

DOI: 10.12264/JFSC2024-0317

基于分子标记技术的中国对虾放流效果评估

邱靖媛^{1,2,3}, 吕丁^{2,3}, 胡玉龙^{2,3}, 王伟继^{2,3}, 吕官正^{1,2,3}, 单秀娟^{2,3}

1. 上海海洋大学海洋生物资源与管理学院, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
3. 山东长岛近海渔业资源国家野外科学观测研究站, 山东 烟台 265800

摘要: 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是我国黄渤海重要的增殖放流物种, 放流效果的精准评估是增殖放流的重要工作内容之一。有鉴于此, 本文采用分子标记放流效果评估技术对山东半岛黄海海域中国对虾放流效果进行评估。具体为先后于 2023 年春汛和秋汛期间, 在山东半岛海阳收集放流用中国对虾亲虾 404 尾, 当年 9 月份于黄岛、海阳和崂山海域, 回捕中国对虾个体共计 461 尾。另于 2024 年春季, 在山东半岛崂山和日照海域, 采集中国对虾生殖洄游个体共计 509 尾。采用微卫星分子标记和线粒体 COI 基因序列信息相结合的亲子溯源方法, 对各批次回捕样本中来自放流的个体进行了鉴别和溯源分析。结果显示, 从 2023 年秋汛及 2024 年生殖洄游的回捕样本中, 共计监测到来自放流的个体 112 尾, 其中秋汛回捕样本和生殖洄游样本中各 56 尾。上述结果表明, 山东半岛黄海海域增殖放流的中国对虾, 对当年黄海秋汛产量和翌年生殖洄游的亲虾资源量均有显著贡献。

关键词: 中国对虾; 放流效果评估; 分子标记; 黄海

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)03-0362-10

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是我国黄渤海重要经济对虾类, 其一生具有显著的洄游习性, 包括生殖、索饵和越冬洄游三个阶段。每年冬季, 交尾雌虾在黄海中部深海区分散越冬, 春季随海水温度回升向北启动生殖洄游。生殖洄游个体约在 3 月底前后抵达山东半岛东南部海域, 大部分继续向北绕过山东半岛东端向西通过渤海海峡进入渤海三大产卵场(辽东湾、渤海湾、莱州湾); 少部分向西洄游至山东半岛南部沿岸的青岛到海阳一带^[1]。历史上中国对虾资源极为丰富, 1979 年捕捞产量曾高达 4 万 t^[2]。这些洄游习性不仅体现中国对虾的生命周期特征, 同时也为后续中国对虾的资源管理和保护提供重要的参考依据。然而, 自 20 世纪 80 年代以来, 由于过度捕捞、

病害(例如, 对虾白斑综合症, white spot syndrome virus, WSSV)频发, 以及环境污染等问题, 中国对虾资源量大幅下降^[3-4]。为恢复日益衰退的中国对虾资源, 我国率先在渤海开展了中国对虾增殖放流活动, 经过近 40 年的持续放流一定程度上增加了黄渤海中国对虾的资源量^[5-6]。以黄海调查数据(该区域中国对虾产量占黄渤海总产量的四分之一)为例, 近几年黄海秋汛的中国对虾产量已稳步恢复约至 1000 t, 据估计, 其中 90%以上来自增殖放流^[7]。渔获物中放流个体的鉴别及准确数量统计是放流效果评估的重要内容。近年来, 国内外学者利用各种分子标记进行了放流效果评估研究, 主要包括微卫星分子标记(microsatellite marker)和线粒体基因序列: 冯晓婷^[8]基于微卫星

收稿日期: 2024-11-07; 修订日期: 2025-01-08.

基金项目: 农业资源调查与保护利用项目(12530014); 崂山实验室科技创新项目(LSKJ202203803).

作者简介: 邱靖媛(2000—), 女, 硕士, 研究方向为渔业资源. E-mail: qjy20000520@163.com

通信作者: 单秀娟, 研究员, 研究方向为渔业资源. E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn; 王伟继, 研究员, 研究方向为海水动物遗传育种与增殖放流效果评估. E-mail: wangwj@ysfri.ac.cn

标记评估长江江苏段鳙(*Aristichthys nobilis*)的增殖放流效果; Wang 等^[9]完成了渤海(莱州湾、渤海湾等)放流中国对虾的迁徙、分布和数量变动, 以及放流对中国对虾秋汛产量和翌年资源量补充效果的研究; Knibb 等^[10]使用 DNA 微卫星等位基因、mtDNA 单倍型变异和基因组 SNP 3 种不同的方法, 评估来自太平洋 7 个孵化场的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)样本的遗传多样性水平。相比物理标记放流的诸多局限, 分子标记放流能够实现对任意放流规格个体、任意数量个体以及放流个体完整生活史的精确跟踪且无伤害操作。因而, 分子标记放流已经成为目前放流评估的主流技术。

山东半岛南部黄海海域是中国对虾放流的重要海区之一, 尚未有利用分子标记放流技术对黄海放流中国对虾效果开展精准评估的研究。有鉴于此, 本研究以山东半岛南部黄海海域为研究区域, 采用基于中国对虾微卫星和线粒体 DNA (mtDNA)分子标记放流效果评估技术体系, 针对放流对当年黄海海域中国对虾秋汛量和翌年生殖洄游亲虾资源量的贡献进行深入研究, 为黄海海域中国对虾的增殖放流效果评估提供科学数据, 为山东半岛黄海以及整个黄渤海中国对虾资源管理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集

实验样品的采集分 3 批进行。第一批: 2023 年 5 月, 在山东省海阳市黄海水产有限公司(HY1)采集放流中国对虾亲虾(产卵完成后采集) 404 尾。第二批: 2023 年 9 月中国对虾秋汛期间, 从山东半岛南岸的黄岛海域(HD)、崂山海域(LS1)和海阳海域(HY2)合计采集海捕中国对虾 461 尾个体。第三批: 2024 年 4 月至 5 月, 从山东半岛南岸的崂山海域(LS2)及日照海域(RZ)采集 509 尾中国对虾生殖洄游个体。所有样本冰冻运送至实验室, -80 ℃ 的超低温冰箱保存备用。样本的采集时间、地点及数量详见表 1 及图 1。其中, 2023 年秋汛回捕样本, 用于评估放流对黄海中国对虾秋汛产量的补充效果; 2024 年回捕的生殖洄游样本, 用于评估

表 1 中国对虾样本采集时间、地点及数量
Tab. 1 Time, place, and number of *Fenneropenaeus chinensis* samples collected

时间 time	地点 location	数量 number
2023.05	HY	404
2023.09	HD(71)、LS(186)、HY(204)	461
2024.04	LS	110
2024.05	RZ	399

注: RZ: 日照; HD: 黄岛; LS: 崂山; HY: 海阳。
Note: RZ: Rizhao; HD: Huangdao; LS: Laoshan; HY: Haiyang.

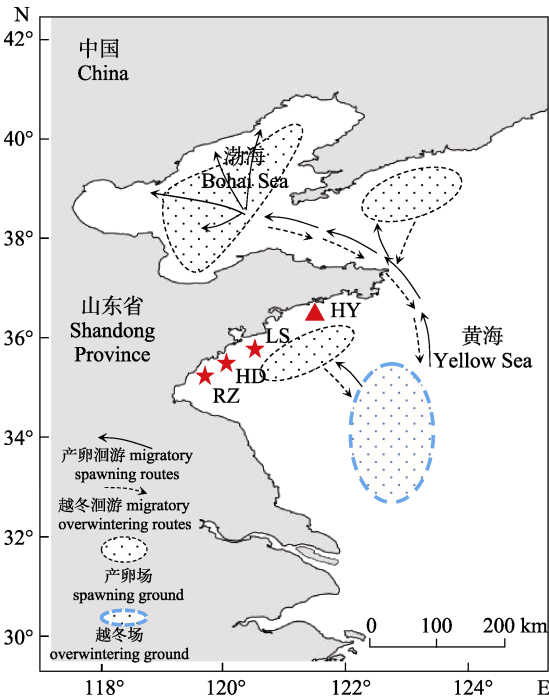


图 1 中国对虾洄游路线图

RZ: 日照; HD: 黄岛; LS: 崂山; HY: 海阳。
星号表示回捕到中国对虾个体的位置,
三角形代表育苗场释放发生的位置。

Fig. 1 Map of *Fenneropenaeus chinensis* migration route map in China
RZ: Rizhao; HD: Huangdao; LS: Laoshan;
HY: Haiyang. Stars indicate the locations where individuals were captured, while the triangle represents the site where releases into nursery grounds occurred.

放流对中国对虾资源量的补充效果。

1.2 方法

所有样本剪取游泳附肢, 取其肌肉, 采用常规酚氯仿异戊醇方法提取基因组 DNA^[11]。分别采用 0.8%琼脂糖凝胶电泳及分光光度计检测提取的基因组 DNA 质量, 并用灭菌后的 ddH₂O 调整至 50 ng/μL 的浓度, -20 ℃ 保存。在遗传多样性

分析中,位点数的多少起着重要作用,适当增加位点数量可以提高检测效率、准确度和精确度,并降低假阳性概率。本实验根据研究目的和已有的资源条件,考虑到样本量、微卫星位点多态性以及环境因素的影响,选用实验室之前开发的 8 个多态性丰富且 PCR 扩增稳定的微卫星位点,对样本基因组 DNA 多态性进行检测^[12-14]。每个 SSR 位点正向引物分别用 FAM、TAMRA、ROX 和 HEX 四种荧光染料之一进行标记(表 2)。SSR-PCR 反应体系为 25 μL : 12 μLMix (Monad)、上下游引物各 1 μL (10 μmol/L)、1 μL 模板 DNA (50 ng/μL) 和 10 μL ddH₂O。SSR-PCR 反应步骤如下: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 20 s, 退火 40 s (各位点对应的退火温度见表 2), 72 °C 延伸 20 s, 变性退火延伸循环 35 次后, 72 °C 终延伸 5 min, 放入 4 °C 冰箱保存备用。PCR 反应完成后, 首先利用 1.0%琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物质量进行抽检, 然后委托上海生工生物工程股份有限公司进行 SSR-PCR 产物基因分型。

除微卫星位点检测外, 还进行中国对虾线粒体 COI 基因的 PCR 反应。这一反应体系的设置与 SSR-PCR 反应类似, 但引物和反应条件有所不

同。中国对虾线粒体 CO I 基因 PCR 反应体系为 25 μL : 12 μLMix (Monad)、上下游引物各 1 μL (10 pmol/μL)、1 μL 模板 DNA (50 ng/μL)和 10 μL ddH₂O。CO I 特异性引物信息见表 3。PCR 反应流程为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 20 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 20 s, 变性退火延伸循环 35 次后, 72 °C 终延伸 5 min。CO I 基因的 PCR 产物委托上海生工生物有限公司进行双向测序。线粒体 CO I 基因测序结果使用 DNAMAN^[15]软件校正, 截掉两端几十 bp 杂峰序列后, 进行序列比对。微卫星等位基因分型数据通过 Gene-Mapper^[16]软件进行读取。所有微卫星位点等位基因分型数据利用 Cervus^[17]软件进行等位基因数(*k*)、观测杂合度(*H_o*)、期望杂合度(*H_e*)、哈迪-温伯格平衡(*H-W*)、无效等位基因[F(Null)]以及多态性信息含量(PIC)等参数的统计分析, 评估微卫星位点在不同情况下(单亲、双亲等)能够提供的个体累计排除率等参数。使用该软件筛查出亲本和回捕样本之间具有潜在亲子关系的样本对(判定 LOD 值设定 ≥ 3.0), 候选亲子关系样本对再利用线粒体 CO I 基因 SNP 位点单倍型进一步筛查, 最终确定回捕样本中来自放流的个体。

表 2 八个微卫星位点的序列信息、退火温度
Tab. 2 Characteristics of eight microsatellite loci

位点 locus	基因库检索号 GenBank accession no.	引物序列(5'-3') primer sequences (5'-3')	退火温度/°C annealing temperature	荧光标记染料 labeled fluorescent dye
EN0033	AY132813	F: CCTTGACACGGCATTGATTGG R: TACGTTGTGCAAACGCCAAGC	64	6-FAM
RS0622	AY132778	F: CAGTCCGTAGTTCATACTTGG R: ACATGCCTTTGTGTGAAAACG	60	HEX
RS1101	AY132811	F: CGAGTGGCAGCGAGTCCT R: TATTCCCACGCTCTTGTC	52	ROX
RS0683	AY132823	F: CACTCACTTATGTCACACTGC R: ACACACCAACACTCAATCTCC	64	TAMRA
EN0113	AY132816	F: TGTCAAGAGAGCGAGAGGGAGG R: TGTCAAGAGAGCGAGAGGGAGG	65	6-FAM
BM29561		F: AACAGACCACATACGGGAC R: TTTTCGGAAGTAACATCACA	58	HEX
RS0916	AY132796	F: GGCTAATGATAATAATGCTG R: CGTTGTTGTTGCTGTTG	56	ROX
RS0779	AY132790	F: ATGACACTCAAATCAAAG R: CAGAATAACATCATTACTAC	50	TAMRA

表 3 CO I 部分序列引物及退火温度
Tab. 3 CO I partial sequence primers and annealing temperature

引物序列(5'-3')	退火温度/℃
primer sequences (5'-3')	annealing temperature
CO I F:TTTTTGACCCTGCAGGAGGT	55
R:CCGTGGAGGGTTCCTATTCA	

2 结果与分析

2.1 SSR 位点的遗传多样性水平

本研究共计分析 2023 年度山东半岛南部黄海海域放流中国对虾亲本及 2023、2024 年度回捕样本 1374 个。就 8 个微卫星位点在所有样本中共检测到 350 个等位基因，每个位点检测到的等位基因数目从 7~80 不等，平均等位基因数目为 31.8。每个位点的观测杂合度 H_o 为 0.606~0.896，平均值为 0.771；期望杂合度 H_e 为 0.619~0.972，平均值为 0.872；平均多态信息含量 PIC 值为 0.856。在亲子溯源分析中，在一个亲本已知的条件下，8 个位点能够提供的个体累积排除率达到 0.999 以上(表 4)。

表 4 8 个 SSR 位点的遗传多样性水平统计
Tab. 4 Statistics on the level of genetic diversity at eight SSR loci

位点 locus	k	H_o	H_e	PIC	AE-2P	H-W	F(Null)
EN0033	88	0.782	0.972	0.971	0.056	—	0.108
RS0622	72	0.896	0.966	0.965	0.069	NS	0.038
RS1101	54	0.749	0.905	0.897	0.190	—	0.097
RS0683	57	0.807	0.927	0.923	0.144	—	0.07
EN0113	14	0.827	0.868	0.854	0.264	NS	0.024
BM29561	37	0.876	0.92	0.914	0.161	—	0.024
RS0916	7	0.621	0.619	0.543	0.659	NS	-0.003
RS0779	12	0.606	0.797	0.777	0.370	—	0.146
平均值 mean	43	0.771	0.872	0.856	0.239	—	0.063

注：k：位点上的等位基因数； H_o ：观测杂合度； H_e ：期望杂合度；PIC：多态信息含量；AE-2P：已知异性亲本基因型的情况下一个候选亲本的平均排除概率；H-W：偏离哈代-温伯格平衡的显著性；F(Null)：估计的无效等位基因频率。NS：无显著差异($P>0.05$)；“—”表示未知。如果选择了邦费罗尼校正选项，则显著性水平包括邦费罗尼校正。

Note: k: number of alleles at the locus; H_o : observed heterozygosity; H_e : expected heterozygosity; PIC: polymorphic information content; AE-2P: average exclusion probability for one candidate parent given the genotype of a known parent of the opposite sex; H-W: significance of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium; F(Null): estimated null allele frequency. NS: no significant difference ($P>0.05$); “—” indicates unknown. The significance level includes a Bonferroni correction, if the Bonferroni correction option was selected.

2.2 CO I 序列特征

中国对虾线粒体 COI 基因测序结果经剪切后，总长度为 650 bp。利用 DnaSP 单倍型分析软件在所有 1374 个中国对虾样本中共检测到 5 个 SNP 多态位点，这 5 个多态位点组成了 7 种单倍型。其中，单倍型 Hap01 占 97.8%，为主要类型，其余所有单倍型的占比均低于 1%，表现为单一单倍型占绝对多数的模式，7 种单倍型各自占比见表 5。单倍型多样性为 0.065，单倍型多样性方差为 0.00015、核苷酸多样性 P_i 值如图 2。

表 5 中国对虾所有样本中检测到的单倍型统计
Tab. 5 Statistics of haplotypes detected in all samples of *Fenneropenaeus chinensis*

单倍型 类型 haplotype	2023 年 增殖放流亲虾 spawned used for released <i>Fenneropenaeus</i> <i>chinensis</i> for enhancement in 2023	2023 年 秋汛回捕个体 recaptured samples in autumn fishing season in 2023			2024 年生 殖 亲虾 recaptured in reproductive migration in 2024		各单倍型 占比 proportion of each haplotype
		HY	LS	HD	HY	LS	RZ
Hap01	388	186	69	201	106	394	97.8%
Hap02	3	0	0	1	0	1	0.36%
Hap03	2	0	0	0	2	1	0.36%
Hap04	5	0	2	2	1	2	0.87%
Hap05	5	0	0	0	0	0	0.36%
Hap06	1	0	0	0	0	1	0.15%
Hap07	0	0	0	0	1	0	0.07%

注：RZ：日照；HD：黄岛；LS：崂山；HY：海阳。以上均为捕捞地点。
Note: RZ: Rizhao; HD: Huangdao; LS: Laoshan; HY: Haiyang. All above are locations at capture.

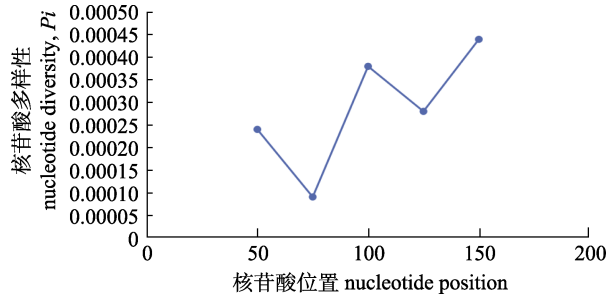


图 2 中国对虾样本 DNA 变异区域的核苷酸多样性(P_i)
Fig. 2 Nucleotide diversity (P_i) of DNA variation region of *Fenneropenaeus chinensis* samples

2.3 回捕样本中放流个体检出情况

利用 8 个多态性丰富的 SSR 位点等位基因信息，从 970 尾回捕个体中检测到 121 尾放流个体

与对应的 87 尾亲本间存在亲子关系。结合候选亲子对个体之间的线粒体 COI 基因 SNP 单倍型验证,剔除掉其中 9 个单倍型不相符的亲子对(包括 2023 年 HD 1 尾、LS 4 尾; 2024 年 LS 1 尾、RZ 3 尾),最终确定回捕样本中 112 尾是来自 2023 年在山东半岛南岸放流的个体。其中,2023 年黄海秋

汛期间回捕的 461 尾个体中,有 56 尾是来自于山东半岛南岸海域放流的个体,所对应的亲本数量为 50 尾; 2024 年 509 尾生殖洄游样本中检测到 56 尾来自于头年山东半岛南岸放流的个体,这 56 尾个体对应的亲本数量为 37 尾,放流个体检出情况见表 6。

表 6 回捕样本中放流个体检出情况统计
Tab. 6 Statistics on the detection of released individuals in recaptured samples

回捕样本编号 recapture individual ID	亲本样本 编号 parent sample ID	Lod 值 Lod score	共享单倍 型 shared haplotype	放流个体检出数量 number of released individuals detected	回捕样本编号 recapture individual ID	亲本样本 编号 parent sample ID	Lod 值 Lod score	共享单倍 型 shared haplotype	放流个体检出数量 number of released individuals detected
HD-4	Q326	6.85	Hap01	5	LS-462	Q215	8.52	Hap01	25
HD-56	Q349	5.31	Hap01		LS-467	Q195	7.45	Hap01	
...					LS-468	Q51	7.04	Hap01	
HY-95	Q347	6.31	Hap01	18	LS-473	Q262	6.65	Hap05	
HY-97	Q338	7.40	Hap01		LS-474	Q267	6.00	Hap01	
HY-254	Q356	5.43	Hap01		LS-488	Q60	5.50	Hap01	
HY-273	Q301	5.92	Hap01		LS-489	Q228	5.49	Hap01	
HY-278	Q313	5.98	Hap01		LS-500	Q89	5.38	Hap01	
...					...				
LS-442	Q286	5.80	Hap05	38	RZ-237	Q338	8.11	Hap01	35
LS-445	Q367	6.26	Hap01		RZ-389	Q331	7.76	Hap01	
LS-449	Q41	9.55	Hap01		RZ-315	Q168	6.79	Hap01	
LS-452	Q380	9.23	Hap01		RZ-273	Q347	6.57	Hap01	
LS-454	Q175	9.02	Hap01		RZ-155	Q313	6.35	Hap01	
LS-456	Q31	8.19	Hap01		RZ-133	Q301	5.83	Hap01	
LS-457	Q196	8.00	Hap01		RZ-203	Q116	5.45	Hap01	
LS-460	Q331	7.44	Hap01		RZ-213	Q133	5.44	Hap01	
LS-461	Q168	6.49	Hap01		...				
...					总数 total				121

注: 未列出所有回捕样本中检出的放流个体。RZ: 日照; HD: 黄岛; LS: 崂山; HY: 海阳。以上均为捕捞地点。
Note: Not all detection of released individuals from recaptured sampled are listed. RZ: Rizhao; HD: Huangdao; LS: Laoshan; HY: Haiyang. All above are fishing locations.

3 讨论

3.1 中国对虾放流群体遗传多样性

在以往的研究中,研究者多选用来源于核基因的微卫星和来源于线粒体基因的 SNP 标记开展中国对虾群体遗传多样性及亲子溯源分析,这两种分子标记的遗传特征和反映出的遗传多样性水平各异。本研究在检测完所有中国对虾样本的线粒体 COI 基因序列后,发现其单倍型多样性和核

苷酸多样性分别仅为 0.065 和 0.00033,显示出较低的遗传多样性,具体表现为单一单倍型类型在所有类型中占据绝对多数(表 5)。Sun 等^[18]利用 SSR 和 mtDNA 分析中国对虾放流群体对补充群体的贡献及该群体的遗传多样性发现,使用线粒体 DNA (mtDNA)得到的单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 0.265 和 0.00058,显示出遗传多样性水平较低,证实本研究结果。与来源于线粒体 COI 基因的 SNP 位点多态性相比,来源于核基因

的微卫星标记则提供了更为丰富的遗传变异水平(表4)。杂合度作为衡量群体遗传多样性的重要指标,反应基因位点在群体中的多态性情况^[19]。本研究中,8个SSR位点均显示出较高水平的 H_o 和 H_e ,表明山东半岛黄海海域中国对虾野生群体具有较高水平的遗传多样性,且放流群体观测杂合度与期望杂合度比较接近,说明放流群体处于遗传平衡状态^[20]。Wang等^[12]利用SSR分子标记分析了渤海湾中国对虾的生殖洄游群体和秋汛回捕群体的遗传多样性,发现其放流群体 H_o 和 H_e 均超过0.5,表明其群体同样具有丰富的遗传多样性,与本实验结果相同。

在亲子溯源分析中,选用分子标记遗传多样性水平的高低直接决定了该标记能够提供的个体分辨能力的水平。本研究中,选用8个多态性丰富(PIC值从0.543到0.971不等)的微卫星位点,在单亲已知的情况下,能够提供的个体分辨率达到0.9999以上水平(表4)。在中国对虾已有研究中,线粒体基因SNP位点处于较低的遗传多样性水平已经得到广泛验证,杨爽^[21]对1个增殖放流亲虾群体和4个中国对虾回捕群体的线粒体DNA控制区序列进行比较分析发现,研究群体拥有低核苷酸多样度的遗传多样性模式。本研究中,所有样本线粒体COI基因序列分析后,共检测到7种单倍型,所能提供的个体排除率仅为7.43%。中国对虾线粒体COI基因SNP位点多态性水平较低,在之前Liu等^[22]和Yang等^[23]的研究中也可得到验证。

3.2 中国对虾放流个体溯源分析

鉴于物理标记放流的诸多局限,采用分子标记进行中国对虾放流效果已经在近年来得到广泛开展,王陌桑等^[1]利用SSR分子标记分析了渤海莱州湾中国对虾放流群体的迁徙及数量变动;Wang等^[12]利用SSR分子标记研究渤海湾放流中国对虾的迁徙分布;Sun等^[18]结合SSR和mtDNA两种分子标记对渤海放流中国对虾对渤海秋汛生物量及翌年生殖洄游亲虾资源量的贡献进行了分析。SSR分子标记的重要特点之一在于其核心重复序列能够产生丰富等位基因变异,因而能够在

亲子溯源分析中提供足够高的个体识别能力,因而一直以来被作为亲子溯源分析的主要分子标记。一般来说,重复单元的碱基数目越少,其简单重复序列变异水平越高(比如2碱基重复序列的变异水平相较3、4、5碱基的变异水平高)。但两碱基重复序列在产生丰富变异性的同时,往往会由于SSR-PCR过程中的碱基错配、滑动等导致在基因分型结果中等位基因判读时产生偏差,影响亲子溯源结果的准确性;相比两碱基重复,3、4、5碱基虽然遗传多态性稍有降低,但等位基因的判读和校正更为准确,这是本研究选择8个SSR位点核心重复序列类型多为3、4和5碱基为主的原因。

除SSR分子标记外,线粒体序列严格遵循母系遗传规律^[24],同样也是适合进行溯源分析的分子标记之一,也已经被应用于中国对虾增殖放流效果评估^[22]。但线粒体序列遗传变异水平较低,能够提供的个体分辨率相对较低。同时,由于其严格的母系遗传特征,本研究选用其与SSR标记结合进行亲子溯源分析。在2023年秋汛回捕个体中,通过8个SSR位点等位基因信息检测到了61对亲子关系,经过亲子关系间线粒体COI基因SNP位点单倍型验证,其中56对亲子对间的COI基因SNP位点单倍型一致,有5对候选亲子对间的COI基因SNP位点单倍型不一致被排除;同样,利用8个微卫星位点,从2024年生殖洄游回捕样本中检测到60对候选亲子关系,其中有4对候选亲子对间的COI序列SNP位点单倍型不一致而被排除。这说明,尽管8个SSR位点的基因分型信息为亲子溯源提供了足够高的精确的判别结果,但仍无法完全排除偶发的假阳性^[25-26]结果。此前有研究者曾采用SNP分子标记基因芯片技术,进行大黄鱼(*Larimichthys crocea*)亲子溯源分析,相比SSR-PCR等位基因判读过程中可能的误差,SNP位点判读不会产生误差,单从准确性来讲,比SSR分析更具优势。但现阶段,其高成本仍旧成为限制它应用于大规模样本的主要因素^[20]。为确保亲子溯源结果的准确性以及成本等多方因素,现阶段采用多态性丰富且分型结果理想的SSR标

记进行亲子溯源, 线粒体 COI 基因 SNP 位点单倍型组成作为辅助监测技术, 对 SSR 标记结果进行再验证。两种分子标记结合识别回捕个体中放流个体, 从而确保放流个体精准识别。

3.3 山东半岛黄海海域中国对虾放流效果评估

本研究采集的 2023 年度中国对虾放流亲虾样本仅为该年度山东半岛南部海域所有放流亲虾中的部分个体, 因而 2023 年度秋汛 461 尾回捕个体中, 除去已经监测到的 61 尾放流个体外, 其余 400 尾个体中应该还包含有其他放流亲本所生产的个体。具体到黄海中国对虾放流回捕率的数据评估, 需结合 2023 年黄海放流中国对虾亲虾数量、放流中国对虾数量、秋汛期间中国对虾的产量(近 10 年一直稳定在 1000 t 左右水平^[27])才能够得出。

在以往放流效果评估中, 研究学者多重点关注放流中国对虾对当年黄渤海秋汛产量的贡献效果, 受技术条件限制, 较少关注放流对翌年中国对虾生殖洄游群体资源量的贡献。本研究回捕的亲虾样本来自黄海 2023 年秋季汛期和 2024 年春季生殖洄游, 黄海秋汛回捕样本用于分析放流对当年秋汛产量的贡献, 生殖洄游亲虾样本则用来分析放流对翌年中国对虾生殖群体资源量的补充效果。本研究结果证实了在山东半岛黄海海域放流的中国对虾不仅能够对当年黄海中国对虾秋汛产量作出贡献, 同时能够完成索饵、越冬以及生殖洄游, 进而对翌年生殖洄游亲虾资源量产生补充效果。结合以往的研究^[12,18], 本研究再一次证实了, 放流的中国对虾与黄渤海中国对虾自然群体都具有相同的洄游习性, 无论渤海湾、莱州湾还是山东半岛南部放流的中国对虾, 都能够完成索饵和越冬洄游, 并且在翌年春季完成生殖洄游。由此可以看出, 人工放流在洄游习性上未对整个群体造成影响。近十余年, 黄渤海中国对虾秋汛产量已经恢复到 4000 t 左右的水平, 其中黄海占 1/4~1/3^[9], 这个产量距最盛期的年产 4 万 t 还有很大差距。因此, 黄渤海中国对虾人工放流仍具有较大潜力, 除去进一步改善人工放流效果外, 还可从整个黄渤海生态系统水平层面尝试改进放流效果, 提高生态效益。未来, 期望探索更先

进的分子标记技术以提升检测效率和准确度。随着分子生物学的发展, 新的分子标记技术不断涌现, 具有更高的分辨率和广泛的应用范围, 为中国对虾增殖放流效果评估提供更多选择。此外, 结合生态学、海洋学等多学科知识和方法, 深入研究中国对虾的栖息环境和食物链关系, 为养护和管理中国对虾资源提供科学依据。

参考文献:

- [1] Liu Y C, Gao Y F. A preliminary study on migration and distribution patterns of released prawn in the coastal water of central Yellow Sea[J]. Journal of Fisheries of China, 1990, 14(2): 120-128. [刘永昌, 高永福. 黄海中部沿海放流增殖对虾秋汛洄游和分布的初步研究[J]. 水产学报, 1990, 14(2): 120-128.]
- [2] Wang W J, Shan X J, Jin X S, et al. Evaluation of shrimp enhancement and release effect and ecological security in China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020: 45-56. [王伟继, 单秀娟, 金显仕, 等. 中国对虾增殖放流效果评估与生态安全[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 45-56.]
- [3] Ye C C, Lin Y, Yang W. The glory and decline of Chinese prawns[J]. The World of Feed, 2004(5): 68-70. [叶昌臣, 林源, 杨威. 中国对虾的辉煌与没落[J]. 饲料世界, 2004(5): 68-70.]
- [4] Deng J Y, Zhuang Z M. The cause of recruitment variation of *Penaeus chinensis* in the Bohai Sea[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2000, 7(4): 125-128. [邓景耀, 庄志猛. 渤海对虾补充量变动原因的分析及对策研究[J]. 中国水产科学, 2000, 7(4): 125-128.]
- [5] Tang Q S. Research on the strategy of fishery resource enhancement in China's exclusive economic zone[M]. Beijing: Ocean Press, 2019: 146-168. [唐启升. 我国专属经济区渔业资源增殖战略研究[M]. 北京: 海洋出版社, 2019: 146-168.]
- [6] Zhang Y T, Lou F R, Zhao G Q, et al. Spatial and temporal variability of *Penaeus chinensis* resources in South of Shandong Peninsula[J]. Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition), 2023, 36(3): 299-306. [张艺腾, 娄方瑞, 赵国庆, 等. 山东半岛南部中国对虾资源时空变异特征[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2023, 36(3): 299-306.]
- [7] Li K Z, Wang C G, Liang H Y, et al. Research on contribution rate of resources on proliferation and releasing of *Penaeus chinensis* in southern Shandong Peninsula[J]. Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition), 2019, 32(2): 165-170. [李科震, 王承国, 梁海永,

- 等. 增殖放流对山东半岛南部中国对虾资源贡献率的研究[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2019, 32(2): 165-170.]
- [8] Feng X T. Microsatellite method assessment of the effects of stock enhancement of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) in Jiangsu reaches of the Changjiang River[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020: 1-14. [冯晓婷. 基于微卫星标记的长江江苏段鳊(*Aristichthys nobilis*)增殖放流效果评估[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020: 1-14.]
- [9] Wang Q Y, Zhuang Z M, Deng J Y, et al. Stock enhancement and translocation of the shrimp *Penaeus chinensis* in China[J]. Fisheries Research, 2006, 80(1): 67-79.
- [10] 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.
- [11] Wang L W, Xu K Q, Luo S Q. Methods and progress of genomic DNA extraction[J]. Shanghai Journal of Medical Laboratory Sciences, 2002, 17(6): 379-381. [王龙武, 徐克前, 罗识奇. 基因组 DNA 提取方法及进展[J]. 上海医学检验杂志, 2002, 17(6): 379-381.]
- [12] Wang W J, Lyu D, Wang M S, et al. Research in migration route of hatchery released Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) in the Bohai Bay using method of SSR marker[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2020, 39(12): 76-81.
- [13] Zhang K, Xiao G X, Wang W J, et al. Genetic variation analysis across six life periods in a natural population of the Chinese shrimp "*Fenneropenaeus chinensis*" in Bohai bay using SSR markers[J]. Russian Journal of Marine Biology, 2015, 41(1): 10-16.
- [14] Wang M S, Wang W J, Xiao G X, et al. Genetic diversity analysis of spawner and recaptured populations of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) during stock enhancement in the Bohai Bay based on an SSR marker[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2016, 35(8): 51-56.
- [15] Huang Y, Zhang L. Rapid and sensitive dot-matrix methods for genome analysis[J]. Bioinformatics, 2004, 20(4): 460-446.
- [16] Sun S. Family tracing and genetic parameter estimation based on microsatellite markers in turbot[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020: 6-28. [孙松. 大菱鲆家系的微卫星溯源和遗传参数评估[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020: 6-28.]
- [17] Slate J, Marshall T, Pemberton J. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS [J]. Molecular Ecology, 2000, 9(6): 801-808.
- [18] Sun S, Lyu D, Jin X S, et al. Parent-offspring relationship recognition based on SSR and mtDNA confirmed resource supplement effect of *Fenneropenaeus chinensis* release[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2024, 43(2): 156-160.
- [19] Cui T X, Liu H Y, Zhang J, et al. Genetic structure and diversity analysis of seven wild populations of *Channa maculata* based on SNP markers[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2024, 31(7): 829-838. [崔同心, 刘海洋, 张晋, 等. 基于单核苷酸多态性标记的 7 个斑鳢野生群体的遗传结构和遗传多样性分析[J]. 中国水产科学, 2024, 31(7): 829-838.]
- [20] Vaseeharan B, Rajakamran P, Jayaseelan D, et al. Molecular markers and their application in genetic diversity of penaeid shrimp[J]. Aquaculture International, 2013, 21(2): 219-241.
- [21] Yang S. Effect evaluation on stock enhancement of *Portunus trituberculatus* and *Fenneropenaeus chinensis* based on mtDNA control region[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014: 1-10. [杨爽. 基于线粒体 DNA 控制区标记的三疣梭子蟹和中国对虾增殖放流效果评价研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014: 1-10.]
- [22] Liu Q, Li C J, Li W Y, et al. Genetic identification of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* post-release in Jiaozhou Bay: Implications for management of stock enhancement[J]. Regional Studies in Marine Science, 2022, 53: 102425.
- [23] Yang T Y, Yang S, Meng W, et al. Genetic evaluation of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) stock enhancement in the Yellow Sea and Bohai Sea based on mitochondrial DNA control region[J]. Aquaculture International: Journal of the European Aquaculture Society, 2020, 28(2): 603-614.
- [24] Avise J C, Arnold J, Ball R M, et al. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial-DNA bridge between population genetics and systematics[J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1987, 18: 489-522.
- [25] Karaket T, Poompuang S. CERVUS vs. COLONY for successful parentage and sibship determinations in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man[J]. Aquaculture, 2012, 324: 307-311.
- [26] van Ba N, Nam L Q, Do D N, et al. An assessment of genetic diversity and population structures of fifteen Vietnamese indigenous pig breeds for supporting the decision making on conservation strategies[J]. Tropical Animal Health and Production, 2020, 52(3): 1033-1041.
- [27] Fu H P. Resource dynamics of enhanced *Fenneropenaeus chinensis* in the Southern Shangdong Peninsula during 2010-2016[D]. Yantai: Yantai University, 2017: 5-27. [付海鹏. 2010-2016 年山东半岛南部中国对虾增殖放流资源动态研究[D]. 烟台: 烟台大学, 2017: 5-27.]

Performance evaluation of *Fenneropenaeus chinensis* release and enhancement based on molecular marker technology

QIU Jingyuan^{1,2,3}, LYU Ding^{2,3}, HU Yulong^{2,3}, WANG Weiji^{2,3}, LYU Guanzheng^{1,2,3}, SHAN Xiujuan^{2,3}

1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Marine Fisheries and Sustainable Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. National Field Observation and Research Center for Fisheries Resources in Changdao Waters, Yantai 265800, China

Abstract: This study used microsatellite molecular markers and mitochondrial COI gene sequence information to investigate the effects of stock enhancement on *Fenneropenaeus chinensis* in the southern waters of the Shandong Peninsula, assessing the ecological contribution of the released *F. chinensis*. This species is an important economic shrimp species in China's Bohai and Yellow Sea regions, playing a key role in fishing and marine aquaculture. However, due to issues such as overfishing, disease, and environmental pollution, there has been a substantial decline in resources since the 1980s. To restore the dwindling resources of *F. chinensis*, China took the lead in conducting stock enhancement activities in the Bohai Sea. After nearly 40 years of continuous release, *F. chinensis* resources in the Bohai and Yellow Seas have been restored to some extent. The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of stock enhancement of *F. chinensis* in the southern waters of the Shandong Peninsula using SSR (simple sequence repeats) and mitochondrial COI molecular marker technology. The experimental sample collection was divided into three stages. In the first stage, in May 2023, 404 parental *F. chinensis* were collected from Haiyang Yellow Sea Aquatic Products Co., Ltd. in the southern part of the Shandong Peninsula after the completion of production of released seedlings. In the second stage, during the autumn fishing season of *F. chinensis* in September 2023, a total of 461 individual *F. chinensis* were recaptured in the sea areas of Huangdao, Haiyang, and Laoshan. In the third stage, from March to April 2024, 110 and 399 migrating individuals of *P. chinensis* were collected in the Laoshan and Rizhao sea areas, respectively. All the samples were frozen and transported to the laboratory for storage. Genomic DNA was extracted using the conventional phenol-chloroform isoamyl alcohol method, and DNA quality was detected by agarose gel electrophoresis and spectrophotometer. The experiment used parent-offspring tracing methods based on microsatellite molecular markers and mitochondrial COI gene sequence information to evaluate the effectiveness of stock enhancement of *F. chinensis* in the southern waters of the Shandong Peninsula. Eight polymorphism-rich microsatellite loci were used for PCR amplification and genotyping, combined with mitochondrial COI gene sequence analysis. Gene Mapper software was used to read allele data, and Cervus software was used for statistical analysis to determine potential parent-offspring pairs. The parentage relationship between released individuals and recaptured individuals was further verified using partial mtDNA sequence haplotypes. The results showed that 350 alleles were detected at eight SSR loci, with the number of alleles detected per locus ranging from 7 to 80, and the average number of alleles was 31.8. The observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.606 to 0.896, the expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.619 to 0.972, and the average polymorphism information content (PIC) value was 0.856. A total of five SNP polymorphic sites and seven haplotypes were detected in the COI sequence, with Hap01 accounting for 80% as the main type. The haplotype diversity was 0.065, and the nucleotide diversity value was 0.00033. A total of 121 individuals from stock enhancement were monitored in the recaptured samples from the autumn fishing season of 2023 and the migratory recapture samples of 2024. Further verification with mitochondrial COI gene sequences excluded nine unfit individuals. Among 970 recaptured individuals, 112 individuals from stock enhancement were detected, including 56 individuals from stock enhancement out of 461 individuals recaptured during the autumn fishing

season of 2023, accounting for 12.4% of the total recaptured individuals. 56 individuals from stock enhancement were detected in the migratory recapture samples of 2024, accounting for 9.2% of the total recaptured individuals. Microsatellite markers showed high levels of genetic diversity, while mitochondrial DNA detected lower haplotype diversity. This is mainly because nuclear genes have higher levels of genetic variation. In the traceability analysis of stock-enhanced *F. chinensis*, SSR markers provided sufficient individual identification capabilities. However, the lower the number of bases in the repeat unit, the higher the level of simple sequence repeat variation. But dinucleotide repeats can produce rich variability while often causing deviations in allele reading results due to base mismatches and slippages during PCR, which affects the accuracy of parent–offspring tracing results. Therefore, it is necessary to combine it with mitochondrial COI gene sequences that strictly follow maternal inheritance for re-verification to ensure the accuracy of allele reading and correction. This study provides a detailed assessment of the effectiveness of stock enhancement of *F. chinensis* in the Yellow Sea located on the southern coast of the Shandong Peninsula. This indicates that the enhancement of *F. chinensis* in the southern waters of the Shandong Peninsula had a significant contribution to the biomass of autumn in the current year and the resources of reproductive migration in the following year. Evaluating the effectiveness of stock enhancement of *F. chinensis* in the Yellow Sea and the Bohai Sea is not only of considerable importance for the conservation of *F. chinensis* resources but also makes an important contribution to the local marine ecosystem. This study can provide a scientific reference for the stock enhancement of *F. chinensis* in the Yellow Sea and the Bohai Sea.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; release effect evaluation; molecular marker; Yellow Sea

Corresponding author: SHAN Xiujuan. E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn; WANG Weiji. E-mail: wangwj@ysfri.ac.cn