

文章编号: 1674-5566(2019)04-0542-08

DOI: 10.12024/j.sou.20180602354

基于转录组数据的铜藻微卫星标记开发与验证

刘颖^{1,2}, 张鹏^{1,2}, 王铁杆^{1,2}, 张敏^{1,2}, 任鹏^{1,2}, 钟晨辉³, 胡程睿^{1,2}

(1. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江温州 325005; 2. 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 浙江温州 325005; 3. 福建省水产研究所, 福建厦门 361000)

摘要: 根据铜藻转录组测序数据来进行微卫星标记的发掘, 共获得 2 800 个微卫星位点。二碱基重复出现的次数最多, 占 32.82%, 其次是三碱基重复, 占 25.21%; 在所有重复单元类型中, AC/GT 出现频率最高, 占 9.18%; 重复序列的长度则主要集中在 12~20 bp, 占 72.79%; 重复次数主要集中在 5~10 次, 占 74.14%。随机选取 74 对引物进行验证, 最终获得 18 个具有多态性的微卫星标记。对 31 株铜藻个体进行检测和评价, 共扩增得到 43 个等位基因, 每个位点平均等位基因数为 2.39, 平均有效等位基因数为 1.91, 平均观测杂合度 (H_o) 为 0.318, 平均期望杂合度 (H_e) 为 0.449, 平均多态信息含量 (PIC) 为 0.365, 在 18 个位点中有 11 个显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ($P < 0.05$)。开发的微卫星标记为后续铜藻多样性、起源和迁移等遗传学问题研究提供了有力支撑。

关键词: 铜藻; 转录组; 微卫星标记

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

铜藻 (*Sargassum horneri*) 隶属于褐藻门 (Phaeophyta), 墨角藻目 (Fucales), 马尾藻科 (Sargassaceae Kuetzing), 马尾藻属 (*Sargassum*)^[1], 属暖温性大型海藻, 广泛分布于太平洋西北部^[2]。近年来, 有关铜藻的研究主要集中在繁殖生物学、增养殖及生态修复等领域, 而关于铜藻种群遗传结构和遗传多样性的研究相对较少^[3], 且相关研究主要集中在核基因、叶绿体基因以及 ISSR 和 SRAP 等显性标记技术方面^[4-7]。由于线粒体、叶绿体基因的变异水平低于核序列, 无法有效检测地理位置或者亲缘关系较近的种群之间的遗传差异^[8], 而显性分子标记在检测杂合等位基因时存在很大的局限性, 故亟需开发适合研究铜藻遗传多样性和种群结构的共显性分子标记。

微卫星 (simple sequence repeats, SSR) 标记, 因其在基因组中含量丰富、分布广泛, 多态性高, 呈共显性遗传等特点, 被广泛用于构建遗传图

谱、分析亲缘关系和种群结构等方面^[9-10]。有关铜藻微卫星标记开发的研究虽然也有报道^[8,11], 但受限于开发手段, 目前可供使用的标记相对较少, 这在很大程度上限制了微卫星标记在铜藻研究中的应用。近年来, 高通量测序技术发展迅速, 已被广泛用于微卫星标记的开发^[12-14]。因此, 采用转录组测序方法开发铜藻的微卫星标记, 为铜藻的群体遗传学研究提供更多可用的分子标记。

1 材料与方法

1.1 实验材料及转录组测序

转录组测序所需铜藻样品于 2012 年 4 月采自浙江省南麂岛马祖岙 (27°28'N, 121°03'E), 从中选取 1 株送至苏州众信生物技术有限公司进行 RNA 提取和 454 高通量测序。

SSR 扩增所需的铜藻样品为浙江省海洋水产养殖研究所人工养殖铜藻, 随机取 10 株用于检

收稿日期: 2018-06-29 修回日期: 2019-01-07

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项(201105008-4); 浙南沿海铜藻海藻场建设与生态修复技术示范项目(浙海渔计[2010]205号); 国家产业技术体系建设任务书(CARS-50)

作者简介: 刘颖(1984—), 女, 研究实习员, 硕士, 研究方向为海洋生物遗传育种。E-mail: 13758423600@163.com

通信作者: 王铁杆, E-mail: wtg605@163.com

测 SSR 引物的有效性,另取 31 株进行 SSR 遗传多样性的检测和评价。

1.2 微卫星位点的搜索

转录组数据经处理拼接后得到 28 608 个 Unigenes,利用 MISA (Microsatellite identification tool) (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>) 软件在 Unigenes 中搜索 SSR 位点,对于非混合型 SSR 位点,检测标准为:单碱基、二碱基、三碱基、四碱基、五碱基、六碱基的重复次数不小于 10、6、5、5、5、5;间隔小于 100 bp 的 SSR 被定义为混合型 SSR。

1.3 微卫星引物设计

选取两端侧翼序列不少于 50 bp 的二至五碱基重复单元的 SSR 序列,采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。引物设计的主要参数为:引物长度 15~30 bp;退火温度 50~60 °C;PCR 产物长度 100~320 bp;GC 含量 40%~60%。从中随机选出 74 对引物,由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.4 样品 DNA 的提取

使用“DN14-植物基因组 DNA 快速提取试剂盒”(北京艾德莱生物科技有限公司, DN1401)按照操作说明提取铜藻基因组 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性后,利用全波长酶标仪 (Varian 50 Bio UV-Vis Spectrophotometer) 测定 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 以确定 DNA 的质量与浓度,将 DNA 浓度调至 30 ng/μL, -20 °C 保存备用。

1.5 PCR 扩增及多态性位点的筛选

PCR 反应体系为 20 μL,包括:模板 DNA (30 ng/μL) 1 μL, Taq 酶 (5 U/μL) 0.1 μL, 10 × PCR buffer (Mg²⁺ plus) 2 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol/μL each) 1.6 μL, 引物对 (10 μmol/L) 各 0.4 μL, 超纯水 14.5 μL。PCR 反应程序:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s, 退火温度 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测引物扩增效果并进行退火温度的优化。采用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳对 PCR 产物进行分析, DuGreen (bridgen) 染色, 拍照 (Bio-Rad Universal Hood II), 筛选具有多态性的微卫星标记。由生工生物工程(上海)股份有限公司和英潍捷基(上海)贸易有限公

司对 PCR 产物进行测序,通过 MEGA 7.0 和 Clustal X 2.0 软件对序列进行比对分析。

1.6 数据分析

将电泳图上清晰的条带按其迁移率的不同,用大写字母 A、B、C、……从小到大进行记录。运用 Popgene 3.2 软件计算微卫星位点的等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e),并进行哈迪-温伯格平衡 (hardy-weinberg equilibrium, HWE) 检测^[15];采用 Cervus 3.0.7 软件计算各微卫星位点的多态信息含量 (polymorphism information content, PIC),按照 BOTSTEIN 等^[16]的标准,当某位点 PIC > 0.5 时,该位点属于高多态性位点。

2 结果与分析

2.1 铜藻转录组中微卫星的分布特征

铜藻转录组测序结果经组装和拼接共得到 28 608 条 Unigenes (总长为 10 758 117 bp),从中检索到 2 800 个 SSR 位点,分布在 2 597 条 Unigenes 中,发生频率为 9.08% (含有 SSR 的 Unigenes 占总 Unigenes 的百分比),其中含有 1 个和含有 2 个及 2 个以上 SSR 的 Unigenes 分别有 2 410 条和 187 条,包含有复合型 SSR 的 Unigenes 共 244 条。SSR 的分布率为 9.79% (SSR 的总个数占总 Unigenes 的百分比),铜藻转录组中平均每 3.84 kb 中就有一个 SSR 位点(表 1)。

在铜藻转录组中出现次数最多的 SSR 是二碱基重复,约占 32.82%;其次是三碱基重复和单碱基重复,各约占 25.21% 和 21.64%;四碱基、五碱基和六碱基重复分别仅占 5.79%、4.54% 和 1.14%,见表 1。1 946 个 SSR (不计算单碱基的 4 种类型和复合型 SSR) 中共包含 201 种重复单元,二、三、四、五、六碱基重复单元的类型分别有 8、30、57、81、25 种。在各碱基类型的微卫星中,不同序列组成的 SSR 数量迥异。二碱基类型中出现频率最高的是 AC/GT,有 257 个,占有 SSR 分子的 9.18%,GC/GC 出现的频率最低,仅 3 个。三碱基类型中出现频率最高的是 CAG/CTG,有 143 个 (5.11%),其次为 GCA/TGC (2.46%) 和 AGC/GCT (2.43%),见表 2。

表 1 铜藻转录组中 SSR 重复单元的分布特征

Tab.1 Distribution of SSR repeat units in *Sargassum horneri* transcriptome

重复类型 Type of repeat	数量 Number	比例 Percentage/%	分布率 Distribution frequency/%	平均距离 Average distance/kb
复合型 SSR Compound SSR	248	8.86	0.87	43.38
单碱基重复 Mononucleotide	606	21.64	2.12	17.75
二碱基重复 Dinucleotide	919	32.82	3.21	11.71
三碱基重复 Trinucleotide	706	25.21	2.47	15.24
四碱基重复 Tetranucleotide	162	5.79	0.57	66.41
五碱基重复 Pentanucleotide	127	4.54	0.44	84.71
六碱基重复 Hexanucleotide	32	1.14	0.11	336.19
合计 Total	2 800	100	9.79	3.84

注：“比例”表示不同重复类型的 SSR 个数/SSR 总个数；“分布率”表示 SSR 的个数占总 Unigenes 的百分比；“平均距离”表示 Unigenes 的总长/SSR 数量

Notes: “Percentage” means the proportion of SSR repeat units in the total number of SSRs; “Distribution frequency” means the number of SSRs as a percentage of total Unigenes; “Average distance” means total length of Unigenes / SSR number

表 2 铜藻转录组中 SSR 重复单元的类型

Tab.2 Types of SSR repeat units in *Sargassum horneri* transcriptome

重复类型 Type of repeat	不同类型重复单元的数量 Number of motif types	主要重复单元 Main repeat units
二碱基重复 Dinucleotide	8	AC/GT, CA/TG, AT/AT
三碱基重复 Trinucleotide	30	CAG/CTG, GCA/TGC, AGC/GCT
四碱基重复 Tetranucleotide	57	TCAA/TTGA, CATC/GATG, ATAC/GTAT
五碱基重复 Pentanucleotide	81	ATTGA/TCAAT
六碱基重复 Hexanucleotide	25	TCTCTT/AAGAGA
合计 Total	201	

铜藻转录组中 SSR 的序列长度从 10 ~ 309 个碱基不等,平均长度为 20.98 bp。复合型 SSR、单碱基、二碱基、三碱基、四碱基、五碱基、六碱基重复的平均长度分别为 63.40、11.50、16.12、17.89、23.98、27.76 和 37.31 bp。重复序列长度范围在 12 ~ 20 bp 的最多,占 72.79%,重复长度在 21 ~ 40 bp 的占 21.46%,大于 40 bp 的最少,仅占 5.75% (图 1)。SSR 重复单元的重复次数在 5 ~ 38 次之间(不计算复合型 SSR)。重复次数在 5 ~ 10 次的有 2 076 个,占 SSR 总数的 74.14%;11 ~ 20 次的有 461 个,占总数的 16.46%;21 ~ 30 次和大于 30 次的分别为 13 个和 2 个,占 0.46% 和 0.07%。见图 2。

2.2 微卫星标记位点的开发

根据转录组测序结果,从两端各具有 50 bp

侧翼序列的微卫星位点中,随机设计出 74 对引物,对 10 株铜藻样本进行 PCR 扩增,经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,筛选出 18 个具有多态性的 SSR 位点,其中,5 个为二核苷酸重复型,7 个为三核苷酸重复型,6 个为五核苷酸重复型,详见表 3。PCR 产物经测序后与目的片段比对分析,确定扩增产物均含有目的序列(图 3)。

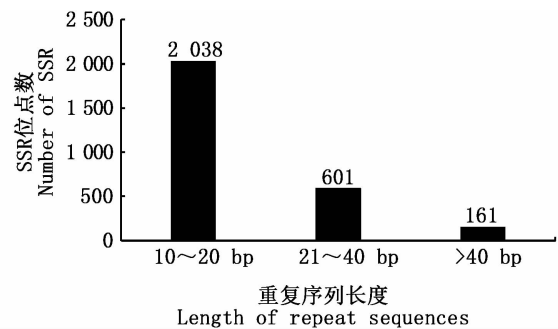


图 1 SSR 重复序列长度的分布情况

Fig.1 Distribution of length of SSR repeat sequences

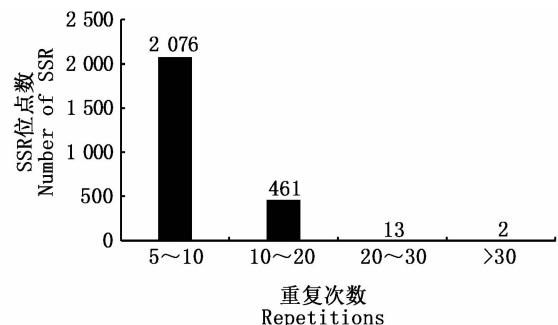
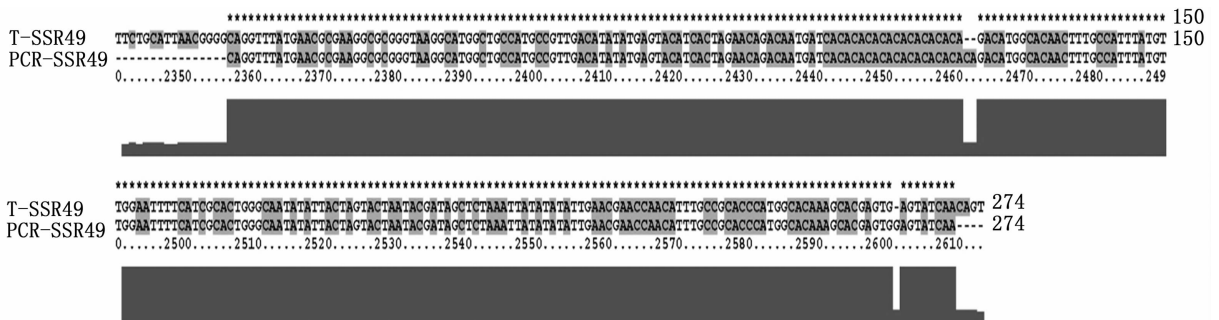


图 2 SSR 重复单元的重复次数分布情况

Fig.2 Distribution of repetitions of SSR repeat unit

表 3 18 个铜藻微卫星位点概要
Tab.3 Summary of 18 SSR loci in *Sargassum horneri*

Table with 5 columns: SSR Locus, The primer sequence 5' - 3', Repeat, Tm/°C, Length of DNA fragments amplified/bp. Rows include ShSSR2, ShSSR8, ShSSR12, ShSSR13, ShSSR15, ShSSR29, ShSSR32, ShSSR35, ShSSR41, ShSSR45, ShSSR46, ShSSR47, ShSSR49, ShSSR50, ShSSR62, ShSSR64, ShSSR65, and ShSSR74.



T-SSR49 表示目的序列;PCR-SSR49 表示 PCR 扩增产物;“*”表示该列碱基相同

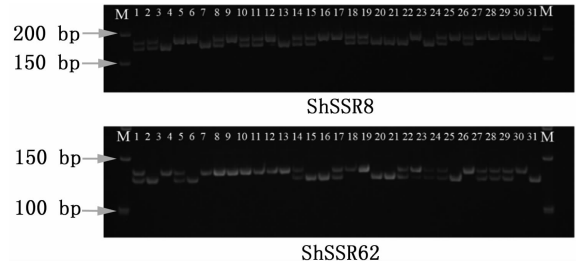
T-SSR49 means target sequences; PCR-SSR49 means PCR amplification products; “*” indicates positions which have fully conserved base

图 3 ShSSR49 位点的 PCR 扩增产物与目的序列比对图

Fig.3 Comparison of PCR amplification products and target sequences of ShSSR49

2.3 微卫星标记多态性的检测和评价

用 18 对引物对 31 株铜藻样本进行多态性检测(图 4),18 对引物共扩增得到 43 个等位基因:每个位点的等位基因数(N_a)为 2~4 不等,平均 2.39 个;有效等位基因数(N_e)为 1.10~3.25,平均 1.91 个;观测杂合度(H_o)为 0.032~0.710,均值为 0.318;期望杂合度(H_e)为 0.094~0.704,均值为 0.449;多态信息含量(PIC)为 0.088~0.641,平均 0.365,其中,高多态性位点($PIC > 0.5$)2 个,中多态性位点($0.25 < PIC < 0.5$)13 个,低多态位点($PIC < 0.25$)3 个。经检测,有 11 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P < 0.05$)。见表 4。



8% 聚丙烯酰胺电泳;M;TaKaRa 50 bp DNA Ladder
8% PAGE, M; TaKaRa 50 bp DNA Ladder

图 4 ShSSR8、ShSSR62 位点在 31 株铜藻样品中的扩增情况

Fig.4 Sequence bands of SSR loci ShSSR8 and ShSSR62

表 4 铜藻的 18 个多态性位点的遗传多样性信息

Tab.4 Characteristics of 18 SSR loci in *Sargassum horneri*

微卫星位点 SSR Locus	等位基因 N_a	有效等位基因 N_e	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量 PIC	哈迪-温伯格平衡 HWE
ShSSR2	2	1.50	0.226	0.337	0.249	0.057 6
ShSSR8	2	1.93	0.355	0.489	0.365	0.119 7
ShSSR12	2	1.84	0.710	0.465	0.353	0.002 9 *
ShSSR13	4	3.25	0.194	0.704	0.641	0.000 0 *
ShSSR15	2	1.50	0.097	0.337	0.277	0.000 0 *
ShSSR29	3	2.18	0.677	0.550	0.476	0.268 2
ShSSR32	3	1.77	0.226	0.442	0.393	0.000 3 *
ShSSR35	3	2.03	0.323	0.516	0.443	0.012 5 *
ShSSR41	3	2.82	0.419	0.656	0.573	0.000 0 *
ShSSR45	2	1.10	0.032	0.094	0.088	0.000 0 *
ShSSR46	2	2.00	0.387	0.508	0.375	0.178 9
ShSSR47	2	1.50	0.290	0.337	0.277	0.426 2
ShSSR49	2	2.00	0.258	0.508	0.375	0.005 4 *
ShSSR50	3	1.98	0.323	0.503	0.421	0.000 0 *
ShSSR62	2	1.97	0.355	0.500	0.371	0.100 6
ShSSR64	2	1.17	0.032	0.151	0.137	0.000 0 *
ShSSR65	2	1.99	0.290	0.506	0.374	0.015 8 *
ShSSR74	2	1.92	0.533	0.488	0.387	0.605 5

注:“*”表示显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P < 0.05$)

Notes: “*” means significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 转录组测序技术在开发微卫星标记中的应用

微卫星标记以其含量丰富、多态性高、在基因组中均匀分布以及呈共显性遗传等特性成为基因组研究的理想标记类型^[9]。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,在所有的标记类型中,微卫星标记的杂合度最高,是信息含量最高的遗传标记,这个特

性使其成为个体认证中使用的唯一标记系统,以及其他许多方面应用的必选标记^[9,17]。传统的微卫星标记开发方法需要构建小片段微卫星富集文库^[18-21],整个过程繁琐且耗时长、成本高。近年来,利用转录组测序数据来开发水产生物微卫星标记的相关研究和报道越来越多^[22-24],这在很大程度上提高了微卫星标记开发的效率。目前,有关铜藻微卫星的研究工作还处于起步阶段,SHAN 等^[11]和 KUBO 等^[8]通过构建微卫星富集文库分别筛选出了 8 对和 10 对微卫星标记用于

铜藻遗传学研究,本文则首次报道了利用转录组数据开发铜藻的微卫星标记,筛选出了 18 对具有多态性的微卫星标记,这些标记将被用于后续的铜藻群体遗传学分析。

3.2 基于铜藻转录组测序的微卫星标记特征

通常,大多数 SSR 存在于基因组 DNA 中,转录组中只有少量的 SSR 存在,一些研究表明在植物 EST 序列中,SSR 位点所占的比例为 7% ~ 10%^[24]。在铜藻转录组的 28 608 条 Unigenes 中发现 2 597 条中含有 2 800 个 SSR 位点,分布率为 9.79%,与植物 EST 序列中的情况相似。铜藻转录组中平均每 3.8 kb 中就有 1 个 SSR 位点,海带 (*Saccharina japonica*) 每 4.6 kb^[24] 而坛紫菜 (*Pyropia haitanensis*) 每 5.8 kb^[22] 才有 1 个 SSR 位点,因此铜藻的 SSR 分布比海带和坛紫菜都密。其中:二碱基重复数量最多,约占 32.82%,AC/GT 是出现频率最多的类型,其次是三碱基重复 25.21%;四碱基、五碱基和六碱基重复相对较少。这与同属褐藻门的瓦氏马尾藻 (*Sargassum vachellianum*)^[25] 的微卫星情况相近,但是在大型海藻中,多数研究显示三碱基序列是最主要的重复单元,如海带^[24]、条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*)^[26]、坛紫菜^[22] 和裙带菜 (*Undaria pinnatifida*)^[27]。这些差异可能由 SSR 在藻类中的物种特异性引起,也可能是受基因组结构组成、数据库大小、数据分析工具和 SSR 筛选参数设计等影响^[28-29]。

铜藻转录组 SSR 的重复次数主要集中在 5 ~ 10 次 (74.14%),因此 SSR 的长度较短,12 ~ 20 bp 之间的最多 (72.79%),与条斑紫菜^[30] 和龙须菜 (*Gracilariopsis lemaneiformis*)^[31] 中的研究结果相符。SIA 等^[32] 认为具有较大重复次数和长度的 SSR 位点通常表现出较高的突变率,所以重复次数较少的铜藻转录组 SSR 可能表现出较低多样性^[31]。

3.3 本研究中铜藻群体的种群遗传学特征

群体的遗传多样性主要表现在等位基因数、杂合度和多态信息含量等 3 个方面^[33]。有效等位基因数反映了同一位点等位基因之间的相互作用。本研究所获得铜藻平均等位基因数为 2.39,小于野生铜藻群体的 3.5 ~ 13.5 (SHAN 等^[11] 和 KUBO 等^[8]),但是大于瓦氏马尾藻的 2.1^[34],说明铜藻的养殖群体存在等位基因缺失

现象,推测是因为人工选择育种、近交等因素丢失了某些遗传多样性^[35]。另外,不同的检测方法可能也是造成等位基因数差异的原因之一。杂合度又被称为基因多样性,是群体杂合程度的度量单位,平均杂合度越高,群体的遗传一致性就越低,其遗传多样性就越高^[35]。本研究得到的铜藻群体的观测杂合度和期望杂合度分别为 0.318 和 0.449,低于 KUBO 等^[8] 在野生铜藻群体中测得的 H_o (0.508) 和 H_e (0.616),说明铜藻养殖群体的遗传多样性较低。

多态信息含量 (PIC) 被认为是衡量变异程度的指标:当 PIC > 0.5 时,该位点具有较高多态性;当 PIC < 0.25 时,该位点表现为低多态性^[35]。本实验共获得 18 个具有多态性的微卫星位点,包括 2 个高多态性位点 (PIC > 0.5)、13 个中多态性位点 (0.5 > PIC > 0.25) 和 3 个低多态性位点 (PIC < 0.25),表明铜藻养殖群体的遗传多态性处于中度多态性水平,其中 ShSSR13 和 ShSSR41 这两个高多态性位点可以提供较多的遗传信息。18 个位点中有 11 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ($P < 0.05$),该现象可能是由于在不同个体中存在 SNP、Indel 等变异,其中的等位基因无法扩增出来,产生无效等位基因而造成^[23]。

综上所述,从转录组测序数据中筛选铜藻微卫星标记是一种高效可行的方法,研究结果增加了铜藻可用的微卫星标记,对于铜藻的种群结构和遗传多样性研究具有重要意义。后续将继续发掘和公布更多的多态性 SSR 引物,并对我国沿海主要铜藻种群和漂浮铜藻进行相关的分析和研究。

参考文献:

- [1] 曾呈奎,陆保仁. 中国海藻志[M]. 北京:科学出版社, 2000.
ZENG C K, LU B R. China seaweed[M]. Beijing: Science Press, 2000.
- [2] 陈亮然,章守宇,陈彦,等. 枸杞岛马尾藻场铜藻的生命史与形态特征[J]. 水产学报, 2015, 39(8): 1218-1229.
CHEN L R, ZHANG S Y, CHEN Y, et al. Life history and morphology of *Sargassum horneri* from the Sargassum seaweed bed of Gouqi Island[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(8): 1218-1229.
- [3] 张鹏,王铁杆,钟晨辉,等. 铜藻苗种繁育研究[J]. 水生生物学报, 2018, 42(2): 428-438.

- ZHANG P, WANG T G, ZHONG C H, et al. study on seed breeding of *Sargassum horneri* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2018, 42(2): 428-438.
- [4] REN J R, YANG R, HE Y Y, et al. Genetic variation of *Sargassum horneri* populations detected by inter-simple sequence repeats [J]. Genetics and Molecular Research: GMR, 2015, 14(1): 619-625.
- [5] HU Z M, UWAI S, YU S H, et al. Phylogeographic heterogeneity of the brown macroalga *Sargassum horneri* (Fucaceae) in the northwestern Pacific in relation to late Pleistocene glaciation and tectonic configurations [J]. Molecular Ecology, 2011, 20(18): 3894-3909.
- [6] UWAI S, KOGAME K, YOSHIDA G, et al. Geographical genetic structure and phylogeography of the *Sargassum horneri/filicinum* complex in Japan, based on the mitochondrial *cox3* haplotype [J]. Marine Biology, 2009, 156(5): 901-911.
- [7] YU S H, CHON G Z, ZHAO F J, et al. Population genetics of *Sargassum horneri* (Fucales, Phaeophyta) in China revealed by ISSR and SRAP markers [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2013, 31(3): 609-616.
- [8] KUBO N, DOUKE A, NISHIGAKI T, et al. Development and characterization of simple sequence repeat markers for genetic analyses of *Sargassum horneri* (Sargassaceae, Phaeophyta) populations in Kyoto, Japan [J]. Journal of Applied Phycology, 2017, 29(3): 1729-1733.
- [9] 刘占江. 水产基因组学技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2011.
- LIU Z J. Aquaculture genome technologies [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2011.
- [10] GUICHOUX E, LAGACHE L, WAGNER S, et al. Current trends in microsatellite genotyping [J]. Molecular Ecology Resources, 2011, 11(4): 591-611.
- [11] SHAN T F, PANG S J, LI J, et al. Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci from the brown alga *Sargassum horneri* [J]. Journal of Applied Phycology, 2015, 27(6): 2419-2421.
- [12] TRIWITAYAKORN K, CHATKULKAWIN P, KANJANAWATTANAWONG S, et al. Transcriptome sequencing of *Hevea brasiliensis* for development of microsatellite markers and construction of a genetic linkage map [J]. DNA Research, 2011, 18(6): 471-482.
- [13] YÜ Z M, LI H M, LIU L Q, et al. Rapid development of microsatellite markers from the large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) using next generation DNA sequencing technology [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2013, 51: 314-319.
- [14] LI Q Y, ZHANG J, YAO J T, et al. Development of *Saccharina japonica* genomic SSR markers using next-generation sequencing [J]. Journal of Applied Phycology, 2016, 28(2): 1387-1390.
- [15] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. Genetics, 1978, 89(3): 583-590.
- [16] 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.
- [17] YANG X H, XU Y B, SHAH T, et al. Comparison of SSRs and SNPs in assessment of genetic relatedness in maize [J]. Genetica, 2011, 139(8): 1045-1054.
- [18] OSTRANDER E A, JONG P M, RINE J, et al. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(8): 3419-3423.
- [19] LYALL J E W, BROWN G M, FURLONG R A, et al. A method for creating chromosome-specific plasmid libraries enriched in clones containing microsatellite repeat sequences directly from flow-sorted chromosomes [J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(19): 4641-4642.
- [20] KIJAS J M H, FOWLER J C S, GARBETT C A, et al. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles [J]. Biotechniques, 1994, 16(4): 656-660, 662.
- [21] ZANE L, BARGELLONI L, PATARNELLO T. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. Molecular Ecology, 2002, 11(1): 1-16.
- [22] XIE C T, LI B, XU Y, et al. Characterization of the global transcriptome for *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) and development of cSSR markers [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 107.
- [23] 杨铭, 于洋, 张晓军, 等. 基于转录组数据的凡纳滨对虾微卫星标记开发 [J]. 海洋科学, 2017, 41(2): 96-102.
- YANG M, YU Y, ZHANG X J, et al. Development of microsatellite markers from the transcriptome sequences of Pacific white shrimp (*Litopenaus vannamei*) [J]. Marine Sciences, 2017, 41(2): 96-102.
- [24] ZHANG J, LIU T, RUI F P. Development of EST-SSR markers derived from transcriptome of *Saccharina japonica* and their application in genetic diversity analysis [J]. Journal of Applied Phycology, 2018, 30(3): 2101-2109.
- [25] 杨旭, 毕燕会, 周志刚. 瓦氏马尾藻微卫星分子标记的筛选 [J]. 海洋渔业, 2014, 36(5): 431-436.
- YANG X, BI Y H, ZHOU Z G. Isolation of microsatellite markers in *Sargassum vachellianum* [J]. Marine Fisheries, 2014, 36(5): 431-436.
- [26] 刘必谦, 曾庆国, 骆其君, 等. 条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) dbEST 中筛选微卫星位点及引物种间转移扩增 [J]. 海洋与湖沼, 2005, 36(3): 248-254.
- LIU B Q, ZENG Q G, LUO Q J, et al. Isolation of microsatellite loci from dbEST of algae *Porphyra yezoensis* and primer amplification of interspecies transfer [J].

- Oceanologia et Limnologia Sinica, 2005, 36(3): 248-254.
- [27] SHAN T F, PANG S J, WANG X M, et al. Assessment of the genetic connectivity between farmed and wild populations of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae) in a representative traditional farming region of China by using newly developed microsatellite markers [J]. Journal of Applied Phycology, 2018, 30(4): 2707-2714.
- [28] TÓTH G, GÁSPÁRI Z, JURKA J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis [J]. Genome Research, 2000, 10(7): 967-981.
- [29] VARSHNEY R K, GRANER A, SORRELLS M E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications [J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(1): 48-55.
- [30] YANG H, MAO Y X, KONG F N, et al. Profiling of the transcriptome of *Porphyra yezoensis* with Solexa sequencing technology [J]. Chinese Science Bulletin, 2011, 56(20): 2119-2130.
- [31] HU Y Y, SUI Z H, ZHOU W, et al. Development of genomic simple sequence repeat markers and genetic diversity analysis of *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2018, 30(1): 707-716.
- [32] SIA E A, KOKOSKA R J, DOMINSKA M, et al. Microsatellite instability in yeast: dependence on repeat unit size and DNA mismatch repair genes [J]. Molecular and Cellular Biology, 1997, 17(5): 2851-2858.
- [33] SENANAN W, KAPUSCINSKI A R, NA-NAKORN U, et al. Genetic impacts of hybrid catfish farming (*Clarias macrocephalus* × *C. gariepinus*) on native catfish populations in central Thailand [J]. Aquaculture, 2004, 235(1/4): 167-184.
- [34] BI Y H, YANG X, SUN Z, et al. Development and characterization of 12 polymorphic microsatellite markers in *Sargassum vachellianum* [J]. Conservation Genetics Resources, 2015, 7(1): 203-205.
- [35] 李青. 重要海水养殖鱼类星斑川鲷 (*Platichthys stellatus*) 微卫星开发及遗传多样性研究 [D]. 济南: 山东大学, 2016.
- LI Q. Study on the development and genetic diversity of microsatellite in the important maricultural fish, *Platichthys stellatus* [D]. Jinan: Shandong University, 2016.

Development and verification of SSR based on transcriptome of *Sargassum horneri*

LIU Ying^{1,2}, ZHANG Peng^{1,2}, WANG Tiegan^{1,2}, ZHANG Min^{1,2}, REN Peng^{1,2}, ZHONG Chenhui³, HU Chengrui^{1,2}

(1. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, Zhejiang, China; 2. Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-resource, Wenzhou 325005, Zhejiang, China; 3. Fisheries Research Institute of Fujian Province, Xiamen 361000, Fujian, China)

Abstract: SSRs were developed and characterized by using transcriptome data. A total of 2800 SSR loci were identified and dinucleotides were the most frequent (32.82%), followed by trinucleotides (25.21%). AC/GT was the most abundant unit (9.18%). The length of repetitive sequences was mainly concentrated between 12–20 bp (72.79%), and 5–10 repeats being the most abundant number (74.14%). 74 pairs of primers were randomly selected for detection, and 18 polymorphic SSRs were obtained finally. The characteristics of these microsatellites were determined in 31 individuals of *S. horneri*. A total of 43 alleles were detected, the allele number per locus ranged from 2 to 4 (average 2.39), and mean effective allele number was 1.91, and mean observed and expected heterozygosity were 0.318 and 0.449, respectively. The average of polymorphism information content (PIC) was 0.365, and 11 loci deviated significantly from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ($P < 0.05$). These obtained SSR markers will be helpful for the genetic studies in *S. horneri*.

Key words: *Sargassum horneri*; transcriptome; SSR