第19卷 第1期 水生生物学报 Vol. 19, No. 1
1995年3月 ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA Mar., 1995

静水压休克诱导水晶彩鲫三倍体和四倍体的细胞学机理初探

桂建芳 肖武汉 梁绍昌 蒋一珪
（中国科学院水生生物研究所， 武汉 430072）

提 要

本文分析了静水压休克诱导水晶彩鲫三倍体和四倍体的细胞学机理．促使第二极体保留的压力敏感期较短，在卵子第二次成熟分裂中后期的某段时间，也就是受精后4—5 min时；而在这之前，为卵子启动期，施加压力会破坏卵子的激动和修整过程，造成发育受阻；其后，为压力不应期，此时第二次成熟分裂态势也趋明朗，压力对保留第二极体失去作用。

本文还对促使第二极体保留生产鱼类三倍体和抑制第一次卵裂诱导鱼类四倍体的条件等问题进行了讨论．

关键词 染色体组操作，静水压休克，细胞学机理，三极纺锤体，观赏鱼

鱼类染色体组操作是近年来鱼类遗传育种研究工作中的活跃领域之一。迄今，采用静水压休克、热休克和冷休克等方法，已在近20种养殖鱼类中获得了三倍体[1,2]，在虹鳟(*Salmo gairdneri* Richardson)白鲫(♀)×红鲤(♂)[4]、虹鳟×褐鳟(*Salmo trutta* Cimaeus)[3]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和莫桑比克罗非鱼(*O. mossamibicus*)[5]获得了同源四倍体或异源四倍体。然而，尽管进展很快、报道甚多，但大多数离实践应用仍有一定的距离，许多结果仍没有完全摸索出最佳的诱导参数。其最基本的原因之一就是对人工诱导鱼类三倍体和四倍体的作用机理缺少系统研究。

鉴于上述原因，作者在采用静水压休克获得了批量三倍体[1]和少数四倍体水晶彩鲫[6]之后，采用组织学切片技术，着重对处理前后的受精卵进行了切片和细胞学观察，就静水压休克保留第二极体和抑制第一次卵裂促使染色体组加倍的细胞学作用机理进行了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 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，待授精

1991年8月2日收到。1994年9月18日修回。

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。从授精卵入水开始计算卵授精后的发育时间。室温为 14—16℃。

1.2 静水压处理、取材固定

处理方法和程序详见桂建芳等的报道[1]。促使第二极体保留诱导三倍体的处理组在受精后 4 min 采用 600 kg/cm^2 的压力持续处理 3 min。抑制第一次卵裂诱导四倍体的处理组分别在处理后 50、52、55、57、65 min 时进行。处理压力均为 550 kg/cm^2，处理持续时间均为 3 min。

在受精后 1、2、4、7、50、52、55、57、65 min 时，分别取 1 小块纱网于 Bouin 液中固定。处理后的受精卵，分别于处理后、处理后 2 min 和处理后 5 min 剪取 1 小块粘卵纱网于 Bouin 液中固定。

1.3 制片观察

固定 12—24 h 后，将粘卵纱网置于盛有 70% 酒精的培养皿中，把卵粒小心剥下。依次经 70%、80%、90%、95%、100% 酒精脱水、二甲苯透明，石蜡包埋，切片厚度 5—8 μm，Delafield 苏木精染色，伊红复染。油镜观察，显微摄影。

2 结果

水晶彩鲫卵呈球形，在卵周隙中有许多卵内排出的物质。受精后 1 min，动物极和受精膜均不明显，整个卵充满卵黄颗粒。受精后 2 min，可见到受精膜、胚体物质继续外排。受精后 4 min，由胞质构成的动物极呈内突的弯月状，在动物极边缘处，由中期向后期过渡的第二次减数分裂图像清晰可见，纺锤体完整明显，染色体在纺锤丝的牵引下，开始离开中期板向两极移动(图版 I:1)，距此不远处，可见一致密的圆形精核。

在受精后 4 min 经 600 kg/cm^2 的静水压处理 3 min 的受精卵切片中，普遍观察到减数分裂 II 的有丝分裂器受到破坏的图像，主要表现为纺锤体及纺锤丝消失，在有丝分裂器原星体附近，染色体凝缩成两团，呈现浓染 (图版 I:2)。处理后 5 min，染色质团开始靠拢，部分形成泡状结构，向胚盘中央和深处移动，并向雄核靠近，此时，雄核原核化程度较强，呈泡状结构，直径明显大于雌原核；雌雄原核均已显现出星光，两星光开始相连，但星光以雄原核较强(图版 I:3)。在少数处理卵中，处理后 5 min 偶尔也可见到未受到有效处理的图像，第二次减数分裂已进入末期，染色体被拉向两极，但由于运动速度不一，染色体在两极呈前后排列(图版 I:4)，由此发育的胚胎很可能是染色体检查中发现的次二倍体或次三倍体[1]。

卵受精后 50 min 和 52 min 时，第一次卵裂进入有丝分裂中期，星体和纺锤体明显，染色体排列于赤道板上，清晰可见 (图版 I:5)。经 550 kg/cm^2 的静水压处理 3 min 后，可观察到三种类型的图像：一种图像可见星体缩小，星射线和纺锤体消失，赤道板上的染色体凝缩为致密状，能区分为一大一小两部分，在其周围有一浅染区 (图版 I:6)；另一种图像可见连接染色体的纺锤丝消失，星体仍明显，染色体聚集成一团，中部有些部分已凝缩(图版 I:7)；第三种图像可见星体和纺锤体均明显，几乎观察不到静水压处理的影响，染色体清晰可辩，已开始向两极移动，但运动速度不一，呈前后排列(图版 I:8)。

卵受精后 55 min 和 57 min 时，第一次卵裂进入有丝分裂后期，染色体在纺锤丝的

牵引下，向两极移动，星体和纺锤体十分明显（图版 I:9）。在受精后 55 min 时的处理组中，观察到两种图像。一种图像是星体明显变小，纺锤丝受到一定程度的破坏，靠近染色体的纺锤丝形成网状结构，染色质聚在一起，部分凝缩，星体和染色质团不在一条直线上，构成一定角度（图版 I:10）；在处理后 5 min 时，观察到典型的类似于三极纺锤体的图像，三星体间呈等腰三角形，星射线较弱，染色质凝缩成团块状，分为二部分，大的呈肾形，小的呈球形，位于等腰三角形的中间（图版 I:11）。另一类图像是星体和纺锤体全部消失，染色体凝缩成团块，分成三部分，围成一不规则的圆（图版 I:12）。

在卵受精后 57 min 时的处理组中所观察到的图像主要与受精后 55 min 处理组中所观察到的第二类图像类似，星体和纺锤体完全消失，染色体凝缩成两团，中间有一细线相连（图版 I:13）；经 2 min 发育后，染色质逐渐膨大，形成一球形泡状结构，泡中间分散着一些棒状深染物质；再过 3 min 也就是压力处理后 5 min 时，泡的直径进一步变大，紧接泡的一侧染色加深，并开始重新发出星光（图版 I:14）。

在受精后 65 min 时的处理组中，仍可观察到静水压休克对受精卵有丝分裂的影响。在处理后 5 min 时的切片中，见有两类图像。一类图像上纺锤体消失，星体变小，染色体位于两星体之间，呈凝缩状（图版 I:15）。另一类图像尤为特别，星体和纺锤体均已消失，染色体分别凝缩成小团，分开呈直线排列（图版 I:16）。

3 讨论

3.1 关于静水压休克的作用

上述结果清楚地表明，静水压休克能够促使第二极体保留和抑制第一次卵裂的最显著作用是静水压处理破坏了有丝分裂器中的纺锤丝，即纺锤体和星体，从而暂时阻断了有丝分裂进程。此外，静水压处理还使染色体发生了不同程度的凝缩，导致染色体在后来的发育过程中呈现出不同的变化。当然，静水压处理不当还可能使受精卵的结构发生某些物理和化学变化，造成发育受阻[1]。

有关静水压处理破坏纺锤体的报道在鱼类仅见一例。日本学者 Onozato 在采用静水压休克诱导虹鳟、马苏大麻哈鱼［(*Oncorhynchus masou* Brevaort)］和大麻哈鱼［(*O. keta* Wabaum)］雌核发育研究中，曾用静水压处理囊胚细胞，处理后与处理前相比，纺锤体消失[7]。在两栖类中，Briedis 和 Elinson 在采用静水压处理豹蛙［(*Rana pipens* Harlan)］的受精卵(此时受精卵处于第二极体已排出、第一次卵裂还未完成之间)时，发现雄原核的运动受到抑制，究其原因，他们认为是静水压休克使受精卵中完整的微管系统受到损害[8]。

现在一般认为，纺锤丝主要由微管蛋白组成。微管蛋白对温度，压力和秋水仙素等药物十分敏感，某一种因素的改变，都会引起微管的可逆性解聚[8]。就静水压休克来说，当施加压力时，微管解聚，纺锤丝崩解，纺锤体及星体随之消失，分裂受到抑制；当压力拆去后，微管蛋白重新聚集，纺锤丝接着形成，星光及纺锤体再现，分裂随之启动。这些过程作者在诱导三倍体和四倍体的受精卵切片中都已观察到(图版 I:2,3,13,14)。

3.2 关于诱导第二极体保留

水晶彩鲫的卵与其它鱼类甚至其它脊椎动物的卵一样，受精在第二次成熟分裂中期

进行[9]。受精后 4 min 时,第二次成熟分裂进程已被启动,开始由中期向后期发展（图版 I:1），静水压处理,将分裂阻断于中后期（图版 I:2)。依据以前发现水晶彩鲫受精卵在受精后 4—5 min 时进行静水压处理效果最好的研究结果[1],作者认为，水晶彩鲫受精卵诱使第二极体保留的压力效应期较短,处在卵子第二次成熟分裂中后期的某段时间,也就是在卵子受精后 4—5 min 之时。

水晶彩鲫受精卵在受精后 4—5 min 之前和之后，静水压休克为什么都不能获理想结果呢？作者从受精后 7 min 和受精后 10 min 的受精卵切片中，并未观察到第二极体的排出。看来，静水压休克促使第二极体保留对于受精卵而言，具有一最为敏感的时间区，且区间很短。这可用一个时间模型来解释。卵受精后从第二次成熟分裂中期到第二极体排出这段时间,据有丝分裂进程可分为中期、后期和末期；时间模型也将这段时间分为三个时期,分别称为卵子启动期、压力敏感期和压力不应期。

在卵子启动期,受精卵要完成激动和修整过程。朱 洗等认为，鱼类的卵子受精后，须先经过激动、修整，然后才是两性结合，没有激动和修整，或只有激动没有修整，受精卵都不能进行正常的发育[9]。在激动和修整过程中,受精卵要进行一系列的物理、化学和生物的变化。受精卵由第二次成熟分裂中期向后期的启动是这些变化的一部分，也许是比较关键的一部分。这时施加压力,一种可能是阻断了第二次成熟分裂的启动,另一种可能是压力直接影响了激动和修整过程中的卵，使正常变化不能进行。作者曾于受精后 2 min 和 3 min 时进行过压力处理,结果表明,受精卵不能发育的较多,即使发育,其孵化率也很低。顺便指出的是,启动期的激动和修整的时间过程对三倍体操作十分有利,正是由于这一启动期为我们完成静水压处理前的必要操作步骤提供了足够的时间。

在压力敏感期,激动和修整基本完成,适当的压力处理就能使微管蛋白解聚，纺锤体消失,将第二次成熟分裂阻止于中后期,而对其它过程几乎没有影响。过少的压力不能有效地破坏纺锤体,达不到留住第二极体的目的;过大的压力会使染色体受到损害或使受精卵破裂;大大降低存活率。

在压力不应期,第二次成熟分裂的态势已趋明朗,受精卵注定要排出第二极体，压力对保留第二极体失去作用。过高的压力只会使染色体受到损害,形成非整倍体,或使受精卵破裂。作者在个别处理组中偶尔观察到的未受到有效处理的第二极体有可能外排的图像(图版 I:4)，可能就是由于受精卵发育速度不均一，少数卵提前进入不应期的缘故。但从染色体运动的情况来看,这样的受精卵仍受到了静水压休克的影响,由此发育而成的胚胎很可能就是次二倍体或次三倍体胚胎,因为压力休克的作用,这样排出的极体不可能是一个完整的染色体组,如果排出的染色体数较多,发育而成的胚胎将是次二倍体,反之,如果排出的染色体数较少,发育而成的胚胎将是次三倍体[1]。

在敏感期受到有效休克的受精卵将如何再次启动进入第一次卵裂呢？显然，这是一个非常有趣的问题。作者在处理后 5 min 时虽然观察到两染色质团靠拢、形成泡状结构、向雄核靠近并开始显出星光等现象(图版 I:3)，但仅仅是这一复杂变化的有限部分，其详细的变化过程有待于进一步研究。

3.3 关于抑制第一次卵裂

人工诱导四倍体与人工诱导三倍体相比，要更为复杂和困难得多[10]。从作者在不同

时间处理组以及在同一处理组中所观察到的受到不同程度影响的第一次卵裂图像来看，也可以清楚地意识到这一点。

水晶彩鲫受精卵就其群体来说，第一次卵裂的大概时相是：受精后 50—52 min 处于有丝分裂中期，52—57 min 处于有丝分裂后期，57 min 后进入末期。从 65 min 时的图像以及其它作者的研究结果来看，受精后 65 min 时可能已进入第二次卵裂中期[10,11]。从受精后 50、52、55、57 以及 65 min 时静水压处理后所获得的切片结果来看，在这些时候，也就是在第一次卵裂中期、后期、末期、甚至第二次卵裂中期进行静水压处理，都有可能破坏纺锤体，抑制分裂进程，促使染色体组加倍，只不过是休克的效果各有不同。这与作者以前通过胚胎期的染色体检查发现在受精后 50—60 min 时的静水压处理组中都具有四倍化胚胎的结果是一致的。

当然，要想获得四倍体，不仅要有效地破坏纺锤体，抑制分裂进程，而且还要保证在休克拆除后，受精卵能够准确地重新启动，确保加倍了的染色体组协同一致，完成正常的分裂及胚胎发育过程。与前者相比，后者更为重要。这也许就是现今人们只是获得了四倍化胚胎而很难得到四倍体鱼的原因所在。作者所观察到的休克效果的差异，其症结也可能正在于此。在抑制卵裂促使染色体组加倍的效应期内，究竟什么时期开始休克处理效果最好，或者说处理后呈现的哪种图像是形成正常四倍体的必经分裂途径，这显然是一个值得继续深入探讨的问题。从此着手，也许能够较为顺利地找到诱导鱼类四倍体的最佳条件。

就本研究结果来说，静水压休克造成受精卵分裂异常的最显著特征就是导致了三极纺锤体的形成。关于三极纺锤体，Uepøac 和俞豪祥[11]分别在雌核发育银鲫的成熟分裂过程中以及葛伟和蒋一珪[12]在银鲫(♂)与红鲤(♀)杂交的第一次卵裂过程中都曾观察到这一类似结构。前者认为是天然雌核发育鱼类进行成熟分裂的一种特殊机制。后者认为是方正银鲫和红鲤染色体的不相容性和着丝点分裂的非同步性共同作用的结果。本实验对象既不是天然雌核发育鱼类，实验组合也不是杂交，更不是远缘杂交，而是经过压力休克使相同的染色体组加倍。因此，作者认为，三极纺锤体的形成并非仅仅在远缘杂交中出现，静水压休克也导致了三极纺锤体的形成。在形成三极纺锤体时，先是染色质团发生偏离，接着形成三极纺锤体，随后可能产生不平衡细胞，造成嵌合的非整倍体胚胎的出现。显然，这是压力休克后导致染色体组未能协同一致引起的。

总之，在诱导四倍体过程中，出现的情况非常复杂，对这些过程和机理的深入研究，将为寻求诱导鱼类四倍体的最佳处理条件提供更完善的理论依据，从而使操作技术更为完善。

参　考　文　献

[1] 桂建芳等，鱼类染色体组操作的研究 1、静水压休克诱导三倍体水晶彩鲫。水生生物学报，1990，**14**(4)：336—344。

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

[3] Chourrout D. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbon trout: production of all-triploids,all-tetraploids and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture*,1984, **36** (2): 111—126.

[4] 陈敏容等，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，1987，**11**：(1)：96—98。

[5] Myers J M., 1986. Tetraploid induction in Oreochromis spp. *Aquaculture*, **57** (1/4): 281—287.

[6] 桂建芳等,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。水生生物学报, 1991, **15**(4):333—342。

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

[8] Brieds A, Elinson R P. Suppression of male pronuclear movement in frog eggs by hydrostatic pressure and deuterium oxide yields androgenetic haploids. *J. Exp. Zool*, 1982, **222**: 45—57.

[9] 朱冼等,金鱼和鳊鱼卵球受精的细胞学研究。实验生物学报, 1960,**7**(1—2): 29—46。

[10] Chourrout D. Genetic manipulation in fish: review of methods. In: K. Tiews (Editor), Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture. (EIFAC/FAO Symp., 1986, publ, 1987) Schr. Bunesforschungsanst. Fisch. Hamburg, 18/19 (Vol. I/II). Heenemann,Berlin Vol. II, pp. 111—127.

[11] 俞豪祥,银鲫雌核发育的细胞学观察。水生生物学集刊, 1982,**7**(4): 481—487。

[12] 葛伟等,银鲫精子在两性融合鱼类卵质中的受精特征。水生生物学报, 1985,**9**(2): 111—115。

图 版 说 明

1—4. 受精后 4 min 时的处理结果: 1.对照组中正常的由中期向后期过渡的第二次减数分裂图相; 2.处理后,纺锤体和纺锤丝消失,染色体凝缩成两团; 3.处理后 5 min, 雌雄原核形成,并开始形成星光; 4.处理后 5 min 偶尔见到的异常末期图相; 5—8.受精后 52 min 时的处理结果: 5.对照组中处于第一次卵裂的中期相; 6.处理后纺锤体消失,染色体凝缩; 7.处理后连接染色体的纺锤丝消失; 8.处理后染色体向两极运动的速度不一; 9—12.受精后 55 min 时的处理结果: 9.对照组中处于第一次卵裂的后期相; 10.处理后 2 min, 星体变小, 与染色质团不在一条直线上; 11.处理后 5 min 时观察到的三极纺锤体; 12.处理后见到的另一种图相,星体和纺锤体消失,染色质凝缩成团; 13—14.受精后 57 min 时的处理结果: 13.处理后星体和纺锤体消失, 染色质凝缩; 14.处理后 5 min, 染色质形成泡状结构,并发出星光; 15—16. 受精后 65 min 时的处理结果: 15.处理后 5 min, 纺锤体消失,染色质凝缩;16 处理后 5 min, 星体和纺锤体均消失,染色体凝缩成小团

1—4. The treatment results at 4 min post-fertilization: 1. The normal second meiosis developing from metaphase to anaphase in controls; 2. Spindle and spindle fibers disappeared, and chromosomes condensed into two groups after treatment; 3. Female and male pronucleus formed, and asters occurred at 5 min after treatment; 4. The anomalous telophase observed from a few of noneffectively treated fertilized-eggs at 5 min after treatment; 5—8. The treatment results at 52 min post-fertilization: 5. The normal metaphase of first cleavage in controls; 6. Spindle disappeared, and chromosomes condensed after treatment; 7. The spindle fibers connecting with chromosomes disappeared after treatment; 8. Chromosomes moved toward two poles at different rates after treatment; 9—12. The treatment results at 55 min post-fertilization: 9. The normal anaphase of first cleavage in controls; 10. The asters became small and were not in a straight line with chromatin granule at 2 min after treatment; 11. The tripolar spindle formed at 5 min after treatment; 12. The asters and spindle disappeared, and chromatin condensed into masses after treatment; 13—14. The treatment results at 57 min post-fertilization: 13. Both asters and spindle disappeared, and chromatin condensed into masses after treatment; 14. The chromatin decondensed and transformed into vacuole structure with reappearing aster; 15—16. The treatment results at 65 min post-fertilization: 15. Spindle disappeared, and chromosomes condensed at 5 min after treatment; 16. The chromosomes condensed into many small granules after treatment

PRELIMINARY STUDY ON THE CYTOLOGICAL MECHANISM OF TRIPLOIDY AND TETRAPLOIDY INDUCED BY HYDROSTATIC PRESSURE SHOCK IN TRANSPARENT COLORED CRUCIAN CARP

Gui Jianfang Xiao Wuhan Liang Shaochang and Jiang Yigui

(Institute of Hydrobiology, the Chinese Academiy of Sciences Wuhan 430072)

Abstract

The cytological mechanism of triploiody and tetraploidy induced by hydrostatic pressure shock was analysed through histological sectoion techniques in transparent colored variety, Crucian carp the major effects of hydrostatic pressure treatment are to destruct spindle and intefere chromosome movement so that triploids and tetraploids are induced because of the retention of the second polar body and blocking of the first cleavage.

The sensitive period for inducing second polar body retention is short and is at the metaphase and anaphase of meiotic division II, i. e. 4—5min after sperm-egg fertilization. Before this period, the fertilized eggs are in the initializing stage. Hydrostatic pressure treatment of this stage would disrupt the exciting and decorating process of fetilized eggs, hindering embryo development. After the sensitive period the tendency of second meiotic division is so strong that application of hydrostatic pressure fails to control and retain second polar body. The stage is the nonsensitive period.

Fertilized eggs of transparent colored crucian carp were shown to develop into metaphase of first mitosis at 50—52min after fertilization, into anaphase at 52—57 min and into telophase at 57 min (water temperature 14—16℃). The effective period for inhibiting first mitosis for inducing tetraploidy by hydrostatic pressure was found to be during the metaphase and anaphase of first cleavage. Hydrostatic pressure treatment not only produced reversible microtubule depolymerization, damaged the spindle and arrested the process of first mitosis, but also resulted in chromosome condensation to various extents. Tripolar spindle bodies were observed in some treated fertilized eggs. These phenomena, especially formation of tripolar spindle body, might be related to chromosome breakage and loss in the induction of tetraploidy. It is these changes of mitotic apparatus that resulted in a large number of aneuploids.

Based on the cytological mechanism of triploidy and tetraploidy induction, a discussion was made on the conditions for the prevention of second body extrusion for producing triploids, and on the conditions for the inhibition of first cleavage for inducing tetraploidy.

Key words　Genome manipulation, Hydrostatic pressure shock, Cytological mechanism, Tripolar spindle, Omamental fish