

# 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\*

桂建芳 梁绍昌 孙建民 黄文郁 蒋一珪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

### 提 要

采用静水压休克方法研究了促使第二极体保留诱发三倍体水晶彩鲫的最佳条件。在卵受精后4—5min采用600kg/cm<sup>2</sup>或650kg/cm<sup>2</sup>的静水压处理3min, 不但能导致100%的三倍化, 而且胚胎的存活率相当高, 孵化率为对照组的90%左右。研究表明, 静水压休克是进行鱼类染色体组操作的有效方法, 休克的最佳条件易于掌握, 处理程序易于标准化。文中讨论了静水压处理的条件与三倍体出现率和胚胎存活率的关系, 以及最佳条件下和不适当条件下胚胎死亡的原因。

**关键词** 三倍体, 染色体组操作, 静水压休克, 观赏鱼, 水晶彩鲫, 倍性鉴定

染色体组操作是动植物细胞工程育种研究中的一个行之有效的途径。在鱼类中, 这一领域的研究近年来进展更快, 报道甚多<sup>[4, 6, 18, 19]</sup>。这一方面可能是由于鱼类一般为体外异体受精, 在成熟的人工繁殖技术条件下, 其高度的产卵能力承担得起人工操作所造成的损耗<sup>[10]</sup>; 另一方面可能是由于鱼类中存在的天然多倍体物种所具有的理论意义和经济价值<sup>[3, 5]</sup>以及人工三倍体鱼所表现出的不育特性<sup>[18]</sup>促使育种学家从事这一研究, 试图创造出经济价值更高的养殖对象。

我国是养殖观赏鱼最悠久的国家, 特别是近年来, 随着人们生活水平的提高, 对观赏鱼的需求量日益增加。为了培育出具有更高欣赏价值的观赏鱼, 并使其生产程序化和专利化, 我们将染色体组操作应用于观赏鱼研究, 在国内首次成功地采用静水压休克生产出三倍体水晶彩鲫, 并就开始处理时间、施加压力大小和处理持续时间这三个参数的最佳化进行了一系列试验, 结果获得了100%的三倍体鱼, 且具有相当高的存活率。

### 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*) 亲本取自本所

\* 本工作得到中国科学院青年科学基金(862001)的资助。

1988年3月2日收到。

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,迅速将纱网剪成一定大小的长条或小块,带水放入静水压器的压力室中待处理。或将受精卵用泥浆脱粘后直接放入压力室中待处理。由于脱粘费时较长,除受精后8min处理组用泥浆脱粘外,其余处理组均采用前一方法。授精、处理和胚胎发育前期的水温一般为14—16℃(试验在3月下旬和4月上旬进行)。从入水开始计算卵受精后的发育时间。

## 2. 静水压处理

静水压力器(hydrostatic pressure apparatus, 简称HSPA)参照前人报道进行设计和制造<sup>[8,11]</sup>。压力室的最大耐受压为1000kg/cm<sup>2</sup>。休克处理之前,将受精卵带水装入已加有一半左右水的压力室中,然后将水补足,旋上螺盖,由排气阀门排出筒内的剩余空气和多余的水。处理时,迅速升压,达到预定靶压。压力上升的速度大约为100kg/cm<sup>2</sup>/s。处理持续时间包括压力开始上升到卸压时的时间。卸压时,拧开压力泵上的卸压阀门,压力即可瞬间释放。卸压后,旋去螺盖,倒出鱼卵,在室温下孵化。

## 3. 存活率统计

在囊胚期、尾芽期、体色素出现期、孵化期和开口摄食期分别取样(一般最少统计100个胚胎左右)统计各个试验组和对照组的存活样品数。以对照组发育到囊胚期的胚胎占卵数的比例作为受精率,分别折算出对照组和试验组在胚胎或幼苗发育中的存活率,再将试验组各个阶段发育的存活率除以对照组相应阶段发育的存活率,分别求得各个阶段试验组相对于对照组发育的存活率。

## 4. 倍性鉴定

当胚胎发育到原肠中期时,随机选出20—50个胚胎,按多个胚胎混合染色体制片法<sup>[1]</sup>进行倍性鉴定。此法操作方便,简单熟练,能很快判断是否多倍化,且中期相的质量较好,可用于核型分析。

当胚胎发育到尾芽期或体色素形成期时,随机选出一定数目的胚胎,按单个胚胎染色体制片法<sup>[2]</sup>进行倍性鉴定。此法虽是一个个胚胎分别制片,但只要保证胚胎间具有一定的间隙,在一个小培养皿中可同时低渗和固定20—30个胚胎,且制片快,便于连续操作,能精确统计试验组的多倍化比例。

幼鱼的倍性鉴定采用尾鳍细胞染色体直接制片法进行,即在幼鱼长到3—4cm左右时(大约孵化1个月),随机取样,直接将尾鳍边缘组织剪下,分别置含有200—400μg/ml秋水仙胺的0.7%柠檬酸钠溶液中处理0.5—1h;其固定和制片步骤基本上与单个胚胎染色体制片法<sup>[2]</sup>相同。当幼鱼长到6—7cm以后,随着鱼的增长,尾鳍细胞直接制片的成功率愈低,必须采用尾鳍的再生组织进行制片。一般在剪鳍后4—6天时取再生组织较好。此法不但能统计出幼鱼的多倍体比例,而且试验鱼仍能继续生长存活,最终筛选出多倍体鱼。

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; 我们发现二倍体水晶彩鲫的染色体数为 100 (图版 I:1), 在确定倍性时, 以染色体数为 100 左右的为二倍体, 150 左右的为三倍体, 明显少于 100 (一般在 90 以下) 的为次二倍体 ( $2n-1$ ), 明显多于 100 少于 150 的为次三倍体 ( $3n-1$ ), 既有 100 左右又有 150 左右的为镶嵌体。

## 结 果

### 1. 受精后至开始压力休克的最佳时间

在压力一定 ( $650 \text{ kg/cm}^2$ ) 和处理持续时间一定 (3 min) 的条件下, 分别在受精后 4、5、6、7 和 8 min 时开始进行静水压处理。结果发现, 在受精后 4 和 5 min 时采用压力持续处理 3 min 的试验组中, 胚胎和幼鱼的存活率最高, 4 min 时处理组的孵化率相当于对照组的 91.0%, 开口摄食时的幼鱼存活率相当于对照组的 80.1%; 5 min 时处理组的孵化率和开口摄食时的存活率分别相当于对照组的 88.2% 和 86.1%; 在卵受精后 6 和 6 min 以后的处理组中, 胚胎的存活率明显降低, 在尾芽期后观察到大量的畸形胚, 有的虽也出现了体色素, 但大部分都不能孵化出苗, 即使出苗, 也多为畸形, 最终死于开口摄食之前, 只有少数(相对于对照组的 10% 以下)幼鱼能存活下来(图 1)。

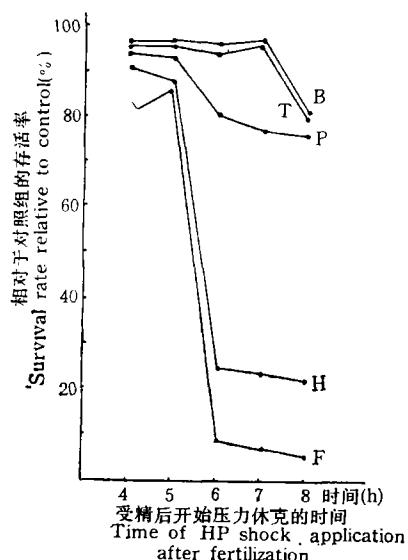


图 1 受精后不同时间开始压力休克的各个试验组在不同发育阶段(囊胚期-B, 尾芽期-T, 色素出现期-P, 孵化期-H 和开口摄食期-F)相对于对照组的存活率

Fig. 1. Survival rate relative to controls at different developmental stages (blastula-B, tail bud-T, pigmentation-P, hatching-H and firstfeeding-F) in each experimental group treated with hydrostatic pressure shocks at different times after fertilization

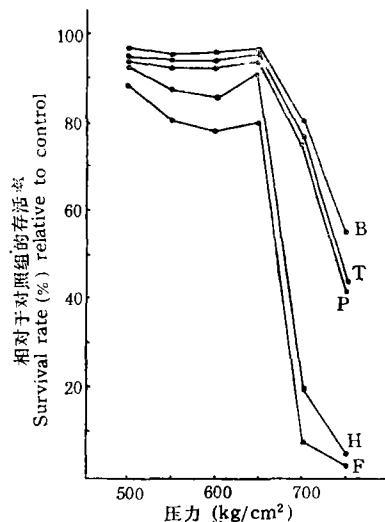


图 2 受精后 4 分钟时用不同大小的压力休克的各个试验组在不同发育阶段(囊胚期-B, 尾芽期-T, 色素出现期-P, 孵化期-H 和开口摄食期-F)相对于对照组的存活率

Fig. 2 Survival rate relative to controls at different developmental stages (blastula-B, tail bud-T, pigmentation-P, hatching-H and first-feeding-F) in each experimental group treated with hydrostatic pressure shocks at different levels. Application of the shock occurred 4 min after fertilization and lasted 3 minutes in all cases

表1 受精后不同时间分别采用  $650\text{kg/cm}^2$  的压力持续休克 3min 的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 following hydrostatic pressure treatment of  $650\text{kg/cm}^2$  for 3 minutes at different times after fertilization

受精后至开始压力休克的时间(分) Time of HP shock application after fertilization (min)	鉴定的样品 Samples examined	鉴定的样品数 No. of samples examined	倍性 Ploidy level						三倍化率 Percentage of triploidy
			单倍体 haploid (1n)	次二倍体 hypodiploid (2n-)	二倍体 diploid (2n)	次三倍体 hypotriplloid (3n-)	镶嵌体 mosaic (2n/3n)	三倍体 triploid (3n)	
4	胚胎 embryo 幼鱼 fingerling	33	1	1		2		29	94.0
		34				1		33	100
5	胚胎 embryo 幼鱼 fingerling	16						16	100
		33						33	100
6	胚胎 embryo	16		11	2	1		2	18.8
7	胚胎 embryo	17		15	2				0
8	胚胎 embryo	13		11	2				0

倍性鉴定表明(表1),在卵受精后 4 和 5min 进行处理时,其效果最佳。4min 时处理组虽在胚胎中发现了少数单倍体和次二倍体,但它们都难以存活,在检查的 34 尾幼鱼中,除 1 尾次三倍体外,其余 33 尾都是三倍体(图版 I:5),三倍化率达到 100%;在 5min 时的处理组中,无论是胚胎还是幼鱼,三倍体出现率都是 100%。6min 时的处理组仍有少量的三倍化了的胚胎,但在 7 和 8min 时的处理组中,均未检查到三倍体胚胎,绝大多数胚胎是次二倍体,其染色体数明显少于 100,分裂相中见有数目不等的染色体片段(图版 I:2)。

## 2. 压力大小对存活率和三倍化的影响

为了获得休克的最适压力范围,在卵受精后 4min 时,分别采用  $500\text{kg/cm}^2$ 、 $550\text{kg/cm}^2$ 、 $600\text{kg/cm}^2$ 、 $650\text{kg/cm}^2$ 、 $700\text{kg/cm}^2$  和  $750\text{kg/cm}^2$  的压力,持续处理相同的时间(3min)。结果表明,当用  $500\text{kg/cm}^2$ 、 $550\text{kg/cm}^2$ 、 $600\text{kg/cm}^2$  和  $650\text{kg/cm}^2$  的压力处理时,胚胎的存活率、孵化率以及摄食时鱼苗的存活率与对照组相比,几乎没有多大改变;当用  $700\text{kg/cm}^2$  和  $750\text{kg/cm}^2$  的压力处理时,胚胎的畸形率明显上升,孵化率分别为对照的 19.8% 和 4.57%,摄食时鱼苗的存活率仅为对照组的 8.29% 和 2.81%(图 2)。

倍性鉴定(表 2)表明,在压力为  $500$  或  $550\text{kg/cm}^2$  的处理组中,胚胎和幼鱼中都混存有少数二倍体;在压力为  $600$  或  $650\text{kg/cm}^2$  的处理组中,虽发现了极个别的单倍体和次二倍体胚胎,但鉴定的幼鱼都为 100% 的三倍体(图版 I:6);在压力为  $700$  或  $750\text{kg/cm}^2$  的

表 2 受精后 4min 时分别用不同大小的压力持续休克 3min 的各个试验组中的胚胎和幼鱼的倍性鉴定结果  
 Tab. 2 The results of ploidy identification of embryos and fingerlings in each experimental group by applying for 3 minutes of a hydrostatic pressure shock at different levels when 4 min after fertilization

压力大小 Pressure levels (kg/cm <sup>2</sup> )	鉴定的样品 Samples identified	鉴定的样品数 No. of samples identified	倍性 Ploidy level					三倍化率 Percenta- ge of triploidy (%)
			次二倍体 hypodiploid (2n-)	二倍体 diploid (2n)	次三倍体 hypotripliod (3n-)	镶嵌体 mosaic (2n/3n)	三倍体 triploid (3n)	
500	胚胎 embryo	17		4			13	76.5
550	胚胎 embryo 幼鱼 fingerling	15	1	1			13	86.7
		21		1		1	19	95.2
600	胚胎 embryo 幼鱼 fingerling	18	1				17	94.4
		11					11	100
650	胚胎 embryo 幼鱼 fingerling	33	2*		2		29	94.0
		34			1		33	100
700	胚胎 embryo 幼鱼 fingerling	12	1		4	2	5	91.7
		4					4	100
750	胚胎 embryo 幼鱼 fingerling	12			3	3	6	100
		3					3	100

\* 其中 1 个胚胎为单倍体 (1n)

表 3 不同持续处理时间的各个试验组中的胚胎和幼鱼的倍性鉴定结果

Tab. 3 The results of ploidy identification of embryos and fingerlings in each experimental group treated by applying a 650kg/cm<sup>2</sup> pressure for various durations at 4 min after fertilization

处理持续 时间 Treatment duration (min)	鉴定的样品 Samples identified	鉴定的样品数 No. of samples	倍性 Ploidy level					三倍化率 Percenta- ge of triploidy (%)
			次二倍体 hypodiploid (2n-)	二倍体 diploid (2n)	次三倍体 hypotripliod (3n-)	镶嵌体 mosaic (2n/3n)	三倍体 triploid (3n)	
4	胚胎 embryo 幼鱼 fingerling	14			3	1	10	100
		6			1		5	100
5	胚胎 embryo 幼鱼 fingerling	10			2	2	6	100
		15					15	100
6	胚胎 embryo 幼鱼 fingerling	10			4	2	4	100
		6					6	100

处理组中, 虽鉴定的胚胎基本上发生了三倍化, 但大多是次三倍体(图版 I:3)和镶嵌体, 在它们的一些分裂相中, 可见到数目不等的染色体断片(图版 I:4), 存活下来的幼鱼经鉴定是三倍体。

### 3. 处理时间过长对胚胎具有破坏作用

当受精后开始处理的时间一定(受精后 4 min), 处理的压力一定( $650 \text{ kg/cm}^2$ ), 而延长处理的持续时间时, 胚胎和鱼苗的存活率受到了严重影响(图 3)。处理时间愈长, 存活率愈低。

倍性鉴定表明(表 3), 在处理时间为 4、5 和 6 min 的处理组中, 虽都 100% 三倍化了, 但在胚胎中发现了较多的次三倍体和  $3n/2n$  镶嵌体, 并在分裂相中可观察到数目不等的染色体片段, 这显然是由于处理时间过长导致染色体断裂或丢失造成的。

## 讨 论

### 1. 静水压休克是进行鱼类染色体组操作的有效方法

鱼类染色体组操作的方法包括生物学、物理学和化学的方法, 最常用而效果又较好的是物理学的静水压休克、热休克和冷休克<sup>[4]</sup>。迄今, 虽然已在很多鱼类中获得了三倍体<sup>[4,6,12,19]</sup>, 但离实际应用仍有一定的距离, 许多结果有的是存活率低, 有的是三倍体出现率低, 有的是结果不稳定, 难以达到商品化生产。

自 Streisinger 等将它成功地用于诱导斑马鱼的杂合和纯合雌核发育<sup>[17]</sup>, 开创了静水压休克进行鱼类染色体组操作的先例以来, 已有一些成功的报道<sup>[7-9,13-16]</sup>。我们用  $600 \text{ kg/cm}^2$  或  $650 \text{ kg/cm}^2$  的压力在卵受精后 4 或 5 min 时持续处理 3 min, 虽在胚胎期发现了极个别的单倍体和次二倍体, 但孵化后存活的幼鱼都是三倍体, 且存活率相当高。这些结果表明, 静水压休克是诱发鱼类染色体组加倍的理想方法, 因为在进行操作时, 特别是将这一技术应用于生产实践的过程中, 重要的是既要获得 100% 的多倍体, 又要有相当高的存活率。相对于其它休克方法来说, 静水压休克能使这两者兼而有之。因此, 静水压休克虽比温度休克需要更专门的设备, 但其处理的最佳条件易于掌握, 程序易于标准化, 是一个值得推广的有效方法。

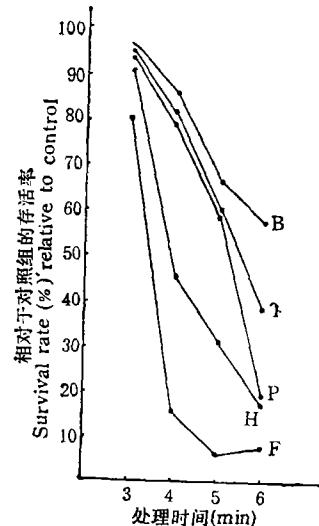


图 3 不同持续处理时间的各个试验组在不同发育阶段(囊胚期-B, 尾芽期-T, 色素出现期-P, 孵化期-H 和开口摄食期-F) 相对于对照组的存活率。

Fig. 3 Survival rate relative to controls at different developmental stages (blastula-B, tail bud-T, pigmentation-P, hatching-H and firstfeeding-F) in each experimental group treated with  $650 \text{ kg/cm}^2$  pressures for different durations at 4 min after fertilization.

## 2. 静水压休克的条件与三倍体出现率和存活率的关系

在寻找促使第二极体保留诱导三倍体水晶彩鲫的最佳条件的试验中, 我们发现, 当卵受精后 4—5min 时采用 600 或  $650\text{kg/cm}^2$  的静水压持续休克 3min, 其效果最好, 不但三倍体出现率为 100%, 而且存活率相当高。当开始处理时间、压力大小和处理持续时间这三个参数没有达到最佳状态时, 对存活率和三倍体出现率具有严重影响, 三个参数相互关联, 缺一不可。当延误了开始处理的时间时, 达不到保留第二极体的目的, 不但不能获得三倍体, 而且压力对受精卵具有损伤作用, 导致染色体断裂或丢失, 成为次二倍体而死亡; 当压力较小时, 仍有部分受精卵的第二极体没有留住, 出现二倍体; 当压力过大时, 超过了卵子所能承受的负荷, 有的当即破裂, 有的受到损伤, 染色体断裂或丢失, 形成次三倍体或镶嵌体而大多夭亡; 当处理时间加长时, 如同压力过高一样, 明显影响了受精卵和胚胎发育过程。

在采用静水压休克促使第二极体保留诱发三倍体或雌核发育的报道中, 最佳压力都在  $500$ — $700\text{kg/cm}^2$ , 大多数在  $550$ — $650\text{kg/cm}^2$  之间<sup>[13—17]</sup>。开始处理时间主要与鱼类的生存环境和胚胎发育速度相关, 一般是冷水性鱼类的较迟, 如鲑科鱼类大多在受精后 15—40min 之间开始处理最好<sup>[13,14]</sup>; 温水性鱼类的较早, 如草鱼<sup>[8]</sup>和水晶彩鲫在受精后 4—5min 时开始处理最好。处理持续时间一般也是鲑科鱼类较长, 大多在 6—10min 左右, 而鲤科鱼类一般 2—3min 最好<sup>[8,9,13,14]</sup>。就草鱼和水晶彩鲫来说, 草鱼的最佳压力比水晶彩鲫低, 最佳持续处理时间也比水晶彩鲫短, 这可能主要与卵子特性有关, 因为草鱼为浮性卵, 卵膜较薄, 耐受的压力和耐受压力的时间就相对小和短; 而水晶彩鲫为粘性卵, 卵膜较厚, 卵子相对坚硬, 耐受压力就相对较大, 耐受时间也较长。上述分析表明, 静水压休克是一种易于掌握的方法, 它有一定的规律可循, 处理的起始时间、压力大小和持续时间主要与鱼类的生长环境、卵子特性以及胚胎发育速度相关。在进行某种鱼的三倍化操作时, 根据这些因素作一些改动, 就容易找到最佳化条件, 达到研究的目的。

## 参 考 文 献

- [1] 余先觉、周璥、李渝成、李康、周密, 1989。中国淡水鱼类染色体。科学出版社。
- [2] 洪云汉, 1987。鱼类单个胚胎染色体标本的快速制备法。淡水渔业, (1): 35—36。
- [3] 桂建芳, 1985。多倍体鱼类的开发和利用。水库渔业, (3): 53—56。
- [4] 楼允东, 1984。国外鱼类多倍体育种的研究。水产学报, 8(4): 343—356。
- [5] Allendorf, F. W. and Thorgaard, G. H., 1984. Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. In Turner, B. J. (ed.) Evolutionary Genetics of Fishes. Plenum press, New York.
- [6] Arai, K. and Wilkins, N. P., 1987. Triploidization of brown trout (*Salmo trutta*) by heat shocks. *Aquaculture*, 64(2): 97—103.
- [7] Benfey, T. J. and Sutterlin, A. M., 1984. Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 36(4): 359—367.
- [8] Cassani, J. R. and Caton, W. E., 1986. Efficient production of triploid grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) utilizing hydrostatic pressure. *Aquaculture*, 55(1): 43—50.
- [9] 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 genogenetics. *Aquaculture*, 36(2): 111—126.
- [10] Chourrout, D., Chevassus, B., Krieg, F., Happe, A., Burger, G. and Renard, P., 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females-poten-

tial of tetraploid fish. *Theor. Appl. Genet.*, 72(2): 193—206.

[11] Dasgupta, S., 1962. Induction of triploidy by hydrostatic pressure in the leopard frog, *Rana pipiens*. *J. Exp. Zool.*, 151(2): 105—121.

[12] Don, J. and Avtalion, R. R., 1986. The induction of triploidy in *Oreochromis aureus* by heat shock. *Theor. Appl. Genet.*, 72(2): 186—192.

[13] Lou, Y. D. and Purdom, C. E., 1984. Diploid gynogenesis induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri Richardson*. *J. Fish Biol.*, 24(6): 665—670.

[14] Lou, Y. D. and Purdom, C. E., 1984. Polyploidy induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri Richardson*. *J. Fish Biol.*, 25(3): 345—351.

[15] 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.

[16] Onozato, H., 1984. Diploidization of gynogenetically activated salmonid eggs using hydrostatic pressure. *Aquaculture*, 43(1—3): 91—97.

[17] Streisinger, G. Walker, C. Dower, N. Knauber, D. and Singer, F., 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291: 293—296.

[18] Thorgaard, G. H., 1983. Chromosome set manipulation and sex control in fish. In Hoar, W. S. et al. (ed.). *Fish Physiology*, Vol. 9B, pp. 405—434, Academic press, New York, NY.

[19] Thorgaard, G. H., 1986. Ploidy manipulation and performance. *Aquaculture*, 57(1—4): 57—64.

# STUDIES ON GENOME MANIPULATION IN FISH I. INDUCTION OF TRIPLOID TRANSPARENT COLORED CRUCIAN CARP (*CARASSIUS AURATUS* TRANSPARENT COLORED VARIETY) BY HYDROSTATIC PRESSURE

Guo Jianfang Liang Shaochang Sun Jianmin Huang Wenyu and Jiang Yigui

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

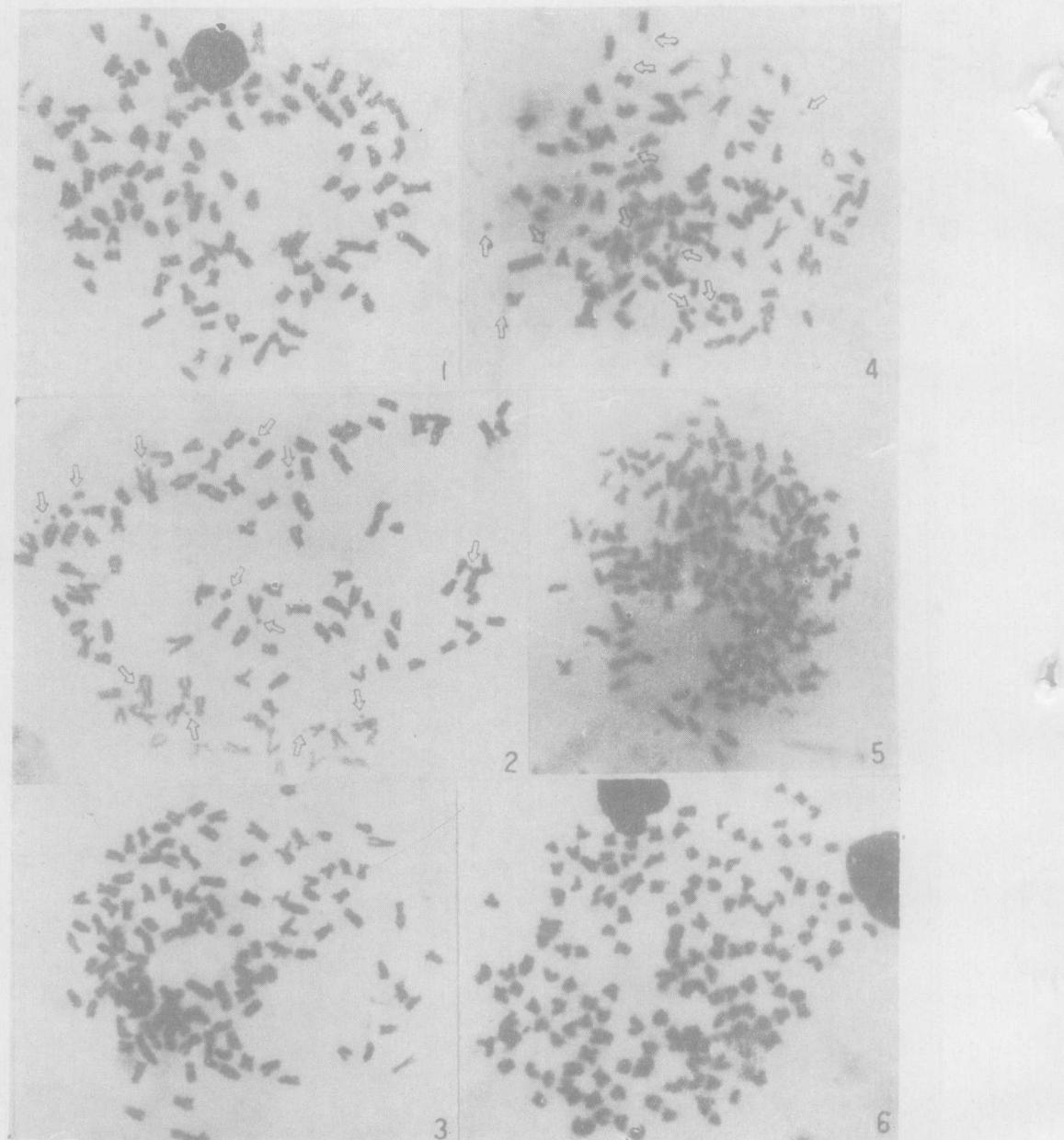
## Abstract

This study was made to optimize hydrostatic pressure shock conditions for producing triploid transparent colored crucian carp (*Carassius auratus* transparent colored variety) by inducing second polar body retention. Shocks involving hydrostatic pressures of 600 kg/cm<sup>2</sup> and 650 kg/cm<sup>2</sup> for 3 minutes, applied 4 min or 5 min after fertilization, not only gave 100% triploidy as assessed by chromosome observation in the cells of embryos and fingerlings, but also produced relatively high rates of survival; the rates of hatching were about 90% relative to controls. Shocks applied at 6 min or later after fertilization had almost no effect on triploidization, and resulted in low survival rates. Shocks of hydrostatic pressures lower than 600 kg/cm<sup>2</sup> (550 kg/cm<sup>2</sup> or 500 kg/cm<sup>2</sup>) for 3 minutes resulted in a small proportion of diploids. Shocks of hydrostatic pressures higher than 650 kg/cm<sup>2</sup> (700 kg/cm<sup>2</sup> or 750 kg/cm<sup>2</sup>) for 3 minutes produced 100% triploidy but strongly affected the development of fertilized eggs, resulting in deformed embryos because of chromosome breakage and loss. The treatment of longer durations had the same effect as the treatment of higher pressures, which apparently disrupted the embryonic developmental processes. The longer the treatment duration, the higher the mortality.

The results obtained from this study and those reported by other investigators seem to indicate that hydrostatic pressure shock may be an efficient method for performing chromosome set manipulation in fish, because the optimal conditions of hydrostatic pressure treatment are easy to obtain and the procedures of treatment are easy to standardize. The relationships between the optimal conditions and the percentage of triploidy as well as the survival rates were discussed. The causes for death under optimal and suboptimal conditions were analysed.

**Key words** Triploid, Genome manipulation, Hydrostatic pressure shock, Ornamental fish. Transparent colored crucian carp, Ploidy identification

## I. 静水压休克诱导三倍体水晶彩鲫



1.对照组二倍体胚胎的中期相; 2.含有染色体片段(箭头表明)的次二倍体胚胎的中期相; 3.次三倍体胚胎的中期相; 4.含有染色体片段的次三倍体胚胎的中期相; 5.三倍体胚胎的中期相; 6.三倍体幼鱼尾鳍细胞的中期相

1. The metaphase of diploid embryo in the control; 2. The metaphase of hypodiploid embryo with chromosome fragments (indicated by arrows); 3. The metaphase of hypotriploid embryo; 4. The metaphase of hypotriploid embryo with chromosome fragments (indicated by arrows); 5. The metaphase of triploid embryo; 6. The metaphase of tail fin cell of triploid fingerling