

翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*)转录组 EST-SSR 位点的信息分析及其多态性检测*

袁文成¹ 黄鹤忠^{1,2} 李文龙¹ 路瑶¹ 张茂友³ 王荣泉⁴

(1. 苏州大学基础医学与生物科学学院 苏州大学水产研究所 苏州 215123; 2. 江苏省区域现代农业与环境保护协同创新中心 淮安 223300; 3. 苏州市水产技术推广站 苏州 215000; 4. 苏州市长漾生态科技发展有限公司 苏州 215200)

摘要 本研究采用高通量测序技术进行了翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*)转录组学研究,并扩增分析了 EST-SSR 分子标记的多态性,以期保护翘嘴鳊种质资源及良种选育,发掘其功能性 SSR 分子标记。结果表明,在翘嘴鳊转录组测序得到的 51245 条 unigenes 中共检测出 14094 个 EST-SSR 位点,分布于 35285 条 Unigenes 中,出现频率为 27.51%。翘嘴鳊转录组 EST-SSR 位点的序列总长度达到 195086bp, EST-SSR 位点长度分布从 10—25 个碱基不等,平均长度 13bp; 翘嘴鳊转录组 EST-SSR 位点共有 90 种重复单元; 其中,二核苷酸和三核苷酸重复单元是主导类型,分别占总 SSR 的 30.62% 和 14.23%,且 GT/AC、AAG/CCT 分别占总 SSR 的 32.12% 和 6.36%。随机选取 100 对经济性状相关 EST-SSR 引物的扩增产物中有 24.7% 表现为多态性,可作为功能性 SSR 分子标记开发。

关键词 翘嘴鳊; 转录组; EST-SSR 信息; 多态性

中图分类号 S941 doi: 10.11693/ylhz20140900248

翘嘴鳊 (*Siniperca chuatsi*) 隶属于鲈形目 (Perciformes)、暖鲈科 (Percichthidae)、鳊属 (*Siniperca*), 俗称桂鱼、桂花鱼、胖鳊、季花鱼等, 是淡水底栖的肉食性鱼类。它具有体型大、生长快、味道鲜美等特点, 深受国内外消费者喜爱, 有“淡水石斑鱼”之称 (张春光等, 1999), 是我国重要的名贵经济鱼类和养殖对象。近年来, 由于江河过度捕捞、水域生态环境恶化及养殖生产中近亲繁殖等原因, 导致自然种质资源衰退、养殖种质性状退化、鱼类疾病不断爆发等现状, 已影响到翘嘴鳊种质延续及其养殖业的正常发展 (黄志坚, 1999; He *et al.*, 2002)。因此, 迫切需要运用现代生物学手段开展翘嘴鳊种质资源保护和良种选育等方面的研究。

微卫星 DNA, 即简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) 或简单序列长度多态性 (simple sequence length polymorphism, SSLP), 是指由 1—6 个核苷酸

组成的简单串联重复 DNA 序列, SSR 标记主要包括基因组 SSR 和表达序列标签 SSR (EST-SSR)。其中, 基因组 SSR 的种属特异性强、操作复杂、技术难度大, 极大地限制了其发展和应用; 而 EST-SSR 除具有传统基因组来源的 SSR 标记优势以外, 还具有信息量大、保守性好、开发简单等优点, 可以为功能基因提供直接的分子标记, 已被广泛应用于遗传多样性评价、基因定位及分子标记辅助育种 (MAS) 等领域 (Morgante *et al.*, 1993; Powell *et al.*, 1996)。Huang 等 (2013) 从 64 对微卫星引物中筛选出 38 对翘嘴鳊和斑鳊杂交 F₁ 代的多态性微卫星引物并在翘嘴鳊和斑鳊之间进行了跨物种扩增, 但是微卫星位点是随机筛选, 获得的标记数量也相对较少。目前有关翘嘴鳊功能性 EST-SSR 分子标记开发的研究鲜有报道。本课题组运用高通量 Illumina 测序技术获得了翘嘴鳊转录组数据, 开展了大规模转录组 EST-SSR 标记的研

* 江苏省水产三新工程项目, Y2014-37 号; 江苏省区域现代农业与环境保护协同创新项目, 48SKY00 号。袁文成, 硕士研究生, E-mail: 953259481@qq.com

通讯作者: 黄鹤忠, E-mail: suda-shui@163.com, huanghz@suda.edu.cn

收稿日期: 2014-09-16, 收修改稿日期: 2014-10-17

究开发,本文基于转录组数据重点对 EST-SSR 标记的组成、分布、特征及多态性进行了分析和研究,为翘嘴鲈功能性 EST-SSR 分子标记的大量开发提供帮助,从而可弥补当前翘嘴鲈种质保护和良种选育研究中遗传背景较模糊、分子标记数量少的局限性,以推动翘嘴鲈种质资源保护、分子标记辅助育种和水产养殖业的健康发展。

1 材料与方法

1.1 材料来源

翘嘴鲈来自于江苏省海门市养殖场,活体运回实验室,挑选健康的、
、
龄翘嘴鲈各3尾(心、肝、脾、胃、肠、肾、肌肉及脑),无菌水冲洗干净后作为测序材料,随机挑选30尾健康个体作为多态性验证的材料。

1.2 翘嘴鲈转录组数据来源及处理

翘嘴鲈转录组数据由本实验室之前采用 Illumina 高通量测序技术对翘嘴鲈各组织混合样本进行转录组测序获得,总共得到4G的数据。经过序列拼接得到51245条 unigenes,最大的 isogene 为18278bp,最小的为651bp。用软件 SeqPrep (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>)和 condetri_v 2.0.pl (http://code.google.com/p/condetri/downloads/detail?name=condetri_v2.0.pl)进行序列除杂,筛除测序质量较低的序列(测序质量值小于25nt),接头序列,含有N值(未知碱基)较多的序列;低质量值及去接头后小于25nt的小片段。

1.3 翘嘴鲈 SSR 的筛选

利用软件 SSRFINDER (<http://www.maizemap.org/bioinformatics/SSRFINDER/>)对翘嘴鲈转录组中 Unigene 的 cDNA 序列数据进行 SSR 搜索,筛选的标准为:重复单元长度2—6 bp,单核苷酸重复的次数在16次或16次以上,二核苷酸重复的次数在6次或6次以上,三至六核苷酸重复的次数在5次或5次以上。

1.4 引物设计、PCR 扩增及多态性检测

利用 Primer 3.0 总共设计出7335对引物,随机选取100对经济性状相关 EST-SSR 微卫星引物,由上海生工生物技术有限公司合成,用于多态性验证。扩增均采用20 μ L PCR 反应体系,包括2 \times ES TaqMIX 10 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各1 μ L,模板DNA 1 μ L,无菌水补足至20 μ L,然后在PCR仪(TaKaRa)上进行扩增,扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性2min,26个循环(94 $^{\circ}$ C 变性30s,50—60 $^{\circ}$ C 退火30s,72 $^{\circ}$ C 延伸30s),最后72 $^{\circ}$ C 延伸2min。PCR 扩增产物用1%琼脂糖凝胶

电泳检测,特异的扩增产物采用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结合银染法显色进行检测。用 Bio-rad 凝胶自动成像系统拍照,Image lab 软件分析所有电泳图片。

2 结果与分析

2.1 翘嘴鲈转录组中 EST-SSR 的分布及频率

测序组装和转录组拼接后共得到51245条 unigenes,在35285个 unigenes 中共检测到14094个 SSR 位点,这意味着至少68.86%的 unigene 含有一个 SSR 位点,微卫星分布频率和密度分别是27.51%和184 per Mb。在这些微卫星位点中统计其重复类型,如表1所示,翘嘴鲈转录组 EST-SSR 较为丰富,一至六核苷酸重复类型都能看到,但各类型 SSR 出频率不同,主要集中在一至三核苷酸重复类型上,占总 SSR 的98.52%。其中,单核苷酸重复类型数量最多,占总 SSR 的53.67%,其次是二和三核苷酸重复类型,分别占总 SSR 的30.62%和14.23%,四、五和六核苷酸重复类型数量相对较少,分别占1.11%、0.28%和0.09%。所有重复类型中,以重复12次以上的单核苷酸 SSR 最多,占24.61%,其次是10次和6次重复类型的 SSR,分别占22.33%和13.72%,4次重复类型的 SSR 仅有0.34%。

翘嘴鲈转录组 EST-SSR 位点的序列总长度达到195086 bp,SSR 位点长度分布从10—25个碱基不等,平均长度13bp,其中,单核苷酸重复基元、二核苷酸重复基元、三核苷酸重复基元、四核苷酸重复基元、五核苷酸重复基元和六核苷酸重复基元的 SSR 位点的碱基总长度分别是76385、54878、56568、6420、595和240bp,各类型 SSR 位点的平均长度分别是12.4、15.6、14、17.5、20.5和24bp(表1)。

2.2 翘嘴鲈转录组 EST-SSR 的特性

在翘嘴鲈14094个转录组 EST-SSR 位点中,共观察到90种重复基元,其中,一、二、三、四、五及六核苷酸重复基元分别有4、6、19、33、28和10种。二和三核苷酸重复类型及出现频率由表2所示,在二核苷酸重复类型中以 GT/AC 出现次数最多,占二核苷酸 SSRs 的32.12%;其次是 AC/GT,占21.89%,而 CG/CG 的发生频率最低,仅占0.02%(图1);在三核苷酸重复类型中,以 AGG/CCT 出现频率最多,占三核苷酸 SSRs 的6.36%;其次是 AGC/GCT、CCT/AGG、AAG/CTT 和 GCT/AGC 四种类型重复基元,占2.59%—3.59%;其它重复基元类型的出现频率均较低。

表 1 EST-SSRs 在翘嘴鳊转录组中的特征
Tab. 1 Characterization of transcriptome EST-SSRs in *S. chuatsi*

重复类型	数目	各类型比例(%)	频率(%)	平均距离(kb)	总长度(bp)	平均长度(bp)
单核苷酸	6153	53.67	12.10	12.44	76385	12.4
二核苷酸	3511	30.62	6.85	21.79	54878	15.6
三核苷酸	1632	14.23	3.18	46.83	56568	14.0
四核苷酸	127	1.11	0.25	602.59	6420	17.5
五核苷酸	32	0.28	0.06	2391.56	595	20.5
六核苷酸	10	0.09	0.02	7652.98	240	24.0
总计	11465	100.00	22.37	6.67	195086	17.0

单、二、三、四、五、六核苷酸重复类型的 SSR 最小重复次数标准分别为 12、6、5、5、4、4 次

表 2 翘嘴鳊转录组中 EST-SSRs 二碱基和三碱基重复基元的类型及频率
Tab.2 Di- and tri-nucleotide transcriptome EST-SSRs repeat motifs and their frequency in *S. chuatsi*

重复单元类型	重复次数								总计	频率(%)
	5	6	7	8	9	10	11	12		
AC/GT	—	298	193	209	254	149	23	0	1126	21.89
AG/CT	—	141	51	36	31	34	17	1	311	6.05
AT/AT	—	93	55	32	23	23	10	0	236	4.59
CG/CG	—	0	1	0	0	0	0	0	1	0.02
CT/AG	—	89	43	24	14	12	4	0	186	3.62
GT/AC	—	365	264	345	392	252	34	0	1652	32.12
AAC/GTT	29	17	12	2	0	0	0	0	60	1.17
AAG/CTT	50	56	31	1	0	0	0	0	138	2.68
AAT/ATT	41	23	19	1	0	0	0	0	84	1.63
ACC/GGT	14	11	3	2	0	0	0	0	30	0.58
ACG/CGT	6	2	2	0	0	0	0	0	10	0.19
ACT/AGT	5	5	2	1	0	0	0	0	13	0.25
AGC/GCT	80	60	27	0	0	0	0	0	167	3.25
AGG/CCT	156	138	32	1	0	0	0	0	327	6.36
AGT/ACT	7	7	2	0	0	0	0	0	16	0.31
ATC/GAT	36	28	17	0	0	0	0	0	81	1.57
ATT/AAT	37	31	18	1	0	0	0	0	87	1.69
CCG/CGG	8	5	4	1	0	0	0	0	18	0.35
CCT/AGG	97	50	22	0	0	0	0	0	169	3.29
CGG/CGG	6	6	1	1	0	0	0	0	14	0.27
CTT/AAG	40	15	14	1	0	0	0	0	70	1.36
GAT/ATC	44	31	14	1	0	0	0	0	90	1.75
GCT/AGC	59	58	16	0	0	0	0	0	133	2.59
GGT/ACC	30	17	6	0	0	0	0	0	53	1.03
GTT/AAC	34	20	18	0	0	0	0	0	72	1.4
总计	779	1566	867	659	714	470	88	1		
频率(%)	15.14	30.44	16.85	12.81	13.88	9.14	1.71	0.02		

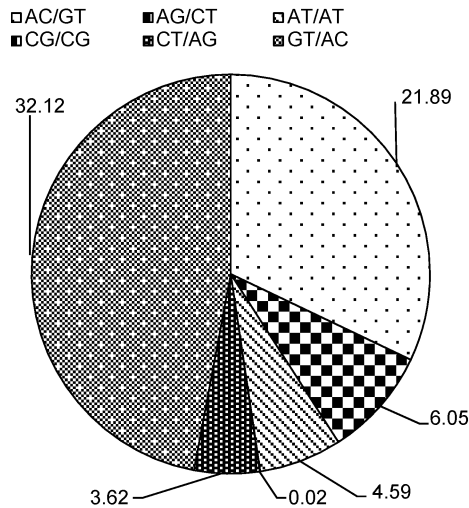


图1 翘嘴鲮转录组二核苷酸 SSRs 不同重复基元的百分比
Fig.1 Percentage of different motifs of transcriptome dinucleotide SSRs in *S. chuatsi*

从翘嘴鲮转录组 EST-SSRs 位点的重复次数看,重复基元以重复 4 次和 10 次的频率较高,分别有 2665 和 2559 个,占总 SSR 的 18.91%和 18.16%;其次为 5、6、7、8、11 和 12 次重复,出现频率均在 659—1566 个之间。统计表明,4—10 次重复的 SSR 位点有 9943 个,占总 SSR 的 71%; 11—15 次重复的位点有 3194 个,占 23%; 16—20 次重复的位点有 809 个,占 6%; 重复 20 次以上的位点有 147 个,仅占总 SSR 的 1% (图 2)。

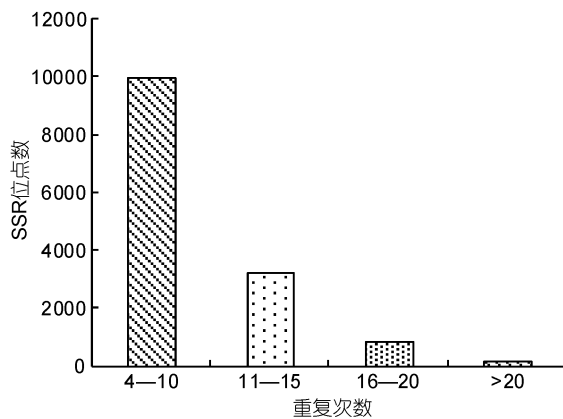


图2 翘嘴鲮转录组 EST-SSRs 重复次数分布
Fig.2 Distribution of the repeats frequency of transcriptome EST-SSRs in *S. chuatsi*

2.3 翘嘴鲮转录组 EST-SSR 的可用性评价

SSR 分子标记的多态性是判断其可用性的主要依据,根据 Temnykh 等(2001)的研究,SSR 的长度是影响其多态性高低的重要因素,当 SSR 长度大于或

等于 20bp 时多态性较高,长度在 12—20bp 之间的 SSR 多态性中等,而长度在 12bp 以下时多态性潜能极低。本研究在翘嘴鲮转录组 EST-SSR 筛选过程中已将 12bp 以下的 SSR 除去,因此获得的翘嘴鲮转录组 EST-SSR 长度主要集中在 12—45bp 范围内,其中长度在 12—20bp 的 SSR 有 9478 条,占 SSR 总数的 67.25%,这类 SSR 具有中等多态性;而长度在 20bp 以上的 SSR 有 1290 条,占 SSR 总数的 9.15%,此类 SSR 具有较高多态性。此外,在翘嘴鲮转录组数据统计中发现,大多数都是低级基元 SSR,例如,二、三核苷酸有 5143 个,占总 SSR 的 44.85%。Dreisigacker 等(2004)发现,低级基元的 SSR 多态性普遍比高级基元的高。由此可预见翘嘴鲮转录组具有较高的多态性潜能,在基因功能研究开发方面具有较高的利用价值。

2.4 翘嘴鲮转录组 EST-SSR 引物扩增产物的多态性检测

随机从与经济性状相关的 EST-SSR 中选取 100 对引物,EST-SSR 位点包括 2—6 核苷酸重复单元,以随机挑选的 30 尾健康翘嘴鲮基因组 DNA 为模板分别对引物进行扩增并检测多态性。结果表明,共有 81 对引物成功获得扩增产物,扩增效率为 81%,其中有 22 对引物扩增片段与预期产物片段大小不符。在 100 个微卫星座位中,以二碱基、三碱基重复类型的扩增成功率较高。在 81 个微卫星座位中共有 20 个座位表现出多态性(表 3),多态性比率为 24.7%,61 个座位表现为单态。20 对多态性引物所在微卫星位点中,有 8 个为二碱基重复,其余为三碱基和四碱基重复。

3 讨论

转录组 EST-SSR 分子序列大多数与已知和未知的功能基因连锁,在生物进化中起到编码氨基酸和蛋白质的重要作用(张琼等,2010)。本研究结果显示,翘嘴鲮转录组 EST-SSR 位点的分布频率达 27.51%,大于灯盏花(6.99%)(陈茵等,2014)、野三七(16.82%)(李翠婷等,2014)、鲫鱼(8.13%)(杨曦,2012)及中华鳖(22.3%)(Wang *et al.*,2013),说明翘嘴鲮转录组 EST-SSR 数量很丰富。本研究发现,翘嘴鲮转录组 EST-SSRs 中双碱基所占比例最大,重复序列以 (AC) n /(GT) n 为主,占总二核苷酸重复类型的 32.12%。李偲等(2011)对草鱼头肾组织 EST 序列的研究中发现,二核苷酸重复位点最多,且 AC/GT 占其中的 50.3%;Wang 等(2007)利用公共 EST 数据库进行

表 3 20 对多态性 EST-SSRs 引物的序列及重复类型
Tab.3 Sequence and repeat types of 20 polymorphic EST-SSRs primers

引物编号	SSR 类型	引物序列(5'—3')	退火温度(°C)	产物大小(bp)
comp5150	(AC) ₉	F: CTGCACATGGCCAAGACTG R: TACCTGTGTGCCCTTGGC	56	217
comp12350	(GGTT) ₅	F: GTCGGGTCAGGCATTAGC R: ACACCACCTGCCAGACTTC	57	242
comp15209	(GT) ₇	F: TTGACCCACCAGAGCAAGG R: TCAGACAACCCTGTGCGAGC	57	341
comp10127	(GT) ₉	F: GCTGGTGCAGGTGGATTTC R: GTGGGTGAGAAGCTTTGCC	57	377
comp5528	(GT) ₇	F: TGTCACCTGCGACCATCCTC R: CGATAACCGGTAGCCCTC	60	383
comp43527	(GCT) ₅	F: GGGCTGTGATGGTTTGACG R: AGTATCAACCACCGAGGCG	57	162
comp14847	(GT) ₈	F: TGATGGAGTGCACAGTCAAG R: CTTGTCATTGGCGCTGAGG	56	354
comp18691	(GCT) ₆	F: GACGAGTCAGTGCACAAC R: CTTTGCCTCTCCTGGCTG	57	177
comp9810	(GT) ₉	F: CTCGGGAGGCTTCTGGAC R: TCCGTTTGTGCCAACCATC	56	384
comp19016	(GT) ₈	F: TCTTGTCTGCCGGTGAGC R: GTGCTTGCAGACATACTCC	56	427
comp13273	(CCG) ₇	F: TGTCTCTGGTGGCGCATC R: TTTGTTGCCAGGGTTCTG	61	397
comp4381	(CCT) ₅	F: CAAGAACATCACCCGGCAG R: AGTGAACACCAGGTCGGAG	52	375
comp32533	(AC) ₈	F: GCGAAGGTGGATCATTGCC R: TCTCGACCCTGAGTCTTGC	56	184
comp15663	(AAT) ₆	F: ATGTTGCGACCTGTTGCTC R: CATCATGCTTTGCACACCG	60	403
comp18332	(GGT) ₄	F: ATGGTGAAGTGGAGCTGGC R: AGTGGACTGTGCCATGCAG	56	449
comp17186	(GCT) ₇	F: ACTGCCAGCTGTCTTCAGG R: AGGCTGGCTATCAGCTTCC	50	299
comp10121	(CTT) ₅	F: CACTTTGTACCTCGGCTG R: CAGTACGTGGAGACCTCGG	50	182
comp106301	(GAT) ₅	F: CCGCATCAAGAAGTTCCGC R: CCATTCTGTGAACCAGTGGAG	48	217
comp121213	(GCT) ₄	F: AGTTGACAGGGCCTTTGGG R: CTCAGGAACCTCAACTGCG	55	352
comp9836	(AGC) ₄	F: AATGGCTGATCCGAGTCCC R: GGCTCCACTCAGCTGTGC	55	295

草鱼新型 EST-SSR 分子标记的开发中发现(AC)_n/(GT)_n 的数量最多,占双碱基重复类型的 60.19%;宋春妮等(2011)研究发现两碱基重复类型(AC)_n 在日本鳊(*Charybdis japonica*)基因组中含量也非常丰富。以上这些相似研究结果的原因有待进一步研究。

大多数鱼类的 EST-SSRs 以二核苷酸和三核苷酸重复类型为主。本研究结果表明,翘嘴鳊转录组 EST-SSR 重复基元以二核苷酸重复为主,其次是三核苷酸重复,分别占 SSR 总数的 30.62%和 14.23%,这与朱滔等(2013)在翘嘴鳊 EST-SSR 研究中的优势重复类型以二核苷酸为主、三核苷酸其次的结果相似,也与团头鲂(曾聪等,2013)的研究结果相似,但各物种的重复基元有所差异,存在种属特异性。本研究结果显示,翘嘴鳊转录组 EST-SSR 双碱基重复类型中仅有一个(CG)_n。已有报道显示,在团头鲂(曾聪等,2013)中(CG)_n 只占总 SSR 的 0.55%,斑海豹(Gao *et al.*, 2013)为 0.2%,在日本沼虾(Jin *et al.*, 2013)中未发现。而在拟南芥、杏树、桃树(Jung *et al.*, 2005)、水稻、大豆(Gao *et al.*, 2003)等植物中均未发现(CG)_n 重复基元,这种情况是否与生物进化有关,有待进一步研究。本研究中未发现(GA)_n 双碱基重复类型,与匡刚桥等(2007)用 FIASCO 筛选的、基于翘嘴鳊 DNA 微卫星标记中(GA)_n 双碱基重复类型约占 13%的研究结果有很大不同,这可能是由于本研究是基于翘嘴鳊转录组 EST-SSR 序列,最终导致了碱基重复基序偏倚性的假象。

本研究中,翘嘴鳊转录组 EST-SSR 多态性比率为 24.7%,较之于野生型灯盏花(52.78%)(陈茵等,2014)、野生型斑海豹(70%)(Gao *et al.*, 2013)等的研究结果有所偏低。推测可能的原因主要有以下两方面:首先,用于多态性验证的 30 尾翘嘴鳊是经过人工选育的养殖群体;其次,实验选取的 100 个位点都来自于生长、发育、增殖和免疫等经济性状的基因。因而导致等位基因数量及遗传多样性有所降低,符合遗传规律。今后还需要对野生翘嘴鳊群体进行研究,以便挖掘更多经济性状的 EST-SSR 多态性基因位点。刘瑞成等(2013)利用磁珠富集法获得宽口光唇鱼的 495 个阳性克隆中,只有 163 个克隆含有微卫星位点,经过 PCR 扩增,仅有 11.4%的多态性位点,较本研究获得的多态性位点比率低,且这些位点的基因功能尚不得而知。因此,采用转录组测序技术来开发与经济性状相关的多态性微卫星标记具有简便、快捷和高效的优势。

综上所述,翘嘴鳊转录组 EST-SSR 不但出现频率高,而且类型丰富;从多态性潜能的角度考虑,这些 SSR 标记具有较高的可用性。因此,本研究结果可为进一步开发新的翘嘴鳊功能基因 EST-SSR 标记奠定基础,对加速翘嘴鳊的资源开发利用,丰富功能基因分子标记类型和遗传资源评价,实现分子标记辅助育种和进行比较基因组学研究都具有重要的意义。

参 考 文 献

- 匡刚桥,刘臻,鲁双庆等,2007. FIASCO 法筛选鳊鱼微卫星标记. 中国水产科学, 14(4): 608—614
- 朱滔,梁旭方,彭敏燕等,2013. 翘嘴鳊 EST-SSR 标记的开发及 3 个群体遗传多态性分析. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 34(3): 347—352
- 刘瑞成,张富铁,但胜国等,2013. 宽口光唇鱼微卫星位点的筛选与特征分析. 四川动物, 32(2): 161—166
- 李偲,刘航,黄容等,2011. 草鱼型微卫星标记的发掘及其多态性检测. 水生生物学报, 35(4): 681—687
- 李翠婷,张广辉,马春花等,2014. 野三七转录组中 SSR 位点信息分析及其多态性研究. 中草药, 45(10): 1468—1472
- 杨曦,2012. 鲫鱼(*Carassius auratus*)表达序列标签资源的 SSR 构成与分布分析. 生物技术通报, 11: 140—143
- 宋春妮,李健,刘萍等,2011. 日本鳊微卫星富集文库的建立与多态性标记的筛选. 水产学报, 35(1): 35—42
- 张琼,刘小林,李喜莲等,2010. EST-SSR 分子标记在水生动物遗传研究中的应用. 水产科学, 29(5): 302—306
- 张春光,赵亚辉,1999. 我国鳊资源现状及其恢复和合理利用的途径. 生物学通报, 34(12): 9—11
- 陈茵,李翠婷,姜倪皓等,2014. 灯盏花转录组中 SSR 位点信息分析及其多态性研究. 中国中医药杂志, 39(7): 1220—1224
- 黄志坚,何建国,1999. 鳊鱼疾病的研究概况. 水产科技情报, 26(6): 268—271
- 曾聪,高泽霞,罗伟等,2013. 基于 454 GS FLX 高通量测序的团头鲂 ESTs 中微卫星特征分析. 水生生物学报, 37(5): 982—988
- Dreisigacker S, Zhang P, Warburton M L *et al.*, 2004. SSR and pedigree analyses of genetic diversity among CIMMYT wheat lines targeted to different mega environments. Crop Science, 44(2): 381—388
- Gao L, Tang J, Li H *et al.*, 2003. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. Molecular Breeding, 12(3): 245—261
- Gao X, Han J, Lu Z *et al.*, 2013. De novo assembly and characterization of spotted seal *Phoca largha* transcriptome using Illumina paired-end sequencing. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 8(2): 103—110
- He J G, Zeng K, Weng S P *et al.*, 2002. Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious

- spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Aquaculture*, 204(1): 11—24
- Huang W, Liang X, Qu C *et al*, 2013. Development and characterization of novel polymorphic microsatellite loci in *Siniperca scherzeri* Steindachner and *Siniperca chuatsi* (Basilewsky). *Molecular Biology Reports*, 40(2): 751—756
- Jin S, Fu H, Zhou Q *et al*, 2013. Transcriptome analysis of androgenic gland for discovery of novel genes from the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*, using Illumina Hiseq 2000. *PLoS One*, 8(10): e76840
- Jung S, Abbott A, Jesudurai C *et al*, 2005. Frequency, type, distribution and annotation of simple sequence repeats in Rosaceae ESTs. *Functional & Integrative Genomics*, 5(3): 136—143
- Morgante M, Olivieri A M, 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3(1): 175—182
- Powell W, Machray G C, Provan J, 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1(7): 215—222
- Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A *et al*, 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Research*, 11(8): 1441—1452
- Wang D, Liao X, Cheng L *et al*, 2007. Development of novel EST-SSR markers in common carp by data mining from public EST sequences. *Aquaculture*, 271(1): 558—574
- Wang W, Li C, Ge C *et al*, 2013. De-novo characterization of the soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis* transcriptome using Illumina RNA-Seq technology. *Journal of Zhejiang University Science B*, 14(1): 58—67

ANALYSIS OF EST-SSRs INFORMATION IN *SINIPERCA CHUATSI* TRANSCRIPTOME AND DETECTION OF POLYMORPHISM

YUAN Wen-Cheng¹, HUANG He-Zhong^{1,2}, LI Wen-Long¹, LU Yao¹,
ZHANG Mao-You³, WANG Rong-Quan⁴

(1. School of Medicine and Life Sciences, Medical College of Soochow University, Fisheries Research Institute of Soochow University, Suzhou 215123, China; 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Regional Modern Agriculture & Environmental Protection, Huaian 223300, China; 3. Aquaculture Technology Guide Station of Suzhou City, Jiangsu Province, Suzhou 215000, China; 4. Chang-Yang Ecological Technology Development Limited Company of Suzhou City, Jiangsu Province, Suzhou 215200, China)

Abstract To protect the germplasm resources of fish *Siniperca chuatsi*, we studied the transcriptome functional SSR molecular makers in high-throughput sequencing technology and detected the polymorphism of EST-SSR molecular makers. Result shows that 14094 EST-SSRs distributed in 35285 unigenes were detected, which is 27.51% of all 51245 unigenes. The total length of *S. chuatsi* transcriptome EST-SSRs was 195086bp, the length distribution of transcriptome EST-SSRs was from 10—25bp and the average length was 13bp. There were 90 types of repeat motifs in the transcriptome EST-SSRs, in which dinucleotide and trinucleotide repeats were two main types for taking 30.62% and 14.23% of all the SSR repeat motifs, respectively. The most abundant di- and tri-motifs were GT/AC and AAG/CCT, occupying 32.12% and 6.36% of all the SSR repeat motifs, respectively. Of 100 EST-SSR microsatellite primers of economic characters that randomly selected, 24.7% were polymorphism primers that could be developed as functional molecular makers of SSR.

Key words *Siniperca chuatsi*; transcriptome; EST-SSR information; polymorphism