

# 鱼类染色体组操作的研究

## II. 静水压处理和静水压与冷休克结合处理 诱导水晶彩鲫四倍体

桂建芳 孙建民 梁绍昌 黄文郁 蒋一珪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

### 提 要

采用静水压处理和静水压与冷休克结合处理两种方法进行了抑制第一次卵裂诱导水晶彩鲫四倍体的研究。水晶彩鲫受精卵在受精后(发育水温 14—16℃) 50、54、55 和 60min 时的静水压 (650kg/cm<sup>2</sup>) 处理 (3min) 组中都出现了四倍化胚胎,而在受精后 48 和 48min 以前的相同处理组中都没有观察到四倍化胚胎。在受精后(发育水温 16—18℃) 48、50、52、55、56 和 60min 时的静水压与冷休克结合处理组中,也都出现了四倍化胚胎,且四倍化率比仅用静水压处理高,但存活率更低。在经过处理而发育形成的胚胎中,既有四倍体、次四倍体和  $4n/2n$  嵌合体,也有二倍体和次二倍体,并在一些次二倍体和次四倍体中期相中还观察到休克处理致使染色体断裂的痕迹——染色体片段。在抑制卵裂诱发加倍的效应期内,可能存在瞬间对休克耐受性较强的时期,而在此前后,对休克更为敏感。在少数处理组中,已筛选出了数尾四倍体鱼。文中还对鱼类四倍体的诱导技术、抑制卵裂诱发染色体组加倍的效应期以及四倍化胚胎的存活率和生命力等有关问题进行了分析和讨论。

**关键词** 染色体组操作,四倍体,静水压休克,静水压与冷休克结合处理,观赏鱼,水晶彩鲫

人工诱导鱼类四倍体的研究是近年来鱼类遗传育种工作中的主攻方向之一。一方面是拟通过获得能育的人工四倍体鱼再与正常二倍体鱼交配得到大量的可供养殖生产的三倍体后代,提供一条大规模生产三倍体鱼的有效途径<sup>[2,4,9]</sup>;另一方面是鱼类四倍体的诱导方法本身具有一定的难度,诱导过程中存在各种影响因素,诱导条件还没有标准化,其所获结果的差异性也较大<sup>[1,2,5-9,11,12,16,17,20-22]</sup>,因而激发起人们更强烈的研究兴趣。

鉴于上述两方面的目的,并希望通过染色体组操作培育出欣赏价值更高并能进行程序化和专利化生产的观赏鱼,作者在采用静水压休克生产三倍体水晶彩鲫<sup>[3]</sup>的同时,进行了静水压休克和静水压休克与冷休克结合抑制第一次卵裂诱导水晶彩鲫四倍体的研究。

### 材 料 与 方 法

#### 1. 人工催产、授精和处理前的准备

试验用的水晶彩鲫 (*Carassius auratus* transparent colored variety) 亲本取自于本所关桥试验场。

采用鲤鱼脑垂体进行人工催产、干法授精。精卵混匀后均匀洒在塑料纱网上,待受精卵粘稳后,带水将纱网剪成一定大小的长条或小块,置室温下发育。从受精卵入水开始计算卵受精后的发育时间。

## 2. 静水压处理

采用静水压休克生产三倍体水晶彩鲫的最佳压力 ( $650\text{kg}/\text{cm}^2$ ) 和持续处理时间 ( $3\text{min}$ )<sup>[3]</sup>, 分别在卵受精后 35—60min 这一段时期内,每隔 2 或 3 min 设一试验组,进行静水压休克处理。其处理程序同于桂建芳等的报道<sup>[3]</sup>。本组试验于 1987 年 4 月上旬进行,其授精、处理和胚胎发育前期的水温均为自然水温,一般为  $14-16^{\circ}\text{C}$ 。

## 3. 静水压休克和冷休克结合处理

在即将进行处理前,把  $1-2^{\circ}\text{C}$  的冰水装满压力室,待受精卵发育到特定的时刻,将粘贴于纱网上的受精卵与纱网一起迅速装入已注有冰水的压力室中(装入材料后压力室中的水温一般为  $7-9^{\circ}\text{C}$ ,随材料的多少而有所变化),立即旋紧螺盖,迅速升压到预定靶压 ( $550\text{kg}/\text{cm}^2$ )。压力上升的速度大约为  $80\text{kg}/\text{cm}^2/\text{s}$ 。从受精卵放入压力室至到达靶压的时间一般为  $30\text{s}$ 。处理的持续时间从受精卵放入压力室开始到开始卸压为止。卸压均在瞬间完成。卸压后,快速旋开螺盖,用镊子迅速夹出纱网,置自然水温下发育,孵化。处理完毕后压力室中的水温一般为  $10-11^{\circ}\text{C}$ 。本组实验在 1988 年 4 月中旬进行,其授精、处理前和处理后胚胎发育前期的自然水温一般为  $16-18^{\circ}\text{C}$ 。

## 4. 存活率统计

静水压处理组分别在囊胚期、体色素出现期和孵化期取样(一般最少统计 100 个胚胎左右),分别统计各个试验组和对照组的存活样品数。静水压休克与冷休克结合处理组分别在原肠期、体色素出现期和孵化期取样统计。以对照组发育到囊胚期或原肠期的胚胎占卵数的比例作为受精率分别折算出对照组和处理组在各个阶段胚胎的发育存活率,再将处理组各个阶段的发育存活率除以对照组相应阶段的发育存活率,分别求得各个阶段处理组相对于对照组的存活率。

## 5. 倍性鉴定

采用多个胚胎混合染色体制片、单个胚胎染色体制片和幼鱼尾鳍组织细胞染色体制片的方法,分别在胚胎发育和幼鱼生长的不同阶段进行倍性鉴定,以判断四倍化的加倍比例和筛选四倍体鱼,其制片方法均同于我们以前的报道<sup>[3]</sup>。对尾鳍组织细胞直接制片筛选出来的四倍体鱼待其长大后,采用血细胞培养制备染色体方法进行最后验证。

在确定每个胚胎和每尾鱼的倍性时,一般观察计数 10 个分裂相左右。因为水晶彩鲫的染色体数较多 ( $2n = 100$ , 图版 I, 1), 在确定倍性时,一般以染色体数为 100 左右的为二倍体 ( $2n$ ), 200 左右的为四倍体 ( $4n$ ), 明显少于 100 的为次二倍体 ( $2n-$ ), 明显多于 100 少于 200 的为次四倍体 ( $4n-$ ), 既有 100 左右或明显少于 100 的又有 200 左右或明显少于 200 的为嵌合体 ( $4n/2n$ )。四倍化率为四倍体、次四倍体和嵌合体的胚胎数占检查总胚胎数的比例。

## 结 果

### 1. 静水压处理对胚胎发育存活率的影响

在压力一定 ( $650 \text{ kg/cm}^2$ ) 和处理持续时间一定 (3min) 的条件下, 分别在受精后 35、38、40、42、45、48、50、54、55 和 60min 时开始静水压休克处理。除 40min 处理组没来得及统计存活率外, 其余处理组都分别在囊胚期、体色素出现期和孵化期统计了其相对于对照组的存活率(图 1)。结果表明, 在受精后 50、54 和 55min 时的处理组中, 其存活率较高, 体色素出现时胚胎的存活率都在相对于对照组的 70% 以上, 到孵化出苗时, 50 和 54 分钟时处理组的不少胚胎不能孵化出首, 存活率显著下降, 而 55 min 时处理组的出苗率

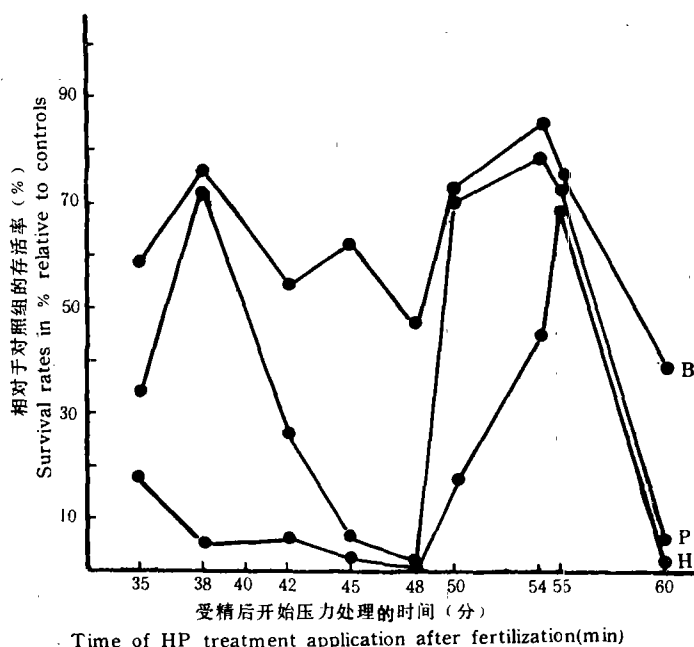


图 1. 受精后不同时间开始压力处理的各个实验组在囊胚期—B, 体色素出现期—P 和孵化期—H相对于对照组的存活率

Fig. 1. Viability relative to controls at Blastula-B, Pigmentation-P and Hatching-Hstages in relation to time (post-fertilization) of hydrostatic pressure treatment  
Pressure =  $650 \text{ kg/cm}^2$ ; Duration = 3min

最高, 为对照组的 68.6%。在受精后 35、38、42、45 和 48min 时的处理组中, 各组的存活率虽然在胚胎发育前期有些波动, 但其主要趋势是开始处理的时间愈接近受精后 50min 时, 其存活率愈低, 这一趋势到孵化出苗时尤为明显, 48min 时处理组的孵化率为 0; 35、38 和 42min 时处理组的胚胎死亡主要发生在体色素出现到孵化出苗阶段, 而 45 和 48min 处理组的胚胎在体色素出现之前就发生了大量死亡。受精后 60min 时处理组从囊胚期开始, 存活率就较低, 其胚胎死亡主要发生在胚胎发育前期。

### 2. 静水压处理的诱导效果

胚胎期倍性鉴定表明(表 1), 在受精后 35、38、40、42、45 和 48min 时的静水压处理组

中,没有发现四倍化胚胎,其胚胎多数为次二倍体,并在一些制片较好的次二倍体分裂相中,观察到数目不等的染色体片段(图版1,3,4);在受精后 50min 时的处理组中,次二倍体胚胎的比例仍然很高,但已有少数四倍化胚胎,在检查的 13 个胚胎中,发现有 1 个次四倍体,四倍化率为 7.69%;在受精后 54 和 55min 时的处理组中,四倍化胚胎的比例有所增加,分别为 15.0% 和 46.2%,但二倍体胚胎的比例明显升高了许多,分别占检查胚胎的

表 1 受精后 35、38、40、42、45、48、50、54、55 和 60min 时分别采用  $650\text{kg}/\text{cm}^2$  的压力

持续处理 3 分钟各个试验组中的胚胎和幼鱼的倍性鉴定结果

Tab. 1 The results of ploidy identification of embryos and fingerlings in each experimental group of the 3-minute hydrostatic pressure treatment at  $650\text{kg}/\text{cm}^2$  in relation to time after fertilization

受精后至开始 压力休克的时间(分) min Time of HP shock appli- cation after fertilization (min)	鉴定的样品 Sample examined	鉴定的样 品数 No. of samples examined	倍性水平 Ploidy level					四倍化率 (%) Rate of tetraploidy (%)
			次二倍体 ( $2n-$ )	二倍体 ( $2n$ )	次四倍体 ( $4n-$ )	嵌合体 ( $4n/2n$ )	四倍体 ( $4n$ )	
35	胚胎 Embryo	9	8	1				0
	幼鱼 Fingerling	8		8				0
38	胚胎 Embryo	27	24	3				0
40	胚胎 Embryo	8	8					0
42	胚胎 Embryo	19	12	7				0
	幼鱼 Fingerling	6		6				0
45	胚胎 Embryo	5	4	1				0
	幼鱼 Fingerling	11		11				0
48	胚胎 Embryo	9	9					0
50	胚胎 Embryo	13	10	2	1			7.69
	幼鱼 Fingerling	14		13			1	7.15
54	胚胎 Embryo	20	1	16	1	1	1	15.0
	幼鱼 Fingerling	45		45				0
55	胚胎 Embryo	13	1	6	5		1	46.2
	幼鱼 Fingerling	125	1	124				0
60	胚胎 Embryo	6	2		2		2	66.7
	幼鱼 Fingerling	1					1	100

80% 和 46.2%; 在受精后 60min 时的处理组中, 仅成功观察了 6 个胚胎, 2 个为次二倍体, 2 个为次四倍体(图版 II, 2), 2 个为四倍体(图版 I, 2), 其四倍化率最高, 为 66.7%。

值得注意的是, 与次二倍体中期分裂相一样, 在一些制片较好、染色体分散较佳的次四倍体分裂相中, 也观察到数目不等的染色体片段(图版 II, 1)。

当孵出的幼鱼长到 3—5cm 时, 采用尾鳍组织细胞直接制片法来检查筛选四倍体鱼。在受精后 60min 时的处理组中, 仅存活下来 1 尾鱼, 经检查为四倍体; 在受精后 50min 时的处理组, 从 14 尾鱼中也筛选出了 1 尾四倍体鱼; 然而, 在存活率较高和四倍化率也较高的 54 和 55min 时的处理组中, 分别检查了 45 尾和 125 尾幼鱼, 除在 55min 时处理组发现了 1 尾小而畸形的次二倍体外, 其余都是二倍体, 没有发现四倍体; 对 35、42 和 45min 时处理组中的一些幼鱼也作了检查, 都是二倍体(表 1)。

尾鳍组织细胞直接制片筛选出来的四倍体鱼长到 12cm 左右时, 经抽血培养、染色体制片观察, 确证其为四倍体(图版 II, 4) 鱼。

### 3. 静水压休克和冷休克结合处理对胚胎发育存活率的影响

静水压休克和冷休克结合处理分别在卵子受精后 40、48、50、52、55、56 和 60min 时进行, 处理持续时间都为 4min。存活率统计结果(图 2)表明, 静水压休克与冷休克结合处理基本上与仅用较高的静水压处理相似, 对胚胎存活率的影响都较大, 相对来说, 结合处理的影响更大。值得注意的是, 结合处理各个试验组的存活率峰值仍然出现在受精后 55min 的处理组, 其原肠胚的存活率为对照组的 79%, 体色素出现期为对照组的 51%, 孵

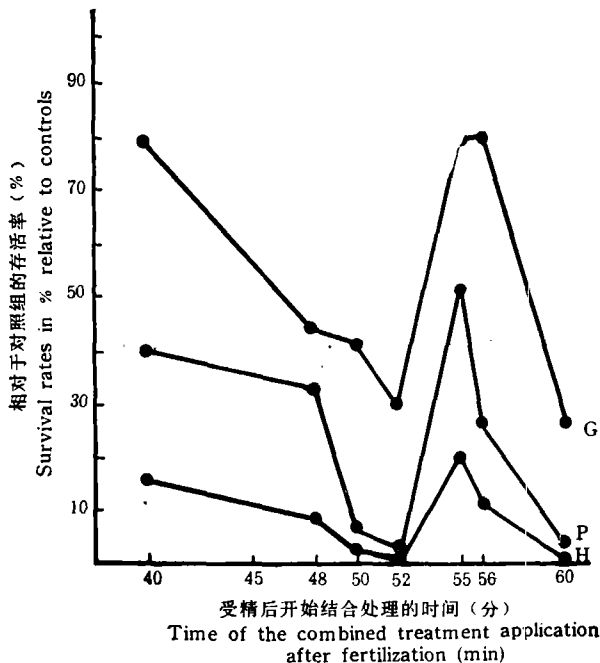


图 2. 受精后不同时间开始静水压与冷休克结合处理的各个试验组在原肠期—G 体色素出现期—P 和孵化期—H 相对于对照组的存活率。

Fig. 2. Viability relative to controls at Gastrula-G, Pigmentation-P and Hatching-H stages in relation to time (post-fertilization) of a combination of hydrostatic pressure and cold treatments.

化率为对照组的 20.1%；在 48、50 和 52min 时的处理组中，存活率要低得多，多数胚胎死于体色素出现之前，48 和 50min 处理组的孵化率分别为对照组的 9.2% 和 2.4%，而 52min 处理组的孵化率为 0；56min 时处理组的胚胎存活率比 55min 处理组的略低，60min 时处理组的胚胎所受的影响最大，从原肠胚开始，其存活率就最低，此试验组也没有孵化出苗。

#### 4. 静水压休克和冷休克结合处理的诱导效果

胚胎的倍性鉴定(表 2)表明，除 40min 时处理组没有四倍化胚胎之外，在 48、50、52、55、56 和 60min 时的处理组中，都观察到四倍化胚胎，其四倍化率虽有所差异，但都在 40% 以上，比仅用静水压处理的诱导效果要强；然而，在四倍化胚胎中，次四倍体、 $4n/2n$  嵌合体仍占有很大的比例，尤其是嵌合体的比例大大提高了。

表 2 受精后 40、48、50、52、55、56 和 60 分钟时分别采用静水压休克和冷休克结合持续处理 4 分钟  
的各个试验组中的胚胎的倍性鉴定结果

Tab. 2 The results of ploidy identification of embryos in each group of the combined 4-min treatment of hydrostatic pressure and cold shock in relation to time after fertilization

受精后至开始处理的时间(分) Time of the combined shock application after fertilization (min)	鉴定的胚胎数 No. of embryos examined	倍 性 水 平 Ploidy Level						四倍化率 (%) Rate of tetraploidy (%)
		单倍体 (1n)	次二倍体 (2n-)	二倍体 (2n)	次四倍体 (4n-)	嵌合体 (4n/2n)	四倍体 (4n)	
40	10		6	4				0
48	13	1	3	1	4	2	2	61.5
50	10			6	1	2	1	40.0
52	4		1		3			75.0
55	18		5	4	3	4	2	50.0
56	4		1	1	1	1		50.0
60	5		1	1	2		1	60.0

到幼鱼阶段，作者采用尾鳍组织细胞直接制片法对受精后 55min 时处理组存活下来的部分幼鱼进行了倍性鉴定。在检查的 70 尾鱼中，发现了 4 尾四倍体(图版 II, 3)鱼，其余的都是二倍体。

## 讨 论

### 1. 鱼类四倍体的诱导技术

人工诱导四倍体与人工诱导三倍体不同，诱导三倍体是通过阻留第二极体而添加了一个染色体组，而诱导四倍体是通过抑制第一次卵裂使本应分裂的两个细胞合二为一来达到染色体组加倍的，这是一个更为复杂的动态过程，因而其技术难度比诱导三倍体也要难得多。迄今，在鱼类中取得成功的主要是热休克法和静水压休克法。

采用热休克法，Thorgaard 等 (1981)<sup>[22]</sup>、Chourrout (1982)<sup>[6]</sup> 和 Bidwell 等 (1985)<sup>[7]</sup> 已分别在虹鳟 (*Salmo gairdneri*) 和斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 中获

得四倍体胚胎, 马涛等(1987)在热休克处理后获得的虹鳟群体中检测出5%的四倍体鱼<sup>[1]</sup>, 陈敏容等(1987)在白鲫(♀)×红鲤(♂)中获得了异源四倍体个体<sup>[2]</sup>。采用静水压休克法, Chourrout(1984)在虹鳟以及虹鳟×褐鳟(*Salmo trutta*)中分别获得了同源四倍体鱼和异源四倍体鱼<sup>[7]</sup>。Myers(1986)在分别采用热休克、冷休克和静水压休克诱导罗非鱼四倍化无效的情况下, 在卵裂之前采用7500psi(约528kg/cm<sup>2</sup>, 1000psi=70.4kg/cm<sup>2</sup>)的压力和7.5℃的冷水处理7min, 成功地诱导出尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和莫桑比克罗非鱼(*O. mossambicus*)的同源四倍体胚胎以及这两种鱼杂交的异源四倍体胚胎<sup>[12]</sup>。作者两年的研究表明, 在水晶彩鲫中, 采用促使第二极体保留诱导三倍体的最佳压力强度(650kg/cm<sup>2</sup>)和持续处理时间(3min)可以成功地抑制第一次卵裂诱导出四倍体; 当将压力休克和冷休克结合在一起处理时, 其加倍效果更佳, 提高了四倍化率, 这可能是因为冷休克一方面可以成为压力休克的一个附加因子, 另一方面可以抑止或减缓卵裂速度, 延长了诱导加倍的效应期, 从而能更好地掌握压力开始处理的时间。

就抑制第一次卵裂来达到染色体组加倍的目的来说, Streisinger等(1981)采用静水压休克和热休克成功地获得了纯合的雌核发育斑马鱼(*Brachydanio rerio*)<sup>[13]</sup>; Naruse等(1985)采用静水压休克诱导出纯合的雌核发育青鳉(*Oryzias latipes*)<sup>[13]</sup>; Onozato(1984)用静水压处理获得了纯合的雌核发育虹鳟<sup>[14]</sup>; Komen等(1988)用热休克诱导出纯合的雌核发育鲤鱼<sup>[10]</sup>; Parsons和Thorgaard(1985)<sup>[15]</sup>以及Scheerer等(1986)<sup>[18]</sup>还采用静水压休克成功地使雄核发育的单倍体染色体组加倍, 获得了雄核发育的二倍体虹鳟。迄今还未见有冷休克成功地抑制第一次卵裂诱发染色体组加倍的报道。

## 2. 抑制第一次卵裂诱发染色体组加倍的效应期

静水压处理获得的结果表明, 水晶彩鲫受精卵在水温为15℃左右的条件下, 其受精后50、54、55和60min时的处理组中都出现了四倍化胚胎, 而在受精后48min时和48min以前的处理组中都没有观察到四倍化胚胎, 说明水晶彩鲫受精卵在这样的条件下, 通过静水压处理抑制第一次卵裂诱发染色体组加倍的有效反应期始于受精后50min。

采用静水压休克和冷休克结合处理, 在受精后48min时的处理组中, 就出现了比例很高的四倍化胚胎, 这一方面是因为受精卵发育的水温约增加了2℃, 加快了发育速度, 提前了抑制卵裂诱发加倍的效应期; 另一方面是采用冷休克这一处理方法, 且把处理的持续时间增加到4min, 延长了1min的处理期限。一般认为, 静水压休克抑制卵裂诱发染色体组加倍的效应期可能在有丝分裂中期, 而热休克的效应期可能在有丝分裂间期<sup>[8]</sup>。Streisinger等(1981)在诱导斑马鱼的纯合雌核发育二倍体时, 就发现热休克抑制卵裂促使染色体组加倍的效应期比静水压休克要早<sup>[19]</sup>; Chourrout(1986)在诱导虹鳟四倍体时也有类似的发现<sup>[8]</sup>。本研究采用静水压休克和冷休克结合处理, 效应期提前了, 除了发育温度约提高2℃而加快了发育速度之外, 是否还与冷休克以及结合处理有关呢? 在受精后40至48min之间, 采用结合处理, 是否还有可能诱导出四倍化胚胎呢? 也就是说, 静水压休克和冷休克结合处理的效应期是否比受精后48min时更早呢? 这当然还有待于在同一条件下进行处理和比较来解答。

不同的鱼, 其诱导四倍化的效应期各不相同。一般来说, 胚胎发育速度较慢的冷水性鱼类, 其效应期开始的时间较迟, 效应期的范围也较长。如鲑科鱼类在受精后4h45min至

5h50min 之间进行压力休克,都能有效地抑制第一次有丝分裂,诱导出四倍化胚胎,其中虹鳟在 10℃ 时的最佳效应期在受精后 5h20min 到 5h30min 之间<sup>[8,14]</sup>。而发育速度较快的温热带鱼类,其效应期起始的时间较早,效应期的范围也较短。如青鳉在受精后 85 至 95min 时,采用热休克和静水压休克都成功地抑制了第一次分裂诱导出纯合的雌核发育二倍体<sup>[43]</sup>;斑点叉尾鲷在受精后 80、85 和 90min 时进行热休克,也都成功地诱导出四倍化胚胎<sup>[9]</sup>;我们研究的水晶彩鲫的效应期更早,在 15℃ 左右的条件下,其静水压休克的效应期在受精后 50 至 60min 之间,当发育温度增加并采用静水压休克和冷休克结合处理时,其效应期的起始时间更早。

值得注意的是,在水晶彩鲫的效应期内,其诱导效果和胚胎的存活率明显不同。在受精后 55min 时的处理组中,其存活率最高,但其诱导效果值得考虑。孵出的鱼虽多,但大都是二倍体,给鉴定筛选四倍体鱼增加了很大工作量。胚胎倍性鉴定也表明,在受精后 55min 左右的处理组中,二倍体胚胎占有较大的比例。这些结果似乎表明,在抑制卵裂诱发染色体组加倍的效应期中间,存在一段对休克处理耐受性较强的时期,而在这段时间前后,对休克更为敏感。了解到这一规律之后,应把开始处理的时间定在对休克更为敏感的效应期内,即在出现存活率峰值的前后,这样虽然存活孵出的鱼不多,但混杂的二倍体鱼大大减少了,对筛选工作带来方便,更易获得四倍体鱼,因为在诱导四倍体的条件没有最佳化,不能成批得到四倍体鱼之前,幼鱼的喂养、鉴定和筛选是一项最为艰巨和繁重的工作,这也是迄今很少获得四倍体鱼的主要原因之一。

### 3. 四倍化胚胎的存活率和生命力

四倍化胚胎的死亡率高是鱼类四倍体诱导研究中普遍遇到的现象,不少人虽然在抑制第一次卵裂促使染色体组加倍上取得了成功,在胚胎阶段观察到许多四倍化胚胎,但要么是没有孵出鱼苗,有的即使有鱼苗也多为畸形,终至死亡,要么是出苗较多,到幼鱼阶段又难以找到四倍体鱼<sup>[2]</sup>,无获而徒劳。

四倍化胚胎的死亡究竟是染色体组加倍后造成的基因剂量不平衡所致、或是休克处理过程的影响呢?这是关系到鱼类四倍体工作有无前途的问题。Chourrout 等(1986)<sup>[69]</sup>和马涛等(1987)<sup>[1]</sup>、陈敏容等(1987)<sup>[2]</sup>以及本研究均成功地获得四倍体成鱼的结果事实上否定了前一假设,说明染色体组真正完整的四倍体鱼具有类似于正常二倍体鱼的生命力。

本研究表明,在经过休克处理而发育形成的胚胎中,不但四倍化胚胎中具有次四倍体和  $4n/2n$  嵌合体,而且在没有加倍的二倍体胚胎中,也有大量的次二倍体,并在一些分散较好的次四倍体和次二倍体的中期分裂相中,明显可见休克处理造成染色体断裂的痕迹——染色体片断,这与作者在诱导三倍体中发现的因压力过高或处理持续时间过长导致染色体断裂或缺失而引起胚胎死亡的结果基本相似。因此,四倍化胚胎死亡率高的真正原因是休克处理过程所致,而与染色体组加倍无关;不适的处理不仅使染色体组加倍了的卵子形成次四倍体或嵌合体而死亡,而且使未加倍的二倍体也形成次二倍体而夭折。

要想提高四倍化胚胎的存活率,诱导出四倍体鱼,关键是要掌握最优化的处理条件。据 Thorgaard 等报道,他们在用 9 000psi 的较高压力使虹鳟的雄核发育单倍体二倍化之后,改用 7 000psi 的较低压力处理获得了更理想的存活率<sup>[8,15]</sup>。处理的压力过高可能也



是几种罗非鱼四倍化胚胎死亡率高的原因<sup>[12]</sup>。Bidwell 等(1985)在热休克诱导斑点叉尾鲷的四倍体时,也在胚胎期观察到  $4n$ 、 $3n$ 、 $2n$  和  $4n/2n$ 、 $4n/3n/2n$  以及  $5n/4n/2n$  嵌合体<sup>[5]</sup>。从现有的资料看来,处理条件的优化不仅与开始处理的效应期、处理的强度(压力大小或水温高低)和处理的持续时间这三大要素有关,而且与卵子的质量以及处理时的操作速度也有关。因此,寻求最优化的处理条件将是鱼类四倍体诱导研究中一个急需解决而又较为棘手的课题。

### 参 考 文 献

- [1] 马涛、朱才宝、朱秉仁, 1987. 热休克诱导虹鳟四倍体. 水生生物学报, 11(4): 329—335.
- [2] 陈敏容、阎康、刘汉勤、易泳兰、杨兴棋、刘沛霖、陈宏溪, 1987. 人工诱导白鲫(♀)×红鲤(♂)异源四倍体鱼的初步研究. 水生生物学报, 11(1): 96—98.
- [3] 桂建芳、梁绍昌、孙建民、黄文郁、蒋一珪, 1990. 鱼类染色体组操作的研究 I. 静水压休克诱导三倍体水晶彩鲫. 水生生物学报, 14(4): 336—344.
- [4] 楼允东, 1984. 国外对鱼类多倍体育种的研究. 水产学报, 8(4): 343—356.
- [5] Bidwell, C. A., Chrisman, C. L. and Libey, G. S., 1985. Polyploidy induced by heat shock in channel catfish. *Aquaculture*, 51(1): 25—32.
- [6] Chourrout, D., 1982. Tetraploidy induced by heat shock in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Reprod. Nutr. Develop.*, 22(3): 569—574.
- [7] 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(2): 111—126.
- [8] Chourrout, D., 1986. Genetic manipulations in fish: review of methods. In: K. Tiews (Editor), Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture. (EIFAC/FAO Symp., 1986, publ. 1987) Schr. Bundesforschungsanst. Fisch. Hamburg, 18/19 (vol. I/II). Heenemann, Berlin, Vol. II, pp. 111—127.
- [9] Chourrout, D., Chevassus, B., Krieg, F., Happe, A. and Renard, P., 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females: Potential of tetraploid fish. *Theor. Appl. Genet.*, 72: 193—205.
- [10] Komen, J., Duynhouwer, J., Richter, C. J. J. and Huisman, E. A., 1988. Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) I. Effects of genetic manipulation of sexual products and incubation conditions of eggs. *Aquaculture*, 69: 227—239.
- [11] Lou, Y. D. and Purdom, C. E., 1984. Polyploidy induced by hydrostatic pressure in the rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 25(3): 345—351.
- [12] Myers, J. M., 1986. Tetraploid induction in *Oreochromis* spp. *Aquaculture*, 57(1/4): 281—287.
- [13] Naruse, K., Ijiri, K., Shima, A. and Egami, N., 1985. The production of cloned fish in the Medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.*, 236(3): 335—341.
- [14] Onozato, H., 1984. Diploidization of gynogenetically activated salmonid eggs using hydrostatic pressure. *Aquaculture*, 43(1—3): 91—97.
- [15] Parsons, J. E. and Thorgaard, G. H., 1985. Production of androgenetic diploid rainbow trout. *J. Hered.*, 76(3): 177—181.
- [16] Purdom, C. E., 1983. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture*, 33(4): 287—300.
- [17] Purdom, C. E., Thompson, D. and Lou, Y. D., 1985. Genetic engineering in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, by the suppression of meiotic and mitotic metaphase. *J. Fish Biol.*, 27(1): 73—79.
- [18] Scheerer, P. D., Thorgaard, G. H., Allendorf, F. W. and Knudsen, K. L., 1986. Androgenetic rainbow trout produced from inbred and outbred sperm sources show similar survival. *Aquaculture*, 57(1/4): 289—298.
- [19] Streisinger, G., Walker, C., Lower, N., Knauber, D. and Singer, F., 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291: 293—296.
- [20] Thorgaard, G. H., 1983. Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: Hoar, W. S. et al., (ed.), *Fish Physiology*, Vol. 9B, Academic Press, New York, pp. 405—434.
- [21] Thorgaard, G. H., 1986. Ploidy manipulation and performance. *Aquaculture*, 57(1/4): 57—64.
- [22] Thorgaard, G. H., Jazwin, M. E. and Stier, A. R., 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 110(4): 546—550.

## STUDIES ON GENOME MANIPULATION IN FISH

### II. TETRAPLOIDY INDUCED BY HYDROSTATIC PRESSURE TREATMENT AND A COMBINATION OF HYDROSTATIC PRESSURE AND COLD TREATMENTS IN TRANSPARENT COLORED CRUCIAN CARP

Gui Jianfang   Sun Jianmin   Liang Shaochang   Huang Wenyu   and   Jiang Yigui

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

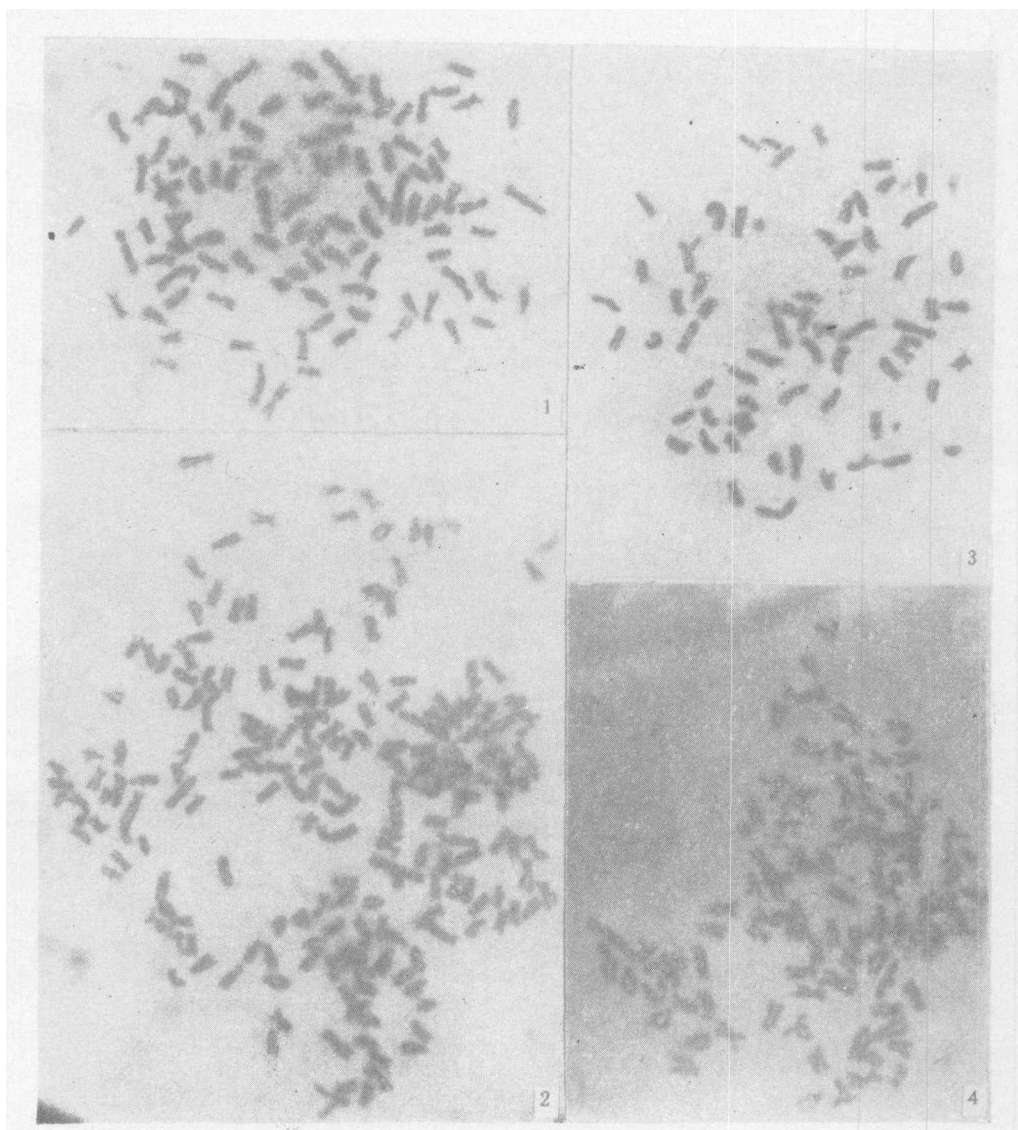
#### Abstract

The studies on the induction of tetraploidy, using either hydrostatic pressure treatment alone or a combination of hydrostatic pressure and cold treatment for blocking first cleavage, were attempted in transparent colored crucian carp (*Carassius auratus* transparent colored variety). The shock treatments involving hydrostatic pressure of 650 kg/cm<sup>2</sup> lasting 3 minutes were applied at 35, 38, 40, 42, 45, 48, 50, 54, 55 or 60 min after fertilization. Tetraploidy embryos that include tetraploids, hypotetraploids and tetraploid/diploid mosaics were found in the pressure treatment groups at 50, 54, 55 and 60 min after fertilization, whereas the tetraploidy embryos were not found in the pressure treatment groups at 48, 45, 42, 40, 38 and 35 min after fertilization. The results suggest that hydrostatic pressure treatment at 50—60 min post-fertilization arrest the first cleavage and induce tetraploidy.

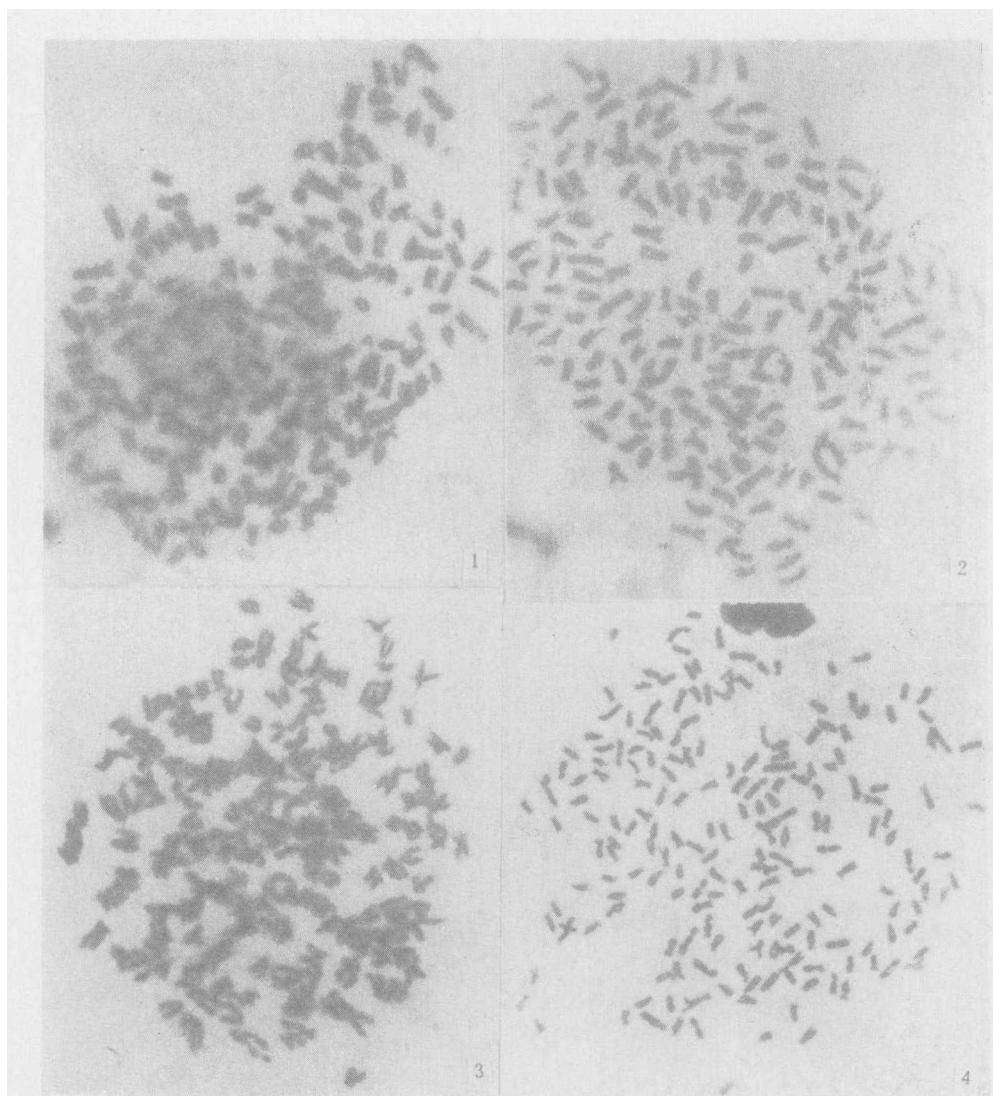
The shocks involving a combination of hydrostatic pressure and cold treatment were applied at 40, 48, 50, 52, 55, 56 or 60 min post-fertilization. The tetraploidy embryos of tetraploids, hypotetraploids and tetraploid/diploid mosaics were observed in the combined treatment groups at 48, 50, 52, 55, 56 and 60 min post-fertilization. The tetraploidy rates in the combined treatment groups were higher than those in the pressure treatment groups. Both methods of treatments, especially the combined treatment, strongly affected the development of fertilized eggs and decreased the survival rates of embryos. The fertilized eggs subjected to pressure shocks and the combined shocks not only produced tetraploids, hypotetraploids and tetraploid/diploid mosaics, but also developed diploids and hypodiploids. Some chromosome fragments caused by the suboptimal treatments were obviously observed in the metaphases of some hypotetraploids and hypodiploids. We also found a short stage at which fertilized eggs have stronger tolerance towards the shock treatments during the effective period for the inhibition of first mitosis and induction of tetraploidy. Before and after this short stage, the fertilized eggs were more sensitive to the shock treatments. Artificial tetraploid transparent colored crucian carp were identified and selected from the individuals developed from some shock groups through chromosome observation of tail-fin tissue cells of fingerlings and blood cultured cells of adult fish. The problems about the techniques of inducing tetraploidy, the effective period of blocking first mitosis for the doubling of chromosome set and the survival rates and viability of tetraploidy embryos in fish were analysed and discussed based on the results obtained from this study and those reported by other investigators

#### Key words

Genome manipulation, Tetraploid, Hydrostatic pressure shock, Combined treatment of pressure and cold shock, Ornamental fish, Transparent colored crucian carp



1. 对照组二倍体胚胎的中期相 (CN = 100); 2. 四倍体胚胎的中期相 (CN = 200); 3. 次二倍体胚胎的中期相 (CN = 67 + 3 个染色体片段)。4. 次二倍体胚胎的中期相 (CN = 96 + 13 个染色体片段)  
1. The metaphase (CN = 100) of diploid embryo in control; 2. The metaphase (CN = 200) of tetraploid embryo; 3. The metaphase (CN = 67 + 3 chromosome fragments) of hypodiploid embryo; 4. The metaphase (CN = 96 + 13 chromosome fragments) of hypodiploid embryo



1. 次四倍体胚胎的中期相 (CN = 183 + 7 个染色体片段); 2. 次四倍体胚胎的中期相 (CN = 187); 3. 四倍体幼鱼尾鳍细胞的中期相 (CN = 200); 4. 四倍体成鱼血培养细胞的中期相 (CN = 200)

1. The metaphase (CN = 183 + 7 chromosome fragments) of hypotetraploid embryo; 2. The metaphase (CN = 187) of hypotetraploid embryo; 3. The metaphase (CN = 200) of tail-fin cell of tetraploid fingerling; 4. The metaphase (CN = 200) of blood cultured cell of tetraploid adult