

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20191022001

http://www.yykxjz.cn/

刘峻宇, 刘均辉, 孔杰, 代平, 于洋, 孟宪红, 罗坤, 曹宝祥, 陈宝龙, 高焕, 栾生. 凡纳滨对虾 SNP 标记开发与家系亲缘关系验证分析. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 108–116

Liu JY, Liu JH, Kong J, Dai P, Yu Y, Meng XH, Luo K, Cao BX, Chen BL, Gao H, Luan S. Development of SNP markers and verification analysis of relationship on family in *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(1): 108–116

凡纳滨对虾 SNP 标记开发与 家系亲缘关系验证分析*

刘峻宇^{1,2} 刘均辉² 孔杰² 代平² 于洋³ 孟宪红²
罗坤² 曹宝祥² 陈宝龙² 高焕^{1①} 栾生^{2①}

(1. 江苏海洋大学 海洋生命与水产业学院 江苏省海洋生物资源与生态环境重点实验室 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
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 青岛 266071;

3. 中国科学院海洋研究所 中国科学院实验海洋生物学重点实验室 青岛 266071)

摘要 本研究基于转录组序列开发了 37 个 SNP 标记, 并对 22 个凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 家系进行了遗传多样性、家系聚类分析和亲子鉴定分析, 探讨 SNP 标记在对虾家系选择育种中的应用途径。结果显示, 37 个 SNP 位点在凡纳滨对虾 22 个家系中的平均期望杂合度(H_e)和平均观测杂合度(H_o)分别为 0.38 和 0.34; 平均多态信息含量(PIC)为 0.30, 属于中度多态性($0.25 < \text{PIC} < 0.5$)。对家系进行遗传距离计算和聚类分析, 半同胞家系 F11 和 F17 间的遗传距离最小(0.04), 最先聚在一起。亲子鉴定结果表明, 在双亲性别已知情况下, 亲子间的累积排除率(CPE)为 99.99%, 子代的实际鉴定率为 77.27%。研究表明, 在凡纳滨对虾性状测试和系谱追踪过程中, 利用高质量的 SNP 标记代替物理标记来识别家系是一种准确可行的方法。

关键词 家系; SNP 标记; 遗传多样性; 聚类分析; 亲子鉴定

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)01-0108-09

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 亦称南美白对虾、太平洋白对虾, 是一种热带虾, 具有生长快、抗病力和适应性强、味道鲜美等特点(唐扬等, 2018; 王兴强等, 2004)。凡纳滨对虾 20 世纪 80 年代引入我

国, 90 年代解决了规模化苗种繁育关键技术后, 养殖规模迅速扩大, 2018 年产量超过 170 万 t (农业部渔业渔政管理局, 2018), 已发展为我国单一产值最高的水产养殖种类之一。凡纳滨对虾种业体系较为健

* 国家重点研发计划(2018YFD0901301)、山东省农业良种工程(2017LZN011)、农业农村部农业国际合作交流项目-热带国家水产养殖科技创新合作和湛江市水产良种体系建设项目(zj002)共同资助 [This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901301), Agricultural Improved Seed Project of Shandong Province (2017LZN011), Agricultural International Cooperation and Exchange Project of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs - Scientific and Technological Innovation Cooperation of Tropical Countries in Aquaculture, and Construction Project of Zhanjiang Excellent Aquatic Species System (zj002)]. 刘峻宇, E-mail: 15192647897@163.com

① 通讯作者: 高 焕, 教授, E-mail: huanmr@163.com; 栾 生, 研究员, E-mail: luansheng@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-10-22, 收修改稿日期: 2019-11-26

全,我国每年的种虾需求量超过 100 万对,苗种需求超过 6000 亿尾。以规模化家系为基础的选择育种,是当前国内外 10 多家对虾育种单位主要采用的技术体系,在该体系中,遗传进展主要取决于目标性状的遗传力和选择强度。研究表明,在奠基者群体已经构建遗传力等参数固定的情况下,育种过程中增加家系数、扩大选育群体规模和提高选择强度可有效增加遗传进展(栾生等,2018)。

在传统的选育中,主要是应用“可视嵌入性橡胶标志”(Visible implant elastomer, VIE)标识不同家系。但在高强度的选育计划中,由于养殖家系数太多,受限于可使用的颜色数量,难以同时区分超过 200 个以上家系。而且对大量的个体进行物理标记的成本太高且耗时耗力,在养殖过程中容易发生物理标记漂移脱落、人工读取标记错误等现象,也会导致个体所属家系识别错误,产生系谱不准确的问题,从而影响遗传评估和选择的准确性。

随着分子标记的发展和分型成本的降低,微卫星(Simple sequence repeat, SSR)、SNP(Single nucleotide polymorphism)等分子标记已成为解决上述问题的有效途径(桂建芳等,2012)。其中,SNP 标记具有数量多、分布广泛,便于高通量、高度自动化检测分析等优点,通过研究其在生物基因组中的分布即能够全面反映群体的遗传及变异水平,在凡纳滨对虾(于洋等,2014;王冉等,2018)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)(张洪伟等,2010)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)(Jiang *et al.*, 2011)等物种中已开展应用。利用分子标记特别是 SNP 标记进行亲缘关系鉴定,在畜牧育种中也已得到广泛应用(李东等,2011;余国春等,2014),但在水产动物中相关研究还较少。根据其他物种的研究结果推测,在虾类高强度选育中,对人工选择出来的优质候选个体进行 SNP 标记分型,通过个体聚类分析及亲缘关系鉴定,可有效区分候选个体的亲本信息,构建更为准确的系谱。

当前,通过 DNA 和 RNA 高通量测序可以获得大量的多态性 SNP 位点。然而,受基因组组装质量、样本测序和分型算法等多种因素影响,很多位点可能是假阳性位点。因此,利用较大样本量,对已有位点进行分型验证,开发高质量的多态性 SNP 位点,是开展分子标记辅助选择的重要基础工作。本研究利用飞行时间质谱分析技术,开发了 37 个源自转录组序列的 SNP 标记,并对 22 个凡纳滨对虾家系进行遗传多样性、家系聚类 and 亲子鉴定分析,旨在探讨 SNP 标记在凡纳滨对虾选育中应用的可行性,以期为分子标记辅助育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

在农业农村部海水养殖遗传育种中心(中国水产科学研究院黄海水产研究所鳌山基地)利用 G1 代核心群留种个体,通过巢式交配设计和定向交尾的方法生产 51 个家系,构建凡纳滨对虾 G2 代核心育种群体,并在 -20°C 温度下保留亲本肌肉组织。从开展生长和存活性状测试的 G2 代家系中选择 22 个全同胞家系(含 4 个半同胞家系),每个家系随机取 9~10 尾个体,共计 218 尾个体,加上 22 尾父本和 20 尾母本,作为本实验的样本材料。子代个体取腹部肌肉组织后,放入冻存管, -80°C 保存。本研究中的转录组数据由中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室提供,共 134 个 SNP 位点及其序列信息。

1.2 实验方法

DNA 提取参照王伟继(2008)的方法。DNA 的质量和浓度使用微量紫外分光光度计测量,保证 DNA 的浓度 $>50\text{ ng}/\mu\text{l}$,吸光度比值($\text{OD}_{260\text{ nm}}/\text{OD}_{280\text{ nm}}$)在 1.7~2.0 之间。采用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性,检测完毕的样品置于 -20°C 冰箱中冷冻保存。

1.3 SNP 分型

随机取 24 尾家系亲本个体,平均分为 2 组,每 12 尾个体的 DNA 混在一起。根据样品 DNA 定量结果,将混合模板的 DNA 浓度稀释到 50~100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 。根据序列信息,通过 Primer Premier 5.0 软件设计上下游引物,扩增含有该位点的 DNA 片段,PCR 反应体积为 50 μl :0.25 μl Taq 酶(5 U/ μl),引物各 2 μl (10 pmol/ μl), 2 μl DNA(50 $\text{ng}/\mu\text{l}$), 4 μl Dntp(2.5 mmol/L), 5 μl 10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ plus)和 34.75 μl ddH₂O。程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 合适退火温度下 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。引物合成和测序由上海生工生物工程股份有限公司完成。

利用直接测序法验证 SNP 位点是否存在双峰,若扩增产物同时出现双峰,即认为该位点在群体内存在多态性。针对存在双峰的位点,通过 Genotyping Tools 及 MassARRAY Assay Design 软件设计 PCR 扩增引物及单碱基延伸引物,利用多重 PCR 设计 2 个多重组合,对所有个体上机测试。最后采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析技术(Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight, MALDITOF)分型检测,此过程由北京博奥晶典生物技术有限公司支持完成。

1.4 数据处理与分析

SNP 位点的期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)和多态信息含量(PIC)分析通过 Cervus 3.0 (Kalinowski *et al*, 2010)软件进行。家系间的遗传距离通过 POPGENE 1.32(Yeh *et al*, 1999)软件计算。基于非加权配对算数平均法,使用 MEGA 7(Tamura *et al*, 2011)绘制 22 个家系聚类图。

目前,最简单常用的亲子鉴定方法是排除法(Jones *et al*, 2010),其中,用累积排除概率(Cumulative probability of exclusion, CPE)表示排除不是真实亲本的候选亲本的概率(Dodds *et al*, 1996; Heaton *et al*, 2002)。亲缘关系鉴定运用 Cervus 3.0 (Kalinowski *et al*,

2010)软件通过似然对数比(log likelihood ratio, LOD)值判断分析。

2 结果

2.1 SNP 分型

测序结果显示,2 组混合 DNA 样品中有 83 个位点出现明显双峰,剩余位点显示单一的峰图或测序失败。本实验设计 2 个多重组合(包含的位点数分别为 27 个和 28 个),最终 2 个组合中分别有 18 和 19 个 SNP 位点在所有样本中均能扩增成功。最后利用飞行时间质谱分析技术对每个样品的 37 个 SNP 位点进行 SNP 分型检测,多态性位点的引物信息见表 1。

表 1 凡纳滨对虾 37 个 SNP 位点的引物信息
Tab.1 Information of 37 SNP loci primers in *L. vannamei*

位点 Locus	类型 Type	引物序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 T_m (°C)	片段大小 Size of fragment (bp)
SNP1	T/C	F: ACGGCGGACGAGAATACA R: TCGCGTTCTGAGAAGGAAGT	57	219
SNP2	A/T	F: ATTTTATGGTTCTCCTGA R: TTTTCTTACATCTTCCTG	45	243
SNP3	T/C	F: TCTACTAACGCCAAGGTC R: AAGGAGATAGCGCAACAG	52	220
SNP4	A/G	F: TGCCACATCCAACACCA R: AACTGCCAGGCCATCAA	52	247
SNP5	T/C	F: ATGGCTATGGTAATCGG R: TCGGAGCATCACAACAC	50	311
SNP6	T/C	F: TTTGCGACAAGGAACAC R: GAAACGCTGGGAGTCAT	50	230
SNP7	T/C	F: GGAGCCTTGTGGTCGTAA R: ACCCTCGGGATTTCGTTT	52	299
SNP8	A/G	F: CCCCAAAGTTCTTCTTA R: TGTCAAATGGTCGTCAG	48	188
SNP9	A/G	F: AATCGTACAATCTTTGATTAGTG R: GTCCGGCTGTTTAGGTG	55	299
SNP10	T/C	F: TTTATCCCCAGAGTGAC R: ATGCTTTGGTTGAGACT	48	276
SNP11	A/G	F: AATGGGTCTAATGATGCT R: TGACTCGGTGAAGTTGTA	48	265
SNP12	T/C	F: CTTCCAGGTCTTCAGTCG R: CTCCCACATCAACACCAC	55	264
SNP13	A/C	F: GCGTCACTCATCACAGGC R: CACAGGTGGGTGGCTCA	55	266
SNP14	T/C	F: GCCAATAGAAGATGGAGAC R: CTTCAATACTTGTGCCTGA	50	248
SNP15	T/C	F: CCCCACCATAAACCAGC R: AGACGAAACAACCGAAAGT	50	267
SNP16	T/C	F: AGTGACGCAGACGCAACC R: AGACATTCCACGACCAT	50	249
SNP17	A/G	F: TTATGGGAATGCGAAAG R: ATTGCTGCTACTGGAGG	48	204
SNP18	T/C	F: ACGTGCTACCATGAAGT R: TATAGACCGAAGGAAAA	48	244

续表 1

位点 Locus	类型 Type	引物序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 T_m (°C)	片段大小 Size of fragment (bp)
SNP19	A/G	F: TACAGTGCCAGTCTCAA R: TCCTTAGGCATACCTCT	50	216
SNP20	A/G	F: GCAACAACCTGGCTATTA R: ACAAACCTTTACTCCGT	48	261
SNP21	A/G	F: TTGGGCTCCTCAACTGG R: TGTTCAAGGAATCAGCGAGT	55	282
SNP22	A/G	F: TAGGTAGTGCCTGGTA R: TTGGGTTATAGAAAGTGATG	50	318
SNP23	A/G	F: TTCGTCATCAGGATCGTGGAG R: CCTTGAAGTCCGAGCCGTAG	55	274
SNP24	T/C	F: TGTCAGGAGCAAAGCAA R: AAGAGTTCAAGCAGGGA	50	294
SNP25	T/C	F: ACAAGGGATGTGGAGTTA R: GTTGACCGTCCGATGCTA	50	267
SNP26	A/G	F: CACTTGGCTTGCTCCTCATC R: TGGAACTTGCTGCTCACA	55	256
SNP27	T/C	F: ACACCCTCCCTATCTCA R: GTAAAGGTCAACGAAAT	50	269
SNP28	T/C	F: GAAGCAGCAGGGCCAAGA R: CACAGCGAGGGCTCCAGTA	57	234
SNP29	A/T	F: GCTCAAACCACCAGGACA R: GGCACCCAAACGAAATAA	50	314
SNP30	T/C	F: CCCGGTCTGGATGTCGTT R: ACCTCCGCCCATCACCT	57	224
SNP31	A/C	F: TTGCTTGACTGACATAGG R: ACTAAATGACTCCGAACC	50	300
SNP32	T/C	F: TTAGCGAAGTCTAGTGAAGA R: TTGAAAGTGACGGAAGTG	50	232
SNP33	A/T	F: TTCCATAGTCGAAATAGT R: TAACACGCAAAGAGGT	48	300
SNP34	C/G	F: AATAGACCCAGGTTTCG R: GCATCCAGTTTCTCCCT	48	324
SNP35	A/C	F: TGAAGGGAGTTCTGGACC R: CCACTCTGGCTTGAAACAT	50	357
SNP36	A/T	F: GTAAAGGCGTAACAGAGCAA R: GCCGAGGGAGTAAGGTG	54	210
SNP37	T/C	F: GATTCCAAAGGATAACGA R: AAATAACAATGTATGCGATA	48	242

2.2 家系遗传多样性分析

利用 37 个 SNP 标记的分型信息对凡纳滨对虾 22 个家系进行遗传多样性分析。结果显示, 平均期望杂合度(H_e)为 0.38; 平均观测杂合度(H_o)为 0.34。平均多态信息含量(Polymorphism information content, PIC)为 0.30, 属于中度多态性($0.25 < PIC < 0.5$) (表 2)。

2.3 亲子关系鉴定

在 95% 的置信水平下, 凡纳滨对虾 37 个 SNP 位点的遗传多样性见表 2, 218 尾子代亲子关系鉴定准确率见表 3。单亲性别已知的情况下, CPE 值在 95.04%~99.75% 之间, 观测鉴定率在 40% 左右; 双亲性别已知情况下, CPE 值超过 99.99%, 观测鉴定率为 100%, 实际鉴定率为 77.27%。

2.4 家系遗传距离和聚类分析

基于凡纳滨对虾 22 个家系间的遗传距离, 绘制家系间的聚类分析图, 见图 1。家系 F11 和 F17、F8 和 F10 分别为两对半同胞家系, 其中, F11 和 F17 家系间的遗传距离最小(0.04), 最先聚在一起; F8 和 F10 家系间遗传距离为 0.10, 未能最先聚在一起。

3 讨论

3.1 遗传多样性分析

本研究基于凡纳滨对虾转录组数据开发了 37 个多态性 SNP 标记。多态信息含量(PIC)是检测群体 DNA 变异程度的指标之一, 根据 Botstein 等(1980)首先提出来的 PIC 划分规则, 本研究群体中平均 PIC

表2 凡纳滨对虾22个家系在37个SNP位点上的遗传多样性
Tab.2 Genetic diversity estimated using 37 SNP loci for 22 families in *L. vannamei*

位点 Locus	H_o	H_e	PIC	E-1P	E-2P	E-PP	HW
SNP1	0.31	0.48	0.36	0.12	0.18	0.28	***
SNP2	0.55	0.50	0.38	0.13	0.19	0.28	NS
SNP3	0.36	0.33	0.28	0.05	0.14	0.22	NS
SNP4	0.34	0.48	0.36	0.12	0.18	0.28	***
SNP5	0.22	0.25	0.22	0.03	0.11	0.18	ND
SNP6	0.03	0.28	0.24	0.04	0.12	0.20	***
SNP7	0.16	0.16	0.15	0.01	0.07	0.13	ND
SNP8	0.41	0.47	0.36	0.11	0.18	0.27	NS
SNP9	0.40	0.50	0.37	0.12	0.19	0.28	NS
SNP10	0.10	0.36	0.29	0.06	0.15	0.23	***
SNP11	0.12	0.28	0.24	0.04	0.12	0.20	***
SNP12	0.46	0.45	0.35	0.10	0.17	0.27	NS
SNP13	0.05	0.08	0.08	0.00	0.04	0.07	ND
SNP14	0.54	0.50	0.37	0.12	0.19	0.28	NS
SNP15	0.53	0.48	0.37	0.12	0.18	0.28	NS
SNP16	0.14	0.39	0.31	0.08	0.16	0.24	***
SNP17	0.35	0.40	0.32	0.08	0.16	0.25	NS
SNP18	0.49	0.50	0.37	0.12	0.19	0.28	NS
SNP19	0.52	0.46	0.35	0.11	0.18	0.27	NS
SNP20	0.39	0.38	0.31	0.07	0.15	0.24	NS
SNP21	0.49	0.49	0.37	0.12	0.19	0.28	NS
SNP22	0.21	0.19	0.17	0.02	0.09	0.15	ND
SNP23	0.29	0.47	0.36	0.11	0.18	0.27	***
SNP24	0.54	0.49	0.37	0.12	0.19	0.28	NS
SNP25	0.34	0.44	0.34	0.10	0.17	0.26	NS
SNP26	0.49	0.45	0.35	0.10	0.17	0.27	NS
SNP27	1.00	0.50	0.38	0.13	0.19	0.28	***
SNP28	0.24	0.30	0.26	0.05	0.13	0.21	NS
SNP29	0.45	0.42	0.33	0.09	0.17	0.26	NS
SNP30	0.30	0.26	0.23	0.03	0.11	0.19	NS
SNP31	0.20	0.23	0.21	0.03	0.10	0.17	ND
SNP32	0.46	0.46	0.35	0.10	0.18	0.27	NS
SNP33	0.31	0.42	0.33	0.09	0.16	0.25	**
SNP34	0.33	0.37	0.30	0.07	0.15	0.24	NS
SNP35	0.15	0.18	0.16	0.02	0.08	0.14	ND
SNP36	0.28	0.32	0.27	0.05	0.13	0.21	NS
SNP37	0.06	0.23	0.20	0.03	0.10	0.17	ND
平均值 Mean	0.34	0.38	0.30	0.92	0.85	0.77	-
累积排除率 Cumulative probability of exclusion, CPE	-	-	-	0.9504	0.9976	0.9999	-

注：E-1P：母本性别已知时的排除率；E-2P：父本性别已知时的排除率；E-PP：双亲性别已知时的排除率；NS表示不显著偏离；**为显著偏离；***为极显著偏离；ND表示未计算出结果

Note: Cumulative probability of exclusion when the gender of dams were known (E-1P) or sires were known (E-2P) or parents were all known(E-PP); NS: Not significant, **: Significant at the 5% level; ***: Significant at the 1% level, ND: Not done

表 3 凡纳滨对虾 218 尾子代亲子关系鉴定准确率
Tab.3 Accuracy of parentage assignment for 218 offspring in *L. vannamei* (%)

基因型 Genotype	观测鉴定率 Observed assignment rate	期望鉴定率 Expected assignment rate	实际鉴定率 Real assignment rate
只有母本 Mother alone	43	80	—
只有父本 Father alone	41	80	—
双亲(性别已知)Parent pair (sexes known)	100	100	77

含量为 0.30, 属于中度多态性(0.25<PIC<0.5)。与利用 SNP 标记获得的凡纳滨对虾、中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)群体遗传多样性分析结果类似(张建勇等, 2011; 吴莹莹等, 2013)。但研究表明, 利用微卫星分析凡纳滨对虾群体, 获得了较高的 PIC 值, 平均值为 0.51~0.58(陈锦豪等, 2019; 黄小帅等, 2019; 孔张伟, 2018; 李东宇等, 2015)。究其原因, 主要是因为 SNP 标记仅有 2 个等位基因, 与 SSR 标记相比, 其携带的 PIC 较低(Kong *et al*, 2014)。

凡纳滨对虾 22 个家系 H_o 和 H_e 平均值分别为 0.34 和 0.38, 且 HW 平衡检验结果表明, 有 30% 的位点极显著偏离平衡, 说明该群体经过了多代选育, 存在着杂合子缺失的现象。与已报道的凡纳滨对虾群体遗传特性一致(Jimenez *et al*, 2004), 在中国对虾(张天时等, 2005)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)(Xu *et al*, 2001; Premruthai *et al*, 2002)育种群体的研究中也发现杂合子缺失。育种群体杂合子缺失将会导致纯合子增加, 提高有害等位基因纯合的几率, 从而导致近交衰退几率升高, 降低群体对环境变化的适应性(杨锐等, 2000)。

3.2 家系聚类 and 亲子鉴定分析

从家系聚类中可以观察到(图 1), 两组半同胞家系中只识别出其中 1 组(F11 和 F17 最先聚在一起)。另外一组半同胞家系 F8 和 F10 中, F8 与 F12、F6 和 F10 最先聚在一起。所以, 对 4 个家系(F6、F8、F10 和 F12)中的共 39 尾个体进行聚类(图 2)。从图 2 可以观察到, F10 家系中的第 4、第 5 个个体聚类在 F12 家系中, F12 家系中的第 10 个个体聚类在 F10 家系中。F8 和 F10 未能最先聚在一起, 原因可能是 F10 家系中混入 F12 家系的个体, 导致 F10 家系的平均遗传距离增大, 在聚类时未能优先与 F8 家系聚类在一起; 且结合系谱观察到, F8 和 F12 家系的母本来源于同一祖先, 2 个家系间亲缘关系较近, 造成优先聚类的现象。

在父母本双亲性别已知的情况下, 亲子间的 CPE 为 99.99%, 观测鉴定率达到 100%, 实际鉴定率达到 77.27%。Kazuhiro 等(2010)利用 29 个 SNP 对日本黑

牛(*Bovine*)群体进行亲子鉴定分析, 单亲已知和双亲已知的情况下, CPE 分别为 96.93%和 99.69%。相关研究表明, 在 20~32 个 SNP 范围内, 親子间累积排除率在 95.6%~99.9%之间(Werner *et al*, 2004; Anderson *et al*, 2006; Heaton *et al*, 2002), 与本研究结果一致。

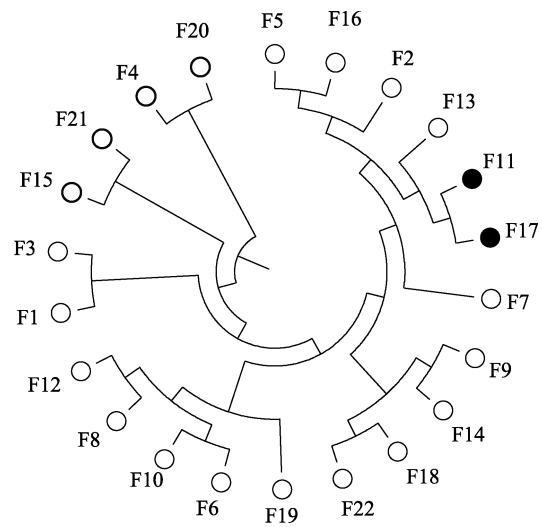


图 1 凡纳滨对虾 22 个家系聚类分析
Fig.1 Cluster analysis between 22 families in *L. vannamei*

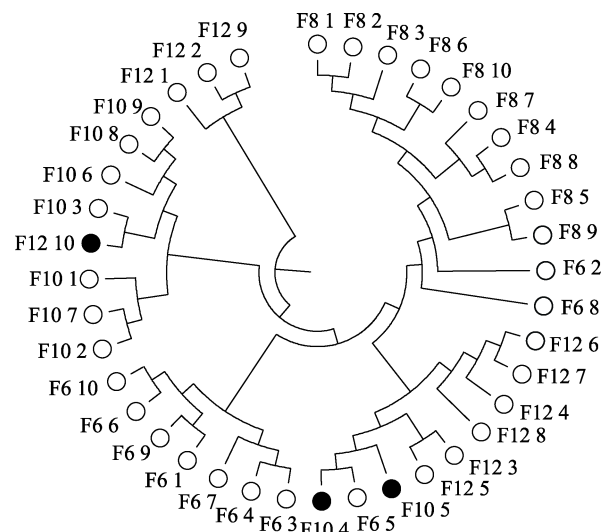


图 2 凡纳滨对虾 F6、F8、F10 和 F12 家系个体聚类分析
Fig.2 Cluster analysis among individuals in family F6, F8, F10 and F12 of *L. vannamei*

Zhu 等(2017)利用 6 对微卫星标记对斑节对虾进行亲缘关系鉴定, 实际鉴定率达到 89%。郭立平等(2013)利用 50 个高多态性的 SNP 位点对 938 头西门塔尔牛 (*Bos taurus*) 进行亲子鉴定, 最终实际鉴定率为 41.04%, Sellars 等(2014)利用 SSR 体系和 SNP 体系对斑节对虾家系鉴定能力进行比较, 各组鉴定结果表明, 60 个 SNP 标记鉴定率在 99%左右。本研究实际鉴定率相对较低, 原因在于 SNP 位点的数量少和存在杂合子缺失, 无法提供充足的信息来鉴定出所有个体的真实父母本, 且候选亲本中存在一定程度的亲缘关系, 遗传相似度较高, 导致亲缘关系的误判; Sellars 等(2014)研究表明, 随着 SNP 位点数的提高, 亲缘关系鉴定的准确性也会增加。刘均辉(2016)通过拟合指数曲线推测, 在凡纳滨对虾群体中, 至少需要 110~130 个随机选取的 SNP 位点, 亲子关系鉴定效力方可达到 100%。

本研究结果表明, 在性状测试和系谱追踪过程中, 利用高质量的 SNP 标记代替物理标记识别家系是一种较为准确可行的方法。同时, 应增加 SNP 位点的数量, 提高家系系谱鉴定的准确性。

参 考 文 献

- Anderson E, Garza J. The power of single-nucleotide polymorphisms for large-scale parentage inference. *Genetics*, 2006, 172(4): 2567–2582
- Bureau of Fisheries and Fisheries Law Enforcement, Ministry of Agriculture. China fishery statistical yearbook, 2018. Beijing: China Agriculture Press, 2018 [农业部渔业渔政管理局. 2018 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2018]
- Botstein D, White RL, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314–331
- Chen JH, Zheng JB, Wang PP, *et al.* Analysis for genetic diversity of broodstock populations of breeding *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries Research*, 2019, 41(1): 1–10 [陈锦豪 郑锦滨, 王攀攀, 等. 凡纳滨对虾养殖亲本群体遗传多样性分析. *渔业研究*, 2019, 41(1): 1–10]
- Dodds KG, Tate ML, Mcewan JC, *et al.* Exclusion probabilities for pedigree testing farm animals. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 92(8): 966–975
- Gui JF, Zhu ZY. Molecular basis and genetic improvement of important economic traits in aquatic animals. *Science China Press*, 2012, 57(19): 1719–1729 [桂建芳, 朱作言. 水产动物重要经济性状的分子基础及其遗传改良. *科学通报*, 2012, 57(19): 1719–1729]
- Guo LP. Parentage Testing with microsatellite and SNP markers in simmental. Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013 [郭立平. 利用微卫星和 SNP 标记对西门塔尔牛进行亲子推断的研究. 中国农业科学院硕士研究生学位论文, 2013]
- Heaton MP, Harhay GP, Bennett GL, *et al.* Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mammalian Genome*, 2002, 13(5): 272–281
- Huang XS, Xu Y, Hu XJ, *et al.* Genetic diversity analysis of first filial generation of seven introduced *Litopenaeus vannamei* populations using microsatellite DNA markers. *South China Fisheries Science*, 2019, 15(1): 54–62 [黄小帅, 徐煜, 胡晓娟, 等. 利用微卫星标记分析 7 个凡纳滨对虾引进群体子一代的遗传多样性. *南方水产科学*, 2019, 15(1): 54–62]
- Jiang G, Li J, Li L, *et al.* Development of 44 gene-based SNP markers in Zhikong scallop, *Chlamys farreri*. *Conservation Genetics Resources*, 2011, 3(4): 659–663
- Jones AG, Ardren WR. Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology*, 2010, 12(10): 2511–2523
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 2010, 16(5): 1099–1106
- Kazuhiro H, Hideki W, Shinji S, *et al.* Development of SNP markers for individual identification and parentage test in a Japanese black cattle population. *Animal Science Journal*, 2010, 81(2): 152–157
- Kong LF, Jie B, Li Q. Comparative assessment of genomic SSR, EST-SSR and EST-SNP markers for evaluation of the genetic diversity of wild and cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Aquaculture*, 2014, 420–421 (S1): 85–91
- Kong ZW. Research and application of molecular markers in selection and breeding of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2018 [孔张伟. 分子标记在凡纳滨对虾选种和配种中的应用研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- Li D, Chu Q, Wang YC. The application and prospect of single nucleotide polymorphism markers in cattle paternity testing. *Journal of Chinese Animal Science*, 2011, 47(7): 73–76 [李东, 初芹, 王雅春. 单核苷酸多态性标记在牛亲子鉴定中的应用与展望. *中国畜牧杂志*, 2011, 47(7): 73–76]
- Li DY, Kong J, Meng XH, *et al.* Development of multiplex PCR systems of microsatellite markers for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and its application for parentage identification. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 58–67 [李东宇, 孔杰, 孟宪红, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)微卫星多重 PCR 体系的建立及其在家系亲权鉴定中的应用. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 58–67]
- Liu JH. The genetic evaluation of breeding population and development & application of SNP marker in the Pacific white shrimp cultured using the zero water exchange system. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2016 [刘均辉. 凡纳滨对虾育种群体零换水养殖模式下遗传评估及 SNP 标记开发应用. 大连海洋大学硕士研究生学位论文. 2016]

- Luan S, Zhong WP, Tan J, *et al.* Effect of large-scale family selection on body weight of *Litopenaeus vannamei* by computer simulation. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(10): 1582–1588 [栾生, 仲伟鹏, 谭建, 等. 凡纳滨对虾收获体质量大规模家系选择效果的计算机模拟分析. *水产学报*, 2018, 42(10): 1582–1588]
- Premruethai S, Sirawut K, Rath P, *et al.* Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Marine Biotechnology*, 2002, 4(5): 487–494
- Sellars MJ, Diedrens L, McWilliam S, *et al.* Comparison of microsatellite and SNP DNA markers for pedigree assignment in black tiger shrimp. *Aquaculture Research*, 2014, 45(3): 417–426
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739
- Tang Y, Meng XF, Shen RF, *et al.* Research and application of family selection breeding in culture of Pacific white shrimp *Lotopenaeus vannamei*. *Fisheries Science*, 2018, 37(4): 125–133 [唐扬, 孟小菲, 沈瑞福, 等. 凡纳滨对虾家系选育的研究与应用. *水产科学*, 2018, 37(4): 125–133]
- Valles-Jimenez R, Cruz P, Perez-Enriquez R. Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology*, 2004, 6(5): 475–484
- Wang R, Liu H. Preliminary study of SNP marker on spawning traits in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2018, 27(6): 24–31 [王冉, 刘红. 凡纳滨对虾繁殖性状的 SNP 分子标记筛选的初步研究. *上海海洋大学学报*, 2018, 27(6): 24–31]
- Wang WJ. I Genetic mapping of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* using AFLP markers and commercial traits QTL mapping II Genetic linkage mapping using AFLP markers and primarily study on sex-determination of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2008 [王伟继. I 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 II 蓝鳃太阳鱼(*Lepomis macrochirus*)AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建及性别决定机制初探. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2008]
- 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]
- Werner FAO, Durstewitz G, Habermann FA, *et al.* Detection and characterization of SNPs used for identity control and parentage testing in major European dairy breeds. *Animal Genetics*, 2004, 35(1): 44–49
- Wu YY, Meng XH, Kong J. Application of unlabeled probe by HRM in development of EST-SNPs in *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 111–118 [吴莹莹, 孟宪红, 孔杰, 等. 非标记探针 HRM 法在中国对虾 EST-SNP 筛选中的应用. *渔业科学进展*, 2013, 34(1): 111–118]
- Xu Z, Primavera JH, Pena LDDL, *et al.* Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture*, 2001, 199(1–2): 13–40
- Yang R, Yu ZN, Chen ZZ, *et al.* Allozyme variation within *Crassostrea plicatula* and *Crassostrea gigas* from Shandong coastal waters. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(2): 130–133 [杨锐, 喻子牛, 陈再忠, 等. 山东沿海褶牡蛎与太平洋牡蛎等位基因酶的遗传变异. *水产学报*, 2000, 24(2): 130–133]
- Yeh FC, Yang R, Boyle T, *et al.* POPGENE version 1.32, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Canada: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, 1999
- Yu GC. Study on the validity of microsatellite and SNP marker technology in pig parentage identification. Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2014 [余国春. 微卫星与 SNP 标记技术在猪亲子鉴定中的有效性研究. 四川农业大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Yu Y. Development of molecular markers and their applications in selective breeding of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2014 [于洋. 凡纳滨对虾分子标记的开发及其在遗传育种中的应用. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2014]
- Zhang HW, Fu HT, Wu Y. Sequencing of ITS1 and identification of SNPs loci in *Macrobrachium nipponense*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(1): 72–77 [张洪伟, 傅洪拓, 吴滢, 等. 日本沼虾 ITS1 序列分析及 SNPs 位点的筛选. *水生生物学报*, 2010, 34(1): 72–77]
- Zhang JY. Development and application of SNP markers in genome of shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2011 [张建勇. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)基因组 SNP 标记的开发与应用. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2011]
- 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]
- Zhu K, Yu W, Huang J, *et al.* Parentage determination in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture International*, 2017, 25(2): 827–836

Development of SNP Markers and Verification Analysis of Relationship on Family in *Litopenaeus vannamei*

LIU Junyu^{1,2}, LIU Junhui², KONG Jie², DAI Ping², YU Yang³, MENG Xianhong²,
LUO Kun², CAO Baoxiang², CHEN Baolong², GAO Huan^{1①}, LUAN Sheng^{2①}

(1. College of Marine Life and Fisheries, Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, 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); Qingdao 266071; 3. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract The Large-scale family-based selective breeding can effectively increase genetic gain in shrimp, but tagging individuals for tracking pedigree is time-consuming, labor-intensive, and would cause inaccurate kinship. Molecular markers are effective in solving this problem. In this study, we developed 37 SNP markers derived from transcriptome sequences and performed analysis on genetic diversity, family clustering, and parentage for 22 families of *Litopenaeus vannamei*. The results provided examples for the application of SNP markers in selective breeding of shrimp. The results showed that the average expected heterozygosity (H_e) and observed heterozygosity (H_o) for 37 SNP loci were 0.38 and 0.34, respectively. Further, the average polymorphism information content (PIC) was 0.30, which means moderate polymorphism ($0.25 < \text{PIC} < 0.5$). The half-sib family F11 and F17 were firstly clustered together in the dendrogram and the genetic distance between them was 0.04. A highly cumulative probability exclusion (CPE) of 99.99% was obtained when the gender of parents was all known and the real identification rate was 77%. In conclusion, it is an accurate and feasible method to identify families using high-quality SNP markers instead of physical markers when testing trait and tracking pedigree in *Litopenaeus vannamei*.

Key words Family; SNP markers; Genetic diversity; Cluster analysis; Parentage assignment

① Corresponding author: GAO Huan, E-mail: huanmr@163.com; LUAN Sheng, E-mail: luansheng@ysfri.ac.cn