

研究简报

黑鲷三倍体人工诱导的初步研究*

尤 锋 沙学绅 阮洪超

(中国科学院海洋研究所, 青岛, 266071)

三倍体鱼类, 因具有不育性、生长快、抗病力强和饲养管理容易等优点, 所以国内外水产科学工作者对其进行了广泛的研究, 并取得了一定的成功和效益^[1-8]。在国内, 虽然淡水鱼这方面的工作较多也较深入, 但海水鱼三倍体人工诱导还尚未见到报道。本文系于1989年3—6月对黑鲷进行人工诱导三倍体的初步研究。

一、材料和方法

实验分别在天津和青岛两地进行。在天津的滨海养虾场育苗室内, 对黑鲷 (*Sparus macrocephalus* Basilewsky) 亲鱼采取人工催产和强化培育相结合的方法, 促使黑鲷提前两个月(3—4月上旬)产卵。适时分次分批进行人工受精。青岛实验室的培育亲鱼, 于6月上旬成熟后采用自然产卵受精获得受精卵。

温度处理及孵化。冷休克, 将卵按受精后不同时刻分别放入 0—3℃ 的冷海水中处理, 一定时间(从 15—60min)后, 再取出放入常温海水中孵化。热休克, 将卵于受精后不同时刻分批放入 30—32℃ 海水中处理, 到预定时间(从 3—8min)后, 取出放入常温海水中孵化。孵化水温, 在天津是 $20 \pm 1^\circ\text{C}$; 在青岛是 $18 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

染色体制片。处理组和对照组的受精卵, 均在原肠胚期取样。先经捣碎、过滤和离心去除卵膜和卵黄物质, 再用 0.075mol/L KCl 作低渗处理, 以甲醇:冰醋酸 = 3:1 固定液固定, 普通空气干燥法制片, Giemsa 染色。镜检计数, 部分较好的分裂相作显微照相 (5×100)。

二、结果和讨论

1. 冷休克诱导三倍体实验结果

由表 1 看出, (1)在不同处理时刻, 其冷休克结果不同: 冷处理 15min, 三倍体的诱导率较低; 处理 30—45min, 诱导率则较高, 然而相对孵化率却随处理时间的延长而降低; 处理 60min, 虽诱导率也较高, 但其相对孵化率却很低。由此可推知, 冷处理的最适时间是在 30—45min; 时间过短, 作用不大; 过长又影响到受精卵的进一步发育和孵化。(2)在不同的孵化温度下, 其三倍体的诱导率也会不同: 在 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 下, 受精后 3min, 进行多倍

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 2022 号。本论文的部分实验得到中科院水生生物研究所吴清江先生等的热情指导, 谨志谢忱。

收稿日期: 1990年1月31日。

体诱导处理,诱导率较高;在 $18 \pm 1^\circ\text{C}$ 下,受精后 10min 进行诱导处理,诱导率仍然很高。这可以解释为,不同的温度对受精卵发育的影响各异:温度低,受精卵的发育速度慢,放出第二极体的时间也相对拖后,故在较后的时刻诱导三倍体,效果较好;若温度高,受精卵因发育速度增快,会较早地放出第二极体,则应在较前的时刻诱导三倍体。

2. 热休克诱导三倍体实验结果

由表 1 看出,在孵化温度为 $18 \pm 1^\circ\text{C}$ 、处理时刻固定在 5min 时,其诱导率和相对孵化率随着热休克处理时间(3—8min 之间)的延长变化不甚明显。当处理时刻为 7, 10min 时,其相对孵化率则随处理时间由 3—5min 明显降低。此结果说明在这种条件下处理时间略为延长就使得受精卵发育受阻,孵化率下降,即受精卵发育在此刻对外界影响反应较为敏感。

冷、热休克对受精卵发育的影响:受精卵经冷处理,其发育受到很大影响,相对孵化率也很低;而经热处理,却无此明显效应。这大约是因冷处理温度低且时间长,对受精卵有较大的损害,减缓了胚胎发育的速度,提高了畸形率,从而使相对孵化率降低。相反,受精卵经热处理后,虽发育速度稍有加快,但处理时间过长,也会有发育停滞和畸形率增加的现象。

人工受精所获受精卵进行冷休克处理效果,比自然受精卵进行冷休克效果要好,这可能是因为对人工受精卵易控制其处理时刻,故而卵发育整齐而同步。由此可以推测,热休克实验(皆用自然受精的卵作实验材料)诱导率较低的原因之一可能是自然受精卵不易控制处理时刻。

3. 染色体制片

由显微镜镜检得知,由原肠胚进行染色体制片效果较好。黑鲷 $2n = 48$, 这与刘静¹⁾

表 1 冷休克和热休克诱导三倍体实验结果

Fig. 1 The experiment results of triploidy induced using cold-and heat-shocks

方法	处理时刻 (min)	孵化温度($^\circ\text{C}$)	处理时间(min)	相对孵化率(%) ^①	3n 诱导率(%)
冷 休 克	3	20 ± 1	15 30	40.9 11.5	3.46 22.30
	7	20 ± 1	15 30	17.9 12.1	2.32 17.40
	10	18 ± 1	45 60	23.7 很低	17.44 16.86
热 休 克	5	18 ± 1	3 5 8	98.0 93.4 94.8	7.30 7.10 6.60
	7	18 ± 1	3 5	87.7 66.3	14.00 6.40
	10	18 ± 1	3 5	88.4 62.4	8.80 6.70

① 相对孵化率系该组孵化率与对照组的孵化率之比。

1) 刘静,1989。青岛近海六种海产鱼的染色体组型的研究。

的结果是一致的。由此推得 $3n = 72$, 实际镜检结果也与此相符。

参 考 文 献

- [1] 马涛、朱才宝、朱秉仁, 1987. 热休克诱导虹鳟四倍体。水生生物学报 11(4): 329—336。
- [2] 刘富光, 1989. 鱼类多倍体诱导技术简介。中国水产 440: 5—9。
- [3] 吴清江、陈荣德、叶玉珍, 1986. 鲤鱼染色体组人工调控的核型证明。水生生物学报 10(3): 265—270。
- [4] 苏泽古、许克圣、白国栋, 1983. 鱼类学论文集(第三辑)。科学出版社, 53—59 页。
- [5] 楼允栋, 1984. 国外对鱼类多倍体育种的研究。水产学报 8(4): 343—356。
- [6] Utter, F. M., O. W. Johnson and G. H. Thorgaard et al., 1983. Measurement and potential applications of induced triploidy in Pacific Salmon. *Aquaculture* 35: 125—135.
- [7] Don, J. and R. R. Avtalion, 1988. Comparative study on the induction of triploidy in tilapias, using cold and heat-shock techniques. *J. Fish Biol.* 32: 665—672.
- [8] Johnstone, R., R. M. Knott and A. G. Macdonald et al., 1989. Triploidy induction in recently fertilized Atlantic Salmon Ova using anesthetics. *Aquaculture* 78: 223—228.

PRELIMINARY STUDY ON INDUCED TRIPLOIDY IN *SPARUS MACROCEPHALUS* (BASILEWSKY)*

You Feng, Sha Xueshen and Ruan Hongchao

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao, 266071)

ABSTRACT

Studies on triploid induction in the Black Porgy, *Sparus macrocephalus* (Basilewsky) were carried out from March to June in 1989 in Qingdao and Tianjin respectively, and triploid fry was obtained by a series of cold (0—3°C)-and heat (30—32°C)-shocks in fertilized eggs. Preliminary results of the experiments show that:

1. When triploidy was induced three minutes after fertilization at a temperature level of $20 \pm 1^\circ\text{C}$, the rate of occurrence of triploidy was high. When triploidy was induced ten minutes after fertilization at a temperature level of $18 \pm 1^\circ\text{C}$, the rate of development of the fertilized egg was slow though the rate of occurrence of triploidy was also high.

2. Cold shock (0—3°C) for 30—45 minutes resulted in higher occurrence rate of triploidy (as high as 17.4—22.3%). Thermal shocks of 30—32°C for 3—8 minutes did not make any great difference in the rate of occurrence of triploidy, but the hatching rate was lowered with increase in duration of shock.

The early stage of triploidy in the Black Porgy can be identified in the gastrula stage. After removal of the egg membrane and the yolk sac, the gastrulae were treated with 0.075 mol/L KCl solution and then fixed in a mixture of 3:1 methanol and acetic acid. They were finally placed onto slides, air-dried and stained in Giemsa, after which rather ideal chromosome spreads were obtained. Observation of chromosome spreads under the microscope showed that the Black Porgy has 48 diploid chromosomes ($2n = 48$), while its triploid individual has 72 ($3n = 72$).

This paper also discusses the relationship between duration of shock exposure and the rate of development of early stage embryo.