

# 静水压休克诱导大黄鱼三倍体\*

林 琪 吴建绍 曾志南

(福建省水产研究所 厦门 361012)

**摘要** 采用静水压休克方法诱导大黄鱼三倍体,在水温 20~26℃条件下,卵受精后 2 min 用 450 kg/cm<sup>2</sup> 的静水压处理大黄鱼受精卵 2 min,三倍体诱导率 65.6%,孵化率相对对照组达 70%。文中还就处理条件与三倍体诱导率和胚胎存活率关系进行了讨论。

**关键词** 大黄鱼,三倍体,静水压

三倍体在许多水产动物的生产中存在着增产的巨大潜力,因此采用染色体组操作人工诱导多倍体已成为当前应用于水产养殖业中最有发展前景和最为活跃的一种生物技术。自 70~80 年代以来,鱼类多倍体育种技术发展很快,至 90 年代初在其实用化研究方面已取得较大发展,迄今已先后在鲤鱼、白鲫<sup>[1]</sup>、虹鳟、尼罗罗非鱼和牙鲆等 30 余种鱼类中开展了研究,有的已进入实用化生产。

1985 年福建省大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* 人工育苗获得成功,其人工网箱养殖在福建、浙江等省广泛开展。2000 年仅福建大黄鱼人工育苗数量已达 12.9×10<sup>8</sup> 尾,养殖网箱 365 000 口,占全省海水养殖网箱数的 60%;土池养殖 613 ha,年产量 38 000 t,产值 19×10<sup>8</sup> 元,大黄鱼养殖已成为福建海水养殖的一大产业。但是,随着大黄鱼养殖业的迅速发展,在养殖生产中也出现一些“瓶颈”问题,主要表现在养殖大黄鱼普遍出现早熟和个体小型化,体重仅 100 g 就有性腺发育。由于早熟现象,使大黄鱼生长速度缓慢,养殖周期长,同时在性腺发育阶段和繁殖季节,鱼肉松软变劣,远不如野生大黄鱼,且繁殖季节雌鱼卵巢发育使鱼体腹部膨胀而易于死亡,死亡率约 20%。三倍体不育或繁殖力低,因此期望通过诱导培育出大黄鱼三倍体,以克服大黄鱼早熟现象,加快大黄鱼生长速度,改善肉质,提高其商品价值。

本文采用静水压方法,抑制大黄鱼受精卵第二极体排放诱导大黄鱼三倍体,并获得较高的诱导率和存活率。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

试验用大黄鱼亲鱼取自厦门火烧屿养殖网箱 2

龄鱼。用宁波激素二厂生产的 LHRHA3 进行胸鳍基部注射催产,干法授精。授精、静水压处理和胚胎发育的水温在 20~26℃。

### 1.2 静水压处理

处理时迅速升压,达到预定压力。处理持续时间指压力开始上升到卸压时的时间。

### 1.3 存活率统计

在受精卵发育至囊胚期及孵化期,分别取样统计试验组和对照组的存活比率,将试验组的存活率除以对照组相应阶段的存活率,得出各个阶段试验组相对于对照组的存活率。

### 1.4 倍性鉴定

当胚胎发育至尾芽期,选取 50~80 个胚胎,按单个胚胎染色体制做法进行倍性鉴定。在确定每个胚胎倍性时,一般计数 10 个左右良好的分裂相。大黄鱼二倍体染色体数为 48 条<sup>[2]</sup>(图 1-A),三倍体为 72 条(图 1-B),48 条至 72 条之间为非整倍体。

## 2 结 果

### 2.1 极体排放时间的观察

对 30 个受精卵极体排放过程的观察,在 20~26℃ 条件下,极体排放时间为授精后 3~4.5 min(图 2)。

### 2.2 压力处理起始时间与三倍体诱导率和孵化率的关系

采用 450 kg/cm<sup>2</sup> 的静水压分别在授精后 1, 2, 3, 4, 5 min 处理大黄鱼受精卵。结果表明各试验组受精卵发育至囊胚期比率较高,为 67.6%~94.3%。孵化率差异很大,在授精后 1 min 和 2 min 处理的试验组

\* 福建省科技厅重点资助项目 2000Z029 号。

收稿日期:2001-03-20;修回日期:2001-05-10

孵化率较高,分别相当于对照组的80%和70%。授精3 min后处理的试验组孵化率显著降低,相当于对照组的35.7%,而授精后4 min和5 min处理的试验组,大部分都不能孵出仔鱼,4 min组孵出的少量仔鱼也多为畸形,并在开口之前死亡(图3)。

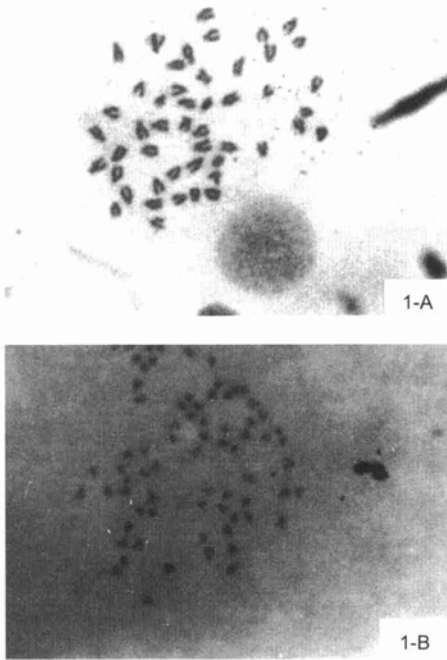


图1 大黄鱼胚胎二倍体、三倍体染色体分裂相(×1 000) A 48; B 72

Fig. 1 The metaphase chromosomes of diploid and triploid in *Pseudosciaena crocea* (×1 000) A 48; B 72

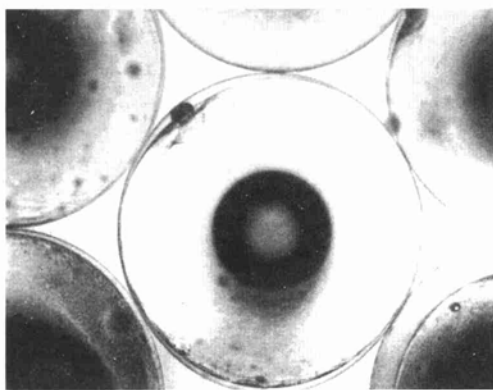


图2 大黄鱼受精卵排出第二极体(×40)  
Fig. 2 The polar body II in fertilized eggs of *P. crocea* (×40)

由于授精后4 min和5 min处理的试验组胚胎只有极少数能发育至尾芽期,因此未做倍性分析。授精后1, 2, 3 min处理的试验组的三倍化率分别为48.0%, 61.3%和30.3%,其中授精后3 min处理的试验组有6.1%的镶嵌体(表1)。

### 2.3 压力处理持续时间对胚胎发育的影响

在450 kg/cm<sup>2</sup>受精后2 min,采用450 kg/cm<sup>2</sup>压力分别处理大黄鱼受精卵1, 2, 3, 4 min。结果表明,随着处理持续时间的延长,各试验组受精卵发育至囊胚期和孵化期的比率均呈下降趋势。处理时间3 min,孵化率为3%,且都畸形,在开口前死亡;处理时间4 min,胚胎无法正常发育至孵化(图4)。

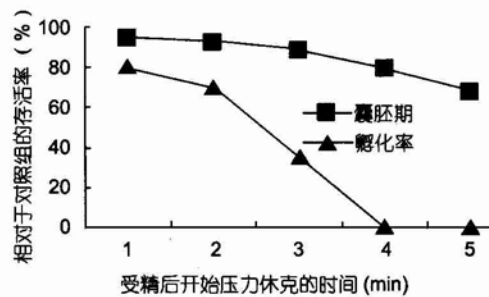


图3 受精后不同时间开始压力休克的各试验组在囊胚期和孵化期相对于对照组的存活率

Fig. 3 Survival rate relative to controls at blastula stage and firstfeeding stage in each experimental group treated with hydrostatic pressure shocks at different times after fertilization

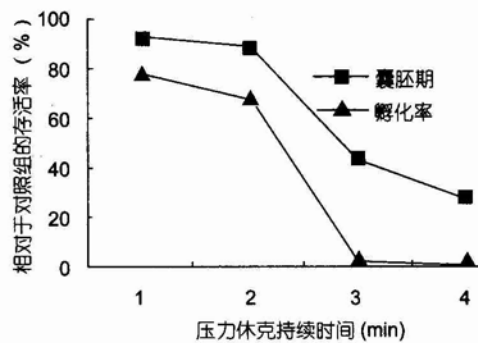


图4 不同处理持续时间的各试验组在囊胚期和孵化期相对于对照组的存活率

Fig. 4 Survival rate relative to controls at blastula stage and firstfeeding stage in each experimental group treated with 450 kg/cm<sup>2</sup> pressure for different durations at 2 min after fertilization

表1 受精后不同时间采用 450 kg/cm<sup>2</sup> 压力持续处理授精卵 2 min 的各个试验组胚胎倍性鉴定结果

Tab.1 The results of ploidy identifications of embryos in each experimental group following hydrostatic pressure treatment of 450 kg/cm<sup>2</sup> for 2 minutes at different times after fertilization

| 压力处理起始时间(受精后 min) | 鉴定样品数(个) | 二倍体 (2n) | 非整倍体 (3n-) | 三倍体 (3n) | 镶嵌体 (2n/3n) | 三倍化率 (%) |
|-------------------|----------|----------|------------|----------|-------------|----------|
| 1                 | 25       | 3        | 10         | 12       | /           | 48.0     |
| 2                 | 31       | 0        | 10         | 19       | /           | 61.3     |
| 3                 | 33       | 0        | 21         | 10       | 2           | 30.3     |

注:试验水温:20~26℃。

#### 2.4 不同强度静水压力、处理起始时间和处理持续时间对诱导效果的影响

为确定适当的压力范围,分别采用 400, 450, 500, 550 kg/cm<sup>2</sup> 和 600 kg/cm<sup>2</sup> 压力,在授精后 2 min 处理受精卵,处理持续时间为 2 min。试验结果表明,当压力在 400~500 kg/cm<sup>2</sup> 时,囊胚期存活率均较高,相对对照组为 100%~84.6%;压力在 550 kg/cm<sup>2</sup> 以上时,囊胚期存活率显著下降,两组的胚胎发育都有畸形现象。孵化率随着压力的升高而下降,5 个试验组的孵化率分别为 100%, 70%, 58.6%, 12.0% 和 0,其中 550 kg/cm<sup>2</sup> 试验组孵出仔鱼大都畸形(图 5)。

不同诱导条件下试验组的倍性鉴定结果:400 kg/cm<sup>2</sup> 压力组三倍化率较低,为 50.0%,有 12.5% 的二倍体。450~550 kg/cm<sup>2</sup> 压力范围的三倍化率接近。在压力 450 kg/cm<sup>2</sup>,处理持续时间 1 min 时,三倍化率仅为 50.0%。当压力时间延至 3 min,三倍化率稍提高,为 66.7%,并出现了 5.1% 的镶嵌体。其中压力为 450 kg/cm<sup>2</sup>,处理起始时间为授精后 3 min,持续时间 2 min 的试验组,三倍化率最高达 84.8%(表 2)。

### 3 讨论

鱼类多倍体研究开展较早,至 90 年代初在其实用化研究方面已取得较大进展。稻田和善 1992 年报道了香鱼到了产卵期,其三倍体生长速度明显较二倍体快。俄罗斯鱼类育种中

心(FSGC)已开始工厂化大规模培育三倍体鲤鱼。日本 1990 年生产出全雌三倍体虹鳟稚鱼  $3.99 \times 10^9$  尾,全雌三倍体大麻哈鱼稚鱼  $2.4 \times 10^8$  尾。对三倍体鱼肉质量、耐氧能力和抗病性等性状的研究表明三倍体虹鳟鱼肉质量优于二倍体。三倍体大西洋鲑需氧能力低于二倍体,可适于低氧环境养殖。在我国,对淡水鱼类多倍体研究较多,已先后报道草鱼、鲤鱼、

团头鲂、水晶彩鲫和白鲫等淡水鱼类的三倍体、四倍体研究,有的已在生产上应用并取得较好效果。相比之下我国海水鱼类多倍体育种尚处于起步阶段,仅开展黑鲷<sup>[3]</sup>、真鲷和牙鲆三倍体诱导的初步研究,在生产上应用尚属空白。

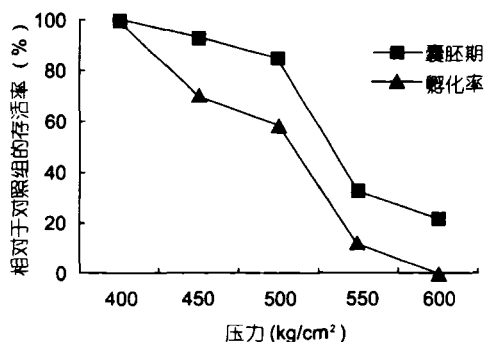


图5 不同压力休克的各试验组在囊胚期和孵化期相对于对照组的存活率

Fig.5 Survival rate relative to controls at blastula stage and first-feeding stage in each experimental group treated with hydrostatic pressure shocks at different levels

表2 不同处理条件各个试验组胚胎倍性鉴定结果

Tab.2 The results of ploidy identifications of embryos in each experimental group treated by different conditions

| 压力 (kg/cm <sup>2</sup> ) | 起始时间 (受精后 min) | 持续时间 (min) | 样品数 (个) | 二倍体 (2n) | 非整倍体 (3n-) | 三倍体 (3n) | 镶嵌体 (2n/3n) | 三倍化率 (%) |
|--------------------------|----------------|------------|---------|----------|------------|----------|-------------|----------|
| 400                      | 2              | 2          | 16      | 2        | 6          | 8        |             | 50.0     |
| 450                      | 2              | 2          | 32      |          | 11         | 21       |             | 65.6     |
| 500                      | 2              | 2          | 25      |          | 9          | 16       |             | 64.0     |
| 550                      | 2              | 2          | 28      |          | 10         | 18       |             | 64.3     |
| 450                      | 2              | 1          | 34      | 2        | 15         | 17       |             | 50       |
| 450                      | 2              | 3          | 39      |          | 11         | 26       | 2           | 66.7     |
| 450                      | 3              | 2          | 33      |          | 5          | 28       |             | 84.8     |

注:试验水温:20~26℃。

摸索静水压诱导大黄鱼三倍体的最适条件,关键在于寻找压力、持续时间和开始处理时间3个参数之间的组合,以获得较高的三倍化率和较低死亡率。压力过高或处理时间过长对受精卵造成损伤,压力过低或处理时间太短则达不到抑制受精卵极体排放的目的。而开始处理的起始时间过早或过迟都无法有效抑制极体排放,起始时间过迟还会对受精卵起相当大的破坏作用,这可能是由于过迟施加的压力影响了受精卵雌、雄原核的形成、接触、融合的过程。作者的研究结果表明,在水温20℃下,在授精后2 min采用450 kg/cm<sup>2</sup>压力,处理受精卵2 min诱导大黄鱼三倍体,获得了较高的诱导率(65.6%),且存活率也较高,相对对照组达70%。

在采用静水压休克抑制第二极体排放诱导鱼类三倍体的报道中,最适压力都在500~700 kg/cm<sup>2</sup>,大多数在550~650 kg/cm<sup>2</sup>之间。处理持续时间也因鱼种类而异,一般鲑科鱼类较长,多在6~10 min,鲤科鱼类较短,一般在2~3 min。而作者的研究表明,大黄鱼受精卵对压力的耐受力较低,当压力达到500 kg/cm<sup>2</sup>时,孵化率就明显下降,压力达550 kg/cm<sup>2</sup>时,孵出仔鱼大都畸形。大黄鱼受精卵对压力持续时间的耐受力也较差,持续时间3 min时,受精卵的发育即受到明显影响,这可能与卵子的特性有关。如草鱼和水晶彩鲤的最适压力分别为550 kg/cm<sup>2</sup>和650 kg/cm<sup>2</sup>,草

鱼卵子的膜比较厚,耐受的壓力较高,水晶彩鲤为黏性卵,卵膜更厚,因此能耐受更高的压力。大黄鱼受精卵为浮性卵,卵膜较薄,对压力的耐受性也较低。开始处理的起始时间主要与鱼类生存环境和胚胎发育速度有关,冷水性鱼类较迟,如鲑科鱼类大多在受精后15~40 min之间开始处理,温水性鱼类较早,如草鱼在受精后4~5 min开始处理。大黄鱼属温水性鱼类,受精卵发育速度较快,在20~26℃的水温下,授精后3~4.5 min即排出第二极体。一般在受精后2 min开始处理,但其中一个试验组在受精后3 min开始处理,得到了84.8%的高倍化率,这可能与处理时水温较低(20℃),受精卵的发育较慢有关,今后还应就处理水温与处理起始时间的关系作更进一步的研究。

作者的研究表明,采用静水压诱导三倍体大黄鱼,诱导率和存活率较高,且操作方法简便,一次可处理受精卵500 000粒左右,处理一批受精卵先后只需要10 min,完全可满足生产的需要。因此它是诱导大黄鱼三倍体的一种有效方法。

#### 参考文献

- 1 陈敏容、俞小牧等。水生生物学报,1998,22(3):209~218
- 2 全成干、王军等。厦门大学学报,2000,39(1):107~110
- 3 张士瑾、马军英、范晓等。海洋生物技术原理和应用。北京:海洋出版社,1997。

## INDUCTION OF TRIPLOID IN *Pseudosciaena crocea* BY HYDROSTATIC PRESSURE

LIN Qi WU Jian-shao ZENG Zhi-nan  
(Fujian Fisheries Research Institute, Xiamen, 361012)

Received: Mar., 20, 2001

Key Words: *Pseudosciaena crocea*, Triploid, Hydrostatic pressure

### Abstract

Triploid was induced by hydrostatic pressure in *Pseudosciaena crocea*. Pressure shock of 450 kg/cm<sup>2</sup> was administered to eggs for 2 min at 2 min after fertilization. The triploid rate was 65.6%, and the survival rate relative to control was 70%. The report also discusses the relation between treatment condition and the rate of triploid and survival.

(本文编辑:刘珊珊)