

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170503002

http://www.yyxjz.cn/

张广明, 孙秀俊, 吴彪, 杨爱国, 刘志鸿, 周丽青, 刘寒苗, 赵庆. 虾夷扇贝 EST-SSR 标记在栉孔扇贝中的通用性研究. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 139-146

Zhang GM, Sun XJ, Wu B, Yang AG, Liu ZH, Zhou LQ, Liu HM, Zhao Q. Transferability of EST-SSR from *Patinopecten yessoensis* into *Chlamys farreri*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 139-146

虾夷扇贝 EST-SSR 标记在栉孔扇贝 中的通用性研究*

张广明^{1,2,3} 孙秀俊^{1,2} 吴 彪^{1,2} 杨爱国^{1,2①}
刘志鸿^{1,2} 周丽青^{1,2} 刘寒苗^{1,2,3} 赵 庆^{1,2,3}

- (1. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 为研究虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的群体遗传多样性并分析其亲缘关系,对在虾夷扇贝中开发的 60 个 EST-SSR 位点在栉孔扇贝中的通用性进行了研究。结果显示,21 个位点可在栉孔扇贝中扩增出特异性条带,通用性比例达 35.00%,其中,17 个位点具有多态性,多态性比例达 28.33%。在虾夷扇贝和栉孔扇贝群体中,平均等位基因数(N_a)分别为 2.7647 和 2.3529;平均有效等位基因数(N_e)分别为 1.9487 和 1.6350;平均观测杂合度(H_o)为 0.6314 和 0.3333;平均期望杂合度(H_e)为 0.4569 和 0.3139;平均多态信息含量(PIC)为 0.3726 和 0.2597;Nei's (1973)基因多样性指数(I)分别为 0.4493 和 0.3087;Shannon 信息指数分别为 0.7176 和 0.5041;固定指数(F_{is})检测发现,7 个位点偏离了 Hardy-Weinberg 平衡;遗传分化系数(F_{st})为 0.2398。本研究开发的 21 对通用性 EST-SSR 标记,为进一步开展虾夷扇贝和栉孔扇贝遗传多样性分析、分子辅助育种、基因发掘和种质资源评价奠定了基础。

关键词 虾夷扇贝;栉孔扇贝;EST-SSRs;微卫星;多态性;通用性

中图分类号 S968.31 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0139-08

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)主要分布于我国北方近海、日本、韩国和俄罗斯等沿海。随着养殖规模的扩大,出现了养殖产量下降和病害频发等问题(王如才等, 2004)。而虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)属冷水

性双壳贝类,原产于日本北海道及本洲北部、俄罗斯千岛群岛的南部海域及朝鲜附近(常亚青等, 2008;杨爱国等, 2004)。近年来,随着养殖规模的扩大,虾夷扇贝养殖群体出现了苗种成活率低、成体小型化、

* 国家自然科学基金(31602153)、青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室开放基金(2016LMFS-B02)、海水养殖教育部重点实验室开放基金(KLM2018004)和山东省自然科学基金(ZR2016CQ32)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31602153), Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, P. R. China (2016LMFS-B02), the Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China (KLM2018004), and Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2016CQ32)]. 张广明, E-mail: zgm985623@163.com

① 通讯作者: 杨爱国, 研究员, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-05-03, 收修改稿日期: 2017-05-16

高死亡率和病害频发等问题(张明明等, 2008; 杨培民等, 2007; 李云峰等, 2011)。虾夷扇贝和栉孔扇贝在育苗和养殖上均遇到了瓶颈和无法单独解决的难题, 而应用遗传学手段进行良种培育, 选育抗病、抗逆和生长快的新品种(品系)是实现扇贝养殖业可持续发展的有效途径(Li *et al.*, 2005)。

EST-SSR 侧翼序列在物种之间高度保守, 因此, EST-SSR 引物可在物种之间通用。种间通用性分子标记作为重要的遗传学研究工具, 对种间进化关系研究、种间比较作图、通用性遗传图谱构建等具有重要的意义(王晓润, 2012)。虾夷扇贝和栉孔扇贝标记开发及应用的工作已有大量研究, 现已有 ISSR 技术(吕振明, 2006; 何斌等, 2007)、RAPD 技术(滕丽莉等, 2005)、SRAP 技术(程宁宁等, 2009)和 AFLP 技术(于涛等, 2011)研究了虾夷扇贝、栉孔扇贝的遗传特性, 但由于操作复杂或准确率低等缺点限制了分子标记的进一步发展, 而基因组 EST(表达序列标签, Expressed Sequence Tags, ESTs)兼具基因组微卫星标记的孟德尔遗传共显性的遗传特征和直接标记功能基因的优点, 同时, 相比其他分子标记, 可靠性更高, 且扩增的目标序列在基因的编码区开发成本较低, 遗传信息含量丰富等优点(刘芳, 2006)。因此, 本研究对 60 对虾夷扇贝 EST 引物在栉孔扇贝基因组中的通用性进行了分析, 对栉孔扇贝和虾夷扇贝的群体遗传多样性和群体遗传结构进行了分析, 以期为进一步的分子辅助育种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

虾夷扇贝(壳长为 10~12 cm)和栉孔扇贝(壳长为 7~8 cm)均于 2015 年 6 月取自山东烟台长岛养殖区, 从 2 个群体中分别随机选取 30 个个体作为研究材料, 活体运回实验室, -80°C 保存备用。

1.2 引物的设计与合成

从已发表的文献(Zhang *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2016)中选择多态性高且扩增效果好的 60 对虾夷扇贝微卫星引物, 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.3 模板 DNA 的制备

模板 DNA 提取自扇贝的闭壳肌。取其闭壳肌组织 100 mg 剪碎, 加入 500 μl 匀浆缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 100 mmol/L EDTA, pH 8.0), 混匀后加入终浓度为 0.5% 的 SDS 和 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的蛋白酶 K, 55°C 消化 3 h, 然后分别用等体积的酚: 氯仿(1:1),

氯仿: 异戊醇(24:1)抽提, 2 倍体积乙醇沉淀, ddH_2O 溶解。基因组 DNA 浓度由 GENEQUANTpro (Eppendorf) RNA/DNA 分析定量仪和琼脂糖凝胶电泳检测其质量。模板 DNA 用灭菌的超纯水稀释成 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, -20°C 保存备用。

1.4 PCR 扩增与电泳检验

PCR 反应体系总体积为 10 μl , 包括 $10\times$ Buffer 1 μl 、 Mg^{2+} (25 mmol/L)0.6 μl 、dNTPs (各 2 mmol/L) 1 μl 、上下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 1 μl 、模板 DNA 1 μl 、Taq DNA 聚合酶(Promega) 0.5 U, 加超纯水补足 10 μl 。反应在 Eppendorf 扩增仪上进行。PCR 反应程序: 95°C 预变性 2 min, 然后 95°C 45 s, 退火 45 s, 72°C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳进行预检测, 然后在 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离, 电泳结果银染显色。待凝胶干燥后使用扫描仪记录电泳图谱。

1.5 数据统计与分析

根据每个个体产生的条带位置确定其基因型, 利用 Cervus 3.0 软件计算多态信息含量(Polymorphism information content, PIC)、观测杂合度(Observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度(Expected heterozygosity, H_e)、等位基因数(Number of allele, N_a)、有效等位基因数(Effective number of allele, N_e)、Nei 群体间的相似性系数和群体间遗传距离以及 F -统计量进行遗传多样性的分析, 统计显著性水平用 Bonferroni 校正。

有效等位基因数:

$$N_e = 1 / \sum p_i^2$$

式中, p_i 为第 i 个等位基因的频率。

多态信息含量的计算方法:

$$\text{PIC} = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2p_i p_j^2 =$$

$$2 \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k p_i p_j (1 - p_i p_j)$$

式中, k 为等位基因数目, p_i 和 p_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因的频率。

平均杂合度观测值: H_o = 观察到的杂合个体总数/观察到的个体总数;

$$\text{期望杂合度: } H_e = 1 - \sum p_i^2$$

$$\text{固定指数}(F_{is}): F_{is} = 1 - (H_o/H_e)$$

$$F\text{-统计量}(F_{st}): F_{st} = \sigma^2 P / (1 - P)$$

式中, P 为某等位基因在整个群体中的平均频率; $\sigma^2 P$ 为该等位基因在分群体之间的方差。

Nei 群体间的相似性系数:

$$I = \sum(X_i Y_i) / [\sum(X_i)^2 \sum(Y_i)^2]^{1/2}$$

式中, X_i 、 Y_i 分别为 X 和 Y 群体第 i 个位点的等位基因频率。

Nei 群体间遗传距离:

$$D_A = -\ln I$$

加上偏差校正后为:

$$I = (2n-1) \sum(X_i Y_i) / \{\sum[2n(X_i)^2 - 1] \sum[2n(Y_i)^2 - 1]\}^{1/2}$$

式中, X_i 、 Y_i 分别为 X 和 Y 群体第 i 个位点的等

位基因频率。

2 结果

2.1 扇贝属间通用性引物的筛选

将 60 对虾夷扇贝微卫星引物在虾夷扇贝和栉孔扇贝基因组 DNA 中进行 PCR 扩增。根据电泳条带优化反应条件, 调整退火温度及时间, 最终有 21 对引物可稳定扩增, 条带之间较为清晰, 引物通用性比例达 35.00%, 其中, 17 对引物的扩增产物具有多态性, 占总数的 28.33%(表 1)。

表 1 在虾夷扇贝和栉孔扇贝基因组中扩增出多态性条带的 17 对 EST-SSRs

Tab.1 Seventeen polymorphic EST-SSRs were amplified from the genomes of the scallops *P. yessoensis* and *C. farreri*.

位点 Locus	引物序列 Primer sequence (5'-3')	大小 Size (bp)	重复 Repeat sequence	退火温度 T_m	登录号 GenBank
comp92213_c0 ^F	TGGATGTCCAGAATGTTTGCT TGGCTTTTCAAACCTTGACCCT	240	(AT) ₁₀	57.841	KU891218
comp91359_c0 ^F	TTGCGACCAGAGACGTATCG AGCACGATCACACGGCATAT	187	(ACGA) ₅	59.895	KU891211
comp87586_c0 ^F	GCCATGCAGACGTACAGAGA CGGAATGTTGCTGAAATGGACA	204	(AT) ₁₀	59.771	KU891224
comp100440_c1 ^F	TCCCGGAGCTCATGGTCTTA CAGCACTGGTACTTCCTTGCT	257	(TGTT) ₅	59.928	KU891210
comp98790_c0 ^F	TGTACACATGCACATCTACTACGA GGTCCATCAGCTTCACCCAA	262	(ATA) ₇	59.603	KU891209
comp88965_c0 ^F	CCGGTCTGAACTCGACCAA GGCCTCCAGGATTCTGTGTC	218	(ACC) ₇	59.967	KU891204
comp91909_c0 ^F	TGTGAACCGCTTTGAGACGA CAACGTTACACGATGGCCAC	246	(ATT) ₇	59.835	KU891207
contig_1217920 ^F	CACCATGAAAACCTGACACG CGGAGTACCCAGAGAAAAACA	140	(AC) ₁₁	59.225	KU999346
contig_1391603 ^F	GCAAGCGTTTATAAAATCACGA AAAGAATTCCTCGGAGCGTA	117	(AC) ₁₁	58.928	KU999357
contig_1443641 ^F	CCCTGATGTGAAGTTGAATGTT CCGATTTGGTCATGTAAATAGC	124	(CA) ₈	58.521	KU999349
contig_1451159 ^F	ACCTGATTTGGATGCCATTA GCTGTGGTGTGCTTGTCTGT	114	(CA) ₉	57.887	KU999344
contig_293601 ^F	CTGTTGCGAACCGAGTTTGT CGAAATACTCATAATTTGTCCCG	126	(TA) ₁₀	59.755	KU999369
contig_963940 ^F	TATACGGTGCTTTTCCCGAC ACCTCGGGCATTGTTACAG	120	(TG) ₈	59.96	KU999370
contig_915269 ^F	GGCAGGGTCAGTGTGTATAGC ACAAGGCTGTGAGAAACGCT	111	(TA) ₈	59.636	KU999362
contig_763705 ^F	TGAGCACTAACAAGGCTGACTC ACTGTGCAACGCTTGATTG	131	(AT) ₈	59.685	KU999378
contig_490627 ^F	TGTAGCCCTCTCTTGATCGTT ACCTTCCAGCCTTTCTCTC	120	(TA) ₉	58.947	KU999351
contig_988858 ^F	TCACATTACCCACGTGCTTG AACTAGTTGTGATAAAGCGGT	149	(AAT) ₇	57.046	KU999350

2.2 群体遗传结构

17 对 EST 引物在虾夷扇贝、栉孔扇贝群体中均能检测到较高的多态性,但多态性水平有所不同(表 2)。虾夷扇贝、栉孔扇贝群体等位基因数变化范围都为

2.00~4.00,平均等位基因数(N_a)分别为 2.7647 和 2.3529;平均有效等位基因数(N_e)分别为 1.9487 和 1.6350;观测杂合度(H_o)范围为 0.0667~0.9667 和 0~0.9667,平均为 0.6314 和 0.3333;期望杂合度(H_e)范围为 0.1588~0.6576 和 0.0333~0.6672,平均为 0.4569 和 0.3139;多

表 2 17 个 EST-SSR 位点在虾夷扇贝、栉孔扇贝各 30 个个体中的遗传特征
Tab.2 Characterization of 17 EST-SSRs in 30 scallops *P. yessoensis* and *C. farreri*

位点 Locus	群体 Populations	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	哈温伯格平衡 HW
comp92213_c0	F1	2	1.9802	0.8333	0.5034	0.3725	0**
	F2	2	1.0689	0.0667	0.0655	0.0623	0.8946
comp91359_c0	F1	2	1.4274	0.3667	0.3045	0.2546	0.5528
	F2	3	2.7397	0.6333	0.6458	0.5615	0.6349
comp87586_c0	F1	4	1.9868	0.7000	0.5051	0.4029	0.0324
	F2	2	1.0689	0.0667	0.0655	0.0623	0.8946
comp100440_c1	F1	2	1.2596	0.1667	0.2096	0.1849	0.3238
	F2	2	1.9802	0.9000	0.5034	0.3725	0**
comp98790_c0	F1	2	1.8000	0.6667	0.4520	0.3457	0.0108
	F2	3	2.0619	0.7333	0.5237	0.4244	0.0469
comp88965_c0	F1	2	1.9802	0.9000	0.5034	0.3725	0**
	F2	2	1.9978	0.9667	0.5079	0.3747	0**
comp91909_c0	F1	3	2.1127	0.8667	0.5356	0.4189	0**
	F2	2	1.8672	0.4000	0.4723	0.3566	0.3924
contig_1217920	F1	4	2.4691	0.8667	0.6051	0.5152	0.0655
	F2	4	2.1765	0.3333	0.5497	0.4927	0**
contig_1391603	F1	3	2.8302	0.8000	0.6576	0.5724	0.3070
	F2	2	1.0339	0.0333	0.0333	0.0323	1.0000
contig_1443641	F1	2	1.9978	0.9667	0.5079	0.3747	0**
	F2	2	1.6000	0.2333	0.3814	0.3047	0.0287
contig_1451159	F1	3	2.4862	0.9333	0.6079	0.5169	0**
	F2	3	2.9079	0.7667	0.6672	0.5814	0.0413
contig_293601	F1	3	1.1850	0.1667	0.1588	0.1500	0.9783
	F2	2	1.1421	0	0.1266	0.1168	0**
contig_963940	F1	2	1.8967	0.2333	0.4808	0.3610	0.0041
	F2	2	1.7630	0.3667	0.4401	0.3391	0.3499
contig_915269	F1	2	1.4706	0.3333	0.3254	0.2688	0.8901
	F2	2	1.1050	0.0333	0.0966	0.0905	0**
contig_763705	F1	3	2.5825	0.9000	0.6232	0.5421	0.0039
	F2	2	1.1421	0	0.1266	0.1168	0**
contig_490627	F1	4	2.4357	0.9667	0.5994	0.5036	0**
	F2	2	1.0339	0.0333	0.0333	0.0323	1.0000
contig_988858	F1	4	1.2270	0.0667	0.1881	0.1769	0**
	F2	3	1.1063	0.1000	0.0977	0.0936	0.9967

F1: 虾夷扇贝群体; F2: 栉孔扇贝群体。统计显著性水平用 Bonferroni 校正(Rice, 1989; $k=17$), *: $P<0.05$; **: $P<0.01$

F1: *P. yessoensis*; F2: *C. farreri*. Table-wide significance levels were applied, using the sequential Bonferroni technique (Rice, 1989; $k=17$), *: $P<0.05$; **: $P<0.01$

态信息含量(PIC)范围为 0.1500~0.5724 和 0.0323~0.5814, 平均为 0.3726 和 0.2597。

2.3 扇贝群体遗传变异性分析

虾夷扇贝和栉孔扇贝群体遗传结构变化和 21 对 EST 引物在 2 个群体内偏离 Hardy-Weinberg 平衡程度见表 2。从表 2 可以看出, 从 F_{is} 参数看, 2 个群体中 7 对引物偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 其中, 位点 comp88965_c0 在 2 个群体中均偏离了 Hardy-Weinberg 平衡。从 F -检验的数据来看(表 3), 配对比较 F_{st} 值 ($F_{st}<0.05$)。通过 17 对微卫星位点计算总的遗传分化系数(F_{st})为 0.2398, 表明有 23.98%的遗传变异来自于群体之间, 76.02%来自个体之间。此外, 对 F_{is} 值的计算表明, 除了 comp100440_c1、contig_963940 和 contig_988858 的 $F_{is}>0$, 其他 14 个位点 $F_{is}<0$, 呈现杂合子过剩状态。2 个扇贝群体在 comp91359_c0、comp100440_c1、comp91909_c0、contig_1217920、contig_1443641、contig_293601、contig_963940、contig_915269、contig_763705、contig_988858 10 个引物呈现一定程度的杂合子缺失。

表 3 扇贝 2 个群体 17 个微卫星位点的 F -检验分析
Tab.3 F -statistics for two scallop populations at seventeen microsatellite loci

位点 Locus	固定指数 F_{is}		遗传分化系数 F_{st}
	虾夷扇贝 <i>P. yessoensis</i>	栉孔扇贝 <i>C. farreri</i>	
comp92213_c0	-0.6835	-0.0345	0.3230
comp91359_c0	-0.2245	0.0026	0.1070
comp87586_c0	-0.4094	-0.0345	0.5489
comp100440_c1	0.1914	-0.8182	0.2113
comp98790_c0	-0.5000	-0.4239	0.2198
comp88965_c0	-0.8182	-0.9355	0.0044
comp91909_c0	-0.6456	0.1388	0.0078
contig_1217920	-0.4566	0.3834	0.1894
contig_1391603	-0.2371	-0.0169	0.2531
contig_1443641	-0.9355	0.3778	0.0752
contig_1451159	-0.5613	-0.1685	0.0315
contig_293601	-0.0676	1.0000	0.7283
contig_963940	0.5065	0.1528	0.0049
contig_915269	-0.0417	0.6491	0.0514
contig_763705	-0.4687	1.0000	0.1556
contig_490627	-0.6400	-0.0169	0.2692
contig_988858	0.6396	-0.0405	0.7352
平均 Mean	-0.4052	-0.0798	0.2398

3 讨论

3.1 虾夷扇贝 EST-SSR 位点的通用性研究

EST-SSR 标记来源于基因的编码区, 具有开发成本低、信息含量丰富、扩增效率高等优点(Wang *et al.*, 2009; 李云峰等, 2011)。本研究从虾夷扇贝的 EST 文库中分离和筛选了 60 对多态性位点, 多态性比例达 40.0%, 这与太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)EST-SSR 的多态性比例相似(王艳红等, 2007)。而刘博等(2011)研究表明, 缢蛏(*Sinonovacula constricta*)EST-SSR 的多态性比例达 35.0%, 与本研究结果基本一致。由于微卫星侧翼序列在种间或属间有高度保守性, 因此, 开发通用性位点应用于近源物种成为可能。有学者研究表明, 文蛤(*Meretrix meretrix*)微卫星引物在彩虹明樱蛤(*Moerella iridescens*)和青蛤(*Cyclina sinensis*)的引物通用性分别为 10.3%和 6.9%(李晓英等, 2010), 美洲紫海胆(*S.purpuratus*)EST-SSR 在光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)中的引物通用性为 22.50%(李晶晶, 2008)。而本研究中, 虾夷扇贝 EST-SSR 在栉孔扇贝中的引物通用性比例达 35.00%, 这与杨璞等(2008)和李晓英等(2010)的研究结果相一致, 但低于栉孔扇贝 cSNP 引物在虾夷扇贝中 52.27%的通用性比例(李晶晶, 2008), 原因可能是 SNP 标记相比 SSR 重复序列具有更高的遗传稳定性, 且更容易对数据进行自动化和规模化分析, 王晓润等(2012)的研究结果与本研究结果相一致。

3.2 虾夷扇贝 EST-SSR 位点的开发及群体遗传多样性分析

本研究中 2 个扇贝群体中的 F_{is} 大部分为负值, 表明这些基因座存在远交或杂交现象, 2 个种群均处于杂合度过剩状态, 这可能是纯合致死或是群体内自然选择引起的(张海滨, 2005; 王宇等, 2012)。Hardy-Weinberg 平衡和多态性信息含量是经常用来衡量群体遗传结构变异程度高低的重要参数。本研究发现, 有 7 个位点偏离了平衡, 可能是人为因素的干扰, 导致种群内基因缺失造成杂合子缺失。其中, 6 个位点为高度多态性基因座($PIC>0.5$), 占总位点数的 35.29%; 11 个位点为中度多态性基因座($0.25<PIC<0.5$), 占总数的 64.71%。说明本研究中所开发的微卫星位点在扇贝遗传多样性研究中可提供有效的遗传信息, 这与齐晓艳等(2013)得出相同的结论。17 对 EST 引物在虾夷扇贝群体中的 H_e 和 H_o 分别为 0.6314 和 0.4569, 高于在栉孔扇贝群体中的 H_e (0.3333)和 H_o (0.3139),

由此可知, 虾夷扇贝群体的遗传多样性略高于栉孔扇贝群体。同时, 这组数据高于利用 AFLP 研究不同地理群体虾夷扇贝遗传多样性的平均杂合度, 可能是 SSR 比 AFLP 技术更加灵敏导致, 刘芳(2006)、薛明等(2006)的研究也说明这一点。

参 考 文 献

- Chang YQ, Chen XX, Ding J, *et al.* Genetic diversity in five scallop populations of the Japanese scallop(*Patinopecten yessoensis*). *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(3): 1145–1152 [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. *生态学报*, 2007, 27(3): 1145–1152]
- Chang YQ, Zhang CS, Cao XB, *et al.* Effect of morphometrical traits on weight traits in one-year old Yesso scallop *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2008, 23(5): 330–334 [常亚青, 张存善, 曹学彬, 等. 1龄虾夷扇贝形态性状对重量性状的影响效果分析. *大连海洋大学学报*, 2008, 23(5): 330–334]
- Cheng NN, Yang AG, Liu ZH, *et al.* Analysis on heterosis of *Chlamys farreri* × *Patinopecten yessoensis* by SRAP marker. *Marine Sciences*, 2009, 33(10): 107–111 [程宁宁, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 栉孔扇贝(♀) × 虾夷扇贝(♂)子一代杂种优势的 SRAP 分析. *海洋科学*, 2009, 33(10): 107–111]
- He B, Yang AG, Wang QY, *et al.* ISSR analysis of the F₁ hybrids of scallop *Chlamys farreri* ♀ × *Patinopecten yessoensis* ♂. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2007, 22(4): 273–277 [何斌, 杨爱国, 王清印, 等. 栉孔扇贝♀ × 虾夷扇贝♂单对杂交子一代的 ISSR 分析. *大连海洋大学学报*, 2007, 22(4): 273–277]
- Li JJ. Isolation and characterization of microsatellite markers in two species of bivalve and sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2008 [李晶晶. 两种双壳贝类和光棘球海胆微卫星标记的分离及特性研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2008]
- Li L, Xiang JH, Liu X, *et al.* Construction of AFLP-based genetic linkage map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston and mapping of sex-linked markers. *Aquaculture*, 2005, 245(1–4): 63–73
- Li XY, Dong ZG, Yan BL *et al.* A Study on the universality of partial shellfish microsatellites in GenBank in *Cyclina sinensis* and *Moerella iridescens*. First International Conference on Cellular, Molecular Biology, Biophysics and Bioengineering, 2010 [李晓英, 董志国, 阎斌伦, 等. GenBank 中部分贝类微卫星标记在青蛤和彩虹明樱蛤的通用性研究. 第 I 届细胞生物学, 分子生物学, 生物物理与生物工程国际会议, 2010]
- Li YF, Liu WD, Gao XG, *et al.* Construction of cDNA libraries from mantle and kidney of Japanese scallop(*Mizuhopecten yessoensis*) and ESTs analysis. Academic Annual Meeting of China Fisheries Society, 2011, 578–585 [李云峰, 刘卫东, 高祥刚, 等. 虾夷扇贝外套膜和肾脏组织 cDNA 文库构建以及 EST 的初步分析. 中国水产学会学术年会, 2011, 578–585]
- Liu B, Shao YQ, Teng SS, *et al.* Characterization, development and utilization of EST-derived microsatellites in *Sinonovacula constricta*. China Zoological Society, Shellfish China Institute of Oceanology and Limnology Society of the Ninth Congress and the Fifteenth National Symposium on Shellfish Abstract Set, 2011 [刘博, 邵艳卿, 滕爽爽, 等. 缢蛏 EST-SSR 分布特征及引物开发利用. 中国动物学会、中国海洋湖沼学会贝类学分会第九次会员代表大会暨第十五次学术讨论会会议摘要集, 2011]
- Liu F. Genetic diversity of different populations of *Patinopecten yessoensis* using AFLP and SSR molecular markers. Master's Thesis of Liaoning Normal University, 2006 [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. 辽宁师范大学硕士研究生学位论文, 2006]
- Liu XL, Chang YQ, Xiang JH, *et al.* Analysis of effects of shell size characters on live weight in Chinese scallop *Chlamys farreri*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2002, 33(6): 673–678 [刘小林, 常亚青, 相建海, 等. 栉孔扇贝壳尺寸性状对活体重的影响效果分析. *海洋与湖沼*, 2002, 33(6): 673–678]
- Lv ZM. Cytogenetic and molecular analysis of hybridization between *Chlamys farreri* and *Patinopecten yessoensis*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2006 [吕振明. 栉孔扇贝和虾夷扇贝杂交过程中的细胞与分子遗传学分析. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2006]
- Qi XY, Dong YH, Yao HH, *et al.* Identification of 30 microsatellite markers in *Meretrix meretrix* and their transferability in *Meretrix lamarckii* and *Meretrix lyrat*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(8): 1147–1154 [齐晓艳, 董迎辉, 姚韩韩, 等. 文蛤 30 个微卫星标记的开发及在斧文蛤和帘文蛤中的通用性检测. *水产学报*, 2013, 37(8): 1147–1154]
- Sun XJ, Zhang GM, Zhou LQ, *et al.* Development of genome-wide microsatellite genetic resources by using RAD tag sequencing in Yesso scallop *Patinopecten yessoensis*. *Conservation Genetic Resource*, 2016, 8(2): 192–194
- Teng LL, Yang AG, Zhao F, *et al.* Analysis on heterosis of *Chlamys farreri* × *Patinopecten yessoensis* by RAPD marker. *Chinese High Technology Letters*, 2005, 15(6): 97–101 [滕丽莉, 杨爱国, 赵峰, 等. 栉孔扇贝 × 虾夷扇贝子一代杂

- 种优势的 RAPD 分析. 高技术通讯, 2005, 15(6): 97-101]
- Wang RC, Zheng XD. Progress of marine shellfishes culture in China and its prospect. Periodical of Ocean University of China(Natural Science), 2004, 34(5): 775-780 [王如才, 郑小东. 我国海产贝类养殖进展及发展前景. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2004, 34(5): 775-780]
- Wang XL, Song B, Qiu XM, *et al.* Development of EST-SSRs in scallop (*Patinopecten yessoensis*) from sequence database. Conservation Genetics, 2009, 10(4): 1129-1131
- Wang XJ. Development of cSNP markers in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) and their cross-species applications. Master's Thesis of Ocean University of China, 2012[王晓润. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)cSNP 标记的开发及其种间通用性研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Wang Y, Li L, Zhang SD, *et al.* Microsatellite segregation distortion analysis of the out bred, inbred and selfed families of the Bay scallop(*Argopecten irradians*). Marine Sciences, 2012, 36(8): 109-115 [王宇, 李莉, 张守都, 等. 海湾扇贝杂交、近交和自交家系的微卫星标记偏分离分析. 海洋科学, 2012, 36(8): 109-115]
- Wang YH, Ren R, Yu ZN. Exploitation of EST-SSR markers for *Crassostrea gigas*. China Zoological Society, Shellfish China Institute of Oceanology and Limnology society of the Eighth Congress and the Thirteenth National Symposium on Shellfish Abstract Set, 2007 [王艳红, 任睿, 喻子牛. 太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)的 EST-SSR 标记开发. 中国动物学会、中国海洋湖沼学会贝类学分会第八次会员代表大会暨第十三次全国贝类学术讨论会论文摘要集, 2007]
- Xue M, Du XD, Huang RL, *et al.* Biochemical genetic variation within three wild populations of *Meretrix meretrix*. Marine Science Bulletin, 2006, 25(1): 38-43 [薛明, 杜晓东, 黄荣莲, 等. 文蛤三个野生种群的生化遗传变异. 海洋通报, 2006, 25(1): 38-43]
- Yang AG, Wang QY, Liu ZH, *et al.* The hybrid between the scallops *Chlamys farreri* and *Patinopecten yessoensis* and the inheritance characteristics of its first filial generation. Marine Fisheries Research, 2004, 25(5): 1-5 [杨爱国, 王清印, 刘志鸿, 等. 栉孔扇贝与虾夷扇贝杂交及子一代的遗传性状. 渔业科学进展, 2004, 25(5): 1-5]
- Yang P, Yang AG, Liu ZH, *et al.* The selection of universal microsatellite primers between *Patinopecten yessoensis* and *Chlamys farreri* and its application in hybrid identification. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(19): 8287-8289 [杨璞, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 栉孔扇贝和虾夷扇贝通用微卫星引物的筛选及其在杂种鉴定中的应用. 安徽农业科学, 2008, 36(19): 8287-8289]
- Yang PM, Yang AG, Liu ZH, *et al.* Cryopreservation of *Patinopecten yessoensis* sperm and its application to hybridization. Journal of Shanghai Ocean University, 2007, 16(4): 351-356 [杨培民, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 虾夷扇贝精子的冷冻保存及其杂交试验应用研究. 上海海洋大学学报, 2007, 16(4): 351-356]
- Yu T, Yang AG, Zhou LQ, *et al.* Genetic variation of *Chlamys farreri*, *Patinopecten yessoensis* and their hybrids. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(3): 574-580 [于涛, 杨爱国, 周丽青, 等. 栉孔扇贝、虾夷扇贝及其杂交子代的群体遗传多样性分析. 中国水产科学, 2011, 18(3): 574-580]
- Zhang GM, Sun XJ, Zhou LQ, *et al.* Isolation and characterization of 44 microsatellite markers in Yesso scallop *Patinopecten yessoensis* by transcriptome mining. Conservation Genetic Resource, 2016, 8(2): 186-188
- Zhang HB. Inbreeding effect and genetic improvement of Bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck). Master's Thesis of University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2005 [张海滨. 海湾扇贝近交生物学效应和遗传改良研究. 中国科学院大学研究生院(海洋研究所)硕士研究生学位论文, 2005]
- Zhang MM, Zhao W. Causes of death of *Patinopecten yessoensis* in China and control measures. China Fisheries, 2008(2): 65-66 [张明明, 赵文. 我国虾夷扇贝死亡原因的探讨及控制对策. 中国水产, 2008(2): 65-66]

(编辑 陈严)

Transferability of EST-SSR from *Patinopecten yessoensis* into *Chlamys farreri*

ZHANG Guangming^{1,2,3}, SUN Xiujun^{1,2}, WU Biao^{1,2}, YANG Aiguo^{1,2①},
LIU Zhihong^{1,2}, ZHOU Liqing^{1,2}, LIU Hanmiao^{1,2,3}, ZHAO Qing^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract In this study, expressed sequence tag (EST)-SSR markers were developed to investigate the genetic relationship between two commercially important scallop species, Yesso scallop *Patinopecten yessoensis* and Zhikong scallop *Chlamys farreri*. A total of 60 EST-SSRs previously developed from *P. yessoensis* were selected, and their cross-species amplification in *C. farreri* was analyzed. As a result, 21 pairs of EST-SSR primers showed unique PCR products. The interspecies transferability was calculated to be 35.00%. Among the 21 EST-SSR primers, 17 were polymorphic in the studied populations, which resulted in 28.33% transferability. In the two populations of *P. yessoensis* and *C. farreri*, the number of alleles ranged from 2.00 to 4.00, with mean allele numbers of 2.7647 and 2.3529, respectively. The mean effective number of alleles was estimated to be 1.9487 and 1.6350, while the mean observed heterozygosity was 0.6314 and 0.3333, respectively. Similar to the observed heterozygosity, the mean expected heterozygosity was higher in *P. yessoensis* (0.4569) than in *C. farreri* (0.3139). For the two populations, the diversity index was consistently higher in *P. yessoensis* than in *C. farreri*. The mean polymorphism information content was estimated to be 0.3726 and 0.2597, and Nei's (1973) gene diversity index was calculated to be 0.4493 and 0.3087, respectively. Furthermore, Shannon's information index in the two populations was 0.7176 and 0.5041, respectively. The genetic identity between the two species was calculated to be 0.619, with a high genetic divergence between them (0.480). Among the polymorphic markers, seven loci significantly deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium according to the average fixation index (F_{is}). The genetic differentiation index (F_{st}) between the two populations was estimated to be 0.2398. The EST-SSR markers developed for cross-species amplification of *P. yessoensis* and *C. farreri* are important resources for the study of genetic diversity, marker-assisted breeding, gene discovery, and genetic evaluation of germplasm resources.

Key words *Patinopecten yessoensis*; *Chlamys farreri*; EST-SSRs; Microsatellites; Polymorphism; Transferability

① Corresponding author: YANG Aiguo, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn