第11卷 第1期 水生生物学报 Vol. 11, No. 1
1987年3月 ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA Mar., 1987

研究简报

人工诱导白鲫(♀)×红鲤(♂)异源四倍体鱼的初步研究

陈敏容、阎 康、刘汉勤、易咏兰、
杨兴棋、刘沛霖、陈宏溪
(中国科学院水生生物研究所,武汉)

PRELIMINARY STUDY ON ARTIFICIALLY INDUCED HETEROGENEOUS TETRAPLOID IN THE HYBRID OF WHITE CRUCIAN CARP AND RED CARP

Chen Minrong, Yan Kang, Liu Hangqin, Yi Yonglan,
Yang Xingqi, Liu Peilin and Chen Hongxi
(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan*)

关键词 四倍体,白鲫,红鲤

Key words Tetraploid, White Crucian Carp, Red Carp

人工诱导鱼类多倍体是动物染色体工程的重要课题。鉴于三倍体鱼的不育性和成活率高、生长快等特点,国内外采用理化手段直接诱导三倍体鱼已在三棘刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus* (L.))、鲽鱼 (*Pleuronectes platessa*)、鲤鱼 (*Cyprinus carpio* L.)[8,9]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、草鱼(♀)×团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)(♂)杂种[5],以及白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)[1],等十多种鱼获得成功。有的已开始用于实践并取得较明显的经济效益。

尽管如此,诱导三倍体鱼的技术毕竟不是一劳永逸的方法。理想的方法是人工诱导获得能育的异源四倍体(或同源四倍体),再与二倍体鱼杂交得三倍体鱼,从而为大规模生产三倍体鱼提供一条行之有效的捷径。

陆仁后等(1982)[4],用草鱼尾鳍细胞诱导成同源四倍体细胞并移至泥鳅去核卵得到心跳期胚胎。Thorgaad等(1981),和 Chourrout (1982)[7]、用热休克技术诱导虹鳟 (*Salmo gairdneri*) 分别得四倍体胚胎和仔鱼。而吴维新等(1981)[2],却在草鱼和红鲤的远缘杂交组合中获得数尾自然加倍的异源四倍体成鱼。总之人工诱导四倍体鱼技术尚未完全突破。自1983年以来,我们以野鲫(♀)×红鲤(♂)、白鲫 (♀)×红鲤 (♂),大鳞副泥鳅(♀)×鳗尾泥鳅(♂)以及尼罗罗非鱼(♀)×莫三比克罗非鱼(♂)等组合的杂种二倍体受精卵为材料,首次获得白鲫(♀)×红鲤(♂)异源四倍体成鱼。本文主要报道白鲫(♀)×红鲤(♂)异源四倍体成鱼的诱导结果。

材料和方法

材料鱼取自东西湖养殖场水产试验站和本所

1986年10月23日收到。

试验场。白鲫 (*Carassius auratus cuvieri*) 为母本，红鲤 (*Cyprinus carpio* var.)为父本，用人工催产法获得鱼卵和精液，在室温下进行人工授精。授精后 30—60 分钟内将受精卵放在 40℃—45℃的水温中进行热休克处理。处理的持续时间为 30—120 秒之间，处理后移至室温条件下孵化。根据授精后的不同时间、不同处理温度及不同的处理持续时间将受精卵分成若干组合。当胚胎发育至原肠中期时，按谷瑞光等(1979)[3]的胚胎染色体制片法制片。每个组合滴 2 张片，每张片计数 100 个中期分裂相。计算出四倍体分裂相占总分裂相的平均百分值(下称 4n 出现率)。留下 4n 出现率较高的几组精心喂养，待鱼长到 2 公分左右，采用再生尾鳍细胞短期培养法制片。具体做法是：平剪尾鳍，再生 7 天后在无菌条件下剪下尾鳍的再生部份，剪碎，接种于 1 毫升含 20% 小牛血清的 199 培养液中，于 25--28℃ 的温度下培养，第四天再加 1 毫升培养液。第七天收获细胞，气干法制片。每尾鱼滴 1 片，每片计数 10 个以上的中期分裂相以确定每条鱼的染色体数目。最后选出四倍体鱼。

结果与讨论

共做 10 批实验，36 个组合，按胚胎染色体制片法进行了初检(表 1)。

初检结果，有 25% 的组合未发现有四倍体细胞。其余各组均有 4n 出现，其中有一组胚胎染色体 4n 出现率在 10% 以下，这组鱼苗成活率高，但养至鱼种时没有发现有四倍体个体。胚胎染色体4n 出现率在 30—50%之间的四个组合，理应是获得四倍体鱼最有希望的一组，可是它们却在孵化前死去。只有 4n 出现率在 10—20% 之间的 5 个组合有 34 尾正常鱼苗，其中 27 尾死于小瓜虫病。尚有 7 尾养成鱼种进行染色体鉴定 (表 2)。从表 2 可以看出，有 3 尾鱼的四倍体分裂相为 79% 以上，可以认为是鲤鲫异源四倍体鱼，并养至成鱼。图 1 和图 2 分别是鲤鲫杂种二倍体鱼和四倍体鱼的中期分裂相。

为了确定四倍体鱼与二倍体鱼细胞核的DNA含量有无倍性关系，分别测定了二倍体鱼和四倍体鱼尾鳍细胞核的 DNA 含量。采用尾鳍细胞滴片法，两者均滴在同一载片上。标本用 Feulgen

表 1　胚胎染色体初检结果

Table 1　Results from fish embryo chromosomes

组合数 Numbers of experiments	占总组合数的百分比 Percent in experiment numbers	4n 出现率 Percent of tetraploids	成活鱼苗 Numbers of viable young fish
9	25.0	0	520
18	50.0	10%	280
5	14.0	10—20%	34
4	11.0	30—50%	孵化前死亡 Death before incubation

表 2　鱼种染色体鉴定结果

Table 2　Results from chromosomes of experimented fish

鱼号 Fish No.	分裂相数 Numbers of mitotic figures				分裂相总数 All numbers of mitotic figures	4n 占总分裂相数的百分比 Percent of tetraploids in mitotic figures
	n	2n	3n	4n		
1	—	116	—	36	152	23.7%
2	—	—	2	10	12	83.3%
3	—	6	—	—	6	0
4	2	9	9	89	109	81.7%
5	—	5	9	54	68	79.1%
6	—	79	—	6	85	7.6%
7	—	44	—	—	46	4.5%

表3 二倍体鱼和四倍体鱼细胞核的 DNA 含量（随机单位 A. U.）

Table 3 DNA amount in nuclei of diploid and tetraploid fish (A. U.)

测量次数 Test No.	二倍体鱼 ($\bar{X}\pm$SD) Diploid fish ($\bar{X}\pm$S. D.)	四倍体鱼 ($\bar{X}\pm$SD) Tetraploid fish ($\bar{X}\pm$S. D.)	度量比值 Rate
1	7.32 0.41	15.45 0.13	2.11
2	7.03 0.54	14.36 0.13	2.04
3	14.03 0.11	27.49 0.14	1.97
4	8.34 0.47	16.14 0.52	1.90
平均 mean			2.01

染色。仪器系武汉大学测试中心的奥地利产 Univer 显微光度计，波长 560 Å，扫描法测定标本的消光值。数据经计算机处理即得到每个细胞核 DNA 含量的随机单位（A. U）。我们共做了 4 张片，每张片所测得的（A. U）平均值列于表 3。计算出二倍体鱼和四倍体鱼细胞核 DNA 含量的平均度量比值。很明显，四倍体鱼细胞核的 DNA 含量是二倍体鱼的一倍。同染色体鉴定的结果一致。

人工诱导四倍体鱼的可能性一直是鱼类育种工作者们最关注的问题。就已发表的文章看还未有获得成鱼。主要原因是找不到最优化的诱导条件。其次是四倍体鱼的生活力差、畸形率高。我们的实验也存在同样的问题。胚胎染色体 4n 出现率高的组合，有的没有孵出鱼苗，有的即使有鱼苗也是畸形居多。相反，在胚胎染色体 4n 出现率为 10—20% 之间的组合，四倍体鱼的存活率较高。我们获得的 3 尾四倍体成鱼都是来自这些组合。因此，胚胎染色体 4n 出现率与最终获得四倍体鱼这两者之间的关系比较复杂，可能涉及到诸多因素。在这方面，我们已做了大量工作，得到较多的数据。

除温度和处理时间外，材料鱼本身以及鱼卵的质量亦是诱导四倍体鱼的关键之一。不同种的实验鱼要求不同的处理条件。而每种鱼的鱼卵质量好坏又直接影响诱导结果。受精卵质量好，对温度的耐受力高，畸形率相应较低。故在作四倍体鱼的人工诱导试验时，首要条件是要有发育良好的亲鱼提供质量好的鱼卵。其次是根据不同种的鱼找出最佳的诱导条件。

人工诱导鱼类多倍体的方法有生物学方法、物理学方法、化学方法等三种[6]。最常用的是物理学方法的静水压，热休克和冷休克法。这三种方法我们均用过，各有优点。冷休克处理的鱼苗成活率高，畸形率低。而热休克处理则 4n 出现率比冷休克高。静水压法要有专门设备，目前正在试验中。由于热休克处理方法简便，设备要求不高，获得四倍体个体的可能性大。因此我们认为热休克诱导四倍体鱼是一种比较好的方法。

人工诱导获得白鲫（♀）×红鲤（♂）异源四倍体成鱼成功，这在鱼类遗传育种的理论研究和实践应用上均有重大的意义。

参 考 文 献

[1] 苏泽古、许克圣、陈尚萍、白国栋，1984。白鲢三倍体及其核型的研究。动物学研究，**5**(3)：15—19。

[2] 吴维新、林临安、徐大义，1981。一个四倍体杂种——兴国红鲤（*Cyprinus carpio* L.）×草鱼（*Ctenopharyngoden idella* Cuv. et Val.）水生生物学集刊，**7**(3)：433—436。

[3] 咎瑞光、宋峥，1979。草鱼、团头鲂染色体组成型的分析比较。遗传学报，**6**(2)：205—210。

[4] 陆仁后、李燕鹃、易泳兰、陈宏溪，1982。四倍化草鱼细胞核的获得、特性和移核实验的初步探讨。遗传学报，**9**(5)：381—388。

[5] 湖北省水生生物研究所第二室育种组家鱼研究小组，1976。用理化方法诱导草鱼（♀）×团头鲂（♂）杂种和草鱼的三倍体、四倍体。水生生物学集刊，**6**(1)：111—114。

[6] 楼允东，1984。国外对鱼类多倍体育种的研究。水产学报，**8**(4)：333—356。

[7] Chourrout, D., 1982. Tetraploidy induced by heat shock in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Reprod. Nutr. Develop.*, **22** (3): 569—574.

[8] Gervai, J., Peter, S., Nagy, A., Horvath, L. & V. Csanyi, 1980. Induced triploidy in carp (*Cyprinus carpio* L.). J. *Fish Biol.*, **17**(6): 667—671.

[9] Ojima, Y. (小岛吉雄) & Makino, S. (牧野佐二郎), 1978. Triploidy induced by cold shock in fertilized eggs of the carp. *Proc. Japan Acad.*, **54**, Ser. B: 359—362.