

利用微卫星标记进行马氏珠母贝家系遗传结构与系谱认证

杜晓东*, 高远镇, 邓岳文, 王庆恒, 陈伟耀

(广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524001)

摘要:为改良马氏珠母贝养殖群体性状,2010年4月,从马氏珠母贝选育系 F_3 选择性腺成熟个体为亲本,建立了36个家系,按照常规技术进行幼体培育和海区养成。2010年11月,从36个家系中随机选取4个家系,每个家系取样30个个体,利用13对微卫星引物进行家系遗传结构和系谱鉴别分析。结果显示,(1)13个微卫星引物在4个家系中共检测到39个等位基因,每个位点的等位基因数为2~5,4个家系的平均观测杂合度(H_o)为0.531~0.597,平均期望杂合度(H_e)为0.474~0.507;(2)根据子代基因型成功地推断出4个家系的亲本基因型,据此鉴别各个家系;用UPGMA法对120个样本进行聚类分析,98.3%的同一家系的子代个体能够聚到一起,分类结果与系谱来源基本一致。结果说明,这4个家系具有较高的遗传多样性和家系间具有明显的遗传分化;微卫星标记能有效地为马氏珠母贝群体的系谱分析提供技术支持。

关键词:马氏珠母贝;家系;遗传结构;系谱印证;微卫星标记

中图分类号:S 917

文献标志码:A

马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)又称合浦珠母贝(*Pinctada fuctada*),隶属于软体动物门(Mollusca),瓣鳃纲(Lamellibranchia)、珍珠贝目(Pterioidea)、珍珠贝科(Pteriidae),属于暖水性动物,主要分布于日本、印度及我国广东、广西和海南的沿海。马氏珠母贝是培育海水珍珠的主要种类之一^[1]。自1965年成功开展马氏珠母贝人工育苗以来,我国海水珍珠养殖业不断发展,到1997年海水珍珠产量达到25 t以上,成为世界上海水养殖珍珠产量最大的国家^[2]。然而,近年来海水珍珠养殖业存在养殖群体生长较慢及插核后育珠贝死亡率较高等问题,成为该产业持续发展的瓶颈。要解决目前产业存在的问题,促进产业健康发展,改良马氏珠母贝养殖群体培育优质品种是主要途径之一^[3]。

家系选育是一种选择育种的基本方法。在品种选育过程中,及时分析群体的系谱关系,能为育种亲本的选择提供依据,有效减少因近交带来的

危害^[4-8]。与RAPD和ISSR等其他分子标记技术相比,微卫星标记(simple sequence repeat, SSR)具有较高的多态性,符合孟德尔遗传模式,呈共显性遗传。目前,微卫星标记已广泛应用于海洋动物的群体遗传结构分析、系谱鉴定、亲缘关系分析及遗传图谱构建等方面^[9-14]。本研究选用微卫星标记分析了4个马氏珠母贝家系的遗传结构与系谱鉴定,以期为该种的养殖群体性状改良与健康养殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料来源

2010年4月,从选系 F_3 选择性腺成熟个体作为亲本,按照单个配对组合方式建立了36个家系,按照常规技术进行幼体培育和海区养殖。2010年11月,随机取样4个家系(编号3[#]、4[#]、5[#]和10[#],其中3[#]和4[#]为父本半同胞家系)。解剖并剪取闭壳肌,分管收集编号,超低温冰箱

收稿日期:2011-06-28 修回日期:2011-09-25

资助项目:现代农业产业技术体系专项经费(CARS-048);广东省海洋渔业科技推广专项(A200708C01, A200908A05, A201008A04)

通讯作者:杜晓东, E-mail:duxd@gdou.edu.cn

(-80 °C)中保存。

1.2 研究方法

基因组 DNA 提取 马氏珠母贝基因组 DNA 的提取采用上海生工生物工程公司的 Universal Genomic DNA Mini-Isolation Kit 试剂盒与传统方法相结合的方式,然后用 200 μL 灭菌双蒸水溶解,最后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性,获得的 DNA 置于 -20 °C 冰箱保存备用。

引物及 PCR 反应条件 PCR 反应体系为 15 μL : 模板 DNA 2 μL , 10 \times PCR Buffer (10 mmol/L) 1.5 μL , dNTPs (4 mmol/L) 1 μL , MgCl_2

(2.5 mmol/L) 1.5 μL , *Taq* polymerase (2.5 U/ μL) 1 μL , 引物(上游) 1 μL , 引物(下游) 1 μL , ddH_2O 补足。按各引物条件于美国伯乐仪器公司 PCR 仪上进行扩增。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 42 s, 相应退火温度下退火 50 s, 72 °C 延伸 45 s, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min, PCR 产物先在 1% 的琼脂糖上进行检测, 然后取 PCR 产物 1.5 μL , 在 100 V 电压下 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 4 ~ 5 h。本研究所采用的引物由本实验室转录组文库设计而成, 引物序列和反应条件见表 1。

表 1 微卫星位点引物序列与扩增信息

Tab. 1 Primer sequence and amplification information of thirteen microsatellite loci

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	产物大小/bp product size	退火温度/°C annealing temperature	Mg^{2+} 浓度/(mmol/ μL) Mg^{2+} concentration
PM1	F:CGTTAATGTGAAATAACAATGCT R:CCTCTTTTCGTGGCAAACAT	147 ~ 155	53	1.5
PM2	F:GCATATGTGTATTCTTACAAAGCA R:TCATGATTCATTAGCAGTACGAGA	194 ~ 204	56	1.5
PM3	F:AAGAAATACATGCCTGACCCA R:TGGCATGTTTGAGAGTTCCA	186 ~ 201	55	1.5
PM5	F:TGGGTTATTGCAAACATGGA R:ACATATGAATGGTGATTTCTCAA	162 ~ 175	53	1.5
PM15	F:CCATAAACTGTTCATTACATGTGG R:ACGTTAGCTGCCTGTGAAGG	157 ~ 177	57	1.5
PM16	F:TTTTGGATAATGCGGTAGGG R:TGGAAAGAACAGTAAGGCTGAA	122 ~ 131	55	1.5
PM19	F:TCACAAAATACAGCTTTAACAA R:GGATGCAATCCTTGCAAAC	184 ~ 194	52	1.5
PM20	F:GGAAATCCCATTCTCTCTCC R:GTTGAAGCAATGCACTGGAA	192 ~ 216	55	1.5
PM23	F:TGTGAAAGAGGAAGAGAGGAA R:ACCCACACAATTGCACACAC	221 ~ 240	56	1.5
PM62	F:CGACCAGAACGCGAGTTAAT R:TTGCATCACTGGGTTTCA	114 ~ 118	54	1.5
PM89	F:ATTTGAGCCCTAACCCCAAG R:TAAGACACCGGAGGTCAAGG	115 ~ 125	57	1.5
PM142	F:TAATTATCTCTTCGCGGGC R:TGTAGGAATTCATGTTGCCA	103 ~ 122	53	1.5
PM162	F:AACCATCTAAACTTGCGTCTGA R:TTGCCAGCAATCTCAGTGTC	142 ~ 161	56	1.5

1.3 数据处理

PCR 产物通过 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染法染色并显色。将固定后的聚丙烯酰胺凝胶放入凝胶成像系统拍照并保存, 通过凝胶分析软件 Gel-Pro Analyzer v 4.5 计算各微卫星

位点等位基因大小。

根据每个个体产生的条带位置确定其基因型, 建立基因型数据库。根据父母本与子代基因型等位基因的对应关系, 推断缺失亲本基因型, 用 Cervus 3.0 分析获得每一位点等位基因频率、杂

合度、多态信息含量及排除概率等参数信息,并且模拟分析微卫星位点个数与排除概率的关系。采用 MEGA 4.1 软件根据遗传距离进行聚类分析,按非加权组对算数平均方差法对 120 个子代建立聚类图。

2 结果

2.1 家系遗传结构分析

13 个微卫星位点在 4 个家系中共检测到 39 个等位基因,每个位点的等位基因数为 2~5,平均每个位点有 3 个等位基因,4 个家系的平均等位基因数为 2.385~2.538。从表 2 可以看出,除 PM1 位点分别在 5[#] 和 10[#] 家系中为单态性标记

外,4 个家系均体现出较高的多态性(表 2)。3[#]、4[#]、5[#] 和 10[#] 家系平均观测杂合度(H_o)分别为 0.531、0.597、0.574 和 0.577;平均期望杂合度(H_e)分别为 0.475、0.507、0.474 和 0.474;平均多态信息含量(PIC)分别为 0.396、0.429、0.418 和 0.416。对 4 个家系进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,其中,4[#] 家系有 1 个位点极显著偏离 HWE 平衡,5[#] 家系有 4 个位点极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡(表 2)。

AMOVA 结果表明,15% 的遗传变异来源于家系间,85% 来源于家系内的个体间,家系间遗传变异远小于家系内个体间的遗传变异(表 3)。

表 2 马氏珠母贝 4 个家系在 13 个微卫星位点的遗传多样性统计
Tab. 2 Summary for thirteen microsatellite loci among four families of *P. martensii*

家系 family	位点 loci	参数 parameter							
		样本 数量 N	等位 基因数 N_a	有效等位 基因数 N_e	Shannon 多样性指数 I	观察 杂合度 H_o	期望 杂合度 H_e	多态信 息含量 PIC	Hardy-Weinberg 平衡 HWE
3 [#]	PM1	30	2	1.142	0.245	0.133	0.124	0.117	0.696
	PM2	30	2	1.427	0.476	0.367	0.299	0.255	0.219
	PM3	30	2	1.763	0.624	0.433	0.433	0.339	0.994
	PM5	30	2	1.763	0.624	0.633	0.433	0.332	0.011
	PM16	30	2	1.427	0.476	0.367	0.299	0.254	0.219
	PM19	30	3	2.761	1.056	0.900	0.638	0.567	0.020
	PM142	30	2	1.867	0.657	0.333	0.464	0.357	0.122
	PM89	30	2	1.998	0.693	0.300	0.499	0.375	0.029
	PM20	30	3	2.880	1.078	0.867	0.563	0.579	0.023
	PM15	30	3	2.773	1.060	0.900	0.639	0.567	0.021
	PM62	30	2	1.946	0.679	0.300	0.486	0.368	0.036
	PM23	30	2	1.998	0.693	0.367	0.499	0.375	0.145
	PM162	30	4	3.475	1.307	1.000	0.712	0.660	0.000
	平均值 mean		30	2.385	2.094	0.744	0.531	0.475	0.396
4 [#]	PM1	30	2	1.260	0.360	0.233	0.206	0.185	0.469
	PM2	30	2	1.471	0.500	0.400	0.320	0.269	0.171
	PM3	30	2	1.800	0.637	0.333	0.444	0.345	0.171
	PM5	30	3	2.406	0.983	0.767	0.584	0.519	0.141
	PM16	30	2	1.867	0.657	0.533	0.464	0.356	0.417
	PM19	30	3	2.632	1.030	0.833	0.620	0.548	0.065
	PM142	30	3	2.476	0.972	0.633	0.596	0.509	0.558
	PM89	30	2	1.980	0.688	0.367	0.495	0.372	0.156
	PM20	30	3	2.740	1.051	0.900	0.635	0.561	0.018
	PM15	30	3	2.456	0.992	0.767	0.593	0.528	0.150
	PM62	30	2	1.684	0.596	0.567	0.406	0.324	0.030
	PM23	30	2	1.946	0.679	0.433	0.486	0.368	0.552
	PM162	30	4	3.846	1.366	1.000	0.740	0.692	0.000
	平均值 mean		30	2.538	2.197	0.809	0.597	0.507	0.429

续表 2

家系 family	位点 loci	参数 parameter							
		样本 数量 N	等位 基因数 N_a	有效等位 基因数 N_e	Shannon 多样性指数 I	观察 杂合度 H_o	期望 杂合度 H_e	多态信 息含量 PIC	Hardy-Weinberg 平衡 HWE
5 [#]	PM1	30	1	1.000	0.000	0.000	0.000	单态 singlet	纯合体 homozygote
	PM2	30	2	1.867	0.657	0.733	0.464	0.357	0.002
	PM3	30	2	1.724	0.611	0.467	0.420	0.332	0.543
	PM5	30	3	1.665	0.642	0.500	0.399	0.332	0.124
	PM16	30	2	1.867	0.657	0.733	0.464	0.357	0.002
	PM19	30	2	2.000	0.693	0.667	0.500	0.375	0.068
	PM142	30	3	2.605	1.017	0.700	0.616	0.539	0.000
	PM89	30	2	2.000	0.693	0.333	0.500	0.375	0.068
	PM20	30	3	2.651	1.035	1.000	0.623	0.552	0.000
	PM15	30	3	2.632	1.030	0.833	0.620	0.548	0.065
	PM62	30	2	1.946	0.679	0.433	0.486	0.368	0.552
	PM23	30	2	2.000	0.693	0.400	0.500	0.375	0.273
	PM162	30	3	2.335	0.965	0.667	0.572	0.508	0.167
平均值 mean	30	2.538	2.022	0.721	0.574	0.474	0.418	0.155	
10 [#]	PM1	30	1	1.000	0.000	0.000	0.000	单态 singlet	纯合体 homozygote
	PM2	30	2	1.867	0.657	0.733	0.464	0.357	0.002
	PM3	30	2	1.897	0.666	0.433	0.473	0.361	0.648
	PM5	30	3	2.469	0.997	0.733	0.595	0.528	0.177
	PM16	30	2	1.642	0.580	0.533	0.391	0.315	0.046
	PM19	30	2	2.000	0.693	0.600	0.500	0.375	0.273
	PM142	30	3	2.476	1.000	0.633	0.596	0.530	0.006
	PM89	30	3	2.341	0.968	0.633	0.573	0.510	0.063
	PM20	30	2	1.998	0.693	0.633	0.499	0.375	0.142
	PM15	30	3	2.332	0.952	0.733	0.571	0.499	0.109
	PM62	30	2	1.385	0.451	0.333	0.278	0.239	0.273
	PM23	30	3	2.528	1.010	0.767	0.604	0.356	0.145
	PM162	30	3	2.582	1.020	0.733	0.613	0.542	0.050
平均值 mean	30	2.385	2.040	0.745	0.577	0.474	0.416	0.161	

表 3 马氏珠母贝家系的 AMOVA 分析
Tab.3 Data derived from AMOVA of *P. martensii*

变异来源 source of variation	自由度 d_f	方差总和 sum of squares	平均方差 mean squares	总变异百分率/% percentage of variation
家系间 among families	3	122.563	40.854	15.00
家系内 within families	120	444.500	3.704	85.00
总计 total	123	567.063	44.558	100.00

$F_{ST} = 0.15$

2.2 家系鉴别

根据发现的特异性等位基因以此来区别各个家系,实验发现 5[#]和 10[#]家系分别在 PM142 和 PM89 位点含有特异性等位基因。在 PM142 位点的 103 等位基因可以将 5[#]与其它 3 个家系区别开来;在 PM89 位点的 125 等位基因可以将 10[#]与其它 3 个家系相区别;3[#]与 4[#]家系未发现特异性等位基因,但是 4[#]在 PM142 位点含有 122 等位基因,通

过基因型可以将 3[#]与 4[#]家系区分。因此,PM142 和 PM89 标记可作为鉴别 4 个家系的特异性标记。

2.3 推断亲本基因型

微卫星是共显性分子标记,符合孟德尔遗传定律,在子代中成对的等位基因一个来自父亲一个来自母亲。可以根据等位基因在子代中的分离来推断亲本基因型。4 个家系子代的基因型分布信息列于表 4。

在 PM142 位点检测到 3[#] 子代有 3 种基因型, 分别为 112/112、116/112 和 116/116。由纯和体 112/112 可以推断双亲各含一个等位基因 112, 再由纯合体 116/116 可得知双亲各含一个等位基因 116, 所以可以确定该位点 3[#] 亲本基因型为 116/112 和 116/112。用同样的方法可以推断出其他 12 个微卫星位点及其他家系的亲本基因型。对于所推断出的双亲基因型哪个是母本哪个是父本可通过获得单亲或双亲对其基因型分析加以验证区分(图 1)。

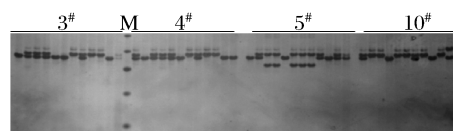


图 1 PM142 位点在 4 个家系的扩增图谱

M 为 Ladder Marker, 由上至下分别为 140、120、100、80 和 60 bp。

Fig. 1 Amplified profile of PM142 locus in four families of *P. martensii*

M represented ladder marker; The fragment sizes from above to below in the amplified profile were 140, 120, 100, 80 and 60 bp, respectively.

表 4 各个家系观察到和推断出的基因型

Tab. 4 Observed and conferred genotypes of each family of *P. martensii*

家系 family	位点 loci	子代基因型(观测个数) progeny genotype(sample size)				推断亲本基因型 parental genotype
		1	2	3	4	
3 [#]	PM1	147/147(26)	151/147(4)			151/147 × 147/147
	PM2	194/194(19)	200/194(11)			200/194 × 194/194
	PM3	186/186(14)	201/186(13)	201/201(3)		201/186 × 201/186
	PM5	162/162(12)	170/162(18)			170/162 × 162/162
	PM16	127/127(19)	131/127(11)			131/127 × 127/127
	PM19	186/184(5)	194/184(12)	194/186(10)	194/194(3)	194/186 × 194/184
	PM142	112/112(6)	116/112(10)	116/116(14)		116/112 × 116/112
	PM89	115/115(10)	120/115(9)	120/120(11)		120/115 × 120/115
	PM20	192/192(4)	204/192(11)	216/192(6)	216/204(9)	216/192 × 204/192
	PM15	165/157(12)	165/165(3)	177/157(5)	177/165(10)	177/165 × 165/157
	PM62	114/114(8)	118/114(9)	118(13)		118/118 × 114/114
	PM23	221/221(10)	228/221(11)	228/228(9)		228/221 × 228/221
	PM162	150/142(7)	152/150(6)	161/152(10)	161/142(7)	161/150 × 152/142
	4 [#]	PM1	147/147(23)	155/147(7)		
PM2		194/194(18)	200/194(12)			200/194 × 194/194
PM3		186/186(15)	201/186(10)	201/201(5)		201/186 × 201/186
PM5		162/162(7)	170/162(9)	175/162(11)	175/170(3)	175/162 × 170/162
PM16		127/127(11)	131/127(16)	131/131(3)		131/127 × 131/127
PM19		186/184(5)	194/184(7)	194/186(13)	194/194(5)	194/184 × 194/186
PM142		112/112(6)	116/112(12)	122/116(5)	122/112(9)	122/112 × 116/112
PM89		115/115(8)	120/115(11)	120/120(11)		120/115 × 120/115
PM20		192/192(3)	204/192(14)	216/192(8)	216/204(5)	216/192 × 204/192
PM15		165/157(11)	165/165(7)	177/157(4)	177/165(8)	177/165 × 165/157
PM62		118/114(17)	118/118(13)			118/118 × 118/114
PM23		221/221(6)	228/221(13)	228/228(11)		228/221 × 228/221
PM162		152/142(7)	152/150(5)	161/142(5)	161/150(13)	161/152 × 150/142
5 [#]		PM1	155/155(30)			
	PM2	194/194(8)	200/194(22)			200/194 × 194/194
	PM3	186/186(14)	201/186(14)	201/201(2)		201/186 × 201/186
	PM5	162/162(15)	175/162(15)			175/162 × 162/162
	PM16	131/127(22)	131/131(8)			131/131 × 131/127
	PM19	186/186(5)	194/186(20)	194/194(5)		194/186 × 194/186
	PM142	112/112(9)	116/103(10)	116/112(11)		116/112 × 112/103
	PM89	115/115(10)	120/115(10)	120/120(10)		120/115 × 120/115
	PM20	204/192(17)	216/204(13)			216/192 × 204/204
	PM15	165/157(13)	165/165(5)	177/157(5)	177/165(7)	177/165 × 165/157
	PM62	114/114(6)	118/114(13)	118/118(11)		118/114 × 118/114
	PM23	221/221(9)	228/221(12)	228/228(9)		228/221 × 228/221
	PM162	150/142(5)	152/142(6)	152/150(9)	152/152(10)	152/150 × 152/142

续表 4

家系 family	位点 loci	子代基因型(观测个数) progeny genotype(sample size)				推断亲本基因型 parental genotype
		1	2	3	4	
10 [#]	PM1	155/155(30)				155/155 × 155/155
	PM2	200/194(22)	200/200(8)			200/200 × 200/194
	PM3	186/186(12)	201/186(13)	201/201(5)		201/186 × 201/186
	PM5	162/162(8)	170/162(10)	175/162(7)	175/170(5)	175/162 × 170/162
	PM16	131/127(16)	131/131(14)			131/131 × 131/127
	PM19	184/184(6)	194/184(18)	194/194(6)		194/184 × 194/184
	PM142	112/112(11)	116/112(6)	122/112(5)	122/116(8)	122/112 × 116/112
	PM89	115/115(11)	120/115(6)	125/115(7)	125/120(6)	125/115 × 120/115
	PM20	192/192(6)	204/192(19)	204/204(5)		204/192 × 204/192
	PM15	165/157(14)	165/165(8)	177/157(4)	177/165(4)	177/165 × 165/157
	PM62	118/114(10)	118/118(20)			118/118 × 118/114
	PM23	225/210(7)	225/225(7)	240/210(5)	240/225(11)	240/225 × 225/210
	PM162	152/150(5)	152/152(8)	161/150(7)	161/152(10)	161/152 × 152/150

2.4 微卫星位点排除率分析

对 13 个 SSR 位点的排除率和累计排除概率进行分析(表 5)。实验发现,微卫星位点的多态信息含量与其排除率成正比,在 PM62 位点多态信息含量(PIC)最小为 0.341,对应的排除率值也最

低为 0.095;在 PM162 位点 PIC 值最高为 0.653,对应的排除率值也最高为 0.280。在父母基因型都未知的情况下,13 个微卫星位点的单独排除概率为 9.5% ~ 28.0%,累积排除概率为 91.1%,其他几种情况的累积排除概率均大于 99%。

表 5 13 个微卫星位点的排除率分析

Tab. 5 Exclusion probability analysis on thirteen microsatellite loci

位点 loci	多态 信息 含量 PIC	亲本基因型 未知时的 排除概率 E-1P	已知一亲本 基因型的 排除概率 E-2P	父母对 的排除 概率 E-PP	两个无关 个体的排 除概率 E-I	同一家系两个 随机个体排 除概率 E-SI	无效等 位基因 频率 F(Null)
	PM1	0.398	0.132	0.208	0.313	0.647	0.419
PM2	0.350	0.102	0.175	0.266	0.598	0.376	-0.104 7
PM3	0.346	0.099	0.173	0.263	0.593	0.370	+0.032 3
PM5	0.475	0.141	0.284	0.434	0.724	0.447	-0.109 7
PM16	0.375	0.125	0.187	0.281	0.625	0.406	-0.040 9
PM19	0.558	0.198	0.344	0.495	0.792	0.512	-0.099 6
PM142	0.528	0.193	0.326	0.480	0.766	0.495	+0.033 4
PM89	0.446	0.150	0.249	0.374	0.694	0.447	+0.153 1
PM20	0.548	0.197	0.334	0.482	0.782	0.509	-0.156 2
PM15	0.538	0.186	0.329	0.479	0.777	0.499	-0.140 8
PM62	0.341	0.095	0.170	0.260	0.587	0.365	+0.032 5
PM23	0.640	0.276	0.443	0.623	0.852	0.560	+0.179 8
PM162	0.653	0.280	0.452	0.628	0.862	0.567	-0.090 1
累积排除率 accumulating probability of exclusion		0.911	0.998	0.999	0.999	0.999	

微卫星位点的数量与家系识别成功率之间的关系进行模拟分析(图 2),从图中可以明显看出随着微卫星位点数量的增多,排除率也随之增大。在

双亲基因型均未知的情况下,当微卫星标记数量为 7 时,累积排除率达到 97%,当位点数量大于 8 时,累积排除率达到 100% 且不再发生变化。

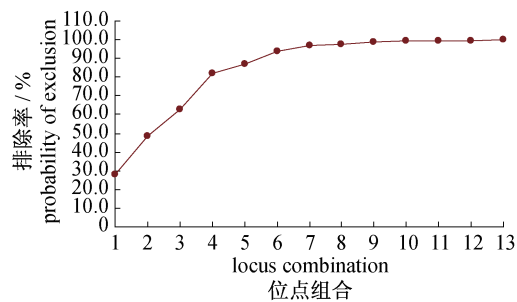


图2 微卫星位点的数量与排除率之间的关系

Fig. 2 Relationship between microsatellite loci numbers and exclusion probability

根据个体间遗传距离矩阵,利用 MEGA 4.1 软件进行聚类分析(图 3)。由聚类图可以看出 98.3% 的同一家系的个体能够完全聚到一起,120 个子代个体被明显的划分为 4 大类,其中 3[#] 与 4[#] 家系的个体首先聚在一起,然后再与 5[#] 家系聚合在一起,最后与 10[#] 家系聚合,分类结果与真实的系谱来源基本是一致的。在图中还可以看到 3[#] 和 4[#] 家系亲缘关系最近,与 5[#] 家系距离次之,与 10[#] 家系亲缘关系较远,与此同时也验证了 3[#] 与 4[#] 两个家系同父异母的关系。这种半同胞关系家系之间具有很高的遗传相似性。

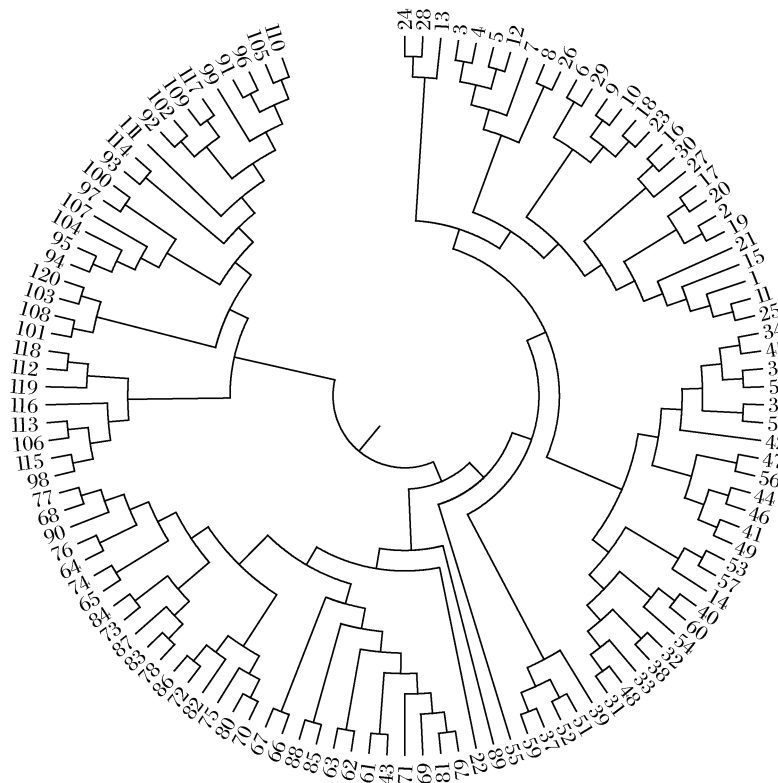


图3 120 个马氏珠母贝个体的 UPGMA 聚类分析图

Fig. 3 UPGMA dendrogram among 120 individuals from four families of *P. martensii*

3 讨论

3.1 遗传结构分析

目前,已有利用微卫星标记分析马氏珠母贝野生或养殖群体的遗传结构报道^[15-17]。例如,佟广香等^[16]报道了马氏珠母贝野生群体的平均观测杂合度(H_o)和平均期望杂合度(H_e)分别为 0.318 2 和 0.638 4,流沙港养殖群体平均观测杂合度(H_o)和平均期望杂合度(H_e)分别为 0.272 7 和 0.464 5。赵晓霞等^[17]利用微卫星标记对不同

亲本数量的马氏珠母贝子代群体进行分析,结果表明,4 个养殖群体观测杂合度和期望杂合度分别为 0.473 7~0.714 3 和 0.527 9~0.592 6。本研究表明,4 个家系的平均观测杂合度(H_o)和平均期望杂合度(H_e)分别为 0.531~0.597 和 0.474~0.507,与上述结果比较,本实验家系具有中等大小的遗传多样性。

多态信息含量(PIC)是衡量基因变异程度高低的理想指标。BOTSTEIN 等^[18]认为,当 $PIC > 0.5$ 时,表示该座位为高度多态性座位;当 $0.25 <$

$PIC < 0.5$ 时,该座位为中度多态性座位;当 $PIC < 0.25$ 时,该座位为低度多态性座位。依此标准,在所检测的 13 个微卫星标记中除 PM1 位点分别在 5[#] 和 10[#] 家系中为单态性标记外,4 个家系均体现出较高的多态位点比例和杂合度。在 3[#] 中有 1 个低度、8 个中度和 4 个高度多态性座位;4[#] 中有 1 个低度、6 个中度和 6 个高度多态性座位;5[#] 有 8 个中度和 4 个高度多态性座位;10[#] 中有 8 个中度和 4 个高度多态性座位。4 个家系的平均多态信息含量 (PIC) 分别为 0.396、0.429、0.418 和 0.416,说明这些微卫星位点在马氏珠母贝中具有较高的信息含量。

遗传分化系数 (F_{ST}) 是衡量群体之间遗传分化程度高低的一个重要指标。WEIGHT^[19] 认为,当 $0 < F_{ST} < 0.05$ 时,表明群体遗传分化较弱;当 $0.05 < F_{ST} < 0.15$ 时,表明群体遗传分化中等;当 $0.15 < F_{ST} < 0.25$ 时,表明群体遗传分化较大;当 $F_{ST} > 0.25$ 时,表明群体遗传分化很大。分子方差分析 (AMOVA) 显示,马氏珠母贝 4 个家系 15% 的遗传变异来源于家系间,85% 的遗传变异来源于家系内的个体间,家系间遗传变异远小于家系内遗传变异,家系间的遗传分化系数 (F_{ST}) 为 0.15,这说明家系间具有较大的遗传分化。

3.2 系谱分析

系谱认证是明确个体间亲缘关系、建立正确系谱的重要辅助手段^[20]。微卫星标记具有多态性强,呈共显性遗传等特点,适合于亲缘关系较近、多态性相似的个体之间的鉴定,因此使用微卫星标记进行系谱鉴定是一种较好的选择^[21-22]。目前,已有利用微卫星标记对皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 和虾夷扇贝 (*Patinopekten yessoensis*) 等海洋动物的系谱鉴定^[23-28]。例如,束靖^[27] 利用 7 个微卫星标记对 4 个家系的 193 个子代皱纹盘鲍 (*H. discus hannai*) 个体进行系谱分析,个体识别率达到 95.85%。于飞等^[28] 用多个微卫星标记对大菱鲆的聚类结果表明 92.6% 的个体能够正确的归到家系。徐科凤^[29] 利用 7 个 SSR 标记对虾夷扇贝 4 个家系进行亲缘关系分析,家系内的遗传距离 0.306 ~ 0.339,明显低于家系间遗传距离 0.475 ~ 0.676,结果证明微卫星标记能有效进行扇贝幼虫亲子鉴定。

本研究使用 13 对微卫星标记对马氏珠母贝

120 个个体进行分析,共发现 39 个等位基因,每个位点平均等位基因数为 3 个。利用 UPGMA 法对 120 个马氏珠母贝聚类分析表明,马氏珠母贝 120 个子代个体被划分为 4 个类群,98.3% 的个体能够被明确区分,聚到各自的家系里,分类结果与系谱来源基本一致。通过聚类图还可以看到各个家系之间的亲缘关系远近,3[#] 与 4[#] 家系亲缘关系最近验证了它们之间的同父异母关系,这充分证明可以利用微卫星标记对马氏珠母贝有效地进行系谱关系鉴定。微卫星标记技术可以为家系选育最大程度地避免近交提供理论参考。

参考文献:

- [1] 王如才,王昭萍,张建中. 海水贝类养殖学[M]. 青岛:青岛海洋大学出版社,1993:205-209.
- [2] 王爱民,石耀华. 中国马氏珠母贝遗传育种的现状与展望[J]. 农业生物技术学报,2003,11(6):547-553.
- [3] 白丽蓉,陈刚,张健东. 珍珠贝育种的研究进展[J]. 水利渔业,2008,28(4):15-18.
- [4] 王鸿霞,吴长功,张留所,等. 微卫星标记应用于凡纳滨对虾家系鉴别的研究[J]. 遗传,2006,28(2):179-183.
- [5] 董世瑞,孔杰,张庆文,等. 微卫星分型方法进行中国明对虾家系系谱鉴定[J]. 海洋学报,2006,28(5):157-161.
- [6] 张于光,李迪强,饶力群,等. 东北虎微卫星 DNA 遗传标记的筛选及在亲子鉴定中的应用[J]. 动物学报,2003,49(1):118-123.
- [7] 张志和,沈富军,孙姗,等. 应用微卫星分型方法进行大熊猫父亲鉴定[J]. 遗传,2003,25(5):504-510.
- [8] 李琪. 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[J]. 中国水产科学,2006,13(3):502-509.
- [9] 姚红伟,陈国栋,宋晶. 微卫星标记在海洋经济贝类中的应用[J]. 河北渔业,2009(6):50-53.
- [10] 刘芳,刘卫东,王强,等. 微卫星标记及其在贝类遗传选育研究中的应用[J]. 水产科学,2006,25(5):268-270.
- [11] HUBERT S, HEDGE COCK D. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Genetics, 2004, 168(1):351-362.
- [12] AN H S, KIM E M, PARK J Y. Isolation and characterization of microsatellite markers for the clam *Ruditapes philippinarum* and cross-species

- amplification with the clam *Ruditapes variegata* [J]. Conservation Genetics, 2009, 10(6):1821-1823.
- [13] ZHANG Q, ALLEN S K, REECE K S, et al. Genetic variation in wild and hatchery stocks of suminoe oyster (*Crassostrea ariakensis*) assessed by PCR-RFLP and microsatellite markers [J]. Marine Biotechnology, 2005, 7(6):588-599.
- [14] OLIVERIRA J C V, RIBEIRO M N, ROCHA L L, et al. Genetic relationships between two homologous goat breeds from Portugal and Brazil assessed by microsatellite markers [J]. Small Ruminant Research, 2010, 93(2-3):79-87.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 赵晓霞, 邓岳文, 杜晓东, 等. 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.
- [18] 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.
- [19] WEIGHT S. Evolution and the genetics of population variability within and among Natural Population Chicago [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1987:4.
- [20] BLOUIN M S. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations [J]. Trends in Ecology and Evolution, 2003, 18(10):503-511.
- [21] 梁利群, 常玉梅, 董崇智, 等. 微卫星 DNA 标记对乌苏里江哲罗鱼遗传多样性的分析[J]. 水产学报, 2004, 28(3):241-244.
- [22] 孙效文, 张晓锋, 赵莹莹, 等. 水产生物微卫星标记技术研究进展及其应用[J]. 中国水产科学, 2008, 15(4):689-703.
- [23] 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, 21(2):811-815.
- [24] LI Q, XU K, YU R. Genetic variation in Chinese hatchery populations of the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*) inferred from microsatellite data [J]. Aquaculture, 2007, 269(1-4):211-219.
- [25] ROBERT T D, JOHN J M J, Ferguson M M. Molecular pedigree analysis in natural populations of fishes: approaches, applications, and practical considerations [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2002, 59(10):1696-1707.
- [26] LAUNEY S, BARRE M, GERARD A, et al. Population bottleneck and effective size in *Bonamia ostreae*-resistant populations of *Ostrea edulis* as inferred by microsatellite markers [J]. Genetical Research, 2001, 78(3):259-270.
- [27] 束靖. 皱纹盘鲍分子群体遗传学研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007:30-45.
- [28] 于飞, 王伟继, 孔杰, 等. 微卫星标记在大菱鲆 (*Scophthalmus maximus* L.) 家系系谱印证中的应用研究 [J]. 海洋学报, 2009, 31(3):127-135.
- [29] 徐科凤. 虾夷扇贝分子遗传学研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009:41-49.

Genetic structure and genealogical identification of four families of pearl oyster *Pinctada martensii*, as inferred by microsatellite markers

DU Xiao-dong*, GAO Yuan-zhen, DENG Yue-wen, WANG Qing-heng, CHEN Wei-yao
(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: In April 2010, thirty-six families were established by selecting mature breeders in the third generation selected line. In November 2011, four families were randomly sampled from the thirty-six families and subjected to the experiment where genetic diversity and kinship of the sampled families were analyzed using thirteen microsatellite markers. Thirty-nine alleles were detected at thirteen microsatellite loci in the four families and the number of the alleles at each locus ranged from two to five. The average observed and expected heterozygosity of the four families varied from 0.531 to 0.597 and from 0.474 to 0.507, respectively. The genetic differentiation index (F_{ST}) among the four families was 0.15. Based on the genotypes of offspring, all parental genotypes of the four families were successfully deduced. A dendrogram was constructed using UPGMA based on genetic similarity matrix. The UPGAM dendrogram of the 120 individuals indicated that 98.3% of the individuals from each family could be fully clustered and the classification results were consistent with the source of genealogy. Results show that there exists high genetic diversity among the four families and microsatellite marker is a useful tool for genealogical identification of pearl oyster.

Key words: *Pinctada martensii*; families; genetic variation; pedigree analysis; microsatellite markers

Corresponding author: DU Xiao-dong. E-mail: zjdx@21cn.com