



三疣梭子蟹低盐耐受性相关甲基化标记的开发及验证

张伟仁^{1,2,3}, 卢少坤^{1,2}, 李荣华^{1,2,3*}, 母昌考^{1,2,3},
宋微微^{1,2,3}, 王春琳^{1,2,3*}

(1. 宁波大学, 水产生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 宁波大学, 浙江海洋高效健康养殖协同创新中心, 浙江 宁波 315211;

3. 宁波大学, 农业农村部绿色海水养殖重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为开发三疣梭子蟹低盐耐受性相关甲基化标记, 采用甲基化敏感性高分辨率溶解曲线法 (methylation sensitive high resolution melting curve, MS-HRM) 进行了三疣梭子蟹低盐耐受性相关甲基化位点的筛选和应用。结果显示, 从三疣梭子蟹转录组数据库中共开发了 8 个甲基化标记, 其中 6 个标记与低盐度耐受性显著相关, 在低盐度条件下表现出显著的去甲基化或甲基化, 这些标记分别位于 V-ATP 酶 (V-type proton ATPase)、CLC 型氯离子通道、琥珀酸脱氢酶、NAD(P) 转氢酶 (NAD(P)、磷酸乙醇酸性磷酸酶、NADH 还原酶基因, 为三疣梭子蟹耐低盐新品种的分子标记辅助选育提供候选工具。研究表明, “宁象 1 号”耐低盐能力显著高于野生群体, 且选育群体中位点 *Pt-M1*、*Pt-M2* 的去甲基化率达到 100%, 可能有利于低盐条件下保持体内 Na^+ 和 Cl^- 的平衡。

关键词: 三疣梭子蟹; 低盐; 甲基化; 标记

中图分类号: S 968.25⁺²

文献标志码: A

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 是我国沿海重要的经济蟹类^[1-3], 年产量达 56.1 万 t^[4]。盐度对三疣梭子蟹的生长发育、呼吸代谢、免疫防御、存活等具有重要影响, 是三疣梭子蟹养殖行业主要关注的环境因子之一^[5]。由于沿海养殖水体的盐度易受到降雨和台风的影响而降低^[6], 因此, 三疣梭子蟹耐低盐新品种的培育对产业的可持续发展具有重要意义。

表观遗传是指在不影响生物体 DNA 序列的情况下导致基因表达变化的可遗传改变过程^[7]。有研究表明, 干旱、高温、低盐等环境条件的胁迫会引起表观遗传的显著改变^[8]。发生在逆境中

的适应性表观遗传变异可以以基因表达模式的形式遗传给后代, 而且经过数代的适应性变化其抗逆性可能明显提高, 暗示了甲基化等表观遗传变异在育种中的潜在应用价值^[9]。表观遗传机制主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、非编码 DNA 调控和染色质的局部修饰等, 从而影响基因表达。其中, DNA 甲基化主要发生在动植物体内 5'-CpG-3'二核苷酸序列的胞嘧啶上。CpG 岛通常处于非甲基的状态, 当 CpG 岛发生甲基化时, 基因调控受到抑制, 进而使得性状产生变化^[10]。

目前检测甲基化差异的方法主要有全基因组重亚硫酸盐测序技术 (WGBS)^[11]、甲基化敏感扩

收稿日期: 2023-02-20 修回日期: 2023-04-10

资助项目: 国家重点研发计划 (2022YFD2400104); 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-48); 宁波大学王宽诚幸福基金

第一作者: 张伟仁 (照片), 从事甲壳动物遗传育种研究, E-mail: 2441276476@qq.com

通信作者: 李荣华, 从事甲壳动物遗传育种研究, E-mail: lironghua@nbu.edu.cn;

王春琳, 从事甲壳动物遗传育种研究, E-mail: wangchunlin@nbu.edu.cn



增多态技术 (MSAP)^[12]、简化基因组甲基化测序技术 (Methyl-RAD)^[13] 等。其中, 甲基化敏感性高分辨率熔解曲线法 (methylation sensitive high resolution melting curve, MS-HRM) 通过检测甲基化的 CpG 和未甲基化 CpG 的氢键差异所引起的熔解温度变化, 来进行 DNA 甲基化的分型^[14], 在单一位点的甲基化检测中具有高灵敏、高通量的优势。

本实验采用 MS-HRM 法筛选出三疣梭子蟹低盐耐受性相关甲基化位点, 并在三疣梭子蟹速生耐低盐新品系“宁象 1 号”和野生群体中进行了验证与比较, 为三疣梭子蟹耐低盐新品种的选育提供了重要的辅助分子标记。

1 材料与方法

1.1 位点筛选及 MS-HRM 检测技术开发

从实验室构建的三疣梭子蟹转录组数据库中, 筛选离子通道、渗透调节、能量代谢等与耐低盐相关的转录序列 300 条, 采用 Methyl Primer Express v1.0 对转录序列进行甲基化位点检测及引物设计, 引物设计参数为^[15-16]: CG 含量为 50%、观测 CpG/预测 CpG 为 0.6, 退火温度设置在 56~60 °C, 共成功设计引物 96 对。

在奉化市臭皮匠水产养殖场选用体格健康、体表无损伤三疣梭子蟹 [(25.8±3.1) g] 共 200 只, 随机分为 2 组放入养殖池中, 分别设为对照组 (盐度 26) 和低盐组 (盐度 12), 养殖期间保持水体温度在 (28±1) °C, 每日统计死亡数量并投喂 2 次, 及时清理残饵。养殖 30 d 后, 各组随机选取 10 个个体的鳃组织, 液氮保存, 采用苯酚/氯仿法提取基因组 DNA, 并采用 EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo research, 美国), 对 DNA 进行亚硫酸盐修饰后, 在罗氏 Light-Cycler 480 中进行甲基化位点分型初步检测。PCR 反应体系: SYBR Green I Mix 10 μL、MgCl₂ 2.8 μL、Primer-R 1 μL、Primer-F 1 μL、DNA 100 ng/μL 1 μL、ddH₂O 4.2 μL。HRM PCR 程序: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 45 个循环; 72 °C 继续延伸 5 min; 最后荧光采集熔解曲线: 65 °C 20 s, 65~95 °C 期间荧光持续采集, 在 40 °C 下保存。根据 MS-HRM 技术的原理, 全基因组 DNA 在经过亚硫酸盐处理时, 未被甲基化的胞嘧啶 C 在脱氨基作用下被转化为尿嘧啶 U, 带有甲基基团的胞嘧啶将不受亚硫酸盐的影响, 无法被

转化成 U, 故甲基化位点具有较高的 TM 值。分型的结果分无甲基化 (C/C)、半甲基化 (¹³C/C)、全甲基化 (¹³C/¹³C) 3 种, C 表示待检测序列上的无甲基化, ¹³C 表示待检测序列上的甲基化, 分别对应不同的熔解曲线^[16]。实验过程中严格参照实验动物伦理操作规范执行。

1.2 耐低盐相关甲基化标记的筛选

养殖 30 d 后的对照组中随机选取 30 只三疣梭子蟹, 在盐度 6 胁迫前取血淋巴 1 mL 并提取血细胞 DNA, 并对其胁迫 12 h 后再次对存活个体取血淋巴 1 mL 并提取血细胞 DNA, 采用 MS-HRM 方法比较甲基化位点在低盐胁迫前后的分型变化。

1.3 “宁象 1 号”耐低盐性能检测及甲基化位点特征

为比较三疣梭子蟹速生耐低盐新品系“宁象 1 号”的耐低盐性能及甲基化位点在各组的分型, 选取三疣梭子蟹野生群体 (YB) 和选育品系“宁象 1 号”(NB) 各 100 只 [(70.3±1.1) g], 盐度 26 暂养 3 d 后, 采集血淋巴 1 mL 并提取血细胞样品, 用于提取 DNA, 进行基于 MS-HRM 的甲基化位点分型。采样后, 每个群体各随机选取 90 个个体随机分为 3 组, 置于盐度 6 下胁迫 72 h, 统计各组存活率, 比较耐低盐性能。

1.4 数据分析

采用 SPSS 22.0 软件对所有数据进行分析。“宁象 1 号”与野生群体的组间存活率采用独立样本 *t* 检验, 候选甲基化位点的组间分型比较采用 R*C 表的卡方检验, 设置 *P*<0.05 为统计差异显著。

2 结果

2.1 甲基化位点筛选及 MS-HRM 检测

MS-HRM 对养殖低盐组和对照组各 10 个个体的甲基化位点的初步检测分型结果表明, 有 8 个位点可根据熔解温度 *T_m* 差异成功分型 (表 1), 根据 TM 值的差异可将甲基化类型分为无甲基化 (C/C)、半甲基化 (¹³C/C)、全甲基化 (¹³C/¹³C) 3 种, 对应的熔解曲线见图 1 (以位点 *Pt-M1* 为例), y 轴表示荧光信号强度, x 轴表示熔解温度^[17]。

2.2 耐低盐相关甲基化标记的筛选

选取的对照组 (盐度 26) 30 个个体经过低盐

表 1 甲基化位点及 MS-HRM 扩增引物序列

Tab. 1 Methylation loci and MS-HRM amplification primer sequence

位点编号 locus ID	序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	序列编号 sequence ID	功能注释 function
<i>Pt-M1</i>	AAATTTTTTTGGGTAGAAATT AATACCAACTACCTTCTACCTA	CL1317Contig2	V-type proton ATPase
<i>Pt-M2</i>	GGAGGAGGAGAGGAAAAT AACCACCGAAAAATAAAA	CL16793Contig1	H ⁺ /Cl ⁻ exchange transporter
<i>Pt-M3</i>	CGTTGTTGTTTTTTTTT ACCCTCTACGATCCCTAT	CL8093Contig1	A/G-specific adenine DNA glycosylase
<i>Pt-M4</i>	TTTTTTTATAGGAGTGTGGG AAAATCCTTACCCTAACCAACA	CL6565Contig1	TATA-binding protein
<i>Pt-M5</i>	AATGGTTGTATAGGGTGATT CACTCCCAATAAAAAATACAA	CL16122Contig1	succinate dehydrogenase
<i>Pt-M6</i>	TATGTYGAGATGGTGGATATT ACTTCCACACCCTAAAAACAA	CL16883Contig1	NAD(P)transhydrogenase
<i>Pt-M7</i>	GTTTTGGTGAAGGTTATTGAGA AACCACAAATCCAAATAAAAAA	CL9793Contig1	phosphoglycolate phosphatase
<i>Pt-M8</i>	TTAGAAAATAAGATGGTTTTGAGATT AAACTACTCTCAAACACTCCA	Comp128475-c0-seq1	NADH dehydrogenase

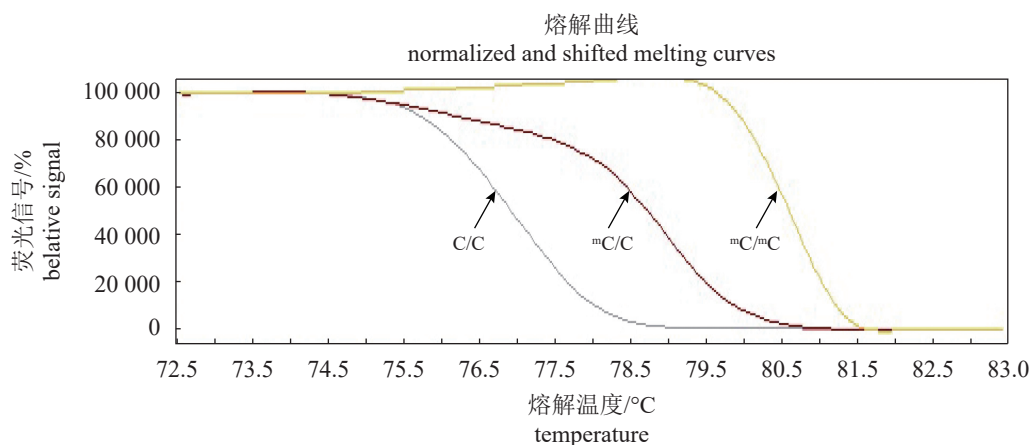


图 1 *Pt-M1* 位点 MS-HRM 结果图

C/C. 无甲基化, ^mC/C. 半甲基化, ^mC/^mC. 全甲基化。

Fig. 1 MS-HRM analysis of *Pt-M1*

C/C. absence of methylation, ^mC/C. hemimethylation, ^mC/^mC. full methylation.

度 6 胁迫 12 h 后存活 16 个个体。对上述 8 个甲基化位点在胁迫前后均取样的 16 个三疣梭子蟹中的分型变化进行检测。结果显示, 4 个位点在低盐胁迫后表现出显著的去甲基化 (*Pt-M1*、*Pt-M2*、*Pt-M6* 和 *Pt-M8*), 且去甲基化率达到 100%; 2 个位点在低盐胁迫后表现出显著的甲基化趋势 (*Pt-M5* 和 *Pt-M7*); 2 个位点在低盐胁迫前后甲基化分型无显著性差异 ($P>0.05$) (*Pt-M3* 和 *Pt-M4*) (表 2)。低盐胁迫前后甲基化分型的显著改变说明这 6 个位点对低盐度胁迫产生明显响应, 这些位点的甲

基化特征可能与三疣梭子蟹耐低盐性能显著相关, 在三疣梭子蟹低盐度适应性过程中发挥重要作用。

2.3 “宁象 1 号”耐低盐性能检测及甲基化位点特征

采用低盐度 6 胁迫 72 h, 进行三疣梭子蟹速生耐低盐新品系“宁象 1 号”群体与野生群体的耐低盐性能比较。2 个群体不同时间点存活率统计分析表明, 2 组存活率均随着胁迫时间延长而降

表 2 低盐胁迫前后三疣梭子蟹甲基化位点分型统计

Tab. 2 Statistics of methylation sites in *P. trituberculatus* before and after low salinity challenge

引物编号 primer ID	甲基化修饰基因型 genotype of methylation modification	处理前(比例/%) before challenge (percentage)		处理后(比例/%) after challenge (percentage)		χ^2	P	甲基化修饰碱基 base type of methylation modification	处理前(比例/%) before challenge (percentage)		处理后(比例/%) after challenge (percentage)		χ^2	P
<i>Pt-M1</i>	C/C			16(100.0)		36.347	0.029	C	12(37.5)		32(100.0)	29.091	0	
	^m C/C	12(75.0)						^m C	20(62.5)					
	^m C/ ^m C	4(25.0)												
<i>Pt-M2</i>	C/C			16(100.0)		36.347	0.029	C	4(12.5)		32(100.0)	49.778	0	
	^m C/C	4(25.0)						^m C	28(87.5)					
	^m C/ ^m C	12(75.0)												
<i>Pt-M3</i>	C/C	12(75.0)		12(75.0)		0	1	C	28(87.5)		28(87.5)	0	1	
	^m C/C	4(25.0)		4(25.0)				^m C	4(12.5)		4(12.5)			
	^m C/ ^m C													
<i>Pt-M4</i>	C/C	8(50.0)		8(50.0)		0	1	C	16(50.0)		16(50.0)	0	1	
	^m C/C	8(50.0)		8(50.0)				^m C	16(50.0)		16(50.0)			
	^m C/ ^m C													
<i>Pt-M5</i>	C/C	8(50.0)				13.042	0.001	C	24(75.0)		12(37.5)	9.143	0.002	
	^m C/C	8(50.0)		12(75.0)				^m C	8(25.0)		20(62.5)			
	^m C/ ^m C			4(25.0)										
<i>Pt-M6</i>	C/C	4(25.0)		16(100.0)		19.2	0	C	8(25.0)		32(100.0)	38.4	0	
	^m C/C							^m C	24(75.0)		0			
	^m C/ ^m C	12(75.0)												
<i>Pt-M7</i>	C/C	16(100.0)				36.06	0	C	32(100.0)		8(25.0)	38.4	0	
	^m C/C			8(50.0)				^m C	0		24(75.0)			
	^m C/ ^m C			8(50.0)										
<i>Pt-M8</i>	C/C	4(25.0)		16(100.0)		19.2	0	C	20(62.5)		32(100.0)	14.769	0	
	^m C/C	12(75.0)						^m C	12(37.5)		0			
	^m C/ ^m C													

低, 但“宁象 1 号”存活率在各检测时间点均显著高于野生群体(图 2)。低盐胁迫 48 h 时, 野生群体存活率降为 0, “宁象 1 号”为 41.1% 并保持稳定, 以上检测结果表明, “宁象 1 号”耐低盐性能显著高于野生群体。

通过对 6 个耐低盐相关甲基化标记在三疣梭子蟹新品系“宁象 1 号”和野生群体的分型情况进行检测。结果显示, 与野生群体相比, 2 个离子通道相关位点 (*Pt-M1* 和 *Pt-M2*) 在“宁象 1 号”新品系表现出显著的去甲基化 ($P>0.05$), 且去甲基化率达到 100%(表 3), 与低盐胁迫后该位点的甲基化特征相一致; 3 个位点的甲基化状态 (*Pt-M5*、*Pt-M6* 和 *Pt-M8*) 在野生群体和“宁象 1 号”新品系中没有显著差异 ($P<0.05$), 1 个位点 (*Pt-M7*) 在“宁象 1 号”新品系表现出显著的甲基化状态 ($P>0.05$), 但与低盐胁迫后该位点的甲基化趋势相反。

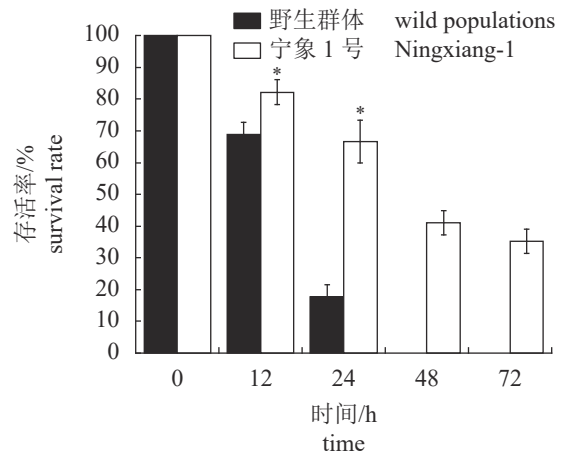


图 2 低盐胁迫下, 三疣梭子蟹新品系“宁象 1 号”与野生群体的存活率比较

* 表示两组间存在显著差异 ($P<0.05$)。

Fig. 2 Survival rate of “Ningxiang-1” and wild populations under low salinity stress

* means significant difference between the two groups ($P<0.05$).

表 3 野生群体和“宁象 1 号”群体间的甲基化位点差异

Tab. 3 Difference of methylation loci between wild population and "Ningxiang -1" population

引物编号 primers ID	甲基化修饰 基因型 genotype of methylation modification	宁象1号 (比例/%) Ningxiang-1 (percentage)	野生群体 (比例/%) wild population (percentage)	χ^2	<i>P</i>	甲基化修饰 碱基 base type of methylation modification	宁象1号 (比例/%) Ningxiang-1 (percentage)	野生群体 (比例/%) wild population (percentage)	χ^2	<i>P</i>
<i>Pt-M1</i>	C/C	100(100.0)	50(50.0)	66.667	0	C	200(100.0)	150(75.0)	57.143	0
	^m C/C		50(50.0)			^m C	0	50(25.0)		
	^m C/ ^m C									
<i>Pt-M2</i>	C/C	100(100.0)	25(25.0)	120.00	0	C	200(100.0)	125(62.5)	92.308	0
	^m C/C		75(75.0)			^m C		75(37.5)		
	^m C/ ^m C									
<i>Pt-M5</i>	C/C	75(75.0)	75(75.0)	0	1	C	175(87.5)	175(87.5)	0	1
	^m C/C	25(25.0)	25(25.0)			^m C	25(12.5)	25(12.5)		
	^m C/ ^m C									
<i>Pt-M6</i>	C/C	50(50.0)	75(75.0)	80.000	0	C	150(75.0)	150(75.0)	0	1
	^m C/C	50(50.0)				^m C	50(25.0)	50(25.0)		
	^m C/ ^m C		25(25.0)							
<i>Pt-M7</i>	C/C	50(50.0)	50(25.0)	33.333	0	C	150(75.0)	125(62.5)	7.273	0.01
	^m C/C	50(50.0)	25(25.0)			^m C	50(25.0)	75(37.5)		
	^m C/ ^m C		25(25.0)							
<i>Pt-M8</i>	C/C	50(50.0)	50(50.0)	0	1	C	100(50.0)	100(50.0)	0	1
	^m C/C	50(50.0)	50(50.0)			^m C	100(50.0)	100(50.0)		

3 讨论

在真核生物体内，DNA 甲基化主要依赖于 DNMT 家族通过 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 调控，将甲基基团转移到 CpG 岛的胞嘧啶上实现对基因表达的抑制^[18]。DNA 甲基化作为基因转录的负调控因子，目前存在 3 种可能的调节基因转录的机制：DNA 甲基化可干扰转录因子与 CpG 岛上相应启动子的特异性识别结合；甲基化的 DNA 结合特异的甲基化结合蛋白，进而阻遏基因的转录；DNA 甲基化使染色质的结构由常规的 B-DNA 向不稳定和超螺旋化的 Z-DNA 过渡，致使蛋白质因子赖以结合的元件缩入大沟，进而造成基因的沉默^[18-19]。

随着甲基化表观遗传特性研究的深入，越来越多的甲基化位点被鉴定开发，并逐步用于动植物分子标记辅助育种实践。如 Wu 等^[20]建立了小麦 (*Triticum*) 光周期相关的 *Ppd-B1* 甲基化分子标记，为小麦分子育种提供辅助。Akimoto 等^[21]通过筛选以去甲基化为主的 *X21a G* 基因的亲本水稻 (*Oryza sativa*)，提高子代水稻的抗稻白叶枯病菌能力。Kumar 等^[22]在耐盐品系 Kharchia-65 小麦中发现了通过胞嘧啶甲基化参与 Na⁺/K⁺转运的

HKT 基因位点，为后续开发更多耐盐品系作物提供了理论基础。Xiu 等^[23]开发了半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 抗哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 的甲基化 LBP-like 和 TNF-like 标记等。本研究成功开发了 8 个可用 MS-HRM 高通量技术准确分型的甲基化标记，进一步的研究表明，有 6 个标记与低盐度耐受性显著相关，在低盐环境中，*Pt-M1*、*Pt-M2*、*Pt-M6* 和 *Pt-M8* 位点以去甲基化为主，而 *Pt-M5* 和 *Pt-M7* 位点以甲基化为主，以上甲基化位点对相关基因表达的影响还有待进一步研究。本实验同时测试了速生耐低盐新品系“宁象 1 号”与野生群体的耐低盐能力，并比较了其甲基化位点分型的差异。结果显示“宁象 1 号”耐低盐性能显著高于野生群体，且选育群体中位点 *Pt-M1*、*Pt-M2* 的去甲基化明显升高，均达到 100%，进一步表明以上 2 个位点的去甲基化与耐低盐性能显著相关。

甲壳动物主要通过特定离子泵对 Mg²⁺、Ca²⁺、Na⁺和 Cl⁻等离子的调控来应对外界环境盐度的变化^[24-25]。在低盐度环境下，三疣梭子蟹可通过提高 Na⁺、Cl⁻等离子的运输来调节渗透压的平衡^[26]。本研究开发的位点 *Pt-M1*、*Pt-M2* 所在的基因均在

离子转运过程中发挥重要作用, 是三疣梭子蟹适应低盐环境的重要调节机制之一。其中位点 *Pt-M1* 位于 V-ATP 酶基因, 该基因通过水解 ATP 获得能量将 H^+ 泵出膜外, 维持胞质内的平衡状态, 形成跨膜电势差, 从而介导 Na^+ 的运输^[27-28]。研究表明该基因在水产动物渗透压调节中具有重要作用, 如在凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 中 V-ATP 酶是渗透压调节的主要承担者^[29], 缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 通过增加 V-ATP 酶表达应对外界低盐胁迫^[30]。本实验中, 低盐条件下位点 *Pt-M1* 产生显著的去甲基化, 可能改变了介导 Na^+ 转运的离子泵速率, 以保持体内的 Na^+ 平衡。位点 *Pt-M2* 位于 CLC 型氯离子通道基因, 该基因作为电压控制门离子通道在阴离子转运过程起重要作用^[31]。本实验中, 低盐条件下位点 *Pt-M2* 产生了显著的去甲基化, 可能增强了对氯离子的重吸收作用, 以保持体内的 Cl^- 平衡。关于以上位点甲基化状态的改变对相关离子运输的调节机制还有待进一步研究。

4 结论

综上所述, 本研究基于 MS-HRM 技术, 从三疣梭子蟹转录组数据库中开发了 8 个甲基化标记, 其中 6 个标记与低盐度耐受性显著相关, 为三疣梭子蟹耐低盐新品种的分子标记辅助选育提供候选工具。通过以上标记在三疣梭子蟹“宁象 1 号”速生耐低盐新品系中的分型及耐低盐性状测试结果表明, “宁象 1 号”耐低盐能力显著高于野生群体, 且选育群体中位点 *Pt-M1*、*Pt-M2* 的去甲基化率达到 100%, 可能有利于低盐条件下保持体内 Na^+ 和 Cl^- 的平衡, 对“宁象 1 号”耐低盐能力的提高具有重要作用, 可作为三疣梭子蟹耐低盐新品种选育甲基化标记。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Chen G Q, Jiang M M, Chen B, *et al.* Emergy analysis of Chinese agriculture[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2006, 115(1-4): 161-173.
- [2] 胡则辉, 徐君卓, 石建高. 浙江沿海三疣梭子蟹的养殖模式[J]. *现代渔业信息*, 2011, 26(3): 3-5.
Hu Z H, Xu J Z, Shi J G. Farming modes of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) along the coast of Zhejiang Province[J]. *Modern Fisheries Information*, 2011, 26(3): 3-5 (in Chinese).
- [3] 吴旭干, 汪倩, 楼宝, 等. 育肥时间对三疣梭子蟹卵巢发育和营养品质的影响[J]. *水产学报*, 2014, 38(2): 170-182.
Wu X G, Wang Q, Lou B, *et al.* Effects of fattening period on ovarian development and nutritional quality of female swimming crab (*Portunus trituberculatus*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(2): 170-182 (in Chinese).
- [4] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 2022[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022.
Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. *China fishery statistical yearbook 2022* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022 (in Chinese).
- [5] 周双林, 姜乃澄, 卢建平, 等. 甲壳动物渗透压调节的研究进展 I. 鳃的结构与功能及其影响因子[J]. *东海海洋*, 2001, 19(1): 44-51.
Zhou S L, Jiang N C, Lu J P, *et al.* Progress of the study on osmotic regulation in crustaceans I. The gill's structure and function and its' concerned factors [J]. *Donghai Marine Science*, 2001, 19(1): 44-51 (in Chinese).
- [6] 许东峰, 刘增宏, 徐晓华, 等. 西北太平洋暖池区台风对海表盐度的影响[J]. *海洋学报*, 2005, 27(6): 9-15.
Xu D F, Liu Z H, Xu X H, *et al.* The influence of typhoon on the sea surface salinity in the warm pool of the western Pacific [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2005, 27(6): 9-15 (in Chinese).
- [7] Jablonka E, Lamb M J. The changing concept of epigenetics [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002, 981(1): 82-96.
- [8] Sow M D, Allona I, Ambrose C, *et al.* Epigenetics in forest trees: state of the art and potential implications for breeding and management in a context of climate change [J]. *Advances in Botanical Research*, 2018, 88: 387-453.
- [9] Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development [J]. *Nature*, 2007, 447(7143): 425-432.
- [10] Zhang Y, Shen W L, Cao M Y, *et al.* Dynamic alterations in methylation of global DNA and growth-related

- genes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in response to starvation stress[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 227: 98-105.
- [11] Brunner A L, Johnson D S, Kim S W, *et al.* Distinct DNA methylation patterns characterize differentiated human embryonic stem cells and developing human fetal liver[J]. *Genome Research*, 2009, 19(6): 1044-1056.
- [12] Xiong L Z, Xu C G, Maroof M A S, *et al.* Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique[J]. *Molecular and General Genetics MGG*, 1999, 261(3): 439-446.
- [13] Wang S, Lv J, Zhang L L, *et al.* MethyRAD: a simple and scalable method for genome-wide DNA methylation profiling using methylation-dependent restriction enzymes[J]. *Open Biology*, 2015, 5(11): 150130.
- [14] Draht M X G, Smits K M, Jooste V, *et al.* Analysis of *RET* promoter CpG island methylation using methylation-specific PCR (MSP), pyrosequencing, and methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM): impact on stage II colon cancer patient outcome[J]. *Clinical Epigenetics*, 2016, 8: 44.
- [15] Parashar N C, Parashar G, Nayyar H, *et al.* Differential DNA methylation in regulation of deacetylase 4-O-acetyl transferase (*DAT*) gene in *Catharanthus roseus*[J]. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2021, 30(2): 326-335.
- [16] Hussmann D, Hansen L L. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM)[M]//Tost J. DNA Methylation protocols. New York: Springer, 2018: 551-571.
- [17] Simide R, Gaillard S. Evolution of molecular investigations on sturgeon sex determination and most recent developments in DNA methylation with a focus on the Siberian sturgeon[M]//Williot P, Nonnotte G, Vizziano-Cantonnet D, *et al.* The Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) Volume 1-Biology. Cham: Springer, 2018: 71-91.
- [18] Singal R, Ginder G D. DNA methylation[J]. *Blood*, 1999, 93(12): 4059-4070.
- [19] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory[J]. *Genes & Development*, 2002, 16(1): 6-21.
- [20] Wu Y Z, Liu J H, Hu G M, *et al.* Functional analysis of the “green revolution” gene *Photoperiod-1* and its selection trends during bread wheat breeding[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 745411.
- [21] Akimoto K, Katakami H, Kim H J, *et al.* Epigenetic inheritance in rice plants[J]. *Annals of Botany*, 2007, 100(2): 205-217.
- [22] Kumar S, Beena A S, Awana M, *et al.* Physiological, biochemical, epigenetic and molecular analyses of wheat (*Triticum aestivum*) genotypes with contrasting salt tolerance[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1151.
- [23] Xiu Y, Shao C W, Zhu Y, *et al.* Differences in DNA methylation between disease-resistant and disease-susceptible Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) families[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 847.
- [24] Mcnamara J C, Faria S C. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod crustacea: a review[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2012, 182(8): 997-1014.
- [25] 龙晓文, 吴仁福, 侯文杰, 等. 水体盐度对雌性三疣梭子蟹生长、卵巢发育、渗透压调节、代谢和抗氧化能力的影响[J]. *水产学报*, 2019, 43(8): 1768-1780.
- Long X W, Wu R F, Hou W J, *et al.* Effects of water salinity on the growth, ovarian development, osmoregulation, metabolism and antioxidant capacity of adult female swimming crab (*Portunus trituberculatus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(8): 1768-1780 (in Chinese).
- [26] Lv J J, Liu P, Wang Y, *et al.* Transcriptome analysis of *Portunus trituberculatus* in response to salinity stress provides insights into the molecular basis of osmoregulation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82155.
- [27] Merzendorfer H, Gräf R, Huss M, *et al.* Regulation of proton-translocating V-ATPases[J]. *Journal of Experimental Biology*, 1997, 200(2): 225-235.
- [28] Tsai J R, Lin H C. V-type H⁺-ATPase and Na⁺, K⁺-ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2007, 210(4): 620-627.
- [29] Pan L Q, Zhang L J, Liu H Y. Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Litopenaeus vannamei* postlarvae[J]. *Aquaculture*, 2007, 273(4): 711-720.
- [30] 徐娴, 何琳, 林志华, 等. 盐度胁迫下缙蛭渗透压变化及V-ATPase H基因的表达分析[J]. *动物学杂志*, 2020, 55(5): 606-613.

- Xu X, He L, Lin Z H, *et al.* Effects of salinity stress on *V-ATPase H* expression, enzyme activity and osmotic pressure in *Sinonovacula constricta*[J]. Chinese Journal of Zoology, 2020, 55(5): 606-613 (in Chinese).
- [31] 郭晓强. CIC型氯离子通道[J]. 生理科学进展, 2005, 36(1): 58-61.
- Guo X Q. CIC Cl-channels[J]. Progress in Physiological Sciences, 2005, 36(1): 58-61 (in Chinese).

Development and validation of methylation markers related to low salinity tolerance in *Portunus trituberculatus*

ZHANG Weiren^{1,2,3}, LU Shaokun^{1,2}, LI Ronghua^{1,2,3*}, MU Changkao^{1,2,3},
SONG Weiwei^{1,2,3}, WANG Chunlin^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Aquacultural Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Collaborative Innovation Center for Zhejiang Marine High-efficiency and Healthy Aquaculture, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

3. Key Laboratory of Green Mariculture (Co-construction by Ministry and Province), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In order to develop methylation markers related to low salinity tolerance in *Portunus trituberculatus*, in this study, methylation sensitive high resolution melting curve method (MS-HRM) was applied to screen and validate methylation loci related to low salinity tolerance. A total of 8 methylation markers were developed from the transcriptome database of *P. trituberculatus*, six of which were significantly related to low salinity tolerance, exhibiting a significant demethylation or methylation pattern in the low salinity condition. They were located in V-type proton ATPase, H⁺/Cl⁻ exchange transporter, succinate dehydrogenase, NAD(P) transhydrogenase, phosphoglycolate phosphatase, NADH dehydrogenase genes, and these markers provided useful tools for marker-assisted breeding of low-salinity-tolerant strain of *P. trituberculatus*. The low salinity tolerance test and genotyping results of these 6 loci in wild populations and “Ningxiang-1” selective strain showed that the survival rate of “Ningxiang-1” was significantly higher than that of wild populations under low salinity conditions, and the demethylation of loci *Pt-M1* and *Pt-M2* in the selective breeding population was significantly increased to 100%, which may be beneficial to maintaining the balance of Na⁺ and Cl⁻ under low salinity conditions. This study provides basic data and favorable tools for genetic improvement of low salinity resistance in *P. trituberculatus*.

Key words: *Portunus trituberculatus*; low salinity; methylation; markers

Corresponding authors: LI Ronghua. E-mail: lironghua@nbu.edu.cn;

WANG Chunlin. E-mail: wangchunlin@nbu.edu.cn

Funding projects: National Key R & D Program of China (2022YFD2400104); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-48); K.C. Wong Magana Fund in Ningbo University