

基于 β -连环蛋白基因的分子标记甄别海蜇 (*Rhopilema esculentum*)和沙海蜇 (*Nemopilema nomurai*)^{*}

杨傲傲^{1,2} 朱玲² 周春娅² 杨洪^{1,2} 骆晓蕊^{1,2} 刘春胜² 庄志猛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 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 采用转录组 454 GS FLX 测序和 PCR 技术,以海蜇(*Rhopilema esculentum*)和沙海蜇(*Nemopilema nomurai*)的基因组 DNA 为模板,分别克隆了包含 EST-SSR 和 EST-SNP 标记的 β -连环蛋白基因目的片段。生物信息学分析显示,海蜇和沙海蜇的 β -连环蛋白基因目的片段长度分别为 166/169 bp 和 157/160 bp,均没有内含子。海蜇个体之间 β -连环蛋白基因目的片段除了微卫星重复差异外,只有一个碱基的差异;沙海蜇个体之间除了微卫星重复差异外,其余完全一致。在海蜇和沙海蜇 β -连环蛋白基因目的片段的相同位置均包含微卫星重复,但其重复单元截然不同:海蜇为:(TGC)₄₋₆(TGT)₁₋₂(TGC)₄₋₅,而海蜇为(TGT)₅₋₆。同时两物种间还存在 14 个单核苷酸多态位点:(T/C)¹, (T/C)², (C/T)³, (C/T)⁴, (C/T)⁵, (T/G)⁶, (G/C)⁷, (T/G)⁸, (A/G)⁹, (C/T)¹⁰, (G/A)¹¹, (A/G)¹², (C/T)¹³, (A/T)¹⁴。聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱也直接客观地反映了两个群体之间目的片段的长度和微卫星多态性差异。上述结果显示,EST-SSR 和 EST-SNP 标记的 β -连环蛋白基因目的片段,可以作为一种简单、有效的分子标记,快速、准确地识别不同发育阶段的海蜇和沙海蜇。

关键词 海蜇;沙海蜇; β -连环蛋白;EST-微卫星;EST-单核苷酸多态位点

中图分类号 Q346 doi: 10.11693/hyhz20140500136

海蜇(*Rhopilema esculentum*)和沙海蜇(*Nemopilema nomurai*)同属于刺胞动物门(Cnidaria)、钵水母纲(Scyphozoa)、根口水母目(Rhizostomeae)、根口水母科(Rhizostomatidae),广泛分布于西北太平洋沿岸海域,在我国主要分布于东海北部和黄海、渤海海域(董婧等,2012)。海蜇隶属于海蜇属(*Rhopilema*),目前作为国际公认品质最好的可食用大型水母,具有极高的经济价值。同时,海蜇也是我国重要海洋渔业捕捞、增养殖和放流对象(谢忠明等,2004)。而沙海蜇属于沙蜇属(*Nemopilema*),经济价值较低,但是作为世界上最大的水母之一,是我国近海暴发的主要大型灾

害性水母(程家骅等,2004)。近年来,沙海蜇频繁暴发于黄海海域及东海北部海域。沙海蜇的大量暴发性增殖,一方面严重改变了自然海洋生态系统的结构与功能,另一方面也严重影响了其它海洋渔业资源产量以及正常的海洋渔业生产,而且对滨海旅游和工业活动等也都产生了重要影响(孙松等,2012)。

海蜇和沙海蜇的生活史复杂,从受精卵到成体,经历浮浪幼虫、螅状体、横裂体、碟状体和水母体五个发育阶段,不同发育阶段之间个体形态、结构差异显著(董婧等,2012)。已有的研究表明:沙海蜇与海蜇的水母体阶段可以根据伞径大小、外伞表面特征

^{*}国家重点基础研究发展计划(973)项目资助,2011CB403605号;国家自然科学基金资助项目,31372507号;科技基础性工作专项,2013FY110700号。杨傲傲, E-mail: yangaoaoly@126.com

通讯作者:朱玲,博士,副研究员, E-mail: zhuling@ysfri.ac.cn

收稿日期:2014-05-21,收修改稿日期:2014-08-17

和附属器形态等直接用肉眼区分(洪惠馨, 2002)。但是在浮浪幼虫、螅状体、横裂体和碟状体阶段, 海蜇和沙海蜇的形态、结构特征极为相似, 几乎难以区别。尽管孙明等(2010)在实验室条件下对沙海蜇与海蜇晚期碟状体的形态特征进行研究, 认为可以通过比较生殖腺、胃丝和口腕等的细微形态差异进行区分(孙明等, 2010)。但由于水母具有含水量多, 采集易破碎, 保存易变形、失真等特点, 导致这种方法在野外采样后难以应用。

本文基于海蜇转录组 454 GS FLX 测序与 PCR 技术, 在海蜇和沙海蜇中分别克隆了包含 EST-SSR 和 EST-SNP 标记的 β -连环蛋白(β -catenin) 基因的片段, 并进行了生物信息学分析, 期望从分子水平上寻找一种简单、准确甄别海蜇和沙海蜇的分子标记, 为海蜇和沙海蜇种群的栖息地调查、资源量或潜在暴发量的评估奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 海蜇转录组 454 GS FLX 测序与 β -连环蛋白基因的筛选

在浙江杭州湾采集野生性成熟的海蜇, 立即运回山东荣成养殖场进行海蜇人工繁育。分别选取海蜇不同发育阶段的个体(螅状体、横裂体、碟状体和幼蛰)提取总 RNA, 并等比例混合, 然后采用 SMARTTM cDNA Library Construction (Clontech)试剂盒构建海蜇 cDNA 文库。由美国夏威夷大学的 ASGPB 实验小组利用 Roche Next Generation Sequencer GS FLX System (a.k.a. 454 Sequencer)进行半板 454 GS FLX 测序。生物信息学分析后, 筛选与其它生物 β -连环蛋白基因具有高度相似性的海蜇 β -连环蛋白基因序列。

1.2 海蜇和沙海蜇样品的采集与基因组 DNA 提取

海蜇和沙海蜇样品分别来自青岛沙子口和胶州湾。液氮保存返回实验室后, 采用酚-氯仿法提取基因组 DNA: 每个个体分别取约 200mg 液氮保存的样品进行研磨, 研磨至粉末状后, 立即加入 600 μ L 的 DNA 提取液[其中 Tris-HCl (pH 8.0) 100mmol/L, EDTA (pH 8.0) 100mmol/L, 1% SDS 50 μ L, 20mg/mL 蛋白酶 K 8 μ L], 充分混匀, 55 $^{\circ}$ C 水浴 1—2h, 待组织充分裂解完全。加入等体积的酚-氯仿试剂[其中饱和酚、氯仿、异戊醇以体积比为 25 : 24 : 1 混合], 静置 10min, 12000r/min 离心 10min, 除去上清。如此反复抽提三次。然后加入 0.6 体积的异丙醇静置 5min, 12000r/min 离心 5min, 除去上清。加入 600 μ L 已预冷的无水乙醇, 沉淀 DNA 约 30min 后, 70%乙醇洗涤沉淀两次,

自然干燥 2min, 加入 20 μ L 超纯水溶解。提取的 DNA 经 1.5%琼脂糖电泳进行检测。

1.3 海蜇和沙海蜇 β -连环蛋白基因目的片段的克隆与测序

利用软件 SSRhunter 1.3 (<http://www.bio-soft.net/dna/SSRHunter.htm>)识别海蜇 β -连环蛋白基因序列中的微卫星重复的位置和重复单位的形式。然后利用 Primer Premier 5.00 在微卫星重复序列的两翼设计一对特异性引物 β -catenin-F1 (5'-TATCAAACCAGGC ATGTCCACC-3')和 β -catenin-R1 (5'-GCCCAGACCT ACCAAGATGA A-3'), 分别扩增海蜇和沙海蜇 β -连环蛋白基因的目的片段。50 μ L 的 PCR 反应体系包括: 5 μ L 10 \times PCR buffer, 4 μ L dNTP (25mmol/L), 3 μ L MgCl₂ (25mmol/L), 上下游引物各 2 μ L (10 μ mol/L), 0.4 μ L (1U) DNA Taq 酶, 2 μ L DNA 模板, 31.6 μ L PCR 水; PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 36 个 PCR 循环(包括: 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 53 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45s), 最后 72 $^{\circ}$ C 总延伸 10min。反应结束后, 用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 对目的片段进行切胶回收后, 与 pMD18-T 载体(TaKaRa)连接, 转化到大肠杆菌感受态细胞(Top10)中。最后通过蓝白斑筛选阳性克隆, 对阳性克隆送华大基因公司进行测序(每个物种随机选取 10 个体); 剩余 PCR 扩增产物用于聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.4 海蜇和沙海蜇 β -连环蛋白基因片段的生物信息学分析

运用 BLAST 技术(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)和蛋白分析系统(<http://www.expasy.org/>), 作者分析了海蜇 β -连环蛋白基因的 cDNA 和氨基酸序列。用 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)对海蜇和沙海蜇群体的 β -连环蛋白基因片段进行多序列比对, 识别海蜇与沙海蜇的 SSR 特征序列和单核苷酸多态位点。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳与图谱分析

PCR 扩增产物通过 6%聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳 55W, 2.5h, 然后银染, 显色, 拍照, 根据 DNA 长度标准 pBR322/MspI, 确定等位基因的长度范围。采用 Genepop 4.0 统计等位基因数, 计算表观杂合度和期望杂合度, 进行哈迪-温伯格平衡背离测试, 并进行成对标记间连锁不平衡测试。

2 结果与分析

2.1 海蜇 β -连环蛋白基因的筛选与同源性分析

生物信息学分析表明, 在半板海蜇 454 GS FLX

转录组测序结果中,共有 7 个 Est 序列与其它生物 β -连环蛋白基因具有高度相似性。将上述 EST 序列拼接后,共获得长 1833 bp 的海蜇 β -连环蛋白基因片段。推导的氨基酸序列经 BLAST 分析发现,海蜇 β -连环蛋白基因片段与来自刺胞动物门的 *Hydractinia echinata* (ACZ51403)、*Podocoryna carnea* (ABI74628)、*Hydra magnipapillata* (AFI99111)和 *Hydra vulgaris* (AAQ02885)的 β -连环蛋白基因具有很高的同源性,其氨基酸序列一致性高达 84%—89%。与长牡蛎 *Crassostrea gigas* (AFL93714)、海鞘 *Ciona savignyi* (BAA32789)和文昌鱼 *Branchiostoma floridae* (BAD12593)的氨基酸序列一致性也分别高达 79%、78%和 82%。

2.2 海蜇 β -连环蛋白基因微卫星筛选与 PCR 扩增

利用软件 SSRhunter 1.3 搜索拼接后的海蜇 β -连环蛋白基因片段,在序列 342—360bp 处发现一个微卫星序列,其重复单位为(TGC)₆。分别以海蜇和沙海蜇的基因组 DNA 为模板,用海蜇 β -连环蛋白基因片段的一对特异性引物 β -catenin-F1 和 β -catenin-R1 进行 PCR 扩增并测序,结果显示:10 个海蜇个体的 β -连环蛋白基因扩增片段的大小分别为 166bp 和 169bp,其中 169bp 与已知的 β -连环蛋白 cDNA 序列的大小相同,表明扩增的目标片段中没有内含子存在。而 10 个沙海蜇个体的 β -连环蛋白基因扩增片段的大小分别为 157bp 和 160bp。

2.3 海蜇和沙海蜇 β -连环蛋白基因目的片段特征分子标记分析

海蜇和沙海蜇 β -连环蛋白基因的目的片段核苷酸多序列比对见图 1。比对结果显示, β -连环蛋白基因在海蜇和沙海蜇中是高度保守的,海蜇个体 β -连环蛋白基因目的序列之间,除了微卫星重复差异外,只有一个碱基的差异;而沙海蜇个体之间除了微卫星重复差异外,其余完全一致。海蜇和沙海蜇的 β -连环蛋白基因目的片段之间,在相同位置上都存在微卫星重复,但所包含的微卫星重复单元截然不同,海蜇为:(TGC)₄₋₆(TGT)₁₋₂(TGC)₄₋₅,而海蜇为(TGT)₅₋₆。除此之外,海蜇和沙海蜇的 β -连环蛋白基因目的片段之间还存

在 14 个能够甄别两物种的单核苷酸多态位点,分别为:(T/C)¹, (T/C)², (C/T)³, (C/T)⁴, (C/T)⁵, (T/G)⁶, (G/C)⁷, (T/G)⁸, (A/G)⁹, (C/T)¹⁰, (G/A)¹¹, (A/G)¹², (C/T)¹³, (A/T)¹⁴。

2.4 微卫星位点的多态性分析

根据 DNA 长度标准 pBR322/MspI,在聚丙烯酰胺凝胶上,海蜇和沙海蜇群体的 PCR 扩增产物长度主要分布在 166 bp 和 160 bp,见图 2。遗传学分析显示:该位点在海蜇和沙海蜇群体中的期望杂合度分别为 0.4998 和 0.7482,表观杂合度分别为 0.5208 和 0.7083,等位基因数均为 2。通过哈迪-温伯格平衡背离测试, Bonferroni 校正后均未发现偏离现象(表 1)。

3 讨论

随着分子生物技术和生物信息学的快速发展,利用 DNA 分子标记对海蜇与沙海蜇进行物种鉴定、探讨物种分类地位及种间亲缘关系已经成为传统分类学的重要辅助手段。刘敏等(2010, 2011)分别利用 18S rDNA 序列和 COI 序列对东黄海沙海蜇与口冠水母分类关系进行了辨析,认为东黄海野生沙海蜇与越前水母的亲缘关系很近,应为同一物种,与海蜇的亲缘关系较远,与口冠水母的关系更远。张姝等(2009)也利用 16S rDNA 和 COI 基因序列对海蜇和沙海蜇进行了分子鉴定,认为线粒体基因作为分子标记可能是解决水母幼体分类困扰的有效途径之一。本研究在海蜇转录组 454 GS FLX 测序基础上,通过对 EST 序列的深度解析,在 β -连环蛋白基因序列中发掘出同时包含 EST-SSR 和 EST-SNP 两种分子标记的目的片段,只需要设计一对引物,分别从海蜇和沙海蜇的基因组 DNA 中扩增出目的片段,经聚丙烯酰胺凝胶电泳即可进行海蜇和沙海蜇的物种甄别。该方法不但简单、快速、准确,同时也为 EST-SSR 和 EST-SNP 分子标记在物种鉴定和亲缘关系分析中的应用提供了一种新思路。

基于 EST 序列开发的 EST-SSR 标记与从基因组开发的 SSR 标记相比,具有以下优点: a) EST-SSR 是在已有的 EST 序列中进行筛选,所以该开发过程不

表 1 海蜇和沙海蜇 β -连环蛋白基因的多态微卫星位点的特征
Tab.1 Characteristics of SSR from β -catenin in *R. esculentum* and *N. nomurai*

物种	重复序列	P-value	H_e	H_o	片段大小(bp)	等位基因数
<i>R. esculentum</i>	(TGC) ₄₋₆ (TGT) ₁₋₂ (TGC) ₄₋₅	0.7219	0.4998	0.5208	166	2
<i>N. nomurai</i>	(TGT) ₅₋₆	1.0000	0.7482	0.7083	160	2

H_e . 期望杂合度; H_o . 观察杂合度


```

Re-9  GTACAATTCATCTTGGTAGGTCTGGGC 169
Re-10 GTACAATTCATCTTGGTAGGTCTGGGC 166
Nn-1  GTACAATTCATCTTGGTAGGTCTGGGC 157
Nn-2  GTACAATTCATCTTGGTAGGTCTGGGC 157
Nn-3  GTACAATTCATCTTGGTAGGTCTGGGC 160
Nn-4  GTACAATTCATCTTGGTAGGTCTGGGC 160
Nn-5  GTACAATTCATCTTGGTAGGTCTGGGC 160
Nn-6  GTACAATTCATCTTGGTAGGTCTGGGC 160
Nn-7  GTACAATTCATCTTGGTAGGTCTGGGC 160
Nn-8  GTACAATTCATCTTGGTAGGTCTGGGC 160
Nn-9  GTACAATTCATCTTGGTAGGTCTGGGC 160
Nn-10 GTACAATTCATCTTGGTAGGTCTGGGC 160
*****

```

图1 海蜇和沙海蜇 β -连环蛋白基因目的片段的核苷酸多序列比对

Fig.1 Multiple alignment of β -catenin target nucleotide sequences from *R. esculentum* and *N. nomurai*

双下划线表示一对引物序列,*表示完全相同的核苷酸位点;黑体表示单核苷酸突变;数字1—14代表单核苷酸突变数目;方框和波浪下划线表示微卫星序列

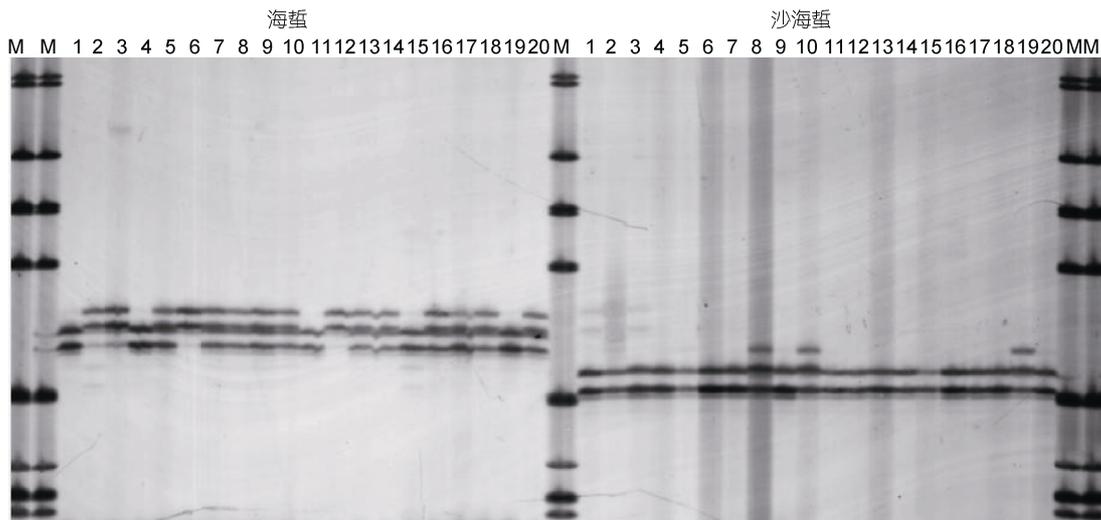


图2 海蜇和沙海蜇 β -连环蛋白基因的多态微卫星图谱

Fig.2 SSR profile from β -catenin in *R. esculentum* and *N. nomurai* populations

仅简单,成本也低;b) EST-SSR 标记通常来自较为保守的转录区,故而开发出的分子标记在近缘物种间具有较高的通用性和可转移性;c) EST-SSR 代表基因的编码部分,因此可作为功能基因的“绝对”的标记,也可用于直接鉴定一些决定重要表型性状的等位基因;d) 通过序列同源性比对,可以分析获得 EST-SSR 标记的某种可能功能(Scott *et al.*, 2000; Areshchenkova *et al.*, 2002)。本研究所获得的 β -连环蛋白基因分子标记正是利用了 EST-SSR 的这些优点。 β -连环蛋白作为 Wnt/ β -catenin 信号通路的核心成员,几乎参与了生物体从胚胎到成体所有的发育过程(Peifer, 1997)。例如调控细胞的增殖和生长(Logan *et*

al., 2004)、保障各种干细胞的功能(Willert *et al.*, 2005)、参与细胞的分化(Prestwich *et al.*, 2007)、控制胚胎早期发育(Klaus *et al.*, 2008)等。通过对目前已在 GenBank 注册的 β -连环蛋白进行生物信息学分析发现:这个位于 β -连环蛋白基因 C 末端的 SSR 重复序列仅存在于刺胞动物海蜇、沙海蜇及 *H. echinata* (ACZ51403)中,其它动物类群均不存在。尽管目前尚不知道这个微卫星序列对 β -连环蛋白的生物功能的影响,但越来越多证据表明,位于编码区的 SSR 序列或者直接影响基因编码产物功能(Ellegren, 2000; Huang *et al.*, 2002),或者通过与转录因子结合进而调控基因表达(Bachtrog *et al.*, 2000),或者通过影响局部

染色质结构等发挥着重要作用(Dupuy *et al*, 2004)。已有研究表明, β -连环蛋白的 C 末端与核转录因子淋巴样增强因子-1/T-细胞因子的结合, 形成转录复合物, 进入细胞核后激活下游基因的表达, 发挥转录因子的作用(Kuhl *et al*, 2001), 因此推测该微卫星序列可能通过与转录因子结合进而调控基因表达, 从而参与刺胞动物的发育过程(Bachtrog *et al*, 2000)。

参 考 文 献

- 刘 敏, 马凌波, 凌建忠等, 2011. 东黄海沙海蜇与口冠水母分类关系的辨析——基于核糖体 18S rDNA 基因序列. 海洋渔业, 33(2): 131—137
- 刘 敏, 程家骅, 马凌波等, 2010. 东黄海沙海蜇群体线粒体 COI 基因序列多态性. 海洋渔业, 32(2): 120—124
- 孙 松, 于志刚, 李超伦等, 2012. 黄、东海水母暴发机理及其生态环境效应研究进展. 海洋与湖沼, 43(3): 401—405
- 孙 明, 董 婧, 赵 云等, 2010. 沙蜇与海蜇晚期碟状体的形态学研究. 渔业科学进展, 31(1): 48—53
- 张 姝, 张 芳, 刘 媛等, 2009. 我国海域两种大型水母分子鉴定. 海洋与湖沼, 40(1): 94—101
- 洪惠馨, 2002. 水母和海蜇. 生物学通报, 37(2): 13—16
- 董 婧, 孙 明, 赵 云等, 2012. 中国北部海域灾害水母沙蜇(*Nemopilema nomurai*)及其它钵水母繁殖生物学特征与形态比较. 海洋与湖沼, 43(3): 550—555
- 程家骅, 李圣法, 丁峰元等, 2004. 东、黄海大型水母暴发现象及其可能成因浅析. 现代渔业信息, 19(5): 10—12
- 谢忠明, 王永顺, 黄鸣夏, 2004. 海蜇增养殖技术. 北京: 金盾出版社, 107—118
- Areshchenkova T, Ganal M W, 2002. Comparative analysis of Polymorphism and chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from different sources. Theor Appl Genet, 104(2—3): 229—235
- Bachtrog D, Agis M, Imhof M *et al*, 2000. Microsatellite variability differs between dinucleotide repeat motifs-evidence from *Drosophila melanogaster*. Mol Biol Evol, 17(9): 1277—1285
- Dupuy B M, Stenersen M, Egeland T *et al*, 2004. Y-chromosomal microsatellite mutation rates: differences in mutation rate between and within loci. Hum Mutat, 23(2): 117—124
- Ellegren H, 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. Trends Genet, 16(12): 551—558
- Huang Q Y, Xu F H, Shen H *et al*, 2002. Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. Am J Hum Genet, 70(3): 625—634
- Klaus A, Birchmeier W, 2008. Wnt signalling and its impact on development and cancer. Nat Rev Cancer, 8(5): 387—398
- Kuhl M, Geis K, Sheldahl L C *et al*, 2001. Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/ β -catenin and Wnt/ Ca^{2+} signaling. Mech Dev, 106(1—2): 61—76
- Logan C Y, Nusse R, 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol, 20: 781—810
- Peifer M, 1997. β -catenin as oncogene: the smoking gun. Science, 275(5307): 1752
- Prestwich T C, Macdougald O A, 2007. Wnt/ β -catenin signaling in adipogenesis and metabolism. Curr Opin Cell Biol, 19(6): 612—617
- Scott K D, Eggler P, Seaton G *et al*, 2000. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. Theor Appl Genet, 100(5): 723—726
- Willert K, Brown J D, Danenberg E *et al*, 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. Nature, 423(6938): 448—452

USING β -CATENIN GENE TO DIFFERENTIATE *RHOPILEMA ESCULENTUM* FROM *NEMOPILEMA NOMURAI*

YANG Ao-Ao^{1,2}, ZHU Ling², ZHOU Chun-Ya², YANG Hong^{1,2}, LUO Xiao-Rui^{1,2},
LIU Chun-Sheng², ZHUANG Zhi-Meng²

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

Abstract The target fragments of β -catenin gene including EST-SSR and EST-SNP markers were cloned with genomic DNA templates of *Rhopilema esculentum* and *Nemopilema nomurai* by the 454 GS-FLX transcriptome sequencing and PCR techniques, respectively. Bioinformatic analysis showed that target fragments nucleotide sequences did not contain intron and the lengths of nucleotide sequences were 166/169bp and 157/160bp in *R. esculentum* and *N. nomurai* populations, respectively. There was only a base difference among individuals of *R. esculentum*, and no difference among individuals of *N. nomurai*, apart from SSR difference. In the same site, the target fragments of β -catenin gene shared a distinct repeat motif, (TGC)₄₋₆(TGT)₁₋₂(TGC)₄₋₅ in *R. esculentum* and (TGT)₅₋₆ in *N. nomurai*. In addition, 14 SNP loci from the target fragments of β -catenin gene were detected in two populations, including (T/C)¹, (T/C)², (C/T)³, (C/T)⁴, (C/T)⁵, (T/G)⁶, (G/C)⁷, (T/G)⁸, (A/G)⁹, (C/T)¹⁰, (G/A)¹¹, (A/G)¹², (C/T)¹³, and (A/T)¹⁴. SSR profile from β -catenin also reflected clearly the differences in the length and polymorphism of the target fragment of β -catenin among individuals of two populations. Therefore, the target fragments of β -catenin gene including EST-SSR and EST-SNP markers, as a simple effective molecular marker, can quickly identify *R. esculentum* and *N. nomurai* at different developmental stages.

Key words *Rhopilema esculentum*; *Nemopilema nomurai*; β -catenin; EST-microsatellite; EST-single nucleotide polymorphism