

陈锦豪, 郑锦滨, 王攀攀, 等. 凡纳滨对虾养殖亲本群体遗传多样性分析[J]. 渔业研究, 2019, 41(1): 1-10.

凡纳滨对虾养殖亲本群体遗传多样性分析

陈锦豪¹, 郑锦滨¹, 王攀攀¹, 李天骄¹, 毛勇^{1,2*}, 苏永全¹, 王军¹

(1. 厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361102;

2. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361102)

摘要: 运用微卫星标记技术, 选用 8 对微卫星引物对厦门市 5 个凡纳滨对虾亲虾群体 (ZA1、HN、ZA2、ZP、DS) 进行遗传多样性分析。结果显示, 8 对微卫星引物在 5 个凡纳滨对虾亲虾群体中共检测到 75 个等位基因, 各群体的平均等位基因数 (N_a) 为 3.875 ~ 7.000、平均有效等位基因数 (N_e) 为 2.632 ~ 3.719、平均 PIC 值范围在 0.498 ~ 0.624。平均观测杂合度 (H_o) 为 0.410 ~ 0.562、平均期望杂合度 (H_e) 为 0.589 ~ 0.687。各群体的平均近交系数 (F_{is}) 为 0.147 ~ 0.305, 说明各群体内近交程度较高, 存在杂合子缺失现象。除 ZP 与 DS 群体外, 其他群体在多个微卫星位点上均显著偏离平衡 ($P < 0.05$), 说明大部分群体存在杂合子缺失现象。遗传变异分析结果显示, 各群体间的遗传分化指数 (F_{st}) 为 0.028 ~ 0.199; 根据 F_{st} 计算得到各群体间的 Slatkin's 遗传距离在 0.029 ~ 0.249 之间。本研究结果表明, 采自厦门市的 5 个凡纳滨对虾亲虾群体均存在不同程度的近交现象。本文通过对厦门市 5 个凡纳滨对虾亲虾群体进行遗传多样性分析, 旨在明确厦门市凡纳滨对虾亲虾群体的遗传结构、种质资源状况及近交程度, 为该地区凡纳滨对虾种质资源的提纯、保优、复壮及遗传选育提供背景资料和建议。

关键词: 凡纳滨对虾; 遗传多样性; 微卫星; 近交衰退; 遗传育种

中图分类号: S917.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-5601(2019)01-0001-10

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*), 亦称南美白对虾、太平洋白对虾, 原产于中、南美的秘鲁北部至墨西哥太平洋沿岸, 但在厄瓜多尔沿岸分布尤为集中^[1]。凡纳滨对虾是一种热带虾, 具有生长快、抗病力强、适应性强、壳薄肉嫩, 味道鲜美等特点, 在对虾业养殖中占有重要地位, 在我国南北方沿海地区广泛养殖^[2]。但近年来, 一方面养殖环境不断恶化, 对虾病害频繁

暴发; 另一方面随着养殖规模的扩大, 对虾亲本来源选择过于盲目, 甚至从养殖池里直接选用, 造成对虾群体遗传多样性降低、近交衰退等, 导致对虾生产降低, 严重影响今后对虾优良种质的保护和利用以及生产的发展^[3-6]。

微卫星 (Microsatellite), 亦称简单序列重复 (Simple sequence repeat, SSR)、短串联重复 (Short tandem repeat, STR), 是指以 1~6 个碱

收稿日期: 2018-11-26

基金项目: 国家虾产业技术体系项目 (CARS-48); 福建省科技厅重大专项专题项目 (No: 2016NZ0001-4); 厦门海洋经济创新发展示范项目 (16CZY009SF05)。

作者简介: 陈锦豪 (1993-), 男, 福建厦门, 硕士研究生, 硕士, 研究方向为日本囊对虾遗传育种。Tel: 13799736658. E-mail: 765859222@qq.com

通讯作者: 毛勇 (1970-), 男, 教授级高级工程师, 研究方向为日本囊对虾遗传育种。Tel: 18959287866. E-mail: maoyong@xmu.edu.cn

基为重复核心的串联重复 DNA 序列, 分布于生物体的整个基因组^[7-8]。作为迅速发展的 DNA 分子标记技术之一, 微卫星具有数量多、多态性丰富、重复性好、易操作、呈共显性遗传、在真核生物基因组中分布的随机性等特点, 故其已被广泛应用于对虾群体遗传学方面的研究^[9-13]。

厦门对虾种苗产业链因独特的地理位置、便捷的交通、对台合作的先天优势而聚集了技术、资金和市场等要素。据数据资料显示, 2014 年厦门海洋经济占据了全市 GDP 总值的 1/8, 总产值 2045.9 亿元, 同比增长 10.2%, 其中, 厦门市对虾种苗产业在厦门乃至福建省的海洋产业中占据重要的地位, 特别是厦门市凡纳滨对虾种苗产业。作为我国虾苗的集约地, 厦门市翔安区拥有数百个对虾种苗场, 出产着全国近 40% 的虾苗, 也曾一度占据我国对虾年育苗量的 60% 以上, 至今依然在全国对虾产业链的种苗环节中占据着不可替代的重要地位。

然而, 随着对虾市场需求量的增大, 种苗培育技术也随之变化。一方面, 高温、高密度、高抗生素的“三高”养殖模式成为普遍形式, 这就导致虾苗繁育过程中经常出现营养不均衡、养殖环境恶化、病害暴发频繁等问题; 另一方面, 在集约化苗种培育技术已达峰值的背景下, 有些育苗场为了进一步降低成本, 对种虾不经选育, 长期近交。近交衰退的潜在风险导致虾苗出现生长缓慢、参差不齐、抵抗力差等现象, 直接影响了种苗质量和健康。为了解析厦门市凡纳滨对虾

“土苗”(大多经养殖的商品成虾、经筛选以备作亲本所产生的子一代苗种)亲虾群体的遗传背景, 了解“土苗”种质资源现状, 明确近交程度, 本研究运用微卫星技术, 选用 8 对多态性较好的微卫星引物, 分别对从厦门市 5 个对虾育苗场选取 5 个来源的凡纳滨对虾“土苗”亲虾群体的遗传多样性进行分析比较, 从分子水平上了解其遗传背景, 为该地区凡纳滨对虾种质资源的提纯、保优、复壮及遗传选育提供背景资料和建议。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究考察了厦门市凡纳滨对虾传统育苗模式下的亲本来源, 所选定的 5 个凡纳滨对虾的亲本分别来自于诏安、海南、漳浦、东山等地的对虾养殖池。由于这些传统育苗场没有规范的苗种生产记录, 也无明晰的选育技术路线, 亲本来源普遍存在种源不明、种质混杂等情况, 本文通过调查走访了解到育苗场亲虾的采集地、亲本来源等信息(表 1)。5 个凡纳滨对虾亲虾群体样品分别于 2016 年 11 月—2017 年 3 月期间采自福建厦门翔安区不同育苗场, 每个群体 30 尾 [体重 (122.05 ± 13.70) mm、体长 (21.8 ± 8.62) g], 编号 ZhaoAn1、HaiNan、ZhaoAn2、ZhangPu、DongShan (ZA1、HN、ZA2、ZP、DS)。样品运送到实验室后, 用剪刀取对虾背部肌肉置于无水乙醇中, -20°C 保存待用。

表 1 凡纳滨对虾亲虾采集地及亲本来源

Tab. 1 The collecting place and broodstock source of *Litopenaeus vannamei*

亲本名称 The name of broodstock	亲虾采集地 Collection sites of broodstock	亲本来源 Source of broodstock	采集时间 Collection time
ZA1	诏安	来源不清 土苗自繁	2017-02-10
HN	海南	正大 F1	2016-11-20
ZA2	诏安	来源不清 土苗自繁	2017-02-10
ZP	漳浦	二代杂交苗 种源不明	2017-03-12
DS	东山	二代杂交苗 种源不明	2016-12-25

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

实验采用异硫氰酸胍法提取凡纳滨对虾基因

组 DNA^[14], 使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳与 Q5000 超微量紫外分光光度计 (美国 Quawell) 进行基因组 DNA 质量及浓度的检测。

1.2.2 微卫星引物筛选

选用 8 对多态性较高、特异性强且重复性好的微卫星引物^[15-16] (表 2) 进行等位基因的扩

增, 在引物 5' 末端设计添加不同类型的特异性荧光标记 (FAM 或 ROX), 荧光标记引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表 2 凡纳滨对虾 8 对微卫星引物信息

Tab. 2 The information for 8 microsatellite primer pairs of *L. vannamei*

位点 Locus	荧光标记类型 Fluorescent label type	引物序列(5' to 3') Primer sequence	退火温度/°C Annealing temperature	片段大小/bp Size of alleles
TUMXLv7.121	FAM	F: GGCACACTGTTTACTCCTCG R: CGAACAGAATGGCAGAGGAG	56	192 ~ 246
TUMXLv7.56	ROX	F: CCATGGCTTTCCTCTTCTTTC R: AGGTAGGGAAGTCGTGAGGG	65	280 ~ 491
TUMXLv7.97	ROX	F: TGTCGTTAGTGCAGCTCATTC R: GGGGAGGAATAAGAGGAAAGG	52	160 ~ 181
TUMXLv8.176	FAM	F: GCAACGCAATATAGCTC R: TCAAGGGAACAAAGTCAAG	52	162 ~ 166
TUMXLv9.178	ROX	F: CATTGAAAACGGAATCCTCG R: GATATCCCATCAACACAGCG	57	194 ~ 200
TUMXLv10.255	FAM	F: CTAAATAAATCACGGTTGGG R: CCTTCTGGTTTACTGTTGAGGC	57	208 ~ 215
TUMXLv10.312	FAM	F: ATACGAAACACCCCATCCC R: GTGGTCTTACCTCGTGGCTC	59	165 ~ 177
Pvan1815	ROX	F: GATCATTCGCCCTCTTTTT R: ATCTACGGTTTCGAGAGCAGA	55	126 ~ 139

1.2.3 PCR 反应体系

PCR 反应体系包括: 10 × PCR 缓冲液 2.5 μL、dNTPs (2.5 μM) 1.6 μL、正向引物 (10 μM) 0.5 μL、反向引物 (10 μM) 0.5 μL、模板 DNA (100 ~ 120 ng/μL) 1 μL、TaqDNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.3 μL、灭菌的去离子水 (ddH₂O) 18.6 μL。反应条件: 94°C 4 min, 94°C 30 s, (57 ± 6) °C 30 s, 72°C 45 s, 循环 30 次, 72°C 10 min, 16°C 90 min。使用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测, 将片段大小与预测相一致的 PCR 产物送上海生工生物工程股份有限公司进行简单重复序列 (SSR) 分型分析。

1.3 数据处理与分析

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) 由 PopGene3.2 软件计算完成。根据等位基因的频率, 运用 PIC_CALC0.6 软件计算各群体各位点的多态信息含量 (PIC)。利用 Arlequin3.5 进行近交系数 (F_{is})、Hardy-Weinberg (H-W) 平衡检验 (P 值)、分子变异分析 (AMOVA)、

遗传分化指数 (F_{st}) 以及基于 F_{st} 的 Slatkin's 遗传距离的计算。运用 MEGA4.0 软件, 根据 5 个凡纳滨对虾群体间的遗传距离, 构建 UPGMA 聚类图。

2 结果

2.1 群体遗传多样性分析

本实验中所用的 8 对微卫星引物在 5 个凡纳滨对虾亲虾群体中共检测到 75 个等位基因, 8 个位点平均等位基因数 (N_a) 为 9.375, 其中, 位点 TUMXLv7.56 最多, 共有 25 个, TUMXLv8.176 最少, 仅有 3 个 (表 3); 5 个群体在 8 个微卫星位点上的平均等位基因数 (N_a) 为 3.875 ~ 7.000, 其中 ZA1 群体最低 (3.875), HN 群体和 ZP 群体最高 (7.000); 平均有效等位基因数 (N_e) 为 2.632 ~ 3.719, 其中 ZA1 群体最低 (2.632), HN 群体最高 (3.719) (表 4)。

在 5 个群体中, 8 个位点的 PIC 值在 0.450 ~ 0.918 之间, 平均 PIC 值为 0.639, 其中最高

为 TUMXLv7.56 (0.918), 最低为 TUMXLv8.176 (0.450) (表3); 在5个群体中, 各群体的平均 PIC 值范围在0.498~0.624, 其中ZA2群体最高(0.624), ZA1群体最低(0.498); 除位点 TUMXLv10.312 在 DS 群体中的 PIC 值低于0.250, 其余位点的 PIC 值均大于0.250 (0.280~0.913) (表4)。

5个群体的平均观测杂合度 (H_o) 为0.410~0.562, 其中ZA1群体最低(0.410), ZA2群体最高(0.562); 平均期望杂合度 (H_e) 为0.589~0.687, 其中DS群体最低(0.589), ZA2群体最高(0.687) (表4)。平均观测杂合度均比平均期望杂合度要小, 表明各群体中普遍存在着杂合子缺失的

情况。各群体的平均近交系数 (F_{is}) 均为正值 (0.147~0.305) (表4), 且除位点 TUMXLv10.255 外, 其余7个位点平均近交系数 (F_{is}) 均为正值 (表3), 说明5个凡纳滨对虾群体近交程度较高, 杂合子缺失较为严重。

通过对5个群体8个位点上的 H-W 平衡遗传检测, 发现40个数据 (5个群体×8个位点) 中只有14个符合 H-W 平衡 ($P>0.05$), 有26个位点由于不同程度的杂合子缺失 ($F_{is}>0$) 导致不符合 H-W 平衡 ($P<0.05$); 在5个群体中, 除 ZP、DS 群体外, 群体 ZA1、HN、ZA2 在多个位点上都显著偏离 H-W 平衡 ($P<0.05$) (表4)。

表3 8对微卫星位点在5个凡纳滨对虾亲本群体上的遗传特性

Tab.3 Genetic characters of 8 microsatellite locus in 5 broodstock populations of *L. vannamei*

位点 Locus	多态信息含量 (PIC) Polymorphic information content	等位基因数 (N_a) Number of alleles	有效等位 基因数 (N_e) Effective number of alleles	观测杂合度 (H_o) Observed heterozygosity	期望杂合度 (H_e) Expected heterozygosity	近交系数 (F_{is}) Inbreeding coefficient
TUMXLv7.121	0.751	13	4.329	0.487	0.772	0.101
TUMXLv7.56	0.918	25	13.010	0.765	0.927	0.177
TUMXLv7.97	0.751	11	4.532	0.395	0.783	0.437
TUMXLv8.176	0.450	3	2.085	0.227	0.523	0.586
TUMXLv9.178	0.458	4	2.034	0.353	0.511	0.357
TUMXLv10.255	0.562	4	2.712	0.874	0.634	-0.497
TUMXLv10.312	0.485	5	2.269	0.479	0.562	0.161
Pvan1815	0.738	10	4.164	0.429	0.761	0.395
平均 Average	0.639	9.375	4.392	0.501	0.684	0.215

表4 5个凡纳滨对虾亲本群体在8对微卫星位点上的遗传特性

Tab.4 Genetic characters of 5 broodstock populations in 8 microsatellite locus of *L. vannamei*

群体 Populations	位点 Locus	多态信息含量 (PIC) Polymorphic information content	等位基 因数(N_a) Number of alleles	有效等位 基因数(N_e) Effective number of alleles	观测杂合度 (H_o) Observed heterozygosity	期望杂合度 (H_e) Expected heterozygosity	近交系数 (F_{is}) Inbreeding coefficient	H-W 平衡 (P) Hardy - weinberg
ZA1	TUMXLv7.121	0.670	5.000	3.500	0.571	0.769	-0.467	0**
	TUMXLv7.56	0.799	9.000	5.444	0.571	0.879	0.410	0**
	TUMXLv7.97	0.324	2.000	1.689	0	0.439	0.281	0.072
	TUMXLv8.176	0.353	2.000	1.849	0.428	0.494	0.453	0.014*
	TUMXLv9.178	0.280	2.000	1.507	0.142	0.362	0.039	1.000
	TUMXLv10.255	0.501	3.000	2.333	0.857	0.615	-0.260	0**
	TUMXLv10.312	0.463	3.000	2.085	0.285	0.560	0.411	0**

续表 4

群体 Populations	位点 Locus	多态信息含量 (<i>PIC</i>) Polymorphic information content	等位基 因数(<i>Na</i>) Number of alleles	有效等位 基因数(<i>Ne</i>) Effective number of alleles	观测杂合度 (<i>Ho</i>) Observed heterozygosity	期望杂合度 (<i>He</i>) Expected heterozygosity	近交系数 (<i>Fis</i>) Inbreeding coefficient	H - W 平衡 (<i>P</i>) Hardy - weinberg
	Pvan1815	0.587	5.000	2.648	0.428	0.670	0.337	0**
	平均	0.498	3.875	2.632	0.410	0.598	0.150	
HN	TUMXLv7.121	0.609	8.000	2.756	0.366	0.648	0.438	0**
	TUMXLv7.56	0.912	19.000	12.244	0.866	0.933	0.109	0**
	TUMXLv7.97	0.556	8.000	2.452	0.400	0.602	0.339	0.028*
	TUMXLv8.176	0.302	3.000	1.503	0.066	0.340	0.807	0**
	TUMXLv9.178	0.413	3.000	1.892	0.366	0.479	0.238	0**
	TUMXLv10.255	0.521	3.000	2.528	0.800	0.614	-0.285	0**
	TUMXLv10.312	0.514	4.000	2.489	0.600	0.608	0.014	0.565
	Pvan1815	0.713	8.000	3.887	0.166	0.755	0.782	0**
	平均	0.568	7.000	3.719	0.454	0.622	0.305	
	ZA2	TUMXLv7.121	0.693	7.000	3.643	0.566	0.737	0.236
TUMXLv7.56		0.859	15.000	7.792	0.800	0.886	0.147	0**
TUMXLv7.97		0.755	7.000	4.663	0.333	0.798	0.586	0**
TUMXLv8.176		0.529	3.000	2.475	0.400	0.606	0.344	0.020*
TUMXLv9.178		0.550	4.000	2.514	0.300	0.612	0.514	0**
TUMXLv10.255		0.375	2.000	2.000	1.000	0.508	-1.000	0**
TUMXLv10.312		0.544	4.000	2.597	0.633	0.625	-0.012	0.213
Pvan1815		0.687	8.000	3.495	0.466	0.726	0.361	0**
平均		0.624	6.250	3.647	0.562	0.687	0.147	
ZP		TUMXLv7.121	0.600	7.000	2.719	0.566	0.642	0.115
	TUMXLv7.56	0.865	18.000	7.894	0.900	0.888	0.044	0.112
	TUMXLv7.97	0.657	9.000	3.114	0.466	0.690	0.343	0**
	TUMXLv8.176	0.461	3.000	2.269	0.200	0.568	0.652	0**
	TUMXLv9.178	0.472	4.000	2.130	0.400	0.539	0.261	0.057
	TUMXLv10.255	0.522	3.000	2.542	0.866	0.616	-0.414	0**
	TUMXLv10.312	0.408	4.000	1.945	0.400	0.494	0.193	0.439
	Pvan1815	0.786	8.000	5.325	0.633	0.826	0.236	0.051
	平均	0.596	7.000	3.492	0.554	0.658	0.179	
	DS	TUMXLv7.121	0.752	8.000	4.627	0.666	0.797	0.172
TUMXLv7.56		0.734	8.000	4.295	0.633	0.780	0.203	0.112
TUMXLv7.97		0.645	6.000	3.185	0.300	0.697	0.570	0**

续表4

群体 Populations	位点 Locus	多态信息含量 (PIC) Polymorphic information content	等位基 因数(N_a) Number of alleles	有效等位 基因数(N_e) Effective number of alleles	观测杂合度 (H_o) Observed heterozygosity	期望杂合度 (H_e) Expected heterozygosity	近交系数 (F_{is}) Inbreeding coefficient	H-W 平衡 (P) Hardy - weinberg
DS	TUMXLv8.176	0.459	3.000	2.181	0.133	0.550	0.761	0**
	TUMXLv9.178	0.375	3.000	1.823	0.166	0.459	0.641	0.057
	TUMXLv10.255	0.416	3.000	2.095	0.866	0.531	-0.664	0**
	TUMXLv10.312	0.214	3.000	1.307	0.133	0.239	0.446	0.439
	Pvan1815	0.599	5.000	2.843	0.500	0.659	0.244	0.051
	平均	0.524	4.875	2.795	0.425	0.589	0.296	

注: * 为显著偏离 H-W 平衡 $P < 0.05$; ** 为极显著偏离 H-W 平衡 $P < 0.01$ 。

Notes: * was significant deviation from H-W balance $P < 0.05$; ** was significantly deviated from H-W balance $P < 0.01$.

2.2 群体遗传变异与聚类分析

对 5 个凡纳滨对虾群体间遗传分化水平进行检测, 各群体间的遗传分化指数 (F_{st}) 在 0.028 ~ 0.199 之间 (表 5)。分析表明, ZA2 群体和 ZP 群体间的 F_{st} 最小 (0.028), 群体遗传分化最弱; ZA1 群体和 DS 群体间的 F_{st} 最大

(0.199), 遗传分化最显著; 除 ZA2 群体与 ZP 群体, HN 群体与 ZA2 群体属于轻度遗传分化 ($0 < F_{st} < 0.05$), 其余群体间的 F_{st} 均在 0.050 ~ 0.199 之间, 均发生了中度或高度遗传分化。显著性检验表明, 各群体间遗传分化极显著 ($P < 0.01$)。

表 5 5 个凡纳滨对虾亲本群体间的遗传分化指数 F_{st}

Tab. 5 The genetic differentiation (F_{st}) of 5 broodstock populations of *L. vannamei*

群体 Populations	ZA1	HN	ZA2	ZP	DS
ZA1					
HN	0.102				
ZA2	0.117	0.047			
ZP	0.143	0.080	0.028		
DS	0.199	0.191	0.109	0.061	

对 5 个凡纳滨对虾亲虾群体的 AMOVA 分析显示, 只有 10.65% 的遗传变异来自于群体间,

而 89.35% 的遗传变异来自于群体内, 表明群体内的遗传变异贡献率要明显大于群体间 (表 6)。

表 6 5 个凡纳滨对虾亲本群体分子变异 (AMOVA) 分析

Tab. 6 AMOVA analysis among 5 broodstock populations of *L. vannamei*

变异来源 Variation source	自由度 d. f.	平方和 Quadratic sum	变异组分 Variance components	变异贡献百分比/% Percentage of variation
群体间 Among populations	4	85.30	0.30	10.65
群体内 Within populations	295	749.35	2.55	89.35
总数 Total	299	834.65	2.85	100

基于群体间遗传分化指数计算 5 个凡纳滨对虾亲虾群体间的 Slatkin's 遗传距离 (表 7), 结果显示各群体间的遗传距离在 0.029 ~ 0.249

之间, 其中, ZA2 群体和 ZP 群体的遗传距离最小 (0.029), ZA1 群体和 DS 群体间的遗传距离最大 (0.249)。根据遗传距离进行的 UPGMA 聚

类分析结果表明 (图 1), DS 群体与其余 4 个群体亲缘关系均较远, ZA2 群体与 ZP 群体亲缘关

系最近, 它们首先聚为一支, 接着分别再与 HN 群体、ZA1 群体、DS 群体聚为一支。

表 7 5 个凡纳滨对虾亲本群体 Slatkin's 遗传距离

Tab. 7 Genetic distances on 5 broodstock populations of *L. vannamei*

群体 Populations	ZA1	HN	ZA2	ZP	DS
ZA1					
HN	0.113				
ZA2	0.132	0.050			
ZP	0.168	0.087	0.029		
DS	0.249	0.236	0.122	0.065	

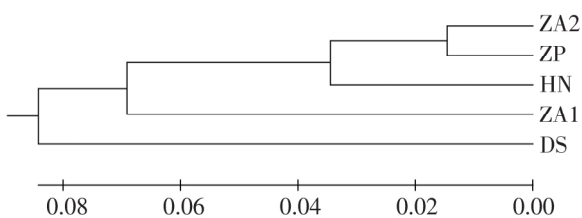


图 1 5 个凡纳滨对虾亲本群体基于 Slatkin's 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig.1 Dendrogram based Slatkin's genetic distance between five culture populations of *L.vannamei*

3 讨论

3.1 凡纳滨对虾群体的遗传多样性

多态信息含量 (PIC) 是表示微卫星 DNA 变异程度高低的一个指标。根据 Botstein 等^[17] 首先提出的 PIC 划分规则, 本实验中五个群体的平均 PIC 在 0.498 ~ 0.624 之间, 除了位点 TUMX-Lv10.312 在 DS 群体上表现出低度多态性 ($PIC < 0.25$), 其余位点均属中度或高度多态性 ($PIC > 0.25$), 所以仅从 PIC 值来看, 这五个群体的遗传多样性较高。根据 Barker^[18] 的报道, 微卫星位点含有 4 个或 4 个以上的等位基因对于物种的遗传进化具有一定程度的贡献。本实验中 8 个微卫星位点上的等位基因数在 3 ~ 25 个, 与 Tassanakajon 等^[19] 结果相似。其中有 7 个位点的等位基因数为 4 个或 4 个以上, 表明用这几个位点对凡纳滨对虾进行微卫星标记遗传多样性分析效果较好。但各位点有效等位基因数在 2.034 ~ 13.010 之间, 除位点 TUMXLv7.56 有效等位基因数最高外 (13.010), 其余位点有效等位基因数均小于 5, 可能是由于部分位点存在较多的无

效等位基因从而高估了 PIC 值, 造成群体遗传多样性水平虚高。

H - W 平衡检验结果表明, 除了 ZP 群体与 DS 群体有 5 个位点符合 H - W 遗传平衡外, 其余几个群体都有至少 6 个位点显著偏离平衡 ($P < 0.05$), 在总共 40 个数据中 (5 个群体 \times 8 个位点), 共有 26 个偏离了 H - W 遗传平衡, 说明绝大部分群体都存在着不同程度杂合子缺失的情况。可能是由于无效等位基因的存在^[20] 以及凡纳滨对虾亲本选择过于盲目, 并且后代长期近交, 从而导致个体间近亲交配率逐渐提高, 造成群体杂合子缺失严重, 群体遗传结构已经较为脆弱。

统计分析结果显示, 5 个凡纳滨对虾群体的平均 H_o 和平均 H_e 分别在 0.410 ~ 0.562 和 0.589 ~ 0.687 之间, ZA1 群体在 TUMXLv7.97 位点上的 H_o 为 0, 表明 ZA1 群体在该位点上的等位基因几乎都为纯合子, 且除位点 TUMX-Lv10.255 外, 其余位点观测杂合度均小于期望杂合度, 表明这 5 个群体普遍存在着杂合子缺失的现象, 这与 Jimenez 等^[21] 关于太平洋凡纳滨对虾群体遗传结构的研究结果一致, 杂合子缺失现象在 Xu 等^[22] 与 Supungul 等^[23] 对斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的研究中也有发现。杨锐等^[24] 研究发现, 杂合子缺失将导致纯合子增加, 提高有害等位基因纯合的几率, 近交衰退几率升高, 从而降低物种对环境变化的适应性。本研究结果显示, 除位点 TUMXLv10.255 ($F_{is} = -0.497$) 外, 其余位点的平均 F_{is} 均为正值, 这与童馨等^[25] 所研究的凡纳滨对虾养殖群体 ($-0.166 <$

$F_{is} < 0.439$) 的实验结果一致, 表明各群体均存在着不同程度的杂合子缺失现象, 群体基因型已经达到了相对纯合的状态, 说明这 5 个亲虾群体遗传多样性较低, 可能是由于这些群体是由亲缘关系较近亲本交配而来, 导致它们杂合基因型比例严重下降。另外, HN 群体 ($F_{is} = 0.305$) 与 DS 群体 ($F_{is} = 0.296$) 的近交系数最高, 一方面可能是 HN 群体的苗种为正大选育群体 F1 代, 在选育过程中采用近交方式进行纯系选育, 从而导致近交系数较高; DS 群体虽为二代杂交苗, 但在“土苗”育苗模式的苗种培育过程中对亲本亲缘关系未进行选择, 经过多代的自繁而使得近交系数升高; 另一方面, 可能由于无效等位基因的存在, 造成这两个群体中纯合子个体过剩^[26-27], 如果不改善之后的育种模式, 可能会出现这两个群体后代遗传多样性降低、优良性状比例减少, 甚至近交衰退等现象。

3.2 凡纳滨对虾群体间的遗传差异

遗传分化指数 (F_{st}) 是衡量群体间遗传分化程度的重要指标, 其划分规则为 0 ~ 0.05 表示群体间分化较弱, 0.05 ~ 0.15 表示分化中等, 0.15 ~ 0.25 表示分化大, 大于 0.25 表示分化极大^[28]。本实验中 5 个凡纳滨对虾群体间的遗传分化指数 (F_{st}) 在 0.028 ~ 0.199 之间。分析结果表明, 除了 HN 群体与 ZA2 群体 ($F_{st} = 0.047$)、ZA2 群体与 ZP 群体 ($F_{st} = 0.028$) 间的遗传分化较弱 ($0 < F_{st} < 0.05$), 其他群体间均发生了一定程度的遗传分化, 尤其是 ZA1 群体和 DS 群体 ($F_{st} = 0.199$)、HN 群体和 DS 群体 ($F_{st} = 0.191$), 均发生了较大程度的遗传分化 ($0.15 < F_{st} < 0.25$)。AMOVA 分析结果表明, 遗传变异只有 10.65% 来自于群体间, 而 89.35% 的遗传变异来自于群体内部。研究结果表明, 在 5 个凡纳滨对虾群体中, 已经有部分群体在遗传上形成了各自独立的关系, 如果要进行后代培育, 就应该选择遗传分化指数较大的群体 (比如 ZA1 群体和 ZP 群体) 进行杂交育种, 以提高后代优良性状的比率以及凡纳滨对虾的养殖性能, 从而提高养殖产量, 促进经济收益^[6]。

群体间的遗传关系一般以基于通过等位基因频率计算而得的遗传距离来体现。Crawford 等^[29]认为由微卫星计算得出的遗传距离更能反

映种群分化时间的长短, 能客观地反映群体间的遗传和分化。分析本研究中基于 F_{st} 的各群体间 Slatkin's 遗传距离, 结果显示, 各群体间的遗传距离在 0.029 ~ 0.249 之间, 表明 5 个群体之间的遗传差异较小。这提示在凡纳滨对虾苗种培育中, 亲本的选择需要考虑遗传距离这一指标, 它反映的是不同品种进化上的关系; 选择遗传距离大且性状良好的群体进行杂交育种, 发挥杂种优势, 有利于种质的提高以及后代各种优良性状的产生与新品种的培育^[30], 进而推动凡纳滨对虾养殖产业的发展。

4 结论

由于市场需求增大而导致的苗种培育方式的改变以及苗种培育企业普遍缺少对虾育种技术的专业指导, 使得厦门市凡纳滨对虾亲虾群体近亲交配严重, 近交衰退现象明显。经过多代的近亲交配后, 有害等位基因纯合比例不断升高, 加上养殖过程中大量抗生素的使用, 使得虾苗普遍较为脆弱, 造成对虾种苗品质下降, 严重阻碍了凡纳滨对虾养殖产业的发展。同时, 由于我国的优良亲虾基本被国外进口的种虾垄断, 导致厦门市庞大的对虾种苗产业链因缺少稳定的种源供应造成无序发展乱象, 而且种源混杂现象十分突出, 国内外的种质、一代二代的虾苗、优劣种齐聚厦门, 良莠不齐、掺假现象也时有发生。因此在生产中应明确对虾种质来源, 科学规范苗种培育流程, 国内各苗种培育企业和相关科研单位可进行联合杂交育种, 选用性状良好的亲本个体, 利用杂交优势, 改善后代的遗传多样性水平, 提高后代优良经济性状的比例, 这对于厦门市对虾新品种的培育乃至国内凡纳滨对虾种苗产业的发展具有重要意义。

参考文献:

- [1] 王兴强, 马生, 董双林. 凡纳滨对虾生物学及养殖生态学研究进展 [J]. 海洋湖沼通报, 2004, (4): 94-100.
- [2] 唐扬, 孟小菲, 沈瑞福, 等. 凡纳滨对虾家系选育的研究与应用 [J]. 水产科学, 2018, 37(4): 555-563.
- [3] Cock J, Gitterle T, Salazar M, et al. Breeding for disease resistance of *Penaeid* shrimps [J]. Aquacul-

- ture, 2009, 286 (1-2): 1-11.
- [4] 马春艳, 马洪雨, 马凌波. 凡纳滨对虾引进群体和 2 个养殖群体遗传变异的微卫星分析 [J]. 海洋渔业, 2011, 33 (1): 1-8.
- [5] Frankham R, Hemmer H, Ryder O A, et al. Selection in captive populations [J]. Zoo Biology, 1986, (5): 127-138.
- [6] 栗志民, 谢丽, 叶富良. 凡纳滨对虾三个亲本及其子代群体的 SSR 分析 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38 (13): 6735-6738.
- [7] Jie K, Huan G. Analysis of tandem repeats in the genome of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Chinese Science Bulletin, 2005, 50 (14-16): 1462-1469.
- [8] 张留所, 相建海. 凡纳滨对虾微卫星位点在两个选育家系中遗传的初步研究 [J]. 遗传 HEREDITAS (Beijing), 2005, 27 (6): 919-924.
- [9] 胡则辉, 周志刚. 微卫星 DNA 标记技术及其在海洋生物遗传学中的应用 [J]. 海洋湖沼通报, 2006, (1): 37-45.
- [10] 高焕, 于飞, 阎斌论. 微卫星技术的发展及在海洋生物中的应用 [J]. 海洋湖沼通报, 2008, (4): 129-136.
- [11] Bentzen P, Taggart C T, Ruzzante D E, et al. Microsatellite polymorphism and the population structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the Northwest Atlantic [J]. Canadian Journal of Fisheries & Aquatic science, 1996, 53 (4): 2706-2721.
- [12] Lee W J, Kocher T D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus* [J]. Journal of Fish Biology, 1996, 49 (1): 169-171.
- [13] Postlethwait J H, Yan Y L, Gates M A, et al. Vertebrate genome evolution and the zebra fish gene map [J]. Nature Genetics, 1998, 18 (4): 345-349.
- [14] 刘娜, 赵新, 陈锐, 等. 动物肌肉组织 DNA 的提取方法及实时荧光定量 PCR 检测 [J]. 食品工业科技, 2016, 37 (18): 74-80.
- [15] Cruz P, Mejia H, Perez - Enriquez R, et al. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [J]. Molecular Ecology Notes 2002 2(3): 239-241.
- [16] Meehan D, Xu Z, Zuniga G, et al. High Frequency and Large Number of Polymorphic Microsatellites in Cultured Shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [Crustacea: Decapoda] [J]. Marine. Biotechnology, 2003, 5 (4): 311-330.
- [17] 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.
- [18] Barker J S F. A Global Protocol for Determining Genetic Distances Among Domestic Livestock Breeds [C] //: Smith C. Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Guelph, Ontario, Canada, 1994, 21: 201-208.
- [19] Tassanakajon A, Tiptawonnukul A, Supungul P, et al. Genetic structure in wild populations of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using randomly amplified polymorphic DNA analysis [J]. Journal of Marine Biotechnology, 1998, 6 (4): 249-254.
- [20] Wanna W, Rolland J L, Bonhomme F, et al. Population genetic structure of *Penaeus merguensis* in Thailand based on nuclear DNA variation [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, 311 (1): 63-78.
- [21] Valles - Jimenez R, Cruz P, Perez - Enriquez R. Population Genetic Structure of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA Variation [J]. Marine Biotechnology (New York), 2004, 6 (5): 475-484.
- [22] Xu Z, Primavera J H, De I P L D, et al. Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites [J]. Aquaculture, 2001, 199 (1): 13-40.
- [23] Supungul P, Klinbunga S, Pichyangkura R, et al. Identification of Immune - Related Genes in Hemocytes of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Marine Biotechnology (New York), 2002, 4 (5): 487-494.
- [24] 杨锐, 喻子牛. 山东沿海褶牡蛎与太平洋牡蛎等位基因酶的遗传变异 [J]. 水产学报, 2000, 24 (2): 130-133.
- [25] 童馨, 龚世圆, 喻达辉. 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 不同世代养殖群体的遗传多样性分析 [J]. 海洋与湖沼, 2009, 40 (2): 214-219.
- [26] Perez - Enriquez R, Fidencio Hernández - Martínez, Cruz P. Genetic diversity status of White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* broodstock in Mexico [J]. Aquaculture, 2009, 297 (1-4): 0

- 50.
- [27] Paetkau D , Strobeck C. The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears [J]. *Molecular Ecology* , 1995 , (4) : 519 - 520.
- [28] Wright S. The genetical structure of populations [J]. *Animals Eugenics* , 1951 , 15 : 323.
- [29] Crawford A M , Littlepohn R P. The use of DNA marker in conservation priorities in sheep and other livestock [J]. *Deciding Animal genetic resources information* , 1998 , 23 : 21 - 26.
- [30] 胡志国, 刘建勇, 袁瑞鹏, 等. 凡纳滨对虾 3 个引进群体及其杂交子代的生长性能评估 [J]. *中国水产科学* , 2015 , 22 (5) : 825 - 932.

Analysis for genetic diversity of broodstock populations of breeding *Litopenaeus vannamei*

CHEN Jinhao¹ , ZHENG Jinbin¹ , WANG Panpan¹ , LI Tianjiao¹ ,
MAO Yong^{1,2*} , SU Yongquan¹ , WANG Jun¹

- (1. College of Ocean And Earth Sciences , Xiamen University , Xiamen , Fujian 361005;
2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science , Xiamen University , Xiamen , Fujian 361005)

Abstract: Eight pairs of primers were selected to analyze the genetic diversity of five random broodstock populations (ZA1 , HN , ZA2 , ZP and DS) of *Litopenaeus vannamei* by using microsatellite labeling technology. The results indicated that a total of seventy - five alleles ($Na = 75$) were detected with eight pairs of primers in five populations , with average numbers of alleles as $Na = 3.875 \sim 7.000$, average effective numbers of alleles as $Ne = 2.632 \sim 3.719$ and average polymorphism information content as $PIC = 0.498 \sim 0.624$. The average observed heterozygosity (Ho) was 0.410 to 0.562 and the average expected heterozygosity (He) was 0.589 to 0.687. The average number of inbreeding coefficient (Fis) of each population was 0.147 ~ 0.305 , indicating a high degree of inbreeding in each population and the absence of heterozygotes. Except population ZP and DS , other groups deviated from equilibrium significantly at multiple microsatellite sites ($P < 0.05$) , which indicated that most groups had the phenomenon of heterozygote deficiency. Genetic variation analysis results showed that the genetic differentiation coefficient (Fst) was 0.028 ~ 0.199. According to Fst calculation , the genetic distance of Slatkin's was between 0.029 and 0.249. The results of this study showed that there were a different level of inbreeding phenomenon in the five broodstock populations of *L. vannamei*. In this paper , the genetic diversity of five broodstock populations of *L. vannamei* in xiamen was analyzed in order to clarify genetic structure , germplasm resources and inbreeding degree of broodstock populations of *L. vannamei* in Xiamen and provide background information and suggestions for purification , optimal protection , rejuvenation and genetic breeding of germplasm resources of *L. vannamei* for this area.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; genetic diversity; microsatellite; genetic breeding; inbreeding depression