

泥蚶(*Tegillarca granosa*)基因组 SSR 和 EST-SSR 的开发及比较研究*

周小龙^{1,2} 朱靖华² 董迎辉² 林志华^{2①} 富凯立² 姚韩韩² 齐晓艳³

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 浙江万里学院 浙江省水产种质资源高效利用
技术研究重点实验室 宁波 315100; 3. 宁波大学海洋学院 宁波 315211)

提要 采用 SSRHunter 软件在泥蚶(*Tegillarca granosa*)磁珠富集文库和 454 转录组文库中搜索核心序列长度 12bp 以上的 2—6 核苷酸重复序列, 根据富集文库所得基因组 SSR 侧翼序列设计 47 对引物, 可成功扩增 17 对且均为多态性引物, 多态率 100%, 平均等位基因数(N_a)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、多态性信息含量(PIC)分别为 6.8、0.468、0.785、0.733。11344 条 EST 序列中得到 1683 个 SSR 位点, 检出率 14.83%, 平均每 3.85kb 出现 1 个位点。根据部分 EST 序列设计 120 对引物, 62 对可扩增出目的片段, 其中 29 个位点具有多态性, 多态率为 46.77%, 平均 N_a 、 H_o 、 H_e 、PIC 分别为 4.2、0.372、0.554、0.500, 均低于基因组 SSR。双变量相关性分析的结果表明, 46 个多态性 SSR 位点的核心序列长度与其 N_a 、 H_o 、 H_e 、PIC 极显著正相关, Spearman 相关系数分别为 0.632、0.387、0.657、0.664。

关键词 泥蚶; 基因组 SSR; EST-SSR

中图分类号 Q789

泥蚶(*Tegillarca granosa* Linnaeus)是一种广温广盐性滩涂贝类, 在我国分布于山东以南沿海地区, 因其具有独特的口感风味和较高的营养价值, 已成为江苏、浙江、福建等地重要的经济贝类。泥蚶的相关研究早期主要集中在人工育苗技术(田传远等, 1996)、环境生态学(方建光等, 1999)和受精生物学等方面(孙慧玲等, 2000)。近 10 年来, 已有学者利用 RAPD、AFLP 等分子标记技术对泥蚶先后开展了种质资源评价(李太武等, 2003)、不同群体或家系遗传结构分析(姚韩韩等, 2011; 董迎辉等, 2012)等研究。在第二代分子标记技术中, 微卫星由于具有呈共显性、高多态性、高稳定性、生物信息量丰富、分析方法相对简易等优点, 是进行群体遗传结构分析、系统进化地位研究、遗传图谱构建、分子标记辅助育种的有力工具(李琪, 2006; Chistiakov *et al.*, 2006)。根据标记来源和开

发方法的不同, 可将 SSR 标记分为基因组 SSR(G-SSR)和 EST-SSR。EST-SSR 是基于 EST 库开发的 SSR 标记, 相比 G-SSR 具有开发成本低、近缘物种通用性高、可直接标记功能基因等优势(Varshney *et al.*, 2005)。对微卫星标记的开发和利用在多种海洋贝类中已见报道(Jiang *et al.*, 2011; 张秀英等, 2012; Dong *et al.*, 2012), 在泥蚶 SSR 开发方面, 已有顾晓英等(2008)、Dong 等(2012)、Liu 等(2012)开发了部分微卫星标记。

本研究利用从磁珠富集文库和 454 转录组文库中得到的 SSR 位点对泥蚶奉化群体进行了遗传学分析, 旨在研究泥蚶 EST-SSR 分布的频率和丰度等特征, 探讨基因组 SSR 和 EST-SSR 在进行群体遗传学分析时的差异, 以期为泥蚶 SSR 标记的开发和群体遗传多样性分析奠定基础。

* 国家“863”计划项目, 2012AA10A410 号; 国家现代贝类产业技术体系项目, CARS-48 号; 宁波市科技创新团队项目, 2011B82017 号; 宁波市科技局农业择优委托项目, 2010C10011 号。周小龙, 硕士研究生, E-mail: zxl19881028@163.com

① 通讯作者: 林志华, 博士, 研究员, E-mail: zhihua9988@126.com

收稿日期: 2012-03-17, 收修改稿日期: 2012-05-15

1 材料与方法

1.1 泥蚶 DNA 提取

实验所用泥蚶采自宁波奉化,取活体闭壳肌于无水酒精中保存备用。采用传统酚-氯仿抽提法提取泥蚶基因组 DNA,使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,利用核酸定量分析仪(GE NanoVue Plus)将 DNA 浓度调至 100ng/ μ l,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2 序列来源与 SSR 位点搜索

通过构建泥蚶微卫星富集文库得到 160 条含 G-SSR 位点序列,使用 SSRHunter 1.3.0 软件对全部序列进行处理,得到核心序列及其上下游各 150bp 的侧翼序列。

从本实验室已开发的泥蚶 454 转录组文库中选取 11344 条序列,使用 SSRHunter 1.3.0 软件对全部序列进行 SSR 位点搜索(搜索标准为:2 核苷酸重复 6 次以上,3 核苷酸重复 4 次以上,4、5、6 核苷酸重复 3 次以上),所得位点为 EST-SSR。

1.3 引物设计

使用 Primer Premier 5 软件根据所得位点的侧翼序列设计引物,设计的主要原则为:引物长度 16—25bp,上下游引物 T_m 值相近且在 40—65 $^{\circ}$ C 之间,GC 含量 30%—70%,产物长度 100—400bp,尽量避免错配、发卡结构、引物二聚体等可引起非特异性扩增的因素。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 引物筛选

以 3 个泥蚶 DNA 混合基因池为模版进行 PCR 扩增,扩增体系为:10 \times PCR Buffer (不含 Mg^{2+}) 2 μ l, dNTP Mixture (各 2.5mmol/L) 1.6 μ l, $MgCl_2$ (25mmol/L) 1.2 μ l, 上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ l, 模版 DNA 1 μ l, TaKaRa Taq DNA 聚合酶(5U/ μ l) 0.2 μ l, 加 ddH₂O 至 20 μ l。PCR 反应在 Eppendorf Mastercycler pro 梯度 PCR 仪上进行,反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 45s, 退火(40—60 $^{\circ}$ C 温度梯度) 45s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 循环 30 次;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。用 2%琼脂糖凝胶电泳检测引物扩增效果并确定引物最适退火温度。

1.5 泥蚶奉化群体基因型检测

选取可稳定扩增的引物分别以泥蚶奉化群体 30 个个体 DNA 为模板进行 PCR 扩增,取 2 μ l 扩增产物和 1 μ l 上样缓冲液混匀,使用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳对其进行分离,电泳电压 5V/cm,电泳时间 3h, E.B 染色,在 Bio-rad 凝胶成像系统上拍照。

1.6 基因型判读和数据分析

电泳图像经 Photoshop CS3 软件校正后,人工判定每个个体基因型。利用 Cervus 3.03 软件计算每个位点的 N_a 、 H_o 、 H_e 和 PIC,使用 Genepop 在线软件(<http://genepop.curtin.edu.au/>)对每个位点进行 Hardy-Weinberg 平衡 χ^2 检验概率值(P)的计算,并对概率值进行 Sequential Bonferroni 法校正,进而判定是否显著偏离平衡。使用统计软件 SPSS 20.0 中的双变量相关性分析(Bivariate correlation analysis)计算 SSR 核心序列长度与等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、PIC 的相关系数。

2 结果与分析

2.1 泥蚶 EST-SSR 位点分布特点

使用 SSRHunter 对泥蚶 454 转录组文库中的 11344 条 EST 序列进行搜索,共得到重复元件为 2—6 核苷酸、重复序列长度在 12bp 以上的 SSR 位点 1683 个,平均每 3.85kb 出现 1 个 SSR 位点,SSR 出现频率为 14.83%。其中 3 核苷酸重复占主导,共 852 个,占搜索到位点总数的 50.62%,其次为 4 核苷酸重复 469 个,占总数的 27.87%,6 核苷酸重复最少,只有 36 个,占总数的 2.14%。

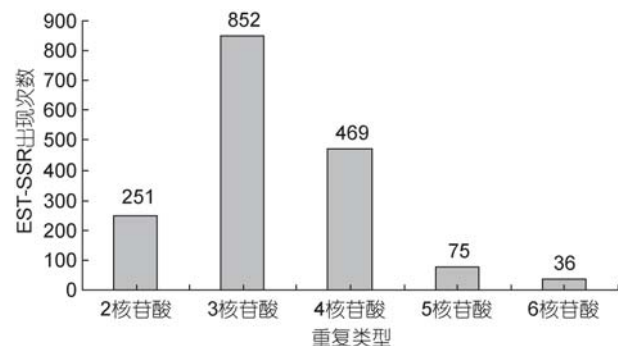


图 1 不同重复类型 EST-SSR 数量分布

Fig.1 Quantitative distribution of different repeat types of EST-SSR

2.2 多态性微卫星位点筛选

从泥蚶微卫星富集文库中选取部分含 SSR 位点的序列,根据位点侧翼序列设计 47 对引物,其中 17 对引物可扩增出清晰且符合预期长度的条带,扩增成功率为 36.17%,17 对引物在以 30 个泥蚶个体 DNA 为模板的扩增试验中均表现出多态性,多态率为 100%。根据部分随机选取的含 SSR 位点的 EST 序列,设计 120 对引物,62 对引物可扩增出目的条带,成功

扩增率 51.67%, 其中 29 对引物具有不同程度的多态性, 多态率为 46.77%。部分位点电泳检测结果如图 2。

利用 Hardy-Weinberg 定律对 46 个位点的基因平衡状态进行检验, 结果经 Sequential Bonferroni 法校正后, 仍有 12 个 G-SSR 位点和 9 个 EST-SSR 位点偏离平衡。

2.3 奉化泥蚶群体遗传多样性分析

17 对多态性 G-SSR 引物在 30 个泥蚶个体中扩增得到

115 个等位基因, 每对引物分别得到 3—11 个等位基因(N_a), 观测杂合度(H_o)在 0.208—0.875 之间, 期望杂合度(H_e)在 0.542—0.883 之间, 平均 N_a 、 H_o 、 H_e 分别为 6.8、0.468、0.785 (表 1)。29 对多态性 EST-SSR 引物在奉化泥蚶群体扩增中得到 122 个等位基因, 每对引物分别检测到 2—8 个等位基因, H_o 介于 0.043—0.750 之间, H_e 介于 0.082—0.823 之间, 平均 N_a 、 H_o 、 H_e 分别为 4.2、0.372、0.554 (表 2)。G-SSR 位点在此三个参数上的平均值均高于 EST-SSR 位点。G-SSR 位点平均 PIC 值为 0.733, 大于 EST-SSR 位点平均 PIC 值 0.500。根据 PIC 判定标准: $PIC < 0.25$ 为低度多态, $0.25 \leq PIC < 0.5$ 为中度多态, $PIC \geq 0.5$ 为高度多态, 可判定 17 个 G-SSR 位点中 16 个为高度多态位点, 1 个为中度多态位点(表 1), 29 个 EST-SSR 中 16 个为高度多态位点, 5 个为中度多态位点, 8 个为低度多态位点(表 2)。

2.4 多态位点核心序列长度与各项参数相关性分析

SPSS 双因素相关性分析结果表明 SSR 位点核心序列长度与等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、PIC 都具有极显著的正相关性($P < 0.01$), Spearman 相关系数分别为 0.632、0.387、0.657 和 0.664。

3 讨论

本研究使用 SSRHunter 软件对泥蚶 454 转录组文库中 11344 条 EST 序列进行 SSR 位点搜索得到 1683 个 SSR 位点, 检出率为 14.83%, 远高于中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的 2.2% (Wang *et al.*, 2005)、马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)的 3.48% (石耀华等, 2008)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的

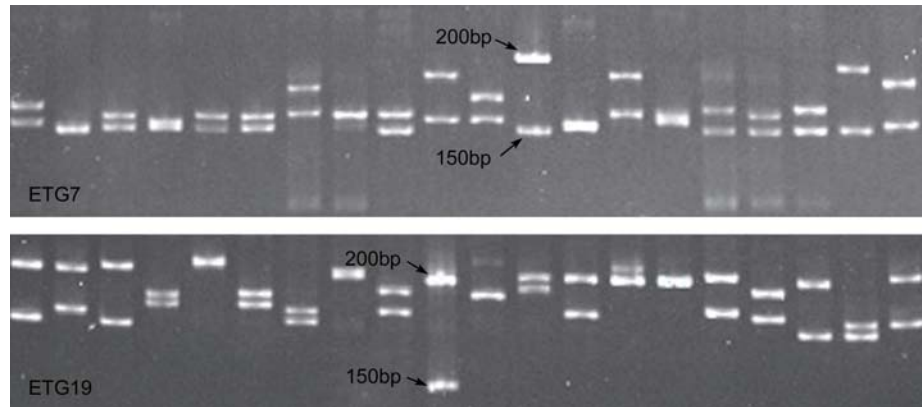


图 2 引物 ETG7 和 ETG19 在奉化泥蚶群体中 PCR 扩增产物电泳图像
Fig.2 Electrophoretic patterns of PCR products amplified by primer ETG7 and ETG19 in *T. granosa* Fenghua population

3.57% (闫喜武等, 2011)、缢蛭(*Sinonovacula constricta*)的 8.89% (刘博等, 2012)。SSR 检出比例的差异主要归因于 SSR 筛选标准不统一、核苷酸序列文库的组织来源不同以及不同物种基因组组成差异性。对核苷酸序列文库进行 SSR 位点检索时, 标准的不同会对检出率造成较大影响。Zhao 等(2008)以筛选标准: 5 次及以上 2—6 核苷酸重复对 6935 条栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)EST 序列进行检索, 得到 154 条含 SSR 序列, 得率为 4.40%; 而 Zhan 等(2009)以较高的严谨度对栉孔扇贝 EST 序列进行 SSR 位点搜索, 得率为 1.90%, 不到前者的 1/2。张秀英等(2012)以两个标准对栉孔扇贝同一个 BES 库进行 SSR 位点检索, 得率分别为 48.92% 和 19.31%, 结果相差 2 倍以上。对于来自同一物种不同组织的核苷酸序列文库, 其 SSR 位点检出率也存在差异, 石耀华等(2008)对马氏珠母贝 9 个组织的 cDNA 文库以同一标准进行 SSR 位点搜索, 微卫星序列检出率在 1.65%—6.16% 之间。因此, 要研究 SSR 序列的丰度和分布特征在不同物种之间的差异性, 需修正位点筛选标准和序列来源带来的影响。

相对于位点成功扩增率会受引物设计水平及序列准确度等因素影响, 根据多态性位点占可扩增位点比率得到的多态率更能揭示 SSR 位点的内在属性。本实验所设计 47 对 G-SSR 引物中 17 对(36.17%)可成功扩增, 低于 EST-SSR 51.67% 的成功扩增率, 但所得 17 个位点全部为多态性位点, 多态率为 100%, 远高于 EST-SSR 46.77% 的多态率。G-SSR 普遍具有较高的多态率, 如大口鲶(*Silurus meriaionalis*) (全迎春等, 2006)基因组微卫星多态率 81.58%, 栉孔扇贝为

表 1 17 对泥蚶 G-SSR 引物特性
Tab.1 Characteristics of 17 Genomic-SSRs in *T. granosa*

位点	引物序列(5'—3')	重复序列	退火温度 (°C)	产物 大小(bp)	等位基因数 (N_e)	观测杂合度 (H_o)	期望杂合度 (H_e)	多态信息含量 (PIC)	P 值	GenBank 登录号
GTG1	F: CAACCAAACTGCGATGA R: TTTACTCCAAACCGACCC	(GA) ₂₇	61	182	7	0.875	0.809	0.761	0.0834	KC355399
GTG2	F: GCAAAGTCGTTCTCATCAA R: GTATCAGCACCAGGCAAT	(AC) ₁₁ -(CT) ₄ (CA) ₈	59	273	3	0.208	0.542	0.453	0.0002	KC355400
GTG3	F: CCGTGCCGCAATCATATC R: AAAGCCATTCCGTCGTCT	(CA) ₁₁ -(AC) ₁₀ (CT) ₂₉	40	206	4	0.417	0.676	0.605	0	KC355401
GTG4	F: TATCAGGAAACTTGTCTC R: GTAAAGCAACCCCTGTAA	(CT) ₁₇ -(CT) ₈	55	171	4	0.261	0.685	0.605	0	KC355402
GTG5	F: CAGTCTTTTATGGGTTGTC R: TAATGGTGTGTCGTTGTTG	(TC) ₃₂ (AC) ₁₈	54	294	6	0.500	0.745	0.686	0.0307	KC355403
GTG6	F: GCTCTTACCTATTTATGTGCTG R: GTGTCTTGTCTCTTATTTCTC	(AC) ₂₇	54	145	10	0.542	0.883	0.850	0	KC355404
GTG7	F: GCGACCTATCAGAGCAGAAAG R: TCCCTAAATACAGAGAGGCAAT	(GT) ₂₃	49	306	6	0.833	0.778	0.727	0.1095	KC355405
GTG8	F: CACATCTGGCACAGCAAA R: ACTTCTTAGGACACAGTAGCA	(TC) ₃₂ (AC) ₁₅	60	259	7	0.696	0.865	0.826	0.0023	KC355406
GTG9	F: GCGGTTTCACAAAAGTAATCATA R: CAAATAACATCGCCATTTCATC	(GA) ₁₉	60	267	6	0.500	0.696	0.629	0.0492	KC355407
GTG10	F: AACACATAGACACCGTTGGAGA R: GATTGGGAGTGGTTTGAAGC	(CT) ₂₇	60	187	5	0.273	0.767	0.708	0	KC355408
GTG11	F: CTACCTGTTGCTTTCATAAA R: TCCGCTTGAGTTCGT	(AC) ₃₂	49	239	9	0.304	0.845	0.808	0	KC355409
GTG12	F: CTTTGCTATTATGTTTGCCA R: GACCACACCCTTTTCCA	(AC) ₁₇ (TC) ₉ -(CT) ₁₀	60	267	8	0.261	0.863	0.826	0	KC355410
GTG13	F: CGTGAACAAGGAGTAACAA R: CAACCAATACAGTCCAACA	(TC) ₂₇	56	181	11	0.652	0.881	0.848	0.0066	KC355411

续表 1

位点	引物序列(5'—3')	重复序列	退火温度 (°C)	产物 大小(bp)	等位基因数 (N_a)	观测杂合度 (H_o)	期望杂合度 (H_e)	多态信息含量 (PIC)	P 值	GenBank 登录号
GTG14	F: CTA AACGACAAAAGCAATG R: TTACAAGCGACAGAAAAC	(TC) ₃₂	54	288	8	0.478	0.816	0.772	0	KC355412
GTG15	F: CAAAGACAGACTGATGCT R: CACTGACAAAATGTGGTA	(TG) ₁₂	56	150	8	0.217	0.852	0.813	0	KC355413
GTG16	F: AATAACGGCGATAACCTC R: TCTGCCTTCAATGTCACTT	(TC) ₅ ...(CT) ₂₂ (CA) ₁₀	60	213	8	0.435	0.851	0.810	0.0003	KC355414
GTG17	F: TCTACTTTACCCGATTGTCT R: GCCCTCACGAAATGTTA	(CT) ₂₆ ...(CT) ₆	56	204	5	0.500	0.789	0.737	0.0002	KC355415
平均值	—	—	—	—	6.8	0.468	0.785	0.733	—	—

表 2 29 对泥蚶 EST-SSR 引物特性

Tab.2 Characteristics of 29 EST-SSRs in *T. granosa*

位点	引物序列(5'—3')	重复序列	退火温度 (°C)	产物 大小(bp)	等位基因数 (N_a)	观测杂合度 (H_o)	期望杂合度 (H_e)	多态信息含量 (PIC)	P 值	GenBank 登录号
ETG1	F: GAACGTGACCGCCTCAAAATAG R: CGCAGGTAGTGGAGATAAAC	(TAC) ₄	56	153	2	0.292	0.254	0.218	1	KC355371
ETG2	F: GTGTGATTTTATTTTCGCTC R: GGACAGTATTTGCTGATTT	(ATG) ₄ ...(TGA) ₅	56	340	3	0.043	0.503	0.391	0	KC355372
ETG3	F: TGTGTAAGATGGTTGG R: AGAACTCCGAGTAAACAG	(GA) ₇ ...(AG) ₇ ...(GA) ₅	54	148	6	0.364	0.823	0.776	0	KC355373
ETG4	F: GCTTCTGGGCAAACTCT R: ATTCCTGATTTACACCTGG	(TG) ₈	56	286	5	0.500	0.747	0.686	0.0001	KC355374
ETG5	F: TTCAACTGCTTGGCTTACG R: GGTTCTTTTGGATTACCGAC	(AT) ₈ ...(AT) ₃	60	217	5	0.227	0.393	0.362	0.0011	KC355375
ETG6	F: ATGTCAAAGTCTAAGGAAT R: TATGCTGAACCCAGAACT	(TA) ₆	58	224	3	0.083	0.082	0.079	1	KC355376
ETG7	F: TAGAAAGTATTTTTGGCTGG R: AGTTACAACCTGAAGACCGA	(TGA) ₉	59	158	7	0.708	0.757	0.707	0.6641	KC355377

续表 2

位点	引物序列(5'-3')	重复序列	退火温度 (°C)	产物 大小 (bp)	等位基因数 (N_a)	观测杂合度 (H_o)	期望杂合度 (H_e)	多态信息 含量 (PIC)	P 值	GeneBank 登录号
ETG8	F: TCAAGACAAAGTGCCATA R: GTAGAATCCATACCAGC	(AT) ₆	53	109	2	0.292	0.361	0.291	0.5578	KC355378
ETG9	F: CATTACTATACACCACCTTCA R: ATTGTATTTCTGGAGAGAG	(ATT) ₁₂	56	104	6	0.381	0.821	0.773	0	KC355379
ETG10	F: CCAACGGTTACACTTAGC R: CGGTGATGGGAGACTT	(AAT) ₅	60	213	7	0.450	0.758	0.697	0.0036	KC355380
ETG11	F: GACATTCAAAGTGTGGCAT R: GGTTTTCCCTATTTCCCTC	(ATG) ₇	56	252	4	0.583	0.499	0.429	0.7003	KC355381
ETG12	F: CCTGTAGTTAGGGATAAATAG R: ACTCAACCATCTTGGAAATA	(AT) ₇	56	250	4	0.217	0.696	0.612	0	KC355382
ETG13	F: TAGAAGCATAAAATGACCA R: CACACAAAACCTTACAGAAACA	(AGA) ₄	49	146	3	0.250	0.228	0.206	1	KC355383
ETG14	F: ATCTCTGACAAATGATAGTTATG R: TACTTTCCCTCCTTCTCT	(TGC) ₅ ···(ATG) ₁₄	56	129	7	0.609	0.767	0.725	0.0859	KC355384
ETG15	F: CCATCACCGTCGTCTTCATCA R: TGTTTTACCAGTTCGGAAATCAGC	(ACA) ₇	60	188	6	0.292	0.784	0.732	0	KC355385
ETG16	F: TCTATCTCAGTATCAGCAGGC R: GAAGAGCAACAAGAGGAAAC	(TGT) ₄	40	206	3	0.667	0.513	0.396	0.2103	KC355386
ETG17	F: CGGCTTCTCGTTGTCTTG R: ATCGTGATGGTATGGCA	(TGT) ₄	60	203	3	0.292	0.627	0.532	0.0036	KC355387
ETG18	F: TATGGCAGTTTACCTCC R: ATGTGGCAGAGCAAAAAG	(CAT) ₁₀	56	178	7	0.304	0.813	0.767	0	KC355388
ETG19	F: CTGCCACATTTATCATTTA R: AGACGACAGAGGACAAAGA	(TCA) ₅ ···(CAT) ₆ ···(CAT) ₆	54	203	5	0.750	0.742	0.686	0.4105	KC355388
ETG20	F: CTCTGTTTGACTTTTGCCTT R: TAATCAAAATGGTCTCTCCC	(TGT) ₄	45	225	3	0.250	0.230	0.212	1	KC355389
ETG21	F: GTTCTTCCCTTCTCCCTTCT R: TTCTTACTACATCCAGCAGC	(CAT) ₄	48	240	2	0.087	0.232	0.201	0.0216	KC355390

续表 2

位点	引物序列(5'-3')	重复序列	退火温度 (°C)	产物 大小 (bp)	等位基因数 (N_a)	观测杂合度 (H_o)	期望杂合度 (H_e)	多态信息 含量 (PIC)	P 值	GeneBank 登录号
ETG22	F: ACATAACACACGACTTGTCTCTCCT R: CTGCCATACCTTCTTCATCAC	(GAT) ₄	40	109	2	0.250	0.223	0.195	1	KC355391
ETG23	F: AGCCTTACTTCCTTGAATG R: CATAGTCGTTTCTGAGTTTC	(GAT) ₅	56	96	6	0.625	0.754	0.694	0.0764	KC355392
ETG24	F: GTGGCATCTATCTTGGCTCA R: TGGGCTTCTGTGCTTTTGT	(CAA) ₄ ...(ACG) ₄ ...(ACA) ₅	54	232	2	0.167	0.223	0.195	0.2997	KC355393
ETG25	F: ACAAGATTACACAAGAGCC R: CGCAGGTATCGTCATT	(AC) ₆	40	192	3	0.286	0.650	0.563	0.0034	KC355394
ETG26	F: CCTGTATCATTTGTTTGTGAAAAGT R: AATCATCACACATTGACGCTGT	(TG) ₂₂	54	253	5	0.682	0.775	0.720	0.4095	KC355395
ETG27	F: CTTTTGAGTGCCAGACAGA R: CTAACAGTACAAGTGGAACCC	(TTTG) ₅	58	201	2	0.318	0.274	0.232	1	KC355396
ETG28	F: CGTAGCAGAAAAGGTTTATG R: CTCCTTGTCCAGAATCATCC	(AC) ₂₁	60	249	4	0.273	0.748	0.681	0	KC355397
ETG29	F: AAAAGAAAACAAAACACACCG R: CGAATCGTACCAGGACTAATA	(ATAC) ₉	59	194	5	0.542	0.786	0.731	0.0244	KC355398
平均值	—	—	—	—	4.2	0.372	0.554	0.500	—	—

表 3 12 种水产动物 SSR 位点核心序列长度与多态率的关联
Tab.3 Correlation between length of SSR core sequence and polymorphic rate in 12 aquatic animals

物种	SSR 类型	平均核心序列长度	多态率(%)	参考文献
泥蚶(<i>Tegillarca granosa</i>)	G-SSR	61.88	100.00	本文
皱纹盘鲍(<i>Haliotis discus hannai</i>)	G-SSR	60.17	83.33	Sekino <i>et al</i> , 2006
大口鲶(<i>Silurus meriaionalis</i>)	G-SSR	58.97	81.58	全迎春等, 2006
栉孔扇贝(<i>Chlamys farreri</i>)	G-SSR	47.88	92.50	战爱斌等, 2008
大竹蛭(<i>Solen grandis</i>)	G-SSR	44.28	72.00	Yuan <i>et al</i> , 2010
中华金沙鳅(<i>Jinshaia sinensis</i>)	G-SSR	40.47	80.95	段友健等, 2012
栉孔扇贝(<i>C. farreri</i>)	G-SSR	23.86	43.43	张秀英等, 2012
泥蚶(<i>T. granosa</i>)	EST-SSR	23.83	46.77	本文
马氏珠母贝(<i>Pinctada martensii</i>)	EST-SSR	15.90	29.08	石耀华等, 2008
凡纳滨对虾(<i>Litopenaeus vannamei</i>)	EST-SSR	69.59	51.90	王艳红等, 2011
中国对虾(<i>Fenneropenaeus chinensis</i>)	EST-SSR	65.11	50.00	Wang <i>et al</i> , 2005
刺参(<i>Apostichopus japonicus</i>)	EST-SSR	14.74	47.78	Jiang <i>et al</i> , 2011
缢蛭(<i>Sinonovacula constricta</i>)	EST-SSR	14.36	48.28	刘博等, 2012
魁蚶(<i>Scapharca broughtonii</i>)	EST-SSR	19.08	61.00	Li <i>et al</i> , 2012

92.50%(战爱斌等, 2008), 中华金沙鳅(*Jinshaia sinensis*) 为 80.95%(段友健等, 2012)。EST-SSR 位点多态率普遍低于 G-SSR, 如中国对虾 EST-SSR 位点多态率为 50% (Wang *et al*, 2005), 马氏珠母贝为 29.08% (石耀华等, 2008), 缢蛭为 48.28%(刘博等, 2012)。引起微卫星位点多态率差异的原因主要有两点: 一是 SSR 核心序列长度的不同。海洋贝类基因组微卫星开发方法主要是经典法和富集法(李琪, 2006), 通过上述两种方法得到的 G-SSR 核心序列通常在 40bp 以上(表 3)。而 EST-SSR 出现频率会随着重复元件的重复次数的增加而降低, 核心序列长度在 30bp 以下的位点占搜索得到位点的大部分(刘博等, 2012)。张秀英等(2012)通过开发栉孔扇贝 BAC 末端序列文库得到的 G-SSR 位点核心序列平均长度仅有 23.86bp, 相对其它方法开发得到的 G-SSR 位点核心序列长度较短, 其位点多态率也只有 43.43%。二是基因组核苷酸序列与 EST 核苷酸序列保守性不同。有学者为了获得更高多态性的 SSR 位点, 在设计引物时优先选取核心序列较长的位点, 如在开发凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)(王艳红等, 2011)和中国对虾(Wang *et al*, 2005)EST-SSR 的研究中, 选取的 SSR 位点核心序列平均长度在 60bp 以上, 位点多态率在 50%左右(见表 3), 仍远低于 G-SSR 位点多态率。推测限制 EST-SSR 位点多态率的因素是 EST 序列来源于高度保守的编码区, 突变率相对非编码区较低。

G-SSR 的高多态性使其对亲缘关系较近的基因

型具有较高的灵敏度(Gupta *et al*, 2000), 在指纹分析和近缘种鉴定方面更有价值。预判具有较高多态性的 EST-SSR 位点是一个有价值的研究方向。通过 SPSS 的计算, SSR 位点核心序列长度与等位基因数、期望杂合度、PIC 呈极显著正相关, Spearman 相关系数分别为 0.632、0.657、0.664, 为强正相关关系。推测在设计引物时选择 SSR 核心序列较长的 EST 序列可得到较高多态性的位点。

参 考 文 献

- 王艳红, 胡超群, 张吕平等, 2011. 凡纳滨对虾 EST 微卫星标记初步筛选. 水产学报, 35(7): 970—976
- 方建光, 孙慧玲, 匡世焕等, 1999. 泥蚶幼虫滤水率和摄食率的研究. 海洋与湖沼, 30(2): 167—171
- 石耀华, 洪葵, 郭希明等, 2008. 马氏珠母贝 EST 微卫星的筛选. 水产学报, 32(2): 174—181
- 田传远, 梁英, 王如才等, 1996. 泥蚶人工育苗高产技术的研究. 青岛海洋大学学报, 26(1): 25—30
- 全迎春, 孙效文, 刘伟等, 2006. 磁珠富集法制备大口鲶的微卫星分子标记. 水产学报, 30(2): 185—191
- 刘博, 邵艳卿, 滕爽爽等, 2012. 缢蛭(*Sinonovacula constricta*)EST-SSR 分布特征及引物开发利用. 海洋与湖沼, 43(1): 132—137
- 闫喜武, 虞志飞, 秦艳杰等, 2011. 菲律宾蛤仔 EST-SSRs 标记开发及不同地理群体遗传多样性. 生态学报, 31(15): 4190—4198
- 孙慧玲, 方建光, 王清印等, 2000. 泥蚶受精过程的细胞学荧光显微观察. 水产学报, 24(2): 104—107
- 李琪, 2006. 海洋贝类微卫星 DNA 标记的开发及其在遗传学研究中的应用. 中国水产科学, 13(3): 502—509

- 李太武, 李成华, 宋林生等, 2003. 5 个泥蚶群体遗传多样性的 RAPD 分析. 生物多样性, 11(2): 118—124
- 张秀英, 张晓军, 赵 翠等, 2012. 栉孔扇贝 BES-SSR 的开发及遗传多样性分析. 水产学报, 36(6): 815—824
- 战爱斌, 胡景杰, 胡晓丽等, 2008. 富集文库-菌落原位杂交法筛选栉孔扇贝的微卫星标记. 水产学报, 32(3): 353—361
- 段友健, 张富铁, 曹善茂等, 2012. 中华金沙鳅多态性微卫星位点的筛选与特征分析. 水生生物学报, 36(1): 148—151
- 姚韩韩, 董迎辉, 林志华等, 2011. 泥蚶 4 个快速生长家系的遗传变异分析. 水产学报, 35(3): 340—347
- 顾晓英, 曾庆国, 尤仲杰等, 2008. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)6 个微卫星引物的分离和鉴定. 海洋与湖沼, 39(6): 662—664
- 董迎辉, 姚韩韩, 林志华等, 2012. 泥蚶生长性状相关 AFLP 分子标记的筛选. 水产学报, 36(6): 825—831
- Chistiakov D A, Hellemans B, Volckaert F A M, 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255: 1—29
- Dong Y H, Yao H H, Lin Z H *et al*, 2012. Characterization of 62 polymorphic EST-SSR markers in the blood clam (*Tegillarca granosa*) and their cross-amplification in *Scapharca subcrenata*. *Conservation Genet Resour*, 4: 991—997
- Gupta P K, Varshney R K, 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113: 163—185
- Jiang Q, Li Q, Yu H, 2011. Identification and characterization of 43 microsatellite markers derived from expressed sequence tags of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Journal of Ocean University of China (English Edition)*, 10(2): 185—190
- Li M, Zhu L, Zhou C Y *et al*, 2012. Development and characterization of EST-SSR markers from *Scapharca broughtonii* and their transferability in *Scapharca subcrenata* and *Tegillarca granosa*. *Molecules*, 17: 10716—10723
- Liu B, Teng S S, Shao Y Q *et al*, 2012. Isolation and characterization of 39 novel polymorphic EST-SSR loci for the blood clam, *Tegillarca granosa*. *Conservation Genet Resour*, 4: 375—378
- Sekino M, Kobayashi T, Hara M, 2006. Segregation and linkage analysis of 75 novel microsatellite DNA markers in pair crosses of Japanese abalone (*Haliotis discus hannai*) using the 50-tailed primer method. *Marine Biotechnology*, 8: 453—466
- Varshney R K, Graner A, Sorrells M E, 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23(1): 48—55
- Wang H X, Li F H, Xiang J H, 2005. Polymorphic EST-SSR markers and their mode of inheritance in *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*, 249: 107—114
- Yuan Y, Li Q, Kong L F *et al*, 2010. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the grand jackknife clam *Solen grandis* (Bivalvia: Veneroida). *Genes and Genomics*, 32: 191—197
- Zhan A B, Bao Z M, Hu X L *et al*, 2009. Methods comparison for microsatellite marker development: different isolation methods, different yield efficiency. *Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research)*, 8(2): 161—165
- Zhao C, Li Q, 2008. Expressed sequence tag-derived microsatellite markers for the zhikong scallop (*Chlamys farreri*) and their utility in two other scallop species. *Aquaculture Research*, 39: 557—560

DEVELOPMENT AND COMPARATIVE STUDY OF GENOMIC-SSR AND EST-SSR IN *TEGILLARCA GRANOSA*

ZHOU Xiao-Long^{1,2}, ZHU Jing-Hua², DONG Ying-Hui², LIN Zhi-Hua², FU Kai-Li²,
YAO Han-Han², QI Xiao-Yan³

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306; 2. Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources, Zhejiang Wanli University, Ningbo, 315100;
3. College of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, 315211)

Abstract 47 pairs of primer were designed according to flanking sequence from magnetic bead enrichment library, 17 of them show amplification while 17 (100%) were polymorphic, the average number of alleles (N_a), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and polymorphism information content (PIC) were 6.8, 0.468, 0.785, 0.733. 1683 SSRs were detected by screening 11344 ESTs, the average density of SSRs was 1 per 3.86kb of EST. Of 120 pairs of primer designed, 62 pairs amplified expected fragment steadily while 29 (46.77%) were polymorphic after tested in 30 individuals of *Tegillarca granosa*. The average N_a , H_o , H_e , PIC were 4.2, 0.372, 0.554, 0.500. The result of bivariate correlation analysis processed by SPSS showed: there were highly significant positive correlation between the length of SSR core sequence and N_a , H_o , H_e , PIC at the 0.01 level, Spearman correlation coefficient were 0.632, 0.387, 0.657, 0.664, respectively.

Key words *Tegillarca granosa*; genomic-SSR; EST-SSR