



基于新开发微卫星标记评价番红砗磲两个野生群体的遗传多样性及近缘种通用性检测

高红梅¹, 马海涛², 喻子牛², 张跃环²,
肖述², 黄飘逸¹, 彭建军^{1*}

(1. 重庆师范大学生命科学学院, 重庆 401331;

2. 中国科学院南海海洋研究所, 广东广州 510301)

摘要: 采用磁珠富集和PCR筛选相结合的方法, 得到番红砗磲的19个多态性微卫星标记。利用新开发微卫星标记对西沙群岛2个野生群体的遗传多样性进行比较分析, 七连屿海域野生群体和永兴岛海域野生群体的平均观测等位基因数(N_a)分别为11.105、11.895, 平均有效等位基因数(N_e)分别为6.274、6.173, 平均期望杂合度(H_e)分别为0.776、0.788, 平均多态性信息含量分别为0.730、0.744, 发现2个野生群体的遗传多样性都处于高度多态水平, 说明其有效群体大小仍然保持在较高水平。Bonferroni校正后, 在2个群体中各有4个位点偏离Hardy-Weinberg平衡。另外分析了这些引物在近缘种中的通用性情况, 发现鳞砗磲中有7对微卫星引物具有通用性, 6对具有多态性; 无鳞砗磲中有3对微卫星引物具有通用性, 1对具有多态性; 诺瓦砗磲中有5对微卫星引物具有通用性, 5对具有多态性; 长砗磲中有9对微卫星引物具有通用性, 8对具有多态性; 砗蚝中有2对引物具有通用性, 2对具有多态性。

关键词: 番红砗磲; 微卫星标记; 野生群体; 遗传多样性; 通用性; 西沙群岛

中图分类号: Q 347; S 917.4

文献标志码: A

番红砗磲(*Tridacna crocea*)属软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、帘蛤目(Veneroida)、砗磲科(Tridacnidae)、砗磲属(*Tridacna*), 分布于太平洋西部和印度洋东部海域^[1-3]。砗磲属于热带海洋贝类, 主要栖息在低潮区附近的珊瑚礁间或较浅礁内区域, 是珊瑚礁生态系统中的主要框架物种, 对于维持珊瑚礁生物多样性、生态系统稳定起关键作用。相较于其他砗磲种类, 番红砗磲是分布较为广泛, 外套膜颜色鲜艳的种类之一, 也是水族市场的新宠^[4-5]。由于砗磲可用于食物、贝壳工艺装饰品、水族馆活

体等, 遭到了过度开采, 导致砗磲在大尺度地理范围内特别是东南亚地区的数量急剧下降^[1, 6]。因此保护砗磲贝类资源刻不容缓。

微卫星DNA, 又称短串连重复(STRs)、简单重复序列(SSRs)、简单序列长度多态性(SSLP), 是指基因组中以1~6个核苷酸为单位串联组成的核苷酸序列^[7]。具有多态性检出率高、信息含量大、易于检测、等位基因条带较容易识别、遵循孟德尔遗传规律等特点, 广泛运用于亲子鉴定、群体遗传结构分析、物种进化以及遗传连锁图谱的构建等工作^[8-12]。

目前国内外对于番红砗磲微卫星标记的研

收稿日期: 2019-03-22 修回日期: 2019-05-26

资助项目: 国家自然科学基金(31470570, 31872566, 31702340); 国家重点研发计划(2018YFC1406505); 重庆市科委自然科学基金(cstc2014jcyjA80013); 广州市重点项目(201803020047, 201804020073); 广东省自然科学基金(2017A030310442)

通信作者: 彭建军, E-mail: jipeng74@163.com

究处于起步阶段。仅有DeBoer等^[13]通过磁珠富集获得9个微卫星标记并对Ulugan Bay 1个野生群体进行多样性分析; Hui等^[14]通过从已有的序列中筛选出9个微卫星标记, 并对Spermonde Archipelago 1个野生群体进行多样性分析; DeBoer等^[15]利用Barber开发的8对微卫星引物对Coral Triangle的27个群体进行了遗传多样性分析。但这些分子标记远不能满足番红砵礁群体遗传结构分析和遗传图谱构建等方面的需求。本研究通过磁珠富集法从番红砵礁基因组中开发出19对多态性高的微卫星标记, 并利用其对2个野生群体进行遗传多样性评价; 同时检测其在近缘种: 鳞砵礁(*T. squamosa*)、无鳞砵礁(*T. derasa*)、诺瓦砵礁(*T. noae*)、长砵礁(*T. maxima*)和砵蚝(*Hippopus hippopus*)中的通用性, 以期对相关物种的遗传多样性研究提供标记基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

番红砵礁野生群体(各30个个体)分别采自西沙群岛的七连屿海域(QLY)和永兴岛海域(YXD)。近缘种鳞砵礁、无鳞砵礁、诺瓦砵礁、长砵礁、砵蚝各3个个体采自七连屿海域。取其闭壳肌于95%的酒精中, -20℃保存备用。

1.2 番红砵礁基因组DNA的提取及酶切

采用常规酚—氯仿抽提法提取番红砵礁基因组DNA, 1%琼脂糖凝胶电泳检测所提取基因组DNA的完整性, NanoDrop2000分光光度计检测浓度和纯度, DNA样品置于-20℃冰箱保存备用。利用限制性核酸内切酶Sau3AI(TaKaRa)对不少于5 μg的基因组DNA进行酶切: 5 μg DNA、10×Buffer 5 μL、0.5 μL Sau3AI, 补水至50 μL。37℃金属浴消化4 h, 经1.5%琼脂糖凝胶检测酶切反应完全后, 使用SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒(上海生工生物工程有限公司)回收400~900 bp片段。

1.3 双链接头的制备和连接

取浓度为50 μmol/L的寡核苷酸链SauA(5'-GATCGTCGGTACCGAATTCT-3')和SauB(5'-GTCAAGAATTCGGTACCGTCGAC-3')各10 μL, 94℃变性10 min后等体积混合, 置于室温下5~6 h使其复性, 4℃冰箱保存备用。酶切产物与

双接头连接采用10 μL的反应体系, 包含胶回收DNA 3 μL、双接头5 μL、10×Buffer 1 μL、T₄ DNA连接酶1 μL, 16℃过夜连接。

1.4 第一次PCR扩增和纯化

反应体系为25 μL, 包含ddH₂O 12.6 μL、5×Buffer 5 μL、dNTP混合液1 μL、MgCl₂ 2 μL、OligaA(10 μmol/L) 2 μL、模板DNA 2 μL、Taq酶0.4 μL (Promega)。PCR反应程序: 94℃预变性5 min, 94℃变性45 s, 60℃退火45 s, 72℃延伸1 min, 30个循环, 72℃延伸10 min。利用SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒(上海生工生物工程有限公司)回收400~900 bp片段。

1.5 含有微卫星核心序列片段的富集

杂交 回收产物在PCR仪中95℃变性10 min, 快速置于冰上冷却, 转入杂交液中, 58℃温育3 h。连接产物与生物素标记探针比例为100 ng : 2 pmol, 杂交体系包含20×SSC 30 μL、10% SDS 1 μL、生物素标记的探针(GA)₁₆和(CA)₁₆各2 μL, OligaA(50 μmol/L) 10 μL, 变性DNA 20 μL, 补水至100 μL。

磁珠富集 取100 μL磁珠(Promega)放于1.5 mL灭菌离心管中, 磁力架上除上清液, 用200 μL Washing buffer(2.5 mL 20×SSC, 0.5 mL 10%SDS, 补水至50 mL)洗涤3次, 弃上清液, 加入杂交液, 43℃杂交4 h; 结束后洗涤4次, 每次15 min, 包含: ①Washing buffer室温清洗1次; ②Washing solution(5.844 g NaCl、500 μL 1 mol Tris.HCl、100 μL 0.5 mol EDTA, 补水至50 μL)室温清洗1次, 40℃清洗2次, 45℃清洗1次; ③45℃0.1×TE清洗2次; ④除上清液, 加50 μL灭菌水, 95℃变性10 min后, 快速插入冰水混合物中3 min, 置于磁力架上, 取上清液于新的灭菌离心管中, 即为含微卫星序列的单链DNA, 置于-20℃冰箱中保存备用。

1.6 第二次PCR

反应体系同第一次PCR, 并用上海生工生物工程有限公司的SanPrep柱式PCR产物纯化试剂盒进行纯化, 放于-20℃冰箱中保存备用。

1.7 富集片段的克隆及筛选

使用pGEM-T Easy载体(Promega)16℃过夜连接, 连接体系10 μL, 包含pGEM-T Easy载体

1 μL 、 $2\times\text{Rapid ligation buffer}$ 5 μL 、 T_4 DNA连接酶 1 μL 、胶回收产物 3 μL 。将连接产物加入 100 μL DH5 α 感受态细胞中,进行转化和培养。挑取阳性单克隆,使用载体引物 SP6、T7及无生物素标记的探针序列(GA)₁₂或(CA)₁₂对随机挑选的克隆进行菌落PCR检测。PCR产物通过1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,选择有2条或2条以上条带对应的菌液送往上海英俊生物公司进行测序。

1.8 引物设计

测序结果用SSR Hunter软件查找含有微卫星核心的序列。查找准则:2碱基单元重复次数5次及以上;3碱基单元重复4次及以上;4、5、6碱基单元重复3次及以上。Primer Premier 5.0(<http://www.premierbiosoft.com>)软件进行引物设计,在设计好的上游引物中加入通用接头序列(TGTAAA ACGACGGCCAGT),送往上海生工生物工程有限公司合成。

1.9 引物筛选及野生群体遗传多样性分析

利用5个模板对合成引物进行筛选,PCR反应体系10 μL 包含 $2\times\text{Taq PCR Master Mix}$ 5 μL 、上游引物(浓度10 pmol/L) 0.1 μL 、下游引物(浓度10 pmol/L) 0.4 μL 、带荧光的M13引物(浓度10 pmol/L)0.4 μL 、模板(基因组DNA)1 μL 、补水至10 μL 。PCR反应程序为95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,30个循环(95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s),8个循环(95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s),最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。扩增产物用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行筛选,挑选出条带清晰且无杂带的多态性微卫星引物。利用筛选出的多态性微卫星引物对番红砵磔2个野生群体进行扩增,并对其遗传多样性进行评价。Popgene 32软件统计每个微卫星位点的观测等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)。Genepop软件检验哈迪—温伯格(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)平衡,并采用Bonferroni校正。PIC Calc 6.0软件计算每个微卫星位点的多态性信息含量值(PIC)。

1.10 近缘种中通用性检测

19对番红砵磔微卫星引物在鳞砵磔、无鳞砵磔、诺瓦砵磔、长砵磔、砵蚝各3个个体中进行PCR扩增,8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染染色,扫描仪拍照记录,根据电泳图谱分

析各个微卫星位点在近缘种中的通用性。

2 结果

2.1 微卫星序列特征

利用三引物菌落PCR法随机检测200个菌落,将阳性克隆送测,其中有129个含有微卫星核心序列,富集效率为64.50%,表明此方法能够大批量筛选微卫星序列。依据Weber^[16]提出的微卫星的划分标准,微卫星的类型包含完美型(perfect)、非完美型(imperfect)和复合型(compound)。完美型微卫星是指无中断的重复序列,非完美型是指具有1个或者多个中断的重复序列,复合型则为3个以下的非重复碱基间隔不同的重复序列或者不间隔直接相连^[16-18]。所有微卫星序列中,完美型微卫星82个(63.57%),非完美型和复合型微卫星47个(36.43%),微卫星重复单元分别为GA、CA、GAG、AGAC、TCTG、TCTA。

2.2 微卫星标记的多态性分析

共筛选出19个多态性微卫星位点(表1),毛细管分型多在3 000以上,电泳条带清晰且稳定,表现出较高的多态性,说明这些微卫星标记可满足群体遗传多样性评价的需要(图1)。利用YXD的1个野生群体对这些微卫星位点的多态性进行了评价(表2)。

在YXD野生群体中共检测到221个等位基因,每个位点的等位基因数为2~22个,平均等位基因数为11.895个。其中Tc2-39的等位基因数最少,为2个,Tc1-5的等位基因数最多,为22个。 (N_e) 为1.835~12.062,均值为6.173; (H_o) 为0.393~0.933,均值为0.680; (H_e) 为0.463~0.930,均值为0.788; PIC 为0.352~0.911,均值为0.744,其中高度多态性的位点($PIC>0.5$)有15个,占78.95%,中度多态性的位点($0.25<PIC<0.5$)有4个,占21.05%。

2.3 微卫星标记的Hardy-Weinberg平衡检测

Hardy-Weinberg平衡检测结果显示,在YXD野生群体中,微卫星位点Tc2-35、Tc2-37、Tc3-12、Tc3-15显著偏离Hardy-Weinberg平衡,占总位数的21.05%;在QLY野生群体中微卫星位点Tc2-35、Tc3-10、Tc3-12、Tc3-15显著偏离Hardy-Weinber平衡,占总位数的21.05%。其余位点均

表 1 番红砗磲19对微卫星引物的序列特征

Tab. 1 Characteristics of 19 pairs of microsatellite primers from *T. crocea*

位点 locus	重复单元 repeat motif	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	产物长度/bp size range	GenBank登录号 GenBank no.
Tc1-5	(GA) ₁₅	F:TGTAACACGACGGCCAGTGATTACCGACGCTTTGAA R:CAGTTGTTGTTGCTTCTT	112	MK064504
Tc2-2	(GA) ₄₉	F:TGTAACACGACGGCCAGTGAGATCAGCGGAAGTTGGAC CGCCTTTGGGACAGTTA	189	MK064505
Tc2-13	(GA) ₁₁	F:TGTAACACGACGGCCAGTGAAGTATTGTCGCATAGGG R:GTCAACTGTCAACCGTCA	144	MK064506
Tc2-27	(GA) ₁₁	F:TGTAACACGACGGCCAGTGAACGACCCTCTGTCCTCA GTATTTCCGACTCCTGCT	269	MK064507
Tc2-35	(CT) ₁₈	F:TGTAACACGACGGCCAGTGAGCCGAAATGGGCGATAA R:CTGTTCTCAAGCCCTGTT	210	MK064508
Tc2-36	(GA) ₁₁	F:TGTAACACGACGGCCAGTGAACGACCCTCTGTCCTCA R:ATTTCCGACTCCTGCTCT	267	MK064509
Tc2-37	(GA) ₁₂	F:TGTAACACGACGGCCAGTGTCACCTTTCCTCACCATG R:TTTGGCTCCCTTTCAGTG	168	MK0645010
Tc2-38	(GA) ₉	F:TGTAACACGACGGCCAGTGCTGACCCTGGTTCGATAAT R:TTCCAGGAAGCAGAACCA	338	MK0645011
Tc2-39	(GA) ₇	F:TGTAACACGACGGCCAGTGAAGAATCAGACACCCATCA TGCATCTGCGAAAGAAT	169	MK0645012
Tc2-40	(GA) ₅ (GA) ₂₆	F:TGTAACACGACGGCCAGTGCTGGTTTACATCCGTGAC R:ATTTACACCGTCCGCTTG	216	MK0645013
Tc3-10	(CT) ₁₂	F:TGTAACACGACGGCCAGTGATTTTCTGACCAAACCCC R:GTCCGGTAAGATGTTTTC	248	MK0645014
Tc3-12	(GA) ₂₂	F:TGTAACACGACGGCCAGTGTAAGCGTTTTGTACCTGG AGCACTGTTCGATAAGCA	277	MK0645015
Tc3-15	(GA) ₁₄	F:TGTAACACGACGGCCAGTGCTTGATACCGTCAGAAAC R:TCCAACTCTATGGTGCT	239	MK0645016
Tc3-24	(CT) ₆ (CT) ₁₂	F:TGTAACACGACGGCCAGTGCTTTAGCTCACATCATGC R:CGTAGTATTTAGTCCAC	143	MK0645017
Tc3-45	(GA) ₂₄	F:TGTAACACGACGGCCAGTGATTGGATAACTGGCCGATGG R:TCCCTCAAGTTGTCAGCA	161	MK0645018
Tc3-65	(GA) ₁₆	F:TGTAACACGACGGCCAGTGAGGAAATGGTATCCGAAGG AGCAACATCCGTTGGGTA	296	MK0645019
Tc3-69	(GT) ₅ (GA) ₁₀	F:TGTAACACGACGGCCAGTGACGCAAATGTCGAAGGT R:ACGTGTCGAGCTTGTGTA	229	MK0645020
Tc3-76	(CT) ₂₁	F:TGTAACACGACGGCCAGTGCAAGACCGAAGTCACGG R:CGAGACGACACTTTACGC	175	MK0645021
Tc3-86	(GA) ₇	F:TGTAACACGACGGCCAGTGGCAAAGAGGCAGATGGAC R:GCAAAGAGGCAGATGGAC	225	MK0645022

符合Hardy-Weinberg平衡。

2.4 两个野生群体的遗传多样性评价

利用所有微卫星标记对QLY 1个野生群体进行了遗传多样性评价。共检测到211个等位基因, 每个位点的等位基因数为2~23个, 平均等位基因为11.105个。 (N_e) 为1.600~15.790, 均值为6.274; (H_o) 为0.379~0.867, 均值为0.639; (H_e) 为0.381~0.953, 均值为0.776; PIC 为0.305~0.933, 均值为0.730。

QLY野生群体和YXD野生群体的 N_a 分别为11.105、11.900, N_e 分别为6.274、6.173, H_o 分别为0.639、0.680, H_e 分别为0.776、0.788, PIC 分别为0.730、0.744; 2个野生群体和养殖群体的香农—威纳多样性指数分别为0.647~2.659、0.562~2.932, 平均值分别为1.920和1.876, 比较2个野生群体6组数据的均值, 除 N_e 外, YXD群体都高于QLY群体, 但对以上6组数据 F 检验无显著差

异。说明YXD野生群体的遗传多样性高于QLY群体, 但是二者之间的差异并不显著。

2.5 番红砗磲微卫星引物在近缘种中的通用性

对番红砗磲微卫星引物在近缘种鳞砗磲、无鳞砗磲、诺瓦砗磲、长砗磲、砗蚝中的通用性和多态性情况进行分析, 结果显示, 19对番红砗磲微卫星引物在鳞砗磲中有7对适用(36.84%), 6对具有多态性; 无鳞砗磲3对适用(15.79%), 1对具有多态性, 诺瓦砗磲5对适用(26.32), 5对具有多态性; 长砗磲9对适用(47.37%), 8对具有多态性; 砗蚝2对适用(10.53), 2对具有多态性(表3)。

3 讨论

微卫星在贝类遗传多样性分析方面的应用广泛, 目前获得微卫星的方法主要有构建小插

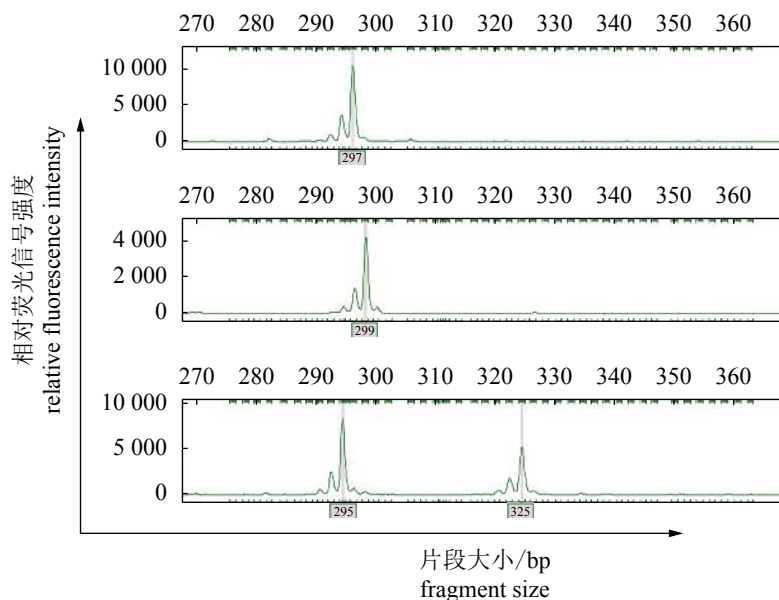


图 1 位点 Tc2-27 的毛细管电泳图

Fig. 1 Diagram of capillary electrophoresis results for locus Tc2-27

表 2 19 对微卫星标记在番红砵野生群体中的遗传多样性参数

Tab. 2 Genetic diversity parameters of 19 microsatellite primers for wild population of *T. crocea*

位点 locus	N_a	N_e	H_o	H_e	PIC	I	P
Tc1-5	22	7.547	0.828	0.883	0.859	2.549	0.257
Tc2-2	13	6.000	0.933	0.848	0.819	2.133	0.084
Tc2-13	16	6.675	0.791	0.8658	0.836	2.267	0.046
Tc2-27	17	10.782	0.759	0.923	0.900	2.570	0.011
Tc2-35	17	11.688	0.567	0.930	0.908	2.620	0*
Tc2-36	15	8.995	0.759	0.904	0.879	2.405	0.052
Tc2-37	13	7.112	0.593	0.876	0.846	2.212	0*
Tc2-38	15	9.064	0.929	0.906	0.880	2.399	0.108
Tc2-39	2	1.835	0.700	0.463	0.352	0.647	0.004
Tc2-40	16	5.788	0.767	0.841	0.813	2.206	0.004
Tc3-10	9	3.249	0.567	0.704	0.645	1.505	0.008
Tc3-12	8	5.388	0.393	0.829	0.792	1.859	0*
Tc3-15	12	5.741	0.448	0.840	0.806	2.020	0*
Tc3-24	7	5.333	0.500	0.867	0.787	1.787	0.050
Tc3-45	18	12.062	0.893	0.934	0.911	2.659	0.235
Tc3-65	12	3.607	0.667	0.735	0.696	1.744	0.039
Tc3-69	6	2.048	0.533	0.520	0.456	0.981	0.020
Tc3-76	3	2.140	0.767	0.542	0.454	0.878	0.023
Tc3-86	5	2.233	0.519	0.563	0.496	1.640	0.007
均值 mean value	11.895	6.173	0.680	0.788	0.743	1.920	

注: N_a 等位基因数, N_e 有效等位基因数, H_o 观测杂合度, H_e 期望杂合度, PIC 多态性信息含量, I 香农指数, P 哈迪—温伯格平衡, * 显著偏离哈迪—温伯格平衡

Notes: N_a number of alleles, N_e number of effective alleles, H_o observed heterozygosity, H_e expected heterozygosity, PIC polymorphism information content, I Shannon's information index, P Hardy-Weinberg equilibrium, * deviations from Hardy-Weinberg equilibrium

表3 近缘种间通用性和多态性检测

Tab. 3 Cross-priming success in 5 additional *Tridacna* spp.

位点 locus	鳞砗磲 <i>T. squamosa</i>	无鳞砗磲 <i>T. derasa</i>	诺瓦砗磲 <i>T. noae</i>	长砗磲 <i>T. maxima</i>	砗蚝 <i>H. hippopus</i>
Tc1-5				√*	
Tc2-2	√*			√*	√*
Tc2-13	√*		√*	√*	
Tc2-27	√*	√		√*	
Tc2-35	√*		√*	√*	
Tc2-36	√*		√*	√*	
Tc2-38	√*			√*	√*
Tc3-12	√				
Tc3-24		√*	√*	√	
Tc3-65		√	√*		
Tc3-76				√*	

注: √*.引物在近缘种中同时具有通用性和多态性; √.引物仅具有通用性

Notes: √*.primer was universal and polymorphic in cross-species; √. primer was universal in cross-species

入片段基因组文库、数据库查找法、构建微卫星富集文库、近缘物种通用性开发获得、454测序技术^[9]。本实验通过生物素标记(GA)₁₆、(CA)₁₆探针,利用磁珠富集与PCR筛选相结合的方法,共获得19对多态性高、特异性强的微卫星引物。

利用永兴岛海域1个野生群体对所有微卫星标记进行了多态性评价。*PIC*是指一个后代所获得的某个等位基因标记来自它亲本的同一个等位标记的可能性大小,是衡量基因座位在群体多态性的指标^[20],*YXD*野生群体的*PIC*均值大于0.5,表明群体遗传多样性较高。*PIC*是衡量基因变异程度的指标:*PIC*<0.25时为低度多态性位点,0.25<*PIC*<0.5时为中度多态性位点,*PIC*>0.5时为高度多态性位点。19个多态性位点中,Tc2-39(0.352)、Tc3-69(0.456)、Tc3-76(0.454)、Tc3-86(0.500)处于中度多态性位点;其余位点均大于0.5,处于高度多态性^[21]。在遗传多样性分析中,*PIC*值大于0.7的微卫星DNA是较理想的遗传标记^[22],本研究中Tc1-5、Tc2-2、Tc2-13、Tc2-27、Tc2-35、Tc2-36、Tc2-37、Tc2-38、Tc2-40、Tc3-12、Tc3-15、Tc3-24、Tc3-45位点均可作为未来遗传连锁分析的候选标记。另外发现位点Tc2-27的有效等位基因数、观测杂合度、多态性信息含量均最高,表明该位点存在较大的遗传变异。

<http://www.scxuebao.cn>

在2个野生群体中,各有4个位点显著偏离Hardy-Weinberg平衡,其原因主要是纯合子过剩,这可能与番红砗磲的生活方式和繁殖习性有关,番红砗磲是雌雄同体生物,通过足丝附着在珊瑚礁上生活或营自由生活,繁殖期间先释放精子后排放卵子,这种生活习性可能发生近亲繁殖,导致微卫星位点偏离Hardy-Weinberg平衡^[23]。已有研究发现固着型海洋贝类存在微卫星位点偏离Hardy-Weinberg平衡的情况^[24-25]。除此之外,无效等位基因也是导致微卫星位点偏离Hardy-Weinberg平衡现象的原因之一^[26]。

微卫星侧翼序列在属内种间和有亲缘关系的种间较保守,且在较远亲缘关系的种间也具有保守性^[27],微卫星引物在亲缘关系越近的物种间实现跨种扩增的可能性越大^[28]。本研究中,属间的通用性最差(10.53%),种间中与番红砗磲亲缘关系最远的无鳞砗磲通用性最差(15.79%),长砗磲最高(43.37%)。与DeBoer等^[13]和Hui等^[14]跨种扩增研究结果相同,通用性最高的也是长砗磲,通用率分别为100%、88.89%;最差的是库氏砗磲(*T. gigas*),分别为44.45%、33.34%。本研究中微卫星引物通用率较低,一方面可能是本实验在上游引物的5'加了通用接头(TGTAACCGACGGCCAGT),增大了引物与序列的错配,从而导致扩增效率降低;另一方面可能与微卫星的核心序列重复类型有关,有分析发现三碱基重复微卫星的通用率高于两碱基重复微卫星^[13],三碱基重复通用率为60%~100%,两碱基为25%~50%;Hui等^[14]研究中三碱基重复率为50%~100%,两碱基重复率为11%~100%。上述结果说明三碱基重复微卫星侧翼序列的保守性远高于两碱基重复微卫星,而本研究获得的微卫星标记都是两碱基重复微卫星,因而通用性较差。研究微卫星标记在近缘种中的通用性,可减少其开发成本,提高利用率,对遗传研究较少的物种有促进作用。这些通用引物为鳞砗磲、无鳞砗磲、诺瓦砗磲、长砗磲、砗蚝的遗传多样性评价奠定基础。

参考文献:

- [1] Lucas J S. The biology, exploitation, and mariculture of giant clams (Tridacnidae)[J]. *Reviews in Fisheries Science*, 1994, 2(3): 181-223.
- [2] 张素萍. 中国海洋贝类图鉴[M]. 北京: 海洋出版社, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 2008: 317-321.
- Zhang S P. Atlas of marine mollusks in China[M]. Beijing: Ocean Publishing Press, 2008: 317-321(in Chinese).
- [3] Bin Othman A S, Goh G H S, Todd P A. The distribution and status of giant clams (family *Tridacnidae*)-a short review[J]. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 2010, 58(1): 103-111.
- [4] 董杨, 李向民. 砗磲资源保护、开发及其产业化发展前景[J]. *水产科学*, 2015, 34(3): 195-200.
- Dong Y, Li X M. Protection, development and industrialization of tridacnidae stock[J]. *Fisheries Science*, 2015, 34(3): 195-200(in Chinese).
- [5] 刘小霞. 光照对番红砗磲生长及呼吸排泄的影响[D]. 海口: 海南大学, 2017.
- Liu X X. Effects of light on the growth, respiration and excretion in *Tridacna crocea*[D]. Haikou: Hainan University, 2017(in Chinese).
- [6] 杨文, 蔡英亚, 邝雪梅. 中国南海经济贝类原色图谱[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013: 194-196.
- Yang W, Cai Y Y, Kuang X M. Color atlas of economic mollusca from the South China Sea[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013: 194-196(in Chinese).
- [7] Tóth G, Gáspári Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis[J]. *Genome Research*, 2000, 10(7): 967-981.
- [8] 郑先虎, 匡友谊, 吕伟华, 等. 水产生物基因组研究进展与趋势[J]. *水产学报*, 2019, 43(1): 15-35.
- Zheng X H, Kuang Y Y, Lv W H, *et al.* Progress and perspective of the genome research in aquatic organisms[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(1): 15-35(in Chinese).
- [9] Huber K, Mousson L, Rodhain F, *et al.* Short report: microsatellite sequences as markers for population genetic studies of the mosquito *Aedes aegypti*, the vector of dengue viruses[J]. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1999, 61(6): 1001-1003.
- [10] Li Q, Zheng X D, Yu R H. Inheritance mode of microsatellite loci and their use for kinship analysis in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2008, 26(3): 256-262.
- [11] Feng L Y, Hu L P, Fu X T, *et al.* An integrated genetic and cytogenetic map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri*, based on microsatellite markers[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e92567.
- [12] Mohanty P, Sahoo L, Pillai B R, *et al.* Genetic divergence in Indian populations of *Macrobrachium rosenbergii* using microsatellite markers[J]. *Aquaculture Research*, 2016, 47(2): 472-481.
- [13] DeBoer T S, Barber P H. Isolation and characterization of 9 polymorphic microsatellite markers for the endangered boring giant clam (*Tridacna crocea*) and cross-priming testing in three other Tridacnid species[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2010, 2(S1): 353-356.
- [14] Hui M, Kochzius M, Leese F. Isolation and characterisation of nine microsatellite markers in the boring giant clam (*Tridacna crocea*) and cross-amplification in five other tridacnid species[J]. *Marine Biodiversity*, 2012, 42(2): 285-287.
- [15] DeBoer T S, Naguit M R A, Erdmann M V, *et al.* Concordant phylogenetic patterns inferred from mitochondrial and microsatellite DNA in the giant clam *Tridacna crocea*[J]. *Bulletin of Marine Science*, 2014, 90(1): 301-329.
- [16] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n•(dG-dT)_n polymorphisms[J]. *Genomics*, 1990, 7(4): 524-530.
- [17] Winter A K, Fredholm M, Thomsen P D. Variable (dG-dT)_n•(dC-dA)_n sequences in the porcine genome[J]. *Genomics*, 1992, 12(2): 218-228.
- [18] Buschiazzo E, Gemmell N J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes[J]. *BioEssays*, 2006, 28(10): 1040-1050.
- [19] 孙波, 鲍毅新, 赵庆洋, 等. 微卫星位点获取方法的研究进展[J]. *生物学杂志*, 2009, 28(10): 2130-2137.
- Sun B, Bao Y X, Zhao Q Y, *et al.* Methods for obtaining microsatellite loci: a review[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28(10): 2130-2137(in Chinese).
- [20] 彭银辉, 刘楚吾, 郭昱嵩, 等. 三种笛鲷的野生群体和养殖群体遗传多样性的微卫星分析[J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(5): 810-814.
- Peng Y H, Liu C W, Guo Y S, *et al.* Microsatellites analysis on genetic diversities of three species from wild and cultured populations of snappers (*Lutjanus*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2008, 16(5): 810-814(in Chinese).
- [21] Suci A, Uthairrt N, Worawut K. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coiodes* from Thailand and Indonesia using microsatellite markers (J)[J]. *Marine Biotechnology*, 2005, 1: 1-10.
- [22] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction

- of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [23] Soo P, Todd P A. The behaviour of giant clams (Bivalvia: Cardiidae: Tridacninae)[J]. *Marine Biology*, 2014, 161(12): 2699-2717.
- [24] Wang Y, Wang A M, Guo X M. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the northern quahog *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758)[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2010, 29(1): 77-82.
- [25] 吴雪萍, 马海涛, 冯艳微, 等. 缢蛏(*Sinonovacula constricta*)微卫星标记的分离及近缘物种通用性[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(6): 1330-1337.
- Wu X P, Ma H T, Feng Y W, *et al.* Isolation of microsatellite loci from razor clam *Sinonovacula constricta* and transferability to related species[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(6): 1330-1337(in Chinese).
- [26] Lehmann T, Hawley W A, Collins F H. An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles[J]. *Genetics*, 1996, 144(3): 1155-1163.
- [27] Rico C, Rico I, Hewitt G. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1996, 263(1370): 549-557.
- [28] 赵丽丽. 3种石斑鱼微卫星标记的开发及跨种扩增[D]. 南昌: 南昌大学, 2008.
- Zhao L L. Development and cross-species amplification of microsatellite markers from three groupers[D]. Nanchang: Nanchang University, 2008(in Chinese).

Microsatellite markers based on new development for evaluation of the genetic diversity of two wild populations of *Tridacna crocea* and transferability to related species

GAO Hongmei¹, MA Haitao², YU Ziniu², ZHANG Yuehuan²,
XIAO Shu², HUANG Piaoyi¹, PENG Jianjun^{1*}

(1. College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China;

2. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Abstract: Using magnetic-bead enrichment and PCR screening method, we obtained 19 pairs of microsatellite primers from *Tridacna crocea*. Comparison between Qilianyu and Yongxing Island wild populations with these markers shows: the mean allele number and the effective allele number were 11.105, 11.895 and 6.274, 6.173 respectively; the values of average expected heterozygosity were 0.776 and 0.788; the mean *PIC* was 0.730 and 0.744; high genetic diversity was maintained in those wild populations. Four loci significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction in each population. In addition, the transferability of all polymorphic short sequence repeats (SSRs) was assessed in five closely-related species. The test resulted in 7 loci amplifying and 6 loci being polymorphic in *T. squamos*; 3 loci amplifying and 1 loci being polymorphic in *T. derasa*; 5 loci amplifying and 5 loci being polymorphic in *T. noae*; 9 loci amplifying and 8 loci being polymorphic in *T. maxima*; 2 loci amplifying and 2 loci being polymorphic in *H. hippopus*.

Key words: *Tridacna crocea*; microsatellites; wild population; genetic diversity; transferability; Xisha Islands

Corresponding author: PENG Jianjun. E-mail: jjpeng74@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China(31470570, 31872566, 31702340); National Key Research and Development Plan(2018YFC1406505); Natural Science Foundation Project of Chongqing(cstc2014jcyjA80013); Key Projects in Guangzhou (201803020047, 201804020073); Natural Science Foundation Project of Guangdong(2017A030310442)