第 37 卷第 8 期
2013 年 8 月

水 产 学 报
JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA

Vol. 37, No. 8
Aug., 2013

文章编号:1000 - 0615(2013)08 - 1147 - 08　　DOI:10.3724/SP.J.1231.2013.38484

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

齐晓艳[1,2]，董迎辉[2]，姚韩韩[2]，周小龙[3]，林志华[2*]

（1.宁波大学海洋学院,浙江 宁波 315211;
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,浙江 宁波 315100;
3.上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306）

摘要：为开展文蛤多态性微卫星标记及其在斧文蛤和帘文蛤中的通用性研究,实验从磁珠富集法构建的基因组文库和 EST 文库中开发了 30 个文蛤多态性微卫星标记,包括 8 个 G-SSR 和 22 个 EST-SSR 多态性位点。共获得 140 个等位基因,平均等位基因数为 4.67;多态性信息含量、观测杂合度、期望杂合度分别为 0.172 ~ 0.744、0.040 ~ 0.720、0.187 ~ 0.793;G-SSRs 的平均等位基因数、平均多态性信息含量、平均观测杂合度和平均期望杂合度都较 EST-SSRs 高;Hardy-Weinberg 平衡检测发现,24 个位点偏离了平衡状态;利用 BLASTx 对含多态性 SSR 位点的 EST 进行功能注释,11 个位点来自注释基因序列。将 30 对文蛤多态性 SSR 引物分别在斧文蛤和帘文蛤中进行了通用性检测,通用率分别为 40% 和 30%。这些微卫星多态性位点的获得,为进一步开展文蛤遗传多样性分析、种质资源评价、分子标记辅助选育等奠定了基础,并且可用于文蛤、斧文蛤和帘文蛤的比较作图、基因发掘和 QTL 定位等研究。

关键词：文蛤；G-SSRs；EST-SSRs；多态性；通用性
中图分类号：Q 178.1；S 917.4　　**文献标志码**：A

文蛤(*Meretrix meretrix*)是我国滩涂养殖的主要经济贝类之一,其肉质鲜美、营养丰富,有“天下第一鲜”之美誉。近年来,文蛤的增养殖业迅猛发展,养殖规模不断扩大,苗种需求量不断增加,但因各地无序的引种移养,人为地加大了不同遗传背景文蛤群体间的混杂,对文蛤种质资源的保护和开发利用极为不利[1-2]。因此,建立适合文蛤的分子标记技术,开展种质资源评价分析,对促进文蛤种质管理和良种培育、实现文蛤增养殖业的可持续发展有重要意义。

微卫星标记技术因呈共显性遗传、多态性丰富、杂合度高等优点,被广泛用于遗传多样性评价[3]、群体遗传结构分析[4]、种质资源的评价和保护[5]及遗传图谱的构建[6]等研究。利用微卫星技术开展海洋经济贝类群体遗传多样性研究已有很多报道[7-11],近年来已有学者开展了文蛤微卫星标记的开发和应用研究,如 Wang 等[12]构建文蛤的基因组文库并从中分离得到 10 个多态性微卫星标记,Lu 等[13-14]开发了 17 个 EST-SSRs 和 16 个 G-SSRs,并发现 3 个 EST-SSRs 与文蛤壳长相关,首次将 SSR 位点与生长性状联系起来;Wang 等[15]通过转录组序列获得 20 个 EST-SSRs;Li 等[16]构建了文蛤肠、外套膜和肝胰脏组织的 cDNA 文库,并从中开发了 7 个微卫星多态性标记;朱东丽等[17]利用 9 个微卫星标记对 4 种壳色的文蛤品系进行了遗传分析。但迄今为止,见诸报道的文蛤多态性微卫星标记仅有 65 个,尚不能满足对其遗传图谱的构建和分子标记辅助育种等研究的需求。本实验分别从文蛤的微卫星富集文库和 EST 文库中筛选 SSR 标记,分析群体遗

收稿日期:2012-12-11　　**修回日期**:2013-04-27
资助项目:国家自然科学基金项目(30972255);国家现代贝类产业技术体系项目(CARS-48);浙江省自然科学基金(Y3110080);宁波市科技创新团队项目(2011B82017)
通信作者:林志华,E-mail:zhihua9988@126.com

传多样性,并在斧文蛤(*M. lamarckii*)和帘文蛤(*M. lyrata*)中进行通用性检测,以期为开展文蛤分子标记辅助育种和推动文蛤养殖业的可持续发展提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用文蛤、斧文蛤和帘文蛤分别取自浙江省象山县宁波象山甬盛水产种业有限公司、象山县石浦镇和广东湛江东海岛,3 个物种分别随机取样 30 个个体,解剖取闭壳肌,-80 ℃超低温冰箱保存,用于 DNA 提取。

1.2 DNA 提取与质量检测

利用酚/氯仿/异戊醇法分别提取文蛤、斧文蛤和帘文蛤基因组 DNA,1% 琼脂糖凝胶检测 DNA 完整性,微量核酸检测仪(美国 GE, Nanovue Plus)测定其浓度和质量,最终稀释至 100 ng/μL。

1.3 微卫星序列来源及引物设计

微卫星富集文库的构建及 G-SSRs 和 EST-SSRs 的获取 参照曾庆国等[18]微卫星富集方法构建文蛤基因组微卫星富集文库。基因组 DNA 经内切酶 *Sau*3A Ⅰ消化完全后,酶切产物经凝胶电泳分离后用 DNA 回收试剂盒(TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2. 0 DV805A TaKaRa)回收,回收片段用 T_4 DNA 连接酶和 *Sau*3A Ⅰ 接头(Oligo1: 5′-GGCCAGAGACCCCAAGCTTCG-3′; Oligo2: 5′-CCGGTCTCTGGGGTTCGAAGCCTAG-3′)连接,重组片段经 pMD-18T 载体连接并转化到 DH5α 感受态细胞中,构建文蛤的部分基因组文库。根据克隆测序结果,利用软件 SSR hunter 进行微卫星序列查找,查找的标准为二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复序列的重复次数分别大于或等于 7、5、4、3 和 3。

在 NCBI 主页(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)的 EST 数据库中以"*Meretrix mereteix*"为关键词搜索,下载文蛤 EST 序列,用软件 SSR hunter 进行微卫星序列查找(同 G-SSRs 中的查找标准)。

引物设计 根据查找结果,利用软件 Primer Premier 5. 0 对含有微卫星位点的序列进行引物设计,设计的标准为引物长度为 18 ~ 25 bp,GC 含量为 40% ~ 60%,上下游引物的 T_m(解链温度)相差≤2 ℃,引物 5′和 3′端距微卫星片段的起始位置和结束位置的长度不小于 15 bp,产物长度 100 ~ 300 bp,所设计的引物用 Oligo 6. 0 软件进行评估,由上海生物工程公司合成。

文蛤微卫星多态性引物的初步筛选及群体遗传多样性分析 随机取样 6 个文蛤个体的 DNA 混成一个基因池,稀释至终浓度为 100 ng/μL,在 Eppendorf 梯度 PCR 仪(Mastercycler pro S)上进行微卫星引物的初步筛选。PCR 反应体系包括:10 × Buffer 2 μL,dNTPs 1. 6 μL,Primer F (10 mmol/L) 0. 5 μL,Primer R (10 mmol/L) 0. 5 μL,r *Taq*(TaKaRa) 0. 2 μL,DNA 1. 0 μL,加蒸馏水至 20 μL。PCR 程序为 95 ℃预变性 5 min,95 ℃变性 30 s,T_m(视引物而定)退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,34 个循环,72 ℃延伸 7 min,4 ℃保存。PCR 产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,EB 染色,凝胶成像系统(Bio-rad)拍照。

随机取样 30 个文蛤个体,用初筛中得到有效扩增的引物在其最佳 T_m 下进行 PCR 扩增,PCR 反应体系、反应程序及产物检测方法同初筛步骤。

文蛤多态性 SSR 位点在斧文蛤和帘文蛤中的通用性检测及遗传多样性分析 将文蛤多态性引物在斧文蛤和帘文蛤中进行通用性检测。在各引物的最佳 T_m 值附近设置 5 个温度梯度,选取条带清晰的温度作为其群体扩增的最佳温度,然后分别在 30 个斧文蛤和帘文蛤个体中进行扩增,计算通用率并进行多态性差异分析。

数据统计与分析 利用软件 Cervus 3. 0[19]计算等位基因数(number of allele, N_a),观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)及多态性信息含量(polymorphism information content, *PIC*);用软件 GenePop 3. 4[20]进行哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)检测,并用 Bonferroni correction 法对其显著水平进行校正;利用 NCBI 中的 BLASTx 对含多态性 SSR 位点的 EST 序列进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 文蛤微卫星引物的筛选和位点特征分析

富集文库法得到 46 条含有微卫星的序列,20 条因侧翼序列太短而无法设计引物,其余 26 条均

成功用于引物设计，其中 16 对引物在初步筛选中能有效扩增，8 对在群体检测时产生多态性分离，分别占总数的 61.54% 和 30.77%，检出的 8 条多态性序列均为二核苷酸重复。从 2 112 条文蛤 EST 序列中筛选得到 104 条微卫星序列，成功设计引物 96 对，其中 54 对引物得到有效扩增，22 对产生多态性分离，分别占总数的 56.25% 和 28.13%。所检出的多态性序列中二核苷酸重复 3 个，三核苷酸重复 8 个，四核苷酸重复 5 个，五核苷酸重复 5 个，六核苷酸重复 1 个，分别占总位点数的 13.64%、36.36%、22.72%、22.72% 和 4.55%。除 MM02 和 MM06 为非完美型之外，其余微卫星序列均为完美型重复。

2.2　文蛤遗传多样性分析

30 个微卫星位点在文蛤 30 个个体中进行扩增，共获得 140 个等位基因。G-SSRs 的等位基因数为 3 ~ 6，平均等位基因数为 5.125，MM03、MM04、MM05、MM08 位点都获得 6 个等位基因，等位基因数最多，MM07 得到 3 个等位基因，等位基因数最少；*PIC* 值为 0.381 ~ 0.744，平均值为 0.595；观测杂合度与期望杂合度分别为 0.120 ~ 0.720 和 0.427 ~ 0.793（表 1）。

表 1　文蛤 8 个 G-SSRs 标记的特征

Tab.1　Characteristics of 8 G-SSRs for *M. meretrix*

位点 locus	引物序列(5′-3′) primer sequences	重复模式 repeat mode	退火温度/℃ annealing temperature	产物大小/bp product size	N_a	H_o	H_e	*PIC*	*P* 值 *P* value	GenBank 登录号 GenBank accession No.
MM01	5′-GGTTAGACCTTTGCTGTT-3′ 5′-ATGTCTATCTTCAAATCAGC-3′	$(AC)_{20}$	50.0	184 ~ 210	4	0.417	0.655	0.590	0.000 5	KC207405
MM02	5′-AGGGGTCAGCGGAAACTA-3′ 5′- TTGCAGTCAGGATGGAGTG-3′	$(GA)_{13}$ $TC(GA)_{8}$	53.8	276 ~ 300	5	0.120	0.442	0.411	0.000 0	KC207406
MM03	5′- AGAACTTGAGTACCAATGTG-3′ 5′- GGCACTGTGATCCATAAT-3′	$(AC)_{26}$	58.1	254 ~ 280	6	0.720	0.793	0.744	0.000 0	KC207407
MM04	5′-ATCTTAGGGTCACATTGGTCA-3′ 5′-CGGCACCAACAAAGAACTA-3′	$(GA)_{23}$	47.5	270 ~ 300	6	0.600	0.745	0.697	0.077 8	KC207408
MM05	5′- AGAAACCACAAGGCATAGAG-3′ 5′- TGACAAAACACTTCCTGAGAG-3′	$(TC)_{40}$	50.4	190 ~ 220	6	0.480	0.745	0.689	0.001 6	KC207409
MM06	5′- ACATTGTGGAAACTTTGACC-3′ 5′- CCAGATGGAACCAACCTC-3′	$(TC)_{27}TA(TC)_{6}$ $TA(TC)_{6}(TC)_{41}$	55.8	320 ~ 345	5	0.480	0.749	0.686	0.001 0	KC207410
MM07	5′- TGACCATAGACATAGGCACT-3′ 5′- GCGGCAAAGTCAGTTATT-3′	$(CT)_{29}$	55.1	180 ~ 190	3	0.360	0.427	0.381	0.244 4	KC207411
MM08	5′- GGAGGAATGGGATTTGGA-3′ 5′- TGCTTCGGATAATATCAGACG-3′	$(CA)_{12}$	53.1	290 ~ 320	6	0.120	0.640	0.564	0.000 0	KC207412
mean					5.125	0.412	0.650	0.595		

EST-SSRs 的等位基因数为 3 ~ 6，平均等位基因数为 4.5，MM13、MM16、MM28 位点都获得 6 个等位基因，等位基因数最多，而 MM19 和 MM20 位点都只得到 3 个等位基因，等位基因数最少；*PIC* 值这 0.172 ~ 0.738，平均值为 0.534，观测杂合度与期望杂合度分别为 0.040 ~ 0.640 和 0.187 ~ 0.789（表 2）。

微卫星位点经 Hardy-Weinberg 平衡检验，Bonferroni correction 法校正后发现除 MM04、MM05、MM07、MM20、MM21、MM25 之外，其余位点均不同程度的偏离 Hardy-Weinberg 平衡。

2.3　文蛤多态性 EST-SSRs 功能注释

利用 NCBI 中的 BLASTx 对含有多态性 SSR 的 EST 序列进行比对分析，结果有 11 个 SSR 位点与已知功能基因相关（表 2），各基因分别含有 1 个 SSR 位点。EST-SSR 的最大特点是来自基因组的转录区，这些 SSR 位点的获得进一步佐证了 EST-SSR 在遗传多样性研究中的优越性，将对相应基因变异的评价和定位有重要意义。

表 2 文蛤 22 个 EST-SSR 标记的特征

Tab. 2 Characteristics of 22 polymorphic EST-SSRs for *M. meretrix*

位点 locus	引物序列(5′-3′) primer sequences	重复模式 repeat mode	退火温度/℃ annealing temperature	产物大小/bp product size	N_a	H_o	H_e	*PIC*	*P* 值 *P* value	GenBank 登录号 GenBank accession No.	功能注释/*E* 值 functional annotations/ *E* value
MM09	5′-CGTTTCTGCCAAATCCTT-3′ 5′-CTGGTTATTGTTGTGGTAGTTA-3′	$(AAC)_5$	53.8	125 ~ 140	5	0.400	0.584	0.539	0.000 1	GR902656	无
MM10	5′- GCTGCGAATTGTAAACAAAC-3′ 5′-AAAATGCCTGGGCTCCTT-3′	$(AAC)_5$	47.8	141 ~ 170	4	0.204	0.623	0.538	0.000 0	GR212012	无
MM11	5′-AGATACTTCTAATGACGACG-3′ 5′-AGAGGTGTTGCCTTTACT-3′	$(GAA)_6$	58.1	250 ~ 275	5	0.200	0.589	0.531	0.000 0	GR902428	无
MM12	5′-CAGGTGGGGACTTTTTGC-3′ 5′-CACTCAGTCTCTCTCGTATTGC-3′	$(GAT)_5$	50.0	215 ~ 235	4	0.083	0.197	0.185	0.000 0	GR211732	转录因子 BTF3 样蛋白 4/3e-72
MM13	5′-CGTTCTTCTATCTGCCA-3′ 5′-TATTCTTATGACAAGGGTTA-3′	$(AACAG)_4$	47.8	220 ~ 246	6	0.240	0.789	0.738	0.000 0	GT184221	丝氨酸-苏氨酸蛋白磷酸酶 6 锚蛋白重复亚基 A/2e-52
MM14	5′-AATAAAATGAGGCGATGAT-3′ 5′-ATGGTATGGATTACAACG-3′	$(AAGT)_4$	47.2	250 ~ 270	5	0.240	0.712	0.654	0.000 0	GT184375	无
MM15	5′-ATAGGGAGGACTTGATGATAC-3′ 5′-CAACTCTGCCTTGTGCTT-3′	$(AT)_9$	57.3	145 ~ 163	5	0.640	0.753	0.695	0.000 0	GR211222	肿瘤坏死因子 α(TNF-α)/ 6e-62
MM16	5′-TGATTTCCTCGTCTTCGT-3′ 5′-GCTTCTTTGCCTTTCGT-3′	$(ATG)_9$	45.8	318 ~ 340	6	0.400	0.783	0.731	0.000 3	GT184119	无
MM17	5′-ATGGTAGCCACAACAAGC-3′ 5′-GAACAAAGCATAGCGTCT-3′	$(GA)_7$	50.4	130 ~ 150	4	0.280	0.527	0.473	0.000 1	GR211583	CDGSH 铁硫簇结合结构域蛋白 2/1e-19
MM18	5′-GTGTTTGGGTAGGAATAGAG-3′ 5′- ACGCCACCACCTGAATA-3′	$(AG)_7$	50.0	165 ~ 180	4	0.240	0.571	0.516	0.000 0	GR903120	NADH 脱氢酶亚基 II/1e-72
MM19	5′-AACGAAAGCGAGGAGGAT-3′ 5′-TACCGAACCATTGTAAAACG-3′	$(GAAAC)_3$	52.6	140 ~ 160	3	0.040	0.187	0.172	0.001 0	GR211876	假想蛋白/ 2e-44
MM20	5′-CGACGAGGCTGACGATAA-3′ 5′-CTTTCTCACCAAGTCAATCC-3′	$(GATGAC)_3$	55.1	170 ~ 190	3	0.400	0.346	0.312	1.000 0	GR211382	无
MM21	5′-GTTGTTGTTCTGTTTAGCAC-3′ 5′-ACCTTACCCTTGACCTTG-3′	$(GTCC)_4$	52.6	280 ~ 300	4	0.520	0.722	0.659	0.016 4	GR211159	无
MM22	5′-AGGAGAATACACGAAACGAA-3′ 5′-GTGACCTTGACCTTTGAGC-3′	$(GTCC)_4$	57.3	245 ~ 265	4	0.360	0.592	0.522	0.000 7	GR211686	假定蛋白 DAPPUDRAFT-6/1e-14
MM23	5′-TGACAACTGACAGAAGGAC-3′ 5′-CTGTGAAAGTTATGGGC-3′	$(GTCC)_4$	50.6	180 ~ 192	5	0.240	0.704	0.637	0.000 0	GR211596	无
MM24	5′-GTTGTTGTTCTGTTTAGCACC-3′ 5′-GACCTTACCCTTGACCTTG-3′	$(GTCT)_4$	50.2	280 ~ 300	5	0.280	0.751	0.689	0.000 0	GR211159	无
MM25	5′-AGACCACTCATCCCAAGA-3′ 5′-TAGCCAAGGTTATAGTATTT-3′	$(TGA)_5$	50.4	210 ~ 220	4	0.480	0.696	0.624	0.005 6	GB211257	跨膜蛋白 59/2e-20
MM26	5′-CAGACCACTCATCCCAAG-3′ 5′-CATCTTCACTTTCGCCAG-3′	$(TGA)_8$	50.4	170 ~ 190	4	0.320	0.673	0.603	0.000 0	GR211423	假定蛋白 CGI_10006614/ 2e-16
MM27	5′-GCCCAACCTCTGTCGT-3′ 5′-TGCCCAGTGTAGAAGTCA-3′	$(TGT)_5$	47.8	145 ~ 155	5	0.040	0.538	0.475	0.000 0	GR902579	异青霉素 N(异构酶)/ 5e-32
MM28	5′-TCGCTCGTGTAAGTTCTAT-3′ 5′-TGTAATCTGTGATGCCAAT3′	$(GAACA)_4$	45.8	230 ~ 248	6	0.240	0.759	0.708	0.000 0	GR211312	无
MM29	5′-TACTGACGGCTCTCATCTG-3′ 5′-CTAACTGTTCTGCTTTATCCA-3′	$(TTTAT)_3$	55.8	175 ~ 200	4	0.040	0.322	0.300	0.000 0	GT184306	原肌球蛋白/ 5e-142
MM30	5′-ATTGGAACATAGTGTCAGTC-3′ 5′-GCCTACAGACATTTTAGTTAT-3′	$(TTTTA)_3$	53.1	200 ~ 220	4	0.040	0.489	0.448	0.000 0	GR211406	无
mean					4.5	0.269	0.587	0.534			

2.4 文蛤多态性 SSR 引物在斧文蛤和帘文蛤中的通用性检测

文蛤 30 对多态性微卫星引物在斧文蛤和帘文蛤中进行通用性检测,16 对在斧文蛤中成功扩增,12 对表现为多态,通用率为 40%,12 对多态性引物在 30 个斧文蛤个体中群体检测共得 43 个等位基因,*PIC* 值为 0.074 ~ 0.720,观测杂合度与期望杂合度分别为 0.040 ~ 0.960 和 0.078 ~ 0.771;12 对引物在帘文蛤中成功扩增,9 对表现为多态,通用率为 30%,9 对多态性引物在 30 个帘文蛤个体中进行扩增,共获得 33 个等位基因,*PIC* 值为 0.136 ~ 0.680,观测杂合度与期望杂合度分别为 0.000 ~ 0.160 和 0.150 ~ 0.744(表 3)。

表 3 文蛤多态性 SSR 引物在斧文蛤和帘文蛤中的通用性及遗传多样性

Tab.3 Cross-species amplification of polymorphic SSRs from *M. meretrix* in *M. lamarckii* and *M. lyrata*

位点 locus	重复模式 repeat mode	文蛤 *M. meretrix* (n = 30)			斧文蛤 *M. lamarckii* (n = 30)			帘文蛤 *M. lyrata* (n = 30)		
		H_o	H_e	*PIC*	H_o	H_e	*PIC*	H_o	H_e	*PIC*
MM04	$(GA)_{23}$	0.600	0.745	0.697	0.280	0.464	0.426			
MM08	$(CA)_{12}$	0.120	0.640	0.564	0.720	0.690	0.607	0.040	0.257	0.240
MM09	$(AAC)_5$	0.400	0.584	0.539	0.960	0.545	0.428	0.000	0.153	0.145
MM10	$(AAC)_5$	0.204	0.584	0.538	0.375	0.318	0.274	0.400	0.642	0.552
MM15	$(AT)_9$	0.640	0.753	0.695	0.080	0.150	0.136			
MM16	$(ATG)_9$	0.400	0.783	0.731	0.045	0.212	0.197			
MM17	$(GA)_7$	0.280	0.527	0.473	0.160	0.771	0.720	0.080	0.222	0.205
MM18	$(AG)_7$	0.240	0.571	0.516				0.160	0.692	0.614
MM23	$(GTCC)_4$	0.240	0.704	0.637	0.040	0.742	0.683			
MM25	$(TGA)_5$	0.480	0.696	0.624				0.080	0.744	0.680
MM26	$(TGA)_8$	0.320	0.673	0.603	0.080	0.078	0.074	0.040	0.187	0.172
MM27	$(TGT)_5$	0.040	0.538	0.475	0.040	0.290	0.078	0.000	0.150	0.136
MM29	$(TTTAT)_3$	0.040	0.322	0.300	0.333	0.284	0.284	0.160	0.571	0.534
MM30	$(TTTTA)_3$	0.040	0.489	0.448	0.458	0.600	0.600			
mean		0.289	0.615	0.560	0.298	0.429	0.376	0.131	0.458	0.413

3 讨论

3.1 文蛤多态性 SSR 位点的开发及群体遗传多样性分析

微卫星标记的获得主要有 2 种途径:一是直接克隆法,即克隆所需要的微卫星位点,构建基因组文库,其中生物素结合磁珠富集法分离微卫星位点被广泛使用[21-24],该技术在大珠母贝(*Pinctada maxima*)[25]、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)[26]、三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)[27]等贝类中均有报道,是一种高效、快速的微卫星分离方法;二是在线数据库检索,随着高通量测序技术的迅猛发展,网络数据库的容量正以惊人的速度增长,太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)[28]的全基因组文库、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)[29]、泥蚶(*Tegillarca granosa*)[30]等多种海洋贝类的 cDNA 文库已成功构建,这为 SSR 标记的开发提供了巨大的来源。本研究从文蛤的基因组文库和 EST 文库中共分离和筛选了 30 对多态性引物。Eujay 等[31]通过对来自基因组和 EST 数据库的 SSR 的比较发现,EST-SSR 的扩增效果较好,本研究也得到与之基本一致的结果。一般认为真核生物基因组中,完美型的比例显著高于非完美型,本实验分离得到的文蛤 G-SSRs 均为二核苷酸重复,完美型序列占 75%,非完美型序列占 25%;EST-SSRs 中有二、三、四、五和六核苷酸重复,与基因组来源的微卫星序列相比,EST 数据库来源的微卫星序列多以完美型形式存在,这可能与这些微卫星序列大多分布在外显子区域,保守而不易发生突变有关。另外,综合基因组和 EST 数据库 2 种来源的微卫星序列可知,文蛤的微卫星序列多以完美型形式存在,比例高达 93.33%,该比例与三角帆蚌[32]、太平洋牡蛎[33]和虾夷扇贝[34]的微卫星序列中完美型分别占 61.0%、54.7% 和 42.69% 相差甚远。这些差异反映了不同物种微卫星序列具有不同的特性,这可能与筛选方法或组织来源不同有关。

多态性信息含量(*PIC*)和杂合度是 2 个重要的

遗传参数,常被用来衡量群体遗传结构变异程度的高低。在文蛤 G-SSRs 群体遗传多样性分析中,除 MM02、MM07 之外,其余位点均为高度多态性基因座($PIC > 0.5$),占总位点数的 75%;68.18% 的 EST-SSRs 为高度多态性基因座,22.73% 为中度多态性基因座($0.25 < PIC < 0.5$),说明本实验所开发的微卫星位点在文蛤遗传多样性研究中可提供有效的遗传信息。G-SSRs 各位点的平均观测杂合度和平均期望杂合度分别为 0.412 和 0.650;EST-SSRs 各位点的平均观测杂合度和平均期望杂合度分别为 0.269 和 0.587,高于薛明等[35]利用同工酶研究文蛤 3 个野生种群的生化遗传变异时 3 个群体的平均杂合度,佐证了微卫星标技术具有较高的多态性、呈共显性遗传等优点。另外,研究发现除 MM20 之外,其他位点在群体分析时的观测杂合度(H_o)均小于期望杂合度(H_e),且有 5 个位点(MM06、MM10、MM13、MM14 和 MM30)的 H_o 和 H_e 之间差异较大,说明用于分析文蛤群体的这些位点的基因频率和基因型频率稳定性较差,可能原因是存在无效等位基因(null allele)[36]或是出现等位基因的"扩增丢失"[37]。无效等位基因在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)[38]、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)[39]、太平洋牡蛎[40]等水产动物中均有报道。30 个微卫星位点中除 MM04、MM05、MM07、MM20、MM21、MM25 之外,其余位点均不同程度的偏离 Hardy-Weinberg 平衡,这可能是由于人为因素的干扰,导致种群内自交、近交积累引起稀有等位基因丢失而造成杂合子缺失,或是由群体内自然选择所引起的。

3.2 文蛤多态性 SSR 位点的通用性研究

根据特定物种所设计的 SSR 引物在其近缘种属间的通用性,极大地降低了 SSR 引物的开发成本。目前,海洋双壳贝类如太平洋牡蛎[41-42]和泥蚶[43]的 SSR 引物在其近缘种甚至亲缘关系较远的物种中通用性的研究已有报道。本实验在所开发的 30 对文蛤多态性 SSR 引物的基础上,将其在斧文蛤和帘文蛤中进行通用性研究,结果得到的多态性引物分别为 12 对和 9 对,这与斧文蛤和文蛤间的遗传距离相对较小有关。另外,8 对文蛤多态性 G-SSRs 引物在斧文蛤和帘文蛤群体检测中分别有 1 对和 2 对表现出多态,其余通用多态引物均来自 EST-SSRs,这与木薯[44]和小麦[45]的 G-SSR 和 EST-SSR 在其近缘物种之间的转移性一致。结果表明,虽然 G-SSR 较 EST-SSR 具较高的多态性,但后者通用性更好。本实验所得文蛤 SSR 引物的通用率并不高,但仍能证明由文蛤 SSR 序列所得的引物在斧文蛤和帘文蛤中具有通用性,这为后者 SSR 引物的开发提供了新的来源,为今后文蛤 SSR 引物在帘文蛤和斧文蛤的遗传多样性分析、系统进化分析和功能基因比较等方面的应用提供依据。

参考文献:

[1] 林志华,董迎辉,李宁,等. 基于形态参数和 AFLP 标记的文蛤(*Meretrix meretrix*)不同地理群体遗传变异分析[J]. 海洋与湖沼,2008,39(3):245-251.

[2] 张志伟,陈爱华,姚国兴,等. 我国沿海不同地理原种文蛤(*Meretrix meretrix*)的 SRAP 分析[J]. 海洋与湖沼,2010,41(3):429-434.

[3] Sobolewska H, Beaumont A, Hamilton A R. Dinucleotide microsatellites isolated from the European flat oyster, *Ostrea edulis*[J]. Molecular Ecology Notes, 2001,1(1-2):79-80.

[4] Launey S, Ledu C, Boudry P, *et al*. Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism[J]. Journal of Heredity, 2002,93(5):331-351.

[5] 李琪. 皱纹盘鲍微卫星研究进展[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2004,34(3):365-370.

[6] Hubert S, Hedgecock D. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Genetics, 2004,168(1):351-362.

[7] An H Y, Park J Y. Ten new highly polymorphic microsatellite loci in the blood clam *Scapharca broughtonii*[J]. Molecular Ecology Notes, 2005,5(4):896-898.

[8] Evans B, Bartlett J, Sweijd N, *et al*. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midae*)[J]. Aquaculture, 2004,233(1-4):109-127.

[9] 李莉,孙振兴,杨树德,等. 用微卫星标记分析皱纹盘鲍群体的遗传变异[J]. 遗传,2006,28(12):1549-1554.

[10] 张靖,常亚青,丁君,等. 虾夷扇贝不同壳色间的遗传结构及微卫星标记与生长性状相关分析[J]. 中国农学通报,2011,27(26):83-91.

[11] Dong Y H, Yao H H, Lin Z H, *et al*. Characterization of 62 polymorphic EST-SSR markers in the blood clam (*Tegillarca granosa*) and their cross-amplification in *Scapharca sub*crenata [J]. Conservation Genetics Resources, 2012,4(4):991-997.

[12] Wang S L, Niu D H, Li J L. Isolation and characterization of 10 polymorphic microsatellites in *Meretrix meretrix* [J]. Conservation Genetics Resources, 2009, 1(1): 111 - 113.

[13] Lu X, Wang H X, Dai P, *et al*. Characterization of EST-SSR and genomic-SSR markers in the clam, *Meretrix mereteix*[J]. Conservation Genetics Resources, 2011, 3(4): 655 - 658.

[14] Lu X, Wang H X, Liu B Z, *et al*. Three EST-SSR Markers associated with QTL for the growth of the clam *Meretrix meretrix* revealed by selective genotyping [J]. Marine Biotechology, 2013, 15(1): 16 - 25.

[15] Wang H X, Huan P, Lu X, *et al*. Mining of EST-SSR markers in clam *Meretrix meretrix* larvae from 454 shotgun transcriptome [J]. Genes Genetic Systems, 2011, 86(3): 197 - 205.

[16] Li H J, Liu W D, Gao X G, *et al*. Identification of host-defense genes and development of microsatellite markers from ESTs of hard clam *Meretrix meretrix*[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(2): 769 - 775.

[17] 朱东丽，董迎辉，林志华，等. 利用微卫星标记对文蛤 4 个壳色花纹品系的遗传分析[J]. 水产学报，2012，36(2)：202 - 209.

[18] 曾庆国，林志华，尤仲杰. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)GT 微卫星位点的筛选和性质鉴定[J]. 海洋与湖沼，2008，39(2)：174 - 177.

[19] Kalinwski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment [J]. Molecular Ecology, 2007, 16(5): 1099 - 1106.

[20] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenism[J]. Journal of Heredity, 1995, 86: 248 - 249.

[21] Li Q, Kijima A. Identification of novel microsatellite loci in the Pacific oyster (*Crassastrea gigas*) by magnetic bead hybridization selection [J]. Tohoku Journal of Agricultural Research, 2002, 53(1 - 2): 25 - 32.

[22] 孙效文，鲁翠云，梁利群. 磁珠富集法分离草鱼微卫星分子标记[J]. 水产学报，2005，29(4)：482 - 486.

[23] Edwards K J, Barker J H, Daly A, *et a. l*. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants[J]. Biotechniques, 1996, 20(5): 758 - 760.

[24] Carleton K L, Streelman J I, Lee B Y, *et al*. Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome [J]. Animal Genetics, 2002, 33(2): 140 - 144.

[25] 柳明，喻达辉，黄桂菊. 大珠母贝微卫星 DNA 标记的分离与筛选[J]. 海洋科学，2010，34(8)：1 - 5.

[26] 赵莹莹，朱晓琛，孙效文，等. 磁珠富集法筛选虾夷扇贝微卫星序列[J]. 中国水产科学，2006，13(5)：749 - 755.

[27] 罗明，白志毅，李应森，等. 三角帆蚌微卫星位点筛选及多态性分析[J]. 淡水渔业，2012，42(1)：80 - 84.

[28] Zhang G F, Fang X D, Guo X M, *et al*. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation[J]. Nature, 2012, 490(7418): 49 - 54.

[29] 秦玉明，苏秀榕，李晔，等. 缢蛏(*Sinonovacula constricta*)cDNA 文库的构建及肌动蛋白基因的研究[J]. 海洋与湖沼，2010，41(1)：54 - 60.

[30] 贺静静，李晔，李太武，等. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)cDNA 文库的构建及铁结合蛋白基因(Ferritin)序列分析[J]. 海洋与湖沼，2009，40(3)：289 - 295.

[31] Eujay I, Sorrells M, Baum M, *et al*. Assessment of genotypic variation among cultivated durum wheat based on EST-SSRs and genomic SSRs[J]. Euphytica, 2001, 119(1 - 2): 39 - 43.

[32] 许巧情，谢骏，许书环，等. 三角帆蚌微卫星富集文库的构建、鉴定及多态性分析[J]. 中国水产科学，2010，17(6)：1200 - 1207.

[33] 李琪，木岛明博. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)微卫星克隆快速分离及特性分析[J]. 海洋与湖沼，2004，35(4)：364 - 370.

[34] 李春艳，丁君，常亚青，等. 虾夷扇贝微卫星标记的分离及其养殖群体的遗传结构分析[J]. 中国水产科学，2009，16(1)：39 - 46.

[35] 薛明，杜晓东，黄荣莲，等. 文蛤三个野生种群的生化遗传变异[J]. 海洋通报，2006，25(1)：38 - 43.

[36] Callen D F, Thompson A D, Shen Y, *et al*. Incidence and origin of “null” alleles in the(AC)n microsatellite markers[J]. Am J Hum Genet, 1993, 52(5): 922 - 927.

[37] Miller C R, Joyce P, Waits L P. Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood[J]. Genetics, 2002, 160(1): 357 - 366.

[38] Chang Y M, Liang L Q, Ma H T, *et al*. Microsatellite analysis of genetic diversity and population structure of Chinese mitten crab(*Eriocheir sinensis*)[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2008, 35(3): 171 - 176.

[39] 张天时，刘萍，李健，等. 用微卫星 DNA 技术对中国对虾人工选育群体遗传多样性的研究[J]. 水产学报，2005，29(1)：6 - 12.

[40] Hedgecock D, Li D, Hubert S, *et al*. Wide spread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Journal of Shellfish Research, 2004, 23(2): 379 - 385.

[41] Huvet A, Boudry P, Ohresser M, *et al*. Variable microsatellite in the Pacific oyster *Crassrstrea gigas* and other cupped oyster species[J]. Animal Genetics,2000, 31(1):71 - 72.
[42] Li Q,Liu S K,Kong L F. Microsatellite within genes and ESTs of the Pacific oyster *Crassrstrea gigas* and their transferability in five other *Crassrstrea* species [J]. Electronic Journal of Biotechnology,2009,12(3): 1 - 6.
[43] 董迎辉,吴国星,姚韩韩,等. 泥蚶 34 个 EST-SSR 标记的开发及在格粗饰蚶中的通用性检测[J]. 水产学报, 2013,37(1):70 - 77.
[44] 文明富,陈新,王海燕,等. 木薯基因组 SSR 和 EST-SSR 在麻疯树和橡胶树中的通用性分析[J]. 作物学报,2011,37(1):74 - 78.
[45] Gao L F, Tang J F, Li H W, *et al*. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches[J]. Molecular Breeding, 2003,12(3):245 - 261.

Identification of 30 microsatellite markers in *Meretrix meretrix* and their transferability in *Meretrix lamarckii* and *Meretrix lyrata*

QI Xiaoyan[1,2], DONG Yinghui[2], YAO Hanhan[2], ZHOU Xiaolong[3], LIN Zhihua[2*]
(1. *College of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo* 315211, *China*;
2. *Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources, Zhejiang Wanli University, Ningbo* 315100, *China*;
3. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306, *China*)

Abstract: 30 microsatellite loci of *Mereteix meretrix* were developed using microsatellite-enhanced genomic library and expressed sequence tags (ESTs). Genetic diversity was analyzed in a population consisting of 30 individuals. 8 G-SSRs and 22 EST-SSRs were found to be polymorphic. In these 30 microsatellite loci, a total of 140 alleles were identified, and the number of alleles varied from 3 to 6, with a mean of 4.67 alleles per locus. Polymorphic information content (*PIC*) ranged from 0.172 to 0.744. The observed heterozygosity (H_o) was from 0.040 to 0.720, while the expected heterozygosity (H_e) was from 0.187 to 0.793. The mean values of number of alleles, *PIC*, H_o, and H_e of G-SSRs were higher than those of the EST-SSRs. 24 of the 30 loci deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction. 11 EST-SSR identified from annotated genes were expected to be useful for mapping these genes in linkage maps. Interspecific transferability of the 30 markers revealed that 12 and 9 were polymorphic in *M. lamarckii* and *M. lyrata*, respectively. These loci obtained will lay a foundation for the study of genetic diversity, germplasm resources evaluation, marker-assisted selection (MAS) and other relevant research in *M. meretrix*, and these novel polymorphic SSR markers can be used for comparative mapping, gene tagging and QTL mapping among *M. meretrix*, *M. lamarckii* and *M. lyrata*.

Key words: *Mereteix meretrix*; G-SSRs; EST-SSRs; polymorphism; transferability

Corresponding author: LIN Zhihua. E-mail: zhihua9988@126.com