

低温诱导胡子鲶四倍体

罗建仁 马进 邬国民 胡红

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

摘 要 胡子鲶卵子受精后 48 分钟即将开始第一次卵裂时施以 4℃ 冷水处理 20 分钟, 孵化率 30.9%, 仔鱼畸形率 61.3%。对存活小鱼作染色体检查初步估计约有 33% 四倍体、22% 嵌合体 ($2n-4n$)、其余为二倍体。四倍体染色体数 $4n=112$ 、二倍体 $2n=56$, 而嵌合体并存 $2n$ 和 $4n$ 两种染色体组合。四倍体和二倍体红细胞核体积比为 1.89:1。结果还反映了四倍体和嵌合体生活力不及二倍体。

关键词 四倍体, 嵌合体, 胡子鲶, 冷休克, 红细胞核

应用染色体倍性操作技术生产具有期望效用的三倍体鱼的研究吸引着许多鱼类育种工作者。迄今的有关知识仍表明用能育的四倍体亲鱼和自然二倍体亲鱼进行倍性杂交 (Interploid crosses)^[9] 是获得预期三倍体的理想方法^[3,5,6,8]。为此国内外学者经努力已获得过多种人工四倍体鱼如四倍体虹鳉^[1,5,6,9]、罗非鱼^[7,8]、沟鲈^[4]、鲮^[3]等, 但未见人工四倍体胡子鲶的报道, 本文介绍我们低温诱导四倍体胡子鲶的初步结果。

材 料 和 方 法

(一) 取材 采用广州近郊池养胡子鲶 (*Clarias fuscus*) 作亲鱼, 在 5 月中旬用 HCG 催产、人工授精取得受精卵, 在经曝气的自来水中发育, 水温 25~28℃。

(二) 染色体倍性操作 参照预先观察记录的第一次卵裂发生时间, 取受精后 43 分钟、48 分钟和 53 分钟的受精卵分别进行低温处理。把粘附了受精卵的大培养皿倒去室温水, 浸入 4℃ 冷水中维持 20 分钟, 换回室温水。对照组不作冷处理。

(三) 孵化及饲养 发育过程中需不时用吸管吸除死亡胚体以免败坏水质, 并适当更换新水。于孵化完毕时计算孵化率。第四天开口摄饵时给以混合浮游动物 (含轮虫、枝角类和桡足类等), 一周后喂以水丝蚓, 体长 3cm 后喂以鳊鱼料或沟鲈料。仔鱼至检测的小鱼都养于 180 升水族箱中。

(四) 检验 取小鱼肾细胞悬液、常规气干法制片, 每份计数分裂相 100 个以上、确定染色体数的倍性。同时对各样品鱼作血涂片测量红细胞核的长、短轴, 根据公式 $V=a^2b/1.91$ (a: 短轴长, b: 长轴长)^[1] 计算红细胞核体积。

结 果

(一) 低温处理对受精卵发育的影响

受精后 43 分钟处理 (第 1 组) 的孵化率为 7.4%, 其中有 65.3% 畸形, 表现为围心腔扩大、无尾或短尾、躯干扭曲等, 均不能存活至开口摄饵, 本组 26 尾正常形仔鱼也均在两周内陆续死亡 (表 1)。受精后 48 分钟处理 (第 2 组) 的孵化率达 30.9%, 畸形率达 61.3%, 14 天正常仔鱼成活率 95%, 共获鱼苗 132 尾 (表 1)。受精后 53 分钟处理 (第 3 组) 的有 33.2% 孵化, 59.1% 畸形, 14 天正常仔鱼成活 91.2%, 获鱼苗 135 尾 (表 1)。

表 1 低温对受精卵发育的影响
Table 1 Effect of cold shock on development of fertilized eggs

组别 Groups	42 分钟组* 42 Min*	48 分钟组* 48 Min*	53 分钟组* 53 Min*	对照组 Control
卵数 Egg counts	1011	1163	1092	765
孵化 Hatching(%)	75(7.4%)	359(30.9%)	362(33.2%)	642(83.9%)
正常 Normal(%)	26(34.7%)	139(38.7%)	148(40.9%)	521(81.2%)
畸形 Abnormal(%)	49(65.7%)	220(61.3%)	214(59.1%)	121(18.9%)
成活率(%)** Survival rates(%)**	0	132(95%)	135(91.2%)	485(93.6%)

* 受精后开始低温处理时间. * The times starting cold treatment after fertilization.

** 孵出 14 天后成活率. ** 14 days after hatching.

(二) 染色体倍性操作效果

经两个多月饲养, 各组存活鱼已长成几克至 20 多克的小鱼, 分别取 10 尾进行染色体标本制作和检测。43 分钟处理的无存活鱼。48 分钟处理的 10 尾样本中染色体众数 112 的有 3 尾, 可确定为四倍体, 染色体众数 56 的有 4 尾, 已知为 2 倍体^[2]; 另有 2 尾同时含有以 56 和 112 为众数的染色体, 应为 2n-4n 嵌合体; 另有 1 尾制片失败。(表 2)。53 分钟处理组未检出单纯的 4n 类型, 但有 2n-4n 嵌合体 2 尾, 其余均为二倍体。对照组全部为二倍体 (表 2)。2n 和 4n 染色体见图 A、B。

表 2 试验鱼倍性
Table 2 Ploidy of the treated fish

编号 No.	48 分钟组 48 Min group		53 分钟组 53 Min group		对照组 Control	
	体重(克) Weight(g)	染色体数 Chromosome counts	体重(克) Weight(g)	染色体数 Chromosome counts	体重(克) Weight(g)	染色体数 Chromosome counts
1	17	56	18	56	17	56
2	8	112	10	56-112	20	56
3	4		16	56	18	56
4	6	112	15	56	18	56
5	8	56-112	11	56	10	56
6	16	56	15	56	15	56
7	15	56	8	56-112	22	56
8	10	112	16	56	18	56
9	12	56	14	56	13	56
10	7	56-112	15	56	20	56

(三) 红细胞核体积

对来自作染色体检查的样本鱼的血涂片红细胞核进行显微测量表明，四倍体红细胞核体积平均 $36.33\mu^3$ ，二倍体则 $19.19\mu^3$ ，两者比值为 3.79 : 2 (表 3)，嵌合体情况复杂，将另辟专文介绍。红细胞见图 C、D。

表 3 四倍体和二倍体红细胞核测量

Table 3 Erythrocyte nucleus dimension of tetraploids and diploids

	短轴(μ) Minor axis(μ)	长轴(μ) Major axis(μ)	体积(μ^3) Volume(μ^3)
四倍体 4n	3.66 ± 0.11	5.18 ± 0.14	36.33 ± 1.06
二倍体 2n	3.16 ± 0.07	3.67 ± 0.08	19.19 ± 0.71
比值 Ratios	1.16 : 1	1.41 : 1	1.89 : 1

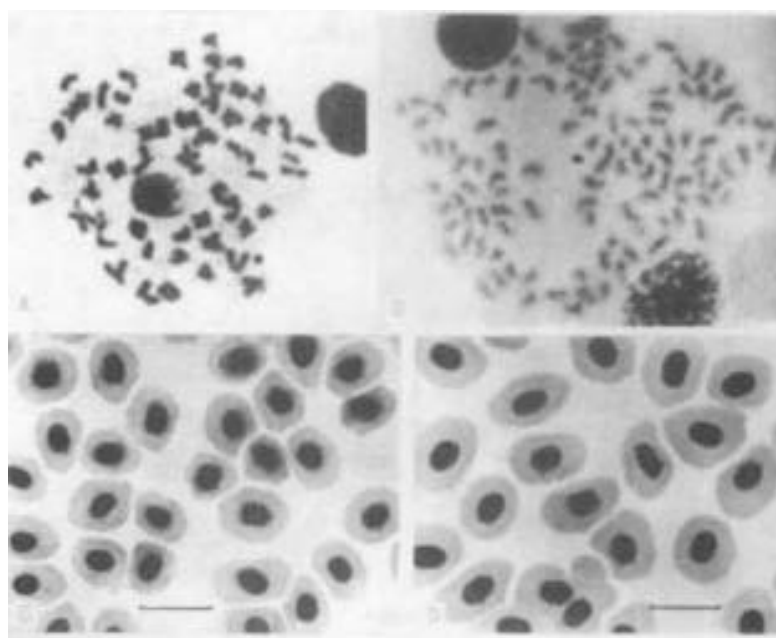


图 1 二倍体染色体和红细胞(A, C)及四倍体染色体和红细胞(B, D)

Fig. 1 Chromosomes and erythrocytes of diploide (A, C) and tetraploids (B, D)

(四) 四倍体的发育生长

早期胚胎发育观察到处理组胚胎发育延迟 1~2 个卵裂时隔 (约 15~30 分钟)，这可能和低温阻滞第一次卵裂和降低发育速度有关。

虽未作能量转换生长比较，但从同一水族箱中饲养的试验鱼来看，查证为四倍体和嵌合体的个体明显较小，都在 10 克以下，而二倍体不论试验组还是对照组均在 10 克以上

(表2)。这反映四倍体和嵌合体生活力较差。解剖观察到四倍体、嵌合体均含有两侧匀称、发育正常的性腺。

讨 论

迄今为止,用温度休克法诱导鱼类多倍体的试验均存在孵化率显著降低、畸形率升高的问题,本研究也出现这种情况。洪云汉^[3]认为发育早期(从胚胎到孵出不久仔鱼)生活力低下可能主要归因于热休克对卵子的损伤作用,而不一定与四倍化有关。从我们实验结果看,早期情况确实如此,四倍化频率极低的53分钟处理组同样存在低孵化率和高畸形率现象(表1)。但从后期鱼苗生长情况看,四倍体或含有四倍体的嵌合体均生长缓慢,个体明显小于二倍体(不论对照组或试验组的二倍体),这至少表明其生活力较差,在同一环境同一能量来源条件下,不是竞争力差,就是消化吸收力差、能量转化不如二倍体。这点似表明与其遗传构成变化有关。不过多倍体生长能力优劣历来存在争议,可能与不同种类有关。

本实验除获得四倍体外,还出现很高频率的二倍体-四倍体嵌合体。这种情况也类见之于露斯塔野鲮^[10]、鳙鱼^[3]等,但仍属少见现象。鉴于多倍体嵌合体是一种较复杂的现象,将另辟专文探讨。

根据本实验结果,作者认同在受精卵第一次有丝分裂开始出现缢缩于胚盘顶部时施加操作处理是获得四倍体最佳时间的公论。

本研究结果分析样本数尚少,象倍性出现频率、嵌合体的比例及其倍性组成等,均有待深入研究使之完善。

参 考 文 献

- [1] 马涛等, 1987. 热休克诱导虹鳟四倍体. 水生生物学报, 11(4): 329-336.
- [2] 邹国民等, 1986. 四种胡子鲶核型的比较研究. 遗传学报, 13(3): 213-220.
- [3] 洪云汉, 1990. 热休克诱导鳙鱼四倍体的研究. 动物学报, 36(1): 70-75.
- [4] Bidwell, C. A. et al., 1985. Polyploidy induced by heat shock in channel catfish. Aquaculture, 51: 25-32.
- [5] Chourrout, D. 1982. Tetraploidy induced by heat shocks in the rainbow trout. Reprod. Nutr. Develop. 22(3): 569-574.
- [6] Chourrout, D. et al. 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: 193-206.
- [7] Don, J. and Avtalion, R. R., 1988. production of viable tetraploid tilapias using the cold shock technique. Bamidgeh. 40(1): 17-21.
- [8] Myers, J. M. 1986. Tetraploid induction in *Oreochromis* spp., Aquaculture, 57: 281-287.
- [9] Myers, J. M. and Hershberger, W. K. 1991. Early growth and survival of heat-shock induced and tetraploid-derived triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 96: 97-107.
- [10] Reddy, P. V. G. K. et al. 1987. Induced polyploid mosaics in indian major carp, *Labeo rohita* (Ham). J. Inland Fish. Soc. India, 19(1): 9-12.

TETRAPLOIDY INDUCED BY COLD SHOCK IN *CLARIAS FUSCUS*

Luo Jianren Ma Jin Wu Guomin Hu Hong

(Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380)

ABSTRACT Tetraploid catfish, *Clarias fuscus*, was produced by cold shocking eggs prior to first cleavage (48 min after fertilization) at 4°C for 20 min duration. About 33% of young fish examined in this experiment were tetraploids, 22% were mosaics polyploids (2n-4n), while the rest were diploids.

ploidy was confirmed by erythrocyte nucleus measurement and chromosome counts. The erythrocyte nucleus volume of tetraploid to diploid was 1.89 : 1. Diploids had 56 chromosomes, tetraploids had 112, while the mosaics had both 2n and 4n chromosome sets. The research also showed that tetraploids and mosaics were subvital compared to their diploids counterparts.

KEYWORDS Tetraploid, Mosaic, *Clarias fuscus*, cold shock