

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170201001

http://www.yyqxjz.cn/

赵莲, 李志辉, 张培, 薛蓓, 赖晓芳, 张庆起, 高焕, 阎斌伦. 三疣梭子蟹线粒体基因组 SNP 在增殖放流家系识别中的应用. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 156-163

Zhao L, Li ZH, Zhang P, Xue B, Lai XF, Zhang QQ, Gao H, Yan BL. Identification on stock enhancement pedigrees of the swimming blue crab *Portunus trituberculatus* using mtDNA SNPs. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 156-163

三疣梭子蟹线粒体基因组 SNP 在增殖放流家系识别中的应用*

赵 莲^{1,2,3} 李志辉^{1,2,3} 张 培^{1,2,3} 薛 蓓^{1,2,3} 赖晓芳^{1,2,3}
张庆起⁴ 高 焕^{1,2,3} 阎斌伦^{1,2,3①}

- (1. 淮海工学院海洋生命与水产业学院 江苏省海洋生物技术重点实验室 连云港 222005;
2. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心 连云港 222005; 3. 江苏省农业种质资源保护与利用平台南京 210014;
4. 连云港赣榆佳信水产开发有限公司 连云港 222005)

摘要 为开发三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)增殖放流分子标志技术, 本研究在前期获得三疣梭子蟹线粒体基因组 24 个 SNP 位点的基础上, 采用高分辨率溶解曲线(HRM)检测技术对 4 个用于增殖放流的家系(A、B、C 和 D) (代表约 80~120 万个放流个体)进行了鉴别工作。结果显示, 含有 SNP 位点的 22 条 PCR 扩增序列中, 有 9 条 SNP 位点扩增产物在亲代(母本)及其子代的 28 个个体之间具有基本一致的溶解峰, 且子代个体间 T_m 的均一性较好, 无明显差异; 进一步以序列已知的野生型及其突变体作为同一 SNP 引物扩增片段, 在各家系间分析 HRM 标准曲线, 这 9 个 SNP 可以成功用于三疣梭子蟹 4 个放流家系的鉴别。在这 9 个 SNP 位点中, 可鉴定 C 家系的有 5 个, 可鉴定 B 家系的有 2 个, 可鉴定 A、D 家系的各 1 个。该研究结果为三疣梭子蟹种质资源的鉴定及标志放流工作的开展提供了技术支持。

关键词 三疣梭子蟹; 增殖放流; 分子标志; SNP; HRM

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0156-08

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是我国重要的海捕经济蟹类, 但随着过度捕捞, 野生海捕资源迅速下降, 年产量已经由 1996 年的 5.9 万 t 迅速下降至 2001 年的 1.1 万 t (Yang *et al*, 2005)。为了恢复野生海捕资源, 我国近年来展开了大量的增殖放流活动, 2004~2006 年先后在长江口、杭州湾海域共计人工增殖放流三疣梭子蟹苗种 1576 亿只(沈新强等, 2007);

截至 2013 年, 山东省累计放流二期幼蟹 18.85 亿只(庞景贵等, 2009; Zhang *et al*, 2009; 杨爽等, 2014), 有效缓解了三疣梭子蟹种质资源的衰退。随着放流活动的持续开展及不断扩大, 如何评估放流效果的问题也摆在了我们面前。作为甲壳类生物, 三疣梭子蟹的一生需要多次蜕壳, 这就大大限制了很多外部和内部物理形态标记的应用, 因此, 需要探索新型放流标志

* 国家自然科学基金(31472282)、江苏省高校自然科学研究重大项目(13KJA240001)和江苏省“六大人才高峰”创新团队项目(2016-HYGC-CXTD-004)共同资助 [This work was supported by the National Science Foundation (31472282), Key University Science Research Project of Jiangsu Province (13KJA240001), and Projects of “Six-Talent Summit” Innovative Talent Team of Jiangsu (2016-HYGC-CXTD-004)]. 赵 莲, E-mail: zhaolialice@163.com

① 通讯作者: 阎斌伦, 教授, E-mail: yanbl@hhit.edu.cn

收稿日期: 2017-02-01, 收修改稿日期: 2017-02-27

技术。同时,在放流过程中,放流个体对野生资源的种质有何影响,即对自然状态下三疣梭子蟹的遗传多样性和群体遗传结构有何影响,也亟待解答。而解决以上这些问题的最佳途径是开发三疣梭子蟹增殖放流效果评估的分子标志技术。

随着三疣梭子蟹线粒体全基因组的公布(Yamauchi *et al.*, 2003),基于线粒体 DNA 的标记技术已广泛用于三疣梭子蟹群体的遗传多样性及遗传结构分析(蔡珊珊, 2015; 王景等, 2015; 杨爽等, 2014)。与核 DNA 相比, mtDNA 具有分子小、结构简单、进化速度快、不同区域进化速度存在差异等特点,是一个相对独立的复制单位(李喜莲, 2007)。借助线粒体 DNA 具有母性遗传的特点,通过此标记很容易追踪同一母本所产生子代个体的去向,因此,非常适合作为增殖放流标志。这些优点决定了线粒体序列多态性标记技术是最适合三疣梭子蟹增殖放流效果评估的分子标志技术。

作为第三代分子标记的典型代表,单核苷酸多态性标记(Single nucleotide polymorphism, SNP)不仅具有微卫星标记易于分型的优势,而且更容易实现高通量分型,大大提高了分型效率(Beacham *et al.*, 2009)。目前,基于核基因组的 SNP 标记已被广泛应用,如遗传图谱的构建(张建勇, 2011)、种质资源遗传分析(Zhang *et al.*, 2011; Batta-Lona *et al.*, 2011)以及分子标记辅助育种(Feng *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2013; Blanck *et al.*, 2013)等,而在线粒体基因组中 SNP 的开发及其应用研究上还相对较少。本研究通过 HRM 检测技术对三疣梭子蟹线粒体 DNA 上的 SNP 进行分型,以达到快速、准确鉴别不同放流家系的目的,为三疣梭子蟹种质资源的鉴定及标志放流工作的开展提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 家系材料及 DNA 提取

本实验所用家系材料取自江苏连云港赣榆佳信水产开发有限公司,为 2016 年用于江苏省连云港海州湾增殖放流活动的 4 个家系,代表 80~120 万只放流三疣梭子蟹个体。每个家系获得母本个体各 1 只,子代个体分别取 28 只,4 个家系的亲本来源于海州湾海捕群体,为野生抱卵亲蟹,亲蟹繁育分别在 4 个繁育池中进行,子代个体之间无混杂。4 个家系编号分别为 A、B、C 和 D。

分别选取上述亲本和相应子代个体的肌肉组织,用液氮进行研磨,使用 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司)提取

三疣梭子蟹总基因组 DNA(其中包含线粒体基因组 DNA),经 Gene Quant Pro 核酸定量仪(通用公司,美国)测定基因组 DNA 浓度,并均一化为 20 ng/ μ l, -20°C 保存备用。

1.2 标准品的制备

针对前期已发现的 SNPs(表 1),同一对 SNP 引物在不同野生个体间进行扩增,并将扩增序列送去测序比对分析,确认个体间所对应的同一片段是否发生突变与未突变情况,进而将同一 SNP 扩增引物对应的未突变与突变体,在 HRM 中进行 SNP 的分型验证,为已获得的 SNP 标记在后续应用于 4 个家系群体的鉴定作标准参照。

1.3 SNP 在家系间的 HRM 分型

利用已获得的标准品(野生/突变体) HRM 分型结果,将对应 SNP 引物在每个家系的 28 只三疣梭子蟹子代个体中进行 PCR 反应,扩增体系为 35 μ l: 25.3 μ l ddH₂O, 3.5 μ l 10 \times PCR 缓冲液, 2.0 μ l 25 mmol/L MgCl₂, 0.6 μ l 10 μ mol/L dNTPs, 0.6 μ l 5 U/ μ l *Taq* DNA 聚合酶,各 1.2 μ l 10 μ mol/L 上下游引物, 0.6 μ l 20 ng/ μ l DNA 单个体模板。采用温度梯度 PCR 程序进行引物的扩增: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, T_m 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 循环 34 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

反应结束后,向 35 μ l PCR 产物中加入高低温内标各 3.5 μ l,随后按照“95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 复性 2 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存”的程序在 PCR 仪上进行变性反应。变性结束后,取扩增样 10 μ l 加入 96 孔反应板中,同时加入 1 μ l LC Green 荧光染料,并以 15~20 μ l 矿物油进行封闭。每个扩增样品设置 3 个重复。在 Light Scanner 96 系统上进行 HRM 分析,反应结束后对熔解曲线进行分析并记录 T_m 。

2 结果

2.1 标准品的分型情况

通过 HRM 技术对野生个体及突变个体在 22 条含有 24 个 SNP 位点的同一 SNP 引物进行扩增,并进行分型分析。结果显示,每一对标准品(野生体/突变体)在同一 SNP 引物扩增序列中具有明显的差异峰,即 T_m 值差异明显,详见表 1 及图 1a, b~图 4a, b。

2.2 SNP 位点在同一家系中的分型情况

从三疣梭子蟹线粒体基因组共得到 24 个具有 SNP 的位点(表 1)。利用 HRM 技术,对这些 SNP 位点在各个家系中的分型情况进行了研究,结果显示,

表 1 SNPs 引物扩增序列在 HRM 分析中的信息
Tab.1 Ampliconic sequences of SNPs used in HRM

引物 编号 Primer No.	引物序列 Primer sequence	产物长度 Product size (bp)	突变类型 Mutation type	T_m (°C)				
				标准品 (野生/突变) Standard substance (wild/mutant)	A	B	C	D
3	ATAAGAATAGACCAAATACCACT AGTAATAGCTCCTGCCAGAAC	96	C/G	78.84/78.50	79.02	78.87	78.44	79.16
9	ATTTTATCTACAGAGCGTTTG GTAGCTGTAATCACTATAATCGT	112	A/G	75.98/76.42	75.84	75.92	76.57	75.88
11	ATTATCACCATTGGAACA GTTTACAAGACCAAAGTTTT	87	T/C	77.60/77.82	75.11	77.85	75.10	75.08
12	CCGCTCATATTCAGCCAGA CGGAAGCAACAAGAGCAAT	99	G/A	79.94/79.73	79.89	79.68	79.74	79.80
13	ATTCTACATGGCCTTCTTC GAGTGGAGGATTTGCTTT	102	C/T	75.40/75.05	76.58	75.02	76.30	75.20
15	GGCAACACTCCGAAGTCT TTGTTTGGGAATGGGAGT	91	T/A	76.87/76.83	76.90	76.48	76.25	76.82
16	CCATTCCCAACAACAGA ACTTAGGTTATTCTTATCTTTGC	107	A/G	77.70/78.02	78.04	77.52	77.48	77.61
20	CTTTTTAGTGACCTTTCCAAT GCTCCAAATCAAGAAGTCG	96	C/T	77.68/77.20	76.22	78.29	77.24	77.90
21	TTAATCATATCCGCCTCAAT GGGCAGCACCTAGTTTT	92	G/A	79.04/78.54	79.02	79.18	78.34	79.10

9 个 SNP 位点在亲代(母本)及其子代的 28 个个体之间具有基本一致的熔解峰,且子代个体间 T_m 的均一性较好,无明显差异,详见表 1。

2.3 SNP 在 4 个家系中的 HRM 分型结果

以序列已知的野生型及其突变体作为同一 SNP 引物扩增片段在各家系间分析 HRM 的标准品,通过对含有 SNP 位点引物的扩增产物进行 HRM 分析,结果发现,在已知的线粒体基因组 24 个 SNP 位点中(22 对引物),有 9 个 SNPs 可以用于三疣梭子蟹 4 个放流家系的鉴别。对相同序列的同一家系的 28 个个体扩增片段的熔解峰所对应 T_m 值取平均值,得出不同变异类型的位点相应扩增产物的 T_m 值(表 1),与标准品中的突变体 T_m 相比较,各家系都有较为稳定且明显的分型效果。

通过比较各引物所对应的标准品及与家系分型后的 T_m 差异,均可用于三疣梭子蟹种质鉴定。其中,引物 3、9、12、20、21,这 5 对引物可用于鉴别 C 家系(以引物 9 的 SNP 分型结果为例,见图 1);引物 11 和 13 可用于鉴别 B 家系(以引物 13 的 SNP 分型结果为例,见图 2);引物 15 分别可用于鉴别 D (以引物

15 的 SNP 分型结果为例,见图 3)、A 家系(以引物 16 的 SNP 分型结果为例,见图 4)。

图 1 显示,野生型与突变型的熔解曲线有明显差异($T_m > 0.3^\circ\text{C}$);经过对 4 个家系与标准品(野生型/突变型)的 HRM 曲线进行对比分析(图 1c 和图 1d),其中 C 家系的 HRM 峰型与突变型(G)的峰型重叠,而其他 3 个家系(A、B 和 D)的熔解曲线峰与野生型(A)的峰型重叠,表明针对引物 9 扩增的 SNP 序列在 C 群体的 HRM 分型与其他 3 个家系的 HRM 分型结果有明显的不同,进而可用于 C 家系的鉴别。

图 2 显示,野生型与突变型的熔解曲线有明显差异($T_m > 0.3^\circ\text{C}$);经过对 4 个家系与标准品(野生型/突变型)的 HRM 曲线进行对比分析(图 1c 和图 1d),其中, B 家系的 HRM 峰型与突变型(T)的峰型重叠,而其他 3 个家系(A、C 和 D)的熔解曲线峰与野生型(C)的峰型重叠,表明针对引物 13 扩增的 SNP 序列在 B 群体的 HRM 分型与其他 3 个家系的 HRM 分型结果有着明显的不同,进而可用于 B 家系的鉴别。

图 3 显示,野生型与突变型的熔解曲线有明显差异($T_m > 0.3^\circ\text{C}$);经过对 4 个家系与标准品(野生型/突变型)的 HRM 曲线进行对比分析(图 1c 和图 1d),其中,

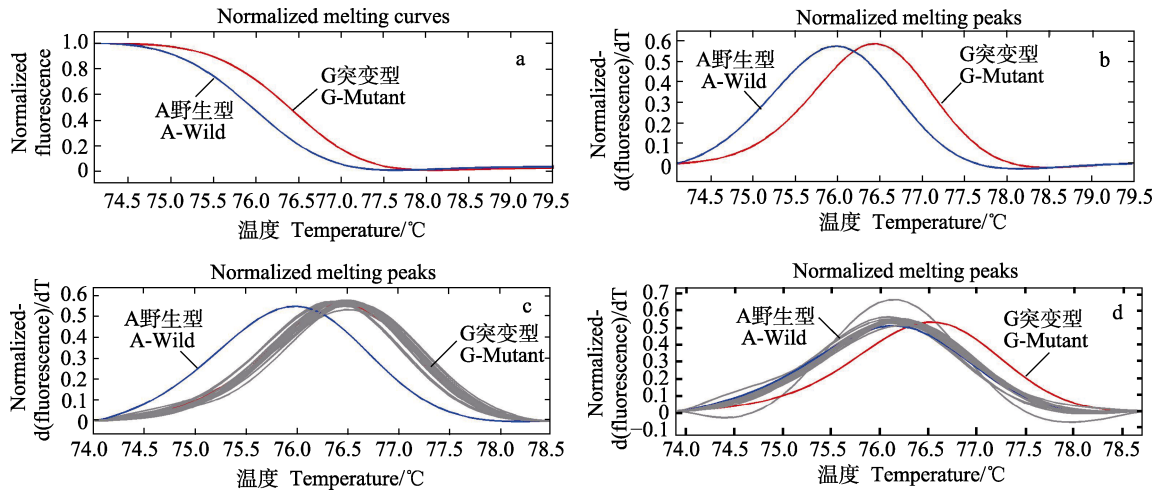


图 1 引物 9 扩增序列在 C 家系(A/G 突变型)中的 SNP 分型结果

Fig.1 SNP typing in the pedigree C for the 9th primer pairs

图中 a、b、c 和 d 中不同的曲线分别代表不同样品的标准化熔解曲线和对应的熔解峰,其中,红色曲线代表突变型(G),蓝色曲线代表野生型(A),灰色代表 4 个放流家系的不同子代个体

Different curves in panel a, b, c, and d were the melting curves and melting peak for different samples, respectively. Mutation type (G) was denoted by red, wild type (A) was denoted by blue, and four releasing groups were denoted by gray

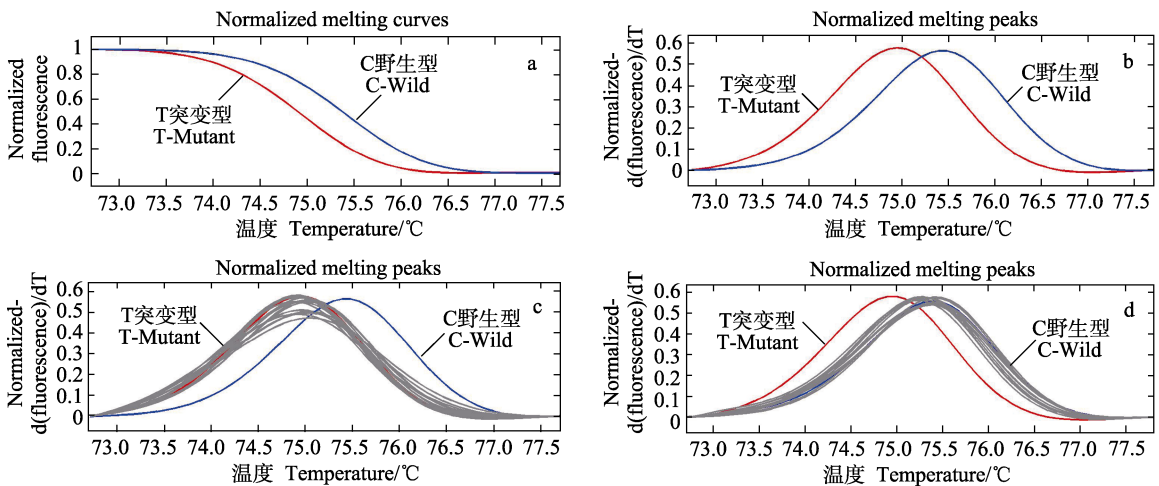


图 2 引物 13 扩增序列在 B 家系(C/T 突变型)中的 SNP 分型结果

Fig.2 SNP typing in the pedigree B for the 13th primer pairs

图中 a、b、c 和 d 中不同的曲线分别代表不同样品的标准化熔解曲线和对应的熔解峰,其中,红色曲线代表突变型(T),蓝色曲线代表野生型(C),灰色代表 4 个放流家系的不同子代个体

Different curves in panel a, b, c, and d were the melting curves and melting peak for different samples, respectively. Mutation type (T) was denoted by red, wild type (C) was denoted by blue, and four releasing groups were denoted by gray

D 家系的 HRM 峰型与突变型(A)的峰型重叠,而其他 3 个家系(A、B 和 C)的熔解曲线峰与野生型(T)的峰型重叠,表明针对引物 15 扩增的 SNP 序列在 D 群体的 HRM 分型与其他 3 个家系的 HRM 分型结果有着明显的不同,进而可用于 D 家系的鉴别。

图 4 显示,野生型与突变型的熔解曲线有明显差异($T_m > 0.3^{\circ}\text{C}$);经过对 4 个家系与标准品(野生型/突变型)的 HRM 曲线进行对比分析(图 1c 和图 1d),其中,

A 家系的 HRM 峰型与突变型(G)的峰型重叠,而其他 3 个家系(B、C 和 D)的熔解曲线峰与野生型(A)的峰型重叠,表明针对引物 16 扩增的 SNP 序列在 D 群体的 HRM 分型与其他 3 个家系的 HRM 分型结果有着明显的不同,进而可用于 A 家系的鉴别。

3 讨论

日本学者在 2004 年就针对三疣梭子蟹的增殖放

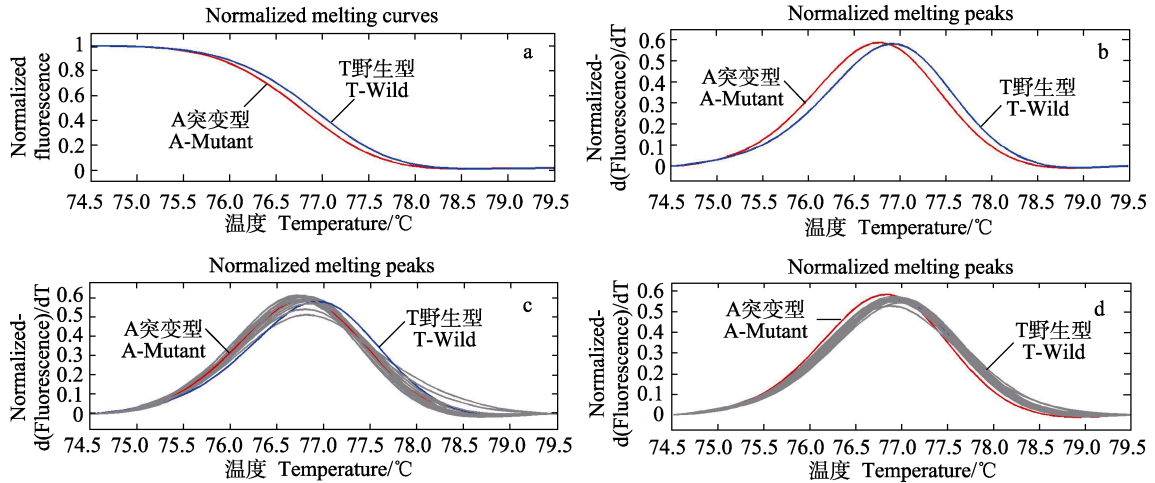


图 3 引物 15 扩增序列在 D 家系(T/A 突变型)中的 SNP 分型结果
 Fig.3 SNP typing in the pedigree D for the 15th primer pairs

图中 a、b、c 和 d 中不同的曲线分别代表不同样品的标准化熔解曲线和对应的熔解峰，其中。红色曲线代表突变型(A)，蓝色曲线代表野生型(T)，灰色代表 4 个放流家系的不同子代个体

Different curves in panel a, b, c, and d were the melting curves and melting peak for different samples, respectively. Mutation type (A) was denoted by red, wild type (T) was denoted by blue, and four releasing groups were denoted by gray

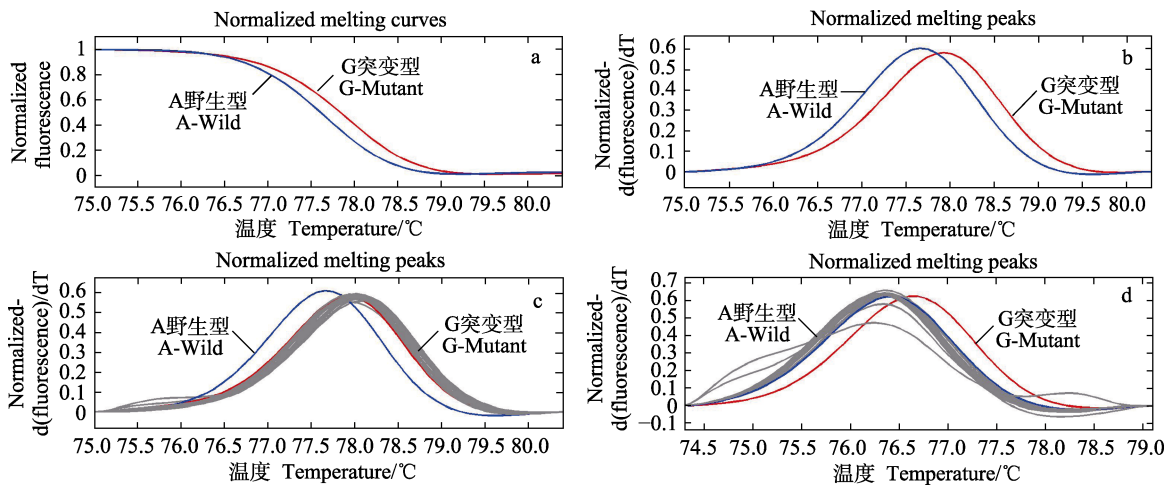


图 4 引物 16 扩增序列在 A 家系(A/G 突变型)中的 SNP 分型结果
 Fig.4 SNP typing in the pedigree A for the 16th primer pairs

图中 a、b、c 和 d 中不同的曲线分别代表不同样品的标准化熔解曲线和对应的熔解峰，其中，红色曲线代表突变型(G)，蓝色曲线代表野生型(A)，灰色代表 4 个放流家系的不同子代个体

Different curves in panel a, b, c, and d were the melting curves and melting peak for different samples, respectively. Mutation type (G) was denoted by red, wild type (A) was denoted by blue, and four releasing groups were denoted by gray

流标记技术进行了研究，所使用的技术为金属线码外部标记(Okamoto, 2004)；后续又有学者比较分析 3 种外部标记(体外绑定标记、身体锚定标记及体内植入金属针绑定标记)技术在龙虾(*Jasus verreauxi*)的标志放流中的应用(Montgomery *et al.*, 2006)，但这些技术应用在三疣梭子蟹这一类甲壳动物身上的效果并不理想，其原因在于：一方面三疣梭子蟹在生长发育过程中需要经历多次蜕壳，影响了外部标记的准确性；

另一方面外部标记对被标记对象的身体存在一定的损伤，不仅影响其后续的生长发育，也会降低其在放流过程中的存活率。为此，我们进行了无任何损失的分子标志放流技术研究，而理论上三疣梭子蟹也是非常适合作为研究分子标志放流技术的对象：三疣梭子蟹具有产卵量大的优点，一只母蟹可产 20~30 万只幼蟹，因此，若知道母本的分子标志特征，则易获得子代个体的遗传特征，这就大大缩减了在大量亲蟹间或

群体间寻找特异分子标记的工作量。以海州湾三疣梭子蟹增殖放流活动为例,每年在海州湾区域放流三疣梭子蟹的数量约为 600 万只(董志国等, 2013), 这只相当于 20~30 个家系(20~30 个亲本)所产生的子代个体数量。本研究获得的在 4 个家系中存在差异的 9 个 SNP 标记中,实际只需要其中的 4 个就可以把 4 个放流家系进行准确鉴别,由此初步推断,鉴别 20~30 个家系所需 SNP 标记的数量也只需要 20~30 个,甚至更少。张超(2014)利用 HRM 技术开发出的 7 个 SNP 位点,成功用于中华鳖(*Trionyx sinensis*)不同品系的鉴别;Zhang 等(2009)甚至利用 SNPs 中的 2 个突变位点就可将中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)与合浦绒螯蟹(*Eriocheir hepensis*)鉴别开来。此外,由于线粒体基因组是单倍型,其上的 SNP 标记对鉴别增殖放流个体要比以往利用核基因组中的微卫星和 SNP 标记的研究(刘海映等, 2016; 李喜莲等, 2016)更有效率。因此,本研究利用线粒体基因组 SNP 标记作为增殖放流的分子标志技术是可行的,简单、高效,如配以 HRM 技术,则更具有高通量分析的特点。

高分辨率熔解曲线(HRM)分型技术具有高通量、高灵敏度以及特异性强等优点。目前已被成功用于水产生物的多态性检测(吴莹莹, 2013)、种质资源的鉴定(张超, 2014)等方面。因此,根据以上 HRM SNP 分型技术在种质资源鉴定的基础上,为了增加其分型技术的可信度,本研究利用测序已知分型样品(野生型/突变型)作为标准品,与每个放流家系群体进行 HRM 比较分析,结果显示,每对 SNP 引物的扩增样品所对应的标准品与家系个体间的 PCR 产物熔解峰相重叠(图 1~图 4),且各家系内的 T_m 均一性也显示良好,表明此方法提高了 SNP 分型的准确性,可用于三疣梭子蟹种质资源鉴定方面的研究。

从实验材料的选取上可以看出,本研究并未选取父本材料,这是因为本研究的目的之一就是希望忽略父本遗传材料的背景下,可以对放流群体进行鉴定。其主要原因在于:一方面实际放流过程中三疣梭子蟹是由各个企业自主繁育蟹苗进行放流的,亲本往来源于野生抱卵蟹,无法准确获得父本信息;另一方面本研究采用的线粒体基因标记在解决增殖放流标记上也不需要父本的遗传信息,这是由线粒体 DNA 母系遗传的特点决定的。线粒体 DNA 属于细胞核外遗传物质,线粒体 DNA 只通过母亲遗传给子代个体(Spuhle, 1988),因此,该标记非常适用于包括三疣梭子蟹在内的各种生物的增殖放流分子标志研究,只要找出不同家系母本间线粒体 DNA 上的特异性 SNP 标记,即可对不同家系群体进行鉴定,而不需要父本材

料的相关信息。与核 DNA 相比,线粒体 DNA 无重组杂合的现象,不会出现因杂合产生的熔解曲线的双峰(李纪勤等, 2013),因此,较核基因 SNP 分型相比,线粒体 SNP 的 HRM 分型结果更直观明了。

总之,本研究所建立的不同放流家系三疣梭子蟹的线粒体特异性 SNP HRM 分型方法可有效鉴别用于增殖放流的不同家系群体,此方法弥补了形态、生化等传统标记方法鉴别的不准确性,并为后续的放流标志工作的展开提供技术支持。

参 考 文 献

- Blanck DV, Valenti WC, Freitas PDD, *et al.* Isolation and characterization of SNPs within HSC70 gene in the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Conservation Genetics Resources*, 2013, 5(3): 631–633
- Batta-Lona PG, Bucklin A, Wiebe PH, *et al.* Population genetic variation of the Southern Ocean krill, *Euphausia superba*, in the Western Antarctic Peninsula region based on mitochondrial single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2011, 58(13): 1652–1661
- Beacham TD, Jonsen K, Wallace C. A comparison of stock and individual identification for *Chinook salmon* in British Columbia provided by microsatellites and single-nucleotide polymorphisms. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 2009, 67(1): 1274–1290
- Cai SS. Evaluation of stock enhancement in *Portunus trituberculatus* and *Fenneropenaeus chinensis* based on molecular markers. Master's Thesis of Ocean University of China, 2015 [蔡珊珊. 基于分子标记的三疣梭子蟹和中国对虾增殖放流效果研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- Dong ZG, Li XY, Zhang QI, *et al.* Genetic impact of swimming crab *Portunus trituberculatus* farming on wild genetic resources in Haizhou Bay. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(23): 7332–7339 [董志国, 李晓英, 张庆起, 等. 三疣梭子蟹增养殖过程对野生种群的遗传影响——以海州湾为例. *生态学报*, 2013, 33(23): 7332–7339]
- Feng N, Ma H, Ma C, *et al.* Characterization of 40 single nucleotide polymorphism (SNP) via T_m-shift assay in the mud crab (*Scylla paramamosain*). *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(8): 5467–5471
- Li JQ, Bao ZM, Li L, *et al.* The development and polymorphism analysis of EST-SNP in *Chlamys (Azumapecten) farreri*. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science Edition)*, 2013, 43(1): 56–63 [李纪勤, 包振民, 李玲, 等. 栉孔扇贝 EST-SNP 标记开发及多态性分析. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2013, 43(1): 56–63]
- Liu HY, Lü HB, Cui F, *et al.* Parental contribution and genetic

- diversity between broodstock and offsprings in *Portunus trituberculatus* releasing into natural waters. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 35(6): 614–619 [刘海映, 吕海波, 崔帆, 等. 放流三疣梭子蟹遗传多样性和贡献率初步研究. *水产科学*, 2016, 35(6): 614–619]
- Li XL. The polymorphism of mitochondrial DNA of *Portunus trituberculatus*. Master's Thesis of Northwest A&F University, 2007 [李喜莲. 三疣梭子蟹线粒体 DNA 多态性研究. 西北农林科技大学硕士研究生学位论文, 2007]
- Li XL, Yang YJ, Li F, *et al.* Development of single nucleotide polymorphism markers for *Macrobrachium nipponensis* using expressed sequence tags. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2016, 47(2): 67–73 [李喜莲, 杨元杰, 李飞, 等. 日本沼虾 EST-SNP 的筛选及多态性检测. *东北农业大学学报*, 2016, 47(2): 67–73]
- Montgomery SS, Brett PA. Tagging eastern rock lobsters *Jasus verreauxi*: Effectiveness of several types of tag. *Fisheries Research*, 2006, 27(4): 141–152
- Okamoto K. Juvenile release and market size recapture of the swimming crab *Portunus trituberculatus* (Miers) marked with coded wire tags. In: Leber KM, Kitada S, Blankenship HL, Svasand T (eds). *Stock enhancement and sea ranching: Development, pitfalls and opportunities (Second Edition)*. Blackwell, Oxford, 2004, 181–186
- Pang JG, Guo JL. Significant enhancement effect on fishing of the Huanghai and Bohai Seas. *Hebei Fisheries*, 2009(1): 34–35 [庞景贵, 郭金龙. 黄渤海放流增殖恢复捕捞渔业效果显著. *河北渔业*, 2009(1): 34–35]
- Spuhle JN. Evolution of mitochondrial DNA in monkeys, apes, and humans. *American Journal of Physical Anthropology*, 1988, 31(Suppl): 15–48
- Shen XQ, Zhou YD. Enhancement releasing and evolution of fishery resources in the Yangtze estuary and Hangzhou Bay sea area. *Fishery Modernization*, 2007, 34(4): 54–57 [沈新强, 周永东. 长江口、杭州湾域渔业资源增殖放流与效果评估. *渔业现代化*, 2007, 34(4): 54–57]
- Wang J, Zhang FY, Jang KJ, *et al.* Genetic diversity of *Portunus trituberculatus* based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I sequence from the East China Sea. *Marine Fisheries*, 2015, 37(2): 114–121 [王景, 张凤英, 蒋科技, 等. 基于线粒体 CO I 基因序列的三疣梭子蟹东海区群体遗传多样性分析. *海洋渔业*, 2015, 37(2): 114–121]
- Wu YY, Meng XH, Kong J, *et al.* Application of unlabeled probe by HRM in development of EST-SNPs in *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 111–118 [吴莹莹, 孟宪红, 孔杰, 等. 非标记探针 HRM 法在中国对虾 EST-SNP 筛选中的应用. *渔业科学进展*, 2013, 34(1): 111–118]
- Yang F, Xu HT, Dai ZM, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunus trituberculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2005, 142(4): 456–464
- Yamauchi MM, Miya MU, Nishida M. Complete mitochondrial DNA sequence of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Gene*, 2003, 311: 129–135
- Yang S, Song N, Zhang XM, *et al.* Genetic diversity of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) from four broodstock populations in stock enhancement inferred from mitochondrial control region. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(8): 1089–1096 [杨爽, 宋娜, 张秀梅, 等. 基于线粒体控制区序列的三疣梭子蟹增殖放流亲蟹遗传多样性研究. *水产学报*, 2014, 38(8): 1089–1096]
- Yang Y, Ye H, Huang H, *et al.* Expression of Hsp70 in the mud crab, *Scylla paramamosain* in response to bacterial, osmotic, and thermal stress. *Cell Stress and Chaperones*, 2013, 18(4): 475–482
- Zhang C, Zhang HQ, Xu XJ, *et al.* Identification of different strains of *Pelodiscus sinensya* by using high resolution melting(HRM) analysis of SNPs in mitochondrial DNA. *Oceanological et Limnological Sinica*, 2014, 45(2): 376–381 [张超, 张海琪, 许晓军, 等. 中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)不同品系线粒体 SNP 的分型与鉴定. *海洋与湖沼*, 2014, 45(2): 376–381]
- Zhang D, Tang B, Ding G, *et al.* Molecular authentication of the fashionable dainty *Eriocheir japonica sinensis* based on mitochondrial DNA bar coding. *European Food Research and Technology*, 2009, 230(1): 173–178
- Zhang JY. Development and application of SNP markers in genome of *Fenneropenaeus chinensis*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2011 [张建勇. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)基因组 SNP 标记的开发与应用. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2011]

(编辑 冯小花)

Identification on Stock Enhancement Pedigrees of the Swimming Blue Crab *Portunus trituberculatus* Using mtDNA SNPs

ZHAO Lian^{1,2,3}, LI ZhiHui^{1,2,3}, ZHANG Pei^{1,2,3}, XUE Bei^{1,2,3}, LAI Xiaofang^{1,2,3},
ZHANG Qingqi⁴, GAO Huan^{1,2,3}, YAN Binlun^{1,2,3}①

(1. College of Fisheries and Life Science, Huaihai Institute of Technology, Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang 222005; 2. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-Industry Technology, Lianyungang 222005; 3. Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014; 4. Lianyungang Ganyu Jiaxin Aquaculture Exploitation Ltd, Lianyungang 222005)

Abstract The wild population of *Portunus trituberculatus*, an important economical species in China, has been dramatically decreased in past decades due to over capturing. To recover wild germplasm resources of *P. trituberculatus*, the activities of stock enhancement were performed, and the released individuals were about six millions each year in Haizhou Bay of Jiangsu Province. To evaluate the effects of stock enhancement, we utilized molecular markers (mtDNA SNPs) to track the released pedigrees of *P. trituberculatus*. Previous studies identified 22 SNPs of mtDNA from *P. trituberculatus*, which were used to trace four released families (on behalf of 0.8~1.2 million released individuals) (A, B, C and D) by HRM (High resolution melt) technology. Nine of 22 SNPs were usable, which resolution melt curve were coincident between female parentages and their offspring. Furthermore, the nine SNPs could be used to distinguish the four families, in which the parentage C, B, A and D could be differentiated by 5, 2, 1 and 1 SNPs, respectively. Our results indicate that the mtDNA SNPs, combined HRM technology, is a wonderful technology to evaluate the effects of stock enhancement of *P. trituberculatus*.

Key words *Portunus trituberculatus*; Stock enhancement; Molecular marker; SNP; HRM

① Corresponding author: YAN Binlun, E-mail: yanbl@hhit.edu.cn