有效群体大小对蛤仔 F_1 生长和存活影响

赵力强，梁　健，闫喜武，霍忠明，杨　凤

(大连海洋大学 水产与生命学院，辽宁 大连 116023)

摘要：对不同有效群体大小(N_e=2、4、8、16、32、200)的蛤仔 F_1 代生长和存活性状进行了比较。结果表明：浮游期，各试验组幼虫壳长均未表现出显著性差异(P>0.05)，实验组 N_e=200 的存活率低于其他各实验组，并随着日龄的增长，差异越来越显著；稚贝期，各实验组的壳长和存活率的变化规律和浮游期基本一致。对壳长变异情况分析表明，浮游期，随着群体有效含量的增大，子代开始出现小型个体和大型个体，壳长分布变异逐渐明显；稚贝期，各试验组组内壳长变异进一步加剧，除 N_e = 2 试验组稚贝壳长介于 400 μm 和 600 μm 之间外，其他各试验组均出现明显的小型和大型个体，表现为有效群体越大，组内稚贝壳长变异越为明显。

关键词：蛤仔；有效群体大小；生长；存活

中图分类号：Q173; Q32　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1000-3096(2015)01-0064-06

doi: 10.11759/hykx20120927002

近交所带来的危害——近交衰退已经被人们广泛关注，亲缘个体间的交配增加了有害等位基因的纯合率，从而导致后代个体适应能力的下降，高度的近交还可导致群体加性遗传变异的迅速丢失和阻碍人工选择的长期遗传响应[1-3]。因此，研究选择育种中由于亲缘个体间的交配而引起近交衰退的形成机理，并由此探索控制近交衰退的有效途径，无论在群体和数量遗传学的进化理论研究方面还是在遗传资源的合理利用和保护方面都具有重要的应用价值。

有效群体大小(N_e)是指与实际群体具有相同基因频率方差的理想群体大小，它反映了群体平均近交系数增量的大小以及群体遗传结构中基因的平均纯合度[4]。因此，开展有效群体大小的研究对选择育种中近交的预测与控制，以及了解遗传漂变对群体遗传多样性的影响具有十分重要的意义。国内外对有效群体大小的研究已经有很多报道，在贝类方面主要集中在牡蛎(*Crassostrea*)[5]、硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)[6]、海湾扇贝(*Argopecten irradiansirradians* Lamarck)[7-8]。目前，尚未见有关蛤仔有效群体大小研究的相关报道。

在中国，自 20 世纪 70 年代南方蛤仔土池育苗技术和 21 世纪初北方蛤仔“三段法”养殖技术获得重大突破后，蛤仔养殖业得到快速发展。目前，世界上近 360 万 t 蛤仔的产量中，约 90%来自于养殖，且主要为中国大陆沿海养殖。很多学者对其生理、生态及养殖技术进行了深入的研究[9-11]，近年来，闫喜武等[12]又相继开展了蛤仔遗传育种的研究，采用家系育种成功地培育出生长快、抗逆性强的蛤仔“海洋橙”品系，进一步推动了中国蛤仔产业的发展。针对蛤仔人工选育过程中出现的近交衰退现象，笔者开展了有效群体大小等近交生物学方面的研究，本文通过建立不同有效群体大小的育种基础群体，通过对 F_1 生长和存活等状进行比较，研究了选择育种中的近交生物学效应。

1　材料与方法

1.1　亲贝来源和选择

试验用蛤仔选自大连石河野生群体。2009 年 6 月，随机挑选外表无损伤、壳型规则整齐的个体作为试验材料，在大连庄河海洋贝类育苗场生态池中进行自然促熟，8 月下旬，待其性腺发育成熟时，取回培育车间准备催产。

1.2　试验设计及处理

蛤仔为雌雄异体，在自然界中雌雄比例约为 1∶1，因此，试验中群体有效含量根据雌雄比(♀∶♂)设

收稿日期：2014-02-01；修回日期：2014-04-24

基金项目：现代农业产业技术体系建设专项(CARS-48)

作者简介：赵力强(1983–)，男，河北石家庄人，硕士，实验师，主要从事贝类遗传育种与健康养殖技术研究，E-mail: zhaoliqiang@dlou.edu.cn；闫喜武，通信作者，教授，E-mail: yanxiwu@dlou.edu.cn

置了 6 个梯度，分别为 N_e = 2(♀∶♂ = 1∶1)、4(♀∶♂ = 2∶2)、8(♀∶♂ = 4∶4)、16(♀∶♂ = 8∶8)、32(♀∶♂ = 16∶16)及对照(N_e = 200)。亲贝阴干 8 h 后，将其放入砂滤海水中进行催产，开始排精产卵后，及时将正在排放的个体挑出，用淡水冲洗干净后，放入盛有新鲜海水的 2.0 L 聚乙烯桶中让其继续排放，排放结束后及时将亲贝捞出，并对所收集的卵子用对角线为 50 μm 的筛网进行洗卵和镜检，弃掉已受精的卵子。精卵收集结束后，按实验设计进行人工授精，由于每个亲贝排精量和产卵量不同，因此，不同实验组授精方式也不同，N_e = 2 试验组：随机挑选一份精子和卵子放入已经处理好的 2.0 L 聚乙烯桶中，搅动海水使其混合均匀，用对角线为 70 μm 的筛网滤出杂质后将受精卵放入 60 L 聚乙烯桶中，按照 30~50 个/mL 密度进行孵化，孵化过程中微量充气；N_e = 4 试验组：随机挑选两份精子和卵子进行定量，在每份精子和卵子中分别取等量的精子和卵子在桶中混合均匀，然后再将已混匀的精卵在聚乙烯桶中授精，将受精卵滤去杂质后转入 60 L 聚乙烯桶中进行孵化，孵化密度同 N_e = 2 试验组；N_e = 8、16、32 各试验组授精和孵化方式同 N_e = 4 试验组；对照组：随机挑选 200 个亲贝，模拟生产条件，将其放入体积为 1 m^3 的水槽中自由排精产卵，收集部分受精卵，放入 60 L 聚乙烯桶中孵化。整个操作过程中，各试验组严格隔离。

1.3 幼虫、稚贝培育和中间育成

受精后经过约 23~25 h，胚胎发育至 D 形幼虫，将幼虫转移至 60 L 聚乙烯桶中进行培育，密度为 5~6 个/mL，各试验组分别设置 3 个重复。幼虫培育前 3 天，投喂等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)，第 4 天起按照等鞭金藻和小球藻(*Chlorella vulgaris*)1∶1 的比例混合投喂，随着幼虫生长发育，日投饵量从 5 000 个/mL 逐渐增加至 20 000 个/mL。每隔 1 天全量换水一次，换水过程中及时调整幼虫密度，保持各试验组幼虫密度一致，以消除密度因素对试验结果的影响。在整个培育过程中，采取隔离措施避免各试验组相互交叉污染。稚贝经过 40 d 室内培育后，采取挂养方式转入室外生态池中进行中间育成，挂养用网袋规格为 40 cm×30 cm，根据稚贝规格，定期更换大网眼网袋，对角线规格从 1 mm 逐渐增大到 3 mm。每隔 7 d 清洗一次网袋，清除淤泥和附着生物，保持袋内水流畅通。

1.4 取样、测量

幼虫阶段，第 1、3、6、9 天及附着前随机取样一次，各试验组随机取样 30 个幼虫测量壳长，同时测定幼虫密度，幼虫存活率即为各日龄幼虫密度与初孵 D 形幼虫密度的百分比；变态期间，以附着幼虫出现鳃原基、足、次生壳为变态完成标志，记录附着幼虫开始出现变态时间至全部完成变态的时间，测量各家系变态规格及变态率，变态率为完成变态的附着幼虫数量占附着幼虫总量的百分比。稚贝阶段，第 20、30、60 和 90 日龄取样测量并统计空壳率，通过空壳率计算出稚贝阶段不同日龄的存活率。

1.5 有效群体大小

采用如下公式计算有效群体大小(N_e)[13]：

$$N_e = \frac{4 \times N_S \times N_D}{N_S + N_D}$$

式中，N_S 和 N_D 分别为实际参与繁殖的雌、雄个体数目。

1.6 数据分析

为了减小方差齐性，所有的壳长均转化为对数 Log_{10}[14]，所有的存活率均转化为反正弦函数 ASIN[15]。用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析处理，数据的比较均采用单因素方差分析方法(Turkey HSD)，差异显著性设置为 P<0.05; Excel 作图。

2 结果

2.1 幼虫生长、存活

蛤仔各试验组幼虫生长比较如图 1 所示，在浮游幼虫期，各试验组 1 日龄 D 形幼虫大小(壳长)没有显著性差异(P>0.05)，随着幼虫的生长发育，虽然幼虫大小开始出现分化，附着变态前(9 日龄时)，方差分析表明，各试验组幼虫壳长均未表现出显著性差异(P>0.05)；根据幼虫 1、3、6 和 9 日龄幼虫存活率绘制出了幼虫的存活曲线(图 2)，从图中可以看出，1、3 日龄时各试验组幼虫存活率差异不显著(P>0.05)，6 日龄时，N_e = 200 试验组幼虫存活率低于其他各试验组，但差异不显著(P>0.05)，至 9 日龄时，N_e = 200 试验组幼虫存活率仅为 62.6%，显著地低于 N_e = 2、4、8、16 和 32 试验组幼虫 71.5%、68.7%、72.6%、69.8%和 68.5%的存活率(P<0.05)，在整个浮游幼虫期，N_e = 2、4、8、16 和 32 试验组幼虫存活率彼此间均差异不显著(P>0.05)。

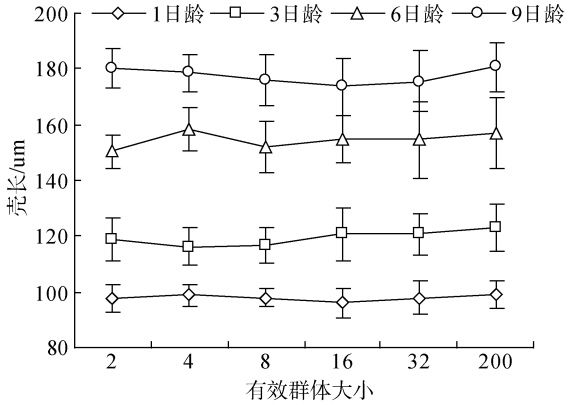

图 1　各实验组幼虫生长发育比较

Fig.1　The larval growth of different population sizes

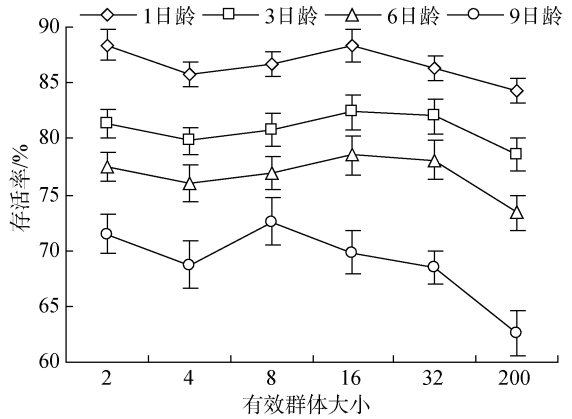

图 2　各实验组幼虫存活比较

Fig.2　The larval survival rate of different population sizes

2.2　稚贝生长、存活

图 3 和 4 分别表示各试验组在稚贝期 20、30、60 和 90 日龄的壳长及存活率。从图 3 可以看出，在室内育成阶段，蛤仔生长速度较慢，在转入室外生态池进行育成后，蛤仔生长速度明显快于室内育成阶段，虽然各试验组蛤仔壳长均表现出不同程度的分化，但方差分析显示，在整个稚贝期，各试验组在同一日龄的蛤仔壳长没有显著性差异(P>0.05)；如图 4 所示，N_e = 200 的存活率在各日龄中均为最小值，其中 20、30 和 60 日龄时各试验组稚贝存活率差异不显著(P>0.05)，90 日龄时，各试验组稚贝已转入室外生态池中进行中间育成，稚贝存活率较室内育成期均出现不同程度的降低，其中，以 N_e = 200 试验组稚贝存活率降低最为明显，仅为室内 60 日龄时稚贝存活率的 77.9%，显著地小于其他各试验组(P<0.05)，而 N_e = 2、4、8、16 和 32 试验组稚贝存活率在稚贝期同样未表现出显著性差异(P>0.05)。

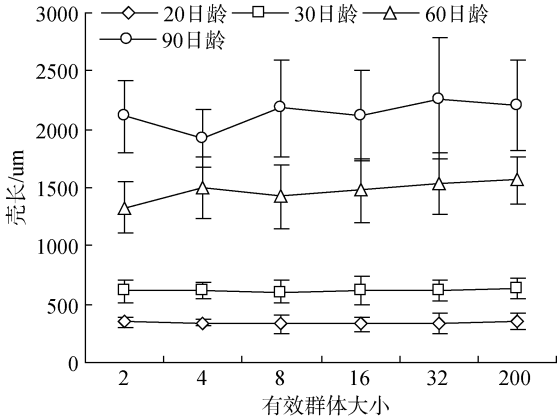

图 3　各试验组稚贝生长发育比较

Fig.3　The juvenile growth of different population sizes

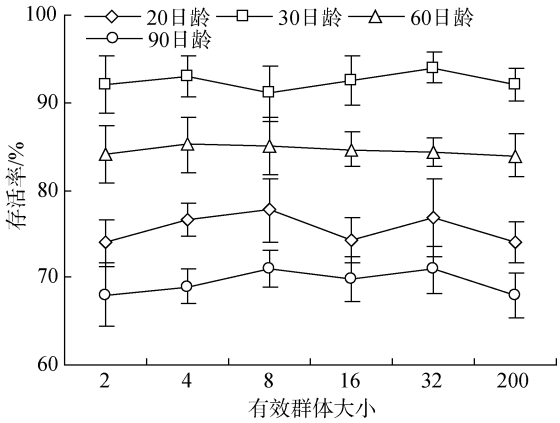

图 4　各试验组稚贝存活比较

Fig.4　The juvenile survival rate of different population sizes

2.3　蛤仔壳长变异

图 5、6、7 和 8 分别对各试验组在浮游幼虫期(3 日龄、9 日龄)和稚贝期(30 日龄、90 日龄)组内个体壳长变异进行了分析。从图 5 可以看出，3 日龄时，N_e = 2 试验组幼虫壳长分布较为均匀，110~119 μm、120~129 μm 和 130~139 μm 个体所占比例分别为 23.3%、43.3%和 33.4%，随着群体有效含量的增大，N_e = 16 时，蛤仔壳长开始出现小型个体，为 6.7%，N_e = 32 时，蛤仔壳长开始出现大型个体，为 3.3%，当 N_e = 200 时试验组幼虫壳长变异最为明显，小型和大型个体均占一定比例，其中，<110μm 和≥140μm 个体所占比例均为 10%，110~119 μm、120~129 μm 和 130~139 μm 个体分别为 20%、33.3%和 26.7%；9 日龄时，各试验组组内壳长变异基本维持 3 日龄时壳长变异水平(图 6)。

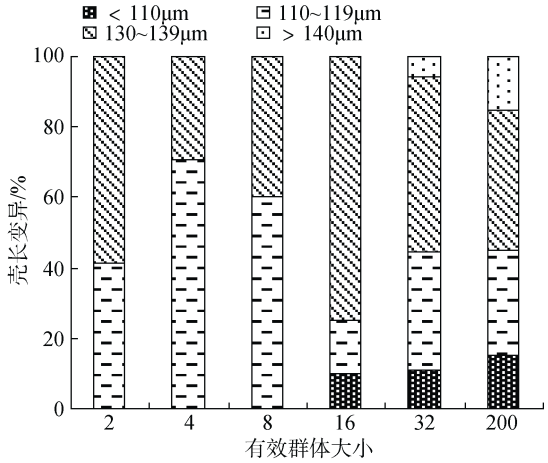

图 5　各试验组 3 日龄的壳长变异

Fig.5　The 3-day shell variation of different population sizes

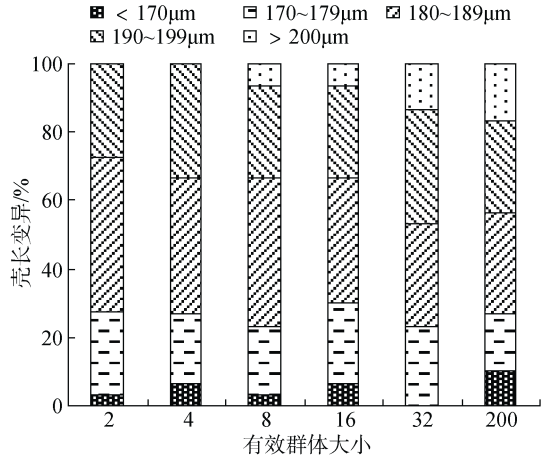

图 6　各试验组 9 日龄的壳长变异

Fig.6　The 9-day shell variation of different population sizes

稚贝期，30 日龄时为室内育成阶段，此时各试验组组内壳长变异进一步加剧，除 N_e = 2 试验组稚贝壳长为 400~600 μm 外，其他各试验组均出现明显的小型和大型个体，表现为群体有效含量越大，组内稚贝壳长变异越为明显，其中，N_e = 200 试验组小型和大型个体所占比例分别达到了 13.3%和 16.7%(图 7)；90 日龄为稚贝室外生态池育成阶段，各试验组组内壳长变异趋于温和，N_e = 2、4、8、16 和 32 试验组稚贝壳长均介于 2.5 cm 和 4.0 cm 之间，N_e = 200 试验组小型和大型个体所占比例较 30 日龄有明显降低，分别为 3.3%和 6.7%(图 8)。

3　讨论

3.1　有效群体大小对选择的影响

贝类育种中主要利用人工选择进行遗传改良，

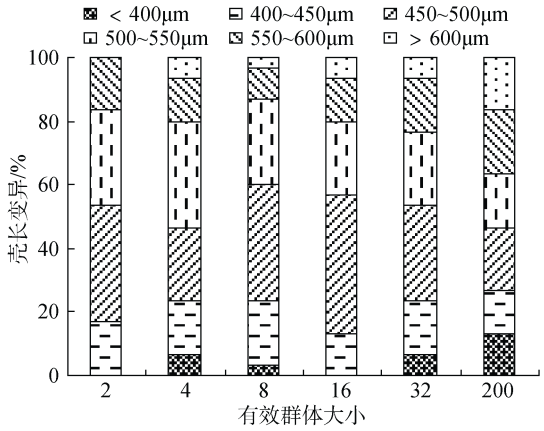

图 7　各试验组 30 日龄的壳长变异

Fig.7　The 30-day shell variation of different population sizes

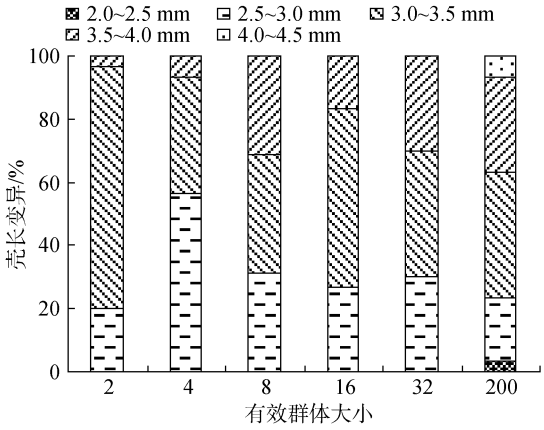

图 8　各试验组 90 日龄的壳长变异

Fig.8　The 90-day shell variation of different population sizes

有效群体大小则从多方面影响选择反应[6]。首先，有效群体大小影响选择差和选择强度，选择差是影响选择反应的主要因素之一，在理想群体中，每一繁殖个体提供给下一代的基因概率相等，但在实际育种过程中，亲代对子代所作的遗传贡献很少有相同的概率，亲本的遗传贡献率与有效群体大小呈正相关，亲本的这种差异导致了群体个体之间的较大变异(图 5~8)，选择进展又取决于群体内的遗传变异，因此，N_e越大，则亲本的遗传贡献率越大，选择差也越大，所以选择反应也就越大。其次，有效群体大小直接决定遗传漂变，并由此影响选择反应，当 N_e 较小时，小群体倾向于近交水平的增加，再加上选择的作用，群体的遗传变异会逐渐消失，造成了在小群体选择中的“随机漂变”效应，这种效应基本上是不可预测的，群体越小，导致的遗传漂变就越严重。Simonsen[16]指出，在小群体中，由于遗传漂变的影

响，使选择反应本身的变异增加，即加大了选择的不可靠性，同时，小群体中加性方差的变异性也会增加。第三，小群体遗传变异较大群体低，在改良品种世代选育过程中，随着选择的持续，伴随着近交的加剧，群体内可利用的遗传变异可能在几个世代就消耗殆尽，从而在选择过程中出现选择极限，导致选择反应停止，选择的效果不明显。

3.2 有效群体大小对近交的影响

近交即近亲交配，是指血缘关系极为相近或者遗传组成极相似的个体之间进行的交配繁殖。近亲交配可以产生一系列的遗传效应，近亲交配的后代常常表现出生活力下降、适应能力减弱、抗病力降低、或者出现一些畸形性状，这种现象称之为近交衰退。同时，近交也可以使优良性状的基因得到纯化，在育种工作中表现出有利的一面。梁健等[17]研究了近交对蛤仔橙色品系生长和存活性状的影响，指出橙色品系控制存活的基因的杂合度较低，但控制生长的基因的杂合度较高。从群体来看，当有效群体大小较小的情况下，控制存活的基因的杂合度也处于很低的水平，并随着有效群体大小的增加，基因杂合度也相对的增长，表现出存活率随着有效群体大小的递增而降低，本实验的结果正好符合这一规律。

有效群体大小(N_e)影响近交的程度，当 N_e 较小时，群体则倾向于近交水平的增加，因此，在小群体中容易出现近交衰退。Hedgecock[5-6]估计了牡蛎和硬壳蛤在人工养殖条件下的有效群体大小，结果发现，所有群体的适宜 N_e 均少于 100，其中有 13 个群体的适宜 N_e 少于 50，且在所有群体中均出现了近交衰退。张海滨研究了有效群体大小对海湾扇贝子代生长和存活的影响，F_1 代，第 1 天各试验组 D 形幼虫壳长差异不显著，随着幼虫的不断生长，差异越来越显著，表现为自交组的生长低于其他各组，附着变态前的差异极显著，而 N_e = 2、10、30、50 及对照组之间的差异并不显著[7]，但在 F_2 代，除 N_e= 1 外，N_e = 2 试验组也与其他各组差异显著[8]。本实验结果显示，无论在幼虫或稚贝的育成阶段，有效群体大小对蛤仔 F_1 生长并没有显著影响，因此，也可以认为在 F_1 代各群体并未产生近交衰退。虽然在 F_1 代有效群体大小并未对近交产生影响，但是其后代群体中，则可认为存在一定的亲缘关系，尤其 N_e = 2 的试验组实际上构成了一个全同胞家系，相关研究表明，全同胞家系传代时都存在一定的近交衰退[18-20]。因此，有效群体大小对 F_2 及(F_3、F_4)的影响应该继续进行研究。

3.3 育种资源保存的适宜有效群体大小

Soule[21]最早从生物保护的角度研究了有效群体大小，当 N_e 为 50 时，种群每世代的近交系数低于 1%，但这一数量并未考虑种群长时间的适应性。Franklin[22]指出，要使种群维持适当的遗传变异，保持长期的适应性所需的种群个体数量则为 500，这也即著名的“50/500 准则”，之后，Soule 和 Franklin 认为 500 只是维持了一个较为一般水平种群的遗传变异，如果考虑遗传变异中包含了非常多的隐性致死或半隐性致死等位基因，同时假设半中性具有潜在适应性突变为总突变数量的十分之一，那么群体最小 N_e 应为 5000，而当需要维持更多的稀有等位基因(如抗病基因)，就需要更大的群体有效数量。秦艳杰等[23]通过对海湾扇贝 F_1 代遗传多样性指数的研究结果也表明，当 N_e 为 340 时，可基本保持海湾扇贝繁殖群体的遗传稳定性。本文通过对蛤仔不同日龄壳长变异分析表明，当 N_e 为 200 时，可以认为其存在较大的遗传多样性，需要指明的是，试验中所有的 N_e 均为理想数值，由于亲本性腺发育不同步，产生子代数量不等等因素，实际育种过程中所需亲本数量要显著提高。

参考文献:

[1] 马大勇，胡红浪，孔杰. 近交及其对水产养殖的影响[J]. 水产学报, 2005, 29(6): 849-856.

[2] 王宇，李莉，张守都，郑怀平，张国范. 海湾扇贝杂交、近交和自交家系的微卫星标记偏分离分析[J]. 海洋科学, 2012, 36(8): 109-115.

[3] 秦艳杰，刘晓，张海滨，张国范. 海湾扇贝正反交两个家系形态学指标比较分析[J]. 海洋科学，2007, 31(3): 22-27.

[4] 张国范. 海洋贝类遗传育种研究 20 年[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(2): 190-194.

[5] Hedgecock D, Sly F. Genetic drift and effective population sizes of hatchery propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Aquaculture, 1990, 88: 21-38.

[6] Hedgecock D, Chow V, Waples R S. Effective population numbers of shellfish broodstocks estimated from temporal variance in allelic frequencies [J]. Aquaculture, 1992, 108: 215-232.

[7] 张海滨，刘晓，张国范. 不同有效繁殖群体数对海湾扇贝 F_1 生长和存活的影响[J]. 海洋学报, 2005, 27(2): 177-180.

[8] Zhang H B, Liu X, Zhang G F, Zhang G Z. Effects of

effective population size (N_e) on the F_2 growth and survival of bay scallop *Argopecten irradians irradians* (Lamarck) [J]. Acta Oceanologia Sinica, 2005, 24(4): 114-120.

[9] 闫喜武, 张国范, 杨凤, 梁俊. 菲律宾蛤仔莆田群体与大连群体生物学比较[J]. 生态学报, 2005, 25(12): 3329-3334.

[10] Yan X, Zhang G, Yang F. Effects of diet, stocking density, and environmental factors on growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum larvae*. Aquaculture, 2006, 253: 350-358.

[11] Yan X, Zhang G, Yang F. A new three-phase culture method for Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, farming in northern China. Aquaculture, 2006, 258: 452-461.

[12] 张国范, 闫喜武. 蛤仔养殖学[M]. 北京: 科学出版社, 2009.

[13] Eknath A E, Doyle R W. Effective population size and rate of inbreeding in aquaculture of Indian major carps [J]. Aquaculture, 1990, 85: 293-305.

[14] Neter J, Wasserman W, Kutner M. Applied linear statistical models [M]. Chicago: McGraw-Hill Irwin, 1985: 1127.

[15] Rohlf F J, Sokal R R. Statistical tables [M]. New York: W H Freemanand Company, 1981: 219.

[16] Simonsen V, Kittiwattanawong K. Marine molluscs: Application of molecular markers for estimation of effective population size and gene flow [J]. Phuket marine biological center special publication, 2000, 21: 21-38.

[17] 梁健, 闫喜武, 霍忠明, 赵力强, 吴云霞, 杨凤.近交对蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)橙色家系生长及存活的影响[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(3): 717-721.

[18] 刘贤德, 张国范. 运用拟测交策略构建遗传图谱的理论依据及研究进展[J]. 海洋科学, 2008, 32(10): 81-85.

[19] 刘贤德, 刘晓, 张国范. 皱纹盘鲍杂交 F1AFLP 标记偏分离现象初析[J]. 海洋科学, 2007, 31(10): 70-76.

[20] 王新安, 马爱军, 黄智慧, 刘滨, 薛宝贵, 侯仕营. 鲆鲽鱼类品种遗传改良的研究进展[J]. 海洋科学, 2010, 34(7): 100-105.

[21] Soule E E. Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential [A]//Soule M E, Wilcox B A. Conservation Biology: an Evolutionary and Ecological Perspective. Sunderland: Sinauer Associates, 1980: 151-169.

[22] Franklin I R. Evolutionary changes in small populations [A]. Soule M E, Wilcox B A. Conservation Biology: an Evolutionary and Ecological Perspective [C]. Sunderland: Sinauer Associates, 1980, 135-150.

[23] Qin Y J, Liu X, Zhang H B, Zhang G F. Effect of parental stock size on F_1 genetic structure in bay scallop, *Argopecten irradians* Lamarck(1819) [J]. Aquaculture Research, 2008, 32: 221-239.

Effects of effective population size on the F_1 growth and survival of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*

ZHAO Li-qiang, LIANG Jian, YAN Xi-wu, HUO Zhong-ming, YANG Feng

(College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Received: Feb., 1, 2014

Key words: *Ruditapes philippinarum*; effective population size; growth; survival

Abstract: In this study, the growth and survival were compared among different effective population sizes (N_e=2, 4, 8, 16, 32, and 200) of the F_1 generation of the Manila clam *Ruditape philippinarum*. The results showed that the difference was not significant in shell length (P>0.05) at larval stage, although the survival of experimental group (N_e=200) was lower than other experimental groups. Moreover, the difference was significant with increasing age. At the juvenile stage, the tendency of growth and survival was the same as that at the larval stage. The results of the variation in shell length showed that the offspring developed into maximization and miniaturization, and the distribution of the shell length was significant. The shell length of experimental group (N_e=2) ranged from 400 to 600 μm, however, the other groups exhibited maximization and miniaturization individuals. The results also showed that the larger the effective population size was, the more the variation of the shell length was.

(本文编辑: 梁德海)