

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*

吴仁协 肖 瑶 牛素芳 翟 云 张浩冉 陈伟勇 黎 晓

(广东海洋大学水产学院 湛江 524088)

摘要 黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)是广泛分布于西北太平洋的暖温性中下层经济鱼类,也是我国沿海重要的海洋捕捞鱼类和增殖对象。然而,目前有关黑棘鲷的微卫星标记研究报道较少,难以对其种质资源状况作出精确评估。本研究采用 SLAF-seq 技术测序共获得 22489 个二至六碱基重复的黑棘鲷微卫星序列,短重复序列(二、三碱基)占总微卫星序列的 90.8%,长重复序列(四至六碱基)占有 9.2%。经过 157 对随机合成引物的多态性筛选,开发出 49 个高多态性的黑棘鲷微卫星标记,其中短重复序列位点有 25 个,长重复序列位点有 24 个。每个位点的等位基因数(N_a)为 2—20(均值为 8.3),观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)分别为 0.097—0.938 和 0.122—0.922(均值分别为 0.663 和 0.701),多态信息含量(PIC)为 0.118—0.897(均值为 0.655)。经 Bonferroni 校正后,有 47 个位点符合哈迪-温伯格平衡(HWE),各位点间未检测到连锁不平衡现象,仅 2 个位点偏离 HWE。结果表明,所开发的大部分微卫星标记具有高多态性,蕴含的遗传信息含量较为丰富,能够为黑棘鲷的种群遗传资源评估提供数量充足、类型多样的有效分子标记。跨物种扩增结果显示,有 43 个黑棘鲷微卫星标记可在 9 种鲷科鱼类中成功扩增,其中 28 个标记在太平洋棘鲷(*Acanthopagrus pacificus*)、黄鳍棘鲷(*Acanthopagrus latus*)和澳洲棘鲷(*Acanthopagrus australis*)中具有较好的通用性,2 个标记在平鲷(*Rhabdosargus sarba*)、蓝点赤鲷(*Pagrus caeruleostictus*)、真赤鲷(*Pagrus major*)、二长棘犁齿鲷(*Eyynnys cardinalis*)及黄牙鲷(*Dentex hypselosomus*)中具有通用性。这些通用性标记可为阐明鲷科属、种间的系统进化关系和棘鲷属鱼类的群体遗传学分析提供新的标记来源和研究角度。

关键词 黑棘鲷; SLAF-seq 技术; 微卫星标记; 跨物种扩增

中图分类号 Q953; S931 doi: 10.11693/hyhz20180900230

黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)是鲷科鱼类最为重要的经济种类之一,广泛分布于西北太平洋的暖温性中下层水域,我国南北沿海均产(刘静等, 2016)。黑棘鲷生长迅速、适应能力强,肉质鲜美、外形美观,具有较高的食用价值和观赏价值,是我国重要的海洋捕捞鱼类和增殖对象(杨慧荣等, 2006)。由于过度捕捞、渔业环境恶化以及人工养殖等原因,黑棘鲷野生群体资源急剧衰减,其养殖群体的种质资源状况也不容乐观(许思思, 2011)。为了恢复黑棘鲷

资源、增加补充群体数量,我国沿海各地纷纷开展了大规模的黑棘鲷增殖放流活动(沈新强等, 2007; 梁君等, 2010)。这些措施对黑棘鲷的渔业资源恢复起到了积极作用,但也可能产生养殖群体与自然群体种质混杂和种群遗传多样性水平下降等不利方面(施晓峰等, 2015; 曹艳, 2016),加大了对其种质资源评估与分析的复杂性。因此,必须采用更加精确的评估方法和开发高灵敏度的分子标记,才能有效评估增殖放流对野生群体遗传特征的影响,以精确评价增殖放

* 公益性行业(农业)科研专项, 201403008 号; 广东省海洋和渔业发展专项(科技攻关与研发), A201708D07 号; 广东省科技计划资助项目, 2017A030303077 号。吴仁协, 博士, 副教授, E-mail: wurenxie@163.com

收稿日期: 2018-09-28, 收修改稿日期: 2018-12-05

流成效和潜在的生态遗传风险。

微卫星标记(Microsatellites),一般由 2—6 个碱基为核心单位组成的短串联排列,广泛存在于真核生物核基因中。微卫星标记不但具有多态性丰富且等位基因条带易识别等优点(鲁双庆等, 2003),而且又可克服 RAPD、RFLP 等分子标记易混淆大小相同但来自不同位点的等位基因的缺点(郭宝英等, 2007),在家系亲权分析、家系鉴别及系谱认证、个体/家系溯源等方面显示出显著的优势和应用价值(李伟亚等, 2012; 刘永新等, 2015),已成为目前物种增殖放流效果评估的最常用分析工具(Gonzalez *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016)。以往的微卫星标记开发主要采用基于传统的富集文库法(Enriched Genomic Library),不但费时费力、成本高昂,而且开发效率较低,通常一次只能筛选出几十个至几百个位点,难以在短时间内一次性即可开发出大批量的高多态性微卫星标记(孙波等, 2009; Grover *et al.*, 2016)。近年来,随着高通量测序平台的快速发展和广泛应用,通过 SLAF-seq (Specific-Locus Amplified Fragment Sequencing)技术可以在短时间内获取遍布于物种基因组 DNA 中海量序列信息(Sun *et al.*, 2013),进而依据其序列开发出特异的分子标记,可筛选出大量高多态性的分子标记。SLAF-seq 技术在保障有效标记数量和质量的同时,还能大幅度降低测序成本,是一种高效、低成本的分子标记开发方法(张浩冉等, 2017)。目前 SLAF-seq 技术已成功用于多种动物的微卫星标记开发,如沼泽山雀(*Parus palustris*) (万冬梅等, 2016)、沙带鱼(*Lepturacanthus savala*) (张浩冉等, 2018)、带鱼(*Trichiurus japonicus*) (张浩冉等, 2019)、蓝圆鲹(*Decapterus maruadsi*) (翟云等, 2018; Niu *et al.*, 2018)等。

目前,有关黑棘鲷的微卫星标记开发已有一些报道,如 Jeong 等(2003, 2007)通过构建基因组酶切片段文库共开发了 8 个二碱基重复标记, Liu 等(2007)基于 6 种鲷科近缘种微卫星位点的跨物种扩增筛选出 16 个适用于黑棘鲷的二碱基重复标记,罗新惠(2010)、徐亘博(2010)、Yang 等(2015)、Mao 等(2016)各自采用磁珠富集法(FIASCO)共开发了 73 个二、三碱基重复标记。然而,这些开发研究都是采用传统的富集文库法,所开发的微卫星标记类型均为短重复序列(二、三碱基),缺乏长重复序列(四至六碱基)类型标记。可见,已开展的黑棘鲷微卫星标记开发研究其方法较为陈旧、标记类型单一,还难以满足黑棘鲷增殖放流遗传效果评估所需的大批量且多样化的微卫

星标记。为此,本研究采用基于高通量测序平台的 SLAF-seq 技术来筛选黑棘鲷基因组 DNA 中的微卫星位点,以开发出高多态性、多样化的微卫星标记,并在 9 种鲷科鱼类中进行微卫星标记的跨物种扩增检测,以期黑棘鲷的种群遗传资源分析提供数量丰富、类型多样的分子标记和有效的技术支撑,也为其近缘种的系统进化和群体遗传学研究提供新的分析手段和研究角度。

1 材料与方法

1.1 实验材料和基因组 DNA 提取

实验所用的 32 尾野生黑棘鲷于 2014 年 3 月采集于湛江市遂溪县江洪和广东雷州珍稀海洋生物国家级自然保护区近岸。取鱼体背部肌肉后浸泡在 95% 的酒精溶液中,并保存于 -20°C 条件下。采用蛋白酶-苯酚氯仿法提取样品基因组 DNA (Sambrook *et al.*, 2001)。

1.2 SLAF-seq 测序和微卫星引物合成

选取一份基因组 DNA 质量较好的肌肉样送至北京百迈客生物科技有限公司进行 SLAF-seq 测序,以获得黑棘鲷全基因组范围内的微卫星序列。利用生物信息学方法确定酶切方案,在酶切片段 SLAF 标签 3' 端加 A 处理基础上,进行连接 Dual-index 测序接头、PCR 扩增、混样、切胶以及文库质检等步骤的处理(张浩冉等, 2019),最后上机(Illumina HiSeq 2500, Illumina Inc., San Diego, CA)对样品进行“全基因组随机测序”。随后,通过微卫星识别软件 MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html/>)对二碱基重复次数 6 次以上、三至六碱基重复次数 5 次以上的微卫星位点进行搜集与统计,并进行分类整理。为了获得具有较好的重复性和稳定性的微卫星标记,按照如下标准挑选测序公司给出的微卫星引物: (1) PCR 产物预计长度在 180—300bp; (2) 引物在距离微卫星重复序列上下游 10bp 以外; (3) 引物长度在 17—23bp, 上、下游引物间长度差异应该 $<4\text{bp}$; (4) 引物对 GC 含为 45%—60%, 退火温度为 50°C — 65°C ; (5) 短重复序列的微卫星核心序列重复次数 ≥ 8 , 长重复序列的微卫星核心序列重复次数 ≥ 5 。在满足这些条件下随机挑选 157 个二至六碱基的微卫星位点引物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行引物序列合成。

1.3 PCR 反应及微卫星多态性引物筛选

采用 4 个黑棘鲷基因组 DNA 对合成的 157 对微卫星引物进行初步筛选,以获得可扩增出具有多态

性片段的微卫星引物。PCR 反应的试剂配比体系(20 μ L)和扩增反应程序见张浩冉等(2018)报道的方法。扩增产物采用 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳(160V, 60—70min)、1%硝酸银染液染色 3—5min, 显色后观察拍照。每对微卫星引物能扩增出 2 条或 2 条以上的具有特异性等位基因条带的统计为多态性引物。

1.4 微卫星荧光引物合成和等位基因分型检测

参考 Schuelke(2000)的 M13 标记法, 对筛选出的多态性微卫星引物进行荧光修饰, 即在每条正向引物的 5'端加上一段 M13 序列(5'-AGGGTTTCCCC AGTCACG-3'或 5'-GAGCGGATAACAATTTCACAC-3'), 同时合成一条具有同样序列的 M13 通用引物, 在其 5'端分别标记 FAM 或 HEX 荧光基团, 引物修饰和合成由上海捷瑞生物工程有限公司完成。在三引物 PCR 扩增体系条件下(Schuelke, 2000), 采用梯度 PCR (52—62 $^{\circ}$ C)重新摸索每对荧光修饰引物的最适退火温度, 再用 32 个黑棘鲷基因组 DNA 进行微卫星标记多态性的 PCR 扩增。PCR 反应总体体系为 20 μ L, 三引物 PCR 反应的试剂配比和扩增反应程序参照张浩冉等(2018)的研究报道, 各对引物的 PCR 反应退火温度见表 1。扩增产物经凝胶电泳和染色后, 选择扩增特异性强、产量高的 PCR 产物送至武汉天一辉远生物科技有限公司进行微卫星等位基因的分型检测。

1.5 微卫星标记通用性检测

采用黄鳍棘鲷(*Acanthopagrus latus*)($n=6$, 湛江近岸)、太平洋棘鲷(*Acanthopagrus pacificus*)($n=4$, 湛江近岸)、澳洲棘鲷(*Acanthopagrus australis*)($n=2$, 湛江近岸)、台湾棘鲷(*Acanthopagrus taiwanensis*)($n=1$, 台湾近岸)、平鲷(*Rhabdosargus sarba*)($n=6$)、蓝点赤鲷(*Pagrus caeruleostictus*)($n=2$, 北海近岸)、真赤鲷(*Pagrus major*)($n=6$, 湛江近岸)、二长棘犁齿鲷(*Eymnis cardinalis*)($n=7$, 湛江近岸)和黄牙鲷(*Dentex hypselosomus*)($n=5$, 湛江近岸)等 9 种鲷科鱼类进行黑棘鲷微卫星标记的跨物种扩增, 以检测开发的微卫星标记在其近缘种中的通用性。微卫星标记跨物种的 PCR 扩增体系、反应程序及电泳条件同 1.4。扩增结果出现 1 条或 1 条以上的特异性等位基因条带的微卫星标记即为具有通用性位点。

1.6 数据分析

各位点的遗传多样性参数, 如等位基因数(N_a)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、多态信息含量(PIC)等由 Cervus 3.0.7 软件计算(Kalinowski *et al.*, 2007)。采用 GenePop 4.3 检测各位点的哈迪-温伯格平衡以

及位点间的连锁不平衡现象(Rousset, 2008)。各位点的无效等位基因频率(Fua)(Brookfield-1 算法)和近交系数(Fis)分别由 MicroChecker v.2.2.3 和 FSTAT 2.9.3 软件分析(Goudet, 2001; Van Oosterhout *et al.*, 2004)。

2 结果与分析

经 SLAF-seq 简化基因组深度水平测序后, 获得黑棘鲷基因组 DNA 3.47 M reads 读长, 平均 GC 含量为 41.24%, 其中大部分的碱基(75.4%)能满足测序质量要求(测序质量值 $Q \geq 30$)。测序数据过滤后, 获得 137358 个 SLAF 标签, 标签长度选择范围为 415—514bp, 平均测序深度为 11.38 $\times$ 。采用微卫星识别软件 MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html>)对所得序列进行微卫星位点筛选, 共识别出 38797 个微卫星位点。其中单碱基重复(Mono-nucleotide)有 16308 个(占总位点的 42.03%, 下同), 二碱基重复(Di-nucleotide)有 16901 个(43.56%), 三碱基重复(Tri-nucleotide)和四碱基重复(Tetra-nucleotide)分别有 3526 个(9.08%)和 1717 个(4.42%), 五碱基重复(Penta-nucleotide)和六碱基重复(Hexa-nucleotide)分别仅有 303 个(0.78%)和 42 个(0.11%)。

在随机挑选的 157 个二至六碱基重复微卫星位点中, 经 4 个黑棘鲷基因组 DNA 的 PCR 扩增检测, 筛选出 57 个(36.3%)位点具有多态性。这些多态性引物经 5'端添加 M13 尾巴修饰后, 有 49 个位点在随后的 PCR 反应中能稳定扩增出清晰的等位基因条带, 包括 13 个二碱基、12 个三碱基、6 个四碱基、9 个五碱基和 9 个六碱基重复位点, 其引物序列信息已上传至 GenBank, 登录号为 MG892346—MG892394。

49 个微卫星位点在 32 个黑棘鲷基因组 DNA 中共扩增出 407 个等位基因, N_a 在 2 (AS-5)和 20 (AS-4)之间, 平均值为 8.3(表 1)。 H_o 在 0.097 (AS4-2)和 0.938 (AS3-12)之间, H_e 在 0.122 (AS2-10)和 0.922 (AS4-3)之间, 平均值分别为 0.663 和 0.701。PIC 分析显示, 49 个位点的 PIC 平均值为 0.6545, 除 AS2-10、AS3-5、AS3-9、AS3-10、AS4-2、AS4-4、AS5-5、AS5-10、AS6-5 等 9 个位点的 PIC 值小于 0.5 外, 其余 40 个位点的 PIC 值均大于 0.5, 显示出较高的多态性。经 Bonferroni 校正后(校正 $P < 0.0011$), 有 47 个位点均符合哈迪-温伯格平衡, 且各位点间未检测到连锁不平衡现象, 仅 2 个位点(AS4-3, AS4-6)偏离哈迪-温伯格平衡。

表 1 黑棘鲷 49 个多态性微卫星标记
Tab.1 The 49 polymorphic microsatellite loci of *A. schlegelii*

位点	登录号	引物序列(5'—3')	重复单元	T_a (°C)	Size (bp)	N_a	H_o	H_e	PIC	Fis	Fua
AS2-1	MG892346	F:FAM-TTGGTATGTCTGGTGC GTGT R:GCGGGTGAGAGGTTAAATGA	(GT)9	62	249-283	11	0.781	0.708	0.663	-0.105	-0.050
AS2-2	MG892347	F:HEX-ATATCAGCAGCACAAAAGCCC R:TGGATGACCTCTTCACACCA	(AC)8	62	284-310	12	0.844	0.910	0.886	0.074	0.027
AS2-3	MG892348	F:FAM-TCCTTTTCAGCTTCACCTGCT R:AATTATGGGCTGTTCCTGCT	(CA)10	58	217-237	10	0.813	0.868	0.839	0.065	0.023
AS2-4	MG892349	F:HEX-TTAAACCCCAACTGCTCCTGT R:TCATGCCCTGATGCTTTTCAG	(CA)18	58	245-317	20	0.906	0.918	0.897	0.013	-0.002
AS2-5	MG892350	F:FAM-CGGTGTGTGTGTTTTTTGTCC R:ATGAGCCATCCATCTTCAGG	(AC)14	58	254-310	17	0.875	0.874	0.849	-0.002	-0.008
AS2-6	MG892351	F:HEX-CCACATAAAGCCATGCACAC R:TTCTCTGTGGGACTGAAGCA	(AC)11	56	184-245	13	0.767	0.821	0.786	0.067	0.022
AS2-7	MG892352	F:FAM-ATTGTGCTTCCACAAACCAAT R:TCCAACCAATAATGACAGCCA	(AC)12	62	219-245	12	0.625	0.734	0.691	0.151	0.057
AS2-8	MG892353	F:HEX-GGCGTTCTTGAGACAAAACC R:GATGGAGTGGTCGGTCAGTT	(AC)8	63	213-223	6	0.656	0.750	0.696	0.127	0.048
AS2-9	MG892354	F:FAM-CACACACAGAACACAGTGCAT R:TACCCCAAGCTTTAATGGTCC	(GT)9	62	281-293	6	0.656	0.683	0.630	0.04	0.010
AS2-10	MG892355	F:HEX-GCTTTGCTTTCCCTCCTTCT R:AAACACCAAGCAAGGATTGG	(TG)8	62	162-218	5	0.125	0.122	0.118	-0.025	-0.004
AS2-11	MG892356	F:FAM-TTCATTTCCGCACAAATTCA R:ACAGGATGGTGCTTTCATC	(TG)8	62	271-281	6	0.750	0.820	0.779	0.087	0.032
AS2-12	MG892357	F:HEX-TGGACACCATCAACATCCTG R:AGACAIGCTGCCACAAACTG	(AC)23	66	245-275	13	0.677	0.871	0.843	0.225	0.097
AS2-13	MG892358	F:FAM-ATGACCCCAACATTCCAAA R:TTTTCATTTACAAAGCGAG	(AC)9	62	293-307	8	0.897	0.792	0.748	-0.135	-0.067
AS3-1	MG892359	F:FAM-AGCAGGAATGATGGAAGTGG R:ACGTTGTTTCAGGATGCACA	(GAT)11	63	265-295	10	0.844	0.881	0.853	0.043	0.013
AS3-2	MG892360	F:HEX-AGAGAGAGCGAGGCAGAGTG R:TTACCTCCAGGCTGTTTGCT	(AGA)8	58	174-195	8	0.594	0.771	0.730	0.233	0.094
AS3-3	MG892361	F:FAM-TCCGTCCCTGTTTTGTCTTC R:GCCACACAAACACTGAA	(CTT)18	62	152-209	15	0.875	0.877	0.850	0.002	-0.006
AS3-5	MG892362	F:FAM-ACAGGACAGGACGCGTGAC R:TGTGTTATGCAAGACGCTCC	(GAG)7	62	127-133	2	0.469	0.503	0.373	0.070	0.018

续表

位点	登录号	引物序列(5'-3')	重复单元	T_a (°C)	Size (bp)	N_a	H_o	H_e	PI-C	Fis	Fua
AS3-6	MG892363	F: HEX-ATTTCGCGATGTTTCAAGGG R: TCAGCAATATGTTTGCAGGC	(TTG)8	62	153-189	12	0.750	0.737	0.706	-0.018	-0.014
AS3-7	MG892364	F: FAM-GGTGCAGGTGTGAAGACTGA R: TTCACGTGGATGTCACGTGTC	(TCA)8	60	230-248	6	0.813	0.754	0.707	-0.078	-0.040
AS3-9	MG892365	F: FAM-TGCTGTTTAGGCTTAATGTGTT R: CCGAACTTCTGAGCATAGCC	(ACA)9	56	279-288	4	0.414	0.533	0.419	0.227	0.072
AS3-10	MG892366	F: HEX-TTTCACAGATCATCTCAGCCC R: GCCGTAAACAACACAGACCT	(TCC)8	56	179-194	4	0.688	0.513	0.449	-0.346	-0.121
AS3-11	MG892367	F: FAM-TGCTGGAAGAGAGCCAAAGTT R: TATCCTGACTCCCTGGTTGC	(TCC)8	62	170-197	8	0.875	0.781	0.738	-0.122	-0.060
AS3-12	MG892368	F: HEX-CACACAAATCCTCACTGCTGC R: CTGCTGCCACTTCTCATCA	(TCC)7	62	138-153	5	0.938	0.671	0.599	-0.406	-0.167
AS3-14	MG892369	F: HEX-TGAACATATTGTGGCAGTGGA R: TTCAGGCTCTGCAGTTCTCA	(AAT)8	62	233-263	9	0.656	0.627	0.595	-0.047	-0.024
AS3-15	MG892370	F: FAM-CCAAGCCTCCAGCATAGAAAG R: GTGCAAAAGCCTGGGACTAAG	(AGA)12	62	266-287	7	0.688	0.761	0.712	0.098	0.035
AS4-2	MG892371	F: FAM-AAGGCATGAGATCACAAGGG R: TGTGTTGGTGCCATACAAC	(AAAT)5	60	235-247	3	0.097	0.154	0.146	0.375	0.047
AS4-3*	MG892372	F: HEX-TGACTGCAAAATCTGGCTACG R: AGAACCCAGATGAGTGGGTGG	(TCTA)22	60	135-363	16	0.519	0.922	0.897	0.442	0.203
AS4-4	MG892373	F: FAM-AAACAGTCTGGAGGTGGCAG R: GCACCGAACAAAGGAGAAC	(GAA)5	60	244-264	5	0.469	0.509	0.416	0.080	0.022
AS4-5	MG892374	F: HEX-GCATTTTGGAGGAGCAAGAG R: TTCACCTCACTGACTGGCTGG	(AGAT)10	60	257-293	10	0.656	0.878	0.850	0.256	0.112
AS4-6*	MG892375	F: FAM-CCTGCTGTGTGATGACCTA R: GTCATAATGATGTTGCCATGC	(TCTA)15	58	261-337	14	0.500	0.910	0.887	0.454	0.209
AS4-7	MG892376	F: HEX-CCAAGAGATCAAGGCAGTGG R: AAGCGCTCATATCCAGCAAT	(TTCT)9	60	285-353	15	0.844	0.871	0.842	0.031	0.007
AS5-2	MG892377	F: FAM-TGAAAAACAGACAATGGCGAA R: GCAATGTCCCGCTATTTGT	(AACAT)7	58	187-302	12	0.750	0.832	0.801	0.103	0.038
AS5-4	MG892378	F: FAM-ATGGCATTCATAGCTTTGGC R: GAATTAGCCGACTGCTCACC	(TCTAT)6	62	169-194	4	0.625	0.656	0.573	0.048	0.013
AS5-5	MG892379	F: HEX-GCTTTCTTATCCTGCCACA R: CTCTGGCTCTATGTGCCCTC	(TCTCC)5	58	208-253	7	0.207	0.315	0.301	0.346	0.078

续表

位点	登录号	引物序列(5'—3')	重复单元	T_a (°C)	Size (bp)	N_a	H_o	H_e	PIC	Fis	Fua
AS5-7	MG892380	F:HEX-CCACAATAGTCTGCCGGATT R:ACCCAACTGGCTGTCAAAAG	(GATAT)5	62	237-252	4	0.781	0.711	0.645	-0.101	-0.048
AS5-8	MG892381	F:FAM-CATCCACACTTCAAAGAATGACA R:CGAGCTTAACCTTGCAATGA	(TAGAA)9	62	182-282	6	0.719	0.757	0.706	0.051	0.015
AS5-9	MG892382	F:HEX-GGAGCTCGATTGGGTAACAA R:CCGCAGTGTGATGAAGAGAA	(GTGTT)6	58	183-203	5	0.719	0.709	0.644	-0.014	-0.012
AS5-10	MG892383	F:FAM-TGGATCTGTGAATCCCACTG R:CACCTCACAGATAGTGGCA	(TTGTT)5	60	158-178	4	0.250	0.284	0.267	0.121	0.023
AS5-11	MG892384	F:HEX-CGGATCCCTTGCACACTTTA R:AATGCAGGTTTGGAGGAGA	(AGTAT)11	62	250-290	6	0.563	0.598	0.520	0.060	0.016
AS5-12	MG892385	F:FAM-ACGTTTGAICTGATTGTGGCA R:TTTCCCTGTTGTGGAATGAA	(TTAGA)9	58	129-159	6	0.516	0.619	0.546	0.169	0.058
AS6-1	MG892386	F:HEX-CTGTGCACAATGTCGGTCAGG R:AAGCCAGAGAGAGGATGCTG	(AGAAGG)9	62	243-291	9	0.813	0.835	0.799	0.028	0.005
AS6-2	MG892387	F:FAM-TCACAACCTCTCCCGTCTCT R:TCTGAAGCTTCGCTGAACAA	(TCTGGT)6	58	214-256	8	0.800	0.766	0.715	-0.046	-0.027
AS6-3	MG892388	F:HEX-TTGTGGTTTAGTGGAAATATAAGGA R:CTAGGAAGTGAGCCGTCCTG	(CAAGTA)5	62	232-280	8	0.806	0.750	0.704	-0.076	-0.039
AS6-4	MG892389	F:FAM-TCTTGAACAGTGGTGTTCGG R:CACCAAGTCTGCCAGTGTGT	(CCTGGT)5	62	175-199	5	0.531	0.645	0.579	0.179	0.064
AS6-5	MG892390	F:HEX-GACCTGACCCCAAGATAAGCA R:GCAACAGATGGGTATCCAC	(AGGGTT)5	58	230-260	4	0.548	0.535	0.477	-0.026	-0.015
AS6-6	MG892391	F:FAM-TCAGAGTGTCTCGTGTGTGCC R:TCTTGGCTTTTCTGCTGATT	(CGATGG)5	62	270-306	7	0.742	0.720	0.665	-0.031	-0.020
AS6-7	MG892392	F:HEX-AGGTTTGTCTCAAAGTGGCAG R:GACCTTCAGAAAGAGGTCTCTGG	(CAGGAC)6	64	256-316	10	0.833	0.749	0.698	-0.115	-0.056
AS6-8	MG892393	F:FAM-TAAAGCGCTATCCCGTATG R:ACGTTTGTGGGCACGTT	(AGGAGA)5	62	227-245	4	0.656	0.664	0.581	0.011	-0.002
AS6-9	MG892394	F:HEX-TGCCAATGTCTGTGTCATCCT R:GGTAACTCAGACCGCCAAAG	(AGTCAG)5	62	177-213	6	0.594	0.691	0.642	0.143	0.051

注: T_a : 退火温度; Size: 等位基因大小范围; N_a : 等位基因数; H_o : 观测杂合度; H_e : 期望杂合度; Fis: 近交系数; Fua: 无效等位基因频率; PIC: 多态信息含量; *表示位点经 Bonferroni 校正后显著偏离哈迪-温伯格平衡($\alpha=0.05$, $P<0.001$)

表 2 43 个黑棘鲷微卫星标记在 9 种鲷科鱼类中的跨物种扩增
Tab.2 Cross-species amplifications of the 43 *A. schlegelii* microsatellite markers in nine sparid species

位点	黄鳍棘鲷 (n=6)	澳洲棘鲷 (n=2)	太平洋棘鲷 (n=4)	台湾棘 鲷(n=1)	平鲷 (n=6)	蓝点赤鲷 (n=2)	真赤鲷 (n=6)	二长棘犁 齿鲷(n=7)	黄牙鲷 (n=5)
AS2-1	+(9)	+(4)	+(7)	-	-	-	-	-	-
AS2-2	+(10)	+(2)	+(6)	-	-	-	-	-	-
AS2-3	+(12)	+(4)	+(8)	-	-	-	-	-	-
AS2-4	-	+(2)	+(7)	-	+(8)	+(2)	+(6)	-	-
AS2-9	+(7)	+(3)	+(5)	-	-	-	-	-	-
AS2-10	+(6)	+(2)	+(1)	-	-	-	-	-	-
AS2-11	+(7)	-	+(7)	-	+(5)	-	-	-	-
AS2-12	+(10)	+(2)	-	-	-	-	-	-	-
AS2-13	+(8)	+(2)	+(4)	-	-	-	-	-	-
AS3-1	+(6)	+(3)	+(4)	-	-	-	-	-	-
AS3-2	+(9)	+(3)	+(4)	-	-	-	-	-	+(7)
AS3-3	-	+(3)	-	-	+(9)	-	-	-	-
AS3-5	+(6)	+(2)	+(5)	-	+(7)	+(2)	+(10)	+(7)	+(7)
AS3-6	+(9)	+(2)	+(4)	-	+(9)	-	-	-	-
AS3-7	+(9)	+(4)	-	-	-	+(4)	+(6)	+(14)	+(10)
AS3-8	-	-	+(3)	-	+(3)	+(5)	+(5)	+(3)	-
AS3-9	+(10)	+(2)	-	-	-	-	-	-	-
AS3-10	+(8)	+(2)	+(4)	-	+(6)	-	-	-	-
AS3-11	+(11)	+(2)	+(7)	-	+(6)	+(2)	-	+(7)	+(5)
AS3-12	+(12)	+(4)	+(8)	-	+(12)	+(4)	+(12)	+(12)	+(10)
AS3-14	+(7)	+(2)	+(5)	-	-	-	-	-	-
AS3-15	+(7)	+(2)	+(6)	-	-	-	-	-	-
AS4-2	+(11)	+(4)	+(8)	-	-	-	-	-	-
AS4-3	+(9)	+(3)	-	-	-	-	-	-	-
AS4-4	+(6)	+(4)	+(8)	-	+(11)	-	-	-	-
AS4-5	+(6)	+(2)	+(4)	-	+(4)	-	+(6)	-	-
AS4-6	+(6)	+(4)	-	-	-	-	-	-	-
AS4-7	+(6)	+(3)	+(5)	-	+(6)	-	-	-	-
AS5-2	+(7)	+(2)	+(7)	-	+(6)	+(5)	-	+(6)	+(4)
AS5-4	+(11)	+(2)	-	-	-	-	-	-	-
AS5-5	+(6)	+(2)	+(4)	-	-	-	-	-	-
AS5-7	+(6)	+(3)	+(5)	-	+(6)	-	-	-	-
AS5-8	+(10)	+(2)	+(6)	-	-	-	-	-	-
AS5-9	+(4)	+(2)	+(4)	-	-	-	-	-	-
AS5-10	+(6)	+(2)	-	-	-	-	-	-	-
AS5-12	+(12)	+(4)	+(2)	-	-	-	-	-	-
AS6-1	+(3)	+(2)	-	-	-	-	-	-	-
AS6-2	+(6)	+(2)	+(8)	-	-	-	-	-	-
AS6-4	+(9)	+(4)	+(7)	-	-	-	-	-	-
AS6-5	-	-	+(4)	-	-	-	-	-	-
AS6-6	+(8)	+(3)	-	-	-	-	-	-	-
AS6-7	+(12)	-	+(4)	-	-	-	-	-	-
AS6-8	+(6)	+(3)	+(4)	-	-	-	-	-	-
AL%	90%	90%	76.7%	0%	32.6%	16.2%	13.9%	13.9%	13.9%

注: n: 样品数; +: 可扩增, -: 不可扩增; AL%: 可扩增率; 括号内代表等位基因数

跨物种扩增结果表明,有 43 个黑棘鲷微卫星标记可在 1 种或 1 种以上鲷科鱼类中有效扩增(表 2)。其中 AS3-5 和 AS3-12 可在 8 种鲷科鱼类中扩增,AS3-11 和 AS5-2 可在 7 种鲷科鱼类中扩增,AS3-7 可在 6 种鲷科鱼类中扩增,AS2-4、AS3-8、AS4-5 等 3 个位点可在 5 个物种中扩增,AS3-2、AS3-6、AS3-10、AS4-4、AS4-7、AS5-7 等 6 个位点可在 4 个物种中扩增,AS2-1、AS2-2、AS2-3、AS2-9、AS2-10、AS2-11、AS2-13、AS3-1、AS3-14、AS3-15、AS4-2、AS5-5、AS5-8、AS5-9、AS5-12、AS6-2、AS6-4、AS6-8 等 18 个位点在 3 个物种中扩增,AS2-12、AS3-3、AS3-9、AS4-3、AS4-6、AS5-4、AS5-10、AS6-1、AS6-6、AS6-7 等 10 个位点在 2 个物种中扩增,AS6-5 位点仅在 1 个物种中扩增。

在跨物种扩增成功率方面,43 个黑棘鲷微卫星标记在黄鳍棘鲷、澳洲棘鲷、太平洋棘鲷等 3 种棘鲷属鱼类中有较高的扩增成功率,分别为 90% (39 个位点)、90% (39 个位点)和 67.7% (33 个位点);在平鲷中的扩增成功率次之,为 32.6% (14 个位点);而在蓝点赤鲷、真赤鲷、二长棘犁齿鲷和黄牙鲷的扩增成功率相对较低,仅有 13.9% (6 个位点)至 16.2% (7 个位点)。值得一提的是,49 个标记在台湾棘鲷中的跨物种扩增均失败。在标记通用性方面,有 28 个黑棘鲷微卫星标记(AS2-1, AS2-2, AS2-3, AS2-9, AS2-10, AS2-13, AS3-1, AS3-2, AS3-5, AS3-6, AS3-10, AS3-11, AS3-12, AS3-14, AS3-15, AS3-4, AS4-4, AS4-5, AS4-7, AS5-2, AS5-5, AS5-7, AS5-8, AS5-9, AS5-12, AS6-2, AS6-4, AS6-8)可在黄鳍棘鲷、澳洲棘鲷、太平洋棘鲷中成功扩增,而只有 2 个标记(AS3-5 和 AS3-12)可在平鲷、蓝点赤鲷、真赤鲷、二长棘犁齿鲷及黄牙鲷中成功扩增。

3 讨论

3.1 SLAF-seq 技术在黑棘鲷微卫星标记开发中的可行性

Jeong 等(2003, 2007)通过构建基因组酶切片文库用探针从文库中筛选出微卫星位点,两次仅开发 8 个二碱基重复的黑棘鲷微卫星标记;Yang 等(2015)采用 FIASCO 法筛选出 42 个黑棘鲷的二碱基重复微卫星序列,并开发出 13 个标记;罗新惠(2010)、徐亘博(2010)、Mao 等(2016)也基于 FIASCO 法分别从黑棘鲷微卫星富集文库中随机筛选出 101 个、60 个、71 个微卫星序列,而后分别开发出 30 个、22 个、8 个二、三碱基重复的微卫星标记。本研究采用 SLAF-seq

技术识别出 22489 个二至六碱基重复的黑棘鲷微卫星位点,其中短重复序列(二、三碱基)有 20427 个,占总微卫星序列的 90.8%;而长重复序列(四至六碱基)虽在比例上不占优势(9.2%),但在数量上仍较可观,有 2062 个。可见,本研究所获得的微卫星序列不但数量庞大,而且类型丰富,可为黑棘鲷的微卫星标记开发提供充足的遗传物质来源和较多的选择余地,位点筛选效率较之传统方法筛选微卫星序列提高了成百上千倍。在随机挑选的 157 个位点中最终成功开发出 49 个多态性的黑棘鲷微卫星标记,包括 5 种不同碱基重复的位点,一次性所开发的标记数量和类型也较之以往的开发方法更加丰富和多样化,开发效率高且操作简便。

本研究基于 SLAF-seq 技术获得的 24 个黑棘鲷四至六碱基微卫星标记完全不同于已开发的 81 个二、三碱基重复微卫星标记(Jeong *et al.*, 2003, 2007; 罗新惠, 2010; 徐亘博, 2010; Yang *et al.*, 2015; Mao *et al.*, 2016)。在 PCR 过程中,这些长重复序列的微卫星新标记被认为比短重复序列标记更加稳定,出现因影子带而干扰基因分型检测的概率更低(Restrepo *et al.*, 2015)。长重复序列的微卫星位点被认为是更加精确、可靠的一类微卫星分子标记(Wu *et al.*, 2016)。本研究的这些长重复序列的微卫星标记可为黑棘鲷相关遗传资源研究提供新的、高分辨力的分子标记和有力分析工具。此外,SLAF-seq 技术还提供了传统开发方法难以获取的微卫星基因组序列特征,而这些微卫星基因组序列信息可为更有效地筛选微卫星目标序列和高多态性标记以及引物设计提供数据基础(吕振明等, 2017),为开发不同类型的微卫星标记提供了遗传物质来源保障。

3.2 黑棘鲷微卫星标记的多态性和哈迪-温伯格平衡偏离

本研究的 49 个微卫星位点在黑棘鲷群体中共检测到 407 个等位基因,位点的平均 N_a 为 8.3, 低于 Jeong 等(2003, 2007)和 Yang 等(2015)所报道的黑棘鲷二碱基重复微卫星位点的平均 N_a (分别为 10.0—13.5 和 10.15)。这可能与本研究含有较多的三至六碱基重复位点(36 个, 占总位点的 69.7%)有关,因为二碱基重复位点通常比多碱基重复位点具有更高的遗传变异(Castoe *et al.*, 2012)。然而,本研究的平均 N_a 明显高于罗新惠(2010)和 Mao 等(2016)所报道的黑棘鲷二、三碱基重复位点的平均 N_a (分别为 5.43 和 3.625)。根据 Botstein 等(1980)提出的以多态信息含量 PIC 来衡

量基因变异程度的高低, 即分为高度($PIC > 0.5$)、中度($0.25 < PIC < 0.5$)、低度($PIC < 0.25$)多态性基因位点。在本研究的 49 个微卫星标记中, 除 9 个标记的 PIC 值小于 0.5 外, 其余 40 个标记的 PIC 值均大于 0.5。上述结果表明, 本研究的大部分微卫星位点具有高多态性, 所蕴含的遗传信息含量较为丰富, 在黑棘鲷种群遗传资源研究中具有较高的应用价值, 能够为黑棘鲷的遗传多样性评估与遗传结构分析提供有力的技术支持。

基因杂合度又称基因多样性, 是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, 是衡量群体遗传变异的一个最适参数(Nei, 1978)。本研究的群体 H_o 为 0.097—0.938(平均值为 0.663), 低于 Jeong 等(2007)与 Yang 等(2015)分析的黑棘鲷群体平均 H_o (分别为 0.844—0.854 和 0.786), 但高于罗新惠(2010)和 Mao 等(2016)报道的黑棘鲷群体平均 H_o (分别为 0.549 和 0.629)以及 DeWoody 等(2000)统计 32 种鱼类微卫星标记的平均 H_o (0.63), 表明所分析的黑棘鲷群体仍处于较高的遗传变异水平, 这可能与其是野生群体有关。研究表明, 养殖群体常因奠基者效应(Founder effects)、随机遗传漂变(Random genetic drift)、人工选育(Artificial breeding)和自然选择(Natural selection)等相互作用导致其遗传多样性下降(Mjølnerød *et al.*, 1997; Norris *et al.*, 1999), 这在斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)和大黄鱼(*Larimichthys crocea*)的养殖群体中表现尤为明显(Wang *et al.*, 2011, 2012)。在南海北部, 黑棘鲷种群长期遭受高强度的捕捞压力, 其资源急剧衰减(赵爽等, 2010; 施晓峰等, 2015)。然而, 所检测的黑棘鲷群体遗传多样性仍较为丰富, 意味着该群体具有较强的进化潜力和适应环境变化的能力(Koljonen *et al.*, 2002; 蒙子宁等, 2003), 也提示该群体适用于补充黑棘鲷的繁育群体, 可为其人工选育提供所需的遗传变异(Wang *et al.*, 2012)。

哈迪-温伯格遗传平衡(HWE)是指在理想状态下, 各等位基因的频率和基因型频率在代际遗传中是稳定不变的, 即保持着基因平衡状态。HWE 检测是群体内基因频率和基因型频率是否保持平衡的重要检验标准(Schaid *et al.*, 2006)。本研究显示, 经 Bonferroni 校正后有 2 个位点(AS4-3 和 AS4-6)显著偏离 HWE, 显示出杂合子缺失现象。诸多因素如无效等位基因(Null alleles)、华伦德效应(Wahlund effect)、近亲杂交(Inbreeding)、人为干扰(Human disturbance)、

自然选择(Natural selection)和种群退化(Population degradation)等皆有可能引起微卫星位点偏离 HWE (Pemberton *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2002)。本研究的 AS4-3 和 AS4-6 位点均显示出较高的近交系数(分别为 0.442 和 0.454)和无效等位基因频率(分别为 0.203 和 0.209), 提示群体中存在的近交和无效等位基因频率是导致这两个位点偏离 HWE 的主要原因。由于本研究样品来自同一采样时间的同一海域, 可排除华伦德效应(样品中存在亚群体)导致检测群体偏离 HWE。此外, 多年来的过度捕捞和近海环境变化无疑对黑棘鲷的资源衰退及种群生物学退化产生了显著的影响(赵爽等, 2010; 许思思, 2011), 同时近年来的大量增殖放流活动亦加大了不同地区、不同种群的黑棘鲷个体基因交流, 对黑棘鲷种群遗传特性的影响也不容忽视(施晓峰等, 2015)。因此, 还难以排除自然选择和种群退化这两个因素可能造成 AS4-3 和 AS4-6 位点偏离 HWE。

Chapuis 等(2007)提出根据无效等位基因频率可将微卫星标记划分为三类: 低频($Fua < 0.05$)、中频($0.05 \leq Fua < 0.2$)及高频($Fua \geq 0.2$)无效等位基因的标记。本研究的 49 个微卫星位点出现的无效等位基因频率为 -0.167—0.209。其中, 低频率无效等位基因共有 20 个位点(占总位点的 40.8%, 下同; $Fua < 0.05$), 这 20 个位点亦显示出高度多态性($PIC > 0.5$), 除 AS2-10 外, 其余 19 个位点的观测杂合度也相对较高(0.449—0.897), 表明这类具有高多态性、高杂合度、低频无效等位基因的微卫星位点可作为黑棘鲷遗传资源研究的可靠分子标记和优先选用标记。中频无效等位基因共有 27 个位点(55%, $0.05 \leq Fua < 0.2$), 该类型位点可能会造成群体遗传多样降低并导致群体间遗传距离和遗传分化指数过高(Chapuis *et al.*, 2007), 因此, 这 27 个位点在后续的黑棘鲷群体遗传分析运用中需持谨慎态度。第三种类型为高频无效等位基因的位点, 包括 AS4-3 和 AS4-6 ($Fua \geq 0.2$), 且这两个位点显著偏离 HWE, 表明这两个位点不适用于黑棘鲷后续的遗传学研究。

3.3 黑棘鲷微卫星标记在鲷科鱼类中的通用性

Primmer 等(1996)提出微卫星 DNA 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, 二者呈负相关性。即微卫星标记跨物种扩增成功率随物种间的遗传距离增加而降低(Carreras-Carbonell *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016)。中国鲷科鱼类线粒体 COI 基因序列的系统进化研究表明, 棘

鲷属先与平鲷属(*Rhabdosargus*)聚为一支(银灰体色种类),而赤鲷属(*Pagrus*)、犁齿鲷属(*Evynnis*)、四长棘鲷属(*Argyrops*)及牙鲷属(*Dentex*)聚为另一支(红体色种类)(陈咏霞等, 2015)。在本研究中, 黑棘鲷微卫星标记在同属的黄鳍棘鲷、澳洲棘鲷和太平洋棘鲷中的跨物种扩增成功率较高(76.7%—90.0%), 在平鲷中次之(32.6%), 而在蓝点赤鲷、真赤鲷、二长棘犁齿鲷及黄牙鲷中的成功率较低(13.9%—16.2%)。本研究的微卫星标记跨物种扩增结果与线粒体 COI 基因序列分析结果相一致, 进一步证实了 Primmer 等(1996)的研究观点, 从核基因角度支持了中国鲷科鱼类可按体色分为两类群的系统进化研究结论(陈咏霞等, 2015)。

蓝点赤鲷是最近报道的一个中国鱼类新纪录, 目前仅见于北部湾北部海域(Chen *et al.*, 2015); 澳洲棘鲷原记录仅分布于澳大利亚东岸, 20 世纪九十年后才报道该物种在台湾和琉球群岛近岸有少量分布(沈世杰, 1993); 台湾棘鲷是仅分布在台湾南部海域的一个鲷科鱼类新种(Iwatsuki *et al.*, 2006)。由于这三个物种的分布范围比较局限, 且分类鉴定存在困难, 导致本研究所能获取的这三个物种的个体数均少于微卫星标记跨物种扩增每个物种个体数需 ≥ 3 的要求。虽然, 本研究的澳洲棘鲷和蓝点赤鲷的个体数较少(均为 2 个), 但其基因组 DNA 均可稳定扩增出目的条带, 同时本研究的跨物种扩增并未涉及微卫星标记的遗传多样性参数的估算。因此, 这两个物种有限个体的跨物种扩增结果的统计学争议或是误差并不突出, 其实验结果较为可信。值得提出的是, 开发标记在台湾棘鲷中未能检测出具有通用性的微卫星位点, 这很可能是因为本研究的台湾棘鲷仅有 1 个个体的基因组 DNA 质量不佳, 难以扩增出清晰的微卫星条带所致的。此外, 本研究有 28 个微卫星标记在棘鲷属(除台湾棘鲷)中具有较好的通用性, 可适用于该属鱼类的分子系统进化和种群遗传学研究。但只有 3 个标记可在蓝点赤鲷、真赤鲷、二长棘犁齿鲷及黄牙鲷中有效扩增, 还难以为这些物种提供数量充足且具有丰富遗传信息的分子标记。因此, 今后有必要单独开发这些物种的特有微卫星标记。

4 结论

本研究基于 SLAF-seq 技术首次在黑棘鲷的基因组 DNA 中识别出数量庞大的微卫星位点, 并成功发出 49 个多态性较高的黑棘鲷微卫星标记, 包括 25

个短重复序列微卫星位点和 24 个全新的长重复序列微卫星位点, 其中 47 个符合 HWE 的位点可作为今后黑棘鲷种质资源评估和群体遗传分析的有效分子标记和新的分析工具。这种快速、高效的开发方法也为鲷科其他鱼类的微卫星标记开发提供了可靠参考和经验借鉴。同时, 28 个在棘鲷属中具有通用性的黑棘鲷微卫星标记亦可为该属鱼类的分子系统进化研究提供新的分子标记来源和分析角度。

参 考 文 献

- 万冬梅, 韩 梅, 李成安等, 2016. 基于高通量测序的沼泽山雀简化基因组微卫星位点的开发. 辽宁大学学报(自然科学版), 43(3): 252—257
- 吕振明, 侯 龙, 龚 理等, 2017. 基于 de novo 高通量测序的曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*)ESTs 中微卫星位点筛选与特征分析. 海洋与湖沼, 48(4): 877—883
- 刘 静, 吴仁协, 康 斌等, 2016. 北部湾鱼类图鉴. 北京: 科学出版社, 221
- 刘永新, 孙朝徽, 王玉芬等, 2015. 牙鲷家系亲权鉴定的微卫星 DNA 标记分析. 水产学报, 39(11): 1593—1603
- 许思思, 2011. 人为影响下渤海渔业资源的衰退机制. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士学位论文, 149
- 孙 波, 鲍毅新, 赵庆洋等, 2009. 微卫星位点获取方法的研究进展. 生态学杂志, 28(10): 2130—2137
- 李伟亚, 王伟继, 孔 杰等, 2012. 中国对虾微卫星四重 PCR 技术的建立及其在模拟放流效果评估方面的应用. 海洋学报, 34(5): 213—220
- 杨慧荣, 江世贵, 2006. 用 RAPD 技术探讨 5 种鲷科鱼类的亲缘关系. 水产学报, 30(4): 469—474
- 沈世杰, 1993. 台湾鱼类志. 台北, 中国: 国立台湾大学动物学系, 364
- 沈新强, 周永东, 2007. 长江口、杭州湾海域渔业资源增殖放流与效果评估. 渔业现代化, 34(4): 54—57
- 张浩冉, 梁镇邦, 吴仁协等, 2019. 利用 SLAF-seq 技术开发带鱼(*Trichiurus japonicus*)微卫星标记以及跨物种扩增检测. 基因组学与应用生物学, 38(2): 574—585
- 张浩冉, 梁镇邦, 吴仁协等, 2018. 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. 基因组学与应用生物学, 37(8): 3331—3338
- 陈咏霞, 吴仁协, 梁 娜等, 2015. 基于线粒体 COI 基因序列的中国鲷科鱼类系统进化关系. 海洋与湖沼, 46(3): 611—619
- 罗新惠, 2010. 黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)和半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)微卫星标记的开发. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 9—27
- 赵 爽, 章 群, 乐小亮等, 2010. 中国近海 5 个黑鲷地理群体的遗传变异. 海洋科学, 34(2): 75—79
- 施晓峰, 苏永全, 王文成等, 2015. 基于 mtDNA 控制区序列的 3 个黑棘鲷群体遗传结构特性研究. 热带海洋学报, 34(1): 56—63
- 徐巨博, 2010. 半滑舌鲷等九种海水鱼微卫星分子标记的开发和应用. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 21—36
- 郭宝英, 谢从新, 熊冬梅, 2007. 微卫星 DNA 标记技术及其在

- 鱼类中的应用. 水利渔业, 27(4): 5—9
- 曹 艳, 2016. 基于线粒体控制区序列的中国沿海 3 种鲷科鱼类遗传多样性分析. 广州: 暨南大学硕士学位论文
- 梁 君, 王伟定, 林桂装等, 2010. 浙江舟山人工生境水域日本黄姑鱼和黑鲷的增殖放流效果及评估. 中国水产科学, 17(5): 1075—1084
- 鲁双庆, 刘 臻, 肖调义, 2003. 微卫星标记在鱼类遗传育种研究中的应用. 水利渔业, 23(6): 9—11
- 蒙子宁, 庄志猛, 金显仕等, 2003. 黄海和东海小黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析. 生物多样性, 11(3): 197—203
- 翟 云, 吴仁协, 牛素芳等, 2018. 基于 SLAF-seq 技术开发蓝圆鲹微卫星标记及跨物种扩增检测. 应用海洋学学报, 37(3): 426—434
- Botstein D, White R L, Skolnick M *et al*, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 32(3): 314—331
- Carreras-Carbonell J, Macpherson E, Pascual M, 2008. Utility of pairwise mtDNA genetic distances for predicting crossspecies microsatellite amplification and polymorphism success in fishes. Conservation Genetics, 9(1): 181—190
- Castoe T A, Streicher J W, Meik J M *et al*, 2012. Thousands of microsatellite loci from the venomous coralsnake *Micrurus fulvius* and variability of select loci across populations and related species. Molecular Ecology Resources, 12(6): 1105—1113
- Chapuis M P, Estoup A, 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. Molecular Biology and Evolution, 24(3): 621—631
- Chen Y X, Liu J, Wu R X, 2015. A new record of blue-spotted seabream *Pagrus caeruleostictus* from Chinese coastal waters documented from morphology and DNA barcoding. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 33(2): 500—505
- DeWoody J A, Avise J C, 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. Journal of Fish Biology, 56(3): 461—473
- Gonzalez E B, Murakami T, Teshima Y *et al*, 2009. Paternity testing of wild black rockfish *Sebastes inermis* (brownish type) from the Seto Inland Sea of Japan. Ichthyological Research, 56(1): 87—91
- Goudet J, 2001. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (Version 2.9.3.2). <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. Accessed on 2018-05-14
- Grover A, Sharma P C, 2016. Development and use of molecular markers: past and present. Critical Reviews in Biotechnology, 36(2): 290—302
- Iwatsuki Y, Carpenter K, 2006. *Acanthopagrus taiwanensis*, a new sparid fish (Perciformes), with comparisons to *Acanthopagrus berda* (Forsskål, 1775) and other nominal species of *Acanthopagrus*. Zootaxa, 1202: 1—19
- Jeong D S, Gonzalez E B, Morishima K *et al*, 2007. Parentage assignment of stocked black sea bream *Acanthopagrus schlegelii* in Hiroshima Bay using microsatellite DNA markers. Fisheries Science, 73(4): 823—830
- Jeong D S, Umino T, Kuroda K *et al*, 2003. Genetic divergence and population structure of black sea bream *Acanthopagrus schlegelii* inferred from microsatellite analysis. Fisheries Science, 69(5): 896—902
- Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C, 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular Ecology, 16(5): 1099—1106
- Koljonen M L, Tähtinen J, Säisä M *et al*, 2002. Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by captive breeding programmes and the geographic distribution of microsatellite variation. Aquaculture, 212(1—4): 69—92
- Liu Y G, Liu L X, Wu Z X *et al*, 2007. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) by cross-species amplification with six species of the Sparidae family. Aquatic Living Resources, 20(3): 257—262
- Mao X Q, Li Z B, Yuan Y *et al*, 2016. Isolation and characterization of eight novel microsatellite markers in *Acanthopagrus schlegelii*. Genetics and Molecular Research, 15(2): gmr.15027902
- Mjølnerød I B, Refseth U H, Karlsen E *et al*, 1997. Genetic differences between two wild and one farmed population of Atlantic salmon (*Salmo salar*) revealed by three classes of genetic markers. Hereditas, 127(3): 239—248
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89(3): 583—590
- Niu S F, Zhai Y, Wu R X *et al*, 2018. Isolation and characterization of 49 polymorphic microsatellite loci for *Decapterus maruadsi* using SLAF-seq, and cross-amplification to related species. Journal of Oceanology and Limnology, online published at <https://doi.org/10.1007/s00343-019-7299-6>
- Norris A T, Bradley D G, Cunningham E P, 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. Aquaculture, 180(3—4): 247—264
- Pemberton J M, Slate J, Bancroft D R *et al*, 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. Molecular Ecology, 4(2): 249—252
- Primmer C R, Møller A P, Ellegren H, 1996. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. Molecular Ecology, 5(3): 365—378
- Restrepo A, Páez V P, Vásquez A *et al*, 2015. Rapid microsatellite marker development in the endangered neotropical freshwater turtle *Podocnemis lewyana* (Testudines: Podocnemididae) using 454 sequencing. Biochemical Systematics and Ecology, 59: 220—225
- Rousset F, 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources, 8(1): 103—106
- Sambrook J, Russell D W, 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor

- Laboratory Press
- Schaid D J, Batzler A J, Jenkins G D *et al*, 2006. Exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium and homogeneity of disequilibrium across strata. *American Journal of Human Genetics*, 79(6): 1071—1080
- Schuelke M, 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18(2): 233—234
- Sun X W, Liu D Y, Zhang X F *et al*, 2013. SLAF-seq: an efficient method of large-scale *De Novo* SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing. *PLoS One*, 8(3): e58700
- Van Oosterhout C, Hutchinson W F, Wills D P M *et al*, 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3): 535—538
- Wang B S, Wang W J, Xiao G X *et al*, 2016. 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. *Acta Oceanologica Sinica*, 35(8): 51—56
- Wang L, Meng Z N, Liu X C *et al*, 2011. Genetic diversity and differentiation of the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) between and within cultured stocks and wild populations inferred from microsatellite DNA analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(7): 4378—4394
- Wang L, Shi X F, Su Y Q *et al*, 2012. Loss of genetic diversity in the cultured stocks of the large yellow croaker, *Larimichthys crocea*, revealed by microsatellites. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5): 5584—5597
- Wu R X, Zhang H R, Niu S F *et al*, 2016. Development of polymorphic microsatellites for *Sillago sihama* based on next-generation sequencing and transferability to *Sillago japonica*. *Genetics and Molecular Research*, 15(4): gmr15049046
- Yang Y X, Cao X X, Feng R Y *et al*, 2015. Isolation and characterization of thirteen polymorphic microsatellite loci from black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*). *Journal of Genetics*, 94(S1): 97—99
- Yu H T, Lee Y J, Huang S W *et al*, 2002. Genetic analysis of the populations of Japanese anchovy (Engraulidae: *Engraulis japonicus*) using microsatellite DNA. *Marine Biotechnology*, 4(5): 471—479
- Zhang H R, Niu S F, Wu R X *et al*, 2016. Development and characterization of 26 polymorphic microsatellite markers in *Lateolabrax maculatus* and cross-species amplification for the phylogenetically related taxa. *Biochemical Systematics and Ecology*, 66: 326—330

DEVELOPMENT OF MICROSATELLITE MARKERS FOR *ACANTHOPAGRUS SCHLEGELII* BASED ON SLAF-SEQ TECHNOLOGY AND GENERALITY IN THE FAMILY SPARIDAE

WU Ren-Xie, XIAO Yao, NIU Su-Fang, ZHAI Yun, ZHANG Hao-Ran, CHEN Wei-Yong, LI Xiao
(College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract The black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*) (Perciformes: Sparidae) is a meso-demersal warm-water fish and widely distributed in the western Pacific coastal waters. It has become an important target species of mariculture in China. However, studies on the microsatellite markers of *A. schlegelii* are scarce. To make an accurate assessment of its current germplasm resources, based on specific-locus amplified fragment sequencing (SLAF-seq) technology, we identified 22 489 di- to hexanucleotide repeats microsatellites from the genomic DNA of *A. schlegelii*. The shorter repeats motifs (2—3 mers) accounted for 90.8%, while the longer repeat motifs (4—6 mers) for 9.2% of the total microsatellite sequences. Finally, 49 high polymorphic microsatellite markers were developed from 157 pairs of randomly synthesized primers, among which 25 are shorter repeats motifs loci and the other 24 are longer repeat motifs loci. The allele number per locus ranges from 2 to 20 (mean 8.3), and the observation and expected heterozygosity varies from 0.097 to 0.938 (mean 0.663), and 0.122 to 0.922 (mean 0.701), respectively. The polymorphism information content (PIC) ranges from 0.118 to 0.897 (mean 0.655). Only two microsatellite loci are deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) after the Bonferroni correction, while the other 47 loci are consistent with HWE and no linkage disequilibrium was detected among these 47 loci. The results show that most of the microsatellite markers are highly polymorphic, and contained abundant genetic information. These polymorphic microsatellite markers provide abundant and various effective molecular markers to assess the population genetic resources. In addition, as shown in cross-species amplification, 43 microsatellite markers could be successfully amplified in nine species of family Sparidae. Among them, 28 are transferable in *Acanthopagrus pacificus*, *Acanthopagrus latus*, and *Acanthopagrus australis*; 2 are transferable in *Rhabdosargus sarba*, *Pagrus caeruleostictus*, *Pagrus major*, *Evynnis cardinalis*, and *Dentex hypselosomus*. The transferable markers provide new analytical tools for elucidating phylogenetic relationships among species and genus of the family Sparidae, and for understanding the population genetic of *Acanthopagrus* species in the future.

Key words *Acanthopagrus schlegelii*; SLAF-seq technology; microsatellite markers; cross-species amplification