

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190417002

http://www.yykxjz.cn/

熊钢, 王晓清, 王佩, 陈贞年, 周先文, 康骊, 曾志南. 泥东风螺 EST-SSR 开发及其群体遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2020, 41(4): 117-124

Xiong G, Wang XQ, Wang P, Chen ZN, Zhou XW, Kang L, Zeng ZN. Development and genetic diversity analysis of *Babylonia lutosa* with EST-SSR markers. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(4): 117-124

泥东风螺 EST-SSR 开发及其群体遗传多样性分析*

熊 钢^{1,2} 王晓清^{2①} 王 佩² 陈贞年²
周先文^{2,3} 康 骊¹ 曾志南⁴

(1. 湖南生物机电职业技术学院动物科技系 长沙 410127; 2. 湖南农业大学动物科技学院 长沙 410128;
3. 湘西州水产工作站 吉首 416000; 4. 福建省水产研究所 厦门 361013)

摘要 本研究采用 MISA 软件分析泥东风螺(*Babylonia lutosa*)转录组中微卫星信息。结果显示,从转录组中共获得 16324 个 SSR,共有 181 种重复基元;泥东风螺转录组中不同类型微卫星的重复基元具有不同的分布特征,其中,二核苷酸重复基元中 AC/GT(70.58%)重复基元以重复 6 次出现频率占优;长度为 12~20 bp 的 SSR 占 63.95%,长度为 21~25 bp 的 SSR 占 9.14%,总体的平均长度为 18.4 bp。随机选取其中 50 条序列设计引物,通过对福建野生泥东风螺群体(WP)DNA 样本进行 PCR 扩增和分型,结果获得 23 个多态性位点,等位基因数目为 2~7 个不等,期望杂合度(N_e)为 0.190~0.937,观察杂合度(N_o)为 0.065~0.936,多态性信息含量(PIC)为 0.061~0.777,有 4 个位点显著偏离哈迪温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) ($P < 0.05$)。对野生群体和养殖群体(BP)遗传多样性分析显示,野生群体和养殖群体的平均 N_e 分别为 0.491 和 0.544,平均 N_o 分别为 0.477 和 0.564,平均 PIC 分别为 0.541 和 0.407。 F_{is} 结果显示,野生群体和养殖群体分别有 13 个和 9 个位点杂合子过剩。群体间遗传分化指数(F_{st})为 0.001~0.655,平均值为 0.053 ($0.05 < F_{st} < 0.15$),属于中等程度分化。群体间的基因流值(N_m)为 0.132~543.787,平均为 4.450。两群体间的遗传距离为 0.892,表明群体间的遗传分化小。本研究结果表明,泥东风螺野生群体和养殖群体均具有较高的遗传多样性,具有很大的选育潜力,开发的泥东风螺 SSR 标记对泥东风螺的群体遗传结构、图谱构建、增殖放流效果评估和分子辅助育种等研究方面具有重要意义。

关键词 泥东风螺; 转录组; EST-SSR; 遗传多样性

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)04-0117-08

东风螺(*Babylonia* sp)隶属于软体动物的腹足纲、新腹足目、蛾螺科、东风螺属(王如才等, 1988),俗称花螺、泥螺、南风螺等,分布于热带和亚热带海域,

是我国沿海重要的经济软体动物。我国现有方斑东风螺(*B. areolata*)、泥东风螺(*B. lutosa*)和台湾东风螺(*B. formosae*) 3 种(张汉华等, 2004; 陈利雄等, 2004)。

* 海洋公益性行业科研专项经费项目(201205021)、国家自然科学基金(31672640)、湖南省自然科学基金(2017JJ3134; 2016NK2115)和湖南省教育厅基金项目(17C0935)共同资助 [This work was supported by Public Science and Technology Research Funds Projects of Ocean (201205021), National Natural Science Foundation of China (31672640), Natural Science Foundation of Hunan Province(2017JJ3134; 2016NK2115), and Scientific Research Fund of Hunan Province Education Department (17C0935)].
熊 钢, E-mail: xionggang709@126.com

① 通讯作者: 王晓清, 教授, E-mail: wangxiao8258@126.com

收稿日期: 2019-04-17, 收修改稿日期: 2019-05-12

泥东风螺分布于我国福建至广西沿海地区。随着人类活动对海洋的影响,海洋中野生泥东风螺锐减,我国研究人员已开展了泥东风螺的人工选育(叶泉土等, 2015a; 林国清等, 2015)、人工养殖(叶泉土等, 2015b)、人工增殖放流(叶泉土等, 2015b)和群体遗传多样性 AFLP 分析(秦溱等, 2014)的相关研究。

简单重复序列(Simple sequence repeats, SSR)又称微卫星 DNA、短串联重复序列,一般以 1~6 个碱基为核心序列,广泛存在真核生物的基因组中,具有数量丰富、多态性高、共显性等特点(Powell *et al.*, 1996)。Morgante 等(1993)将微卫星用于遗传和物理图谱的构建、品种鉴定、基因定位、遗传多样性、分类和进化及比较基因组等方面的研究。目前,SSR 标记主要分为基因组 SSR(Genomic SSR, gSSR)和表达序列标签 SSR(Expressed sequence tag SSR, EST-SSR)两种。EST-SSR 反映的是基因的编码部分,可为功能基因提供更可靠的功能性标记,所以它在物种起源与进化、资源多样性、遗传作图、功能基因的发现与定位和比较基因组学研究等方面都有重要的利用价值。EST-SSR 多态性可能与基因功能直接相关,因此,比 gSSR 标记具有更高通用性(Eujayl *et al.*, 2002)。新一代测序技术可以对全基因组范围内的转录本进行大规模的高通量测序,并能产生海量的转录组数据(Simon *et al.*, 2009),这为功能基因组 SSR 标记的开发提供了更丰富和极有价值的可利用资源(Graham *et al.*, 2010)。我国研究工作者采用新一代测序技术已从曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*)(管奥等, 2018)、长江刀鲚(*Coilia ectenes*)(于爱清等, 2018)、栉江珧(*Atrina pectinata*)(李东明等, 2017)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)(李东宇等, 2017)、扇贝(*Chlamys farreri*)(张广明等, 2018; 倪守胜等, 2018)、黄口荔枝螺(*Thais luteostoma*)(李威等, 2015)和泥蚶(*Tegillarca granosa*)(史松富等, 2013)等水生动物中成功开发并应用于物种群体遗传多样性分析的 SSR 标记。本课题组利用软件分析泥东风螺转录组数据中微卫星分布特点和规律,利用筛选 SSR 标记对野生群体和养殖群体的遗传多样性进行分析,可为泥东风螺微卫星标记的开发及应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

野生泥东风螺采自福建连江和长乐,共 62 只。养殖群体来源于福建长乐泥东风螺育种场,共 206 只。

1.2 方法

1.2.1 泥东风螺转录组数据来源 泥东风螺转录组数据是由腹足和肝胰腺组织的 mRNA 建立混合池,经 Illumina HiSeq™ 2000 高通量测序平台获得的转录组数据文库。

1.2.2 泥东风螺转录组 SSR 的筛选及引物设计

利用软件 MISA(Kanehisa *et al.*, 2008) (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>)对泥东风螺转录组中 Unigene 的 cDNA 序列数据进行 SSR 搜索,设置参数:单碱基最少重复 10 次以上,双碱基最少重复 6 次以上,3~6 碱基最少重复 5 次以上;混合重复的 2 个重复之间的距离不能大于 100 bp。随机挑选 EST-SSR 序列,参照引物设计原则(张新宇等, 2004),利用软件 Primer premier 5.0 在重复序列两侧保守区设计微卫星扩增引物。

1.2.3 DNA 提取 取泥东风螺腹足,采用天泽基因柱式动物 DNA 提取试剂盒提取泥东风螺总 DNA。总 DNA 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,-20℃保存备用。SSR 分析采用 20 μl PCR 扩增反应体系,扩增条件为:94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s,退火(退火温度见表 3) 30 s,72℃延伸 30 s,30 个循环;72℃延伸 5 min,在 4℃条件下保存。扩增产物采用 8%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染显色,人工读带后记录带型。

1.2.4 EST-SSR 分析 用 PopGene 1.3.1(Yeh *et al.*, 1997)软件计算有效等位基因数(Effective numbers of allele, N_e)、观测杂合度(Observed heterozygosity, H_o)、(Expected heterozygosity, H_e)、群体间基因流(N_m)、固定系数(F_{st})和群体近交系数(F_{is})。位点多态性(Polymorphis information content, PCI)采用软件包计算, Cervus 3.03 (Kalinowsk *et al.*, 2007)软件计算哈迪温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)。

2 结果

2.1 转录组中 EST-SSR 特性

利用 MISA 软件对 Unigenes 的 cDNA 序列数据中筛选 1 kb 以上的 Unigenes 进行 SSR 分析,共筛选到 16324 个 SSR 符合设置条件(表 1),泥东风螺转录组中 SSR 种类丰富,共有 181 种重复类型;各种类型的出现频率差异较大,主要集中在单核苷酸重复、二核苷酸重复和三核苷酸重复,分别占 SSR 总数量的 40.17%、29.75%和 15.27%,四核苷酸重复和五核苷酸重复数量少,分别占 0.76%和 0.04%,未发现多于 5 个核苷酸重复。SSR 在整个泥东风螺转录组中的

出现频率和发生频率分别为 13.62%和 6.86%,平均每 350.78 kb 出现 1 个 SSR。各种重复基元出现频率差异大(表 2), 如: AC/GT 重复基元占二核苷酸重复的 70.58%, AGG/CCT 和 ACC/GGT 重复基元分别占三

核苷酸重复的 22.60%和 20.50%。从整体分布分析中发现多核苷酸重复序列以重复 6 次出现频率占优势。长度为 12~20 bp 的 SSR 占 63.95%, 长度为 21~25 bp 的 SSR 占 9.14%, 总体的平均长度为 18.4 bp。

表 1 泥东风螺转录组中 EST-SSRs 重复次数分布
Tab.1 Repeat number of EST-SSRs in *B. lutosa* transcriptome

重复类型 Type of SSR	重复次数 Repeat number								总计 Total	比例 Ratio (%)
	5	6	7	8	9	10	11	> 12		
单核苷酸重复 Mononucleotide	—	—	—	—	—	—	2864	3658	6522	40.17
二核苷酸重复 Dinucleotide	—	1937	1292	862	510	199	29	1	4830	29.75
三核苷酸重复 Trinucleotide	1603	715	155	6	0	0	0	0	2479	15.27
四核苷酸重复 Tetranucleotide	110	14	0	0	0	0	0	0	124	0.76
五核苷酸重复 Pentanucleotide	7	0	0	0	0	0	0	0	7	0.04
混合重复 SSR	—	—	—	—	—	—	—	—	2272	14.00
总计 Total	1720	2666	1447	868	510	199	2893	3659	16234	100.00
比例 Ratio(%)	10.60	16.42	8.91	5.35	3.145	1.23	17.82	22.54	100.00	—

表 2 二核苷酸和三核苷酸 EST-SSRs 不同重复基元分布比例
Tab.2 Percentage of different motifs dinucleotide and trinucleotide EST-SSRs

重复类型 Type of SSR	重复次数 Repeat number								总计 Total	比例 Ratio (%)
	5	6	7	8	9	10	11	12		
AC/GT	—	1345	898	648	353	147	18	0	3409	70.58
AG/CT	—	378	275	152	108	43	11	1	968	20.02
AT/AT	—	202	108	55	49	9	0	0	423	8.76
CG/CG	—	12	11	7	0	0	0	0	30	0.63
AAC/GTT	248	95	16	0	0	0	0	0	359	14.49
AAG/CTT	140	56	11	1	0	0	0	0	208	8.40
AAT/ATT	61	27	8	0	0	0	0	0	96	3.88
ACC/GGT	310	158	39	1	0	0	0	0	508	20.50
ACG/CGT	51	34	6	1	0	0	0	0	92	3.72
ACT/AGT	20	7		1	0	0	0	0	28	1.13
AGC/CTG	234	119	35	1	0	0	0	0	389	15.70
AGG/CCT	376	155	29	0	0	0	0	0	560	22.60
ATC/ATG	126	59	8	0	0	0	0	0	193	7.79
CCG/CGG	37	5	3	1	0	0	0	0	46	1.86

2.2 扩增位点的多态性

随机选取其中 50 条序列设计引物, 通过对福建野生泥东风螺 62 只个体 DNA 样本进行 PCR 扩增和分

型, 获得 23 个多态性位点(表 3)。23 个位点的等位基因数为 2~7 个不等, 平均 N_a 为 3.5, 平均 N_e 为 0.491, 平均 N_o 为 0.477, 平均 PIC 为 0.451。HWE 平衡检验显示, 4 个位点显著偏离平衡($P < 0.05$)(表 4)。

表3 泥东风螺 EST-SSR 引物信息
Tab.3 Information of EST-SSR primer in the *B. lutosa*

位点 Locus	正向引物序列 Forward primer (5'~3')	反向引物序列 Reverse primer (5'~3')	退火温度 Annealing temperature (°C)
B01	GCCAGTATTTGCCCAACAGT	TGGAGGTGGTGGGGAGTGT	52
B02	GTGATGGATTACGAGACTGAT	CTACCTGTCCGTCCCTTC	55
B03	GATGACCTACTGACCTCCTA	AACCTTGACACCCTTTGC	55
B04	ACCCTCGCCACTAACTACCT	GGCGTGGTCGTCGTTT	58
B05	TCCGACTCGCAACCTTCT	ACCCGAATGTAACAACCTAACC	58
B06	CCTGTGAGGTGAAGTTGAC	AACTGTTACGATAGGCAGCAAT	58
B07	CGCAGACGGCATGTTATCCT	TTCTCTCCTCCATCTATGCTGTG	58
B08	CTGAATGATACACCCTGACAA	AGTAAAGTAGCTCAGGGTAAGATT	58
B09	ACTGACGATGACAAGACAAT	CACTGGACCCTTCGTTAGAT	58
B10	TAAGTGGATAAAGTAAAGGAGCA	GTGGAGAACAAGTCCAAGTCAT	58
B11	TGCGGAATGCAGCCACTCT	CTCACAACCTCCTGGTCTCGG	58
B12	AGTGCTAATATCTTACCGTTG	TGGAGCCACTGACAGGACTA	58
B13	TACAGATATAACTACATGGTGGAGA	TATGTATGAAAAGCAGCACCAAT	58
B14	AACATTTGGTCCAGATTGCG	GAATTCACGGAGGAGCAGC	58
B15	GTTTTGCAGATCGATCACGT	AATCAACCAGCACCAGAGAGT	58
B16	CAACCCAACATCAAGACCAT	GCGTGGCGAGCTATGACAT	58
B17	TGTGCTCCGCCTCTATGTT	GGGCGAACAGAACGAATG	58
B18	AAGACTCACCGTGTGACAGTAT	ACACTGCCGCTGACTTGAC	58
B19	GCTTGCCGTTTCGTTCTGT	TGCCTGGAGGAGAGTGTGT	58
B20	CTTGCTCTTTCTGTGCTATCGTT	TCAGAGTAACAGAGAGACCTTCAA	58
B21	GTGAAGAGGTATGTCGTTATGA	ATGACGACGAGTAAATGTGCT	58
B22	GAGATGGAAAATGGAGTGACAGA	CTGTACAAAATAGGTCCAGGTGC	58
B23	GCAGCACCACGCAGACAAT	GACGGACTCTGATTGGCTGAT	58

2.3 野生群体和养殖群体遗传多样性

利用 23 个多态性位点分析泥东风螺野生群体和养殖群体遗传多样性(表 4), 结果显示, 福建野生群体 H_e 值为 0.190~0.937, H_o 为 0.065~0.936, PIC 为 0.061~0.777, 其中, 9 个微卫星位点表现为高度多态性 (PIC>0.5), 11 个位点表现为中度多态性(0.5>PIC>0.25), 3 个位点表现为低度多态性(PIC<0.25)。养殖群体 N_e (0.183~0.979)和 N_o (0.130~0.980)的平均值均高于野生群体, 但 PIC(0.020~0.787)的平均值低于野生群体。SPSS 分析群体间 N_e 、 N_o 和 F_{is} 差异显著($P<0.05$), PIC 差异极显著($P<0.01$)。养殖群体高度多态性位点和低度多态性位点分别为 7 个和 5 个。在养殖群体样本中检测到 B05、B08、B12、B15、B16 和 B20 位点中出现等位基因缺失现象。野生群体和养殖群 F_{is} 分别为 -0.214~0.377 和 -0.130~0.129, 群体的 F_{is} 平均值都大于 0, 在野生群生群体和养殖群体中, 位点 $F_{is}<0$ 的分别有 13 个和 9 个。HWE 平衡检验显示, 野生群体和养殖群体分别有 4 个和 9 个位点偏离平衡。

2.4 野生群体和养殖群体遗传分化

Popgene 分析野生群体与养殖体间的位点基因流值(N_m)为 0.132~543.787(表 4), 平均 N_m 为 4.450, 说明这 2 个群体间的遗传分化小。群体间位点遗传分化指数 (F_{st})为 0.001~0.655(表 4), 平均 F_{st} 为 0.053, 属于遗传分化中等(0.05< F_{st} <0.15)。Popgene 分析野生群体与养殖体间两群体这间的遗传距离为 0.892 (Yeh *et al.*, 1997)。

3 讨论

3.1 转录组中 EST-SSR 分布

不同物种转录组数据库中微卫星分布的频率存在差异。本研究分析了泥东风螺转录组中 SSR 的分布频率和重复基元的特点。从泥东风螺 SSR 重复基元来看, 二核苷酸重基元中 AC/GT 占 70.58%, 这与其他水产动物中 AC/GT 重复最多一致(曾聪等, 2013)。三核苷酸重基元占总数 15.27%, 其中, CCG/CGG 重复基元数量最少, 这与一些真核生物中发现一定比例

表4 泥东风螺 23 个 EST-SSR 位点的野生群体和养殖群体遗传多样性分析
Tab.4 Genetic diversity of wild and breeding populations in *B. lutosa* at 23 EST-SSR loci

位点 Locus	野生群体 WP wild population						养殖群体 BP breeding population						F_{st}	N_m^*
	N_a	H_o	H_e	HWE	PIC	F_{is}	N_a	H_o	H_e	HWE	PIC	F_{is}		
B-01	2	0.936	0.937	1.000	0.061	-0.033	2	0.979	0.979	1.000	0.020	-0.011	0.006	43.524
B-02	7	0.066	0.223	0.009	0.737	-0.214	7	0.302	0.293	0.022	0.676	0.011	0.014	17.941
B-03	3	0.259	0.356	0.117	0.563	-0.161	3	0.552	0.419	0.000	0.484	0.227	0.015	16.485
B-04	5	0.145	0.241	0.677	0.712	-0.136	5	0.271	0.269	0.000	0.678	0.001	0.048	4.9386
B-05	6	0.410	0.355	0.066	0.587	0.108	5	0.385	0.349	0.220	0.597	0.053	0.001	216.914
B-06	2	0.7107	0.727	1.000	0.234	-0.073	2	0.719	0.750	0.085	0.218	-0.129	0.001	543.787
B-07	5	0.532	0.548	0.700	0.422	-0.043	5	0.573	0.591	0.543	0.382	-0.048	0.001	261.297
B-08	4	0.468	0.476	0.904	0.466	-0.023	4	0.469	0.545	0.000	0.416	-0.171	0.008	30.280
B-09	3	0.472	0.560	0.203	0.341	0.203	3	0.563	0.538	0.631	0.360	0.051	0.014	17.462
B-10	3	0.630	0.640	0.761	0.320	-0.039	3	0.714	0.711	0.793	0.258	0.006	0.003	91.502
B-11	3	0.403	0.463	0.670	0.444	-0.120	3	0.552	0.597	0.001	0.354	-0.114	0.045	5.292
B-12	3	0.500	0.454	0.243	0.483	0.077	4	0.542	0.502	0.084	0.437	0.078	0.145	1.472
B-13	7	0.081	0.190	0.086	0.777	-0.145	7	0.130	0.183	0.007	0.787	-0.068	0.005	48.734
B-14	2	0.548	0.530	0.790	0.358	0.032	2	0.776	0.793	0.4801	0.186	-0.082	0.087	2.615
B-15	5	0.361	0.304	0.0170	0.630	0.101	4	0.589	0.278	0.000	0.633	0.429	0.005	49.298
B-16	5	0.119	0.256	0.011	0.690	-0.103	4	0.443	0.385	0.043	0.564	0.092	0.039	6.251
B-17	3	0.726	0.728	0.800	0.250	-0.017	3	0.823	0.818	0.253	0.172	0.026	0.005	50.996
B-18	2	0.516	0.585	0.230	0.327	-0.174	2	0.656	0.635	0.437	0.298	0.057	0.003	75.398
B-19	4	0.403	0.317	0.1730	0.617	0.119	4	0.418	0.323	0.109	0.613	0.136	0.001	161.782
B-20	3	0.519	0.542	0.7720	0.351	0.201	2	0.448	0.510	0.024	0.365	-0.130	0.006	38.700
B-21	3	0.661	0.605	0.0585	0.352	0.135	3	0.672	0.673	0.955	0.293	-0.005	0.002	103.480
B-22	3	0.613	0.374	0.000	0.541	0.377	3	0.625	0.619	0.322	0.332	0.013	0.102	2.188
B-23	3	0.903	0.877	0.217	0.116	0.204	3	0.766	0.751	0.556	0.230	0.058	0.655	0.132
平均 Mean	3.5	0.477	0.491	0.4130	0.451	0.012	3.6	0.564	0.544	0.285	0.407	0.021	0.053	4.450

的 CCG/CGG 重复相似(Toth *et al*, 2000)。Schlottere 等(1992)推测微卫星的长度因在复制过程中的滑动而反映了微卫星位点获得(或失去)重复基元的活跃程度。Schlotterer(2000)认为, SSR 位点的变异频率与基元重复数存在一定正相关, 即重复次数越多, SSR 产生变异的可能性越大。Temnykh 等(2001)进一步研究表明, SSR 的长度是影响其多态性高低的重要因素, 据此分析, 泥东风螺转录组基因所含的微卫星长度绝大部分分布在 12~25 bp 之间, 推测是受到强烈趋同选择的压力影响。

3.2 EST-SSR 在泥东风螺野生和养殖群体中的多态性变化

对福建野生群体和养殖群体的位点各项参数进行分析, 结果显示, 野生群体杂合子过剩($F_{is}<0$, 表明存在杂合子过剩)现象比养殖群体多 4 个位点。养殖群体有 6 个位点检测到等位基因缺失, 这可能与本

研究选取样本数量较少及养殖群体选择的亲本来自不同地理群体有关。 H_o 和 H_e 是判定群体遗传多样性水平的重要指标, 养殖群体中平均 H_o 和 H_e 显著高于野生群体, 推测是因目前养殖群体选育采用的技术策略导致养殖群体的遗传多样性发生变化。

3.3 泥东风螺野生群体和养殖群体遗传多样性与遗传分化

野生群体和养殖群体间 F_{st} 为 0.053 ($0.05<F_{st}<0.15$), 说明遗传分化中等, 但已接近遗传分化较弱 ($0<F_{st}<0.05$) 水平。基因流(N_m)是基因从一个种群到另一个种群的转移。在两群体间位点平均基因流(N_m)为 4.450($N_m>4$), 表明不同地理群体亲本种群间的基因交流充分。

本研究中, 泥东风螺养殖群体的遗传多样性显著低于野生群体, 这与中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)(王军等, 2018)、草鱼(*Ctenopharyngodon*

idellus)(王沈同等, 2018)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)(赵广泰等, 2010)、鳊(*Siniperca chuatsi*)(郑荷子等, 2013)水产动物养殖群体比野生群体遗传多样性低的研究结果一致, 其原因可能为目前养殖泥东风螺繁育亲本群体来源和个体数量问题。研究表明, 本研究所开发的 SSR 具有较高的多态性, 研究的群体具有较高的遗传多样性, 具有进一步选育的价值。

SSR 标记在水生生物之间通用性较好(张琼等, 2010; 刘必谦等, 2007), SSR 遗传作图将使物种之间连锁信息的转换更快, 实现多个图谱整合, 从而更有利于比较基因组学的研究。本研究开发的泥东风螺 EST-SSR 标记对泥东风螺的亲谱系分析、群体遗传结构分析、图谱构建、增殖放流效果评估和分子辅助育种等研究方面具有重要的意义。

参 考 文 献

- Chen LX, Wu JF. Culture technique and industrial prospect of ivory shell *Babylonia*. Shandong Fisheries, 2004, 21(10): 9–11 [陈利雄, 吴进锋. 东风螺的增养殖技术及产业化前景. 齐鲁渔业, 2004, 21(10): 9–11]
- Eujayl I, Sorrells ME, Baum M, *et al.* Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104(2–3): 399–407
- Graham IA, Besser K, Blumer S, *et al.* The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin. Science, 2010, 327(5963): 328–331
- Guan A, Wu YT, Chen Y, *et al.* Deep sequence-based transcriptome analysis of microsatellites in the cuttlefish (*Sepiella japonica*). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(3): 144–151 [管奥, 毋玉婷, 陈宇, 等. 曼氏无针乌贼转录组微卫星特征分析. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 144–151]
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular Ecology, 2007, 16(5): 1099–1106
- Kanehisa M, Araki M, Goto S, *et al.* KEGG for linking genomes to life and the environment. Nucleic Acids Research, 2008, 36: D480–D484
- Li DM, Yang AG, Wu B, *et al.* Development and application of the EST-SSR markers in *Atrina pectinata*. Progress in Fishery sciences, 2017, 38(2): 137–142 [李东明, 杨爱国, 吴彪, 等. 栉江珧(*Atrina pectinata*) EST-SSR 标记的开发与应用. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 137–142]
- Li DY, Meng XH, Kong J, *et al.* The difference of genetic diversity and the comparison of growth performance between selected population and hybridized population of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under low temperature conditions. Progress in Fishery sciences, 2017, 38(4): 69–77 [李东宇, 孟宪红, 孔杰, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)选育群体与杂交群体遗传多样性差异及其在低温条件下生长性能的比较. 渔业科学进展, 2017, 38(4): 69–77]
- Li W, Zhao S, Jiao HF, *et al.* Characterization and analysis of microsatellite markers in *Thais luteostoma* using next generation sequencing. Marine Sciences, 2015, 39(11): 61–67 [李威, 赵姗, 焦海峰, 等. 黄口荔枝螺转录组数据的微卫星标记开发与分析. 海洋科学, 2015, 39(11): 61–67]
- Lin GQ, Lin D, Chen XF, *et al.* Research on the scale artificial breeding technique and the morphological observation of the early developmental stages of *Babylonia lutosa*. Journal of Fujian Fisheries, 2015, 37(1): 20–28 [林国清, 林丹, 陈曦飞, 等. 泥东风螺(*Babylonia lutosa*)规模化人工育苗技术和早期发育观察. 福建水产, 2015, 37(1): 20–28]
- Liu BQ, Zeng QG, Wang YJ, *et al.* The cross-species amplification and validation of EST-SSR loci in *Porphyra haitanensis*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(2): 149–154 [刘必谦, 曾庆国, 王亚军, 等. 条斑紫菜 EST-SSR 引物种间转移扩增真实性研究. 水生生物学报, 2007, 31(2): 149–154]
- Morgante M, Olivieri AM. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. Plant Journal, 1993, 3(1): 175–182
- Ni SS, Yang Y, Liu SF, *et al.* Microsatellite analysis of *Patinopecten yessoensis* using next-generation sequencing method. Progress in Fishery sciences, 2018, 39(1): 107–113 [倪守胜, 杨钰, 柳淑芳, 等. 基于高通量测序的虾夷扇贝基因组微卫星特征分析. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 107–113]
- Powell WMGCP. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Science, 1996, 7(1): 215–222
- Qin Z, Wang XQ, Zeng ZN, *et al.* Genetic distance in four populations of *Babylonia lutosa* (Lamer) assessed by AFLP makers. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2014, 40(3): 299–304 [秦臻, 王晓清, 曾志南, 等. 泥东风螺 4 个群体遗传多样性的 AFLP 分析. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2014, 40(3): 299–304]
- Schlotterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Research, 1992, 20(2): 211–215.
- Schlotterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma, 2000, 109(6): 365–371
- Shi SF, Yao HH, Lin ZH, *et al.* Characterization and analysis of 24 polymorphic EST-SSR loci in *Tegillarca granosa*. Marine Sciences, 2013, 37(8): 42–46 [史松富, 姚韩韩, 林志华, 等. 24 个泥蚶 EST-SSR 标记的开发与分析. 海洋科学, 2013, 37(8): 42–46]
- Simon SA, Zhai J, Nandety RS, *et al.* Short-read sequencing

- technologies for transcriptional analyses. *Annual Review of Plant Biology*, 2009, 60: 305–333
- Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, *et al.* Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Research*, 2001, 11(8): 1441–1452
- Toth G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*, 2000, 10(7): 967–981
- Wang J, Wang QY, Kong J, *et al.* SSR analysis on genetic diversity in breeding and wild populations of *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery sciences*, 2018, 39(2): 104–111 [王军, 王清印, 孔杰, 等. 中国明对虾人工选育群体与野生群体遗传多样性的 SSR 分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 104–111]
- Wang RC. China aquatic shellfish primary color guide. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1988 [王如才. 中国水生贝类原色图鉴. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1988]
- Wang ST, Shen YB, Meng XZ, *et al.* Genetic variability in wild and selected populations of *Ctenopharyngodon idella* using microsatellite markers. *Journal of Fisheries of China*, 2018(8): 1273–1284 [王沈同, 沈玉帮, 孟新展, 等. 草鱼野生与选育群体遗传变异微卫星分析. *水产学报*, 2018(8): 1273–1284]
- Ye QT, Liu Y, Zeng ZN, *et al.* Tracking survey after enhancement and releasing of *Babylonia lutosa* and its effects analysis. *Journal of Fujian Fisheries*, 2015a, 37(2): 140–147 [叶泉土, 刘勇, 曾志南, 等. 泥东风螺增殖放流跟踪调查及效果分析. *福建水产*, 2015a, 37(2): 140–147]
- Ye QT, Wu QS, Zeng ZN, *et al.* Effect of different bottom sowing density on growth and survival of *Babylonia lutosa* juveniles. *Journal of Fujian Fisheries*, 2015b, 37(1): 36–42 [叶泉土, 巫旗生, 曾志南, 等. 不同底播密度对泥东风螺 (*Babylonia lutosa*) 幼螺生长和存活的影响. *福建水产*, 2015b, 37(1): 36–42]
- Yeh FC, Boyle TJB. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 1997, 129–157
- Yu AQ, Shi YH, Xu JB, *et al.* Characteristic analysis of microsatellites in the selected *Coilia ectenes* based on transcriptome dataset. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 101–109 [于爱清, 施永海, 徐嘉波, 等. 长江刀鲚选育群体转录组 EST-SSR 的分布特征分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(5): 101–109]
- Zeng C, Gao ZX, Luo W, *et al.* Characteristics of microsatellites in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) EST sequences using 545 FLX. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(5): 982–988 [曾聪, 高泽霞, 罗伟, 等. 基于 454GS FLX 高通量测序的团头鲂 ESTs 中微卫星特征分析. *水生生物学报*, 2013, 37(5): 982–988]
- Zhang GM, Sun XJ, Wu B, *et al.* Transferability of EST-SSR from *Patinopecten yessoensis* into *Chlamys farreri*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 1–8 [张广明, 孙秀俊, 吴彪, 等. 虾夷扇贝 EST-SSR 标记在栉孔扇贝中的通用性研究. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 1–8]
- Zhang HH, Wu JF, Chen LX, *et al.* Prospect of artificial breeding, breeding and industrialization of *Babylonia*. *Southern Aquaculture*, 2004(11): 2–5 [张汉华, 吴进锋, 陈利雄, 等. 东风螺人工育苗、养殖及产业化发展前景. *南方水产*, 2004(11): 2–5]
- Zhang Q, Liu XL, Li XL, *et al.* Application of simple sequence repeats derived from expression sequence tags (EST-SSRs) in aquatic animal genomics. *Fisheries Science*, 2010, 29(5): 302–306 [张琼, 刘小林, 李喜莲, 等. EST-SSR 分子标记在水生动物遗传研究中的应用. *水产科学*, 2010, 29(5): 302–306]
- Zhang XY, Gao YN. To design PCR primers with Oligo 6 and Primer premier 5. *China Journal of Bioinformatics*, 2004, 2(4): 15–18 [张新宇, 高燕宁. PCR 引物设计及软件使用技巧. *生物信息学*, 2004, 2(4): 15–18]
- Zhao GT, Liu XD, Wang ZY, *et al.* Genetic structure and genetic diversity analysis of four consecutive breeding generations of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) using microsatellite markers. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(4): 500–507 [赵广泰, 刘贤德, 王志勇, 等. 大黄鱼连续 4 代选育群体遗传多样性与遗传结构的微卫星分析. *水产学报*, 2010, 34(4): 500–507]
- Zheng HZ, Yi TL, Liang XF, *et al.* Genetic structure and genetic diversity analysis of four consecutive breeding generations of *Siniperca chuatsi*. *Freshwater Fisheries*, 2013, 43(6): 8–12 [郑荷子, 易提林, 梁旭方, 等. 翘嘴鲌连续 4 代选育群体遗传多样性及遗传结构分析. *淡水渔业*, 2013, 43(6): 8–12]

(编辑 冯小花)

Development and Genetic Diversity Analysis of *Babylonia lutosa* with EST-SSR Markers

XIONG Gang^{1,2}, WANG Xiaoqing^{2①}, WANG Pei², CHEN Zhennian²,
ZHOU Xianwen^{2,3}, KANG Li¹, ZENG Zhinan⁴

(1. Department of Animal Science and Technology, Hunan Biological and Electromechanical Polytechnic, Changsha 410127;

2. College of Animal Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128;

3. Station of Aquaculture in Xiang xi, Jishou 416000; 4. Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013)

Abstract *Babylonia lutosa* is a marine shellfish that has high economic values. In recent decades, the natural resource of *B. lutosa* has declined due to the environment destruction and overfishing. To further understand the level of genetic diversity and population genetic structure of *B. lutosa*, we have evaluated the information characteristics of *B. lutosa*'s microsatellites, after obtaining transcriptome sequences using MISA software. The results show that a total of 16342 microsatellites and 181 nucleotide repeat motifs were identified. Different types of repeat microsatellites had considerably different distribution characteristics. Mononucleotide and dinucleotide microsatellite repeating units were the most abundant in the *B. lutosa* transcriptome, in which 6 repeats of AC/GT (70.58%) were the dominant repeating dinucleotide units. The length of the dominant repeating units was 12~20 bp (63.95%) and 21~25 bp (9.14%), respectively, and the average length was 18.4 bp. Among the 50 designed primer pairs, 23 proved to be polymorphic microsatellite markers in the *B. lutosa* wild populations (WP). The results showed that the allele number of these microsatellites ranged from 2 to 7. The expected heterozygosity (H_e) and observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.190 to 0.937, and 0.065 to 0.936, respectively. The polymorphism information content (PIC) ranged from 0.061 to 0.777. The H_e values of the WP and breeding population (BP) were 0.491 and 0.544, respectively. The H_o values of the WP and BP populations were 0.477 and 0.564, respectively. The PIC values for WP and BP were 0.541 and 0.407, respectively. There were 13 population loci that were heterozygote excesses in WP, and 13 population loci in BP. The genetic differentiation index (F_{st}) ranged from 0.001 to 0.655, with an average value of 0.053 ($0.05 < F_{st} < 0.15$), and the gene flow value (N_m) ranged from 0.132 to 543.787, with an average value of 4.450. The genetic distance between the WP and BP was 0.892, which indicated that the two populations had little genetic differentiation. The results above show that the BP still has high genetic diversity after selection, and that it could still potentially be used as breeding material. The EST-SSR in this study will facilitate further studies on the population genetic structure, genetic mapping, evaluation artificial releasing and molecular assisted breeding of *B. lutosa*.

Key words *Babylonia lutosa*; Transcriptome; EST-SSR; Polymorphism

① Corresponding author: WANG Xiaoqing, E-mail: wangxiao8258@126.com