



利用高通量测序开发的熊本牡蛎微卫星标记评价野生和养殖群体的遗传多样性及通用性

黄飘逸¹, 马海涛², 喻子牛², 张跃环², 高红梅¹, 彭建军^{1*}

(1. 重庆师范大学生命科学学院, 重庆 401331;

2. 中国科学院南海海洋研究所, 广东广州 510220)

摘要: 利用高通量测序的方法, 从熊本牡蛎基因组中开发了20对具有多态性的微卫星标记, 通过微卫星标记位点比较了野生群体和养殖群体的遗传多样性。野生群体中, 所有位点共扩增出330个等位基因, 等位基因数(N_a)范围为6~39, 平均等位基因数为16.500 0; 有效等位基因数(N_e)范围为1.352 9~33.361 7, 平均值9.517 2; 观测杂合度(H_o)范围为0.200 0~1.000 0, 平均值0.671 5; 期望杂合度(H_e)范围为0.265 6~0.987 7, 平均值0.832 1; Shannon-Weiner指数(I)范围为0.648 3~3.585 8, 平均值2.276 9; 多态信息含量(PIC)范围为0.254 5~0.969 2, 平均值0.803 5, 共有16个位点符合Hardy-Weinberg平衡。养殖群体中, N_a 平均值为10.250 0, N_e 平均值为5.843 4, H_o 平均值为0.639 1, H_e 平均值为0.763 6, I 平均值为1.791 4, PIC 平均值为0.720 7。结果显示, 熊本牡蛎养殖群体的遗传多样性低于野生群体, 但仍然维持在高度多态水平。研究表明, 在熊本牡蛎人工繁育过程中, 使用大数量的亲本进行繁育, 可有效防止选育群体的遗传多样性降低, 但人工选育对选育群体的遗传多样性也产生了一定的影响。另外, 分析了这些引物在近缘种葡萄牙牡蛎、长牡蛎、香港牡蛎、有明牡蛎、僧帽牡蛎、咬齿牡蛎以及舌骨牡蛎中的通用性情况, 发现XB1-6、XB1-39和XB1-45 3个位点在8个物种中均能扩增出目的条带, XB1-41仅能在熊本牡蛎中扩增出目的条带。

关键词: 熊本牡蛎; 微卫星标记; 野生群体; 养殖群体; 通用性

中图分类号: Q 348; S 917.4

文献标志码: A

熊本牡蛎(*Crassostrea sikamea*)属于软体动物门(Molluscas)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、牡蛎科(Ostreidae)、巨蛎属(*Crassostrea*)^[1-2]。在日本、中国、韩国等多个国家有自然分布^[3-4], 并被引种至美国进行养殖^[4-5], 因其肉质鲜美、营养丰富, 同时体型较好, 在美国成为重要的海水养殖对象, 有很高的经济价值^[3, 6-7]。在我国, 熊本牡蛎是第4种牡蛎经济物种, 仅次于香港牡蛎(*C. hongkongensis*)、葡萄牙牡蛎(*C. angulata*)、长牡

蛎(*C. gigas*)^[8-9]。熊本牡蛎繁殖期晚, 可以弥补夏季因长牡蛎、有明牡蛎(*C. ariakensis*)等重要养殖物种处于繁殖期而导致的市场空白^[3, 6]。因此, 熊本牡蛎的良种选育对于促进其养殖业的发展极其重要。

高通量测序, 又称为第二代DNA测试技术, 或称世代测序技术^[10], 是可以同时对几十万到几百万条DNA序列进行测序的技术^[11]。通过将待检测的DNA序列打断为小片段, 以其为模板,

收稿日期: 2019-03-09 修回日期: 2019-06-06

资助项目: 国家自然科学基金(31702340, 31470570); 重庆市科委自然科学基金(cstc2014jcyjA80013); 重庆市教育委员会自然科学基金; (kj1400534); 广东省自然科学基金(2017A030310442)

通信作者: 彭建军, E-mail: jipeng74@163.com

4种不同荧光标记的碱基为底物,模拟DNA复制的过程,边合成边测序,具有成本低、速度快、通量高、准确率高(99%以上)等优点,同时具有定量功能,目前已经成为主要的测序技术,广泛应用于基因组、转录组测序等^[10-13]。微卫星DNA,又被称为简单重复序列(simple sequence repeat, SSRs)或短串连重复序列(short tandem repeats, STRs),是由2~6个核苷酸单元组成的串联重复序列。它由一段高度多态的串联重复序列和两端高度保守的侧翼序列共同构成^[14],存在于绝大多数真核生物的基因组中^[15],被用作亲缘关系鉴定、群体遗传结构分析及遗传图谱构建等方面^[16-18]。已有研究者针对牡蛎开发了微卫星分子标记,Wang等^[19]通过已发表的5 132条长牡蛎转录组序列获得了17个微卫星标记;Yu等^[20]从23 803条长牡蛎转录组序列中获得了51个微卫星标记;Wang等^[21]从9 101条美洲牡蛎(*C. virginica*)转录组序列中获得了53个微卫星标记,但并未有学者针对熊本牡蛎开发微卫星标记。

本实验通过高通量测序的数据从熊本牡蛎基因组中开发了20个高多态性的微卫星标记,利用这些位点对一个野生群体和一个养殖群体的遗传多样性进行了分析,同时检测了这些标记在近缘种中的通用性情况。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料包含2个熊本牡蛎的群体样品和21个熊本牡蛎近缘种的个体样品:①美国熊本牡蛎养殖群体(用群体A表示),共30个个体;②台山市下川岛野生群体(用群体TXX表示),共28个个体;③近缘种,葡萄牙牡蛎、长牡蛎、香港牡蛎、有明牡蛎、僧帽牡蛎(*Saccostrea cucullata*)、咬齿牡蛎(*Ostrea mordax*)以及舌骨牡蛎(*Hyotissa hyotis*),每个物种3个个体。

1.2 基因组DNA的提取及鉴定

采用传统酚/氯仿/异戊醇提取基因组DNA。用1%琼脂糖凝胶电泳检验DNA的完整性,并用NanoDrop2000紫外分光光度计检测DNA浓度和纯度。提取后的DNA样品于-20℃保存,使用时稀释到20~50 ng/μL。

为了确保熊本牡蛎物种单一性,采用线粒体DNA的16S *rDNA*基因(F: CGCCTGTTTATCAAAAA CAT, R: CCGGTCTGAACTCAGATCACGT)对每

个个体进行物种鉴定。PCR反应体系50 μL: 5×PCR mix 25 μL(genestar公司), 10 μmol/L的上下游引物各5 μL, DNA模板5 μL, 灭菌水补齐。PCR反应程序: 95℃预变性5 min; 95℃变性50 s; 50℃退火50 s; 72℃延伸1 min, 共30个循环; 72℃终延伸10 min。PCR产物送至南京英维捷基贸易有限公司进行测序, 测序结果在NCBI数据库中进行比对分析。

1.3 微卫星引物的设计和合成

选取完整性和纯度较高的熊本牡蛎单个个体基因组DNA送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行高通量测序, 并针对含有微卫星核心的序列设计引物^[22], 选取192对微卫星引物送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 微卫星引物的筛选

选用5个不同个体DNA模板对微卫星引物进行初步筛选, 选出能稳定扩增微卫星标记的引物, 再通过温度梯度PCR进行退火温度的优化。实验使用的仪器为Eppendorf普通PCR仪。PCR反应体系共10 μL: 5×PCR mix 5 μL(genestar公司), 上下游引物各1 μL (10 μmol/L), DNA模板1 μL (50 ng/μL), 灭菌水补齐。PCR反应程序: 95℃预变性5 min; 95℃变性30 s, 退火30 s, 72℃延伸1 min, 30个循环; 72℃终延伸10 min。PCR产物用8%聚丙烯酰胺凝胶检测, 银染后扫描保存。

1.5 群体多态性检测

挑选出多态性好、缺失少、扩增结果稳定的微卫星标记进行野生群体PCR扩增, 并进行评价, 再利用筛选出的引物对养殖群体DNA进行扩增, 比较分析野生群体和养殖群体的遗传多样性。实验加入了带荧光标记的M13引物(TGTAAAACGACGGCCAGT), PCR反应体系共10 μL: 5×PCR mix 5 μL(genestar公司), 上游引物0.1 μL (10 μmol/L), 下游引物0.4 μL (10 μmol/L), 带荧光的M13引物0.4 μL (10 μmol/L), DNA模板1 μL (50 ng/μL), 灭菌水补齐。PCR反应程序: 95℃预变性5 min; 95℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 30个循环; 95℃变性30 s, 53℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 8个循环; 72℃终延伸20 min。产物送至天一辉远生物科技有限公司进行毛细管分型。

1.6 多态性位点引物通用性检测

选用香港牡蛎等7个近缘种，每个物种3个个体DNA作为模板进行通用性检测。PCR反应体系、程序同“微卫星引物的筛选”部分，PCR产物用8%聚丙烯酰胺凝胶检测，银染染色后扫描保存。

1.7 数据分析

通过Genepop 4.0.6软件检验Hardy-Weinberg平衡；Popgene 32软件分析位点等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Shannon-Weiner指数(I)；PIC 6.0软件计算每个位点的多态性信息含量(PIC)。

2 结果

2.1 牡蛎样品的个体鉴定

熊本牡蛎养殖群体(A)共提取40个个体的基

因组DNA，测序结果在NCBI数据库中进行BLAST在线比对，结果发现全部为熊本牡蛎，选用30个个体进行群体遗传多样性分析。熊本牡蛎野生群体(TXX)共提取30个个体的基因组DNA，经鉴定有2个非熊本牡蛎个体，选用剩余的28个个体进行群体遗传多样性分析。

2.2 微卫星标记的多态性分析

共筛选出20个具有多态性的微卫星标记(表1)，聚丙烯酰胺凝胶电泳图条带清晰，毛细管分型峰值多在3 000以上，说明这些微卫星标记具有较高的可靠性(图1)。20个微卫星标记在野生群体中表现出较高的多态性(表2)。所有位点在野生群体中共扩增出330个等位基因，每个微卫星位点 N_a 为6(XB1-83)~39(XB1-71)，平均值为16.500 0。 N_e 为1.352 9~33.361 7，平均值为9.517 2； H_o 为0.200 0~1.000 0，平均值为0.671 5； H_e 为0.265 6~

表 1 20对熊本牡蛎微卫星引物特征

Tab. 1 Characteristics of 20 pairs of microsatellite primers for *C. sikamea*

引物号 locus	登录号 accession no.	重复单位 repeat motif	正向引物(5'-3') forward primer sequences	反向引物(5'-3') reverse primer sequences
XB1-6	MK359108	(CAT) ₁₁	ATCCAATTGTCAGTGCCTTTAGA	AGCAATAACATCCACCAAAGAGT
XB1-13	MK359109	(TTG) ₉	AGCCTTATGTCGCTCTTTGATAA	ACTATTGGGATAAAAAGAAATGTTCA
XB1-25	MK359110	(TATCA) ₆	CTCCTTTCAGCAACCTTTAGAAAT	GCAAGGTAATTACATGGTGAATTG
XB1-39	MK359111	(GTCT) ₈	TCGAGTTATCGAGATTCACCTGT	AAGCATTCCATTTGTAAGTGACTGT
XB1-41	MK359112	(AG) ₁₅	GAATCTAGGCAAAAAGTAAGGCGT	TTTGCAAATAGCAACAAAGAACA
XB1-45	MK359113	(CT) ₁₅	ATCGAAGAAAGACAACAGACTGG	CGCCACATTTTTAATACCCCTAC
XB1-55	MK359114	(TGA) ₁₁	AGTGACCTACCTTTGCATGTGTT	ATTCTCTGCCAAGTCTATCTCC
XB1-71	MK359115	(AGAA) ₈	TGAACATTTTTAAATCCGTTTTG	CGACAGTCTTTCCAAATTCATC
XB1-77	MK359116	(GATA) ₈	GAGATTGTCTACGCTTCAGGAAA	CGAATGAACTTCGAAGCAAGTA
XB1-83	MK359117	(AG) ₁₆	TCTTGCTTACTGGTTAGACACA	TTGTTGATTATAGAAAAGCGTTTGA
XB2-12	MK359118	(TAAGC) ₆	TGATTGACCAATATGACACCTGA	CATGCATCAACAAATTAGGACAG
XB2-14	MK359119	(TGA) ₁₁	GACCGTTGAAAGTTGACTTCTGT	TTATCATCGTTGTCGTCATCATC
XB2-20	MK359120	(CAT) ₁₁	TGTTTGTGTAAAAAGGCTCTCA	GATCTTAAGCTGGCTGATGACA
XB2-38	MK359121	(GA) ₁₅	TTCCCATGTTAGTATGATCTCCTGT	AGATACCTGCAATGTCAAAGGC
XB2-45	MK359122	(ATAG) ₈	AAACGGACGGACAGACAGAC	AGAAAGGGGATTCTGTACTGAG
XB2-48	MK359123	(AG) ₁₅	ATTGGTAGATCCGCATACAAGA	TCACATTAATCCCAAGAGAATGG
XB2-59	MK359124	(GA) ₁₆	TTGCATCTAACCGTTTACTATCG	CAAATTTGAATATTTCTACATCCTGG
XB2-64	MK359125	(CA) ₁₆	CAAAAATTATGAAATCAAGGCG	ATAAGTCGAATGCTCTGCTTCAG
XB2-68	MK359126	(GAT) ₁₀	TGCAAAAATAACACTAACGATGG	TCATCATCATCATTACCTTCCC
XB2-79	MK359127	(AC) ₁₄	CGACACCTTTAAGATGCCTAGTG	ATGGTAAACTTCCCAGATGCTTT

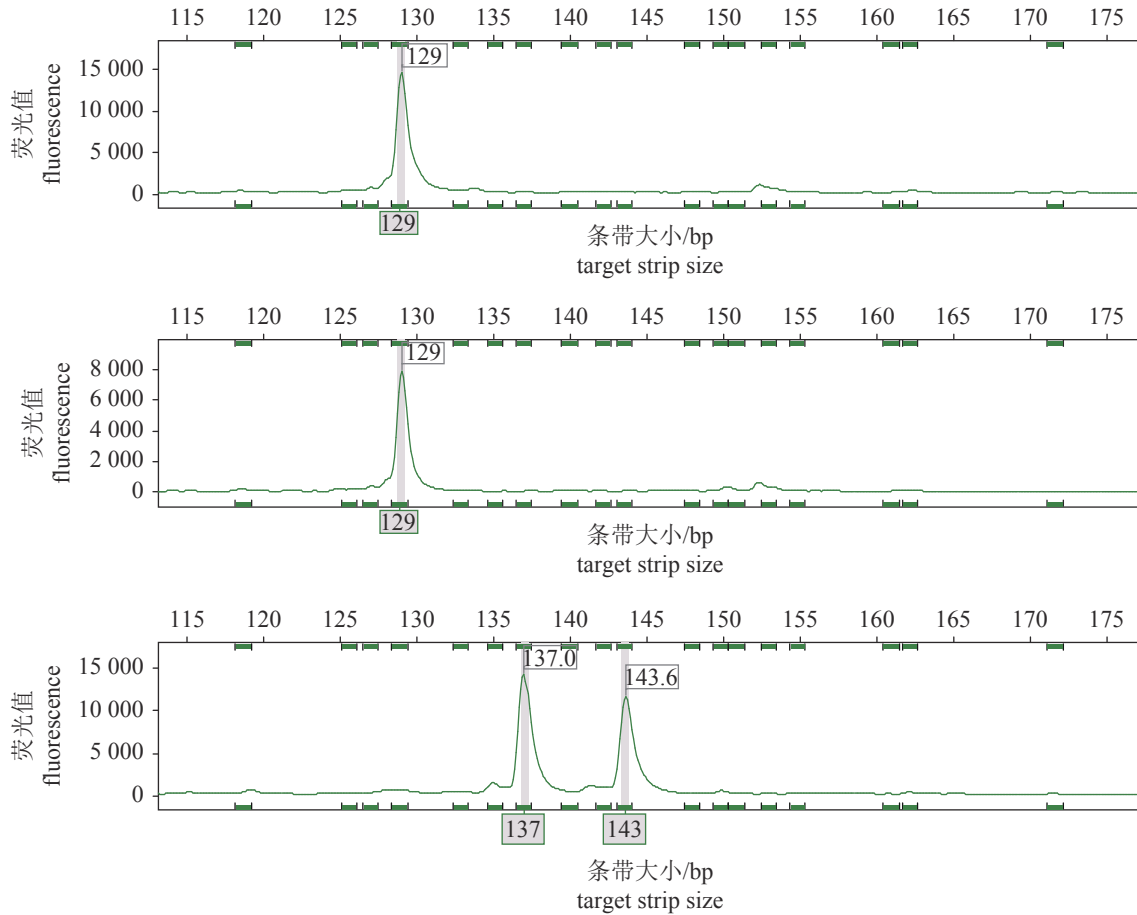


图 1 位点XB1-41的部分毛细管电泳结果

Fig. 1 Samples of capillary electrophoresis results for locus XB1-41

0.987 7, 平均值为0.832 1; I 为0.648 3~3.585 8, 平均值为2.276 9; PIC 为0.254 5~0.969 2, 平均值为0.803 5。 H_o 高于0.700 0的位点共有12个, H_e 为高分辨率($H_e > 0.700 0$)的共有17个, 仅位点XB1-25、XB1-39和XB1-83的 H_e 低于0.700 0。 PIC 为高度多态($PIC > 0.500 0$)的位点共有18个, 占90%, 仅位点XB1-25 PIC 含量为0.254 5、XB1-83的 PIC 含量为0.374 8, 属于中度多态位点。

2.3 Hardy-Weinberg平衡检测

在熊本牡蛎野生群体中有4个位点即XB1-45、XB2-12、XB2-20和XB2-45偏离平衡($P < 0.002$), 占20%。在熊本牡蛎养殖群体中, 共有5个位点即XB1-6、XB1-45、XB2-12、XB2-20和XB2-45偏离平衡($P < 0.002$), 占25%。其余微卫星位点均符合Hardy-Weinberg平衡(表2)。

2.4 养殖群体的遗传多样性分析

将所有引物在养殖群体中进行了扩增, 养殖群体中共扩增出205个等位基因, N_a 范围为

2(XB1-6)~23(XB1-71), 平均值为10.250 0; N_e 范围为1.707 8~13.043 5, 平均值为5.843 4; H_o 范围为0.241 4~1.000 0, 平均值为0.639 1; H_e 范围为0.421 5~0.939 0, 平均值为0.763 6; I 范围为0.693 1~2.813 6, 平均值为1.791 4; PIC 范围为0.375 0~0.918 2, 平均值为0.720 7(表2)。

2.5 引物通用性检测

选用了葡萄牙牡蛎、长牡蛎、香港牡蛎、有明牡蛎、僧帽牡蛎、咬齿牡蛎及舌骨牡蛎共7个物种进行引物通用性检测(表3)。XB1-6、XB1-39和XB1-45 3个位点在8个物种中均能扩增出目的条带; XB1-41仅能在熊本牡蛎中扩增出目的条带; XB1-83、XB2-38、XB2-48、XB2-59和XB2-79等5对引物在所能扩增出条带的物种中均表现出多态性。20对引物通用性由高到第为葡萄牙牡蛎中为75%, 长牡蛎中为70%, 香港牡蛎和有明牡蛎中为45%, 僧帽牡蛎中为25%, 舌骨牡蛎和咬齿牡蛎中为20%。

表2 20对微卫星引物在养殖群体和野生群体中的遗传多样性参数

Tab. 2 Genetic diversity parameters of 20 microsatellite primers for wild and cultured populations of *C. sikamea*

位点 locus	群体 population	等位基因数 N_a		有效等位基因数 N_e	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	Shannon-Weiner指数 I	多态性信息含量 PIC	Hardy-Weinberg平衡 P
XB1-6	A	13	2	2.000 0	1.000 0	0.511 1	0.693 1	0.375 0	0.000 0*
	TXX		12	7.744 0	0.818 2	0.891 1	2.225 6	0.857 9	0.049 5
XB1-13	A	14	8	5.696 2	0.866 7	0.838 4	1.894 2	0.802 9	0.509 5
	TXX		12	6.250 0	0.666 7	0.869 0	2.135 2	0.824 3	0.020 5
XB1-25	A	9	5	3.428 6	0.433 3	0.720 3	1.336 4	0.653 6	0.004 5
	TXX		7	1.352 9	0.285 7	0.265 6	0.648 3	0.254 5	1.000 0
XB1-39	A	8	4	2.405 9	0.518 5	0.595 4	1.033 9	0.524 3	0.473 9
	TXX		7	3.056 5	0.714 3	0.685 1	1.345 1	0.624 3	0.507 6
XB1-41	A	22	7	4.627 2	0.766 7	0.797 2	1.717 9	0.757 1	0.584 1
	TXX		15	11.261 3	0.840 0	0.929 8	2.538 9	0.904 4	0.052 5
XB1-45	A	21	7	4.795 1	0.357 1	0.805 8	1.676 4	0.760 7	0.000 0*
	TXX		14	11.764 7	0.200 0	0.938 5	2.532 1	0.908 5	0.000 0*
XB1-55	A	20	10	4.368 9	0.766 7	0.784 2	1.827 2	0.749 6	0.118 1
	TXX		17	8.568 3	0.857 1	0.899 4	2.455 5	0.874 1	0.664 7
XB1-71	A	49	23	12.277 4	0.827 6	0.934 7	2.813 6	0.913 5	0.074 6
	TXX		39	33.361 7	1.000 0	0.987 7	3.585 8	0.969 2	1.000 0
XB1-77	A	35	19	13.043 5	0.733 3	0.939 0	2.710 8	0.918 1	0.031 7
	TXX		20	7.031 4	0.714 3	0.873 4	2.459 1	0.848 5	0.088 9
XB1-83	A	9	6	1.707 8	0.400 0	0.421 5	0.869 7	0.388 3	0.037 6
	TXX		6	1.650 5	0.250 0	0.401 3	0.861 7	0.374 8	0.007 3
XB2-12	A	35	11	3.891 9	0.291 7	0.758 9	1.808 2	0.722 0	0.000 0*
	TXX		29	20.484 8	0.615 4	0.969 8	3.195 1	0.949 0	0.000 0*
XB2-14	A	34	16	8.411 2	0.800 0	0.896 0	2.436 8	0.872 4	0.038 0
	TXX		27	19.702 7	0.851 9	0.967 2	3.135 0	0.946 9	0.112 5
XB2-20	A	12	4	2.875 2	0.241 4	0.663 6	1.179 2	0.590 1	0.000 0*
	TXX		12	7.361 5	0.357 1	0.879 9	2.214 5	0.850 9	0.000 0*
XB2-38	A	21	13	10.650 9	0.866 7	0.921 5	2.437 5	0.898 4	0.053 9
	TXX		14	6.567 6	0.740 7	0.863 7	2.225 3	0.834 9	0.022 9
XB2-45	A	28	17	12.188 4	0.482 8	0.934 1	2.639 1	0.912 1	0.000 0*
	TXX		22	12.250 0	0.642 9	0.935 1	2.785 7	0.913 2	0.000 0*
XB2-48	A	23	15	5.625 0	0.600 0	0.836 2	2.118 8	0.806 3	0.015 4
	TXX		18	5.879 0	0.629 6	0.845 6	2.294 7	0.817 1	0.012 6
XB2-59	A	24	16	7.751 2	0.862 1	0.886 3	2.350 8	0.858 8	0.398 7
	TXX		19	6.877 4	0.740 7	0.870 7	2.441 4	0.845 9	0.055 8
XB2-64	A	19	9	4.663 2	0.833 3	0.798 9	1.716 9	0.753 1	0.558 2
	TXX		15	7.309 9	0.840 0	0.880 8	2.284 5	0.849 9	0.069 6

· 续表2 ·

位点 locus	群体 population	等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	Shannon-Weiner指数 I	多态性信息含量 PIC	Hardy-Weinberg平衡 P	
XB2-68	A	12	6	4.736 8	0.700 0	0.802 3	1.625 0	0.756 6	0.311 1
	TXX		11	6.660 1	0.807 7	0.866 5	2.110 3	0.834 2	0.216 3
XB2-79	A	15	7	1.724 1	0.433 3	0.427 1	0.943 0	0.400 2	0.075 8
	TXX		14	5.209 3	0.857 1	0.822 7	2.064 5	0.787 1	0.017 2
平均值	A	21.6	10.250 0	5.843 4	0.639 1	0.763 6	1.791 4	0.720 7	
	TXX		16.500 0	9.517 2	0.671 5	0.832 1	2.276 9	0.803 5	

注: *. 表示具有显著性差异($P<0.05$)
Notes: *. indicates the significant difference ($P<0.05$)

表 3 20对引物近缘种通用性检测

Tab. 3 Transfer ability in related species of 20 loci

位点 locus	聚丙烯酰胺电泳条带 polyacrylic acid electrophoresis strip							
	熊本牡蛎 <i>C. sikamea</i>	葡萄牙牡蛎 <i>C. angulata</i>	长牡蛎 <i>C. gigas</i>	香港牡蛎 <i>C. hongkongensis</i>	有明牡蛎 <i>C. ariakensis</i>	僧帽牡蛎 <i>S. cucullata</i>	咬齿牡蛎 <i>O. mordax</i>	舌骨牡蛎 <i>H. hyotis</i>
XB1-6	127~164 bp	+	+	+	+	+	+	+
XB1-13	166~198 bp	+	+	-	-	-	-	-
XB1-25	138~222 bp	-	+	-	-	-	+	-
XB1-39	140~166 bp	+	+	+	+	+	+	+
XB1-41	124~156 bp	-	-	-	-	-	-	-
XB1-45	151~192 bp	+	+	+	+	+	+	+
XB1-55	134~175 bp	+	+	-	-	+	-	-
XB1-71	143~315 bp	+	+	+	-	-	-	-
XB1-77	160~270 bp	+	+	+	+	+	-	-
XB1-83	192~238 bp	-	-	+	-	-	-	-
XB2-12	123~263 bp	+	+	-	-	-	-	-
XB2-14	118~215 bp	+	+	-	+	-	-	-
XB2-20	129~162 bp	+	-	-	-	-	-	-
XB2-38	172~236 bp	+	+	-	+	-	-	-
XB2-45	116~236 bp	-	-	-	-	-	-	+
XB2-48	129~193 bp	+	+	-	-	-	-	-
XB2-59	175~235 bp	+	+	+	+	-	-	-
XB2-64	135~178 bp	+	-	+	+	-	-	-
XB2-68	128~159 bp	-	-	+	+	-	-	-
XB2-79	114~156 bp	+	+	-	-	-	-	-
引物通用率 primer universal rate		75%	70%	45%	45%	25%	20%	20%

注: +. 表示能扩增出目的条带, -. 表示不能扩增出目的条带
Notes: +. indicating the fragments appeared; -. indicating the fragments not appeared

3 讨论

微卫星分子标记是研究群体遗传结构和多样性的工具, 获得微卫星序列一般有基因文库获取法、PCR扩增测序法及微卫星富集法

等^[23-24]。韩斐斐等^[25]通过基因组测序获得了34个长牡蛎的多态性微卫星位点; 白洁^[26]通过已发表的表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 序列获得了长牡蛎的68个多态性微卫星位点; 李莉^[27]通过已发表的序列获得了15个长牡蛎的多态

性微卫星位点。本实验采用高通量测序的方法获得了20个多态性微卫星标记,且均为核心序列,以不间断的重复方式首尾相连的完美型位点^[28],说明熊本牡蛎基因组具有较高的微卫星标记开发潜力,通过高通量测序可以得到大量稳定且多态性高的微卫星标记,且实施难度不大,效率更高。

所有位点在野生群体中共扩增出330个等位基因,等位基因数范围为6~39个,高于Wang等^[19]得到的3~10个及Yu等^[20]得到的3~11个。本实验中位点出现高多态性的可能原因:①当2个碱基微卫星单元的重复次数在12次以上,微卫星位点可能会表现出高度多态现象^[28]。本实验在挑选序列时,均选择微卫星序列长度大于27 bp,碱基重复次数均大于等于6次的序列,微卫星序列较长。②可能与实验使用的毛细管分型方法有关。毛细管电泳有分子内标作为参照,在判读目的条带分子量大小十分灵敏^[28]。若等位基因分子量差异较大、等位基因数目较多且检测个体数较多时,毛细管电泳比聚丙烯酰胺凝胶电泳更准确、高效^[29]。毛细管电泳起步较晚,但已成为重要的分离检测技术之一^[30]。

20个位点在野生群体中有4个位点偏离Hardy-Weinberg平衡,而在养殖群体中有5个位点偏离Hardy-Weinberg平衡。这可能与熊本牡蛎的生活方式有关,熊本牡蛎一般营固着生活,活动范围较小^[9],容易导致近亲交配,从而偏离Hardy-Weinberg平衡。而养殖群体所用的亲本个体数量一般相对较少,也可能造成微卫星位点偏离Hardy-Weinberg平衡现象。除此之外,无效等位基因也是导致微卫星位点偏离Hardy-Weinberg平衡现象的原因之一^[31]。

遗传多样性是生物多样性的核心,一个物种的遗传变异程度也决定了其稳定性和进化的潜能^[32-33]。*PIC*是指一个后代所获的某个等位基因标记来自其亲代的同一个等位标记的可能性,平均*PIC*是衡量等位基因片段多态性的很好指标^[34]。养殖群体*PIC*平均值为0.720 7,属于高度多态,但养殖群体的所有多样性参数平均值均低于野生群体。从结果分析,一方面养殖群体仍然具有较高的遗传多样性,这可能与繁育时选用的亲本个体数量有关系,繁育时选用大量优质亲本,有利于保持养殖群体的遗传多样性,同时有效避免近交衰退和瓶颈效应现象的

<http://www.sxuebao.cn>

出现。另一方面,养殖群体的遗传多样性要低于野生群体。这说明了人工选育对养殖群体的遗传多样性产生了一定影响。较高的遗传多样性是群体可以长期繁衍的保证,因此,在人工繁育的过程中需要有意识地增加野生个体数目,并及时用分子标记进行检测,防止遗传多样性进一步降低。

微卫星的侧翼序列通常比较保守,因此常用来跨物种开发通用性标记。一般来说,亲缘关系更相近的物种,引物跨物种扩增出来的可能性也更大。本实验选用了与熊本牡蛎相近的7个近缘种进行引物通用性检测,大部分微卫星位点可在一种或多种物种中扩增出条带。葡萄牙牡蛎(通用率75%)、长牡蛎(通用率70%)、香港牡蛎(通用率45%)、有明牡蛎(通用率45%)和熊本牡蛎同属于巨砺属,亲缘关系更近,因此表现出了更高的引物通用性。Wang等^[19]针对长牡蛎开发的17个微卫星标记在5个近缘种中进行引物通用性检测实验,熊本牡蛎中通用率13/17;葡萄牙牡蛎中通用率12/17;香港牡蛎中通用率12/17;有明牡蛎中通用率9/17,与本实验结果相近。

熊本牡蛎基因组有较高的微卫星开发潜力,本实验中共有11个位点(XB1-6、XB1-41、XB1-55、XB1-71、XB1-77、XB2-14、XB2-38、XB2-59、XB2-64、XB2-68和XB2-79)符合Hardy-Weinberg平衡,且具有高多态性($PIC \geq 0.500 0$)和高分辨率($H_o、H_e \geq 0.700 0$),这些位点更适合用于熊本牡蛎遗传多样性评价、个体鉴定及家系溯源等研究。

参考文献:

- [1] 阙华勇,刘晓,王海艳,等. 中国近海牡蛎系统分类研究的现状和对策[J]. *动物学杂志*, 2003, 38(4): 110-113. Que H Y, Liu X, Wang H Y, et al. Systematics of oysters along the coast of China: status and countermeasures[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2003, 38(4): 110-113(in Chinese).
- [2] 杜玄,郭希明,钱鲁闽. 福建沿海巨砺属牡蛎的主要种类及其分布[J]. *台湾海峡*, 2009, 28(3): 399-404. Du X, Guo X M, Qian L M. Distribution of *Crassostrea oysters* in coastal sea of Fujian[J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2009, 28(3): 399-404(in Chinese).
- [3] 王昌勃,李琪,孔令锋,等. 熊本牡蛎单体苗种生产技术研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2016, 46(11): 136-142, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 186.
- Wang C B, Li Q, Kong L F, *et al.* Establishment of single oyster (*Crassostrea sikamea*) seeds[J]. Periodical of Ocean University of China, 2016, 46(11): 136-142, 186(in Chinese).
- [4] 张跃环, 秦艳平, 张扬, 等. 熊本牡蛎多嵴和无嵴品系 F₁ 生长性状的群体选育[J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 882-889.
- Zhang Y H, Qin Y P, Zhang Y, *et al.* Population selection for growth in two strains of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(4): 882-889(in Chinese).
- [5] 吕晓燕. 熊本牡蛎人工繁育与长牡蛎单体苗种培育技术研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- Lü X Y. Studies on the techniques of artificial reproduction of the *Crassostrea sikamae* and cultivation of the cultchless spat of *Crassostrea gigas*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013(in Chinese).
- [6] 于洋, 李伟, 王许波, 等. 熊本牡蛎室内人工育苗技术研究[J]. 海洋湖沼通报, 2016(5): 104-108.
- Yu Y, Li W, Wang X B, *et al.* The study of *Crassostrea sikamea* indoor artificial seedling technique[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2016(5): 104-108(in Chinese).
- [7] Sekino M. In search of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* (Amemiya, 1928) based on molecular markers: is the natural resource at stake?[J]. *Fisheries Science*, 2009, 75(4): 819-831.
- [8] Wang H Y, Qian L M, Wang A M, *et al.* Occurrence and distribution of *Crassostrea sikamea* (Amemiya 1928) in China[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2013, 32(2): 439-446.
- [9] 武祥伟, 张跃环, 肖述, 等. CB 诱导熊本牡蛎三倍体及其存活率与倍化率的变化关系[J]. 水产学报, 2019, 43(4): 1029-1037.
- Wu X W, Zhang Y H, Xiao S, *et al.* Triploidy induction by CB and their survival rate and triploidy rate in Kumamoto oyster (*Crassostrea sikamea*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(4): 1029-1037(in Chinese).
- [10] 徐疏梅. 新一代DNA测序技术的应用与研究进展[J]. 徐州工程学院学报(自然科学版), 2018, 33(4): 60-64.
- Xu S M. Application and research progress of a new generation of DNA sequencing technology[J]. Journal of Xuzhou Institute of Technology (Natural Sciences Edition), 2018, 33(4): 60-64(in Chinese).
- [11] 王海. 高通量测序技术新名词的理解和辨析[J]. *中国科技术语*, 2017, 19(4): 51-54.
- Wang H. Discrimination of novel terms in high-throughput sequencing[J]. *China Terminology*, 2017, 19(4): 51-54(in Chinese).
- [12] 王兴春, 杨致荣, 王敏, 等. 高通量测序技术及其应用[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(1): 109-114.
- Wang X C, Yang Z R, Wang M, *et al.* High-throughput sequencing technology and its application[J]. *China Biotechnology*, 2012, 32(1): 109-114(in Chinese).
- [13] 于聘飞, 王英, 葛芹玉. 高通量DNA测序技术及其应用进展[J]. *南京晓庄学院学报*, 2010, 26(3): 1-5.
- Yu P F, Wang Y, Ge Q Y. High-fluxed DNA sequencing technology and its application development[J]. *Journal of Nanjing Xiaozhuang University*, 2010, 26(3): 1-5(in Chinese).
- [14] Zhan A B, Wang Y, Brown B, *et al.* Isolation and characterization of novel microsatellite markers for yellow perch (*Perca flavescens*)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 10(1): 18-27.
- [15] Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1984, 12(10): 4127-4138.
- [16] 代金霞. 微卫星DNA标记技术及其应用[J]. *农业科学研究*, 2005, 26(1): 67-70, 79.
- Dai J X. Application of microsatellite DNA as molecular genetic marker[J]. *Journal of Agricultural Sciences*, 2005, 26(1): 67-70, 79(in Chinese).
- [17] 瞿陆峰, 潘伟荣, 曾养志. 微卫星DNA标记及其应用[J]. *畜牧与饲料科学*, 2010, 31(4): 6-8.
- Qu L F, Pan W R, Zeng Y Z. Genetic marker and application of microsatellite DNA[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2010, 31(4): 6-8(in Chinese).
- [18] 张正义, 邢秀梅, 胡鹏飞, 等. 微卫星标记及其在动物亲缘关系鉴定中的应用[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(4): 1406-1412.
- Zhang Z Y, Xing X M, Hu P F, *et al.* Microsatellite markers and their application in animal genetic relationship identification[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(4): 1406-1412(in Chinese).
- [19] Wang Y, Ren R, Yu Z. Bioinformatic mining of EST-SSR loci in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Animal Genetics*, 2008, 39(3): 287-289.
- [20] Yu Z N, Wang Y H, Fu D K. Development of Fifty-one novel EST-SSR loci in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* by data mining from the public EST database[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2010, 2(S1): 13-18.
- [21] Wang Y P, Guo X M. Development and characterization

- of EST-SSR markers in the eastern oyster *Crassostrea virginica*[J]. *Marine Biotechnology*, 2007, 9(4): 500-511.
- [22] 雷杜娟. 额尔齐斯河贝加尔雅罗鱼微卫星标记筛选及其遗传多样性分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
Lei D J. Isolation of microsatellite makers for *Leuciscus leuciscus baicalensis* from the irtys river in Xingjiang and analysis of its genetic diversity[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017(in Chinese).
- [23] 刘志毅, 相建海. 微卫星DNA分子标记在海洋动物遗传分析中的应用[J]. *海洋科学*, 2001, 25(6): 11-13.
Liu Z Y, Xiang J H. Application of the microsatellite technique for genetic analysis in marine animals[J]. *Marine Sciences*, 2001, 25(6): 11-13(in Chinese).
- [24] 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): 2130-2137.
Sun B, Bao Y X, Zhao Q X, *et al.* Methods for obtaining microsatellite loci: a review[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28(10): 2130-2137(in Chinese).
- [25] 韩斐斐, 元海刚, 李莉, 等. 长牡蛎基因组微卫星引物的开发和特性描述[J]. *海洋通报*, 2011, 30(5): 566-571.
Han F F, Qi H G, Li L, *et al.* Development and characterization of SSR in genome for the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Marine Science Bulletin*, 2011, 30(5): 566-571(in Chinese).
- [26] 白洁. 太平洋牡蛎分子标记的开发与应用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
Bai J. Development and application of molecular markers in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010(in Chinese).
- [27] 李莉. 长牡蛎的分子标记筛选和遗传图谱构建[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2003.
Li L. Molecular marker development and linkage mapping in the pacific oyster *Crassostrea gigas* thunberg[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2003(in Chinese).
- [28] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA) *n*·(dG-dT) *n* polymorphisms[J]. *Genomics*, 1990, 7(4): 524-530.
- [29] 胡依依, 隋正红, 彭冲, 等. 聚丙烯酰胺凝胶与毛细管电泳检测龙须菜SSR位点的比较研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2018, 48(3): 65-72.
Hu Y Y, Sui Z H, Peng C, *et al.* Comparison on two SSR detection methods of polyacrylamide gel electrophoresis and capillary electrophoresis in *Gracilariaopsis lemaneiformis*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2018, 48(3): 65-72(in Chinese).
- [30] 牛夏梦, 勾新磊, 赵新颖. 毛细管电泳技术的发展与应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(11): 4341-4345.
Niu X M, Gou X L, Zhao X Y. Development and application of capillary electrophoresis technique[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2016, 7(11): 4341-4345(in Chinese).
- [31] Lehmann T, Hawley W A, Collins F H. An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles[J]. *Genetics*, 1996, 144(3): 1155-1163.
- [32] 沈浩, 刘登义. 遗传多样性概述[J]. *生物学杂志*, 2001, 18(3): 4-7.
Shen H, Liu D Y. Summary of genetic diversity[J]. *Journal of Biology*, 2001, 18(3): 4-7(in Chinese).
- [33] Solbrig O T. From genes to ecosystems: a research agenda for biodiversity: report of a IUBS-SCOPE-UNESCO workshop, Harvard Forest, Petersham, MA, USA, June 27-July 1, 1991[M]. Cambridge: IUBS, 1991.
- [34] 彭银辉, 刘楚吾, 郭昱嵩, 等. 三种笛鲷的野生群体和养殖群体遗传多样性的微卫星分析[J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(5): 810-814.
Peng Y H, Liu C W, Guo Y S, *et al.* Microsatellites analysis on genetic diversities of three species from wild and cultured populations of snappers (*Lutjanus*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2008, 16(5): 810-814(in Chinese).

Evaluation of genetic diversity and versatility of wild and cultured populations based on high-throughput sequencing of *Crassostrea sikamea* microsatellite markers

HUANG Piaoyi¹, MA Haitao², YU Ziniu², ZHANG Yuehuan², GAO Hongmei¹, PENG Jianjun^{1*}

(1. College of Life Sciences of Chongqing Nonmal University, Chongqing 401331, China;

2. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510220, China)

Abstract: Using high-throughput sequencing, we characterized 20 pairs of polymorphic microsatellite primers from *Crassostrea sikamea* genome, and we examined the markers in a wild population. A total of 330 alleles were found in 25 microsatellites. The observed number of alleles (N_a) ranged 6-39 in average of 16.500 0, and the effective number of alleles (N_e) ranged 1.352 9-33.361 7. The observed and expected heterozygosity values range 0.200 0-1.000 0 and 0.265 6-0.987 7, respectively. The Shannon Weiner index ranged 0.648 3-3.585 8 and Polymorphic information content (PIC) ranged 0.254 5-0.969 2. 16 microsatellite markers accord with Hardy-Weinberg equilibrium. Using these loci to analyze the genetic diversity of a cultured population, the average number of alleles was 10.25; the average number of N_e was 5.843 4. The observed heterozygosity (H_o) average was 0.639 1; the expected heterozygosity (H_e) average was 0.763 6; the Shannon-wiener index (I) average was 1.791 4; and the polymorphic information content (PIC) average was 0.720 7. It was found that the genetic diversity of *C. sikamea* cultured population was lower than that of the wild population, but it maintained a high-genetic diversity. The results of this study indicate that in the artificial breeding process of *C. sikamea*, the use of a large number of parents for breeding can effectively prevent the decline of genetic diversity of the cultured population, but artificial breeding also has a certain impact on the genetic diversity of the cultured population. The 20 loci were surveyed the cross-species proportions in *C. angulate*, *C. gigas*, *C. hongkongensis*, *C. ariakensis*, *Saccostrea cucullata*, *Ostrea mordax* and *Hyotissa hyotis*. Loci XB1-6, XB1-39, and XB1-45 can amplify the target band in 8 species, and the XB1-41 can only amplify the target band in *C. sikamea*.

Key words: *Crassostrea sikamea*; microsatellite markers; wild population; cultured population; universality

Corresponding author: PENG Jianjun. E-mail: jjpeng74@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China(31702340, 31470570); Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2014jcyjA80013); Natural Science Foundation of Chongqing Municipal Education Commission (kj1400534); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2017A030310442)