

乌鳢三倍体诱导及其生长

邹远超 李中 李艳 覃川杰 岳兴建 文正勇 王涪
齐泽民 谢碧文*

内江师范学院生命科学学院, 长江上游鱼类资源保护与利用四川省重点实验室 内江 641112

摘要: 采用热休克抑制第二极体排放的方法诱导乌鳢 (*Channa argus*) 三倍体, 以探索人工诱导乌鳢三倍体的理想热休克条件。采用 DNA 含量测定法和红细胞核大小鉴定法对获得的鱼苗倍性进行鉴定, 同时对普通二倍体乌鳢群体与三倍体群体的生长差异进行了比较研究。结果表明, (1) 热休克法适宜诱导条件为, (28 ± 0.5) °C 培育水温授精后 4 min, 在水温 42 °C 条件下持续处理 3 min, 三倍体诱导率最高, 达到 87.69%; (2) 三倍体与二倍体 DNA 含量差异极显著 ($P < 0.01$), 其比值为 1.50 : 1.00; (3) 三倍体和二倍体在红细胞核长径、红细胞核体积、红细胞核面积等 6 项指标上存在极显著差异 ($P < 0.01$); 与二倍体相比, 三倍体红细胞体积和核体积分别是其 1.69 倍和 1.60 倍; (4) 在 4 月龄与 8 月龄, 三倍体的体长和体重比二倍体稍高, 但两者差异不显著 ($P > 0.05$)。本实验结果为进一步开展乌鳢倍性育种奠定了基础。

关键词: 乌鳢; 三倍体; 诱导; 热休克; 生长

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2017) 01-75-10

Induction and Growth of Triploid Snakehead (*Channa argus*)

ZOU Yuan-Chao LI Zhong LI Yan QIN Chuan-Jie YUE Xing-Jian WEN Zheng-Yong
WANG Yu QI Ze-Min XIE Bi-Wen*

Conservation and Utilization of Fishes Resources in the Upper Reaches of the Yangtze River Key Laboratory of Sichuan Province,
College of Life Sciences, Neijiang Normal University, Neijiang 641112, China

Abstract: Snakehead (*Channa argus*) is a commercially important freshwater fish cultured in China. The induction of triploidy can be used to control unwanted reproduction in culture and is an important breeding method in fish. Given this, the development of triploid stock would be of significant benefit for aquaculture. In the present study, the second polar body extrusion was inhibited by heat shock for triploidy induction in the Snakehead, and the optimal induction conditions were evaluated. Ploidy of putative triploid larvae was determined by means of DNA content and red blood cell size identification method. Meanwhile, the growth performance of triploids and diploids were compared. All the data were analyzed by using Microsoft excel

基金项目 四川省科技厅应用基础项目 (No. 2015JY0262), 四川省大学生创新项目 (No. 201410640002);

* 通讯作者, E-mail: xiebw6873@163.com;

第一作者介绍 邹远超, 女, 副教授; 研究方向: 鱼类遗传育种及种质资源保护; E-mail: zou3891@163.com.

收稿日期: 2016-01-22, 修回日期: 2016-06-15 DOI: 10.13859/j.cjz.201701009

2003 and SPSS 13.0. The results showed that: (1) the highest triploid induction rate of 87.69% was observed when the fertilized eggs were shocked at 42°C for 3min after fertilization 4 min, and incubated at water temperature of (28 ± 0.5)°C (Table 3); (2) the cellular DNA content of triploid Snakehead was 1.50 times to that of the diploid ($P < 0.01$); (3) there were very significant differences in cell and nuclear sizes between the triploid and diploid erythrocytes ($P < 0.01$) (Fig. 2), and the erythrocyte volume and nucleus volume of triploids were 1.69 and 1.60 times of the diploids, respectively (Table 5); (4) from 4 to 8 months of age, the triploids growth rates (body length, weight) were not significantly different compared to the diploid controls ($P > 0.05$) (Table 6). In conclusion, this technique lays foundation and provides important tool for polyploid breeding in Snakehead.

Key words: Snakehead, *Channa argus*; Triploid; Induction; Heat shock; Growth

乌鳢 (*Channa argus*) 又叫黑鱼、乌鱼、生鱼、财鱼、斑鱼等, 俗称乌棒, 隶属鲈形目 (Perciformes) 攀鲈亚目 (Anabantoidei) 鳢科 (Channidae) 鳢属, 是一种凶猛的名贵肉食性鱼类。目前我国除新疆、西藏地区外, 其他省份各大水系均有分布 (Lu et al. 2009)。该种鱼对外界环境有较好的适应能力, 我国从 20 世纪 70 年代末开始人工养殖, 目前已成为外贸出口的重要经济鱼类。作为我国重要的经济水产品种, 因其营养价值高且无肌间刺、味道鲜美而广受人们喜爱 (陈飞东等 2013)。2013 年我国乌鳢年产量达到 509 865 t, 列所有淡水鱼类的第 9 位 (农业部渔业渔政管理局 2014)。然而, 近年来我国养殖的乌鳢群体开始出现性早熟、个体小型化、病害滋生等种质退化问题 (刘改艳 2011, 姜龙等 2013), 大大降低了商品鱼的品质, 阻碍了消费者对大规格乌鳢的需求。如何提高鱼体的抗逆性已成为乌鳢养殖产业中急待解决的难题, 培育三倍体乌鳢成为解决这一问题的有效途径。

由于三倍体鱼类性腺发育受阻, 常常表现出不育的性状。不育的三倍体经济鱼类具有生长速度快且易长成大规格个体、饵料系数低且养殖成本低等优点 (楼允东 2001); 另外, 三倍体鱼类因其不育, 即使流放到江河中也不会污染原生种, 造成基因污染 (Devlin et al. 2002)。基于三倍体鱼类有上述优势, 开展乌鳢三倍体育种, 培育出生长快、肉质优、抗逆能

力强的新品种, 以推动乌鳢养殖产业可持续发展十分必要。

目前已先后在三棘刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*) (Swarup 1959)、虹鳟 (*Salmo gairdneri*) (Chourrout 1980, Thorgaard et al. 1981, Chourrout 1984)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) (Wattendorf 1986)、水晶彩鲫 (*Carassius auratus transparent colored variety*) (桂建芳 1990) 和鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) (Linhart et al. 1991) 等 30 多种海、淡水鱼类中获得三倍体。有的三倍体已经应用于养殖生产上, 并带来了巨大的经济效益。例如在美国, 草鱼和虹鳟的三倍体苗种生产已达到商业化规模 (Piferrer et al. 2009)。本文采用热休克法对乌鳢三倍体的诱导进行了初步研究, 筛选得到了最佳的诱导条件; 采用 DNA 含量测定法和红细胞核大小比较法对实验鱼苗的倍性进行了鉴定; 并对三倍体鱼苗的生长性状进行了分析, 以期为其倍性育种提供重要的理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 亲鱼来源和精卵收集

实验用乌鳢亲鱼来源于内江市江龙水产养殖专业合作社养殖的 2 龄以上、体质健壮、无伤病的个体。实验于 2014 年和 2015 年的 5~7 月在内江师范学院长江上游鱼类资源保护与利用四川省重点实验室试验基地进行。雌性乌鳢

亲鱼用促黄体生成素释放激素类似物 (luteinizing hormone releasing hormone analogue, LHRH-A₂) 直接进行人工催产, 催产药物按照鱼体重剂量为 10 μg/kg, 一次注射, 到达效应时间 (30 ~ 36 h) 后, 人工挤卵并均分成若干等份待用。雄性亲鱼按 5 μg/kg 剂量注射 LHRH-A₂ 进行催产。达到效应时间后, 杀雄鱼取精巢, 用剪刀剪碎, 加入 5 倍体积的自制 0.85% 生理盐水, 混匀后置于 4℃ 冰箱中待用。共催产 5 尾雌性亲鱼和 5 尾雄性亲鱼。

1.2 三倍体诱导

1.2.1 热休克处理最佳起始时间的筛选 根据前期诱导匙吻鲟 (*Polyodon spathula*) 三倍体的经验 (邹远超等 未发表) 和预实验, 确定受精卵分别于授精后 3 min、4 min、5 min 和 6 min 置于精密恒温水浴箱 (XT 5018-GP38, 杭州雪中炭恒温技术有限公司) 中 40 ~ 42℃ 热休克处理 2 ~ 3 min, 之后将受精卵移入 (28 ± 0.5)℃ 水中孵育。正常乌鳢精卵授精后, 不进行热休克处理作为对照组。各个处理组和对照组分别为 1 500 粒受精卵。孵育期间, 分别统计实验组及对照组的受精率和孵化率, 受精率即发育至原肠中期的胚胎数占总卵数的百分比, 孵化率为孵出鱼苗数占受精卵数的百分比。仔鱼孵出后统计三倍体率, 即三倍体检出个体数占总检测个体数的百分比, 从而筛选出最佳热休克处理起始时间。每组实验进行 3 次以上重复。运用 Excel 和 SPSS13.0 软件对数据进行统计分析。

1.2.2 热休克处理温度和持续处理时间的筛选 由 1.2.1 得出热休克处理最佳起始时间后, 设置热休克处理温度分别为 38℃、40℃、42℃ 和 44℃ 共 4 个实验组和一个对照组。实验时将受精卵置于上述水温的精密恒温水浴箱中分别热休克处理 2 ~ 3 min, 处理完毕后将受精卵移入 (28 ± 0.5)℃ 水中进行孵育, 分别统计不同处理组的受精率、孵化率和三倍体率, 从而确定最佳的处理温度。各个处理组和对照组分别为 1 500 粒受精卵。

最后根据上述两个实验结果筛选持续处理时间, 设置持续处理时间分别为 1 min、2 min、3 min 和 4 min 共 4 个实验组和一个对照组。处理完毕后将卵移入 (28 ± 0.5)℃ 水中进行孵育。统计各组的受精率、孵化率和三倍体率, 从而确定最佳的处理持续时间。各个处理组和对照组分别为 1 500 粒受精卵。

1.3 倍性鉴定

1.3.1 DNA 相对含量测定 分别收集各实验组孵化出膜后的鱼苗 10 尾, 捣碎、用 300 目筛绢过滤, 用 PBS (pH 7.4) 调成细胞数为 10 个/ml 的细胞悬液, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色 1 min。用流式细胞仪 (Beckman Coulter, CytoFlex, USA) 进行 DNA 含量分析。采用正常二倍体鱼苗作对照进行检测。被测定鱼苗与正常二倍体细胞的 DNA 相对含量的比值若为 1.5 ± 0.05, 则为三倍体; 比值若为 1.0 ± 0.05, 则为二倍体。

1.3.2 红细胞核大小比较 每个实验组随机选取 1 月龄幼鱼 10 ~ 20 尾, 用经 1% 肝素钠浸润过的 1 ml 注射器从鱼尾部静脉抽血, 涂片后用甲醇固定, 在空气中干燥后用 Wright-Giemsa 混合染液染色 5 min, 室温干燥。在显微镜下分别测量红细胞及红细胞核的短径 (a) 和长径 (b), 根据公式 $S = \pi ab/4$, $V = a^2 b/1.91$ (Lou et al. 1984) 分别计算红细胞或红细胞核的面积 (S) 及体积 (V)。核质比 = $V_n/(V_c - V_n)$, 式中, V_c 为红细胞体积, V_n 为红细胞核体积。每个样本各测 100 个细胞, 求其平均值。

1.4 二倍体、三倍体乌鳢鱼苗生长比较

二倍体对照组鱼苗和三倍体乌鳢鱼苗的生长对比实验在长江上游鱼类资源保护与利用四川省重点实验室的试验养殖基地完成。实验所用三倍体鱼苗均为经倍性鉴定后的体格健壮、无伤病的鱼苗, 鱼苗均在水泥培育池中采用静水养殖, 气泵增氧。鱼种培育池面积为 10 m², 水深 0.8 m, 每池放实验鱼 250 尾, 鱼苗放养密度为 25 尾/m²。每天投喂 2 次, 即 8:00

~ 9:00 时和 16:00 ~ 17:00 时各投喂 1 次, 日投饲量为池内乌鳢总重量的 5% ~ 8%。实验设置 3 个平行。二倍体对照组和三倍体群体均分别在 4 月龄和 8 月龄 2 次采样, 测其体长、体重, 每个群体分别测 50 尾。实验结束后统计各个实验组的存活率。采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析 (ANOVA), 以 Duncan 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 热休克处理的最佳起始时间

不同热休克处理起始时间对受精率、孵化率和三倍体率的影响见表 1。对照组与热休克组孵化率存在显著性差异 ($P < 0.05$), 热休克组之间不存在显著性差异 ($P > 0.05$)。随着起始时间的延长孵化率呈下降趋势, 热休克组之间的三倍体率存在显著性差异 ($P < 0.05$), 尤其在受精后 4 min 热休克处理, 获得的三倍体鱼苗比例最高, 达到 82.46%。因此确定受精后 4 min 进行热休克诱导的效果最好。

2.2 热休克处理的最佳温度与持续时间

不同热休克处理温度对乌鳢三倍体诱导率的影响见表 2。4 个热休克处理组均有鱼苗孵化出膜, 但随着热休克处理温度的增加, 鱼苗孵化率呈下降趋势。40℃ 和 42℃ 之间的孵化率不存在显著差异 ($P > 0.05$), 但三倍体率差异显著 ($P < 0.05$); 42℃ 和 44℃ 之间的三倍体率不存在显著差异 ($P > 0.05$), 但孵化率差异显著 ($P < 0.05$), 因此确定 42℃ 为诱导三倍体乌鳢的最适热休克温度。

最后根据上述两个实验结果筛选热休克处理持续时间。在受精后 4 min, 将受精卵置入 42℃ 水温中分别处理 1 min、2 min、3 min 和 4 min (表 3), 乌鳢受精卵在 42℃ 下持续热休克处理 1 ~ 4 min 均有鱼苗出膜, 随着热休克处理持续时间的增加, 鱼苗孵化率呈下降趋势, 但三倍体鱼苗的诱导率有所增加, 在热休克持续时间为 3 min 时, 三倍体率最高, 达到 87.69%, 且与其他处理组相比, 三倍体率存在显著差异 ($P < 0.05$)。因此确定最佳的热休克持续时间为 3 min。

表 1 不同热休克处理起始时间对乌鳢三倍体诱导效果的影响

Table 1 Effects of initiation time of heat shock after fertilization on induction rate of triploid in Snakehead

热休克起始时间 (min) Initiation time of heat shock after fertilization	受精率 (%) Fertilization rate	孵化率 (%) Hatching rate	三倍体率 (%) Percentage of triploid
对照组 Control	89.53 ± 6.24 ^a	84.84 ± 5.65 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
3	75.96 ± 5.73 ^b	69.15 ± 5.27 ^b	60.78 ± 4.07 ^c
4	70.16 ± 4.87 ^{bc}	58.70 ± 2.90 ^{bc}	82.46 ± 5.52 ^d
5	62.79 ± 5.61 ^c	56.54 ± 3.42 ^c	65.10 ± 4.68 ^c
6	56.82 ± 4.28 ^d	54.83 ± 5.64 ^c	18.75 ± 2.63 ^b

上标字母表示多重比较结果, 具有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

表 2 不同热休克处理温度对乌鳢三倍体诱导效果的影响

Table 2 Effects of heat shock treatment temperature on induction of triploid in Snakehead

热休克处理温度 (℃) Heat shock treatment temperature	受精率 (%) Fertilization rate	孵化率 (%) Hatching rate	三倍体率 (%) Percentage of triploid
对照组 Control	86.75 ± 7.69 ^a	82.30 ± 8.45 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
38	78.49 ± 6.32 ^b	70.74 ± 5.56 ^b	10.95 ± 1.73 ^b
40	74.23 ± 5.48 ^b	66.82 ± 6.68 ^{bc}	22.51 ± 3.26 ^c
42	53.21 ± 5.36 ^c	59.15 ± 4.47 ^c	84.79 ± 7.51 ^d
44	49.86 ± 5.05 ^c	10.21 ± 3.06 ^d	85.05 ± 4.68 ^d

上标字母表示多重比较结果, 具有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

表 3 不同热休克持续时间对乌鳢三倍体诱导效果的影响

Table 3 Effects of heat shock duration on the induction of triploid in Snakehead

热休克持续时间 (min) Heat shock duration	受精率 (%) Fertilization rate	孵化率 (%) Hatching rate	三倍体率 (%) Percentage of triploid
对照组 Control	89.78 ± 6.36 ^a	86.51 ± 7.38 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
1	83.64 ± 5.85 ^a	80.74 ± 4.82 ^b	58.36 ± 10.47 ^b
2	76.90 ± 5.43 ^b	74.58 ± 5.90 ^c	75.54 ± 6.15 ^c
3	74.85 ± 4.64 ^b	70.25 ± 4.27 ^c	87.69 ± 4.37 ^d
4	60.47 ± 4.79 ^c	52.78 ± 3.59 ^d	66.27 ± 5.13 ^b

上标字母表示多重比较结果, 具有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.3 乌鳢三倍体鱼苗 DNA 相对含量

采用流式细胞仪对对照组鱼苗和实验组鱼苗的细胞 DNA 相对含量进行了测定。正常二倍体乌鳢细胞 DNA 相对含量为 $1\ 245.26 \pm 3.26$ ($n = 2$), 三倍体乌鳢细胞 DNA 相对含量为 $1\ 867.89 \pm 4.03$ ($n = 10$), 三倍体鱼苗的 DNA 相对含量是二倍体鱼苗的 1.50 倍 (图 1), 证实诱导出的鱼苗为三倍体。

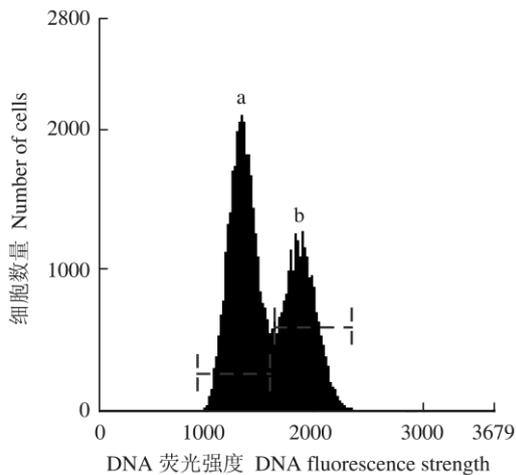


图 1 二倍体 (a) 和三倍体乌鳢 (b) 细胞 DNA 相对含量

Fig. 1 DNA relative content histograms of erythrocytes of normal diploid (a) and triploid Snakehead (b)

图中虚线分别表示二倍体乌鳢 (左) 和三倍体乌鳢 (右) DNA 荧光强度的分布范围。

The dotted lines in figure indicate distribution ranges of DNA fluorescence strength of erythrocytes of normal diploid (left) and triploid (right) Snakeheads, respectively.

2.4 乌鳢二倍体、三倍体红细胞比较

2.4.1 红细胞核大小 二倍体与三倍体乌鳢的红细胞及核的大小测量结果见表 4。乌鳢二倍体和三倍体在红细胞核长径、红细胞核体积、红细胞核面积等指标方面存在极显著差异 ($P < 0.01$)。三倍体红细胞体积及核体积分别是二倍体的 1.69 倍和 1.60 倍, 二倍体细胞的核质比略大于三倍体细胞。

2.4.2 红细胞核形态 二倍体乌鳢与三倍体乌鳢红细胞显微结构见图 2, 二倍体红细胞 (图 2a, c) 和三倍体红细胞 (图 2b, d ~ f) 形态无明显差异。成熟红细胞外形多为椭圆形, 细胞核椭圆形且位于细胞中央; 未成熟红细胞较大, 近圆形, 核较大 (图 2a)。三倍体乌鳢红细胞及其细胞核明显大于二倍体乌鳢红细胞及细胞核。部分三倍体乌鳢成熟红细胞核呈哑铃形 (图 2f) 或有两个核 (图 2d, e), 二核细胞的两个核大小相同 (图 2d) 或不同 (图 2e), 与二倍体乌鳢成熟红细胞核呈椭圆形明显不同, 称为异常红细胞。统计三倍体乌鳢 1 000 个成熟红细胞, 发现异常红细胞达 5.31%。二倍体乌鳢未见异常红细胞。

2.5 乌鳢三倍体群体的生长

二倍体和三倍体乌鳢两个群体均在相同的条件下饲养, 在实验期间没有发病现象, 因此各组实验鱼苗培育的成活率均很高, 三倍体达到 85.7%, 二倍体达到 87.4%, 差异不显著 ($P > 0.05$)。在 4 月龄和 8 月龄对两个群体进行体重和体长测量 (表 5)。在 4 月龄与 8 月龄, 三倍体群体的体长和体重均较二倍体群体

表 4 二倍体和三倍体乌鳢红细胞及其细胞核大小比较 ($n = 100, \mu\text{m}$)

Table 4 Comparison on size of erythrocyte and cellular nucleus in diploid and triploid Snakehead

项目 Item		二倍体 (2n) Diploid	三倍体 (3n) Triploid	3n/2n Triploid / Diploid
红细胞 Erythrocyte	长径 Long diameter	12.86 ± 0.89	17.58 ± 1.18**	1.37
	短径 Short diameter	7.65 ± 0.77	9.08 ± 0.75*	1.19
	体积 Volume	398.77 ± 85.71	675.36 ± 144.91**	1.69
	面积 Area	77.31 ± 9.59	125.45 ± 14.68**	1.62
红细胞核 Erythrocyte nucleus	长径 Long diameter	5.53 ± 0.51	7.40 ± 0.65**	1.34
	短径 Short diameter	2.91 ± 0.41	3.18 ± 0.45*	1.09
	体积 Volume	25.11 ± 8.01	40.29 ± 12.02**	1.60
	面积 Area	12.65 ± 2.29	18.56 ± 3.32**	1.47
核质比 Nuclear cytoplasmic ratio		0.067	0.063	

二倍体与三倍体比较, * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

The comparison of diploid and triploid, sign "*" indicates significant difference ($P < 0.05$), sign "**" indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

表 5 二倍体乌鳢和三倍体乌鳢生长比较

Table 5 Growth comparison between diploid and triploid Snakeheads

指标 Item		二倍体 Diploid ($n = 50$)	三倍体 Triploid ($n = 50$)	P 值 P value
4 月龄 4 months of age	体长 Body length (cm)	18.35 ± 2.54	19.39 ± 2.75	> 0.05
	体重 Body weight (g)	33.76 ± 4.75	37.86 ± 5.43	> 0.05
8 月龄 8 months of age	体长 Body length (cm)	35.20 ± 2.43	36.58 ± 3.15	> 0.05
	体重 Body weight (g)	73.42 ± 6.38	76.92 ± 6.51	> 0.05

稍高, 但两者的差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 三倍体诱导方法比较

鱼类三倍体人工诱导的主要方法包括热休克法 (Arai et al. 1987)、冷休克法 (Don et al. 2006, Dias da Silva et al. 2007) 和静水压法 (Chourrout 1984), 其有效性已经在很多鱼类中得到了证实。虽然这三种诱导方法在很多鱼类上已使用, 但并不表示这三种方法在所有鱼类中都普遍适用。如 Lincoln 等 (1974) 采用冷休克和热休克两种方法诱导大西洋鲑 (*Salmo salar*) 三倍体, 发现冷休克法无法获得三倍体后代, 而热休克的诱导效果却很好; 许建和等 (2006) 采用冷休克和静水压两种方法诱导

大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 三倍体, 发现静水压法的三倍体诱导率要明显优于冷休克法; Kettunen 等 (2007) 对大西洋鳕 (*Gadus morhua*) 三倍体进行人工诱导, 冷休克的诱导率不足 4%, 而热休克的诱导率高达 100%。有研究表明, 静水压法是诱导三倍体的最有效方法 (Chourrout 1984, 许建和等 2006), 然而采用此方法诱导欧洲鳎 (*Solea solea*) (Howell et al. 1995) 三倍体的效果并不理想。究其原因, 可能与鱼类本身的生物学特性、遗传背景以及对压力或温度敏感性不同有关。本研究通过反复实验, 筛选出了人工诱导乌鳢三倍体的最佳诱导条件, 即: (28 ± 0.5) °C 培育水温下授精后 4 min, 在水温 42°C 条件下持续处理 3 min, 三倍体诱导率最高, 达到 87.69%。这一结果与

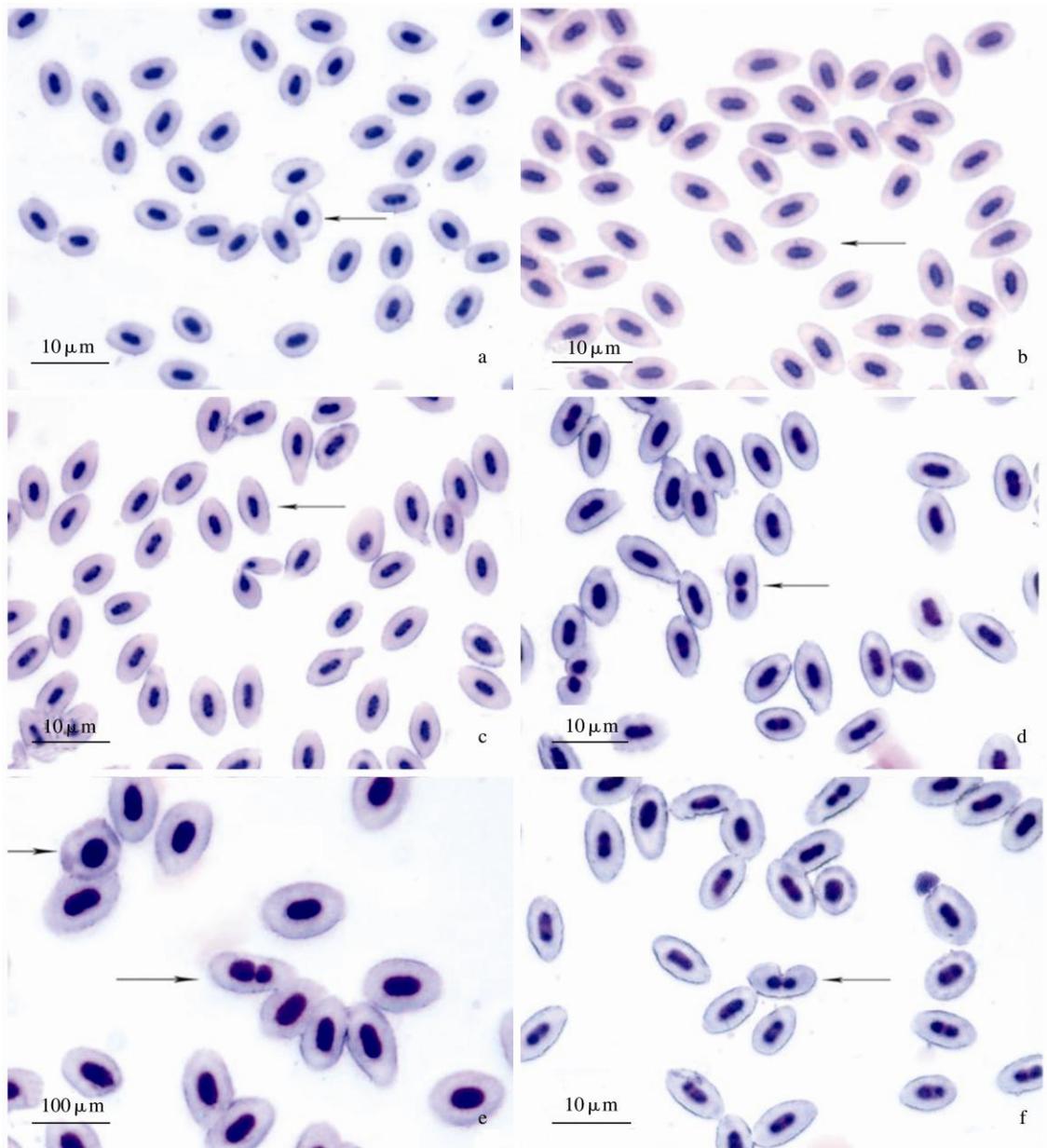


图 2 二倍体和三倍体乌鳢血细胞的形态

Fig. 2 Morphology of blood cells in diploid and triploid Snakeheads

a. 二倍体乌鳢未成熟红细胞; b. 三倍体乌鳢成熟红细胞; c. 二倍体乌鳢成熟红细胞; d. 三倍体乌鳢两核相等的红细胞; e. 三倍体乌鳢一大一小两核的红细胞; f. 三倍体乌鳢哑铃形的红细胞。

a. Immature erythrocyte of diploid Snakehead; b. Mature erythrocyte of triploid Snakehead; c. Mature erythrocyte of diploid Snakehead; d. Erythrocyte with two equal nuclei of triploid Snakehead; e. Erythrocyte with two unequal nuclei of triploid Snakehead; f. Dumbbell erythrocyte of triploid Snakehead.

其他作者所报道的三倍体诱导结果略有不同, 如 Kavumpurath 等 (1990) 采用热休克法诱导

斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 三倍体, 诱导率为 100%; 尤锋等 (1993) 采用热休克法诱导黑鲷

(*Sparus macrocephalus*) 三倍体, 诱导率仅为 29.74%; 宋立民等 (2010) 采用冷休克和热休克两种方法诱导黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 三倍体, 其中热休克法的诱导率为 40%, 要明显高于冷休克法的诱导率 (最高为 25%)。这一差异的原因可能与不同鱼类受精卵对温度敏感性不同, 从而造成了耐受温度的差异。在本实验采用热休克法处理, 未能获得 100% 的三倍体后代, 这可能与实验中使用的受精卵的发育过程不同步, 导致受精后第二极体释放时间不一致有关。

3.2 倍性鉴定方法的比较

相关文献表明 (Vance et al. 1994, Devlin et al. 2002), 多倍体的鉴定最常用的方法包括染色体计数法、DNA 含量测定法、核体积测量法、生化分析法及形态学检查等。染色体计数法优点是鉴定的准确性高, 缺点是技术难度较大, 制备染色体需要将鱼杀死。采用细胞培养的方法能保证实验样本存活的同时获得染色体分裂相, 但是技术要求严格且操作过程复杂, 不适宜作为快速和大规模鉴定倍性的方法。利用流式细胞术能快速准确地鉴定物种倍性。目前, 该项技术已广泛运用于鱼类、虾类等 DNA 含量和倍性检测 (Wattendorf 1986, 段爱丽等 2014)。高泽霞等 (2007) 通过对多倍体泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 的倍性分析, 认为流式细胞仪检测多倍体是一个良好的方法。高静等 (2010) 采用流式细胞术对 6 种重要经济鱼类进行了倍性鉴定, 发现该方法在不杀死实验鱼的前提下能快速、高效、准确地鉴定大量样品。本实验运用流式细胞术对获得的乌鳢三倍体后代进行了检测, 结果与红细胞测量结果一致。证明了运用流式细胞术进行倍性鉴定时具有快速、准确、可靠的优点, 弥补了制备鱼类细胞染色体耗时长、方法复杂的不足。故流式细胞术可以作为鱼类倍性鉴定的一种好方法。

高泽霞等 (2007) 在对 4 个地理种群的泥鳅进行倍性鉴定时发现, 红细胞核大小测量法

具有操作简便, 准确性高的特点, 可作为鉴定鱼类倍性的一个较好方法。陈侠君等 (2010) 对二倍体和三倍体虹鳟 (*Onchorynchus mykiss*) 的外周血细胞进行研究, 发现两种倍性虹鳟红细胞在红细胞核面积、红细胞核体积方面存在极显著差异 ($P < 0.01$); 邹曙明等 (2006) 发现团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 同源四倍体、倍间三倍体的核体积分别为二倍体团头鲂的 1.97 倍和 1.39 倍。本研究显示, 乌鳢二倍体和三倍体在红细胞核体积、红细胞核面积等指标方面存在极显著差异 ($P < 0.01$), 且三倍体红细胞体积及核体积分别是二倍体的 1.69、1.60 倍, 具有较高的准确性。故认为红细胞核大小测量法是鉴定乌鳢三倍体的有效方法。综合比较上述三种方法之后, 可以考虑对后期诱导产生的多倍体后代采用流式细胞仪检测法结合红细胞核比较法进行倍性快速鉴定, 以便能将多倍体育种技术广泛地应用到生产实践中。

3.3 二倍体乌鳢和三倍体乌鳢生长比较

人工诱导鱼类三倍体研究主要有两个目的: 一是希望其生长速度快于同类二倍体, 为其品种选育及改良奠定基础; 二是培养不育的群体, 利用三倍体鱼的不育性控制鱼类的过度繁殖和防止其对生态环境的破坏。然而有关三倍体鱼类生长性状的研究, 不同学者的研究结果差异较大。一些研究发现三倍体鱼生长速度慢于二倍体, 如 Utter 等 (1983) 发现三倍体银大麻哈鱼 (*O. keta*) 的幼鱼比二倍体生长还要慢。Chourrout (1984) 发现三倍体虹鳟在 2 龄以前比二倍体生长慢。Felip 等 (1999) 研究表明, 三倍体欧洲黑鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 在 2 龄以前生长速度比二倍体慢。然而也有研究表明, 三倍体鱼类的生长速度较二倍体快。如中国科学院水生生物研究所等单位 (1979) 研究发现, 三倍体草鱼在鱼种阶段的体重比二倍体增长了 70.4%。Cal 等 (2006) 研究发现在性成熟之前, 大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 三倍体与普通二倍体的生长没有差异 ($P > 0.05$), 但当初次性成熟之后, 三倍体生长速

度明显加快, 与二倍体生长差异显著 ($P < 0.05$), 体重比二倍体增长了 11.4%。三倍体群体比同类二倍体生长快主要表现在性成熟期, 原因可能是由于二倍体用于发育性腺的能量在三倍体却用于生长。本研究发现, 乌鳢三倍体在 4 月龄到 8 月龄的生长速度与二倍体没有显著性差异, 随着二倍体性腺的发育, 两者之间在生长上是否表现差异, 我们将进一步研究。

本研究采用了热休克的方法开展了乌鳢三倍体诱导实验, 筛选出了最佳热休克诱导条件, 诱导率高达 87.69%, 并成功获得三倍体后代, 说明热休克法是诱导乌鳢三倍体的有效方法, 本项技术的建立将为乌鳢倍性育种奠定基础。

参 考 文 献

- Arai K, Wilkins N P. 1987. Triploidization of brown trout (*Salmo trutta*) by heat shocks. *Aquaculture*, 64(2): 97–103.
- Cal R M, Vidal S, Gómez C, et al. 2006. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 251(1): 99–108.
- Chourrout D. 1980. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Reproduction Nutrition Development*, 20(3): 727–733.
- Chourrout D. 1984. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: Production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture*, 36(1/2): 111–126.
- Devlin R H, Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208(Supple): 191–364.
- Dias da Silva F S, Moreira R G, Orozco-Zapata C R, et al. 2007. Triploidy induction by cold shock in the South American catfish, *Rhamdia quelen* (Siluriformes) (Quoy & Gaimard, 1824). *Aquaculture*, 272(Supple): 110–114.
- Don J, Avtalion R R. 2006. Comparative study on the induction of triploidy in tilapias using cold and heat-shock techniques. *Journal of fish biology*, 32(5): 665–672.
- Felip A, Zanuy M, Piferrer F. 1999. Growth and gonadal development in triploid sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during the first 2 years of age. *Aquaculture*, 173(1): 389–399.
- Howell B R, Baynes S M, Thompson D. 1995. Progress towards the identification of the sex determining mechanism of the sole, *Solea solea* (L), by the induction of diploid gynogenesis. *Aquaculture Research*, 26(2): 135–140.
- Kavumpurath S, Pandian T J. 1990. Induction of triploidy in the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton). *Aquaculture Research*, 21(3): 299–306.
- Kettunen A, Kauric G, Peruzzi S. 2007. Induction of triploidy in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) by thermal shocks. *Aquaculture*, 272(1): S276.
- Lincoln R F, Aulstad D, Grammeltvedt A. 1974. Attempted triploid induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using cold shocks. *Aquaculture*, 4(3): 287–297.
- Linhart O, Flajshans M, Kvasnieka P. 1991. Induced triploidy in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): a comparison of two methods. *Aquatic Living Resources*, 4(3): 139–145.
- Lou Y D, Purdom C E. 1984. Polyploidy induced by hydrostatic pressure in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of fish biology*, 25(3): 345–351.
- Lu F, Liu D, Ye X, et al. 2009. Alginate-calcium coating in incorporating nisin and EDTA maintains the quality of fresh northern snakehead (*Channa argus*) fillets stored at 4°C. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(5): 848–854.
- Piferrer F, Beaumont A, Falguière J C, et al. 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293(3): 125–156.
- Swarup H. 1959. Production of triploidy in *Gasterosteus aculeatus*. *Journal of Genetics*, 56(2): 129–142.
- Thorgaard G H, Jazwin M E, Stier M W. 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, 110(4): 546–550.
- Utter F M, Johnson O W, Thorgaard G H, et al. 1983. Measurement and potential applications of induced triploidy in Pacific salmon. *Aquaculture*, 35(83): 125–135.
- Vance B W, Estger A S, Wells J K. 1994. Estimating nuclear DNA

- content in Peach and related diploid species using laser flow cytometry and DNA hybridization. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119(6): 1312–1316.
- Wattendorf R J. 1986. Rapid identification of triploid grass carp with a coulter counter and channelyzer. *Progressive Fish-Culturist*, 48(2): 125–132.
- 陈飞东, 杨立锋. 2013. 乌鳢营养价值及其深加工开发前景. *农产品加工: 学刊*, 314(4): 51–53.
- 陈侠君, 王炳谦, 刘奕, 等. 2010. 二倍体和三倍体虹鳟外周血细胞的比较研究. *东北农业大学学报*, 41(1): 86–92.
- 段爱丽, 陈昆慈, 张新铨, 等. 2014. 斑鳢、乌鳢及其杂种细胞核 DNA 流式含量分析. *动物学杂志*, 49(1): 46–50.
- 高静, 黄小红, 曾华嵩, 等. 2010. 中国 6 种经济鱼类的基因组大小测定. *中国水产科学*, 17(4): 689–694.
- 高泽霞, 王卫民, 周小云. 2007. 2 种鉴定泥鳅多倍体方法的比较. *华中农业大学学报*, 26(4): 524–527.
- 桂建芳. 1990. 鱼类染色体操作的研究 I. 静水压休克诱导三倍体水晶彩鲫. *水生生物学报*, 14(4): 336–342.
- 姜龙, 王忠卫, 周莉, 等. 2013. 乌鳢一个养殖群体中性别连锁 AFLP 标记的筛选. *水生生物学报*, 37(6): 1174–1178.
- 刘改艳. 2011. 乌鳢、斑鳢性别差异 SSR 标记的初步筛选及其遗传多样性分析. 上海: 上海海洋大学硕士论文, 2–15.
- 楼允东. 2001. 鱼类育种学. 修订版. 北京: 中国农业出版社, 140–145.
- 农业部渔业渔政管理局. 2014. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 31.
- 宋立民, 王卫民, 周小云, 等. 2010. 冷、热休克法诱导黄颡鱼三倍体的比较研究. *水产学报*, 34(5): 768–776.
- 许建和, 尤锋, 吴雄飞, 等. 2006. 冷休克法和静水压法人工诱导大黄鱼三倍体. *中国水产科学*, 13(2): 206–210.
- 尤锋. 1993. 黑鲷三倍体的人工诱导研究. *海洋与湖沼*, 24(3): 248–254.
- 中国科学院水生生物研究所, 广西壮族自治区水产研究所, 广西壮族自治区水产试验站. 1979. 草鱼、团草人工诱导多倍体的研究. *遗传学报*, 6(1): 77.
- 邹曙明, 李思发, 蔡完其, 等. 2006. 团头鲂同源四倍体、三倍体与二倍体倍间红细胞的形态特征比较. *中国水产科学*, 13(6): 891–896.