

熊良伟,王帅兵,封琦,等. 基于高通量测序的中华鲢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.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.18.041

# 基于高通量测序的中华鲢基因组微卫星特征分析及标记开发

熊良伟,王帅兵,封琦,王建国,岳丽佳,张娟,吴云菲,王权

(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300)

**摘要:**利用 Illumina Miseq 测序技术,对中华鲢基因组文库进行测序,查找基因组微卫星(SSR)位点并分析其组成,共检测到 249 167 个 SSR 位点,1~6 核苷酸重复 SSR 均存在,其中二核苷酸重复 SSR 数量最多(53.59%),其次为单核苷酸重复 SSR(34.19%),其他数量由多到少依次为三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复。随机选择 50 个 SSR 位点利用 8 份中华鲢 DNA 样品进行验证,有 41 个位点能检测到扩增产物,其中 28 个位点扩增产物带型清晰且具多态性,利用上述多态性 SSR 标准检测泰州地区中华鲢多态性。结果表明,有 21 个 SSR 标记扩增产物稳定,每个位点观测到等位基因 3~13 个,观测杂合度、期望杂合度分别为 0.306 7~0.914 5、0.384 5~0.952 1,多态性信息含量为 0.317 3~0.910 5,各位点间不存在连锁不平衡现象。说明利用 Illumina Miseq 测序技术开发中华鲢 SSR 标记效率高,开发的标记适用中华鲢资源评估。

**关键词:**中华鲢;基因组;微卫星标记;特征分析;高通量测序

**中图分类号:** S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)18-0164-04

鲢鱼是一种常见的淡水小型鲤科鱼类,在欧洲和亚洲地区分布广泛,全世界鲢鱼有近 40 个种<sup>[1]</sup>。繁殖期时,雌鲢鱼利用生殖管突将卵产到背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)等淡水蚌的鳃中,同时雄鲢鱼将精子射到蚌体内,鲢鱼胚胎在蚌鳃瓣发育成熟后游出蚌体,由于其特殊的繁殖习性,一直以来,鲢鱼被当作共同进化研究理想材料<sup>[2-3]</sup>。而中华鲢(*Rhodeus sinensis*)是我国特有鲢鱼类,是长江、珠江等流水体中常见鱼类之一,由于其资源丰富、色彩鲜艳、体型优美,还被用作观赏鱼类进行开发<sup>[4]</sup>。近年来,由于水体污染、水利设施建设,中华鲢生存环境遭到破坏,中华鲢野生种群数量不断下降,一些水体中华鲢正逐渐消失<sup>[5]</sup>,为此对中华鲢的保护迫在眉睫。

利用分子标记技术分析水产动物遗传多样性可以为其资源保护和利用提供理论指导。微卫星(microsatellite)亦称简单重复序列(simple sequence repeats, SSR),因其在基因组中分布广泛、多态性丰富、PCR 扩增重复性好和呈共显性遗传的优点,已广泛应用于水生动物群体遗传结构分析、遗传图谱构建及分子标记辅助育种等研究<sup>[6-8]</sup>,成为当前常用分子标记之一。然而,每种生物的 SSR 标记在首次使用时须先进行分离和 PCR 扩增验证,传统通过构建富集文库方法分离 SSR 标记须要经过建库、杂交、分离、测序等步骤,试验操作繁琐、

效率低<sup>[9]</sup>。利用高通量测序开发 SSR 标记具有操作简单、效率高等特点<sup>[10-12]</sup>。本研究利用 Illumina Miseq 测序技术对中华鲢基因组进行测序开发 SSR 标记,通过试验验证首次获得中华鲢 21 个多态性 SSR 标记,为中华鲢遗传种质资源保护和利用提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

中华鲢为笔者所在项目组 2015 年 3—6 月从泰州地区河道内收集经驯化中华鲢。试验时取活中华鲢的背部和尾柄部肌肉置于 100% 乙醇中低温保存,共采 30 尾。

### 1.2 基因组 DNA 提取与检测

采用苯酚/三氯甲烷抽提和乙醇沉淀的方法分别提取中华鲢基因组 DNA,用 0.8% 琼脂糖电泳检测 DNA 完整性,用 NanoDrop 2 000 超微量分光光度计检测 DNA 浓度和纯度,要求 DNA 电泳主带 21 kb,  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  在 1.80~2.00 nm, DNA 样品检测符合要求后置于 -80 ℃ 超低温冰箱保存待用。

取 1 尾经检测符合要求中华鲢基因组 DNA(约 10 μg)送上海美吉生物医药科技有限公司进行基因组扫描。

### 1.3 基因组扫描与拼接

根据 Illumina Miseq 测序试验流程构建 1 个 350 bp Illumina Miseq PE 文库,利用 MiSeq 测序仪完成测序工作。利用生物信息统计学方法对原始测序数据(reads)进行质控。去除原始测序数据中的接头(adapter)序列;去除原始测序数据的 5' 端含有非 A、T、G、C 碱基;修剪测序质量值 < Q20 的原始测序数据末端;去除含 N 的比例达到 10% 的原始测序数据;舍弃质量修剪后长度 < 25 bp 的小片段,经过上述剪切获得高质量的测序片段。

对剪切后的数据使用错误校正(ErrorCorrection),去除低

收稿日期:2017-03-16

基金项目:江苏农牧科技职业学院科研项目(编号:NSF201510-1);

江苏省水产三新工程项目(编号:Y2015-25);江苏省高校“青蓝工程”(编号:苏教师[2017]15号)。

作者简介:熊良伟(1978—),男,湖北武汉人,博士,副教授,主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail:xlwei2002@163.com。

通信作者:王权,教授,主要从事水产养殖技术教学和研究。

E-mail:yyqwq@sohu.com。

频率的测序错误;后对校正后的数据进行连接(merge),基于重叠(overlap)关系将剪切后的原始测序数据连接到一起;最后用专业组装软件 GS de Novo Assembler v2.8 对连接好的数据进行拼接获得重叠群序列(Contigs)。

#### 1.4 SSR 位点分析

利用 SSR 位点查找软件 MISA (MicroSatellite Identification Tool)在组装的重叠群序列中查找 SSR 位点。参数设置:重复单元为 1~6 个碱基分别要求重复 10、6、5、5、5 次及以上。查找到的 SSR 序列记录下重复序列单位(如 AG、AAG)、重复次数和该位点重叠群序列号。

查找到的 SSR 用 primer3 (<http://www.simgene.com/primer3>)软件设计 SSR 位点扩增引物,引物长度 18~27 bp、GC 含量 50%~80%,正反引物相差不超过 20%,退火温度( $T_m$ )值控制 57~63℃,正反引物  $T_m$  值相差不超过 1℃,扩增片段大小为 100~300 bp。

#### 1.5 SSR PCR 验证

从不同重叠群序列中选择设计好引物的 SSR 位点 50 个,要求 SSR 重复单元为 2 个或 2 个以上核苷酸,SSR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。先用 8 个中华鲢基因组 DNA 样品进行 PCR 扩增、PAGE 电泳,检测选择 SSR 标记扩增效果;选择扩增条带清晰、多态性好的 SSR 标记检测泰州地区中华鲢遗传多样性。

PCR 反应体积 10  $\mu$ L,其中 DNA 模板(约 50 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L,2  $\times$  Tap PCR MasterMix(上海旭飞生物科技有限公司) 5  $\mu$ L,上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L,去离子水 3  $\mu$ L。PCR 反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 40 s,退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min;4℃ 保存。PCR 产物利用 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测,银染法显色、定影,照相机拍照保存<sup>[13]</sup>。

参考 DNA Marker 标记(DL500 DNA marker, TaKaRa),根据中华鲢每个个体在检测 SSR 位点电泳条带的位置确定每个个体的基因型。利用 CONVERT1.3.1 软件<sup>[14]</sup>将中华鲢各位点基因型进行转换。每个检测 SSR 位点等位基因数( $N$ )、观测杂合度( $H_o$ )和期望杂合度( $H_e$ )由 Popgene 1.32 分析;用 PIC Calc 0.6 计算多态信息含量(PIC);哈迪-温伯格平衡(Hardy-weinberg equilibrium, HWE)和连锁不平衡情况由 Popgene4.2 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组扫描与组装

通过对中华鲢 350 bp Illumina Miseq PE 文库高通量测序获得原始测序数据 151 418 131 个  $\times$  2 条,碱基数 45.43 Gb,对获得原始测序数据每个位点碱基进行分析,结果获得的 reads 序列第 10 位点后,各位点 ATGC 4 种碱基波动较小,几乎呈一直线, $N$  的比例非常低,说明建库均匀,测序结果好,可用于后续分析。

通过对原始 reads 质量剪切,获得高质量序列 43.38 Gb。利用序列拼接软件对剪切后数据进行组装(表 1),共获得重叠群序列 416 997 个,片段累计长度 5.17 Gb,GC 含量为 37.81%;组装的重叠群序列中片段长段 >1 kb 有 203 411 个,占 48.78%;N50 和 N90 分别为 1 852、1 139 bp,说明中华

表 1 中华鲢基因组组装情况一览表

统计指标	数值
总重叠群序列数量(个)	416 997
碱基数量(Gb)	5.17
长度超过 1 kb 重叠群序列数(个)	203 411
长度超过 1 kb 重叠群序列碱基数(Gb)	0.39
最大长度(bp)	16 676
N50(bp)	1 852
N90(bp)	1 139
GC 含量(%)	37.81

鲢基因组组装质量好。

### 2.2 SSR 位点分析

从组装的序列中共检测到 249 167 个 SSR 位点,其中二核苷酸重复 SSR 最多,有 133 528 个,占总 SSR 数量的 53.59%;其次为单核苷酸重复 SSR,有 85 198 个;其他数量由多到少依次为三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复 SSR,分别为 17 652、11 436、1 124、229 个(表 2)。随着重复单元重复次数增加,SSR 数量逐渐减少(图 1)。

表 2 中华鲢基因组中不同类型 SSR 统计

重复单元	SSR 数量(个)	占比(%)
一核苷酸	85 198	34.19
二核苷酸	133 528	53.59
三核苷酸	17 652	7.08
四核苷酸	11 436	4.59
五核苷酸	1 124	0.45
六核苷酸	229	0.09
合计	249 167	100.00

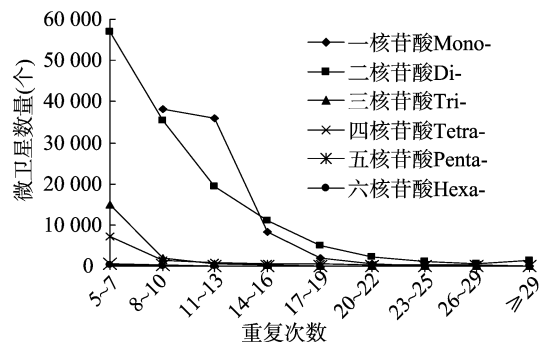


图 1 中华鲢不同重复单元 SSR 数量

由表 2 可知,二核苷酸重复 SSR 占总 SSR 数量达到 53.59%,说明二核苷酸重复 SSR 是中华鲢主要 SSR 类型。在 SSR 分析过程中,考虑到碱基互补配对,将同类重复兼并为一种重复,二核苷酸重复 SSR 有 AC/CA/TG/GT、AG/GA/TC/CT、AT/TA/GC/CG 4 种重复类型。由图 2 可知,二核苷酸重复 SSR 4 种类型重复 SSR 数量相差较大,重复序列为 AC/CA/TG/GT SSR 有 80 964 个,比例达到 60.63%;重复类型为 GC/CG SSR 仅有 423 个,比例仅为 0.32%;重复类型为 AG/GA/TC/CT 和 AT/TA 的 SSR 数量较为接近,分别有 29 587 个(22.16%)和 22 554 个(16.89%)。

### 2.3 中华鲢 SSR 评价

在查找的 SSR 位点中有 212 109 个位点设计出符合条件的 PCR 引物,占总位点数的 85.13%。随机合成的 50 对 PCR

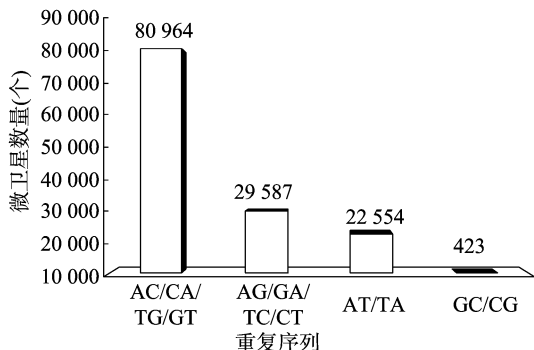


图2 中华鲮不同类型二核苷酸重复 SSR 分布

引物扩增验证结果中有 9 对引物未能检测出扩增产物;41 对引物检测出扩增产物,其中,在 8 份 DNA 样品中扩增产物带型复杂或无多态性的引物有 13 对,其余 28 对引物扩增产物带型清晰、无(或少量)杂带、具多态性。

#### 2.4 中华鲮群体遗传多样性分析

采用“2.3”中多态性丰富、扩增条带清晰的 28 对 SSR 引物检测分析中华鲮泰州野生群体遗传多样性,28 对引物中有 21 对引物扩增效果稳定、产物带型清楚,其 SSR 特征见表 3。21 个 SSR 位点中每个位点观测到等位基因 3~13 个;观测杂合度和期望杂合度分别为 0.306 7~0.914 5 和 0.384 5~0.952 1;多态性信息含量为 0.317 3~0.910 5;分析得到 Rs4、Rs9 和 Rs36 3 个位点存在无效等位基因;经 Bonferroni 校正后,除 Rs4、Rs43、Rs44 3 个位点外,其余位点等位基因频率符合 Hardy-Weinberg 平衡;连锁不平衡检测表明,各位点间不存在连锁不平衡现象。

### 3 讨论与结论

SSR 是由 1~6 个核苷酸为重复单元组成的 DNA 序列,在真核生物基因组中广泛存在<sup>[15]</sup>,有了生物基因组信息就可以分析基因组 SSR 特征。随着基因组学研究技术进步,世界上许多重要经济鱼类基因组序列图谱已经绘制。我国鲤科鱼类资源丰富,2014 年和 2015 年我国研究人员先后完成了鲤鱼(*Cyprinus carpio*)<sup>[16]</sup>和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)<sup>[17]</sup>基因组测序工作,其中鲤鱼基因组为 16.9 Gb,雌草鱼基因组 0.9 Gb、雄草鱼 1.07 Gb。2016 年 Yang 等完成了滇池金线鲃(*S. grahami*)、犀角金线鲃(*S. rhinoceros*)和安水金线鲃(*S. anshuiensis*)基因组序列研究工作,获得 3 种金线鲃基因组序列分别为 1.75、1.73、1.68 Gb<sup>[18]</sup>。本试验利用 Illumina Miseq 测序技术对中华鲮基因组进行扫描,获得高质量基因组序列 43.38 Gb,组装后的 contigs 序列长度达到 5.17 Gb。参考草鱼、金线鲃和鲤鱼基因组大小,本次中华鲮基因组测序深度大,基因组覆盖率高,组装后的 contigs 序列特征能代表基因组特征,因此本次开发的微卫星标记能反映中华鲮基因组 SSR 标记特征。

从查找中华鲮 SSR 位点来看,中华鲮 SSR 种类较丰富,基因组中 1~6 核苷酸的重复 SSR 均存在,其中二核苷酸重复 SSR 占主导地位,占 SSR 总数的 53.59%,其次是单核苷酸重复 SSR,占 SSR 总数的 34.19%,而 3~6 核苷酸重复 SSR 含量较低,均不超过 8.00%。进一步分析发现,二核苷

酸重复的 4 种类型 SSR 标记数量相差较大,AC/CA/TG/GT 重复序列 SSR 占二核苷酸标记 60.63%,GC/CG 重复序列仅占 0.32%,AG/GA/TC/CT 和 AT/TA 重复序列 SSR 分别占 22.16%和 16.89%。说明在中华鲮基因组中以二核苷酸重复 SSR 标记为主,AC/CA/TG/GT 重复序列 SSR 数量丰富,而 GC/CG 重复序列 SSR 少见。在裸体异鳃鲃(*Xenophysogobio nudicorpa*)SSR 特征分析中发现,二碱基重复 SSR 占总 SSR 比例高达 83.15%,AC/CA/TG/GT 重复占二碱基重复 SSR 49.36%,仅发现 4 个核心序列为 GC/CG 的重复类型<sup>[11]</sup>;中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)基因组扫描分析结果表明,二碱基重复 SSR 占总 SSR 比例最高,达到 58.54%,二碱基重复 SSR 中 AC/CA/TG/GT 重复类型为 67.55%,GC/CG 重复类型不到 0.01%<sup>[10]</sup>。裸体异鳃鲃和中华绒螯蟹 SSR 特征与中华鲮 SSR 特征相似,说明 AC/CA/TG/GT 重复 SSR 在水产动物基因组中分布较多,GC/CG 重复 SSR 较少。

在高通量测序技术广泛应用之前,富集法成为开发 SSR 标记最常用的方法。鲁翠云等采用磁珠富集法结合放射性同位素杂交法得到 SSR 序列 325 个,合成引物 145 对,有 44.62% SSR 位点可以设计引物<sup>[19]</sup>;郭宝英等采用生物素标记的(CA)<sub>12</sub>探针从黑斑鳊(*Glyptosternum maculatum*)基因组富集库中筛选 SSR 标记,结果 124 个含 SSR 序列中有 59 条可以设计引物,比例为 47.58%<sup>[20]</sup>。本研究利用 Illumina Miseq 测序技术开发中华鲮 SSR 标记,从基因组中查找到各种类型重复 SSR 位点 249 167 个,由于组装序列长,85.13% SSR 位点可以设计出引物,PCR 扩增试验中合成的 50 对引物中仅 9 对引物未能得到扩增产物。由此可以看出,利用高通量测序技术开发 SSR 标记不仅数量大,而且拼接后序列长,可设计 PCR 引物的 SSR 位点比例高。

21 个多态性 SSR 检测泰州地区中华鲮群体结果显示,每个 SSR 位点存在等位基因 3~13 个,平均 7 个,PIC 平均值超过 0.500 0,达到 0.655 3,绝大多数标记(21 个标记中的 18 个)符合 Hardy-Weinberg 平衡,且各位点间不存在连锁不平衡现象。上述结果表明,本研究开发 21 个多态性 SSR 标记适用于我国中华鲮野生资源评估和遗传多样性分析。

#### 参考文献:

- [1] Kim W J, Shin E H, Kong H J, et al. Characterization of novel microsatellite markers derived from Korean rose bitterling (*Rhodeus uyekii*) genomic library [J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(4): 8147-8152.
- [2] Reichard M, Przybylski M, Kaniewska P, et al. A possible evolutionary lag in the relationship between freshwater mussels and European bitterling [J]. Journal of Fish Biology, 2007, 70(3): 709-725.
- [3] Reichard M, Polacik M, Tarkan A S, et al. The bitterling-mussel coevolutionary relationship in areas of recent and ancient sympatry [J]. Evolution, 2010, 64(10): 3047-3056.
- [4] 赵朝阳,姜彦珍,方秀珍,等. 鲮的生物学特性及观赏价值 [J]. 生物学通报, 2010, 45(4): 7-9.
- [5] 冯旭松,钱志平. 里下河地区水资源现状分析及对策 [J]. 治淮, 2008(8): 7-8.

表 3 中华鲢 21 个多态性微卫星位点的基本信息和遗传多亲性参数

位点	引物序列 (5'→3')	重复序列	产物范围 (bp)	样本数 (个)	等位基 因数(个)	退火温度 (℃)	PIC	$H_0$	$H_E$	HWE $P$
Rs1	F:TCGCATTGTTGCTCCTACTG R:AACTGGTCCCACCTTGACAG	[TG] <sub>6</sub>	174 ~ 194	30	7	60	0.786 3	0.865 7	0.796 8	0.071
Rs4	F:ATATTCAGGGCCAAAATCCC R:ATCAACAACCTTACCAGGCCG	[TC] <sub>11</sub>	104 ~ 126	30	9	59	0.823 4	0.596 5	0.874 1	0.000 *
Rs6	F:TTTTGCAAGCAGTATGACGC R:TCTGTTCTGCCGTTCTGTTG	[TAA] <sub>10</sub>	150 ~ 174	30	6	60	0.567 4	0.541 1	0.610 1	0.170
Rs9	F:GAAGCTCCTGCAGACAAACC R:TCAACTTTTGGCTCAGCCTT	[TC] <sub>7</sub>	155 ~ 183	30	11	60	0.837 8	0.545 3	0.798 7	0.281
Rs10	F:GCTTCTGAAGGTGCCTGAAC R:GAAGTTCAGAGGCTGTGTC	[CTC] <sub>5</sub>	101 ~ 121	30	4	60	0.391 5	0.389 4	0.567 9	0.341
Rs11	F:GATGCATGTAACCAACACGC R:CAGCCATTTTCTAAGGCTGC	[CA] <sub>9</sub>	166 ~ 202	30	12	59	0.872 9	0.914 5	0.952 1	0.009
Rs15	F:CGGCCCTGTCTAACTCTCTG R:AGAGCGCGAGAAAACACATT	[ATT] <sub>8</sub>	118 ~ 139	30	6	60	0.482 1	0.498 7	0.632 1	0.176
Rs18	F:GCAGAGAAACACCTTCAGGC R:CCAGACCGCTGAACCTAGG	[GA] <sub>9</sub>	148 ~ 168	30	4	60	0.568 2	0.485 1	0.623 3	0.324
Rs19	F:AGTTTTGCACCAAGTCCACC R:TAATAGCCGGCTCTGCATCT	[GC] <sub>6</sub>	151 ~ 165	30	4	60	0.567 2	0.784 7	0.621 1	0.148
Rs23	F:TTGCTCTTCCATGAGCACAC R:AGCCCGAACTGAAGAGTGAA	[TTCT] <sub>8</sub>	170 ~ 202	30	4	60	0.317 3	0.356 7	0.384 5	0.010
Rs25	F:ACAGGCTTTGACATTTTGGG R:TTCAGGAATCATGGGAGGAG	[CA] <sub>8</sub>	179 ~ 205	30	9	60	0.831 7	0.810 5	0.717 6	0.217
Rs31	F:ACGAACCAATCCGCTAACAC R:CCGCTTACAGTCAGCATTGA	[TTA] <sub>16</sub>	142 ~ 175	30	6	60	0.597 1	0.795 2	0.633 1	0.189
Rs33	F:AGCATGCTTTTCATCCATCC R:TCTGCTTAGGCCGAGACATT	[GT] <sub>6</sub>	184 ~ 198	30	7	60	0.331 7	0.306 7	0.482 1	0.175
Rs36	F:TGACCTTCAGCTGTCTGGTG R:GGTACGGTGATCTGGCAAGT	[AT] <sub>13</sub>	102 ~ 138	30	13	60	0.910 5	0.681 0	0.875 4	0.443
Rs38	F:CCATGGCCTCGTTATGTCTT R:CGTGGCACGAACATAAACAC	[AGAT] <sub>15</sub>	84 ~ 104	30	3	60	0.627 6	0.800 0	0.540 0	0.217
Rs42	F:GCAAGCAATGCTGTTTTGAA R:GCTCCCTGTGTCTCTTCCTG	[CT] <sub>8</sub>	100 ~ 132	30	7	60	0.801 4	0.798 1	0.821 4	0.095
Rs43	F:CTGTGCTCTCTTCCTGGACC R:GCGTATGGTGAGGAACACCT	[CAG] <sub>5</sub>	136 ~ 154	30	4	60	0.771 9	0.906 2	0.674 0	0.000 *
Rs44	F:GCTGTGTTGGGTCTTTTCAT R:CCTTCAGATTCACAGATCCA	[GT] <sub>6</sub>	189 ~ 217	30	8	60	0.592 7	0.513 2	0.724 6	0.000 *
Rs46	F:AGGCAGGGGTTCAAGGTACT R:GCTAAGCCAGGATTGACAGC	[TA] <sub>6</sub>	150 ~ 196	30	11	60	0.881 3	0.796 3	0.821 7	0.141
Rs49	F:GGACCGGATAAGAGCATGAA R:CAGCCTTAAGCATGGGAGAG	[AG] <sub>13</sub>	122 ~ 152	30	7	60	0.617 0	0.465 7	0.514 8	0.017
Rs50	F:CACTACGAATTTGGCAAGA R:GCACTCTGAACGTCACAAA	[TG] <sub>13</sub>	151 ~ 173	30	6	60	0.584 1	0.657 8	0.591 0	0.152

注:“HWE  $P$ ”表示“哈迪-温伯格”平衡显著性检验  $P$  值;“\*”表示等位基因频率显著背离“哈迪-温伯格”平衡位点。

- [6] Chistiakov D A, Hellemans B, Volckaert F M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics[J]. Aquaculture, 2006, 255:1-29.
- [7] 熊良伟, 李真, 马克异, 等. 利用微卫星 DNA 分子标记分析中华绒螯蟹养殖群体遗传分化[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(12):1441-1448.
- [8] Qiu G F, Xiong L W, Liu Z Q, et al. A first generation microsatellite-based linkage map of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* and its application in quantitative trait loci (QTL) detection[J].

- Aquaculture, 2016, 451:223-231.
- [9] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review[J]. Molecular Ecology, 2002, 11(1):1-16.
- [10] Xiong L W, Wang Q, Qiu G F. Large-Scale isolation of microsatellites from *Chinese mitten crab* *Eriocheir sinensis* via a solexa genomic survey[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(12):16333-16345.
- [11] 曾晓芸, 杨宗英, 田辉伍, 等. 基于 Mi-Seq 高通量测序分析裸体异鳃鲈微卫星组成[J]. 淡水渔业, 2015, 45(1):3-7.
- [12] Li Y, Zhao H, Peng Z, et al. Isolation and characterization of 21

王建国,熊良伟,陶桂庆,等. 不同体质量宽体金线蛭对饵料螺的摄食规律及生长特性[J]. 江苏农业科学,2018,46(18):168-171.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.18.042

# 不同体质量宽体金线蛭对饵料螺的摄食规律及生长特性

王建国<sup>1</sup>,熊良伟<sup>1</sup>,陶桂庆<sup>2</sup>,王 叔<sup>1</sup>,牛 超<sup>1</sup>,宋欣芮<sup>1</sup>,杨 林<sup>3</sup>,侯 君<sup>4</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院水产科技系,江苏泰州 225300; 2. 江苏省靖江市农业委员会水产技术指导站,江苏泰州 214500;  
3. 江苏省泰州市万利水产养殖有限公司,江苏泰州 225300; 4. 江苏省靖江市明星水蛭科技有限公司,江苏泰州 214500)

**摘要:**将体质量为 0.02~6.00 g 的宽体金线蛭分别单独放入圆柱形的饲养杯中,投喂 0.02~3.00 g 的方形环棱螺,连续观测其摄食螺蛭的特征和生长规律。结果显示,摄食时对螺蛭大小表现出一定的选择性,体质量越大,对螺蛭大小的选择范围越大,但会优先摄食较小的个体。摄食量会随着体质量增加而增加,但摄食率逐渐减少,约 0.02 g 的幼苗摄食量达到其质量的 8 倍以上,约 0.50 g 的苗种摄食量和其质量相当,1.00 g 以上时摄食量约为其质量的 23%。摄食螺蛭后,增质量率和饵料系数呈现出随苗体质量增大逐渐变小的规律,约 0.02 g 的幼苗增质量率为 (69.70 ± 37.50)% ,2.00 g 以上平均增质量率为 (25.30 ± 13.30)% ;约 0.02 g 的幼苗饵料系数为 10.94 ± 3.39、0.10~3.00 g 为 2.80 ± 2.09、3.00 g 以上组为 1.20 ± 0.83。结果表明,宽体金线蛭苗种对质量较小的幼螺具有选择性偏好,初期幼苗摄食量大,投饵量要达到体质量的 11 倍以上才能满足需要。

**关键词:**宽体金线蛭;螺蛭;摄食;生长;特征;生长规律;增质量率;饵料系数

**中图分类号:** Q959.194 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)18-0168-04

宽体金线蛭 (*Whitmania pigra* Whitman) 别称蚂蟥、水蛭,为环节动物门蛭纲蛭目水蛭科<sup>[1]</sup>。宽体金线蛭被腌渍或晾晒干后制成中药产品<sup>[2]</sup>,具有抗凝血作用,对淤血、高血压、冠心病和肿瘤等疾病有较好疗效<sup>[3]</sup>,还被用于制作化妆品、保健品。水蛭产品的市场供应主要来源于野外捕捞,因需求量大,资源逐渐减少,价格逐渐上涨,我国有部分地区开始进行了人工养殖<sup>[4]</sup>。

宽体金线蛭繁殖和养殖有较多研究,饵料是动物养殖的

基础,宽体金线蛭人工养殖主要投喂活体螺类<sup>[5]</sup>。王宣朋等比较了宽体金线蛭仔蛭饵料发现,投喂轮虫和圆田螺组的仔蛭生长速度最快、存活率最高,投喂蛋黄组的仔蛭存活率最低、生长速度最慢<sup>[6]</sup>。林小清等比较了螺蛭、河蚌和原生动物单独投喂以及螺蛭和原生动物混合投喂,发现螺蛭是宽体金线蛭的主要饵料<sup>[7]</sup>。宽体金线蛭苗种对饵料螺类的摄食规律,如摄食螺类规格、摄食量、饵料系数等均未见报道。因此,本研究旨在弄清宽体金线蛭不同阶段苗种摄食时对饵料螺类个体大小的选择、摄食量、增质量率、饵料系数等摄食规律及生长规律,为宽体金线蛭人工养殖提供理论基础参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验用宽体金线蛭为江苏省泰州地区野外河道和池塘采集的亲本[体质量(21.32 ± 3.55) g]所产卵茧孵化所得的苗

收稿日期:2017-03-29

基金项目:江苏省泰州市农业科技支撑计划(编号:TN201604);江苏省渔业三新工程项目(编号:Y2016-30)。

作者简介:王建国(1983—),男,四川广元人,硕士,讲师,从事特种水生动物增养殖研究。E-mail:j.g.wang@163.com。

通信作者:熊良伟,博士,副教授,从事水生动物遗传育种研究。E-mail:xlwei2002@163.com。

polymorphic microsatellite markers for a new labeonine fish (*Paraqianlabeo lineatus* Zhao et al. 2014) using illumina paired-end sequencing[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2016, 32(1): 126-128.

[13] 曲鲁江,李显耀,杜志强,等. 微卫星 PCR 产物变性与非变性 PAGE-银染检测方法的比较[J]. 遗传, 2004, 26(4): 522-524.

[14] Glaubitz J C. CONVERT: a user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages[J]. Molecular Ecology Notes, 2004, 4(2): 309-310.

[15] Tóth G, Gáspári Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis[J]. Genome Research, 2000, 10(7): 967-981.

[16] Xu P, Zhang X F, Wang X M, et al. Genome sequence and genetic

diversity of the common carp, *Cyprinus carpio* [J]. Nature Genetics, 2014, 46(11): 1212-1219.

[17] Wang Y P, Lu Y, Zhang Y, et al. The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation[J]. Nature Genetics, 2015, 47(6): 625-631.

[18] Yang J X, Chen X L, Bai J, et al. The *sinocyclocheilus* cavefish genome provides insights into cave adaptation[J]. BMC Biology, 2016, 14(1): 1-13.

[19] 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.

[20] 郭宝英,谢从新,祁鹏志,等. 黑斑原鲤微卫星 DNA 富集文库构建与鉴定[J]. 水生生物学报, 2011, 35(6): 908-912.