

罗氏沼虾抗病选育群体的抗病性能及其遗传多样性分析

朱其建¹, 戴习林^{1*}, 邹卫丽¹, 蒋飞¹, 苏建¹,
过正乾¹, 王海洋¹, 丁福江²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 上海申漕特种水产开发公司, 上海 201516)

摘要: 为深入了解罗氏沼虾抗病选育群体的抗病力和遗传信息, 通过人工注射溶藻弧菌感染 16 个罗氏沼虾选育群体, 并利用微卫星分子标记对选育群体进行遗传结构分析。结果显示, 16 个选育群体抗溶藻弧菌感染能力存在明显差别, 并从中鉴定出抗病力强的群体 3 个 (SCR11-6、SCR11-11 和 SCR11-16), 其在感染溶藻弧菌感染后的成活率达 80%; 抗病力比较强的群体 7 个; 抗病力一般的群体 4 个, 成活率为 65%~70%; 抗病力差的群体 2 个, 成活率为 35%~50%。8 对微卫星引物共检测到 53 个等位基因, 每对引物的等位基因数为 5~9 个, 平均为 6.625 个, 多态信息含量 (PIC) 为 0.629 4~0.829 4, 平均为 0.732 3。16 个群体的平均 PIC 为 0.493 2~0.695 6, 平均观测杂合度为 0.506 2~0.651 3, 平均期望杂合度为 0.551 9~0.733 2, 遗传相似系数平均为 0.655 2, 遗传距离平均为 0.434 4。并对 DP 和 SP 两群体罗氏沼虾个体扩增出的差异条带进行统计, 分析其与罗氏沼虾抗病性状的相关性。结果表明, 5 个微卫星位点 SUGbp8-103b、SUGbp8-101c、MRMB11、SUGbp8-137 和 MRMC2 分别在 203、263、185、335 和 96 bp 等位基因与罗氏沼虾抗病性状存在一定的相关性, 其中, 位点 MRMB11 在 185 bp 等位基因跟抗病性有极显著的正相关性, 相关系数为 0.282。研究表明, 16 个选育群体中有 4 个群体的抗病力较强, 同时与其它 12 个选育群体相比, 这 4 个群体遗传多样性也比较丰富, 这些罗氏沼虾群体的筛选为罗氏沼虾抗病新品种的培育奠定了重要基础。

关键词: 罗氏沼虾; 选育; 抗病力; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号: Q 346; S 917.4

文献标志码: A

罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 又称马来西亚大虾或泰国虾, 其食性广、生长快、肉质鲜嫩, 是目前世界上养殖产量最高的三大虾种之一^[1-2]。但是, 由于养殖的迅速普及, 养殖水域环境的日益恶化, 其病害也愈发严重^[3-4]。其中, 由溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 引起的弧菌病成为虾类养殖中传染性较强的疾病之一, 其发病率高, 致病性强, 给我国虾类养殖业带来巨大的经济损失^[5-9]。因此, 结合现代生物技术培育出优质抗病新品种, 才是预防疾病流行的最有效途径。

微卫星 (microsatellite), 由于多态性丰富、遗

传信息含量大^[10]、操作简便快捷、稳定性好等特点, 被广泛应用于遗传结构分析、种质鉴定、基因定位等研究领域^[11-12]。目前, 有关罗氏沼虾遗传学的研究较少, 主要集中在不同地区罗氏沼虾群体间遗传差异的比较^[13-18]。而有关罗氏沼虾抗病群体建立及遗传基础的研究鲜有报道, 本研究对罗氏沼虾进行溶藻弧菌人工感染实验, 并运用简单重复序列标记 (simple sequence repeats, SSR) 研究其遗传多样性, 探讨了 SSR 标记与抗病性状的相关性, 以期为今后罗氏沼虾抗病选育以及养殖生产奠定分子遗传学基础。

收稿日期: 2013-04-10 修回日期: 2013-06-14

资助项目: 科技部科技人员服务企业行动项目 (2009GJC00021); 上海市科委重点攻关项目 (11391901400); 上海市教育委员会重点学科建设项目 (J50701)

通信作者: 戴习林, E-mail: xldai@shou.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 实验材料

从来源于马来西亚的上海养殖群体,按外部形态(体质量、体长、头胸甲宽、第一腹节宽、第一腹节高)差异,结合聚类分析结果,选择建立的 16 个群体的子一代中,分别挑选一定数量体格健壮的罗氏沼虾作为实验用虾,编号依次为 SCR11-1、SCR11-2、SCR11-3……SCR11-16。实验用溶藻弧菌为从罗氏沼虾养殖水体中分离鉴定得到的菌株。实验用水为经充分曝气且除氯的自来水。

1.2 抗病感染实验

感染实验前将实验水槽(70 cm × 50 cm × 40 cm)清洗干净,用 5‰高锰酸钾溶液浸泡 30 min 消毒,然后冲洗干净。放虾前 1 d,注入自来水并充分曝气 24 h。

对 16 个选育群体进行溶藻弧菌感染实验,每个群体设 2 个平行,每个平行选取沼虾 20 尾(9.43 ± 1.11) cm。感染方法为肌肉注射法,即在第 2 ~ 3 腹节间注射浓度为 1 × 10⁶ CFU/mL 的溶藻弧菌悬液,注射剂量最终为 0.5 × 10⁴ CFU/g。

实验期间每隔 3 h 检查虾的活动情况,及时记录死亡数量并收集死亡个体肌肉(约 1.0 g),

浸入无水乙醇, -40 °C 保存,组成死亡群体记为 DP。感染 10 d 后,剪取仍然存活的罗氏沼虾个体最后一对步足,浸入无水乙醇, -40 °C 保存,组成存活群体记为 SP。

1.3 基因组 DNA 提取

每个个体 DNA 提取和定量的主要过程参照 Strauss 等^[19]。从酒精中取肌肉组织约 100 mg,用蒸馏水洗净,滤纸吸去多余水分后剪碎,加入 500 μL 裂解液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 100 mmol/L EDTA, pH 8.0; 10% SDS; 100 μg/mL 蛋白酶 K)55 °C 中消化过夜。然后分别用等体积的 Tris-饱和酚、饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)提取、纯化 DNA,用 2 倍体积、-20 °C 预冷的无水乙醇沉淀后,加入适量 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)溶解,制成终浓度为 50 ng/μL 的模板 DNA,4 °C 保存备用。

1.4 SSR 遗传分析

微卫星引物 本研究共使用 8 对微卫星引物,其中 2 对(编号为 SUGbp8-103b、SUGbp8-137)由本实验室自主开发筛选而来,其余 6 对多态性丰富的引物从外文文献^[20-22]的 38 对引物中筛选而来。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,引物信息见表 1。

表 1 罗氏沼虾 8 对微卫星位点的特征
Tab. 1 Characterization of 8 microsatellite loci of tested *M. rosenbergii*

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence	退火温度/°C annealing temperature	核心重复序列 repeat sequences	GenBank 登录号 GenBank accession No.
Mr7-88	F: TATTACGATTCCGTGGCACA R: ATATTCTTTGTAGCGGCTGG	53	(CT) ₇	EU847619
SUGbp8-103b	F: ATTCGGTATCAGCTCTGC R: AGGTCATCACCCCTTTCCA	58	(TTC) ₅	DQ019869
SUGbp8-101b	F: CCGTGGCTGAGAGTTTCATAC R: GGGGAATAAAGGACCTCTGG	60	(CAT) ₂ (CTT) ₂ (TAAA) ₂	EF204177
SUGbp8-101c	F: ATAGATGCCAACAGCACAGG R: GACAGTGAGGCACTTTACCG	60	(CAC) ₂	EF204177
SUGbp8-103a	F: AGGATTTCTGCGAGGTCTTG R: CGTGTGTTCTTCATAGGCTTC	60	(TCT) ₂ (ATA) ₂	EF204178
MRMB11	F: GACGCTGCCAAAAAGAAAAG R: ACCGTGCCATTAACCTTCCA	44	(CT) ₃₀	EF515170
SUGbp8-137	F: CGACTGGGTGGTATTTAT R: CGCTGACGTTTATTCTGT	55	(TTA) ₁₆	EF204180
MRMC2	F: TTGGGTGCAGGAAGTCTTGT R: GGGTCTGGGAGATTTCAAGT	46	(GA) ₁₀	EF515175

PCR 扩增及检测 PCR 反应液总体积为 10 μL , 包括 2 \times Mastermix (0.1 U *Taq* Polymerase/ μL , 500 $\mu\text{mol/L}$ dNTP each, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 100 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl_2 , 天根生化科技有限公司) 5 μL , 上、下游引物 (5 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , 模板 DNA (50 ng/ μL) 1 μL , 用 ddH₂O 补足体积。PCR 反应程序: 实验室自主设计引物参照 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火温度 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 4 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 扩增产物在 8% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离, 电泳结果银染检测, 拍照。

1.5 数据统计与分析

罗氏沼虾抗病选育群体抗病性能及遗传结构分析 采用 SPSS 13.0 For Windows 统计软件对感染后成活率数据进行独立样本 *T* 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。

银染之后得到的电泳谱带利用 Gelpro analyzer 4.5 进行分析。使用 PopGene (Version 3.2) 软件统计微卫星基因座的等位基因数 (observed number of alleles, N_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)、遗传相似系数和遗传距离。基因座间连锁不平衡分析, 卡方检验估计群体 Hardy-Weinberg 平衡偏离也由 PopGene (Version 3.2) 来统计。由 MEGA 4.0^[23] 构建 UPGME 聚类图并将其输出。

多态信息含量 (polymorphism information content, *PIC*), 根据 Botstein 等^[24] 公式计算:

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

式中, n 为某位点上等位基因数, P_i 、 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, $j = i + 1$ 。

抗病性状与差异条带的相关性分析 通过对电泳结果进行分析, 获得 DP 和 SP 群体间差异条带的分布情况及泳动位置。用 SPSS 软件对微卫星位点所扩增出的差异等位基因与罗氏沼虾抗病性状间进行皮尔逊检验 (Pearson correlation), 判断有差异的等位基因与抗病性状间是否具有相关性。Pearson 相关系数公式:

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (2)$$

2 结果

2.1 罗氏沼虾的抗病性

本研究对 16 个罗氏沼虾选育群体进行抗溶藻弧菌感染能力测试。结果表明, 在注射溶藻弧菌约 10 h 后, 罗氏沼虾行动迟缓、活力下降、摄食量减少; 16 h 后出现少量死亡, 死亡个体肝脏发白, 肌肉内有白斑块; 48 h 后出现死亡高峰; 120 h 内死亡数占死亡总数的绝大多数, 120 h 后才有所缓解。

由表 2 可知, 经人工感染溶藻弧菌后, 16 个选育群体表现出不同的抗病能力。其中, 选育群体 SCR11-6、SCR11-10、SCR11-11 和 SCR11-16 号的成活率最高, 均为 80.0% 左右; 选育群体 SCR11-5、SCR11-7、SCR11-12、SCR11-15、SCR11-1、SCR11-14、SCR11-9 和 SCR11-13 号成活率为 70% ~ 79%, 平均成活率为 (72.9% \pm 2.3%); 选育群体 SCR11-2、SCR11-4 和 SCR11-3 号的成活率为 50% ~ 69%; 而选育群体 SCR11-8 号的成活率最低, 为 35.0%。16 个选育群体成活率为 35.0% ~ 80.0%, 平均成活率为 (69.9% \pm 12.1%)。

表 2 罗氏沼虾不同选育群体抗溶藻弧菌能力比较
Tab. 2 Comparison of disease resistance of various groups to *V. alginolyticus*

选育群体 population no.	成活率/% survival	选育群体 population no.	成活率/% survival
SCR11-1	72.23 \pm 7.86 ^{ab}	SCR11-9	70.00 \pm 1.34 ^b
SCR11-2	65.00 \pm 7.07 ^b	SCR11-10	80.00 \pm 14.14 ^{ab}
SCR11-3	49.53 \pm 2.35 ^c	SCR11-11	80.00 \pm 1.26 ^a
SCR11-4	65.00 \pm 7.08 ^b	SCR11-12	75.00 \pm 11.78 ^{ab}
SCR11-5	75.00 \pm 17.68 ^{ab}	SCR11-13	70.00 \pm 1.34 ^b
SCR11-6	80.00 \pm 1.22 ^a	SCR11-14	71.43 \pm 1.35 ^{ab}
SCR11-7	75.00 \pm 7.06 ^{ab}	SCR11-15	75.00 \pm 17.68 ^{ab}
SCR11-8	35.00 \pm 9.49 ^c	SCR11-16	80.00 \pm 2.12 ^a

注: 不同的上标字母表示差异性显著 ($P < 0.05$)

Notes: Values with the different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$)

2.2 微卫星标记扩增结果

本研究利用 8 对微卫星引物对 16 个选育群体进行扩增, 结果每个选育群体的扩增带均为多态 (图 1 和图 2)。8 对微卫星引物在 16 个选育群体中共检测到 53 个等位基因, 多数集中在 100 ~ 330 bp。

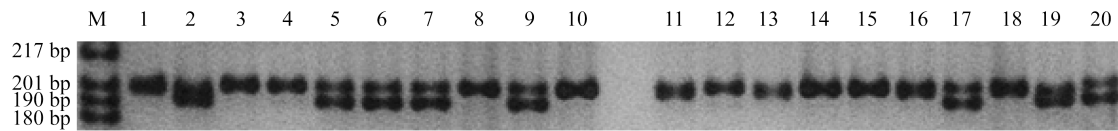


图 1 引物 SUGbp8-103b 在 SCR11-3 和 SCR11-4 中部分个体的扩增电泳图谱

M. Marker pBR322 DNA/Msp I ; 1 ~ 10. SCR11-3 中部分个体; 11 ~ 20. SCR11-4 中部分个体

Fig. 1 Electrophoresis pattern of microsatellite locus amplified by primer SUGbp8-103b in partial samples of SCR11-3 and SCR11-4

M. DNA Marker pBR322 DNA/Msp I ; 1 - 10. partial samples of SCR11-3; 11 - 20. partial samples of SCR11-4

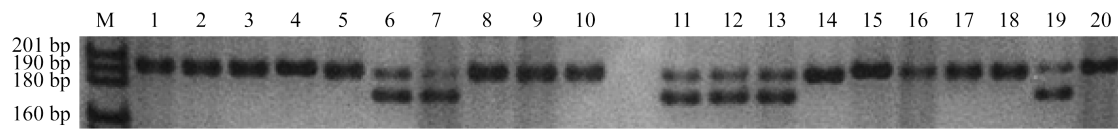


图 2 引物 SUGbp8-103a 在 SCR11-2 中的扩增电泳图谱

M. Marker pBR322 DNA/Msp I ; 1 ~ 20. SCR11-2 的 20 个个体

Fig. 2 Electrophoresis pattern of microsatellite locus amplified by primer SUGbp8-103a in SCR11-2

M. DNA Marker pBR322 DNA/Msp I ; 1 - 20. 20 samples in SCR11-2

2.3 遗传多样性分析

由表 3 可以看出,每个位点的等位基因数 (N_a) 为 5 ~ 9 个,平均等位基因数为 (6.6250 ± 1.4079) ,其中微卫星座位 MRMC2 检测到 9 个等位基因;有效等位基因数 (N_e) 为 $3.1517 \sim$

6.5256 ;观测杂合度 (H_o) 为 $0.1429 \sim 0.8645$;期望杂合度 (H_e) 为 $0.6827 \sim 0.8468$;PIC 为 $0.6294 \sim 0.8294$,均大于 0.5,平均 PIC 值为 (0.7323 ± 0.0764) ,其中 MRMC2 的多态性最高,为 0.8294。

表 3 8 个微卫星座位在罗氏沼虾选育群体内的等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、多态信息含量、遗传分化系数和基因流

Tab. 3 Number of alleles (N_a), number of effective alleles (N_e), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), polymorphism information content (PIC), genetic differentiation (G_{st}) and gene flow (N_m) of eight microsatellite loci

位点 locus	等位基因数 N_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	遗传分化系数 G_{st}	基因流 N_m
Mr7-88	7	5.7047	0.6447	0.8247	0.8005	0.1121	1.9808
SUGbp8-103b	6	3.9839	0.6081	0.7490	0.7137	0.1398	1.5386
SUGbp8-101b	6	3.1517	0.6593	0.6827	0.6294	0.1560	1.3525
SUGbp8-101c	5	3.8652	0.8645	0.7413	0.6972	0.0660	3.5407
SUGbp8-103a	8	4.7285	0.3553	0.7885	0.7633	0.2601	0.7112
MRMB11	5	3.2049	0.7253	0.6880	0.6323	0.1338	1.6181
SUGbp8-137	7	5.4979	0.1429	0.8181	0.7930	0.2570	0.7226
MRMC2	9	6.5256	0.5165	0.8468	0.8294	0.1519	1.3960
mean	6.6250	4.5828	0.5646	0.7674	0.7323	0.1610	1.3025

SCR11-1、SCR11-2、SCR11-3 等 16 个选育群体的平均等位基因数、平均有效等位基因数、平均观测杂合度、平均期望杂合度、平均 Hardy-Weinberg 平衡和平均多态信息含量见表 4。由表 4 可见,多态性 PIC 值大于 0.6 的选育群体有 7 个(SCR11-4、

SCR11-5、SCR11-6、SCR11-8、SCR11-10、SCR11-15、SCR11-16),其中选育群体 SCR11-5 号多态性最高,为 0.6956;小于 0.5 的选育群体仅有 1 个,为选育群体 SCR11-13 号,PIC 值 0.4932;其余选育群体的 PIC 值均在 0.5 ~ 0.6 之间。

表 4 罗氏沼虾 16 个选育群体在 8 个微卫星座位上的平均等位基因数、平均有效等位基因数、平均观测杂合度、平均期望杂合度、平均 Hardy-Weinberg 平衡和平均多态信息含量

Tab. 4 The mean number of alleles (N_a), mean number of effective alleles (N_e), mean observed heterozygosity (H_o), mean expected heterozygosity (H_e), mean Hardy-Weinberg departure value (P) and mean polymorphism information content (PIC) of 8 microsatellite loci in 16 stocks of *M. rosenbergii*

选育群体 population no.	N_a 平均值 mean alleles	N_e 平均值 mean effective alleles	H_o 平均值 mean H_o	H_e 平均值 mean H_e	平均 Hardy-Weinberg 平衡 mean P	平均多态 信息含量 mean PIC
SCR11-1	4.250 0 ± 1.908 6	3.128 8 ± 1.083 1	0.520 8 ± 0.323 9	0.646 2 ± 0.121 2	0.025 8 ± 0.053 2	0.589 7 ± 0.138 7
SCR11-2	4.250 0 ± 1.165 0	2.878 9 ± 0.634 7	0.581 3 ± 0.252 0	0.638 6 ± 0.073 7	0.097 2 ± 0.195 9	0.583 3 ± 0.083 2
SCR11-3	3.250 0 ± 0.462 9	2.608 2 ± 0.569 8	0.600 0 ± 0.378 0	0.598 1 ± 0.099 7	0.153 5 ± 0.335 8	0.529 0 ± 0.102 3
SCR11-4	4.875 0 ± 1.126 0	3.499 8 ± 0.626 5	0.543 7 ± 0.359 0	0.706 4 ± 0.050 7	0.022 4 ± 0.051 3	0.656 7 ± 0.060 2
SCR11-5	5.250 0 ± 0.886 4	3.977 7 ± 0.955 0	0.562 5 ± 0.236 2	0.733 2 ± 0.074 7	0.034 1 ± 0.051 7	0.695 6 ± 0.080 4
SCR11-6	4.750 0 ± 1.281 7	3.583 8 ± 0.911 5	0.575 0 ± 0.263 2	0.703 1 ± 0.082 4	0.006 6 ± 0.015 2	0.648 4 ± 0.108 5
SCR11-7	4.125 0 ± 1.552 6	3.135 8 ± 1.196 0	0.532 9 ± 0.298 3	0.646 8 ± 0.110 0	0.026 4 ± 0.056 7	0.580 9 ± 0.137 3
SCR11-8	4.375 0 ± 1.598 0	3.391 6 ± 0.871 7	0.650 0 ± 0.318 5	0.681 4 ± 0.106 7	0.026 0 ± 0.055 2	0.623 2 ± 0.135 8
SCR11-9	3.500 0 ± 1.772 8	2.782 0 ± 1.372 6	0.587 5 ± 0.383 4	0.551 9 ± 0.248 5	0.194 4 ± 0.328 3	0.501 6 ± 0.236 4
SCR11-10	4.500 0 ± 1.511 9	3.435 7 ± 1.245 8	0.513 2 ± 0.354 5	0.674 5 ± 0.113 1	0.029 7 ± 0.073 9	0.612 8 ± 0.143 2
SCR11-11	4.625 0 ± 1.922 6	3.052 7 ± 1.305 5	0.506 2 ± 0.429 6	0.606 4 ± 0.199 5	0.004 8 ± 0.009 2	0.555 3 ± 0.198 6
SCR11-12	3.250 0 ± 0.886 4	2.498 8 ± 0.580 8	0.572 9 ± 0.334 6	0.580 7 ± 0.096 1	0.119 4 ± 0.214 5	0.511 3 ± 0.106 6
SCR11-13	3.000 0 ± 0.755 9	2.419 7 ± 0.467 9	0.651 3 ± 0.351 3	0.573 4 ± 0.080 9	0.008 5 ± 0.016 7	0.493 2 ± 0.097 3
SCR11-14	3.625 0 ± 0.916 1	2.809 6 ± 0.941 0	0.508 9 ± 0.361 1	0.599 8 ± 0.157 1	0.147 7 ± 0.203 6	0.538 8 ± 0.162 4
SCR11-15	5.250 0 ± 1.752 5	3.627 8 ± 1.281 4	0.523 4 ± 0.289 2	0.674 8 ± 0.174 9	0.098 8 ± 0.243 5	0.634 2 ± 0.174 9
SCR11-16	5.250 0 ± 1.669 0	3.652 3 ± 1.130 3	0.606 2 ± 0.216 2	0.700 8 ± 0.097 4	0.084 1 ± 0.199 1	0.655 1 ± 0.112 3

注: P 为对 Hardy-Weinberg 平衡的显著性检验

Notes: P : Probability value of chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium

2.4 群体遗传变异分析

各位点的遗传分化系数 (G_{st}) 和基因流 (N_m) 见表 3, 微卫星座位 SUGbp8-101c 的遗传分化系数最低, 为 0.066 0; 微卫星座位 SUGbp8-103a 遗传分化系数最高, 为 0.260 1, 其次是 SUGbp8-137, 为 0.257 0, 这 2 个位点均存在很大的遗传分化 ($G_{st} > 0.25$); 有较大遗传分化 ($0.15 < G_{st} < 0.25$) 的位点有 2 个, 分别是 SUGbp8-101b 和 MRMC2; 其余均为中度遗传分化。各群体平均遗传分化系数为 0.161 0, 表明 16.10% 的遗传分化来自群体间, 83.90% 的遗传分化来自群体内。 N_m 与 G_{st} 呈负相关, 因此基因流所反映的群体遗传分化与基因分化系数是类似的。根据基因流的大小, 遗传分化较小 ($N_m > 4$) 的位点没有; 群体间分化较大 ($N_m < 1$) 的位点有 SUGbp8-103a 和 SUGbp8-137; 其余 6 个位点均存在一定程度的分化。

根据 Nei^[25] 的方法, 计算得到 16 个罗氏沼虾选育群体间的遗传相似系数和遗传距离 (表 5), 结果显示: 在 16 个选育群体中, 选育群体 SCR11-

9 与选育群体 SCR11-12 间遗传相似系数最小, 为 0.387 3, 选育群体 SCR11-3 与选育群体 SCR11-4 间遗传相似系数最大, 为 0.844 1; 而 SCR11-9 与 SCR11-12 选育群体间的遗传距离最大, 为 0.948 5, SCR11-3 与 SCR11-4 选育群体间的遗传距离最小, 为 0.169 5。所有选育群体之间的遗传相似系数平均为 0.655 2, 遗传距离平均为 0.434 4, 总体而言, 各罗氏沼虾选育群体间有一定的遗传距离。

以各选育群体间的遗传距离为依据, 用 UPGMA 分析法构建系统进化树, 能够更直观地体现出各选育群体间的关系 (图 3)。由图 3 可见, 16 个选育群体由于亲缘关系的远近而形成 3 个姐妹群: SCR11-3、SCR11-4、SCR11-2、SCR11-6、SCR11-7、SCR11-8 及 SCR11-1 形成第一个群, 记为 I 群; SCR11-12、SCR11-13、SCR11-5、SCR11-15、SCR11-14 及 SCR11-16 为第二个群, 记为 II 群; SCR11-9、SCR11-10 及 SCR11-11 形成第三个群, 记为 III 群。3 个姐妹群中 I 群与 II 群的亲缘关系较与 III 群的要相对较近。I 群由 7 个选育群体组成, 形成 3 个亚群, 其中 SCR11-3、

SCR11-4、SCR11-2 组成 1 个亚群 I a, SCR11-6、SCR11-7 和 SCR11-8 形成 I b 亚群, SCR11-1 为 I c 亚群, 3 个亚群的遗传距离依次为 I a 亚群与 I b 亚群最近, 与 I c 亚群最远; II 群由 6 个选育群体组成, 也形成 3 个亚群, 其中 SCR11-12 和 SCR11-13 组成 1 个亚群 II a, SCR11-15、SCR11-

14 和 SCR11-16 形成 II b 亚群, SCR11-5 为 II c 亚群, 3 个亚群的遗传距离依次为 II b 亚群与 II c 亚群最近, 与 II a 亚群最远; III 群由 3 个选育群体组成, 形成 2 个亚群, SCR11-9 形成 III a 亚群, SCR11-10 和 SCR11-11 形成 III b 亚群。

表 5 不同选育群体间的遗传距离及遗传相似系数
Tab. 5 Genetic similarity coefficient and genetic distance between 16 populations

群体 population	SCR 11-1	SCR 11-2	SCR 11-3	SCR 11-4	SCR 11-5	SCR 11-6	SCR 11-7	SCR 11-8	SCR 11-9	SCR 11-10	SCR 11-11	SCR 11-12	SCR 11-13	SCR 11-14	SCR 11-15	SCR 11-16
SCR11-1		0.718 6	0.638 3	0.681 5	0.630 4	0.688 5	0.676 1	0.725 3	0.441 7	0.651 0	0.705 0	0.584 5	0.574 9	0.655 1	0.764 6	0.662 7
SCR11-2	0.330 4		0.721 3	0.771 6	0.626 0	0.722 3	0.700 5	0.728 8	0.453 3	0.613 8	0.648 7	0.559 1	0.583 5	0.601 9	0.746 2	0.681 3
SCR11-3	0.448 9	0.326 7		0.844 1	0.568 4	0.698 7	0.674 2	0.621 1	0.410 5	0.559 6	0.587 8	0.472 8	0.544 0	0.442 5	0.503 6	0.668 4
SCR11-4	0.383 5	0.259 3	0.169 5		0.823 2	0.756 9	0.753 9	0.750 6	0.541 5	0.681 4	0.657 9	0.630 5	0.650 1	0.564 9	0.627 7	0.760 4
SCR11-5	0.461 5	0.468 4	0.565 0	0.194 6		0.730 9	0.734 2	0.643 7	0.525 8	0.660 5	0.597 8	0.690 9	0.706 7	0.667 9	0.722 2	0.742 3
SCR11-6	0.373 2	0.325 4	0.358 5	0.278 5	0.313 5		0.760 8	0.714 4	0.555 1	0.797 3	0.671 4	0.543 9	0.537 4	0.539 3	0.634 1	0.822 4
SCR11-7	0.391 4	0.356 0	0.394 2	0.282 5	0.309 0	0.273 4		0.792 7	0.593 8	0.670 5	0.655 6	0.699 5	0.738 2	0.647 6	0.677 6	0.777 1
SCR11-8	0.321 2	0.316 4	0.476 2	0.286 8	0.440 5	0.336 3	0.232 4		0.612 6	0.637 2	0.560 4	0.518 4	0.573 5	0.607 6	0.682 5	0.762 2
SCR11-9	0.817 1	0.791 2	0.890 4	0.613 5	0.642 7	0.588 5	0.521 3	0.490 0		0.624 9	0.692 6	0.387 3	0.537 3	0.650 1	0.429 8	0.708 2
SCR11-10	0.429 3	0.488 0	0.580 6	0.383 6	0.414 8	0.226 5	0.399 7	0.450 6	0.470 2		0.828 8	0.603 4	0.671 3	0.523 1	0.523 6	0.677 9
SCR11-11	0.349 6	0.432 8	0.531 3	0.418 7	0.514 6	0.398 4	0.422 2	0.579 1	0.367 3	0.187 8		0.636 8	0.780 0	0.687 6	0.615 3	0.693 9
SCR11-12	0.537 0	0.581 5	0.749 1	0.461 2	0.369 7	0.608 9	0.357 4	0.657 0	0.948 5	0.505 1	0.451 3		0.800 4	0.680 0	0.753 9	0.650 0
SCR11-13	0.553 5	0.538 7	0.608 8	0.430 6	0.347 1	0.620 9	0.303 5	0.556 0	0.621 2	0.398 5	0.248 4	0.222 7		0.738 6	0.684 8	0.693 2
SCR11-14	0.423 0	0.507 7	0.815 3	0.571 0	0.403 6	0.617 4	0.434 4	0.498 3	0.430 7	0.647 9	0.374 5	0.385 6	0.303 0		0.798 2	0.838 2
SCR11-15	0.268 4	0.292 8	0.686 0	0.465 8	0.325 5	0.455 6	0.389 1	0.382 0	0.844 4	0.647 0	0.485 6	0.282 5	0.378 7	0.225 3		0.759 8
SCR11-16	0.411 5	0.383 8	0.402 9	0.274 0	0.298 1	0.195 5	0.252 1	0.271 5	0.345 0	0.388 7	0.365 5	0.430 7	0.366 4	0.176 5	0.274 7	

注: 对角线上方为遗传相似系数, 下方为遗传距离

Note: The numbers above the diagonal are genetic similarity, and those below the diagonal are genetic distance

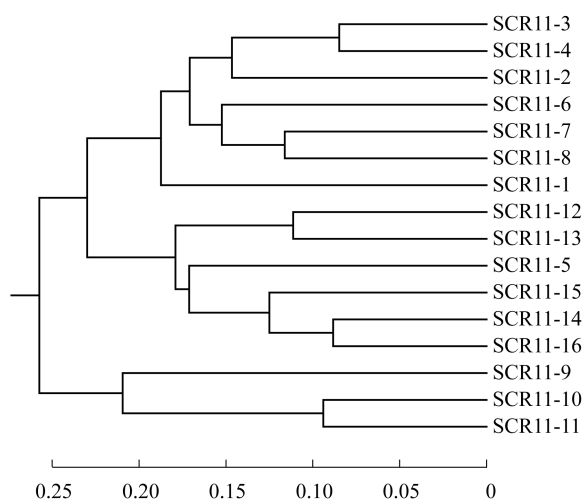


图 3 罗氏沼虾 16 个选育群体的 UPGMA 聚类图

Fig. 3 Cluster dendrogram of 16 selected stocks in *M. rosenbergii*

2.5 微卫星位点的差异等位基因在罗氏沼虾个体中带型统计及 SPSS 相关性分析

为进一步了解微卫星标记与罗氏沼虾抗病性状的相关性, 本研究采用 8 个微卫星标记对 DP 组和 SP 组各 80 尾罗氏沼虾个体分别进行 PCR 扩增, 分析了每个位点的差异等位基因片段在不同个体间的扩增情况, 其出现频率统计结果见表 6。以表 6 的微卫星位点 MRMB11 为例, 在其 185 bp 差异等位基因片段中, DP 组 80 个个体中共有 9 个个体扩增出该片段 (11.25%), 而 SP 组 80 个个体中有 38 个个体扩增出该片段 (47.50%)。可见该位点的这个差异等位基因片段对罗氏沼虾抗病性具有较明显的偏好性, 其可能与某种抗病基因存在一定的连锁关系。

根据表 6 的结果, 使用 SPSS 统计软件对以上 5 个微卫星位点的差异等位基因片段与抗病性状进行相关性分析, 结果表明, 有 3 个微卫星位点

(SUGbp8-103b、SUGbp8-101c、SUGbp8-137) 分别在 203、263 和 335 bp 等位基因与抗病性存在负相关, 其中位点 SUGbp8-137 与其具有极显著的负相关性, 相关系数为 -0.204 ; 有 2 个微卫星位

点 (MRMB11、MRMC2) 分别在 185 bp 和 96 bp 等位基因与抗病性存在正相关, 其中位点 MRMB11 所扩增出的差异等位基因与其具有极显著的正相关性, 相关系数为 0.282 (表 7)。

表 6 差异等位基因片段在个体扩增带型中出现次数统计

Tab. 6 Statistics of differential bands of individual's banding patterns

微卫星位点 locus	SUGbp8-103b	SUGbp8-101c	MRMB11	SUGbp8-137	MRMC2
差异片段大小/bp fragment size	203	263	185	335	96
DP 组(阳性/总数) DP group	58/80	34/80	9/80	16/80	9/80
出现率/% frequency	72.50	42.50	11.25	20.00	11.25
SP 组(阳性/总数) SP group	43/80	20/80	38/80	5/80	20/80
出现率/% frequency	53.75	25.00	47.50	6.25	25.00

表 7 微卫星位点与罗氏沼虾抗病特性的相关性分析

Tab. 7 The correlative analysis of microsatellite loci and disease resistance of *M. rosenbergii*

微卫星位点 locus	SUGbp8-103b	SUGbp8-101c	MRMB11	SUGbp8-137	MRMC2
差异片段大小/bp fragment size	203	263	185	335	96
泊松相关系数 Poisson's correlation coefficient	-0.194	-0.185	0.282	-0.204	0.178
P 值(双尾) P value(2-tailed)	0.014	0.019	0.000	0.009	0.024
相关性 correlation	*	*	**	**	*

注: * 表示在 0.05 置信度显著相关; ** 表示在 0.01 置信度极显著相关

Notes: * indicates correlation is significant at the 0.05 confidence level; ** indicates correlation is extremely significant at the 0.01 confidence level

3 讨论

生长快、抗病力强的品种选育是目前国际上良种选育的重要方向。就国内而言, 在虾类抗病品种选育方面, 在凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 等虾类已有较多研究, 而在罗氏沼虾品种选育工作中, 目前仅有浙江省淡水水产研究所通过家系选育获得生长性能较为突出的“南太湖 1 号”、“南太湖 2 号”新品种^[26-27], 抗病研究国内也仅有苏永腾等^[28]、黄辉等^[29]报道的大黄葱醌提取物、左旋咪唑对罗氏沼虾抗病力影响的研究, 抗病性状优良的选育品种还未见报道。本研究讨论了罗氏沼虾 16 个选育群体的抗病力, 根据感染后罗氏沼虾成活率的统计分析结果, 将 16 个选育群体的抗病性能分为 4 个类群: 抗病力强的选育群体、抗病力较强的选育群体、抗病力一般的选育群体和抗病力差的选育群体。按此标准, 初步鉴定出抗病力强的选育群体 3 个 (SCR11-6、SCR11-11 和 SCR11-16); 抗病力较强的选育群体 7 个 (SCR11-10、SCR11-5、SCR11-7、SCR11-12、SCR11-15、SCR11-1 和 SCR11-14); 抗病力一般的选育群体 4 个

(SCR11-9、SCR11-13、SCR11-2 和 SCR11-4); 抗病力差的选育群体 2 个 (SCR11-3 和 SCR11-8)。在其它虾类品种中也有类似的划分, 如 Huang 等^[30]将凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系划分为高抗性类群、中抗性类群和敏感类群; 陈秀荔等^[31]将凡纳滨对虾抗 IHNV 群体分为轻度感染群体、中度感染群体和高度感染群体。本实验中, 除 SCR11-3 选育群体和 SCR11-8 选育群体的存活率较低外 (分别为 49%、35%), 其余选育群体的存活率均大于 50%, 比 Huang 等^[30]报道的高抗性凡纳滨对虾 ($22.7\% \pm 12.30\%$) 存活率要高出许多, 这可能与注射的溶藻弧菌浓度、罗氏沼虾自身抗病力及品种间的差异有关。

将现代分子技术与传统选育相结合的育种方式成为新型的育种手段, 并在水产动物的抗病选育中得到广泛运用^[13, 32-34]。本研究利用 8 对 SSR 分子标记对 16 个罗氏沼虾选育群体进行了分析, 结果表明, 8 个微卫星座位的 PIC 为 $0.6294 \sim 0.8294$, 平均值为 (0.7323 ± 0.0764) , PIC 值均大于 0.5, 说明这 8 个位点均可提供丰富的遗传信息, 能有效揭示群体的遗传变异水平, 可用作群体遗传分析。出现多态性较高的微卫星座

位,其原因可能是实验室前期对微卫星引物进行了筛选,人为淘汰了很多多态性低的引物和单态引物。罗氏沼虾 16 个选育群体的 PIC 为 0.493 2~0.695 6,除选育群体 SCR11-13(PIC 为 0.493 2)外,其余选育群体的 PIC 值均大于 0.5,表明绝大部分选育群体拥有丰富的遗传信息,这可能是由于本研究所用的罗氏沼虾群体未受到较强烈的人工定向选择的影响,保留较多的基因型。这为罗氏沼虾抗病选育基础群体的建立提供了较为丰富的遗传基础,有利于选育工作的顺利进行。

一般认为,标记在群体中的平均杂合度在 0.3~0.8 之间才有实际意义。杂合度高的群体能更好地适应环境变化,承受自然选择的压力,并可能具备更多的优良性状。本研究中,16 个选育群体的平均观测杂合度为 0.506 2~0.651 3,平均期望杂合度为 0.551 9~0.733 2。与 Divu 等^[14]报道的 Karnataka 群体平均观测杂合度(0.507 9±0.116 7),平均期望杂合度(0.522 6±0.144 7),Kerala 群体平均观测杂合度(0.517 7±0.112 7),平均期望杂合度(0.535 5±0.099 1)相比,本研究的结果偏高,这可能是由于 Divu 等^[14]研究的 Karnataka 和 Kerala 野生群体样本量偏少,不能有效代表该群体的基因型。而与孟宪红等^[35]报道的黄、渤海海域 7 个地理群体的中国对虾平均观测杂合度(0.638~0.713)、平均期望杂合度(0.810~0.864)相比,本研究中的数值偏低,这可能是由于本研究中的罗氏沼虾来自于养殖群体,不可避免地丧失某些特定的等位基因,而孟宪红等等^[35]研究的是野生群体的中国对虾,基因型更为丰富。Hardy-Weinberg 检测结果显示 16 个选育群体中除 SCR11-3、SCR11-9、SCR11-12 和 SCR11-14 通过 Hardy-Weinberg 平衡检测,其余选育群体均显著或极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡,说明选育群体的基因型分布发生一定程度的偏离。

遗传分化系数(G_{st})是衡量群体间基因分化相对大小的重要指标。本研究中各选育群体平均遗传分化系数为 0.161 0,与陈文华等^[36]研究的罗非鱼的平均遗传分化系数(0.167 6)相似,表明 16.10% 的遗传分化来自群体间,83.90% 的遗传分化来自群体内个体间,说明各选育群体之间存在一定程度的遗传分化,发生近交及瓶颈效应的可能性不大。遗传距离可以有效地表示物种间的

遗传变异,而用微卫星标记得出的遗传距离更能客观地反映出群体间的遗传变异和系统分化^[37]。本研究中 SCR11-9 与 SCR11-12 选育群体间的遗传距离最大,为 0.948 5,熊小飞等^[38]研究也反映不同群体间斑节对虾的遗传距离可达 0.9。但本实验中所有选育群体之间的遗传距离平均为 0.434 4,说明各选育群体间有一定的遗传距离,由于实验所用 16 个选育群体均来自同一养殖群体,基因交流比较频繁,实验得到的 N_m 平均值为 1.302 5,也证明 16 个选育群体间的基因流没有受阻,所以选育群体间遗传距离的产生可能是由于本实验群体是经一定程度的人工选择和人工控制交尾而形成。一般认为,杂交优势的大小一定程度上取决于亲本间遗传距离的大小,一定范围内,随着遗传距离的增大,杂种优势也随之提高^[39]。通过遗传距离可有效预测杂种优势,本研究利用 MEGA 4.0 构建 16 个罗氏沼虾选育群体的 UPGMA 分子聚类关系树,SCR11-3、SCR11-4、SCR11-2、SCR11-6、SCR11-7、SCR11-8 和 SCR11-1 聚成一支,SCR11-12、SCR11-13、SCR11-5、SCR11-15、SCR11-14 和 SCR11-16 聚类成第二支,SCR11-9、SCR11-10 及 SCR11-11 聚成第三支。其中,选育群体 SCR11-3 与 SCR11-11 的亲缘关系较远,若两者进行杂交可能会获得较好的杂交优势。

随着微卫星辅助育种技术的广泛应用,通过遗传操作培养出罗氏沼虾抗病品种,是虾病控制中一个值得选择的方法。已有的研究表明,疾病发生时群体内会有显著的变异,通过微卫星等标记对发病动物中死亡群体和存活群体的遗传变异进行研究,可期望获得与抗病性状相连锁的标记,进而对抗病基因进行标记和定位以培育出具有持久抗病能力的优良品种。本研究发现 5 个微卫星位点与抗病性状相关,其中 MRMB11 位点的 185 bp 等位基因在 SP 群体中的表型频率极显著高于 DP 群体,说明该位点可能与抗病基因相连锁。

本研究通过 16 个罗氏沼虾选育群体的溶藻弧菌感染实验,分析了不同选育群体的抗病性能,并利用微卫星分子标记对 16 个罗氏沼虾群体进行遗传多样性和遗传变异分析。根据实验结果结合 UPGMA 系统树,从 16 个选育群体中共筛选得到抗病力强,遗传信息丰富,选育潜力大的选育群体 4 个,他们分别是 SCR11-5、SCR11-6、SCR11-

10 和 SCR11-16, 为罗氏沼虾抗病选育基础群体的建立奠定了重要基础。另外, 通过对罗氏沼虾 DP 群体和 SP 群体中差异等位基因的比较分析, 筛选出与抗病正相关的微卫星标记 2 个 (MRMB11、MRMC2), 在后续的研究中可将其应用于其它群体和子代选育群体中, 以进一步验证这种相关关系及其与抗病基因的连锁程度。

参考文献:

- [1] 刘恩生, 万全. 罗氏沼虾的养殖现状与发展前景 [J]. 安徽农业大学学报, 1997, 24(2): 189 - 192.
- [2] 刘波, 明俊超, 谢骏, 等. 大黄萘醌提取物对罗氏沼虾高温下抗氧化能力与热应激蛋白 70 基因表达的影响 [J]. 水产学报, 2010, 34(6): 792 - 800.
- [3] 徐海圣. 罗氏沼虾细菌性病原的分离与鉴定 [J]. 水利渔业, 2003, 23(3): 58 - 59.
- [4] Wang C S, Chang J S, Shih H H, *et al.* RT-PCR amplification and sequence analysis of extra small virus associated with white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) cultured in Taiwan [J]. Journal of Fish Diseases, 2007, 30(3): 127 - 132.
- [5] 于占国, 林凤翱, 卞正和, 等. 溶藻弧菌引起中国对虾红腿病的回接实验观察 [J]. 海洋学报, 1996, 18(6): 135 - 139.
- [6] Selvin J, Lipton A P. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 57(1-2): 147 - 150.
- [7] Tanasomwang V, Nakai T, Nishimura Y, *et al.* Vibrio-inhibiting marine bacteria isolated from black tiger shrimp hatchery [J]. Fish Pathology, 1998, 33(5): 459 - 466.
- [8] Lightner D V, Lewis D H. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp [J]. Marine Fisheries Review, 1975, 37(5-6): 25 - 28.
- [9] Lee K K, Yu S R, Chen F R, *et al.* Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon* [J]. Current Microbiology, 1996, 32(4): 229 - 231.
- [10] Tautz D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers [J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17(16): 6463 - 6471.
- [11] 王艳红, 胡超群, 张昌平, 等. 凡纳滨对虾 EST 微卫星标记初步筛选 [J]. 水产学报, 2011, 35(7): 969 - 976.
- [12] 何永琴, 苏永全, 毛勇, 等. 用微卫星标记分析不同形态变异类型日本囊对虾的遗传多样性 [J]. 水产学报, 2012, 36(10): 1520 - 1528.
- [13] 陈雪峰, 杨国梁, 孔杰, 等. 人工养殖与选育对罗氏沼虾遗传多样性的影响 [J]. 水生生物学报, 2012, 36(5): 866 - 873.
- [14] 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(1-4): 281 - 284.
- [15] 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(Sup): 18 - 22.
- [16] 杨学明, 郭亚芬, 蒋钦杨, 等. 三个群体罗氏沼虾线粒体 CO I 基因的遗传多样性分析 [J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(2): 144 - 149.
- [17] 杨学明, 黄光华, 蒋钦杨, 等. 罗氏沼虾不同群体线粒体 16S rRNA 基因的序列变异及其保守性分析 [J]. 西南农业学报, 2007, 20(6): 1373 - 1376.
- [18] 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 [J]. 水产学报, 2004, 28(4): 360 - 364.
- [19] Strauss W M. Preparation of genomic DNA from mammalian tissues [M] // Current Protocol in Molecular Biology. New York: John Wiley and Sons, 1989: 221 - 222.
- [20] Bhat S, Patel A, Das P, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite loci in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Conservation Genetics, 2009, 10(5): 1473 - 1475.
- [21] Bhatt S, See L M, Hassan R, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite loci in the Malaysian giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Molecular Ecology Resources, 2008, 8(5): 983 - 985.
- [22] Divu D, Karunasagar I, Karunasagar I. Microsatellite DNA markers in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: A tool for genetic analysis [J]. Molecular Ecology Resources, 2008, 8(5): 1040 - 1042.
- [23] 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.
- [24] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3):

- 314 - 331.
- [25] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89(3): 583 - 590.
- [26] 王军毅, 杨国梁, 张宇飞, 等. 罗氏沼虾“南太湖 1 号”选育群体的生长性能与养殖效益分析[J]. *水产养殖*, 2008, 29(4): 7 - 10.
- [27] 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分析[J]. *水产学报*, 2011, 35(1): 116 - 123.
- [28] 苏永腾, 刘波, 周群兰, 等. 大黄萘醌提取物对罗氏沼虾抗鳃弧菌感染的研究[J]. *水产学报*, 2008, 32(3): 455 - 463.
- [29] 黄辉, 李义, 郝向举. 左旋咪唑对罗氏沼虾免疫功能及抗病力的影响[J]. *淡水渔业*, 2008, 38(4): 36 - 39.
- [30] Huang Y C, Yin Z X, Ai H S, *et al.* Characterization of WSSV resistance in selected families of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 2011, 311(1 - 4): 54 - 60.
- [31] 陈秀荔, 牛生洋, 赵永贞, 等. 凡纳滨对虾 IHNV 群体遗传多样性的 SSR 分析[J]. *广东海洋大学学报*, 2012, 32(3): 29 - 34.
- [32] 刘萍, 孟宪红, 孔杰, 等. 对虾抗病性状遗传标记的 RAPD 分析[J]. *水产学报*, 2002, 26(3): 270 - 274.
- [33] 岳志芹, 王伟继, 孔杰, 等. 用 AFLP 方法分析中国对虾抗病选育群体的遗传变异[J]. *水产学报*, 2005, 29(1): 13 - 19.
- [34] Dong S R, Kong J, Meng X H, *et al.* Microsatellite DNA markers associated with resistance to WSSV in *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis* [J]. *Aquaculture*, 2008, 282(1 - 4): 138 - 141.
- [35] 孟宪红, 孔杰, 王清印, 等. 微卫星标记技术对黄、渤海海域 7 个不同地理群体中国对虾的遗传结构和遗传分化研究[J]. *海洋水产研究*, 2008, 29(5): 1 - 10.
- [36] 陈文华, 李建林, 徐跑, 等. 五个家系吉富罗非鱼的遗传多样性分析[J]. *生物技术通报*, 2009, 8: 83 - 87.
- [37] Crawford A M, Littlejohn R P. The use of DNA markers in deciding conservation priorities in sheep and other livestock [M] // Cambridge: Animal Genetic Resources Information, 1998, 23: 21 - 26.
- [38] 熊小飞, 江世贵, 夏军红, 等. 中国南海海域斑节对虾群体与西印度洋、西太平洋群体种群遗传结构的比较分析[J]. *水产学报*, 2008, 32(6): 855 - 863.
- [39] Smith O S, Smith J S C, Bowen S L, *et al.* Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F_1 grain yield, grain yield, heterosis and RFLPs [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1990, 80(6): 833 - 840.

Disease resistance and genetic diversity analysis in selected populations of *Macrobrachium rosenbergii*

ZHU Qijian¹, DAI Xilin^{1*}, ZOU Weili¹, JIANG Fei¹, SU Jian¹,
GUO Zhengqian¹, WANG Haiyang¹, DING Fujiang²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Shencao Special Fisheries Development Co. Ltd, Shanghai 201516, China)

Abstract: 16 selected populations were injected with bacteria (*Vibrio alginolyticus*) suspension to know deeply about disease resistance of *Macrobrachium rosenbergii*. Bacterial challenge experiments demonstrated that there were big differences in disease resistance among the 16 selected populations. Some families exhibited strong disease resistance to bacterial infection, while some families were not resistant to bacterial challenge. Among the 16 selected populations, 3 populations (population SCR11-6, SCR11-11 and SCR11-16) with strong disease resistance with a survival rate of 80% were identified, 7 populations with secondly strong disease resistance, 4 populations with normal disease resistance with a survival rate of 65% – 70%, and 2 populations with low disease resistance with a survival rate of 49.53% and 35.0% were identified. The genetic structure of 16 selected populations was analyzed assessed by 8 microsatellite markers. The results showed that the number of total alleles was 53. The numbers of allele at each locus ranged from 5 to 9 with an average of 6.625, and polymorphic information content (PIC) was 0.629 4 – 0.829 4, and the average was 0.732 3. The mean polymorphism information content in 16 selected populations was 0.493 2 – 0.695 6. The average observed and expected heterozygosity of the 16 selected populations varied from 0.506 2 to 0.651 3 and from 0.551 9 to 0.733 2, respectively, and the average genetic similarity coefficient and genetic distance between them was 0.655 2 and 0.434 4, respectively. Besides, after PCR amplification on the individuals of DP and SP populations, differential bands were calculated and the correlation between growth trait and microsatellite loci was established. The results showed that 5 loci were correlated with disease resistant trait, of which MRMB11 had extreme significance of 0.282. These results indicated that 4 of 16 selected populations had strong disease resistance and high genetic diversity. The development of these 8 populations lays foundation for selective breeding of *M. rosenbergii* with disease resistance.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; selective breeding; disease resistance; microsatellite marker; genetic diversity

Corresponding author: DAI Xilin. E-mail: xldai@shou.edu.cn