

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)选育群体与杂交群体遗传多样性差异及其在低温条件下生长性能的比较*

李东宇^{1,2,3} 孟宪红^{1,2}① 孔杰^{1,2} 栾生^{1,2} 曹宝祥^{1,2} 罗坤^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081)

摘要 选取连续3年选育的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)群体作为选育群体(SP), 选育群体与引进的凡纳滨对虾群体的杂交 F₁代群体(HP), 探究了这2个群体在低温条件下的生长性能及遗传多样性的差异。结果显示, 在生长性能方面, HP群体与SP群体的平均体重分别为(13.18±3.65)g和(12.20±3.14)g, 变异系数(CV)分别为27.69%和25.74%。HP群体的体重和其他可测量性状的平均值均大于SP群体。单因素方差分析(One-way ANOVA)表明, 2个群体体重(BW)和第3腹节宽(TASW)存在极显著差异(P<0.01)。HP群体的特定增长率(SGR)和绝对增重率(AGR)分别为(5.09±0.61)%/d和(0.26±0.60)g/d, SP群体的SGR和AGR分别为(4.94±0.57)%/d和(0.24±0.63)g/d, HP群体的SGR和AGR均极显著高于SP群体(P<0.01), 表明HP群体相对于SP群体有着明显的生长优势。在遗传多样性方面, HP群体的平均等位基因数(N_a=7.9)略高于SP群体(N_a=7.6)。HP群体和SP群体的平均多态信息含量(PIC)分别为0.63和0.62, 均为高度多态。2个群体的平均观测杂合度(H_o)分别为0.492(HP群体)和0.483(SP群体), 平均期望杂合度(H_e)分别为0.675(HP群体)和0.663(SP群体), HP群体的H_e和H_o均略高于SP群体, 表明HP群体相比SP群体有着更加丰富的遗传多样性。遗传分化分析表明, 2个群体间遗传分化指数(F_{st})为0.1556, 表明群体间遗传分化水平显著。

关键词 凡纳滨对虾; 杂交育种; 耐低温; 生长性能; 遗传多样性

中图分类号 Q785 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)04-0069-09

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)俗称南美白对虾, 自然分布于墨西哥南部至秘鲁北部的太平洋沿岸水域, 具有生长速度快、抗逆性强等特点(王兴强

等, 2004)。目前, 凡纳滨对虾的养殖产量已达到我国养殖对虾总产量的80%以上(渔业统计年鉴, 2011), 成为我国最重要的海水经济类养殖品种之一。

* 中国水产科学研究院黄海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(20603022016006)、山东省重点研发计划项目(2016GSF115030)、青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ01)和泰山学者种业计划专家良种工程项目共同资助 [This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016006), the Focus on Research and Development Projects of Shandong Province(2016GSF115030), Science and Technology Innovation Program of National Laboratory for Marine Science and Technology of Qingdao (2015ASKJ01), and the Seed Project of Taishan Scholar Seed Industry Program]. 李东宇, E-mail: 1138854187@qq.com

① 通讯作者: 孟宪红, 研究员, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-03-01, 收修改稿日期: 2016-03-08

凡纳滨对虾自然生长温度为 25–35℃, 低于 18℃ 时则停止摄食(Ponce-Palafox *et al*, 1997)。但是, 近年来由于气候异常, 频发低温现象, 导致凡纳滨对虾大量死亡, 同时, 温度因素也影响着凡纳滨对虾的养殖产量和效益(Qiu *et al*, 2011)。因此, 选育耐低温性状优良的凡纳滨对虾良种已经成为其育种领域的重要目标之一。

在水产动物育种过程中, 利用不同遗传背景的人群体进行相互杂交能获得杂种优势(姚雪梅等, 2007), 而探究不同群体间自交与杂交子代性状的差异性, 能够为在生产中如何充分利用杂种优势提供理论和实践的经验。在凡纳滨对虾育种领域, 目前已报道的有“中兴 1 号”(陈锚等, 2008)、“中科 1 号”(黄永春等, 2010)、“科海 1 号”(安迪, 2011)¹⁾和“壬海 1 号”(梁华芳等, 2011), 其优良性状包括生长速度、存活率、抗病等, 均是利用杂种优势选育出来的(阮晓红等, 2013), 但目前未见与耐低温性状相关的选育良种。

微卫星分子标记目前已被广泛应用在水产动物育种领域中(张博等, 2012)。利用微卫星分子标记对群体间进行遗传多样性和遗传结构差异性的研究, 既有助于对选育群体进行遗传多样性监测, 也对亲本群体的选择也有着指导作用(Cruz *et al*, 2004)。目前, 在许多水产动物中都有相关的研究报告, 如大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) (候仕营等, 2011)、斑节对虾(*Penaeus monodon*) (Dixon *et al*, 2008)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) (张天时等, 2005)、太平洋鲑(*Gadus macrocephalus*) (Liu *et al*, 2010)、海湾扇贝(*Argopecten irradians*) (Wang *et al*, 2007)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*) (张荣良等, 2016)等。

本研究利用中国水产科学研究院黄海水产研究所种质资源与工程育种研究室连续 3 年选育的凡纳滨对虾群体, 与国外引进的群体进行杂交, 比较自交与杂交 F₁ 群体在低温条件下生长性能的差异, 同时利用 13 个微卫星位点, 对 2 个子代群体进行遗传多样性及遗传分化的研究, 以期对凡纳滨对虾耐低温遗传改良与杂交选育提供遗传背景数据和生产实践经验。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所选凡纳滨对虾来源于中国水产科学研究

院黄海水产研究所农业部海水遗传育种中心, 主要包括 2 个群体。

1.1.1 选育群体(SP) 由美国和新加坡引进的 7 个不同来源的凡纳滨对虾群体作为基础群体, 通过采用控制近交的交配方案, 进行以生长性状为主的多性状复合选育, 经连续 3 年选育后形成的育种群体, 共 45 个家系。

1.1.2 杂交群体(HP) 由凡纳滨对虾选育群体的种虾作为父本或母本, 当年从韩国和新加坡的良种公司引进的凡纳滨对虾种虾作为母本或父本, 杂交产生的 F₁ 代群体, 共 30 个家系。

1.2 实验方法

1.2.1 低温生长测试 将建立的凡纳滨对虾家系培育至体长约 3 cm 时, 对每个家系的个体进行 VIE 荧光标记, 以便在混养时区分不同的家系。标记后, 逐尾测量初始生长性状指标, 并将所有家系转移至 100 m² 养殖池内混养。暂养期间, 每天降温 1℃ 至 (19.0±0.5)℃ 时正式开始实验, 实验共持续 50 d。实验期间, 每天投喂 3 次配合饲料, 投喂量为池中虾总体重的 3%–8%, 每天定时排污 1 次, 期间不换水, 每 3 d 补水 1 次至正常水位。

1.2.2 实验数据的采集 低温生长测试结束后, 对存活的凡纳滨对虾个体进行生长性状的测量。对每个样品测量其体长(BL)、体重(BW)、第 1 腹节宽(FASW)、第 3 腹节宽(TASW)、第 1 腹节长(FASL)、第 1 腹节高(FASH)、头胸甲长(CL)和腹节全长(ASL), 其中, FASW、TASW、FASL、FASH、CL、ASL 用电子游标卡尺进行测量, 精度为 0.01 mm; 体长的测量采用普通直尺, 精度为 0.1 cm; 体重采用电子天平进行测量, 精度为 0.01 g。表型性状测量完毕后, 每个家系随机选取 10–20 尾个体, 提取腹部肌肉组织, 并保存在–80℃ 冰箱中备用。

1.2.3 凡纳滨对虾基因组 DNA 的提取与检测 参照王伟继(2008)²⁾的方法提取凡纳滨对虾基因组 DNA。用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。用微量紫外分光光度计对 DNA 进行定量检测(五洲东方牌), 检测浓度和吸光值(A_{260 nm}/A_{280 nm}, 最佳范围为 1.8–2.0), 定量后将 DNA 溶液稀释至 50 ng/μl, –20℃ 冷冻保存备用。

1) An D. Study on the effect of selective breeding and genetic parameters for *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of North West Agriculture and Forestry University, 2011, 10–12 [安迪. 凡纳滨对虾体重和体尺性状的遗传参数和选择育种效果研究. 西北农林科技大学硕士研究生学位论文, 2011, 10–12]

2) Wang WJ. Genetic mapping of the Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) using AFLP markers and commercial traits QTL mapping. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2008, 19–20 [王伟继. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建以及相关性状的 QTL 定位分析. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2008, 19–20]

1.2.4 PCR 扩增及产物基因分型 采用本实验室建立的 3 组凡纳滨对虾微卫星多重 PCR 体系进行样品的检测。微卫星位点信息及修饰荧光类型见表 1, 并利用 ABI 3130xl 测序仪对 PCR 产物进行基因分型。荧光引物合成由上海生物工程技术有限公司完成。

1.3 数据分析

1.3.1 生长数据分析 应用 Excel 统计所测量表型性状的最大值(Max)、最小值(Min)、平均值(AVG)、标准差(SD)和变异系数(CV)。应用 SPSS 19.0 数据分析软件计算特定增长率(SGR)和绝对增重率(AGR), 并通过单因素方差分析(One-way ANOVA)检验生长性状的差异显著性。特定增长率(SGR)和绝对增重率(AGR)分别通过以下公式计算:

$$\text{特定增长率(Specific growth rate, SGR, \% / d)} = 100 \times (\ln W_e - \ln W_b) / t$$

$$\text{绝对增重率(Absolute weight gain, AGR, g/d)} = (W_e - W_b) / t$$

式中, W_b 和 W_e 分别指生长初期的体重和生长末期的体重, t 为养殖的天数。

1.3.2 分子数据分析 利用 GeneMapper 4.0 软件进行基因分型数据分析。利用 Cervus 3.0 软件对基因型数据进行分析, 主要分析内容包括平均等位基因数(N_a)、平均观测杂合度(H_o)、平均期望杂合度(H_e)、平均多态信息含量(PIC)以及哈迪-温伯格(Hardy-Weinberg)平衡。利用 Popgene 3.2 软件计算群体遗传分化指数(F_{st})以及进行群体中各个微卫星位点的 F -statistics 分析。

表 1 凡纳滨对虾微卫星多重 PCR 位点信息及其修饰荧光类型
Tab.1 The information and the fluorescence labeling of microsatellite multiplex PCR for *L. vannamei*

组别 Groups	位点名称 Loci	退火温度 Annealing temperature(°C)	引物序列(5'-3')及荧光类型 Primer sequences (5'-3') and the fluorescence labeling of primers
五重 PCR Multiplex PCR of 5 loci	TM6	60	F: 6-FAM-TGGAGATTTTCGGAACCTTTG R: CTGCTGGAGCACAAAATCT
	TUMXLv3.1	58	F: ROX-TAAAACCGAAAGACAATGGCG R: CTGACATTGCGTTATGATTGG
	TUMXLv7.121	58	F: HEX-GGCACACTGTTTAGTCCTCG R: CGAACAGAATGGCAGAGGAG
	TUMXLv9.90	58	F: TAMRA-GACCAAAGGATATTGGCTCG R: GTAATCAGGAGATGGTCCCG
	1103	55	F: 6-FAM-GGCTGTGTTTTCGGGTGTAGTTT R: TCATACGATAATGGCATAGAAGG
四重 PCR1 Multiplex PCR1 of 4 loci	TUMXLv10.117	58	F: 6-FAM-CTCCAGGACCGATAATGAGG R: CGACAGTCAAAACAAACATCC
	TUMXLv9.103	58	F: ROX-CACCAAACGAACGAAACG R: GGATAAAAACGAATTGTATACCG
	TUMXLv10.14	55	F: HEX-CAGTCTACACGCACAGGCAC R: TTATACGGCGTTCTCTTGG
	10749	55	F: TAMRA-GAATACGTAGCGGAGATCCCA R: TAATGCAGCGATGCGATT
四重 PCR2 Multiplex PCR2 of 4 loci	Lv12	55	F: 6-FAM-GATCATTCGCCCTCTTTTT R: ATCTACGGTTCGAGAGCAGA
	Lv14	55	F: ROX-TATGCTCGTTCCCTTTGCTT R: TTGAAGGAAAAGTGTGGGG
	TUMXLv10.33	56	F: HEX-CGAAGAGATTTATCCAGGG R: CGTGCATTATTATCCTTTCC
	10592b	55	F: TAMRA-AAAGACACTTACTAAACAGTCGAT R: CGTCTCGTTGTTGAGTTATAAACA

2 结果

2.1 低温条件下 2 个群体生长性状统计

凡纳滨对虾 SP 群体和 HP 群体在低温条件下体重及其他可测量性状的统计见表 2。从表 2 可以看出, SP 群体平均体重为(12.20±3.14) g, HP 群体平均体重为(13.18±3.65) g, HP 群体的平均体重要高于 SP 群体; SP 群体和 HP 群体体重的变异系数(CV)分别为 25.74%和 27.69%。HP 群体 BL、FASW、TASW、FASL、FASH、CL 和 ASL 的平均值均高于 SP 群体。生长性状单因素分析表明, 2 个群体 BW 和 TASW 存在极显著差异($P < 0.01$), 但 BL 性状差异不显著($P > 0.05$), 其他性状由于不符合方差齐性检验, 因此, 方差分析无

意义(表 3)。

2.2 2 个群体在低温条件下 SGR 和 AGR 的比较

通过计算得到 2 个群体的 SGR 和 AGR(表 2)。结果显示, 在低温生长条件下, HP 群体的 SGR 和 AGR 分别为(5.09±0.61) %/d 和(0.26±0.60) g/d, SP 群体的 SGR 和 AGR 分别为(4.94±0.57) %/d 和(0.24±0.63) g/d, HP 群体的 SGR 和 AGR 均高于 SP 群体。对 2 个群体的 SGR 和 AGR 值进行 ANOVA 分析表明, 2 个群体的 SGR 和 AGR 值均存在极显著差异($P < 0.01$), HP 群体相比 SP 群体有明显的生长优势。HP 群体和 SP 群体的生长性状和 SGR 及 AGR 的方差分析见表 3。

表 2 凡纳滨对虾低温条件下生长性状及特定增长率和绝对增重率的统计

Tab.2 The statistical description of growth traits, SGR and AGR of *L. vannamei* under low temperature conditions

性状指标 Traits	群体 Population	样本含量 Sample size	平均值 Mean	标准差 SD	标准误 SE	均值的 95%置信区间 95% confidence interval		极小值 Min	极大值 Max	变异系数 CV(%)
						下限 Lower	上限 Upper			
体重	SP	1332	12.20	3.14	0.0860	12.03	12.37	0.00	27.59	25.74
BW(g)	HP	946	13.18	3.65	0.0979	12.98	13.37	0.00	22.18	27.69
体长	SP	1332	9.69	1.54	0.0422	9.61	9.78	0.00	14.10	15.89
BL(cm)	HP	946	9.82	1.93	0.0626	9.70	9.95	0.00	13.40	19.65
第 1 腹节宽	SP	1332	11.75	1.39	0.0381	11.67	11.82	0.00	18.07	11.82
FASW(mm)	HP	946	12.25	1.20	0.0391	12.17	12.32	7.06	15.48	9.80
第 3 腹节宽	SP	1332	9.10	1.29	0.0354	9.03	9.17	0.00	13.06	14.17
TASW(mm)	HP	946	9.61	1.18	0.0384	9.54	9.69	4.51	13.67	12.28
第 1 腹节长	SP	1332	11.36	1.39	0.0382	11.29	11.44	1.19	26.66	12.24
FASL(mm)	HP	946	11.77	1.15	0.0375	11.69	11.84	4.89	15.97	9.77
第 1 腹节高	SP	1332	11.12	6.38	0.1750	10.78	11.46	0.00	132.62	57.37
FASH(mm)	HP	946	11.55	5.18	0.1684	11.22	11.88	0.00	19.61	44.84
头胸甲长	SP	1332	25.15	2.48	0.0680	25.02	25.28	0.00	33.00	9.86
CL(mm)	HP	946	25.94	2.13	0.0693	25.81	26.08	0.00	30.96	8.21
腹节全长	SP	1332	58.77	6.27	0.1718	58.43	59.11	0.00	80.23	10.67
ASL(mm)	HP	946	61.11	5.22	0.1699	60.78	61.45	37.40	93.27	8.54
特定增长率	SP	1327	4.94	0.57	0.0156	4.91	4.97	0.28	6.63	11.54
SGR(%/d)	HP	944	5.09	0.61	0.0197	5.05	5.13	0.15	6.02	11.98
绝对增重率	SP	1332	0.24	0.63	0.0017	0.24	0.25	0.00	0.55	25.00
AGR(g/d)	HP	946	0.26	0.60	0.0020	0.26	0.27	0.00	0.44	23.07

2.3 2 个群体遗传多样性的差异

通过对 3 组多重 PCR 共 13 个微卫星位点进行遗传参数分析发现(表 4), HP 群体的 N_a 略高于 SP 群体, 二者分别为 7.90 和 7.60。2 个群体的 H_o 分别为 0.492(HP)和 0.483(SP), H_e 分别为 0.675(HP)和

0.663(SP), HP 群体的 H_e 和 H_o 均略高于 SP 群体。在 2 个群体中, 13 个微卫星位点只有位点 TM6 的略高于 H_e , 表现为杂合子过剩, 其余位点 H_o 均低于 H_e , 表现为杂合子缺失。HP 群体和 SP 群体的 PIC 分别为 0.63 和 0.62, 二者皆为高度多态($PIC \geq 0.5$), 显示出 13 个微卫星位点拥有较丰富的多态性信息。对 13 个

表 3 HP 群体和 SP 群体的生长性状、SGR 及 AGR 的方差分析
Tab.3 The ANOVA table of growth traits, SGR and AGR among HP and SP *L. vannamei*

分析指标 Analytical indicators	体重 BW	体长 BL	第 1 腹节宽 FASW	第 3 腹节宽 TASW	第 1 腹节长 FASL	第 1 腹节高 FASH	头胸甲长 CL	腹节全长 ASL	特定增长率 SGR	绝对增重率 AGR
方差齐性检验 Homogeneity of variance	0.053	0.087	0.013	0.794	0.000	0.013	0.000	0.000	0.051	0.053
F 值 F value	54.71	3.14	—	93.44	—	—	—	—	37.44	54.71
差异显著性 Significance level	0***	0.076	—	0***	—	—	—	—	0***	0***

***为差异极显著 $P < 0.01$

*** means level of statistical significant difference at $P < 0.01$

表 4 13 个微卫星位点在 2 个凡纳滨对虾群体中的遗传参数信息
Tab.4 The information of 13 loci of two populations of *L. vannamei*

位点 Loci	群体 Population	平均等位基 因数 N_a	平均观测 杂合度 H_o	平均期望 杂合度 H_e	多态信息 含量 PIC	哈迪-温伯格平衡 Hardy-Weinberg
TM6	SP	2	0.643	0.493	0.372	***
	HP	2	0.699	0.482	0.365	***
TUMXLv3.1	SP	6	0.531	0.701	0.654	***
	HP	9	0.705	0.771	0.736	***
TUMXLv7.121	SP	5	0.603	0.685	0.636	***
	HP	4	0.555	0.578	0.505	NS
TUMXLv9.90	SP	7	0.686	0.783	0.751	***
	HP	8	0.730	0.785	0.752	***
1103	SP	4	0.284	0.317	0.268	NS
	HP	2	0.224	0.230	0.203	NS
TUMXLv10.117	SP	3	0.280	0.396	0.361	***
	HP	4	0.500	0.538	0.471	***
TUMXLv9.103	SP	13	0.572	0.870	0.857	***
	HP	12	0.573	0.825	0.804	***
TUMXLv10.14	SP	18	0.652	0.839	0.825	***
	HP	15	0.417	0.833	0.815	***
10749	SP	12	0.345	0.684	0.642	***
	HP	17	0.445	0.856	0.840	***
Lv12	SP	7	0.548	0.703	0.659	***
	HP	6	0.558	0.693	0.654	***
Lv14	SP	5	0.580	0.722	0.675	***
	HP	6	0.505	0.731	0.682	***
TUMXLv10.33	SP	6	0.316	0.655	0.614	***
	HP	6	0.185	0.587	0.513	***
10592b	SP	11	0.235	0.775	0.754	***
	HP	12	0.304	0.862	0.846	***
平均值 Average value	SP	7.6	0.483	0.663	0.62	—
	HP	7.9	0.492	0.675	0.63	—

NS 为不显著偏离; ***为极显著偏离

NS means no significant deviation; *** means level of statistical significant deviation at $P < 0.01$

微卫星位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检验, 结果显示, 13 个位点在 2 个群体中只有 2 个位点偏离不显著 ($P>0.05$), 其余 11 个位点均极显著偏离 ($P<0.01$)。

2.4 群体遗传分化

群体遗传分化指数 (F_{st}) 是衡量群体遗传分化程度的重要参数。Wright(1978) 提出了衡量群体遗传分化的标准, 即遗传分化指数 F_{st} 在 0–0.05 之间, 表明种群遗传分化很弱; 在 0.05–0.15 之间, 表明种群遗传分化中等; 介于 0.15–0.25 之间, 则体现出很大的种群遗传分化; 大于 0.25, 显示种群遗传分化极大。通过分析得到 13 个微卫星位点在 2 个凡纳滨对虾群体中的遗传分化情况(表5)。各基因座的 F_{st} 平均值为 0.1566, 其中, 有 4 个基因座的 F_{st} 处于群体间无遗传分化的范围内, 有 5 个基因座处于中等遗传分化水平, 其余 4 个基因座则显现出很高水平的遗传分化。

3 讨论

3.1 低温条件下 HP 群体与 SP 群体生长性能的比较

温度是影响水产动物生长性能的重要因素之一。凡纳滨对虾属于变温动物, 其机体温度受环境温度影响比较大(张伟权, 1990)。然而, 陈昌生等(2001)和唐啸尘(2003)的研究发现, 凡纳滨对虾对小幅度的温度变化有一定的耐受性, 这为凡纳滨对虾耐低温选育提供了可能性。

通过种群间或品系间杂交获得杂种优势, 随后将优良性状通过近交或连续多代选择使其能够稳定地遗传, 进而培育出新品系, 这已经成为水产动物杂交育种的主要方式。杨章武等(2012)比较凡纳滨对虾自交群体与杂交群体的仔虾幼体在低温条件下的生长性能, 发现杂交系子代的生长速度高于自交系 15.5%, 养成 97 d 时, 杂交群体平均体重为(20.7±4.1) g, 自交群体平均体重为(18.1±2.7) g, 二者差异极显著。本研究选取体长为 3 cm 以上的凡纳滨对虾进行低温生长实验, 以探究在凡纳滨对虾育成期 HP 与 SP 群体在低温条件下生长性能的差异, 结果显示, HP 群体平均体重为(13.18±3.65) g, 极显著 ($P<0.01$) 高于 SP 群体的平均体重, HP 群体的其他可测量性状如 BL、FASW、TASW、FASL、FASH、CL 和 ASL 的平均值也均高于 SP 群体。SGR 和 AGR 表明在一定时间段内个体的生长情况(曹宝祥等, 2015)。在本研究中, 2 个群体的 SGR 和 AGR 有极显著差异 ($P<0.01$), HP 群体

表 5 13 个微卫星位点在凡纳滨对虾 2 个群体中的 F -分析
Tab.5 F -test for two populations of *L. vannamei* at 13 microsatellite loci

位点名称 Loci	F_{st} 值	F_{is} 值	F_{it} 值
TM6	0.0025	-0.3559	-0.3526
TUMXLv3.1	0.2153	0.1829	0.3589
TUMXLv7.121	0.0775	0.0945	0.1647
TUMXLv9.90	0.0125	0.1047	0.1159
1103	0.6585	0.0843	0.6873
TUMXLv10.117	0.4937	0.1964	0.5932
TUMXLv9.103	0.0618	0.3325	0.3737
TUMXLv10.14	0.0188	0.3068	0.3198
10749	0.0908	0.4903	0.5365
Lv12	0.0970	0.2120	0.2885
Lv14	0.1618	0.2340	0.3579
TUMXLv10.33	0.0273	0.5537	0.5659
10592b	0.1179	0.6823	0.7197
平均值 Average value	0.1566	0.2399	0.3638

的 SGR 和 AGR 分别为(5.09±0.61) %/d 和(0.26±0.60) g/d, SP 群体的 SGR 和 AGR 分别为(4.94±0.57) %/d 和(0.24±0.63) g/d, 显示 HP 群体相对于 SP 群体有着明显的生长优势。

张嘉晨等(2015)研究表明, 杂种优势的产生主要是由于优良显性基因的互补作用和群体中杂合子频率的增大, 从而抑制和减弱了不良基因的作用。如果通过杂交累积的是隐性有害基因, 其杂交后代就有可能表现出杂交劣势。因此, 对于杂交的亲本进行选择是十分重要的。本研究后续将会探究不同杂交组合产生的不同家系间在低温条件下的生长性能差异, 从而可以更加深入地对凡纳滨对虾低温选育进行研究。

3.2 HP 群体和 SP 群体遗传多样性的差异及遗传分化

丰富的遗传多样性是培育优良性状品种的基础, 而比较不同群体间遗传多样性的差异可以明确群体间遗传距离和遗传分化水平, 对杂交选育亲本群体的选择有指导意义(刘晓慧等, 2008)。另外, 在选育过程中, 选育群体更容易由于不合理的管理导致发生瓶颈效应和近交衰退而加速种质的同质化, 造成等位基因丢失的现象(崔朝霞等, 2011), 所以要保持选育群体较高的遗传多样性则有必要对群体进行遗传多样性的监测。王霞等(2009)利用 7 个微卫星位点对凡纳滨对虾育种过程中 G_0 代与 G_1 代的遗传多样性进行比较, 得到 G_0 代群体 H_e 显著高于 G_1 代, 表明封闭群

体在经过一代人工选择后其遗传多样性会下降。Cruz等(2004)在利用微卫星标记监测凡纳滨对虾育种进程时发现,从 G_1 代到 G_2 代有明显的等位基因缺失,表明在育种进程中,随着选择强度的加大,一些稀有等位基因会不可避免的缺失,而引进外源亲本可以显著提高群体遗传多样性。本研究利用13个多态性微卫星位点,分析凡纳滨对虾HP群体和SP群体间遗传多样性的差异,结果显示,HP群体的 $N_e=7.9$ 略高于SP群体($N_e=7.6$),2个群体的 H_o 分别为0.492(HP群体)和0.483(SP群体), H_e 分别为0.675(HP群体)和0.663(SP群体),HP群体的 H_e 和 H_o 均略高于SP群体,表现出HP群体相比SP群体有着更加丰富的遗传多样性,这恰好佐证了Cruz等(2004)的研究结果,并且在其他物种如栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)与虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)群体的杂交子代群体中也出现遗传多样性升高的现象(于涛等,2011),表明杂交可以增加基因的杂合度,不仅获得杂种优势,还可以丰富群体遗传多样性,更加有利于良种选育。

在本研究中,除位点TM6以外,其余位点 H_o 均低于 H_e ,表现为杂合子的缺失。杂合子的缺失可能由于无效基因或者研究样本范围大小等方面因素导致稀有碱基的丢失所致,还可能是由于选择性交配、种群混合和瓶颈效应等引起(Wanna *et al.*, 2004; Cannas *et al.*, 2012)。本研究所建立的2个群体,共75个家系并不是随机交配产生的,而是按照一定配种方案选择性交配的;其次,每个家系只随机选取10–20个个体,故每个家系取样量较少,所以极有可能造成杂合子缺失的现象。另外,本研究中,13个微卫星位点中有11个极显著偏离Hardy-Weinberg平衡,这与Supungul等(2002)和张凯(2012)¹⁾等的研究结果相似。Hardy-Weinberg平衡的偏离很可能是由于当研究对象为相对小的群体或者封闭群体时,长期人工选育后产生基因的遗传漂变或混杂现象所引起的(Zhang *et al.*, 2012)。在本研究中,选育群体是经过连续3年人工选育的群体,所以极有可能在选育过程中一些与选育性状无关的等位基因被排除,造成基因频率变化,从

而导致Hardy-Weinberg平衡的偏离。

遗传分化指数即指不同群体间或同一群体不同个体间的遗传变异占总遗传变异的大小(包秀凤,2014)²⁾。在本研究中,各微卫星位点的遗传分化指数介于0.0025–0.6585之间,选育群体与杂交群体间遗传分化指数为0.1556,有着显著遗传分化水平,这恰好体现出杂交组合的遗传多样性和遗传分化特点,即不同来源的群体杂交使得等位基因重组,增加了遗传变异,构成了杂种优势的遗传学基础。

参 考 文 献

- Cannas R, Sacco F, Follesa MC, *et al.* Genetic variability of the blue and red shrimp *Aristeus antennatus* in the Western Mediterranean Sea inferred by DNA microsatellite loci. *Marine Ecology*, 2012, 33(3): 350–363
- Cao BX, Kong J, Luo K, *et al.* Comparison of growth and survival performance among selected population, imported population and inbreeding population in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(1): 42–51 [曹宝祥, 孔杰, 罗坤, 等. 凡纳滨对虾选育群体与近交群体、引进群体生长和存活性能比较. *水产学报*, 2015, 39(1): 42–51]
- Chen CS, Huang B, Ye ZH, *et al.* Effect of temperature on growth, food intake and survival rate in *Penaeus vannamei* under different temperature conditions. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2001, 6(4): 296–300 [陈昌生, 黄标, 叶兆弘, 等. 南美白对虾摄食、生长及存活与温度的关系. *集美大学学报(自然科学版)*, 2001, 6(4): 296–300]
- Chen M, Wu CG, Xiang JH, *et al.* Selective breeding and pedigree foundation of *Litopenaeus vannamei*. *Marine Science*, 2008, 32(11): 5–8 [陈锚, 吴长功, 相建海, 等. 凡纳滨对虾的选育与家系的建立. *海洋科学*, 2008, 32(11): 5–8]
- Cruz P, Ana MI, Humberto MR, *et al.* Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Marine Biotechnology*, 2004, 6(2): 157–164
- Cui ZX, Zhang H, Song LS, *et al.* Genetic diversity of marine animals in China: A summary and prospectiveness. *Biodiversity Science*, 2011, 19(6): 815–833 [崔朝霞, 张岷, 宋林生, 等. 中国重要海洋动物遗传多样性的研究进展. *生物多样性*,

1) Zhang K. Molecular pedigree reconstruction of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and effect assessment of release enhancement of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) by using SSR markers. Master's Thesis of Ocean University of China, 2013, 32–34 [张凯. 凡纳滨对虾引进群体分子系谱构建及中国对虾分子标志家系放流效果评估. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 32–34]

2) Bao XF. Analysis of genetic diversity of selected stocks of *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2014, 48–50 [包秀凤. 凡纳滨对虾选育群体遗传多样性分析. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2014, 48–50]

- 2011, 19(6): 815–833]
- Dixon TJ, Coman GJ, Arnold SJ, *et al.* Shifts in genetic diversity during domestication of black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, monitored using two multiplexed microsatellite systems. *Aquaculture*, 2008, 283(1–4): 1–6
- Hou SY, Ma AJ, Wang XA, *et al.* Analysis of genetic structure among four different stocks of turbot *Scophthalmus maximus* using microsatellite technique. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(1): 16–23 [侯仕营, 马爱军, 王新安, 等. 大菱鲆 4 个引进地理群体遗传多样性的微卫星分析. *渔业科学进展*, 2011, 32(1): 16–23]
- Huang YC, Ai HS, Yin ZX, *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*. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(10): 1549–1558 [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. *水产学报*, 2010, 34(10): 1549–1558]
- Liang HF, Du GP, Huang HL, *et al.* A preliminary study on the families selection for fast growth of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2011, 31(3): 12–15 [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. *广东海洋大学学报*, 2011, 31(3): 12–15]
- Liu M, Lu ZC, Gao TX, *et al.* Remarkably low mtDNA control-region diversity and shallow population structure in Pacific cod *Gadus macrocephalus*. *Journal of Fish Biology*, 2010, 77(5): 1071–1082
- Liu XH, Wang YQ. The applications of molecular marker in the study on aquatic animals. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2008(S2): 228–231 [刘晓慧, 王义权. 分子标记技术在水产动物研究中的应用. *厦门大学学报 (自然科学版)*, 2008(S2): 228–231]
- Ministry of Agriculture, Fisheries Agency. *China Fishery Statistics Yearbook*. BeiJing: China Agriculture Press, 2011 [农业部渔业局. *中国渔业统计年鉴*. 北京: 中国农业出版社, 2011]
- Ponce-Palafox J, Martinez-Palacio CA, Ross LG. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 1997, 157(1): 107–115
- Qiu J, Wang WN, Wang LJ, *et al.* Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2011, 154(1): 36–41
- Ruan XH, Luo K, Luan S, *et al.* Evaluation of growth performance in *Litopenaeus vannamei* populations introduced from other nations. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(1): 34–42 [阮晓红, 罗坤, 栾生, 等. 凡纳滨对虾 7 个引进群体的生长性能评估. *水产学报*, 2013, 37(1): 34–42]
- Supungul P, Klinbunga S, Pichyangkura R, *et al.* Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Marine Biotechnology*, 2002, 4(5): 487–494
- Tang XC. The influence of temperature on *Litopenaeus vannamei*. *Marine Science*, 2003, 27(10): 79–80 [唐啸尘. 温度对南美白对虾的影响. *海洋科学*, 2003, 27(10): 79–80.]
- Wang LL, Zhang H, Song LS, *et al.* Loss of allele diversity in introduced populations of the hermaphroditic bay scallop *Argopecten irradians*. *Aquaculture*, 2007, 271(1–4): 252–259
- Wang X, Liu XL, Zhang JQ, *et al.* Kinship analysis and genetic variation monitoring in *Litopenaeus vannamei* breeding program using microsatellite DNA markers. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(5): 832–839 [王霞, 刘小林, 张继泉, 等. 微卫星用于凡纳滨对虾育种过程中亲权分析及遗传多样性的变化监测. *水产学报*, 2009, 33(5): 832–839]
- Wang XQ, Ma S, Dong SL. Studies on the biology and cultural ecology of *Litopenaeus vannamei*: A review. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2004(4): 94–100 [王兴强, 马牲, 董双林. 凡纳滨对虾生物学及养殖生态学研究进展. *海洋湖沼通报*, 2004(4): 94–100]
- Wanna W, Rolland JL, Bonhomme F, *et al.* Population genetic structure of *Penaeus merguensis* in Thailand based on nuclear DNA variation. *Journal of Experimental Marine Biology*, 2004, 311 (1): 63–78]
- Wright S. *Evolution and the genetics of populations variability within and among natural populations*. University of Chicago Press, 1978, 25–32
- Yang ZW, Zheng YY, Li ZL, *et al.* A comparative study on growth, low-salinity and low-temperature resistance among the inbred and hybrid offsprings at larval stages for *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(2): 284–289 [杨章武, 郑雅友, 李正良, 等. 凡纳滨对虾群体自交与杂交子代幼体对低温、低盐抗逆性与生长比较. *水产学报*, 2012, 36(2): 284–289]
- Yao XM, Huang B, Zhang JT, *et al.* Comparison of growth and survival rate of F₁, F₂ and hybrid generation from SPF *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(2): 326–330 [姚雪梅, 黄勃, 张继涛, 等. SPF 凡纳滨对虾 F₁、F₂ 及杂交代生长和存活比较研究. *中国水产科学*, 2007, 14(2): 326–330]
- Yu Tao, Yang AG, Zhou LQ, *et al.* Genetic variation of *Chlamys farreri*, *Patinopecten yessoensis* and their hybrids. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(3): 574–580 [于涛, 杨爱国, 周丽青, 等. 栉孔扇贝、虾夷扇贝及其杂交子代的群体遗传多样性分析. *中国水产科学*, 2011, 18(3): 574–580]
- Zhang B, Song WP. Recent progress on microsatellite multiplex PCRs for parentage analysis of aquatic animals. *Marine Fisheries*, 2012(3): 350–356 [张博, 宋文平. 微卫星多重 PCR 在水生动物亲权分析中的研究进展. *海洋渔业*, 2012(3): 350–356]
- Zhang K, Wang SJ, Li WY, *et al.* Analysis of genetic diversity and differentiation of seven stocks of *Litopenaeus vannamei* using microsatellite markers. *Journal of Ocean University of China*, 2014, 13(4): 647–656
- Zhang JC, Liu JY, Yuan RP, *et al.* Effect of stocking density on growth and survival of inbred and hybrid offspring of *Litopenaeus vannamei*. *South China Fisheries Science*, 2015,

11(4): 53–58 [张嘉晨, 刘建勇, 袁瑞鹏, 等. 养殖密度对凡纳滨对虾杂交和自交子一代生长与成活的影响. 南方水产科学, 2015, 11(4): 53–58]

Zhang RL, Wang WJ, Feng YW, *et al.* Assessment of genetic variability and microsatellite analysis of pacific oyster (*Crassostrea gigas*) after artificial selection of the shell width. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 90–97 [张荣良, 王卫军, 冯艳薇, 等. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)壳宽快速生长选育群体遗传多样性及遗传结构的微卫星标记分析. 渔业科学进展, 2016, 37(4): 90–97]

Zhang TS, Liu P, Li J, *et al.* Genetic diversity of cultured populations of *Fenneropenaeus chinensis* shrimp using microsatellites. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(1): 6–12 [张天时, 刘萍, 李健, 等. 用微卫星 DNA 技术对中国对虾人工选育群体遗传多样性的研究. 水产学报, 2005, 29(1): 6–12]

Zhang WQ. The world's major aquaculture species-Introduction to *Litopenaeus vannamei*. *Marine Science*, 1990(3): 69–73 [张伟权. 世界重要养殖品种—南美白对虾生物学简介. 海洋科学, 1990(3): 69–73]

(编辑 陈严)

The Difference of Genetic Diversity and the Comparison of Growth Performance Between Selected Population and Hybridized Population of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Under Low Temperature Conditions

LI Dongyu^{1,2,3}, MENG Xianhong^{1,2}①, KONG Jie^{1,2}, LUAN Sheng^{1,2}, CAO Baoxiang^{1,2}, LUO Kun^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081)

Abstract To breed the *Litopenaeus vannamei* that could resist low temperature during production cycle, this study investigated the heterosis advantage in breeding program and compared the growth performance and genetic diversity between two populations under the low temperature conditions. One population, namely the Selected Population (SP), was bred for three consecutive years in our aquatic laboratory, whereas the other one, the Hybrid Population (HP), came from the hybridization of the Selected Population and the Introduced Population. The results showed that the growth performance of HP was significantly higher than SP. The average body weight of HP and SP shrimps were (13.18±3.65) g and (12.20±3.14) g respectively, and the coefficient of variation were 27.69% and 25.74%, respectively. The average body weight and other measurable traits in HP were higher than those in SP. The results of One-way ANOVA indicated that there were significant differences ($P<0.001$) between HP and SP in both body weight and TASW. The specific growth rate (SGR) and absolute growth rate (AGR) in HP were (5.09±0.61) %/d and (0.26±0.60) g/d, respectively. By comparison, in SP group, the SGR was (4.94±0.57) %/d and the AGR was (0.24±0.63) g/d, significantly lower ($P<0.01$) than the HP group. The results of genetic diversity analysis showed that the N_a of HP ($N_a=7.9$) was slightly higher than SP ($N_a=7.6$). The average polymorphic information content (PIC) of HP and SP was similar as 0.63 and 0.62, respectively, both belong to the relatively high polymorphism level. The average observed heterozygosity (H_o) of HP and SP was 0.492 and 0.483, respectively, and the expected heterozygosity (H_e) was 0.675 and 0.663, respectively. Both H_o and H_e in HP were higher than that in SP, suggesting that HP had higher genetic diversity abundant compared to the SP. The analysis of genetic differentiation indicated that the genetic differentiation was significant between HP and SP, with the genetic differentiation index (F_{st}) between HP and SP was 0.1556. The results of this study provides a genetic background and production experience of *L. vannamei* for breeding low temperature breed and crossbreeding technique.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Crossbreeding; Resistance of low temperature; Growth performance; Genetic diversity

① Corresponding author: MENG Xianhong, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn