	8/0	0.018 *	7/1	0.101	3/5	0.167	0.004 **	0.074	0.742
渡口 DK	8/0	0.020 *	5/3	0.587	3/5	0.153	0.004 **	0.313	0.055
陆巷 LX	8/0	0.018 *	6/2	0.296	4/4	0.373	0.004 **	0.027 *	0.383
浦庄 PZ	8/0	0.018 *	8/0	0.015 *	4/4	0.348	0.004 **	0.004 **	1.000
陈巷 CX	8/0	0.019 *	7/1	0.135	3/5	0.167	0.004 **	0.020 *	0.313
太湖渔港 TYG	6/2	0.331	6/2	0.301	3/5	0.153	0.039 *	0.742	0.055
马山 MS	8/0	0.018 *	7/1	0.098	3/5	0.169	0.004 **	0.195	0.055
华庄 HZ	7/1	0.114	4/4	0.412	2/6	0.044 *	0.055	0.844	0.020 *
吴塘门 WTM	8/0	0.017 *	6/2	0.317	5/3	0.620	0.004 **	0.027 *	0.844
渤公岛 BGD	8/0	0.019 *	8/0	0.016 *	3/5	0.168	0.004 **	0.004 **	0.250
万丰 WF	6/2	0.332	5/3	0.581	4/4	0.364	0.020 *	0.844	0.313
太滂 TG	7/1	0.118	6/2	0.307	2/6	0.046 *	0.005 **	0.250	0.039 *
洋渚 YZ	8/0	0.019 *	5/3	0.599	4/4	0.421	0.004 **	0.195	0.547
夹浦 JP	8/0	0.019 *	6/2	0.299	3/5	0.180	0.004 **	0.055	0.250
水产 SC	8/0	0.019 *	7/1	0.098	2/6	0.046 *	0.004 **	0.055	0.074
合计 Total	8/0	0.020 *	7/1	0.090	4/4	0.358	0.004 **	0.008 **	0.844

$H_e/H_d$ : 杂合过剩与不足位点数之比 Ratio of loci number with heterozygosity excess to deficiency.

表 7 日本沼虾群体间  $F_{ST}$  统计量 ( $F_{ST}$ ) 和遗传距离 ( $D_A$ )Table 7 Pairwise  $F_{ST}$  estimates ( $F_{ST}$ ) and genetic distance ( $D_A$ ) among *Macrobrachium nipponense* populations

群体 Population	$D_A$														
	庙港 MG	渡口 DK	陆巷 LX	浦庄 PZ	陈巷 CX	太湖 渔港 TYG	马山 MS	华庄 HZ	吴塘门 WTM	渤公岛 BGD	万丰 WF	太滪 TG	洋渚 YZ	夹浦 JP	水产 SC
$F_{ST}$ 庙港 MG		0.142	0.155	0.158	0.139	0.169	0.164	0.117	0.189	0.158	0.136	0.155	0.123	0.122	0.106
渡口 DK	0.014		0.114	0.147	0.115	0.144	0.141	0.151	0.147	0.163	0.102	0.125	0.123	0.107	0.119
陆巷 LX	0.014	0.007		0.107	0.104	0.128	0.113	0.163	0.142	0.138	0.129	0.149	0.152	0.153	0.128
浦庄 PZ	0.015	0.012	0.008		0.102	0.144	0.141	0.159	0.157	0.160	0.145	0.169	0.150	0.155	0.139
陈巷 CX	0.013	0.007	0.006	0.005		0.118	0.133	0.131	0.150	0.130	0.123	0.147	0.131	0.117	0.117
太湖渔港 TYG	0.019	0.013	0.009	0.016	0.007		0.138	0.165	0.162	0.154	0.115	0.153	0.175	0.134	0.140
马山 MS	0.012	0.009	0.005*	0.009	0.008	0.008		0.165	0.173	0.156	0.125	0.152	0.168	0.145	0.130
华庄 HZ	0.016	0.022	0.026	0.028	0.016	0.018	0.020		0.206	0.167	0.137	0.164	0.131	0.122	0.132
吴塘门 WTM	0.019	0.013	0.009	0.012	0.013	0.017	0.013	0.033		0.193	0.164	0.186	0.172	0.159	0.165
渤公岛 BGD	0.012	0.011	0.010	0.014	0.008	0.015	0.010	0.023	0.016		0.155	0.163	0.169	0.149	0.149
万丰 WF	0.015	0.007	0.010	0.014	0.009	0.009	0.007	0.019	0.016	0.013		0.122	0.135	0.116	0.120
太滪 TG	0.019	0.009	0.011	0.017	0.017	0.010	0.009	0.023	0.019	0.017	0.008		0.156	0.132	0.126
洋渚 YZ	0.010	0.008	0.011	0.012	0.007	0.012	0.011	0.015	0.013	0.013	0.010	0.012		0.127	0.120
夹浦 JP	0.011	0.003*	0.010	0.014	0.007	0.008	0.008	0.016	0.015	0.011	0.009	0.009	0.006		0.113
水产 SC	0.010	0.006	0.007	0.011	0.007	0.010	0.006	0.021	0.011	0.011	0.009	0.007	0.006	0.005	

表 8 日本沼虾群体子方差分析

Table 8 AMOVA analysis among *Macrobrachium nipponense* populations

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	方差比例 Percentage of variance (%)
群体间 Among populations	14	127.223	0.0397Va	1.1
群体内个体间 Between individuals among populations	885	3823.808	0.6289Vb	16.8
个体内 Within individuals	900	2756.500	3.0627Vc	82.1
总变异 Total variation	1799	6707.532	3.7313	

夹浦群体间最小 ( $F_{ST} = 0.003$ ), 在华庄和浦庄群体间最大 ( $F_{ST} = 0.028$ ), 且除渡口和夹浦、马山和陆巷群体间无显著差异外, 其余群体间差异极显著 ( $P < 0.01$ ). 15 个群体间遗传变异 AMOVA 分析结果如表 8 所示, 98.9% 的遗传变异来自群体内, 仅有 1.1% 的变异来自于群体间, 太湖整个群体处于未分化状态。

### 3 讨 论

#### 3.1 群体遗传多样性

本研究所用 8 个微卫星位点多态信息含量 PIC 介于 0.888 ~ 0.960 之间, 根据 Botstein 等<sup>[22]</sup>提出的标准, 属于高度多态性 (PIC > 0.5), 可见这些位点能够充分地诠释太湖日本沼虾野生群体的遗传结构. 15 个群体观测杂合度介于 0.683 ~ 0.835 之间, 显著高于洪泽湖日本沼虾 ( $H_o = 0.304 \sim 0.460$ )<sup>[17]</sup>, 说明太湖日本沼虾野生群体表现出了较高的遗传多样性水平以及良好的种质状况. 因而可基于太湖日本沼虾的优异种质进行良种选育工作, 以促进养殖产业的发展. 本研究中, 太湖日本沼虾野生群体中, 东、

南部的渡口、陆巷、浦庄、陈巷等群体遗传多样性高于西、北部的华庄、太滪、洋渚、夹浦等群体, 这是由于生境变化对水生动物的遗传变异产生一定的选择作用, 不同群体日本沼虾所处水域的生境差异引起的, 太湖西、北部处于上游地区, 入湖水质较差、且水域环境变化较大, 对日本沼虾野生生境的影响较大, 遗传多样性相对较小; 而东、南部湖区位于太湖下游地区, 且为湖水主要出湖口<sup>[26-27]</sup>, 水环境条件较好, 对日本沼虾野生生境的影响较小, 遗传多样性相对较高。

本研究结果中, 15 个群体大多数位点显现出杂合不足, 且经 Bonferroni 校正后, 各群体仍至少有 3 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 表现出杂合不足, 这说明太湖日本沼虾群体微卫星多数位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 其原因主要是由于西部、北部上游日本沼虾在幼体浮游阶段随水流运动漂浮到东部、东南部下游水域, 以及渔民在不同水域捕虾活动使得日本沼虾在不同湖区间被动移动增加了不同湖区群体间的基因流动, 进而引起太湖湖区日本沼虾偏离了 Hardy-Weinberg 平衡。

### 3.2 瓶颈效应

瓶颈效应分析是评估群体发展趋势的一种方法,可为遗传资源保护提供参考意见.本研究结果中,在IAM假设下,15个日本沼虾群体在所有位点表现为杂合过剩,除 *Mni34* 和 *Mni93* 位点的  $H_E$  与  $H_{E0}$  差异显著外,其余位点极显著;在TPM假设下,除 *Mni93* 位点表现为杂合不足外,其余位点均表现为杂合过剩,有5个杂合过剩位点的  $H_E$  与  $H_{E0}$  差异显著或极显著.从符号检验和Wilcoxon符号秩次检验的结果来看,在IAM进化模式下两种检验表明太湖日本沼虾群体显著或极显著具有杂合过剩位点,而在TPM进化模式下,Wilcoxon符号秩次检验表明仍具有极显著的杂合过剩位点.可见太湖日本沼虾群体显著具有的杂合过剩位点,偏离了突变-漂移平衡,表明太湖日本沼虾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太湖近年来水域生态环境波动较大有关,如太湖水华的暴发引起的水域环境巨变,对甲壳动物有很大杀伤度的农药杀虫剂等农业面源污染物等,都可破坏日本沼虾野生生活环境,直接或间接地引起群体数量下降和瓶颈效应的发生,使野生资源量有明显下降趋势;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直接采捕于野生个体,在没有严格执行太湖休渔的情况下,过度捕捞等现象严重,使得野生资源量严重下降,从而引发瓶颈效应.因而针对经历瓶颈效应的太湖日本沼虾野生群体,急需进一步采取保护措施,修复太湖水域生态环境,严格制定和执行休渔期制度,以恢复太湖日本沼虾的种质资源遗传多样性.

### 3.3 群体间遗传分化

15个群体间遗传分化指数介于0.003~0.028之间,除渡口和夹浦、马山和陆巷群体间无显著差异外,其余差异极显著( $P<0.01$ ).太湖日本沼虾群体间遗传固定指数  $F_{ST}$  为0.011,小于0.05,说明这15个日本沼虾群体间存在微弱的遗传分化<sup>[28]</sup>,并没有形成显著的遗传结构,这主要是与近年实施的“引江济太”促进太湖水流运动及湖内频繁交错的捕捞活动,人为地促进了日本沼虾在湖区不同地点的基因交流,从而使太湖日本沼虾仍保持着群体内变异.这与吴滢等<sup>[14]</sup>用RAPD方法得出太湖不同水域日本沼虾群体存在较大遗传分化的结论不同,这一方面是由于本研究在太湖周边及湖区中心较为全面地采集了15个群体,远远大于吴滢等<sup>[14]</sup>在太湖周边采集苏州、无锡、宜兴和湖州等4个群体,因而采样

地点密集度显著增大,群体数量显著增多,群体间的地理位置显著缩短,加上太湖各湖区捕虾活动交叉历来都很频繁,过往船只也会加大不同水域间日本沼虾的流动,这些原因都会使得群体间遗传关系较近、遗传分化程度较小;另一方面还与本研究采用了具有共显性、高重复率和高稳定性的微卫星标记,吴滢等<sup>[14]</sup>采用的是具有显性、重复率低、不能区分杂合型和纯合型等的RAPD标记,因而两者在位点多态性、重复性等方面差异显著,实践证明微卫星标记比RAPD标记更具有优越性和准确性.基于本研究结果,太湖整个日本沼虾群体遗传分化程度微弱,且没有形成显著的遗传结构,因而在其种质资源保护和管理上可将整个太湖湖区视作一个单元进行有效操作.

15个群体的遗传距离分析结果显示,吴塘门与华庄之间的遗传距离最大, $D_A$  值达到0.206 ( $0.2 < D_A < 0.8$ ),接近物种间遗传距离的临界值,可以认为是两个不同的物种<sup>[29]</sup>,而其他群体两两之间的遗传距离均小于0.2,说明遗传变异和分化仍局限在种内水平.吴塘门和华庄群体间偏大的原因可能是由于被引入外来群体,例如长江或洞庭湖等其他流域与太湖群体的日本沼虾杂交引起的,或与被引入的沼虾种如海南沼虾(*M. hainanense*)有关,由于海南沼虾与日本沼虾可以进行人工杂交,杂交 $F_1$ 代雌雄均可育,而且在养殖过程中能自行进行交配<sup>[30]</sup>,在这种情况下若杂交后代的人为控制不严格或杂交后代在养殖过程中不经意间逃逸到自然水域都可与野生日本沼虾杂交,必然会引起基因渗入而污染太湖日本沼虾种质纯洁性,而吴塘门和华庄群体附近是养殖杂交后代较多的地区,因而较易受到这种影响,当然至于是不是由于该因素引起的仍需进一步求证,但加强控制外来群体、物种的引进以及养殖群体逃逸到自然水域十分重要,这将防患于未然,以保护太湖群体日本沼虾种质纯洁性.

本研究通过对太湖野生日本沼虾的遗传结构分析,揭示了太湖日本沼虾的遗传多样性现状,弄清了整个太湖日本沼虾的群体遗传结构.研究数据可对太湖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.但由于个别群体间分化程度接近种的界限,因而太湖日本沼虾种质资源可持续利用工作仍须深入研究.

致 谢 感谢上海海洋大学水产与生命学院张俊彬教授在

文章讨论、写作及中英文摘要修改中给予的无私指导和帮助。

### 参考文献

- [1] Li J-L (李家乐), Nie S-Z (聂式忠), Feng J-B (冯建彬), *et al.* The comparison of growth and culture performance in cage for five populations of oriental river prawn from the midstream and downstream of Yangtze River. *Journal of Shanghai Fisheries University* (上海水产大学学报), 2005, **14**(3): 258-262 (in Chinese)
- [2] Feng J-B (冯建彬), Li J-L (李家乐), Cheng X (程熙). Research progress on germplasm resource exploitation and protection of *Macrobrachium nipponense*. *Journal of Shanghai Fisheries University* (上海水产大学学报), 2008, **17**(3): 371-376 (in Chinese)
- [3] Yan S-L (严生良), Jin D-Y (金德沂). Oriental river prawn in Taihu Lake. *Fisheries Science & Technology Information* (水产科技情报), 1981, **6**(1): 18-19 (in Chinese)
- [4] Jin D-Y (金德沂), Yan S-L (严生良), Liang X-Q (梁象秋). Investigation reports of prawn resource in Taihu Lake// Jiangsu Management Committee of Aquatic Production in Taihu Lake (江苏省太湖渔业生产管理委员会), ed. Investigation Materials Assembly of Fishery Resource in Taihu Lake (1980-1981), 1982, **7**: 1-6 (in Chinese)
- [5] Gu X-H (谷孝鸿), Zhu S-Q (朱松泉), Wu L-K (吴林坤), *et al.* The natural fishery and the development countermeasures in Lake Taihu. *Journal of Lake Sciences* (湖泊科学), 2009, **21**(1): 94-100 (in Chinese)
- [6] Xue H (薛辉), Wu X-B (吴孝兵), Yan P (晏鹏). Application of microsatellite DNA in molecular ecology and strategies for loci isolation. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2005, **16**(2): 385-389 (in Chinese)
- [7] Yuan C-Z (苑存忠), Wang J-M (王建民), Ma Y-H (马月辉), *et al.* Genetic diversity of indigenous sheep breeds in Shandong Province based on microsatellite markers study. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2006, **17**(8): 1459-1464 (in Chinese)
- [8] Xiao T-F (肖天放), Ke L-Y (柯柳玉), Zhang L (张力), *et al.* Genetic diversity of duck breeds: A study with microsatellite markers. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2009, **20**(1): 190-196 (in Chinese)
- [9] Chen B (陈冰), Liu D-W (刘德稳), Fu T (付彤), *et al.* Genetic diversity of native goat breeds in Henan Province. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2010, **21**(4): 979-986 (in Chinese)
- [10] Feng J-B (冯建彬), Sun Y-N (孙悦娜), Li J-L (李家乐). Sequence analysis of mitochondrial COI gene of *Macrobrachium nipponense* from the five largest freshwater lakes in China. *Journal of Fisheries of China* (水产学报), 2008, **32**(4): 517-525 (in Chinese)
- [11] Yang P (杨频), Zhang H (张浩), Chen L-Q (陈立侨), *et al.* Genetic structure of the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) from the Yangtze and Lancang rivers, inferred from COI gene sequence. *Zoological Research* (动物学研究), 2007, **28**(2): 113-118 (in Chinese)
- [12] Sun Y-N (孙悦娜), Feng J-B (冯建彬), Li J-L (李家乐), *et al.* Sequence analysis and molecular phylogeny of mitochondrial 16S rRNA gene fragments in three populations of *Macrobrachium nipponense*. *Chinese Journal of Zoology* (动物学杂志), 2007, **42**(1): 59-66 (in Chinese)
- [13] Jiang S-F (蒋速飞), Fu H-T (傅洪拓), Xiong Y-W (熊贻伟), *et al.* Genetic diversity of four geographical populations of *Macrobrachium nipponense* revealed by RAPD analysis. *Journal of Yangtze University* (Natural Science) (长江大学学报·自然科学版), 2006, **3**(2): 179-182 (in Chinese)
- [14] Wu Y (吴滢), Fu H-T (傅洪拓), Li J-L (李家乐), *et al.* Research on genetic diversity of *Macrobrachium nipponense* in Taihu Lake. *Journal of Shanghai Fisheries University* (上海水产大学学报), 2008, **17**(5): 620-624 (in Chinese)
- [15] Zhu Y-A (朱银安), Shan H (单红), Wang Q (王庆), *et al.* Genetic diversity of three geographical populations of *Macrobrachium nipponense* revealed by RAPD analysis. *Journal of Aquaculture* (水产养殖), 2008, **28**(1): 5-7 (in Chinese)
- [16] Chen C-J (陈婵娟), Zhang X (张鑫), Xu Z-Q (许志强), *et al.* RAPD analysis of genetic resource of *Macrobrachium nipponense* in Jiangsu. *Jiangsu Agricultural Sciences* (江苏农业科学), 2008(2): 62-65 (in Chinese)
- [17] Feng J-B (冯建彬), Wu C-L (吴春林), Ding H-Y (丁怀宇), *et al.* Microsatellite analysis of genetic diversity in 9 wild populations of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* in Hongze Lake. *Journal of Fishery Sciences of China* (中国水产科学), 2010, **17**(2): 218-227 (in Chinese)
- [18] Fu H-T (傅洪拓), Qiao H (乔慧), Li F-J (李法君), *et al.* Genetic diversity of *Macrobrachium nipponense* on a regional scale in the Yangtze River. *Journal of Fisheries of China* (水产学报), 2010, **34**(2): 204-212 (in Chinese)



- [19] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [20] Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 1991, **196**: 80–83
- [21] Rousset F. GENEPOP'007: A complete e-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 2008, **8**: 103–106
- [22] Botstein D, White RL, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, 1980, **32**: 314–331
- [23] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, **1**: 47–50
- [24] Nei M, Tajima F, Tateno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution*, 1983, **19**: 153–170
- [25] Cornuet JM, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 1997, **144**: 2001–2014
- [26] Qian Y-C (钱益春), He P (何平). Analysis of water environment variation in the Taihu Lake Basin. *Yangtze River (人民长江)*, 2009, **40**(5): 40–43 (in Chinese)
- [27] Shen G-H (沈国华), Chen Y (陈颖). Variation analysis of inlet and outlet water quality in Taihu Lake. *Jiangsu Water Resources (江苏水利)*, 2008(2): 27–28 (in Chinese)
- [28] Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 2002, **11**: 155–165
- [29] Thorp JP. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation, and systematic. *Annual Review of Ecology Systematics*, 1982, **13**: 139–168
- [30] Jiang S-F (蒋速飞), Fu H-T (傅洪拓), Gong Y-S (龚永生), *et al.* The hybridization between *Macrobrachium hainanense* (♀) and *Macrobrachium nipponense* (♂) and their RAPD analysis. *Journal of Shanghai Fisheries University (上海水产大学学报)*, 2006, **15**(4): 409–413 (in Chinese)

---

作者简介 冯建彬,男,1978年生,讲师.主要从事水产动物种质资源与遗传育种研究,发表论文20多篇. E-mail: jbfeng@shou.edu.cn

责任编辑 肖红

---