

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00072

日本沼虾 ITS1 序列分析及 SNPs 位点的筛选

张洪伟¹ 傅洪拓^{1,2} 吴 滢² 龚永生² 王 庆¹ 夏德全^{1,2}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 无锡 214081)

摘要: 研究采用直接测序法, 分析日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*) rDNA 基因内转录间隔区 ITS1 的 DNA 序列, 以筛选日本沼虾 SNPs 位点。共分析了 32 个太湖水域野生日本沼虾样本, 结果表明, 日本沼虾 ITS1 序列平均长度为 1749.8 bp, 是迄今已报道的最长的 ITS1 序列, A、G、T 和 C 的平均含量分别为 29.9%、28.3%、27.7%、14.0%, G+C 的含量平均为 42.3%。通过序列比对, 共筛选出 22 个 SNPs 位点, SNPs 位点出现频率为 0.0126, 其中 9 个为 C/T 转换(占 40.91%), 4 个为 A/G 转换(占 18.18%), 2 个为 A/T 颠换(占 9.09%), 5 个为 T/G 颠换(占 22.73%), 1 个为 A/C 颠换(占 4.55%), 1 个 A/T 或 C 颠换(占 4.55%)。日本沼虾 ITS1 序列的 22 个 SNP 位点中, 21 个位点为 2 个等位基因, 1 个位点出现了 3 个等位基因, 为复等位基因位点。日本沼虾 ITS1 序列中还发现 3 个具有多态性的微卫星位点、1 个高度变异区以及大量的缺失、插入。研究首次对日本沼虾 ITS1 序列进行了分析, 并发现了大量的 SNP 位点, 为日本沼虾遗传育种研究提供了新的分子标记。

关键词: 日本沼虾; rDNA; 内转录间隔区; ITS; 单核苷酸多态性; SNP

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2010)01-0072-06

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*), 俗称青虾, 是我国重要的淡水养殖虾类。但近年来, 日本沼虾出现了品种退化现象, 包括性早熟、规格变小、商品率降低、抗病能力下降等^[1], 严重影响了日本沼虾养殖业的效益, 迫切需要对日本沼虾进行资源保护和遗传改良。开发日本沼虾分子遗传学标记, 并对其进行遗传背景分析, 则是资源保护和遗传改良的基础。

单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)是指由于单个核苷酸的替换而引起的多态性, SNPs 以其含量丰富和稳定遗传而逐步得到关注; 同时由于 SNPs 检测和分析技术的飞速发展, 特别是与 DNA 微阵列和芯片技术相结合, 使其迅速成为继 RFLP 和微卫星标记之后最有发展前途的第三代分子标记技术^[2]。SNP 分子标记已在鱼、虾、

蟹、贝等水产动物中得到了研究和应用, 已报道的应用包括亲缘关系分析、遗传多样性调查、QTL 定位、分子标记辅助选育等方面^[2-16]。凌去非等^[11]采用测序法进行了丁鲶不同群体 ITS1 区序列分析, ITS1 和较为保守的 18S rDNA 区域均存在 SNP。Smith, *et al.*^[13]用已建立的快速、高通量技术检测在阿拉斯加雪蟹渔场非法获得的革蟹, 将一个以在核 rRNA ITS1 区和线粒体 16S rRNA 基因中的 SNP 为基础的快速、高通量技术应用于鉴别雪蟹和革蟹中, 这些 SNPs 也能用于推测杂交方向。迄今未见有关日本沼虾等沼虾类 SNPs 研究的报道。本文拟采用直接测序法, 分析日本沼虾 rDNA 基因内转录间隔区 ITS1 的 DNA 序列, 筛选日本沼虾 SNPs 位点, 为日本沼虾的遗传育种研究提供新的分子标记。

收稿日期: 2008-04-29, 修订日期: 2009-03-12

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD01A13; 2006BAD03B07); 农业部农业科技跨越计划; 江苏省高技术研究项目(BG2007328)资助

作者简介: 张洪伟(1973—), 男, 朝鲜族, 哈尔滨人; 博士生; 研究方向为水产动物遗传育种。E-mail: zhanghw_2008@yahoo.cn

通讯作者: 傅洪拓(1964—), 男, 长沙人, 研究员, 博士生导师; 研究方向为水生动物遗传育种。E-mail: fuht@mail.ffrc.cn

1 材料与方法

1.1 材料

用于分析的日本沼虾为采自太湖的野生成虾, 活体取样或采样后浸泡于 95% 的酒精中备用, 共采集了 32 个样本。

1.2 基因组 DNA 提取

基因组 DNA 的提取参照《分子克隆实验指南》^[17] 的方法, 并有所改进。主要过程为: 取虾背部肌肉组织各 100 mg 放入 1.5 mL 的离心管中, 加入 450 μ L 的 SET 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 1 mmol/L EDTA, pH8.0), 剪碎, 再加入终浓度分别为 0.5% 的 SDS 和 200 ng/ μ L 的蛋白酶 K。上述混合物于 55 $^{\circ}$ C 消化 3h 左右至溶液澄清透明后, 加入 1 μ L 的 RNA 酶于 37 $^{\circ}$ C 消化 30min, 消化物经酚/氯仿抽提, 酒精沉淀。提取的 DNA 经 70% 的乙醇洗涤, 室温干燥后, 溶于适量 ddH₂O 中, 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。DNA 浓度通过紫外分光光度计和电泳-EB 染色的荧光强度双重测定。

1.3 扩增引物

#1 引物: GTAAAGTCGTAACAAGG 和 TCCTCCGCTWAWTGATATGC

#2 引物: TGYGAAGTGCAGGACACA 和 TGTGTCCTGCAGTTCRCA

#3 引物: CACACCGCCGTCGCTACTA 和 ATTTAGCTGCGGTCTTCATC

#1 和 #2 引物分别是采用了克氏螯虾的 ITS1 和 ITS2 引物^[18], #3 引物为蟹类等甲壳类用的 ITS1 引物^[19]。

1.4 PCR 扩增

Taq DNA 聚合酶和 dNTPs 购自上海申能博彩生物公司, PCR 反应在 ABI9600 PCR 仪上进行。以全 DNA 为模板, 用上述特异性引物进行 PCR 扩增, 反应体系为 25 μ L, 如: 2.5 μ L 10 \times buffer, 1.0 μ L dNTPs (2.5 mmol/L), 2.0 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 正反向引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 0.5 μ L Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L), 1.0 μ L 模板 DNA (20 μ g/mL), 超纯水补至 25 μ L。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 90s; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 56.8 $^{\circ}$ C 复性 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20s, 共进行 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

1.5 PCR 产物纯化、克隆及测序

用上海生工的 UNIQ-10 柱式胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物, 将回收纯化的产物与大连宝生物的

pMD18-T 载体连接, 然后转化到大肠杆菌 DH5 感受态细胞中, 利用白斑筛选阳性克隆。随机挑选白色单菌落于液体培养基中培养过夜, 用上海生工的 UNIQ-10 柱式质粒抽提试剂盒提取质粒。序列测定采用 M13 通用引物在 Beckman CEQ8000 遗传分析仪上进行, 每个样本测定 1 次。中间引物根据正反方向的测序结果, 通过 DNASTar 软件设计而成。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.6 数据处理

采用 MEGA3.1 软件对所测序列进行序列比对分析, 确定 SNP 位点及类型, 对碱基含量、重复序列、缺失和插入进行分析, 并计算 SNP 位点出现频率以及等位基因频率。

SNP 位点出现频率 = SNP 位点数/序列长度

SNP 等位基因频率 = 表现为某个等位基因的样本数/总样本数

2 结 果

2.1 日本沼虾 ITS1 扩增引物的筛选

日本沼虾样品抽提 DNA, 用 #2 引物未扩增出产物, #1 和 #3 引物扩增出一条特异性电泳条带, 相比较而言, #3 引物比 #1 引物扩增出来的条带更亮, 说明 #3 引物扩增的产物浓度更高, 故以后的实验均采用 #3 引物来扩增。32 个样品经 #3 引物扩增, 都有一条清晰的特异性条带, 扩增出来的片段分子量在 1600—1900 bp 左右, 由于 #3 引物系蟹类等甲壳类用的 ITS1 引物^[19], 与虾蟹类等进行同源性比较, 同刀额新对虾同源性为 98%, 因此, 本文所扩增出的 DNA 片段应为 ITS1 序列。

2.2 日本沼虾 ITS1 序列测定

共测定了 32 个样品的 ITS1 序列, 碱基长度 1686—1900 bp, 平均长度 1749.8 bp; A、G、T 和 C 的平均含量分别为 29.9%、28.3%、27.7% 和 14.0%, G+C 的平均含量为 42.3%, A、G、T、C 四种碱基的含量在个体之间存在一定差异 (表 1)。利用 MEGA3.1 软件对 32 个样品的 ITS1 全序列进行分析统计, 合成了日本沼虾 ITS1 的标准序列, 长度为 2046 bp (GenBank 登录号: EU346851.1)。

2.3 日本沼虾 ITS1 序列中的 SNPs 位点

32 个样本 ITS1 序列平均长度为 1749.8 bp 的 ITS1 序列。通过序列比对, 共发现 22 个 SNPs 位点, SNPs 位点出现频率为 0.0126, 即平均每 100 bp 中出

现 1.26 个 SNP 位点。日本沼虾 ITS1 序列的 22 个 SNPs 中, 9 个为 C/T 转换(占 40.91%), 4 个为 A/G 转换(占 18.18%), 2 个为 A/T 颠换(占 9.09%), 5 个为 T/G 颠换(占 22.73%), 1 个为 A/C 颠换(占 4.55%), 1 个 A/T 或 C 颠换(占 4.55%)。日本沼虾 ITS1 序列的 22 个 SNP 位点中, 21 个为二等位基因, 1 个为三等位基因(复等位基因), 位于 1065 bp(A/T/C)。22 个 SNP

位点, 包括 411 bp (T, 0.7812; G, 0.2188)、727 bp (T, 0.6250; C, 0.3750)、1065 bp (A, 0.9063; T, 0.0625; C, 0.0313)、1496 bp (C, 0.5937; A, 0.4063) 等(表 2)。

2.4 日本沼虾 ITS1 全序列中的微卫星序列

ITS1 全序列中, 共发现 3 个具有多态性的微卫星序列, 分别为位于 711 bp 的(GA)_n序列、位于 1027 bp 的(GA)_n序列和位于 1539 bp 的(AGC)_n序列(表 3)。

表 1 日本沼虾 ITS1 序列碱基含量和碱基长度
Tab. 1 Length and content of basepairs of ITS1 in *Macrobrachium nipponense*

	A 含量 A content	G 含量 G content	T 含量 T content	C 含量 C content	G+C 含量 (G+C) content	序列长度 Length of sequence
变化范围						
Range of change	28.7%—31.6%	27.5%—29.2%	27.1%—28.1%	13.2%—14.7%	40.7%—43.9%	1686bp—1900bp
平均值						
Value of average	29.9%	28.3%	27.7%	14.0%	42.3%	1749.8bp
变化幅度						
Scope of change	9.70%	6.00%	3.61%	10.71%	7.56%	12.23%

表 2 日本沼虾 ITS1 序列中 22 个 SNPs 位置及等位基因频率
Tab. 2 Location and alleles frequency of 22 SNPs in ITS1 sequence of *Macrobrachium nipponense*

碱基位置 Position of base (bp)	变异模式 Variation pattern	等位基因频率 Alleles frequency	
727	C/T	0.3750(C)	0.6250(T)
1012	C/T	0.3125(T)	0.6875(C)
1102	C/T	0.0938(T)	0.9062(C)
1280	C/T	0.2188(C)	0.7812(T)
1767	C/T	0.0938(T)	0.9062(C)
1855	C/T	0.3125(T)	0.6875(C)
1880	C/T	0.0625(C)	0.9375(T)
1932	C/T	0.2500(T)	0.7500(C)
1967	C/T	0.0625(T)	0.9375(C)
1122	A/G	0.2500(G)	0.7500(A)
1151	A/G	0.2500(G)	0.7500(A)
1790	A/G	0.1875(G)	0.8125(A)
1877	A/G	0.3438(A)	0.6562(G)
1129	A/T	0.0625(T)	0.9375(A)
1826	A/T	0.0625(A)	0.9375(T)
411	T/G	0.2188(G)	0.7812(T)
735	T/G	0.1563(G)	0.8437(T)
1859	T/G	0.1250(T)	0.8750(G)
1909	T/G	0.2188(G)	0.7812(T)
1953	T/G	0.2813(G)	0.7187(T)
1496	A/C	0.4063(A)	0.5937(C)
1065	A/T/C	0.0313(C); 0.0625(T)	0.9063(A)

表 3 日本沼虾 ITS1 序列中的微卫星位点
Tab. 3 Simple sequence repeat in ITS1 sequence of *Macrobrachium nipponense*

位置 Position (bp)	微卫星序列 Sequence of SSR	等位基因数 Number of alleles	等位基因及其频率 Alleles and frequency
711	(GA) _n	4	(GA) ₅ , 0.7500; (GA) ₁ , 0.1875; (GA) ₆ , 0.0313; (GA) ₃ , 0.0313
1027	(GA) _n	4	(GA) ₆ , 0.5625; (GA) ₄ , 0.3125; (GA) ₅ , 0.0625; (GA) ₇ , 0.0625
1539	(AGC) _n	8	(AGC) ₆ , 0.3125; (AGC) ₄ , 0.1875; (AGC) ₅ , 0.1250; (AGC) ₂ , 0.1250; (AGC) ₈ , 0.0938; (AGC) ₉ , 0.0938; (AGC) ₃ , 0.0313; (AGC) ₇ , 0.0313

2.5 日本沼虾 ITS1 全序列中的缺失和插入序列

ITS1 序列存在大量的缺失和插入, 在 46 个位点共发现缺失和插入 254 个, 其中缺失 130 个, 插入 124 个, 缺失长度范围是 1—13 bp, 插入长度范围是 1—80 bp, 较长的缺失有 11、12、13 bp 片段, 较长的插入有 56、58、80 bp 片段; 同时, 在日本沼虾 ITS1 序列中, 发现一个高度变异区, 位置为 243—384 bp。

3 讨 论

He, *et al.*^[3]研究发现叉尾鲷 ESTs 中, SNPs 的频率为 0.013。凌去非等^[11]采用测序法进行了丁鲷不同群体 ITS1 区序列分析, ITS1 和较为保守的 18S rDNA 区域均存在 SNP。程汉良等^[16]对帘蛤科贝类 4 种蛤的 ITS1 进行了测序, 发现 SNP 位点出现频率为 0.0017。Smith, *et al.*^[7,13]用等位基因特异核苷酸片段分析在三种蟹 ITS 区中检测出 2 个 SNP, SNPs 频率为 0.0089。本文在太湖青虾 ITS1 中共检测出 22 个 SNPs, SNPs 出现频率为 0.0126, 显著高于已报道的 SNPs 出现频率的平均值, 说明作为非编码区的插入序列 ITS1, 其变异程度高于基因组平均值。日本沼虾 ITS1 序列中的 SNP 源于碱基转换(13/22), 部分来源于颠换(9/22)。在日本沼虾 ITS1 序列 22 个 SNPs 中, 还出现了 1 个复等位基因, 位于 1065(A/T/C)。日本沼虾 ITS1 序列中的 SNP 位点绝大多数为二等位基因(21/22), 仅个别为三等位基因(1/22), 未出现四等位基因位点; 与此同时, SNP 位点的二个等位基因中, 往往一个等位基因占主导, 其频率(0.9375—0.5937)显著高于另一个等位基因。

已报道的 ITS1 序列中, 最短的是鹿角珊瑚 (*Acropora longicyathus*), 其 ITS1 只有 70 bp, 最长的是文蛤 900 bp^[16]。但本文结果表明, 日本沼虾 ITS1 序列平均长度 1749.8 bp, 比文蛤更长, 因此是迄今为止发现的最长的 ITS1 序列。

在已报道的 ITS 区序列中, 克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 的 ITS1 和 ITS2, 包含了多个

微卫星位点^[18]。本文测定的日本沼虾 ITS1 序列中, 同样存在碱基含量的个体差异、多个微卫星位点、ITS1 序列存在大量的缺失和插入, 日本沼虾个体 ITS1 序列存在较大的长度差异, 群体存在丰富的缺失/插入多态性; 同时, 在日本沼虾 ITS1 序列中, 发现一个高度变异区, 位置为 243—384 bp, 该区域也可种质鉴定、遗传多样性分析等。

本文首次测定了日本沼虾 rDNA 基因内转录间隔区 ITS1 的 DNA 全序列, 筛选了日本沼虾 SNP 位点, 填补了日本沼虾 ITS1 序列特征研究和 SNP 研究的空白, 积累了日本沼虾遗传背景知识, 为日本沼虾遗传育种提供了新的分子标记和手段。

参考文献:

- [1] Fu H T, Gong Y S, Wu Y, *et al.* Artificial interspecific hybridization between *Macrobrachium nipponense*, *macrobrachium hainanense* and their isozyme analysis [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(3): 327—329 [傅洪拓, 龚永生, 吴滢, 等. 日本沼虾与海南沼虾的人工种间杂交及其同工酶分析. 水生生物学报, 2004, **28**(3): 327—329]
- [2] Zhang H W, Fu H T, Xia D Q. Progress in the study on SNPs of agricultural economical animals [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University* (Natural Science), 2007, **26**(2): 192—197 [张洪伟, 傅洪拓, 夏德全. 农业经济动物的 SNPs 研究进展. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2007, **26**(2): 192—197]
- [3] He C, Chen L, Simmons M, *et al.* Putative SNP discovery in interspecific hybrids of catfish by comparative EST analysis [J]. *Animal Genetics*, 2003, **34**(6): 445—448
- [4] Choi Y S, Lee Y H, Jin D H. Cloning and DNA sequences analysis of mitochondrial NADH dehy-drogenase subunit 3 from Korean chum salmon *Oncorhynchus keta* [J]. *Journal of the Korean Fisheries Society*, 2003, **36**(2): 94—99
- [5] Kim G E, Kim C G, Lee Y H. Genetic similarity-dissimilarity among Korea Chum salmon of each stream and their relationship with Japan salmon [J]. *Journal of Korean Society of Oceanography* (The Sea), 2007, **12**(2): 94—101
- [6] Schwenke P L, Rhydderch J G, Ford M J, *et al.* Forensic identification of endangered Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) using microsatellite DNA [J]. *Conservation Genetics*, 2004, **5**(2): 145—155

- chus tshawytscha) using a multilocus SNP assay [J]. *Conservation Genetics*, 2006, **7**(6): 983—989
- [7] Smith C T, Seeb J E, Schwenke P, *et al.* Use of the 5' -nuclease reaction for SNP genotyping in Chinook salmon [J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2005, **134**: 207—217
- [8] Smith C T, Park L, Vandoornik D, *et al.* Characterization of 19 single nucleotide polymorphism markers for Coho Salmon [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, **6**(3): 715—720
- [9] Elfstrom C M, Smith C T, Seeb J E. Thirty-two single nucleotide polymorphism markers for high-throughput genotyping of sockeye salmon [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, **6**(4): 1255—1259
- [10] Rengmark A H, Slettan A, Skaala O, *et al.* Genetic variability in wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) strains estimated by SNP and microsatellites [J]. *Aquaculture*, 2006, **253**(1-4): 229—237
- [11] Ling Q F, Li S F, Zhang H J, *et al.* Studies on ITS1 regions in different stocks of *Tinca tinca* [J]. *Reservoir Fisheries*, 2006, **26**(6): 24—25 [凌去非, 李思发, 张海军, 等. 丁鲋不同群体 ITS1 区序列分析. 水利渔业, 2006, **26**(6): 24—25]
- [12] Glenn K L, Grapes L, Suwanasopee T, *et al.* SNP analysis of *AMY2* and *CTSL* genes in *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon* shrimp [J]. *Animal Genetics*, 2005, **36**(3): 235—236
- [13] Smith C T, Grant W S, Seeb L W. A rapid, high-throughput technique for detecting Tanner Crabs *Chionoecetes bairdi* illegally taken in Alaska's Snow Crab Fisheries [J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2005, **134**: 620—623
- [14] Elfstrom C M, Gaffney P M, Smith C T, *et al.* Characterization of 12 single nucleotide polymorphisms in weathervane scallop [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2005, **5**: 406—409
- [15] Scott G P, Carnegie R B, Reece K S, *et al.* Development of single nucleotide polymorphism (SNP) markers for the hard clam (*Mercenaria mercenaria*) [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2005, **24**(2): 674—675
- [16] Cheng H L, Xia D Q, Wu T T, *et al.* Study on sequences of ribosomal DNA internal Transcribed spacers of clams belonging to the veneridae family (*Mollusca: bivalvia*) [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, **33**(8): 702—710 [程汉良, 夏德全, 吴婷婷, 等. 帘蛤科贝类 rDNA 内转录间隔区序列的研究. 遗传学报, 2006, **33**(8): 702—710]
- [17] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed [M]. Beijing: Science Press. 1996 [J. 萨姆布鲁克, E.F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社. 1996]
- [18] Harris D J, Crandall K A. Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (*Decapoda: Cambaridae*): implications for phylogenetic and microsatellite studies [J]. *Mol. Biol. Evol*, 2000, **17**: 284—291
- [19] Chu K H, Li C P, Ho H Y. The first internal transcribed spacer of Ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic and population analysis in crustacean [J]. *Marine Biotechnology*, 2001, **3**: 355—361

SEQUENCING OF ITS1 AND IDENTIFICATION OF SNPS LOCI IN *MACROBRACHIUM NIPPONENSE*

ZHANG Hong-Wei¹, FU Hong-Tuo^{1,2}, WU Yan², GONG Yong-Sheng², WANG Qing¹ and XIA De-Quan^{1,2}

(1. College of Fisheries, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081; 2. Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081)

Abstract: *Macrobrachium nipponense* is one of the most important freshwater prawns for aquaculture in China, especially in the southern regions of the country. But in recent years, *M. nipponense* farming has seriously declined due to diseases and small body size. Investigation of genetic background and genetic selection may help this situation for *M. nipponense*, and development of genetic marker is the basis. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) is a type of genetic marker based on single DNA base differences between individuals at defined positions. The possible alleles for a SNP locus are four bases of A, T, C and G. SNPs is a new molecular marker with high value because of its abundance, genetic stability and easy to check. In agricultural economical animals, SNPs were developed in livestock, domestic birds as well as aquatic animals, including fish, shrimp, crab and shellfish. The reported applications of SNPs included determination of relativeness, survey of genetic polymorphisms, QTL localization, marker-assisted selection, etc. So far, no work was reported on development and application of SNPs in *M. nipponense*. Nuclear rDNA internal transcribed spacer (ITS) were composed of ITS1 fragment between 18S and 5.8S rRNA and ITS2 fragment between 5.8S and 28S

rRNA. In this paper, ITS1 sequences were analyzed and SNPs in ITS1 were screened in *M. nipponense*. Totally 32 samples were sequenced, and the average length of ITS1 sequence was 1749.8bp, which was the longest among reported ITS1 sequences. The average contents of A, G, T and C were 29.9%, 28.3%, 27.7% and 14.0% respectively, and that of G+C was 42.3%. By comparison of sequences from different individuals, 22 SNP loci were found, including 9 C/T transitions (40.91%), 4 A/G transitions (18.18%), 2 A/T transversions (9.09%), 5 T/G transversions (22.73%), 1 A/C transversions (4.55%), 1 A/T or C transversion (4.55%). Among 22 SNP Loci, 21 loci were two alleles, and 1 was three alleles. In addition, 3 SSR loci with polymorphisms, 1 highly variable segment (243—384 bp), and a great deal of deletions and insertions were found in the ITS1 sequences of *M. nipponense*. Total 130 deletions and 124 insertions were found, and deletion length was between 1—13 bp, insertions length between 1—80 bp. This paper firstly analyzed the ITS1 sequence of *M. nipponense*, and filled the gap of its ITS1 characterization, and it also filled the gap of SNP loci development in *M. nipponense*, and provided new available molecular markers for research of genetics and genetic breeding in *M. nipponense*.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; Single nucleotide polymorphisms; SNP; ITS; rDNA