

双列杂交分析比较两个养殖群体杂交牙鲆抗病力

徐田军^{1,2} 王磊^{1,2} 陈松林^{1*} 田永胜¹

¹农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

²上海海洋大学 生命科学与技术学院, 201306)

摘要 采用双列杂交设计对牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 两个养殖群体: 日本群体(J)和中国抗病选育群体(C)进行群体间杂交和群体内自繁, 获得 C(♀) × C(♂)、J(♀) × J(♂)、J(♀) × C(♂) 和 C(♀) × J(♂) 4 个交配组合的子一代。针对受精率、孵化率、白化率和存活率 4 个性状进行了组合间的比较, 计算了各项性状的杂种优势率, 对组间各性状进行了方差分析, 并进行了相关分析。结果表明, 杂交组在受精率、孵化率及存活率上存在着不同程度的杂种优势, 其中 C(♀) × J(♂) 后代在孵化率和存活率两个性状上的杂种优势率分别为 33.99% 和 31.37%。对 4 个性状的表型相关分析表明, 受精率和孵化率的相关系数为 0.657, 受精率和存活率相关系数为 0.432, 分别达到了极显著水平 ($P < 0.01$)。分析结果认为, 两个不同群体间的种内杂交是牙鲆优良品种培育的有效途径。

关键词 牙鲆 群体 杂交优势 抗病力

中图分类号 Q348; Q959.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)05-0034-06

Analysis of intraspecific cross effects on complete diallel crosses in two stocks of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*

XU Tian-jun^{1,3} WANG Lei^{1,2} CHEN Song-lin^{1*} TIAN Yong-sheng¹

¹ Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

² College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT The first generation of four broodstock combinations, C(♀) × C(♂), J(♀) × J(♂), J(♀) × C(♂) and C(♀) × J(♂) were obtained from mating and crossing within and between Japanese broodstock (J) and China disease resistant broodstock (C) of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using complete diallel crosses. Comparisons of fertilization rate, hatch rate, albinism rate and survivorship were made among four treatments in this study. Heterosis and correlations were found in different characteristics. The results showed that there were significant differences between the hybridization groups and self-fertilized groups on albinism rate and survival rate. Heterosis on hatch rate reached 33.99% and heterosis on survivor

国家科技支撑计划项目(2006BAD01A12011)、国家高技术研究发展计划项目(2006AA10A404)、国家自然科学基金(30413240)和山东省泰山学者建设工程专项经费共同资助

* 通讯作者。E-mail: chensl@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85844606

收稿日期: 2008-11-18; 接受日期: 2009-01-08

作者简介: 徐田军 (1982-), 男, 博士, 主要从事鱼类生物技术和分子育种研究。E-mail: tianjunxu@163.com, 电话: 15863030825

rate reached 31.37% in C (♀) × J (♂) group. Correction analysis demonstrated highly significant correlations ($P < 0.01$) between fertilization rate and hatch rate (0.657), and fertilization rate and survival rate (0.432). These results indicated that the crosses between different stocks might be potentially effective for genetic improvement in Japanese flounder.

KEY WORDS Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* Broodstock Heterosis
Disease resistance

杂交优势(Heterosis)是指由两种具有不同遗传基础的亲本杂交所产生的杂交子一代在生长、繁殖以及抗逆性能等方面优于双亲的现象(李思发等 2006)。杂交育种是水产生物育种中最重要的方法之一,迄今为止,在很多鱼类中已经进行了杂交育种的研究(楼允东 1999;吴仲庆 2000),并培育出了一些在生产中能产生明显经济效应的杂交品种。对鲤鱼、虹鳟、鲑鱼及斑点叉尾鲷的研究表明,通过群体间的杂交可以使生长速度、存活率及饵料系数等经济性性状相对于双亲获得较大水平的提升(Gjerde 1988; Bakos *et al.* 1995; Gjerde *et al.* 2002; Wolters *et al.* 1995)。

牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 广泛分布于中国、日本以及韩国海域(Fuji *et al.* 2006; Liu *et al.* 2005a, b)。是我国海水养殖鱼类的主导品种之一,在我国北方沿海广泛进行工厂化养殖和网箱养殖,其产值在水产业中占有相当大的比重。但目前国内主要的牙鲆育苗基地内的亲鱼均存在野生亲鱼补充不及时,亲鱼的老化、近亲交配等问题。在鱼类近亲交配过程中,会出现生长速度减慢、繁殖性能和存活率降低等现象(陈松林等 2008),以及隐性有害基因的表达,导致近交衰退;同时近交还能导致基因频率的变化和稀有基因的丢失,导致遗传多样性降低,损害育种的遗传基础(李思发等 2005)。因此有必要利用不同的基础亲鱼群体,针对牙鲆的某些重要经济性性状进行遗传改良,确保养殖产业的持续发展。目前,国内关于牙鲆群体间的杂交组合的研究尚未见报道。

本研究利用通过自然选择和人工感染选择获得的牙鲆抗病群体及引进的日本群体作为育种的基础群体,对两个不同群体的牙鲆采用双列杂交的方式进行种内杂交以及群体内自繁,在各发育阶段对受精率、孵化率以及白化率进行统计,并通过进行鳃弧菌感染实验获得了子一代的存活率数据,利用获得的 4 种性状对不同交配组合进行比较分析。通过双列杂交,分析其杂交组合所产生的杂交效果,以期为牙鲆的遗传育种和杂交优势的利用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与设 计

实验亲鱼养殖在山东海阳市黄海水产有限公司,两个群体分别为中国抗病选育群体(C)和日本群体(J)。按照 2×2 完全双列杂交方案通过建立全同胞家系的方式进行群体内自繁和群体间杂交(陈松林等 2008),4 个交配组合是:自繁组合 C (♀) × C (♂) 共 20 个家系, J (♀) × J (♂) 共 3 个家系;杂交组合 J (♀) × C (♂) 共 16 个家系, C (♀) × J (♂) 共 14 个家系(表 1)。

1.2 人工授精及培 育

通过人工控温、控光使亲鱼达到性成熟后,通过挤压腹部获得精液和卵子,按照设计的交配方案进行人工授精。干法授精后,加入海水,静置后收集上层卵布入孵化缸内,同时各取 1ml 受精卵(约 1 000 粒)放在 1L 塑料量杯内进行孵化,设置重复。受精后,胚胎发育至 4 细胞期时进行受精卵的统计,受精率=(受精卵/上浮卵数)×100%;出苗后,统计出苗数,孵化率=(初孵仔鱼数/上浮卵数)×100%(季士治等 2006)。孵化缸内鱼苗培育至体长为 5cm 左右,每个家系随机选择约 2 000 尾统计白化鱼苗数,白化率=(白化鱼苗数/总鱼苗数)×100%。

1.3 鳎弧菌感染存活率的测定

培育至体重 10g 左右时,进行鳎弧菌感染实验,获得各交配组合所产生的各家系的平均存活率数据。具体方法参照陈松林等(2008)。

1.4 数据分析

利用 SPSS 13.0 计算各性状的平均值及标准差,进行各组合的方差分析(ANOVA),并对各性状的观测值进行相关关系分析。计算各性状的杂种优势。

杂种优势的计算公式(李思发等 2006):

(1)平均杂种优势 $H_M(\%) = [(F_1 - MP) / MP] \times 100\%$; F_1 , MP 分别代表杂交子一代某性状的平均值、双亲某性状的平均值。

(2)超亲杂种优势 $H_B(\%) = [(F_1 - BP) / BP] \times 100\%$; F_1 , BP 分别代表杂交子一代某性状的平均值、亲本某性状的平均值。 H_{BC} 表示 F_1 超过中国群体亲本的超亲杂种优势; H_{BJ} 表示 F_1 超过日本群体亲鱼的超亲杂种优势。

2 结果

2.1 不同交配组合各性状的统计值及杂种优势

中国和日本两个牙鲆地理群体子一代 4 种性状的统计值及杂交优势见表 1。从表 1 中可以看出,4 种交配组合的后代在 4 种性状的表现上差异比较大,受精率在 60.98%~83.27%之间,孵化率在 50.77%~76.48%之间,白化率在 1.40%~10.30%之间,存活率在 24.80%~41.33%之间。杂交子一代在受精率、孵化率以及存活率上均表现出不同程度的杂交优势,分别为 14.03%~25.13%、13.72%~34.99%和 21.04%~31.37%。同样,除白化率在 $J(\text{♀}) \times C(\text{♂})$ 后代群体相比中国群体自繁后代和日本群体自繁后代,以及 $C(\text{♀}) \times J(\text{♂})$ 后代群体相比日本群体自繁后代呈现负向超亲优势, $J(\text{♀}) \times C(\text{♂})$ 后代相比日本群体自繁后代在存活率上表现为负向超亲优势,其他 3 种性状在两种杂交组合内均体现出不同程度的正向超亲优势(3.02%~66.65%)。

表 1 两个群体牙鲆交配组合的 4 种性状的杂交优势率

Table 1 Phenotype value and heterosis of four traits in hybridization combinations of two populations of Japanese flounder

交配组合 Combination	杂种优势率 (%) Heterosis	受精率 Fertilization rate	孵化率 Hatch rate	白化率 Albinism rate	存活率 Survival rate
$C(\text{♀}) \times C(\text{♂})$		72.11±18.12	62.54±18.10	2.39±5.35	24.80±8.15
$J(\text{♀}) \times J(\text{♂})$		60.98±16.09	50.77±11.00	10.30±14.57	38.12±9.02
$J(\text{♀}) \times C(\text{♂})$		75.88±19.46	64.43±25.70	1.40±2.31	34.92±17.44
	H_M	14.03	13.72	-77.94	21.04
	H_{BC}	5.23	3.02	-41.42	40.81
	H_{BJ}	24.43	26.91	-86.41	-8.39
$C(\text{♀}) \times J(\text{♂})$		83.27±13.47	76.48±11.23	7.68±8.97	41.33±12.16
	H_M	25.13	34.99	21.04	31.37
	H_{BC}	15.48	22.29	221.34	66.65
	H_{BJ}	36.55	50.64	-25.44	8.42

2.2 交配组间的方差分析

对4个性状在4种交配组间进行方差分析(表2)。从表2中可以看出,受精率和孵化率在4个组间不存在显著的差异($P>0.05$);白化率在组间存在显著差异($P<0.05$);而存活率在4个交配组间存在极显著差异($P<0.01$)。

表2 牙鲆不同群体交配后代的4种性能的方差分析
Table 2 ANOVA for four traits among 4 cross combinations

性状 Trait	变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	均方 Mean square	F 检验 F value	P 值 P value
受精率 Fertilization rate	组间 Between groups	0.131	0.044	1.415	0.252
	组内 Within groups	1.291	0.031		
	总计 Total	1.422			
孵化率 Hatch rate	组间 Between groups	0.176	0.059	1.501	0.231
	组内 Within groups	1.411	0.039		
	总计 Total	1.587			
白化率 Albinism rate	组间 Between groups	0.037	0.012	3.229	0.032
	组内 Within groups	0.160	0.004		
	总计 Total	0.197			
存活率 Survival rate	组间 Between groups	0.229	0.076	4.611	0.007
	组内 Within groups	0.762	0.017		
	总计 Total	0.991			

2.3 相关性分析

对每个家系的受精率、孵化率、白化率以及感染后存活率进行相关分析表明(表3),受精率与孵化率之间存在极显著的相关关系($P<0.01$),相关系数为0.657;同时存活率与受精率之间也存在显著的相关关系($P<0.01$),相关系数为0.432。而孵化率与存活率不存在显著的相关关系,同时白化率与其他3种性状均不存在显著的相关关系。

表3 牙鲆家系内各性状的相关关系分析
Table 3 Correlation analysis of 4 traits within Japanese flounder family

性状 Traits		受精率 Fertilization rate	孵化率 Hatch rate	白化率 Albinism rate	存活率 Survival rate
受精率 Fertilization rate	相关系数 Correlation	1			
孵化率 Hatch rate	相关系数 Correlation	0.657**	1		
白化率 Albinism rate	相关系数 Correlation	0.247	0.116	1	
存活率 Survival rate	相关系数 Correlation	0.432**	0.132	0.122	1

注:**表示极显著相关($P<0.01$, 双尾检验)

3 讨论

杂种优势在水产育种中具有非常大的利用价值。利用杂种优势的理论已经在国内外培育出了一些高产、抗逆性强的优良品种。其中,培育出的“丰鲤”、“荷元鲤”和“建鲤”等优良品种由于具有明显的杂种优势已经在淡水养殖中产生了巨大的经济效益(李思发等 2006; 楼允东 1999)。而在海水养殖鱼类中,也开展了一些物种间的杂交研究,并培育出了一些杂交种,但尚未对其杂种优势及其育种价值进行评估。在大菱鲆的育种研究中,季士治等(2006)按照双列杂交组合的设计利用来自西班牙群体和英国群体的亲鱼进行群体间杂交及群体内自繁,对4个交配后代的受精率和孵化率等指标进行了杂交优势的分析,不同的性状体现了不同程度的杂种优势,认为不同养殖群体的杂交有可能是大菱鲆遗传改良的有效途径。

本研究首次根据双列杂交的设计利用来自中国群体和日本群体的牙鲆亲鱼进行群体内自交和群体间杂交,并对 F_1 代的受精率、孵化率、白化率和存活率进行比较分析。杂种优势分析结果表明,两个群体的杂交后代在受精率、孵化率和存活率上均表现出不同程度的杂种优势。其中, $C(\text{♀}) \times J(\text{♂})$ 杂交后代相对于两个群体自繁后代所体现的杂种优势最为明显,在受精率、孵化率和存活率3种性状上表现的杂种优势分别为25.13%、34.99%和31.37%。而 $J(\text{♀}) \times C(\text{♂})$ 后代的杂种优势在这3种性状上分别为14.03%、13.72%和21.04%,低于 $C(\text{♀}) \times J(\text{♂})$ 后代体现出的杂种优势。另外,从表1中也可以看出,杂交后代相对于对照自繁群体后代在受精率、孵化率和存活率上表现出不同程度的超亲优势。两个群体杂交产生的较高的杂种优势可能是两个亲本群体均为经过人工选择而成的,其遗传纯度较高,群体间的杂交可以使有利基因得以互补。产生杂种优势的遗传基础是两个亲本群体中显性有利基因的互补,并增加基因互作的机会(李思发等 2006)。同时,由于性状的连锁关系,母性效应的存在以及父母本群体因选择强度不同导致的基因频率差异等原因,同样两个种群之间的正反交效果可能并不一样(盛志廉等 2001)。白化率在 $C(\text{♀}) \times J(\text{♂})$ 杂交后代并没有体现出杂种优势,白化率 $7.68 \pm 8.97\%$,而 $J(\text{♀}) \times C(\text{♂})$ 杂交后代的白化率仅为 $1.40 \pm 2.31\%$,体现出明显的杂种优势。同时,白化率易受环境因素及仔鱼培育期间的营养因素所影响。因此,杂种优势在白化率性状上体现的优劣是否是受亲鱼遗传因素所致还有待商榷和进一步的研究。

组间方差分析显示,受精率和孵化率在4个群体间没有显著的差异($P > 0.05$),而白化率在群体间存在显著的差异($P < 0.05$)。但是值得注意的是存活率在4个后代群体间存在极显著的差异($P < 0.01$)。这说明由于不同亲本的显性有利基因的不同,所产生的后代的抗病能力差异很大,由于群体间的杂交使得显性有利基因间的互作机会大大增加,因此在抗病力性能上群体间的杂交后代产生的杂种优势很大(21.04%~31.27%)。说明了利用群体间的杂交可以培育出抗病力性能优越的后代,为进一步的牙鲆抗病育种提供材料。但由于实验条件所限,日本群体自繁家系较小,因此日本群体自繁后代数据还有待进一步实验验证。

由于基因的连锁和基因多效性的存在以及一些环境因素的影响,生物体的某些性状间存在着不同程度的相关性(李思发等 2006)。Jonasson(1999)曾对190日龄的大西洋鲑研究发现,成活率-体重、成活率-体长以及体长-体重的相关分别为 0.31 ± 0.26 、 0.39 ± 0.26 和 0.98 ± 0.01 。在实际育种过程中,一些易观察得到的性状可以直接进行选择育种,而一些性状例如抗病能力则很难在育苗初期获得明显的结果,而性状间相关程度的获得可以有效的改善这一状况,可以利用易观察的性状来间接选育与之相关系数较高的其他性状。性状间的相关系数越大,间接选育的效果越好。本研究发现在牙鲆中,受精率-孵化率、受精率-存活率之间的相关系数分别为0.657和0.432,相关关系均达到了极显著的水平。这说明受精率的高低直接影响到孵化率的高低,同时在卵子质量保证的前提下,通过对易得到的受精率性状的比较可以在一定程度上间接的预测存活率这一性状的表现水平。

在鱼类育种中,不同性状的杂种优势程度不同(季士治等 2006)。因此,可以针对某些目的改良性状来选择合适的亲本杂交组合。不同群体间具有不同的遗传背景是进行杂交育种的条件,当群体间的遗传差异较大时,一般能获得较大的杂种优势,因此有必要在进行杂交育种前进行亲本的遗传结构分析。本研究在进行牙鲆杂交育种前,已经对两个群体亲本的遗传背景利用微卫星标记进行了分析,认为日本群体与中国群体牙鲆遗传分化显著,具有遗传改良的基础(邵长伟等 2008)。另外在进行各性状的组间比较时,环境因素的影响也较

大,本研究在相同条件下进行组间的比较,除白化率易受后代的摄食情况等因素影响外,其他性状应该可以真实的反映不同群体杂交后代的杂交优势,杂交优势的获得主要来自于亲本间的遗传差异。本研究结果认为,日本群体和中国抗病群体之间的杂交是进行牙鲆遗传改良和培育抗病优良品种的优良途径。

参 考 文 献

- 李思发,王成辉,刘志国,项松平,王 剑,潘增云,段江萍,徐志彬. 2005. 3 种红鲤生长性状的杂种优势与遗传相关分析. 水产学报, 30(2): 175~180
- 李思发,杨怀宇,邹晓明. 2005. 快速近交对团头鲂遗传结构的影响和近交效应的估算. 水产学报, 29(2): 161~165
- 邵长伟,廖小林,田永胜,陈松林. 2008. 牙鲆 3 个养殖群体遗传结构的微卫星分析. 海洋水产研究, 30(1): 41~46
- 吴仲庆. 2000. 水产生物遗传育种学(第三版). 厦门: 厦门大学出版社, 153~167
- 陈松林,田永胜,徐田军,邓 寒,刘寿堂,刘本伟,季相山,于过才. 2008. 牙鲆抗病群体和家系的建立及其生长和抗病性能初步测定. 水产学报, 32(5): 665~673
- 季士治,雷霖霖,王伟继,孔 杰. 2006. 双列杂交法分析两个大菱鲆养殖群体的杂交效果. 中国水产科学, 13(6): 1 001~1 005
- 盛志廉,陈瑶生. 2001. 数量遗传学. 北京: 科学出版社, 310~320
- 楼允东. 1999. 鱼类育种学. 北京: 中国农业出版社, 40~107
- Bakos, J., and Gorda, S. 1995. Genetic improvement of common carp strains using intraspecific hybridization. Aquaculture, 129: 183~185
- Fuji, K., Kobayashi, K., Hasegawa, O., Coimbra, M. R. M., Sakamoto, T., and Okamoto, N. 2006. Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture, 254: 203~210
- Gjerde, B., Reddy, V. P., Mahapatra, K. D., Saha, J. N., Jana, R. K., Meher, P. K., Sahoo, M., Lenka, S., Govindassamy, P., and Rye, M. 2002. Growth and survival in two complete diallele crosses with five stocks of Rohu carp (*Labeo rohita*). Aquaculture, 209: 103~115
- Gjerde, B. 1988. Complete diallele cross between six inbred groups of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Aquaculture, 75: 71~87
- Jonasson, J. 1999. Selection experiments in salmon ranching. Genetic and environmental sources of variation in survival and growth in freshwater. Aquaculture, 109: 225~236
- Liu, Y., Chen, S., Li, B., and Wang, Z. 2005a. Analysis of genetic variation in selected stocks of hatchery flounder, *Paralichthys olivaceus*, using AFLP markers. Biochemical Systematics and Ecology, 33: 993~1 005
- Liu, Y., Chen, S., and Li, B. 2005b. Assessing the genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers. Aquaculture, 243: 103~111
- Walters, W. R., and Johnson, M. R. 1995. Analysis of a diallele cross to estimate effects of crossing on resistance to enteric septicemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Aquaculture, 137: 263~269