

基于转录组测序的圆口铜鱼微卫星标记筛选

李学梅, 吴兴兵, 杨德国, 朱永久

(中国水产科学院长江水产研究所, 农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室, 湖北 武汉 430223)

摘要:分析圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)的遗传多样性,可为其人工繁殖家系鉴别、分子标记辅助育种及长江上游珍稀特有鱼类的种质资源保护提供理论依据和技术支撑。以室内循环水养殖的圆口铜鱼为研究对象,提取其肝脏 RNA,通过 Illumina HiSeq™ 2000 高通量测序平台进行转录组测序,利用 MISA 软件对测序获得的 unigene 进行微卫星(SSR)位点挖掘和特征分析,设计 SSR 位点引物并进行验证。结果显示,圆口铜鱼转录组测序共获得 80 688 条 unigene,通过查找获得 34 155 个 SSR 位点,分布在 25 947 条序列上,发生率为 32.2%。圆口铜鱼 SSR 中主要重复单元类型为单碱基和二碱基,其中 A/T 和 AC/GT 为优势单碱基和二碱基重复单元,占总 SSR 数量的 57.2%和 19.7%。SSR 重复数在 5~60 次,其中有 40.3%的 SSR 序列集中在 11~15 次;SSR 序列长度变化显著,单碱基至六碱基重复类型的总体长度在 11~101 bp,其中 12~35 bp 序列长度占 78.8%。随机选取 50 个 SSR 位点合成引物对 9 尾圆口铜鱼样本进行 PCR 扩增验证,可稳定扩增出目的条带的有 40 对引物,其中 16 对具有多态性,证明了通过转录组测序开发圆口铜鱼 SSR 标记的可行性。

关键词:圆口铜鱼;转录组测序;微卫星标记

中图分类号:Q781 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2021)04-0097-07

圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)隶属鲤形目(Cypriniformes)、鮡亚科(Gobioninae)、铜鱼属(*Coreius*),主要分布在长江上游水域,是当地重要的经济鱼类和主要捕捞对象,也是长江上游珍稀特有鱼类保护区指标性物种(丁瑞华,1994)。近年来,随着水电开发和过度捕捞对生态环境的影响,圆口铜鱼产卵场遭到破坏、洄游通道被阻断,其种群资源量急剧下降,物种生存面临巨大威胁,2016 年被列入极危(CR)等级(蒋志刚等,2016)。因此,加强圆口铜鱼种群资源保护和恢复工作已极为迫切(陈桂来和张薪,2011)。目前,增殖放流被认为是水生生物资源保护和水域生态保护的主要途径,也是保护珍稀濒危鱼类的有效措施之一(李继龙等,2009;姜亚洲等,2014)。

为突破圆口铜鱼的人工繁殖技术难关并建立人工种群,已开展了多方面的研究,主要包括生殖与发育(张贤芳等,2005)、生理生化(孙宝柱等,2010)、种群生物学(杨志,2009;周灿等,2010)、人工驯养

(朱挺兵等,2015a)、应激缓解(赵建华,2014;朱挺兵等,2015b)、食性(刘飞等,2012)等。本项目组已于 2014 年突破了圆口铜鱼人工繁殖技术难关,并建立了循环水养殖系统与人工繁育技术体系。因此,建立分子辅助育种技术,对循环水系统的圆口铜鱼亲本种质进行鉴定,既可避免近亲繁殖,提高育种效率,同时也可以长期保存那些具有优良性状的种质资源。

微卫星(Simple sequence repeats, SSR)是用于物种进化、群体遗传变异和遗传多样性分析及种间关系鉴定等方面研究的主要分子标记技术之一(陈亮,2017;林婷婷,2017)。廖小林(2006)首次通过构建基因组富集文库分离了圆口铜鱼多态性微卫星标记;之后,多位学者通过传统方法筛选微卫星标记,并分析了长江宜宾江段、金沙江观音岩段野外圆口铜鱼群体(徐树英等,2007;王伟等,2015)及其人工繁殖家系群体的遗传多样性(何勇凤等,2019);但尚未见通过高通量测序技术分析圆口铜鱼转录组 SSR 位点分布及特征报道。本研究利用圆口铜鱼转录组测序数据筛选 SSR 序列,分析其碱基重复类型与序列分布特征,设计 SSR 引物并筛选其多态性位点,旨在为圆口铜鱼遗传多样性分析和人工繁殖家系鉴别等提供技术支撑,也为这一珍稀特有鱼类的种质资源保护提供更多基础资料。

收稿日期:2019-11-07 修回日期:2020-12-21

基金项目:国家重点研发计划项目(No.2019YFD0900603);财政部和农业农村部-国家现代农业产业技术体系专项资金(CARS-46);院级基本科研业务经费(2020TD57)。

作者简介:李学梅,1985 年生,女,副研究员,主要从事水产健康养殖研究。E-mail: lanqian1985@163.com

通信作者:朱永久。E-mail: zhuyj@yfi.ac.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

2017年9月,在中国水产科学院长江水产研究所循环水养殖系统养殖桶里随机捞取3尾圆口铜鱼亲本,平均体重(524.20 ± 20.80) g;3尾圆口铜鱼子代,平均体重(19.30 ± 0.12) g;亲本为已成熟的后备亲鱼,子代为2016年6月人工繁殖获得。将鱼麻醉后,在低温条件下解剖,取肝脏液氮速冻后, -80°C 保存备用。

1.2 RNA提取和转录组测序

将肝脏样本置于液氮预冷的研钵中,边加液氮边研磨至粉末状,混合后使用RNA Purification Reagent(Invitrogen)试剂盒对肝脏组织总RNA进行抽提,1%琼脂糖电泳检测总RNA的完整性,通过Nanodrop 2000核酸检测仪检测总RNA的浓度和纯度。样品检测合格后,以总RNA为模板,使用TruseqTM RNA sample prep Kit(Illumina)试剂盒构建cDNA文库,然后进行转录组测序,由明科生物技术(杭州)有限公司完成。

1.3 转录组拼接组装

原始数据需过滤以控制序列的质量。过滤原则如下:(1)去除reads中的接头序列,去除由于接头自连等原因导致没有插入片段的reads;(2)将序列末端(3'端)质量较低(<20)的碱基修剪掉,如剩余序列中仍然有质量值小于10的碱基,则将整条序列剔除,否则保留;(3)去除含N超过10%的reads;(4)舍弃去adapter及质量修剪后长度小于70bp的序列,同时计算 Q_{20} 和 Q_{30} 含量及重复序列水平,后续分析均在清洁数据基础上进行。所获得的数据利用Trinity软件进行拼接组装。

1.4 SSR分析方法和引物设计

SSR位点搜索主要是通过MISA软件(<http://pgrc.ipkgtatersleben.de/misa/>)进行,搜索转录组组装后unigene数据中的潜在SSR位点,软件中参数设置为单碱基、二碱基、三碱基、四碱基、五碱基、六碱基的最短重复次数分别为11、6、5、5、5、6。利用Primer 3.0软件设计SSR位点的相关引物,在数据库中随机选取50对引物对圆口铜鱼基因组DNA样品(9尾)进行序列分析,引物合成由明科生物技术(杭州)有限公司完成。

1.5 PCR扩增和产物检测

PCR反应为30 μL 体系:2 \times HOTSTART PCR Mix 15 μL , 25 mM Mg^{2+} 2.0 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$

上游引物 0.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 0.5 μL , 模板DNA 2.0 μL , 加无菌水补足至30 μL 。

PCR反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, T_m 退火30 s(退火温度视情况而定), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s, 进行40个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。通过8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶对PCR产物进行电泳,采用银染法显色定影,测序个体间存在重复差异即为多态性SSR。

2 结果

2.1 转录组测序与统计

通过对圆口铜鱼亲本和子代肝脏样品的转录组测序,发现各样品在测序质控后均获得超过6.00 G数据(表1)。各样品 Q_{30} 的碱基质量值比例均大于94.55%, GC含量区间为45.83%~48.13%,说明测序数据的数量和质量较高。经进一步组装后,共获得80 688条unigene, N_{50} 为683 bp,平均长度为694.8 bp, unigene长度分布主要集中在401~600 bp, 占总unigene的43.56%,随着序列长度的增加, unigene总体呈逐步递减趋势。

表1 圆口铜鱼转录组的测序组装结果

Tab.1 Statistics for the de novo assembled unigenes of *C. guichenoti* transcriptome

长度与数量	拼接序列数/条	占比/%
1~400 bp	22 336	27.7
401~600 bp	35 146	43.6
601~1000 bp	12 381	15.3
1001~2000 bp	7 331	9.1
>2000 bp	3 494	4.3
单基因总数/条	80 688	
平均长度/条	694.8	
N_{50} 长度/bp	683	

2.2 转录SSR位点数量和分布

通过MISA软件对圆口铜鱼转录组测序获得的80 688条unigene的SSR位点进行查找,共获得34 155个SSR位点,分布在25 947条序列上,发生频率与出现频率分别为32.2%和42.3%,包含了复合型SSR位点3 219个和含有1个以上SSR位点6 153个(表2)。

分析搜索到的SSR位点数据,共获得6种主要的SSR重复类型,其中单碱基重复基元占比为58.0%,其次是二碱基重复基元,占总数32.5%,三、四、五和六碱基重复基元数量占比依次减少,分别为6.3%、2.7%、0.4%和0.1%。可见不同SSR重复类型的数量和分布特征变化明显。

表2 圆口铜鱼转录组 SSR 各重复类型分布

Tab.2 Distribution of SSR repeat types in *C. guichenoti* transcriptome

重复类型	SSR 数量/个	占比/%	≥20bp 的数量
单碱基	19 811	58.0	4 179
二碱基	11 108	32.5	4 558
三碱基	2 160	6.3	1 311
四碱基	909	2.7	909
五碱基	137	0.4	137
六碱基	30	0.1	30
总计	34 155	100	11 124

2.3 转录 SSR 重复基元碱基组成

根据碱基互补原则,经统计分析,圆口铜鱼转录组中发掘的 34 155 个 SSR 中共有 101 种重复基元类型,6 种核苷酸重复基元的种类数量分别为 2、4、

10、26、37 和 22 种,SSR 主要重复类型中各重复基元占比见图 1。其中,单碱基重复单元中,A/T 类型最多(19 528),占总数 98.6%,AC/GT 为二碱基的主要类型,占 60.6%,AAT/ATT 为三碱基的主要类型,占 39.1%,四碱基的主要类型为 AAAT/ATTT 和 AGAT/ATCT,分别占 18.5% 和 18.0%;AATAT/ATATT 为五碱基的主要类型,占 21.2%;六碱基重复类型均只有 1 个 SSR。

进一步分析不同碱基类型的优势重复基元在总 SSR 中的分布特征,共发现 5 种类型的优势重复单元,分别为 A/T、AC/GT、AG/CT、AT/AT 和 AAT/ATT,分别占圆口铜鱼转录组总 SSR 数量的 57.2%、19.7%、7.4%、5.3% 和 2.5%(图 2)。

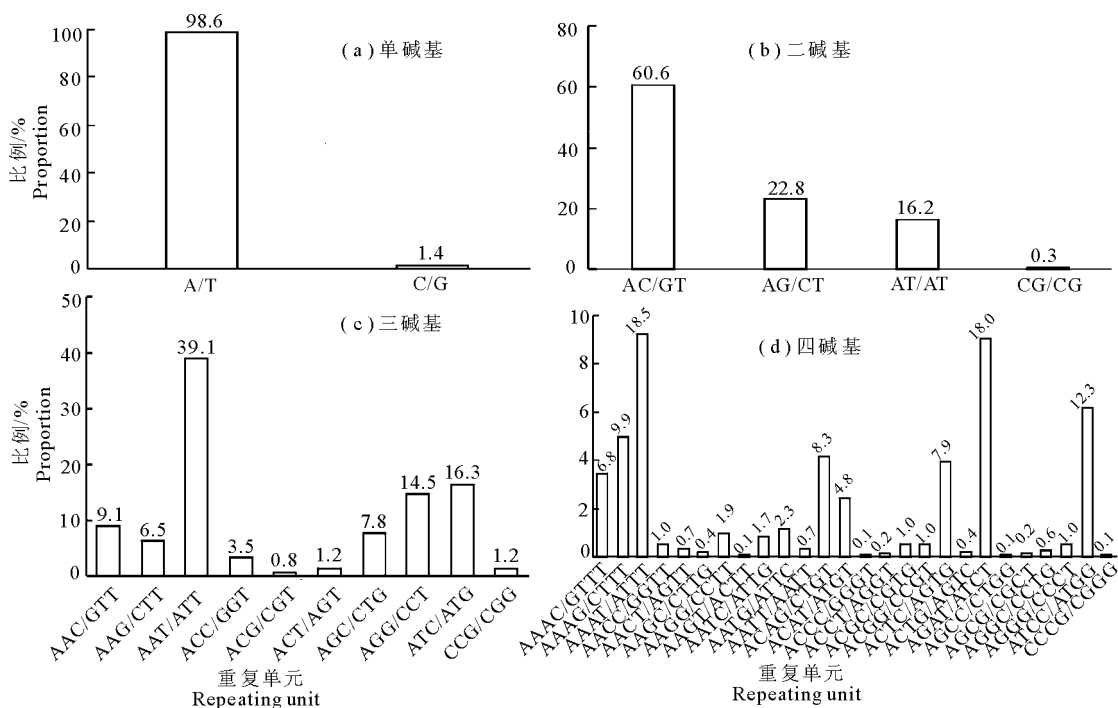


图 1 圆口铜鱼转录组 SSR 主要重复类型中各重复基元占比

Fig.1 Repetitive elementary distribution for each SSR repeat type in *C. guichenoti* transcriptome

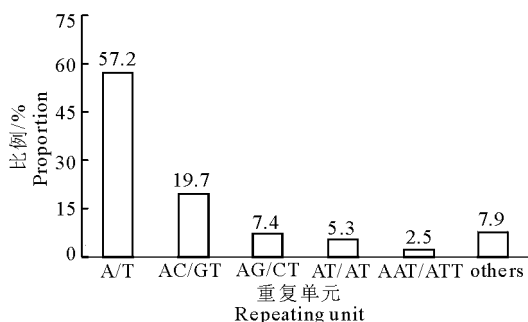


图 2 圆口铜鱼转录组 SSR 中各优势重复基元占比

Fig.2 Dominant repetitive elementary distribution of SSR in *C. guichenoti* transcriptome

2.4 转录 SSR 重复次数和重复长度分布

圆口铜鱼转录组中 SSR 重复单元的重复次数在 5~60 次;其中,11~15 次为主要重复次数,共有 13 766 个 SSR 位点,占总重复单元的 40.3%,5~10 次的占 29.5%,16~20 次的占 16.2%,20 次以上的占 14.0%(图 3-a)。

圆口铜鱼转录组 SSR 序列长度变化显著,从单碱基至六碱基重复类型的总体长度在 11~101 bp,序列长度主要分布在 11~35 bp;其中,11 bp 的 SSR 占总 SSR 数量比例为 9.9%,12 bp 的占 13.5%,13~15 bp 的占 22.7%,16~20 bp 的占

22.3%, 21~35 bp 的占 20.3%, ≥ 35 bp 的 SSR 比例较低, 仅 11.4% (图 3-b)。

2.5 多态性 SSRs 标记序列信息

基于 SSR 位点两端的保守单拷贝序列, 通过 Primer 3.0 软件对圆口铜鱼转录组中的 SSR 位点进行引物设计, 共得到 19 864 对 SSR 引物。随机

选择 50 对引物, 对 SSR 位点的多态性进行验证, 有 40 对引物在检测样品中均能扩增出清晰条带, 其中 16 对引物的扩增产物具有多态性, 部分多态性条带如图 4 所示。具有多态性的 16 对 SSR 引物信息及部分验证结果见表 3。相关的 SSR 引物信息已上传 GenBank, 序列号为 MN905028 - MN905043。

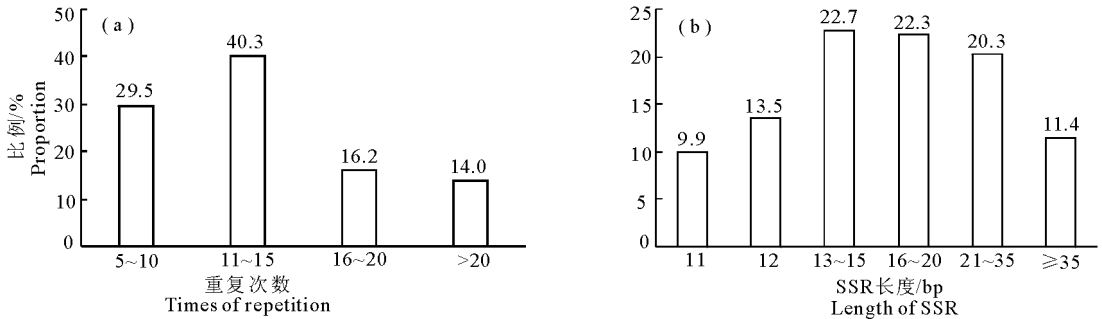


图 3 圆口铜鱼转录组中 SSR 重复次数 (a) 和重复长度 (b) 占比

Fig.3 Distribution of repeat number (a) and length (b) of SSR in *C. guichenoti* transcriptome

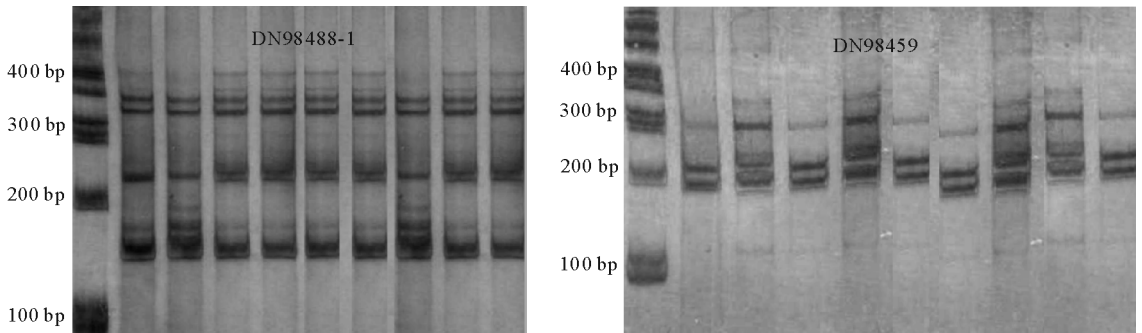


图 4 部分 SSR 引物扩增的带谱

Fig.4 Sequence bands amplified by partial microsatellite primers

3 讨论

高通量测序技术的快速发展, 加快了 DNA 分子标记的开发。传统的 SSR 分子标记筛选一般包括建立、富集、基因组文库测序等步骤, 但费时费力 (袁文成等, 2015)。相比较而言, 基于转录组测序的 SSR 开发技术具有快捷、自动化、开发效率高等优点。近年来, 基于转录组测序获得 SSR 序列并开展其遗传多样性的相关研究已在多种鱼类中进行报道 (Xiao et al, 2015; 岳华梅等, 2016)。因生境破坏、过度捕捞等原因, 圆口铜鱼资源量急剧下降且已被列入极危 (CR) 等级 (蒋志刚等, 2016), 亟需高效的分子标记手段来保护其遗传资源。

3.1 圆口铜鱼 SSR 位点发生频率及种间比较

本研究中, 圆口铜鱼转录组中 SSR 位点的发生频率 (32.2%) 高于已报道的翘嘴鲌 (*Siniperca chuatsi*) (27.51%) (袁文成等, 2015)、斑点叉尾鮰 (*Ictalurus punctatus*) (11.20%) (Serapion et al,

2004)、鲫 (*Carassius auratus*) (8.13%) (杨曦, 2012) 等, 说明其转录组中 SSR 相对比较丰富。发生频率的高低一方面可能是物种间的差异造成, 另外也可能是由 MISA 软件在分析过程中的参数设置不同而引起的差异, 如单碱基重复的筛选标准上, 本研究设定为 ≥ 11 次, 而袁文成等 (2015) 研究翘嘴鲌时设定为 ≥ 16 次。

3.2 圆口铜鱼的碱基重复类型及种间差异

圆口铜鱼转录组 SSR 主要重复类型以单碱基和二碱基重复为主, 与已报道的银鲌 (*Pampus argentatus*) (刘磊等, 2016)、波纹唇鱼 (*Cheilinus undulatus*) (刘洪涛等, 2020) 等结果相似, 但已报道的多数鱼以二碱基和三碱基重复单元为主导类型 (Serapion et al, 2004; 杨曦, 2012; 袁文成等, 2015), 说明圆口铜鱼的进化历程可能较长或者变异频率较高。有学者认为 SSR 中低等重复单元的数量越多, 则表明该物种的进化水平越高 (Dreisigacker et al, 2004)。圆口铜鱼转录组 SSR 单碱基重复

表3 16对多态性SSR引物信息
Tab.3 Information on 16 pairs of polymorphic SSR primers

位点	重复序列	引物序列(5'-3')	退火温度/°C	产物/bp
DN41173	(T) ₁₅	F: AGAAGCAACTCCCTGTGACG R: GGTTGAGTAGCGATGACCCA	60	130
DN41174	(A) ₂₅	F: TGAAACGGATGTGCTGCTGA R: TGGAAGTTTATTTACATTCTTGCTG	60	153
DN15154	(T) ₁₃	F: TGGAGTCTATGTGGTTGAGCT R: TTTACATAGAGCGGGTGGCC	60	263
DN15131	(T) ₁₅	F: GCGCGTCATGGATTGTCATG R: ACCGACAAACCCGTTTCGTAA	65	209
DN15190	(T) ₂₀	F: GTGCAGCGTTTCCAAGACAA R: GCAGTCTGCACATTTTGGC	65	225
DN15143	(A) ₁₄	F: AGCCTGTCTTTCACCTCTGC R: GGAGCTGCAGTGACCTCATC	60	191
DN98463	(A) ₁₂	F: TCGGCTTAATGTTTTTCTCAGAACC R: ACAGACGCTGTACAGACACT	60	279
DN98475-2	(T) ₁₁	F: TGCTTTGTCAATGGAGGAGAGA R: GAGTTTGTCTGTTGCCAATACGA	60	275
DN98475-3	(T) ₁₁	F: TGACAGTAGTGTTCTGTGCC R: GCAAGCAGCAATGTAGGGC	60	107
DN98475-5	(T) ₁₅	F: ACCCATGTGTCCTCATAAACC R: TACCCTGAGACCCTTCTGG	65	116
DN98488-1	(TAA) ₅	F: AACGCGACAACCTGCTTGTC R: CTGCCGTTGTGAATCCAACG	60	209
DN98454	(T) ₁₈	F: CGCTTACTTGAGGAGGCTCC R: CCCACCTACTACCCCATGA	60	191
DN98459	(AT) ₈	F: CCTCACTGGCCTTTGTTTTGG R: GACCCATAGAGGAGAGGGCA	65	270
DN98446	(T) ₁₈	F: GTGGCTCATTTCCCTCTC R: CCCACAATGCAAAGCTCTCG	65	242
DN98453-2	(CAT) ₉	F: TCCAGTTATCCTTTGCCGAAAC R: AGGCATGTTACTCGCACACA	60	146
DN98418	(A) ₂₂	F: AGTTCGAGTCTGGCTTGTG R: AAAATCATGTAAAAATGCAAGTATGA	60	150

类型中以 A/T 类型为主,二碱基重复中以 AC/GT 为主,这与团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)和斑点叉尾鲴的单碱基和二碱基优势重复单元相似(Serapion et al, 2004);但因受物种的种间差异影响,其他碱基类型优势重复单元的种间差异较大。

3.3 重复次数是影响 SSR 位点多态性的重要因素

Thao 等(2013)研究认为,当 SSR 重复次数高于 12 次以上时,多态位点的比例较高。圆口铜鱼转录组 SSR 重复次数集中在 11~15 次(40.3%),说明其转录组 SSR 具有较高的多态性潜能;另外,片段长度多态性也是影响 SSR 多态性的另一个主要因素,有研究指出,长度大于或等于 20 bp 的 SSR 多态性较高,12~20 bp 的 SSR 多态性中等,而长度在 12 bp 以下 SSR 多态性极低(Xiao et al, 2015)。本研究中,圆口铜鱼 SSR 长度 12 bp 以上的序列占 90.1%,而大于 20 bp 以上的仅占 31.7%(图 3-b),再次说明了圆口铜鱼转录组 SSR 具有较高的多态

性,可进行后续分子标记研究。

3.4 转录组用于圆口铜鱼 SSR 标记具有可行性

通过软件对圆口铜鱼转录组中的 SSR 位点进行引物设计,共得到 19 864 对 SSR 引物。随机选取 50 对引物对 9 尾圆口铜鱼样本基因组 DNA 进行验证,共有 40 对引物能够扩增出目的片段,其中 16 对引物检测出具有多态性的 SSR 位点,说明初步开发的 16 对引物可用于圆口铜鱼的群体遗传背景分析;同时,本研究也证实了通过转录组测序技术开发圆口铜鱼 SSR 标记的可行性。

综上所述,圆口铜鱼转录组中 SSR 位点发生频率较高(32.2%),重复单元类型丰富,重复次数集中在 11~15 次,90%以上的序列长度大于 12 bp,说明圆口铜鱼转录组中 SSR 具有较高的特异性和多态性潜能,PCR 扩增也验证其具有多态性。该结果为圆口铜鱼进一步遗传多样性分析、人工繁殖家系鉴别及珍稀特有鱼类的种质资源保护提供技术支撑。

参考文献

- 陈亮, 2017. 长鳍吻鮠微卫星亲子鉴定技术研究[D]. 上海: 上海海洋大学.
- 陈桂来, 张薪, 2011. 圆口铜鱼的生物学特征及疾病防治技术[J]. 吉林农业, (4): 289, 298.
- 丁瑞华, 1994. 四川鱼类志[M]. 成都: 四川科学技术出版社.
- 何勇风, 朱永久, 吴兴兵, 等, 2019. 基于微卫星标记的圆口铜鱼亲子鉴定技术[J]. 水生生物学报, 43(6): 1216 - 1223.
- 姜亚洲, 林楠, 杨林林, 等, 2014. 渔业资源增殖放流的生态风险及其防控措施[J]. 中国水产科学, 21(2): 413 - 422.
- 蒋志刚, 江建平, 王跃招, 等, 2016. 中国脊椎动物红色名录[J]. 生物多样性, 24(5): 500 - 501.
- 李继龙, 王国伟, 杨文波, 等, 2009. 国外渔业资源增殖放流状况及其对我国的启示[J]. 中国渔业经济, 27(3): 111 - 123.
- 廖小林, 2006. 长江流域几种重要鱼类的分子标记筛选开发及群体遗传分析[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所.
- 林婷婷, 2017. 大刺鲃(*Mastacembelus armatus*)微卫星标记开发及野生群体遗传多样性分析[D]. 广州: 广州大学.
- 刘飞, 但胜国, 王剑伟, 等, 2012. 长江上游圆口铜鱼的食性分析[J]. 水生生物学报, 36(6): 1081 - 1086.
- 刘洪涛, 刘金叶, 杨明, 等, 2020. 基于转录组测序的波纹唇鱼 SSR 和 SNP 多态特征分析[J]. 基因组学与应用生物学, (6): 2451 - 2461.
- 刘磊, 彭士明, 高权新, 等, 2016. 基于银鲟 RNA-seq 数据中 SSR 标记的信息分析[J]. 安徽农业科学, 44(28): 102 - 105.
- 孙宝柱, 黄浩, 曹文宣, 等, 2010. 厚颌鲂和圆口铜鱼耗氧率与窒息点的测定[J]. 水生生物学报, 34(1): 88 - 93.
- 王伟, 周琼, 张沙龙, 等, 2015. 金沙江观音岩段圆口铜鱼的微卫星遗传多样性分析[J]. 淡水渔业, 45(6): 22 - 26.
- 徐树英, 张燕, 汪登强, 等, 2007. 长江宜宾江段圆口铜鱼遗传多样性的微卫星分析[J]. 淡水渔业, 37(3): 76 - 79.
- 杨曦, 2012. 鲫鱼(*Carassius auratus*)表达序列标签资源的 SSR 构成与分布分析[J]. 生物技术通报, (11): 139 - 143.
- 杨志, 2009. 长江中上游圆口铜鱼种群生物学研究[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所.
- 袁文成, 黄鹤忠, 李文龙, 等, 2015. 翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*)转录组 EST-SSR 位点的信息分析及其多态性检测[J]. 海洋与湖沼, 46(2): 403 - 409.
- 岳华梅, 翟晴, 宋明月, 等, 2016. 基于转录组测序的兴国红鲤微卫星标记筛选[J]. 淡水渔业, 46(1): 24 - 28.
- 张贤芳, 张耀光, 甘光明, 等, 2005. 圆口铜鱼卵巢发育及卵子发生的初步研究[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 27(6): 892 - 897.
- 赵建华, 2014. 圆口铜鱼应激生理机制及缓解策略研究[D]. 武汉: 华中农业大学.
- 周灿, 祝茜, 刘焕章, 2010. 长江上游圆口铜鱼生长方程的分析[J]. 四川动物, 29(4): 510 - 516.
- 朱挺兵, 吴兴兵, 朱永久, 等, 2015a. 封闭循环水系统和船体网箱驯养圆口铜鱼幼鱼的效果比较[J]. 淡水渔业, 45(6): 97 - 101.
- 朱挺兵, 李飞, 吴兴兵, 等, 2015b. 电麻醉对圆口铜鱼幼鱼行为及血液生化指标的影响[J]. 四川动物, 34(6): 885 - 888.
- Dreisigacker S, Zhang P, Warburton M L, et al, 2004. SSR and pedigree analyses of genetic diversity among CIM-MYT wheat lines targeted to different megaenvironments[J]. Crop Science, 44(2): 381 - 388.
- Serapion J, Kucuktas H, Feng J, et al, 2004. Bioinformatic mining of type I microsatellites from expressed sequence tags of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Marine Biotechnology, 6(4): 364 - 377.
- Thao D V, Yamashita M, Watanabe A, et al, 2013. Development of tetranucleotide microsatellite markers in *Pinus kesiya* Royle ex Gordon [J]. Conservation Genetics Resources, 5(2): 405 - 407.
- Xiao T Q, Lu C Y, Xu Y L, et al, 2015. Screening of SSR markers associated with scale cover pattern and mapped to a genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Journal of Applied Genetics, 56(2): 261 - 269.

(责任编辑 万月华)

Development of Microsatellite Markers for *Coreius guichenoti* Based on Transcriptome Sequencing

LI Xue-mei, WU Xing-bing, YANG De-guo, ZHU Yong-jiu

(Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture
of China Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy
of Fishery Sciences, Wuhan 430223, P.R.China)

Abstract: Largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*) belongs to *Coreius*, Gobioninae and Cypriniformes. As an indicator species of rare and endemic fish, *C. guichenoti* is primarily distributed in the upper reaches of the Yangtze River. In this study, RNA was extracted from the liver of *C. guichenoti* cultured in an indoor recirculating aquaculture system, and transcriptome sequencing was conducted using the Illumina HiSeq™ 2000 sequencing platform. The simple sequence repeats (SSR) loci were extracted and analyzed by MISA and then SSR loci primers were designed, tested and verified. A total of 80 688 unigenes were obtained from the transcriptome sequencing of *C. guichenoti* and 34 155 SSR loci were obtained, distributed in 25 947 unigenes at a frequency of 32.2%. Mononucleotides and dinucleotides were the primary repeat units and A/T and AC/GT were the dominant repeat units with proportions of 57.2% and 19.7% of the total SSR. The number of SSR repeats ranged from 5 – 60, with 11 – 15 repeats accounting for 40.3%. The length of SSR sequence changed significantly and ranged from 11 – 101 bp, with lengths of 12 – 35 bp accounting for 78.8%. Fifty SSR loci primers were randomly selected and validated in nine *C. guichenoti* samples. Most of the primers (40) amplified well and yielded clear and readable products, and 16 primers were polymorphic, proving that SSR markers of *C. guichenoti* could be developed by transcriptome sequencing. The results provide a theoretical basis and technical guidance for analyzing genetic diversity and molecular marker-assisted breeding of *C. guichenoti*.

Key words: *Coreius guichenoti*; transcriptome sequencing; microsatellite markers