

鄱阳湖日本沼虾 15 个群体遗传多样性的微卫星分析*

苏翔¹ 汪桂玲^{1**} 冯建彬¹ 李家乐^{1,2} 李远宁¹

(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 上海市高校水产养殖学 E-研究院, 上海 201306)

摘要 利用微卫星分子标记研究鄱阳湖 15 个日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 野生群体的遗传多样性。结果表明: 10 个微卫星位点呈高度多态性, 共检测到 129 个多态性位点; 每个群体中至少有 5 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 表现出杂合不足; 15 个日本沼虾群体均表现出较高的遗传多样性, 其中大坝外群体和星池群体遗传多样性较高, 万户和湖口群体相对较低。瓶颈效应和突变-漂移平衡分析表明, 鄱阳湖日本沼虾群体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 分析显示, 鄱阳湖日本沼虾群体存在极显著的遗传分化程度 ($F_{ST} = 0.04709, P < 0.01$)。综上所述, 鄱阳湖日本沼虾群体具有丰富的遗传多样性, 可作为日本沼虾选育的基础群。

关键词 鄱阳湖; 日本沼虾; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 1000-4890(2011)9-2007-07

Genetic diversity of 15 *Macrobrachium nipponense* populations in Poyang Lake based on microsatellite analysis. SU Xiang¹, WANG Gui-ling^{1**}, FENG Jian-bin¹, LI Jia-le^{1,2}, LI Yuan-ning¹ (¹Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China; ²Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai 201306, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2011, 30(9): 2007–2013.

Abstract: By the method of microsatellite analysis, an investigation was conducted on the genetic diversity of 15 wild populations of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in Poyang Lake. The 10 microsatellite loci were highly polymorphic, and a total of 129 alleles were detected. The tests of departure from Hardy-Weinberg equilibrium indicated that at least 5 loci for each population were in significant heterozygosity deficiency. For all the populations, there existed significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. The 15 populations all showed high genetic diversity; the genetic diversity in Dabawai and Xinchu populations was relatively higher compared with the Wanhu and Hukou populations. Bottleneck effect and mutation-drift equilibrium tests indicated that the *M. nipponense* populations in the Lake did not suffer bottleneck effect, and had no decline in their quantity in recent time. The F_{ST} and AMOVA analysis across all the populations suggested that there was a significant genetic differentiation among the 15 populations ($F_{ST} = 0.04709, P < 0.01$). This study showed that the *M. nipponense* populations in Poyang Lake had high genetic diversity, with greater potential for breeding.

Key words: Poyang Lake; *Macrobrachium nipponense*; microsatellite marker; genetic diversity.

日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 是中国分

布范围广、经济价值较大的一种重要淡水虾类。迄今为止, 养殖的日本沼虾均来自未经系统选育的野生群体, 其规格、品质的下降已严重影响到日本沼虾养殖产业的健康发展。野生群体遗传多样性研究是制定合理有效的保护和管理策略的前提和基础(杨

* 国家自然科学基金青年基金项目(31001111)、上海市水产养殖重点学科建设项目(Y1101)和江苏省苏北科技发展计划项目(BN2009036)资助。

** 通讯作者 E-mail: glwang@shou.edu.cn

收稿日期: 2011-02-23 接受日期: 2011-03-25

频等,2010)。鄱阳湖作为中国五大淡水湖之一,也是中国日本沼虾的主要产区(冯建彬等,2008),近年来鄱阳湖水文环境变化较大,生物多样性受到了破坏,虾类等底栖动物产量也受到了影响(黄秋萍等,2006)。因此,充分了解鄱阳湖日本沼虾群体遗传多样性,对于鄱阳湖日本沼虾种质资源的开发、保护和利用有极其重要的意义。

微卫星标记具有多态性高、共显性遗传、重复性高和易检测等优势,已经广泛应用于动植物遗传多样性、遗传图谱构建、遗传育种等研究领域(Wolfus *et al.*, 1997;孙效文等,2008;汪桂玲等,2011)。本研究通过微卫星标记位点变异分析了鄱阳湖日本沼虾群体的遗传多样性,探讨日本沼虾群体的遗传结构变化及数量变化,为鄱阳湖日本沼虾种质资源保护和开发利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 样本采集

2010年5—6月,在江西省鄱阳湖区及周边随机采集共15个日本沼虾野生群体,每群体60尾,用无水乙醇保存后带回实验室,具体采样地点见表1。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA提取 采用苯酚-氯仿法(Sambrook *et al.*, 2001)提取日本沼虾腹部肌肉组织的DNA,无菌水溶解后测定浓度和OD值,−20℃保存。

表 2 日本沼虾微卫星引物的序列
Table 2 Sequences of SSR primers of *Macrobrachium nipponense*

位点	引物序列(5′-3′)	重复单元	退火温度(℃)	等位片段大小(bp)
Mni133	F: ACCGTCTGGTTCATTTTCA R: AACGCGAGCTTTCTTTTGT	(TC) ₁₈	46	131 ~ 149
Mni179	F: CTCTGCCTCAATTTTGTA R: GTATTATTTCTCTGTTATCCA	(TG) ₁₃ G(GT) ₈	45	168 ~ 188
Mni86	F: TACTAACACCGAAGCTATGC R: AACAGTCACAACCGAACC	(AC) ₁₁ ... (AC) ₅	59	167 ~ 189
Mni103	F: TAGCGTGAGCTAGCAAC R: ATGGTAGGGAGAAAAGTGT	(GC) ₄ ... (GT) ₁₃	58	148 ~ 166
Mni125	F: GACGGGACGGGAATTTAA R: GAGGAGGGGATTGGGAAC	(AG) ₂₂	50	146 ~ 162
Mni83	F: GATGCCAACGTCCTTCCC R: TCCGATTACCGCCCTATT	(GA) ₂₀	53	136 ~ 156
Mni55	F: ATACATCACCCCTCAATAGC R: TATAAAGCCACATTGTCC	(AG) ₂₇ ... (GA) ₉	57	188 ~ 220
Mni160	F: AGGAAGTACGAGAGAAAGGG R: ATGGAAGTAAGCACAGCAGC	(GA) ₂₅	56	191 ~ 223
Mni114	F: CTCGTTCTTGCCACTCTT R: TGACCCGTCTATGTTCTGT	(TG) ₂₂ ... (GA) ₂₉	50.5	220 ~ 250
Mni96	F: AAGTAAAGAAGAGCCCCAACA R: CCAAGTGCCCAACCAAGTAA	(TG) ₄₆	54	199 ~ 229

表 1 鄱阳湖日本沼虾样本采集位置及数目
Table 1 Sample sites of *Macrobrachium nipponense* in Poayng Lake

群体	采样地	地理位置
蚌湖 BH	星子县蚌湖	29°15′ N, 115°57′ E
大坝外 DBW	都昌县多宝乡新妙湖	29°21′ N, 116° 9′ E
万户 WH	都昌县万户镇	29°11′ N, 116°31′ E
王家湾 WJW	都昌县王家湾	29°28′ N, 116° 9′ E
杨梅颈 YMJ	都昌县周溪镇杨梅颈	29° 6′ N, 116°20′ E
大坝内 DBN	都昌县多宝乡李洞林	29°22′ N, 116° 8′ E
湖口 HK	湖口县城	29°43′ N, 116°11′ E
金溪湖 JXH	进贤县金溪湖	28°43′ N, 116°18′ E
罗溪湖 LXH	进贤县罗溪湖	28°29′ N, 116° 8′ E
莲湖 LH	鄱阳县大莲子湖	28°56′ N, 116°35′ E
舜德 SD	湖口县舜德乡	29°37′ N, 116°11′ E
新池 XC	星子县新池乡	29°26′ N, 116° 3′ E
吴城 WC	永修县吴城镇	29°10′ N, 116° 4′ E
大塘 DT	余干县大塘乡	28°48′ N, 116°31′ E
珠湖 ZH	鄱阳县珠湖乡	29°10′ N, 116°37′ E

1.2.2 微卫星位点扩增 10对微卫星引物为本实验开发的多态性引物(表2)。PCR反应体系为10 μl,包括:0.8 μl dNTP,1 μl 1×PCRbuffer,2 μl 上下游引物,0.15 μl Taq 酶,1 μl DNA模板,5.05 μl 去离子水。PCR反应条件为:94℃ 3 min;94℃ 30 s;Tm 30 s,Tm 时 30 个循环;72℃ 1 min;72℃ 5 min;4℃ 保存。PCR产物经8%的非变性聚丙烯酰胺胶分离后,用银染法染色(Bassam *et al.*, 1991)观察分析。

1.2.3 遗传多样性 根据条带的位置确定基因型,利用 GENPOP 4.0 (Rousset,2008) 进行群体遗传分析,计算等位位点数(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(Botstein *et al.*,1980)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(Excoffier *et al.*,2005)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 遗传距离(Genetic distance, D_A)(Nei *et al.*,1983),基于 D_A 构建 UPGMA 系统树,并聚类分析。

根据各个微卫星位点的等位位点频率,基于无限等位位点模型(infinite allele model,IAM)、逐步突变模型(stepwise mutation model,SMM)和双相突变模型(two-phased model of mutation,TPM),利用 BOTTLENECK 3.4(Cornuet & Luikart,1997)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 日本沼虾群体遗传多样性

用 10 对引物对鄱阳湖 15 个日本沼虾群体进行遗传多样性分析(图 1),扩增后各个位点等位位点数及座位多态信息含量如表3,10个微卫星位点等

表 3 日本沼虾 10 个微卫星位点有效等位位点数、杂合度及多态信息含量

位点	等位位 点数 A	有效等位 位点数 N_E	观测杂合 度 H_o	期望杂合 度 H_e	多态信息 含量 PIC
Mni133	10	7.67	0.2877	0.8709	0.8554
Mni179	11	9.99	0.6449	0.9012	0.8911
Mni86	12	10.88	0.6619	0.9094	0.9005
Mni103	10	8.05	0.4108	0.8771	0.8632
Mni125	9	8.57	0.6441	0.8846	0.8716
Mni83	11	9.63	0.7203	0.8974	0.8867
Mni55	17	15.52	0.6884	0.9369	0.9317
Mni160	17	14.73	0.7330	0.9334	0.9279
Mni114	16	13.76	0.5439	0.9287	0.9226
Mni96	16	14.28	0.7034	0.9313	0.9256

位位点数介于 9 ~ 17 个,其中 Mni55 和 Mni160 获得 17 个等位片段,等位位点数最多;Mni125 获得 9 个等位片段,等位位点数最少。10 个等位位点的多态信息含量 PIC 介于 0.8554 ~ 0.9317,具有较高多态性,可有效进行遗传多样性分析。

15 个群体的遗传多样性参数如表 4,其中大坝外群体平均等位位点数最大($A=12.4$),万户镇群体最小($A=8.8$);新池群体的平均观测杂合度($H_o=0.6661$)最大,湖口群体最小($H_o=0.5400$),由此

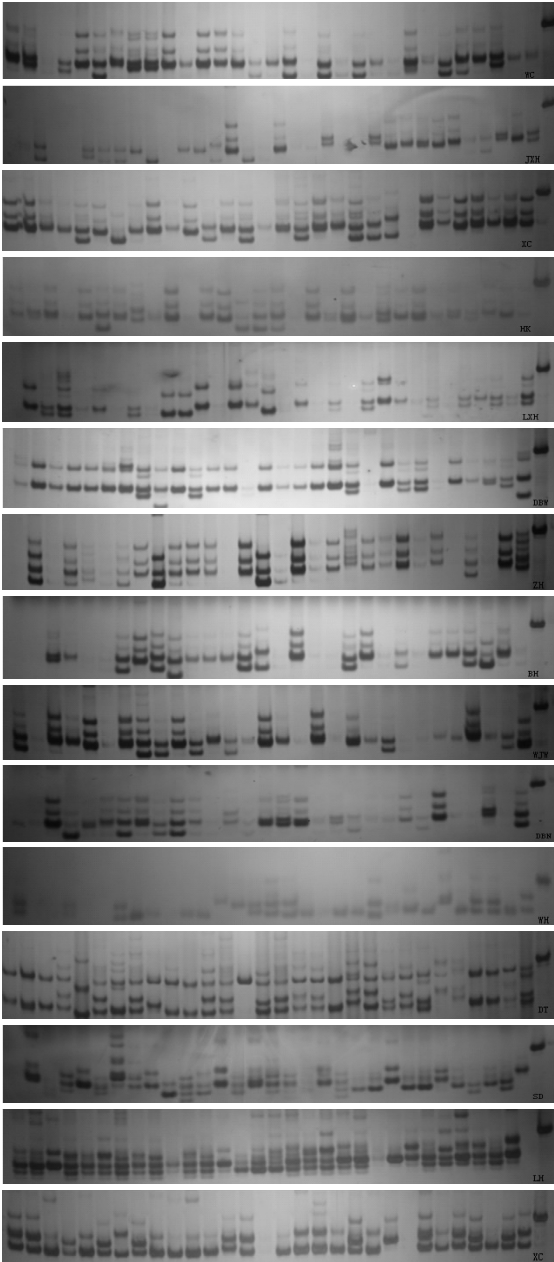


图 1 引物 Mni125 在 15 个日本沼虾群体扩增的电泳图谱
Fig.1 Electrophoretogram of locus Mni125 of 15 populations of Macrobrachium nipponense

表 4 日本沼虾群体微卫星遗传多样性

Table 4 Statistics analysis of genetic diversity in *Macrobrachium nipponense* populations

	位点	Mni7	Mni179	Mni86	Mni103	Mni125	Mni83	Mni55	Mni160	Mni114	Mni96	平均
BH	A	10	9	8	8	8	11	17	16	16	15	11.8
	H ₀	0.0333 *	0.6000 *	0.6000 *	0.3000 *	0.8333	0.8667	0.7000 *	0.7000 *	0.5000 *	0.9333 *	0.6067
	H _E	0.8605	0.8684	0.8723	0.7418	0.7989	0.8960	0.9175	0.9051	0.9102	0.9085	0.8679
DBW	A	9	9	10	10	9	11	17	17	16	16	12.4
	H ₀	0.2667 *	0.5000 *	0.5000 *	0.3333 *	0.6333 *	0.7667	0.6667 *	0.9000	0.6333	0.6333 *	0.5833
	H _E	0.8096	0.7989	0.8571	0.8412	0.8073	0.8847	0.9339	0.9299	0.8966	0.9282	0.8688
WH	A	6	8	8	6	7	8	13	9	10	13	8.8
	H ₀	1.0000 *	0.3333 *	0.3333 *	0.2778 *	0.2778 *	0.4444 *	0.5000 *	0.8889	0.7222 *	0.7778	0.5556
	H _E	0.8127	0.7587	0.7508	0.6349	0.7524	0.8587	0.9016	0.8937	0.8492	0.8889	0.8102
WJW	A	9	10	10	8	9	11	15	16	16	12	11.6
	H ₀	0.2667 *	0.7333	0.7333 *	0.2000 *	0.4000 *	0.8333 *	0.5667 *	0.7000	0.6667 *	0.4000 *	0.5500
	H _E	0.8356	0.8520	0.8395	0.7831	0.8486	0.8706	0.8994	0.9141	0.9107	0.9107	0.8664
YMJ	A	7	9	11	6	8	11	16	15	14	16	11.3
	H ₀	0.3929 *	0.8929 *	1.0000	0.3214 *	0.5357 *	0.7500	0.7857 *	0.7037	0.4286 *	0.6786	0.6489
	H _E	0.5688	0.7110	0.8636	0.7526	0.8201	0.8643	0.9156	0.8707	0.9208	0.9240	0.8212
DBN	A	8	10	12	9	9	11	17	15	16	16	12.3
	H ₀	0.1379 *	0.4667 *	0.4667 *	0.4333 *	0.7333	0.9333	0.8966	0.7333 *	0.7333	0.7000 *	0.6234
	H _E	0.7102	0.8339	0.8520	0.7062	0.8463	0.8785	0.9183	0.8983	0.9102	0.9237	0.8478
HK	A	8	9	9	10	8	11	17	14	16	15	11.7
	H ₀	0.3333 *	0.6333 *	0.7000	0.5333 *	0.4000 *	0.5333	0.6333 *	0.6667	0.2000 *	0.7667	0.5400
	H _E	0.6650	0.8446	0.8040	0.7944	0.8153	0.8390	0.9215	0.8994	0.9215	0.8853	0.8390
JXH	A	8	11	11	8	9	11	16	15	16	15	12
	H ₀	0.2000 *	0.8333	0.8333	0.4483 *	0.7333 *	0.7000 *	0.3333 *	0.8000	0.7000	0.8000	0.6382
	H _E	0.6503	0.8825	0.8853	0.8294	0.8678	0.8825	0.9373	0.8746	0.9277	0.8678	0.8605
LXH	A	5	10	12	7	7	11	13	13	15	12	10.5
	H ₀	0.1739 *	0.7391	0.7391	0.2609 *	0.6522 *	0.7826	0.7391 *	0.6818 *	0.6522 *	0.6087 *	0.6030
	H _E	0.7314	0.8773	0.9092	0.8048	0.8048	0.8599	0.8957	0.8562	0.9285	0.8918	0.8560
LH	A	8	11	11	8	9	11	16	15	16	15	12
	H ₀	0.1333 *	0.8667 *	0.8667	0.4667 *	0.6667 *	0.8000 *	0.8000 *	0.8667 *	0.4000 *	0.6667 *	0.6533
	H _E	0.7175	0.8718	0.8977	0.8311	0.8147	0.8960	0.9198	0.9164	0.9215	0.9006	0.8687
SD	A	7	9	9	10	9	11	17	15	15	16	11.8
	H ₀	0.3103 *	0.2759 *	0.2759 *	0.6333 *	0.9333	0.6333 *	0.7333 *	0.5000 *	0.3103 *	0.8333 *	0.5439
	H _E	0.7629	0.7919	0.8143	0.8802	0.8672	0.8458	0.9136	0.8768	0.9377	0.8910	0.8581
XC	A	10	8	8	9	9	9	15	14	16	15	11.3
	H ₀	0.2222 *	0.9231	0.9231	0.6296 *	0.6667 *	0.6296 *	0.8148 *	0.7407 *	0.5556 *	0.5556 *	0.6661
	H _E	0.8840	0.7843	0.7632	0.8057	0.8749	0.8861	0.9113	0.9231	0.9308	0.9043	0.8668
WC	A	8	9	9	10	9	11	15	16	16	14	11.7
	H ₀	0.1000 *	0.6000 *	0.6333 *	0.6333 *	0.7333 *	0.4000 *	0.7333 *	0.9333 *	0.6667 *	0.5000 *	0.5933
	H _E	0.8141	0.8554	0.8237	0.8503	0.8689	0.8802	0.9243	0.8944	0.9322	0.9141	0.8758
DT	A	7	10	9	10	9	10	16	15	15	12	11.3
	H ₀	0.2500 *	0.2800 *	0.2800 *	0.6400 *	0.8000 *	0.6800 *	0.8400 *	0.8800	0.7200 *	0.6400 *	0.6010
	H _E	0.7606	0.8327	0.8457	0.8400	0.8343	0.8751	0.9110	0.9224	0.9208	0.8318	0.8575
ZH	A	6	9	10	7	9	9	14	11	13	12	10
	H ₀	0.0435 *	0.6087 *	0.6087 *	0.5652 *	0.6522 *	0.6522 *	0.6522 *	0.3913 *	0.6957 *	0.8261 *	0.5696
	H _E	0.7604	0.8406	0.8309	0.8261	0.8754	0.8174	0.9121	0.8870	0.9159	0.8754	0.8541

经 Bonferroni 校正后仍显著偏离Hardy-Weinberg ($P<0.003$),且表现为杂合不足。

可知,大坝外群体和星池群体遗传多样性较高,万户和湖口群体相对较低。

2.2 日本沼虾群体微卫星位点 Hardy-Weinberg 平衡分析

对每个群体中的各个位点基因平衡状态进行检验(表 5),显著性标准经 Bonferroni 法校正 ($P<$

0.003) 后,每个群体至少有 5 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡,其中金溪湖群体有 5 个位点,杨梅颈、大坝内和湖口群体有 6 个位点,大坝外和罗溪湖群体有 7 个位点,蚌湖、万户、万家湾和新池群体有 8 个位点,莲湖、舜德和大塘群体有 9 个位点,吴城和珠湖群体有 10 个位点。

2.3 日本沼虾群体瓶颈效应

鄱阳湖 15 个群体在 IAM、TPM 和 SMM3 种突变模型假设下的平均期望杂合度 H_{EQ} 如表 5。在 IAM 假设下,15 个群体的各个位点 H_E 均高于 H_{EQ} ,差异均为极显著;在 TPM 假设下,15 个群体的各个位点 H_E 均高于 H_{EQ} ,差异均为极显著;在 SMM 假设下,15 个群体的各个位点 H_E 均高于 H_{EQ} ,除 Mni133 位点外其余位点 H_E 与 H_{EQ} 差异均为极显著。符号检验和 Wilcoxon 符号秩次检验结果如表 6,在 IAM 假设下,符号检验结果显示除杨梅颈大坝内和湖口群体外其他群体均偏离了突变-漂移平衡,表现为杂合显著或极显著过剩;Wilcoxon 符号秩次检验结果显示,除杨梅颈群体外其他群体均极显著偏离了突变-

漂移平衡;鄱阳湖整个日本沼虾杂合显著过剩。在 TPM 假设下,符号检验结果显示蚌湖、大坝外、万户、王家湾、罗溪湖、莲湖、吴城和大塘群体显著偏离了突变-漂移平衡,新池群体极显著偏离了突变-漂移平衡,表现出杂合极显著过剩;Wilcoxon 符号秩次检验结果显示,蚌湖、大坝外、万户、王家湾、罗溪湖、莲湖、吴城和新池群体极显著偏离了突变-漂移平衡,表现出杂合极显著过剩;大塘群体显著偏离了突变-漂移平衡,表现出杂合显著过剩。在 SMM 假设下,符号检验结果显示鄱阳湖整个日本沼虾群体没有表现出显著或极显著过剩;Wilcoxon 符号秩次检验结果显示大坝内和湖口群体显著偏离了突变-漂移平衡,表现出杂合显著过剩。

表 5 日本沼虾群体微卫星位点瓶颈效应

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

位点	H_E	IAM			TPM			SMM		
		H_{EQ}	DH/sd	P	H_{EQ}	DH/sd	P	H_{EQ}	DH/sd	P
Mni133	0.869	0.605	1.737	0.000**	0.731	1.650	0.001**	0.823	1.218	0.056
Mni179	0.898	0.630	1.818	0.000**	0.754	2.012	0.000**	0.839	1.726	0.000**
Mni86	0.906	0.652	1.877	0.000**	0.777	1.975	0.000**	0.853	1.744	0.001**
Mni103	0.881	0.606	1.768	0.000**	0.729	1.863	0.000**	0.822	1.451	0.006**
Mni125	0.885	0.578	1.894	0.000**	0.700	1.927	0.000**	0.789	1.939	0.000**
Mni83	0.899	0.635	1.860	0.000**	0.756	1.945	0.000**	0.840	1.709	0.001**
Mni55	0.938	0.750	1.865	0.000**	0.844	2.169	0.000**	0.898	1.689	0.000**
Mni160	0.934	0.742	1.836	0.000**	0.847	2.220	0.000**	0.898	1.891	0.000**
Mni114	0.929	0.731	1.822	0.000**	0.833	2.104	0.000**	0.891	1.816	0.000**
Mni96	0.933	0.735	1.961	0.000**	0.832	2.235	0.000**	0.892	1.973	0.000**

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

表 6 日本沼虾群体突变-漂移平衡

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

群体	符号检验						Wilcoxon 符号秩次检验		
	IAM		TPM		SMM		IAM	TPM	SMM
	H_E/H_d	P	H_E/H_d	P	H_E/H_d	P	P	P	P
BH	10/0	0.006**	9/1	0.043*	4/6	0.182	0.001**	0.007**	0.922
DBW	10/0	0.007**	9/1	0.042*	5/5	0.402	0.001**	0.007**	0.375
WH	10/0	0.007**	9/1	0.042*	5/5	0.408	0.001**	0.007**	0.275
WJW	10/0	0.007**	10/0	0.005*	3/7	0.064	0.001**	0.001**	0.322
YMJ	7/3	0.395	7/3	0.366	5/5	0.410	0.131	0.922	0.432
DBN	9/1	0.052	7/3	0.371	3/7	0.067	0.003**	0.375	0.014*
HK	9/1	0.051	6/4	0.620	3/7	0.067	0.005**	0.432	0.019*
JXH	9/1	0.051	7/3	0.377	7/3	0.355	0.005**	0.375	1.000
LXH	10/0	0.007**	9/1	0.040*	7/3	0.347	0.001**	0.005**	0.375
LH	10/0	0.007**	9/1	0.041*	7/3	0.347	0.001**	0.005**	0.695
SD	10/0	0.006**	7/3	0.368	3/7	0.069	0.001**	0.275	0.275
XC	10/0	0.007**	10/0	0.005**	6/4	0.605	0.001**	0.001**	0.322
WC	10/0	0.007**	9/1	0.043*	7/3	0.353	0.001**	0.002**	0.232
DT	9/1	0.049*	9/1	0.044*	5/5	0.410	0.002**	0.032*	0.432
ZH	10/0	0.007**	7/3	0.375	4/6	0.187	0.001**	0.084	0.375
合计	10/0	0.044*	8/2	0.186	5/5	0.285	0.010*	0.169	0.404

H_E/H_d :杂合过剩与不足位点数之比; * 显著偏离平衡 ($P<0.05$); ** 极显著偏离平衡 ($P<0.01$)。

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

群体	BH	DBW	WH	WJW	YMJ	DBN	HK	JXH	LXH	LH	SD	XC	WC	DT	ZH
BH	0	0.1661	0.1122	0.1437	0.1761	0.1697	0.1695	0.2156	0.1474	0.1374	0.2077	0.1729	0.1661	0.1477	0.1605
DBW	0.0450	0	0.1562	0.1345	0.1712	0.1469	0.1440	0.1726	0.1639	0.1556	0.2104	0.1963	0.1603	0.1101	0.1171
WH	0.0367	0.0534	0	0.1227	0.1739	0.1732	0.1300	0.2308	0.1113	0.1479	0.1991	0.1588	0.1502	0.1409	0.1474
WJW	0.0391	0.0582	0.0404	0	0.1442	0.1389	0.1351	0.1942	0.1475	0.1443	0.1752	0.1782	0.1379	0.1496	0.1678
YMJ	0.0642	0.0852	0.0746	0.0557	0	0.2092	0.1954	0.2317	0.1818	0.1700	0.2059	0.2114	0.2209	0.1856	0.2140
DBN	0.0635	0.0563	0.0594	0.0641	0.0849	0	0.1409	0.1364	0.1851	0.1702	0.1932	0.1718	0.1686	0.2021	0.1664
HK	0.0678	0.0617	0.0542	0.0525	0.0939	0.0548	0	0.1829	0.1764	0.1258	0.1755	0.1573	0.1611	0.1680	0.1844
JXH	0.0676	0.0523	0.0628	0.0542	0.0813	0.0627	0.0730	0	0.2079	0.1884	0.2212	0.2054	0.2058	0.1990	0.2300
LXH	0.0500	0.0453	0.0402	0.0370	0.0622	0.0421	0.0494	0.0511	0	0.1564	0.2257	0.1852	0.1605	0.1668	0.1772
LH	0.0439	0.0547	0.0502	0.0459	0.0747	0.0596	0.0590	0.0313	0.0388	0	0.1928	0.1950	0.1815	0.1677	0.1867
SD	0.0538	0.0603	0.0661	0.0581	0.0661	0.0582	0.0665	0.0733	0.0539	0.0587	0	0.1628	0.2143	0.2374	0.1840
XC	0.0461	0.0460	0.0343	0.0461	0.0621	0.0395	0.0466	0.0512	0.0320	0.0336	0.0441	0	0.1842	0.2071	0.1724
WC	0.0353	0.0413	0.0319	0.0367	0.0700	0.0480	0.0255	0.0604	0.0296	0.0423	0.0476	0.0268	0	0.1641	0.1369
DT	0.0313	0.0324	0.0476	0.0526	0.0768	0.0503	0.0624	0.0448	0.0350	0.0353	0.0481	0.0387	0.0433	0	0.1602
ZH	0.0423	0.0528	0.0502	0.0464	0.0802	0.0540	0.0513	0.0682	0.0488	0.0481	0.0488	0.0389	0.0293	0.0502	0

表 8 日本沼虾群体分子方差分析
Table 8 AMOVA analysis among *Macrobrachium nipponense* populations

变异来源	自由度	平方和	方差组分	方差比例 (%)	分子方差分析
群体间	14	257.78	0.21	4.71	0.31
群体内个体间	435	2448.10	1.32	29.09	0.05
个体内	450	1348.00	3.00	66.20	0.34
总变异	899	4053.88	4.53		

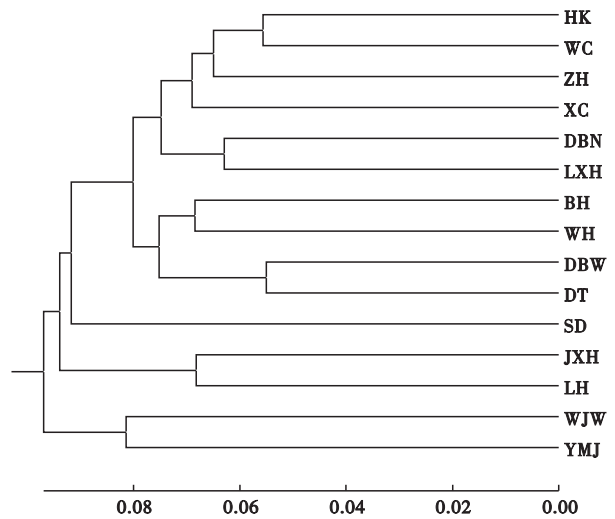


图 2 基于 D_A 遗传距离的 UPGMA 聚类树
Fig. 2 UPGMA clustering tree based on D_A genetic distance

2.4 日本沼虾群体遗传分化

大塘和舜德群体间的遗传距离最远 ($D_A =$

0.2374), 大塘和大坝外群体间的遗传距离最远 ($D_A = 0.1101$); 15 个日本沼虾群体的遗传分化指数如表 7 所示, 其中湖口和吴城群体间的遗传固定指数最小 ($F_{ST} = 0.0255$), 湖口和杨梅颈群体间的遗传固定指数最大 ($F_{ST} = 0.0939$)。AMOVA 遗传变异分析结果如表 8 所示, 群体间遗传变异占变异总量的 6.43%, 15 个群体中 95.29% 的遗传变异存在于群体内。

基于 D_A 遗传距离用 UPGMA 法构建的聚类图如图 2 所示, 湖口、吴城群体聚在一起, 大坝内、罗溪湖群体聚在一起, 蚌湖、万户群体聚在一起, 大坝外、大塘群体聚在一起, 金溪湖、莲湖群体聚在一起, 王家湾、杨梅颈群体聚在一起。

3 讨论

本研究选用 10 个微卫星位点研究在鄱阳湖中 15 个群体日本沼虾遗传多样性, 共检测到 129 个多态性等位点, 平均每个微卫星位点获得 12.9 个等位点。10 个微卫星位点的 PIC 值介于 0.8554 ~ 0.9317, 均 > 0.5, 且为高度多态性位点。显示鄱阳湖 15 个群体各位点具有很高的杂合性, 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。在遗传连锁分析中, PIC > 0.7 的微卫星标记为最理想的选择标记 (王长忠等, 2008)。本研究中的 10 个微卫星位点的 PIC 值均 > 0.7, 这 10 个微卫星

位点可用于日本沼虾遗传多样性的进一步分析及未来遗传图谱的构建。

当群体处于 Hardy-Weinberg 平衡时,各等位位点的分布频率是相对稳定的,显著性标准经 Bonferroni 法校正 ($P < 0.003$) 后每个群体至少有 5 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡,表现出杂合不足,原因可能是鄱阳湖水文环境的变化对群体内自然选择,随机自交产生影响,这一方面是因为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被动扩散(冯建彬等,2008);另一方面是因为渔民在不同水域的捕虾活动(冯建彬等,2010),以及在不同区域网箱暂养而造成了不同湖区日本沼虾的基因流动,使得鄱阳湖日本沼虾偏离了 Hardy-Weinberg 平衡。

遗传固定指数 $F_{ST} = 0 \sim 0.05$ 说明群体间的遗传差异很小; $F_{ST} = 0.05 \sim 0.15$ 说明群体间存在中等程度的遗传差异; $F_{ST} = 0.15 \sim 0.25$ 说明群体间的遗传差异比较大; $F_{ST} > 0.25$ 说明群体间的遗传差异极大(Wright, 1978)。本研究中 15 个群体的 F_{ST} 值介于 $0.025 \sim 0.094$,鄱阳湖各个群体间遗传固定指数 F_{ST} 为 0.047 ($P < 0.01$) 属于低等程度分化,群体遗传分化极显著。

瓶颈效应的分析对于遗传多样性研究非常重要,经历了瓶颈效应的群体中,微卫星位点上的等位位点数和期望杂合度 (H_E , 从等位位点频率计算而来) 会降低,但等位位点数比杂合度降低的更快,从而使得杂合度比突变-漂变平衡下根据等位位点数计算来的期望杂合度大 ($H_E > H_{EQ}$), 即杂合度过量(Piry et al., 1999)。瓶颈效应遵循 3 种进化模型: 无限等位位点模型 (IAM)、逐步突变模型 (SMM)、两步突变模型 (TPM)。已被证实,只有在符合 IAM 进化模型的位点上,才能检测出杂合度过量(Maruyama & Fuerst, 1985),在 SMM 进化模型下不会观察到杂合过度,在严格的情况下,只有少数微卫星位点完全符合一步的逐步突变模型(Cornuet & Luikart, 1997),TPM 进化模型是介于 IAM 和 SMM 之间的中间模型,大多数的微卫星位点都能较好地符号 TPM 模型。本研究在 IAM 假设下,15 个群体的各个位点 H_E 均高于 H_{EQ} ,差异均为极显著;在 TPM 假设下,15 个群体的各个位点 H_E 均高于 H_{EQ} ,差异均为极显著,反映了鄱阳湖日本沼虾群体已经偏离了突变漂变平衡。

从符号检验和 Wilcoxon 符号秩次检验的结果来看,在 IAM 进化模型下鄱阳湖日本沼虾群体显著具有杂合位点过剩,在 TPM 计划模型下,鄱阳湖日

本沼虾群体不具有显著的杂合位点过剩。由于 Wilcoxon 符号秩次检验比符号检验的统计效率高(Cornuet & Luikart, 1997),因此,本研究表明鄱阳湖日本沼虾群体近期没有经历过瓶颈效应,群体数量没有下降。

参考文献

- 冯建彬,孙悦娜,程熙,等. 2008. 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. 水产学报, **32**(4): 517-525.
- 冯建彬,吴春林,丁怀宇,等. 2010. 洪泽湖日本沼虾 9 个野生群体遗传多样性微卫星分析. 中国水产科学, **17**(2): 218-227.
- 黄秋萍,黄国勤,刘隆旺. 2006. 鄱阳湖生态环境现状、问题及可持续发展对策. 江西科学, **24**(6): 517-544.
- 孙效文,张晓峰,赵莹莹,等. 2008. 水产生物微卫星标记技术研究进展及其应用. 中国水产科学, **15**(4): 689-703.
- 汪桂玲,苏翔,李家乐,等. 2011. 背角无齿蚌基因组 (GT)n 微卫星 DNA 特征. 生态学杂志, **30**(1): 1-6.
- 王长忠,梁宏伟,邹桂伟,等. 2008. 长江中上游两个蚌群体遗传变异的微卫星分析. 遗传, **30**(10): 1341-1348.
- 杨频,陈立侨,王伟. 2010. 日本沼虾遗传多样性的 ISSR 分析. 中国水产科学, **17**(5): 913-921.
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, **196**: 80-83.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, **2**: 31-34.
- Cornuet JM, Luikart G. 1997. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**: 2001-2014.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**: 47-50.
- Maruyama T, Fuerst PA. 1985. Population bottlenecks and non-equilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics*, **111**: 675-689.
- Nei M, Tajima F, Tateno Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution*, **19**: 153-170.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM. 1999. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, **90**: 502-503.
- Rousset F. 2008. Genepop'007: A complete reimplementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**: 103-106.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wolfus GM, Garcia DK, Alcivar-Warren A. 1997. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture*, **152**: 35-47.
- Wright S. 1978. *Evolution and the genetics of populations// Invariability within and among natural populations*. Chicago: University of Chicago Press.

作者简介 苏翔,男,1985 年生,硕士研究生。从事水产动物遗传育种与种苗工程的研究。E-mail: suxiang1986@163.com

责任编辑 李凤芹