

罗氏沼虾缅甸野生群体和浙江养殖群体的遗传多样性比较

张海琪¹, 何中央¹, 徐晓林¹, 李星云², 杜建明¹

(1. 浙江省水产引种育种中心, 浙江 杭州 310012; 2. 宁波大学 海洋与水产业系, 浙江 宁波 315211)

摘要:采用形态学方法、同工酶电泳技术和 DNA 分析方法对罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii* DeMan) 缅甸野生群体 (BNP 种群) 和浙江省养殖群体 (ZCP 种群) 的遗传多样性进行比较分析。结果表明, 两种群在外形、体色、生长等方面存在一定的差异; 对罗氏沼虾 11 种酶的 25 个基因位点进行分析, 得出 BNP 种群和 ZCP 种群的同工酶分析所得出的多态位点比例及平均杂合度分别为 12% 和 16%, 0.043 1 和 0.050 1。根据同工酶的基因频率计算得两种群的遗传相似系数为 0.996 3, 遗传距离为 0.003 7; 22 个经筛选的 10 bp 随机引物共检测到 139 个 RAPD 位点, BNP 种群的多态位点比例和遗传多态度 (H_s) 分别为 33.81% 和 0.094 0, 高于 ZCP 种群的 30.22% 和 0.078 0, 两个群体的平均遗传多态度 (H_{pp}) 为 0.086 0, 90% 以上的遗传变异是在群体内检测到的。根据 RAPD 扩增的基因频率得出两群体间的遗传距离为 0.120 6。无论是同工酶电泳结果还是 RAPD 分析结果, 都表明罗氏沼虾缅甸野生群体的遗传多样性高于浙江养殖群体, 说明人工养殖会导致罗氏沼虾遗传多样性的下降。结果还表明, 罗氏沼虾群体遗传多样性水平欠丰富, 因此需要对罗氏沼虾群体实行科学的管理。

关键词: 罗氏沼虾; 遗传多样性; 同工酶; RAPD

中图分类号: Q959.223 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)06-0506-07

罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii* DeMan) 是世界上大型的淡水经济虾类之一, 主要分布于泰国、缅甸、马来西亚等东南亚国家。我国罗氏沼虾的人工养殖已有 20 多年的历史, 尤其是在突破人工育苗技术以来, 养殖业迅速发展^[1]。目前我国罗氏沼虾年育苗量在 150 亿尾以上, 养殖面积约 3.3 万公顷, 年养殖产量超过 10 万吨, 产值 20 亿元, 已成为全球罗氏沼虾的养殖大国。但随着罗氏沼虾养殖的迅速普及, 病害也不断爆发流行, 尤以肌肉白浊病最为严重, 造成巨大损失。引起罗氏沼虾发病死亡的原因是多方面的, 其根本原因则是养殖种质的衰退, 抗病力下降。已有研究表明, 遗传变异水平与生物的生长速度、抗病能力等生产性状密切相关。而有关罗氏沼虾遗传学研究仅有零星报道^[2-4]。本研究以产于缅甸的罗氏沼虾野生群体和浙江省的养殖群体为研究对象, 以形态学特征结合同工酶电泳技术和 RAPD 分析方法对其遗传多样性进行系统比较, 以便为制订相应的资源保护措施, 保证养殖业的健康、稳步发展提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用罗氏沼虾缅甸野生群体 (简称 BNP 种群) 样品为浙江省水产引种育种中心于 2002 年 5 月从缅甸自然水域 (12°30'04"N, 98°30'58"E) 引进, 隔离暂养于海宁实验区。同时以浙江海宁 (30°33'20"N, 120°40'15"E) 的人工繁养殖两代以上的罗氏沼虾作为对照 (下称为浙江养殖群体, 简称 ZCP 种群)。在尽可能相同条件下饲养 4 个月后, 随机取样用于遗传学比较分析。每个种群样本 50 尾 (表 1), 所有个体皆为成虾。活体放入大塑料袋内充氧后, 扎紧袋口快速运回实验室供分析用。

1.2 形态特征度量

活体进行形态特征度量, 用游标卡尺测量全长、第二步足长等数值, 精确到 0.1 mm, 计数上、下额齿数, 用电子天平称量体重, 精确到 0.1 g。新鲜肌肉取出后置于 -76℃ 超低温冰箱中备用。

1.3 同工酶电泳技术

1.3.1 电泳样品制备与电泳

每个种群的 50 尾虾

收稿日期: 2003-11-17; 修订日期: 2004-06-07.

基金项目: 农业部全国水产技术推广总站资助项目; 浙江省水产种子种苗工程建设项目 (503050009).

作者简介: 张海琪 (1977-), 男, 硕士, 研究方向: 水产种质资源与生物技术. Tel: 0571-85029759, E-mail: nbzhq@hotmil.com

都用于同工酶电泳分析。每尾虾称取肌肉 0.3 g, 加 0.01 mol·L⁻¹ 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 1 mL 于玻璃匀浆器中冰浴匀浆, 于 4 ℃ 14 000 r·min⁻¹ 离心 20 min。取上清液与 0.025% 溴酚蓝 + 40% 蔗糖标记指示物以体积比 4:1 混匀, 直接电泳或 -76 ℃ 超低温冰箱中保存备用。采用不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳法进行同工酶分析^[5], 分离胶浓度为 7.5%, 浓缩胶浓度为 3%。显色方法参考王中仁等^[6] 的方法。

1.3.2 实验记录与分析 显色后的胶片采用福日生物凝胶成像系统进行扫描拍照。酶位点的编号参照国际生化化学命名规则而定, 把向阳极泳动最快的酶位点编号为 1, 如 EST-1, 从阳极到阴极依次编号。对酶谱的遗传学解释参考王中仁^[6] 的方法。多态位点比例 P 、平均杂合度 H 、遗传相似系数 I 、Nei 遗传距离 D 等遗传学指标的计算参考王中仁^[6] 的方法。

1.4 RAPD 分析方法

1.4.1 基因组 DNA 的提取 每群体取 20 尾用于 DNA 分析。DNA 的提取参考文献 [2]、[7] 的方法进行。每尾取肌肉 100 mg 剪碎, 加入 500 μL 匀浆缓冲液 (10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0; 100 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8.0), 混匀后加入终浓度为 1% SDS 和 100 mg·L⁻¹ 蛋白酶 K, 55 ℃ 消化 4 h, 然后分别用等体积的饱和酚、酚/氯仿 (酚、氯仿、异戊醇体积比 25:24:1) 及氯仿 (氯仿、异戊醇体积比 24:1) 抽提, 二倍体积无水乙醇沉淀。用 100 μL TE (10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8.0) 溶解, 紫外分光光度计定量, 置于 4 ℃ 保存备用。

1.4.2 RAPD 检测 RAPD 扩增引物购自上海 Sangon 公司。筛选出 22 个引物进行扩增。RAPD 反应条件基本与 Williams 等^[7-8] 相似。基因组 DNA 在 PCR 扩增仪上经 94 ℃ 预变性 4 min 后, 进行 40 个循环, 每一循环包括 94 ℃ 1 min、36 ℃ 1 min、72 ℃ 2 min, 最后在 72 ℃ 延伸 8 min。扩增产

物用 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg·mL⁻¹ E. B.) 电泳分离, 紫外灯光下观察、照像。

1.4.3 数据分析 按琼脂糖凝胶同一位置上 DNA 带的有无进行统计, 有带的记为 1, 无带的记为 0。将这些片段作为基因位点进行分析。

多态位点比例 P 等于多态位点数除以总位点数。Shannon 遗传多样性指数 $H_o = - \sum (x_i \ln x_i) / N$, 其中 x_i 为位点在某种群中出现的频率, N 为检测到的位点总数, H_o 可用来分析和比较各种群的遗传多样性。设 H_{pop} 为所研究的种类 n 个不同群体内遗传多态度, $H_{pop} = \sum H_o / n$, n 为所研究的种群数。设 H_{sp} 为所研究的种类 n 个群体的遗传多态度总量, $H_{sp} = - \sum (X \ln X) / N$, 其中 X 为 n 个群体的综合表型频率。分别以 H_{pop} / H_{sp} 和 $(H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}$ 表示群体内和群体间的遗传变异比例^[11]。群体间的遗传距离计算如下: $D = - \ln I$, 这里 $I = \sum (X_i \times X_j) / (\sum X_i \times \sum Y_j)^{1/2}$, 其中 X_i 和 Y_j 分别是 X 和 Y 群体中第 i 个等位基因的频率^[10-11]。

2 结果

2.1 形态特征

罗氏沼虾不同种群存在一定的形态差异 (表 1)。就其生长而言, 由于 BNP 种群的野性较强, 短时间难以适应本地的环境, 因此生长速度比 ZCP 种群要慢些。但其抗逆、抗病能力强, 体色鲜艳、透明, 斑纹清晰, 育苗过程中未出现“肌肉白浊病”, 深受群众欢迎。而 ZCP 种群虽表现出生长快, 但其体色浑浊不美观, 且在育苗过程中常有肌肉白浊病发生, 苗种死亡率高, 因此急需改良; 就其外形而言, 两者最大的差别在于 BNP 种群雄虾第二步足前端出现一白点, 而 ZCP 种群未发现。

表 1 罗氏沼虾形态特征参数

Table 1 Morphological characteristics of *M. rosenbergii*

项目 Item	BNP 群体 (n = 50) Burma wild population	ZCP 群体 (n = 50) Zhejiang cultured population
全长/cm Body length	11.26 ± 1.28	11.35 ± 1.20
体重/g Body weight	13.50 ± 4.75	15.20 ± 3.27
颌齿齿式 Dental formula of rostrum	13.17 ± 1.01 11.22 ± 2.19	12.95 ± 0.79 10.95 ± 2.19
第二步足与体长比 Second pereopod length/Body length	0.76 ± 0.04 (♀) 1.01 ± 0.25 (♂)	0.78 ± 0.11 (♀) 1.05 ± 0.15 (♂)

2.2 同工酶电泳

对罗氏沼虾肌肉的乳酸脱氢酶 LDH、超氧化物歧化酶 SOD、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 G6PDH、醇脱氢酶 ADH、苹果酸酶 MEP、山梨醇脱氢酶 SDH、苹果酸脱氢酶 MDH、葡萄糖脱氢酶 GDH、碱性磷酸酶 AKP、酸性磷酸酶 ACP 和酯酶 EST 等 11 种酶进行电泳。图 1a、b 是罗氏沼虾两群体肌肉苹果酸酶的电泳图谱。11 种酶在 2 群体中共检测到 25 个位

点。在这些基因位点中,ZCP 样品的编码葡萄糖 6 磷酸脱氢酶、苹果酸酶和酯酶的 G6PDH-1、MEP-1 和 EST-3 位点具有多态性;而 BNP 中除上述 3 个基因位点外,还发现 GDH-1 具有多态性。计算显示 BNP 种群的多态位点比例为 16%,ZCP 种群则为 12%。两种群的期望杂合度 H_e 、遗传相似系数 I 等遗传学指标的计算结果见表 2。

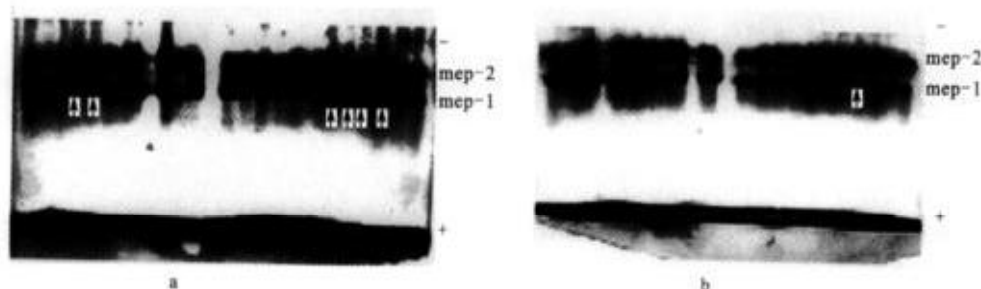


图 1 罗氏沼虾苹果酸酶电泳图谱

a. 为缅甸野生群体,b. 为浙江养殖群体,箭头示多态。

Fig.1 Electrophoregram of MEP in *M. rosenbergii*

a. Burma wild population; b. Zhejiang cultured population; arrows indicate polymorphic loci.

表 2 罗氏沼虾同工酶图谱的分析结果

Table 2 Analyzed results of isozyme patterns of *M. rosenbergii*

群体*	多态位点比例/%	位点平均有效等位基因数	期望杂合度	遗传相似系数	遗传距离
Population*	Polymorphic loci rate	N_e	H_e	Genetic similarity	Genetic distance
	P			I	D
BNP	16	1.20	0.050 1		
ZCP	12	1.16	0.043 1	0.996 3	0.003 7

* BNP—Burma wild population; ZCP—Zhejiang cultured population.

N_e ——Effective number of alleles per locus.

H_e ——Expected heterozygosity.

2.3 RAPD 分析

缺少 DNA 模板的对照中,均无扩增带,重复实验结果一致。本研究所使用的 45 条引物中,有 42 条引物可以扩增出条带,22 条引物可产生清晰、可重复的扩增带。单一引物扩增条数为 2~10 条(表 3),扩增片段长度大多在 100~3 500 bp。22 条引物共获得 139 条扩增带,其中 BNP 种群有 47 个多态位点,ZCP 种群有 42 个多态位点,比例分别为 33.81% 和 30.22%,显示了较为丰富的多态性。图 2a、b 分别举例了引物 S_2 和 S_{10} 对两个群体的扩增产物电泳图谱。

根据所检测到的表型频率进行遗传多态度计算分析(表 4),结果表明,两个群体的平均遗传多态度(H_{pop})为 0.086 0, BNP 群的遗传多态度(H_e)为 0.094 0,高于 ZCP 种群的 0.078 0。从 H_{pop}/H_{sp} 比值可见, S_{32} 和 S_{406} 引物分别检测出群体内的最大和最小遗传变异(H_{pop}/H_{sp} 分别为 0.992 6 和 0.725 9),群体内的遗传变异 H_{pop}/H_{sp} 均值为 0.915 9;而群体间的遗传变异 $(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp}$ 平均为 0.084 1,可见,90% 以上的遗传变异是在群体内检测到的。计算得两群体间的遗传距离为 0.120 6。

表 3 RAPD-PCR 反应所用的引物、总扩增带数以及在 2 个种群的扩增多态位点数

Table 3 Primer sequences used and the amplified bands of the different primers and the numbers of amplified polymorphic fragments of the two populations

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	总扩增带数 Total bands	扩增多态位点数 Morphologic loci	
			BNP	ZCP
S ₁	GTTTCGCTCC	10	5	6
S ₂	TGATCCCTGG	7	0	0
S ₃	CATCCCCCTG	7	3	1
S ₄	GGA CTGGAGT	3	1	0
S ₅	TGCGCCCTTC	7	2	2
S ₈	GTCCACACGG	9	4	4
S ₉	TGGGGGACTC	8	3	2
S ₁₀	CTGCTGGGAC	6	0	0
S ₁₁	GTAGACCCGT	9	3	4
S ₁₂	CCTTGACGCA	4	0	0
S ₁₃	TTCCCCCGCT	8	5	3
S ₁₉	ACCCCGAAG	8	4	4
S ₄₉	CTCTGGAGAC	9	2	2
S ₅₀	GGTCTACACC	5	1	0
S ₅₁	AGCCGTATCC	2	0	0
S ₅₂	CACCGTATCC	9	2	2
S ₅₈	GAGAGCCAAC	3	0	0
S ₅₉	CTGGGGACTT	5	4	4
S ₆₀	ACCCGGTCAC	4	2	1
S ₄₀₄	GGCGTTTGTC	6	2	2
S ₄₀₆	CTGGGCAACT	3	0	2
S ₄₁₇	TCAGTCCGGG	7	4	3

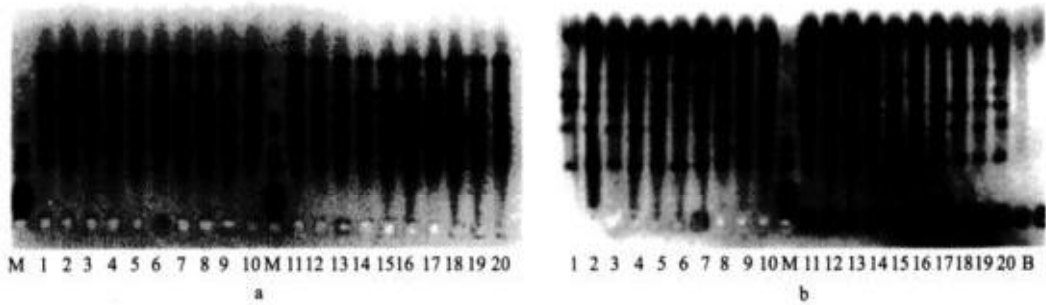


图 2 不同引物对罗氏沼虾缅甸野生群体和浙江养殖群体的 RAPD 扩增电泳图谱

1-10: 缅甸野生群体的不同个体; 11-20: 浙江养殖群体的不同个体; M: λ DNA (*Eco*R I + *Hind* III); B: 空白; a: 多态引物 S₂ 的扩增结果; b: 单态引物 S₁₀ 的扩增结果。

Fig. 2 RAPD electrophoregrams of wild and reared stocks of *M. rosenbergii* amplified by different primers

Lane 1-10 are different individuals of Burma wild population; Lane 11-21 are different individuals of Zhejiang cultured population; M: λ DNA (*Eco*R I + *Hind* III); B: Blank; a shows the result of polymorphic primer S₂; b shows the result of monomorphic primer S₁₀.

表4 罗氏沼虾缅甸野生群体和浙江养殖群体遗传多样性的 RAPD 分析

Table 4 RAPD analysis of genetic diversity in Burma wild population and Zhejiang cultured population of *M. rosenbergii*

引物 Primer	H_s		H_{sp}	H_{pop}	H_{pop}/H_{sp}	$(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp}$
	BNP	ZCP				
S ₁	0.164 8	0.175 5	0.174 5	0.170 2	0.975 4	0.024 6
S ₃	0.090 7	0.028 2	0.074 2	0.059 5	0.801 9	0.198 1
S ₄	0.034 8	0.000 0	0.023 8	0.017 4	0.731 1	0.268 9
S ₅	0.083 3	0.073 1	0.079 6	0.078 2	0.982 4	0.017 6
S ₈	0.141 1	0.123 0	0.133 2	0.132 1	0.991 7	0.0083
S ₉	0.121 4	0.057 7	0.104 0	0.089 6	0.861 5	0.138 5
S ₁₁	0.128 7	0.139 7	0.154 6	0.134 2	0.868 0	0.132 0
S ₁₃	0.160 3	0.103 1	0.142 5	0.131 7	0.924 2	0.075 8
S ₁₉	0.150 3	0.155 9	0.156 5	0.153 1	0.978 3	0.021 7
S ₄₉	0.067 5	0.063 1	0.074 2	0.065 3	0.880 1	0.119 9
S ₅₀	0.018 3	0.000 0	0.011 3	0.009 2	0.814 2	0.185 8
S ₅₂	0.062 5	0.072 3	0.067 9	0.067 4	0.992 6	0.007 4
S ₅₉	0.120 9	0.118 7	0.138 1	0.119 8	0.867 5	0.132 5
S ₆₀	0.036 6	0.018 3	0.029 6	0.027 5	0.929 1	0.070 9
S ₄₀₄	0.064 2	0.034 1	0.058 5	0.049 2	0.841 0	0.159 0
S ₄₀₆	0.000 0	0.046 5	0.032 1	0.023 3	0.725 9	0.274 1
S ₄₁₇	0.152 3	0.117 1	0.152 4	0.134 7	0.947 9	0.052 1
均值	0.094 0	0.078 0	0.093 9	0.086 0	0.915 9	0.084 1

3 讨论

3.1 同工酶结果与 RAPD 结果的比较

目前检测水产种质资源遗传多样性的手段主要有同工酶电泳技术和分子遗传标记技术。本研究检测了罗氏沼虾2个种群的遗传多样性,采用同工酶电泳技术得出缅甸野生群体的多态位点比例和平均杂合度分别为16%和0.0501,浙江养殖群体的多态位点比例和平均杂合度分别为12%和0.0431。采用RAPD技术检测到缅甸野生群体的多态位点比例和遗传多态度分别为33.81%和0.0940,而浙江养殖群体的多态位点比例和遗传多态度分别为30.22%和0.0780。可见,同工酶分析和RAPD分析所得的结论是一致的,只是同工酶得出的遗传多样性要比RAPD分析的低。这主要是由于同工酶图谱是从蛋白质水平反映物种的遗传多样性,因而对遗传多样性的反映是比较间接和局部的;RAPD标记是直接以DNA的差异为基础的检测手段,能够比较全面地反映出物种的遗传多样性,但缺乏同工酶能区分显性、隐性基因的优点。因此两者结合起来进行遗传多样性分析,基本上能反映整个基因组的实际情况。

3.2 罗氏沼虾两群体遗传多样性及与其他虾类的比较

从遗传学角度而言,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。贫乏的遗传多样性必将给物种种质资源的保护和利用带来许多不利的影响,而丰富的遗传多样性意味着比较高的适应生存潜力,蕴藏着比较大的进化潜能以及比较丰富的育种和遗传改良的潜力。从表2和表4可以看出,罗氏沼虾缅甸野生群体无论是多态位点比例、平均杂合度,还是遗传多样性都高于浙江养殖群体。与其他虾类相比,中国对虾黄渤海沿岸种群、朝鲜半岛西海岸种群和2个养殖群体的同工酶多态位点比例分别为15%、20%、10%和20%,平均杂合度分别为 0.014 ± 0.007 、 0.020 ± 0.010 、 0.010 ± 0.007 和 0.033 ± 0.017 ^[14];中国对虾黄渤海区群体的RAPD多态位点比例为17.95%~20.45%^[13];日本对虾日本人工繁殖群体F₁代、F₄代、F₅代和F₆代的平均杂合度分别为0.105、0.071、0.059和0.049^[14];日本对虾中国野生和养殖群体的RAPD多态位点比例和平均杂合度分别为54.14%和37.91%、0.2517和0.1343^[15],而台湾野生地理种群(海峡北部)及其移植到中国北方水域

的养殖群体的 RAPD 多态比例分别为 85.14% 和 78.62%, 遗传多态度分别为 0.214 和 0.201^[9]; 南美白对虾的不同群体和家系的 RAPD 多态位点比例为 39% ~ 77%^[16]; 罗氏沼虾的遗传多样性水平较低。相比之下, 罗氏沼虾缅甸野生群体更具遗传改良的潜力。石拓等^[17]认为中国对虾低水平遗传多样性在一定程度上可能与过度捕捞、劣质苗种的人工放流及养殖个体大规模的逃逸等人为不合理的干预有关; Mulley 等^[18]则认为大多位点突变性变异的选择性丧失, 可以解释对虾类低水平的遗传多样性; 黎中宝等^[19-20]认为, 造成日本对虾、斑节对虾、南美白对虾和新对虾等几种优良养殖对虾相应位点上杂合体完全缺失的主要原因可能是自然选择、种内杂交和 Wahlund 效应。本研究所揭示的罗氏沼虾遗传多样性水平也较低, 可能与过度捕捞、近交繁殖等不合理的人工干预有关。

3.3 关于罗氏沼虾种质改良技术问题

有关利用分子标记差异预测杂种优势, 在作物中已取得可喜的进展, 在鱼类、贝类育种研究中也有过报道^[11]。罗氏沼虾缅甸野生群体体色纯, 鲜艳美观, 耐低氧能力强, 无白浊病, 但由于刚引进野性比较足, 生长优势不明显; 而浙江省养殖群体体色杂, 体表附着物多, 且由于多年的养殖适应了本地的养殖环境, 生长速度快, 但耐低氧能力、抗病等能力弱。目前正在开展两群体的杂交育种工作, 初步试验表明, 杂交苗在体长增长、体重增长等方面显示出一定的杂种优势, 这对改良现有养殖罗氏沼虾的种质具有重要意义。

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] 甘西, 邓凤蛟, 陈晓汉, 等. 罗氏沼虾遗传多样性的 RAPD 研究[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 2000, 46(2): 215-218.
- [3] 史建华, 肖雨, 徐琴英. 罗氏沼虾引种复壮技术的研究[J]. 水产科技情报, 2001, 28(2): 64-67.
- [4] 李广丽, 朱春华. 罗氏沼虾个体发育早期的同工酶研究[J]. 水生生物学报, 2001, 25(4): 338-343.
- [5] 何忠效, 张树政. 电泳[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1999. 284-302.
- [6] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996. 140-163.
- [7] 李凌云, 张海琪, 钟爱华. 大黄鱼基因组 DNA 的提取及其 RAPD 分析条件的摸索[J]. 科技通报, 2002, 18(5): 368-373.
- [8] Williams J G K, Kubelik A, Livak K, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [9] 庄志猛, 孔杰, 石拓, 等. 日本对虾野生和养殖群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 自然科学进展, 2001, 11(3): 250-255.
- [10] Wachira F N, Waugh R, Hackett C A, et al. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers[J]. Genome, 1995, 38: 201-210.
- [11] 张国范, 王继红, 赵洪恩, 等. 皱纹盘鲍中国群体和日本群体自交与杂交 F₁ 的 RAPD 标记[J]. 海洋与湖泊, 2002, 33(5): 484-491.
- [12] Wang W J, Kong J, Bao Z M, et al. Isozyme variation in four populations of *Penaeus chinensis* shrimp[J]. Biodiversity Science, 2001, 9(3): 241-246.
- [13] 刘萍, 孔杰, 石拓, 等. 中国对虾黄渤海沿岸野生种群的 RAPD 分析[J]. 海洋与湖泊, 2000, 7(2): 86-89.
- [14] Sbordon V, Matthaes E D E, Cobolliabordoni M, et al. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda)[J]. Aquaculture, 1986, 57: 239-251.
- [15] 宋林生, 相建海, 李晨曦, 等. 日本对虾野生种群和养殖群体遗传结构的 RAPD 标记研究[J]. 海洋与湖泊, 1999, 30(3): 261-266.
- [16] Alcivar-Warren A, Overstreet R M, Dhar A K, et al. Genetic susceptibility of cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) to infection hypodermal and hematopoietic necrosis virus and *Baculovirus penaei*: Possible relationship with growth and metabolic gene expression[J]. J Invertebr Pathol, 1997, 70(3): 190-197.
- [17] 石拓, 孔杰, 刘萍, 等. 中国对虾遗传多样性的 RAPD 分析——朝鲜半岛西海岸群体的 DNA 多态性[J]. 海洋与湖泊, 1999, 30(6): 609-615.
- [18] Mulley J C, Latter B D. Genetic variation and evolutionary relationships within a group of thirteen species of penaeid prawns[J]. Evolution, 1980, 34: 904-916.
- [19] 黎中宝, 吴仲庆. 几种优良养殖对虾杂合性的比较研究[J]. 海洋科学, 2002, 26(12): 45-48.
- [20] Li Zhongbao, Wu Zhongqing. Study on genetic diversity of cultivated populations in 4 species of shrimps[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2003, 22(1): 97-101.

Genetic diversity analysis on Zhejiang cultured and Burma wild populations of *Macrobrachium rosenbergii* De Man

ZHANG Hai-qi¹, HE Zhong-yang¹, XU Xiao-lin¹, LI Ming-yun², DU Jian-ming¹

(1. Zhejiang Fisheries Introduction and Inbreeding Center, Hangzhou 310012, China; 2. Ocean and Fishery Department, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Genetic diversity analysis on the two populations of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* De Man) was investigated by morphologic method, enzyme electrophoresis and RAPD method. The samples of the wild population were introduced from Burma natural waters in May, 2002. The live materials of the cultured population were collected from Haining, Zhejiang. Morphological characteristics of the samples were measured using traditional methods. Eleven isozymes (LDH, SOD, G6PDH, ADH, ME, SDH, MDH, GDH, AKP, ACP and EST) were analyzed by vertical polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The buffer system: Tris-Gly (pH 8.3), voltage: 120 V 30–40 min in concentrated gel (3%, pH 6.7), 200 V 4 h in separated gel (7.5%, pH 8.9). The results showed that there were some differences between the two populations on their morphology, body color and growth. The eleven enzymes were coded by 25 genetic loci, of which four were found polymorphic in the wild population, while three in the cultured population. The proportion of polymorphic loci and mean heterozygosity of the wild and cultured population were 16% and 12%, 0.050 1 and 0.043 1, respectively. The genetic similarity and genetic distance of the two populations were 0.996 3 and 0.003 7 calculated by allelic frequencies.

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was also employed to detect the genetic variation of 20 inds from each population. The RAPD reactions were performed by 94 °C pre-denaturation for 4 min, 40 cycles of 94 °C denaturation for 1 min, 36 °C annealing for 1 min and 72 °C polymerization for 2 min. Complete extension was done by 72 °C for 8 min. Each primer used for the detection could produce 2–10 molecular markers. Amplification with 22 selected primers produced 139 distinctive and reproducible bands varying in length from 100 to 3 500 bp. There were 47 and 42 bands polymorphic, and the proportions of polymorphic loci in the wild population and the cultured were 33.81% and 30.22%, respectively. The Shannon index H_o of the wild population and the cultured one were 0.094 0 and 0.078 0 respectively. The mean genetic diversity of the two populations is 0.086 0, and more than 90% of which were detected among the populations. The genetic distance between the two populations was 0.120 6 calculated by the frequencies of RAPD loci.

The results from enzymes analysis and those from RAPD analysis showed that the genetic diversity of Burma wild population of *M. rosenbergii* was higher than that of Zhejiang cultured population. But, compared with other shrimps, the genetic diversity in the two populations of *M. rosenbergii* was low. The appropriate measurements should be conducted in the shrimp aquaculture. The way to improve the germplasm resource of the cultured *M. rosenbergii* was also discussed.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; genetic diversity; enzyme; RAPD