

养殖对虾新品种培育技术研究进展

高冬梅, 李 健, 王清印

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:本文介绍了国内外有关养殖对虾遗传改良研究的现状,并对选择育种、杂交育种、多倍体育种、人工雌核发育和转基因育种等手段研究进展进行了详细分析。提出利用现代生物学的新技术、新方法改造传统养殖业,将传统的育种研究技术与现代生物学技术相结合,加快培育优质、抗逆对虾养殖新品种是从根本上解决困扰对虾养殖业发展的重要研究方向。

关键词:对虾,遗传改良

中图分类号:S968.22

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2002)04-0375-04

近20年来我国在海水养殖生物的改良方面作了大量的工作。在海带(*Laminaria japonica*)、紫菜(*Porphyra tenera*)、裙带菜(*Undaria pinnatifida*)等海藻方面,曾采用选择育种、诱变育种、细胞融合、基因工程等方法进行遗传育种和优化培养。转基因鱼的研究及贝类杂交育种和多倍体育种也已跻身于世界先进行列^[1-4]。但作为对虾养殖大国至今尚未建立起系统的亲虾驯化和选育体系,培育苗种所用的亲体主要来自野生群体。盲目的引种、移植和人工放流,造成种群变异、品质退化等资源衰退现象;高密度集约化养殖已造成对虾暴发病的流行,经济损失严重。要解决这些问题,需要多方面的努力,其中培育优质、抗逆性强的养殖品种是可能的途径之一^[5]。

在过去10多年里,对虾遗传改良计划在世界范围内已先后启动,最早开始的是美国农业部支持的“海产对虾养殖计划”(marine shrimp farming program)。该计划从1989年开始培育无特定病原(SPF)的凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)。SPF对虾的培育,使美国虾产量在1992年比1991年增加了1倍;在SPF对虾培育研究的基础上,美国CEATECH HHGI育种公司通过遗传改良计划,成功培育了抗Taura综合症病毒(TSV)的高健康凡纳对虾,并对养虾业产生了重要影响^[6]。法国海洋开发研究院(IFREMER)已成功选育出抗IHHNV的蓝对虾(*P. stylirostris*)种群,澳大利亚联邦科学

和工业研究院(CSIRO)对日本对虾(*P. japonicus*)的驯化和选育明显促进了养殖业的经济效益;委内瑞拉开发的抗IHHNV蓝对虾已作为超级虾(Super-shrimpTM)品牌,对周边国家的养虾业产生了重要影响^[5]。

1 对虾遗传改良技术

1.1 选择育种

在苗种培育过程中挑选大且健康的个体作为亲本进行次年苗种生产,是虾类选育的萌芽或初始形式。Lester^[7]在1983年曾提出了对虾选择育种的方案,为以后的选育工作提供了理论指导。美国高健康养殖公司(High Health Aquaculture Inc.)通过对凡纳对虾抗TSV性状的选育,每代成活率增加15%,经过连续4代选择,存活率可达到92%~100%,而对照组的存活率只有31%,对生长速度的选择已使凡纳对虾个体重达到22~25 g。这表明选择育种可明显改进养殖对虾的生长表现^[8]。中国水产科学研究院黄海水产研究所等单位进行了中国对虾(*P. chinensis*)遗传改良研究,从1997年开始进行中国对虾种群选育技术的研究。对无特定病原对虾亲虾的筛选、幼体的培育、病原的检疫和检测以及健康对虾的养殖技术进行了比较系统的研究和探索,到2001年已取得良好结果。使用经筛选的对虾种群培育的5代苗种比对照组生长速度快、发病率低(表1)。目前养殖面积已扩大到日照、青岛等地60多hm²^[9-10]。

一般来说遗传力高的性状选择容易,而遗传力低的性状选择难。夏威夷海洋研究所曾对凡纳对虾的主要遗传参数进行了研究,包括体重、生长率和抗TSV病等方面的遗传力,表型和遗传型变异及其相关关系以及遗传型和环境的相互作用等,结果表明凡纳对虾的可选择性潜力很大^[5]。在国

收稿日期:2001-10-09。

基金项目:国家“九七三”重点基础研究资助项目(G1999012009);国家“十五”科技攻关资助项目(2001BA505B05010)。

作者简介:高冬梅(1976),女,青岛海洋大学硕士研究生,主要从事遗传育种研究。

内,有关对虾遗传力的报道还不多,厦门水产学院曾对长毛对虾(*P. penicillatus*)体长、体重的一些遗传参数进行了分析,表明体长和体重之间有极显著的直线相关,并对体长、体重的遗传力进行了估算^[11];湛江水产学院对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的数量性状遗传参数进行了研究,也进行了体长、体重遗传参数的分析,表明体长体重的大小是可遗传的,个体间具有显著的相似性^[12]。

表1 日照试验点中国对虾累代选择育种结果

Table 1 Selected breeding results of *P. chinensis* in Rizhao County

选育材料 Shrimp	验收时间 Harvest date	平均体长/cm Body length	最大个体/cm Maximum length	最小个体/cm Minimum length
F ₂	4 Oct. 1998	12.13	14.2	9.3
F ₃	13 Oct. 1999	13.29	15.5	9.7
F ₄	6 Oct. 2000	13.59	16.4	11.0
F ₅	15 Oct. 2001	15.10	18.3	12.9

选择育种一般只选择少量优良个体,一定要避免近交效应,维持有效群体大小,防止近交造成遗传种质的衰退;其次,还必须加强数量遗传学基础研究,利用一些遗传参数(如:遗传力)指导选择育种,减少选择的盲目性。

1.2 杂交育种

1985年以后,相继研究了主要经济类对虾的染色体数目,结果表明,对虾属二倍体染色体数目多为88,白对虾(*P. setiferus*)为90,日本对虾(*P. japonicus*)为92,罗氏沼虾为118,日本沼虾(*M. nipponense*)为104,染色体最少的为北方长额虾(*Pandalus borealis*), $2n=68$,最多的是亚太螯虾(*Pacifastacus trowbridgii*), $2n=376$ 。如果杂交亲本的染色体数目不同,由于杂交不亲和会产生杂交不育和杂交不孕现象^[13]。对于杂交育种来说,虾类精英移植人工受精技术的成功为其提供了一种有效的手段^[14]。Persyn^[15]于1977年最早成功研究了虾类人工受精方法—挤压法;Sandifer等^[16]又将挤压法发展到了电刺激法,并且证明该方法可以引起80%的对虾不同程度地排放精英,而且利用排放的精英进行人工受精实验,可以产生正常的胚胎。1982年Chew、Bray^[17-18]及1984年Sandifer等^[16]分别使用粘着剂将精英牢固的粘贴到雌虾腹部的纳精囊上,大大提高了受精的成功率。杨从海等^[1]应用改进了的电刺激方法采取雄性精英,人工交配成功率达35%~75%。

一般来说,种间杂交的受精率和孵化率要比种内杂交低,杂种后代的形态特征及生长发育速度大多为父母本的中间型^[19-20]。曾报道长毛对虾×斑节对虾(*P. monodon*)的杂种后代成活率较低,但生长速度较快,即使是摘除杂种后代雌虾眼柄,卵巢也不能成熟^[21];Carlberg等^[19]于1978年报道过美洲螯龙虾(*Homonarus americanus*)×*H. gammarus*的杂种后代雌性个体不能产生精子;Shokita^[20]报道粗糠沼

虾(*M. asperulum*)×台湾沼虾(*M. shokitai*)杂种后代是不育的。许多实验表明虾类种间杂交后代大多是中性不育的。

1.3 多倍体育种

我国最早开展虾类多倍体育种是在1989年6~12月,相建海和Clark^[22]以锐脊单肢虾(*Sicyonia ingentis*)为材料在国际上首次获得对虾二倍体幼体,该成果倍受国内外学者的关注。随后以温度休克和细胞松弛素诱导受精卵发育成四倍体,诱导成功率达66.7%,共获得10cm左右的对虾数千尾;实验还表明四倍体中国对虾具有一定的生长优势,生长速度优于二倍体^[23]。邱高峰等^[24]以热休克法抑制受精卵第1次卵裂,获得了四倍体胚胎。随后,戴继勋等^[25]利用温度休克中国对虾的受精卵,结果表明用低温休克,温度越低或休克时间越长,对细胞分裂的抑制作用也越强,孵化率也越低;用高温休克,温度越高或休克时间越长,对细胞的伤害也越大,孵化率明显降低,低温和高温休克都能诱发三倍体,最高诱发率低温(9℃)为43.8%,高温(30℃)为32%。包振民等^[26]用细胞松弛素B处理中国对虾的受精卵,获得了三倍体对虾幼体,诱导率达62.5%,细胞松弛素浓度越高,对极体排放的抑制力越强,但胚胎畸形率和非整倍体数则增多。近年中国科学院海洋研究所在对虾三倍体和四倍体研究中又取得进展,经过条件的优化,中国对虾三倍体的最高诱导率可达90%以上;在胚胎期检测,四倍体最高诱导率达90%以上(未发表)。

利用三倍体不育性导致的生长优势,可培育出大规模的对虾个体,同时还可能克服雄虾因性腺早熟造成的大量死亡而提高繁殖期的成活率。而四倍体的虾有可能达到性成熟并繁育后代,它与二倍体交配,即可产生不育的三倍体,这将使大规模生产三倍体虾成为可能,比用诱导方法使染色体加倍获得三倍体更为有效。因此,今后虾类多倍体育种研究的重点应放在四倍体诱导上。

1.4 人工雌核发育

相建海等^[22]于1990年以确凿的细胞学证据证明了对虾人工雌核发育的可行性,随后,戴继勋等^[27]于1993年用⁶⁰Co射线照射中国对虾的精子诱导雌核发育,实验表明用⁶⁰Co射线照射精子受精后,随着辐射剂量的增加,胚胎的存活率显著下降,而到了更高剂量时,胚胎的存活率反而增加,存活率出现了“U”形曲线,表现有所谓Hertwig效应。蔡难儿等^[28]用紫外线照射精子、受精、温度或细胞松弛素B处理卵子方法,诱导出了中国对虾雌核发育个体,最高诱导率达37.22%。陈本难等^[29]研究了365nm波长紫外线辐射中国对虾精子对其顶体反应和受精能力的影响,结果表明低剂量紫外线辐射可促进精子发生顶体反应,大剂量辐射使精子丧失发生顶体反应的生理机能,从而获得遗传物质失活的精子来作为雌核发育的激活源。

利用雌核发育可进行性别控制,生产单性种群,可在较

1) 杨从海,麻松松,刘一萍,等. 中国对虾人工交配方法研究[J]. 中国水产科学院学报, 1989, 2(1): 41-46.

短的时间内获得纯系。一般来说采用常规育种办法培育纯系需要8~10代,而利用雌核发育只需2~3代;而且由于雌核比雄核生长快,在水产养殖上有着广泛的应用前景。但雌核发育所产生的后裔是高度自交,且遗传上完全一致,因此人工诱发雌核发育的后裔较之正常受精所获得的后裔成活率低、繁殖力弱。

1.5 转基因育种

转基因虾的研究还处于早期阶段,在这方面的成果还不多。刘萍等^[30]于1996年用精子作为载体,将羊生长激素基因注射至交配过的中国对虾雌体纳精囊中,获得了首例转基因仔虾,转基因比率为1%;另外,用显微注射法将羊生长激素的基因导入中国对虾受精卵,受精卵发育到溞状幼体第3期后,采用PCR及斑点杂交技术检测,结果表明转基因比率至少在3%以上^[31]。中国科学院海洋研究所利用基因枪的方法成功地带有GFP基因的外源DNA转入中国对虾受精卵中(未发表)。

在转基因方面,由于虾类迄今尚未分离和克隆任何有重要经济价值的基因,只能使用其他种动物分离的有价值基因进行转基因育种,但是异源基因是否能整合表达,以及表达效率及其产生的遗传效应尚不甚了解。因此,要利用基因转移改良对虾品种,就要早日建立虾类基因文库,筛选和克隆一批具有优良性状的基因,特别是抗病、抗逆基因。

2 现代生物学技术在对虾遗传改良中的应用

随着近年来分子生物学技术的发展,尤其是染色体分辨技术、蛋白质分析技术、体细胞遗传操作技术、DNA分析技术的发展,使人们对于遗传学的研究深入到分子水平,利用DNA分子水平上的变异作为遗传标记的研究取得了新的突破,已经应用于种质资源鉴定、基因定位、家系分析及分子标记育种等方面^[32]。在对虾的遗传改良中现代生物学技术的应用将重点体现在以下方面:

2.1 构建遗传图谱

基因组图谱的构建是遗传学研究的重要领域,它是系统性研究基因组的基础,是进行数量性状位点定位的前提,也是动植物遗传育种的根据,它将实现辅助标记技术^[33]。而对于虾类遗传图谱的构建工作则刚刚起步,Moore等^[34]利用246个多态性的AFLP标记,构建了具有44个连锁群的日本对虾AFLP图谱,这是甲壳动物以至水生无脊椎动物中首次报道的连锁图谱。据报道现已从斑节对虾中分离出大量多态性微卫星座位和AFLP标记,第1个斑节对虾图谱据信不久将面世^[35]。通过对虾遗传图谱的构建,可使一些有重要经济价值的基因得以定位和克隆,但是目前这方面的研究工作还很少,主要原因是对虾类基因组缺乏了解,可供作图的遗传标记的数量较少,不足以连成高密度的连锁图谱。

2.2 分子标记辅助选择育种(Marker Assisted Selection, MAS)

DNA分子标记是DNA水平遗传变异的直接反映,与表型标记相比,DNA分子标记能对各发育时期的个体、各个组织、器官甚至细胞作检测,即不受环境的影响,也不受基因表达与否的限制;数量丰富,遗传稳定,对生物体的影响表现“中性”,并且操作简单。标记辅助选择是通过标记,对目的性状实施间接选择,其前提是标记与目的性状紧密连锁^[36]。

应用分子标记辅助选择育种,可以提前预知选育的结果,大大提高选育的效率。一般认为应用传统选育技术,每代的遗传获得率通常在10%~15%,但分子标记选择育种技术可明显提高选育进度,特别是那些靠传统的表型工具难以度量的性状^[6]。目前,对养殖虾类主要经济性状的分子标记研究已经取得了许多进展,曾报道在斑节对虾、凡纳对虾、北美白对虾(*P. setiferus*)、美非对虾(*P. notialis*)、蓝对虾中发现部分微卫星标记^[37-41];从斑节对虾中已分离出大量多态性的AFLP标记^[35];中国科学院海洋研究所徐鹏等^[42]利用PCR法对中国对虾小片断部分基因组文库进行筛选,首次在中国对虾中获得31个微卫星序列。利用这些分子标记可以鉴别不同品系的数量性状位点,培育品质更优良的品种。相信在不久的将来,分子标记技术将大大促进育种工作。

3 结束语

据报道,国外农作物良种使用率已达到100%,畜牧良种使用率也达到80%,在国内农作物良种使用率达到80%,畜牧良种使用率因品种不同为20%~60%,而海水养殖业良种使用率目前不足5%。因此以前所未有的速度来改良经济养殖品种,对满足人类对其需求量的日益增加具有重要意义。目前国内外在对虾遗传改良方面采用的技术主要还是经典的选择育种、杂交育种、多倍体育种及人工雌核发育等,但由于每种方法都存在一些技术上的困难,阻碍了育种的快速进行。要使对虾的良种培育工作取得突破性进展,必须运用现代生物学的新技术、新方法改造传统养殖业,这是我们必须遵循的一个非常重要的发展策略。

参考文献:

- [1] 王清印. 海洋生物技术在海水养殖动植物品种培育和病害防治中的应用[J]. 生物工程进展, 1996, 16(6): 41-48.
- [2] 周百成, 曾呈奎. 藻类生物技术与海洋产业发展[J]. 生物工程进展, 1996, 16(6): 13-16.
- [3] 谭海东, 张波, 郝景泉, 等. 转基因鱼的研究进展[J]. 大连水产学院学报, 1999, 14(2): 54-61.
- [4] 田传远, 王如才, 梁英. 6-DMAP诱导太平洋牡蛎三倍体—抑制受精卵第二极体释放[J]. 中国水产科学, 1999, 6(2): 1-4.
- [5] 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.
- [6] Bienfang P K, Sweeney J N. The use of SPF broodstock to prevent disease in shrimp farming[J]. Aquaculture Asia, 2001, 6(1): 12-

- 14.
- [7] Lester L J. Developing a selective breeding plan for penaeid shrimp [J]. *Aquaculture*, 1983, 33: 41 - 50.
- [8] Jim Wyban. Breeding shrimp for fast growth and virus resistance [J]. *The Advocate*, 2000, 3(6): 32 - 33.
- [9] 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.
- [10] 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*, 2001, 25(12): 30 - 33.
- [11] 吴仲庆, 徐福章, 周雪芳. 长毛对虾体长和体重的一些遗传参数[J]. *厦门水产学院学报*, 1990, 12(2): 5 - 14.
- [12] 陈刚, 柴华金, 林晓文. 罗氏沼虾体长和体重的一些遗传参数分析[J]. *湛江水产学院学报*, 1996, 16(1): 25 - 30.
- [13] 楼允东. *鱼类育种学*[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [14] Lin M N, Ting Y. Spermatophore transplantation and artificial fertilization in grass shrimp [J]. *Bull Japan Soc Sci Fish*, 1986, 52: 585 - 589.
- [15] Persyn H O. Artificial insemination of shrimp U. S [P]. Patent 4031855, June, 28, 1977.
- [16] Sandifer P A, Lawrence A L, Harris S G, et al. Electrical stimulation of spermatophore expulsion in marine shrimp [J]. *Penaeus spp Aquaculture*, 1984, 41: 181 - 187.
- [17] Chew S. Artificial insemination using preserved spermatophores in palaemonid shrimp *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Bull Jap Soc Fish*, 1982, 48(12): 1 693 - 1 695.
- [18] Bray W A, Lawrence A L, Lester L J, et al. Increased larval production of penaeus scitiferus by artificial insemination during sourcing cruises [J]. *World Maricult Soc*, 1982, 13: 123 - 133.
- [19] Carlberg J M, Van olst J, Ford R. A comparison of larval and juvenile stages of the lobsters *Homarus americanus*, *Homarus gammarus*, and their hybrids [J]. *Proc World Maricult Soc*, 1978, 11: 488 - 499.
- [20] Shokita S. Larval development of interspecific hybrid between *Macrobrachium asperulum* from Taiwan and *Macrobrachium shokitai* from the Ryukyus [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1978, 44: 1 187 - 1 195.
- [21] 邱高峰. 虾蟹类遗传育种学研究[J]. *水产学报*, 1998, 22(3): 265 - 274.
- [22] Xiang J H, Clark W H, Griffin F, et al. Study on feasibility of chromosome set manipulations in the marine shrimp, *scyonia ingentis* [R]. International Crustacea Conference, Brisbane, Australia, 1990.
- [23] 相建海, 周令华, 刘瑞玉, 等. 中国对虾四倍体诱导研究[J]. *海洋科学*, 1992(4): 55 - 61.
- [24] Qiu Gaofeng, Du Nanshan, Lai Wei. A Preliminary study on Induction of tetraploidy in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense* by Heat Shock [J]. *水产学报*, 1997, 21(1): 13 - 18.
- [25] 戴继勋, 包振民, 张全启. 中国对虾三倍体的诱发研究——温度休克[J]. *遗传*, 1993, 15(5): 15 - 18.
- [26] 包振民, 张全启, 王海, 等. 中国对虾三倍体的诱导研究——细胞松弛素 B 处理[J]. *海洋学报*, 1993, 15(3): 101 - 105.
- [27] 戴继勋, 包振民, 张全启, 等. ^{60}Co 射线诱导中国对虾雌核发育的观察[J]. *青岛海洋大学学报*, 1993, 23(4): 151 - 154.
- [28] 蔡难儿, 林峰, 柯亚夫, 等. 中国对虾人工诱导雌核发育的研究 I——四步诱导法[J]. *海洋科学*, 1995, 3: 35 - 41.
- [29] 陈本难, 蔡难儿, 李光友. 中国对虾人工诱导雌核发育的研究——紫外线辐射对精子顶体反应和受精能力的影响[J]. *海洋科学*, 1997, 1: 41 - 47.
- [30] 刘萍, 孔杰, 李健. 中国对虾精子载体将生长激素基因导入受精卵的研究[J]. *中国水产科学*, 1996, 3(1): 6 - 10.
- [31] 刘萍, 孔杰, 王清印, 等. 显微注射生长激素基因导入中国对虾受精卵的研究[J]. *中国水产科学*, 1996, 3(4): 35 - 38.
- [32] 王和勇, 陈敏, 廖志华, 等. RFLP、RAPD、AFLP 分子标记及其在植物生物技术中的应用[J]. *生物学杂志*, 1999, 16(4): 24 - 25.
- [33] 林红, 夏德全, 杨弘, 等. 遗传连锁图谱及其在鱼类遗传育种中的应用[J]. *中国水产科学*, 2000, 7(1): 95 - 98.
- [34] Moore S S, Whan V, Davis G, et al. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Aquaculture*, 1999, 173: 19 - 32.
- [35] 董金荷, 朱嘉薇, 吴清江. 鱼类和水生动物基因组作图研究的现状及前景[J]. *水产学报*, 2001, 25(3): 270 - 278.
- [36] 张德水, 陈受宜. DNA 分子标记、基因组作图及其在植物遗传育种上的应用[J]. *生物技术通报* 1998(5): 15 - 22.
- [37] Tassanakajon A, Tiptononnukul A, Supungul C. Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn (*P. monodon*) [J]. *Mol Mar Biol Biotechn*, 1999, 7: 55 - 61.
- [38] Wolfus G M, Garcia D K, Alcivar Warren A. Application of the microsatellite technique for analysis genetic diversity in shrimp breeding program [J]. *Aquaculture*, 1997, 152: 35 - 47.
- [39] Alcivar Warren A. Efforts towards developing a linkage map for penaeid shrimp [A]. Grant D, Lazo G R., eds: *Plant and Animal Genome II* [C]. San Diego: Scherago Co, 1999. 34.
- [40] Emmanuel Goyard, Jacques Patrois, Jean-Marie Peignon, et al. IFREMER's Shrimp Genetic's Program [J]. *The Advocate*, 1999, 2(6): 26 - 28.
- [41] Kenneth Jones. Improving shrimp stocks with microsatellites [J]. *The Advocate*, 2000, 3(6): 35 - 36.
- [42] 徐鹏, 周岭华, 相建海. 用 PCR 法快速筛选中国对虾含微卫星的重组阳性克隆[J]. *水产学报*, 2001, 25(1): 127 - 130.

(For English abstract see page 374)