

文章编号: 1674-5566(2013)04-0510-08

## 两种壳色文蛤选育亲本及其子一代的 SSR 和 ISSR 分析

郑培<sup>1</sup>, 陈爱华<sup>2</sup>, 沈和定<sup>1</sup>, 张志伟<sup>2</sup>, 姚国兴<sup>2</sup>, 吴杨平<sup>2</sup>, 张雨<sup>2</sup>,  
王成暖<sup>1</sup>, 周娜<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226007)

**摘要:** 利用 9 对 SSR 引物和 6 条 ISSR 引物对江苏省文蛤良种场保存的红、黄两种壳色文蛤选育亲本(分别以 PR 和 PY 表示)及其子一代(红壳色文蛤亲本的后代产生壳色分离分别为红壳色子一代 RF<sub>1</sub>R、黄壳色子一代 RF<sub>1</sub>Y, 黄壳色文蛤亲本的后代全部为黄壳色 YF<sub>1</sub>)进行遗传多样性监测。9 对微卫星引物在文蛤 5 个群体的多态信息含量(PIC)在 0.643 0~0.704 9 之间, 表观杂合度(N<sub>a</sub>) 在 0.745 5~0.794 6 之间, 期望杂合度(N<sub>e</sub>) 为 0.717 5~0.752 0。6 条 ISSR 引物在 5 个文蛤群体中多态位点百分率为 92.11%~97.37%, Shannon 多样性指数(I) PR 最高为 0.503 3, RF<sub>1</sub>Y 最低为 0.412 6。两种标记均显示了较高的多态性。与红、黄壳色亲本相比, 3 种壳色后代的遗传多样性均未发生显著变化。两种标记对 5 个文蛤群体的聚类结果基本一致: 5 个群体聚为两大类, 红壳色亲本文蛤及其子代为一类, 即 RF<sub>1</sub>R 群体和 RF<sub>1</sub>Y 群体先聚一起, 然后再与 PR 群体聚在一起; 另外黄壳色亲本文蛤及其子代为一类, 即 PY 群体与 YF<sub>1</sub> 群体聚一起, 最后统一聚为一类。就整体而言, 两种标记所检测的多样性均在同一水平, 也就是说经过一代的选育, 其多样性水平变化并不明显, 仍保持较高水平, 可以继续进行下一代人工繁殖选育。

**研究亮点:** 目前对文蛤遗传多样性研究多集中在对野生群体或无世代关系群体的研究。本文针对当前热点, 结合文蛤新品系选育, 对选育各世代群体进行遗传多样性分析, 时刻对各选育群体进行检测, 以加快选育进程, 为更早获得文蛤新品系提供理论支持。

**关键词:** 文蛤; 选育; SSR; ISSR

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

随着分子生物学的飞速发展, DNA 分子标记技术的进步也呈现出日新月异的局面, 自 20 世纪 80 年代以来, 先后出现了 RFLP、RAPD、AFLP、SRAP、SSR、ISSR 和 SNP 等多种分子标记, 并已广泛用于动、植物遗传多样性检测、连锁图谱的构建及重要基因的定位和克隆。

SSR (simple sequence repeat) 是一类以 2~5 个核苷酸为基本单位, 多次串联重复的 DNA 序列, 具有数量多、分布广且均匀、呈共显性遗传、多态性丰富分析快速等优点, 已成为遗传图谱构建、功能基因定位标记、QTL 连锁分析标记辅助选择检测种群内遗传变异和种群间遗传距离等

多项研究中的重要标记。1994 年, ZIETKEIWITCZ 等在微卫星分子标记的基础上发展了另一种分子标记 ISSR (inter-simple sequence repeat)。其基本原理是: 用锚定的 SSR DNA 为引物, 在 PCR 反应中所扩增的 inter SSR 区域的多个条带通过聚丙烯酰胺凝胶电泳得以分辨, 扩增谱带多为显性表现。

目前, 用于文蛤群体多样性分析的分子标记已有很多, 如 SSR<sup>[1]</sup>、RAPD<sup>[2]</sup>、ISSR<sup>[3]</sup>、AFLP<sup>[4]</sup>、SRAP<sup>[5]</sup> 等, 但多是对文蛤野生群体的研究。选育过程中, 及时对各世代群体遗传多样性检测, 是选育子代遗传多样性可预测性的保证。本研究

收稿日期: 2012-12-31 修回日期: 2013-03-14

基金项目: 江苏省科技支撑计划 (BE2010317、PJ2010-50); 南通市农业科技创新计划项目 (AS2010021、HL2011016); 南通科技应用研究计划项目 (BK2012021); 上海市教育委员会重点学科项目 (J50701)

作者简介: 郑培 (1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物学。E-mail: zhengpei09@163.com

通信作者: 陈爱华, E-mail: chenah540540@yahoo.com.cn

结合当前需要,针对文蛤良种选育,对选育亲本及其子代群体进行多样性分析,旨在为文蛤的良种培育提供理论基础,以期加快良种选育速率。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

试验用文蛤均取自于江苏省文蛤良种场,其中繁殖用亲本捕自野生种群,于江苏省文蛤良种场保存两年,子一代群体为 2009 年,以野生文蛤为亲本,人工繁殖,并于江苏省文蛤良种场养成,保存。依据其亲代关系和壳色的不同,共分为 5 个群体文蛤:亲本群体中有亲本红壳色文蛤(用 PR 表示,以下括弧内均为群体代码)、亲本黄壳色文蛤(PY)两种壳色群体。红壳色文蛤亲本繁殖子一代出现壳色性状分离,主要有子一代红壳色文蛤(RF<sub>1</sub>R)、子一代黄壳色文蛤(RF<sub>1</sub>Y),黄壳色文蛤亲本子一代均为黄壳色文蛤(YF<sub>1</sub>)。亲本壳长 53.89 ~ 71.19 mm,粒重 40.2 ~ 80.5 g,繁殖子一代壳长 12.15 ~ 75.89 mm,粒重 0.43 ~ 82.23 g,每个群体各取 30 个个体。

### 1.2 DNA 提取

试验采用活体取样,每个样本取约 0.2 g 文蛤斧足肌肉,用滤纸吸干水分置于 1.5 mL 的离心管剪碎,分别加入 410  $\mu$ L STE 缓冲液,80  $\mu$ L 的 10% SDS,10  $\mu$ L 蛋白酶 K (20 mg/mL) 混匀,55  $^{\circ}$ C 消化至无大块组织,用苯酚、氯仿各抽提一次,取上清移至新管,加入等体积的异丙醇沉淀,12 000 r/min 离心 10 min,小心倒去上清。沉淀用 70% 的乙醇洗 2 次,再用 100  $\mu$ L 双蒸水溶解,在 0.8% 的琼脂糖凝胶上检测 DNA 的质量和纯度。

### 1.3 PCR 反应体系

实验所用 SSR 引物选用陈淑吟等<sup>[6-7]</sup>研究,PCR 反应采用 30  $\mu$ L 体系:2  $\times$  Taq Master Mix 15  $\mu$ L,上下游引物各 1  $\mu$ L,模板 DNA 1  $\mu$ L,灭菌双蒸水补足 30  $\mu$ L。PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火 30 s,退火温度依各个引物而定(表 1),72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s,30 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

ISSR 引物为加拿大 British Columbia 大学研究的成套引物,PCR 反应采用 30  $\mu$ L 体系:2  $\times$  Taq Master Mix 15  $\mu$ L,上下游引物各 1  $\mu$ L,模板 DNA 1  $\mu$ L,灭菌双蒸水补足 30  $\mu$ L。PCR 反应条

件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s,退火 45 s,退火温度依各个引物而定(表 1),72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s,30 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

### 1.4 扩增产物电泳与染色

扩增产物采用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳,快速银染法显色<sup>[8]</sup>。

### 1.5 数据分析

用 gel-pro 32 分析电泳图谱,并进行基因分型操作利用 popgene 32 进行基因频率等位基因数杂合度统计分析,位点上的多态性信息含量 PIC 用 PIC\_Calc 6.0 计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 标记结果

#### 2.1.1 SSR 标记引物筛选

依据陈淑吟等<sup>[6-7]</sup>的研究,经 PCR 扩增,最终筛选出 9 对多态性高、目标条带清晰的微卫星位点,其引物序列、退火温度、GenBank 登录号见表 1。

#### 2.1.2 SSR 标记等位基因数

用筛选出的 9 对微卫星引物,对文蛤 5 个群体进行 PCR 扩增,共检测到 58 个等位基因,每个位点测出的等位基因数从 4 ~ 11 不等。5 个群体的平均等位基因数在 5.888 9 ~ 6.333 3 之间。其中,红壳色亲本文蛤(PR)群体平均等位基因最大,为 6.333 3,黄壳色亲本文蛤(PY)群体平均等位基因最小,为 6。5 个群体平均有效等位基因在 3.962 1 ~ 4.469 8 之间,红壳色文蛤子一代中红壳色文蛤(RF<sub>1</sub>R)群体平均有效等位基因最小,为 3.962 1,黄壳色文蛤子一代黄壳色文蛤(YF<sub>1</sub>)群体平均有效等位基因最大,为 4.469 8(表 2)。

#### 2.1.3 SSR 标记的杂合性检测

杂合度是表征群体遗传变异程度的物理量,红壳色亲本、黄壳色亲本、红壳色亲本子一代中红壳色文蛤、红壳色亲本子一代中黄壳色文蛤、黄壳色亲本子一代黄壳色文蛤 5 群体各个群体观察杂合度(Obs\_Het)平均值分别为:0.777 7,0.776 4,0.745 5,0.752 3,0.794 6;根据 LEVENE<sup>[9]</sup>各群体期望杂合度(Exp\_Het)平均值依次为:0.743 8,0.746,0.729 7,0.760 8,0.765 9;根据 NEI<sup>[10]</sup>各群体期望杂合度(Nei)平均值为 0.731 5,0.728 7,0.717 5,0.748,0.752。

期望杂合度略低于观察杂合度, Nei's 期望杂合度略低于 Levene 期望杂合度, 见表 3。

表 1 9 个微卫星引物序列

Tab. 1 Primer sequences of 9 microsatellites

位点	引物序列(5' - 3')	退火温度/°C	GenBank 登录号
WG307	F:AGCTACGCTATACTCCACACTC R:GGACCAGACACAATGTATAAACT	58	FJ232978
WG323	F:GCCATAACAGTCTCTACAAACGG R:CGATCAATGATAGTTCAAAG	60	FJ232980
WG335	F:ATAACTCTCCCACTCTAAAACCTC R:TAGAATGGGAGCATGTGATAG	52	FJ232981
WG337	F:TCATGGCATGTGTTTAGAAGG R:TTTATCGTTGTGATTGACAGTTC	52	FJ232982
WG347	F:GTGATTCCAATATAGCTTCCCC R:GCACATAGGCAAAACAATAGACAG	58	FJ232983
WG607	F:ATGAATCTTGAAAACCTCTGGGTG R:AATCAAATGTTTCTGGCGG	60	FJ232985
WG609	F:TAAAGTTTGGGCAGACACTCGGT R:CGTTTCCAAGCAACAGGGCATAAC	59	FJ232986
WG610	F:TCATTGCTTACTATTGGTTGGTC R:TCGATTGCGAAACAAGTTCTAAC	62	FJ232987
WG633	F:GGGTGTTACTAGCACTGGCAG R:TAGTATGGCGACGAATGAGGTTG	58	FJ232988

表 2 9 个微卫星位点在文蛤 5 个群体上的等位基因数统计

Tab. 2 The allele statistics of 9 microsatellite loci in five groups of *Meretrix meretrix*

位点	参数	PR	RF <sub>1</sub> R	RF <sub>1</sub> Y	PY	YF <sub>1</sub> Y
WG307	N <sub>a</sub>	5	5	5	5	5
	N <sub>e</sub>	2.885 9	2.748 1	3.041 6	3.142 9	3.511 7
WG323	N <sub>a</sub>	6	6	6	6	6
	N <sub>e</sub>	4.203 8	4.186	4.672 2	4.546 4	4.777 4
WG335	N <sub>a</sub>	11	10	10	10	10
	N <sub>e</sub>	8.178 7	5.806 5	5.405 4	7.014 5	7.293
WG337	N <sub>a</sub>	9	9	10	8	8
	N <sub>e</sub>	4.275 5	6.183 8	6.020 1	5.653 8	6.452 7
WG347	N <sub>a</sub>	4	4	4	4	4
	N <sub>e</sub>	2.269 2	2.139 9	2.658 8	2.304 8	2.856 1
WG607	N <sub>a</sub>	5	5	5	5	5
	N <sub>e</sub>	3.680 5	4.090 9	4.090 9	3.955 2	3.760 2
WG609	N <sub>a</sub>	7	6	6	6	5
	N <sub>e</sub>	4.1602	2.612 5	3.813 6	2.75	3.604 6
WG610	N <sub>a</sub>	6	6	6	6	6
	N <sub>e</sub>	5.1117	4.326 9	4.433 5	4.5	5.192 1
WG633	N <sub>a</sub>	4	4	4	4	4
	N <sub>e</sub>	3.055 6	3.564 4	3.765 7	3.205 3	2.780 1
平均	N <sub>a</sub>	6.333 3	6.111 1	6.222 2	6	5.888 9
	N <sub>e</sub>	4.202 3	3.962 1	4.211 3	4.119 2	4.469 8

#### 2.1.4 SSR 标记多样性检测

香农信息指数(Shannon's information index)最初在信息理论中作为测量熵概念被提出。目前,已广泛应用于群体遗传多样性检测中。多态

信息含量(PIC)是衡量位点多样性的一个指标,表示后代获得某个等位基因来自它的父本或母本的同个等位基因的可能性。当  $PIC > 0.5$  时,该基因座为高度多态基因座,  $0.25 < PIC <$

0.5时为中度多态基因座, PIC < 0.25 时为低度多态(计算各个位点在群体的 PIC 平均值,以便表征该位点的特征),本研究中 9 个微卫星位点均为高度多态位点,可运用于文蛤遗传多样性的研究。

5 个文蛤群体的香农信息指数和多态性信息

含量见表 4。从表 4 可以看出 5 个文蛤群体香农信息指数(I)在 1.463 8 ~ 1.553 7 之间,其中, YF<sub>1</sub>群体最高, RF<sub>1</sub>R 群体最低。多态性信息含量在 0.643 0 ~ 0.704 9 之间。其中, RF<sub>1</sub>Y 群体最高, PY 群体最低。

表 3 9 个微卫星位点在文蛤 5 个群体上的杂合性统计

Tab. 3 The heterozygosity statistics of 9 microsatellite loci in five groups of *Meretrix meretrix*

位点	参数	PR	RF <sub>1</sub> R	RF <sub>1</sub> Y	PY	YF <sub>1</sub>
WG307	Obs_Het	0.774 2	0.733 3	0.517 2	0.772 7	0.846 2
	Exp_Het	0.664 2	0.646 9	0.683 0	0.697 7	0.729 3
	Nei	0.653 5	0.636 1	0.671 2	0.681 8	0.715 2
WG323	Obs_Het	0.714 3	0.733 3	0.758 6	0.666 7	0.769 2
	Exp_Het	0.776 0	0.774 0	0.799 8	0.799 1	0.806 2
	Nei	0.762 1	0.761 1	0.786 0	0.780 0	0.790 7
WG335	Obs_Het	0.935 5	0.800 0	0.700 0	0.954 5	0.892 9
	Exp_Het	0.892 1	0.841 8	0.828 8	0.877 4	0.878 6
	Nei	0.877 7	0.827 8	0.815	0.857 4	0.862 9
WG337	Obs_Het	0.666 7	0.655 2	0.800 0	0.857 1	0.857 1
	Exp_Het	0.779 1	0.853 0	0.848 0	0.843 2	0.860 4
	Nei	0.766 1	0.838 3	0.833 9	0.823 1	0.845 0
WG347	Obs_Het	0.967 7	0.965 5	0.933 3	0.727 3	0.892 9
	Exp_Het	0.568 5	0.542 0	0.634 5	0.579 3	0.661 7
	Nei	0.559 3	0.532 7	0.623 9	0.566 1	0.649 9
WG607	Obs_Het	0.586 2	0.866 7	0.833 3	0.857 1	0.785 7
	Exp_Het	0.741 1	0.768 4	0.768 4	0.765 4	0.747 4
	Nei	0.728 3	0.755 6	0.755 6	0.747 2	0.734 1
WG609	Obs_Het	0.709 7	0.633 3	0.700 0	0.500 0	0.642 9
	Exp_Het	0.772 1	0.627 7	0.750 3	0.651 2	0.735 7
	Nei	0.759 6	0.617 2	0.737 8	0.636 4	0.722 6
WG610	Obs_Het	0.741 9	0.700 0	0.600 0	0.571 4	0.535 7
	Exp_Het	0.817 6	0.781 9	0.787 6	0.796 7	0.822 1
	Nei	0.804 4	0.768 9	0.774 4	0.777 8	0.807 4
WG633	Obs_Het	0.903 2	0.900 0	0.866 7	0.863 6	0.928 6
	Exp_Het	0.683 8	0.731 6	0.746 9	0.704 0	0.651 9
	Nei	0.672 7	0.719 4	0.734 4	0.688 0	0.640 3
平均	Obs_Het	0.777 7	0.776 4	0.745 5	0.752 3	0.794 6
	Exp_Het	0.743 8	0.729 7	0.760 8	0.746 0	0.765 9
	Nei	0.731 5	0.717 5	0.748 0	0.728 7	0.752 0

#### 2.1.5 SSR 标记的 Nei's 遗传距离和遗传相似系数

遗传距离是反映群体间遗传分化程度的物理量,遗传相似系数常用来分析群体之间的亲缘关系。张爱兵等<sup>[11]</sup>综述了遗传距离的概念、背景,关于遗传距离的一般假定是:遗传距离是起源于共同祖先的相同基因进化趋异的一种测度。

由表 5<sup>[12]</sup>可知,5 个群体文蛤间的最大遗传距离是红壳色亲本文蛤(PR)群体与黄壳色亲本文蛤(PY)群体之间距离,为 0.219 4。最小遗传距离在黄壳色亲本文蛤(PY)群体与其子一代黄

壳色文蛤(YF<sub>1</sub>)群体之间,为 0.062 9;其次最小遗传距离是红壳色亲本文蛤(PR)群体与其子一代中红壳色文蛤(RF<sub>1</sub>R)群体,为 0.079 9。根据文蛤 5 个群体间的遗传距离,用 UPGMA 法进行聚类分析(图 1),从图中可以看出,5 个群体聚为两大类,红壳色亲本文蛤及其子代为一类,即 RF<sub>1</sub>R 群体和 RF<sub>1</sub>Y 群体先聚一起,然后再与 PR 群体聚在一起;另外黄壳色亲本文蛤及其子代为一类,即 PY 群体与 YF<sub>1</sub> 群体聚一起;最后统一聚为一类。SHAKLEE 等<sup>[13]</sup>综合已发表的信息,提

出鱼类在属、种和种群 3 级水平上的遗传距离分别为 0.9、0.3 及 0.05。借此依据,本研究所得遗传距离均在 0.05 ~ 0.3 之间,表明 5 个文蛤群体在人工选择的压力下已经出现了一定的遗传分化。

遗传相似系数常用来分析群体之间的亲缘关系,如果两个群体遗传相似系数越接近 1,表明它们的亲缘关系越接近<sup>[14]</sup>。本实验 5 个文蛤群体的遗传相似系数在 0.803 ~ 0.939,表明群体间亲缘关系较近。

表 4 9 个微卫星位点在文蛤 5 个群体上的多样性统计  
Tab.4 The diversity statistics of 9 microsatellite loci in five groups of *Meretrix meretrix*

座位	参数	PR	RF <sub>1</sub> R	RF <sub>1</sub> Y	PY	YF <sub>1</sub>
WG307	PIC	0.592 6	0.597	0.612 1	0.626 3	0.667 8
	I	1.213 6	1.268 6	1.257 6	1.288 5	1.397 6
WG323	PIC	0.726 8	0.724 6	0.752 8	0.748 2	0.758 7
	I	1.582 9	1.573 3	1.630 4	1.636 9	1.648 5
WG335	PIC	0.865 2	0.807 4	0.791 8	0.841 8	0.848 4
	I	2.203 2	1.967 6	1.907 5	2.094 9	2.117 7
WG337	PIC	0.747 1	0.819 5	0.815 6	0.802 7	0.826 1
	I	1.823 4	1.972 1	1.987 7	1.902 1	1.943 0
WG347	PIC	0.461 5	0.423 7	0.551 5	0.505 4	0.587 2
	I	0.923 4	0.842 5	1.110 8	1.023 7	1.178 0
WG607	PIC	0.681 9	0.715 2	0.717 7	0.708 2	0.695 3
	I	1.409 4	1.489 8	1.501 9	1.480 1	1.461 1
WG609	PIC	0.725 6	0.543 7	0.698 8	0.608 8	0.675 7
	I	1.617 8	1.167 0	1.530 5	1.357 1	1.408 5
WG610	PIC	0.775 6	0.733 1	0.739 1	0.743 1	0.778 8
	I	1.691 8	1.571 3	1.584 2	1.601 1	1.701 7
WG633	PIC	0.614 8	0.667 7	0.686 7	0.628 2	0.568 9
	I	1.218 2	1.322 1	1.356 4	1.242 0	1.127 2
平均值	PIC	0.678 7	0.643 0	0.704 9	0.643 0	0.644 3
	I	1.520 4	1.463 8	1.540 8	1.514 0	1.553 7

表 5 根据 SSR 标记 5 个文蛤群体遗传相似度和遗传距离  
Tab.5 The genetic identity and genetic distance of microsatellite markers of five groups of *Meretrix meretrix*

群体	PR	RF <sub>1</sub> R	RF <sub>1</sub> Y	PY	YF <sub>1</sub>
PR		0.923 3	0.918 3	0.803 0	0.852 5
RF <sub>1</sub> R	0.079 9		0.934 6	0.813 5	0.850 0
RF <sub>1</sub> Y	0.085 2	0.067 6		0.883 8	0.904 5
PY	0.219 4	0.206 4	0.123 5		0.939 0
YF <sub>1</sub>	0.159 6	0.162 5	0.100 3	0.062 9	

注:右上表示遗传相似度,左下表示遗传距离。

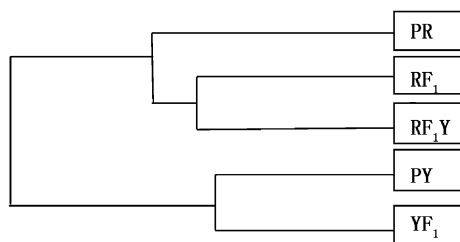


图 1 SSR 标记构建 5 个文蛤群体 UPGMA 系统树

Fig.1 Dendrogram based Nei's genetic distance of microsatellite markers; Method = UPGMA

## 2.2 ISSR 标记结果

### 2.2.1 混合基因组法筛选引物

采用混合基因组法,用 100 个引物(UBC Primer Set#9)801 ~ 900 进行扩增反应,从中挑选出 6 个扩增出清晰条带的引物。6 条引物共检测出 38 条清晰条带,各位点数从 5 到 9 不等,平均每条引物可检测到位点数 6.33 个。所筛选的引物编号、引物序列、扩增条带和多态性条带数目如表 6。

表 6 ISSR 引物序列

Tab. 6 Primer sequences of ISSR

引物 编号	引物序列 (5'-3')	退火温度/ ℃	扩增条 带数
809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	48	6
816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	52	9
826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	52	7
861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC	48	5
880	GGA GAG GAG AGG AGA	42	6
881	GGG TGG GGT GGG GTG	52	5

### 2.2.2 等位基因及多样性检测

6 个 ISSR 引物对 5 个文蛤群体 PCR 扩增,进行多样性检测,见表 7。检测得出 5 个文蛤群体多态位点百分率为 92.11% ~ 97.37%,观测等位基因数( $N_a$ )为 1.921 1 ~ 1.973 7,有效等位基因数( $N_e$ )为 1.421 9 ~ 1.560 6,Nei's 基因多样性(H)为 0.264 3 ~ 0.333 7,Shannon 多样性指数(I)为 0.412 6 ~ 0.503 3。PR 群体的遗传多样性最高,RF<sub>1</sub>Y 群体最低。

表 7 5 个文蛤群体的遗传多样性

Tab. 7 The genetic diversity of five groups of *Meretrix meretrix*

种群	$N_a$	$N_e$	H	I	PIC	多态位点百分比
PR	1.973 7	1.560 6	0.333 7	0.503 3	0.265 2	97.37%
RF <sub>1</sub> R	1.921 1	1.460 5	0.281 2	0.432 5	0.262 8	92.11%
RF <sub>1</sub> Y	1.921 1	1.421 9	0.264 3	0.412 6	0.235 6	92.11%
PY	1.947 4	1.536 5	0.312 4	0.470 8	0.259 8	94.74%
YF <sub>1</sub>	1.921 1	1.467 7	0.280 1	0.428 5	0.203 5	92.11%

### 2.2.3 Nei's 遗传距离和遗传相似系数

ISSR 扩增获得群体间的遗传相似系数和遗传距离见表 8。遗传距离为 0.014 6 ~ 0.051 6,遗传相似系数为 0.949 7 ~ 0.985 5;其中,红壳色亲本文蛤子一代中红壳色文蛤(RF<sub>1</sub>R)群体与黄壳色文蛤(RF<sub>1</sub>Y)遗传距离最小,为 0.014 6,遗传相似系数最大,为 0.985 5;黄壳色亲本文蛤(PY)群体与红壳色亲本文蛤子一代中黄壳色文蛤(RF<sub>1</sub>Y)群体遗传距离最大,为 0.051 6,遗传相似系数最小,为 0.949 7。根据 UPGMA 法构建 5 个文蛤群体的系统树,见图 2。聚类结果基本与 SSR 标记一致,群体之间聚类距离略有差异。

## 3 讨论

### 3.1 两种分子标记比较

微卫星 DNA 数目众多,成串联重复状,广泛

散布于整个基因组中,约占真核生物基因组的 5%;微卫星序列通过 PCR 进行扩增,检测所需样品量少;微卫星序列短,即使降解的 DNA 样品也可能包含足够用来扩增的微卫星位点序列,这使得那些保存差的样品也可能成为有价值的研究材料;微卫星是共显性标记,在多种生物基因组中具有丰富的多态性,在群体中变异范围大,杂和性高。但 SSR 作为一种标记,其方法学上的缺点是必须针对每个染色体上的微卫星,测定并找出其两端的单拷贝序列,这需要大量的人力、物力,费用较高。据此设计引物,给 SSR 标记在植物基因组研究中的广泛应用带来不便,使得 SSR 标记尚难成为常规标记。

表 8 根据 ISSR 标记 5 个文蛤群体遗传相似度和遗传距离

Tab. 8 The genetic identity and genetic distance of ISSR of five groups of *Meretrix meretrix*

种群	PR	RF <sub>1</sub> R	RF <sub>1</sub> Y	PY	YF <sub>1</sub>
PR		0.982 0	0.975 1	0.968 8	0.963 9
RF <sub>1</sub> R	0.018 1		0.985 5	0.968 1	0.964 1
RF <sub>1</sub> Y	0.025 3	0.014 6		0.949 7	0.976 1
PY	0.031 7	0.032 4	0.051 6		0.973 5
YF <sub>1</sub>	0.036 7	0.036 6	0.024 2	0.026 8	

注:右上表示遗传相似度,左下表示遗传距离。

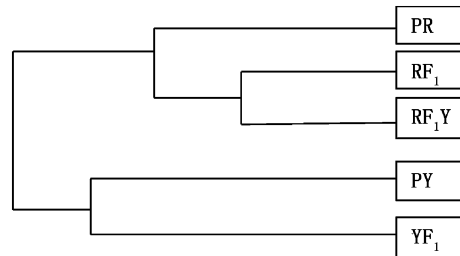


图 2 ISSR 标记构建 5 个文蛤群体 UPGMA 系统树  
Fig. 2 Dendrogram based Nei's genetic distance of ISSR: Method = UPGMA

用于 ISSR-PCR 扩增的引物通常为 16 ~ 18 个碱基序列,由 1 ~ 4 个碱基组成的串联重复和几个非重复的锚定碱基组成,从而保证了引物与基因组 DNA 中 SSR(又称微卫星 DNA)的 5'和 3'末端结合,通过 PCR 反应扩增 SSR 之间的 DNA 片段。微卫星 DNA 在真核生物中的分布非常普遍,并且进化变异速度非常快,因而锚定引物的 ISSR-PCR 可以检测到基因组许多位点的差异。

ISSR 通常是显性标记,并且开发的 ISSR 引物具有通用性,且有很好的稳定性和多态性,因而是非常理想的分子标记。

本研究中,两种标记所得系统树基本一致,见图 1 和图 2。在多样性方面,红壳色亲本文蛤子代黄壳色文蛤( $RF_1Y$ ),黄壳色亲本文蛤子代黄壳色文蛤( $YF_1$ )出现较大差异,SSR 标记这两

个群体多样性均高于其各自亲本,ISSR 标记这两个群体多样性低于其各自亲本,见图 3。这种差异应该是由不同分子标记所引起,在此尚未进一步研究取证。但就整体而言,两种标记所检测的多样性均在同一水平,说明两种标记基本一致,也增加了研究结果的可信度。

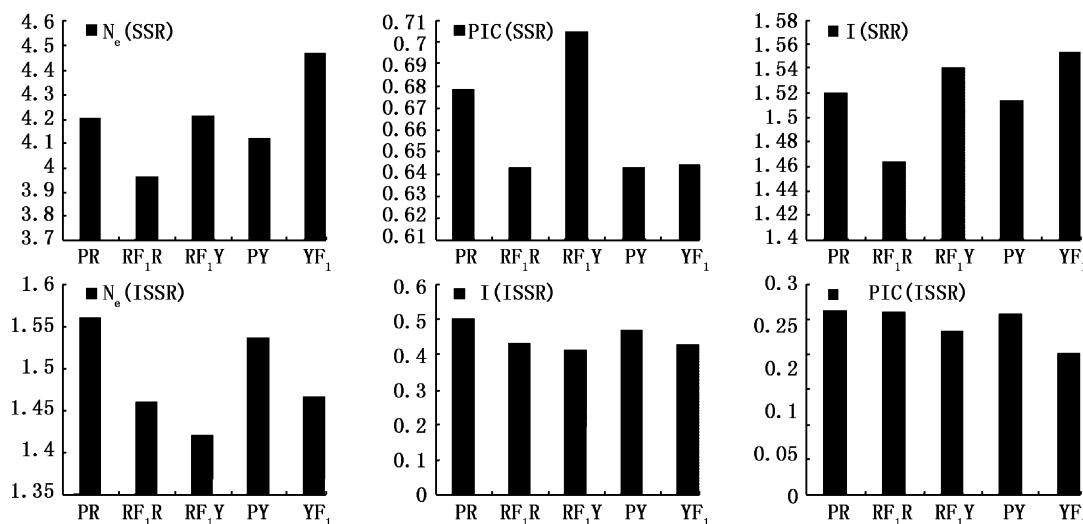


图 3 两种标记多样性比较(上为 SSR 标记统计,下为 ISSR 标记统计)

Fig. 3 Diversity comparisons of two kinds of markers(the upper:SSR statistics, the lower:ISSR statistics)

### 3.2 遗传多样性研究结果分析

遗传多样性作为一个群体遗传能力、种质优劣的指标,特别是在人工选择,新品系培育的过程要时刻关注,以防止种质下降,延缓新品系形成时间。由于人工选育引起养殖群体遗传多样性降低已有凡纳滨对虾<sup>[12]</sup>,中国对虾<sup>[13-14]</sup>、菲律宾蛤仔<sup>[15]</sup>和大黄鱼<sup>[16]</sup>等海洋经济动物的报道,本研究中与其亲本相比较,各壳色后代遗传多样性并未出现显著性降低的状况,可能原因是繁育时亲本数量较多,且只经过一代的选育,所以多样性程度未出现显著性降低,也就是说经过一代的选育,其多样性水平变化并不明显,可以继续进行下一代人工繁殖选育。

研究中 PR 群体子代出现了壳色分离,子代中分为红黄两种壳色。根据聚类图可以看出,拥有共同的遗传基础的  $RF_1R$  群体和  $RF_1Y$  群体首先聚为一类,然后再与其亲本聚为一类。聚类结果并没有依据其壳色而聚类,仍是以前子关系为聚类基础。可能原因是,研究中选用的标记与壳色遗传没有相关性,是文蛤共有的遗传标记,所

以导致即使亲本和子代有壳色的不同和分化,但传代后亲缘关系聚类情况以亲子关系为基础,且两种分子标记结果相似。

由于分子标记所用材料不受个体成长时间影响,所以能够在进行下一代选育之前得出结果。不仅起到时刻检测的作用,更能够在出现种质下降的情况下及时做出调整策略,以保证新品系的质量和研究计划的如期进行。

### 参考文献:

- [1] WANG S L, NIU D H, LI J L. Isolation and characterization of 10 polymorphic microsatellites in *Meretrix meretrix* [J]. Conservation Genet Resour, 2009(1): 111-113.
- [2] 沈怀舜,朱建一,丁亚平,等.我国沿海三个文蛤地理群的 RAPD 分析[J].海洋学报:中文版,2003(5):97-102.
- [3] 陈大鹏,沈怀舜,丁亚平,等.文蛤(*Meretrix meretrix*)地理种群 ISSR 分子标记的初步研究[J].南京师大学报:自然科学版,2004(3):74-77.
- [4] 林志华,董迎辉,李宁,等.基于形态参数和 AFLP 标记的文蛤(*Meretrix meretrix*)不同地理群体遗传变异分析[J].海洋与湖沼,2008(3):245-251.

- [5] 张志伟,陈爱华,姚国兴,等.我国沿海不同地理原种文蛤 (*Meretrix meretrix*) 的 SRAP 分析[J].海洋与湖沼,2010(3):429-434.
- [6] 陈淑吟.海洋双壳类 bivalve 群体遗传结构与多样性研究[D].南京:南京师范大学,2009.
- [7] 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):134-138,14.
- [8] 梁宏伟,王长忠,李忠,等.聚丙烯酰胺凝胶快速、高效银染方法的建立[J].遗传,2008,30(10):1379-1382.
- [9] LEVENE H. On a matching problem arising in genetics[J]. Annals of Mathematical Statistics, 1949, 20:91-94.
- [10] NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1973, 70:3321-3323.
- [11] 张爱兵,王正军,谭声江,等.分子生态学重要概念——遗传距离及其测度的理论研究概况[J].生态学报,2002(6):943-949.
- [12] NEI M. Genetic distance between populations[J]. The American Naturalist, 1972, 106:283-292.
- [13] SHAKLEE J B, TAMARU C S, WAPLES R S. Speciation and evolution of marine fishes studied by the electrophoresis analysis of proteins[J]. Pacific Science, 1982(36):141-157.
- [14] 熊全沐.同工酶电泳数据的分析及其在种群遗传上的应用[J].遗传,1986(1):1-5.
- [15] 童馨,龚世圆,喻达辉,等.凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 不同世代养殖群体的遗传多样性分析[J].海洋与湖沼,2009,40(2):214-220.
- [16] 张天时,王清印,刘萍,等.中国对虾 *Penaeopenaeus chinensis*—人工选育群体不同世代的微卫星分析[J].海洋与湖沼,2005,36(1):72-80.
- [17] 李朝霞,李健,何玉英,等.中国对虾人工选育快速生长群体不同世代间的 AFLP 分析[J].高技术通讯,16(4):435-440.
- [18] 虞志飞,闫喜武,杨霏,等.菲律宾蛤仔大连群体不同世代的遗传多样性[J].生态学报,2011,31(15):4199-4206.
- [19] 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):500-507.

## SSR and ISSR analysis of two kinds of clam shell color of breeding patterns of *Meretrix meretrix* and their $F_1$

ZHENG Pei<sup>1</sup>, CHEN Ai-hua<sup>2</sup>, SEHN He-ding<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-wei<sup>2</sup>, YAO Guo-xing<sup>2</sup>, WU Yang-ping<sup>2</sup>, ZHANG Yu<sup>2</sup>, WANG Cheng-nuan<sup>1</sup>, ZHOU Na<sup>1</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Institution of Oceanology & Marine Fisheries, Nantong 226007, Jiangsu, China)

**Abstract:** Genetic structure of five hard clam stocks were detected using nine pairs of SSR primers and six ISSR primers. The shell color of one population is red and their offspring are red or yellow, while another population is yellow and their offspring are yellow also. The PIC, observed and expected heterozygosity of five populations detected from SSR ranged from 0.643 0 to 0.704 9, 0.745 5 to 0.794 6 and 0.717 5 to 0.752 0, respectively. The percentages of polymorphic loci detected from ISSR were from 92.11% to 97.37%. The highest Shannon Index from PR population was 0.503 3 and the lowest from RF<sub>1</sub>Y was 0.412 6. Both two markers showed high polymorphism. Compared with their parents', the genetic structure of the three offspring populations didn't change. The results of cluster from the two kinds of markers were the same: the red shell color parents and their offspring gathered together at first, while the yellow parents and offspring gather together, then those two sub-branches clustered into one group. Overall, the genetic diversity of the parents and their offspring was very high, and compared to their parents', the genetic structure of the offspring didn't change. That is to say, those offspring could be used for artificial breeding as parents successively.

**Key words:** *Meretrix meretrix*; selection breeding; SSR; ISSR