

## 冷、热休克法诱导黄颡鱼三倍体的比较研究

宋立民<sup>1,2</sup>, 王卫民<sup>1\*</sup>, 周小云<sup>1</sup>, 阎里清<sup>3</sup>, 王玉芬<sup>2</sup>

(1. 华中农业大学水产学院, 农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070;

2. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站, 河北 秦皇岛 066100;

3. 湖北省漳水库水产公司, 湖北 荆门 448156)

**摘要:** 分别采用冷、热休克抑制第二极体释放的方法诱导黄颡鱼三倍体。结果表明, 在卵受精后 2 min, 5 ℃处理 20 min, 胚胎时期的三倍体率达 70% 左右, 孵化率 50% 左右, 幼鱼时期三倍体(含嵌合体)的检出率为 25%, 此条件为冷休克处理的优化参数; 在卵受精后 2 min, 40 ℃处理 2 min, 胚胎时期的三倍体诱导率达 58%, 孵化率为 39%, 幼鱼时期三倍体(含嵌合体)的检出率为 40%, 此条件为热休克处理的优化参数。正交分析得出, 冷休克条件下起始休克时间是原肠期三倍化率和孵化率的重要影响因子, 温度对畸形个体的产生有重要影响; 热休克条件下, 参考三倍体率、畸形率、孵化期相对存活率三者而言, 休克温度均是重要因素。比较观察到冷休克处理组的胚胎受损情况严重, 后期的成活率较热休克处理组要低, 总体诱导效果逊于热休克处理组。

**关键词:** 黄颡鱼; 冷休克; 热休克; 人工诱导; 三倍体

**中图分类号:** Q 343.2; S 917

**文献标识码:** A

鱼类多倍体育种是鱼类遗传育种工作的重点研究领域之一。在理论上, 由于三倍体性腺发育受阻, 可以节省性腺发育方面的能量, 进而可能使其获得其他方面的优势。因此鱼类育种学家期望通过诱导鱼类染色体三倍化, 来改良其经济性状。国内外已先后在三棘刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)<sup>[1]</sup>、鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[2]</sup>、水晶彩鲫(*Carassius auratus transparent colored variety*)<sup>[3]</sup>等 30 多种鱼类中成功获得三倍体, 其中温度休克是鱼类三倍化的一种简单可行的方法。

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)是一种广泛分布于我国各大水系的重要经济鱼类, 它肉质细嫩, 味道鲜美, 营养丰富, 刺少肉多, 深受广大消费者的青睐, 然而, 黄颡鱼雌雄生长速度和个体大小相差悬殊, 在相同的生活条件下, 同龄的成熟个体雄性是雌性的 2~4 倍, 严重制约其产量提高。改良目前黄颡鱼品种的经济性状备受关注, 人工诱导三倍体是一个重要途径, 一些工作者在这方面已经取得了阶段性成果<sup>[4]</sup>。本研究

采用温度休克法对黄颡鱼三倍体诱导进行了探索, 并对冷、热休克效果进行了综合比较, 以期丰富三倍体黄颡鱼诱导工作的相关技术参数。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 亲本来源

成熟黄颡鱼亲鱼部分采自湖北武汉市白沙洲水产市场, 部分采自本课题组武汉东西湖区水产养殖基地。于繁殖季节(一般为 5~6 月份), 挑选大小合适、体色正常、身体健壮、性成熟好的亲鱼进行人工繁殖, 雌鱼体重 50~100 g, 雄鱼体重 75~150 g, 年龄 2~3 龄。

#### 1.2 受精卵的获取

采用人工繁殖, 具体参照王卫民等<sup>[5]</sup>的方法。

#### 1.3 三倍体诱导

**冷处理** 冷休克试验过程, 首先进行处理起始时间(TA)、处理温度(T)、处理持续时间(D)3 因素的单因子试验, 依此并参照吴玉萍等

收稿日期: 2009-12-24 修回日期: 2010-03-13

资助项目: 国家科技支撑计划项目(2006BAD03B07)

通讯作者: 王卫民, E-mail: wangwm5911@gmail.com

的方法<sup>[6]</sup>,按  $L_9(3^3)$  正交表进行正交试验分析, Microsoft Office Excel 2003 和 SPSS 13.0。试验即获得最适诱导条件。数据处理软件为 安排如表 1、表 2。

表 1 冷休克单因素处理试验结果

Tab.1 The results of the single factor experimental design by cold-shock treatment in *P. fulvidraco*

处理因素 factors	组号 number	TA (min)	D (min)	T(℃)	Se(%)	n(%) <sup>[1]</sup>	3n-(%) <sup>[1]</sup>	3n(%) <sup>[1]</sup>	RH(%)	RD(%)
起始时间 (TA)	A	1	30	3	30	0	0	26	22	12
	B	2	30	3	37	5	5	70	46	10
	C	3	30	3	28	0	0	45	42	8
	D	4	30	3	15	6	12	12	17	10
	E	5	30	3	12	0	10	10	10	5
	F	6	30	3	10	0	5	5	10	5
温度 (T)	A	2	30	0	10	0	0	0	0	0
	B	2	30	3	30	5	12	55	12	13
	C	2	30	6	58	0	6	30	48	6
	D	2	30	9	66	0	0	0	51	2
	E	2	30	12	67	0	0	0	54	0
持续时间 (D)	A	2	5	5	62	0	0	10	30	0
	B	2	10	5	38	0	0	56	40	8
	C	2	20	5	35	0	6	75	47	5
	D	2	30	5	16	8	10	70	20	11
	E	2	40	5	5	0	0	0	0	0
	F	2	50	5	0	0	0	0	0	0

注:TA(min)表示休克起始时间;T(℃)表示休克温度;D(min)表示休克持续时间;Se(%)表示原肠期胚胎相对存活率;n(%)表示休克处理实验组当中单倍体出现的机率;3n-(%)表示休克处理实验组当中次三倍体出现的机率;3n(%)表示休克处理实验组当中三倍体,包括非整倍体出现的机率;RH(%)表示休克处理实验组孵化期相对存活率;RD(%)表示休克处理实验组当中完全破膜后畸形个体出现的机率;[1]表示以混合胚胎为样本,染色体计数法检测倍性。

Notes: TA indicates treatment after fertilization; T indicates shock temperature; D indicates shock duration; Se(%) indicates relative survival rate in stage of gastrula; n(%) indicates haploid rate; 3n-(%) indicates aneuploid rate; 3n(%) indicates the sum of triploid and aneuploid rate; RH(%) indicates relative survival rate in stage of post hatch; RD(%) indicates deformity rate; [1] indicates ploidy identification by chromosome counting using mix embryos as sample.

表 2 黄颡鱼冷休克正交试验结果

Tab.2 The results of the orthogonal experimental design by cold-shock treatment in *P. fulvidraco*

编号 number	TA (min)	T(℃)	D (min)	Se(%)	N(%) <sup>[1]</sup>	3n-(%) <sup>[1]</sup>	3n(%) <sup>[1]</sup>	RH(%)	RD(%)	3n(%) <sup>[2]</sup> (样本数)
A	1	4	25	18	5	15	30	28	15	13(15)
B	1	5	15	54	0	0	22	44	6	13(15)
C	1	6	20	50	0	0	38	34	0	0(25)
D	2	4	15	23	0	0	62	40	8	0(25)
E	2	5	20	40	3	6	70	52	5	25(20)
F	2	6	25	55	0	0	50	33	6	0(20)
G	3	4	20	15	0	5	43	19	10	15(20)
H	3	5	25	42	8	12	32	26	8	4(25)
I	3	6	15	58	0	10	26	30	0	0(25)

注:TA(min)表示休克起始时间;T(℃)表示休克温度;D(min)表示休克持续时间;Se(%)表示原肠期胚胎相对存活率;n(%)表示休克处理实验组当中单倍体出现的机率;3n-(%)表示休克处理实验组当中次三倍体出现的机率;3n(%)表示休克处理实验组当中三倍体,包括非整倍体出现的机率;RH(%)表示休克处理实验组孵化期相对存活率;RD(%)表示休克处理实验组当中完全破膜后畸形个体出现的机率;3n(%)<sup>[2]</sup>(样本数)表示所检测的幼鱼样本中三倍体个体(包括嵌合体)出现的机率;[1]表示以混合胚胎为样本,染色体计数法检测倍性;[2]表示以血细胞为样本,流式细胞技术检测倍性。表 4 注解同表 2。

Notes: TA(min) indicates treatment after fertilization; T(℃) indicates shock temperature; D(min) indicates shock duration; Se(%) indicates relative survival rate in stage of gastrula; n(%) indicates haploid rate; 3n-(%) indicates aneuploid rate; 3n(%)<sup>[1]</sup> indicates the sum of triploid and aneuploid rate using mix embryos as sample; RH(%) indicates relative survival rate in stage of post hatch; RD(%) indicates deformity rate; 3n(%)<sup>[2]</sup> indicates the sum of triploid and aneuploid rate using fry as sample; [1] indicates ploidy identification by chromosome counting using mix embryos as sample; [2] indicates ploidy identification by FCM using red blood cells as sample. The notes of Tab. 4 are the same as Tab. 2.

**热处理** 三倍体的热休克诱导试验于亚致死温度附近实施,处理时间及处理温度选择范围较窄,另外参考冷休克试验参数,直接按表4操作,并进行正交分析。

参与比较的各试验组及对照组用的受精卵均为同一批雌鱼所产,均匀铺于带标记的网片上。经处理的卵子分别放回水温为23~26℃的曝气自来水中继续培育,按时观察其胚胎发育情况<sup>[7]</sup>并计算各组的中期原肠胚发育阶段的成活率(Se%)、相对孵化率(RH%)和畸形率(RD%)。

#### 1.4 倍性检测

待受精卵发育至原肠期参照洪云汉<sup>[8]</sup>的方法混合胚胎制备染色体标本,进行倍性检测。幼鱼期参照Allen<sup>[9]</sup>,利用流式细胞仪测定血细胞相对DNA含量的方法检测倍性。

#### 1.5 存活率计算

在原肠期、孵化期统计各个实验组和对照组当中成活的样本个体数目,并以对照组为基础,换算出各发育阶段的相对存活率。

#### 1.6 畸形率计算

孵出鱼苗中畸形个体所占的比例。

#### 1.7 三倍体率计算

在胚胎时期用染色体计数法确定倍性时,染色体数为52左右的为二倍体,78左右的为三倍体,26左右的为单倍体,明显少于52多于26的为次二倍体,明显多于52少于78的为次三倍体。观察100个左右分裂相,计数,取平均值。三倍体率计算参照桂建芳等<sup>[10]</sup>,为三倍体、次三倍体的分裂相占检测总分裂相数的百分比。

在幼鱼时期用流式细胞技术法确定倍性时,被测定幼鱼与标准二倍体血细胞的DNA相对含量进行比较,比值以DNA指数(DI)表示,若 $DI = 1.5 \pm 0.05$ 则为三倍体, $DI = 1.25 \pm 0.05$ 则为嵌合体, $DI = 1.0 \pm 0.05$ 则为二倍体。用检测出三倍体(包括嵌合体)幼鱼的尾数与被检测样本总数的比值作为幼鱼时期的三倍体率。

## 2 结果与分析

天然与人工繁殖的黄颡鱼染色体数均为 $2n = 52$ (图1-A),诱导产生三倍体,染色体数目为 $3n = 78$ (图1-B),并检测出存在单倍体和非整倍体(图1-C,D)。幼鱼中利用流式细胞仪检测出嵌合体和三倍体的存在(图2-B,C)。

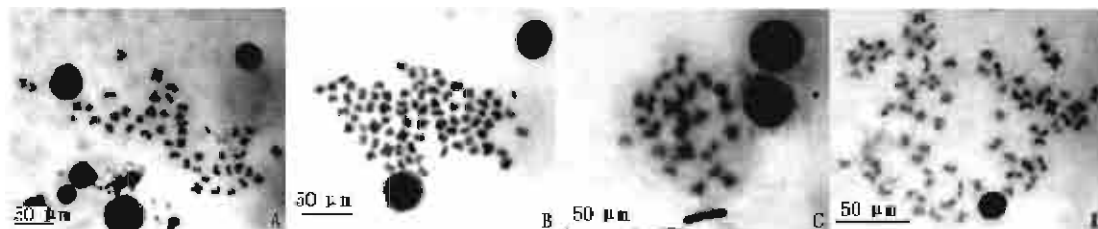


图1 黄颡鱼二倍体、三倍体、单倍体、非整倍体染色体图

A. 二倍体对照组的染色体 $2n = 52$ ; B. 诱导产生的三倍体 $3n = 78$ ; C. 诱导产生的单倍体 $n = 26$ ; D. 诱导产生的非整倍体染色体数目为60~70。

Fig.1 Chromosome photos of the diploid, triploid, haploid and aneuploid in *P. fulvidraco*

A. diploid with chromosome number  $2n = 52$ ; B. triploid with chromosome number  $3n = 78$ ; C. haploid with chromosome number  $n = 26$ ; D. aneuploid with chromosome number 60~70.

#### 2.1 冷休克处理

**单因素试验结果及分析** 对黄颡鱼受精卵在处理起始时间(TA)、处理温度(T)和持续时间(D)三方面不同条件下进行诱导三倍体的对比试验。在设定条件(T为3℃,D为30min)下,对处理起始时间做1,2,3,4,5,6min筛选试验(图3-B),结果表明,处理起始时间在受精后3~4min处理组中三倍体诱导率就已经很低,5min

后几乎没有检测到整三倍体的存在,从受精开始延后,三倍体诱导率、原肠期成活率和孵化率在受精后2min左右存在峰值,因此将其作为诱导的优化起始时间。

在设定条件(TA为2min,D为30min)下,对处理温度做0,3,6,9,12℃筛选试验(图3-A),结果表明,0~3℃时对胚胎发育影响较大,存活率很低,畸形率较高,随着处理温度的升高三倍

体诱导率和孵化鱼苗畸形率呈下降的趋势,胚胎成活率和孵化率呈上升趋势,温度超过 9 ℃ 时,基本上检测不到三倍体的存在,说明高于 9 ℃ 刺激温度不足以抑制卵子第二极体的释放。在曲

线的交汇处,4~5 ℃ 范围内,诱导率和成活率都比较高,考虑到 4 ℃ 时畸形率比较高,因此将 5 ℃ 作为诱导的优化温度。

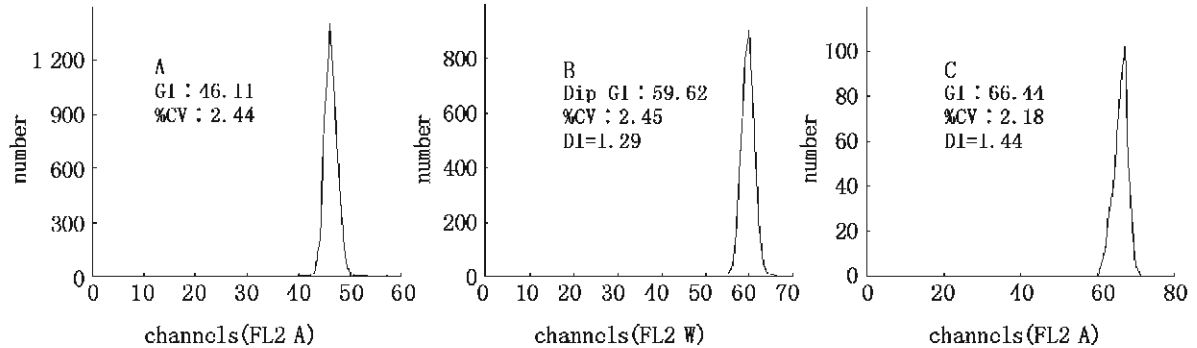


图 2 利用流式细胞计数法鉴定倍性的相关图形

A. 二倍体图形示例; B. 嵌合体图形示例; C. 整三倍体图形示例。

Fig. 2 Flow cytometry (FCM) histograms for ploidy determination of *P. fulvidraco*

A. the FCM histogram of diploid; B. the FCM histogram of heteroploid; C. the FCM histogram of triploid.

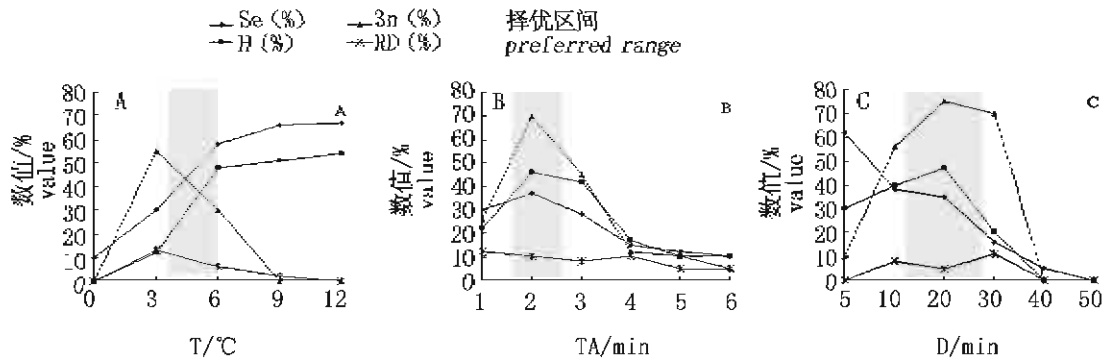


图 3 在不同处理条件下的胚胎原肠期和孵化期的相对成活率,孵化后的畸形率以及三倍体胚胎诱导率的曲线图  
A. 开始处理时间 TA 在 2 min,处理温度 T 为 0~12 ℃,持续时间 D 为 30 min; B. 开始处理时间 TA 在 1~6 min,处理温度 T 为 3 ℃,持续时间 D 为 30 min; C. 开始处理时间 TA 在 2 min,处理温度 T 为 5 ℃,持续时间 D 为 5~50 min。

Fig. 3 The curves for relative survival rate in stages of gastrulae and post hatch, and the rates of triploidy induction and deformity under different treatment methods

A. cold shock starting time at 2 min, shock temperature of 0~12 ℃, shock duration of 30 min; B. cold shock starting time at 1~6 min, shock temperature of 3 ℃, shock duration of 30 min; C. cold shock starting time at 2 min, shock temperature of 5 ℃, shock duration of 5~50 min.

在设定条件(TA 为 2 min,T 为 5 ℃)下,对处理持续时间做 5,10,20,30,40,50 min 筛选试验(图 3-C),表明随着处理持续时间的延长三倍体诱导率呈上升趋势,但是持续刺激时间超过 30 min 就会造成成活率的急速下降,超过 40 min 孵化率几乎为 0,诱导率和孵化率在 20 min 处均有一个最高值,并且此时孵化鱼苗畸形率较低,因此将 20 min 作为诱导的优化持续时间。

冷休克正交试验结果及分析 TA 为 2 min,T 为 5 ℃,D 为 20 min 条件下处理组的三倍体诱导率、成活率与孵化率均比较高,与单因素分析的结果相一致(表 2)。将样本鱼养殖到 5 cm 左右,用流式细胞仪测定血细胞 DNA 相对含量的方法得出 25 % 的诱导率。表 3 的正交分析表明,起始休克时间是原肠期三倍化率和孵化率的重要影响因子,休克温度对畸形个体的产生有

重要影响。

表 3 冷休克诱导黄颡鱼三倍体实验的结果分析

Tab. 3 Statistical analysis for the induction of triploid in *P. fulvidraco* by cold shock

项目 items	3n(%) <sup>[1]</sup>			RD(%)			RH(%)		
	TA(min)	T(°C)	D(min)	TA(min)	T(°C)	D(min)	TA(min)	T(°C)	D(min)
K <sub>1</sub>	90	135	110	21	33	14	106	87	114
K <sub>2</sub>	182	124	151	19	19	15	125	122	105
K <sub>3</sub>	101	114	112	18	6	29	75	97	87
R	92	21	41	3	27	15	50	35	27

注:K 值为不同水平上三倍体诱导结果对各处理参数的平均值;R 为极差;极差=最大值-最小值。表 5 注解同表 3。

Notes:K indicates the mean values at different levels by different treatment factors; R=Max-Min. The notes of Tab. 5 are the same as Tab. 3.

对受精卵胚胎发育的影响 观察发现,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。外部形态上观察,随着刺激强度的增加卵膜皱折甚至破裂的发生机率升高,可见冷休克对胚胎的影响还是较大的。

## 2.2 热休克正交试验结果及分析

根据试验中诱导处理的各项参数,得出了胚胎的三倍体诱导率,并统计出胚胎发育至原肠期、孵化期时相对对照组的存活率。由表 4 可见,E 组实验的三倍体诱导率、孵化率以及幼鱼时

期三倍体的检出率均比较高,并且非整倍体发生率较低,所以将受精后 2 min,40 °C 处理 2 min 作为诱导的优化指标。对表 4 进行数据分析,总结于表 5。在表 5 中,由于极差大的因素为重要因素,因此对三倍体率、畸形率、孵化期相对存活率三者而言,休克温度均是重要因素,次之为起始休克时间,以及持续时间。结果表明,起始休克时间为受精后 2 min,休克温度为 40 °C,持续时间为 2 min,胚胎三倍体率和各时期相对存活率比较高。

表 4 热休克正交试验结果

Tab. 4 The results of the orthogonal experimental design by heat-shock treatment in *P. fulvidraco*

编号 number	TA (min)	T(°C)	D(min)	Se(%)	n(%) <sup>[1]</sup>	3n(%) <sup>[1]</sup>	3n(%) <sup>[1]</sup>	RH(%)	RD(%)	3n(%) <sup>[2]</sup> (样本数)
A	1	38	3	46	0	0	8	30	0	4(25)
B	1	40	1	39	0	0	30	24	0	13(15)
C	1	42	2	21	0	5	33	4	6	40(10)
D	2	38	1	50	0	0	6	41	0	0(25)
E	2	40	2	43	3	0	58	39	0	40(15)
F	2	42	3	12	0	7	60	6	8	50(10)
G	3	38	2	61	0	0	6	33	0	0(25)
H	3	40	3	46	5	10	51	20	2	20(15)
I	3	42	1	29	5	8	28	12	0	5(20)

表 5 热休克诱导黄颡鱼三倍体实验的结果分析

Tab. 5 Statistical analysis for the induction of triploid in *P. fulvidraco* by heat shock

项目 items	3n(%) <sup>[1]</sup>			RD(%)			RH(%)		
	TA(min)	T(°C)	D(min)	TA(min)	T(°C)	D(min)	TA(min)	T(°C)	D(min)
K <sub>1</sub>	71	20	64	6	0	0	58	104	76
K <sub>2</sub>	124	138	97	8	2	6	105	83	75
K <sub>3</sub>	84	121	119	2	14	10	135	21	56
R	53	118	55	6	14	10	77	83	21

## 2.3 优化诱导条件下的鱼苗成活情况

受精后 2 min,在 T 为 5 °C,D 为 20 min 和 T 为 40 °C,D 为 2 min 的诱导条件处理受精卵,分

别获得破膜苗约 2 000 尾、1 700 尾。饲喂过程中观察到,卵黄囊吸收完全后有一个死亡高峰,长至 16~18 mm 时又有一个明显的死亡高峰,冷休

克优化条件下获得幼鱼 98 尾,热休克优化条件下获得幼鱼 192 尾。

### 3 讨论

#### 3.1 两种诱导方法最佳处理条件的探索

三倍体诱导的基本理论依据是阻止鱼类第二极体的释放,其关键是确定处理的开始时间、持续时间以及处理温度的高低。处理时刻不能过早或过迟,尤锋<sup>[11]</sup>研究认为,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,三倍体效果最佳;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。楼允东<sup>[12]</sup>认为,温水性鱼类宜用冷休克诱导多倍体,这样可以增加刺激强度,获得较高的诱导率,休克温度范围多为 0~6℃。采用热休克方法时,多数学者采用的方法是把受精后的卵在 2~3 min 内移入 41~42℃水中,经 2~3 min 处理,再移回自然水温中孵化。

不同鱼类第二极体的排放时间是不同的,一般冷水性鱼类较迟,如鲑科鱼类大多在受精后 15~40 min<sup>[13-14]</sup>,温水性鱼类较早,如丰鲤(*Cyprinu carpio*) (♂) × *Carpio* var. *singuones* (♀) 受精后 3 min<sup>[15]</sup>,异源斑马鱼(*Brachydanio rerio*) (♂) × (*Brachydanio frankei*) (♀) 受精后 2 min<sup>[16]</sup>开始处理较好。但是实际情况还应依据鱼类生长习性、所处生长环境<sup>[17]</sup>,卵子成熟状态<sup>[18]</sup>以及授精水温等具体条件来确定三倍体诱导的适当时期。本试验结果显示,黄颡鱼卵受精后 1 min 进行休克,可能是因为不能完成激动和休整,阻断了二次成熟分裂,所以三倍化率和胚胎相对成活率较低;受精 3 min 以后虽能够得到一定比例的三倍体,但胚胎形成非整倍体的几率呈上升趋势,可能是由于过了休克敏感期,经温度刺激的受精卵排出的极体不是一个完整的染色体组所致;受精后 2 min,给予超过反映阈值的温度刺激如 40、42、4、5℃都能得到明显高于对照组的诱导率,因此初步确定黄颡鱼受精后 2 min 为热休克敏感时期。

温度休克的机制主要是引起细胞内酶构型的变化,不利于酶促反应的进行,导致细胞分裂时形成纺锤丝所需 ATP 的供应途径受阻,破坏微管的形成,能使由微管蛋白聚合成的微管解体或

阻止微管的聚合过程,组织染色体的移动,从而抑制细胞分裂<sup>[19]</sup>。受精后用仅低于致死温度的热休克可以抑制卵子的第二次成熟分裂诱导三倍体<sup>[20]</sup>,冷水性鱼类所需的热休克诱导温度较低,温水性鱼类较高。实验结果显示,温度越高时间越长对受精卵的刺激越大,存活率有一个降低的趋势,但诱导率却增大;三倍体的产生需要一个适度的外界刺激以破坏卵子的二次成熟分裂,阻止第二极体的释放,刺激强度太小,虽能保证较高的成活率,但不能阻止大多数卵子染色体组的迁移,只能产生少量多倍体,刺激过低的话根本不能产生多倍体,刺激强度过大,则会使染色体断裂或丢失,形成非整倍体,胚胎受到损害,存活率大大降低;本实验结果显示,对催产获得的黄颡鱼卵受精 2 min 后施加 40℃持续 2 min,或 5℃持续 20 min 的刺激能够获得较高的成活率和三倍体率,热休克温度高于 42℃,或时间超过 3 min,冷休克低于 3℃,或时间超过 30 min 都不利于胚胎的成活和整三倍体的获得。因此得出,黄颡鱼三倍化诱导的适宜条件热休克为受精后 2 min,40℃持续 2 min;冷休克为受精后 2 min,5℃持续 20 min。

#### 3.2 影响休克的关键因子

对于 3 个诱导因子重要性的论述不同学者对不同研究对象存在不同认识,尤锋<sup>[11]</sup>认为在一定范围内影响黑鲟(*Sparus macrocephalus*)三倍体诱导的主次顺序为处理时间,处理时刻和处理温度,王茂林等<sup>[21]</sup>则认为影响红鳍东方鲀(*Takifugu rubripe*)三倍体诱导率的主次顺序是处理时间、处理温度和处理起始时间,吴玉萍等<sup>[16]</sup>认为热休克诱导斑马鱼异源三倍体的诱导参数中起始休克时间为重要因素,其次为持续时间和休克温度。本试验表明,在特定繁殖条件下,利用冷休克方法诱导三倍体黄颡鱼的诱导率、成活率主要由诱导时机决定,而热休克诱导中主要由处理温度决定。

产生这种差异的原因目前不太清楚,没有定论。不同物种当中多倍体诱导所得重要因子不尽相同,原因比较复杂,卵的生物性状、质量以及具体操作环境和方法都是值得考虑的因素。

对于本试验休克关键因子分析中,冷、热两种方法所得情况不尽相同,这可能是由于黄颡鱼受精卵对冷效果更加敏感,即在冷刺激下较之热

处理更易达到抑制极体排放的阈值,所以利用冷休克方法诱导黄颡鱼受精卵三倍化的限制因子倾向于产生在其他方面;另外,极体排放过程的短暂性又使冷休克诱导首要限制因子倾向于诱导时机(热休克当中的次要因子)的决定。

本试验利用冷和热两种方式对黄颡鱼受精卵进行三倍化诱导,虽然诱导机制总方向相同,但其中存在的细微差别还有待于深入研究。

### 3.3 冷、热休克效果的比较

纵观实验结果,在冷、热休克处理的优化条件下,胚胎时期可以获得70%、58%的三倍体检出率,养至幼鱼可以获得25%、40%的三倍体检出率,证明两种诱导黄颡鱼三倍体的方法都是可行的。

试验前期,与对照组相比几个热休克实验组当中的胚胎没有明显的发育速度变化,和胚胎大规模损伤情况的发生,而冷休克对胚胎的发育推迟作用明显,多有褶皱和破裂的卵,这对胚胎后期发育(成活率低,畸形率高)影响很大,结果与尤锋等<sup>[11]</sup>的研究相似,可见冷休克较之热休克对黄颡鱼的胚胎有更大的损伤作用;另外,冷休克处理组的畸形率(范围:0~15%,择优参数下值为5%,并且几乎每个处理组都存在相当比例的畸形个体)也明显高于热休克实验(范围:0~8%,择优参数下值为0);在鱼苗的两个死亡高峰期,观察到冷休克处理组的情况要比热休克糟糕(相似条件下,本研究冷处理获得98尾幼鱼,热处理获得192尾幼鱼),尤其是在第一个时期约有4/5个体死亡,原因可能是此时期鱼苗的外部形态及内部组织结构变化剧烈,包括向完全外援性营养转变、鳔充气完成等过程,原来受到处理刺激而损伤的个体延迟表达,相当一部分不能完成转型而至;最后,幼鱼当中多倍体的检出率,热休克处理组最高值为50%,择优参数条件下为40%,冷休克组最高值仅为25%,明显低于热休克处理组。

一般冷水性鱼类如鲑科鱼类用热休克,而温水性鱼类如鲤科和鳊科鱼类用冷休克效果较好,这可能是增加了刺激强度所致<sup>[12]</sup>。但是最近的一些研究结果表明也不尽然,如鲤<sup>[15]</sup>用热休克同样可以获得较高比例的三倍体,大菱鲂<sup>[22]</sup>三倍体的诱导用冷休克法也可获得令人满意的结果。另外,杨彩卿等<sup>[4]</sup>采用化学方法诱导黄颡鱼三倍

体所得的参数与本试验结果不尽相同,考虑到具体操作方法,试验水温,卵质与亲本遗传背景等因素不同所致。综合试验结果表明,采用冷休克方法诱导黄颡鱼三倍体虽然在早期胚胎阶段可以获得较高的三倍体率(70%),但其反应强度不易控制,严重影响后期成活率,效果稍逊于热休克。

### 参考文献:

- [1] Swarup H. Production of triploidy in *Gasterosteus aculeatus* [J]. *Genetics*, 1959, 44: 129 - 142.
- [2] Gervai J, Peter S, Nagy A, et al. Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio* L [J]. *J Fish Biol*, 1980, 17 (6): 667 - 671.
- [3] 桂建芳. 鱼类染色体操作的研究 I. 静水压休克诱导三倍体水晶彩鲫 [J]. *水生生物学报*, 1990, 14 (4): 336 - 342.
- [4] 杨彩卿, 韩烁. 黄颡鱼三倍体的诱导 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(19): 8118 - 8119.
- [5] 王卫民, 严安生, 查金苗. 黄颡鱼两种人工繁殖方法的比较研究 [J]. *淡水渔业*, 2002, 32(2): 7 - 8.
- [6] 吴玉萍, 叶玉珍, 吴清江. 热休克诱导斑马鱼异源三倍体的研究 [J]. *海洋与湖沼*, 2000, 31(5): 465 - 470.
- [7] 张孝威, 沙学绅, 何桂芬, 等. 鲮鱼卵子和仔、稚鱼的形态观察 [J]. *海洋与湖沼*, 1980, 11(2): 161 - 171.
- [8] 洪云汉. 鱼类单个胚胎染色体标本的快速制备法 [J]. *淡水渔业*, 1987, (1): 35 - 36.
- [9] Allen S K. Flow cytometry: assaying experimental polyploidy fish and shellfish [J]. *Aquaculture*, 1983, 33(1-4): 317 - 328.
- [10] 桂建芳, 梁绍昌, 孙建民, 等. 鱼类染色体组操作的研究 I: 静水压休克诱导三倍体水晶彩鲫 [J]. *水生生物学报*, 1990, 14(4): 336 - 343.
- [11] 尤锋. 黑鲷三倍体的人工诱导研究 [J]. *海洋与湖沼*, 1993, 24(3): 248 - 255.
- [12] 楼允东. 鱼类育种学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 117 - 147, 310 - 343.
- [13] Lou Y D, Purdom C E. Diploid gynogenesis induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson [J]. *Journal of Fish Biology*, 1984, 24: 662 - 670.
- [14] Lou Y D, Purdom C E. Polyploidy induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson [J]. *Journal of Fish Biology*, 1984, 25: 345 - 351.

- [15] 吴清江,柯鸿文,陈荣德. 鲤鱼杂种优势多代利用的探讨[J]. 水生生物学集刊,1979,6(4):445 - 452.
- [16] 吴玉萍,叶玉珍,吴清江. 热休克诱导斑马鱼异源三倍体的研究[J]. 海洋与湖沼,2000,31(5):465 - 470.
- [17] Streisinger G, Walker C, Dower N, *et al.* Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*)[J]. Nature, 1981, 291:293 - 296.
- [18] Refstie T, Gjedrem T. Chromosome engineering [M]//Selection and Breeding Programs in Aquaculture. Netherlands: Springer, 1982: 287 - 299.
- [19] 汪得耀. 普通细胞生物学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1988:133 - 208,339 - 346.
- [20] 楼允东. 国外对鱼类多倍体育种的研究[J]. 水产学报,1984,8(4):343 - 356.
- [21] 王茂林,姜志强,李荣. 红鳍东方鲀三倍体诱导的初步研究[J]. 水产科学,2006,25(7):349 - 352.
- [22] Piferrer F, Cal R M, Alvarez-Blazquez B. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*) I. Ploidy determination and the effects of cold shocks[J]. Aquaculture, 2000, 188(1-2): 79 - 90.



## Comparative studies in the induction of triploidy for *Pelteobagrus fulvidraco* by cold and heat shocks

SONG Li-min<sup>1,2</sup>, WANG Wei-min<sup>1\*</sup>, ZHOU Xiao-yun<sup>1</sup>, YAN Li-qing<sup>3</sup>, WANG Yu-fen<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China;

3. Fisheries Company of Zhanghe Reservoir, Jingmen 448156, China)

**Abstract:** The yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* has become a valuable aquaculture species in China and the possible use of sterile triploids is an interesting option for its culture. The optimal conditions for the induction of triploidy for *P. fulvidraco* by means of cold and heat shocks were investigated and compared in the present study. Three treatment variables were considered: the time after fertilization when the shock was applied, the temperature and the duration of the shock. Ploidy was determined by chromosome counting and flow cytometric analysis. The diploid, triploid, haploid and aneuploid (or heteroploid) were all identified in the *P. fulvidraco* eggs (or juvenile individuals) after cold and heat shocks. The survival rate in stages of gastrulae and post hatch, the rates of triploidy induction and deformity under different treatment methods were evaluated. The results indicated that optimal treatment conditions for cold shocks were 5 °C for 20 min at 2 min after fertilization, which resulted in about 70% triploidy embryos, 50% relative survival at hatching stage, and 25% triploidy individuals in juvenile period. The optimal treatment conditions for heat shocks were 40 °C for 2 min at 2 min after fertilization, which results in 58% triploidy embryos, 39% relative survival at hatching stage, and 40% triploidy individuals in juvenile period. The orthogonal design analysis showed that the time after fertilization when the shock was applied was the most important factor to the rates of hatching and triploid induction at embryonic stage in cold-shock groups, while in heat-shock groups temperature was the most important factor to the inducing rates of triploids, deformities and relative survival at hatching stage. The results demonstrated that cold shock was less effective in inducing triploidy in *P. fulvidraco* for its serious injury to embryos and lower survival rate after hatching compared with heat shock. In conclusion, this paper presents the optimal conditions for triploidy induction in *P. fulvidraco* using cold and heat shocks and indicates that it is possible to mass-produce triploids of this commercially important species.

**Key words:** *Pelteobagrus fulvidraco*; cold shock; heat shock; triploid; artificial induction

**Corresponding author:** WANG Wei-min. E-mail: wangwm5911@gmail.com