

热休克诱导马苏大麻哈鱼三倍体的初步研究

魏凯¹, 郑伟², 时晓¹, 何亚鹏¹, 韩姝伊^{3,4}, 董颖⁵, 陈春山¹

(1. 北京市水生野生动植物救护中心, 北京 102100; 2. 吉林省延边自治州水产站, 吉林延吉 133001;
3. 中国科学院动物研究所, 北京 100101; 4. 河北师范大学, 石家庄 050024;
5. 北京市水产科学研究所, 北京 100068)

摘要: 为探索马苏大麻哈鱼(*Oncorhynchus masou*)三倍体育种技术方法,更好地解决其个体小、生长慢和性成熟后死亡率高等问题,采用热休克法进行三倍体诱导实验,设4个诱导温度(24、26、28、30℃),2个起始诱导时间(15 min、20 min)和2个持续诱导时间(15 min、20 min)共分13个实验组和1个对照组。结果显示,13个实验组均能诱导出三倍体个体,而不同温度组的诱导率差异显著,分别为13.3%、31.65%、52.28%和78.81%($P < 0.05$)。随着温度的上升,孵化率呈显著降低的趋势。结果表明,温度是影响诱导成功的关键因素,利用热休克诱导受精卵制备陆封型马苏大麻哈鱼三倍体苗种的方法是可行的,三倍体诱导的最佳条件是:水温28℃,卵子受精后15 min持续处理20 min,发眼率(72.57 ± 0.26)%,孵化率(60.92 ± 0.31)%,三倍体率53.1%,综合诱导效果最佳。

关键词: 马苏大麻哈鱼(*Oncorhynchus masou*); 陆封群体; 三倍体; 热休克

中图分类号: S961.6

文献标识码: A

文章编号: 1000-6907-(2020)02-0067-05

DOI:10.13721/j.cnki.dsyy.2020.02.010

马苏大麻哈鱼(*Oncorhynchus masou*),隶属于鲑科大麻哈鱼属,是仅分布在北太平洋亚洲一侧水域的溯河洄游性鱼类,主要分布在日本和我国的图们江、绥芬河、台湾的大甲溪中^[1-2]。幼鱼在淡水生活期间,分化成降海型和陆封型两个生态群体,后者终生生活在淡水河流中,不营降海洄游,但参与洄游群体的繁殖^[3-5]。日本60年代将陆封型种群开发成人工养殖品种称作山女鲑,被誉为20多种鲑科鱼类中,肉质最好、最受欢迎淡水游钓鱼类,1996年引进我国后进行了详细研究^[6-10]。马苏大麻哈鱼由于个体小,在原产地人工养殖2年一般体重250 g左右,而且具有鲑科鱼类繁殖后亲鱼绝大部分死亡的特征,影响规模化生产的推广。

鱼类染色体组操作是水产领域运用较为成熟的遗传育种技术之一。三倍体鱼类,理论上可以避免性腺发育阶段和产卵季节鱼肉质量下降、生长停滞和亲鱼死亡率上升等问题,并且具有个体大、生长快和成活率高等优良品质^[11-12],已成为国内外水产领域的研究热点。鲑科鱼类中的三倍体技术在虹鳟(*O. mykiss*)^[13-14]、金鳟(*O. mykiss Walbaum*)^[15]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[16]、美洲红点鲑(*Salvelinus*

fontinalis)^[17-18]、细鳞鲑(*Brachymystax lenok*)^[19]等鱼类中得到广泛的研究应用。但是,国内外对于马苏大麻哈鱼的三倍体研究仍处于空白状态,本研究采用热休克法进行了三倍体诱导实验,对影响诱导率的水温、受精时间和持续时间进行探讨,从而确定最佳的诱导条件。此外,考虑到部分鲑科鱼类的三倍体雄性后代同样出现性腺发育情况^[13],今后还将重点对马苏大麻哈鱼三倍体的性腺发育和全雌三倍体制备技术进行研究。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼和养殖管理

实验用鱼为吉林珲春细鳞鱼良种场培育的2+龄陆封型马苏大麻哈鱼(见图1),体质量♀(654 ± 182) g, ♂(488 ± 85) g。其中,雌性亲鱼524尾,共采卵60.84万粒,采卵水温8.3℃,孵化期水温6.4~10.8℃。亲鱼选择、采卵受精、孵化方法按照陈春山等^[9]方法进行。马苏大麻哈鱼的三倍体诱导实验和孵化工作在珲春细鳞鱼良种场养殖车间进行,后期将部分鱼苗运至北京市水生野生动植物救护中心养殖基地进行饲养管理。每个玻璃钢水槽

收稿日期: 2019-03-20; 修订日期: 2019-12-17

资助项目: 北京市鲟鱼鲑鱼创新团队项目(BAIC08-2019)

第一作者简介: 魏凯(1984-),男,高级工程师,专业为水生动物保护技术研究。E-mail: 157205267@qq.com

通讯作者: 陈春山。E-mail: chenchunshan8888@126.com

放置 1 000 尾鱼苗, 养殖用水为曝气后的地下水, 平均溶氧 >8 mg/L, 每天投喂 6 次, 日投喂量按体重的 5% ~ 7% 计算, 每天上午 9 点和下午 3 点各吸污一次, 养殖 180 d 后进行倍性检测。



图 1 陆封型马苏大麻哈鱼

Fig. 1 Landlocked group of *O. masou*

1.2 三倍体诱导

实验共分 13 个实验组和 1 个对照组, 实验组设 4 个诱导温度 (24、26、28、30 °C), 2 个起始诱导时间 (15、20 min), 2 个持续诱导时间 (15、20 min), 每组设 3 个重复, 实验参数见表 1。热休克处理在不锈钢水槽中进行, 电子控温, 水温误差 <0.5 °C, 灵敏度 0.1 °C, 热处理前用 CEM 高精度数字温度计 (型号为 DT-613) 矫正水温。热处理后受精卵即刻放入装有与采卵水温相同水的容器中, 静置 2 h 挑除死卵。对照组受精后放入相同条件容器中, 与热处理卵同时挑除死卵。捡卵后放入相同孵化器中孵化。

表 1 热休克诱导马苏大麻哈鱼三倍体实验参数

Tab. 1 Experiment parameters of heat shock induced triploid of *O. masou*

| 组别 | 处理温度/°C | 起始时/min | 持续时/min | 受精水温/°C |
|----|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 24 | 20 | 20 | 8.3 |
| 2 | 26 | 15 | 15 | 8.3 |
| 3 | 26 | 15 | 20 | 8.3 |
| 4 | 26 | 20 | 15 | 8.3 |
| 5 | 26 | 20 | 20 | 8.3 |
| 6 | 28 | 15 | 15 | 8.3 |
| 7 | 28 | 15 | 20 | 8.3 |
| 8 | 28 | 20 | 15 | 8.3 |
| 9 | 28 | 20 | 20 | 8.3 |
| 10 | 30 | 15 | 15 | 8.3 |
| 11 | 30 | 15 | 20 | 8.3 |
| 12 | 30 | 20 | 15 | 8.3 |
| 13 | 30 | 20 | 20 | 8.3 |
| 对照 | | | | 8.3 |

1.3 倍性检测

采用 Pacfec CyFlow Cube 8 型流式细胞仪检测鱼苗血液 DNA 相对含量, 取两次平均值计算三倍

体率。鱼苗培育至体长 (8.24 ± 0.74) cm, 实验组每组随机抽样 30 尾, 尾静脉采血, 每次取 3 尾二倍体鱼苗作为对照, 检测实验在北京市水产研究所完成。综合评分按照 Gervai^[20] 标准, 孵化率占 60%, 三倍体率占 40%, 计算综合诱导效果。

1.4 数据处理

用重量法计算采卵量。受精卵热处理后 2 h 挑除死卵, 统计死亡率。发眼后检出未发眼卵, 统计发眼率。出苗后检出未孵化卵, 统计孵化率。根据抽样检测结果计算三倍体率。

实验数据采用 Excel 软件进行整理, 用 SPSS19.0 进行非参数检验, 分析各组间的差异性, 其中 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 诱导时间对实验结果的影响

受精后 15 min 和 20 min, 热休克处理 15 min 和 20 min 都可诱导出三倍体鱼, 但受精卵 2 h 死亡率、发眼率、孵化率、三倍体率差异显著。起始处理时间 15 min 的 6 个组间及起始处理时间 20 min 的 7 个组间上述 4 项指标差异较大。起始处理时间 15 min 和 20 min 之间无明显规律。持续诱导时间 15 min 的 6 个组和 20 min 的 7 个组对上述 4 项指标的影响与起始处理时间规律相同。说明在本实验条件下, 起始处理时间和持续处理时间不是影响实验结果的主要因素。诱导结果如表 2 所示。

表 2 马苏大麻哈鱼三倍体诱导结果

Tab. 2 Experiment results of triploid induction by heat shock

| 组别 | 采卵量/粒 | 2h死亡率/% | 发眼率/% | 孵化率/% | 三倍体率/% |
|----|--------|---------------------|--------------------|----------------------|---------------------|
| 1 | 49 283 | 8.01 ^j | 82.94 ⁱ | 68.35 ^d | 13.30 ^a |
| 2 | 46 085 | 0.43 ^b | 93.84 ^m | 41.34 ^a | 23.30 ^b |
| 3 | 43 875 | 0.14 ^a | 86.83 ^k | 49.00 ^{abc} | 36.70 ^c |
| 4 | 54 457 | 7.21 ⁱ | 85.64 ^j | 60.55 ^c | 33.30 ^{bc} |
| 5 | 59 163 | 1.74 ^{ef} | 52.82 ^c | 39.40 ^e | 33.30 ^{bc} |
| 6 | 63 466 | 1.33 ^{ede} | 42.03 ^a | 47.50 ^{ab} | 46.70 ^d |
| 7 | 42 843 | 1.26 ^{cd} | 72.57 ^g | 60.92 ^f | 53.10 ^e |
| 8 | 41 762 | 0.79 ^c | 77.38 ^h | 50.53 ^{bc} | 54.50 ^f |
| 9 | 37 906 | 1.58 ^{def} | 87.46 ^l | 34.02 ^g | 54.80 ^f |
| 10 | 51 616 | 1.74 ^{ef} | 61.71 ^d | 12.46 ^h | 71.43 ^h |
| 11 | 45 190 | 2.52 ^e | 70.55 ^e | 8.04 ⁱ | 69.57 ^g |
| 12 | 29 859 | 1.97 ^f | 72.07 ^f | 4.74 ^j | 90.91 ^j |
| 13 | 42 899 | 2.96 ^h | 49.37 ^b | 1.95 ^k | 83.33 ⁱ |
| 对照 | 12 300 | 0.06 | 83.45 | 86.62 | |

注: 同列中不同上标字母表示各组间差异显著 ($P < 0.05$)

在受精后 15 min, 用 26 °C 和 28 °C 处理, 持续处理 20 min 组的 2 h 死亡率低于 15 min 组, 而孵化率和三倍体率高于 15 °C 组。30 °C 处理组恰恰相反, 持续处理 20 min 组的 2 h 死亡率高于 15 min 组, 而孵化率和三倍体率则低于 15 °C 组。在受精后 20 min, 用 26、28 °C 和 30 °C 处理, 持续处理 20 min 组的 2 h 死亡率高于 15 min 组(第 4 组除外), 同时也高于起始时间 15 min 处理 20 min 组; 而孵化率、三倍体率低于 15 °C 组和起始 15 min 处理 20 min 组。说明随着起始时间和持续时间的延长, 受精卵成活率降低, 特别是高温组。起始时间和持续时间都不应该超过 20 min。

2.2 诱导温度对实验结果的影响

受精卵经 24、26、28、30 °C 处理均获得了三倍体鱼(见表 2)。各实验组 2 h 死亡率差异较大, 都高于对照组。最高的是 1 组(24 °C) 8.01%, 其次是 4 组(26 °C) 7.21%, 其余各组在 0.14% ~ 2.96% 之间。温度对发眼率影响较小, 除第 6 组和 13 组发眼率接近 50% 外, 其它各组都在 80% 左右, 与对照组(83.45%) 接近, 最高为 93.84%(2 组)。温度对孵化率影响较大, 实验组孵化率最高的是 24 °C 组(68.35%), 最低的是 30 °C 组(1.95%)。30 °C 组平均孵化率只有 6.8%, 26 °C 和 28 °C 组孵化率也只有 50%(34.02% ~ 60.92%) 左右, 明显低于对照组(86.62%), 说明热休克处理对马苏大麻哈鱼受精卵的成活影响较大。温度对三倍体率的影响规律是: 随着温度的升高, 三倍体率逐渐升高, 最低的是 24 °C 组 13.3%, 最高的是 30 °C 组 90.91%。诱导温度是影响马苏大麻哈鱼三倍体诱导成功的关键因素。

2.3 三倍体诱导率

经流式细胞仪检测结果, 马苏大麻哈鱼二倍体 DNA 相对含量为 33, 三倍体 DNA 相对含量为 51 (见图 2)。经抽样检测, 各实验组三倍体率有一定差异, 最高的是 12 组(30 °C) 90.91%, 最低的是 1 组(24 °C) 13.3%。平均三倍体率: 24 °C 组 13.3%, 26 °C 组 31.65%, 28 °C 组 52.28%, 30 °C 组 78.81%。

3 讨论

3.1 诱导时间的确定

人工三倍体的诱导是通过保留受精卵第二极体来实现的。精子进入卵子时, 卵子正进入减数分裂中期, 数分钟后即释放出第二极体。通过物理或化

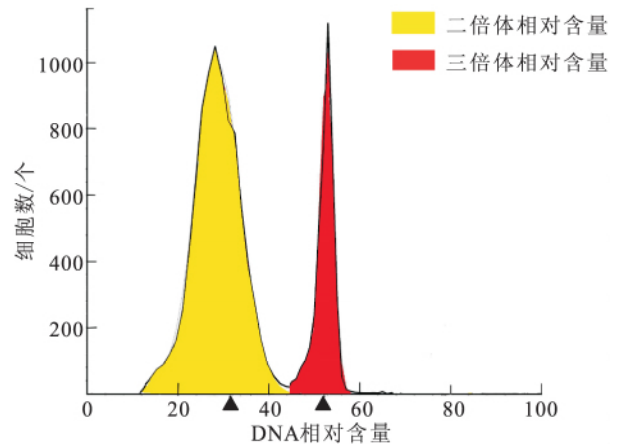


图2 二倍体和三倍体马苏大麻哈鱼 DNA 相对含量

Fig. 2 Relative DNA content of diploid and triploid *O. masou*

学的方法抑制第二极体排放, 受精卵中保留了两套雌核的染色体和一套雄核的染色体而成为三倍体。因此, 起始诱导时间非常重要, 处理过早第二极体没有形成, 外界刺激容易对卵子造成伤害。处理过晚第二极体已经释放完成, 不能形成三倍体胚胎。此外, 不同鱼类第二极体排放时间不同, 温水鱼类较早, 冷水鱼类较迟, 鲑科鱼类一般在 15 - 40 min。张燕萍等^[14]认为, 虹鳟授精后 15 min 是热休克敏感期, 此时第二极体已形成但未排出细胞外, 是获得三倍体的最佳时期。本实验在温度相同(26 °C 和 28 °C) 的条件下, 起始诱导时间 15 min 持续处理 20 min 的 2 h 死亡率、孵化率、三倍体率均高于起始诱导时间 20 min 持续处理 20 min。说明马苏大麻哈鱼受精后 15 min 已进入减数分裂晚期, 35 min 后第二极体已释放完毕, 此时段是获得三倍体的最佳时期。

楼允东^[11]认为, 温度休克诱导三倍体技术中, 随着持续时间的增加(在一定处理时间范围内), 诱导率也在增加。本实验 2 个温度组(26、28 °C) 受精后 15 min 进行诱导处理, 三倍体率持续诱导 20 min 组均高于持续诱导 15 min 组, 30 °C 组没有差异。说明在 26 ~ 28 °C 处理条件下, 受精后 30 - 35 min 仍有一部分受精卵处在第二极体排放阶段, 因此持续诱导时间应达到 20 min。

3.2 诱导温度的确定

宋立民等^[21-22]认为, 三倍体诱导需要适度的外界刺激, 刺激太小不能有效阻止第二极体排放, 刺激过大, 胚胎受到伤害, 存活率降低。张艳萍等^[14]采用三个不同温度(26.5、28、30 °C) 均可诱导出虹鳟三倍体, 26.5 °C 效果最佳, 30 °C 持续

处理超过 10 min 受精卵全部死亡或停止发育。陈春山等^[18]采用热休克法诱导细鳞鲑三倍体, 受精卵 2~4 h 死亡率和孵化率 28 °C 明显高于 26 °C。本实验处理温度 30 °C 组尽管三倍体率最高, 但孵化率只有 1.95%~12.46%, 明显低于其它各组, 说明 30 °C 是诱导的极限温度。

3.3 最佳诱导条件

王炳谦等^[13]采用热休克法诱导全雌虹鳟三倍体, 26 °C 效果好于 24 °C 和 28 °C 的, 最佳条件为卵子受精后 20 min, 26 °C 处理 20 min。张艳萍等^[14]热休克诱导虹鳟三倍体最佳条件是受精后 15 min, 26.5 °C 处理 10 min。Peter 等^[16]认为溪鳟受精卵受精 10 min 后, 在 11~12 °C 水中预处理后放入 28 °C 水刺激 10 min, 获得三倍体率达到 98% 以上。Duba 等^[18]美洲红点鲑三倍体最佳诱导条件是: 受精卵受精后 15 min, 用 28 °C 水刺激 10 min 或 20 min, 获得三倍体率分别为 53% 和 56%。按照 Gervai 等^[20]评分标准, 本实验条件下, 马苏大麻哈鱼三倍体诱导的最佳条件是: 水温 28 °C, 卵子受精后 15 min 持续处理 20 min, 评分结果为 57.79%。最佳诱导温度与虹鳟^[13-14]、金鳟^[15]、细鳞鲑^[19]不同, 与大西洋鲑^[17]、美洲红点鲑^[18]相同。处理时间与其它鲑科鱼类接近。鱼类温度休克敏感性的差异, 不仅与物种遗传背景有关, 还与卵子质量、亲鱼成熟度有关。本实验三倍体率较低, 是否与部分亲鱼个体较小卵子成熟度差异有关还有待进一步研究。综合评分结果如表 3 所示。

表 3 综合评分结果

Tab. 3 Comprehensive scoring results

| 组别 | 孵化率% | 三倍体率% | 评分结果 |
|----|-------|-------|-------|
| 1 | 41.01 | 5.32 | 46.33 |
| 2 | 24.8 | 9.32 | 34.12 |
| 3 | 29.4 | 16.48 | 44.08 |
| 4 | 36.33 | 13.32 | 49.65 |
| 5 | 23.64 | 13.32 | 36.96 |
| 6 | 28.5 | 18.68 | 47.18 |
| 7 | 36.55 | 21.24 | 57.79 |
| 8 | 30.32 | 21.8 | 52.12 |
| 9 | 20.41 | 21.92 | 42.33 |
| 10 | 7.48 | 28.57 | 36.05 |
| 11 | 4.82 | 27.83 | 32.65 |
| 12 | 2.84 | 36.36 | 39.2 |
| 13 | 1.17 | 33.33 | 34.5 |

参考文献:

- [1] 李思忠. 我国鲑科鱼类地理分布的探讨[J]. 动物学杂志, 1984, (1): 36-39.
- [2] 郑葆珊. 图们江鱼类[M]. 长春: 吉林人民出版社, 1980: 20-25.
- [3] 董崇智, 赵春刚. 马苏大麻哈鱼生物学及其增殖[J]. 水产学杂志, 1996, 9(2): 47-53.
- [4] 董崇智, 赵春刚. 绥芬河马苏大麻哈鱼陆封型种群生态学特征及资源保护[J]. 水产学杂志, 1997, 10(1): 38-42.
- [5] 张玉玲. 图们江马苏大麻哈鱼陆封型的生物学资料[J]. 水产科学, 1988, 7(4): 1-5.
- [6] 王昭明, 王新军, 陈惠, 等. 山女鳟人工受精孵化技术初步研究[J]. 水产学杂志, 2000, 13(2): 1-5.
- [7] 白庆力, 杨萍, 贾钟贺, 等. 山女鳟的生物学特性及繁殖力[J]. 水产学杂志, 2000, 17(2): 65-68.
- [8] 陈春山, 郑伟, 申慧卿, 等. 不同地区陆封型马苏大麻哈鱼人工养殖效果比较[J]. 水产科技情报, 2017, 44(2): 96-98, 102.
- [9] 陈春山, 魏凯, 常宝全, 等. 图们江陆封型马苏大麻哈鱼移植培育及全人工繁殖[J]. 水产学杂志, 2018, 31(1): 1-6.
- [10] 陈春山, 郭明磊, 杜迎春, 等. 图们江陆封型马苏大麻哈鱼的个体繁殖力[J]. 水生态学杂志, 2018, 39(1): 124-129.
- [11] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 117-149.
- [12] 吴萍. 我国鱼类多倍体育种的研究进展[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(1): 72-78.
- [13] 王炳谦, 徐连伟, 贾钟贺, 等. 热休克诱导全雌虹鳟三倍体[J]. 水产学杂志, 2005, 18(2): 22-27.
- [14] 张艳萍, 王太, 俞小牧, 等. 热休克诱导虹鳟三倍体的最佳条件[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2011, 47(6): 69-74.
- [15] 贾钟贺, 徐革锋, 牟振波, 等. 金鳟伪雄鱼的制备及全雌三倍体的诱导[J]. 大连水产学院学报, 2009, 24(1): 8-11.
- [16] Johnstone R. Induction of triploidy in Atlantic salmon by heat shock[J]. Aquaculture, 1985, 49(2): 133-139.
- [17] Peter F, Galbreath B L. Optimization of thermal shock protocols for induction of triploidy in brook trout[J]. N A J Aquacult, 2000, 62(4): 249-259.
- [18] Dube P, 卢怡. 热刺激诱导美洲红点鲑三倍体[J]. 国外水产, 1992, (3): 31-34.
- [19] 陈春山, 魏凯, 韩姝伊, 等. 热休克诱导细鳞鲑三倍体的初步研究[J]. 淡水渔业, 2018, 48(6): 3-11.
- [20] Gervai J, Peter S, Nagy A, et al. Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio*[J]. J Fish Biol, 1980, 17(6): 667-671.
- [21] 宋立民, 杨毅, 王卫民, 等. 热休克诱导黄颡鱼三倍体的研究[J]. 水产科学, 2010, 29(6): 352-355.
- [22] 宋立民, 王卫民, 周小云, 等. 冷、热休克法诱导黄颡鱼三倍体的比较研究[J]. 水产科学, 2010, 34(5): 768-776.

Preliminary study on heat shock-induced triploid of *Oncorhynchus masou*

WEI Kai¹, ZHENG Wei², SHI Xiao¹, HE Ya-peng¹, HAN Shu-yi^{3 #}, DONG Ying⁵, CHEN Chun-shan¹

(1. Beijing Aquatic Wildlife Rescue and Conservation Centre, Beijing 102100, China;

2. Aquatic Technology Extension Station of Yanbian Autonomous Prefecture of Jilin Province, Yanji 133001, Jilin, China;

3. Institute of Zoology CAS, Beijing 100101, China; 4. Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China;

5. Beijing Fisheries Research Institute, Beijing 100068, China)

Abstract: The triploid induction experiments of thirteen groups by heat shock was conducted to explore the method of triploid breeding of *Oncorhynchus masou* and solve the problem of the smaller individual, slower growth and higher mortality after sexual maturity. Twelve groups in the condition of two different fertilisation time (15 min, 20 min) and duration time (15 min, 20 min) at 26 °C, 28 °C and 30 °C were compared with the optimal treatment conditions at 24 °C. The results showed that triploid individuals were induced in all thirteen groups and it could be estimated that temperature was the critical factor. The average induction rate in the same temperature was 13.3%, 31.65%, 52.28% and 78.81%, respectively. As the temperature rises, the hatching rate tended to decrease significantly. The results indicated that the induced condition by heat shock was feasible and the best condition was 15 min after fertilisation 20 min for the duration under the condition of 28 °C. The eyed rate was 72.57% ± 0.26%, the hatching rate was 60.92% ± 0.31% and the induced rate was 53.1%, respectively.

Key words: *Oncorhynchus masou*; landlocked group; triploid; heat shock