

双列杂交法分析2个大菱鲆养殖群体的杂交效果

季士治^{1,2}, 雷霖霖², 王伟继², 孔杰²

(1. 中国海洋大学 生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:采用完全双列杂交法对2个大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)养殖群体:西班牙群体(S)和英国群体(E)进行群体间杂交及群体内自繁,得到了S(♂)×S(♀)、E(♂)×E(♀)、S(♂)×E(♀)和E(♂)×S(♀)4个组合的子一代。对各交配组合的受精率、孵化率、畸形率、30日龄和70日龄稚鱼的体长、体质量等指标进行比较,结果表明,杂交组与自繁组在受精率、孵化率及畸形率等方面均不存在显著性差异;但杂交组30日龄稚鱼和70日龄稚鱼的体长、体质量与自繁组相比,表现出不同程度的杂种优势,其中S(♂)×E(♀)组30日龄稚鱼的体长杂种优势达到5.43%,E(♂)×S(♀)组70日龄稚鱼体质量杂种优势达到25.00%。实验初步显示,不同养殖群体间的杂交有可能是大菱鲆遗传改良的一条有效途径。[中国水产科学,2006,13(6):1 001-1 005]

关键词:大菱鲆;双列杂交;杂种优势

中图分类号:Q321.6

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2006)06-1001-05

大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)原产欧洲北海、波罗的海和地中海沿岸,隶属于鲽形目(Pleuronectiformes),鲽亚目(Pleuronectoidei),鲽科(Bothidae),菱鲽属(*Scophthalmus*)^[1-2]。自1992年引进中国以来,大菱鲆已发展成为中国北方沿海一种重要的养殖鱼类^[3]。但国内的养殖群体,由于种质来源单一,近交退化现象明显^[4-5],表现在养殖群体的孵化率、成活率降低,生长速度减慢,死亡率增高等问题日显突出。大菱鲆养殖产业正面临严峻考验,当务之急是要对其进行遗传改良,以确保该种养殖获得可持续发展。

目前,已有不少关于鱼类种内杂交育种的研究报道^[6],如虹鳟(*Salmo gairdneri*)^[7]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[8-9]、野鲮(*Labeo rohita*)^[10]、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[11]等。研究表明,大部分杂交组合后代的生长性能和抗逆性都较自交组合后代有不同程度的提高。但迄今为止,尚未见有大菱鲆不同养殖群体间进行杂交方面的研究报道。

本实验对2个大菱鲆养殖群体采用完全双列杂交法进行群体内自繁和群体间杂交,研究子一代的发育和幼体生长情况,分析其杂交效果,以期为大菱鲆的杂种优势利用和长远育种规划提供理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 亲鱼来源

实验鱼取自山东海阳黄海水产公司蓄养的亲鱼。2个亲鱼群体的初始进口苗种分别来自西班牙(S)和英国(E)。挑选发育良好、性腺成熟的个体作为本实验的亲本。

1.2 实验方法

按照完全双列杂交法^[12]对S群体和E群体进行群体间杂交和群体内自繁,得到如下4个组合:

杂交实验组:S(♂)×E(♀)(正交);E(♂)×S(♀)(反交);

自繁对照组:S(♂)×S(♀);E(♂)×E(♀)。

1.3 人工授精和受精卵孵化

参照 Suquet 等^[13]的方法进行人工授精。从S和E 2个亲鱼群体中各挑选8尾发育良好、性腺成熟的雌雄亲鱼,实验用2群体雌雄亲鱼的体长、体质量均不存在显著性差异。将挑选好的亲鱼平置于润湿的海绵上,用湿毛巾盖住头部,将生殖孔处擦干,然后沿生殖孔口方向轻轻挤压腹部获得精液或卵子。分别将每个群体8尾雄鱼的精液和8尾雌鱼的卵子收集于不同的烧杯中,然后按照实验组合分别进行人工授精。具体方法是:将适量精液加入盛有

收稿日期:2006-03-21; 修订日期:2006-05-24。

基金项目:国家“863”高技术研究发展计划项目(2004AA603330)。

作者简介:季士治(1977-),男,硕士研究生,主要从事动物遗传育种与分子生物学研究。E-mail: jishizhi@gmail.com

通讯作者:孔杰。Tel:0532-85823291; E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

卵子的烧杯中,立即加入适量海水均匀搅动约1 min,进行人工授精。静置15 min后,卵子在烧杯中自动分为2层,上浮的为受精卵,下沉的为未受精卵或坏卵。只收集上浮卵,用新鲜海水冲洗3次,然后按照每个组合3个平行,分别取1 g受精卵(约1 200粒)放入微充气的2 000 mL烧杯(内盛1 600 mL洁净海水)中,控制在15℃恒温下孵化。孵化过程中定时吸出下沉的死卵,每天换水1次,每次换水1/2。

受精约3 h后,胚胎发育至4细胞期的正常胚胎统计为受精卵。用受精卵数除以上浮卵数,乘以100%,记作受精率^[13]。受精约96 h后,正常胚胎孵出仔鱼。统计孵出的仔鱼数,除以上浮卵数,乘以100%,记作孵化率^[14]。以初孵仔鱼无色素、歪尾等作为畸形指标,统计畸形仔鱼数,除以孵出仔鱼总数,乘以100%,记作畸形率^[14]。

1.4 仔鱼培育

参照门强^[15]、雷霖霖等^[16]的方法培育仔鱼。仔鱼培育用受精卵与上述受精卵为同一批,置于育苗池的微充气网箱中孵化。因实验条件限制,每个组合设置1个孵化网箱。在受精卵孵化出膜前约15 h时,每个实验组合取1 000 g发育正常胚胎,置于容积为36 m³的育苗池中继续培育,育苗水体为29 m³。至30日龄时,大部分稚鱼已转入底栖生活。届时,每个组合随机取样30尾底栖个体,测量体长和体质量。同时,从每个组合中随机取样200尾底栖个体,转移至水体为4 m³的育苗池中继续培育。至70日龄时,每个组合随机取样30尾底栖个体,测量体长、体质量。培育过程中,根据仔鱼发育的不同阶段,逐渐提高日换水量,并适时适量投喂优质饵料。培育期间先后投喂的饵料为轮虫、卤虫幼体、微颗粒配合饲料。实验各阶段所用育苗池均保持相同的培育条件,以消除环境差异的影响。

1.5 杂种优势分析方法

统计各个性状的测量值、平均值和标准差,计算杂交子一代的杂种优势率 H ^[17]:

$$H = \frac{\overline{F_1} - 1/2(\overline{P_1} + \overline{P_2})}{1/2(\overline{P_1} + \overline{P_2})} \times 100\%$$

式中, $\overline{F_1}$ 、 $\overline{P_1}$ 、 $\overline{P_2}$ 分别代表杂种子一代平均值、S群体和E群体的群体内自繁个体平均值。

1.6 母性效应分析方法

按照Van Vleck等^[18]的方法分析每个群体的母

性效应(Maternal effect, ME),计算公式为:

$$ME(X) = F_1(X) - P - (H \times P)$$

ME(X)为群体X的母体效应值。每一性状的母体表现比较(Maternal performance comparison, MPC)的计算公式为:

$$MPC_i = ME(S)_i - ME(E)_i$$

式中, i 代表不同的性状。

1.7 数据处理

实验数据用MINITAB14.13(Minitab Incorporation, USA)统计软件分析。不同组合间的差异用单因素方差分析法(ANOVA)进行比较, $P < 0.05$ 时为差异显著。对存在显著性差异的数据用最小显著差异法(Least Significant Difference, LSD)进行多重比较。

2 结果

2.1 不同组合各性状统计量和杂种优势率

S和E2个大菱鲆养殖群体子一代各性状统计量和杂种优势率见表1。由表1可知,受精率(58.14%~72.11%)和孵化率(15.48%~28.75%)均较低,畸形率(7.92%~15.04%)较高;杂种子一代的这3个指标均不表现杂种优势($H < 0$)。而30日龄和70日龄稚鱼的体长、体质量均表现出不同程度的杂种优势(7.06%~20.03%),其中E(♂)×S(♀)组合70日龄稚鱼的体质量杂种优势达到25.00%。而且,各组合的体质量杂种优势(8.46%~25.00%)要大于相应的体长杂种优势(5.43%~15.07%)。

2.2 单因素方差分析结果

由表1可知,4个组合间的受精率、孵化率、畸形率均不存在显著性差异($P > 0.05$);而4个组合间的30日龄体长、体质量,70日龄体长、体质量均存在显著性差异($P < 0.05$)。

2.3 母性效应和母体表现比较

母性效应和母体表现比较的计算结果由表1可知,受精率、孵化率、畸形率均表现出较强的母性效应;30日龄稚鱼和70日龄稚鱼的体长、体质量的母性效应值是负值,表明母性效应对30日龄稚鱼的影响已消失。从表1还可看出,各统计量的MPC均为正值,说明S群体各项性状的母性效应要高于E群体。

表1 2个大菱鲆养殖群体的杂交效果

Tab. 1 Different traits, heterosis, ME(maternal effect) and MPC(maternal performance comparison) of two stocks of turbot

项目 Item	杂交组合 Hybrid ($\bar{X} \pm SD$)				杂种优势/% Heterosis			ME(S)	ME(E)	MPC
	S(δ) $\times$ S(ϕ)	E(δ) $\times$ E(ϕ)	S(δ) $\times$ E(ϕ)	E(δ) $\times$ S(ϕ)	S(δ) $\times$ E(ϕ)	E(δ) $\times$ S(ϕ)	$\bar{X}$			
受精率/% Fertilization rate	72.11 $\pm$ 8.04 ^a	58.14 $\pm$ 6.36 ^a	60.49 $\pm$ 7.56 ^a	67.82 $\pm$ 8.65 ^a	-7.12	4.14	-1.49	99.69	92.36	7.33
孵化率/% Hatch rate	28.75 $\pm$ 6.83 ^a	20.71 $\pm$ 3.65 ^a	15.48 $\pm$ 4.28 ^a	23.38 $\pm$ 4.22 ^a	-37.40	-5.46	-21.43	528.65	520.75	7.90
畸形率/% Malformation rate	7.92 $\pm$ 1.55 ^a	15.04 $\pm$ 3.54 ^a	9.76 $\pm$ 1.73 ^a	12.83 $\pm$ 1.65 ^a	-14.98	11.76	-1.61	19.85	16.78	3.07
30日龄体长/cm BL of 30 days	1.792 $\pm$ 0.151 ^a	1.34 $\pm$ 0.179 ^b	1.651 $\pm$ 0.32 ^c	1.702 $\pm$ 0.121 ^{ac}	5.43	8.68	7.06	-10.91	-10.97	0.05
30日龄体质量/g BW of 30 days	0.180 $\pm$ 0.049 ^a	0.080 $\pm$ 0.031 ^b	0.141 $\pm$ 0.029 ^c	0.161 $\pm$ 0.051 ^c	8.46	23.85	16.15	-2.07	-2.09	0.02
70日龄体长/cm BL of 70 days	2.771 $\pm$ 0.510 ^a	2.740 $\pm$ 0.472 ^a	2.930 $\pm$ 0.263 ^a	3.151 $\pm$ 0.301 ^b	6.33	14.35	10.34	-28.10	-28.33	0.22
70日龄体质量/g BW of 70 days	0.607 $\pm$ 0.187 ^a	0.601 $\pm$ 0.179 ^a	0.695 $\pm$ 0.147 ^a	0.755 $\pm$ 0.222 ^b	15.07	25.00	20.03	-11.95	-12.0	10.06

注: BL - 体长; BW - 体质量; ME - 母性效应; MPC - 母体表现比较。同一行中上标具有不同字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$)。

Note: BL - body length; BW - body weight; ME - maternal effect; MPC - maternal performance comparison. Different letters in each row mean significant difference ($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 杂种优势的性状表现

杂交 (Hybridization) 是用来提高水生生物, 尤其是人工繁育多代物种生产性能的一种有效方法; 通常生产上都依据杂交后代是否显示杂种优势来评估不同的杂交方案是否可行。杂种优势是一种普遍存在的重要生物学现象。王亚馥等^[17]认为, 杂种优势 (Heterosis) 是指 2 个遗传基础不同的亲本 (如不同品系, 不同品种, 甚至不同种属) 杂交所得到的杂种一代在生长势、生活力、抗逆性等方面均要优于双亲的现象。本实验结果表明, 2 个养殖群体大菱鲆杂种一代的 30 日龄稚鱼和 70 日龄稚鱼, 其体长、体质量均表现出不同程度的杂种优势。目前, 国内大菱鲆受种苗来源制约, 种质资源较为单一。在这种情况下, 利用不同来源的种质资源进行杂交, 不失为实现大菱鲆种质遗传改良的一种有效方法。

3.2 杂种优势的时空表达

随着生长发育阶段的推进, 2 个大菱鲆养殖群体杂交产生的杂种个体的杂种优势逐渐得到表现。在 30 日龄时, 杂种一代体长、体质量的杂种优势率分别为 7.06% 和 16.15%; 到 70 日龄时, 2 者分别达到 10.34% 和 20.03%。此结果表明, 随着生长发育的进行, 到 70 日龄时杂种优势得到了更充分地表现。另外, 本实验中, 30 日龄和 70 日龄稚鱼的体质量杂种优势表现均优于体长杂种优势表现, 这可能与体长、体质量在大菱鲆生活早期的不同生长规律有关。但这一结论还需要进一步的实验验证。

3.3 母性效应的影响

母性效应与卵径大小、卵子质量高低及细胞质遗传等因素有关^[18]。本实验中, 杂种一代的受精率、孵化率、畸形率均不表现杂种优势, 可能与这 3 者受母性效应影响有关。Chevassus 等^[1]报道, 卵径大小对 4 月龄前鲑鱼 (Salmonids) 的生长速度有显著影响; Fowler^[19]曾报道, 大鳞大麻哈鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*) 的母性效应对其生长速度有显著影响。

1) Chevassus B, Blank J M. Genetic analysis of growth performance in salmonids [R]. Communication to the Third European Ichthyological Congress, Warsaw, 18 - 25 September 1979. 4.

chus tshawytscha) 幼苗和幼鱼的存活率与卵径大小有关。本实验中,母性效应的影响在 30 日龄时即已消失,比前二者报道的持续影响时间要短,这可能与不同的鱼种及亲鱼来源有关。

生物体具有多种性状,不同性状的杂种优势表现往往不同。所以,只有正确选择杂交亲本才能充分利用杂种优势,这是杂交育种的关键^[20]。不同亲本间具有一定的遗传差异是亲本选择的必要条件之一。就同一物种而言,一般地,群体内的基因纯合化程度越高,群体间的基因频率差异就会越大,遗传距离也越远,当这样的群体间进行杂交时,就会产生较大的杂种优势。本实验是在相同条件下进行的,环境对 2 群体表型性状的影响可以排除,因此,2 群体的表型差异主要来自于亲本间的遗传差异。由于本实验初始进口苗种来源及养殖环境不同,不同群体间就会产生遗传差异,这是杂种一代产生杂种优势的根本原因。本实验结果表明,不同养殖群体间的杂交可能是大菱鲆遗传改良的一条捷径。

参考文献:

- [1] Blanquer A, Alayse J P. Allozyme variation in turbot (*Psetta maxima*) and brill (*Scophthalmus rhombus*) (*Osteichthyes pleuronectiformes*, Scophthalmidae) throughout their range in Europe [J]. J Fish Biol, 1992, 41: 725 - 736.
- [2] 雷霖霖, 刘新富. 大菱鲆引进养殖的初步研究 [J]. 现代渔业信息, 1995, 10(11): 1 - 3.
- [3] 雷霖霖, 门强, 王印庚, 等. 大菱鲆“温室大棚 + 深井海水”工厂化养殖模式 [J]. 海洋水产研究, 2002, 23(4): 1 - 7.
- [4] 邹曙明, 李思发, 蔡完其. 牙鲆和大菱鲆养殖群体的分子标记和遗传变异 [J]. 中国水产科学, 2001, 7(4): 6 - 9.
- [5] 申雪艳, 宫庆礼, 雷霖霖, 等. 进口大菱鲆 *Scophthalmus maximus* L. 苗种的遗传结构分析 [J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(4): 332 - 341.
- [6] Tave G. Inbreeding and brood stock management [M]. USA: FAO Fisheries Technical Paper, 1998.
- [7] Gjerde B. Complete diallel cross between six inbred groups of rainbow trout, *Salmo gairdneri* [J]. Aquaculture, 1988, 75: 71 - 87.
- [8] Bakos J. Crossbreeding Hungarian races of common carp to develop more productive hybrids [A]. Advances in Aquaculture [M]. Fishing News Books Ltd., Farnham, Surrey, UK, 1979. 635 - 642.
- [9] Bakos J, Gorda S. Genetic improvement of common carp strains using intraspecific hybridization [J]. Aquaculture, 1995, 129: 183 - 186.
- [10] Gjerde B, Reddy V P, Mahapatra K D, et al. Growth and survival in two complete diallel crosses with five stocks of Rohu carp (*Labeo rohita*) [J]. Aquaculture, 2002, 209: 103 - 115.
- [11] Wolters W R, Johnson M R. Analysis of a diallel cross to estimate effects of crossing on resistance to enteric septicemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Aquaculture, 1995, 137: 263 - 269.
- [12] Griffing B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems [J]. Aust J Biol Sci, 1956, 9: 463 - 493.
- [13] Sequet M, Billard R, Cosson J, et al. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact [J]. Aquaculture, 1995, 133: 83 - 95.
- [14] Devauchelle N, Alexandre J C, Corre L E N, et al. Spawning of turbot (*Scophthalmus maximus*) in captivity [J]. Aquaculture, 1988, 69: 159 - 184.
- [15] 门强, 雷霖霖, 王印庚. 大菱鲆的生物学特性和苗种生产关键技术 [J]. 海洋科学, 2004, 28(3): 1 - 4.
- [16] 雷霖霖. 海水鱼类养殖理论与技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005. 566 - 572.
- [17] 王亚馥, 戴灼华. 遗传学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 528 - 536.
- [18] Van Vleck L D, Pollak E J, Oltenacu E A B. Genetics of the animal sciences [M]. New York: Freeman W H and Company, 1987. 391.
- [19] Fowler L G. Growth and mortality of fingerling chinook salmon as affected by egg size [J]. Prog Fish Cult, 1972, 34: 66 - 69.
- [20] 楼允东. 鱼类育种学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999. 40 - 44.

Analysis of hybridization effects on complete diallel crosses in two stocks of turbot, *Scophthalmus maximus*

JI Shi-zhi^{1,2}, LEI Ji-lin², WANG Wei-ji², KONG Jie²

(1. Faculty of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Using complete diallel crosses, the first generation of four combinations, S(♂) × S(♀), E(♂) × E(♀), S(♂) × E(♀) and E(♂) × S(♀) were obtained from mating and crossing within and between Spain stock(S) and England stock(E) of turbot(*Scophthalmus maximus*). Comparisons of fertilization rate, hatch rate, malformation rate, body length(BL) and body weight(BW) of 30-day-old and 70-day-old juveniles were made among four treatments in this study. The results showed that there were no significant differences between the hybridization groups and self-fertilized groups on fertilization rate, hatch rate, and malformation rate. But, as far as BL and BW of 30-day-old and 70-day-old juveniles were concerned, the hybridization treatments showed obvious heterosis compared with self-fertilized groups. Heterosis on BL reached 5.43% in S(♂) × E(♀)(Day 30) and that on BW attained 25.00% in E(♂) × S(♀)(Day 70). It was concluded that the crosses between different farmed stocks may be an effective way for genetic improvement of turbot. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6): 1 001 – 1 005]

Key words: *Scophthalmus maximus*; diallel crosses; heterosis

Corresponding author: KONG Jie. E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

欢迎订阅 2007 年《上海水产大学学报》

《上海水产大学学报》是上海水产大学主办的以水产科学为主的综合性学术刊物。主要反映自然科学各学科的科研成果,促进学术与教学研究的交流与繁荣。主要刊载渔业资源、水产养殖和增殖、水产捕捞、水产品保鲜与综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器、渔业经济与技术管理以及基础研究等方面的论文,调查报告,研究简报,综述与评述,简讯等,并酌登学术动态和重要书刊的评价等。目前,《上海水产大学学报》已同时被中文核心期刊要目总览定为中文核心期刊、中国科学院文献情报中心定为中国科技论文统计源期刊、中国科学技术信息研究所定为中国科技核心期刊。

本刊为双月刊,大16开,国内外公开发行。每期定价10元。全年定价60元(含邮费)。国际标准刊号:ISSN 1004-7271,国内统一刊号:CN 31-1613/S。国内邮发代号:4-604,国外发行代号:4822Q。读者可在当地邮局订阅,也可直接汇款至编辑部订阅。

编辑部地址:上海市军工路334号,上海水产大学38信箱

邮 编:200090

联系电话:021-65710892

传 真:021-65710232

E-mail: xuebao@shfu.edu.cn