

近交对马氏珠母贝生长性状、遗传多样性及矿化基因表达的影响

李俊辉¹, 罗燕秋¹, 钟雅诗¹, 黄 怡¹, 黄荣莲^{1,2}, 王庆恒^{1,2}, 邓岳文^{1,2*}

(¹广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524088; ²广东省珍珠养殖与加工工程技术研究中心, 广东 湛江 524088)

摘要:【目的】探讨近交对马氏珠母贝生长性状、遗传结构及矿化基因表达的影响, 阐明近交引起子一代性状退化的遗传原理, 为贝类品种培育提供参考依据。【方法】以两个黄色全同胞家系(M和N)为亲本, 按照因子设计构建4个家系组合($F_1: M1♀ \times M1♂$; $F_2: M1♀ \times N1♂$; $F_3: N1♀ \times M1♂$; $F_4: N1♀ \times N1♂$), 比较4个家系成贝生长性状差异, 利用9对SSR引物分析其遗传多样性, 并以实时荧光定量PCR检测家系间矿化基因*nacrein*、*pearlin*和*pif177*的表达差异。【结果】4个家系间的平均壳长、平均壳高、平均壳宽、平均体重和平均壳重存在明显差异, 且近交家系(F_1 和 F_4)的平均壳长、平均壳高、平均壳宽、平均体重和平均壳重均小于杂交家系(F_2 和 F_3), 其生长性状退化率(ID)为11.7%~29.4%。家系 F_1 、 F_2 、 F_3 和 F_4 的平均观测杂合度分别为0.2525、0.3116、0.3178和0.2752, 平均期望杂合度分别为0.3451、0.3822、0.4005和0.3549, 平均多态信息含量(PIC)分别为0.4591、0.5389、0.4878和0.4810。杂交家系(F_2 和 F_3)矿化基因*nacrein*、*pearlin*和*pif177*的相对表达量均高于近交家系(F_1 和 F_4), 且4个家系的生长性状平均值与3个矿化基因的相对表达量存在明显正相关。【结论】近交能导致马氏珠母贝生长性状、遗传多样性及矿化基因表达量明显降低, 因此制定马氏珠母贝育种方案时应构建合理的交配组合系统, 防止因近交导致性状退化与遗传多样性指标降低而影响育种进程。

关键词: 马氏珠母贝; 近交; 生长性状; 遗传多样性; 矿化基因

中图分类号: S968.316

文献标志码: A

文章编号: 2095-1191(2017)01-0132-07

Effects of inbreeding on growth traits, genetic diversity and biomineralization gene expression of *Pinctada fuctada martensii*

LI Jun-hui¹, LUO Yan-qiu¹, ZHONG Ya-shi¹, HUANG Yi¹, HUANG Rong-lian^{1,2},
WANG Qing-heng^{1,2}, DENG Yue-wen^{1,2*}

(¹Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China; ²Pearl Breeding and Processing Engineering Technology Research Center of Guangdong Province, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

Abstract:【Objective】The effects of inbreeding on growth traits, genetic diversity and biomineralization gene expression were evaluated with an aim to clarify genetics principle of trait degradation in first filial generation caused by inbreeding and provide valuable information for breeding shellfish varieties. 【Method】Two yellow colored full-sib families (M and N) were taken as parents, four family combinations ($F_1, M1♀ \times M1♂$; $F_2, M1♀ \times N1♂$; $F_3, N1♀ \times M1♂$; $F_4, N1♀ \times N1♂$) were constructed based on factorial design. Growth traits of the shells at adult stage from the four families were compared. Genetic diversity of the four families were analyzed by nine pairs of SSR primers. The expression differences among *nacrein*, *pearlin* and *pif177* genes were evaluated by real-time PCR. 【Result】There were significant differences on mean shell length, mean shell height, mean shell width, mean total weight and mean shell weight among the four families ($P < 0.05$). Mean shell length, mean shell height, mean shell width, mean total weight and mean shell weight of inbreeding families (F_1 and F_4) were smaller than those of hybrid families (F_2 and F_3), growth trait degradation rate (ID) was 11.7%~29.4%. The observed heterozygosity values of F_1 , F_2 , F_3 and F_4 were 0.2525, 0.3116, 0.3178 and 0.2752, while the expected heterozygosity values of F_1 , F_2 , F_3 and F_4 were 0.3451, 0.3822, 0.4005 and 0.3549. Average polymorphism information content (PIC) of F_1 , F_2 , F_3 and F_4 were 0.4591, 0.5389, 0.4878 and 0.4810. The expressions of biomineralization genes *nacrein*, *pearlin* and *pif177* in hybrid families (F_2 and F_3) were higherer than those in inbreeding families (F_1 and F_4). There was positive correlation between mean growth traits and relative expressions of the three biomineralization genes.

收稿日期: 2016-07-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372526); 广东省科技计划专项项目(2015A030302079); 广东省海洋与渔业局科技专项项目(Z2014009)

作者简介: *为通讯作者, 邓岳文(1975-), 教授, 主要从事珍珠贝遗传育种与养殖研究工作, E-mail: dengyw@gdou.edu.cn。李俊辉(1976-), 主要从事无脊椎动物增殖养殖研究工作, E-mail: lijunh@21cn.com

【Conclusion】Inbreeding can lead to decrease in growth traits, genetic diversity and gene expression in *P. fuctada martensii*. Therefore, rational mating combination system should be established when formulating *P. fuctada martensii* breeding plan. In this way, traits degradation and genetics diversity indexes decreasing caused by inbreeding can be prevented, and breeding process is not to be infected.

Key words: *Pinctada fuctada martensii*; inbreeding; growth trait; genetic diversity; biomineralization gene

0 引言

【研究意义】马氏珠母贝(*Pinctada fuctada martensii*)是我国南方重要的海水经济养殖贝类,主要用于生产6.0~8.0 mm的有核珍珠(王大鹏等,2011)。20世纪50年代马氏珠母贝人工育苗获得成功,珍珠产业在21世纪初达到发展高峰,年产珍珠20 t左右。然而,近年来马氏珠母贝珍珠产量与质量均呈明显的下滑趋势,其主要原因在于养殖群体性状退化及养殖海区环境污染。马氏珠母贝的成贝亲本怀卵量高,一般育苗过程中会从养殖群体选取少量亲本进行繁殖(邓岳文等,2008),因加速近亲配子结合机会而导致养殖群体出现贝体变小、性早熟、珍珠质分泌能力弱等性状退化现象。因此,有必要通过构建近交与杂交组合,分析近交对马氏珠母贝的影响,为其品种培育提供参考依据。【前人研究进展】近交与杂交一直是遗传育种领域研究的热点。杂交是将没有亲缘关系的个体、群体或物种进行交配组合,其杂交子一代群体生长、成活率等性状超过双亲性状均值的现象称为杂种优势。杂交育种主要是利用杂交子一代的杂种优势,张国范和刘晓(2006)通过地理群体定向杂交获得的大连1号皱纹盘鲍就是一个典型的案例,其杂交子一代的成活率显著高于亲本群体。与杂交相对应,近交是指具有亲缘关系个体间的交配,近交育种的目的是培育纯系,然后利用杂交优势。在育种材料培育过程中,近交通常导致其子代生理机能或繁殖能力性状下降,称为近交衰退现象(Deng et al., 2005)。在贝类中,已有文献报道近交能降低其子代生长性状和成活率,包括美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)(Mallet and Haley, 1983)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)(Beattie et al., 1987; Evans et al., 2004; 张景晓等, 2014)、欧洲大扇贝(*Pecten maximus*)(Beaumont and Budd, 1983)、紫扇贝(*Argopecten purpuratus*)(Concha et al., 2011)、海湾扇贝(*A. irradians*)(张国范等, 2003; 郑怀平等, 2004; Zheng et al., 2008)、墨西哥湾扇贝(*A. irradians concentricus*)(Liu et al., 2011)、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)(傅强等, 2015)、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)(Deng et al., 2005; Kobayashi and Kijima, 2010)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)(梁健等, 2013)。但有关近交对贝类遗传多样性与基因表达影响的报道相对较少(Launey and Hedgecock, 2001; 王宇, 2011; 傅强, 2014; 张嘉丽等, 2015; 张景晓, 2015)。【本研究切入点】基于本课题组的前期研究基础,初步观测到

近交能导致马氏珠母贝生长性状退化,但引起性状退化的遗传解释尚未清楚。【拟解决的关键问题】利用亲缘关系清晰的育种材料,构建近交与杂交家系,从生长性状、遗传结构与基因表达3个层面探讨近交对马氏珠母贝的影响,旨在阐明近交引起子一代性状退化的遗传原理,为贝类品种培育提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从马氏珠母贝黄壳色群体选择亲本构建全同胞家系,按照常规技术进行苗种培育与海区养殖;然后又从两个全同胞家系(M和N)选取亲本,按照因子设计构建如下组合:近交家系F₁(M1♀×M1♂)、杂交家系F₂(M1♀×N1♂)、杂交家系F₃(N1♀×M1♂)和近交家系F₄(N1♀×N1♂)。

1.2 生长性状测量与取样

贝龄达1.5龄时从每个家系取样50个贝体,测量其壳长、壳高、壳宽、体重与壳重。从每个家系取样30个贝体,剪取闭壳肌,以75%酒精固定,用于遗传多样性分析;从每个家系取样10个贝体,剪取闭壳肌,置于灭菌抗冻管内,立即加入液氮保存,用于矿化基因表达量分析。

1.3 遗传多样性分析

样品DNA提取采用生工生物工程(上海)股份有限公司的Universal Genomic DNA Mini-Isolation Kit,参照试剂盒说明进行操作。选用本课题组开发的9对SSR引物(表1)进行PCR扩增,其反应体系和扩增程序参照张嘉丽等(2015)的方法。PCR反应体系15.0 μL,包括:DNA 2.0 μL, 10×PCR Buffer(10 mmol/L)1.5 μL, dNTPs(4 mmol/L)1.0 μL, MgCl₂(2.5 mmol/L)1.5 μL, Taq DNA聚合酶(2.5 μmol)1.0 μL, 引物1.0 μL, ddH₂O 7.0 μL。扩增程序:94℃预变性5 min; 94℃ 42 s, 相应退火温度下退火50 s, 72℃ 45 s, 进行30个循环; 72℃延伸5 min。

1.4 矿化基因表达量分析

利用Trizol法提取样品总RNA,超微量分光光度计测定A₂₆₀/A₂₈₀,检测RNA的纯度和产量,并以1%琼脂糖凝胶检测RNA样品完整性。取1.0 μg总RNA,用M-MLVRTase cDNA Synthesis Kit(Invitrogen)反转录合成cDNA。依据实时荧光定量PCR引物的设计原则,运用Primer 5.0分别设计针对矿化基因*nacrein*、*pearlin*和*pifl* 77的实时荧光定量PCR引物(表2)。以β-actin基因为内参基因,采用实时荧光定量PCR检测各家系间

表 1 微卫星引物序列及其退火温度

Table 1 Primer sequence and annealing temperature of microsatellite

位点 Locus	引物序列 Prime sequence	核心序列 Core sequence	退火温度(°C) Annealing temperature
2PM-142	F: 5'-TAATTATCTCTTTCGCGGGC-3' R: 5'-TGTAGGAATTCATGTTGCCA-3'	(AT) ₆	53
2PM-162	F: 5'-AACCATCTAAACTTGCCTCTGA-3' R: 5'-TTGCCAGCAATCTCAGTGTC-3'	(GT) ₆	56
2PM-206	R: 5'-TTTGATTTTGGGTGCAGTGA-3' F: 5'-TTTTGGACCCCAACATAA-3'	(AC) ₇	53
3PM-033	F: 5'-TTTGGACACATTTTGTTCAG-3' R: 5'-CACCAAACAGAAAAACCAAACA-3'	(GTT) ₄	54
3PM-049	F: 5'-CGACAATACAAAAGGGCATCC-3' R: 5'-AAGATTCGAAGGCCTGAGTG-3'	(GAA) ₄	57
4PM-031	F: 5'-TTATGGCCCAGGTAAGCTTTT-3' R: 5'-GCATGCGCTGTAGTTGTGAT-3'	(ACAG) ₃	56
4PM-052	F: 5'-TAAGGTGATCATCCCTCCA-3' R: 5'-CTCAGCAGGGGAAAACACTC-3'	(ACAG) ₃	57
4PM-176	F: 5'-CGCAAGGGCAACATAAAGG-3' R: 5'-CGGACAGTTGGTGTGTGTC-3'	(TGTC) ₅	58
4PM-312	F: 5'-TGTAATTGCAAAAACATTCATAAAGA-3' R: 5'-CCCCTTGCCTTCTCTAAAA-3'	(TTTA) ₃	52

表 2 实时荧光定量PCR引物序列信息

Table 2 Real-time quantitative PCR primer sequence information

目的基因 Target gene	引物序列 Primer sequence
<i>nacrein</i>	F: 5'-GGGTGATGTCCCTTTAAGATGTG-3' R: 5'-GATTTTGTGTCGTCGTTGGAGTTT-3'
<i>pearlin</i>	F: 5'-TCCACATCTTAGCCACTCA-3' R: 5'-GCTGGATACCCTACGACA-3'
<i>pif177</i>	F: 5'-GACTTCCCTTCTCACACTTCCA-3' R: 5'-TGCTGCCATCACGTGAGTATG-3'
<i>β-actin</i>	F: 5'-TGGTATGGGACAGAAGGAC-3' R: 5'-GACAATGCCGTGCTCAAT-3'

nacrein、*pearlin*和*pif177*基因的表达差异，扩增程序：95 °C预变性2 min;95 °C 15 s;60 °C 1 min,进行40个循环。按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算矿化基因相对表达量。

1.5 数据分析

参考Deng等(2005)的方法计算马氏珠母贝生长性状近交退化率(ID):

$$ID(\%) = (M_1 - M_0) / M_0 \times 100$$

表 3 近交与杂交家系的生长性状比较

Table 3 Comparison of growth traits between inbreeding and hybrid families of *P. fuctada martensii*

家系 Family	平均壳长(mm) Mean shell length	平均壳高(mm) Mean shell height	平均壳宽(mm) Mean shell width	平均体重(g) Mean total weight	平均壳重(g) Mean shell weight
F ₁	45.26±1.79a	47.66±1.93a	15.44±0.87a	12.72±1.37a	6.28±1.19a
F ₂	49.45±4.33a	50.55±3.47a	15.67±1.45a	14.18±2.43a	7.78±1.22a
F ₃	47.22±2.36a	48.31±2.51a	15.88±0.97a	13.05±2.29a	7.11±1.09a
F ₄	36.82±1.46b	40.74±1.39b	12.76±1.14b	8.56±1.10b	5.36±1.05b
退化率(%) ID	17.7	11.8	11.7	27.9	29.4

同列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。表6同

Different lowercase letters in the same column represented significant difference(P<0.05). The same was applied in Table 6

2.2 遗传多样性比较结果

从Popgen 32处理的数据(表4)来看,本研究选用的9个微卫星引物在4个家系中均呈多态性,每个SSR位点均可检测到2~3个等位基因。家系F₁、F₂、F₃和F₄的

式中,M₁为杂交家系性状平均值,M₀为近交家系性状平均值。

同时,利用Popgene 32计算等位基因频率、等位基因数、有效等位基因数、观察杂合度及期望杂合度;根据各位点的等位基因频率,通过PIC-CALC计算每个位点的多态信息含量(PIC)。利用单因素方差分析统计各家系生长性状和矿化基因表达量的差异,并以LSD比较均值差异。

2 结果与分析

2.1 生长性状比较结果

由表3可看出,4个家系间的平均壳长、平均壳高、平均壳宽、平均体重和平均壳重存在明显差异,且近交家系(F₁和F₄)的平均壳长、平均壳高、平均壳宽、平均体重和平均壳重均小于杂交家系(F₂和F₃)。其中,家系F₄的平均壳长、平均壳高、平均壳宽、平均体重和平均壳重最低,均显著低于其他3个家系(P<0.05,下同)。4个家系的生长性状退化率为11.7%~29.4%。

平均有效等位基因数分别为1.5938、1.6034、1.5022和1.5698。

从表5可知,4个家系的平均观测杂合度分别为0.2525、0.3116、0.3178和0.2752,平均期望杂合度分别

表 4 近交与杂交家系的等位基因数、有效等位基因数与等位基因频率比较

Table 4 Number of allele, effective number of allele and allele frequency in inbreeding and hybrid families of *P. fuctada martensii*

家系 Family	位点 Locus	等位基 因数 Number of allele	有效等位 基因数 Effective number of allele	等位基因频率 Allele frequency		
				P1	P2	P3
				F ₁	2PM-142	2
	2PM-162	2	1.7241	0.7000	0.3000	
	2PM-206	2	1.0689	0.9667	0.0333	
	3PM-033	3	2.1028	0.6000	0.3333	0.0667
	3PM-049	2	1.5571	0.7667	0.2333	
	4PM-031	2	1.9912	0.6667	0.2000	0.1333
	4PM-052	2	1.3243	0.8571	0.1429	
	4PM-176	2	1.5571	0.7667	0.2333	
	4PM-312	2	1.2195	0.9000	0.1000	
	平均 Mean	2.1111	1.5938			
F ₂	2PM-142	2	1.8000	0.6667	0.3333	
	2PM-162	2	1.8672	0.6333	0.3667	
	2PM-206	2	1.2195	0.9000	0.1000	
	3PM-033	3	2.2277	0.6000	0.2667	0.1333
	3PM-049	2	1.4152	0.8214	0.1786	
	4PM-031	2	1.8672	0.6333	0.3667	
	4PM-052	2	1.5077	0.7857	0.2143	
	4PM-176	2	1.6897	0.7143	0.2857	
	4PM-312	2	1.2195	0.9000	0.1000	
	平均 Mean	2.1111	1.6034			
F ₃	2PM-142	2	1.6897	0.7143	0.2857	
	2PM-162	2	1.8672	0.6333	0.3667	
	2PM-206	2	1.8333	0.1667		
	3PM-033	3	1.8519	0.7000	0.2000	0.1000
	3PM-049	2	1.3006	0.8667	0.1333	
	4PM-031	2	1.9651	0.5667	0.4333	
	4PM-052	3	1.7857	0.1786	0.0357	
	4PM-176	2	1.3846	0.8333	0.1667	
	4PM-312	2	1.3006	0.8667	0.1333	
	平均 Mean	2.2222	1.5022			
F ₄	2PM-142	2	1.8000	0.6667	0.3333	
	2PM-162	2	1.5571	0.7667	0.2333	
	2PM-206	2	0.8333	0.1667		
	3PM-033	2	1.8000	0.6667	0.3333	
	3PM-049	2	1.3846	0.8333	0.1667	
	4PM-031	2	1.8672	0.6333	0.3667	
	4PM-052	2	1.6575	0.7273	0.2727	
	4PM-176	2	1.0740	0.9643	0.0357	
	4PM-312	2	1.3006	0.8667	0.1333	
	平均 Mean	2.0000	1.5698			

为 0.3451、0.3822、0.4005 和 0.3549，平均 PIC 分别为 0.4591、0.5389、0.4878 和 0.4810。

2.3 矿化基因相对表达量比较结果

利用实时荧光定量 PCR 检测家系矿化基因 *nacrein*、*pearlin* 和 *pif177* 的表达差异，结果表明，杂交家系 F₂ 和 F₃ 矿化基因 *nacrein*、*pearlin* 和 *pif177* 的相对表达量均高于近交家系 F₁ 和 F₄ (表 6)。其中，以家系 F₄ 矿化基因 *nacrein*、*pearlin* 和 *pif177* 的相对表达量最低，均显著低于其他 3 个家系。

利用 SPSS 17.0 计算 4 个家系的生长性状平均值与 3 个矿化基因相对表达量的相关系数，结果表明，4 个家系的生长性状平均值与 3 个矿化基因的相对表达量存在明显正相关 (表 7)。其中，平均壳长、平均壳高、平

表 5 近交与杂交家系的遗传参数

Table 5 Genetic parameters of inbreeding and hybrid families of *P. fuctada martensii*

家系 Family	位点 Locus	观测杂合度 Observed	期望杂合度 Expected	多态信息含量 Polymorphism information content
		heterozygosity	heterozygosity	
F ₁	2PM-142	0.2667	0.4598	0.6365
	2PM-162	0.2000	0.4345	0.6109
	2PM-206	0.0667	0.0667	0.1461
	3PM-033	0.4000	0.5425	0.3970
	3PM-049	0.3333	0.3701	0.5433
	4PM-031	0.3204	0.4217	0.5196
	4PM-052	0.2857	0.2540	0.4101
	4PM-176	0.2000	0.3701	0.5433
	4PM-312	0.2000	0.1862	0.3251
	平均 Mean	0.2525	0.3451	0.4591
	F ₂	2PM-142	0.2667	0.4598
2PM-162		0.4667	0.4805	0.6572
2PM-206		0.2000	0.1862	0.3251
3PM-033		0.4000	0.5701	0.6623
3PM-049		0.3571	0.3042	0.4692
4PM-031		0.2000	0.4805	0.6572
4PM-052		0.4286	0.3492	0.5196
4PM-176		0.2857	0.4233	0.5983
4PM-312		0.2000	0.1862	0.3251
平均 Mean		0.3116	0.3822	0.5389
F ₃		2PM-142	0.4286	0.4233
	2PM-162	0.2000	0.4805	0.6572
	2PM-206	0.3126	0.4778	0.5392
	3PM-033	0.4000	0.4759	0.3668
	3PM-049	0.2667	0.2391	0.3927
	4PM-031	0.3333	0.5080	0.6842
	4PM-052	0.3188	0.3749	0.3085
	4PM-176	0.3333	0.3852	0.4506
	4PM-312	0.2667	0.2391	0.3927
	平均 Mean	0.3178	0.4005	0.4878
	F ₄	2PM-142	0.2667	0.4598
2PM-162		0.2000	0.4345	0.6109
2PM-206		0.0667	0.0667	0.1461
3PM-033		0.4000	0.5425	0.6502
3PM-049		0.3333	0.3701	0.5433
4PM-031		0.5248	0.5104	0.4638
4PM-052		0.2857	0.2540	0.4101
4PM-176		0.2000	0.3701	0.5433
4PM-312		0.2000	0.1862	0.3251
平均 Mean		0.2752	0.3549	0.4810

表 6 近交与杂交家系矿化基因基因表达量的差异分析结果

Table 6 Difference analysis on gene expression quantity of biomineralization genes in inbreeding and hybrid families of *P. fuctada martensii*

家系 Family	<i>nacrein</i> 基因	<i>pearlin</i> 基因	<i>pif177</i> 基因
F ₁	19.98±2.63b	4.68±0.21a	2.35±0.22a
F ₂	39.28±3.75a	5.37±1.18a	3.91±1.42a
F ₃	20.73±5.31b	5.22±0.84a	2.47±0.51a
F ₄	3.53±2.34c	0.41±0.11b	0.49±0.28b

均体重与 *pearlin* 和 *pif177* 基因相对表达量呈显著正相关，平均壳重与 *nacrein* 和 *pif177* 基因相对表达量呈显著正相关，平均壳宽与 *pearlin* 基因相对表达量呈显著正相关。

3 讨论

3.1 近交对马氏珠母贝杂交一代生长性状的影响

育种过程中常利用近交培育纯系，但近交导致繁殖力和生理机能相关性状的表型值降低。张国范等

表7 4个家系生长性状与矿化基因相对表达量的相关性分析结果

Table 7 Correlation analysis on growth traits and mineralized gene expression quantity of four families from *P. fuctada martensii*

指标 Item	平均壳长 Mean shell length	平均壳高 Mean shell height	平均壳宽 Mean shell width	平均体重 Mean total weight	平均壳重 Mean shell weight
<i>nacrein</i> 基因	0.92	0.93	0.78	0.93	0.95*
<i>pearlin</i> 基因	0.98*	0.98*	0.99*	0.98*	0.87
<i>pifl 77</i> 基因	0.96*	0.97*	0.86	0.96*	0.95*

表示相关显著($P<0.05$) meant significant correlation($P<0.05$)

(2003)通过构建海湾扇贝近交家系和杂交家系,并对两个家系的生长性状,结果表明,与杂交家系相比,近交家系生长缓慢,幼虫阶段与成体阶段近交退化率分别为25.9%和12.7%。郑怀平等(2004)通过对比海湾扇贝杂交与近交家系的生长性状和成活率,结果表明,与杂交家系相比,自交家系在幼虫期与养成期的生长性状退化率分别为35.34%和21.17%,成活率分别降低25.23%和49.44%。梁健等(2013)以菲律宾蛤仔橙色全同胞家系为材料进行近交,结果表明,橙色家系生长的近交衰退率为5.38%~26.57%。本研究结果表明,马氏珠母贝近交家系的生长性状明显小于杂交家系,成体阶段的生长性状退化率为11.7%~29.4%,与上述其他贝类的研究结果一致。

母本效应来源于细胞质遗传、母本营养、母性病原物与抗体的传递及母子间或同胞间习性的模仿等,其中,由营养物质引起的母本效应对贝类早期幼体生长、成活率及变态均存在明显影响(Jones et al., 1996; Deng et al., 2005)。也有研究表明,母本效应对贝类稚贝或成贝生长均可能存在影响(Liu et al., 2005; 桑士田等, 2012)。本研究通过双因子设计构建了4个家系组合,近交家系 F_1 与杂交家系 F_2 具有相同母本,但二者间的生长性状差异不明显,可能与母本效应对生长性状的影响有关。

3.2 近交对马氏珠母贝杂交一代遗传多样性的影响

Botstein等(1980)根据PIC确定多态位点的丰度,当 $PIC>0.50$ 时为高度多态性位点, $0.25<PIC<0.50$ 为中度多态性位点, $PIC<0.25$ 时为低度多态性位点。本研究结果表明,4个家系中的平均PIC分别为0.4591、0.5389、0.4878和0.4810,杂交家系的位点基本处于高度多态性。说明选用的9对微卫星引物具有较高的遗传信息,能较好地反映出各家系的遗传信息,即适用于家系遗传多样性分析。

近交能导致适合度性状退化,目前主要有显性假说和超显性假说解释遗传退化机制。但两种学说均认为,近交通过增加纯合位点比例、降低杂合位点比例而造成近交衰退。已有研究表明,近交能降低水产动物养殖群体基因频率变化和稀有基因缺失,遗传多样性指标降低(李思发等, 2005; 刘宇飞等, 2007; 张嘉丽

等, 2015; 张景晓, 2015)。李思发等(2005)以RAPD分析团头鲂(*Megalobrama amblycephal*)近交群体的遗传结构,结果发现近交群体(全同胞交配组合)的多态位点和有效基因均低于对照群体。刘宇飞等(2007)利用20对SSR标记分析剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)RW-H近亲交配家系15代的遗传多样性,结果发现20个位点中有17个位点呈单态位点。张嘉丽等(2015)利用SSR标记比较马氏珠母贝近交与杂交家系的遗传结构,结果表明,近交家系观测杂合度与期望杂合度指标均低于杂交家系。张景晓(2015)利用9对AFLP引物分析长牡蛎家系遗传多样性,结果表明,9对引物在对照、 F_1 ($F=0.250$)和 F_2 ($F=0.375$)3个家系中扩增出的位点总数分别为215、204和200个,平均每对引物扩增的多态性位点数为7.4、6.4和6.1个,对应的家系平均多态位点比例依次为31.16%、28.43%和27.5%。本研究中,近交家系的观测杂合度和期望杂合度指标均低于杂交家系,进一步说明近交能导致马氏珠母贝遗传多样性降低。

3.3 近交对马氏珠母贝杂交一代矿化基因表达的影响

生物矿化是指生物体(从细胞到整个有机体)介入矿物质生成的过程,包括复杂的生物事件和化学事件(黄荣莲, 2016)。珍珠贝的生长也是一个矿化过程,多个矿化基因及相关蛋白参与该过程,包括*nacrein*、*pearlin*、*MSI60*、*pifl 77*和*n19*等基因(Zhao et al., 2012)。马氏珠母贝的生长性状与矿化基因表达量存在相关性。Zhang和He(2011)报道,家系 F_2 大、中、小规格个体的贝壳基质蛋白基因*aspein*、*prismalin-14*、*n16*和*nacrein*表达量与壳高、壳重呈显著正相关。陈伟耀(2014)研究表明,*nacrein*、*MSI60*、*pifl 77*和*n19*矿化基因与马氏珠母贝珠层厚度呈明显正相关。杨创业等(2015)通过比较投喂不同饵料对马氏珠母贝生长与矿化基因的影响,结果发现投喂混合饵料组具有较高的壳宽与壳高增长率,并证实生长率与*nacrein*、*pifl 77*矿化基因表达量呈正相关。上述研究结果均表明,矿化基因表达量与马氏珠母贝生长性状存在正相关。

近交除了能导致生长性状与遗传多样性的降低外,还可导致基因表达量变化。傅强(2014)研究报道,虾夷扇贝自交家系的下调基因显著富集在与生长显

著相关的EGF家族基因。Shi和He(2014)利用转录组技术筛选马氏珠母贝家系内大、小规格个体基因差异,并选取34个差异基因进行验证,发现其中19个基因表达量与转录组结果一致。本研究通过比较马氏珠母贝近交与杂交家系矿化基因*nacrein*、*pearlin*和*pif177*的表达量,结果表明,近交家系矿化基因的相对表达量明显低于杂交家系,与近交家系生长缓慢相吻合,即矿化基因也可作为生长性状评价指标。

4 结论

近交能导致马氏珠母贝生长性状、遗传多样性及矿化基因表达量明显降低,因此制定马氏珠母贝育种方案时应构建合理的交配组合系统,防止因近交导致性状退化与遗传多样性指标降低而影响育种进程。

参考文献:

- 陈伟耀. 2014. 马氏珠母贝育种和生长性状与相关基因的关联分析[D]. 湛江:广东海洋大学.
- Chen W Y. 2014. Correlation analysis of pearl production and growth traits with related genes from *Pinctada martensii*[D]. Zhanjiang:Guangdong Ocean University.
- 邓岳文,符韶,杜晓东,王庆恒. 2008. 马氏珠母贝选系F₂早期选择反应和现实遗传力估计[J]. 广东海洋大学学报,28(4):26-29.
- Deng Y W, Fu S, Du X D, Wang Q H. 2008. Response to selection and realized heritability for early growth in the second-generation selected line of pearl oyster *Pinctada martensii*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 28(4):26-29.
- 傅强,王师,赵亮,张璐,包振民. 2015. 不同近交系数的虾夷扇贝近交衰退研究[J]. 中国海洋大学学报,45(11):43-48.
- Fu Q, Wang S, Zhao L, Zhang L, Bao Z M. 2015. Analysis of inbreeding depression in *Patinopecten yessoensis* based on different inbreeding coefficient[J]. Periodical of Ocean University of China, 45(11):43-48.
- 傅强. 2014. 虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)近交衰退的生物学效应及遗传机理研究[D]. 青岛:中国海洋大学.
- Fu Q. 2014. Biological effects and genetic mechanism of inbreeding depression in Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*)[D]. Qingdao: Ocean University of China.
- 黄荣莲. 2016. 珍珠贝壳壳蛋白组学及胁迫环境下的应激调控网络[D]. 北京:中国科学院.
- Huang R L. 2016. The shell proteomics and stress network of biomineralization in pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*)[D]. Beijing: Chinese Academy of Sciences.
- 李思发,杨怀宇,邹曙明. 2005. 快速近交对团头鲂遗传结构的影响和近交效应的估算[J]. 水产学报,29(2):161-165.
- Li S F, Yang H Y, Zou S M. 2005. Effects on genetic structure from quick inbreeding and estimation of inbreeding response in cultured populations of *Megalobrama amblycephala*[J]. Journal of Fisheries of China, 29(2):161-165.
- 梁健,闫喜武,霍忠明,赵力强,吴云霞,杨凤. 2013. 近交对蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)橙色家系生长及存活的影响[J]. 海洋与湖沼,44(3):717-721.
- Liang J, Yan X W, Huo Z M, Zhao L Q, Wu Y X, Yang F. 2013. Inbreeding and its impact on growth and survival of the orange family manila clam *Ruditapes philippinarum*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 44(3):717-721.
- 刘宇飞,白俊杰,李凯彬,黄志斌,全迎春. 2007. 剑尾鱼RW-H近交系20个微卫星位点的遗传结构[J]. 中国水产科学,14(4):602-607.
- Liu Y F, Bai J J, Li K B, Huang Z B, Quan Y C. 2007. Genetic structure of 20 microsatellite loci in RW-H swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) inbred strain[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 14(4):602-607.
- 桑士田,闫喜武,霍忠明,杨鹏,杨凤,张国范. 2012. 家系内大、小两种规格菲律宾蛤仔的双列杂交[J]. 水产学报,36(6):832-837.
- Sang S T, Yan X W, Huo Z M, Yang P, Yang F, Zhang G F. 2012. The diallel cross between large and small sizes within family of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*)[J]. Journal of Fisheries of China, 36(6):832-837.
- 王大鹏,何安尤,曹占旺,甘西. 2011. 北海营盘新马氏珠母贝养殖区养殖容量的研究[J]. 南方农业学报,42(12):1555-1559.
- Wang D P, He A Y, Cao Z W, Gan X. 2011. Carrying capacity of Yingpan new *Pinctada martensii* culture area in Beihai city, Guangxi[J]. Journal of Southern Agriculture, 42(12):1555-1559.
- 王宇. 2011. 海湾扇贝近交衰退的遗传分子机理的研究[D]. 青岛:中国科学院.
- Wang Y. 2011. The molecule and genetic analysis of inbreeding depression in Bay scallop (*Argopecten irradians*)[D]. Qingdao: Chinese Academy of Science.
- 杨创业,王庆恒,孙瑞椒,刘兴旺,杜晓东,邓岳文. 2015. 微胶囊饲料对马氏珠母贝生长性状和矿化基因表达的影响[J]. 基因组学与应用生物学,34(8):1681-1687.
- Yang C Y, Wang Q H, Sun R J, Liu X W, Du X D, Deng Y W. 2015. Growth rate and expression of mineralization gene of pearl oyster *Pinctada martensii* fed on microencapsulated diets[J]. Genomics and Applied Biology, 34(8):1681-1687.
- 张国范,刘述锡,刘晓,郭希明,张福绥. 2003. 海湾扇贝自交家系的建立和自交的生物学效应[J]. 中国水产科学,10(6):441-445.
- Zhang G F, Liu S X, Liu X, Guo X M, Zhang F S. 2003. Self-fertilization family establishment and its depression in bay scallop *Argopecten irradians*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 10(6):441-445.
- 张国范,刘晓. 2006. 关于贝类遗传改良几个问题的讨论[J]. 水产学报,30(1):130-137.
- Zhang G F, Liu X. 2006. Theory and method of genetic improvement in mariculture mollusks: a review[J]. Journal of Fisheries of China, 30(1):130-137.
- 张嘉丽,罗燕秋,黄怡,钟雅诗,刘青云,李俊辉,邓岳文. 2015.

- 马氏珠母贝近交与杂交家系的遗传结构的比较[J]. 基因组学与应用生物学, 34(4):723-730.
- Zhang J L, Luo Y Q, Huang Y, Zhong Y S, Liu Q Y, Li J H, Deng Y W. 2015. Genetic structure of inbred and hybrid families of pearl oyster *Pinctada martensii*[J]. Genomics and Applied Biology, 34(4):723-730.
- 张景晓, 李琪, 葛建龙, 王许波, 孔令锋. 2014. 近交对长牡蛎幼虫和稚贝生长与存活的影响[J]. 水产学报, 38(12):2005-2011.
- Zhang J X, Li Q, Ge J L, Wang X B, Kong L F. 2014. Effects of inbreeding on growth and survival of larval and juvenile Pacific oyster(*Crassostrea gigas*)[J]. Journal of Fisheries of China, 38(12):2005-2011.
- 张景晓. 2015. 长牡蛎近交家系生物学特性及遗传多样性分析[D]. 青岛:中国海洋大学.
- Zhang J X. 2015. Biological performances and genetic diversity of inbred families in the Pacific oyster(*Crassostrea gigas*) [D]. Qingdao: Ocean University of China.
- 郑怀平, 张国范, 刘晓, 阙华勇. 2004. 海湾扇贝杂交家系与自交家系生长和存活的比较[J]. 水产学报, 28(3):267-272.
- Zheng H P, Zhang G F, Liu X, Que H Y. 2004. Comparison of growth and survival between the self-fertilized and hybridized families in *Argopecten irradians irradians*[J]. Journal of Fisheries of China, 28(3):267-272.
- Beattie J H, Perdue J, Hershberger W, Chew K. 1987. Effects of inbreeding on growth in the Pacific oyster(*Crassostrea gigas*)[J]. Journal of Shellfish Research, 6: 25-28.
- Beaumont A R, Budd M D. 1983. Effects of self-fertilization and other factors on the early development of the scallop *Pecten maximus*[J]. Marine Biology, 76: 285-289.
- Botstein D, White R L, Skolnick M, Davis R W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 32(3):314-331.
- Concha C, Figueroa E, Winkler F M. 2011. Association between self-fertilization rates and the frequency of malformed larvae in farmed populations of the northern scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819)[J]. Latin American Journal of Aquatic Research, 39(2):327-337.
- Deng Y W, Liu X, Zhang G F, Guo X M. 2005. Inbreeding depression and maternal effects on early performance of Pacific abalone[J]. North American Journal of Aquaculture, 67(3):231-236.
- Evans F, Matson S, Brake J, Langdon C. 2004. The effects of inbreeding on performance traits of adult Pacific oysters (*Crassostrea gigas*)[J]. Aquaculture, 230(1-4):89-98.
- Jones R, Bates J A, Innes D J, Thompson R J. 1996. Quantitative genetic analysis of growth in larval scallops (*Placopecten magellanicus*)[J]. Marine Biology, 124(4):671-677.
- Kobayashi T, Kijima A. 2010. Effects of inbreeding depression in Pacific abalone *Haliotis discus hannai*[J]. Journal of Shellfish Research, 29(3):643-649.
- Launey S, Hedgecock D. 2001. High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Genetics, 159(1):255-265.
- Liu J Y, Liu Z G, Sun X Z. 2011. The effects of inbreeding on production traits of the southern bay scallop *Argopecten irradians concentricus*[J]. Journal of Shellfish Research, 30(1):109-113.
- Liu X, Deng Y W, Zhang G F. 2005. Growth of eight Pacific abalone families at three temperatures[J]. Acta Oceanologica Sinica, 24(3):148-153.
- Mallet A L, Haley L E. 1983. Growth rate and survival in pure population matings and crosses of the oyster *Crassostrea virginica*[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 40(7):948-954.
- Shi Y, He M X. 2014. Differential gene expression identified by RNA-Seq and qPCR in two sizes of pearl oyster (*Pinctada fucata*)[J]. Gene, 538(2):313-322.
- Zhang L J, He M X. 2011. Quantitative expression of shell matrix protein genes and their correlations with shell traits in the pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. Aquaculture, 314(1-4):73-79.
- Zhao X, Wang Q, Jiao Y, Huang R, Deng Y, Wang H, Du X. 2012. Identification of genes potentially related to biomineralization and immunity by transcriptome analysis of pearl sac in pearl oyster *Pinctada martensii*[J]. Marine Biotechnology, 14(6):730-739.
- Zheng H P, Zhang G F, Guo X M, Liu X. 2008. Inbreeding depression for various traits in two cultured populations of the American bay scallop, *Argopecten irradians irradians* Lamarck (1819) introduced into China[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 364(1):42-47.

(责任编辑 兰宗宝)