

文章编号:1000-0615(2009)05-0832-08

微卫星用于凡纳滨对虾育种过程中亲权分析及遗传多样性的变化监测

王霞^{1,2}, 刘小林¹, 张继泉², 张成松², 黄皓³, 相建海²

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071;

3. 海南南疆生物技术有限公司, 海南 三亚 572000)

摘要:利用7个微卫星标记分析了6个凡纳滨对虾家系的亲本(G_0)及其后代(G_1)的基因型分离情况,同时对 G_0 和 G_1 的所有座位期望杂合度进行配对比较分析,并且通过对 G_1 群体每个位点的 F -statistics分析检验群体的遗传分化,以期对凡纳滨对虾育种进行遗传监测。结果表明:共检测到44个等位基因。 G_0 和 G_1 的平均每个座位的等位基因数目分别为6.14和6.27,平均期望杂合度为0.786和0.733,平均多态性信息含量为0.709和0.695。7个微卫星座位的累计排除概率为0.99,并且在有亲本存在的情况下,能够将6个家系分开。 G_0 与 G_1 的所有座位期望杂合度的配对比较分析结果表明 G_0 平均期望杂合度要显著高于 G_1 ($P < 0.01$)。 G_1 各座位的遗传分化指数 F_{ST} 在0.270 3~0.465 4,平均分化系数为0.358 4。说明亚群间属于高度遗传分化。最后,根据6个家系的遗传距离,利用UPGMA法对 G_1 个体聚类分析,结果表明亲缘关系较近的家系A和B以及C和D的相似系数很高分别各聚为一类,E和F分别聚为一类。

关键词:凡纳滨对虾;微卫星;亲权分析;遗传监测

中图分类号:Q 348; S 917

文献标识码:A

DNA分子标记技术是根据基因组DNA存在的丰富的多态性而发展起来的可直接反映生物个体在DNA水平上差异的一类新型的遗传标记技术,为水产动物遗传学的研究开辟了道路。微卫星标记表现为共显性遗传特性,即对来自亲本双方的等位基因型可以同时表现出来,同时由于微卫星标记技术具有简便、快速、稳定性好等优点,在水产动物系统进化分析、亲缘关系鉴定、遗传结构和遗传变异及遗传连锁图谱构建和基因定位等方面的研究中发挥着非常重要的作用^[1-6]。

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*),又称为南美白对虾,太平洋白对虾,自然分布于秘鲁至墨西哥太平洋沿岸,在对虾渔业及养殖工业中占有重要地位,是西半球最重要的养殖种类^[7]。我国自1998年引进凡纳滨对虾并开始养殖,但是长期

以来亲本得不到更新,加上引种后人工繁殖中的遗传漂变以及一些不合理的人为因素,种质出现了退化现象。从长远角度来看,培育优良品种和利用遗传改良来选育优质、高产、抗病、抗逆的新品种,将是进行凡纳滨对虾养殖业可持续发展的有效途径。一方面,凡纳滨对虾的雌虾具有开放式纳精囊,雄虾能够进行多次交配,近亲交配会导致性状的衰退;另一方面,家系遗传选育是人工培育优良品系的主要途径。因此,在其遗传育种过程中,追踪谱系,需要利用分子标记监测上下代之间的遗传变异;同时,为了监控近交造成个体生长率和抗病力的影响,保护凡纳滨对虾的遗传多态性,防止种质退化,弄清育种亲本的家系信息具有很重要的意义。

本研究利用我们在凡纳滨对虾选择育种项目

收稿日期:2008-11-08

修回日期:2009-04-09

资助项目:国家自然科学基金(40706048);国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A406)

通讯作者:相建海, E-mail: jhxiang@ms.qdio.ac.cn

中建立的家系为试验材料,评价利用 7 个微卫星标记对凡纳滨对虾家系的鉴别能力,为凡纳滨对虾的选育提供必要的分子生物学工具,对实施凡纳滨对虾育种规划提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

6 个家系的凡纳滨对虾(4 尾雄虾和 6 尾雌虾交尾所得)采自海南南疆繁育中心,家系分别标号为 A、B、C、D、E、F,其中 A 和 B,C 和 D 分别

共有 1 个父本,每个家系子代取 18 尾个体。取肌肉保存于 75% 酒精中运回实验室。

1.2 方法

基因组 DNA 提取 凡纳滨对虾的基因组 DNA 提取采用常规的酚仿抽提法,用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测,分光光度计检测浓度,−20 ℃ 保存以备使用。

微卫星来源 使用的 7 个凡纳滨对虾微卫星引物序列参考 Meehan 等^[7](表 1)。

表 1 凡纳滨对虾微卫星座位的引物序列和及其特征
Tab. 1 Primer sequences and its characteristics of microsatellite loci in Pacific white shrimp

微卫星座位 microsatellite loci	正向和反向引物(5'→3') forward and reverse primer(5'→3')		退火温度(℃) T _m	Genebank 登录号 Genebank accession
TUMXL5.45	F: TTTGTCGTTTGTCTTTCTCC	R: AGTAACTTACGTGAATGCTTGG	54	AF360025
TUMXL5.66	F: GGGGCACTGAGACGAGTAAG	R: CCGTTTTATCAGTCTCCATATACGA	60	AF360027
TUMXL6.124	F: GAAGTGCTTCAGTTGGCGAC	R: CCGGATATCTGTTGCGTTTC	55	AF360029
TUMXL7.121	F: GGCACACTGTTTAGTCCTCG	R: CGAACAGAATGGCAGAGGAG	56	AF360043
TUMXL7.56	F: CCATGGCTTTCCTCTTCTTTC	R: AGGTAGGGAAGTCGTGAGGG	62	AF360055
TUMXL8.32	F: TTACCGCCTAAGAGCGAATG	R: TGTCCCTTCGTACCAGTCAAG	56	AF360080
TUMXL10.411	F: AGCACCTAGCACTTGCTGAAC	R: AGAGACTCACATCCTCATCCTC	52	AF360004

注:F. 正向引物;R. 反向引物
Notes:F. forward primer;R. reverse primer

PCR 扩增与检测 每个 PCR 反应(20 μL)包括 20 ng 的基因组 DNA,10 pmol 的引物,1 × Buffer,2.5 pmol MgCl₂,0.2 pmol dNTPs,Taq DNA 聚合酶 1 U。PCR 反应条件 94 ℃ 40 s,适宜退火温度 40 s,72 ℃ 延长 40 s,一共 35 个循环;72 ℃ 10 min;4 ℃ 保温。PCR 产物在 8% 的非变性聚丙烯酰胺分离,EB 染色。用凝胶自动成像系统拍照。

基因型分型和亲权分析 利用 Quantity one 软件(Bio RAD 公司)对 6 个家系的 108 个子代个体,以及构建家系的亲本在 7 个微卫星座位上的基因型进行分析。根据每个条带的位置确定基因型,并进行人工校正。检验是否符合孟德尔分离比例。用 CERVUS (Version 3.0)^[8]软件分析家系中位点等位基因的数目、等位基因的频率、平均期望杂合度(H_e)、平均多态性信息含量(PIC)等参数,并且计算 7 个微卫星座位对 108 个

子代个体的累计排除概率。

群体遗传多样性分析 将 6 个家系的亲本作为 G₀ 代,6 个家系的 108 个子代个体作为 G₁ 代。检测 G₀ 代和 G₁ 代等位基因和基因型数,平均期望杂合度,平均多态性信息含量。并对 G₀ 代所有座位期望杂合度与 G₁ 代的做配对比较分析,比较两代平均期望杂合度的差异。

聚类分析 根据基因型识别的结果,使用软件 Popgene^[9] 计算家系之间的 Nei 氏遗传距离^[10],用 UPGMA 的方法进行聚类分析;以及利用 Genepop^[11] 计算每个位点固定指数 F_{IT} 、 F_{IS} 、 F_{ST} 检验 6 个家系的所有子代群体的遗传分化。

2 结果与分析

2.1 电泳结果

部分电泳图谱见图 1,结果表明,每个家系的子代的基因与亲本的基因型相符合。

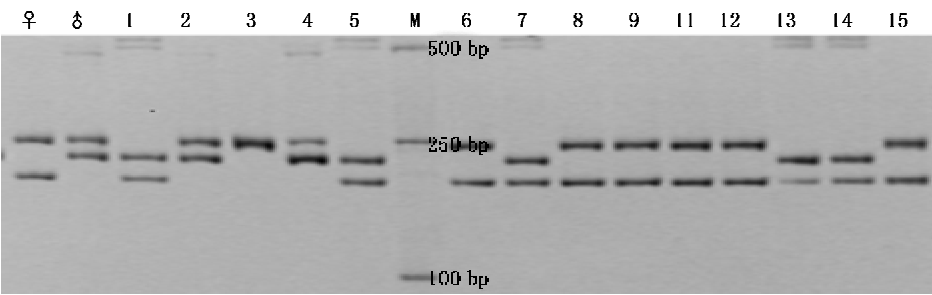


图1 微卫星引物 TUMXL7.121 在家系 E 扩增后部分 PAGE 图谱

Fig.1 Some PAGE results amplified by TUMXL7.121 primer pairs in family E

2.2 基因型分型

6 个家系在 7 个微卫星座位上的基因型分型结果如表 2。7 个微卫星座位除在大多数家系中都表现共显性遗传,部分微卫星座位在少数家系中表现偏离孟德尔分离比例。从表中我们可以看

出部分引物对能在某些家系中表达特异性基因片段,例如引物对 TUMXL7.56 在家系 B 中能表达 480 bp 的片段,而在其他家系中没有,故利用该引物可以区分出家系 B。

表 2 6 个家系 7 个微卫星座位中子代的基因型分离情况

Tab.2 Genotype segregation of offspring at 7 microsatellite loci in each family

家系 family	基因座 loci	亲本基因型 parental genotype		子代基因型 offspring genotype				H-W
		父本 sire	母本 dam					
A	TUMXL5.45	165/165	149/177	149/165(8)	165/177(10)			* *
	TUMXL5.66	284/254	284/254	284/254(6)	254/254(10)	284/284(2)		NS
	TUMXL6.124	156/150	156/150	156/150(14)	156/156(4)			NS
	TUMXL7.121	222/222	222/257	222/257(5)	222/222(13)			NS
	TUMXL7.56	413/394	444/444	413/444(7)	394/444(11)			* *
	TUMXL8.32	228/210	238/210	238/228(13)	228/210(5)			* *
	TUMXL10.411	194/178	194/184	194/184(6)	184/178(5)	194/178(2)	194/194(5)	NS
B	TUMXL5.45	165/165	149/165	165/165(8)	149/165(10)			NS
	TUMXL5.66	284/254	247/254	284/254(7)	284/247(4)	254/254(3)	254/247(4)	NS
	TUMXL6.124	156/150	156/150	156/150(7)	156/156(8)	150/150(3)		NS
	TUMXL7.121	222/222	222/257	257/222(8)	222/222(10)			NS
	TUMXL7.56	413/394	480/435	394/435(5)	394/480(3)	480/413(7)	413/435(3)	NS
	TUMXL8.32	228/210	228/220	228/228(6)	228/220(6)	228/210(5)	220/210(1)	NS
	TUMXL10.411	194/178	194/165	194/178(4)	178/165(2)	194/194(10)	194/165(2)	NS
C	TUMXL5.45	171/161	171/161	171/171(7)	171/161(6)	161/161(5)		NS
	TUMXL5.66	240/254	240/254	254/254(3)	254/240(11)	240/240(4)		NS
	TUMXL6.124	162/162	162/150	162/162(9)	162/150(9)			NS
	TUMXL7.121	204/228	243/228	243/228(9)	228/228(8)	228/204(1)		NS
	TUMXL7.56	444/492	427/444	444/492(7)	444/444(10)	444/427(1)		NS
	TUMXL8.32	228/210	228/228	228/228(10)	228/210(10)			NS
	TUMXL10.411	184/194	161/194	194/194(8)	184/194(2)	161/194(4)	184/161(4)	NS
D	TUMXL5.45	171/161	171/161	171/171(4)	171/161(13)	161/161(1)		NS
	TUMXL5.66	240/254	240/254	254/254(4)	254/240(5)	240/240(9)		NS
	TUMXL6.124	162/162	162/162	162/162(18)				NS
	TUMXL7.121	204/228	243/228	228/228(3)	228/204(4)	243/228(6)	243/204(5)	NS
	TUMXL7.56	444/492	492/467	444/467(3)	444/492(5)	492/467(3)	492/492(7)	NS
	TUMXL8.32	228/210	228/228	210/228(7)	228/228(11)			NS
	TUMXL10.411	184/194	184/194	184/184(7)	194/194(6)	184/194(5)		NS

· 续表 2 ·

E	TUMXL5.45	165/177	149/165	177/165(9)	165/165(7)	149/165(2)		NS
	TUMXL5.66	276/265	276/254	276/265(5)	265/254(5)	276/276(6)	276/254(2)	NS
	TUMXL6.124	162/162	162/150	162/162(12)	162/150(6)			NS
	TUMXL7.121	191/228	228/243	243/228(5)	228/228(7)	243/191(2)	191/228(4)	NS
	TUMXL7.56	444/403	427/359	444/427(9)	403/359(4)	403/427(4)	359/444(1)	**
	TUMXL8.32	224/210	224/210	224/224(15)	210/210(3)			NS
	TUMXL10.411	178/189	178/189	178/189(5)	189/189(9)	178/178(4)		NS
F	TUMXL5.45	149/161	161/177	161/177(11)	149/161(3)	161/161(4)		NS
	TUMXL5.66	247/247	276/234	276/247(11)	247/234(7)			**
	TUMXL6.124	162/162	156/162	162/162(4)	162/156(14)			NS
	TUMXL7.121	216/243	191/191	191/216(7)	191/243(11)			**
	TUMXL7.56	444/403	427/444	444/444(5)	427/444(8)	444/403(3)	427/403(2)	NS
	TUMXL8.32	228/228	228/210	228/228(4)	228/210(14)			NS
	TUMXL10.411	194/184	184/178	194/184(5)	194/178(5)	178/184(2)	184/184(6)	NS

注: ** 表示偏离 H-W 平衡
Notes: ** denotes deviation from H-W equilibrium

2.3 亲权分析

根据基因分型的结果,每个家系的子代个体基因型与其亲本的基因型信息均吻合。7 个微卫星座位的累计非排除概率如图 2 所示。

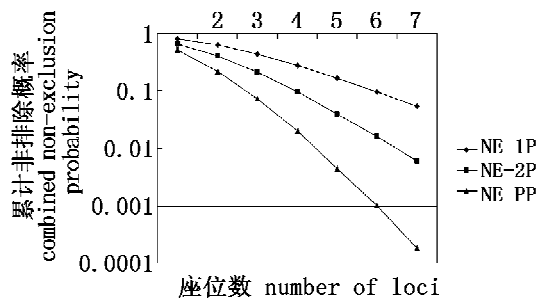


图 2 7 个微卫星座位的累计非排除概率的对数图
NE-1P, NE-2P, NE-PP 分别代表第一亲本,第二亲本和双亲

Fig. 2 Combined non-exclusion probability logarithmic graph of 7 microsatellite markers

NE-1P, NE-2P, NE-PP represent first parent, second parent and parent pair respectively

从图中我们可以看出,随着微卫星座位数目增加,第一亲本、第二亲本和双亲的累计非排除概率逐渐下降,并且双亲的下降最快,第二亲本次之,第一亲本最慢。7 个微卫星累计非排除概率分别为第一亲本 5.46E-2,第二亲本 6.18E-3 和双亲 1.8E-04。所以在双亲基因型信息明确的情况下,7 个微卫星在 95% 的置信区间内累计排除概率大于 0.99,并且能够将这 6 个家系分开。

2.4 6 个家系的凡纳滨对虾遗传多样性分析

G₀ 与 G₁ 代的遗传变化如表 3。G₁ 代中共检测出 44 个等位基因,75 种基因型,平均每个座位的等位基因数目为 6.27,平均期望杂合度为 0.733,平均多态性信息含量为 0.695。G₀ 代的平均每个座位的等位基因数目为 6.14,平均期望杂合度为 0.786,平均多态性信息含量为 0.709。G₀ 代与 G₁ 代的所有座位期望杂合度的配对比较分析结果表明,G₀ 代期望杂合度要显著高于 G₁ 代。

表 3 G₀ 和 G₁ 代的遗传变异以及所有座位期望杂合度的配对比较分析
Tab. 3 Genetic variation through consecutive generations(G₀ and G₁) and heterogeneity analysis for pairwise comparisons of expected heterozygosities (H_e) of all loci

座位 loci	G ₀		G ₁		G ₀ -G ₁ (H _e)
	H _e	H _e	H _e	H _e	
TUMXL5.45	0.900	0.832	0.667	0.784	
TUMXL5.66	0.900	0.837	0.620	0.782	
TUMXL6.124	0.600	0.626	0.463	0.643	
TUMXL7.121	0.800	0.863	0.620	0.788	
TUMXL7.56	0.900	0.863	0.796	0.796	
TUMXL8.32	0.700	0.679	0.546	0.625	
TUMXL10.411	1.000	0.800	0.481	0.715	
平均值 mean(std)	0.8286(0.1380)	0.7857(0.0947)	0.5990(0.1151)	0.7332(0.0731)	P=0.0059**

注: ** 表示差异极显著 P<0.01
Notes: ** denotes significant difference(P<0.01)

2.5 群体遗传分化

近交系数可用于衡量一个种群近亲繁殖程度。它是指一个个体在某个基因座上从某一祖先得到两个等同的等位基因的概率。近交系数有助于探索种群内近亲繁殖程度和该种群的衰退情况。

通过每个位点的固定指数 F_{IT} 、 F_{IS} 、 F_{ST} 检验

群体的遗传分化,6 个家系的凡纳滨对虾的子代总群体各个位点的 F -statistics 分析结果见表 4,对于整个子代群体而言,本研究得出 F_{IS} 在 $-0.317\ 1\sim0.118\ 2$,平均值为 $-0.210\ 7$; F_{IT} 在 $0.043\ 2\sim0.356\ 5$,平均值为 $0.223\ 2$ 。各座位的遗传分化指数 F_{ST} 在 $0.270\ 3\sim0.465\ 4$,平均分化系数为 $0.358\ 4$ 。

表 4 6 个家系的凡纳滨对虾的子代总群体的 F -statistics 分析结果
Tab. 4 F -statistics analysis of the offspring of all six *Litopenaeus vannamei* families

位点 loci	群体内的近交系数 F_{IS}	总近交系数 F_{IT}	群体分化系数 F_{ST}
TUMXL5.45	-0.315 4	0.192 8	0.386 3
TUMXL5.66	-0.127 7	0.249 8	0.334 8
TUMXL6.124	-0.319 9	0.294 4	0.465 4
TUMXL7.121	-0.307 7	0.269 0	0.441 0
TUMXL7.56	-0.317 1	0.043 2	0.273 6
TUMXL8.32	-0.264 8	0.174 6	0.347 4
TUMXL10.411	0.118 2	0.356 5	0.270 3
All	-0.210 7	0.223 2	0.358 4

注:单位点根据 Raymond 等^[11]标准 ANOVA 计算
Notes:One loci estimates following standard ANOVA as in Raymond *et al.* ^[11]

2.6 聚类分析

根据 Nei 氏方法对 6 个家系间的遗传距离进行计算(表 5),利用 UPGMA 方法构建遗传距离树图(图 3)。结果显示,因具有半同胞关系,家系

C 和 D 之间的遗传距离最小,相似性最高,聚为一类,家系 A 和 B 次之,聚为另一类;家系 C 和 D 与 E 聚合后再与 F 聚合,最后与 A 和 B 聚合。

表 5 凡纳滨对虾 6 个家系间的遗传距离和相似性指数
Tab. 5 Genetic distance and genetic identity among 6 *Litopenaeus vannamei* families

家系 family	A	B	C	D	E	F
A		0.868 2	0.440 8	0.327 9	0.247 7	0.414 0
B	0.141 3		0.353 0	0.292 6	0.215 7	0.332 2
C	0.819 2	1.0412		0.888 8	0.406 0	0.602 3
D	1.115 1	1.228 9	0.117 9		0.352 0	0.588 4
E	1.395 4	1.534 0	0.901 4	1.0442		0.396 9
F	0.881 8	1.102 1	0.507 0	0.530 3	0.924 1	

注:对角线上方为相似性指数,对角线下方为遗传距离
Notes:Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

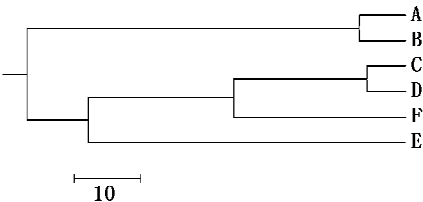


图 3 凡纳滨对虾 6 个家系的 UPGMA 图
Fig. 3 UPGMA dendrogram among 6 *Litopenaeus vannamei* families

3 讨论

3.1 亲权分析

微卫星标记因具有符合孟德尔遗传模式,呈共显性遗传,所以无论在群体遗传^[1,12]还是在基因连锁分析^[6]、家系鉴定^[13-14](包括亲子鉴定)、交配系统^[15]等方面都得到了广泛的应用。王鸿霞等^[14]以凡纳滨对虾选择育种项目中建立的家系为实验材料,利用 CERVUS 模拟分析表明从 10

个微卫星基因座组合中选取的多态性信息含量最高的6个进行组合与原组合的累积排除概率均在0.99,本实验中的7个微卫星组合累计排除概率也在0.99,在双亲存在的情况下,能够区分6个家系。多态性信息含量(PIC)是衡量标记多态性较好的指标。Bostein等^[16]提出衡量基因变异程度高低的多元信息量指标, $PIC > 0.5$ 时为高度多态, $0.25 < PIC < 0.5$ 时为中度多态, $PIC < 0.25$ 时为低度多态,本实验从40个微卫星座位中筛选7个多态性较高(0.577~0.774)的座位用于凡纳滨对虾的亲权分析,它们基本满足了在需要检测的6个家系中呈共显性的要求。同时,利用6个家系母本基因型和子代的基因型信息能正确推断4个父本的基因型。根据亲本交配关系和家系鉴定的结果,我们可以找出子代个体间全同胞和半同胞的关系,了解它们的亲缘关系对后面的育种工作也具有重要的意义。

本研究中,部分微卫星座位在少数家系中显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P < 0.05$),观测杂合度要比期望杂合度要高,表现杂合位点过剩。这可能由两个原因造成:(1)这些家系不是随机交配的,导致杂合过剩,因此,不符合 Hardy-Weinberg 平衡;(2)样本量较小,统计误差造成。另外,从相似性聚类的结果看出 G_1 代主要分为4大类,这主要是由 A 和 B、C 和 D 的半同胞关系造成的。这也可能是部分微卫星座位在整个 G_1 代中表现偏离 Hardy-Weinberg 平衡的主要原因,而不是无效等位基因,因为 G_0 代和 G_1 代中都含有相同的样本等位基因。

3.2 遗传多样性变化

观测杂合度是一个座位的杂合子数除以观察个体总数,它与期望杂合度相比,更易受样本大小等因素的影响。作为遗传多样性度量的最常用杂合度指的是期望杂合度,即从一个基因库中随机抽出的一个位点的两个拷贝为不同等位基因的概率。期望杂合度是假定各基因座位符合 Hardy-Weinberg 平衡的前提下算得的杂合度。多个座位期望杂合度的平均值即为平均期望杂合度,又称群体基因多样性。它受样本取样的影响较小,常用它来度量群体的遗传多样性,其高低可反映群体的遗传一致性程度^[17]。Nei等^[18]认为它比观测值更适于在小样本中用来评价种群的杂合度水平。本研究中 G_0 代群体平均期望杂合度要显

著高于 G_1 代,这表明 G_0 代群体遗传多样性要比 G_1 代丰富,这也暗示一个封闭的小群体在经过一代人工控制交配后遗传多样性会下降。

3.3 群体遗传分化和聚类分析

F_{IS} 、 F_{IT} 分别指亚群内个体之间的近交系数和总群内亚群间近交系数,它们的取值范围均为 $-1 \sim 1$ 。当和 F_{IT} 的值为极显著的正值时,则表示群体内近交程度较严重,如是极显著的负值时,群体内观测杂合度大于期望杂合度,则表示群体内存在远交^[17],本研究得出 F_{IS} 为负值,说明 G_1 群体内杂合体较多,亲本的近交较少。 F_{IT} 为正值,说明各家系群体间发生一定程度的近交,育种群体中纯合体得到一定程度的固定。

遗传分化系数(F_{ST})是反映各亚群间遗传分化的重要指标,若群体 F_{ST} 值在 $0 \sim 0.05$,则表明其各亚群间不存在分化;若 F_{ST} 值在 $0.05 \sim 0.15$,为中度分化;若 F_{ST} 值在 $0.15 \sim 0.25$,则为高度分化^[19]。本研究中各座位的 F_{ST} 平均值为 0.358 4,属于高度分化。这可能由于本试验群体是由于人工控制交尾的家系组成,各亚群分别为不同的家系群体,即6个家系群体分别构成6个亚群。

聚类分析结果显示,6个家系聚为4大类,家系 E 和 F 分别聚为一类,家系 A 和 B 及家系 C 和 D 分别聚为另一类。因为家系 A 和 B 及家系 C 和 D 分别共有—个父本,为半同胞关系,个体间相似性较高,亲缘关系较近,被聚在一起。若要将其分开,需要开发更多的微卫星标记。

4 小结

选择合适的微卫星位点及足够的位点数量是凡纳滨对虾育种过程中展开遗传监测进一步研究工作的关键。获得更多的微卫星标记也是必需解决的问题,虽然现在公布的微卫星序列有很多,但是不同的微卫星标记不能适合所有的群体,因此育种工作者在遗传育种过程中需要筛选一定数量并且合适的位点来监测育种群体遗传多样性的变化。本研究筛选的7个微卫星标记能够初步进行6个家系的鉴定,并且能够对上下代之间的遗传多样性进行监测,表明微卫星技术在对虾育种过程中是一种有力的分子生物学工具。

感谢澳大利亚 CSIRO 的李玉桃教授在数据处理和分析时提供的宝贵意见。

参考文献:

- [1] Wolfus G M, Garcia D K, Alcivar-Warren A. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs [J]. *Aquaculture*, 1997, 152: 35–47.
- [2] Wuthisuthimethavee S, Lumubol P, Vanavichit A, *et al.* Development of microsatellite markers in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) [J]. *Aquaculture*, 2003, 224: 39–50.
- [3] Supungul P, Sootanan P, Klinbunga S, *et al.* Micro-satellite polymorphism and the population structure of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand [J]. *Mar Biotechnology*, 2000, 2(4): 339–347.
- [4] 刘萍, 孟宪红, 何玉英, 等. 中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 黄、渤海 3 个野生地理群遗传多样性的微卫星 DNA 分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(3): 252–257.
- [5] Valles-Jimenez R, Cruz P, Perez-Enriquez R. Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: microsatellite DNA variation [J]. *Mar Biotechnology*, 2004, 6(5): 475–484.
- [6] Zhang L S, Yang C J, Zhang Y, *et al.* A genetic linkage map of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rates [J]. *Genetica*, 2007, 131: 37–49.
- [7] Meehan D, Xu Z, Zuniga G, *et al.* High frequency and large number of polymorphic microsatellite in cultured shrimp, *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* [Crustacea: Decapoda] [J]. *Mar Biotechnology*, 2003, 5: 311–330.
- [8] Marshall T C, Slate J, Kruuk L. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7(5): 639–655.
- [9] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. POPGENE version 1.31. A Microsoft window based freeware for population genetic analysis [M]. Edmonton: University of Alberta, .
- [10] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89: 583–590.
- [11] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact test and ecumenicism [J]. *J Hered*, 1995, 86(3): 248–249.
- [12] Valles-Jimenez R, Cruz P, Perez-Enriquez R. Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: microsatellite DNA variation [J]. *Mar Biotechnology*, 2004, 6(5): 475–484.
- [13] 张留所, 相建海. 凡纳滨对虾微卫星位点在两个选育家系中遗传的初步研究 [J]. *遗传*, 2005, 27(6): 919–924.
- [14] 王鸿霞, 吴长功, 张留所, 等. 微卫星标记应用于凡纳滨对虾家系鉴别的研究 [J]. *遗传*, 2006, 28(2): 179–183.
- [15] 王鸿霞, 张晓军, 李富花, 等. 应用微卫星标记分析野生中国明对虾的亲权关系 [J]. *水生生物学报*, 2008, 32(1): 42–46.
- [16] Botstein D, White R, Skolnick M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314–331.
- [17] Weir B S, Cockerham C C. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure [J]. *Evolution*, 1984, 38: 1358–1370.
- [18] Nei M, Roychoudhury A K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance [J]. *Genetics*, 1974, 76: 379–390.
- [19] Wright S. *Evolution and the genetics of populations* [C]// *Invariability within and among natural populations*. Chicago: University of Chicago Press, 1978: 4.

Kinship analysis and genetic variation monitoring in *Litopenaeus vannamei* breeding program using microsatellite DNA markers

WANG Xia^{1,2}, LIU Xiao-lin¹, ZHANG Ji-quan²,
ZHANG Cheng-song², HUANG Hao³, XIANG Jian-hai²

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China;

2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Nanjiang Marine Biotechnology Company Limited, Sanya 572000, China)

Abstract: Genotype segregation of parents livestock (G₀ generation) and their offspring (G₁ generation) of 6 *Litopenaeus vannamei* families was analyzed on basis of 7 microsatellite DNA markers. In addition, heterogeneity analysis for pairwise comparisons of expected heterozygosities (H_e) of all loci between G₀ and G₁ was carried out and genetic differentiation through F -statistics at each locus in G₁ population was expected to monitor genetic variation in *Litopenaeus vannamei* breeding. The results showed that 44 alleles were detected in total across 7 loci assayed, mean number per locus, mean expected heterozygosity and mean polymorphism information content of G₀ generation were 6.14, 0.786 and 0.709 respectively, and those of G₁ generation were 6.27, 0.733 and 0.695 respectively. The combined exclusion probability of 7 microsatellite markers arrived at 0.99 and could separate all 6 families with known parent. Heterogeneity analysis for pairwise comparisons of expected H_e of all loci between G₀ and G₁ indicated that H_e of G₀ was significantly higher than G₁ ($P < 0.01$). F_{ST} of G₁ per locus ranged from 0.270 3 to 0.465 4 and average was 0.358 4 which meant that genetic differentiation in its sub-population was high. The UPGMA analysis based on six families genetic distances showed all individuals of G₁ generation could be classified into 4 categories. Similarly to families C and D, families A and B sharing father had high similarity coefficient and clustered together, family E and F were assigned into another group respectively.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; microsatellite; kinship analysis; genetic monitoring