

海湾扇贝自交家系的建立和自交效应

张国范¹, 刘述锡^{1,2}, 刘晓¹, 郭希明^{1,3}, 张福绥¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 大连水产学院, 辽宁 大连 116023;
3. Haskin Shellfish Research Laboratory, Rutgers University, NJ 08349 USA)

摘要:以1992年12月从加拿大引种到中国、以群体交配的方式在中国繁养了7代的海湾扇贝(*Argopecten irradians*)为材料,随机选取15个性腺发育成熟的个体,分为A、B、C3组,分别通过自体受精建立15个自交家系,每组设各自混群对照。结果表明,海湾扇贝自体交配家系的受精率较高,并与对照组相近;但孵化率变化较大,15个自交系的孵化率变化范围为1.35%~68.23%,平均为31.44%。自交家系F₁面盘幼虫的生长速率明显低于对照组,附着变态时间也迟于对照。在15个自交家系中有14个获得成体子代,共1311个个体,但各家系间差异很大,从13个到186个不等。自交家系子代个体可以发育到性成熟并可繁殖F₂,证明通过自交培育海湾扇贝家系在技术上可行。方差分析表明,除A组自交家系体重与其对照差异不显著($P \geq 0.05$)外,其余绝大多数自交家系和对照组相比,在壳长、壳高和体重方面的差异显著($P \leq 0.05$)或极显著($P \leq 0.01$)。本研究还表明,海湾扇贝的自交可导致自交衰退,表现为发育迟缓和个体小型化。在面盘幼虫阶段自交衰退率为25.9%,成体阶段平均为12.7%。

关键词:海湾扇贝;自交家系;自交衰退

中图分类号:S961.2

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2003)06-0441-05

海湾扇贝(*Argopecten irradians*)已经成为我国海水养殖的支柱产业^[1-2]。但中国海湾扇贝养殖群体本质上依然是野生家养型贝类,在其养殖过程中存在着一些困扰产业发展的问題,如幼虫面盘解体、局部异常死亡、生长速率缓慢等^[3]。对其遗传改良,培育抗逆、高产、优质的新品种是解决这些问題的重要途径。

选择育种是新品种培育的有效方法,已经在动植物的育种中取得广泛的成功。其中,建立家系并进行系统选择是选择育种的重要手段^[4]。利用群体定向选择技术对贝类经济数量性状进行改良已有成功的报道,Newkirk等^[5]对2龄欧洲牡蛎(*Ostrea edulis*)体重进行个体选择,第1代的选择效应平均比对照组增加23%;Haley等^[6]对美洲牡蛎(*Cras-*

ostrea virginica)生长速率所做的选择工作表明,对于3~4龄个体进行选择比在2龄个体上选择更有效;Haskin等^[7]对美洲牡蛎进行连续四代的抗单孢子虫病(MSX)选择,使其抗病能力比野生群体提高了8~9倍;Beattie等^[8]对长牡蛎(*Crassostrea gigas*)抗夏季死亡的亲本进行选择,建立了7个全同胞家系,其中几个家系的耐高温能力明显提高。

通过自交建立家系可大大加快基因纯化的速率,加快育种进程。Ibarra等^[9]对扇贝(*Argopecten circularis*)的自交进行过初步尝试,研究了幼虫的生长和存活等过程。但到目前为止,还很少见到有关通过自交建立贝类家系的研究报道。

海湾扇贝是雌、雄同体型贝类,既可行异体受精,也可行自体受精,有可能通过自体受精建立自交家系,以进行遗传学和育种学研究。本研究以从加拿大引种到中国,并且已在中国群繁了7代的海湾扇贝为材料,探讨通过自交建立自交家系的可能性及其自交的生物学效应。

收稿日期:2003-04-29; **修订日期:**2003-07-28.

基金项目:中国科学院知识创新工程方向性项目(ZKXC2-211);国家杰出青年基金项目(39825121);中国科学院知识创新前沿领域项目。

作者简介:张国范(1954-),男,博士,研究员,博士生导师,从事海洋贝类遗传学与育种学研究. E-mail: gkzhang@ms.qdio.ac.cn

1 材料和方法

1.1 种贝的选择

实验所用海湾扇贝系1992年12月从加拿大引入中国,以群体交配的方式在中国繁殖的第7代。2000年3月亲贝在大连水产学院海养楼进行升温促熟,选择性腺发育成熟的个体备用。实验分A、B、C 3组,每组有5个自交家系,1个混群对照(脚注为0者是混群对照,其余为自交家系)。

1.2 人工催产、受精和孵化

海湾扇贝的催产和培育操作均按张福绥等^[1]进行,阴干1 h后,每个亲本单独置于1个洁净的10 L聚乙烯桶中,加入经紫外线消毒的23℃砂滤海水;同时选取20个以上的亲贝在60 L聚乙烯桶中进行群体催产作为混群对照。单独催产的亲贝如先排精,可随时弃去精液后再加入新鲜海水以降低水体中的精子密度。待精、卵数量合适后,搅动海水,使精、卵充分混匀,用500目筛绢洗卵后,转入干净的10 L聚乙烯桶中,按30~50粒/mL的密度进行孵化。孵化过程中,适时轻搅孵化水体。操作过程中严格注意隔离,使各家系不受外源精、卵和幼虫的污染。

1.3 幼虫培育

受精后经过20~22 h,胚胎发育到面盘幼虫,开始主要投喂等鞭金藻(*Isochrysis galbana*),后期加投三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*),培育水温控制在17~21℃,日投饵量以幼虫胃部饱满为度,日全量换水1次。培育过程中严格注意保持各组间的隔离,所用器具使用前均经淡水彻底浸泡,操作中避免各组间相互交叉污染。尽可能调整培育密度一致。

1.4 采苗、稚贝培育、中间育成及养成

待10%幼虫出现眼点时,投放经青霉素预处理的棕绳附着基,适量增加投饵。2000年5月3日,自交组和对照组稚贝出海暂养,挂养在大连傅家庄海区。暂养采用40目的40 cm×30 cm网袋。将附着稚贝的棕绳连同防海水腐蚀的标签装入网袋中。1根吊绳上缚15只网袋,采取平挂方式,水深1.0~1.5 m。稚贝壳长到5 mm左右时,更换大网目的网袋。每周洗刷网袋1次,防止网眼堵塞。当贝苗达到1 cm时,装入暂养笼(网眼0.5 cm)中。贝苗达到2 cm时,移到养成笼(网眼1.5~2.0 cm)中,每层装30~40粒,养殖水深2~3 m,经常洗刷网笼,

清除淤泥和附着生物。同年11月20日,该批试验材料由大连移到青岛薛家岛越冬。

1.5 自交后代的生长和发育

各试验组定期抽样测量受精率、孵化率、面盘幼虫生长和附着变态时间等。养成阶段从各自交组和对照组随机取10~20个个体,测量壳长、壳高和全湿重等。A₂测量全部13个个体。

1.6 自交衰退率(self-fertilization depression)

自交衰退率(SFD)以混群(MP)和自交家系(AF)的壳长和壳高测量值为生长速率的计算依据,即:

$$SFD = \frac{MP - AF}{AF} \times 100\%$$

2 结果

2.1 海湾扇贝自交系的受精率与孵化率

实验分3次进行,共建立15个自交系及作为各批次对照的3个混群。分别测定受精率和孵化率(表1)。由表1可见,各自交组和对照组受精率都较高,为88.18%~99.99%,在不同的自交系间及其与混群间的受精率没有明显的差别。但孵化率变化较大,15个自交系的孵化率为1.35%~68.23%,平均为31.44%,但3个对照组的孵化率却相对稳定,为56.76%~75.00%,平均为68.53%。这表明自交的孵化率在不同亲本之间存在较大的差异,而且自交F₁家系的孵化率普遍低于混群。

表1 海湾扇贝不同自交系与对照组的受精率和孵化率
Table 1 Fertilization rate and hatching rate of self-fertilized *Argopecten irradians*

家系 Family	受精率/% Fertilization rate	孵化率/% Hatching rate
A ₁	97.48	1.35
A ₂	97.92	2.88
A ₃	97.44	20.74
A ₄	99.65	3.54
A ₅	99.75	16.69
A ₀	89.29	75.00
B ₁	98.32	43.21
B ₂	97.74	38.75
B ₃	99.99	47.06
B ₄	99.99	23.21
B ₅	98.78	60.76
B ₀	88.18	56.76
C ₁	99.98	41.47
C ₂	99.99	68.23
C ₃	97.11	40.46
C ₄	98.87	31.64
C ₅	98.28	27.03
C ₀	99.23	73.83

2.2 海湾扇贝自交家系面盘幼虫的生长

选取 $C_1 \sim C_5$ 5 个自交家系和混群对照 C_0 , 从选育后第 1 天开始, 每 5 d 对面盘幼虫分别测量壳长、壳高(表 2)。对照组经过 11 d 培育, 面盘幼虫壳长已达 $178.3 \mu\text{m}$, 然而经过 16 d 的培养, 5 个自交系

的面盘幼虫壳长才达到 $166 \sim 173 \mu\text{m}$, 表明自交子代的面盘幼虫生长速率较混群对照组显著减慢。面盘幼虫阶段的壳长自交衰退率为 27.3%, 壳高为 24.4%, 平均为 25.9%(表 2)。

表 2 海湾扇贝不同自交系与对照组的面盘幼虫生长均值

培育天数 Rearing days	C_1		C_2		C_3		C_4		C_5		C_0	
	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L
1	73.4	91.0	73.0	92.0	73.4	91.8	72.2	91.0	72.6	91.2	73.4	92.0
6	91.8	110.2	93.1	112.4	91.8	109.0	92.0	110.6	92.8	111.2	133.5	140.8
11	130.0	139.0	133.2	141.4	133.6	141.8	131.2	140.2	129.8	137.8	163.6	178.3
16	154.2	165.6	160.2	171.6	161.2	172.2	159.6	171.6	161.2	172.6	稚贝 Larvae	

注: H - 壳高; L - 壳长

Note: H - Shell height; L - Shell length

2.3 海湾扇贝不同自交家系的 F_1 存活数及壳长、壳高和体重

2000 年 11 月 20 ~ 22 日转入越冬培育前, 统计成体阶段各家系的存活数和个体平均壳长、壳高和体重(表 3)。由表 3 可见, 至成体阶段, 除 C_1 外, 其他自交家系都获得了数量不等的自交子代, 获得 100 个子代个体以上的家系有 3 个, 即 A_3 、 B_3 和 B_5 , 表明通过自交培育海湾扇贝家系在技术上具有可行性。

将各批次实验组与其对照组进行比较, 可以看出自交家系和混群在壳长、壳高方面都具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。在体重方面 A 组自交系与对照不具显著性差异 ($P > 0.05$), C 组具有显著性差异 ($P < 0.05$), 而 B 组具有极显著性差异 ($P < 0.01$), 同一家系的子代个体间的生长速率也有较大的差异。养成阶段壳长、壳高自交衰退率分别为 13.5% 和 11.9%, 平均为 12.7%(表 3)。

2.4 自交系面盘幼虫的附着变态时间

海湾扇贝自交组与对照组面盘幼虫自受精到附着变态时间间隔相差较大(表 4)。对照组自受精到附着变态需 11 d, 自交 F_1 需 16 d, 而 F_2 需要时间更长。

2.5 自交系 F_2 的繁殖

同样采用自交的策略, 将 A_3 家系的 2 个 F_1 个体进行促熟、催产并继续自体受精建立 F_2 自交系, 结果其中的 1 个 F_1 个体排放精子和卵子, 从自体受精到附着变态经历了 21 d(表 4)。

表 3 各自交家系 F_1 的成活数量、壳长、壳高和体重

Table 3 Progeny number, shell length, shell height and total wet weight of self-fertilization family in *Argopecten irradians*

家系 Family	家系子代数量/个 Progeny number	壳长/mm Shell length	壳高/mm Shell height	体重/g Total wet weight
A_1	27	36.1 ± 10.6	35.3 ± 9.8	12.77 ± 11.32
A_2	13	42.6 ± 8.2	42.3 ± 8.0	15.89 ± 5.75
A_3	181	38.9 ± 4.5	37.7 ± 4.1	12.44 ± 3.65
A_4	28	39.5 ± 6.6	38.3 ± 5.8	14.18 ± 5.76
A_5	51	38.7 ± 3.3	36.2 ± 3.2	11.11 ± 2.19
A_0	43	43.7 ± 3.0	42.1 ± 3.1	14.95 ± 2.66
SFD _A	/	10.4%	10.9%	/
B_1	37	39.3 ± 4.9	38.0 ± 5.0	13.03 ± 5.34
B_2	61	39.8 ± 3.9	37.6 ± 3.5	12.44 ± 3.16
B_3	142	39.5 ± 5.5	37.2 ± 4.4	11.24 ± 4.86
B_4	98	39.2 ± 6.7	38.2 ± 6.1	11.87 ± 5.02
B_5	186	37.0 ± 4.3	34.7 ± 4.0	9.97 ± 3.40
B_0	64	46.1 ± 3.2	42.7 ± 2.7	20.27 ± 2.96
SFD _B	/	18.3%	15.0%	/
C_1	0	/	/	/
C_2	86	43.8 ± 3.5	41.4 ± 2.5	17.03 ± 3.04
C_3	48	37.9 ± 5.2	36.9 ± 5.2	13.66 ± 5.30
C_4	66	42.7 ± 5.5	40.9 ± 5.2	15.36 ± 5.53
C_5	74	41.4 ± 5.0	39.3 ± 4.4	14.40 ± 4.84
C_0	106	46.3 ± 4.4	43.5 ± 4.1	18.56 ± 5.12
SFD _C	/	11.7%	9.8%	/

注: SFD_A、SFD_B、SFD_C 分别为 A、B、C 组壳高自交衰退率和壳长自交衰退率。

Note: SFD_A, SFD_B, SFD_C refer to self-fertilization depression of shell length and shell height.

2.6 壳颜色的分离

2000 年建立的自交家系经过近 6 个月的海上

养殖,到11月20日统计数据时,发现个别家系发生壳色分离现象。 B_2 家系的亲本一侧为黑色,另一侧为花褐色,通过其自交获得61个 F_1 成体,其中20个个体为暗红壳色,41个为黑壳色。

表4 海湾扇贝自交系的幼虫附着变态时间(培育水温17~22℃,盐度31)

Table 4 Metamorphosis time of larval settling of self-fertilization family in *Argopecten irradians* (water temperature 17~22℃, Salinity 31)

分组 Group	受精日期 Fertilized date	附着变态日期 Metamorphosis date	时间间隔/d Interval
Control	28 Mar. 2000	7 Jul. 2000	11
F_1	28 Mar. 2000	13 Apr. 2000	16
F_2	1 Jun. 2001	21 Jun. 2001	21

3 讨论

海湾扇贝自交系和对照组都表现出较高的受精率,表明海湾扇贝自体受精不存在显著的障碍。但孵化率的情况却显然不同,在本研究中所统计的3个组共15个自交家系中出现了较大幅度的变化。同期3个批次混群对照组(A_0 、 B_0 、 C_0)的孵化率相对较稳定,自交家系孵化率大幅度变动的主要原因之一,可能是由于不同家系的亲本个体间的遗传背景存在差异。自交家系的孵化率普遍低于对照,表明海湾扇贝的交配方式对孵化率有显著的影响,自交导致了孵化率降低。自交家系的面盘幼虫生长速率也显著低于对照组、幼虫的附着变态时间较对照组显著推迟,表明自交导致海湾扇贝的幼虫发育过程出现延迟。至成体阶段统计,各自交家系的 F_1 个体在生长方面出现了一定的抑制,表现出自交个体的小型化趋势。Beaumont^[10]研究表明,自交效应只显著地影响大扇贝(*Pecten maximus*)的幼虫生长,对幼虫成活率影响不显著。本研究结果显示,自交效应显著影响海湾扇贝的幼虫生长,虽然本次实验没有统计成活率,但就整个实验过程来看,不论担轮幼虫阶段还是面盘幼虫阶段,自交组死亡率均明显高于对照组,尤其在变态期间表现更为明显。自交组面盘幼虫生长相对于对照组表现出一定的衰退趋势。Ibarra^[9]对扇贝(*Argopecten circularis*)自交幼虫生长研究指出,对比群体幼虫和一对一杂交幼虫,自交幼虫在18日龄时分别衰退12.4%和11.2%,并指出这种自交作用引起的生长衰退将在日后的生长过程中更明显。本次实验得到的数据显示海湾扇贝

自交面盘幼虫对比混群面盘幼虫在11日龄时生长衰退25.9%。Mallet等^[11]报道美洲牡蛎的幼虫大小在自交组和对照组之间差异不显著。可见在不同贝类之间,由于遗传背景和繁殖方式等的差异,自交效应的表现不尽相同。

到成体阶段统计,除 C_1 没有获得自交后代外,其他自交家系都获得了一定数量的子代,表明通过自交培育海湾扇贝家系具有可行性;并且自交家系培育的成功率在一定程度上受亲本基因型的影响。以 A_3 家系的 F_1 个体为亲本继续自交建立的 F_2 自交家系,可发育到眼点幼虫阶段,表明自交家系的 F_1 个体可达到性成熟并排放有活力的精卵;但是, F_2 自交家系的面盘幼虫从选育到附着变态经历了21 d,表明自交 F_2 幼虫在面盘幼虫阶段的发育障碍较自交 F_1 更严重,换言之,在海湾扇贝进行2代以上的连续自交可能因为基因纯合速率过快而导致家系全体成员的死亡。但这可能与各个体间遗传背景的不同而有异。上述结果说明如海湾扇贝等未经过人工品系化培育的雌雄同体型动物的基因纯化速率值得进一步深入研究。

在成体阶段,各家系内不同个体间在壳长方面表现出较对照组更大的离差,表明同一家系子代个体间在生长速率方面出现较大的分化,该现象可能是部分与生长相关的基因出现纯合的结果。这表明通过家系选择对于目标基因的纯化可能更为有利。此外,本研究培育的15个自交系中,获子代最多的2个自交家系 A_3 和 B_5 ,其 F_1 成体数达到180余个。这些自交家系在海湾扇贝育种和遗传图谱构建等研究方面具有潜在的应用价值。

本研究明确表明,海湾扇贝的自交可以导致自交衰退,其表现是个体发育迟缓 and 小型化。在面盘幼虫阶段,自交衰退率为25.9%,但到了成体阶段平均为12.7%。这种变化的原因尚不清楚。但总体来说壳长的自交衰退率大于壳高。本研究没有采用全湿重来评价自交衰退,主要是因为全湿重对即时环境变化敏感,稳定性差。本实验中 F_1 和 F_2 子代的附着变态都表现出延迟的现象,这反应出自交的生物学效应,但采用不同遗传背景的实验材料,在不同的实验温度等条件下,这一延迟的时间长短可能有差异。本研究采用的实验温度较低,可能强化了附着变态延迟的生物学效应。

致谢:在实验中得到中国科学院海洋研究所的闾华勇博士、

大连水产学院的尹文新同学的帮助,在此一并致谢。

参考文献:

- [1] 张福绥,何义朝,刘祥生,等. 海湾扇贝引种、育苗及试养[J]. 海洋与湖沼, 1986, 17(5): 367-373.
- [2] 张福绥. 海湾扇贝引进中国十周年[J]. 齐鲁渔业, 1993, 48(5): 9-12.
- [3] 张国范,李震,薛真福. 我国贝类大规模死亡的现状[J]. 中国水产, 1999, 9: 34-39.
- [4] 沈俊宝,刘明华. 鱼类育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999. 10-39.
- [5] Newkirk G F. Selection for growth rate in European oyster, *Ostrea edulis*; response of second generation groups[J]. Aqu, 1983, 33: 149-155.
- [6] Haley L E, Newkirk G F. Selecting oysters for faster growth[J]. Proc World Maricul Soce, 1977, 8: 557-565.
- [7] Haskin H H, Ford S E. Development of resistance to *Minchinia nelsoni* (MSX) mortality in laboratory-reared and native oyster stocks in Delaware Bay[J]. Mar Fish Rev, 1978, 41(1-2): 54-63.
- [8] Beatie J H, Hershberger W K, Chew K K, et al. Breeding for resistance to summertime mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [M]. WSG; Washington Sea Grant Rep, 1978. 780-813.
- [9] Ibarra A, Cruz P, Romero B A. Effects of inbreeding on growth and survival of self-fertilized catarina scallop larvae, *Argopecten circularis* [J]. Aqu, 1995, 134: 37-47.
- [10] Beaumont A R. Genetic aspects of hatchery rearing of the scallop, *Pecten maximus* (L.) [J]. Aqu, 1986, 57: 99-110.
- [11] Maillet A L, Haley L E. Effects of inbreeding on larvae and spat performance in the American oyster [J]. Aqu, 1983, 33: 229-235.

Self-fertilization family establishment and its depression in bay scallop *Argopecten irradians*

ZHANG Guo-fan¹, LIU Shu-xi^{1,2}, LIU Xiao¹, GUO Xi-ming^{1,3}, ZHANG Fu-sui¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China; 3. Rutgers University, NJ 08349 USA)

Abstract: The bay scallop *Argopecten irradians* in this experiment was the F₁ offspring of the scallop introduced from Canada in 1992. Fifteen adults were divided into three groups, each with five individuals. Each group was randomly selected to establish self-fertilization family (SFF), and each group had its control reproduced by mixed crossing of more than 20 individuals. The fertilization rates in all groups are high and close to those in controls, however, in SFF groups, the hatching rate varied from 1.35% to 68.23%, which was less than that in controls (56.76% to 75.00%). The growth rate of body weight and shell length in SFF were obviously lower and the settlement was delayed five days in F₁ and ten days in F₂ than those in controls. Fourteen families in all SFF groups obtained their offspring from 13 to 186 individuals in each family, which grew to adult and could produce F₂. The conclusion is that self-fertilization may be used for the rapid establishment of inbred line and purification of useful alleles. The analysis of variance showed that most of SFF had a significant difference ($P \leq 0.05$) in shell length, shell height and total wet weight (TWW) with their group controls, but TWW in group A ($P \geq 0.05$). The experiment proves that self-fertilization will lead to self-fertilization depression (SFD) involved in developmental delay and miniaturization. The SFD in veliger was 25.9% and 12.7% in adult. To investigate the effects of self-fertilization, shell length, shell height and body weight were compared between SFF and control and the results showed that there was a significant difference ($P < 0.05$).

Key words: *Argopecten irradians*; self-fertilization family (SFF); self-fertilization depression (SFD)