

文章编号: 1000-0615(2005)01-0001-05

中国对虾快速生长新品种“黄海 1 号”的人工选育

李 健¹, 刘 萍¹, 何玉英¹, 宋全山², 牟乃海², 王清印¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 山东省日照水产研究所, 山东 日照 276826)

摘要: 中国对虾经过连续 6 代的群体选育, 表现出生长快、抗逆性强等优良的经济性状。选育群体的体长比对照平均增长 8.40%, 体重增长 26.86%。抗逆性强, 发病率不足 10%, 而未经选育的对照池发病率在 40% 以上。对不同世代进行了遗传结构分析, (1)同工酶: 在 13 个基因位点中, *MDH-2*、*GPI*、*MPI*、*PGM-2* 和 *PGM-3* 五个位点呈多态。*PGM-3* 位点上的变异程度最高, 其等位基因频率呈递减趋势, 选育群体在 *MPI* 位点上发现 c 基因, 其等位基因频率呈递增趋势, 其平均观察杂合度呈依次递减趋势。(2)RAPD: 对 5 个世代进行了 RAPD 分析, 各世代间多态性比例呈下降趋势, F_6 代保持了 F_5 水平。遗传分化指数 G_{st} 除 F_3 与 F_4 之间遗传分化弱之外, 其他世代间已发生了中等程度的分化。(3)SSR: 对 5 个世代进行了 8 个基因位点分析, 共产生 108 个等位基因, 群体间的杂合度呈下降趋势, F_6 保持了 F_5 水平。遗传分化指数 G_{st} 值均小于 0.05, 说明中国对虾人工选育群体之间存在一定程度的分化, 但分化较弱。

关键词: 中国对虾; 群体选育; 快速生长群体; 遗传结构

中图分类号: Q347; Q959.223+.63

文献标识码: A

Artificial selection in the new breed of *Fenneropenaeus chinensis* named “Yellow Sea 1” based on fast growth trait

LI Jian¹, LIU Ping¹, HE Yuying¹, SONG Quanshan², MU Naï-hai², WANG Qing-yin¹

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

2. Fisheries Research Institute of Rizhao in Shandong Province, Rizhao 276826, China)

Abstract: After six-generation selection successively, *Fenneropenaeus chinensis* showed better economical traits such as fast growth and disease-resistance and so on. The average body length and the weight of each selective population increased by 8.4% and 26.86%, respectively, compared to the control. The morbidity was less than 10%, while it was more than 40% in the control. Genetic structure of each generation was also analyzed in the paper, the results were as follows: (1) Isozyme analysis: thirteen loci were examined and five loci were polymorphic, i. e., *MDH-2*, *GPI*, *MPI*, *PGM-2* and *PGM-3*. There were significant differences at the locus *PGM-3*, and the gene frequency showed a decreased trend. At *MPI* locus allele C was found at the cultured populations, and the frequency showed an increased trend. (2) RAPD analysis: RAPD technique was used to investigate the genetic structure of five generation successively. The proportions of polymorphic loci showed a decreased trend while there was no difference between fifth generation and sixth generation. The degree of genetic differentiation (G_{st}) was moderate between populations except third population and fourth population. (3) SSR analysis: eight loci were analyzed among five generations, and 108 alleles were detected. The average heterozygosities showed a decreased trend while sixth generation remained the level of fifth generation. The values of G_{st} were less than 0.05, which showed that there was differentiation to some degree but it was weaker.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; population selection; fast growth; genetic structure

中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 是黄渤海的主要经济虾类, 是我国上世纪 60 至 90 年代最

主要的出口和养殖对象之一, 在国际市场具有较高的声誉。中国对虾养殖区主要集中在我国北方

收稿日期: 2004-08-23

资助项目: 国家自然科学基金项目(30271038); 国家科技攻关专题(2004BA526B0101); 农业产业结构调整重大项目(2003-08-04A)

作者简介: 李 健(1961-), 男, 山东招远人, 博士生导师, 研究员, 从事对虾育种与健康养殖。E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

的黄渤海沿岸,适宜养殖面积占全国对虾养殖面积的60%以上,1990年曾占到我国对虾养殖产量的70%。但1993年以后,由于种质、病害和环境等因素的影响,养殖产量急剧下降,目前不足全国对虾养殖总产量的1/3。据报道,现生产性养殖的中国对虾基本上使用未经选育的野生种,经过累代养殖,出现了遗传力减弱、抗逆性差、性状退化严重等问题,已成为产业可持续发展的“瓶颈”^[1,2]。因此培育生长速度快、抗逆能力强的优良品种成为解决中国对虾养殖二次创业的技术关键之一。笔者自1997年开始实施中国对虾人工选育计划^[3,4],进行了中国对虾优良性状人工选育研究。至2002年,快速生长中国对虾群体已进行了6代人工选育,其生长速度明显加快,同时利用分子生物学遗传标记技术对其遗传变异进行了检测,了解其遗传结构的变化。2003年,选育后的中国对虾快速生长新品种“黄海1号”已通过全国水产原良种审定委员会的审定,成为我国第一个人工选育而成的海水养殖动物新品种。

1 材料与方法

1.1 中国对虾快速生长群体选育

1997年春从黄海水域海捕亲虾培育的F₁起,每年从养成的交尾雌虾中选择大个体进行越冬。每年于冬、春进行两次筛选,即11月份结合养殖

池出池进行初选,使用3 000~4 000尾成虾进行越冬,到次年3月中上旬再从越冬存活的个体中再优选1 000~2 000尾亲虾用于苗种培育。整个选择强度控制在1%~3%。

1.2 同工酶分析

选择中国对虾人工选育F₁、F₄和F₅群体和黄渤海野生群体,参照文献[5]方法进行分析。

1.3 RAPD分析

中国对虾人工选育群体F₁、F₃~F₆群体5个世代共计100尾为实验材料,引物序列见上海生工S系列的S121-140,实验参照文献[6]的方法。

1.4 SSR分析

实验材料同RAPD分析相同,分析用引物及实验步骤参照文献[7]。

2 结果

2.1 中国对虾快速生长群体选育结果

中国对虾经过连续6代的选育,表现出生长快、抗逆性强等优良的经济性状。历代选育群体的体长比对照平均增长8.40%,体重增长可达26.86%。同时还表现出抗逆性强的优点,养殖对比试验总发病率低,发病率不足10%,而未经选育的对照组发病率在40%以上。中国对虾选育群体主要生物学性状见表1、2,示范养殖结果见表3、4。

表1 中国对虾F₆外部形态学特征

Tab.1 Morphological character in the sixth cultured population of *Fenneropenaeus chinensis*

样本数(ind) sample no.	80♀	94♂	总平均 total average
体重(g) body weight	31.63 ± 4.71	21.33 ± 2.46	26.06 ± 6.31
全长(cm) total length	16.94 ± 0.80	15.03 ± 0.60	15.91 ± 1.18
体长(cm) body length	13.93 ± 0.70	12.46 ± 0.49	13.14 ± 0.94
头胸甲长(cm) carapace length	4.400 ± 0.32	3.900 ± 0.25	4.158 ± 0.38
1	1.332 ± 0.13	1.158 ± 0.12	1.248 ± 0.15
2	1.109 ± 0.09	1.007 ± 0.06	1.060 ± 0.09
腹节长(cm) abdominal segmental length	3	1.089 ± 0.07	1.046 ± 0.08
4	1.054 ± 0.07	0.969 ± 0.07	1.013 ± 0.08
5	1.114 ± 0.06	1.024 ± 0.05	1.070 ± 0.07
6	2.186 ± 0.26	2.039 ± 0.08	2.115 ± 0.21
尾节长(cm) telson length	2.109 ± 0.20	1.936 ± 0.13	2.025 ± 0.19
宽度(cm) width	头胸甲 carapace	2.057 ± 0.22	1.632 ± 0.08
	腹节1 abdominal segment I	1.696 ± 0.15	1.372 ± 0.06
背腹高(cm) dorsoventral tall	头胸甲 carapace	2.340 ± 0.21	1.942 ± 0.10
	腹节1 abdominal segment I	2.035 ± 0.13	1.763 ± 0.13

表 2 选育中国对虾 F6 体长回归分析
Tab. 2 Recursive analysis on the sixth cultured population of *Fenneropenaeus chinensis*

外形性状 morphological character	回归关系 recursive relation	R ² 值 R ² value
全长对体重 total length \bar{L} s body weight	$y = 5.9923x^{0.3012}$	0.9330
体重对全长 body weight \bar{W} s total length	$y = 0.0048x^{3.0975}$	0.9330
体重对体长 body weight \bar{W} s body length	$y = 0.0074x^{3.1623}$	0.9093
体长对体重 body length \bar{L} s body weight	$y = 5.1731x^{0.2875}$	0.9093
全长对体长 total length \bar{L} s body length	$y = 1.2068x + 0.0549$	0.9295
体长对全长 body length \bar{L} s total length	$y = 0.7702x + 0.8834$	0.9295
头胸甲长对体重 carapace length \bar{L} s body weight	$y = 1.165Ln(x) + 0.3555$	0.5673
体重对头胸甲长 body weight \bar{W} s carapace length	$y = 3.4509e^{0.487x}$	0.5673
腹节 1 的宽对头胸甲的宽 abdominal segment I width \bar{W} s carapace width	$y = 0.6071x + 0.423$	0.6825
头胸甲的宽对腹节 1 的宽 carapace width \bar{W} s abdominal segment I width	$y = 1.1241x + 0.1119$	0.6825
腹节 1 的背腹高对头胸甲的背腹高 dorsoventral tall of abdominal segment I \bar{W} s dorsoventral tall of carapace	$y = 1.0679e^{0.2666x}$	0.4875
头胸甲的背腹高对腹节 1 的背腹高 dorsoventral tall of carapace \bar{W} s dorsoventral tall of abdominal segment I	$y = 1.8284Ln(x) + 0.9798$	0.4875
头胸甲的背腹高对腹节 1 的宽 abdomen and back tall of carapace \bar{W} s abdominal segment I width	$y = 1.5431Ln(x) + 1.4858$	0.5577
腹节 1 的宽对头胸甲的背腹高 abdominal segment I width \bar{W} s dorsoventral tall of carapace	$y = 0.7063e^{0.3614x}$	0.5577
头胸甲的背腹高对头胸甲的宽 dorsoventral tall of carapace \bar{W} s carapace width	$y = 1.4429Ln(x) + 1.2726$	0.5934
头胸甲的宽对头胸甲的背腹高 carapace width \bar{W} s dorsoventral tall of carapace	$y = 0.7579e^{0.4112x}$	0.5934
腹节 1 的背腹高对腹节 1 的宽 dorsoventral tall of abdominal segment I \bar{W} s abdominal segment I width	$y = 1.484x^{0.5682}$	0.5185
腹节 1 的宽对腹节 1 的背腹高 abdominal segment I width \bar{W} s dorsoventral tall of abdominal segment I	$y = 0.8571x^{0.9125}$	0.5185

表 3 中国对虾累代选择育种结果
Tab. 3 Results of successive selection in *Fenneropenaeus chinensis*

选育材料 cultured population	验收时间 check and acceptance time	平均体长 (cm) average body length	最大个体 (cm) maximal ind.	最小个体 (cm) minimal ind.
F ₂	1998-10-04	12.13	14.2	9.3
F ₃	1999-10-13	13.29	15.5	9.7
F ₄	2000-10-06	13.59	16.4	11.0
F ₅	2001-10-15	15.10	18.3	12.9

2.2 中国对虾快速生长群体世代间遗传结构

同工酶分析 采用水平淀粉凝胶电泳技术对中国对虾人工选育 F₁、F₄ 和 F₅ 群体和黄渤海野生群体进行了同工酶比较分析。结果表明: 在检测的 4 个群体肌肉组织的 13 个基因位点中, MDH-2、GPI、MPI、PGM-2 和 PGM-3 五个位点呈多态。PGM-3 位点上的变异程度最高, 其等位基因频率呈递减趋势; 人工选育群体在 MPI 位点上出现 c 基因, 其等位基因频率呈递增趋势, 见图 1。中国对虾野生群体同人工选育群体的多态位点比例相同, 为 38.46%; 其平均观察杂合度分别为 0.0577、0.0377、0.0263、0.0231, 呈依次递减趋

势。中国对虾野生群体和人工选育群体之间的遗传距离平均值为 0.0062, 远大于 F₄ 和 F₅ 间的遗传距离。

表 4 中国对虾选育群体示范区养殖结果
Tab. 4 Results of the selective populations of *Fenneropenaeus chinensis*

年份 year	代数 generations	养殖产量 (kg·km ⁻²) yield	发病率 (%) disease rate
1998	F ₂	958.5	25.0
1999	F ₃	2007	11.0
2000	F ₄	3348	0.0
2001	F ₅	2745	12.0
2002	F ₆	2644.5	0.0

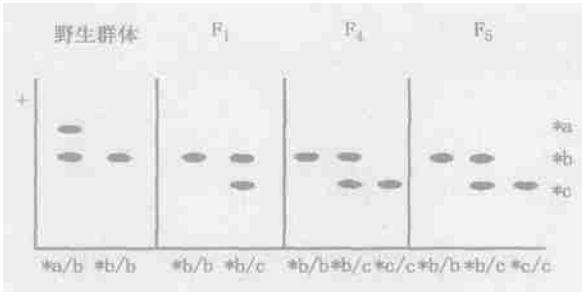


图1 中国对虾 MPI 同工酶电泳图谱
Fig. 1 Electrophoretograms of MPI isozymes of *Fenneropenaeus chinensis*

中国对虾 RAPD 分析 利用 RAPD 技术对

人工选育群体 F_1 、 $F_3 \sim F_6$ 群体 5 个世代共计 100 尾进行了遗传分析, 见图 2。在 20 个 10bp 寡核苷酸引物中筛选出 16 个重复性好, 谱带清晰的引物进行了 PCR 扩增。多态性比例分别为 38. 2%、37. 86%、36. 89% 和 33. 01% 和 33. 71%。遗传分化指数 (G_{st}) 除 F_3 与 F_4 之间遗传分化弱之外 (0. 046), 其他各世代间遗传分化指数均大于 0. 05, 发生了中等程度的分化 (0. 0686~ 0. 085)。群体间的遗传变异 ($H_{sp}H_{pop}/H_{sp}$) 为 0. 197, 说明 80. 3% 的遗传变异来自于群体内, 而近 19. 7% 的变异则是来自于群体间。

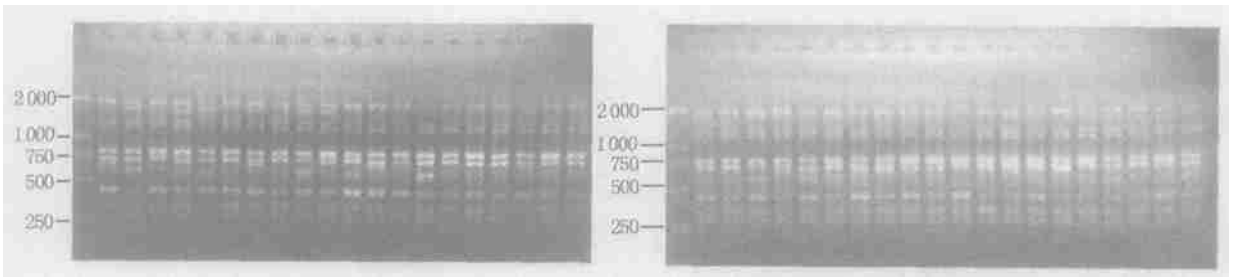


图2 S121 引物对中国对虾 F_3 和 F_5 的 RAPD 扩增图谱
Fig. 2 Electrophoretograms of S121 in the third population and the fifth population of *Fenneropenaeus chinensis* with RAPD technique

中国对虾 SSR 分析 利用微卫星 DNA 技术对人工选育群体 F_1 、 $F_3 \sim F_6$ 群体 5 个世代共计 100 尾进行了遗传分析。对 8 个基因位点进行了扩增, 引物序列参照文献 [7], 共产生 108 个等位基因。每个位点的等位基因数从 3 到 16 不等, 其片段大小在 159bp~ 600bp 之间(图 3)。PIC 值从 0. 09274 到 0. 8877, 基因型数从 5 到 20。5 个世代群体的平均杂合度分别为 0. 6625, 0. 6250, 0. 6563, 0. 6188, 0. 6188, 其中除 RS0956 位点以外的 7 个位点观察杂合度值都比期望杂合度值大。

群体内遗传变异 H_{pop}/H_{sp} 均值为 0. 9215; 而群体间的遗传变异平均值为 0. 0785, 亦即 92. 15% 的遗传变异是在群体内检测到的, 只有 7. 85% 的遗传变异来自世代间, 说明经过人工选育群体的遗传多态性并没有显著降低。各基因位点遗传分化指数 G_{st} 值均小于 0. 05, 说明中国对虾人工选育群体之间存在一定程度的分化, 但分化较弱。5 个群体的系统进化关系, 根据遗传距离构建了 UPGMA 系统树图(图 4)。

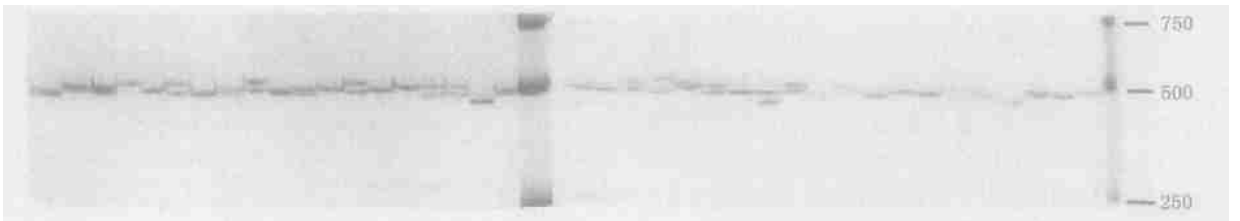


图3 RS0622 基因位点对中国对虾 F_3 和 F_5 的 SSR 扩增图谱
Fig. 3 Electrophoretograms of RS0622 in the third population and the fifth population of *Fenneropenaeus chinensis* with SSR technique

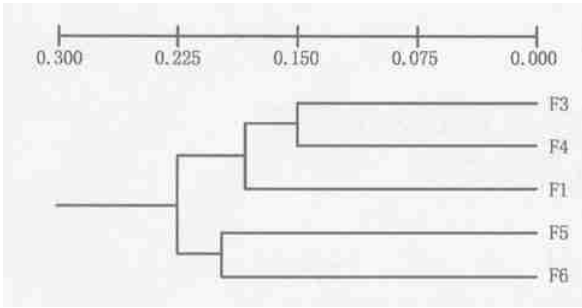


图 4 SSR 技术对中国对虾选育群体各世代的聚类图

Fig. 4 Cluster analysis in cultured populations of *Fenneropenaeus chinensis* with SSR technique

3 讨论

在过去 10 年里对虾选择育种在国外已陆续启动。位于夏威夷 Kona 的高健康水产养殖公司致力于抗 Taura 综合征病毒(TSV)的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)选育研究,经过 3 代的选育后,对照群体的对虾养殖的成活率只有 31%,而选育群体的成活率达到 69%,且呈逐年增加的趋势^[8];夏威夷海洋研究所对生长速度的选择已使凡纳滨对虾的体重提高了 21.2%,对抗 TSV 性状的选择使成活率比对照提高了 18.4%^[9]。法国海洋开发研究院的对虾育种计划开始于 1992 年,对生长率的群体选育结果是, F₂ 生长率提高 6%, F₄、F₅ 分别提高了 18% 和 21%,对抗病品系的选育通过感染试验来筛选,已成功培育出抗 IHHNV 的兰对虾(*Litopenaeus stylirostris*)种群^[10]。澳大利亚联邦科学和工业研究院对日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)的驯化和选育使日本对虾每代的生长表现平均分别提高了 11% 和 10%~15%^[11]。中国对虾“ 黄海 1 号” 为我国第一个经人工选育的海水养殖动物新品种,对加快我国海水养殖业良种产业化起到重要的推动作用。

由于人工选育是一个复杂的过程,每一代的外部环境及人工选择压力会造成群体遗传变异水平的波动。在日本对虾引入意大利后, Sbordoni 等^[12]利用同工酶技术跟踪养殖群体遗传多样性变化, F₁~ F₆ 的平均杂合度从 0.102 持续下降至 0.039,分析原因可能是人工选育过程中,有效群

体过小是主要因素。而在中国对虾人工选育过程中,选留了足够数目的亲虾,同时严格控制交尾,选留后代覆盖面广,这是育种过程中避免近交衰退的有效手段。

经典的同工酶技术,发现多态性比例没有随选育世代的增多而降低,也就是说,在选育过程中有些基因位点会逐渐减少乃至消失,但有些基因位点会逐渐出现并积累; mtDNA 分析,分别扩增了 COI 基因序列和 16S rRNA 基因序列,实验结果证明了中国对虾在这两个基因上的保守性; RAPD 技术,说明经过世代的连续选育,中国对虾已经发生了中等程度的分化;微卫星技术,结果表明中国对虾人工选育群体连续的世代之间存在一定程度的遗传变异,但分化较弱。所以,中国对虾快速生长群体的选育没有产生“ 近亲杂交” 等因素导致某些位点选择性的丧失而造成选育群体遗传多样性整体水平下降。

参考文献:

- [1] 刘萍,孔杰,石拓,等. 暴发性流行病原对中国对虾亲虾人工感染及对子代影响的 PCR 检测[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(2): 139-144.
- [2] Wang W J, Kong J, Bao Z M, et al. Isozyme variation in four populations of *Fenneropenaeus chinensis* shrimp[J]. Biodiversity Science, 2001, 9(3): 241-246.
- [3] 李健,王清印. 中国对虾高健康养殖品种选育的初步研究[J]. 中山大学学报, 2000, 39(增刊): 86-90.
- [4] 李健,牟乃海,孙修涛,等. 无特定病原中国对虾种群选育的研究[J]. 海洋科学, 2000, 25(12): 30-33.
- [5] 李健,高天翔,柳广东,等. 中国对虾人工选育群体的同工酶分析[J]. 海洋水产研究, 2003, 24(2): 1-8.
- [6] Liu P, Kong J, Shi T, et al. RAPD analysis of wild stock of penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) in Chinese coastal waters of the Huanghai Sea and coastal waters of the Bohai Sea[J]. Oceanol Sin, 2000, 7(2): 86-89.
- [7] 刘萍,孟宪红,孔杰,等. 中国对虾微卫星 DNA 多态性分析[J]. 自然科学进展, 2004, 14(2): 150-155.
- [8] Wyhan J. Breeding shrimp for fast growth and virus resistance[J]. The Advocate, 2000, 3(6): 32-33.
- [9] Paul K, Bienfang, Sweeney N J. The use of SPF broodstock to prevent disease in shrimp farming[J]. Aquaculture Asia, 2001, 6(1): 12-14.
- [10] Emmanuel G. IFREMER's shrimp genetic's program[J]. The Advocate, 1999, 2(6): 26-28.
- [11] Hetzel D J, Crocos P J, Davis G P, et al. Response to selection and heritability for growth in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* [J]. Aquac, 2000, 181: 215-223.
- [12] Sbordoni V, Matthaes E De, Sbordoni M C, et al. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda) [J]. Aquac, 1986, 57: 239-251.