

栉江珧(*Atrina pectinata*)EST-SSR 标记的 开发与应用

李东明^{1,2} 杨爱国^{2①} 吴 彪² 孙秀俊²
周丽青² 刘寒苗^{1,2} 张广明^{1,2}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 本研究以前期获得的栉江珧(*Atrina pectinata*)转录组数据为基础, 筛选获得 10550 条微卫星标记(SSR), 检出率为 8.2%, 平均 9.01 kb 出现 1 个 SSR 位点。设计并合成 120 对 SSR 引物, 筛选得到 36 对能够稳定扩增的引物, 并利用已获得的 36 对 SSR 引物对青岛海区栉江珧进行了群体遗传多样性分析。结果显示, 12 对引物的扩增片段表现出多态性, 共产生 42 个等位基因, 平均每个位点产生 3.5 个等位基因, 平均观测杂合度(H_o)、平均期望杂合度(H_e)和平均多态信息含量(PIC)分别为 0.417、0.604 和 0.526, 表明青岛海区栉江珧群体的遗传多样性较高。本研究获得的 EST-SSR 标记和群体遗传信息为栉江珧的种质资源保护提供了重要的参考资料。

关键词 栉江珧; EST-SSR; 遗传多样性; 杂合度

中图分类号 Q178.53 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)02-0137-06

微卫星标记(Simple sequence repeat, SSR)因具有多态性丰富、共显性等优点而被广泛应用于种群的遗传结构分析、遗传连锁图谱构建和分子标记辅助育种等。与传统 SSR 开发技术相比, 基于 EST 序列开发 SSR 具有成本低、周期短、与功能基因关联性强等特点而被广泛应用。在海洋双壳贝类中, EST-SSR 标记的开发和应用已在泥蚶(*Tegillarca granosa*)(董迎辉等, 2013)、文蛤(*Meretrix meretrix*)(齐晓艳等, 2013)、蛤仔(*Ruditapes variegata*)(闫路路等, 2015)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)(刘博等, 2012a、b)、马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)(王忠良等, 2015)和虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)(李云峰等, 2010)等多种贝类

中报道。

栉江珧(*Atrina pectinata*)隶属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、翼形亚纲(Pterimorphia)、贻贝目(Mytiloida)、江珧科(Pinnidae)、江珧属(*Atrina*), 俗称“土杯”、“马蹄”、“骚蛤蜊”等, 广泛分布于温、热带近海海域, 为海产底栖贝类, 具有较高经济价值(王如才等, 2008)。近年来, 栉江珧遭遇生存环境的破坏和过度捕捞, 出现资源量下降、种质资源退化和遗传多样性降低等问题, 因此, 开展栉江珧群体的种质资源评估和保护非常有必要。

目前, 有关栉江珧群体遗传结构的研究较少。主要有采用 AFLP 标记对栉江珧不同地理群体进行遗传

*山东省重点研发计划项目(2016GSF115012)、青岛市战略性新兴产业培育计划项目(13-4-1-60-hy)和科技基础条件平台项目(2060503-01)共同资助 [This work was supported by Shandong Province Key Development Program for Research (2016GSF115012), the Cultivate Project for Strategic Emerging Industries of Qingdao City (13-4-1-60-hy), and the National R & D Infrastructure and Facility Development Program of China(2060503-01)]. 李东明, E-mail: 1044578418@qq.com

① 通讯作者: 杨爱国, 研究员, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-11-16, 收修改稿日期: 2015-12-23

多样性分析(陈丽娜, 2012)¹⁾, 而 SSR 标记都通过磁珠富集法开发(陈晓皎, 2012²⁾; 白临建, 2012³⁾; 李明爽, 2008⁴⁾)。本研究基于前期的栉江珧转录组测序, 从得到的 EST 数据库中筛选和开发微卫星标记, 并应用于栉江珧青岛群体的遗传多样性分析, 以期为栉江珧的种质资源评估和保护提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 样品采集与 DNA 提取

实验用栉江珧于 2015 年 6 月取自山东青岛野生群体, 活体运回实验室, 取 30 个个体解剖, 剪取闭壳肌, 于 -80℃ 保存备用。采用常规酚-氯仿-异戊醇法提取 DNA, 然后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, 并用分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度。

1.2 SSR 序列获得和引物设计

根据本实验室转录组测序获得的 EST 序列, 利用 MISA 软件进行微卫星序列搜索, 搜索标准为二碱基至少重复 6 次, 三碱基至少重复 5 次, 四碱基至少重复 5 次, 五碱基至少重复 5 次, 六碱基至少重复 5 次。采用 Primer premier 5.0 软件设计引物, 挑取 120 对引物由华大基因公司合成。

1.3 微卫星引物的筛选和优化

将 8 个栉江珧个体的 DNA 混合成基因池, 模板浓度调整至 100 ng/μl。PCR 反应体系 20 μl: 0.5 U *Taq* 酶, 2 μl 10×*Taq* Buffer (含 Mg²⁺), 2 μl dNTPs (10 mmol/L), 上下游引物(10 μmol/L)各 1 μl, 补水至 20 μl。PCR 扩增反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 退火温度 45 s (退火温度视引物而定), 72℃ 延伸 45 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺电泳检测, 银染。根据电泳图谱确定引物的最佳退火温度。然后分别用 8 个个体作为对象, 使用筛选出的最适退火温度进行 PCR 扩增, 反应体系和反应条件同上, 产物经 8% 非变性

聚丙烯酰胺电泳检测, 银染, 用于检测引物多态性。

1.4 青岛海区栉江珧群体 SSR 标记的多态性分析

在栉江珧青岛群体 30 个个体中, 根据引物筛选结果进行多态性验证, 8% 非变性聚丙烯酰胺电泳检测。根据电泳图谱, 并参照引物设计时预期片段的大小统计条带, 用 POPGENE 1.31 计算微卫星引物的等位基因数(*Na*)、期望杂合度(*He*)、观望杂合度(*Ho*), PIC-CAL 计算多态信息含量(PIC)。

2 结果

2.1 栉江珧 EST-SSR 序列筛选

在获得的 127263 条 EST 序列中, 检测出含有 SSR 的 EST 序列 10550 条(8.2%), 包括二核苷酸重复 8132 条, 三核苷酸重复 2010 条, 四核苷酸重复 401 条, 五核苷酸重复 7 条。二核苷酸重复最多, 占 77.08%; 其次为三核苷酸和四核苷酸重复, 分别占 19.05% 和 3.80%; 五核苷酸重复最少, 占 0.07%(表 1)。

表 1 栉江珧 SSR 在 EST 中出现的频率
Tab.1 The frequency of *A. pectinata* SSR in the EST

类型 Type	数目 Number	比例 Rate (%)
二核苷酸 Dinucleotide	8132	77.08
三核苷酸 Trinucleotide	2010	19.05
四核苷酸 Teranucleotide	401	3.80
五核苷酸 Pentanucleotide	7	0.07
合计 Total	10550	100

在二核苷酸重复单元中, AC/GT 最多, 共 3096 条, 占 38.07%; 其次是 AT/TA 和 AG/CT, 分别占 32.97% 和 28.85%; CG/CG 最少, 共 9 条, 占 0.11%(表 2)。

在三核苷酸重复单元中, ATC/ATG 最丰富, 共 625 条, 占 31.09%; AAC/GTT 和 AAT/ATT 分别有 554 和 374 条, 分别占 27.56% 和 18.61%; 其次为 AAG/CTT 和 ACC/GGT, 分别占 6.12% 和 5.30%; 最少的是 CCG/CGG, 共 2 条, 占总数的 0.10%(表 3)。

1) Chen LN. Analysis of genetic structure of the comb pen shell *Atrina pectinata* and development of microsatellite loci in *Acrossocheilus labiatus*. Master's Thesis of Jimei University, 2012 [陈丽娜. 栉江珧的群体遗传结构及厚唇光唇鱼微卫星位点的研究. 集美大学硕士研究生学位论文, 2012]

2) Chen XJ. Development of the microsatellite and genetic structure of *Atrina pectinata* population. Master's Thesis of Jimei University, 2012 [陈晓皎. 栉江珧微卫星分子标记的发育及其群体遗传结构的研究. 集美大学硕士研究生学位论文, 2012]

3) Bai LJ. Effects of morphometric traits on weight traits and microsatellite markers based genetic diversity in the *Atrina pectinata*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2012 [白临建. 栉江珧形态性状对重量性状的影响及五个野生群体遗传多样性的微卫星分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]

4) Li MS. Identification of microsatellite markers and analysis of genetic diversity of *Atrina pectinata*. Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2008 [李明爽. 栉江珧微卫星标记的筛选及其遗传多样性的研究. 南京农业大学研究生学位论文, 2008]

表 2 二核苷酸重复中各重复单元的数量与比例

Tab.2 The number and proportion of all the repeat motifs in the binucleotide repeats

类型 Type	数量 Number	比例 Rate (%)
AC/GT	3096	38.07
AT/TA	2681	32.97
AG/CT	2346	28.85
CG/CG	9	0.11
合计 Total	8132	100

表 3 三核苷酸重复中各重复单元的数量与比例

Tab.3 The number and proportion of all the repeat motifs in the trinucleotide repeats

类型 Type	数量 Number	比例 Rate (%)
ATC/ATG	625	31.09
AAC/GTT	554	27.56
AAT/ATT	374	18.61
AAG/CTT	123	6.12
ACC/GGT	106	5.30
ACT/AGT	89	4.43
AGC/CTG	71	3.53
AGG/CCT	53	2.64
ACG/CGT	13	0.65
CCG/CGG	2	0.10
合计 Total	2010	100

2.2 栉江珧 EST-SSR 引物筛选

利用 Primer premier 5.0 软件, 对 10550 条含有 SSR 的 EST 进行引物设计, 共设计 3401 对。随机选取 120 对引物合成, 以 8 个青岛群体栉江珧个体组成

的基因池为模板, 退火温度上下波动 5℃为梯度, 对 120 对引物进行初步筛选。结果显示, 有 36 对引物获得稳定、清晰的扩增片段, 扩增成功率为 30%; 36 对引物在青岛栉江珧群体中进行多态性检测, 其中 12 对引物表现出多态性(表 4), 多态引物比例为 33.3%。

2.3 EST-SSR 在青岛海区栉江珧群体的多态性评价

利用筛选的 12 对多态性引物对青岛海区栉江珧群体的 30 个个体进行遗传变异分析, 结果见表 5。12 对引物共获得 42 个等位基因, 每对引物在青岛栉江珧群体中检测到 2-5 个等位基因, 平均每个位点有 3.5 个等位基因, 其中, c62721_g1 位点的等位基因最少(2 个), c67433_g5 位点的等位基因最多(5 个)。观测杂合度 H_o 、期望杂合度 H_e 、多态信息含量 PIC 分别为 0.167-0.667、0.432-0.794、0.368-0.746, 平均观测杂合度 H_o 、平均期望杂合度 H_e 、平均多态信息含量 PIC 分别为 0.417、0.604、0.526。依据 PIC 判断标准: PIC<0.25 为低度多态, 0.25<PIC<0.5 为中度多态, PIC>0.5 为高度多态, 12 个多态性位点中, 有 6 个高度多态位点(PIC>0.5), 6 个中度多态位点(0.25<PIC<0.5), 可以看出栉江珧 EST-SSR 在青岛群体中表现出较高的多态性, 说明青岛栉江珧群体遗传多样性水平较高。

3 讨论

本研究利用栉江珧转录组测序获得的 127263 条 EST 序列进行 SSR 筛选, 检出率为 8.2%, 结果与缢蛏 EST 中 SSR 比例(8.89%)相似(刘博等, 2012a), 但

表 4 栉江珧多态性 EST-SSR 引物序列及参数

Tab.4 Primer sequences and parameters of polymorphic EST-SSR in *A. pectinata*

引物 Primer	重复单 元 Repeat motif	上游引物序列(5'-3') Forward primer sequence	下游引物序列(5'-3') Reverse primer sequence	预扩片段 大小 Expected size(bp)	退火温度 Annealing temperature(°C)
c65097_g1	(GTG)7	TGGGGTCAACCACTAGGACA	TGCGAGTTCGGTTAATCCC	241	57.5
c55835_g1	(AC)9	GACCATCCAAGACCAGCTCA	CGGTTTGTGTGTTCAAGCCA	247	55.4
c29478-g1	(TG)8	CGACAACGCCAATTCTGACC	TTGAAGCGGTCAGGCGTATT	149	55.4
c73921_g1	(GA)8	CTCATGCATGCATAGCAGTGT	TTGTCTGTCCATCCCTCCCT	119	55.4
c72420_g2	(TGTC)5	CCCCCTAGCACATATCAAACA	TGTTGTGCATCAGGAGGAGGA	205	55.4
c73582_g4	(CTGT)5	TATCTGTCTGTCTGCCTGCC	CAGCCTCGATGACGCAAATG	172	57.4
c73109_g2	(CTGT)5	TGTCCATCTTGCTGTCTGTCC	TGACACACAGACAGCAAGACT	135	55.4
c72142_g2	(GT)10	GCTTGTAAGCGCTTATGAACCT	CCCACACATCATACCCATGC	170	56.2
c67726_g1	(AT)11	CCATGTGGAGTCCAGTGCAT	TCTAGGGGCCACAAAGCAAC	181	54.1
c69026_g3	(CA)11	TCACAGTTGGACAGGTCTTTGT	ATTGAGAGCAGGTGCCAGTC	226	57.4
c62721_g1	(CAA)7	AGAGGCTTTCACAAACAACAAC	TCTTCCATCAAGAGCAGCGG	264	54.6
c67433_g5	(CA)9	GGCAGACCCTTGATGTACCA	GGCAAAACAAGAAACAAAACGCA	232	60.8

表 5 青岛海区栉江珧群体 EST-SSR 分析统计

Tab.5 Statistics of the EST-SSR analysis for the Qingdao population of *A. pectinata*

基因座位 Locus	等位基因数 N_a	观测杂合 度 H_o	期望杂合 度 H_e	多态信息 含量 PIC
c65097_g1	4	0.633	0.667	0.590
c55835_g1	3	0.400	0.623	0.541
c29478_g1	3	0.667	0.567	0.496
c73921_g1	3	0.533	0.432	0.383
c72420_g2	4	0.167	0.584	0.483
c73582_g4	4	0.233	0.625	0.562
c73109_g2	4	0.467	0.607	0.541
c72142_g2	3	0.300	0.513	0.428
c67726_g1	3	0.200	0.583	0.479
c69026_g3	4	0.467	0.758	0.697
c62721_g1	2	0.567	0.494	0.368
c67433_g5	5	0.367	0.794	0.746
平均值 Mean	3.5	0.417	0.604	0.526

该比例低于马氏珠母贝 EST-SSR 出现频率(13.34%) (王忠良等, 2015), 高于菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) EST-SSR 出现频率(3.57%)(闫喜武等, 2011)。造成这种差异的原因主要有筛选标准、数据库大小以及物种的不同。如, 张秀英等(2012)以 3 个不同标准对栉孔扇贝同一 BES 文库进行 SSR 筛选, 筛选率随着筛选标准的提高而降低。同样, 数据库丰富程度不同也会造成 EST-SSR 位点出现频率不同, 王忠良等(2015)和石耀华等(2008)分别从马氏珠母贝 74007 和 6979 条 EST 序列中筛选得到 9872 和 243 个 EST-SSR 位点, 其位点出现频率分别为 13.34%和 3.48%。在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中也有相似报道, 王艳红等(2011)和马宁等(2013)对凡纳滨对虾不同数量的 EST 序列进行 EST-SSR 筛选, 其筛选率也不同。

本研究中, 栉江珧 EST 微卫星中以二核苷酸重复所占比例最高, 其次是三核苷酸重复, 分别占 77.08%和 19.05%, 这和马氏珠母贝(石耀华等, 2008)和凡纳滨对虾(王艳红等, 2011)的研究结果相似。在位点多态率方面, 本研究设计合成了 120 对 EST-SSR 引物, 其中, 36 对引物获得稳定、清晰的扩增位点, 扩增成功率为 30.0%; 12 对引物表现出多态性, 多态引物比例为 33.3%, 其比率分别低于 G-SSR 的

63.15%、62.5% (李明爽, 2008)¹⁾和 81.25%、80.76% (白临建, 2012)²⁾。这与泥蚶(周小龙等, 2013)、文蛤(齐晓艳等, 2013)和红鳍东方鲀(郝君等, 2007)G-SSR 位点多态率高于 EST-SSR 位点多态率结果相似。

刘博等(2012a)得到的缢蛭 EST-SSR 平均观测杂合度 H_o (0.569)和平均期望杂合度 H_e (0.490)分别低于吴雪萍等(2014)的结果(缢蛭基因组 SSR 的 H_o 为 0.6866, H_e 为 0.7525)。闫路路等(2015)在研究基于转录组平台的蛤仔微卫星标记也得到了相似的结果, 其所得的 N_a 、 H_o 、 H_e 和 PIC 也分别低于 Yasuda 等(2007)和 An 等(2009)通过 G-SSR 得到的结果。本研究也得到了与之基本一致的结果, 平均每个位点产生 3.5 个等位基因, H_o 、 H_e 、PIC 分别为 0.417、0.604、0.526。与白临建(2012)²⁾通过基因组来源 SSR 所得平均位点、 H_o 、 H_e 分别为 6.43、0.4215、0.5857 相比, 除 H_e 略高外, 其他均低, 造成 H_e 略高的原因可能是标记本身不同造成的, 也可能是实验所用的地理群体不同造成的, 白临建(2012)²⁾是使用蓬莱长岛县的栉江珧群体进行多态性引物的筛选, 而本研究使用青岛地区的栉江珧进行多态性引物的筛选, 具体原因有待于进一步探究。

本研究获得的 12 对 EST-SSR 引物, 具有多态性丰富、稳定性高和重复性好等优点, 并可应用于栉江珧群体的遗传多样性分析, 揭示了栉江珧青岛群体的种质资源现状, 将为栉江珧的种质资源保护提供重要的参考资料。

参 考 文 献

- An HS, Kim EM, Park JY. 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
- Dong YH, Wu GX, Yao HH, et al. Characterization of 34 polymorphic EST-SSR markers in *Tegillarca granosa* and their transferability in *Anadara craticulata*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(1): 70–77 [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. *水产学报*, 2013, 37(1): 70–77]
- Hao J, Sun XW, Meng XS, et al. Identification and application of microsatellite makers from BAC and ESTs sequence in redfin puffer (*Takifugu rubripes*). *Journal of Dalian*

1) Li MS. Identification of microsatellite markers and analysis of genetic diversity of *Atrina pectinata*. Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2008 [李明爽. 栉江珧微卫星标记的筛选及其遗传多样性的研究. 南京农业大学研究生学位论文, 2008]

2) Bai LJ. Effects of morphometric traits on weight traits and microsatellite markers based genetic diversity in the *Atrina pectinata*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2012 [白临建. 栉江珧形态性状对重量性状的影响及五个野生群体遗传多样性的微卫星分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]

- Fisheries University, 2007, 22(2): 97–101 [郝君, 孙效文, 孟雪松, 等. 红鳍东方鲀 BAC 数据库和 ESTs 数据库中微卫星的筛选与应用. 大连水产学院学报, 2007, 22(2): 97–101]
- Li YF, Liu WD, Gao XG, *et al.* Construction of cDNA libraries from mantle and kidney of Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) and ESTs analysis. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(3): 578–585 [李云峰, 刘卫东, 高祥刚, 等. 虾夷扇贝外套膜和肾脏组织 cDNA 文库构建以及 EST 的初步分析. 中国水产科学, 2010, 17(3): 578–585]
- Liu B, Shao YQ, Teng SS, *et al.* Characterization, development and utilization of EST-derived microsatellites in *Sinonovacula constricta*. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2012a, 43(1): 132–137 [刘博, 邵艳卿, 滕爽爽, 等. 缢蛏(*Sinonovacula constricta*) EST-SSR 分布特征及引物开发利用. 海洋与湖沼, 2012a, 43(1): 132–137]
- Liu B, Shao YQ, Teng SS, *et al.* Genetic variation of cultured population structure in *Sinonovacula constricta* using microsatellites. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012b, 28(2): 69–73 [刘博, 邵艳卿, 滕爽爽, 等. 乐清湾养殖缢蛏群体遗传结构的微卫星标记分析. 中国农学通报, 2012b, 28(2): 69–73]
- Ma N, Zeng DG. Isolation of microsatellite sequences from *Litopenaeus vannamei*. Southwest China Journal of Agricultural Science, 2013(6): 2629–2633 [马宁, 曾地刚. 凡纳滨对虾微卫星序列的筛选. 西南农业学报, 2013(6): 2629–2633]
- Qi XY, Dong YH, Yao HH, *et al.* Identification of 30 microsatellite markers in *Meretrix meretrix* and their transferability in *Meretrix lamarckii* and *Meretrix lyrata*. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(8): 1147–1154 [齐晓艳, 董迎辉, 姚韩韩, 等. 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, 2013, 37(8): 1147–1154]
- Shi YH, Hong K, Guo XM, *et al.* Microsatellite markers screening from EST sequences of *Pinctada martensii* Dunker. Journal Of Fisheries Of China, 2008, 32(2): 174–181 [石耀华, 洪葵, 郭希明, 等. 马氏珠母贝 EST 微卫星的筛选. 水产学报, 2008, 32(2): 174–181]
- Wang RC, Wang ZP. Seawater shellfish culture. Qingdao: Publishing House of Ocean University of China, 2008, 532–534 [王如才, 王昭萍. 海水贝类养殖学. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008, 532–534]
- Wang YH, Hu CQ, Zhang LP, *et al.* A preliminary study on microsatellite markers screening from EST sequences of *Litopenaeus vannamei*. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(7): 969–976 [王艳红, 胡超群, 张吕平, 等. 凡纳滨对虾 EST 微卫星标记初步筛选. 水产学报, 2011, 35(7): 969–976]
- Wang ZL, Ding Y, Xu YH, *et al.* Polymorphism of EST-SSRs from *Pinctada martensii* based on transcriptom datasets. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2015, 46(3): 687–693 [王忠良, 丁燊, 许尤厚, 等. 基于转录组数据的马氏珠母贝 EST-SSR 位点的信息分析及其多态性检测. 海洋与湖沼, 2015, 46(3): 687–693]
- Wu XP, Ma HT, Feng YY, *et al.* Isolation of microsatellite loci from razor clam *Sinonovacula constricta* and transferability to related species. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2014, 45(6): 1330–1337 [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. 海洋与湖沼, 2014, 45(6): 1330–1337]
- Yan LL, Qin YJ, Yan XW, *et al.* Development of microsatellite markers in *Ruditapes philippinarum* using next-generation sequencing. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(5): 1573–1580 [闫路路, 秦艳杰, 闫喜武, 等. 基于转录组平台的蛤仔微卫星标记筛选. 生态学报, 2015, 35(05): 1573–1580]
- Yan XW, Yu ZF, Qin YJ, *et al.* Development of EST-SSRs markers and analysis of genetic diversities among different geographical populations of Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(15): 4190–4198 [闫喜武, 虞志飞, 秦艳杰, 等. 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]
- Yasuda N, Nagai S, Yamaguchi S, *et al.* Development of microsatellite markers for the Manila clam *ruditapes philippinarum*. Molelar Ecology Notes, 2007, 7(1): 43–45
- Zhang XY, Zhang XJ, Zhao C, *et al.* The development of BAC-end sequence-based microsatellite markers and analysis on population genetic diversity in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*). Journal of Fisheries of China, 2012, 36(6): 815–824 [张秀英, 张晓军, 赵翠, 等. 栉孔扇贝 BES-SSR 的开发及遗传多样性分析. 水产学报, 2012, 36(6): 815–824]
- Zhou XL, Zhu QH, Dong YH, *et al.* Development and comparative study of genomic-SSR and EST-SSR in *Tegillarca granosa*. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2013, 44(2): 467–475 [周小龙, 朱靖华, 董迎辉, 等. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)基因组 SSR 和 EST-SSR 的开发及比较研究. 海洋与湖沼, 2013, 44(2): 467–475]

Development and Application of the EST-SSR Markers in *Atrina pectinata*

LI Dongming^{1,2}, YANG Aiguo^{2①}, WU Biao², SUN Xiujun², ZHOU Liqin²,
LIU Hanmiao^{1,2}, ZHANG Guangming^{1,2}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;
2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture,
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract *Atrina pectinata* is a large deep-water mollusk species that has high economic values. It is distributed in the coastal areas of China, from the Liaodong Peninsula in the north to the Qiongzhou Strait in the south. Its habitat is adjacent to China's provinces such as Fujian, Guangdong, Liaoning and Shandong. In recent decades, the natural resource of *A. pectinata* has declined due to the environment destruction and overfishing. To better protect the resource of *A. pectinata*, we need to understand its population genetic structure. Microsatellites is a widely used method to assess the genetic diversity in farmed aquatic species and construct QTL due to its characteristics such as the abundant polymorphism, the rich information, the co-dominance and conservation. The EST-SSR marker is inexpensive and is probably associated with functional regions of the genome. Therefore, in this research, we developed a series of EST-SSR markers using a transcriptome-based platform to study the genetic diversity of *A. pectinata*. We identified 10550 EST-SSR (8.2%) using MISA software, and the corresponding frequency was 1 EST-SSR per 9.01 kb of the sequence. Dinucleotide repeats were dominant among all EST-SSRs, counting for 77.08%. We designed 120 primers for PCR, and 36 out of 120 resulted in successful amplification. Fragments amplified with 12 primers were polymorphic. Next we used these SSR primers to explore the genetic variation of 30 *A. pectinata* samples collected from the Qingdao Bay. The number of alleles for the 12 SSR makers varied from 2 to 5 in these samples with an average of 3.5 alleles per locus. The observed heterozygosity ranged from 0.1667 to 0.6667, and the expected heterozygosity varied from 0.4316 to 0.7938. Polymorphic information content ranged from 0.3679 to 0.7459. These indicated high genetic diversity of the *A. pectinata* population in the Qingdao Bay. Moreover, we verified that the polymorphic EST-SSR markers could be a useful tool in comparative mapping, gene tagging and QTL mapping.

Key words *Atrina pectinate*; EST-SSR; Genetic diversity; Heterozygosity

① Corresponding author: YANG Aiguo, E-mai: yangag@ysfri.ac.cn