

长牡蛎 3 代人工选育群体的微卫星分析

王庆志^{1,2}, 李 琪^{1*}, 孔令锋¹

(1. 中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 进行群体选育时, 因近交机率增加和有效亲本数的减少, 可能导致选育群体的遗传多样性下降, 进而引起选育群体的性状衰退。为监测长牡蛎人工选育群体在选育过程中的遗传差异, 实验应用微卫星 DNA 标记对长牡蛎野生和人工 3 代选育群体及其基础群体的遗传多样性进行了研究。微卫星 10 个位点在所有群体中均表现出较高的多态性, 6 个群体的平均等位基因数范围为 24.0 ~ 29.7 个, 期望和观测杂合度分别为 0.925 ~ 0.956 和 0.724 ~ 0.809。与野生群体和基础群体相比, 长牡蛎选育 3 代群体的平均等位基因数和等位基因丰富度略有下降, 但杂合度水平未发生明显变化。哈迪-温伯格平衡 (HWE) 检验结果显示, 60 个群体一位点组合中 47 个群体一位点组合显著偏离 HWE 平衡 ($P < 0.05$)。 F_{is} 指数均为正值, 平均范围 0.152 ~ 0.233, 表明各群体在 10 个位点上表现为一定程度的杂合子缺失。各群体间 F_{st} 值的范围为 0.008 ~ 0.025, 遗传分化程度较弱。结果表明, 连续 3 代的人工选育尚未明显降低长牡蛎群体的遗传多样性, 仍可以一定的选择压力对选育群体进行人工选育, 从而保证长牡蛎的优良生长性状得到持续提高。

关键词: 长牡蛎; 微卫星; 选育群体; 遗传变异

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 又称太平洋牡蛎, 具有环境适应强、生长快、风味鲜美、营养丰富等优点, 是世界上养殖范围最广、产量最高的经济贝类。目前我国牡蛎年产量已达 300 多万 t, 产量位居世界首位^[1-2]。近几年, 随着养殖集约化程度的提高, 由于近亲交配、累代养殖等原因导致遗传多样性不断下降, 加之养殖不规范和受环境胁迫等诸多因素的影响, 养殖的长牡蛎开始出现生长慢、死亡率增高、形态不规则等品质下降现象。对养殖的长牡蛎进行遗传改良, 培育生长快、抗逆性强的新品种, 是解决品质下降和良种匮乏的有效途径之一。双壳贝类具有繁殖力高、世代间隔短, 野生群体遗传变异水平高的特点, 尤其适于开展选择育种工作^[3]。利用家系选育或群体选育方法, Hershberger 等^[4] 和 Dégremont 等^[5-6] 建立了

长牡蛎夏季死亡率明显降低的选育系, Ward 等^[7] 和 Langdon 等^[8] 选育出总重和产量显著提高的长牡蛎优良品系。为了培育我国长牡蛎高产抗逆优质新品种, 我们自 2007 年开展长牡蛎的人工选育^[9-10], 利用群体选育方法构建的中国、日本和韩国 3 个群体快速生长选育系^[11-12], 至 2011 年已连续进行了 5 个世代的选育, 选育群体的生长速度显著提高。

进行群体选育时, 因近交机率增加和有效亲本数的减少, 可能导致选育群体的遗传多样性下降, 进而引起选育群体的性状衰退^[13]。虽然一些研究报道了贝类养殖群体的遗传多样性与野生群体相比未发生明显变化^[14-17], 但贝类的苗种培育和群体选育过程中, 常因亲本数量过少、雌雄比例不当、亲本贡献不均、配子质量差异、配子竞争、人

收稿日期: 2012-05-17 修回日期: 2012-07-14

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2006AA10A409, 2012AA10A405-6); 国家重点基础研究发展计划 (2010CB126406)

通讯作者: 李 琪, E-mail: qili66@ouc.edu.cn

工选优和选型交配等因素,引起有效群体的数量的减少,从而降低选育群体的遗传多样性^[18-23]。遗传多样性影响群体对环境变化的适应能力以及继代人工选育的效果,因此,对于成功的育种管理,监测选育苗种的遗传变异及其在养殖过程中的变化极为重要。

随着分子生物学技术的发展,分子标记技术已被广泛应用于动植物遗传与育种等相关研究领域。微卫星标记技术,具有简单易操作、重复性好、信息量大,且以孟德尔共显性方式遗传的特点,在水产动物遗传多样性与育种研究方面得到广泛应用^[24]。本研究利用微卫星分子标记对长牡蛎快速生长连续3代选育群体的遗传多样性进行分析,并与基础群体和野生群体进行比较,旨在揭示选育群体的遗传变异,为选育工作提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究采集的长牡蛎群体样本信息见表1。2个野生群体分别采自中国文登近海(CWD)和日本九州佐伯近海(JSP),人工选育的基础群体(JSF0)系2007年采自日本宫城县近海的半人工采苗养殖群体。2007—2009年连续3年从生长快的个体中选留亲本进行选育,具体方法见Li等^[11]和Wang等^[12]的报道。每个世代的样品分别从3代连续选育群体(JSF1、JSF2和JSF3)的成体个体中随机采集。样品采集后,于超低温冰箱(-80℃)中保存。基因组DNA的提取采用常规酚/氯仿法,具体操作参照Li等^[14]的方法,用紫外分光光度计检测DNA浓度,并将其浓度稀释至100 ng/ μ L, -20℃保存备用。

表1 长牡蛎不同群体的采集时间、地点、群体类型和样本数
Tab. 1 Details of sample locations, types, time and number of *C. gigas*

群体 population	采集地点 sample location	采集时间 sample time	群体类型 population type	采集样本数 sample number(<i>n</i>)
CWD	中国文登(36.5°N, 121.6°E)	2003-08	野生	49
JSP	日本佐伯(32.6°N, 131.6°E)	2002-10	野生	55
JSF0	日本宫城(38.3°N, 141.3°E)	2007-04	基础群体	40
JSF1	中国威海(37.3°N, 122.1°E)	2008-06	第1代选育群体	56
JSF2	中国威海(37.3°N, 122.1°E)	2009-08	第2代选育群体	60
JSF3	中国威海(37.3°N, 122.1°E)	2010-05	第3代选育群体	60

1.2 微卫星分析

根据Li等^[25]报道的长牡蛎79对微卫星引物,从中筛选出10对多态性较高且没有无效等位基因的作为本研究使用的引物,并对部分引物的退火温度进行优化。引物编号分别为*ucdCg-129*, *ucdCg-130*, *ucdCg-134*, *ucdCg-138*, *ucdCg-148*, *ucdCg-149*, *ucdCg-151*, *ucdCg-160*, *ucdCg-198*和*ucdCg-200*。

PCR反应体系为10 μ L体系,包含100 ng模板DNA, 1 \times PCR buffer, 0.2 mmol/L dNTP混合液, 1 μ mol/L引物, 1~2 mmol/L MgCl₂和0.25 U *Taq* DNA聚合酶(TaKaRa)。PCR反应条件为94℃预变性3 min; 35个循环为94℃ 1 min, 退火1 min, 72℃ 1 min; 72℃延伸5 min。PCR反应在GeneAmp[®] RCR System 9700上进行。PCR产物在6%变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳,硝酸银法染色。10 bp DNA ladder (Invitrogen)作为

marker检测等位基因位置。为避免不同凝胶之间条带位置的误差,用同一个参照样品在每一块胶上进行电泳作为对照。

1.3 统计分析

用FSTAT 2.9.3软件^[26]计算每个位点等位基因数(N),等位基因丰富度(R_s)和近交系数(F_{is})^[27]。用GENEPOP 3.4软件^[28]检测期望杂合度(H_e),观测杂合度(H_o)和哈迪-温伯格平衡(HWE)。用MSA软件^[29]计算两群体间的遗传分化指数(F_{st})^[30],用Bonferroni法^[31]对多重比较的显著性水平进行校正。

2 结果

2.1 群体的遗传多样性

长牡蛎野生群体和选育群体的遗传多样性分析结果见表2。10个位点在所有群体中均表现出较高多态性,野生的文登群体和佐伯群体的平均

等位基因数分别为 29.4 和 29.7,基础群体和选育群体的平均等位基因数依次为 27.5, 24.0, 26.7 和 24.5。由于等位基因数可能会受抽样大小的影响,本研究比较了不同群体间等位基因丰富度的差异。3 代选育群体 (JSF1-JSF3) 的等位基因丰富度依次为 23.7, 26.5 和 24.3, 较 2 个野生群体 (CWD, 28.6; JSP, 29.5) 和基础群体 (JSF0, 27.2) 略有下降。多重比较分析 (Kruskal-Wallis test) 表明, 等位基因丰富度在 2 个野生群体间 ($df = 1, P = 0.425$), 基础和选育群体间 ($df = 3, P = 0.986$) 及 6 个群体间 ($df = 5, P = 0.896$) 的

差异均不显著。

所有群体 10 个位点的观测杂合度值 (H_o) 均小于期望杂合度值 (H_e)。 H_o 和 H_e 在不同群体间没有显著的差异 ($P > 0.05$), 观测杂合度平均值的大小范围 0.724 ~ 0.809, 期望杂合度范围 0.925 ~ 0.956。经 Bonferroni 校正的 HWE 平衡检验结果显示, 6 个群体在 10 个位点上有 47 个群体一位点组合显著偏离 HWE 平衡 (表 2)。近交系数 F_{is} 均为正值, 平均值范围 0.152 ~ 0.233, 表明 6 个群体在 10 个位点上表现为一定程度的杂合子缺失。

表 2 长牡蛎野生群体和连续选育世代的遗传多样性分析

Tab.2 Genetic diversity for wild populations and successive selection stocks of *C. gigas*

位点 locus		群体 population					
		CWD	JSP	JSF0	JSF1	JSF2	JSF3
		$n = 49$	$n = 55$	$n = 40$	$n = 56$	$n = 60$	$n = 60$
<i>ucdCg-129</i>	N	38	33	27	28	29	27
	R_s	36.8	32.6	26.5	27.6	28.9	26.7
	H_o	0.830	0.891	0.825	0.786	0.814	0.783
	H_e	0.97	0.964	0.947	0.95	0.956	0.944
	F_{is}	0.146	0.076	0.131	0.174	0.150	0.171
	P	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.001*	0.000*
<i>ucdCg-130</i>	N	29	33	28	25	28	26
	R_s	27.9	33	27.7	24.7	27.8	25.7
	H_o	0.854	0.811	0.821	0.741	0.883	0.750
	H_e	0.959	0.919	0.949	0.922	0.955	0.947
	F_{is}	0.111	0.118	0.137	0.198	0.076	0.209
	P	0.056	0.003*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
<i>ucdCg-134</i>	N	37	35	35	30	35	33
	R_s	35.5	34.6	34.3	29.5	34.6	32.8
	H_o	0.833	0.691	0.850	0.836	0.75	0.780
	H_e	0.963	0.966	0.97	0.957	0.957	0.962
	F_{is}	0.136	0.287	0.125	0.127	0.218	0.191
	P	0.000*	0.000*	0.000*	0.007	0.000*	0.000*
<i>ucdCg-138</i>	N	25	27	25	24	26	23
	R_s	24.6	27	24.8	23.6	25.9	22.8
	H_o	0.867	0.698	0.821	0.786	0.7	0.847
	H_e	0.946	0.941	0.933	0.943	0.930	0.933
	F_{is}	0.085	0.26	0.122	0.168	0.249	0.092
	P	0.629	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.210
<i>ucdCg-148</i>	N	38	42	30	26	32	31
	R_s	36.5	41.4	30	25.7	32	31
	H_o	0.851	0.564	0.737	0.564	0.603	0.789
	H_e	0.965	0.968	0.956	0.939	0.963	0.951
	F_{is}	0.119	0.42	0.232	0.402	0.375	0.171
	P	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*

续表 2

位点 locus		群体 population					
		CWD	JSP	JSF0	JSF1	JSF2	JSF3
		<i>n</i> = 49	<i>n</i> = 55	<i>n</i> = 40	<i>n</i> = 56	<i>n</i> = 60	<i>n</i> = 60
<i>ucdCg</i> -149	<i>N</i>	33	36	32	26	30	28
	<i>R_s</i>	33	35.7	31.5	26	29.9	27.9
	<i>H_o</i>	0.814	0.741	0.85	0.846	0.678	0.593
	<i>H_e</i>	0.973	0.961	0.972	0.951	0.961	0.942
	<i>F_{is}</i>	0.165	0.231	0.126	0.111	0.296	0.372
	<i>P</i>	0.000*	0.000*	0.004*	0.017	0.000*	0.000*
<i>ucdCg</i> -151	<i>N</i>	20	28	23	18	22	22
	<i>R_s</i>	19.3	27.6	22.7	17.8	21.8	21.8
	<i>H_o</i>	0.776	0.927	0.775	0.833	0.817	0.9
	<i>H_e</i>	0.93	0.942	0.947	0.909	0.935	0.933
	<i>F_{is}</i>	0.167	0.016	0.184	0.084	0.127	0.035
	<i>P</i>	0.002*	0.097	0.000*	0.039	0.000*	0.171
<i>ucdCg</i> -160	<i>N</i>	27	32	27	30	30	22
	<i>R_s</i>	26.4	31.7	26.8	29.5	29.8	21.8
	<i>H_o</i>	0.604	0.600	0.846	0.618	0.583	0.644
	<i>H_e</i>	0.956	0.957	0.954	0.934	0.937	0.925
	<i>F_{is}</i>	0.37	0.375	0.114	0.34	0.380	0.305
	<i>P</i>	0.000*	0.000*	0.006	0.000*	0.000*	0.000*
<i>ucdCg</i> -198	<i>N</i>	24	17	26	16	19	18
	<i>R_s</i>	23.4	17	25.8	15.9	18.9	17.8
	<i>H_o</i>	0.857	0.736	0.795	0.755	0.746	0.667
	<i>H_e</i>	0.949	0.77	0.943	0.854	0.931	0.921
	<i>F_{is}</i>	0.098	0.045	0.159	0.117	0.201	0.278
	<i>P</i>	0.095	0.520	0.000*	0.018	0.002*	0.000*
<i>ucdCg</i> -200	<i>N</i>	23	14	22	17	16	15
	<i>R_s</i>	22.9	14	21.8	16.8	15.9	14.8
	<i>H_o</i>	0.644	0.685	0.769	0.667	0.667	0.700
	<i>H_e</i>	0.949	0.903	0.941	0.891	0.893	0.914
	<i>F_{is}</i>	0.324	0.243	0.185	0.254	0.255	0.235
	<i>P</i>	0.000*	0.000*	0.007	0.000*	0.000*	0.000*
mean	<i>N</i>	29.4	29.7	27.5	24.0	26.7	24.5
	<i>R_s</i>	28.6	29.5	27.2	23.7	26.5	24.3
	<i>H_o</i>	0.793	0.734	0.809	0.743	0.724	0.745
	<i>H_e</i>	0.956	0.929	0.951	0.925	0.942	0.937
	<i>F_{is}</i>	0.172	0.207	0.152	0.198	0.233	0.206

注:哈迪-温伯格平衡偏离水平: * $P < 0.05/10$ 。

Notes: Significance of Hardy-Weinberg departure: * $P < 0.05/10$.

2.2 遗传分化

不同群体间的 F_{st} 值均存在显著差异 ($P < 0.01$), F_{st} 值范围为 0.008 ~ 0.025, 遗传分化仍

属于较低的弱分化水平。随着选育世代的增加, 相邻世代群体间的 F_{st} 值有逐渐降低的趋势 (表 3)。

表3 长牡蛎不同群体配对比较的 F_{st} 值
Tab.3 F_{st} values of pairwise comparison
among six populations of *C. gigas*

	CWD	JSP	JSF0	JSF1	JSF2	JSF3
CWD						
JSP	0.023					
JSF0	0.008	0.024				
JSF1	0.025	0.010	0.023			
JSF2	0.016	0.015	0.017	0.013		
JSF3	0.018	0.017	0.020	0.017	0.008	

注:配对群体间均差异显著($P < 0.01$)。

Notes: Pairwise differentiation is all significant ($P < 0.01$).

3 讨论

维持群体的遗传多样性,是利用和保护种质资源的前提和基础,群体遗传多样性的高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关。遗传多样性的降低可导致其适应能力降低和有害隐性基因表达增加及经济性状衰退,最终导致物种退化^[13]。因此,进行人工选育时要设法维持选育群体的遗传多样性,以保证选育工作顺利进行,并最终获得高质量的选育新品种。等位基因数、观测杂合度和期望杂合度都是体现群体遗传多样性的量度参数,本研究中3个连续选育世代群体的平均等位基因数和等位基因丰富度均表现了较高的多态性。与野生群体和基础群体相比,选育群体的等位基因丰富度分别下降了14.5%和8.7%(表2)。类似结果在相关研究中已有报道,Appleyard等^[21]用同工酶和微卫星标记技术对长牡蛎2个塔斯马尼亚野生群体、2个日本野生群体和人工连续4代选育群体进行研究,选育群体较野生群体的等位基因丰富度下降13.9~28.0%。Lind等^[22]利用6个微卫星标记对大珠母贝(*Pinctada maxima*)养殖群体与野生群体的比较研究发现,养殖群体的等位基因丰富度下降达29%~44%。选育群体和养殖群体的平均等位基因丰富度低于野生群体,可能是由于稀有等位基因的缺失,或选育和养殖群体使用繁殖亲本较少,导致遗传漂变加剧、有效群体较少而引起的瓶颈效应。

遗传杂合度是衡量群体遗传多样性的重要参数。杂合度是指在群体随机交配的情况下,一个个体的两个等位基因处于杂合状态的概率。本研究发现,虽然长牡蛎连续3代选育群体的等位基因数和等位基因丰富度较基础群体和野生群体略

有下降,但选育群体的杂合度却并未明显降低。人工养殖群体的杂合度与野生群体的杂合度相比没有显著差异,在长牡蛎^[15,18]、合浦珠母贝(*P. margaritifera*)^[16]和大珠母贝^[22]等种类已有过类似报道。群体的平均等位基因数和等位基因丰富度下降,而遗传杂合度水平未发生明显变化,一方面是由于杂合度水平的主要决定因素是等位基因的相对频率而不是等位基因的数量;另一方面可能是在贝类的苗种培育和人工养殖时,常对生长慢的纯合小个体进行人工淘汰,而生长较快的杂合大个体得到保留^[13]。在本研究中,3个选育世代群体的苗种培育和养殖过程中均未淘汰生长慢的小个体,因此选育群体保持较高的杂合度水平可能由第一种因素引起。此外,对各位点的 F_{is} 值分析发现,各群体均表现为一定程度的杂合子缺失。此现象在中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[32]、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[33]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[34]和刺参(*Apostichopus japonicus*)^[35]等群体中均有报道。杂合子缺失可能是由于稀有等位基因的存在、群体亲本的性别比例不均衡、近交、人为干扰以及抽样范围较小所致^[13]。因此,在今后的选育工作中,应注重亲本群体性别比例的均衡,加大留种数量,尽力避免亲缘近交。

遗传分化指数 F_{st} 值是反映群体间遗传分化程度的重要参数。在人工控制条件下,人工选择、人工诱变、杂交等一些手段均可破坏遗传平衡,从而使基因和基因型发生改变,因此群体内的遗传特性也会随之发生改变^[16]。张天时等^[32]报道中国明对虾的5代人工选育群体,微卫星分析得到的 F_{st} 值范围为0.016 6~0.033 8,5个世代间的遗传分化程度处于较低水平。颉晓勇等^[33]用微卫星检测了吉富品系尼罗罗非鱼9代选育群体,群体间 F_{st} 值在 F_0 与 F_6 、 F_7 之间分别为0.037 68和0.064 37,平均值为0.051 03;而在 F_0 与 F_8 、 F_9 之间分别为0.060 93和0.075 87,平均值为0.068 40,有所提高。池喜峰等^[34]对鲤易捕选育群体的4个连续世代进行微卫星分析,群体间 F_{st} 平均值为0.099 5,选育群体处于中等分化水平,有90%的遗传变异来自于群体内个体间。孙孝德等^[35]对刺参野生及两代选育群体遗传变异的微卫星分析发现, F_{st} 的平均值为0.044 3,选育群体处在较弱的分化水平,相邻世代之间遗传分化

系数逐代减小,累代选育使群体的遗传结构发生了变化。在本研究中,对野生群体及选育各代遗传分化指数 F_{st} 值比较后发现,随着选育世代的增加,相邻世代之间的遗传分化系数呈逐渐减小的趋势,表明经过累代选育,选育群体的遗传结构开始趋于稳定,体现了人工定向选育的效应。各群体间 F_{st} 值的范围为 0.008 ~ 0.025, 根据 Wright^[30] 对遗传分化指数的界定, F_{st} 值小于 0.05 的遗传分化程度属于较低的弱分化水平,这可能与选育的世代较短有关,也可能与选育过程中采取的采用较多的亲本数、平衡的雌雄比例以及未筛选生长慢的小个体等措施有关^[11-12]。

本实验的结果表明,人工选育 3 个世代群体的遗传多样性下降和遗传分化程度仍处于较低水平,人工选育尚未对长牡蛎选育群体的遗传多样性产生明显的不利影响,长牡蛎选育群体仍有较大的选育潜力。因此,在对该选育群体进行进一步选育时,仍可保持一定的选择压力,使选育群体的优良生长性状得到持续提高,同时应继续采用合理的措施,减少近交繁殖可能带来的负面影响,保证长牡蛎选择育种工作的成功。

参考文献:

- [1] Miossec L, Le Deuff R M, Goulletquer P. Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster) [M]. ICES Cooperative Research Report, 2009:42.
- [2] Food and Agriculture Organization (FAO). World aquaculture production of fish, crustaceans, molluscs, etc., by principal species [M]. Yearbooks of Fishery Statistics, 2010.
- [3] Newkirk G F. Applied breeding of commercially important molluscs: a summary of discussion [J]. Aquaculture, 1983, 33(1-4):415-422.
- [4] Hershberger W K, Perdue J A, Beattie J H. Genetic selection and systematic breeding in Pacific oyster culture [J]. Aquaculture, 1984, 39(1-4):237-245.
- [5] Dégremont L, Ernande B, Bédier E, et al. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth [J]. Aquaculture, 2007, 262(1):41-53.
- [6] Dégremont L, Bédier E, Boudry P. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield [J]. Aquaculture, 2010, 299(1-4):21-29.
- [7] Ward R D, English L J, Mcgoldrick D J, et al. Genetic improvement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Australia [J]. Aquaculture Research, 2000, 31(1):35-44.
- [8] Langdon C, Evans F, Jacobson D, et al. Yields of cultured Pacific oysters *Crassostrea gigas* Thunberg improved after one generation of selection [J]. Aquaculture, 2003, 220(1-4):227-244.
- [9] 王庆志, 李琪, 刘士凯, 等. 长牡蛎幼体生长性状的遗传力及其相关性分析 [J]. 中国水产科学, 2009, 16(5):736-743.
- [10] 王庆志, 李琪, 刘士凯, 等. 长牡蛎不同地理群体选育系数数量性状的比较 [J]. 中国海洋大学学报, 2011, 41(7):36-41.
- [11] Li Q, Wang Q Z, Liu S K, et al. Selection response and realized heritability for growth in three stocks of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Fisheries Science, 2011, 77(4):643-648.
- [12] Wang Q Z, Li Q, Kong L F, et al. Response to selection for fast growth in the second generation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. Journal of Ocean University of China, 2012, 11(3):1-6.
- [13] Beaumont A, Boudry P, Hoare K. Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture [M]. Singapore: Wiley-Blackwell, 2010.
- [14] 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(1-4):95-102.
- [15] English L J, Maguire G B, Ward R D. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Australia [J]. Aquaculture, 2000, 187(3-4):283-298.
- [16] Durand P, Wada K T, Blanc F. Genetic variation in wild and hatchery stocks of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, from Japan [J]. Aquaculture, 1993, 110(1):27-40.
- [17] Zhao C, Li Q, Kong L F. Inheritance of AFLP markers and their use for genetic diversity analysis in wild and farmed scallop (*Chlamys farreri*) [J]. Aquaculture, 2009, 287(1-2):67-74.
- [18] Hedgecock D, Sly F. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Aquaculture, 1990, 88(1):21-38.

- [19] 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 (3-4): 283-296.
- [20] Taris N, Ernande B, McCombie H, *et al.* Phenotypic and genetic consequences of size selection at the larval stage in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2006, 333(1): 147-158.
- [21] Appleyard S A, Ward R D. Genetic diversity and effective population size in mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. *Aquaculture*, 2006, 254(1-4): 148-159.
- [22] Lind C E, Evans B S, Knauer J, *et al.* Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*) [J]. *Aquaculture*, 2009, 286 (1-2): 12-19.
- [23] Li R H, Li Q, Yu R H. Parentage determination and effective population size estimation in mass spawning Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) based on microsatellite loci analysis [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2009, 40(5): 667-677.
- [24] 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.
- [25] Li G, Hubert S, Bucklin K, *et al.* Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2003, 3(2): 228-232.
- [26] Goudet J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3) [Z]. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. 2001.
- [27] Weir B S, Cockerham C C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure [J]. *Evolution*, 1984, 38(6): 1358-1370.
- [28] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism [J]. *Journal of Heredity*, 1995, 86(3): 248-249.
- [29] Dieringer D, Schlötterer C. MICROSATELLITE ANALYSER (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2003, 3(1): 167-169.
- [30] Wright S. Variability within and among natural populations [M]. Chicago: The University of Chicago Press, 1978: 121-124.
- [31] Rice W R. Analyzing tables of statistical tests [J]. *Evolution*, 1989, 43(1): 223-225.
- [32] 张天时, 王清印, 刘萍, 等. 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 人工选育群体不同世代的微卫星分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2005, 36(1): 72-80.
- [33] 颀晓勇, 李思发, 蔡完其. 吉富尼罗罗非鱼选育过程中遗传变异的微卫星分析 [J]. *水产学报*, 2007, 31(3): 385-390.
- [34] 池喜峰, 贾智英, 李池陶, 等. 鲤易捕性状选育群体不同世代微卫星分析 [J]. *上海海洋大学学报*, 2010, 17(3): 308-313.
- [35] 孙孝德, 孙国华, 袁廷柱, 等. 刺参 (*Apostichopus japonicus*) 野生及两代选育群体间遗传变异的微卫星标记研究 [J]. *海洋与湖沼*, 2011, 42(3): 380-386.

Genetic variability assessed by microsatellites in mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)

WANG Qing-zhi^{1,2}, LI Qi^{1*}, KONG Ling-feng¹

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Liaoning Ocean and Fishery Science Research Institute, Dalian 116023, China)

Abstract: In breeding industries, a challenging problem is how to keep genetic diversity over ensuing generations, with the reason that a sufficient level of genetic variability is essential to maintain a sustained response from long-term selection for important traits. To investigate how mass selection process affects the genetic properties in our successive selection strains for fast growth of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), ten polymorphic microsatellite loci were used to examine the genetic variation within population and differentiation among two wild populations, one base stock and three successive mass selection lines of *C. gigas*. High levels of genetic diversity of *C. gigas* in six populations were detected, as evidenced by large numbers of alleles per locus ($N = 24.0 - 29.7$), and high levels of heterozygosities ($H_e = 0.925 - 0.956$, $H_o = 0.724 - 0.809$). Compared with the wild and base populations of *C. gigas*, the mean allelic richness (R_s) in the three selectively bred generations declined slightly, but genetic heterozygosities were similar. Among the 60 population-locus cases (6 populations \times 10 loci), 47 cases deviated from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$). F_{is} values ranged from 0.152 to 0.233, resulting in heterozygote deficiencies at the ten loci in each population. F_{st} values ranged from 0.008 to 0.025, showing weak genetic differentiation among the populations. The results obtained in this study show that high genetic variation exists in the three generations of selective populations, and suggest that there is still potential for increased gains in future generations of *C. gigas*.

Key words: *Crassostrea gigas*; microsatellite; mass selection population; genetic variability

Corresponding author: LI Qi. E-mail: qili66@ouc.edu.cn