

利用微卫星标记对文蛤4个壳色花纹品系的遗传分析

朱东丽^{1,2}, 董迎辉¹, 林志华^{1*}, 姚韩韩³

(1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100;

2. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;

3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 利用9个微卫星位点对文蛤红壳(RS)、黑斑(BS)、细纹(TC)、暗纹(DF)4个壳色花纹品系共120个个体进行遗传差异分析。结果共检测到105个等位基因,每个位点平均观察等位基因数为11.7个,其中WG07位点等位基因数最多(21个),WG11位点最少(7个)。每个品系均具有特异等位基因类型,不同品系中相同微卫星位点的等位基因分布规律不同。4个文蛤品系的观测杂合度、期望杂合度和多态信息含量变异范围分别为0.110~1.000、0.486~0.867、0.433~0.834,均属高度多态性位点。Hardy-Weinberg平衡的卡方检测发现,大多数位点偏离平衡状态;聚类分析表明,4个品系间存在较明显的遗传差异,TC品系与其它品系的遗传距离最大,DF品系和RS品系的遗传距离相对较小。

关键词: 文蛤; 壳色花纹; 微卫星标记; 遗传结构

中图分类号: Q 785; S 917

文献标志码: A

文蛤(*Meretrix meretrix*)是我国滩涂养殖的重要经济贝类,也是我国大宗出口创汇的鲜活水产品之一,在我国南北沿海均有分布,尤其在辽宁辽河口、山东莱州湾、江苏南部沿海、广西北部湾沿海等资源最为丰富^[1]。文蛤的壳色和壳面花纹多种多样,壳色有青灰色、淡黄色、灰白色、咖啡色、酱红色等,花纹图案有细纹、粗纹、点状花纹、锯齿纹、环纹和形状大小不等的斑块,当壳色和壳面花纹重叠出现时就更加纷繁复杂,一些壳色花纹漂亮的文蛤商品价格也显著提高。本实验以文蛤山东东营群体为基础群,经过连续3代的定向选育,已成功培育出细纹、黑斑、红壳和暗纹4个壳色花纹漂亮、性状较稳定的新品系,为壳色花纹分子遗传基础研究及良种培育提供了材料。

微卫星标记(SSR)具有高度多态性、符合孟德尔遗传、在基因组中广泛分布等优点,被广泛用于遗传连锁图的构建、资源及品种(系)鉴定、分子标记辅助选择育种等多方面的研究^[2],微卫星标记也可用于对目标性状的间接选择,已有不少利用微卫

星标记对选育群体进行遗传监测的研究^[3-7]。微卫星标记技术已在许多海洋贝类的群体遗传多样性研究中得到应用,如栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[8-9]、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)^[10]、美洲牡蛎(*Crossostrea virginica*)^[11]、长牡蛎(*C. gigas*)^[12]、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hanai*)^[13]等。目前,仅见陈淑吟等^[14]、Lu等^[15]对文蛤微卫星位点的筛选及遗传多样性进行过微卫星分析,但对文蛤不同壳色花纹品系的遗传分析还未见报道。本研究以选育出的4个壳色花纹品系为研究对象,利用微卫星标记技术,对4个壳色花纹品系进行了遗传分析,从中筛查与壳色花纹相关的微卫星标记,为下一步开展文蛤分子遗传育种、培育兼具壳色和生长优良性状的文蛤养殖新品种提供的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用文蛤细纹(TC)、黑斑(BS)、暗纹(DF)

收稿日期:2011-06-28 修回日期:2011-10-21

资助项目:国家自然科学基金项目(30972255,31101895);浙江省自然科学基金(Y3110080)

通讯作者:林志华,E-mail:zhihua9988@126.com

和红壳(RS)4 个壳色花纹品系(图 1),于 2009 年 7 月采自浙江省海洋水产养殖研究所清江基地,各品

系随机取样 30 个,活体解剖取闭壳肌,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中,用于 DNA 提取。

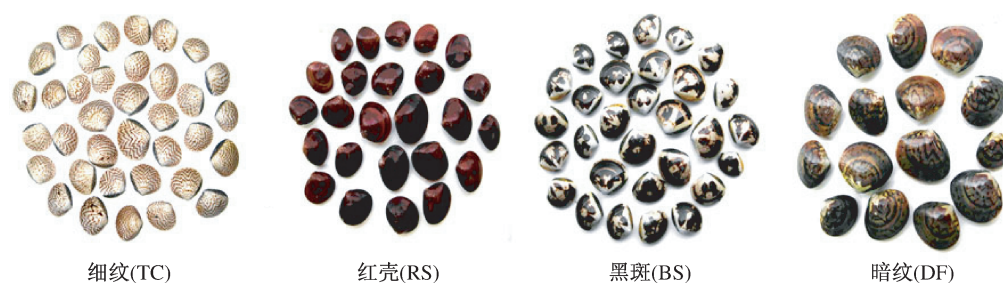


图 1 文蛤 4 个壳色花纹品系

Fig. 1 Four *M. meretrix* strains with different shell colors and decorative patterns

1.2 DNA 的提取及质量检测

取文蛤闭壳肌,采用常规酚/氯仿/异戊醇法提取基因组 DNA, DNA 样品用 1% 的琼脂糖电泳和紫外分光光度仪(Varian Cary50 型)进行定量,无菌超纯水稀释至 $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

1.3 微卫星引物来源

本实验微卫星序列是在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) GenBank EST 数据库中查找得到的,以“*Meretrix meretrix*”为关键词,用 FASTA 格式下载 2 086 条 EST 序列,利用在线查找软件 SSR Hunter 分析查找 SSR 位点。用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.44 软件根据引物设计原则设计引物,送上海生工生物工程公司合成。

1.4 微卫星引物的筛选与 PCR 扩增

将每个品系中各取 5 个个体的 DNA 等量混合成一个基因池,浓度大约为 $100\text{ ng}/\mu\text{L}$,利用合成的微卫星引物进行初步 PCR 扩增筛选,根据 T_m 值筛选优化不同的引物,在 Eppendorf Mastercycler pro S 梯度 PCR 仪上做温度梯度优化,然后进行扩增反应,PCR 程序为在 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下预变性 5 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, T_m (视引物而定)退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,反应进行 35 个循环。反应体系为 $20\text{ }\mu\text{L}$: 含有正、反引物各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 、dNTP $1.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\times\text{Buffer}$ $2\text{ }\mu\text{L}$ 、Taq 酶 $0.2\text{ }\mu\text{L}$ 、DNA 模板 $0.8\text{ }\mu\text{L}$,加无菌水至 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

PCR 反应产物先用 2% 的琼脂糖胶检测,经凝胶成像系统拍照,看是否有目标条带,然后用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,60 W 恒功率电泳 2 h。

1.5 数据统计与分析

用 Cervus 软件统计微卫星座位的等位基因

数(A_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、每个微卫星位点的多态信息含量(polymorphism information content, PIC); GENEPOP 3.4 软件处理得到等位基因频率 Hardy-Weinberg 平衡检测,等位基因频率,有效等位基因数(A_e)使用公式 $A_e = 1 / \sum P_i^2$ 计算,其中 P_i 为该位点上第 i 个等位基因的频率;用 MSA 软件分析 F_{ST} 、 F_{IS} 、 F_{IT} 等参数;根据遗传距离利用 MEGA 4.0 软件构建 NJ (Neighbor-Joining)、UPGMA 系统进化树。

2 结果

2.1 微卫星引物筛选结果

从 EST 文库所搜到的微卫星相关序列中,设计出 75 对微卫星引物,经初步筛选和最佳退火温度的优化,最终筛选出 9 个多态性高、目标条带清晰的微卫星位点,其引物序列、预期 PCR 产物的长度、退火温度、核心重复序列、GenBank 登录号见表 1。

2.2 文蛤 4 个品系中 9 个微卫星位点的等位基因及频率

用筛选出的 9 个多态性高的微卫星位点对 4 个品系共 120 个个体的基因组 DNA 进行了 PCR 扩增和电泳检测。结果检测到的等位基因数及基因频率分布见表 2,9 个微卫星位点在 4 个品系中共检测出 105 个等位基因,每个位点产生的等位基因数从 7~21 个不等,平均每个位点产生 11.7 个等位基因。在所有微卫星位点中, WG11 位点扩增的等位基因数最少, WG07 位点扩增出的等位基因数最多。

表1 9个多态微卫星引物序列
Tab.1 Primers sequences for the nine polymorphic loci

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequences	片段长度/bp size range	退火温度/°C annealing temperature	重复模式 repeat mode	GenBank 登录号 GenBank accession no.
WG04	F:AGAAGGCTTAGAGGAGTA R:GTGGCACAGGCAGTTAGA	226	53.3	(GA) ₁₀	GR211584
WG07	F:CTGGAAACCACCACTAAA R:ATGAGGTTGTCTGCGATA	242	50.2	(CAA) ₈	GR211758
WG09	F:TCCGTTCTGTAGACCCT R:CAACTGACCATTTCCTCC	138	57.3	(AT) ₁₃	GR211370
WG11	F:ATCTGCCATATTCGATTGTC R:CTATGTGAGTGGTCGAGGAA	288	57.3	(TGTAC) ₅ (CTGTG) ₇	GR903121
WG13	F:GCTTGATCCCGTTCTGTGA R:AACTCTGCCTTGTGCTTT	360	58.2	(CA) ₇ (AT) ₉	GR902934
WG14	F:GCTTGATCCCGTTCTGTGA R:ACTCTGCCTTGTGCTTT	359	52.7	(CA) ₆ (ATA) ₆	GR902931
WG18	F:TCTGTTATTTCCCGTTCC R:TCTCGTTATCGCTTTGT	282	50.2	(TG) ₁₆	GR211023
WG19	F:TTGCTGCGTTGACCTATT R:ACGCCTTGTTAACTTCTGT	334	50.2	(GT) ₁₅	GR211095
WG22	F:GATAGTAGTTGATGAGTGGGTT R:TGTATGCCTGTACTCTTGTG	183	59.5	(GA) ₁₄	GR211391

注:F.正向引物;R.反向引物。

Notes:F. Forward primer;R. Reverse primer.

表2 9个微卫星座位的等位基因数及频率分布
Tab.2 Allele frequency distribution at nine microsatellites

位点 locus	等位基 因数/个 allele number	等位基 因范围/bp allele range	等位基因大小/bp(频率/%) size(frequency)
WG04	9	220~230	220(18.22);222(0.47);223(0.93);224(0.47);225(45.33);226(28.04);227(0.93); 228(3.73);230(1.87)
WG07	21	222~259	230(8.05);232(18.64);233(0.42);234(5.08);235(3.39);237(8.89);240(10.59); 242(0.42);243(3.81);244(1.27);245(2.54);247(3.39);248(3.81);249(0.84);250 (15.7);252(0.42);255(0.42);259(3.81)
WG09	14	132~148	132(7.91);133(6.25);134(0.83);135(22.91);136(1.25);137(4.16);138(19.58); 139(9.16);140(10.41);141(7.5);142(1.25);143(6.67);144(0.83);148(1.25)
WG11	7	348~360	348(14.58);350(32.5);352(15);353(0.83);355(32.08);358(3.75);360(1.25)
WG13	8	348~370	348(1.39);350(6.02);352(7.41);355(25.93);360(28.24);362(6.48);365(16.67); 370(7.87)
WG14	13	345~370	345(3.57);348(5.80);350(31.70);352(5.80);354(0.89);356(0.45);358(1.78);359 (20.53);360(21.43);362(5.80);365(0.89);368(0.89);370(0.45)
WG18	11	260~300	260(3.06);265(3.57);270(2.55);272(1.53);275(11.73);280(5.10);282(17.34); 285(30.10);290(8.16);295(1.02);300(15.81)
WG19	12	320~352	320(1.26);325(8.40);328(0.84);334(18.48);337(2.52);338(0.42);340(27.31); 342(21.01);345(7.14);348(9.24);350(16.39);352(5.88)
WG22	10	175~210	175(0.46);187(0.92);190(6.94);192(18.98);(21.76);195(17.13);196(20.83);198 (5.56);200(5.09);210(2.31)

另外,特有等位基因在4个品系中都有发现,如TC品系在WG04位点发现特有等位基因222 bp(16.67%),DF品系在WG09位点发现特有等

位基因348 bp(36.67%)和WG19位点的352 bp(23.3%),BS品系在WG22位点发现特有等位基因198 bp(23.08%),RS品系在WG14位点发

现特有等位基因 358 bp(6.67%)。

2.3 文蛤不同品系的遗传多样性分析

4 个品系的等位基因数(A_o)、有效等位基因(A_e)、品系观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、多态信息含量(PIC)及 HW 检测结果详见表 2。4 个品系的平均观测杂合度分别是 0.581、0.626、0.526、0.511, 平均期望杂合度分别是 0.747、0.739、0.698、0.754, 每个品系的平均观测杂合度

低于平均期望杂合度,9 个微卫星位点在所有品系的平均 PIC 值介于 0.433~0.834, 说明这 9 个微卫星位点在文蛤中具有较高的多态信息含量; 各微卫星位点的 Hardy-Weinberg 平衡检验。结果 4 个品系除 WG07 位点的 BS 品系、WG13 位点的 RS 品系未偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$), 其余位点都处于偏离 Hardy-Weinberg 状态($P < 0.05$)。

表 3 9 个微卫星位点在文蛤 4 个品系中的遗传多样性及 Hardy-Weinberg 平衡检验
Tab.3 Genetic diversity and Hardy-Weinberg in four strains of *M. meretrix* at nine microsatellites

品系 strains	参数 index	位点 locus									平均值 mean
		WG04	WG07	WG09	WG11	WG13	WG14	WG18	WG19	WG22	
TC	A_o	3.0	10.0	6.0	5.0	7.0	9.0	10.0	7.0	4.0	6.8
	A_e	1.8	7.6	4.7	3.2	4.8	5.9	7.2	4.3	1.9	4.6
	H_o	0.462	0.552	0.600	0.967	1.000	0.400	0.520	0.379	0.346	0.581
	H_e	0.516	0.860	0.780	0.733	0.785	0.817	0.832	0.696	0.701	0.747
	PIC	0.448	0.829	0.729	0.678	0.738	0.777	0.794	0.656	0.629	0.698
	HW	0.039 2	0.000 0	0.000 0	0.002 1	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 3	
DF	A_o	4.0	10.0	11.0	5.0	6.0	5.0	10.0	5.0	5.0	6.8
	A_e	2.9	7.3	8.4	2.6	3.7	3.1	7.3	1.2	2.3	4.3
	H_o	0.933	0.586	0.400	0.633	0.444	0.793	0.643	0.500	0.700	0.626
	H_e	0.642	0.668	0.842	0.694	0.773	0.738	0.867	0.746	0.675	0.739
	PIC	0.566	0.633	0.807	0.630	0.719	0.676	0.835	0.688	0.605	0.684
	HW	0.000 0	0.010 6	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.008 5	0.000 1	0.011 7	0.044 1	
BS	A_o	4.0	9.0	10.0	4.0	7.0	9.0	4.0	4.0	5.0	6.2
	A_e	1.9	6.8	7.1	2.8	5.1	7.4	1.6	2.1	3.5	4.3
	H_o	0.231	0.800	0.733	0.800	0.640	0.679	0.400	0.333	0.115	0.526
	H_e	0.486	0.709	0.828	0.739	0.829	0.826	0.629	0.511	0.725	0.698
	PIC	0.433	0.669	0.796	0.677	0.789	0.786	0.559	0.439	0.669	0.646
	HW	0.000 1	0.061 0	0.003 5	0.000 0	0.003 7	0.014 6	0.020 9	0.016 3	0.000 0	
RS	A_o	6.0	13.0	8.0	4.0	8.0	7.0	7.0	5.0	5.0	7.5
	A_e	3.9	11.2	6.8	2.3	5.3	3.6	4.1	2.9	1.8	7.0
	H_o	0.408	0.900	0.467	0.600	0.741	0.633	0.100	0.367	0.308	0.511
	H_e	0.731	0.864	0.806	0.698	0.835	0.779	0.833	0.673	0.568	0.754
	PIC	0.667	0.834	0.769	0.629	0.796	0.733	0.787	0.604	0.524	0.705
	HW	0.000 0	0.010 6	0.000 0	0.013 4	0.056 5	0.011 6	0.000 0	0.000 1	0.000 1	

表 4 9 个微卫星位点的固定指数

Tab.4 Fixation index of nine microsatellites

座位 locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
WG04	0.089	0.240	0.166
WG07	0.083	0.248	0.179
WG09	0.328	0.382	0.079
WG11	-0.048	0.013	0.059
WG13	0.116	0.121	0.005
WG14	0.199	0.215	0.020
WG18	0.450	0.481	0.057
WG19	0.402	0.563	0.269
WG22	0.436	0.575	0.246
平均 mean	0.228	0.315	0.120

2.4 文蛤 4 个品系间的遗传距离与聚类分析

由 MSA 软件计算各品系的遗传距离(表 5),

表 5 文蛤 4 个品系间的遗传距离

Tab.5 The genetic distance among four strains of *M. meretrix*

品系 strains	TC	DF	BS	RS
TC				
DF	0.082 0			
BS	0.098 0	0.071 0		
RS	0.085 0	0.063 0	0.052 0	

BS 和 RS 之间的遗传距离最小,为 0.052 0,TC 与 BS 之间的遗传距离最大,为 0.098。根据文蛤 4 个品系间的遗传距离,用 UPGMA 法和 NJ 法进行聚

类分析(图 2)。从图中可以看出,两种方法构建的聚类图类似,RS 品系和 DF 品系先聚一起,然后再与 BS 聚在一起,最后与 TC 品系聚在一起。

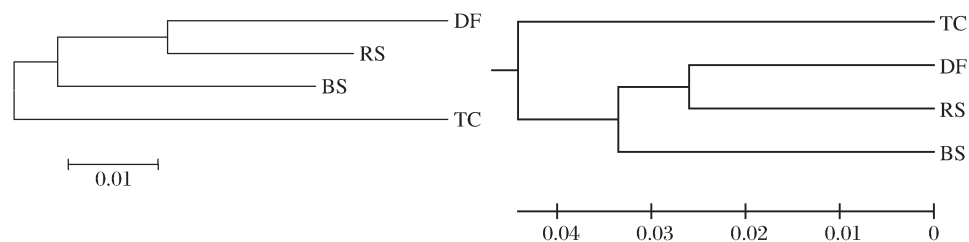


图 2 根据品系间遗传距离用 NJ 法和 UPGMA 法构建 4 个文蛤品系的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on genetic distance of 4 strains of *M. meretrix* by NJ and UPGMA methods

3 讨论

3.1 文蛤微卫星位点的筛选及多态性分析

表达序列标签 (expressed sequence tags, ESTs) 是从 cDNA 文库中随机挑选克隆测序而产生的核苷酸片段。由于 ESTs 库容量较大,从 ESTs 库中筛选微卫星标记已经成为发展标记的最主要途径之一,如家蚕、水稻、人等,只要利用软件对其全基因组进行分析即可筛选到所有的微卫星 DNA,并且可从中筛选得到多个多态性标记^[9,16-20]。在海洋贝类方面,太平洋牡蛎全基因组序列图谱^[21]、文蛤^[22]和虾夷扇贝^[23]转录组以及泥蚶 (*Tegillarca granosa*)^[24]、缢蛏 (*Sinonovacula constricta*)^[25]等多种贝类 cDNA 文库已经成功构建,利用这些海量的 ESTs 序列信息可以大量开展微卫星位点的筛查,为群体遗传分析、高密度遗传连锁图谱构建、重要经济性状的 QTLs 定位等研究奠定重要基础。与传统的建立小型 DNA 文库或者建立富集文库相比,从 ESTs 库中筛选微卫星序列更加快捷方便,并且耗费较小^[26]。

采用 SSR Hunter 软件对下载的全部文蛤 EST 序列进行微卫星重复序列查找,经筛选优化得到了 9 个目标条带清晰、多态性较好微卫星位点。利用筛选出的 9 个微卫星位点对文蛤 4 个壳色花纹品系进行遗传分析,结果共检测到 105 个等位基因位点,平均每个微卫星位点获得了 11.7 个等位基因,*PIC* 值介于 0.433 ~ 0.834,表明 9 个微卫星位点在 4 个壳色花纹品系中具有较高的多态信息含量 (*PIC* > 0.5)^[27],平均期望杂合度介于 0.698 ~ 0.754,显示各品系各位点具有

较高的杂合性。另外,RS 品系期望杂合度最高,表明该品系的遗传多样性较丰富,可以作为宝贵的种质资源加以保护及利用。

通过每个座位的品系内近交系数 (F_{IS}) 和品系间的基因分化系数 (F_{ST}) 来检测品系的遗传分化。 F_{IS} 为正值时,表示品系内存在较严重的近交现象,造成杂合子缺失; F_{IS} 为负值时,表示品系内存在远交,有杂合子剩余。统计结果表明,大部分遗传变异来自品系间。

3.2 贝类壳色花纹相关分子标记的大量发掘及其在分子标记辅助选育中的应用

分子标记技术是寻找相关基因的重要手段,特异标记是联系性状和基因的纽带,目前在海洋贝类中,已经用各种标记技术找到一些相关标记,可能与壳色花纹相关基因紧密连锁,利于查找基因。如 Qin 等^[28]在海湾扇贝 (*Chlamys nobilis*) 中找到了 6 个与壳色相关的 AFLP 标记;何毛贤等^[29]从华贵栉孔扇贝 (*Argopecten irradians*) 橙黄壳色群体中分离出 1 个高特异性的 AFLP 标记,鉴定准确率可高达 100%;孙秀俊等^[30]用 RAPD 技术对比了虾夷扇贝白色贝和褐色贝群体的遗传差异,发现 S285-1 位点在大部分褐色贝中出现而在白色贝中完全缺失;在文蛤细纹品系中已找到一个高特异的 AFLP 分子标记,频率为 100%^[31],这些工作将为基因发掘、基因调控和分子标记辅助育种提供科学依据。

SSR 标记是目前海洋生物分子遗传学研究中最常用、最准确的手段,已被广泛用于水产动物与生长、抗病、壳色等性状相关标记的筛选及经济性状与基因间的相关关系分析中,如张天等^[32]对中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)

人工选育生长快的第 6 代群体的 7 个多态性微卫星位点进行了遗传分析,结果在大个体组和小个体组间找到 7 个片段表现差异;王桂兴等^[33]利用 30 对微卫星标记对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)雌核发育家系 91 个个体基因组 DNA 进行检测,结果发现有 8 个座位分别与体重、体长、体高等生长性状显著相关。在水产动物基因定位方面,Ozaki 等^[34]利用 51 个微卫星标记构建了虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的区域连锁图谱,定位了 2 个与抗病相关的 QTL;Fuji 等^[35]利用 SSR 标记将牙鲆抗淋巴囊肿疾病的单基因位点定位。本研究用 9 个微卫星位点对文蛤 4 个壳色花纹品系进行了遗传分析,9 个位点均表现出了很高的遗传多态性,检测出 4 个品系都存在遗传差异。但也存在不足,虽然在各品系中发现一些特异等位基因,但频率不高,目前文蛤壳色相关的分子标记开发的还较少,准确高效的分子标记辅助选育(marker assisted selection, MAS)体系尚未建立,随着文蛤 cDNA 转录组测序^[22]的完成和不久的将来全基因组测序的进行,大量开发微卫星标记和筛查壳色相关功能标记将成为可能,下一步应继续分离不同壳色品系的特异性分子标记,发掘出壳色决定的关键基因,并对壳色性状相关基因进行筛查、克隆和结构解析,揭示壳色形成的分子遗传机制,有利于分子遗传育种工作的进一步开展。

参考文献:

- [1] 庄启谦. 中国动物志. 软体动物门、双壳纲、帘蛤科 [M]. 北京:科学出版社,2001:1-278.
- [2] Zane L, Bargelloni L, Patamello T. Strategies for microsatellites isolation: a review [J]. Molecular Ecology, 2002, 11:1-16.
- [3] 冯建彬, 马克异, 李家乐, 等. 日本沼虾微卫星引物筛选及群体遗传多样性分析[J]. 水产学报, 2010, 34(5):688-695.
- [4] 赵广泰, 刘贤德, 王志勇, 等. 大黄鱼连续 4 代选育群体遗传多样性与遗传结构的微卫星分析[J]. 水产学报, 2010, 34(4):500-508.
- [5] Zheng K, Lin K, Liu Z, et al. Comparative microsatellite analysis of grass carp genomes of two gynogenetic groups and the Xiangjiang river group [J]. Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34(4):321-330.
- [6] 李思发, 陈林, 蔡完其. 吉奥罗非鱼(新吉富罗非鱼 × 奥利亚罗非鱼)和 4 个近缘遗传型罗非鱼的遗传差异的 RAPD, SSR 比较分析[J]. 水产学报, 2008, 32(5):657-664.
- [7] 叶小军, 王志勇, 刘贤德, 等. 大黄鱼连续两代人工雌核发育群体的微卫星标记分析[J]. 水生生物学报, 2009, 33(6):121-128.
- [8] 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, 13(12):72-75.
- [9] Zhan A B, Bao Z M, 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.
- [10] 李春艳, 丁君, 常亚青, 等. 虾夷扇贝微卫星标记的分离及其养殖群体的遗传结构分析[J]. 中国水产科学, 2009, 16(1):39-46.
- [11] Reece K S, Ribeiro W L, Gaffney P M, et al. Microsatellite marker development and analysis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: Confirmation of null alleles and non-Mendelian segregation ratios [J]. Heredity, 2004, 95:346-352.
- [12] 李琪, 木岛明博. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)微卫星克隆快速分离及特性分析[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(4):364-370.
- [13] 李莉, 孙振兴, 杨树德, 等. 用微卫星标记分析皱纹盘鲍群体的遗传变异[J]. 遗传, 2006, 28(12):1549-1554.
- [14] 陈淑吟, 吉红九, 许广平, 等. 文蛤微卫星 DNA 的筛选及其特性分析[J]. 生物技术通报, 2009, 12:134-138.
- [15] Lu X, Wang H X, Liu B Z, et al. Microsatellite-based genetic and growth analysis for a diallel mating design of two stocks of the clam, *Meretrix meretrix* [J]. Aquaculture Research, 2011:15-18.
- [16] 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, 6:364-377.
- [17] Hu J, Nakatani M, Lalusin A, et al. Development and characterization of microsatellite markers in sweet potato [J]. Breeding Science, 2004, 54:177-188.
- [18] Hachauf B, Wehling P. Identification of microsatellite polymorphism in an expressed portion of their e genome [J]. Plant Breeding, 2002, 21:17-25.
- [19] Scott K D, Eggler P, Seaton G, et al. Analysis of SSRs derived from grape ESTs [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100:723-726.

- [20] Zhan A B, Bao Z M, Wang X L, *et al.* Microsatellite markers derived from bay scallop *Argopecten irradians* expressed sequence tags [J]. *Fisheries Science*, 2005, 71: 1341 - 1346.
- [21] 廖洋. 水产养殖研究进入基因组时代 [N]. *科学时报*, 2010, 28(2): 7.
- [22] Huan P, Wang H X, Liu B Z. Transcriptomic analysis of the clam *Meretrix meretrix* on different larval stages [J]. *Marine Biotechnology*, 2011, DOI 10.1007/s10126-011-9389-0.
- [23] Hou R, Bao Z M, Wang S, *et al.* Transcriptome sequencing and *De Novo* analysis for yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) using 454 GS FLX [J]. *Plos One*, 2011, 6(6): 1 - 7.
- [24] 贺静静, 李晔, 李太武, 等. 泥蚶 (*Tegillarca granosa*) cDNA 文库的构建及铁结合蛋白基因 (Ferritin) 序列分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2009, 40(3): 289 - 295.
- [25] 秦玉明, 苏秀榕, 李晔, 等. 缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) cDNA 文库的构建及肌动蛋白基因的研究 [J]. *海洋与湖沼*, 2010, 41(1): 54 - 60.
- [26] Zhan A B, Hu J J, Wang X L, *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.
- [27] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *The American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 31 - 34.
- [28] Qin Y J, Liu X, Zhang H B, *et al.* Identification and mapping of amplified fragment length polymorphism markers linked to shell color in bay scallop, *Argopecten irradians irradians* (Lamarck, 1819) [J]. *Marine Biotechnology*, 2007(9): 66 - 73.
- [29] 何毛贤, 袁涛, 黄良民. 一种华贵栉孔扇贝橙黄壳色分子标记及其鉴定方法和试剂盒: 中国, CN101712992A [P]. 2009.
- [30] 孙秀俊, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 两种壳色虾夷扇贝的 RAPD 分析 [J]. *渔业科学进展*, 2009, 30(6): 110 - 117.
- [31] 朱东丽, 林志华, 董迎辉, 等. 文蛤 (*Meretrix meretrix*) 4 个壳色花纹品系的遗传差异分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2011, 42(3): 5 - 9.
- [32] 张天时, 刘萍, 李健, 等. 中国对虾与生长性状相关微卫星 DNA 分子标记的初步研究 [J]. *海洋水产研究*, 2006, 27(5): 35 - 38.
- [33] 王桂兴, 刘永新, 孙效文, 等. 牙鲆微卫星分子标记与生长性状的相关性分析 [J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(7): 77 - 84.
- [34] Ozaki A, Sakamoto T, Khoo S, *et al.* Quantitative trait loci (QTL) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2001, 265: 23 - 31.
- [35] Fuji K, Kobayashi K, Hasegawa O, *et al.* Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocytic disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Aquaculture*, 2005, 254: 203 - 210.

Genetic analysis among four strains of different shell colors and decorative patterns of *Meretrix meretrix* using microsatellite markers

ZHU Dong-li^{1,2}, DONG Ying-hui¹, LIN Zhi-hua^{1*}, YAO Han-han³

(1. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

2. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

3. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Genetic variation of four strains of *Meretrix meretrix*, thin checkered (TC), black spot (BS), dark fringe (DF) and red shell (RS) was studied. Thirty randomly selected individuals from each strain and nine polymorphic microsatellite loci were used for genetic analysis. A total of 105 alleles were identified, the most alleles were 21 (WG07) and the least locus were 7 (WG11). The distribution of the alleles for the same loci was different in different strains and specific allele types were detected in each strains. All the microsatellites were highly polymorphic, and various genetic variability measures, including observed heterozygosity (0.486 to 0.867), expected heterozygosity (0.110 to 1.000), and polymorphism information content (0.433 to 0.834), Chi-square tests showed that most of the cases in four strains deviated from Hardy-Weinberg equilibrium. Pairwise F_{ST} ranged from 0.005 to 0.269. Genetic distances among strains ranged from 0.052 to 0.098. The results of cluster analysis indicated that TC strain had higher genetic difference than other strains, then was BS strain, and the genetic variation between DF and RS strains was relatively lower.

Key words: *Meretrix meretrix*; shell color and decorative pattern; microsatellite markers; genetic structure

Corresponding author: LIN Zhi-hua. E-mail: zhihua9988@126.com