

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00866

## 人工养殖与选育对罗氏沼虾遗传多样性的影响

陈雪峰<sup>1,2</sup> 杨国梁<sup>1,2</sup> 孔杰<sup>3</sup> 栾生<sup>3</sup> 张宇飞<sup>1,2</sup> 王军毅<sup>1,2</sup>  
高强<sup>1,2</sup> 罗坤<sup>3</sup> 官金华<sup>2</sup> 叶少群<sup>2</sup>

(1. 浙江省淡水水产研究所, 国家罗氏沼虾遗传育种中心, 湖州 313001; 2. 浙江南太湖淡水水产种业有限公司, 湖州 313001;  
3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 青岛 266071)

**摘要:** 为探讨人工养殖与选择育种对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)遗传多样性的影响, 实验测定了孟加拉野生群体、缅甸野生群体、浙江养殖群体、广西养殖群体及选育群体“南太湖2号”共111只罗氏沼虾核糖体转录间隔区2 (Internal transcribed spacer 2, *ITS2*)基因序列, 结果发现58个碱基变异位点, 定义56个单倍型。在5个群体中, 孟加拉野生群体的遗传多样性最高 (平均核苷酸差异数  $K$  和核苷酸多态性指数  $P_i$  分别为7.186和0.0155), 依次为缅甸野生群体、浙江养殖群体、广西养殖群体, 选育群体“南太湖2号”遗传多样性最低 ( $K$  和  $P_i$  分别为3.032和0.0065)。5个群体间配对  $F_{st}$  分析表明, 养殖群体与野生群体遗传分化显著 ( $P < 0.01$ ), 选育群体“南太湖2号”不仅与野生群体遗传分化显著, 同时还与广西养殖群体产生了显著的遗传分化 ( $P < 0.01$ )。系统树显示, 孟加拉野生群体和缅甸野生群体聚为一支, 浙江养殖群体、广西养殖群体和选育群体“南太湖2号”则聚为另一支。研究结果表明, 人工养殖和选育降低了罗氏沼虾的遗传多样性水平, 并导致群体间发生了显著的遗传分化。

**关键词:** 罗氏沼虾; *ITS2* 基因; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号: Q346 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)05-0866-08

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)又名马来西亚大虾, 为世界最大淡水虾类, 是热带和亚热带地区内陆水产养殖中最重要的经济甲壳动物之一<sup>[1]</sup>。1976年我国从日本引进该虾养殖, 发展至今, 我国罗氏沼虾养殖业已经位居世界第一。但是, 罗氏沼虾引进30多年来, 由于人工养殖中亲本管理不够严谨(如亲本逆向保留、近交等), 导致了种质衰退(如生长慢、病害多等), 严重危害产业健康发展。为此, 本课题组自2006年开始, 以缅甸野生群体、浙江养殖群体、广西养殖群体为基础群体, 运用“水产动物多性状复合育种技术”, 经过连续4代的大规模家系选育和生长对比测试, 获得了罗氏沼虾选育新品种“南太湖2号”(品种登记号: GS-01-001-2009)。与商业苗种相比, 经遗传改良后, 罗氏沼虾“南太湖2号”的生长速度提高36.87%, 成活率提高7.76%<sup>[2]</sup>。

真核生物 rDNA 基因为多拷贝基因, 重复序列高度一致<sup>[3]</sup>。其中分隔 18S、5.8S 和 28S 的内转录间隔区 (Internal transcribed spacer, ITS) 由于不参加功能基因编码, 所受选择压力小, 进化速率快, 变异大, 因而该区可用以研究群体间的遗传多样性水平<sup>[4]</sup>。*ITS2* 是介于 5.8S 和 28S 之间的非编码序列, 具有较大的变异性、信息量丰富、序列短和易于扩增等特点, 已逐渐成为研究物种遗传关系的基本工具之一。利用 *ITS2* 序列变异研究水产动物群体遗传多样性的工作也已经开展<sup>[5]</sup>。

种质资源是育种的物质基础, 从保护罗氏沼虾野生种质资源和选育良种的角度出发, 开展罗氏沼虾遗传资源的调查和研究, 探索野生群体与人工养殖群体和选育群体遗传多样性的变化规律, 对其野生种质资源的保护和良种选育的持续开展有着科学

收稿日期: 2011-06-28; 修订日期: 2012-04-19

基金项目: 浙江省重大科技专项项目(2007C12059); 科技部农业科技成果转化资金项目(2007GB2C200124) 资助

作者简介: 陈雪峰(1984—), 男, 江苏南通人; 研究实习员; 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: chenfenghailan@126.com

通讯作者: 杨国梁(1963—), 男, 浙江湖州人; 教授级高工; 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: yg10572@163.com

的指导意义。目前, 国内外学者已经通过各种分子标记进行了罗氏沼虾群体遗传多样性研究<sup>[6-10]</sup>。有关罗氏沼虾 *ITS2* 序列的遗传多样性的研究工作还未见报道。此外, 之前的研究大多集中在通过这些分子标记来评估罗氏沼虾野生群体与人工养殖群体的遗传多样性, 而对经系统人工定向选育而来的罗氏沼虾新品种群体遗传多样性评估的研究尚未见报道。本文以罗氏沼虾 *ITS2* 基因的序列变异为分子标记, 分析了罗氏沼虾孟加拉野生群体、缅甸野生群体、浙江养殖群体、广西养殖群体、选育群体“南太湖 2 号”5 个群体的遗传多样性, 探讨长期人工养殖以及选育对罗氏沼虾群体遗传结构的影响, 以期为今后罗氏沼虾种质资源评估以及进一步开展良种选育提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

所用实验材料为浙江省淡水水产研究所国家罗氏沼虾遗传育种中心内收集的罗氏沼虾不同群体成虾样本, 活体冷冻于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 保存备用(表 1)。

### 1.2 方法

**基因组 DNA 提取** 采集虾肌肉 100 mg 放入 1.5 mL 离心管内, 酚-氯仿法抽提基因组 DNA<sup>[11]</sup>。提取的 DNA 用 TE 溶解, 使用时稀释为 50 ng/ $\mu\text{L}$ 。

**PCR 扩增、产物纯化和测序** 根据本实验室克隆到的罗氏沼虾 *ITS* 全序列(GenBank accession number: HM5905795)中 5.8S 和 28S 保守区设计特异性引物来扩增罗氏沼虾 *ITS2*。PCR 引物序列为 F: 5'-TGTCAGCATGTGAATCGCAAGA-3'和 R: 5'-TATTAGCCTTAGATGGAGTTTAC-3'。PCR 反应总体系为 25  $\mu\text{L}$ , 模板为基因组 DNA 50 ng, 使用 *Taq* 酶(TakaRa)进行 PCR 扩增, 其余组分按照说明书要求添加。PCR 反应条件为:  $94^{\circ}\text{C}$  2min;  $94^{\circ}\text{C}$  30s,  $55^{\circ}\text{C}$  45s,  $72^{\circ}\text{C}$  1min, 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10min;  $4^{\circ}\text{C}$  保

存。PCR 扩增产物的纯化和基因测序由上海捷瑞生物工程有限公司完成, 采用双向测序, 测序所用引物与扩增引物为同一对引物。

**数据处理** 所测序列用 NCBI 服务器上的 Blast 软件进行同源性检索, 确定 *ITS2* 的边界及长度。CLUSTL W 软件进行序列比对, 辅以手工校正。通过 Dna SP 4.10 软件<sup>[12]</sup>统计各群体的单倍型多样性(Haplotype diversity,  $H_d$ )、平均核苷酸差异数(Average number of nucleotide,  $K$ )、核苷酸多态性指数(Nucleotide diversity,  $P_i$ )。Mega 4.0 软件包<sup>[13]</sup>分析序列碱基含量, 邻接法 Neighbore-Joining (NJ)构建分子系统进化树。使用 Arlequin 3.0 软件<sup>[14]</sup>中的分子变异分析(AMOVA)方法估算遗传变异在群体内和群体间的分布, 群体间成对  $F_{st}$  值<sup>[15]</sup>采用排列测验法(Permutation test)进行显著性检验(重复次数为 1000)。根据  $N_m=(1-F_{st})/2F_{st}$  计算群体间基因流<sup>[16]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 序列特征

PCR 产物测序后, 去除两端部分 5.8S 及 28S 序列后, 得到 *ITS2* 全序列, 序列比对后, 得到 605 bp 的对齐序列。序列碱基组成(表 2), 所有序列中平均 C+G 含量为 54.1%, 明显高于 A+T 含量 45.9%。5 个群体所有序列中共发现 58 个碱基变异位点, 占位点总数的 9.6%, 其中颠换位点 18 个, 分别为 A/C 颠换 5 个, A/T 颠换 5 个, C/G 颠换 3 个, T/G 颠换 5 个; 转换位点为 40 个, 分别为 C/T 转换 20 个, A/G 转换 20 个(图 1)。颠换与转换的比值为 1 : 2.2。

### 2.2 五个群体 *ITS2* 序列变异及其遗传多样性参数

从 58 个碱基变异位点共定义了 56 个单倍型(GenBank accession number: JF502465—JF502520), 单倍型及其在罗氏沼虾 5 个群体中的分布(图 1), 其中群体间共享单倍型为 10 个, 占单倍型总数的 17.9%。在共享单倍型中, 2 个单倍型(*Hap1*、*Hap23*)

表 1 实验材料详细信息  
Tab.1 Detailed information on experimental materials

| 群体 Populations   | 群体信息 Information                  | 采样时间 Time | 样本数 Samples |
|------------------|-----------------------------------|-----------|-------------|
| 孟加拉野生群体 M        | 2007 年从孟加拉引进本中心                   | 2007.6    | 21          |
| 缅甸野生群体 MD        | 2002 年从缅甸引进本中心                    | 2002.9    | 21          |
| 浙江养殖群体 Z         | 该群体在浙江封闭养殖 10 年以上, 2002 年引进本中心    | 2002.9    | 23          |
| 广西养殖群体 G         | 该群体在广西封闭养殖 10 年以上, 2002 年引进本中心    | 2002.9    | 23          |
| “南太湖 2 号”群体 NTH2 | 2006 年开始, 以 MD、Z、G 上述三群体为基础群体选育获得 | 2010.6    | 23          |



体次之, 其多态位点均为 27, 广西养殖群体的多态位点数为 17, “南太湖 2 号”群体的多态位点数最少为 15。在罗氏沼虾 5 个群体中, 孟加拉野生群体的平均核苷酸差异数( $K$ )与核苷酸多样性指数( $P_i$ )分别为 7.186 和 0.0155, 明显高于其他 4 个罗氏沼虾群体, 在此两个遗传指标上, 排在最后的是“南太湖 2 号”群体, 其平均核苷酸差异数( $K$ )与核苷酸多样性指数( $P_i$ )分别为 3.032 和 0.0065(表 3)。结果表明野生群体遗传多样性高于养殖和选育群体。

### 2.3 五个群体间遗传分化

对罗氏沼虾 5 个群体 *ITS2* 序列进行分子变异分析(AMOVA), 总方差剖分为群体间的方差( $V_a$ )和群体内的方差( $V_b$ ), 并进行显著性检验。结果表明, 群体间遗传变异占总遗传变异的 7.51%, 群体内个体间遗传变异占总遗传变异的 92.49%。群体间遗传分化极显著( $F_{st}=0.07510$ ,  $P=0.00000<0.01$ )(表 4)。

采用 Arlequin 3.0 软件计算罗氏沼虾 5 个群体的遗传分化指数  $F_{st}$  和相应的  $P$  值(表 5), 进一步分析群体间的遗传分化。5 个群体间的遗传分化指数  $F_{st}$  在 -0.0169—0.1755 之间。两个野生群体间遗传分化

指数  $F_{st}$  为 -0.0169( $P>0.05$ ), 表明野生群体间不存在显著的遗传分化; 2 个野生群体与 2 人工养殖群体间配对遗传分化指数  $F_{st}$  分别为 0.0711( $P<0.05$ )、0.0872( $P<0.01$ )、0.1345( $P<0.01$ )、0.1755( $P<0.01$ ), 表明野生群体与养殖群体存在显著的遗传分化; 2 个野生群体与“南太湖 2 号”群体间配对遗传分化指数  $F_{st}$  分别为 0.0770( $P<0.01$ )、0.1107( $P<0.01$ ), 表明野生群体与选育群体存在极显著的遗传分化。浙江养殖群体与广西养殖群体遗传分化指数  $F_{st}$  为 0.0168 ( $P>0.05$ ), 2 个养殖群体间遗传分化不显著。“南太湖 2 号”选育群体与浙江养殖群体遗传分化不显著( $F_{st}=0.0080$ ,  $P>0.05$ ), 而与广西养殖群体遗传分化极显著( $F_{st}=0.0647$ ,  $P<0.01$ )。根据 5 个群体两两配对遗传分化指数  $F_{st}$  计算基因流  $N_m$  值, 5 群体间基因流  $N_m$  在 2.293—37.961 之间(表 5)。

### 2.4 基于 5 个罗氏沼虾群体 *ITS2* 序列聚类关系

使用 Mega 4.0 软件中 NJ 法, 构建 5 个群体系统聚类树(图 2), NJ 系统聚类树显示, 5 个罗氏沼虾群体分为 2 个大支, 野生群体聚为一支, “南太湖 2 号”群体与浙江养殖群体、广西养殖群体聚为另一支。

表 3 罗氏沼虾 5 个群体 *ITS2* 遗传多样性参数比较

Tab. 3 Summary of genetic diversity of *M. rosenbergii* from five populations

| 群体 Population    | 多态位点数 $S$ | 单倍型多样性 $H_d$ | 平均核苷酸差异数 $K$ | 核苷酸多样性指数 $P_i$ |
|------------------|-----------|--------------|--------------|----------------|
| 孟加拉野生群体 M        | 42        | 0.98         | 7.186        | 0.0155         |
| 缅甸野生群体 MD        | 27        | 0.99         | 5.552        | 0.0120         |
| 浙江养殖群体 Z         | 27        | 0.95         | 4.470        | 0.0101         |
| 广西养殖群体 G         | 17        | 0.97         | 4.150        | 0.0089         |
| “南太湖 2 号”群体 NTH2 | 15        | 0.93         | 3.032        | 0.0065         |
| 总和 Total         | 58        | 0.96         | 4.114        | 0.0096         |

表 4 群体间遗传变异的分子变异等级分析

Tab. 4 Analysis of molecular variance

| 组别                          | 自由度  | 遗传变异元素         | 占总变异百分比             | 总变异百分比                  | $F$ -统计量 | $P$ 值      |
|-----------------------------|------|----------------|---------------------|-------------------------|----------|------------|
| Source of variation         | $df$ | Sum of squares | Variance components | Percentage of variation | $F_{st}$ | $P$ -value |
| 5 个群体间<br>Among populations | 4    | 24.351         | 0.17643 $V_a$       | 7.51                    | 0.07510  | 0.00000    |
| 群体内<br>Within populations   | 106  | 230.333        | 2.17296 $V_b$       | 92.49                   |          |            |
| 总体 Total                    | 110  | 254.685        | 2.34939             |                         |          |            |

表 5 罗氏沼虾各群体间的基因流(对角线下方)及遗传分化指数  $F_{st}$ (对角线上方)

Tab. 5 Gene flow (below diagonal) and population pairwise  $F_{st}$  values (upper diagonal) of the different populations of *M. rosenbergii*

| 群体<br>Population | 孟加拉野生群体 M | 缅甸野生群体 MD            | 浙江养殖群体 Z            | 广西养殖群体 G            | “南太湖 2 号”群体 NTH2    |
|------------------|-----------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 孟加拉野生群体 M        |           | -0.0169 ( $P>0.05$ ) | 0.0872 ( $P<0.01$ ) | 0.1755 ( $P<0.01$ ) | 0.1107 ( $P<0.01$ ) |
| 缅甸野生群体 MD        | —         |                      | 0.0711 ( $P<0.05$ ) | 0.1345 ( $P<0.01$ ) | 0.0770 ( $P<0.01$ ) |
| 浙江养殖群体 Z         | 5.055     | 9.115                |                     | 0.0168 ( $P>0.05$ ) | 0.0080 ( $P>0.05$ ) |
| 广西养殖群体 G         | 2.308     | 3.964                | 37.961              |                     | 0.0647 ( $P<0.01$ ) |
| “南太湖 2 号”群体 NTH2 | 2.293     | 3.925                | 24.500              | 12.321              |                     |

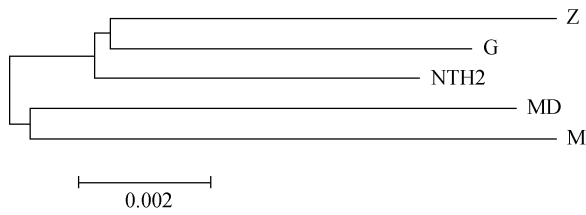


图2 罗氏沼虾5个群体 *ITS2* 序列 NJ 系统树

Fig. 2 *ITS2* Neighbor-joining phylogenetic tree of five *M. rosenbergii* populations

### 3 讨论

#### 3.1 *ITS2* 序列变异作为群体遗传多样性研究的分子标记

相对于其他分子标记技术,如同工酶、RAPD及RFLP等,DNA序列分析在进行群体遗传多样性分析时更直接、准确和可靠。本文对5个群体111个罗氏沼虾个体 *ITS2* 序列进行了分析,共发现58个变异位点(占分析位点总数9.6%),定义56个单倍型。此前,杨学明等<sup>[8]</sup>对罗氏沼虾不同群体 *CO1* 基因片段进行研究,共检测到10个变异位点,5种单倍型,而其对罗氏沼虾不同群体16S rRNA基因片段进行研究,结果没有检测到变异位点<sup>[10]</sup>。与之相比,本文所用 *ITS2* 序列变异位点和单倍型丰富,群体间差异较明显,表明 *ITS2* 序列是检测罗氏沼虾群体遗传变异的有效标记。

#### 3.2 人工养殖与选育对遗传多样性的影响

遗传多样性丰富意味着适应生存能力比较高、进化潜能大以及比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。迄今,许多学者已经通过多种分子手段对罗氏沼虾野生群体与养殖群体的遗传多样性进行了比较分析,其研究结果都表明野生群体的遗传多样性较养殖群体丰富。本文通过罗氏沼虾 *ITS2* 基因序列的研究表明,野生群体的遗传多样性参数高于养殖群体,这与以往的研究结果一致。野生群体之所以保持较高的遗传多样性水平,可能是由于野生群体未受到较强烈的人工选择的影响,依然保持着部分原有的基因型所致;而人工养殖过程中影响群体遗传多样性的瓶颈效应、遗传漂变和近交等因素,使养殖群体不可避免地丧失某些特定的等位基因,因此造成养殖群体的遗传变异度及遗传多样性水平低于野生群体,这在很多养殖虾类,如中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)<sup>[17]</sup>、

日本对虾(*Penaeus japonicus*)<sup>[18]</sup>的研究中已得到证实。

姚茜等<sup>[19]</sup>报道了人工遗传改良对罗氏沼虾群体遗传多样性的影响,其利用线粒体D-loop基因分析了浙江养殖群体、缅甸引进种F<sub>2</sub>代群体以及这两个群体杂交而来的“南太湖1号”群体3者的遗传多样性水平,结果表明,人工杂交群体“南太湖1号”的遗传多样性相对于浙江养殖群体有所提高。迄今为止,有关人工定向选育对罗氏沼虾群体遗传多样性影响的研究尚未见报,本文经过连续4代人定向选育而来的“南太湖2号”群体在多态位点数(*S*)、单倍型多样性(*H<sub>d</sub>*)、平均核苷酸差异数(*K*)、核苷酸多样性指数(*P<sub>i</sub>*)等方面,要低于野生群体和养殖群体,表明人工定向选育使得罗氏沼虾群体遗传多样性水平降低,罗氏沼虾“南太湖2号”是以生长速度和成活率两大经济性状为选育指标选育而来。在选育过程中,通过大规模的家系构建对近交进行了严格控制,因此由于近交而造成遗传多样性下降的机会不大,导致“南太湖2号”群体遗传多样性程度不高的原因可能是以少数经济性状为指标高强度人工定向选择。人工定向选择会使目标性状相关基因纯合化,势必导致选育过程中某些位点选择性的丧失,使得选育群体的基因型变得较为单一,造成遗传多样性下降。这与吉富尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)<sup>[19]</sup>、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)<sup>[20]</sup>、中国对虾<sup>[21]</sup>的人工定向选育导致选育群体遗传多样性下降的研究结果类似。

#### 3.3 群体间遗传分化的产生机制

一般而言,影响野生群体间遗传分化的因素有群体所处的地理位置、历史事件、群体特殊的生活史<sup>[22-24]</sup>等。Benzie, *et al.*<sup>[23]</sup>和Brooker, *et al.*<sup>[24]</sup>分别采用同工酶与微卫星技术对澳大利亚斑节对虾(*Penaeus monodon*)野生群体研究结果表明,群体间的地理位置决定着群体间的遗传分化是否显著。Cui, *et al.*<sup>[25]</sup>利用线粒体控制区研究采自黄海、渤海6个地点中国对虾野生群体遗传结构的结果表明,由于中国对虾洄游产卵的特殊生活史,导致野生群体间遗传分化很弱。Kancee, *et al.*<sup>[26]</sup>利用微卫星研究了泰国两个野生罗氏沼虾群体的遗传结构,其结果表明由于地理隔离两个野生群体间遗传分化明显。在本文中孟加拉和缅甸两个野生群体间的遗传分化指数  $F_{st}$  为-0.0169,两群体遗传分化不显著( $P>0.05$ ),表明两群体间存在较大的基因交流,推测原因可能

是由于孟加拉和缅甸为邻国, 在地理位置上接壤, 两国南临孟加拉湾, 罗氏沼虾母体抱卵之后, 必须在海水中进行产卵, 而后幼体发育为仔虾后再洄游至淡水中, 这就有可能导致原本来自孟加拉(或缅甸)的罗氏沼虾仔虾洄游至缅甸(或孟加拉)河流中, 并定居发育成熟, 进而与当地种群发生了基因的交流。

人工养殖导致罗氏沼虾群体间产生遗传分化的研究已有报道, 姚茜等<sup>[9]</sup>利用线粒体控制区分析缅甸野生群体与浙江养殖群体的遗传结构, 其结果表明两群体间的遗传分化指数  $F_{st}$  为 0.105( $F_{st}>0.05$ ), 已达到中等分化水平。在本文中 2 个野生群体与 2 个养殖群体间两两遗传分化指数  $F_{st}$  为 0.0711—0.1755, 野生群体与养殖群体遗传分化显著( $P<0.05$ ), 人工养殖影响了罗氏沼虾群体遗传结构。由于在人工养殖过程中选用的亲虾数量不够多, 或存在近亲繁殖, 可能使某些稀有基因在养殖过程中丢失, 从而影响群体的遗传结构。广西与浙江养殖群体的遗传分化指数  $F_{st}$  为 0.0168, 两个养殖群体遗传分化不显著( $P>0.05$ ), 存在基因的交流。本文所选的两个养殖群体虽然分处两个不同的地区, 但该两个地区都是我国罗氏沼虾育苗与养殖业发达的地区, 在自然条件下, 长期地理隔离会造成不同群体间产生遗传分化, 两地区罗氏沼虾在自然条件下不可能进行基因的交流, 可能通过罗氏沼虾苗种的互相输入, 使得两个地区的养殖群体发生了基因的交流。

选择使等位基因的变异可以区分, 从而产生遗传上的分化。在吉富罗非鱼、团头鲂、中国对虾中的研究表明, 选育良种同野生群体出现明显的遗传分化<sup>[19-21]</sup>, 本文选育群体“南太湖 2 号”与 2 个野生群体间的遗传分化指数  $F_{st}$  分别为 0.0770、0.1107, “南太湖 2 号”群体与野生群体遗传分化极显著( $P<0.01$ )。值得一提的是, “南太湖 2 号”选育群体与浙江养殖群体遗传分化不显著( $F_{st}=0.0080$ ,  $P>0.05$ ), 而与广西养殖群体遗传分化极显著( $F_{st}=0.0647$ ,  $P<0.01$ ), “南太湖 2 号”是以缅甸野生群体、浙江养殖群体、广西养殖群体为基础群体选育而来。本文研究结果表明, 其与两个基础群体出现了极其明显的遗传分化( $P<0.01$ ), 说明“南太湖 2 号”在经济性状得到改良的同时, 在选育 4 个世代的时间里, 遗传型也出现了一定的变异, 这一结果可作为选育过程中罗氏沼虾获得遗传进展的佐证; 而与基础群体之一的浙江养殖群体遗传分化不显著( $F_{st}=0.0168$ ,

$P>0.05$ ), 提示虽然经 4 世代的选育, “南太湖 2 号”良种经济性状已经相当稳定, 但还有进一步的选育潜力。

#### 参考文献:

- [1] Yang G L, Luo K, Kong J, *et al.* Correlation of growth and survivorship for *Macrobrachium rosenbergii* in different culture conditions [J]. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(3): 74—79 [杨国梁, 罗坤, 孔杰, 等. 罗氏沼虾不同养殖条件下的生长和存活率相关分析. 海洋水产研究, 2008, 29(3): 74—79]
- [2] Gao Q, Yang G L, Wang J Y, *et al.* Studies on muscle nutritive quality of a selected strain of *Macrobrachium rosenbergii*, “South Tailake No. 2” [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(1): 116—123 [高强, 杨国梁, 王军毅, 等. 罗氏沼虾“南太湖 2 号”选育群体肌肉营养品质研究. 水产学报, 2011, 35(1): 116—123]
- [3] Dover G A. Molecular drive in muhigene families, how biological novelties arise spread and assimilated [J]. *Trends in Genetics*, 1986, 2: 159—165
- [4] Shi Z G, An W, Jiao E N, *et al.* Genetic polymorphism of eighteen *Lycium barbarum* resources based on nrDNA ITS sequence [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(3): 53—55
- [5] Jiang Z Y, Niu D H, Chen H, *et al.* The genetic analysis of *ITS-1* and *ITS-2* between wild and cultured populations of *Sinonovacula constricta* in Fujian [J]. *Marine Fisheries*, 2007, 29(4): 314—318 [姜志勇, 牛东红, 陈慧, 等. 福建缙蛭野生群体与养殖群体的 *ITS1* 和 *ITS2* 分析. 海洋渔业, 2007, 29(4): 314—318]
- [6] Li M Y, Zhang H Q, Zhu J J, *et al.* Genetic variation between cultured population from Zhejiang province and natural population from Burma of *Macrobrachium rosenbergii* revealed by RAPD method [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(4): 360—364 [李明云, 张海琪, 朱俊杰, 等. 罗氏沼虾浙江养殖群体与缅甸自然群体遗传差异的 RAPD 分析. 水产学报, 2004, 28(4): 360—364]
- [7] Divu D, Khushiramani R, Malathi S, *et al.* Isolation, characterization and evaluation of microsatellite DNA makers in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, from South India [J]. *Aquaculture*, 2008, 284(1): 281—284
- [8] Yang X M, Guo Y F, Chen F Y, *et al.* Intraspecific DNA sequence polymorphism and genetic markers in the mitochondrial *COI* gene from three populations of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Hereditas* (Beijing), 2006, 28(5): 540—544 [杨学明, 郭亚芬, 陈福艳, 等. 罗氏沼虾 3 个群体线粒体 *COI* 基因的序列差异和遗传标记研究. 遗传, 2006, 28(5): 540—544]
- [9] Yao Q, Yang P, Chen L Q, *et al.* Interspecific DNA se-

- quence polymorphism in the mitochondrial D-loop gene from three populations of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, **31**(Suppl.): 18—22 [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. 水产学报, 2007, **31**(增刊): 18—22]
- [10] Yang X M, Huang G H, Jiang Q Y, *et al.* The sequence variation and conservatism analysis of mitochondrial 16SrRNA gene from different populations of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2007, **20**(6): 1373—1376 [杨学明, 黄光华, 蒋钦杨, 等. 罗氏沼虾不同群体线粒体 16SrRNA 基因的序列变异及其保守性分析. 西南农业学报, 2007, **20**(6): 1373—1376]
- [11] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Springs Harbor Laboratory Press. 1989, 463—468
- [12] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguer X, *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. *Bioinformatics*, 2003, **19**(18): 2496—2497
- [13] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**(8): 1596—1599
- [14] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver.3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [Z]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, **1**: 47—50
- [15] Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies [J]. *Genetics*, 1995, **139**(1): 457—462
- [16] Yang B, Chen X Y, Yang J X. Structure of the mitochondrial DNA control region and population genetic diversity analysis of *Anabarilius grahami* (Regan) [J]. *Zoological Research*, 2008, **29**(4): 379—385 [杨博, 陈小勇, 杨君兴. 鳊浪白鱼线粒体 DNA 控制区结构和种群遗传多样性分析. 动物学研究, 2008, **29**(4): 379—385]
- [17] Zhang H, Gao T X, Zhuang Z M, *et al.* Comparative analysis of the mitochondrial control region between the cultured and wild populations of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, **34**(8): 1149—1155 [张辉, 高天翔, 庄志猛, 等. 中国对虾养殖群体与野生群体线粒体控制区序列的比较. 水产学报, 2010, **34**(8): 1149—1155]
- [18] Zhuang Z M, Meng X H, Quan J X, *et al.* Genetic diversity in the wild population and hatchery stock of *Penaeus japonicus* shrimp by isoenzyme analysis [J]. *Zoological Research*, 2000, **21**(4): 323—326 [庄志猛, 孟宪红, 权洁霞, 等. 日本对虾野生种群和养殖群体的同工酶遗传变异. 动物学研究, 2000, **21**(4): 323—326]
- [19] Xie X Y, Li S F, Cai W Q. Analysis of genetic diversity of GIFT strain Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during selection processing by microsatellites [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, **31**(3): 385—390 [颀晓勇, 李思发, 蔡完其. 吉富品系尼罗罗非鱼选育过程中遗传变异的微卫星分析. 水产学报, 2007, **31**(3): 385—390]
- [20] Zhao Y, Li S F, Tang S J. Genetic variations among late selected strains and wild populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) by ISSR analysis [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, **33**(6): 893—900 [赵岩, 李思发, 唐首杰. 团头鲂“浦江 1 号”选育后期世代群体同野生群体间遗传变异的 ISSR 分析. 水产学报, 2009, **33**(6): 893—900]
- [21] He Y Y, Liu P, Li J, *et al.* Analysis of genetic structure in the first cultured stock and the sixth cultured stock of *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, **11**(6): 572—575 [何玉英, 刘萍, 李健, 等. 中国明对虾第一代和第六代人工选育群体的遗传结构分析. 中国水产科学, 2004, **11**(6): 572—575]
- [22] Benzie J A H, Ballment E, Forbes A T, *et al.* Mitochondrial DNA variation in Indo-Pacific populations of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon* [J]. *Molecular Ecology*, 2002, **11**(12): 2553—2569
- [23] Benzie J A H, Frusher S, Ballment E, *et al.* Geographical variation in allozyme frequencies of populations of *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda) in Australia [J]. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 1992, **43**(4): 715—725
- [24] Brooker A L, Benzie J A H, Blair D, *et al.* Population structure of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* in Australian waters, determined using microsatellite markers [J]. *Marine Biology*, 2000, **136**(1): 149—157
- [25] Cui Z X, Li C P, Jang I K, *et al.* Lack of genetic differentiation in the shrimp *Penaeus Chinensis* in the Northwestern Pacific [J]. *Biochemical Genetics*, 2007, **45**(7—8): 579—588
- [26] Kancee C, Supawadee P, Uthairat N N, *et al.* Genetic diversity of hatchery stocks of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Thailand [J]. *Aquaculture*, 2007, **271**(1—4): 121—129

## EFFECT OF ARTIFICIAL CULTURE AND SELECTIVE BREEDING ON THE GENETIC DIVERSITY OF *MACROBRACHIUM ROSENBERGII*

CHEN Xue-Feng<sup>1,2</sup>, YANG Guo-Liang<sup>1,2</sup>, KONG Jie<sup>3</sup>, LUAN Sheng<sup>3</sup>, ZHANG Yu-Fei<sup>1,2</sup>,  
WANG Jun-Yi<sup>1,2</sup>, GAO Qiang<sup>1,2</sup>, LUO Kun<sup>3</sup>, GONG Jin-Hua<sup>2</sup> and YE Shao-Qun<sup>2</sup>

(1. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, National Genetic Breeding Center of *Macrobrachium rosenbergii*, Huzhou 313001, China; 2. Zhejiang South TaiLake Freshwater Fish Breeding Co., Ltd, Huzhou 313001, China; 3. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** The giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) is one of the most important crustaceans in inland aquaculture, especially in many tropical and subtropical areas. China has become the largest producer of the giant freshwater prawn in the world. For protecting species resources and then achieving selective breeding, it is necessary to study the effect of artificial culture and selective breeding on the genetic diversity of *M. rosenbergii*. In this study, the ribosomal internal transcribed spacer 2 (*ITS2*) of 111 individuals from 5 populations (Bengal wild population, Burma wild population, Zhejiang culture population, Guangxi culture population and selected population “South Tailake No. 2”) were sequenced and analyzed in order to estimate the genetic diversity and genetic differentiation of *M. rosenbergii*. Genomic DNA was isolated following the standard method from muscle tissue, and then was kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ . PCR primers were synthesized by Shanghai Generay Biotech Co., Ltd. The PCR reaction mixture contained 25  $\mu\text{L}$ , thermal cycling consisted of an initial denaturing at  $94^{\circ}\text{C}$  for 2min, followed by 30 cycles of denaturing at  $94^{\circ}\text{C}$  with each cycle of 30s, 45s annealing at  $55^{\circ}\text{C}$ , and 1min extension at  $72^{\circ}\text{C}$ , and concluded with a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 10min. The PCR products, which were purified and sequenced by Shanghai Generay Biotech Co., Ltd and analyzed using CLUSTL W, Dna SP 4.10, Mega 4.0 and Arlequin 3.0 softwares.

The results showed that 58 variations and 56 haplotypes were revealed in the 111 sequences. The mean contents of A, T, C and G were 21.6%, 24.4%, 19.5% and 34.6% in *ITS2*, and the content of G + C was significantly higher than A + T. It was also found that Bengal wild population had the highest genetic diversity with 7.186 for the average of nucleotide differences ( $K$ ) and 0.0155 for nucleotide diversity ( $P_i$ ). In decreasing order of genetic diversity, the others were Burma wild population, Zhejiang culture population, Guangxi culture population in turn. And selected population “South Tailake No. 2” had the lowest genetic diversity ( $K$  and  $P_i$  were 3.032 and 0.0065, respectively) among the five populations of *M. rosenbergii*. Pairwise  $F_{st}$  of control region sequence analysis among five populations showed that there were significant differences between the wild populations and the culture populations ( $P < 0.01$ ). Significant differences were also found not only between selected population “South Tailake No. 2” and wild populations, but also between selected populations “South Tailake No. 2” and Guangxi culture population ( $P < 0.01$ ). Genealogical tree showed that Bengal wild population and Burma wild population clustered together, Zhejiang culture population, Guangxi culture population and selected population “South Tailake No. 2” clustered together. The results indicated that the *ITS2* sequence was a good molecular marker for detecting genetic variation of *M. rosenbergii* populations, in addition, artificial culture and breeding had led to decreases in genetic diversity and significant genetic differentiation among *M. rosenbergii* populations. After a 4-generation selection, there was clear genetic differentiation between new selected population “South Tailake No. 2” and the base population, and the new breed with stable characteristics would lay a foundation for breeding other new varieties.

**Key words:** *Macrobrachium rosenbergii*; Ribosomal internal transcribed spacer 2 (*ITS2*); Genetic diversity; Genetic differentiation