

冷休克法和静水压法人工诱导大黄鱼三倍体

许建和^{1,2}, 尤 锋¹, 吴雄飞³, 郑春静³, 石钢德³, 蒋宏雷³, 刘伟健³, 徐永立¹,
张培军¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039; 3. 宁波市海洋渔业研究院, 浙江 宁波 315012)

摘要:同时采用冷休克法和静水压法进行大黄鱼(*Pseudosciaena crocea* Richardson)三倍体诱导条件研究,同时比较适合条件下两种方法诱导效果差异以及大批量诱导组不同生长阶段三倍体检出率的差别。结果表明:(1)冷休克法和静水压法都可成功诱导出大黄鱼三倍体。冷休克法适宜诱导条件为20℃培育水温下授精后3 min,在3~4℃海水中处理8~10 min;静水压法适宜诱导条件为同样培育水温下授精后3 min,在静水压450 kg/cm²下处理3 min。三倍体诱导率受处理时刻、处理时间和处理温度(或压力)3因素的影响。(2)综合三倍体诱导率、处理后受精卵原肠期存活率和仔鱼孵化率,静水压法诱导效果要明显优于冷休克法。(3)采用冷休克法进行大黄鱼三倍体大批量诱导,早期胚胎、初孵仔鱼和4月龄幼鱼三倍体检出率分别为34.03%、29.54%和14.81%,表明随生长发育诱导组三倍体检出率有下降趋势。[中国水产科学,2006,13(2):206-210]

关键词:三倍体;大黄鱼;人工诱导;冷休克;静水压

中图分类号:Q959.483 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)02-0206-05

三倍体鱼类因其具有不育或低育性可被应用于大规模商品鱼培育以及防止引进外来种所产生的安全问题,而受到国内外水产科学工作者的广泛重视。目前国外已经先后在鲑鳟类^[1]、鲆鲽类^[2-3]等海水鱼类中诱导出三倍体。国内也成功诱导出了三倍体真鲷(*Pagrosomus major*)、黑鲷(*Sparus macrocephalus*)和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[4-6]等。

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea* Richardson)为暖水集群洄游海水鱼类,其分布从黄海南部到南海以东近海^[7],20世纪60~70年代曾是中国海水渔业四大种类之一,但因人为过度捕捞,其野生资源目前已处于极度匮乏状态。20世纪80年代中期,为保护和恢复大黄鱼野生资源,开展了大黄鱼人工育苗并获得成功,随后大黄鱼人工网箱养殖在南方沿海广泛发展,目前已成为南方网箱养殖面积最大的海水鱼类^[8]。但因缺乏科学的养殖管理,随着高密度集约化养殖的发展,大黄鱼养殖群体普遍出现个体小型化和性早熟等现象,已成为制约大黄鱼人工养殖可持续发展的主要“瓶颈”,三倍体人工诱导是解

决这些问题的一个有效途径之一。大黄鱼三倍体诱导国内已有相关报道^[9-10],但只是就一种诱导方法进行了研究。而对于不同方法诱导大黄鱼三倍体效果的比较尚未见到报道。Johnson等^[11]认为静水压法诱导大鳞大马哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)三倍体的效果要优于热休克法。Peruzzi等^[12]报道了冷休克和静水压法诱导欧鲈(*Dicentrarchus labrax*)三倍体的效果差别。本研究同时采用冷休克和静水压两种方法进行大黄鱼三倍体人工诱导,并比较分析这两种方法诱导效果的差异,旨在为大黄鱼三倍体应用于养殖生产提供重要的实践和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 亲鱼培育和人工授精

实验用亲鱼购自宁波象山港海区养殖网箱,充氧后运至宁波市象山港引种育种有限公司亲鱼车间,进行控光控温培育至性成熟。水温为16.5~24℃,投喂鱼肉并添加卵磷脂和维生素复合物,日

收稿日期:2005-03-14; 修订日期:2005-08-23.

基金项目:中国科学院合作种子资金-宁波市科技计划项目(2002D21004);宁波市科技攻关项目(01N40111).

作者简介:许建和(1976-),男,博士研究生,主要从事鱼类遗传育种研究. E-mail: xujianbe@tom.com

通讯作者:张培军. E-mail: pjzhang@ms.qdio.ac.cn

换水 1/3~1/2,每日清污一次。人工授精前 30 d 选取雌鱼 50 尾,雄鱼 25 尾。雌鱼用 LRH-A₃ 进行促熟,剂量为 3 μg/kg,而雄鱼不注射。30 d 后进行人工催产,仍注射 LRH-A₃,雌鱼的剂量为 10 μg/kg,雄鱼剂量减半。催产后雌鱼、雄鱼分别放于同一水体的两个网箱,到达效应时间(28~40 h)后进行人工挤卵、挤精,半干湿法授精获得受精卵。

1.2 冷休克法诱导

根据文献[9]和预实验结果,首先进行处理时刻(Treatment after fertilization, TA)实验,设置受精后 1 min, 2 min, 3 min, 4 min 和 5 min 5 个处理时刻(处理温度 3~4 ℃, 处理时间 8 min); 根据 TA 诱导实验结果进行处理时间(Duration, D)实验,设置 5 min, 8 min, 10 min, 12 min, 15 min 和 20 min 6 个处理时间梯度(处理温度 3~4 ℃, TA 3 min)。每次实验设正常对照组,为同期正常精卵受精获得。实验和对照组授精水温都为 20 ℃, 孵化水温为(20 ± 1) ℃, 并进行重复实验。

1.3 静水压法诱导

根据冷休克 TA 实验结果,在 20 ℃ 培育水温条件下进行压力强度(Pressure, P)实验,设置 400 kg/cm², 450 kg/cm², 500 kg/cm², 550 kg/cm² 和 600 kg/cm² 5 个压力水平(TA 3 min, D 3 min)。每次实验设正常对照组,并进行重复实验。

1.4 原肠期相对存活率、相对孵化率计算

每一实验组和对照组在人工授精后 1~2 h, 取 100~200 粒上浮受精卵于(20 ± 1) ℃ 海水中培育, 计算原肠期存活率、孵化率, 将各实验组原肠期存活率、孵化率除以对照组的相应值, 得出各实验组原肠期相对存活率和相对孵化率。

1.5 倍性鉴定及诱导率计算

采用染色体制片计数和流式细胞仪检测 DNA 相对含量进行大黄鱼三倍体诱导组倍性鉴定。

1.5.1 染色体制片 选取 100~200 粒原肠胚, 进行秋水仙碱处理, 0.075 mol/L KCl 低渗、卡诺氏液(甲醇与冰醋酸体积比为 3:1)固定、滴片、空气干燥、15% Giemsa 染色等, 获得的染色体制片在显微镜油镜下观察和计数, 根据文献[8]和实验结果, 设染色体数 48 左右的为二倍体(2n), 72 左右的为三倍体(3n)。每一组随机选取 30 个以上中期分裂相计算其中三倍体分裂相所占比例即为该组诱导率。

1.5.2 流式细胞仪检测 DNA 相对含量 采取 10 尾以上初孵仔鱼整鱼或幼鱼部分肌肉, 分别捣碎、过

260 目筛绢、DAPI 染色、PARTEC Cell counter Analyser (CCA-II) 细胞计数仪分析检测 DNA 相对含量。二倍体对照 DNA 相对含量设为 100, 三倍体 DNA 相对含量则为 150。三倍体检出个体数与总检测个体比值数即为三倍体诱导率。

2 结果

2.1 冷休克法诱导

2.1.1 处理时刻诱导结果 冷休克法人工诱导大黄鱼三倍体不同处理时刻诱导实验结果见图 1。从图 1 可以看出受精后不同时刻实施处理, 其原肠期相对存活率、相对孵化率较对照组都有所下降, 但处理组之间无太大差异, 而诱导率则是处理时刻为受精后 3 min 时最高, 到 5 min 时已经下降为零。综合原肠期相对存活率、相对孵化率和诱导率 3 因素, 冷休克诱导大黄鱼三倍体处理时刻在实验水温条件下为受精后 3 min 较适合。

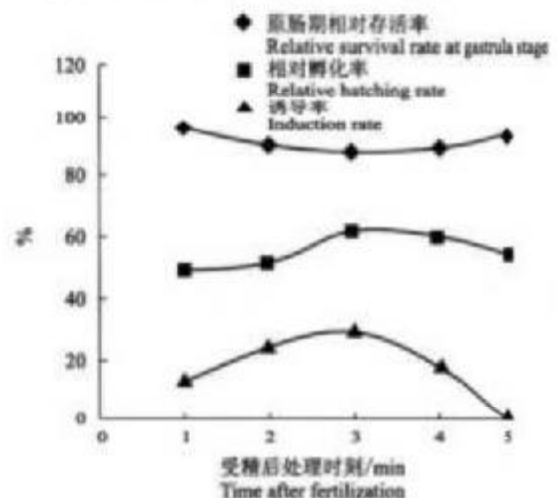


图 1 冷休克法人工诱导大黄鱼三倍体不同处理时刻原肠期相对存活率、相对孵化率和诱导率
注: D 8 min, T 3~4 ℃。

Fig.1 Relative survival rates at gastrula stage, relative hatching rates and triploid induction rates of the experimental groups by different TA of cold shock
Note: D 8 min, T 3~4 ℃.

2.1.2 处理时间诱导结果 根据 2.1.1 实验结果, 进行冷休克法人工诱导大黄鱼三倍体的不同处理时间实验(图 2)。从图 2 可看出, 各实验组原肠期相对存活率、相对孵化率都低于对照组, 且在处理时间范围内随处理时间延长而降低; 诱导率则随处理时

间延长而增加。综合原肠期相对存活率、相对孵化率和诱导率3因素,冷休克诱导大黄鱼三倍体体克的处理时间在8~10 min 较适合。

2.2 静水压诱导

根据冷休克处理时刻实验结果,进行静水压法诱导大黄鱼三倍体压力实验(图3)。从图3可以看出,各实验组原肠期相对存活率、相对孵化率随压力强度增加而下降,当压力达到600 kg/cm²时,受精卵全部死亡。在实验压力强度范围内,诱导率随压力增高而升高。综合原肠期相对存活率、相对孵化率

和诱导率3因素,静水压诱导大黄鱼三倍体适合条件为受精后3 min 用450 kg/cm²压力处理3 min。

2.3 倍性鉴定

对大黄鱼原肠胚、初孵仔鱼和4月龄幼鱼分别采用染色体制片计数法和流式细胞仪检测DNA相对含量法进行倍性鉴定。在大批量诱导组早期胚胎、初孵仔鱼和4月龄幼鱼阶段三倍体检出率分别为34.03%、29.54%和14.81%。染色体中期分裂相和流式细胞仪检测图分别见图4和图5。

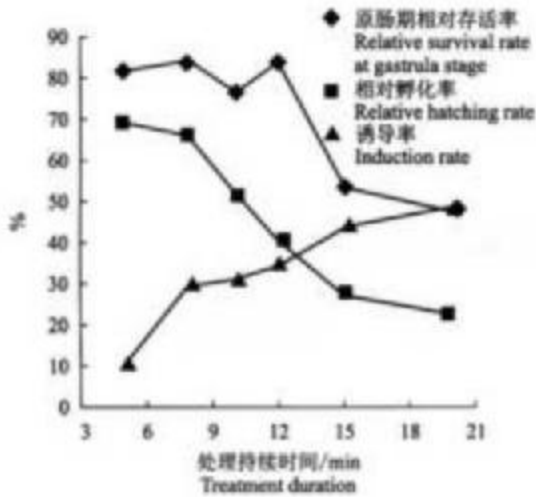


图2 冷休克诱导大黄鱼三倍体不同处理时间原肠期相对存活率、相对孵化率和诱导率

注:TA 3 min, T 3~4℃.

Fig.2 Relative survival rates at gastrula stage, relative hatching rates and triploid induction rates of the experimental groups by different duration of cold shock

Note: TA 3 min, T 3~4℃.

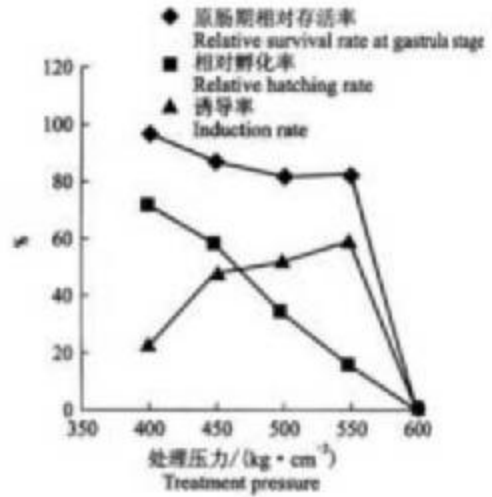


图3 静水压法诱导大黄鱼三倍体原肠期相对存活率、相对孵化率和诱导率

注:TA 3 min, D 3 min.

Fig.3 Relative survival rates at gastrula stage, relative hatching rates and triploid induction rates of the experimental groups by different pressure intensity

Note: TA 3 min; D 3 min.

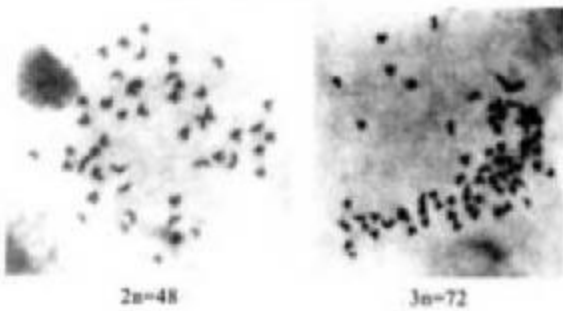


图4 大黄鱼染色体中期分裂相

Fig.4 Representative metaphase spreads obtained from diploid (2n=48) and triploid (3n=72) large yellow croaker

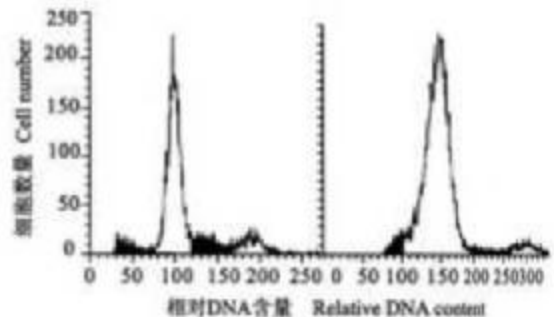


图5 大黄鱼 2n(左)和 3n(右)流式细胞仪检测图

Fig.5 DNA value of diploid (left) and triploid (right) cell of large yellow croaker measured by flow cytometry

3 讨论

温度休克法和静水压法是鱼类三倍体人工诱导的主要方法,其诱导效果受处理时刻、处理时间和处理水温或压力水平的影响。本研究的结果也表明大黄鱼三倍体诱导效果明显受上述3因素的影响。在本实验中冷休克处理最适条件为TA,3 min;T,3~4℃;D,8~10 min;这与王军等^[9]在大黄鱼中的研究结果相一致。但与牙鲆三倍体冷休克诱导条件(T,0~1℃;TA,3~5 min;D,45~60 min)^[2,6]相比,大黄鱼的冷休克诱导条件要明显温和,而与真鲷三倍体的诱导条件(T,2~3℃;TA,3~5 min;D,5 min)^[4]相近。造成这一差别的原因可能与不同鱼类耐受水温不同有关,大黄鱼和真鲷都是暖温性鱼类,牙鲆则为冷温性鱼类,前二者的最低耐受温度要高于后者,在进行温度法诱导三倍体时通常要采用亚致死温度才能有效地抑制第二极体的放出,太高无抑制作用,太低则会对胚体造成较大损伤,导致孵化率下降、畸形率上升而影响整体诱导效果。这种现象在大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[3]等鱼的四倍体诱导中亦得到证实。

本实验中静水压诱导大黄鱼三倍体适合条件为P,450 kg/cm²;D,3 min,这与林琪等^[10]报道的静水压诱导大黄鱼三倍体条件相一致,但这一压力和处理时间明显低于或短于大多海水鱼类三倍体压力诱导的强度(牙鲆600~700 kg/cm²,D 6 min;真鲷700 kg/cm²,D 5 min)^[2]。这可以解释为不同鱼类受精卵对压力刺激敏感性不尽相同,从而造成了耐受压力的差异。本研究中比较了温度休克和静水压两种方法诱导大黄鱼三倍体诱导效果的差别,综合存活率、诱导率等指标发现,在最适诱导条件下静水压法诱导效果要优于冷休克法。Peruzzi等^[12]也报道了静水压法诱导欧鲈三倍体效率要高于冷休克法。静水压法较冷休克法诱导效果好,可能是因为在这些种类中较短时间的高静水压处理对受精卵损伤程度要低于较长时间的冷休克刺激,而对第二极体的抑制效率却高于冷休克,从而在诱导后表现出比冷休克法较高的诱导率、存活率和较低的畸形率。在本实验中冷休克和静水压两种处理方法,都未能达到100%的三倍体诱导率,这可能与实验中人工挤卵所获卵子成熟度不一,受精后极体排放不同步有关。

本实验中冷休克最佳诱导组的诱导率与王军等^[9]用相同诱导条件所得结果相似,但孵化率前者(59.32%)明显高于后者(8.4%),造成上述差异一方

面可能与两实验中所用的卵子质量本身的差别有关,卵子质量影响诱导后诱导组的孵化率在许多鱼类中都有报道,Peruzzi等^[12]曾报道低质量的卵导致欧鲈三倍体诱导组较高的死亡率;另一方面诱导过程中不同的操作也会对诱导后孵化率产生影响。在实验过程中就发现,若将受精卵冷休克后直接置于正常海水中培育,其孵化率要明显低于缓慢过渡至正常海水组,孵化期的畸形率明显高于缓慢过渡至正常海水组。实验中还显示出,随着处理压力的上升(处理温度降低)、处理时间的延长,各诱导组的畸形率明显上升,存活率也明显下降,这一现象在许多鱼类三倍体诱导时都有发现。Johnson^[11]认为,其原因可能是压力或温度刺激会干扰受精卵细胞表达模式和蛋白质功能进而影响诱导后胚胎发育和存活,并且这种损伤程度随处理强度和持续时间的增加而增强。

目前在鱼类中性性鉴定的方法主要包括染色体制片计数,流式细胞仪检测DNA相对含量,核仁计数和核面积测量等。本研究中采用了染色体制片计数和流式细胞仪检测DNA相对含量两种直接鉴定方法对三倍体诱导组进行了倍性鉴定。采用染色体制片计数可以在胚胎发育早期就对诱导效果进行评价,但这种方法通常花费时间较长,需要具备熟练的染色体制备技术和稳定的制备条件。采用流式细胞仪检测DNA相对含量尽管需要特殊的设备,但其倍性鉴定精确度高,可在从初孵仔鱼、鱼苗期、苗种期到成鱼期的任何时期进行单体倍性检测,在苗种和成鱼阶段甚至可以不开杀鱼体情况下检测其倍性,故是目前常见的倍性鉴定方法。在本研究中,对大批量诱导组原肠胚阶段采用染色体计数进行检测,其三倍体检出率为34.03%;初孵仔鱼和120 d苗种则采用流式检测DNA相对含量,其三倍体检出率分别为29.04%、14.81%。同一诱导组不同阶段三倍体检出率下降的原因,一方面可能是不同检测方法本身存在检出率的差别;另一方面则可能是在三倍体诱导过程中压力或温度刺激对受精卵中蛋白质功能造成的损伤影响了三倍体在胚胎和早期发育关键阶段的存活^[13-14],从而随生长发育诱导组三倍体检出率下降。

4 结论

采用冷休克法和静水压法可成功诱导出大黄鱼三倍体。综合原肠期存活率、孵化率和诱导率3因素,冷休克法诱导最适合条件为TA 3 min;T 3~4℃;D 8 min~10 min。静水压法诱导条件为TA

3 min; P 450 kg/cm²; D 3 min。静水压法的诱导效果明显优于冷休克法。

参考文献:

- [1] Benfey T J. Use of all-female and triploid salmonids for aquaculture in Canada [J]. Bull Aquacul Assoc Canada, 1996, 2: 6-8.
- [2] Arai K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan [J]. Aquaculture, 2001, 197: 205-228.
- [3] Pferrer F, Cal R M, Gomez C, et al. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*) II. Effects of cold shock timing and induction of triploidy in a large volume of eggs [J]. Aquaculture, 2003, 220: 821-831.
- [4] 蔡国雄. 真鲷三倍体诱导初步研究[J]. 热带海洋, 1997, 16(4): 95-97.
- [5] 尤 锋. 真鲷三倍体的人工诱导初步研究[J]. 海洋与湖泊, 1993, 22(5): 489-491.
- [6] You F, Lu J, Wang X, et al. Study on the embryonic development and early growth of triploid and gynogenetic diploid left-eyed flounder *Paralichthys olivacea* [J]. Chin Oceanol Limnol, 2001, 19(2): 147-151.
- [7] 田明诚, 徐基昭, 余日秀. 大黄鱼形态特征的地理变异和地理种群问题[J]. 海洋科学集刊, 1962, 2: 79-97.
- [8] Hong W, Zhang Q. Review of captive breed species and fry production of marine fish in China [J]. Aquaculture, 2003, 227: 1-14.
- [9] 王 军, 王德祥, 尤 颖, 等. 大黄鱼三倍体诱导的初步研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(4): 927-928.
- [10] 林 琪, 吴建超, 曾志南. 静水压休克诱导大黄鱼三倍体[J]. 海洋科学, 2001, 25(9): 6-9.
- [11] Johnson M, Heath J W. Family induction methodology and interaction effects on the performance of diploid and triploid chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* [J]. Aquaculture, 2004, 234: 123-142.
- [12] Peruzzi S, Chatain B. Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: relative efficiency of methods and parental variability [J]. Aquaculture, 2000, 189: 23-27.
- [13] Benfey T J. The physiology and behavior of triploid fishes [J]. Rev Fish Sci, 1999, 7: 39-67.
- [14] Hyndeman C A, Kieffer J L, Benfey T J. Physiology and survival of triploid brook trout following exhaustive exercise in warm water [J]. Aquaculture, 2003, 222: 629-643.

Artificial induction of triploidy *Pseudosciaena crocea* by cold and hydrostatic pressure shock

XU Jian-he^{1,2}, YOU Feng¹, WU Xiong-fei³, ZHENG Chun-jing³, SHI Gang-de³, JIANG Hong-lei³, LIU Wei-jian³, XU Yong-li², ZHANG Pei-jun¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Science, Beijing 100039, China; 3. Marine Fisheries Research Institute of Ningbo, Ningbo 315012, China)

Abstract: The production of sterile triploidy *P. crocea* was an effective strategy to solve the sexual pre-maturation problems in its cultured stocks and minimize the possible genetic and ecological threats to wild populations. In this study, the optimal conditions for triploidy *P. crocea* induction were investigated by altering the timing, and the intensity and duration of application of pressure and cold shocks and the efficiency of two methods were also compared. The results showed that the triploidy *P. crocea* could be obtained by cold or hydrostatic pressure shock and triploid rates in experimental groups were mainly affected by the timing, intensity and duration of shocks. Treatment optimal for cold shock was 3-4 °C for 8-10 min at 3 min after fertilization and for pressure shock was 450 kg/cm² for 3 min at 3 min after fertilization. Under the optimal conditions, the efficiency of pressure shock in duplicating of chromosome sets of *P. crocea* was much higher than that of cold shock in terms of triploid productivity, embryonic survival and hatching rates. Cold shock was applied to mass-produce triploid *P. crocea*. Triploid rates of gastrula (by chromosome counting), 1 d larvae and 120 d juveniles (by flow-cytometry) were 34.03%, 29.54% and 14.81%, respectively, which indicated that the triploid rates of induction groups decreased with development and growth of *P. crocea*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 206-210]

Key words: triploid; *Pseudosciaena crocea*; artificial induction; cold shock; hydrostatic pressure shock

Corresponding author: ZHANG Pei-jun. E-mail: pjzhang@ms.qdio.ac.cn