

文章编号:1000-0615(2007)01-0068-08

中国对虾杂交优势对自然感染白斑综合征 病毒的抗病力分析

李素红^{1,2}, 张天时¹, 孟宪红¹, 孔杰¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:一个包括42个全同胞家系的中国对虾选育群体, 荧光标记后每个家系各取40尾健康个体混养, 自然发病并确认感染白斑综合征病毒(white spot-syndrome virus, WSSV)。发病1周后将所有个体取出, 统计各家系的存活率, 并对活体利用巢式聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)进行WSSV检测。对存活率进行分析, 结果显示:4个家系的存活率在60%以上, 7个家系的存活率在20%以下; 存活率与第一次扩增阳性率、第二次扩增阳性率呈不显著负相关。第一次扩增阳性率与第二次扩增阳性率呈极显著正相关。结合两次扩增的阳性率分析得出:青岛野生群体内自交产生的一个家系和韩国群体养殖家系与乳山野生群体杂交产生的一个家系在抗病力上显著优于其它家系; 经独立样本 t 检验表明, 群体间交配组合的存活率差异不显著, 因此家系选育可能是进行抗WSSV品种选育的重要途径。多重比较结果发现:韩国群体养殖家系(δ)与乳山野生群体(η)杂交后代的存活率($56.20\% \pm 8.75\%$)显著高于韩国群体养殖家系自交后代($22.50\% \pm 2.50\%$) ($P < 0.05$), 说明该杂交后代在抗WSSV方面有一定程度的杂种优势。而韩国群体养殖家系(δ)和乳山野生群体(η)的杂交后代所表现的杂种优势(26.95)与其反交后代(3.85)差异显著。

关键词:中国对虾; 巢式PCR; 白斑综合征病毒

中图分类号:S 945.1; Q 959.223.1

文献标识码:A

Analysis of the resistance of heterosis in *Fenneropenaeus chinensis* to natural infection with white spot syndrome virus

LI Su-hong^{1,2}, ZHANG Tian-shi¹, MENG Xian-hong¹, KONG Jie¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: A selected population of the shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) was tagged, which included 42 full-sib families. A sample of 40 tagged test animals per family was infected by WSSV without hominine help. A week later, the surviving animals were taken out and then the survival rate per family was calculated. The virus positive rate of white-spot syndrome per family was detected by nested-PCR (Polymerase Chain Reaction) for every survivor. Comparison was carried out between pairs of families mainly in terms of the survival rates and the conclusion as follows: 4 families' survival rates were over 60

收稿日期:2006-01-17

资助项目:山东省自然科学基金(Y2004D05); 国家“八六三”课题(2003AA603021); 中挪合作项目“对虾复合育种技术”

作者简介:李素红(1979-), 女, 山东菏泽人, 硕士, 从事种苗工程与种质资源管理研究。E-mail: lisuhong1008@163.com

通讯作者:孔杰, Tel:0532-85823291; E-mail: kongjie@sina.com

percent and 7 families' survival rates were under 20 percent. The analysis of correlation among the indexes indicated that the relationship between the survival rate and the virus positive rate of the first-step and second-step PCR was negative correlation and not significantly different. However, there was positive correlation and significant difference between the virus positive rate of the first-step and the second-step PCR. The analysis was carried out depending on both the survival rate and the virus positive rate and the results as follows: one self-fertilized family of Qingdao population and one hybridized family between the cultured family population of Korea(♂) and Rushan population(♀) were much better than those of the others in resistance to WSSV. There were no significant differences between pairs of cross combinations in the survival rate, which were analysed by independent-sample T test. So the family selection probably was the main method for culturing WSSV-resistant breed. The cross combinations were analysed by multiple comparison method and the result showed: there was difference between the cross combination of the cultured family population of Korea(♂) and Rushan wild population(♀) (56.20% ± 8.75%) compared with the self-fertilized combinations of the cultured family population of Korea ($P < 0.05$) in resistance to WSSV, which showed the cross combination could get the heterosis. However, there was great difference between the cross combination of the Rushan wild population(♂) and the cultured family population of Korea(♀) compared with their reciprocal hybrids in heterosis.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; nested-PCR; white-spot syndrome virus (WSSV)

白斑综合征(white spot syndrome, WSS)是目前对虾养殖中的主要病害之一,其病原体为白斑综合征病毒^[1]。从1993年WSSV暴发至今,科研工作者仍未找到有效的预防和治疗措施,WSSV一直困扰着中国对虾养殖业的发展。对中国对虾进行品种改良成为走出困境的另一条出路。

杂交是动植物遗传改良的重要手段,其作用主要是直接利用杂种优势或为育种制备中间材料^[2]。十多年前,人们已开始对对虾进行了遗传改良,并取得了显著成果。美国CEATECH HHGI育种公司通过遗传改良计划,成功培育了抗Taura综合征病毒(TSV)的高健康凡纳对虾,并对养虾业产生了重要影响^[3];法国海洋开发研究院(IFREMER)已成功选育出抗IHHNV的蓝对虾(*Penaeus stilyrostris*)种群^[4]。而在中国,在1993年WSSV暴发以前尚未建立起系统的亲虾驯化和培育基地。中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)曾是我国对虾养殖的重要养殖对象之一,所用亲虾主要是海捕的野生个体,再加上长期盲目的引种、人工放流等造成种质退化,高密度的集约化养殖使得虾病流行^[5],使中国对虾养殖业受到重挫,造成了巨大的经济损失。因此,抗病品系选育成为必需解决的问题。

自1997年起,中国水产科学研究院黄海研究

所主要对中国对虾快速生长性状和抗病性状进行了人工选育^[6],以期选育出生长快抗病力强的新品种。在抗病性状的选育过程中一般采用人工感染实验,即在饥饿状态下投喂毒饵或注射病毒,以保证实验个体同时感染同剂量(相对于体重)的病毒。在育种计划中,为保证计划的顺利进行,需要明确每个家系抵抗WSSV病毒的情况,其自然感染状况在一定程度上也反映出了这个家系抗WSSV的能力。但是,人工感染因为强制性地对每个个体进行感染,不能完整地反映出对虾在自然条件下感染病毒后实际的染病、死亡等过程。基于这个目的,本文调查了一个中国对虾选育群体在自然养殖条件下染病、发病的情况,并利用巢式PCR技术对自然养殖条件下发病的中国对虾全同胞的家系进行WSSV检测,对其感染状态进行评估,比较各个杂交组合后代对WSSV的抵抗能力,选出对WSSV抵抗力强的家系,以期为中国对虾WSSV病的防治提供参考,并为下一步抗病品种培育提供中间材料。

1 材料与方法

1.1 材料来源

材料采用未交尾的8个亲本群体,具体采样时间地点见表1。2004年11月-2005年3月期间,通过自然交尾或人工授精在这8个亲本群体

表 1 8 个亲本群体的体长及采样时间和地点
Tab. 1 Body length and collected time and location of 8 populations

群体名称 population name	采集时间 sampling time	采集地点 sampling location	体长 (cm) body length
乳山湾海捕 Rushan bay wild population, RS	2004-10	乳山湾 Rushan Bay	14.0 ~ 17.4
黄海“一号” Huanghai No. 1, HHI	2005-03	黄海所鳌山卫引种育种中心 breeding center of Aoshanwei	15.4 ~ 19.2
青岛近海海捕 Qingdao wild population, QD	2004-11	青岛近海 Qingdao nearshore	13.8 ~ 16.4
日照野生群体 Rizhao wild population, RZ	2004-09	日照近海 Rizhao nearshore	14.0 ~ 17.6
即抗“98” Jikang 98, JK98	2004-11	黄海所鳌山卫引种育种中心 the breeding center of Aoshanwei	13.1 ~ 17.2
韩国群体养殖家系 the cultured family population of Korea, FKF	2004-11	黄海所鳌山卫引种育种中心 the breeding center of Aoshanwei	16.4 ~ 17.8
韩国群体养殖子二代 the cultured family population F ₂ of Korea, KFC	2004-09	黄海所鳌山卫引种育种中心 the breeding center of Aoshanwei	13.6 ~ 16.2
韩国野生群体 the wild population of Korea, FK	2004-09	朝鲜半岛南海岸 the south coast of Korea peninsula	15.7 ~ 18.2

间和群体内建立家系,以所构建家系雌虾的眼柄标记来命名家系。2005年7月25日从42个家系中每个家系取5尾进行巢式PCR检测。8月1日,将42个家系所取的1680个个体(每个家系选择40个,体长4~5cm)分别用VIE(visible implant elastomer)^[7]进行荧光标记后,放养在同一100 m³圆形水泥池(池内径500 cm,高127 cm)中,然后连续观察,8月7日开始发现有虾呈发病状态,发现有死亡的虾立即捞出,至大约一半个体死亡,即8月14日取出所有未死亡的虾,根据荧光标记鉴别家系,统计各家系的存活率,并用巢式PCR检测各家系感染WSSV的阳性率。阳性对照由黄海水产研究所病研室提供。

1.2 PCR引物

PCR引物是中国科学院黄海水产研究所育种室自行设计由上海生工生物工程技术有限公司合成。对引物的可靠性和检出灵敏度已经过检验,证明该引物具有良好的特异性和灵敏度,其引物位置及序列见图1^[8]。

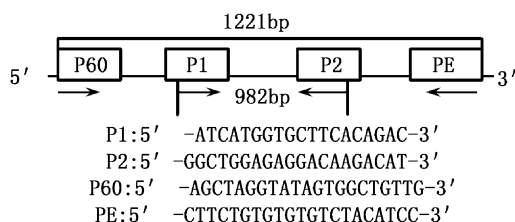


图 1 4 个 PCR 引物位置示意图及引物序列
Fig. 1 Location representation and sequences of the four primers

1.3 测定方法

基因组 DNA 的提取 取病虾鳃提取基因组 DNA,采用常规的酚/氯仿抽提法,具体操作见刘萍等^[9]。基因组 DNA 用高压灭菌的 ddH₂O 稀释至 100 ng · mL⁻¹, -20 °C 保存备用。

PCR 反应及电泳检测 PCR 反应在 System-9600 反应仪上进行,反应体系包括: 10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH8.0), 50 mmol · L⁻¹ KCl, 0.1% TritonX-100, 2 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 0.8 mmol · L⁻¹ dNTPs, 0.8 μmol · L⁻¹ 引物, 0.6 U Taq 酶, 100 ng 模板 DNA, 双蒸水补充至 15 μL。PCR 反应经 94 °C 预变性 5 min, 之后是 25 个循环, 每一个循环包括: 94 °C 40 s, 53 °C 40 s, 72 °C 2 min, 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。反应产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色, 然后于 Gel Doc 1000 上成像, 观测结果。

1.4 数据处理

数据处理与分析 家系间的存活率和巢式 PCR 两次扩增阳性率的比较采用卡方检验, 群体间的存活率及两次扩增阳性率用独立样本 *t* 检验, 数据处理与分析采用 SPSS11.0 统计分析软件, 显著性检验水平为 0.05。

如果资料的 *p* 值在 0.3 ~ 0.7, 则因不同处理的误差均方差差异不大, 即可直接进行方差分析。如果资料 *p* 值大于 0.7 或小于 0.3 时, 则需将全部的 *p* 值转换成 θ 尺度再作方差分析, 即 $\theta = \sin^{-1} \sqrt{p}$ ^[10]。

在对杂交组合间的第一次扩增阳性率和第二

次扩增阳性率作方差分析时,需将数值按上式进行转换后再作比较。

杂种优势的计算 确定一个父本 P_1 和一个母本群体 P_2 。对某一个数量性状而言,这两个群体杂交产生的子一代群体均值 MF_1 超过两亲本群体均值平均数的部分称为杂种优势 H , 即有:

$$H = MF_1 - \frac{1}{2}(MP_1 + MP_2)^{[11]}$$

式中: MP_1 、 MP_2 分别为父本和母本群体均值。

2 结果与分析

2.1 各家系混养前巢式 PCR 检测结果

对每个家系取的 5 尾虾进行巢式 PCR 检测,结果显示全部呈阴性(部分检测结果见图 2),表明所有家系在混养时不携带 WSS 病毒。



图 2 混养前几个家系的 WSSV 感染情况

Fig. 2 Detective results of several families infected with WSSV before mixed culture

1~5 为绿 6 家系; 7~10 为绿 15 家系; 11~14, 17 为蓝 175 家系; 18 为蓝 116 家系; 15 为阳性对照; 16、阴性对照; M 为 Marker

1-5: G6 family; 7-10: G15 family; 11-14, 17: B175 family; 18: B116 family; 15: positive control; 16: negative control; M: Marker

2.2 家系间的比较

家系间感染 WSSV 情况的比较 通过对各家系存活率的统计以及用巢式 PCR 对存活个体进行 WSSV 感染情况的检测表明,各指标在家系间的变化很大(表 2)。从表 2 可以看出:有 4 个家系的存活率在 60% 以上,如自交组合 RS × RS 的后代绿 37、自交组合 RS' × RS' 的后代绿 6、自交组合 QD × QD 的后代粉 402、杂交组合 FKF(♂) × RS(♀)(该文中的交配组合都为父本在前母本在后)的后代绿 344; 7 个家系的存活率在 20% 以下,如自交组合 RS × RS 的后代绿 15、杂交组合 RS × FKF 的后代蓝 175、杂交组合 RS × FKF 的后代蓝 116、杂交组合 RS × FKF 的后代蓝 102、自交组合 QD × QD 的后代粉 403、自交组合 HH1 ×

HH1 的后代粉 405、自交组合 FKF × FKF 的后代蓝 236 家系; 韩国养殖群体家系与乳山野生杂交的后代绿 344 和青岛野生群体后代(F_1)粉 402 的存活率仅次于乳山野生群体后代自然交配的后代绿 6 但综合第一次扩增和第二次扩增的阳性率看,自交组合 QD × QD 的后代粉 402、杂交组合 FKF × RS 的后代绿 344 的阳性率显著低于其他家系。因此,综合本实验各项指标可以得出如下结论,青岛野生群体后代(F_1)粉 402 和韩国养殖群体家系与乳山野生群体的杂交后代绿 344 在抗病力上显著优于其它家系。

指标间的相关性分析 各项指标的相关性分析见表 3。从表 3 可以看出:存活率与第一次扩增阳性率、第二次扩增阳性率均呈负相关,且相关不显著($P > 0.05$);第一次扩增阳性率与第二次扩增阳性率之间呈正相关,且相关极显著($P < 0.01$)。

2.3 杂交组合间感染 WSSV 情况的比较

家系间的存活率差异较大,为了分析其差异来源,进一步对组合间的存活率进行分析比较,各杂交组合(组合内家系数大于 1)的存活率、第一次扩增、第二次扩增阳性率(取各组合内所有家系的平均值 ± 标准误)见表 4,其变化差异程度见图 3。用 SPSS11.0 软件对各杂交组合(组合内家系数大于 1)的 3 项指标进行方差分析,结果见表 4 和表 5。由于第一次扩增、第二次扩增阳性率的数值分布不在 0.3~0.7 之间,因此对其进行反正弦转换后再进行方差分析。

对 9 个杂交组合间后代的存活率进行独立样本 t -检验表明:中国对虾 9 个杂交组合间后代的存活率在整体上差异不显著($P = 0.54 > 0.05$)(表 5)。对 9 个组合的 3 项指标进行多重分析结果(表 4)可以看出 FKF × RS(56.20% ± 8.75%)组合后代的存活率显著高于 FKF 群体内自交产生后代的存活率(22.50% ± 2.50%)($P < 0.05$);而 FKF × RS 与其反交组合 RS × FKF(34.58% ± 3.94%)、母本组合 RS × RS(36.0% ± 7.48%)及其余组合间两两差异不显著($P > 0.05$);RS × FKF 组合与其父母本自交后代的存活率差异不显著。在第一次扩增阳性率上,FKF × RS 组合(41.8%)显著低于 RS × FKF 组合(76.48%)($P < 0.05$)。因此综合来说,FKF × RS 组合的后代在抗病力上高于其父本及反交后代。

表 2 各家系感染 WSSV 的情况
Tab. 2 WSSV infective results in all families of *F. chinensis*

杂交组合 cross combinations	家系 families	入池数 input number	出池数 output number	存活率(%) survival rate	第一次扩增 阳性率(%) first-step PCR positive rate	第二次扩增 阳性率(%) second-step PCR positive rate
RS × RS	绿 35	40	15	37.5	60	93
	绿 5	40	11	27.5	63.6	81.1
	绿 15	40	7	17.5	85.7	85.7
	绿 37	40	25	62.5	80	92
	绿 324	40	14	35	35.7	57.1
FKC × RS	绿 8	40	9	22.5	55.6	77.8
	绿 70	40	22	55	54.5	72.7
	绿 74	40	20	50	40	70
RS × FKF	蓝 175	40	7	17.5	71.4	100
	蓝 148	40	15	37.5	80	100
	蓝 205	40	21	52.5	61.9	95.2
	蓝 193	40	11	27.5	81.8	100
	蓝 151	40	21	52.5	76.2	100
	蓝 116	40	8	20	62.5	100
	蓝 179	40	12	30	83.3	91.7
	蓝 210	40	13	32.5	69.2	92.3
	蓝 153	40	13	32.5	84.6	100
	蓝 102	40	6	15	66.7	100
	蓝 135	40	21	52.5	85.7	95.2
	蓝 136	40	18	45	94.4	100
	FKF' × FKF' (自然交尾)	蓝 161	40	9	22.5	88.9
蓝 142		40	18	45	94.4	100
蓝 186		40	15	37.5	86.7	100
蓝 137		40	13	32.5	69.2	100
RS' × RS' 1 (自然交配)	38962	40	14	35	78.6	85.7
	绿 94	40	20	50	55	100
	绿 99	40	18	45	50	100
	3596	40	11	27.5	54.5	81.8
	绿 6	40	28	70	86.4	100
QD × QD (F ₁)	粉 403	40	6	15	16.7	100
	粉 402	40	25	62.5	12	80
HH1 × HH1 (F ₁)	粉 405	40	6	15	50	100
HH1 × RS	绿 73	40	13	32.5	38.4	100
FKF × RS	绿 304	40	19	47.5	68.4	100
	绿 344	40	26	65	15.3	73
FKF × FKF	黄 413	40	10	25	30	100
	蓝 236	40	8	20	100	100
FK × RS	绿 27	40	10	25	90	100
	绿 308	40	23	57.5	43.5	86.9
	绿 1	40	14	35	100	100
RS × JK98	绿 346	40	21	52.5	37.5	100

注: FKF'、RS' 表示自然交尾

Notes: FKF' and RS' mean populations that were attained by natural mating

2.4 杂种优势的分析

本实验中,一些群体的自交系未能建立,只能计算 RS、FKF、HH1 3 个群体相互杂交的杂种优势。从表 4 中存活率的杂种优势结果可以看出 RS × FKF、HH1 × RS 和 FKF × RS 杂交后代的存

活率都高于两亲本均值,其杂种优势值分别为 3.85、7.26、9.95,虽然经独立样本 *t*-检验组间间的存活率差异不显著,但也在一定程度上显示了杂种优势,并且杂交组合 FKF × RS(26.95)和 RS × FKF(3.85)的杂种优势差异显著。这进一步证实

了上述得出的结论。

表 3 各指标间的相关性分析
Tab.3 The correlation analysis among the indexes

	存活率(%) survival rate	第一次扩增阳性率(%) first-step PCR positive rate	第二次扩增阳性率(%) second-step PCR positive rate
存活率(%) survival rate	1		
第一次扩增阳性率(%) first-step PCR positive rate	-0.13	1	
第二次扩增阳性率(%) second-step PCR positive rate	-0.17	0.47**	1

表 4 杂交组合间感染 WSSV 的比较
Tab.4 Condition of all cross combinations infected with WSSV

杂交组 cross combinations	家系数 families number	存活率(%) survival rates	杂种优势 heterosis	95% 置信区间 confidence interval		第一次扩增 阳性率(%) first-step PCR positive rate	第二次扩增 阳性率(%) second-step PCR positive rate
				上限 upper bound	下限 lower bound		
RS × RS	5	36.0 ± 7.48 ^{ab}		56.78	15.22	65.0 ± 7.48 ^{bc}	81.78 ± 6.54 ^{ab}
FKC × RS	3	42.5 ± 10.10 ^{ab}		85.97	-0.97	50.03 ± 5.03 ^{bc}	73.50 ± 2.29 ^a
RS × FKF	12	34.58 ± 3.94 ^{ab}	3.85 ^a	43.25	25.91	76.48 ± 2.94 ^c	97.87 ± 0.95 ^c
FKF' × FKF'	4	34.37 ± 4.72 ^{ab}		49.39	19.36	84.80 ± 5.45 ^c	100.00 ± 0.00 ^c
RS' × RS'	5	45.50 ± 7.26 ^{ab}		65.67	25.33	64.90 ± 7.34 ^a	93.50 ± 4.03 ^{bc}
QD × QD	2	38.70 ± 23.75 ^{ab}		340.52	-263.02	41.30 ± 2.35 ^{bc}	95.00 ± 5.00 ^{bc}
FKF × RS	2	56.20 ± 8.75 ^b	26.95 ^b	167.43	-54.93	14.8 ± 26.55 ^b	86.50 ± 13.50 ^{abc}
FKF × FKF	2	22.50 ± 2.50 ^a		54.27	-9.27	65.00 ± 35.00 ^b	100.00 ± 0.00 ^c
FK × RS	3	39.17 ± 9.61 ^{ab}		80.52	-2.18	77.83 ± 17.41 ^c	95.60 ± 4.37 ^{bc}
RZ × RZ	1	20.00 ± 0.00				37.50 ± 0.00	75.00 ± 0.00
HH1 × HH1	1	15.00 ± 0.00				50.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
HH1 × RS	1	32.50 ± 0.00	7			38.40 ± 0.00	100.00 ± 0.00
RS × JK98	1	52.50 ± 0.00				37.50 ± 0.00	87.50 ± 0.00

注:有相同字母的表示差异不显著($P > 0.05$);有不同字母的表示差异显著($P < 0.05$)。

Notes: same letter between two values means no significant difference ($P > 0.05$); different letter between two values means significant difference ($P < 0.05$)

表 5 中国对虾各杂交组合存活率方差分析表

Tab.5 Variation analysis of survival rate of different cross combinations in *F. chinensis*

变异来源	平方和 sum of square	自由度 df	均方 mean square	F 值 F-value	P 值 P-value
组间 between groups	1706.06	8.00	213.26	0.89	0.54
组内 within groups	6950.52	29.00	239.67		
总值 total	8656.58	37.00			

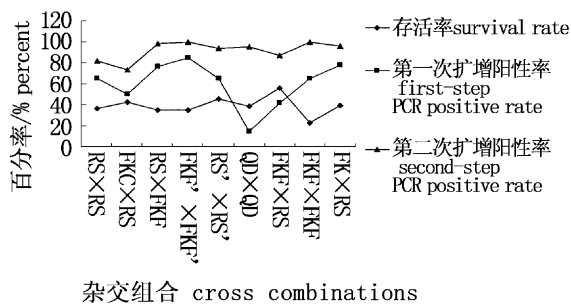


图 3 各杂交群体间的感染情况
Fig.3 The comparison of all cross combinations infected with WSSV

3 讨论

3.1 家系间自然感染白斑综合征病毒后抗病力的比较

中国对虾感染 WSSV 后, WSSV 病毒首先感染鳃(浸泡)或消化道(经口)后进入血细胞,并在血细胞内增殖,进而随循环系统感染其他组织器官的细胞^[12]。巢式 PCR 技术具有良好的特异性和灵敏性,可以检测出 1 pg 的 WSSV 病毒。本实验利用巢式 PCR 技术取在自然养殖条件下发病的中国对虾的鳃组织进行 WSSV 检测,具有很

好的可靠性。

中国对虾一些个体感染 WSSV 后而不死亡,说明中国对虾对 WSSV 有一定的耐病力,董世瑞等^[13]在不同饵料对中国对虾幼虾生长及感染 WSSV 存活率的影响的实验中也证明了这一点;一些个体在白斑病毒暴发的环境中,WSSV 检测呈阴性,说明这些个体对 WSSV 具有一定的抗感性。因此阳性率可以衡量中国对虾各家系对 WSSV 的耐受力 and 抗感性,可以作为在家系间或组合间比较对 WSSV 抵抗能力的辅助指标。在存活率差异不显著的前提下,抗感性强的家系在抗病力上优于耐受力强的家系。因此,本实验,在同样的养殖环境下,存活率高的杂交组合后代对 WSSV 的抵抗力强于存活率低的杂交组合后代。在存活率差异不显著时,从阳性率来看,阳性率低的杂交组合后代在对 WSSV 的抗感性上优于阳性率高的杂交组合后代;同样,阳性率和存活率都很高的家系在对 WSSV 的耐受力上也强,而阳性率低存活率高的家系在对 WSSV 的抗感力强于其它家系。本实验结果自交组合 RS × RS 后代绿 37、自交组合 RS' × RS' 后代绿 6 家系、自交组合 QD × QD 后代粉 402 和杂交组合 FKF × RS 后代绿 344 4 个家系的存活率都在 60% 以上,且两两之间差异不显著,说明这 4 个家系在对 WSSV 的抵抗力上可能强于其它存活率低的家系。从 4 个家系的 WSSV 感染阳性率来看,青岛野生群体内自交后代粉 402 和韩国群体养殖家系与乳山野生群体的杂交后代绿 344 在对 WSSV 的抗感性上可能优于乳山野生群体内自交后代绿 37 和乳山野生群体内自然交配后代绿 6 家系。后两个家系的存活率高于其它家系,说明乳山野生群体内自交后代绿 37 和乳山野生群体内自然交配后代绿 6 家系对 WSSV 的耐受力可能强于其它家系。因此,青岛野生群体内自交后代粉 402 和韩国群体养殖家系与乳山野生群体的杂交后代绿 344 在对 WSSV 的抗病力可能强于其它家系。

3.2 杂交组合效应

杂种优势是指两个遗传背景不同的亲本杂交产生的杂种在生长势、生活力、生殖力、抗逆性、产量和品质上比亲本的一方或双亲优越的现象。杂种优势的大小不仅取决于基因型,还与所处的环境有密切联系,环境不具备或者不完善,所具有的基因型就不能充分的表达,优势的潜能就不能实

现^[2]。实验中所有中国对虾家系是由 8 个群体的不同组合通过人工授精和自然交尾两种方式建立,混养前标准化管理,因此排除了因各组合后代所处的养殖环境不同而影响杂种优势表达的情况。本文讨论了 9 个组合的后代(家系数目大于 1)在对 WSSV 抵抗力上的差异。通过方差分析(表 5),结果表明:在整体上,组合间的存活率差异不显著($P > 0.05$),这种情况可能说明各群体的遗传结构不同不是造成家系间存活率差异显著的主要原因,这种差异可能主要是由各个亲本的遗传背景不同造成的,因此家系选育可能是进行抗 WSSV 品种选育的重要途径。多重比较结果发现:FKF × RS ($56.20\% \pm 8.75\%$) 和 FKF × FKF ($22.50\% \pm 2.50\%$) 两种组合后代的存活率差异显著($P < 0.05$);而 RS × FKF 杂交组合与其父母本自交后代及反交后代的存活率差异不显著,但杂交组合 FKF × RS 所表现的杂种优势显著大于 RS × FKF ($P < 0.05$),说明 FKF × RS 杂交组合后代存在一定程度的抗 WSSV 杂种优势。

3.3 展望

刘小林等^[14]在扇贝育种中指出,野生亲本使养殖群体经济性性状改进量和纯化程度均较低,因此很难期望得到稳定的杂种优势。通过选择育种,克服种质退化,提供更为纯合的杂交亲本是杂交育种和提高杂种优势的基础。本实验中韩国群体养殖家系经过家系选育,基因型比较纯合;而乳山野生群体是未经选育的野生群体,遗传多样性较为丰富,但同样也由于其基因型非常混杂不纯,产生的子代表型参差不齐从而也导致杂种优势减弱或消失。这正好能解释在 RS 群体内自交产生的后代绿 6 和绿 37 家系与组合内各家系在抗病力上差异显著,同样可以说明各杂交组合后代在整体上抗病力差异不显著而家系间差异显著的情况。虽然这种野生亲本群体背景复杂,产生的后代不稳定,但也有一定的利用价值,可以利用这些产生杂种优势的亲本后代培育中间材料,为下一步抗病品种选育打好基础。Wada^[15]通过对不同选择品系间的杂交以及对养殖的不同地理群体间的杂交表明在成活率和壳厚方面都显示了杂种优势,说明了亲本纯正的重要性。因此,通过对野生群体经过家系选育,把与优良性状相关的基因进一步富集,利用杂种优势培育出适应我国养殖条件的高产、抗病新品种。

参考文献:

- [1] 黄 健,于 佳,王秀华,等. 单克隆抗体酶联免疫技术检测对虾皮下及造血组织坏死病的病原及其传播途径[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 40 - 50.
- [2] 张国范,刘 晓,阙华勇,等. 贝类杂交及杂种优势理论和技术研究进展[J]. 海洋科学, 2004, 28(7): 54 - 60.
- [3] Bienfang P K, Sweeney J N. The use of SPF brood stock to prevent disease in shrimp farming [J]. Aquaculture Asia, 2001, 6(1): 12 - 14.
- [4] 王清印. 养殖对虾的优良品种选育与海洋生物技术[R]. 海洋高新技术产业化高级论坛, 2000: 192 - 201.
- [5] 高冬梅,李 健,王清印. 养殖对虾新品种培育技术研究进展[J]. 中国水产科学, 2002, 9(4): 375 - 378.
- [6] 李 健,牟乃海,孙修涛,等. 无特定病原中国对虾群体选育的研究[J]. 海洋科学, 2001, 25(12): 30 - 33.
- [7] Godin D M, Carr W H, Hagino G, et al. Evaluation of a fluorescent elastomer internal tagged in juvenile and adult shrimp *Penaeus vannamei* [J]. Aquaculture, 1996, 13(9): 243 - 248.
- [8] 邓 灯,张庆文,王伟继,等. 中国对虾几个产卵场群体携带白斑综合征病毒状况调查[J]. 水产学报, 2005, 29(1): 74 - 78.
- [9] 刘 萍,孔 杰,石 拓,等. 中国对虾黄渤海沿岸地理群的 RAPD 分析[J]. 海洋学报, 2000, 22(5): 88 - 93.
- [10] 李 馨,刘胜军,朱香萍,等. 生物实验统计学[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2001: 104.
- [11] 盛志廉,陈瑶生. 数量遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 319.
- [12] 吴文林,戴聪杰,王 磊. PCR 法分析 WSSV 在日本对虾体内的感染增殖[J]. 泉州师范学院学报, 2005, 23(2): 77 - 80.
- [13] 董世瑞,高 焕,孔 杰,等. 不同饵料对中国对虾幼虾生长及感染 WSSV 存活率的影响[J]. 中国水产科学, 2006, 13(1): 52 - 58.
- [14] 刘小林,常亚青,相建海,等. 栉孔扇贝不同种群杂交效果的研究[J]. 海洋学报, 2005, 27(2): 135 - 139.
- [15] Wada K T. Breeding study of the pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Bull Natl Res Inst Aquac, 1984, 6: 79 - 157.