

太平洋牡蛎与近江牡蛎的种间杂交

张跃环^{1,2}, 王昭萍^{1*}, 闫喜武³, 姚 托¹, 虞志飞³, 霍忠明¹,
于瑞海¹, 李晓喻⁴, 李雅林⁴, 郭希明⁵

(1. 中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 中国科学院南海海洋研究所, 海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广东 广州 510301;

3. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁省贝类良种繁育工程技术研究中心, 辽宁 大连 116023;

4. 青岛崂东海珍品良种培育有限公司, 山东 青岛 266105;

5. 美国新泽西州立大学 Haskin 贝类研究室, 新泽西 诺里斯 08349)

摘要: 为了评估太平洋牡蛎与近江牡蛎能否产生远缘杂种优势, 于 2010 年 5 月, 以成熟的两种牡蛎亲本为材料开展了 2×2 远缘杂交研究, 由长牡蛎自繁组 GG(*Crassostrea gigas*♀ × *C. gigas*♂)、近江牡蛎自繁组 AA(*C. ariakensis*♀ × *C. ariakensis*♂)、正交组 GA(*Crassostrea gigas*♀ × *C. ariakensis*♂)、反交组 AG(*C. ariakensis*♀ × *C. gigas*♂) 4 个实验组组成。分析了子代早期表型性状和杂种优势, 并对杂交子代进行了遗传鉴定。结果表明: GA 杂交组与 AG 组的受精强度具有不对称性。幼虫浮游期间, 表型性状的中亲杂种优势几乎为 0, GA 组生长与存活性状表现出积极的单亲杂种优势, 而 AG 组则具有明显的远交衰退现象; 幼虫早期表型性状受到母本效应影响, 而后减弱。变态期间, GA 组变态率较高, 得到了大量杂交稚贝; 而 AG 组变态率极低, 仅获得了 72 个杂交稚贝。稚贝培育期间, 稚贝表现出中亲生长劣势与存活优势; GA 组具有明显的单亲生长与存活优势, 而 AG 组则表现出生长劣势并具有一定程度的存活优势。利用复合 COI 及 ITS₂ 鉴定了种间杂交子结果表明: 正反交组杂交子均为真正意义上的两性融合杂交子。实验获得了具有显著杂种优势的 GA 组杂交子, 为现有牡蛎的遗传改良提供了新的方向。

关键词: 太平洋牡蛎; 近江牡蛎; 种间杂交; 杂种优势; 遗传鉴定

中图分类号: Q 321⁺.2; S 917.4

文献标志码: A

远缘杂交(distant hybridization)是指种间、属间乃至亲缘关系更远的生物类型之间的杂交。以往, 近缘杂交在育种中已经发挥了重要的作用, 使得动、植物种质资源得到了广泛交流, 有利基因得到了充分利用, 但是其潜力已越来越小。同时, 近缘杂交变异幅度非常有限, 现代育种学提出了更高的要求, 只靠近缘杂交无法解决, 因此, 远缘杂交越来越受到各国育种学家的重视。远缘杂交可以显著地扩大动植物基因库, 促进种间基因交流, 引入异种有利基因(特别是各种抗逆基因

等), 进而能够创造养殖中前所未有的变异类型, 或形成新的物种^[1]。

贝类的远缘杂交起源于牡蛎, 早在 1882 年, Bouchon-Brandely^[2]就开展了葡萄牙牡蛎(*Ostrea angulata*)与欧洲牡蛎(*O. edulis*)的种间杂交。在 1950 年, Davis^[3]研究了太平洋牡蛎 *O. gigas* × 美洲牡蛎 *O. virginica* 及美洲牡蛎 × 奥林匹亚牡蛎 *O. lurida* 的种间杂交。随后, 学者们开展了大量的牡蛎种间杂交研究。Gaffney 等^[4]在 1993 年对巨蚌属牡蛎的种间杂交进行研究并提出, 之前的牡蛎

收稿日期: 2012-02-23

修回日期: 2012-04-23

资助项目: 国家自然科学基金项目(31172403); 国家重点基础研究发展规划项目(2010CB126403)

通讯作者: 王昭萍, E-mail: zpwang@ouc.edu.cn

种间杂交由于尚未进行遗传鉴定,只通过表型性状观测,杂交成功的可信度令人怀疑。目前,遗传鉴定的牡蛎种间杂交组合有:太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas*×近江牡蛎 *C. rivularis*^[5]、太平洋牡蛎 *C. gigas*×美洲牡蛎 *C. virginica*^[4]、太平洋牡蛎 *C. gigas*×葡萄牙牡蛎 *C. angulata*^[6-7]、太平洋牡蛎 *C. gigas*×熊本牡蛎 *C. sikamea*^[8-10]、近江牡蛎 *C. rivularis*×美洲牡蛎 *C. virginica*^[11]、近江牡蛎 *C. ariakensis*×熊本牡蛎 *C. sikamea*^[12]等。这些杂交组合中,除了太平洋牡蛎与葡萄牙牡蛎可以成功的获得种间杂交子,其它的种间杂交很少能获得种间杂交子;但是,Wang等^[13]在2010年又将太平洋牡蛎与葡萄牙牡蛎重新划分为两个亚种,使得原来报道的这两个种间杂交变成了亚种间杂交。也就是,巨牡蛎属牡蛎的远缘杂交虽然报道较多,但真正成功的较少,生殖隔离障碍的突破仍存在较大困难与挑战。

太平洋牡蛎 *C. gigas*, 又称长牡蛎,在2008年Wang等^[14]将我国原有的大连湾牡蛎及褶牡蛎都划入这一物种。太平洋牡蛎主要分布在我国辽宁及山东,年产量近80万t,喜好高盐环境,是我国北方最主要的牡蛎经济种^[15]。近江牡蛎 *C. ariakensis* 又称“赤蚝”,是在2004年从原有的 *C. rivularis* 划分出来的,分布在我国南北沿海,主要集中在广东、广西,分布于我国南北低盐海^[16]。由于牡蛎分类问题在不断演变,使得以往的牡蛎种间杂交结果进一步受到质疑,太平洋牡蛎与近江牡蛎种间杂交已经报道过几次。周茂德等^[17]在1982年研究了太平洋牡蛎与近江牡蛎的种间杂交,当时使用的亲本近江牡蛎中含有香港巨牡蛎 *C. hongkongensis*, 而且太平洋牡蛎也可能含有葡萄牙牡蛎,使得杂交结果受到质疑,虽然获得了一些稚贝,但是缺少遗传鉴定,无法保证是真正意义上的杂交子。国外Allen等^[11]也研究了 this 杂交组合,获得很少的稚贝,并且进行了遗传鉴定,但尚未对这个杂种组合的杂种优势进行评估。Que等^[18]利用四倍体太平洋牡蛎与近江牡蛎进行了杂交,获得少量的杂交三倍体。总之,以上都说明,这两个物种间杂交是可行的,是否可以进一步突破生殖隔离障碍,获得更多的杂交稚贝是本研究的一个挑战。本文在突破了这两个物种配子兼容性的基础上,对种间杂交的表型性状进行了测定,并对杂交子进行遗传鉴定,从而达到对牡蛎养殖

性状进行遗传改良的目的。

1 材料与方法

1.1 亲本来源

在2010年4月,采集太平洋牡蛎(山东烟台)和近江牡蛎来(江苏南通)为实验材料,在青岛崂东海珍品良种培育有限公司进行人工促熟。至5月初,两种牡蛎性腺同步成熟。

1.2 实验设计

选取成熟的太平洋牡蛎3雌3雄,近江牡蛎3雌3雄,采用解剖精卵的方式,获得配子。解剖后,将亲本的闭壳肌用80%酒精固定,用于亲本遗传鉴定。将每个种类的3个个体的卵子混合到一起,精子混合到一起,即获得太平洋牡蛎混合卵子G♀及混合精子G♂,近江牡蛎的混合卵子A♀及混合精子A♂4个配子组。然后按照双列杂交设计原则,制作太平洋牡蛎自交组G♀×G♂,近江牡蛎自交组A♀×A♂,正交组G♀×A♂及反交组A♀×G♂,共计4个实验组。为了保证实验数据准确,每个实验设置3个重复。在杂交实验之前,卵子需要在海水中浸泡30~60min,使得卵子充分变圆;而且受精前检查是否有卵子被污染,易污染的弃掉,换取尚未污染的混合卵子作为实验样本,精子使用前检查其活力,以保证受精率。采用微充气孵化,密度控制在30~40个/mL。期间,水温25.2~25.8℃,盐度27。

1.3 幼虫培养

幼虫培育在60L塑料桶中,密度5~6个/mL,微充气培养。饵料为(*Isochrysis zhangjiangensis*)和小球藻(*Chlorella vulgaris*),前3天,只投湛江等鞭金藻,投喂量 $(0.3\sim 0.5)\times 10^4$ 细胞/(mL·d);之后,金藻与小球藻(体积比为1:1)混合投喂,投喂量 $(0.5\sim 2.0)\times 10^4$ 细胞/(mL·d),直至变态。根据幼虫的摄食情况适当增减饵料量,保持水中有足够的饵料。为了消除培育密度的影响,在培育阶段每3天对密度进行调整,使各个实验组密度基本保持一致。为避免实验组间混杂,各实验组的幼虫培育,严格隔离。幼虫培育期间,水温25.0~26.4℃,盐度25~28。

1.4 稚贝培养

当幼虫出现眼点时,以波纹板为附着基进行采苗。下板后7~8d,可以看到附着在波纹板上的

稚贝。稚贝培养期间, 饵料量增大, 根据稚贝摄食量随机调整投饵量; 期间, 水温在 18.3~25.0 °C、盐度 25~27。当稚贝生长至 60 日龄时, 采用震荡的方式将其剥离下来, 在大连庄河海量水产食品有限公司的虾池内进行单体培育。每个实验组设置 3 个重复, 每个重复随机选取 324 粒稚贝平均装进 9 个网袋(网孔 3 mm)中, 进行室外养成。由于 AG 杂交组只获得了 72 个稚贝, 将其装在 2 个网袋中进行培养。室外培育期间, 水温 12.0~30.0 °C, 盐度 24~27。随着稚贝生长定期更换网袋, 调整密度, 使各实验组密度保持一致。

1.5 测定指标

测定指标包括: 幼虫 0、3、6、9、12、15、18、21 日龄的壳高及存活率, 变态期间幼虫的变态率、变态时间及变态规格, 90、150 和 210 日龄稚贝壳高及存活率。卵径在显微镜下用目微尺(10×)测量, 受精率为受精卵密度与受精前卵密度的百分比; 孵化率为 D 形幼虫密度与受精卵密度的百分比。

变态规格为初生壳与次生壳交界处壳缘的最小壳高值。壳高 ≤ 400 μm 的幼虫在显微镜下用目微尺(100×)测量; 壳高 ≥ 3000 μm 的稚贝采用电子游标卡尺测量。每次测量时, 每个重复随机测量 30 个个体。

幼虫存活率为不同日龄幼虫密度与 D 形幼虫密度的百分比; 变态率为出现鳃原基、足、次生壳稚贝数与足面盘幼虫数量的百分率; 变态时间为从幼虫培育开始至 90% 幼虫完成变态的时间; 稚贝存活率为不同日龄稚贝数量与刚刚完成变态稚贝数量的百分率。

1.6 遗传鉴定

参照 Wang 等^[19]开发的复合 COI(线粒体细胞色素氧化酶 I)方法, 对其亲本及其子代进行母本测定。遗传鉴定参照 Wang 等^[20]开发的引物序列, 利用 ITS₂(细胞核核糖体 DNA 内转录间隔区 2)多态性, 对其进行扩增。该引物在太平洋牡蛎与近江牡蛎中片段大小不同, 可以有效区分这两个物种。联合使用复合 COI 及其 ITS₂ 这两种方法, 不仅能够区分出所有的杂交子, 而且能够区分出杂交子的正反交类型。

1.7 杂种优势

为了确定卵源及其配对策略对幼虫表性状的影响, 参照 Zhang 等^[21]方法, 利用双因子分析模型检测母本效应(EO)及配对方式(MT)对杂交组幼虫生长与存活的影响:

$$Y_{ijk} = u + EO_i + MT_j + (EO \times MT)_{ij} + e_{ijk}$$

式中: Y_{ijk} 为 k 个重复 i 个卵源 j 种配对方式下的壳长(存活率); u 为常数; EO_i 为壳长(存活率)的卵源效应(母本效应)($i=1, 2$); MT_j 为壳长(存活率)的配对效应($j=1, 2$); $(EO \times MT)_{ij}$ 为卵源与配对策略的交互作用; e_{ijk} 为随机误差($k=1, 2, 3$)。

为了确定种间杂交是否会有杂种优势产生, 参照 Zheng 等^[22-23]使用的方法, 用下面公式计算杂种优势(heterosis):

$$H_{G \times A} (\%) = [(GA + AG) - (GG + AA)] \times 100 / (GG + AA) \quad (1)$$

$$H_{GA} (\%) = (GA - GG) \times 100 / GG$$

$$H_{AG} (\%) = (AG - AA) \times 100 / AA \quad (2)$$

式中, G、A 分别代表太平洋牡蛎和近江牡蛎, GG、GA、AG、AA 分别表示各实验组的 F_1 在同一日龄的表型值(生长、存活)。公式(1)表示中亲杂种优势; 公式(2)表示双列杂交中正、反交组的单亲杂种优势。

1.8 数据处理

为了减小方差齐性, 所有的卵径、壳高、变态时间均转化对数 Log_{10} , 所有的受精率、存活率、变态率均转化为反正弦函数。用 SPSS18.0 统计软件对数据进行分析处理, 不同实验组间数据的比较采用单因素方差分析方法(Turkey HSD), 差异显著性设置为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 孵化参数

太平洋牡蛎 GG 的卵径(53.60 μm)显著大于近江牡蛎 AA(51.23 μm)($P < 0.05$)。AG 受精率(12.91%)最低, 显著小于其它实验组($P < 0.05$), GA 受精率(95.13%)较高, 与 GG(99.33%)无显著差异($P > 0.05$), 且显著大于 AG、AA(87.43%)($P < 0.05$) (表 1)。受精水平上, 种间杂交组表现出不同程度的杂种劣势, H_{GA} 、 H_{AG} 及 $H_{G \times A}$ 分别为 -4.23、-85.23 及 -42.15。AG 孵化率(6.22%)最低, 显著小于其它实验组($P < 0.05$); GA 孵化率(87.24%)较高, 显著

大于 AA(81.72%)及 AG($P<0.05$), 但显著小于 GG(98.35%)($P<0.05$)。孵化水平的种间杂种劣势更为明显, H_{GA} 、 H_{AG} 及 $H_{G \times A}$ 分别为 -11.30、-92.39 及 -48.10。从 D 形幼虫规格上看, GA 与 GG 大小相似, 彼此间无显著差异($P>0.05$), 均显著大于 AA 和 AG($P<0.05$); AG 的 D 形幼虫规格略大于 AA, 但彼此间无显著差异($P>0.05$)。初孵 D 形幼虫的杂种优势表现出明显的母本效应, 其大小几乎为 0 (表 1)。

2.2 幼虫生长、存活及变态

在幼虫浮游期间, 各实验组之间存在明显的生长差异, 中亲杂种优势 $H_{A \times G}$ 几乎为 0, 单亲杂种优势 H_{GA} 及 H_{AG} 具有明显的不对称性(图 1)。9 日龄以前, GA 大小与 GG 比较相似, AG 大小与 AA 比较相似, 且以 G 为母本的两个实验组壳高显著大于以 A 为母本的两个实验组($P<0.05$)(图 1-a)。

在此期间, 生长性状主要受母本效应影响, 其次为受配对策略及母本效应共同作用(表 2)。9 日龄以后, 各实验组之间生长差异进一步增大, 其大小次序一直是 $GG>GA>AG>AA$, 且各实验组间差异显著($P<0.05$)(图 1-a)。此时, 生长性状主要受配对策略的影响, 其次为卵源及配对策略交互作用影响。在整个幼虫浮游期间, H_{GA} 表现出明显的生长优势, H_{AG} 表现出明显的生长劣势, 表现出不对称式效应, 而总体上的杂种优势 $H_{A \times G}$ 几乎为 0(图 2)。

将刚刚孵化出的 D 形幼虫定义为 0 日龄, 此时存活率为 100%, 随着幼虫生长, 存活率降低, 除了 H_{GA} 表现出一定程度的杂种优势以外, H_{AG} 及 $H_{A \times G}$ 均为杂种劣势(图 2)。12 日龄以前, GA、GG 存活率逐渐减少, 但是 AG、AA 存活率迅速减小, 而后各实验组存活率比较稳定(图 2-a)。从浮游期存活率上看, GA 存活率最高, 与 GG 无显著差异

表 1 各实验组的孵化参数
Tab.1 Hatching index of the experimental groups

类别 items	卵径/ μm egg diameter	受精率/% fertilization rate	孵化率/% hatching rate	D 形幼虫规格/ μm D larvae size
GG	53.60 \pm 1.61 ^a	99.33 \pm 0.99 ^a	98.35 \pm 1.87 ^a	73.30 \pm 1.80 ^a
GA	53.60 \pm 1.61 ^a	95.13 \pm 5.23 ^a	87.24 \pm 5.55 ^b	72.60 \pm 1.85 ^a
AG	51.23 \pm 1.04 ^b	12.91 \pm 3.38 ^c	6.22 \pm 2.68 ^d	67.40 \pm 1.69 ^b
AA	51.23 \pm 1.04 ^b	87.43 \pm 6.69 ^b	81.72 \pm 7.41 ^c	66.64 \pm 1.64 ^b
H_{GA}	—	-4.23	-11.30	-0.95
H_{AG}	—	-85.23	-92.39	1.14
$H_{G \times A}$	—	-42.15	-48.10	0.04

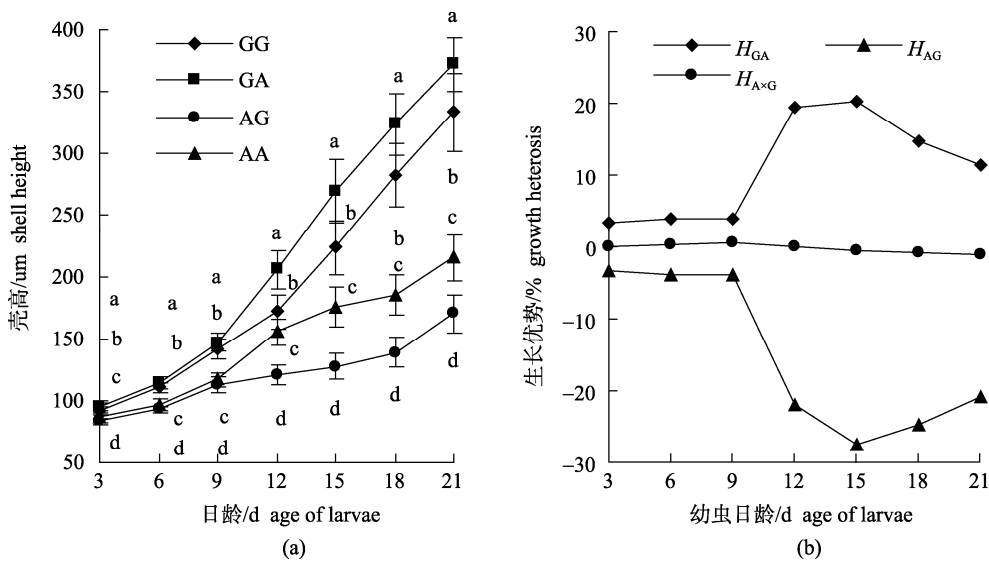


图 1 幼虫的壳高(a)及其生长优势(b)比较
Fig. 1 Comparison of larval shell height (a) and its growth heterosis (b)

($P>0.05$), 显著大于 AA 及 AG($P<0.05$), 获得 1.53~8.89 的单亲杂种优势; AG 存活率最低, 显著小于其它实验组($P<0.05$), 杂种劣势为 -95.06~-31.62; 总的杂种劣势为 -23.63~-3.63(图 2-b)。

幼虫的存活在 12 日龄以前, 主要受卵源作用影响, 而后主要受到配对策略作用的影响, 整个过程中卵源与配对策略的交互作用起着次要影响作用(表 2)。

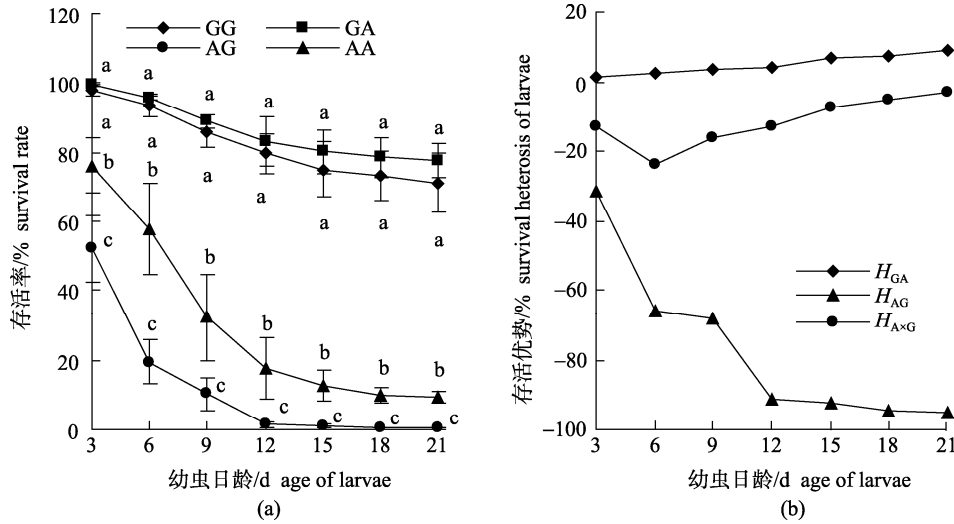


图 2 幼虫的存活率(a)及其存活优势(b)比较

Fig. 2 Comparison of larval survival rate (a) and its survival heterosis (b)

表 2 卵源(EO)及配对策略(MT)对幼虫生长与存活作用分析

Tab.2 Analyses of variance showing egg origin (EO) and mating type (MT) effects on larval growth and survival

来源 source	df	壳高 shell height		存活 survival rate	
		M.S.	P	M.S.	P
Day3	EO	3.64E-0.006	0.000***	0.048	0.000***
	MT	0.057	0.914	1.602	0.017
	EO×MT	0.006	0.000***	0.115	0.091
Day6	EO	1.62E-0.007	0.000***	0.092	0.000***
	MS	0.171	0.982	2.112	0.052
	EO×MT	0.008	0.000***	0.188	0.106
Day9	EO	2.50E-0.009	0.000***	0.022	0.000***
	MS	0.297	0.998	2.177	0.021
	EO×MT	0.009	0.000***	0.061	0.125
Day12	EO	0.549	0.000***	0.008	0.000***
	MS	0.160	0.000***	2.216	0.064
	EO×MT	0.256	0.000***	0.038	0.362
Day15	EO	1.364	0.000***	2.050	0.000***
	MS	0.025	0.000***	0.029	0.073
	EO×MT	0.365	0.000***	0.001	0.724
Day18	EO	2.250	0.000***	1.981	0.000***
	MS	0.030	0.000***	0.023	0.057
	EO×MT	0.252	0.000***	0.000	0.869
Day21	EO	2.093	0.000***	1.896	0.000***
	MS	0.021	0.000***	0.025	0.060
	EO×MT	0.169	0.000***	1.39E-0.005	0.960

注: *表示 $P<0.001$, **表示 $P<0.001$, ***表示 $P<0.001$ 。

Note: * indicates $P<0.05$, ** indicates $P<0.01$, *** indicates $P<0.001$.

从各实验组变态参数上看, GA 变态最快, 仅用 24.33 d, AG 变态最慢, 表现出明显的延迟变态(表 3)。GA 的变态规格最大, 显著大于其它实验组($P<0.05$); AG 变态规格最小, 与 AA 无显著差异($P>0.05$), 但显著小于 GG 及 GA($P<0.05$)。GA 变态率最高, 达 37.38%, 与 GG 无显著差异($P>0.05$), 但显著大于 AA 及 AG($P<0.05$); AG 变态率最低, 为 0.0040%, 显著小与其它实验组($P<0.05$)。在整个实验中, AG 仅仅获得了 72 个杂交稚贝, 而其它的实验组均获得了大量稚贝。在变态过程中, H_{GA} 表现出明显的变态优势, 而 H_{AG} 变态率劣势近乎 -100; 总体上杂种优势 $H_{A \times G}$ 是积极的(表 3)。

2.3 稚贝生长与存活

在稚贝培养过程中, GA 生长最快, 其壳高显著大于其它实验组($P<0.05$); AG 生长最慢, 壳高显著小于其它实验组($P<0.05$)(图 3)。 H_{GA} 生长优势较为明显(10.95~12.99); H_{AG} 生长劣势也非常明显(-21.06~-14.93); 总体上表现出杂种劣势

$H_{A \times G}$ (-3.44~-1.46)。从稚贝存活性状上看, 90 日龄时, AG 存活率高于 GA, 彼此间无显著差异($P>0.05$); 150~210 日龄期间, GA 存活率高于 AG, 二者间无显著差异($P>0.05$), 但均显著高于自交组 GG 和 AA($P<0.05$)(图 4-a)。从其杂种优势上看, 种间杂交稚贝均获得了不同程度的杂种优势, H_{GA} 、 H_{AG} 及 $H_{A \times G}$ 分别为 5.08~36.00、7.14~27.56、6.11~31.92(图 4-b)。

2.4 遗传鉴定

利用复合 COI 及其 ITS₂ 鉴定出亲本种及其杂交子代(图 5)。复合 COI 结果表明: 太平洋牡蛎亲本及其子代在 269 bp 位置出现特异性条带, 而近江牡蛎亲本及其子代在 183 bp 位置出现特异性条带, 说明实验中使用的亲本没有任何问题。GA 杂交子也在 269 bp 出现与太平洋牡蛎一致的特异性条带, 说明该杂交子的母本为太平洋牡蛎; AG 杂交子在 183 bp 出现与近江牡蛎一致的特异性条带, 说明该杂交子的母本为近江牡蛎。ITS₂ 结果表明:

表 3 各实验组的变态参数
Tab. 3 Metamorphic index of experimental groups

类别	items	变态时间/d	metamorphic time	变态规格/ μm	metamorphic size	变态率/%	metamorphosis	数量	quantity
GG		27.00±1.00 ^c		362.97±8.45 ^b		32.12±7.74 ^a		> 600 000	
GA		24.33±0.58 ^d		389.50±7.09 ^a		37.38±6.65 ^a		> 630 000	
AG		36.33±1.53 ^a		320.20±8.30 ^c		0.0040±0.0008 ^b		72	
AA		32.67±1.15 ^b		332.53±8.20 ^c		1.22±0.46 ^b		> 20 000	
H_{GA}		—		7.31		16.38		—	
H_{AG}		—		-3.71		-99.67		—	
$H_{G \times A}$		—		2.04		12.13		—	

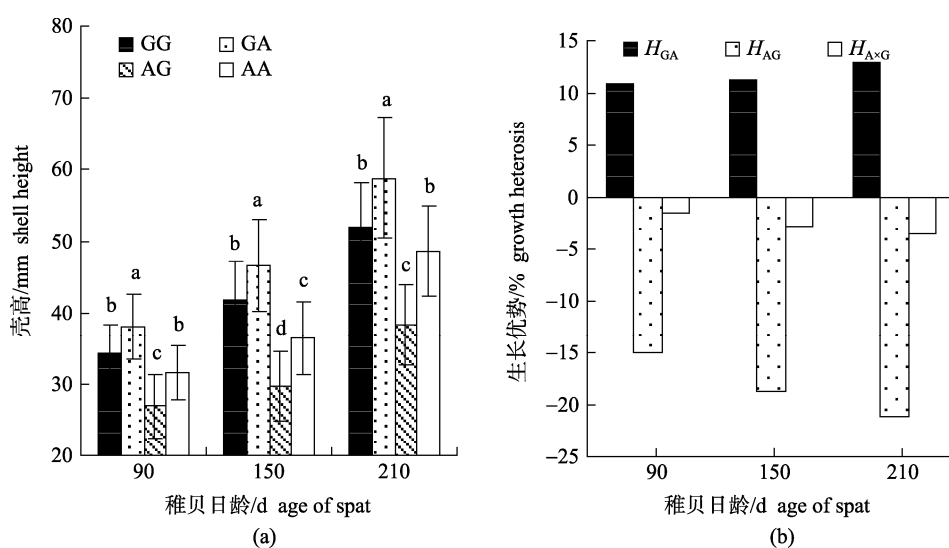


图 3 稚贝的壳高(a)及其生长优势(b)比较
Fig. 3 Comparison of spat shell height (a) and heterosis (b)

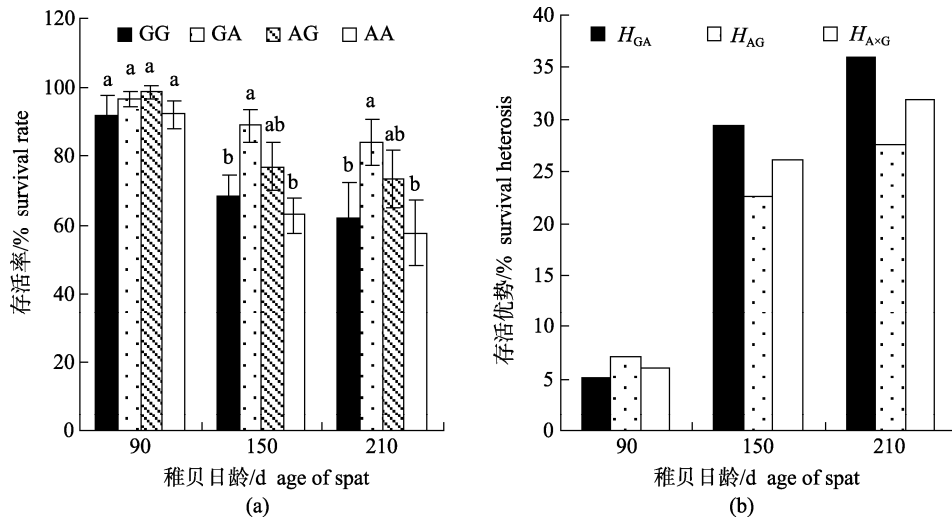


图 4 稚贝的存活率(a)及其存活优势(b)比较
Fig. 4 Comparison of spat survival rate (a) and heterosis (b)

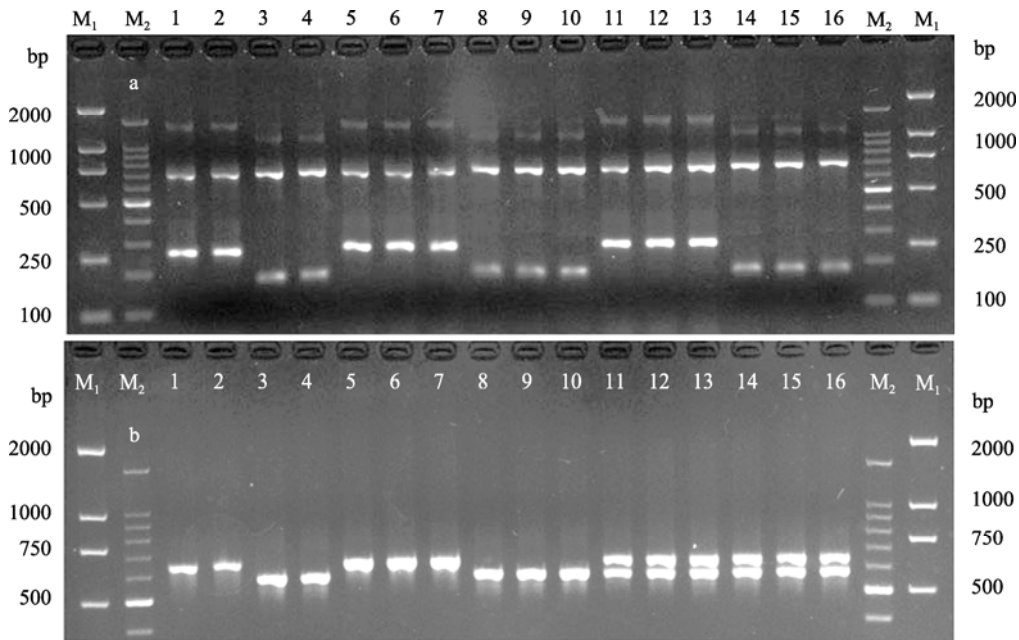


图 5 复合 COI (a)及 ITS₂ (b) PCR 反应结果

M₁.2000 marker, M₂.1000 marker; 1, 2.太平洋牡蛎亲本; 3, 4.近江牡蛎亲本; 5~7.太平洋牡蛎子代; 8~10.近江牡蛎子代; 11~13.太平洋牡蛎雌×近江牡蛎雄杂交子; 14~16.近江牡蛎雌×太平洋牡蛎雄杂交子。

Fig. 5 Complex COI (a) and ITS₂ (b) PCR fragments from parental species and their offspring

Sample codes are: M₁. marker DL2000, M₂. marker DL1000; 1-2. *C. gigas* parent; 3-4. *C. ariakensis* parent; 5-7. spat of *C. gigas*; 8-10. spat of *C. hongkongensis*; 11-13. hybrids from *C. gigas* female × *C. ariakensis* male cross; 14-16. hybrids from *C. ariakensis* female × *C. gigas* male cross.

太平洋牡蛎亲本及子代在 650 bp 左右出现一条特异性条带, 而近江牡蛎亲本及其子代在 580 bp 左右出现一条特异性条带; GA 及其 AG 杂交子均出现了两条与两亲本一致的特异性条带, 说明杂交子中含有双亲遗传物质, 为真正意义上的两性融合杂交子。

3 讨论

3.1 受精强度

结果表明, 太平洋牡蛎与近江牡蛎可以双向受精, 但是受精强度具有不对称现象。即太平洋牡蛎卵子很容易与近江牡蛎精子受精, 并且具有

较高的受精率;但近江牡蛎的卵子不容易太平洋牡蛎的精子受精,只有少量可以受精,且孵化率不高。这也说明,这两个物种间配子兼容性具有不对称性,也许伴随着时间推移及物种进化,近江牡蛎卵子与太平洋牡蛎精子之间不会受精,出现配子的完全不兼容。在牡蛎的远缘杂交受精卵识别的过程中,精子结合素蛋白是决定能否受精的一个关键基因,这种基因进化速度较快,导致了完全或者部分不对称受精现象的发生^[24]。已报道的双向受精的杂交组合有:太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas*×近江牡蛎 *C. rivularis*^[5, 18]、太平洋牡蛎 *C. gigas*×美洲牡蛎 *C. virginica*^[11]、太平洋牡蛎 *C. gigas*×葡萄牙牡蛎 *C. angulata*^[7]等。

3.2 母本效应

母本效应在贝类的早期发生中,经常出现,随着幼虫的生长、变态,其母本效应通常会逐渐消失,但有的时候也会影响至成体阶段^[25]。本研究中,杂交子在 9 日龄以前,其生长性状表现出明显的母本效应,之后,母本效应逐渐减弱,对其生长性状主要因素转化为卵源及其配对作用的交互作用。对于存活性状而言,在 12 日龄以前,幼虫存活受卵源影响最大;之后,其存活主要受到卵源及配对策略的影响,母本效应减弱。在牡蛎的远缘杂交中,一般情况下,幼虫表型性状在前两周会表现出强烈的母本效应。如太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas*×近江牡蛎 *C. rivularis*^[5, 11, 17]、熊本牡蛎 *C. sikamea*×近江牡蛎 *C. ariakensis*^[12]、熊本牡蛎 *C. sikamea*×长牡蛎 *C. gigas*^[13]、近江牡蛎 *C. rivularis*×美洲牡蛎 *C. virginica*^[14]等。

3.3 杂种优势

由于贝类远缘杂交过程中,经常会出现配子不兼容、幼虫停滞生长、幼虫不变态等多种情况,大多数报道杂种优势均为杂种劣势。杂种优势的报道仅限于大西洋浪蛤 *Spisula solidissima*×侏儒蛤 *Mulinia lateralis*^[26]及海湾扇贝 *A. irradians irradians*×紫扇贝 *A. purpuratus*^[27]等杂交组合。在本研究中发现,总体上的中亲杂种优势一直介于单亲杂种优势之间,且单亲杂种优势具有明显的不对称性。即 GA 单亲杂种优势非常明显,无论是从生长、存活还是变态性状看;而 AG 却是恰恰相反,表型值均为劣势,表现出明显远交衰退现象。牡蛎远缘杂交过程中,杂种劣势报道较多,

如近江牡蛎 *C. ariakensis*×熊本牡蛎 *C. sikamea*^[12]、太平洋牡蛎 *C. gigas*×香港巨牡蛎 *C. hongkongensis*^[28]等。本研究表明:在双列杂交过程中,单纯的计算中亲杂种优势,可能不会完全体现杂交组的杂种优势,而单亲杂种优势可以有效的反映到正反交实验组的杂种优势,是一种有效、具体的计算方法。

3.4 遗传鉴定

遗传鉴定是非常有必要,因为在牡蛎的远缘杂交中,经常会出现雌核发育、天然多倍体、雄核发育等现象的发生;而且会出现精子污染、培育过程中的幼虫污染等现象,所以单存就以表型性状作为杂交成功标志,是不可科学的,而且也很令人怀疑其结果的可信度^[4]。本研究中,采用复合 COI 及 ITS₂ 不仅可以鉴定出所有杂交子,而且可以有效的区分出是正交组还是反交组杂交子。由于 COI 是母性遗传,可以确定杂交子的母本来源;而 ITS₂ 可以确定杂交子,因为它具有两条与亲本一致的条带,说明包含两亲本的遗传物质。这种鉴定法方已经在牡蛎(太平洋牡蛎 *C. gigas*×近江牡蛎 *C. rivularis*; 近江牡蛎 *C. ariakensis*×熊本牡蛎 *C. sikamea*、太平洋牡蛎 *C. gigas*×香港巨牡蛎 *C. hongkongensis*、葡萄牙牡蛎 *C. angulata*×香港巨牡蛎 *C. hongkongensis*^[29])、扇贝(海湾扇贝 *A. irradians irradians*×紫扇贝 *A. purpuratus*)、蛤(槽蛤仔 *Ruditapes decussatus*×菲律宾蛤仔 *R. philippinarum*)^[30]上等到了验证,而且它具有简便、快速、准确性高的特点。

本实验是一个验证性实验,在确保亲本毫无疑问的前提下,对杂交子进行了遗传鉴定,确保了杂交子为真正意义上的杂交子,并首次评估了太平洋牡蛎与近江牡蛎的杂种优势,虽然没有发现明显的中亲杂种优势,但是 GA 组单亲杂种优势非常明显,而 AG 组则出现了远交衰退,这种差异可能是来由于染色体组间兼容性分歧造成的;最后,GA 出现的单亲杂种优势可以有效改良现有牡蛎的遗传性状。

参考文献:

- [1] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 83-84.
- [2] Bouchon-Brandely M. On the sexuality of the common oyster (*Ostrea edulis*) and that of the Portuguese oyster

- (*O. angulata*). Artificial fecundation of the Portuguese oyster [J]. *Annals and Magazine of Natural History*, 1882, 10 (5): 328–330.
- [3] Davis H C. On interspecific hybridization in *Ostrea* [J]. *Science*, 1950, 111(12): 522.
- [4] Gaffney P M, Allen S K. Hybridization among *Crassostrea* species: a review [J]. *Aquaculture*, 1993, 116(1): 1–13.
- [5] Allen S K, Gaffney P M. Genetic confirmation of hybridization between *Crassostrea gigas* (Thunberg) and *Crassostrea rivularis* (Gould) [J]. *Aquaculture*, 1993, 113(4): 291–300.
- [6] Soletchnik P, Huvet A, Moine O L, et al. A comparative field study of growth, survival and reproduction of *Crassostrea gigas*, *C. angulata* and their hybrids [J]. *Aquatic Living Resource*, 2002, 15(4): 243–250.
- [7] 郑怀平, 王迪文, 林清, 等. 太平洋牡蛎与葡萄牙牡蛎两近缘种间杂交及其早期阶段生长与存活的杂种优势[J]. *水产学报*, 2012, 36(2): 210–215.
- [8] Camara M D, Davis J P, Sekino M, et al. The Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* is neither rare nor threatened by hybridization in the Northern Ariake sea, Japan [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2008, 27(2): 313–322.
- [9] Banks M, McGoldrick D, Borgeson W, et al. Gametic incompatibility and genetic divergence of Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *C. sikamea*[J]. *Marine Biology*, 1994, 121(1): 127–135.
- [10] 滕爽爽, 李琪, 李金蓉. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)与熊本牡蛎(*C. sikamea*)杂交的受精细胞学观察及子一代的生长比较[J]. *海洋与湖沼*, 2010, 41(6): 914–922.
- [11] Allen S K, Gaffney P M, Scarpa J, et al. Inviability of hybrids of *Crassostrea virginica* (Gmelin) with *C. rivularis* (Gould) and *C. gigas* (Thunberg) [J]. *Aquaculture*, 1993, 113(4): 269–289.
- [12] Xu F, Zhang G, Liu X, et al. Laboratory hybridization between *Crassostrea ariakensis* and *C. sikamea* [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2009, 28(3): 453–458.
- [13] Wang H, Qian L, Liu X, et al. Classification of a common Cupped Oyster from Southern China[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2010, 29(4), 857–866.
- [14] Wang H, Zhang G, Liu X, et al. Classification of common oysters from North China[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2008, 27(3): 495–503.
- [15] 张跃环, 王昭萍, 闫喜武, 等. 香港巨牡蛎与长牡蛎早期表型性状研究[J]. *生态学报*, 2012, 32(4): 1105–1114.
- [16] Wang H, Guo X, Zhang G, et al. Classification of jinjiang oysters *Crassostrea rivularis* (Gould, 1861) from China, based on morphology and phylogenetic analysis[J]. *Aquaculture*, 2004, 242(1–4): 137–155.
- [17] 周茂德, 高允田, 吴融. 太平洋牡蛎与近江牡蛎、褶牡蛎人工杂交的初步研究[J]. *水产学报*, 1982, 6(3): 235–241.
- [18] Que H, Allen S K. Hybridization of tetraploid and diploid *Crassostrea gigas* (Thunberg) with diploid *C. ariakensis* (Fujita) [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2002, 27(K) 137–143.
- [19] Wang H, Guo X. Identification of *Crassostrea ariakensis* and related oysters by multiplex species-specific PCR [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2008, 27(3): 481–487.
- [20] Wang Y, Guo X. Its length polymorphism in oysters and its use in species identification [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2008, 27(3): 489–493.
- [21] Zhang H, Liu X, Zhang G, et al. Growth and survival of reciprocal crosses between two bay scallops, *Argopecten irradians concentricus* Say and *A. irradians irradians* Lamarck [J]. *Aquaculture*, 2007, 272(S1): 88–93.
- [22] Zheng H P, Zhang G F, Guo X, et al. Heterosis between two stocks of the bay scallop, *Argopecten irradians irradians* Lamarck (1819)[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2006, 25(4) 807–812.
- [23] Zheng H P, Xu F, Zhang G F. Crosses between two subspecies of bay scallop *Argopecten irradians* and heterosis for yield traits at harvest[J]. *Aquaculture Research*, 2011, 42(4): 602–612.
- [24] Wu Q, Li L, Zhang G. *Crassostrea angulata* bindin gene and the divergence of fucose-binding lectin repeats among three species of *Crassostrea* [J]. *Marine Biotechnology* 2011, 13(2): 327–335.
- [25] 张国范, 郑怀平. 海湾扇贝养殖遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 2009:89–90.
- [26] Lindell S, Walton B, Simmons J, et al. Hybridization between two genera of clams, *Spisula solidissima* and *Mulinia lateralis*, and early growth trials[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2006, 25: 750.
- [27] Wang C, Liu B, Li J, et al. Introduction of the Peruvian scallop and its hybridization with the bay scallop in China [J]. *Aquaculture*, 2011, 310(3–4): 380–387.
- [28] Zhang Y, Wang Z, Yan X, et al. Laboratory hybridization between two oyster *Crassostrea gigas* and *C. hongkongensis*[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2012, 31:1-7.
- [29] Zhang Y, Wang Z, Yan X, et al. Interspecific hybridization between *Crassostrea hongkongensis* and *C. angulata*[C]. 广州: 第十五次全国贝类学术研讨会, 2011: 287–288.
- [30] Hurtado N S, Pérez-García C, Morán P, et al. Genetic and cytological evidence of hybridization between native *Ruditapes decussates* and introduced *Ruditapes philippinarum* (Mollusa, Bivalvia, Veneridae) in NW Spain [J]. *Aquaculture*, 2011, 311(1–4): 123–128.

Interspecific hybridization between two oysters *Crassostrea gigas* and *C. ariakensis*

ZHANG Yue-huan^{1,2}, WANG Zhao-ping^{1*}, YAN Xi-wu², YAO Tuo¹, YU Zhi-fei², HUO Zhong-ming¹,
YU Rui-hai¹, LI Xiao-yu⁴, LI Ya-lin⁴, GUO Xi-ming⁵

(1. Key Laboratory of Mariculture Ministry of Education, Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, South China Sea Institute of Oceanology,

Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

3. Engineering Research Center of Shellfish Culture and Breeding of Liaoning Province,
College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

4. Qingdao Laodong Aquaculture Breeding Company, Qingdao 266105, China;

5. Haskin Shellfish Research Laboratory, Institute of Marine and Coastal Sciences,

Rutgers University, Port Norris, New Jersey 08349, USA)

Abstract: To evaluate whether heterosis can be obtained from hybridization between *Crassostrea gigas* and *C. ariakensis*, a 2×2 factorial cross experiment was conducted between these two species in May 2010. Heterosis was first examined by comparing growth and survival of the two reciprocal hybrid crosses (GA and AG) with that of the two parental crosses (GG and AA). Gametic compatibility between the two species was asymmetric with GA crosses having higher fertilization success than AG crosses. In the hybrid crosses, GA offspring were significantly larger than AG offspring. Larval growth of interspecific crosses was similar to that of the maternal species during the first nine days, indicating dominant maternal effects. Beyond larval day 9, however, we observed asymmetry in single parent heterosis for growth and survival for both larvae and spat. GA crosses had good success in metamorphosis, while AG crosses produced only 72 spat. Heterosis was positive for GA hybrids but negative for AG hybrids, with the exception of higher AG survival during the grow-out stage. Maternal origin had a dominant effect on heterosis of both growth and survival, while the interaction between maternal origin and mating type was the second significant factor impacting growth heterosis during the first several days. After that, mating type emerged as an independent factor influencing growth heterosis for the rest of the larval stage. Genetic analysis confirmed that the spat of reciprocal crosses contained DNA from both species. Our study indicates that interspecific hybridization between female *C. gigas* and male *C. ariakensis* may be a promising method for genetic improvement of these two species for aquaculture.

Key words: *Crassostrea gigas*; *Crassostrea ariakensis*; hybridization; heterosis; genetic confirmation

Corresponding author: WANG Zhao-ping. E-mail: zpwang@ouc.edu.cn