

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220323001

http://www.yykxjz.cn/

马骞, 吴雨薇, 王刘永, 赵晓龙, 周启苓, 陈刚, 黄建盛. 军曹鱼全基因组微卫星特征分析与多态性标记的筛选及应用. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 135-144

MA Q, WU Y W, WANG L Y, ZHAO X L, ZHOU Q L, CHEN G, HUANG J S. Screening and characterization of polymorphic SSR markers based on whole genome sequencing of cobia (*Rachycentron canadum*). Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 135-144

军曹鱼全基因组微卫星特征分析与多态性标记的筛选及应用*

马骞^{1,2} 吴雨薇¹ 王刘永¹ 赵晓龙¹ 周启苓¹ 陈刚^{1,2①} 黄建盛^{1,2}

(1. 广东海洋大学水产学院 广东 湛江 524025;

2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江) 广东 湛江 524025)

摘要 为更好地开发军曹鱼(*Rachycentron canadum*)高多态性微卫星分子标记,本研究基于军曹鱼全基因组测序结果,利用MISA1.0软件对其简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)的位点信息进行检索及分析。结果显示,基因组中共筛选出1~6个核苷酸为重复单元的SSR位点344 820个,其中,以单核苷酸重复序列最多(174 146个),占SSR总数的50.50%;其次为二核苷酸重复和三核苷酸重复序列,分别占SSR总数的30.23%和14.02%。在SSR包含的重复单元中,单核苷酸重复以A/T类型为主,AC/GT是二核苷酸的优势重复单元类型。军曹鱼基因组SSR核心序列重复次数在4~275次范围内波动,单核苷酸SSR重复数为10的最多,二核苷酸SSR重复次数为6的最多。本研究设置长度≥12 bp为筛选高多态性SSR位点的标准,共获得361 684个位点。在上述位点中随机选取100个候选位点进行基因分型检测,利用从中筛选到多态性较高的10个SSR标记分别对北海、陵水、硇洲、徐闻和三亚5个养殖群体进行遗传多样性分析,145尾个体中共检测到69个等位基因,观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和多态信息含量(PIC)平均值分别为0.628、0.706和0.653。相关研究表明,军曹鱼基因组中SSR位点类型较为丰富、多态性潜能较高,从中筛选获得的多态性SSR标记可为军曹鱼分子标记辅助育种、群体遗传多样性评价等研究提供有力支持。

关键词 军曹鱼; 基因组; SSR; 分子标记; 遗传多样性

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0135-10

军曹鱼(*Rachycentron canadum*)俗称海鲷、海龙,是大型肉食性暖水鱼类,主要分布于印度洋、西太平洋和大西洋沿岸,在我国的南海、东海及黄海均有分布(勾效伟等, 2007)。军曹鱼因其肉质细嫩、味道鲜美、营养价值高而深受消费者喜爱;其在营养成分上富含多种不饱和脂肪酸及微量元素,具有一定的药用

价值;加之军曹鱼具有生长速度快、抗病力强等优点,因而成为我国最具养殖前景的海水鱼类之一(李刘冬等, 2002)。近年来,国内外学者针对军曹鱼的生长发育特征(邝杰华等, 2021; 毛非凡等, 2022)、繁殖生物学特征(邝杰华等, 2021)、营养需求(麻永财等, 2012)、人工繁育及苗种培育(陈刚等, 2004; 刘海娟等, 2012)

* 广东海洋大学科研启动经费资助项目(R19022)、广东省大学生创新创业训练计划项目(S202110566012)、现代农业产业技术体系专项资金(CARS-47)和南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江)(ZJW-2019-06)共同资助。马骞, E-mail: maq@gdou.edu.cn

① 通信作者: 陈刚, 教授, E-mail: cheng@gdou.edu.cn

收稿日期: 2022-03-23, 收修改稿日期: 2022-04-28

等开展了大量研究。目前,关于军曹鱼遗传多样性水平的研究报道较少。王中锋等(2010、2011)利用简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)分子标记和扩增片段长度多态分析技术(AFLP)对军曹鱼养殖群体的遗传多样性分析显示,选取的各养殖群体遗传多样性水平较高,其群体遗传分化水平与野生群体差异不大。李伟强等(2020)利用 12 个 SSR 标记对广东、海南等 5 个军曹鱼养殖群体的遗传多样性分析结果显示,各群体的遗传多样性水平较 10 年前均有所下降。由此推测,长期人工繁育可能会导致军曹鱼不同养殖群体间基因交流减少,群体遗传多样性水平降低。因此,加强军曹鱼种质资源保护与利用,对于其增养殖业的健康发展具有重要意义。

SSR 分子标记也称为微卫星 DNA 序列标记,其最常见的重复单元类型为 1~6 个核苷酸重复排列(赵相艳, 2014)。SSR 在真核生物基因组中广泛分布(罗文永等, 2003),鱼类基因组中绝大多数 SSR 位于非编码区,但也有少数 SSR 位于编码区附近,甚至编码区内(李红梅, 2014)。SSR 具有数量多、分布广、易检测且符合孟德尔遗传等特点,目前已被广泛应用于遗传多样性分析、遗传图谱构建、物种及亲缘关系鉴定等研究(罗文永等, 2003; 李红梅, 2014; 赵相艳, 2014)。SSR 分子标记的开发对于海水鱼类种质资源保护利用及分子辅助育种等工作的开展具有重要意义。然而,目前已发表军曹鱼 SSR 标记的数量十分有限,亟需开发筛选更多的多态性标记。

相较于传统的文库法、富集法等 SSR 开发方法,基于高通量测序数据批量开发 SSR 标记这一研究策略已在大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)(李红梅, 2014)、黄鳍棘鲷(*Acanthopagrus latus*)(吴仁协等, 2019)、红鳍笛鲷(*Lutjanus erythropterus*)(郭显嵩等, 2011)等多种鱼类中获得广泛应用。本研究在军曹鱼 Illumina HiSeq X Ten 及 PacBio Sequel 测序平台测序获得数据信息的基础上,利用 MicroSatellite (MISA)软件从基因组测序结果中查找 SSR 位点,并对其分布、数量、组成特征等进行分析;利用从中开发的多态性 SSR 标记用于养殖群体的遗传多样性分析。筛选获得的 SSR 标记可用于军曹鱼群体遗传结构分析、重要性状 QTL 定位和良种选育等研究,以期为军曹鱼增养殖业的健康发展提供有效技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

基因组测序用军曹鱼取自北部湾养殖群体,剪取

其背部肌肉,置于 95%的乙醇中储存,用于军曹鱼基因组 DNA 的提取。

军曹鱼样品为北海养殖群体(RC-BH) 30 尾、陵水养殖群体(RC-LS)30 尾、硃洲养殖群体(RC-NZ) 30 尾、徐闻养殖群体(RC-XW) 20 尾和三亚养殖群体(RC-SY) 35 尾,共 145 尾。剪取少量尾鳍保存在 95%的乙醇中,于-40 °C 储存,用于基因组 DNA 提取。

1.2 全基因组数据来源

军曹鱼基因测序由武汉菲沙基因信息有限公司完成,基因组大小为 575.35 Mb,原始数据已上传至 NCBI (登录号 PRJNA634421)。

1.3 SSR 序列搜索及筛选标准

利用 MISA1.0 软件对军曹鱼全基因组序列进行分析,并对基因组单链 DNA 上 SSR 序列的数量和种类进行统计。SSR 位点的选择及筛选参数设置参照其他鱼类基因组 SSR 特征分析结果及筛选依据(段永楠等, 2019; 王耀嵘等, 2020; 黄纬杰等, 2022),选取单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复;通过设定筛选标准为单核苷酸重复单元的重复次数至少 10 次,二核苷酸重复至少 6 次,三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复次数至少 4 次,以筛选多态性 SSR 位点。

1.4 多态性 SSR 标记的筛选

根据上述筛选得到的 SSR 位点信息,随机选取适合扩增的 100 个位点设计并合成引物。所有正向引物在 5'端添加 16 bp 的通用 Tag,以随机 5 尾军曹鱼的混合 DNA 作为模板,优化 PCR 条件,并排除扩增无条带、条带模糊及多条带等 PCR 结果不理想的位点。此后,以不同养殖群体的 16 尾军曹鱼 DNA 为模板,利用 PCR 扩增理想的 SSR 引物进行多重扩增(Tag 修饰引物,各标记正向、反向引物)(Schuelke, 2000)。所有引物由北京擎科生物科技有限公司合成。PCR 体系为 20 μ L: 金牌 Mix 16.45 μ L (北京擎科生物科技有限公司),正向引物(10 μ mol/L) 0.15 μ L,反向引物(10 μ mol/L) 1.2 μ L, Tag 引物(10 μ mol/L) 1.2 μ L, gDNA 10~50 ng。PCR 条件: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s,各引物适宜退火温度 10 s, 72 °C 延伸 10 s,共进行 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物由北京擎科生物科技有限公司进行毛细管荧光电泳检测(ABI3730),并利用 GeneMapper 4.1 软件进行数据准确位点的分析。基于基因分型数据,挑选其中多态性高的 SSR 位点进行 5 个养殖群体的遗传多样性分析。

1.5 数据分析

群体遗传多样性的数据统计及分析参照李伟强等(2020)的方法。利用 PopGene32 软件计算等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Shannon 指数(H)、近交系数(F_{is})、基因流(N_m)等; 利用 Cervus 3.0.7 软件(Kalinowski *et al.*, 2007)计算微卫星标记观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和多态信息含量(PIC); 利用 Genepop4.0.7 软件检测哈迪-温伯格(Hardy-Weinberg, HWE)平衡。利用 MEGA 6.0 软件构建 5 个军曹鱼养殖群体的系统进化树。

2 结果与分析

2.1 军曹鱼基因组 SSR 位点类型与数量分析

统计军曹鱼基因组中不同碱基重复序列, 共发现 424 827 条 SSR 重复序列, 其中, 符合本研究筛选标准的以 1~6 个碱基为重复单元的 SSR 位点共计 344 820 个, 占总 SSR 的 81.17%。在这些 SSR 位点中, 单核苷酸重复类型最多(174 146 个), 占总数的 50.50%; 其次为二核苷酸重复(104 242 个), 占总 SSR 的 30.23%; 三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复各有 48 358、12 792、4 403 和 879 个, 分别占总 SSR 的 14.02%、3.71%、1.28%和 0.25%(表 1)。

2.2 军曹鱼 SSR 重复单元的序列组成

由表 2 可知, 在军曹鱼基因组 SSR 中, 单核苷酸重复序列以 A/T 重复类别最多, 共 159 774 条, 占 SSR 总数的 46.34%; 二核苷酸重复序列中, AC/GT 为主要重复类别, 有 75 190 条, 占 SSR 总数的 21.81%,

CG/CG 重复类别数量最少(105 条), 占 SSR 总数的 0.03%; 三核苷酸重复序列以 AAT/ATT 和 AGG/CCT 居多, 分别为 13 133 和 8 775 条, 各占 SSR 总数的 3.81%和 2.54%; 四核苷酸重复以 AAAT/ATTT 出现频率最高, 这一重复单元序列共有 2 452 条, 占 SSR 总数的 0.71%; 五核苷酸重复序列中 AGAGG/CCTCT

表 2 军曹鱼 SSR 重复单元的类型
Tab.2 Type of microsatellite repeat motifs in cobia genome

重复类型 Repeat type	重复单元 Repeat motif	重复个数 Repeat number	占总 SSR 比例 Proportion of total SSR/%
单核苷酸 Mononucleotide	A/T	159 774	46.34
	C/G	14 372	4.17
二核苷酸 Dinucleotide	AC/GT	75 190	21.81
	AG/CT	18 236	5.29
	AT/AT	10 711	3.11
	CG/CG	105	0.03
三核苷酸 Trinucleotide	AAT/ATT	13 133	3.81
	AGG/CCT	8 775	2.54
	GCC/GGC	523	0.15
	AAC/GTT	5 303	1.54
	AAG/CTT	4 676	1.36
	ACT/AGT	3 648	1.06
	ATC/ATG	3 596	1.04
	ACG/CGT	2 938	0.85
	AGC/CTG	2 930	0.85
	ACC/GGT	2 836	0.82
四核苷酸 Tetranucleotide	AAAT/ATTT	2 454	0.71
	AAAC/GTTT	1 664	0.48
	AAAG/CTTT	872	0.25
	AGAT/ATCT	1 326	0.38
	AGAC/GTCT	841	0.24
	其他类型四核苷酸 Other types of tetranucleotide	5 635	1.63
五核苷酸 Hexanucleotide	AGAGG/CCTCT	913	0.26
	AGAGA/TCTCT	227	0.07
	AAAAC/GTTTT	315	0.09
	AAAAT/ATTTT	224	0.06
	AAGGC/GCCTT	331	0.10
	ATTAT/ATAAT	235	0.07
	其他类型五核苷酸 Other types of pentanucleotide	2 158	0.63
六核苷酸 Hexanucleotide	ACCAGG/CCTGGT	92	0.03
	其他类型六核苷酸 Other types of hexanucleotide	787	0.23

表 1 军曹鱼基因组 SSR 不同重复单元分布情况

Tab.1 Distribution of different nucleotide repeat types of microsatellite in cobia genome

重复类型 Repeat type	SSR 数 SSR number	占总 SSR 比例 Proportion in total SSR/%
单核苷酸 Mononucleotide	174 146	50.50
二核苷酸 Dinucleotide	104 242	30.23
三核苷酸 Trinucleotide	48 358	14.02
四核苷酸 Tetranucleotide	12 792	3.71
五核苷酸 Pentanucleotide	4 403	1.28
六核苷酸 Hexanucleotide	879	0.25

重复类别最多,有913条,占SSR总数的0.25%;六核苷酸重复序列的重复类别种类多于其他核苷酸,以ACCAGG/CCTGGT为主,仅有92条。

2.3 军曹鱼基因组 SSR 的重复次数

军曹鱼基因组 SSR 核心序列重复次数整体在4~275范围内波动,不同类型SSR核苷酸重复次数的波动范围和数量差异较大。单核苷酸SSR核心序列的重复次数为10~105,其中,重复数为10的SSR最多,有37572个,占单核苷酸SSR总数的21.58%,20次及以上的重复共计24812个,在单核苷酸SSR中占14.25%;二核苷酸SSR的重复数为6~167,其中,6次重复的SSR最多,有24371个,占其总数的23.38%;三核苷酸SSR重复次数为4~275,其中,4次重复最多(29144个),占SSR总数的60.27%;四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸的重复次数分别为4~272、4~28和4~19,均以4次重复最多,分别有7200、2290和602个,在同类型的SSR中各自占比56.29%、52.01%和68.49%。

2.4 军曹鱼基因组 SSR 的长度

为筛选具有潜在利用价值的高多态性SSR位点,本研究只对长度 ≥ 12 bp的SSR位点进行分析,共筛选出符合上述标准的SSR位点361684个。由军曹鱼基因组SSR片段长度的分布情况(图1)可知,片段长度为12~19 bp的SSR位点最多(188166个),占SSR总数的52.02%;其次是重复单元长度为20~30 bp的SSR位点(70081个),占SSR总数的19.38%;长度为31~40 bp的SSR位点共有22809个,占SSR总数的6.31%;长度为41~50 bp的SSR位点有14551个,占SSR总数的4.02%;片段长度 >50 的SSR数量为66077个,占SSR总数的18.27%。66077个,占SSR总数的18.27%。

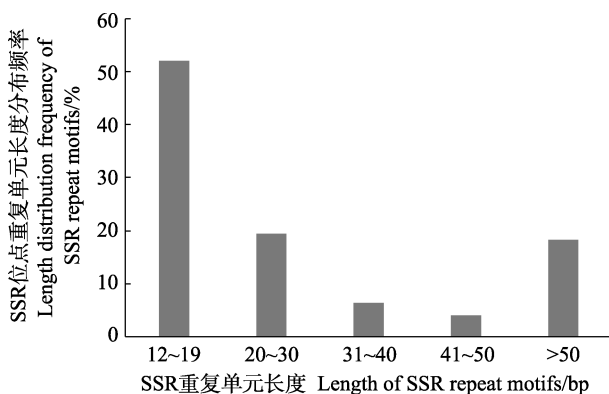


图1 军曹鱼SSR位点重复单元序列长度分布频率

Fig.1 Frequency of SSR repeat sequence length distribution in cobia

2.5 多态性SSR位点的筛选及其在养殖群体遗传多样性分析中的应用

基于100个候选位点设计的引物在5尾军曹鱼混合DNA的扩增结果中,筛选出条带明亮单一的引物共23对。随后,对筛选出的引物进行荧光标记修饰,并检测其在16尾军曹鱼DNA中的基因分型结果,共从中筛选到10个多态性较高的SSR标记(表3)。利用这些标记在5个养殖群体145尾军曹鱼中共检测到69个等位基因,其中,最小等位基因数目为5(RCSSR155),最大等位基因数目为11(RCSSR50)。观测杂合度(H_o)为0.396~0.799,平均值为0.628;期望杂合度(H_e)为0.610~0.767,平均值为0.706;平均多态信息含量(PIC)为0.528~0.724,平均值为0.653。10个位点在5个军曹鱼养殖群体中的近交系数(F_{is})范围为-0.317~0.270(表4)。

5个军曹鱼养殖群体间的遗传相似度和遗传距离如表5所示,遗传距离为0.141~0.464,相似度为0.629~0.868。根据Nei's遗传距离构建的UPGMA系统进化树如图2所示,RC-LS和RC-XW聚为一支后与RC-NZ聚在一起;RC-BH和RC-SY聚为一支。

3 讨论

随着SSR重复单元序列碱基数目的增加,军曹鱼基因组SSR不同重复单元的出现频率逐渐下降,与斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)(唐荣叶等,2021)、斑鳢(*Channa maculata*)(上官清等,2020)、达氏鲟(*Acipenser dabryanus*)(李薇等,2017)等鱼类基因组或转录组中SSR的分布特征相似。然而,各物种基因组SSR在核苷酸组成分布上(优势SSR类型)存在一定的特异性,例如,军曹鱼基因组1~6碱基SSR中单核苷酸重复所占比例最大,其次为二核苷酸重复和三核苷酸重复,这与鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(梁霞等,2021)、圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)(李学梅等,2021)、斑鳢(上官清等,2020)等鱼类基因组SSR的分布情况相似;但在黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)(徐杰杰等,2020)、大黄鱼(李红梅,2014)和金钱鱼(*Scatophagus argus*)(王耀嵘等,2020)等鱼类基因组中,其SSR均以二核苷酸重复类型为主。推测造成这种差异的主要原因,可能是各研究用于筛选和分析SSR特征的软件及其中设置的筛选标准等存在差异。目前,硬骨鱼类基因组SSR在分布特征上尚未发现三核苷酸重复类型占优势的情况,但在西施舌(*Coelomactra antiquata*)(王雨吉等,2021)、缢蛏(*Sinonovacula constricta* Lamarck)(刘博等,2012)等软

表 3 10 个军曹鱼微卫星位点引物基本信息
Tab.3 Basic information of ten identified SSR primers for cobia

引物 Primer	重复单元 Repeat motif	引物序列 Primer sequence	片段大小 Size range /bp	退火温度 Annealing temp./°C	荧光标记物质 Fluorescence label
RCSSR026	(TTCC) ₇	F: CCTTCCTCCGTTCTTTCCTC R: AGGGAGGGTGGCAGTGAG	199	62.00	Fam
RCSSR027	(TGAT) ₈	F: ACAGCGTTTGCTCAGTTCCT R: GATGCTCAGCTCTTTGCCTT	216	60.00	Fam
RCSSR045	(CA) ₂₁	F: TGCTGTTGTTGACCCAACCTC R: GGCGACTTCTGCTTTCAATC	206	60.00	Fam
RCSSR046	(GAG) ₁₀	F: CTGTCAGTGAGGAAGGGAGG R: GACAACAATGGCATGTCAGC	224	64.00	Fam
RCSSR095	(ATTA) ₄	F: ACCAAGGCCAAACTACAACG R: CTTAGAGTGCAGGCTGGCTT	263	60.00	Hex
RCSSR104	(TG) ₂₅	F: AGGTGAGACTGGGACACTTCTC R: GGCTTCTGCACTAAATTGCC	264	60.00	Hex
RCSSR112	(CTTT) ₇	F: GTGACACAGCTGCTGGAAAG R: CACAATGCACACATGCAGAG	187	62.00	Rox
RCSSR148	(ATTG) ₁₀	F: TGTCAAACTACACAAAGCTGCAT R: ACCTCTTCAACCACACGACC	220	54.90	Rox
RCSSR155	(GT) ₁₆	F: GGACTAGTTTCCCTGACGCA R: AGTGATGGTCGGTCGATACC	164	62.00	Rox
RCSSR050	(CA) ₁₃	F: ATGTGGAGCAACACACAAGG R: CGTGTTTGCCCTGTCCTG	136	60.00	Fam

表 4 军曹鱼 10 个多态性微卫星位点的遗传学特征
Tab.4 Characterization of 10 polymorphic SSR loci in in five cultured population of cobia

位点 Locus	等位基因数 N_a	有效等位基因 N_e	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	Shannon 指数 H	多态信息含量 PIC	HWE 平衡 P_{HWE}	近交系数 F_{is}	基因流 N_m
RCSSR026	8	4.242	0.799	0.767	1.528	0.724	0.002**	-0.228	1.447
RCSSR027	6	2.997	0.718	0.669	1.184	0.598	0.000***	-0.204	1.426
RCSSR045	6	3.425	0.655	0.710	1.433	0.671	0.000***	0.086	1.099
RCSSR046	6	2.888	0.577	0.656	1.218	0.596	0.010*	-0.123	1.235
RCSSR104	6	2.548	0.685	0.610	1.057	0.528	0.000***	-0.317	0.983
RCSSR095	7	3.433	0.664	0.711	1.399	0.662	0.000***	-0.163	1.216
RCSSR112	6	3.617	0.584	0.726	1.420	0.676	0.000***	-0.238	0.628
RCSSR148	8	3.893	0.642	0.746	1.550	0.707	0.000***	-0.118	1.001
RCSSR155	5	3.465	0.557	0.714	1.351	0.660	0.000***	-0.012	0.758
RCSSR050	11	3.941	0.396	0.749	1.674	0.710	0.000***	0.270	1.245

注: P_{HWE} 为哈迪-温伯格平衡。*为显著偏离 HWE, $P<0.05$; **为极显著偏离 HWE, $P<0.01$; ***为极其显著偏离 HWE, $P<0.001$ 。

Note: P_{HWE} represented Hardy-Weinberg equilibrium. * indicated significant deviation from HWE, $P<0.05$; ** indicated significantly deviated from HWE, $P<0.01$; *** indicated extremely significant deviation from HWE, $P<0.001$.

体动物中, 三核苷酸重复则是基因组 SSR 的主要重复类型。

军曹鱼基因组 SSR 中, 单核苷酸重复类别主要以 A/T 类型为主, 这与红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)

(崔建洲等, 2006)、西施舌(王雨吉等, 2021)等物种基因组 SSR 中的主要单核苷酸重复类型相同。二核苷酸重复类别中, AC/GT 类型出现的频率最高, 这与黄唇鱼(*Bahaba flavolabiata*)(赵彦花等, 2019)、大泷六

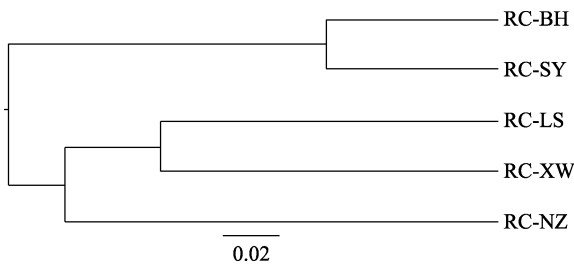
表5 5个军曹鱼养殖群体的遗传相似度和遗传距离

Tab.5 Genetic identity and genetic distance of five cultured population of cobia

群体 Population	RC-BH	RC-LS	RC-NZ	RC-SY	RC-XW
RC-BH	***	0.633	0.629	0.868	0.692
RC-LS	0.457	***	0.704	0.759	0.750
RC-NZ	0.464	0.352	***	0.659	0.704
RC-SY	0.141	0.276	0.417	***	0.764
RC-XW	0.369	0.288	0.352	0.269	***

注：对角线以上为遗传相似度，对角线以下为遗传距离。
RC-BH：北海养殖群体；RC-LS：陵水养殖群体；RC-NZ：
硃洲养殖群体；RC-XW：徐闻养殖群体；RC-SY：三亚养
殖群体。图2同。

Note: Genetic distance is above diagonal, genetic identity is
below diagonal. RC-BH, RC-LS, RC-NZ, RC-XW and
RC-SY respectively represented cultured population collected
in Beihai, Lingshui, Naozhou, Xuwen and Sanya. The same as
in Fig.2.

图2 基于 Nei's 遗传距离构建的 5 个军曹鱼群体的
UPGMA 系统进化树Fig.2 UPGMA dendrogram of five population of cobia
based on Nei's genetic distance

线鱼(*Hexagrammos otakii*)(沈朕, 2017)、鲤鱼(梁霞等, 2021)等硬骨鱼类的结果一致。此外, 在已报道的脊椎动物基因组 SSR 特征分析结果中, CG/CG 这一类型的二核苷酸重复序列的分布水平普遍较低, 同样地, 军曹鱼基因组 SSR 中 CG/CG 类型中在二核苷酸重复类别中的出现次数最少。推测产生上述现象的原因有二, 一是少量的 CG 利于维持 DNA 热力学稳定性; 二是基因组 DNA 在复制及转录过程中 C/G 可能突变为 A/T (Schorderet *et al*, 1992)。军曹鱼基因组 SSR 三核苷酸重复类别中, AAT/ATT 重复单元的占比最高。这一优势类型在斑点叉尾鲷(唐荣叶等, 2021)、花斑无须鲈(*Ageneiosus marmoratus*)(苏孟园等, 2021)、美丽硬仆骨舌鱼(*Scleropages formosus*)(段永楠等, 2019)等多种鱼类基因组 SSR 的三核苷酸重复类别中的位点数目均为最高。此外, 卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)(张永德等, 2020)基因组 SSR 三核苷酸类别以 GAG/CTC 为优势类型; 虾虎鱼科(Gobiidae)物种则以

ACT/AGT 为优势类型(白翠翠等, 2016)。四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸类型在不同生物基因组中分布存在较大差异, 分布情况更为复杂。

随着核心序列拷贝数的增加, 军曹鱼基因组中各重复类型 SSR 的数目呈递减趋势。这一现象同样存在于斑点叉尾鲷(唐荣叶等, 2021)、黄颡鱼(徐杰杰等, 2020)、金钱鱼(王耀嵘等, 2020)、花斑无须鲈(苏孟园等, 2021)等鱼类中。推测这一现象产生的主要原因, 一是 SSR 重复单元的重复次数增多会导致其长度相应增加, 从而引起稳定性降低、突变率增高等情况, 并最终导致该重复类型 SSR 数目减少(Wierdl *et al*, 1997); 二是 SSR 通常会维持一定的长度范围, 长等位基因会倾向于变短, 从而使得 SSR 长度不能无限增长, 因而核心序列拷贝数越多的 SSR 其数目就会越少(Ellegren *et al*, 2000)。

SSR 片段长度大小会影响其多态性的高低, SSR 分子标记的多态性越高, 其潜在利用价值则越高。当 SSR 的重复单元长度低于 12 bp 时, 其多态性较低; 当 SSR 重复单元长度大小在 12~20 bp 区间时, 其具有中等多态性水平; 当长度 >20 bp 时, 其多态性较高(田镇等, 2021)。军曹鱼基因组中, 重复序列长度在 20 bp 以上的 SSR 位点共有 173 518 个, 占 SSR 总数的 47.98%, 这些 SSR 位点在理论上具有较高的多态性, 本研究从中随机选取 100 个位点进行多态性标记筛选, 共获得 10 个多态性较高的 SSR 标记, 并将其应用于军曹鱼养殖群体遗传多样性分析。

本研究采用李伟强等(2020)使用的相同军曹鱼养殖群体样品, 10 个 SSR 位点在 5 个群体中获得的 N_a 、 N_e 均低于前期报道中 12 个 SSR 位点所获得的数值, 但 H_o 和 H_e 则高于或接近前期结果。上述结果表明, 利用不同标记对相同养殖群体的遗传多样性评估结果存在一定差异, 但各参数的平均值并无显著差异。此外, 遗传距离和遗传相似度分析结果显示, 各参数数值排序与前期研究相似, 即 RC-SY 与 RC-BH 之间的遗传距离最小(0.141), 而 RC-NZ 与 RC-BH 之间的最大(0.464), 表明两批次标记对各养殖群体间遗传关系的评价较为一致。基于 UPGMA 法构建的群体聚类分析结果显示, RC-NZ 与 RC-LS/RC-XW 分支先聚在一起, 而后与 RC-BH/RC-SY 进行聚类; 但前期研究结果中, RC-BH 和 RC-SY 聚为一支, RC-LS 和 RC-XW 聚为一支, 两支聚为一支后又与 RC-NZ 聚为一支。由此可见, 本研究基于基因组信息查找筛选获得的 SSR 标记在 5 个养殖群体中的遗传多样性参数、群体遗传距离等结果均与前期研究相似, 进一步验证

了军曹鱼养殖群体遗传多样性在多代的人工选育后有所降低这一现状;但群体聚类分析结果的差异也在一定程度上反映了标记数量及类型对遗传多样性评估结果的影响,因此,针对不同情况选取最适数量及类型的标记对于获得准确研究结果至关重要。此外,SSR位点的无效等位基因频率及多态性等因素也会影响聚类分析结果的可靠性。与前期研究相比,本研究筛选得到的SSR标记偏离哈迪-温伯格平衡的情况更为突出,因此,也会造成系统进化树分支的聚类存在差异。最后,鉴于军曹鱼各养殖群体间仍存在较大的分化程度,因此,在后续选育过程中,可利用本研究筛选获得的多态性标记对亲本群体进行评估,优化繁殖配组方式,避免因近亲交配等产生种质退化问题,保障军曹鱼种业的健康发展。

本研究开展的军曹鱼基因组SSR特征分析可为多态性SSR标记的筛选提供重要数据资料,相关研究为鱼类多态性分子标记的开发提供了新思路,筛选获得的SSR标记为鱼类群体遗传多样性分析、种质资源评估及分子辅助育种等提供了有力的评价工具。

参 考 文 献

- BAI C C, LIU S F, ZHUANG Z M. Characteristic analysis of microsatellite DNA in the genome of Gobiidae. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 9–15 [白翠翠, 柳淑芳, 庄志猛. 虾虎鱼科(Gobiidae)基因组微卫星 DNA 的分布特征. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 9–15]
- CHEN G, ZHANG J D, YE N, *et al.* Introduction of culture technology of cobia, *Rachycentron canadum* (I). *Scientific Fish Farming*, 2004(1): 10–11 [陈刚, 张健东, 叶宁, 等. 军曹鱼的养殖技术介绍(上). *科学养鱼*, 2004(1): 10–11]
- CUI J Z, SHEN X Y, YANG G P, *et al.* The analysis of simple sequence repeats in *Takifugu rubripes* genome. *Journal of Ocean University of China (Natural Sciences)*, 2006, 36(2): 249–254, 272 [崔建洲, 申雪艳, 杨官品, 等. 红鳍东方鲀基因组微卫星特征分析. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2006, 36(2): 249–254, 272]
- DUAN Y N, LIU Y, HU Y C, *et al.* Distribution regularity of microsatellites in *Scleropages formosus* genome. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, 35(23): 152–158 [段永楠, 刘奕, 胡隐昌, 等. 美丽硬仆骨舌鱼全基因组微卫星分布规律特征. *中国农学通报*, 2019, 35(23): 152–158]
- ELLEGREN H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nature Genetics*, 2000, 24(4): 400–402
- GOU X W, OU Y J, LIAO R. Present status on studies of cobia *Rachycentron canadum* in China. *Marine Fisheries*, 2007, 29(1): 84–89 [勾效伟, 区又君, 廖锐. 我国军曹鱼研究现状. *海洋渔业*, 2007, 29(1): 84–89]
- GUO Y S, WANG Z D, XIE Z Q, *et al.* Isolation and genetic diversity analysis of microsatellite DNA in *Lutjanus erythropterus*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2011, 31(4): 13–17 [郭昱嵩, 王中锋, 谢子强, 等. 红鳍笛鲷微卫星DNA标记的开发与遗传多样性分析. *广东海洋大学学报*, 2011, 31(4): 13–17]
- HUANG W J, GUO X Z, ZHANG Z H, *et al.* Analysis of microsatellite in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) genome and the application in parentage identification. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(2): 1–12 [黄伟杰, 郭向召, 张子豪, 等. 草鱼全基因组微卫星特征分析与亲子鉴定. *水产学报*, 2022, 46(2): 1–12]
- KALINOWSKI S T, TAPER M L, MARSHALL T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 2007, 16(5): 1099–1106
- KUANG J H, CHEN G, MA Q, *et al.* Embryonic development and morphological characteristics of larvae and juveniles of cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(11): 1814–1824 [邝杰华, 陈刚, 马骞, 等. 军曹鱼的胚胎发育及仔稚鱼形态观察. *水产学报*, 2021, 45(11): 1814–1824]
- KUANG J H, CHEN G, MA Q, *et al.* Histological observation on gonadal differentiation and first annual gonadal development of cobia (*Rachycentron canadum*). *Haiyang Xuebao*, 2021, 43(8): 128–138 [邝杰华, 陈刚, 马骞, 等. 军曹鱼(*Rachycentron canadum*)性腺分化及首周年发育的组织学观察. *海洋学报*, 2021, 43(8): 128–138]
- LI H M. New microsatellite satellite markers development based on whole genome sequencing information and its application in population genetics in large yellow croaker. Master's Thesis of Zhejiang Ocean University, 2014 [李红梅. 基于基因组信息的大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)微卫星标记开发及应用. 浙江海洋学院硕士研究生学位论文, 2014]
- LI L D, CHEN B S, FENG J, *et al.* Analysis and evaluation in nutritive value of *Rachycentron canadum* (Linnaeus). *Journal of Tropical Oceanography*, 2002(1): 76–82 [李刘冬, 陈毕生, 冯娟, 等. 军曹鱼营养成分的分析及评价. *热带海洋学报*, 2002(1): 76–82]
- LI W Q, CHEN G, MA Q, *et al.* Genetic diversity in five cultured population of cobia (*Rachycentron canadum*) using microsatellite markers. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 113–120 [李伟强, 陈刚, 马骞, 等. 利用微卫星标记分析军曹鱼养殖群体的遗传多样性. *渔业科学进展*, 2020, 41(2): 113–120]
- LI W, LI J X, JING H F, *et al.* Development of microsatellite loci for Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) using high-throughput sequencing. *Chinese Journal of Zoology*, 2017, 52(3): 449–457 [李薇, 李久焯, 荆慧芳, 等. 基于高通量测序的达氏鲟微卫星标记筛选. *动物学杂志*, 2017,

- 52(3): 449–457]
- LI X M, WU X B, YANG D G, *et al.* Development of microsatellite markers for *Coreius guichenoti* based on transcriptome sequencing. *Journal of Hydroecology*, 2021, 42(4): 97–103 [李学梅, 吴兴兵, 杨德国, 等. 基于转录组测序的圆口铜鱼微卫星标记筛选. *水生态学杂志*, 2021, 42(4): 97–103]
- LIANG X, WANG H Q, MA Y X, *et al.* Distribution characteristics of microsatellites in the whole genome of *Cyprinus carpio*, Linnaeus. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science)*, 2021, 44(3): 103–111 [梁霞, 王慧琪, 马宇璇, 等. 鲤鱼(*Cyprinus carpio*)全基因组微卫星分布特征研究. *南京师大学报(自然科学版)*, 2021, 44(3): 103–111]
- LIU B, SHAO Y Q, TENG S S, *et al.* Characterization, development and utilization of EST-derived microsatellites in *Sinonovacula constricta*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(1): 132–137 [刘博, 邵艳卿, 滕爽爽, 等. 缢蛏(*Sinonovacula constricta*) EST-SSR 分布特征及引物开发利用. *海洋与湖沼*, 2012, 43(1): 132–137]
- LIU H J, CHEN R F, PENG Y H, *et al.* Artificial breeding of *Rachycentron canadum*. *Guangxi Sciences*, 2012, 19(3): 293–296 [刘海娟, 陈瑞芳, 彭银辉, 等. 军曹鱼人工繁育试验研究. *广西科学*, 2012, 19(3): 293–296]
- LUO W Y, HU J, LI X F. The evolution and application of microsatellites. *Hereditas(Beijing)*, 2003, 25(5): 615–619 [罗文永, 胡骏, 李晓方. 微卫星序列及其应用. *遗传*, 2003, 25(5): 615–619]
- MA Y C, ZHANG G R, LI M M, *et al.* Progress in nutritional requirements and feed research of cobia *Rachycentron canadum*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(3): 680–692 [麻永财, 张关荣, 李孟孟, 等. 军曹鱼营养需求与饲料研究进展. *水生生物学报*, 2019, 43(3): 680–692]
- MAO F F, CHEN G, MA Q, *et al.* Skeletal deformities in the juveniles of cultured cobia (*Rachycentron canadum*). *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(1): 133–140 [毛非凡, 陈刚, 马骞, 等. 养殖军曹鱼稚鱼骨骼畸形研究. *渔业科学进展*, 2022, 43(1): 133–140]
- NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1973, 70(12): 3321–3323
- SCHORDERET D F, GARTLER S M. Analysis of CpG suppression in methylated and nonmethylated species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(3): 957–961
- SCHUELKE M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(2): 233–234
- SHANGGUAN Q, CHEN K C, LIU H Y, *et al.* Characteristics of microsatellites and genetic structure of wild *Channa maculate*. *South China Fisheries Science*, 2020, 16(3): 47–60 [上官清, 陈昆慈, 刘海洋, 等. 斑鳢基因组中微卫星分布特征及野生种群遗传结构分析. *南方水产科学*, 2020, 16(3): 47–60]
- SHEN Z. Characterization of novel molecular markers, correlation with growth traits and research of genetic diversity. Master's Thesis of Shandong University, 2017 [沈朕. 大龙六线鱼分子标记的开发、生长性状的关联性分析及遗传多样性研究. 山东大学硕士研究生学位论文, 2017]
- SU M Y, YANG W S, TANG R Y, *et al.* Microsatellite distribution in the whole genome of *Ageneiosus marmoratus*. *Journal of Nanjing Normal University (Engineering and Technology)*, 2021, 21(2): 65–71 [苏孟园, 杨汶珊, 唐荣叶, 等. 花斑无须鲈(*Ageneiosus marmoratus*)全基因组微卫星分布特征研究. *南京师范大学学报(工程技术版)*, 2021, 21(2): 65–71]
- TANG R Y, SU M Y, YANG W S, *et al.* Analysis of microsatellite distribution characteristics in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) genome. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(2): 89–97 [唐荣叶, 苏孟园, 杨汶珊, 等. 斑点叉尾鲷全基因组微卫星分布特征分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(2): 89–97]
- TIAN Z, CHEN A H, WU Y P, *et al.* Bioinformatics analysis of microsatellite sites in the RNA-sequencing of *Meretrix meretrix*. *Marine Fisheries*, 2021, 43(2): 160–167 [田镇, 陈爱华, 吴杨平, 等. 文蛤转录组中微卫星位点生物信息分析. *海洋渔业*, 2021, 43(2): 160–167]
- WANG Y J, MENG X P, YI L F. Isolation of microsatellite markers in transcriptome of *Coelomaetra antiquata* and their application in cryptic species identification. *Fisheries Science*, 2022, 41(2): 289–295 [王雨吉, 孟学平, 易乐飞. 基于转录组西施舌微卫星标记开发及隐种鉴定. *水产科学*, 2022, 41(2): 289–295]
- WANG Y R, YANG W, REN X L, *et al.* Distribution patterns of microsatellites and development of polymorphic markers from *Scatophagus argus* genome. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2020, 40(4): 7–14 [王耀嵘, 杨尉, 任席林, 等. 金钱鱼基因组微卫星分布特征分析及多态性标记开发. *广东海洋大学学报*, 2020, 40(4): 7–14]
- WANG Z D, CHEN T M, GUO Y S, *et al.* A genetic analysis of cultured populations of cobia (*Rachycentron canadum*) with microsatellite markers. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2010, 30(3): 16–21 [王中锋, 陈铁妹, 郭昱嵩, 等. 军曹鱼全人工繁殖群体遗传特征的 SSR 分析. *广东海洋大学学报*, 2010, 30(3): 16–21]
- WANG Z D, SHI P X, SU H N, *et al.* Analysis on population genetic structure of cobia (*Rachycentron canadum*) with AFLP markers. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2011, 31(1): 12–17 [王中锋, 史沛鑫, 苏惠娜, 等. 军曹鱼群体遗传结构的 AFLP 分析. *广东海洋大学学报*, 2011, 31(1): 12–17]
- WIERDL M, DOMINSKA M, PETES T D. Microsatellite instability in yeast: Dependence on the length of the

- microsatellite. *Genetics*, 1997, 146(3): 769–779
- WU R X, ZHAI Y, XIAO Y, *et al.* Microsatellite marker development for *Acanthopagrus latus* and cross-species amplification in the family Sparidae. *Journal of Applied Oceanography*, 2019, 38(3): 356–364 [吴仁协, 翟云, 肖瑶, 等. 黄鳍棘鲷微卫星标记开发及其在鲷科鱼类中的跨物种扩增. *应用海洋学学报*, 2019, 38(3): 356–364]
- XU J J, ZHENG X, LI J, *et al.* Distribution characteristics of whole genome microsatellite of *Pelteobagrus fulvidraco*. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(12): 5488–5498 [徐杰杰, 郑翔, 李杰, 等. 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)全基因组微卫星分布特征分析. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(12): 5488–5498]
- ZHANG Y D, WEN L T, LUO H L, *et al.* Genome survey and development of SSR molecular markers for *Trachinotus ovatus*. *Journal of Southern Agriculture*, 2020, 51(5): 983–994 [张永德, 文露婷, 罗洪林, 等. 卵形鲳鲹基因组调研及其 SSR 分子标记的开发应用. *南方农业学报*, 2020, 51(5): 983–994]
- ZHAO X Y. Compositional and comparative analysis of microsatellite in organism genomes. Doctoral Dissertation of Hunan University, 2014 [赵相艳. 微卫星序列在生物体基因组中的组成与比较分析. 湖南大学博士研究生学位论文, 2014]
- ZHAO Y H, OU Y J, WEN J F, *et al.* Development of SSR markers in *Bahaba flavolabiata* by transcriptome sequencing. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, 50(9): 2078–2087 [赵彦花, 区又君, 温久福, 等. 基于转录组测序技术的黄唇鱼 SSR 分子标记筛选. *南方农业学报*, 2019, 50(9): 2078–2087]

(编辑 冯小花)

Screening and Characterization of Polymorphic SSR Markers Based on Whole Genome Sequencing of Cobia (*Rachycentron canadum*)

MA Qian^{1,2}, WU Yuwei¹, WANG Liuyong¹, ZHAO Xiaolong¹,
ZHOU Qiling¹, CHEN Gang^{1,2}*, HUANG Jiansheng^{1,2}

(1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang), Zhanjiang 524025, China)

Abstract The cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766), is an important aquaculture species in cage and other intensive systems. This species has many advantages such as fast growth rate, excellent meat quality, and high market value, making cobia an excellent candidate species for commercial aquaculture. However, long-term artificial breeding of cobia has reduced gene exchange and population genetic diversity. To better protect germplasm resources, molecular markers provide a powerful tool in developing the breeding industry of cobia. Microsatellites are widely distributed, large in number with high polymorphism, and have long been considered important molecular markers for genetic diversity and marker-assisted breeding. More polymorphic microsatellite markers need to be developed for cobia because the number of published polymorphic simple sequence repeat (SSR) loci is very limited. In this study, Micro Satellite (MISA) software was used to identify SSR loci based on the genome sequencing data of cobia. We analyzed the distribution, quantity, and composition characteristics of the SSR loci to develop polymorphic microsatellite markers. The identified markers were used to evaluate the genetic diversity in five cultured populations.

In this study, a total of 424 827 SSR loci were identified in the genome data of cobia, among which mononucleotides, dinucleotides, and trinucleotides accounted for 50.50%, 30.23%, and 14.02% of the total SSRs, respectively. Among all the repeat units contained in the total SSRs, A/T was the predominant repeat type of the mononucleotide repeats; AT/AT and AC/GT were the dominant repeat types of dinucleotides; AAT/ATT and AGG/CCT were the dominant repeat types of

* Corresponding author: CHEN Gang, E-mail: cheng@gdou.edu.cn

trinucleotides. Repeat numbers of the SSR core sequences in the genome of cobia ranged from 4 to 275 times. The predominant repeat number of the mononucleotide SSR was ten and the predominant number of the dinucleotide and trinucleotide SSR were six and four, respectively. A total of 173 518 SSR loci had a length of ≥ 20 bp, accounting for 47.98% of the total number of SSRs in the genome. These results indicated that the SSR loci in the genome of cobia were of a high frequency, rich variety, and with high polymorphic potential.

Unigenes obtained by the genome sequencing of cobia were used to detect and analyze the SSR loci information using MISA software. The numbers and types of SSR sequences on the single-stranded DNA of the genome were counted. SSR sites in cobia genome mainly contain mononucleotide, dinucleotide, trinucleotide, tetranucleotide, pentanucleotide, and hexanucleotide repeats. The screening criteria for the polymorphic SSR loci was set as “mononucleotide repeat units with repeats at least 10 times; dinucleotides with repeats at least six times; trinucleotides, tetranucleotides, pentanucleotides, and hexanucleotides with repeats at least four times”. Subsequently, based on the information of SSR loci screening, 100 candidate loci were randomly selected to design and synthesize primers for amplification. A total of 16 DNA samples from different cultured populations were used as templates. Multiple PCR amplifications were performed to screen ideal polymorphic SSR loci and suitable PCR primers. PCR products were detected using capillary fluorescence electrophoresis. The GeneMapper 4.1 software was used to analyze the accurate sites of the amplified sequences. Based on the genotyping data of the 100 SSR loci, SSR loci with high polymorphism were selected to analyze the genetic diversity of five cultured populations of cobia.

The screening analysis results revealed a total of 344 820 SSR loci were detected in the genome of cobia. Among these SSR (with 1–6 nucleotide as repeat units), the top three repeat types were mononucleotide, dinucleotide, and trinucleotide, accounting for 50.49%, 30.23% and 14.02% of the total detected SSRs, respectively. Among the repeating units included in the detected SSRs, the mononucleotide repeats were dominated by A/T type, accounting for 46.34% of the total detected SSRs; AC/GT was the dominant repeat unit type of dinucleotide, accounting for 21.81% of the total detected SSRs. The number of SSR core sequence repeats in the total detected SSRs fluctuated in the range of 4 to 275 times. The predominant number of repeats of mononucleotide SSR was ten, and the predominant number of repeats of dinucleotide SSR was six. In this study, the length of ≥ 12 bp was set as the standard for screening high polymorphic SSR loci. A total of 361 684 SSR loci were obtained. However, the SSR loci with fragment lengths of 12–19 bp accounted the largest number, with a total of 188 166; these loci accounted for 52.02% of the total number of SSRs. Among the selected 100 candidate loci for genotyping, a total of ten polymorphic SSR markers were obtained. These markers were used in the genetic diversity analysis of five cultured populations collected in Beihai (RC-BH), Lingshui (RC-LS), Naozhou (RC-NZ), Xuwen (RC-XW), and Sanya (RC-SY). A total of 69 alleles were detected from 145 individuals, the average observed heterozygosity (H_o) was 0.628, and the average expected heterozygosity (H_e) was 0.706, and the mean polymorphism information content (PIC) was 0.653. The inbreeding coefficient (F_{is}) of the ten loci in the five cultured populations ranged from -0.317 to 0.270. The genetic distance between the five cultured populations ranged from 0.141 to 0.464, and the genetic similarity was 0.629–0.868. The results were similar to that of previous research using published markers, indicating that the polymorphic markers screened from the genome of cobia were of high accuracy and reliability. These polymorphic SSR markers provide strong support for population genetic diversity evaluation and molecular marker-assisted breeding of cobia, and provide effective technical support for the development of the cobia aquaculture industry.

Key words *Rachycentron canadum*; Genome; SSR; Molecular marker; Genetic diversity