

牙鲆与夏鲆杂交及回交子代胚胎发育及早期生长比较

隋娟¹, 徐世宏¹, 王文琪², 马道远¹, 肖志忠¹, 肖永双¹, 刘清华¹, 李军¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071; 2. 青岛农业大学动物科技学院, 山东青岛 266109)

摘要: 通过人工授精技术对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和夏鲆(*Paralichthys dentatus*)进行了正反交及回交实验, 并比较了正反交、回交子代的胚胎发育时序和仔稚幼鱼的生长。结果表明: 孵化水温 $18.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 下, 初孵仔鱼破膜用时为: 牙鲆 41 h, 正交鲆 47 h, 回交牙鲆 42 h 30 min, 回交夏鲆 44 h; $16.5\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 下, 夏鲆 61 h 40 min, 反交鲆 66 h。正交及两组回交子代在胚胎期均可正常发育。反交子代卵裂期出现异常, 仅少数胚胎可以孵化。胚胎孵化后, 在 1~64 日的培养过程中, 反交鲆于 3~4 d 内全部死亡, 回交牙鲆发育至 18 日龄时全部死亡。正交鲆和回交夏鲆可正常发育, 与牙鲆没有明显差别。

关键词: 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*); 夏鲆(*Paralichthys dentatus*); 杂交; 回交; 早期发育

中图分类号: S917 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2012)06-0054-05

杂交育种不仅可以对现有品种加入更优良的新的遗传性状, 也可以使两种或两种以上具有不同优良特性的类型结合而成更加优秀的新类型, 是鱼类育种的基本手段之一^[1]。杂种一代除了一些比较优良的类型可直接利用外, 还可以进行杂种与某一亲本间的回交。回交是杂交育种的重要手段之一, 旨在通过杂交种与双亲之一再次杂交, 使后代加强轮回亲本的某些优良性状, 减少杂种后代的分离, 并保留非轮回亲本的少数优良性状^[2]。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)与夏鲆(*Paralichthys dentatus*)均属于鲽形目(Pleuronectiformes)、鲽亚目(Pleuronectoidei)、鲆科(Bothidae)、牙鲆属(*Paralichthys*)。牙鲆主要分布于中国东部沿海以及朝鲜、日本、俄国远东沿岸海区, 在中国、韩国、日本均有大规模养殖, 是优良的海水养殖种之一。夏鲆又称夏牙鲆、大西洋牙鲆、犬齿牙鲆等, 主要分布于北美洲大西洋沿岸, 于 2002 年引入中国。与牙鲆相比, 夏鲆耐高温, 但越冬死亡率高, 而牙鲆渡夏困难, 能安全越冬。为培育出生长快、适温范围广的养殖新品种, 本实验室通过人工授精的方法对牙鲆和夏鲆进行杂交试验并获得了杂种 F1 代, 利用 F1(♀)分别同牙鲆(♂)和夏鲆(♂)回交, 获得了两组回交子代。

目前, 国内许多学者已对牙鲆和夏鲆杂交进行了研究, 研究内容主要集中在牙鲆♀ × 夏鲆♂杂种早期发育、遗传特征以及杂种优势^[3-7], 而对正反交及回交的胚胎发育比较以及仔稚幼鱼生长比较目前尚未见报道。因此, 本研究以牙鲆和夏鲆正反交子代以及两组回

交子代作为研究对象, 系统比较了正反交子代、回交子代及亲本的胚胎发育时序以及仔稚幼鱼的生长, 以期为鲆鲽类养殖新品种的开发提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 亲鱼及配子采集

牙鲆和夏鲆的杂交及回交实验在中国科学院海洋研究所海洋生物技术工程研究发展中心进行。夏鲆亲鱼为 2002 年从美国引进的鱼苗, 经过人工培育而成。牙鲆为青岛本地养殖种。雌性杂交鲆来自 2005 年在青岛连三岛养殖场进行的牙鲆(♀)与夏鲆(♂)杂交实验。共有 5 尾雌牙鲆, 10 尾雄牙鲆, 2 尾雌夏鲆, 10 尾雄夏鲆及 2 尾雌杂交鲆作为亲鱼用于本研究。用于繁殖的雌鱼(牙鲆、正交鲆)为 3 龄鱼, 体质量 2~4 kg; 雄鱼(夏鲆)为 2 龄鱼, 体质量 1~2 kg。亲鱼经人工诱导性成熟后采用人工挤压腹部的方法采集精液和卵子。显微镜下观察精子的运动情况, 仅运动率高于 90% 的精子用于实验, 与质量好的卵子(规则圆形,

收稿日期: 2010-11-12; 修回日期: 2011-01-11

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资助项目(nycytx-50); 国家农业成果转化资金(2009GB24910539); 中国科学院知识创新项目(KSCX2-EW-B-3); 山东省科技发展计划项目(2011GHY11530); 山东省中青年科学家科研奖励基金(BS2009HZ007); 青岛市基础研究计划项目(09-1-3-11-jch)

作者简介: 隋娟(1984-), 女, 山东淄博人, 博士研究生, 主要从事海洋动物遗传育种研究, E-mail: suijuan0313@yahoo.com.cn; 李军, 通信作者, E-mail: junli@qdio.ac.cn; 刘清华, 通信作者, E-mail: qinghualiu@qdio.ac.cn

颜色为半透明微黄色)通过干法授精获得受精卵。等受精卵充分上浮后, 过滤并洗卵数次。共得到 6 组组合, 包括:

- 两组亲本组合: 牙鲆♀ × 牙鲆♂ (牙鲆)
- 夏鲆♀ × 夏鲆♂ (夏鲆)
- 两组杂交组合: 牙鲆♀ × 夏鲆♂ (F1) (正交)
- 牙鲆♂ × 夏鲆♀ (反交)
- 两组回交组合: 正交 F1♀ × 牙鲆♂ (回交牙鲆)
- 正交 F1♀ × 夏鲆♂ (回交夏鲆)

1.2 受精卵培育及观察

由于各组实验进行的时间不同, 因此受精卵培育水温有所差别。牙鲆、正交鲆及两组回交鲆培育水温为 18.0 ± 0.5 , 夏鲆及反交鲆培育水温为 16.5 ± 0.5 。盐度 32~33, pH 7.8~8.2。每组取 500 粒卵于 500 mL 烧杯中静水孵化, 设 3 个平行样。孵化及培养用海水预先在养殖池内进行加热, 将烧杯悬浮于养殖池大水体中以保持孵化水温恒定。培育期间定期取样, 在 Nikon YS-100 型显微镜下观察各组合胚胎发育时序并记录。各组剩余受精卵分别放入 160 L 圆柱形培养缸内进行培育, 微充气。

1.3 正交、回交子代与牙鲆仔稚幼鱼的培育及数据测量

初孵仔鱼的培育水温为 19 ± 0.5 , 随仔鱼发育缓慢升高至 20 ± 0.5 , 保持此温度进行培育。破膜仔鱼开口后采用经营养强化的褶皱臂尾轮虫 (*Branchionou plicatilis*)、卤虫 (*Artemia* spp.) 无节幼体、桡足类及其幼体和鱼虾肉糜作为仔稚幼鱼的饵料系列。在仔稚幼鱼培育期间 (1~64 日龄), 每天固定时间取样, 每次随机采集 10 尾, 用 100 mg/L 的 MS-222 麻醉后在解剖镜下测定各组仔稚幼鱼全长、

体长、体高和肛前长等形态学特征, 用 5% 的福尔马林进行固定。

1.4 统计分析

测量所得各组生长数据用 excel 2003 处理, SPSS16.0 软件分析每组鱼的生长情况, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 6 组组合胚胎发育

正交子代及两组回交子代的胚胎发育规律与双亲的发育规律基本一致。反交子代在分裂期出现大量畸形, 仅有少部分卵子能通过原肠期继续发育。在孵化水温 18.0 ± 0.5 下, 初孵仔鱼破膜用时为: 牙鲆 41 h, 正交鲆 47 h, 回交牙鲆 42 h 30 min, 回交夏鲆 44 h。孵化水温 16.5 ± 0.5 下, 夏鲆 61 h 40 min, 反交鲆 66 h, 具体发育时间和发育阶段见表 1。

2.2 正反交及回交组合与牙鲆的早期生长比较

正反交及两组回交组合的仔鱼均可孵化, 但反交鲆孵化后身体畸形, 开口前全部死亡 (图 1)。回交牙鲆从 1~15 日龄可正常生长, 从 15 日龄开始, 直至 18 日龄生长明显缓慢 ($P < 0.05$), 并最终死亡。

作者对正交鲆、回交夏鲆的仔稚幼鱼生长进行测量并与牙鲆作了比较 (图 2)。初孵仔鱼经过 64 d 的生长, 正交鲆平均全长达到 19.28 cm, 体长 16.17 cm, 体高 7.62 cm, 肛前长 6.54 cm; 回交夏鲆全长 21.35 cm, 体长 17.54 cm, 体高 8.04 cm, 肛前长 6.80 cm; 牙鲆平均全长 21.87 cm, 体长 19.11 cm, 体高 8.97 cm, 肛前长 8.38 cm。直至 64 日龄, 3 个组合的生长情况并未见明显差别 ($P > 0.05$)。

表 1 牙鲆与夏鲆杂交及回交胚胎发育时序的比较

Tab. 1 Time-table of embryonic developments of reciprocal hybrids and backcrosses of *P. olivaceus* and *P. dentatus*

发育时序	牙鲆	夏鲆	正交鲆	反交鲆	回交牙鲆	回交夏鲆
水温	$18.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$	$16.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$	$18.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$	$16.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$	$18.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$	$18.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
卵裂期	1 h	1 h 50 min	1 h 5 min	2 h	1 h 5 min	1 h 5 min
囊胚期	5 h 40 min	8 h 40 min	5 h 25 min	8 h 20 min	4 h 20 min	4 h 10 min
原肠期	12 h 10 min	17 h 10 min	10 h 30 min	18 h	11 h 30 min	10 h 30 min
神经胚	18 h 10 min	26 h 10 min	16 h 30 min	29 h	17 h 30 min	17 h 15 min
胚孔封闭	21 h 10 min	30 h	20 h 30 min	33 h	21 h 10 min	21 h 20 min
尾牙游离	30 h 10 min	42 h 20 min	31 h 30 min	47 h	32 h 50 min	31 h 40 min
即将孵化	36 h 40 min	60 h 10 min	43 h 30 min	61 h	40 h 30 min	42 h 50 min
破膜孵出	41 h	61 h 40 min	47 h	66 h	42 h 30 min	43 h 50 min

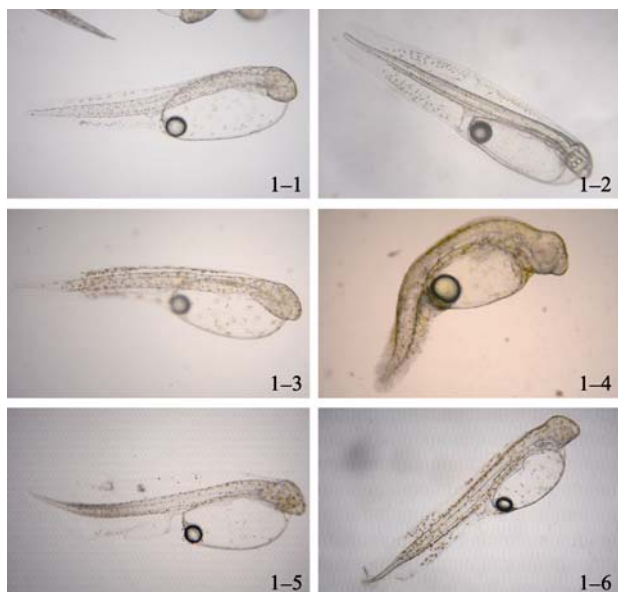


图 1 6个组合的初孵仔鱼

Fig. 1 Newly hatched larvae of six groups

1-1. 牙鲆; 1-2. 夏鲆; 1-3. 正交鲆; 1-4. 反交鲆; 1-5. 回交牙鲆; 1-6. 回交夏鲆

1-1. *P. olivaceus*; 1-2. *P. dentatus*; 1-3. F1; 1-4. *P. dentatus*(♀) × *P. olivaceus*(♂); 1-5. F1(♀) × *P. olivaceus*(♂); 1-6. F1(♀) × *P. dentatus*(♂); F1. *P. olivaceus*(♀) × *P. dentatus*(♂)

正交鲆, 回交夏鲆及牙鲆的全长与体长增幅比较平稳, 从初孵仔鱼到 64 日龄平均日增长率分别为 27.20%和 23.26%。体高和肛前长的增长明显分为 3 个阶段, 体高的变化从初孵仔鱼到 22 日龄为缓慢增长期, 平均增长率为 6.17%; 22~28 日龄为快速增长期, 平均增长率为 62.17%; 28~64 日龄涨幅变慢, 平均增长率为 7.57%。肛前长从初孵仔鱼到 22 日龄为缓慢增长期, 平均增长率为 8.67%, 22~28 日龄为快速增长期, 平均增长率为 44.44%, 28~64 日龄涨幅变慢, 平均增长率为 3.80%。体长/体高经历了先缓慢下降, 再快速下降, 再趋向平稳的过程。第一个拐点出现在 19 d(全长/体高均值为 5.6), 表明 19 d 之前体高比体长生长稍快, 而后体高生长迅速加快, 26 d 前后是全长/体高的第二个拐点(均值 1.95), 此后全长/体高相对稳定。体长/肛前长经历了平稳期, 快速下降以及缓慢上升 3 个阶段。第一个拐点出现在 22 d(体长/肛前长均值为 2.59), 表明 22 d 以前体长与肛前长增长速度一致, 之后肛前长生长速度加快, 26 d 前后为体长/肛前长的第二个拐点(均值 1.75), 此后体长/肛前长缓慢增长, 表明 26 天后肛前部的躯干部生长开始加快。

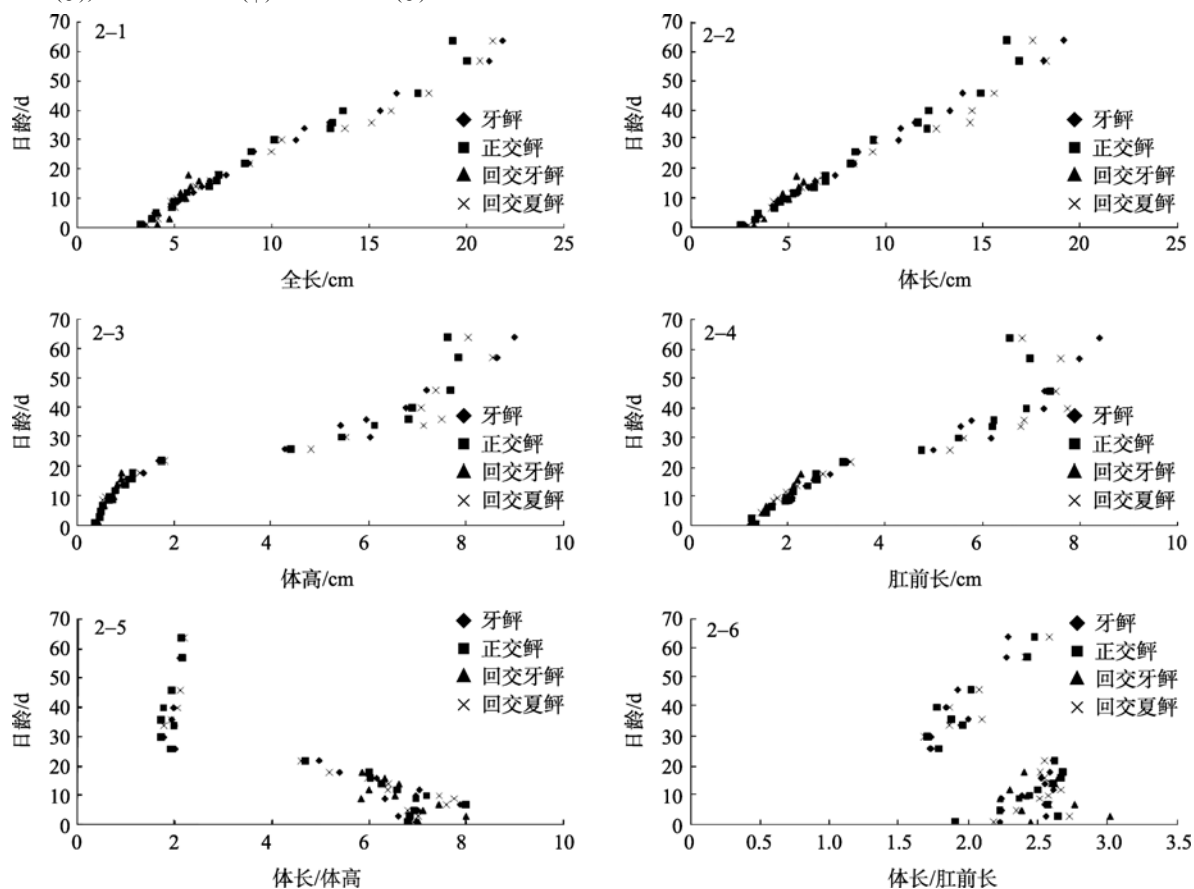


图 2 牙鲆、正交鲆、回交牙鲆、回交夏鲆的早期生长

Fig. 2 Early development of *P. olivaceus*, F1, F1(♀) × *P. olivaceus*(♂), F1(♀) × *P. dentatus*(♂)

3 讨论

3.1 正反交及回交子代与亲本胚胎发育比较

正反交及两组回交的胚胎发育所经历的发育过程与其他牙鲆属的种基本相同, 经历卵裂前期、卵裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期、器官发生期和孵化出膜期 7 个主要发育时期, 在发育过程中未出现明显的特异性。

大多数鱼类的胚胎发育都比较复杂, 其细胞增殖和分化同时出现, 但会以不同的速度进行^[9]。在于道德^[3]等的研究中提到正反交的胚胎发育时间与父本牙鲆孵化时间相近, 在 15.4~16.0℃下, 杂交鲆孵化需 76 h, 牙鲆为 64 h, 夏鲆为 77 h^[11], 并非简单介于父母本之间。该遗传现象在弓斑东方鲀(*Fugu ocellatus*)与暗纹东方鲀(*Fugu obscurus*)的杂交中也有过类似报道^[12]。在 18.6~21.5℃下, 杂交东方鲀孵化需 144 h50 min, 母本弓斑东方鲀需 169 h30 min, 父本暗纹东方鲀需 139 h10 min。然而, 亦有大量杂交胚胎的孵化时间偏向母本, 如金鱼(*Carassius auratus*)与大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)的杂交^[13], 鮟状皇姑鱼(*Nibea miichthoides*)与大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)的杂交^[14]等。

遗憾的是, 本研究中由于亲鱼成熟时间前后有一定差异, 完全控制在同一时间段产卵十分困难, 6 组交配试验分为两次完成。虽然 6 组组合的胚胎发育所处温度并不完全一致, 但同在 18.0±0.5℃下, 所得的回交牙鲆分别与其母本杂交鲆和父本牙鲆的胚胎发育时间相比, 孵化时间与其父本牙鲆相近。杂交鱼胚胎孵化时间的这种偏父或偏母现象是受遗传影响还是环境影响仍需进一步研究。

3.2 早期发育过程中的杂种优势

在本研究中, 1~64 日龄的正交鲆与回交夏鲆在生长速度上并未出现明显的杂种优势, 正交鲆工厂化养殖中所表现出的生长快的特点(未发表)在发育早期并没有体现。在野生与驯化的虹鳟鱼之间的杂交及回交研究中也报过类似现象^[8]。作者推测这可能与杂种优势的延迟表达有关。杂种优势源自于两套在遗传上有一定距离且能相容的基因组在受精时的融合, 来自父亲的一套基因组被激活标志着发育过程中合子由母源性表达开始向合子表达过渡^[15]。而在拟南芥(*Arabidopsis* spp.)^[16]、玉米(*Zea mays*)^[17]、

小鼠(*Mus* spp.)^[18]等生物中发现父本基因组存在某种程度的延迟表达现象, 使得这些杂交子代在发育早期不能表现出明显的杂种优势现象。因此, 正反交或回交夏鲆发育早期在生长上没有明显杂种优势的现象有可能与父本基因组的延迟表达有关。当然, 养殖室内的培养条件也可能并非正反交与回交夏鲆的最适生长条件。要解释这一问题需要对等位基因在受精后的表达进行追踪以及对培养条件进一步优化。

参考文献:

- [1] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 40.
- [2] 李思发. 淡水鱼类种群生态学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1990: 25-30.
- [3] 于道德, 肖志忠, 徐世宏, 等. 杂交鲆(牙鲆♀×夏鲆♂)胚胎发育的初步观察[J]. 海洋科学, 2007, 31(2): 55-60.
- [4] 田永胜, 陈松林, 刘本伟, 等. 大西洋牙鲆冷冻精子×褐牙鲆卵杂交胚胎的发育及胚后发育[J]. 水产学报, 2006, 30(4): 433-443.
- [5] 关键, 柳学周, 蔡文超, 等. 褐牙鲆(♀) × 犬齿牙鲆(♂)杂交子一代胚胎发育及仔稚鱼形态学观察[J]. 中国水产科学, 2007, 14(4): 644-653.
- [6] Xu D D, You F, Wu Z H, et al. Genetic characterization of asymmetric reciprocal hybridization between the flatfishes *Paralichthys olivaceus* and *Paralichthys dentatus*[J]. Genetica, 2009, 137: 151-158.
- [7] Yu D D, Xiao Z Z, Liu Q H, et al. Ontogeny of gastrointestinal tract in hybrid flounder *Jasum*, *Paralichthys olivaceus* × *P. dentatus* [J]. J World Aquacult Soc, 2010, 41: 344-357.
- [8] Tymchuk W E, Devlin R H. Growth differences among first and second generation hybrids of domesticated and wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquaculture, 2005, 245: 295-300.
- [9] 殷名称. 鱼类生态学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 136-137.
- [10] 王波, 张朝晖, 谭萌, 等. 大西洋牙鲆胚胎发育的形态观察[J]. 海洋科学进展, 2007, 25(2): 191-199.
- [11] Johns D, Howell W, Klein-MacPhee. Yolk utilization and growth to yolk-sac absorption in summer flounder (*Paralichthys dentatus*) larvae at constant and cyclic temperature[J]. Mar Biol, 1981, 63: 301-308.
- [12] 胡亚丽, 华元渝. 东方杂交鲆的胚胎和仔鱼的发育[J].

- 湖南师大学报(自然科学版), 1996, 19(1): 59-63.
- [13] 夏仕玲. 鱼类卵细胞质对胚胎发育速度的调控[J]. 珠江水产, 1992, 18: 65-68.
- [14] 马梁, 王军, 陈武各. 鲩状黄姑鱼与大黄鱼人工杂交子代的胚胎发育[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 41(3): 378-382.
- [15] Stephanie M, Stefan S. Equivalent parental contribution to early plant zygotic development[J]. *Curr Biol*, 2007, 17(19): 1686-1691.
- [16] Vielle-Calzada J P, Baskar R, Grossniklaus U. Delayed activation of the paternal genome during seed development[J]. *Nature*, 2000, 404: 91-94.
- [17] Grimanelli D, Perotti E, Ramirez J, *et al.* Timing of the maternal-to-zygotic transition during early seed development in maize[J]. *Plant Cell*, 2005, 17: 1061-1072.
- [18] Sawicki J A, Magnuson T, Epstein C J. Evidence for expression of the paternal genome in the two-celled mouse embryo[J]. *Nature*, 1981, 294: 450-451.

Comparison of embryonic development and growth of hybrids and backcrosses from *Paralichthys olivaceus* and *Paralichthys dentatus*

SUI Juan¹, XU Shi-hong¹, WANG Wen-qi², MA Dao-yuan¹, XIAO Zhi-zhong¹, XIAO Yong-shuang¹, LIU Qing-hua¹, LI Jun¹

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Qingdao Agricultural University, Institute of animal science and technology, Qingdao 266109, China)

Received: Nov., 12, 2010

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *Paralichthys dentatus*; hybridization; backcross; early development

Abstract: Reciprocal and back crosses were carried out on *Paralichthys olivaceus* (Po) and *Paralichthys dentatus* (Pd) by artificial fertilization. The embryonic and larvae development were compared among the six groups. The results showed that, at 18.0°C±0.5°C, the embryos of *P. olivaceus*, Po(♀) × Pd(♂), F1(♀) × Po(♂) and F1(♀) × Pd(♂) took 41, 47, 42.5, and 44 h to hatch, respectively. At 16.5°C±0.5°C, the embryos of *P. dentatus* and Pd(♀) × Po(♂) took 61 h 40 min and 66 h to hatch, respectively. For Po(♀) × Pd(♂) and two back crosses, the embryos developed normally. While most of the embryos from Pd(♀) × Po(♂) developed with abnormal cleavage, only few embryos hatched out normally. During a 64-day cultivation of the post hatching larvae, all hybrids of Pd(♀) × Po(♂) died at 3-4 days post hatching (dph) and F1(♀) × Po(♂) offspring died completely at 18 dph. The progenies of Po(♀) × Pd(♂) and F1(♀) × Pd(♂) experienced normal development and growth stages as that of *P. olivaceus*.

(本文编辑: 谭雪静)