

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101884314 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 23

(21) 申请号 201010236641. 9

毛铭庭

(22) 申请日 2010. 07. 26

梁桂霞. 草鱼、团头鲂卵球杂交受精的细胞学研究. 《西北师范大学学报(自然科学版)》. 1985, (第3期), 20-25.

(73) 专利权人 湖南师范大学

地址 410081 湖南省长沙市岳麓区麓山路36号湖南师范大学生命科学院发育生物学研究室

审查员 杜长亮

(72) 发明人 刘少军 刘筠 周工健 罗凯坤

陶敏 张纯 张虹 何伟国 肖军
胡婕 刘刚 赵如榕

(74) 专利代理机构 湖南兆弘专利事务所 43008

代理人 赵洪 杨斌

(51) Int. Cl.

A01K 61/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101341859 A, 2009. 01. 14,

CN 1518864 A, 2004. 08. 11,

CN 1871902 A, 2006. 12. 06,

CN 1709046 A, 2005. 12. 21,

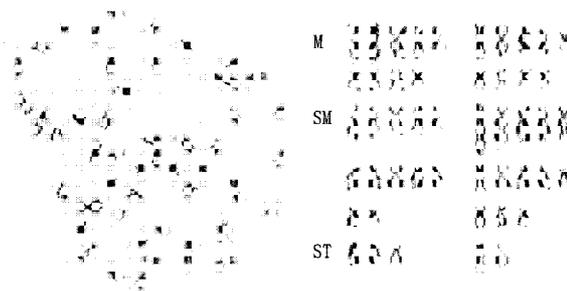
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 6 页

(54) 发明名称

草鱼与团头鲂亚科间远缘杂交的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种鲤科鱼类中亚科间远缘杂交的方法,具体公开了一种草鱼与团头鲂亚科间远缘杂交的方法,包括以下步骤:首先挑选雌性草鱼和雄性团头鲂作为亲鱼进行专池培育,然后在繁殖季节对所述亲鱼进行人工催产,挑选催产效果良好的亲鱼进行干法人工授精,对授精完成后的受精卵进行流水孵化,孵化的鱼苗在大面积的水泥池中进行饲养,对饲养后的杂交鱼进行检测、筛分,获得三倍体草鲂和二倍体草鲂。本发明的方法受精率高、孵化率高、后代性状优良,对遗传育种具有重要意义。



1. 一种草鱼与团头鲂亚科间远缘杂交的方法,包括以下步骤:首先,在繁殖期前3~4个月,挑选雌性草鱼和雄性团头鲂作为亲鱼进行专池培育,在繁殖期前一个月以精饵饲养所述亲鱼,每隔2~3天流水刺激一次;然后在繁殖季节对所述亲鱼进行人工催产,挑选产卵顺利的母亲亲鱼和产精量大的父亲亲鱼进行干法人工授精,对授精完成后的受精卵置于水温为19℃~20℃的孵化环道或人工孵化器中进行流水孵化,鱼苗全部孵出后,于孵化环道或人工孵化器中继续培育2~3天,待鱼苗出现腰点后将鱼苗转入预先培肥的水泥池中饲养,1~2天后泼洒豆浆,2~3次/天,鱼苗长成后,对饲养后的杂交鱼进行检测、筛分,获得三倍体草鲂和二倍体草鲂;

所述的检测操作具体是指利用流式细胞DNA含量测定法、外周血细胞培养的染色体倍性检测方法和血涂片法对饲养后的鱼苗分别进行DNA含量、染色体数目以及血细胞大小的检测。

草鱼与团头鲂亚科间远缘杂交的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种鱼类杂交的方法,尤其涉及一种鲤科鱼类中亚科间远缘杂交的方法。

背景技术

[0002] 亲缘关系在种间或种间以上的杂交一般称为远缘杂交,它是鱼类性状改良常用的方法。远缘杂交作为一种重要的鱼类遗传育种和性状改良方法,它可以整合整套外源基因,从而改变杂交后代基因的表达调控,使得杂交后代可能在生长速度、抗逆性、抗病性以及肉质等方面表现出杂种优势。如红鲫与湘江野鲤的属间远缘杂交形成的杂交后代具有生长速度快、肉质鲜嫩、抗病力强、存活率高等优点,并且通过多代遗传选育,筛选出了两性可育的异源四倍体鲫鲤群体;红鲫与团头鲂的亚科间远缘杂交形成的三倍体杂交后代具有体背明显增高、外形优美等优点。

[0003] 如何利用和改进现有的生物学技术和方法,挑选合适的亲本鱼进行远缘杂交,对其进行遗传改良以获得性状更为优良、品种更加丰富和对遗传研究更有意义的新型多倍体鱼,已成为本领域技术人员长期面临和需要解决的问题。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种受精率高、孵化率高、后代性状优良、且对遗传育种具有重要意义草鱼与团头鲂亚科间远缘杂交的方法。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明提出的技术方案为一种草鱼与团头鲂亚科间远缘杂交的方法,包括以下步骤:首先挑选雌性草鱼和雄性团头鲂作为亲鱼进行专池培育,然后在繁殖季节对所述亲鱼进行人工催产,挑选催产效果良好的亲鱼进行干法人工授精,对授精完成后的受精卵进行流水孵化,孵化的鱼苗在大面积的水泥池中进行饲养,对饲养后的杂交鱼进行检测、筛分,获得三倍体草鲂和二倍体草鲂。

[0006] 上述的技术方案优选按以下具体的操作步骤进行:

[0007] 1) 亲鱼的选择和培育:在繁殖期前3~4个月,挑选性成熟特征明显、体征良好的雌性草鱼和雄性团头鲂作为远缘杂交的亲鱼进行专池培育,保持水质良好;在繁殖期前一个月以精饵饲养所述亲鱼,每隔2~3天流水刺激一次,以促进亲鱼性腺发育成熟;体征良好的亲鱼一般表现为体型好、体色鲜艳、体质健壮、无病无伤;

[0008] 2) 人工催产:在同年的5月中旬至6月上旬,当水温稳定在20℃以上时,为上述亲鱼注射黄体素释放激素类似物(LRH-A)、绒毛膜促性腺激素(HCG)与地欧酮的混合催产剂进行催产,所述黄体素释放激素类似物的用量为2μg/kg~3μg/kg,绒毛膜促性腺激素的用量为100IU/kg~150IU/kg,地欧酮的用量为1mg/kg~1.5mg/kg;先注射母本亲鱼,4h~5h后再注射父本亲鱼,父本亲鱼的注射剂量减半;注射完毕后按1:(6~8)的数量比将母、父本亲鱼放入同一产卵池中(水面面积为80m²左右的产卵池),然后视水情及时向池中冲水,尤其在产卵前3h~4h,注入一定水量后,停止注水,让鱼在静水中催产,直至其

开始顺利产卵和产精；注射时优选采用胸鳍基部无鳞处腹腔一针注射法，以提高亲鱼的存活率；

[0009] 3) 授精孵化：挑选产卵顺利的母亲亲鱼，可以用我们特制的帆布担架固定，以便于操作和减少对母亲亲鱼的损伤；然后与产精量大的父亲亲鱼进行干法人工授精，得到的受精卵置于水温为 19℃～20℃的孵化环道或人工孵化器中进行流水孵化；

[0010] 4) 饲养：鱼苗全部孵出后，于孵化环道或人工孵化器中继续培育 2～3 天，待鱼苗出现腰点后将鱼苗转入预先培肥的水泥池中饲养，1～2 天后泼洒豆浆，2～3 次/天，鱼苗长大后经检测、筛分获得三倍体草鲂和二倍体草鲂。

[0011] 上述的技术方案中，所述的检测操作优选是指利用流式细胞 DNA 含量测定法、外周血细胞培养的染色体倍性检测方法和血涂片法对饲养后的鱼苗分别进行 DNA 含量、染色体数目以及血细胞大小的检测。

[0012] 上述技术方案中的草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus* (C. et V.)) 隶属于鲤形目，鲤科，雅罗鱼亚科中的二倍体鱼 ($2n = 48$)，典型的草食性鱼类，生长速度快，是池塘主要养殖鱼类之一，但其易感染疾病，成活率不高；团头鲂 (*Megalobrama amblycephala* Yih) 隶属于鲤形目，鲤科，鲂亚科，鲂属中的二倍体鱼 ($2n = 48$)，体高侧扁，尾柄高而短，体型优美，草食性，抗逆性强，肉质细嫩、腴美，脂肪丰富。与现有技术相比，本发明的优点在于通过反复实验选择草鱼作为母本亲鱼，团头鲂作为父本亲鱼，二者进行远缘杂交获得了具备多种杂交优势的三倍体草鲂和二倍体草鲂。本发明的远缘杂交方法具有受精率和孵化率高的特点，成功地解决了许多远缘杂交后代不能存活或存活率较低的问题；且本发明杂交方法获得的三倍体草鲂和二倍体草鲂不仅体型美观（体背高），在饲养过程中很少发生疾病或死亡的情况，具有抗病力强的特点。另外，以本发明的远缘杂交方法为基础，还有望通过多代选育从二倍体草鲂中获得四倍体草鲂群体；且三倍体草鲂不育，生长速度快，其生长速度是二倍体草鲂的 2.7 倍，也具有良好的市场前景。考虑到三倍体草鲂和二倍体草鲂中都具有团头鲂的遗传物质，因此本发明方法得到的杂交鱼的肉质有望得到改良，本发明中三倍体草鲂和二倍体草鲂的获得，在生物进化和鱼类遗传育种方面具有重要的生物学意义。

附图说明

[0013] 图 1 为本发明实施例中草鱼 (♀) × 团头鲂 (♂) 后代中二倍体草鲂的外形照片；

[0014] 图 2 为本发明实施例中草鱼 (♀) × 团头鲂 (♂) 后代中二倍体草鲂的染色体图及核型图 ($2n = 48$)；

[0015] 图 3 为本发明实施例中草鱼 (♀) × 团头鲂 (♂) 后代中三倍体草鲂的外形照片；

[0016] 图 4 为本发明实施例中草鱼 (♀) × 团头鲂 (♂) 后代中三倍体草鲂的染色体图及核型图 ($3n = 72$)；

[0017] 图 5 为本发明实施例中草鱼的 DNA 含量图；

[0018] 图 6 为本发明实施例中草鱼 (♀) × 团头鲂 (♂) 后代中二倍体草鲂的 DNA 含量图；

[0019] 图 7 为本发明实施例中草鱼 (♀) × 团头鲂 (♂) 后代中三倍体草鲂的 DNA 含量图；

图；

[0020] 图 8 为本发明实施例中草鱼的血涂片图 (100×)；

[0021] 图 9 为本发明实施例中草鱼 (♀) × 团头鲂 (♂) 后代中二倍体草鲂的血涂片图 (100×)；

[0022] 图 10 为本发明实施例中草鱼 (♀) × 团头鲂 (♂) 后代中三倍体草鲂的血涂片图 (100×)。

具体实施方式

[0023] 实施例

[0024] 在繁殖期前 3 ~ 4 个月,挑选性成熟特征明显、体型好、体色鲜艳、体质健壮、无病无伤的雌性草鱼和雄性团头鲂作为远缘杂交的亲鱼进行专池培育,保持水质良好。特别是在繁殖期前一个月左右合理投喂饲料,以精饵饲养亲鱼,每隔 2 ~ 3 天流水刺激一次,以促进亲鱼性腺发育成熟。

[0025] 在同年的 5 月中旬至 6 月上旬,当水温稳定在 20℃ 以上时,为挑选的亲鱼注射 LRH-A、HCG 与地欧酮的混合催产剂进行催产,LRH-A 的用量为 2 μg/kg ~ 3 μg/kg, HCG 的用量为 100 ~ 150 IU/kg,地欧酮的用量为 1 ~ 1.5 mg/kg;先注射母本亲鱼,4h ~ 5h 后再注射父本亲鱼,父本亲鱼的注射剂量减半;注射完毕后按 1 : (6 ~ 8) 的数量比将母、父本亲鱼放入同一水面面积为 80m² 左右的产卵池中,然后视水情及时向池中冲水,尤其在产卵前 3h ~ 4h,注入一定水量后,停止注水,让鱼在静水中催产,直至其开始顺利产卵和产精;注射时采用胸鳍基部无鳞处腹腔一针注射法,以提高亲鱼的存活率。

[0026] 当发现亲鱼在产卵池中相互追逐后,开始拉网打捞,对亲鱼进行检测(注意要用软质网,操作要轻,水中检测,并且检测母本草鱼时用特制的帆布担架),将催产效果良好的雌性草鱼用特制的帆布担架包裹固定,然后与雄性团头鲂进行干法人工授精,把精卵挤入干净的瓷盆中,用干净的搅拌器迅速不停地搅拌 2min ~ 3min,然后迅速将受精卵轻轻倒入事先准备好的孵化环道(或人工孵化器)中进行流水孵化,密度控制在 40000 ~ 50000 粒/m² 左右,水温控制在 19℃ ~ 20℃ 之间。

[0027] 鱼苗全部孵出后,先于孵化环道中培育 2 ~ 3 天,待鱼苗出现腰点后,将鱼苗转入预先培肥的面积为 100m² 的水泥池中饲养,1 ~ 2 天后泼洒豆浆,2 ~ 3 次/天,力求细、匀,直至鱼苗长到能正常摄食。

[0028] 孵化期间,统计胚胎的受精率和孵化率。草鱼与团头鲂远缘杂交鱼的受精率和孵化率分别为 95% 和 80%,相比同类杂交试验,其受精率和孵化率得到了显著地提高。

[0029] 再用外周血细胞培养的染色体倍性检测方法对上述杂交鱼的体细胞染色体数目进行抽样检测,我们发现草鱼与团头鲂杂交鱼中存在两种倍性的个体,一种为二倍体 (2n = 48),含有一套草鱼染色体和一套团头鲂染色体(参见图 2),我们称其为二倍体草鲂;另一种为三倍体 (3n = 72),含有两套草鱼染色体和一套团头鲂染色体(参见图 4),我们称其为三倍体草鲂。

[0030] 同时,以普通草鱼为参照,用流式细胞仪测定上述筛选出的二倍体草鲂和三倍体草鲂红细胞中的 DNA 含量,测定结果分别如图 5、图 6、图 7 所示。分析图中数据可知,草鱼、二倍体草鲂和三倍体草鲂的 DNA 平均含量分别为 60.56、68.63 和 98.19,二倍体草鲂与对照

草鱼的 DNA 平均含量比值为 1.133, 该比值与预计的 1 : 1 理论比值间无显著差异 ; 三倍体草鲂与对照草鱼的 DNA 平均含量比值为 1.621, 该比值与预计的 1.5 : 1 理论比值间无显著差异。可见, 流式细胞 DNA 含量测定法的试验结果与外周血细胞培养的染色体倍性检测方法获得的结果是一致的。

[0031] 另外再以普通草鱼为参照, 用血涂片法比较上述筛选出的十二个月龄的二倍体草鲂与三倍体草鲂红细胞大小, 结果如下表 1 所示 :

[0032] 表 1 : 草鱼、二倍体草鲂及三倍体草鲂的血细胞大小比较

[0033]

| | 长轴 (A μm) | 短轴 (B μm) | 面积 (S= π *A*B/4 μm^2) |
|-------|-----------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| 草鱼 | 9.89 \pm 0.89 | 5.71 \pm 0.43 | 44.09 \pm 2.78 |
| 二倍体草鲂 | 9.12 \pm 0.91 | 5.79 \pm 0.35 | 41.37 \pm 4.01 |
| 三倍体草鲂 | 11.01 \pm 0.60 | 6.29 \pm 0.48 | 54.67 \pm 3.28 |

[0034] 由表 1 的比较分析可见, 二倍体草鲂血细胞大小与母本草鱼血细胞的大小相近, 而三倍体草鲂血细胞的大小明显要比草鱼和二倍体草鲂血细胞要大 (参见图 8、图 9、图 10)。另外, 在二倍体草鲂中未发现“哑铃状”细胞核血细胞, 而在三倍体草鲂中发现有“哑铃状”细胞核血细胞 (参见图 10 中黑色箭头所指处)。

[0035] 在相同条件下, 我们对上述培育出的十二个月龄的二倍体草鲂、三倍体草鲂、草鱼、团头鲂的体重、侧线鳞数、侧线上鳞数、侧线下鳞数、背鳍条数、腹鳍条数、臀鳍条数等生物学性状进行随机抽样检测, 检测的结果如下表 2、表 3 所示 :

[0036] 表 2 : 二倍体草鲂与三倍体草鲂生长速度比较 (单位 : 克)

[0037]

| | 体重 | 体重比值 (三倍体草鲂/二倍体草鲂) |
|-------|-------------------|--------------------|
| 二倍体草鲂 | 144.30 \pm 3.44 | |
| 三倍体草鲂 | 384.10 \pm 8.71 | 2.66 \pm 0.09 |

[0038] 表 3 : 草鱼、团头鲂及杂交后代的可数性状比较 (单位 : 片或条)

[0039]

| | 侧线鳞 | 侧线上鳞 | 侧线下鳞 | 背鳍条 | 腹鳍条 | 臀鳍条 |
|-------|-------|------|------|---------|------|-----------|
| 草鱼 | 39~42 | 6~7 | 4~5 | III+7 | 8 | III+8 |
| 团头鲂 | 49~52 | 9~10 | 9~11 | III+8-9 | 8~10 | III+25~27 |
| 二倍体草鲂 | 46~47 | 8 | 6 | III+8 | 8 | III+15~16 |
| 三倍体草鲂 | 43~46 | 8 | 5~6 | III+9 | 8~9 | III+12~14 |

[0040] 注：上表中大写的罗马数字代表硬棘条的数目，阿拉伯数字代表鳍条的数目。

[0041] 由上表 2 可见，三倍体草鲂的生长速度要明显快于二倍体草鲂（三倍体草鲂的生长速度是二倍体草鲂的 2.7 倍）。由上表 3 可见，二倍体草鲂（参见图 1）和三倍体草鲂（参见图 3）具有杂交特征，例如二倍体草鲂与三倍体草鲂的侧线鳞数分别为 46 ~ 47、43 ~ 46，介于草鱼的 39 ~ 42 和团头鲂的 49 ~ 52 之间；二倍体草鲂与三倍体草鲂的部分性状则偏向父本，例如背鳍条式分别为 III+8 和 III+9，均超过了其母本 III+7 的范围，靠近父本的 III+8 ~ 9。另外，从图 1、图 3 所示的杂交鱼外形图上比较可以发现，虽然两种杂交鱼貌似其母本草鱼，但是也显示出父本团头鲂的高背特征，例如二倍体草鲂和三倍体草鲂的侧线上鳞数与侧线下鳞数（分别为 8、6 和 8、5 ~ 6）都要高于其母本草鱼的（6 ~ 7、4 ~ 5），表现出体形优美的特征。

[0042] 由上可见，本实施例方法获得的三倍体草鲂和二倍体草鲂，不仅遗传了父母本亲鱼的多项优良性状，还具有受精率和孵化率高的特点，在生物进化研究和鱼类遗传育种方面具有重要的生物学意义。

[0043] 本实施例中，外周血细胞培养的染色体倍性检测方法操作步骤为：1) 在超净工作台中配制培养基，100ml 培养基含以下成分：84ml RPMI-1640，15ml 小牛血清，2 支 PHA，1ml 0.1% 的肝素钠，以 7.5% NaHCO₃（无菌）或 1N HCl 调 pH 至 7.2 ~ 7.4；2) 用注射器吸取少量灭菌肝素钠溶液，于用碘酒消毒后的实验鱼尾部静脉取血；3) 按每 10ml 培养液中加入约 0.2ml 抗凝血的标准将抗凝血加入培养基中，于 24℃ 5% 二氧化碳浓度的培养箱中培养 68h ~ 72h，培养期间，定期轻摇匀，以使细胞充分接触培养基；4) 终止培养前 24h，在培养液中用 1ml 注射器滴加 10 μg/ml 的秋水仙碱，使终浓度为 0.05 μg/ml ~ 0.07 μg/ml（以上步骤 1 ~ 4 均需无菌操作）；5) 将培养物全部转入洁净的 10ml 离心管中，以 1000rpm 离心 5min，弃上清液；6) 向离心管中加入低渗液 9ml，混匀，低渗 25min ~ 30min；7) 加入 1ml 固定液，轻轻混匀后 1000rpm 离心 5min，弃上清液；8) 加入 5ml 固定液，轻轻混匀，静置 20min 后 1000rpm 离心 5min，弃上清液；9) 重复步骤 4 一次；10) 视最后细胞数量多少加入适量固定液制成细胞悬液（一般为 1ml ~ 2ml）后，吸取细胞悬液自 20cm ~ 30cm 高处滴片，轻吹散，空气中自然干燥；11) Giemsa 染液染色 20min ~ 40min，细水流冲洗载玻片背面去除染液，气干后镜检、拍照。

[0044] 本实施例中，流式细胞 DNA 含量测定法的操作步骤为：用经肝素钠润湿的一次性注射器从鱼尾静脉血管采血约 0.2mL，注入装有 0.8% 生理盐水的 Eppendorf 管中，在血液和生理盐水混合液中加入 1mL 细胞核提取液 DAPI-A (nuclei extraction solution, 德国 Partec GmbH 提供)，处理时间 10min ~ 15min；样品经过 20 μm 尼龙滤器（德国 Partec GmbH 提供）过滤；DNA 染色液 (DAPI-B, 德国 Partec GmbH 提供) 静置于暗处染色样品约 5min ~ 10min，然后上机检测。

[0045] 本实施例中，血涂片法的操作步骤为：1) 用碘酒棉签擦拭鱼尾静脉部位，用一次性注射器取适量血液，轻推一滴于干净载玻片一端，使血滴附于玻片面上；2) 以一只手拿该载玻片的两端，迅速用另一只手拿住另一载玻片的一端，在滴有血液的载玻片上由前向后接触血滴，使两载玻片约成 45° 角，轻轻移动，使血滴成一直线，然后由前向后推为一均匀的薄片；3) 涂片在空气中干燥后置于染色架上，滴加瑞氏染色液，使涂片被染色液覆盖；4) 染色 5min ~ 10min 后，于载玻片背面用蒸馏水均匀冲洗，见涂片呈粉红色后，自然晾干，最后镜检。

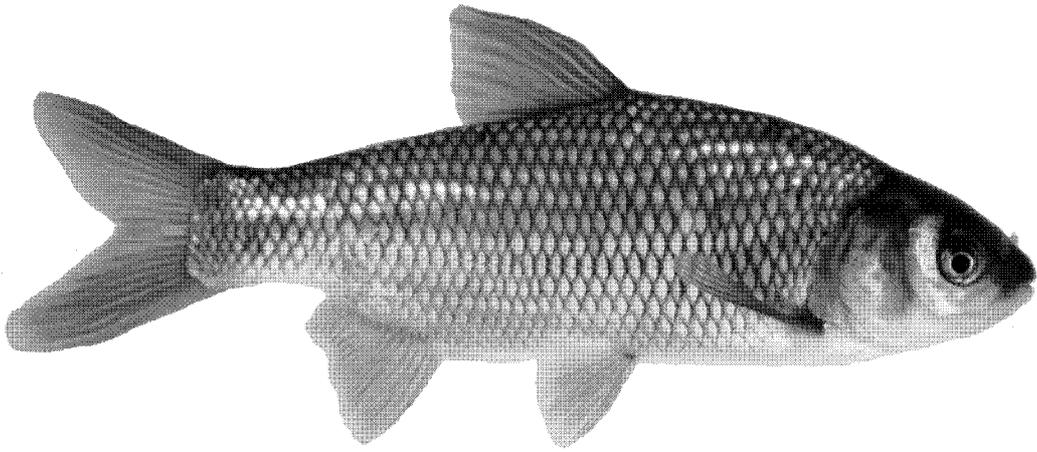


图 1

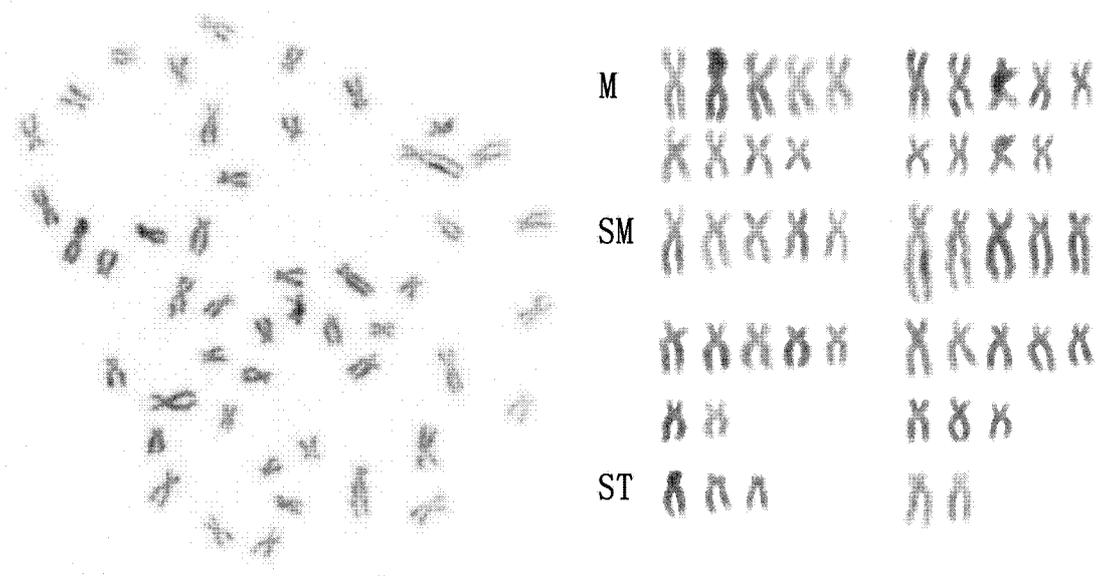


图 2

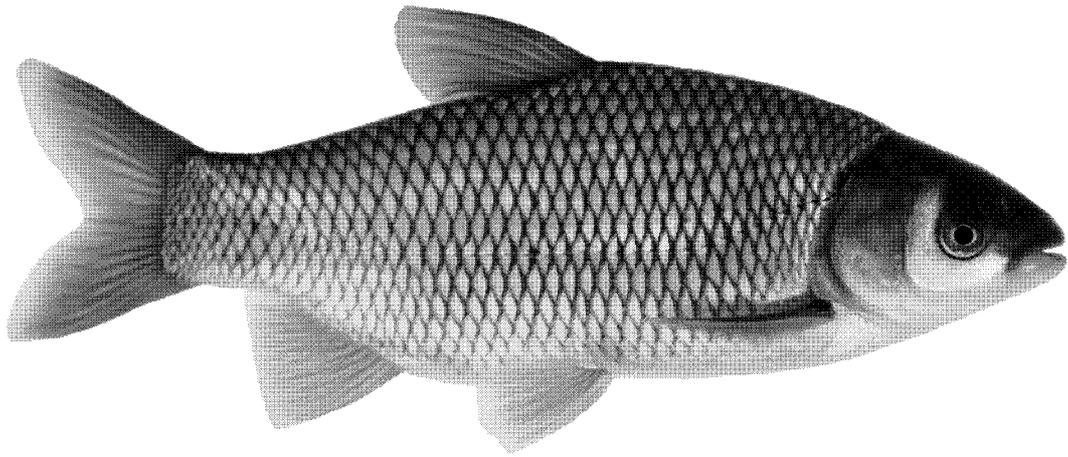


图 3

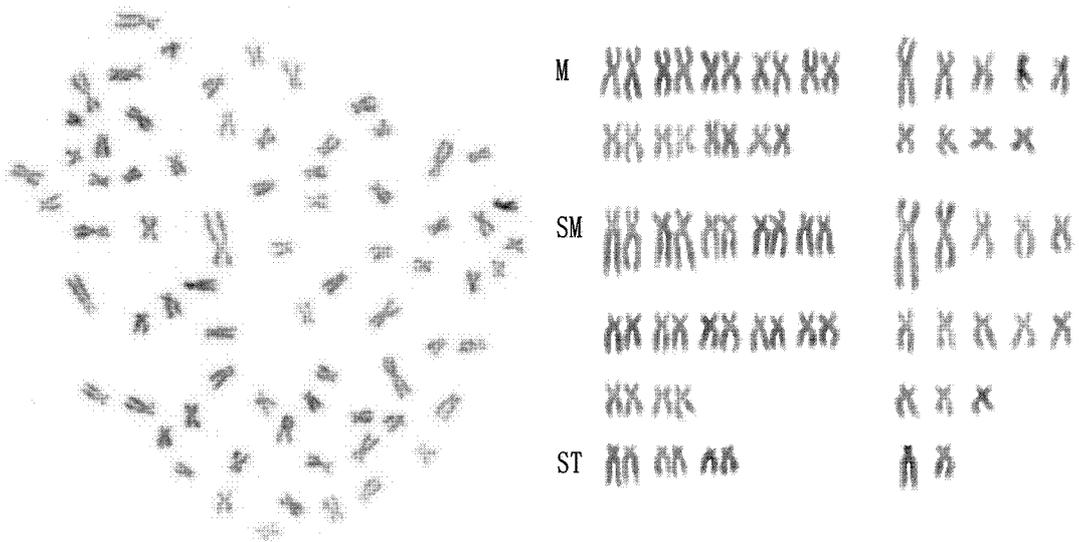


图 4

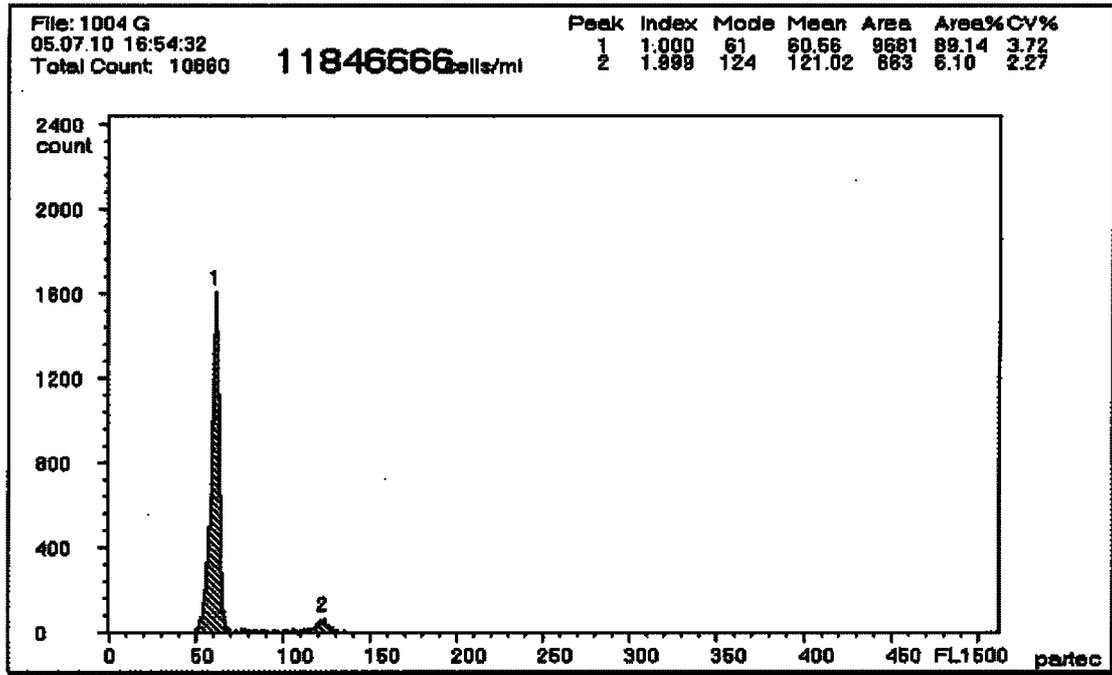


图 5

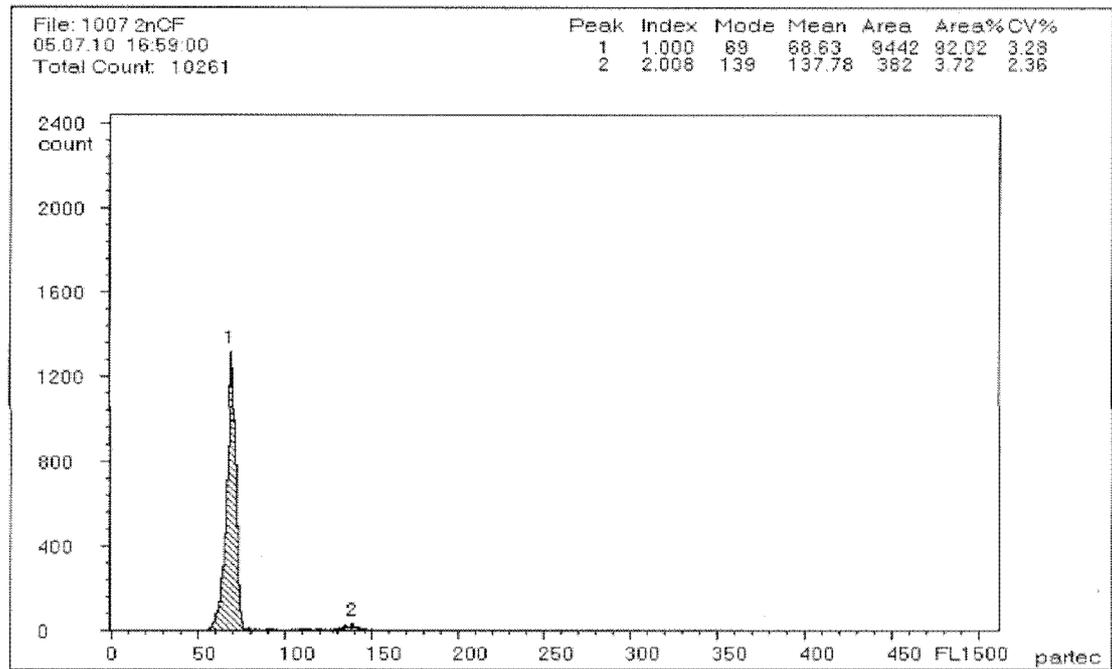


图 6

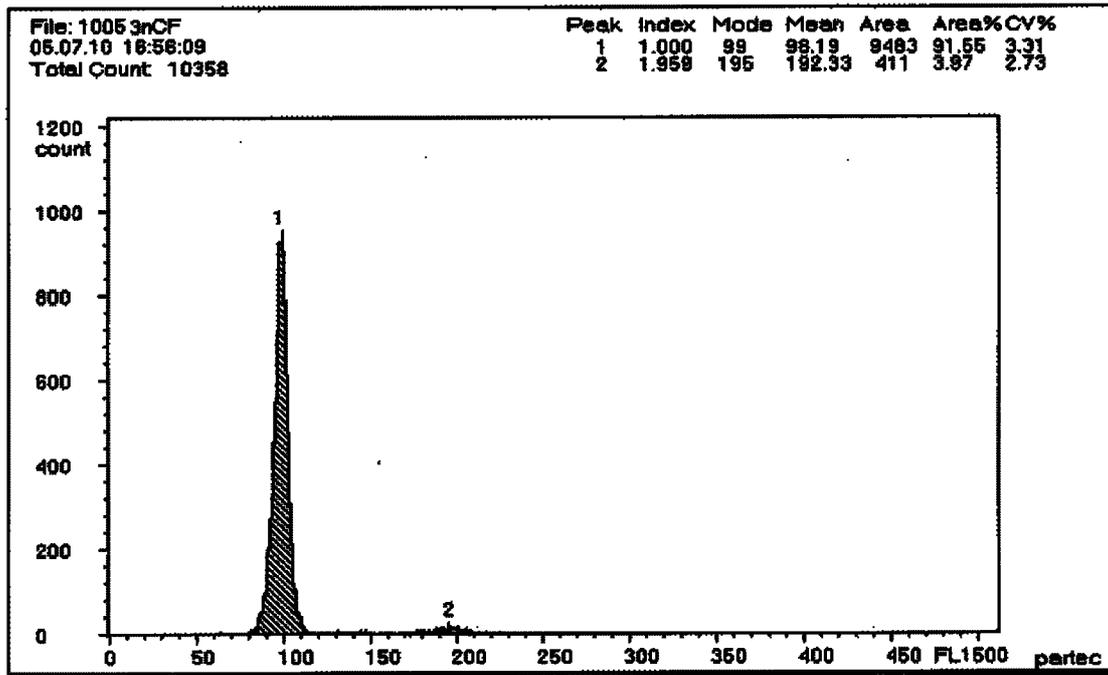


图 7

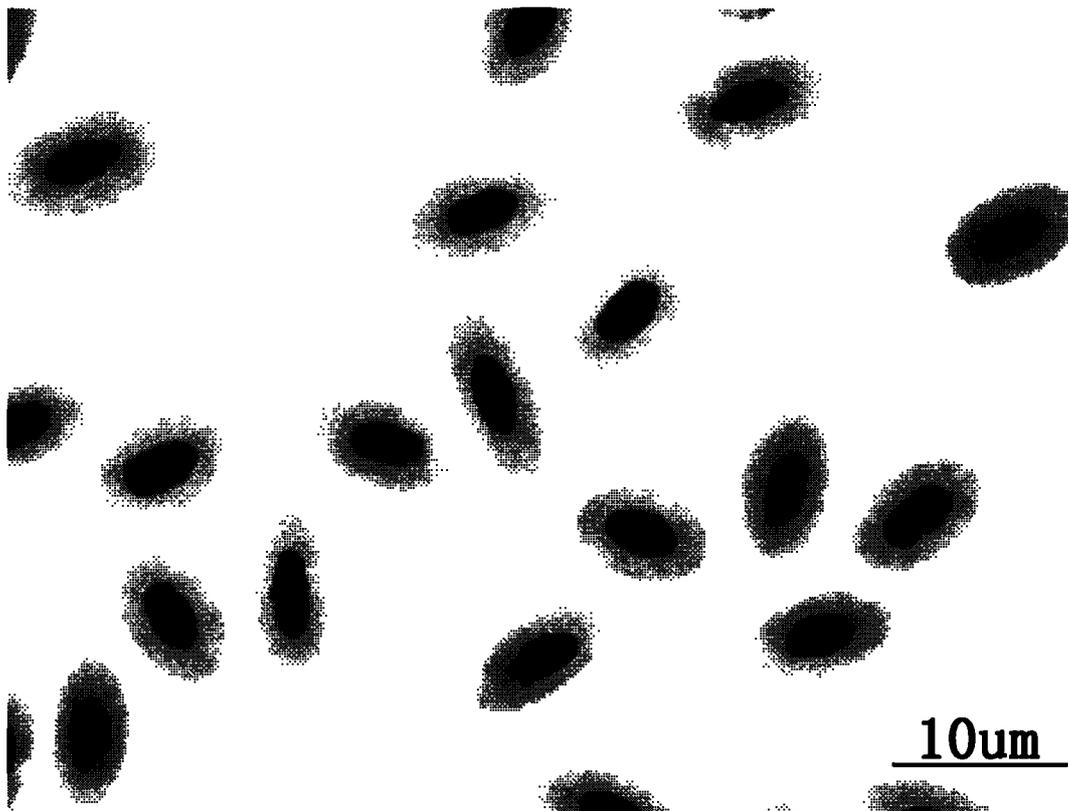


图 8

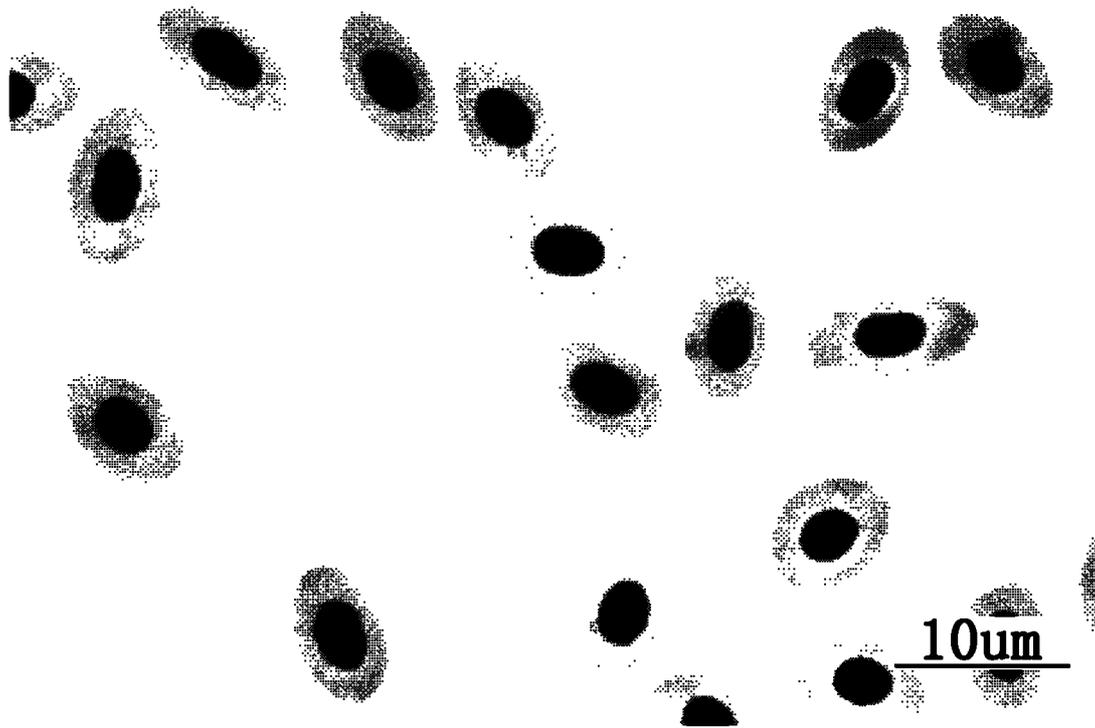


图 9

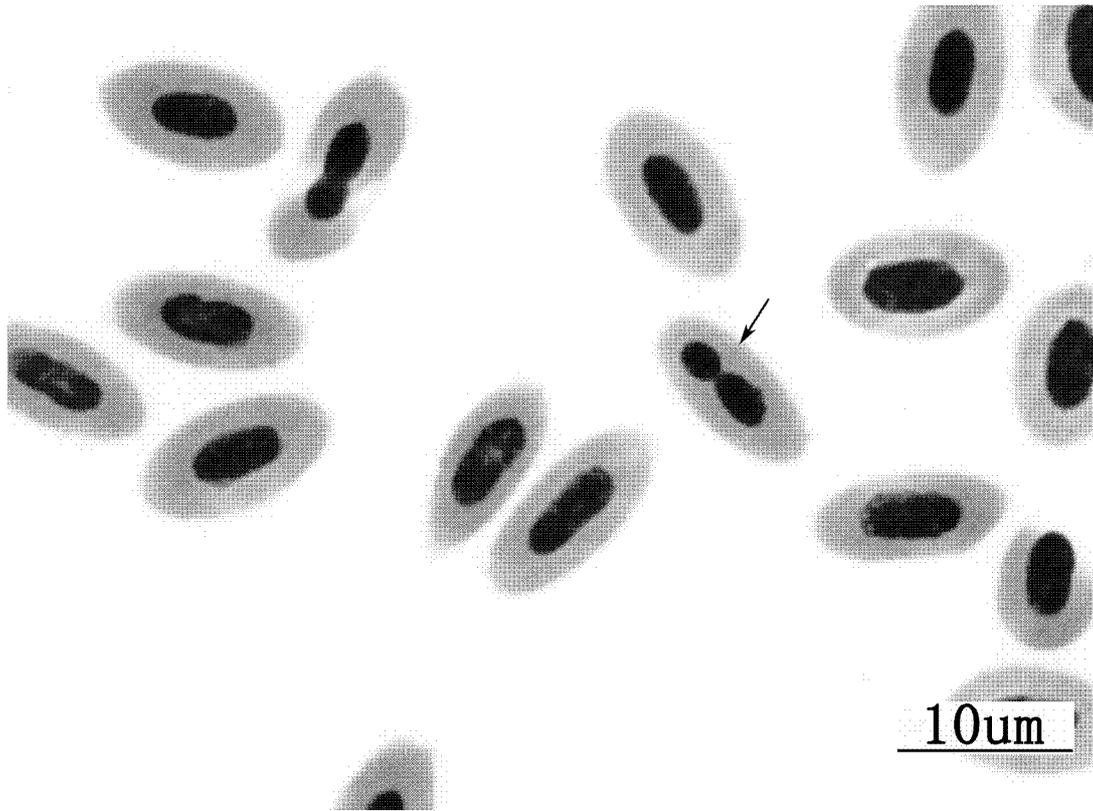


图 10