

热休克诱导虹鳟四倍体*

马涛 朱才宝

(山西大学生物系,太原)

朱秉仁

(山西省虹鳟鱼实验场,朔县)

提 要

虹鳟卵受精后5—9小时期间,用热休克处理,12月龄时检查,四倍体出现频率为5%。较高的温度处理可导致卵的高死亡率

$2n = 60$ 的虹鳟核型中,有中部和亚中部着丝点染色体22对,近端着丝点染色体1对,端着丝点染色体7对,总臂数 $NF = 104$ 。 $4n = 120$ 的虹鳟四倍体核型中,有22套中部和亚中部着丝点染色体,1套近端着丝点染色体,和7套端着丝点染色体,总臂数 $NF = 208$ 。未发现染色体倍性镶嵌的个体。

分析比较了二倍体和四倍体两类鱼的红细胞及其核的9个度量值(DNA相对含量,细胞及核的长轴、短轴,面积和体积),为应用红细胞鉴定四倍体虹鳟提供了倍性标准。在形态、解剖和生长速度方面未发现两类鱼有什么差别。

关键词 虹鳟 四倍体 热休克

虹鳟 (*Salmo gairdneri* R.) 即 rainbow trout 隶属鲑科,是适应性很广的冷水性鱼类。自1874年逐渐为许多国家移植驯养后,现已遍及86个国家和地区,成为世界上分布最广的优势养殖鱼类之一。

人工诱导虹鳟多倍体,国外研究较多^[7,8,11,12,16,17,20,21],其中有用物理或化学方法诱导虹鳟多倍体的研究报道。国内仅见对草鱼、鲢多倍体诱导的研究^[1-3,5],但尚未见到有关虹鳟多倍体的研究报道。

材 料 与 方 法

本实验在山西省朔县虹鳟鱼实验场进行。

卵采自4尾3龄雌鱼,约12000粒。精液来自3尾3龄雄鱼。利用改进的人工“湿法”授精¹⁾热休克处理实验设计如表1所示。

* 本文承中国科学院水生生物研究所陈宏溪研究员,上海水产学院楼允东副教授审阅,并提出宝贵意见,特此深表谢忱。

1986年9月2日收到。

1) 朱秉仁,1983。虹鳟鱼人工繁殖干法授精的改进。淡水渔业资料。1: 9—10。

表 1 热休克处理虹鳟受精卵的实验设计

Tab. 1 Experimental design of heat shock treatment on the fertilized eggs of rainbow trout

组 别	1	2	3	4	5	对照 ³⁾
处理卵数 ¹⁾	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000
受精后至休克前的持续时间 (小时) ²⁾	5	6	7	8	9	—
休克温度 ³⁾	28℃	30℃	32℃	34℃	36℃	—
休克持续时间(分) ⁴⁾	12	8	6	4	1	—

1) Numbers of treated eggs; 2) Duration from fertilization to shock treatment (hr); 3) shock temperature (℃); 4) Shock duration (min); 5) Control

热休克方法：卵受精后至处理时的孵化水温是 8℃。热休克处理是先将受精卵置于长方形网筐中(约两层卵厚),然后浸入恒温水浴。处理毕,将卵在间隔 3℃ 的各级水温中,依次缓冲降温 3—5 分钟,最后放至正常孵化水温。7 天后检查卵的死亡率。定期去除死卵。整个孵化期水温 8—10℃。

四倍体鱼的鉴定：鱼苗孵出后,各组混合饲养在一个池中,12 月龄时(成鱼期),抽 100 尾进行倍性鉴定。

① **染色体核型检查：**采用活体注射 PHA 和秋水仙素制备肾细胞染色体标本方法^[4],每尾鱼均计数 100 个以上分裂相,以确定其倍性。

② **红细胞的涂片制备及测量：**取每尾鱼的尾动脉血进行涂片。Wright 氏染色。油镜下,测量红细胞及其核的长轴、短轴。每尾鱼均测定 50 个细胞,按 $a \cdot b \cdot \pi/4$ 公式计算面积, $a^2 \cdot b/1.91$ 公式计算体积。a 为短轴,b 为长轴。

③ **红细胞中 DNA 含量的测定：**将血样涂在 0.8 mm 厚的载片上,经空气干燥后,用 10% 中性甲醛固定 30 分钟,然后在 $5\text{mol/L} \left[\frac{1}{2} \text{HCl} \right]$ 中室温水解 1 小时。Schiff 氏剂避光染色 1.5 小时。Olympus 细胞显微分光光度计上,以二个波长程序测定每尾鱼 50 个红细胞核的 DNA 含量,然后取其平均值。

结 果

1. 热休克对卵死亡率及胚胎发育的影响

处理后第 7 天,各组卵的死亡率如图 1 所示。

从图 1 中可以看出: 32℃ 以上的温度处理对卵的致死效应要显著大于 30℃ 以下的处理。观察破膜后鱼苗的情况,畸形苗显著多于对照组,胚体呈弯曲,双头,或双尾等。在处理的 10 000 粒卵中,共获鱼苗约 400 尾,出苗率为 2%。

2. 四倍体鱼的出现频率及其染色体数量变化

抽样检查 100 尾实验鱼,有 5 尾经染色体计数可确定为四倍体(表 2),出现频率 5%。

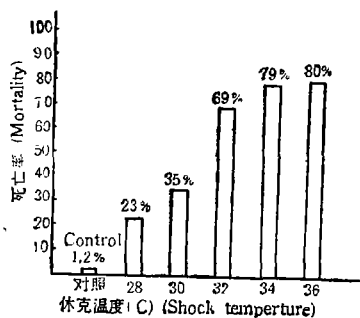


图 1 处理后第 7 天卵的死亡率

Fig. 1 Mortality of eggs at 7th day after treatment

表 2 5 尾四倍体虹鳟的染色体计数

Tab. 2 Chromosome counts for 5 tetraploid rainbow trout

鱼号数 ¹⁾ 染色体数目 ²⁾	1	2	3	4	5
122			1		
121	1			1	
120	68	53	51	71	64
119	8	16	14	11	9
118	4	7	18	9	7
117	3	2	7	3	2
116	2	4	3	5	4
115	4	2	6	2	1
114	4		1		5
113		6		1	
112		3			3
111	2		4		2
110		2		2	
109	3		3		1
108				2	1
107		1			1
106			2	1	
105		3	1		2
104	1			1	
103		1	2		1
102					1
101			1		
100	1			1	
总计 ³⁾	101	100	114	110	104
4n = 120(NF = 208) 百分率 ⁴⁾	67.3%	53%	44.7%	64.5%	61.5%

1) Fish No.; 2) Chromosome number; 3) Total counts; 4) Percentage of 4n = 120(NF = 208)

虹鳟染色体由于着丝粒分裂和融合等原因,其数目不尽相同($2n = 58-64$, $NF = 104$),个体间和个体内皆有染色体多态性^[9,10,13,18,22]。对于本场虹鳟品系,我们的研究结果只证实个体间具染色体多态性($2n = 58-62$, $NF = 104$),而未发现个体内有染色体多态性*。因此,预计四倍体核型范围应该是 $4n = 116-124$, $NF = 208$ 。5尾四倍体鱼的100个以上的分裂相以 $4n = 120$, $NF = 208$ 占绝大多数,其余的分裂相则在 $4n = 100$ 到 $4n = 120$ 之间, $NF \approx 208$,这可能与染色体数目众多,制片时易丢失有关。可见,这5尾四倍体鱼是由 $2n = 60$ 的虹鳟经染色体数目二倍化后形成的。

对两类鱼的核型初步分析表明, $2n=60$ 的虹鳟具中部和亚中部着丝点染色体22对,近端着丝点染色体1对,和端部着丝点染色体7对(图版I:1)。经热休克诱导产生的四倍体虹鳟核型中,则有22套中部和亚中部着丝点染色体,1套近端着丝点染色体,和7套端部着丝点染色体(图版I:2)。

被检100尾鱼中,未见有染色体倍性镶嵌的个体。

3. 二倍体与四倍体虹鳟 DNA 含量及红细胞大小的比较

测量二倍体和四倍体虹鳟各5尾的50个红细胞。

从四倍体鱼与二倍体鱼的红细胞及其核的9个度量比值看,作为确定倍性的指标,核体积是最显著的,在不进行计算的情况下,核长轴又是最显著的。短轴变化甚小,几乎不能确定倍性。在DNA相对含量上,二倍体与四倍体的比率是1:2.27,与期望的1:2比较接近(表3)。

表3 二倍体和四倍体虹鳟的红细胞度量值及其DNA相对含量
Tab. 3 DNA relative content and erythrocyte dimensions of diploid and tetraploid rainbow trout

	二倍体 ¹⁾	四倍体 ²⁾	度量比值 ³⁾
DNA 相对含量 ⁴⁾	25.02±2.13	56.66±5.74	1:2.27
细胞短轴 (μm) ⁵⁾	10.40±0.71	11.65±0.79	1:1.12
细胞长轴 (μm) ⁶⁾	16.07±1.13	23.10±1.35	1:1.44
细胞表面积 (μm ²) ⁷⁾	132.04±10.26	213.44±18.69	1:1.61
细胞体积 (μm ³) ⁸⁾	922.56±114.06	1673.39±240.86	1:1.81
核长轴 (μm) ⁹⁾	7.08±0.04	11.51±0.72	1:1.62
核短轴 (μm) ¹⁰⁾	4.13±0.02	5.09±0.22	1:1.23
核表面积 (μm ²) ¹¹⁾	23.29±3.75	46.49±3.79	1:2.00
核体积 (μm ³) ¹²⁾	65.73±19.35	158.82±17.93	1:2.42

1) Diploid; 2) Tetraploid; 3) Ratios of dimension; 4) DNA relative content; 5) Cell minor axis (μm); 6) Cell major axis(μm); 7) Cell surface area(μm²); 8) Cell volume (μm³); 9) Nucleus major axis (μm); 10) Nucleus minor axis (μm); 11) Nucleus surface area(μm²); 12) Nucleus volume (μm³)

* 马涛: 虹鳟二倍体与四倍体核型的分析及比较(手稿)。

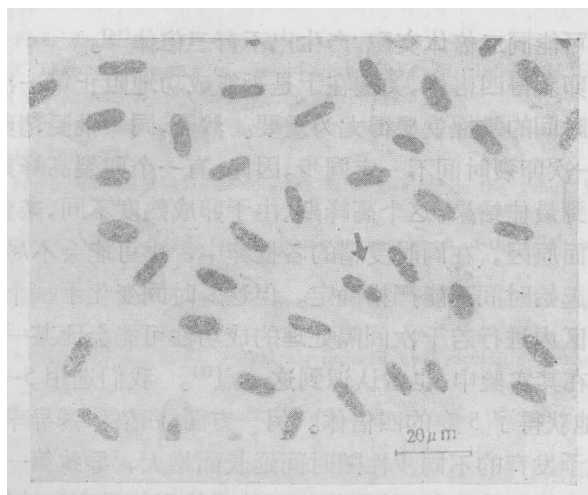


图2 虹鳟四倍体红细胞(箭头示双核红细胞)

Fig. 2 Erythrocyte of rainbow trout (4n) (arrow shows binucleate erythrocyte)

另外,我们还观察到,热休克处理得到的四倍体虹鳟红细胞中,许多是双核的,约占9.5%。在二倍体中却罕见这种现象。Refstie (1981)^[17]在用细胞松弛素B处理得到的多倍体鱼中,也观察到这种情况。其原因尚不清楚,有待进一步研究(图2)。

4. 四倍体与二倍体虹鳟在形态解剖上的初步比较

我们将正常二倍体和四倍体进行了外观比较。在身体形状,肥满度及体色、花纹上,不能确定四倍体有那些不同于二倍体的特征。生长状况上,也不能显示其比同时期非四倍体鱼生长快。在活体药物处理(PHA注射),机械损伤(实验操作)方面,四倍体鱼耐受力未表现出低于二倍体的迹象。解剖观察四倍体,其精巢,卵巢外观正常,与同期二倍体鱼无显著差别,内脏器官亦未发现增大或缩小的现象。

本实验结果表明,虹鳟卵受精后5—9小时期间,进行热休克处理获得四倍体是有效的,在抽样检查的100尾实验鱼中四倍体出现率为5%。并取得四倍体虹鳟红细胞的9个度量值,为今后利用红细胞快速、简便鉴定四倍体,提供了倍性标准。

讨 论

关于人工诱导四倍体虹鳟的研究,Refstie (1981)^[17]首先用细胞松弛素B处理受精卵进行了尝试。他将诱导成的“四倍体”养至成鱼进行检查,发现其染色体数目 $4n = 88-109$,中部着丝点染色体没有加倍,二倍体与四倍体红细胞核之比是1:2.05,这和实验鱼其染色体数目 $4n = 120$,核体积比1:2.42的结果不同,故Refstie^[17]的“四倍体”令人怀疑。Thorgaard (1981)^[20]和Chourrout (1982)^[8]也曾利用热休克方法得到虹鳟四倍体胚胎和仔鱼,但未能获得四倍体鱼种或成鱼。因此,一些研究者认为,四倍体鱼可能难以诱导成功或不能成活^[15]。然而,本实验结果和Thorgaard^[20]、Chourrout^[8]一样成功地证明热休克诱导四倍体虹鳟是一种行之有效的办法,并能够成活。任何培育至成鱼

期的可育四倍体都有可能同二倍体交配,产生出不育三倍体^[6]。

热休克处理受精卵获得四倍体,关键在于是否能成功地阻止第一次卵裂。因而,对达到第一次卵裂的这一时间的掌握就显得尤为重要。然而,同一批受精卵中,由于卵间个体差异,每一个卵的第一次卵裂时间不一定同步,因此,有一个卵裂高峰期存在,这一时期的热休克处理可能会得到最佳结果。这个高峰期、由于卵成熟度不同,亲鱼间差异,处理前孵化水温的不同等各方面原因,在同时受精的各批卵中,也可能会不尽相同,致使每一批受精卵热休克处理的起始时间不能严格确定,但这一时间变化于一个时区内。选择一个适当时区,在这个时区内进行若干次间隔处理的成功性可能会比某一时间处理的成功性大得多。Chourrout 在其实验中,也曾认识到这一点^[8]。我们选用 5—9 小时时区,进行 5 次间隔处理,成功地获得了 5% 的四倍体。另一方面,四倍体诱导率要较三倍体诱导率低得多,这可能是由于发育的不同步性随时间延长而增大,导致第一次卵裂高峰值远低于第二次成熟分裂高峰值的缘故。关于热休克处理使用的温度和持续时间,不一定是问题的关键,鉴于 Chourrout 用 28℃, 8—23 分钟处理受精后 5 小时 30 分至 10 小时 30 分期间的卵,也获得较多的四倍体(胚胎和仔鱼)^[8]。我们认为选用低温长时,淘汰高致死率的高温短时,可能会更经济些。

目前,在多倍体鱼的研究中,红细胞的测量已被广泛用来作为鉴定标准^[6,11,12,19,21]。对于诱导率极低的四倍体鱼来说,确定一种快而有效的鉴定方法尤为重要。利用体外血培养进行的染色体鉴定复杂而昂贵,活体染色体检查需要牺牲鱼,都不能为大规模生产所采纳。二倍体与四倍体虹鳟红细胞的几个度量值相比较,四倍体核长轴较二倍体核长轴长出 62%,显然,作为快速、简便的鉴定倍性指标最为合适。我们在不牺牲鱼的情况下,利用鳃丝红细胞鉴定四倍体虹鳟,已取得令人满意的结果^[1]。

另外,在实验中我们偶然发现,热休克处理组的鱼要比同期未处理的鱼生长状况好些,原因可能是热处理淘汰了劣质卵,而保留了优质卵的缘故。这提示我们,适当温度的热处理筛选受精卵,可能在生产优质鱼苗上是一种廉价而有效的手段,有待进一步研究。

诱导四倍体的目的,是期望它能和二倍体交配产生出三倍体。三倍体鱼可能由于不育性而可避免由性成熟引起的死亡率提高和生长率降低^[14],在商品鱼生产上会有很大潜力。再者,由于四倍体鱼具有四个等位基因,重组形式变多,自交纯合速率变慢,从而变异性增大,适应性增强,在遗传育种上也具有重大意义。因此,四倍体鱼的人工诱导将会成为培育鱼类新品种的一条有效途径。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院水生生物研究所二室多倍体小组,广西壮族自治区水产试验站, 1979。草鱼,团草人工诱导多倍体的研究。遗传学报, 6(1): 77。
- [2] 苏泽古、许克圣、白国栋, 1983。草鱼三倍体及其核型的研究。鱼类学论文集, (第 3 辑): 53—60。
- [3] 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) 增刊: 15—19。
- [4] 林义浩, 1982。快速获得大量鱼类肾细胞中期分裂相的 PHA 体内注射法。水产学报, 6(3): 201—208。
- [5] 湖北省水生生物研究所二室育种组家鱼小组, 1976。用理化方法诱导草鱼(♀)×团头鲂(♂)杂种和草鱼三倍体, 四倍体。水生生物学集刊, 6(1): 111—112。
- [6] Benfey, T. J., Suttlin, A. M. and Thompson, R. J., 1984. Use of erythrocyte measurements to identify triploid

- salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41: 980—984.
- [7] Chourrout, D., 1980. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Reprod. Nutr. Develop.*, 20(3A): 727—733.
- [8] Chourrout, D., 1982. Tetraploidy induced by heat shocks in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Reprod. Nutr. Develop.*, 22(3): 569—574.
- [9] Hartley, S. E. and Horne, M. T., 1984. Chromosome relationships in the genus *Salmo*. *Chromosoma* (Berl.), 90: 229—237.
- [10] Hartley, S. E. and Horne, M. T., 1982. Chromosome polymorphism in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Chromosoma* (Berl.), 87: 461—468.
- [11] Lincoln, R. F. and Scott, A. P., 1983. Production of all-female triploid rainbow trout. *Aquaculture*, 30: 375—380.
- [12] Lou, Y. D. and Purdom, C. E., 1984. Polyploidy induced by hydrostatic pressure in the rainbow trout. *J. Fish. Biol.*, 25(3): 345—351.
- [13] Ohno, S., Stenius, C., Faisst, E. and Zenzen, M. T., 1965. Post-zygotic chromosomal rearrangements in the rainbow trout (*Salmo irideus* Gibbons) *Cytogenetics*, 4: 117—119.
- [14] Purdom, C. E. and Lincoln, R. F., 1973. Chromosome manipulation in fish. In "Genetics and Mutagenesis of fish" (ed. by J. H. Schroder). Springer-Verlag, Berlin, 83—89.
- [15] Purdom, C. E., 1983. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture*, 33(1—4): 287—300.
- [16] Refstie, T., Vassvik, V. and Gjerdem, T., 1977. Induction of polyploid in salmonids by cytochalasin B. *Aquaculture*, 10: 65—74.
- [17] Refstie, T., 1981. Tetraploid rainbow trout produced by cytochalasin B. *Aquaculture*, 25(1): 51—58.
- [18] Thorgaard, G. H., 1976. Robertsonian polymorphism and constitutive heterochromatin distribution in chromosomes of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Cytogenet Cell Genet.*, 17: 174—184.
- [19] Thorgaard, G. H. and E. Gall, G. A., 1979. Adult triploids in a rainbow trout family. *Genetics*, 93: 961—973.
- [20] Thorgaard, G. H. Jazwin, M. E. and Stier, A. R., 1981. Polyploidy induced by heat shock in the rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 110: 546—550.
- [21] Thorgaard, G. H., Rabinovitch, P. S., Shen, M. W., Gall, G. A. E., Propp, J. and Utter, F. M., 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. *Aquaculture*, 29: 305—309.
- [22] Thorgaard, G. H., 1983. Chromosomal differences among rainbow trout populations. *Copeia*, (3): 650—662.

TETRAPLOID OF RAINBOW TROUT (*SALMO GAIRDNERI* RICHARDSON) INDUCED BY HEAT SHOCKS

Ma Tao Zhu Caibao

(*Department of Biology, Shanxi University, Tai Yuan*)

Zhu Bingren

(*Rainbow Trout Experimental Hatchery of Shanxi Province, Shouxian*)

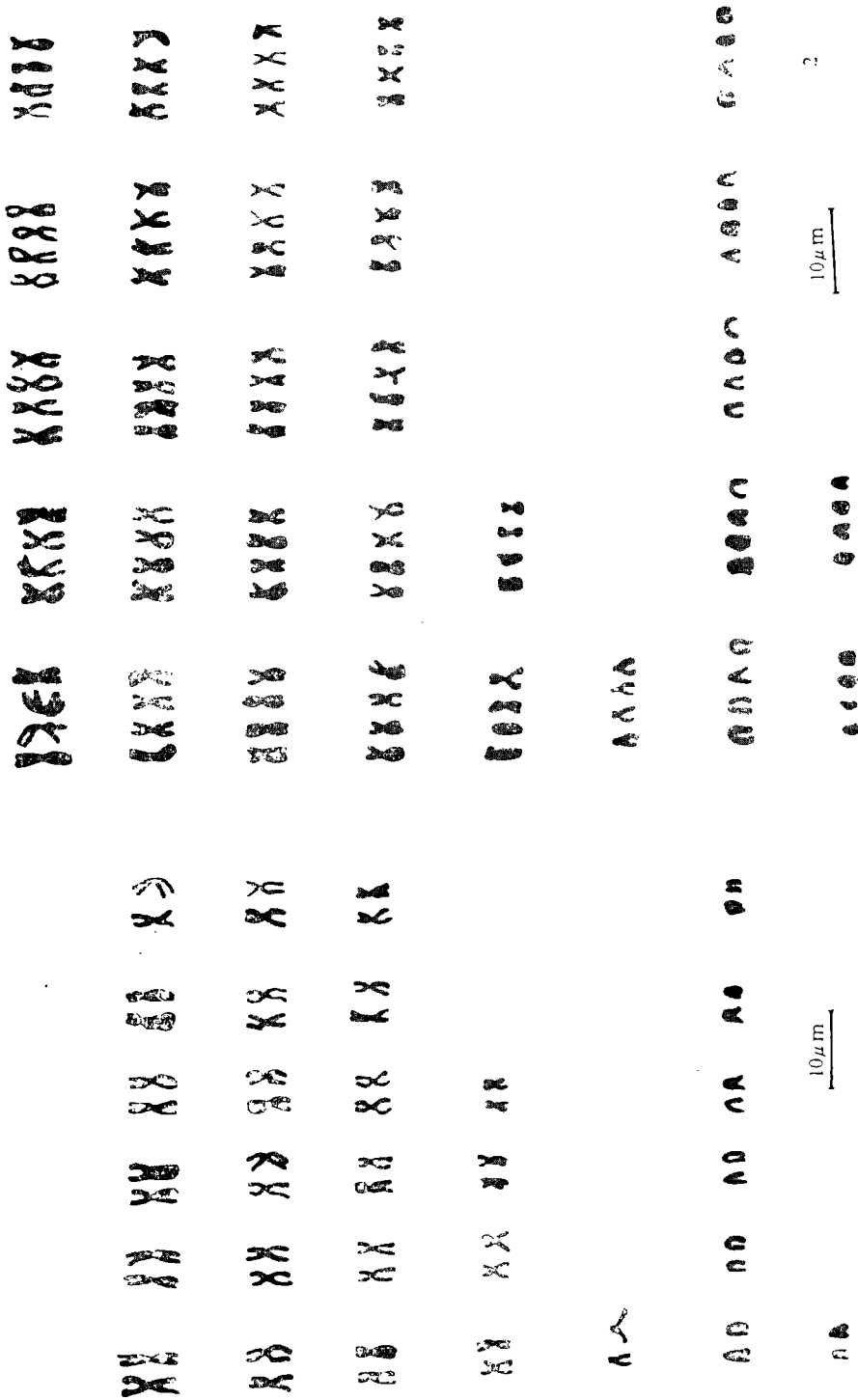
Abstract

Heat shocks were applied to rainbow trout eggs, starting between 5h and 9h after fertilization. The frequency of occurrence of tetraploid was 5% in fish of twelve-month-old. During the experiment, the higher temperature resulted in high mortality rate of fish eggs.

Being different from the diploid rainbow trout which consists of 22 pairs of metacentric and submetacentric chromosomes, 1 pair of subtelocentric chromosomes and 7 pairs of telocentric chromosomes, the karyotype of the tetraploid rainbow trout consists of 22 sets of metacentric and submetacentric chromosomes, 1 set of subtelocentric chromosomes and 7 sets of telocentric chromosomes. No mosaic polyploids were found amongst the young trout.

Nine erythrocyte indexes (DNA content, and major axis, minor axis, surface area and volume of cell and nucleus) of diploid and tetraploid rainbow trout were analysed and compared in order to provide the basis of identifying tetraploid in rainbow trout by means of erythrocyte inspection. No differences were found between the tetraploid and the diploid in morphology, anatomy, and growth rate.

Key words Rainbow trout, heat shock, tetraploid



1. 虹鳟二倍体染色体组型 1 Karyotype of rainbow trout (2n) 2. 虹鳟四倍体染色体组型 2 Karyotype of rainbow trout (4n)