

文章编号: 1674-5566(2018)06-0825-08

DOI:10.12024/j.sou.20180402287

凡纳滨对虾繁殖性状的 SNP 分子标记筛选的初步研究

王 冉^{1,2}, 刘 红^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘 要: 对虾繁殖性状的相关分子遗传标记一直是甲壳动物中研究极少的部分, 为了筛选与凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 繁殖性状(产卵与产卵量)相关的 SNP(Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 分子标记, 为凡纳滨对虾的良种选育提供参考, 选择卵黄蛋白原(vitellogenin, VG) 基因作为筛选基因。本实验采用 PCR 产物直接测序法对 VG 基因进行 SNP 位点筛查, 并与繁殖性状进行关联分析。结果表明:(1) 在 150 个凡纳滨对虾样品中, VG 基因的 4 个结构域一共可以检测到 37 个 SNP 位点, 8 个能引起蛋白质氨基酸的同义突变, 3 个错义突变, 26 个无义突变。(2) 对 37 个位点进行分析, 发现 4 个可能的 SNP 候选位点。(3) 多态性分析结果显示, 4 个候选位点都在中等多态水平, 多态信息较为丰富。(4) 对 4 个候选位点与产卵次数、产卵总量、平均产卵量和单位体质量产卵量繁殖性状进行单因素方差分析, 结果显示位点 3 839 与总产卵量和单位体质量产卵量存在显著性差异($P < 0.05$), 其他位点不存在显著差异($P > 0.05$)。

关键词: 凡纳滨对虾; 卵黄蛋白原基因; SNP; 繁殖性状; 分子标记

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

凡纳滨对虾自 1988 年引进我国后迅速实现了大规模养殖, 现今占我国虾类产量首位, 占 80% 以上^[1-3]。在人工养殖条件下, 雌虾卵巢发育较为缓慢, 不易成熟, 因此通常通过摘除眼柄的方式促进卵巢发育^[4-5]。摘除眼柄可以减少性腺抑制激素(GIH)的分泌, 促进卵黄蛋白原的表达, 加速卵巢发育和卵子形成^[6-7], 但是摘除眼柄以后会对凡纳滨对虾的其他生理活动造成一定的影响。生产实践中需要选育具有优良繁殖性状的新品种以避免继续采用这种促熟方法, 优良繁殖性状的种虾选育中急需解决的关键之一是繁殖性状相关联的分子遗传标记的筛选, 本研究选用 SNP 分子标记方法。

卵黄蛋白原是卵黄蛋白的前体物质, 具有储能、运输、免疫、发育、繁殖等功能^[8-10]。卵黄蛋白原在对虾中主要由肝胰腺和卵巢共同合成, 在卵巢发育过程中大量表达^[11-13]并在卵母细胞形成过程中不断累积直到卵子从卵巢释放。由于卵

黄蛋白原在凡纳滨对虾的卵巢发育过程中占据重要地位, 所以实验选择卵黄蛋白原作为目标基因, 来筛选与繁殖性状相关联的 SNP 位点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验选取养殖在塞班岛的凡纳滨对虾不同群体的雌虾进行繁殖性状测试, 实验时间为 2014 年 10 月 28 日到 2015 年 1 月 5 日。实验开始前对所有待实验的凡纳滨对虾雌虾分别测量体长、体质量, 剪除单侧眼柄并戴眼标, 随后强化营养以促进其卵巢发育, 剪下的眼柄作为 DNA 分子标记筛选的材料。实验期间每日观察虾的卵巢发育情况, 将性腺成熟即将产卵的雌虾分别取出并放入单独产卵桶等待产卵, 次日将产出的卵收集放入一定体积的海水中, 搅拌均匀, 取 10 mL 直接计数卵子总量, 重复 3 次, 取平均值, 最后计算出产卵总量。

收稿日期: 2018-04-19 修回日期: 2018-06-05

基金项目: 上海市虾类产业技术体系建设项目(沪农科产字[2014]第 5 号)

作者简介: 王 冉(1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向为海洋动物的繁殖与发育生物学。E-mail: 13764537953@163.com

通信作者: 刘 红, E-mail: hliu@shou.edu.cn

根据产卵情况挑选了关岛群体 (GD2) 中 30 只实验期间不产卵的雌虾和产卵 1~5 次的 70 只雌虾, 从 SyAqua 群体 (OS) 中选择 15 只不产卵雌虾和 15 只产卵量各异的雌虾, 从 V101 群体选择 10 只不产卵雌虾和 10 只产卵量各异的雌虾, 3 个养殖群体中合计选择了 150 只具有代表性的雌虾用于筛选与繁殖性状相关联的 SNP 位点。其中 GD2 群体是实验室基地采购自关岛本地的一批亲虾, OS 群体是在引自 SyAqua 公司的亲虾, V101 是在塞班岛长期传代养殖的亲虾。

1.2 凡纳滨对虾总 DNA 提取和引物设计

采用天根生物科技有限公司的海洋生物组织 DNA 提取试剂盒 (离心柱型 200 次) 对虾的眼柄进行总 DNA 提取, 用含有核酸染料的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 (本实验使用剪除掉的眼柄进行实验, 因为实验雌虾需要进行繁殖下一代)。

凡纳滨对虾 *VG* 基因 (AY321153.2) mRNA

序列全长 7 763 bp, DNA 全长 10 419 bp, *VG* 基因经蛋白分析后发现含有 4 个结构域分别是 Vitellogenin N (参与脂质的转运)、DUF1943、DUF1081 和 vWD (von Willebrand factor type D domain, 血液凝集因子 VII 结合到 VWF 的必需)。将 NCBI 数据库里的中国对虾 *VG*-mRNA 序列 (DQ345690.1), 斑节对虾 *VG*-mRNA 序列 (DQ288843.1), 凡纳滨对虾 *VG*-mRNA 序列 (AY321153.2), 刀额新对虾 *VG*-mRNA 序列 (AF548364.1), 刀额新对虾 *VG*-DNA 序列 (AF548363.1) 进行 Cluster 比对, 找出外显子和内含子之间的分界点, 在编码 4 大结构域的 DNA 序列中筛选 SNP 位点。在外显子保守区分别设计引物扩增主要的内含子区域及部分外显子区域, 具体引物及扩增产物信息见表 1。

表 1 凡纳滨对虾 *VG* 基因筛选 SNP 位点所用的引物

Tab. 1 Primers used in SNP screening of *VG* gene of *Litopenaeus vannamei*

结构域 Domain	引物名称 Name of primer	引物序列 Primer sequence	预计产物大小 Expected product	扩增产物包含区间 Section of amply primer
Vitellogenin N	N1	GCCAAGATGCTCCACCGAATG AAGCGAAGTGTGAATCCTGACT	917 bp	3 个外显子, 2 个内含子区域
	N2	TGAAATTGAGACCGAAGG TGAAGGCAGTACTGGTTT	797 bp	在 1 个外显子区域内
	N3	TGAAATTGAGACCGAAGG CACGAGGAATGAAAGATCCG	1 127 bp	3 个外显子, 2 个内含子
DUF1943、 DUF1081 和 vWD	N4	TCAACATCCAAGAGGGTA TGGTTCCAAAGCAGCAAT	1 116 bp	在 1 个外显子区域内
	N5	ACAACCTTCCTCCACGCTACAT ACACTGAACCGGCGACCTAC	589 bp	在 1 个外显子区域内

1.3 PCR 扩增和产物测序

PCR 反应体系: DNA 模板 2 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 2 \times Taq PCR Master Mix 试剂 25 μ L, 加 ddH₂O。所得 PCR 产物先经电泳检验为单一产物者直接送至上海生工生物公司进行一代 Sanger 双向测序。其余 PCR 产物先使用天根生物科技有限公司的克隆试剂盒进行克隆, 然后送到生工生物公司进行测序。

1.4 数据分析

(1) 利用 BioEdit 软件对凡纳滨对虾 *VG* 基因测序图谱进行校正, 将所测序列进行群体内比对, 找到 SNP 位点。(2) 利用 DNAMAN 软件分析所有 SNP 位点导致的氨基酸变异。(3) 每个 SNP 位点在读取基因型时, 位点出现双峰时, 读取方

是测序低峰低于高峰一半的点算作纯合基因型 (图 1), 测序低峰高于高峰一半的点算作杂合基因型 (图 2)。(4) 将群体内所有样品的基因型进行比对, 当携带某一基因型的个体数量低于 3 的时候, 该位点不计入候选位点; 在群体间进行每个位点的基因型比对, 当在某一群体的某一位

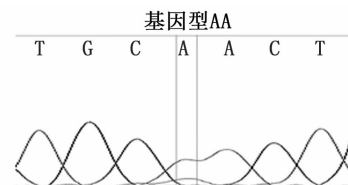


图 1 纯合基因型 AA

Fig. 1 Homozygous genotype AA

点呈现单一基因型时,该位点不计入候选位点。
 (5)用 PopGene 软件分析候选位点的多态性。
 (6)在 GD2 群体中,从每个数量型表现性状中挑选 40 只符合正态分布的凡纳滨对虾样品,采用 SPSS 22 软件单因素方差分析方法计算基因型和表现型之间的差异。

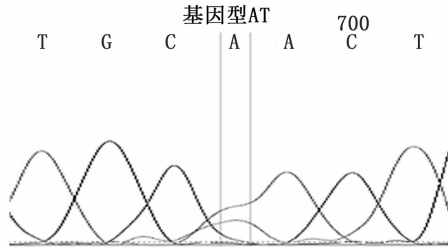


图 2 杂合基因型 AT
 Fig. 2 Heterozygous genotype AT

2 结果

2.1 凡纳滨对虾总 DNA 凝胶电泳分析

对所提取的凡纳滨对虾总 DNA 进行电泳分析,所得结果如图 3 所示,图中可见清晰明亮的电泳条带,基本无拖尾现象,说明凡纳滨对虾个体总 DNA 完整无降解,可以用作 PCR 实验。

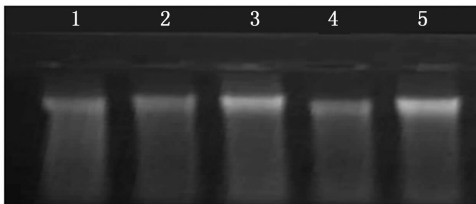


图 3 凡纳滨对虾总 DNA 电泳结果
 Fig. 3 Electrophoresis result of total DNA of *Litopenaeus vannamei*

2.2 凡纳滨对虾 VG 基因 PCR 扩增结果

用所设计的 VG 基因的 5 对引物对凡纳滨对虾总 DNA 进行 PCR 扩增,均获得扩增产物。其中一对引物的扩增产物电泳结果如图 4 所示,由图可知,PCR 产物经电泳检测结果显示一对引物

的 PCR 产物均为一条特异明亮的条带,与预期预计产物大小相符。将扩增的 PCR 产物进行测序,在 NCBI 上 Blast, Blast 结果显示扩增片段是凡纳滨对虾 VG 基因的一部分,序列相似度为 99%。

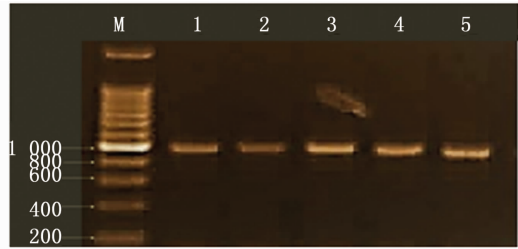


图 4 凡纳滨对虾 VG 基因 N3 引物扩增产物电泳结果
 Fig. 4 Amplification products of VG based on N3 primer gene of *Litopenaeus vannamei*

2.4 凡纳滨对虾 VG 基因的 SNP 位点分析

用凡纳滨对虾 VG 基因 5 对引物对 150 个个体进行扩增后得到的 750 个 DNA 产物中共检测到 37 个 SNP 位点,其中 11 个位点在外显子区域,其余 26 个位点在内含子区域(表 2)。11 个外显子区域的突变包括 8 个同义突变和 3 个错义突变,3 个错义突变分别是位点 1 512 精氨酸和组氨酸之间变异,位点 3 597 异亮氨酸和苯丙氨酸之间变异,以及位点 3 878 的终止子和半胱氨酸之间变异。在所得到的 37 个 SNP 位点中进一步去除个体数低的基因型以及群体表现单一的基因型,最后得到 4 个候选 SNP 位点,分别是两个错义突变位点 3 597 和位点 3 878,两个同义突变位点 3 839 和 3 923,4 个位点都位于结构域 DUF1 943 上。

2.5 VG 基因候选 SNP 位点的多态性分析

对筛选出的 4 个 VG 基因候选 SNP 位点进行多态性分析,具体结果见表 3。这 4 个候选位点的杂合度在 0.407 55 ~ 0.475 80 之间,有效等位基因数在 1.5 ~ 1.9 之间,多态信息含量在 0.319 2 ~ 0.362 6 之间。根据 BOTSTEIN^[14] 的理论,4 个位点在凡纳滨对虾群体中的遗传多样性属于中等水平。

表 2 实验中所获得的凡纳滨对虾 *VG* 基因的 SNP 位点
Tab. 2 The SNP locus in *VG* gene of *Litopenaeus vannamei*

序号 Name	位点 Locus	位置 Location	碱基变化 Change of Nucleotide	氨基酸变化 Change of amino acid	变化类型 Type of change
1	1 512	E4	G/A	精氨酸/组氨酸	转换
2	2 527	I5	T/G	ORF 外	颠换
3	2 530	I5	T/A	ORF 外	颠换
4	2 544	I5	T/G	ORF 外	颠换
5	2 546	I5	A/G	ORF 外	转换
6	2 552	I5	A/T	ORF 外	颠换
7	2 555	I5	T/G	ORF 外	颠换
8	2 559	I5	G/A	ORF 外	转换
9	2 563	I5	A/T	ORF 外	颠换
10	2 568	I5	G/T	ORF 外	颠换
11	2 573	I5	A/G	ORF 外	转换
12	2 575	I5	G/T	ORF 外	颠换
13	2 578-2 583	I5	T___A/TAATACGA	ORF 外	缺失
14	2 585	I5	T/C	ORF 外	转换
15	2 588	I5	C/T	ORF 外	转换
16	2 600	I5	G/A	ORF 外	转换
17	2 603	I5	A/G	ORF 外	转换
18	2 608	I5	G/A	ORF 外	转换
19	2 615-2 620	I5	T___A/TGAGTA	ORF 外	缺失
20	2 978	I6	G/A	ORF 外	转换
21	2 987	I6	A/T	ORF 外	颠换
22	2 988	I6	A/T	ORF 外	颠换
23	3 052	I6	A/G	ORF 外	转换
24	3 053	I6	A/C	ORF 外	颠换
25	3 089	I6	A/T	ORF 外	颠换
26	3 207	I6	A/T	ORF 外	颠换
27	3 213	I6	C/A	ORF 外	颠换
28	3 476	E6	C/A	同义突变	颠换
29	3 479	E6	C/T	同义突变	转换
30	3 597	E6	A/T	异亮氨酸/苯丙氨酸	颠换
31	3 719	E6	A/G	同义突变	颠换
32	3 761	E6	C/T	同义突变	转换
33	3 776	E6	A/T	同义突变	转换
34	3 788	E6	A/C	同义突变	颠换
35	3 839	E6	G/A	同义突变	颠换
36	3 878	E6	A/C	终止子/半胱氨酸	颠换
37	3 923	E6	A/T	同义突变	转换

注: E 和 I 分别表示外显子 (Exon) 和内含子 (Intron); E6 表示第 6 个外显子; I5 表示第 5 个内含子; ORF 表示开放阅读框

Notes: E means exon and I means intron; E6 means sixth exon; I5 means fifth intron; ORF means Open Reading Frame

表 3 凡纳滨对虾 *VG* 基因候选 SNP 位点的多态性分析

Tab. 3 The polymorphism analysis of potential SNP loci of *VG* gene in *Litopenaeus vannamei*

候选位点 Candidate locus	基因型频率 Genotypic frequency	等位基因频率 Allele frequencies	最小等位基因频率 Minor Allele Frequency	杂合度 Heterozygosity	纯合度 Homozygosity	有效等位基因数 The number of effective allele	多态信息含量 Polymorphic information content
3 597	AA = 43% AT = 57%	A = 71.5% T = 28.5%	0.285	0.407 55	0.592 6	1.7	0.324 5
3 839	AG = 28% GG = 72%	A = 64% G = 36%	0.36	0.460 8	0.539 2	1.9	0.354 6
3 878	AA = 45% AC = 55%	A = 72.5% C = 27.5%	0.275	0.443 8	0.655 6	1.5	0.319 2
3 923	AA = 22% AT = 78%	A = 61% T = 39%	0.39	0.475 8	0.524 2	1.9	0.362 6

2.6 VG 基因候选 SNP 位点与繁殖性状的关联分析

将 4 个位点在 GD2 群体中,逐一分析其产卵特性和基因型(表 4),4 个候选 SNP 位点上各自两种基因型所对应的凡纳滨对虾个体在产卵特性上没有明显差异,即每个基因型的个体中既有产卵个体,也有不产卵个体,且产卵个体与不产

卵个体比例差异不明显。如位点 3 597 的 AA 基因型不产卵和产卵个体比例是 1:2.58,AT 基因型不产卵和产卵比例是 1:2.35,该位点在产卵和不产卵这两个性状上未能表现出关联性。其他 3 个位点的结果与之类似,均未能是在是否产卵的性状上表现出关联性。

表 4 凡纳滨对虾 SNP 位点产卵和不产卵个体的样本比例

Tab.4 The proportion of spawn and non-spawn in *Litopenaeus vannamei* SNP locus

候选位点 Candidate locus	基因型 Genotype	样本量/个 Number of shrimp	不产卵:产卵(个) Proportion of non-breeding to breeding
3 597	AA	43	1:2.58(12)
	AT	57	1:2.35(17)
3 839	AG	28	1:3(7)
	GG	72	1:2.27(22)
3 878	AA	45	1:2.21(14)
	AC	55	1:2.67(15)
3 923	AA	22	1:2.67(6)
	AT	78	1:2.39(23)

注:括号内为不产卵的雌虾个体数

Notes:It was number of non-spawn in the brackets

对凡纳滨对虾的 SNP 位点基因型和产卵数量型表现性状(产卵次数、总产卵量、平均产卵量和单位体质量产卵量)进行单因素方差分析,具体结果如表 5 所示。SPSS 软件分析可知位点 3 839 的 GG 和 AG 基因型与总产卵量和单位体质量产卵量表现出相关性,其他 3 个位点的基因型与产卵次数、总产卵量、平均产卵量和单位体质量

量产卵量等数量性状间没有呈现相关性。对数据分析发现,位点 3 839 处在总产卵量和单位体质量产卵量这 2 个性状上,基因型 GG 和基因型 AG 存在显著差异($P < 0.05$);位点 3 597 处基因型 AA 和基因型 AT 在 4 个性状上不存在显著差异($P > 0.05$),其他 2 个位点与之类似。

表 5 凡纳滨对虾 VG 基因 SNP 位点与繁殖性状的关联性分析

Tab.5 The analysis between spawn character and SNP locus of *Litopenaeus vannamei* VG gene

位点名称 Locus	基因型 Genotype	产卵次数/次 Number of spawn	总产卵量/粒 Egg number	平均产卵量/粒 Average egg number	单位体质量产卵量/(粒/g) Egg number per body weight
3 597	AA	2.2 ± 1.1	52 358.2 ± 28 667.0	30 788.7 ± 15 765.6	965.3 ± 564.8
	AT	2.4 ± 1.0	69 187.1 ± 30 122.2	28 601.8 ± 13 212.1	1 263.1 ± 640.1
3 839	GG	2.4 ± 0.8	54 748.0 ± 27 220.3 ^a	29 021.7 ± 14 632.3	990.4 ± 560.7 ^b
	AG	2.2 ± 1.0	80 041.5 ± 31 305.0 ^a	30 944.6 ± 13 636.8	1 641.3 ± 569.9 ^b
3 878	AA	2.2 ± 1.0	55 309.6 ± 28 001.5	32 373.2 ± 14 839.5	994.5 ± 471.9
	AC	2.3 ± 0.9	66 973.6 ± 31 647.0	27 397.6 ± 13 668.7	1 240.4 ± 704.6
3 923	AA	2.6 ± 1.1	69 181.0 ± 31 575.9	30 427.2 ± 13 606.8	1 379.5 ± 747.2
	AT	2.2 ± 0.9	60 173.1 ± 30 267.8	29 319.6 ± 14 577.5	1 087.1 ± 595.4

注:产卵次数是每尾对虾在实验期间的产卵次数总数;总产卵量是每尾对虾在实验期间产卵量的和;平均产卵量是每尾对虾总产卵量除以每尾对虾的产卵次数;单位体质量产卵量是每尾对虾的总产卵量除以每尾对虾体质量

Notes: Number of spawns means total number of spawns for multiple-spawner during experiment; Egg number means the total number of eggs for multiple-spawner during experiment; Average egg number means total number of eggs divided by the number of spawn; Egg number per body weight means total number of eggs divided by body weight

3 讨论

3.1 11 个突变位点分析

卵黄蛋白是大部分卵生动物胚胎发育所必需的营养物质,在卵巢成熟过程中大量表达。根据本实验结果可知,37 个 SNP 位点包括 11 个外显子突变和 26 个内含子突变。11 个外显子区域的突变中存在 3 个错义突变,分别位于 Vitellogenin N 结构域(1 512 位点)和结构域 DUF1943(其余两个错义突变)。根据 3 个位点氨基酸的改变,位点 1 512 处精氨酸和组氨酸之间的变化,精氨酸和组氨酸都是带正电荷的极性氨基酸,所以不会对卵黄蛋白的功能产生一定的影响;位点 3 597 处异亮氨酸和苯丙氨酸的变化,两种氨基酸都是非极性氨基酸,对卵黄蛋白原蛋白的三维构象不会产生大的影响,因而对蛋白质的功能方面不会有大的改变。位点 3 878 处是终止子和半胱氨酸的变化,本来应该翻译结束,此时又有新的氨基酸继续连接,半胱氨酸还能形成二硫键,对卵黄蛋白原的三维结构会产生重大影响,可能导致蛋白质功能的完全改变。产生这种变化的虾在卵黄蛋白原的合成方面会与其他虾出现差异,能否直接影响产卵特性还需进一步实验分析。实验中同时发现结构域 vWD 和结构域 DUF1081 完全保守,没有突变位点。而 DUF1943 上存在多个突变位点,其中就包括 3 839 处变异。

3.2 对虾产卵特性的遗传标记分析

本实验筛选 4 个候选位点产卵与不产卵之间的差异,没有发现与产卵相关的位点。出现以上结果,推测可能与研究对象的数量和筛选的位点数量有关,遗传背景的干扰和分离群体的大小也是影响 QTL 定位精度的两个重要因素。在选择凡纳滨对虾样本时我们发现一种现象,在整个繁殖实验期间,部分凡纳滨对虾一直不产卵,实验中也找不到与是否产卵直接相关联的分子标记。对此存在有两方面可能:首先在分子遗传标记的筛选方面实验中只是选用了 VG 基因的部分序列,数量有限;其次在整个繁殖实验 60 天的时间没有产卵的雌虾,有可能是还没有到它们开始产卵的时间。这些未来可能产卵的雌虾在实验中只能当做不产卵虾对待,由此寻找产卵与否的分子遗传标记存在不确定性。

产卵量作为重要的数量性状,在对虾良种选

育中具有重要作用,选择产卵量多的个体进行繁育,可以提高育苗效率,获得较大收益。现阶段,利用 SNP 标记筛选与繁殖性状相关的位点,大多集中在畜禽^[15-17]方面,水生动物则集中在中华绒螯蟹^[18]、牙鲆^[19],在凡纳滨对虾中尚未见相关研究。

对产卵数量性状分析发现,位点 3 839 与总产卵量和单位体质量产卵量显著相关,说明体质量和总产卵量之间可能存在一定的相关关系,这与袁瑞鹏等的结果一致^[20]。进一步比较发现位点 3 839 处基因型 AG 总产卵量显著高于 GG 基因型,推测等位基因 A 对产卵量具有促进作用,但是在实验群体中没有发现 AA 基因型,所以需要加大实验的样本数量做进一步的验证。产卵量是数量遗传性状,由多基因调控,实验中发现的与繁殖性状(总产卵量、单位体重产卵量)相关联的 VG 基因的 1 个 SNP 位点,应该属于这些众多调控因子其中之一,需要进行更多的与繁殖相关的基因筛选。

参考文献:

- [1] 师尚丽,叶满,朱春华,等. 摘除眼柄与注射眼柄粗提物对凡纳滨对虾性腺发育相关基因表达的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(3): 344-349.
SHI S L, YE M, ZHU C H, et al. Effects of the eyestalk hormones and eyestalk ablation on the gene expressions related gonadal development of *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(3): 344-349.
- [2] 潘玉洲,丁茂昌,李爽. 凡纳滨对虾人工繁育技术研究[J]. 齐鲁渔业, 2010, 27(6): 17-20.
PAN Y Z, DING M C, LI S. Study on artificial breeding technology of *Litopenaeus vannamei* [J]. Shandong Fisheries, 2010, 27(6): 17-20.
- [3] 杨琼. 南美白对虾高效生态养殖技术[J]. 中国水产, 2005(11): 87-89.
YANG Q. Efficient ecological breeding technology of white shrimp in South America [J]. China Fisheries, 2005(11): 87-89.
- [4] 颜婕. 凡纳滨对虾卵巢发育差异表达基因的克隆与 mRNA 相对表达量分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
YAN J. Molecular cloning and mRNA expression of differential expressed genes during ovarian development of white prawn (*Litopenaeus vannamei*) [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.
- [5] 叶满. 凡纳滨对虾性腺抑制激素定位及激素对性腺发育基因表达的影响[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2014.

- YE M. Localization of gonad-inhibiting hormone in the eyestalk and effects of hormones on gonad development related genes expression in *Litopenaeus vannamei* [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2014.
- [6] 朱春华, 赵光凤, 李广丽. 眼柄粗提物对凡纳滨对虾性分化的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2011, 31(1): 23-27.
- ZHU C H, ZHAO G F, LI G L. Effects of eyestalk extracts on the sex differentiation on *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2011, 31(1): 23-27.
- [7] 邓思平, 叶满, 朱春华, 等. 切除眼柄对凡纳滨对虾亲虾卵巢、肝胰腺、血清生化组成的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2016, 36(3): 29-34.
- DENG S P, YE M, ZHU C H, et al. Influence of eyestalk ablation on biochemical composition of ovary, hepatopancreas and serum in Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei* broodstock [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2016, 36(3): 29-34.
- [8] 张士瑾, 孙旭彤, 李红岩. 卵黄蛋白原研究及其进展[J]. 海洋科学, 2002, 26(7): 32-35.
- SUN S C, SUN X T, LI H Y. Review on vitellogenin [J]. Marine Sciences, 2002, 26(7): 32-35.
- [9] 孙亚宁. 文昌鱼一种新卵黄蛋白原的纯化、鉴定及其免疫防御功能的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- SUN Y N. Purification and characterization of a new form of vitellogenin from amphioxus (*Branchiostoma Belcheri Tsingtaunense*) and its immune function study [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004.
- [10] 白鸿坤. 青虾卵黄蛋白原和卵黄蛋白原受体基因的克隆及功能研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- BAI H K. Gene clone and functional analysis of vitellogenin and vitellogenin receptor in *Macrobrachium nipponense* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.
- [11] 李媛媛. 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 和罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 卵黄蛋白原 mRNA 合成部位的初步研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
- LI Y Y. Study on site of vitellogenin synthesis in the shrimp *Litopenaeus vannamei* and *Macrobrachium rosenbergii* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012.
- [12] 张成锋, 刘红, 高祥刚, 等. 中国对虾卵黄蛋白原合成部位的研究[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(6): 7-13.
- ZHANG C F, LIU H, GAO X G, et al. Studies on site of vitellogenin synthesis in the shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(6): 7-13.
- [13] TIU S H K, HUI J H L, MAK A S C, et al. Equal contribution of hepatopancreas and ovary to the production of vitellogenin (PmVgI) transcripts in the tiger shrimp, *Penaeus monodon* [J]. Aquaculture, 2006, 254 (1/4): 666-674.
- [14] 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.
- [15] 石磊, 岳文斌. SNP 的研究进展及其在家畜育种中的应用[J]. 畜禽业, 2007(3): 2-4.
- SHI L, YUE W B. Advance in Single Nucleotide Polymorphism and its application in livestock [J]. Livestock and Poultry Industry, 2007(3): 2-4.
- [16] 王洋. 香猪 8 个 SNP 的群体分型及其与繁殖性状的关联研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2016.
- WANG Y. Eight SNPs genotyping and their association analysis with the reproduction traits of Xiang pigs [D]. Guiyang: Guizhou University, 2016.
- [17] 肖礼华. 鸡 CRBPs 基因家族克隆、表达及其与繁殖性状的关联分析[D]. 成都: 四川农业大学, 2011.
- XIAO L H. Molecule clone, expression and the association analysis in reproduction traits of the chicken CRBPs [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2011.
- [18] 唐刘秀. 中华绒螯蟹育种群体遗传特征分析及性早熟相关 SNP 标记筛选[D]. 南京: 南京师范大学, 2014.
- TANG L X. Analysis on the genetic characteristics of breeding stocks and identification of SNPs associated with precocity of *Eriocheir sinensis* [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2014.
- [19] 马瑞芹. 牙鲆三种细胞色素 P450 酶基因 SNP 与繁殖内分泌相关性分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- MA R Q. Study on associations of SNP of three cytochrome P450 enzymes gene and the reproductive endocrine of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.
- [20] 袁瑞鹏, 刘建勇, 张嘉晨, 等. 凡纳滨对虾不同家系间繁殖性状的比较[J]. 海洋学报, 2016, 38(6): 89-97.
- YUAN R P, LIU J Y, ZHANG J C, et al. A comparative study of reproductive traits among different *Litopenaeus vannamei* families [J]. Haiyang Xuebao, 2016, 38(6): 89-97.

Preliminary study of SNP marker on spawning traits in *Litopenaeus vannamei*

WANG Ran^{1,2}, LIU Hong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Molecular markers related with spawning traits in shrimps is limited. At present study, vitellogenin (VG) gene of *Litopenaeus vannamei* was selected for SNP (Single Nucleotide Polymorphism) marker screening on spawning traits (ie. spawn or not & egg number). Direct sequencing of VG gene was used for SNP loci screening. The detected SNP loci were further correlated with spawning traits. The experiment was based on 150 ablated female shrimps and the four domains of VT gene. During the discovered 37 SNP loci, there were 3 missense mutation, 8 synonymous mutation and 26 nonsense mutation. Further analysis found 4 potential SNP loci whose polymorphism information content (PIC) were between 0.31-0.36 indicated their middle standard of PIC. Single-factor ANOVA analysis was used for the reproductive variables (number of spawns, total egg number, average egg number, and egg number per body weight). Only the locus 3 839 showed the significance difference on total egg number and egg number per body weight ($P < 0.05$), no significance differences were found in the other 3 potential loci.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; vitellogenin (VG); SNP; spawn traits; molecular marker