

三疣梭子蟹 I 型微卫星标记的发掘及多态性分析

吕建建¹, 王 渝^{1,2}, 高保全¹, 李 健^{1*}, 刘 萍¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为发掘三疣梭子蟹 I 型微卫星标记, 实验运用生物信息学方法, 从 NCBI 数据库已公开的 13 985 条三疣梭子蟹 EST 序列中搜索微卫星位点。结果显示, 共搜索到 287 个微卫星位点, 其中主要为二核苷酸重复序列 (173 个), 占总数的 60.3%; 其次为三核苷酸重复序列 (79 个), 占总数的 27.5%; 四、五、六核苷酸重复位点较少; 在二核苷酸重复位点中, AC/GT 重复位点最为丰富, 占二核苷酸重复位点总数的 53.8%, AG/CT 重复次之, 占二核苷酸重复位点总数的 37.0%, AT 和 GC 重复较少。挑选 14 个 I 型微卫星标记在野生三疣梭子蟹群体中进行多态性检测, 发现 8 个位点呈多态性, 平均多态信息含量 (PIC) 和平均遗传杂合度 (H) 分别为 0.57 和 0.63。其中 6 个多态性位点的 PIC 值大于 0.5, 呈现较高多态性特征。研究表明, 基于三疣梭子蟹 EST 数据发掘 I 型微卫星标记的方法切实可行。本研究发掘的 I 型微卫星标记将为三疣梭子蟹遗传多样性评估、遗传连锁图谱构建和 QTL 分析提供有效的分子标记。

关键词: 三疣梭子蟹; 微卫星标记; 多态信息含量

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

I 型微卫星标记, 即位于基因组外显子区域的简单重复序列, 是微卫星标记 (microsatellite) 中的重要成员。相比 II 型微卫星标记而言 (位于基因组内含子区简单重复序列), I 型微卫星除具有多态性高、共显性遗传、符合孟德尔分离方式等微卫星标记共有的优点外^[1], 还具有其独特的、极具应用价值的特点: I 型微卫星为功能基因提供直接的分子标记, 其多态性能够更好地解释个体的性状差异^[2-3]; I 型微卫星标记具有更好的种间通用性^[4], 利于标记的种间通用以及种间比较作图等研究; 在物种 EST 序列数据丰富的前提下, I 型微卫星发掘相对便捷。因此, 该标记被广泛应用于水生生物种质资源管理、遗传多样性分析、品系鉴定、遗传连锁图谱构建和 QTL 定位分析等各个领域^[5-11]。

随着新一代测序技术的发展, EST 数据库序

列日益丰富, 为 I 型微卫星标记的发掘、利用提供契机。目前 NCBI 数据库中已公布多种水生动物 EST 序列, 很多经济水生生物已经利用公开的 EST 序列发掘 I 型微卫星标记, 其中鱼类包括鲤 (*Cyprinus carpio*)^[9]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[12]、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[13]、鳕 (*Gadus morhua* L.)^[14]、鲑 (*Salmo salar* L.)^[15]、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)^[5] 等, 甲壳类包括中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)^[16]、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[17]、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)^[11] 等, 贝类包括栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)^[8]、海湾扇贝 (*Argopecten irradians*)^[18]、太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[19] 等, 为进一步了解和利用水生生物 I 型微卫星标记提供数据和参考。

收稿日期: 2012-09-18 修回日期: 2013-03-21

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2012AA10A409); 中国博士后科学基金 (2013M531657); 黄海水产研究所基本科研业务费专项 (20603022013039)

通信作者: 李 健, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 隶属于甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda)、梭子蟹科 (Portunidae)、梭子蟹属 (*Portunus*), 是我国重要的渔业捕捞对象和海水养殖对象^[20]。为更好的研究三疣梭子蟹遗传背景、种质资源及群体多样性, 不少学者已通过基因组文库测序^[21]、微卫星富集文库^[22]等方法发掘三疣梭子蟹 II 型微卫星标记, 并对其特征及多态性评估。然而有关三疣梭子蟹 I 型微卫星标记少有报道, 仅崔朝霞等^[23]从 494 个 EST 序列中发掘出 31 个三疣梭子蟹 I 型微卫星标记, 其中 8 个呈多态性。由于其所用的 EST 序列较少, 得到的 I 型微卫星标记数量有限, 难以从整体上评价三疣梭子蟹 I 型微卫星标记的特征。因此, 本实验基于 NCBI 数据库公开的 13985 条三疣梭子蟹 EST 序列, 运用生物信息学方法, 大量发掘三疣梭子蟹 I 型微卫星标记, 分析其序列特征并评估其多态信息含量和杂合度, 评价基于三疣梭子蟹 EST 数据发掘 I 型微卫星标记的可行性, 为三疣梭子蟹遗传多样性评估、遗传连锁图谱构建和 QTL 分析提供有效分子标记。

1 材料与方法

1.1 三疣梭子蟹 EST 序列的获取

从 NCBI 数据库中下载 EST 序列, 利用 DNASTAR 软件包中的 seqman 软件对原始的 EST 序列进行去载体, 获得 clean EST, 并进行聚类拼接, 获得非冗余的 EST。

1.2 微卫星分子标记的发掘

参考李偲等^[12]研究方法, 使用 Tandem repeats finder v4.0 软件^[24]对 EST 进行微卫星发掘。序列比对打分规则 alignment parameters (match, mismatch, indel): 2, 7, 7; 目标序列最小得分 (minimum alignment score to report repeats): 20; 允许的最大核苷酸重复类型 (maximum period size): 10。选取重复单元为二核苷酸至六核苷酸, 重复次数不少于 5 次的微卫星位点进行相关统计分析。

1.3 微卫星序列引物设计

根据 I 型微卫星高度保守的侧翼序列设计 PCR 引物。引物设计遵循以下原则: 引物长度为 18 ~ 30 bp; T_m 值为 40 ~ 60 °C; PCR 目的片段长度为 100 ~ 400 bp; 引物内少于 3 个核苷酸的

互补, 引物间避免 3 个以上连续的核苷酸配对。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.4 试验群体及基因组 DNA 制备

2010 年 10 月, 从胶州湾采集三疣梭子蟹 30 只。运回实验室后, 采用苯酚 - 氯仿 - 异戊醇方法迅速提取大鳌肌肉基因组 DNA, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 于 -20 °C 保存备用。具体 DNA 提取方法参考戴艳菊等^[25]。

1.5 PCR 扩增与电泳检测

PCR 反应体系 (10 μ L): 基因组 DNA (20 ng/ μ L) 0.5 μ L; 10 \times Buffer 1 μ L; dNTP 混合物 (2.5 mmol/L) 0.8 μ L; 正向引物 (10 μ mol/L) 0.4 μ L; 反向引物 (10 μ mol/L) 0.4 μ L; Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.05 μ L; ddH₂O 6.85 μ L。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 扩增 35 个循环 (94 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s); 72 °C 延伸 5 min; 4 °C 保存。PCR 产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 电泳后用 10% 的醋酸浸泡 0.5 h, 1.5% 的硝酸银染色 30 min, 显色液 (甲醛, 硫代硫酸钠, 无水碳酸钠) 显色 10 min。

2 结果

2.1 微卫星的丰度

从 NCBI 下载 13 985 条 EST 序列, 经过拼接获得 2 612 条 unigene。在上述 unigene 中共搜索到 287 个微卫星位点, 表明三疣梭子蟹 EST 微卫星丰度为 11.0% (287/2612)。核心序列为二核苷酸至六核苷酸, 重复次数不少于 5 次, 其中 127 个 (44.3%) 微卫星位点属于没有插入删除或错配的完美型微卫星位点。

2.2 微卫星的类型

三疣梭子蟹 EST 微卫星位点主要为二核苷酸重复序列, 287 个微卫星位点中共有 173 个位点为二核苷酸重复序列, 占总数的 60.3%; 其次为三核苷酸重复序列, 共有 79 个位点, 占总数的 27.5%; 四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复序列则出现较少 (图 1)。微卫星位点核心序列重复次数的分析显示, 大多数位点的重复次数为 10 ~ 30, 占总数的 68.3%。随重复次数的增高, 位点数依次减少。平均重复次数为 25 次 (图 2)。在二核苷酸重复类型中, 出现最多的是 AC/GT 类

型,共有 93 个位点,占总数的 53.8%;其次为 AG/CT 类型,共 64 个位点,占总数的 37.0%;而 AT 与 GC 类型均较少出现(图 3)。

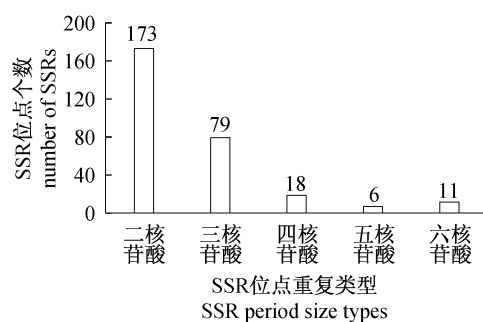


图 1 微卫星位点类型(核苷酸碱基数目)分布

Fig. 1 Distribution of microsatellite types (based on period size)

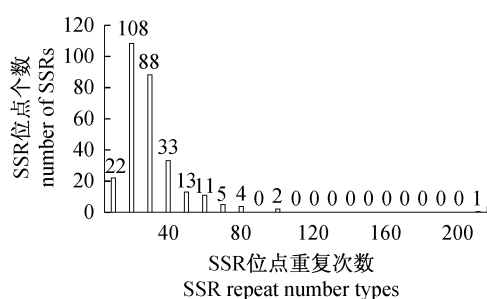


图 2 微卫星位点类型(重复次数)分布

Fig. 2 Distribution of microsatellite types (based on repeat number)

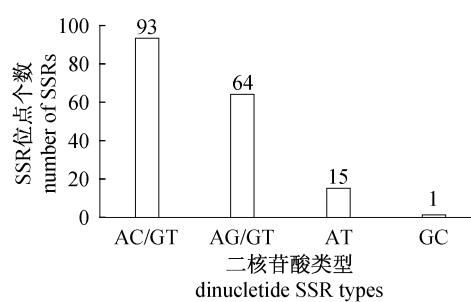


图 3 二核苷酸型微卫星位点碱基类型分布

Fig. 3 Distribution of dinucleotide microsatellites

2.3 微卫星的多态性检测

选取 14 个完美型二核苷酸重复序列微卫星位点进行多态性检测,所选位点核心序列重复次数在 11~67 次之间(表 1)。在三疣梭子蟹胶州湾野生群体(30 只)中的多态性检测结果显示,9 个座位获得清晰扩增条带(图 4),其中 8 个座位呈现多态性,占检测位点总数的 57.1%(图 5)。8 个多态性位点在测试群体中共检测到 33 个等位基因,位点平均等位基因数为 4.13。这些多态性位点的平均多态信息含量(PIC)、平均遗传杂合度(H)和平均有效等位基因数(N_e)分别为 0.57、0.63 和 3.1,其中 6 个位点的 PIC 值都大于 0.5,呈现高度多态性特征(表 2)。利用 SPSS 13.0 软件对所选位点核心序列重复次数和 PIC 值进行相关性分析,结果显示所选位点核心序列重复次数与 PIC 值不存在相关性($P > 0.05$)。

表 1 微卫星位点遗传参数

Tab. 1 Genetic values of all loci

位点 locus	平均等位 基因数 average allele (N_a)	平均有效 等位基因数 average effective numbers of allele(N_e)	平均观测 杂合度 average observed heterozygosity (H_o)	平均期望 杂合度 average expected heterozygosity (H_e)	平均多态 信息含量 polymorphic information content (PIC)	所在 EST 的 NCBI 注册号 NCBI registration number of EST
pt_576	3.00	2.67	0.59	0.64	0.55	GW400405.1;GW399381.1
pt_291	4.00	3.69	1.00	0.74	0.68	GT558331.1;GT557654.1
pt_514	5.00	4.33	0.96	0.79	0.73	GE468116.1;GE46819.1
pt_568	2.00	1.22	0.20	0.18	0.16	GE468127.1;GW400771.1
pt_634	4.00	2.61	1.00	0.63	0.54	GW399475.1;GW399413.1
pt_882	5.00	3.75	1.00	0.75	0.69	GT558359.1;GE342936.1
pt_902	3.00	2.16	0.72	0.55	0.43	GT557237.1;GT557589.1
pt_907	7.00	4.43	0.92	0.79	0.74	GT564028.1;GT564520.1
pt_339	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	GW397803.1;GW401893.1

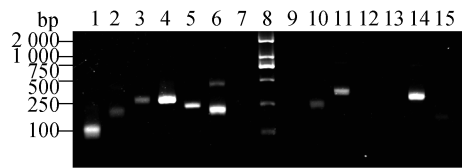


图 4 所选 14 个 I 型微卫星标记的琼脂糖电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis for

14 type I microsatellite markers

1. pt_568; 2. pt_514; 3. pt_907; 4. pt_902; 5. pt_339; 6. pt_882; 7. pt_297; 8. DL_2000; 9. pt_42; 10. pt_337; 11. pt_291; 12. pt_586; 13. pt_898; 14. pt_576; 15. pt_634.

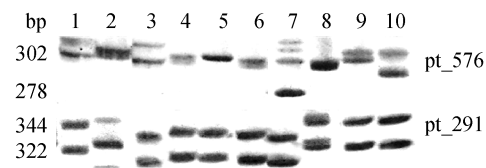


图 5 两个 I 型微卫星在 10 个个体中的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 5 Polyacrylamide gel electrophoresis for 2 microsatellite markers in the 10 individuals

表 2 多态性检验的微卫星位点

Tab. 2 Microsatellite sites selected for polymorphism estimation

位点 locus	注释 annotation	重复类型 (type) no.	正向引物 forward primer	反向引物 reverse primer	长度/bp length	退火温度/°C annealing temperature
pt_514	None	(AC) ₂₉	ATGCAGTGAATGGAGATCA	TTCTCAATAGCTTTTATTGTAGC	197	51
pt_568	None	(CA) ₂₇	GACCAACAGGCGACCGAG	AGCCGCTTCCCGAGATTC	124	59
pt_907	None	(TG) ₂₁	CGGTAAGATCACCACAAC	CAGAAAGAAAATCAAGCA	264	47
pt_902	None	(GT) ₂₀	CAAAGGCAGCAGCACCAG	ATGCAGCCAGAGGGAACG	296	58
pt_339	None	(TC) ₁₆	CACTAGGAAAAGGAACGG	TCACGAAAGACTGGAGACA	248	50
pt_882	c-reactive protein-1	(TG) ₁₃	AAGACCCCGAGGAAGAGC	GCAAGGCATATCCAACAT	193	53
pt_297	None	(TGC) ₁₁	GTCTTCGCCTTAGTCAGT	TCTTTATTGTTCCTCAAAG	262	47
pt_42	cytochrome c oxidase subunit i	(CT) ₆₇	AAAGCTCGTATGACGTTTC	AATTTGAGTGCCATGAAGA	267	50
pt_337	None	(AC) ₅₀	TGCCTGTTTTTCATTTATTTTC	GATTAAGATTTGTAACTTTGGTG	216	50
pt_291	hypothetical protein	(AC) ₄₁	ATATTTTGCTACCTTTTCGA	CACCCTGACAATCTATGGC	344	51.5
pt_586	None	(GA) ₃₆	CTGAACAGTGGGAGAAATG	CTATAGGCAAGGGTAACGA	249	50
pt_898	c-type lectin domain family 2 member a-like	(AC) ₃₅	CAGACAAGGTGCAAAGTCA	CAACAACCACGGCAAAGC	332	54
pt_576	None	(AG) ₃₄	CCATTGCCATCACCATCA	TGTGCGTGACTTTGCGAC	302	55.5
pt_634	None	(CA) ₃₃	TCAATAAAGTTTCAGCGTGT	TTGCCTGTTTGTATGTGC	173	52.5

3 讨论

I 型微卫星标记作为具有应用前景的分子标记,相比其他分子标记而言具有自身独特的优点,已被应用于水生生物研究的多个领域^[26]。本研究利用 NCBI 数据库中已公开的三疣梭子蟹 EST 序列,结合基于 Windows 系统的生物信息分析软件,大量发掘三疣梭子蟹 I 型微卫星标记,并利用胶州湾野生群体三疣梭子蟹材料对其进行多态性检验,为三疣梭子蟹 I 型微卫星标记更好的发掘和利用提供依据和参考。

3.1 三疣梭子蟹 EST 序列微卫星丰度及特征分析

本研究的数据显示,三疣梭子蟹 EST 中微卫星位点的丰度为 11.0%。与相关研究资料比较发现,三疣梭子蟹 I 型微卫星位点的丰度和一些

水产动物的丰度非常相似,如草鱼为 10.6%^[12],河豚(*Fugu rubripes*)为 11.5%^[27],斑节对虾为 13.7%^[11];但与另外一些水产动物的丰度存在显著差异,如中国明对虾为 2.2%^[16],海湾扇贝为 3.9%^[18]。这表明水生生物 EST 序列中 I 型微卫星的丰度具有较高的物种特异性。

对三疣梭子蟹 I 型微卫星标记的特征分析发现,二核苷酸重复类型的分布最为丰富,占总数的 60.3%,其次为三核苷酸重复序列,四、五、六核苷酸重复位点较少。一般认为,动物 I 型微卫星以二核苷酸重复类型为主,而大多数植物的 I 型微卫星则以三核苷酸重复类型为主^[28-29]。在二核苷酸重复位点中,AC/GT 重复位点最为丰富,AG/CT 重复次之,AT 和 GC 重复较少。这一研究结果同宋来鹏等^[21]对三疣梭子蟹基因组微卫

星特征分析的研究结果非常相似,说明在三疣梭子蟹中, I 型微卫星标记和 II 型微卫星标记具有相似的特征。

3.2 三疣梭子蟹 I 型微卫星标记多态性分析

本实验挑选 14 个微卫星标记进行多态性分析,其中 9 个座位成功扩增出清晰的目的条带,其余 5 个未得到清晰条带。相似的结果也在凡纳滨对虾和中国明对虾中发现^[16-17],这种现象一般认为是由于所设计的引物在基因组上跨过内含子所造成^[16]。用这 9 个 I 型微卫星在含 30 只胶州湾野生三疣梭子蟹的群体中进行多态性检测结果显示:8 个微卫星为多态,平均多态信息含量(PIC)为 0.57,呈现较高多态性特征。本结果同韩智科等^[22]通过富集文库法发掘 II 型微卫星标记和崔朝霞^[23]等通过 EST 数据发掘 I 型微卫星标记在三疣梭子蟹野生群体中进行多态性检测的结果大致相似,所检测的多态微卫星标记大多呈现较高的多态性。本实验中多态微卫星的比例(57.1%)显著高于以上两研究的结果(29.6%和 25.8%),然而在平均多态信息含量上,本实验结果均低于以上研究结果(分别为 0.81 和 0.78)。造成这一结果的原因可能有三点:第一,不同实验采用不同的三疣梭子蟹群体,不同群体间遗传多样性可能会有差别;第二,不同实验选用的微卫星标记重复类型以及重复次数不同,而这些微卫星序列特征与多态性相关;第三,由于 I 型微卫星引物来自高度保守的 DNA 转录区,其揭示的多态性在理论上应低于基因组微卫星标记^[30]。

另外,实验对核心序列重复次数和 PIC 值进行相关性分析,发现所选三疣梭子蟹 I 型微卫星标记核心序列重复次数与多态性信息含量不相关。类似结果在中国明对虾中也曾报道^[31]。一般认为微卫星位点的重复拷贝数目影响位点多态性,重复次数高的微卫星在种群中会表现出较高的多态性^[32]。本结果与这一理论不符,推测有以下两个原因:第一,所选位点较少,可能无法代表所有位点的特征;第二,所选座位的重复次数在 15~55 次之间,并没有涵盖更低或更高的重复次数,并且重复次数也不具连续性,因此,只能代表部分重复次数与 PIC 值之间的相关性结果。

感谢中国海洋大学贾舒雯同学在本实验中给予的帮助;感谢上海海洋大学隋延鸣同学在实验

材料收集上给予的支持。

参考文献:

- [1] 李莉好,喻达辉. 微卫星 DNA 标记在水产养殖中的应用[J]. 水利渔业,2007,27(5):23-25.
- [2] Chen X, Salamini F, Gebhardt C. A potato molecular-function map for carbohydrate metabolism and transport [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001,102(2-3):284-295.
- [3] Thiel T, Michalek W, Varshney R K, et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003,106(3):411-422.
- [4] Cordeiro G M, Casu R, McIntyre C L, et al. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum [J]. *Plant Science*, 2001, 160(6):1115-1123.
- [5] Sha Z X, Luo X H, Liao X L, et al. Development and characterization of 60 novel EST-SSR markers in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* [J]. *Journal of Fish Biology*, 2011,78(1):322-331.
- [6] Bai J, Li Q, Cong R H, 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.
- [7] Ye H, Wang X Q, Gao T X, et al. EST-derived microsatellites in *Pseudosciaena crocea* and their applicability to related species [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2010,29(6):83-91.
- [8] Zhao C, Li Q. Expressed sequence tag-derived microsatellite markers for the zhikong scallop (*Chlamys farreri*) and their utility in two other scallop species [J]. *Aquaculture Research*, 2008, 39(5):557-560.
- [9] Wang D, Liao X L, Cheng L, et al. Development of novel EST-SSR markers in common carp by data mining from public EST sequences [J]. *Aquaculture*, 2007,271(1-4):558-574.
- [10] Wang Y P, Guo X M. Development and characterization of EST-SSR markers in the eastern oyster *Crassostrea virginica* [J]. *Marine Biotechnology*, 2007,9(4):500-511.
- [11] Maneeruttanarungroj C, Pongsomboon S, Wuthisuthimethavee S, et al. Development of polymorphic expressed sequence tag-derived

- microsatellites for the extension of the genetic linkage map of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Animal Genetics*, 2006, 37 (4): 363 - 368.
- [12] 李偲,刘航,黄容,等. 草鱼 I 型微卫星标记的发掘及其多态性检测[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(4): 681 - 687.
- [13] Serapion J, Kucuktas H, Feng J, *et al.* Bioinformatic mining of type I microsatellites from expressed sequence tags of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2004, 6(4): 364 - 377.
- [14] Westgaard J I, Tafese T, Wesmajervi MS, *et al.* Development of ten new EST-derived microsatellites in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) [J]. *Conservation Genetics*, 2007, 8(6): 1503 - 1506.
- [15] Vasemägi A, Nilsson J, Primmer C R. Expressed sequence tag-linked microsatellites as a source of gene-associated polymorphisms for detecting signatures of divergent selection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2005, 22(4): 1067 - 1076.
- [16] Wang H, Li F, Xiang J. Polymorphic EST-SSR markers and their mode of inheritance in *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Aquaculture*, 2005, 249(1 - 4): 107 - 114.
- [17] 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.
- [18] Romano C, Roberts S. Development of EST-SSR markers for the bay scallop, *Argopecten irradians* [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2005, 24 (2): 673 - 673.
- [19] Li R H, Li Q, Cornette F, *et al.* Development of four EST-SSR multiplex PCRs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and their validation in parentage assignment [J]. *Aquaculture*, 2010, 310 (1 - 2): 234 - 239.
- [20] 薛俊增, 堵南山, 赖伟, 等. 中国三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* Miers 的研究 [J]. *东海海洋*, 1997, 15(4): 60 - 65.
- [21] 宋来鹏, 刘萍, 李健, 等. 三疣梭子蟹基因组微卫星特征分析 [J]. *中国水产科学*, 2008, 15 (5): 738 - 744.
- [22] 韩智科, 刘萍, 李健, 等. 三疣梭子蟹多态性微卫星 DNA 标记的筛选及评价 [J]. *渔业科学进展*, 2012, 33(1): 72 - 78.
- [23] Cui Z X, Liu Y, Wang H X, *et al.* Isolation and characterization of microsatellites in *Portunus trituberculatus* [J]. *Conservation Genetics Resources*, 2012, 4(2): 251 - 255.
- [24] Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences [J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(2): 573 - 580.
- [25] 戴艳菊, 刘萍, 高保全, 等. 三疣梭子蟹 4 个野生群体线粒体 16S rRNA 和 CO I 基因片段的比较分析 [J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2010, 40 (3): 54 - 60.
- [26] 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 [J]. *水产科学*, 2010, 29 (5): 302 - 306.
- [27] Edwards Y J K, Elgar G, Clark M S, *et al.* The identification and characterization of microsatellites in the compact genome of the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*: perspectives in functional and comparative genomic analyses [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 278(4): 843 - 854.
- [28] Chen C, Zhou P, Choi Y A, *et al.* Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 112 (7): 1248 - 1257.
- [29] Kantety R V, La Rota M, Matthews D E, *et al.* Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat [J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 48 (5 - 6): 501 - 510.
- [30] 段惠生, 张安盛, 赵传志, 等. 西花蓟马 EST-SSR 信息分析、标记筛选及其与 Genomic-SSR 的多态性比较 [J]. *昆虫学报*, 2012, 55(6): 634 - 640.
- [31] 高焕, 于飞, 栾生, 等. 中国明对虾基因组微卫星重复单元类型与其多态性关系 [J]. *水生生物学报*, 2009, 33(1): 94 - 102.
- [32] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n · (dG-dT)_n polymorphisms [J]. *Genomics*, 1990, 7 (4): 524 - 530.

Identification of type I microsatellite markers and their polymorphism in *Portunus trituberculatus*

LÜ Jianjian, WANG Yu, GAO Baoquan, LI Jian*, LIU Ping

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: In the present study, type I microsatellites of *Portunus trituberculatus* were screened from 13 985 ESTs in the NCBI database by bioinformatics approach. A total of 287 type I microsatellites were identified, among which 173 were the type of dinucleotide repeat being the most abundant microsatellite and accounting for 60.3% of the identified microsatellite markers, and 79 were the type of trinucleotide accounting for 27.5%, while hexa-, penta- and tetra-nucleotide repeats were rare. Among the dinucleotide repeats, AC/GT was the most abundant type with percentage of 53.8%, followed by the AG/CT type with 37.0%, while AT and GC were rare. 14 microsatellites were selected for polymorphism analyses, 8 of them showed polymorphism in a wild population of *P. trituberculatus*. The mean PIC and heterozygosity values were 0.57 and 0.63, respectively. Among them, 6 PIC of microsatellites greater than 0.5, showing high polymorphism. This study showed that the way of screening type I microsatellite markers from EST data was feasible. These type I microsatellites can be used for further study in genetic diversity, genetic mapping and quantitative trait loci (QTLs) identification in *P. trituberculatus*.

Key words: *Portunus trituberculatus*; microsatellite; polymorphism information content (PIC)

Corresponding author: LI Jian. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn