

人工诱导兴国红鲤三倍体最佳诱导条件的研究*

洪一江 胡成钰

(南昌大学生物科学工程系 南昌 330047)

摘要 采用冷休克处理兴国红鲤受精卵诱导产生三倍体鱼,初步探讨了获得三倍体兴国红鲤的最佳诱导条件,即最恰当的诱导温度,最恰当的诱导起始时间,最恰当的冷休克处理时间。结果表明,在人工授精后 5~8 min,将受精卵置于 0~2℃ 的冰水中冷休克处理 10~15 min,再迅速回温至正常水温(20~25℃)的水中发育,可以获得(70±5)% 的三倍体兴国红鲤胚胎,孵化率为 50%~70%,成活率可达 40%~50% 以上,此为采用冷休克技术人工诱导兴国红鲤三倍体的最佳条件。

关键词 三倍体;诱导条件;冷休克;兴国红鲤

中图分类号:Q343.2⁺45;Q959.46⁺8 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2000)04-02-03

Studies of the Best Condition to Induce Triploid in Xingguo Red Carp

HONG Yi-Jiang HU Cheng-Yu

(Department of Bioscience and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract Triploidy fish of Xingguo Red Carp (*Cyprinus carpio* var. *singuonensis*) was induced by cold shock in fertilized egg. The best results were gotten from the following procedure: putting the fertilized egg into the cold water (0~2℃) after 5~8 minutes insemination to cold shock 10~15 minutes, then transferring them to the room temperature water (20~25℃) quickly to develop continue. Under that situation, about (70±5)% triploidy embryo was obtained, the hatching rate was about 50%~70%, the survival rate of the fish is about 40%~50%.

Key words: Triploid; Induced condition; Cold shock; *Cyprinus carpio* var. *singuonensis*

鱼类多倍体育种研究是动物染色体组工程的重要内容。采用人工方法诱导三倍体鱼的研究从 20 世纪 40 年代开始经数十年,已有数十种鱼被人工诱导产生三倍体,有的已用于生产中^[1~4]。人工诱导三倍体鱼的方法主要有冷休克、热休克、静水压等物理方法,种间杂交的生物学方法和采用化学物质如细胞松弛素 B 和秋水仙素等处理的化学方法。各种实验表明^[5~7],只要处理方法恰当,都可以获得较好的效果。

兴国红鲤是江西省经多年选育的一个优良品种,抗逆性强,性状稳定,杂交优势明显,已成

为科研和生产的重要鱼种,经济潜力很大。本实验采用简便易行的冷休克方法诱导产生三倍体兴国红鲤,以摸索处理的最佳条件。

1 材料与方法

亲鱼选自国家级兴国红鲤良种场,人工注射 HCG 后,待发情时将亲鱼捞起,人工干法授

* 江西省自然科学基金项目;

第一作者介绍:洪一江,男,36岁,副教授,硕士;研究方向:发育生物学;

收稿日期:1999-06-07,修回日期:2000-04-20

精,使受精卵粒均匀散开于盛有已暴气蒸馏水的解剖盘中,盘底铺满载玻片。每块载玻片上粘有 350~400 个卵粒,镜检结果,受精率达 98% 以上。

人工授精 3、5、8、10 和 15 min 后,分五组,每组各取 5 块载玻片分别浸入 0~2℃ 的冰水中,冷休克处理时间分别达 5、10、15、20 和 30 min 时,取出一块载玻片迅速回温至 (20±2)℃ 的蒸馏水中继续发育。当胚胎发育至囊胚晚期和原肠早期时,分别从每块载玻片上刮下 100~150 个早期胚胎于 0.005% 的秋水仙素溶液中培养 12~14 小时,剥去卵膜,将卵黄去掉,留下的胚胎细胞按常规方法制作染色体标本, Giemsa 染色。其余的胚胎继续发育至出膜,统计孵化率和成活率。对照组未进行冷休克处理,并在人工授精后 6、8、9 和 10 min 时,分别刮下约 50 个卵粒固定于 Bouin 氏固定液中,按常规方法进行石蜡连续切片,确定第二极体排出的大致时间。

2 结果与分析

冷休克处理时间为 30 min 的各组胚胎,大部分在受精卵未开始卵裂或卵裂早期被冻死,能发育的亦很早夭折,少量胚胎发育到囊胚中期后死亡,无一能发育至出膜。

将人工授精 15 min 后的受精卵进行冷休克处理,在各处理组中,镜检染色体片子计算单

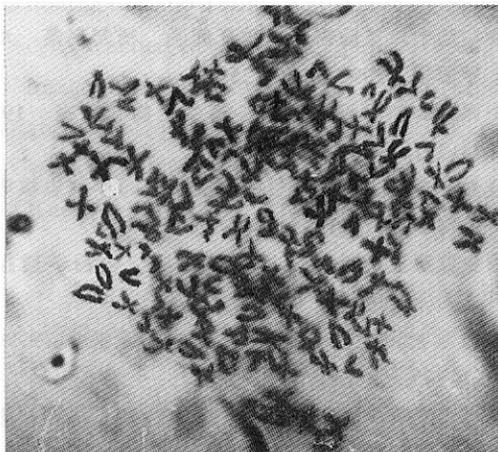


图 1 兴国红鲤三倍体 (3n=150) 胚胎染色体

个胚胎细胞内的染色体数目。由于兴国红鲤二倍体染色体数目为 $2n=100$,镜检时,单个细胞中染色体数目为 130~150 时,均被计为三倍化胚胎(图 1)。在此条件下,未找到三倍化的胚胎细胞;而人工授精 10 min 后的受精卵在进行冷休克后其胚胎三倍体率仅占 5%~10%,绝大多数仍为二倍体。

由于上述两项几乎不能获得三倍体胚胎,因此重复试验中不再考虑。其余各组中胚胎三倍化现象结果不同,三倍化率详见表 1。

表 1 冷休克处理兴国红鲤受精卵染色体三倍化率 (%)

授精后时 间(min)	不同处理时间的倍化率			
	5	10	15	20(min)
3	15±5	30±5	38±5	36±5
5	12±5	70±5	70±5	72±5
8	18±5	72±5	71±5	71±5
10	7±2	8±2	8±2	10 以下

从表 1 结果来看,在人工授精后 5~8 min,将受精卵置于 0~2℃ 的冰水中进行冷休克处理 10~20min,可以获得较高比率的三倍体胚胎,约 (70±5)%。

对上表各组胚胎继续发育进行观察,卵裂球在卵裂早期至多细胞期均出现少量分裂不规则现象,分裂球有的大小不一,一些胚胎在发育过程中死亡。部分孵化出的幼鱼尾部很短甚至畸形,生长缓慢,在水中游动十分艰难,大部分时间沉在水底,一般在孵出 2~4 天后死亡。其余孵出的幼鱼大部分生长正常,在水族箱中培养 15 天后放养于精养池中。以存活 10 天以上的幼鱼为存活标准统计幼鱼存活率见表 2。

$$\text{孵化率} = \frac{\text{孵出数}}{\text{受精卵数}} \times 100\% ;$$

$$\text{存活率} = \frac{\text{存活数}}{\text{受精卵数}} \times 100\%$$

从表 2 的结果来看,人工授精后经冷休克处理 5 min 以内,各组的孵化率和存活率均较高,但由于三倍化率较低,因此实际获得三倍体兴国红鲤数较少。而冷休克处理时间达到 20 min 时,其孵化率和存活率很低。对照组的孵化率为 (80±5)%,存活率为 (70±5)%。由此可以看出,随着冷休克处理时间的延长,孵化率

和存活率逐渐降低,最后被冻死。

表 2 各组孵化率及幼鱼存活率(%)

授精后时间 (min)	处 理 时 间(min)							
	5		10		15		20	
	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率
3	82±5	60±5	64±5	48±5	50±2	40±3	15±4	9±2
5	75±4	57±3	66±5	43±5	50±6	38±3	15±5	9±2
8	70±5	55±5	68±5	42±4	51±5	38±2	18±3	10±2
10	70±5	58±5	60±4	42±4	53±4	39±5	13±5	8±2

根据对石蜡切片的观察,第二极体排出的时间约在授精后 9~10 min,这与人工授精 10 min 后出现三倍化胚胎(表 1)比率大幅下降相吻合,同时,冷休克处理时间为 5 min 时,三倍化率也低,表明冷休克处理时间长短对产生三倍体有影响。值得令人关注的是,在人工授精后 3 min 内将受精卵进行冷休克所获得的三倍体比率不足 50%,即使冷休克时间达到 10~15 min,大部分受精卵在回温后第二极体仍然被排出,表明冷休克阻断第二极体排出,并使第二极体发育仅局限在很短的特定的时间范围内发挥作用,其机制有待于进一步研究。统计结果可以得出采用冷休克处理兴国红鲤受精卵获得三倍体的最恰当方法是:在人工授精后 5~8 min 将受精卵置于 0~2℃ 的冰水中处理 10~15 min 再迅速回到正常温度下发育,可以获得 (70±5)% 左右的三倍体兴国红鲤胚胎,孵化率可达 50%~70%,存活率为 40%~50% 以上,

此为最佳处理条件。此外,亲鱼的选择、鱼卵质量以及操作时对时间、环境条件的把握均会对诱导效果,包括三倍化率、孵化率、存活率以及畸形率等产生重要影响。

参 考 文 献

- [1] 楼允东. 国外对鱼类多倍体育种的研究. 水产学报, 1984, 8(4): 343~356.
- [2] 楼允东. 鱼类育种学. 北京: 中国农业出版社, 1999. 108~152.
- [3] 尤锋. 黑鲷三倍体的人工诱导研究. 海洋与湖沼, 1993, 24(3): 248~255.
- [4] Gerval J. et al. Induced triploidy in carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Fish Biol.*, 1980, 17(6): 667~671.
- [5] 桂建芳. 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. 水生生物学报, 1995, 19(1): 49~55.
- [6] 陈敏容, 阎康, 刘汉勤等. 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): 96~99.
- [7] 苏泽古, 许克圣, 陈尚萍等. 白鲢三倍体及其核型的研究. 动物学研究, 1984, 5(3): 15~19.