

淮河水系日本沼虾群体遗传结构和系统演化的 线粒体 COI 序列分析

姜虎成^① 冯建彬^{①②*} 丁怀宇^② 汪桂玲^① 李家乐^①

① 上海海洋大学 省部共建水产种质资源创新与利用重点实验室 上海 201306;

② 江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室 淮阴师范学院 淮安 223300

摘要:测定了淮河水系 17 个日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 野生群体共 248 个个体的线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (COI) 部分序列, 获得 623 bp 核苷酸片段, 包括 48 个变异位点, 定义了 31 个单倍型, 共享单倍型有 12 个, 整体单倍型多样性和平均核苷酸多样性均处于中间水平。AMOVA 分析表明, 17 个群体间的遗传分化系数 $F_{st} = 0.0413$ ($P < 0.05$), 群体间遗传分化较小。Kimura 2-parameter 遗传距离在五河与焦岗湖、花家湖及瓦埠湖群体间最大, 为 0.014, 在高邮和邵伯湖群体之间最小, 为 0.003。MP 系统树与单倍型进化网络关系图具有较高的一致性, 31 个单倍型被分为 3 个进化枝, 其中一个进化枝主要以下游群体为主, 另外 2 个进化枝主要以中游群体为主。群体中性检验、错配分析表明, 淮河日本沼虾近期曾经历过种群扩张。

关键词: 日本沼虾; 细胞色素氧化酶亚基 I; 遗传结构; 系统演化; 淮河

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2012)02-73-12

Genetic Structure and Phylogeography of Natural *Macrobrachium nipponense* Populations in Huaihe River Based on Mitochondrial COI Sequence

JIANG Hu-Cheng^① FENG Jian-Bin^{①②*} DING Huai-Yu^② WANG Gui-Ling^① LI Jia-Le^①

① Key Laboratory of Ministry of Education for Aquatic Germplasm Enhancement and Utilization, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

② Jiangsu Key Laboratory for Eco-Agricultural Biotechnology around Hongze Lake, Huai'an 223300; China

Abstract: Genetic structure and phylogeography of seventeen natural populations of *Macrobrachium nipponense* in Huaihe River were analyzed based on mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) gene sequence. Total DNA was extracted from 10 – 19 individuals of each population. A fragment of the 623 bp COI gene was amplified using the primers LCO1492 and HCO2198. 48 variable nucleotides were detected, and 31 haplotypes with 12 shared haplotypes were found in 17 populations. The result of haplotypic and nucleotide diversity analysis showed a middle genetic diversity. AMOVA analysis across all populations showed that there were low levels of genetic divergences among the 17 populations ($F_{st} = 0.0413$, $P < 0.05$). The Kimura 2-parameter

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31001111), 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室项目 (No. KFT2008-3), 江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室开放课题 (No. HZHL0803), 江苏省苏北科技发展计划项目 (No. BN2009036);

* 通讯作者, E-mail: jbfeng@shou.edu.cn;

第一作者介绍 姜虎成, 男, 硕士研究生; 研究方向: 水产动物种质资源与种苗工程; E-mail: hcjiang@163.com。

收稿日期: 2011-10-24, 修回日期: 2012-01-04

genetic distance between Wuhe and Jiaogang, Huajia, Wabu populations ($D_A = 0.014$) was higher than that between other populations. UPGMA tree and haplotype network based on the 31 haplotypes indicated that the populations of the lower Huaihe River formed one clade and the populations of the middle Huaihe River formed the two others. The biomodel mismatch distribution of pairwise haplotype difference and the neutrality tests showed that population expansion occurred. These results would offer theoretical direction for the protection and utilization of the *M. nipponense* in Huaihe River.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; Cytochrome oxidase subunit I; Genetic structure; Phylogeography; Huaihe River

日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 作为我国重要的淡水经济虾类,一直是淮河水系及附属湖泊中资源量较大的虾类。1980 年以前仅下游洪泽湖中年产量就达 800 t^[1-2],但自 20 世纪 80 年代中期以来,由于淮河日本沼虾资源的利用和增殖研究的缺乏,以及持续的无序开发、生境紊乱等原因,淮河水系日本沼虾野生资源遭到破坏,表现为产量降低、个体变小、低龄化等。目前,有关淮河水系日本沼虾等水产生物资源的研究,早期仅见 1982 年的水产资源调查研究^[2],近 10 年来才逐渐采用了同工酶、微卫星标记,分析了淮河鲤 (*Cyprinus carpio*) 以及洪泽湖日本沼虾、河蚬 (*Corbicula fluminea*)、三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 等生物的种质资源^[3-6],至今仍未见对整个淮河水系日本沼虾等水产生物种质资源的研究报道。因此,充分了解整个淮河水系的日本沼虾种质资源现状,对其野生资源的有效保护和合理利用,具有重要的理论与应用价值。

国内外有关日本沼虾种质资源的研究,主要采用 SSR、线粒体基因序列变异等方法分析了长江中下游、五大淡水湖泊等水域野生群体的遗传结构,其中线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (cytochrome oxidase subunit I, COI) 序列片段已被作为线粒体 DNA 的主要标记,用于探讨属级以下近缘种及种群等低级阶元的群体遗传结构和系统进化关系^[7-10],也有较多的应用在日本沼虾等虾类分子生态学研究^[11-12]。本研究通过测定淮河水系野生日本沼虾 COI 基因片段序列变异,分析其群体遗传和系统演化状况,以期对野生种质资源的保护、利用及遗传育种研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料 研究用的 17 个日本沼虾野生群体于 2010 年 8 月采自淮河水系主要水体 (图 1、表 1),无水乙醇固定后 -20℃ 保存。

表 1 淮河日本沼虾样本采集位置

Table 1 Sample sites of *Macrobrachium nipponense* in Huaihe River

群体 Population	采集地 Sample site	地理位置 Location
平岗 (BG)	安徽省阜阳市	N32°50' E116°20'
Bangang	颍上县平岗镇	
城东湖 (CD)	安徽省六安市	N32°18' E116°20'
Chengdonghu	霍邱县新店镇	
正阳关 (ZY)	安徽省六安市	N32°28' E116°31'
Zhengyangguan	寿县正阳关镇	
焦岗湖 (JG)	安徽省淮南市	N32°61' E116°63'
Jiaoganghu	凤台县焦岗乡	
花家湖 (HJ)	安徽省淮南市	N32°42' E116°39'
Huajiahu	凤台县岳张集镇	
瓦埠湖 (WB)	安徽省六安市	N32°31' E116°54'
Wapuhu	寿县陶店回族乡	
高塘湖 (GT)	安徽省淮南市	N32°43' E117°08'
Gaotanghu	上窑镇	
芡河 (QH)	安徽省蚌埠市	N32°56' E116°59'
Qianhu	怀远县荆茨乡	
天河 (TH)	安徽省蚌埠市	N32°53' E117°13'
Tianhe	怀远县马城镇	
花园湖 (HY)	安徽省滁州市凤阳县枣巷渔业乡	N33°01' E117°51'
Huayuanhu		
五河 (WH)	安徽省蚌埠市	N33°08' E117°53'
Wuhe	五河县城关镇	
女山湖 (NS)	安徽省明光市	N32°95' E118°25'
Nvshanhu	女山湖镇	
老子山 (LZ)	江苏省淮安市	N33°18' E118°60'
Laozishan	洪泽县老子山镇	
金湖 (JH)	江苏省淮安市	N33°03' E119°03'
Jinhu	金湖县	
界首 (JS)	江苏省扬州高邮市	N33°00' E119°25'
Jieshou	界首镇界首村	
高邮 (GY)	江苏省扬州高邮市	N32°43' E119°24'
Gaoyou	高邮镇湖滨	
邵伯湖 (SB)	江苏省江都市	N32°53' E119°51'
Shaobohu	邵伯镇	

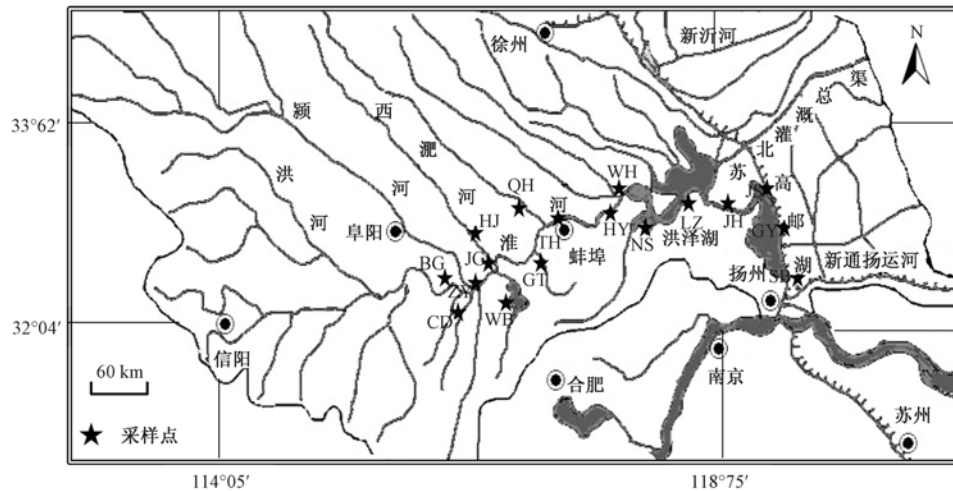


图 1 淮河 17 个日本沼虾群体的采样位点

Fig. 1 Sample sites of 17 *Macrobrachium nipponense* populations in Huaihe River

种群名称详见表 1。The names of populations were shown in Table 1.

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 用苯酚/氯仿法^[13]随机提取各群体 10~19 个个体的基因组 DNA,测定质量后, -20℃ 保存。

1.2.2 PCR 扩增和 DNA 序列测定 PCR 扩增上游引物 LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') 和下游引物 HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3')^[14],由上海生工生物技术有限公司合成。

25 μ l 的 PCR 反应体系包括:模板 DNA 30~50 ng, 10 \times Buffer 2.5 μ l, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, dNTP 各 0.2 mmol/L, 上、下游引物各 0.2 μ mol/L, Taq 酶 1 U。扩增程序为:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。每次反应都设不含模板的空白对照。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,送至上海迈浦生物技术有限公司,纯化后在 ABI3730 基因分析仪上测序,测序引物为 HCO2198。

1.2.3 统计分析 测得序列用 Bioedit 7.0.1^[15] 进行编辑和人工核查, Clustal X 1.81^[16] 进行同源比对和确定长度。用 DNASP 4.0^[17] 计算单倍型多样性 (h) 和核苷酸多样性

(π)。同时检验中性分子进化演变^[18], 计算 Tajima's D、Fu and Li's F、Fu and Li's D 和 Fu's Fs 参数来推测群体的历史变化。

用 MEGA 4.0^[19] 计算序列的碱基组成、变异位点、简约信息位点和不同地理群体的 Kimura 2-paramter 遗传距离。用 jModeltest 0.1^[20] 来估计序列,进而选择出最佳核苷酸替代突变模型。应用 PAUP 4.0b10^[21] 软件以最大简约性分析法 (maximum parsimony, MP) 构建单倍型系统发育树,空位作缺失处理,采用启发式搜索,1 000 次随机加入序列, TBR 枝长交换,每步保留 10 棵树。得到的一致性系统树分支的可靠性使用 Bootstrap 分析,用 1 000 次重复来检验单倍型各分支的支持率值。用 TCS1.21^[22] 分析单倍型的进化网络关系。用 Geodis 2.6^[23] 软件检测单倍型与地理学特征的关系,该过程是通过嵌套的偶发性交换分析和巢式地理距离分析得以实现。对于具有统计显著性的分枝,可通过推断最新检索表^[24] 进行历史事件的推测。用 ARLEQUIN 3.5^[25] 中的分子变异分析 (AMOVA) 方法估算遗传变异的分布及遗传分化系数 (F -statistics, F_{st}),并用排列测验法 (Permutation test) 检验 F_{st} 的显著性 (重复次数为 1 000)。群体的单倍型错配分布检

验 (mismatch distribution tests) 的模型被用于检验是否存在群体扩张。

2 结果

2.1 COI 序列特征和遗传多样性分析

COI 序列经排序比对后, 得到 623 bp 同源序列, 序列组成 (表 2) 显示 A + T 的含量 (59.0%) 明显高于 G + C 的含量 (41.0%); 共鉴定出 48 个变异位点 (占位点总数的 7.70%), 包括 41 个转换和 7 个颠换, 转换与颠换的比值为 5.86 : 1.00, 没有插入或缺失位点。

从 248 尾日本沼虾个体中共检测出 31 个不同的单倍型 (表 3) (GenBank 登录号: JN874515 ~ JN874545), 其中共享单倍型有 12 个, 占单倍型总数的 38.71% 。其中 5 个单倍型 (Hap6、Hap7、Hap10、Hap11 和 Hap14) 被 2 个群体共享, 2 个单倍型 (Hap1、Hap19) 被 3 个群体共享, 5 个单倍型 (Hap5、Hap4、Hap9、Hap2 和 Hap3) 被 8 个以上群体共享, 单倍型 Hap3 被全部 17 个群体共享。17 个群体的单倍型及核苷酸多样性见表 4, 所有群体的整体单倍型多样性和平均核苷酸多样性均处于中间水平 ($h = 0.775 \pm 0.022$, $\pi = 0.00826 \pm 0.00072$)。单倍型多样性最高的是瓦埠湖群体 ($h = 0.902 \pm 0.050$), 最低的是茨河群体 ($h = 0.505 \pm 0.158$); 核苷酸多样性最高的是五河群体 ($\pi = 0.01534 \pm 0.00359$), 最低的为高邮群体 ($\pi = 0.00350 \pm 0.00087$); 17 个群体中花家湖和瓦埠湖群体遗传多样性相对较高, 高邮群体遗传多样性相对较低。

2.2 系统发育和嵌套分析

AIC (akaike information criterion) 分析表明 TPM1uf + I 是最佳核苷酸替代突变模型。用 PAUP 4.0 分析 31 个单倍型, 进行系统发育分析。最大简约性 (MP) 分析, 获得了严格一致性树 (图 2)。从严格一致性树看出, 日本沼虾 17 个群体的 31

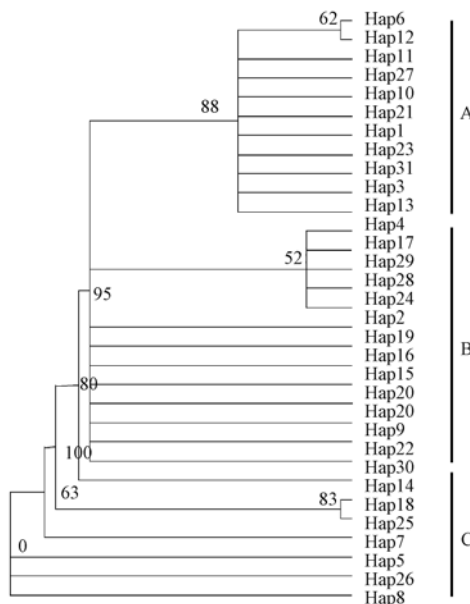


图 2 日本沼虾群体 COI 序列 31 个单倍型 MP 系统树

Fig. 2 The MP tree of 31 haplotypes of COI sequence in *Macrobrachium nipponense*

A、C. 淮河中游群体; B. 淮河下游群体。

分支上的数据即 bootstrap 值;

Hap1 ~ Hap31 表示单倍型 1 至单倍型 31。

A、C. including the middle Huaihe River populations;

B. including the lower Huaihe River populations.

The data on the branch indicated bootstrap value.

Hap1 to Hap31 indicated different Haplotypes.

表 2 日本沼虾群体线粒体 COI 序列的碱基组成 (%)

Table 2 Base compositions of COI sequences of *Macrobrachium nipponense*

碱基 Base	种群 Population																	平均 Average
	BG	CD	ZY	JG	HJ	WB	GT	QH	TH	HY	WH	NS	LZ	JH	JS	GY	SB	
A	29.3	29.3	29.3	29.4	29.4	29.4	29.3	29.3	29.3	29.3	29.3	29.4	29.4	29.4	29.4	29.4	29.5	29.4
T	29.6	29.6	29.6	29.6	29.6	29.6	29.6	29.6	29.6	29.6	29.7	29.6	29.6	29.6	29.6	29.7	29.7	29.6
C	23.0	23.0	23.0	23.1	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	22.9	22.9	23.0	
G	18.1	18.1	18.1	18.0	18.1	17.9	18.1	18.0	18.0	18.1	18.1	18.0	18.0	18.0	17.9	17.9	18.0	

种群名称详见表 1。The names of populations were shown in Table 1.

表 3 日本沼虾 COI 序列的核苷酸变异位点及各单倍型的分布

Table 3 Distribution of nucleotide variation sites and haplotypes in COI sequences of *Macrobrachium nipponense*

单倍型 Haplotype	11111222223333344444444445555555556666	1233467890678935556825689123367780066778889011	135519484081475161576700292681450656969251243018	BC	CD	ZY	JG	HJ	WB	GT	QH	TH	HY	WH	NS	LZ	JH	JS	GY	SB	总和 Total	
Hap1	AGTTGTTCCGTCGCGACACCACTCGACCAACCCATCCC	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	6	3	3	3	4	3	3
Hap2	T.....A.....TA.....G....	3	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	6	3	3	4	4	35
Hap3	T.....	6	9	5	8	6	5	5	5	5	10	8	9	4	9	4	7	4	3	2	2	104
Hap4	T.....C.....C.....A.....TA.....	1	1	1	3	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	17
Hap5	T.....AC..TCATA.....G..CTAG...G..TAT...T...GC...	1	2	2	2	1	2	1	2	1	2	1	3	3	3	1	1	1	1	1	1	14
Hap6	T.....TT.....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Hap7	T.....AC..TCATA.....G..CTAG...G..TAT...G....GC...	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Hap8	T...A.....AC..TCATA.....G..CTAG...G..TAT...T...GC...	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	5	2	2	4	2	4	2	7	8	38
Hap9	T.....A.....T.....TA.....	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Hap10	T.....T.....	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	4
Hap11	T.....T.....T.....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hap12	T.....T.....G.....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hap13	T.....T.....G.....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hap14	T...CC...A..TCATA..T..T..AG...TA..G...TT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Hap15	T.....A.....T.....TA.....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hap16	T.....A.....T.....G..G..TA.....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hap17	T.....C.....C.....A.....T.....TA.....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hap18	T.....A...AC..TCA..AG...A...G..TAT...G...	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Hap19	T.....A.....A.....T.....TA.....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
Hap20	T.....A.....A..G..T.....TA.....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hap21	T...C.....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hap22	T.....A.....TA.....A...	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hap23	T.....T.....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hap24	T..C.....C.....A.....TA.....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hap25	T.....AC..TCA..AG...A...G..TAT...G...	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hap26	T.....AC..TCATA.....G..CTAG...G..TAT...T...CCG...	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hap27	T.....G.....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Hap28	T.....C.....C.....A.....G.....T.....TA.....G...	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hap29	T.....C.....C.....A.....TA.....G...	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hap30	TA.....C.....A.....TA.....G...	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hap31	T.....A.....TA.....G...	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

种群名称详见表 1。The names of populations were shown in Table 1.

个单倍型分化为 3 个主要分支: A、B、C。其中 B 进化枝主要以淮河下游群体为主, A、C 进化枝主要是以淮河中游群体为主。用 TCS 软件构建了单倍型间的最小生成网状图(图 3)并进行了分层次的嵌套进化分支分析, 其分布格局与最大简约树基本一致。31 个单倍型组成了 13 个一级分支(1-step clades), 6 个二级分支(2-step clades), 3 个三级分支(3-step clades)。利用软件 Geodis 2.0 进行巢式距离计算, 按照 Templeton 检索表的推断得到的种群结构和历史事件(表 5)。进化枝 3-2 呈现出地理距离隔离而导致的基因流受限, 整个支系表现为受阻的基因流/扩散, 但伴随较长距离的扩散, 其他进化枝的历史事件尚无定论。

基于单倍型的进化网络关系图(图 3)(圆代表单倍型, 斜线代表演变事件), Hap3 是最主要最原始的单倍型, 其他单倍型都是由其拓展出来的。花园湖群体(Hap13)、天河群体(Hap21)、瓦埠湖群体(Hap23)、花家湖群体(Hap27)、正阳关群体(Hap31)都是直接从 Hap3 拓展出来, 其他群体则是通过其他单倍型间接拓展出来, 不连续的 Hap14 独立于其他单倍型之外。单倍型 Hap3 出现在所有实验群体中, 占有核苷酸变异率的 41.77%(104/249)。Hap2、Hap22、Hap30 聚合在一组, 而 Hap5、Hap7、Hap8、Hap18、Hap25、Hap26 聚合为另一组, 结果与 MP 分子系统树一致。

表 4 日本沼虾群体的遗传多样性参数

Table 4 Parameter summary of genetic diversity of *Macrobrachium nipponense*

种群 Population	单倍型数 Number of haplotypes	单倍型多样性 Haplotype diversity	多态位点数 Number of polymorphic sites	核苷酸多样性 Nucleotide diversity
BG	7	0.802 ± 0.094	24	0.010 90 ± 0.003 44
CD	7	0.721 ± 0.111	23	0.011 31 ± 0.003 37
ZY	4	0.733 ± 0.120	20	0.012 45 ± 0.004 18
JG	5	0.739 ± 0.075	27	0.011 44 ± 0.002 96
HJ	11	0.882 ± 0.072	25	0.011 05 ± 0.002 94
WB	10	0.902 ± 0.050	24	0.011 31 ± 0.002 46
GT	4	0.733 ± 0.120	6	0.003 71 ± 0.000 91
QH	5	0.505 ± 0.158	20	0.006 21 ± 0.002 94
TH	8	0.772 ± 0.097	23	0.007 35 ± 0.002 54
HY	5	0.719 ± 0.080	8	0.004 00 ± 0.000 54
WH	4	0.778 ± 0.091	20	0.015 34 ± 0.003 59
NS	6	0.648 ± 0.134	17	0.006 18 ± 0.002 06
LZ	5	0.781 ± 0.074	21	0.007 31 ± 0.002 64
JH	4	0.714 ± 0.081	6	0.004 01 ± 0.000 42
JS	7	0.872 ± 0.067	10	0.005 31 ± 0.000 55
GY	3	0.564 ± 0.134	6	0.003 50 ± 0.000 87
SB	4	0.667 ± 0.099	7	0.003 61 ± 0.000 86
总和 Total	31	0.775 ± 0.022	48	0.008 26 ± 0.000 72

种群名称详见表 1。The names of Populations were shown in Table 1.

表 5 根据推断表(Templeton, 2004)检索的日本沼虾嵌套分析结果

Table 5 Chain of inference for nested clade analysis of *Macrobrachium nipponense* based on the key (Templeton, 2004)

进化枝 Cladogram	巢内距离(D_c) Clade distance	巢间距离(D_n) Nested-clade distance	卡方检验 χ^2 statistic	概率(P) Probability	推断过程 Clade key	推断结果 Inferences
3-1	88.904 1S	94.526 4S	19.688 5	0.249 0	1-2-11-17-No	无确定结果
3-2	113.045 0L	115.851 1L	53.376 6	0.005 0	1-2-3-4-No	地理距离隔离而导致的基因流受限
3-3	75.618 1	94.309 5	15.555 6	0.089 0	1-2-11-17-No	无确定结果
总体 Total	26.078 4L	21.356 3L	53.445 7	0.009 0	1-2-3-4-5-6-7-Yes	受阻的基因流/扩散但伴随较长距离的扩散

S 表示显著小, L 表示显著大。S means significantly small, L means significantly large.

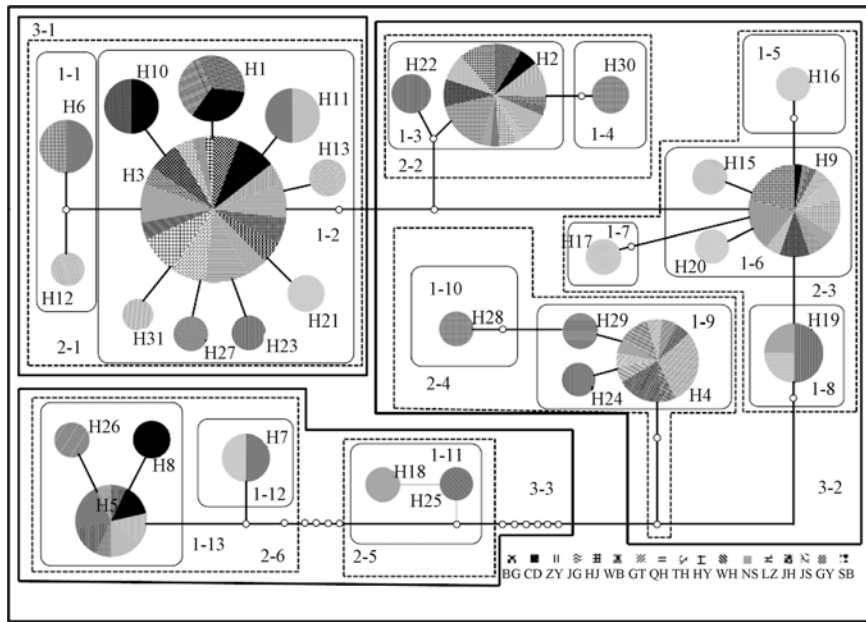


图 3 日本沼虾群体所有单倍型进化网络关系图

Fig. 3 Haplotype network from all haplotypes based on COI sequence of *Macrobrachium nipponense*

H1 ~ H31 表示单倍型 1 至单倍型 31;不同颜色代表不同的种群;不同的线条表示各单倍型的亲缘关系远近程度(从等级 1 至等级 3 表示单倍型间的亲缘关系由近至远);不考虑连线长度,单倍型间的每个连线代表一次单独的突变;单倍型的大小代表共享该单倍型的个体数。

H1 to H31 indicated different haplotypes. Haplotypes in different populations were in different colors. The lines in different types indicated the genetic relationship among haplotypes (The genetic relationship among haplotypes was moving away from level 1 to level 3). Each line represented a single mutation, irrespective of length. The size of the round indicated the number of each haplotype.

2.3 群体遗传结构分析 17 个群体 COI 序列的遗传差异 AMOVA 分析结果见表 6, 群体间遗传分化系数 $F_{st} = 0.0413 (P < 0.05)$, 表明在整个遗传变异中群体间变异仅占 4.13%, 其余的遗传变异来自于群体内。遗传分化系数在高塘湖与邵伯湖群体间最高 ($F_{st} = 0.261$), 其次是五河与邵伯湖群体间 ($F_{st} = 0.259$), 城东湖与正阳关群体间最低 ($F_{st} = -0.079$); 花园湖与焦岗湖、瓦埠湖、五河、老子山群体, 老子山与高塘湖群体, 金湖与瓦埠湖、五河群体, 界首与五河群体, 高邮与半岗、城东湖、正阳关、焦岗湖、花家湖、高塘湖、茨河及花园湖群体之间存在着显著遗传分化 ($P < 0.05$); 高邮与五河群体, 邵伯湖与城东湖、正阳关、焦岗湖、花家湖、茨河及五河群体之间存在极显著遗传分化 ($P < 0.01$), 其他群体之间没有显著的遗传分化 ($P > 0.05$)。

表 6 日本沼虾群体间遗传差异的分子方差分析 (AMOVA)

Table 6 Analysis of molecular variance (AMOVA) among populations of *Macrobrachium nipponense*

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	16	64.380	0.10656	4.13085
群体内 Within populations	231	571.265	2.47301	95.86915
总变异 Total variation	247	635.645	2.57957	

遗传分化系数 (F_{st}): 0.0413 ($P < 0.05$)。

Genetic fixations index (F_{st}): 0.0413 ($P < 0.05$)。

日本沼虾群体的遗传距离见表 7, 群体间的遗传距离在 0.003 ~ 0.014 之间, 五河和焦岗湖、花家湖及瓦埠湖群体之间的遗传距离最远, 为 0.014, 高邮与邵伯湖群体之间的遗传距离最近, 为 0.003。

表 7 日本沼虾群体间的相对遗传距离(对角线下)和遗传分化系数(F_{st}) (对角线上)
 Table 7 Genetic distances (below diagonal) and genetic fixations index (above the diagonal)
 within populations of *Macrobrachium nipponense*

种群 Population	BG	CD	ZY	JG	HJ	WB	GT	QH	TH	HY	WH	NS	LZ	JH	JS	GY	SB
BC		-0.056	-0.078	-0.034	-0.038	-0.016	0.009	-0.002	-0.019	0.048	-0.028	-0.014	0.005	0.028	0.049	0.124*	0.141*
CD	0.011		-0.079	-0.009	-0.020	0.008	0.024	0.010	0.001	0.064	-0.043	0.003	0.051	0.052	0.089	0.145*	0.175**
ZY	0.011	0.011		-0.034	-0.038	-0.019	0.044	0.024	0.004	0.096	-0.082	0.014	0.028	0.074	0.091	0.167*	0.190**
JG	0.011	0.012	0.012		-0.025	-0.038	0.068	0.029	0.010	0.098*	0.004	0.018	-0.001	0.068	0.037	0.099*	0.131**
HJ	0.011	0.011	0.012	0.011		-0.010	0.035	0.019	-0.003	0.065	0.010	0.003	0.017	0.043	0.044	0.102*	0.135**
WB	0.011	0.012	0.012	0.011	0.011		0.101	0.076	0.010	0.116*	0.012	0.028	-0.014	0.076*	0.018	0.061	0.090*
GT	0.008	0.008	0.009	0.009	0.008	0.009		-0.041	-0.009	-0.034	0.128	-0.029	0.115*	-0.019	0.121	0.243*	0.261*
QH	0.009	0.009	0.010	0.009	0.009	0.010	0.005		-0.012	-0.008	0.109	-0.036	0.110*	0.009	0.106	0.186*	0.234**
TH	0.009	0.010	0.010	0.010	0.009	0.010	0.006	0.007		-0.017	0.082	-0.050	0.020	-0.035	-0.006	0.030	0.075*
HY	0.008	0.008	0.009	0.009	0.008	0.009	0.004	0.005	0.006		0.199*	-0.026	0.120*	-0.037	0.080	0.144*	0.183*
WH	0.013	0.013	0.013	0.014	0.014	0.014	0.011	0.012	0.012	0.012		0.099	0.097	0.175*	0.168*	0.225**	0.259**
NS	0.009	0.009	0.010	0.009	0.009	0.009	0.005	0.006	0.007	0.005	0.012		0.054	-0.030	0.035	0.093	0.144*
LZ	0.009	0.010	0.010	0.010	0.010	0.009	0.006	0.008	0.008	0.006	0.013	0.007		0.049	-0.028	0.063	0.030
JH	0.008	0.008	0.009	0.009	0.008	0.008	0.004	0.005	0.006	0.004	0.012	0.005	0.006		0.011	0.083	0.100
JS	0.009	0.009	0.010	0.009	0.009	0.009	0.005	0.007	0.006	0.005	0.012	0.006	0.006	0.005		-0.033	-0.049
GY	0.009	0.009	0.010	0.009	0.008	0.008	0.005	0.006	0.006	0.004	0.012	0.005	0.006	0.004	0.004		-0.024
SB	0.009	0.009	0.010	0.009	0.009	0.008	0.005	0.006	0.006	0.005	0.012	0.006	0.006	0.004	0.004	0.003	

种群名称详见表 1; * 示差异显著($P < 0.05$), ** 示差异极显著($P < 0.01$)。

The names of populations were shown in Table 1; * Means significant difference ($P < 0.05$), ** Means great significant difference ($P < 0.01$).

表 8 淮河日本沼虾错配分布参数

Table 8 Parameters of the mismatch distribution of *Macrobrachium nipponense* from Huaihe River

种群 Population	T (95% CI)	θ_0	θ_1	P	粗糙指数 Raggedness index
BG	0.000(0.000,11.881)	4.787	4.797	0.055	0.101 68
CD	19.346(0.551,80.000)	0.000	3.087	0.075	0.123 92
ZY	19.086(0.262,108.086)	0.002	4.090	0.118	0.218 27
JG	18.670(0.000,63.670)	0.000	6.802	0.110	0.204 28
HJ	0.037(0.000,6.678)	7.142	99 999.000	0.032	0.042 17
WB	3.375(0.645,12.275)	3.373	14.028	0.041	0.060 87
GT	5.289(0.199,30.289)	0.002	3.811	0.085	0.204 44
QH	0.000(0.000,0.000)	0.000	99 999.000	0.329	0.332 93
TH	5.063(1.232,8.027)	0.000	5.547	0.064	0.105 91
HY	4.951(0.078,10.014)	0.000	4.277	0.092	0.253 41
WH	19.535(0.000,108.535)	0.000	4.871	0.126	0.160 99
NS	5.441(1.125,8.299)	0.002	3.599	0.114	0.218 14
LZ	4.129(1.238,6.078)	0.000	7.676	0.071	0.156 10
JH	4.811(0.496,6.691)	0.004	5.621	0.158	0.445 53
JS	4.313(1.969,6.207)	0.000	26.914	0.044	0.139 38
GY	5.094(0.152,54.760)	0.002	2.942	0.176	0.381 49
SB	4.971(0.000,41.970)	0.000	3.070	0.115	0.451 43

种群名称详见表 1。括号内的数字代表 95% 的置信区间。

The names of populations were shown in Table 1. The numbers in parentheses are 95% credibility intervals.

2.4 群体统计分析 17 个群体的错配分布检验(表 8)结果表明,各群体统计历史具有显著的差异。通过基于平方偏差和(sun of squared deviation, SSD)的拟合检验,我们不能拒绝淮河区的群体扩张模型($P_{SSD} > 0.05$)。将检验的序列两两配对,比较出现差异的碱基对数,统计差异碱基对数出现的频次。以差异碱基对数及频次分别为纵、横座标,绘制曲线图,所有群体显示为多峰错配分布(图 4)。根据 FU 提出的, F_u 's F_s 在 hitchhiking 及族群扩张的情况下会比 F_u and L_i 's D^* 和 F^* 具有说服力。换句话说,当 F_u 's F_s 显著而 F_u and L_i 's D^* 和 F^* 不显著时应该要考虑可能是 hitchhiking 或族群扩张造成的^[26]。中性检验的结果显示(表 9),正阳关、焦岗湖和五河群体的 F_u 's F_s 显著, F_u 和 L_i 's F^* 和 D^* 都不显著。说明其群体历史上曾发生过区域膨胀现象。但除正阳关、高塘湖、花园湖、五河、金湖、高邮和邵伯湖 7 个群体外其

他群体的 Tajima' D 和 F_u 's 值均为负值,表明检验结果偏离中性模式,可能是由于群体的扩张引起的。

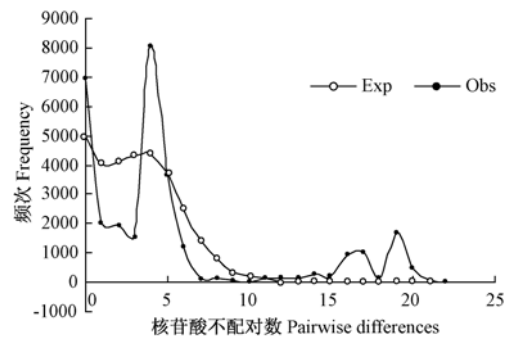


图 4 淮河水系日本沼虾不同群体的错配分布图

Fig. 4 Mismatch distributions of *Macrobrachium nipponense* from Huaihe River

Obs 表示频次的观测值, Exp 表示频次的期望值。

Obs means observed number of frequency, Exp means expected number of frequency.

表 9 淮河日本沼虾群体的中性检验
Table 9 Neutrality indices calculated for each population of *Macrobrachium nipponense* from Huaihe River

种群 Population	Tajima's D	Fu 和 Li's D*	Fu 和 Li's F*	Fu's Fs
BG	-0.577 90	0.462 04	0.205 54	1.403
CD	-0.031 07	0.750 73	0.610 69	2.321
ZY	0.211 10	1.372 71	1.221 81	4.528 *
JG	-0.499 34	0.306 11	0.084 60	5.349 *
HJ	-0.424 25	0.822 25	0.539 85	-1.376
WB	-0.270 27	0.607 17	0.409 85	-0.167
GT	0.370 99	0.774 91	0.758 11	0.920
QH	-1.609 12	-2.118 27	-2.270 38	1.867
TH	-1.423 90	-2.215 96	-2.301 71	-0.018
HY	0.302 32	0.231 66	0.290 68	1.229
WH	1.354 37	1.372 71	1.542 61	5.372 *
NS	-1.066 88	-1.475 14	-1.566 57	0.954
LZ	-1.349 84	-1.682 25	-1.829 46	2.611
JH	1.233 11	0.632 22	0.907 67	1.931
JS	0.105 65	0.200 65	0.200 27	-0.840
GY	0.257 64	0.149 14	0.198 99	2.388
SB	0.158 60	0.176 00	0.196 22	1.629

种群名称详见表 1。* 显著分化 ($P < 0.05$)。

The names of populations were shown in Table 1. * Significant differentiation ($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 遗传差异 本研究中日本沼虾 mtDNA COI 碱基序列中 A + T 含量明显高于 G + C, 这与我国九大水系日本沼虾以及沼虾属 34 种沼虾类线粒体 COI 序列组成结果一致^[27-29], 且符合节肢动物 mtDNA 碱基组成中 G 碱基相对缺乏, AT 含量高的普遍现象。COI 序列转换与颠换的比值为 5.86:1.00, 高于沼虾属 34 种沼虾类种间转换与颠换比平均值 2.2:1.0^[29], 说明 17 个群体间日本沼虾的 COI 序列替换未达到饱和, 这与核苷酸的替换主要以转换为主, 转换多于颠换, 表现较高的转换偏向^[30-31]的规律相符, 可见淮河日本沼虾的线粒体变异仍为种内变异, 并未发现种间近亲交配和亚种分化。COI 序列高 AT、低 GC 以及序列变异以转换为主的变异模式也证实了本试验所获得的 DNA 序列不存在核基因组假基因^[32]。

淮河日本沼虾群体平均单倍型多态性为 0.775 ± 0.022 , 低于我国九大水系 32 个日本沼虾野生群体 (0.806 ± 0.031)^[27] 和澳洲沼虾 ($0.923 0 \pm 0.007 5$)^[11]; 淮河日本沼虾群体平均核苷酸多态性为 $0.008 26 \pm 0.000 72$, 高于中国对虾 (*Penaeus chinensis*)^[33]、小褐美对虾 (*P. subtilis*)、保罗美对虾 (*P. paulensis*)、巴西美对虾 (*Farfantepenaeus brasiliensis*) 和南方滨对虾 (*P. schmitti*)^[34] 等。由此可见淮河日本沼虾的遗传多样性处于相对中等水平。

3.2 群体遗传结构 AMOVA 分析结果显示, 群体间遗传变异仅为 4.13%, 其余变异源于群体内, 可见研究的 17 个日本沼虾群体之间亲缘关系较近。可能与样本采集区域在同一个水系有关。除城东湖与瓦埠湖的 F_{st} 为 0.008 外, 半岗、城东湖、正阳关、焦岗湖、花家湖、瓦埠湖两两之间 F_{st} 为负值, 说明 6 个群体之间几乎没有遗传分化。高邮与五河群体, 邵伯湖与城东湖、正阳关、焦岗湖、花家湖、芡河及五河群体之间存在极显著 ($P < 0.01$) 的遗传分化。另外群体间的相对遗传距离能反映群体间的亲缘关系, 本研究中淮河日本沼虾群体间的遗传距离在 0.003 ~ 0.014 之间, 整体上反映了高邮群体与邵伯湖遗传距离较近, 五河和焦岗湖、花家湖及瓦埠湖群体之间的遗传距离较远。

3.3 系统地理学与群体统计历史 基于 17 个群体序列变异形成的 31 个单倍型的最小拓展网络图和 MP 系统树均显示, 17 个群体大致可以分为 3 个进化支, B 进化支 (淮河水系下游族群) 和 A、C 进化支 (淮河水系中游族群)。中游族群之间的亲缘关系没有被很好的解决。扩张或收缩时在分子多样性上均有反映, 星状发散的进化关系是典型的群体扩张特征。17 个群体的拓展网络图与系统进化树分析结果一致, 且 3 个族群均表现出典型星状发散。B 族群主要由淮河水系下游江苏境内 4 个群体聚合在一起, A 族群和 C 族群同属淮河水系中上游, 却分为了二支, 群体间没有形成明显分化, 可能是由于 A、C 族群的群体同属安徽境内, 地理跨度不大, 加上日本沼虾具有很强的扩散能力, 无

疑增加了基因交流机会。

巢式支系分析(nested clade analysis, NCA)揭示的日本沼虾遗传多样性格局为,一种祖先单倍型广泛分布在研究的所有野生群体中。淮河下游群体单倍型由于有限基因流的作用,局限分布在一个地域内,从分布可以看出,各个分支在冰期可能分享同一个避难所或来自同一避难所。NCA 结果支持这一推断,淮河水系表现为受阻的基因流/扩散,但伴随较长距离的扩散,表现了大多数温带生物在第四纪冰期所经历过的种群集体扩张和迁移的现象,造成除避难所之外的很多种群都有固定相同的单倍型^[35-36]。

嵌套分析和 AMOVA 分析的结果显示,日本沼虾群体存在基因流受限并未形成明显的种群遗传结构。淮河流域历来都是洪水多发的区域^[37],中游下段河床纵剖面倒比降和洪泽湖水面抬高使得中上游干流受湖水顶托,坡降变缓,增加了支流排洪的困难。汛期干支流同时涨水,支流入淮处往往引起长久的倒漾。而日本沼虾具有较强的适应性,较容易适应新的环境,并形成一定规模的群体^[38],洪水泛滥在一定程度上加大了群体间的交流机会,使得淮河中段日本沼虾没有形成明显分化。由于日本沼虾定居性较强,游泳能力较弱,主动活动范围较小^[39],且洪泽湖湿地生态系统对淮河下游的水环境质量有重要调节功能^[40],所以受洪水影响淮河水系中、下游的日本沼虾群体还是会有明显分化。

错配分布分析显示出分布不规则的分布形状,暗示了淮河日本沼虾群体具有一个复杂的群体统计学历史。根据错配分布分析的平方偏差和(SSD)的显著性水平,我们预测所有的淮河日本沼虾群体不能拒绝群体扩张模型($P_{SSD} > 0.05$)。中性检验得到的一些显著结果可能是由于背景选择、选择性清除或者是群体扩增造成的。这些过程可以通过对比不同的中性检验进行分辨。 $Fu's F_s$ 显著,而 $Fu、Li's F^*$ 和 D^* 不显著就说明,过度丰富的少见单倍型要么是由于群体扩张,要么就是选择性清除产生的。

对于正阳关、焦岗湖和五河群体,我们得到了确切的支持结果,该群体的 $Fu's F_s$ 值显著,但 $Fu、Li's F^*$ 和 D^* 值是不显著的,暗示了该区群体增长的信号是由于群体扩张或选择性清除产生的。但是其他 14 个群体 $Fu、Li's F^*$ 和 D^* 都不显著, $Fu's F_s$ 在统计上也不显著,这些检验没有很好解释这些群体的扩张问题,为群体增长提供了一点不确定的支持。

参 考 文 献

- [1] 刘瑞玉,梁象秋,严生良. 中国长臂虾亚科的研究 1. 沼虾属、虾属和拟瘦虾属//中国甲壳动物学会. 甲壳动物学论文集:第二辑. 北京:科学出版社,1990:111-112.
- [2] 任百洲,吴美安. 南水北调以沿线湖泊水生生物影响的预测分析//南水北调东线第一期工程环境影响报告书专题报告之四. 1986,6:131-147.
- [3] 薛明. 淮河鲤同工酶及其对形态学遗传效应的研究. 合肥:安徽农业大学,2001.
- [4] 冯建彬,吴春林,丁怀宇,等. 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,2010,17(2):218-227.
- [5] 丁怀宇,姜虎成,冯建彬,等. 河蚬微卫星引物筛选及洪泽湖野生群体遗传结构分析. 水产学报,2011,35(11):42-50.
- [6] 王建军,李家乐,汪桂玲,等. 我国五大湖三角帆蚌群体 ITS-1 序列变异分析. 湖泊科学,2008,20(2):208-214.
- [7] 宋红梅,胡隐昌,王培欣,等. 福寿螺线粒体 DNA COI 基因序列测定及分类地位. 动物学杂志,2010,45(1):1-7.
- [8] 张合彩,陈广文,孙健,等. 云南省日本三角涡虫不同地理种群 mtDNA COI 基因序列分析及其系统发育. 动物学杂志,2011,46(3):131-135.
- [9] Lunt D H, Zhang D X, Szymura J, et al. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. Insect Molecular Biology, 1996, 5(3):153-165.
- [10] 张合彩,乔格侠. 基因序列在蚜虫分子系统发育研究中的应用. 昆虫学报,2006,49(3):521-527.
- [11] Carini G, Hughes J M. Population structure of *Macrobrachium australiense* (Decapoda: Palaemonidae) in Western Queensland, Australia: the role of contemporary and historical processes. Heredity,2004,93(4):350-363.
- [12] 杨学明,郭亚芬,蒋钦杨,等. 三个群体罗氏沼虾线粒体 COI 基因的遗传多样性分析. 上海水产大学学报,

- 2006, 15(2): 144–149.
- [13] 萨母布鲁克 J, 拉塞尔 D W; 黄培堂, 译. 分子克隆实验指南. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002; 461–469.
- [14] Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 294–299.
- [15] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1998, 41: 95–98.
- [16] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876–4882.
- [17] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messenguier X, et al. DnaSp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 2003, 19(18): 2496–2497.
- [18] Ramos-Onsins S E, Rozas J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 2002, 19(12): 2092–2100.
- [19] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150–163.
- [20] Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, 25(7): 1253–1256.
- [21] Swofford D L. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)*. Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2003.
- [22] Clement M, Posada D, Crandall K A. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 2000, 9(10): 1657–1659.
- [23] Posada D, Crandall K A, Templeton A R. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, 2000, 9(4): 487–488.
- [24] Templeton A R. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, 2004, 13: 789–809.
- [25] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, 1: 47–50.
- [26] Fu Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 1997, 147(2): 915–925.
- [27] 冯建彬. 我国日本沼虾分子遗传多样性及系统进化研究. 上海: 上海海洋大学博士学位论文, 2008; 123–147.
- [28] Yang P, Zhang H, Chen L Q. Genetic Structure of the Oriental River Prawn (*Macrobrachium nipponense*) from the Yangtze and Lancang Rivers, Inferred from COI Gene Sequence. *Zoological Research*, 2007, 28(2): 113–118.
- [29] Liu M Y, Cai Y X, Tzeng C S. Molecular systematic of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) inferred from mtDNA sequences, with emphasis on east Asian species. *Zoological Studies*, 2007, 46(3): 272–289.
- [30] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1989, 86(16): 6196–6200.
- [31] Stephen A K, Dawn S W. Phylogeography and systematics of the mud turtle, *Kinosternon baurii*. *Copeia*, 2001, 2001(3): 797–801.
- [32] Zhang D X, Hewitt G M. Nuclear integrations: Challenges for mitochondrial DNA markers. *TREE*, 1996, 11(6): 247–251.
- [33] Quan J X, Lü X M, Zhuang Z M, et al. Low genetic variation of *Penaeus chinensis* as revealed by mitochondrial COI and 16S rRNA gene sequences. *Biochemical Genetics*, 2004, 39(7/8): 279–284.
- [34] Gusmão J, Lazoski C, Solé-Cava A M. A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. *Marine Biology*, 2000, 137(3): 435–446.
- [35] 宋敏舒, 乐霖培, 孙航, 等. 横断山地区海仙报春的谱系地理学研究. *植物分类与资源学报*, 2011, 33(1): 91–100.
- [36] 李吉均, 舒强, 周尚哲, 等. 中国第四纪冰川研究的回顾与展望. *冰川冻土*, 2004, 26(3): 235–243.
- [37] 王嘉涛, 梁树献, 徐慧. 淮河流域 2000–2009 年水势分析. *中国防汛抗旱*, 2011, (1): 21–24.
- [38] Sammy D G, Ahmad G. The establishment of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* (de Haan, 1849) in Anzali Lagoon, Iran. *Aquatic Invasions*, 2006, 1(4): 204–208.
- [39] 王克行. 虾蟹类增殖学. 北京: 中国农业出版社, 1997: 251–254.
- [40] 胡瑾, 王海青, 杨刚. 洪泽湖湿地生态系统特征及保护对策. *治淮*, 2010, (12): 16–17.