

研究简报

# 日本沼虾与海南沼虾的人工种间杂交及其同工酶分析

傅洪拓<sup>1,2</sup> 龚永生<sup>1</sup> 吴滟<sup>1</sup> 徐跑<sup>1</sup> 吴清江<sup>2</sup>

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081;

2 中国科学院水生生物研究所; 淡水生态和生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

## ARTIFICIAL INTERSPECIFIC HYBRIDIZATION BETWEEN *MACROBRACHIUM NIPPONENSE* *MACROBRACHIUM HAINANENSE* AND THEIR ISOZYME ANALYSIS

FU Hong-Tuo<sup>1,2</sup>, GONG Yong-Sheng<sup>1</sup>, WU Yan<sup>1</sup>, XU Pao<sup>1</sup> and WU Qing-Jiang<sup>2</sup>

(1. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081;

2. Institute of Hydrobiology; The Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072)

关键词: 日本沼虾; 海南沼虾; 人工授精; 杂交; 同工酶

**Key words:** *Macrobrachium nipponense*; *Macrobrachium hainanense*; Artificial insemination; Hybridization; Isozyme

中图分类号: S968.22 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)03-0327-03

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*), 又名青虾, 是我国重要的淡水养殖虾类。但近年来, 青虾的性状出现了严重的退化, 包括性早熟、规格变小、商品率低、抗病力下降等, 严重地影响了青虾养殖业的效益, 因此有必要对青虾进行遗传改良。由于虾类种内变异很小<sup>[1]</sup>, 种间杂交可能是遗传改良的有效途径, 但沼虾类的人工种间杂交未见有成功的报道。本文主要研究日本沼虾与海南沼虾(*Macrobrachium hainanense*)的人工种间杂交, 并借此探索虾类的遗传改良途径。

### 1 材料和方法

**1.1 亲本** 青虾为太湖野生, 海南沼虾采自浙江青田瓯江。选择健康、性腺发育良好、体长6—7cm的雌性青虾和雄性海南沼虾作亲本。

**1.2 人工杂交** 试验于2001年10月—2002年5月之间进行, 试验地点是淡水渔业研究中心水族实验室, 室温均为15—27℃之间。雌性青虾和雄性海南沼虾分开饲养于两个水族箱中, 控制水温在22—29℃之间, 全天充气。每天投喂适量的螺蛳肉、土豆丝和颗粒饲料。当雌性青虾出现生殖蜕皮时, 以雌性青虾作母本, 雄性海南沼虾作父本, 按Sandifer and Smith<sup>[6]</sup>的方法并略作一些修改, 进行人工授精。人工授精的雌虾单个饲养于一个水族箱中, 一般在人工授精后12—72h抱卵。在27—29℃控温条件下, 10—20d孵出虾苗。

**1.3 同工酶电泳** 用于电泳分析的样品都采自2001年5月进行人工授精的亲本及其F<sub>1</sub>代, 即用来作同工酶分析的青虾和海南沼虾, 是子一代的嫡亲父本和母本。从虾腹部采集适量新鲜肌肉, 并用蒸馏水洗涤干净, 按1g:4mL加蒸馏水匀浆, 14,000r/min离心20min, 取上清液, -20℃储存备用。用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳分析杂种及其双亲的酯酶(EST)和苹果酸脱氢酶(MDH)(表1)。

表1 同工酶电泳条件

Tab. 1 The Conditions of isozyme electrophoresis

同工酶 Isozymes	分离胶浓度 Concentrations	缓冲系统 Buffers	电泳条件 Conditions
EST	7.5%	0.155mol/L Tris, 0.043mol/L Citric Acid, pH7.4	240V, 1.5h
MDH	8.5%	0.25mol/L Tris, 0.057mol/L Citric Acid, pH8.0	270V, 2hr

### 2 结果

#### 2.1 杂交

水族箱中的对比实验表明, 青虾和海南沼虾之间完全缺乏性吸引, 相互间不能自行杂交。通过人工授精, 总计进行

了5次杂交,其中4次抱卵,三次孵出了杂种虾苗。在三次成功的杂交中,孵化率平均达90%以上;从蚤状幼体到仔虾

(变态完成),存活率分别为20%,27%和60%;从仔虾到接近成体期,存活率分别为23%,26%和52%(表2)。

表2 青虾(♀)X海南沼虾(♂)杂交结果

Tab. 2 The Results of *M. nipponense* (♀) X *M. hainanense* (♂)

编号 No	人工授精时间 Experiment Date	抱卵 Brood	蚤体幼体 Nauplius	仔虾(存活率) post Larva( survival)	4—6cm 杂交虾(存活率) Hybrid juvenile( survival)
1#	2001-10-26	+	0	0	0
2#	2001-10-29	-	0	0	0
3#	2001-11-2	+	2300	630(27%)	165(26%)
4#	2001-11-15	+	500	100(20%)	23(23%)
5#	2002-5-16	+	1200	720(60%)	372(52%)

## 2.2 形态特征

$F_1$ 代杂种的形态兼有双亲的特征。青虾的第二对步足细长、斑纹形状不规则、图案复杂,指节平直;海南沼虾第二对步足粗短,斑纹呈圆环状且清晰规则,指节顶端向内弯曲; $F_1$ 代杂种第二对步足粗短、斑纹呈规则环状,但清晰度介于双亲之间,指节顶端向内弯曲,主要表现出父本特征。青虾

额角上缘平直或者末端微上翘,极少数呈向上弧形,海南沼虾额角上缘呈向上弧形,极少数呈平直形, $F_1$ 代杂种额角上缘呈向上弧形,与父本相似。此外,青虾身体向上驼背明显,而海南沼虾身体相对较为伸展, $F_1$ 代杂种的体形偏向母本青虾(表3)。第一窝杂种已发育至成体,肉眼可见发育成熟的雌雄性腺,但其育性有待进一步研究。

表3 母本青虾、父本海南沼虾和 $F_1$ 代杂种形态学比较

Tab. 3 Comparison of Morphological traits between Parents and their  $F_1$  hybrids

	母本青虾 Maternal	父本海南沼虾 Paternal	$F_1$ 代杂种 Hybrid
第二对步足形态	细长	粗短	粗短
第二对步足斑纹	斑纹复杂,形状不规则	斑纹呈圆环状,清晰规则	斑纹呈规则环状但清晰度 介于双亲之间
雄性第二对步足指节	平直	顶端弯曲	顶端弯曲
额角上缘	平直或者末端微上翘 极少数呈向上弧形	呈向上弧形极少数呈平直形	呈向上弧形

## 2.3 同工酶分析

**2.3.1 酯酶(EST)** 由于遗传基础还不清楚,按其迁移速度,由阴极朝阳极的出现顺序进行编号。雌性青虾共有5条带,除Band 5外,其它4条带均在杂种中表达。雄性海南沼虾共3条带,除Band 2外,其它2条在杂种中表达。 $F_1$ 代杂种中两条迁移得最快的浅带Band 6、Band 7,在双亲中找不到对应的带(图1)。

**2.3.2 苹果酸脱氢酶(MDH)** 由于遗传基础还不清楚,与EST一样,按其迁移速度,由阴极朝阳极的出现顺序对MDH的电泳带进行编号。雌性青虾和雄性海南沼虾都出现5条带,其中有4条带迁移率相同, $F_1$ 代杂种中也出现了对应的四条带,而双亲迁移率不同的一条带则同时在 $F_1$ 代杂种表达(图2)。

## 3 讨论

沼虾类大部分不能进行种间自然杂交,但有少数非常近缘的种之间可以自行交配。已报道的能进行自然杂交的组合有:罗氏沼虾与马氏沼虾、*M. asperulum* 和 *M. shokitai* 以及 *M. formosense* 和 *M. nipponense*<sup>[1]</sup>。美洲龙虾(*H. americanus*)和欧洲龙虾(*H. gammarus*)杂种是可育的,而且具有遗传改良的潜力。Sandifer and Smith 报道了小长臂虾属两个近缘种之间成功的人工杂交。人工种间杂交在对虾类也取得了成功。用人工授精方法尝试沼虾属 *M. acanthurus*, *M. rosenbergii*, *M. ohione*, and *M. offerti* 之间的种间杂交,但均未取得成功。*M. rosenbergii* 和 *M. carcinus* 之间的人工杂交获得了杂种胚胎,但胚胎发育未能超过原肠期。

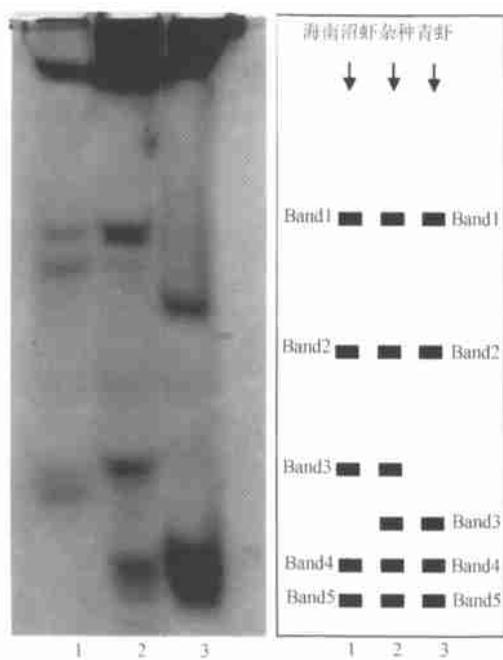
图1 酯酶电泳结果(1. 青虾; 2.  $F_1$ 代杂种; 3. 海南沼虾)

Fig. 1 The results of EST electrophoresis (1. *M. nipponense*; 2.  $F_1$  hybrid; 3. *M. hainanense*)

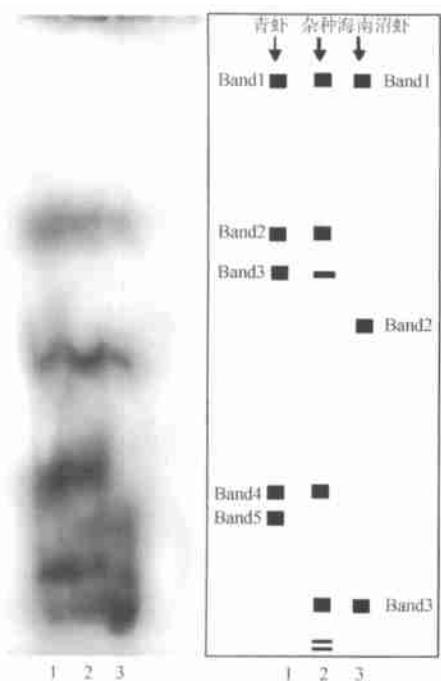
图2 苹果酸脱氢酶电泳结果(1. 海南沼虾; 2.  $F_1$ 代杂种; 3. 青虾)

Fig. 2 The results of MDH electrophoresis (1. *M. hainanense*; 2.  $F_1$  hybrid; 3. *M. nipponense*)

沼虾类的人工种间杂交与对虾比,要困难很多。首先,沼虾有抱卵习性,而对虾卵不依赖母体,在水中自行发育。第二,雌性对虾有纳精囊,但沼虾类没有。第三,对虾类人工授精可在产卵前几个月提前进行,但沼虾类必须在生殖蜕皮

后和产卵前的很短时间内完成。因此,对虾类已有较多人工种间杂交的例子,但沼虾类的人工种间杂交此前一直未取得成功。青虾和海南沼虾为沼虾属的不同种,水族箱中的对比实验表明,青虾和海南沼虾之间完全缺乏性吸引,相互间不能自行杂交。作为亲本的雌性青虾和雄性海南沼虾都是单独饲养,可以排除因疏忽而产生种内杂交的可能性。杂种兼有双亲的形态,并同时表达了双亲的同工酶,进一步证明是青虾和海南沼虾的杂种。

甲壳类酯酶(EST)一般有5个座位,为单体酶,但根据已有的报道,电泳条带数各不相同。罗氏沼虾EST有报道6条酶带的<sup>[2]</sup>,也有报道8—17条酶带的<sup>[3]</sup>,而青虾EST有10条电泳带<sup>[4]</sup>。

本文结果为,青虾EST共有5条带,海南沼虾有3条带。 $F_1$ 代杂种的两条迁移得最快的EST浅带Band6、Band7,在双亲中找不到对应的带,它们可能是双亲同工酶亚基的重组。 $F_1$ 代杂种中迁移最慢的一条EST带,染色深,可能是双亲基因的重叠表达。

甲壳类苹果酸脱氢酶(MDH)为二聚体酶,分为线粒体型和细胞质型,一般有三个座位,通常显示出3条酶带。已有报道,青虾MDH为7条带<sup>[4]</sup>,罗氏沼虾MDH为7条带<sup>[3]</sup>或者10条带<sup>[2]</sup>。本文结果为雌性青虾和雄性海南沼虾都出现5条带。同一物种的同一种同工酶,电泳结果常常各不相同,原因是多方面的。首先可能是电泳条件不同造成的;第二,同一生物个体,其同工酶表达会随着发育阶段、生理状况和环境条件的变化而变化;第三,可能是基因多态性导致。

由于 $F_1$ 代杂种表现出一定的杂种优势,具有育种潜力,因此本工作不仅具有学术价值,而且为以后青虾的遗传育种提供了可能的技术途径,也将对淡水虾类的品种改良起到促进作用。

#### 参考文献:

- [1] Qiu G F. A review of genetics and breeding in shrimps (prawns) and crab [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1998, 22(3): 265—274.
- [2] 邱高峰. 虾蟹类遗传育种学研究. 水产学报, 1998, 22(3): 265—274.
- [3] Lu J P, Jiang N C. The isozyme patterns in embryo development of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Donghai Marine Science*, 2000, 18(3): 34—39.
- [4] 卢建平, 姜乃澄. 罗氏沼虾胚胎发育过程中同工酶的研究. 东海海洋, 2002, 18(3): 34—39.
- [5] Li G L, Zhu C H. Studies on isozymes during early ontogeny of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, 25(4): 338—343.
- [6] 李广丽, 朱春华. 罗氏沼虾个体发育早期的同工酶研究. 水生生物学报, 2001, 25(4): 338—343.
- [7] Wu H X, Xie J Z. Variation of several isozymes in black brachiae disease shrimp, *Macrobrachium nipponense*, and a preliminary pathological analysis [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2002, 1: 32—37.
- [8] 吴惠仙, 薛俊增. 日本沼虾黑鳃病几种同工酶的变化与病理分析. 海洋湖沼通报, 2002, 1: 32—37.