



液相芯片“黄海芯 1 号”在凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病抗性基础群体遗传评估中的应用

刘绵宇^{1,2}, 李旭鹏², 孔杰², 孟宪红², 陈美佳², 罗坤², 隋娟²,
代平², 张雅文², 强光峰², 谭建², 陈宝龙²,
曹家旺², 李波波³, 赖晓芳¹, 栾生^{2*}

(1. 江苏海洋大学海洋科学与水产学院, 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室/
江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 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 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. 邦普种业科技有限公司, 山东 潍坊 261312)

摘要: 为评估基因型鉴定芯片在育种群体构建中的应用价值, 实验对凡纳滨对虾 3 个群体 (EE、PP 和 SS) 进行急性肝胰腺坏死病 (AHPND) 副溶血弧菌 (Vp_{AHPND}) 侵染实验, 利用自主研发的 40K SNP 液相芯片“黄海芯 1 号”获得 146 尾个体的基因型信息, 对群体遗传背景进行了系统调查并估算了 AHPND 抗性遗传力。 Vp_{AHPND} 侵染实验结果显示, 不同群体间存在抗病差异, PP 群体的存活性能比 EE 和 SS 群体分别高出 12.9% 和 11.6%。利用质控后的 38 148 个 SNP 信息构建系统进化树, 结果显示群体内同一个家系的个体首先聚在一起, 进而同属一个群体的多个家系聚在一起。主成分和遗传结构分析显示, 可以准确地将 146 尾个体划分为 3 个组, 与系统进化树聚类结果一致。遗传多样性分析显示, 3 个群体的观测杂合度 (H_o) 平均值为 0.25~0.29, 多态信息含量 (PIC) 平均值为 0.20~0.23, 上述遗传参数达到极显著水平。3 个群体间的遗传分化系数 (F_{ST}) 为 0.11~0.21, 存在中高度遗传分化。基因组近交分析表明, EE、PP 和 SS 群体的近交系数均值分别为 -0.05 ± 0.06 、 0.20 ± 0.09 和 0.37 ± 0.07 , 后 2 个群体内部分个体表现出较高的近交水平。使用 ssGBLUP-MF (Single Step Genomic BLUP with Metafounders) 模型, 复合基因型、表型和系谱信息, 获得 Vp_{AHPND} 侵染后存活状态的遗传力估计值为 0.24 ± 0.07 , 表现为中等水平, 表明基础群体具有较好的选育潜力。研究表明, 利用液相芯片“黄海芯 1 号”开展辅助育种, 可以进一步提高基础群体构建和评估的效率。

关键词: 凡纳滨对虾; 基础群体; AHPND; 育种芯片; 遗传多样性

中图分类号: S 941

文献标志码: A

收稿日期: 2021-10-24 修回日期: 2022-01-02

资助项目: 所级基本科研业务费项目 (20603022020003); 中国水产科学研究院科技创新团队项目 (2020TD26); 山东省农业重大应用技术创新项目 (SD2019YY001); 海南省院士创新平台科研专项 (YSPTZX202104); 湛江市海洋装备与海洋生物揭榜挂帅制人才团队项目 (2021E05032); 现代农业产业技术体系专项 (CARS-48)

第一作者: 刘绵宇 (照片), 从事对虾遗传育种研究, E-mail: liu.mianyu@foxmail.com

通信作者: 栾生, 从事对虾遗传育种研究, E-mail: luansheng@ysfri.ac.cn



凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是我国最重要的海水经济类养殖种类之一, 于 1988 年由我国科学家首次从美国夏威夷引入我国, 逐渐开展规模化人工育苗及养殖研究^[1]。据《中国渔业统计年鉴》统计, 2020 年我国凡纳滨对虾养殖产量超过 186 万 t^[2]。然而, 最近十几年, 病害威胁已成为制约凡纳滨对虾产业发展的一个重要因素。其中, 急性肝胰腺坏死病 (acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND) 是威胁凡纳滨对虾养殖业的主要疾病之一。该疾病于 2009 年首次在中国出现, 造成了重大的经济损失。目前普遍认为 AHPND 是由带有毒素质粒的急性肝胰腺坏死综合征副溶血弧菌 (*Vp_{AHPND}*) 感染引起的^[3]。该病多发于养殖初期, 传播迅速, 死亡率极高, 通过养殖管理很难从根本上抑制弧菌的感染, 因此培育具有 AHPND 抗性的新品种是减少该疾病对产业影响的一条重要的途径。已有研究证明, 凡纳滨对虾 AHPND 抗性存在可遗传的变异^[4], 具备遗传改良的空间。但由于不同群体间的遗传背景和抗性表现存在差异, 因此在组建育种基础群体开展选择育种工作前, 亟需明确奠基者群体的遗传背景及 AHPND 抗性的遗传参数, 为下一步制定育种方案提供关键支撑。此外, 由于凡纳滨对虾属国外引进种, 引进群体间的亲缘关系及其遗传背景不清楚。如果在遗传评估中忽略这种未知亲本组 (unknown parent group, UPG) 效应, 会导致育种群体目标性状的遗传参数估计值出现偏差。通过 Legarra 等^[5] 和 Garcia-Baccino 等^[6] 提出的“元奠基者”(Metafounder) 方法, 利用基因组信息构建基础群体间 Metafounder 亲缘关系矩阵, 可以获得估计值更准确的遗传参数。

单核苷酸多态性 (SNP) 标记因其在基因组上分布广泛、遗传稳定、便于分型等优点, 已成为动物遗传多样性分析的有力工具。有关 SNP 标记在水产动物群体遗传分析方面的研究已有较多报道, 如 Rengmark 等^[7] 利用 26 个 SNP 标记估计了野生和养殖大西洋鲑 (*Salmo salar*) 群体的遗传多样性参数, 并进行了群体划分; Wenne 等^[8] 在鳕鱼 (*Gadus morhua*) 中利用 SNP 信息揭示了不同群体间的遗传差异, Correa 等^[9] 利用 50K SNP 信息估计了大西洋鲑海虱抗性遗传力; 随着技术的发展, 基于固相和液相芯片的高通量 SNP 基因型鉴定技术在水产养殖物种中开始应用。当前, 已针

对大西洋鲑、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、鲤 (*Cyprinus carpio*)、凡纳滨对虾等物种分别开发出 130 K^[10]、5 K^[11]、250 K^[12]、50 K^[13] 等不同密度 SNP 固相芯片, 应用于群体遗传结构分析、体重、海虱抗性、细菌性冷水病抗性等性状基因组选择研究中。针对国内凡纳滨对虾缺乏自主可控的商业育种芯片现状, 中国水产科学研究院黄海水产研究所研发出 40 K SNP 液相芯片“黄海芯 1 号”, 用于育种群体遗传背景分析和重要经济性状遗传评估研究。当前, 尚未有该工具在 AHPND 抗性遗传评估中的应用报道。

本实验收集了 3 个奠基者群体, 构建群体内自交家系组建育种基础群体, 对全同胞家系进行了 *Vp_{AHPND}* 侵染实验, 比较了不同群体的 AHPND 抗性差异; 首次利用液相芯片“黄海芯 1 号”对部分 *Vp_{AHPND}* 侵染后存活或死亡的家系个体进行基因型鉴定, 对比分析了不同群体的遗传背景和遗传多样性; 评估了不同群体的基因组近交水平。此外, 利用基因组 SNP 信息, 首次构建包括元奠基者效应的分析模型, 估计了基础群体 AHPND 抗性的遗传参数, 为利用液相芯片开展凡纳滨对虾 AHPND 抗性育种研究提供了参考。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验材料来自于邦普种业科技有限公司 3 个奠基者群体内自交产生的家系个体, 其中厄瓜多尔群体内自交家系 14 个 (EE 群体); 普利茂群体内自交家系 13 个 (PP 群体); 具有生长快特性的美国群体内自交家系 4 个家系 (SS 群体), 共计 31 个家系。

1.2 AHPND 抗性测试

测试环境及养殖流程 2019 年 12 月至 2020 年 1 月, 在位于即墨鳌山卫镇的农业农村部海水养殖遗传育种中心 (山东省青岛市, 纬度 36°20'32.22"N, 经度 120°39'1.93"E, 海拔 3.04 m) 开展 AHPND 抗性测试。养殖环境为 100 L 水体的玻璃钢水槽 (240 cm×40 cm×20 cm), 养殖海水盐度为 30, 水温为 (24±1) °C, 每天 16:00 投喂一次 0 号颗粒料。

病原浸染 测试个体初期在潍坊邦普种业科技有限公司以家系为单位分别进行养殖, 生长

至体长为 3 cm 左右, 经过病原 (WSSV、EHP、AHPND、IHHNV、DIV1) 检测后, 选择不携带上述病原的家系, 每个家系随机选择 30 尾个体。为确保个体感染弧菌, 将每个家系测试个体移入带有 10 L 海水 (盐度 30、 Vp_{AHPND} 浓度 1×10^7 cfu/mL) 的塑料小桶中浸浴 15 min 后, 模拟实际生产养殖过程中弧菌侵染情况, 转移至 100 L 海水 (盐度 30、 Vp_{AHPND} 浓度 1×10^5 cfu/mL) 的玻璃钢水槽中养殖。在移入玻璃钢水槽 6 h 后, 开始观察个体的存活情况, 每 4 小时观察记录一次, 主要记录死亡个体的家系编号、温度、死亡时间等信息。每 2 天换水一次, 每次换水量 100%, 每次换水后添加菌液使养殖水体含有 1×10^5 cfu/mL Vp_{AHPND} 。全部个体死亡过半后停止实验。

1.3 基因型鉴定

侵染实验开始 24 h 后开始取样, 每隔 4 小时取样一次。为了减少基因型鉴定的样本量, 降低分型成本, 且保证样品能够均匀分散在不同的家系中, 每次每个家系内随机选择一半的死亡个体, 取每个对虾的尾部肌肉放入 5 mL 的冻存管中, 迅速放入液氮中保存。使用高通量 DNA 提取试剂盒获取肌肉组织高质量 DNA, 利用 GenoBaits 探针捕获技术构建液相芯片“黄海芯 1 号”45 KSNP 标记的靶向测序文库, 使用 MGISEQ-2000 测序平台进行测序。原始测序数据通过生信分析最终获得 147 尾对虾的 44 354 个 SNP 标记基因分型信息。通过 PLINK 进行质控, 删除次等位基因频率 (MAF) < 0.05 和 SNP 缺失率 > 0.1 标记, 剔除样本缺失率 > 0.2 的个体, 最终保留了 146 尾个体、38 148 个 SNP 标记, 其中包括 EE 群体 66 尾、PP 群体 54 尾、SS 群体 26 尾。

1.4 群体遗传背景分析

为了明确奠基者群体间的遗传关系, 对 3 个群体 146 尾样本进行遗传背景、遗传结构分析并计算遗传多样性参数。提取 3 个群体的 SNP 信息, 利用 r 包 AGHmatrix 计算得到 G 矩阵后, 通过 R 语言计算特征向量和特征值, 根据特征值计算解释百分比, 并在 R 语言中绘制 PCA 图, 进行主成分分析。利用 admixture 软件对 3 个群体设置 K 值为 2~5 后进行群体结构分析, 使用 r 包 pophelper 包绘制群体遗传结构图^[14]。利用 PLINK1.9 计算 3

个群体的 1-IBS 距离矩阵, 估计群体间的遗传距离, 进一步使用 phylip 软件输出 neighbor-joining 树文件^[15], 由 r 包 ggtree 绘制系统进化树^[16]。利用 PLINK1.9 计算 3 个群体的期望杂合度 (H_e)、观测杂合度 (H_o)。基于 Bostein 等给出的公式编写 R 代码计算多态信息含量 (PIC)^[17]。使用 vcftools 计算群体间遗传分化系数 (F_{st})^[18]。采用 Yang 等^[19] 的方法构建了基因组关系矩阵 (GRM), 矩阵内非对角线元素为群体个体间基因组亲缘关系系数。将矩阵对角线元素减 1 即为每尾分型个体的基因组近交系数。

1.5 遗传参数估计

在本研究中, 设置在总体死亡率达到 50% 时停止实验。因此将个体的存活状态作为评价 AHPND 抗性的表型性状, 其中死亡对虾对应的表型设置为 0, 存活对虾对应的表型设置为 1。利用 R 语言计算不同群体内家系存活率的描述性统计参数, 包括最小值、最大值、标准差和变异系数等。使用 R 包 ggplot2 绘制不同群体内家系存活率的箱型图。

由于实验中的凡纳滨对虾来源于不同群体, 遗传和表型性能存在差异, 使用包括遗传组效应的 pBLUP-GG (pBLUP with genetic groups) 模型以及包括元奠基者的 ssGBLUP-MF (single step genomic BLUP with Metafounders) 模型估计个体存活状态的方差组分。使用两种模型进行分析时, 采用了 930 尾对虾的存活表型数据, 其中包括 784 为未分型个体。

利用平均信息约束最大似然 (AIREML) 方法^[20], 结合父母本阈值性状模型 (连接函数 Probit) 通过 ASReml-R V4.1 包估计凡纳滨对虾存活状态的遗传参数。育种分析模型如下:

$$y_{ijk} \begin{cases} 0, \eta_{ijk} \leq 0 \\ 1, \eta_{ijk} > 0 \end{cases}$$

$$\eta_{ijk} = \mu + Sire_i + Dam_j + e_{ijk}$$

式中, η_{ijk} 表示 k 尾虾的存活状态 (0: 死亡; 1: 存活), 为 y_{ijk} 的潜在变量, 假设其符合累积标准正态分布; μ 表示总体均值; $Sire_i$ 和 Dam_j 表示第 i 个父本和第 j 个母本的加性遗传效应, $Sire$ 和 $Dam \sim (0, A\sigma_{sd}^2)$ 或 $(0, H\sigma_{sd}^2)$ ($\sigma_{sd}^2 = (\sigma_s^2) = (\sigma_d^2)$, σ_μ^2 为父本 (σ_s^2) 和母本 (σ_d^2) 加性遗传方差的均值, A 为加性遗传相关矩阵, H 为复合系谱信息和基因组信

息的亲缘关系矩阵; e_{ijk} 表示第 k 尾虾的随机残差, $e \sim (0, I\sigma_e^2)$, 其中, σ_e^2 是残差方差, I 是单位矩阵。使用 ASReml-R V4.1 包的 `ainverse` 函数, 生成包含遗传组的 A 矩阵^[20]。利用 `creatHmf` 软件生成包含元奠基者的 H 矩阵, 计算前要求所有标记等位基因频率的平均值为 0.5^[6]。

根据以下公式计算基于潜在变量的存活性状遗传力 (h_u^2):

$$h_u^2 = \frac{4\sigma_{sd}^2}{2\sigma_{sd}^2 + \sigma_e^2}$$

使用如下公式将其转换为基于观察值尺度的遗传力 (h_p^2)^[21]:

$$h_p^2 = h_u^2 \frac{z^2}{p(1-p)}$$

式中, p 是存活个体在全部个体中的比例, z 是正

态分布的最高点的纵坐标^[21]。

2 结果

2.1 描述性统计

V_{PAHPND} 侵染共测试 930 尾虾, 其中存活个体 466 尾, 3 个群体存活率均值范围为 44.50%~57.40%, 其中 PP 群体存活率最高为 57.40%, 高出 EE 群体 12.90%, 高出 SS 群体 11.60%。EE 与 SS 群体存活率相似, 分别为 44.50% 和 45.80%。最小存活率 (13.30%) 家系出现在 EE 群体中, 最大存活率 (76.70%) 家系出现在 EE 与 PP 群体中 (表 1)。不同群体内家系存活率变异系数范围为 27.23%~42.01%, 其中 EE 群体的变化幅度最大, PP 群体的变化幅度最小。全部群体内家系存活率变异系数为 34.93% (图 1)。

表 1 凡纳滨对虾不同群体存活率的描述性统计参数

Tab. 1 Descriptive statistical parameters of survival rate of different populations in *L. vannamei*

群体 population	存活个体数 number	存活率/% survival rate	家系存活率 family survival rate				
			家系个数 number of families	最小值/% minimum	最大值/% maximum	标准差/% sd	变异系数/% cv
EE 群体 population	187	44.50	14	13.30	76.70	0.19	42.01
PP 群体 population	224	57.40	13	26.70	76.70	0.16	27.23
SS 群体 population	55	45.80	4	33.30	60.00	0.13	28.09
全部 total	466	50.10	31	13.30	76.70	0.18	34.93

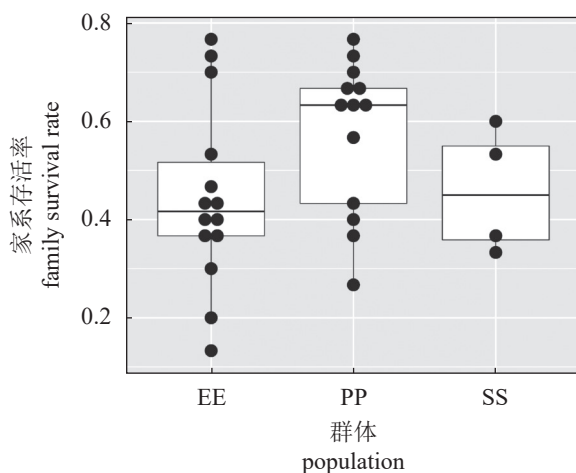


图 1 凡纳滨对虾 3 个群体内家系存活率箱线图

Fig. 1 Box plots of survival rate of families in three populations of *L. vannamei*

2.2 遗传背景分析

系统进化与主成分分析 凡纳滨对虾 3 个群体 146 尾个体的系统进化树显示, 不同家系内

的个体首先聚在一起; 然后 PP 群体聚为一类, EE 群体聚为一类, SS 群体聚为一类 (图 2)。这表明通过 SNP 分型信息可以清晰地分辨出来源于不同群体的个体。通过主成分再次分析个体间的亲缘关系, 可以将 146 尾个体分别确定为对应的 3 个类群 (图 3)。

群体结构分析 凡纳滨对虾 3 个群体 146 尾对虾个体的遗传结构如图 4 所示。当 $K=2$ 时, 不能明确对虾间的遗传背景, 而当 $K=3$ 时, 对虾的遗传背景与系统进化和主成分分析的结果相符, 3 个群体具有不同的遗传背景, 呈现出较为明显的分化。当 $K=4$ 时, EE 群体内出现不同的遗传背景, 并在 $K=5$ 时遗传背景更加驳杂。

遗传多样性参数统计 3 个群体的 H_0 、 H_e 、和 PIC 等遗传多样性统计参数见表 2。其中, PP 群体的估计值最高, EE 群体次之, SS 群体最小。单因素方差分析表明, 不同群体间的差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。EE 群体和 SS 群体间遗传分化系数 (F_{st}) 为 0.13, EE 群体和 PP 群体间 F_{st} 为

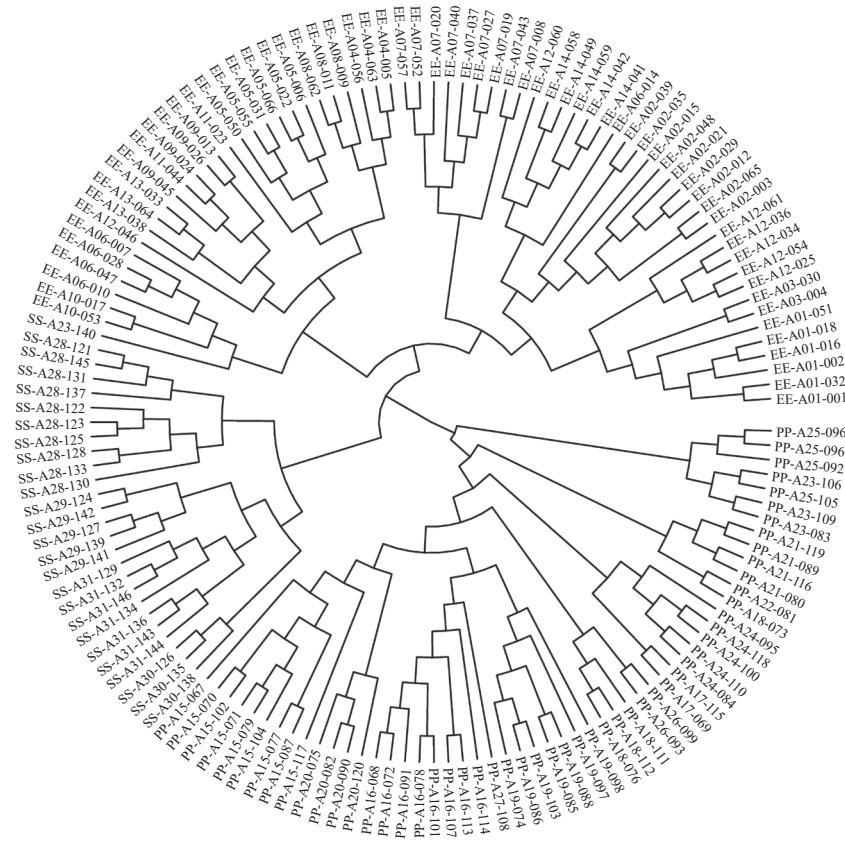


图 2 凡纳滨对虾 3 个群体 146 尾个体的系统进化树

图中编号含义, 以 PP-A15-071 为例, PP 为群体编号, A15 为家系编号, 071 为个体编号

Fig. 2 The phylogenetic tree of the 146 individuals in three populations of *L. vannamei*

0.11, 均为中度遗传分化; PP 群体和 SS 群体间 F_{st} 为 0.21, 遗传分化程度更大。

基因组亲缘关系与近交系数 EE、PP 和 SS 群体的基因组近交系数均值分别为 -0.05 ± 0.06 、 0.20 ± 0.09 和 0.37 ± 0.07 , 后两个群体内部分个体表现出较高的近交水平。EE、PP 和 SS 群体内个体基因组近交系数的变异系数分别为 -112.25% 、 19.79% 和 44.88% (图 5)。EE、PP 和 SS 群体个体间的亲缘系数均值分别为 0.099 ± 0.11 、 0.26 ± 0.14 、 0.47 ± 0.20 , 后两个群体内个体间的亲缘关系更近 (图 6)。因此在构建下一代家系时, 应根据基因组亲缘关系矩阵设计优化方案, 避免后代的近交水平进一步提升。

2.3 方差组分和遗传力

利用 pBLUP-GG 和 ssGBLUP-MF 模型, 获得个体存活状态的加性遗传方差分别 0.38 ± 0.14 和 0.47 ± 0.17 , 遗传力分别为 0.20 ± 0.06 和 0.24 ± 0.07 (表 3)。相较于 pBLUP-GG 模型, 利用 ssGBLUP-MF 模型获得的遗传力估计值更高。

3 讨论

奠基者群体的遗传背景分析对于构建育种基础群体具有重要的意义。奠基者群体间的分化程度越清晰, 奠基者个体间的亲缘关系越明确, 越有利于设计优化的基础群体构建方案。在本研究中, 利用液相芯片“黄海芯 1 号”提供的 38 148 个高质量 SNP 标记调查 3 个引进群体的遗传背景, 其中系统进化分析和 PCA 分析将 146 尾个体划分为 3 个组, 划分结果与实际引种来源高度一致。群体间的 F_{st} 系数也表明, 3 个群体间存在中高度遗传分化。在系统进化树中, 群体内同一个家系的个体首先聚在一起, 进而相同群体的不同家系聚在一起。上述结果表明, 可以利用 3 个奠基者群体设计双列杂交方案, 同时避免群体内个体间的近亲交配, 构建一个遗传变异更为丰富的育种基础群体。利用基因组信息, 即使在奠基者个体遗传背景未知的情况下, 仍然可以准确地查清个体间的亲缘关系, 并对其进行群体划分, 用于指导育种基础群体构建。Agarwal 等^[22] 通过转录组

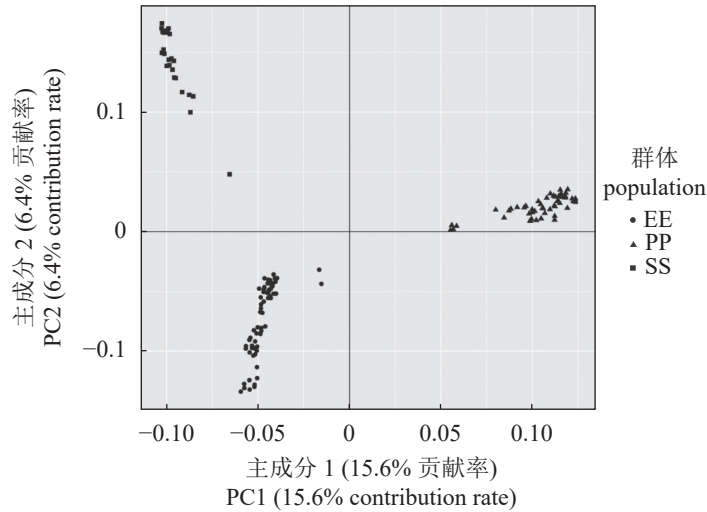


图3 凡纳滨对虾3个群体146尾个体的主成分分析

Fig. 3 The principal component analysis of the 146 individuals in three populations of *L. vannamei*

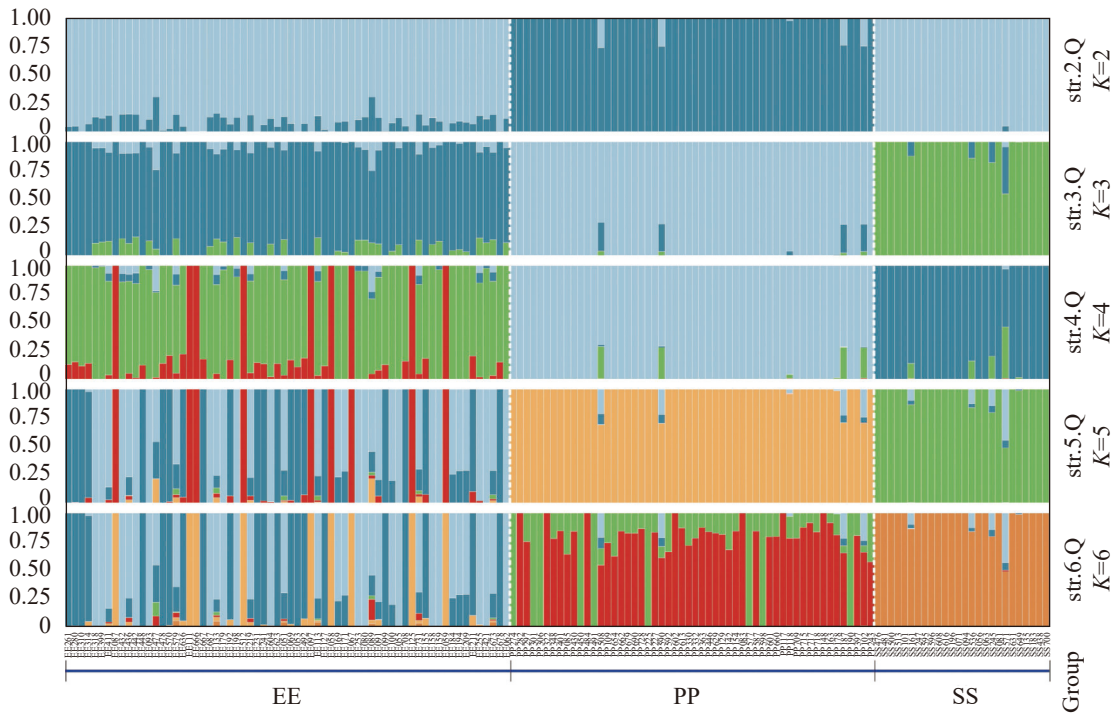


图4 凡纳滨对虾3个群体146尾个体的遗传结构

Fig. 4 The population structure of the 146 individuals in three populations of *L. vannamei*

挖掘 SNP 标记 320 个, 并成功区分了 4 个罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 群体; Larson 等^[23] 通过 RAD 测序技术获得了 10944 个 SNP 标记, 对 5 个大鳞大麻哈鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*) 群体进行划分的准确率均大于 90%; Massault 等^[24] 开发了用于大珠母贝 (*Pinctada maxima*) 亲子鉴定的 SNP 芯片, 准确鉴定出 79 个全同胞家系及其父母本; Arbon 等^[25] 开发了澳大利亚绿边鲍 (*Haliotis laevigata*) 的 SNP 面板, 重构了 16 个候选亲本

及其子代的亲缘关系。

育种基础群体的遗传多样性越丰富, 获得的遗传增益越大, 育种项目的可持续性越强。本研究中 3 个群体的 H_o 范围为 0.25~0.29, PIC 范围为 0.20~0.23, 多态性较低 ($PIC < 0.25$)^[17]。申淑慧等^[26] 利用 24 个位于生长和抗逆功能基因上的 SNP 标记分析了凡纳滨对虾野生和选育群体共计 120 尾虾的遗传多样性, 其中 2 个野生群体的 PIC 值分别为 0.2587 和 0.2762, 略高于本研究结

表 2 凡纳滨对虾 3 个群体的遗传多样性参数

Tab. 2 Genetic diversity parameters in three populations of *L. vannamei*

群体 population	观测杂合度 observed heterozygosity	期望杂合度 expected heterozygosity	多态信息含量 polymorphic information content
PP群体	0.29 ^a	0.29 ^a	0.23 ^a
EE群体	0.27 ^b	0.26 ^b	0.21 ^b
SS群体	0.25 ^c	0.25 ^c	0.20 ^c

注: 同一列不同字母表示经统计检验后群体间差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

Notes: The letters mean significant difference ($P < 0.01$)

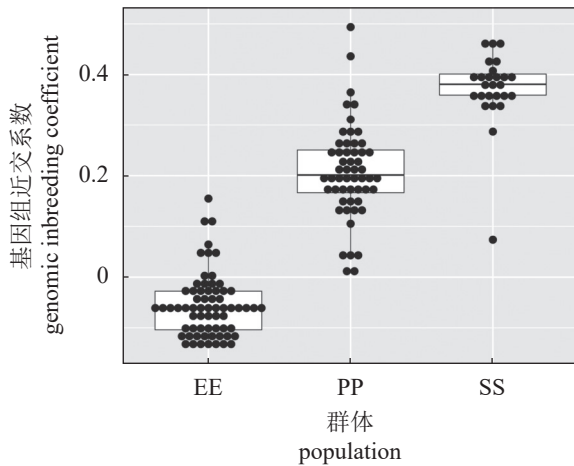


图 5 凡纳滨对虾 3 个群体的基因组近交系数箱形图
Fig. 5 Box plots of genomic inbreeding coefficients in three populations of *L. vannamei*

果; 2 个选育群体的 PIC 值为 0.1341 和 0.1513, 低于本研究结果。Garcia 等^[13] 利用 50K SNP 芯片对来自厄瓜多尔的一个凡纳滨对虾育种群体的 96 尾个体进行基因型鉴定, 获得群体的 H_0 范围 0.3496~0.4041, 高于本研究结果。究其原因, 厄瓜多尔育种群体平均每个世代构建的家系数量约为 140 个, 有效群体大小为 86, 而本研究中进行基因型鉴定个体的来源家系数量仅为 31 个, 从而导致群体的遗传多样性处于较低水平。因此, 下一步需要继续引入新的种质资源群体, 扩大家系,

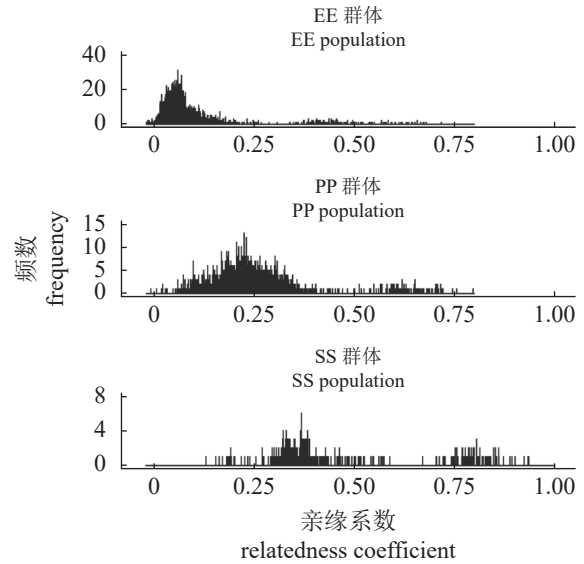


图 6 凡纳滨对虾 3 个群体的基因组亲缘关系矩阵非对角线元素分布
Fig. 6 Histograms of off-diagonal relatedness coefficient in genomic relationship matrix of three populations in *L. vannamei*

提高基础群体的遗传多样性。此外, 基因组近交系数分析结果表明, PP 与 SS 群体内部分个体表现出较高的近交水平。因此在构建下一代家系时, 应根据基因组亲缘关系矩阵设计优化方案, 避免后代的近交水平进一步提升。

在育种过程中, 获得准确的遗传力估计值是制定育种规划、预测育种值和选择反应的前提条件^[27]。当基础群体由遗传和表型性能差异较大的奠基者群体组成时, 需要在分析模型中考虑 UPG 效应, 避免遗传力估计值出现较大偏差^[28]。本研究表明, 使用 ssGBLUP-MF 模型获得的 Vp_{AHPND} 侵染后存活状态的遗传力估计值 (0.24 ± 0.07) 高于使用 pBLUP-GG 模型获得的估计值 (0.20 ± 0.06), 且均表现为中等遗传力, 每代选择预期可获得较高的遗传增益。与基于 A 矩阵的 pBLUP-GG 模型相比, 在 ssGBLUP 模型中利用基因组信息构建包

表 3 基于不同模型估计凡纳滨对虾基础群体存活状态的方差组分和遗传力

Tab. 3 Variance components and heritability of survival state of *L. vannamei* obtained using two models

模型 model	σ_p^2	$4\sigma_a^2$	σ_e^2	h_u^2	h_p^2
pBLUP-GG	1.19±0.07	0.38±0.14	1.00	0.32±0.10	0.20±0.06
ssGBLUP-MF	1.23±0.09	0.47±0.17	1.00	0.38±0.11	0.24±0.07

注: σ_p^2 . 表型方差; $4\sigma_a^2$. 加性遗传方差; σ_e^2 . 残差方差; h_u^2 . 转换前的遗传力; h_p^2 . 转换后的遗传力

Notes: σ_p^2 . phenotypic variance; $4\sigma_a^2$. additive genetic variance; σ_e^2 . residual variance; h_u^2 . heritability on the underlying liability scale; h_p^2 . heritability on the observed scale

括 Metafounders 的 H 矩阵, 可以进一步追溯祖先个体^[29], 更好地刻画个体间的亲缘关系^[30], 减少加性遗传方差与随机残差方差的混淆^[19], 从而获得更高的遗传力估计值。Wang 等^[4] 利用基因组信息获得凡纳滨对虾 Vp_{AHPND} 侵染后存活状态的遗传力估计值为 0.16 ± 0.09 , 略低于本研究结果。这可能是由于本研究中 3 个奠基者群体遗传和表型性能差异大, 携带相对较多与 AHPND 抗性相关的有利等位基因, 从而导致加性遗传变异丰富。对于其他病原如桃拉病毒 (TSV) 和白斑综合征病毒 (WSSV) 抗性, 利用不同的育种群体和分析模型, 获得的遗传估计值变化范围较大 ($0.03 \pm 0.02 \sim 0.28 \pm 0.14$), 表现为中低等遗传力水平^[31-32]。

4 结论

本研究首次利用液相芯片“黄海芯 1 号”提供的高通量 SNP 分型信息, 准确地刻画出 3 个奠基者群体及个体间的亲缘关系; 发现 3 个群体的遗传多样性水平存在显著差异; 构建了个体间的基因组亲缘关系矩阵, 筛选出近交水平较高的部分群体及个体; 查明了基础群体 Vp_{AHPND} 侵染后存活状态的遗传力为中等水平, 相关研究结果为后续育种方案设计和育种群体构建提供了关键的技术参数支持。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 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. The development status and countermeasures of the seed industry of *Penaeus vannamei* in China[J]. China Fisheries, 2013(12): 22-25 (in Chinese).
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2020 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 22-24.
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook in 2020[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020: 22-24 (in Chinese).
- [3] Soto-Rodríguez S A, Gomez-Gil B, Lozano-Olvera R, et al. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(5): 1689-1699.
- [4] Wang Q C, Yu Y, Zhang Q, et al. Evaluation on the genomic selection in *Litopenaeus vannamei* for the resistance against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Aquaculture, 2019, 505: 212-216.
- [5] Legarra A, Christensen O F, Vitezica Z G, et al. Ancestral relationships using metafounders: Finite ancestral populations and across population relationships[J]. Genetics, 2015, 200(2): 455-468.
- [6] Garcia-Baccino C A, Legarra A, Christensen O F, et al. Metafounders are related to F_{st} fixation indices and reduce bias in single-step genomic evaluations[J]. Genetics Selection Evolution, 2017, 49(1): 34.
- [7] Rengmark A H, Slettan A, Skaala Ø, 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.
- [8] Wenne R, Bernas R, Kijewska A, et al. SNP genotyping reveals substructuring in weakly differentiated populations of Atlantic cod (*Gadus morhua*) from diverse environments in the Baltic Sea[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 9738.
- [9] Correa K, Lhorente J P, Bassini L, et al. Genome wide association study for resistance to *Caligus rogercresseyi* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) using a 50K SNP genotyping array[J]. Aquaculture, 2017, 472(S1): 61-65.
- [10] Houston R D, Taggart J B, Cézard T, et al. Development and validation of a high density SNP genotyping array for Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 90.
- [11] Palti Y, Gao G, Liu S, et al. The development and characterization of a 57K single nucleotide polymorphism array for rainbow trout[J]. Molecular Ecology Resources, 2015, 15(3): 662-672.
- [12] Xu J, Zhao Z X, Zhang X F, et al. Development and evaluation of the first high-throughput SNP array for common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 307.
- [13] Garcia B F, Bonaguro Á, Araya C, et al. Application of a novel 50K SNP genotyping array to assess the genetic diversity and linkage disequilibrium in a farmed Pacific

- white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) population[J]. *Aquaculture Reports*, 2021, 20: 100691.
- [14] Francis R M. POPHELPER: An R package and web app to analyse and visualize population structure[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2017, 17(1): 27-32.
- [15] Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), Version 3.5 c[M]. Version Seattle: University of Washington, 1993.
- [16] Yu G C, Smith D K, Zhu H C, *et al.* GGTREE: An R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2017, 8(1): 28-36.
- [17] Botstein D, White R L, Skolnick M H, *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] Danecek P, Auton A, Abecasis G, *et al.* The variant call format and VCFtools[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(15): 2156-2158.
- [19] Yang J, Benyamin B, McEvoy B P, *et al.* Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height[J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(7): 565-569.
- [20] Gilmour A R, Gogel B J, Cullis B R, *et al.* ASReml User Guide Release 4.1 Structural Specification[M]. Hemel Hempstead: VSN international ltd, 2015.
- [21] Robertson A, Lerner I M. The heritability of all-or-none traits: Viability of poultry[J]. *Genetics*, 1949, 34(4): 395-411.
- [22] Agarwal D, Aich N, Pavan-Kumar A, *et al.* SNP mining in transcripts and concomitant estimation of genetic variation in *Macrobrachium rosenbergii* stocks[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2016, 8(2): 159-168.
- [23] Larson W A, Seeb L W, Everett M V, *et al.* Genotyping by sequencing resolves shallow population structure to inform conservation of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)[J]. *Evolutionary Applications*, 2014, 7(3): 355-369.
- [24] Massault C, Jones D B, Zenger K R, *et al.* A SNP parentage assignment panel for the silver lipped pearl oyster (*Pinctada maxima*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2021, 20: 100687.
- [25] Arbon P M, Silva C N S, Jones D B, *et al.* Development and validation of a SNP-based genotyping tool for pedigree establishment in Australian greenlip abalone *Haliotis laevis* Donovan, 1808[J]. *Aquaculture Reports*, 2021, 20: 100746.
- [26] 申淑慧, 戴习林. 基于生长和抗逆功能基因SNP分子标记的凡纳滨对虾野生及选育群体遗传多样性分析[J]. *南方农业学报*, 2020, 51(11): 2836-2845.
- Shen S H, Dai X L. Genetic diversity analysis in wild and selected populations of *Penaeus vannamei* based on SNP markers in growth and stress resistance genes[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2020, 51(11): 2836-2845 (in Chinese).
- [27] Falconer D S. Introduction to Quantitative Genetics[M]. Harlow: Longman, 1996.
- [28] Macedo F L, Christensen O F, Astruc J M, *et al.* Bias and accuracy of dairy sheep evaluations using BLUP and SSGBLUP with metafounders and unknown parent groups[J]. *Genetics Selection Evolution*, 2020, 52(1): 47.
- [29] Legarra A, Aguilar I, Misztal I. A relationship matrix including full pedigree and genomic information[J]. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(9): 4656-4663.
- [30] Hayes B J, Visscher P M, Goddard M E. Increased accuracy of artificial selection by using the realized relationship matrix[J]. *Genetics Research*, 2009, 91(1): 47-60.
- [31] Argue B J, Arce S M, Lotz J M, *et al.* Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus[J]. *Aquaculture*, 2002, 204(3-4): 447-460.
- [32] Gitterle T, Rye M, Salte R, *et al.* Genetic (co) variation in harvest body weight and survival in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* under standard commercial conditions[J]. *Aquaculture*, 2005, 243(1-4): 83-92.

Application of the liquid chip "Yellow Sea Chip No.1" in genetic evaluation of the base population with resistance to acute hepatopancreatic necrosis disease in *Litopenaeus vannamei*

LIU Mianyu^{1,2}, LI Xupeng², KONG Jie², MENG Xianhong², CHEN Meijia², LUO Kun², SUI Juan², DAI Ping², ZHANG Yawen², QIANG Guangfeng², TAN Jian², CHEN Baolong², CAO Jiawang², LI Bobo³, LAI Xiaofang¹, LUAN Sheng^{2*}

(1. Key Laboratory of Marine Biological Resources and Environment of Jiangsu Province, College of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

2. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. BLUP Aquabreed Co., Ltd., Weifang 261312, China)

Abstract: To evaluate the application potential of single nucleotide polymorphism(SNP) chip in the construction of the base population for breeding, three different populations (EE, PP and SS) of *Litopenaeus vannamei* were challenged by *Vibrio parahaemolyticus* (Vp_{AHPND}), and the genomic information of 146 samples was obtained using the independently developed 40K SNP liquid chip "Yellow Sea Chip No.1". The genetic background was systematically investigated and acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) resistance of populations was estimated. The Vp_{AHPND} challenge test indicated that there were differences in disease resistance between different populations. When the overall mortality was more than 50%, the survival rate of PP population was 12.9% and 11.6% higher than that of EE and SS populations, respectively. The phylogenetic tree was constructed by using 38 148 SNP markers after quality control. The result showed that the individuals of the same family first clustered together, and then the multiple families of the same population clustered together. Principal component analysis and genetic structure analysis also implied that the 146 individuals could be accurately divided into 3 groups, which was consistent with the phylogenetic tree. The analysis of genetic diversity for three populations showed that the average value of observed heterozygosity (H_o) was 0.25-0.29. The average value of polymorphic information content (PIC) was 0.20-0.23. The differences on the above three parameters between three populations were very significant ($P < 0.01$). The coefficient of genetic differentiation (F_{ST}) among the three populations was 0.11-0.21, indicating that there was medium-high level of genetic differentiation. Genomic inbreeding analysis showed that the average inbreeding coefficients of EE, PP and SS populations were -0.05 ± 0.06 , 0.20 ± 0.09 and 0.37 ± 0.07 , respectively. Some individuals of PP and EE populations showed high levels of inbreeding. Using single step genomic BLUP with metafounder(sssGBLUP-MF) model with genotype, phenotype and pedigree information, the estimated heritability of survival after Vp_{AHPND} infection was medium (0.24 ± 0.07), indicating that the base population had a promising breeding potential. To summarize, the efficiency of constructing and evaluating the base population can be further enhanced by using the liquid chip "Yellow Sea Chip No.1".

Key words: *Litopenaeus vannamei*; base population; AHPND; SNP chip; genetic diversity

Corresponding author: LUAN Sheng. E-mail: luansheng@ysfri.ac.cn

Funding projects: Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (No. 20603022020003); Science and Technology Innovation Team project of Chinese Academy of Fishery Sciences (2020TD26); Major Applied Technology Innovation Project of agriculture in Shandong Province (No. SD2019YY001); Scientific Research Project of Academician Innovation platform in Hainan Province (YSPTZX202104); Talent Team bidding Project of Marine Equipment and Marine Biology in Zhanjiang (2021E05032); Supported by China Agriculture Research System (CARS-48)