

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)不同世代养殖群体的遗传多样性分析*

童馨^{1,2} 龚世圆² 喻达辉¹ 黄桂菊¹ 杜博¹ 李色东³

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 广州 510300; 2. 华中农业大学水产学院 武汉 430072;
3. 湛江市水产研究所 湛江 524039)

提要 采用微卫星位点对凡纳滨对虾的海南群体(进口亲虾繁育的第 1 世代: G1)、山东和饶平群体(G2)、湛江 2 和湛江 3 群体(G3)、湛江 1 和上海群体(G4)共 4 个世代 7 个养殖群体的遗传多样性进行了分析。从 21 对微卫星引物中筛选出 12 对有效扩增引物, 对 7 个群体共 280 个个体进行扩增, 得到 10 个多态位点, 共获得等位基因数 63 个。各位点的等位基因数在 2—15 个之间, 各群体的平均等位基因数在 4.70—5.80 之间。平均观测(期望)杂合度在 0.36—0.43(0.53—0.65)之间。杂合子偏离指数(D)为负值, 表明存在杂合子缺失现象。对 7 个群体、10 个多态位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检测, 共有 54 个偏离平衡。对 7 个群体间的遗传分化水平进行检测, 得到近交系数 F_{IS} 在 9 个多态位点均为正值, 两两群体间的固定指数 F_{ST} 值在 0.149—0.375 之间。 F_{ST} 显著性检验表明, 各群体之间的遗传分化极显著($P < 0.01$)。分子方差分析结果显示, 大部分遗传变异(72.17%)来自于群体内, 来自于群体间的遗传变异(27.83%)较小。凡纳滨对虾不同世代间遗传变异大, 随着繁育世代的增加, 遗传多样性降低。

关键词 凡纳滨对虾, 微卫星 DNA, 遗传分化, 杂合子缺失
中图分类号 S968.22

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)已经在我国实现了大规模养殖, 2007 年仅广东省的养殖产量就达 25 万 t, 产值 56.1 亿元, 出口 10.9 万 t, 创汇 6.1 亿美元, 居全国首位。但近年来, 各种外来病毒相继入侵, 使我国凡纳滨对虾产业遭受了重大打击(Briggs *et al.*, 2004)。目前, 我国凡纳滨对虾养殖存在种质退化、生长性状衰退、易感染病毒等问题。由于我国养殖的凡纳滨对虾为进口的选育品种, 用其后代进行多代繁殖提供种苗, 以减少进口亲虾的用量来降低成本。因此对不同繁殖世代的群体遗传多样性进行研究, 无论是对凡纳滨对虾养殖种群遗传资源的管理, 还是对以进口亲虾为亲本开展遗传育种都具有重要的意义。微卫星标记是遗传多样性分析的重要手段(Liu *et al.*, 2004), 已被广泛应用于凡纳滨对虾遗传多样性研

究(Benzie, 2000; Xu *et al.*, 2001; Supungul *et al.*, 2002; Brooker *et al.*, 2000; Tassanakajon *et al.*, 1998; Jimenez *et al.*, 2005)。本研究中采用微卫星分子标记对我国凡纳滨对虾 4 个世代的 7 个养殖群体的遗传多样性进行分析, 以期对凡纳滨对虾的遗传资源管理和遗传改良提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

凡纳滨对虾样品共 1150 尾, 为 7 个人工养殖群体, 分别于 2005 年 9 月—2006 年 4 月采于广东省湛江市 863 亲虾培育基地(3 个群体: 湛江 1、湛江 2、湛江 3), 样品数依次为 200 尾、200 尾、100 尾; 广东省饶平县柘林镇(饶平群体), 样品数 200 尾; 海南琼

* 广东省科技计划重点项目, 2004A20105002 号。童馨, 硕士, E-mail: weshighway@yahoo.com.cn

通讯作者: 喻达辉, 博士, 研究员, E-mail: pearlydh@163.com

收稿日期: 2008-03-29, 收修改稿日期: 2008-05-27

海(海南群体), 样品数 50 尾; 山东青岛(山东群体), 样品数 200 尾; 上海金山(上海群体), 样品数 200 尾。其中海南群体为进口亲虾繁育的第 1 代(G1); 饶平群体和山东群体为第 2 代(G2); 湛江 2 和湛江 3 群体为第 3 代(G3); 湛江 1 和上海群体为第 4 代(G4)。样品用 90% 的酒精固定保存。

1.2 基因组 DNA 的提取

进行种群遗传学分析时, 一个群体的样本容量应该大于 30 (Silvia *et al.*, 2000), 本研究从每个群体中随机挑选 40 尾样品。DNA 的提取参照王小玉等(2006), 取 25mg 肌肉组织, 用双蒸水洗 2 次, 加 400 μ l TEN9 (50mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 100mmol/L EDTA, 200mmol/L NaCl)裂解液, 剪碎。再加入 100 μ l TEN9 裂解液、150 μ l 10% SDS 和 10mg/ml 10 μ l 蛋白酶 K, 56 消化 2h。分别用等体积饱和酚抽提 1 次, 酚、氯仿、异戊醇(25:24:1)抽提 2 次, 氯仿-异戊醇(24:1)抽提 1 次。加入 2 倍体积无水乙醇和 0.1 体积 3mol/L NaAc (pH 5.2), -20 沉淀 2h。70%乙醇洗涤 2 次。干燥后, 加 100 μ l 灭菌双蒸水溶解, 1%琼脂糖凝胶电泳检测。提取的 DNA 放于 4 保存备用。

1.3 微卫星 PCR 反应和电泳检测

用 21 对微卫星引物(Meehan *et al.*, 2003)对提取的 DNA 样品进行聚合酶链式反应(PCR)扩增。PCR 扩增体系如下: 总体积 20 μ l, 包括: 10 \times PCR buffer 2 μ l, 10mmol/L dNTP 0.4 μ l, 25mmol/L Mg²⁺ 2 μ l, 微卫星引物各 0.5 μ l, *Taq* 酶 0.2 μ l, 50ng DNA 模板共 2.5 μ l, ddH₂O 11.9 μ l。

PCR 扩增程序参照文献(Meehan *et al.*, 2003)略有修改: 95 变性 5min, 然后 35 个循环: 95 变性 1min, 退火 1min, 72 延伸 1min, 最后 72 延伸 10min, 各引物的退火温度见表 1。PCR 扩增产物用 5%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染法染色检测。

1.4 数据分析

对电泳谱带进行分析, 记录每一位点不同个体的等位基因和基因型。用 Popgene1.32 软件计算每个群体的等位基因数(A)、有效等位基因数(A_e)、观察杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e), 通过各位点的基因型频率对 7 个群体进行 Hardy-Weinberg 平衡分析。利用 Genepop3.4 软件(Raymond *et al.*, 1995)计算 7 个养殖

群体在 10 个多态位点的近交系数 F_{IS} , 用 Arlequin 2.0 软件(Schneider *et al.*, 2000)¹⁾计算分化指数 F_{ST} , 估计群体间的遗传分化, 分析群体内和群体间的分子方差(Analysis of Molecular Variance, AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992)。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

从随机挑选的 21 对凡纳滨对虾微卫星引物中, 筛选出 12 对有效扩增引物(表 1)。用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 得到清晰谱带。其中位点 TUMXLv7.74 和 TUMXLv8.25 呈单态, 其余 10 个位点为多态。

2.2 遗传多态性分析

7 个凡纳滨对虾养殖群体在 10 个多态位点上共检测出 63 个等位基因。每个位点扩增的等位基因数量在 2—15 之间(表 2)。位点 M1 在 7 个群体中的等位基因数最多, 共有 15 个(表 2)。7 个群体中, 海南群体的平均等位基因数最多, 为 5.80 个, 上海群体最少, 只有 4.70 个。7 个群体的平均观测杂合度在 0.36—0.46 之间, 期望杂合度在 0.53—0.65 之间, 平均杂合子偏离指数均为负值, 表明存在杂合子缺失现象。

对 7 个群体、10 个多态位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检测, 发现检测的 70 个数据(7 个群体 \times 10 个位点)中, 有 54 个偏离遗传平衡状态(表 2)。

2.3 遗传分化分析

除 TUMXLv6.63 位点外, 其余 9 个多态位点近交系数 F_{IS} 值均为正值(表 3), 表明 7 个种群的近交程度比较严重。群体间各位点遗传分化(F_{ST})值在 0.018—0.684 之间(表 3), 显著性检验表明, 7 个养殖群体在 10 个多态位点表现出显著的遗传分化。

对两两群体间的遗传分化水平进行检测 (Schneider *et al.*, 2000)¹⁾, 得到固定指数 F_{ST} 值在 0.149—0.375 之间(表 4), 显著性检验表明, 各群体之间的遗传分化极显著($P < 0.01$)。

对凡纳滨对虾 7 个养殖群体进行分子方差分析, 发现超过 72% 的遗传变异来自群体内, 群体间的变异为 27.8%(表 5), 群体内的遗传变异大于群体间的遗传变异。

1) Schneider S, Roessli D, Excoffier L, 2000. Arlequin version 2.000: A Software for Population Genetics Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory University of Geneva, Switzerland

表 1 12 对有效扩增的微卫星引物
Tab.1 Twelve pairs of microsatellite primers effective for PCR amplification

微卫星位点	GenBank 注册号	引物序列(5'—3')	退火温度()
TUMXLv3.1	AF360017	F: TAAAACCGAAAAGACAATGGCG R: CTGACATTGCGTTATGATTGG	58
TUMXLv5.27	AF360022	F: CAGACCCTAAATCTCCGTGC R: TGGAAAGGTCAGAGGTCACG	54
TUMXLv5.66	AF360027	F: GGGGCACTGAGACGAGTAAAG R: CCGTTTTATCAGTCTCCATATACGA	60
TUMXLv6.63	AF360040	F: TGTGAAGGTGTGTGAACGTG R: CTGCAACCTTGGTCTTGC	52
TUMXLv6.124	AF360029	F: GAAGTGCTTCAGTTGGCGAC R: CCGGATATCTGTTGCGTTTC	58
TuMXLv7.74	AF360056	F: CCTGCGCAATACTGGATATG R: CGAGGTGTAGTTGTGCTTTGG	54
TUMXLv7.97	AF360057	F: TGTCGTTAGTGCAGCTCATTC R: GGGGAGGAATAAGAGGAAAAGG	52
TUMXLv8.25	AF360075	F: ATTCTTTGTGTTTCTTCGCC R: CGTCCCTGAACTTTATCTCC	52
TUMXLv8.32	AF360080	F: TTACCGCCTAAGAGCGAATG R: CGTCCCTGAACTTTATCTCC	52
TUMXLv8.193	AF360069	F: GATGTACACAACCTGTACTCG R: GAGATGATAAGAGAACGAAAAG	52
TUMXLv8.256	AF360076	F: GGAATCACACTTCTGGTTC R: GGCTGCACCTTGTAAAGTC	55
M1	—	MIR: CTAACCCAATATCGAATC B202FB: CTAACCCAATATCGAATC	52

表 2 凡纳滨对虾 4 个世代 7 个养殖群体的遗传变异

Tab.2 Genetic variation at 10 microsatellite loci in four generations of seven cultured stocks of Pacific white shrimp *L. vannamei*

位点	参数	群体和世代						
		海南(G1)	山东(G2)	饶平(G2)	湛江 2(G3)	湛江 3(G3)	湛江 1(G4)	上海(G4)
TUMXLv3.1	A	8	8	7	7	8	8	7
	A_e	5.44	4.82	4.86	3.87	4.56	4.35	5.28
	H_o	0.51	0.72	0.48	0.50	0.56	0.50	0.59
	H_e	0.62	0.80	0.63	0.76	0.73	0.78	0.82
	D	- 0.16	- 0.11	- 0.25	- 0.34	- 0.23	- 0.36	- 0.29
	HWE	**	**	ns	**	**	**	**
TUMXLv5.27	A	5	5	5	5	5	5	5
	A_e	4.74	4.26	4.39	4.08	4.13	3.70	4.21
	H_o	0.20	0.53	0.54	0.32	0.30	0.26	0.58
	H_e	0.45	0.80	0.70	0.42	0.51	0.66	0.78
	D	- 0.56	- 0.23	- 0.22	- 0.25	- 0.41	- 0.61	- 0.27
	HWE	**	**	**	**	**	**	ns
TUMXLv5.66	A	5	4	4	4	4	4	4
	A_e	3.23	3.03	2.90	2.89	2.99	2.45	2.82
	H_o	0.10	0.13	0.46	0.33	0.38	0.37	0.37
	H_e	0.21	0.53	0.50	0.68	0.63	0.62	0.70
	D	- 0.53	- 0.76	- 0.08	- 0.52	- 0.41	- 0.41	- 0.47
	HWE	**	**	**	**	**	**	**
TUMXLv6.63	A	4	4	4	4	4	4	3
	A_e	3.48	3.31	2.65	3.06	3.03	2.84	1.81
	H_o	0.70	0.69	0.43	0.38	0.50	0.63	0.20

续表

位点	参数	群体和世代						
		海南(G1)	山东(G2)	饶平(G2)	湛江 2(G3)	湛江 3(G3)	湛江 1(G4)	上海(G4)
TUMXLv6.63	<i>A</i>	4	4	4	4	4	4	3
	<i>H_e</i>	0.62	0.58	0.42	0.68	0.68	0.67	0.46
	<i>D</i>	0.12	0.20	0.02	- 0.45	- 0.26	- 0.06	- 0.56
	<i>HWE</i>	**	**	ns	ns	**	ns	**
TUMXLv6.124	<i>A</i>	2	2	2	2	2	2	2
	<i>A_e</i>	1.97	1.85	2.00	1.96	1.94	1.98	1.98
	<i>H_o</i>	0.48	0.41	0.68	0.60	0.58	0.68	0.59
	<i>H_e</i>	0.50	0.49	0.52	0.49	0.49	0.52	0.50
	<i>D</i>	- 0.05	- 0.16	0.31	- 0.21	0.17	0.31	0.18
	<i>HWE</i>	ns	ns	**	ns	ns	*	ns
TUMXLv7.97	<i>A</i>	5	5	5	5	3	5	5
	<i>A_e</i>	3.34	2.96	3.28	2.79	2.83	2.07	1.75
	<i>H_o</i>	0.23	0.35	0.25	0.24	0.33	0.53	0.31
	<i>H_e</i>	0.28	0.50	0.59	0.67	0.66	0.53	0.45
	<i>D</i>	- 0.18	- 0.30	- 0.41	- 0.65	- 0.05	0.00	- 0.32
	<i>HWE</i>	**	**	**	**	**	ns	**
TUMXLv8.32	<i>A</i>	4	4	4	3	3	3	3
	<i>A_e</i>	2.35	2.29	2.25	2.18	1.89	1.64	1.23
	<i>H_o</i>	0.45	0.42	0.02	0.00	0.18	0.15	0.15
	<i>H_e</i>	0.62	0.59	0.29	0.18	0.19	0.42	0.21
	<i>D</i>	- 0.27	- 0.28	- 0.93	- 1.00	- 0.06	- 0.64	- 0.29
	<i>HWE</i>	*	*	**	**	ns	**	ns
TUMXLv8.193	<i>A</i>	4	4	4	4	3	3	3
	<i>A_e</i>	2.37	2.37	2.07	1.84	1.86	1.77	2.02
	<i>H_o</i>	0.78	0.54	0.35	0.43	0.05	0.53	0.31
	<i>H_e</i>	0.58	0.58	0.54	0.63	0.23	0.44	0.62
	<i>D</i>	0.33	- 0.07	- 0.35	- 0.33	- 0.74	0.20	- 0.50
	<i>HWE</i>	*	ns	ns	*	**	ns	**
TUMXLv8.256	<i>A</i>	6	6	6	6	6	5	6
	<i>A_e</i>	4.95	4.88	4.80	3.44	3.49	2.52	3.18
	<i>H_o</i>	0.40	0.53	0.40	0.24	0.43	0.21	0.46
	<i>H_e</i>	0.73	0.81	0.58	0.31	0.61	0.61	0.78
	<i>D</i>	0.22	- 0.35	- 0.31	- 0.67	- 0.11	- 0.30	- 0.41
	<i>HWE</i>	**	**	**	**	**	**	**
M1	<i>A</i>	15	14	14	13	14	12	9
	<i>A_e</i>	11.68	10.69	10.91	10.08	9.88	9.54	7.94
	<i>H_o</i>	0.43	0.44	0.69	0.59	0.45	0.64	0.21
	<i>H_e</i>	0.72	0.93	0.90	0.85	0.67	0.89	0.88
	<i>D</i>	- 0.40	- 0.53	- 0.23	- 0.30	- 0.33	- 0.28	- 0.76
	<i>HWE</i>	**	**	**	**	**	**	**
平均值	<i>A</i>	5.80	5.60	5.50	5.30	5.20	5.10	4.70
	<i>A_e</i>	4.36	4.05	3.01	3.62	3.46	3.29	3.42
	<i>H_o</i>	0.43	0.46	0.43	0.36	0.39	0.45	0.41
	<i>H_e</i>	0.53	0.65	0.56	0.57	0.54	0.61	0.62
	<i>D</i>	- 0.15	- 0.26	- 0.25	- 0.47	- 0.24	- 0.22	- 0.37
	<i>HWE</i>	**	**	**	**	**	**	**

注: *A* 为等位基因数, *A_e* 为有效等位基因数, *H_o* 为观测杂合度, *H_e* 为期望杂合度, *D* 为杂合度偏离指数, *HWE* 为哈代-温伯格平衡检测。
 ns: 差异不显著 ($P > 0.05$); *: 差异显著 ($P < 0.05$); **: 差异极显著 ($P < 0.01$)

表 3 凡纳滨对虾 7 个养殖群体在 10 个微卫星位点的近交系数和遗传分化

Tab.3 Inbreeding coefficient and differentiation of seven cultured stocks of Pacific white shrimp *L. vannamei* at 10 microsatellite loci

位点	F_{IS}	F_{ST}
TUMXLv3.1	0.244	0.120
TUMXLv5.27	0.349	0.082
TUMXLv5.66	0.127	0.079
TUMXLv6.63	- 0.166	0.018
TUMXLv6.124	0.382	0.312
TUMXLv7.97	0.439	0.201
TUMXLv8.32	0.287	0.233
TUMXLv8.193	0.370	0.684
TUMXLv8.256	0.160	0.094
M1	0.373	0.108
总计	0.252	0.222

3 讨论

Barker(1994)认为, 带有 4 个或 4 个以上等位基因的微卫星位点对于物种的遗传进化具有一定的贡献。10 个多态位点中, 等位基因数在 2—15 个之间, 与 Jimenez 等(2005)的结果(2—13 个)相似, 低于其他相关报道(Benzie, 2000; Xu *et al.*, 2001; Supungul *et al.*, 2002; Brooker *et al.*, 2000; Tassanakajon *et al.*, 1998), 高于等位酶分析得到的结果(Benzie, 2000), 其中有 9 个位点含有 4 个或 4 个以上的等位基因, 表明这 9 个微卫星位点作为遗传标记, 适于对凡纳滨对虾群体

的遗传变异进行分析。其中位点 M1 的等位基因比较多, 在各群体产生的等位基因数为 9—15 个, 而 Wolfus 等(1997)在 M1 位点得到 2—23 个等位基因。

7 个群体中, 海南群体作为进口虾苗繁育的第 1 代, 其平均等位基因数和平均有效等位基因数最多, 然后为繁育的第 2 代(山东、饶平群体)、第 3 代(湛江 2、湛江 3 群体), 最后为第四代(湛江 1、上海群体), 表明随着繁育世代的增加, 凡纳滨对虾养殖群体的遗传多样性逐渐降低。生长性状分析结果显示, 随着繁育世代的增加, 生长性状(体长和体重)的变异系数也随之增加, 体长和体重的分布参差不齐, 繁育的后代出现性状分离(童馨等, 2007)。因此遗传选育应以进口亲虾繁育第 1 代作为育种材料, 最好是用原产地的野生亲虾。

对 7 个群体、10 个多态位点进行 Hardy-Weinberg 检测, 得到的 70 个数据(7 个群体 \times 10 个位点)中, 有 54 个偏离平衡状态, 与 Jimenez 等(2005)的结果(20 个数据有 19 个偏离平衡状态)、Supungul 等(2002)的结果(25 个数据有 19 个偏离平衡状态)和 Xu 等(2001)的结果(24 个数据中有 8 个偏离平衡状态)相似。由于我国凡纳滨对虾养殖依赖国外进口, 成本很高, 引进的亲虾数量少, 群体规模较小, 在多代的人工养殖和选育中, 可能产生遗传漂变和瓶颈效应, 导致等位基因频率的改变, 因此遗传漂变和人工选择可能是引起凡纳滨对虾群体在大部分位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡的主要原因。

表 4 凡纳滨对虾 7 个养殖群体的遗传分化

Tab.4 Pairwise F_{ST} estimates among seven cultured stocks of Pacific white shrimp *L. vannamei*

群体和世代	海南(G1)	山东(G2)	饶平(G2)	湛江 2(G3)	湛江 3(G3)	湛江 1(G4)
山东(G2)	0.290	—	—	—	—	—
饶平(G2)	0.198	0.289	—	—	—	—
湛江 2(G3)	0.317	0.207	0.352	—	—	—
湛江 3(G3)	0.348	0.200	0.363	0.235	—	—
湛江 1(G4)	0.320	0.210	0.250	0.277	0.149	—
上海(G4)	0.288	0.297	0.195	0.352	0.375	0.246

表 5 凡纳滨对虾 7 个养殖群体的分子方差分析

Tab.5 AMOVA of seven cultured stocks of Pacific white shrimp *L. vannamei*

变异来源	自由度(d.f.)	平方和	方差组成	变异百分比
种群间	6	326.01	0.66	27.8
种群内	553	943.56	1.71	72.2
合计	559	1269.57	2.36	100.0

观察杂合度水平($H_o = 0.36—0.46$)的统计结果也高于等位酶分析(Brooker *et al.*, 2000; Sunden *et al.*, 1991; Garcia *et al.*, 1994), 低于 Wolfus 等(1997)分析的结果。统计分析显示, 除个别位点外, 观察杂合度在数值上均低于期望杂合度, D 值为负, 7 个养殖群体存在杂合子缺失现象, 与 Jimenez 等(2005)的研究结果一致, 与 Wolfus 等(1997)报道的结果相反。杂合子缺失现象也在其他物种中被发现(Fujio *et al.*, 1989; Gaffney *et al.*, 1990; Zouros *et al.*, 1984; 杨锐等, 2000)。杂合子缺失会导致纯合子增加, 近交衰退机率增高, 从而降低物种适应环境变化的能力(杨锐等, 2000)。本研究中各群体的近交系数绝大部分都很高, 除 TUMXLv6.63 位点外, 其余 9 个多态位点中, 近交系数 F_{IS} 值为正, 7 个群体的平均杂合基因型比例显著降低, 表明杂合子缺失可能与近亲交配有关。

F_{ST} 值检测结果显示 7 个群体之间存在显著的遗传差异, 表现出群体间较高的遗传分化水平(Hartl *et al.*, 1997), 与 Jimenez 等(2005)对凡纳滨对虾 4 个不同地理群体检测的结果一致, 在太平洋鲍群体中也有类似现象(Li *et al.*, 2004), 表明不同世代养殖群体之间遗传差异较大。

参 考 文 献

- 王小玉, 喻达辉, 郭奕惠等, 2006. 7 种珍珠贝 RAPD 鉴别标记的初步研究. 南方水产, 2(1): 18—22
- 杨 锐, 喻子牛, 2000. 山东沿海褶牡蛎与太平洋牡蛎等位基因酶的遗传变异. 水产学报, 24(2): 130—133
- 童 馨, 龚世圆, 喻达辉等, 2007. 凡纳滨对虾不同世代生长性状的变异. 南方水产, 3(6): 30—33
- Barker J S F, 1994. A Global Protocol for Determining Genetic Distances Among Domestic Livestock Breeds. In: Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Guelph, Ontario, Canada, 21(3): 201—208
- Benzie J A H, 2000. Population genetic structure in penaeid prawns. Aquaculture Research, 30(2): 95—119
- Briggs M, Funge-Smith S, Subasinghe R *et al.*, 2004. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific // Briggs M. Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific. Bangkok: RAP publication. <http://www.fao.org/docrep/007/ad505e/ad505e00.htm>, 1—120
- Brooker A L, Benzie J A H, Blair D *et al.*, 2000. Population structure of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* in Australian waters, determined using microsatellite markers. Marine Biology, 136(3): 149—157
- Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 13(3): 479—491
- Fujio Y, Oniwa K, Yuzawa A *et al.*, 1989. Genetic variability and population structure in abalone. In: Japan Fisheries Resource Conversation Association (ed) // Fujio Y. Genetic Assessment Project Report in 1985—1988. Japan Fisheries Resource Conversation Association, Tokyo, 459—476
- Gaffney P M, Scott T M, Koehn R K *et al.*, 1990. Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiencies in the coot clam, *Mulinia lateralis*. Genetics, 124(1): 687—699
- Garcia D K, Faggart M A, Rhoades L *et al.*, 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3(5): 270—280
- Hartl D L, Clark A G, 1997. Principles of Population Genetics, 3rd edn. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1—542
- Jimenez R V, Cruz P, Enriquez R P, 2005. Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: microsatellite DNA variation. Marine Biotechnology, 6(1): 475—484
- Li Q, Park C, Endo T *et al.*, 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). Aquaculture, (5): 207—222
- Liu Z J, Cordes J F, 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture, 238: 1—37
- Meehan D, Xu Z K, Zuniga G *et al.*, 2003. High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [Crustacea: Decapoda]. Marine Biotechnology, 5(3): 311—330
- Raymond M, Rousset F, 1995. An exact test for population differentiation. Evolution, 49(6): 1280—1283
- Silvia E P, Russo C A M, 2000. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. Hydrobiologia, 420(1): 119—135
- Sunden S L F, Davis S K, 1991. Evaluation of genetic variation in a domestic population of *Penaeus vannamei* (Boone): a comparison with three natural populations. Aquaculture, 97(1): 131—142
- Supungul P, Klinbunga S, Pichyangkura R *et al.*, 2002. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Marine Biotechnology, 4(5): 487—494
- Tassanakajon A, Tiptawonnukul A, Supungul P *et al.*, 1998. Genetic structure in wild populations of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using randomly amplified polymorphic DNA analysis. Journal of Marine Biotechnology, 6(4): 249—254
- Wolfus G M, Garcia D K, Alcivar-Warren A A, 1997. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diver-

- sity in shrimp breeding programs. *Aquaculture*, 152(2): 35—47
- Xu Z, Primavera J H, Pena L D *et al*, 2001. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture*, 199(3): 13—40
- Zouros E, Foltz D W, 1984. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks. *Malacologia*, 25(2): 541—583

GENETIC DIVERSITY OF CULTURED PACIFIC WHITE SHRIMP (*LITOPENAEUS VANNAMEI*) STOCKS OF DIFFERENT GENERATIONS IN CHINA

TONG Xin^{1,2}, GONG Shi-Yuan², YU Da-Hui¹, HUANG Gui-Ju¹, DU Bo¹, LI Se-Dong³

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, 510300;

2. Fisheries College of Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430072;

3. Zhanjiang Fisheries Research Institute, Zhangjiang, 524039)

Abstract The genetic diversity of seven cultured Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* stocks of four generations in China was investigated using microsatellite DNA. Twelve pairs of primers were screened out from 21 pairs based on effective amplification. Using the 12 microsatellite loci, ten polymorphic loci were obtained and the percentage of polymorphic loci was 83.33%. At the ten polymorphic loci, the total allele number was 63. Average allele number varied from 2 to 15 for each locus, and from 4.70 to 5.80 for each stock. The mean observed (expected) heterozygosity varied from 0.36 (0.53) to 0.43 (0.65). The mean value of D (heterozygote deficiency of excess) was negative, indicating an overall deficit of heterozygotes for the seven cultured stocks. 54 out of 70 cases (7 stock 10 loci) were detected for significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. F_{IS} values was positive at nine loci. Pairwise F_{ST} values ranged from 0.149 to 0.375 and all pairs of stocks are significantly differentiated. AMOVA indicated that the genetic variation among stocks (27.83%) is lower than that within stocks (72.17%). Genetic difference between generations was obvious, and showed a tendency of decrease from generation to generation.

Key words Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Microsatellite DNA, Genetic differentiation, Deficiency of heterozygote