

研究简报

多元 PCR 技术在毛蚶家系鉴定中的应用*

陈辰, 李琪**, 孔令锋, 于红

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 为促进毛蚶(*Scapharca kagoshimensis*)的遗传育种研究及开展其资源的保护工作。本研究用4组微卫星多元PCR体系对5个毛蚶全同胞家系进行了家系鉴定分析。研究表明:4组多元PCR体系中的10个微卫星位点均为高多态性位点,使用1组多元PCR体系的子代模拟鉴定成功率和实际鉴定成功率分别为78%和72%,3组以上多元PCR体系子代的鉴定成功率为100%。研究结果表明,微卫星多元PCR技术能快速、准确地将任意子代鉴定至其所属家系,该技术可用于大批量家系材料分析,具有较好的应用价值。

关键词: 毛蚶;微卫星标记;多元PCR;家系鉴定

中图分类号: Q347

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2016)09-018-06

DOI: 10.16441/j.cnki.hdx.20150171

引用格式: 陈辰, 李琪, 孔令锋, 等. 多元PCR技术在毛蚶家系鉴定中的应用[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2016, 46(8): 18-23.

CHEN Chen, LI Qi, KONG Ling-Feng, et al. Parentage analysis in the ark shell (*Scapharca kagoshimensis*) based on microsatellite multiplex PCR[J]. Periodical of Ocean University of China, 2016, 46(8): 18-23.

毛蚶(*Scapharca kagoshimensis*)是广泛分布在西北太平洋近海的埋栖型贝类,因其肉质肥嫩,营养丰富,具有较高的经济价值,是中国传统的渔业对象^[1]。由于在采捕过程中,长期缺乏必要的资源保护意识和行之有效的保护措施,近年来中国毛蚶的自然资源量出现明显的下降,一些重要的毛蚶产区目前已无法形成渔汛^[2-3]。为促进我国毛蚶产业的可持续发展,很多地方已经陆续展开了毛蚶苗种人工繁育和底播增殖放流工作^[3-4]。

准确掌握亲本和子代的遗传信息是制订科学合理放流计划和评估放流效果的前提条件。与鱼类和甲壳类不同,贝类体表通常存在钙质外壳,限制了物理标记和荧光标记的应用,因而使用分子标记进行家系分析,是目前贝类群体研究和种质资源保护中最为有效的分析工具^[5-9]。微卫星标记因其变异程度高,在基因组中分布广泛,易于PCR扩增等特点,是家系分析中常用的分子标记^[10-12]。

然而,在实际应用中微卫星标记存在2个突出问题。首先,微卫星标记属于单位点标记^[13],通过一个PCR反应,每次只能获得1个样本的1个位点的遗传信息,样本的处理通量较低。应用多元PCR体系,可

以一定程度上解决微卫星标记处理通量的问题^[14]。其次,虽然微卫星标记理论上符合孟德尔遗传规律,但在一些位点中存在无效等位基因以及与隐性致死基因连锁的情况,使得这些微卫星标记在子代的分离比产生偏离^[15-17],从而影响数据分析的准确性。因而,在实际应用前,对于已经开发的微卫星标记进行相关验证是必要的^[18]。

目前毛蚶已经开发出微卫星标记^[19],但对于标记的验证工作尚未见报道。本文根据前期开发的多元PCR体系^[20],利用5个毛蚶全同胞家系对标记进行验证,以期对毛蚶今后的增殖放流效果评估提供可靠的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

全同胞家系构建于2014年6月在山东省日照欣慧水产育苗有限公司进行。挑选性成熟良好的亲贝,采用阴干加流水刺激的方法,诱导亲贝配子排放,通过人工受精的方式建立了5个毛蚶单对交配家系。受精后72h,使用300目筛绢过滤收集每个家系的D形幼虫。使用胶头滴管将收集到的幼虫,分别转移至1.5mL的

* 基金项目: 海洋公益性行业科研专项(201205023);教育部博士点基金项目(20130132110009)资助

Supported by the Grants from National Marine Public Welfare Research Program (201205023); Doctoral Program of Ministry of Education of China (20130132110009)

收稿日期: 2015-05-04; 修订日期: 2015-07-30

作者简介: 陈辰(1987-),男,博士生。E-mail: chenchen3729@163.com

** 通讯作者: E-mail: qili66@ouc.edu.cn

离心管中,每个离心管中加入 1 mL 无水乙醇进行固定。此后,每 12 h 更换无水乙醇 1 次,更换无水乙醇 3~4 次,以充分置换样本中的水分。亲贝精卵排放后,立即对亲本进行解剖,剪取亲本闭壳肌,转移至 1.5 mL 的离心管中,加入无水乙醇进行固定,处理方法同幼虫。

1.2 DNA 提取与微卫星分析

亲本 DNA 提取使用优化苯酚-氯仿法^[21];幼虫 DNA 提取方法参照 Li 等^[17],使用 Chelex 树脂方法。选择前期开发的 4 组微卫星多元 PCR 体系^[20],位点的序列信息见表 1。PCR 反应体系为 10 μ L,每个反应体系中包括:50~100 ng/ μ L 的 DNA 模板,0.4 U DNA 聚合酶,1 \times PCR Buffer (Mg²⁺ Free),dNTP 混合物 200 mmol/L,MgCl₂ 1.5 mmol/L,正反向引物各 1 μ L (2~5 μ mol/L)。为保证多元 PCR 的扩增效率,在反应体系中加入强化了组分,成分包括 30% (w/v) PEG6000,2.5 μ g/ μ L BSA,5 mol/L Betaine。PCR 的反应程序为:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,54 $^{\circ}$ C 退火 60 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 75 s,35~40 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物经 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min 后,与变性剂等体积混合,使用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等位基因,使用弱碱法进行银染显色,选择 10 bp DNA Lad-

der(Invitrogen)作为 marker。

1.3 数据分析

使用 χ^2 检验子代中位点的分离情况是否符合孟德尔遗传定律,子代表型期望分离比分别为 1:1,1:2:1 和 1:1:1:1,差异显著性水平设定为 0.01。使用 CERVUS 3.0 软件^[22]计算各位点在 5 个家系中的等位基因数(N_A),多态信息含量(PIC),以及位点的非排除能力(NE-1P,NE-2P,NE-PP)。使用 FSTAT 软件^[23]计算每一位点在全家系样本中的等位基因丰富度(A_R),以校正样本数目差异产生的误差。混合 5 个单对交配家系 135 个子代的基因型数据,以检验多元 PCR 技术在家系鉴定中的效率。使用 CERVUS 3.0 软件进行家系的模拟鉴定以及实际鉴定计算,具体参数设置为:亲本数量 10,模拟子代数 10 000,亲本检测率及位点检测率 100%,分型误差率 1%,置信水平 95%。

2 结果

2.1 微卫星位点的特征

4 组微卫星多元 PCR 体系在 5 个家系中,每个位点的等位基因数目、等位基因丰富度、多态信息含量和非排除率见表 1。10 个微卫星位点的等位基因数范围

表 1 毛蚶 4 组微卫星多元 PCR 在 5 个全同胞家系中的特征

Table 1 Characteristics of the four multiplex PCR in 5 full-sibling families of *Scapharca kagoshimensis*

多元组合 ^①	位点 ^②	GenBank号 ^③	引物序列(5'-3') ^④	片段大小 ^⑤ /bp	N_A	A_R	PIC	NE-1P ^a	NE-2P ^b	NE-PP ^c
I	Sk01	KP844583	F: CTTTTTCATTGGGCAGTCCTTA R: GGAACACACAAATACACATACG	162~212	8	3.890	0.779	0.552	0.375	0.187
	Sk02	KP844584	F: ATTGTCAGCGTTTCGGTA R: ACCAACAACAAAATACAGT	376~396	7	3.606	0.727	0.624	0.440	0.241
	Sk03	KP844585	F: GGGAAATAAAGGGATAAACTC R: AGATAATTTGGTAATGGTCTT	263~319	7	3.888	0.783	0.550	0.373	0.192
II	Sk04	KP844586	F: ATAGTCACCATATTCCTACAA R: TATACTCTCTATTTTACGCTC	254~286	7	3.978	0.798	0.526	0.352	0.173
	Sk05	KP844587	F: TTTAACCACGTGTAAACGAAA R: TTCAAATAGCTTAGATTCCGA	425~471	9	3.752	0.757	0.583	0.406	0.218
III	Sk07	KP844589	F: TATTAGTGAGTTGGTTTCGTC R: ATTCACCGCTGGGTATTT	324~368	12	4.393	0.847	0.430	0.272	0.107
	Sk08	KP844590	F: AGTCAGTAATTGTAGTCTTGT R: ACATAAATAGCTGGGACTC	266~298	9	3.932	0.779	0.547	0.371	0.182
	Sk09	KP844591	F: GTAAGCAAATTTGGACATC R: TTATGCAACACTTCCAGTA	407~483	12	4.780	0.895	0.330	0.197	0.062
IV	Sk14	KP844596	F: TTATGTTTTGTTTAACCACG R: TCAAATAGCTTAGATTCCGA	245~279	13	4.689	0.883	0.354	0.214	0.071
	Sk15	KP844597	F: TGGCAAGATAGGTATGTGCAA R: TAGGCAGACCAATCGTGAAGC	410~514	10	4.346	0.844	0.440	0.280	0.115

注: 上标 a, b, c 含义如下, a. 单亲本的平均非排除率; b. 已知单亲本基因型的平均非排除率; c. 两亲本的平均非排除率。

Note: The meaning of superscript a, b, c are as follows. a. Average nonexclusion probability for one candidate parent. b. Average non-exclusion probability for one candidate parent given the genotype of a known parent of the opposite sex. c. Average non-exclusion probability for a candidate parent pair.

① Multiplex panel; ② Locus; ③ GenBank accession number; ④ Primer sequence (5'-3'); ⑤ Size range

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

为 7(Sk02, Sk03, Sk04)~13(Sk14), 平均等位基因数为 9.4。等位基因丰富度范围为 3.606~4.780, 平均等位基因丰富度为 4.125。位点的多态信息含量范围为 0.727(Sk01)~0.895(Sk09), 平均多态信息含量为 0.809。

2.2 微卫星位点在子代中的分离模式

在获得的 50 个基因型分离比中(10 位点×5 个家系), 有 5 个为亲本全部为纯合子产生的基因型(见表

2), 所获得的子代的基因型与亲本或者完全相同(亲本等位基因相同), 或者为同一种杂合状态的基因型(亲本等位基因不同)。对剩余的 45 个分离模式分析发现, 32 个分离模式符合孟德尔分离规律; 在考虑无效等位基因的情况下, 剩余 13 个基因型中, 有 2 个基因型分离比偏离孟德尔分离定律(F3: Sk04, Sk05; $P < 0.01$)。在 5 个家系所包含的 200 个等位基因中(10 个亲本×10 个微卫星位点×2), 无效等位基因频率为 9.5%(见表 2)。

表 2 10 个微卫星标记在 5 个毛蚶全同胞家系中的分离
Table 2 Segregation of 10 microsatellites in five full-sibling families of *S. kagoshimensis*

家系 ^①	多元组合 ^②	位点 ^③	母本 ^④	父本 ^⑤	子代 ^⑥	期望分离比 ^⑦	观测分离比 ^⑧	χ^2	P 值 ^⑨	
F1	I	Sk01	162/204	162/164	162/162 : 162/164 : 162/204 : 164/204	1 : 1 : 1 : 1	11 : 4 : 7 : 5	4.259	0.235	
		Sk02	380/384	384/396	380/384 : 380/396 : 384/384 : 384 : 396	1 : 1 : 1 : 1	6 : 10 : 5 : 5	2.615	0.455	
		Sk03	285/307	263/263	263/285 : 263/307	1 : 1	14 : 9	1.087	0.297	
	II	Sk04	274/282	268/276	268/274 : 274/276 : 268/282 : 276/282	1 : 1 : 1 : 1	7 : 3 : 4 : 12	7.538	0.057	
		Sk05	445/445	425/445	425/445 : 445/445	1 : 1	10 : 14	0.667	0.414	
	III	Sk07	324/346	324/346	324/324 : 324/346 : 346/346	1 : 2 : 1	10 : 7 : 7	5.688	0.058	
		Sk08	272/272	298/X	272/298 : 272/X	1 : 1	12 : 14	0.154	0.695	
		Sk09	435/449	445/483	435/445 : 435/483 : 445/449 : 449/483	1 : 1 : 1 : 1	5 : 8 : 4 : 10	3.370	0.338	
	IV	Sk14	410/456	456/512	410/456 : 410/512 : 456/456 : 456/512	1 : 1 : 1 : 1	9 : 6 : 8 : 4	2.185	0.535	
		Sk15	261/275	245/271	245/261 : 261/271 : 254/275 : 271/275	1 : 1 : 1 : 1	6 : 5 : 5 : 9	1.720	0.632	
	F2	I	Sk01	192/200	192/200	192/192 : 192/200 : 200/200	1 : 2 : 1	10 : 9 : 6	4.513	0.105
			Sk02	384/X	380/384	380/384 : (384/384+384/X) : 380/X	1 : 2 : 1	4 : 12 : 7	2.536	0.281
			Sk03	303/303	303/303	303/303	1	25	—	—
		II	Sk04	268/276	276/282	268/276 : 268/282 : 276/276 : 276/282	1 : 1 : 1 : 1	4 : 7 : 8 : 8	1.593	0.661
			Sk05	453/X	471/X	453/471 : 453/X : 471/X : X/X	1 : 1 : 1 : 1	8 : 11 : 5 : 3	5.444	0.142
III		Sk07	324/350	362/368	324/362 : 324/368 : 350/362 : 350/368	1 : 1 : 1 : 1	10 : 7 : 2 : 3	7.455	0.059	
		Sk08	272/272	270/270	270/272	1	25	—	—	
		Sk09	459/X	445/449	445/459 : 449/459 : 445/X : 449/X	1 : 1 : 1 : 1	10 : 8 : 4 : 5	3.370	0.338	
IV		Sk14	468/474	436/436	436/468 : 436/474	1 : 1	18 : 7	4.840	0.028	
		Sk15	269/271	245/277	245/269 : 269/277 : 245/271 : 271/277	1 : 1 : 1 : 1	7 : 4 : 4 : 12	6.333	0.096	
F3		I	Sk01	162/188	188/212	162/188 : 162/212 : 188/188 : 188/212	1 : 1 : 1 : 1	5 : 7 : 5 : 10	2.481	0.479
			Sk02	378/388	384/396	378/384 : 378/396 : 384/388 : 388/396	1 : 1 : 1 : 1	11 : 7 : 5 : 4	4.259	0.235
			Sk03	307/307	301/319	301/307 : 307/319	1 : 1	10 : 15	1.000	0.317
		II	Sk04	276/286	254/262	254/276 : 262/276 : 254/286 : 262/286	1 : 1 : 1 : 1	2 : 1 : 9 : 14	17.385	0.001*
			Sk05	427/X	461/X	427/461 : 427/X : 461/X : X/X	1 : 1 : 1 : 1	3 : 14 : 3 : 7	11.963	0.008*
	III	Sk07	358/368	334/354	334/358 : 354/358 : 334/368 : 354/368	1 : 1 : 1 : 1	7 : 9 : 5 : 6	1.296	0.730	
		Sk08	266/X	286/X	266/286 : 266/X : 286/X : X/X	1 : 1 : 1 : 1	6 : 4 : 11 : 6	3.963	0.265	
		Sk09	459/X	407/433	407/459 : 433/459 : 407/X : 433/X	1 : 1 : 1 : 1	11 : 8 : 2 : 3	9.000	0.029	
	IV	Sk14	432/464	426/470	426/432 : 432/470 : 426/464 : 464/470	1 : 1 : 1 : 1	2 : 6 : 4 : 12	9.333	0.025	
		Sk15	249/277	279/279	249/277 : 277/279	1 : 1	16 : 10	1.38	0.239	

续表 2

家系 ^①	多元组合 ^②	位点 ^③	母本 ^④	父本 ^⑤	子代 ^⑥	期望分离比 ^⑦	观测分离比 ^⑧	χ^2	P 值 ^⑨	
F4	I	Sk01	162/180	162/162	162/162 : 162/180	1 : 1	18 : 9	3.000	0.083	
		Sk02	376/382	384/X	376/384 : 376/X : 382/384 : 382/X	1 : 1 : 1 : 1	4 : 7 : 11 : 4	5.077	0.166	
		Sk03	287/X	307/X	287/307 : 287/X : 307/X : X/X	1 : 1 : 1 : 1	8 : 13 : 4 : 2	8.590	0.035	
	II	Sk04	276/282	276/282	276/276 : 276/282 : 282/282	1 : 2 : 1	10 : 8 : 9	5.667	0.059	
		Sk05	459/465	425/445	425/459 : 445/459 : 425/465 : 445/465	1 : 1 : 1 : 1	7 : 7 : 3 : 10	3.667	0.300	
	III	Sk07	332/364	324/346	324/332 : 332/346 : 324/364 : 346/364	1 : 1 : 1 : 1	9 : 9 : 6 : 2	5.077	0.166	
		Sk08	272/296	282/290	272/282 : 272/290 : 282/296 : 290/296	1 : 1 : 1 : 1	10 : 6 : 2 : 8	5.385	0.146	
		Sk09	455/479	413/413	413/455 : 413/479	1 : 1	16 : 8	2.667	0.102	
	IV	Sk14	474/474	456/456	456/474	1	26	—	—	
		Sk15	265/279	279/279	265/279 : 279/279	1 : 1	12 : 14	0.154	0.695	
	F5	I	Sk01	164/164	164/192	164/164 : 164/192	1 : 1	14 : 9	1.087	0.297
			Sk02	384/396	376/382	376/384 : 382/384 : 376/396 : 382/396	1 : 1 : 1 : 1	6 : 10 : 3 : 8	3.963	0.265
			Sk03	285/307	301/X	285/301 : 285/X : 301/307 : 307/X	1 : 1 : 1 : 1	5 : 11 : 7 : 1	8.667	0.034
		II	Sk04	254/254	262/274	254/262 : 254/274	1 : 1	8 : 17	3.240	0.072
			Sk05	449/449	449/449	449/449	1	27	—	—
III		Sk07	344/348	362/X	344/362 : 344/X : 348/362 : 348/X	1 : 1 : 1 : 1	6 : 10 : 6 : 4	2.923	0.404	
		Sk08	270/X	284/X	270/284 : 270/X : 284/X : XX	1 : 1 : 1 : 1	9 : 4 : 12 : 2	6.448	0.092	
		Sk09	457/457	425/425	457/425	1	24	—	—	
IV		Sk14	434/514	428/428	428/434 : 428/514	1 : 1	12 : 14	0.154	0.695	
		Sk15	265/X	245/X	245/265 : 265/X : 245/X : X/X	1 : 1 : 1 : 1	5 : 4 : 9 : 9	3.074	0.380	

注: X 代表无效等位基因; * 代表基因型分离比偏离孟德尔分离定律 ($P < 0.01$)。

Note: X, Null allele; *, Genotypic ratios that are not in agreement with Mendelian segregation ($P < 0.01$).

①Family; ②Multiplex panel; ③Locus; ④Dam; ⑤Sire; ⑥Offspring; ⑦Expected segregation ratio; ⑧Observed segregation ratio; ⑨P value

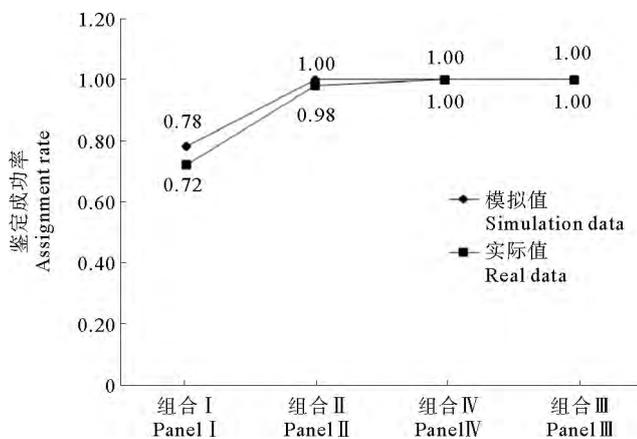
2.3 多元 PCR 体系的家系鉴定成功率

在 5 个毛蚶单对交配家系中, 4 组微卫星多元 PCR 鉴定结果如图 1 所示。CERVUS 3.0 软件分析结果显

示, 只使用 1 组多态性信息含量最高的多元 PCR (Panel III), 其家系模拟和实际的鉴定结果成功率分别为 78% 和 72%。使用 3 组以上的多元 PCR 组合时, 子代的亲本鉴定成功率可达 100%。

3 讨论

微卫星标记是一种多态性丰富的共显性标记。根据 Bostein 等^[24]所提出的多态信息含量指标范围, 当 $PIC > 0.5$ 时, 为高度多态基因位点, $PIC < 0.25$ 时, 则为低多态基因位点。本研究所使用的 4 组多元 PCR 体系, 位点的 PIC 均大于 0.7, 属于高多态基因位点。在实际应用中, 选择的标记具有较高的多态性, 对于家系分析效率具有重要意义, 因为这意味着在位点数目相同的情况下, 可以获得更多的遗传信息, 从而提高分析结果的准确度^[25]。Norris 等^[26]研究发现, 在全部的 15 个标记中使用其中 8 个多态性最高位点 (平均期望杂合度 0.85) 获得成功鉴定的子代比例, 仅比使用全部标记降低了 2%, 这样可以大量节省分析时间和基因分型



(鉴定成功置信水平为 95%。95% confidence interval.)

图 1 微卫星多重 PCR 在毛蚶家系中模拟和实际鉴定的累积成功率

Fig. 1 Cumulative assignment success rates of real and simulated genotype data in *S. kagoshimensis*

成本。通常,家系鉴定所需要的位点数量,取决于标记的总体信息量,排除能力的高低以及亲本和子代的数量。Bulter 等^[27]根据实际和模拟数据的计算结果,建议家系分析中应该至少使用 6~8 个标记。在本研究中,使用 2 组多元 PCR 组合,就可达到 95% 以上的实际鉴定成功率。这可能是与组成这 4 组多元 PCR 的 10 个微卫星标记具有较高的多态信息含量,且家系亲本规模较为有限(5 个父本和 5 个母本)有关。因此,在大批量的家系材料分析中,可能需要更多的标记位点,才能使家系鉴定成功率达到满意的效果。

子代基因型的分离模式显示了本研究中的一些位点存在无效等位基因。无效等位基因是指不能被 PCR 扩增的等位基因,微卫星标记中存在无效等位基因是一个较普遍的现象,尤其在海洋贝类^[28]。本研究结果表明,10 个微卫星位点在 5 个全同胞家系中无效等位基因频率为 9.5%,这与其他海洋贝类微卫星标记的研究结果相类似。例如:聂鸿涛等^[29]研究结果显示,在皱纹盘鲍 12 个家系中,12 个微卫星标记的无效等位基因频率为 10.7%;Li 等^[30]开发的 12 个太平洋牡蛎 EST 微卫星标记中,无效等位基因频率为 4.9%;而太平洋牡蛎的非编码区基因组微卫星标记,无效等位基因的频率为 11%~22%^[31-32]。一般来说,来自 EST 中的微卫星标记,无效等位基因频率通常会小于来自基因组中的微卫星^[33]。偏分离现象也是使用微卫星标记进行海洋贝类家系分析研究中经常会遇到的情况。一般来说,偏分离的产生主要由两方面原因造成,即无效等位基因的存在和合子存活力的差异^[28]。本研究结果表明,在考虑无效等位基因的情况下,仍有 2 个位点的基因型分离偏离孟德尔分离比。这种偏分离情况,可能的原因是基因转换、减数分裂过程中染色体非随机分离,以及同致死的主效基因连锁等形成^[15]。

综上所述,微卫星标记是较为理想的分子标记,在水产动物研究的很多领域都有广泛的应用。本研究将开发的微卫星标记多元 PCR 体系应用于毛蚶的家系鉴定分析,获得较高的家系鉴定成功率,对于毛蚶的遗传多样性分析、遗传育种研究以及种质资源保护具有重要意义。

参考文献:

- [1] 马云聪. 毛蚶育苗养殖实用技术[M]. 北京: 海洋出版社, 2008: 1-2.
Ma Y C. Practical Technologies for Ark Shell (*Scapharca kagoshimensis*) Seed Breeding [M]. Beijing: China Ocean Press, 2008: 1-2.
- [2] 边绍新. 丰南区浅海养殖毛蚶现状及发展设想[J]. 河北渔业, 2004, 3: 21-22.
Bian S X. Status and development plan for inshore culture of ark shell (*Scapharca kagoshimensis*) in Fengnan district [J]. Hebei Fisheries, 2004, 3: 21-22.
- [3] 付卓, 朱守维. 锦州浅海毛蚶底播增殖养殖成效调查[J]. 河北渔业, 2008, 2: 40-42.
Fu Z, Zhu S W. Investigation of bottom sowing effects of ark shell (*Scapharca kagoshimensis*) in Jinzhou city [J]. Hebei Fisheries, 2008, 2: 40-42.
- [4] 任玉水, 赵炳然. 莱州湾毛蚶苗种健康培育技术初探[J]. 中国水产, 2014, 3: 55-57.
Ren Y S, Zhao B R. Preliminary study on healthy farming of ark shell (*Scapharca kagoshimensis*) seedlings [J]. China Fisheries Monthly, 2014, 3: 55-57.
- [5] Waples R S, Punt A E, Cope J M. Integrating genetic data into management of marine resources: How can we do it better? [J]. Fish and Fisheries, 2008, 9: 423-449.
- [6] Palumbi S R. Marine reserves and ocean neighborhoods: The spatial scale of marine populations and their management [J]. Annual Review of Environment and Resources, 2004, 29: 31-68.
- [7] Haig S M. Molecular contributions to conservation [J]. Ecology, 1998, 79: 413-425.
- [8] Ni L H, Li Q, Kong L F. Microsatellites reveal fine-scale genetic structure of the Chinese surf clam *Macrta chinensis* (Mollusca, Bivalvia, Mactridae) in Northern China [J]. Marine Ecology, 2011, 32: 488-497.
- [9] Selkoe K A, Henzler C M, Gaines S D. Seascape genetics and the spatial ecology of marine populations [J]. Fish and Fisheries, 2008, 9: 363-377.
- [10] Li R H, Li Q, Wang C L. Sibship reconstruction and effective population size estimation in mass spawning ark shell, *Scapharca broughtonii* based on microsatellite analysis [J]. Genes & Genomics, 2013, 35: 703-708.
- [11] Jones O R, Wang J. Molecular marker-based pedigrees for animal conservation biologists [J]. Animal Conservation, 2010, 13: 26-34.
- [12] Li Q, Yu H, Yu R H. Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China [J]. Aquaculture, 2006, 259: 95-102.
- [13] Sunnucks P. Efficient genetic markers for population biology [J]. Trends in Ecology & Evolution, 2000, 15: 199-203.
- [14] Guichoux E, Lagache L, Wagner S, et al. Current trends in microsatellite genotyping [J]. Molecular Ecology Resources, 2011, 11: 591-611.
- [15] Li Q, Park C, Kobayashi T, et al. Inheritance of microsatellite DNA markers in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* [J]. Marine Biotechnology, 2003, 5: 331-338.
- [16] Li Q, Zheng X D, Yu R H. Inheritance mode of microsatellite loci and their use for kinship analysis in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2008, 26: 256-262.
- [17] Li Q, Park C, Kijima A. Allelic transmission of microsatellites and application to kinship analysis in newly hatched Pacific abalone larvae [J]. Fisheries Science, 2003, 69: 883-889.
- [18] Hellberg M E. Gene flow and isolation among populations of marine animals [J]. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics, 2009, 40: 291-310.
- [19] Feng Y W, Li Q, Kong L F. Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite loci in the ark shell *Scapharca subcrenata* (Bivalvia: Arcidae) [J]. Conservation Genetics, 2009, 10:

- 1125-1127.
- [20] Chen C, Li Q, Yu H, et al. Development and multiplex genotyping of 20 microsatellite markers in the ark shell *Scapharca kagoshimensis* (Mollusca: Bivalvia)[J]. Conservation Genetics Resources, 2015, 7: 917-944.
- [21] Li Q, Park C, Kijima A. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* [J]. Journal of Shellfish Research, 2002, 69: 883-889.
- [22] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. Molecular Ecology, 2007, 16: 1099-1106.
- [23] Goudet J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)[EB/OL]. [2015-04-20]. <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. Updated from Goulet.
- [24] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32 (3): 314-331.
- [25] Pearse D E, Crandall K A. Beyond F_{ST} : Analysis of population genetic data for conservation [J]. Conservation Genetics, 2004, 5: 585-602.
- [26] Norris A T, Bradley D G, Cunningham E P. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers [J]. Aquaculture, 2000, 182: 73-83.
- [27] Butler K, Field C, Herbinger C M, et al. Accuracy, efficiency and robustness of four algorithms allowing full sibship reconstruction from DNA marker data [J]. Molecular Ecology, 2004, 13: 1589-1600.
- [28] 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]. Journal of Heredity, 2004, 95: 346-352.
- [29] 聂鸿涛, 李琪, 孔令锋. 皱纹盘鲍微卫星多重 PCR 体系构建及其在家系鉴定中的应用[J]. 水产学报, 2013, 37: 207-215.
- Nie H T, Li Q, Kong L F. Development of four multiplex PCR panels of microsatellites and application to kinship analysis in the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37: 207-215.
- [30] Li R H, Li Q, Cornette F, et al. Development of four EST-SSR multiplex PCRs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and their validation in parentage assignment [J]. Aquaculture, 2010, 310: 234-239.
- [31] Li L, Guo X M, Zhang G F. Inheritance of 15 microsatellites in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: segregation and null allele identification for linkage analysis [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2009, 74-79.
- [32] MCGoldrick D J, Hedgecock D, English L J, et al. The transmission of microsatellite alleles in Australian and North American stocks of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): selection and null alleles [J]. Journal of Shellfish Research, 2000, 19: 779-788.
- [33] Li Q, Liu S K, Kong L F. Microsatellites within genes and ESTs of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and their transferability in five other *Crassostrea* species [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2009, 12: 1-6.

Parentage Analysis in the Ark Shell (*Scapharca kagoshimensis*) Based on Microsatellite Multiplex PCRs

CHEN Chen, LI Qi, KONG Ling-Feng, YU Hong

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Ark shell (*Scapharca kagoshimensis*) is a commercially important but dwindling natural resource bivalve species in the shallow coastal waters of the northwestern Pacific. In order to protect and exploit the resource of the species effectively, the inheritance mode of 10 microsatellite markers, which were pooled into 4 multiplex PCR panels, was investigated in newly hatched *S. kagoshimensis* larvae from five full-sib families, and the feasibility of these markers for kinship estimation was also examined. The result showed that all of these loci were highly polymorphic. The average polymorphism information content was 0.809. The frequency of null alleles was estimated 9.5%. Two loci (Sk04, Sk05) showed deviation from Mendelian segregation in a family (F3) even though null alleles were considered. Parentage analysis showed that with the most informative multiplex set (Panel III), the simulated and real assignment success could be 78% and 72%, respectively, and 100% of the offspring were correctly allocated to their parents when three or more multiplex PCR panels were used. Our results showed that the four multiplex PCR panels of microsatellites are possible and can be used for rapid and highly efficient parentage assignment in *S. kagoshimensis*.

Key words: *Scapharca kagoshimensis*; microsatellite locus; multiplex PCR; parentage assignment

责任编辑 朱宝象