

DOI: 10.15886/j.cnki.hdxzbzkb.2024031701

CSTR: 32403.14.hndk.2024031701

海洋牧场与现代渔业



引用格式: 卢章旺, 李福宇, 廖婷馨, 等. 丛生盔形珊瑚转录组微卫星标记的分离和鉴定 [J]. 海南大学学报(自然科学版中英文), 2025, 43(1): 25-32.

Citation: LU Zhangwang, LI Fuyu, LIAO Tingxin, et al. Development of novel EST-SSR markers for the stony coral *Galaxea fascicularis*[J]. Natural Science of Hainan University, 2025, 43(1): 25-32.

丛生盔形珊瑚转录组微卫星标记的 分离和鉴定

卢章旺, 李福宇, 廖婷馨, 李立微, 王 嫣*

(海南大学 海洋生物与水产学院, 海南 海口 570228)

摘要: 丛生盔形珊瑚是中国南海岛礁造礁珊瑚的代表性物种。根据其刺丝囊形态与线粒体基因组 *CYTB-ND2* 基因间区插入/缺失(indel)的基因型, 丛生盔形珊瑚可分为 S 和 H 两种形态型, 且二者的遗传和生态表型有明显的分化。本研究通过挖掘丛生盔形珊瑚编码蛋白的转录本序列的微卫星资源, 分离和鉴定了 11 个在两种形态型中均能稳定而均衡扩增的 EST-SSR 分子标记, 并分别在一个 S 群体($n=16$)和一个 H 群体($n=31$)中进行检测和验证。这 11 个标记均呈现多态性, 在 S 群体, 其等位基因数为 3~8 个(平均 4.8 ± 1.9 个), 观测杂合度(H_o)为 0.06~0.92 (0.55 ± 0.26), 期望杂合度(H_e)为 0.24~0.83 (0.40 ± 0.27); 在 H 群体, 其等位基因数为 2~9 个(4.5 ± 2.1), 观测杂合度(H_o)为 0.17~1.00 (0.70 ± 0.15), 期望杂合度(H_e)为 0.46~0.86 (0.62 ± 0.19)。仅一个位点(*Gf-E24*)因存在无效等位基因, 在 H 群体中偏离哈迪-温伯格平衡。

关键词: 丛生盔形珊瑚; EST-SSR; 形态型; 线粒体基因型; 遗传分化

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1004-1729(2025)01-0025-08

Development of novel EST-SSR markers for the stony coral *Galaxea fascicularis*

LU Zhangwang, LI Fuyu, LIAO Tingxin, LI Liwei, WANG Yan*

(School of Marine Biology and Fisheries, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: *Galaxea fascicularis* is a representative species of reef-building coral in the South China Sea. Based on the nematocyst morphology and the indel genotype of *CYTB-ND2* in mitochondrial genome, *G. fascicularis* can be divided into two morphotypes: S and H, and there is significant differentiation in the genetic and ecological phenotypes between these two morphotypes. By mining microsatellite resources from the transcriptome sequences, we developed 11 SSR markers that could be used in both morphotypes, and tested and validated them in one S population ($n=16$) and one H population ($n=31$), respectively. All the 11 markers showed polymorphism. In S population, the number of alleles ranged from 3 to 8 (mean 4.8 ± 1.9), the observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.06 to 0.92 (0.55 ± 0.26), and the expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.24 to 0.83 (0.40 ± 0.27). In H population, the number of alleles were 2~9 (4.5 ± 2.1), the observed heterozygosity (H_o) was 0.17~1.00 (0.70 ± 0.15), and the expected heterozygosity (H_e) was

收稿日期: 2024-03-17

基金项目: 国家科技基础资源调查专项课题(2022FY100604); 国家自然科学基金项目(41376174)

作者简介: 卢章旺(1999—), 男, 海南海口人, 海南大学水产专业 2021 级硕士研究生, E-mail: 1594904704@qq.com

通信作者: 王 嫣(1965—), 女, 山东青岛人, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 海洋生物学, E-mail: ywang@hainanu.edu.cn

0.46 ~ 0.86 (0.62±0.19). Only one locus (*Gf-E24*) deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium in H population, probably due to the presence of null allele.

Keywords: *Galaxea fascicularis*; EST-SSR; morphotypes; mitochondrial genotype; genetic differentiation

0 引言

珊瑚礁是重要的海洋生态系统,虽然仅覆盖地球表面的0.063%,但却对地球表面形状、生物地理分布、海洋化学和大气成分等都产生着重要的影响^[1]。然而,随着人类社会的工业化进程和CO₂释放,全球气候持续变暖,局部海区极端高温频发^[2],导致全球范围珊瑚白化事件越来越频繁,珊瑚的种类和数量都急剧下降,造成了珊瑚礁结构和功能的明显衰退^[2-3]。在全球范围,珊瑚礁的整体覆盖率近三四十年来已下降约50%^[1],因此,采取有效的措施来保护和恢复珊瑚礁生态系统已迫在眉睫。

丛生盔形珊瑚(*Galaxea fascicularis*)是一种压力耐受性较强的块状造礁珊瑚^[4-5],它广泛分布于印度洋和太平洋海域珊瑚礁区,是中国南海诸岛和海南岛岸礁的代表性物种^[6],其覆盖率经常被用作南海珊瑚礁状况的评价指标^[7]。最初,Hidaka^[8]发现,冲绳岛的丛生盔形珊瑚根据连接水螅体的共骨的软硬,可分为S(soft, 较软)和H(hard, 较硬)两种形态型,且二者触手的MpM(microbasic p-mastigophore)刺丝囊也存在显著的差异,S型的刺丝囊较宽,刺较长。而Watanabe等^[9]发现,丛生盔形珊瑚线粒体基因*CYTB*与*ND2*的间区存在一个290 bp的插入/缺失(indel),大多数H型缺失290 bp片段,其线粒体基因型为mt-S(Short);而多数S型则含有这290 bp片段,其线粒体基因型为mt-L(Long)。研究发现中国南海的丛生盔形珊瑚,同样存在这两种形态型和线粒体基因型^[10]。这两种类型同域分布,但具有不同的生态表型,在高温胁迫实验中,H型比S型具有显著较强的耐热性。这两个具有稳定形态和遗传标记的丛生盔形珊瑚类群,可提供研究造礁珊瑚耐热性分化机制和遗传基础的上佳材料。

微卫星又称简单序列重复(simple sequence repeats, SSR),它广泛分布于真核生物基因组^[11]。微卫星标记是一种高度多态的共显性分子标记,目前被普遍用于非模式生物的种群遗传分析^[12]。而造礁珊瑚作为典型的克隆生物,有性和无性混合的繁殖方式使其在群体水平上遗传上单一的克隆实体,在生态上却可能由许多个体组成^[13]。而经典的平衡群体理论以克隆或一个基因组为一个种群单位^[14-15],因此克隆身份的认定也成为了造礁珊瑚的群体遗传学研究首先要面临的挑战。只有在基因组中随机分布的多位点、高度多态的共显性遗传标记,如微卫星标记,才能精准识别造礁珊瑚群体中的无性系克隆^[16],并有助于揭示生态时间尺度上微妙的遗传连通性和变异^[17]。另一方面在造礁珊瑚中,开发的微卫星标记需要仔细剔除属于内共生虫黄藻的微卫星标记,并在扩增中排除虫黄藻DNA的干扰,其开发成本和技术要求相对较高。因此近十多年才在一些广分布的代表性造礁珊瑚物种的群体遗传结构和连通性分析^[18-19]以及遗传世系鉴定上^[20-21]得到广泛应用。而开发自转录组表达序列标签(expressed sequence tag, EST)的微卫星(EST-SSR)分子标记,由于其属于功能基因或与之相邻的区域,其基因型可能与某些功能基因相关,因而可能与珊瑚的环境适合度性状有关联。或可用于分析环境压力下,丛生盔形珊瑚两种形态型种群遗传结构和连通性的变化。

本研究利用之前测定的编码蛋白的转录本序列^[5],挖掘和开发EST-SSR分子标记,这可为研究和比较丛生盔形珊瑚两个形态型的遗传分化和连通性格局提供一个有效的工具。

1 材料与方法

1.1 珊瑚群体样品的采集 丛生盔形珊瑚群体样品于2016年采集自海南省三亚市鹿回头(18°12'45"N, 109°28'27"E)与昌江黎族自治县海尾岸礁(19°26'48"N, 108°51'12"E)。在每块礁体(colony)上部采集一小块(<3 cm × 3 cm)健康样品,礁体之间至少间隔10 m。取2~3个完整的水螅体,置于预装95%乙醇的2 mL离心管。24 h内更换乙醇3次,确保DNA样品完全固定。

1.2 刺丝囊类型的检测 取完整的乙醇固定的水螅体,参考Hidaka^[8]的方法,用尖头镊子准确夹取水螅

体触手末端顶球体(白点),置于载玻片上的水滴中。以盖玻片压片并向一侧轻搓,展开顶球体组织,然后置于显微镜下观察。以 Motic 3.0.19.129 软件进行拍照,测量刺丝囊的囊长(LC)、刺长(LS)和囊宽(WC)。测量仅选刺未释放、囊长大于 40 μm 的发育成熟的刺丝囊。每个样本测量 4 个顶球体,每个顶球体测量 5 个刺丝囊。统计刺长与囊长的比值(LS/LC)。刺较长(LS/LC \geq 1/2)囊体较宽(囊宽 $>$ 6.5 μm)的样品判定为 S 型;刺较短(LS/LC \leq 1/3)囊体较细($<$ 5.8 μm)的样品判定为 H 型,以此将丛生盔形珊瑚分为 S 和 H 两种形态型。

1.3 线粒体基因型的鉴定 从鉴定刺丝囊类型的水螅体内,用镊子从隔片间夹取不多于 30 mg 的软组织,使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒 [天根生化科技(北京)有限公司],按说明书提取样品的 DNA。以引物 188-2 (5'-TCCTGTAGAATAGGGTATAC-3')和 188-R2 (5'-TTTGCCTTCCGTATCCAC-CAT-3'),扩增 *CYTB* 和 *ND2* 基因之间的区域^[9]。PCR 反应在 2720 Thermal Cycler PCR 仪(Thermo Fisher, 美国)上进行。PCR 体系为: 5 μL 2 \times Taq PCR MasterMix II [天根生化科技(北京)有限公司], 5 pmol (1 μL) 正反向引物, 1 μL 模板 DNA ($<$ 100 ng), dd H₂O 补足至 10 μL 。PCR 程序设定为: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ (3 min); 30 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 总延伸 5 min。以琼脂糖(浓度 1.2%)凝胶电泳检测扩增产物,产物大小为 700 bp 的样品判定为 mt-L 基因型,产物为 410 bp 判定为 mt-S^[9]。

1.4 EST-SSR 的挖掘与微卫星标记的开发 使用 MISA 软件(<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>)对先前测序获得的 77 986 条丛生盔形珊瑚转录组序列^[5]进行微卫星筛选。筛选标准为二碱基重复至少 7 次,三碱基重复至少 6 次,四以上碱基至少重复 4 次。从中挑选包含足够侧翼区域的序列,用 Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>)进行引物设计,参数设置参照 Wang 等^[12],共设计出 83 对引物。

参考李福宇等^[22]的方法,分别以 S 型和 H 型的各 3 个个体形成的两个 DNA 池,以及从丛生盔形珊瑚中分离后体外驯化的共生藻 GF19C1 和 GF20D1^[23]的 1:1 DNA 混合池,同时扩增和验证上述引物。PCR 体系为: 5 μL MonAmp 2 HS Taq Mix [莫纳(苏州)生物科技有限公司],正反向引物各 5 pmol, 1 μL 模板 DNA ($<$ 100 ng),最后用 dd H₂O 补足至 10 μL 。PCR 程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 30 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,退火在 50 ~ 62 $^{\circ}\text{C}$ 间测试与选择 (30 s), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 ~ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 总延伸 5 min。扩增产物以浓度为 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。筛选出在虫黄藻 DNA 中无扩增,但在 S 型和 H 型中均有清晰扩增产物条带的引物,并将其序列放到 NCBI 进行 BLAST,搜索出这些序列所编码的功能基因。

1.5 微卫星标记在群体中的扩增和遗传参数分析 使用 Schuelke^[24]的经济型 PCR 产物荧光标记方法,将筛选出的 11 对引物(表 1),分别在一个丛生盔形珊瑚 S 型群体(16 个个体,采自鹿回头)和一个 H 型群体(31 个个体,采自海尾)中进行 PCR 扩增。PCR 体系为: 5 μL MonAmp 2 HS Taq Mix [莫纳(苏州)生物科技有限公司], 0.08 μL 正向引物(5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.24 μL 反向引物(5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.16 μL 5'分别标记了 4 种荧光(6-FAM, VIC, NED, PET, ThermoFisher, 美国)之一标记的 M13 引物(5'-TGTAACGACGG-CCAGT-3'), 1 μL 模板 DNA ($<$ 100 ng),最后用 dd H₂O 补足至 10 μL 。PCR 程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;

表 1 丛生盔形珊瑚 11 个微卫星标记的信息及其在 S 群体($n=16$)和 H 群体($n=31$)的遗传参数

位点/ GenBank 号	功能基因ID	功能基因	基序	引物序列 (5'—3')	退火 温度 / $^{\circ}\text{C}$	类 型	等位基 因数/个	等位基 因范围 /bp	观测杂 合度	期望杂 合度	多态信 息含量	哈迪-温 伯格 平衡
Gf-E03/ MT648722	XP_029184451.2	lon protease homolog 2, peroxisomal-like	(CT)10	F: TGCGTACC ATTGTAATCA GGAC	55.0	S	7	169 ~ 221	0.62	0.86	0.79	0.011
				R: ACTTCAT CCGCAGAC TCAAAAAG		H	4	189 ~ 201	0.33	0.59	0.51	0.007*
Gf-E06/ MT648724	KAJ7386833.1	Protein tanc2	(CT)7	F: GTCCAAA AGAAATGTC GGTCTC	60.0	S	7	319 ~ 343	0.69	0.76	0.69	0.158
				R: TCCGTCA TGACAACA GTTTAC		H	7	187 ~ 329	0.83	0.79	0.72	0.032

续表 1

位点/ GenBank 号	功能基因ID	功能基因	基序	引物序列 (5'—3')	退火 温度 /°C	类 型	等位基 因数/个	等位基 因范围 /bp	观测杂 合度	期望杂 合度	多态信 息含量	哈迪-温 伯格 平衡
<i>Gf-E07/</i>	—	—	(CT)7	F: CCATAAC AGGACCCATA ACAGG	60.0	S	3	189 ~ 215	0.17	0.83	0.54	0.206
MT648725				R: TATGGC ATCTGCCAA AGAAATC		H	4	189 ~ 205	0.26	0.58	0.40	0.016
<i>Gf-E15/</i>	XP_044168250.1	hypothetical protein	(TA)7	F: AGGGACT GGACATCCT CCTAC	60.5	S	8	200 ~ 246	0.46	0.79	0.42	0.008
MT648726	LOC122952275	LOC122952275		R: CGTTTT CTGTTACAG CTTCTGC		H	2	200 ~ 204	0.50	0.39	0.19	0.528
<i>Gf-E24/</i>	KAJ7390973.1	hypothetical protein	(ACTCG) 4	F: ATTACCC CTTCTTGATC GTCATC	60.0	S	3	225 ~ 235	0.23	0.61	0.55	0.016
MT648731	OS493_020993	OS493_020993		R: AAGGTA TTCCTCAGGC TTTCC		H	4	220 ~ 245	0.25	0.74	0.72	0.000*
<i>Gf-E28/</i>	KAK2573568.1	Inositol hexakisphosphate kinase 1	(AGAC)5	F: TATATTC TGCAATGCC CATCC	60.0	S	3	147 ~ 155	0.67	0.53	0.70	1.000
MT648732				R: TGTCTG TCTTGTC TTAGCTC		H	3	147 ~ 159	0.06	0.45	0.31	0.006*
<i>Gf-E37/</i>	KAJ7333611.1	hypothetical protein	(CAT)7	F: CCACAAC AATGCAAC AGAGAC	55.0	S	3	212 ~ 218	0.23	0.46	0.42	0.049
MT648737	OS493_017154	OS493_017154		R: AAGCTTT TGTTTACAG TCTTCC		H	3	212 ~ 218	0.17	0.63	0.62	0.009
<i>Gf-E41/</i>	KAK2567088.1	Apical junction component 1-like protein	(TTC)7	F: TGGTTTC CGAGTCAG TTTCTTC	55.0	S	3	213 ~ 219	0.54	0.60	0.35	0.121
MT648738				R: CGGGGAA ATTACATT CACTAC		H	2	213 ~ 216	0.17	0.24	0.47	1.000
<i>Gf-E48/</i>	XP_044180598.1	hypothetical protein	(TCAA)6	F: CAAAAG CTTACGACA TTGTTGG	60.0	S	4	206 ~ 230	0.50	0.67	0.50	0.263
MT648742	LOC122961846	LOC122961846		R: GTCTGGG ATACAAAA TGGAACG		H	9	170 ~ 414	0.61	0.79	0.14	0.104
<i>Gf-E51/</i>	—	—	(TA)7	F: AACTATT CCACCTCA GCATTGG	61.0	S	6	201 ~ 227	0.92	0.72	0.65	0.330
MT648744				R: AAGAGC CTTGTCAAA GCATGTAG		H	7	207 ~ 235	0.92	0.83	0.77	0.035
<i>Gf-E57</i>	—	—	(TAAA)5	F: TCCGTCA ATTTGCTAT CTCTACC	55.0	S	6	214 ~ 246	1.00	0.83	0.77	0.641
MT648746				R: CAGCCTA GCGAATTAC AATGG		H	5	218 ~ 246	0.33	0.81	0.67	0.009
平均值						S	4.8±1.9		0.55±0.26	0.70±0.15	0.58±0.14	
						H	4.5±2.1		0.40±0.27	0.62±0.19	0.50±0.21	

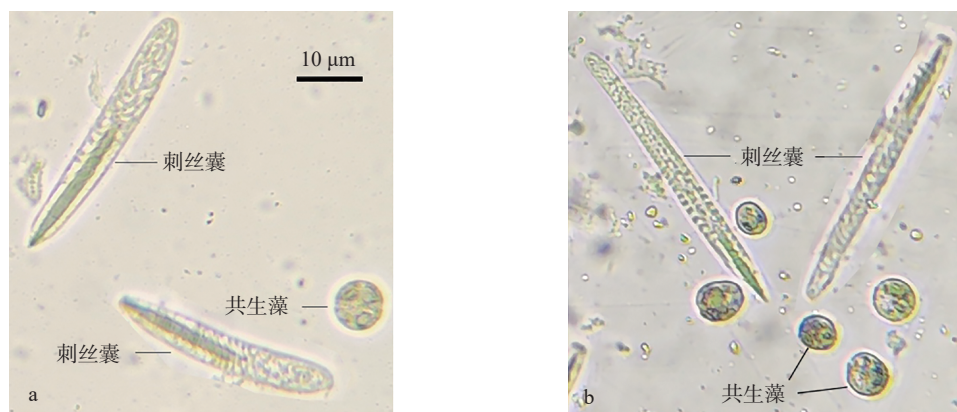
注: 加粗字体代表显著 ($P < 0.05$) 偏离哈迪-温伯格平衡; “*”表示该位点可能存在无效等位基因; “—”表示未搜索到特定功能基因。

30 个循环: 94 °C 变性 30 s, 退火 30 s (退火温度见表 1), 72 °C 延伸 20 s; 15 个循环: 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s; 72 °C 总延伸 15 min。将不同荧光标记的 PCR 产物等量混合送至广州擎科生物科技有限公司, 以 ABI 3730xl 遗传分析仪 (Thermo Fisher, USA) 进行毛细管电泳, 内标为 GS-500LIZ (Applied Biosystems, 美国)。使用 GENEMARER ver.3.7 软件读取等位基因, 对等位基因读取失败的样本, 重复一次上述扩增与检测步骤。

对群体的每个个体在每个位点的基因型进行统计分析。将各位点基因型均相同的个体判定为遗传同质性个体(克隆), 仅使用多位点基因型 (Multi-locus genotypes, MLGs) 组合进行后续的群体遗传分析。使用在线软件 GENEPOP^[25] (<http://genepop.curtin.edu.au/>) 进行哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) 和基因型连锁失衡检测 (exact tests, 1 000 iterations), 并对显著性进行 Bonferroni 校正^[26]。使用软件 ARLEQUIN ver. 3.0^[27] 计算期望杂合度 (H_E) 与观测杂合度 (H_O), 软件 Cervus 3.0.7 计算多态信息含量 (polymorphism information content, PIC), 软件 MICRO-CHECKER 2.2.1^[28] 检测各位点在群体中的无效等位基因。使用软件 GenALEX 6.503^[29] 进行分子方差分析 (Analysis of Molecular Variance, AMOVA), 获得两个群体间的遗传分化系数 F_{ST} 。

2 结果与分析

2.1 样品形态型与线粒体基因型的鉴定 在海南省三亚市鹿回头岸礁和昌江黎族自治县海尾岸礁分别采集了 18 和 32 个个体。根据刺丝囊囊宽与刺长的差异(图 1), 采自鹿回头岸礁的 18 个个体中, 16 个鉴定为 S 型, 2 个鉴定为 H 型; 采自海尾岸礁的 32 个个体, 31 个为 H 型, 1 个为 S 型。所有 S 型的线粒体基因型均为 mt-L, 而所有 H 型的线粒体基因型均为 mt-S。鹿回头的 16 个 S 型个体组成 S 群体, 海尾的 31 个 H 型个体组成 H 群体, 进行后续微卫星标记的群体扩增和遗传参数分析。



a S型: 囊较宽, 刺较长, 刺长与囊长比值 $\geq 1/2$

b H型: 囊细长, 刺较短, 刺长与囊长比值 $\leq 1/3$

图 1 2 种类型的刺丝囊

2.2 微卫星标记的开发与多样性 从 77 986 条丛生盔形珊瑚转录组序列中查找出 4 769 条含微卫星的序列, 并从中设计了 83 对引物(记为 *Gf-E01* ~ *Gf-E83*)。经重测序确认了 11 对在虫黄藻 DNA 中无扩增, 但在 S 型和 H 型中均有清晰扩增产物条带的引物。这些引物所对应的 11 条序列, 有 8 条序列 BLAST 比对出编码蛋白基因(表 1), 其中有 4 条只是比对出假定蛋白(hypothetical protein), 仅有 4 条比对出特定的功能基因, 其编码的蛋白分别为 *Gf-E03*: lon protease homolog 2, peroxisomal-like, *Gf-E06*: Protein tanc2, *Gf-E28*: 肌醇六磷酸激酶 1 (Inositol hexakisphosphate kinase 1) 和 *Gf-E41*: Apical junction component 1-like protein。这 11 个微卫星标记在上述 S 群体和 H 群体中均具有多态性(图 2)。在 S 群体, 其等位基因数在 3 ~ 8 个之间, 平均每个标记有 4.8 ± 1.9 个等位基因(表 1), 多态信息含量(PIC)平均为 0.58 ± 0.14 。观测杂合度(H_O)为 0.06 ~ 0.92 (平均 0.55 ± 0.26), 期望杂合度(H_E)为 0.24 ~ 0.83 (0.40 ± 0.27)。在 H 群体, 其等位基因个数为 2 ~ 9, 平均每个标记有 4.5 ± 2.1 个等位基因, 多态信息含量平均为 0.50 ± 0.21 。观测杂合度(H_O)为 0.17 ~ 1.00 (0.70 ± 0.15), 期望杂合度(H_E)为 0.46 ~ 0.86 (0.62 ± 0.19)。位点 *Gf-*

E24 在 H 群体中经 Bonferroin 多重比较校正后 ($P_{\text{HWE}} < 0.0045$), 仍偏离哈迪-温伯格平衡(表 1)。经 MICRO-CHECKER 检测, 该位点均可能存在无效等位基因。经 AMOVA 分析, S 群体和 H 群体之间的遗传分化系数 F_{ST} 为 0.214。

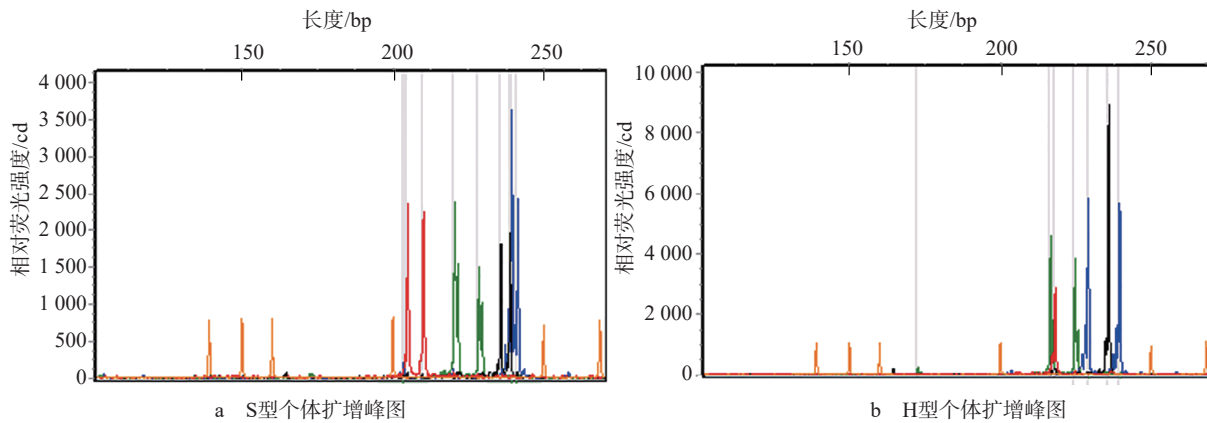


图 2 微卫星位点扫描群体的毛细管电泳的等位基因峰图

3 讨论

丛生盔形珊瑚的刺丝囊与线粒体基因型均有两种类型, 虽然 Watanabe 等^[9] 发现其形态型与线粒体基因型高度相关, 但仍有少部分个体不一致, 或许正是这个原因, 他们之后研究丛生盔形珊瑚的遗传分化时, 放弃了刺丝囊形态的检测, 仅用线粒体基因型来区分类群^[19-20, 30]。而我们的研究发现, 在形态个体(水螅体)水平, 丛生盔形珊瑚的形态型与线粒体基因型完全对应, 由此, 丛生盔形珊瑚自然群体可分成两个同域分布并带有显著形态和遗传标记的类群, 并且在开发微卫星标记时, 我们将在二者群体中均衡扩增, 作为附带筛选标准, 这便于进一步研究二者的微卫星遗传分化, 以及监测二者在地理群体间的各自基因流。此外, Nakajima 等^[20] 在琉球群岛的丛生盔形珊瑚 S 和 H 的自然群体随机样品中检测到克隆占比接近 50%, 而本研究所使用的两个群体未检出克隆, 主要是由于采用了严格的群体样品采样规范, 即采样的珊瑚礁体间隔至少 10 m。

此前曾有研究人员开发基于丛生盔形珊瑚基因组序列的微卫星标记^[31], 但其在两个类群中扩增不均衡, 同样的情况也发生在 Nakajima 等^[19] 开发的基因组微卫星标记中。这反映出两个形态型的基因组层面已发生了相当的分化^[30]。而本研究开发的微卫星标记是基于具有更高保守性^[32-33] 的转录组序列^[5], 经过针对性的筛选, 实现了在 S 型和 H 型之间的均衡扩增。本研究基于这些位点分析海南岛岸礁的两个形态型群体间的遗传分化, 其分化系数 F_{ST} 高达 0.214, 也显示出相当的分辨力。另一方面, 转录组序列的相对保守性会限制其微卫星的等位基因数^[32-33]。本研究的 11 个 EST-SSR 标记在 S 和 H 群体中平均等位基因数分别为 4.8 ± 1.9 和 4.5 ± 2.1 , 比 Nakajima 等^[19] 的基因组微卫星标记的等位基因数 (S: 10.3 ± 1.8 ; H: 7.6 ± 1.7) 要低。

相对于其他动物, 造礁珊瑚微卫星的开发面临着特别的挑战与困难, 即共生虫黄藻 DNA 的污染。造礁珊瑚的基因组较小而虫黄藻的基因组巨大^[34], 珊瑚遗传物质仅占整个共生体的 10% 左右^[35], 因此, 提取的珊瑚 DNA 中必定含有虫黄藻的 DNA。为排除虫黄藻 DNA 的干扰, 将分离纯化的虫黄藻 GF19C1 和 GF20D1^[14] (C 型和 D 型, 丛生盔形珊瑚所共生的两类虫黄藻) 的 DNA 混成 1:1 的混合池, 与珊瑚 DNA 一起进行扩增和验证, 筛选出在虫黄藻 DNA 中无扩增, 但在珊瑚 DNA 中有清晰条带的引物。

本研究开发了 11 个来自丛生盔形珊瑚 EST-SSR 的分子标记, 均显示较高的多态性。仅 1 个标记由于存在无效等位基因, 偏离了哈迪-温伯格平衡。无效等位基因会导致群体遗传多样性的低估^[36], 因此该位点在用于群体分析时需慎重。此外, 如果在群体分析中, 不区分 S 和 H 群体, 而使用混合群体, 则会出现较多的位点偏离 HWE^[30, 37]。这是因为两种形态型之间存在部分生殖隔离^[38], 如果将二者混为一个群体, 则违背了哈迪-温伯格平衡的前提假设。

4 结 论

本研究基于丛生盔形珊瑚的部分编码蛋白的转录本序列, 分离了 11 个多态的 EST-SSR 分子标记。经丛生盔形珊瑚两种形态型群体扩增鉴定, 均能稳定和均衡扩增。可精准评估二者种群的遗传多样性水平和遗传结构, 并可用于分析二者在环境压力下遗传结构的改变和分化。

参考文献:

- [1] BIRKELAND C. Coral Reefs in the Anthropocene[M]. Dordrecht: Springer, 2015.
- [2] HUGHES T P, ANDERSON K D, CONNOLLY S R, et al. Spatial and temporal patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene[J]. *Science*, 2018, 359(6371): 80–83.
- [3] HOEGH-GULDBERG O, MUMBY P J, HOOTEN A J, et al. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification[J]. *Science*, 2007, 318(5857): 1737–1742.
- [4] BAIRD A H, MARSHALL P A. Mortality, growth and reproduction in scleractinian corals following bleaching on the Great Barrier Reef[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2002, 237: 133–141.
- [5] HOU J, XU T, SU D J, et al. RNA-Seq reveals extensive transcriptional response to heat stress in the stony coral *Galaxea fascicularis*[J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 37.
- [6] HUANG W, CHEN Y M, WU Q, et al. Reduced genetic diversity and restricted gene flow of broadcast-spawning coral *Galaxea fascicularis* in the South China Sea reveals potential degradation under environmental change[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2023, 193: 115147.
- [7] 黄晖, 陈竹, 黄林韬. 中国珊瑚礁状况报告(2010—2019)[M]. 北京: 海洋出版社, 2021.
- [8] HIDAKA M. Use of nematocyst morphology for taxonomy of some related species of scleractinian corals[J]. *Galaxea*, 1992, 11: 21–28.
- [9] WATANABE T, NISHIDA M, WATANABE K, et al. Polymorphism in nucleotide sequence of mitochondrial intergenic region in scleractinian coral (*Galaxea fascicularis*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2005, 7(1): 33–39.
- [10] 陆芷滢. 我国西沙造礁石珊瑚的形态统计分类学研究[D]. 海口: 海南大学, 2022.
- [11] TÓTH G, GÁSPÁRI Z, JURKA J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis[J]. *Genome Research*, 2000, 10(7): 967–981.
- [12] WANG Y, WANG A M, GUO X M. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the northern quahog *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758)[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2010, 29(1): 77–82.
- [13] SACKVILLE HAMILTON N R, SCHMID B, HARPER J L. Life-history concepts and the population biology of clonal organisms[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1987, 232(1266): 35–57.
- [14] JACKSON J B C, COATES A G. Life cycles and evolution of clonal (modular) animals[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1986, 313(1159): 7–22.
- [15] HUGHES R N. The functional ecology of clonal animals[J]. *Functional Ecology*, 1987, 1(1): 63–69.
- [16] LIU S Y V, DAI C F, FAN T Y, et al. Cloning and characterization of Microsatellite loci in a gorgonian coral, *Junceella juncea* (Anthozoa: Octocorallia: Ellisellidae) and its application in clonal genotyping[J]. *Marine Biotechnology*, 2005, 7(1): 26–32.
- [17] PRITCHARD J K, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data[J]. *Genetics*, 2000, 155(2): 945–959.
- [18] POLATO N R, CONCEPCION G T, TOONEN R J, et al. Isolation by distance across the Hawaiian Archipelago in the reef-building coral *Porites lobata*[J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19(21): 4661–4677.
- [19] NAKAJIMA Y, SHINZATO C, SATOH N, et al. Novel polymorphic microsatellite markers reveal genetic differentiation between two sympatric types of *Galaxea fascicularis*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0130176.
- [20] NAKAJIMA Y, ZAYASU Y, SHINZATO C, et al. Genetic differentiation and connectivity of morphological types of the

- broadcast-spawning coral *Galaxea fascicularis* in the Nansei Islands, Japan[J]. *Ecology and Evolution*, 2016, 6(5): 1457–1469.
- [21] GÉLIN P, POSTAIRE B, FAUVELOT C, et al. Reevaluating species number, distribution and endemism of the coral genus *Pocillopora* Lamarck, 1816 using species delimitation methods and microsatellites[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2017, 109: 430–446.
- [22] 李福宇, 陈丹丹, 李元超, 等. 澄黄滨珊瑚微卫星标记的开发 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(7/8): 2513–2521.
- [23] WANG J, CHEN J Q, WANG S Y, et al. Monoclonal culture and characterization of symbiodiniaceae C1 strain from the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 11: 621111.
- [24] SCHUELKE M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(2): 233–234.
- [25] RAYMOND M, ROUSSET F. An exact test for population differentiation[J]. *Evolution*, 1995, 49(6): 1280–1283.
- [26] RICE W R. Analyzing tables of statistical tests[J]. *Evolution*, 1989, 43(1): 223–225.
- [27] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis[J]. *Evolutionary Bioinformatics*, 2005, 1: 47–50.
- [28] VAN OOSTERHOUT 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.
- [29] PEAKALL R, SMOUSE P E. Genalex 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6(1): 288–295.
- [30] WEPFER P H, NAKAJIMA Y, SUTTHACHEEP M, et al. Evolutionary biogeography of the reef-building coral genus *Galaxea* across the Indo-Pacific ocean[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2020, 151: 106905.
- [31] CHEN D D, WANG D R, ZHU J T, et al. Identification and characterization of microsatellite markers for scleractinian coral *Galaxea fascicularis* and its symbiotic zooxanthellae[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2013, 5(3): 741–743.
- [32] QIU Y, HUANG X Z, LU H, et al. Development of EST-derived microsatellite markers in the pearl oyster *Pinctada martensii* (Dunker) for genetic resource monitoring[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2013, 5(2): 401–403.
- [33] QIU Y, LU H, ZHU J T, et al. Characterization of novel EST-SSR markers and their correlations with growth and nacreous secretion traits in the pearl oyster *Pinctada martensii* (Dunker)[J]. *Aquaculture*, 2014, 420–421: S92–S97.
- [34] LIN S J, CHENG S F, SONG B, et al. The *Symbiodinium kawagutii* genome illuminates dinoflagellate gene expression and coral symbiosis[J]. *Science*, 2015, 350(6261): 691–694.
- [35] SPECTOR D L. Dinoflagellate nuclei[M]//SPECTOR D L. *Dinoflagellates*. London: Academic Press, 1984: 107–147.
- [36] CARLON D B, LIPPÉ C. Fifteen new microsatellite markers for the reef coral *Favia fragum* and a new *Symbiodinium* microsatellite[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(4): 870–873.
- [37] 苏定佳. 海南岛丛生盔形珊瑚(*Galaxea fascicularis*)的遗传结构和连通性 [D]. 海口: 海南大学, 2017.
- [38] ABE M, WATANABE T, HAYAKAWA H, et al. Breeding experiments of hermatypic coral *Galaxea fascicularis*: partial reproductive isolation between colonies of different nematocyst types and enhancement of fertilization success by presence of parental colonies[J]. *Fisheries Science*, 2008, 74(6): 1342–1344.

(责任编辑: 陈 俊)