

·综述·

海洋贝类微卫星 DNA 标记的开发及其在遗传学研究中的应用

李 琪

(中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003)

摘要:微卫星 DNA 由于具有高度多态性、共显性遗传、基因组中含量丰富且随机分布等特点, 目前已成为最有效的分子标记之一, 并应用于种群分化研究、血缘分析、基因连锁分析、进化以及生态学研究等许多领域。近年来, 海洋贝类微卫星的研究报道日益增多。本文对海洋贝类微卫星分离方法、开发现状、遗传学特性以及在种群遗传、家系分析、遗传多样性评价等方面的最新研究进展进行了综述, 并分析了微卫星分析中无效等位基因、“结巴”带、短等位基因显性和等位基因“扩增丢失”现象的产生原因以及对微卫星基因型判读带来的影响。[中国水产科学, 2006, 13(3): 502-509]

关键词:海洋贝类; 微卫星; 遗传学

中图分类号:Q959.215 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)03-0502-08

微卫星 (microsatellites) 或称简单序列重复 (simple sequence repeats, SSR) 是指由 1~6 个核苷酸组成的简单串联重复 DNA 序列。迄今研究过的所有生物种类中都发现了它的存在, 并且分布密度很大^[1]。由于微卫星具有多态性丰富, 遵循孟德尔分离定律共显性遗传等特点, 已成为种群分化、家系分析、基因连锁分析、进化研究中使用最为广泛的遗传标记。

在水产养殖领域, 微卫星标记的开发和应用日趋增多。在海洋贝类, 近年来国外也相继报道了太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[2]、欧洲牡蛎 (*Ostrea edulis*)^[3]、皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*)^[4] 等多种贝类微卫星标记的分离, 并已应用于种群结构分析、种质鉴定、遗传图谱构建等研究领域^[5]。本文在简要概述微卫星标记分离方法的基础上, 侧重介绍目前海洋贝类微卫星的开发现状以及在遗传学特性、家系分析、遗传图谱构建等方面取得的研究成果和近期研究进展, 并探讨微卫星分析存在的一些问题, 旨在为微卫星标记在海洋贝类遗传学研究中的应用提供基础资料。

1 海洋贝类微卫星的分离

1.1 微卫星的分离方法

对于大多数物种, 在第一次开展微卫星研究时

首先需要分离微卫星序列, 开发特异性扩增引物。目前, 关于微卫星分离方法的研究报道很多, 概括起来基本上分为经典法、富集法、省略筛库法、ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) 片段扩增法和数据库检索法 5 种。

1.1.1 经典法 主要是将内切酶处理后的 DNA 片段重组入质粒载体中, 建立小片段基因组文库, 然后再用含不同重复序列的寡核苷酸探针进行筛选克隆。对于那些基因组中含量不是很丰富的微卫星序列, 用这种方法进行分离很困难。在欧洲牡蛎, 含有双核苷酸重复序列的阳性克隆的比例在 pBKS 基因组文库中仅为 0.52%, 在 pUC 基因组文库中为 0.66%^[3]。在贝类基因组中, 含有微卫星序列的阳性克隆的比例为 0.1%~6.4% (平均 1.96%)^[1]。因此, 即使考虑到筛选效率和使用探针种类不同带来的不确定性, 用传统经典方法分离贝类微卫星的效率也是比较低的。

1.1.2 富集法 又分为杂交选择法 (hybridization selection)^[6-7]、引物伸长法 (primer extension)^[8-9] 和 FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats) 法^[1] 3 种。杂交选择法是将小片段 DNA 与衔接头连接, 用含微卫星序列的探针进行选择杂交, 获取富含微卫星序列的单链 DNA,

收稿日期: 2005-05-08; 修订日期: 2005-07-05。

基金项目: 教育部重点项目 (104114)。

作者简介: 李 琪 (1966-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事贝类遗传与繁殖生物学研究。E-mail: qli66@mail.ccit.edu.cn

然后利用衔接头 PCR 恢复双链,重组入质粒载体,进行筛选、克隆。引物伸长法是将酶切后的 DNA 选择片段重组入噬菌体载体中,建立单链 DNA 文库,然后以单链 DNA 为模板,含微卫星序列的寡核苷酸为 PCR 引物,进行引物伸长反应,获得富含目标微卫星的双链产物。FIASCO 法实际是 AFLP 与杂交选择法的结合。在 AFLP 预扩增片段中,利用磁珠杂交选择富集含有微卫星的 DNA 片段,然后克隆、测序。利用杂交选择法,Li 等^[10]成功分离了太平洋牡蛎和皱纹盘鲍的(CA)_n微卫星标记,富集效率分别达到 20.5% 和 13.1%,显著高于传统的菌落直接杂交法。采用引物伸长法, Sekino 等^[11-12]相继分离了日本盘鲍(*Haliotis discus discus*)和太平洋牡蛎的微卫星标记。FIASCO 法在贝类目前还没有应用报道。

1.1.3 省略筛库法 是以 RAPD 为基础的 PCR 法^[13-14]。由于不需要构建和筛选基因组文库,分离步骤比较简便。基本原理是将 RAPD 扩增片段转移至膜上,与微卫星探针杂交进行 Southern 分析,获得阳性 RAPD 片段后进行克隆。利用该方法, Huang 等^[15]分离了黑唇鲍(*Haliotis rubra*) 3 个(CA)_n和(GACA)_n微卫星标记。

1.1.4 ISSR 片段扩增法 是一种不需要富集和筛选程序的新型微卫星分离法^[16]。主要步骤是用微卫星引物扩增简单序列重复间区的 DNA,获得两端具有微卫星序列的片段,进行克隆、测序,然后在微卫星序列间区设计特异性引物,利用“步行”法确定微卫星两侧的保守性序列。使用该方法 Lian 等^[16]分离出红松等多种植物的微卫星标记。

1.1.5 数据库检索法 在 DNA 数据库登录的 DNA 序列中,使用微卫星搜索软件筛选引物。Takagi 等^[17]利用 GenBank 中红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)的基因组序列,分析了微卫星的组成特点,分离了 12 个微卫星标记。

1.2 海洋贝类微卫星的开发现状

利用经典法、富集法、省略筛库法和数据库搜索法,近年来成功分离了太平洋牡蛎^[2,10,12,18-20]、欧洲牡蛎^[3,21-22]、美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)^[23-24]、大珠母贝(*Pinctada maxima*)^[25]等贝类的微卫星。据统计,目前已有 19 种海洋经济贝类进行了微卫星标记分离研究(表 1),其中双壳类 12 种,腹足类 7 种。这些微卫星基本上都采用经典法和富集法分离,核心重复序列大多为 2 碱基。

2 海洋贝类微卫星的特性

2.1 序列特性

依据 Weber^[39]提出的微卫星序列分类标准,可以把微卫星序列划分为完全的、不完全的和复合的 3 类。完全的微卫星是指没有中断的重复序列;不完全的微卫星指具有 1 个或多个中断的重复序列;复合的微卫星则指不同种重复序列被 3 个以下的非重复碱基间隔。从太平洋牡蛎得到的微卫星序列中,完全的占 54.7%,不完全的占 20.8%,复合的占 24.5%,其中完全的微卫星比例最高^[40]。太平洋牡蛎微卫星重复次数主要集中在 5~30 次之间,占 71.7%,最高为 60 次。在基因组中微卫星多态性程度与微卫星长度显示出正比关系^[41],因而一个位点的微卫星长度是预测该位点多态性水平的重要参数。

2.2 引物的保守性

微卫星大多存在于基因组中碱基置换率较高的非编码区,无法像粒线体 DNA 一样,针对微卫星 DNA 设计所谓的“通用引物”(universal primer),因而大部分物种的微卫星都必须重新分离,这也是微卫星应用上最大的困难之处。尽管如此,近年来在鱼类、贝类、甲壳类都报道了近缘种之间微卫星高度保守侧翼区的存在,指出部分微卫星位点间扩增的可行性。Evans 等^[42]研究了 22 个黑唇鲍微卫星在同属 12 种鲍鱼中的扩增,发现扩增成功率在不同种类差异较大,在亚种 *Haliotis conicopora* 为 68%,在地理隔离的其他种类仅为 14%。Li 等^[43]在皱纹盘鲍测试了 5 个日本盘鲍微卫星,证实 3 个位点可以扩增。Havet 等^[18]分析了 4 个太平洋牡蛎微卫星在巨蛎属(*Crassostrea*)及小蛎属(*Saccostrea*)共 12 种牡蛎中的保守性。结果表明,仅在近缘种 *C. angulata*、*C. sikamea* 和 *C. ariakeensis* 中有扩增,其扩增位点数分别为 4、3 和 3。

2.3 遗传特性

一般认为微卫星是中性的共显性标记,遵循孟德尔规律遗传。这一特性在欧洲牡蛎^[3]、太平洋牡蛎^[19]、皱纹盘鲍^[43]和美洲牡蛎^[24]的微卫星研究中都得到了证实。然而在这些研究中,同时也发现了一些微卫星位点的偏分离现象的存在。McGoldrick 等^[19]在太平洋牡蛎 43 个微卫星分离分析中发现 16 个分离(37%)显著偏离孟德尔分离比。这一结

果与在欧洲牡蛎的报道(1/3 偏分离)基本一致。Li 等^[43]研究了7个微卫星位点在4个皱纹盘鲍家系中的分离,发现2个位点的3个分离不符合孟德尔遗传,推测其原因可能是由于减数分裂过程中染色

体的非随机分离、不同配子的成活力与功能上的差异、或与显性致死基因的连锁引起的。在美洲牡蛎,也报道了26个微卫星分离中有8个分离显著偏离孟德尔比率^[24]。

表1 海洋贝类微卫星标记的分离
Tab.1 The isolation of microsatellite markers in marine molluscs

贝类 Species	重复单元 Repeat motif	分离方法 Methods of isolation	文献 References
太平洋牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	2 碱基	经典	[2]
	2 碱基	经典	[18]
	—	经典	[19]
	2 碱基	富集	[10]
	2-4 碱基	富集	[20]
	2-4 碱基	富集	[12]
欧洲牡蛎 <i>Ostrea edulis</i>	2 碱基	经典	[3]
	2 碱基	富集	[21]
	2 碱基	经典	[22]
美洲牡蛎 <i>Crassostrea virginica</i>	3 碱基,4 碱基	经典	[2]
	2-4 碱基	经典	[24]
大珠母贝 <i>Pinctada magellanicus</i>	2 碱基,4 碱基	经典	[25]
巨扇贝 <i>Placopendten magellanicus</i>	2 碱基	经典	[26]
智利扇贝 <i>Argopecten purpuratus</i>	2-4 碱基	经典	[27]
栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>	2-6 碱基	数据库搜索	[28]
贻贝 <i>Mytilus</i> spp	2-4 碱基	经典	[29]
贻贝 <i>Perna perna</i>	—	经典	[30]
贻贝 <i>Dreissena bugensis</i>	3 碱基,4 碱基	富集	[31]
象拔蚌 <i>Panopea abrupta</i>	2 碱基,4 碱基	富集	[32]
皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus hannai</i>	2 碱基,4 碱基	富集	[4]
	2-4 碱基	富集	[33]
日本盘鲍 <i>Haliotis discus discus</i>	2-5 碱基	富集	[11]
黑唇鲍 <i>Haliotis rubra</i>	2 碱基	省略筛库	[15]
	2 碱基,4 碱基	经典	[34]
红鲍 <i>Haliotis rufescens</i>	2 碱基	经典	[35]
堪察加鲍 <i>Haliotis kamtschatkana</i>	2-4 碱基	经典	[36]
耳鲍 <i>Haliotis asinina</i>	2 碱基	富集	[37]
粗糙玉黍螺 <i>Littorina saxatilis</i>	2-4 碱基,6-7 碱基	富集	[38]

3 海洋贝类微卫星在遗传育种中的应用

3.1 种群遗传结构分析

微卫星标记的高度多态性以及基因型判别的准确性已使其成为种群结构精细分析的有力工具。Huang 等^[44]用3个微卫星、2个小卫星和RAPD分析了澳大利亚沿海10个地理种群的100个黑唇鲍个体,发现种群之间存在显著的遗传分化,并认为这种分化与黑唇鲍短暂的浮游期和有限的扩散能力有

关。Herbinger 等^[45]用3个微卫星标记和3个cDNA探针研究了加拿大 Trinity 湾不同深度海底采集的2个巨扇贝(*Placopecten magellanicus*)种群,发现这2个种群尽管在耗氧率、滤水率和配子生产力的生理指标上存在着差异,但在遗传组成上并未出现分化。Launey 等^[46]用5个微卫星标记分析了从挪威至黑海的欧洲沿海15个欧洲牡蛎种群的遗传分化,结果表明,杂合度期望值差异明显,种群间存在显著的地理隔离。

3.2 养殖种群的遗传多样性监测

由于育苗生产中使用的亲本数量一般都非常有限,许多鱼类和贝类的人工苗种都显示出遗传多样性的显著降低^[5]。这种降低不仅有可能降低种群的疾病耐性以及对环境变化的适应能力,而且还具有引起野生种群遗传结构发生改变的潜在危险。因此,监测人工苗种的遗传变异及其在养殖过程中的变化对于成功的育种管理极为重要。

近年来,微卫星标记已成功应用于多种鱼类养殖种群的遗传变异检测。在皱纹盘鲍, Li 等^[47]用 6 个微卫星标记分析了 3 养殖种群和 2 野生种群的 380 个体,结果表明所有养殖种群的等位基因数和平均杂合度期望值都显著低于野生种群,其中等位基因数平均减少了 76%,证实了皱纹盘鲍养殖种群建立时瓶颈效应的发生。此外,皱纹盘鲍养殖种群间以及养殖和野生种群间也表现出显著分化,野生种群间则未出现明显差异。Evans 等^[48]分别用 3 和 5 个微卫星标记研究了南非 *Haliotis midae* 和澳洲黑唇鲍的 6 个养殖种群,发现同野生种群相比所有养殖种群的遗传多样性都普遍下降,等位基因数减少了 35%~62%。从上述结果可以看出,在育苗生产中进行人工苗种的遗传监测,对于保护贝类养殖种群的遗传多样性至关重要。

3.3 亲缘关系的鉴定及繁殖成功率分析

通过亲缘关系鉴定,开展家系分析研究可以阐明精子竞争、繁殖成功、幼体扩散等许多有关繁殖生态学 and 遗传学方面的科学问题。在水产动物生产和育种中,准确的系谱鉴定对于确定个体选留、培育优良苗种也非常重要。微卫星标记的多态性丰富、共显性遗传、服从孟德尔遗传规律的优点已使微卫星成为亲缘关系鉴定的重要工具。Selvarani 等^[49]使用 5 个微卫星标记鉴定了耳鲍(*Haliotis asinina*) 3 组独立交配($1\text{♀} \times 2\text{♂}$, $2\text{♀} \times 2\text{♂}$ 和 $1\text{♀} \times 4\text{♂}$)产生的幼虫后代的亲本来源,结果表明仅需组合 3 个微卫星位点就可以确定全部幼虫的父本和母本,在各交配组中幼虫的父本来源不均衡,表明存在精子竞争。在用 6 个微卫星标记分析 4 家系 160 个皱纹盘鲍孵化幼虫的研究中发现,在用邻接法绘制的树形图上来自 4 家系的所有个体被全部明确区分,表明这些微卫星标记可以有效地用于皱纹盘鲍幼虫亲缘关系的判别^[30]。为探讨合子前隔离与合子后选择的相对影响,Boudry 等^[51]用 1 个微卫星分析了太平洋牡蛎 2 个 5×5 远交系,结果显示,亲本的繁殖成功率

在不同发育阶段变化很大,从而导致有效种群大小明显下降。配子质量、精卵相互作用以及不同基因型个体的生活力差异是繁殖成功率变化的主要成因。

3.4 遗传图谱构建

遗传图谱可以显示 DNA 标记或基因在染色体上的线性排列以及彼此之间的相对距离,已成为遗传分析的基本工具。用于构建遗传图谱的常用标记包括同工酶、RAPD、RFLP、AFLP、微卫星、EST 等。在这些标记中,微卫星标记由于具有密度大、高度杂合、共显性遗传等特点,是目前最好的作图标记。近几年许多国家在水产动物遗传图谱研究方面投入了大量的人力、物力,并在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[52-53]、鲶(*Ictalurus punctatus*)^[54-55]、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[56-57]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[58]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[59]和日本对虾(*P. japonicus*)^[60]等种类取得了一些进展。在贝类相关的报道还很少。Hubert 等^[61]利用 102 个微卫星标记构建了太平洋牡蛎的雄性和雌性连锁图谱,美国 Guo 领导的研究小组则主要利用 AFLP 标记分别构建了太平洋牡蛎和美洲牡蛎的遗传图谱^[62-63]。

4 微卫星分析存在的问题

相矛盾的是,微卫星标记的诸多优点同时也增大了基因型错误判别的可能性。无效等位基因(null allele)、“结巴”带(stutter bands)、短等位基因显性(short allele dominance)和等位基因的“扩增丢失”(allelic dropout)现象的发生都可能导致微卫星基因型的鉴定错误。然而这些问题迄今还未能引起人们足够的重视。

4.1 无效等位基因

无效等位基因是指不被 PCR 扩增的等位基因,通常是由引物结合部位的点突变、插入或缺失引起^[64]。在太平洋牡蛎 172 个亲本微卫星等位基因中,30 个(17%)为无效等位基因^[19]。皱纹盘鲍微卫星遗传特性的研究表明,等位基因中无效等位基因的比例为 10.7%^[43]。在美洲牡蛎的微卫星研究中也发现,18 个微卫星位点中有 3 个位点存在无效等位基因,其中 2 个位点经过引物重新设计后能够恢复有效扩增^[24]。这些结果不仅表现了微卫星序列重复次数上的变异,而且还显示了微卫星侧翼区的多态性。

由于微卫星序列点突变频率($10^{-2} \sim 10^{-3}$)和

复制滑脱频率(10^{-3} – 10^{-4})很高^[65],无效等位基因在包括哺乳类、鱼类、甲壳类在内的许多生物中都有报道^[66–68]。在种群研究中,如果无效等位基因存在而不被考虑,就会出现把杂合子计数为纯合子的错误,在结果中产生纯合子过剩。在家系分析中,如果无效等位基因存在而未被检测,则会导致可能亲本的错误排除或个体间血缘关系的错误推断。因此,微卫星标记在用于种群或家系研究之前需要验证其是否符合孟德尔遗传。

4.2 “结巴”带

在用变性聚丙烯酰胺凝胶检测微卫星位点的PCR扩增产物时,有时1个等位基因不是1条带,而是由1个主带和数条附加带组成,这些附加带称作“结巴”带或“阴影”带(shadow bands)(图1)。“结巴”带大多出现在重复单位为2碱基的微卫星位点,并且通常比主带(长度 n)短数个重复单位($n-2$, $n-4$, …),强度随着离主带距离的加大而减弱,出现几率则随重复次数的增多而增大^[69–70]。对于“结巴”带的形成原因虽然有多种不同的解释,但是PCR产物直接测序结果显示,模板DNA中不含有“结巴”带,PCR反应过程中TaqDNA聚合酶的复制滑脱是“结巴”带的主要成因^[71]。由于每个等位基因都有多条带谱,当2个等位基因的片段大小比较接近时,就会给基因型判读带来困难。



图1 皱纹盘鲍 *Hdh1321* 微卫星位点的PCR扩增结果
Fig.1 Electropherogram indicating the stutter products at the Pacific abalone *Hdh1321* locus

4.3 短等位基因显性

短等位基因显性是指在含有2个长短不同等位基因的微卫星(或小卫星)杂合位点中只有短等位基因被检测的现象^[72]。这一现象在人类、鲸鱼、鲑鱼等许多种类都有报道^[73–75],在皱纹盘鲍的微卫星 *Hdh1761* 位点,也观察到长等位基因扩增带的强度

明显比短等位基因弱^[4]。为阐明其机理,Wattier等^[76]在龙须菜(*Gracilaria gracilis*)通过混合2个单倍体DNA样品建立了人工杂合体,分析了PCR反应中等位基因间竞争,发现长等位基因强度总是低于短等位基因,证实短等位基因显性是由于PCR反应中短等位基因的优先扩增引起的,并指出优化长等位基因的扩增条件(如增高热变性温度、时间,增加MgCl₂和Taq酶浓度)能够改善长等位基因的检测和产量。由于短等位基因显性能导致杂合子缺失的高估,因而在有关交配系统、亲子分配的种群研究中有可能导致错误结论。

4.4 等位基因的“扩增丢失”

等位基因的“扩增丢失”是指在模板DNA浓度很低或高度降解的情况下,1个体2个等位基因中有1个等位基因扩增失败的现象^[77]。这种现象是由随机抽样误差引起,而与等位基因的长短没有关系^[78]。抽样过程通常在提取物加入PCR混合液以及PCR反应中引物和聚合酶与模板DNA结合时发生。如果模板DNA浓度非常低,1个等位基因就可能比另一个扩增的多,从而产生1个“伪纯合子”^[79]。Taberlet等^[79]利用随机抽样模拟显示DNA浓度低时,等位基因的“扩增丢失”率能够超过50%。

综上所述,微卫星作为一种新型DNA标记,具有密度大、多态性丰富、高度杂合、稳定性好、遵循孟德尔分离定律、共显性遗传、易于PCR扩增等特点,已成为遗传学、生态学和进化研究的有力工具。海洋贝类的种类很多,目前仅在小部分海洋贝类中有微卫星分离的报道,微卫星标记在贝类遗传学研究中的应用还处于初级阶段。随着贝类分子遗传学研究和分子生物学技术的飞速发展,微卫星技术在海洋贝类种群遗传、亲子鉴定、遗传图谱构建、基因连锁分析、遗传多样性保护等研究领域的应用将更加广泛而深入。

参考文献:

- [1] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellites isolation: a review [J]. Mol Ecol, 2002, 11:1–16.
- [2] Magnoulas A, Gjetvåg B, Terzaghi V, et al. Three polymorphic microsatellites in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) [J]. Anim Genet, 1998, 29:69–70.
- [3] Naciri Y, Vigouroux Y, Dallas J, et al. Identification and inheritance of (GA/TC)-n and (AC/GT)-n repeats in the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.) [J]. Mol Mar Biol Biotechnol,

- 1995, 4: 83-89.
- [4] Li Q, Park C, Kijima A. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* [J]. J Shellfish Res, 2002, 21: 811-815.
- [5] 李 琪. 皱纹盘鲍微卫星研究进展[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34: 365-370.
- [6] Kijima J M H, Fowler J C S, Garbutt C A, et al. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles [J]. Biotechniques, 1994, 16: 657-662.
- [7] Refseth U H, Fagan B M, Jakobsen K S. Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA [J]. Electrophoresis, 1997, 18: 1519-1523.
- [8] Ostrander E A, Jong P M, Rine J, et al. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 3419-3423.
- [9] Takahashi H, Nirasawa K, Furukawa T. An efficient method to clone chicken microsatellite repeat sequences [J]. Japanese Paul Sci, 1996, 33: 292-299.
- [10] Li Q, Kijima A. Identification of novel microsatellite loci in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) by magnetic bead hybridization selection [J]. Tiboku J Agric Res, 2002, 53: 25-32.
- [11] Sekino M, Hara M. Microsatellite DNA loci in Pacific abalone *Haliotis discus discus* (Mollusca, Gastropoda, Haliotidae) [J]. Mol Ecol Notes, 2001, 1: 8-10.
- [12] Sekino M, Harauchi M, Araiishi F, et al. Development of novel microsatellite DNA markers from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Mar Biotechnol, 2003, 5: 227-233.
- [13] Ender A, Schwenk K, Stadler T, et al. RAPD identification of microsatellites in *Daphnia* [J]. Mol Ecol, 1996, 5: 437-441.
- [14] Lant D H, Hutchinson W F, Carvalho G R. An efficient method for PCR-based identification of microsatellite arrays (PIMA) [J]. Molecular Ecology, 1999, 8: 893-894.
- [15] Huang B, Hanna P J. Identification of three polymorphic microsatellite loci in blacklip abalone, *Haliotis rubra* (Lach), and detection in other abalone species [J]. J Shellfish Res, 1998, 17: 795-799.
- [16] Lian C, Zhou Z, Higashi T. A simple method for developing microsatellite markers using amplified fragments of inter-simple sequence repeat (ISSR) [J]. J Plant Res, 2001, 114: 381-385.
- [17] Takagi M, Sato J, Maruyoshi C, et al. Evaluation of microsatellites identified in the tiger puffer *Takifugu rubripes* DNA database [J]. Fish Sci, 2003, 69: 1085-1095.
- [18] Havet A, Roudry P, Ohresser M, et al. Variable microsatellites in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and other cupped oyster species [J]. Anim Genet, 2000, 31: 68-79.
- [19] McGoldrick D J, Hodgstock 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]. J Shellfish Res, 2000, 19: 779-788.
- [20] Li G, Hubert S, Bucklin K, et al. Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Mol Ecol Notes, 2003, 3: 228-232.
- [21] Morgan T S, Rogers A D, Iyengar A. Novel microsatellite markers for the European oyster *Ostrea edulis* [J]. Mol Ecol, 2000, 9: 495-497.
- [22] Sobolewska H, Beaumont A R, Hamilton A. Dinucleotide microsatellites isolated from the European flat oyster, *Ostrea edulis* [J]. Mol Ecol Notes, 2001, 1: 79-80.
- [23] Brown B, Franklin D E, Gaffney P M, et al. Characterization of microsatellite loci in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* [J]. Mol Ecol, 2000, 9: 2217-2219.
- [24] 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]. J Hered, 2004, 95: 346-352.
- [25] Smith C, Benzie J A, Wilson K J. Isolation and characterization of eight microsatellite loci from silver-lipped pearl oyster *Pinctada mazurina* [J]. Mol Ecol Notes, 2003, 3: 125-127.
- [26] Gervay B, Bell R M, Barbridge S, et al. Amounts of polymorphism at microsatellite loci in the sea scallop *Placopecten magellanicus* [J]. J Shellfish Res, 1997, 16: 547-553.
- [27] Pickrell T, McConnell S, Skibinski D. Isolation and characterization of three microsatellite loci from the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* [J]. Ann Zool Fennici, 2004, 41: 455-457.
- [28] 李红雷, 宋林生, 王玲玲, 等. 褶孔扇贝 EST 中微卫星标记的筛选 [J]. 高技术通讯, 2003, 12: 72-75.
- [29] Pons P, Perra M, Da A P. Polymorphic microsatellite markers for blue mussels (*Mytilus* spp.) [J]. Conservation Genetics, 2002, 3: 441-443.
- [30] Holland B S. Invasion without a bottleneck: Microsatellite variation in natural and invasive populations of the brown mussel *Peru perna* (L.) [J]. Mar Biotechnol, 2001, 3: 407-415.
- [31] Wilson A B, Boulding E G, Nash K A. Characterization of tri- and tetranucleotide microsatellite loci in the invasive mussel *Dreissena lugensis* [J]. Mol Ecol, 1999, 8: 692-693.
- [32] Vadopoulos B, Bentzen P. Isolation and characterization of di- and tetranucleotide microsatellite loci in gadoid clupe, *Polipha abruptus* [J]. Mol Ecol, 2000, 9: 1435-1436.
- [33] Sekino M, Saito T, Fujita T, et al. Microsatellite DNA markers of Ezo abalone (*Haliotis discus hannai*): a preliminary assessment of natural populations sampled from heavily stocked areas [J]. Aquaculture, 2005, 243: 33-47.
- [34] Evans B, White R W G, Elliott N G. Characterization of microsatellite loci in the Australian blacklip abalone (*Haliotis rubra*, Lach) [J]. Mol Ecol, 2000, 9: 1183-1184.
- [35] Kirby V L, Villa R, Powers D A. Identification of microsatellites in the California red abalone, *Haliotis rufescens* [J]. J Shellfish Res, 1998, 17: 801-804.

- [36] Miller K M, Lalreue K, Kaikinen K H, et al. Development of microsatellite loci in pinto abalone (*Haliotis kamtschatkana*) [J]. Mol Ecol Notes, 2001, 1:315-317.
- [37] Selvarani M J P, Degnan S M, Paetkau D, et al. Highly polymorphic microsatellite loci in the Heron Reef population of the tropical abalone *Haliotis asinina* [J]. Mol Ecol, 2000, 9:1384-1386.
- [38] Sokolov E P, Sokolova I M, Portner H O. Composition and relative abundance of microsatellite repeats in genome of *Littorina saxatilis* (Oliv) (Gastropoda: Littorinidae) [J]. J Moll Stud, 2001, 67:499-501.
- [39] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n(dG-dT)_n polymorphisms [J]. Genomics, 1985, 7:524-530.
- [40] 李 斌, 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, 35:364-370.
- [41] Rico C, Ibrahim K M, Rico I, et al. Stock composition in North Atlantic populations of whiting using microsatellite markers [J]. J Fish Biol, 1997, 51:462-475.
- [42] Evans B, Conod N, Elliott N G. Evaluation of microsatellite primer conservation in abalone [J]. J Shellfish Res, 2001, 20:1065-1070.
- [43] Li Q, Park C, Kobayashi T, et al. Inheritance of microsatellite DNA markers in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* [J]. Mar Biotechnol, 2003, 5:331-338.
- [44] Huang B X, Penkall R, Harris P J. Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) populations using RAPD, minisatellite and microsatellite markers [J]. Mar Biol, 2000, 136:207-216.
- [45] Herbinger C M, Vercauteren B M, Gjertvåg B, et al. Absence of genetic differentiation among geographically close sea scallop (*Placopecten magellanicus* G.) beds with cDNA and microsatellite markers [J]. J Shellfish Res, 1998, 17:117-122.
- [46] Loney S, Lodi C, Boudry P, et al. Geographic structure in the European flat oyster, *Ostrea edulis* L., as revealed by microsatellite polymorphism [J]. J Hered, 2002, 93:331-351.
- [47] Li Q, Park C, Endo T, et al. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) [J]. Aquaculture, 2004, 235:207-222.
- [48] Evans B, Bartlett J, Sweijd N, et al. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midiae*) [J]. Aquaculture, 2004, 233:109-127.
- [49] Selvarani M J P, Degnan S M, Degnan B M. Microsatellite genotyping of individual abalone larvae: Parentage assignment in aquaculture [J]. Mar Biotechnol, 2001, 3:478-485.
- [50] Li Q, Park C, Kijima A. Allelic transmission of microsatellites and application to kinship analysis in newly hatched Pacific abalone larvae [J]. Fish Sci, 2003, 69:883-889.
- [51] Boudry P, Collet B, Cornette F, et al. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses [J]. Aquaculture, 2002, 204:283-296.
- [52] Solomon T, Drummond R G, Gharbi K, et al. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates [J]. Genetics, 2000, 155:1331-1345.
- [53] Young W P, Wheeler P A, Coryell V H, et al. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids [J]. Genetics, 1998, 148:839-850.
- [54] Waldbieser G C, Bosworth B G, Nonnenman D J, et al. A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Genetics, 2001, 158:727-734.
- [55] Liu Z, Li P, Kucuktas H, et al. Development of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers suitable for genetic linkage mapping of catfish [J]. Trans Am Fish Soc, 1999, 128:317-327.
- [56] Agresti J J, Seki S, Cravini A, et al. Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci [J]. Aquaculture, 2000, 185:43-56.
- [57] Kocher T D, Lee W, Sobolewska H, et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Genetics, 1998, 148:1225-1232.
- [58] Coimbra M R, Kobayashi K, Koyama S, et al. A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 2003, 220:203-218.
- [59] Wilson K, Li Y, Wham V, et al. Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism [J]. Aquaculture, 2002, 204:297-309.
- [60] Li Y, Byrne K, Muggiano E, et al. Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers [J]. Aquaculture, 2003, 219:143-156.
- [61] Hubert S, Hedgecock D. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Genetics, 2004, 168:351-362.
- [62] Li L, Guo X. AFLP-based genetic linkage maps of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg [J]. Mar Biotechnol, 2004, 6:26-36.
- [63] Yu Z, Guo X. Genetic linkage map of the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin [J]. Biol Bull, 2003, 204:327-338.
- [64] Callen D F, Thompson A D, Shen Y, et al. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers [J]. Am J Hum Genet, 1993, 52:922-927.
- [65] Vigouroux Y, Jaspard J S, Matsuda Y, et al. Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize [J]. Mol Biol Evol, 2002, 19:1251-1260.
- [66] Pemberton J M, Slate J, Bancroft D R, et al. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: A caution for parentage and population studies [J]. Mol Ecol, 1995, 4:249-252.
- [67] Jones A G, Stockwell C A, Walker D, et al. The molecular basis of a microsatellite null allele from the white sands pupfish [J]. J Hered, 1998, 89:339-342.

- [68] Sugaya T, Ikeda M, Mori H, et al. Inheritance mode of microsatellite DNA markers and their use for kinship estimation in kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Fish Sci*, 2002, 68:299-305.
- [69] Murray V, Monchuwin C, England P R. The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21:2395-2398.
- [70] Huang X Y, Litt M. A study of the origin of 'shadow bands' seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR [J]. *Hum Mol Genet*, 1993, 2:411-415.
- [71] Shinde D, Lai Y, Sun F, et al. *Taq* DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31:974-980.
- [72] Deika R, De Croo S, Yu L M, et al. Variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism at locus D17S5 (YNZ22) in four ethnically defined human populations [J]. *Human Genetics*, 1992, 90:86-90.
- [73] Day D J, Speiser P W, Schulze E, et al. Identification of non-amplifying CYP21 genes when using PCR-based diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia (CAH) affected pedigrees [J]. *Hum Mol Genet*, 1996, 5:2039-2048.
- [74] Van Pijlen I A, Amos B, Burke T. Patterns of genetic variability at individual microsatellite loci in Minke whale *Balaenoptera acutorostrata* populations from three different oceans [J]. *Mol Ecol*, 1995, 12:459-472.
- [75] Burke M A, Hixon M S, Baldwin B A, et al. Isolation and inheritance of novel microsatellites in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J]. *J Hered*, 1999, 90:281-288.
- [76] Wattier R, Engel C R, Saumitou-Laprade P, et al. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus GvCT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta) [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7:1569-1573.
- [77] Miller C R, Joyce P, Waits L P. Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood [J]. *Genetics*, 2002, 160:357-366.
- [78] Navidi W, Arnheim N, Waterman M S. A multiple-tubes approach for accurate genotyping of very small DNA samples by using PCR: statistical considerations [J]. *Am J Hum Genet*, 1992, 50:347-359.
- [79] Taberlet P, Griffin S, Gonnema H, et al. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24:3189-3194.

Development of microsatellite DNA markers and their applications in genetic studies in marine mollusks

LI Qi

(Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Microsatellite DNA is among the most efficient class of molecular markers due to their hyper-variable and co-dominant nature with relatively high abundance and random distribution in the genome, and have been applied to a variety of fields including population differentiation, kinship analysis, linkage analysis, and evolutionary and ecological studies. Recently, studies on microsatellites in marine mollusks are increasing. In this article, we review isolation methods, developmental status and genetic characteristics of microsatellites, and their applications in studies on population study, pedigree analysis, assessment of genetic diversity, and construction of genetic maps in the marine mollusks, and analyzed the causes resulting to null allele, stutter bands, short allele dominance and allelic dropout, and their effects on genotyping of microsatellite. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3):502-509]

Key words: marine mollusks; microsatellites; genetics