

白鲫(♀) × 红鲫(♂)异源四倍体鱼的倍性操作及其生殖力的研究^{*}

陈敏容 杨兴棋 俞小牧
陈宏溪 易泳兰 刘汉勤

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

采用热休克调控技术诱导出103尾第一代白鲫(♀) × 红鲫(♂)异源四倍体鱼,并对其生殖力进行了研究。1或2龄的四倍体雄鱼能产生精子,而雌鱼不能产生正常的卵。将异源四倍体雄鱼与二倍体白鲫雌鱼交配产生倍间三倍体鱼,染色体检查证明是整三倍体($3N = 150$),但其受精率很低(11.4—51.3%,平均32.4%)。网箱养殖结果表明,倍间三倍体白鲫的生长速度比白鲫快30%以上,雌雄均不育。并用冷休克处理回收异源四倍体 $4N(\delta) \times$ 白鲫 $2N(\eta)$ 受精卵的第二极体产生了新的四倍体鱼。文中还对第一代异源四倍体鱼的批量化生产、生殖能力以及异源三倍体鱼的生产应用进行了讨论。

关键词 染色体组操作,异源四倍体,倍间三倍体,新四倍体,生殖力

八十年代以来,通过染色体组调控技术诱导四倍体,在鱼类遗传育种领域已得到广泛的应用,并在多种鱼类获得成功^[1-13]。人工诱导四倍体,再通过能育的四倍体雄鱼与二倍体雌鱼配交产生三倍体后代已成为当代鱼类多倍体育种的主攻方向。Chourrout和Myers等人^[14-16]在这方面做了大量的工作,他们的第一代四倍体虹鳟雌雄均能达到性成熟,并将四倍体虹鳟雄鱼与二倍体雌鱼配交已生产出倍间三倍体后代。这种源于四倍体的倍间三倍体鱼,尽管在早期生长方面与用休克技术回收受精卵第二极体的诱导三倍体差别不大,但前者无论在生产规模,商业利用价值以及免遭由于诱导技术所引起的损伤等方面都优于后者。他们认为倍间三倍体鱼身体健壮抗病力强,成活率高,更不必通过鱼类个体的鉴定亦可保证100%的三倍性,显然已日益成为鱼类倍性育种的主要途径。

多年来,作者采用热休克技术抑制白鲫(♀) (*Carassius auratus* Caviere T.et S.) × 红鲫(♂) (*Carassius auratus* red var)受精卵的第一次有丝分裂获得成功,诱导出小批量异源四倍体鱼,并以此作为材料研究了异源四倍体白鲫的性腺发育,异源四倍体 $4N(\delta) \times$ 白鲫 $2N(\eta)$ 的受精率以及源于四倍体鱼的倍间三倍体鱼和新四倍体鱼的产生。本文报道

^{*}国家“八五”攻关项目
1996年10月29日收到。

这些试验的结果。

1 材料与方法

1.1 受精卵

白鲫(♀)和红鲫(♂)均取自本所关桥试验场。用人工催产法获得精子和卵子。将精液和卵子混匀后分放于φ15cm培养皿中,再加入21±0.1℃(或室温)的曝气水到培养皿中并摇匀。入水后开始计时,在21±1℃(或室温)水浴中孵育备用。

1.2 染色体倍性操作程序(如图1所示)

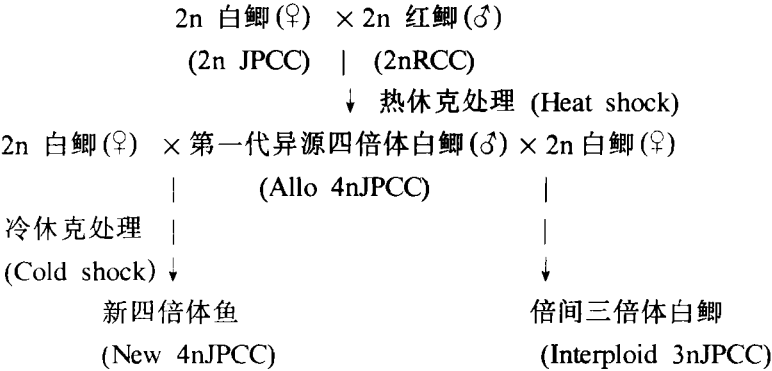


图1 染色体倍性操作程序

Fig.1 Chromosome ploidy manipulation

1.2.1 第一代异源四倍体鱼的诱导

热休克早期处理: 当卵受精后 37' 30"—38' 30" 时, 立即倒干培养皿中的水并投入 40±1℃ 的水浴中, 处理持续时间 100s, 每隔 15" 设一组合, 处理完毕后迅速将培养皿移至室温水浴中继续孵化。

热休克晚期处理: 受精卵在室温下发育至 50min 左右, 置于实体解剖镜下观察, 当观察到 2 / 3 的受精卵分裂沟开始出现时进行处理, 处理水温 42℃, 处理持续时间 60", 其后与早期处理同。

1.2.2 倍间三倍体鱼和新四倍体鱼的产生

选取可育的第一代异源四倍体雄鱼和二倍体白鲫雌鱼配交可得倍间三倍体鱼, 当配交受精卵在受精后 4—6min 进行冷休克处理, 休克温度 0—1℃, 处理持续时间 30', 可回收第二极体, 获得新四倍体鱼。

1.3 试验鱼倍性的鉴定:

混合胚胎染色体制片: 当胚胎发育至原肠中期时, 随机取样 30—50 枚发育正常的原肠胚进行混合胚胎染色体制片, 方法同于以前的报道^[7]。

幼鱼尾鳍染色体制作: 平剪幼鱼尾鳍末端少许, 饲养 5—6d 后剪下再生尾鳍组织, 分放在 24 孔板中, 每尾一孔, 加入 0.5ml 50—100ppm 用 0.7% 柠檬酸钠配制的秋水仙碱溶液, 置于 27±0.5℃ 培养箱中温育 2h, 再经预固定, 固定后置于 -4℃ 冰盒中 2h 以上, 其余步骤基本与单个胚胎染色体快速制备法同^[17], 略加改进。

待试验鱼长大后, 采用常规全血培养法制备染色体标本, 在油镜下镜检, 照相, 放大,

精确数出每个分裂相的染色体数目,每尾计数 10 个以上,最后验证被检鱼的倍性。

2 结果

2.1 第一代异源四倍体鱼的热休克诱导

热休克早期处理:对受精后 25' 15"—40' 的受精卵进行热休克处理,处理水温 40 ± 1℃,处理持续时间 100s,每 15" 设一组合,每个组合设一重复。结果表明:受精后 25' —37' 之间胚胎的四倍化细胞出现率(简称胚胎 4N 出现率)很低,虽有个别较高的组合但不稳定。而 37' 30"—38' 45" 之间的组合胚胎 4N 出现率达到峰值稳定在 20%—60% 左右,几次重复,其结果均一致。追踪其中一组,发现鱼种阶段 4N 出现率较高,尤以 38' 30" 最好。检查 39 尾鱼得 14 尾 4N 鱼,占被检鱼数的 35.8%。

热休克晚期处理:以第一次卵裂沟刚开始出现时作为晚期处理的开始处理时间,因此最佳的开始处理时间随着受精卵发育水温的改变而异。实验结果是:当处理水温为 42℃,持续时间 60" 时,孵育水温为 21.5℃ 的最佳开始处理时间为受精后 52—54min, 21℃ 为 54—56min, 20℃ 为 59—61min, 19℃ 为 70—72min, 18℃ 为 80—82min, 17℃ 为 91—92min, 16℃ 为 98—100min。孵育温度愈低,开始处理的最佳时间愈长(图 2)。从图 2 可见,在孵育温度低于 20℃ 时,发育水温每下降 1℃,开始处理的最佳时间延长 10min 左右,开始处理时间与孵育温度成负相关。

胚胎染色体检查发现,早、晚期处理组虽然都有二倍体、亚四倍体、四倍体和超四倍体,然而早期处理组四倍体分裂相的染色体数目较完整,大多是 4N=200,晚期处理组则亚四倍体较多,染色体数目在 180—196 之间变动。

根据预备实验结果,在孵育水温为 21.5℃ 时,早期处理的开始时间取受精后 37' 45"—38' 30",处理强度 40℃ / 100",晚期处理的开始时间取受精后 52—54min,处理强度为 42℃ / 60"。共处理 1215 组,其中早期处理 375 组,晚期处理 840 组,结果列于表 1。从表 1 可看出,早期有 32 组胚胎的 4N 出现率为 0,晚期有 215 组,各占其总组合数的百分比是 8.5% 和 25.6%,这些组合在孵化前去掉。胚胎 4N 出现率在 1—17% 的组合分别为:早期处理 90 组,占 24.0%;晚期处理 348 组,占 41.4%。这些处理组合鱼苗早期存活率高,但在鱼种阶段未检测出四倍体鱼,也在孵化前去掉。4N 出现率在 20% 以上的组合,尽管孵化率和早期存活率都低,但仍能检测到四倍体鱼。这一组合,早期处理有 253 组,占 67.4%,晚期处理有 277 组,占 33.0%。前者的水花鱼苗 2 674 尾,后者为 4 267 尾,胚后鱼苗饲养过程,早期处理组出现大批死亡,最后存活 253 尾,存活率为 9.5%,晚期处理组胚后鱼苗生长较好,存活鱼苗 3 594 尾,存活率为 84.2%。有 213 尾早期组和 394 尾晚期组接受血培养染色体检查验证后共得 103 尾四倍体鱼;早期处理组 87 尾占被检鱼数的 40.8%,而晚期处理组只有 16 尾,仅占 4.06%。雌鱼 35

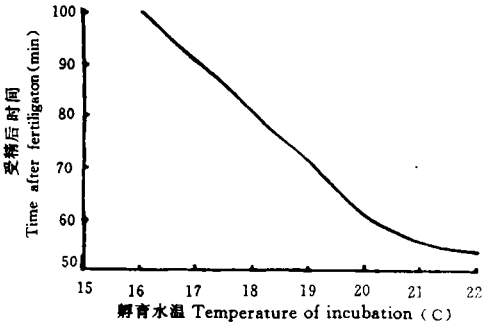


图2 热休克晚期处理最佳时间与发育水温的关系
Fig.2 Relationship between the starting time of late heat shock and the temperature of incubation.

尾,雄鱼 68 尾,雌雄比例接近 1:2。图版 I: 1—3 分别是白鲫红鲫及其杂交一代的成鱼血培养中期相。图版 I: 4 是第一代异源四倍体成鱼血培养中期相。

2.2 第一代异源四倍体鱼的生殖能力

第一代四倍体鱼养至一年后发现,雄鱼能达性成熟,轻压腹部即有少量乳白色的精液流出,注射鲤脑垂体 12h 后,精子量增加仍很稀少,二龄雄鱼稍多,其精子密度为 $3.16 \times 10^9 / \text{ml}$ (同样条件下,白鲫的精子密度为 $12.7 \times 10^{10} / \text{ml}$)。四倍体雄鱼的精子能使白鲫卵子受精产生三倍体,而即使是 2—3 龄的四倍体雌鱼仍未达到性成熟,注射鲤脑垂体后只挤出一些含无卵黄空泡状卵子的体液,个别有卵黄粒,三龄雌鱼卵黄粒较大。

2.2.1 性腺组织学观察

四倍体雄性个体的精巢其外观与二倍体的一般无异。组织切片观察其发育过程完全与正常二倍体雄鱼相同,具有明显的曲细精管里充满成熟的精子。雌性个体卵巢外观呈不均匀的带状,性腺周围充满脂肪,有的甚至看不到性腺所在。组织切片观察发现它们完全处在开始分化与未分化阶段,细胞排列杂乱且小,已分叶的性腺组织可观察到卵原细胞,初级卵母细胞以及败育的初级卵母细胞和空泡。

2.2.2 四倍体雄鱼的受精能力

四倍体雄鱼精子能与二倍体雌鱼卵子正常受精。表 2 是 3 尾四倍体雄鱼和 3 尾二倍体雄鱼受精率的比较(每一对应组用同一尾白鲫雌鱼鱼卵)。3 尾四倍体雄鱼的受精率分别为: $4N_1$: 51.3%, $4N_2$: 11.4%, $4N_3$: 34.6%, 平均为 32.4%。3 尾白鲫 $2N$ 雄鱼的受精率分别是: 白鲫₁: 88.6%, 白鲫₂: 47.9%, 白鲫₃: 80.9%, 平均为 72.5%。由此可见, $4N$ 雄鱼精子的受精率比二倍体对照要低得多(表 2)。

2.3 倍间三倍体鱼

将四倍体白鲫雄鱼与二倍体白鲫雌鱼配交即可生产出倍间三倍体鱼。作者做了三批试验: 第一批: 一龄 $4N$ 雄鱼 6 尾, 生产 5 千尾水花鱼苗, 用于网箱养殖作生长对比试验; 第

二批: $4N$ 雄鱼二龄 2 尾, 一龄 18 尾, 生产 2 万尾夏花鱼种, 分养于湖北省浠水县良种场和汉口后湖鱼场; 第三批: $4N$ 雄鱼三龄 1 尾, 二龄 6 尾。生产 5 万尾夏花鱼种, 分别在洪山乡 17 个村进行生产性中试。这三批试验鱼经过染色体验证均是三倍体。图版 I: 5 是倍间三倍体成鱼血培养中期相。 $4N(\delta) \times 2N(\varphi)$ 除受精率明显低于对照外, 其余各个发育阶段的存活率之间的差异不明显(表 2)。值得注意的是: 倍间三倍体夏花鱼种的规格较整齐, 不易脱鳞, 抗病力强, 表现出顽强的生命力。

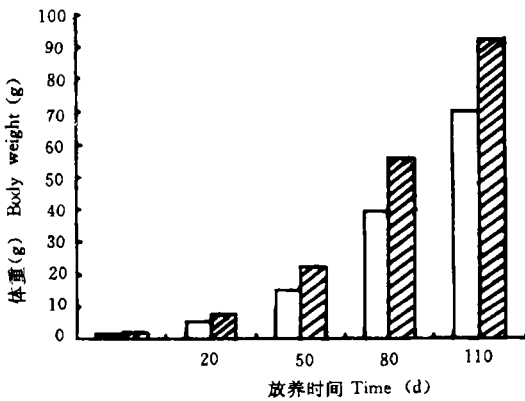


图 3 三倍体和二倍体白鲫生长速度的比较
Fig.3 Comparison of growth rate between triploid and diploid JPC

□ 2N ▨ 3N

2.3.1 倍间三倍体鱼的生长速度

网箱养殖生长对比试验表明, 倍间三倍体比白鲫生长快(杨兴棋等 1993^[18])。图

表1 胚胎四倍化率与成鱼4N出现率的关系

Tab.1 Relationship between the rate of 4N embryo and of 4N Fish

胚胎四倍 化率 Rate of the tetraploidy in embryo	组合数 Number of group		占总组合数的 百分(%) Rate of group all		处理卵数 No. of treated eggs		存活鱼苗数 No. of surviving fries		存活鱼种数 No. of surviving fergerling		血培养染色 体检查鱼数 No. of fish examined for chromosome		4N鱼数及其% No. of tetraploidy & %	
	早处理①	晚处理②	早处理	晚处理	早处理	晚处理	早处理	晚处理	早处理	晚处理	早处理	晚处理	早处理	晚处理
0	32	215	8.5	25.6	2.56×10 ⁵	17.20×10 ⁵	∧	∧	∧	∧	∧	∧	∧	∧
1--17	90	348	24.0	41.4	7.20×10 ⁵	27.84×10 ⁵	∧	∧	∧	∧	∧	∧	87	40.8%
18--60	253	277	67.4	33.0	20.24×10 ⁵	22.16×10 ⁵	2674	4276	253	3592	213	394	87	4.06%
合计	375	840	100	100	30.00×10 ⁵	67.20×10 ⁵	2674	4276	253	3592	213	394	87	4.06%

① early treatment ② late treatment

表2 4N(♂)×2N(♀)和2N(♂)×2N(♀)的受精率 and 不同发育阶段存活率的比较

Tab. 2 Comparison of fertility rate and survival of different developmental stages between 4N(♂)×2N(♀)and 2N(♂)×2N(♀)

	总卵数 sum of eggs	原肠期的存活数 及受精率(%) survival of gastral and fertility rate		尾芽期的存活 数及百分比(%) survival of bud		色素出现期的存 活数及百分比(%) survival of pigmentation		孵化期的存活 及出苗率(%) survival of hatching		畸形鱼苗数及 百分比(%) abnormal of fry		下塘鱼数 Transferred to grow-out tanks		夏花育种存活 及百分比 Survival fergerling	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	%	%	Transferred to grow-out tanks	Survival fergerling	Survival fergerling	Survival fergerling
4N(♂)×2N(♀) (1)	906	465	51.3	477	96.1	445	95.7	399	85.8	7	1.8				
4N(♂)×2N(♀) (2)	651	74	11.4	58	78.4	56	75.7	37	50.0	1	2.7				
4N(♂)×2N(♀) (3)	327	113	34.6	100	88.5	98	86.7	84	74.3	2	2.4				
平均			32.4		87.7	86.0		70.0		2.3		340	261	7	
2N(♀)×2N(♂) (1)	911	807	88.6	802	99.3	795	98.5	633	78.4	37	5.8				
2N(♀)×2N(♂) (2)	326	156	47.9	147	94.2	145	92.9	113	72.4	10	8.8				
2N(♀)×2N(♂) (3)	305	166	80.9	154	92.8	150	90.4	126	75.9	7	5.6				
合 计			72.5		90.2	93.9		75.6		6.7		340	265	7	

3 表示在网箱养殖条件下,倍间三倍体和白鲫的生长速度的比较。从图 3 可以看出,放养 20d 后,倍间三倍体平均重量为 15.4g / 尾,白鲫为 5.7g / 尾;50d 后,3N 为 22.6g / 尾,白鲫为 15.4g / 尾;80d 后,3N 为 55.5g / 尾,白鲫为 39.1g / 尾;112d 后,3N 为 92.6g / 尾,白鲫为 70.0g / 尾。由此可见三倍体比白鲫增重速度快约 30% 左右。

2.3.2 倍间三倍体的可育性

由于倍间三倍体的雌雄个体大小较一致,即使在生殖季节也难以从外形加以区别,雄鱼追星不明显。解剖观察发现,精巢组织虽发达但精液稀淡,实体显微镜下观察精液,大多是不能运动的精子头,尾巴不明显,偶尔发现个别作剧烈运动的精子,但难以起到受精的作用。组织切片可观察到初级精母细胞和精子细胞,但都是败育的或即将败育的,最后形成异形精子。

倍间三倍体雌鱼的卵巢不明显,呈不均匀的扁带状或细条状附着在很多的脂肪组织上不易发现。生殖季节期间卵巢呈透明的葡萄状空泡,不含卵黄,个别有小卵黄粒,组织切片观察发现,未分叶的卵巢组织只有小细胞,已分叶的卵巢组织虽有卵母细胞但都是些已败育的空泡,或呈固缩状核物质向胞外扩散最后解体,无法形成卵子。

至今尚未发现可育的倍间三倍体雌鱼和雄鱼。

2.4 新四倍体鱼

第一代四倍体雄鱼精子与二倍体白鲫雌鱼卵子受精后 4—6min,用冷休(0—1℃)抑制受精卵的第二次成熟分裂产生新四倍体鱼。混和胚胎染色体检查发现,100 个中期分裂相中含 44 个四倍体细胞,4N = 200,26 个三倍体,3N = 150,20 个二倍体,2N = 100;成鱼血培养染色体验证结果发现,被检的 72 尾鱼中,有 19 尾四倍体鱼,占被检鱼数的 26.4%。32 尾三倍体,占 44.4%,21 尾二倍体,占 29.2%,与胚胎染色体检查结果吻合。图版 I: 6 是新四倍体成鱼血培养中期分裂相。

3 讨论

3.1 第一代四倍体鱼的批量生产

欲获得大量四倍体鱼并养至性成熟的报道,除在鲑鳟鱼类中有成功的报道外,其它鱼类尚属少见。作者在胚胎 4N 出现率为 20—60% 的 40 多万颗处理卵中仅筛选出 103 尾异源四倍体鱼,大量生产第一代四倍体鱼还存在一定难度。四倍化胚胎成活率低是主要障碍之一,从表 1 看来,42 万多颗处理卵只孵化出 6 000 多尾鱼苗,成活率只有 1.6%。在混合胚胎制片中所观察到的亚四倍体和超四倍体表明:热休克使一部分胚胎染色体不能整倍增加,细胞分裂产生紊乱从而形成异倍镶嵌体,使一些胚胎在原肠期下包不完全而导致孵化前夭折;其次是第一代四倍化鱼苗成活率低。Chourrout 等人^[14]指出,压力休克得出的子代不可避免地产生轻微的染色体畸变。Alen 等^[9]也是认为有这种可能性,四倍体杂种草鱼开始是四倍体,但随着以后的细胞分裂丢失了一些染色体而形成非整倍体,非整倍体的成活率是低的,与作者的结果极其相似。表 1 中的早期处理组,原孵出 2 674 尾鱼苗,饲养期间大批死亡,其原因不明,最后只存活 253 尾,这一结果也说明了诱导效应在鱼苗阶段的延续影响。如何减少诱导效应的影响是当今生产四倍体鱼的主攻方向。当然质量好的受精卵,较稳定的发育温度以及适宜的处理条件是重要前提,但诱导效应的影响并不因为条

件的改善而减少,早期处理组大批胚胎和鱼苗的死亡便是例证。是否可以认为倍间杂交四倍体鱼 $4N(\delta) \times 4N(\varphi)$ 的生产才是生产四倍体鱼直接而有效的途径? 因为雌雄两性结合的胚胎主要不是异倍体,至少虹鳟是这样(Chourout 等^[15])。另外,新四倍体鱼的产生也可以弥补四倍体雌鱼不育的缺陷。作者的实验证明:第一代异源四倍体白鲫雄鱼可以完成这一使命,冷休克效应的影响固然存在,但毕竟比直接的热休克诱导要轻得多。

3.2 第一代四倍体鱼的生殖力

研究结果表明第一代四倍体雄鱼能育,其性腺外观及组织切片观察均与二倍体雄鱼一样能正常发育产生具有受精能力的精子,但受精率较低,与 Chourout 等人^[14]有关虹鳟 $4N$ 雄鱼受精率低的报道一致。由于一龄 $4N$ 雄鱼的精液稀淡,二龄的精子密度也低于 $2N$ (低 2 个数量级),因此精子量不足是 $4N$ 雄鱼受精率低的原因之一。此外精子头部的大小也可能直接影响 $4N$ 雄鱼的受精率。Chourout^[14]等发现约有 30% $4N$ 雄鱼精子,其头部大于 $2N$ 精子,他们认为这一部分精子很难通过 $2N$ 精子所能通过的受精卵孔道,但测量精子头部的宽度与测量打开的卵孔道的大小的绝对值,由于技术上的原因而无法比较,故难以找出两者之间的关系。最近 Blane 等^[20]用 Chourout 等 1986 年生产的第一代四倍体虹鳟的子代雄鱼为材料,研究了 $4N$ 雄鱼精子的受精率与相应的精子头部大小的关系,并与二倍体对照进行比较,发现受精率高的组合其精子头部的宽度(W)和长度(L)接近对照($4N$: $W = 1.97-2.5\mu m$, $L = 2.55-2.97\mu m$; $2N$: $W = 2.12-2.21\mu m$, $L = 2.68-2.77\mu m$),而受精率低的组合则比对照大得多($W = 2.62-3.08\mu m$, $L = 3.04-3.58\mu m$),这一组数据说明了 $4N$ 雄鱼受精率低与其精子头部的大小直接有关。

作者在生产新四倍体鱼时发现,对 $4N(\delta) \times 2N(\varphi)$ 受精卵进行冷休克处理的结果除得到 26.4% 的四倍体鱼外,还有 44.4% 的三倍体和 29% 的二倍体。三倍体的出现是预料中的,因为用冷休克技术回收第二极体尚未达到 100% 的成功。如何解释二倍体的出现是值得探讨的问题。从结果看,由 $4N$ 雄鱼提供的异源三倍体,其胚胎及成鱼的染色体检查均未发现二倍体,证明 $4N$ 雄鱼的配子绝大部分是正常的二倍体,与二倍体雌鱼回交的子代全是三倍体。因此,冷休克处理后所出现的二倍体与 $4N$ 雄鱼配子的倍性无关,而可能是单性生殖的结果。一个可能是:某些卵子经不起低温的刺激,失去与 $4N$ 精子受精的能力,形成天然雄核发育。10 尾这样的二倍体鱼中有雄鱼 6 尾,其形态特征与第一代四倍体鱼相似。Chourout 等^[14]在生产第二代三倍体虹鳟时发现 $4N(\delta) \times 2N(\varphi)$ 的后代大部分是三倍体,其中有少量可育的二倍体雄鱼,他们认为有可能是因为与之交配的二倍体雌鱼由于卵巢条件的原因使得四倍体雄鱼精子无法受精而形成天然雄核发育的结果,与作者的解释完全一致。而其余 4 尾雌鱼,作者认为可能是雌核发育的结果。在 $4N(\delta) \times 2N(\varphi)$ 的受精过程中,因为有一部分头部较大的 $4N$ 精子未能通过比自身窄得多的卵通道,从而滞留在卵孔道中起到刺激卵子的作用,在冷休克刺激下回收第二极体,形成雌核发育二倍体。这种解释也可作为 $4N$ 雄鱼授精率低与其头部大小有关的佐证。总之,单性生殖的可能是存在的,其推论是否正确尚待进一步深入研究证实。

至今,尚未发现第一代异源四倍体白鲫雌鱼成熟,注射鲤脑垂体后也只能挤出一些带有空泡或空泡中含有少量卵黄粒的体液。然而,人工诱发的四倍体虹鳟和远缘杂交产生的草鲤杂种四倍体鱼两性均能成熟,说明四倍体鱼的性成熟不受亲本的亲缘关系和染色

体组型之间差异的影响,而主要是与该四倍体鱼的整倍化程度有关。

对白鲫异源四倍体细胞遗传学的分析结果(另文发表)发现,它的染色体数目分布变异的幅度较大(165—200),众数百分率偏低(60%),是否可以认为雌性对整倍化的要求比雄性高?因此,进一步改善条件,提高染色体的整倍性,雌性能育将指日可待。

3.3 倍间三倍体鱼的生产应用

有关三倍体鱼的生长速率是否比二倍体快,学者们的认识尚未统一,但源于四倍体鱼的倍间三倍体鱼可以避免像人工诱导三倍体鱼那样受到休克技术的影响从而提高三倍体鱼的早期存活率的说法似乎是一致的。Myers等^[16]认为热休克诱导的三倍体鱼和源于四倍体的三倍体鱼的生存能力有明显的差别,热休克三倍体组早期死亡率高不是与疾病有关,似乎是诱导处理的延续。源于四倍体的三倍体鱼的死亡率很低,除受精较困难外,它们像二倍体对照一样健壮。作者的实验结果与Myers的结果是一致的(表2)。此外倍间杂交的方法可用于三倍体鱼的大规模生产,这对于某些鱼类特别有意义。罗非鱼的商业兴趣在于严格控制其繁殖,否则将会因鱼的数量不断增加而影响个体生长。源于四倍体的三倍体鱼的成功,实际上解决了罗非鱼怀卵量少,受精时间难掌握的缺点,只要能诱导出一定数量的四倍体雄性个体,就能生产出大量的异源三倍体罗非鱼,解决其生产上的难题。

作者已经生产出几万尾倍间三倍体白鲫夏花鱼种,目前已用于生产。在网箱养殖条件下,倍间三倍体白鲫的生长比二倍体白鲫快30%以上(图1),成为一种既保持白鲫的优良性状,而且也克服了白鲫的肉质差,易脱鳞,抗病力弱等缺点,初步受到生产者的好评,显示出广阔的商业利用前景。

参 考 文 献

- [1] Refstie T., Tetraploid rainbow trout produced by cytochalasin B. *Aquaculture*. 1981, **25**: 51—58.
- [2] Thorgaard G H., Jazwin M E., Stier A. R., Polyploid induced by heat shock in rainbow trout. *Trans Am Fish Soc.* 1981, **110**: 546—550.
- [3] Chourrout D., Tetraploid induced by heat shock in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R). *Reprod Nutr Develop.* 1982, **22**: 569—574.
- [4] Chourrout D., Pressure - induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow - trout: production of all - triploid, all - tetraploid, heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture*. 1984, **36**: 111—126.
- [5] 马 涛, 朱才宝, 朱秉仁. 热休克诱导虹鳟四倍体. *水生生物学报*, 1987, **11** (4): 329—335.
- [6] Valenti R G, Induced polyploidy in *Tilapia aurea*(steindachner) by means of temprature shock treatment. *J. Fish Biol.* 1975, **7**: 519—528.
- [7] 陈敏容, 阎康等. 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.
- [8] 洪云汉. 热休克诱导鳊鱼四倍体的研究. *动物学报*, 1990, **36** (1): 70—74.
- [9] Aldridge F J, Marston R Q, Shireman J V, Induced triploids and tetraploids Bighead Carp (*Hypophthalmichthys, nobilis* Verified) by mulu - Embryo Cytofluorometric Analysis. *Aquaculture*. 1990, **87**: 121—131.
- [10] Cassani J R, Maloney D R, Allaire H P Kerby J H, Problms associated with tetraploid induction and survival in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Aquaculture*, 1990, **88**: 273—284.

- [11] Reddy P V G K, Kowtal G V, Tania M S. Preliminary observations on induced polyploidy in Indian major carps. *Labeo rohita* (Ham) and *Catla Catla* (Ham), *Aquaculture* 1990, **81**: 279—287.
- [12] 桂建芳, 孙健民, 梁绍昌等. 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.
- [13] Flajšhans M, Linhart O, Kvasnička P. Genetic studies of tench (*Tinca tinca* L.) induced triploidy and tetraploidy and first performance data. *Aquaculture*, 1993, **113**: 301—312.
- [14] Chourrout, D, chevassus B, Krieg F, et al Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females — Potential of tetraploid fish. *Theor Appl Genet*, 1986, **72**: 193—206.
- [15] Chourrout D, Nakayama, I., Chromosome studies of progenies of tetraploid female rainbow trout. *Theor Appl Genet*, 1987, **74**: 687—692.
- [16] Myers J M, Hershberger W K., Early growth and survival of heat — shocked and tetraploid — derived triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 1991, **96**: 97—107.
- [17] 洪云汉. 鱼类单个胚胎染色体标本的快速制备法. *淡水渔业*, 1987, (1): 35—36.
- [18] 杨兴棋, 陈敏容, 俞小牧, 陈宏溪. 三倍体白鲫的生物学特性. *水生生物学报*, 1994, **18** (2): 156—163.
- [19] Allen S K, Jr and Stanley J G. Ploidy of the hybrid grass carp × bighead carp determined by flow cytometry. *Trans. Am. Fish. Soc*, 1983, **112**: 431—435.
- [20] Blanc J M, Poisson H, Escaffre A M., Aguirre, P., Vallée F. Inheritance of fertilizing ability in male tetraploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 1993, **110**: 61—70.
- [21] 吴维新等. 鲤和草鱼杂交四倍体及其回交四倍体草鱼杂种的研究. *水生生物学报*, 1988, **12** (4): 355—363.

**CHROMOSOME PLOIDY MANIPULATION OF
ALLOTETRAPLOIDS AND THEIR FERTILITY IN JAPANESE
PHYTOPHAGOUS CRUCIAN CARP
(JPCC) (♀) × RED CRUCIAN CARP (RCC) (♂)**

Chen Minrong Yang Xingqi Yu Xiaomu
Chen Hongxi Yi Yonglan and Liu Hanqin

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract

Heat shock was used to induce allotetraploidy in Japanese phytophagous crucian carp (JPCC) eggs fertilized artificially with sperms from red crucian carp (RCC) 37—38min after fertilization and shortly before cleavage. Milt was obtained from 1- and 2-year old h4n JPCC male, but ovulated females were not found, and back crossed to the 2n JPCC female produced a large number of offsprings. Chromosome analysis of the offsprings, based on cultured leucocytes from peripheral blood indicated that all were triploids ($3n = 150$). The fertilizing ability of the offspring was very low (11.4—51.3% of fertility, average: 32.4%). The present observation supports the hypothesis that the head of the diploid spermatozoas being wider than the haploid may prevent their penetration through the micropyle canal. Females or males of interploid triploid JPCC did not develop into maturity, but they have higher growth rate than the diploid one. New tetraploids were produced by the retention of the second polar body following fertilization ($4N♂ \times 2N♀$), and they were found to be tetraploid, triploid and diploid by chromosome analysis (among 72 resultant fish, there were 19 tetraploid, 32 triploid and 21 diploid, respectively.)

Key words Chromosome ploidy manipulation, Allotetraploid, Interploid triploid, New tetraploidy, Fertilization