

文章编号:1000 - 0615(2004)06 - 0728 - 05

研究简报 ·

## 三倍体大黄鱼的诱导及其对生长、性腺发育的影响

林 琪<sup>1,2</sup>, 吴建绍<sup>2</sup>

(1. 厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005;

2. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361012)

关键词: 大黄鱼; 三倍体; 生长; 性腺发育

中图分类号: S917

文献标识码: A

### Induction of triploidy and its effect on growth and gonadal development in *Pseudosciaena crocea*

LIN Qi<sup>1,2</sup>, WU Jian-shao<sup>2</sup>

(1. College of Oceanography and Environmental Science of Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Fujian Fisheries Research Institute, Xiamen 361012, China)

**Abstract:** Triploid was induced by hydrostatic pressure in *Pseudosciaena crocea*. Pressure shock of 500kg·cm<sup>-2</sup> was administered to eggs for 2 min at 3 min after fertilization. The triploid rate was 92.1%. The nucleus diameters (major axes) and volumes of erythrocytes in triploid were measured respectively 1.28 and 1.70 times those in diploid. The triploid growth rates (body length, weight) were not significantly different compared to the diploid controls. The gonadal development was studied through tissue section. The result showed that the triploids had undeveloped gonads and were sterile.

**Key words:** *Pseudosciaena crocea*; triploid; growth; gonadal development

自 20 世纪 50 年代以来,采用染色体操作技术人工诱导多倍体在鱼类遗传育种领域已得到广泛的应用。国内外已先后在三棘刺鱼<sup>[1]</sup>、鲤<sup>[2]</sup>、水晶彩鲫<sup>[3]</sup>等 30 多种鱼类成功获得三倍体。在理论上,由于三倍体性腺发育受阻,其用于性腺发育的能量可全部用于生长。因此鱼类育种学家期望通过诱导三倍体,使经济鱼类生长更快,经济效益更高。但历经 30 余年的研究,诸家看法仍未统一。一些学者认为三倍体鱼比二倍体生长快<sup>[4,5]</sup>,另一些学者则认为三倍体鱼并不比二倍体生长快<sup>[6,7]</sup>还有一些学者的研究表明三倍体鱼在性成熟以后比二倍体生长稍快<sup>[8,9]</sup>。对于三倍体鱼究竟是否比二倍体生长更快的问题,至今尚无定论。大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 是我国四大海洋经

济鱼类之一,也是福建省最具地方特色的海洋经济鱼类。作者在 1999 - 2001 年率先对大黄鱼三倍体诱导进行了初步摸索<sup>[10]</sup>,并在此基础上,2002 年对亲鱼精养,诱导条件等各种因素作进一步改进,首次诱导培育出三倍体大黄鱼,并以此为材料研究比较了大黄鱼三倍体与二倍体生长、生殖腺发育的差异。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试验鱼

试验用大黄鱼亲鱼取自宁德海上网箱养殖 3 龄鱼。挑选体色正常、健壮的亲鱼,在产卵前 3 个月移入室内亲鱼池,给予优质的饵料进行精养。

收稿日期:2003-11-20

资助项目:福建省科技厅资助项目(99 - 2 - 212)

作者简介:林 琪(1970 - ),男,福建泉州人,副研究员,主要从事水产养殖及生物技术育种研究。E-mail:qlin@public.xm.fj.cn

## 1.2 诱导方法

用 LHRH-A3 胸鳍基部注射催产,干法授精,水温为 21。处理时迅速升压,达到预定压力。处理持续时间指压力开始上升到卸压时的时间。在受精卵发育至孵化期,分别取样统计试验组和对照组的存活比率,将试验组的存活率除以对照组相应阶段的存活率,得出各个阶段试验组相对于对照组的存活率。

## 1.3 倍性鉴定

当胚胎发育至尾芽期,按单个胚胎染色体制作法进行倍性鉴定。在幼鱼和成鱼期,取鳍条采用 PA- 型流式细胞仪进行倍性鉴定。

## 1.4 红细胞及核大小的测定

常规血涂片,甲醇固定 10min, Wright 氏染色,在高倍显微镜下测量红细胞及其核的长径和短径,采用公式  $a^2b/1.91$  计算体积<sup>[11]</sup>。

## 1.5 性腺观察

取性腺部位的材料,固定在 Bouin 氏液内,常规方法石蜡包埋、切片、染色,光学显微镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 多倍体的诱导

采用不同压力在受精卵授精后 3min 开始处理,取尾芽期胚胎制作染色体进行倍性鉴定,结果见表 1。在水温 21 条件下,用  $500 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$  静水压处理受精卵 2min,三倍化率达 92.1%,存活率也较高,相对对照组为 75.5%。处理时间持续 3min,各组存活率均较低。

2002 年 4 月,水温 21 条件下,我们采用  $500 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$  压力,在授精后 3min 开始处理受精卵,持续时间 2min 的方法,诱导处理了一批受精卵,培育出稚鱼  $4.5 \times 10^4$  尾进行养成。在生长 2 个月和 7 个月时,用流式细胞仪检测倍性,三倍体比率达 100%。分析结果见图 1。

表 1 不同处理条件各个试验组孵化率及胚胎倍性鉴定结果

Tab. 1 Survival rate relative to firstfeeding and the results of ploidy identifications of embryos in each experimental group treated by different conditions

压力 pressure levels ( $\text{kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	持续时间 treatment duration time (min)	样品数 no. of samples	二倍体 diploid	三倍体 triploid	非整倍体 aneuploid	镶嵌体 mosaic	三倍化率 percentage of triploidy (%)	孵化率 hatching rate (%)
450	2	32	2	26	4		81.3	76.3
450	3	35		25	8	2	71.4	32.1
500	2	38		35	3		92.1	75.5
500	3	36		25	9	2	69.4	24.2
550	2	41		26	15		63.4	51.5
550	3	37		20	17		54.1	5.3

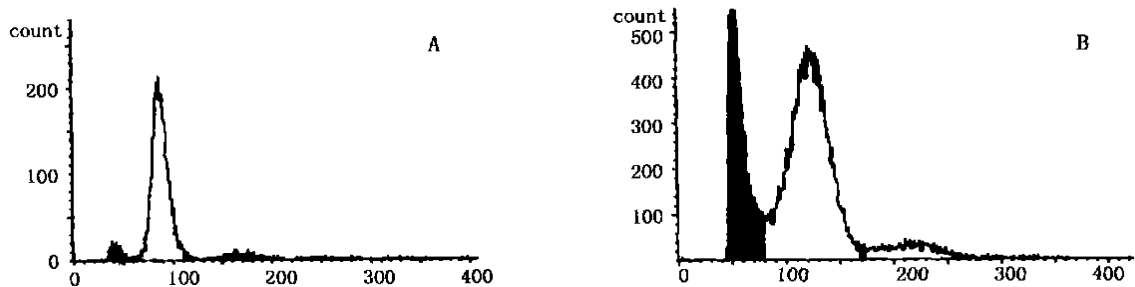


图 1 大黄鱼流式细胞仪分析结果

Fig. 1 Flow cytometer analysis of *Pseudosciaena crocea*

A. 二倍体; B. 三倍体 A. diploid; B. triploid

## 2.2 红细胞及其核的测量

我们对大黄鱼三倍体和二倍体红细胞的长轴、短轴、核长轴、核短轴进行了测量,结果见表 2。三倍体大黄鱼

红细胞的长轴、短轴分别为二倍体的 1.26、1.29 倍,核长轴、核短轴分别为二倍体的 1.28、1.04 倍。三倍体红细胞体积和核体积分别为二倍体的 1.97 倍和 1.70 倍(图版-1, 2)。

表2 大黄鱼二倍体和三倍体红细胞及其核测量值

Tab.2 Measurement of erythrocytes and their nuclei of diploids and triploids in *Pseudosciaena crocea*

	细胞 cell			细胞核 nucleus		
	长径( $\mu\text{m}$ ) long diameter	短径( $\mu\text{m}$ ) short diameter	体积( $\mu\text{m}^3$ ) volume	长径( $\mu\text{m}$ ) long diameter	短径( $\mu\text{m}$ ) short diameter	体积( $\mu\text{m}^3$ ) volume
二倍体 diploid	11.09 $\pm$ 0.15	8.24 $\pm$ 0.47	66.31 $\pm$ 3.03	3.95 $\pm$ 0.33	3.18 $\pm$ 0.21	3.27 $\pm$ 0.57
三倍体 triploid	14.01 $\pm$ 0.32	10.14 $\pm$ 0.46	130.36 $\pm$ 8.89	5.05 $\pm$ 0.20	3.32 $\pm$ 0.28	5.55 $\pm$ 0.60

### 2.3 生长

图2、图3分别示2002年5月至2002年11月大黄鱼二倍体和三倍体体长和体重的增长比较。结果显示,三倍体的体长和体重均比二倍体稍低,但两者差异不显著( $P > 0.05$ ),在7-8月份,两者的体长增长速率均趋缓。

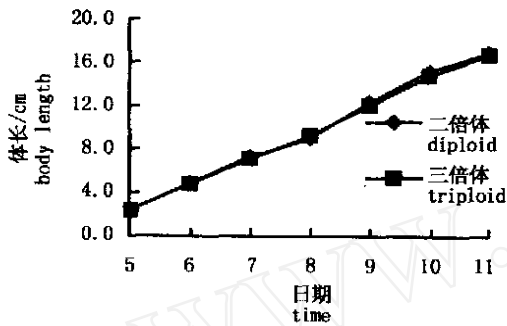


图2 大黄鱼二倍体和三倍体平均体长比较

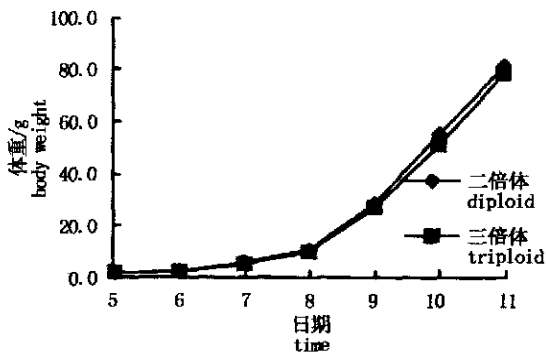
Fig.2 Comparison of body length between diploids and triploids in *Pseudosciaena crocea*

图3 大黄鱼二倍体和三倍体平均体重比较

Fig.3 Comparison of body weight between diploids and triploids in *Pseudosciaena crocea*

### 2.4 生殖腺发育

2002年11月解剖体长在15~17cm的大黄鱼,从外观观察,二倍体大黄鱼雌性性腺呈淡黄色,个别卵巢已发育较成熟;雄性性腺为带状,呈乳白色(图版-3)。三倍体性腺仅为透明细线状,外观无法区分雌雄(图版-4)。组织切

片观察结果显示,二倍体雄性精巢壶腹内有不同发育阶段的生殖细胞,已有发育较成熟的精子;雌性卵巢发育处于第 时相,可见到此时早、中、晚不同时期的卵母细胞(图版-5,6),三倍体大黄鱼中一些卵巢可见个别卵母细胞,精巢中有少量精母细胞,大部分性腺发育停滞在性原细胞阶段(图版-7,8)。

## 3 讨论

### 3.1 三倍体诱导及倍性检测

在诱导鱼类多倍体的研究中,除采用静水压外,还有冷、热休克,冷、热休克结合静水压<sup>[1-4,6,7,10,11]</sup>等方法。多倍体诱导关键在于摸索处理强度、持续时间和处理起始时间3个参数之间的组合,使诱导过程能有效抑制极体的排放,同时尽量减少对受精卵的损伤。作者在1999-2000年对大黄鱼三倍体诱导条件进行了初步摸索<sup>[9]</sup>。此后我们发现卵子发育的好坏对诱导结果产生极大的影响。对亲鱼进行精养,给予适宜的环境条件,提供优质的饵料,亲鱼产出的卵子质量好,能承受更高的压力。在不损伤卵子的前提下,压力提高,倍化率亦相应提高。当压力为 $500 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 时,三倍化率达92.1%,孵化率也较高,相对对照组达75.5%。压力过高,处理时间过长时,则会产生较多的非整倍体、镶嵌体,同时孵化率下降。

流式细胞技术是对单个细胞或细胞器快速测量DNA的高新技术,通过测量细胞中的DNA含量来检测倍性。采用流式细胞技术进行倍性鉴定,具有操作简单、快速等优点,在幼鱼及成鱼阶段只需取一小片鳍条组织即可检测其倍性,可使被检测样品保持健康存活状态。因此采用倍体分析仪进行倍性检测是一种较理想的倍性鉴定方法。但当样品的染色体数为接近整倍体数的非整倍体时,例如 $3n \pm 3$ ,这时在倍体分析仪的检测图上无法反映,往往被认为是整倍体。而这些非整倍体将在以后的发育中死亡。因此作者认为,在进行诱导条件摸索的实验时,需要准确查明样品的染色体数,此时仍应制备染色体,通过染色体计数的方法进行倍性鉴定。

### 3.2 二倍体与三倍体红细胞比较

在不同的鱼种类中,二倍体与多倍体的红细胞核体积比存在着较大差异。白鲫倍间三倍体与二倍体细胞核体积比值为1.41<sup>[12]</sup>,三倍体鲢细胞核体积为二倍体鲢的1.63

倍<sup>[13]</sup>,真鲷三倍体和二倍体红细胞核长径比值为1.42<sup>[14]</sup>。大黄鱼三倍体红细胞及其核的体积分别为二倍体的1.97、1.70倍,通过测量红细胞、红细胞核的大小也可快速鉴定倍性。由于三倍体鱼细胞及其核相对较大,故在同一组织中,细胞数较少,这可能影响组织的代谢和系统的功能。在血液中,红细胞较大,数量较少,导致载氧、输氧能力的变化,最终可能影响鱼体的代谢行为,今后应当在这方面进行进一步的研究。

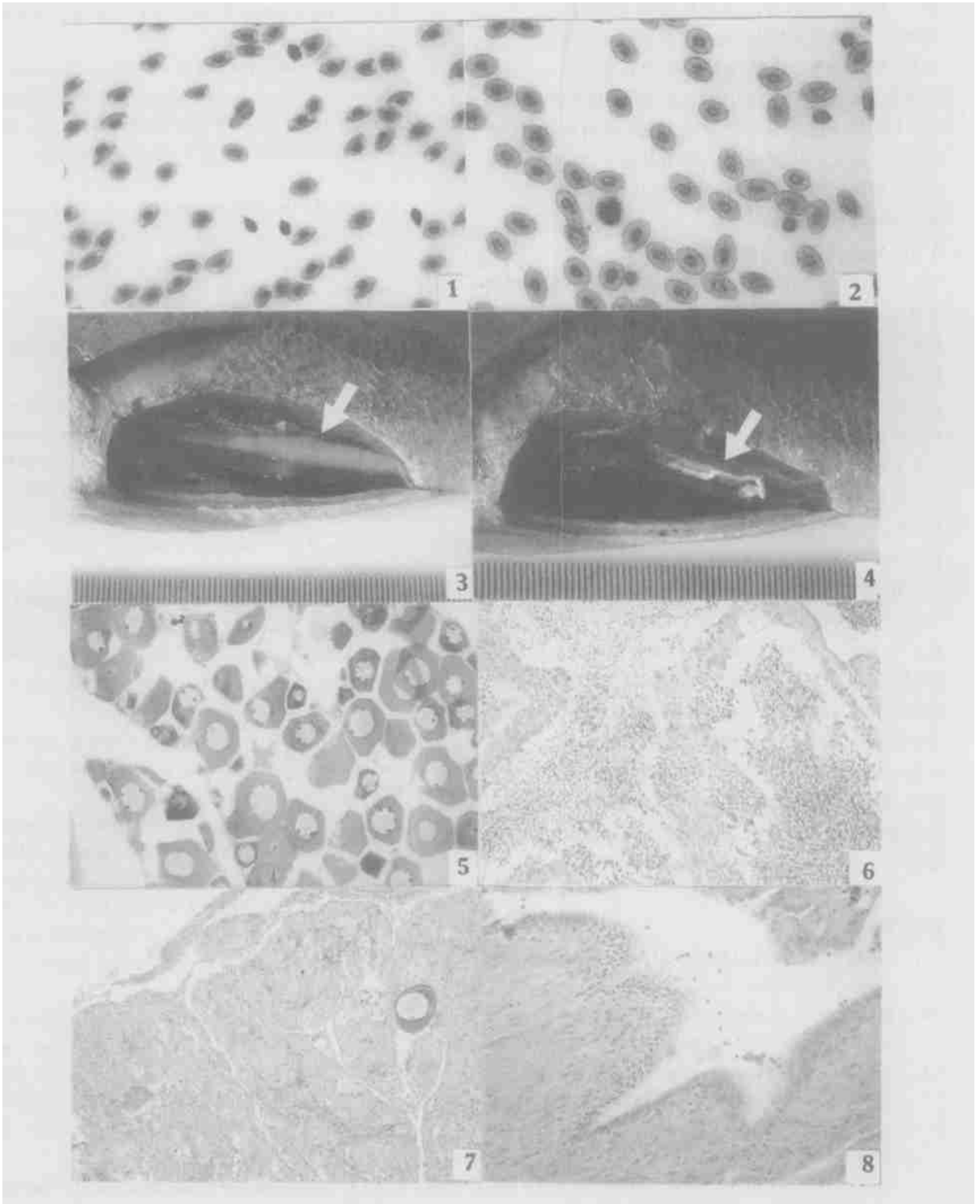
### 3.3 生长及生殖腺发育

三倍体在水产养殖上具有增产潜力,鱼类育种学家试图通过三倍体鱼比二倍体生长快的特点提高养殖产量,对此做了大量实验。但也有一些研究发现三倍体鱼生长速度慢于二倍体。从大黄鱼三倍体和二倍体体长、体重的增长比较分析,至7月龄,大黄鱼三倍体与二倍体在生长方面没有显著差异。随着二倍体生殖腺的发育,两者之间在生长上是否表现差异,我们将作进一步观察。

三倍体生殖腺发育受阻是人工诱导三倍体的直接目的。尹洪滨等<sup>[4]</sup>报道雄性三倍体鲶鱼精巢发育与二倍体基本保持在相同的发育水平上,雌性三倍体鲶鱼的卵巢处于未分化的卵原细胞阶段。Dong Soo Kim等<sup>[7]</sup>报道泥鳅三倍体卵巢与精巢发育均受阻。作者对三倍体大黄鱼性腺发育观察结果表明:三倍体大黄鱼生殖腺发育明显受阻,虽能产生个别卵母细胞、精母细胞,大部分仍停留在性原细胞阶段。而对对照组二倍体性腺发育较好,卵巢处于第时相,精巢中已能见到成熟的精子。Chevassus<sup>[15]</sup>把不育性分为3类:一是性腺不育,指性腺没有发育;二是配子不育,即配子畸形,且数量很少;三是合子不育,即配子具有活性,能完成受精过程,但其幼虫不能存活。三倍体大黄鱼可归于第一类,即性腺不育。

### 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. Inducted triploidy in carp, *Cyprinus carpio* L [J]. J Fish Biol, 1980, 17(6): 667 - 671.
- [3] Gui J F. Studies on genome manipulation in fish. Induction of triploid transparent colored crucian carp (*Carassius auratus* transparent colored variety) by hydrostatic pressure [J]. Acta Hydrobiol Sin, 1990, 14(4): 336 - 342. [桂建芳. 鱼类染色体操作的研究. 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] Yin H B, Pan W Z, Sun Z W. Morphologic characters and growth of triploid catfish (*Parasilurus asotus* L.) [J]. Chinese Journal of Fisheries, 1996, 9(2): 23 - 26. [尹洪滨, 潘伟志, 孙中武. 三倍体鲶鱼的形态学性状及生长[J]. 水产学杂志, 1996, 9(2): 23 - 26.]
- [5] Yang X Q, Chen M R, Yu X M. Biological characters of triploid Japanese phytophagous crucian carp [J]. Acta Hydrobiol Sin, 1994, 18(2): 156 - 163. [杨兴棋, 陈敏容, 俞小牧. 三倍体白鲫的生物学特性[J]. 水生生物学报, 1994, 18(2): 156 - 163.]
- [6] Johnson O W, Dickoff W W, Uffer F M. Comparative growth and development of diploid and triploid coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* [J]. Aquac, 1986, 57: 329 - 336.
- [7] Dong Soo Kim, Jae-Yoon Jo, Taek-Yuil Lee. Induction of triploidy in mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and its effect on gonad development and growth [J]. Aquac, 1994, 120: 263 - 270.
- [8] Chourrout D, Chevassus B, Kirey F, et al. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females-potential of tetraploid fish [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1986, 72: 193 - 206.
- [9] Lincoln R. F. Sexual maturation in female triploid plaice, *Pleuronectes platessa*, and plaice  $\times$  flounder, *Platichthys flesus* hybrid [J]. J Fish Biol, 1981, 19: 499 - 507.
- [10] Lin Q, Wu J S, Zeng Z N. Induction of triploid in *Pseudosciaena crocea* by hydrostatic pressure [J]. Marine Sciences, 2001, 25(9): 6 - 9. [林琪, 吴建绍, 曾志南. 静水压休克诱导大黄鱼三倍体[J]. 海洋科学, 2001, 25(9): 6 - 9.]
- [11] Lou Y D, Purdom C E. Polyploidy induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson [J]. J Fish Biol, 1984, 25(3): 345 - 351.
- [12] Yu X M, Chen M R, Yang X Q. Observation on erythrocytes and measurement of DNA contents in artificially-induced allotetraploid and interploidy triploid Japanese phytophagous crucian carp [J]. Acta Hydrobiol Sin, 1998, 22(3): 291 - 294. [俞小牧, 陈敏容, 杨兴棋, 等. 人工诱导异源四倍体和倍间二倍体白鲫的红细胞观察及其相对DNA含量测定[J]. 水生生物学报, 1998, 22(3): 291 - 294.]
- [13] Zhu L F, Gui J F, Liang S C. Observation on erythrocyte in artificial autotriploid and allotriploid of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. Acta Hydrobiol Sin, 1992, (16) 1: 84 - 86. [朱蓝菲, 桂建芳, 梁绍昌, 等. 人工同源和异源三倍体鲢的红细胞观察[J]. 水生生物学报, 1992, (16) 1: 84 - 86.]
- [14] Cai G X. Triploid induction of pagrosomus major by cold shock [J]. Tropic Oceanology, 1997, 16(4): 95 - 98. [蔡国雄. 真鲷三倍体诱导初步研究[J]. 热带海洋, 1997, 16(4): 95 - 98.]
- [15] Chevassus B. Hybridization in fish [J]. Aquac, 1983, 33(1 - 4): 245 - 262.



### 图版 Plate

1. 二倍体红细胞,  $\times 400$ ; 2. 三倍体红细胞,  $\times 400$ ; 3. 二倍体精巢( ); 4. 三倍体精巢; 5. 二倍体卵巢组织切片,  $\times 200$ ; 6. 二倍体精巢组织切片,  $\times 400$ ; 7. 三倍体卵巢组织切片,  $\times 400$ ; 8. 三倍体精巢组织切片,  $\times 400$

1. erythrocyte of diploid,  $\times 400$ ; 2. erythrocyte of triploid,  $\times 400$ ; 3. diploid testis ( ); 4. triploid testis; 5. section of diploid ovary,  $\times 200$ ; 6. section of diploid testis,  $\times 400$ ; 7. section of triploid ovary,  $\times 400$ ; 8. section of triploid testis,  $\times 400$