

合浦珠母贝3个养殖群体遗传多样性的微卫星分析

曲妮妮^{1,2}, 龚世园¹, 黄桂菊², 喻达辉²

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘要:采用微卫星分子标记对我国广东大亚湾、广西北海、海南三亚的合浦珠母贝养殖群体进行了遗传多样性分析。从49对引物中筛选出31对有效扩增引物,种群扩增获得9个多态位点,多态位点比例为29.03%。它们在3个群体共96个个体中产生了44个等位基因,平均每个位点产生4.889个。3个群体的平均期望杂合度分别为0.590、0.600、0.615;平均观察杂合度分别是0.393、0.425、0.325;平均多态信息含量PIC值分别是0.530、0.551、0.556。表明3个群体的遗传多样性处于较高水平。平均遗传偏离指数分别为-0.324、-0.336、-0.304;哈代-温伯格平衡检测发现,3个群体27个位点中21个位点偏离平衡状态。遗传分化和遗传距离分析表明,海南群体与广东群体之间的亲缘关系较近,而与广西群体的亲缘关系较远。

关键词:合浦珠母贝;养殖群体;遗传多样性;微卫星

中图分类号:Q173 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2009)04-0089-05

合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)又称为马氏珠母贝,是我国生产海水珍珠的主要贝类,所产珍珠即为历史悠久、闻名遐迩的南珠。自1965年我国合浦珠母贝人工育苗成功以来,海水珍珠养殖业发展迅速。目前,我国的合浦珠母贝养殖主要集中在广东、广西、海南等地区,海水珍珠养殖已经成为这些地区的重要产业。但近年来,由于累代的人工繁殖,出现了养殖性状退化的现象,主要表现在个体小型化、抗病力差、珍珠质量下降,因此迫切需要对其种质资源进行系统的研究。目前,已有学者采用RAPD(王小玉等,2006)、AFLP(喻达辉等,2007)等显性标记对其种质资源进行了研究,然而利用共显性标记进行研究的报道很少。微卫星标记由于其多态性高、重复性好、信息量大等优点,是最好的共显性标记之一,目前已广泛用于种质资源和遗传育种等研究(Holland B S, 2001; Li Q et al, 2004)。本研究利用分离的部分微卫星标记对我国广东大亚湾、广西北海、海南三亚的养殖合浦珠母贝群体进行遗传多样性分析,以为合浦珠母贝的种质资源保护和遗传选育等提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 样品采集与基因组DNA提取

实验用合浦珠母贝于2001~2002年分别采集于广东大亚湾、广西北海和海南三亚的珍珠养殖场,每个群体32个个体,取闭壳肌组织保存于95%的酒精中。

DNA的提取:取50 mg闭壳肌,用纯水漂洗后放入1.5 mL离心管内,加入100 μ L TEN9细胞裂解缓冲液(Tris-Cl 50 mmol/L, pH 9.0; EDTA 100 mmol/L; NaCl 200 mmol/L),剪碎,再加入TEN9 400 μ L、SDS(10%) 150 μ L和蛋白酶K(20 mg/mL) 5 μ L,于56 $^{\circ}$ C消化至溶液澄清。加入15 μ L RNase A, 37 $^{\circ}$ C反应约15 min,冷却后用常规的酚、氯仿、乙醇方法纯化、沉淀DNA,干燥后加入200 μ L去离子超纯水溶解DNA,4 $^{\circ}$ C保存。提取的基因组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

根据本实验室用磁珠富集法筛选出来的微卫星序列,用在线引物设计软件Primer Premier 3.0(http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)共设计引物219对,随机挑选49对引物由上海生物工程有限公司合成,通过优化PCR反应条件,初步筛选出能够稳定扩增的引物。然后进行群体扩增以筛选多态性标记。PCR反应总体积20 μ L,包括10 $\times$ PCR缓冲液2.0 μ L,10

收稿日期:2008-03-23

基金项目:国家科技支撑计划项目(2006BAD01A13)和广东省科技计划项目(2006B20201063)联合资助。

通讯作者:喻达辉。E-mail: pearlydh@163.com; pearlydh@pub.gz.gd.cn

作者简介:曲妮妮,1982年生,女,硕士研究生,从事海洋生物遗传育种研究。E-mail: qunini0605@163.com

mmol/L dNTPs 0.4 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μL, 10 μmol/L 双向引物各 0.5 μL, 1 U *Taq* 酶, 40 ng 模板 DNA。PCR 反应程序为 94℃ 变性 5 min, 然后 30 个循环, 每个循环包括: 94℃ 变性 30 s, 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 最后 72℃ 延伸 10 min, 退火温度见表 1。

1.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

取 PCR 产物 2 μL 用 5% 变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 电泳缓冲液为 0.5 × TBE。电泳完毕后, 硝酸银染色, 然后 Na₂CO₃ 显色。

1.4 数据统计与分析

统计每个位点的等位基因数量 (*A*), 用 Popgene 1.32 软件 (Yeh F C & Boyle T J B, 1997) 计算群体的有效等位基因数 (*A_e*)、观察杂合度 (*H_o*)、期望杂合度 (*H_e*) 和 Hardy-Weinberg 平衡检测, 计算衡量杂合子缺失或杂合子过剩的遗传偏离指数 *D* 值, 根据 Botstein 等 (1980) 计算每个微卫星位点的多态信息含量 (polymorphism information content, PIC), 计算公式如下:

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

式中, *p_i* 和 *p_j* 分别表示第 *i* 和第 *j* 个等位基因在群体中的频率, *m* 为等位基因数。

用 Arlequin 2.0 软件 (Schneider S et al, 2000) 计算固定指数 *F_{ST}*; 计算群体间的遗传距离 (Nei M, 1972); 并用 MEGA 3.0 (Kumar S et al, 2004) 软件构建个体聚类关系图。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

从随机挑选合成的 49 对微卫星引物中, 筛选出 31 对有效扩增引物。种群筛选发现其中 9 对引物具有多态性, 多态位点比例为 29.03% (表 1)。

2.2 群体内的遗传多样性

广东、广西、海南合浦珠母贝 3 个群体的平均等位基因数、平均有效等位基因数、平均期望杂合度、平均观察杂合度、平均遗传偏离指数、平均多态信息量以及 shannon 多样性指数见表 2。9 个多态位点共检测出 44 个等位基因, 平均每个位点 4.889 个。每个位点的等位基因数 2~9, 其中位点 M114 检测出的等位基因最多 (9 个), 位点 M113 的等位基因最少 (2 个)。3 个群体的平均等位基因数分别是 4.778、4.778、4.889; shannon 多样性指数 (*I*) 分别是 1.126、1.185 和 1.192; 平均期望杂合度 (*H_e*) 分别为 0.590、0.600、0.615; 平均多态信息含量 PIC

表 1 9 对多态微卫星引物序列
Tab. 1 Primers sequences for the nine polymorphic loci

位点 Locus	引物序列 (5' - 3') Primer sequences (5' - 3')	片段长度 / bp Size range	退火温度 / °C Annealing temperature
M2	F: TCTCTCCGACAACTAAACA R: CTGAATTTTGAAATCCACA	168	47
M3	F: CCAAGAAAGTCGATCTACCA R: ACAATCCTGACAAGCATAAA	147	50
M7	F: GGACCAGACGTGTTGTCAATT R: TGATTCTTCTCCCTTTCTC	169	52
M12	F: TAATAAGTACTGTGGATAGGC R: CTCCATTGTTATGTCTTTATC	140	50
M113	F: TGCAGTCATTTGTTCGTG R: TTGCTTTGTCTCTATGCTATT	241	52
M114	F: GATGCTCAAATTCGTCTTTA R: TCTTGGGTGTTCTCTCTT	224	50
M213	F: AGTTGACATAACCAGGGTG R: CCATACAAACAGACAGCAT	242	52
M247	F: ATGCTCCCGCGAACAAA R: CAGCGTCTGGACAAGAAGTGA	106	52
M287	F: TTAGACCCAATGAAATCTCG R: TTGAAGTTGAACATAGCCAC	226	50

注: F: 正向引物; R: 反向引物。
Notes: F: forward primer; R: reverse primer.

表 2 合浦珠母贝 3 个群体的遗传多样性
Tab. 2 Genetic diversity in the three cultured populations of Chinese pearl oyster *Pinctada fucata*

参数 Parameter	广西群体 Guangxi population	广东群体 Guangdong population	海南群体 Hainan population
<i>A</i>	4.778	4.778	4.889
<i>A_e</i>	2.770	3.334	2.578
<i>H_o</i>	0.393	0.425	0.415
<i>H_e</i>	0.590	0.600	0.615
<i>D</i>	-0.324	-0.336	-0.304
<i>P_{HW}</i>	0.028	0.055	0.113
PIC	0.530	0.551	0.556
<i>I</i>	1.126	1.185	1.192

注: *A*: 等位基因数; *A_e*: 有效等位基因数; *H_o*: 观测杂合度; *H_e*: 期望杂合度; *D*: 遗传偏离指数 $D = (H_o - H_e) / H_e$; *P_{HW}*: 哈代 - 温伯格平衡显著性检验 0.05 水平的 *P* 值; PIC: 多态信息含量; *I*: shannon 多样性指数。

Notes: *A*: number of alleles; *A_e*: number of effective alleles; *H_o*: observed heterozygosity; *H_e*: expected heterozygosity; *D*: deficit or excess of heterozygous, $D = (H_o - H_e) / H_e$; PIC: polymorphic information content; *P_{HW}*: *P* value of significant test on Hardy-Weinberg equilibrium at 0.05 level; *I*: shannon's information index.

值分别是 0.530、0.551、0.556。3 个群体的平均遗传偏离指数 *D* 值均为负, 表明 3 个群体均存在不同程度杂合子的缺失。

Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验发现, 9 个多态位点中, 广西群体有 6 个位点偏离平衡状态; 广东和海南群体分别有 8 个和 7 个位点偏离遗传平衡状

态。群体的平均近交系数 FIS 为 0.323,表明群体间存在一定程度的近交。

2.3 群体间的遗传分化、遗传距离和聚类分析

3 个群体间总的遗传分化指数 FST 为 0.062,两两比较发现,广西群体与海南群体之间的遗传分化指数最高,为 0.093,而广东群体与海南群体之间的遗传分化指数最低,为 0.003(表 3)。广西群体与广东群体之间、广西群体与海南群体之间差异极显著($P<0.01$);而广东群体与海南群体之间的差异不显著($P>0.05$)(表 3,下三角)。遗传距离分析表明,广西群体与海南群体之间的遗传距离最大,为 0.193,广西群体与广东群体次之(0.192),广东群体与海南群体之间的遗传距离最小,为 0.037(表 3)。采用软件 MEGA 3.0 的 UPGMA 程序进行群体间亲缘关系聚类分析,3 个群体分为 2 支,广东群体和海南群体聚为一支,而广西群体则单独为一支(图 1)。

表 3 3 个合浦珠母贝养殖群体间的遗传距离及遗传分化指数 FST

Tab.3 Genetic distances and pairwise FST among three cultured populations of Chinese pearl oyster *Pinctada fucata*

群体	广西群体	广东群体	海南群体
Population	Guangxi	Guangdong	Hainan
	population	population	population
广西群体 Guangxi population	—	0.192	0.193
广东群体 Guangdong population	0.083 *	—	0.037
海南群体 Hainan population	0.093 *	0.003 ^{ns}	—

注: * $P<0.01$; ns: $P>0.05$; 对角线上方为遗传距离, 对角线下方为遗传分化指数 FST.

Notes: * $P<0.01$; ns: $P>0.05$; the data above diagonal was Genetic distances, below diagonal was pairwise FST.

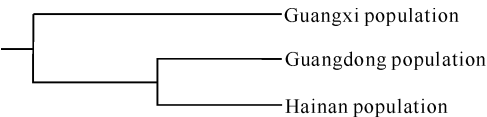


图 1 3 个合浦珠母贝群体的 UPGMA 系统树

Fig.1 UPGMA tree of three populations of Chinese pearl oyster *Pinctada fucata*

3 讨论

很多研究表明,贝类养殖群体的遗传多样性比野生群体降低(Hedgecock D & Sly F,1990; Hedgecock D et al, 1992; Gaffney P M et al, 1992),但本研究发现,我国合浦珠母贝养殖群体尽管经历了 40 余年的人工养殖,其遗传多样性仍然较高。广东、广西和海南 3 个群体的平均多态信息含量 PIC 值分别为

0.530、0.551、0.556,属于高度多态范围(Botstein D et al,1980)。3 个群体的平均等位基因数(4.778、4.778、4.889)、Shannon 多样性指数(1.126、1.185、1.192)和平均期望杂合度(0.590、0.600、0.615)也较高,与 Yu 和 Chu(2006a)、Yu 和 Li(2007)的研究结果相似。其中,海南群体无论是平均等位基因数、多样性指数还是平均期望杂合度均高于其它 2 个群体,表明海南群体的遗传多样性高于广西群体和广东群体,广东群体的遗传多样性次之,广西群体最低,与 AFLP 的研究结果(广西群体遗传多样性最高)有所不同(Yu D H & Chu K H,2006a)。但与野生群体相比,遗传多样性是否下降,有待进一步比较研究。

FST 是群体衡量群体间遗传分化程度的重要参数。本研究中,群体之间总的 FST 值为 0.062,两两之间的 FST 值分别是 0.093(广西群体与海南群体之间)、0.083(广西群体与广东群体之间)、0.003(广东群体与海南群体之间),表明群体之间的遗传分化处于中等水平(Wright S,1978),比 AFLP 标记揭示的分化程度(0.009~0.011)高(Yu D H & Chu K H,2006a)。刘必谦等(1998)在对 4 个不同地区的大连湾牡蛎进行研究时发现,相邻群体的遗传差异不明显,且遗传差异与地理位置有关,地理位置相距越远,遗传差异越明显。本研究遗传距离和聚类分析表明,广东群体和海南群体的亲缘关系最近,广西群体和广东群体次之,广西群体和海南群体的亲缘关系最远,与 Yu 和 Chu(2006b)的研究结果一致。推测可能是雷州半岛以及海南岛对于广西群体和其它 2 个群体之间的基因交流产生了阻碍作用,又经过多年的人工养殖,因此,广西群体与其它 2 个群体之间的亲缘关系较远是正常的。

3 个群体的平均遗传偏离指数 D 值均为负,表明 3 个群体均存在不同程度的杂合子缺失。同时,3 个群体的平均近交系数 FIS 为 0.323,表明群体之间存在一定程度的近交。说明在人工繁殖中,近交程度比较严重,导致杂合子缺失(张国范和张福绥,1993)。因此在人工繁殖和养殖的过程中,要尽量采用较多的亲本以避免近交。

参考文献:

刘必谦,戴继勋,喻子牛. 1998. RAPD 标记在大连湾牡蛎种群研究中的应用[J]. 青岛海洋大学学报,28(1):82-88.

王小玉,喻达辉,郭奕惠,等. 2006. 七种珍珠贝 RAPD 鉴别标记的初步研究[J]. 南方水产,2(1):18-22.

- 喻达辉,王小玉,黄桂菊,等. 2007. 合浦珠母贝遗传连锁图谱的构建[J]. 中国水产科学, 14(3):361-368.
- 张国范,张福绥. 1993. 贝类遗传多样性及其永续利用(I)[J]. 海洋科学,5:17-21.
- Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 32(3): 314-331.
- Gaffney P M, Davis C V, Hawes R O. 1992. Assessment of drift and selection in hatchery population of oysters (*Crassostrea virginica*) [J]. Aquaculture, 105:1-20.
- Hedgecock D, Chow V, Waples R S. 1992. Effective population numbers of shellfish broodstocks estimated from temporal variance in allelic frequencies [J]. Aquaculture, 108: 215-232.
- Hedgecock D, Sly F. 1990. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Aquaculture, 88: 21-38.
- Holland B S. 2001. Invasion without a bottleneck: Microsatellite variation in natural and invasive populations of the brown mussel *Perna perna* (L) [J]. Marine Biotechnology, 3(5): 407-415.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Brief Bioinformatics, 5: 150-163.
- Li Q, Park C, Kijima A. 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) [J]. Aquaculture, 235(1/2/3/4): 207-222.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations[J]. American Naturalist, 106: 283-292.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. 2000. Arlequin version 2.000: a software for population genetics data analysis [Z]. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Wright S. 1978. Evolution and the genetics of population, variability within and among natural populations [Z]. Chicago: The University of Chicago Press.
- Yeh F C, Boyle T J B. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits [J]. Belgian Journal of Botany, 129:157.
- Yu D H, Chu K H. 2006a. Genetic variation in wild and cultured populations of the pearl oyster *Pinctada fucata* in southern China [J]. Aquaculture, 258(1/2/3/4): 220-227.
- Yu D H, Chu K H. 2006b. Low genetic differentiation among widely separated populations of the pearl oyster *Pinctada fucata* as revealed by AFLP [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 333(1): 140-146.
- Yu H, Li Q. 2007. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* assessed by microsatellite markers [J]. Journal of Genetics and Genomics, 34(12): 1114-1122.

(责任编辑 杨春艳)

Genetic Diversity of Three Cultured Populations of Chinese Pearl Oyster *Pinctada fucata* Using Microsatellite DNA

QU Ni-ni^{1,2}, GONG Shi-yuan¹, HUANG Gui-ju², YU Da-hui²

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy
of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Genetic diversity of three cultured populations of Chinese pearl oyster *Pinctada fucata* from Daya Bay, Beihai and Sanya was analysed using microsatellite DNA. Among 49 pairs of primers designed, 31 pairs (63%) were effective for PCR amplification. The result shown that there were 9 polymorphic loci and the proportion of polymorphic loci was 29.03%. Total 44 alleles were observed at the 9 loci from 96 individuals, with an average of 4.889 alleles per locus. Average expected and observed heterozygosities were 0.590 and 0.393, 0.600 and 0.425, 0.615 and 0.415 for the three populations, respectively. Average polymorphism information contents were 0.530, 0.551 and 0.556 and D values of heterozygote deviation were -0.324, -0.336 and -0.304 for the three populations, respectively. Chi-square tests showed that 21 cases out of 27 in the three populations deviated from Hardy-Weinberg equilibrium. Genetic differentiation and genetic distance analysis showed that Sanya and Daya populations were genetically close while Sanya and Beihai populations were distant.

Key words: *Pinctada fucata*; Cultured population; Genetic diversity; Microsatellite DNA