

文章编号:1000-0615(2009)02-0348-09

· 综述 ·

几种养殖扇贝微卫星标记的研究进展

胡景杰, 战爱斌, 胡晓丽, 陆 维, 黄晓婷, 包振民

(中国海洋大学海洋生命学院海洋生物遗传与种质工程实验室, 山东 青岛 266003)

关键词: 栉孔扇贝; 华贵栉孔扇贝; 虾夷扇贝; 海湾扇贝; 微卫星标记

中图分类号: Q 579.1; S 917

文献标识码: A

我国贝类养殖取得了举世瞩目的成就,2007年养殖面积超过 100 万公顷,总产量超过 1 100 万吨。扇贝营养价值高、味美,深受国内外消费者的喜爱,是我国贝类养殖业的主导产品之一。我国扇贝养殖规模占世界首位,据 2005 年统计,养殖扇贝总产量达 103 万吨。栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)和海湾扇贝(*Argopecten irradians*)是我国 4 种主要养殖扇贝。其中,栉孔扇贝主要分布于我国北部沿海、朝鲜和日本沿海;华贵栉孔扇贝分布于日本的本州、四国、九州,我国的东部和南部沿海以及印尼;海湾扇贝和虾夷扇贝是分别从美国和日本引进的^[1]。近年来随着养殖规模的扩大,扇贝养殖出现了个体小型化,品质下降,大面积死亡等问题。据估算 1998 年扇贝病害仅山东省就损失 15~30 亿元。分析扇贝的遗传多样性,对保护和利用资源,建立良种培育体系有重要意义。

随着分子生物学的发展,人们开发了 RAPD、RFLP、AFLP 等标记,由于微卫星(microsatellite)标记有优于其它标记的诸多特点(表 1),在遗传图谱的构建、遗传多样性分析和种质鉴定等方面得到广泛的应用^[2]。

微卫星(microsatellite)DNA,又称短串联重复序列(short tandem repeats, STRs)或简单序列重复(simple sequence repeats, SSRs),是以 1~6

个核苷酸为基本单位(核心序列),首尾相连组成的串联重复序列。根据核心序列排列方式的不同,Weber 等^[3]将微卫星分为完全、不完全和复合型三类。1)完全型微卫星是指核心序列以不间断的重复方式首尾相连构成;2)不完全型微卫星是指在微卫星的核心序列之间有 3 个以下的非重复碱基,但其两端的连续的核心序列重复数大于 3;3)复合型微卫星是指两种或两种以上的串联核心序列由 3 个或 3 个以上连续的非重复碱基分隔开,连续的核心序列重复数不少于 5。由于核心序列的重复数不同,引起了物种间,甚至种内不同个体间微卫星位点的多态性。微卫星核心序列虽然是重复的,但其侧翼序列在基因组中却是以单拷贝形式存在,因此微卫星具有位点特异性。研究表明,不同的物种微卫星的含量和分布各不相同,并且微卫星的重复类型在不同的生物中也差异很大^[4]。在真核生物中,微卫星随机均匀地分布于基因组,间隔为 10~50 kb^[5]。但是,这种随机均匀并不是完全均匀,编码区及非编码区均有分布,对于不同核心序列的重复单元,也存在分布的偏好性和特异性。

本文主要概述我国 4 种主要养殖扇贝微卫星标记开发现状以及在遗传多样性分析、遗传图谱构建、物种鉴定等方面取得的研究成果和应用进展,为微卫星标记在扇贝类遗传学研究提供基础资料。

收稿日期:2008-07-09 修回日期:2008-12-17

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A408);国家科技支撑计划(2006BAD09A09, 2006BAD09A10);农业部公益性行业科研专项(NYHYZX07-47);国家科技基础平台建设项目(2005DKA30470);教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0594)

通讯作者:包振民, Tel: 0532-82031969, E-mail: zmbao@ouc.edu.cn

表 1 RAPD、RFLP、AFLP 和 SSR 分子标记的比较
Tab.1 Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR

	RFLP	RAPD	Microsatellite	AFLP
原理 principle	限制性酶切, Southern 印记,杂交 restriction endonuclease digestion,Southern blot and hybridization	随机引物扩增 DNA amplification of DNA using random primers	扩增微卫星区域 amplification of microsatellite repeats	扩增部分限制性酶切片 amplification of DNA fragments generated by restriction endonuclease digestion
多态性的性质 polymorphism property	单碱基的变化, 插入,缺失 single nucleotide variation, insert or deletion	单碱基的变化, 插入,缺失 single nucleotide variation, insert or deletion	重复区域长度变化 variation in repeat numbers	单碱基的变化, 插入,缺失 single nucleotide variation, insert or deletion
在基因组中的数量 numbers in genome	高 high	很高 extremely high	中等 medium	高 high
多态性的高低	中等 medium	中等 medium	高 high	中等 medium
遗传特点 inheritance pattern	共显性 co-dominance	显性 Dominance	共显性 co- dominance	显性 Dominance
检测的位点数 number of loci detected	1~2 1~2	5~20, 可调整 5~20, adjustable	1 1	30~100, 可调整 30~100, adjustable
检测所需 DNA 量 amount of DNA	2~10 μg 2~10 μg	10~25 ng 10~25 ng	50~100 ng 50~100 ng	1~2 μg 1~2 μg
DNA 质量要求 DNA quality	高 high	中等 medium	低 low	高 high
DNA 序列信息 DNA sequence information	不需要 unnecessary	不需要 unnecessary	需要 necessary	不需要 unnecessary
放射性同位素 radioactive isotope	要/不 yes/no	不 no	不/要 no/yes	要/不 yes/no
使用成本 use cost	高 high	低 low	中等 medium	中等 medium
开发费用 development cost	较高 higher	低 low	高 high	中等 medium
可靠性 reliability	高 high	低 low	高 high	高 high
使用技术难度 technique difficulty	高 high	低 low	低 low	中等 medium

1 扇贝微卫星 DNA 标记的开发

微卫星标记属于特异性标记,其引物开发要在明确物种 DNA 序列的前提下进行,所以开发成本较大。目前从动物基因组中获得微卫星标记的途径有多种^[6],以下方法被用于扇贝微卫星 DNA 标记的开发中。

1.1 从 DNA 数据库中开发

生物信息学技术是微卫星 DNA 分子标记开发的有力工具之一。目前,东方红鳍豚、文昌鱼和海胆等海产动物的全基因组测序已完成,牡蛎等的全基因组测序研究正在进行,积累了大量的基因组序列和表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 数据,NCBI ([http://www.ncbi.nlm.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

[nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl>), DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) 和 GDB (<http://www.gdb.org>) 等数据库为微卫星标记的开发提供了丰富的资源。扇贝的 EST 序列数据明显偏少,仅海湾扇贝和栉孔扇贝分别有 7 057 和 3 335 个 EST 序列在 GenBank 注册。基于生物信息学技术开发 SSR 标记的基本流程包括,从公共基因数据库 (如 EMBL、GenBank 和 DDBJ 等) 下载 DNA 序列 (多为 EST 数据),然后利用相应软件寻找含有 SSR 的序列,最后根据其两端的保守性序列设计 SSR 引物并进行扩增验证。

Roberts 等^[7] 构建了海湾扇贝不同发育时期幼虫、肌肉和生殖腺的 cDNA 文库,测序后在

GenBank 注册了 2 089 个 EST, Song 等^[8] 构建了海湾扇贝成体的 cDNA 文库, 发表了 496 8 个 EST 序列。Zhan 等^[9] 利用自行设计微卫星序列分析软件(Repeat Reporter v1.5), 从 7057 个海湾扇贝 EST 序列中筛查了含有 2~6 个碱基重复的 SSR 的序列, 结果表明 193 个序列含有微卫星序列(占总序列的 2.73%), 其中 71 个可归于 19 个簇, 其余 122 个为独立的序列, 共筛查到 141 个微卫星位点。分析发现, 2、3 碱基的微卫星最多, 占 69.95%, 其他 4、5、6 碱基的微卫星分别占 10.36%, 15.03% 和 4.66%; 有 19 个 EST (9.84%) 包含 2 个以上的微卫星 DNA。TA 为核心序列的微卫星丰富, 占 2 碱基微卫星的 78.48%, GA 为核心序列的次之, 占 15.19%, CA 型仅占 6.33%, 未发现 GC 型的微卫星(图 1)。70 个含 3 碱基 SSR 的 EST 中, 包含了 13 种核心序列类型, 各种类型的比例不同, 其中 ATG 和 AGC 占 27.14%, 而 4、5、6 碱基微卫星的核心序列类型的比例基本相同。通过分析同簇的序列, 还可以观察到不同序列间核心序列的重复数目不同, 即微卫星的长度不同(图 2)。Roberts 等^[10] 设计了 29 对引物, 经 PCR 检测, 8 对不能扩增; 13 对为单态, 8 对能扩增多态位点。每个多态位点有 2~5 个等位基因, 观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)分别为 0.093 0~0.720 0 和 0.095 0~0.600 0。由于缺失杂合子并偏离哈迪-温伯格平衡(HWE), 可以推测 GL23 位点存在无效等位基因。Zhan 等^[11] 选取了 19 个分别含 2~5 个碱基为核心序列的微卫星位点设计引物, 16 对引物能

扩增。利用 30 个个体对引物进行评估, 发现 11 个微卫星位点具多态性, 多态位点的等位基因数为 2~6 个, 平均 3.1, 多态信息含量(PIC)为 0.212 8~0.784 3, 平均 0.508 2。结果证明引物的扩增效率与核心序列(重复单元)的结构及重复数无关。Zhan 等^[9] 还检测了另外 10 对引物, 结果表明多态位点能扩增 3~12 个等位基因, 平均 6.4; 观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)分别为 0.066 7~0.800 0(平均 0.4259)和 0.096 1~0.825 3, 5 个位点符合 HWE 平衡。Li 等^[12] 下载了 5 381 个海湾扇贝的 EST, 设计 28 对 EST-SSR 引物, 筛选了 15 对有多态性的位点。多态位点的等位基因数为 3~14 个, 平均 5.5, 观测杂合度和期望杂合度分别为 0.000 0~0.781 0 和 0.155 0~0.885 0, 多态信息含量(PIC)平均为 0.548 0, 7 个位点符合 HWE 平衡。

通过对比剔出冗余位点, 迄今为止, 共开发了 35 个独立的海湾扇贝的 EST-SSR 标记。

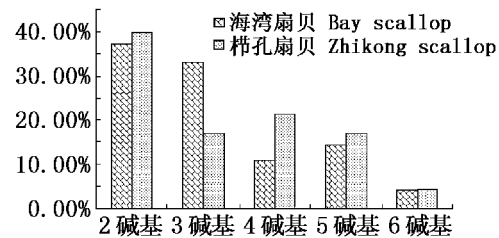


图 1 海湾扇贝和栉孔扇贝 EST 库中各种微卫星重复类型的含量

Fig.1 Proportion of different microsatellites in expressed sequence tags (ESTs) of Zhikong scallop *Chlamys farreri* and Bay scallop *Argopecten irradians*

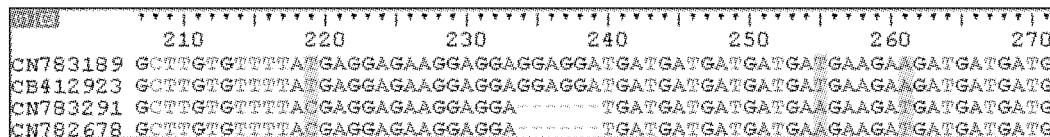


图 2 含 SSR 的不同 EST 序列的对比, 示不同的重复次数和 SNP (浅灰色)

Fig.2 Alignment analysis of homologous SSR-containing ESTs reveals length polymorphism and SNPs (the gray mask)

利用 RepeatMasker 软件李红蕾等^[13] 发现栉孔扇贝的 6 935 条 ESTs 中 42 条序列包含微卫星。选取其中的 7 个序列, 根据微卫星的侧翼序列设计引物, 并利用中国、日本、韩国野生群体对

引物进行多态性检测, 发现 6 对引物能扩增, 其中有 3 对引物可望在群体分析及连锁图谱的构建中应用。该结果初步证实了在栉孔扇贝的 ESTs 序列中存在微卫星位点, 为栉孔扇贝微卫星

标记的筛选提供了新途径。NCBI 库中注册的栉孔扇贝 EST 序列,经过计算机结合人工筛选共发现微卫星序列 66 个,占整个数据库的 1.9%^[14]。各种类型微卫星的分布情况见图 1,其中 2 碱基重复序列为 26 个,3 碱基重复序列 11 个,分别占发现微卫星序列总数的约 40% 和 17%。在发现的微卫星重复序列中核心序列重复次数介于 3 到 44 之间,在 2 碱基核心序列中 AT/TA 重复类型最多,占整个 2 碱基重复类型的 71.5%。聚类分析显示 66 条序列各自独立,且不包含李红蕾等^[13]筛选的位点。37 个位点可以设计引物,其中 23 对引物可扩增出多态性位点,共扩增得到 87 个等位基因,平均每个位点扩增得到 4.2 个等位基因。观测杂合度范围和期望杂合度范围分别为 0.041 7~0.750 0 和 0.167 2~0.760 9,10 个偏离 HWE 平衡。Cui 等^[15]发表了 15 个具有多态性的 EST-SSR 标记,多态位点的等位基因数为 2~13 个,平均 6.3,观测杂合度和期望杂合度分别为 0.267 0~0.867 0 和 0.282 0~0.864 0,11 个位点符合 HWE 平衡。

剔出冗余位点,迄今共开发了 49 个独立的栉孔扇贝的 EST-SSR 标记。

1.2 筛选基因组文库

这是传统的筛选微卫星标记的方法,通过转化克隆大肠杆菌(*Escherichia coli*)重组体,构建小插入片段基因组文库,用含有微卫星序列的探针筛选文库,挑选阳性克隆测序,再根据微卫星两端的侧翼序列设计引物,分析相应的微卫星位点。

战爱斌^[16]构建了小插入片段 DNA 文库。利用 PCR 法(微卫星序列和载体序列为引物)筛选了 1 270 个重组克隆,得到 15 个阳性克隆(1.18%)。测序结果显示,15 个克隆全部含有微卫星。根据侧翼序列长度和 GC 含量,7 个位点可以设计引物,6 对引物能扩出与期望值大小相等或相近的片段。利用 48 个栉孔扇贝个体估算位点主要遗传学参数,其中 3 个位点有多态性,获得了 8 个等位基因,平均每对引物获得 2.7 个等位基因。3 个位点的期望杂合度和观测到的杂合度分别为 0.100 0~0.180 0 和 0.201 0~0.352 0,只有 1 个位点符合 HWE 平衡。利用 PCR 法筛选含有微卫星序列,方法易于掌握,尤其适用于小规模筛选或者没有 Southern 杂交基础的实验室^[17]。Zhan 等^[18]利用化学发光试剂盒(ECL)标记的(GA)

15、(CA)₁₅ 作探针,筛选了栉孔扇贝小插入片段基因组 DNA 文库。1800 个重组克隆中得到 121 个阳性克隆(6.72%),随机挑选 50 个阳性克隆测序,阳性克隆均含有微卫星 DNA,利用侧翼序列设计了 26 对引物,发现 14 个位点有多态性,获得了 77 个等位基因,不同的引物获得的等位基因数为 2~13 个不等,平均 5.5 个等位基因;观测杂合度和期望杂合度分别为 0.000 0~0.800 0 和 0.190 0~0.910 0。

1.3 基因组文库富集法

为提高开发微卫星标记的效率,降低成本,许多科研人员研发了不同的技术,构建 SSR 富集文库。将基因组 DNA 经酶切后与微卫星探针杂交,使标记在探针上的生物素与磁珠表面的链亲和素之间结合,或固定在尼龙膜或硝酸纤维素膜上,就可将微卫星富集,通过克隆和测序得到微卫星 DNA,此种方法提高了获得阳性克隆的效率,富集效率可达到 50%~90%^[6]。4 种扇贝的微卫星标记多以此方法筛选。

韩国学者 An 等^[19]采用生物素-磁珠吸附微卫星富集法,构建虾夷扇贝基因组微卫星文库,利用 PCR 法筛选到 220 个含有 SSR 的阳性克隆,测序发现其中 190 个为独立克隆,设计的 74 对引物中 32 对能扩增虾夷扇贝 DNA,根据退火温度、预期产物的大小,从中确定了 10 对引物检测多态性,为微卫星多重 PCR 打下基础。不同的引物获得的等位基因数为 2~17 个不等,观测杂合度和期望杂合度分别为 0.170 0~0.990 0 和 0.330 0~0.900 0;6 个位点不符合 HWE 平衡。赵莹莹等^[20]采用生物素-磁珠吸附微卫星富集法构建虾夷扇贝基因组微卫星文库,结合放射性同位素菌落杂交,筛选虾夷扇贝微卫星标记。在筛选的 192 个菌落中获得 136 个阳性克隆,经测序分析,获得微卫星序列 179 个,其中完美型占 50.8%,非完美型 43.0%,混合型占 6.1%。除探针中使用的 CA 重复外,还得到 TC、AG、ACA、CTAT 等类型的重复序列。设计引物 85 对,挑选其中的 40 对合成并进行扩增。15 对引物有多态性,引物获得的等位基因数为 2~7 个不等,平均 3.5 个等位基因;观测杂合度和期望杂合度分别为 0.100 0~1.000 0 和 0.127 0~0.812 0;11 对引物符合 HWE 平衡^[21]。Sun 等^[22]将虾夷扇贝 DNA 酶切,选取 400~1 500 bp 的片段,与固定于尼龙膜

上的探针(GA)₂₀和(CA)₂₀杂交,构建微卫星富集文库。利用化学发光试剂盒标记的(GA)₁₅、(CA)₁₅作探针,筛选微卫星富集文库,测序发现50个阳性克隆均含有微卫星序列,设计的34对引物中,12对引物有多态性,等位基因数为2~8个不等,平均3.5个等位基因;观测杂合度和期望杂合度分别为0.000 0~0.833 3和0.254 6~0.823 1;9个位点符合HWE平衡。

Li等^[23]利用固定于尼龙膜上的寡聚核苷酸(GA)₂₀和(CA)₂₀,构建了海湾扇贝微卫星富集文库,插入片段长度为300~800 bp。用化学发光试剂盒标记的(GA)₁₅、(CA)₁₅作探针,筛选微卫星富集文库,根据阳性克隆的测序结果,设计27对引物。利用38个养殖个体评估微卫星位点的多态性,结果显示15对引物有多态性,每个位点的等位基因数3~7个不等,平均3.9个等位基因;观测杂合度和期望杂合度分别为0.083 0~0.833 0和0.198 0~0.813 0;由于无效等位基因和近交的存在,仅5个位点符合HWE平衡。

Zhan等^[14]利用寡聚核苷酸(GA)₂₀和(CA)₂₀富集栉孔扇贝基因组DNA的AFLP预扩增产物中含有微卫星的片段,构建微卫星富集文库。文库包含1100个白色克隆,插入片段340~800 bp,筛选到70个具多态性的位点,每个位点的等位基因数3~16个,共得到489个等位基因,平均每个位点7个,观测杂合度和期望杂合度分别为0.006 7~0.916 7和0.271 6~0.916 3。另外,将栉孔扇贝的DNA用不同的限制性内切酶酶切,与固定于尼龙膜上的寡聚核苷酸(GA)₂₀和(CA)₂₀杂交,构建SSR富集文库,开发了187个具有多态性的位点^[24-25],为遗传连锁图谱的构建奠定了基础。

Hui等^[26]将华贵栉孔扇贝的DNA用Alu I酶切,电泳后选取400~1 500 bp的片段,与接头连接。利用固定于尼龙膜上的寡聚核苷酸(GA)₂₀和(CA)₂₀,筛选含SSR的片段,经PCR扩增,DNA片段恢复双链结构,将PCR产物克隆到T-载体,构建了华贵栉孔扇贝微卫星富集文库。文库经菌落原位杂交筛选后,得到阳性克隆,根据58个序列结果,设计了22对引物。利用48个个体评估微卫星位点的多态性,结果显示10对引物有多态性,每个位点的等位基因数3~6个,观测杂合度和期望杂合度分别为0.000 0~0.880 0和

0.290 0~0.760 0,6个位点符合HWE平衡。

1.4 物种间同源转移法

由于物种之间存在DNA序列的同源性,微卫星DNA的侧翼序列相对保守,从一种物种开发出来的微卫星引物可以在其他物种使用。一般认为微卫星引物在亲缘关系近的物种有较好的通用性,此方法在扇贝中进行了尝试。Cui等^[15]尝试了栉孔扇贝EST-SSRs在海湾扇贝和虾夷扇贝的通用。所用的15对引物中分别有14对和13对可扩增海湾扇贝和虾夷扇贝的DNA。在海湾扇贝中13个位点有多态性,共检测到35个等位基因;在虾夷扇贝中9个位点有多态性,共检测到32个等位基因。Zhan等^[11]报道16对海湾扇贝EST-SSR仅1对可扩增华贵栉孔扇贝(且无多态性),而不能扩增栉孔扇贝和虾夷扇贝。而Li等^[12]发现15对海湾扇贝EST-SSR中各有9对可扩增栉孔扇贝和虾夷扇贝,且各有5对具多态性。

1.5 其他方法

以RAPD为基础的PCR法,将RAPD扩增片段转移至膜上,与微卫星探针杂交,获得阳性RAPD片段后进行克隆。Sato等^[27]利用该方法得到37条阳性条带,克隆测序证明阳性条带中包含微卫星序列。另外,将酶切后的DNA选择片段重组入载体中,建立DNA文库,以载体引物进行不对称PCR扩增,得到单链DNA;用磁珠法富集含微卫星序列的单链DNA,PCR恢复成双链DNA,构建了由426个克隆组成的富集文库,80%有微卫星序列。Sato等^[27]设计了6对引物,由于存在无效等位基因,4个多态性位点可用于群体分析。

2 扇贝微卫星标记的应用

2.1 遗传多样性研究

扇贝遗传多样性及亲缘关系的研究对种质的搜集、保存以及在育种工作中的应用具有重要意义,可以为扇贝的遗传改良和扇贝基因资源的利用提供科学依据。

利用9个多态性微卫星标记,战爱斌^[16]评价了选育体系中基础群体和选育群体的遗传多样性和遗传分化。分析结果显示,基础群体的遗传多样性丰富,在所有的9个位点上共扩增得到106个等位基因,平均每个位点扩增得到11.8个。群体的平均观测杂合度和平均期望杂合度分别为

0.600 7 和 0.721 2。遗传学分析显示选育 5 代群体发生了显著的遗传分化。选育 2 代群体与基础群体的等位基因数目和杂合度差异不显著,但是 3 个位点上的等位基因频率差异和 2 个位点上的基因型频率差异暗示了选育 2 代群体正在经受“瓶颈效应”的影响;同时,最常见等位基因的变化也说明了 2 代群体发生了遗传分化。另外,随着选育年限(代数)的增加,选育群体的遗传多样性丢失加剧。

海湾扇贝 1982 年引入我国时仅有 26 个个体,由于养殖规模的扩大,不可避免地出现近交和近交衰退的问题。通过 11 个微卫星标记,Wang 等^[28]分析了中国的养殖群体和美国东海岸的野生群体。结果表明,两个群体的杂合度的差异小,但中国群体的等位基因数降低了 20%。为提高基因的多样性,尽管近期进行了多次引种,但是等位基因数的降低表明我国海湾扇贝的养殖群体还是存在遗传多样性的瓶颈效应。因此,引种的工作还应继续,育种计划应包括评估遗传结构的变化,避免近交的发生。

Campanella 等^[29]根据具有多态性的微卫星的位点鉴定了新泽西州 Barnegat 湾内海湾扇贝的来源,通过比较发现 2004 年和 2005 年取自 Barnegat 湾内的海湾扇贝遗传结构基本一致,北卡莱罗纳的海湾扇贝有特殊的等位基因,Barnegat 湾内的海湾扇贝和取自纽约长岛的有相同的等位基因,另外,遗传距离和基因流的计算结果也证实,Barnegat 湾的海湾扇贝是从纽约长岛转运的。

利用 4 个微卫星标记,Sato 等^[27]分析了取自日本北海道(14 个群体)、本州(3 个群体)和俄罗斯南 Primorye(4 个群体)共 21 个群体的 766 个个体的样品。研究发现,所有群体的遗传多样性高,平均期望杂合度为 0.701 1~0.762 2,有纯合子过剩的趋向,3 个地理区域的遗传分化明显;通过分析 20 年的样本,表明养殖未对群体遗传结构产生大的影响。

赵莹莹等^[30]应用微卫星标记分析了虾夷扇贝群体,发现取样群体的多态信息含量 PIC 为 0.443 0~0.463 0,说明虾夷扇贝目前养殖状况良好。常亚青等^[31]对大连獐子岛底播增殖放流群体、黄海北部海区采集的群体、日本青森养殖群体、俄罗斯远东日本海沿岸养殖群体及大连大长

山岛壳白化养殖群体等 5 个虾夷扇贝群体的遗传多样性进行研究。用 8 个微卫星位点进行扩增,共获得 45 个等位基因,每个位点的等位基因数处于 3~9。5 个群体的观测杂合度分别为 0.329 2、0.304 8、0.316 7、0.270 8 和 0.304 2,期望杂合度分别为 0.459 5、0.400 2、0.383 8、0.362 0 和 0.388 5,群体间差异不显著。通过 HWE 平衡及 F_{ST} 检验发现,5 个群体都不同程度的偏离平衡,均处于不同程度的杂合子缺失状态,群体间的遗传分化程度较高,但遗传变异主要来自群体内的个体间;虾夷扇贝的种质情况并不乐观,表现出一定水平的近交,而且在繁殖过程中发生了某些基因位点的丢失,说明种质资源已经受到一定程度的破坏。

Li 等^[32]比较了 3 个虾夷扇贝的中国养殖群体和 2 个日本的野生群体在 6 个微卫星位点多态性,探讨养殖对群体遗传结构的影响。结果显示养殖群体和野生群体在每个位点上的等位基因数分别是 5.7 和 7.9,预期杂合度分别是 0.582 0 和 0.671 0;遗传多样性的缺失是由于 20 年的地理隔离和遗传漂变所致;基因分化系数表明 5 个种群间有显著遗传差异。根据种群间遗传距离可清楚的将养殖群体和野生群体区别开来。

刘芳^[33]利用 7 对 AFLP 引物组合和 3 对微卫星引物分析了虾夷扇贝的 3 个野生群体和 4 个养殖群体的 168 个样品,发现 7 个群体均有高的遗传多样性,微卫星检测的变异高于 AFLP 标记。与野生群体相比,养殖群体的杂合度和有效等位基因数有所降低,应注意养殖群体遗传多样性的保护。

2.2 家系分析和遗传连锁图谱构建

无效等位基因和标记的非孟德尔遗传在双壳类中是普遍存在的,Zhan 等^[34]构建了 4 个自交家系,分析海湾扇贝 19 个 EST-SSR 位点的遗传方式。其中 3 个家系-位点组合严重偏离孟德尔遗传,抛开无效等位形式影响,则仅有 1 个位点不符合孟德尔遗传。通过重新设计引物,发现无效等位基因是由于引物序列包含单核苷酸突变引起的。因此,对海湾扇贝种群研究和亲子鉴定之前应对于所用的微卫星标记的无效等位形式进行进一步的分析。另外,Zhan 等^[34]还推荐 6 个标准微卫星位点用于种群遗传研究和亲子鉴定。

Qin 等^[35]利用 317 个 AFLP 和 10 个 SSR 标

记构建了海湾扇贝的遗传连锁图谱,雌性亲本的图谱由15个连锁群构成,包括120个标记,图谱共479.6 cM,标记间隔7.0 cM,覆盖率为70.4%;雄性亲本的图谱由17个连锁群构成,包括190个标记,图谱共883.8 cM,标记间隔7.2 cM,覆盖率为81.1%。根据区间作图定位了壳长、壳高、壳宽、总重、软体重及壳重等6个与壳大小相关的性状,筛选到1个定位于雌性亲本第3连锁群的主效QTL。

战爱斌^[16]利用2个半同胞F₁代家系(共享母本)和318个标记(包括315个微卫星标记、2个小卫星标记和1个形态学标记)构建了栉孔扇贝的遗传连锁图谱。利用在不同性别中分离的标记分别构建了栉孔扇贝雌性和雄性连锁图谱,并整合了不同性别的连锁图谱。整合的图谱共19个连锁群,与栉孔扇贝单倍体染色体数目一致。19个连锁群共含有154个标记,覆盖整个栉孔扇贝基因组的1561.8 cM(约77.0%的覆盖率),平均标记间隔为12.3 cM。利用该图谱进行了生长相关性状的QTL定位。在整合的图谱上共定位了25个关于壳长、壳宽、壳高和总重相关的QTL。

2.3 物种鉴定

扇贝幼虫鉴定和区分是十分困难的。惠敏^[36]利用由8个扇贝微卫星组成的一套组合,用于鉴定扇贝的4个主要养殖种类。这种方法很大程度上取决于微卫星标记的物种特异性,利用该方法能检测出混合浮游幼虫中1%的个体,具有了较好的准确性和灵敏性。

扇贝的闭壳肌(肉柱)味道鲜美,深受消费者喜爱。对闭壳肌的商业产品进行物种鉴定,对于确定在分发过程中商品名称的正确与否非常重要。Zhan等^[37]开发了一套微卫星标记用于鉴定和区分4种主要的经济扇贝的闭壳肌。利用物种特异性微卫星标记,分析了3种(冷冻、干品、罐头)共140个闭壳肌样本,利用该方法可以清晰地区分和鉴定不同的物种,具有较高的准确性和敏感性,并能鉴定混合的商业样品。

3 小结

研究表明,微卫星DNA标记较其他标记有众多优势:微卫星位点的等位基因数目多,多态性信息量大;微卫星呈孟德尔共显性遗传,可以区分

纯合显性个体和杂合显性个体,给扇贝遗传研究提供更多可供分析利用的信息。目前,扇贝可供利用的微卫星引物相对于其他研究深入的物种来说还很少,而且还未定位,难以满足遗传育种的应用需求,因此鉴定大量的多态性微卫星DNA标记是很有必要的。

参考文献:

- [1] 陈省平,包振民,潘洁,等. 4种养殖扇贝的群体遗传多样性及特异性 AFLP 标记研究[J]. 海洋学报, 2005, 27(2): 160-164.
- [2] 何平. 真核生物中的微卫星及其应用[J]. 遗传, 1998, 20(4): 42-47.
- [3] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms[J]. Genomics, 1990, 7: 524-530.
- [4] Toth G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis[J]. Genome Research, 2000, 10: 967-981.
- [5] Tautz D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers[J]. Nucleic Acid Research, 1989, 17: 6463-6471.
- [6] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review[J]. Molecular Ecology, 2002, 11: 1-16.
- [7] Roberts S, Goetz F. Expressed sequence tags analysis of genes expressed in the bay scallop, *Argopecten irradians*[J]. Biological Bulletin, 2003, 205: 227-228.
- [8] Song L, Xu W, Li C, et al. Development of expressed sequence tags from the bay scallop, *Argopecten irradians irradians* [J]. Marine Biotechnology, 2006, 8: 161-169.
- [9] Zhan A, Hu J, Wang X, et al. A panel of polymorphic EST-derived microsatellite loci for the bay scallop (*Argopecten irradians*) [J]. Journal of Molluscan Studies, 2006, 72: 436-438.
- [10] Roberts S, Romano C, Gerlach G. Characterization of EST derived SSRs from the bay scallop, *Argopecten irradians*[J]. Molecular Ecology Notes, 2005, 5: 567-568.
- [11] Zhan A, Bao Z, Wang X, et al. Microsatellite markers derived from bay scallop *Argopecten irradians* expressed sequence tags [J]. Fisheries Science, 2005, 71: 1341-1346.
- [12] Li R, Li Q, Yu R. A set of polymorphic expressed sequence tag - derived microsatellites from the bay

- scallop, *Argopecten irradians irradians*, and their transportability in three other scallop species [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2008, 39: 138 - 141.
- [13] 李红蕾, 宋林生, 王玲玲, 等. 栉孔扇贝 EST 中微卫星标记的筛选 [J]. *高技术通讯*, 2003, 12: 72 - 75.
- [14] Zhan A, Bao Z, Hu X, *et al.* Characterization of 95 novel microsatellite markers for Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) using FIASCO-colony hybridization and EST database mining [J]. *Fisheries Science*, 2008, 74: 516 - 526.
- [15] Cui Z, 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, 33: 1 - 4.
- [16] 战爱斌. 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 微卫星标记的筛选及应用 [D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2007.
- [17] 徐 鹏, 周岭华, 相建海. 中国对虾微卫星 DNA 的筛选 [J]. *海洋与湖沼*, 2001, 32 (3): 255 - 259.
- [18] Zhan A, Bao Z, Yao B, *et al.* Polymorphic microsatellite markers in the Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6: 127 - 129.
- [19] An H S, Park J Y, Lee Y G, *et al.* Ten polymorphic microsatellite loci in the giant scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2005, 5: 806 - 808.
- [20] 赵莹莹, 朱晓琛, 孙效文, 等. 磁珠富集法筛选虾夷扇贝微卫星序列 [J]. *中国水产科学*, 2006, 13 (5): 750 - 756.
- [21] Zhao Y, Zhu X, Sun X, *et al.* Polymorphic microsatellite loci for population studies of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis* [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7: 480 - 482.
- [22] Sun C, Zhan A, Hui M, *et al.* Characterization of novel microsatellite markers from the Yesso scallop *Mizuhopecten yessoensis* [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7: 106 - 108.
- [23] Li H, Liu X, Hu J, *et al.* A set of polymorphic microsatellite loci for the bay scallop, *Argopecten irradians* [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7: 422 - 424.
- [24] Zhan A, Bao Z, Hu X, *et al.* Isolation and characterization of 150 novel microsatellite markers for Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7: 1015 - 1022.
- [25] 战爱斌, 胡景杰, 胡晓丽, 等. 富集文库-菌落原位杂交法筛选栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 的微卫星标记 [J]. *水产学报*, 2008, 32 (3): 353 - 361.
- [26] Hui M, Bao Z, Zhan A, *et al.* Ten polymorphic dinucleotide microsatellite markers of the noble scallop *Chlamys nobilis* [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6: 1033 - 1035.
- [27] Sato M, Kawamata K, Zaslavskaya N, *et al.* Development of microsatellite markers for Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) and their application to a population genetic study [J]. *Marine Biotechnology*, 2005, 7: 713 - 728.
- [28] Wang L, Zhang H, Song L, *et al.* Loss of allele diversity in introduced populations of the hermaphroditic bay scallop *Argopecten irradians* [J]. *Aquaculture*, 2007, 271: 252 - 259.
- [29] Campanella J J, Bologna P A X, Kim L E J, *et al.* Molecular genetic evidence suggests Long Island as the geographic origin for the present population of bay scallops in Barnegat Bay, New Jersey [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2007, 26: 303 - 306.
- [30] 赵莹莹, 朱晓琛, 孙效文, 等. 虾夷扇贝的多态性微卫星座位 [J]. *动物学报*, 2006, 52 (1): 229 - 233.
- [31] 常亚青, 陈晓霞, 丁 君, 等. 虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 5 个群体的遗传多样性 [J]. *生态学报*, 2007, 23 (3): 1145 - 1152.
- [32] Li Q, Kong L, Yu R. Genetic variation in Chinese hatchery populations of the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*) inferred from microsatellite data [J]. *Aquaculture*, 2007, 269: 211 - 219.
- [33] 刘 芳. 利用 AFLP 和 SSR 分子标记研究不同地理虾夷扇贝群体的遗传多样性 [D]. 辽宁师范大学硕士研究生学位论文, 2006.
- [34] Zhan A, Bao Z, Hui M, *et al.* Inheritance pattern of EST-SSRs in self-fertilized larvae of the bay scallop *Argopecten irradians* [J]. *Annales Zoologici Fennici*, 2007, 44: 259 - 268.
- [35] Qin Y, Liu X, Zhang H, *et al.* Genetic mapping of size-related quantitative trait loci (QTL) in the bay scallop (*Argopecten irradians*) using AFLP and microsatellite markers [J]. *Aquaculture*, 2007, 272: 281 - 290.
- [36] 惠 敏. 扇贝微卫星标记的筛选及其在物种鉴定

- 中的应用[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2008.
- [37] Zhan A, Hu J, Hu X, *et al.* Fast identification of scallop adductor muscles using species-specific microsatellite markers[J]. *European Food Research and Technology*, 2008, 227: 353–359.

Research progress of microsatellite DNA markers in four maricultured scallops in China: A review

HU Jing-jie, ZHAN Ai-bin, HU Xiao-li, LU Wei, HUANG Xiao-ting, BAO Zhen-min

(*Laboratory of Marine Genetics and Breeding, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China*)

Abstract: Scallops, comprise more than 300 species identified in worldwide oceans, occupy an economically important position in many coastal countries. Until now, more than 15 scallop species have been considered as valuable fishery or aquaculture resources. Scallop adductor muscles are being considered as one of the most flavorful sea foods in markets at home and abroad, mainly due to their delicious taste and abundant nutrition. Because of the potential values, the scallop aquaculture has made great progress during the past three decades in many countries, especially in China. For examples, the farmed tideland for scallop aquaculture has exceeded 1 million hectares (ha.) and the annual production is more than 11 million tons in 2007, which makes China the first-rank not only in farmed acreage but also in annual production. However, with the blooming expansion of scallop aquaculture, some problems such as poor growth of some wild strains and large-scale breakout of diseases have been arising during the past years. Further investigation and solution to these problems mainly depend on the availability of primary molecular genetic tools and the combination of efficient breeding programs with these molecular tools (i. e. molecular marker assisted selection, MAS). Microsatellite analysis based on polymerase chain reaction (PCR) offers the finest resolution for studying such genetic questions in aquacultural species. Based on the studies to date, microsatellite DNA marker has been one of the leading molecular markers for genetic analysis. Four scallops including Zhikong scallop *Chlamys farreri*, Noble scallop *C. nobilis*, Yesso scallop *Patinopecten yessoensis* and Bay scallop *Argopecten irradians* are the main species maricultured in China. In this study, we reviewed the progress in development of microsatellite DNA markers for these four scallops. We also summarized the applications of this robust molecular marker system in genetic analysis, such as genetic diversity analysis, pedigree reconstruction, genetic linkage map construction and species identification.

Key words: *Chlamys farreri*; *Chlamys nobilis*; *Patinopecten yessoensis*; *Argopecten irradians*; microsatellite markers