

马氏珠母贝 3 个野生种群及种群间杂交后代遗传多样性的 ISSR 分析

吕林兰^{1,2,3,4} 杜晓东² 王 嫣^{3,4} 石耀华^{3,4} 王爱民^{3,4}

(1. 盐城工学院, 盐城 224003; 2. 广东海洋大学, 湛江 524025; 3. 海南大学海洋学院, 海口 570228;

4. 海南省热带水生生物技术重点实验室, 海口 570228)

摘要:运用 ISSR 分子标记技术分析了马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 广西北海(BW)、广东大亚湾(DW)和海南三亚(SW)野生种群及其自繁子一代(BB₁、SS₁、DD₁)和杂交子一代(BS₁、BD₁、DS₁) 9 个群体各 50 个个体的遗传多样性。结果表明:3 个野生群体遗传多样性分别是 0.2585、0.2607 和 0.2571;3 个自繁群体子一代遗传多样性分别是 0.2504、0.2545 和 0.2527,3 个杂交子一代遗传多样性分别是 0.2747、0.2659 和 0.2784。种群间杂交增加了子代的遗传多样性,同时增加了杂交子一代与杂交亲本间的遗传距离,而自繁群体的遗传多样性与其来源的野生种群比较,遗传多样性降低。本文指出利用野生群体进行杂交育种应该纯化亲本才能获得杂种优势,人工育苗或选择性育种需要保持足够数量的繁殖亲本以避免遗传多样性降低。

关键词: 马氏珠母贝;野生种群;遗传多样性;杂交;ISSR 标记

中图分类号: Q344⁺.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)01-0026-07

杂交育种是水产动物育种的一种传统而有效的方法。两种或两种以上不同类型的亲本进行杂交可以获得基因组合不同的杂交后代,有些杂交能够产生优于亲本的优良性状。贝类的种内杂交,特别是不同种群间及近交系间的杂交越来越多地受到重视。Cruz 等对产于墨西哥、加利福尼亚两个不同地理种群扇贝 (*Argopecten circularis*, Sowerby 1835) 的正反交发现,杂交后代幼虫成活率和生长率明显地区别于亲本的子代^[1],不同地理种群及正反交后代的生长和对环境的适应也有差异^[2]。Wada 对日本产马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 不同地理种群间杂交子代研究发现其在生长方面有明显优势^[3];Hedgecock 等对太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 近交系间杂交发现经济性状出现杂种优势^[4],并从数量遗传学和分子遗传学方面探讨了杂种优势的机理^[5]。我国学者对栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 中国种群和俄罗斯种群间杂交子代生长^[6,7]、中国种群与日本种群间杂交子代生长^[8,9]及遗传变异^[10]、中国种群与韩国种群间杂交子代生长及遗传结构变化^[11]进行了系列研究。为进一步揭示马氏珠母贝种群间杂交

的遗传规律,我们选用了高效稳定的 ISSR (Inter-simple sequence repeats,简单序列重复间区) 分子标记对不同地理种群及群体间杂交后代的遗传多样性进行了系统研究,以期马氏珠母贝杂交育种措施提供理论依据并用于指导育种实践。

1 材料与方法

1.1 材料 马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 的广西北海野生种群(BW)采自北海市侨港镇近海;广东大亚湾野生种群(DW)采自深圳市大亚湾近海;海南三亚野生种群(SW)采自三亚市安游镇近海。

选取 3 龄、性腺成熟的贝作为亲贝。分别在 3 个野生种群中挑选 30 个雌性和 10 个雄性,解剖后分别人工采卵、采精、进行种群内人工授精,获得 3 个种群内自繁子一代 BB₁、DD₁和 SS₁。同样,选取 3 龄、性腺成熟的贝为亲贝。进行三组杂交,分别选取 30 个雌性和 10 个雄性,进行 BW ♀ × DW ♂ 和 DW ♀ × BW ♂ 人工授精,幼虫变态附着前混合培养,产生的杂交子一代为 BD₁;第二组:分别进行 BW ♀ × SW ♂ 和 SW ♀ × BW ♂ 人工授精,幼虫变态附着前混

收稿日期:2006-02-21;修订日期:2007-01-18

基金项目:国家高技术发展计划(863 计划)(2006AA10A409);科技部农业科技成果转化资金项目(2006CB2E200236);国家自然科学基金资助项目(40676075,30460105)

作者简介:吕林兰(1976—),女,重庆人;硕士;主要从事无脊椎动物学和动物生理学研究。E-mail:lvlinlan@ycit.cn

通讯作者:王爱民(1961—),男,河南郾城人;硕士,教授;主要从事贝类遗传育种和养殖技术研究。E-mail:ainmwang@163.com

合培养,产生的杂交子一代为 BS_1 ;第三组:分别进行 $DW \text{♀} \times SW \text{♂}$ 和 $SW \text{♀} \times DW \text{♂}$ 人工授精,幼虫变态附着前混合培养,产生的杂交子一代为 DS_1 。

对不同地理种群内自繁和种群间杂交获得的 6 组子一代群体(BB_1 、 DD_1 、 SS_1 、 BD_1 、 BS_1 和 DS_1)的培育同常规方法。海上养殖在广西北海市铁山港珍珠养殖场完成。

随机选取 3 个地理群野生亲贝和人工繁殖的 6 个群体子代(18 月龄)各 50 个个体,取闭壳肌组织于 75 % 的酒精固定, - 20 °C 保存备用。

1.2 基因组 DNA 的制备 每个个体取 0.2 g 闭壳肌用于提取 DNA。DNA 提取方法按常规的酚/氯仿提取方法,用 0.8 % 的生理盐水多次清洗闭壳肌,于研钵中加液氮磨成粉末状,加入 500 μ L 的组织匀浆缓冲液,混匀后加入终浓度为 0.8 % 的 SDS 和 100 g/mL 的蛋白酶 K,55 °C 消化过夜,分别用等体积的饱和酚(pH 8.0),饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),氯仿/异戊醇(24:1)抽提,二倍体积的冷冻无水乙醇沉淀,70 % 的酒精洗涤后干燥,TE(pH 8.0)溶解,置 4 °C 保存备用。

1.3 PCR 扩增 ISSR 引物购自加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia),使用的 10 个 ISSR 引物见表 1。PCR 反应体系参照 Tsumura 等的报道^[12],进行适当的优化。即 25 μ L 反应体系为:2.5 μ L 10 $\times$ buffer、1.5 mmol/L $MgCl_2$ 、200 nmol/L ISSR 引物、2 % 甲酰胺、1U Taq 酶、0.10 mmol/L dNTPs、50 ng DNA、加双蒸水至总体积 25 μ L。反应程序为:94 °C 预变性 5 min,39 个循环(94 °C 30 s,52 °C 1 min,72 °C 2 min),最后 72 °C 延伸 7 min。

PCR 反应是在 PTC-100 扩增仪上进行,扩增产物用 6 % 的非变性聚丙烯酰胺凝胶分离,染色参照 Sanguinetti C J 等^[13]快速银染法染色,染色时间严格一致。DNA 片段通过计算机凝胶成像系统观察记录。

表 1 使用的 10 个 ISSR 引物及序列

Tab. 1 Nucleotide sequences of 10 ISSR primers

引物编号 No. of primer	核苷酸序列(5'→3') Nucleotide sequence(5'→3')
817	CACACACACACACAA
823	TCCTCTCTCTCTCTCC
825	ACACACACACACACT
835	AGAGACAGACAGAGYC
887	DVDTCTCTCTCTCTCTC
888	DBDCACACACACACA
889	DBDACACACACACAC
890	VHVGTTGTTGTTGTTGT
891	HVHTGTGTGTGTGTGTG
895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC

Note: Y = (C, T); B = (C, G, T); D = (A, G, T); H = (A, C, T); V = (A, C, G)

1.4 数据分析 在胶上根据 Marker 各带的迁移率确定扩增产物各带的迁移率,记录各泳道的带型,即某一条带存在记为 1,缺乏记为 0,无重复性的弱带不记录,从而建立原始的谱带矩阵,并据此统计位点总数、多态位点数和每个多态位点在群体中的分布频率。

群体间遗传相似性(F)和遗传距离(D)用软件 Rapd200 计算如下:

$$F = 2X_{ab} / (X_a + X_b) \quad D = 1 - F$$

其中, X_{ab} 为个体 a 和个体 b 的共享位点, X_a 和 X_b 分别为 a 个体和 b 个体的位点数;

多态位点的比例(P): $P = (\text{该群体的多态位点} / \text{总位点数}) \times 100 \%$

Shannon 遗传多样性指数量化遗传多态性(H):

$$H' = - \sum x_i \ln x_i$$

如将单态位点、所采用的引物数量多寡加以考虑,将上式修改为:

$$H_0 = - \sum x_i \ln x_i / N$$

x_i 为位点在某种群中出现的频率, N 为在该种群中检测到的位点总数; H_0 可用来分析和比较各群体的遗传多态度。

2 结 果

2.1 多态位点比例和扩增片段数比较结果

各群体的多态位点比例见表 2,3 个亲本野生群体的多态位点比例均为 95.83 %,在这 9 个杂交子一代群体中, DS_1 的多态位点比例最大为 97.87 %, BS_1 最小为 91.49 %;就扩增片段数量(表 3)而言, DW 扩增片段最少为 1050 个,而 BS_1 群体扩增的片段数最多达 1170 个;在遗传多样性指数(表 4)方面,3 个野生群体中 DW 的遗传多样性指数最大(0.2607), BW 次之(0.2585), SW 最小(0.2571),在这 9 个杂交子一代群体中, DS_1 的遗传多样性指数最大(0.2784),自繁子一代 BB_1 最小(0.2504)。由表 4 可知,9 个群体的遗传多样性大小顺序为: $DS_1 > BS_1 > BD_1 > DW > BW > SW > SS_1 > DD_1 > BB_1$ 。

2.2 群体间遗传距离

亲本间遗传距离见表 5,北海种群与大亚湾种群遗传距离最大(0.3928),北海种群与三亚种群次之(0.3925),大亚湾种群与三亚种群遗传距离最近(0.3835)。

北海种群与三亚种群的自繁和杂交一代各群体遗传距离(表 6),自繁一代 BB_1 和 SS_1 之间的距离(0.3477)小于它们分别与其杂交子一代(BS_1)之间

的距离 (0.3635、0.3693), 杂交子代 BS₁ 的与自繁子代 BB₁ 遗传距离更接近。

表 2 10 个引物对 9 个种群的扩增位点比较

Tab. 2 Comparison of amplified locus among the nine populations of *Pinctada martensii* with 10 primers

	BW		DW		SW		BB ₁		DD ₁		SS ₁		BD ₁		BS ₁		DS ₁	
	L	P-I	L	P-I	L	P-I	L	P-I	L	P-I	L	P-I	L	P-I	L	P-I	L	P-I
位点总数 Numbers of amplified locus	48	46	48	46	48	46	47	44	47	45	47	45	47	45	47	43	47	46
多态位点 Polymorphic site	95.83		95.83		95.83		93.62		95.74		95.74		95.74		91.49		97.87	

Note :L ,loci ;P-I ,polymorphic-loci

表 3 10 个引物对 9 个种群的扩增片段数量的比较

Tab. 3 Comparison of the numbers of amplified fragments among the nine populations with 10 primers

引物 Primer	BW	DW	SW	BD ₁	BS ₁	DS ₁	BB ₁	DD ₁	SS ₁
817	110	108	103	100	146	95	112	123	107
823	88	68	67	81	80	79	76	69	89
825	81	77	90	82	85	73	84	86	89
835	87	91	89	109	115	107	119	110	116
887	81	82	80	84	108	89	81	106	81
888	202	155	174	172	188	151	167	186	155
889	125	117	126	97	120	122	103	124	116
890	128	143	145	105	106	119	105	94	110
891	125	120	133	123	112	124	118	127	129
895	93	89	107	113	110	105	99	100	105
合计 Total	1120	1050	1114	1066	1170	1064	1064	1125	1097

表 4 马氏珠母贝三地理种群及自繁群体和杂交群体的遗传多样性指数

Tab. 4 Genetic diversity in the nine populations of pearl oyster , *Pinctada martensii*

引物 Primer	BW	DW	SW	BD ₁	BS ₁	DS ₁	DD ₁	BB ₁	SS ₁
817	0.3121	0.2521	0.2261	0.4000	0.2881	0.2642	0.2309	0.2228	0.2601
823	0.2883	0.2647	0.2792	0.2706	0.3231	0.2918	0.2894	0.3200	0.2835
825	0.2551	0.1914	0.1963	0.2983	0.3113	0.3393	0.2575	0.2811	0.2722
835	0.1822	0.1960	0.2023	0.1384	0.1278	0.2272	0.1243	0.1576	0.2018
887	0.2582	0.3175	0.2938	0.2773	0.3213	0.3405	0.3016	0.2845	0.2910
888	0.28622	0.2991	0.3060	0.245	0.2394	0.2949	0.2536	0.2506	0.2486
889	0.28692	0.3170	0.3064	0.2627	0.2858	0.2920	0.2958	0.2338	0.2592
890	0.2975	0.2841	0.3013	0.2873	0.3191	0.3273	0.3139	0.3039	0.3047
891	0.2370	0.2448	0.2468	0.2499	0.2970	0.2303	0.2391	0.2322	0.2258
895	0.1818	0.2398	0.2130	0.2296	0.2338	0.1768	0.2212	0.2173	0.1981
平均 Average	0.2585	0.2607	0.2571	0.2659	0.2747	0.2784	0.2527	0.2504	0.2545

表 5 三地理种群亲本群体间遗传距离

Tab. 5 Genetic distances of three populations of *Pinctada martensii*

Populations	BW	DW	SW
BW	0.0000		
DW	0.3928	0.0000	
SW	0.3925	0.3835	0.0000

表 6 BW 和 SW 自繁和杂交子一代各群体之间的遗传距离

Tab. 6 Genetic distances of the first generation of self-mating and hybridizing between BW and SW

Populations	BB ₁	SS ₁	BS ₁
BB ₁	0.0000		
SS ₁	0.3477	0.0000	
BS ₁	0.3635	0.3693	0.0000

从北海种群与大亚湾种群的自繁和杂交一代各群体遗传距离(表 7)看出:自繁一代 BB₁ 与 DD₁ 之间

的距离 (0.3583) 小于它们分别与其杂交子一代 (BD₁) 之间的距离 (0.3645、0.3757), 杂交子代 BD₁ 与自繁子代 BB₁ 的遗传距离更接近。

表 7 BW 和 DW 自繁和杂交一代各群体之间的遗传距离

Tab. 7 Genetic distances of the first generation of self-mating and hybridizing between BW and DW

Populations	BB ₁	DD ₁	BD ₁
BB ₁	0.0000		
DD ₁	0.3583	0.0000	
BD ₁	0.3645	0.3757	0.0000

大亚湾与三亚的自繁和杂交一代各群体遗传距离(表 8), 自繁一代 DD₁ 与 SS₁ 之间的距离 (0.3653) 小于它们分别与其杂交子一代 (BS₁) 之间的距离 (0.3888、0.3826), 杂交子代 BS₁ 与自繁子代 SS₁ 的遗传距离更接近。

表 8 DW 和 SW 自繁和杂交一代各群体之间的遗传距离

Tab. 8 Genetic distances of the first generation of self-mating and hybridizing between DW and SW

	DD ₁	SS ₁	DS ₁
DD ₁	0.0000		
SS ₁	0.3653	0.0000	
DS ₁	0.3888	0.3826	0.0000

从 BB₁、DD₁、SS₁、BD₁、BS₁ 和 DS₁ 共 6 个子一代群体聚类(图 1) 结果来看: 三自繁群体 (BB₁、SS₁、DD₁) 遗传距离最近, 杂交子一代 BD₁ 与自繁群体的遗传距离最近, BS₁ 次之, 而 DS₁ 与它们的遗传距离最远。

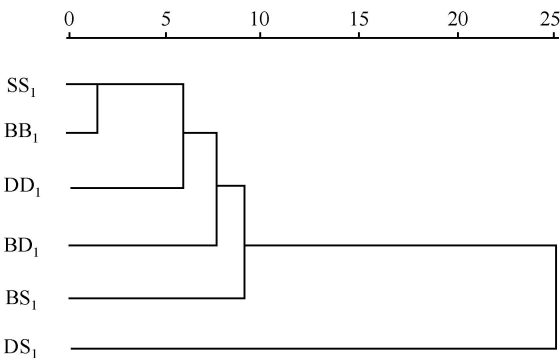


图 1 三地理群马氏珠母贝自繁和杂交一代 6 个群体基于遗传距离的聚类分析

Fig. 1 The cluster analysis of the first generation from self-mating and hybridizing of different populations base on genetic distance

3 讨 论

3.1 3 个野生种群的遗传多样性

遗传多样性是生物多样性的基础, 种群遗传多

样性是种质资源的基础。最大限度地维持种内遗传多样性水平是持续利用种质资源的前提和保证。马氏珠母贝作为我国最主要的海水经济贝类, 其种质资源的遗传多样性状况一直是关注的重点^[14-16]。王爱民等^[17]用 RAPD 分析北海、大亚湾和三亚野生种群的遗传多样性指数分别为 0.174、0.211 和 0.266; 杜晓东等^[18]利用 12 个同工酶的 26 个位点比较分析了北部湾种群和大亚湾种群的遗传多样性, 指出 2 种群都显示出较高的多态性。我们此次所研究的 3 个野生种群与王爱民等^[17]研究所使用的种群样品是一致的, ISSR 分析揭示北海、大亚湾和三亚野生种群的遗传多样性指数分别为 0.2585、0.2607 和 0.2571, 3 个种群多态位点比例在 95.83%, 表明这 3 个野生种群的遗传多样性丰富, 种质资源状况仍处于较好的水平, 该结果对于开发利用我国马氏珠母贝种质资源提供了可靠的科学依据。

值得提出的是此次研究结果与王爱民等^[17]用 RAPD 方法得到结果有些出入, 就其原因主要可能是 ISSR 和 RAPD 标记本身差异造成的, RAPD 标记检测的是颠倒重复序列及其间片段, 而 ISSR 标记检测是重复序列间片段, 致使 ISSR 标记和 RAPD 标记所检测的基因座位不同; RAPD 引物是任意序列的 10 碱基, ISSR 引物是 15-24 个碱基的重复锚定引物, 因为不同的引物检测得到的多态性不一样, 而且多态性片段数随着引物数量的增加而增加, 必然引起遗传距离的变化^[19]。

钱韦等^[20]在用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性时, 用 Mantel 检测法评估了这两种技术的相关性, 结果表明: 在居群内, RAPD 和 ISSR 对个体间遗传相似性检测结果的相关性极低, 相关系数均不足 0.2, 用遗传距离获得的 RAPD 和 ISSR 聚类图的形状差异较大。类似的研究也说明 RAPD 标记与其他分子标记的相关性比较低^[21, 22]。就研究方法而言, 选择高效稳定的分子标记技术和建立标准的试验操作程序对研究种群遗传多样性显得越来越重要。虽然 ISSR 标记技术在贝类遗传多样性研究上使用的并不多, 但与 RAPD 相比因其在多态性、稳定性和重复性方面具有明显的优势, 应该优先考虑 ISSR 标记技术, 而特异性微卫星标记的开发和利用应更加重视(待发表)。

3.2 杂交一代遗传多样性与杂种优势

遗传育种的理论和实践皆已证明杂种优势利用的关键在于找到强优势的杂交组合, 一方面需要亲本间遗传差异大, 另一方面亲本要有好的配合力, 因

此,杂种优势的产生关键在于亲本的选择。由于 BW、DW 和 SD 种群在地理和生态环境上存在较大差异,具有一定的地理区域性,属于不同的生态类型种群^[17],BW 与 DW、BW 与 SW、DW 与 SW 种群间遗传距离分别为 0.3928、0.3925 和 0.3835。一般说来,分布地区距离较远,来源差别较大,类型不同的种群间杂交以及长期与外界隔绝,基因型相对较纯的种群间杂交,可以获得较大的杂种优势。从本研究结果可以看出,不同地理种群的杂交可以增加子代的遗传多样性指数,BD₁ (0.2659) 遗传多样性指数高于 BB₁ (0.2504) 和 DD₁ (0.2527),BS₁ (0.2747) 高于 BB₁ 和 SS₁ (0.2545),DS₁ (0.2784) 高于 DD₁ 和 SS₁;这个结果与丁小雷等^[23]和王爱民等^[24]用 RAPD 分析的结果相一致;本研究杂交子一代 BD₁、BS₁ 和 DS₁ 遗传多态性甚至高于其来源的野生种群(BW、DW 和 SW);这是由于不同亲本基因之间在杂交后代出现了重组,改变了不同位点上的基因互作。

无论是杂种优势的显性学说还是超显性学说,都是基于亲本有利基因在子代杂合性突出表现而建立的;基因的杂合性能提高机体的生活力、繁殖力和生长速度等。贝类群体间交配子代在养殖中应具有一定的生长、抗病等方面的优势。栉孔扇贝不同杂交组合的后代普遍表现出杂种优势,不同地理种群的杂色鲍杂交子代稚鲍的生长等方面同样表现出杂种优势。王爱民等对不同地理种群马氏珠母贝杂交子一代经济性状分析表明杂种优势不明显^[25],其主要原因是马氏珠母贝野生种群作为杂交亲本未经选育,基因型混杂和不纯是导致主要生长经济性状未能表现杂种优势。而杂交子一代群体 DS₁ 和 BD₁ 的多毛类寄生率与自繁群体 BB₁ 相比,分别降低了 8.4% 和 8.8% ($p < 0.05$),表明种群间部分杂交一代提高了抗多毛类寄生虫病的能力^[26]。贝类杂种优势是一种生理复杂的现象,不同贝类及不同杂交组合对不同的性状其表现形式有很大的差别^[1,2,6-9,11]。张国范等^[27]认为贝类种内杂交是杂种优势利用的主要途径,而关键是要找到配合力高的杂交组合。太平洋牡蛎近交系间杂交^[4,5]和海湾扇贝杂交家系与自交家系比较^[28]所表现的杂种优势更说明亲本纯正的重要性,这也应该是贝类育种应该引起重视的问题。

3.3 自繁一代遗传多样性与人工育苗的作用

通过对比马氏珠母贝野生种群与其对应的自繁子一代群体的遗传多样性,很容易发现人工繁殖群体后代的遗传多样性与野生种群相比有所下降,BB₁

(0.2504) 低于 BW (0.2585),DD₁ (0.2527) 低于 DW (0.2607),SS₁ (0.2545) 低于 SW (0.2571);野生种群第一次人工繁殖的后代就能检测出来其遗传多样性降低,说明人工繁殖和养殖对种群遗传多样性变化的影响是不能忽视的。王爱民等^[15]将雷州(流沙)养殖马氏珠母贝与广西和海南野生种群平均遗传变异度比较发现,养殖群体低于野生群体。English 等^[29]对太平洋牡蛎自然群体和人工育苗群体的遗传结构分析发现,人工育苗群体多态性位点的比率为 70.6%,而自然种群为 73.5%。宋林生等^[30]用 RAPD 对栉孔扇贝的野生种群与养殖群体的 RAPD 遗传多态性分析,两者的多态性位点比例分别为 75.82% 和 73.47%,杂合度分别是 0.27 和 0.26;养殖群体发生遗传漂变和稀有基因缺失的现象已在蛤仔^[31]、鲍鱼^[32]等贝类用同工酶或 RFLP 标记技术所证实。人工选择群体单位位点的等位基因数目和稀有等位基因数目明显降低^[33,34]。万俊芬等^[35]通过分析亲本数量不同对皱纹盘鲍养殖群体遗传结构的影响发现,亲本数量减少会引起一些低频率位点的丧失和位点频率发生漂变。贝类人工养殖群体遗传结构变化和遗传多样性降低是普遍存在的现象,这是由于人工养殖过程中瓶颈效应、遗传漂变和近亲杂交等影响种群遗传多样性因素增强,使养殖群体基因库不可避免地会丧失某些特定的等位基因或稀有基因,因此造成养殖群体的遗传变异度及遗传多样性水平均低于野生群体的状况。我国主要经济贝类的大规模养殖均是通过人工育苗成功而实现的,育苗场往往只重视苗种的数量而忽视苗种的质量,更为普遍地使用少量的人工养殖群体作为亲贝进行繁殖,近亲交配,导致苗种质量越来越差。为避免养殖群体遗传多样性发生明显地变化,一方面要保证繁殖亲本数量要大;另一方面要经常使用野生群体或野生群体与养殖群体杂交繁殖苗种;人工选育群体更要注重维持有效繁殖群体,避免发生瓶颈效应。

致谢:

本文主要工作是在海南省热带农业资源开发利用研究所完成的,在研究期间受到方宣钧研究员的热情指导,在此表示衷心感谢。

参考文献:

- [1] Cruz P, Ibarra M. Larval growth and survival of two catarina scallop (*Argopecten circularis*, Sowerby, 1835) populations and their reciprocal crosses [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1997, 212: 95-110
- [2] Cruz P, Ramirez J L, Garcia G A, et al. Genetic differences between

- two populations of catarina scallop (*Argopecten circularis*) for adaptation for growth and survival in a stressful environment [J]. *Aquaculture*, 1998, **166**:321—335
- [3] Wada K T. Breeding study of the pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. *Bulletin of National Research Institute Aquaculture*, 1984, **6**:79—157
- [4] Hedgecock D, McGoldrick D J, Bayne B L. Hybrid vigor in Pacific oysters: an experimental approach using crosses among inbred line [J]. *Aquaculture*, 1995, **137**:285—298
- [5] Hedgecock D, McGoldrick D J, Manahan D T, et al. Quantitative and molecular genetic analyses of heterosis in bivalve mollusks [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1996, **203**:49—59
- [6] Liu X L, Chang Y Q, Xiang J H, et al. Studies on hybridization of the different geographic variety population of *Chlamys farreri*. I. Hybridization between Chinese population and Russian population of *Chlamys farreri* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2003, **25**:93—99 [刘小林, 常亚青, 相建海, 等. 栉孔扇贝不同种群杂交效果的初步研究. I. 中国种群与俄罗斯种群的杂交. 海洋学报, 2003, **25**:93—99]
- [7] Liu X L, Chang Y Q, Xiang J H, et al. Studies on hybridization effects of the different geographic population of *Chlamys farreri*. II. The medium-term growth and development of Chinese population and Russian population and their reciprocal crosses [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2005, **27**:135—140 [刘小林, 常亚青, 相建海, 等. 栉孔扇贝不同种群杂交效果的研究. II. 中国种群与俄罗斯种群及其杂种 F1 中期生长发育. 海洋学报, 2005, **27**:135—140]
- [8] Chang Y P, Liu X L, Xiang J H, et al. The juvenile growth and survival of hybrid between Chinese population and Japanese population of *Chlamys farreri* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, **26**:385—390 [常亚青, 刘小林, 相建海, 等. 栉孔扇贝中国种群与日本种群杂交一代的早期生长发育. 水产学报, 2002, **26**:385—390]
- [9] Liu X L, Chang Y Q, Xiang J H, et al. The medium-term growth and development of hybrid between Chinese and Japanese populations of *Chlamys farreri* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2003, **27**:193—199 [刘小林, 常亚青, 相建海, 等. 栉孔扇贝中国种群与日本种群杂交一代的中期生长发育. 水产学报, 2003, **27**:193—199]
- [10] Li T W, Sun X Q, Liu Y, et al. Allozyme variation of two subspecies of *Chlamys farreri* and their reciprocal hybrids [J]. *High Technology Letters*, 2002, **12**(6):101—105 [李太武, 孙修勤, 刘艳, 等. 中日栉孔扇贝杂交子一代群体的遗传变异. 高技术通讯, 2002, **12**(6):101—105]
- [11] Li H L, Song L S, Liu B Z, et al. Studies on the genetic structure of different population of *Chlamys farreri* and their hybrids' heterosis [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2002, **33**(2):188—195 [李红蕾, 宋林生, 刘保忠, 等. 栉孔扇贝不同种群的遗传结构及其杂种优势. 海洋与湖沼, 2002, **33**(2):188—195]
- [12] Tsumura Y, Ohba K, Strauss S H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, **92**:40—43
- [13] Sanguinetti C J, Dias Neto E, Simpson A J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. *Biotechniques*, 1994, **17**:914—921
- [14] Li G, Jin Q Z, Jiang W G, et al. Biochemical genetic variation in the pearl oysters, *Pinctada fucata* and *P. chemnitzii* [J]. *Acta Genetica Sinica*, 1985, **12**:204—212 [李刚, 金启增, 姜卫国, 等. 合浦珠母贝和长耳珠母贝的生化遗传变异. 遗传学报, 1985, **12**:204—212]
- [15] Wang A M, Deng F J, Zhang X Y, et al. RAPD analysis on diversity of *Pinctada martensii* Dunker [J]. *Journal of Wuhan University (Nature Science)*, 2000, **46**:467—470 [王爱民, 邓凤娇, 张锡元, 等. 马氏珠母贝遗传多样性的 RAPD 分析. 武汉大学学报(自然科学版), 2000, **46**:467—470]
- [16] Su T F, Cai Y C, Zhang D C, et al. RAPD analysis of three cultured populations of *Pinctada martensii* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, **9**(2):106—109 [苏天凤, 蔡云川, 张殿昌, 等. 马氏珠母贝 3 个养殖群体的 RAPD 分析. 中国水产科学, 2002, **9**(2):106—109]
- [17] Wang A M, Yan B, Ye L, et al. Genetic diversity analyses of three wild populations of *pinctada martensii* (Dunker.) using RAPD technique [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2003, **11**(2):163—168 [王爱民, 阎冰, 叶力, 等. 三个野生种群马氏珠母贝遗传多样性的 RAPD 分析. 农业生物技术学报, 2003, **11**(2):163—168]
- [18] Du X D, Li G L, Liu Z G, et al. Studies on genetic diversity of two wild populations of *Pinctada martensii* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, **9**:100—105 [杜晓东, 李广丽, 刘志刚, 等. 合浦珠母贝两个野生种群遗传多样性的研究. 中国水产科学, 2002, **9**:100—105]
- [19] Zhou Y Q, Jing J Z, Li Z Y, et al. Assessment of genetic diversity of *Rehmannia glutinosa* Gemplasm detected by RAPDs and ISSR [J]. *Hereditas* (Beijing), 2004, **26**(6):922—928 [周延清, 景建洲, 李振勇, 等. 利用 RAPD 和 ISSR 分子标记分析地黄种质遗传多样性. 遗传, 2004, **26**(6):922—928]
- [20] Qian W, Guo S, Hong Y D. Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPDs and ISSRs [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2000, **42**(7):741—750 [钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性. 植物学报, 2000, **42**(7):741—750]
- [21] Russell J R, Fuller J D, Macaulay M, et al. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, **95**:714—722
- [22] Pejic I, Marscan P A, Morgante M, et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, **97**:1248—1255
- [23] Ding X L, Deng F J, Wang A M, et al. Genetic diversity of two wild *Pinctada martensii* populations' F1 generations [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2003, **38**(1):2—7 [丁小蕾, 邓凤娇, 王爱民, 等. 野生马氏珠母贝子一代的遗传多样性. 动物学杂志, 2003, **38**(1):2—7]
- [24] Wang A M, Ding X L, Deng F J, et al. The genetic diversity of the first filial generation from matings and crosses of two wild populations (Daya Bay, Guangdong and Sanya, Hainan) in *Pinctada martensii*

- (Dunker) [J]. *Marine Fisheries Research*, 2003, **24** (4) :19—25 [王爱民, 丁小蕾, 邓凤娇, 等. 马氏珠母贝大亚湾和三亚野生种群自繁及种群间杂交一代的 RAPD 分析. 海洋水产研究, 2003, **24** (4) :19—25]
- [25] Wang A M, Yan B, Ye L, *et al.* Comparison on main traits of F_1 from matings and crosses of different geographical populations in *Pinctada martensii* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2003, **27** (3) :200—206 [王爱民, 阎冰, 叶力, 等. 马氏珠母贝不同地理种群内自繁和种群间杂交子一代主要性状的比较. 水产学报, 2003, **27** (3) :200—206]
- [26] Wang A M, Yan B, Ye L, *et al.* Analyses on polychaetes infestation of the first filial generation from matings and crosses of different geographical populations in *Pinctada martensii* (Dunker) [J]. *Marine Fisheries Research*, 2003, **24** (3) :38—44 [王爱民, 阎冰, 叶力, 等. 马氏珠母贝不同地理种群内自繁和种群间杂交子一代感染多毛类寄生病的分析. 海洋水产研究, 2003, **24** (3) :38—44]
- [27] Zhang G F, Liu X, Que H Y, *et al.* The theory and application of hybridization and heterosis in marine mollusks [J]. *Marine Science*, 2004, **28** (7) :54—60 [张国范, 刘晓, 阙华勇, 等. 贝类杂交及杂种优势理论和技术研究进展. 海洋科学, 2004, **28** (7) :54—60]
- [28] Zheng H P, Zhang G H, Liu X, *et al.* Comparison of growth and survival between the self-fertilized and hybridized families in *Argopecten irradians irradians* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, **24** (3) :267—272 [郑怀平, 张国范, 刘晓, 等. 海湾扇贝杂交家系与自交家系生长和存活比较. 水产学报, 2004, **24** (3) :267—272]
- [29] 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** :283—298
- [30] Song L S, Li J Q, Li H L, *et al.* The genetic structure and genetic differentiation of the natural population and the hatchery stock of *Chlamys farreri* revealed by RAPD analysis [J]. *High Technology Letters*, 2002, **12** (7) :83—86 [宋林生, 李俊强, 李红蕾, 等. 用 RAPD 技术对我国栉孔扇贝野生种群与养殖群体的遗传结构及其遗传分化的研究. 高技术通讯, 2002, **12** (7) :83—86]
- [31] Manzi J J, Hadley N H Jr, Dillon R T. Hard clam, *Mercenaria mercenaria*, broodstocks growth of selected hatchery stocks and their reciprocal crosses [J]. *Aquaculture*, 1991, **94** :17—26
- [32] Smith P J, Conroy A M. Loss of genetic variation in hatchery-produced abalone, *Haliotis iris*, New Zealand [J]. *J Mar Freshwater Res*, 1992, **26** :81—85
- [33] English L J, Nell J A, Maguire G B, *et al.* Allozyme variation in three generations of selection for whole weight in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*) [J]. *Aquaculture*, 2001, **193** :215—225
- [34] Yu Z N, Gou X M. Genetic analysis of selected strains of Eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin) using AFLP and microsatellite markers [J]. *Marine Biotechnology*, 2005, **6** :575—586
- [35] Wan J F, Bao Z M, Wang X L, *et al.* The influence of parental stock size on the genetic structure of *Haliotis discus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, **28** :127—132 [万俊芬, 包振民, 汪小龙, 等. 亲本数目对鲍养殖群体 AFLP 标记位点及其遗传结构的影响. 水产学报, 2004, **28** :127—132]

GENETIC DIVERSITY OF THREE POPULATIONS AND THE FIRST GENERATIONS OF HYBRIDIZATION BETWEEN DIFFERENT POPULATIONS OF PEARL OYSTER, *PINCTADA MARTENSII* (DUNKER)

LÜ Lin-Lan^{1,2,3,4}, DU Xiao-Dong², WANG Yan^{3,4}, Shi Yao-Hua^{3,4} and WANG Ai-Min^{3,4}

(1. College of Chemistry and Biology Engineering of Yancheng Institute of Technology, Jiangsu Yancheng 224003; 2. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025; 3. Ocean College, Hainan University, Haikou 570228; 4. Hainan Provincial Key Laboratory for Tropical Hydrobiology & Biotechnology, Haikou 570228)

Abstract : ISSR, the inter-simple sequence repeats was applied to investigate the genetic diversities of three wild population of pearl oyster; *Pinctada martensii* (Dunker), the wild populations from Beihai (BW), Daya Bay (DW) and Sanya (SW). The genetic diversity index of BW, DW and SW were 0.2585, 0.2607 and 0.2571 respectively. Three first generations of hybridization between wild population were produced, BD_1 from BW and DW, BS_1 from BW and SW, DS_1 from DW and SW. At the same time, three first generations of mating in each wild population were also produced, BB_1 from BW, DD_1 from DW, and SS_1 from SW. The genetic diversity index of hybridizing generation, BD_1 , BS_1 and SD_1 was 0.2659, 0.2747 and 0.2784 respectively. BB_1 , DD_1 and SS_1 had its diversity index, which was 0.2504, 0.2527 and 0.2545. To get heterosis from hybridization between populations, genetic traits of parents need to be purified. Genetic diversity in self-mating population was lower than that of corresponding wild population. It suggested that keeping effective population size was very important to avoid inbreeding in cultured breeding and selective breeding.

Key words : *Pinctada martensii*; Wild population; Hybridization; Genetic diversity; ISSR marker