绿鳍马面鲀微卫星标记开发及在丝背细鳞鲀中的通用性检测

王九龙, 徐文刚, 杨　沛, 杨　婕, 杜荣斌, 刘立明

(烟台大学 海洋学院, 山东 烟台 264005)

摘要: 为充分挖掘绿鳍马面鲀(*Thamnaconus modestus*)基因组资源, 开发可用于群体遗传学研究的分子标记, 本研究利用 NCBI 数据库中公布的绿鳍马面鲀全基因组序列筛查微卫星位点并在野生群体中验证, 在 85 个选取的位点中筛选得到 30 个新的多态性较高的微卫星标记。每个微卫星标记的等位基因数为 4~16, 平均为 8.5 个; 观测杂合度范围为 0.207~0.916, 平均值为 0.685; 期望杂合度范围为 0.315~0.971, 平均值为 0.756; 多态信息含量范围为 0.301~0.898, 平均值为 0.716, 其中属于高度多态的位点有 26 个, 占总位点数的 86.67%; 经过 Bonferroni 校正后, 有 7 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。将 30 个绿鳍马面鲀多态性微卫星标记在丝背细鳞鲀(*Stephanolepis cirrhifer*)中进行通用性检测, 其中 13 个位点成功扩增, 9 个位点具有多态性。本研究开发的微卫星标记可用于绿鳍马面鲀及相关物种的遗传多样性分析、QTL 定位以及系统进化等研究。

关键词: 绿鳍马面鲀(*Thamnaconus modestus*); 丝背细鳞鲀(*Stephanolepis cirrhifer*); 微卫星标记; 通用性

中图分类号: S917.4　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-3096(2022)06-0099-10

DOI: 10.11759/hykx20220120003

绿鳍马面鲀(*Thamnaconus modestus*)俗称扒皮鱼、象皮鱼、马面鱼等, 广泛分布于中国、日本、朝鲜半岛沿海, 为外海暖温性底层鱼类, 栖息于水深 50~120 m 处, 主要以浮游生物和底栖生物为食[1]。绿鳍马面鲀具有味道鲜美、营养丰富等优点, 经济价值较高[2]。绿鳍马面鲀曾是中国主要的海洋捕捞对象之一, 但由于过度捕捞和产卵场生态环境受到破坏, 造成绿鳍马面鲀的资源量急剧下降[3]。目前, 中国已经突破绿鳍马面鲀苗种规模化繁育技术[4-5], 为保护中国绿鳍马面鲀种质资源、促进其养殖业可持续发展提供了重要保障。

目前, 国内外对绿鳍马面鲀的研究主要集中在苗种繁育[4]、胚胎和早期阶段发育[6-7]以及群体遗传结构分析[8-10]等方面, 而分子遗传资源相关研究较少, 重要经济性状的分子机制等研究进展缓慢。微卫星(Microsatellite)作为第二代分子标记, 具有多态性高、稳定性好、共显性遗传等特点, 是较为理想的遗传标记, 现已广泛应用于水产动物遗传多样性分析[11]、基因定位[12]以及家系鉴定[13]等研究中。目前, 仅有少量研究报道了绿鳍马面鲀微卫星标记的开发工作, 如徐亘博[14]通过构建微卫星富集文库开发了 28 个绿鳍马面鲀微卫星标记, AN 等[15-16]开发了 39 个微卫星标记并进行了特性分析。微卫星标记数量的不足严重限制了其在经济性状 QTL 精细定位等方面的应用。传统的富集文库法等微卫星标记开发技术步骤繁琐, 且开发标记的效率较低[17]。随着测序技术的高速发展以及越来越多物种全基因组序列的公布, 利用全基因组序列结合生物信息学分析成为一种经济、高效的微卫星位点筛查方法, 并已在多个水产动物中成功应用: 如唐荣叶等[18]对斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)全基因组微卫星进行了搜索分析, 共筛选得到完整型微卫星 510 256 个; 梁霞等[19]利用 MISA 软件对鲤鱼(*Cyprinus carpio*)全基因组中的微卫星进行搜索, 共筛查到 837 004 个完整型微卫星, 同时对微卫星定位在编码区域的基因进行了 GO 注释和 KEGG 富集分析。此外, 在高通量测序平台基础上发展而来的 RAD[20-21]、SLAF-seq[22-24]等简化基因组测序技术因测序成本更低, 也越来越多地应用于大规模微卫星标记的开发工作。最近, 绿鳍马面鲀基因组测序及精细图谱绘制已经完成, 为其开展分子标记开发、比较基因

收稿日期: 2022-01-20; 修回日期: 2022-04-01

基金项目: 烟台大学青年博士科研启动基金项目(HX19B18); 烟台市科技创新发展计划(2022XDRH022)

[Foundation: Rescarch Start-up Fund for Young Doctor of Yantai University, No. HX19B18; Science and Technology Innovation Development Plan of Yantai, No. 2022XDRH022]

作者简介: 王九龙(1989—), 男, 山东聊城人, 博士, 讲师, 主要从事水产动物遗传育种研究, E-mail: Wangjiulong_work@163.com; 刘立明(1971—), 通信作者, E-mail: liu_liming71@163.com

组分析等研究提供了宝贵的数据资源[25]。

绿鳍马面鲀和丝背细鳞鲀(*Stephanolepis cirrhifer*)同为单角鲀科(Monacanthidae), 分别隶属于马面鲀属(*Thamnaconus*)和细鳞鲀属(*Stephanolepis*)。丝背细鳞鲀作为具有较高开发前景的经济鱼类, 国内仅见有对其外部形态特征及染色体核型分析的报道, 研究基础薄弱, 分子遗传资源严重缺乏。目前, 作者所在科研团队正对该两种经济鱼类开展养殖技术、繁育生物学和分子遗传学等方面的研究。通过开发、筛选在丝背细鳞鲀中通用的微卫星标记, 可为开展丝背细鳞鲀群体遗传多样性分析和遗传改良等工作提供必要的分子标记资源。此外, 通用标记的开发与验证也可为阐明两种鱼类之间的系统进化关系提供新的研究角度。本研究通过对绿鳍马面鲀全基因组序列进行挖掘, 筛选并开发了 30 个新的多态性较高的绿鳍马面鲀微卫星标记, 并将微卫星标记在丝背细鳞鲀中进行了通用性检测。

1 材料与方法

1.1 材料

绿鳍马面鲀野生群体捕自山东烟台近海, 丝背细鳞鲀养殖群体采集于烟台市莱州顺昌水产有限公司。绿鳍马面鲀和丝背细鳞鲀各取 48 尾, 剪取尾鳍置于无水乙醇中。采用苯酚-氯仿法提取样品基因组 DNA, 使用分光光度计 Nano Drop 2000(Thermo Fisher Scientific, 美国)测定基因组 DNA 的浓度和纯度, 采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整度。提取的基因组 DNA 使用超纯水稀释至 50 ng/μL, 保存在–30 ℃冰箱备用。

1.2 微卫星筛查和引物设计

从美国国家生物信息中心网站(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)下载绿鳍马面鲀全基因组序列(GenBank: GCA_009823395.1)。基因组总长度约为 474.3 Mb, 包含 20 条染色体以及 135 条 scaffolds。采用微卫星识别工具 MISA(Microsatellite identification tool, http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/)在参考基因组中搜索微卫星位点, 搜索所采用的参数如下: 单核苷酸重复次数≥10 次、二、三、四、五、六核苷酸重复次数≥5 次。

利用 Primer3 V2.3.6 分别对搜索到的微卫星序列两端设计引物, 扩增片段长度控制在 100~400 bp, 扩增片段位置为重复序列前 1 个碱基到重复序列后 5 个碱基, 其他参数默认。因少量不同的微卫星序列距离较近, 同一对引物的扩增产物中包含多个微卫星序列, 会对后续条带判读造成影响, 故需将这些距离较近的微卫星位点剔除, 筛选出扩增片段中只含有一个微卫星位点的引物。选取 85 对引物送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 所选微卫星位点不与已发表的微卫星标记重复。

1.3 微卫星标记的引物筛选及特性分析

随机选取绿鳍马面鲀 6 个野生个体的基因组 DNA 模板进行初步筛选, 得到能稳定扩增且呈多态性的微卫星位点, 再通过温度梯度 PCR 进行退火温度的优化。利用绿鳍马面鲀 48 个个体, 对初筛中呈多态性的微卫星位点进行特性分析。PCR 反应在 Bio-Rad T100™ PCR 仪中进行。PCR 反应体系总体积为 10 μL, 包括 10×PCR buffer 1 μL, 0.6 μL $MgCl_2$(25 mmol/L), 0.8 μL dNTP mix(2.5 μmol/L), 正反向引物各 0.4 μL (10 μmol/L), DNA 模板 1 μL(50 ng/μL), 0.05 μL rTaq DNA 聚合酶(5 U/μL, Takara), 超纯水补充总体积至 10 μL。PCR 反应程序为: 95 ℃预变性 5 min, 95 ℃变性 30 s, 退火反应 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 扩增产物首先利用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测, 对能扩增出单一条带的位点不进行测序验证, 直接利用 6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测多态性, 银染显影进行条带判读后扫描保存。

1.4 微卫星标记通用性检测

利用在绿鳍马面鲀中筛选得到的微卫星标记, 首先以丝背细鳞鲀 6 个个体的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测筛选可稳定扩增的微卫星引物; 再对丝背细鳞鲀 48 个个体进行多态性分析, 经 6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 银染染色后扫描保存。

1.5 数据统计与分析

利用 Genepop 4.0 软件检验微卫星位点间的 Hardy-Weinberg 平衡的偏离情况, 并经 Bonferroni 法校正(P<0.05); 利用 Cervus 3.0.7 软件计算每个位点的等位基因数(number of allele, N_a)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)以及多态信息含量(polymorphism information content, PIC)。

2 结果

2.1 引物筛选及初步多态性检测结果

在绿鳍马面鲀基因组中共筛选得到 566 561 个

完整型微卫星位点, 其中单碱基重复类型 70 087 个(12.37%); 二碱基重复类型数量最多, 有 336 653 个(59.42%); 三碱基重复类型 113 998 个(20.12%); 四碱基重复类型 39 059 个(6.90%); 五碱基重复类型 3 694 个(0.65%); 六碱基重复类型数量最少, 只有 3 070 个, 占所有微卫星位点的 0.54%。

在选取的 85 对微卫星引物中, 18 对引物扩增后无条带, 23 对引物扩增后有非特异性扩增, 14 对引物扩增后有单一条带但无多态性。最终, 共筛选得到 30 个可扩增出清晰条带且具多态性的微卫星标记(表 1、图 1)。

表 1　30 对绿鳍马面鲀微卫星引物信息

Tab. 1　Microsatellite primers for *T. modestus*

位点	引物序列(5'-3')	重复单元	退火温度/℃	产物长度/bp	登录号
TM-53	F: GTGATGGTGGTTGTGGTCAG R: ATGGACCAAAGGAAGTCGTG	$(TG)_{30}$	58	362	OK144258
TM-55	F: TGCGTGTAGTGCAGATAGGG R: TCTTGAGAGGGCATCTGTGA	$(GT)_5$	56	122	OK144259
TM-59	F: TGGATGCAGGTGTACGAGTG R: GACGTGCTGCAGTATCCAGA	$(TG)_7$	60	256	OK144260
TM-62	F: TCCTCCTCCTGCTGTGTTCT R: ACCACGATCTGGATGACCTG	$(TG)_6$	60	332	OK144261
TM-63	F: CGCCCACTTACTGTCTGTCC R: GTCGCTCTGGTCCACAATCT	$(TG)_5$	56	151	OK144262
TM-68	F: AGACCTCCTGTCCTGCTTCA R: GGTACGACAAACCACAGAGGA	$(TGT)_5$	58	157	OK144263
TM-70	F: GACCGGCATCTCTAGGATCA R: TTCGGCGTCTGCTCTATTTT	$(TG)_8$	60	274	OK144264
TM-71	F: ACAGCCGTCTAACGCAGAAG R: TGGGGAAATTCACAACAACA	$(TG)_{18}$	60	333	OK144265
TM-74	F: TGATGCGGTGAGTCAAGAAC R: TGGAGGTCCAAAGCAGAAAC	$(TGC)_6$	60	252	OK144266
TM-78	F: AGATGAATGATGGGGCAGAG R: GGGCAGAAAGAAGGAGAAGG	$(TTAT)_8$	57	306	OK144267
TM-83	F: GAGGCGTCTGAAGAATCAGC R: TCCACCGTCTGAAGGAGAAG	$(TTC)_6$	56	244	OK144268
TM-86	F: GGGAATGTGAAGCCACTGAT R: CGATCAAAGCAACACCACAC	$(GT)_{26}$	60	249	OK144269
TM-87	F: GTGTGGTGTTGCTTTGATCG R: CAGCCAGGAAGTGGGAATAA	$(TG)_{20}$	60	341	OK144270
TM-89	F: CTACGTCGAGGCAATGTGTG R: GTGGGTGTCACATGATCCAA	$(AC)_5$	60	233	OK144271
TM-92	F: GTGATCATGTGACCGGTTTG R: GGGAGTTTAGTGGGGTTGGT	$(GCAC)_8$	60	399	OK144272
TM-94	F: TAAACTCCCCACCACCACAG R: CTGACAGCTCATGCAACACA	$(GCGT)_{13}$	60	326	OK144273
TM-97	F: TCCCATGTGCATTTATGCTT R: CCTCTGGGAAATGCTGCTAA	$(TG)_{15}$	58	231	OK144274
TM-101	F: ATGAGAGCCCCTCCTCTCTC R: TAGGGGTCGCTGTACTCCAC	$(AGG)_7$	60	234	OK144275

续表

位点	引物序列(5'-3')	重复单元	退火温度/℃	产物长度/bp	登录号
TM-105	F: CAGTCGCCCCTCTACTCCT R: GAGCCACATGGGTCGTTTC	$(TA)_{14}$	60	352	OK144276
TM-106	F: GTCGCCCCTCTACTCCTCTC R: TGGCCATAATGACAAGCAGA	$(GT)_8$	60	485	OK144277
TM-113	F: CTGCTCTGCACTCTCACCTG R: ATGCACATTCCAGCTTCACA	$(ATG)_7$	57	291	OK144278
TM-115	F: GACCTCCAGCCAACTGATGT R: ACTCACAGGATCCCAACCAG	$(TG)_5$	58	279	OK144279
TM-119	F: GGCCACCTAACTCATTGCAT R: CACACACTCACACACGGACA	$(GT)_{26}$	58	276	OK144280
TM-121	F: TCCGTGTGTGAGTGTGTGTG R: ATCACCGCTGCCATAGTCTC	$(TG)_{17}$	60	388	OK144281
TM-124	F: CCCCTCCTTGTGTCTGTGAT R: CACAGGGAATCCAGCTTGTC	$(TCT)_7$	60	281	OK144282
TM-125	F: GAAAACAGGTAACGCCTGGA R: TTGTCCACAGAGTCCTTCACA	$(GA)_5$	58	213	OK144283
TM-127	F: GTGCATCGAGAACAGCTACG R: CCTGGAGAGGAAACACAGGA	$(AC)_{14}$	58	191	OK144284
TM-130	F: TACACTGTTGGGTGCAGTCG R: TCGCTGATTTGATTCCTGCT	$(TG)_5$	56	268	OK144285
TM-134	F: CAGCAGGGTCACTTCAACAA R: GTGCTCACTGAAGGTCACGA	$(GT)_{55}$	58	303	OK144286
TM-135	F: ATTTGCTGCTGGCTTTGTTT R: GTGACCTTGTCGGTGTCCTT	$(GAT)_9$	60	301	OK144287

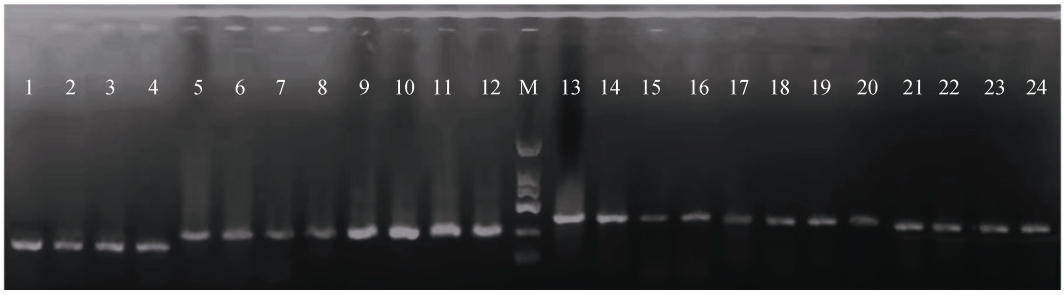


图 1　微卫星标记的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1　Agarose gel electrophoresis of microsatellite markers

M. DNA marker; 1-4. TM-68; 5-8. TM-70; 9-12. TM-74; 13-16. TM-78; 17-20. TM-94; 21-24. TM-115

2.2　微卫星标记在绿鳍马面鲀野生群体中的多态性分析

30 个微卫星标记在绿鳍马面鲀野生群体中共扩增出 254 个等位基因, 平均等位基因数为 8.5 个, 其中位点 TM-127 等位基因数最少(4 个), 位点 TM-74 等位基因数最多(16 个)。观测杂合度平均值为 0.685(0.207~0.916), 期望杂合度平均值为 0.756 (0.315~0.971)。多态信息含量平均值为 0.716(0.301~0.898), 其中高度多态(PIC>0.5)的位点有 26 个, 占总位点数的 86.67%, 中度多态位点(0.25<PIC<0.5) 4 个, 占 13.33%。在 30 个微卫星位点中, 7 个位点(TM-59、TM-68、TM-87、TM-92、TM-94、TM-105 和 TM-106)显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 占总数的 23.33%(表 2、图 2)。

表 2　30 个微卫星标记在绿鳍马面鲀野生群体中的遗传多样性参数
Tab. 2　Genetic diversity of 30 microsatellite markers in a wild population of *T. modestus*

位点	等位基因数	观测杂合度	期望杂合度	多态信息含量	*P* 值
TM-53	6	0.673	0.715	0.786	0.577
TM-55	8	0.897	0.792	0.748	0.164
TM-59	5	0.361	0.476	0.374	0.042*
TM-62	7	0.688	0.761	0.712	0.317
TM-63	10	0.833	0.749	0.698	0.086
TM-68	8	0.474	0.523	0.462	0.035*
TM-70	12	0.700	0.915	0.892	0.206
TM-71	13	0.767	0.921	0.898	0.153
TM-74	16	0.854	0.971	0.887	0.316
TM-78	10	0.733	0.909	0.884	0.240
TM-83	9	0.815	0.848	0.817	0.061
TM-86	5	0.594	0.691	0.642	0.143
TM-87	11	0.733	0.915	0.891	0.000*
TM-89	10	0.656	0.878	0.858	0.497
TM-92	8	0.667	0.823	0.783	0.009*
TM-94	10	0.800	0.894	0.867	0.000*
TM-97	7	0.207	0.315	0.301	0.346
TM-101	5	0.916	0.664	0.582	0.055
TM-105	6	0.633	0.820	0.778	0.046*
TM-106	10	0.567	0.905	0.880	0.003*
TM-113	6	0.688	0.761	0.707	0.235
TM-115	11	0.761	0.807	0.764	0.823
TM-119	9	0.655	0.800	0.756	0.074
TM-121	7	0.688	0.632	0.567	0.473
TM-124	10	0.774	0.791	0.746	0.456
TM-125	6	0.656	0.581	0.520	0.910
TM-127	4	0.438	0.375	0.344	0.975
TM-130	8	0.625	0.788	0.751	0.322
TM-134	10	0.844	0.848	0.817	0.143
TM-135	7	0.857	0.823	0.781	0.117

注: *差异显著, Hardy-Weinberg 平衡检验经 Bonferroni 法校正(P<0.05)

2.3　绿鳍马面鲀微卫星标记的通用性检测

利用筛选出的 30 个绿鳍马面鲀微卫星标记在丝背细鳞鲀养殖群体中进行扩增, 其中 17 个位点无扩增产物或产生非特异性扩增, 剩余 13 个可扩增出清晰目的条带的位点中, 9 个位点具有多态性, 通用率和多态率分别为 43.33%和 30.00%。

2.4　微卫星标记在丝背细鳞养殖群体中的多态性分析

在丝背细鳞养殖群体中, 9 个通用的微卫星标记共扩增出 66 个等位基因, 平均等位基因数为 7.3 个, 其中位点 TM-130 等位基因数最少(4 个), 位点 TM-74 等位基因数最多(11 个)。观测杂合度平均值为 0.525 (0.285~0.753), 期望杂合度平均值为 0.608 (0.344~0.792)。多态信息含量平均值为 0.534(0.327~0.748), 其中高度多态的位点有 5 个, 占总位点数的 55.56%, 中度多态位点有 4 个, 占 44.44%(表 3)。

3　讨论

3.1　绿鳍马面鲀微卫星标记开发及群体遗传多样性分析

Hardy-Weinberg 平衡是群体遗传学的一个重要

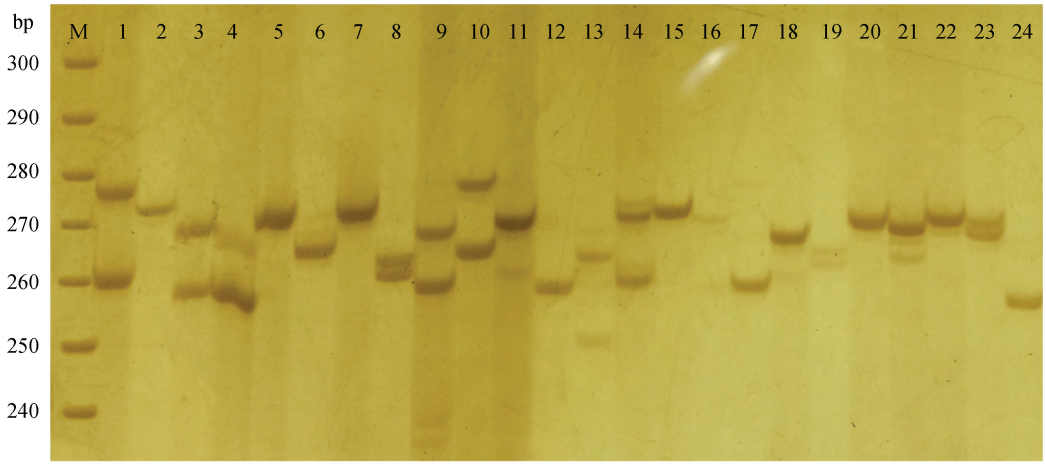


图 2　微卫星标记 TM-70 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图(M.DNA marker)

Fig. 2　Polyacrylamide gel electrophoresis of microsatellite marker TM-70

表 3　9 个通用微卫星标记在丝背细鳞鲀养殖群体中的遗传多样性参数

Tab. 3　Genetic diversity of 9 transferable microsatellite markers in a cultured population of *Stephanolepis cirrhifer*

位点	等位基因数	观测杂合度	期望杂合度	多态信息含量	*P* 值
TM-55	5	0.361	0.586	0.748	0.349
TM-68	6	0.430	0.466	0.429	0.000*
TM-74	11	0.718	0.772	0.625	0.475
TM-89	7	0.583	0.637	0.558	0.533
TM-94	9	0.644	0.792	0.467	0.026*
TM-97	7	0.285	0.344	0.327	0.553
TM-106	8	0.504	0.572	0.583	0.263
TM-121	9	0.753	0.787	0.697	0.031*
TM-130	4	0.446	0.513	0.369	0.482

注: *表示差异显著, Hardy-Weinberg 平衡检验经 Bonferroni 法校正(P<0.05)

基本原理, 它指出“在没有外界因素干扰的情况下, 群体的基因型频率在世代间保持恒定”。在水产动物群体遗传学研究中, 微卫星标记偏离 Hardy-Weinberg 平衡的现象较为常见[26-27]。突变、自然选择、非随机交配、遗传漂变和基因流等因素都可能导致偏离 Hardy-Weinberg 平衡。在绿鳍马面鲀野生群体中, 7 个微卫星标记偏离 Hardy-Weinberg 平衡且均表现为杂合子缺失(heterozygote deficiency), 其原因可能是野生群体在这 7 个位点受到了自然选择作用, 这些位点可能与适应环境能力有关。此外, 华伦德效应、存在无效等位基因以及近亲交配也是导致杂合子缺失的重要原因[28]。为全面、准确地掌握绿鳍马面鲀群体遗传多样性水平, 研究者应综合利用微卫星标记和线粒体 DNA 等多种类型的标记开展相关研究。

分子标记的多态信息含量、等位基因数以及杂合度是评价遗传多样性最重要的参数。根据 BOTSTEIN 等[29]提出的分类标准, 本研究开发的 30 个微卫星标记中有 26 个位点表现为高度多态性, 这些位点将为绿鳍马面鲀群体遗传学研究提供丰富的遗传信息; 此外, 等位基因数≥5 的位点有 29 个, 表明这些位点具有较高的多态性, 实验所用野生绿鳍马面鲀群体遗传多样性较高。在徐亘博[14]和 AN 等[15-16]的研究中, 也得到野生绿鳍马面鲀群体遗传多样性较高的结果。此外, 本文与徐亘博[14]的研究采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳方法对微卫星标记进行基因分型, 两项研究中的微卫星标记在野生群体中检测到的平均等位基因数(8.5 和 4.36)显著低于 AN 等[15-16]研究中相应的平均值(15.18 和 13.35), 其原因可能是 AN 等利用分辨率更高的毛细管电泳技术对微卫星标记

进行基因分型, 可以检测出更多片段长度相近的扩增产物[30]。基因杂合度可反映群体在多个基因上的遗传变异及群体遗传多样性的丰富度, 杂合度越高, 表明该群体的遗传变异越复杂[31]。微卫星标记的平均观测杂合度为 0.685, 表明该绿鳍马面鲀野生群体仍处于较高的遗传变异水平, 这一结果为未来开展绿鳍马面鲀人工选育提供了一定理论依据。

3.2 绿鳍马面鲀微卫星标记的通用性分析

由于微卫星侧翼序列在种间或属间具有一定保守性, 因此开发通用性标记应用于近缘物种成为可能。目前, 研究者已在多个水产动物中开展了微卫星标记通用性研究。如: 吴仁协等[23]利用 SLAF-seq 技术从黑棘鲷(*Acanthopagrus Schlegelii*)中开发了 49 个高多态性的微卫星标记, 其中 43 个微卫星标记可在其他 9 种鲷科(Sparidae)鱼类中成功扩增; 张广明等[32]对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)EST-SSR 标记在栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)中的通用性进行了研究, 结果显示, 60 个位点中有 21 个可在栉孔扇贝中扩增出特异性条带, 通用性比例为 35.00%。本研究中, 来源于绿鳍马面鲀的微卫星标记在丝背细鳞鲀中的多态率为 30.00%; 而在 AN 等[16]的研究中, 来源于绿鳍马面鲀的微卫星标记在丝背细鳞鲀中的多态率为 60.00%(12/20)。不同研究中来源于绿鳍马面鲀的微卫星标记在丝背细鳞鲀中通用性差异较大, 其原因可能是用于检测的标记数量较少所致。分子标记的跨物种扩增通用性反映了检测物种间的遗传分化程度, 亲缘关系越远的物种, 种间分子标记的通用性越差、扩增成功率越低。如利用兰州鲇(*Silurus Lanzhouensis*)的微卫星标记在鲇形目(Siluriformes)和鲤形目(Cypriniformes)的 12 种鱼类中进行跨物种通用性分析, 结果表明兰州鲇微卫星标记在近缘种中都表现出一定的通用性, 但随着亲缘关系变远, 其通用性降低[33]; 在巨蛎属牡蛎(*Crassostrea*)中, 从长牡蛎(*Crassostrea gigas*)中开发的 EST-SNP 标记在葡萄牙牡蛎(*Crassostrea angulata*)、熊本牡蛎(*Crassostrea sikamea*)、香港巨牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)和有明巨牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)的通用率分别为 93.6%、82.5%、67.4%和 67.1%, 这一结果与巨蛎属牡蛎之间遗传距离的远近相一致[34]。除相关物种间的亲缘关系远近外, 微卫星标记的来源也会影响通用率的高低。相比于从基因组中开发的微卫星标记(genomic SSR), 从基因转录区开发的 EST-SSR 标记侧翼序列更加保守, 引物在跨物种间扩增的成功率更高[31]。

4 结论

本研究开发的 30 个微卫星标记可用于相关物种的遗传多样性评价、系统进化分析和比较基因组作图等研究。虽然本研究中绿鳍马面鲀的遗传多样性相对较高, 但考虑到未来市场对野生种群的需求和海洋生态环境变化对绿鳍马面鲀资源和种群结构的影响, 保护绿鳍马面鲀野生资源仍任重道远。下一步, 我们将结合简化基因组测序等技术对中国沿海多个地理群体的绿鳍马面鲀开展群体遗传学分析, 以期为制定科学的资源保护方案提供理论基础。

参考文献:

[1] 苏锦祥, 李春生. 中国动物志: 硬骨鱼纲-鲀形目、海蛾鱼目、喉盘鱼目、鲛鳚目[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 125-132.
SU Jinxiang, LI Chunsheng. Fauna Sinica: Osteichthyes-Tetraodontiformes, Pegasiformes, Gobiesociformes, Lophiiformes[M]. Beijing: Science Press, 2002: 125-132.

[2] 徐大凤, 刘琨, 王鹏飞, 等. 绿鳍马面鲀肌肉营养成分分析和营养评价[J]. 海洋科学, 2018, 42(5): 122-129.
XU Dafeng, LIU Kun, WANG Pengfei, et al. Analysis of nutritional composition in the muscle of *Thamnaconus septentrionalis*[J]. Marine Sciences, 2018, 42(5): 122-129.

[3] 郑元甲. 东海区马面鲀资源变动及其原因的初步研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(4): 19-25.
ZHENG Yuanjia. A preliminary study on the stook variations and their causes of filefishes *Thamnaconus* spp. in the East China Sea[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1997, 4(4): 19-25.

[4] 张立宁, 邵鑫斌, 单乐州, 等. 绿鳍马面鲀规模化人工繁育技术[J]. 水产科技情报, 2020, 47(5): 258-260.
ZHANG Lining, SHAO Xinbin, SHAN Lezhou, et al. Large-scale artificial breeding technology of *Thamnaconus septentrionalis*[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2020, 47(5): 258-260.

[5] 姜良龙, 张哲, 王臻, 等. 绿鳍马面鲀工厂化早繁苗种培育关键技术[J]. 水产科学, 2021, 40(6): 801-809.
JIANG Lianglong, ZHANG Zhe, WANG Zhen, et al. Key techniques of industrial seedling production for *Thamnaconus septentrionalis* in earlier breeding season[J]. Fisheries Science, 2021, 40(6): 801-809.

[6] 关健, 陈志信, 张家男, 等. 人工培育条件下绿鳍马面鲀 *Thamnaconus modestus* 胚胎发育的研究[J]. 海

洋科学进展, 2011, 29(4): 498-505.
GUAN Jian, CHEN Zhixin, ZHANG Jianan, et al. Investigation of embryonic development of *Thamnaconus modestus* in artificial breeding condition[J]. Advances in Marine Science, 2011, 29(4): 498-505.

[7] 张哲, 姜良龙, 王臻, 等. 绿鳍马面鲀早期生长发育与摄食特性的研究[J]. 海洋科学, 2021, 45(1): 1-13.
ZHANG Zhe, JIANG Lianglong, WANG Zhen, et al. Growth, development, and feeding characteristics of *Thamnaconus modestus* during early stages[J]. Marine Sciences, 2021, 45(1): 1-13.

[8] 边力, 王鹏飞, 陈四清, 等. 基于线粒体 Cyt *b* 基因序列的绿鳍马面鲀 6 个野生群体的遗传结构分析[J]. 中国水产科学, 2018, 25(4): 827-836.
BIAN Li, WANG Pengfei, CHEN Siqing, et al. Population genetic structure of *Thamnaconus septentrionalis* in China's coastal waters based on mitochondrial Cyt *b* sequences[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(4): 827-836.

[9] YANG T, WANG Z, LIU Y, et al. Population genetics and molecular phylogeography of *Thamnaconus modestus* (Tetraodontiformes, Monachanthidae) in Northwestern Pacific inferred from variation of the mtDNA control region[J]. Aquatic Living Resources, 2019, 32: 18.

[10] GWAK W S, ROY A. Genetic diversity and population genetic structure of Korean black scraper *Thamnaconus modestus* in Korea and Japan based on the mtDNA marker[J]. Ocean Science Journal, 2021: 1-9.

[11] LIU F, QU Y K, GENG C, et al. Analysis of the population structure and genetic diversity of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in China using SSR markers[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2020, 47: 59-71.

[12] GUO X, LI Q, WANG Q Z, et al. Genetic mapping and QTL analysis of growth-related traits in the Pacific oyster[J]. Marine Biotechnology, 2012, 14(2): 218-226.

[13] LIU T, LI Q, SONG J, et al. Development of genomic microsatellite multiplex PCR using dye-labeled universal primer and its validation in pedigree analysis of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. Journal of Ocean University of China, 2017, 16(1): 151-160.

[14] 徐亘博. 半滑舌鳎等九种海水鱼微卫星分子标记的开发和应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010: 37-50.
XU Genbo. Development and application of microsatellite markers in *Cynoglossus semilaevis* and other eight crucial marine fish species[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010: 37-50.

[15] AN H S, LEE J W, DONG C M, et al. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of the Korean black scraper, *Thamnaconus modestus*[J]. Genes & Genomics, 2011, 33(5): 499-504.

[16] AN H S, KIM M, LEE W, et al. Novel polymorphic microsatellite loci for the Korean black scraper (*Thamnaconus modestus*), and their application to the genetic characterization of wild and farmed populations[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(6): 4104-4119.

[17] 王娟娟, 赵明, 韩雨威, 等. 微卫星 DNA 标记开发技术进展及其在经济植物研究中的应用[J]. 生命科学研究, 2016, 20(3): 260-266.
WANG Juanjuan, ZHAO Ming, HAN Yuwei, et al. Advances in development of microsatellite DNA markers and their applications in economic plant research[J]. Life Science Research, 2016, 20(3): 260-266.

[18] 唐荣叶, 苏孟园, 杨汶珊, 等. 斑点叉尾鮰全基因组微卫星分布特征分析[J]. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 89-97.
TANG Rongye, SU Mengyuan, YANG Wenshan, et al. Analysis of microsatellite distribution characteristics in the Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) Genome[J]. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 89-97.

[19] 梁霞, 王慧琪, 马宇璇, 等. 鲤鱼(*Cyprinus carpio*)全基因组微卫星分布特征研究[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2021, 44(3): 103-111.
LIANG Xia, WANG Huiqi, MA Yuxuan, et al. Distribution characteristics of microsatellites in the whole genome of *Cyprinus carpio*, Linnaeus[J]. Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition), 2021, 44(3): 103-111.

[20] 倪守胜, 杨钰, 柳淑芳, 等. 基于高通量测序的虾夷扇贝基因组微卫星特征分析[J]. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 107-113.
NI Shousheng, YANG Yu, LIU Shufang et al. Microsatellite analysis of *Patinopecten yessoensis* using next-generation sequencing method[J]. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 107-113.

[21] DONG W, HE F, WEI S, et al. Identification and characterization of SSR markers in taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] by RAD sequencing[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2021, 68(7): 2897-2905.

[22] LI X, TANG Y, ZHANG R, et al. Characterization and development of SSR markers of schizothoracine fish (Cypriniformes: Cyprinidae) based on SLAF-seq technique[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2020, 36(4): 519-527.

[23] 吴仁协, 肖瑶, 牛素芳, 等. 基于 SLAF-seq 技术的黑棘鲷微卫星标记开发及其在鲷科鱼类中的通用性研究[J]. 海洋与湖沼, 2019, 50(2): 365-377.
WU Renxie, XIAO Yao, NIU Sufang, et al. Development of microsatellite markers for *Acanthopagrus Schlegelii* based on SLAF-seq technology and generality in the family Sparidae[J]. Oceanologia et Limnologia

Sinica, 2019, 50(2): 365-377.

[24] 张浩冉, 梁镇邦, 吴仁协, 等. 基于SLAF-seq技术的沙带鱼(*Lepturacanthus savala*)微卫星标记开发以及在近缘种中的通用性[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(8): 3331-3338.
ZHANG Haoran, LIANG Zhenbang, WU Renxie, et al. Microsatellite loci isolation in the Savalai hairtail (*Lepturacanthus savala*) based on SLAF-seq technology and generality in the related species[J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(8): 3331-3338.

[25] BIAN L, LI F, GE J, et al. Chromosome‐level genome assembly of the greenfin horse‐faced filefish (*Thamnaconus septentrionalis*) using Oxford Nanopore PromethION sequencing and Hi‐C technology[J]. Molecular Ecology Resources, 2020, 20(4): 1069-1079.

[26] 任建功, 王青林, 孙朝徽, 等. 许氏平鲉6个地理群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 水产科学, 2021, 40(3): 301-309.
REN Jiangong, WANG Qinglin, SUN Zhaohui, et al. Genetic diversity among six geographical populations of Schlegel's Black Rockfish *Sebastes schlegelii* by microsatellite marker[J]. Fisheries Science, 2021, 40(3): 301-309.

[27] 梁业松, 张维炜, 宋飞彪, 等. 虎龙杂交斑养殖群体遗传多样性与遗传结构的微卫星分析[J]. 水产学报, 2022, 46(1): 31-40.
LIANG Yesong, ZHANG Weiwei, SONG Feibiao, et al. Genetic diversity and genetic structure analysis of aquaculture groups ofhybrid grouper [*Epinephelus fuscoguttatus* (♀) *E.lanceolatus* (♂)] using microsatellite markers[J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(1): 31-40.

[28] RICO C, CUESTA J A, DRAKE P, et al. Null alleles are ubiquitous at microsatellite loci in the wedge clam (*Donax trunculus*)[J]. Peer J, 2017, 5: e3188.

[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(3): 314-331.

[30] VOETEN R L C, VENTOURI I K, HASELBERG R, et al. Capillary electrophoresis: trends and recent advances[J]. Analytical Chemistry, 2018, 90(3): 1464-1481.

[31] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics, 1978, 89(3): 583-590.

[32] 张广明, 孙秀俊, 吴彪, 等. 虾夷扇贝EST-SSR标记在栉孔扇贝中的通用性研究[J]. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 139-146.
ZHANG Guangming, SUN Xiujun, WU Biao, et al. Transferability of EST-SSR from *Patinopecten yessoensis* into *Chlamys farreri*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 139-146.

[33] 杨忠礼. 兰州鲇EST-SSR分子标记的开发及其在鲇形目和鲤形目鱼类中的通用性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016: 42-46.
YANG Zhongli. Development of *Silurus Lanzhouensis* EST-SSR markers and their transferability analysis in Siluriformes and Cypriniformes fishs[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2016: 42-46.

[34] ZHONG X, LI Q, YU H, et al. SNP mining in *Crassostrea gigas* EST data: transferability to four other *Crassostrea* species, phylogenetic inferences and outlier SNPs under selection[J]. PLoS ONE, 2014, 9(9): e108256.

Development of microsatellite markers for *Thamnaconus modestus* and their transferability in *Stephanolepis cirrhifer*

WANG Jiu-long, XU Wen-gang, YANG Pei, YANG Jie, DU Rong-bin, LIU Li-ming
(College of Ocean, Yantai University, Yantai 264005, China)

Received: Jan. 20, 2022
Key words: *Thamnaconus modestus*; *Stephanolepis cirrhifer*; microsatellite markers; transferability

Abstract: In this study, microsatellite loci in the complete genome sequence of *T. modestus* (published in NCBI) were screened and verified in a wild population. The aim is to develop molecular markers for population genetics research and fully exploit the genomic resources of *Thamnaconus modestus*. Thirty highly polymorphic, novel microsatellite markers were identified in 85 selected loci. The number of alleles ranged from 4 to 16, with an average of 8.5. The observed heterozygosity ranged from 0.207 to 0.916, with an average of 0.685. The expected heterozygosity ranged from 0.315 to 0.971, with an average of 0.756. The polymorphic information content ranged from 0.301 to 0.898, with an average of 0.716. Of the 30 microsatellite loci identified, 26 (86.67%) were highly polymorphic, and 7 significantly deviated from the Hardy–Weinberg equilibrium after Bonferroni correction. The transferability of these polymorphic microsatellite markers was assessed in the closely related species *Stephanolepis cirrhifer*, in which 13 loci were successfully amplified, and 9 were found to be polymorphic. The microsatellite markers developed in this study can be used in genetic diversity analysis, QTL mapping, and phylogenic studies of *T. modestus* and related species.

(本文编辑: 谭雪静)