

马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)2 个地理群体杂交子代的杂种优势和遗传变异*

王爱民^{1,2} 王 嫣² 顾志峰² 黎 明² 石耀华² 李思发¹

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室 上海 201306;

2. 海南大学海洋学院 教育部热带生物资源重点实验室 海南省热带水生生物技术重点实验室 海口 570228)

提要 采用马氏珠母贝的印度群体(II_0)和三亚群体(SS_0)的 2×2 双列式杂交获得了 4 组子代, $II_1(II_0 \times II_0)$ 、 $IS_1(II_0 \times SS_0)$ 、 $SI_1(SS_0 \times II_0)$ 和 $SS_1(SS_0 \times SS_0)$; 分析表明, 杂交组子代 IS_1 和 SI_1 在壳高、壳长、绞合线长、壳宽、壳重上都表现出杂种优势; IS_1 在壳宽指数上表现出杂种优势, 而在总重和壳重指数上未表现杂种优势; SI_1 在总重和壳宽指数上表现出杂种优势, 而在壳重指数上未表现杂种优势; SI_1 在壳高、壳长、绞合线长和壳重上的杂种优势较 IS_1 高, 差异极显著($P < 0.01$), 而 IS_1 在壳宽上的杂种优势较 SI_1 高, 差异极显著($P < 0.01$)。应用 6 个微卫星位点分析 4 个组合子代的平均 F_{ST} 值为 0.357, 表明 4 个组合子代间有较大的遗传差异和较高的分化水平; 平均等位基因数依次为 $SI_1(6.17) > IS_1(6.00) > II_1(5.00) > SS_1(4.67)$, 等位基因丰度依次为 $SI_1(5.34) > IS_1(5.04) > II_1(4.47) > SS_1(4.55)$, 期望杂合度(H_e)依次为 $IS_1(0.55) > SI_1(0.54) > SS_1(0.44) > II_1(0.42)$, 观察杂合度(H_o)依次为 $SI_1(0.52) > IS_1(0.46) > SS_1(0.35) > II_1(0.29)$, 杂交子代的杂合度和遗传多样性高于自繁子代, 杂交增加了杂交子代的杂合度和遗传多样性, 杂种优势与杂合度和遗传多样性增加直接相关; 综合考虑杂种优势与遗传变异的结果, 确定三亚野生群体 \times 印度养殖群体 杂交组合作为“珍珠贝育种规划 POBs”的主要育种方式。

关键词 马氏珠母贝, 地理种群, 杂种优势, 遗传变异, 微卫星

中图分类号 Q789

通过种群间或品系间杂交获得杂种优势已成为经济贝类育种的主要方式。国内已对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) (常亚青等, 2002; 李太武等, 2002; 刘小林等, 2005)、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino) (张国范等, 2002)和杂色鲍(*Haliotis diversicolor*) (游伟伟等, 2005; You *et al.*, 2009)等开展了不同地理种群间的杂交, 在海湾扇贝(*Argopecten irradians irradians*) (郑怀平等, 2004)和菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) (闫喜武等, 2008)等开展了不同家系间或品系间的杂交; 国外开展了太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)家系之间的杂交(Hedgecock *et al.*, 1995, 2007; Pace *et al.*, 2006)和不同地理种群扇贝(*Argopecten*

circularis Sowerby, 1835)的杂交(Cruz *et al.*, 1997); 这些杂交无论是在生长速度还是在成活率上都有不同程度的杂种优势。马氏珠母贝(*Pinctada martensii* 或为 *P. fucata*)是非食用性贝类, 用于生产海水珍珠。Wada(1984)报道了日本产马氏珠母贝不同地理种群间杂交子代在生长等方面的经济性状明显的优势, 王爱民等(2003)报道了我国马氏珠母贝不同地理种群(广西北海、广东大亚湾和海南三亚)间杂交, 在许多经济性状上未显示明显的杂种优势; 考虑到在马氏珠母贝育种上, 除需获得生长速度快和抗病的经济性状外, 提高与珍珠质量相关的性状也是育种的重要目标, 杂交亲本和杂交方式的选择直接关系到杂

* 国家重点基础研究发展计划(973)项目, 2010CB126405 号、2009CB126005 号; 国家高技术研究发展计划(863)项目, 2002AA603022 号; 国家自然科学基金资助项目, 30960295 号。王爱民, 教授, E-mail: aimwang@163.com

收稿日期: 2008-12-13, 收修改稿日期: 2009-02-28

种能否得到优良、高产及非加性效应大的基因, 进而决定能否获得杂种优势。近年来, 作者制定了“珍珠贝育种规划(Pearl oyster breeding scheme, POBs)”, 以马氏珠母贝的印度养殖群体和三亚群体作为 2 个基础群(basic population), 开展 2×2 双列式杂交, 以封闭继代选育法建立父系或母系专门化品系(specialized lines), 构建配套系, 通过杂交获得在生长速度(壳高和总重)、珍珠质量(珍珠颜色和珠层厚度)等性状优良的新品种。本文在研究印度群体和三亚群体形态性状、贝壳珍珠质颜色和遗传差异的基础上(顾志峰等, 2009; 侯战辉等, 2008), 开展 2×2 双列式杂交, 通过分析杂交子代的杂种优势及遗传变异, 以期指导“珍珠贝育种规划”实施。

1 材料与方法

1.1 材料来源

马氏珠母贝印度养殖群体(II_0)由海南陵水毅珠水产养殖场提供, 为该场于 2000 年由印度养殖场引进并自繁的群体; 马氏珠母贝三亚野生群体(SS_0)采自海南省三亚市亚龙湾近海。

2×2 双列式杂交组合:

II_1 : 印度养殖群体(II_0) \times 印度养殖群体(II_0)

IS_1 : 印度养殖群体(II_0) \times 三亚野生群体(SS_0)

SI_1 : 三亚野生群体(SS_0) \times 印度养殖群体(II_0)

SS_1 : 三亚野生群体(SS_0) \times 三亚野生群体(SS_0)

每个组合通过阴干刺激后人工繁殖, 子代幼虫的培育、收集和海上养殖为常规养殖方法。4 组子代培养和养殖条件完全相同。

1.2 形态测量和数据处理

4 组子代在培养和养殖 24 个月时取样; 用游标卡尺测量壳高(Shell high, SH)、壳长(Shell Length, SL)、

壳宽(Shell Width, SW)和绞合线长(Hinge Length, HL), 精确到 0.1mm; 用电子天平称量壳重(Shell Weight, SWT)、总重(Total Weight, TW)精确到 0.01g。用 SPSS12.0 软件处理数据, 计算平均值、标准差、最大值、最小值和卡方检验。

壳宽指数 (Shell Width Index, SWI) = $\frac{SW}{SH + HL + SW}$, (Wada *et al*, 1991);

壳重指数 (Shell Weight Index, $SWTI$) = $\frac{SWT}{SH \times HL \times SW} \times 10^5$, (杜晓东等, 2002);

杂种优势指数(H_i) = $\frac{F_1 - (P_1 + P_2)/2}{(P_1 + P_2)/2} \times 100\%$, (F_1 、

P_1 、 P_2 分别为杂种一代和双亲某一性状的实际平均观测值)(Tave, 1993)。

1.3 微卫星标记分析

1.3.1 样品的采集和保存 从上述 4 个组合子代中分别取 100 个体的新鲜闭壳肌, 约 2.0g。分别用 95%乙醇固定, 更换 2—3 次固定液, 存放于 -20 冰箱中备用。

1.3.2 DNA 提取 从每个组合子代乙醇固定的样品中随机取 50 个样品, 每个样品称取 0.05g 左右, 用清水冲洗后剪碎, 加入 SDS 缓冲液和蛋白酶 K 消化, 用酚-氯仿法进行提取。具体的 DNA 提取方法见侯战辉等(2008)。

1.3.3 微卫星引物及 PCR 扩增条件 从本实验室已建立的马氏珠母贝微卫星标记(Shi *et al*, 2009)中筛选出 6 个扩增稳定的位点用于群体分析。引物由上海生物工程公司合成。微卫星位点的重复结构、引物序列及 PCR 扩增条件见表 1。

PCR 反应体系(15 μ l)为: *Tag* DNA 聚合酶 0.24U,

表 1 马氏珠母贝微卫星位点的重复结构、引物序列及 PCR 扩增条件

Tab.1 Repeat structures, primer sequences and PCR amplification parameters of microsatellite loci in *P. martensii*

位点	核心序列	引物序列(5'—3')	Mg ²⁺ 浓度(mmol/L)	最适退火温度 T_a ()
HNUPM003	(AC) ₅	F: TTCGGAAC TCTTTTGGTTGG R: TTTTGCGTGTATAATCAGATTGC	1.5	60.0
HNUPM113	(TTAT) ₅	F: CCATGCGGAGTGTATTCTG R: GCTGAACTGCCTTCTCGAC	1.5	60.0
HNUPM122	(TACA) ₄	F: AAGGTATGGCGATATTTGGAAC R: TTAGCGTTGTTGTCGTCGTC	1.5	61.0
HNUPM123	(TATC) ₄	F: CGCCATGAGGGGATACTTAC R: ACCCTGAGAGCTTCAGATTCC	1.5	60.0
HNUPM125	(AAACG) ₄	F: CCGAAATGCACTGTAAGTGG R: GGTTCGTTTCGTTTCGATTTC	1.5	61.0
HNUPM146	(ATGA) ₁₂ C(TGAA) ₅	F: GCAGCGTCGTTGTGTTGAG R: GTTTTCATTGTTTCATAAAATTTGTC	1.5	61.0

10 × Buffer 1.5μl, 1.5mmol/L MgCl₂, 200μmol/L dNTP, 前后端引物各 6pmol, 20—50ng DNA 模板, 灭菌水补至 15μl。

PCR 反应程序为: 94 预变性 4min, 94 变性 30s, 60—61 退火 45s, 72 延伸 1min, 34 个循环, 72

延伸 5min。Taq DNA 聚合酶和 dNTPs 均购自大连宝生物公司。

1.3.4 PCR 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

PCR 扩增产物用 12% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离和溴化乙啶染色, 采用 2μl 购自大连宝生物的 Marker-1 作为分子量标准。用 Tanon 凝胶成像系统拍照存档。

1.3.5 数据分析 采用软件 GENEPOP 3.4 分析哈代-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE, Raymond *et al*, 2003)、软件 FASTAT2.9.3.2 (Goudet, 2001)¹⁾ 计算等位基因丰度 R_s 和软件 ARLEQUIN 3.0 (Excoffier *et al*, 2005) 计算期望杂合度 (H_e)、观测杂合度 (H_o) 和单个位点的 F_{ST} 。

2 结果

2.1 形态特征

对 2 × 2 双列式杂交 4 个组合子代养殖 24 个月后的壳高、壳长、绞合线长、壳宽、总质量、壳重、壳宽指数和壳重指数比较 (表 2) 表明: 在最能表现形态大小的壳高上, IS₁ 和 SI₁ 两者无显著差异 ($P > 0.01$), II₁ 大于 IS₁、SI₁ 和 SS₁, 差异极显著 ($P < 0.01$), IS₁ 和 SI₁ 大于 SS₁, 差异极显著 ($P < 0.01$); 壳长的情况与壳高相同; 在绞合线长方面, II₁ > SI₁ > IS₁ > SS₁, 差异极显著 ($P < 0.01$); 在壳宽上, SS₁ 大于 II₁、SI₁ 和 IS₁, 差异极显著 ($P < 0.01$); 在总重量上, II₁ > SI₁ > IS₁ > SS₁, 差异极显著 ($P < 0.01$), 但壳重方面, SI₁ 和 IS₁ 无显著差异 ($P > 0.01$), II₁ 大于 SI₁ 和 IS₁ ($P < 0.01$), SI₁ 和 IS₁ 大于 SS₁ ($P < 0.01$); 在壳宽指数方面, SS₁ > SI₁ > IS₁ > II₁, 差异极显著 ($P < 0.01$), 而在壳重指数上, SI₁、IS₁ 和 II₁ 三者差异不显著 ($P > 0.01$), 但 SS₁ 大于 SI₁、IS₁ 和 II₁, 差异极显著 ($P < 0.01$)。

在 2 × 2 双列式杂交 4 个组合中, 杂交组子代 IS₁ 在壳高、壳长、绞合线长、壳宽、壳重和壳宽指数上表现出杂种优势, 而在总重和壳重指数上未表现杂种优势; 杂交组子代 SI₁ 在壳高、壳长、绞合线长、

表 2 4 组子代养殖 24 个月后主要形态性状参数和指数比较
Tab.2 Comparison of morphometric parameter and index among four groups of offspring in *P. martensii* after 24-month culture

性状	组	平均值	最大值	最小值
SH(mm)	II ₁	78.51 ± 0.83 ^a	98.10	51.00
	IS ₁	70.78 ± 0.59 ^b	83.50	48.60
	SI ₁	72.22 ± 0.72 ^b	92.00	50.20
	SS ₁	58.88 ± 0.71 ^c	81.20	40.80
SL(mm)	II ₁	73.68 ± 0.87 ^a	93.50	49.40
	IS ₁	66.97 ± 0.65 ^b	85.30	50.40
	SI ₁	67.91 ± 0.74 ^b	97.40	45.80
	SS ₁	57.55 ± 0.72 ^c	84.50	38.90
HL(mm)	II ₁	66.56 ± 0.69 ^a	85.60	50.40
	IS ₁	60.51 ± 0.54 ^c	73.70	45.60
	SI ₁	62.90 ± 0.72 ^b	96.80	40.80
	SS ₁	52.38 ± 0.61 ^d	74.50	38.00
SW(mm)	II ₁	25.96 ± 0.28 ^a	33.00	17.80
	IS ₁	26.50 ± 0.27 ^a	33.00	18.40
	SI ₁	25.92 ± 0.26 ^a	32.10	19.60
	SS ₁	22.68 ± 0.26 ^b	31.20	16.00
TW(g)	II ₁	55.80 ± 1.40 ^a	47.25	11.51
	IS ₁	44.31 ± 0.91 ^c	40.81	11.73
	SI ₁	48.96 ± 1.20 ^b	41.22	10.90
	SS ₁	33.74 ± 0.97 ^d	39.70	8.49
SWT(g)	II ₁	28.96 ± 0.68 ^a	18.94	12.17
	IS ₁	24.91 ± 0.49 ^b	19.63	13.29
	SI ₁	26.06 ± 0.62 ^b	20.38	13.46
	SS ₁	18.76 ± 0.52 ^c	19.09	14.80
SWI	II ₁	0.15 ± 0.11 ^c	0.26	0.13
	IS ₁	0.17 ± 0.09 ^a	0.29	0.15
	SI ₁	0.16 ± 0.09 ^b	0.33	0.12
	SS ₁	0.17 ± 0.08 ^a	0.36	0.17
SWTI	II ₁	21.35 ± 0.24 ^c	26.07	13.20
	IS ₁	21.95 ± 0.23 ^{bc}	28.55	15.04
	SI ₁	22.13 ± 0.26 ^b	32.76	11.63
	SS ₁	26.82 ± 0.20 ^a	36.03	17.20

注: 同一组中不同小写字母上标表示数据之间有极显著差异 ($P < 0.01$)

壳宽、总重和壳重上表现出杂种优势, 而在壳宽指数和壳重指数上未表现杂种优势; 比较 2 个杂交组子代的性状杂种优势发现, SI₁ 在壳高、壳长、绞合线长、总重和壳重上的杂种优势较 IS₁ 大, 差异极显著 ($P < 0.01$), 而 IS₁ 在壳宽和壳宽指数上的杂种优势较

1) Goudet J, 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (Ver 2.9.3). <http://www.unil.ch/izea/software/fastat.htm/>

表 3 杂交子代养殖 24 个月后杂种优势比较

Tab.3 Comparison of heterosis between 2 hybrids in *P. martensii* after 24-month culture

性状	IS ₁	SI ₁
SH	3.04 ^b	5.13 ^a
SL	2.07 ^b	3.50 ^a
HL	1.75 ^b	5.77 ^a
SW	8.96 ^a	6.58 ^b
TW	-1.03 ^b	9.36 ^a
SWT	4.40 ^b	9.22 ^a
SWI	6.25 ^a	0.00 ^b
SWTI	-0.85 ^b	-0.10 ^a

注: 同一组中不同小写字母上标表示数据之间有极显著差异($P < 0.01$)

SI₁ 大, 差异极显著($P < 0.01$)。

2.2 微卫星分析

从 6 个微卫星位点(表 4)显示 2×2 双列式杂交 4 个组合子代的遗传差异结果来看, 所有 6 个位点均在至少两个子代群体中符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P < 0.05$, 且经过 Bonferroni 多重比较校正)。4 个子代群体在 6 个位点上的平均 F_{ST} 值为 0.357。就每个位点来说, F_{ST} 值介于 0.066(HNUPM146)到 0.590(HNUPM122)之间。4 个子代群体在 6 个微卫星位点上具有的平均等位基因数依次为 SI₁(6.17) > IS₁(6.00) > II₁(5.00) > SS₁(4.67), 而等位基因丰度具有相似的分布趋势, 依次为 SI₁(5.34) > IS₁(5.04) > II₁(4.47) >

表 4 6 个微卫星在马氏珠母贝 4 个组合子代中的遗传多样性统计

Tab.4 Summary statistics for 6 microsatellite loci among four groups of offspring in *P. martensii*

组	参数	位点						平均值
		HNUPM003	HNUPM113	HNUPM122	HNUPM123	HNUPM125	HNUPM146	
II ₁	F_{ST}	0.567	0.515	0.59	0.27	0.135	0.066	0.357
	n	42	42	42	42	42	33	
	a	4	5	4	5	4	8	5.00
	R_s	4	4.74	3.78	4.91	3	8	4.74
	as	380—430	230—269	390—440	310—360	265—320	170—280	
	H_e	0.41	0.32	0.2	0.32	0.58	0.68	0.42
	H_o	0.17	0.05	0.05	0.15	0.73	0.56	0.29
IS ₁	HWE	0.101	0.011	0.000	0.004	0.082	0.020	
	n	41	42	42	42	42	39	
	a	7	6	5	4	4	10	6.00
	R_s	3.99	4.91	4.7	4	2.79	9.82	5.04
	as	375—410	230—290	380—440	310—340	280—310	170—250	
	H_e	0.66	0.46	0.22	0.39	0.71	0.85	0.55
	H_o	0.51	0.42	0.12	0.10	0.93	0.69	0.46
SI ₁	HWE	0.002	0.22	0.021	0.008	0.012	0.005	
	n	42	42	42	42	42	40	
	a	4	6	6	5	5	11	6.17
	R_s	3.79	4	5.44	4	3.99	10.82	5.34
	as	370—420	220—290	390—430	300—310	265—320	170—290	
	H_e	0.42	0.68	0.2	0.44	0.64	0.87	0.54
	H_o	0.29	0.53	0.14	0.38	0.90	0.90	0.52
SS ₁	HWE	0.022	0.007	0.075	0.000	0.007	0.017	
	n	42	42	42	42	42	42	
	a	5	5	3	3	4	9	4.67
	R_s	4.78	4.99	2.95	2	3.65	8.9	4.55
	as	340—390	220—280	405—420	310—320	280—310	170—300	
	H_e	0.46	0.44	0.14	0.2	0.58	0.81	0.44
	H_o	0.33	0.31	0.02	0.02	0.73	0.71	0.35
	HWE	0.002	0.012	0.002	0.014	0.016	0.21	

注: F_{ST} 为单个位点固定系数; n 为样品个体数; a 为等位基因数; R_s 为每个位点等位基因丰度; as 为等位基因大小范围; H_e 为期望杂合度; H_o 为观测杂合度; HWE 为哈代-温伯格平衡状态的概率值

SS₁(4.55)。平均期望杂合度和观测杂合度以 II₁ 群体最低, 为 0.42 和 0.29; SS₁ 次之, 为 0.44 和 0.35; 而两个杂交子代群体相对较高分别为 IS₁: 0.55 和 0.46 以及 SI₁: 0.54 和 0.52, 杂交子代群体比自繁组合显示出较高的杂合度。

3 讨论

3.1 杂种优势与杂交组合

Cruz 等(1997)对产于墨西哥加利福尼亚湾 Concepcion 群体和太平洋 Megdalana 群体的扇贝的正反交发现, 杂交子代幼虫成活率与母性效应相关, 来自 Megdalana 群体以及用 Megdalana 群体 × Concepcion 群体 杂交子代的幼虫成活率分别高于 Concepcion 群体以及用 Concepcion 群体 × Megdalana 群体 杂交子代的幼虫, 虽然, 自 Megdalana 群体幼虫的生长速度高于 Concepcion 群体幼虫, 但两者正反交子代幼虫的生长并没有表现出杂种优势。但我国学者在不同的经济贝类种群间、品系间或家系间杂交均在生长速度上获得了杂种优势, 但正反交组合的杂种优势程度不一致(常亚青等, 2002; 李太武等, 2002; 刘小林等, 2005; 游伟伟等, 2005; 郑怀平等, 2004; 闫喜武等, 2008; You *et al.*, 2009); 王爱民等(2003)对来自我国广西北海、广东大亚湾和海南三亚的 3 个马氏珠母贝群体间杂交研究发现, 杂交子代仅在各别性状上表现出杂种优势, 大多数性状仍未显示杂种优势。上述研究表明, 亲本的选择和杂交组合方式关系到是否能够获得杂种优势以及获得杂种优势的程度, 这将直接关系到杂交育种是否成功。

作者目前进行的马氏珠母贝育种选择了来自印度洋的印度养殖群体与来自太平洋的我国三亚野生群体进行杂交。印度养殖群体体型大, 具有生长快的优点, 但壳宽系数低, 体略显偏平, 不利插大核, 壳重系数低, 壳薄, 插核时易于破裂; 三亚野生群体的壳宽系数高, 体呈凸形, 利于插大核, 壳重系数高, 生产珍珠的珠层厚, 但缺点是体型小, 生长速度慢(顾志峰等, 2009); 在本研究的 2 × 2 双列式杂交中, 自繁组合子代 II₁ 和 SS₁ 在形态性状上的表现与顾志峰等(2009)对印度养殖群体和三亚野生群体的研究结果是一致的; 杂交子代 SI₁ 和 IS₁ 在杂种优势上的表现不相同, 有两种现象, 一是在两者都表现出杂种优势的性状上, 但两者的杂种优势的程度不同, 如在壳高、壳长、绞合线长和壳重上, SI₁ 的杂种优势大于 IS₁,

而在壳宽和壳宽指数上, IS₁ 的杂种优势较 SI₁ 大; 二是 SI₁ 在总重上表现出杂种优势, 但 IS₁ 未能表现杂种优势, IS₁ 和 SI₁ 在壳重指数上没有表现出杂种优势; 因此, 正反交子代对任何个性状的杂种优势表现形式都有差异的; 从通常确定生长速度的两个指标——壳高和总重来看, 三亚野生群体(SS₀) × 印度养殖群体(II₀) 杂交组合能够提高生长速度; 由于珍珠贝双壳隆起程度关系到产生珍珠的大小, 双壳隆起高的珍珠贝利于插大核生产大粒珍珠, 反之, 只能插小核生产小粒珍珠, 双壳隆起的程度常以壳宽系数表示, 壳宽系数也是珍珠贝遗传育种非常重要的指标之一(Wada, 1986), 从目前的研究结果看, 印度养殖群体(II₀) × 三亚野生群体(SS₀) 杂交组合能够提高壳宽系数。

本研究表明, 印度养殖群体与三亚野生群体间杂交获得了两种不同的结果, 这就需要决定哪种杂交组合及杂交子代作为进一步育种方式及育种对象? 虽然, 三亚野生群体(SS₀) × 印度养殖群体(II₀)

杂交组合子代 SI₁ 在壳宽系数和壳宽系数的杂种优势上不及印度养殖群体(II₀) × 三亚野生群体(SS₀)

杂交组合子代 IS₁, 但 SI₁ 的壳宽系数显著大于 II₁, 说明杂交已经明显地改变了 SI₁ 的壳宽系数; 另外, 在马氏珠母的养殖生产中, 需要两类贝: 一类是育珠母贝, 供插核施术培育珍珠的母贝; 另一类是细胞小片贝, 用于提供外套膜细胞小片。Wada 等(1996)研究发现马氏珠母贝壳重量与其作为细胞小片所产生的珍珠的重量呈正相关。虽然, 杂交子代 SI₁ 和 IS₁ 的壳重指数都没有表现出杂种优势, 但壳重的杂种优势还是显著的, 其中 SI₁ 大于 IS₁; 因此, 综合考虑认为, 三亚野生群体(SS₀) × 印度养殖群体(II₀) 杂交组合应是马氏珠母贝育种方式, 由此建立父系——印度群体(专门化品系)和母系——三亚群体(专门化品系), 构建三亚野生群体(SS₀) × 印度养殖群体(II₀) 杂交配套系, 培育优质经济性状的新品种。

3.2 杂种优势与遗传变异

杂交能够产生杂种优势其根本的原因在于杂交过程将两个或两个以上遗传基础不同的种类、种群或品系的个体的基因自由组合, 出现了新的遗传类型, 杂交子代遗传结构发生了改变(Lippman *et al.*, 2006)。新的 DNA 分子标记, 特别是微卫星(microsatellite), 又称为 SSR(简单序列重复, simple sequence repeats), 由于种类多、多态性位点丰富、遵循孟德尔分离定律、共显性遗传、易于 PCR 扩增和操作方便等优点, 目

前已成为水产遗传分析中发展最快的分子标记(Liu *et al.*, 2004)。微卫星分子标记已被用于水产动物的杂种优势分析上。Bierne 等(2000)研究对虾(*Penaeus stylirostris*)2 个人工孵化种子群体与微卫星连锁的杂种优势(microsatellite-associated heterosis)时发现, 在一个群体内微卫星三位点杂合度与生长率之间呈显著的正相关, 而另一个群体中单个位点的杂合度与生长率之间呈显著正相关。

本研究用 6 个微卫星标记分析马氏珠母贝 2×2 双列杂交 4 个组合子代发现, F_{ST} 平均值为 0.357, 这意味着遗传变异中的 64.3% 是由于个体间差异, 而 35.7% 来自不同的群体之间。若按 F_{ST} 值大于 0.25 时为群体间极大分化的话(Wright, 1951), 4 个组合子代间有较大的遗传差异和较高的分化水平。平均等位基因数(a)、等位基因丰度(R_s)以及基于等位基因频率的杂合度(期望杂合度 H_e 和观察杂合度 H_o)是表示群体遗传多样性和遗传分化常用的指标。在 2×2 双列式杂交 4 个组合子代中, 无论是平均等位基因数和等位基因丰度, 还是期望杂合度和观察杂合度, 杂交子代高于自繁子代; 说明杂交改变了子代的基因组合, 增加了基因杂合性和遗传多样性, 改变了不同位点上的基因互作。这种现象与用 RAPD(随机扩增多态性 DNA, Random amplified polymorphic DNA)分析皱纹盘鲍地理群体间杂交子代(万俊芬等, 2001; 张国范等, 2002)和用 ISSR(简单序列重复区间, Inter-Simple Sequence Repeats)分析马氏珠母贝地理群体间杂交子代(吕林兰等, 2008)遗传多样性增加的结果是一致的。根据杂种优势的显性学说, 当基因型和环境之间达到一种相互协调的平衡时, 基因的杂合性能够提高机体的生活力、繁殖力和生长速度等性状。本研究中马氏珠母贝杂交获得的杂种优势与基因的杂合度和遗传多样性增加直接相关, 也为作者选择三亚野生群体(SS₀) \times 印度养殖群体(II₀) 杂交组合作为马氏珠母贝育种方式提供了分子遗传学的理论支持。

Shikano 等(2002a)运用微卫星标记对模式动物——青鳉(*Poecilia reticulata*) 17 个群体(包括 11 个家养品系)研究抗盐度能力(在盐度为 35 海水中的存活时间)与平均杂合度之间关系发现, 其耐盐力(salinity tolerance)与平均杂合度存在强的正相关($r^2 = 0.650$), Shikano 等(2002b)用实验室的 4 个品系近交及品系间正反交研究青鳉的抗盐力, 发现耐盐力的杂种优势与用微卫星标记分析的亲本品系间的 Nei's 遗传距离呈正相关, 说明杂种优势依赖于杂交品系间遗传多

样性水平。但值得注意的是, 利用遗传标记预测和分析贝类杂种优势会出现一些偏差, 这是因为, 首先, 如果杂交亲本往往未经选育, 基因型混杂和不纯, 虽然杂交子代的分子遗传多样性增加, 但并不能表现出杂种优势(吕林兰等, 2008); 其次, 分子遗传标记多为中性的, 不受环境影响, 而杂交试验则受环境影响, 从而导致经济性状的杂种优势与遗传多样性的不相关; 再次, 贝类是遗传多样性较高, 平均杂合度大多在 0.15 以上, 即使在一个人工群体内部个体间的遗传多样性也很高(孙博等, 2003), 而所使用的分子标记无论如何也无法覆盖一个种类的整个基因组; 最后, 贝类的微卫星位点通常存在无效等位基因(null allele), 会在一定程度上影响遗传多样性分析结果, 如在本研究中, 4 个组合子代中的平均期望杂合度(H_e)均高于其平均观测值(H_o), 说明 4 个组合子代中杂合子缺失的状况是普遍存在的。Hedgecock 等(2004)提出, 贝类因微卫星位点杂合体缺失而导致偏离 HWE 的现象普遍存在, 主要原因是微卫星位点的无效等位基因所致, 只有选择不含无效等位基因的微卫星标记才能更有效地分析遗传多样性。

总之, 依据亲本间杂合度和遗传距离来预测杂种优势和依据杂交子代遗传多样性来分析杂种优势是可行的, 但由于杂合度和杂种优势的相关性受多种因素制约, 因此, 在实验设计和结果分析时要充分考虑经济性状和分子标记的选择以及遗传效应和环境效应相互作用。

参 考 文 献

- 万俊芬, 汪小龙, 潘 洁等, 2001. 日本盘鲍 \times 皱纹盘鲍子代杂种优势的 RAPD 分析. 青岛海洋大学学报, 31(4): 506—512
- 王爱民, 阎 冰, 叶 力等, 2003. 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, 27: 200—206
- 吕林兰, 杜晓东, 王 嫣等, 2008. 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. 水生生物学报, 32: 26—31
- 刘小林, 常亚青, 相建海等, 2005. 栉孔扇贝不同种群杂交效果的研究. 中国种群与俄罗斯种群及其杂种 F_1 中期生长发育. 海洋学报, 27: 135—140
- 闫喜武, 张跃环, 霍忠明等, 2008. 不同壳色菲律宾蛤仔品系间的双列杂交. 水产学报, 32: 864—875
- 孙 博, 刘 晓, 张国范等, 2003. 一个皱纹盘鲍人工群体内个体大小遗传变异的 RAPD 分析. 海洋科学, 27(5): 27—30
- 杜晓东, 李广丽, 刘志刚等, 2002. 合浦珠母贝 2 个野生种群

- 的遗传多样性. 中国水产科学, 9: 100—105
- 李太武, 孙修勤, 刘 艳等, 2002. 中日栉孔扇贝杂交子一代群体的遗传变异. 高技术通讯, 12(6): 101—105
- 张国范, 王继红, 赵洪恩等, 2002. 皱纹盘鲍中国群体和日本群体的自交与杂交 F_1 的 RAPD 标记. 海洋与湖沼, 33: 484—491
- 郑怀平, 张国范, 刘 晓等, 2004. 海湾扇贝杂交家系与自交家系生长和存活比较. 水产学报, 28: 267—272
- 侯战辉, 王 嫣, 石耀华等, 2008. 马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 2 个不同地理种群遗传变异的 EST-SSR 分析. 海洋与湖沼, 39: 174—181
- 顾志峰, 王 嫣, 石耀华等, 2009. 马氏珠母贝 2 个不同地理种群的形态性状和贝壳珍珠质颜色比较分析. 渔业科学进展, 30: 79—86
- 常亚青, 刘小林, 相建海等, 2002. 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, 26: 385—390
- 游伟伟, 柯才焕, 蔡明夷等, 2005. 杂色鲍日本群体与台湾群体杂交的初步研究. 厦门大学学报(自然科学版), 44: 701—705
- Bierne N, Beuzart I, Vonau V *et al*, 2000. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. Aquaculture, 184: 203—219
- Cruz P, Ramirez J L, Garcia G A *et al*, 1998. Genetic differences between two populations of Catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) for adaptations for growth and survival in a stressful environment. Aquaculture, 166: 321—335
- Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin ver.3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 1: 47—50
- Hedgecock D, Davis J P, 2007. Heterosis for yield and crossbreeding of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Aquaculture, 272(S1): 1—14
- Hedgecock D, Li G, Hubert S *et al*, 2004. Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Journal of Shellfish Research, 23: 379—385
- Hedgecock D, McGoldrick D J, Bayne B L, 1995. Hybrid vigor in Pacific oysters: an experimental approach using crosses among inbred lines. Aquaculture, 137: 285—298
- Lippman Z B, Zamir D, 2006. Heterosis: revisiting the magic. Trends in Genetics, 23: 60—66
- Liu Z J, Cordes J F, 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture, 238: 1—37
- Pace D A, Marsh A G, Leong P K *et al*, 2006. Physiological bases of genetically determined variation in growth of marine invertebrate larvae: A study of growth heterosis in the bivalve *Crassostrea gigas*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 335: 188—209
- Raymond M, Rousset F, 2003. Genepop 3.4, an updated version of Genepop V.1.2 (1995): population genetics software for exact tests and ecumenicism. J Heredity, 86: 248—249
- Shi Y H, Wang Y, Hong K *et al*, 2009. Characterization of 31 EST-derived microsatellite markers for the pearl oyster *Pinctada martensii* (Dunker). Molecular Ecology Resources, 9: 177—179
- Shikano T, Taniguchi N, 2002a. Relationships between genetic variation measured by microsatellite DNA markers and a fitness-related trait in the guppy (*Poecilia reticulata*). Aquaculture, 209: 77—90
- Shikano T, Taniguchi N, 2002b. Using microsatellite and RAPD markers to estimate the amount of heterosis in various strain combinations in the guppy (*Poecilia reticulata*) as a fish model. Aquaculture, 204: 271—281
- Tave D, 1993. Genetics for fish hatchery managers, 2nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York, USA, 212—213
- Wada K T, 1984. Breeding study of the pearl oyster, *Pinctada fucata*. Bull Natl Res Inst Aquacult, 6: 79—157
- Wada K T, 1986. Genetic selection for shell traits in the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. Aquaculture, 57: 171—176
- Wada K T, Komaru A, 1991. Estimation of genetic variation in shell traits of the Japanese pearl oyster. Bull Natl Res Inst Aquacult, 20: 19—24
- Wada K T, Komaru A, 1996. Color and weight of pearls produced by grafting the mantle tissue from a selected population for white shell color of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* (Dunker). Aquaculture, 142: 25—32
- Wright S, 1951. The genetic structure of populations. Ann Eugen, 15: 323—354
- You W W, Ke C H, Luo X *et al*, 2009. Growth and survival of three small abalone *Haliotis diversicolor* populations and their reciprocal crosses. Aquaculture Research, 40: 1474—1480

HETEROSIS AND GENETIC VARIATION OF HYBRIDS FROM TWO GEOGRAPHICAL POPULATIONS OF PEARL OYSTER, *PINCTADA MARTENSII*

WANG Ai-Min^{1,2}, WANG Yan², GU Zhi-Feng², LI Ming², SHI Yao-Hua², LI Si-Fa¹

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquaculture Ecosystem, Ministry of Agriculture, Shanghai, 201306; 2. The Ocean College, Hainan University, Key Laboratory of Tropic Biological Resources, Ministry of Education, Hainan Key Laboratory of Tropical Hydrobiological Technology, Haikou, 570228)

Abstract A 2×2 complete diallel cross between two populations of pearl oyster, *Pinctada martensii*, from Indian (II_0) and Chinese Sanya (SS_0) was carried out and four groups of offspring, II_1 ($II_0 \times II_0$), IS_1 ($II_0 \times SS_0$), SI_1 ($SS_0 \times II_0$), and SS_1 ($SS_0 \times SS_0$), were produced. Hybrid IS_1 and SI_1 showed heterosis in shell height (SH), shell length (SL), hinge length (HL), shell width (SW), and shell weight (SWT). IS_1 had heterosis in shell width index (SWI), but not in total weight (TW) and shell weight index ($SWTI$), while SI_1 had heterosis in total weight and shell width index, but not in shell weight index. SI_1 exhibited significantly larger heterosis in SH , SL , HL , and TW than IS_1 ($P < 0.01$), but significantly smaller in SW ($P < 0.01$). Six selected microsatellite markers were used to analyze four lines of progeny. The results reveal that the F_{ST} was 0.375 and the average numbers of alleles were in the order of $SI_1(6.17) > IS_1(6.00) > II_1(5.00) > SS_1(4.67)$; the average allelic richness per locus was $SI_1(5.34) > IS_1(5.04) > II_1(4.47) > SS_1(4.55)$; the average expected heterozygosities (H_e) were $IS_1(0.55) > SI_1(0.54) > SS_1(0.44) > II_1(0.42)$; and the observed heterozygosities (H_o) were $SI_1(0.52) > IS_1(0.46) > SS_1(0.35) > II_1(0.29)$, indicating that the cross increased heterozygosity and genetic diversity, and directly brought about heterosis. As a whole, the cross between female Sanya wild population and male Indian cultured population promised more potential for pearl oyster breeding scheme, or POBs.

Key words *Pinctada martensii*, Geographical population, Heterosis, Genetic variation, Microsatellites