

doi: 10.12131/20180256

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

孔啸兰, 李 敏, 陈作志, 龚玉艳, 张 俊, 张 鹏

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部外海渔业开发重点实验室, 广东广州 510300)

摘要: 通过对长体圆鲹 (*Decapterus macrosoma*) 基因组进行 RAD-Seq 高通量测序, 共获得 58 180 条微卫星序列, 选取 112 条二、三核苷酸重复的微卫星序列设计引物, 经筛选后, 共获得 27 个具有多态性的微卫星标记。利用一个长体圆鲹群体对通过筛选的微卫星标记的种群遗传学特征进行评价。结果显示, 27 对引物扩增的序列中 18 个位点为二核苷酸重复, 重复次数为 9~14 次, 9 个位点为三核苷酸重复, 重复次数为 6~10 次, 等位基因数 (N_a) 为 5~17 (平均 10.6), 表观杂合度 (H_o) 为 0.342 9~0.857 1 (平均 0.631 7), 期望杂合度 (H_e) 为 0.538 3~0.911 8 (平均 0.796 8), 多肽信息含量 (PIC) 为 0.497~0.886 (平均 0.780 9), 除 1 个位点外, 其他位点 PIC 值均大于 0.500, 表明开发的微卫星位点具有较高的多态性。“哈迪-温伯格”平衡 (HWE) 检测结果显示, 19 个标记等位基因频率符合 HWE。连锁不平衡检测表明各位点间无连锁不平衡现象。该研究开发的 27 个微卫星标记可为长体圆鲹种群遗传学研究提供基础。

关键词: 长体圆鲹; 高通量测序; 微卫星标记

中图分类号: S 931; Q 347

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2019)03-0097-07

Development and evaluation of di-/tri-nucleotide-repeated microsatellites by RAD-seq in *Decapterus macrosoma*

KONG Xiaolan, LI Min, CHEN Zuozhi, GONG Yuyan, ZHANG Jun, ZHANG Peng

(Key Laboratory of Open-Sea Fishery Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: A total of 58 180 microsatellites were developed by RAD-Seq high-throughput sequencing technology in *Decapterus macrosoma*. One hundred and twelve microsatellite loci were randomly selected from di-/tri-nucleotide repeat microsatellite loci. Finally, twenty-seven highly polymorphic markers were developed. The population genetic analysis finds 18 dinucleotide-repeated microsatellite loci (9~14 repeated) and 9 trinucleotide-repeated microsatellite loci (6~10 repeated). The number of alleles (N_a) ranged from 5 to 17 (mean 10.6). The observed and expected heterozygosities ranged from 0.342 9 to 0.857 1 (mean 0.631 7) and 0.538 3 to 0.911 8 (mean 0.796 8), respectively. The polymorphism information content (PIC) ranged from 0.497 to 0.886 (mean 0.780 9), and the PIC at all loci except for one was greater than 0.500, indicating that the microsatellites were highly polymorphic. The Hardy-

收稿日期: 2018-11-22; 修回日期: 2019-01-24

资助项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1406502); 农业农村部财政专项 (NFZX2018); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2017YB23); 广东省促进经济发展专项 (GDME-2018E004); 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2015TS04); 农业农村部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室开放课题 (201720761)

作者简介: 孔啸兰 (1986—), 女, 硕士, 助理研究员, 从事渔业资源和分子生物学研究。E-mail: weilankong.2005@163.com

通信作者: 陈作志 (1978—), 男, 博士, 研究员, 从事海洋生态和渔业资源研究。E-mail: zzchen2000@163.com

Weinberg equilibrium (HWE) test shows that 19 microsatellite markers conformed to HWE. There is no linkage imbalance among the 27 loci. The 27 microsatellites developed by this study will be useful for further population genetic analysis.

Key words: *Decapterus macrosoma*; high-throughput sequencing; microsatellite loci

长体圆鲹 (*Decapterus macrosoma*), 又名长身圆鲹, 隶属于鲈形目、鲹科、圆鲹属, 主要分布于中国南海、印度尼西亚、澳洲和日本南部沿海等地^[1]。长体圆鲹在中国南海分布较广, 是南海灯光围网渔业的主要捕捞对象, 具有较高的经济价值^[2-5]。目前, 国内外学者关于长体圆鲹的研究主要集中在生长繁殖^[6]和资源评估^[7-8]方面, 与种群遗传和分子标记相关的研究报道较少。微卫星标记仅见翟云等^[9]开发蓝圆鲹微卫星标记中获得 5 个跨物种通用标记可用于长体圆鲹, 并无专门针对长体圆鲹开发的微卫星标记。种群遗传信息的匮乏, 将大大影响对其资源的评估和长期有效的管理。

微卫星分子标记因是共显性标记, 具有多态性高、变异性强、数据易统计等突出优点^[10], 广泛应用于海洋生物遗传结构及遗传多样性分析^[11-12]。但由于微卫星标记通用性较差, 常常具有极强的种属特异性。鱼类微卫星标记开发中多以二核苷酸重复为主^[13-15], 普遍认为它们具有较高的遗传变异^[16], 但是也有部分学者研究认为三、四核苷酸重复位点较二核苷酸重复具有更高的筛选效率和多态性^[17-19]。

本研究通过 RAD-Seq 高通量测序方法开发长体圆鲹二、三核苷酸微卫星分子标记, 并对测试群体进行多样性分析, 同时比较二、三核苷酸的筛选效率和多态性差异, 旨在为长体圆鲹种群遗传结构及遗传多样性分析提供技术基础, 并为该资源的评估和管理提供帮助。

1 材料与方法

1.1 样品采集与基因组 DNA 提取

长体圆鲹样品采集于中国南海中沙群岛东部海域, 共 35 尾。剪取部分肌肉样品加入无水乙醇保存。每个样品剪取少量肌肉组织, 使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒 (天根, 北京) 提取基因组 DNA, 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量, -20 °C 保存备用。

1.2 高通量测序与引物合成

使用 HiSeq2000 高通量测序仪 (Illumina, USA) 对长体圆鲹基因组 DNA 进行 RAD-seq (测序服务

由广州基迪奥生物科技有限公司提供), 经生物信息学搜索出微卫星位点^[20]。使用 Premier 5.0 软件在重复单元侧翼序列上选择性设计出 112 条引物, 主要参数为: G-C 含量为 40%~60%, 引物长度为 18~25 bp, 退火温度为 45~60 °C, 预期产物长度 180~320 bp。送上海英潍捷基贸易有限公司合成引物。

1.3 引物筛选与分型检测

选取 3 个样本混合成的基因组 DNA 为模板, 优化 PCR 反应条件, 对引物进行首轮筛选, 琼脂糖电泳检测是否能扩增出稳定且均一的目的片段。之后选取 8 尾个体的基因组 DNA 作为模板, 使用三引物法^[21], 利用 M13 荧光接头引物进行 PCR 扩增, 扩增产物送华大基因公司经毛细管电泳进行等位基因分型, 检测引物是否具有多态性。PCR 反应体系为 15 μL , 其中包括 10 \times PCR Buffer 1.5 μL , 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 1.2 μL , 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs 2 μL , M13 正向引物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.2 μL , M13 反向引物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.6 μL , M13 通用荧光引物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , *Taq* 酶 (5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.15 μL , DNA 模版 1 μL , 加双蒸水至 15 μL 。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 55~60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环; 94 °C 变性 45 s, 53 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 8 个循环; 72 °C 延伸 30 min。

1.4 长体圆鲹群体遗传学评价

使用 35 尾长体圆鲹个体的基因组 DNA 为模板, 对通过筛选的微卫星标记的种群遗传学特征进行评价。PCR 反应体系和条件、等位基因分型方法如上。使用软件 Genepop 4.0^[22] 对每个标记的种群遗传学特征值进行计算, 包括等位基因数 (N_a)、表观杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e), 进行“哈迪-温伯格”平衡 (HWE) 检验和连锁不平衡检测, 并对 P 值进行 Bonferroni 校正。使用 Cervus 3.0.7^[23] 软件计算多态信息含量 (PIC)。

2 结果

2.1 高通量测序结果与微卫星位点分析

RAD-seq 高通量测序共获得长体圆鲹基因组原

始数据 2.06 G, GC 含量为 41.43%, Q30 达 93.05%。说明测序结果质量较好, 可用于后续分析。搜索后共获得微卫星序列 58 180 条, 一至六核苷酸重复微卫星位点 70 508 个, 其中二核苷酸重复微卫星位点最多 (37 646 个), 占总数的 53.39% (表 1), 说明二核苷酸重复为主要的微卫星类型。二核苷酸重复微卫星位点共有 4 种重复类型, 4 种类型重复微卫星数量相差较大, AC/GT 类有 29 754 个, 占二核苷酸重复的 68.4%; AG/CT 类有 6 487 个, 占 17.2%; AT/TA 有 1 340 个, 占 3.6%; GC/CG 仅有 65 个, 占 0.17%。

表1 长体圆鲂基因组中不同类型SSR统计

Tab.1 Different types of SSR statistics in *D. macrosoma* genome

重复单元 repeat unit	微卫星数量/个 number of microsatellite	占比/% ratio
一核苷酸 mono-nucleotide	8 184	11.61
二核苷酸 di-nucleotide	37 646	53.39
三核苷酸 tri-nucleotide	13 960	19.80
四核苷酸 tetra-nucleotide	7 741	10.98
五核苷酸 penta-nucleotide	2 255	3.20
六核苷酸 hexa-nucleotide	722	1.02
合计 total	70 508	100.00

2.2 PCR 引物设计和筛选

选取 112 条二、三核苷酸重复序列设计引物, 其中二核苷酸重复为 81 对, 三核苷酸重复为 31 对。经过筛选后, 共有 27 对引物通过筛选 (表 2), 27 对引物扩增的序列中 18 个位点为二核苷酸重复, 重复次数为 9~14 次; 8 个位点为三核苷酸重复, 重复次数为 6~10 次。二核苷酸重复位点检出效率为 22.2%, 三核苷酸重复位点检出效率为 25.8%。

2.3 微卫星标记的种群遗传学评价

使用 1 个采集自南海东南部海域的长体圆鲂群体对筛选合格的微卫星标记进行种群遗传学评价。所有 27 个标记在测试群体中共检测到 285 个等位基因, 等位基因数为 5~17, H_o 为 0.342 9~0.857 1, 平均为 0.631 7; H_e 为 0.538 3~0.911 8, 平均为 0.7968。PIC 为 0.497~0.886, 平均为 0.780 9 (表 3), 表明开发的微卫星位点具有较高的多态性。共有 19 个标记等位基因频率符合“哈迪-温伯格”平衡。连锁不平衡检测表明各位点间无连锁不平衡现象。

3 讨论

3.1 高通量测序发掘微卫星序列的技术优势

传统微卫星标记开发方法耗时长、花费高、技术难度大。以磁珠富集法为例, 标记开发过程中基因组 DNA 浓度、接头连接效率、富集过程中的杂交温度以及洗脱条件的控制等因素都会影响微卫星筛选的效率^[24-25], 且最终获得的有效微卫星序列仅几百条^[26-27]。相比较而言, 高通量测序技术开发微卫星标记, 省略了建库、克隆、筛选等, 只需提取基因组 DNA 测序, 利用生物信息学手段可直接获取微卫星序列, 通常是传统方法获得微卫星序列数目的几百倍^[15,28-29], 具有高效、便捷、准确的特点, 能够满足短时间内大批量微卫星位点的开发需求, 比如连锁图谱构建、QTL 定位等^[30-31]。

本次 RAD-seq 高通量测序共获得长体圆鲂基因组原始数据 2.06 G, GC 含量为 41.43%, 测序质量 Q30 达 93.05%; 共获得微卫星序列 58 180 条, 一至六核苷酸重复微卫星位点 70 508 个。说明测序质量稳定高效, 并获得了数量庞大、类型丰富的长体圆鲂微卫星序列, 可用于后续长体圆鲂微卫星标记的大规模开发和相关遗传学研究。

3.2 不同核苷酸重复微卫星位点比较

本次高通量测序结果表明在长体圆鲂微卫星位点中二核苷酸重复为主要重复类型, AC/GT 类重复数量最为丰富, GC/CG 重复较为少见。此结果与大量水产动物微卫星位点研究结果相一致^[32-34], 差异仅在于比例多少, 以及除二核苷酸重复占主要地位外其他核苷酸重复的含量差异。熊良伟等^[33]对中华鲮 (*Rhodeus sinensis*) 微卫星的分析中, 二核苷酸占总微卫星位点的 53.59%, 其次为单核苷酸重复, 二核苷酸重复中 AC/GT 类占 60.63%, GC/CG 仅占 0.32%。在裸体异鳔鳅 (*Xenophysogobio nudicorpa*) 中^[32], 二核苷酸重复占总微卫星位点比例高达 83.15%, AC/GT 类重复占 49.36%, GC/CG 重复仅有 4 个。

多数鱼类开发的微卫星标记以二核苷酸重复为主, 但研究表明, 在人类基因组中三核苷酸重复序列与遗传疾病的发生有关, 并且具有较高的多态性和遗传稳定性^[35]。部分学者对三、四核苷酸重复微卫星标记的研究结果存在差异。房祖业等^[28]对大刺鳅 (*Mastacembelus armatus*) 二、三、四核苷酸重复微卫星标记的筛选发现二核苷酸重复较三、四核

表2 27对长体圆鲮微卫星引物信息

Tab.2 Information of 27 pairs of primers in *D. macrosoma*

位点 locus	引物序列 (5'-3') primer sequence	重复单元 repeat motif	退火温度/°C annealing temperature	期望长度/bp allele size
Dma03	F:CCACGCCTATTGAGTTACAGA R:GAGCCAGTGGATGAACAGAGT	(CA) ₉	60	186
Dma07	F:GCCCCTGTGGGTGTGTGA R:GGGTGGTGGGTTTCGGTTT	(CA) ₉	60	225
Dma12	F:GAACCAAGTGCCTACAATAGA R:CTGCTCACGGTAAGTCCA	(AC) ₉	60	243
Dma15	F:ACAGGAAGGAACAGGACAG R:TATTGAAGTGAAAAAGCCG	(TG) ₁₀	55	254
Dma22	F:CGTGTTGAAATGAAGAAGA R:AGTGATGTGCCTCATAAAT	(GT) ₁₀	60	317
Dma23	F:AAACTGAGGGCGAGATAGAGG R:CCACAGGCTGAGTAAACCAAC	(AC) ₁₀	55	190
Dma26	F:ATCCCATTCACCGACATAG R:CTGTGGTATCGTTCCTGT	(TG) ₁₀	58	258
Dma28	F:TGATTGGCTTCTACTCTGC R:AGTGGCTTGTGACTCTTAT	(AC) ₁₀	55	281
Dma36	F:GGATGTAGTGAAGAGGGGAG R:CACAATCAGTGTATGGCAG	(GT) ₁₁	55	239
Dma38	F:GCCAATAAAGGCAAACAGT R:ATCCGAGACAAAGACATACAA	(CA) ₁₁	60	227
Dma39	F:AGTGTGCTGACTTTTCTCTG R:TTATTGTTGTGCTGGGT	(CA) ₁₁	55	241
Dma45	F:CTCCTTTTCTTCTCCTCT R:CTACCTGCTTCAACTCAT	(CA) ₁₁	60	281
Dma51	F:TGACAGCCTCCACTACTCC R:GCTAACCAAGACACGCAA	(GA) ₁₂	55	225
Dma54	F:AAAGCCCATCTGTCTCGT R:TGTTTCAGTCCGTTCCCTG	(GT) ₁₂	60	202
Dma58	F:TCAAGAGGGAGTGGGAGC R:TCAAATGGGTGTTAGCG	(AC) ₁₂	58	279
Dma64	F:GCTCAGACTGCGTGGACA R:GCTGGTGAACAACAGGACA	(TG) ₁₃	55	314
Dma72	F:TTCCGCAGGCATAAAAAC R:CCAAGGTCCGCTACTACTA	(CT) ₁₃	58	301
Dma76	F:TTCTCGCTGACCTGCTTG R:GCGTCTCGTCTGCTTTT	(TG) ₁₄	55	253
Dma81	F:GAGACACGGTCAGAAAACA R:GGAAGTAGGACTCTAGGGG	(TGC) ₆	60	216
Dma82	F:CTGTCACTCCATTCTATTCC R:CCTACATTTGTGCTTTTGTTC	(GTT) ₆	58	244
Dma83	F:CTCTAAAGCCGACCTAACC R:TGTCTCAACACAGCGAAAC	(CTT) ₆	58	239

续表 2

to be continued

位点 locus	引物序列 (5'-3') primer sequence	重复单元 repeat motif	退火温度/°C annealing temperature	期望长度/bp allele size
Dma84	F:AAACTAACTCATCACCAG R:AAACGACAGGAAGCAAT	(TGT) ₆	55	283
Dma85	F:CTCACTTTGACCCAACCAG R:CCTTTCACCGAGACACCAG	(AGG) ₆	55	256
Dma131	F:TGCGGATGGGTGGTAGTGT R:ATTGCTGGTAGTCGGTGGC	(GGT) ₈	55	208
Dma132	F:CCCAGTGAGACCAGAACCA R:GACCCGTAGACAGGAGAGT	(GCT) ₈	55	268
Dma135	F:GTTGTTGTTTTTTTCCTT R:CATCAGTCTGGCTTTATA	(GCA) ₉	55	301
Dma145	F:ACGATACAGCAGCCGAAG R:AGTGATGTCGCCTCATAAAT	(TCA) ₁₀	60	197

表3 长体圆鲈微卫星标记的种群遗传学特征

Tab.3 Characteristics of microsatellite loci in *D. macrosoma*

位点 locus	<i>N</i>	<i>N_a</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>P_{HWE}</i>	PIC
Dma03	35	8	0.857 1	0.790 9	0.042 0	0.746 0
Dma07	35	9	0.771 4	0.855 9	0.553 4	0.825 0
Dma12	34	11	0.685 7	0.816 6	0.106 4	0.809 0
Dma15*	35	14	0.542 9	0.911 8	0.000 0	0.890 0
Dma22*	32	14	0.485 7	0.813 2	0.000 0	0.864 0
Dma23	34	17	0.714 3	0.864 8	0.003 3	0.868 0
Dma26*	34	14	0.428 6	0.869 1	0.000 0	0.870 0
Dma28	35	11	0.742 9	0.837 7	0.035 3	0.803 0
Dma36	35	9	0.685 7	0.786 3	0.054 5	0.743 0
Dma38*	34	12	0.628 6	0.851 2	0.000 0	0.849 0
Dma39*	33	12	0.514 3	0.782 0	0.000 0	0.793 0
Dma45	34	12	0.771 4	0.847 8	0.139 2	0.844 0
Dma51*	31	12	0.485 7	0.784 5	0.000 0	0.859 0
Dma54	35	15	0.771 4	0.900 6	0.139 0	0.878 0
Dma58	34	12	0.771 4	0.845 6	0.449 7	0.843 0
Dma64*	31	13	0.428 6	0.788 3	0.000 0	0.865 0
Dma72	35	8	0.628 6	0.713 9	0.155 7	0.659 0
Dma76	35	12	0.685 7	0.908 1	0.003 6	0.886 0
Dma81	35	8	0.628 6	0.795 0	0.045 7	0.752 0
Dma82	35	5	0.485 7	0.538 3	0.023 6	0.497 0
Dma83*	34	8	0.342 9	0.705 8	0.000 0	0.674 0
Dma84	35	7	0.542 9	0.704 8	0.005 9	0.649 0
Dma85	35	8	0.828 6	0.747 8	0.876 9	0.704 0
Dma131	35	9	0.628 6	0.717 6	0.646 6	0.661 0
Dma132	35	8	0.657 1	0.746 6	0.365 5	0.692 0
Dma135	34	10	0.742 9	0.840 5	0.241 8	0.835 0
Dma145	34	7	0.600 0	0.749 3	0.077 4	0.725 0

注: *N*: 有效样品数; *N_a*: 等位基因数; *H_o*: 表观杂合度; *H_e*: 期望杂合度; *P_{HWE}*: “哈迪-温伯格”平衡显著性检验 *P* 值; PIC: 多态信息含量; *: 经 Bonferroni 校正后显著背离“哈迪-温伯格”平衡 (校正 *P*<0.001 85)

Note: *N*: effective number of samples; *N_a*: number of alleles; *H_o*: observed heterozygosity; *H_e*: expected heterozygosity; *P_{HWE}*: Hardy–Weinberg probability test; PIC: polymorphism information content; *: significant deviation from HWE after Bonferroni's correction (adjusted *P*-value<0.001 85)

核苷酸重复具有更高的筛选效率和多态性；鲁翠云等^[17]、谭照君等^[18]、李文升等^[19]的研究认为三、四核苷酸具有更高的多态性和分型效果。长体圆鲂二、三核苷酸的筛选效率分别为 22.2% 和 29.0%，PIC 分别为 0.827 4 和 0.687 7 (表 4)。就筛选效率而言，三核苷酸重复略高于二核苷酸重复，但二者相差不大。PIC 为衡量种群遗传变异程度的重要指标^[36]，二核苷酸重复多态性明显高于三核苷酸重复。本文中长体圆鲂二核苷酸重复筛选效率低于三核苷酸重复，但多态性二核苷酸重复明显高于三核苷酸重复。因此，筛选效率和多态性的差异可能由种属差异或其他多种因素导致。

表4 长体圆鲂二、三核苷酸重复微卫星标记的比较

Tab.4 Comparison on di- and trinucleotide-repeated microsatellite loci in *D. macrossoma*

序列 sequence	引物数 primer number	重复次数 repeat number	筛选效率 efficiency	PIC
二核苷酸重复 di-nucleotide-repeated	18	9~14	22.2%	0.827 4
三核苷酸重复 tri-nucleotide-repeated	9	6~10	29.0%	0.687 7

通过筛选的 27 对引物中 18 个位点为二核苷酸重复，重复次数为 9~14 次不等；9 个位点为三核苷酸重复，重复次数为 6~10 次不等，符合 Ellegren^[37]提出的真核生物微卫星位点重复大部分在 30 次重复以下。但 Ellegren^[37]认为二核苷酸重复以 15~19 次为主，本文中高通量测序获得的二核苷酸重复主要在 6~15 次。基于 Weber^[38]的研究结果，重复次数高的微卫星在种群中表现出的多态性较高，龚小玲等^[39]对澳洲鳗鲡 (*Anguilla australis*) 进行标记开发时发现，微卫星重复序列的重复次数过高会影响 PCR 效果，应选择居中的重复次数为宜。长体圆鲂二核苷酸重复 PIC 为 0.827 4，具有较高多态性，表明选择 6~15 次的二核苷酸重复是合适的。

3.3 微卫星标记的种群遗传学特征

群体杂合度的高低反映了群体在多个基因座上的遗传变异及群体遗传多样性丰富度^[19]。本研究中长体圆鲂中沙群体的平均 H_o 为 0.631 7，平均 H_e 为 0.796 8，说明长体圆鲂该群体的遗传多样性较高。平均 H_o 和 H_e 存在差异，说明存在杂合子缺失或者纯合子过剩的情况。PIC 也是衡量群体遗传多样性的重要指数，Botstein 等^[36]认为基因标

记 $PIC > 0.5$ 为高度多态位点， $0.25 < PIC < 0.5$ 为中度多态位点， $PIC < 0.25$ 为低度多态性位点，通常不作为遗传多样性分析。本文中长体圆鲂位点除 1 个为中度多态外，其他位点均为高度多态位点。表明开发所得的长体圆鲂微卫星标记在中沙群体中具有较好的遗传稳定性和丰富的遗传多样性。

在所有 27 个位点中有 8 个位点偏离了“哈迪-温伯格”平衡，这些位点不适合进一步的遗传分析。近亲杂交、无效等位基因、种群退化和自然选择等因素皆可能导致微卫星位点偏离 HWE^[15]。

参考文献:

- [1] 中国科学院动物研究所, 中国科学院海洋研究所, 上海水产学院. 南海鱼类志 [M]. 北京: 科学出版社, 1962: 387-389.
- [2] 杨吝, 张旭丰, 谭永光, 等. 南海北部灯光围网渔获组成分析 [J]. 南方水产, 2009, 5(6): 65-70.
- [3] 张立, 李渊, 林龙山, 等. 南海中南部主要经济种类渔业资源声学评估 [J]. 海洋渔业, 2016, 38(6): 577-587.
- [4] 张俊, 张鹏, 陈作志, 等. 南海外海鲷科鱼类资源量及其分布 [J]. 南方水产科学, 2016, 12(4): 38-48.
- [5] 张鹏, 张俊, 李渊, 等. 秋季南海中南部海域的一次灯光罩网探捕调查 [J]. 南方水产科学, 2016, 12(2): 67-74.
- [6] SHIRAIISHI T, TANAKA H, OHSHIMO S, et al. Age, growth and reproduction of two species of scad, *Decapterus macrossoma* and *D. macarellus* in the waters off southern Kyushu [J]. Jpn Agr Res Q, 2010, 44(2): 197-206.
- [7] BALASUBRAMANIAN N K, NATARAJAN P. Resource characteristics of the scads, *Decapterus russelli* and *D. macrossoma* of the Vizhinjam area, southwest coast of India [J]. Indian J Fish, 1999, 46(2): 111-122.
- [8] POTIE M, DRAPEAU L. Modelling and forecasting the catch of the scads (*Decapterus macrossoma*, *Decapterus russelli*) in the Javanese purse seine fishery using ARIMA time series models [J]. Asian Fish Sci, 2000, 13: 75-85.
- [9] 翟云, 吴仁协, 牛素芳, 等. 基于 SLAF-seq 技术开发蓝圆鲂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.
- [10] DEWOODY J A, AVISE J C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals [J]. J Fish Biol, 2000, 56(3): 461-473.
- [11] EUSTICE M, YU Q Y, LAI C W. Development and application of microsatellite markers for genomic analysis of papaya [J]. Tree Genet Genome, 2008, 4(2): 333-341.
- [12] VARELA A I, RITCHIE P A, SMITH P J. Global genetic population structure in the commercially exploited deep-sea teleost orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*) based on microsatellite DNA analyses [J]. Fish Res, 2013, 140: 83-90.
- [13] 海萨, 李家乐, 郭焱, 等. 河鲈微卫星引物筛选 [J]. 水生态学杂

- 志, 2008, 1(6): 90-94.
- [14] 赵哲霞, 蒋珊, 王滨花, 等. 黄颡鱼属 SSR 分子鉴定及其遗传多样性 [J]. 南昌大学学报 (理科版), 2014, 38(5): 498-501.
- [15] 翟云, 吴仁协, 牛素芳, 等. 采用高通量技术开发花鲈二碱基重复微卫星标记 [J]. 基因组学与应用生物学, 2018(9): 1-11.
- [16] 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]. Mol Ecol Resour, 2012, 12(6): 1105-1113.
- [17] 鲁翠云, 毛瑞鑫, 李鸥, 等. 鲤鱼三、四核苷酸重复微卫星座位的筛选及特征分析 [J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(6): 979-987.
- [18] 谭照君, 张天奇, 鲁翠云, 等. 鲢三、四核苷酸重复微卫星标记的筛选及其特征分析 [J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(3): 328-335.
- [19] 李文升, 刘翠, 鲁翠云, 等. 草鱼三、四核苷酸重复微卫星标记的分离与特征分析 [J]. 中国水产科学, 2011, 18(4): 742-750.
- [20] THIEL T, MICHALEK W, VARSHNEY R K, et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2003, 106(3): 411-422.
- [21] SCHUELKE M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(2): 233-234.
- [22] ROUSSET F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux [J]. Mol Ecol Resour, 2008, 8(1): 103-106.
- [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]. Mol Ecol, 2007, 16(5): 1099-1106.
- [24] 杨兵, 林琳, 李纯厚, 等. 基于高通量测序的二长棘鲷微卫星标记开发与评价 [J]. 南方水产科学, 2015, 11(4): 116-120.
- [25] 秦海峰, 龙宁, 吴建国, 等. 甜叶菊微卫星富集文库的构建与多态性标记的筛选 [J]. 作物学报, 2014, 40(3): 447-456.
- [26] LIN L, LI C H, CHEN Z Z, et al. Development and characterization of twenty-three microsatellite markers for the purpleback flying squid (*Symplectoteuthis oualaniensis*) [J]. Conserv Genet Resour, 2015, 7(1): 161-163.
- [27] KONG X L, CHEN Z Z, LIN L, et al. Polymorphic micro-satellite loci isolated from the yellowbelly threadfin bream, *Nemipterus bathybius* [J]. Genet Mol Res, 2014, 13(3): 5254-5257.
- [28] 房祖业, 陈晓东, 吴咏诗, 等. 大刺鲃 (*Mastacembelus armatus*) 二、三、四碱基重复微卫星标记的筛选和特征分析 [J]. 海洋与湖沼, 2018, 49(1): 174-182.
- [29] 高峰涛, 邵长伟, 崔忠凯, 等. 基于高通量测序的青石斑鱼基因组微卫星开发及评价 [J]. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 2017, 47(4): 52-57.
- [30] SONG W T, PANG R Y, NIU Y Z, et al. Construction of high-density genetic linkage maps and mapping of growth-related quantitative trait loci in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. PLoS One, 2012, 7(11): 50404.
- [31] SONG W, LI Y, ZHAO Y, et al. Construction of high-density microsatellite genetic linkage maps and mapping of sexual and growth-related traits in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52097.
- [32] 曾晓芸, 杨宗英, 田辉伍, 等. 基于 Mi-Seq 高通量测序分析裸体异鳔鳅微卫星组成 [J]. 淡水渔业, 2015, 45(1): 3-7.
- [33] 熊良伟, 王帅兵, 封琦, 等. 基于高通量测序的中华鳊基因组微卫星特征分析及标记开发 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(18): 164-168.
- [34] XIONG L W, WANG Q, QIU G F. Large-scale isolation of microsatellites from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* via a sol-exa genomic survey [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(12): 16333-16345.
- [35] 高焕, 孔杰. 串联重复序列的物种差异及其生物功能 [J]. 动物学研究, 2005, 26(5): 555-564.
- [36] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(3): 314-331.
- [37] ELLEGREN H. Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation [J]. Trends Genet, 2002, 18(2): 70.
- [38] WEBER J L. Informativeness of human (dC-dA)_n-(dG-dT)_n polymorphisms [J]. Genomics, 1990, 7(4): 524-530.
- [39] 龚小玲, 李思发, 蔡完其, 等. 澳洲鳎微卫星分子标记的筛选与检测 [J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 133-138.