

长江不同江段青虾的遗传多样性

傅洪拓^{1,2*}, 乔慧¹, 李法君¹, 吴滢²,
龚永生², 蒋速飞², 熊贻伟², 王宁¹

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传育种和
养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081)

摘要:利用20个微卫星分子标记对长江不同江段共6个青虾群体进行了遗传多样性分析, 采样点包括重庆、万州、宜昌、武汉、九江和江阴。结果表明, 6个青虾群体平均等位基因数(A)为5.25, 平均有效等位基因数(N_e)为3.4622; 20个位点平均多态信息含量(PI)为0.5894; 期望杂合度(H_e)由高到低依次为江阴群体(0.6308)、九江群体(0.6096)、宜昌群体(0.5945)、武汉群体(0.5934)、万州群体(0.5844)、重庆群体(0.5821), 平均值为0.6296。分子方差分析(AMOVA)结果表明长江青虾6群体间遗传变异6.92%来自群体间, 93.08%来自群体内部, 两两群体间 F_{ST} 值在0.0253~0.0838($P < 0.05$)之间, 表明群体间已明显出现分化, 但分化程度中等, 与湖泊青虾群体相比, 长江各群体间遗传分化程度较弱, 可能是由于流动的江水增加了群体间的交流。Hardy-Weinberg遗传平衡分析表明, 6群体均出现杂合子缺失现象, 可能是由于稀有等位基因缺失或无效等位基因造成; 6群体间遗传距离为0.0620~0.1809, UPGMA聚类分析表明, 江阴群体单独聚为一类, 其余5个群体聚为另一类, 其中九江和武汉群体最先聚到一起, 其次万州、宜昌和重庆群体聚为一类。

关键词:青虾; 微卫星标记; 简单重复序列; 遗传多样性; 长江

中图分类号:Q 953; S 917

文献标识码:A

青虾, 学名日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*), 属于甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda)、长臂虾科 (Palaemonidae)、沼虾属 (*Palaemonidae*), 广泛分布于我国各种淡水水体, 尤以长江中下游及华南各省产量最多, 是我国淡水虾类的一个重要养殖品种。国内有关青虾的研究主要集中在养殖技术、病害防治和营养饲料等方面^[1-4]。近年来, 随着分子生物学技术的发展, 一些分子标记开始应用于青虾群体遗传学分析的研究中, 主要包括同工酶标记^[5]、线粒体DNA分子标记(*CO I*基因)^[6-7]和RAPD标记^[8-9]等。长江水系作为我国渔业的宝库, 是青虾的主要产区,

但国内对其蕴含的丰富青虾资源状况尚未有较系统、全面的调查和研究报道。

微卫星分子标记, 相对于RAPD等分子标记, 具有共显性、多态信息含量高、遗传稳定、重复性好、较易操作等优势, 已经在家系鉴定、遗传作图、群体遗传分析、育种计划以及系统发生研究等多个遗传学研究领域得到广泛应用^[10-13]。

本文拟采用微卫星分子标记, 对长江干流不同江段青虾群体的遗传多样性进行分析, 以研究长江青虾种质资源现状以及不同江段之间的遗传分化情况, 为长江青虾种质资源保护和开发利用提供理论依据。

收稿日期: 2009-09-04 修回日期: 2009-11-09

资助项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD01A13); 农业部农业科技跨越计划; 江苏省高新技术研究项目(BG2007328); 中央级基本科研业务费专项(2007JBF08, 2007JBFA08)

通讯作者: 傅洪拓, E-mail: fuht@ffrc.cn

1 材料与方法

1.1 材料

野生青虾分别取自长江干流 6 个不同地点, 采样点具体位置、时间见表 1。每个采样点采集

数十尾, 无水乙醇保存, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2 方法

基因组 DNA 提取 每个群体随机挑选 32 尾, 基因组 DNA 的提取参照 Skinner 等^[14]的方法(略作修改)进行。

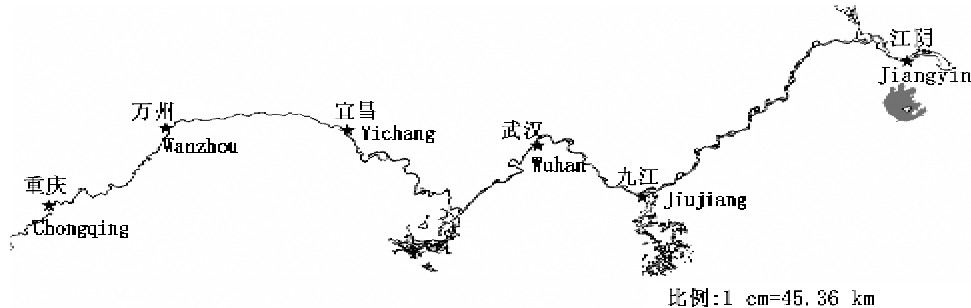


图 1 6 个采样点的地理分布图

Fig. 1 Location map of 6 sampling sites

表 1 长江青虾采样地点和时间
Tab. 1 Sources of *M. nipponense* sampled in this study

群体 population	采集时间 time	采集地点 site
重庆(CQ)	2007-07	重庆市嘉陵江入长江处 (E:106.44°, N:27.90°)
万州(WZ)	2007-07	重庆市万州区江段 (E:108.42°, N:30.75°)
宜昌(YC)	2007-08	湖北省宜昌市区江段 (E:111.28°, N:30.78°)
武汉(WH)	2007-08	湖北省武汉市金口镇江段 (E:114.33°, N:30.52°)
九江(JJ)	2007-09	江西省九江大桥上游 1 km 处江段 (E:114.33°, N:30.52°)
江阴(JY)	2007-09	江苏省江阴市区江段 (E:120.26°, N:31.91°)

PCR 反应 采用 25 μL 反应体系, 其中 2.5 mmol/L dNTP 1 μL , 10 \times Buffer 2.5 μL , 25 mmol/L MgCl_2 2 μL , 8 pmol/ μL 两侧引物各 0.75 μL , 5 U *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL , 50 ng/ μL 的 DNA 模板 2 μL , 用超纯水补足 25 μL 。微卫星引物 17 对来自本实验室筛选的微卫星序列, 其余 3 对从 GenBank 获得日本沼虾微卫星序列, 设计引物, 由上海生工生物技术有限公司合成, 引物序列见表 2。所用试剂均从上海申能博彩生物公司购置。

PCR (epENDORF Mastercycler ep 系列 PCR 仪) 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 复性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延

伸 7 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反应结束后, PCR 产物用 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, Maker 采用 PBR322/*Bsu*R I Marker。Goldview 染色 15 ~ 30 min, 凝胶成像系统拍照。

数据处理 采用 BIO-PROFIL 软件对电泳图形进行分析, PopGene (Version 3.2) 软件统计各微卫星位点的等位基因数 (number of alleles, A)、有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e)、观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e)、Hardy-Weinberg 平衡 χ^2 检验概率值 (Chi-square test value for Hardy-Weinberg equilibrium, P) 和遗传偏离指数 (Hardy-Weinberg departure value, d)、遗传距离 (genetic distance, D)、遗传相似系数 (genetic identity, I)。多态信息含量 (polymorphism information content, PIC) 由公式计算:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \left(\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n-1} 2P_i^2 P_j^2 \right)$$

式中, n 为某一位点上等位基因数, P_i 、 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, $j = i + 1$ 。使用软件 FSTAT 2.9.2 (基于无限等位基因模型 IAM) 对两两群体间的遗传分化统计值 F_{ST} 进行量化分析, 并由 Benferroni 程序计算其显著性。采用 GenALEX 6 软件进行群体间遗传变异的 AMOVA 分析。根据遗传距离用 Mega 3.1 软件, 采用 UPGMA 方法构建 6 个群体的 UPMGA 聚类图。

2 结果

2.1 微卫星引物扩增结果

本实验所选用的 20 对微卫星引物在 6 个群体中均能扩增出稳定清晰的片段并表现出稳定的多态性。位点 WXM05 在 6 个群体的扩增结果如图 2。

微卫星位点的遗传多样性参数见表 3。20 个

位点产生的等位基因数为 2~10 个,平均为 5.25;有效等位基因数为 1.4517~7.2811,平均为 3.4622。各位点的观测杂合度(H_o)为 0.1667~0.6458,平均为 0.3378;期望杂合度(H_e)为 0.3111~0.8649,平均为 0.6296。 $PIC > 0.5$ 的位点有 14 个,表现为高度多态,占全部引物的 70%; $0.25 < PIC < 0.5$ 的位点有 6 个,表现为中度多态,平均 PIC 为 0.5894。

表 2 20 对微卫星引物的特征

Tab.2 Characteristics of 20 pairs of microsatellite primers

位点 loci (登录号 accession no.)	引物序列(5'-3') primer sequences	退火温度(°C) annealing temperature	产物长度范围(bp) product size
WXM01 (GU189600)	TTCCCCACGCACCTCAAT GACATCCATGCAAAGCAACAG	54	105~150
WXM02 (GU189601)	GCCATTTTCTCATAAGGGT ACGGTGGTATTTCAGGGAT	54	155~220
WXM03 (GU189602)	AGAGGCAATTGTAGCCGAGA TGGCACGATAGGAAGGAGTT	54	185~250
WXM05 (GU189604)	ATCCTGCGAAGATCATAACGG TGCATTTGCAATCCACTCAT	54	135~185
WXM06 (GU189605)	TTGGCAAGTCTCGTCTGATG CGAGGAAACGCCTGCTAC	54	125~175
WXM07 (GU189606)	CGACGAGGCAACAGAATA TGATAATGCGAGGGAGTAA	54	234~280
WXM08 (GU189607)	CGTGACGGACGTTTACTG ATCGTTTACGAATGACTAAT	54	175~185
WXM09 (GU189608)	GTCAGTACTATGAACAATAACA GGTTTGATCTGGAAGTTTAG	52	110~145
WXM10 (GU189609)	CAAGAAGAAAGAAGCAGGTAAG ATTTCGTGATTGGCGATGAT	50	285~320
WXM11 (GU189610)	GAGCGTGGGAAATGTTAGAGA GGAGAAGGCTGCGATTAGAA	56	110~165
WXM14 (GU189612)	GCAGCAGTAAAGCAAATGAGG TTGAATTCCTTGCCCTCTCC	58	100~152
WXM15 (GU189613)	TGACAACGAGACTGCTAA TTGACGCTGCTTACATC	58	300~335
WXM16 (GU189614)	AATGTAAGAATCAGGGGAGA TCGGCAGTTGTGGGT	58	185~230
WXM17 (GU189615)	GAAAGGAACTTCAAGAGGC GGACAGTGAGCAAAGCATC	58	190~245
WXM18 (GU189616)	TCGATGGCGACTTGCA CCTCTGCCCTGACTTGAA	58	115~160
WXM19 (GU189617)	ATACAAAGAAGCGAGCATT GAGTTTAGCATTTCACCAT	54	255~265
WXM20 (GU189618)	TCCCGATGAAAGGCACA TAAAGGCGGTGATGAT	58	165~200
Mni001 (EU130924)	TTCCCTTACCTTCCAA AGGTGAAGTGATACCCTAA	50	125~160
Mni004 (EU130926)	TCTGAAGAAGCCAACG TCGACCCCAAAGTAT	46	235~265
Mni009 (EU130930)	AGAAAGGGACTGGTGG GTCTACAGGAAATGTAAAGC	54	165~185

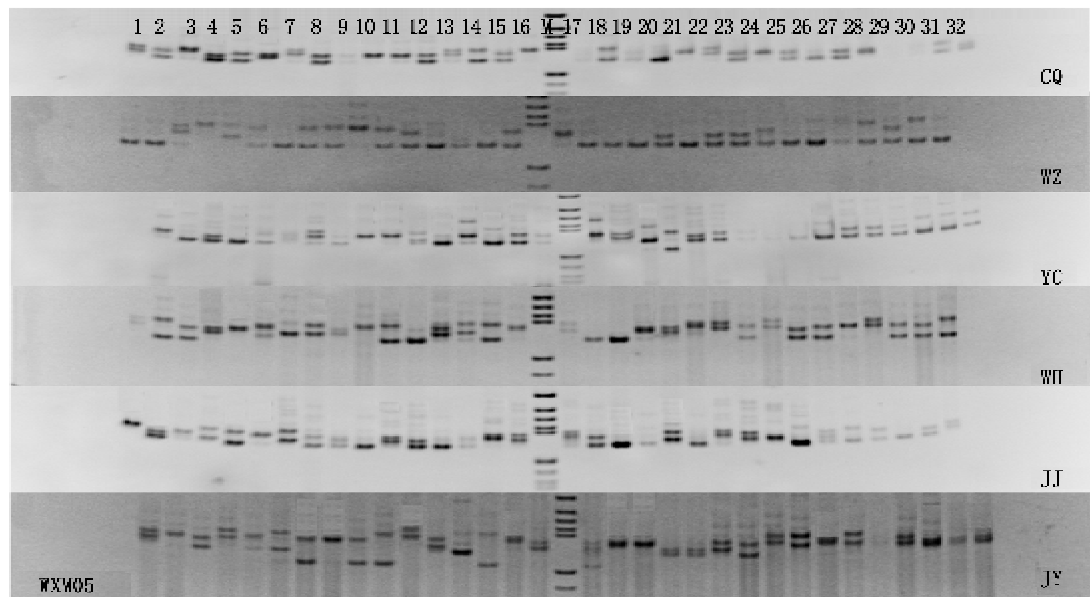


图2 微卫星位点 WXMN05 在 6 个种群的电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis patterns of microsatellite locus amplified by primer WXMN05 of 6 *M. nipponense* populations

表3 微卫星位点的等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、多态信息含量

Tab.3 Number of alleles (A), number of effective alleles (N_e), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), PIC of microsatellite loci

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
WXM01	7	4.554 8	0.427 1	0.782 5	0.751 8
WXM02	10	7.281 1	0.645 8	0.864 9	0.847 7
WXM03	7	5.765 0	0.395 8	0.828 7	0.803 4
WXM05	7	5.053 3	0.520 8	0.804 2	0.776 0
WXM06	8	6.684 9	0.557 3	0.852 6	0.832 4
WXM07	6	5.029 9	0.442 7	0.803 3	0.772 1
WXM08	2	1.451 7	0.312 0	0.311 1	0.262 7
WXM09	4	2.324 0	0.276 0	0.571 2	0.528 3
WXM10	3	1.644 0	0.166 7	0.392 7	0.356 6
WXM11	5	2.121 2	0.171 9	0.530 0	0.492 7
WXM14	7	4.305 5	0.328 1	0.769 7	0.736 8
WXM15	4	2.519 3	0.364 6	0.604 6	0.539 7
WXM16	6	3.270 8	0.338 5	0.696 1	0.655 9
WXM17	5	2.993 3	0.302 1	0.667 7	0.606 1
WXM18	5	1.585 3	0.349 0	0.370 2	0.353 8
WXM19	2	1.566 5	0.203 1	0.362 6	0.296 3
WXM20	6	4.353 8	0.312 5	0.772 3	0.735 9
Mni001	3	1.681 2	0.213 5	0.406 2	0.348 8
Mni004	4	2.220 0	0.296 9	0.551 0	0.508 1
Mni009	4	2.838 4	0.276 0	0.649 4	0.583 6
average	5.25	3.462 2	0.337 8	0.629 6	0.589 4

2.2 遗传多样性分析

6 个青虾群体遗传多样性参数见表 4。每个群体产生等位基因数为 4.900 0 ~ 5.150 0,有效

等位基因数为 2.910 4 ~ 3.253 2,其中,江阴群体产生的等位基因最多平均为 5.150 0 个,九江群体产生的等位基因最少为 4.900 0 个。各群体的

平均观测杂合度(H_o)为 0.282 8~0.373 4, 平均期望杂合度(H_e)为 0.582 1~0.630 8, 其中, 江阴群体的平均期望杂合度(H_e)最高为 0.630 8, 重庆群体的平均期望杂合度(H_e)最低为 0.582 1。

表 4 6 个青虾群体平均等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度
Tab.4 Number of alleles (A), number of effective alleles (N_e), observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) of 6 populations

群体 population	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
CQ	4.950 0	2.950 2	0.282 8	0.582 1
WZ	5.050 0	3.089 7	0.350 0	0.584 4
YC	5.000 0	2.910 4	0.314 1	0.594 5
WH	4.950 0	2.845 5	0.345 3	0.593 4
JJ	4.900 0	2.961 8	0.373 4	0.609 6
JY	5.150 0	3.253 2	0.360 9	0.630 8

2.3 群体间遗传分化分析

从表 5 的 AMOVA 分析结果可以看出, 在总变异中, 6.92% 的变异显著地归因于青虾群体间的差异, 6 个长江青虾群体存在显著的遗传分化 ($\alpha=0.01$)。

群体间成对 F_{ST} 值(表 6)表明, 武汉-江阴群体的分歧最大(0.083 8), 武汉-九江群体分歧最小(0.025 3), 平均为 0.050 1, 且 F_{ST} 值均达到显著性水平 ($P<0.05$)。

表 5 青虾 6 个群体基于 20 个微卫星位点的分子变异分析 (AMOVA)

Tab.5 Analysis of molecular variance (AMOVA) for loach populations based on 20 microsatellite loci

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	方差分量 variance components	变异的百分率(%) percentage of variation	F 统计量 F-statistics
群体间 among populations	5	293.427	1.291	6.92%	0.069 2**
群体内 within populations	186	3 232.250	17.378	93.08%	
总计 total	191	3 525.677	18.669		

注: ** 表示在 $\alpha=0.01$ 水平上显著。
Notes: ** Represents significance at $\alpha=0.01$.

表 6 青虾 6 个群体间的遗传分化指数 F_{ST}

Tab.6 F_{ST} values between 6 populations of *M. nipponense*

群体 population	CQ	WZ	YC	WH	JJ	JY
CQ						
WZ	0.031 9*					
YC	0.038 9*	0.027 3*				
WH	0.051 9*	0.055 2*	0.035 3*			
JJ	0.039 0*	0.039 6*	0.027 4*	0.025 3*		
JY	0.073 8*	0.081 3*	0.079 4*	0.083 8*	0.061 3*	

注: * 表示经连续性 Bonferroni 校正后 F_{ST} 值显著性 ($\alpha=0.05$)。
Notes: * Indicates significant pairwise F_{ST} after sequential Bonferroni corrections ($\alpha=0.05$).

利用 PopGene (Version 3.2) 软件计算了 6 个群体间的 Nei 氏遗传距离和相似系数(表 7)。6 个群体中, 武汉-江阴群体间的遗传相似系数最小(0.834 5), 遗传距离值最大(0.180 9); 武汉-

九江群体间遗传相似性指数最大(0.939 9), 遗传距离值最小(0.062 0)。根据群体间遗传距离采用 UPGMA 方法对 6 个群体进行聚类分析(图 3)。从图 3 可以看出, 6 个青虾群体可以分为 2

类。遗传距离最近的武汉和九江群体最先聚到一起,其次万州与宜昌群体聚为一起,然后与重庆群

体聚在一起;江阴群体单独聚为一类,然后与其他群体聚合。

表7 青虾6个群体的遗传相似系数 I (上三角)和遗传距离 D (下三角)
Tab.7 Inter-population genetic identification (upper triangle) and genetic distances (lower triangle) between 6 populations of *M. nipponense*

群体 population	CQ	WZ	YC	WH	JJ	JY
CQ		0.933 0	0.920 1	0.900 6	0.918 9	0.855 9
WZ	0.069 3		0.938 8	0.896 2	0.918 8	0.842 9
YC	0.083 3	0.063 1		0.924 9	0.935 6	0.841 6
WH	0.104 7	0.109 6	0.078 1		0.939 9	0.834 5
JJ	0.084 6	0.084 7	0.066 5	0.062 0		0.871 1
JY	0.155 6	0.170 9	0.172 5	0.180 9	0.1380	

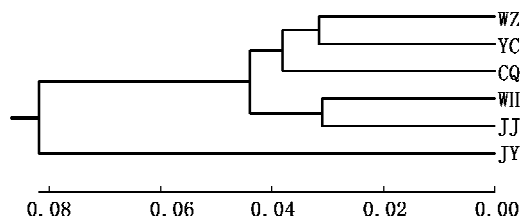


图3 6个青虾群体的UPGMA聚类图
Fig.3 Dendrogram of 6 populations by UPGMA cluster analysis

2.4 Hardy-Weinberg 平衡分析

20个微卫星位点 Hardy-Weinberg 平衡 χ^2 检验概率值 P 及遗传偏离指数 d 值(表8)。

120个群体位点组合中(6群体 \times 20位点),符合 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$)的群体位点组合有21个,占总数的17.5%,分别是万州群体的 WXM05、06、15、16、17、18,宜昌群体的 WXM08 和 Mni001,武汉群体的 WXM02、05、06、07、18、19 和 Mni009,九江群体的 WXM18、19。剩余99个群体位点组合检验为显著偏离($P < 0.05$),占总数的82.5%。120个群体位点组合中,只有2个群体位点组合 $d > 0$,表现为杂合子过剩。其余全部表现为杂合子缺失($d < 0$)。

3 讨论

3.1 遗传多样性

杨频等^[6]对长江和澜沧江流域部分青虾群体的 *CO I* 基因序列比较中发现,云南昆明群体具有较丰富的遗传多样性,而重庆群体的遗传多样性最小($h:0.700, \pi:0.008$)。冯建彬等^[7]也利用 *CO I* 基因序列比较分析了我国五大淡水湖青虾

群体遗传结构,发现鄱阳湖群体遗传多样性最高。吴滢等^[9]采用 RAPD 标记对太湖湖区不同水域(无锡、宜兴、苏州及湖州)野生青虾群体进行分析,发现宜兴湖区的野生青虾的遗传多样性最高,无锡湖区最低。

本文采用微卫星标记对长江干流6个不同江段的青虾群体遗传结构进行分析,20个位点在长江青虾群体中的平均等位基因数为5.25,平均期望杂合度 H_e 为0.6296。表明长江青虾群体的遗传多样性较为丰富。根据 H_e 大小,长江干流6个青虾群体遗传多样性由高到低依次为:江阴群体(0.6308) > 九江群体(0.6096) > 宜昌群体(0.5945) > 武汉群体(0.5934) > 万州群体(0.5844) > 重庆群体(0.5821),这一结果同杨频等^[6]的结果基本一致。

根据表3可知,长江6个青虾群体的20个位点中,14个位点表现为高度多态,其余表现为中度多态。在遗传连锁分析中,以上高度多态的标记对青虾遗传多样性的进一步分析以及未来青虾遗传连锁图谱的构建有着重要的意义。

3.2 群体间遗传分化

群体间遗传分化指数 F_{ST} 是衡量群体间遗传差异的主要指标。张天时等^[15]认为 F_{ST} 值在0~0.05,群体分化较弱;0.05~0.15 群体分化中等;0.15~0.25,表示群体遗传分化较大;当 F_{ST} 大于0.25时,表示分化极大。蒋速飞等^[8]在对六安、龙感湖、淮南、高淳4个青虾群体的遗传多样性研究中发现4个群体的 F_{ST} 值均大于0.15;冯建彬等^[7]发现五大淡水湖青虾群体遗传分化系数 F_{ST} 高达0.3187,表明湖泊青虾群体间遗传分化较大。本文中青虾群体间的 F_{ST} 值在0.0253~

0.083 8, 都显著偏离数值 0 ($P < 0.05$), 但均小于 0.15, 说明 6 个长江青虾群体已开始出现分化, 且分化程度中等。AMOVA 分析结果表明, 长江青虾 6 群体的总遗传变异 6.92% 源于群体间差异 ($P < 0.01$), 与 F_{ST} 分析结果相吻合。这可能与各

群体所处的水体环境有关。湖泊环境为相对静止、封闭环境, 水体流动性差, 且青虾活动范围较小, 较少进行长距离迁徙; 而江河水系为相对开放环境, 水体流动性强, 因此加强了各群体之间的交流, 导致群体间遗传分化较低。

表 8 Hardy-Weinberg 平衡 χ^2 检验概率值 (P) 与遗传偏离指数 (d)

Tab. 8 P value of Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium and d value of heterozygote deficiency or excess

位点 locus	CQ		WZ		YC		WH		JJ		JY	
	P	d	P	d	P	d	P	d	P	d	P	d
WXM01	0.000 0**	-0.387 0	0.000 1**	-0.489 6	0.000 0**	-0.427 0	0.013 5*	-0.384 2	0.000 3**	-0.318 3	0.000 0**	-0.514 1
WXM02	0.034 8*	-0.157 4	0.000 0**	-0.334 9	0.021 9*	-0.189 4	0.175 1	-0.206 6	0.023 8*	-0.178 3	0.000 2**	-0.157 4
WXM03	0.004 6**	-0.278 0	0.000 0**	-0.696 1	0.000 0**	-0.642 2	0.000 0**	-0.652 4	0.000 0**	-0.432 9	0.000 0**	-0.227 1
WXM05	0.000 0**	-0.369 1	0.190 6	-0.151 9	0.000 6**	-0.369 2	0.067 7	-0.215 7	0.002 3**	-0.274 5	0.005 2**	-0.312 3
WXM06	0.000 2**	-0.430 9	0.164 1	-0.020 8	0.000 0**	-0.562 5	0.415 6	-0.154 7	0.006 3**	-0.210 9	0.009 6**	-0.387 8
WXM07	0.000 0**	-0.579 3	0.003 1**	-0.331 7	0.000 0**	-0.392 4	0.065 4	-0.410 8	0.000 0**	-0.290 4	0.000 0**	-0.372 1
WXM08	0.000 2**	-0.612 1	0.001 4**	-0.518 8	0.348 0	-0.142 9	0.000 4**	-0.589 7	0.019 8*	-0.390 5	0.021 5*	-0.389 2
WXM09	0.001 3**	-0.097 3	0.000 0**	-0.609 5	0.000 1**	-0.602 5	0.000 0**	-0.354 1	0.000 0**	-0.719 5	0.017 5*	-0.369 2
WXM10	0.000 0**	-0.901 7	0.000 0**	-0.901 7	0.002 2**	-0.551 2	0.000 0**	-0.510 8	0.000 0**	-0.372 5	0.000 0**	-0.298 1
WXM11	0.002 0**	-0.382 6	0.000 0**	-0.584 9	0.000 0**	-0.894 1	0.000 0**	-0.713 6	0.000 0**	-0.611 2	0.000 0**	-0.559 2
WXM14	0.000 0**	-0.742 3	0.000 0**	-0.533 2	0.000 2**	-0.367 6	0.000 0**	-0.630 1	0.000 0**	-0.555 0	0.000 0**	-0.517 0
WXM15	0.000 0**	-0.766 9	0.061 4	-0.230 0	0.004 7**	-0.381 0	0.690 0	-0.137 1	0.000 0**	-0.066 5	0.001 5**	-0.442 0
WXM16	0.000 0**	-0.645 3	0.160 2	-0.201 9	0.000 0**	-0.484 6	0.000 0**	-0.566 9	0.002 2**	-0.401 4	0.000 0**	-0.593 9
WXM17	0.000 7**	-0.482 0	0.060 2	-0.359 5	0.000 9**	-0.471 1	0.001 0**	-0.470 4	0.000 0**	-0.477 1	0.000 0**	-0.685 5
WXM18	0.000 4**	0.030 6	0.999 9	0.099 2	0.011 3*	-0.039 0	0.956 5	0.149 7	0.770 6	0.224 9	0.023 6*	-0.400 2
WXM19	0.002 1**	-0.517 3	0.001 5**	-0.525 9	0.002 1**	-0.517 3	0.614 4	-0.072 5	0.258 7	-0.179 5	0.000 0**	-0.671 8
WXM20	0.000 0**	-0.712 3	0.000 0**	-0.678 2	0.000 0**	-0.542 0	0.000 0**	-0.470 0	0.000 0**	-0.634 3	0.001 2**	-0.410 3
Mni001	0.000 1**	-0.445 9	0.650 3	-0.037 6	0.110 2	-0.241 5	0.000 0**	-0.867 2	0.000 0**	-0.792 0	0.078 4	-0.223 1
Mni004	0.000 0**	-0.907 2	0.161 3	-0.024 6	0.000 0**	-0.572 3	0.001 0**	-0.423 4	0.007 3**	-0.104 4	0.003 8**	-0.284 2
Mni009	0.000 9**	-0.562 8	0.000 0**	-0.626 8	0.000 0**	-0.491 6	0.057 3	-0.361 5	0.001 1**	-0.502 3	0.000 0**	-0.660 1

注: * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$ 。

Notes: * means $P < 0.05$; ** means $P < 0.01$.

研究中 6 个青虾群体间遗传距离在 0.062 0 ~ 0.180 9, 其中, 武汉群体和九江群体间的遗传距离最近, 江阴群体和武汉群体间的遗传距离最远。聚类分析表明, 宜昌以上 3 个群体 (宜昌、万州和重庆) 聚为一类, 长江中游两个群体 (武汉和九江) 聚为一类, 下游江阴单独一类, 呈现出一定的规律性。

3.3 Hardy-Weinberg 平衡

长江青虾群体中, 82.5% 的群体位点组合检测为显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 且其 d 值均小于 0, 说明引起长江青虾群体偏离 Hardy-Weinberg 平衡的主要原因是杂合子缺失。表明群体内基因频率发生了较大改变。杂合子缺失可能与自然选择、种群内交、无效等位基因和稀有等位基因丢失等原因有关^[16]。本文中造成各群体杂合子缺失的原因可能有如下两个: (1) 与稀有等位基因丢失有关。6 个群体当中, 万州群体偏离平衡的位点最少, 有 12 个; 重庆群体全部位点

都偏离平衡。虽然有些群体的杂合度最高, 但某些位点上的稀有等位基因可能丢失, 造成平衡显著偏离。该现象需要在种质资源保护工作中引起高度重视。(2) 与无效等位基因的存在有关。在用微卫星分子标记对群体进行遗传分析中, 存在无效等位基因而被忽略, 将杂合子计数为纯合子, 就会在结果中产生纯合子过剩, 从而影响 Hardy-Weinberg 平衡。无效等位基因的存在在许多生物中都有报道。Li 等^[17] 在对皱纹盘鲍微卫星遗传特性的研究中, 发现皱纹盘鲍无效等位基因的比例为 10.7%。

总体来看, 采用微卫星标记对 6 个长江干流野生青虾群体的分析表明, 长江青虾目前还保持了较高的遗传多样性, 但也普遍出现了杂合子缺失现象; 与湖泊青虾群体间分化较高相比, 长江青虾群体遗传分化水平中等。因此, 在开发利用长江流域青虾丰富的资源的同时, 对长江流域青虾遗传多样性的研究和保护具有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] 何绪刚,龚世园. 日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 规模化育苗试验[J]. 内陆水产, 2003, 28(11): 36-38.
- [2] 吴惠仙,薛俊增. 日本沼虾黑鳃病几种同工酶的变化与病理分析[J]. 海洋湖沼通报, 2002, 1: 32-37.
- [3] 张凌燕,叶金云,王友慧,等. 配合饲料中不同蛋白质水平对日本沼虾生长的影响[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(6): 668-673.
- [4] 庄平,宋超,章龙珍. 长江口安氏白虾与日本沼虾营养成分比较[J]. 动物学报, 2008, 54(5): 822-829.
- [5] 傅洪拓,龚永生,吴滢,等. 日本沼虾与海南沼虾的人工种间杂交及其同工酶分析[J]. 水生生物学学报, 2004, 28(3): 327-329.
- [6] 杨频,张浩,陈立侨,等. 利用 *CO I* 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.
- [7] 冯建彬,孙悦娜,程熙,等. 我国五大淡水湖日本沼虾线粒体 *CO I* 基因部分片段序列比较[J]. 水产学报, 2008, 32(4): 517-525.
- [8] 蒋速飞,傅洪拓,龚永生,等. 日本沼虾 4 个地理群体遗传变异的 RAPD 分析[J]. 长江大学学报(自科版), 2006, 3(2): 179-182.
- [9] 吴滢,傅洪拓,李家乐,等. 太湖日本沼虾的遗传多样性分析[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(5): 620-624.
- [10] Nielsen E, Heino M B. Looking for a needle in a haystack; discovery of indigenous Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in stocked population [J]. Conservation Genetics, 2001, 2: 219-232.
- [11] Nichols K M, Young W P, Danzmann R G, et al. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Anita Genet, 2003, 34(2): 102-115.
- [12] 张于光,李迪强,饶力群,等. 东北虎微卫星 DNA 遗传标记的筛选及在亲子鉴定中的应用[J]. 动物学报, 2003, 49(1): 118-123.
- [13] 张研,梁利群,常玉梅,等. 鲤鱼体长性状的 QTL 定位及其遗传效应分析[J]. 遗传, 2007, 29(10): 1243-1248.
- [14] Skinner D D, Denoya C D. A Simple DNA polymerase chain reaction method to locate and define orientation of specific sequences in cloned bacterial genomic fragments [J]. Microbios, 1993, 75(303): 125-129.
- [15] 张天时,王清印,刘萍,等. 中国对虾人工选育群体不同世代的微卫星分析[J]. 海洋与湖沼, 2005, 36(1): 72-79.
- [16] 董秋芬,刘楚吾,郭显嵩,等. 青石斑鱼微卫星标记的筛选及群体多态性分析[J]. 水产学报, 2007, 31(6): 841-847.
- [17] Li Q, Park C, Kobayashi T, et al. Inheritance of microsatellite DNA markers in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* [J]. Mar Biotechnol, 2003, 5: 331-338.

Genetic diversity of *Macrobrachium nipponense* on a regional scale in the Yangtze River

FU Hong-tuo^{1,2*}, QIAO Hui¹, LI Fa-jun¹, WU Yan², GONG Yong-sheng²,
JIANG Su-fei², XIONG Yi-wei², WANG Ning¹

(1. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture, Freshwater Fishery Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) is one of the most important freshwater prawns for aquaculture in China. However, *M. nipponense* farming recently declined due to genetic retrogression. Its genetic diversity of different populations in the Yangtze River with microsatellite markers was investigated in order to give support to conservation and utilization of wild resources of *M. nipponense*. Twenty polymorphic microsatellite markers were applied to investigate the genetic diversity of 6 *M. nipponense* populations in the Yangtze River. The sampling sites included Chongqing, Wanzhou, Yichang, Wuhan, Jiujiang and Jiangyin. The average number of alleles (A) and effective numbers of alleles (N_e) in 6 populations were 5.25 and 3.462 2 respectively. The mean PIC value of 20 microsatellite loci was 0.589 4. Expected heterozygosity (H_e) of 6 populations was as follows: Jiangyin (0.630 8), Jiujiang (0.609 6), Yichang (0.594 5), Wuhan (0.593 4), Wanzhou (0.584 4) and Chongqing (0.582 1), and their mean value was 0.629 6. The analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that almost majority of the variance in the *M. nipponense* was within populations (93.08%), and 6.92% was among populations. The F_{ST} values between populations were 0.025 3 – 0.083 8 ($P < 0.05$), which showed the genetic divergence between populations in the Yangtze River was intermediate but lower than that in the lakes. It was probably because running water promoted the exchanges between populations. Hardy-Weinberg equilibrium analysis indicated that deficiency of heterozygote existed in all of 6 populations, which was probably because of rare allele deficiency or null alleles. The genetic distances among populations ranged from 0.062 0 to 0.180 9. The UPGMA tree showed that Jiangyin stock formed an independent clade and resident 5 populations formed another one in which Jiujiang and Wuhan populations clustered at first.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; microsatellite marker; simple sequence repeat; genetic diversity; the Yangtze River

Corresponding author: FU Hong-tuo. E-mail: fuht@ffrc.cn