

河北3个日本沼虾野生群体线粒体DNA D-Loop基因 序列变异及种群遗传结构分析

董新培¹, 武小斌¹, 万海付¹, 穆淑梅¹,
康现江^{1*}, 肖国华², 薛建民³

(1. 河北大学生命科学学院, 河北 保定 071002;

2. 河北省海洋与水产科学研究院, 河北 秦皇岛 066200;

3. 衡水市水产技术推广站, 河北 衡水 053000)

摘要: 为进一步了解白洋淀与衡水湖日本沼虾种质资源现状, 实验通过对白洋淀南淀(SB)、白洋淀北淀(NB)、衡水湖(HS)日本沼虾群体线粒体DNA D-Loop基因片段进行扩增和测定, 得到935 bp的序列用于进一步的分析, 其中变异位点80个, 占分析位点的8.56%, 含有77个简约信息位点, 平均转换/颠换比值(T_S/T_V)为7.28, 4种碱基在所得序列中平均含量为A(42.65%)、G(9.08%)、T(36.98%)、C(11.29%), 其中A+T含量为79.63%, 明显高于C+G含量。AMOVA分析结果显示, 群体间的遗传分化系数 $F_{ST}=0.2336$, 群体间遗传变异占23.36%, 群体内遗传变异占76.64%, 群体间具有较高程度的遗传分化。运用K-2-P模型构建了3群体的23个单倍型的NJ系统发育树, 单倍型之间并没有按照单倍型所属群体的分类聚簇, 表现为不同群体个体相互交错形成复杂的簇群。群体中性检验、错配分析表明, 日本沼虾近期未曾经历过种群扩张。

关键词: 日本沼虾; D-Loop基因; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号: Q 347; S 931

文献标志码: A

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*), 俗称青虾或河虾, 隶属软甲纲(Malacostraca), 十足目(Decapoda), 长臂虾科(Palaemonidae), 沼虾属(*Macrobrachium*), 是中国重要的淡水经济虾类之一, 广泛分布于我国各地的江河、湖泊、水库及沟渠等淡水水域中^[1]。因其具有生长快、适应性强、个体大及繁殖能力强等特点, 20世纪50年代后期其养殖业得到不断发展。而野生群体因受自然或人为因素的影响, 栖息范围变小, 资源锐减, 个体小型化, 低龄化严重^[2]。

遗传多样性是生物多样性的重要组成部分, 它是指地球上所有生物携带的遗传信息的总和, 表现为多层次、多水平, 遗传多样性不仅包括变异水平的高低, 也包括变异的分布格局, 即

种群的遗传结构^[3]。目前, 国内一些学者已应用RAPD^[4]、SSR^[5]、ISSR^[6]和CO I^[7]等技术对不同水域的日本沼虾野生群体进行了分析。线粒体DNA(mtDNA) D-Loop区序列由于不编码蛋白质而不受自然选择的影响, 因而进化速率最快, 积累了较多的突变, 如碱基替换、插入、缺失, 以及众多的串联重复序列等, 所以在种群遗传学分析中得到普遍应用^[8-9]。

本研究对白洋淀和衡水湖日本沼虾野生群体的mtDNA D-Loop序列进行PCR扩增和测序, 开展关于群体间遗传变异和系统分化等方面研究, 旨在完善我国日本沼虾野生群体的种质资源研究, 为制定合理的育种方案提供数据参考。

收稿日期: 2016-06-07 修回日期: 2016-09-27

资助项目: 河北省现代农业产业技术体系淡水养殖创新团队项目

通信作者: 康现江, E-mail: xjkang218@126.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用日本沼虾样本于2015年9月至10月采集于衡水湖、白洋淀南淀(大麦淀)和北淀(烧车

淀)(表1), 活体带回实验室备用。

1.2 日本沼虾总DNA的提取

日本沼虾实验样本随机选取(表1), 每个样本取肌肉20~30 mg。采用蛋白酶K进行裂解, 参

表 1 日本沼虾的采集地点及数量

Tab. 1 Sampling sites and quantities of *M. nipponense* in this study

采集地 collection places	经纬度 latitude and longitude	缩写 abbreviation	数量/尾 quantity	取样部位 sampling part
河北省白洋淀南淀(大麦淀) South Baiyangdian of Hebei Province (Damaidian)	116.02°E, 38.86°N	SB	37	肌肉
河北省白洋淀北淀(烧车淀) North Baiyangdian of Hebei Province (Shaochedian)	116.00°E, 38.97°N	NB	35	肌肉
河北省衡水湖 Hengshui Lake of Hebei Province	115.62°E, 37.62°N	HS	34	肌肉

考《分子克隆实验指南》^[10]的酚/氯仿抽提法提取总DNA, 得到的DNA用双蒸水充分溶解, 并通过1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 经紫外分光光度仪检测其纯度及浓度, DNA样品被稀释至终浓度为20~50 ng/ μ L, 保存于-20 °C备用。

1.3 mtDNA D-Loop区PCR扩增及序列测定

扩增日本沼虾mtDNA D-Loop区的引物序列: D-Loop-F: 5'-TTTACTCCAGTCTAACC-3'; D-Loop-R: 5'-TTCATTATTCGCCCTATC-3'^[11], 送上海生工生物工程有限公司进行引物合成。PCR反应体系为50 μ L, 其中含有10 \times PCR Buffer 5 μ L, dNTP 4 μ L, 引物各2 μ L, Taq DNA聚合酶0.25 μ L, 模板DNA 2 μ L, 加ddH₂O至50 μ L。PCR扩增程序: 94 °C预变性2 min; 94 °C变性45 s, 52 °C退火45 s, 72 °C延伸3 min, 33个循环; 72 °C终延伸10 min, 4 °C保存。用1%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物, 送上海生工生物工程有限公司进行双向测序, 使用PCR扩增引物作为测序引物。

1.4 数据分析

使用Clustal X 1.81软件比对测序结果, 辅以人工校对。利用MEGA 5软件统计序列的碱基含量; 利用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)基于Kimura双参数(Kimura-2-parameter, K-2-P)模型构建日本沼虾群体单倍型系统发生树, 进化树各分支的自举置信度水平由自举法(Bootstrap value)估计, 自引导次数为1000。通过DnaSP(version 5.0)软件统计单倍型(h)、单倍型多样性(H_d)、核苷酸多样性(P_i)遗传多样性参数、同时检验中性

分子进化演变, 计算Tajima's D参数以推测群体的历史变化。利用Arlequin 3.1中的AMOVA分析方法进行遗传差异分析, 并进行核苷酸不配对分布分析。

2 结果

2.1 mtDNA D-Loop区序列碱基组成与变异分析

本实验对3个群体106个样本的日本沼虾mtDNA D-Loop基因进行了序列测定。通过比对和人工校对, 选择935 bp的序列用于进一步分析, 其中变异位点80个, 占分析位点的8.56%, 含有77个简约信息位点, 平均转颠换比值(T_S/T_V)为7.28, 其中有一处碱基缺失。4种碱基在所得序列中平均含量为A (42.65%)、G (9.08%)、T (36.98%)、C (11.29%), 其中A+T含量为79.63%, 明显高于C+G含量(表2)。

从106个个体中共定义了23种单倍型(表3), 其中单倍型Hap2和Hap12为3个群体共享, SB和NB群体间有2个共享单倍型(Hap22和Hap13), NB群体和HS群体间有2个共享单倍型(Hap6和Hap8), SB群体和HS群体间有1个共享单倍型(Hap4), 其余单倍型为每个群体所特有。其中NB群体拥有的单倍型最多, 为13个; HS群体次之, 为12个; SB群体最少, 为7个。Hap2和Hap12为优势单倍型, 分别占个体总数的21.70%、23.58%。

2.2 日本沼虾D-Loop基因遗传结构分析

使用Dna SP(version 5.0)软件计算日本沼虾

表 2 日本沼虾3个野生群体线粒体D-Loop区碱基组成
Tab. 2 Nucleotide compositions of mtDNA D-Loop in three populations of *M. nipponense* %

群体 population	碱基 base					
	A	G	T/U	C	A+T	C+G
SB	42.52	9.18	36.95	11.35	79.47	20.53
NB	42.77	8.98	36.97	11.28	79.74	20.26
HS	42.67	9.08	37.01	11.24	79.68	20.32
总体 total	42.65	9.08	36.98	11.29	79.63	20.37

表 3 日本沼虾群体中的D-Loop序列单倍型分布情况

Tab. 3 Distribution of haplotypes in D-Loop sequences of *M. nipponense*

单倍型 haplotype 23	SB 37	NB 35	HS 34	总计 total
Hap_1	0	0	2	2
Hap_2	21	1	1	23
Hap_3	1	0	0	1
Hap_4	4	0	5	9
Hap_5	0	2	0	2
Hap_6	0	2	3	5
Hap_7	0	1	0	1
Hap_8	0	1	1	2
Hap_9	0	1	0	1
Hap_10	0	0	1	1
Hap_11	0	0	3	3
Hap_12	4	11	10	25
Hap_13	4	5	0	9
Hap_14	0	2	0	2
Hap_15	0	0	1	1
Hap_16	0	1	0	1
Hap_17	0	1	0	1
Hap_18	0	0	1	1
Hap_19	0	0	5	5
Hap_20	0	0	1	1
Hap_21	1	0	0	1
Hap_22	2	6	0	8
Hap_23	0	1	0	1

3个群体的遗传多样性参数(表4), 结果显示3个群体的单倍型(0.656~0.872)和核苷酸(0.011 50~

0.022 45)的多样性程度处于同一个水平。其中白洋淀北淀群体的 P_i 值最高, 为0.022 45, 而衡水湖群体的较其他两个群体偏低, 为0.011 50, 表明日本沼虾3个群体具有较高的遗传多样性。群体中性检验显示NB、SB群体的Tajima's D值为正值; HS群体为负值, 3个群体Tajima's D值检验均不显著($P>0.05$)。

日本沼虾3个群体mtDNA D-Loop序列的遗传差异AMOVA分析结果表明, 群体间的遗传分化系数 $F_{ST}=0.233 55$ ($P<0.01$), 整个遗传变异中群体间占23.36%, 其余的遗传变异来自于群体内(76.64%), 群体间具有较高度度的遗传分化(表5)。

研究基于日本沼虾3个群体线粒体D-Loop序列, 运用K-2-P模型构建了3群体的23个单倍型的NJ系统发育树(图1)。从NJ系统树可以看出, 单倍型之间并没有按照单倍型所属群体的分类聚簇, 表现为不同群体个体相互交错形成复杂的簇群。

2.3 群体动态分析

根据Tajima's D值中性检验以及日本沼虾野生群体碱基错配分布曲线是否呈现多峰或单峰型来判定日本沼虾野生群体在过去是否发生了群体扩张。对日本沼虾3个野生群体的23个单倍型进行Tajima's D中性检测和核苷酸不配对分布分析, 结果显示, 日本沼虾野生群体的单倍型检测中, 核苷酸不配对分布(mismatch distribution)分析图谱呈现多峰型(图2), 在中性检验中Tajima's D ($D=0.07984$, $P>0.05$)值为正值, 且统计结果不显著, 表明日本沼虾3个野生群体大小保持相对稳定, 未发生明显的种群扩张。

3 讨论

3.1 日本沼虾线粒体D-Loop区序列碱基组成与变异分析

关于日本沼虾遗传多样性的研究报道较多,

表 4 日本沼虾群体线粒体D-Loop区序列的遗传多样性参数

群体 population	样本数/尾 sample size	变异位点 variable sites	单倍型 <i>h</i>	单倍型多样性 <i>H_d</i>	核苷酸多样性 nucleotide diversity (<i>P_i</i>)	Tajima's D
SB	37	69	7	0.656	0.020 61	0.601 23
NB	35	77	13	0.861	0.022 45	0.798 09
HS	34	44	12	0.872	0.011 50	-0.029 52
总计	106	80	23	0.878	0.022 05	1.128 56

表 5 日本沼虾群体线粒体DNA D-Loop区分子变异分析

变异来源 source of variation	自由度 <i>df</i>	方差总和 sum of squares	变异组分 variance components	变异百分比/% percentage of variation	遗传分化指数 <i>F_{ST}</i>
群体间 among populations	2	201.011	2.604 24 Va	23.36	0.233 55 (<i>P</i> =0.000)
群体内 within populations	103	880.272	8.546 33 Vb	76.64	
总计 total	105	1081.283	11.536 58		

注: Va. 群体间方差组分; Vb. 群体内方差组分

Notes: Va. variance component of inter- population; Vb. variance component of intra- population

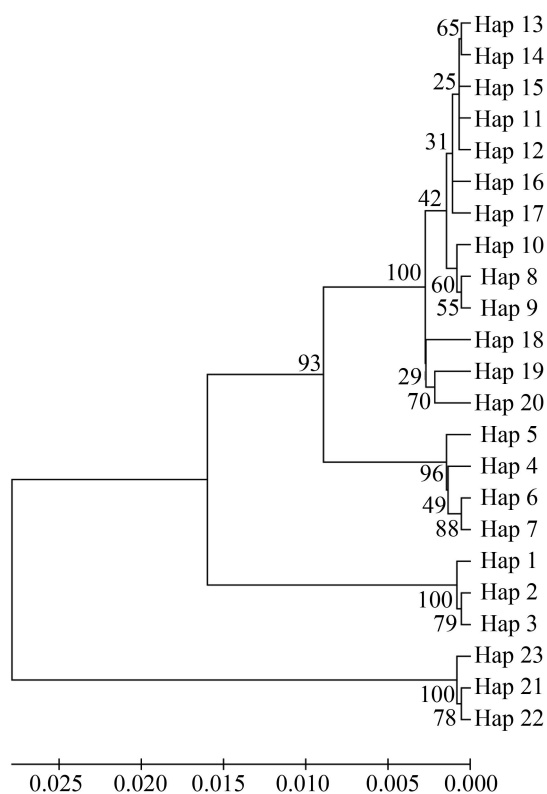


图 1 日本沼虾3个野生群体单倍型基于线粒体DNA D-Loop区序列构建的NJ树

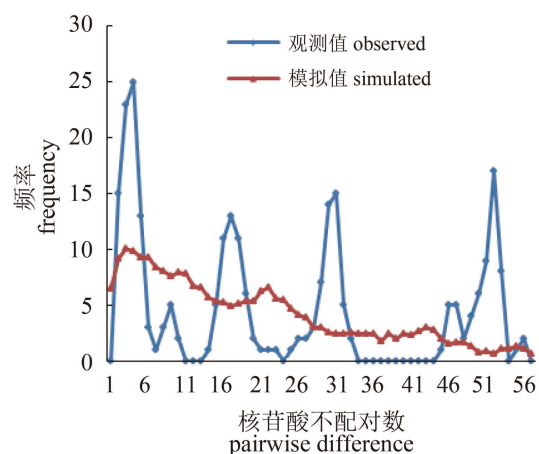
Fig. 1 NJ tree based on the mtDNA D-Loop sequence in three wild populations of *M. nipponense*

图 2 日本沼虾群体单倍型不配对分布图

Fig. 2 The mismatch distributions of the haplotypes of *M. nipponense*

主要利用SSR、RAPD、CO I等分子标记分析日本沼虾遗传多样性,但对于河北地区的日本沼虾群体的多样性研究报道较少。Ma等^[12]选用9个微卫星位点研究千岛湖中4个日本沼虾群体遗传多样性,野生群体均表现出较高的遗传多样性。Chen^[7]等通过CO I序列和16S *rRNA*基因片段研究中国台湾日本沼虾野生群体的遗传结构,共定义了76种单倍型,分为两个族群,并进行群体动态分析,显示中国台湾日本沼虾野生群体近期发生过群体扩张。与其结果相比,本研究对3个

群体106个样本的日本沼虾D-Loop基因935 bp的序列进一步分析,其中变异位点80个,占分析位点的8.56%,基因片段中出现的变异位点和单倍型较丰富,提示D-Loop是检测日本沼虾群体遗传差异的有效分子标记之一。

本研究对3个日本沼虾群体的线粒体D-Loop基因序列分析表明4种碱基在所得序列中平均含量为A(42.65%)、G(9.08%)、T(36.98%)、C(11.29%),其中A+T含量为79.63%,明显高于C+G含量。该结果与其他虾类及蟹类等的控制区碱基组成相似,符合节肢动物mtDNA碱基组成中GC碱基相对缺乏,AT含量高的普遍现象^[13],D-Loop序列转换与颠换的比值为7.28:1.00,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^[14],说明3个群体间日本沼虾的D-Loop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的规律相符^[15-16],可见3个群体之间的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。

3.2 日本沼虾群体遗传多样性及遗传分化

一个物种的遗传多样性高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关。丰富的遗传多样性意味着较高的适应生存潜力,蕴藏着较大的进化潜能以及较丰富的育种和遗传改良的潜力,而贫乏的遗传多样性则会给物种生存、进化及种质资源的保护和利用带来许多不利影响。核苷酸多样性指数和线粒体DNA的单倍型多样性指数^[17]是衡量DNA多态程度的两个重要指标。本研究对日本沼虾3个野生群体的遗传多样性水平进行分析,结果显示,3个群体的 H_d 为0.656~0.872, P_i 为0.011 50~0.022 45,总的 H_d 和 P_i 分别为0.878和0.022 05,说明这3个群体的多样性程度处于同一个水平,表现为较高的遗传多样性。AMOVA分析结果显示,在整个遗传变异中,群体间遗传变异占23.36%,其余76.64%的遗传变异则来自于群体内。衡水湖和白洋淀尽管同属河北省,但两水域之间并无河流沟通,使得地理阻碍成为二者群体间产生遗传分化的重要原因。从采样地点分析,白洋淀水域辽阔,主要分为烧车淀、大麦淀、藻乍淀、小白洋淀等四个核心区。不同的淀区之间以沟壕相连,村庄和园田相隔,导致不同淀之间的水体交换受阻^[18]。日

本沼虾为底栖甲壳动物,游泳能力较弱,只能作短距离的游动,具有较强的定居性^[19]。这些都是导致日本沼虾群体间产生遗传分化的原因。

群体遗传学研究认为,引起群体分化的主要原因是遗传漂变和自然选择,同时也受到种群历史动态的影响。种群历史演化通常通过2种方法来检测^[20]:中性选择分析(如Tajima's D检验)和碱基不配对分析,若Tajima's D值显著偏离中性检验,而且核苷酸错配曲线呈现单峰分布,则表明群体在过去经受了扩张;反之,群体保持稳定^[21]。本研究结果显示核苷酸不配对分布分析图谱呈现多峰型,在中性检验中Tajima's D($D=0.07984$, $P>0.05$)值为正值,且统计结果不显著,表明日本沼虾3个野生群体大小保持相对稳定,未发生明显的种群扩张。

河北白洋淀和衡水湖作为我国重要的淡水湖泊,野生日本沼虾资源较为丰富。本研究通过对不同水域及相同水域的野生日本沼虾群体的遗传多样性进行分析,结果显示,衡水湖和白洋淀的日本沼虾群体具有较高的遗传多样性,为合理开发、利用、保护日本沼虾野生种质资源提供参考数据;同时,合理开发、保护日本沼虾栖息水域的生态资源,也将对其遗传多样性的维持提供基本保证。

参考文献:

- [1] Fu H T, Gong Y S, Wu Y, *et al.* Artificial interspecific hybridization between *Macrobrachium* species[J]. *Aquaculture*, 2004, 232(1-4): 215-223.
- [2] 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, 17(3): 371-376. Feng J B, Li J L, Cheng X. Research progress on germplasm resource exploitation and protection of *Macrobrachium nipponense*[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, 17(3): 371-376(in Chinese).
- [3] 褚嘉祐,李绍武,张亚平. 努力推动中国的遗传多样性研究[J]. 遗传, 2012, 34(11): 1349-1350. Chu J Y, Li S W, Zhang Y P. Efforts to promote genetic diversity in China[J]. *Heredity*, 2012, 34(11): 1349-1350(in Chinese).
- [4] 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. Wu Y, Fu H T, Li J L, *et al.* Research on genetic diversity of *Macrobrachium nipponense* in Taihu

- Lake[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2008, 17(5): 620-624(in Chinese).
- [5] Qiao H, Lv D, Jiang S F, *et al.* Genetic diversity analysis of oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*, in Yellow River using microsatellite marker[J]. Genetics and Molecular Research, 2013, 12(4): 5694-5703.
- [6] 杨频, 陈立侨, 王伟, 等. 日本沼虾遗传多样性的 ISSR分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(5): 913-921.
- Yang P, Chen L Q, Wang W, *et al.* Genetic diversity of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense* De Haan) revealed by ISSR markers[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(5): 913-921(in Chinese).
- [7] Chen P C, Shih C H, Chu T J, *et al.* Population structure and historical demography of the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in Taiwan[J]. Plos One, 2015, 10(12): e145927.
- [8] Liao Y Y, Mo G D, Sun J L, *et al.* Genetic diversity of Guangxi chicken breeds assessed with microsatellites and the mitochondrial DNA D-loop region[J]. Molecular Biology Reports, 2016, 43(5): 415-425.
- [9] Maltsev A N, Stakheev V V, Bogdanov A S, *et al.* Phylogenetic relationships of intraspecific forms of the house mouse *Mus musculus*: analysis of variability of the control region (D-Loop) of mitochondrial DNA[J]. Doklady Biological Sciences, 2015, 465(1): 285-288.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 463-470.
- [11] 姚茜, 杨频, 陈立侨, 等. 罗氏沼虾三群体线粒体D-loop基因序列差异的初步研究[J]. 水产学报, 2007, 31(S1): 18-22.
- Yao Q, Yang P, Chen L Q, *et al.* Interspecific DNA sequence polymorphism in the mitochondrial D-loop gene from three populations of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(S1): 18-22(in Chinese).
- [12] Ma K Y, Feng J B, Li J L. Genetic variation based on microsatellite analysis of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* from Qiandao Lake in China[J]. Genetics and Molecular Research, 2012, 11(4): 4235-4244.
- [13] Beati L, Nava S, Burkman E J, *et al.* *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: Phylogeography and evidence for allopatric speciation[J]. BMC Evolutionary Biology, 2013, 13: 267.
- [14] Liu M Y, Cai Y X, Tzeng C S. Molecular systematics of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868(Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) inferred from mtDNA Sequences, with emphasis on East Asian species[J]. Zoological Studies, 2007, 46(3): 272-289.
- [15] Karl S A, Wilson D S. Phylogeography and systematics of the mud turtle, *Kinosternon baurii*[J]. Copeia, 2001, 2001(3): 797-801.
- [16] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, *et al.* Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989, 86(16): 6196-6200.
- [17] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(10): 5269-5273.
- [18] 刘立华. 白洋淀湿地水资源承载能力及水环境研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2005.
- Liu L H. Study on water resources carrying capacity and water environment of the Baiyang Wetlands[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2005(in Chinese).
- [19] 吴伟, 瞿建宏, 王小娟, 等. 水生植物-微生物强化系统对日本沼虾养殖水体的生物净化[J]. 生态与农村环境学报, 2011, 27(5): 108-112.
- Wu W, Qu J H, Wang X J, *et al.* Effect of fortified aquatic plants-microorganisms system on purifying *Macrobrachium nipponense* culturing water[J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2011, 27(5): 108-112(in Chinese).
- [20] Chen S Y, Su Y H, Wu S F, *et al.* Mitochondrial diversity and phylogeographic structure of Chinese domestic goats[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2005, 37(3): 804-814.
- [21] De Oliveira-Neto J F, Pie M R, Chammas M A, *et al.* Phylogeography of the blue land crab, *Cardisoma guanhumi* (Decapoda: Gecarcinidae) along the Brazilian coast[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 2008, 88(7): 1417-1423.

Genetic variation analysis of three wild populations of Oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in Hebei Province with mtDNA D-Loop sequences

DONG Xinpei¹, WU Xiaobin¹, WAN Haifu¹, MU Shumei¹,
KANG Xianjiang^{1*}, XIAO Guohua², XUE Jianmin³

(1. College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China;

2. Department of Oceanographic and Aquatic Research Institute in Hebei, Qinhuangdao 066200, China;

3. Hengshui Fishery Technology Extending Station, Hengshui 053000, China)

Abstract: In order to understand further the genetic resources of *Macrobrachium nipponense* in South Baiyangdian (SB), North Baiyangdian (NB) and Hengshui Lake (HS) of Hebei Province, we investigated the genetic structure of Oriental river prawn *M. nipponense* among three different wild populations from Baiyangdian and Hengshui Lake of Hebei Province using nucleotide sequences from control region (D-Loop) gene of mitochondria. The results revealed polymorphisms at 80 nucleotide sites from an approximately 935 bp fragment of this gene region sequenced, accounting for 8.56% of all sites, of which 77 were parsimony-informative sites, the contents of A, T, G and C of D-loop were 42.65%, 36.98%, 9.08% and 11.29%, respectively, and the content of A+T (79.63%) was significantly higher than that of G+C. The fixation indices (F_{ST}) analyzed by AMOVA of ARLEQUIN Version 3.11 was 0.2336, which indicated that the variation percentages between and within groups were 23.36% and 76.64%, respectively. NJ phylogenetic tree of 23 haplotypes constructed by Kimura-2-parameter model showed haplotypes did not cluster in accordance with the group of haploid type, but characterized by different groups with individual interlaced form complex cluster. The mismatch distribution analysis and neutrality test demonstrated that *M. nipponense* has not experienced a population expansion recently.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; D-Loop sequence; wild population; genetic variation

Corresponding author: KANG Xianjiang. E-mail: xjkang218@126.com

Funding projects: Freshwater Aquaculture Innovation Team of Hebei Province Modern Agricultural Industry Technology System