◆海洋科学◆

基于锈斑蟳简化基因组数据的微卫星 DNA 标记开发*

唐　棣[1],杨明秋[1],邹　雄[2],刘洪涛[1]**
(1.海南省海洋与渔业科学院,海南省热带海水养殖技术重点实验室,海南海口　571126;2.中国水产科学研究院东海水产研究所,上海　200090)

摘要:锈斑蟳(*Charybdis feriata*)是我国重要的海洋水产种质资源保护对象,具有较高的经济价值和遗传育种价值,开发微卫星 DNA(Microsatellite DNA)标记有助于锈斑蟳种群生态、种质资源等方面研究。本研究基于简化基因组测序技术获得锈斑蟳简化基因组序列信息,开展微卫星相关信息分析,并开发微卫星 DNA 标记。共检测到 2 419 242 个微卫星位点,其中二核苷酸和单核苷酸重复基序数量最多,各占总位点的 43.95%和 28.71%。六核苷酸重复基序的类型最多,达 287 种;其次是五核苷酸的重复基序的类型,为 275 种。不同类型 SSR 位点基序的重复次数也不同。使用 Primer3 v2.3.6 软件共设计出 21 330 对锈斑蟳微卫星引物,选取多态性高的 192 对引物在 12 个锈斑蟳样本中进行验证,有 14 对引物具有单一条带且多态性较好,每个引物的等位基因数为 4－14,期望杂合度(H_e)和观测杂合度(H_o)分别为 0.503－0.892 和 0.167－1.000,多态信息含量(PIC)为 0.456－0.882。研究表明,本方法在筛选锈斑蟳 SSR 标记中是可行的,所得引物可以应用于锈斑蟳遗传多样性、种群遗传分析等研究。

关键词:锈斑蟳;简化基因组;微卫星;引物开发;遗传多样性

中图分类号:S917.4　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1005-9164(2024)04-0763-10

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20240919.005

锈斑蟳(*Charybdis feriata*)俗称红花蟹,隶属节肢动物门(Arthropoda)甲壳纲(Crustacea)梭子蟹科(Portunidae)蟳属(*Charybdis*),是我国大型水产经济蟹类之一,主要分布于广西、广东、台湾、海南等东南沿海地区的近岸海域[1]。锈斑蟳多栖息于近岸浅海底或岛礁,属底栖生物食性类型,主要以甲壳类、鱼类为食,兼食珊瑚虫、底栖藻类和腹足类,其肉质鲜美、营养价值高,具有较高的经济价值[2,3]。20 世纪 90 年代以前,锈斑蟳主要为底拖网、拖虾网等兼捕对象,自东海中、南部海域三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)资源衰落和蟹笼作业兴起后,锈斑蟳成为蟹笼、定制刺网作业的主捕对象,加上锈斑蟳资源群

收稿日期:2024-06-12　　　修回日期:2024-07-11
*海南省重点研发项目(ZDYF2021XDNY278)和 2024 年海南省科技条件平台专项(重点实验室)建设项目(ZDSYS202408)资助。

【第一作者简介】
唐　棣(1990－),女,工程师,主要从事养殖水域生态学研究,E-mail:tangdi_hnhky@163.com。
【**通信作者简介】
刘洪涛(1986－),男,副研究员,主要从事海洋生物遗传育种与免疫病害研究,E-mail:xmulht@gmail.com。

【引用本文】
唐棣,杨明秋,邹雄,等.基于锈斑蟳简化基因组数据的微卫星 DNA 标记开发[J].广西科学,2024,31(4):763-772.
TANG D,YANG M Q,ZOU X,et al.Development of Microsatellite DNA Markers Based on RAD-seq Data of *Charybdis feriata* [J].Guangxi Sciences,2024,31(4):763-772.

体数量不大,缺少如细点圆趾蟹(*Ovalipes punctatus*)的明显高生物量区域[4,5],导致近年来锈斑蟳生物资源量逐渐减少,分布范围不断缩小[6],可能造成群体间的基因交流频率降低,遗传多样性发生改变。目前对锈斑蟳的研究主要集中在渔业资源调查[1]、人工育苗[7]、胚胎发育[8]、营养成分评价[9]、食性与营养级研究[10]等方面,尚未对其种群遗传多样性和遗传结构开展系统评价和研究。

简单重复序列(Simple Sequence Repeats,SSR)长度多态性又称微卫星DNA(Microsatellite DNA)标记,是一类由1－6个核苷酸为基本单位组成的重复串联序列[11]。由于SSR具有进化所受选择压力小、共显性遗传、易于分析、重复性较好等特点,现已成为第二代分子辅助标记方法[12],被广泛应用于遗传多样性检测及遗传差异性评估中。利用高通量测序数据是目前开发SSR引物的主要方法,常用的高通量测序技术主要为全基因组测序(全基因组中测序、全基因组低深度重测序)、靶向捕获测序技术和简化基因组测序[13]。全基因组测序技术是通过对全基因组文库扫描测序,获得整个基因组范围的遗传变异信息;靶向捕获测序技术是对靶向位点进行测序,获取目标位点的变异信息;而简化基因组测序技术则是对特定的酶切位点进行高通量测序,从而获得目标区域的遗传标记信息。其中,由于简化基因组测序技术相比其他测序技术具有测序数据量少、生物信息学分析周期短、测序成本相对较低等优点[14-16],现已在大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)[17]、三棘刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)[18]、印尼虎鱼(*Datnioides pulcher*)[19]、长体圆鲹(*Decapterus macrosoma*)[20]等水生生物的种群遗传学研究领域得到广泛应用。

然而,目前对锈斑蟳的微卫星DNA标记开发相对较少,除了Ma等[21]在2016年首次利用锚定PCR分离并验证了8对锈斑蟳多态性SSR引物,以及Fang等[22]通过全基因组测序技术获得并验证了14对多态性SSR引物之外,未见其他相关报道。因此,本研究拟采用简化基因组测序技术开发适用于锈斑蟳的SSR引物,并对筛选出的多态性SSR分子标记进行遗传多样性验证,以期为基于SSR微卫星DNA标记开展的锈斑蟳遗传多样性、种群遗传分析等研究提供基础资料,这对促进锈斑蟳种质资源的保护与可持续利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

根据锈斑蟳野生资源调查文献记录[4,23,24],实验用锈斑蟳样本分别采集自广东省阳江市、福建省宁德市、广西壮族自治区北海市、海南省三亚市、浙江省宁波市、福建省漳州市等6个沿海城市,具体采样信息见表1。取锈斑蟳螯足长节肌肉经液氮速冻后,－80℃保存。

表1 用于开发锈斑蟳SSR引物的样本采集信息

Tabel 1 Sample information of *C. feriata* for the development of SSR primers

样本 Sample	采集地点 Sample collection site	纬度 Latitude	经度 Longitude	采样数量/个 Number of samples	体重/g Body weight/g	采样日期 Sampling date
GD	Yangjiang City,Guangdong Province	21°34′21.92″N	111°49′58.13″E	3	143.87±7.99	2023-10-20
ND	Ningde City,Fujian Province	27°03′49.86″N	120°13′34.38″E	3	137.77±9.55	2023-11-07
GX	Beihai City,Guangxi Zhuang Autonomous Region	21°26′34.11″N	109°03′49.86″E	3	145.70±8.15	2023-12-05
HN	Sanya City,Hainan Province	18°13′57.41″N	109°30′15.36″E	3	168.67±12.65	2023-10-31
ZJ	Ningbo City,Zhejiang Province	29°13′16.43″N	121°57′4.75″E	3	147.87±7.01	2023-11-27
FJ	Zhangzhou City,Fujian Province	23°54′33.43″N	117°44′25.34″E	3	164.20±10.72	2023-10-23

1.2 方法

1.2.1 DNA提取和质控

使用全自动核酸提取仪(NanoMagBio S-96,武汉纳磁生物科技有限公司)提取锈斑蟳基因组DNA。取30－50 mg样品适当剪碎放置提取板对应孔位;向样品板中每孔加入400 μL组织裂解液和5 μL蛋

白酶 K,振荡混匀,置于 65 ℃恒温箱消化 16 h;在新的提取板中每孔分装 100 μL 磁珠放置在提取仪工位 2,分装 3 板 500 μL/孔的 75%乙醇分别放在工位 3、工位 4、工位 5,洗脱板每孔分装 100/80/60 μL(根据样品状态分装对应体积)洗脱液放置在工位 6;消化结束后,将提取板取出放在提取仪工位 1,启动程序裂解 15 min,裂解完成后,向样品板每个孔中加入 280 μL 异丙醇,将样品板放在提取仪工位 1;选择自定义的核酸提取程序,检查仪器状态和提取板信息后运行;运行完成之后,将洗脱板取出进行 DNA 浓度和电泳胶检测,4 ℃条件下保存。取 2 μL DNA 原液进行 NanoDrop 8000 检测,取 2 μL DNA 原液添加 2 μL 溴酚蓝进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2　简化基因组测序

取 6 个质控合格的样本 DNA 进行建库,根据预实验选择内切酶 DpnII_MspI 将 DNA 分解成小片段,富集 220－450 bp 的片段,构建 Illumina 测序文库,利用二代测序技术,基于 Illumina Novaseq 测序平台,开展双端测序。对原始测序数据进行过滤,生成高质量序列。将样品的数据合并成 pop A,再采用 FLASH(version 1.2.11,Magoc and Salzberg 2011)对序列按照 overlap 搭载为一条高质量 reads,参数设置如下:(1)Min overlap:10;(2)Max mismatch density:0.2;(3)Allow “outie” pairs:false。

1.2.3　SSR 位点信息分析与引物设计

采用微卫星识别工具(MIcroSAtellite Identification Tool, MISA, http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/)在所有序列中搜索 SSR 位点,搜索所采用的参数如下:mono-10、di-6、tri-5、Tetra-5、penta-5、hexa-5。复合序列中两个不同 SSR 之间允许的最大间隔设置为 100 bp。采用 Perl 程序屏蔽序列上的重复序列(用字母 R 代替),过滤掉侧翼序列短于 20 bp 的 SSR(过短的侧翼序列无法进行相似性比对)。利用 cdhit 4.8.1 软件对过滤后的序列进行聚类,聚类所采用的核苷酸序列的相似度设置为 90%,覆盖度为 70%,空位罚分设置为-gap1-gap-ext 0。其中,一条序列上有两个及以上 SSR 的序列分开统计聚类群组。采用 Perl 程序对聚类结果进行解析,根据 SSR 的长度分别对每一个类进行统计,同一个类中所有 SSR 的长度一致,则该类的多态性为 1;如果同一个类中 SSR 具有 2 种长度,则该类的多态性为 2;依次类推,获得每一个类的 SSR 多态性。利用 Primer3 v2.3.6 软件分别对搜索到的多态性＞2 的 Clusters 内的 SSR 序列针对位点两端设计引物;扩增目标片段长度控制在 100－400 bp,扩增目标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。对所有设计得到的引物进行筛选,筛选标准如下:(1)设计引物的 SSRs 类型为非单核苷酸重复模体、非复合重复模体;(2)仅选取每条 read 上有一个 SSR 的 SSRs 类型设计引物,以避免扩增过程中扩增出第二条 SSR 影响多态性;(3)设计的引物必须在某一个 Clusters 内,且 Clusters 内 SSRs 的长度多态性≥2;(4)每一条设计的引物在 Clusters 中必须有两条引物支持(避免测序错误);(5)去除完全相同的引物结果。

1.2.4　引物验证

从筛选后的设计引物中选择多态性较高的引物用于实验验证,引物采用接头法合成,即合成时在上游引物加上 21 bp 的接头序列。采用接头法进行 PCR 扩增时,第一步带接头的上游引物与下游引物、模板结合,得到带有接头序列的 PCR 产物,第二步带荧光基团的接头引物与下游引物、第一步的 PCR 产物结合,得到带有荧光基团和 21 bp 接头序列的 PCR 产物。PCR 扩增体系为 10.0 μL,包含 5.0 μL 2× Taq PCR Master Mix,10 pmol/μL 上、下游引物各 0.5 μL,基因组 DNA 1.0 μL,用灭菌超纯水补至 10.0 μL。每个群体选择 2 个样本,共计 12 个样本筛选验证所设计引物,反应在 Veriti384 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)上进行。PCR 扩增程序设置为 95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 30 s,62－52 ℃梯度退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,运行 10 个循环;95 ℃变性 30 s,52 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,运行 25 个循环;72 ℃延伸 20 min,最后 4 ℃保存。PCR 反应结束后,扩增产物经荧光毛细管电泳检测。使用 GeneMarker 3.0.0 软件对结果进行分析,获得每个样品的等位基因数、峰图和基因型。

2　结果与分析

2.1　简化基因组测序数据质量

锈斑蟳 6 个样本的简化基因组测序共获得原始数据 6.78 GB,每个样本的数据量为(1 129 203 648± 145 715 946.0) bp,序列数为 7 841 692±1 011 916.3,GC 比例为 43.37±0.73,Q30%为 95.04±0.23。对数据进行质控过滤后得到高质量数据 6.44 GB,每个样本过滤后的高质量序列数据量为(1 073 912 793±139 382 244.1) bp,序列

数为 7 563 637± 979 862.3,GC 比例为 43.18±0.73,Q30%为 97.36±0.05(表 2)。结果表明,送测样本的数据质量满足分析要求,测序数据准确度较高,GC 比例在正常范围。

表 2 锈斑蟳简化基因组测序数据质量

Table 2 Quality of data obtained by restriction site-associated DNA sequencing for *C. feriata*

样本 Sample	过滤前 Before filter				过滤后 After filter			
	序列数 Sequence number	数据量/bp Data/bp	GC 比例 GC content	Q30%	序列数 Sequence number	数据量/bp Data/bp	GC 比例 GC content	Q30%
GD01	8 142 426	1 172 509 344	43.79	95.16	7 857 916	1 116 765 135	43.63	97.34
ND01	7 973 226	1 148 144 544	43.68	94.57	7 672 878	1 085 459 924	43.44	97.26
GX01	6 638 540	955 949 760	43.33	95.19	6 418 858	912 078 772	43.16	97.39
HN01	8 518 824	1 226 710 656	41.82	95.18	8 234 968	1 169 521 701	41.64	97.44
ZJ01	6 452 318	929 133 792	44.08	94.93	6 202 428	880 836 211	43.90	97.36
FJ01	9 324 818	1 342 773 792	43.49	95.19	8 994 774	1 278 815 014	43.33	97.36
Mean value	7 841 692±1 011 916.3	1 129 203 648±145 715 946.0	43.37±0.73	95.04±0.23	7 563 637±979 862.3	1 073 912 793±139 382 244.1	43.18±0.73	97.36±0.05

2.2 简化基因组中的 SSR 位点情况

将 6 个样本的数据进行序列合并后得到 popA 样本集,样本 popA 中可检测数据量为 2.24 GB,可检测序列数为 9 568 560。通过 MISA 软件开展 SSR 搜索后识别出 SSR 位点 2 419 242 个,含有 SSR 的序列数为 1 786 277,其中含有超过一个 SSR 位点的序列数为 480 143,存在复合性 SSR 位点的序列数为 604 684。

对锈斑蟳不同 SSR 的类型和基序等进行统计(表 3)。其中,二核苷酸重复基序最多,数量为 1 063 280 个,占总位点的 43.95%;其次为单核苷酸的重复基序,数量为 694 638 个,占总位点的 28.71%;三核苷酸重复基序的数量为 559 377 个,占总位点的 23.12%,四核苷酸和五核苷酸重复基序数量分别为 85 909 和 10 148 个,分别占总位点的 3.55%和 0.41%;六核苷酸重复基序的数量最少,仅有 5 890 个,占总位点的 0.24%。在这些 SSR 位点中,单核苷酸重复位点中 A/T 为主要基序,占该类型基序的 97.72%;二核苷酸重复基序类型有 12 种,其中主要基序为 AG/CT 和 AC/GT,占比分别为 57.72%和 40.33%;三核苷酸重复基序有 60 种,ACT/AGT、AGG/CCT 和 AAT/ATT 为主要基序,共占该类型基序的 59.12%;四核苷酸重复基序的种类数为 207 种,其中 AAAT/ATTT 和 ACAG/CTGT 为主要基序,占该类型基序的 38.53%;五核苷酸的重复基序类型数量为 275,主要基序分别为 AACCT/AGGTT。六核苷酸重复基序类型种类数最多,达 287 种,其中主要基序为 ACAGAG/CTCTGT 和 AGAGGG/CCCTCT,数量分别为 1 187 和 1 170 个。

表 3 锈斑蟳简化基因组中 SSR 位点信息

Table 3 Information of SSR loci in *C. feriata*

SSR 类型 SSR type	重复基序数量 Number of repeated motifs	占总基序数量的比例/% Percentage in total number of motifs/%	重复基序类型数量 Number of motif type	主要基序 Main motif
Mono-nucleotide	694 638	28.71	4	A/T
Di-nucleotide	1 063 280	43.95	12	AG/CT,AC/GT
Tri-nucleotide	559 377	23.12	60	ACT/AGT,AGG/CCT,AAT/ATT
Tetra-nucleotide	85 909	3.55	207	AAAT/ATTT,ACAG/CTGT
Penta-nucleotide	10 148	0.41	275	AACCT/AGGTT
Hexa-nucleotide	5 890	0.24	287	ACAGAG/CTCTGT,AGAGGG/CCCTCT

2.3 锈斑蟳 SSR 位点基序的分布

锈斑蟳基因组不同类型 SSR 位点基序的重复次数统计见表 4,单核苷酸的基序重复次数主要集中在 10—13 次,二核苷酸的基序重复次数主要集中在 6—7 次,三核苷酸、四核苷酸和五核苷酸的基序重复次数主要集中在 5—7 次,六核苷酸的基序重复次主要集中在 5—6 次。

表 4 锈斑蟳不同类型及不同重复次数 SSR 位点基序的分布数量

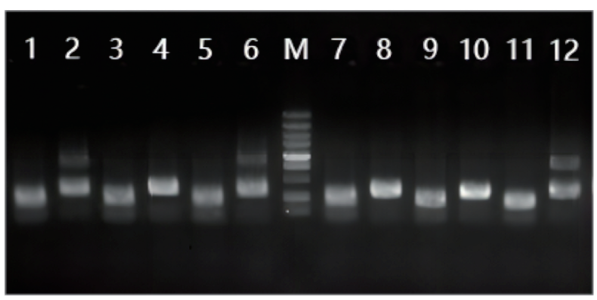
Table 4 Amounts of different types of motifs with different repeats in SSR loci in *C. feriata*

重复次数 Repeat number	重复基序的分布数量 Amounts of motifs					
	单核苷酸 Mono-nucleotide	二核苷酸 Di-nucleotide	三核苷酸 Tri-nucleotide	四核苷酸 Tetra-nucleotide	五核苷酸 Penta-nucleotide	六核苷酸 Hexa-nucleotide
5	0	0	131 289	34 747	5 591	3 067
6	0	110 740	110 974	18 062	2 078	1 427
7	0	62 487	62 892	11 630	1 144	558
8	0	42 716	45 118	7 004	487	363
9	0	37 234	32 888	4 243	277	145
10	219 563	30 358	27 309	2 872	260	88
11	103 880	28 627	37 296	2 384	173	71
12	67 665	27 380	16 497	1 407	47	40
13	53 936	24 662	13 419	935	21	40
14	41 639	22 879	12 417	744	24	24
15	32 064	22 071	10 272	538	12	39
16	23 119	21 897	8 493	471	12	7
17	16 602	19 592	8 509	201	6	7
18	13 458	19 909	6 547	179	7	0
19	12 281	18 356	9 125	121	3	3
20	12 678	19 816	4 933	86	2	9
Above 20	97 753	555 456	21 399	285	4	2

2.4 多态性引物筛选与验证

利用 CD-HIT 4.8.1 软件进行 SSR 聚类后共获得 94 793 个聚群。对这些聚群进行多态性评估,多态性为 1 的聚群数量为 60 205 个,占总聚群的 63.51%,多态性>1 的数量为 34 588 个,占总聚群的 36.49%。

利用 Primer3 v2.3.6 软件对搜索到的多态性>1 的聚群内的 SSR 序列针对位点两端设计引物,筛选过滤后共获得 21 330 对锈斑蟳微卫星引物,优先选取多态性高的 192 对设计引物,利用 12 个锈斑蟳样本 DNA 进行 PCR 扩增,对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。以 SPT689F/SPT690R 引物为例,PCR 产物表现出明显的单一条带以及较好的多态性(图 1)。



Marker (M) bands are 100,250,500,750,1 000,1 500,2 000,3 000,and 5 000 bp from bottom to top,and 1—12 represent individual samples.

图 1 微卫星引物 SPT689F/SPT690R 的 12 个样本 PCR 产物结果

Fig.1 PCR product results of 12 samples with microsatellite primers SPT689F/SPT690R

对检测合格的PCR产物进行毛细管电泳分型，根据荧光信号，采用GeneMarker 3.0.0软件对分型结果进行读取，以XBX007位点为例（图2），毛细管电泳分型谱带清晰，杂峰少，最后筛选出14对具有较高多态性的SSR引物（表5）。这14对引物的等位基因数共136个，每个引物的等位基因数在4－14，引物的期望杂合度（H_e）为0.503－0.892，观测杂合度（H_o）为0.167－1.000，多态信息含量（PIC）为0.456－0.882（表6）。

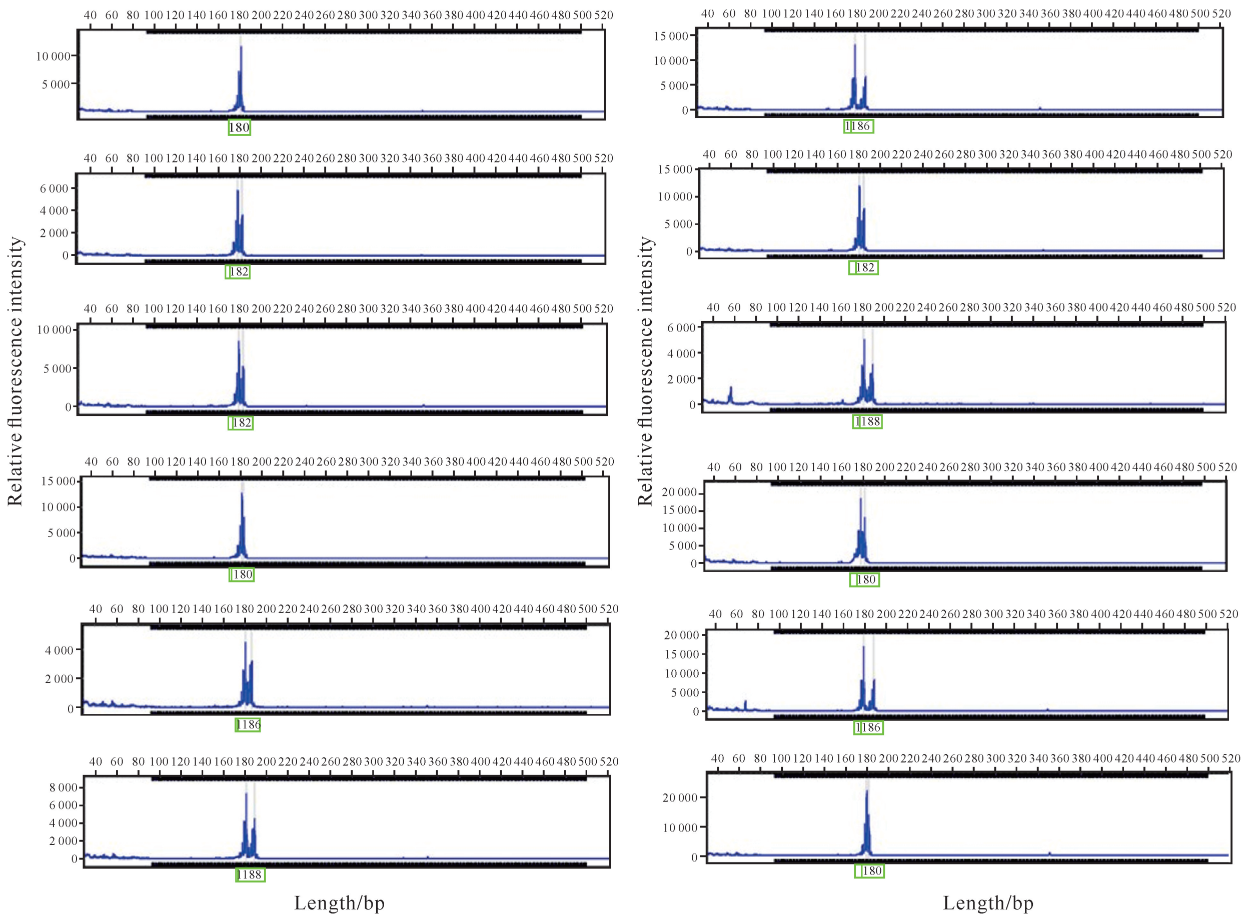


图2　12个个体的微卫星引物XBX007基因分型结果

Fig.2　Gene typing results of 12 individuals based on SSR primer XBX007

表5　筛选的锈斑蟳微卫星引物的序列信息

Table 5　Sequence information of the selected SSR primers of *C. feriata*

SSR位点 SSR loci	正向引物序列（5′→3′） Forward primer sequence (5′→3′)	反向引物序列（5′→3′） Reverse primer sequence (5′→3′)	重复单元 Repeat motif	预期长度/bp Expected size/bp
XBX005	CACTTTTGGCATCAGGTGAG	GTGCAGTTAAGGTGGGGATG	(AG)19	164
XBX007	GAGGAAAGCAAAACCGATGA	CCGTGCAGTGACTGATGACT	(CA)18	171
XBX031	ACTGCGCGAGGAGAATAAAG	TGGCCAAGGTTGAGCTACTT	(CA)23	226
XBX046	GTATTCCCCTTGGACTGGGT	GAAAGTGGCGAGGATTGGTA	(TC)22	136
XBX088	GGAGTGAGTGAATGCCAAAAA	TTTGTGTTGCTTCATCTTTTGAA	(TC)27	176
XBX102	TGCTTATGCGTATGGAGTGC	CGAAAAACAAAGCGTCACTG	(CA)44	193
XBX110	GGCGACATTTCAACAGACAA	TCATCGTCTGAGCAAGTTGG	(CA)29	249
XBX112	ATGAGAGAAGGGGCGTATGT	GCGGAAATTCTTGGACGATA	(CA)25	198

续表

Continued table

SSR 位点 SSR loci	正向引物序列(5′→3′) Forward primer sequence (5′→3′)	反向引物序列(5′→3′) Reverse primer sequence (5′→3′)	重复单元 Repeat motif	预期长度/bp Expected size/bp
XBX118	GACTAATTAACCGTGTTGGGC	TGTTTGGCGGGAGAAGTTAC	(AG)11	232
XBX122	TCTCCCTCTGCTTGTCATTG	ATATAGCAGGAAATGCCCCC	(AG)25	141
XBX133	AAATACGGTGTTGGAGAGGG	CCAACAACAAAGCAACGAAA	(TC)20	99
XBX135	AGGTGGAAGGTTACGGTGGT	TAGGGAGAAGGATGTGCTCG	(TG)12	195
XBX152	TTAAATGGGATGAGTTGAGCG	AATACGCCCGCAGTAAATTG	(GT)19	210
XBX153	TTTCACAACAGCGGAGTCAG	GAGGGAAGGACAAGGGAGAG	(CT)15	153

表 6　筛选的锈斑蟳微卫星引物的多态性验证

Table 6　Polymorphism validation of the selected SSR primers of *C. feriata*

微卫星位点 SSR loci	样本数 Number	等位基因数 Number of alleles	有效等位基因数 Effective number of alleles	观测杂合度(H_o) Observed heterozygosity (H_o)	期望杂合度(H_e) Expected heterozygosity (H_e)	多态信息含量(PIC) Polymorphism Information Content (PIC)
XBX005	12	14	8.443	0.917	0.882	0.871
XBX007	12	6	4.810	0.917	0.792	0.764
XBX031	12	12	9.271	0.750	0.892	0.882
XBX046	12	6	2.132	0.667	0.531	0.509
XBX088	12	12	6.393	0.583	0.844	0.828
XBX102	12	4	2.013	0.167	0.503	0.456
XBX110	12	10	6.111	0.833	0.836	0.819
XBX112	12	12	8.472	0.667	0.882	0.871
XBX118	12	11	7.790	1.000	0.872	0.860
XBX122	12	13	9.257	1.000	0.892	0.882
XBX133	12	10	8.016	1.000	0.875	0.863
XBX135	12	11	6.400	0.917	0.844	0.827
XBX152	12	8	2.964	0.667	0.663	0.636
XBX153	12	7	4.365	0.750	0.771	0.738

3　讨论

设计出足够数量的 SSR 标记是群体遗传结构分析及种质资源保护研究等方面的基础。传统的微卫星标记开发方法是利用基因组文库构建微卫星富集文库后进行杂交测序,步骤较为繁琐且耗时长、效率低,无法满足遗传学研究中需要快速开发大量分子标记的要求[14]。近年来随着高通量测序技术的发展,更为高效廉价的简化基因组测序已被较多地应用于 SSR 引物的开发。本研究基于简化基因组测序方法共获得 2 419 242 个锈斑蟳微卫星位点,包含 SSR 的序列数量为 1 786 277 条,这些微卫星位点可以设计较多数量的引物,为下一步研究提供条件。本研究所鉴定到的微卫星位点以二核苷酸重复基序为主,其次是单核苷酸重复基序,这与在远海梭子蟹(*Portunus pelagicus*)[25]、蛛雪蟹(*Chionoecetes opilio*)[26]、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)[27]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)[28]、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)[29]等其他甲壳类动物 SSR 标记中发现的二碱基重复基序数量最多的研究结果一致。同时,锈斑蟳重复基序的类型也表现出一定的偏倚性,如单核苷酸、五核苷酸重复基序中主要基序分别为 A/T、AACCT/AGGTT,其中 A/T 为大多数无脊椎动物的主要基序[30],AACCT/AGGTT 与其他甲壳类动物基序存在差异,这可能与物种特异性有关。

本研究经简化基因组技术测序组装、筛选过滤与

扩增验证,开发确认了 14 对锈斑蟳 SSR 多态性引物,获得率总体为 7.3%。从遗传多样性来看,微卫星标记中的杂合度能较好地反映群体中等位基因的丰富程度和均匀程度[31],本研究所得 14 对锈斑蟳 SSR 引物的 H_o 为 0.167－1.000,平均值为 0.770,处于较高水平,表明锈斑蟳样本种群有较高的遗传多样性。从片段多态性来看,SSR 等位基因数目和 PIC 能从一定程度上反映遗传标记包含或提供的遗传信息含量[31],本研究获得的 14 对多态性微卫星引物中,等位基因数为 4－14,高于 Cui 等[32]获得的拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)微卫星等位基因数(5－9),和 Yap 等[25]获得的远海梭子蟹微卫星等位基因数(2－17)相近,但远低于 Puebla 等[26]获得的蛛雪蟹微卫星标记等位基因数(14－79),这种差异可能是群体物种的选择以及不同位点本身的变异情况不同所致。同时,这些引物的 PIC 为 0.456－0.882,其中仅 XBX102 为中度多态性位点(0.25＜PIC＜0.50),其他均为高度多态性位点(PIC≥0.50),表明本研究开发的微卫星 DNA 标记具有较高的多态性,将其用于锈斑蟳群体遗传多样性研究的可靠性较高。

对比基于锈斑蟳全基因组数据的微卫星标记开发结果[22]可以发现,锈斑蟳全基因组测序共获得原始数据 126.6 GB,鉴定出 3 779 209 个微卫星位点,而本研究仅基于 6.78 GB 简化基因组原始测序数据,就可以分离鉴定出 2 419 242 个微卫星位点,表明基于简化基因组数据的微卫星位点的开发效率高于全基因组。此外,本研究基于简化基因组获得的 SSR 引物的 H_o、等位基因数目和 PIC 平均值分别为 0.770、9.710、0.770,均高于全基因组测序获取的 SSR 引物平均值(0.691、6.800、0.652),且简化基因组获取的 14 个引物中高度多态性位点比例为 92.86%,高于全基因组测序获取的 SSR 引物高度多态性位点比例(78.57%),这表明高通量测序技术中简化基因组测序技术能相对高效地获得目标物种的序列遗传信息,有利于筛选多态性高、特异性强的引物,是一种较为理想可行的技术[33]。综上,本研究基于简化基因组开发的锈斑蟳微卫星 DNA 标记和多态性引物,可为后续锈斑蟳群体遗传多样性评价、种质资源保护和管理、遗传连锁图谱构建、分子标记辅助育种等工作提供数据基础,为锈斑蟳品种选育和品系遗传种质评估提供科学依据。

参考文献

[1] 黄培民.东海南部锈斑蟳数量分布及生物学特点[J].福建水产,2006,28(1):23-25.

[2] 王红勇,姚雪梅.虾蟹生物学[M].北京:中国农业出版社,2007.

[3] 张珏.溶解氧、温度、盐度、氨氮和亚硝酸盐氮对锈斑蟳(*Charybdis Feriatus*)存活和摄饵的影响[D].湛江:广东海洋大学,2010.

[4] 俞存根,宋海棠,姚光展.东海中南部海域锈斑蟳渔业生物学和数量分布[J].湛江海洋大学学报,2005,25(3):24-28.

[5] 俞存根,宋海棠,姚光展.东海细点圆趾蟹数量分布的研究[J].水产学报,2005(2):198-204.

[6] 王语同.闽南渔场蟹笼作业渔获组成和主要种类[J].河北渔业,2011(9):16-21.

[7] 邹雄,杨明秋,蒲利云,等.锈斑蟳人工育苗技术[J].湖北农业科学,2023,62(9):97-100.

[8] 廖永岩,黄惠良,王能钦.室内锈斑蟳幼体发育的形态观察[J].热带海洋学报,2010,29(4):138-147.

[9] 陈瑜,许丹,何鹏飞,等.锈斑蟳蒸煮液和酶解液氨基酸组成及滋味分析[J].食品研究与开发,2022,43(18):157-163.

[10] 黄美珍.福建海区拥剑梭子蟹、红星梭子蟹和锈斑蟳的食性与营养级研究[J].台湾海峡,2004(2):159-166.

[11] BECKMAN J S,WEBER J L.Survey of human and rat microsatellites [J],Genomics,1992,12(4):627-631.

[12] LIU Z J,CORDES J F.DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics [J],Aquaculture,2004,238(1/2/3/4):1-37.

[13] 石少磊,武丽娜,冯羿方,等.基因组检测技术在肉鸡遗传育种中的应用[J].中国畜禽种业,2023,19(12):122-128.

[14] 贺玉姣,胡万军,都玉蓉,等.基于高原鼠兔简化基因组数据的微卫星引物开发[J].野生动物学报,2021,42(3):730-736.

[15] 宁馨,姜小龙,邓敏,等.基于简化基因组数据开发岭南青冈微卫星引物[J].植物研究,2020,40(4):629-634.

[16] ANDREWS K R,GOOD J M,MILLER M R,et al.Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics [J].Nature Reviews Genetics,2016,17(2):81-92.

[17] LARSON W A,SEEB L W,EVERETT M V,et al.Genotyping by sequencing resolves shallow population structure to inform conservation of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J].Evolutionary Applications,2014,7(3):355-369.

[18] HOHENLOHE P A,AMISH S J,CATCHEN J M,et al.Next-generation RAD sequencing identifies thousands of SNPs for assessing hybridization between

rainbow and westslope cutthroat trout [J]. Molecular Ecology Resources,2011,11(Suppl 1):117-122.

[19] 屈政委,宋红梅,汪学杰,等.印尼虎鱼 RAD-seq 数据中微卫星标记的初步筛选及特征分析[J].淡水渔业,2019,49(4):9-15.

[20] 孔啸兰,李敏,陈作志,等.基于 RAD-seq 技术的长体圆鲹二、三核苷酸重复微卫星标记开发与评价[J].南方水产科学,2019,15(3):97-103.

[21] MA H Y,ZOU X,JI X S,et al. Discovery and characterization of a first set of polymorphic microsatellite markers in red crab (*Charybdis feriatus*) [J]. Journal of Genetics,2013,92(3):e113-e115.

[22] FANG S B,WU R X,SHI X,et al. Genome survey and identification of polymorphic microsatellites provide genomic information and molecular markers for the red crab *Charybdis feriatus* (Linnaeus,1758) (Decapoda: Brachyura:Portunidae) [J]. Journal of Crustacean Biology,2020,40(1):76-81.

[23] 杨思谅,陈惠莲,戴爱云.中国动物志:无脊椎动物 第四十九卷 甲壳动物亚门 十足目 梭子蟹科[M].北京:科学出版社,2011.

[24] 钟爱华.舟山沿海锈斑蟳肌肉氨基酸组成及营养分析[J].中国农学通报,2015,31(2):97-100.

[25] YAP E S,SEZMIS E,CHAPLIN J A,et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Portunus pelagicus* (Crustacea:Portunidae) [J]. Molecular Ecology Notes,2002,2(1):30-32.

[26] PUEBLA O,PARENT É,SÉVIGNY J M. New microsatellite markers for the snow crab *Chionoecetes opilio* (Brachyura: Majidae) [J]. Molecular Ecology Notes,2003,3(4):644-646.

[27] ZHU Z Y,SHI Y H,LE G W. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites from Chinese mitten crab,*Eriocheir sinensis* [J]. Molecular Ecology Notes,2006,6(3):838-839.

[28] DENISE K G,ACACIA A W. Characterization of 35 new microsatellite genetic markers for the pacific whiteleg shrimp,*Litopenaeus vannamei*: their usefulness for studying genetic diversity of wild and cultured stocks,tracing pedigree in breeding programs,and linkage mapping [J]. Journal of Shellfish Research,2007,26(4):1203-1216.

[29] 段亚飞,张喆,李吉涛,等.脊尾白虾血细胞 ESTs 的生物信息学与微卫星序列特征分析[J].水产科学,2016,35(5):562-567.

[30] JIA S W,LI Y C,CHEN S Q,et al. Microsatellite markers for *Monitipora digitata* designed using restriction-site associated DNA sequencing [J]. Frontiers in Marine Science,2023,10:1019419.

[31] 国伟,沈佐锐.微卫星 DNA 的多态性及其应用[J].生物技术通讯,2004,15(2):158-159.

[32] CUI H,MA H,MA L,et al. Development of eighteen polymorphic microsatellite markers in *Scylla paramamosain* by 5′ anchored PCR technique [J]. Molecular Biology Reports,2011,38(8):4999-5002.

[33] 欧阳泽怡,李志辉,牟虹霖,等.基于简化基因组开发青冈和滇青冈微卫星引物[J/OL].南京林业大学学报(自然科学版),2023,1-13(2023-05-25)[2024-04-17]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1161.s.20230524.1029.002.html.

Development of Microsatellite DNA Markers Based on RAD-seq Data of *Charybdis feriata*

TANG Di[1],YANG Mingqiu[1],ZOU Xiong[2],LIU Hongtao[1**]

(1. Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Maricultural Technologies,Hainan Academy of Ocean and Fisheries Sciences,Haikou,Hainan,571126,China;2. East China Sea Fisheries Research Institute,Chinese Academy of Fishery Sciences,Shanghai,200090,China)

Abstract:*Charybdis feriata* is an important marine aquatic species for conservation of germplasm resources in China,with a high economic value and a high genetic breeding value. Developing microsatellite DNA markers is helpful for studying the population ecology and germplasm resources of this species. In this study,the simplified genome information of *C. feriata* was obtained by restriction site-associated DNA sequencing (RADseq), and the microsatellite-related information was analyzed to develop microsatellite DNA markers. The results showed that a total of 2 419 242 Simple Sequence Repeat (SSR) loci were identified, among which the di-nucleotide and mono-nucleotide motifs were the most, each accounting for 43.95% and 28.71% of the total loci. Hexanucleotide repeat motifs were the most diverse, amounting to 287 types; followed by pentanucleotide repeat motifs (275 types). The number of repeats varied among different types of motifs in SSR loci. A total of 21 330 pairs of microsatellite primers for *C. feriata* were designed by primer3 v2.3.6, and 192 pairs of primers with high polymorphism were selected to be verified in 12 samples of *C. feriata*. The results showed that 14 pairs of primers had a single band and good polymorphism, and the number of alleles of each primer ranged from 4 to 14. The expected heterozygosity (H_e) and observed heterozygosity (H_o) were 0.503–0.892 and 0.167–1.000, respectively, and the Polymorphic Information Content (PIC) was 0.456–0.882. This study showcases that this method is feasible in screening SSR markers for *C. feriata*, and the obtained primers can be applied in the research of the genetic diversity and population genetics of *C. feriata*.

Key words: *Charybdis feriata*; RADseq; microsatellite; development of primers; genetic diversity

责任编辑:陆　雁