许氏平鲉(*Sebastes schlegelii*)EST-SSR 标记开发及通用性检测*

薛 蕊[1, 2] 马海涛[2] 韩承慧[1, 2] 王 斐[2] 孙国华[2] 姜海滨[2①]

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;
2. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006)

摘要 利用已发表的 EST 序列设计引物并结合 PCR 筛选的方法, 对许氏平鲉多态 EST-SSR 引物进行了开发。结果表明: (1) 许氏平鲉 EST-SSR 位点发现率为 9.14%, 核心序列以二碱基重复出现频率最高, 占到 33.03%, 其中以 TG/CA 基序最为丰富。(2) 共设计引物 56 对, 46 对实现有效扩增, 其中 18 对具有多态性。(3) 野生群体遗传多样性分析显示, 每个位点观测等位基因数(N_a)为 2—9, 平均观测等位基因数为 3.89; 观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)及平均值分别是 0.0333—0.8000、0.0333—0.7927 和 0.3037、0.3757; 每个位点的多态信息含量(PIC)在 0.0323—0.7522 之间, 其中高度多态位点 5 个, 中度多态位点 5 个; 经 Bonferroni 校正后, 3 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 但两两位点间不存在连锁不平衡现象。(4) 许氏平鲉多态 EST-SSR 引物对朝鲜平鲉、褐菖鲉通用性检测结果表明, 引物对二者的通用率和多态率分别为 88.89%、100.00%和 33.33%、88.89%。研究表明, 这些通用引物可用于相关物种的遗传多样性评价、系统进化分析和比较基因组作图等研究。

关键词 许氏平鲉; 表达序列标签; 微卫星标记; 通用性
中图分类号 S965 doi: 10.11693/hyhz20141000284

微卫星标记是以 2—6 个核苷酸单位组成的串联重复序列, 存在于绝大多数真核生物基因组中, 因此又称简单序列重复(Simple sequence repeats, SSRs)和短串联重复(Simple tandem repeats, STRs)(Tautz *et al*, 1984)。它由核心序列和侧翼序列两部分构成, 核心序列高度多态, 而侧翼序列则一般高度保守。相较于以往的分子标记, 微卫星标记具有数量丰富、操作简便、重复性好、共显性遗传等优点(Schug *et al*, 1998), 因此已成为水产动物种群遗传多样性分析、亲缘关系鉴定和遗传图谱构建等方面的有效工具(Chistiakov *et al*, 2006)。

EST(Expressed Sequence Tag)即表达序列标签, 是一段通过单向测序得到的 200—250 bp 核苷酸序列(侯战辉等, 2008)。由于来源于 cDNA 文库, 因此 EST 是功能基因的一部分, 可以对其进行基因注释(邱樱, 2013)。EST-SSR 即存在于 EST 序列上的微卫星标记, 与传统的基因组微卫星标记(Genomic-SSR)相比, EST-SSR 标记开发成本低, 可以节省大量的人力物力, 并且在不同物种间具有一定的通用性(易少奎等, 2013; 董迎辉等, 2013), 因此已经成为新型高效的开发 SSR 途径。

许氏平鲉(*Sebastes schlegelii*)又称黑鲩, 俗称黑寨、黑老婆等, 是分布在西北太平洋近岸的温水性岩礁栖息鱼种, 广泛存在于黄海、渤海近海海域, 为卵胎生鱼类。由于其肉质鲜美、营养丰富, 而且生长较为迅速, 已成为我国北方深水网箱养殖的重要经济鱼种。进行许氏平鲉的良种选育, 既可保护自然资源, 又可提高养殖效率, 意义重大, 而开发具有良好多态

*山东省良种工程项目“优质抗病速生鱼类良种选育”, 2005—2015; 现代农业产业技术体系项目, nycytx-50 号; 烟台市科技发展计划, 2013ZH088 号; 山东省农业良种项目“水产经济生物种质资源收集保护与评价”。薛蕊, E-mail: xuerui198989@126.com
① 通讯作者: 姜海滨, 研究员, E-mail: haibinjiang326@163.com
收稿日期: 2014-10-23, 收修改稿日期: 2015-03-12

性的微卫星标记是进行遗传育种的基础。已有研究者采用传统方法开发了一些许氏平鲉 Genomic-SSR 标记(Yoshida *et al*, 2005; An *et al,* 2009; Bai *et al*, 2011; Yasuike *et al*, 2013), 但对 EST-SSR 标记的开发未见报道。本研究首次利用已发表的许氏平鲉 EST 序列进行 EST-SSR 标记开发, 分析了与 Genomic-SSR 标记的差异, 并检测了其在近缘种朝鲜平鲉(*Sebastes koreanus*)、褐菖鲉(*Sebastiscus marmoratus*)的通用性, 以期为许氏平鲉良种选育提供条件。

1　材料与方法

1.1　样品采集及 DNA 提取

许氏平鲉野生群体样品 30 个取自长岛附近海区, 朝鲜平鲉 样品 8 个取自大连, 褐菖鲉样品 8 个取自威海乳山。尾鳍和肌肉样品暂存放在 70%乙醇中, 带回实验室后于–20°C 冰箱保存。采用传统酚/氯仿/异戊醇法抽提基因组 DNA, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性、NanoDrop2000 紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度。DNA 样品保存于–20°C 冰箱中, 实验前进行稀释, 终浓度为 50ng/μL。

1.2　EST 序列获取及分析

从 NCBI 公共数据库(http: //www.ncbi.nlm.nil.gov/sites/entrez)下载许氏平鲉 EST 序列(检索词为 *Sebastes schlegelii*)。对序列进行拼接后利用 SSR Hunter 1.3 软件查找微卫星序列, 查找条件为: 二碱基重复 5 次以上(含 5 次); 三碱基重复 4 次以上(含 4 次); 四碱基、五碱基和六碱基重复均在 3 次以上(含 3 次)。

1.3　EST-SSR 引物设计

用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。引物长度控制在 18—22bp; GC 含量控制在 40%—60%, 正反引物相差不超过 10%; Tm 值控制在 40—60°C, 正反引物相差不超 10°C; 产物长度控制在 100—500bp。设计好的引物送生工生物(上海)有限公司合成。

1.4　EST-SSR 引物筛选与优化

实验在 Eppendorf 普通梯度 PCR 仪中进行。第一步用 3 个 DNA 样品混合进行初步筛选, 选出能够稳定扩增目的条带的 EST-SSR 引物; 第二步对扩增效果不理想的引物进行梯度优化。实验用酶为 TIANGEN Taq DNA Polymerase ET101-02-04, 25μL 反应体系如下: 2μL DNA 模板(50ng/μL), 2.5μL 10×buffer, 引物各 1μL (50μmol/L), 0.5μL dNTP (10mmol/L), 0.2μL Taq DNA 聚合酶(5U/μL), 剩余体积以灭菌水补齐。PCR 程序设为: 94°C 预变性 5min, 接着进行 30 个循环: 94°C 变性 45s, 退火 45s, 72°C 延伸 1min, 循环结束后 72°C 延伸 10min。扩增产物进行 8%(*W*/*V*)非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染染色, 并用扫描仪拍照。

1.5　野生群体多态性检测

筛选出的 EST-SSR 引物进行野生群体 PCR 扩增, 反应体系和扩增程序同引物筛选部分, 不同引物的退火温度参见表 1。扩增产物进行 8% (*W*/*V*)非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染染色、扫描仪拍照。

1.6　多态性微卫星引物通用性检测

用多态性微卫星引物对朝鲜平鲉和褐菖鲉 DNA 样品进行 PCR 扩增, 反应体系和扩增程序同引物筛选部分, 不同引物的退火温度参见表 1。扩增产物进行 8% (*W*/*V*)非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染染色, 扫描仪拍照。

1.7　数据统计

统计各 SSR 位点 DNA 带型, 估算条带分子量大小, 统计结果输入 POPGENE 32 (Yeh *et al,* 1999)计算每个位点的等位基因数(N_a)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和香农多样性指数(I)。用软件 CERVUS 3.0 (Marshall *et al*, 1998)计算多态信息含量(Polymorphic information content, PIC)。GENEPOP v.4.1.4(Rousset, 2008)检验 Hardy-Weinberg 平衡和连锁不平衡情况。另外统计 18 对多态 EST-SSR 引物对朝鲜平鲉和褐菖鲉个体的通用率和多态率, 分析各位点通用性情况。

2　结果与分析

2.1　许氏平鲉 EST 序列中 SSR 位点种类、数量及出现频率

从 NCBI 公共数据库下载的 1980 条 EST 序列经拼接、SSR 位点查找后, 发现 181 条 EST 序列含有 SSR 位点, 共计 224 个, EST-SSR 位点的发现率为 9.14%, 平均每条 EST 序列上有 SSR 位点 1.24 个。其中, 含有一个 EST-SSR 位点的 144 条, 两个 EST-SSR 位点的 33 条, 三个及三个以上 EST-SSR 位点的 4 条。依据 Weber(1990)提出的分类方法, 所有 EST-SSR 位点中完美型比例占到 91.52%, 二到六碱基重复均有出现, 位点个数分别为 109、88、4、2 和 2, 分别对应百分比 53.17%、42.93%、1.95%、0.98%以及 0.98%。其中, 二碱基重复出现频率最高, 分为 10 种重复类型, 以 TG/CA 基序最多, 占 33.03%, 占总完美型位点的 17.56%; 三碱基重复有 23 类, 以 CAG/CTG 出

表 1 18 对许氏平鲉 EST-SSR 引物特征

Tab.1 Characteristics of 18 pairs of EST-SSR primers for *S. schlegelii*

位点名称	重复基元	引物序列(5'—3')	退火温度(°C)	片段长度(bp)
HJ126	$(TG)_5$	F: GCGTTCACTATTTGGGTT R: GTCACGTTTTCAAGTTTGG	60	258
HJ157	$(AAT)_4$	F: AGGGCAAATGCGTTGATA R: TTGAGCCACTTGGGAACT	60	151
HJ306	$(AT)_5$	F: GAGTCACTGGCAAAGAATT R: TTAGCACCAAACAGGGAGA	60	256
HJ606	$(GCT)_4$	F: TCACTGTGGAGCCTTTCTG R: CTCGGACTCTTCCTTCTTCT	50	197
HJ4118	$(AC)_5$	F: AGAGTGAGCCGTTTATGTC R: GAGCCAGTAGTTGTAAGAGTAG	66	259
HJ4136	$(TG)_5$	F: AGGGATATGAACAGGAGGAG R: TGGTAACTGCCAATGATGAC	50	212
HJ4137	$(TG)_{14}$	F: TGTTGTTGCCTGTTCGTC R: CAGCAGCTCATATTGGTAGA	60	192
HJ4164	$(GT)_8$	F: CCTCGCTATGGCATACAC R: GAGGGCTGTTCCTAATGT	60	261
HJ4183	$(AC)_{11}AT(AC)_5$	F: CACCGTTTACACTCCATTA R: CATACACCGGACATACTCA	60	442
HJ4202	$(TTC)_8$	F: AATGTTGCTGATGGGAGA R: GAGTTATGAGCCAATCCA	50	263
HJ4203	$(ATG)_4$	F: TGGTGAACAATCAGCCAATG R: CTGCCACAAATCACATCCAA	60	167
HJ4215	$(TA)_5$	F: GCCAGGGACCATTACCAT R: GCATCCAAATCCACCACA	60	188
HJ4249	$(GT)_6$	F: ACGATTTCCAACCCATTAG R: CTCCTTCCTTCCCATTTCT	50	201
HJ4286	$(AT)_6$	F: GTCAAGGGATAGTAGGTAGAG R: GCACGAGGAAGATTTTAG	50	251
HJ4930	$(TTA)_{14}…(TTC)_4$	F: CAAAGCAGTGGGCAGGGA R: TGGCGAGGTGGAGCAATC	60	266
HJ4944	$(AT)_{11}…(AT)_5G(TA)_6$	F: AAGTAGTGTCACAAGGTAAGAG R: AGAACAGGCTTCAAGGTC	56	155
HJ4959	$(CA)_{12}$	F: CAAAGCCTTTCAGCATCT R: GGTTGTCAAACGAATCAC	60	298
HJ9578	$(AT)_5$	F: AACGGGCATAGAAAAGTAG R: GTGAAAAGATTCCAGGGAT	60	145

F 表示正向引物(Forward Primer); R 表示反向引物(Reverse Primer)

现频率最高，为 12.50%，四到六碱基所有重复类型皆出现一次。

2.2 引物筛选和多态性检测结果

对查找到的 224 个 EST-SSR 位点进行进一步分析，挑选出部分适合设计引物的位点，共设计引物 56 对，筛选后共计 46 对引物能够进行有效扩增，野生群体多态性检测结果显示，其中 18 个位点具有多态性(表 1)，位点 HJ4137 的电泳图见图 1。

2.3 EST-SSR 位点在野生群体中的多态性评价

所有位点共检测出 70 个等位基因，每个位点观测等位基因数为 2—9，平均观测等位基因数为 3.89。观测杂合度(H_o)在 0.0333—0.8000 之间，平均

观测杂合度为 0.3037; 期望杂合度(H_e)在 0.0333—0.7927 之间, 平均期望杂合度为 0.3757; 香农指数(I)在 0.0848—1.7819 之间, 平均香农指数为 0.7416; 每个位点的多态信息含量(PIC)在 0.0323—0.7522 之间, 平均多态信息含量为 0.3419, 其中高度多态(PIC>0.5)位点 5 个, 中度多态(0.25<PIC<0.5)位点 4 个, 中高度多态位点比例为 50.00%。经 Bonferroni 校正后, 仍有 3 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡(P<0.0028), 但两两位点间不存在连锁不平衡现象(表 2)。

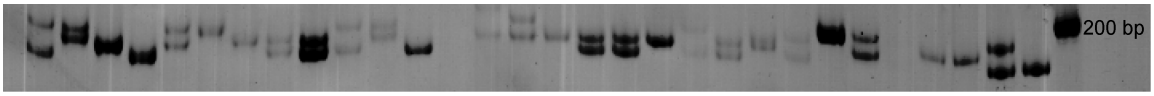

图 1　位点 HJ4137 的 PCR 扩增结果
Fig.1　The result of PCR amplification of locus HJ4137

表 2　18 个许氏平鲉 EST-SSR 位点的遗传多样性参数
Tab.2　Genetic diversity parameters of 18 EST-SSR loci for *S. schlegelii*

位点	等位基因数 N_a	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	P 值	多态信息含量 PIC	香浓指数 I
HJ126	2	0.0667	0.0655	1.0000	0.0623	0.1461
HJ157	3	0.0667	0.1288	0.0314	0.1227	0.2911
HJ306	2	0.2000	0.1831	1.0000	0.1638	0.3251
HJ606	3	0.3667	0.3102	0.6349	0.2676	0.5323
HJ4118	2	0.1667	0.2593	0.1036	0.2225	0.4227
HJ4136	4	0.4000	0.5497	0.0123	0.4405	0.8816
HJ4137	9	0.5667	0.7927	0.0058	0.7522	1.7819
HJ4164	5	0.5000	0.5836	0.0232	0.5378	1.1474
HJ4183	4	0.1667	0.2458	0.0500	0.2309	0.5226
HJ4202	4	0.6333	0.6537	0.4088	0.5979	1.2030
HJ4203	2	0.0667	0.0655	1.0000	0.0623	0.1461
HJ4215	2	0.0333	0.0333	1.0000	0.0323	0.0848
HJ4249	2	0.3333	0.2825	0.5626	0.2392	0.4506
HJ4286	2	0.0333	0.0333	1.0000	0.0323	0.0848
HJ4930	5	0.4000	0.4927	0.0753	0.4590	1.0041
HJ4944	8	0.3667	0.7814	0.0000*	0.7457	1.7647
HJ4959	7	0.8000	0.7921	0.0023*	0.7483	1.6790
HJ9578	4	0.3000	0.5102	0.0005*	0.4370	0.8813
平均	3.89	0.3037	0.3757	0.3069	0.3419	0.7416

*表示显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡位点(经 Bonferroni 校正后 P<0.0028 表示显著偏离)

2.4　许氏平鲉多态性微卫星引物的通用性检测

在朝鲜平鲉中除位点 HJ606 和 HJ4183 其余位点均能有效扩增, 其中 6 个位点多态; 在褐菖鲉中所有位点均能有效扩增, 除位点 HJ4215 和 HJ4286 单态外其余位点均为多态。18 个位点在朝鲜平鲉和褐菖鲉中的通用率分别是 88.89%和 100%, 多态率为 33.33%和 88.89%。其中, 位点 HJ4215 和 HJ4286 在许氏平鲉中显示多态而在朝鲜平鲉、褐菖鲉个体中为单态; 位点 HJ4136、HJ4202 以及 HJ4959 对许氏平鲉、褐菖鲉显示多态而在朝鲜平鲉中为单态; 位点 HJ606 和 HJ4183 对许氏平鲉、褐菖鲉显示多态而在朝鲜平鲉中不能有效扩增; 位点 HJ126、HJ4203 以及 HJ4249 对许氏平鲉、褐菖鲉显示多态, 且对褐菖鲉多态性更高; 位点 HJ4137、HJ4930、HJ4944 以及 HJ9578 在三个物种中均具有较高多态性, 且在许氏平鲉中多态性最高(表 3)。位点 HJ4136 在朝鲜平鲉、褐菖鲉和许氏平鲉中的多态性检测结果见图 2。

3　讨论

到目前为止, NCBI 公共数据库中许氏平鲉 EST 序列共 1980 条, 相比研究较早的水生生物来说数目较少。本研究中许氏平鲉 EST-SSR 位点发现率为

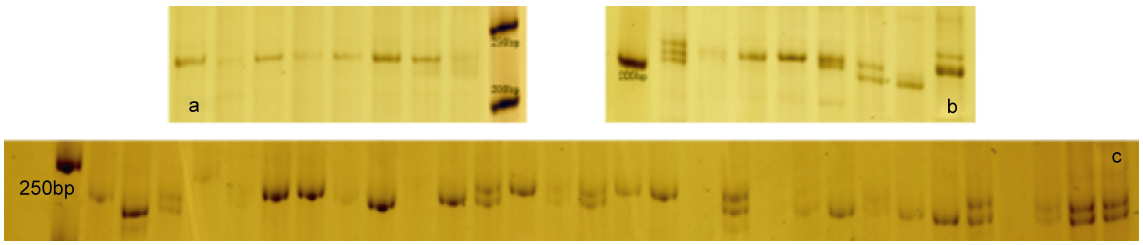

图 2 位点 HJ4136 在朝鲜平鲉和褐菖鲉以及许氏平鲉中的检测结果

Fig.2 The results of transferability of locus HJ4136 in *Sebastes koreanus*, *Sebastiscus marmoratus* and *Sebastes schlegelii*

a: 位点 HJ4136 在朝鲜平鲉中的通用性检测结果; b: 位点 HJ4136 在褐菖鲉中的通用性检测结果; c: 位点 HJ4136 在许氏平鲉中多态性检测结果

表 3 18 个位点通用性检测结果

Tab.3 The results of transferability of 18 loci

位点	许氏平鲉		朝鲜平鲉		褐菖鲉	
	等位基因数	条带大小范围	等位基因数	条带大小范围	等位基因数	条带大小范围
HJ126	2	270—274	1	252	3	268—274
HJ157	3	162—168	1	168	2	150—153
HJ306	2	276—278	1	280	2	268—270
HJ606	3	180—189	0		2	198—204
HJ4118	2	271—273	2	259—263	2	255—259
HJ4136	4	220—238	1	224	4	194—202
HJ4137	9	184—214	4	210—218	7	214—232
HJ4164	5	274—282	5	284—310	2	264—270
HJ4183	4	514—544	0		3	502—510
HJ4202	4	273—282	1	270	4	264—276
HJ4203	2	180—186	1	180	3	180—186
HJ4215	2	196—204	1	192	1	198
HJ4249	2	195—199	1	201	3	195—201
HJ4286	2	264—270	1	150	1	160
HJ4930	5	269—290	3	266—281	3	260—278
HJ4944	8	155—185	4	165—173	3	145—155
HJ4959	7	300—336	1	298	3	298—338
HJ9578	4	149—161	2	145—149	2	145—149

9.14%, 而海带为 5.03%(王国良, 2010)、坛紫菜为 5.64%(杨惠等, 2009)、泥蚶为 6.50%(董迎辉等, 2013)、中华鳖为 7.45%(许晓军等, 2013)、牙鲆为 7.95%(陈松波等, 2010), 这说明相较于其它水生生物, 许氏平鲉 EST-SSR 位点发现率较高, 具有较好的开发潜力。本研究查找到的许氏平鲉 EST-SSR 核心序列以二碱基重复出现频率最高, 这一结果与有关马氏珠母贝(邱樱, 2013)、牙鲆(陈松波等, 2010)以及中华鳖(许晓军等, 2013)的研究结果相同, 而在其它学者的研究中也存在不同结果, 比如在泥蚶、海带和坛紫菜中均以三碱基重复最丰富(杨惠等, 2009; 王国良, 2010; 周小龙等, 2013)。

许氏平鲉 EST-SSR 核心序列以 TG/CA 基序最为常见, 在 205 个完美型位点中占到 17.56%, 李霞等(2004)有关剑尾鱼的研究结果与之类似。18 个多态 EST-SSR 位点中, 有 4 个位点核心序列是 TG 或 CA 基序, 重复次数范围在 5—14 之间, 占完美型多态位点比例 26.67%, 因此在本研究中许氏平鲉 EST-SSR 位点 TG/CA 基序的开发效率较高; 上述 4 个多态位点分别是 HJ126、HJ4136、HJ4959 以及 HJ4137, 对应的核心序列重复次数和等位基因个数分别为 5、5、12、14 和 2、4、7、9, 由此可见随着核心序列重复次数增加位点多态性有逐渐增强的趋势。通常认为微卫星多态性的形成与复制过程中的滑链错配有关(张云武等, 2001), 由此形成的插入或缺失突变会导致微卫星核心序列长度的变化(乔洪金等, 2012), 而核心

序列重复次数越高其出现插入或缺失突变的几率就越大。

许氏平鲉 46 对有效扩增的 EST-SSR 引物中, 其中 18 对具有多态性, 多态检测率为 39.13%; An 等(2009)开发的许氏平鲉 Genomic-SSR 位点 14 对有效扩增, 其中 13 对多态, 多态检测率高达 92.86%; Yasuike 等(2013)设计 30 对完美型 Genomic-SSR 引物, 其中 17 对有效扩增并且显示多态, 多态检测率为 100.00%。EST 序列中有效扩增的微卫星引物中, 具有多态性的微卫星比例明显低于基因组中的微卫星比例。此外, Bai 等(2011)开发的多态 Genomic-SSR 位点平均观测等位基因数、平均观测杂合度以及平均期望杂合度分别为 5.7、0.4194 和 0.5002, 均高于本研究开发的 EST-SSR, 同样的结果也存在于 An 等(2009)和 Yasuike 等(2013)开发的许氏平鲉 Genomic-SSR 标记中。上述结果均证实了以往学者有关 EST-SSR 位点多态性低于 Genomic-SSR 位点的结论(齐晓艳等, 2013; 周小龙等, 2013)。一般认为这是由于 EST 序列来源于基因编码区, 更易受到选择压力的作用从而表现出较高的保守性, 因此多态性要比基因组 SSR 低(Chabane *et al*, 2005)。

微卫星侧翼序列在近缘物种中比较保守, 根据已有物种的微卫星引物实现跨物种通用是开发微卫星引物的一种有效途径。分子标记可以被分为两类, Ⅰ型分子标记与已知功能的基因相关联, 而Ⅱ型分子标记与基因组未知区域相关(O'Brien, 1991)。EST 序列来源于功能基因, 由此开发的 EST-SSR 引物属于Ⅰ型微卫星引物, 而Ⅰ型微卫星引物已被证实比未知基因背景的Ⅱ型引物通用性更强(Holton *et al*, 2002)。Ma 等(2010, 2011)开发了拟穴青蟹Ⅱ型和Ⅰ型微卫星引物, 并分别检验其在同属物种中的通用情况, 结果显示紫螯青蟹(*Scylla tranquebarica*)对拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)Ⅰ型微卫星引物的通用性更强。本研究中开发的 18 对多态 EST-SSR 引物对褐菖鲉的通用率和多态率分别达到 100%和 88.89%, 显著优于 An 等(2009)开发的 14 对 Genomic-SSR 位点, 后者的相关数据分别为 78.57%、78.57%。

一般认为, 对于微卫星引物, 亲缘关系越近的物种实现扩种扩增的可能性越大, 而在本研究中, 与许氏平鲉亲缘关系较远的褐菖鲉(*Sebastiscus marmoratus*)却表现出了更好的通用性。此外, 通过分析 An 等(2009)有关许氏平鲉 14 对微卫星引物在 4 个近缘种中的通用性实验结果得知, 与许氏平鲉亲缘关系较近的 *Sebastes inermis* 通用情况(通用率 10/14, 多态率 10/14)却没有 *Sebastes marmoratus*(通用率 11/14, 多态率 11/14)好。同样的结果都与褐菖鲉(*Sebastiscus marmoratus*)这个物种有关, 具体原因有待进一步研究分析。另外, 上述结果与赵丽丽(2008)在青石斑鱼和美洲黑石斑鱼的跨种扩增结果类似, 后者认为这可能与跨种扩增研究中使用的样品数量有限、DNA 复制时错配而产生假阳性带、副产物带过多、多态位点判断等原因有关。此外, 通用性实验结果显示, 位点 HJ606 和 HJ4183 在许氏平鲉和褐菖鲉中可以有效扩增而在朝鲜平鲉中不能有效扩增, 这一结果得到进一步确认后可以应用于从上述三个物种中鉴定朝鲜平鲉的工作。

本研究结果显示, 许氏平鲉 EST-SSR 位点检出率较高, 具有较好的开发潜力, 实验开发的多态 EST-SSR 位点可用于许氏平鲉群体遗传多样性分析、系统进化分析和近缘种通用性检测等研究, 为今后许氏平鲉的良种选育工作奠定基础。

参　考　文　献

王国良, 2010. 海带 EST-SSR 标记开发及 TPS 基因的克隆和比较遗传学研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 31—34

乔洪金, 刘相全, 孙国华等, 2012. 大竹蛏(*Solen grandis*)cDNA 文库中微卫星标记的筛选. 海洋与湖沼, 43(6): 1128—1133

齐晓艳, 董迎辉, 姚韩韩等, 2013. 文蛤 30 个微卫星标记的开发及在斧文蛤和帘文蛤中的通用性检测. 水产学报, 37(8): 1147—1154

许晓军, 张海琪, 张　超等, 2013. 中华鳖表达序列标签资源中的微卫星信息分析. 经济动物学报, 17(1): 15—18

李　霞, 白俊杰, 吴淑勤等, 2004. 剑尾鱼微卫星 DNA 的筛选. 中国水产科学, 11(3): 196—201

杨　惠, 茅云翔, 孔凡娜等, 2009. 坛紫菜 EST-SSR 筛选及其在遗传多样性分析中的实用性. 中国海洋大学学报, 39(2): 265—270

邱　樱, 2013. 马氏珠母贝 EST-SSR 和 SNP 标记开发及其与珍珠层性状的关联分析. 海口: 海南大学硕士学位论文, 3—4

张云武, 张亚平, Ryder O A, 2001. 微卫星及其应用. 动物学研究, 22(4): 315—320

陈松波, 龚　丽, 刘海金, 2010. 牙鲆 EST 资源的 SSR 信息分析. 东北农业大学学报, 41(10): 82—86

易少奎, 高泽霞, 罗　伟等, 2013. 团头鲂 EST-SSR 在厚颌鲂中的跨种扩增及杂交 F1 的鉴定. 水产学报, 37(7): 970—977

周小龙, 朱靖华, 董迎辉等, 2013. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)基因组 SSR 和 EST-SSR 的开发及比较研究. 海洋与湖沼, 44(2): 467—475

赵丽丽, 2008. 3 种石斑鱼微卫星标记的开发及跨种扩增. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 32—34

侯战辉, 王 嫣, 石耀华等, 2008. 马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)2个不同地理种群遗传变异的EST-SSR分析. 海洋与湖沼, 39(2): 178—183

董迎辉, 吴国兴, 姚韩韩等, 2013. 泥蚶34个EST-SSR标记的开发及在格粗饰蚶中的通用性检测. 水产学报, 37(1): 70—77

An H S, Park J Y, Kim M-J *et al*, 2009. Isolation and characterization of microsatellite markers for the heavily exploited rockfish *Sebastes schlegeli*, and cross-species amplification in four related *Sebastes* spp.. Conservation Genetics, 10(6): 1969—1972

Bai C C, Liu S F, Zhuang Z M *et al*, 2011. Isolation and characterization of microsatellite markers for the Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. Genetics and Molecular Research, 10(3): 2065—2068

Chabane K, Ablett G A, Cordeiro G M *et al*, 2005. EST versus genomic derived microsatellite markers for genotyping wild and cultivated barley. Genetic Resources and Crop Evolution, 52(7): 903—909

Chistiakov D A, Hellemans B, Volckaert F A, 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. Aquaculture, 255(1—4): 1—29

Holton T A, Christopher J T, McClure L *et al*, 2002. Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. Molecular Breeding, 9(2): 63—71

Ma H Y, Ma C Y, Ma L B *et al*, 2010. Novel polymorphic microsatellite markers in *Scylla paramamosain* and cross-species amplification in related crab species. Journal of Crustacean Biology, 30(3): 441—444

Ma H Y, Ma C Y, Ma L B, 2011. Identification of type I microsatellite markers associated with genes and ESTs in *Scylla paramamosain*. Biochemical Systematics and Ecology, 39(4—6): 371—376

Marshall T C, Slate J, Kruuk L E B *et al*, 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology, 7(5): 639—655

O'Brien S J, 1991. Mammalian genome mapping: lessons and prospects. Current Opinion in Genetics & Development, 1(1): 105—111

Rousset F, 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources, 8(1): 103—106

Schug M D, Wetterstrand K A, Gaudette M S *et al*, 1998. The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. Molecular Ecology, 7(1): 57—70

Tautz D, Renz M, 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research, 12(10): 4127—4138

Weber J L, 1990. Informativeness of human $(dC\text{-}dA)_n\cdot(dG\text{-}dT)_n$ polymorphisms. Genomics, 7(4): 524—530

Yasuike M, Noda T, Fujinami Y *et al*, 2013. Tri-, tetra- and pentanucleotide-repeat microsatellite markers for the Schlegel's black rockfish *Sebastes schlegelii*: the potential for reconstructing parentages. Conservation Genetics Resources, 5(2): 577—581

Yeh F C, Yang R, Boyle T, 1999. POPGENE version 1.31: Microsoft Window Based Freeware for Genetic Analysis. Alberta, Canada: University of Alberta and Centre for International Forestry Research

Yoshida K, Nakagawa M, Wada S, 2005. Multiplex PCR system applied for analysing microsatellite loci of Schlegel's black rockfish, *Sebastes schlegeli*. Molecular Ecology Notes, 5(2): 416—418

DEVELOPMENT OF EST-SSR MARKERS FOR ROCKFISH *SEBASTES SCHLEGELII* AND CROSS-SPECIES AMPLIFICATION

XUE Rui[1, 2], MA Hai-Tao[2], HAN Cheng-Hui[1, 2], WANG Fei[2], SUN Guo-Hua[2], JIANG Hai-Bin[2]

(1. *College of Fisheries and Life Science*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*; 2. *Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology*, *Shandong Marine Resource and Environment Research Institute*, *Yantai* 264006, *China*)

Abstract We designed primers with published expressed sequence tag (EST) sequences in combination with PCR amplification, polymorphic EST-SSR (simple sequence repeats) markers in rockfish *Sebastes schlegelii*. The results show that the discovery rate of EST-SSR on EST sequences was 9.14%; dinucleotide motif had the highest frequency at 33.03%; and TG/CA motif was the richest one. In total, primers, 46 pairs out of 56 pairs that designed proved effective, and 18 pairs expressed polymorphism. We then applied these loci to analyze 30 *S. schlegelii* DNA specimens in population diversity. The observed number of alleles (N_a) ranged 2—9 in average of 3.89. The observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and their average values were 0.0333—0.8000, 0.0333—0.7927, 0.3037 and 0.3757, respectively. Polymorphic information content (PIC) ranged 0.0323—0.7522, five loci were highly polymorphic, and 4 were moderately polymorphic. After Bonferroni correction, 3 loci deviated significantly from Hardy-Weinberg Equilibrium (*P*-value), but no linkage disequilibrium phenomenon. The 18 loci were surveyed in *S. koreanus* and *Sebastiscus marmoratus*, the cross-species proportions and polymorphic rates were 88.89%, 100.00% and 33.33%, 88.89%, respectively. Therefore, these EST-SSR loci of *S. schlegelii* may facilitate studies on genetic diversity, phylogeny, and genomes mapping of related species.

Key words *Sebastes schlegelii*; EST; microsatellite markers; transferability