

DOI: 10.5846/stxb201305151071

闫路路, 秦艳杰, 闫喜武, 王琳楠, 毕成隆, 张津源. 基于转录组平台的蛤仔微卫星标记筛选. 生态学报, 2015, 35(5): 1573-1580.

Yan L L, Qin Y J, Yan X W, Wang L N, Bi C L, Zhang J Y. Development of microsatellite markers in *Ruditapes philippinarum* using next-generation sequencing. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(5): 1573-1580.

基于转录组平台的蛤仔微卫星标记筛选

闫路路, 秦艳杰, 闫喜武*, 王琳楠, 毕成隆, 张津源

大连海洋大学, 水产与生命学院, 辽宁省贝类良种繁育工程技术研究中心, 大连 116023

摘要:以菲律宾蛤仔转录组测序所得拼接序列为基础, 采用 MISA 软件进行微卫星分析, 对其中的 145 个微卫星位点进行引物设计, 得到具有清晰扩增条带的微卫星位点 58 个。对大连庄河野生蛤仔群体的扩增结果表明, 18 个位点显示单态性, 40 个位点表现为多态性。该群体 40 个多态性微卫星位点得到的等位基因数在 2—6 之间, 平均等位基因数为 3.4250 ± 0.9718 , 观测杂合度和期望杂合度分别在 0.0000—1.0000 和 0.0615—0.7996 之间, 平均值分别为 0.2727 ± 0.2272 和 0.4739 ± 0.1902 , 群体平均 Nei 指数为 0.4664 ± 0.1872 。多态信息含量 (PIC) 在 0.0586—0.7529 之间, 平均值为 0.4148 ± 0.1707 , 其中 16 个微卫星位点的 PIC 值大于 0.5, 为高度多态性, 15 个位点 $0.25 < \text{PIC} < 0.5$, 为中度多态性, 其余 9 个为低度多态性。经 Sequential Bonferroni 校正的 Hardy-Weinberg 平衡检验, 有 10 个位点尚未偏离平衡。基于转录组平台筛选微卫星标记的方法, 在很大程度上推动了 DNA 分子标记的开发。研究开发的微卫星标记可用于蛤仔群体遗传学、遗传连锁图谱构建及其他相关研究, 为蛤仔分子标记辅助育种及群体种质保护等工作提供技术支持。

关键词: 菲律宾蛤仔; 转录组; 微卫星; 遗传多样性

Development of microsatellite markers in *Ruditapes philippinarum* using next-generation sequencing

YAN Lulu, QIN Yanjie, YAN Xiwu*, WANG Linnan, BI Chenglong, ZHANG Jinyuan

Engineering Research Center of Shellfish Culture and Breeding in Liaoning Province, College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian, 116023, China

Abstract: *Ruditapes philippinarum* has a high growth rate, short culture cycle, and is highly adaptable. Because of these traits, it is one of China's four major cultured shellfishes, and one of the world's major cultured shellfishes. Microsatellites known as simple sequence repeats are widely used to assess genetic diversity in farmed aquatic species populations, construct molecular genetic maps, and carry out gynogenesis, gene mapping, gene cloning, and paternity tests. These molecular markers have high stability and polymorphism, are site-specific and easily detected, and exhibit codominant inheritance and transferability of SSR primers. At present, the sustainable culture of *Ruditapes philippinarum* is threatened by having a single breeding method and difficulties with disease prevention, control, and treatment. We developed a series of microsatellite markers using a transcriptome-based platform to provide a foundation for genetic research in *Ruditapes philippinarum*. These markers may also be used for *Ruditapes* marker-assisted breeding. Genetic diversity measures the degree of variability of biological genetic information. DNA is the primary carrier of genetic information, so the diversity of DNA directly reflects the degree of genetic variation. The genetic diversity of a population can be represented by the number of alleles, heterozygosity scores, and polymorphism information content (PIC). We sequenced a large number of ESTs and

基金项目: 国家 863 计划 (2012AA10A410-2); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助 (CARS-48)

收稿日期: 2013-05-15; 网络出版日期: 2014-04-17

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yanxiwu2002@163.com

screened 145 potential microsatellites of trinucleotide repeats using MISA software. We successfully obtained clear, reproducible bands for 58 microsatellite loci. These were amplified in 32 wild clam individuals sampled from Zhuanghe, Dalian, Liaoning. A single allele was detected at 18 loci and another 40 were polymorphic (number of alleles per locus ranged from 2 to 6, with an average of 3.4250 ± 0.9718). The observed and expected heterozygosity was 0.000—1.000 (0.2727 ± 0.2272) and 0.0615—0.7996 (0.4739 ± 0.1902), respectively. The average of the Nei index was 0.4664 ± 0.1872 . The polymorphism information content (PIC) of all loci ranged from 0.0586 to 0.7529 (0.4148 ± 0.1707). Among these, 16 loci had a PIC of >0.5 , so were classified as highly polymorphic. An additional 15 loci were moderately polymorphic with PICs ranging from 0.25 to 0.5. The PIC of 9 loci was <0.25 , meaning that these were classified as low polymorphic loci. Using a test of the Hardy-Weinberg principle (χ^2 test) and sequential Bonferroni calibration, all except 10 loci had deviated equilibrium. Eight loci had a core sequence of TTG, 6 had a core sequence of TGG, and 5 each had a core sequence of TGT or ATC. These four core sequences accounted for 41.38% of the 58 SSR screened loci. Based on this, we infer that TTG, TGG, TGT, and ATC are relatively abundant copy categories of the trinucleotide repeat sequences. Our results provide a reference for subsequent repetitive sequence screening and further understanding the characteristics of the *Ruditapes* genome. Microsatellite marker development by transcriptome sequencing proved to be efficient and feasible in *R. philippinarum*. Further in-depth analysis based on transcriptome analysis will likely yield more microsatellite sites which are associated with functional genes, thereby providing more molecular markers for *Ruditapes* artificial marker-assisted breeding. These polymorphic markers may also be used in future studies of population genetics, linkage mapping and assisted breeding in *R. philippinarum*.

Key Words: *Ruditapes philippinarum*; transcriptome sequencing; microsatellite markers; genetic diversity

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) 又称蛤仔^[1], 具有生长快、周期短、适应强等特点, 是我国四大养殖贝类之一, 也是世界主要养殖贝类之一。据 FAO (Food and Agriculture Organization) 统计, 2011 年世界蛤仔产量为 368 多万 t。我国年产量约 300 多万吨, 占世界总产量的 90% 以上, 占我国海水养殖总产量的 20%, 贝类产量的 30%^[2]。现阶段, 菲律宾蛤仔正面临着育种方式单一和病害防治难等问题, 以转录组平台为基础, 开发一系列微卫星标记^[3-4], 可为系统开展蛤仔物种遗传多样性的研究奠定基础, 也将有助于蛤仔标记辅助育种工作的开展。微卫星, 又称简单重复序列 (SSR)^[5], 具有高稳定性、高多态性、引物通用性、位点特异性、检测方便和呈共显性遗传等特点^[6-7], 是广泛应用于水产动物遗传多样性分析^[8]、遗传图谱构建^[9]、雌核发育^[10]、基因定位及克隆^[11]、亲权鉴定^[12]等的理想分子标记。菲律宾蛤仔微卫星引物的开发和遗传多样性分析有一系列相关报道, 如闫喜武^[13]等利用微卫星标记对 3 个地区蛤仔群体进行遗传多样性分析。虞志飞等人^[14]利用 SSR 引物查明年龄结构对蛤仔遗传多样性的影响。2007 年 N. YASUDA^[15]等人用 9 对引物对菲律宾蛤仔进行遗传多样性分析。2009 年韩国学者 Hye Suck An^[16]等人利用 13 个微卫星标记位点对菲律宾蛤仔进行遗传多样性研究。由于引物开发的局限, 目前蛤仔尚没有足够的微卫星标记用于相关遗传学研究。

蛤仔转录组数据平台可以提供大量 EST (expressed sequence tags) 数据, 且直接与功能基因密切相关。本文将转录组测序所得数据用于蛤仔微卫星标记开发、筛选和遗传多样性分析, 此研究将为蛤仔遗传图谱的构建、亲权鉴定、QTL (quantitative trait locus) 定位等提供批量的微卫星位点, 并为蛤仔的分子标记辅助育种和种质保护等工作提供强有力技术支持。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本实验材料为采自大连庄河的 32 个野生菲律宾蛤仔个体。壳长为 (1.5 ± 0.2) cm。

1.2 基因组 DNA 的提取

分别剪取 32 只蛤仔的足 100 mg 左右,于离心管中剪碎,采用常规的酚/氯仿抽提的方法^[16]提取 DNA,后用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量 (golden view 染色)。模板 DNA 保存于 -20 °C 冰箱中待用。

1.3 微卫星序列的来源

根据罗氏 454 公司的 Genome Sequencer (GS) 高通量测序得到的所有数据进行 reads 长度频数的统计,使用软件 SeqClean (Lastest86_64 版本) 和 Lucy (1.20p 版本) 处理原始数据,去掉接头和引物序列,保留 50 bp 长度的序列。利用 454 Newbler2.5.3 软件去除低质量区域序列,将保留的 50 bp 长度的序列进行拼接,将拼接得到的序列用 MISA 软件进行 SSR 分析。对于非混合型 SSR 位点,设置条件为单碱基类型重复至少 10 次,2 碱基类型重复至少 6 次,大于等于 3 个碱基类型的 SSR 其重复单元至少重复 5 次。在此基础上,如两个 SSR 位点间距离小于 100 bp,则认为这两个 SSR 位点组成一个混合型 SSR 位点。

1.4 引物设计与合成

挑选以三碱基为重复单元的微卫星标记序列设计引物,引物长度在 18—22 bp 之间,GC 含量在 40%—60% 之间,扩增目的片段长度在 100—500 bp 之间,引物需在序列保守区内。共设计 145 对菲律宾蛤仔微卫星引物,并由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.5 PCR 扩增及产物检测

PCR 反应体系 (10 μL): 基因组 DNA 2 ng、10×Easy Taq Buffer 1 μL (20 mmol/L Mg²⁺)、Easy Taq DNA 聚合酶 0.2 μL (5 units/μL)、dNTP 0.8 μL (0.2 mmol/L)、引物各 0.4 μL (0.4 μmol/L)。PCR 反应条件: 94 °C 变性 5 min; 94 °C 40 s, 最适退火温度下 40 s, 72 °C 40 s, 共 35 个循环; 循环结束后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。扩增产物经 12% 的非变性聚丙烯酰胺 (丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺体积比为 29:1) 凝胶电泳分离 PCR 反应产物,电泳液为 1×TBE 缓冲液,电压 300 V,电泳时间约为 2 h (北京六一仪器厂 DYY-II 型电泳仪, DYCZ-30 型电泳槽),硝酸银染色后用凝胶成像仪成像。

1.6 菲律宾蛤仔 SSR 引物的筛选及遗传多样性分析

实验利用 12 个大连庄河野生个体对 145 对引物进行初筛,在预设退火温度 (PP5 软件推荐温度) ±3 °C 区间内,设置 12 个温度梯,按照上述 PCR 反应条件和产物检测方法进行 PCR 扩增和检测,以出现清晰条带、主带清楚为标准,筛选每对引物最适退火温度和可用引物。

将能够获得清晰条带的微卫星位点用于野生蛤仔遗传多样性分析,以 32 个野生蛤仔 DNA 样品为模板,按照上述 PCR 反应体系和条件进行 PCR 扩增,其中最适退火温度为引物初筛得到的退火温度。最后用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳对扩增产物进行检测,并对扩增结果进行拍照。

1.7 数据统计与分析

群体扩增结果统计时,将每个位点所有条带按照片段从小到大依次命名为 A, B, C, ..., 即为等位基因,并按照每个个体的带型统计出基因型。利用 PopGene32 软件统计每个微卫星位点的等位基因数 (Allele number, N_a), 观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o), 期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e) 和香农-威纳指数 (Shannon-Wiener Index, H), 并计算多态信息含量 (polymorphism information content, PIC)。具体参数的计算方法如下:

$$PIC = 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+n}^n p_i p_j (1 - p_i p_j)$$

$$H_o = \text{杂合子观察数} / \text{观察个体总数}$$

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

$$H = - \sum X_i \ln(X_i/n)$$

2 结果

2.1 转录组中微卫星标记分析

利用 MISA 软件,将拼接得到的序列进行微卫星标记分析,结果如表 1 所示。

2.2 菲律宾蛤仔 SSR 引物筛选结果

初筛结果中,共 58 对引物出现清晰扩增条带,且杂带少易于鉴别等位基因。在 32 个蛤仔个体中的扩增结果发现,18 对引物表现为产物单一条带(图 1c),另 40 对引物能够分别在 32 个庄河自然野生蛤仔个体中扩增出清晰、稳定的 DNA 目的片段,在蛤仔野生群体中可表现出不同程度的多态性,并能对其进行准确的基因分型(图 1a,b)。呈现多态性的 40 个位点中,15 个位点出现 3 个等位基因,13 个位点出现 4 个等位基因,7 个位点出现 2 个等位基因,4 个位点出现 5 个等位基因,1 个位点出现 6 个等位基因。上述 58 对 SSR 引物,其退火温度在 43—59 °C 范围内,扩增产物片段大小在 117—605 bp 之间,均是以三碱基为重复单元的序列,其中有 8 个微卫星位点以 TTG 为重复单元,有 6 个位点以 TGG 为重复单元,以 ATC、TGT 为核心序列的位点各有 5 个,这 4 种核心序列在筛选出的 58 个 SSR 位点中占 41.38%,其余重复单元位点个数均小于 5 个位点。

2.3 菲律宾蛤仔野生群体遗传多样性分析

根据 40 对 SSR 引物在 32 个个体中扩增片段的分布情况进行统计,得出等位基因数(N_a)在 2—6 之间,平均等位基因数为 3.4250 ± 0.9718 ,观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)分别在 0.000—1.000 和 0.0615—0.7996 之间,平均值分别为 0.2727 ± 0.2272 和 0.4739 ± 0.1902 。群体平均 Nei 指数为 0.4664 ± 0.1872 ,遗传多样性指数为平均 Shannon 指数为 0.8330 ± 0.3445 。多态信息含量(PIC)在 0.0586—0.7529 范围内,平均值为 0.4148 ± 0.1707 ,其中 16 个 SSR 位点的 PIC 值均大于 0.5,15 个位点的 PIC 值在 0.25—0.5 之间,9 个位点的 PIC 值小于 0.25。 χ^2 检验 Hardy-Weinberg 平衡结果表明,有 29 个位点极显著的偏离($P < 0.01$),2 个位点显著偏离($P < 0.05$),9 个位点表现为符合 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$)(表 2),经 Sequential Bonferroni 校正后,除 Rpt23、Rpt83、Rpt111、Rpt161、Rpt163、Rpt177、Rpt188、Rpt219、Rpt254、Rpt261 10 个位点,其余位点均偏离平衡。

3 讨论

目前,菲律宾蛤仔微卫星开发技术比较单一,且开发数量有限。如 N. YASUDA^[15]等人利用双重抑制 PCR 技术从菲律宾蛤仔(*R. philippinarum*)中分离出 22 对微卫星引物,共有 9 对引物成功扩增出特异条带,可用于蛤仔的微卫星 DNA 标记。Hye Suck An^[16]等人利用预杂交 PCR 扩增技术(prehybridization PCR amplification)得到 13 个微卫星标记位点并对杂色蛤进行跨物种扩增,得到 9 对引物在菲律宾蛤仔(*R. philippinarum*)中有多态性,8 对引物在杂色蛤(*R. variegata*)中呈现多态性。闫喜武^[13]等人通过搜索 NCBI 中 EST 文库,获得 5658 个 EST 序列,筛选出 13 个蛤仔 SSR 序列,利用筛选出的 13 个 SSR 序列对蛤仔 3 个地理群体的遗传多样性进行研究分析,虞志飞^[14]等人用上述 SSR 位点,对大连群体不同年龄阶段的蛤仔进行遗传

表 1 SSR 标记分析结果

Table 1 Output statistics of SSR (simple sequence repeats)	
SSR 标记种类 Types of SSR	样本 Samples
含有 SSR 的序列个数 The number of sequences containing SSR	1409
含有 2 个以上 SSR 的序列个数 The number of sequences containing more than two SSRs	145
混合型 SSR 个数 The number of mixed SSRs	164
单碱基型 SSR 个数 The number of single base SSRs	22
双碱基型 SSR 个数 The number of two bases SSRs	492
3 碱基型 SSR 个数 The number of three bases SSRs	903
4 碱基型 SSR 个数 The number of four bases SSRs	160
5 碱基型 SSR 个数 The number of five bases SSRs	23
6 碱基型 SSR 个数 The number of six bases SSRs	1
1—6 碱基型 SSR 总数 The total number of one to six bases SSRs	1601

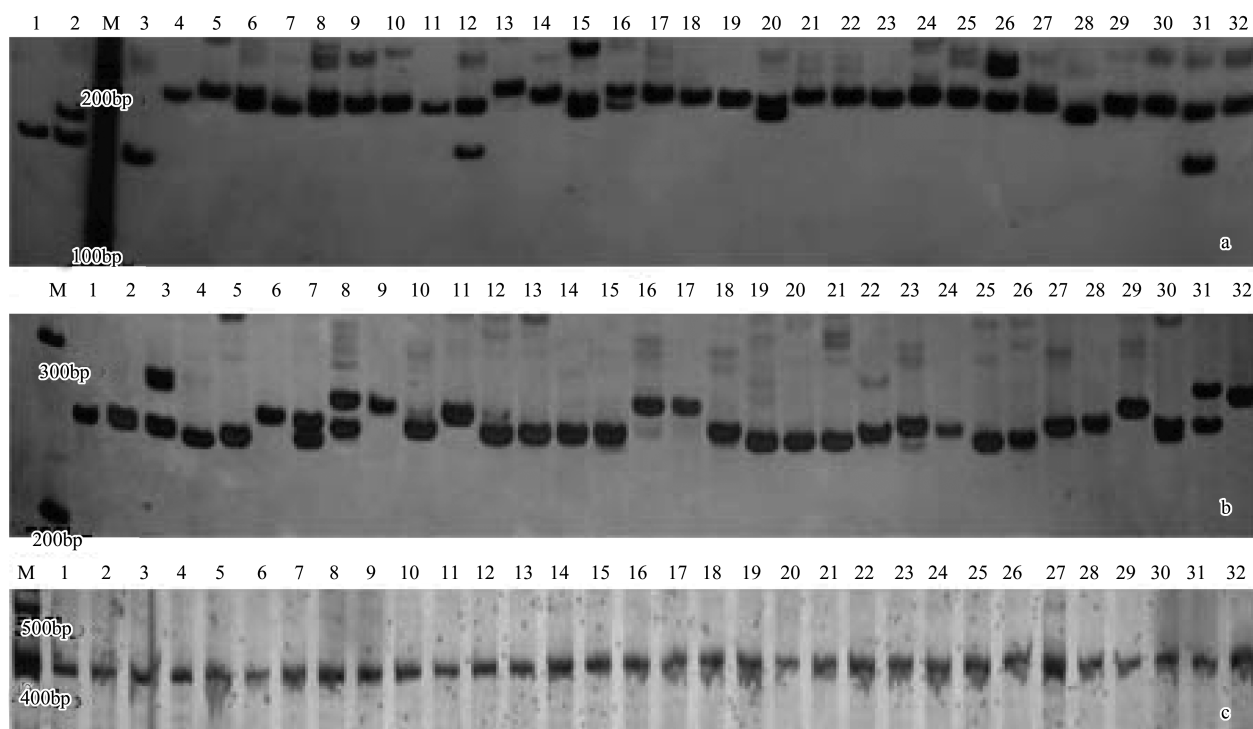


图 1 部分引物的扩增结果

Fig.1 The amplification results of some microsatellite loci

a; Rpt372 位点扩增结果 PCR amplification results of Rpt372, b; Rpt233 位点扩增结果 PCR amplification results of Rpt233, c; Rpt282 位点扩增结果 PCR amplification results of Rpt282 1—32; 32 clam individuals, M; marker, 1—32 表示 32 个个体

多样性分析,结果表明年龄结构对蛤仔种群内遗传分化的影响较小。随着蛤仔大规模养殖及育种工作的广泛开展,仅有上述的微卫星标记还远远不够。转录组平台的构建,在很大程度上推动了 DNA 分子标记的开发。近年来利用转录组数据获得含有微卫星的序列,并对其进行遗传多样性的研究在国际上已有成功报道^[17-19]。如 2012 年 Hye Suck An^[20] 等人利用 454 测序系统筛选出 22 个厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) SSR 位点并对其进行多态性分析;同年其同样利用第二代测序技术在太平洋鲍鱼 (*Haliotis diversicolor supertexta*) 中挑选出 20 个有多态座位的 SSR 标记位点^[21]。可见该方法已成功应用于大规模筛选贝类微卫星标记位点。本文首次在蛤仔中利用转录组测序数据批量筛选 SSR 位点,筛选出具有清晰扩增条带的 58 个微卫星位点,其中 40 个呈现出不同程度的多态性。相比之下该方法筛选效率高,工作量相对较小,且适合大规模开发微卫星标记位点,且开发位点可能与功能基因相关,可为后续遗传图谱构建, QTL 定位等提供有力支持。

遗传多样性可用于衡量生物遗传信息变异的程度, DNA 则是遗传信息的主要载体,所以 DNA 的多样性能够直接反映物种遗传变异程度。群体的遗传多样性主要表现在等位基因数、杂合度和多态信息含量 3 个方面^[22]。本研究中,对基于转录组平台得到的 145 个微卫星位点进行引物筛选,并在大连庄河野生蛤仔群体中研究其多样性,发现 58 个位点可以扩增出清晰条带,其中 18 个位点表现为单态性,暂不计于遗传多样性分析,另 40 个位点则表现出不同程度的多态性,用于遗传多样性分析。得到 $N_a = 2-6$ (平均值 3.4250 ± 0.9718), $H_o = 0.000-1.000$ (平均值 0.2727 ± 0.2272), $H_e = 0.0615-0.7996$ (平均值 0.4739 ± 0.1902), $PIC = 0.0586-0.7529$ (平均值 0.4148 ± 0.1707), 根据多态信息含量指标,共有 16 个微卫星位点表现为高度多态性 ($PIC \geq 0.5$), 15 个位点为中度多态性 ($0.25 \leq PIC < 0.5$), 9 个位点为低度多态性 ($PIC < 0.25$), 且 PIC 平均值也接近于 0.5, 可见庄河野生蛤仔维持着较好的多样性,能够为蛤仔的群体结构和其他遗传研究做理论指导。与其他人研究结果相比, Hye Suck An^[16] 等人研究结果为 $N_a = 9-26$, $H_e = 0.73-0.94$, N. YASUDA^[15] 等人研究得 $N_a = 6-22$, $H_o = 0.136-0.909$, $H_e = 0.553-0.954$, 本实验结果均略低于以上研究数据,究其原因,作者认为可能由于微卫星位点不同、个体间差异、生长环境迥异等非确定性因素,导致实验

结果与他人结果存在一定偏差,但本研究结果与闫喜武^[13] 2011 年报道的大连野生群体 $Na = 3-5$, $Ho = 0.10-0.97$, $He = 0.51-0.72$ 的结果相比差别不大,可能是由于该研究与本文中群体都来源于大连庄河,且微卫星标记均来自于 EST 数据有关。

表 2 32 个野生蛤仔中的 40 个微卫星位点的特征描述

Table 2 Characterization of 58 microsatellite loci in 32 wild clam

位点 Loci	引物序列(5'→3') Primer Sequences(5'→3')	重复片段 Repeat motif at first isolated	退火温度 T_m / ℃	Na	片段 大小/bp Allele size range	Ho	He	PIC	H	P_{new}	GenBank 注册号 Accession No.
Rpt04	F: TTGTAGCCTTTGGAGTT R: GCGATAACGAAAGTGAAG	(ATC) ₅	48	3.0000	178—205	0.2188	0.6553	0.5724	1.0676	0.000000	KC811245
Rpt23	F: AGCGTGTGCTGCTCTTC R: ATTACTCCCACTGTTCTGT	(AGC) ₆	48	6.0000	117—156	0.7419	0.7996	0.7529	1.6125	0.072896	KC811247
Rpt28	F: TGATTGGAGCCGATAAAC R: TGCCGTCCCTGACCTTCT	(AAC) ₉	53	3.0000	445—493	0.1875	0.3269	0.2978	0.6099	0.000008	KC811248
Rpt32	F: TCACCTTTCTGCTCCTACA R: AAAGGGAATCTCGTGCTG	(CAT) ₅	47	3.0000	456—498	0.1935	0.5204	0.4100	0.7938	0.000583	KC811249
Rpt33	F: TCACCTTTCTGCTCCTACA R: AAAGGGAATCTCGTGCTG'	(TCA) ₅	47	2.0000	463—496	0.0000	0.2679	0.2289	0.4334	0.000000	KC811250
Rpt36	F: TTGAGGCATCAATAACTTTTC R: ACTTCTGCATCTCGGCTA	(TTG) ₈	50	4.0000	267—315	0.2000	0.6147	0.5286	1.0581	0.000050	KC811251
Rpt67	F: GGGTCTTCTGTAGTTGG R: TGAGAAATCAGACCCAAT	(GAA) ₅	46	3.0000	412—490	0.0000	0.1210	0.1157	0.2771	0.000000	KC811255
Rpt83	F: GGTGCGCTAATTTCTGTAG R: TAATAATTTTCTGGAGCTCTGGCG	(TGT) ₇	46	4.0000	410—566	0.3125	0.4539	0.4084	0.8475	0.072452	KC811257
Rpt89	F: ATGATATGCCATCTAATGTG R: CCTTCTAATCCGTTCTG	(ATC) ₅	47	3.0000	346—388	0.1250	0.4459	0.3553	0.6831	0.000145	KC811258
Rpt100	F: TCATTTCCAAGCAGGTA R: GAGGTGTTGAAGGACGAG	(ATG) ₅	50	2.0000	274—490	1.0000	0.5079	0.3750	0.6931	0.000000	KC811260
Rpt105	F: GGTATGGTGGTAAATGGA R: TCATAGGTAGGCTGCTTT	(GTT) ₅	46	3.0000	422—434	0.0625	0.2029	0.1885	0.4106	0.000001	KC811262
Rpt106	F: ACCTCAGTTCAAATGTCT R: AATACTAACGCTGTGGAT	(AGT) ₆	48	5.0000	412—514	0.3750	0.6830	0.6136	1.2734	0.000190	KC811263
Rpt111	F: ATCTATCCCATGCAAGCT R: TACAATCACTGCCGAGTA	(TCT) ₅	50	4.0000	354—411	0.6250	0.6602	0.5839	1.1707	0.080697	KC811264
Rpt118	F: TTGTTTCCCGTCTCCTTA R: GCGTATGACTCTGTGGC	(GTT) ₅	51	4.0000	325—397	0.2188	0.6687	0.5897	1.1559	0.000001	KC811267
Rpt122	F: CCTCTGTATCCGAGTCAC R: GGAAAGCCAATAGTATCA	(TTC) ₈	45	3.0000	412—484	0.2188	0.4320	0.3865	0.7625	0.000000	KC811268
Rpt124	F: CGCTGTGCATGTAGGTGT R: TAATAGCCGCCAACAAT	(CAT) ₅	52	5.0000	333—417	0.4062	0.6925	0.6244	1.2842	0.000283	KC811269
Rpt145	F: CTTTTATGAGGGTGGGTG R: TTTTATACGTGGCAAAT	(TTG) ₅	49	4.0000	125—197	0.0625	0.7212	0.6582	1.3063	0.000000	KC811270
Rpt161	F: ATATTTCCAGTTGCTCCAT R: CTTGAACCCATGATCCCT	(CAT) ₅	53	3.0000	427—538	0.2500	0.2257	0.2035	0.4239	0.904704	KC811272
Rpt163	F: TTGAGAGCCGCTGTAATA R: TCAGTGCTAAGTGATGC	(TGT) ₅	48	2.0000	410—431	0.2812	0.2455	0.2125	0.4061	0.385997	KC811274
Rpt167	F: ATGCTGTATCGAGCTAAG R: AGTTACGCTGGAAGAAGA	(AAT) ₅	46	4.0000	455—605	0.1935	0.5436	0.4668	0.9467	0.000000	KC811275
Rpt174	F: CTCTAACCAAGCAGGACA R: GCTTTAACCCTACTTTTC	(GTT) ₅	46	3.0000	478—490	0.1000	0.2672	0.2415	0.5022	0.000020	KC811276
Rpt177	F: ATTGGCGTACTTGGTGTT R: AATGGGAAAAGCATGTG	(TGT) ₅	54	4	478	0.4839	0.6457	0.5780	1.1491	0.020747	KC811277
Rpt188	F: TCCGTGCGTAAATCAATC R: AGGTGCAATGTGCCTTT	(GCA) ₅	55	3.0000	171—291	0.2812	0.3041	0.2788	0.5773	0.127186	KC811278

续表

位点 Loci	引物序列(5'→3') Primer Sequences(5'→3')	重复片段 Repeat motif at first isolated	退火温度 <i>T_m</i> / ℃	<i>N_a</i>	片段 大小/bp Allele size range	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	PIC	<i>H</i>	<i>P_{hew}</i>	GenBank 注册号 Accession No.
Rpt202	F: GCTGGATCAGGCGGAAGA R: CGGAGCCACGGGTTACAT	(TGT) ₆	59	3.0000	475—499	0.2903	0.5880	0.5025	0.9586	0.000171	KC811280
Rpt219	F: AGTCGTCGCAACTGGTAG R: GAAAGAAAGTCGGGAGGT	(TCA) ₅	50	5.0000	215—236	0.3438	0.3576	0.3355	0.7629	0.017690	KC811281
Rpt226	F: GAAGCAACAGATTATCAA R: GTTTCATATGCCACATTAT	(AAC) ₅	48	2.0000	400—502	1.0000	0.5079	0.3750	0.6931	0.000000	KC811282
Rpt233	F: ACAGCAGTGAGGGTCAAG R: GGTAGGAAATTAAGGGTTA	(TTA) ₆	48	4.0000	245—263	0.3750	0.6171	0.5563	1.1194	0.000003	KC811283
Rpt238	F: AAACAGAAATGTCAGCGAATAG R: AACGGCACCAACAGCAAC	(TTG) ₆	56	2.0000	220—289	0.0000	0.2222	0.1948	0.3768	0.000000	KC811284
Rpt248	F: AAAAGTCGGTCTGCTATG R: GATCCAGGATGTAAAGATA	(TGT) ₅	46	3.0000	213—306	0.1562	0.4112	0.3443	0.6751	0.000303	KC811287
Rpt254	F: CAACAATTATTGACGGAG R: CATTTTCAAAGATTCCAG-	(AAC) ₆	45	2.0000	313—364	0.0625	0.0615	0.0586	0.1391	0.898120	KC811288
Rpt261	F: GAGGTCTGTGTCGGTTTA R: CTTTCATCTCCCATTTTCATT	(TGA) ₆	51	4.0000	163—187	0.2903	0.5547	0.4978	1.0035	0.002077	KC811289
Rpt 301	F: GTTCATAGGGAAGACTGG R: TTTGGCTAGATTGGGTAA	(TTA) ₇	48	4.0000	124—145	0.2500	0.6776	0.6063	1.1943	0.000000	KC811291
Rpt312	F: TTCATGTCCCAAAAGTG R: CAAGAGCAGGCTCAGTTA	(TTG) ₇	46—49	2.0000	159—210	0.1250	0.1726	0.1556	0.3111	0.089654	KC811293
Rpt323	F: GGAACAAGGCTGGTGGA R: GACATCGTGAATATGCTCTA	(TTG) ₆	48—51	3.0000	355—400	0.0312	0.5134	0.3925	0.7527	0.000000	KC811294
Rpt325	F: AATGAACCTCTCCTGCTT R: GTGGACTACACCCTAAAA	(GTT) ₆	43—46	5.0000	245—287	0.3125	0.7277	0.6712	1.4075	0.000000	KC811295
Rpt333	F: TACTCAACTCACCCTCCC R: ATTGTTCAGAAAAGCATC	(ACA) ₅	44—47	3.0000	268—301	0.1250	0.5615	0.4835	0.9262	0.000000	KC811296
Rpt337	F: TAACCAGACAAAGCGTAT R: GGTGAAGGGATTAGAAT	(CAA) ₅	44—47	4.0000	282—321	0.2812	0.2569	0.2402	0.5378	0.993311	KC811297
Rpt340	F: AATGTGACGGAAACTCTT R: ATGATGTTGATGCTGATG	(ATC) ₆	44—47	4.0000	202—310	0.3226	0.5833	0.5343	1.0907	0.000450	KC811298
Rpt341	F: TAATGGAAGAAGGAGCAA R: TCACAGCACCAAGTAAA	(CAA) ₅	46—49	3.0000	169—184	0.1875	0.5496	0.4642	0.8949	0.000043	KC811299
Rpt372	F: CACGAAATGCTAACAATG R: TGAAGTGAAGGCTATGA	(ATC) ₆	45—48	4.0000	142—202	0.2188	0.5868	0.5089	1.0298	0.000000	KC811300

T_m 退火温度; annealing temperature; *N_a* 等位基因数; Allele number; *H_o* 观测杂合度; observed heterozygosity; *H_e* 期望杂合度; expected heterozygosity; PIC 多态信息含量; polymorphism information content; *H* 香农-威纳指数; Shannon-Wiener Index; *P_{hew}*: 哈德-温格平衡 χ^2 检验 *Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium*

另外统计得到以 *TTG* 为核心序列的位点有 8 个,以 *TGG* 为核心序列的位点有 6 个,分别以 *TGT* 和 *ATC* 为核心序列的位点各有 5 个(表 2),这 4 种核心序列在筛选出的 58 个 *SSR* 位点中占 41.38%,在三碱基重复序列中,*TTG*、*TGG*、*TGT*、*ATC* 为相对丰富的拷贝类别,且具有相对高的多态性,这为后续重复序列的筛选以及进一步了解蛤仔基因组特性提供了参考。随着转录组平台的进一步深入分析,更多与功能基因相关的微卫星位点将被发掘出来,这将为蛤仔人工标记辅助育种提供更多的分子标记,并为蛤仔生长、抗病力、肉质等重要经济性状相关标记的筛选和定位奠定必要的基础。

参考文献 (References):

- [1] 齐亚超. 三丁基锡对菲律宾蛤仔的毒性效应研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- [2] 张国范, 闫喜武. 蛤仔养殖学. 北京: 科学出版社, 2010.
- [3] Wang H X, Huan P, Lu X, Liu B Z. Mining of EST-SSR markers in clam *Meretrix meretrix* Larvae from 454 shotgun transcriptome. Genes and

- Genetic Systems, 2011, 86(3): 197-205.
- [4] Wang L, Niu D H, Li J L. Characterization of novel EST-derived SNP markers using 454 pyrosequencing in *Sinonovacula constricta*. Conservation Genetics Resources, 2012, 5(1): 191-193.
- [5] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research, 1989, 17(16): 6463-6471.
- [6] 叶华, 任鹏, 刘洋, 刘贤德, 王志勇. 大黄鱼微卫星标记的开发及其遗传方式分析. 水生生物学报, 2012, 36(6): 1156-1163.
- [7] 段友健, 张富铁, 曹善茂, 王剑伟, 谭德清. 中华金沙鲈多态性微卫星位点的筛选与特征分析. 水生生物学报, 2012, 36(1): 148-151.
- [8] Shen Y B, Bai Z Y, Guo S Z, Li J L. Polymorphic microsatellite loci for population genetics of the hard shelled mussel, *Mytilus coruscus*. Conservation Genetics Resources, 2013, 5(1): 121-123.
- [9] Wang L L, Song L H, Zhang H, Gao Q, Guo X M. Genetic linkage map of bay scallop, *Argopecten irradians irradians* (Lamarck 1819). Aquaculture Research, 2007, 38(4): 409-419.
- [10] 叶小军, 王志勇, 刘贤德, 蔡明夷, 姚翠鸾. 大黄鱼连续两代雌核发育群体的微卫星标记分析. 水生生物学报, 2010, 34(1): 144-151.
- [11] Lu X, Wang H X, Liu B Z, Xiang J H. Three EST-SSR markers associated with QTL for the growth of the Clam *Meretrix meretrix* revealed by selective genotyping. Marine Biotechnology, 2013, 15(1): 16-25.
- [12] 程鹏, 杨爱国, 吴彪, 周丽青, 李霞. 微卫星标记在不同壳色虾夷扇贝家系亲权鉴定的适用性. 水生生物学报, 2011, 35(5): 768-775.
- [13] 闫喜武, 虞志飞, 秦艳杰, 杨霏, 王金海, 张跃环, 杨凤, 张国范. 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, 2011, 31(15): 4190-4198.
- [14] 虞志飞, 闫喜武, 张跃环, 杨霏, 杨凤, 张国范. 不同年龄段大连群体菲律宾蛤仔 EST-SSR 多样性. 生态学报, 2012, 32(15): 4673-4681.
- [15] Yasuda N, Nagai S, Yamaguchi S, Lian C L, Hamaguchi M. Development of microsatellite markers for the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Molecular Ecology Notes, 2007, 7(1): 43-45.
- [16] An H S, Kim E M, Park J U. Isolation and characterization of microsatellite markers for the clam *Ruditapes philippinarum* and cross-species amplification with the clam *Ruditapes variegata*. Conservation Genetics, 2009, 10(6): 1821-1823.
- [17] Qi H G, Wu Q, Li L, Zhang G F. Development and characterization of microsatellite markers for the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. Conservation Genetics Resources, 2009, 1(1): 451-453.
- [18] Ma H T, Yu Z N. Isolation and characterization of twenty-three microsatellite loci in the noble scallop, *Chlamys nobilis*. Conservation Genetics Resources, 2009, 1(1): 131-134.
- [19] Teacher A G F, Kähkönen K, Merilä J. Development of 61 new transcriptome-derived microsatellites for the Atlantic herring (*Clupea harengus*). Conservation Genetics Resources, 2012, 4(1): 71-74.
- [20] An H S, Lee J W. Development of microsatellite markers for the Korean mussel, *Mytilus coruscus* (Mytilidae) using next-generation sequencing. Molecular Sciences, 2012, 13(8): 10583-10593.
- [21] An H S, Lee J W, Hong S W. Application of novel polymorphic microsatellite loci identified in the Korean Pacific Abalone (*Haliotis diversicolor supertexta* (Haliotidae)) in the genetic characterization of wild and released populations. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(9): 10750-10764.
- [22] Senanan W, Kapuscinski A R, Na-Nakorn U, Miller L M. Genetic impacts of hybrid catfish farming (*Clarias macrocephalus* × *C. gariepinus*) on native catfish populations in central Thailand. Aquaculture, 2004, 235(1/4): 167-184.