

DOI: 10.12264/JFSC2025-0059

克氏原螯虾选育群体不同世代遗传多样性与遗传结构

林诗瑀^{1,2}, 陶杨^{1,2}, 陈楠^{1,2}, 廖明聪^{1,2}, 王江华^{1,2}, 顾泽茂^{1,2*}

1. 华中农业大学水产学院, 双水双绿研究院, 湖北 武汉 430070;

2. 湖北洪山实验室, 湖北 武汉 430070

摘要: 为了解人工选育对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)选育群体遗传多样性的影响, 研究采用 20 个微卫星标记比较分析了克氏原螯虾 5 个连续选育世代(F_1 ~ F_5)的遗传多样性和遗传结构。结果显示: 20 个微卫星标记在 389 尾样本中共检测到 246 个等位基因, 每个位点检测到的等位基因数为 5~22 个, 平均为 12.30 个。选育过程中, F_1 到 F_5 的平均观测杂合度(H_o)从 0.539 下降至 0.433, 平均期望杂合度(H_e)从 0.734 下降至 0.680, 平均多态信息含量(PIC)从 0.695 下降至 0.638。尽管选育群体的 H_o 、 H_e 和 PIC 均有所下降, 但差异并不显著($P>0.05$)。 F 检验结果显示, 基于微卫星标记的选育群体的近交系数(F_{is})介于 0.106~0.622 之间, 平均值为 0.304, 所有多态性位点均为正值, 说明群体中存在一定程度的近交。世代间配对比较的遗传分化指数(F_{st})值介于 0.010~0.039 之间, 说明群体的遗传分化处于低等水平。分子方差分析(AMOVA)结果表明, F_1 ~ F_5 中的遗传变异主要来自群体内(95.16%)。基于 Nei 氏遗传距离构建的非加权组平均法系统发育树结果显示, F_1 、 F_2 独立聚类为一支, F_4 与 F_5 先聚类, 再与 F_3 聚类为另一支, 遗传结构已经发生改变。综上所述, 克氏原螯虾经多代人工选择后, 选育群体的遗传多样性依然维持在较高水平, 具有进一步选育的潜力, 今后选育过程中应引入不同来源亲本或增加育种亲本数量, 减少近交现象的发生。

关键词: 克氏原螯虾; 遗传多样性; 遗传结构; 选育群体; 微卫星标记

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)08-1110-13

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)俗称小龙虾, 原产北美洲, 1929 年经日本引入我国^[1]。随着稻虾种养模式的普及, 小龙虾的养殖规模迅速扩大, 已成为我国重要的淡水养殖虾类^[2]。然而, 多年人工养殖中的累代近交与逆向选择导致小龙虾规格变小、产量降低, 种质退化严重^[3], 阻碍了小龙虾养殖业和产业链的健康发展。选育优良品种是提高小龙虾养殖性能的有效途径之一, 遗传多样性丰富的种质资源是品种选育工作的物质基础。从 2009 年起, 有大量的研究系统地评估了小龙虾不同地理群体的遗传资源现状, 发现小龙虾主要养殖省份的群体遗传多样性处于较高水平, 且不同

地区群体已产生了不同程度的遗传分化, 为品种选育创造了条件^[4-6]。群体选育因简单易行、筛选强度大和育种技术要求低等优点, 普遍应用于水产动物遗传改良领域中, 但长期的人工选育易引起群体遗传多样性下降及近交衰退等问题, 影响其遗传结构^[7-8]。因此, 为掌握选育群体的遗传多样性变化趋势, 选择合适的分子标记检测多个连续选育世代的遗传多样性水平与遗传结构具有重要意义。

微卫星分子标记(simple sequence repeats, SSR)具有分布广泛、多态性高、易检测和共显性遗传等^[9]优势, 已在水产经济物种的多代选育群体的

收稿日期: 2025-03-19; 修订日期: 2025-04-02.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD2400700); 湖北省重点研发计划项目(2023BBB169); 湖北省支持种业高质量发展资金项目(HBZY2023B009); 湖北省第四批现代农业产业技术体系水产产业技术体系项目(2023HBSTX4-05); 湖北省农业科技创新中心项目(2024-620-000-001-029).

作者简介: 林诗瑀(2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水生动物遗传育种. E-mail: sylin1027@163.com

通信作者: 顾泽茂, 教授, 研究方向为水生动物病害与绿色种养. E-mail: guzemaomail@mail.hzau.edu.cn

遗传多样性与遗传结构研究中得到了普遍应用。欧阳苗峰等^[10]利用 20 个微卫星标记分析了红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*) 3 代选育群体的遗传多样性和遗传结构, 结果表明选育后的群体遗传多样性有所降低, 但仍保持较高水平, 遗传分化程度不高; 董丁建等^[11]对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)生长快专门化选育群体和抗病专门化选育群体的 3 个世代进行微卫星分析, 发现前者的遗传多样性趋于下降, 具有轻度的近亲杂交, 后者的遗传多样性则无明显变化, 不存在近亲杂交; Wang 等^[12]基于 10 对微卫星标记对连续 4 代的长牡蛎(*Crassostrea gigas*)群体进行分析, 结果显示群体选育对群体的遗传变异影响微弱, 遗传分化程度低, 仍有较大的育种潜力。由上可知, 微卫星标记是用于评价水产动物选育效果的有效手段, 而利用微卫星技术对小龙虾连续选育世代的遗传多样性与遗传结构分析尚未见报道。

本研究利用已开发并应用的 20 个多态性较高的微卫星标记, 对人工选育后的小龙虾 5 个世代选育群体的遗传多样性与遗传结构变化进行分析, 以期为小龙虾新品种的进一步育种提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 选育群体和采样

实验所用小龙虾 F₁~F₅ 选育群体均采自湖北省武汉市华中农业大学小龙虾良种繁育基地(蔡甸), 合计 389 尾样品(表 1)。2017 年, 笔者将湖北省借粮湖、洪湖和江苏省洪泽湖收集的野生群体进行群体内杂交, 在蔡甸养殖基地中同环境驯养一年后, 挑选体型大、健康、生长快的 600 尾雄虾, 600 尾雌虾作为基础群体, 以生长速度为主要选育指标, 完成连续 5 代的选育。每一代在虾苗阶段和 45 天养殖的成虾阶段分别进行一次选择, 苗种阶段留种率为 20%, 成虾阶段留种率为 5%, 总留种率为 1%(选择强度为 2.64), 选留 1200 尾(雌雄比例为 1:1)繁殖下一代。

1.2 DNA 提取

每年随机挑选养殖基地内的小龙虾个体, 取

虾腹部肌肉保存于无水乙醇中, 以便提取基因组 DNA。利用苯酚-氯仿抽提法^[13]提取 DNA, 随后采用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整程度, 将完整性较好的 DNA 置于蛋白核酸分析仪(Nano-300)中检测浓度, 利用无菌超纯水统一将 DNA 浓度稀释到 50 ng/μL, -20 ℃保存备用。

表 1 选育群体小龙虾 5 个世代的样本信息
Tab. 1 Sample information of five generations of the *Procambarus clarkii* breeding population

世代 generation	样本数量 sample number	采样年份 year
F ₁	78	2018
F ₂	78	2019
F ₃	78	2020
F ₄	77	2021
F ₅	78	2022

1.3 PCR 扩增与微卫星分型

所用 20 对微卫星标记来自本课题组前期研究成果^[6], 具体信息见表 2。在上游引物的 5'端添加 FAM、HEX 或 TAMAR 等荧光基团进行修饰。引物均由梓熙生物(北京)科技有限公司合成。PCR 反应体系(20 μL): Taq PCR Master Mix (2×) 10 μL, 上、下游混合引物各 1 μL, 基因组 DNA 1 μL, 灭菌 ddH₂O 7 μL。PCR 扩增条件: 94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 30 s, 复性 59 ℃ 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 ℃延伸 10 min。

PCR 扩增产物送至擎科生物(武汉)科技股份有限公司进行毛细管电泳检测, 记录每个小龙虾样品各微卫星位点的基因型, 其中用于判断片段大小的标准为 LIZ500。

1.4 数据统计与分析

采用 GeneMarker 2.6.3 软件^[14]记录微卫星位点上不同个体的等位基因大小及其基因型, 并对检测结果进行分析与校正。采用 GenAlEx 6.51 软件^[15]计算各个位点在选育群体中的观测等位基因数(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)、遗传分化指数(F_{st})这些参数。使用 Genepop 4.3 软件^[16]对选育群体的近交系数(F_{is}), 哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)进行分析检验。Cervus 3.0 软件^[17]用于分析选育

群体的多态信息含量(polymorphism information content, PIC)。利用 SPSS 26.0 软件^[18]对选育群体的遗传变异参数进行 K-W 检验(Kruskal-Wallis test)。利用 Arlequinn3.5 软件^[19]进行分子方差分析(AMOVA)。5 个世代的非加权组平均法(UPGMA)系统发育树由 MEGA 7.0 软件^[20]构建。

表 2 20 对微卫星标记引物信息
Tab. 2 Information of 20 microsatellite loci

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence	退火温度/℃ annealing temperature	片段大小/bp size range	重复单元 repeat motif
<i>PcWH-04</i>	F:AATGTCAGACTACGAAGCATTGA R:TTGTTTCACGTCTAGATCTTCCAG	59	132~195	(AAT) ₁₄
<i>PcWH-45</i>	F:TGGAGTCTTGCCTACAATACAGG R:CATGGTTTTATCCAATTTTCTCG	59	146~162	(AAAC) ₅
<i>PcWH-49</i>	F:CCACTAACAACTTTCTCTGTCAT R:CATCTCAAGATAACCACTCCCAG	58	140~164	(CGCA) ₅
<i>PcWH-55</i>	F:TCATGTGCCAATACTGCTCAAT R:TAGTCAGAGGACAAGGTGAGAGG	60	138~162	(ACTC) ₁₇
<i>PcWH-56</i>	F:GTTACTGACCTGGCACACTCTTT R:ATGGTTTAGTGCATAGTTAGCCC	61	142~197	(TAACC) ₇
<i>PcWH-73</i>	F:GTGTTAAATGATGCTCGCTTGTT R:GGAGGACTCTCAGAGCTGGTATT	59	132~156	(GTCTCT) ₄
<i>PcWH-84</i>	F:TTTACATTTTTCCAATCCAGTCC R:TATTTGGGAGGACAACAGGATG	62	154~158	(TCCA) ₅
<i>PcWH-101</i>	F:CGACATCAAGAACAAGGACAAAAG R:CTTTGTGGTGTCGTACATCCTT	59	130~157	(ACA) ₆
<i>PcWH-130</i>	F:TGAACTCAAAAGATTCAAACGCT R:GCATAGGGTATATATCTGACGGC	58	90~118	(GCCT) ₁₆
<i>PcWH-149</i>	F:TAGGCATACCTGTGTACCTTCGT R:TAGGGTTTAATTTCTGAGCCCAT	59	79~115	(ATT) ₁₅
<i>PcWH-182</i>	F:TATCCATGGGTCAAGTAAACCAC R:TTGATCCAGTCGAGTTGTCACTA	60	119~191	(TGG) ₆
<i>PcWH-192</i>	F:ATATATTGACCCGACACCAACTG R:CTTCATCATACACACGTGAAAACA	59	116~152	(GAAATT) ₅
<i>PcWH-204</i>	F:CCAATGTTTGAAGAAGGAACCTA R:CCTCATAGCCCTAGTGGATTTTC	59	123~156	(TAT) ₇
<i>PcWH-208</i>	F:TTGAGCTTGGAACATACCAAAT R:GTGTGTATTATGAACGGGATTGC	59	103~133	(TAACC) ₅
<i>PcWH-210</i>	F:GTAGTGATCGTTGTTGCCAGTTT R:GTCACACCATGACCCAGTATTTT	60	102~122	(TGTC) ₅
<i>PcWH-230</i>	F:GTATGGTAAGTTTGTCGTGTGGC R:TGCGTATTTTTGGACCTTTTCTA	59	78~90	(ACTG) ₅
<i>PcWH-240</i>	F:TTGGGACAAACCTTGTAACATTC R:CAGACAGAGAGGGACAGACAGAT	59	85~89	(TCTG) ₆
<i>PcWH-266</i>	F:ATTGCCCTGTTATCAGTGACTTC R:TATCCTCACATTCCCAATGTACC	59	111~147	(TTTA) ₆
<i>PcWH-316</i>	F:ATAGAAGGCACTCAGCCATCATA R:TGGTCTGGTCAACCTTTGTCTAT	58	130~146	(AGAC) ₇
<i>PcWH-356</i>	F:TCTCTCAAACCTCAATGTACCTTCTTG R:GTTGAGAAATGGCATTAATTTTCG	59	92~116	(ATAA) ₁₆

2 结果与分析

2.1 选育群体小龙虾微卫星标记的多态性

20 个微卫星位点在群体中均能稳定扩增出条带,且呈现出多态性(表 3)。总共检测到 246 个等

位基因,每个位点含有 5~22 个等位基因。 $F_1\sim F_5$ 的 N_a 介于 5~22,平均值为 12.30; N_e 介于 1.863~8.812,平均值为 4.521; H_o 介于 0.237~0.699,平均值为 0.501; H_e 介于 0.463~0.887,平均值为 0.745; PIC 介于 0.384~0.877,平均值为 0.711。

表 3 选育群体小龙虾 20 对微卫星标记的遗传变异参数

Tab. 3 Genetic parameters of 20 microsatellite loci in the *Procambarus clarkii* breeding population

微卫星位点 locus	观测等位基因数 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
<i>PcWH-04</i>	15.00	5.030	0.699	0.801	0.777
<i>PcWH-45</i>	7.00	1.863	0.413	0.463	0.384
<i>PcWH-49</i>	10.00	4.104	0.428	0.756	0.724
<i>PcWH-55</i>	15.00	4.181	0.450	0.761	0.723
<i>PcWH-56</i>	9.00	3.919	0.575	0.745	0.709
<i>PcWH-73</i>	15.00	3.870	0.296	0.742	0.698
<i>PcWH-84</i>	5.00	3.321	0.434	0.699	0.650
<i>PcWH-101</i>	22.00	7.547	0.668	0.867	0.855
<i>PcWH-130</i>	15.00	3.665	0.410	0.727	0.695
<i>PcWH-149</i>	22.00	8.812	0.679	0.887	0.877
<i>PcWH-182</i>	15.00	3.271	0.524	0.694	0.649
<i>PcWH-192</i>	8.00	4.852	0.496	0.794	0.764
<i>PcWH-204</i>	17.00	5.639	0.695	0.823	0.800
<i>PcWH-208</i>	11.00	5.314	0.474	0.812	0.785
<i>PcWH-210</i>	7.00	2.187	0.371	0.543	0.494
<i>PcWH-230</i>	9.00	4.730	0.581	0.789	0.761
<i>PcWH-240</i>	9.00	3.026	0.237	0.669	0.629
<i>PcWH-266</i>	7.00	4.006	0.416	0.750	0.713
<i>PcWH-316</i>	12.00	7.543	0.685	0.867	0.854
<i>PcWH-356</i>	16.00	3.545	0.482	0.719	0.671
平均 mean	12.30	4.521	0.501	0.745	0.711

2.2 选育小龙虾群体的遗传多样性

小龙虾 5 个世代选育群体的平均遗传变异参数的分析结果如下(表 4): N_a 为 6.700~8.150, 其中 F_5 最低, F_3 最高; N_e 为 3.815~4.216, 其中 F_5 最低, F_1 最高; H_o 为 0.433~0.539, 其中 F_5 最低, F_1 最高; H_e 为 0.680~0.734, 其中 F_5 最低, F_1 最高; PIC 为 0.638~0.695, 其中 F_5 最低, F_1 最高。连续选育的群体在 N_e 、 H_o 、 H_e 和 PIC 上均呈现出累代递减的趋势。通过 K-W 检验分析小龙虾各世代选育群体, 结果显示群体之间的 N_e 、 H_o 、 H_e 和 PIC 没有显著差异($P>0.05$)。HWE 检验结果显示在 F_1 ~ F_5 中分别有 17、18、18、19、18 个位点显著偏离 Hardy-Weihberg 平衡($P<0.01$)。各个群体详细的遗传变异参数信息见表 5。

2.3 选育小龙虾群体的遗传分化与遗传结构

对小龙虾 5 个世代选育群体进行 F -检验的数据分析(表 6)发现, 5 个世代的近交系数(F_{is})的范围为 0.106~0.622, 平均值为 0.304, 20 个位点的 F_{is} 均为正值, 表明世代内近交程度较高。结果显

示, 有 6 个群体位点表现为杂合子过剩, 对于整个世代而言, 所有位点杂合子均处于一定程度的缺失状态。整个选育群体中各位点的遗传分化(F_{st})值介于 0.005~0.210, 平均值为 0.048, 其中 14 个位点遗传分化较弱, 5 个位点遗传分化中等, 1 个位点遗传分化较大(表 6)。

表 4 20 对微卫星标记在选育群体小龙虾 5 个群体中平均遗传变异参数

Tab. 4 Mean genetic parameters of the five generations of the *Procambarus clarkii* breeding population at 20 microsatellite loci

世代 generation	N_a	N_e	H_o	H_e	PIC	d(HWE)
F_1	7.650	4.216	0.539	0.734	0.695	17
F_2	7.050	4.186	0.535	0.731	0.689	18
F_3	8.150	4.039	0.506	0.710	0.676	18
F_4	7.050	3.999	0.490	0.707	0.665	19
F_5	6.700	3.815	0.433	0.680	0.638	18

注: d(HWE)表示偏离哈迪-温伯格平衡位点数。
Note: d(HWE) means number of loci deviating from Hardy-Weinberg equilibrium.

表 5 20 对微卫星标记在选育群体小龙虾 5 个群体中的遗传多样性分析

Tab. 5 Genetic diversity analysis of 20 microsatellite loci in the five generations of the *Procambarus clarkii* breeding population

项目 item	世代 generation					世代 generation				
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅
PcWH-04						PcWH-56				
N_a	10	11	12	9	7	4	5	8	6	5
N_e	3.776	4.535	5.488	4.384	4.545	3.779	3.690	3.935	3.897	2.811
H_o	0.696	0.705	0.753	0.610	0.731	0.615	0.640	0.500	0.662	0.462
H_e	0.735	0.780	0.818	0.772	0.780	0.735	0.729	0.746	0.743	0.644
PIC	0.709	0.747	0.798	0.739	0.747	0.687	0.684	0.706	0.705	0.597
HWE	0.085	0.058	0.032	0.000*	0.026	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
PcWH-45						PcWH-73				
N_a	4	2	4	5	3	8	4	10	6	6
N_e	1.710	1.820	1.762	2.149	1.853	4.333	3.254	4.376	3.260	3.520
H_o	0.403	0.514	0.308	0.390	0.462	0.321	0.346	0.378	0.260	0.179
H_e	0.415	0.451	0.433	0.535	0.460	0.769	0.693	0.771	0.693	0.716
PIC	0.339	0.349	0.379	0.453	0.375	0.732	0.636	0.738	0.633	0.664
HWE	0.012	0.297	0.000*	0.000*	0.001*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
PcWH-49						PcWH-84				
N_a	9	5	5	8	6	4	4	5	4	4
N_e	4.193	3.170	3.799	5.490	2.680	3.376	3.556	2.897	3.477	2.725
H_o	0.500	0.449	0.461	0.507	0.224	0.462	0.513	0.329	0.494	0.372
H_e	0.762	0.685	0.737	0.818	0.627	0.704	0.719	0.655	0.712	0.633
PIC	0.728	0.641	0.691	0.792	0.573	0.652	0.669	0.611	0.656	0.582
HWE	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
PcWH-55						PcWH-101				
N_a	9	8	13	4	6	10	11	13	12	13
N_e	3.581	3.907	2.757	3.126	3.400	7.217	7.029	6.301	5.203	5.416
H_o	0.500	0.645	0.256	0.429	0.423	0.833	0.782	0.584	0.662	0.474
H_e	0.721	0.744	0.637	0.680	0.706	0.861	0.858	0.841	0.808	0.815
PIC	0.668	0.707	0.608	0.622	0.652	0.846	0.842	0.823	0.781	0.790
HWE	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
PcWH-130						PcWH-204				
N_a	11	8	13	7	8	11	12	7	10	10
N_e	4.475	4.161	4.314	2.146	2.299	5.624	5.882	4.386	4.858	6.768
H_o	0.487	0.885	0.297	0.182	0.192	0.671	0.566	0.750	0.662	0.821
H_e	0.777	0.760	0.768	0.534	0.565	0.822	0.830	0.772	0.794	0.852
PIC	0.745	0.722	0.746	0.473	0.522	0.799	0.809	0.736	0.764	0.835
HWE	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
PcWH-149						PcWH-208				
N_a	13	12	12	18	16	7	6	8	7	6
N_e	7.204	7.221	6.844	7.948	8.779	2.844	2.697	5.066	4.696	4.206
H_o	0.705	0.590	0.744	0.701	0.654	0.372	0.346	0.564	0.558	0.532
H_e	0.861	0.862	0.854	0.874	0.886	0.648	0.629	0.803	0.787	0.762
PIC	0.848	0.847	0.838	0.862	0.876	0.604	0.580	0.774	0.754	0.726
HWE	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*

(待续 to be continued)

(续表 5 Tab. 5 continued)

项目 item	世代 generation					世代 generation				
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅
PcWH-182						PcWH-210				
<i>N_a</i>	6	10	6	3	3	5	5	4	3	3
<i>N_e</i>	3.757	5.439	2.836	2.524	1.920	3.378	2.815	1.413	1.438	1.422
<i>H_o</i>	0.333	0.449	0.846	0.571	0.423	0.613	0.240	0.333	0.338	0.333
<i>H_e</i>	0.734	0.816	0.647	0.604	0.479	0.704	0.645	0.292	0.304	0.297
PIC	0.693	0.791	0.584	0.524	0.431	0.646	0.578	0.273	0.283	0.270
HWE	0.000*	0.000*	0.000*	0.003*	0.002*	0.000*	0.000*	0.776	1.000	0.519
PcWH-192						PcWH-230				
<i>N_a</i>	6	5	6	6	6	6	6	7	8	6
<i>N_e</i>	4.122	3.913	4.164	4.606	4.755	4.413	4.956	4.316	4.075	4.136
<i>H_o</i>	0.577	0.423	0.756	0.419	0.293	0.654	0.679	0.423	0.545	0.603
<i>H_e</i>	0.757	0.744	0.760	0.783	0.790	0.773	0.798	0.768	0.755	0.758
PIC	0.720	0.701	0.721	0.750	0.759	0.742	0.769	0.736	0.721	0.718
HWE	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
PcWH-240						PcWH-316				
<i>N_a</i>	5	6	7	5	4	12	8	9	10	9
<i>N_e</i>	2.606	2.683	2.908	2.638	2.396	6.577	5.921	6.386	6.186	5.623
<i>H_o</i>	0.189	0.312	0.342	0.213	0.123	0.628	0.615	0.779	0.766	0.636
<i>H_e</i>	0.616	0.627	0.656	0.621	0.583	0.848	0.831	0.843	0.838	0.822
PIC	0.547	0.569	0.609	0.551	0.500	0.832	0.811	0.824	0.820	0.799
HWE	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
PcWH-266						PcWH-356				
<i>N_a</i>	6	6	5	5	6	7	7	9	5	7
<i>N_e</i>	4.230	3.965	2.960	4.097	3.621	3.132	3.099	3.883	3.786	3.416
<i>H_o</i>	0.584	0.493	0.346	0.338	0.321	0.641	0.500	0.359	0.500	0.408
<i>H_e</i>	0.764	0.748	0.662	0.756	0.724	0.681	0.677	0.742	0.736	0.707
PIC	0.729	0.711	0.612	0.715	0.682	0.633	0.619	0.702	0.691	0.655
HWE	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.653	0.001*	0.000*	0.000*	0.000*

注: “*”表示该数据显著偏离哈迪—温伯格平衡($P<0.01$).

Note: “*” represents the data significantly deviated from Hardy–Weinberg equilibrium ($P<0.01$).

表 6 选育群体小龙虾 5 个世代 20 个微卫星位点的 *F* 检验

Tab. 6 *F* statistics for 5 generations of the *Procambarus clarkii* breeding population at 20 microsatellite loci

位点 locus	近交系数 inbreeding coefficient <i>F_{is}</i>					近交系数 <i>F_{is}</i>	<i>F</i> 统计量 <i>F_{st}</i>
	世代 1 F ₁	世代 2 F ₂	世代 3 F ₃	世代 4 F ₄	世代 5 F ₅	5 个世代 5 generations	5 个世代 5 generations
<i>PcWH-04</i>	0.061	0.102	0.086	0.216	0.070	0.108	0.030
<i>PcWH-45</i>	0.037	−0.134	0.295	0.278	0.004	0.106	0.005
<i>PcWH-49</i>	0.349	0.350	0.381	0.386	0.647	0.415	0.042
<i>PcWH-55</i>	0.312	0.140	0.602	0.376	0.406	0.361	0.094
<i>PcWH-56</i>	0.169	0.129	0.335	0.116	0.290	0.207	0.035
<i>PcWH-73</i>	0.588	0.505	0.515	0.629	0.752	0.598	0.012
<i>PcWH-84</i>	0.350	0.292	0.503	0.313	0.418	0.372	0.017

(待续 to be continued)

(续表 6 Tab. 6 continued)

位点 locus	近交系数 inbreeding coefficient F_{is}					近交系数 F_{is}	F 统计量 F_{st}
	世代 1 F_1	世代 2 F_2	世代 3 F_3	世代 4 F_4	世代 5 F_5	5 个世代 5 generations	5 个世代 5 generations
<i>PcWH-101</i>	0.039	0.095	0.311	0.186	0.425	0.208	0.036
<i>PcWH-130</i>	0.378	-0.158	0.617	0.663	0.663	0.402	0.071
<i>PcWH-149</i>	0.188	0.321	0.136	0.204	0.268	0.224	0.019
<i>PcWH-182</i>	0.550	0.455	-0.301	0.060	0.124	0.207	0.060
<i>PcWH-192</i>	0.244	0.437	0.011	0.470	0.633	0.359	0.034
<i>PcWH-204</i>	0.190	0.324	0.035	0.172	0.044	0.154	0.005
<i>PcWH-208</i>	0.432	0.455	0.303	0.296	0.307	0.352	0.122
<i>PcWH-210</i>	0.135	0.632	-0.135	-0.103	-0.118	0.174	0.210
<i>PcWH-230</i>	0.161	0.155	0.455	0.283	0.212	0.252	0.021
<i>PcWH-240</i>	0.697	0.508	0.484	0.660	0.791	0.622	0.080
<i>PcWH-266</i>	0.241	0.346	0.482	0.558	0.562	0.436	0.024
<i>PcWH-316</i>	0.265	0.266	0.083	0.093	0.232	0.188	0.037
<i>PcWH-356</i>	0.065	0.268	0.521	0.327	0.429	0.326	0.008
平均 mean	0.273	0.274	0.286	0.309	0.358	0.304	0.048

小龙虾 5 个世代选育群体之间的遗传距离与遗传分化指数配对比较结果见表 7。 $F_1\sim F_5$ 遗传距离范围为 0.061~0.222, 其中 F_1 和 F_2 之间遗传距离最小($D=0.061$), 说明两个群体之间亲缘关系最近; F_2 和 F_4 之间遗传距离最大($D=0.222$), 说明两个群体之间亲缘关系最远。 $F_1\sim F_5$ 的配对 F_{st} 值范围为 0.010~0.039, 其值小于 0.5, 表明 5 个世代间的遗传分化程度不高。其中 F_1 与 F_2 的遗传分化指数最低($F_{st}=0.010$), F_2 和 F_4 的遗传分化指数最高

($F_{st}=0.039$)。

分子方差分析(AMOVA)结果显示, 95.16%的遗传变异存在于小龙虾群体内, 而仅有 4.84%的遗传变异存在于小龙虾群体间, 即小龙虾选育世代的变异主要来源于群体内(表 8)。

基于 Nei 氏遗传距离对小龙虾 5 个世代选育群体构建 UPGMA 系统发育树(图 1), 结果显示 F_1 、 F_2 独立聚类为一支, F_4 与 F_5 先聚类, 再与 F_3 聚类为另一支。

表 7 选育群体小龙虾 5 个世代的遗传距离 D (对角线以下)与遗传分化指数 F_{st} (对角线以上)
Tab. 7 Matrix of pair-wise genetic distance (below diagonal) and F_{st} values (above diagonal) between the five generations of the *Procambarus clarkii* breeding population

群体 population	F_1	F_2	F_3	F_4	F_5	群体 population	F_1	F_2	F_3	F_4	F_5
F_1	*****	0.010	0.029	0.038	0.037	F_4	0.217	0.222	0.134	*****	0.016
F_2	0.061	*****	0.033	0.039	0.035	F_5	0.197	0.179	0.113	0.081	*****
F_3	0.161	0.186	*****	0.025	0.022						

表 8 基于 20 个微卫星位点的分子方差分析
Tab. 8 AMOVA based on 20 microsatellite loci

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of saqures	方差组分 variance components	变异百分比/% percentage of variation
群体间 among populations	4	249.832	0.356	4.84
群体内 within populations	773	5465.358	7.012	95.16
总体 total	777	5670.135	7.368	100

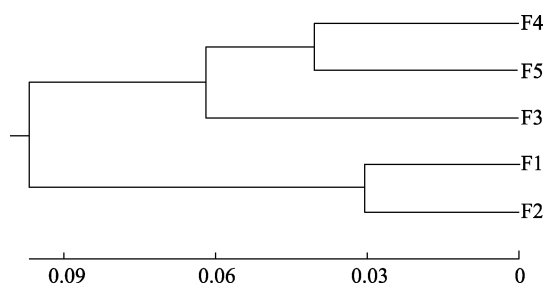


图 1 基于 Nei 氏遗传距离构建的选育群体小龙虾 5 个世代的 UPGMA 系统发育树

Fig. 1 An unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) dendrogram for five generations of the *Procambarus clarkii* breeding population based on Nei's genetic distance

3 讨论

3.1 微卫星标记的多态性

由于微卫星标记具有遗传稳定、快速高效等优势,在水产动物的种质鉴定与品种育种研究中得到广泛应用^[21-22]。多态信息含量是用于评估微卫星标记多态性常用的指标。邢智珺等^[23]利用 8 个微卫星位点对江苏省内的 8 个克氏原螯虾群体进行遗传多样性分析, PIC 的范围介于 0.381~0.795, 仅 1 个位点为中度多态性($0.25 < \text{PIC} < 0.50$), 其余 7 个位点为高度多态性($\text{PIC} > 0.5$)。胡倩等^[24]在广西南宁的 3 个克氏原螯虾养殖群体中使用的 12 个微卫星标记的 PIC 为 0.632~0.840, 呈现高度多态性。本研究中, 平均每个微卫星位点的 N_a 为 12.30, PIC 为 0.711, 其中 90% 的位点呈现高度多态性, 数量高于上述研究小龙虾遗传多样性的微卫星标记, 且 PIC 值范围一致。因此, 实验所用的 20 个微卫星位点呈现高度遗传多样性, 能准确反映小龙虾世代选育群体的遗传多样性及遗传结构。

3.2 小龙虾世代选育群体的遗传多样性

遗传多样性反映了物种的遗传变异水平与适应环境的能力, 是种群在复杂的生境中生存发展的重要基础。在人工选择育种时, 所选目标性状相关基因会趋于纯合化, 导致遗传多样性下降, 群体出现产卵量减少、免疫力降低等问题^[25-26]。因此, 育种中维持高遗传多样性的选育群体是水产种质资源可持续利用的前提。本研究结果表明, 小龙虾连续 5 代选育中群体的 PIC 值均大于 0.5,

表明小龙虾选育群体的遗传多样性水平高, 具有进一步选育的潜力。该情况与草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[27]、华南鲤 (*Cyprinus carpio rubrofasciatus*)^[28]、翘嘴鲌 (*Siniperca chuatsi*)^[29] 等多种水生动物累代选育后群体的遗传多样性变化类似。在前期构建基础群体时, 实验室采集了遗传多样性较高的 3 个野生群体进行杂交, 保留生长优势明显的组合进行群体封闭繁育, 这是选育群体经多代选育后得以保留较高的遗传多样性的原因。

杂合度为检验的位点上基因型为杂合子的数量占该位点所有基因型的比例, 其中期望杂合度 (H_e) 相较于观测杂合度 (H_o) 不易受到样本量大小的干扰, 更适用于评估群体遗传变异, 数值越高, 物种的遗传资源越丰富^[30-31]。本研究中, 小龙虾各世代选育群体的 H_e 为 0.680~0.734, 高于谭云飞等^[32]对长江中下游流域 13 个小龙虾期望杂合度的研究结果 (0.37~0.57), 表明选育群体具有较好的遗传潜力。但 5 个选育群体的 H_e 均大于 H_o , 且数值呈现逐代下降的趋势, 说明人工选育导致该选育群体的遗传变异程度有所下降, 群体存在杂合子缺失现象, 遗传基础逐渐趋向纯化, 符合选育预期, 与瓦氏黄颡鱼 (*Pseudobagrus vachellii*)^[33] 的相关研究结果一致。

近交系数 (F_{is}) 用于评估因非随机交配造成的杂合子缺失或杂合子过剩, 可有效估算种群中近亲交配的概率^[34]。选育世代群体中存在一定水平的近交已经在中间球海胆 (*Strongylocentrotus intermedius*)^[35]、文蛤 (*Meretrix meretrix*)^[22] 等海洋生物中被报道。本研究中, 小龙虾各个世代的 F_{is} 平均值为 0.304, 表明选育群体在育种过程中表现出一定程度的近亲交配, F_{is} 平均值与凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 连续 3 个世代的选育群体的平均 F_{is} (0.354) 相似^[30], 高于元江鲤 (*Cyprinus carpio yuankiang*) 3 个选育群体的平均 F_{is} (-0.046)^[36]。产生的原因可能是选择强度与近交系数呈正相关, 本研究中每代选育群体的选择强度约为 2.64, 高于元江鲤选育世代的选择强度 (1.76)。近交现象在小龙虾群体中十分普遍, 小龙虾抱卵量仅为 300~400 粒^[3], 容易发生近亲交配,

累代近交后群体的经济性状将面临衰退风险^[37-38]。因此, 后续育种中需根据小龙虾的繁殖习性, 设定更为合适的人工选择强度, 同时通过杂交育种或轮换交配等^[39]方式, 控制选育群体的近交水平, 保障选育群体的育种潜力。

Hardy-Weinberg 平衡是指在理想状态下, 群体中各个体的基因型与基因频率在遗传过程中保持不变。本研究中, 小龙虾的 5 个世代选育群体约 90% 的位点偏离了 Hardy-Weinberg 平衡 ($P < 0.01$), 表明群体面临了较大的人工选择压力, 各个群体内的基因型分布不均衡。该情况与李妍等^[31]研究发现长牡蛎 3 个选育群体均有位点 Hardy-Weinberg 平衡偏离的结果相似; 但比庄振俊等^[40]利用 20 个微卫星标记在中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 的 3 个选育世代中发现偏离的位点数量更多 (约 66.7%)。偏离的原因包括近亲繁殖、基因型读取有误和微卫星突变等^[41]。其中, 近亲繁殖可能是造成本研究中微卫星位点 Hardy-Weinberg 平衡严重异常的主要因素。人工定向选择会导致部分稀有等位基因丢失, 且有效群体数量减少引起的遗传漂变也会致使群体纯合基因型增加^[42], 最终表现为 Hardy-Weinberg 平衡的偏离程度增加。

3.3 小龙虾世代选育群体的遗传分化和遗传结构

对种群的遗传分化与遗传结构进行分析有助于评估群体对环境变化的适应能力以及生存与进化的潜力, 用于进一步指导新品种的选育与应用^[43]。遗传分化指数 (F_{st}) 是用于评价种群间遗传分化程度的重要参数。本研究数据显示, 小龙虾 5 个世代选育群体间配对比较的遗传分化指数为 0.010~0.039, 基于 Wright^[44] 的判定标准, 选育群体遗传分化水平较低 ($F_{st} < 0.05$)。AMOVA 结果表明, 选育群体以个体内的遗传变异为主, 群体间的遗传分化较少, 佐证了小龙虾各群体间处于低水平遗传分化的情况。这与徐昊旻等^[45]对乌龟 (*Mauremys reevesii*) 5 个选育世代进行微卫星分析后, 得到群体遗传分化程度较低 ($F_{st} < 0.05$) 的结果一致; 也与王庆志等^[46]利用 10 个微卫星分析得出 3 个长牡蛎人工选育群体中 F_{st} 值的范围为

0.008~0.025, 表明群体的遗传分化程度弱的事实类似。造成这种现象的原因, 可能是选育群体间几乎不存在地理隔离, 且有多次人为选择, 基因交流频繁, 同时小龙虾引入我国时间不足一百年, 现有群体由当年美国运输至日本存活的 20 尾虾繁育而来^[47], 种质趋于同质化。

遗传距离同样是种群遗传分化与遗传结构的重要评判指标。Thorpe^[48] 提出同种群间遗传距离为 0.03~0.20, 本研究中小龙虾 5 个世代选育群体的遗传距离为 0.061~0.222, 与理论相符。其中 F_5 与 F_1 的遗传距离为 0.197, 与 F_2 的遗传距离为 0.179, 与 F_3 的遗传距离为 0.113, 与 F_4 的遗传距离为 0.081, 表明定向选择提高了群体的遗传相似度, 体现了选育工作的有序进行。基于 Nei 氏遗传距离构建的系统发育树显示, 5 个世代选育群体中前两个世代独立聚为一支, 后三个世代聚为另一支, 表明连续 5 代的选育后小龙虾选育群体的遗传结构趋于稳定。值得注意的是, F_3 在大支中与 F_4 、 F_5 分开成为独立亚群, 该情况与马氏珠母贝 (*Pinctada fucata*)^[49]、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)^[50]、菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)^[51] 等水生物种中自 F_3 后选育群体的遗传结构出现了明显的转变的现象相似。推测可能因为 3 代选育后, 目标性状相关的基因大部分趋向于富集, 在表型与遗传上都已经相对稳定, 因此后代与 F_3 的亲缘关系更近, 但 F_3 中某些基因的纯合程度不如 F_4 、 F_5 , 因此成为独立亚群。

4 结论

本研究利用 20 个具有多态性的微卫星标记对小龙虾 5 个世代选育群体的遗传多样性及遗传结构进行了分析。研究表明, 遗传多样性水平虽随着世代的推移而逐渐降低, 但总体上仍然维持在较高水平, 选育群体的遗传分化程度较小, 具备继续选育的条件。为了后续小龙虾遗传改良工作的顺利开展, 应持续监测世代选育群体的遗传多样性与遗传结构, 并采取引入不同来源亲本或增加育种亲本数量等方法来减少近亲交配带来的负面影响。

参考文献:

- [1] Oficialdegui F J, Clavero M, Sánchez M I, et al. Unravelling the global invasion routes of a worldwide invader, the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. Freshwater Biology, 2019, 64(8): 1382-1400.
- [2] Yu X J, Hao X J, Yang L K, et al. China crayfish industry development report (2023)[J]. China Fisheries, 2023(7): 26-31. [于秀娟, 郝向举, 杨霖坤, 等. 中国小龙虾产业发展报告(2023)[J]. 中国水产, 2023(7): 26-31.]
- [3] Zhang Q F. Theory and practice of “Shuangshui Shuanglü” (two-aquatics and double-green) industry development[M]. Beijing: China Science Press, 2021: 127-132. [张启发. “双水双绿”产业发展的理论与实践[M]. 北京: 科学出版社, 2021: 127-132.]
- [4] Wang C Z, Li Z, Liang H W, et al. Genetic diversity in four *Procambarus clarkii* populations in the lower reaches of the Yangtze River[J]. Biodiversity Science, 2009, 17(5): 518-523. [王长忠, 李忠, 梁宏伟, 等. 长江下游地区 4 个克氏原螯虾群体的遗传多样性分析[J]. 生物多样性, 2009, 17(5): 518-523.]
- [5] Li Y H, Guo X W, Cao X J, et al. Population genetic structure and post-establishment dispersal patterns of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in China[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e4065.
- [6] Zhang J L, Liao M C, Wang J H, et al. Development of microsatellite markers and comprehensive assessment on genetic variation of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in Hubei province, China[J]. Aquaculture International, 2024, 32(4): 5067-5083.
- [7] Wang X B, Li Q, Yu H, et al. Genetic variation assessed with microsatellites in mass selection lines of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China[J]. Journal of Ocean University of China, 2016, 15(6): 1039-1045.
- [8] Yi T L, Guo W J, Liang X F, et al. Microsatellite analysis of genetic diversity and genetic structure in five consecutive breeding generations of mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basilewsky)[J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(1): 2600-2607.
- [9] Varshney R K, Graner A, Sorrells M E. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications[J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(1): 48-55.
- [10] Ouyang M F, Chen H L, Liu F, et al. Genetic diversity and genetic structure analysis of different cultured populations and breeding populations of *Cherax quadricarinatus*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2024, 32(9): 2112-2123. [欧阳苗峰, 陈红林, 刘峰, 等. 红螯螯虾不同养殖群体和选育群体遗传多样性及遗传结构分析[J]. 农业生物技术学报, 2024, 32(9): 2112-2123.]
- [11] Dong D J, Dai X L. SSR analysis on genetic diversity in different populations and generations of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2020, 51(2): 421-428. [董丁健, 戴习林. 罗氏沼虾不同群体世代遗传多样性的 SSR 分析[J]. 南方农业学报, 2020, 51(2): 421-428.]
- [12] Wang X B, Li Q, Yu H, et al. Genetic variation assessed with microsatellites in mass selection lines of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China[J]. Journal of Ocean University of China, 2016, 15(6): 1039-1045.
- [13] Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [14] Holland M M, Parson W. GeneMarker® HID: A reliable software tool for the analysis of forensic STR data[J]. Journal of Forensic Sciences, 2011, 56(1): 29-35.
- [15] Peakall R, Smouse P E. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update[J]. Bioinformatics, 2012, 28(19): 2537-2539.
- [16] Rousset F. Genepop'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux[J]. Molecular Ecology Resources, 2008, 8(1): 103-106.
- [17] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. Molecular Ecology, 2007, 16(5): 1099-1106.
- [18] George D, Mallery P. IBM SPSS statistics 26 step by step: A simple guide and reference[M]. London: Routledge, 2019.
- [19] Excoffier L, Lischer H E L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. Molecular Ecology Resources, 2010, 10(3): 564-567.
- [20] Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences[J]. Briefings in Bioinformatics, 2008, 9(4): 299-306.
- [21] Gao Y, Tian C, Jiang J J, et al. Genetic diversity and genetic structure analysis of *Procambarus clarkii* population based on microsatellite markers[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2023, 51(5): 191-199. [高杨, 田灿, 姜京京, 等. 基于微卫星标记的克氏原螯虾种群遗传多样性和遗传结构分析[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(5): 191-199.]
- [22] Tian Z, Chen A H, Cao Y, et al. Microsatellite analysis on genetic diversity of breeding populations of red shell color *Meretrix meretrix*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(9): 2582-2589. [田镇, 陈爱华, 曹奕, 等. 红壳色文蛤选育群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 南方农业学报,

- 2021, 52(9): 2582-2589.]
- [23] Xing Z J, Jiang H C, Lu W, et al. Genetic diversity analysis of eight *Procambarus clarkii* stocks in Jiangsu Province based on microsatellites[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2014, 23(5): 656-662. [邢智珺, 姜虎成, 陆伟, 等. 江苏 8 个克氏原螯虾群体遗传多样性微卫星分析[J]. 上海海洋大学学报, 2014, 23(5): 656-662.]
- [24] Hu Q, Wang Q S, Huang J, et al. Genetic diversity analysis of farming *Procambarus clarkii* population based on morphology traits and SSR markers[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2024, 43(3): 258-266. [胡倩, 王齐帅, 黄瑾, 等. 基于形态性状和 SSR 标记的克氏原螯虾养殖群体遗传多样性分析[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(3): 258-266.]
- [25] [25] Liu F, Qu Y K, Geng C, et al. Analysis of the population structure and genetic diversity of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in China using SSR markers[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2020, 47: 59-71.
- [26] Bilodeau L. Genetic diversity and structure in a closed breeding system of Russian honey bees[J]. Journal of Economic Entomology, 2022, 115(2): 682-687.
- [27] Yu C C, Zhang W, Xu X Y, et al. Genetic variations among different generations of a breeding population of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) using microsatellite markers[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(8): 1109-1118. [余成晨, 张伟, 徐晓雁, 等. 草鱼选育群体不同世代遗传变异的微卫星分析[J]. 中国水产科学, 2022, 29(8): 1109-1118.]
- [28] Ma D M, Su H H, Zhu H P, et al. Genetic diversity and genetic structure analysis of different selective breeding generations in *Cyprinus carpio rubrofasciatus* using microsatellite markers[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2018, 42(5): 887-895. [马冬梅, 苏换换, 朱华平, 等. 华南鲤选育群体不同世代遗传多样性与遗传结构的微卫星分析[J]. 水生生物学报, 2018, 42(5): 887-895.]
- [29] Zheng H Z, Yi T L, Liang X F, et al. Genetic structure and genetic diversity analysis of four consecutive breeding generations of *Siniperca chuatsi*[J]. Freshwater Fisheries, 2013, 43(6): 8-12. [郑荷子, 易提林, 梁旭方, 等. 翘嘴鲃连续 4 代选育群体遗传多样性及遗传结构分析[J]. 淡水渔业, 2013, 43(6): 8-12.]
- [30] Peng M, Chen H F, Li Q Y, et al. Genetic diversity of three consecutive generations of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2020, 51(6): 1442-1450. [彭敏, 陈慧芳, 李强勇, 等. 凡纳滨对虾连续 3 个世代选育群体的遗传多样性分析[J]. 南方农业学报, 2020, 51(6): 1442-1450.]
- [31] Li Y, Yao J T, Zhang E S, et al. Microsatellite analysis on genetic diversity of breeding populations and wild populations of *Crassostrea gigas*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2024, 55(2): 462-470. [李妍, 姚健涛, 张恩烁, 等. 长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 野生与选育群体的微卫星遗传多样性分析[J]. 海洋与湖沼, 2024, 55(2): 462-470.]
- [32] Tan Y F, Peng G H, Xiong L J, et al. Genetic diversity and structure analysis of 13 red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) populations in Yangtze River basin[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2020, 39(2): 33-39. [谭云飞, 蓬国辉, 熊礼静, 等. 长江中下游流域 13 个克氏原螯虾群体遗传多样性和遗传结构分析[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(2): 33-39.]
- [33] Wang H, Duan G Q, Zhou H X. Genetic diversity of three consecutive selective breeding generations in *Pseudobagrus vachellii* (Actinopterygii: Siluriformes: Bagridae)[J]. Acta Ichthyologica et Piscatoria, 2024, 54: 13-20.
- [34] Wright S. Coefficients of inbreeding and relationship[J]. The American Naturalist, 1922, 56: 330-338.
- [35] Liu L, Zhang W J, Liu Y S, et al. Evaluation of the genetic diversity and genetic structure of multiple generation selection populations and unselected common population of sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) using SSR-seq[J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(3): 145-155. [刘雷, 张伟杰, 刘岩松, 等. 基于 SSR-seq 技术评估中间球海胆多代选育群体和普通养殖群体的遗传多样性[J]. 水产学报, 2023, 47(3): 145-155.]
- [36] Liu J, Yuan L C, Yang J H, et al. Analysis of genetic diversity and genetic structure of three successive breeding generations in *Cyprinus carpio yuangiang*[J]. Freshwater Fisheries, 2024, 54(2): 105-112. [刘娟, 袁林聪, 杨剑虹, 等. 元江鲤 3 个连续选育世代的遗传多样性与遗传结构变化[J]. 淡水渔业, 2024, 54(2): 105-112.]
- [37] Wang H F, Liu P, Gao B Q, et al. Inbreeding influence to some economic traits of six inbreeding generations of *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(6): 1157-1165. [王好锋, 刘萍, 高保全, 等. 近交对三疣梭子蟹若干经济性状衰退的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(6): 1157-1165.]
- [38] Luo K, Kong J, Luan S, et al. Comparison of growth and survival between selected population and inbreeding population at different growing stage in *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2014, 44(7): 51-57. [罗坤, 孔杰, 栾生, 等. 中国对虾选育群体与近交群体不同生长时期的生长性状和存活率的比较[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2014, 44(7): 51-57.]

- [39] Rhode C, Badenhorst R, Hull K L, et al. Genetic and phenotypic consequences of early domestication in black soldier flies (*Hermetia illucens*)[J]. *Animal Genetics*, 2020, 51(5): 752-762.
- [40] Zhuang Z J, Tang M J, Zhang D D, et al. Genetic diversity of three consecutive generations of *Eriocheir sinensis* “Changdang Lake 1”[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2023, 47(9): 1523-1533. [庄振俊, 唐美君, 张冬冬, 等. 中华绒螯蟹“长荡湖 1 号”连续 3 个世代的遗传多样性分析[J]. *水生生物学报*, 2023, 47(9): 1523-1533.]
- [41] Tarang M, Kumar P, Kumar A, et al. Genetic characterization of F₀ outbred and F₁ inbred Swiss albino mice using microsatellite markers and their performance evaluation[J]. *Indian Journal of Animal Sciences*, 2021, 91(3): 200-205.
- [42] Urrea-Rojas A M, Bignardi A B, de Souza F P, et al. Genetic variability in Tambaqui generations of the breeding program in the Central-West Region of Brazil[J]. *Semina: Ciências Agrárias*, 2021, 42(3Supl1): 1785-1796.
- [43] Jiang G W, Zhang Y F, Du L J, et al. Genetic diversity and structure in a selected strain of hybrid oysters between *Crassostrea gigas* and *C. angulata* evaluated from microsatellites and mitochondrial COI sequences[J]. *Aquaculture*, 2023, 574: 739716.
- [44] Wright S. Evolution and the genetics of populations, volume 4: Variability within and among natural populations[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978.
- [45] Xu H Y, Yang X Y, Ni W, et al. Genetic diversity and genetic structure of selected generations of Chinese pond turtle (*Mauremys reevesii*) based on microsatellite DNA[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2023, 38(5): 812-818. [徐昊旻, 杨雪莹, 倪未, 等. 乌龟选育世代遗传多样性及遗传结构的微卫星分析[J]. *大连海洋大学学报*, 2023, 38(5): 812-818.]
- [46] Wang Q Z, Li Q, Kong L F. Genetic variability assessed by microsatellites in mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(10): 1529-1536. [王庆志, 李琪, 孔令锋. 长牡蛎 3 代人工选育群体的微卫星分析[J]. *水产学报*, 2012, 36(10): 1529-1536.]
- [47] Guo X F, Liu M, Zhou Y L, et al. Genetic diversity evaluation and population structure analysis of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) from lakes and rice fields by SSR markers[J]. *Fishes*, 2022, 7(4): 142.
- [48] Thorpe J P. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematics[J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1982, 13: 139-168.
- [49] Guan Y Y, Liu W G, He M X. Genetic variation during four generations of selective breeding in the pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(4): 764-770. [管云雁, 刘文广, 何毛贤. 马氏珠母贝选育群体 4 个世代的遗传变异[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(4): 764-770.]
- [50] Han Z K, Liu P, Li J, et al. SSR analysis of selected populations of inbred *Portunus trituberculatus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(1): 25-31. [韩智科, 刘萍, 李健, 等. 三疣梭子蟹选育家系微卫星分析[J]. *水产学报*, 2012, 36(1): 25-31.]
- [51] Nie H T, Li J, Huo Z M, et al. Analysis of genetic variability in selected lines and a wild population of *Ruditapes philippinarum* using microsatellite markers[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(3): 538-546. [聂鸿涛, 李佳, 霍忠明, 等. 菲律宾蛤仔人工选育群体与野生群体的遗传多样性分析[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(3): 538-546.]

Genetic diversity and genetic structure analysis of different selective breeding generations in *Procambarus clarkii*

LIN Shiyu^{1,2}, TAO Yang^{1,2}, CHEN Nan^{1,2}, LIAO Mingcong^{1,2}, WANG Jianghua^{1,2}, GU Zemao^{1,2*}

1. College of Fisheries, Shuangshui Shuanglu Institute, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China

Abstract: China is currently the largest producer and consumer of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in the world. However, self-propagation breeding has resulted in germplasm degradation, which led to smaller body

sizes and weaker disease resistance. Thus, implementing selective breeding to enhance commercially desirable traits is critical issue for the sustainable development of the *P. clarkii* industry. Maintenance of high genetic diversity within breeding populations is essential for a selective breeding program. Microsatellites are valuable tools for analyzing genetic diversity and structure in aquatic species. In this study, 20 microsatellite markers were analyzed across five consecutive generations (F_1 – F_5) of *P. clarkii* ($n=389$). The base population was sourced from wild populations from Jieliang Lake (Hubei Province), Honghu Lake (Hubei Province), and Hongze Lake (Jiangsu Province). The results showed that the number of alleles per loci ranged from 5 to 22, with an average polymorphic information content (PIC) of 0.711, indicating substantial genetic polymorphism suitable for further research. Throughout the five selected generations, the average number of effective alleles (N_e) decreased from 4.216 to 3.815, the average observed heterozygosity (H_o) decreased from 0.539 to 0.433, the average expected heterozygosity (H_e) decreased from 0.734 to 0.680, and the average PIC decreased from 0.695 to 0.638. Although N_e , H_o , H_e , and PIC showed a decreasing trend over successive generations, the differences were not significant (Kruskal–Wallis test, $df=4$, $P>0.05$). Therefore, genetic diversity was maintained in the selected strains over five generations. The inbreeding coefficient (F_{is}) ranged from 0.106 to 0.622, with an average of 0.304, and all microsatellite loci were positive, indicating inbreeding within the five successive generations. Genetic distances between F_1 – F_5 ranged from 0.061 to 0.222, with the smallest genetic distance observed between F_1 and F_2 and the largest between F_2 and F_4 . The genetic differentiation coefficients (F_{st}) among the five successive *P. clarkii* generations were all less than 0.050, suggesting a low level of genetic differentiation. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that 95.16% of genetic variation occurred within generations, while 4.84% was attributed to differences among generations, suggesting the occurrence of genetic differentiation among the generations. According to the genetic distance data, the cluster tree constructed by unweighted pair-group method with arithmetic means showed that the five generations were divided into two branches. F_1 and F_2 were clustered into one branch, and F_4 and F_5 clustered first before merging with F_3 as another branch. In conclusion, the genetic diversity of each generation was maintained at a relatively high level, indicating that there is still potential for breeding in selected strains of *P. clarkii*. In future breeding programs, parental populations from diverse genetic backgrounds should be incorporated or the number of breeding individuals should be increased to mitigate inbreeding depression.

Key words: *Procambarus clarkii*; genetic diversity; genetic structure; breeding populations; SSR

Corresponding author: GU Zema. E-mail: guzema@mail.hzau.edu.cn