

综述

国外对鱼类多倍体育种的研究*

STUDIES ON FISH POLYPLOID BREEDING ABROAD

楼允东

Lou Yundong

(上海水产学院)

(Shanghai Fisheries College)

在育种学上,多倍体与雌核发育的人工诱导都属于“染色体组工程”(Genome engineering)的范畴。由于它们有控制染色体组和性别的潜力,因此这些技术正在引起人们的浓厚兴趣。虽然鱼类的遗传育种工作起步较慢,但最近十五年来却十分活跃。本文拟对国外有关鱼类多倍体育种方面的研究现状及其动向作一综合评述,供国内同仁参考。

历史的简略回顾

“多倍体”(Polyploid)这个名词是由 Winkler(1916)首先使用,它是指每个体细胞中含有三个或更多个染色体组的个体而言。染色体组的多倍性现象在高等植物中是相当普遍的,但动物界的多倍性现象却少得多。自从六十年代发现一种美洲角蛙(*Odontophrynus americanus*)是一个确定的四倍体动物后,学者们陆续在低等脊椎动物,包括鱼类,两栖类和爬行类中发现不少多倍体动物。

在鱼类,苏联西部与我国黑龙江流域的银鲫(*Carassius auratus gibelio*)以及日本关东系银鲫(*Carassius auratus langsdorfii*)的某些种群为天然三倍体,并以雌核发育(Gynogenesis)方式繁殖后代,这是早已知道的事实(Cherfas, 1966; Kobayasi 等, 1970, 1973)。在鳉形目中,花鳉科的 *Poecilia* 属与 *Poeciliopsis* 属中也有不少多倍体种群存在,例如墨西哥西北部的一种卵胎生帆鳉(*Poecilia formosa*) (Hubbs 与 Hubbs, 1932; Schultz, 1967, 1969; Cimino, 1972, 1973)。另外,天然发生的三倍体也发现于虹鳟(*Salmo gairdneri*) (Cuellar 与 Uyeno, 1972; Grammeltvedt, 1974; Thorgaard 与 Gall, 1979)、溪红点蛙 (*Salvelinus fontinalis*) (Allen 与 Stanley, 1978)、加州拟鲤 (*Hesperoleucis symmetricus*) (Gold 与 Avise, 1976) 以及泥鳅 (*Misgurnus anguillicandatus*) (Ojima 与 Takai, 1979) 这样一些两性鱼类的天然种群中。而且有时出现的频率还很高,例如据 Thorgaard 与 Gall (1979) 报道,在 11 个全同胞的虹鳟中就有 6 个是三倍体。鱼类群体中自然发生的三倍体据信是由于卵子受精后不排出第二极体所造成,也即它们没有经过减数分裂而形成二倍体卵然后与正常精子受精而形成三倍体 (Cuellar 与 Uyeno, 1972; Gold 与 Avise, 1976; Thorgaard 与 Gall, 1979)。

* 本文是作者在英国农业、渔业与食品部罗斯托夫渔业研究所(MAFF Fisheries Laboratory, Lowestoft, UK)进修期间写成的。在写作过程中,承蒙业师、英国渔业学会副会长、该所鱼贝类养殖部长、著名的鱼类遗传育种学家 C.E. Purdom 博士的大力支持与热情指导,特此表示衷心感谢。

关于人工诱导三倍体动物的研究,最早可以追溯到本世纪三十年代末。据文献报导, Fankhauser 与 Griffiths (1939) 首先在两栖类中成功地诱发了三倍体。在鱼类方面,早在四十年代, Makino 与 Ojima (1943) 就曾以鲤鱼为实验材料以了解人工诱导蝶鲮三倍体的机制,他们将产卵后 5—10 分钟的鲤鱼受精卵在 0.5—3°C 低温下放置 10—30 分钟。经细胞学观察,这样处理后抑制了第二次成熟分裂,结果本来要成为第二极体的单倍染色体组被保留了下来,引起卵子染色体的加倍,从而导致二倍体卵核的产生。于是,他们提出如果二倍体卵核与单倍体精核结合可能形成三倍体合子并进而产生三倍体个体。虽然 Makino 与 Ojima 并没有报道其受精卵是否育成鱼苗,但这一实验为后来诱导鱼类多倍体奠定了理论基础。不久, Svardson (1945) 用接近 0°C 的冷水处理受精后 10 分钟白鲑 (*Coregonus lavaretus*) 以及大西洋鲑同褐鳟杂种卵约 26 小时而得到了少数三倍体囊胚,但他并没有将试验继续进行下去。就作者所知,真正诱导鱼类三倍体成功的是 Swarup (1956, 1957, 1959), 他不仅以低温诱导三棘刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*) 获得三倍体,而且饲养至性成熟。后来, Purdom (1972) 又报道了海水经济鱼类蝶 (*Pleuronectes platessa*) 与川蝶 (*Platichthys flesus*) 杂交种人工诱导三倍体成功。自此以后,诱导鱼类多倍体的研究越来越引起学者的兴趣,研究报告也日益增多。到目前为止,先后已在三棘刺鱼、蝶、川蝶、大菱鲆、菱鲆、鲤鱼、兰罗非鱼、虹鳟、大西洋鲑、溪红点鲑、斑点叉尾鲷以及大麻哈鱼等 10 多种鱼类获得成功(表 1),有的已开始应用于生产实践,并取得了明显的经济效益。

表 1 人工诱导鱼类多倍体的实例

鱼类名称	诱导方法	剂 量	处理时间	持续时间	结 果	鉴别倍性的方法	文 献
三棘刺鱼	冷休克	0°C	受精后 3 分钟	1.5—3 小时	三倍体成鱼	染色体计数—胚胎与幼鱼眼结膜压片; 细胞及细胞核大小—胚胎与仔鱼切片	Swarup, 1959a, b
	热休克	33.5—34°C	受精后 10 分钟	5 分钟	三倍体成鱼		
蝶以及蝶与川蝶杂种	冷休克	0°C	受精后 15 分钟	3.5 小时	三倍体成鱼	遗传性状—仔鱼黑色素细胞分布与含量; 红血球核体积—血涂片	Pardom, 1972
兰罗非鱼	冷休克	11°C	受精后 15 分钟	1 小时	多倍体幼鱼	红血球核体积—血涂片	Valenti, 1975
	热休克	38°C					
鲤 鱼	冷休克	0°C	受精后 10 分钟	10 分钟	三倍体成鱼	染色体计数—血培养	Ojima 等, 1978
	冷休克	0—2°C	受精后 1—9 分钟	45 分钟	三倍体成鱼	染色体计数—血培养; D-NA 含量测定—血涂片	Gervai 等, 1980
溪红点鲑	秋水仙素	0.01%	受精后 84h°	36h°	嵌合体仔鱼	染色体计数—鳃上皮及囊胚压片	Smith 等, 1979
大西洋鲑	细胞松弛素 B	10µg/ml	受精后 32h°	约 12 小时	嵌合体仔鱼	红血球核体积—血涂片; 染色体计数	Allen 等, 1979
虹 鳟	热休克	27—30°C	受精后 70 分钟	10 分钟	三倍体幼鱼	染色体计数—鳃上皮	Chourrout, 1980
	热休克	36°C	受精后 10 分钟	1 分钟	三倍体胚胎	染色体计数—胚胎组织	Thorgaard 等, 1981
	热休克	36°C	受精后 5 小时	1 分钟	四倍体胚胎		
	细胞松弛素 B	10µg/ml	受精后 30—40h°	到 4 细胞期为止	四倍体成鱼	染色体计数—血培养; 红血球核体积—血涂片	Refstie, 1981
	热休克	28°C	受精后 6.5—9 小时	14 分钟以上	四倍体仔鱼	染色体计数—胚胎尾上皮及仔鱼鳃上皮	Chourrout, 1982
	热休克处理与雄性化雌鱼精子受精的卵	28°C	受精后 40 分钟	10 分钟	全雌三倍体幼鱼	红血球核体积—血涂片	Lincoln 等, 1983
	水静压	8000 p.s.i.	受精后 40 分钟	10 分钟	三倍体幼鱼	红血球核测定—鱼苗切片及幼鱼血涂片	Lou 与 Purdom, 1984b
斑点叉尾鲷	冷休克	5°C	受精后 5 分钟	1 小时	三倍体成鱼	染色体计数—血培养及肾组织	Wolters 等, 1981
草鱼与花鲢	种间杂交				三倍体杂种成鱼	染色体计数—鳃上皮、头肾	Beck 等, 1982

注: 1. h° = hour - degrees, 即小时 × 温度; 2. p.s.i. = pounds per square inch, 即磅/平方英寸。

人工诱导多倍体的方法

根据 Makino 与 Ojima(1943) 以及后来许多学者所进行的细胞学研究表明, 多倍体的产生需要卵子第二极体的保留或受精卵早期有丝分裂的抑制。第二极体的保留或第一次有丝分裂的抑制, 有时受精卵不经特殊处理就可以产生(即天然多倍体), 或者可以由种种人为的处理而引起(即人工多倍体)。归纳起来, 这些处理方法不外乎生物的、物理的以及化学的三种。

1. 生物学方法 即采用杂交, 尤其是种间杂交的方法。Rasch 等(1965) 首先提出了三倍体脊椎动物可以通过杂交产生的证据。他们将雌核发育的二倍体帆鳍 (*Poecilia formosa*) 与 *P. vittata* 或 *P. sphenops* 杂交, 根据核内 DNA 测定判断, 其后裔是三倍体。

Schultz 与 Kallman(1968) 将生活在美国得克萨斯州南部以及墨西哥东北部的全雌雌核发育二倍体种群帆鳍与另一种帆鳍 (*P. sphenops*) 的雄鱼受精而获得不育三倍体杂种。 *P. formosa* 与 *P. sphenops* 的二倍体数为 $46(2N)$, 而其杂种的染色体数为 $49(3N)$; 另外 *P. formosa* 的体色为正常型, 而 *P. sphenops* 的身体为黑色, 其杂种则为中间型, 在银灰色身体上出现黑色斑点, 说明它是一个杂种。而在天然情况下出现这种父性性状的后裔是非常罕见的。

Vasilev 等(1975)用鲤鱼与鲮条 (*Hemiculter eigenmanni*) 以及草鱼进行远缘杂交(不同亚科)而获得少量存活的杂种。染色体组型分析证明它们是异源三倍体, 杂种具有与母本二倍体和父本单倍体总和相一致的染色体数。例如鲤鱼的二倍体数 ($2N$) 为 104, 鲮条的单倍体数 (N) 为 24, 其杂种染色体数则为 $128(3N)$ 。

Stanley(1976)用 160,000 个鲤鱼卵与草鱼精子受精, 结果孵出 4,300 尾鱼苗。3 个月后其中仅存杂种鱼 16 尾。虽然没有对杂种鱼进行核型分析, 但根据其红血球核面积 ($23.5\mu\text{m}^2$) 约为草鱼 ($12.4\mu\text{m}^2$) 与鲤鱼 ($18.3\mu\text{m}^2$) 平均值 ($15.4\mu\text{m}^2$) 的 1.5 倍而不是介于两者之间这一事实, 他相信该杂种是多倍体。而雄草鱼与雄鲤鱼杂交的杂种则在胚胎发育期间死亡。

Márián 与 Krasznai(1978)发现草鱼与花鲢之间的种间杂种是具有 72 条染色体的三倍体, 但她们对该杂种三倍体中额外单倍染色体组的来源并不清楚。后来, Beck 等(1980)对草鱼、花鲢及其子一代杂种的染色体组型进行了分析研究, 结果发现草鱼与花鲢具有二倍体染色体数 ($2N=43$), 而雌草鱼与雄花鲢的杂交种全部具有三倍体染色体数 ($3N=72$)。根据中央与亚中央着丝点染色体的出现频率表明杂种接受 2 个母本染色体组和 1 个父本染色体组。这与一般认为的三倍体化机制是卵子第二极体的保留相一致的。最近, Beck 与 Biggers(1982)发现当雌草鱼与雄花鲢杂交时同时出现二倍体杂种与三倍体杂种, 但 35.1% 的二倍体杂种畸形, 而三倍体杂种畸形率仅 5.1%。

至于为什么种间杂交时会导致卵子第二极体不排出, 其原因并不清楚。在种内杂交中不排出第二极体的现象似乎是比较罕见的。

2. 物理学方法 在鱼类, 受精卵的温度处理已被广泛用来抑制第二次成熟分裂或第二极体的排出。冷休克(例如 Swarup, 1959a; Purdom, 1972; Valenti, 1975; Lincoln, 1976; Ojima 与 Makino, 1978; Gervai 等, 1980; Lemoine 与 Smith, 1980; Wolters 等, 1981a)与热休克(例如 Swarup, 1959a; Vasetskii, 1967; Chourrout, 1980, 1982; Thorgaard 等, 1981; Purdom, 1983; Lincoln 与 Scott, 1983; Utter 等, 1983)处理都可能是有效的(表 1)。热休克也已被用来阻止虹鳟卵的第一次有丝分裂而产生四倍体 (Thorgaard 等, 1981)。

对每一种鱼来说, 进行温度处理最重要的是必须确定处理的开始时间、持续时间以及温度高低。有证据表明温度休克敏感性的差异与遗传背景有关 (Streisinger 等, 1981), 也与卵子成熟度有关 (Refstie 等, 1982)。受精后不久(对诱导三倍体来说)或第一次卵裂前不久(对诱导四倍体来说)用仅低于致死温度的热休克也许是一个简便而又实用的诱导多倍体的途径。用较低的温度而进行较长时间的处理

则将对处理的卵提供较大的均匀性。温度休克处理是廉价的,如果多倍体确实证明是有价值的话,它可以被养殖场采用来大规模生产。

另外,在两栖类的研究中,水静压(Hydrostatic pressure)已被用来阻止第二极体排出(Dasgupta, 1962; Gillespie 与 Armstrong, 1979)或第一次有丝分裂(Reinschmidt 等, 1979; Gillespie 与 Armstrong, 1980)。在鱼类, Streisinger 等(1981)成功地用水静压阻止第二极体排出并用这种处理与乙酰相结合阻止第一次有丝分裂而产生纯合二倍体雌核发育斑马鱼(*Brachydamio rerio*)。本文作者等用水静压诱导杂合二倍体雌核发育与三倍体虹鳟也分别获得成功(Lou 与 Purdom, 1984a, b)。虽然应用水静压处理比温度休克处理需要更专门的设备(例如水压机),但由于它对胚胎的损伤可能比温度休克小,所以这个方法值得深入研究。例如 Gillespie 与 Armstrong (1979)发现用水静压产生的三倍体蟒鳉比用热休克产生的三倍体成活率高得多。

3. 化学方法 化学物也可以用来阻止第二极体的排出或受精卵的有丝分裂而产生三倍体或四倍体。Refstie 等(1977)、Refstie(1981)以及 Allen 与 Stanley(1979, 1981)报道受精卵置于细胞松弛素 B (Cytochalasin B)后产生了多倍体与二倍体嵌合体虹鳟与大西洋鲑。根据他们的试验,其细胞松弛素 B 的浓度以 10 μ g/ml(溶解于 0.1%二甲亚砜水溶液中)为最好,从受精后 30—40h^o (小时 \times 温度)开始处理直到 4 细胞期为止。虽然 Refstie 等以及 Allen 与 Stanley 用细胞松弛素 B 处理受精卵都获得了多倍体与二倍体嵌合体,但前者认为占优势的多倍体细胞类型是四倍体,而后者则确认占优势的多倍体细胞类型是三倍体而不是四倍体。如果细胞松弛素 B 是阻止胞质分裂而不是阻止有丝分裂(Carter, 1967; Krishan, 1972),则予期胚胎应该发育为四倍体或二倍体与四倍体嵌合体。因此对细胞松弛素 B 的作用机制仍有进一步研究的必要。

另外, Smith 与 Lemoine(1979)曾报道将第一次卵裂前的受精卵置于 0.01%秋水仙素(Colehicine)后产生了类似的多倍体与二倍体嵌合体溪红点鲑。关于嵌合体形成的机制,按 Lemoine 与 Smith (1980)的解释是:第二极体被保留下来但没有立即融合,导致双核细胞。如果该额外的细胞核分裂一次或一次以上,然后与正常的核融合,这样就会形成嵌合体(Mosaic)。

据 Thorgaard(1984)认为,除细胞松弛素 B 与秋水仙素外,聚乙烯乙二醇(Polyethylene glycol)是诱导多倍体的另一潜在的有效试剂。虽然它还没有被用于鱼类,但它已成功地诱导鼠胚胎的四倍性(Eglitis, 1980)。

由于温度休克与水静压处理对阻止鱼类极体排出和第一次有丝分裂比较成功,也比较容易,所以化学处理不可能是被选中的方法。与其它方法比较,它们也很可能不适合于大规模生产。

多倍体的鉴定

由于各种处理方法并不总是百分之百的成功,而且处理过的群体中也可能是由多倍体、二倍体甚至多倍体与二倍体嵌合体等混合组成,因而用一个准确的方法来确定染色体的倍性就显得格外重要。根据文献报道,多倍体鱼可以用间接法(如核体积测量、蛋白质电泳、生化分析以及形态学检查等)和直接法(如染色体计数以及 DNA 含量测定等)鉴定出来。现分别介绍如下:

1. 核体积测量 按照一般规律,细胞核大小与染色体数目成比例增加,而且为了维持恒定的核质比率,随着细胞核的增大,细胞大小也按比例增加。因此组成多倍体有机体的细胞及其细胞核通常要比二倍体的大些。但多倍体的器官或身体并不一定都比二倍体大,不是说同龄四倍体鱼就一定比二倍体鱼类大一倍。这是因为随着细胞大小增加而细胞数目相应减少,从而保持器官或身体大小大致相等(Swarup, 1959b; Valenti, 1975)。

红血球的测量被广泛用来鉴定多倍体鱼(Swarup, 1959b; Cherfas, 1966; Purdom, 1972; Ciminno, 1973; Valenti, 1975; Lincoln, 1976, 1983; Sezaki 等, 1977; Allen 与 Stanley, 1978, 1979;

Wolters 等, 1982a; Beck 与 Biggers, 1983; Lou 与 Purdom, 1984b)。其中以核体积之比最为常用, 不过也有用核面积甚至单独用核长轴或短轴之比来表示的。按照上述规律, 二倍体与三倍体核体积预期比率应该是 1:1.5, 而椭圆形核面积预期比率应该是 1:1.3(Purdom, 1972)。实际测定结果大致接近这个预期比率。至于四倍体的情况, 据 Sezaki 与 Kobayasi(1978)对刺鲃(*Cobitis biwa*)的测量结果, 二倍体与四倍体红血球面积之比为 1:1.74。红血球核体积测量是简便的, 所需专门设备也不多。因此它被许多学者认为是一个鉴定染色体倍性的好方法。不过, 也有学者提出它经常不能准确地反映倍性(Thorgaard 与 Gall, 1979; Wolters 等, 1982a)。有鉴于此, 在使用这个方法之前应该用直接倍性测定法来加以校准。另外, 在缺乏其它证据的情况下, 这个方法的潜在的不准确性也使得以红血球核体积为基础的多倍体与二倍体嵌合体的结论成为问题(Thorgaard 与 Gall, 1979)。

除红血球外, 也有用其它的体细胞如脑细胞、软骨细胞、网膜细胞、上皮细胞、肝细胞以及肾细胞等的核体积来鉴定染色体倍性的, 但要预先制作连续切片, 比较费时。

2. 蛋白质电泳 蛋白质电泳也可用来鉴定多倍体鱼。Balsano 等(1972)用血清蛋白电泳图差异来辨别二倍体与三倍体卵胎生帆鳍。可是, Liu 等(1978)发现二倍体与三倍体关东系银鲫在血清蛋白上并没有明显的差异, 她们用各种蛋白质或酶, 例如血红蛋白, 肌浆蛋白、乳酸脱氢酶、葡萄糖磷酸变位酶以及磷酸果糖激酶等进行反复电泳分析, 最后找出肌肉肌浆蛋白(Myogen)和肌酸激酶(Creatine kinase)是鉴定二倍体与三倍体关东系银鲫的最好标志物。Allen 等(1981)用电泳成功地筛选出多倍体草鱼与花鲢杂种。二倍体与三倍体之间等位基因相对含量的差异也可以为大量种间杂种与合适的种内杂交多倍体个体作出筛选。可是, 种间杂种母本或父本等位基因优先表达的可能性使得在做这样研究的时候, 既要包括对照组二倍体杂种, 也要包括多倍体杂种以及亲本种(Whitt 等, 1973)。

3. 生化分析 Sezaki 等(1983)对关东系银鲫二倍体与三倍体种群的肌肉与血液的化学组成进行了生化分析, 结果发现两者肌肉的近似组成及蛋白质组成基本上一致, 但三倍体具有较二倍体少的红血球数量, 较高的平均血球体积与平均血球血红蛋白。可是, 两者血红蛋白水平、血细胞容量计值以及平均血球血红蛋白浓度并无明显差别。另外, 每 10^{10} 个红血球的丙酮酸激酶(Pyruvate Kinase)活性, 三倍体显著高于二倍体, 其比率是 1.63, 而已糖激酶(Hexokinase)与磷酸果糖激酶(Phosphofructokinase)的活性, 三倍体也略高于二倍体, 其比率分别是 1.26 与 1.35。Barker 等(1983)对三倍体与二倍体草鱼与花鲢杂种进行了血液分析, 也得到与上述相类似的结果。关于这方面的研究工作还刚刚开始, 相信今后会有更多的报道问世。

4. 形态学检查 三倍体与二倍体鱼在形态上并没有显著差异(Swarup, 1959b; Gold 与 Avise, 1976; Thorgaard 与 Gall, 1979; Gervai 等, 1980)。Swarup(1959b)发现三倍体三棘刺鱼与二倍体对照组比较, 仅具有较短的躯干以及较长的尾部。

可是, 在某些情况下, 由于与双亲基因剂量的差异, 三倍体种间杂种可容易地与二倍体杂种相区别。例如 Purdom(1972)根据仔鱼色素能够区别三倍体和二倍体鲮与川鲮杂种。二倍体鲮呈现中等色素而在边缘鳍上全然没有色素细胞, 二倍体杂种无论在身体上还是鳍上都具有浓密的色素细胞, 而三倍体杂种则介于两者之间。三倍体草鱼与花鲢杂种形态上也是可以二倍体杂种相区别的(Allen 与 Stanley, 个人通讯; Beck 与 Biggers, 个人通讯)。

5. 染色体计数 染色体计数是鉴定倍性的一个准确的直接法, 但比较费时。质量好的染色体标本可以从胚胎获得, 因为胚胎具有高的有丝分裂系数(Hoornbeek 与 Burke, 1981; Thorgaard 等, 1981)。从大鱼的大多数身体组织所得到的标本则很少成功且需要杀鱼。再生鳧(Streisinger 等, 1981)或淋巴细胞培养(Thorgaard 与 Gall, 1979; Gervai 等, 1980; Wolters 等, 1981b)的染色体标本可以用作成鱼的倍性测定而不需要牺牲鱼。

6. DNA 含量测定 细胞 DNA 含量测定是倍性鉴定的另一个有效的直接法。最初 Rasch 等(1965)用 Feulgen 染色的组织切片的显微光密度测定法(Microdensitometry)来测定帆鳍(*P. formo-*

sa、*P. sphenops*、*P. vittata*)及其杂种体细胞核的 DNA 含量,结果发现杂种的 DNA 含量是其亲本的一倍半,从而确定这些杂种是三倍体。Gervai 等(1980)用 Feulgen 染色的红血球核的显微光密度测定法来鉴定三倍体鲤鱼。

流动血球计数法(Flow cytometry)是一个很有前途的新技术。用这种技术,大量染过色的细胞的荧光可以被快速测量从而估计出 DNA 含量。它已被用来鉴定三倍体虹鳟(Thorgaard 等, 1982)、大西洋鲑(Allen, 1983)、草鱼与花鲢杂种(Allen, 1983; Allen 与 Stanley, 1983)以及三种太平洋鲑鱼(Utter 等, 1983)。流动血球计数法的优越性是:(1)快速(每次测定仅需 3—5 分钟);(2)准确;(3)用血量少(10^{-4} ml 即可);(4)不但可以检测多倍体,还可以检测多倍体与二倍体嵌合体;(5)经非离子化净化剂处理使核分离后还可以用来分析其他组织。唯一缺点是仪器昂贵,需要有电子计算机配套的流动血球计数计,一般科研机构与生产单位不具备这种条件。

多倍体鱼类的生长与发育

1. 多倍体鱼类的生存力 许多三倍体鱼类的成功诱导以及天然三倍体的存在说明三倍体鱼类具有良好的生存力,这与三倍体哺乳类不能生存的情况完全相反,而与三倍体两栖类中所观察到的情况非常相似。

大多数学者的研究发现,人工诱导的三倍体鱼类具有正常的生存力。例如三倍体三棘刺鱼(Swarup 1959b)、蝶与川蝶杂种(Purdom, 1972; Purdom 与 Lincoln, 1973)、兰罗非鱼(Valenti, 1975)、鲤(Gerrai 等, 1980)以及斑马鱼(Streisinger, 个人通讯)显然生存得与二倍体一样好。不过也有例外,例如虹鳟(Thorgaard 等, 1982)和银大麻哈鱼(Utter 等, 1983)和人工诱导三倍体的生存力就可能稍许比二倍体差些。

产生四倍体的可能性已引起人们兴趣,因为如果它们能育的话,可以与二倍体杂交产生不育的三倍体(Refstie 等, 1979)。四倍体鱼的生存力预期比三倍体差些。例如四倍体斑马鱼与二倍体比较,生存力极低(Streisinger, 个人通讯)。四倍体虹鳟胚胎在外形上往往是畸形的(Thorgaard 等, 1981)。可是,Refstie(1981)报道成功地培育四倍体虹鳟至成熟。但在他鉴定为四倍体的鱼类当中,发现畸形率不断增加。Valenti(1975)发现当兰罗非鱼受精卵用冷休克处理后有一些可能是四倍体。在 14 周龄时,这些鱼比对照组和三倍体都大。由于这方面的资料不多,因此对四倍体鱼的生存力还很难下一个肯定的结论。

在种间杂交中所观察到的三倍体的高频率也可以反映出三倍体杂种较强的生存力。例如虹鳟与溪红点鲑(Capanna 等, 1974)、草鱼与鲤鱼(Vasilev 等, 1975)以及草鱼与花鲢(Marian 与 Krasznai, 1978; Beck 等, 1980)的杂种内出现天然三倍体就可能同三倍体杂种比二倍体杂种存活得更好有关系。另外,人工诱导的三倍性也可以导致种间杂种生存力提高。例如三倍体草鱼与花鲢杂种比通常畸形的二倍体杂种更健壮(Allen 与 Stanley, 1981, 1983; Beck 与 Biggers, 1982)。三倍体种间杂种生存力的提高可能与物种之间由于双亲染色体组比例从 1:1 改变为 2:1 而产生遗传不调和性的“缓冲作用”(Buffering)有关。

由于杂种优势和双亲合乎需要的特性可能会结合在一个比较健壮的不育杂种内,所以种间三倍体杂种在鱼类养殖上将是有用的(Allen 与 Stanley, 1981a)。例如 Refstie 等(1982)发现银大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)与大鳞大麻哈鱼(*O. tshawytscha*)杂种比银大麻哈鱼生长快,但死亡率较高,杂种也出现高频率畸形。三倍体银大麻哈鱼与大鳞大麻哈鱼杂种可以保留二倍体的杂种优势且呈现较低死亡率与较少畸形。Utter 等(1983)用正反交细鳞大麻哈鱼(*O. gorbuscha*)与大鳞大麻哈鱼杂种以及 Wolters(个人通讯)用斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)与白叉尾鲷(*I. catus*)杂种正在研究三倍体种间杂种在鱼类养殖上的潜力。

2. 多倍体的性别 在用雌性配子同型以及在许多情况下用雌性配子异型鱼类诱导的三倍体中, 预期雄性占一半。在雌性同型配子的鱼类中, 第二极体的保留的结果导致 XX 卵子与 X 或 Y 精子受精。如果 Y 染色体是决定雄性的, 于是预期产生同等比例的 XXY 三倍体雄性与 XXX 三倍体雌性。在雌性异型配子的鱼类中, 如果性染色体的决定性别的片断与其着丝点之间没有染色体的交换, 第二极体的保留则导致半数 XX 与半数 Y Y 卵子。用带有 X 的精子受精以后, 预期得到同等比例的 XYY (雌性) 与 XXX (雄性) 后裔。另外, 如果性别等位基因位点与着丝点之间有染色体的交换, 则可能发现若干 XXY (假定雌性) 后裔。Lindsley 等(1956)在研究用冷休克诱导的美西螈(一种雌性异型配子蝾螈)三倍体的性比中证实性别基因位点(Sex Locus)远离着丝点, 即两者之间没有发生染色体的交换。

人工诱导的三倍体鲤鱼(Gervai 等, 1980)、斑点叉尾鲟(Wolters 等, 1982b)与三棘刺鱼(Swarup, 1957)以及天然发生的三倍体虹鳟的性别研究已经显示大致相等的雌雄比例。这些结果是与这些鱼类的雄性配子异型相一致的。但在用蝶的研究中则得到相抵触的结果。Purdom (1972)在三倍体蝶与川蝶杂种幼鱼中发现同等比例的雄鱼与雌鱼。可是, Lincoln (1981b)发现在三倍体蝶与川蝶杂种以及三倍体蝶中雄鱼过量。不过, 他发现在二倍体对照组中雄鱼也稍多一点。虽然蝶鱼雌核发育结果表明是雌性配子异型(Purdom 与 Lincoln, 1973), 但无论是雄性配子异型还是雌性配子异型都不预期三倍体雄鱼的过量。Lincoln (1981b)提出雌鱼的不足可能是由仔鱼阶段选择性死亡而引起。

在三倍体鲤鱼、斑点叉尾鲟、虹鳟以及蝶鱼当中, 并没有出现间性性状, 这表明所有这些鱼类可能具有“显性 Y”性别决定机制。可是, Swarup (1957) 发现了三倍体三棘刺鱼雌雄间性的若干迹象。这表明三棘刺鱼如同果蝇以及鸡一样, 可能具有以 X 染色体与常染色体之比为依据的“基因平衡”性别决定机制。

在以抑制第一次有丝分裂而产生的四倍体中, 预期得到相等的雌雄比例。在性别决定中, 如果 Y 染色体是显性的话, 那么可能通过 XXYY 与 XXXX 个体杂交而产生的 XXXY 个体应该是雄性(在雄性配子异型种类)或雌性(在雌性配子异型种类)。这样显性 Y 机制使得 XXXY 四倍体避免成为不育的间性体(Intersex)。产生 XXXY 不育间性体的可能性是 Muller (1925)对动物界中天然多倍体稀少的解释之一。

3. 多倍体的性腺发育 三倍体预期是不育的, 因为奇数染色体组将导致减数分裂的瓦解以及性腺发育的衰退或非整倍体配子的产生。反过来, 性腺发育的衰退又可以阻止性成熟不利方面影响的出现, 例如较差的肉质、较慢的生长以及较高的死亡率等。实践证明三倍体鱼功能上确实是不育的, 但副性征并不受影响。

一般三倍体雄鱼可能比三倍体雌鱼呈现较好的性腺发育, 这可能是由于三倍体不妨碍精巢发育到其成熟大小的多次有丝分裂。天然三倍体虹鳟的精巢发育相当好。几乎与正常雄鱼的精巢差不多(Thorgaard 与 Gall, 1979)。在 8 月龄时, 三倍体斑点叉尾鲟的精巢比二倍体的精巢稍小一些, 但它不像二倍体精巢, 组织学上没有产生精子的任何迹象(Wolters 等, 1982b)。三倍体蝶以及蝶与川蝶杂种在 3 龄时具有大小和外形上与二倍体相似的精巢(Lincoln, 1981a)。三倍体杂种的精巢组织学上畸形, 但产生了若干精子。可是, 三倍体蝶具有组织学上正常的精巢, 数尾三倍体雄蝶还产生了能用来与正常卵子受精的精子, 但在发育早期全部死亡, 产生的胚胎显然是非整倍体。与三倍体虹鳟、斑点叉尾鲟以及蝶相反, 三倍体雄鲤却呈现很差的性腺发育(Gervai 等, 1980)。

在某些情况下, 三倍体雄鱼相当丰富的性腺发育使副性征得以表现出来。例如雄性三棘刺鱼(Swarup, 1959b)和虹鳟(Thorgaard 与 Gall, 1979)成熟时呈现正常雄鱼的副性征。三倍体雄蝶性成熟时具有与那些二倍体部分重叠的睾丸酮水平(Lincoln, 1981a)。可是, 三倍体斑点叉尾鲟性成熟时却没有发生如二倍体雄鱼所出现的阔的头部以及暗的体色(Wolters 等, 1982b)。

三倍体雌鱼似乎抑制性腺发育比雄鱼尤甚。成熟分裂的失败可能阻止卵母细胞的发育以及伴随的性腺体积的增加。三倍体雌性虹鳟成熟时仅具细线状性腺, 内含许多停留在成熟分裂粗线期的卵母细

胞 (Thorgaard 与 Gall, 1979)。斑点叉尾鲷 (Wolters 等, 1982b)、以鲢及鳙与川鲮杂种 (Lincoln, 1981b), 成熟时二倍体卵巢约为三倍体卵巢的四倍。在这三种鱼类的三倍体卵巢中, 组织学观察仅能偶尔看到几个卵母细胞 (Purdum, 1972; Lincoln, 1981b; Wolters 等, 1982b)。三倍体雌性鲤鱼, 性腺发育也大大受到抑制 (Gervai 等, 1980)。三倍体雌性鲢与川鲮杂种, 尽管性腺发育受到抑制, 但性激素水平与二倍体对照组并没有明显差别 (Lincoln, 1981c)。

四倍体并不预期必然是不育的。Refstie (1981) 报道了他鉴定为四倍体的若干雄性虹鳟, 2 龄时产生了精液。由于减数分裂时多价染色体配对会导致性腺发育的失败或非整倍体配子的产生, 因此新产生的同源四倍体可能存在能育性问题。在四倍体美西鳟中, 雄性是不育的, 而雌性则产生高频率的非整倍性卵子。关于四倍体鱼的能育性问题, 似乎大有深入研究的必要。因为如果能育的四倍体主要产生二倍体配子的话, 则它们可以容易地与二倍体杂交而产生不育的三倍体 (Refstie 等, 1977)。

多倍体的经济价值

鱼类多倍体对控制过度繁殖、增加幼鱼生长速率以及延长成熟鱼的寿命与促进生长等都可能是有效的。

关于三倍体对种群控制的应用方面, 目前多半兴趣集中在草鱼及其杂种上 (Stanley, 1979)。草鱼对控制杂草是有用的, 但自 1964 年它被移入美国后, 由于不能控制其天然繁殖, 从而造成对环境的破坏, 所以大部分州已禁止引进。为了培育放流后不能繁殖的草鱼, 除了应用雌核发育的技术培育全雌的单性草鱼以外, 用人工诱导的方法产生具有消耗杂草能力的不育三倍体草鱼或不育草鱼杂种应该是极有价值的。在这方面, Beck 等 (1980, 1982, 1983) 对三倍体草鱼与花鲢杂种的一系列工作是引人注目的。三倍体对那些在湖泊中趋于过度繁殖的诸如溪红点鲑以及许多温水游钓鱼类的渔业经营管理也可能是有用的。为了这个目的, 非整倍体精子的成功产生, 如在三倍体雄鲢所观察到的 (Lincoln, 1981a) 或非整倍体精子与卵子的成功产生, 如在三倍体美西鳟所观察到的 (Fankhauser 与 Humphrey, 1959), 可能更有作用。如果产生配子的三倍体鱼与二倍体交配并产生不能存活的后代则它们可以用来控制种群; 相似的控制种群的遗传学方法已经应用于昆虫。

对于种群控制的三倍体来说, 优越的生长与成活并不是需要的, 但三倍体的高效率生产则是必要的, 即使在处理组内有二倍体的话也应该是极少几个。这需要很好地进行三倍体产生与检测的质量控制或可育四倍体的成功产生。这些严格的要求可能是不育三倍体广泛地应用于鱼类种群控制的一个障碍。

从水产养殖角度出发, 人工诱导三倍体的多半兴趣是寄希望于三倍体会比二倍体生长得更快。一般地说, 三倍体幼鱼已经发现并不比二倍体生长快, 例如三棘刺鱼 (Swarup, 1959b)、鲢与川鲮杂种 (Purdum, 1976)、鲤 (Gervai 等, 1980) 以及斑点叉尾鲷 (Wolters 等, 1982b) 等, 三倍体幼鱼的生长类似于二倍体。但在兰罗非鱼, 发现三倍体幼鱼比二倍体大 (Valenti, 1975), 在 14 周龄时, 11°C 冷休克组的多倍体幼鱼平均标准体长为 4.7 厘米, 而对照组二倍体幼鱼则为 3.5 厘米, 平均大 1/3。可是, 在虹鳟 (Lincoln, 个人通讯) 与银大麻哈鱼 (Utter 等, 1983), 三倍体幼鱼比二倍体幼鱼生长得慢。

不少研究发现在性成熟时三倍体可能比二倍体生长快, 其原因大概是因为在二倍体中用来促进性腺发育的能量而在三倍体中则被用来生长, 例如三倍体雌性鲢与川鲮杂种 (Lincoln, 1981b) 和天然三倍体雌性虹鳟 (Thorgaard 与 Gall, 1979) 在正常鱼的产卵期间会继续增加体重。三倍体斑点叉尾鲷在 8 月龄时比二倍体重些和老练些 (Wolters 等, 1982b)。可是, 在雌性鲢与川鲮杂种, 到产卵期过去后两个月, 产卵后通过快速生长而得到补偿的二倍体在体重上与三倍体并没有重大差异。不过, 三倍体杂种的平均鱼片重量仍然比二倍体高得多 (Lincoln, 1981b)。这说明在评估三倍体的经济价值时, 其质量因子 (鱼片重量和鱼肉质量) 也必须考虑进去。例如 Wolters 等 (1982b) 发现三倍体雄性斑点叉尾鲷具有比

二倍体雄鱼小的头部, 这样在加工过程中浪费就少。

关于三倍体的鱼肉质量。据 Scott (1983) 报道, 英国农业、渔业与食品部罗斯托夫渔业研究所的科学研究工作者曾进行过一次别开生面的三倍体与二倍体鱼的品味试验。他们将虹鳟二倍体雄鱼、二倍体雌鱼、三倍体雄鱼与三倍体雌鱼分别编号, 由同一个人用同样的作料烹调成油烤鱼, 然后邀请 54 个包括从未尝过虹鳟、曾经尝过但次数不多以及经常食虹鳟的“顾客”进行品味试验。试验结果表明参加者比较偏爱三倍体雌鱼而最不喜欢二倍体雄鱼。据笔者所知, 最近他们又进行了类似的试验, 但所试的是鳊鱼。

对那些在性成熟时遭受损失的鱼类来说, 不育三倍体还可能比二倍体存活得更长久。在鲑鳟鱼类, 例如虹鳟在缺乏产卵支流的湖泊中遭受高的死亡率 (Purdom 与 Lincoln, 1973); 又如太平洋鲑鱼产卵后通常死亡。因此, 延长这些鱼类以及其它鱼类存活时间的可能性具有明显的吸引力, 值得很好研究。

结 束 语

综上所述, 人工诱导鱼类染色体突变, 获得多倍体个体是完全可能的, 其中应用最广泛的是温度刺激, 包括冷休克与热休克。但总的来说, 人工诱导三倍体比较容易, 而诱导四倍体的技术则尚未完全过关, 主要原因是难以掌握给予各种刺激的准确时间 (Purdom, 1972; Refstie, 1981; Chourrout, 1982)。四倍体预期是能育的, 但当它与正常的二倍体杂交时则可产生不育的三倍体。

由于处理并不一定成功, 因此寻求一个准确而又简便的方法来确定染色体的倍性就显得十分重要。目前所采用的鉴定倍性的方法各具优缺点, 显然还有进一步改进的必要。

鱼类三倍体对控制过度繁殖, 增加幼鱼生长速率以及延长成熟鱼的寿命与促进生长等都可能是有效的。三倍体的这些优点主要是三倍体不育性的结果而不是三倍体本身。因为不育性也可以用外科手术阉割 (Brown 与 Richards, 1979)、自体免疫阉割或称自体免疫性腺毁灭 (Laird 等, 1978, 1980) 以及用外源类固醇激素抑制性腺形成, 即所谓的激素绝育的方法 (Johnstone 等, 1979; Bye 与 Lincoln, 1981) 来达到。但这些方法没有一个被证明是成功的, 不是不可靠就是不能被用来大规模生产, 尤其是激素绝育, 在许多国家得不到政府与用户的认可, 难以推行。而人工生产不育的三倍体, 方法简单, 操作容易, 也无需专门设备, 对人体也没有什么不良影响。总之, 人工诱导三倍体的确具有激素绝育等所缺乏的、独一无二的不育杂种新类型的能力。虽然其经济效益目前还不如植物多倍体, 但仍不失为一种培育动物新品种的有效途径之一。

对于鲑鳟鱼类养殖来说, 由于现代的科学管理方法以及优质饵料的引进, 经济效益日益提高, 鱼肉质量也不断改善。但目前影响产卵量的主要问题是性成熟。它导致死亡率提高和生长率降低, 并严重影响产卵季节过后的商品鱼上市, 因为这个时候肉质和外观都很差。这在雄鱼以及生长在海水里的鱼类特别明显。诱导不育性不但可以去除这些弊病, 而且还可以把本来用于性腺发育的能量直接用于身体生长, 提高饵料转化系数, 从而提高产量。人工诱导三倍体固然可以控制性腺发育, 但越来越多的研究表明, 只有雌性三倍体是不育的, 而雄性三倍体却照常产生精子且当性成熟时出现正常的副性征。如果精巢生长不受染色体数目影响, 则生产三倍体雄鱼没有多大经济价值。最近, Lincoln 与 Scott (1983) 用热休克处理与雄性化雌鱼 (即遗传上的雌鱼、功能上的雄鱼) 精子受精的卵而产生不育的全雌三倍体虹鳟, 从而淘汰了雄性个体。这是鱼类多倍体育种的一个新的发展方向。

另外, 鱼类的种间杂交被广泛地应用于养殖生产实践。一般地说, 种间杂种生长快, 可以同时具有两个不同种的优良特性, 而且有时可能是不育的, 从而可以控制生殖。可是, 它往往表现出较低的成活率。许多学者研究表明, 诱导三倍性可以增加种间杂种的成活率, 三倍体种间杂种可以比二倍体杂种成活得好些。例如最近 Scheerer 等 (1983) 在用热休克诱导褐鳟、虹鳟以及溪红点鲑之间的不同杂交组合

三倍性的研究中发现,在大多数杂交组合中,三倍体杂种都表现出比二倍体杂种好得多的存活力,其中以三倍体虎鲮(褐鲮与溪红点鲑的杂种)的效果最好,在摄食开始时的鱼苗成活率平均为73.8%,而二倍体杂种仅为23.7%。由于三倍性在卵子受精后不久用温度休克或水静压处理比较容易获得,因此对增加鱼类杂种的成活率来说,诱导三倍性可能是一个行之有效的办法。

参 考 文 献

- [1] Allen, S. K. (1983). Flow cytometry: Assaying experimental polyploid fish and shellfish. *Aquaculture* 33(1-4), 317-328.
- [2] Allen, S. K. & Stanley, J. G. (1978) Reproductive sterility in polyploid brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Trans. Am. Fish. Soc.* 107(8), 478-478.
- [3] Allen, S. K. & Stanley, J. G. (1979). Polyploid mosaics induced by cytochalasin B in landlocked Atlantic salmon *Salmo salar*. *Trans. Am. Fish. Soc.* 108(5), 462-466.
- [4] Allen, S. K. & Stanley, J. G. (1981a). Polyploidy and gynogenesis in the culture of fish and shellfish. *Int. Council. Explor. Sea Coop. Res. Rep. Ser. B. C. M.* 1931/F: 2818pp.
- [5] Allen, S. K. & Stanley, J. G. (1981b). Mosaic polyploid Atlantic Salmon (*Salmo salar*) induced by cytochalasin B. *Rapp. p.-v. Reun. Cons. int. Explor. Mer.* 178, 509-510.
- [6] Allen, S. K. & Stanley, J. G. (1983). ploidy of hybrid grass carp x bighead carp determined by flow cytometry. *Trans. Am. Fish. Soc.* 112(3), 431-435.
- [7] Balsano, J. S., Darnell, R. M. & Abramoff, P. (1972). Electrophoretic evidence of triploidy associated with population of the gynogenetic teleost *Poecilia formosa*. *Copeia* 2, 292-297.
- [8] Barker, C. J., Beck, M. L. & Biggers, C. J. (1983). Hematologic and enzymatic analysis of *Ctenopharyngodon idella* x *Hypophthalmichthys nobilis* F₁ hybrids. *Comp. Biochem. physiol.* 74A(4), 915-918.
- [9] Beck, M. L., Biggers, C. J. & Dupree, H. K. (1980). Karyological analysis of *Ctenopharyngodon idella*, *Aristichthys nobilis*, and their F₁ hybrid. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109, 433-438.
- [10] Beck, M. L. & Biggers, C. J. (1982). Chromosomal investigation of *Ctenopharyngodon idella* x *Aristichthys nobilis* hybrids. *Experientia* 38, 319.
- [11] Beck, M. L. & Biggers, C. J. (1983). Erythrocyte measurements of diploid and triploid *Ctenopharyngodon idella* x *Hypophthalmichthys nobilis* hybrids. *J. Fish Biol.* 22(4), 497-502
- [12] Brown, L. A. & Richards, R. M. (1979). Surgical gonadectomy of fish: A technique for veterinary surgeons. *Vet. Rec.* 104, 215.
- [13] Bye, V. & Lincoln, R. (1979). Male trout—an expensive luxury. *Fish Farmer* 2(3), 19-20.
- [14] Bye, V. & Lincoln, R. (1981). Trout: get rid of the males and let the females prosper. *Fish Farmer* 4(8), 22-24
- [15] Capanna, E., Cataudella, S. & Volpe, R. (1974). Un ibrido intergenerico tra trota iridea e salmerino di fonte (*Salmo gairdneri* x *Salvelinus fontinalis*). *Boll. Pesca Piscic. Idrobiol.* 29, 101-106.
- [16] Carter, S. B. (1967). Effects of cytochalasin on mammalian cells. *Nature* 213, 261-264.
- [17] Cherfas, N. B. (1966). Natural triploidy in females of the goldfish (*Carassius auratus gibelio*). *Genetica* 12(5), 16-24.
- [18] Chourrout, D. (1980). Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Reprod. Nutr. Develop.* 20(3A), 727-733.
- [19] Chourrout, D. (1982). Tetraploidy induced by heat shocks in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Reprod. Nutr. Develop.* 22(3), 569-574.
- [20] Cimino, M. C. (1972). Meiosis in triploid all-female fish (*Poeciliopsis*, Poeciliidae). *Science* 175, 1484-1486.
- [21] Cimino, M. C. (1973). Karyotypes and erythrocyte size of some diploid and triploid fishes of the genus *Poeciliopsis*. *J. Fish. Res. Board Can.* 30(11), 1736-1737.

- [22] Cuellar, O. & Uyeno, T. (1972). Triploidy in rainbow trout. *Cytogenetics* 11(6), 508—515.
- [23] Dasgupta, S. (1962). Induction of triploidy by hydrostatic pressure in the leopard frog, *Rana pipiens*. *J. Exp. Zool.* 151, 105—121.
- [24] Eglitis, M. A. (1980). Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethylene glycol. *J. Exp. Zool.* 213, 309—313.
- [25] Fankhauser, G. & Griffiths, R. B. (1939). Induction of triploidy and haploidy in the newt *Triturus viridescens*, by cold treatment of unsegmented eggs. *Pro. Nat. Acad. Sci. Wash.* 25, 233—238.
- [26] Fankhauser, G. & Humphrey, R. R. (1959). The origin of spontaneous heteroploids in the progeny of diploid, triploid and tetraploid axolotl females. *J. Exp. Zool.* 142, 379—421.
- [27] Gervai, J., Peter, S., Nagy, A., Horvath, L. & Csanyi, V. (1980). Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.* 17(6), 667—671.
- [28] Gillespie, L. L. & Armstrong, J. B. (1979). Induction of triploid and gynogenetic diploid axolotls (*Ambystoma mexicanum*) by hydrostatic pressure. *J. Exp. Zool.* 210, 117—122.
- [29] Gillespie, L. L. & Armstrong, J. B. (1980). production of androgenetic diploid axolotls by suppression of first cleavage. *J. Exp. Zool.* 213, 423—425.
- [30] Gold, J. R. & Avise, J. C. (1976). Spontaneous triploidy in the California roach, *Hesperoleucus symmetricus* (Pisces: Cyprinidae). *Cytogenet. Cell Genet.* 17, 144—149.
- [31] Grammeltvedt, A-F. (1974). A method of obtaining chromosome preparation from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by leukocyte culture. *Norw. J. Zool.* 22, 129—134.
- [32] Hoorabeek, F. K. & Burke, P. M. (1981). Induced chromosome number variation in the winter flounder. *J. Hered.* 72, 189—192.
- [33] Hubbs, C. L. & Hubbs, L. C. (1932). Apparent parthenogenesis in nature, in a form of fish of hybrid origin. *Science* 76, 628—630.
- [34] Hunter, G. A., Donaldson, E. M., Geetz, F. W. & Edgell, P. F. (1982). production of all female and sterile groups of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), and experimental evidence for male heterogamety. *Trans. Am. Fish. Soc.* 111, 367—372.
- [35] Johnstone, R., Simpson, T. H., Youngson, A. F. & Whitehead, C. (1979). Sex reversal in salmonid culture. part II. The progeny of sex-reversed rainbow trout. *Aquaculture* 18, 13—19.
- [36] Krishan, A. (1972). Cytochalasin B: time-lapse cinematographic studies on its effect on cytokinesis. *J. Cell Biol.* 54, 657—664.
- [37] Kabayasi, H. (小林弘), Kawashima, Y. (川岛康代) & Takeuchi, N. (竹内直政) (1970). Comparative chromosome studies in the genus *Carassius*, especially with a finding of polyploidy in the ginbuna (*C. auratus longsdorffii*). *Jpn. J. Ichthyol.* 17(4), 153—160.
- [38] Kobayasi, H. (小林弘), Ochi, H. (越智尚子) & Takeuchi, N. (竹内直政) (1973). Chromosome studies in the genus *Carassius*: Comparison of *C. auratus grandoculis*, *C. auratus buergeri*, and *C. auratus longsdorffii*. *Japan. J. Ichthyol.* 20(1), 7—12.
- [39] Laird, L. M., Ellis, A. E., Wilson, A. R. & Holliday, F. G. T. (1973). The development of the gonadal and immune systems in the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and a consideration of the possibility of inducing autoimmune destruction of the testis. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 13(4), 1101—1106.
- [40] Laird, L. M., Wilson, A. R. & Holliday, F. G. T. (1980). Field trials of a method of induction of autoimmune gonad rejection in Atlantic salmon (*salmo salar* L.) *Repro. Nutr. Develop.* 20 (6), 1781—1788
- [41] Lemoine, H. L. & Smith, L. T. (1980). Polyploidy induced in brook trout by cold shock *Trans. Am. Fish. Soc.* 109, 626—631.
- [42] Lincoln, R. F. (1976). Studies on induced polyloidy in fish. *PhD. Thesis, Univ. East Anglia, UK.* 156 pp.
- [43] Lincoln, R. F. (1981a). Sexual maturation in triploid male plaice (*Pleuronectes platessa*) and

- plaice x flounder (*Platichthys flesus*) hybrids. *J. Fish Biol.* 19, 415—426.
- [44] Lincoln, R. F. (1981b). Sexual maturation in female triploid plaice, *Pleuronectes platessa*, and plaice x flounder, *Platichthys flesus*, hybrid. *J. Fish Biol.* 19, 499—507.
- [45] Lincoln, R. F. (1981c). The growth of female diploid and triploid plaice (*Pleuronectes platessa* x flounder (*Platichthys flesus*) hybrids over one spawning season. *Aquaculture* 25, 259—268.
- [46] Lincoln, R. F., Aulstad, D. & Grammeltvedt, A. (1974). Attempted triploid induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using cold shocks. *Aquaculture* 4, 287—297.
- [47] Lincoln, R. F. & Bye, V. (1980). Triploid rainbows—nature's mistake could be the fish of the future. *Fish Farmer* 3(4), 46.
- [48] Lincoln, R. F. & Scott, A. P. (1983). production of all-female triploid rainbow trout. *Aquaculture* 30, 375—380.
- [49] Lindsley, D. L., Fankhauser, G. & Humphrey, R. R. (1956). Mapping centromeres in the axolotl. *Genetics* 41, 58—64.
- [50] Liu, S. M. (刘秀美), Sezaki, K. (瀬崎啓次郎), Hashimoto, K. (橋本属久), Kobayashi, H. (小林弘) & Nakamura, M. (中林守纯) (1978). Simplified techniques for determination of polyploidy in ginbuna *Carassius auratus langsdorfi*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 44(6), 601—606.
- [51] Lou, Y. D. (楼允东) & Purdom, C. E. (1984a). Diploid gynogenesis induced by hydrostatic pressure in rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 24(6), 665—670.
- [52] Lou, Y. D. (楼允东) & Purdom, C. E. (1984b). Polyploidy induced by hydrostatic pressure in rainbow trout. *J. Fish Biol.*, in press.
- [53] Makino, S. (牧野佐二郎) & Ozima, Y. (小島吉雄) (1943). Formation of the diploid egg nucleus due to suppression of the second maturation division, induced by refrigeration of fertilized eggs of the carp, *Cyprinus carpio*. *Cytologia, Tokyo* 13, 55—60.
- [54] Marián, T. & Krasznai, Z. (1978). Kariological investigation on *Ctenopharyngodon idella* and *Hypophthalmichthys nobilis* and their cross-breeding. *Aquaculture Hungarica* I, 44—50.
- [55] Muller, H. J. (1925). Why polyploidy is rarer in animals than in plants. *Am. Nat.* 59, 346—353.
- [56] Ojima, Y. (小島吉雄) & Makino, S. (牧野佐二郎) (1978). Triploidy induced by cold shock in fertilized eggs of the carp. *Proc. Japan Acad.* 54, Ser. B, 359—362.
- [57] Ojima, Y. (小島吉雄) & Takai, A. (高井明徳) (1979). The occurrence of spontaneous polyploidy in the Japanese common loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Proc. Japan Acad.* 55, 487—491.
- [58] Pedersen, R. A. (1971). DNA content, ribosomal gene multiplicity, and cell size in fish. *J. Exp. Zool.* 177, 65—78.
- [59] Purdom, C. E. (1972). Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) and its hybrid with the flounder (*Platichthys flesus*). *Heredity* 29(1), 11—24.
- [60] Purdom, C. E. (1976). Genetic techniques in flatfish culture. *J. Fish. Res. Board Can.* 33(4), 1088—1093.
- [61] Purdom, C. E. (1983). Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture* 33(1-4), 287—300.
- [62] Purdom, C. E. & Lincoln, R. F. (1973). Chromosome manipulation in fish. In "Genetics and Mutagenesis of Fish" (ed by J. H. Schroeder), Springer-Verlag, Berlin, 83—89.
- [63] Purdom, C. E., Thompson, D. & Dando, P. R. (1976). Genetic analysis of enzyme polymorphisms in plaice (*Pleuronectes platessa*). *Heredity* 37(2), 193—206.
- [64] Rasch, E. M., Darnell, R. M., Kallman, K. D. & Abramoff, P. (1965). Cytophotometric evidence for triploidy in hybrids of the gynogenetic fish, *Pocilia formosa*. *J. Exp. Zool.* 160(2), 155—170.
- [65] Refstie, T. (1981). Tetraploid rainbow trout produced by cytochalasin B. *Aquaculture* 25(1), 51—58.
- [66] Refstie, T., Stoss, J. & Donaldson, E. N. (1982). Production of all female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by diploid gynogenesis using irradiated sperm and cold shock. *Aquaculture* 29,

67—82.

- [67] Refstie, T., Vassvik, V. & Gjedrem, T. (1977). Induction of polyoidy in salmonids by cytochalasin B. *Aquaculture* 10, 65—74.
- [68] Reinschmidt, D. C., Simon, S. T., Volpe, E. P. & Tompkins, R. (1979). Production of tetraploid and homozygous diploid amphibians by suppression of first cleavage. *J. Exp. Zool.* 210, 137—143.
- [69] Scheerer, P. D. & Thorgaard, G. H. (1983). Increased survival in trout hybrids by induced triploidy. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40, 2040—2044.
- [70] Schultz, R. J. (1967). Gynogenesis and triploidy in the viviparous fish *Poeciliopsis*. *Science* 157, 1564—1567.
- [71] Schultz, R. J. (1969). Hybridization, unisexuality and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. *Am. Nat.* 103, 605—609.
- [72] Schultz, R. J. (1980). Role of polyploidy in the evolution of fish. In "Polyploidy: Biological Relevance" (ed by W. H. Lewis), Plenus Press, New York, 313—340.
- [73] Schultz, R. J. & Kallman, K. D. (1968). Triploid hybrids between the all-female teleost *Poecilia formosa* and *Poecilia Sphenops*. *Nature* 219, 280—282.
- [74] Scott, A. P. (1983) Trout tasting trial. *MAFF Directorate of Fisheries Research Newsletter*, Dec 1982 and Jan 1983, 13—15.
- [75] Sezaki, K. (瀬崎啓次郎) & Kobayasi, H. (小林弘) (1978). Comparison of erythrocytes size between diploid and tetraploid in spinous loach, *Cobitis biwae*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 44 (8), 851—854.
- [76] Sezaki, K. (瀬崎啓次郎), Kobayasi, H. (小林弘) & Nakamura, M. (中林守純) (1977). Size of erythrocytes in the diploid and triploid specimens of *Carassius auratus langsdorfi*. *Japanese Journal of Ichthyology* 24(2), 135—140.
- [77] Sezaki, K. (瀬崎啓次郎), Watabe, S. (渡部终五) & Hashimoto, K. (桥本周久) (1983). A comparison of chemical composition between diploids and triploids of "ginbuna" *Carassius auratus langsdorfi*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 49(1), 97—101.
- [78] Smith, L. T. & Lemoine, H. L. (1979). Colchicine-induced polyploidy in brook trout. *Prog. Fish-cult.* 41(2), 86—88.
- [79] Stanley, J. G. (1976). Production of hybrid, androgenetic, and gynogenetic grass carp and common carp. *Trans. Am. Fish. Soc.* 105(1), 10—16.
- [80] Stanley, J. G. (1979). Control of sex in fishes, with special reference to the grass carp. In "Proceedings of the Grass Carp Conference" (ed. by J. V. Shireman), Univ. of Florida, Gainesville, 201—242.
- [81] Stanley, J. G. (1981). Manipulation of developmental events to produce monosex and sterile fish. *Rapp. p.-v. Reun. int. Explor. Mer.* 178, 485—491.
- [82] Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D. & Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature, Lond.* 291, 293—296.
- [83] Svardson, G. (1945). Chromosome studies on Salmonidae. Medd. Undersokn Anst. Satvattens-fisk, Stockh. 23, 1—151.
- [84] Swarup, H. (1956). Production of heteroploidy in the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* (L). *Nature, Lond.* 178, 1124—1125.
- [85] Swarup, H. (1957). The production and effects of triploidy in the 3-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* (L). *PhD. Thesis*, Oxford University.
- [86] Swarup, H. (1959a). Production of triploidy in *Gasterosteus aculeatus* (L). *J. Genet.* 56, 129—142.
- [87] Swarup, H. (1959b). Effect of triploidy on the body size, general organisation and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* (L). *J. Genet.* 56, 143—155.
- [88] Thorgaard, G. H. (1983). Chromosome set manipulation and sex control in fish. In "Fish physiology" Vol. 9, Part B (ed. by W. S. Hoar, D. J. Randall & E. M. Donaldson), Academic

Press, London, 405—434.

- [89] Thorgaard, G. H. & Gall, G. A. E. (1979). Adult triploids in a rainbow trout family. *Genetics* 93(4), 961—973.
- [90] Thorgaard, G. H., Jazwin, M. E. & Stier, A. R. (1981). Polyloidy induced by heat shock in rainbow trout *Trans. Am. Fish. Soc.* 110, 546—550.
- [91] Thorgaard, G. H., Rabinovitch, P. S., Shen, M. W., Gall, G. A. E., Propp, J. & Utter, F. M. (1982). Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. *Aquaculture* 29, 305—309.
- [92] Utter, F. M., Johnson, O. W., Thorgaard, G. H. & Rabinovitch, P. S. (1983). Measurement and potential applications of induced triploidy in Pacific salmon. *Aquaculture* 35, 125—135.
- [93] Valenti, R. J. (1975). Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. *J. Fish Biol.* 7, 519—528.
- [94] Vasetskii, S. G. (1967). Changes in the ploidy of sturgeon larvae induced by heat treatment of eggs at different stages of development. *Dokl. Biol. Sci.* 172, 23—26.
- [95] Vasilev, V. P., Makeeva, A. P. & Ryabov, I. N. (1975). Triploidy of hybrids of carp with other representatives of the family Cyprinidae. *Soviet Genetics* 11(8), 980—985.
- [96] Whitt, G. S., Childers, W. F. & Cho, P. L. (1973). Allelic expression at enzyme loci in an intertribal hybrid sunfish. *J. Hered.* 64, 54—61.
- [97] Winkler, H. (1916). Über die experimentelle Erzeugung von P flanzan mit abweichenden Chromosomenzahlen. *Z. Bot.* 8, 417—531.
- [98] Wolters, W. R., Libey, G. S. & Chrisman, C. L. (1981a). Induction of triploidy in channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 110(2), 310—312.
- [99] Wolters, W. R., Chrisman, C. L. & Libey, G. S. (1981b). Lymphocyte culture for chromosomal analyses of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Copeia* 2, 503—504.
- [100] Wolters, W. R., Chrisman, C. L. & Libey, G. S. (1982a). Erythrocyte nuclear measurements of diploid and triploid channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Fish Biol.* 20(3), 253—258.
- [101] Wolters, W. R., Libey, G. S. & Chrisman, C. L. (1982b). Effect of triploidy on growth and gonad development of channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 111(1), 102—105.