



基于微卫星标记评估凡纳滨对虾收获体长、体质量以及抗 WSSV 性状的遗传参数

孙 坤^{1,2,3}, 李旭鹏^{2,3}, 隋 娟^{2,3}, 曹家旺^{2,3}, 谭 建^{2,3},
罗 坤^{2,3}, 栾 生^{2,3}, 孔 杰^{2,3}, 孟宪红^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;

3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 为更加准确地评估凡纳滨对虾体长、体质量以及抗 WSSV 性状的遗传参数, 实验利用 8 个微卫星位点对凡纳滨对虾 69 个家系母本和子代进行基因分型, 并利用分型信息进行系谱重构和分子亲缘关系相关度的计算, 以重构系谱、分子亲缘关系度以及物理系谱分别构建加性遗传相关矩阵, 进而对体长、体质量和抗 WSSV 性状的遗传参数进行评估。最终通过交叉验证的方法, 比较三者对遗传参数评估的预测能力以及准确性。分型结果显示, 8 个微卫星位点, 共检测到 166 个等位基因, 各位点等位基因数为 12~45 个, 亲本和子代群体每个位点平均等位基因数分别为 9.50 个和 18.13 个, 平均观测杂合度分别为 0.618 和 0.709, 平均期望杂合度分别为 0.749 和 0.775, 平均多态性信息含量分别为 0.711 和 0.750, 所有位点均表现高度多态性。遗传力分析结果显示, 利用物理系谱、重构系谱以及分子亲缘相关度对体长的遗传力估计值分别为 0.119 ± 0.031 、 0.120 ± 0.032 、 0.132 ± 0.030 , 对体质量的遗传力估计值分别为 0.176 ± 0.039 、 0.182 ± 0.040 、 0.172 ± 0.034 , 对抗 WSSV 性状的遗传力估计值分别为 0.135 ± 0.033 、 0.134 ± 0.033 、 0.098 ± 0.031 , 在体长、体质量以及抗 WSSV 性状的遗传力中, 以分子亲缘相关度评估的标准差小于重构系谱和物理系谱。通过交叉验证, 三者对遗传参数评估的预测能力以及准确性从高到低分别为分子亲缘相关度、重构系谱、物理系谱。研究表明, 利用微卫星分子标记评估凡纳滨对虾体长、体质量以及抗 WSSV 性状遗传参数比利用物理系谱评估具有更高的准确性, 但同样利用微卫星分子标记进行遗传评估, 直接利用子代的亲缘相关度比重构系谱具有更好的效果。本研究为凡纳滨对虾遗传参数的评估提供了更为精确的方法, 为进一步良种选育提供了参考资料。

关键词: 凡纳滨对虾; 微卫星; 分子亲缘关系; 系谱重构; 遗传力

中图分类号: Q 348; S 968.22

文献标志码: A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 野生群体主要分布于太平洋东岸, 于 20 世纪末引入中国,

经过近 30 多年的发展, 已经成为中国最主要的海水养殖对虾种类, 产量占海水养殖对虾总量的

收稿日期: 2020-05-05 修回日期: 2021-03-08

资助项目: 山东省农业良种工程项目 (2019LZGC014); 山东省农业重大应用技术创新项目 (SD2019YY001); 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-48); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2020TD26)

第一作者: 孙坤 (照片), 从事水产动物分子标记辅助育种研究, E-mail: sunkun6008@163.com

通信作者: 孟宪红, 从事水产动物分子标记辅助育种研究, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn



80%^[1]。凡纳滨对虾产业的迅速发展,离不开对优良品种的选育与改良。目前,通过对凡纳滨对虾生长、存活和抗病等性状的遗传改良,国内已相继培育出“中科1号”^[2]、“中兴1号”^[3]、“壬海1号”^[4]等9个新品种。在遗传改良的过程中,以家系选育为主的育种技术占有极为重要的地位,它能对不同家系不同经济性状进行系统分析和选择,保持选育亲本优良性状的统一,能够快速、定向地获得优良性状^[5]。家系选育需要明确不同家系之间的亲缘关系,以便性状的测试、遗传参数的评估和配种方案的制定。常规家系选育中,一般采用物理标记的方式区分不同的家系。然而在长期的应用过程中,物理标记耗时耗力、准确性不足等问题越来越突出,利用物理标记构建物理系谱进而评估遗传参数的方法也受到了很大影响,很大程度上限制了育种工作的大规模开展和深入研究。

随着分子生物学的不断发展,育种学家已经尝试从现代分子生物学技术中选择合适的分子标记进行个体的亲缘关系鉴定,进而达到区分不同家系的目的^[6]。在众多的分子标记当中,微卫星标记以其高多态性、共显性遗传、遵循孟德尔遗传法则、数量丰富等特点成为进行亲缘鉴定的首选标记,并成功应用于多个水产动物品种的家系选育过程中^[7-10]。目前利用微卫星标记辅助家系选育工作,主要有两种思路,一种是通过微卫星标记对亲本和子代进行基因分型,利用基因型进行系谱重构,重新确定子代之间的亲缘关系,以重新确定的亲缘关系构建加性遗传相关矩阵,进而应用于遗传参数的估计。另一种则是仅对子代进行基因分型,通过子代基因型计算子代之间的分子亲缘度,以分子亲缘相关度构建加性遗传相关矩阵,进而应用于遗传参数的估计。在利用微卫星标记评估水产动物的遗传参数中,Lyu等^[11]分别利用分子相关度和物理系谱估计了大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)79个家系的体质量和体长性状的遗传力,结果显示分子相关度比系谱具有更好的预测能力和准确度。Blonk等^[12]利用分子相关度和重建系谱估计野生欧洲鳎(*Solea solea*)群体体质量的育种值,结果显示分子相关度估计育种值的准确度高于系谱估计育种值。目前在对凡纳滨对虾收获体长、体质量和抗WSSV(white spot syndrome virus)性状的遗传评估中,基本都是利用物理系谱进行遗传参数的评估,鲜有以分子相关度和重建系谱进行遗传参数的评估报道。

本研究利用8个微卫星位点对凡纳滨对虾69个家系母本和子代进行系谱重构和分子亲缘相关度的计算。利用分子亲缘相关度、重构系谱信息以及物理系谱信息分别构建加性遗传相关矩阵,结合固定效应,以混合线性模型评估凡纳滨对虾体长、体质量和抗WSSV性状的遗传力,并通过交叉验证的方法检验三者估计凡纳滨对虾遗传力上的预测能力和准确性,以期对凡纳滨对虾遗传参数的估计提供一种新的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用材料均来自山东省潍坊市昌邑市邦普种业科技有限公司构建的凡纳滨对虾G₀群体。从G₀群体中选取无特定病原的69个家系,每个家系选取约3月龄的对虾40尾,总计2760尾凡纳滨对虾用于人工感染WSSV测试。利用人工感染WSSV测试实验,收集个体体质量、体长和抗WSSV存活时间性状的表型值。与此同时,从每个家系中选取10尾子代及其母本用于基因分型,获取部分个体基因型信息。

1.2 实验方法

毒饵制备 在感染测试实验开始之前,先进行WSSV毒饵的制备。使用WSSV发病濒死、甲壳有明显白斑、且经检验无其他特殊病原的对虾,取肌肉组织与可食用红色素混合,在充分预冷的组织匀浆机中搅拌,制成混合均匀、颜色醒目的毒饵,经实时荧光定量PCR检测病毒拷贝数,制备成10⁶拷贝/mg的毒饵。毒饵制备过程必须在低温环境快速进行,制备好的毒饵于-80℃保存备用。

人工感染WSSV测试 当对虾生长至PL20阶段,从每个家系中随机挑选600尾,单独饲养在4m×4m的养殖池中。饲养2个月后,从每个家系中随机挑选40尾,于对虾第五腹节和第六腹节处以不同颜色组合的“可视嵌入性荧光标记”(visible implant elastomer, VIE)进行标记,以标记来区分不同家系。标记完成后,将2760尾凡纳滨对虾转移至中国水产科学研究院黄海水产研究所对虾性状测试车间中暂养1周,待基本适应后,进行饥饿处理,保证对虾肠胃排空,然后参考孟宪红等^[13]报道的专利方法对每尾对虾饲喂等量毒饵。待全部饲喂完毕,按照正常饲养管理,每小

时观察 1 次, 捞出濒死对虾, 利用电子台秤 (精度为 0.01 g) 和游标卡尺 (精度为 0.01 mm) 分别测量记录对虾的体质量、体长数据, 并记录每尾对虾的死亡时间和颜色组合。

基因组 DNA 的提取 每个家系在标记前选取子代 10 尾及其母本, 使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司) 从对虾游泳足肌肉组织中提取 DNA。分别使用分光光度计和琼脂糖电泳检测 DNA 的质量。合格的 DNA 用于后期微卫星分型实验。

PCR 扩增及产物基因分型 使用 8 对已公开发表的凡纳滨对虾微卫星引物进行实验^[14-16]。引物序列信息详见表 1。PCR 反应体系包括 12.5 μL Premix TaqTM (TaKaRa TaqTM Version 2.0) (TaKaRa Taq 0.625 U、dNTPs 0.4 mmol/L、Tris-HCl 20 mmol/L、KCl 100 mmol/L、MgCl₂ 3 mmol/L) (TaKaRa), 1 μL 模板 DNA (20 ng/ μL), 1 μL 正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 1 μL 反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 9.5 μL 去离子水。PCR 反应程序为 98 °C 3 min; 98 °C 30 s, 60 °C 10 s, 72 °C 1 min, 25 个循环; 72 °C 延伸 3 min; 4 °C 保存。PCR 产物送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 使用 ABI 3730XL 测序仪 (Applied Biosystems) 获得每个微卫星位点的基因型信息。

1.3 数据分析

基因型分析及系谱重构 利用 GeneMapper 4.0 软件对分型数据进行预处理。利用 Cervus 3.0 软件分析母本和子代分型数据, 计算各个位点的等位基因数 (number of alleles, N_a)、观测杂合度 (observed heterozygosities, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosities, H_e)、8 个微卫星位点的多态性信息含量 (polymorphism information content, PIC)、无效等位基因频率 [null alleles frequency, F (Null)] 和哈迪-温伯格 (Hardy-Weinberg) 平衡检验。利用 Colony 2.0.6.5 软件进行系谱重构。

分子亲缘相关度 利用 Coancestry 1.0.1.2 软件估算个体间 TrioML 参数来表示亲缘相关度, TrioML 即 $r_{xy}(r_{xy}=2f_{xy})$, f_{xy} 表示个体 X 和个体 Y 之间的共组率。然后以平均分子相关度来表示家系间和家系内个体间的分子相关度。家系内和家系间的分子相关度公式:

$$R_w = \sum r_w/n_w \quad (1)$$

$$R_b = \sum r_b/n_b \quad (2)$$

式中, R_w 和 R_b 分别表示家系内和家系间的分子亲缘相关度, $\sum r_w$ 和 n_w 分别表示一个家系内分型的

表 1 凡纳滨对虾 8 对微卫星引物信息

Tab. 1 Information of 8 pairs of microsatellite primers for *L. vannamei*

位点名称 loci	引物序列(5'-3')及荧光类型 primer sequences (5' to 3') and the fluorescence labeling of primers	退火温度/°C annealing temperature	产物片段范围/bp amplified fragment size
Lv12	F: 6-FAM-GATCATTCGCCCTCTTTT R: ATCTACGGTTCGAGAGCAGA	55	125~134
M1103	F: 6-FAM-GGCTGTGTTTGCCTGTAGTTT R: TCATACGATAATGGCATAAGAAGG	55	376~391
TUMXLv7.56	F: TAMRA-CCATGGCTTTCCTCTCTTTT R: AGGTAGGGAAGTCGTGAGGG	62	311~490
TUMXLv7.121	F: HEX-GGCACACTGTTTAGTCCTCG R: CGAACAGAATGGCAGAGGAG	58	194~244
TUMXLv8.256	F: ROX -GGACTCACACTTCTGGTTC R: GGCTGCACCTTGTAAGTC	55	150~163
TUMXLv9.90	F: TAMRA-GACCAAAGGATATTGGCTCG R: GTAATCAGGAGATGGTCCGC	58	282~292
TUMXLv9.103	F: ROX-CACCAAAACGAACGAAACG R: GGATAAAAACGAATTGTATACCG	58	199~393
TUMXLv10.33	F: HEX-CGAAGAGATTTATCCAGGG R: CGTGCAATTATTATCCTTTCC	56	252~324

两个个体间 r_{xy} 的总和与总数, $\sum r_b$ 和 n_b 分别表示家系间分型的两个个体间 r_{xy} 的总和与总数。

遗传力 利用 ASReml 4.0 软件采用混合线性模型和平均信息约束极大似然法估计凡纳滨对虾体长、体质量和抗 WSSV 存活性状的方差组分和遗传参数, 在估算过程中分别利用物理系谱 (PR)、重构系谱 (AR) 以及分子亲缘相关度 (MR) 来构造加性遗传相关矩阵, 物理系谱 (PR) 和重构系谱 (AR) 加性遗传相关矩阵直接利用 asreml.Ainverse 函数构建, 分子亲缘相关度 (MR) 则利用 nadiv 和 corpcor 函数构建。其中混合线性模型:

$$y_{jk} = \mu + \text{Age}_j + a_k + e_{jk} \quad (3)$$

$$y_{ijk} = \mu + \text{TANK}_i + \text{Age}_j + a_k + e_{ijk} \quad (4)$$

式中, y_{jk} 表示收获体长、体质量的表型值, y_{ijk} 表示抗 WSSV 存活时间的表型值, Age_j 表示日龄协变量, TANK_i 表示第 i 个性状测试的固定效应, a_k 表示加性遗传效应, e_{jk} 、 e_{ijk} 表示随机残差。上述公式中的固定效应经 Wald F 检验表明, 均达到极显著水平 ($P < 0.001$)。体长、体质量以及抗 WSSV 存活性状遗传力计算公式:

$$h^2 = \sigma_a^2 / \sigma_p^2 \quad (5)$$

式中, h^2 表示遗传力, σ_a^2 表示加性遗传方差, σ_p^2 表示表型方差。

交叉验证 采用十折交叉验证法计算模型的预测能力和育种值估计的准确度。十折交叉验证把总数据集平均分成 10 份, 每次交叉验证时,

9 份作为训练集, 1 份作为验证集。根据训练集构建模型, 再利用构建的模型预测验证集。交叉验证重复 500 次后, 计算预测值与验证集观察值之间的皮尔逊相关度的平均值来衡量模型预测能力。育种值估计准确度计算公式:

$$r(\alpha, \hat{\alpha}) = r(y, \hat{y}) / \sqrt{h^2} \quad (6)$$

式中, $r(\alpha, \hat{\alpha})$ 为育种值的准确度, $r(y, \hat{y})$ 为预测值与验证集观察值之间的皮尔逊相关度, 即模型的预测能力, h^2 表示利用系谱估计的遗传力。

2 结果

2.1 收获体长、体质量和抗 WSSV 存活时间统计性描述

生长性状分析结果显示, 凡纳滨对虾 3 月龄收获体质量、体长均值分别为 (1.85±0.77) g、(55.31±6.94) mm, 其中最大收获体质量、体长分别为 12.32 g、92.85 mm, 最小收获体质量、体长分别为 0.29 g、24.27 mm, 变异系数分别为 41.62%、12.55%, 属于中高等变异 (表 2)。抗 WSSV 性状分析结果显示, 凡纳滨对虾人工感染 WSSV 后, 最大存活时间为 360 h, 最小存活时间为 6 h, 平均存活时间为 (169.39±47.06) h, 变异系数为 27.78%, 属于中等变异。生长性状和抗 WSSV 性状的变异水平处于中高等水平, 表明对凡纳滨对虾生长和抗 WSSV 性状进行遗传改良具有较大的潜力。

表 2 凡纳滨对虾收获体长、体质量以及抗 WSSV 存活时间性状的统计性描述

Tab. 2 Statistical description of harvest body length, body weight and anti-WSSV survival time of *L. vannamei*

性状 trait	极小值 min	极大值 max	平均值 mean	标准差 SD	变异系数/% CV
体长/mm body length	24.27	92.85	55.31	6.94	12.55
体质量/g body weight	0.29	12.32	1.85	0.77	41.62
抗WSSV存活时间/h survival time	6	360	169.39	47.06	27.78

进一步分析人工感染 WSSV 过程, 绘制出凡纳滨对虾抗 WSSV 存活时间的频率分布直方图 (图 1-a) 和累计死亡曲线图 (图 1-b), 从图中可以看出, 在 96 h 之前, 每 24 h 的死亡频率均小于 100, 到 96 h 时的累计死亡率仅为 0.042, 96~288 h, 每 24 h 的死亡频率均大于 100, 其中 120~216 h 的死亡频率大于 300, 144~168 h 的死亡频率最高, 大于 500。96~288 h, 累计死亡率由 0.042 上升到 0.988, 其中 144~168 h, 累计死亡率由 0.255 上升

到 0.530, 上升速率最快, 当人工感染实验进行到 164 h 时, 50% 的个体死亡, 当进行到 360 h 时, 100% 的个体死亡。

2.2 微卫星位点多态性分析

对 8 个微卫星在亲本和子代中的基因型进行分析, 发现 8 个微卫星位点在亲本和子代中的等位基因数为 12~45 个, 平均为 20.75 个, 其中 TUMXLv7.56 位点等位基因数最多, Lv12 位点等

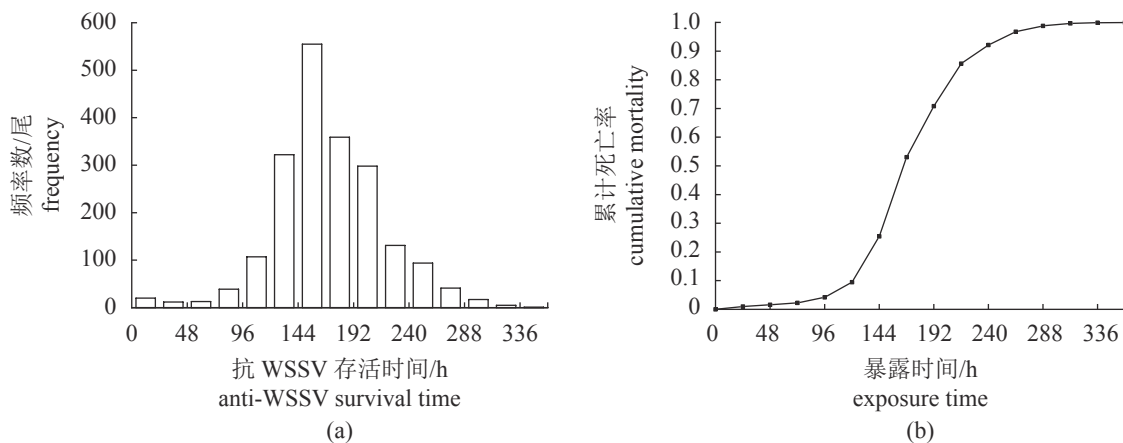


图 1 凡纳滨对虾抗 WSSV 存活时间分布

(a) 抗 WSSV 存活时间的频率分布直方图, (b) 累计死亡曲线图

Fig. 1 Survival time distribution of WSSV resistance in *L. vannamei*

(a) the frequency distribution histogram of anti WSSV survival time, (b) the cumulative death curve

位基因数最少。观测杂合度为 0.537~0.838, 平均为 0.702, Lv12 位点的观测杂合度最高, TUMXLv10 位点观测杂合度最低。期望杂合度为 0.691~0.918, 平均为 0.801, 其中 TUMXLv7.56 位点的期望杂合度最高, M1103 的期望杂合度最低。8 个微卫星位点的多态性信息含量为 0.669~0.911, 平均为 0.780, 其中 TUMXLv7.56 位点的多态性信息含量最高, M1103 位点的多态性信息含量最低, 并且所有位点均极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。亲本和子代每个位点平均等位基因数分别为 9.50 和 18.13 个, 平均有效个体数分别为 64.38 和 661.38, 平均观测杂合度分别为 0.618 和 0.709, 平均期望杂合度分别为 0.749 和 0.775, 平均多态性信息含量分别为 0.711 和 0.750, 所有位点均表现高度多态性, 具体每个位点的基因型信息见表 3。

2.3 分子亲缘相关度比较

分别基于 PR、AR 和 MR 构建亲缘关系矩阵, 通过分析亲缘关系矩阵之间的相关性可以看出, 基于 PR 和 AR 的亲缘关系矩阵相关性为 0.979, PR 和 MR 的亲缘关系矩阵相关性为 0.465, AR 和 MR 的亲缘关系矩阵相关性为 0.469。从 PR 和 AR 构建的亲缘关系矩阵中可以看出, PR 和 AR 仅能反映出个体间全同胞关系、半同胞关系, 而分子亲缘相关度则是根据计算得出的两两个体间具体的亲缘关系系数, 比 PR 和 AR 构建的矩阵信息更加丰富。通过分析 PR 与 AR 对应的分子相关度水平可以看出, 在 PR 系谱 0、0.25 和 0.5 水平上对应的分子亲缘相关度分别为 0.094±0.210、

0.154±0.086、0.413±0.196, 在 0 与 0.5 水平上较为接近, 但在 0.25 水平存在差异。AR 系谱在 0.25 和 0.5 对应的分子亲缘相关度上与 PR 系谱相同, 但比 PR 系谱多了 0.125 水平。AR 系谱在 0 和 0.125 水平上对应的分子亲缘相关度分别为 0.092±0.204 和 0.104±0.123, AR 系谱更加接近 MR 系谱。总体而言, MR 系谱反映的个体间亲缘关系信息更加丰富, AR 其次, PR 最少 (表 4)。

2.4 收获体长、体质量和抗 WSSV 存活时间遗传力估计

结合 PR、AR 和 MR 信息构建的加性遗传相关矩阵, 利用混合线性模型计算得到收获体长、体质量以及抗 WSSV 存活时间的遗传力。从不同系谱信息估算的遗传力中发现 (表 5), 利用 PR、AR 和 MR 对体长估算的遗传力分别为 0.119±0.031、0.120±0.032 和 0.132±0.030, 其中 MR 信息估算的体长遗传力最高, 标准差最小。以 PR、AR 和 MR 信息对体质量遗传力进行估算的结果分别为 0.176±0.039、0.182±0.040 和 0.172±0.034, 其中 AR 估算的体质量遗传力最高, MR 估算的体质量遗传力最低, 但 MP 估算遗传力的标准差最小。对抗 WSSV 存活时间性状利用 PR、AR 和 MR 信息估算的遗传力分别为 0.135±0.033、0.134±0.033 和 0.098±0.031, 其中 MP 信息估算的遗传力最低, 标准差较小, PR 和 AR 估算的遗传力较高, 标准差较大。所有性状的遗传力经检验均达到极显著水平, 并且以 MR 估算的遗传力标准差均小于 PR 和 AR。

表3 凡纳滨对虾8个微卫星位点的基因型信息

Tab. 3 Genotype information of 8 microsatellite loci in *L. vannamei*

位点 locus	群体类型 type	等位基因数 allele	有效个体数 valid individual	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态性信息含量 PI_C	Hardy-Weinberg平衡 HW	无效等位基因 $F(Null)$
Lv12	全部 all	12	751	0.838	0.802	0.773	***	-0.0301
	亲本 parent	7	67	0.746	0.811	0.776	ND	0.0340
	子代 offspring	12	684	0.846	0.800	0.769	***	-0.0373
M1103	全部 all	15	756	0.610	0.691	0.669	***	0.0628
	亲本 parent	7	67	0.701	0.567	0.528	*	-0.1392
	子代 offspring	14	689	0.601	0.646	0.626	***	0.0261
TUMXLv7.56	全部 all	45	692	0.825	0.918	0.911	***	0.0529
	亲本 parent	19	67	0.881	0.813	0.792	NS	-0.0551
	子代 offspring	34	625	0.821	0.904	0.895	***	0.0475
TUMXLv7.121	全部 all	15	749	0.821	0.721	0.687	***	-0.0936
	亲本 parent	5	67	0.687	0.621	0.566	NS	-0.0382
	子代 offspring	13	682	0.836	0.670	0.625	***	-0.1446
TUMXLv8	全部 all	12	755	0.456	0.745	0.711	***	0.2494
	亲本 parent	5	67	0.164	0.668	0.602	***	0.6060
	子代 offspring	10	688	0.483	0.701	0.657	***	0.2007
TUMXLv9.90	全部 all	19	749	0.840	0.871	0.858	***	0.0186
	亲本 parent	14	67	0.716	0.840	0.818	NS	0.0737
	子代 offspring	17	682	0.850	0.857	0.842	***	0.0047
TUMXLv9.103	全部 all	25	627	0.691	0.913	0.906	***	0.1387
	亲本 parent	13	63	0.746	0.905	0.888	ND	0.0925
	子代 offspring	24	564	0.683	0.903	0.894	***	0.1390
TUMXLv10	全部 all	23	728	0.537	0.748	0.727	***	0.1619
	亲本 parent	6	50	0.300	0.763	0.715	*	0.4196
	子代 offspring	21	677	0.554	0.717	0.693	***	0.1274
平均值 average	全部 all	20.75	725.88	0.702	0.801	0.780		
	亲本 parent	9.50	64.38	0.618	0.749	0.711		
	子代 offspring	18.13	661.38	0.709	0.775	0.750		

注: ND表示没有进行Hardy-Weinberg平衡显著性分析, NS表示Hardy-Weinberg平衡分析不显著, “*”表示Hardy-Weinberg平衡分析显著($P < 0.05$), “***”表示Hardy-Weinberg平衡分析极显著($P < 0.01$)

Notes: ND indicates that Hardy-Weinberg analysis was not done, NS indicates that Hardy-Weinberg analysis is not significant, the asterisk indicates very significant differences at $P < 0.05$, and triple-asterisk indicate significant differences at $P < 0.01$

2.5 交叉验证

利用 PR、AR 和 MR 对收获体长、体质量、抗 WSSV 存活时间性状进行 500 次十折交叉验证, 计算不同系谱对各性状的预测能力及准确性。从预测能力来看, 利用 MR 估算体长、体质量以及抗 WSSV 存活时间性状的预测值与观察值间的皮尔逊相关系数分别为 0.6174、0.6960 和 0.6170, 均高于利用 PR 和 AR 估算的相关系数。AR 与 PR 相比较, AR 略高于 PR, 但二者差值较小, 基本接近。从育种值的准确度分析, 对体长、体质量和抗 WSSV 性状利用 MR 进行计算的准确度分别为

0.7858、0.8343 和 0.7855, 均高于利用 PR、AR 进行计算的准确度, 而 PR 和 AR 二者比较, AR 略高于 PR, 但差值相对较小。显示利用 MR 对性状进行评估要比 PR 和 AR 更加准确, 而 PR 和 AR 在对性状评估的准确度上基本一致(表 6)。

3 讨论

家系选育需要提供两个重要的育种指标, 即遗传参数和育种值。准确、可靠的遗传参数是制定育种规划的前提和基础^[17]。为了获得准确的估计值, 往往要求选育群体具有清晰的系谱结构和

表 4 在不同系谱相关度水平上分子相关度的平均值、最大值、最小值和标准差

Tab. 4 Mean, maximum, minimum and standard deviation of molecular correlation at different levels of pedigree correlation

系谱类型 pedigree type	相关度水平 correlation level	平均值 average	最大值 max	最小值 min	标准差 SD
PR	0	0.094	0.935	0	0.210
	0.25	0.154	0.373	0	0.086
	0.5	0.413	0.866	0	0.196
	1	1	1	1	0
AR	0	0.092	0.935	0	0.204
	0.125	0.104	0.644	0	0.123
	0.25	0.154	0.373	0	0.086
	0.5	0.413	0.866	0	0.196
	1	1	1	1	0

表 5 不同系谱信息估计凡纳滨对虾收获体长、体质量及抗 WSSV 存活时间遗传力

Tab. 5 Estimation of body length, body weight and heritability of anti-WSSV survival time of *L. vannamei* with different pedigree information

性状 trait	系谱类型 genealogical type	表型方差 σ_p^2	加性遗传方差 σ_a^2	残差 σ_e^2	遗传力 h^2
体长 body length	PR	43.28	5.13	38.15	0.119±0.031**
	AR	43.34	5.21	38.13	0.120±0.032**
	MR	48.20	6.36	41.84	0.132±0.030**
体质量 body weight	PR	0.520	0.092	0.428	0.176±0.039**
	AR	0.521	0.095	0.426	0.182±0.040**
	MR	0.598	0.103	0.495	0.172±0.034**
抗WSSV存活时间 survival time	PR	2131.05	286.97	1844.08	0.135±0.033**
	AR	2129.56	285.96	1843.60	0.134±0.033**
	MR	2288.25	224.83	2063.42	0.098±0.031**

注: “**”表示差异极显著($P < 0.01$)Notes: “**” represent extremely significant difference ($P < 0.01$)

表 6 不同系谱对各性状的预测能力及准确度

Tab. 6 Prediction ability and correlation degree of different pedigrees for each character

性状 trait	PR		AR		MR	
	相关度 relevance	准确度 accuracy	相关度 relevance	准确度 accuracy	相关度 relevance	准确度 accuracy
体长 body length	0.5248	0.7244	0.5660	0.7523	0.6174	0.7858
体质量 body weight	0.5795	0.7612	0.5912	0.7689	0.6960	0.8343
抗WSSV存活时间 survival time	0.5657	0.7521	0.5660	0.7523	0.6170	0.7855

精确的目标性状表型记录。系谱中包含的亲本和个体数越多、世代数越长则越有利于进行育种指标的遗传评估。但在实际的育种过程中, G_0 和 G_1 亲本和个体较少、世代较短、系谱结构简单, 另外, 由于物理标记容易脱落或误读, 使得系谱记录信息错误等原因, 对 G_0 和 G_1 个体遗传参数进行准确评估显得尤为困难^[18]。然而, 对 G_0 和 G_1

性状的遗传力和个体的育种值进行准确评估是制定育种规划、选择目标性状、进行多世代选育的前提和基础。因此, 为了准确评估育种早期基础群体性状的遗传参数, 降低物理系谱的误差以及外界环境对性状表型的影响, 分子标记辅助家系选育的方法应运而生。目前, 在水产动物育种中, 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[19]、团头鲂 (*Megalob-*

ama amblycephala)^[9]、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*)^[20] 等多个物种上均有利用微卫星标记进行遗传参数评估的报道, 报道结果显示利用微卫星标记计算分子亲缘关系并进行遗传评估具有更高的准确性, 进一步证实了微卫星标记作为分子标记辅助育种的有效性。

然而, 基于微卫星标记对遗传参数估算的准确与否, 与标记本身位点数目以及遗传多样性有关。刘贵阳等^[21] 以及 Oliehoek 等^[22] 利用蒙特卡罗 (Monte Carlo) 模拟的方法证实了位点数目、等位基因数目及样本含量是影响分子亲缘相关度估计遗传力准确性的主要方面。在已有的报道中, 胡玉龙等^[23] 利用平均等位基因数为 8.08 的 12 个微卫星位点对大菱鲂幼鱼 2 个世代 39 个家系的体质量性状进行遗传参数评估, 评估准确性为 0.81; Lyu 等^[11] 利用平均等位基因数为 12.4 的 20 个微卫星位点对大菱鲂 79 个家系的生长性状进行遗传参数评估, 评估准确性为 0.92; 王军^[24] 利用等位基因总数为 462 的 15 个微卫星位点对 4302 尾中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 的抗 WSSV 性状进行遗传评估, 评估准确性为 0.728。进一步证明了不同物种遗传多样性不同遗传评估准确性不同, 同一物种不同的位点数目、等位基因数目以及样本含量不同, 评估的准确性也不相同。本研究利用微卫星标记对凡纳滨对虾 G₀ 群体的生长和抗 WSSV 性状进行遗传评估, 其中对微卫星标记统计结果显示, 8 个微卫星位点的平均等位基因数为 20.75 个, 平均观测杂合度、平均期望杂合度、平均多态性信息含量分别为 0.702、0.801 和 0.780, 均表明这些标记具有丰富的遗传多样性; 遗传参数评估结果显示, 直接利用分子亲缘相关度对体长、体质量以及抗 WSSV 性状评估的育种值准确度分别为 0.785 8、0.834 3 和 0.785 5, 比利用物理系谱准确度分别高了 8.48%、9.60% 和 4.44%, 比利用微卫星标记重构系谱进行评估的准确性分别高了 4.45%、8.51% 和 4.41%, 即利用微卫星标记进行遗传评估比利用物理系谱评估所得准确性更高; 但同样利用微卫星标记, 直接利用分子亲缘相关度比间接利用重构系谱评估所得准确性更高。本研究进一步证明了对于凡纳滨对虾 G₀ 群体, 采用 8 个多态性较高的微卫星位点直接对生长和抗 WSSV 性状进行遗传评估是可行的, 并能够取得较好的遗传评估效果, 为进一步制定育种方案, 进行性状选育奠定基础。

在选育过程中, 遗传力估计是一项十分重要的工作。遗传力是反映性状遗传能力大小的重要遗传参数, 它在选择方法比较、选择指数确定、育种值估计、选择反应预测以及育种规划决策等方面起着十分重要的作用, 是数量遗传学中从表型变异研究其遗传实质的一个关键性定量指标^[25]。目前, 国内外有关凡纳滨对虾生长性状以及抗 WSSV 存活时间性状的遗传力研究较多, 但基本都是基于物理系谱计算得到。在凡纳滨对虾生长性状的遗传评估中, Perez-Rostro 等^[26] 利用 43 个全同胞家系资料分别对 19、23 和 29 周龄凡纳滨对虾全长和体质量性状的遗传力进行评估, 评估遗传力分别为 0.17~0.22, 均为中等遗传力; Tan 等^[27] 利用 50 个全同胞家系结合 6 代系谱资料分别对 4、8 和 11 月龄凡纳滨对虾体质量性状的遗传力进行评估, 评估遗传力为 0.32~0.58, 均为中高等遗传力。本研究分别利用物理系谱、重构系谱以及分子亲缘相关度对 G₀ 3 月龄凡纳滨对虾的体长、体质量性状的遗传力进行评估, 评估结果显示, 体长性状遗传力为 0.119~0.132, 体质量性状遗传力为 0.172~0.182, 均为中等遗传力。但相比于利用分子亲缘相关度对体长、体质量评估的遗传力, 基于物理系谱评估的体长遗传力被低估了 10.92%, 体质量性状遗传力被高估了 2.33%, 基于重构系谱评估的体长遗传力被低估了 10.00%, 体质量性状遗传力被高估了 5.82%。在水产动物中, 生长性状是十分重要的经济性性状之一, 准确衡量早期生长性状的遗传参数, 合理制定育种方案, 对于实现快速再生产, 增加经济效益十分重要。结合已有报道和本研究, 3~11 月龄的凡纳滨对虾生长性状遗传力均为中高等遗传力, 并且随着月龄的增加遗传力也呈现增加的趋势。因为早期凡纳滨对虾生长性状遗传力相对较低, 对于早期的凡纳滨对虾选育应当采用家系选育的方式, 而对于后期的凡纳滨对虾选育应当采用个体选育和家系选育结合的方式。同样, 在凡纳滨对虾抗 WSSV 性状的遗传评估中, Gitterle 等^[28]、Caballero-Zamora 等^[29] 和 Campos-Montes 等^[30] 均对凡纳滨对虾抗 WSSV 存活性状进行了遗传力评估, 发现凡纳滨对虾抗 WSSV 存活性状遗传力估计值为 0.03~0.20, 均为中低等遗传力。本研究评估结果显示, 凡纳滨对虾抗 WSSV 性状遗传力为 0.098~0.135, 均为中低等遗传力, 与已有报道一致。但相比于利用分子亲缘相关度对抗 WSSV 性状评估的结果, 基

于物理系谱评估的遗传力被高估了 37.76%, 而基于重构系谱评估的遗传力则被高估了 36.73%。遗传力被高估或被低估都会导致错误的估计遗传进展和育种值, 进而影响育种方案的制定和新品种的培育进程。

因此, 在凡纳滨对虾家系选育过程中, 以微卫星 DNA 分子标记建立分子亲缘相关度, 进而评估生长以及抗 WSSV 存活时间性状遗传参数的方法, 比传统的物理标记和物理系谱评估遗传参数的方法具有更高的准确性, 对家系选育具有更好的指导意义和参考价值, 为良种选育提供更为精确的方向和实验资料。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 李旭鹏, 栾生, 曹宝祥, 等. 凡纳滨对虾6个国内群体的遗传背景分析[J]. *渔业科学进展*, 2020, 41(3): 103-110. Li X P, Luan S, Cao B X, *et al.* Genetic background analysis of six groups of white shrimp *Litopenaeus vannamei* in China using SSR markers[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(3): 103-110 (in Chinese).
- [2] 黄永春, 艾华水, 殷志新, 等. 第四代凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系的抗病及免疫特性研究[J]. *水产学报*, 2010, 34(10): 1549-1558. Huang Y C, Ai H S, Yin Z X, *et al.* Studies on WSSV-resistant and immune characteristics of the 4th generation selective breeding families for resistance to the white spot syndrome virus (WSSV) of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(10): 1549-1558 (in Chinese).
- [3] 陈锚, 吴长功, 相建海, 等. 凡纳滨对虾的选育与家系的建立[J]. *海洋科学*, 2008, 32(11): 5-8,55. Chen M, Wu C G, Xiang J H, *et al.* Selective breeding and pedigree foundation of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Marine Sciences*, 2008, 32(11): 5-8,55 (in Chinese).
- [4] 梁华芳, 杜国平, 黄海立, 等. 凡纳滨对虾快速生长家系选育的初步研究[J]. *广东海洋大学学报*, 2011, 31(3): 12-15. Liang H F, Du G P, Huang H L, *et al.* A preliminary study on the families selection for fast growth of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2011, 31(3): 12-15 (in Chinese).
- [5] 黄永春, 艾华水, 潘忠诚, 等. 凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系的建立及其抗病特性[J]. *水产学报*, 2013, 37(3): 359-366. Huang Y C, Ai H S, Pan Z C, *et al.* Establishment and WSSV resistant characteristics of selective breeding families for resistance to the white spot syndrome virus of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(3): 359-366 (in Chinese).
- [6] 刘永新, 周勤, 张红涛, 等. 基于标记系谱的红鳍东方鲀生长性状遗传分析[J]. *水产学报*, 2017, 41(1): 21-30. Liu Y X, Zhou Q, Zhang H T, *et al.* Genetic analysis of redfin puffer (*Takifugu rubripes*) for growth traits by using a marker-based pedigree[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(1): 21-30 (in Chinese).
- [7] Kim S G, Morishima K, Satoh N, *et al.* Parentage assignment in hatchery population of brown sole *Pleuronectes herzensteini* by microsatellite DNA markers[J]. *Fisheries Science*, 2007, 73(5): 1087-1093.
- [8] Wang H, Iwai Jr T, Zhao B P, *et al.* Identification of microsatellite DNA markers for pacific threadfin parentage assignment[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2010, 41(4): 640-647.
- [9] Luo W, Zeng C, Deng W, *et al.* Genetic parameter estimates for growth-related traits of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) using microsatellite-based pedigree[J]. *Aquaculture Research*, 2014, 45(11): 1881-1888.
- [10] Liu X D, Zhao G T, Cai M Y, *et al.* Estimated genetic parameters for growth-related traits in large yellow croaker *Larimichthys crocea* using microsatellites to assign parentage[J]. *Journal of Fish Biology*, 2013, 82(1): 34-41.
- [11] Lyu D, Wang W J, Luan S, *et al.* Estimating genetic parameters for growth traits with molecular relatedness in turbot (*Scophthalmus maximus*, Linnaeus)[J]. *Aquaculture*, 2017, 468: 149-155.
- [12] Blonk R J W, Komen H, Kamstra A, *et al.* Estimating breeding values with molecular relatedness and reconstructed pedigrees in natural mating populations of common sole, *Solea solea*[J]. *Genetics*, 2010, 184(1): 213-219.
- [13] 孟宪红, 张天时, 孔杰, 等. 对虾抗白斑综合症病毒能力的等量、定量测试方法: 中国, 102657109A [P]. 2012-09-12. Meng X H, Zhang T S, Kong J, *et al.* Equivalent and quantitative test method of white spot syndrome virus resistance of prawns: CN, 102657109A[P]. 2012-09-12 (in Chinese).
- [14] Meehan D, Xu Z K, 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.
- [15] Alcivar-Warren A, Meehan-Meola D, Park S W, *et al.* ShrimpMap: a low-density, microsatellite-based linkage map of the pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: identification of sex-linked markers in linkage group 4[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2007, 26(4): 1259-1277.
- [16] Zhang L S, Yang C J, Zhang Y, *et al.* A genetic linkage map of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rates[J]. *Genetica*, 2007, 131(1): 37-49.
- [17] Henderson C R. Estimation of variances and covariances under multiple trait models[J]. *Journal of Dairy Science*, 1984, 67(7): 1581-1589.
- [18] 张涛, 庄平, 章龙珍, 等. 可视荧光硅橡胶标志用于西伯利亚鲟幼鱼标志的初步评价[J]. *水生生物学报*, 2010, 34(3): 639-641.
- Zhang T, Zhuang P, Zhang L Z, *et al.* Preliminary evaluation of implant visible implant fluorescent elastomer tags in siberian sturgeon *Acipenser baerii*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(3): 639-641 (in Chinese).
- [19] Shikano T. Estimation of quantitative genetic parameters using marker-inferred relatedness in Japanese flounder: a case study of upward bias[J]. *Journal of Heredity*, 2008, 99(2): 94-104.
- [20] Jerry D R, Preston N P, Crocos P J, *et al.* Application of DNA parentage analyses for determining relative growth rates of *Penaeus japonicus* families reared in commercial ponds[J]. *Aquaculture*, 2006, 254(1-4): 171-181.
- [21] 刘贵阳, 孙晓燕, 刘桂琼, 等. 基于遗传标记的亲缘关系估测方法的建立[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(7): 2531-2538.
- Liu G Y, Sun X Y, Liu G Q, *et al.* Estimation of pairwise relationship using molecular marker[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(7): 2531-2538 (in Chinese).
- [22] Oliehoek P A, Windig J J, van Arendonk J A M, *et al.* Estimating relatedness between individuals in general populations with a focus on their use in conservation programs[J]. *Genetics*, 2006, 173(1): 483-496.
- [23] 胡玉龙, 官健涛, 马雨, 等. 利用父母本微卫星标记估计大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长性状的遗传参数[J]. *海洋学报*, 2016, 35(2): 126-130.
- Hu Y L, Guan J T, Ma Y, *et al.* An estimation of genetic parameters of growth traits in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using parental molecular relatedness[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2016, 35(2): 126-130 (in Chinese).
- [24] 王军. 基于 SSR 标记的中国对虾抗 WSSV 性状遗传参数估计及野生和选育群体的遗传多样性分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
- Wang J. The genetic parameter estimates on WSSV resistance and genetic diversity analysis in wild and selected populations of *Fenneropenaeus chinensis* based on SSR marker[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017 (in Chinese).
- [25] 孟思远, 常亚青, 李文东, 等. 仿刺参幼参阶段4个生长性状遗传力的估计[J]. *大连海洋大学学报*, 2010, 25(6): 475-479.
- Meng S Y, Chang Y Q, Li W D, *et al.* Heritability of four growth traits in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2010, 25(6): 475-479 (in Chinese).
- [26] Pérez-Rostro C I, Ibarra A M. Heritability and genetic correlation of size traits at harvest size in sexually dimorphic Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) grown in two environments[J]. *Aquaculture Research*, 2003, 34: 1079-1085.
- [27] Tan J, Luan S, Cao B X, *et al.* Evaluation of genetic parameters for reproductive traits and growth rate in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in brackish water[J]. *Aquaculture*, 2019, 511: 734244.
- [28] Gitterle T, Gjerde B, Cock J, *et al.* Optimization of experimental infection protocols for the estimation of genetic parameters of resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2006, 261(2): 501-509.
- [29] Caballero-Zamora A, Montaldo H H, Campos-Montes G R, *et al.* Genetic parameters for body weight and survival in the Pacific White Shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* affected by a White Spot Syndrome Virus (WSSV) natural outbreak[J]. *Aquaculture*, 2015, 447: 102-107.
- [30] Campos-Montes G R, Caballero-Zamora A, Montaldo H H, *et al.* Genetic (co)variation in resistance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and white spot syndrome virus (WSSV) in challenge tests[J]. *Aquaculture*, 2020, 520: 734994.

Evaluation of genetic parameters of body length, body weight and WSSV resistance of *Litopenaeus vannamei* based on microsatellite markers

SUN Kun^{1,2,3}, LI Xupeng^{2,3}, SUI Juan^{2,3}, CAO Jiawang^{2,3}, TAN Jian^{2,3},
LUO Kun^{2,3}, LUAN Sheng^{2,3}, KONG Jie^{2,3}, MENG Xianhong^{1,2,3*}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for
Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;

3. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China)

Abstract: In order to evaluate the genetic parameters of body length, weight and WSSV resistance of *Litopenaeus vannamei* more accurately, 8 microsatellite loci were used to genotype mother and offspring of 69 families of *L. vannamei*, and the pedigree reconstruction and the calculation of the molecular relationship correlation were carried out by using the genotyping information. The reconstructed pedigree, the molecular affinity and the physical pedigree were used to construct the additive genetic correlation matrix. Then, the genetic parameters of body length, body weight and WSSV resistance were evaluated. Finally, through the cross validation method, the prediction ability and accuracy of genetic parameter evaluation were compared. The results of genotyping showed that 166 alleles were detected in 8 microsatellite loci; the number of alleles in each locus was 12-45; the average number of alleles in each locus in parent and offspring population was 9.50 and 18.13; the average observed heterozygosity was 0.618 and 0.709; the average expected heterozygosity was 0.749 and 0.775; the average polymorphism information content was 0.711 and 0.750, respectively, and all of loci showed high polymorphism. The heritability of reconstructed pedigree, molecular affinity and physical pedigree analysis showed that the heritability of body length was 0.119±0.031, 0.120±0.032, 0.132±0.030; the heritability of body weight was 0.176±0.039, 0.182±0.040, 0.172±0.034; and the heritability of resistance to WSSV was 0.135±0.033, 0.134±0.033 and 0.098±0.031, respectively. In the heritability of body length, body weight and resistance to WSSV, the standard deviation of molecular affinity was smaller than that of reconstructed pedigree and physical pedigree. Through cross validation, the prediction ability and accuracy of the three genetic parameters evaluation from high to low are molecular affinity, reconstructed pedigree and physical pedigree. The results showed that it was more accurate to evaluate the body length, body weight and WSSV resistance of *L. vannamei* by using microsatellite molecular markers than using physical pedigree. In the method of evaluating heritability by using microsatellite molecular markers, it was more effective to directly use the genetic correlation of offspring. This study provides a more accurate method for the evaluation of genetic parameters of *L. vannamei* and a reference for further breeding.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; microsatellite; molecular affinity; reconstructed pedigree; heritability

Corresponding author: MENG Xianhong. E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

Funding projects: Shandong Province Agricultural Seed Project (2019LZGC014); Shandong Province Agriculture Major Applied Technology Innovation Project (SD2019YY001); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-48); Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2020TD26)