

黄口荔枝螺转录组数据的微卫星标记开发与分析

李威¹, 赵 珊¹, 焦海峰², 林志华¹, 包永波¹

(1. 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; 2. 宁波市海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315100)

摘要: 以黄口荔枝螺转录组测序所得到的拼接序列为基础, 利用 MISA 软件进行微卫星分析, 利用 Primer5.0 设计引物 160 对。结果显示, 83 对引物能够成功扩增, 引物在黄口荔枝螺渔山列岛群体多态性检测中发现, 37 个 SSR 位点能够表现出多态性, 一共获得了 129 个等位基因, 各位点等位基因数为 2~5 个, 平均每个位点等位基因数为 3.49 个, 观测杂合度 H_o , 期望杂合度 H_e , 多态信息含量 PIC 范围分别介于 0.000~0.800、0.146~0.645、0.139~0.573 之间, 有 9 个表现为高度多态, 20 个表现为中度多态, 8 个表现为低度多态。实验结果进行 Hardy-Weinberg 平衡检测后, 利用 Bonferroni correction 法进行校正, 有 29 个位点显著偏离, 结果表明渔山列岛黄口荔枝螺群体总体遗传多样性水平较低。

关键词: 黄口荔枝螺; 转录组; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号: S 917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)11-0061-07

doi: 10.11759/hyxx20150616002

黄口荔枝螺(*Thais luteostoma*)隶属软体动物门骨螺科、荔枝螺属, 被称为“黄螺”, 是一种生活在潮间带低潮区, 水深为 20 m 的岩礁或者砾石之间的广温、广盐性软体动物^[1]。主要分布在我国南北沿海岸地区, 以一些行动迟缓的小型腹足类, 以及牡蛎、藤壶和苔藓虫等双壳贝类为食; 黄口荔枝螺的壳具有药用价值, 并且肉质又十分鲜美, 是一种具有较高经济价值的贝类^[2]。不过近年来, 由于沿海渔民滥采捕捞以及海洋污染不断加剧, 加之螺种资源又得不到有效保护, 导致黄口荔枝螺在许多沿海地区已经销声匿迹。目前, 关于黄口荔枝螺的研究报道主要集中在毒性、营养成分、性畸变、齿舌、群体遗传结构等方面^[3-7], 而关于黄口荔枝螺微卫星分子标记的研究尚未见报道。

微卫星标记又被称为简单重复序列(simple sequence repeat, SSR), 具有多态性丰富、共显性遗传、重复性好和操作分析简单等优点, 已被广泛应用于种群遗传多样性评价、遗传连锁图谱构建、分子标记辅助育种等各个领域^[8]。目前在海洋贝类中, SSR 标记已在太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[9-10]、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[11-12]、文蛤(*Meretrix meretrix*)^[13-15]、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)^[16]、泥蚶(*Tegillarca granosa*)^[17]中等得到开发和分析。本研究在黄口荔枝螺转录组文库的基础上, 分析 SSR 位点的信息, 并设计 SSR 引物, 为黄口荔枝螺遗传多样性分析、种

群鉴定以及种质资源保护提供较为有力的工具。

1 材料和方法

1.1 实验样品采集与 DNA 的提取

实验样品为野生群体, 采自浙江宁波渔山列岛(28°53.3'N, 122°16.5'E), 采样结束, 活体直接运回实验室, 对所取样本进行测量, 得到样本平均壳高为 23.06 mm, 平均壳宽 16.98mm, 随机取其中 30 枚个体进行解剖, 取其腹足保存在-20℃冰箱中备用。采用酚-氯仿法提取基因组 DNA, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量, 紫外分光光度计检测 DNA 的纯度与浓度, 调节 DNA 浓度最终为 100 ng/μL, 用于之后实验 PCR 扩增。

1.2 微卫星序列的来源及引物设计与合成

根据黄口荔枝螺转录组测序得到的 EST 序列(测序全部由北京百迈克公司完成), 利用 MISA 软件进行 SSR 分析, 设置条件为二碱基重复数至少为 6 次, 三碱基重复数至少为 5 次, 四碱基重复数至少为 4 次,

收稿日期: 2015-06-16; 修回日期: 2015-07-22

基金项目: 宁波市农业科技攻关项目(2014C10018)

作者简介: 李威(1989-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为水生生物种质资源与海洋牧场, E-mail:18368406632@163.com, 电话 18368406632; 包永波, 通信作者, E-mail:bobbao2001@gmail.com

五碱基和六碱基重复数至少为 3 次。利用软件 Primer5.0 完成引物设计, 设计了 160 对引物, 引物设计标准为: 引物长度在 18~24 bp, GC%含量在 40%~60%, 上下游引物 T_m 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。设计的引物由上海生工合成(表 1)。

表 1 SSR 分析统计表
Tab.1 SSR analysis statistics

SSR 的类型	样本	SSR 的类型	样本
包含 SSR 的序列数目	4573	三碱基重复	1254
包含 1 个以上 SSR 的序列数目	2109	四碱基重复 SSR	169
以复合物形式存在的 SSR 数目	791	五碱基重复	12
单碱基重复	4373	1-5 碱基型 SSR 总数	8202
双碱基重复	2394		

1.3 黄口荔枝螺微卫星的筛选及 PCR 扩增

随机取 8 个黄口荔枝螺个体的 DNA 混成一个基因池, 稀释到最终浓度为 100 ng/ μ L, 在 Eppendorf 梯度 PCR 仪上进行微卫星引物的初步筛选及反应体系优化。PCR 反应体系包括: 10 \times Buffer 2 μ L, dNTPs 1.6 μ L, Primer F(10 mmol/L)0.5 μ L, Primer R (10 mmol/L) 0.5 μ L, r Taq (TaKaRa)0.2 μ L, DNA 1.0 μ L, 加蒸馏水至 20 μ L。PCR 程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 95 $^{\circ}$ C 变性 40 s, T_m (根据不同引物而定)退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR

产物用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 电泳时间为 3~4 h, 缓冲液为 1 \times TBE, 电压为 180V, EB 染色, 凝胶成像系统(Bio-rad)拍照, 最后根据电泳图结果来确定不同引物的 T_m 。

1.4 黄口荔枝螺微卫星位点分析

利用筛选出有扩增条带的引物对渔山列岛黄口荔枝螺 30 个个体进行微卫星标记多态性检测, 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, 使用软件 CERVUS 3.0 计算等位基因数(N_a)、期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)和多态信息含量(PIC); 用 GENEPOP 在线软件计算 Hardy-Weinberg 平衡, 用 Bonferroni correction 对结果进行校正。

2 结果

2.1 转录组微卫星的分析

利用 MISA 软件, 将拼接后得到的黄口荔枝螺序列进行微卫星标记分析, 结果见表 1。

2.2 黄口荔枝螺微卫星位点的筛选结果

从初筛的 160 对引物中, 83 对引物能够获得清晰条带; 在黄口荔枝螺群体进行多态性检测, 其中 37 条引物的扩增产物具有多态性, 多态率为 44.6%, 图 1 为部分引物在群体中扩增的条带。在 37 对引物中, 最多的为三碱基重复类型, 达到 22 对, 占 59.6%; 其次是四碱基重复类型, 有 12 对, 占 32.4%; 最少的为二碱基重复类型, 只有 3 对。

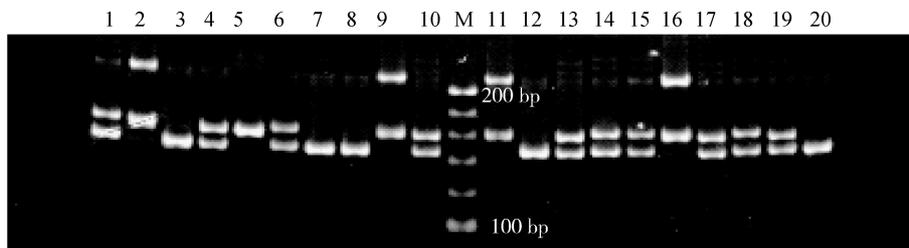


图 1 TL33 位点在黄口荔枝螺渔山列岛群体部分个体中扩增的电泳图谱

Fig.1 Amplified allele of loci TL33 in partial Yushan Island population of *Thais luteostoma*

2.3 黄口荔枝螺遗传多样性分析

37 个微卫星位点在黄口荔枝螺 30 个个体中进行扩增, 共获得 129 个等位基因。EST-SSRs 的等位基因数介于 2~5, 平均等位基因数为 3.49, TL02、TL06、TL08、TL13、TL16、TL18、TL19、TL35 位点都获得 5 个等位基因, 等位基因数最多, 而 TL03、

TL05、TL12、TL17、TL27、TL28、TL30、TL34 位点都只得到 2 个等位基因, 等位基因数最少; PIC 值是衡量群体变异程度的重要参数^[18]。24 个多态位点的 PIC 值介于 0.139~0.573, 平均值为 0.344, 观测杂合度与期望杂合度分别介于 0.000~0.800 和 0.146~0.645, 平均值为 0.228 和 0.393(见表 2)。

表 2 黄口荔枝螺 37 个 EST-SSRs 标记的特征
Tab.2 Characteristics of 37 EST-SSRs for *Thais luteostoma*

位点	引物序列(5'-3')	重复模式	退火温度(°C)	产物大小(bp)	等位基因 (Na)	观测杂合度(Ho)	期望杂合度(He)	多态信息含量 (PIC)	P 值
TL01	F: TACAGGCCTCGCCAAAGTCT R: CACAGGGGAAAACTGGCTAA	(CTGC) ₅	49.8	210~225	4	0.400	0.595	0.535	0.0001
TL02	F: CCAGTTTGGGGTCTGTCTGT R: TATCACGACCATCCTCCCTC	(CCTG) ₅	55.2	155~180	5	0.400	0.610	0.528	0.0000
TL03	F: CAGTGGACTGGGTATGGGAG R: CCTGCAAAAGAAAGCCAAAAC	(TTCC) ₅	59.6	150~165	2	0.000	0.185	0.164	0.0000
TL04	F: TTTCTTGCAITTTGCTGTGC R: TCGAITTTGGCAGACTTCCTC	(ATTT) ₅	48	165~180	3	0.000	0.190	0.177	0.7780
TL05	F: TTCATGCCCTCAAAAACCTC R: GGCACCAGGACTCTGAATGAT	(TACA) ₅	57	165~185	2	0.000	0.262	0.222	0.0016
TL06	F: TACCAGATGAAACGCCATGA R: AATGGTGTGGCCAAATAAGG	(GTGA) ₅	59.6	265~280	5	0.200	0.528	0.424	0.0010
TL07	F: GAGTCGTTGCTTCCAIFAGGC R: AAAAACCATTTCTGGCAGACG	(CCTT) ₅	59.6	135~145	4	0.150	0.388	0.354	0.2224
TL08	F: TGGTAATCCAAAACCTGCAA R: GGACCCCCACAGCTAITTTT	(TTAA) ₆	57	210~230	5	0.550	0.594	0.515	0.0004
TL09	F: AAGAAAGGTTGATCGGGACA R: GCTCAGTATGTGCCCAATTT	(AGTA) ₅	55.2	270~285	4	0.150	0.273	0.250	0.0000
TL10	F: CAGACTGCCACTTCAGGGTT R: GAIGTTTTGTCTGAAGGCA	(TGTC) ₅	48	210~230	3	0.100	0.277	0.250	0.0001
TL11	F: AGGAGGTGATGTGTTCCGAC R: AGAGTCTGTGGCGAAGTCGT	(GCA) ₉	64.6	155~170	4	0.300	0.310	0.279	0.0003
TL12	F: CCACACCACACCTTTCCTCT R: CAGACGTGATTCATGGCT	(GCT) ₇	62	250~270	2	0.000	0.508	0.372	0.0000
TL13	F: TATCAGCCCGTTCTTCCAAC R: CTCCTCGCCAGTAAACGAGTC	(GTT) ₇	62	210~225	5	0.800	0.586	0.503	0.0000
TL14	F: AATCCTTAACGGGCAGACCT R: TGAAGAACTCCTCCACCACC	(GCA) ₇	64.6	230~250	4	0.200	0.233	0.217	0.0001
TL15	F: ACAGGAGCTGGTGTGTTCT R: GCTGAGGATGCTGTTCCGT	(AGG) ₇	64.6	230~245	3	0.450	0.383	0.343	0.0004
TL16	F: GCAACCAAGTCTCCAAAAGC R: CTTTGGCTGTGCTGGATCA	(GCT) ₇	62	185~205	5	0.750	0.594	0.515	0.0000
TL17	F: TGGGACAACCGTACTCACAG R: TTCTTCAIGAIGTGCCTTCG	(CAC) ₆	64.6	265~280	2	0.100	0.146	0.139	0.2242
TL18	F: CGTTCCTCTTTGTTTCCA R: GCGAITTTATCGCTCGCTAC	(GTG) ₆	56.6	210~225	3	0.350	0.355	0.329	0.0084

续表

位点	引物序列(5'-3')	重复模式	退火温度(°C)	产物大小(bp)	等位基因 (Na)	观测杂合度(Ho)	期望杂合度(He)	多态信息含量 (PIC)	P 值
TL19	F: TGTCCATCTATCCCTCTGGC R: AGCCGCTAGTCCCTACAGCAG	(CAG) ₆	56.6	240~260	5	0.550	0.601	0.503	0.0002
TL20	F: ATTGGGCACAGGAGATTTCAG R: GAGAGAAGGAGGACGACGTTG	(GCA) ₆	58.4	215~235	4	0.050	0.406	0.350	0.0000
TL21	F: TGGCTACCATCAGCACTCAG R: CTCCCAGCTGATCAAGGAAG	(TGC) ₆	56.6	200~225	3	0.150	0.191	0.180	0.0004
TL22	F: GATGCAACAGATGCTGGCTA R: GGTGGTGGAAAGTGGTAGTGG	(CAC) ₆	58.4	250~265	4	0.153	0.458	0.384	0.1399
TL23	F: CTTCAAAGTCGGGTCTAGG R: CTGACTTCTGCTGCTTGCTG	(AGC) ₆	58.4	240~260	3	0.200	0.309	0.276	0.0001
TL24	F: GACTGAAGGTGGTGTGAGCA R: TCCAACTGTAGGCAGTGCAG	(CTG) ₆	58.4	190~205	4	0.050	0.345	0.306	0.1012
TL25	F: TGTCAAAGAACTCCCCGTACC R: CTGACAGTGGCCTCACACAC	(TGC) ₆	58.4	160~180	3	0.350	0.406	0.350	0.0001
TL26	F: TGCCTGAGACATTGAGGATG R: GACGAGCCATCTTTGTTCC	(TG) ₆	58.4	210~220	4	0.150	0.350	0.317	0.0000
TL27	F: TTCCTTGAAGTGCACCCAGTG R: CATGTTGATTCATCGCCAAC	(AT) ₆	58.4	175~190	2	0.100	0.146	0.140	0.0003
TL28	F: AGATGCACCGAGCAAAAAGT R: TGCAIGCAGAGTTAGACGAAA	(CAGG) ₅	59.6	145~160	2	0.000	0.328	0.269	0.0000
TL29	F: ACGCATGTCAAATTCGTCAAA R: TGAGCTGTGGTTGAAAAACG	(CAAA) ₅	57	140~155	3	0.150	0.450	0.401	0.2251
TL30	F: CGGCAGCCAAAACITTAACAT R: ACCCACAGGGTATCAAGCTG	(TTG) ₆	64.6	220~235	2	0.000	0.262	0.222	0.0042
TL31	F: GAAAGTGACAAGAAAACAGCAA R: TTCAGCCTTTGGGAGAAAAA	(CA) ₆	45.4	135~145	4	0.200	0.515	0.464	0.0012
TL32	F: CACAAGACAAGCAAGGCAAA R: TCAGGAAAACGACCCACTTC	(GCT) ₆	55.2	225~240	3	0.450	0.645	0.573	0.0001
TL33	F: CCCATCCTCTGTGGTTCAT R: GTCCAGTTCCTGTATGAGGT	(CCA) ₆	48	160~225	4	0.200	0.595	0.535	0.0003
TL34	F: ATCTGTGGTTTCCGTAACGC R: GATTTGGCAGCAGTAATGGC	(CTG) ₆	51.6	145~160	2	0.000	0.328	0.269	0.0000
TL35	F: AGAGGACTGAGCACCGACAT R: CTGCCTGGCAAAATCTTGT	(TGA) ₇	62	235~250	5	0.550	0.573	0.518	0.0001
TL36	F: TAACGCAAGTGTAGCAGG R: GTGCACATATGGGCACATC	(ACC) ₇	51.6	135~150	3	0.000	0.185	0.164	0.0000
TL37	F: GGCTGTGTTGGGAAGTCAI R: TCATCAGCTACAGCAGCACC	(TGT) ₇	62	170~185	4	0.400	0.421	0.379	0.0016
mean	—	—	—	—	3.49	0.228	0.393	0.344	—

筛选出来的黄口荔枝螺微卫星位点经 Hardy-Weinberg 平衡检验, Bonferroni correction 法校正后发现除 TL04、TL07、TL17、TL18、TL22、TL24、TL29、TL30 之外($P>0.05/30$), 其余位点均有不同程度的偏离 Hardy-Weinberg 平衡。

3 讨论

黄口荔枝螺转录组中 SSR 出现频率不仅比较高, 而且密度大, 类型也较为丰富。转录组测序共获得 114832 条 unigene 序列, 在 7412 条 unigene 中发现 8202 个 SSR 位点, 发生频率为 6.45%。转录组中 SSR 以一核苷酸、二核苷酸和三核苷酸重复为主, 占 SSR 总数 97.79%, 四、五核苷酸相对少, 只占 2.21%(表 1)。多态性筛选中, 统计得到以 GCA 为核心序列的位点有 3 个, 以 GCT 为核心序列的位点有 3 个, 三碱基重复序列具有相对高的多态性, 一共得到 78 个等位基因, 占 60.5%(表 2), 这也为后续黄口荔枝螺重复序列筛选以及进一步了解其基因组特性提供了参考。随着不断深入分析黄口荔枝螺转录组平台数据, 将有更多与个体生长功能基因相关的微卫星位点会被发掘出来, 这在其他水产动物中已有报道。张曼等^[19]利用 19 个微卫星位点分析虾夷扇贝群体的遗传结构并筛选了与虾夷扇贝生长相关的标记; 吴滢等^[20]采用 30 个微卫星标记分析同池养殖的长江水系中华绒螯蟹群体, 筛选出生长性状(体重、体长和体宽)相关的分子标记。在将来随着黄口荔枝螺微卫星位点的不断开发, 可以为黄口荔枝螺个体生长功能基因筛选奠定必要的基础。

多态性信息含量(PIC) 和杂合度是 2 个重要遗传参数, 是衡量群体遗传结构变异程度高低的一种标准, 其值高低是群体内个体遗传变异程度的反应, 数值高, 则代表遗传变异大, 具有高的遗传信息, 反之则遗传变异小, 遗传多样性较差^[21]。渔山列岛黄口荔枝螺在群体遗传多样性分析中有 9 对为高度多态性基因座($PIC > 0.5$), 20 对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渔山列岛黄口荔枝螺遗传多样性研究中提供较为有效的遗传信息。利用微卫星技术所得到荔枝螺各位点的平均观测杂合度为 0.228, 明显低于安俊庭^[22]利用微卫星标记筛选脉红螺野生群体所得到的平均观测杂合度(平均值为 0.645), 说明渔山列岛黄口荔枝螺野生群体相对于其他螺群来说遗传多样性水平较低。牛东红等^[23]利用 8 个微卫星位点对浙江和福建 8

个缢蛏群体的遗传多样性进行分析, 得到缢蛏群体的平均期望杂合度在 0.806~0.875; 束靖等^[24]利用 7 个微卫星位点对皱纹盘鲍 5 个养殖群体与 4 个野生群体的遗传结构进行分析, 得到养殖群体和野生群体的期望杂合度介于 0.754~0.787 和 0.821~0.866。实验所得到渔山列岛黄口荔枝螺群体的平均期望杂合度为 0.393, 这说明渔山列岛黄口荔枝螺群体的遗传变异水平不是很高, 可能是由于渔山列岛是具有生态隔离特征的岛屿型海洋生态系统, 其生态系统具有自身脆弱性。由 Hardy-Weinberg 平衡定律可知, 当群体处于平衡状态时, 各个群体中的等位基因分布频率会处于相对稳定状态, 观测杂合度和期望杂合度之间没有明显差异。统计分析渔山列岛黄口荔枝螺群体中的平衡检验概率 P 值, 78.4%的群体位点组合未偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 部分位点偏离平衡, 可能是由于渔山列岛黄口荔枝螺群体受到不同程度的人为干扰、近交、存在无效等位基因而引起稀有等位基因丢失而造成杂合子缺失, 也或许是由群体内自然选择而引起的。

目前, 黄口荔枝螺微卫星标记尚未开发。本文首次在黄口荔枝螺上利用转录组测序数据批量筛选 SSR 位点, 筛选出清晰扩增条带的微卫星位点 83 个, 其中 37 个呈现出不同程度多态性。近些年利用转录组数据获得含有微卫星的序列, 对海洋双壳贝类遗传多样性分析已有报道, 如 An 等^[25]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; 闫路路等^[26]利用转录组测序筛选出 40 个蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)微卫星标记。利用黄口荔枝螺转录组数据平台不仅可以提供大量 EST(expressed sequence tags) 数据, 而且直接与功能基因密切相关。基于转录组 SSR 的分子标记不但具有如基因组 SSR 和 EST-SSR 等分子标记的特点, 而且还具有所得的数据丰富以及通用性好等优点^[27]。相对于利用基因组 SSR 和 EST-SSR 开发分子标记, 由于转录组测序起步时间较晚, 目前利用转录组序列开发 SSR 标记的研究相对来说较少。已经有研究表明, 转录组 SSR 开发所得到分子标记多态性与扩增效果较好, 用来进行分子标记的开发比较合适^[28]。同时, 由于近些年转录组发展十分迅猛, 未来将是开发分子标记的一种重要方法。

本实验以渔山列岛黄口荔枝螺为研究对象, 运用 SSR 分析可知渔山列岛黄口荔枝螺种群遗传多样性水平较低, 下一步的工作我们将扩大黄口荔枝螺

育苗的规模, 利用放流等人工方法, 为渔山列岛黄口荔枝螺及其他海洋生物的合理利用与保护提供可靠保证。

参考文献:

- [1] 张素萍, 张福绥. 中国近海荔枝螺属的研究(腹足纲: 骨螺科)[J]. 海洋科学, 2005, 29(8): 75-83.
- [2] 尤仲杰, 陈志云. 浙江沿海荔枝螺属(腹足纲: 骨螺科)分类学研究[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2010, 29(4): 306-317.
- [3] 吕振明, 樊甄姣, 吴常文, 等. 两种重金属离子对黄口荔枝螺的毒性及其影响因素的研究[J]. 渔业现代化, 2007, 34(6): 35-38.
- [4] 朱爱意, 谢佳彦, 杨运琪, 等. 舟山东极岛潮间带两种荔枝螺的营养成分分析[J]. 海洋学研究, 2008, 26(1): 470-475.
- [5] 管云雁, 韩雅莉. 两种荔枝螺染色体核型以及性畸变个体染色体研究[J]. 海洋环境科学, 2004, 23(3): 21-23.
- [6] 黄建荣, 丁少雄, 王德祥, 等. 中国沿岸 13 荔枝螺的齿舌形态分析[J]. 海洋科学, 2013, 37(8): 72-77.
- [7] 王旭. 黄口荔枝螺和疣荔枝螺遗传多样性研究[D]. 舟山: 浙江海洋学院, 2013.
- [8] Somers D J, Isaac P, Edwards K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(6): 1105-1114.
- [9] 李慧娟, 元海刚, 李莉, 等. 长牡蛎 17 个 fosmid-SSR 标记的开发与分析[J]. 水产学报, 2011, 35(10): 1464-1467.
- [10] Bai J, Li Q, Cong R, et al. Development and characterization of 68 expressed sequence tag derived simple sequence repeat markers in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2011, 42(3): 444-455.
- [11] Zhan A B, Bao Z M, Hu X L, et al. Characterization of 95 novel microsatellite marker for Zhikong scallop *Chlamys farreri* using FIASCO-colony hybridization and EST database mining[J]. Fisheries Science, 2008, 74(3): 516-526.
- [12] 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[J]. 水产学报, 2012, 36(6): 815-824.
- [13] 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 and Genetic Systems, 2011, 86(3): 197-205.
- [14] Lu X, Wang H X, Dai P, et al. Characterization of EST-SSR and genomic-SSR markers in the clam, *Meretrix meretrix*[J]. Conservation Genetics Resource, 2011, 3(4): 655-658.
- [15] 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[J]. 水产学报, 2013, 37(8): 1447-1154.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 张曼, 陈蒙, 姬南京. 虾夷扇贝家系群体遗传结构及其微卫星标记与经济性状相关性的分析研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(20): 125-130.
- [20] 吴滢, 付春鹏, 蒋速飞, 等. 中华绒螯蟹微卫星标记与生长性状相关性的初步分析[J]. 水生生物学报, 2011, 35(2): 197-202.
- [21] 廖信军, 常洪, 孙伟, 等. 利用微卫星标记对六个羊群体性的研究[J]. 家畜生态学报, 2006, 27(2): 13-18.
- [22] 安俊庭. 脉红螺人工苗种繁育与微卫星标记筛选[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- [23] 牛东红, 冯冰冰, 刘达博, 等. 浙闽沿海缢蛏群体遗传结构的微卫星和线粒体 COI 序列分析[J]. 水产学报, 2011, 35(12): 1805-1812.
- [24] 束靖, 李琪, 于瑞海, 等. 皱纹盘鲍野生与养殖群体微卫星标记遗传变异研究[J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(1): 52-58.
- [25] An H S, Lee J W, Development of microsatellite markers for the Korean mussel, *Mytilus coruscus* (Mytilidae) using next-generation sequencing[J]. Molecular Sciences, 2012, 13(8): 10583-10593.

- [26] 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[J]. 生态学报, 2015, 35(5): 1573-1580.
- [27] Varshney RK, Sigmund R, Borner A, et al. Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice[J]. Plant Science, 2005, 168(1): 195-202.
- [28] 李小白, 向林, 罗洁, 等. 转录组测序(RNA-seq)策略及其数据在分子标记开发上的应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(5): 720-726, 740.

Characterization and analysis of microsatellite markers in *Thais luteostoma* using next generation sequencing

LI Wei¹, ZHAO Shan¹, JIAO Hai-feng², LIN Zhi-hua¹, BAO Yong-bo¹

(1. Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China; 2. Ningbo Institute of Marine and Fishery, Ningbo 315100, China)

Received: Jun., 16, 2015

Key words: *Thais luteostoma*; transcriptome sequencing; microsatellite markers; polymorphism

Abstract: *Thais luteostoma* is one of the most important marine shellfish species, which widely inhabits throughout the southern and northern coastal areas in China. In this paper, we developed a series of microsatellite markers using a transcriptome-based sequencing to provide a foundation for genetic research on *Thais luteostoma*. We sequenced a large number of ESTs and screened 160 potential microsatellites of nucleotide repeats using MISA software. We successfully obtained clear reproducible bands for 83 microsatellite loci. These were amplified in 30 wild individuals sampled from Yushan Island, Ningbo, Zhejiang province. 37 SSR loci were polymorphic (number of alleles per locus ranged from 2 to 5, with an average of 3.49). The observed heterozygosity ranged from 0.000 to 0.800, while the expected heterozygosity varied from 0.146 to 0.645. Polymorphic information content ranged from 0.139 to 0.573, and 29 SSR loci deviated from Hardy-Weinberg equilibrium. Among these, 9 loci had a PIC of <0.5, so were classified as highly polymorphic, additional 20 loci were moderately polymorphic with PICs ranging from 0.25 to 0.5. The PIC of 8 loci was <0.25, indicating that these were classified as low polymorphic loci. The results show that the genetic diversity of *Thais luteostoma* is low in Yushan Island.

(本文编辑: 康亦兼)