



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106577382 B

(45)授权公告日 2019.08.20

(21)申请号 201611071960.2

(22)申请日 2016.11.29

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106577382 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(73)专利权人 浙江省海洋水产研究所
地址 316021 浙江省舟山市定海区临城体育路28号

(72)发明人 刘峰 楼宝 陈睿毅 詹炜

(74)专利代理机构 杭州浙科专利事务所(普通合伙) 33213

代理人 吴秉中

(51)Int.Cl.

A01K 61/10(2017.01)

A01K 61/95(2017.01)

(56)对比文件

CN 101699998 A,2010.05.05,

CN 101699998 A,2010.05.05,

CN 102144596 A,2011.08.10,

CN 102630616 A,2012.08.15,

CN 104904636 A,2015.09.16,

CN 102870719 A,2013.01.16,

楼宝等.小黄鱼全人工繁育技术研究.《浙江海洋学院学报》.2016,第35卷(第5期),

审查员 窦碧霞

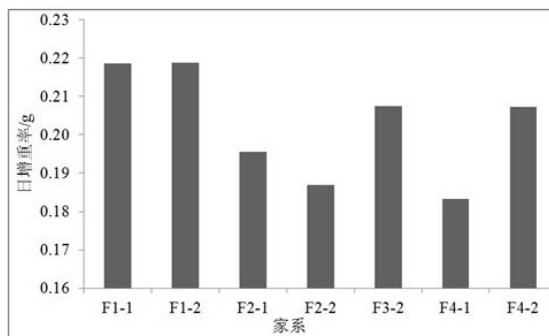
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种小黄鱼家系构建及优良家系选育方法

(57)摘要

一种小黄鱼家系构建及优良家系选育方法,属于水产养殖领域中的鱼类良种选育方法。其包括以下步骤:1)小黄鱼亲鱼获得;2)小黄鱼家系构建;3)家系标准化培育;4)小黄鱼家系荧光标记;5)快速生长家系的筛选。采用上述方法,可以通过构建小黄鱼家系,采用标准化方法进行苗种培育,培育后期对家系进行荧光标记并进行混合养殖,两种方法可有效排除不同养殖环境对家系生长的影响,家系标记时测定体质量作为协变量带入到家系筛选分析模型中,更进一步排除环境因素的影响,可以准确高效的筛选出生长快速的家系。



1. 一种小黄鱼家系构建及优良家系选育方法,其特征在于包括以下步骤:1)小黄鱼亲鱼获得;2)小黄鱼家系构建;3)家系标准化培育;4)小黄鱼家系荧光标记;5)快速生长家系的筛选;

所述步骤1)小黄鱼亲鱼获得具体包括:

取野生小黄鱼繁殖的F1个体和野生小黄鱼作为亲鱼,分别进行强化培育,其中饵料为活沙蚕,拌以3%的维生素C;次年自然水温达到15℃时,观察亲鱼性腺发育情况,挑选出性腺发育良好的亲鱼,准备用于构建家系;

所述步骤2)小黄鱼家系构建具体包括:

a家系构建:

从步骤1)中的亲鱼中挑选出性腺发育至V期的F1养殖小黄鱼雌鱼10尾,野生小黄鱼雄鱼5尾,进行人工催产,雌鱼注射催产剂量:LRH-A₂ 0.25μg + HCG 100IU/kg鱼体重,雄鱼注射剂量减半,注射催产剂后的F1养殖小黄鱼雌鱼放入亲鱼培育桶中,野生小黄鱼雄鱼放于另一个亲鱼培育桶中,流水刺激促使精卵发育成熟,亲鱼培育桶上覆盖黑色遮光网,催产后36h后每隔2h检查一次,及时捞出发育成熟的雌鱼,采用人工挤卵的方式获得卵子,每尾雌鱼的卵子独立采集分别放置于塑料烧杯中,同时用塑料吸管采集野生小黄鱼雄鱼精液,采用一雄配2雌的方式进行人工干法受精,受精完成后将静置5min,分别收集上浮的优质受精卵倒入筛绢缝制洗卵的手抄网中,放入添加了聚维酮碘的16±0.5℃海水中进行轻柔冲洗杀菌消毒,随后用海水清洗3遍,把洗好的各个家系受精卵分别放入单独的孵化桶中孵化;

b苗种孵化管理:

每桶孵化桶布卵量为20mL,孵化桶水温16±0.5℃,盐度26-28,D0≥5mg/L, pH 7.8-8.5,光照300-500Lux,每天早、晚两次采用虹吸法吸出沉于底部的未孵化受精卵,受精卵经40h孵化发育至膜内仔鱼期时将受精卵转移到苗种培育桶中进行培育;

所述步骤3)家系标准化培育具体包括:

每个培育桶中投放受精卵15mL,培育桶中初始水体0.5m³,仔鱼出膜第3d开始每天加水0.1m³,第7日龄时开始换水,每天上午和下午各换水一次,初始换水量为10%,每隔3天增加10%的换水量,逐渐增加到100%;1-15日龄微充气,以充气最高水流超出水面1cm,15日龄时,仔鱼停止投喂轮虫后改为常流水,流水速率为60L/h,充气量增大,以充气水流高出水面3cm;仔鱼孵出后第3d投喂开口饵料褶皱臂尾轮虫,投喂量8-10个/mL,同时在培育桶中投放浓缩小球藻用于调节水色和饲喂轮虫,12日龄开始增加投喂卤虫无节幼体,卤虫数量1-2个/mL,投喂前停止流水,并且培育桶中排水30%,投喂卤虫半小时之后再投喂轮虫,轮虫投喂量降低为5-6个/mL,日投喂2次,轮虫投喂后半小时内开始缓慢加水,卤虫数量每2天增加1个/mL,轮虫数量相应减少,15日龄停止投喂轮虫,开始进行人工配合饲料的驯化,先投喂鱼宝饲料2#,半小时之后再投喂卤虫;随着苗种长大,卤虫密度逐渐降低,每3天降低1个/mL,直至降到1个/mL,保持这一投喂量,人工配合饲料投喂量逐渐增加,20日龄时,对各个家系苗种数量进行标准化,每个培育桶苗种数量均严格保持在1200-1400尾,30日龄之后彻底停喂卤虫,全部投喂人工配合饲料,根据苗种生长情况更换颗粒直径较大的饲料进行投喂,苗种达到40日龄时,每桶保留一半苗种,则每桶苗种数量为600-700尾,苗种达到60日龄时,每桶苗种数量再次减半,此时苗种数量300-350尾;

所述步骤4)小黄鱼家系荧光标记具体包括:

家系生长至90日龄时,每个家系随机取样200尾,采用荧光染料进行标记,家系标记之前,用0.2ppm丁香酚对待标记个体进行麻醉1min,然后进行荧光标记,标记完成后迅速放入水泥池中,并采用盐酸土霉素进行为期3天的药浴;

所述步骤5)快速生长家系的筛选具体包括:

小黄鱼家系生长至60日龄和90日龄时,每个家系随机抽样30尾进行体质量测定;首先用浓度为0.2ppm丁香酚麻醉待测量个体1min,用量程为6kg的电子称称量体质量,精度0.1g,家系生长至150日龄,即在水泥池中混合养殖2个月后,每个家系再次随机取样30尾测量体质量,分别计算各个家系体质量的平均数,利用日增重率、相对增重率评价不同家系的生长性能,日增重率、相对增重率越大,其生长速度越快、生长性能越好,即可筛选出快速生长的家系。

一种小黄鱼家系构建及优良家系选育方法

技术领域

[0001] 本发明属于水产养殖领域中的鱼类良种选育方法,具体涉及一种小黄鱼家系构建及优良家系选育方法。

背景技术

[0002] 小黄鱼(*Pseudosciaenapolyactis*, Bleeker)又名小鲜、黄花鱼等,隶属于硬骨鱼纲Osteichthyes、石首鱼科Sciaenidae、黄鱼属Larimichthys,是中国近海渔业的重要经济种类,其肉质鲜美、营养价值高,曾与大黄鱼(*Larimichthyscrocea*)、墨鱼(*Sepiellamaindron*)、带鱼(*Trichiurus japonicas*)并称为我国“四大海产”。近年来由于过度捕捞、水质污染以及生态环境恶化,小黄鱼的渔获量正在急剧下降,并且捕获的小黄鱼出现低龄化、小型化现象。采取有效措施进行小黄鱼资源的保护亟待执行。小黄鱼的人工繁殖已于2015年取得成功,这一成果为小黄鱼的资源保护提供了至关重要的一个途径,即进行规模化人工繁殖,进行小黄鱼的增殖放流,补充海洋中小黄鱼数量。同时开展小黄鱼的推广养殖,满足市场消费需求,可以降低小黄鱼捕捞压力,实现资源保护和合理利用。但是目前养殖小黄鱼个体很小,养殖至当年年底平均体质量仅有50g左右,养殖经济收益低,养殖推广困难,此种情形下,开展小黄鱼的生长迅速优良品种选育显得尤为迫切,家系选育则是进行高产良种选育的主要手段之一。但到目前为止,有关小黄鱼家系建立、苗种标准化培育及其快速生长优良家系筛选方面的研究尚未见报道。

发明内容

[0003] 针对现有技术存在的问题,本发明的目的在于设计提供一种小黄鱼家系构建及优良家系选育方法的技术方案。

[0004] 所述的一种小黄鱼家系构建及优良家系选育方法,其特征在于包括以下步骤:1)小黄鱼亲鱼获得;2)小黄鱼家系构建;3)家系标准化培育;4)小黄鱼家系荧光标记;5)快速生长家系的筛选。

[0005] 所述的一种小黄鱼家系构建及优良家系选育方法,其特征在于小黄鱼亲鱼获得具体包括:

[0006] 取野生小黄鱼繁殖的F1个体和野生小黄鱼作为亲鱼,分别进行强化培育,其中饵料为活沙蚕,拌以3%的维生素C;次年自然水温达到15℃时,观察亲鱼性腺发育情况,挑选出性腺发育良好的亲鱼,准备用于构建家系。

[0007] 所述的一种小黄鱼家系构建及优良家系选育方法,其特征在于黄鱼家系构建具体包括:

[0008] a家系构建:

[0009] 从步骤1)中的亲鱼中挑选出性腺发育至V期的F1养殖小黄鱼雌鱼10尾,野生小黄鱼雄鱼5尾,进行人工催产,雌鱼注射催产剂量:LRH-A₂ 0.25ug + HCG 100IU/kg鱼体重,雄鱼注射剂量减半,注射催产剂后的F1养殖小黄鱼亲鱼放入亲鱼培育桶中,野生小黄鱼放于

另一个亲鱼培育桶中,流水刺激促使精卵发育成熟,亲鱼培育桶上覆盖黑色遮光网,催产后36h后每隔2h检查一次,及时捞出发育成熟的小黄鱼雌鱼,采用人工挤卵的方式获得卵子,每尾雌鱼的卵子独立采集分别放置于塑料烧杯中,同时用塑料吸管采集野生小黄鱼雄鱼精液,采用一雄配2雌的方式进行人工干法受精,受精完成后将静置5min,分别收集上浮的优质受精卵倒入筛绢缝制洗卵的手抄网中,放入添加了聚维酮碘的 $16\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 海水中进行轻柔冲洗杀菌消毒,随后用海水清洗3遍,把洗好的各个家系受精卵分别放入单独的孵化桶中孵化;

[0010] b苗种孵化管理:

[0011] 每桶孵化桶布卵量为20mL,孵化桶水温 $16\pm 0.5^{\circ}\text{C}$,盐度26-28, $\text{DO}\geq 5\text{mg/L}$,pH 7.8-8.5,光照300-500Lux,每天早、晚两次采用虹吸法吸出沉于底部的未孵化受精卵,受精卵经40h孵化发育至膜内仔鱼期时将受精卵转移到苗种培育桶中进行培育。

[0012] 所述的一种小黄鱼家系构建及优良家系选育方法,其特征在于家系标准化培育具体包括:

[0013] 每个培育桶中投放受精卵15mL,培育桶中初始水体 0.5m^3 ,仔鱼出膜第3d开始每天加水 0.1m^3 ,第7日龄时开始换水,每天上午和下午各换水一次,初始换水量为10%,每隔3天增加10%的换水量,逐渐增加到100%;1-15日龄微充气,以充气最高水流超出水面1-2cm为宜,15日龄时,仔鱼停止投喂轮虫后改为常流水,流水速率为60L/h,充气量增大,以充气水流高出水面3cm为宜;仔鱼孵出后第3d投喂开口饵料褶皱臂尾轮虫,投喂量8-10个/mL,同时在培育桶中投放浓缩小球藻用于调节水色和饲喂轮虫,12日龄开始增加投喂卤虫无节幼体,卤虫数量1-2个/mL,投喂前停止流水,并且培育桶中排水30%,投喂卤虫半小时之后再投喂轮虫,轮虫投喂量降低为5-6个/mL,日投喂2次,轮虫投喂后半小时开始缓慢加水,卤虫数量每2天增加1个/mL,轮虫数量相应减少,15日龄停止投喂轮虫,开始进行人工配合饲料的驯化,先投喂鱼宝饲料2#,半小时之后再投喂卤虫;随着苗种长大,卤虫密度逐渐降低,每3天降低1个/mL,直至降到1个/mL,保持这一投喂量,人工配合饲料投喂量逐渐增加,20日龄时,对各个家系苗种数量进行标准化,每个培育桶苗种数量均严格保持在1200-1400尾,30日龄之后彻底停喂卤虫,全部投喂人工配合饲料,根据苗种生长情况更换颗粒直径较大的饲料进行投喂,苗种达到40日龄时,每桶保留一半苗种,则每桶苗种数量为600-700尾,苗种达到60日龄时,每桶苗种数量再次减半,此时苗种数量300-350尾。

[0014] 所述的一种小黄鱼家系构建及优良家系选育方法,其特征在于小黄鱼家系荧光标记具体包括:

[0015] 家系生长至90日龄时,每个家系随机取样200尾,采用荧光染料进行标记,家系标记之前,用0.2ppm丁香酚对待标记个体进行麻醉1min,然后进行荧光标记,标记完成后迅速放入水泥池中,并采用盐酸土霉素进行为期3天的药浴。

[0016] 所述的一种小黄鱼家系构建及优良家系选育方法,其特征在于快速生长家系的筛选具体包括:

[0017] 小黄鱼家系生长至60日龄和90日龄时,每个家系随机抽样30尾进行体质量测定;首先用浓度为0.2ppm丁香酚麻醉待测量个体1min,用量程为6kg的电子称称量体质量,精度0.1g,家系生长至150日龄,即在水泥池中混合养殖2个月后,每个家系再次随机取样30尾测量体质量,分别计算各个家系体质量的平均数,利用日增重率、相对增重率评价不同家系的

生长性能,日增重率、相对增重率越大,其生长速度越快、生长性能越好,即可筛选出快速生长的家系。

[0018] 采用上述方法,可以通过构建小黄鱼家系,采用标准化方法进行苗种培育,培育后期对家系进行荧光标记并进行混合养殖,两种方法可有效排除不同养殖环境对家系生长的影响,家系标记时测定体质量作为协变量带入到家系筛选分析模型中,更进一步排除环境因素的影响,可以准确高效的筛选出生长快速的家系。采用上述方法,已经构建了小黄鱼家系7个,有效筛选出快速生长家系2个,这一优良家系鱼苗可以直接进行推广应用,同时也可以用于高产抗病优良品种培育基础材料。

附图说明

[0019] 图1为小黄鱼家系生长至150日龄时日增重率;

[0020] 图2为小黄鱼家系150日龄至60日龄之间的相对增重率;

[0021] 图3为小黄鱼家系150日龄至90日龄的相对增重率。

具体实施方式

[0022] 以下结合实施例来进一步说明本发明。

实施例

[0023] 一种小黄鱼家系构建及优良家系选育方法包括以下步骤:(1)小黄鱼亲鱼获得;(2)小黄鱼家系构建;(3)家系标准化培育;(4)小黄鱼家系荧光标记;(5)快速生长家系的筛选。

[0024] 其具体步骤如下:

[0025] (1)小黄鱼亲鱼获得及培育

[0026] 取2015年野生小黄鱼繁殖的F1个体作为亲本之一,养殖与室内水泥池中;另取2015年捕获的野生小黄鱼作为另一亲本,在网箱中暂养。2015年11月底,选择形态、体色均正常、健康无伤的养殖F1和野生小黄鱼分别放入两个水泥池中进行强化培育,饵料为活沙蚕,拌以3%的维生素C;次年自然水温达到15℃时,观察亲鱼性腺发育情况,挑选出性腺发育良好的亲鱼,准备用于构建家系。

[0027] (2)小黄鱼家系构建

[0028] a家系构建:

[0029] 挑选出性腺发育至V期的养殖小黄鱼雌鱼10尾,野生小黄鱼雄鱼5尾,进行人工催产,雌鱼注射催产剂量:LRH-A₂ 0.25ug + HCG 100IU/kg鱼体重,雄鱼注射剂量减半。注射催产剂后的养殖小黄鱼雌鱼放入一个0.5 m³亲鱼培育桶中,野生小黄鱼雄鱼放于另一个桶中,流水刺激促使精卵发育成熟,亲鱼培育桶上覆盖黑色遮光网,营造安静弱光环境,有利于亲鱼性腺发育产卵。催产后36h后开始每隔2h检查一次,及时捞出发育成熟的小黄鱼雌鱼,采用人工挤卵的方式获得卵子,每尾雌鱼的卵子独立采集分别放置于1L塑料烧杯中,同时用1.5mL塑料吸管采集野生小黄鱼雄鱼精液。采用一雄配2雌(即1尾雄鱼的精液分成两份分别与2尾雌鱼卵子授精)的方式进行人工干法受精。受精完成后将烧杯静置5min,分别收集上浮于烧杯中的优质受精卵倒入筛绢缝制专用洗卵的手抄网中,放入添加了聚维酮碘的

16±0.5℃海水中进行轻柔冲洗杀菌消毒,随后用海水清洗3遍,把洗好的受精卵转入孵化桶中孵化。

[0030] b苗种孵化管理:

[0031] 孵化桶为上部圆柱形,下部漏斗形,底部充气,容积0.3m³;每桶布卵量为20mL,孵化桶水温16±0.5℃(温控仪和加热棒控制),盐度26-28,D0≥5mg/L, pH 7.8-8.5,光照300-500Lux,每天早、晚两次采用虹吸法吸出沉于底部的未孵化受精卵,受精卵经40h孵化发育至膜内仔鱼期时将受精卵转移到1m³苗种培育桶中进行培育。

[0032] (3)家系标准化培育

[0033] 每个培育桶中投放受精卵15mL,培育桶中初始水体0.5m³,仔鱼出膜第3d开始每天加水0.1m³,第7日龄时开始换水,每天上午和下午各换水一次,初始换水量为10%,每隔3天增加10%的换水量,逐渐增加到100%;1-15日龄微充气,以充气最高水流超出水面1-2cm为宜;仔鱼停止投喂轮虫后(15日龄时)改为常流水,流水速率大约为60L/h,充气量增大,以充气水流高出水面3cm左右为宜;仔鱼孵出后第3d投喂开口饵料褶皱臂尾轮虫(投喂前用浓缩小球藻强化12h以上),投喂量8-10个/mL,同时在培育桶中投放浓缩小球藻用于调节水色和饲喂轮虫。12日龄开始增加投喂卤虫无节幼体,卤虫数量1-2个/mL,投喂前停止流水,并且培育桶中排水30%,投喂卤虫半小时之后再投喂轮虫,轮虫投喂量降低为5-6个/mL,日投喂2次,轮虫投喂后半小时开始缓慢加水,卤虫数量每2天增加1个/mL,轮虫数量相应减少;15日龄停止投喂轮虫,开始进行人工配合饲料的驯化,先少量投喂鱼宝饲料2#,半小时之后再投喂卤虫;随着苗种长大,卤虫密度逐渐降低,每3天降低1个/mL,直至降到1个/mL,保持这一投喂量,配合饲料投喂量逐渐增加;20日龄时,对各个家系苗种数量进行标准化,每个培育桶苗种数量均严格保持在1200-1400尾;30日龄之后彻底停喂卤虫,全部投喂人工配合饲料,根据苗种生长情况更换颗粒直径较大的饲料进行投喂;苗种达到40日龄时,每桶保留一半苗种,则每桶苗种数量为600-700尾;苗种达到60日龄时,每桶苗种数量再次减半,此时苗种数量300-350尾。

[0034] (4)家系荧光标记

[0035] 家系生长至90日龄时,每个家系随机取样200尾,采用荧光染料进行标记,染料颜色有红、橙、黄、绿、粉、蓝6种颜色,鱼体标记部位为小黄鱼额头左右两侧皮下,根据不同的染色和标记位置可以有36个组合,即可以标记36个家系。由于本次试验通过1尾雄鱼配2尾雌鱼的方式完成了10尾雌鱼卵子的授精,后期由于精子和卵子质量问题,最终只成功构建了7个家系,其中父系半同胞家系3个,所以只选用了红、橙、绿三种颜色进行标记。家系标记之前,用0.2ppm丁香酚对待标记个体进行麻醉1min,然后进行荧光标记,标记完成后迅速放入一个20m³水泥池中,并采用盐酸土霉素进行为期3天的药浴。

[0036] (5)小黄鱼生长快速家系的筛选

[0037] 小黄鱼家系生长至60日龄和90日龄时,每个家系随机抽样30尾进行体质量测定。测量方法:首先用浓度为0.2ppm丁香酚麻醉待测量个体1min,用量程为6kg的电子称称量体质量,精度0.1g。家系生长至150日龄,即在水泥池中混合养殖2个月后,每个家系再次随机取样30尾测量体质量。分别计算各个家系体质量的平均数,如表1所示。利用日增重率(养殖期间增加的重量/实际养殖天数)(图1)、相对增重率(两次测量的差值/两次测量相隔天数)(图2、图3)评价不同家系的生长性能。

[0038] 表1 不同生长时期小黄鱼家系体质量统计结果

[0039]

家系	N	均值(g) mean ± SE		
		60 d	90 d	150 d
F1-1	30	2.33 ± 0.11	9.13 ± 0.42	32.80 ± 0.69
F1-2	30	2.14 ± 0.13	9.44 ± 0.61	32.81 ± 1.20
F2-1	30	1.75 ± 0.10	7.18 ± 0.43	29.35 ± 0.72
F2-2	30	1.15 ± 0.09	5.81 ± 0.36	28.04 ± 1.62
F3-2	30	2.00 ± 0.10	9.33 ± 0.50	31.13 ± 1.84
F4-1	30	1.23 ± 0.07	6.02 ± 0.34	27.49 ± 1.00
F4-2	30	2.14 ± 0.12	10.21 ± 0.62	31.10 ± 3.55

[0040] 从图1可以看出,家系F1-1和F1-2的日增重率远远高于其余几个家系。图2 和图3 分别是各个家系60日龄至150日龄和90日龄至150日龄的相对增重率比较图,可以看出F1-1和F1-2的相对增重率同样远远大于其他几个家系。日增重率和相对增重率越大,其生长速度越快、生长性能越好。由此可成功筛选出快速生长的家系F1-1和F1-2。

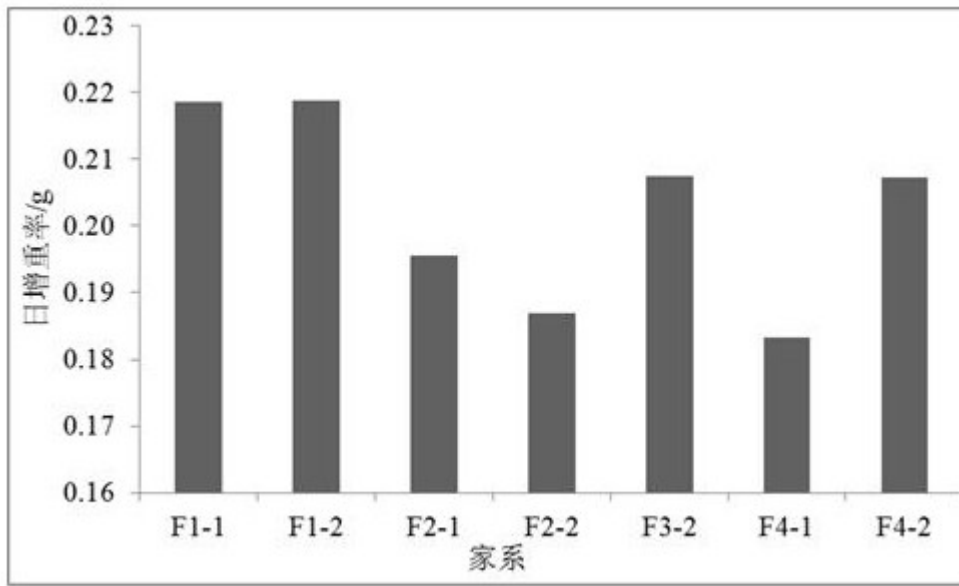


图1

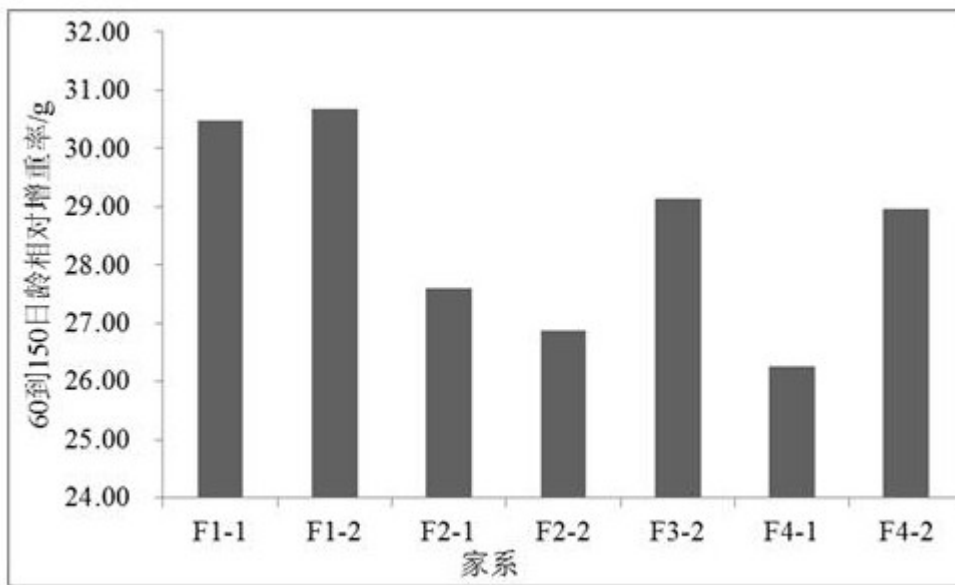


图2

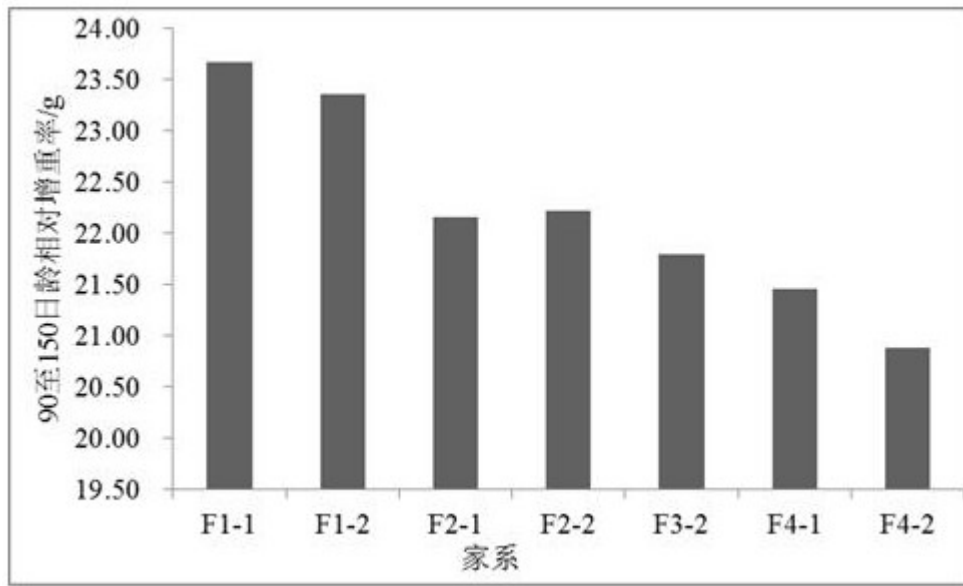


图3