

黑鲷三倍体的人工诱导研究*

尤 锋

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 分别于 1989 年 3—6 月、1990 年 3—5 月在天津和青岛两地采用冷、热休克法对黑鲷进行三倍体的人工诱导研究。结果表明,冷休克法诱导三倍体的效果好于热休克法,其最适诱导条件为卵子在受精后 5 min,温度为 3—4℃的海水中处理 10—20 min,三倍体诱导率最高可达 50.35%;正交试验证明,三倍体率受冷、热休克法的三因素影响程度的顺序由大到小依次为,处理时间、处理时刻、处理温度;黑鲷染色体数目: $2n = 48, 3n = 72$, 它们的染色体组型也同时获得。

关键词 黑鲷三倍体 人工诱导 冷休克 热休克 倍性鉴定

始于四五十年代的鱼类三倍体研究由于易操作,所获三倍体具生长快、不育等特性已经成为生物工程和现代遗传育种的重要组成部分。迄今已先后对 20 余种鱼进行了成功的诱导实验 (Don, 1988; Kitamura, 1991; Purdom, 1972; 等),有的已应用于生产,如三倍体牙鲆的养殖(长崎县水产试验场,1987)。在国内三倍体的研究仅限于淡水鱼类(苏泽古,1984;吴清江,1979;等),而海水鱼类方面至今未见到报道。本文对黑鲷进行了三倍体的人工诱导实验,以期寻找加快其生长速度、缩短其养殖周期的最佳途径。

1 材料与方 法

黑鲷 (*Sparus macrocephalus* (Basilewsky)) 亲鱼于 1988 和 1989 年采捕自青岛近海,在人工条件下饲养。分别于 1989 年 3—6 月和 1990 年 3—5 月在天津滨海养虾场和本所实验室内进行实验。

1.1 受精卵的获取

黑鲷用自然海水培育,在室内的产卵季节一般是 4 月中、下旬至 5 月下旬。在天津,采用人工诱导和强化培育的方法使黑鲷提前到 3 月上、中旬产卵。受精卵由人工授精和自然产卵受精两种方法获得。

1.2 温度处理

首先进行处理开始时间(处理时刻)、处理持续时间、处理温度三因素的单因子试验,依此再进行正交试验 ($L_9 3^4$)¹⁾,经方差分析即获得最适诱导条件。实验安排如下:

1.2.1 冷处理 处理时刻 (TA)、处理持续时间 (D)、处理温度 (T) 实验和正交试验

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 2150 号。研究生经费资助。本文是在沙学绅、阮洪超先生的指导下完成的。在实验中得到了吴清江教授、刘恩阳同志的指导和帮助,刘静同志、天津滨海养虾场给予大力协助,均此一并致谢。

收稿日期: 1991 年 12 月 13 日;接受日期: 1992 年 3 月 23 日。

1) 中国科学院数学研究所概率统计室,1978,正交试验设计。

依次见表 1、表 2。

1.2.2 热处理 处理时刻、处理持续时间、处理温度实验和正交试验依次见表 3、表 4。

各实验组及对照组用的受精卵数约 1 000 粒, 每次所用卵子均为一尾雌鱼所产。经处理的卵子分别放回水温为 17—20℃ 的正常海水中继续培育, 按时观察其胚胎发育情况(张孝威, 1980)并计算各组的中期原肠胚发育阶段的成活率(S_c %)、孵化率(H %) 和相

表 1 冷休克处理与三倍体率、孵化率的关系

Tab. 1 Relationship of treatment time, duration, temperature with the rate of occurrence of triploidy and the hatching rate under cold-shock treatment

处理三因素	组号	TA (min)	D (min)	T (°C)	S_c (%)	H (%)	RH (%)	3n (%)
处理时刻	1	3	20	0—3	88.6	76.90	79.45	35.69
	2	5	20	0—3	91.9	60.10	62.09	50.35
	3	7	20	0—3	89.6	74.10	76.55	41.13
	4	10	20	0—3	84.5	80.87	83.54	21.11
	5	15	20	0—3	97.7	97.70	100.93	0
	6	25	20	0—3	90.0	90.00	92.98	0
	对照	—	—	—	96.8	96.80	—	0
处理持续时间	1	5	5	0—3	88.1	83.61	93.25	18.89
	2	5	10	0—3	80.4	64.72	72.19	38.42
	3	5	20	0—3	75.0	32.93	36.72	42.22
	4	5	30	0—3	40.0	10.00	11.15	47.74
	5	5	40	0—3	极低	极低	极低	—
	6	5	60	0—3	0	0	0	—
	对照	—	—	—	91.4	89.66	—	0
处理温度	1	5	20	-1—0	18.9	1.57	1.58	44.18
	2	5	20	0—1	22.9	4.17	4.21	44.11
	3	5	20	2—3	24.2	4.16	4.22	39.44
	4	5	20	4—5	56.1	25.25	25.53	34.38
	5	5	20	7—8	87.7	86.21	87.17	13.19
	6	5	20	10	94.1	94.10	95.15	0
	对照	—	—	—	98.9	98.90	—	0

表 2 冷休克正交试验结果

Tab. 2 The results of the orthogonal design under cold-shock treatment

组号	TA (min)	D (min)	T (°C)	X_i (3n%)	X'_i (X_i-30)
1	5	10	0—1	25.38	-4.62
2	5	15	2—3	27.75	-2.25
3	5	20	4—5	45.08	15.08
4	3	10	2—3	24.55	-5.45
5	3	15	4—5	27.65	-2.35
6	3	20	0—1	40.00	10
7	8	10	4—5	20.02	-9.98
8	8	15	0—1	23.74	-6.26
9	8	20	2—3	32.38	2.38

表 3 热休克处理与三倍体率、孵化率的关系

Tab. 3 Relationship of treatment time, duration, temperature with the rate of occurrence of triploidy and the hatching rate under heat-shock treatment

处理三因素	组号	TA (min)	D (min)	T (°C)	S _i (%)	H (%)	RH (%)	3n (%)
处理时刻	1	1	5	30±1	83.33	77.72	92.19	5.04
	2	3	5	30±1	87.3	87.30	103.56	12.77
	3	5	5	30±1	88.9	86.68	102.82	20.11
	4	8	5	30±1	90.6	88.88	105.43	8.45
	5	10	5	30±1	86.5	86.50	102.61	8.97
	6	15	5	30±1	88.7	88.70	105.22	0
	7	25	5	30±1	81.9	81.90	97.15	0
	对照	—	—	—	84.3	84.30	—	0
处理持续时间	1	5	3	29±1	89.1	87.50	93.68	6.15
	2	5	5	29±1	71.1	65.41	70.03	10.02
	3	5	8	29±1	62.3	53.48	57.36	15.04
	4	5	10	29±1	27.9	16.96	18.16	18.86
	5	5	15	29±1	极低	极低	极低	—
	6	5	20	29±1	0	0	0	—
	7	5	30	29±1	0	0	0	—
	对照	—	—	—	93.4	93.40	—	0
处理温度	1	5	5	28±1	93.2	93.20	96.06	16.01
	2	5	5	30±1	92.2	92.20	95.03	20.53
	3	5	5	32±1	89.7	89.70	92.46	25.87
	4	5	5	35±1	85.9	83.67	86.24	29.74
	对照	—	—	—	98.5	97.02	—	0

表 4 热休克正交试验结果

Tab.4 The results of the orthogonal design under heat-shock treatment

组号	TA (min)	D (min)	T (°C)	X _i (3n%)	X' _i (X _i -25)
1	5	5	30±1	21.19	-3.81
2	5	8	32±1	29.09	4.09
3	5	10	35±1	36.04	11.04
4	3	5	32±1	17.35	-7.65
5	3	8	35±1	19.32	-5.68
6	3	10	30±1	23.51	-1.49
7	8	5	35±1	20.22	-4.78
8	8	8	30±1	24.59	-0.41
9	8	10	32±1	28.86	3.86

对孵化率(RH%)。每项实验重复 3—5 次。

1.3 倍性鉴定

分别取各实验组和对照组的后期原肠胚约 100 粒,做染色体制片(尤锋等,1991)。镜检染色体数目,统计各实验组的三倍体率(3n%),同时照相、分析得出黑鲷二倍体和人工

诱导的三倍体的染色体组型。

2 结果

经镜检, 黑鲟二倍体的染色体数目为 48。按照 Leven 等 (1964) 的命名和分类标准以及计算结果得出染色体相对长度和臂比(表 5), 其臂数为 58; 染色体组型为 $3m + 2sm + 19t$, 即有 3 对中部着丝点染色体、2 对亚中部着丝点染色体和 19 对端部着丝点染色体。黑鲟三倍体的染色体众数为 72, 根据表 5, 将这 72 个染色体配成三套, 其臂数为 87 (见图版 I)。

表 5 黑鲟染色体相对长度和臂比

Tab. 5 The relative length and arm ratio of chromosome of *Sparus macrocephalus* (Basilewsky)

染色体编号	相对长度	臂 比	着丝点位置
1	4.47±0.80	1.37±0.027	m
2	3.74±0.42	1.46±0.014	m
3	3.53±0.26	1.53±0.028	m
4	5.17±0.87	1.95±0.15	sm
5	4.45±0.48	2.34±0.14	sm
6	4.78±0.45	∞	t
7	4.64±0.52	∞	t
8	4.53±0.53	∞	t
9	4.40±0.53	∞	t
10	4.25±0.48	∞	t
11	4.18±0.46	∞	t
12	4.10±0.43	∞	t
13	4.02±0.41	∞	t
14	3.97±0.39	∞	t
15	3.83±0.42	∞	t
16	3.78±0.43	∞	t
17	3.74±0.43	∞	t
18	3.67±0.43	∞	t
19	3.59±0.38	∞	t
20	3.28±0.32	∞	t
21	3.09±0.39	∞	t
22	2.77±0.49	∞	t
23	2.47±0.40	∞	t
24	1.78±0.55	∞	t

2.1 冷处理

2.1.1 处理时刻、处理时间、处理温度与三倍体率、孵化率的关系(表 1) 结果表明, 三倍体率在处理时刻为受精后 5min 时最高, 在此之前或之后都呈逐渐下降的趋势; 当处理时刻为受精后 15min 时, 已降为零。原肠胚成活率与孵化率则没有什么太大的变化, 到处理时刻为受精后 15min 时已与对照组渐趋一致。综合考虑三倍体率与孵化率两个因素, 当处理温度为 0—3℃、处理时间为 20min 时, 其最适的处理时刻是在受精后 5min。

当将处理时刻和处理温度固定, 而只改变处理时间的长短时, 三倍体率随着处理时间的延长而增高, 但原肠胚成活率和孵化率却与处理时间成反比, 到处理时间为 40min 时,

两者均几乎降为零。综合考虑三倍体率和相对孵化率的高低,并以三倍体率为主要因素,当处理温度为 0—3℃、处理时刻为受精后 5min 时,处理时间应选在 10—20min 较为合适。

处理温度则与三倍体率呈负相关,但当温度降到 0℃, -1℃ 时,两者的三倍体率则无明显差异,都在 44% 左右。原肠胚成活率及孵化率则与处理温度呈正相关。综合考虑三倍体率和相对孵化率的数值变化,要获得较多的三倍体,在处理时刻为受精后 5min、处理时间为 20min 时,将处理温度选为 3—4℃ 较为合适。

2.1.2 正交试验结果 将试验结果填入正交试验表(表 2)中,三因素的最优水平,即最佳组合由方差分析结果直观来看,卵子在受精后 5min,放入水温为 0—1℃ 海水中处理 20min。可是,除了要得到较高的三倍体率外,还应考虑其成活率的高低,故应将两者综合分析,则选取处理时刻为受精后 5min、处理时间为 10—20min、处理温度为 3—4℃ 为最优处理条件。这与上述三项实验的结果也是相符的。

2.1.3 对受精卵胚胎发育的影响 据观察,冷休克对受精卵的发育有阻滞作用,其发育速度随处理时间的延长、处理温度的降低而明显减慢。如 2-细胞的形成,处理时间为 60min 时,较对照组迟约 1h,而处理时间为 5min 时,只晚约 10min (处理时刻为受精后 5min,处理温度为 0—3℃ 时)。处理时刻的不同对其发育速度的阻滞程度基本相同。冷休克还会影响受精卵的外部形态——卵膜表面出现皱折和产生畸形卵裂(如 2 胞期的细胞大小不一,卵子分裂为 3-细胞、5-细胞等不规则现象),其影响程度随处理时刻的提前、处理时间的延长、处理温度的降低而增大。但随着受精卵发育的继续,其受阻和卵膜皱折状况趋于缓解,至孵化时大多恢复正常(除受损过重而致死外),畸形卵裂产生的畸形卵则不能继续发育而中途夭折。

2.2 热处理

2.2.1 处理时刻、处理时间、处理温度与三倍体率、孵化率的关系(表 3) 结果表明,随着处理时刻的推迟三倍体率逐渐增高,到处理时刻为受精后 5min 时,达到最高(20.11%),之后又急剧下降;当处理时刻为受精后 15min 时,降为零。原肠胚成活率和孵化率在处理时间为 5min 时与处理时刻的关系不甚明显,故可以认为,在处理时间为 5min、处理温度为 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 时,最适处理时刻为受精后 5min。

在 3—10min 之间,处理持续时间越长,三倍体率越高,呈正相关,而原肠胚成活率和孵化率却随之急剧下降;当处理时间延长为 15min 时,已很少可以成活,20min 以后降为零。综合三倍体率、相对孵化率的数值可看出,随着处理时间的延长其综合值也增大,到 8min 时达最大;之后又开始下降。故在处理时刻为受精后 5min、处理温度为 $29 \pm 1^\circ\text{C}$ 时,受精卵处理 8min,可获得较多的三倍体。

处理温度也与三倍体率呈正相关;而原肠胚成活率与孵化率受处理温度的影响却不很大,只随其升高略有降低。因此,当处理时刻为受精后 5min、处理时间为 5min 时,热休克的较适处理温度可选在 32—35℃ 之间。

2.2.2 正交试验结果 由正交试验的结果,热休克诱导的最佳处理条件组合,经方差分析直观上来看,处理时刻为受精后 5min;处理时间为 10min;处理温度为 35℃。但是兼顾到温度由 32—35℃、时间由 8—10min,成活率均有所下降;另外在这两种温度下,三倍

体率差异也不很大。因而为获得数量多的三倍体,其诱导的最优条件应选作:处理时刻为受精后 5min,处理时间为 8min,处理温度为 32—35℃。这也同于单因子的实验结果。

2.2.3 对受精卵胚胎发育的影响 热休克对实验组受精卵的发育影响不甚一致。经观察,在大部分实验组中其早期胚胎发育速度随着处理时间延长、处理温度升高略有加快,并随着胚胎的继续发育,实验组的发育速度与对照组的渐趋一致。处理时间过长,也有受精卵发育停滞和畸形率增高的现象。而对处理时刻的变化,受精卵发育所受的影响变化不大。

3 讨论与结语

3.1 染色体倍性的鉴定

染色体倍性的及时鉴定是衡量诱导效果的唯一指标。目前倍性鉴定的方法很多,其中较为常用的有染色体计数、DNA 含量测定等直接法和红血球核体积测量、生化分析等间接法。本文的倍性鉴定是用分裂旺盛、具有一定细胞数量的中期原肠胚制片直接进行染色体计数的。实验证明,该法能够获得较高质量和数量的中期分裂相,依此进行实验鱼倍性的鉴定是可行、可靠和及时的。经镜检分析出的黑鲷二倍体的染色体数目及组型与刘静¹⁾的结果相同。由此得出的三倍体的染色体数目与实际镜检结果也是一致的。

3.2 关于冷、热休克对黑鲷受精卵的不同诱导效果的探讨

Utter 等(1983)指出,热休克法对冷水性鲑科鱼类是有效的。其他报道也证明鲑科鱼类三倍体的人工诱导,其成功的实验大多是采用热休克法。Sloar(1984)试图用冷休克法诱导大西洋鲑,但没有获得成功。在国内,进行较多的鲤鱼三倍体的诱导研究,往往采用冷休克法效果较好,而鲤科鱼类恰恰属于温水性鱼类。纵观本文结果可知,对于温水性的黑鲷,采用冷休克法的诱导效果明显好于热休克法的。例如,在冷休克实验中三倍体率最高可达 50%,而在热休克实验中其最高只有 36%。这说明黑鲷受精卵对高、低温诱导的反应有明显差异。综上所述,本研究支持了谷口顺彦(1986)的冷休克法适应于温水性鱼类的观点。

3.3 处理时刻、处理持续时间和处理温度三因素对人工诱导黑鲷三倍体效果的影响

对任何一种鱼来说,三因素的确定是温度休克法诱导三倍体的关键(湖北水生生物研究所,1976)。如处理时刻就不能过早或过迟,据文献及本实验的观察,选取第二极体刚刚形成至放出之前这段时间进行诱导处理效果最佳;同样,处理时间也不能过长或过短,过长会影响受精卵的进一步发育,过短则诱导效果不佳;处理温度也是如此。综合这三个因素进行正交试验和方差分析,得出它们影响诱导效果的主次顺序为:处理时间>处理时刻>处理温度(在一定范围内)。当然,这三个因素同时也是互相影响和制约的。

尚须提及的是,大多数鱼类用冷休克法,处理时间在 60min 以上较有效(谷口顺彦,1986),这与本文结果不一致,黑鲷受精卵当处理 40min 时其孵化率已降至很低,到了 60min 时几无存活。Sugama 等(1988)在黑鲷三倍体诱导实验中也是在处理时间为 15min 时就获得了较高的三倍体率,这可能与黑鲷的遗传背景和卵膜较薄而对温度反应较敏感有关。

1) 刘 静,1989,青岛近海六种海产鱼染色体组型的研究。

3.4 有关冷休克法诱导黑鲷三倍体效果的比较

前已提及,日本 Sugama 等(1988)对黑鲷受精卵进行冷休克处理,其实验条件是:处理时刻为受精后 3min、处理时间为 15min、处理温度为 0—1℃,获得了 96.6% 的三倍体率(文中未注明其成活率)。这个结果与本文取得的最高诱导率(50%)相比要高得多,这在其它鱼类用同法诱导的文献中也极为罕见。分析差别原因可能是:(1)倍性鉴定的方法不同,本实验采用的是染色体直接计数法,而 Sugama 采用的是同工酶电泳法,属间接鉴别法。(2)不同地理种群的差异性,本实验用黑鲷亲鱼捕自青岛近海与 Sugama 采自日本近海的黑鲷,由于种群在地理上的隔离,可能发生了分化,而具有不同的特性,所以对诱导的反应不尽一致,导致了两地实验结果的差异。(3)诱导工艺的差异性。以上所述几点均有待于进一步探讨。

黑鲷三倍体人工诱导的成功,使得探讨这种技术在海水鱼类养殖和渔业资源管理中的应用成为可能。好的诱导方法及其最佳处理条件的确定,是获得大量三倍体的先决条件。根据文献报道,有的鱼种,象蓝罗非鱼(Valenti, 1975)、红鲤×镜鲤(吴清江,1979)等的三倍体均较二倍体长得大;可在另一些鱼种,象三棘刺鱼等的三倍体与二倍体之间大小无甚差异。还有大多数鱼类的三倍体均为不育(刘富光,1989;楼允栋,1984)。那么,黑鲷三倍体的生物学特性与二倍体的差异如何?其优良品性又是如何表现的呢?这有待今后进一步深入的研究。

参 考 文 献

- 尤锋等,1991,黑鲷三倍体人工诱导的初步研究,海洋与湖沼,22(5): 489—491。
 刘富光,1989,鱼类多倍体诱导技术简介,中国水产,440: 5—19。
 苏泽古、许克圣、陈尚萍等,1984,白鲢三倍体及其核型的研究,动物学研究(增刊),5(3): 15—20。
 吴清江等,1979,鲤鱼杂种优势多代利用的探讨,水生生物学集刊,6(4): 445—451。
 张孝威等,1980,黑鲷卵子及仔、稚、幼鱼的形态观察,动物学报,26(4): 331—336。
 湖北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—112。
 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。
 谷口順彦,1986,染色体倍化技術と魚類育種(上),水産の研究,5(5): 86—90。
 長崎県水産試験場,1987,三倍体ヒラメの実用化にめど,養殖,8: 130。
 Don, J. and Avtalion, R. R., 1988, Comparative study on the induction of triploidy in tilapias using cold- and heat-shock techniques, *J. Fish Biol.*, 32: 665—672。
 Kitamura, H. et al., 1991, Gonadal development of artificially induced triploidy in red sea bream, *Pagrus major*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(9): 1657—1660。
 Leven, A. et al., 1964, Nomenclature for centromeric position on chromosomes, *Heredity*, 52: 201—220。
 Purdom, C. E., 1972, Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) and its hybrid with the flounder (*Patichthys flesus*), *Heredity*, 29: 11—24。
 Solar, I. I. et al., 1984, Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmon gairdneri* Richardson) by heat shock and investigation of early growth, *Aquac.*, 42: 52—67。
 Sugama, K. and Taniguchi, N., 1988, Isozyme expression of artificially induced ploidy in red sea bream, black sea bream and their hybrid, *Rep. Usa. Mar. Biol. Inst., Kochi Univ.*, 10: 75—81。
 Utter, F. M. et al., 1983, Measurement and potential applications of induced triploidy in pacific salmon, *Aquac.*, 35: 125—135。
 Valenti, R. J., 1975, Induced polyploidy in *Tilapia aurca* (Steindacher) by means of temperature shock treatment, *J. Fish Biol.*, 7: 519—528。

STUDY ON TRIPLOIDY INDUCTION IN THE BLACK PORGY, *SPARUS MACROCEPHALUS* (BASILEWSKY)*

You Feng

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071)

ABSTRACT

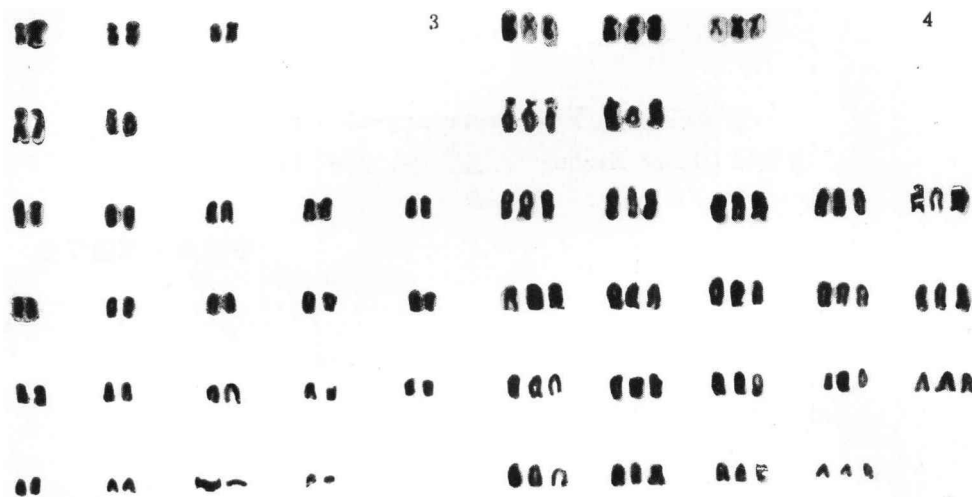
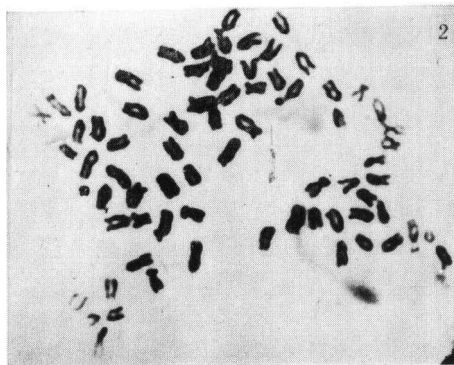
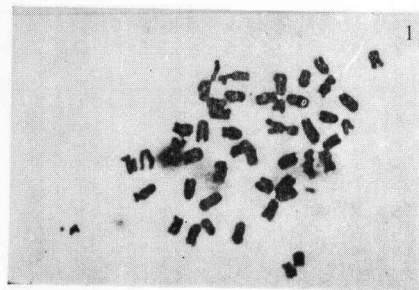
Studies on triploidy induction in the marine commercial fish—the black porgy, *Sparus macrocephalus* (Basilewsky) were carried out using cold- and heat-shock techniques from March to June in 1989 and March to May in 1990 in Tianjin and Qingdao. Results of studies show that the cold-shock technique is more advantageous for inducing triploidy in the black porgy than the heat-shock technique. Under cold-shock treatment, the optimal condition for inducing triploidy in the black porgy was to treat the eggs at 3—4°C, 5 minutes after fertilization for 10—20 minutes. The maximum percentage of occurrence of triploidy was 50.35%. Under heat-shock treatment, the optimal condition for the inducing triploidy was to treat the eggs at 32—35°C, 5 minutes after fertilization for 8 minutes. The maximum percentage of occurrence of triploidy was 36.04%. The orthogonal design results showed that the rate of occurrence of triploidy was affected firstly by treatment duration, secondly by treatment time, and lastly by treatment temperature under both cold-shock and heat-shock treatment.

The early stage of triploidy in the black porgy can be identified in the gastrula stage from chromosome spreads. Observation under the microscope revealed 48 chromosomes in diploidy and 72 in triploidy. Karyotypes of diploidy and triploidy were obtained through observation and analysis.

This paper also presents the results of observation and analysis of the effect of cold- and heat-shock on the extent of embryo development and on the relationship between fertilization temperature and inducing triploidy.

Key words Black porgy triploidy Artificial induction Cold-shock Heat-shock
Ploidy identification

* Contribution No. 2150 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.



黑鲷二倍体、三倍体的中期分裂相及其染色体组型

The metaphase chromosomes and karyotypes of diploidy, induced triploidy in black porgy, *Sparus macrocephalus* (Basilewsky)

1. 二倍体中期分裂相; 2. 三倍体中期分裂相; 3. 二倍体的染色体组型; 4. 三倍体的染色体组型。