



凡纳滨对虾全基因组 SSR 标记开发及 不同养殖群体的遗传多样性

王佳佳^{1,2}, 王琼^{1,2}, 秦桢¹, 陈耀辉^{1,2}, 李健^{1,2}, 李吉涛^{1,2*}

(1. 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;
2. 青岛海洋科学与技术国家试点实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东青岛 266071)

摘要: 为了探究 SSR 标记对凡纳滨对虾养殖群体的遗传多样性和群体遗传结构的影响, 为凡纳滨对虾种质资源的遗传改良提供基础信息。实验利用 MISA 软件对凡纳滨对虾全基因组 SSR 位点进行检索, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳获得多态性高的 SSR 标记, 基于 POP-GENE 1.32、PIC-CALC 和 Mega 6.0 软件分析 6 个不同来源的凡纳滨对虾养殖群体的遗传多样性和群体结构特征。在凡纳滨对虾全基因组数据中共鉴定出 10 453 975 个微卫星, 约占基因组序列总长度的 18.56%, 其中, 二碱基微卫星最丰富, 占总数的 82.15%。利用具有多态性的 14 个 SSR 标记分析 3 个国内群体 [桂海 1 号 (CG)、海兴农 2 号 (CH) 和山东养殖群体 (CT)], 及 3 个国外群体 [厄瓜多尔 1 号 (FO)、厄瓜多尔 2 号 (FT) 和墨西哥群体 (FM)] 的遗传特征。结果显示, 14 个 SSR 标记在 6 个群体中共检测到 208 个等位基因变异, 等位基因数、观测杂合度、期望杂合度和多态性信息含量的范围分别为 6~25、0.112~0.994、0.234~0.925 和 0.226~0.918; 遗传多样性丰富程度为 CH>FO>FM>CT>FT>CG。桂海 1 号与山东养殖群体、3 个国外群体间属于中等程度的遗传分化。聚类分析结果显示, 国内群体桂海 1 号和海兴农 2 号聚为一大类, 山东养殖群体与国外群体厄瓜多尔 1 号、厄瓜多尔 2 号和墨西哥群体聚为一大类。研究表明, 筛选的 14 个 SSR 标记可用于凡纳滨对虾群体遗传多样性的评估; 3 个国外群体的遗传多样性相对较高, 且与国内群体桂海 1 号和海兴农 2 号的亲缘关系较远。本研究对凡纳滨对虾种质资源的开发利用与新品种选育具有十分重要的意义。

关键词: 凡纳滨对虾; 养殖群体; 遗传多样性; 基因组; 微卫星标记

中图分类号: Q 348; S 968.22

文献标志码: A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 又称南美白对虾, 其野生群体主要分布于墨西哥至秘鲁太平洋沿岸, 具有温度、盐度适应性广, 生长速率快, 抗病力强等优点。我国是世界上凡纳滨对虾养殖产量最高的国家^[1], 2019 年养殖总产量达 181.5 万 t, 占我国对虾养殖总产量的 85%。我国

凡纳滨对虾的优质种质资源较少, 大部分种虾是由国外进口种虾经过苗种扩繁培育而来, 种虾常年累代近交养殖、育种保种技术落后以及病害检验检疫松懈等导致国内养殖群体遗传多样性降低、种质退化严重, 且病害频发, 对我国对虾养殖业的发展造成了严重的影响^[2]。因此, 在凡纳滨对

收稿日期: 2021-06-10 修回日期: 2021-10-20

资助项目: 国家虾蟹产业技术体系专项 (CARS-48); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2021GH05, 2020TD46)

第一作者: 王佳佳 (照片), 从事甲壳动物遗传育种研究, E-mail: jialp212@163.com

通信作者: 李吉涛, 从事甲壳动物遗传育种研究, E-mail: lij@ysfri.ac.cn



虾遗传选育过程中, 及时评估国内外已有群体的遗传资源现状, 认清不同群体间的分子遗传背景差异, 制定合理配种方案, 是优化国内凡纳滨对虾种质的有效途径。

遗传多样性分析是评估遗传资源状况的重要手段, 其中基于简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 标记的遗传多样性分析是最常用且有效的方法^[3-4]。SSR 标记凭借其多态性高、信息量大、重复性强、技术难度低等优点, 广泛应用于水产动物的遗传结构分析、种质评价及亲子鉴定等研究^[5-7]。李旭鹏等^[8]对 6 个国内凡纳滨对虾群体的遗传背景分析, 发现利用 8 个 SSR 标记可以准确区分不同的凡纳滨对虾群体。刘洪涛等^[9]利用 SSR 标记分析 8 个不同地理位置的凡纳滨对虾群体的种群结构和遗传多样性。Rezaee 等^[10]基于 SSR 标记分析伊朗国内凡纳滨对虾养殖群体的遗传特征。以往研究大多是对国内外凡纳滨对虾养殖群体的独立分析, 尚未见对国内和国外养殖群体的遗传多样性和遗传结构的比较分析。本研究对凡纳滨对虾全基因组数据的微卫星序列特征进行分析, 并筛选 14 个稳定扩增的多态性 SSR 标记, 对 3 个国内凡纳滨对虾群体和 3 个国外群体进行遗传特征研究, 分析当前国内外凡纳滨对虾养殖群体的遗传背景, 为凡纳滨对虾种质资源的开发利用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用凡纳滨对虾包括 3 个国内群体 [桂海 1 号 (CG)、海兴农 2 号 (CH) 和山东养殖群体 (CT)], 3 个国外群体 [厄瓜多尔 1 号 (FO)、厄瓜多尔 2 号 (FT) 和墨西哥群体 (FM)], 每个群体分别随机选取 30 尾虾, 合计 180 尾。每个样本剪取适量的肌肉组织, 置于 2 mL 无菌的离心管中, 保存于 95% 乙醇, 用于后续提取基因组 DNA。实验过程中操作人员严格遵守实验动物相关伦理规范。

1.2 基因组 DNA 提取

使用改进的 SDS 方法提取凡纳滨对虾肌肉组织的基因组 DNA, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, 通过 Nanodrop ND-1000 (Thermo scientific, 英国) 检测 DNA 的质量和浓度, 合格的 DNA 用于 SSR 标记检测。DNA 的工作浓度稀释至 50 ng/ μ L, 置于 -20 °C 保存。

1.3 数据来源及 SSR 位点分析

从凡纳滨对虾基因组数据库网站 (<http://www.shrimpbaseset.net/vannamei.html>) 下载凡纳滨对虾基因组全部序列, 基于 MISA 的脚本 (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>) 对其进行 SSR 筛选, 单核苷酸的筛选标准为 ≥ 10 次, 二核苷酸的筛选标准为 ≥ 6 次, 三、四、五和六核苷酸重复次数 ≥ 5 次。

1.4 SSR 引物设计与筛选

使用 Primer premier 5.0 软件在微卫星侧翼序列上设计引物 (表 1), 设计原则为 GC 含量 40%~60%, 引物长度 18~24 bp, 退火温度 55~60 °C, PCR 产物长度为 100~400 bp。引物的合成由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。PCR 反应体系包括 10 μ L 2 \times Reaction Mix, 0.4 μ L Golden DNA Polymerase [天根生化科技 (北京) 有限公司], 2 μ L DNA 模板, 1 μ L 正向引物, 1 μ L 反向引物, 5.6 μ L 去离子水。反应程序: 95 °C 5 min; 98 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

使用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳验证已扩增出目的片段的 SSR 标记的多态性。选择多态性较好的 14 个 SSR 标记, 使用 ABI 3730XL 测序仪 (Applied Biosystems, 美国) 获得每个样本各 SSR 位点的基因型信息。

1.5 遗传多样性分析

使用 POPGENE version 1.32 软件^[11]计算等位基因数 (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)、遗传一致度和遗传距离; 根据 Botstein 等^[12]的方法, 利用 PIC-CALC 软件计算每个 SSR 位点的多态性信息含量 (PIC); 根据 Nei 氏遗传距离, 采用 Mega 6.0 软件的非加权配对算术平均法构建群体间聚类图。

2 结果

2.1 凡纳滨对虾全基因组微卫星特征分析

利用 MISA 软件, 在总长度为 1 663 588 777 bp 的凡纳滨对虾基因组序列中共检出 10 453 975 个微卫星, 其总长度为 308 796 770 bp, 约占基因组序列总长度的 18.56%, 相对丰度为 6 589.25 个/Mb。在全部的 6 种基序类型中, 二碱基重复基序的数量最多, 为 8 587 589 (82.15%), 其次为单碱基重

表 1 14 个 SSR 位点的信息

Tab. 1 Information of 14 SSR loci in *L. vannamei*

引物名称 primers name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	核心序列(重复次数) core sequence (repeat)	产物大小/bp size	退火温度/°C T _m
Lv01	GAGGACGACCTTGATGATGACA CGCCTCGTAATCTTCGCC	GGA(6)	210	55
Lv03	TCTTAGCGTTTCAAACAGAC AGAGGGGAAAGAAGAATGT	GA(13)	156	55
Lv09	ATGTATGTGCCTGTATGGATGTA AAGTAGAGGCAGTACACGAACAT	TG(7)	265	55
Lv12	GCCACCCATCAGCAAACAT GACCTGCCTCGTTCTTCTCA	GA(67)	366	55
Lv18	TCGCTTCAGTGGGAGTGG ACCCGAACAGCGAACACC	TTTTG(5)	290	55
Lv55	CCTTCTCCCTCAGCAACACAG TGACGGTAAGGAACGCCAAT	AC(27)	302	55
Lv99	TAAATCTGTCTATCTATCGGTCTG GCGACATCTGAACATTAGTGA	TCT(5)	357	55
Lv106	GACATATTCGGCGATCTGTGT AGCATCACCTTTGCGTTCA	AG(9)	242	55
Lv119	AAAATAACTGCAACCGGC AAGTTCATGGTGGCTTTGTCT	GT(7)	137	55
Lv1291	CGTCTTGATTGCCGTGTA TCTTCTTCGCCACTTGTT	GAT(5)	164	55
Lv1292	ATTCCCAACTCCACCCC GCAATAGAAGGGAGAATGAAATG	CCT(6)	255	55
Lv3201	CCTTGGGACTTAGCGTTGG GTAACGATAGGGAGAAAGGCAT	TC(26)	311	55
Lv3202	TAACGATAGGGAGAAAGGCAT TAGCGTTGAAAGAAATACCC	AG(26)	299	55
Lv1969	AAGAGGCACTGACCACTTTATC AGTACTCGAATTGGAGGGGTA	CA(7)	357	55

复 (7.78%) 和三碱基重复 (6.03%), 五碱基重复基序的数量最少 (0.28%) (表 2)。6 种基序类型分别以 A/T(68.04%)、AT/AT(50.34%)、AAT/ATT

(46.72%)、AGAT/ATCT(32.86%)、AACCT/AGGTT (43.92%) 和 AGAGGG/CCCTCT(14.60%) 所占各类型比例最高 (表 3)。

表 2 凡纳滨对虾基因组微卫星分布特征

Tab. 2 Distribution of microsatellite loci in the genome of *L. vannamei*

重复类型 repeat types	重复数量/个 counts	占比/% proportion	长度/bp length	平均长度/bp average length	相对密度/(个/Mb) relative abundance
单碱基 mononucleotide	813 395	7.78%	11 931 269	14.67	512.69
二碱基 dinucleotide	8 587 589	82.15%	268 781 584	31.30	5 412.84
三碱基 trinucleotide	630 065	6.03%	14 810 346	23.51	397.14
四碱基 tetranucleotide	341 209	3.26%	10 031 400	29.40	215.07
五碱基 pentanucleotide	29 298	0.28%	1 105 355	37.73	18.47
六碱基 hexanucleotide	52 419	0.50%	2 136 816	40.76	33.04
合计 total	10 453 975	100%	308 796 770	29.54	6 589.25

表 3 凡纳滨对虾完美型微卫星部分拷贝类别

Tab. 3 Part of copy categories in the perfect SSRs of *L. vannamei*

单碱基 mononucleotide	二碱基 dinucleotide	三碱基 trinucleotide	四碱基 tetranucleotide	五碱基 pentanucleotide	六碱基 hexanucleotide
A/T (553 421)	AC/GT (2 173 723)	AAT/ATT (294 352)	AGAT/ATCT (112 123)	AACCT/AGGTT (12 869)	AGAGGG/CCCTCT (7 651)
C/G (259 974)	AG/CT (2 081 461)	AGG/CCT (122 707)	ACAT/ATGT (75 895)	AAGAG/CTCTT (3 509)	ACATAT/ATATGT (6 996)
	AT/AT (4 323 130)	ATC/ATG (68 980)	AGGG/CCCT (36 946)	AGAGG/CCTCT (3 175)	ACACGC/CGTGTG (5 832)
	CG/CG (9 275)	AAG/CTT (62 731)	ACAG/CTGT (30 723)	AAAAG/CTTTT (2 165)	ACAGAG/CTCTGT (4 046)
		ACT/AGT (30 099)	AAAG/CTTT (20 425)	AGGGG/CCCCT (1 061)	AAAGAG/CTCTTT (3 611)
		AAC/GTT (29 757)	AAAT/ATTT (17 777)	AATAT/ATATT (854)	AATGAT/ATCATT (2 922)
		ACC/GGT (12 714)	ACTC/AGTG (16 972)	AACCC/GGGTT (846)	ACACAT/ATGTGT (2 693)
		AGC/CTG (3 705)	ACGC/CGTG (10 130)	AAGGG/CCCTT (810)	ACTCTC/AGAGTG (2 230)
		CCG/CGG (3 387)	AAAC/GTTT (5 160)	AAACC/GGTTT (514)	AGATAT/ATATCT (2 176)
		ACG/CGT (1 633)	AAGG/CCTT (3 589)	AAAAT/ATTTT (335)	ACACTC/AGTGTG (1 727)

注: 括号内数字指该微卫星数量。

Notes: The number in brackets represents the number of given SSRs.

由图 1 可知, 各重复类型的重复拷贝次数多集中在 50 次以内, 同一种微卫星重复类型, 随着重复拷贝次数的增加, 微卫星的数量逐渐下降。单碱基微卫星的重复拷贝数主要分布在 10~28, 占单碱基的 94.00%; 双碱基微卫星的重复拷贝数主要分布在 6~27, 占双碱基的 86.16%; 三碱基微卫星的重复拷贝数主要分布在 5~12, 占三碱基的 88.70%; 四碱基微卫星的重复拷贝数主要分布在 5~12, 占四碱基的 91.68%; 五碱基微卫星的重复拷贝数主要分布在 5~10, 占五碱基的 86.71%; 六碱基微卫星的重复拷贝数主要分布在 5~11, 占六碱基的 93.73%。

2.2 SSR 标记多态性检测

随机设计并合成 42 对 SSR 引物, 23 对引物能扩增出清晰的条带, 其中 14 对引物在 6 个凡纳滨对虾群体中具有多态性 (图 2)。利用 14 个多态性 SSR 标记共检出 208 个等位基因变异, N_a 、 N_e 、 H_o 、 H_e 的范围分别为 6~25、2.472~12.946、0.112~0.994 和 0.234~0.925, 平均值分别为 14.9、6.055、0.462 和 0.736; PIC 的范围为 0.226~0.918, 平均

值为 0.711 (表 4)。12 个标记的多态性信息含量 > 0.5, 为高度多态性标记。

2.3 凡纳滨对虾群体的遗传多样性分析

凡纳滨对虾群体的遗传多样性参数如表 5 所示, 其中 CG 群体的 5 个遗传多样性参数在 6 个群体中皆为最低。CH 群体的 N_a (8.286) 和 N_e (4.652) 最高, FO 群体的 H_o (0.518) 最高, FT 群体的 H_e (0.710) 和 PIC (0.665) 最高。所有群体的多态性信息含量为 FT>CH>CT>FM>FO>CG, 且 6 个群体的 PIC 均大于 0.5, 表明其遗传多态性较高。

2.4 群体的遗传分化及遗传距离

3 个国外群体相互间遗传分化程度均较低 ($F_{st}<0.05$), 其中 FM 和 FT 群体间的遗传分化水平最低 (0.013 3)。CG 与 3 个国外群体间为中等程度的遗传分化 ($0.05<F_{st}<0.15$), 其中 CG 和 FO 群体间的遗传分化水平最高 (0.081 4)。国内群体 CG 和 CT 群体间属于中等程度的遗传分化 (表 6)。

群体间的遗传相似度和遗传距离如表 7 所示, 6 个群体间的遗传距离的范围为 0.142~0.485, CG

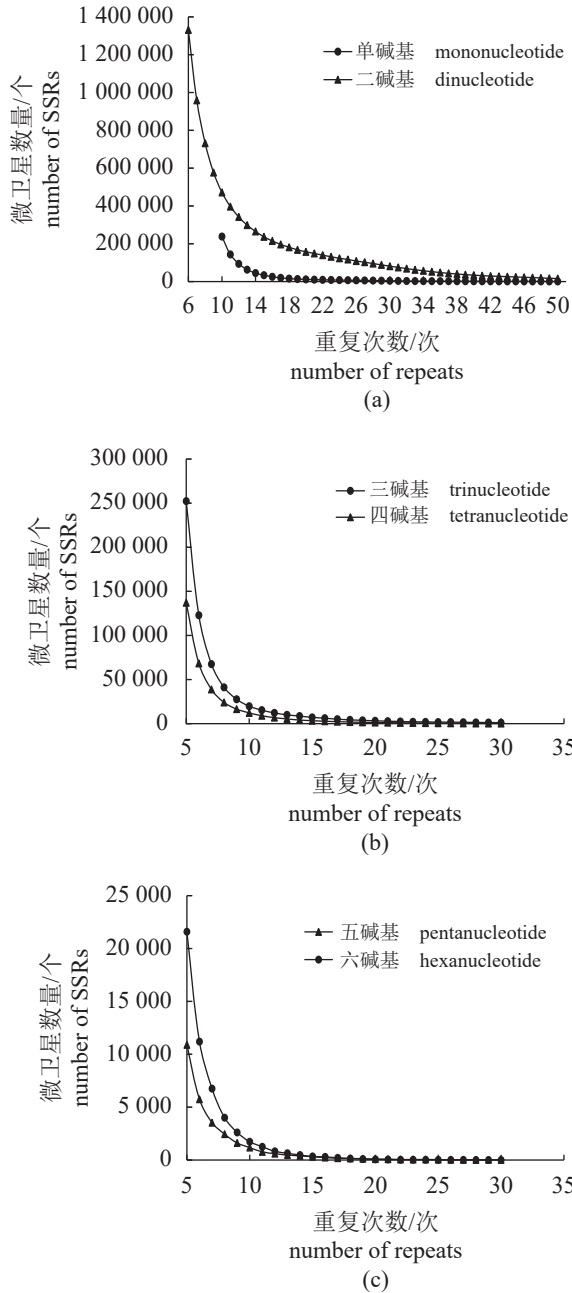


图1 凡纳滨对虾完美型微卫星的重复拷贝次数分布
Fig. 1 Distribution of repeated numbers in the perfect SSRs of *L. vannamei*

与FO群体间的遗传距离最远(0.485), 遗传相似度最低(0.616), CG群体与国外3个群体的遗传距离相对较远; FT和FM间的遗传距离最近(0.142), 遗传相似度最高(0.868)。根据UPGMA对6个不同养殖地区的凡纳滨对虾群体进行聚类(图3), 将其划分为两大类, 国外FM群体先与FT聚为一支, 再与FO聚为一支, 最后与国内CT群体聚为一大支; 国内群体CG与CH聚为一支。

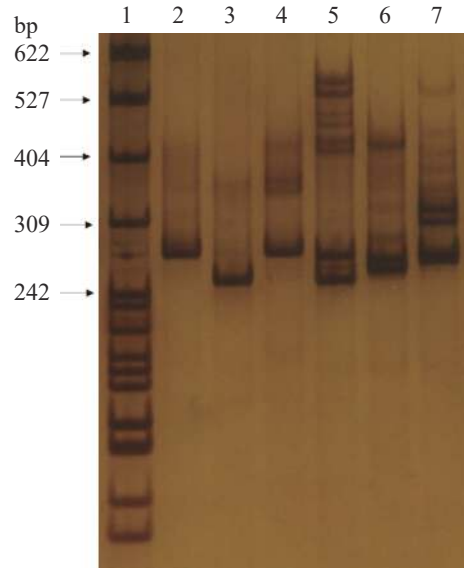


图2 Lv09引物的非变性聚丙烯酰胺电泳图
1. marker PBR322, 2~7. 分别为CT、CG、CH、FO、FM和FT群体样本。

Fig. 2 The non-denatured polyacrylamide gel electrophoresis of Lv09

1. marker PBR322, 2-7. CT, CG, CH, FO, FM and FT, respectively.

表4 14个SSR标记遗传多样性参数

Tab. 4 Genetic diversity parameters of 14 SSR markers

位点 loci	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	多态性信息含量 PIC
Lv01	12	3.260	0.655	0.695	0.655
Lv03	25	7.719	0.380	0.873	0.858
Lv09	16	5.689	0.317	0.827	0.807
Lv12	10	3.303	0.141	0.234	0.226
Lv18	9	3.788	0.434	0.442	0.406
Lv55	25	12.946	0.746	0.925	0.918
Lv99	11	4.707	0.271	0.790	0.759
Lv106	19	8.297	0.485	0.882	0.869
Lv119	13	4.783	0.994	0.793	0.765
Lv1291	6	2.472	0.112	0.597	0.547
Lv1292	11	2.763	0.441	0.640	0.593
Lv3201	22	10.850	0.689	0.910	0.901
Lv3202	20	9.087	0.590	0.894	0.881
Lv1969	9	5.103	0.210	0.808	0.776
平均值 mean	14.857	6.055	0.462	0.736	0.711

2.5 不同群体等位基因的差异

不同群体的等位基因差异分析结果如图4所示, 6个凡纳滨对虾群体中共同包含31个等位基

表 5 6 个凡纳滨对虾群体的遗传特性

Tab. 5 Genetic characteristics of six populations of *L. vannamei*

群体 populations	位点 locus	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	多态性信息 含量 PIC	群体 populations	位点 locus	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	多态性信息 含量 PIC		
CT	Lv01	5	2.748	0.600	0.647	0.588	FO	Lv01	8	3.186	0.600	0.698	0.639		
	Lv03	11	5.426	0.250	0.831	0.796		Lv03	11	3.586	0.414	0.734	0.682		
	Lv09	9	4.467	0.071	0.790	0.752		Lv09	8	3.000	0.407	0.679	0.630		
	Lv12	3	1.249	0.217	0.204	0.190		Lv12	2	1.268	0.240	0.216	0.189		
	Lv18	3	1.428	0.345	0.305	0.278		Lv18	5	2.199	0.621	0.555	0.490		
	Lv55	10	4.986	0.733	0.813	0.771		Lv55	11	5.573	0.700	0.835	0.799		
	Lv99	7	3.698	0.214	0.743	0.684		Lv99	5	3.482	0.241	0.725	0.658		
	Lv106	13	8.237	0.519	0.895	0.868		Lv106	9	4.860	0.519	0.809	0.768		
	Lv119	7	3.766	1.000	0.747	0.695		Lv119	7	2.995	1.000	0.677	0.617		
	Lv1291	5	2.483	0.167	0.607	0.528		Lv1291	3	2.393	0.241	0.592	0.495		
	Lv1292	4	2.740	0.467	0.646	0.572		Lv1292	6	2.679	0.567	0.637	0.556		
	Lv3201	14	8.909	0.714	0.904	0.877		Lv3201	17	10.714	0.733	0.922	0.900		
	Lv3202	13	7.004	0.567	0.872	0.844		Lv3202	13	9.931	0.750	0.938	0.891		
	Lv1969	6	3.689	0.333	0.754	0.694		Lv1969	5	3.733	0.214	0.759	0.688		
	平均值 mean	7.86	4.345	0.443	0.697	0.653		平均值 mean	7.86	4.257	0.518	0.698	0.643		
	CG	Lv01	4	2.182	0.931	0.551		0.442	FM	Lv01	5	3.292	0.724	0.708	0.635
		Lv03	5	1.296	0.071	0.233		0.219		Lv03	12	5.640	0.500	0.838	0.801
Lv09		5	2.835	0.120	0.660	0.580	Lv09	8		5.061	0.320	0.819	0.776		
Lv12		3	1.210	0.188	0.179	0.166	Lv12	4		1.252	0.044	0.206	0.195		
Lv18		3	1.269	0.133	0.215	0.199	Lv18	4		1.684	0.393	0.414	0.371		
Lv55		12	3.913	0.767	0.757	0.711	Lv55	16		11.762	0.552	0.931	0.909		
Lv99		5	3.155	0.179	0.696	0.627	Lv99	7		4.585	0.429	0.796	0.759		
Lv106		5	3.255	0.433	0.705	0.639	Lv106	9		4.333	0.500	0.784	0.739		
Lv119		7	4.358	0.967	0.784	0.737	Lv119	5		2.785	1.000	0.652	0.580		
Lv1291		4	2.177	0.033	0.550	0.441	Lv1291	3		1.515	0.000	0.346	0.301		
Lv1292		3	1.867	0.200	0.472	0.383	Lv1292	7		3.014	0.621	0.680	0.640		
Lv3201		15	7.407	0.667	0.880	0.854	Lv3201	17		9.191	0.655	0.907	0.882		
Lv3202		15	7.317	0.667	0.878	0.852	Lv3202	6		3.790	0.500	0.803	0.701		
Lv1969		6	3.478	0.300	0.731	0.668	Lv1969	7		5.769	0.000	0.855	0.804		
平均值 mean		6.57	3.266	0.404	0.592	0.537	平均值 mean	7.86		4.548	0.445	0.696	0.650		
CH		Lv01	4	1.665	0.483	0.407	0.371	FT		Lv01	7	2.885	0.600	0.664	0.625
		Lv03	8	4.904	0.517	0.810	0.768			Lv03	12	5.391	0.517	0.829	0.794
	Lv09	10	7.153	0.539	0.877	0.845	Lv09		7	3.000	0.444	0.679	0.616		
	Lv12	4	1.228	0.120	0.189	0.178	Lv12		5	1.529	0.067	0.352	0.328		
	Lv18	5	2.350	0.633	0.584	0.514	Lv18		5	1.914	0.483	0.486	0.432		
	Lv55	17	9.092	0.828	0.906	0.882	Lv55		13	10.012	0.897	0.916	0.891		
	Lv99	8	4.506	0.250	0.792	0.751	Lv99		6	3.633	0.310	0.737	0.678		
	Lv106	9	4.486	0.370	0.792	0.752	Lv106		8	4.082	0.567	0.768	0.727		
	Lv119	10	3.719	1.000	0.744	0.702	Lv119		7	2.786	1.000	0.652	0.585		
	Lv1291	5	2.273	0.133	0.570	0.513	Lv1291		5	2.995	0.100	0.677	0.620		
	Lv1292	7	2.539	0.333	0.616	0.537	Lv1292		4	2.416	0.467	0.596	0.545		
	Lv3201	12	8.295	0.733	0.894	0.868	Lv3201		12	7.407	0.633	0.880	0.852		
	Lv3202	12	9.575	0.600	0.911	0.886	Lv3202		10	7.127	0.357	0.892	0.844		
	Lv1969	5	3.347	0.200	0.719	0.657	Lv1969		7	4.900	0.191	0.815	0.766		
	平均值 mean	8.29	4.652	0.481	0.701	0.659	平均值 mean		7.71	4.291	0.474	0.710	0.665		

表 6 凡纳滨对虾群体的遗传分化指数
Tab. 6 Genetic differentiation index of six populations of *L. vannamei*

群体 populations	CT	CG	CH	FO	FM
CG	0.0610				
CH	0.0306	0.0338			
FO	0.0346	0.0814	0.0324		
FM	0.0263	0.0693	0.0354	0.0294	
FT	0.0334	0.0671	0.0239	0.0216	0.0133

表 7 凡纳滨对虾群体间的遗传一致性和遗传距离
Tab. 7 Genetic identity and genetic distance of different populations

群体 populations	CT	CG	CH	FO	FM	FT
CT		0.685	0.790	0.779	0.805	0.779
CG	0.378		0.840	0.616	0.630	0.659
CH	0.236	0.174		0.775	0.751	0.810
FO	0.249	0.485	0.255		0.807	0.835
FM	0.217	0.462	0.287	0.215		0.868
FT	0.250	0.418	0.211	0.180	0.142	

注：对角线上方为遗传一致度，下方为遗传距离。
Notes: The numbers above the diagonal line are genetic identities, and the numbers below the diagonal line are genetic distances.

因类型。3 个国内群体的分析结果表明，CT、CG 和 CH 群体共同检测到的等位基因类型为 57 个，各自特有的等位基因类型分别为 25、8 和 20 个；3 个国外群体的分析结果表明，FO、FM 和 FT 群体共同检测到的等位基因类型为 57 个，各自特有的等位基因类型分别为 21、23 和 23 个。

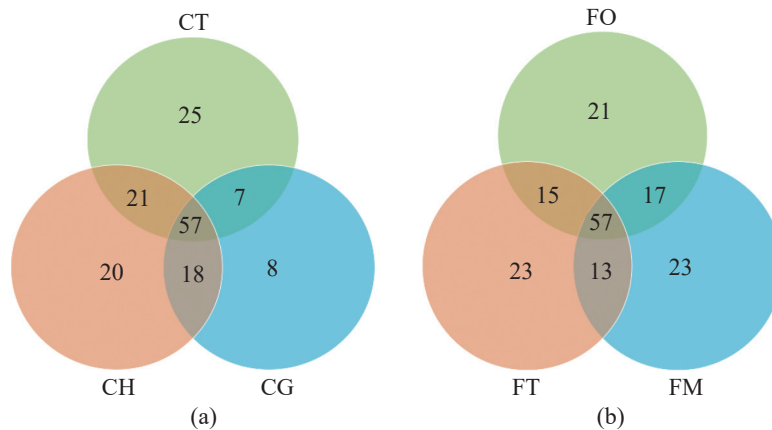


图 4 国内群体 (a) 和国外群体 (b) 等位基因类型分布

Fig. 4 Allele distribution of *L. vannamei* in Chinese populaitons (a) and foreign populaitons (b)

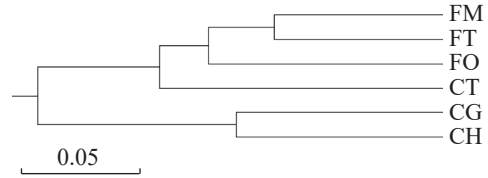


图 3 群体聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of six populations of *L. vannamei*

3 讨论

群体的遗传多样性是评估种群遗传资源状况的重要依据，也是物种适应复杂外界环境和生存进化的基础^[13]。等位基因越多、遗传杂合度越高、多态性信息含量越丰富，则群体的遗传变异更高，更能适应外界环境的变化^[14]。基于分子标记方法对群体的遗传结构和多样性分析是群体遗传分析的有效手段^[15]，其中 SSR 标记检测方法在遗传多样性检测和分子辅助选择育种方面得到广泛的应用^[16]。三代测序技术的发展，促使甲壳动物的基因组数据相继公布^[17-18]，为全基因组水平上 SSR 标记的开发奠定基础。本研究对凡纳滨对虾全基因组微卫星的分布规律进行了统计分析，其相对丰度为 6 589.25 个/Mb，高于甲壳纲 (Crustacea) 的中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*, 572 个/Mb)^[19]；凡纳滨对虾中微卫星序列的长度约占基因组的 18.56%，高于同为对虾属的日本对虾 (*Penaeus japonicus*, 9.79%) 和斑节对虾 (*P. monodon*, 10.90%)^[20]。凡纳滨对虾基因组序列的微卫星优势类型为二碱基重复，这与日本对虾^[20]、斑节对虾^[20] 和红螯光壳螯虾 (*Cherax quadricarinatus*)^[21] 的结果一致，与中华绒螯蟹^[19] 和脊尾白虾 (*Exopalaemon*

carinicauda)^[22]以单碱基重复类型的比例最高不一致, 表明不同甲壳动物基因组的优势微卫星类型存在一定的物种差异性, 但大都以单碱基和二碱基重复为主要类型。

含有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更大的贡献^[23], 本研究基于凡纳滨对虾基因组数据筛选出14个具有多态性的SSR位点, 其等位基因数的范围为6~25个, 平均值为14.857。Santos等^[24]利用凡纳滨对虾EST序列开发EST-SSR标记的等位基因数为2~20个, 平均值为9.5。杨铭等^[25]基于转录组序列开发SSR标记, 其等位基因数的范围为2~11个。与以往的研究结果相比, 本研究开发的SSR标记含有更多的遗传信息, 且12个标记属高度多态标记。本研究筛选的14个SSR标记可用于分析凡纳滨对虾群体遗传多样性, 结果可为凡纳滨对虾遗传资源的鉴定和合理利用提供资料。

群体具有遗传多样性的基础是杂合度的数值 >0.3 , 当 H_o 与 H_e 相近时, 此时群体内处于遗传平衡状态, 当 H_e 高于 H_o 时, 说明群体出现杂合子缺失现象^[26]。本研究所有群体的平均杂合度 >0.4 , H_o 皆小于 H_e , 表明6个群体遗传多样性相对较高, 但国内外商业苗种皆出现杂合子缺失、纯合子过剩的情况; 墨西哥群体在Lv1291和Lv1969位点上的 H_o 为0, 表示墨西哥群体在两个位点上的等位基因皆为纯合子。杂合子缺失导致纯合子增加, 一方面会增加群体遗传的稳定性, 但同时也会增加有害等位基因纯合的几率, 进而降低物种对环境的适应能力。杂合子缺失的现象在国外野生的凡纳滨对虾群体和国内养殖的凡纳滨对虾群体的研究中也发现^[27-28]。因此, 通过群体遗传多样性检测, 设计合理的育种方案, 能够增加群体后代遗传多样性, 防止优良等位基因的丢失。

多态性信息含量的高低与位点变异程度成正比, 本研究中, 桂海1号、山东养殖群体和海兴农2号的多态性信息含量分别为0.537、0.653和0.659, 表现为高度多态性的位点分别有8、12和12个; 厄瓜多尔1号、墨西哥和厄瓜多尔2号群体的多态性信息含量分别为0.643、0.650和0.665, 表现为高度多态的位点分别为11、11和12个。国内群体桂海1号的变异程度相对较低, 且桂海1号群体的平均等位基因数低于其他群体, 表明桂海1号群体的多态性和等位基因的丰度皆相对较低, 可能与其群体内存在一定的近亲交配有关。

<https://www.china-fishery.cn>

遗传距离是衡量不同群体亲缘关系远近的指标^[29]。基于遗传距离的群体聚类分析表明, 凡纳滨对虾的6个群体主要分为2大支, 其中国内群体桂海1号和海兴农2号聚为一支, 说明这两个国内群体的亲缘关系较近; 墨西哥群体和厄瓜多尔2号聚为一个小支, 其遗传距离最近(0.142), 相似度最高(0.868), 可能与两个国外群体的地理位置较近有关; 山东养殖群体与3个国外群体的遗传距离相对较近, 说明其亲本可能来源于国外的进口亲虾。

遗传分化指数是衡量群体间的遗传分化程度的重要指标。遗传分化指数 <0.05 , 说明群体间的遗传分化较弱; 遗传分化指数为0.05~0.15, 属于中等程度的遗传分化^[30]。本研究中, 6个群体间的遗传分化指数为0.0133~0.0814, 表明群体间存在不同程度的遗传分化; 3个国外群体间的遗传分化指数皆小于0.05, 相互间存在较小的遗传分化, 与3个群体来源于太平洋东岸海域有关。桂海1号与3个国外群体的遗传分化指数大于0.05, 其存在中等程度的遗传分化, 说明桂海1号群体作为国内选育品种群体, 与国外群体基因交流较少。结合遗传距离结果表明, 山东养殖群体与国外群体的遗传相似度高且遗传分化低, 桂海1号群体与国外群体的遗传相似度相对较低, 且遗传分化较高。

4 结论

基于微卫星标记的遗传数据丰富了凡纳滨对虾群体的遗传信息, 对于制订凡纳滨对虾选育计划和种质资源的保护策略有一定的参考价值。本研究开发了14个多态性SSR标记, 并对不同来源的凡纳滨对虾群体进行遗传分析, 发现国外群体的遗传多样性相对较高, 与国内群体桂海1号和海兴农2号的亲缘关系较远, 通过引入国外的凡纳滨对虾种质资源进行杂交育种, 发挥杂种优势, 改善后代的遗传多样性水平, 对凡纳滨对虾种质资源开发与新品种选育具有十分重要的意义。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] 孔杰, 栾生. 推进南美白对虾联合育种助力水产种业质量提升[J]. 中国水产, 2020(9): 28-30.

Kong J, Luan S. Promoting joint breeding of *Litopen-*

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- aeus vannamei* to improve the quality of aquatic seed industry[J]. *China Fisheries*, 2020(9): 28-30 (in Chinese).
- [2] 邓伟, 黄太寿, 张振东. 我国南美白对虾种业发展现状及对策建议[J]. *中国水产*, 2013(12): 22-25.
Deng W, Huang T S, Zhang Z D. Development status and countermeasures of *Litopenaeus vannamei* seed industry in China[J]. *China Fisheries*, 2013(12): 22-25 (in Chinese).
- [3] 阮惠婷, 徐姗楠, 李敏, 等. 飘鱼微卫星位点的筛选及珠江流域5个地理群体的遗传多样性分析[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(3): 501-508.
Ruan H T, Xu S N, Li M, *et al.* Microsatellite primers screening and genetic diversity analysis of five geographical populations of *Pseudolaubuca sinensis* in the pearl river basin[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(3): 501-508 (in Chinese).
- [4] Mojekwu T O, Anumudu C I. Microsatellite markers in aquaculture: application in fish population genetics[J]. *IOSR Journal of Environmental Science Toxicology and Food Technology*, 2020, 5(4): 43-48.
- [5] Wang M S, Wang W J, Xiao G X, *et al.* Genetic diversity analysis of spawner and recaptured populations of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) during stock enhancement in the Bohai Bay based on an SSR marker[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2016, 35(8): 51-56.
- [6] Huang C W, Chu P Y, Wu Y F, *et al.* Identification of functional SSR markers in freshwater ornamental shrimps *Neocaridina denticulata* using transcriptome sequencing[J]. *Marine Biotechnology*, 2020, 22(6): 772-785.
- [7] 赵燕, 陈红菊, 孔维祎, 等. 日本沼虾多态性标记筛选及群体遗传结构分析[J]. *水产科学*, 2020, 39(5): 639-648.
Zhao Y, Chen H J, Kong W Y, *et al.* Screening of polymorphic markers and analysis of population genetic structure of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*[J]. *Fisheries Science*, 2020, 39(5): 639-648 (in Chinese).
- [8] 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).
- [9] 刘洪涛, 杨明秋, 何玉贵, 等. 凡纳滨对虾八个地理群体遗传多样性的微卫星分析[J]. *海南大学学报*, 2018, 36(2): 146-152.
Liu H T, Yang M Q, He Y G, *et al.* Microsatellite analysis of genetic diversity in eight geographical populations of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Natural Science Journal of Hainan University*, 2018, 36(2): 146-152 (in Chinese).
- [10] Rezaee S, Farahmand H, Nematollahi M A. Genetic diversity status of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using SSR markers in Iran[J]. *Aquaculture International*, 2016, 24(2): 479-489.
- [11] Lambertini C, Gustafsson M H G, Frydenberg J, *et al.* Genetic diversity patterns in *Phragmites australis* at the population, regional and continental scales[J]. *Aquatic Botany*, 2008, 88(2): 160-170.
- [12] 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.
- [13] Machmoum M, Boujenane I, Azelhak R, *et al.* Genetic diversity and population structure of arabian horse populations using microsatellite markers[J]. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2020, 93: 103200.
- [14] Sharma H, Kumar P, Singh A, *et al.* Development of polymorphic EST-SSR markers and their applicability in genetic diversity evaluation in *Rhododendron arboreum*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(4): 2447-2457.
- [15] 王衍莉, 杨义明, 范书田, 等. 基于SSR分子标记的73份山葡萄及杂交后代的遗传多样性分析[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(1): 189-197.
Wang Y L, Yang Y M, Fan S T, *et al.* Genetic diversity analysis of 73 vitis amurensis and its hybrids offsprings based on SSR molecular markers[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37(1): 189-197 (in Chinese).
- [16] Nahas L D, Alsamman A M, Hamwieh A, *et al.* Functional description and development of polymorphic EST-SSR markers in bread wheat and their gene interactions network[J]. *Gene Reports*, 2020, 21: 100902.
- [17] Zhang X J, Yuan J B, Sun Y M, *et al.* Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and

- frequent molting[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 356.
- [18] Tang B P, Wang Z K, Liu Q N, *et al.* High-quality genome assembly of *Eriocheir japonica sinensis* reveals its unique genome evolution[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 10: 1340.
- [19] 徐杰杰, 毕宜慧, 程景颖, 等. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)全基因组微卫星分布特征研究[J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(Z2): 2422-2429.
- Xu J J, Bi Y H, Cheng J H, *et al.* Study on distribution characteristics of whole genome microsatellite of *Eriocheir sinensis*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2021, 40(Z2): 2422-2429 (in Chinese).
- [20] Yuan J B, Zhang X J, Liu C Z, *et al.* Genomic resources and comparative analyses of two economical penaeid shrimp species, *Marsupenaeus japonicus* and *Penaeus monodon*[J]. *Marine Genomics*, 2018, 39: 22-25.
- [21] 李喜莲, 郭建林, 李倩, 等. 红螯螯虾转录组中的 SSR 位点信息分析 [J]. *湖北农业科学*, 2020, 59(7): 207-211.
- Li X L, Guo J L, Li Q, *et al.* The information analysis of SSR loci in the red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) transcriptome[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2020, 59(7): 207-211 (in Chinese).
- [22] Wang J J, Ge Q Q, Li J T, *et al.* Identification of novel EST-SSR markers by transcriptome sequencing in ridge-tail white prawn *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Genes & Genomics*, 2018, 40(2): 207-215.
- [23] Stephen J G H, Daniel G B. Conserving livestock breed biodiversity[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 1995, 70(7): 267-270.
- [24] Santos C A, Rossini B C, Marques C G, *et al.* Characterization and genomic annotation of polymorphic EST-SSR loci in *Litopenaeus vannamei* shrimp[J]. *Aquaculture Research*, 2012, 43(10): 1567-1570.
- [25] 杨铭, 于洋, 张晓军, 等. 基于转录组数据的凡纳滨对虾微卫星标记开发[J]. *海洋科学*, 2017, 41(2): 96-102.
- Yang M, Yu Y, Zhang X J, *et al.* Development of microsatellite markers from the transcriptome sequences of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Marine Sciences*, 2017, 41(2): 96-102 (in Chinese).
- [26] Williams S T, Benzie J A H. Genetic uniformity of widely separated populations of the coral reef starfish *Linckia laevigata* from the East Indian and West Pacific Oceans, revealed by allozyme electrophoresis[J]. *Marine Biology*, 1996, 126(1): 99-107.
- [27] 方振朋, 孟宪红, 李旭鹏, 等. 基于微卫星分子标记的凡纳滨对虾商业苗种遗传多样性分析[J]. *渔业科学进展*, 2020, 41(5): 101-109.
- Fang Z P, Meng X H, Li X P, *et al.* Genetic diversity analysis of domestic commercial brands seedlings of *Litopenaeus vannamei* based on microsatellite molecular markers[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(5): 101-109 (in Chinese).
- [28] 李强勇, 李旻, 曾地刚, 等. 凡纳滨对虾微卫星分子标记的开发及不同养殖家系遗传多态性分析[J]. *南方农业学报*, 2020, 51(2): 429-436.
- Li Q Y, Li M, Zeng D G, *et al.* Development of microsatellite markers of *Litopenaeus vannamei* and genetic polymorphism analysis of different cultured families[J]. *Journal of southern agriculture*, 2020, 51(2): 429-436 (in Chinese).
- [29] 郑国栋, 陈杰, 蒋霞云, 等. 长江草鱼不同群体EST-SSR多态性标记的筛选及其遗传结构分析[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(5): 1003-1011.
- Zheng G D, Chen J, Jiang X Y, *et al.* Detection of est-ssr markers and genetic structure of different populations of grass carp in Yangtze river system[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(5): 1003-1011 (in Chinese).
- [30] Gong X L, Davenport E R, Wang D H, *et al.* Lack of spatial and temporal genetic structure of Japanese eel (*Anguilla japonica*) populations[J]. *Conservation Genetics*, 2019, 20(3): 467-475.

Development of SSR markers from genomic data for *Litopenaeus vannamei* and analysis of genetic diversity in different cultured populations

WANG Jiajia^{1,2}, WANG Qiong^{1,2}, QIN Zhen¹, CHEN Yaohui^{1,2}, LI Jian^{1,2}, LI Jitao^{1,2*}

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

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

Abstract: *Litopenaeus vannamei* is a major cultured shrimp, accounting for 70% of the total output of mariculture shrimp in China. Genetic improvement is an essential measure for improving the important economic traits in shrimp aquaculture. Understanding the genetic diversity and population structure of different populations using molecular markers is considered as a prerequisite for efficient germplasm exploitation and utilization to deploy suitable breeding program for genetic improvement. Using the criteria of motif repeats, a total of 10 453 975 potential SSRs with a minimum of five repetitions were identified from the 1 663 588 777 bp genome sequence by Perl script of MISA, which accounts for 18.56% of the total length of the genome sequence with a distribution density of 6 589.25 loci/Mb. A total of 42 SSR primer pairs were randomly selected for validation, and 14 SSR loci had allelic polymorphism. The genetic characteristics of three representative domestic populations including Guihai No.1 (CG), Haixingnong No.2 (CH) and Shandong population, and three foreign populations including Ecuador No. 1 (FO), Ecuador No. 2 (FT) and Mexico (FM) were evaluated using 14 polymorphic microsatellite markers. The results showed that 208 alleles were detected in six populations, the average allele number, average expected heterozygosity, average observed heterozygosity and polymorphism information content were 14.9, 0.462, 0.736 and 0.741 1, respectively. The genetic diversity of six populations ranged from high to low: CH > FO > FM > CT > FT > CG. There was medium genetic differentiation between the Guihai No.1 and three foreign populations. The analysis showed that Guihai No.1 and Haixingnong No.2 clustered into one branch, while Shandong population and three foreign populations including Ecuador No. 1, Ecuador No. 2 and Mexico clustered into another branch. In conclusion, the 14 polymorphic markers could be used as efficient markers to analyze the genetic diversity of *L. vannamei* population, and the furthest distance was found between Guihai No. 1 and three foreign populations. This study analyzed the genetic background of six important populations of *L. vannamei*, which is of great significance to its development of breeding program.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; culture population; genetic diversity; genome; microsatellite markers

Corresponding author: LI Jitao. E-mail: lijt@ysfri.ac.cn

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-48); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2021GH05, 2020TD46)