

DOI: 10.12264/JFSC2024-0227

低盐条件下脊尾白虾养殖群体不同世代间遗传变异的微卫星分析

张晓宇¹, 梁俊平^{1,2}, 李泽龙¹, 李慧¹, 王先锋¹, 李吉涛²

1. 河南师范大学水产学院, 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 河南 新乡 453007;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

摘要: 为了揭示低盐养殖条件下脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)养殖群体连续世代间的遗传变异, 采用微卫星分子标记分析了脊尾白虾 2021—2023 年间 4 个连续世代 GP2~GP5 养殖群体的遗传多样性和遗传分化。实验结果显示, 对 11 个微卫星位点进行扩增, 共检测到 70 个等位基因, 片段长度在 138~296 bp 之间, 10 个位点表现为中高度多态。GP2~GP5 养殖群体的平均观测杂合度(H_o)分别为 0.504、0.555、0.499 和 0.416, 平均期望杂合度(H_e)分别为 0.564、0.546、0.554 和 0.550, 平均多态信息含量(PIC)分别为 0.518、0.483、0.489 和 0.490。GP2~GP5 相邻世代养殖群体间的遗传分化水平逐渐加剧, 表现为弱分化, 相邻世代之间基因交流较为充分($N_m=11.32\sim 14.62$), 但逐渐降低; 聚类分析显示 4 个世代养殖群体间遗传组成具有差异, Structure Selector 分析最佳 K 值为 2。脊尾白虾不同世代的有效群体大小(N_e)为 3.1~37.1, 群体内部存在近交现象($F_{is}=0.061\sim 0.212$)。研究结果表明, 低盐养殖条件下脊尾白虾第 2 代到第 5 代的遗传多样性较为丰富, 处于中等水平, 尚具有良好的选育潜力, 但在今后的选育过程中仍需注意防止有效群体大小较低的问题, 避免群体内近亲交配而导致优良性状丢失。研究结果为下一步制定脊尾白虾耐低盐新品种人工选育计划提供了遗传数据。

关键词: 脊尾白虾; 低盐; 微卫星; 遗传变异

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)01-0014-10

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)又称白虾、五须虾和迎春虾等, 主要分布于中国大陆沿岸及朝鲜半岛西岸的浅海低盐区域, 是重要的中小型经济虾类。由于其具有繁殖力强、生长速度快、环境适应性广、肉质细腻、味道鲜美等优点, 已成为海水养殖的重要品种^[1-2], 全国每年的养殖面积约约有 2 万 hm^2 , 年产量约为 45 万 t, 养殖区域主要分布在江苏、浙江、山东、福建和广东等沿海省份^[3]。随着脊尾白虾养殖业不断发展, 人工育种工作也相继展开, 快速生长型脊尾白虾“黄育 1 号”和含高虾青素型脊尾白虾“科苏红 1 号”等新品种已在沿海地区大面积推广养殖^[4-5]。因脊尾白虾对盐度适应性较广, 其养殖范围已扩展到了

半咸水甚至淡水区^[6]。有研究认为, 低盐环境其实更适合脊尾白虾生长, 低盐条件下其生长速度明显快于高盐环境^[7-8], 此外, 低盐养殖虾类也被认为是控制暴发性病害的有效途径^[9]。为拓展脊尾白虾内陆低盐碱水域规模化养殖, 培育低盐碱水适应性品种, 丰富内陆盐碱水养殖虾类品种, 作者所在实验团队前期突破了脊尾白虾内陆低盐碱繁育技术, 并连续养殖到了第 5 代。当前, 低盐条件下脊尾白虾在连续世代选育过程中遗传变异情况如何? 在低盐条件下选育耐低盐脊尾白虾新品种是否具有可行性? 这些问题有待进一步探究。对低盐条件下养殖的脊尾白虾群体进行种质资源调查, 探究养殖环境对其遗传多样性的影响, 对

收稿日期: 2024-07-22; 修订日期: 2024-08-01.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFD2401001); 国家自然科学基金项目(32072974); 河南省重点科技攻关项目(202102110257); 河南师范大学博士科研启动基金项目(20230250).

作者简介: 张晓宇(1994-), 女, 实验师, 研究方向为甲壳动物环境适应机制与分子生物学. E-mail: 2022127@htu.edu.cn

通信作者: 梁俊平, 副教授, 研究方向为甲壳动物逆境生物学. E-mail: liangjunpinglover@163.com

脊尾白虾耐低盐新品种选育具有重要指导意义。

微卫星又被称为简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)或短串联重复(short tandem repeats, STR), 由 1~10 bp 核苷酸为重复单元的微卫星本体和两侧的侧翼序列组成, 具有典型的高突变性, 是群体遗传研究中常用的分子标记^[10-11]。先前基于微卫星手段的研究证明, 脊尾白虾回交家系遗传多样性属中度或低度多态, 亲缘关系较近, 基因纯合率较高^[12]; 近交家系已达到一定的近交程度, 随着近交世代的增加, 遗传多样性逐渐降低, 并且近交家系对经济性状和免疫应答有负面影响^[13-14]; 养殖群体的遗传多样性水平相对于沿海野生群体较低^[15]。目前, 关于脊尾白虾人工养殖群体不同世代的遗传特性研究比较缺乏。水产动物在养殖过程中如何保持后代的遗传多样性是相关科技工作者面临的重要挑战。近亲交配与养殖群体规模密切相关, 当养殖群体规模较小时, 可能出现近交几率增加和有效群体规模不断减少等现象, 导致遗传变异程度降低^[16-17], 并表现出物种适应能力和选择反应的降低。研究证明, 群体的遗传多样性每丧失 10%, 就会对其繁育能力、存活率和生长等重要性状产生显著负面影响^[18]。因此, 在种群管理中, 遗传基础是养殖群体生长和经济性能的保障, 持续监测亲本的遗传变异(如等位基因数量)和遗传组成(如等位基因频率)能够有效避免养殖群体出现遗传多样性改变、有效种群大小降低和适应性下降等情况, 对于种群的长期可持续性具有重要意义^[19]。本研究利用 11 对微卫星荧光引物对低盐条件下养殖的脊尾白虾第 2 代到第 5 代群体进行遗传分析, 旨在研究养殖过程中脊尾白虾的遗传多样性变化、遗传分化和有效群体大小等, 以期对脊尾白虾种质资源评价及其耐低盐品种选育提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

低盐条件下人工养殖的脊尾白虾基础群体来自 2020 年从山东日照市渤海湾地区采集的海捕亲虾, 经过低盐适应性驯化, 养殖在河南师范大学校内水产基地。各代抱卵虾、苗种培育阶段水

体盐度为 5, 其他养殖阶段水体盐度 1~5。养殖水体以自来水为水源, 通过添加各种离子配制而成。2021 年分别获得第 1 代和第 2 代群体, 2022 年获得第 3 代群体, 2023 年分别获得第 4 代和第 5 代群体。本研究随机选取来自第 2 代到第 5 代的脊尾白虾个体各 30 尾样本, 按群体分组分别命名为 GP2、GP3、GP4、GP5。各脊尾白虾样本取背部新鲜肌肉保存在 75% 的乙醇溶液中, 并存放于 -20 °C 冰箱, 以用于下一步的 DNA 提取。

1.2 基因组 DNA 提取

基因组 DNA 的提取采用高盐抽提法^[20], 在提取过程中, 使用无菌无酶离心管和无菌无酶枪头, 快速操作, 并多次洗涤沉淀, 以防止 DNA 降解并避免其他非核酸类成分污染。采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 完整性, 并用 NanoDrop ONE 超微量分光光度计检测 DNA 浓度和含量, 稀释至 100 ng/μL, 4 °C 冰箱保存备用。

1.3 微卫星位点的选择和分型

在 Wang 等^[14,21]发表的文献中选取 20 个用于特异性扩增的微卫星位点, 通过预实验筛选出 11 对多态性较高、特异性好的微卫星引物, 用于本研究中脊尾白虾连续 4 个世代养殖群体的遗传分析, 具体序列如表 1 所示。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 其中正向引物的 5'端进行荧光标记(修饰 FAM-蓝色), 选择 PAGE 纯化方式, 用于后续的 PCR 扩增产物测序。

微卫星扩增体系为 10.0 μL: 2×Taq Master Mix 5.0 μL, 正向和反向引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, DNA 模板 1.0 μL, 其余用双蒸水补足至 10.0 μL。微卫星扩增程序为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s; 50~58 °C 退火 15 s; 72 °C 延伸 1 min, 回到第二步, 30 个循环; 72 °C 彻底延伸 5 min。扩增程序完成后, 取 1 μL 扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 挑选带型清晰、完整的产物, 由武汉天一华煜基因科技有限公司进行等位基因荧光毛细管电泳分型。在分型时, 利用遗传分析仪(Prism3730, ABI, 美国)对 PCR 扩增产物的等位基因进行分离, DNA 长度标准使用 GeneScanTM-500LIZ Size。利用 GeneMarker 2.4 软件读取分型数据, 并辅以人工核对和校正以获取等位基因。

表 1 脊尾白虾 11 对多态性微卫星引物序列
Tab. 1 Sequences of 11 pairs of polymorphic microsatellite primers of *Exopalaemon carinicauda*

位点 locus	登录号 GenBank ID	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	核心序列 repeat motif	退火温度/°C T_m	参考文献 reference
EC034	KX394706	F: ACTTCATCCACAAGCAGAGGT R: GAAGAAGAGGAAGGTGGGGC	(ATC) ₇	56	[14]
EC051	KX394711	F: CACTGCCAGGAGTCTCGATG R: GTACAGATGCGGACGAGGAG	(ACTG) ₅	56	[21]
EC052	KX394712	F: TGCAAGTGCATCATGACTTGT R: AGGCAATATCTGTATCGGCAGT	(TGAA) ₅	52	[21]
EC054	KX394714	F: AGGCATTACCTAACTCCTTTGT R: ACCATTTATATGCACACGCTGT	(AGAT) ₅	52	[21]
EC058	KX394716	F: ATTAGGACGTTGACGCCTCG R: CAAGACGTGGCTCAGGTGAC	(TTTC) ₅	52	[21]
EC096	KX394741	F: GCAATTTGCCTGTTTCGGTCT R: GGTAGGGGTAAGGGGGTGAT	(TTG) ₆	55	[14]
EC105	KX394698	F: GTCCCCTTTTGCCAATCCT R: CTGGCAAGCCAACGTTATGG	(ACAG) ₆	58	[21]
EC149	KX394710	F: GGAGGAGGAGGGATGTCAGT R: GCATCTGATCGGCGTCAAAC	(GATT) ₅	57	[21]
EC153	KX394713	F: ACCTGTTCCGTTTCTTGAAAGG R: GGATGGACATGCCGAGACC	(TATG) ₅	50	[21]
EC216	MG976893	F: ATCATGAGGAGGACATTGCGT R: GACTTGACCCTGTTCTCTGCC	(GGA) ₁₄	57	[14]
EC219	MG976895	F: GTTTGTCCAACTCCGAGTGAAA R: CATCGCAACACCGACAGACA	(CTT) ₂₃	58	[14]

1.4 数据分析与处理

利用 GenAlEx version 6.501 软件^[22]计算 11 个微卫星位点和 4 个世代养殖群体的等位基因数 (numbers of alleles, N_a)、有效等位基因数 (effective number of alleles, A_e)、观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e) 和多态信息含量 (polymorphism information content, PIC) 等主要遗传多样性参数; 并利用 GraphPad Prism 9.5.1 软件对各参数的平均值绘制柱形图。利用 Fstat version 2.9.3 软件^[23]计算各世代养殖群体的近交系数 (inbreeding coefficient, F_{is})。

利用 Arlequin suite ver 3.5 软件^[24]计算世代养殖群体间的遗传分化系数, 使用 10^4 种排列进行显著性检验, 并进行群体间和群体内个体间的分子方差分析。利用 GenAlEx version 6.501 软件^[22]计算群体间的基因流。利用 STRUCTURE version 2.3.4 软件^[25]对 120 个脊尾白虾样本的基因型进行聚类分析, 设置参数如下: $K=2\sim 5$, 舍弃前 10^4 次运行值, 进行 10^5 次蒙特卡洛马尔科夫链 (MCMC) 迭代, 每个 K 值重复运行 20 次。获取运行结果后, 通过 Web 服务器 Structure Selector (<https://lmme.ac.cn/>

StructureSelector/) 进行聚类分析的可视化^[26]。

利用 NeEstimator 2.01 软件^[27]基于连锁不平衡方法计算不同世代养殖群体的有效群体大小 (effective population size, N_e) 和 95% 置信区间。

2 结果与分析

2.1 微卫星位点多态性分析

11 个微卫星位点在脊尾白虾 4 个世代养殖群体中共检测出 70 个等位基因, 片段大小在 138~296 bp 之间, 等位基因数在 2 (*EC058*)~12 (*EC216* 和 *EC219*) 之间, 有效等位基因数在 1.327 (*EC051*)~7.137 (*EC216*) 之间, 观测杂合度在 0.218 (*EC153*)~0.916 (*EC219*) 之间, 期望杂合度在 0.247 (*EC051*)~0.860 (*EC216*) 之间, 多态信息含量在 0.233 (*EC216*)~0.845 (*EC216*) 之间 (表 2)。

2.2 世代养殖群体的遗传多样性

基于 11 个微卫星位点对脊尾白虾 4 个世代养殖群体进行各遗传多样性参数分析, 并根据平均值绘制柱形图 (图 1)。结果显示 GP2~GP5 群体的平均等位基因数分别为 5.36、4.36、4.55 和 4.18, 平均有效等位基因数分别为 3.07、2.70、2.82 和

表 2 11 个微卫星位点在脊尾白虾 4 个世代养殖群体的遗传多样性参数
Tab. 2 Genetic diversity parameters of 11 microsatellite loci in four generations of *Exopalaemon carinicauda* breeding stock

位点 locus	产物大小/bp product size	等位基因数 N_a	有效等位基因数 A_e	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量 PIC
EC034	138~147	6	2.726	0.700	0.633	0.599
EC051	273~277	4	1.327	0.275	0.247	0.233
EC052	258~262	5	3.092	0.600	0.677	0.620
EC054	162~202	6	2.287	0.573	0.563	0.479
EC058	188~192	2	1.439	0.325	0.305	0.259
EC096	257~269	4	1.780	0.283	0.438	0.378
EC105	251~267	5	1.668	0.283	0.400	0.371
EC149	154~158	3	2.019	0.633	0.505	0.382
EC153	189~225	11	4.556	0.218	0.781	0.750
EC216	245~296	12	7.137	0.622	0.860	0.845
EC219	193~235	12	5.107	0.916	0.804	0.779

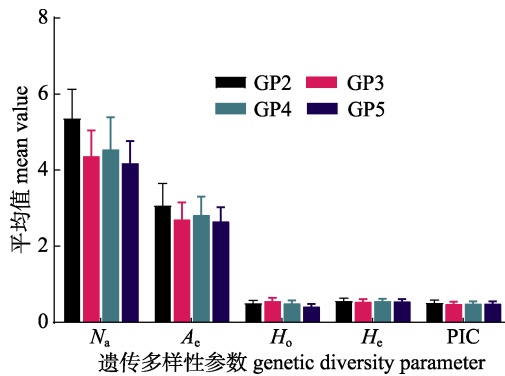


图 1 脊尾白虾 4 个世代养殖群体在 11 个微卫星位点上的各遗传多样性参数

Fig. 1 Genetic diversity parameters at 11 microsatellite loci in four generations of *Exopalaemon carinicauda* breeding stock

2.65, 平均观测杂合度分别为 0.504、0.555、0.499 和 0.416, 平均期望杂合度分别为 0.564、0.546、0.554 和 0.550, 平均多态信息含量分别为 0.518、0.483、0.489 和 0.490, 总体上, 各遗传多样性参数从第 2 代到第 5 代呈现出轻微下降的趋势。

2.3 世代养殖群体间的遗传分化

GP2~GP5 世代养殖群体之间的成对遗传分化系数 (F_{st}) 在 0.0096~0.0617 之间, P 值范围为 0.000~0.036, 表明不同世代群体之间存在显著或者极显著的遗传分化(表 3)。其中 GP2 和 GP3 群体间的 F_{st} 值为 0.0096, GP3 和 GP4 群体间的 F_{st} 值为 0.0146, GP4 和 GP5 群体间的 F_{st} 值为 0.0243, 表明随着世代的逐渐增加, 相邻世代群体之间的

遗传分化系数逐渐增加。GP2~GP5 世代养殖群体间的基因流 (N_m) 范围为 5.08~14.62, GP2 和 GP3 群体间的 N_m 值为 14.62, GP3 和 GP4 群体间的 N_m 值为 14.17, GP4 和 GP5 群体间的 N_m 值为 11.32, 相邻世代间的基因流逐渐减小。

如表 4 所示, 分子方差分析结果显示, GP2~GP5 群体的总变异中, 97.06% 的遗传变异来自世代养殖群体的个体之间, 2.94% 的遗传变异来自世代间, 说明目前的遗传变异主要来源于养殖群体个体内部的遗传差异。

表 3 脊尾白虾 4 个世代养殖群体间的成对遗传分化系数 F_{st} 和基因流 N_m

Tab. 3 Pairwise genetic differentiation coefficient F_{st} and gene flow N_m among four generations of *Exopalaemon carinicauda* breeding stock

群体 population	GP2	GP3	GP4	GP5
GP2		14.62	11.54	5.08
GP3	0.0096*		14.17	7.05
GP4	0.0142*	0.0146**		11.32
GP5	0.0617**	0.0493**	0.0243**	

注: 对角线上方为基因流, 对角线下方为遗传分化系数; *表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$), P 值范围为 0.000~0.036。

Note: The values above diagonal represent gene flow, while those below diagonal represent genetic differentiation coefficient; * denotes a significant difference ($P < 0.05$), and ** indicates an extremely significant difference ($P < 0.01$), with P values ranging from 0.000 to 0.036.

表 4 脊尾白虾 4 个世代养殖群体的分子方差分析

Tab. 4 Analysis of molecular variance across four generations of *Exopalaemon carinicauda* breeding stock

变异来源 source of variation	自由度 df	方差总和 sum of squares	变异组分 variance components	变异所占比例/% percentage of variation
世代间 among generations	3	22.279	0.07980	2.94
世代内 within generations	236	622.633	2.63828	97.06
总和 total	239	644.913	2.71808	

2.4 世代养殖群体间的遗传结构

如图 2 所示, 脊尾白虾 GP2~GP5 世代养殖群体的聚类分析表明, 当 $K=2\sim 5$, 不同世代群体间的遗传簇聚类组成具有差异, 与 F_{st} 值结果一致。Structure Selector 分析认为最佳 K 值为 2, 目前世代养殖群体中包含两种遗传簇。当 $K=2$, 也就是

存在蓝、橙 2 个遗传簇时, GP2 群体中的两种遗传簇分布均匀一致, 各占 45.96% 和 54.04%; GP3 群体中橙色遗传簇居多, 达到 74.44%, 随着世代的延续过程, 橙色遗传簇占比逐渐减少到 24.06%。当 $K=3, 4$ 和 5 时, 即存在更多不同的遗传簇时, 橙色遗传簇表现出相似的遗传组成变化。

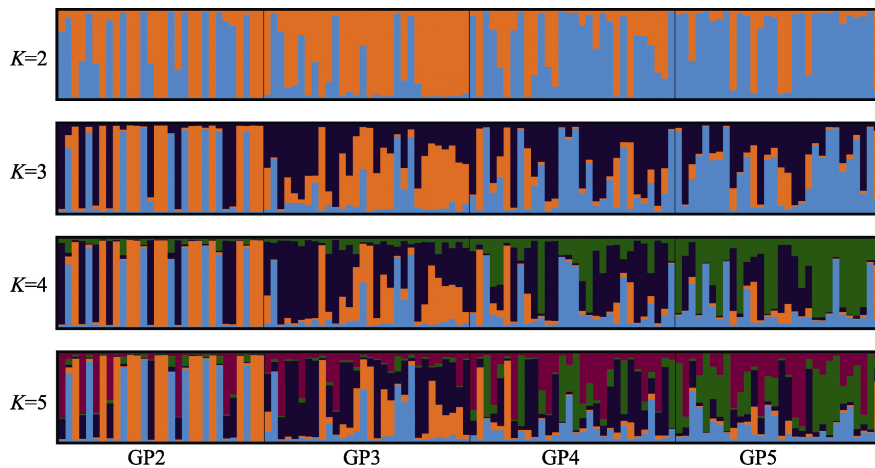


图 2 脊尾白虾 4 个世代养殖群体在 11 个微卫星位点的遗传聚类分析

Structure Selector 分析认为最佳 K 值为 2, 所有世代由两种遗传簇构成。

Fig. 2 Cluster analysis of genotypes at 11 microsatellite loci performed in four generations of *Exopalaemon carinicauda* breeding stock

Structure Selector analysis indicates that the optimal K value is 2, suggesting that all generations consist of two genetic clusters.

2.5 有效群体大小和近交

基于连锁不平衡方法估计目前脊尾白虾 GP2~GP5 世代的有效群体大小(N_e)和置信区间分别为 3.1 (2.6~4.8)、35.6 (19.0~105.4)、37.1 (20.9~95.3)、10.3 (6.9~15.4)。GP2~GP5 群体的近交系数分别为 0.061、0.010、0.075 和 0.212, 均表现为正值。

3 讨论

3.1 低盐下脊尾白虾世代养殖群体的遗传多样性

内陆低盐碱水体不同于自然海水水质, 盐度远低于海水, 其离子成分复杂且比例不平衡, 这

种环境要求养殖对象有更强的适应能力, 因此选育耐低盐碱新品种是解决低盐碱养殖海水虾的根本途径之一。人工定向选择是育种实践中最基础的方法, 在人工选育过程中, 选育群体的生产性能依赖大量等位基因变异的存在。然而定向选育容易导致原先具有的异质基因(等位基因)流失, 从而引起群体退化^[28], 因此维持群体内的遗传多样性是养殖种类种质资源研究、保护和利用的重点。

多态信息含量(PIC)是判断微卫星位点所能提供遗传信息容量的重要标准。当 $PIC > 0.5$ 时, 该

微卫星位点为高度多态性位点; 当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时, 为中度多态性位点; $PIC < 0.25$ 时, 为低度多态性位点^[29]。从本研究统计结果来看, 11 个基因位点中, EC034、EC052、EC153、EC216 和 EC219 表现为高度多态性, EC054、EC058、EC096、EC105 和 EC149 表现为中度多态性, EC051 表现为低度多态性。PIC 值越高, 表示该位点的多态性越丰富, 能够提供更多的遗传信息, 这些位点可为脊尾白虾群体遗传多样性分析提供高效的标记和准确的遗传信息。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 3 个世代选育群体的 PIC 分别为 0.6689、0.6657 和 0.6650^[30], 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) 人工选育群体第 1 代和第 6 代群体的 PIC 范围为 0.5567~0.8877^[31], 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) 泰国群体 3 个世代的 PIC 范围为 0.3630~0.5008^[32]。脊尾白虾 4 个世代养殖群体的 PIC 范围为 0.483~0.518, 低于凡纳滨对虾和中国明对虾、高于罗氏沼虾, 遗传多样性仍较为丰富。

期望杂合度(H_e)能够较为准确地反映研究群体中等位基因的丰富程度和均匀程度, 适合用来揭示近交动物群体的遗传变异水平。本研究中, 第 2 代到第 5 代群体的 H_e 值介于 0.546~0.564 之间, 低于 2016—2018 年的凡纳滨对虾耐寒家系选育亲本 3 个世代的 H_e (0.7029~0.7057)^[30], 低于中国对虾第 3 代到第 6 代养殖群体的 H_e (0.8082~0.8349)^[31], 但与凡纳滨对虾第 1 代到第 3 代的 H_e (0.58~0.63)^[33] 和 2016—2019 年连续选择 2~4 代的 4 个品系的 H_e (0.450~0.566)^[34] 相似, 表明脊尾白虾世代养殖群体的遗传多样性尚处于中等水平。除第 3 代群体外, 其他各世代检测到的观测杂合度低于期望杂合度, 表现出纯合子过剩、杂合子不足的现象, 说明养殖群体内存在杂合子缺失情况。杂合子缺失与无效等位基因的存在和研究样本数量有限有关, 还可能与亲缘近交或人为因素引起稀有碱基缺失等有关^[35]。从各遗传多样性参数(N_a , A_e , H_o , H_e 和 PIC)的变化趋势来看, 随着世代的逐渐增加, 从第 2 代到第 5 代群体的遗传多样性有所降低, 但降低幅度较小。结合杂合子缺失这一现象分析, 脊尾白虾世代间遗传多样性的

轻微降低可能是由于人工养殖条件下亲本数量有限或养殖群体规模较小等, 在进行人工定向选育时, 重点关注抗逆和经济特性(如耐低盐和生长速度)的选育, 导致后代个体的一些等位基因特别是稀有等位基因的丢失, 群体内发生遗传漂变或近交效应, 进一步降低遗传多样性^[36]。脊尾白虾在经过连续 4 代的培育后, 群体内保持中等水平的遗传多样性, 尽管人工选育在一定程度上降低遗传多样性, 但降低程度不明显, 因此该养殖群体仍具有良好的选育潜力。

3.2 低盐下脊尾白虾世代养殖群体间的遗传分化

遗传分化系数 F_{st} 是反映种群遗传分化水平的重要参数。在实际研究中 F_{st} 值为 0~0.05, 表示群体间存在弱遗传分化; F_{st} 值为 0.05~0.15, 表示群体间存在中等程度遗传分化^[37]。本研究中脊尾白虾相邻世代间的 F_{st} 值在 0.0096 到 0.0243 之间, 表明脊尾白虾世代间的遗传分化程度很小, 这一结果与凡纳滨对虾和中国明对虾选育群体在世代间表现出的遗传分化程度相似^[30-31,33]。AMOVA 分析结果表明, 97.06% 的遗传变异来源于脊尾白虾世代内, 而 2.94% 的变异来源于世代间, 说明脊尾白虾大部分的遗传变异来自世代内的个体之间。这种低水平的遗传分化可能是由于人工选育过程中对亲本的选择较为严格, 基因库相对稳定有关, 尽管在选育过程中注重保留某些性状, 但仍维持了整体种群的遗传多样性^[38]。

然而需要指出的是, 脊尾白虾相邻世代间 F_{st} 值呈现递增趋势, 表明随着世代的延续, 脊尾白虾的遗传分化程度加剧, 甚至在第 2 代与第 5 代群体间检测到的遗传分化水平已经达到中度遗传分化($F_{st}=0.0617$)。从聚类分析结果来看, 不同世代养殖群体之间遗传组成差异较大, 说明脊尾白虾群体的遗传结构处于不稳定状态^[30]。基因流分析结果认为, 相邻世代选育群体间的基因流大于 1, 表明世代间基因交流较充分, 但相邻世代群体间的基因流逐渐减少。脊尾白虾繁殖能力强, 几乎全年都有抱卵个体, 成熟雌虾每次抱卵量可达 1500~4000 粒, 这种高抱卵量和全年繁殖特性使得脊尾白虾少量亲本能够在相对较短的时间内产

生大量后代,从而减弱了世代间遗传漂变导致的分化^[39]。然而在人为定向选育的干预下,基因交流可能减弱,进一步增加世代间的遗传异质性,导致相邻世代间遗传分化加剧。其他一些虾类研究^[40-41]发现,随着选育过程的进行,世代间遗传背景趋于一致,遗传结构趋向稳定,体现人工定向选育的效应,因此在今后的选育过程中,有必要持续监测脊尾白虾连续世代的遗传分化状况,避免遗传异质性的过度积累导致的负面效应。

3.3 低盐下脊尾白虾有效群体大小和近交

有效群体大小(N_e)是水产动物育种与选择中需要考虑的重要参数^[42], N_e 的降低会直接影响种群遗传多样性,从而削弱种群应对未来环境变化的适应能力。基于连锁不平衡方法,本研究中估计的脊尾白虾第 2 代到第 5 代养殖群体的 N_e 在 3.1~37.1 之间,未表现出显著的增加或减少趋势。在育种计划中,为避免种群内遗传多样性的严重损失,对于仅繁育几代的繁育体系,应确保每代遗传异质性的减少率小于 1%,因此亲本群体的有效数量应不少于 50 尾^[43]。本研究所有世代中,由于连锁不平衡导致的较低 N_e 值引发了显著的近交效应,所有世代的近交系数 (F_{is}) 在 0.061~0.212 之间,表明世代群体中出现了近交现象。在人工养殖条件下,由于高密度养殖、难以有效追踪个体的系谱关系等管理问题,加之缺乏自然选择压力,脊尾白虾等水产动物面临着近亲交配的挑战^[44],这种现象较为常见,例如罗氏沼虾泰国群体 3 个世代的近交系数范围为 0.1131~0.2108,已经出现近交衰退现象^[32];凡纳滨对虾 5 个群体亲虾的平均近交系数为 0.147~0.305,表明近交程度较高^[45]。一般来说,近亲交配通常会导致虾类亲本的繁殖率降低,后代生存率、生长率和免疫功能等下降,从而影响养殖群体的生产效益^[46]。但另一方面,在育种过程中,近交可以帮助固定某些优良性状,近交系动物在遗传学研究中也具有重要应用价值,其潜在的积极作用也不容忽视。因此,如何有效避免有效群体大小降低导致的近亲交配的发生,保护繁殖群体优良遗传性能,是今后脊尾白虾新品种选育需要高度关注的**关键问题**。

4 结论

低盐条件下,脊尾白虾经过连续世代的人工养殖,遗传多样性略有下降,但整体上仍处于中等水平,仍具有良好的选育潜力。相邻世代间出现弱遗传分化且逐渐增加,群体遗传结构尚不稳定。目前有效群体大小较低,群体内已产生近亲交配现象。在今后的脊尾白虾耐低盐品种选育工作中需进行科学管理,避免过度亲缘交配,有必要定期进行遗传检测,防止因有效群体大小降低而引发的近交衰退等问题。

参考文献:

- [1] Liang J P, Li J, Li J T, et al. Molecular cloning of the vitellogenin receptor and its expression during ovarian development of *Exopalaemon carinicauda*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(4): 800-812. [梁俊平, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾 *VgR* 基因克隆及其在卵巢发育过程中的表达分析[J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 800-812.]
- [2] Zhang Q, Zhang C S, Yu Y, et al. Analysis of genetic diversity and population structure of the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* in China[J]. Aquaculture Reports, 2022, 27: 101369.
- [3] Li J T, Lyu J J, Liu P, et al. Genome survey and high-resolution backcross genetic linkage map construction of the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* applications to QTL mapping of growth traits[J]. BMC Genomics, 2019, 20: Article No.598.
- [4] Li Z H, Li G, Shen X D, et al. Study of pond culture of "Huangyu No.1" *Exopalaemon carinicauda* in the Liaohu estuary coastal area[J]. Scientific Fish Farming, 2020, 42(12): 33-34. [李忠红, 李耕, 申旭东, 等. 脊尾白虾“黄育 1 号”辽河口沿岸池塘养殖中试[J]. 科学养鱼, 2020, 42(12): 33-34.]
- [5] Zhang C S, Li F H, Yu Y. "Keshong No.1" *Exopalaemon carinicauda*[J]. China Fisheries, 2018(11): 73-77. [张成松, 李富花, 于洋. 脊尾白虾“科苏红 1 号”[J]. 中国水产, 2018(11): 73-77.]
- [6] Liang J P, Li J, Li J T, et al. Effects of salinity on spawning and larval development of *Exopalaemon carinicauda*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2014, 25(7): 2105-2113. [梁俊平, 李健, 李吉涛, 等. 盐度对脊尾白虾亲虾抱卵及其子代生长发育的影响[J]. 应用生态学报, 2014, 25(7): 2105-2113.]
- [7] Zhang C S, Li F H, Xiang J H. Effect of salinity on growth

- and first sexual maturity of *Exopalaemon carinicauda* (Holthuis, 1950)[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2014, 32(1): 65-70.
- [8] Zhang N G, Zhou Y H, Yu F, et al. Growth characteristics of different *Exopalaemon carinicauda* populations under low and high salinity conditions[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2022, 49(10): 135-145. [张年国, 周裕华, 于飞, 等. 低盐和高盐条件下不同脊尾白虾群体生长特性研究[J]. 广东农业科学, 2022, 49(10): 135-145.]
- [9] Jaffer Y D, Saraswathy R, Ishfaq M, et al. Effect of low salinity on the growth and survival of juvenile Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*: A revival[J]. Aquaculture, 2020, 515: 734561.
- [10] Kelkar Y D, Strubczewski N, Hile S E, et al. What is a microsatellite: A computational and experimental definition based upon repeat mutational behavior at A/T and GT/AC repeats[J]. Genome Biology and Evolution, 2010, 2: 620-635.
- [11] Guichoux E, Lagache L, Wagner S, et al. Current trends in microsatellite genotyping[J]. Molecular Ecology Resources, 2011, 11(4): 591-611.
- [12] Liu J M, Li J T, Liu P, et al. Microsatellite marker analysis on genetic variation of the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* backcross populations[J]. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(3): 133-139. [刘九美, 李吉涛, 刘萍, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)回交家系遗传变异的微卫星分析[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(3): 133-139.]
- [13] Wang R F, Li J, Li J T, et al. Genetic analysis of 33 microsatellite loci in 3 families of *Exopalaemon carinicauda* inbred line[J]. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(4): 78-86. [王日芳, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)近交系 3 个家系 33 个微卫星座位的遗传分析[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(4): 78-86.]
- [14] Wang J J, Li J T, Ge Q Q, et al. Effects of inbreeding on genetic characteristic, growth, survival rates, and immune responses of a new inbred line of *Exopalaemon carinicauda* [J]. International Journal of Genomics, 2020, 2020: Article ID 5735968.
- [15] Zhang X Y, Li S F, Li Y L, et al. Genetic diversity and population structure of wild and artificially selected populations of the ridgetail white prawn (*Exopalaemon carinicauda*) using consolidated mitochondrial cytochrome *b* and microsatellite markers[J]. Aquaculture Reports, 2024, 37: 102236.
- [16] de los Ríos-Pérez L, Campos-Montes G R, Martínez-Ortega A, et al. Inbreeding effects on reproductive traits in a breeding population of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*[J]. Aquaculture, 2017, 479: 442-446.
- [17] Knibb W, Giang C T, Premachandra H K A, et al. Feasible options to restore genetic variation in hatchery stocks of the globally important farmed shrimp species, *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2020, 518: 734823.
- [18] Allendorf F W, Ryman N. Genetic Management of Hatchery Stocks[M]//Ryman N, Utter F. Population Genetics and Fishery Management. Seattle: University of Washington Press, 1987: 144-160.
- [19] Bert T M. Ecological and Genetic Implications of Aquaculture activities[M]. Cham: Springer, 2007: 123-174.
- [20] Aljanabi S M, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(22): 4692-4693.
- [21] Wang J J, Ge Q Q, Li J T, et al. Identification of novel EST-SSR markers by transcriptome sequencing in ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*[J]. Genes & Genomics, 2018, 40(2): 207-215.
- [22] Peakall R, Smouse P E. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research [J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(1): 288-295.
- [23] Goudet J. FSTAT: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)[J]. Journal Of Heredity, 2001, 86: 485-486.
- [24] Excoffier L, Lischer H E L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. Molecular Ecology Resources, 2010, 10(3): 564-567.
- [25] Porras-Hurtado L, Ruiz Y, Santos C, et al. An overview of STRUCTURE: Applications, parameter settings, and supporting software[J]. Frontiers in Genetics, 2013, 4: 98.
- [26] Li Y L, Liu J X. StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods[J]. Molecular Ecology Resources, 2018, 18(1): 176-177.
- [27] Do C, Waples R S, Peel D, et al. NeEstimator v2: Re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data[J]. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(1): 209-214.
- [28] Lu C Y, Kuang Y Y, Zheng X H, et al. Advances of molecular marker-assisted breeding for aquatic species[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(1): 36-53. [鲁翠云, 匡友谊, 郑先虎, 等. 水产动物分子标记辅助育种研究进展[J]. 水产学报, 2019, 43(1): 36-53.]
- [29] 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: 314-331.

- 1980, 32(3): 314-331.
- [30] Peng M, Chen H F, Li Q Y, et al. Genetic diversity of three consecutive generations of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2020, 51(6): 1442-1450. [彭敏, 陈慧芳, 李强勇, 等. 凡纳滨对虾连续 3 个世代选育群体的遗传多样性分析[J]. 南方农业学报, 2020, 51(6): 1442-1450.]
- [31] Zhang T S. Study of microsatellites technique in selected populations of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004: 43-45. [张天时. 中国对虾人工选育群体的微卫星分子标记技术研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004: 43-45.]
- [32] Dong D J, Dai X L. SSR analysis on genetic diversity in different populations and generations of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2020, 51(2): 421-428. [董丁健, 戴习林. 罗氏沼虾不同群体世代遗传多样性的 SSR 分析[J]. 南方农业学报, 2020, 51(2): 421-428.]
- [33] Feng N N, Xu Z, Ma H Y, et al. Genetic variances in seven families of *Litopenaeus vannamei* revealed by microsatellite markers[J]. Biotechnology Bulletin, 2012, 28(11): 133-138. [冯娜娜, 徐真, 马洪雨, 等. 凡纳滨对虾 7 个不同家系遗传差异的微卫星标记分析[J]. 生物技术通报, 2012, 28(11): 133-138.]
- [34] Zhang Z, Lu C K, Lin K B, et al. Genetic diversity and genetic structure among four selected strains of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using SSR markers[J]. Fishes, 2023, 8(11): 544.
- [35] Antoro S, Na-Nakorn U, Koedprang W. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers[J]. Marine Biotechnology, 2006, 8(1): 17-26.
- [36] Li Z X, Li J, He Y Y, et al. AFLP analysis on selected fast growth populations of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Chinese High Technology Letters, 2006, 16(4): 435-440. [李朝霞, 李健, 何玉英, 等. 中国对虾人工选育快速生长群体不同世代间的 AFLP 分析[J]. 高技术通讯, 2006, 16(4): 435-440.]
- [37] Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers[J]. Molecular Ecology, 2002, 11(2): 155-165.
- [38] Wang J, Santiago E, Caballero A. Prediction and estimation of effective population size[J]. Heredity, 2016, 117(4): 193-206.
- [39] Li M Y. An approach to the reproduction and growth of shrimp *Exopelaeon carinicauda* cultured in earthen ponds with reference to its maximum sustaining yield on catch rotation[J]. Journal of Fisheries of China, 1994, 18(2): 85-92. [李明云. 池养脊尾白虾的繁殖、生长及其最大持续轮捕量的初步探讨[J]. 水产学报, 1994, 18(2): 85-92.]
- [40] Zhang T S, Kong J, Wang W J, et al. Genetic variability assessed by microsatellites in the breeding populations of the shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis* in China[J]. Aquaculture, 2010, 310(1-2): 229-233.
- [41] Wang F J, Meng X H, Fu Q, et al. Analysis of genetic diversity in three generations of breeding populations of *Fenneropenaeus chinensis* based on reduced-representation genome sequencing[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(4): 68-76. [王凤娇, 孟宪红, 傅强, 等. 基于简化基因组测序的中国明对虾 3 个选育世代遗传多样性分析[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(4): 68-76.]
- [42] Knibb W, Whatmore P, Lamont R, et al. Can genetic diversity be maintained in long term mass selected populations without pedigree information?—A case study using banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*[J]. Aquaculture, 2014, 428-429: 71-78.
- [43] Ponzoni R W, Khaw H L, Nguyen N H, et al. Inbreeding and effective population size in the Malaysian nucleus of the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Aquaculture, 2010, 302(1-2): 42-48.
- [44] Luo K, Kong J, Meng X, et al. Comparison of growth and survival among selected population, inbreeding population, and wild population in *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Aquaculture International, 2017, 25: 2177-2188.
- [45] Chen J H, Zheng J B, Wang P P, et al. Analysis for genetic diversity of broodstock populations of breeding *Litopenaeus vannamei*[J]. 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[J]. 渔业研究, 2019, 41(1): 1-10.]
- [46] De los Ríos-Pérez L, Campos-Montes G R, Martínez-Ortega A, et al. Inbreeding effects on reproductive traits in a breeding population of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*[J]. Aquaculture, 2017, 479: 442-446.

Microsatellite analysis of genetic variation in different generations of *Exopalaemon carinicauda* breeding stock under low-salinity culture conditions

ZHANG Xiaoyu¹, LIANG Junping^{1,2}, LI Zelong¹, LI Hui¹, WANG Xianfeng¹, LI Jitao²

1. College of Fisheries, Henan Normal University; Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation, Xinxiang 453007, China;
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: The ridgetail white prawn (*Exopalaemon carinicauda*) is an important small to medium-sized economic species. Due to its strong reproductive capacity, fast growth, and excellent environmental adaptability, it has gradually become the main species for the development of saltwater aquaculture modes in China. However, like many aquaculture industries, robust genetic foundations are essential to ensure the growth and economic performance of breeding stock. It is necessary to continuously monitor the genetic variation in broodstock to maintain long-term sustainability. Eleven polymorphic microsatellite loci were used to analyze the genetic diversity and genetic differentiation of four consecutive generations (GP2–GP5) of an *E. carinicauda* breeding stock from 2021 to 2023 to reveal the genetic variation of different generations under low-salinity culture conditions. The results were as follows. A total of 11 microsatellite loci were amplified, and 70 alleles were detected, with fragment lengths ranging from 138 to 296 bp, of which 10 loci were moderately to highly polymorphic. The average observed heterozygosity (H_o) of GP2–GP5 breeding stock was 0.504, 0.555, 0.499, and 0.416, respectively; the average expected heterozygosity (H_e) was 0.564, 0.546, 0.554, and 0.550, respectively; and the average polymorphic information content (PIC) was 0.518, 0.483, 0.489, and 0.490, respectively. The genetic diversity of white shrimp slightly declined with successive generations of breeding but remained at a moderate level. Genetic differentiation results indicated that the degree of genetic differentiation between adjacent generations gradually increased from GP2 to GP5, showing weak differentiation. Additionally, the sufficient genetic exchange ($N_m=11.32-14.62$) between adjacent generations of the breeding stock gradually decreased. Cluster analysis also showed differences in genetic composition between generations, with the optimal K value being 2. The effective population size of *E. carinicauda* in different generations ranged from 3.1 to 37.1 individuals, and inbreeding within the stock was detected ($F_{is}=0.061-0.212$). This study illustrated that although the genetic diversity of the second to fifth generations of *E. carinicauda* remained relatively rich under low-salinity culture conditions, it slightly declined over several generations. However, the species still showed good breeding potential. The stock exhibits weaker genetic differentiation and unstable structure, necessitating continuous monitoring and reinforcement. In future breeding efforts, it is crucial to prevent a reduction in effective population size to avoid issues such as inbreeding within the stock. The results of this study provide genetic data essential for the next step in developing a breeding plan for new low-salinity-tolerant white shrimp varieties.

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; low-salinity; microsatellites; genetic variation

Corresponding author: LIANG Junping. E-mail: liangjunpinglover@163.com