

马氏珠母贝家系遗传结构的微卫星分析

汤 健^{1,2}, 管云雁², 刘文广², 何毛贤²

(1. 中国科学院大学, 北京 100039; 2. 中国科学院 南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东 广州 510301)

摘要: 利用 6 个微卫星位点研究了 9 个马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)养殖家系的遗传结构, 为后续育种工作提供了指导。从 60 对引物中筛选出 6 对能够稳定扩增且多态性较好的引物。6 个微卫星位点在 9 个家系中共检测到 17 个等位基因, 每个位点等位基因数(A)为 2~4 个, 平均 2.833 个。6 个位点在 9 个家系上的有效等位基因数(N_e)平均值为 2.030~2.632, 平均杂合度观测值(H_o)为 0.4306~0.6354, 平均杂合度期望值(H_e)为 0.4380~0.5962。家系间遗传分化系数(F_{ST})为 0.0749。采用 NJ 法进行聚类分析显示, 9 个家系分为明显的两支, 根据遗传距离计算结果, F7 和 F9 家系之间的遗传距离最近, F11 与 F12 家系遗传距离最远。结果表明, 9 个家系的遗传多样性和遗传分化处于中等水平, 可以考虑 F11 与 F12 家系杂交, 以期获得较好的杂种优势, F11 自交培育出遗传稳定的优良家系。

关键词: 马氏珠母贝(*Pinctada fucata*); 微卫星; 家系; 遗传结构

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2013)08-0035-07

马氏珠母贝(*Pinctada fucata*), 又称合浦珠母贝, 主要分布于太平洋西南部, 是世界上培育海水珍珠的主要种类。在中国主要分布于广东、广西、海南和台湾海峡南部一带, 是中国海水珍珠养殖的主要品种。我国自1965年成功开展其人工育苗以来, 经多年养殖的马氏珠母贝的性状已呈现明显退化现象, 盲目引种杂交给马氏珠母贝种质带来不同程度的影响, 具体表现为遗传力减弱、抗逆性差、成活率下降、性状退化等严重问题^[1]。因此对马氏珠母贝进行遗传改良, 培育出生长快、个体大、育珠性状好的品种, 是当前珍珠养殖业的重要课题。利用DNA分子标记可显著促进海洋生物资源保护和遗传改良工作的实施, 为遗传育种提供理论依据和指导^[2-4]。目前, 中国已有科技工作者采用多种遗传标记对不同的马氏珠母贝野生种群、养殖种群及育种群体进行了遗传多样性和遗传变异的研究, 如RAPD^[5-6]、ISSR^[7-8]、AFLP^[9-10]、SSR^[11-12]等, 然而利用DNA分子标记进行家系遗传研究还很少见到报道^[13]。通过家系选育获得新的品系或品种, 对于马氏珠母贝优良品种的培育具有重要的意义。

微卫星(microsatellite), 又称简单序列重复(SSR, simple sequence repeat), 是2~6个碱基串联重复序列, 广泛分布于真核生物基因组中^[14-15]。微卫星由于分布随机广泛(包括编码区和非编码区), 多态性高, 符

合孟德尔遗传, 可区分纯合子和杂合子表现共显性, 适于操作等特点, 是近年来迅速发展起来的第二代DNA多态分子标记之一^[16-17], 现已被广泛应用于水产经济品种的种质鉴定、遗传育种等研究领域^[18-20]。本研究利用6个微卫星位点对9个马氏珠母贝家系进行了遗传分析, 以期获得9个家系的遗传多样性水平、遗传结构及可能与生长的关系, 为马氏珠母贝的育种选配方案提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 样品采集与基因组 DNA 提取

用于本研究的马氏珠母贝 *Pinctada fucata* 家系构建于 2008 年并养殖于深圳大鹏澳海区, 编号 F1~F12, 其中 F1、F8 和 F10 因台风灾害丢失, 家系构建方法见汤健等^[21]。从每个家系随机取样 48 个个体, 取其闭壳肌组织于 95%酒精中保存待用。取 50~100 mg 闭壳肌组织, 纯水漂洗后使用北京天根公司提供的海洋动物组织基因组提取试剂盒(QIAGEN Marine

收稿日期: 2013-05-18; 修回日期: 2013-06-29

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-EW-Q21); 广东省海洋渔业科技推广专项 (A201201A05)

作者简介: 汤健(1985-), 男, 辽宁大连人, 硕士研究生, 研究方向为贝类遗传育种与养殖, E-mail: strive_since1985@hotmail.com; 何毛贤, 通信作者, 研究员, E-mail: hmx@scesio.ac.cn

Animals DNA Kit)提取基因组 DNA。DNA 样品用 1% 琼脂糖凝胶电泳、EB 染色检测, 并测定 260 nm 和 280 nm 处吸光度, 检测 DNA 的质量和计算浓度, 然后配成 20 ng/ μ L 的 DNA 溶液备用。

1.2 微卫星引物筛选及 PCR 扩增

引物来源于石耀华等^[22-23]开发的微卫星标记, 共选用 60 对引物由生工生物(上海)有限公司合成, 通过优化 PCR 反应条件, 初步筛选出能够稳定扩增的引物 17 对, 选用其中多态性较好的 6 对引物。引

物信息见表 1。

PCR 扩增反应总体积为 25 μ L, 其中包括 DNA 模板 2 μ L, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, dNTP 2 μ L(2.5 μ mol/L), 上下游引物(10 μ mol/L) 各 1 μ L, MgCl₂(25 mmol/L) 1.5~2.0 μ L, Taq DNA 聚合酶(上海生工)1U, 加 ddH₂O 补足体系。按各引物条件于 BioRad PTC-200 PCR 扩增仪上进行扩增。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58.5~61 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

表 1 6 对马氏珠母贝多态微卫星引物序列

Tab. 1 Microsatellite primer sequences for the six polymorphic loci of *Pinctada fucata*

微卫星位点	重复类型	引物序列(5'-3')	退火温度 ($^{\circ}$ C)
HNUM001	(AC) ₅	F: TGGCCCAGTTGTATTTGTG R: GCTAGGTCCCCGTC AATTA	59
HNUM004	(AG) ₅	F: CGGAAAGAGAAGCGAAAGAG R: CGCTTAGCAATGACAGGTTG	60
HNUM068	(AAT) ₄	F: CGGCAAGTTCATCGCATAGTTC R: TCCACCAGAAGAGAAACCAAC	61
HNUM125	(AAACG) ₄	F: CCGAAATGCACTGTA ACTGG R: GGTTCGTTTCGTTTCGATTTG	58.5
HNUM129	(TACTGA) ₄	F: CCGAAATGCACTGTA ACTGG R: GGTTCGTTTCGTTTCGATTTG	60.5
HNUM146	(ATGA) _{12c} (TGAA) ₅	F: GCAGCGTCGTTGTGTTGAG R: GTTTTCATTGTTTTCAIAAAAATTTGTC	61

1.3 扩增产物检测

取 PCR 扩增产物 2 μ L 用 10% 聚丙烯酰胺凝胶在 180 V 电压下电泳分离 4~5 h, 电泳缓冲液为 0.5 \times TBE。电泳完毕后, 使用 0.1% 硝酸银溶液染色, 显色液(0.5% 氢氧化钠, 0.4% 甲醛, 0.02% 硼砂)显影, 扫描仪扫描凝胶成像以记录实验结果。

1.4 数据统计与分析

微卫星是共显性遗传, 位点可以直接从聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上判读。统计每个位点的等位基因数量(A), 用 Popgene1.32 软件计算每个家系的有效等位基因数 (N_e)、观察杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e), Hardy-Weinberg 平衡检测和 Shannon 多样性指数 (I), 同时计算了家系间的遗传距离 (D) 和遗传分化指数 (F_{ST})。

2 结果与分析

2.1 微卫星位点多态性及家系间遗传结构分析

6 个微卫星标记在 9 个马氏珠母贝家系中均能扩增获得稳定清晰的条带, 并在不同家系中表现出不同程度的多态性(图 1)。9 个家系的平均等位基因数

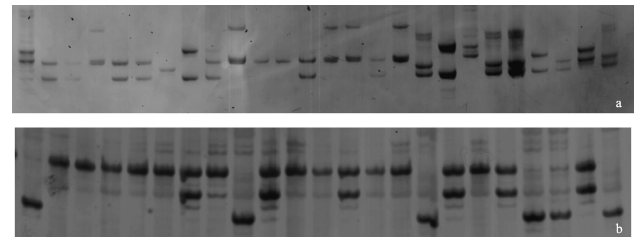


图 1 引物在家系部分个体中的扩增结果

Fig. 1a The PCR results of SSR primer amplified in some individuals of family

a. 引物 HNUMP068 在 F2 家系部分个体中的扩增结果
a. The PCR results of SSR primer HNUMP068 amplified in some individuals of F2 family

b. 引物 HNUMP146 在 F11 家系部分个体中的扩增结果
b. The PCR results of SSR primer HNUMP146 amplified in some individuals of F11 family

(A)、平均有效等位基因数 (N_e)、平均期望杂合度 (H_e)、平均观察杂合度 (H_o) 以及 Shannon 多样性指数 (I) 见表 2。6 个多态位点共检测出 17 个等位基因, 每个位点的等位基因数 (A) 2~4, 其中位点 HNUMP068 检测出的等位基因最多 (4 个), 位点 HNUMP001、HNUMP004 的等位基因最少 (2 个), F3、F5、F7 和 F12 的 A 最高 (3.333), F2 的 A 最少 (2.833); 9 个家系的有效等位基因数 (N_e) 为 2.030~2.632, 平均观测杂合度 (H_o) 为 0.4306~0.6354,

表 2 6 个 SSR 位点在 9 个马氏珠母贝家系中的统计总结

Tab. 2 Statistics of 6 microsatellite loci among nine families of *Pinctada fucata*

家系	参数	位点 loci						平均值
		HNUMP001	HNUMP004	HNUMP068	HNUMP125	HNUMP129	HNUMP146	
F2	<i>A</i>	2	2	4	3	3	3	2.833
	N_e	1.573	1.411	3.451	2.801	2.396	2.359	2.332
	H_e	0.3644	0.2914	0.7103	0.6430	0.5827	0.5762	0.5280
	H_o	0.4792	0.3542	0.7292	0.7083	0.6042	0.3333	0.5347
	<i>I</i>	0.5506	0.4669	1.3131	1.0647	0.9703	0.9681	0.8890
	HWE	0.0334	0.1497	0.1725	0.7131	0.0697	0.0000	
F3	<i>A</i>	2	4	4	4	3	3	3.333
	N_e	1.822	1.731	3.514	2.994	1.928	2.969	2.493
	H_e	0.4512	0.4225	0.7155	0.6660	0.4816	0.6632	0.5667
	H_o	0.6875	0.5208	0.5625	0.5833	0.4375	0.3958	0.5313
	<i>I</i>	0.6435	0.8064	1.3167	1.1334	0.7897	1.0934	0.9639
	HWE	0.0003	0.4606	0.0003	0.3641	0.7911	0.0002	
F4	<i>A</i>	2	3	4	3	3	3	3
	N_e	1.254	1.440	3.324	2.452	1.694	2.425	2.098
	H_e	0.2029	0.3058	0.6992	0.5922	0.4099	0.5877	0.4663
	H_o	0.2292	0.3542	0.6458	0.5208	0.3333	0.5000	0.4306
	<i>I</i>	0.3560	0.5819	1.2750	0.9922	0.6809	0.9673	0.8089
	HWE	0.3948	0.5570	0.0296	0.3001	0.1886	0.5509	
F5	<i>A</i>	2	4	4	3	3	4	3.333
	N_e	1.156	2.108	3.418	2.298	2.460	2.922	2.394
	H_e	0.1352	0.5258	0.7075	0.5649	0.5935	0.6578	0.5308
	H_o	0.1458	0.7083	0.6458	0.4792	0.4375	0.5833	0.5000
	<i>I</i>	0.2611	0.8259	1.2848	0.9037	0.9682	1.1209	0.8941
	HWE	0.6156	0.1007	0.1127	0.2311	0.0340	0.0143	
F6	<i>A</i>	2	4	4	3	3	3	3.167
	N_e	1.600	2.293	3.569	2.907	2.637	2.787	2.632
	H_e	0.3750	0.5640	0.7198	0.6560	0.6209	0.6413	0.5962
	H_o	0.5000	0.5833	0.7292	0.8750	0.4375	0.6875	0.6354
	<i>I</i>	0.5623	0.9672	1.3192	1.0819	1.0262	1.0615	1.0030
	HWE	0.0242	0.4979	0.3333	0.0027	0.0027	0.6395	
F7	<i>A</i>	2	4	4	3	3	4	3.333
	N_e	1.358	1.590	3.282	2.547	2.567	3.180	2.421
	H_e	0.2637	0.3711	0.6953	0.6074	0.6105	0.6855	0.5389
	H_o	0.3125	0.3333	0.8750	0.5000	0.5625	0.6458	0.5382
	<i>I</i>	0.4334	0.7489	1.2512	1.0069	1.0034	1.2023	0.9410
	HWE	0.2171	0.0003	0.0034	0.3786	0.2452	0.0000	
F9	<i>A</i>	2	4	4	3	3	3	3.167
	N_e	1.132	1.184	2.352	2.316	2.202	2.992	2.030
	H_e	0.1172	0.1556	0.5749	0.5684	0.5460	0.6658	0.4380
	H_o	0.1250	0.1667	0.5625	0.5208	0.7500	0.4792	0.4340
	<i>I</i>	0.2338	0.3481	1.0224	0.9493	0.8722	1.0973	0.7539
	HWE	0.6748	0.9992	0.0701	0.4681	0.0003	0.0242	
F11	<i>A</i>	2	3	4	4	3	3	3.167
	N_e	1.132	1.158	3.569	2.978	2.080	2.738	2.276
	H_e	0.1172	0.1365	0.7198	0.6643	0.5193	0.6348	0.4653
	H_o	0.1250	0.1458	0.7917	1.0000	0.3125	0.5833	0.4931
	<i>I</i>	0.2338	0.2910	1.3273	1.1310	0.7791	1.0533	0.8026
	HWE	0.6748	0.9687	0.0386	0.0000	0.0000	0.1120	
F12	<i>A</i>	2	4	4	4	3	3	3.333
	N_e	1.384	1.839	3.496	3.053	1.854	2.413	2.340
	H_e	0.2917	0.5000	0.7917	0.7500	0.4583	0.6250	0.5279
	H_o	0.2778	0.4564	0.7140	0.6725	0.4607	0.5857	0.5694
	<i>I</i>	0.4506	0.8998	1.3189	1.1828	0.7532	0.9774	0.9304
	HWE	0.7807	0.2123	0.5967	0.1359	0.2197	0.6727	

注: *A*, 等位基因数; N_e , 有效等位基因数; H_o , 观测杂合度; H_e , 期望杂合度; *I*, Shannon 多样性指数; HWE, Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验

平均期望杂合度(H_e)为0.4380~0.5962, Shannon多样性指数(I)为0.7539~1.003; F6的 H_e 最高, 为0.5962, F9最低, 为0.438; F6具有最高的 I 值(1.003), F9最低(0.7539)。

Hardy-Weinberg 平衡 χ^2 检验发现, 6 个多态位点中, F4 有 1 个位点偏离平衡状态, F2、F5 和 F9 各有 2 个位点偏离平衡状态, F3、F6、F7 和 F11 各有 3 个位点偏离遗传平衡状态($P < 0.05$)。Hardy-Weinberg 平衡指数(d)为-0.1573~0.1496。在 9 个家系中, 4 个家系(F3、F4、F5 和 F7)表现为杂合子过剩($d > 0$), 其余家系(F2、F6、F9、F11 和 F12)均表现为杂合子

缺失($d < 0$)。

2.2 家系间遗传分化比较

分析结果显示, 各位点上 9 家系间遗传分化系数 F_{ST} 为 0.0375~0.2733, 均值为 0.0749。发现有 4 个位点 F_{ST} 小于 0.05, 剩下两个位点的 F_{ST} 大于种群间无遗传分化的标准($F_{ST}=0\sim 0.05$)^[24]。根据 Nei^[25]计算 9 个家系的遗传距离和遗传相似性指数(表 3), 结果显示 F7 和 F9 遗传距离最近(0.0202), 遗传相似性指数最高(0.9800); F11 和 F12 遗传距离最远(0.2776), 相似性指数最低(0.7576)。

表 3 9 个马氏珠母贝家系间的遗传距离及相似性指数

Tab. 3 Genetic distances and similarity index among nine families of *Pinctada fucata*

	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F9	F11	F12
F2	****	0.9652	0.9565	0.8721	0.8897	0.9420	0.9138	0.9592	0.7725
F3	0.0354	****	0.9605	0.8913	0.9047	0.9653	0.9402	0.9433	0.8176
F4	0.0444	0.0403	****	0.9013	0.8625	0.9630	0.9611	0.9588	0.8037
F5	0.1368	0.1151	0.1039	****	0.9517	0.9234	0.9047	0.8954	0.9186
F6	0.1169	0.1001	0.1480	0.0495	****	0.8861	0.8508	0.8605	0.9544
F7	0.0597	0.0353	0.0377	0.0797	0.1209	****	0.9800	0.9715	0.8074
F9	0.0901	0.0616	0.0397	0.1001	0.1616	0.0202	****	0.9717	0.7784
F11	0.0416	0.0584	0.0421	0.1105	0.1503	0.0289	0.0287	****	0.7576
F12	0.2581	0.2013	0.2185	0.0849	0.0467	0.2140	0.2505	0.2776	****

注: 对角线上方为遗传相似性指数, 对角线下方为遗传距离

利用软件 MEGA 3.0, 根据遗传距离采用 NJ 法进行聚类分析。结果如图 2 所示, 聚类树分为明显的两支。F7 和 F9 首先聚类, 再分别与 F11、F4 聚类, 然后与 F2、F3 相聚; 另一支 F6 和 F12 相聚后与 F5 相聚, 最后两支聚到一起。

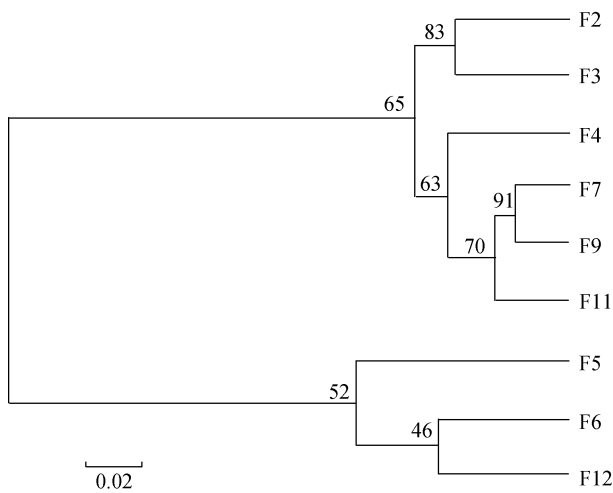


图 2 9 个马氏珠母贝家系的 NJ 系统树

Fig.2 NJ tree of nine families of *Pinctada fucata*

3 讨论

3.1 马氏珠母贝家系多样性水平及遗传差异分析

本研究中 9 个马氏珠母贝家系的观测杂合度为 0.4306~0.6354, 期望杂合度为 0.4380~0.5964, 所选 6 个位点的杂合度皆高于这些标记所分析的两个地理种群^[26]。根据已有的文献报道^[12-13,27-28], 微卫星标记分析的马氏珠母贝养殖群体的观测杂合度和期望杂合度分别为 0.15~0.56 和 0.38~0.75, 与之相比, 本研究中的 9 个家系的观测杂合度处于中等偏上的水平, 期望杂合度处于中等水平。9 个家系中, 其中有 5 个家系(F2、F6、F9、F11 和 F12)表现为杂合子缺失, 说明近交机会增大使得这些家系遗传多样性正在逐渐变小, 进而造成纯合子增多、杂合子减少, 部分等位基因丧失。F4 是一个自交家系, 其有效等位基因数最少, N_e 和 N_s 也较低, 说明自交会使其遗传多样性降低。张红玉等^[13]使用 SRAP 分子标记分析也表明马氏珠母贝家系的遗传多样性随世代的增加而有下降的趋势, 在罗

非鱼、中国对虾的群体选育中也有相似的现象^[29-30], 连续的封闭群体自交会引起遗传多样性的下降。虽然一些研究表明杂交能提高后代的杂合度^[31], 但由于本研究中其他3个自交家系丢失, 家系间杂交能否增加杂合度, 从而改善生长性能难以得到证实。

卡方检验Hardy-Weinberg平衡结果表明所检测的6个位点的基因型在群体中的分布均极显著偏离了Hardy-Weinberg平衡, 说明群体内的基因型频率发生了很大改变, 这与突变、杂交、选择等因素有关, 与家系培育中亲本数量少也有很大的关系, 有限的亲本数量会引起养殖群体的遗传结构发生改变, 导致群体的随机漂变或瓶颈效应^[32-33]。遗传分化的本质是基因频率的变化和杂合度变化, 是杂合度与一致度的度量。遗传分化系数 F_{ST} 能够反映各个家系间的分化水平, 本研究中各座位的 F_{ST} 均值为0.0749, 表明各个家系间存在中度遗传分化, 9个家系仅有7.49%的变异是由群体间分化导致的, 而92.51%的变异来源于群体内。其中位点HNUMP068、HNUM125、HNUMP129和HNUMP146表现出极显著差异($P<0.05$), 表明这4个位点在不同家系中的分布不均衡, 该结果与卡方检验Hardy-Weinberg平衡结果得出的结论一致。

3.2 家系杂交组合策略及杂种优势分析

家系选育在水产经济种类育种中具有重要地位, 通过家系选育进行不断遗传改进, 可以使经济性状得到改进。家系的建立和选育是否成功关键在于亲本的选择, 根据传统育种经验如亲本性状互补, 亲缘关系及地理距离远近等, 作为亲本选配的原则, 准确性较小, 很难达到预期目的。分子标记能够直接反映亲本家系间基因组水平上的遗传差异, 通过分子标记遗传距离能够在一定程度上预测生物的杂种优势, 一些研究表明遗传距离与杂种优势呈显著正相关^[34], 而且亲本的遗传距离越远, 其交配产生杂种优势就越明显^[35]。本研究中, 9个家系的分子聚类关系树形成明显的2支, 在后续的家系选育中可以优先利用遗传距离最远且生长速率较快的F11家系与F12家系(见备注2)进行杂交, 以期获得较好的杂种优势; F11生长快, 杂合度较低, 可通过自交以期培育出遗传稳定的优良家系。

9个家系中杂合度较高的家系, 亲本中出现F12的频率最高, 其次F19, 再次F14, 最次F17。从子代各家系的生长速率来看, 以F17为亲本的家系各数量

性状生长速率显著大于以F19为亲本的家系, 这说明亲本F17的后代已经具备优良性状的稳定遗传。特别是子代F11, 可对其进一步培育, 获得具有能够稳定遗传优良性状的后代, 形成优良品种。

研究中发现, 一些微卫星位点的出现频率与亲本杂交方式以及子代杂交优势存在一定程度联系。如具有相同亲本的正反交子代F2与F6, F9与F11在一些座位上, 各基因型出现频率大体相似, 并且除F2与F6在壳宽生长速率外各数量性状生长速率差异不显著; 而F2与F6相比, 在HNUMP004座位上表现出杂合子缺失, AA型基因富集较为严重(共计出现31次)。有相同亲本的正反交子代F3与F12在体质量生长速率上存在显著差异($P<0.05$), 而F3在HNUMP001座位上, AA基因型出现15次, AB基因型出现33次, F12在此座位上, AA基因型出现34次, AB基因型出现14次, 其他性状生长速率差异不显著。这表明杂交子代只在个别数量性状有杂种优势, 获得杂种优势的程度与亲本的选择和杂交组合方式有关, 这与王爱民等^[31]研究结果一致。并且杂种优势和亲本杂交组合方式在子代基因型的出现频率上能够得到一定程度的反映。用最小二乘法对标记座位与马氏珠母贝生长速率进行连锁显著性检验, 未发现与数量性状的生长速率显著相关的基因座位, 这可能与所选用的微卫星标记数量较少有关。

3.3 引物筛选过程中出现的问题分析

本研究在微卫星引物筛选的过程中遇到了较大困难, 从文献中引用的EST-SSR, 大部分难以扩增出稳定清晰的条带, 在反复优化PCR反应条件的过程中, 一些引物在提高退火温度之后, 能够得到稳定的扩增条带, 但扩增条带呈单态。根据引物筛选的电泳图谱, 观察条带是否清晰和检测位点是否多态来确定引物是否可用。在文献报道的退火温度基础上适当扩大范围采用梯度PCR以摸索最适温度和调整 Mg^{2+} 浓度。最后只筛选出17对能够稳定扩增的引物, 其中具有多态性的引物仅6对。本实验室在研究一个野生群体和四个养殖群体的遗传多样性也使用了部分相同的引物, 同样只有17对能够稳定扩增条带的引物, 但多态性明显好于该研究中的9个家系, 不过仍低于文献的报道^[23,26]。其原因可能在于, 供试群体来源于不同地理群体, 其种群的遗传背景存在较大的差异, 而且不同地理群体经过多年封闭养殖, 由于人工育苗时采用较少数量的亲贝, 甚至在生产

过程中重复使用养殖贝作为亲贝,累代繁殖过程中高强度人工选育以及近交等因素,使得养殖群体遗传多样性降低,微卫星位点表现为杂合子缺失,某些位点少数等位基因的富集较为严重,稀有等位基因大量丢失。这种明显的非目的性人为选择趋向,对种质资源的保护和持续利用是极为不利的。

致谢:家系材料构建在中国科学院大亚湾海洋生物综合实验站完成。

参考文献:

- [1] 何毛贤,林岳光,袁涛. 马氏珠母贝养殖群体的生长特性研究[J]. 热带海洋学报, 2006, 25(4): 56-60.
- [2] Wallace A L, Anita K S, Arthur M C. Determining the affinities of salt marsh fucoids using microsatellite markers: Evidence of hybridization and introgression between two species of *Fucus* (Phaeophyta) in a maine estuary [J]. *J Phenol*, 2004, 40: 1013-1027.
- [3] Ozaki A, Sakamoto T, Khoo S. Quantitative trait loci(QTLs)associated with resistance susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus(IPNV)in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Molecular Genetics Genomics*, 2001, 265:23-31.
- [4] O'malley K G, Sakamoto T, Danzmann G. Quantitative trait loci for spawning date and body weight in rainbow trout: testing for conserved effects across ancestrally duplicated chromosomes [J]. *Hered*, 2003, 94: 273-284.
- [5] 王爱民, 阎冰, 叶力. 三个野生种群马氏珠母贝遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(2): 163-168.
- [6] 陈静, 刘志刚, 孙小真, 等. 马氏珠母贝 4 种壳色选育系 F3 的生长特性和遗传多样性比较[J]. 广东海洋大学学报 2010, 19(5): 580-595.
- [7] 姜因萍, 何毛贤, 林岳光. 马氏珠母贝群体内遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 海洋通报, 2007, 26(5): 62-66.
- [8] 郭俊, 邓岳文, 杜晓东, 等. 马氏珠母贝黄壳色选育系 G1 遗传结构的 ISSR 分析[J]. 广东海洋大学学报, 2009, 29(7):87-89.
- [9] Yu D H, Chu K H. Genetic variation in wild and cultured populations of the pearl oyster *Pinctada fucata* from southern China. [J]. *Aquaculture*, 2006, 258: 220-227.
- [10] 史兼华, 何毛贤, 黄良民, 等. 马氏珠母贝选育系遗传变异的 AFLP 分析[J]. 高技术通讯, 2006, 16(5): 534-538.
- [11] 佟广香, 闫学春, 匡友谊, 等. 马氏珠母贝微卫星快速分离及遗传多样性分析[J]. 海洋学报, 2007, 29(4): 170-176.
- [12] 赵晓霞, 邓岳文, 杜晓东. 利用微卫星标记分析马氏珠母贝 4 个养殖群体遗传结构[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(5): 879-884.
- [13] 张红玉, 何毛贤, 管云雁. 马氏珠母贝红色壳家系不同世代遗传变异的 SRAP 分析[J]. 水产学报, 2009, 33(5): 727-732.
- [14] Nichols K M, Young W P, Danzmann R G, et al. A consolidated linkage map for rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Animal Genet*, 2003, 34: 102-115.
- [15] Hedgecock D, Hubert S, Li G, et al .A genetic linkage map of 100 microsatellite markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *J Shellfish Res*, 2002, 21: 381.
- [16] Li Q, Park C, Kijima A. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) [J]. *Aquaculture*, 2004, 235:207-222.
- [17] Holland B S. Invasion without a bottleneck: microsatellite variation in natural and invasive populations of the brown mussel *Perna perna* (L) [J]. *Marine Biotechnology*, 2001, 3: 407 - 415.
- [18] Ibarra A M, Hernández-Ibarra N K, Cruz P, et al. Genetic certification of presumed hybrids of blue×red abalone(*Haliotis fulgens* Philippi and *H.rufescens* Swainson)[J]. *Aquacult Res*, 2005, 36: 1356-1368.
- [19] Li Q, Xu K F, Yu R H. Genetic variation in Chinese hatchery populations of the Japanese scallop(*Patinopecten yessoensis*)inferred from microsatellite data[J]. *Aquaculture*, 2007, 269: 211-219.
- [20] Lippman Z B, Zamir D. Heterosis: revisiting the magic [J]. *Trends in Genetics*, 2006, 23: 60-66.
- [21] 汤健, 刘文广, 林坚士, 等. 9 个马氏珠母贝家系的中期生长性状评估[J]. 南方水产科学, 2011, 7(5):30-36.
- [22] 石耀华, 洪葵, 王嫣, 等. 马氏珠母贝 EST 微卫星的筛选[J]. 水产学报, 2008, 32(2): 174-181.
- [23] Shi Y H, Wang Y, Hong K, et al. Characterization of 31 EST-derived microsatellite markers for the pearl oyster *Pinctada martensii* (Dunker) [J]. *Molecular Ecology*

- Resources, 2009, 9:1, 177-179.
- [24] Wright S. Evolution and the genetics of populations [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978: 203-210.
- [25] Nei M. Genetic distance between populations [J]. Am Nat, 1972, 106:283-292.
- [26] 侯占辉, 王嫣, 石耀华, 等. 马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)2 个不同地理种群遗传变异的 EST-SSR 分析[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(2): 178-183.
- [27] 曲妮妮, 龚世园, 黄桂菊. 合浦珠母贝 3 个养殖群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 水生态学杂志, 2009, 2(4): 89-93.
- [28] 闫学春, 佟广香, 匡友谊, 等. 两个马氏珠母贝养殖群体遗传多样性微卫星分析[J]. 水产学杂志, 2009, 22(1): 5-9.
- [29] 安丽, 刘萍, 李健, 等. “黄海 1 号”中国对虾不同世代间的 AFLP 分析[J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(6): 921-926.
- [30] 于爱清, 李思发, 蔡完其. “新吉富”罗非鱼选育 F₁₀-F₁₃ 遗传变异微卫星分析[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(1):1-7.
- [31] 王爱民, 王嫣, 顾志峰, 等. 马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)2 个地理群体杂交子代的杂种优势和遗传变异[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(1): 140-147.
- [32] Hedgecock D, Sly F. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Aquaculture, 1990, 88: 21-38.
- [33] 万俊芬, 包振民, 汪小龙, 等. 亲本数目对鲍养殖群体 AFLP 标记位点及其遗传结构的影响[J]. 水产学报, 2004, 28(2): 127-132.
- [34] Smith O S, Smith J S C, Bowen S L, et al. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F1 grain yield, grain yield heterosis and RFLPs [J]. Theor Appl Genet, 1990, 80: 833-840.
- [35] Lee M, Godshalk K, Lamkey K R, et al. Association of restriction fragment length polymorphisms among maize inbreds with agronomic performance of their crosses [J]. Crop Science, 1989, 29: 1067-1071.

Microsatellite DNA analysis of genetic structures about 9 families of *Pinctada fucata*

TANG Jian^{1, 2}, GUAN Yun-yan², LIU Wen-guang², HE Mao-xian²

(1. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 2. CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Received: May, 18, 2013

Key words: *Pinctada fucata*; microsatellites; families; genetic structure

Abstract: To further study the breeding strategy for *Pinctada fucata*, genetic structures of 9 families was investigated by using 6 microsatellite loci. 6 pairs of amplified and polymorphic primers are screened out from 60 pairs., and 17 alleles were discovered among 6 microsatellite loci. The number of alleles on each loci is 2 to 4 and the average is about 2.833. The effective allele number ranged from 2.030 to 2.632. The mean observed value and mean expected value of heterozygosis were 0.4306 to 0.6354 and 0.4380 to 0.5962, respectively. Genetic differentiation coefficient (F_{ST}) reached 0.0749, demonstrating these 9 families had a moderately differentiation. 9 families were divided into two clusters after clustering analysis by using NJ method. According to the calculation, the genetic distance between F7 and F9 was the nearest, the furthest one was between F11 and F12. It is suggested that F11 should be given prior consideration so as to gain stable genetic family by using selfing and to gain heterosis by hybridizing with F12.

(本文编辑: 梁德海)