

# 基于转录组数据的凡纳滨对虾微卫星标记开发

杨 铭<sup>1,2</sup>, 于 洋<sup>1</sup>, 张晓军<sup>1</sup>, 王全超<sup>1,3</sup>, 刘敬文<sup>1,3</sup>, 李富花<sup>1</sup>, 相建海<sup>1</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所, 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 福州市海洋与渔业技术中心, 福建 福州 350005; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 对虾遗传多样性和育种研究需要大量的分子标记。作者利用凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)转录组测序数据, 采用 MISA 软件进行微卫星序列挖掘, 共获得 14 767 条微卫星序列。统计发现在凡纳滨对虾中微卫星出现的频率为 16.76%; 在所有的微卫星序列中, 2 碱基微卫星最多, 占 59.53%; 其次是 3 碱基微卫星, 占 35.78%。随机选取其中 74 条序列设计引物, 通过 DNA 混池扩增和分型的方法进行微卫星标记的开发, PCR 扩增的显示有 54 对(72.97%)能扩增出清晰的目的条带, 进一步分型的结果显示 27 条(36.49%)微卫星显示出多态性, 从这些多态性的微卫星位点中选择 11 个位点在“科海 1 号”种质库材料中进行个体分型, 结果显示在该群体中微卫星标记的等位基因数目为 2~11 个不等, 期望杂合度值为 0.256~0.858, 观察杂合度为 0.213~0.875, 多态性信息含量为 0.221~0.830, 在 11 个位点中有 4 个位点显著偏离 HWE ( $P < 0.05$ )。本研究结果为后续使用微卫星标记进行对虾遗传学研究, 促进对虾的遗传选育和种质资源保护提供了重要基础。

**关键词:** 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*); 微卫星; 转录组; 遗传多样性

中图分类号: S917.4 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2017)02-0096-07

DOI: 10.11759/hyxx20160322002

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)又称南美白对虾, 因其具有生长速度快、抗病能力强、饵料蛋白需求低等突出的养殖特性, 成为中国和世界上最主要的养殖对虾种类, 占虾类总产量的 85%。然而, 病害频发和种质退化给对虾养殖造成了巨大经济损失, 通过遗传改良提高对虾的种质, 培育生长快速、抗性能力强的优良品种对于对虾养殖业的稳定发展显得尤为迫切。

在传统的遗传选育基础上, 利用分子标记研究选育种群的遗传多样性、辅助亲本选择能够有效地提高选育效率, 尤其是对于如抗病性状等难以进行表型测定的性状。微卫星(又称简单重复序列, Simple Sequence Repeats, SSR)多态性高、稳定性好, 且为共显性标记, 是一种理想的分子标记。目前, 微卫星标记技术已被广泛用于遗传图谱构建、家系鉴定、品种纯度检测以及目标性状基因定位等研究领域<sup>[1-4]</sup>。

凡纳滨对虾微卫星标记在 1996 年即有报道<sup>[5]</sup>, 最早批量开发微卫星标记的是 Meehan 等, 他们通过构建基因组 DNA 文库, 使用探针筛选的方法共得到含有 573 个微卫星的 173 条序列, 据此设计了 136 对微卫星引物并用于后续的连锁图谱构建<sup>[6-7]</sup>、家系鉴定<sup>[8]</sup>等多方面工作。随着测序技术的发展, NCBI 上凡纳滨对虾的测序数据显著增多, 利用已有的测序数据,

特别是大量的 EST 数据, 采用生物信息学方法进行微卫星发掘成为研究热点, 很多的 EST-SSR 位点被发现和验证<sup>[3,9-10]</sup>。目前已发表的凡纳滨对虾微卫星标记约有 600 多个, 然而对于具有如此重要经济价值的物种, 这样少的微卫星标记显然是不相称的。可用遗传标记的缺乏是影响对虾选育的重要原因之一<sup>[11]</sup>。

近年来, 通过高通量测序, 很多物种获得了海量的序列数据, 从这些序列中发掘微卫星标记成为一种更高效的手段<sup>[12-15]</sup>。本研究利用已公布的凡纳滨对虾高通量转录组测序数据库, 通过 *de novo* 组装的方法构建出凡纳滨对虾转录组参考序列, 运用生物信息学方法分析凡纳滨对虾转录组 unigenes 中的 SSR 标记, 并验证了开发出的 SSR 标记的多态性, 这些微卫星位点和开发出的分子标记为后续对虾选

收稿日期: 2016-03-22; 修回日期: 2016-06-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31502161, 31672632); 国家“863”高技术研究发展计划资助项目(2012AA10A404)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 31502161, 31672632; The National High Technology Research and Development Program of China (863 Program), No.2012AA10A404]

作者简介: 杨铭(1971-), 男, 福建福州人, 工程师, 主要从事水产养殖技术研究工作, E-mail: ymfj88@163.com; 张晓军, 通信作者, E-mail: xjzhang@qdio.ac.cn

传研究提供了很好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

转录组数据来源为包括 5 个不同胚胎和幼体发育时期的凡纳滨对虾转录组测序数据(NCBI 数据库: SRR1460493, SRR1460494, SRR1460495, SRR1460504, SRR1460505)<sup>[16]</sup>, 测序平台为 HiSeq 2000 (Illumina, USA), 共获得 263 300 374 条经过过滤处理的序列, 总数据量为 29.2 Gb。使用 Trinity 软件(<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>)对这些经过过滤处理的序列进行混合拼接形成参考序列。

### 1.2 微卫星位点的批量发掘和引物设计

微卫星序列的定位和识别使用 MISA 软件(<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>)进行, 由于转录组中存在 polyA 和 polyT, 因此使用转录组进行 SSR 发掘时不考虑单碱基重复, MISA 参数设置如下: 2-6、3-5、4-5、5-5、6-5, 复合微卫星标记的最大长度为 100 bp。MISA 网站同时提供了用于批量转换微卫星两侧序列的 Perl 脚本 p3\_in.pl 和 p3\_out.pl, 利用这两个脚本将 MISA 结果转换成 Primer 3 程序可以识别的格式, 在本地运行 Primer 3 批量设计引物。

### 1.3 混池方法筛选多态性微卫星位点

从凡纳滨对虾“科海 1 号”核心种质库中取 32 尾, 体长 13~14 cm, 体质量 30~35 g。采用海洋生物基因组提取试剂盒(Tiangen)提取 DNA, 提取的 DNA 使用 Nanodrop 2000(Thermo Scientific, USA)测量 DNA 浓度后稀释至 100 ng/μL, 每 8 个个体的 DNA 等量混合, 构建 4 个 DNA 混池。

在批量设计的引物中随机选取 74 条, 采用 TP-M13 方法<sup>[17]</sup>对 4 个混池的对虾基因组 DNA 进行微卫星分型, 为了避免非特异性扩增, 扩增并分型在单个个体中同时进行。PCR 扩增上述样品混池和单个个体 DNA, PCR 反应在 20 μL 体系中进行, 体系如下: 模板 DNA(100 ng/μL)2 μL, 10× Buffer 2 μL, dNTP 0.4 μL, MgCl<sub>2</sub> 1.2 μL, 正向引物 0.1 μL, 反向引物 0.4 μL, M13 引物 0.2 μL, Taq(2.5 U/μL)0.25 μL, 超纯水 13.35 μL。PCR 反应程序如下: 94℃ 4 min, 然后运行 94℃ 30 s, 50~60℃ 30 s, 72℃ 30 s 38 个循环; 接着运行 94℃ 45 s, 45℃ 45 s, 72℃ 45 s 12 个循环; 最后 72℃ 5 min, 4℃ 终止, PCR 扩增产物避光保存。

将上述 PCR 产物使用超纯水稀释 20 倍, 之后配

置上机样品缓冲液, 缓冲液由 HiDi 甲酰胺和 ROX 500 标准品(Applied Biosystems, USA)组成, 两者比例为 9.85 : 0.15。取稀释后的 PCR 产物 1 μL 与 9 μL 的上机缓冲液混合, 95℃ 变性 2 min, 立刻置于冰上以阻止 DNA 的复性。然后将加入上机缓冲液后的样品在 3130xl(Applied Biosystems, USA)进行测序仪分型。分型结果使用 GENEMARKER v1.91(SoftGenetics, USA)读取分型数据, 根据分型结果获得每个微卫星位点的多态性。

### 1.4 个体微卫星分型研究微卫星等位基因频率

在凡纳滨对虾“科海 1 号”种质库的 32 个个体中研究微卫星标记的多态性分布, 同时验证混池筛选的微卫星的准确性, 所采用的分型方法同上。获得微卫星分型数据后, 使用 PopGen32 软件计算群体的等位基因数、观测杂合度和期望杂合度, 利用 Cervus 3.0 软件计算位点的多态信息含量(PIC)。利用 GENEPOP 4.2 软件进行 Hardy-Weinberg 平衡分析 (<http://genepop.curtin.edu.au/>)。

## 2 结果与分析

### 2.1 转录组 SSR 位点开发

凡纳滨对虾的 5 个转录组 *de novo* 组装共获得 66 815 条非冗余基因, 利用该数据共发掘 SSR 位点 14 767 个, 这些 SSR 位点分布于 11 195 条基因片段中, 其中以复合微卫星形式存在的有 1 844 个, 微卫星的发生频率(含有 SSR 的非冗余基因数量与总非冗余基因数量的比值)为 16.76%(表 1)。在所发掘的微卫星中, 2 碱基微卫星最多, 占 59.53%, 其次是 3 碱基微卫星, 占 35.78%(图 1)。

表 1 凡纳滨对虾转录组 SSR 发掘位点统计  
Tab. 1 Characteristics of SSR developed in the transcriptome of *L. vannamei*

|                           |            |
|---------------------------|------------|
| 检测的序列总数(条)                | 66 815     |
| 检测的序列总长度(bp)              | 68 615 776 |
| 鉴定出的 SSR 位点数目(个)          | 14 767     |
| 包含 SSR 的序列数目(条)           | 11 195     |
| SSR/包含超过 1 个 SSR 的序列数目(条) | 2 503      |
| 复合结构的 SSR 数目(个)           | 1 844      |

### 2.2 微卫星标记验证

从转录组选择的 74 对微卫星引物, 在“科海 1

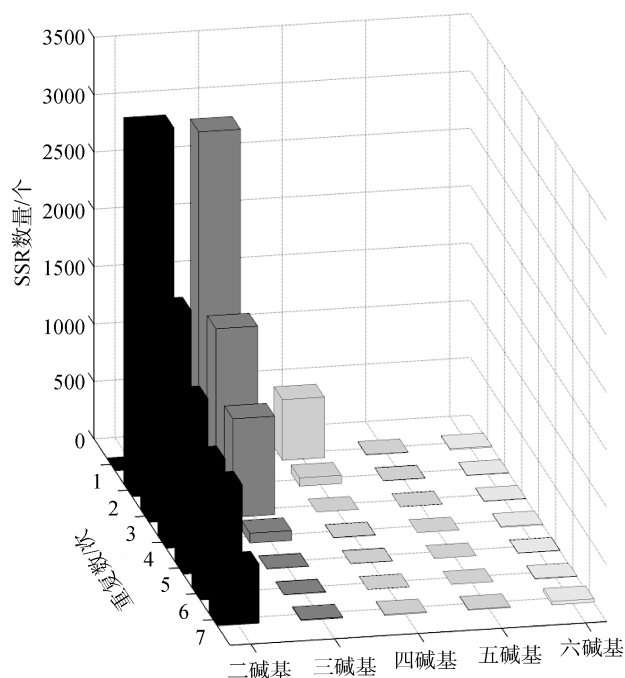


图1 通过转录组数据挖掘的微卫星重复单元类型和分布  
Fig. 1 Distribution and frequency of different SSR repeat motifs identified from the transcriptome of *L. vannamei*

表2 从凡纳滨对虾转录组中挖掘的具有多态性的微卫星位点

Tab. 2 Polymorphic SSR loci developed from transcriptome of *L. vannamei*

| 微卫星位点   | 引物序列(5'-3')                                     | 退火温度(°C) | 重复单元       | 序列长度(bp) | 等位基因数 |
|---------|-------------------------------------------------|----------|------------|----------|-------|
| LvC1035 | GAATCAGGGAATGAGGACGA<br>GGCGAGAGTACTCGGATGTT    | 60       | (acacct)14 | 176~207  | 2     |
| LvC1624 | ATCGGCGACTCATGGTGTA<br>AGACGCGAGGCTAACTTCAG     | 60       | (ttta)5    | 126~134  | 3     |
| LvC1031 | GAATCAGGGAATGAGGACGA<br>GGCGAGAGTACTCGGATGTT    | 60       | (gag)7     | 131~140  | 4     |
| LvC1876 | CTCCTCCACCCACGACAG<br>TCGTTGAGCGATGAGGACTA      | 60       | (tcg)7     | 120~135  | 6     |
| LvC3042 | AAATCGCCCCAGAACTC<br>CGGTAGCAGAGGTGATTGGA       | 60       | (cagctc)8  | 91~103   | 3     |
| LvC2006 | TGGAGATTTCGGAACCTTGT<br>CTGCTGGAGCACCAAAATCT    | 60       | (gat)7     | 108~114  | 4     |
| LvC2197 | TCCTCTTCTTCTAAACCGTCTTC<br>AACGCTCACATCATGGGAAT | 59       | (ctt)7     | 137~149  | 4     |
| LvC3550 | GGACCCCTGCCTTACCAC<br>TCAGTTGATGGGCTCCTCTT      | 60       | (aca)7     | 114~122  | 2     |
| LvC2814 | AGTGAGGAGGTTCCAGCAGA<br>CTGTCTCATGGGCCAAAAGT    | 60       | (tgg)7     | 116~129  | 3     |
| LvC3977 | TGCAGCAGGGTCAACTTATG<br>TGGTTTCGGCCATAACCATAG   | 60       | (gca)7     | 139~148  | 2     |
| LvC3004 | CGAGCTCCTTGTCTCATTC<br>GGACGACGACCTCATATCCA     | 60       | (gtc)7     | 122~131  | 2     |

号”DNA 混池中进行 PCR 扩增,结果显示能够成功扩增的引物有 54 对,占设计所选序列的 72.97%。经过微卫星分型后有 27 对(36.49%)显示出多态性(表 2),多态性位点的等位基因数从 2~8 不等,以 2 和 3 等位基因的居多,少量微卫星标记含有 7~8 个等位基因。将这些发掘的标记与已公布的微卫星标记进行 BLAST 比对,未发现有共同的部分,因此这些标记为新发现的凡纳滨对虾微卫星标记。

## 2.3 多态性微卫星的种群分析

选择 11 对具有多态性的转录组微卫星引物,在“科海 1 号”种质库中进行分型。结果显示,这 11 个微卫星引物共包含 65 个等位基因,每个位点检测到的等位基因 2~11 个不等(表 3)。遗传多态性分析显示,这 11 个标记在“科海 1 号”种群中的期望杂合度值从 0.256 到 0.858 不等,观察杂合度从 0.213 到 0.875 不等,多态性信息含量在 0.221~0.830,在 11 个位点中 7 个位点符合 Hardy-Weinberg 平衡,有 4 个位点(LvU15501、LvC905、LvC2235、LvU27836)显著偏离 HWE ( $P<0.05$ )。

续表

| 微卫星位点    | 引物序列(5'-3')                                     | 退火温度(°C) | 重复单元     | 序列长度(bp) | 等位基因数 |
|----------|-------------------------------------------------|----------|----------|----------|-------|
| LvC4800  | GCCTCGTCGAATCTTCTAGC<br>CACAACCTCATGGTGACTGC    | 60       | (gtca)5  | 109~117  | 2     |
| LvC4959  | CTGGTCTGACTTTGGCTTTCG<br>AGACAGCTGCCTTACGCTCT   | 60       | (ctgg)5  | 94~102   | 2     |
| LvC5147  | GGAGATGAGTAACCCGCACT<br>CTCTTCCCCAACCTCCTCAT    | 60       | (gtg)7   | 112~121  | 2     |
| LvU15501 | CCCTTGCAACATATCTGAGG<br>GCCTGCTCTGTGGAATTCT     | 60       | (ttgc)10 | 183~203  | 5     |
| LvC966   | CGGACTTGATGCTCGTCTCT<br>CCGTCAGGAACCTCGTAGAGG   | 60       | (gcc)7   | 133~166  | 3     |
| LvC905   | ACATCATCGACATCGAGCAG<br>GTCATCGTCTCCTCGTCAT     | 55       | (gac)9   | 279~315  | 6     |
| LvC1661  | CCTGAGCCCAATAGCCTCTA<br>TGCCGGTTCTGAAGGAGTAG    | 60       | (cga)7   | 114~126  | 4     |
| LvU16123 | AGCAGAGGCACCACCAAC<br>GTCGACTTCACCACGCTGT       | 60       | (cag)7   | 104~121  | 5     |
| LvC3954  | GCTCAAGTACCGCAAAGACC<br>TCCTTGGAATCAGGCTCAAC    | 60       | (acg)7   | 144~147  | 2     |
| LvC753   | GCCGATTTTAGTCTCGAACG<br>TTGACCTGTAGGAGTTTCCTGA  | 60       | (aca)5   | 137~154  | 2     |
| LvU15623 | TGTTCCACAGTTTCCTCGTCT<br>TGCTCCCTAGGTACAGGTCTTG | 60       | (agc)7   | 141~150  | 3     |
| LvU3848  | CCACTGGCAAATGCAAAGAT<br>TGGCTTCCCTTGCTCTGTCT    | 60       | (gag)7   | 110~119  | 3     |
| LvC3299  | ACCAGACCTTCACCGAAATG<br>AAGGAAAGAAGGGGAAGTGC    | 55       | Compound | 345~357  | 4     |
| LvC2235  | TGTTGGCTACAAGTGCAGAAA<br>ACGATTCTGTGTCGCAAAAA   | 58       | Compound | 289~311  | 8     |
| LvU27836 | GGGGCCCATTTCTGTTTATT<br>GTCAGTTTCGCTATCCCAGC    | 55       | (cat)7   | 243~270  | 7     |
| LvC96    | AAGTGATCACAGGAGGCGAG<br>CGGTGCAGGTTCTCCCTAT     | 58       | Compound | 202~208  | 2     |

表 3 从转录组中发掘的 11 个多态性位点的遗传多样性信息

Tab. 3 Characteristics of 11 highly polymorphic SSR markers developed from transcriptome sequences

| 微卫星位点    | 等位基因数目(个) | 观测杂合度 | 期望杂合度 | 多态信息含量 | 哈-温平衡检验  | 注册号      |
|----------|-----------|-------|-------|--------|----------|----------|
| LvC1624  | 4         | 0.688 | 0.673 | 0.596  | 0.870 4  | KU530162 |
| LvC1876  | 6         | 0.781 | 0.770 | 0.723  | 0.649 2  | KU530163 |
| LvC2006  | 4         | 0.781 | 0.670 | 0.596  | 0.710 4  | KU530164 |
| LvC2197  | 4         | 0.594 | 0.712 | 0.647  | 0.418 3  | KU530165 |
| LvU15501 | 5         | 0.875 | 0.787 | 0.737  | 0.002 0* | KU530166 |
| LvC905   | 9         | 0.721 | 0.699 | 0.651  | 0.006 0* | KU530167 |
| LvU16123 | 6         | 0.719 | 0.709 | 0.664  | 0.142 7  | KU530168 |
| LvC3299  | 5         | 0.533 | 0.621 | 0.562  | 0.430 0  | KU530169 |
| LvC2235  | 11        | 0.625 | 0.845 | 0.817  | 0.003 0* | KU530170 |
| LvU27836 | 9         | 0.405 | 0.858 | 0.830  | 0.000 0* | KU530171 |
| LvC96    | 2         | 0.213 | 0.256 | 0.221  | 0.251 0  | KU530172 |

注: “\*”: 显著偏离哈-温平衡( $P < 0.05$ )

### 3 讨论

微卫星标记由于其较高的遗传多样性,一直是研究人员开发的重点。虽然新一代分子标记 SNP、Indel 等的出现使其关注度有所降低,但是微卫星标记具有多态性高,相对于 SNP 标记多为 2 态性的特征,微卫星标记在进行种群遗传关系分析方面具有更大用处。研究人员分析了微卫星标记和 SNP 标记在进行亲缘关系鉴定方面的功效,发现 SNP 标记具有很高的品种与群体特异性,同一品种不同的群体之间也存在差异,而中等密度的微卫星标记在种群关系上的作用比 SNP 效果更好<sup>[18]</sup>,因此微卫星标记仍然有很大的应用空间。

具有多态性的 SSR 位点才可能开发为微卫星标记。本研究利用已经获得的高通量测序转录组序列,采用生物信息学方法从测序拼接的数据中发掘 SSR 位点,并进行批量的引物设计,通过混池法对微卫星标记的多态性进行分析,最终获得 27 个新的多态性微卫星标记,并在一个育种群体中分析了 11 个微卫星标记的等位基因数、等位基因频率和多态性信息含量等。从 11 个微卫星标记在育种群体的分型结果看,91%(10/11)的位点平均多态信息含量分别为都在 0.5 以上,根据 Botstein 等<sup>[19]</sup>提出的衡量标准,当  $PIC > 0.5$  时,意味着该位点为高度多态位点,说明本研究开发的标记的多态性较高,同时也说明了育种群体虽然经过多代的选育,仍然具有较为丰富的遗传多样性。基因杂合度是衡量群体遗传变异水平的理想参数,除了位点 LvC96 外,其他 10 个位点的观测杂合度和期望杂合度均较高,也从一个侧面说明了对虾作为一种人工驯化程度较低的物种,个体的杂合度仍然较高。

在进行个体分型的 11 个位点中,有 4 个(36%)位点显著偏离哈-温平衡( $P < 0.05$ )。在已报道的水产动物微卫星挖掘的文章中,偏离哈-温平衡的标记出现较为普遍,在菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)和拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)的微卫星发掘中,发现有 84%和 75%的标记显著偏离哈-温平衡<sup>[20-21]</sup>,该现象的原因可能是由于海洋动物的遗传变异度较高,因此在微卫星标记的引物位置在不同个体中可能会存在 SNP、Indel 等变异,使其中的等位基因无法扩增出来,产生无效等位基因,导致分型结果显著偏离哈-温平衡。在本研究中,所用的实验材料取自育种群体,由于在育种过程中是按照育种目的进行的家

系构建,亲本之间的交配并不是随机的,这也可能是导致有些标记偏离哈-温平衡的原因之一。

凡纳滨对虾基因组复杂,重复序列所占比例很高,其中串联重复序列至少占基因组序列的 18.59%左右<sup>[22]</sup>。在本文的研究中,生物信息学方法预测的微卫星数目明显高于其他物种,可见无论在转录组中还是基因组中,对虾微卫星的发生频率均较高。相对于基因组序列,从转录组中发掘的 SSR 数量较少,这与转录组序列为功能基因有关,在编码区较少有重复序列的出现,转录组中重复序列多出现在 UTR 区域。转录组中开发微卫星的效率较低,这与扩增产物可能跨越较大内含子或者引物位于内含子外显子结合处造成扩增失败所致,这也决定了在扩增转录组中的微卫星序列时一般会选择扩增片段较小的引物。然而由于转录组开发的微卫星来源于基因的调控区或编码区,可以直接、准确地标记功能基因,所以更真实地反映该物种的遗传多样性。

本研究表明从高通量测序数据中筛选对虾微卫星是一种高效可行的方法,研究结果大大增加了凡纳滨对虾可用的微卫星标记,对于凡纳滨对虾的遗传学研究、分子标记选育以及种质资源保护都具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] 王鸿霞, 吴长功, 张留所, 等. 微卫星标记应用于凡纳滨对虾家系鉴别的研究[J]. 遗传, 2006, 28(2): 179-183.  
Wang Hongxia, Wu Changgong, Zhang Liusuo, et al. The application of microsatellite markers for parentage determination in selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Hereditas (Beijing), 2006, 28(2): 179-183.
- [2] 程鹏, 杨爱国, 吴彪, 等. 微卫星标记在不同壳色虾夷扇贝家系亲权鉴定的适用性[J]. 水生生物学报, 2011, 35(5): 768-775.  
Cheng Peng, Yang Aiguo, Wu Biao, et al. The applicability analysis on microsatellite markers for parentage determination of different shell color lines of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(5): 768-775.
- [3] 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[J]. 水产学报, 2011, 35(7): 969-976.  
Wang Yanhong, Hu Chaoqun, Zhang Lüping, et al. A preliminary study on microsatellite markers screening from EST sequences of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(7): 969-976.
- [4] Norris A T, Bradley D G, Cunningham E P. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic

- salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers[J]. Aquaculture, 2000, 182(1-2): 73-83.
- [5] Garcia D K, Dhar A K, Alcivar-Warren A. Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*[J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1996, 5(1): 71-83.
- [6] Meehan D, Xu Z K, Zuniga G, et al. High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [Crustacea : Decapoda][J]. Marine Biotechnology, 2003, 5(4): 311-330.
- [7] Alcivar-Warren A, Meehan-Meola D, Park S W, et al. ShrimpMap: A low-density, microsatellite-based linkage map of the pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Identification of sex-linked markers in linkage group 4[J]. Journal of Shellfish Research, 2007, 26(4): 1259-1277.
- [8] 王鸿霞, 吴长功, 张留所, 等. 微卫星标记应用于凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)家系鉴别的研究[C]//第四届世界华人虾类养殖研讨会, 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2004.  
Wang Hongxia, Wu Changgong, Zhang Liusuo, et al. The application of microsatellite markers for family identification of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[C]//The 4<sup>th</sup> World Chinese Symposium on Shrimp Aquaculture, Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2004.
- [9] Perez F, Ortiz J, Zhinaula M, et al. Development of EST-SSR markers by data mining in three species of shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus birdy*[J]. Marine Biotechnology, 2005, 7(5): 554-569.
- [10] Santos C A, Rossini B C, Marques C G, et al. Characterization and genomic annotation of polymorphic EST-SSR loci in *Litopenaeus vannamei* shrimp[J]. Aquaculture Research, 2011, 43(10): 1567-1570.
- [11] Cruz P, Mejia-Ruiz C H, Perez-Enriquez R, et al. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*[J]. Molecular Ecology Notes, 2002, 2(3): 239-241.
- [12] Zheng X F, Pan C, Diao Y, et al. Development of microsatellite markers by transcriptome sequencing in two species of *Amorphophallus* (Araceae)[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 490.
- [13] Ma H Y, Jiang W, Liu P, et al. Identification of transcriptome-derived microsatellite markers and their association with the growth performance of the mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. Plos One, 2014, 9(2): e89134.
- [14] Ahn Y K, Tripathi S, Cho Y I, et al. *De novo* transcriptome assembly and novel microsatellite marker information in *Capsicum annuum* varieties Saengryeg 211 and Saengryeg 213[J]. Botanical Studies, 2013, 54: 58.
- [15] Huang D N, Zhang Y Q, Jin M D, et al. Characterization and high cross-species transferability of microsatellite markers from the floral transcriptome of *Aspidistra saxicola* (Asparagaceae)[J]. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(3): 569-577.
- [16] Wei J K, Zhang X J, Yu Y, et al. RNA-Seq reveals the dynamic and diverse features of digestive enzymes during early development of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology D-Genomics & Proteomics, 2014, 11(5): 37-44.
- [17] Oetting W S, Lee H K, Flanders D J, et al. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers[J]. Genomics, 1995, 30(3): 450-458.
- [18] Yang X, Xu Y, Shah T, et al. Comparison of SSRs and SNPs in assessment of genetic relatedness in maize[J]. Genetica, 2011, 139(8): 1045-1054.
- [19] 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.
- [20] 宋忠魁, 聂振平, 王芳宇. 拟穴青蟹(CA)<sub>n</sub> 微卫星 DNA 多态性引物筛选[J]. 海洋科学, 2013, 37(10): 98-103.  
Song Zhongkui, Nie Zhenping, Wang Fangyu. Screening for polymorphic primer pairs of (CA)<sub>n</sub> microsatellite from *Scylla paramamosain* (mud crab) genome[J]. Marine Sciences, 2013, 37(10): 98-103.
- [21] 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.  
Yan Lulu, Qin Yanjie, Yan Xiwu, et al. Development of microsatellite markers in *Ruditapes philippinarum* using next-generation sequencing[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(5): 1573-1580.
- [22] Zhao C, Zhang X J, Liu C Z, et al. BAC end sequencing of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: a glimpse into the genome of Penaeid shrimp[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2012, 30(3): 456-470.

# Development of microsatellite markers from the transcriptome sequences of Pacific white shrimp (*Litopenaus vannamei*)

YANG Ming<sup>1, 2</sup>, YU Yang<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-jun<sup>1</sup>, WANG Quan-chao<sup>1, 3</sup>, LIU Jing-wen<sup>1, 3</sup>, LI Fu-hua<sup>1</sup>, XIANG Jian-hai<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Oceanic & Fishery Technology Center of Fuzhou, Fuzhou 350005, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Received:** Mar. 22, 2016

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; microsatellite; transcriptome; polymorphism

**Abstract:** The Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, is one of the most economically important marine aquaculture species in China, as well as the world. A large number of molecular markers are required for the studies of genetic diversity and breeding in shrimp. In the present investigation, 14 767 SSRs were detected in *L. vannamei* unigenes derived from transcriptome sequencing. Among these, dinucleotide SSRs were the most abundant motif (59.53%), followed by trinucleotide (35.78%) SSRs. A total of 74 primer pairs were designed and validated using DNA pools. 54 pairs (72.97%) were amplified with clear band, and 27 pairs (36.49%) were found to be polymorphic. The genetic diversity was analyzed using 11 highly polymorphic SSR markers in the breeding population of “Kehai No.1,” a selected new variety of *L. vannamei*. Consequently, the allele number of these microsatellites ranged from 2 to 11. Expected heterozygosity and observed heterozygosity ranged from 0.256 to 0.858 and 0.213 to 0.875, respectively. The polymorphic information varied from 0.221 to 0.830. Four loci deviated significantly from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ( $P < 0.05$ ). The large number of genetic markers developed in the present study would be highly beneficial to the researches to understand genetic diversity, selective breeding, and germ-plasm conservation in shrimp.

(本文编辑: 谭雪静)