

文章编号 : 1004 - 7271( 2006 )04 - 0409 - 05

## 海南沼虾( ♀ ) × 日本沼虾( ♂ ) 的 人工种间杂交及其 RAPD 分析

蒋速飞<sup>1</sup>, 傅洪拓<sup>1, 2</sup>, 龚永生<sup>2</sup>, 吴 滢<sup>2</sup>

( 1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081 ;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部水生  
生物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081 )

**摘 要** 运用人工授精方法, 进行海南沼虾( ♀ ) × 日本沼虾( ♂ ) 杂交试验, 获得了可育的  $F_1$  代杂种, 并对  $F_1$  代及其双亲进行了 RAPD 分析。共进行 6 批杂交试验, 4 批抱卵, 3 批获得杂交虾, 成活率分别为 30%、48%、64%。形态上,  $F_1$  代兼有双亲特征, 但偏向父本。RAPD 扩增结果显示, 海南沼虾和日本沼虾的扩增带型存在显著的差异,  $F_1$  杂种兼有双亲的特征带, 父、母本之间的遗传距离为 0.785 6, 父本与  $F_1$  的遗传距离为 0.410 9, 母本与  $F_1$  的遗传距离为 0.423 8。从分子水平确认了日本沼虾( ♀ ) 和海南沼虾( ♂ ) 种间杂交的成功, 并为进一步寻找经济性状相关分子标记提供了条件。

**关键词** 海南沼虾; 日本沼虾; 杂交; 杂种; RAPD

中图分类号 S 917; S 961.6 文献标识码: A

## The hybridization between *Macrobrachium hainanense*( ♀ ) and *Macrobrachium nipponense*( ♂ ) and their RAPD analysis

JIANG Su-fei<sup>1</sup>, FU Hong-tuo<sup>1, 2</sup>, GONG Yong-sheng<sup>2</sup>, WU Yan<sup>2</sup>

( 1. Wuxi Fisheries College NAU, Wuxi 214081, China ;

2. Freshwater Fisheries Research center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory  
of Genetic Breeding of Aquatic Animal & Aquaculture Biology Ministry of Agriculture, Wuxi 214081, China )

**Abstract:** *Macrobrachium nipponense* ( ♂ ) were crossed with *Macrobrachium hainanense* ( ♀ ) by artificial insemination, and fertile  $F_1$  were obtained. Genetic relationship among *Macrobrachium nipponense*, *Macrobrachium hainanense* and their  $F_1$  hybrids was analyzed by RAPD analysis. Six pairs of crosses were carried out, four of which spawned,  $F_1$  hybrids were obtained from three crosses. The hatching rate was 30%, 48%, 64% respectively. The morphological characteristics of  $F_1$  hybrids were a combination of *Macrobrachium nipponense* and *Macrobrachium hainanense*, but nearer to paternal parent. The results of RAPD showed that the differences between parents were remarkable, and all the bands of  $F_1$  hybrids came from the parents. The genetic distance between  $F_1$  and *Macrobrachium nipponense* was 0.410 9, 0.423 8 between  $F_1$  and *Macrobrachium hainanense*, and 0.785 6 between the parents. The results showed that the artificial interspecific hybridization

收稿日期 2006-01-12

基金项目: 中国水产科学研究院基金( 2001-1-8 ); 江苏省“ 三项 ”工程( PJ2005-6 ); 科技部农转资金( 04EFN216900379 ) 无锡市重大科技专项( 农业 ) O1060008 )

作者简介: 蒋速飞( 1980 - ) 男, 江苏金坛人, 硕士研究生, 专业方向为水产遗传育种。E-mail: jsufe@ yahoo. com. cn

通讯作者: 傅洪拓, E-mail: fuht@ ffr. cn

between *Macrobrachium nipponense* (♀) and *Macrobrachium hainanense* (♂) was successful. The results were also helpful to find trait-related molecular markers.

**Key words** : *Macrobrachium hainanense* ; *Macrobrachium nipponense* ; hybridization ; hybrid ; RAPD

日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 和海南沼虾 (*Macrobrachium hainanense*) 为同属近缘种, 均为我国重要的淡水经济虾类。傅洪拓等<sup>[1,2]</sup>首次获得了日本沼虾(♀)×海南沼虾(♂)杂交的成功, 并对双亲及 F<sub>1</sub> 代杂种进行了同工酶分析。随机扩增多态性 DNA (RAPD) 是一种快速分析不同个体遗传差异的便利方法, 在其它虾类的遗传多样性研究中已得到广泛应用<sup>[3-6]</sup>, 但迄今未见有关日本沼虾和海南沼虾 RAPD 分析的报道。本文拟进行海南沼虾(♀)×日本沼虾(♂)人工杂交试验, 并对双亲及其 F<sub>1</sub> 代杂种进行了 RAPD 分析, 以分析双亲及其杂种子一代的遗传关系, 为杂种后代的选育和管理提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

日本沼虾为太湖野生, 海南沼虾采自广东珠江口。以海南沼虾为母本, 日本沼虾为父本进行杂交获得杂交虾。在杂交 F<sub>1</sub> 代生长 3 个月后, 取第五批杂交实验的嫡亲父母本及反交 F<sub>1</sub> 代 30 尾。为保证亲本的扩增条带具有种的代表性, 另取父母本同一地区的日本沼虾和海南沼虾各 29 尾, 同时运用 RAPD 技术进行分析。

### 1.2 种间杂交

以海南沼虾为母本, 日本沼虾为父本, 当雌性海南沼虾出现生殖蜕皮时, 按傅洪拓等<sup>[1,2]</sup>的方法进行人工授精。人工授精雌虾单个饲养于一个水族缸中, 一般在人工授精后 12~72 h 抱卵。在 27~29 °C 控温条件下, 10~20 天孵出虾苗。

### 1.3 随机引物

实验所用随机引物采用 Operon 公司 OPP 系列引物, 分别为 OPP-01~20, 碱基序列见表 1。

表 1 研究用的随机引物及其序列

Tab 1 Random primers used in study and their sequence

引物 (primer)	序列 (sequence) 5'~3'	引物 (primer)	序列 (sequence) 5'~3'
OPP-01	GTAGCACTCC	OPP-11	AACGCGTCGG
OPP-02	TCGGCACGAC	OPP-12	AAGGCGCAGT
OPP-03	CTGATACGCC	OPP-13	GGAGTGCCTC
OPP-04	GTGTCTCAGG	OPP-14	CCAGCCGAAC
OPP-05	CCCCGGTAAC	OPP-15	GGAAGCCAAC
OPP-06	GTGGGCTGAC	OPP-16	CCAAGCTGCC
OPP-07	GTCCATGCCA	OPP-17	TGACCCGCCT
OPP-08	GTGGTCCGAC	OPP-18	GGCTTGGCCT
OPP-08	ACATCGCCCA	OPP-19	GGGAAGGACA
OPP-10	TCCCGCCTAC	OPP-20	GACCCTAGTC

### 1.4 基因组 DNA 制备

基因组 DNA 的提取参照《分子克隆实验指南》<sup>[7]</sup>的方法, 并有所改进。取虾肌肉组织消化后经酚/氯仿(1/1)、氯仿/异戊醇(24/1)抽提。DNA 浓度通过紫外分光光度计和电泳-EB 染色的荧光强度双重测定。

### 1.5 RAPD-PCR 反应

DNA 扩增按 Williams 等<sup>[8]</sup>的方法略作修改。PCR 反应体系包括 10 mmol/L Tris-HCl (PH 8.0) 50

mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mmol/L dNTP, 0.1 mmol/L 引物、25 μg 基因组 DNA、1U Taq DNA 聚合酶。扩增程序为 94 °C 预变性 10 min, 94 °C 变性 1 min, 36 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min。1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, UV-200 紫外透射分析仪上观察和拍照。

## 1.6 数据处理

经电泳获得的 RAPD 图谱中每一条带即为一个 RAPD 位点, 在同一电泳迁移位置上, 扩增条带有且清晰记为 1, 否则记为 0。每群体所有位点的谱带组成一个 0、1 矩阵, 并据此统计位点总数和多态位点比例, 分析和计算遗传距离。其中: 多态位点比例

$$P = n_p / n_l \times 100\%$$

( $n_p$  多态位点数,  $n_l$  总位点数)。遗传相似度 ( $I$ ) 和遗传距离 ( $D$ ) 根据 Nei<sup>[9]</sup> 的公式计算:

$$I = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

( $N_x$  和  $N_y$  分别为群体 X 和 Y 的扩增多态 DNA 片段数;  $N_{xy}$  为两群体间相同的片段数),  $D = 1 - I$ 。使用 PopGen1.32 软件进行计算。

## 2 结果

### 2.1 种间杂交

以海南沼虾为母本, 日本沼虾为父本, 进行人工授精, 共进行了 6 次人工杂交, 其中 4 次抱卵, 3 次获得了  $F_1$  代杂种。在三次成功的杂交中, 孵化率都在 80% 以上, 从蚤状幼体到仔虾(变态完成)成活率分别为 30%、48%、64%; 从仔虾到成体, 存活率分别为 32%、52%、67%(表 2)。父本日本沼虾的第二对步足细长、斑纹形状不规则, 图案复杂, 指节平直, 而母本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;  $F_1$  代杂种第二步足细长、斑纹呈规则环状, 但清晰度介于双亲之间、指节顶端向内略弯曲, 兼有双亲的特征, 但主要表现出父本特征。此外, 日本沼虾身体向上隆起明显, 而海南沼虾身体相对较为伸展,  $F_1$  代杂种的体形弯曲也偏向父本日本沼虾。雌雄比例为 17:13。成体杂交虾在养殖过程中能自行进行交配, 杂种  $F_1$  代雌雄均可育并已获得自交后代和回交后代。

表 2 海南沼虾(♀)×日本沼虾(♂)杂交结果

Tab. 2 The hybridization result of *Macrobrachium hainanense*(♀) × *Macrobrachium nipponense*(♂)

编号 No	人工授精时间 Experiment time	抱卵 Brood	蚤状幼体 Nauplius	仔虾(存活率) Post Larva( survival )	4~6cm 成虾(存活率) Hybrid juvenile( survival )
1	2004.06.17	-	0	0	0
2	2004.06.18	-	0	0	0
3	2004.06.25	+	0	0	0
4	2004.07.02	+	1 900	570(30%)	180(32%)
5	2004.07.06	+	2 100	1 000(48%)	520(52%)
6	2004.07.09	+	2 350	1 500(64%)	1 000(67%)

### 2.2 杂交后代与亲本间的 RAPD 分析

20 个引物对试验材料的扩增共获得 158 条带, 其中仅有 39 个扩增片段是亲本和 30 个后代所共有的, 所有试验材料扩增的多态位点比例为 75.3%。从  $F_1$  代来看, 共扩增出 96 个片段, 多态位点比例为 53.1%。以上结果表明, 不同种间杂交后代之间及杂交后代和亲本之间在 DNA 水平上存在较高的异质性。

在 20 个引物扩增图谱中发现 13 条海南沼虾有而日本沼虾没有的特征带, 17 条日本沼虾有而海南沼虾没有的特征带。海南沼虾和日本沼虾的这些特征带均在杂交后代的指纹图谱中被发现。  $F_1$  代中没有发现双亲中不具有的新带。

图1是引物OPP-19的扩增结果,父母本和 $F_1$ 代都具有OPP-19-490 bp这条带。图2是引物OPP-15的扩增结果,OPP-15-600 bp和OPP-15-500 bp分别是父本日本沼虾和母本海南沼虾的特征带, $F_1$ 代同时具有这两条特征带。

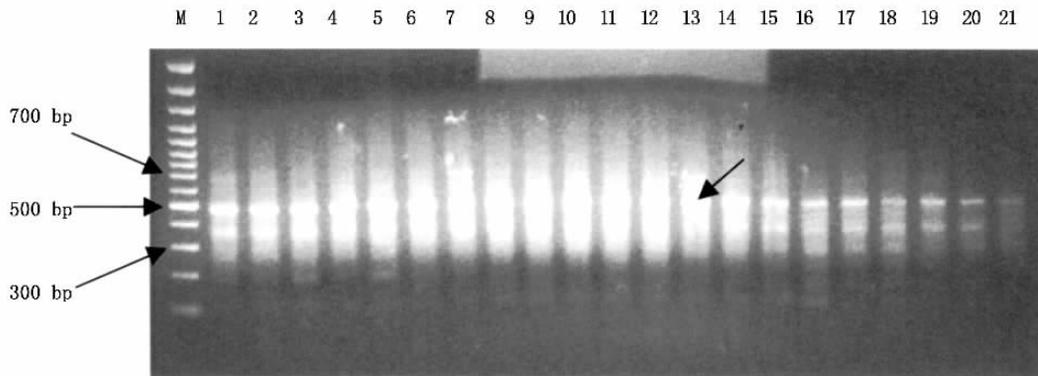


图1 引物OPP-19的扩增结果

Fig. 1 The results of primers OPP-19

注:1-7:日本沼虾(7为父本)8-14: $F_1$  15-21:海南沼虾(15为母本),M:Marker。

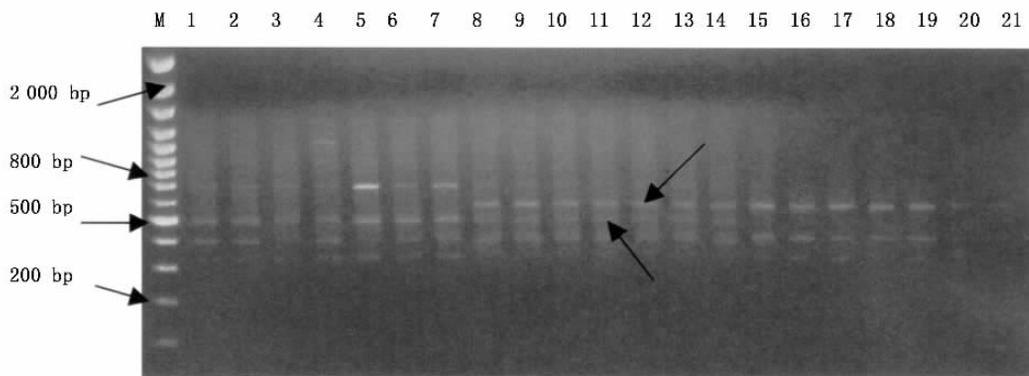


图2 引物OPP-15的扩增结果,

Fig. 2 The results of primers OPP-15

注:1-7:日本沼虾(7为父本)8-14: $F_1$  15-21:海南沼虾(15为母本),M:Marker。

### 2.3 遗传距离

根据PopGen1.32软件计算,父母本之间的遗传距离为0.7856,父本与子一代的遗传距离为0.4109,母本与子一代的遗传距离为0.4238。

## 3 讨论

### 3.1 杂交后代形态

傅洪拓等<sup>[1,2]</sup>在国际上首次取得了沼虾类人工种间杂交的成功,应用人工授精方法,将日本沼虾(♀)

与海南沼虾(♂)种间杂交,获得了  $F_1$  代杂种成体。本文在该工作的基础上,将日本沼虾(♂)与海南沼虾(♀)人工反交试验,同样获得了可育的  $F_1$  代杂种。日本沼虾的第二对步足细长、斑纹形状不规则,图案复杂、指节平直,而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。本文获得的  $F_1$  代杂种第二步足细长、斑纹呈规则环状,但清晰度介于双亲之间、指节顶端向内略弯曲,兼有双亲的特征,但主要表现出父本特征。此外,日本沼虾身体向上隆起明显,而海南沼虾身体相对较为伸展, $F_1$  代杂种的体形弯曲也偏向父本日本沼虾。此结果说明,在海南沼虾(♀)和日本沼虾(♂)的杂交后代中,对形态特征的影响主要来自父本日本沼虾,父本基因呈现显性。

### 3.2 RAPD 检测杂交后代

RAPD 技术在品种鉴定、遗传多样性检测、谱系分析和遗传图谱的构建等方面得到了广泛的应用。刘必谦等<sup>[10]</sup>建立的 RAPD 技术体系对鲤鲫杂交  $F_1$  代及亲本进行了鉴定,夏德全等<sup>[11]</sup>用 RAPD 分析鉴定了尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼种间杂交后代,并认为 RAPD 技术可作为检测亲本和杂种 DNA 关系及其来源的有效手段,且具有鉴定样品少、时间短、效率高的特点。本研究利用 RAPD 在海南沼虾与日本沼虾种间杂交后代检测出了来源于海南沼虾和日本沼虾的特异性扩增片段,如 OPP-19-490 bp 在全部个体中是一致的,没有多态性,它反映的是进化中的保守序列(图 1),而 OPP-15-500 bp 和 OPP-15-600 bp 分别是海南沼虾和日本沼虾的特征带,而杂种  $F_1$  代同时具有这两条带(图 2)。此结果从 DNA 水平上证实了种间杂交后代与父本日本沼虾或母本海南沼虾之间的遗传关系。

根据 PopGen1.32 软件计算,父母本之间的遗传距离为 0.785 6,父本与子一代的遗传距离为 0.410 9,母本与子一代的遗传距离为 0.423 8,更进一步证明该杂交是正常的两性杂交,排除了雌核发育的可能。

日本沼虾肉质细嫩、味道鲜美、营养丰富、且适应性强,经济价值高。选择海南沼虾与日本沼虾杂交,一方面是海南沼虾个体大,生长快;另一方面,海南沼虾和日本沼虾都是纯淡水虾,在具有经济价值的沼虾中,两者亲缘关系最近<sup>[12]</sup>。杂交结果表明, $F_1$  代个体大小接近于海南沼虾,生长速度快于日本沼虾,表现出良好的经济性状,显示出一定的育种潜力。本研究为淡水沼虾类的品种改良提供了可能的技术途径。

### 参考文献:

- [1] 傅洪拓,龚永生,吴滢,等.日本沼虾与海南沼虾的人工种间杂交及其同工酶分析[J].水生生物学报,2004,28(3):327-329.
- [2] Hongtuo Fu, Yongsheng Gong, Yan Wu, et al. Artificial interspecific hybridization between *Macrobrachium* species [J]. *Aquaculture*, 2004, 232: 215-223.
- [3] 刘萍,孔杰,石拓,等.中国对虾黄渤海沿岸种群亲本及子一代 RAPD 分析[J].海洋水产研究,2000,21(1):13-21.
- [4] 刘萍,孟宪红,孔杰,等.对虾抗病性状遗传标记的 RAPD 分析[J].水产学报,2002,26(3):270-274.
- [5] 邱高峰,常林瑞.我国近海中国对虾种群遗传差异的 RAPD 分析[J].上海水产大学学报,2001,10(1):1-5.
- [6] 石拓,庄志猛,孔杰,等.中国对虾遗传多样性的 RAPD 分析[J].自然科学进展,2001,11(4):360-364.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a Laboratory Manual* [M]. Beijing: Science Press, 1996. 464-468.
- [8] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531-6535.
- [9] Nei M. The theory of genetic distance and evolution of human races [J]. *Human Genetics*, 1978, 23(4): 341-369.
- [10] 刘必谦,王亚军,周湘池.鲤鲫杂交  $F_1$  及其亲本 RAPD 标记[J].宁波大学学报,2000,13(4):31-34.
- [11] 夏德全,曹莹,杨弘,等.罗非鱼杂交  $F_1$  代与亲本的遗传关系及其杂种优势的利用[J].中国水产科学,1999,16(4):29-32.
- [12] 邱涛,陆仁后.4 种沼虾的 SRFA 的指纹研究[J].中国水产科学,1999,16(1):1-4.