

日本沼虾微卫星引物筛选及群体遗传多样性分析

冯建彬^{1,2}, 马克异¹, 李家乐^{1,3*}, 华雪铭¹, 丁怀宇²

(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. 淮阴师范学院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;

3. 上海市高校水产养殖学 E 研究院, 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要:采用 (CT)₁₅、(CA)₁₅ 两种生物素标记及磁珠富集法构建了太湖日本沼虾基因组微卫星富集文库。120 个微卫星克隆中 83 个位点的核心序列重复在 10 个以上, 长度介于 191 ~ 580 bp, 平均为 311 bp; 重复类型中, (CA/GT)_n 及 (AG/TC)_n 分别占 59.09% 及 20.45%, 还检测到 (GC)_n、(AAG)_n、(ACAA)_n 和 (GGCAGA)_n 等 17 种类型, 包括 25.75% 完美型、20.45% 非完美型和 53.80% 复合性。用其中 12 条微卫星引物扩增吴江、滨湖、宜兴和吴兴 4 个群体 240 个个体的基因组 DNA, 各位点表现出较高的遗传多样性, 除 *Mnu*86、*Mnu*103 和 *Mnu*114 外, 其它群体位点大都表现出显著的杂合子缺失, 4 个群体的遗传分化为低度分化 ($F_{ST} < 0.05$), 4 个群体中 97.58% 遗传变异存在于群体内, 仅有 2.42% 的遗传变异来自于群体之间; 吴江和吴兴群体亲缘关系最近, 与宜兴和滨湖群体亲缘关系渐远。

关键词:日本沼虾; 微卫星引物; 筛选; 遗传多样性

中图分类号:Q 346⁺.5; S 917

文献标识码:A

日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 是我国重要的淡水经济养殖虾类^[1]。我国日本沼虾的养殖业起步于二十世纪五十年代, 养殖年产量从 2004 年起均超过了 20 万吨。但最近十多年来, 对日本沼虾野生种质资源保护重视不够, 日本沼虾良种选育工作进展缓慢, 从而出现了养殖日本沼虾抗逆性减弱、性早熟、生长减慢、个体小型化等种质退化现象^[2], 因此开展日本沼虾的种质资源保护、良种选育工作, 培育生长快、品质优、抗逆性强的良种将成为日本沼虾养殖业中亟待解决的问题。

种质资源遗传多样性研究为良种选育工作提供了基础理论指导, 利用微卫星标记研究群体遗传多样性在虾类中已有较多的研究报道^[3]。目前, 国内外有关日本沼虾群体遗传多样性的报道不多, 仅见采用线粒体 *COI*^[4-5] 和 16S *rRNA*^[6] 序列片段变异方法分析了我国长江、澜沧江及五大淡水湖泊野生日本沼虾群体遗传多样性和系

统进化, 以及采用 RAPD^[7-9] 方法对长江、龙感湖、高邮湖、太湖等野生群体遗传多样性分析, 尚未见利用微卫星标记分析日本沼虾遗传多样性。日本沼虾微卫星筛选工作虽然已经展开^[10], GeneBank 中已有相关微卫星相关序列报道, 但对其各种类型微卫星及其分布特征方面还知之甚少。因此, 分离和筛选日本沼虾基因组微卫星分子标记对其种质资源保护及合理开发利用具有重要的意义。本研究开发一批微卫星序列, 同时研究了它们在基因组中的分布特征, 分析太湖中几个群体的遗传多样性, 为日本沼虾种质挖掘、利用和保护以及良种选育工作提供理论指导和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

微卫星引物筛选和群体遗传多样性分析所用野生的日本沼虾分别采集于太湖周边的江苏

收稿日期:2009-11-15 修回日期:2010-01-14

资助项目:江苏省苏北科技发展计划项目(BN2009036);江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室开放课题(HZHL0803);上海海洋大学博士科研启动基金(B-8201-08-0279);上海市科委重点科技攻关计划项目(073205111);上海市重点学科建设项目(Y1101)

通讯作者:李家乐, Tel:021-61900401, E-mail:jlli@shou.edu.cn

省吴江市、无锡市滨湖区、宜兴和浙江省湖州市吴兴区水域内,具体采样地点如表 1 所示。每个群体各采集 60 尾日本沼虾并用无水乙醇保存运回实验室,放在 -20°C 冰箱中保存备用。

表 1 日本沼虾样本采集地点
Tab.1 Sample location of *M. nipponense* stocks

群体 stocks	采集地 sampling site	地理位置 location
吴江 WJ	江苏省吴江市七都镇	N30°53' E120°26'
滨湖 BH	江苏省无锡市滨湖区蠡湖	N31°32' E124°14'
宜兴 YX	江苏省宜兴市新庄镇	N31°19' E119°50'
吴兴 WX	浙江省湖州市吴兴区塘甸乡	N30°57' E120°06'

1.2 方法

DNA 提取 采用苯酚/氯仿法提取吴江等群体日本沼虾尾部肌肉组织的 DNA,并测定其 OD 值,再经琼脂糖凝胶电泳检测后确定纯度和浓度, -20°C 保存备用。

微卫星富集文库构建及引物筛选 参照 Feng^[10] 及 Yue^[11] 等微卫星富集方法及链霉亲和素包被磁珠试剂盒 (streptavidin coated magnetic beads, Promega) 操作说明书构建日本沼虾基因组微卫星富集文库。基因组 DNA 经内切酶 Sau3AI 消化完全后,分离纯化 200 ~ 1 000 bp DNA 片段,用 T₄ DNA 连接酶与 Brown 接头 (5'-CGTCGACGGTACCGAATTCT-3'; 5'-GTCAAG AATTCGGTACCGTCGAC-3') 进行连接,再将重组 DNA 片段经 pGEM-T 载体连接并转化到大肠杆菌 DH5 α 中,从而建立日本沼虾部分基因组文库。根据对文库中克隆序列的测定,挑选含微卫星 DNA 序列的克隆,在其核心序列的两端利用 Primer premier 5.0^[12] 软件设计了相应的 PCR 引物。按照 WEBEB 等基于微卫星核心序列碱基重复模式将微卫星分为完美型 (P, perfect)、不完美型 (I, imperfect)、复合型 (C, compound) 3 种类型^[13] 的标准,判定所筛选的微卫星序列类型。

遗传多样性分析 利用筛选获得的 12 对多态性引物,对上述 4 个群体各 60 尾随机选取的日本沼虾进行遗传多样性分析。PCR 产物在 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶中分离,根据每个个体产生的条带位置确定其基因型,利用 GENPOPOP 4.0^[14] 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,根据 P 值判断杂合度缺失或过剩。用 Botstein 等^[15] 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^[16] 计算群体遗传分化的 F-统计量 (F-statistics, F_{ST}) 及分子方差分析 (AMOVA)。利用 DISPAN 计算群体间 Nei 氏遗传距离 (genetic distance, D_A)^[17], 基于 D_A 构建 UPGMA 聚类树,并进行 Bootstrap 检验。

2 结果

2.1 微卫星序列特征

随机选出 120 个克隆进行测序。在成功获得测序结果的 111 个位点中,共有 83 个序列中包含重复次数不少于 10 次的微卫星位点,占全部序列的 69.2%。

获得的微卫星序列长度大小范围为 191 ~ 580 bp, 平均为 311 bp。大部分克隆片段大小主要集中在 500 bp 以内,占 95.60%, 4 个克隆大于 500bp,占 4.39% (图 1)。日本沼虾微卫星序列组成和分布如表 2 所示, $(CA/GT)_n$ 及 $(AG/TC)_n$ 两种核心序列类型占绝大多数,分别占所分离的微卫星核序列碱基类型数目的 59.09% 及 20.45%。此外还检测到 $(GC)_n$ 、 $(AAG)_n$ 、 $(GAT)_n$ 、 $(TGA)_n$ 、 $(AAT)_n$ 、 $(ACAA)_n$ 和 $(GGCAGA)_n$ 等 17 种核心序列类型,这些类型所占的比例范围为 0.76% ~ 2.27%, 共占检测到的微卫星数目的 20.46%, 平均每种类型占 1.20%。根据此类分类标准,本研究获得的日本沼虾基因组微卫星序列中,完美型占 25.75%, 非完美型占 20.45%, 复合型占 53.80%。两个碱基重复单位的序列中, $(CA)_n > (AG)_n > (TA)_n = (CG)_n$; 三个碱基重复单位的序列中,以 $(GGA)_n$ 、 $(GAA)_n$ 最多, 其次是 $(TAG)_n$ 、 $(TAA)_n$ 。碱基重复序列的次数介于 4 ~ 46。

2.2 遗传多样性分析

用筛选获得的 12 对多态性引物对太湖 4 个群体进行群体遗传学分析,12 对引物的核心序列、产物片断大小、退火温度等情况如表 3 所示。12 对引物在 4 个群体中均得到较好扩增,图 2 为 Mni53 引物在 4 个群体的扩增图谱。各位点等位基因数及多态信息含量如表 4 所示,12 个微卫星

位点等位基因数介于 16 ~ 46 个, *Mni31* 获得 46 个等位基因, 等位基因数最多; *Mni120* 其次, 为 27 个等位基因。12 个等位的多态信息含量 PIC 介于 0. 873 1 ~ 0. 956 1, 其中 *Mni31* 最高, *Mni120* 其次, 其余也都属于高度多态性, 可用于遗传多样性分析。

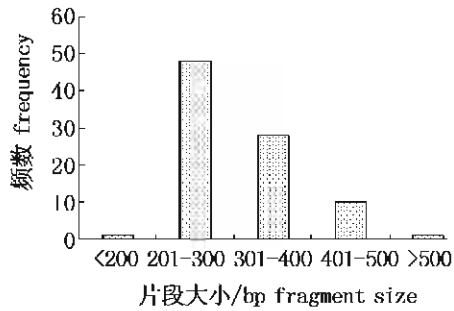


图 1 日本沼虾微卫星长度的频率分布
Fig. 1 Length distribution of microsatellite in the genome of *M. nipponense*

表 2 日本沼虾基因组微卫星特征分析
Tab. 2 Characterization of microsatellites in *M. nipponense* genome

微卫星种类 microsatellite species	微卫星分类 classification of microsatellite				
	P perfect	I imperfect	C compound	总计 total	百分比(%) percentage
(CA/GT) _n	27	24	27	78	59.09
(AG/TC) _n	7	3	17	27	20.45
(TA) _n	0	0	3	3	2.27
(CG) _n	0	0	3	3	2.27
(GGA) _n	0	0	3	3	2.27
(GAA) _n	0	0	3	3	2.27
(TAG) _n	0	0	2	2	1.52
(TAA) _n	0	0	2	2	1.52
(AGA) _n	0	0	1	1	0.76
(TTG) _n	0	0	1	1	0.76
(TGA) _n	0	0	1	1	0.76
(GCT) _n	0	0	1	1	0.76
(CAG) _n	0	0	1	1	0.76
(GGC) _n	0	0	1	1	0.76
(GTTT) _n	0	0	1	1	0.76
(ACAA) _n	0	0	1	1	0.76
(GGGAG) _n	0	0	1	1	0.76
(TGCTGA) _n	0	0	1	1	0.76
(GGCAGA) _n	0	0	1	1	0.76
total	34	27	71	132	

表 3 日本沼虾 12 个多态性微卫星位点的各项指标
Tab. 3 Characteristics of twelve polymorphic microsatellite loci from *M. nipponense*

位点 locus	核心序列 motif	引物序列 primer (5'-3')	等位基因大小 (bp) size range	退火温度(℃) annealing temperature	GenBank accession number
<i>Mni31</i>	(GT) ₇	TCGGCATATTTCTTTACCT ACAAACACCCCTTTCTCCAT	180 ~ 210	57	GQ257528
<i>Mni39</i>	(TG) ₁₂	AGTCCTGTGAAGGGTCTA GCAGAATACGGTAACATT	237 ~ 258	51	GQ257536
<i>Mni47</i>	(AG) ₁₀ ... (GT) ₁₀	CAAATGCCACGCAGGTAC GGAGAAAGGCTTCAAGGA	114 ~ 156	56	GQ257544
<i>Mni55</i>	(AG) ₂₇ ... (GA) ₉	ATACATCACCCCTCAATAGC TATAAAGCCACATTGTCC	168 ~ 249	57	GQ257552
<i>Mni67</i>	(AG) ₂₁	TCTGTAGTGGGCATTGGT GCTGTCTTCTGGTCTCA	246 ~ 297	56	GQ257564
<i>Mni77</i>	(CA) ₄ ... (AC) ₉ ... (AC) ₁₀	TGAGGGCGGACAGAATA TCITGAAAGGCGGTAATGG	375 ~ 396	53	GQ257574
<i>Mni86</i>	(AC) ₁₁ ... (AC) ₅	TACTAACACCGAAGCTATGC AACAGTCACAACCGAACC	168 ~ 213	59	GQ257583
<i>Mni93</i>	(TG) ₄ ... (TG) ₁₅	TCACAGCACGAGATAACA TGCCGATTCTGGACTTTA	216 ~ 264	53	GQ257590
<i>Mni96</i>	(TG) ₄₆	AAGTAAAGAAGAGCCCCAACA CCAAGTGCCAACCAAGTAA	186 ~ 252	54	GQ257593
<i>Mni103</i>	(GC) ₄ ... (GT) ₁₃	TAGCGTGAGTCTAGCAAC ATGGTAGGGAGAAAGTGT	153 ~ 202	58	GQ257600
<i>Mni114</i>	(TG) ₂₂ ... (GA) ₂₀	CTCGTCTTGCCACTCTT TGACCCGTCTATGTTCGT	195 ~ 237	50	GQ257610
<i>Mni120</i>	(TG) ₁₆	ATTTCTTCCCAATCTCG TTGCCTGATTAGTGGTAT	135 ~ 174	48	GQ257616

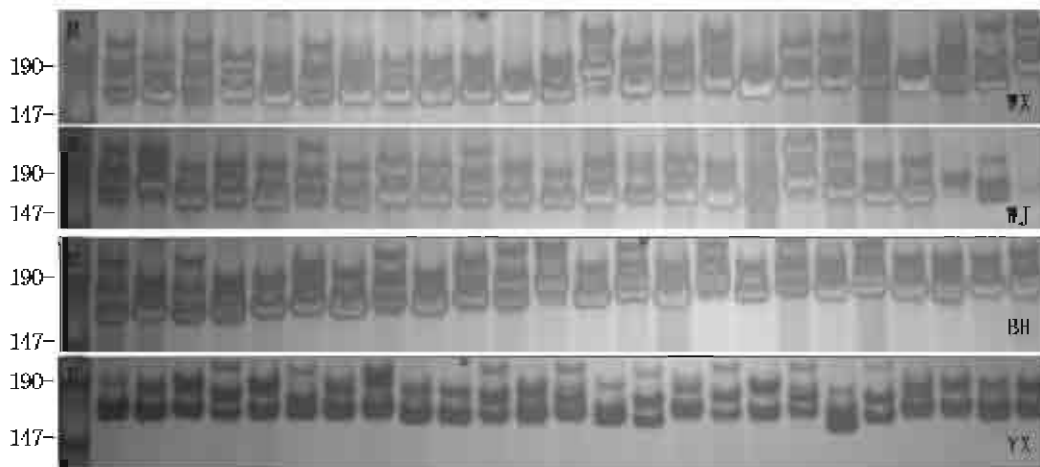


图 2 *Mni114* 在 4 个群体扩增图谱

M 为标准分子量。

Fig. 2 Electrophoretograms of locus *Mni114* in *M. nipponense* stocks

M means standard molecular weight.

表 4 日本沼虾 12 个微卫星位点有效等位基因数、杂合度及多态信息含量

Tab. 4 Statistics of number of effective alleles, expected and observed heterozygosity and polymorphism information content for 12 microsatellite loci of *M. nipponense*

位点 locus	等位基因数 number of alleles, A	有效等位基因数 number of effective alleles, N_e	期望杂合度 expected heterozygosity, H_e	观测杂合度 observed heterozygosity, H_o	多态信息含量 polymorphism information content, PIC
<i>Mni31</i>	46	23.66	0.959 7	0.687 5	0.956 1
<i>Mni39</i>	23	15.49	0.937 4	0.870 8	0.931 6
<i>Mni47</i>	19	11.74	0.916 7	0.525 0	0.908 7
<i>Mni55</i>	20	13.50	0.927 9	0.820 8	0.921 0
<i>Mni67</i>	20	12.28	0.920 5	0.683 3	0.912 8
<i>Mni77</i>	16	8.56	0.885 1	0.750 0	0.873 1
<i>Mni86</i>	23	11.98	0.918 4	0.945 8	0.910 7
<i>Mni93</i>	19	10.75	0.908 8	0.666 7	0.899 6
<i>Mni96</i>	23	10.30	0.904 8	0.854 2	0.895 1
<i>Mni103</i>	17	11.67	0.916 2	0.920 8	0.907 9
<i>Mni114</i>	16	9.30	0.894 3	0.945 8	0.882 8
<i>Mni120</i>	27	16.30	0.940 6	0.762 5	0.935 2

4 个群体遗传多样性如表 5 所示,宜兴群体平均等位基因数最大($A = 18.25$),吴江群体最小($A = 14.17$),滨湖群体平均期望杂合度($H_e = 0.9149$)最大,吴江群体最小($H_e = 0.8886$)。由此可知,宜兴和滨湖群体遗传多样性较高,而吴江群体相对较低。4 群体 12 个微卫星位点除 *Mni86*、*Mni103* 和 *Mni114* 没有显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡外,其他位点的显著性标准经 Bonferroni 法校正($P < 0.003$)后,仍至少在 2 个群体中显著偏离 Hardy-Weinberg 定律,并表现出显著的杂合子缺失。

4 个群体间的 Nei 氏遗传距离和遗传分化指数(F_{ST})如表 6 所示,经 UPGMA 聚类分析显示,距离最小的吴江和吴兴群体首先聚在一起,然后再依次与宜兴和滨湖群体进行聚类。4 个群体的遗传分化指数均小于 0.03,表明 4 个群体的遗传分化为低度分化,但显著性水平为极显著($P < 0.01$)。AMOVA 分析如表 7 所示,4 个群体中 97.58% 遗传变异存在于群体内,仅有 2.42% 的遗传差异来自于群体间,但群体间遗传分化极显著($P < 0.01$)。

表 5 4 个日本沼虾群体微卫星遗传多样性

Tab. 5 Summary statistics analysis of genetic diversity in *M. nipponense* stocks

指数 index	位点 locus												总计 total	
	Mni31	Mni39	Mni47	Mni55	Mni67	Mni77	Mni86	Mni93	Mni96	Mni103	Mni114	Mni120		
YX	A	39	19	14	16	16	15	18	16	19	13	11	23	18.25
	Ho	0.6667*	0.8167*	0.6167*	0.8167	0.5167*	0.7667*	0.9667	0.6167*	0.8333*	0.9500	0.9667	0.6667*	0.7667
	He	0.9688	0.9875	0.8926	0.9049	0.9165	0.8700	0.8994	0.9132	0.9172	0.8983	0.8878	0.9308	0.9110
BH	A	23	21	14	17	15	15	21	15	14	17	13	20	17.06
	Ho	0.7833*	0.7667*	0.3333*	0.8500*	0.7167*	0.7833*	0.9167	0.5833*	0.7167*	0.9167	0.9000	0.7333*	0.7500
	He	0.9506	0.9361	0.8994	0.9275	0.8940	0.9042	0.9153	0.8962	0.9029	0.9305	0.8888	0.9332	0.9149
WJ	A	22	15	13	14	14	13	11	13	13	12	13	17	14.17
	Ho	0.6667*	0.9167	0.6333*	0.8167	0.8000*	0.6500*	0.9167	0.6333*	0.9333	0.9667	0.9500	0.7333*	0.8056
	He	0.9374	0.9136	0.8727	0.9134	0.8931	0.8378	0.8536	0.8644	0.8727	0.8867	0.8960	0.9197	0.8386
WX	A	20	19	11	17	15	11	12	12	15	11	15	20	14.83
	Ho	0.6333*	0.9333	0.5167*	0.8000	0.7000*	0.8000	0.9333	0.7333	0.9333	0.8500	0.9667	0.9167	0.8222
	He	0.9314	0.9307	0.8590	0.9006	0.8998	0.8289	0.8997	0.8805	0.8375	0.8845	0.8702	0.9336	0.8921

注: * 为经 Bonferroni 校正后仍显著偏离 Hardy-Weinberg, 且位点表现为杂合不足。

Notes: * means significant deviations Hardy-Weinberg expectations after Bonferroni correction ($P < 0.003$), locus was heterozygote deficiency.

表 6 4 个日本沼虾群体间 F_{ST} 统计量 (F_{ST} , 对角线下) 和遗传距离 (DA, 对角线上)

Tab. 6 F -statistics and genetic distance (DA, above diagonal) among *M. nipponense* stocks

群体 stocks	YX	BH	WJ	WX
YX		0.1984	0.1822	0.1638
BH	0.0258		0.2080	0.1905
WJ	0.0227	0.0294		0.1272
WX	0.0198	0.0287	0.0183	

表 7 4 个日本沼虾群体分子方差分析

Tab. 7 AMOVA analysis among *M. nipponense* stocks

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 stocks	3	66.625	0.13411 V_a	2.42*
群体内个体间 among individual within stock	236	1 443.183	0.699 26 V_b	12.60*
个体内 within individuals	240	1 132	4.7166 7 V_c	84.98*
总变异 total variation	479	2 641.808	5.550 03	

注: * 为经过 1 023 次模拟检验后极显著 ($P < 0.01$)。

Notes: * means extreme significance ($P < 0.01$) after 1 023 permutation tests.

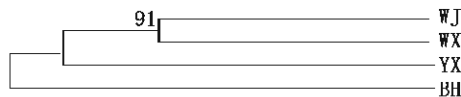


图 3 基于 D_A 遗传距离的 UPGMA 聚类树

数字表示 Bootstrap 的置信度。

Fig. 3 UPGMA clustering tree based on

D_A genetic distance

Number indicate Bootstrap confidence values.

3 讨论

微卫星分子标记的筛选是以基因组中不同核心重复序列在基因组中的丰度为基础的, 在已筛选的虾类基因组微卫星位点中, 中国对虾 (*Penaeus orientalis*) 的 AT 重复多于 AC 和 AG, AAT 重复多于 AAG 和 ATC^[18]; 斑节对虾 (*P. monodon*) 的 CT 重复多于 GT、AT 和 CG^[19]; 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的 AG 重复多于 AC 和 AT^[20]; 罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)

的 AG/CT 类型最多,其次是 GT^[21-22]。本研究中,日本沼虾的 CA/GT 类型最多,其次为 AG/TC,这与本实验室先前筛选的微卫星位点也是这两种类型的重复序列最多^[10]以及动物中微卫星 DNA 一般以 CA/GT 重复为主相一致,进一步说明了在日本沼虾 CA/GT 和 AG/TC 两种类型的重复序列最多。但也有报道显示,在斑节对虾等^[19,23]甲壳动物基因组中存在着丰富的 (AT)_n 重复序列^[24],但 (AT)_n 探针的自身互补及杂交结合力较弱,因而本研究仅采用了 (CA)₁₅ 和 (CT)₁₅ 两种类型的生物素探针,对于日本沼虾基因组中 (AT)_n 重复序列丰度仍未清晰,因而对日本沼虾微卫星的类型和分布规律的认识也有一些局限性。另外,本研究获得的日本沼虾基因组微卫星序列中复合型占 53.80%,而完美型和不完美型均低于 30%,而在凡纳滨对虾基因组中完美性非常丰富^[19],在斑节对虾复合型序列和完美性序列均有超过 50% 的报道^[23,25],也有不完美型序列最为丰富的报道^[26]。不同虾类基因组中微卫星序列重复类型不同,这可能与不同虾类间基因组差异较大有关,也可能与研究分离的微卫星数量不够有关。

本研究选用 12 个微卫星位点研究太湖中 4 个群体日本沼虾遗传多样性,共检测到 269 个等位基因位点,平均每个微卫星位点获得了 22.4 个等位基因, PIC 值介于 0.873 1 ~ 0.956 1,这充分显示了 12 个微卫星位点在日本沼虾中具有高度多态信息含量 (PIC > 0.5)^[15];平均期望杂合度介于 0.914 9 ~ 0.888 6,显示各群体各位点具有很高的杂合性, Hardy-Weinberg 平衡分析显示,除 Mni86、Mni103 和 Mni114 没有显著偏离外,其它位点的显著性标准经 Bonferroni 法校正 ($P < 0.003$) 后,至少在 2 个群体位点出现显著的杂合子缺失,这可能与太湖中日本沼虾近年来受到的人为干扰程度较大,群体内自然选择或发生自交引起的。4 个群体间遗传分化指数 (F_{ST}) 和方差分析结果显示,4 个群体的遗传分化程度较低 ($F_{ST} < 0.05$),但仍达到显著性水平 ($P < 0.01$),遗传变异的 97.58% 存在于群体内,仅有 2.42% 的遗传变异来自于群体间,这可能是与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相关^[4]。4 个群体

UPGMA 聚类分析显示,吴江和吴兴群体遗传距离最小,亲缘关系最近,宜兴和滨湖群体的遗传距离逐步扩大,亲缘关系渐远,这与吴滢等^[9]采用 RAPD 分析得结果基本一致,也基本反映了其地理距离的远近以及日本沼虾的生物地理进化关系。太湖流域是日本沼虾重要的养殖区域,因而仍需加强对该地区的日本沼虾种质资源遗传多样性保护和研究,这对保持日本沼虾养殖业的持续健康发展十分有益。

参考文献:

- [1] 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, 15(3): 371-376.
- [2] 李家乐, 袁式忠. 浅谈青虾养殖中的品种问题[J]. 科学养鱼, 2005, (8):5.
- [3] 孙悦娜, 冯建彬, 李家乐. 微卫星标记技术在虾类分子遗传学研究中的应用[J]. 海洋渔业, 2006, 28(2):167-172.
- [4] 冯建彬, 孙悦娜, 李家乐. 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.
- [5] 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.
- [6] 孙悦娜, 冯建彬, 李家乐, 等. 日本沼虾三群体线粒体 16SRNA 基因片段序列的差异与系统进化[J]. 动物学杂志, 2007, 42(1):59-66.
- [7] 蒋速飞, 傅洪拓, 熊贻伟, 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(自然科学版), 2006, 3(2):179-182.
- [8] 朱银安, 单红, 王庆, 等. 长江、高邮湖、太湖日本沼虾遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 水产养殖, 2008, (1):5-7.
- [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] Feng J B, Li J L. Twelve polymorphic microsatellites in Oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* [J]. Mol Ecol Res, 2008, 8(5): 986-988.
- [11] Yue G H, Chen F, Orban L. Rapid isolation and characterisation of microsatellites from the genome of Asian arowana (*Scleropages formosus*) [J]. Mol Ecol, 2000, (9): 1007-1009.
- [12] Lalitha S. Biotech Software & Internet Report[R]. 2000: 270-272.
- [13] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n

- (dG-dT)_n polymorphisms[J]. *Genomics*, 1990, 7 (3):524-530.
- [14] Francois R. GENEPOP'007: a complete e-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux [J]. *Mol Ecol Res*, 2008, 8(1):103-106.
- [15] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 1980, 32 (3):31-34.
- [16] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evol Bioinformatics Online*, 2005, 1(1):47-50.
- [17] Nei M, Tajima F, Tateno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data[J]. *J Mole Evol*, 1983, 19(3):153-170.
- [18] 高焕, 刘萍, 孟宪红, 等. 中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 基因组微卫星特征分析[J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(5):424-431.
- [19] Xu Z, Dhar A K, Wyrzykowski J, et al. Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome [J]. *Anim Genet*, 1999, 30(2):150-156.
- [20] 贾智英, 全迎春, 梁利群, 等. 凡纳滨对虾微卫星 DNA 的筛选及其特性的研究[J]. *上海水产大学学报*, 2007, 16(1):11-15.
- [21] Chand V, de Bruyn M, Mather P B. Microsatellite loci in the eastern form of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) [J]. *Mol Ecol Res*, 2005, (5):308-310.
- [22] Charoentawee K, Poompuang S, Nakorn U. Isolation and characterization of microsatellites in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Mol Ecol Res*, 2006, (6):823-825.
- [23] Tassanakajon A, Tiptawonnukul A, Supungul P, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon* [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1998, 7(1):55-61.
- [24] Bachmann K, Rheinsmith E L. Nuclear DNA amounts in Pacific Crustacea [J]. *Chromosoma*, 1973, 43(2):225-236.
- [25] 夏军红, 朱彩艳, 苏天凤, 等. 斑节对虾基因组微卫星分离及其序列特征研究[J]. *南方水产*, 2006, 2(6):1-7.
- [26] Suwit W, Prajuab L. Development of microsatellite markers in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) [J]. *Aquaculture*, 2003, 224(1):39-50.

Isolation and genetic diversity analysis of microsatellite DNA in *Macrobrachium nipponense*

FENG Jian-bin^{1,2}, MA Ke-yi¹, LI Jia-le^{1,3*}, HUA Xue-ming¹, DING Huai-yu²

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for Eco-Agricultural Biotechnology Around Lake Hongze, Huaiyin Normal College, Huaian 223300, China;

3. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Microsatellite-enhanced genomic library of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* of Lake Taihu was constructed using repeat-enrichment method with biotin-labeled oligos [(CA)₁₅ and (CT)₁₅] and streptavidin magnetic beads. From a total of randomly selected 120 clones, 83 clones with more than ten motif repeats were positive. And the sequence size ranges from 191 to 580 bp with an average of 311 bp. The (CA/GT)_n and (AG/TC)_n were the abundant microsatellite motifs with a percentage of 59.09% and 20.45% in the isolated microsatellites. Other 17 types of repeat sequences were detected, including repeats consisting of (GC)_n, (AAG)_n, (ACAA)_n and (GGCAGA)_n. Characterization of these microsatellites showed that 25.75% of sequences were classified as perfect type, 20.45% as imperfect type and 53.80% as compound type. Genetic diversity of 4 wild stocks of *M. nipponense* in 4 sites of Lake Taihu, i. e. Wujiang (WJ), Binhu (BH), Yixing (YX) and Wuxing (WX), were investigated using 12 microsatellite DNA loci from the isolated primers. The allele numbers, effective allele numbers, observed heterozygosity and expected heterozygosity under Hardy-Weinberg equilibrium were estimated to characterize genetic diversity. The result showed that all the 12 loci in the 4 stocks were highly polymorphic. Tests of departures from Hardy-Weinberg equilibrium indicated the loci except *Mni86*, *Mni103* and *Mni114* in each stock with significant heterozygosity deficiency. F_{ST} and AMOVA analysis across all stocks and loci indicated that there was low level of divergence among 4 stocks. The UPGMA clustering tree based on D_A genetic distance demonstrated that Wujiang and Wuxing stocks have near relationship, and they have a distant relationship with Wuxi and Yixing stocks.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; microsatellite; isolation; population genetic diversity

Corresponding author: LI Jia-le. E-mail: jlli@shou.edu.cn