

DOI: 10.12264/JFSC2021-0078

中国对虾 4 代人工选育群体与 1 个野生群体遗传多样性分析及差异 SNP 位点筛查

盖超伟^{1,3}, 李旭鹏^{2,3}, 曹宝祥^{2,3}, 陈宝龙^{2,3}, 张雅文^{2,3}, 刘绵宇³, 栾生^{2,3},
孔杰^{2,3}, 孟宪红^{2,3}

1. 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海海洋大学, 上海 201306;
2. 海洋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. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 利用 2b-RAD 技术对中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) 2015 年、2016 年、2017 年、2019 年 4 代选育群体和野生群体合计 821 尾个体进行简化基因组测序, 分析中国对虾人工选育群体和野生群体遗传多样性特征, 挖掘在持续人工选育过程中受选择的 SNP 位点。测序共得到 83767 个 SNP 位点, F -统计结果显示, 野生群体与选育群体间遗传分化系数(F_{ST})均值为 0.022, 野生群体与 2019 年选育群体之间遗传分化程度最高为 0.0260, 与 2015 年选育群体之间遗传分化程度最低为 0.0190; 野生群体与选育群体之间遗传分化系数(F_{ST})均小于 0.05, 为弱遗传分化。群体主成分分析(PCA)结果显示野生群体与选育群体之间遗传结构未发生明显改变。遗传多样性统计结果表明, 野生群体与选育群体期望杂合度(H_o)均值分别为 0.1716 和 0.1806, 观测杂合度(H_o)均值分别为 0.1861 和 0.1943, 多态性信息含量(PIC)均值分别为 0.1428 和 0.1515, 核苷酸多态性(P_i)均值分别为 0.1732 和 0.1813, 其中 2017 年、2019 年选育群体各遗传多样性指数与野生群体相比均存在显著差异($P<0.05$)。对不同世代选育群体与野生群体进行选择消除分析, 分别得到 92 个、103 个、166 个、117 个受选择 SNP 位点, 共有位点数目为 4 个。相邻世代选育群体之间等位基因频率逐代上升的共有位点数目为 7107 个, 其中 3674 个位点显著偏离哈迪-温伯格平衡($P<0.05$); 等位基因频率逐代下降的共有位点数目为 8501 个, 其中 4101 个位点显著偏离哈迪-温伯格平衡($P<0.05$)。研究结果表明, 中国对虾经过累代人工选育, 依然具有较高的遗传选育潜力, 可以继续作为人工选育材料。

关键词: 中国对虾; 2b-RAD; SNP 标记; 遗传多样性; 人工选择

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)12-1505-10

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是我国重要的海水养殖经济物种之一, 主要分布区域位于我国黄渤海和朝鲜半岛西海岸等海域, 具有适应性强、耐低温、营养价值高等特点^[1]。20 世纪 80—90 年代以来, 中国对虾养殖技术取得重要突破, 养殖产量快速上升。然而 1993 年暴发的白斑综合征使中国对虾养殖产量急剧下降, 严重影响

了中国对虾养殖业发展。为了培育具有生长速度快、抗病能力强的新品种, 重振中国对虾养殖产业, 中国水产科学研究院黄海水产研究所自 1996 年开始实施中国对虾良种选育计划, 已先后培育了多个具有优良性状的对虾新品种^[2-5], 为中国对虾养殖产业可持续发展提供了优质的种质资源。

选择育种是中国对虾遗传改良过程中最常用

收稿日期: 2021-03-05; **修订日期:** 2021-03-25.

基金项目: 国家自然科学基金联合基金项目(U1706203); 国家重点研发计划项目(2018YFD0901302); 中国水产科学研究院创新团队项目(2020TD26).

作者简介: 盖超伟(1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向为对虾遗传育种. E-mail: gaichaowei999@163.com

通信作者: 孟宪红, 研究员, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

的方法,利用数量遗传学原理构建核心群体,并对相关的经济性状进行遗传评估,根据既定选择强度保留具有优良性状的个体,同时在保证较低的近交水平下进行配种繁育,通过多代持续的定向选择,得到具有优良性状且稳定遗传的后代个体,最终培育出新品种^[6-7]。随着生物技术的进步,DNA 分子标记技术逐渐成为研究水产动物遗传变异以及辅助育种的重要手段,已在水产动物遗传多样性、遗传变异分析、遗传图谱构建、分子标记辅助育种以及亲缘关系鉴定等方面取得了一定进展^[8-9]。与传统分子标记相比,SNP 标记具有在基因组内分布密度高、遗传稳定等优势^[10],逐渐成为遗传学研究中最常用的 DNA 分子标记手段。由于中国对虾基因组杂合度高,目前没有高质量参考基因组,一定程度限制了中国对虾分子标记辅助育种研究进展。近年来简化基因组测序技术的发展为水产物种 SNP 标记开发提供了新的研究手段^[11-12]。2b-RAD 技术是一项经济、高效的简化基因组测序技术,与传统的简化基因组测序技术相比,该技术能够得到更多的分子标记和更加准确的分型准确率^[13],可广泛适用于非模式生物连锁图谱构建以及遗传变异分析所需的高通量基因分型^[14-16]。

本研究中,中国对虾选育群体是自 1998 年开始,经过群体、家系累代选育与多性状复合育种技术相结合,先后于 2008 年和 2017 年获得的国家级水产新品种“黄海 2 号”和“黄海 5 号”,其中“黄海 2 号”是由中国对虾“黄海 1 号”“即抗 98”2 个选育群体以及朝鲜半岛南海群体、乳山湾群体、青岛沿岸群体及海州湾群体交配选育而成;“黄海 5 号”是由中国对虾“黄海 2 号”育种核心群、黄海群体、海州湾群体、朝鲜半岛西海岸群体组建而成的育种群体。新品种在抗病能力、生长速度、存活率等方面具有明显优势^[17]。本研究利用中国对虾 4 代选育群体和朝鲜半岛西海岸的野生群体进行 2b-RAD 简化基因组测序,并批量开发 SNP 标记,通过分析群体间遗传分化、遗传多样性和等位基因频率变化,了解人工选育群体与野生群体遗传多样性和遗传结构特征,挖掘在持续人工选育过程中受选择的 SNP 位点,为中国对虾人工

选育和种质资源评价提供基础数据及理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用实验材料为两部分,选育群体来自中国水产科学研究院黄海水产研究所水产遗传育种中心利用家系选择与家系内选择相结合的方式培育的 4 代中国对虾选育亲本(2015 年、2016 年、2017 年、2019 年),以下简称为 Fc_2015、Fc_2016、Fc_2017、Fc_2019。取样时随机选取不同家系的亲本个体,样本数量分别为 137 尾、244 尾、268 尾、112 尾;野生群体(WP)来自 2017 年引自朝鲜半岛西海岸的海捕亲虾个体 60 尾,合计 821 尾。所有样品取样后置于-80℃冰箱保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取及质检 实验用 TIANamp Marine Animals DNA Kit 试剂盒(天根)提取中国对虾肌肉组织基因组 DNA,利用 1%琼脂糖凝胶电泳以及 NanoDrop 2000 紫外分光光度计(Thermo Fisher Scientific)对基因组 DNA 进行浓度及质量检测,质量检测结束后将样品 DNA 置于-20℃冰箱保存备用。

1.2.2 2b-RAD 简化基因组文库构建及测序质控

利用 2b-RAD 五标签串联技术^[18]参考 Wang 等^[13]的方法构建中国对虾简化基因组测序文库,利用 IIB 型限制性内切酶 *Bsa*XI 对总量 ≥ 200 ng 的基因组 DNA 进行酶切,文库构建过程中样品均采用 5'-NNN-3'接头与酶切标签连接以得到更多的标记,文库质控合格后在 Illumina HiSeq X Ten 平台进行 Paired-end 测序。测序结束后利用 Pear 软件(Version 0.9.6)将成对的 raw reads 进行拼接得到拼接序列^[19]。同时对测序数据进行质控,过滤标准主要包括:过滤删除含有 N 碱基比例超过 8%的 reads;过滤质量值低于 Q30 的碱基超过 15%的低质量 reads;过滤含有接头序列的 reads。raw reads 经过过滤后得到 clean reads,对 clean reads 进一步过滤,剔除不含有酶切识别位点的 reads 后,得到 enzyme reads 用于后续的生物信息学分析。

1.2.3 SNP 标记分型 参照 RAD-typing 分型策

略^[18,20]对全基因组 SNP 标记分型, 利用 SOAP 软件^[21]将过滤得到的 enzyme reads 比对到参考序列后(参数为: -M 4 -v 2 -r 0), 利用最大似然法(ML)得到每个个体在每个位点的基因型。为了保证后续分析的准确性, 全基因组 SNP 分型完成后对分型结果进一步过滤: 剔除只含有 1 种等位基因的位点; 剔除基因组碱基为 N 的位点; 剔除同一位置两种分型的位点; 剔除所有样品中低于 80% 个体可分型的位点; 剔除最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF)低于 0.01 的位点; 剔除等位基因大于 2 的位点。

1.2.4 SNP 标记数据统计与分析 得到 SNP 标记分型结果后, 按照群体为单位计算群体期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)、多态性信息含量(PIC)、核苷酸多态性(P_i)以及野生型等位基因频率(allele frequency), 利用 SPSS 26.0 软件对遗传多样性指数(H_e 、 H_o 、PIC、 P_i)平均值进行单因素方差分析, 运用 Duncan 多重比较以 $P < 0.05$ 作为标准检验群体间是否存在显著性差异。利用 Genepop 软件(Version 1.0.5)计算群体遗传分化系数(F_{ST})^[22], 群体间遗传距离(Reynolds' genetic distance, DR)由遗传分化系数(F_{ST})计算得到。结合 F_{ST} 和 P_i 结果, 对历代选育群体与野生群体进行选择消除分析, 并筛选 F_{ST} 值最高的前 1% 和 P_i Ratio (分别计算 4 个选育群体与野生群体 $\theta\pi$ 比值并取 $\log_{10}$)的最低值前 1% 和最高值前 1% 作为候选位点, 根据 F_{ST} 及 $\theta\pi$ 计算结果进行可视化展示。利用 Excel 软件筛选野生群体与不同世代选育群体等位基因频率差异 SNP 位点, 利用 R 包 Venn Diagram 软件(Version 1.6.20)绘制相关差异 SNP 位点韦恩图^[23]。使用 GCTA 软件(version 1.26.0)对野生群体及选育群体, 进行主成分分析(PCA)判断野生群体与选育群体之间是否形成群体结构分层^[24]。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取

利用 TIANamp Marine Animals DNA Kit 试剂盒(天根)提取中国对虾基因组 DNA, 通过 1% 的

琼脂糖凝胶电泳检测样本 DNA 无明显拖尾现象, 利用 NanoDrop 2000 紫外分光光度计进一步检测基因组 DNA $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.0, 表明基因组 DNA 质量较好, 可以进行后续的 2b-RAD 简化基因组建库及测序。

2.2 2b-RAD 测序及 SNP 标记分型

本研究利用中国对虾野生群体和 4 个世代选育群体合计 821 尾个体的 2b-RAD 简化基因组测序数据构建了中国对虾 SNP 数据库。所有样本测序后共得到 30027775092 条 raw reads, 平均每个样本的测序 reads 数为 25533822 个, 筛选所有样本 raw reads 中含有 *Bsa* XI 酶切位点的高质量 reads, 共得到 98996323 个高质量 reads, 高质量 reads 所占比例为 75.93%。对 raw reads 进行质控过滤后统计, 所有样本共得到 523367100 个 unique 标签, 每个样本平均获得 unique 标签数目为 445040 个, 平均测序深度为 28 $\times$, 测序深度满足准确分型的要求。经过过滤后共得到 83767 个高质量的 SNP 位点, 用于后续群体遗传多样性分析, 筛选中国对虾在人工选择压力下受选择的 SNP 位点。

2.3 群体遗传多样性分析

野生群体与选育群体期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)、多态性信息含量(PIC)、核苷酸多态性(P_i)等各项遗传参数统计及 Duncan 多重比较结果如表 1 所示, 野生群体各项遗传多样性参数均低于选育群体。野生群体 H_e 、 H_o 、 P_i 与 Fc_2015、Fc_2016 群体相比无显著差异, 但与 Fc_2017、Fc_2019 群体相比存在显著差异($P < 0.05$); 野生群体 PIC 与任一选育群体相比均存在显著差异($P < 0.05$), 选育群体之间 Fc_2017、Fc_2019 与 Fc_2015、Fc_2016 群体相比存在显著差异($P < 0.05$)。F-统计结果如表 2 所示, 野生群体与选育群体不同世代 F_{ST} 范围在 0.0190~0.0260, 野生群体与 Fc_2019 群体之间分化程度最高, 与 Fc_2015 群体之间遗传分化程度最低; 野生群体与选育群体之间 F_{ST} 均小于 0.05, 属于弱遗传分化。群体间遗传距离(DR)结果显示野生群体与 Fc_2019 群体的遗传距离最远, 与 Fc_2015 群体的遗传距离最近。

表 1 中国对虾群体 SNP 位点遗传多样性参数统计

Tab. 1 Statistics of genetic polymorphism parameters of SNP loci in populations of *Fenneropenaeus chinensis*

群体 population	n=83767; $\bar{x} \pm SD$			
	期望杂合度 H_e	观测杂合度 H_o	多态性信息 PIC	核苷酸多态性 P_i
Fc_2015	0.1729±0.1610 ^c	0.1866±0.2314 ^c	0.1450±0.1217 ^c	0.1737±0.1617 ^c
Fc_2016	0.1795±0.1576 ^c	0.1890±0.2155 ^c	0.1509±0.1189 ^c	0.1799±0.1579 ^c
Fc_2017	0.1892±0.1598 ^a	0.2084±0.2333 ^a	0.1586±0.1199 ^a	0.1896±0.1601 ^a
Fc_2019	0.1809±0.1624 ^b	0.1931±0.2297 ^b	0.1513±0.1230 ^b	0.1818±0.1632 ^b
野生群体 WP	0.1716±0.1676 ^c	0.1861±0.2351 ^c	0.1428±0.1278 ^d	0.1732±0.1692 ^c

注: 同列数据上标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 相同小写字母表示差异不显著。
Note: Data in the same column with different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$), while the same letter means the difference is not significant.

表 2 中国对虾群体遗传分化系数(F_{ST})和遗传距离(DR)

Tab. 2 Genetic differentiation coefficient (F_{ST}) and genetic distance (DR) in populations of *Fenneropenaeus chinensis*

群体 population	Fc_2019	Fc_2017	Fc_2016	Fc_2015	野生群体 WP
Fc_2019	—	0.0036	0.0105	0.0074	0.0263
Fc_2017	0.0036	—	0.0063	0.0032	0.0208
Fc_2016	0.0105	0.0062	—	0.0063	0.0236
Fc_2015	0.0074	0.0032	0.0062	—	0.0192
野生群体 WP	0.0260	0.0206	0.0233	0.0190	—

注: 下三角为群体间遗传分化系数(F_{ST}), 上三角为群体间遗传距离(DR)。
Note: The lower triangle is the genetic differentiation coefficient (F_{ST}) between groups, and the upper triangle is the genetic distance between groups (DR).

2.4 群体遗传结构分析

中国对虾野生群体与选育群体间 PCA 分析结果如图 1 所示, 野生群体出现明显的聚集现象, 所有个体紧密聚为一簇, 而选育群体不同世代之间没有明显的聚集现象, 所有个体间分布较为广泛, 且与野生群体样本之间有一定距离。

2.5 SNP 位点筛选

根据分型得到的 83767 个 SNP 位点信息, 统计野生群体与选育群体野生型等位基因频率变化规律。结果如表 3 所示, 与野生群体相比, Fc_2015、Fc_2016、Fc_2017、Fc_2019 等位基因频率上升的位点数目均高于等位基因频率下降的位点数目。不同世代选育群体与野生群体等位基因频率变化的 SNP 位点差异如图 2、图 3 所示, 选育群体比野生群体等位基因频率上升的共有位点数目为 30915 个, 占总位点数比例为 36.91%, 等位基因频率下降的共有位点数目为 26906 个, 占

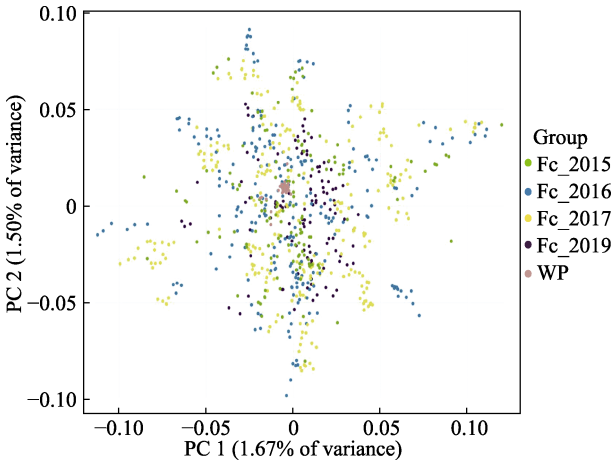


图 1 中国对虾野生群体(WP)与选育群体(Fc_)主成分分析(PCA)

Fig. 1 Principal component analysis (PCA) of wild population (WP) and breeding populations (Fc_) of *Fenneropenaeus chinensis*

表 3 中国对虾野生群体(WP)与选育群体(Fc_)等位基因频率变化

Tab. 3 Change of allele frequency in breeding populations (Fc_) and wild population (WP) of *Fenneropenaeus chinensis*

群体 population	等位基因频率变化位点 change locus of allele frequency	
	频率上升位点数目 number of loci with increased frequency	频率下降位点数目 number of loci with reduced frequency
Fc_2015-WP	42091	40053
Fc_2016-WP	44646	38018
Fc_2017-WP	45912	36315
Fc_2019-WP	42287	39306

总位点数比例为 32.12%。不同世代选育群体与野生群体选择性消除分析结果如图 4 所示, 图中紫色区域和红色区域分别代表筛选得到的选育群体

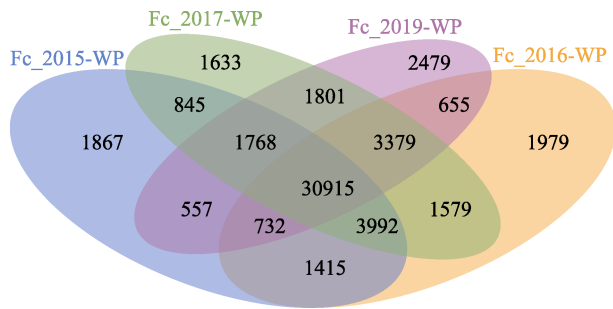


图 2 中国对虾选育群体(Fc_)与野生群体(WP)间等位基因频率上升位点 Venn 图 $\leq \geq$

Fig. 2 The Venn diagram of the increased allele frequency between breeding populations (Fc_) and the wild population (WP) of *Fenneropenaeus chinensis*

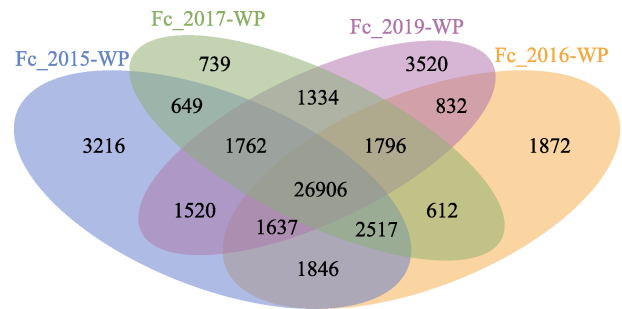


图 3 中国对虾选育群体(Fc_)与野生群体(WP)间等位基因频率下降位点 Venn 图

Fig. 3 Venn diagram of decreasing allele frequency between breeding populations (Fc_) and the wild population (WP) of *Fenneropenaeus chinensis*

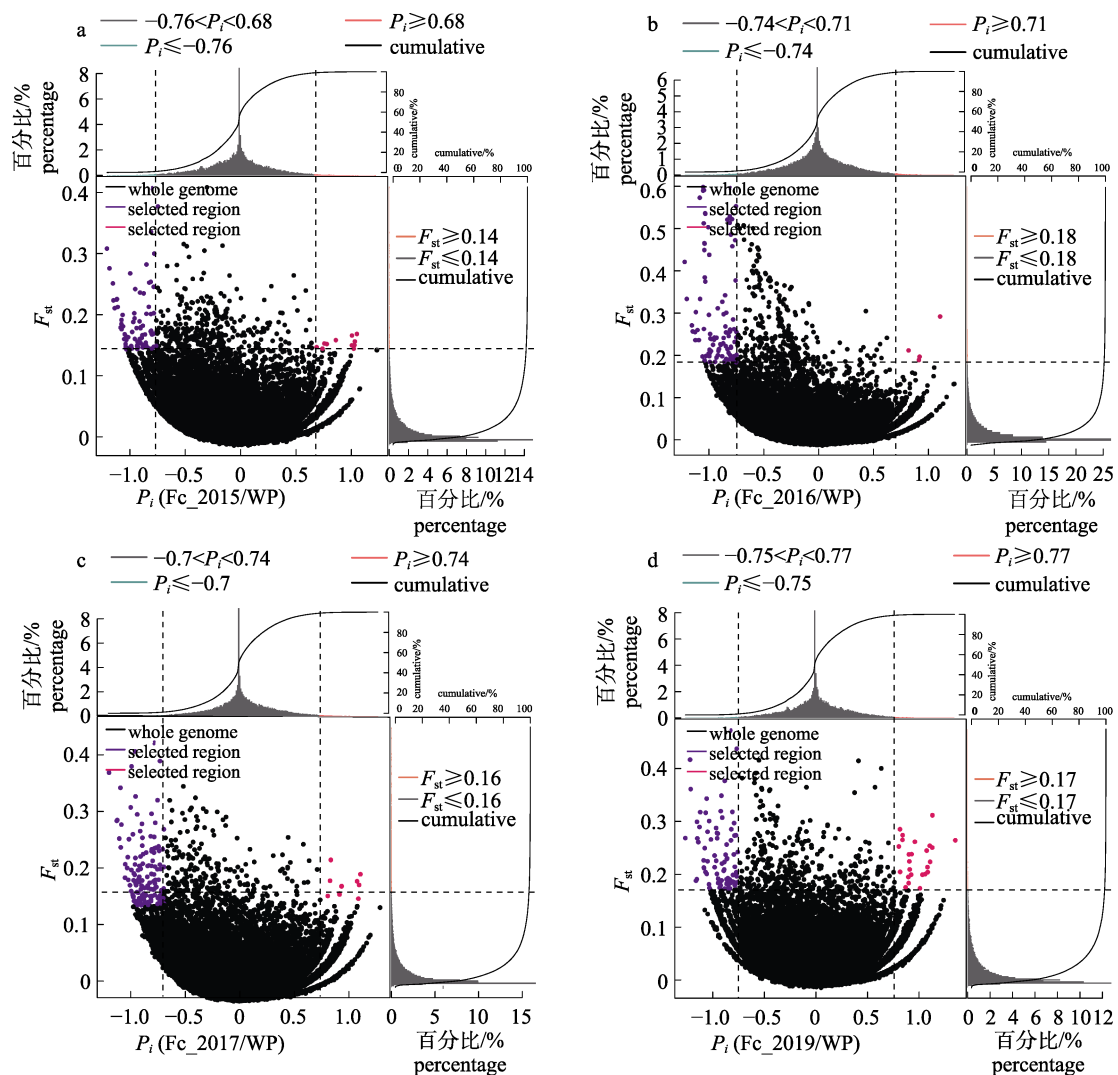


图 4 中国对虾选育群体(Fc_)与野生群体(WP)的 F_{ST} 和 $\theta\pi$ 选择消除分析

a. Fc_2015/WP; b. Fc_2016/WP; c. Fc_2017/WP; d. Fc_2019/WP.

Fig. 4 Selective sweep analysis between breeding populations (Fc_) and the wild population (WP) of *Fenneropenaeus chinensis*

a. Fc_2015/WP; b. Fc_2016/WP; c. Fc_2017/WP; d. Fc_2019/WP.

及野生群体受选择位点,各选育群体与野生群体筛选得到的受选择 SNP 位点数目分别为 92 个、103 个、166 个、117 个。将 4 组筛选得到的受选择 SNP 位点进行统计并绘制韦恩图,最终得到 4 个共有的 SNP 位点(图 5)。筛选不同世代选育群体之间等位基因频率规律性变化的位点并绘制韦恩图,结果如图 6、图 7 所示,选育群体相邻世代之间 (Fc_2015-Fc_2016、Fc_2016-Fc_2017、Fc_2017-Fc_2019),等位基因频率逐代上升的共有位点数目为 7107 个,其中 3674 个位点显著偏离哈迪-温伯格平衡($P<0.05$);等位基因频率逐代下降的共有位点数目为 8501 个,其中 4101 个位点显著偏离哈迪-温伯格平衡($P<0.05$)。

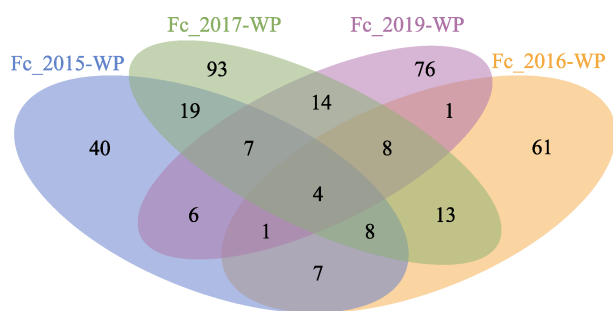


图 5 中国对虾选育群体(Fc_)与野生群体(WP)差异 SNP 位点 Venn 图

Fig. 5 Venn diagram of differences SNP loci between breeding populations (Fc_) and wild population (WP) of *Fenneropenaeus chinensis*

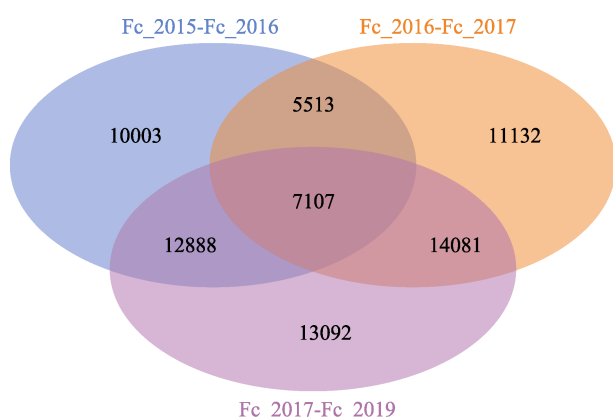


图 6 中国对虾选育群体(Fc_)相邻世代等位基因频率上升位点 Venn 图

Fig. 6 Venn diagram of the increase of allele frequency in neighboring generations of breeding populations (Fc_) of *Fenneropenaeus chinensis*

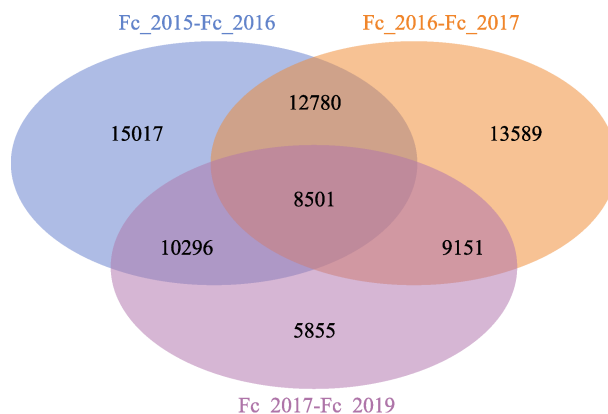


图 7 中国对虾选育群体(Fc_)相邻世代等位基因频率下降位点 Venn 图

Fig. 7 Venn diagram of the decreasing of allele frequency in neighboring generations of breeding populations (Fc_) of *Fenneropenaeus chinensis*

3 讨论

随着高通量测序技术的不断发展,分子标记技术被广泛应用于水产经济动物亲缘关系鉴定^[25]、种群遗传多样性分析^[26-27]以及遗传变异^[28]等研究方面。本研究通过 2b-RAD 技术对中国对虾 4 代选育群体和 1 个野生群体进行简化基因组测序,共得到 30027775092 条 raw reads,筛选所有样本的 raw reads 中含有 *Bsa*XI 酶切位点的高质量 reads,共得到 98996323 个高质量 reads,经过分型、过滤后,最终得到 83767 个高质量的 SNP 位点用于后续群体遗传多样性分析,以及筛选中国对虾在高强度人工选育压力下可能受选择的 SNP 位点。

遗传分化系数(F_{ST})是衡量群体间遗传分化程度的重要参数,群体遗传分化对于物种的生存、繁衍和进化具有重要作用^[29]。本研究中 F -统计结果显示,野生群体与选育群体之间 F_{ST} 均值为 0.022,野生群体与选育群体之间 F_{ST} 均小于 0.05,按照 Wright^[30]对遗传分化指数(F_{ST})标准的划分, F_{ST} 值介于 0~0.05,群体间属于弱遗传分化。选育群体与野生群体 DR 结果与 F_{ST} 结果相似,野生群体与 Fc_2015 群体间 DR 结果为 0.0192,群体间遗传距离最近,与 Fc_2019 群体间 DR 结果为 0.0263,群体间遗传距离最远,该结果与王凤娇等对中国对虾 G₉~G₁₁ 3 个连续选育世代遗传分化系数进行计算得到 3 个世代总 F_{ST} 为 0.0061,选育

群体未发生明显遗传分化的结论相似^[31]。本研究群体 PCA 结果显示, 选育群体与野生群体并未发生明显的遗传结构改变。选育群体与野生群体之间遗传分化程度相当小, 其遗传结构并未发生明显分层, 该结果与王军等^[8]利用微卫星(SSR)分子标记技术对中国对虾第 10 代选育群体与韩国西海岸野生群体之间遗传变异分析得到的结果相似(选育群体观测杂合度 $H_o=0.810$, 香农指数 $H=2.399$, 野生群体观测杂合度 $H_o=0.852$, 香农指数 $H=2.789$, 二者无显著性差异); 但不同于张辉等^[32]利用威海市乳山第一对虾养殖场中国对虾 2009 年养殖群体与野生群体(黄海及渤海水域) mtDNA 控制区序列得到的两群体间存在显著的遗传分化($F_{ST}=0.0698$, $P=0.00$)的结果, 可能是研究中涉及的 mtDNA 控制区序列信息与本研究中基因组 DNA 序列信息存在较大差异, 因而导致结果不同。本研究统计结果中选育群体 F_{st} 、DR 以及 PCA 以及各遗传多样性参数结果相较于野生群体并未出现明显降低, 说明人工选育群体依然具有较高的选育潜力。

遗传多样性统计结果中各选育群体 PIC 与野生群体存在显著差异($P<0.05$), 选育群体与野生群体 PIC 平均值分别为 0.1515 和 0.1428。PIC 是衡量基因组 DNA 变异程度高低的重要参数^[33], 根据 PIC 划分标准, $PIC>0.5$ 为高度多态, $0.25<PIC<0.5$ 为中度多态, $PIC<0.25$ 为低度多态, 说明野生群体与选育群体整体均属于低度多态性($PIC<0.25$), 该结果略低于吴莹莹等^[34]利用非标记探针 HRM 法分析中国对虾 39 个 EST-SNP 位点遗传多样性结果(PIC 均值为 0.272)。造成该结果的原因与研究物种以及分子标记类型有一定关系。例如, 岳志芹等^[35]利用 AFLP 分子标记技术对中国对虾 4 代抗病群体遗传多样性进行比较, 结果表明群体间遗传多样性差异不显著; 董丁健等^[36]对罗氏沼虾泰国群体 3 个世代遗传多样性进行分析, 结果表明 3 个世代的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和多态性信息含量(PIC)随着世代增加呈逐代下降的趋势。在本研究中 4 代选育群体观测杂合

度(H_o)、期望杂合度(H_e)和核苷酸多态性(P_i)平均值均高于野生群体, 其中 Fc_2017、Fc_2019 群体 H_o 、 H_e 、 P_i 与野生群体间存在显著性差异($P<0.05$), 这种结果可能是与中国对虾人工选育技术路线有关。中国对虾新品种“黄海 5 号”自 2009 年开始选育, 基础群体包括中国对虾“黄海 2 号”育种核心群体、山东省海阳附近海域的黄海群体、日照市附近海域海州湾群体和朝鲜半岛西海岸群体等 4 个基础群体, 选育群体综合了 4 个基础选育群体的遗传多样性。这与唐琼英等^[37]利用微卫星标记与线粒体基因分析相结合的方法, 对罗氏沼虾 4 个选育群体遗传多样性进行研究, 得到利用不同种质资源进行选育的数丰群体(SF)遗传多样性最高的结果相似; 也与张芹等^[38]对黄河鲤野生群体和人工养殖群体遗传多样性分析得到养殖群体经过 20 多年人工选育后依然保持较高的遗传多样性结果一致。说明中国对虾在科学的人工选育条件下依然可以保持较高的遗传多样性。

人工选择并不能产生新的等位基因, 但经过人工选育受选择位点的等位基因发生不同程度富集或缩减, 使得与目的性状相关的位点基因频率不断积累或减少, 最终达到选育目的。本研究对选育群体及野生群体进行选择消除分析得到的受选择 SNP 位点数目分别为 92 个、103 个、166 个、117 个。选育群体比野生群体等位基因频率上升的共有位点数目为 30915 个, 等位基因频率下降的共有位点数目为 26906 个。而对相邻世代选育群体之间等位基因频率规律性变化位点进行筛选, 逐代上升的共有位点数目为 7107 个, 其中 3674 个位点显著偏离哈迪-温伯格平衡($P<0.05$); 等位基因频率逐代下降的共有位点数目为 8501 个, 其中 4101 个位点显著偏离哈迪-温伯格平衡($P<0.05$)。初步筛选得到的具有规律性变化的 SNP 位点还需要进行后续的功能验证, 进一步挖掘与中国对虾人工选育目的性状相关的变异位点。随着中国对虾“黄海 2 号”“黄海 5 号”选育群体遗传改良进程推进, 在定向选育过程中有利于生产的基因仍在不断富集、固定, 中国对虾“黄海 2 号”依然具有较高的遗传选育潜力, 可以继续作为选育材料。

参考文献:

- [1] Wang Q Y. General situation of prawn culture and breeding in China[J]. Scientific Fish Farming, 2008(4): 1-3. [王清印. 我国对虾养殖和育种概况[J]. 科学养鱼, 2008(4): 1-3.]
- [2] Kong J, Luo K, Luan S, et al. The new variety of *Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai No.2”[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(12): 1854-1862. [孔杰, 罗坤, 栾生, 等. 中国对虾新品种“黄海 2 号”的培育[J]. 水产学报, 2012, 36(12): 1854-1862.]
- [3] Li J, He Y Y, Wang Q Y, et al. Selective breeding of fast-growing and ammonia toxicity-resistant Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(1): 61-66. [李健, 何玉英, 王清印, 等. 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)“黄海 3 号”新品种的培育[J]. 渔业科学进展, 2015, 36(1): 61-66.]
- [4] Zhang J, Sun S Y, Li G L. Chinese shrimp culture technology of “Huanghai No.1”[J]. Scientific Fish Farming, 2011(6): 25-26. [张洁, 孙绍永, 李广来. “黄海 1 号”中国对虾养殖技术[J]. 科学养鱼, 2011(6): 25-26.]
- [5] Meng X H. Breeding and key technology of new variety “Huanghai No.5” of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)[J]. Management and Research on Scientific & Technological Achievements, 2020, 15(2): 89-91. [孟宪红. 中国对虾“黄海 5 号”新品种选育及配套关键技术[J]. 科技成果管理与研究, 2020, 15(2): 89-91.]
- [6] Olesen I, Gjedrem T, Bentsen H B, et al. Breeding programs for sustainable aquaculture[J]. Journal of Applied Aquaculture, 2003, 13(3-4): 179-204.
- [7] Kong J, Luan S, Tan J, et al. Progress of study on penaeid shrimp selective breeding[J]. Periodical of Ocean University of China, 2020, 50(9): 81-97. [孔杰, 栾生, 谭建, 等. 对虾选择育种研究进展[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(9): 81-97.]
- [8] Wang J, Wang Q Y, Kong J, et al. SSR analysis on genetic diversity in breeding and wild populations of *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 104-111. [王军, 王清印, 孔杰, 等. 中国明对虾人工选育群体与野生群体遗传多样性的 SSR 分析[J]. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 104-111.]
- [9] Liu B, Wang Q, Li J, et al. A genetic linkage map of marine shrimp penaeus (*Fenneropenaeus chinensis*) based on AFLP, SSR, and RAPD markers[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2010, 28(4): 815-825.
- [10] Wenne R. Single nucleotide polymorphism markers with applications in aquaculture and assessment of its impact on natural populations[J]. Aquatic Living Resources, 2018, 31: 2.
- [11] Su S, Li H, Du F, et al. Combined QTL and genome scan analyses with the help of 2b-RAD identify growth-associated genetic markers in a new fast-growing carp strain[J]. Frontiers in Genetics, 2018, 9: 592.
- [12] Li R, Bekaert M, Lu J, et al. Mapping and validation of sex-linked SNP markers in the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Aquaculture, 2020, 524: 735228.
- [13] Wang S, Meyer E, McKay J K, et al. 2b-RAD: a simple and flexible method for genome-wide genotyping[J]. Nature Methods, 2012, 9(8): 808-810.
- [14] Cui A, Wang B, Jiang Y, et al. Development of SNP markers for yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) by 2b-RAD simplified genome sequencing[J]. Conservation Genetics Resources, 2020, 12: 403-407.
- [15] Dou J, Li X, Fu Q, et al. Evaluation of the 2b-RAD method for genomic selection in scallop breeding[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 19244.
- [16] Xue L Z, Guo X F, Zhou Y L, et al. Screening and characterization of sex-specific markers by 2b-RAD sequencing in zig-zag eel (*Mastacembelus armatus*) with implication of XY sex determination system[J]. Aquaculture, 2020, 528: 735550.
- [17] Pang J F, Kong J, Meng X H, et al. Real-time PCR assay for quantifying WSSV load in *Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai No.2”[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2013, 44(3): 782-787. [逢锦菲, 孔杰, 孟宪红, 等. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)“黄海 2 号”人工感染 WSSV 的荧光定量分析[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(3): 782-787.]
- [18] Wang S, Liu P, Lv J, et al. Serial sequencing of isologous RAD tags for cost-efficient genome-wide profiling of genetic and epigenetic variations[J]. Nature Protocols, 2016, 11(11): 2189-2200.
- [19] Zhang J, Kobert K, Flouri T, et al. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End read merger[J]. Bioinformatics, 2014, 30(5): 614-620.
- [20] Fu X, Dou J, Mao J, et al. RADtyping: an integrated package for accurate de novo codominant and dominant RAD genotyping in mapping populations[J]. PloS ONE, 2013, 8(11): e79960.
- [21] Li R, Yu C, Li Y, et al. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment[J]. Bioinformatics, 2009, 25(15): 1966-1967.
- [22] Rousset F. Genepop’ 007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux[J]. Molecular Ecology Resources, 2008, 8(1): 103-106.
- [23] Chen H, Boutros P C. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 1-7.
- [24] Yang J, Lee S H, Goddard M E, et al. GCTA: a tool for ge-

- nome-wide complex trait analysis[J]. The American Journal of Human Genetics, 2011, 88(1): 76-82.
- [25] Lemopoulos A, Prokko J M, Uusi-Heikkilä S, et al. Comparing RADseq and microsatellites for estimating genetic diversity and relatedness—Implications for brown trout conservation[J]. Ecology and Evolution, 2019, 9(4): 2106-2120.
- [26] Su Y, Zhang C, Li Q Q, et al. Genetic diversity analysis of wild and cultured *Eriocheir sinensis* populations from the Yangtze River, Yellow River, and Liaohe River based on the mitochondrial D-loop gene[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(3): 436-444. [苏雨, 张成, 李青青, 等. 中华绒螯蟹长江、黄河和辽河水系野生和养殖群体的遗传多样性[J]. 中国水产科学, 2019, 26(3): 436-444.]
- [27] Sha H, Luo X Z, Li Z, et al. Genetic diversity of six silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) geo-graphical populations based on mitochondrial COI sequences[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(04): 783-792. [沙航, 罗相忠, 李忠, 等. 基于 COI 序列的长江中上游鲢 6 个地理群体遗传多样性分析[J]. 中国水产科学, 2018, 25(04): 783-792.]
- [28] Cheng K, Chen K, Shi Y, et al. Genetic diversity monitoring of selected generations of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) based on microsatellites[J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(9): 3774-3781. [程珂, 陈辰, 史燕, 等. 基于微卫星的中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)选育世代遗传多样性监测[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(9): 3774-3781.]
- [29] Guan Y Y, Liu W G, He M X. Genetic variation during four generations of selective breeding in the pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(4): 764-770. [管云雁, 刘文广, 何毛贤. 马氏珠母贝选育群体 4 个世代的遗传变异[J]. 中国水产科学, 2013, 20(4): 764-770.]
- [30] Wright S. Evolution and the genetics of populations. A treatise in four volumes. Volume 4. variability within and among natural populations[J]. Journal of Biosocial Science, 1972, 4(2): 253-256.
- [31] 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.]
- [32] Zhang H, Gao T X, Zhuang Z M, et al. Comparative analysis of the mitochondrial control region between the cultured and wild populations of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(8): 1149-1155. [张辉, 高天翔, 庄志猛, 等. 中国对虾养殖群体与野生群体线粒体控制区序列的比较[J]. 水产学报, 2010, 34(8): 1149-1155.]
- [33] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [34] Wu Y Y, Meng X H, Kong J, et al. Application of unlabeled probe by HRM in development of EST-SNPs in *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 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[J]. 渔业科学进展, 2014, 34(1): 111-118.]
- [35] Yue Z Q, Wang W J, Kong J, et al. AFLP analysis of four selected generations on disease-resistance trait of *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(1): 13-19. [岳志芹, 王伟继, 孔杰, 等. 用 AFLP 方法分析中国对虾抗病选育群体的遗传变异[J]. 水产学报, 2005, 29(1): 13-19.]
- [36] 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.]
- [37] Tang Q Y, Xie J H, Xia Z L, et al. Genetic diversity of the breeding populations of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(5): 1097-1104. [唐琼英, 谢巨洪, 夏正龙, 等. 罗氏沼虾不同育种群体遗传多样性研究[J]. 水生生物学报, 2020, 44(5): 1097-1104.]
- [38] Zhang Q, Song W, Hou Z P, et al. Genetic diversity analysis of wild and cultured population of *Cyprinus carpio*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(16): 91-93. [张芹, 宋威, 侯志鹏, 等. 黄河鲤鱼野生和人工养殖群体遗传多样性分析[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(16): 91-93.]

Genetic diversity analysis and SNP loci screening of four generations of *Fenneropenaeus chinensis* and one wild population

GAI Chaowei^{1,3}, LI Xupeng^{2,3}, CAO Baoxiang^{2,3}, CHEN Baolong^{2,3}, ZHANG Yawen^{2,3}, LIU Mianyu³, LUAN Sheng^{2,3}, KONG Jie^{2,3}, MENG Xianhong^{2,3}

1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education (Shanghai Ocean University), Shanghai 201306, China;
2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;
3. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: In this study, a total of 821 shrimps from four breeding population generations and a wild population of *Fenneropenaeus chinensis* (2015, 2016, 2017, and 2019) were sequenced using 2b-RAD technology to analyze the genetic diversity characteristics of artificial breeding and wild populations of *F. chinensis*, mining the selected single nucleotide polymorphism (SNP) sites in the continuous artificial selection process. A total of 83767 SNP sites were obtained by sequencing; *F*-statistics showed that the average coefficient of genetic differentiation (F_{ST}) between wild population and breeding populations was 0.022. The highest degree of genetic differentiation between the wild and breeding populations in 2019 was 0.0260; the lowest degree in 2015 was 0.0190. The F_{ST} between wild and breeding populations is less than 0.05, indicating weak genetic differentiation. The population principal component analysis results showed that the genetic structure between wild and breeding populations did not change significantly. The statistical results of genetic diversity showed that the average expected heterozygosity (H_e) of the wild population and the breeding populations were 0.1716 and 0.1806, respectively; the average observed heterozygosity (H_o) values were 0.1861 and 0.1943; and the average polymorphism information contents were 0.1428 and 0.1515. The mean values of nucleotide polymorphism (P_i) were 0.1732 and 0.1813. Among them, each genetic diversity index of the selected populations in 2017 and 2019 was significantly different compared to the wild population ($P<0.05$). Selection and elimination analysis of different generations of breeding and wild populations yielded 92, 103, 166, and 117 selected SNP loci; the number of common loci was 4. The number of common sites with allele frequencies increasing generation by generation between adjacent generations of selective breeding populations was 7107, of which 3674 sites deviated significantly from the Hardy-Weinberg balance ($P<0.05$). The allele frequency between adjacent generations of breeding populations decreased to 8501, of which 4101 loci significantly deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.05$). Results indicate that the population genetic diversity and genetic structure of *F. chinensis* have not changed significantly after artificial selection and breeding, and a high genetic selection potential is maintained.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; 2b-RAD; SNP; genetic diversity; artificial selection

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