

利用微卫星荧光多重PCR技术分析壳白长牡蛎3代人工选育群体的遗传多样性

邢德, 李琪*, 张景晓

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东青岛 266003)

摘要: 为了探讨壳白长牡蛎人工选育对群体遗传变异的影响, 实验利用4个多重PCR组合共10个微卫星标记分析了连续3代壳白长牡蛎人工选育群体和野生群体及基础群体的遗传多样性。结果发现, 6个群体的平均等位基因数量为7.2~12.6, 等位基因丰度为6.8~11.0, 期望和观测杂合度分别为0.672~0.769和0.486~0.542; 与野生群体相比, 3代选育群体的平均等位基因数显著降低, 但平均期望杂合度并无显著差异。哈迪—温伯格平衡检验结果显示, 在60个群体一位点组合中有39个群体一位点组合显著偏离哈迪—温伯格平衡, 近交系数 F_{is} 范围为0.215~0.342。群体间遗传分化指数 F_{st} 范围为0.005~0.076, 处于中—低等的遗传分化水平。研究表明, 虽然连续选育对群体的遗传多样性和遗传分化造成了一定程度的影响, 但人工选育群体依然表现为较高的遗传多样性, 仍可以一定的选择压力对选育群体进行人工选育。

关键词: 长牡蛎; 壳白; 微卫星; 多重PCR; 遗传多样性

中图分类号: Q 786; S 968.3

文献标志码: A

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)又称太平洋牡蛎, 具有味道鲜美, 营养丰富, 环境适应能力强, 生长快等优点, 是我国乃至世界上最重要的海产经济贝类之一。2015年中国牡蛎养殖产量达457万t, 居世界首位^[1]。然而, 多年来我国人工养殖的长牡蛎苗种主要来源于未经遗传改良的养殖和野生群体, 存在着生长慢、存活率低、抗逆性差、壳型不规则等问题, 严重制约了牡蛎养殖产业的健康发展。研究表明, 人工选育可以使牡蛎的生长、存活、抗逆性、外观等显著提高, 开展长牡蛎种质遗传改良和选育新品种是解决品质下降、良种匮乏问题的有效途径^[2-3]。在国外, Langdon等^[4]采用家系选育方法, 建立了总重和产量显著提高的长牡蛎优良品系; Dégremont等^[5]利用家系选育培育出了长牡蛎夏季死亡率明显降低的选育系, 并通过4代家系培育出抗牡蛎疱疹病毒(OsHV-1)、存活率高的长牡蛎品

系^[6]。在国内, 李琪等^[7]利用群体选育技术培育出快速生长的长牡蛎“海大1号”新品种。

壳色影响消费者的喜好, 关系着水产商品价值, 以壳色为选育性状进行定向选育已经在许多水产生物上取得了重要进展^[8-10]。本团队自2010年开始进行连续4代家系选育, 纯化白壳色性状^[11-12], 并在此基础上为提高生长性状, 又进行了连续3代的群体选育, 构建了生长性状优良的白壳色长牡蛎选育系, 为长牡蛎新品种培育提供了重要素材。

在水产动物人工选育的过程中, 亲本数量过少, 近交几率的增加, 遗传漂变的影响和人工选育过程中不经意的选择等都可能选育群体遗传多样性的下降以及遗传结构的改变, 进而引起选育群体生长性状衰退和对环境适应能力下降, 因此, 对于成功的育种管理, 监测

收稿日期: 2016-11-12 修回日期: 2017-03-06

资助项目: 泰山学者种业计划专家项目(2014GB2B020029); 山东省科技发展计划项目(2014GHY115002)

通信作者: 李琪, E-mail: qili66@ouc.edu.cn

群体的遗传变异是十分必要的。壳白长牡蛎品系已进行多代选育, 为了保证继代选育的效果和选育群体的质量, 分析群体遗传多样性水平及变化是极为重要的。微卫星标记技术具有多态性高、共显性遗传、基因组分布广泛等优点, 是水产动物遗传多样性研究的理想分子标记。微卫星多重PCR (multiplex PCR) 是指在一个反应体系中同时进行多个目的片段的PCR技术, 具有快速高效, 经济节约等优点, 已广泛应用于水产动物的遗传分析和亲子鉴定^[13-17]。

本实验利用微卫星多重PCR技术, 分析壳白长牡蛎品系3代选育群体的遗传多样性和遗传结构, 监测人工选育群体的遗传变异, 旨在为新品种的选育提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

采集的长牡蛎样品信息见表1。2个野生群体采自山东乳山和蓬莱近海(图1), 人工选育的基础群体为2010年取自山东乳山的养殖群体。在进行连续4代壳色纯化家系选育的基础上, 2014—2016年以壳高为选育指标进行了连续3代的群体选育。分别从3代壳白选育群体中随机采集成体个体, 置于-80 °C保存。采用常规酚/氯仿法提取闭壳肌组织基因组DNA, 具体操作参照Li等^[18]的方法。使用NanoDrop 2000检测DNA浓度, 用灭菌超纯水稀释成50 ng/μL的模板DNA, -20 °C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 sampling site	采集时间 sample time	群体类型 population type	采集样本数 sample number (n)
G ₀	山东乳山(36.5°N, 121.3°E)	2010-06	基础群体	50
G ₁	山东乳山(36.5°N, 121.3°E)	2015-08	第1代群体选育	50
G ₂	山东乳山(36.5°N, 121.3°E)	2016-03	第2代群体选育	50
G ₃	山东乳山(36.5°N, 121.3°E)	2016-11	第3代群体选育	50
RW	山东乳山(36.8°N, 121.7°E)	2016-03	野生群体	50
PW	山东蓬莱(37.7°N, 120.0°E)	2016-02	野生群体	50

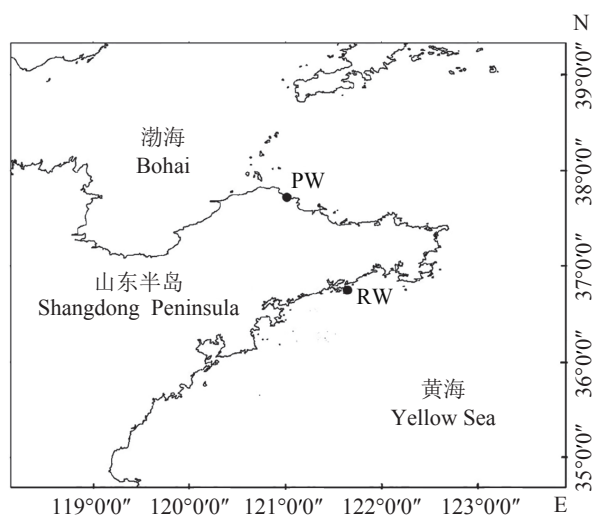


图 1 野生群体和基础群体取样地点示意图

PW. 蓬莱野生群体; RW. 乳山野生群体

Fig. 1 Locations of wild populations and base stock samples collected

PW. wild Penglai population; RW. wild Rushan population

1.2 微卫星多重PCR分析

采用Liu等^[19]开发的4个多重PCR组合共10个微卫星位点进行分析。多重PCR反应的组合、引物序列和最适PCR扩增条件见表2。PCR的反应体系为10 μL: 50 ng DNA模板, 10×PCR Buffer (含Mg²⁺) 1 μL, 0.2 mmol/L dNTP混合液, 10 μmol/L 荧光引物0.15 μL, 10 μmol/L的3对上游引物各0.06 μL, 10 μmol/L的3对下游引物各0.15 μL, Taq酶(5 U/μL) 0.05 μL。多重PCR的反应程序: 94 °C 3 min; 94 °C变性30 s, 退火温度退火60 s, 72 °C延伸75 s, 35个循环; 94 °C变性30 s, 53 °C退火60 s, 72 °C延伸75 s, 8个循环; 72 °C延伸10 min, 12 °C保存。PCR扩增产物用ABI3130全自动遗传分析仪进行毛细管电泳检测, 用软件GeneMarker 2.2.0分析微卫星基因型。

1.3 统计分析

用GenA1Ex 6.502^[20]计算每个位点等位基因

表 2 长牡蛎微卫星多重PCR引物组合及特征

Tab. 2 Multiplexes of microsatellite markers for *C. gigas*

组合 group	位点 locus	引物序列(5'~3') primer sequence (5'-3')	退火温度/°C annealing temperature	产物片段大小/bp size
panel 1	ucdCg-117	F-TGTAAAACGACGGCCAGTCCAAGCTTGCACTCACTCAA 6-FAM R-GAGTGTCTCTGGTGTGCCAAAT	58	290
	ucdCg-120	F-TGTAAAACGACGGCCAGTGGGTGAGATTTAGGGGAGAGA 6-FAM R-CTCCATCAAACCTGCCAAAC	58	152
	ucdCg-198	F-TGTAAAACGACGGCCAGTGAAAGACACGACCGGAGAGA 6-FAM R-CTGATGATGTCCACACCTG	58	230
panel 2	ucdCg-146	F-TGTAAAACGACGGCCAGTCGCTCTGGTCTTTGTTCCAT VIC R-ACCCCAACAGATCACAATCC	58	218
	Crgi3	F-TGTAAAACGACGGCCAGTTAGGATGAGGCTGGCACCTTGGGA VIC R-GCCTGCCTTGCTTTGAGGAATA	58	161~173
	uscCgi-210	F-TGTAAAACGACGGCCAGTTTACAATGAAGATGACAGTGC VIC R-CCTCTCTGCCTCCATATCA	58	316
panel 3	ucdCg-170	F-TGTAAAACGACGGCCAGTTGGTGGTCAGTGAATGTGAGA NED R-CGGACAGTAGCCTTTTAAACACA	58	276
	ucdCg-199	F-TGTAAAACGACGGCCAGTGGGAAGAGTTGAATTCTGCAA NED R-AAACCGAGGCTCAGGAAAAT	58	270
panel 6	ucdCg-200	F-TGTAAAACGACGGCCAGTAAAGTTGCTTTGCTGTCGTC PET R-CGCTAACGTGCTTCATTCAA	54	254
	otgfa0_408293	F-TGTAAAACGACGGCCAGTACCCTGGTTTGATCTGAGAAATG PET R-TCTAAGGAGTGTGAGTGTAGTAG	54	118~122

数(N_a), 期望杂合度(H_e), 观测杂合度(H_o), 哈迪—温伯格平衡(HWE)和群体间的遗传距离(D_c)。使用软件FSTAT V2.9.3.2^[21]计算等位基因丰富度(A_r), 近交系数(F_{is})和两群体间的遗传分化指数(F_{st})。利用非参数分析(Mann-Whitney U test)^[22]检验群体间平均等位基因数、等位基因丰富度和平均期望杂合度的差异显著性。聚类关系图由MEGA 6^[23]软件的UPGMA法构建。

2 结果

2.1 群体遗传多样性

4组荧光多重PCR10个微卫星位点在2个野生群体、3代壳白长牡蛎选育群体及其基础群体的遗传多样性分析结果见表3。10个位点在6个长牡蛎群体中均检测到较高的遗传多样性, 每个位点的等位基因数为3~20, 6个群体的平均等位基

因数为7.2~12.6, 平均等位基因丰度为6.8~11.0, 观测杂合度平均值范围为0.486~0.542, 期望杂合度范围为0.672~0.769。Mann-Whitney U检验表明, 与野生群体相比, 3代选育群体的平均等位基因数量和等位基因丰富度显著降低($P<0.05$), 且随着选育世代的增加呈下降趋势, 平均期望杂合度并无显著差异($P>0.05$)。近交系数 F_{is} 的平均值范围为0.215~0.342, 6个群体在10个位点上有50个群体—位点组合的观测杂合度(H_o)小于期望杂合度(H_e), 近交系数为正值。经Bonferroni校正后的哈迪—温伯格平衡检验结果显示, 在60个群体—位点组合中有39个群体—位点组合显著偏离哈迪—温伯格平衡($P<0.05/10$)。

2.2 群体遗传分化

6群体间的 F_{st} 值存在极显著差异($P<0.01$), 其中, G_1 、 G_2 、基础群体和野生群体间的 F_{st} 值

范围为0.005~0.045, 遗传分化的程度处于较低的水平, 然而 G_3 与其他群体间的 F_{st} 值范围为0.046~0.076, 表现为中度分化水平(表4)。群体间Nei氏无偏遗传距离 D_c 值的大小范围为0.007~0.236, 以选育群体 G_1 和选育群体 G_2 遗传距离

D_c 最小, 选育群体 G_3 与乳山野生群体RW遗传距离 D_c 最大(表4)。基于 D_c 值的UPGMA进化树显示, 基础群体与乳山野生群体聚为一支后, 再与蓬莱野生群体聚为一支, G_1 与 G_2 聚为一支, G_3 独立为一支(图2)。

表 3 长牡蛎野生群体和连续选育世代的遗传多样性分析($n=50$)

Tab. 3 Genetic diversity of successive mass-selection strains, and wild and base populations of *C. gigas*

位点 locus	群体 population						
	G_0	G_1	G_2	G_3	RW	PW	
ucdCg-120	N_a	8.0	4.0	4.0	5.0	9.0	9.0
	H_o	0.673	0.600	0.694	0.844	0.660	0.571
	H_c	0.614	0.573	0.602	0.700	0.695	0.706
	A_r	6.0	4.0	4.0	4.6	7.4	7.9
	F_{is}	-0.087	-0.036	-0.142	-0.195	0.061	0.201
	P	1.000	0.154	0.078	0.373	0.843	0.000*
ucdCg-198	N_a	14.0	11.0	9.0	9.0	18.0	18.0
	H_o	0.521	0.429	0.548	0.571	0.520	0.375
	H_c	0.823	0.809	0.838	0.812	0.911	0.880
	A_r	11.2	9.0	8.5	8.3	15.7	15.7
	F_{is}	0.376	0.478	0.357	0.307	0.437	0.581
	P	0.000*	0.000*	0.001*	0.050	0.000*	0.000*
ucdCg-117	N_a	17.0	12.0	10.0	9.0	18.0	16.0
	H_o	0.296	0.512	0.639	0.677	0.500	0.459
	H_c	0.912	0.830	0.813	0.805	0.917	0.919
	A_r	17.0	10.4	9.6	8.9	16.0	15.5
	F_{is}	0.685	0.394	0.227	0.175	0.464	0.51
	P	0.000*	0.000*	0.000*	0.009*	0.000*	0.000*
Crgi3	N_a	7.0	5.0	3.0	3.0	7.0	6.0
	H_o	0.220	0.260	0.122	0.217	0.380	0.420
	H_c	0.389	0.346	0.360	0.232	0.479	0.404
	A_r	5.2	4.4	3.0	2.8	5.9	5.1
	F_{is}	0.442	0.258	0.665	0.072	0.217	-0.03
	P	0.002*	0.000*	0.000*	0.000*	0.112	0.872
ucdCg-146	N_a	17.0	13.0	11.0	11.0	20.0	20.0
	H_o	0.447	0.939	0.913	0.690	0.660	0.617
	H_c	0.903	0.862	0.871	0.877	0.922	0.918
	A_r	15.1	11.2	10.0	10.4	16.8	17.8
	F_{is}	0.513	-0.079	-0.038	0.224	0.294	0.337
	P	0.000*	0.261	0.015	0.000*	0.024	0.000*

· 续表3 ·

位点 locus	群体 population						
		G ₀	G ₁	G ₂	G ₃	RW	PW
uscCgi-210	N_a	7.0	4.0	5.0	4.0	9.0	6.0
	H_o	0.604	0.313	0.295	0.361	0.521	0.587
	H_c	0.666	0.561	0.550	0.721	0.668	0.680
	A_r	6.0	4.6	4.5	4.0	7.4	5.8
	F_{is}	0.103	0.541	0.472	0.524	0.231	0.148
	P	0.000*	0.005	0.000*	0.000*	0.895	0.125
ucdCg-170	N_a	18.0	9.0	10.0	11.0	14.0	15.0
	H_o	0.583	0.440	0.408	0.429	0.440	0.408
	H_c	0.914	0.824	0.848	0.761	0.906	0.900
	A_r	15.4	8.0	9.5	9.5	13.5	13.1
	F_{is}	0.371	0.474	0.526	0.445	0.522	0.553
	P	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
ucdCg-199	N_a	7.0	8.0	8.0	7.0	8.0	7.0
	H_o	0.143	0.132	0.306	0.138	0.205	0.220
	H_c	0.390	0.521	0.590	0.337	0.323	0.592
	A_r	6.5	7.2	7.3	6.9	6.5	6.4
	F_{is}	0.641	0.753	0.493	0.601	0.377	0.636
	P	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
otgfa0_40829 3	N_a	9.0	6.0	6.0	7.0	10.0	11.0
	H_o	0.800	0.755	0.714	0.680	0.780	0.780
	H_c	0.820	0.614	0.653	0.654	0.785	0.828
	A_r	8.8	5.3	5.5	6.3	9.2	9.8
	F_{is}	0.035	-0.22	-0.083	-0.03	0.016	0.068
	P	0.797	0.900	0.418	0.000*	0.015	0.098
ucdCg-200	N_a	10.0	6.0	8.0	6.0	13.0	12.0
	H_o	0.574	0.596	0.653	0.809	0.592	0.646
	H_c	0.861	0.814	0.812	0.823	0.870	0.865
	A_r	9.2	7.1	8.1	6.0	11.8	10.5
	F_{is}	0.342	0.285	0.211	0.028	0.329	0.263
	P	0.000*	0.014	0.000*	0.466	0.000*	0.000*
mean	N_a	11.4±4.6 ^{ab}	7.8±3.3 ^a	7.4±2.8 ^a	7.2±2.8 ^a	12.6±4.7 ^b	12.0±5.1 ^b
	H_o	0.486±0.209	0.497±0.239	0.529±0.241	0.542±0.244	0.526±0.162	0.508±0.162
	H_c	0.729±0.206 ^a	0.676±0.176 ^a	0.694±0.169 ^a	0.672±0.216 ^a	0.748±0.208 ^a	0.769±0.171 ^a
	A_r	10.0±4.4 ^{ab}	7.1±2.5 ^{ab}	7.0±2.6 ^{ab}	6.8±2.5 ^a	11.0±4.3 ^b	10.8±4.6 ^b
	F_{is}	0.342±0.255	0.285±0.309	0.269±0.282	0.215±0.256	0.295±0.167	0.327±0.234

注: 哈迪—温伯格平衡偏离水平: * $P < 0.05/10$; 同行数据肩标相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Notes: significance of Hardy-Weinberg departure: * $P < 0.05/10$; in the same row, values with the same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$), while with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$)

表 4 群体间遗传分化指数 F_{st} (对角线下方)和Nei氏遗传距离 D_c (对角线上方)

	G ₀	G ₁	G ₂	G ₃	RW	PW
G ₀		0.092	0.109	0.186	0.026	0.033
G ₁	0.035		0.007	0.166	0.113	0.128
G ₂	0.036	0.005		0.165	0.140	0.145
G ₃	0.063	0.046	0.061		0.236	0.215
RW	0.005	0.040	0.045	0.076		0.039
PW	0.007	0.043	0.045	0.068	0.008	

注: 配对群体间 F_{st} 值均差异显著 ($P < 0.01$)

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

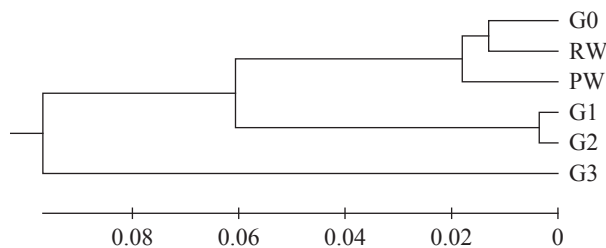


图 2 基于Nei氏无偏遗传距离的UPGMA进化树

PW. 蓬莱野生群体; RW. 乳山野生群体; G0. 基础群体; G1. 第1代选育群体; G2. 第2代选育群体; G3. 第3代选育群体

Fig. 2 A UPGMA dendrogram of six *C. gigas* populations based on Nei unbiased genetic distance

PW. wild Penglai population; RW. wild Rushan population; G0. base stock; G1. the first-generation population; G2. the second-generation population; G3. the third-generation population

3 讨论

维持群体遗传多样性是人工选择育种工作重点关注的问题。在目标性状基因纯合化的选育过程中, 可能会导致与适应性相关基因位点多样性的降低, 进而引起群体适应性下降和经济性状的衰退, 所以监测和维持人工选育群体的遗传多样性是十分必要的。本研究结果显示, 3代人工选育群体之间平均等位基因数、平均等位基因丰度以及杂合度没有明显变化, 而与基础群体和野生群体相比, 3代人工选育群体平均等位基因数和等位基因丰度分别下降了31.6%~42.9%和29.0%~38.2%, 但选育群体的杂合度并没有明显降低。这表明壳色纯化的家系选育过程中存在稀有等位基因的缺失现象, 可能与家系数量或有效亲本数较少而引起的瓶颈效应有关^[24]。Allendorf等^[25]认为瓶颈效应后的近交

导致稀有等位基因的丢失和位点多样性的改变要比杂合度变化的更剧烈。该现象在以前的长牡蛎养殖群体遗传多样性研究中也有报道^[26-28]。

哈迪—温伯格平衡检验结果显示, 65%的群体一位点组合出现杂合子缺失导致的偏分离 ($P < 0.05$), 这可能与微卫星位点普遍存在的无效等位基因有关。Li等^[29]报道51.9%(41/79)的长牡蛎微卫星位点存在无效等位基因。此外, 非随机交配、自然或人工选择以及多个独立群体的混合等都可能造成哈迪—温伯格平衡发生偏离^[18]。6个群体平均 F_{is} 大小范围为0.215~0.342, 正值比例为83.3%, 说明群体内可能存在一定的近交和非随机交配的现象。因此在今后人工选育过程中, 应该注重亲本群体性别比例的均衡, 增加有效亲本数量, 尽量避免亲缘近交造成的杂合子缺失。

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。王庆志等^[27]对长牡蛎3代人工选育群体和野生群体进行微卫星分析, 群体间的 F_{st} 值的范围为0.008~0.025, 属于较弱的遗传分化程度。王学颖等^[30]对马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 金黄壳色系和基础群体遗传结构比较研究中得到 F_{st} 值为0.0031~0.1478。本研究发现人工选育群体 G_1 、 G_2 与野生群体和基础群体间的遗传分化程度处于较弱的水平, G_3 与其他群体间出现了中度遗传分化, 并且根据遗传距离构建的进化树显示, G_3 单独聚为一支, 这表明连续的人工选育过程使群体出现了一定程度的遗传分化。

本研究表明, 经过3代群体选育的壳白长牡蛎群体的遗传多样性与野生群体和基础群体相比有一定程度的下降, 但依然处于较高的水

平, 人工选育群体与野生群体和基础群体的遗传分化程度处于低中度的水平。继代人工选育对群体的遗传分化和遗传结构虽然产生了一定的影响, 但长牡蛎壳白选育群体仍然具有较大的选育潜力, 在对长牡蛎壳白群体进一步选育时, 仍可以保持一定的选择压力, 持续提高长牡蛎壳白品系优良的壳色和生长性状。

参考文献:

- [1] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴2016[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
Fisheries and Fishery Administration, the Ministry of Agriculture. China fishery statistical yearbook 2016[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2016 (in Chinese).
- [2] Sheridan A K. Genetic improvement of oyster production—a critique[J]. *Aquaculture*, 1997, 153(3-4): 165-179.
- [3] 肖述, 喻子牛. 养殖牡蛎的选择育种研究与实践[J]. 水产学报, 2008, 32(2): 287-295.
Xiao S, Yu Z N. Review of selective breeding research and practice in oyster cultivation[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(2): 287-295(in Chinese).
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Dégremont L, Nourry M, Maurouard E. Mass selection for survival and resistance to OsHV-1 infection in *Crassostrea gigas* spat in field conditions: response to selection after four generations[J]. *Aquaculture*, 2015, 446: 111-121.
- [7] 全国水产技术推广总站. 2014水产新品种推广指南[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014.
National Fisheries Technology Extension Center. Guidelines for culture techniques of new varieties of aquatic organisms[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2014 (in Chinese).
- [8] 王照旗, 韩学凯, 白志毅, 等. 三角帆蚌紫色选育系1龄阶段内壳色及生长性状的遗传参数估计[J]. 水产学报, 2014, 38(5): 644-650.
Wang Z Q, Han X K, Bai Z Y, *et al.* Estimates of genetic parameters for inner shell color and growth traits during one year old stage in the purple strain of *Hyriopsis cumingii* using microsatellite based parentage assignment[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(5): 644-650(in Chinese).
- [9] 许飞, 郑怀平, 张海滨, 等. 海湾扇贝“中科红”品种与普通养殖群体不同温度下早期性状的比较[J]. 水产学报, 2008, 32(6): 876-883.
Xu F, Zheng H P, Zhang H B, *et al.* Comparison on the larval traits between strain “Zhongkehong” and common cultured population of bay scallop *Argopecten irradians* under different temperature[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(6): 876-883(in Chinese).
- [10] 李清清, 白志毅, 刘晓军, 等. 三角帆蚌生长性状和内壳色与所产无核珍珠质量的相关性分析[J]. 水产学报, 2015, 39(11): 1631-1639.
Li Q Q, Bai Z Y, Liu X J, *et al.* Correlation analysis of non-nucleated pearl quality parameters with growth traits and inner shell color of *Hyriopsis cumingii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(11): 1631-1639(in Chinese).
- [11] 丛日浩, 李琪, 葛建龙, 等. 长牡蛎4种壳色家系子代的表型性状比较[J]. 中国水产科学, 2014, 21(3): 494-502.
Cong R H, Li Q, Ge J L, *et al.* Comparison of phenotypic traits of four shell color families of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(3): 494-502(in Chinese).
- [12] 葛建龙, 李琪, 于红, 等. 长牡蛎3种壳色家系间杂交子代生长和存活比较[J]. 水产学报, 2015, 39(3): 345-352.
Ge J L, Li Q, Yu H, *et al.* Comparison of growth and survival among the hybrid offspring of three different shell color families of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(3): 345-352(in Chinese).
- [13] 孔杰, 高焕, 于飞, 等. 微卫星三重PCR基因扫描技术在中国明对虾家系标识中的应用[J]. 中国水产科学, 2007, 14(1): 59-66.
Kong J, Gao H, Yu F, *et al.* Parentage identification of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) using microsatellite-based triplex PCR Genescan technology[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(1): 59-66(in Chinese).

- [14] An H S, Kim W J, Lim H J, *et al.* Genetic structure and diversity of *Crassostrea gigas* in Korea revealed from microsatellite markers[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2014, 55: 283-291.
- [15] Li Y T, Wongprasert K, Shekhar M, *et al.* Development of two microsatellite multiplex systems for black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its application in genetic diversity study for two populations[J]. *Aquaculture*, 2007, 266(1-4): 279-288.
- [16] Li R H, Li Q, Cornette F, *et al.* Development of four EST-SSR multiplex PCRs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and their validation in parentage assignment[J]. *Aquaculture*, 2010, 310(1-2): 234-239.
- [17] Miller P A, Elliott N G, Koutoulis A, *et al.* Genetic diversity of cultured, naturalized, and native Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, determined from multiplexed microsatellite markers[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2012, 31(3): 611-617.
- [18] 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.
- [19] Liu T, Li Q, Song J L, *et al.* Development of genomic microsatellite multiplex PCR using dye-labeled universal primer and its validation in pedigree analysis of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2017, 16(1): 151-160.
- [20] Peakall R O D, Smouse P E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6(1): 288-295.
- [21] Goudet J. FSTAT version 2.9.3.2, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices[EB/OL]. Lausanne, Switzerland: Institute of Ecology, 2002[2012-08-20]. <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- [22] 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(1-4): 207-222.
- [23] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [24] 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.
- [25] Allendorf F W, Ryman N. Genetic management of hatchery stocks[M]// Ryman N, Utter F, Eds. *Population Genetics and Fisheries Management*. Seattle: University of Washington Press, 1987: 141-160.
- [26] 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.
- [27] 王庆志, 李琪, 孔令锋. 长牡蛎3代人工选育群体的微卫星分析[J]. *水产学报*, 2012, 36(10): 1529-1536.
Wang Q Z, Li Q, Kong L F. Genetic variability assessed by microsatellites in mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(10): 1529-1536(in Chinese).
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 王学颖, 高远镇, 杜晓东, 等. 马氏珠母贝金黄壳色系 F3 和基础群体遗传结构比较[J]. *海洋通报*, 2012, 31(3): 324-328.
Wang X Y, Gao Y Z, Du X D, *et al.* Genetic structure of the third generation yellow colored line and base stock of pearl oyster *Pinctada martensii* as revealed by SSR marker system[J]. *Marine Science Bulletin*, 2012, 31(3): 324-328(in Chinese).

Analysis of genetic diversity in mass selection lines of white-shell Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) using microsatellite fluorescent multiplex PCR technique

XING De, LI Qi*, ZHANG Jingxiao

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: To investigate the genetic variances in our successive selection strains for fast growth and white shell color of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) during mass selection process, genetic diversity of three successive mass selection strains from G₁ to G₃, one based stock and two wild populations was analysed using multiplex assays with ten microsatellite markers. The study showed that the average allele number (N_a) ranged from 7.2 to 12.6 and the mean allelic richness (A_r) ranged from 6.8 to 11.0, the expected heterozygosity (H_e) and observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.672 to 0.769 and 0.486 to 0.542, respectively. Compared to wild populations, the three successive mass selection strains showed significantly lower in the mean number of alleles and the mean allelic richness, but there was no significant difference in the average expected heterozygosity among the populations. There were 39 cases deviating significantly from Hardy-Weinberg equilibrium among the 60 population-locus cases (6 populations \times 10 loci), and the inbreeding coefficient (F_{is}) ranged from 0.215 to 0.342. F_{st} values ranged from 0.005 to 0.076, showing low-moderate level genetic differentiation among the populations. The results suggest that the genetic variation has not been significantly affected by continuous mass selection and high genetic variability remains existing in the three successive selection strains, indicating that there is still potential for increased gains in future selective breeding programs.

Key words: *Crassostrea gigas*; white-shell; microsatellite; multiplex PCR; genetic diversity

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

Funding projects: Taishan Scholars Seed Industry Experts Project Plan(2014GB2B020029); Science and Technology Development Project of Shandong Province (2014GHY115002)