

黄鳍棘鲷微卫星标记开发及其在 鲷科鱼类中的跨物种扩增

吴仁协, 翟云, 肖瑶, 牛素芳, 张浩冉, 黎晓, 陈伟勇

(广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088)

摘要:采用基于高通量测序平台的 SLAF-seq 技术, 开发出 47 个高多态性的黄鳍棘鲷 (*Acanthopagrus latus*) 微卫星标记, 其中二碱基重复位点 17 个, 三至六碱基重复位点 30 个。各位点的等位基因数为 2~27 (均值为 10), 观测杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e) 分别为 0.156~0.938 (均值为 0.682) 和 0.177~0.963 (均值为 0.741), 多态信息含量 (PIC) 为 0.166~0.946 (均值为 0.705)。经 Bonferroni 校正后, 有 43 个位点符合哈迪-温伯格平衡 (HWE), 其余 4 个位点偏离 HWE。这些多态性微卫星标记为黄鳍棘鲷遗传资源研究提供新的有效分子标记。跨物种扩增结果显示, 共有 31 个黄鳍棘鲷微卫星标记可在 9 种鲷科鱼类中成功扩增。其中 17 个标记在太平洋棘鲷 (*Acanthopagrus pacificus*)、黑棘鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*) 和澳洲棘鲷 (*Acanthopagrus australis*) 中具有较好的通用性, 这些标记可为棘鲷属 (*Acanthopagrus*) 的系统进化和种群遗传学分析提供新的标记来源; 另有 3 个标记在二长棘梨齿鲷 (*Eyynnys cardinalis*)、真赤鲷 (*Pagrus major*)、蓝点赤鲷 (*Pagrus caeruleostictus*) 及黄牙鲷 (*Dentex hypselosomus*) 中具有通用性。

关键词:海洋生物学; 黄鳍棘鲷; 微卫星标记; SLAF-seq 技术; 跨物种扩增

DOI: 10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2019. 03. 007

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 2095-4972(2019)03-0356-09

黄鳍棘鲷 (*Acanthopagrus latus*) 隶属于鲈形目、鲷科、棘鲷属 (*Acanthopagrus*), 是广泛分布于印度—西太平洋近海的暖水性中下层经济鱼类^[1]。在我国, 黄鳍棘鲷主要分布于东南沿海, 其肉质鲜美、经济价值高, 已成为我国海水鱼类的重要养殖对象^[2]。自上世纪 90 年代以来, 由于过度捕捞、近海环境恶化以及近亲繁殖等原因, 黄鳍棘鲷自然资源严重衰退, 其种质资源出现明显退化^[3-4]。为了恢复与保护黄鳍棘鲷种质资源, 各国政府实施了一系列渔业管理措施。比如澳大利亚政府削减渔业资格捕捞证的颁布数量, 以期控制黄鳍棘鲷的资源捕捞量^[5]; 日本政府的重要沿海口岸实施黄鳍棘鲷苗种增殖放流; 在我国东南沿海常年大量放流黄鳍棘鲷鱼苗^[6]。目前, 有关黄鳍棘鲷的生物学、养殖技术、人工育苗等方面已有广泛的研究报道^[7-8]。但是, 关于黄鳍棘鲷种群遗传多样性和遗传结构的研究报

道较少^[4], 这与缺乏大批量的高多态性分子标记有关, 难以对其种质资源现状做出精确的遗传学评估。

微卫星序列 (Microsatellites DNA) 是由中间高度变异的核心序列和两旁相对保守的侧翼序列组成, 广泛存在于各类真核生物基因组中, 分布均匀且高多态性、呈孟德尔共显性遗传特性, 具有检测快速、操作简单等优点, 已成为生物种质资源研究最为常用的第二代分子标记^[9-10]。关于黄鳍棘鲷的微卫星标记, 已有学者采用传统的富集文库法共开发了 24 个二碱基重复的微卫星标记^[11-13], 并显示出较高的多态性。然而, 二碱基重复微卫星位点在 PCR 扩增中容易因“滑动链错配”产生影子带而导致分型结果错误^[14]。此外, 传统的微卫星标记开发方法比如富集文库法、基因组 DNA 文库筛选法等, 存在开发过程繁杂、成本高昂、效率较低等缺点, 通常一次只能筛选几个或十几个可用位点^[15]。因此, 有必要

收稿日期: 2018-09-06

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项资助项目 (201403008); 广东省科技计划资助项目 (2017A030303077); 广东省海洋和渔业发展专项 (科技攻关与研发) 资助项目 (A201708D07); 国家自然科学基金资助项目 (31372532)

作者简介: 吴仁协 (1981—), 男, 博士, 副教授; E-mail: wurenxie@163.com

借助高通量测序平台来识别和筛选出大批量、多碱基重复的黄鳍棘鲷微卫星位点,以促进其种群遗传背景调查、种质资源评估和分子标记辅助育种等相关研究。

SLAF-seq (Specific-Locus Amplified Fragment sequencing) 是一种通过酶切、构建 SLAF 文库和高通量测序来快速获取样品基因组 DNA 中 SLAF 标签序列的简化基因组测序技术^[16]。SLAF-seq 技术具有实验成本低、开发周期短、获取标记数量和类型丰富等优点,是一种高效且经济的分子标记开发方法,已成功应用于多种鱼类的微卫星标记开发^[17-20]。鉴于此,本研究采用 SLAF-seq 技术来筛选黄鳍棘鲷基因组 DNA 中高多态性的微卫星位点,以期为该物种的种质资源评估提供新的有效分子标记。同时,将所开发的微卫星标记在 9 种鲷科鱼类中进行跨物种扩增,以检测开发标记在近缘种中的通用性。

1 材料与方法

1.1 样品采集和基因组 DNA 提取

2014 年 7 月,采集广东雷州珍稀海洋生物国家级自然保护区(简称雷州保护区,下同)和阳西县近岸的 32 尾野生黄鳍棘鲷用于本研究。经形态学鉴定后,取鱼体背部肌肉,先后在体积分数为 75%、85% 和 95% 的酒精中进行脱水处理,于 -20℃ 冰箱保存。样品基因组 DNA 提取采用蛋白酶-苯酚氯仿法^[21]。

1.2 SLAF-seq 测序和微卫星引物合成

由北京百迈客生物科技有限公司进行 1 个样品肌肉样的高通量测序,采用 SLAF-seq 技术来筛选黄鳍棘鲷全基因组范围内的微卫星位点。基因组酶切、文库构建和高通量测序参见张浩冉等(2018)^[18]的研究。采用微卫星识别软件 MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html/>) 对所得的微卫星位点进行搜集与统计,并挑选 151 个二至六碱基的微卫星位点进行引物合成。

1.3 微卫星引物筛选、三引物 PCR 扩增和分型检测

本研究的 151 个微卫星位点引物多态性筛选方法参照张浩冉等的研究^[18]。初步筛选出可产生 2 条及以上特异性等位基因条带的位点即为多态性位点。根据 Schuelke(2000)报道的 M13 标记法^[22],对筛选出的 64 个黄鳍棘鲷多态性微卫星位点的正向引物 5' 端添加 M13 序列,并合成标记为 FAM 或 HEX 荧光基团的 M13 通用引物,引物修饰和合成由上海捷瑞生物工程有限公司完成。通过梯度 PCR

(52 ~ 62℃) 重新摸索三引物(修饰的正、反向引物和 M13 通用引物) PCR 扩增的最适退火温度(表 1)。三引物 PCR 反应体系和扩增产物检测参照翟云等(2018)的研究^[17],由武汉天一辉远生物科技有限公司进行 PCR 扩增产物的等位基因分型检测。

1.4 跨物种扩增

采用 9 种鲷科鱼类进行黄鳍棘鲷微卫星标记的跨物种扩增检测,包括太平洋棘鲷(*Acanthopagrus pacificus*, 4 尾,湛江硇洲岛近岸)、黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegelii*, 6 尾,湛江硇洲岛和雷州保护区近岸)、澳洲棘鲷(*Acanthopagrus australis*, 2 尾,湛江硇洲岛近岸)、台湾棘鲷(*Acanthopagrus taiwanensis*, 1 尾,台湾岛西岸)、平鲷(*Rhabdosargus sarba*, 6 尾,湛江硇洲岛和雷州保护区近岸)、二长棘梨齿鲷(*Evynnis cardinalis*, 7 尾,湛江硇洲岛和雷州保护区近岸)、真赤鲷(*Pagrus major*, 6 尾,湛江硇洲岛近岸)、蓝点赤鲷(*Pagrus caeruleostictus*, 2 尾,北海近岸)和黄牙鲷(*Dentex hypselosomus*, 5 尾,湛江硇洲岛近岸)。PCR 扩增体系和扩增产物检测同“1.3”。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。

1.5 数据分析

微卫星位点的等位基因数(N_a)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、多态信息含量(PIC)等基本遗传参数由 Cervus 3.0.7 软件计算^[23],各位点的哈迪-温伯格平衡(HWE)及连锁不平衡由 GenePop 4.3 软件检测^[24]。通过 Micro-Checker 2.2.3 软件在 Brookfeld-1 算法下估算位点的无效等位基因频率(F_{ua})^[25],使用 FSTAT 2.9.3 软件分析位点的近交系数(F_{is})。

2 结果与讨论

2.1 SLAF-seq 测序

采用 SLAF-seq 技术,通过简化基因组深度水平测序,共产生 2.32 M reads 读长,其中测序质量值(Q)大于等于 30 的读长占总数的 75.63%,表明大部分碱基测序出错的概率低于 0.10%。将酶切片段长度在 415 ~ 514 bp 的序列定义为 SLAF 标签,平均测序深度为 9.13 ×。过滤质量较差的测序数据后,共获得 137 358 个 SLAF 标签。

利用 MISA 共搜索出 30 676 个微卫星位点,其中最多的为单碱基重复,有 14 018 个(占总位点的 45.70%,下同);其次是二碱基重复,有 12 302 个(40.10%);三碱基重复和四碱基重复也有相当数量,分别有 2 833 个(9.24%)和 1 265 个(4.12%);

五碱基重复和六碱基重复数量则较少, 分别仅有 222 个(0.72%) 和 36 个(0.12%)。

2.2 多态性微卫星标记筛选和遗传多样性参数

经 PCR 扩增检测后, 在 151 个二至六碱基重复微卫星位点中有 64 个显示出多态性, 其多态比率为 42.38%。这些多态性引物经荧光标记修饰后, 最终有 47 对引物在 32 个黄鳍棘鲷基因组 DNA 中扩增出具有特异性且清晰的等位基因条带(表 1), 包括 17 个二碱基、6 个三碱基、8 个四碱基、10 个五碱基和 6 个六碱基重复位点, 引物序列的 GenBank 登录号为 MG214909 ~ MG214955。

47 个微卫星位点扩增片段大小为 102 ~ 374 bp, 共检测出 464 个等位基因, 等位基因数在 2 (AL6-9) 和 27 (AL2-9) 之间(均值为 10)。Ho 在 0.156 (AL6-9) 和 0.938 (AL4-11) 之间(均值为 0.628), He 在 0.177 (AL3-7) 和 0.963 (AL2-9) 之间(均值为 0.741)。47 个位点的 PIC 平均值为 0.705, 有 44 个位点的 PIC 值均大于 0.250, 仅 3 个位点 (AL3-7、AL3-11、AL6-9) 的 PIC 值小于 0.250, 表明大多数位点显示出较高的多态性。经 Bonferoni 校正后(校正 $p < 0.001$), 有 4 个位点 (AL2-16、AL4-12、AL5-1、AL5-9) 偏离 HWE 并显示较高的 Fis 值(分别为 0.415、0.455、0.509、0.293) 和 Fua 值(分别为 0.163、0.212、0.221、0.128); 其余 43 个位点均符合 HWE 检验, 且各位点之间不存在连锁不平衡。

2.3 微卫星标记跨物种扩增检测

有 31 个黄鳍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出特异性条带(表 2)。其中 AL2-1、AL2-8、AL3-1、AL4-1 分别可在 9、8、7、6 种鲷科鱼类中扩增, AL2-4、AL2-9、AL2-17、AL6-7 等 4 个位点可在 4 个物种中扩增, AL2-2、AL2-11、AL2-12、AL2-14、AL3-7、AL3-9、AL4-5、AL4-11、AL4-12、AL5-3、AL6-3、AL6-6 等 12 个位点可在 3 个物种中扩增, AL2-5、AL3-11、AL4-2、AL4-4、AL6-2 等 5 个位点可在 2 个物种中扩增, AL2-13、AL2-19、AL4-8、AL5-6、AL5-8、AL6-1 等 6 个位点只在 1 个物种中扩增。

从表 2 可以看出, 31 个黄鳍棘鲷微卫星标记在太平洋棘鲷、黑棘鲷和澳洲棘鲷中的扩增成功率较高, 分别为 63.8% (26 个位点)、51.1% (24 个位点) 和 48.9% (23 个位点); 在平鲷、二长棘梨齿鲷、真赤鲷、蓝点赤鲷和黄牙鲷的扩增成功率相对较低, 在前两者中分别为 14.9% (7 个位点) 和 10.6% (5 个位点), 在后三者中均为 8.5% (均为 4 个位点); 意外的是在台湾棘鲷中的扩增成功率最低, 仅为 2.1% (1 个位点)。在标记通用性方面, 有 17 个黄鳍棘鲷微卫星标记 (AL2-1、AL2-8、AL2-9、AL2-11、AL2-12、AL2-14、AL2-17、AL3-1、AL3-7、AL3-9、AL4-1、AL4-5、AL4-11、AL5-3、AL6-3、AL6-6、AL6-7) 在太平洋棘鲷、黑棘鲷和澳洲棘鲷中均可扩增, 而只有 3 个标记 (AL2-1、AL2-8、AL3-1) 可在二长棘梨齿鲷、真赤鲷、蓝点赤鲷及黄牙鲷中扩增。

表 1 黄鳍棘鲷 47 个多态性微卫星标记信息及其遗传参数

Tab. 1 Information and genetic indices of 47 polymorphic microsatellite markers of *Acanthopagrus latus*

位点	引物序列(5'—3')	重复单元	Ta/°C	S/bp	n	Na	Ho	He	PIC	Fis	Fua
AL2-1	F:FAM-CTGATCAGTGGTGTCTGTCTGT R:GACGCCCTTCGTTTATGAGA	(GT)18	64	154 ~ 202	32	20	0.844	0.913	0.891	0.077	0.029
AL2-2	F:HEX-CCTGTTGACCAACAAGATT R:GCAGCGTCTTATCACGTTCA	(CA)12	62	185 ~ 205	31	12	0.839	0.878	0.849	0.045	0.013
AL2-4	F:HEX-TCTGAAGAACTGCTCGTCCA R:TTCCAAGGTAATGGCAGAGG	(AC)13	54	240 ~ 266	32	9	0.594	0.816	0.778	0.163	0.066
AL2-5	F:FAM-TGACTGTACACAGATGAATGAG R:CTTGTACCGCTGGAACACCT	(GT)8	64	252 ~ 302	32	12	0.719	0.839	0.807	0.146	0.059
AL2-7	F:FAM-AGCTCAGAGACCGAGACAG R:ACAGCTGCTCCGACAAAAAT	(TG)16	64	157 ~ 181	32	9	0.781	0.800	0.759	0.023	0.003
AL2-8	F:HEX-CAITTAGCTCTGGCTCCGTC R:AGAGTGGGTGGGGTCTTACC	(TC)8	60	178 ~ 182	32	3	0.375	0.431	0.384	0.132	0.035
AL2-9	F:FAM-CGAAGTCACAAAAGCGACTGA R:ATCTTGTCTCGTCTCCAC	(TC)27	63	234 ~ 300	32	27	0.875	0.963	0.946	0.093	0.038
AL2-11	F:FAM-TAGGTTCCCCCTCTGACCTT R:AGGCAACCCTGAGCTTTACA	(AC)16	66	127 ~ 271	32	10	0.781	0.748	0.698	-0.045	-0.026
AL2-12	F:HEX-AAATATTCGACTGATGGCC R:CCAGTCGCTGTCTTCTCCTC	(TG)8	60	199 ~ 225	32	12	0.900	0.820	0.784	-0.099	-0.052

续表 1

位点	引物序列(5'—3')	重复单元	Ta/°C	S/bp	n	Na	Ho	He	PIC	Fis	Fua
AL2-13	F:FAM-TACGGCTTCCTGTCAGTGTG R:GAGGATCTTTCCCAAAAGG	(AC)13	64	191~285	32	23	0.839	0.912	0.890	0.081	0.031
AL2-14	F:HEX-TGATGAACATGCTGCAGTGA R:TGTGTGAATGTGCTGCGTAA	(AC)9	62	208~236	32	6	0.563	0.505	0.450	-0.116	-0.044
AL2-15	F:FAM-TGGCTGCTCCAGTGAACAA R:TTCCTAGAGCACAGATTGCG	(AC)11	62	261~277	32	9	0.594	0.717	0.670	0.174	0.066
AL2-16 *	F:HEX-TTGCTGCATGTCATCTCCTC R:AACAGGCAGTTAATCGGTCG	(TA)8	60	108~202	32	11	0.406	0.690	0.656	0.415	0.163
AL2-17	F:FAM-GACCCTGTGAGCAACCTAA R:TGAATCCGCTTCTTCTCCAT	(GT)12	63	107~137	29	8	0.759	0.701	0.664	-0.085	-0.042
AL2-18	F:HEX-AGAAAGGTGTGGATGGATGG R:TTTGACGGGTTCTCTAAT	(CA)8	63	162~182	31	11	0.613	0.719	0.685	0.150	0.056
AL2-19	F:FAM-TGCCATTACCTATTCGACA R:CAAGACATGTGGCATCACAA	(GT)10	64	159~185	30	12	0.700	0.885	0.857	0.212	0.091
AL2-20	F:HEX-TGCATACAGAACTGCTGG R:AGGATGAGAGAGAGGGGAA	(AC)11	62	126~142	32	10	0.688	0.807	0.765	0.150	0.059
AL3-1	F:FAM-TCACATCAGTTCCCCCTCTC R:ATTCATTGACAGAATGCCTCC	(CTC)8	58	261~303	32	10	0.844	0.793	0.761	-0.065	-0.035
AL3-2	F:HEX-TGAGTGTGGTTGTGTGAGCA R:CCCGTGTGAAGAAGAAAGGA	(TCT)21	52	156~207	30	14	0.867	0.887	0.861	0.023	0.003
AL3-5	F:FAM-CATCCAGCACTTCAACGGTA R:GTTGAGCAACCCAAACAACC	(CAT)10	54	296~320	32	9	0.781	0.819	0.779	0.047	0.014
AL3-6	F:HEX-TGATCCCATCCTTCTCTAAC R:ATTTGTGCTCTCGTCTGCT	(CAG)10	58	249~294	31	12	0.903	0.901	0.876	-0.002	-0.009
AL3-7	F:FAM-CGAGCTCTACGATGTGCTC R:GCCATATTGGCAACGAGATT	(TTG)7	62	183~189	32	3	0.188	0.177	0.166	-0.150	-0.040
AL3-11	F:FAM-ACCCATGGAAGGGATAAGC R:GCAGAATACATGGAGGGAA	(ATA)7	64	180~189	29	3	0.207	0.249	0.227	0.172	0.306
AL4-1	F:FAM-TTCACTCACTGACTGGCTGG R:GCATTTTGGAGGAGCAAGAG	(ATCT)14	54	262~306	32	11	0.813	0.870	0.840	0.067	0.023
AL4-2	F:HEX-AAAAGGCTGGTTCCTCACT R:TGGTTTCATACCAAGATCAGAGTT	(TCTG)9	56	126~167	32	9	0.625	0.601	0.563	-0.041	-0.021
AL4-4	F:HEX-GAGGCAGAAATAGGGAAAG R:TCCTGTGCTGGTATGCTCTG	(CAAA)6	62	186~206	32	6	0.375	0.334	0.314	-0.196	-0.065
AL4-7	F:FAM-CACCCCTCACTTTTGCAGT R:TGACTTGGCAAACATAACCC	(AAAC)6	62	102~122	32	5	0.625	0.627	0.543	0.004	-0.005
AL4-8	F:HEX-AGCTTCCACCAAAAAGCTGA R:CCGTGGTGAAGTAGGACGTTT	(AAAC)9	62	135~179	32	12	0.813	0.883	0.857	0.081	0.031
AL4-10	F:HEX-AAGCTCCTGAGAGAAAAGGC R:TCAGTCCCTCTGTGCTTCAG	(AGAT)22	62	277~317	32	12	0.844	0.887	0.860	0.044	0.013
AL4-11	F:FAM-GCTGACACGAGAGTTGTGGA R:ATCGATCCGTCTGACTTTGG	(TCTT)15	58	221~269	32	12	0.938	0.887	0.860	-0.058	-0.034
AL4-12 *	F:HEX-ATGTTGGCTTCAGCTGCTTT R:TCAAGTTTGTGATGTCTTAGTAGC	(GATA)20	60	202~374	31	18	0.516	0.939	0.919	0.455	0.212
AL5-1 *	F:FAM-AAGAAGTTGCCAAAGCCAGA R:CTTGAAGGGGCACATGATTC	(GATAT)13	60	228~263	27	7	0.407	0.823	0.781	0.509	0.221
AL5-2	F:HEX-ACCCCATGGAAGGGATAAG R:TGGA AAAACATGCTTTGAAAAA	(ATGAC)5	58	268~283	32	4	0.469	0.603	0.542	0.225	0.078
AL5-3	F:FAM-CCTTCTATGACGCTGCATT R:CGCTTACTCGGAGCAAAAAG	(CTCTT)13	62	144~194	31	10	0.871	0.879	0.851	0.010	-0.003

续表 1

位点	引物序列(5'—3')	重复单元	Ta/°C	S/bp	n	Na	Ho	He	PIC	Fis	Fua
AL5-4	F:HEX-GAGACTGTTTGGTTGGGAGG R:GCTGTATAAGCAAGGCTGGG	(AAAGG)5	56	197~212	32	5	0.781	0.678	0.617	-0.183	-0.078
AL5-6	F:HEX-TTCGGTAAGGCTAACGAGACA R:AGAGCTGCAGCATACAACCA	(CTTTT)9	58	187~237	32	10	0.813	0.835	0.800	0.027	0.005
AL5-8	F:HEX-GGCTCTGGACCCCATCTTAT R:GCGGCTATGGAGATGGTTTA	(TCCTT)11	62	221~271	32	10	0.813	0.860	0.827	0.056	0.018
AL5-9*	F:FAM-CACTCAGATGCTGCACACAGA R:TGCCCTCTTTTGTACCACT	(TTTCT)9	62	280~320	29	9	0.621	0.873	0.842	0.293	0.128
AL5-10	F:HEX-CGAGCTTAACTTGCAATGA R:CATCCACACTTCAAAGAATGACA	(ATTCT)10	62	248~288	32	8	0.781	0.784	0.744	0.003	-0.006
AL5-11	F:FAM-GCAAGTCTCTGCATTTCATC R:CCCAAGGCAAGGGAAAGTAT	(AACTA)14	64	200~265	26	13	0.885	0.886	0.856	-0.003	-0.011
AL5-12	F:HEX-TTTTGCATGAATTTGACCGA R:CCTGGACATGATGCAGTTTG	(CACAA)11	62	248~313	32	10	0.750	0.752	0.717	0.003	-0.005
AL6-1	F:FAM-CTGCAGTTGTCAGCTGTCGT R:GAGGGTGAAGGAGTGAGTGG	(CCAGCA)6	62	191~215	31	5	0.581	0.629	0.548	0.078	0.024
AL6-2	F:HEX-GCAACACAACAACAAGCTGC R:CACACCGCCAGATCTCTTTT	(TACATA)9	58	252~300	32	13	0.875	0.869	0.842	-0.007	-0.011
AL6-3	F:FAM-CTAGGAAGTGAGCCGTCCTG R:TTGTGTTTACTGGAAGTATAAAGGA	(GTACTT)5	62	220~256	32	6	0.688	0.756	0.708	0.092	0.033
AL6-6	F:HEX-CCAATTTTCTGTGTCTGTATGG R:TGTTGCCGGAACATCATAAA	(TAGGTT)5	58	215~233	31	4	0.581	0.564	0.501	-0.030	-0.016
AL6-7	F:FAM-ACAAGCCTCCATTGACAAC R:CTGACTCTATTGCCCCCTCA	(TGTGCT)13	56	215~257	32	8	0.781	0.824	0.784	0.053	0.016
AL6-9	F:FAM-GGTACAAGTTCCACCCAC R:TGCAGAACTCATTGGAGCTG	(TCAGAA)5	62	274~316	32	2	0.156	0.246	0.212	0.367	0.069

注:F和R分别代表正、反向引物;Ta表示退火温度,S表示等位基因大小范围,n表示样品数;位点标“*”表示经 Bonferroni 校正后显著偏离 HWE ($\alpha=0.05, p<0.001$)

表 2 黄鳍棘鲷 31 个微卫星标记在 9 种鲷科近缘种中的跨物种扩增

Tab. 2 Cross-species amplifications of the 31 microsatellite markers of *Acanthopagrus latus* in 9 relative species of family Sparidae

位点	太平洋棘鲷 (n=4)	黑棘鲷 (n=6)	澳洲棘鲷 (n=2)	台湾棘鲷 (n=1)	平鲷 (n=6)	二长棘梨齿鲷 (n=7)	真赤鲷 (n=6)	蓝点赤鲷 (n=2)	黄牙鲷 (n=5)
AL2-1	+(7)	+(9)	+(3)	+(2)	+(6)	+(9)	+(12)	+(3)	+(6)
AL2-2	+(4)	+(6)	-	-	+(6)	-	-	-	-
AL2-4	+(2)	-	+(2)	-	+(6)	-	-	-	+(4)
AL2-5	+(5)	+(6)	-	-	-	-	-	-	-
AL2-8	+(8)	+(12)	+(4)	-	+(12)	+(14)	+(12)	+(4)	+(10)
AL2-9	+(4)	+(8)	+(4)	-	+(6)	-	-	-	-
AL2-11	+(4)	+(8)	+(2)	-	-	-	-	-	-
AL2-12	+(6)	+(10)	+(3)	-	-	-	-	-	-
AL2-13	+(4)	-	-	-	-	-	-	-	-
AL2-14	+(4)	+(6)	+(2)	-	-	-	-	-	-
AL2-17	+(4)	+(6)	+(3)	-	+(6)	-	-	-	-

续表 2

位点	太平洋棘鲷 (n=4)	黑棘鲷 (n=6)	澳洲棘鲷 (n=2)	台湾棘鲷 (n=1)	平鲷 (n=6)	二长棘梨齿鲷 (n=7)	真赤鲷 (n=6)	蓝点赤鲷 (n=2)	黄牙鲷 (n=5)
AL2-19	+(4)	-	-	-	-	-	-	-	-
AL3-1	+(3)	+(9)	+(2)	-	-	+(8)	+(9)	+(2)	+(5)
AL3-7	+(3)	+(7)	+(4)	-	-	-	-	-	-
AL3-9	+(4)	+(9)	+(3)	-	-	-	-	-	-
AL3-11	-	+(7)	+(3)	-	-	-	-	-	-
AL4-1	+(8)	+(8)	+(4)	-	-	+(7)	+(6)	+(2)	-
AL4-2	+(4)	+(6)	-	-	-	-	-	-	-
AL4-4	-	+(6)	+(2)	-	-	-	-	-	-
AL4-5	+(4)	+(6)	+(2)	-	-	-	-	-	-
AL4-8	+(4)	-	-	-	-	-	-	-	-
AL4-11	+(8)	+(12)	+(2)	-	-	-	-	-	-
AL4-12	-	+(9)	+(3)	-	-	+(2)	-	-	-
AL5-3	+(7)	+(9)	+(1)	-	-	-	-	-	-
AL5-6	+(8)	-	-	-	-	-	-	-	-
AL5-8	+(5)	-	-	-	-	-	-	-	-
AL6-1	-	-	+(2)	-	-	-	-	-	-
AL6-2	-	+(6)	+(3)	-	-	-	-	-	-
AL6-3	+(4)	+(8)	+(1)	-	-	-	-	-	-
AL6-6	+(3)	+(1)	+(2)	-	-	-	-	-	-
AL6-7	+(4)	+(6)	+(2)	-	+(4)	-	-	-	-
AL%	63.80	51.10	48.90	2.10	14.90	10.60	8.50	8.50	8.50

注: n 为样品数,“+”表示可扩增,“-”表示不可扩增,AL%为可扩增率,括号内代表等位基因数

2.4 讨论

2.4.1 SLAF-seq 技术开发微卫星标记的优势 Xia 等(2006)、夏军红等(2007)、Ahmad-Syazni 等(2012)采用磁珠富集法构建黄鳍棘鲷基因组微卫星富集文库分别获得了 58、41、33 个二碱基重复的微卫星序列,而后分别只开发出 11、3、10 个多态性微卫星标记^[11-13]。本研究基于 SLAF-seq 技术识别出黄鳍棘鲷 16 658 个二至六碱基重复微卫星位点,在挑选的 151 个位点中成功开发出 47 个多态性微卫星标记,其位点识别数量和开发效率比以往的研究报道提高了上百倍。此外,本研究的微卫星位点还包含了采用传统开发方法难以获取的大量多碱基重复位点(四至六碱基重复有 1 523 个),有效保障了标记开发的数量要求和标记类型的多样化。可见,基于 SLAF-seq 技术开发物种微卫星标记具有明

显的优势和便利,非常适用于大规模的分子标记开发^[18-19]。同时,本研究开发的 30 个高多态性三至六碱基重复微卫星标记完全不同于已报道的 24 个黄鳍棘鲷二碱基重复微卫星标记^[11-13],尤其是 24 个多碱基重复(四至六碱基)的微卫星标记在等位基因分型中通常比二碱基重复位点具有更高的准确性和有效性^[9],可为黄鳍棘鲷种质资源评估提供新的分子标记和分析角度。

2.4.2 黄鳍棘鲷微卫星标记的多态性和 HWE 偏离 本研究的微卫星位点的 N_a 均值(10)、 H_o 均值(0.682)和 H_e 均值(0.742)均低于 Xia 等^[11]和 Ahmad-Syazni 等^[13]所报道的黄鳍棘鲷二碱基重复微卫星位点的 N_a 均值(分别为 17.1、18.1,下同)、 H_o 均值(0.74、0.867)和 H_e 均值(0.91、0.92)。这可能与本研究含有较多的四至六碱基重复位点(占总

位点的 51.06%)，而之前所开发的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有关^[26]。然而，本研究的 *Ho* 均值不但高于 Dewoody 等(2000)统计的 32 种鱼类微卫星标记的 *Ho* 均值(0.63)^[27]，也稍高于花鲈(*Lateolabrax maculatus*)、带鱼(*Trichiurus japonicus*)和沙带鱼(*Lepturacanthus savala*)微卫星标记的 *Ho* 均值(分别为 0.674、0.620、0.634)^[10,18-19]，表明所开发的 47 个黄鳍棘鲷微卫星标记具有较高的多态性和遗传变异水平。*PIC* 可反映遗传标记的多态性程度，当 $PIC \geq 0.500$ 时，该位点为高度多态位点；当 $0.250 \leq PIC < 0.500$ 时，为中度多态位点；当 $PIC < 0.250$ 时，则为低度多态位点^[28]。本研究的 47 个微卫星标记 *PIC* 平均值为 0.705，有 41 个位点呈高度多态性，且各位点间不存在连锁不平衡。表明所开发的大部分微卫星标记含有丰富的遗传变异信息，在黄鳍棘鲷种群遗传资源研究中具有较高的潜在应用价值。

经过 Bonferroni 校正后，本研究有 4 个位点(Al2-16、Al4-12、Al5-1、Al5-9)偏离 HWE，显示出杂合子缺失现象。同时这 4 个位点均具有较高的 *Fis*(0.293 ~ 0.415)和 *Fua*(0.128 ~ 0.221)，提示近亲交配和无效等位基因可能是造成这 4 个位点偏离 HWE 的重要原因。此外，随着人工繁殖技术不断成熟和完善，中国沿海黄鳍棘鲷的养殖面积和养殖规模不断扩大，增加了养殖群体的逃逸机会，同时近年来各沿海先后开展了大规模的增殖放流活动，这些人为因素加剧了黄鳍棘鲷种群的生态遗传风险，可能导致养殖群体与野生群体的种质混杂和降低种群遗传多样性^[7]。因此，种群退化和自然选择导致本研究 4 个微卫星位点偏离 HWE 的可能性还难以排除^[29]，有待于今后进一步研究确认。

2.4.3 黄鳍棘鲷微卫星标记在鲷科鱼类中的通用性 本研究的黄鳍棘鲷微卫星标记在同属的太平洋棘鲷、黑棘鲷和澳洲棘鲷中的跨物种扩增成功率较高(48.9% ~ 63.8%)，其次是在平鲷中(14.9%)，而在二长棘梨齿鲷、真赤鲷、蓝点赤鲷及黄牙鲷中的成功率较低(8.5% ~ 10.6%)，表明跨物种扩增成功率与物种间遗传距离有直接的相关性^[30]。基于线粒体 COI 基因序列的系统进化关系研究表明中

国鲷科鱼类可分为两大类群，类群 I 包括四长棘鲷属(*Argyrops*)、犁齿鲷属(*Evynnis*)、赤鲷属(*Pagrus*)、牙鲷属(*Dentex*)等红体色种类，类群 II 含平鲷属(*Rhabdosargus*)、棘鲷属等银灰体色种类^[31]。可见，除了棘鲷属外，黄鳍棘鲷与平鲷属的亲缘关系更近于它与其他鲷科鱼类。这种系统进化关系与本研究的跨物种扩增结果相对应。同时，本研究的跨物种扩增结果也从核基因方面进一步支持了中国鲷科鱼类属间的系统划分^[31]。值得注意的是，黄鳍棘鲷微卫星标记在台湾棘鲷中的跨物种扩增成功率(2.1%)远低于棘鲷属和其他鲷科鱼类，仅有 1 个位点具有通用性。这可能与台湾棘鲷可检测样品数量少(仅 1 尾)且基因组 DNA 质量不佳有关，难以扩增出清晰的微卫星条带，导致实验结果出现误差。

除台湾棘鲷外，本研究的跨物种扩增成功率(平均值为 26.85%)低于带鱼和沙带鱼的微卫星标记在 6 种带鱼科鱼类中的跨物种扩增成功率(平均值分别为 33.86% 和 41.43%)^[18-19]，但大于花鲈在 10 种尖吻鲈科和鲈科鱼类中的跨物种扩增成功率(3.8% ~ 15.4%)^[10]，这可能与研究所检测的种类数量有关，也可能与不同科的属、种间的遗传分化程度有关。此外，本研究有 17 个标记在棘鲷属(除台湾棘鲷)中能有效扩增，说明这些标记具有较好的通用性，可以适用于该属鱼类的系统进化和种群遗传学分析。但只有 3 个标记可在二长棘梨齿鲷、真赤鲷、蓝点赤鲷及黄牙鲷中有效扩增，难以满足后续种质资源评估对分子标记数量的要求。

3 结论

基于 SLAF-seq 技术，本研究在识别出大量微卫星位点的基础上，成功开发出 47 个二至六碱基重复的多态性黄鳍棘鲷微卫星标记，为该物种的种质资源评估和种群遗传分析提供了新的有效分子标记。本研究的开发方法为其他鱼类的微卫星标记筛选提供了可靠的方法参考和经验借鉴。同时，17 个开发标记在棘鲷属中具有较好的通用性，可为该属鱼类的分子系统进化研究提供新的标记来源和研究角度。

参考文献:

- [1] 刘静, 吴仁协, 康斌, 等. 北部湾鱼类图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 2016.
- [2] 江世贵, 刘红艳, 苏天凤, 等. 4 种鲷科鱼类的线粒体细胞色素 b 基因序列及分子系统学分析[J]. 中国水产科学, 2003, 10(3): 184-188.
- [3] 杨慧荣, 江世贵. 用 RAPD 技术探讨 5 种鲷科鱼类的亲缘关系[J]. 水产学报, 2006, 30(4): 469-474.

- [4] XIA J H, HUANG J H, GONG J B, et al. Significant population genetic structure of yellowfin seabream *Acanthopagrus latus* in China[J]. *Journal of Fish Biology*, 2008, 73(8): 1 979-1 992.
- [5] HESP S A, POTTER I C, HALL N G. Reproductive biology and protandrous hermaphroditism in *Acanthopagrus latus*[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2004, 70(3): 257-272.
- [6] 江兴龙, 黄永春, 黄良敏, 等. 厦门湾黄鳍鲷增殖放流效果的评估[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2013, 18(3): 161-166.
- [7] 江世贵, 苏天凤, 夏军红, 等. 中国近海鲷科鱼类种质资源及其利用[M]. 北京: 海洋出版社, 2012.
- [8] 区又君. 黄鳍鲷的人工繁殖[J]. *海洋与渔业*, 2008(7): 30-31.
- [9] WU R X, ZHANG H R, NIU S F, et al. Development of polymorphic microsatellites for *Sillago sihama* based on next-generation sequencing and transferability to *Sillago japonica*[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2016, 15(4): gmr15049046.
- [10] ZHANG H R, NIU S F, WU R X, et al. Development and characterization of 26 polymorphic microsatellite markers in *Lateolabrax maculatus* and cross-species amplification for the phylogenetically related taxa[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2016, 66: 326-330.
- [11] XIA J H, XIA K F, JIANG G. Characterization of 11 polymorphic microsatellite loci in the yellowfin seabream *Acanthopagrus latus*[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2006, 6(2): 484-486.
- [12] 夏军红, 朱彩艳, 苏天凤, 等. 黄鳍鲷基因组微卫星的分离[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(2): 321-325.
- [13] AHMAD-SYAZNI K, WATANABE M, OKA T, et al. Ten novel polymorphic microsatellite loci for yellowfin black seabream (*Acanthopagrus latus*)[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2012, 4(4): 909-911.
- [14] EDWARDS A, CIVITELLO A, HAMMOND H A, et al. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1991, 49(4): 746-756.
- [15] 孙波, 鲍毅新, 赵庆洋, 等. 微卫星位点获取方法的研究进展[J]. *生态学杂志*, 2009, 28(10): 2 130-2 137.
- [16] SUN X W, LIU D Y, ZHANG X F, et al. SLAF-seq: An efficient method of large-scale *De Novo* SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58700. doi: 10.1371/journal.pone.0058700.
- [17] 翟云, 吴仁协, 牛素芳, 等. 基于 SLAF-seq 技术开发蓝圆鲈微卫星标记及跨物种扩增检测[J]. *应用海洋学学报*, 2018, 37(3): 426-434.
- [18] 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): 3 331-3 338.
- [19] 张浩冉, 梁镇邦, 吴仁协, 等. 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[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(2): 574-585.
- [20] NIU S F, ZHAI Y, WU R X, et al. Isolation and characterization of 49 polymorphic microsatellite loci for *Decapterus maruadsi* using SLAF-seq, and cross-amplification to related species[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2019, 37(1): 245-255.
- [21] SAMBROOK J, RUSSELL D W. *Molecular cloning: A laboratory manual*[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [22] SCHUELKE M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(2): 233-234.
- [23] KALINOWSKI S T, TAPER M L, MARSHALL T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(5): 1 099-1 106.
- [24] ROUSSET F. Genepop'007: a complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(1): 103-106.
- [25] OOSTERHOUT V C, HUTCHINSON W F, WILLS D P M, et al. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4(3): 535-538.
- [26] CASTOE T A, STREICHER J W, MEIK J M, et al. Thousands of microsatellite loci from the venomous coral snake *Micrurus fulvius* and variability of select loci across populations and related species[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2012, 12(6): 1 105-1 113.
- [27] DEWOODY J A, AVISE J C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals[J]. *Journal of Fish Biology*, 2000, 56(3): 461-47.
- [28] 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.

- [29] YU H T, LEE Y J, HUANG S W, et al. Genetic analysis of the populations of Japanese anchovy (Engraulidae; *Engraulis japonicus*) using microsatellite DNA[J]. *Marine Biotechnology*, 2002, 4(5): 471-479.
- [30] PRIMMER C R, MOLLER A P, ELLEGREN H. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds [J]. *Molecular Ecology*, 1996, 5(3): 365-378.
- [31] 陈咏霞, 吴仁协, 梁娜, 等. 基于线粒体 COI 基因序列的中国鲷科鱼类系统进化关系[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(3): 611-619.

Microsatellite marker development for *Acanthopagrus latus* and cross-species amplification in the family Sparidae

WU Ren-xie, ZHAI Yun, XIAO Yao, NIU Su-fang, ZHANG Hao-ran, LI Xiao, CHEN Wei-yong
(College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Using the specific-locus amplified fragment sequencing (SLAF-seq) technology, we developed 47 high polymorphic microsatellite markers for *Acanthopagrus latus*, among which 17 were di-nucleotide repeats and the other 30 were tri- to hexa-nucleotide repeats. The allele number per locus ranged from 2 to 27 (mean 10), and the observed and expected heterozygosities varied from 0.156 to 0.938 (mean 0.682) and 0.177 to 0.963 (mean 0.741), respectively. The polymorphism information contents (*PIC*) ranged from 0.166 to 0.946 (mean 0.705). After Bonferroni correction, 43 microsatellite loci were consistent with Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), while the other 4 loci deviated from the HWE. These polymorphic microsatellite markers could provide new and effective molecular markers for the genetic resources study of *A. latus*. The results of cross-species amplification showed that a total of 31 microsatellite markers could be successfully amplified in 9 species of family Sparidae. Among them 17 were transferable in *Acanthopagrus pacificus*, *Acanthopagrus schlegelii* and *Acanthopagrus australis*, and they would provide new markers for the future studies of phylogenetic relationship and population genetics of these species. The other 3 markers were also transferable in *Evynnis cardinalis*, *Pagrus major*, *Pagrus caeruleostictus* and *Dentex hypselosomus*.

Key words: marine biology; *Acanthopagrus latus*; microsatellite marker; SLAF-seq technology; cross-species amplification

DOI: 10.3969/J. ISSN.2095-4972.2019.03.007

(责任编辑:方建勇)