

# 用雄核发育方法制备改良异源四倍体鲫鱼群体

段巍<sup>†</sup> 覃钦博<sup>†</sup> 陈松<sup>†</sup> 刘少军\* 王静 张纯 孙远东 刘筠

(湖南师范大学生命科学学院 教育部蛋白质化学与鱼类发育生物学重点实验室, 长沙 410081)

**摘要** 用 UV 照射金鱼的卵子使其卵核的遗传物质失活, 再与异源四倍体鲫鱼(AT)产生的二倍体精子受精, 在无雄核染色体加倍处理情况下, 成功地获得了两性可育的二倍体雄核发育鱼(A<sub>0</sub>)。II 龄性成熟的 A<sub>0</sub> 自交形成了雄核发育鱼自交子一代(A<sub>1</sub>)。本研究对 10 月龄 A<sub>1</sub> 的染色体数目、性腺的显微和亚显微结构以及外型特征进行了观察, 实验结果表明: (i) A<sub>1</sub> 中包含有四倍体(A<sub>1</sub>-4n)、三倍体(A<sub>1</sub>-3n)以及二倍体后代(A<sub>1</sub>-2n), 他们所占比例分别为 85%, 10%和 5%, 其染色体数目分别为 4n=200, 3n=150 和 2n=100。其中四倍体和三倍体的形成证明二倍体 A<sub>0</sub> 能产生二倍体配子。二倍体雄核发育鲫鱼杂交鱼产生二倍体配子的原因与早期生殖细胞的核内复制机制有关。(ii) A<sub>1</sub>-4n 的性腺为两性型且发育正常。其中雄性个体能挤出白色精液, 其中的二倍体精子头部明显比红鲫的单倍体精子头部大。这些二倍体精子具有正常结构, 由头部和尾部组成, 头部与尾部交接处有多个线粒体, 精子尾巴的中央轴有典型的“9+2”微管结构。A<sub>1</sub>-4n 雌性个体的卵巢发育饱满, 其中含有大量 II, III 和 IV 时相的卵母细胞。在 IV 时相卵母细胞的放射膜上能观察到受精孔。同时期的 A<sub>1</sub>-2n, A<sub>1</sub>-3n 的性腺发育异常, 均表现为不育。A<sub>1</sub>-2n 的不育性与其为远源杂交二倍体有关, A<sub>1</sub>-3n 的不育性与其为远源杂交三倍体有关。(iii) 与 AT 相比, A<sub>1</sub>-4n 不仅具有生长速度快、抗逆性强的优点, 而且在外型上具有体背高、尾柄短、头部小等优良性状。本实验说明运用雄核发育技术不仅能获得两性可育的四倍体鱼, 而且能对异源四倍体鲫鱼进行有效的遗传改良, 这在细胞遗传研究和鱼类育种方面都具有重要意义。

**关键词** 异源四倍体鲫鱼 二倍体精子 单倍体卵子 雄核发育 雄核发育二倍体

通过十多年的研究, 我们在世界上首次研制成功两性可育的异源四倍体鲫鱼(4n=200)群体。该四倍体鱼群体已连续繁育了 14 代(F<sub>3</sub>~F<sub>16</sub>), 形成了一个四倍体性能代代相传、遗传性状稳定的四倍体鱼新种群, 这是世界上唯一人工培育的两性可育的异源四倍体鱼群体 [1-6], 在生物进化和鱼类育种方面都有重要意义。在二倍体配子的生物学特性研究方面, 我们

已开展了一系列研究工作 [1-9]。如在二倍体卵子的研究方面, 刘少军等人 [2] 用灭活的散鳞镜鲤精子诱导异源四倍体鲫鱼产生的二倍体卵子, 无需雌核加倍, 成功获得了雌核发育二倍体鲫鱼杂交鱼(简称 G<sub>1</sub>)。非常有趣的是 G<sub>1</sub> 也能产生大量二倍体卵子, 在无需雌核加倍处理情况下, 通过雌核发育形成了第二代雌核发育二倍体鲫鱼杂交鱼(G<sub>2</sub>), G<sub>2</sub> 以同样的方法形成了

收稿日期: 2007-03-17; 接受日期: 2007-05-30

国家杰出青年科学基金(批准号: 30725028)、国家自然科学基金重点项目、面上项目(批准号: 30330480, 30571444)、教育部高等学校博士学科专项科研基金(批准号: 200405422001)、教育部长江学者和创新团队基金(批准号: IRT0445)、科技部农业科技成果转化基金(批准号: 2005380)和湖南省重点攻关课题(批准号: 2006NK2008)资助项目

<sup>†</sup> 同等贡献

\* 联系人, E-mail: [lsj@hunnu.edu.cn](mailto:lsj@hunnu.edu.cn)

$G_3$ , 这样形成了一个能产生大量二倍体卵子的雌核发育二倍体鲫鲤杂交克隆品系( $G_1G_2G_3$ )<sup>[3]</sup>. 在二倍体精子研究方面, 孙远东等人<sup>[4]</sup>用异源四倍体鲫鲤产生的二倍体精子与遗传物质失活的金鱼单倍体卵子受精, 无需雄核加倍, 成功诱导出两性可育的二倍体雄核发育后代( $A_0$ ). 在本研究中, II 龄性成熟的 $A_0$  自交, 在 $A_1$  中获得两性可育的 $A_1-4n$  和不育的 $A_1-3n$ , 证明 $A_0$  与 $G_1$ ,  $G_2$  一样也能产生二倍体配子, 不同的是 $G_1$ ,  $G_2$  只能产生二倍体卵子, 而雌性 $A_0$  和雄性 $A_0$  能分别产生二倍体卵子和二倍体精子, 两者受精形成了新型的四倍体鲫鲤( $A_1-4n$ ). 这种四倍体鱼不仅具有生长速度快、抗逆性强等优良特性, 而且在外型上有了显著改良, 具体表现为体背高、尾柄短、头部小. 至今还没有发现通过雄核发育获得四倍体鱼的报道. 生长快、体型好的新型四倍体鱼的形成将丰富现有四倍体鱼种类, 在生物进化和鱼类育种方面都有重要意义.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

雄核发育二倍体鲫鲤杂交鱼(简称 $A_0$ )的制备过程见我们以前的相关报道<sup>[4]</sup>. 本实验中 $A_0$  和其自交后代(简称 $A_1$ )以及对对照的异源四倍体鲫鲤和红鲫均取自教育部“多倍体鱼繁殖与育种技术”工程研究中心.

### 1.2 实验方法

在2006年繁殖季节(4~5月), 挑选成熟度好的 $A_0$  (雌、雄各15尾), 用人工授精方法混合其精液和卵子, 受精卵在培养皿中孵化, 水温为 $20\pm 2^\circ\text{C}$ , 2~3天后脱膜, 将所有鱼苗养于 $150\text{ m}^2$ 的水泥池中.

#### (1) 染色体数目的检测

随机选取 $A_1$  40尾(10月龄)进行染色体检测, 在 $18\sim 22^\circ\text{C}$ 水温下培育实验鱼1~3天后, 对实验鱼注射植物血凝素1~3次, 每次剂量为 $2\sim 8\ \mu\text{g/g}$ 体重, 间隔时间为12~24 h, 在解剖取材前2~6 h, 注射秋水仙素, 剂量为 $2\sim 4\ \mu\text{g/g}$ 体重; 取出肾组织, 在生理盐水下碾磨, 在 $20^\circ\text{C}$ 温度下用 $0.075\ \text{mol/L}$  KCl低渗处理40~60 min; 然后用冰醋酸:甲醇(1:3)固定肾细胞1~3次; 在冰冻载玻片上滴片, Giemsa染色, 在显微镜下观察其染色体的形态和数目, 每尾鱼取50个分裂相并统

计其染色体数的分布情况.

#### (2) $A_1-4n$ 的精子外型显微观察

肾细胞取材之前用手挤实验鱼的腹部, 有的实验鱼能挤出卵子或精液(后经染色体检测为雌性四倍体和雄性四倍体), 有的实验鱼不能挤出卵子或精液(后经染色体检测为三倍体和二倍体). 用干净的吸管吸取刚刚挤出的精液, 放入预冷的2.5%的戊二醛中, 以 $2000\times g$ 低速离心1 min, 收集的沉淀用冷的4%的戊二醛固定过夜, 再用1%的锶酸固定2 h, 各级酒精脱水、滴片、空气干燥、离子溅射镀金, JFC-1600扫描电子显微镜观察.

#### (3) 形态特征的测量

肾细胞取材之前采用传统的测量方法<sup>[10]</sup>对实验鱼的全长、体长、头长、尾柄长、尾柄高、体高、头高等可量性状(精确到0.1 cm)进行测量; 还对实验鱼的背鳍条、腹鳍条、臀鳍条、侧线鳞、侧线上鳞、侧线下鳞、有无口须等可数性状进行计数, 并求出其平均值.

#### (4) 性腺的显微和亚显微结构观察

肾细胞取材同时, 取部分性腺组织, 用 Bouin's 液进行固定, 系列酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 连续切片厚度为 $6\sim 8\ \mu\text{m}$ , HE染色, 中性树胶封片, Olympus显微镜镜检并对部分材料进行显微摄影. 另取部分性腺用3%戊二醛在 $4^\circ\text{C}$ 的条件下固定4~10 h小时, 样品用磷酸缓冲液冲洗2次, 后固定于1%锶酸中, 丙酮脱水, Epon812包埋, 超薄切片厚度 $0.04\sim 0.07\ \mu\text{m}$ , 醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, 日本JEM-1230透射电子显微镜观察.

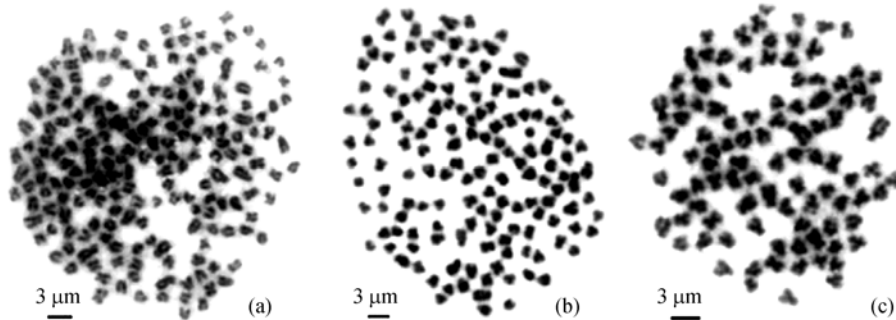
## 2 实验结果

### 2.1 染色体数目及倍性分析

$A_1$ 长到10月龄以后, 共获得存活的 $A_1$ 8000多尾. 对随机选取的40尾 $A_1$ 进行染色体观察的结果见表1. 其中 $A_1-4n$ 染色体众数值分布在195~200范围内, 其所占比例为96.47%, 证明它们是四倍体( $4n=200$ )(图1(a)), 该结果与其他有关 $F_3\sim F_{11}$ 四倍体鲫鲤染色体数目结果一致.  $A_1-3n$ 染色体众数值分布在145~150范围内, 其所占比例为97.5%, 证明它们是三倍体( $3n=150$ )(图1(b)).  $A_1-2n$ 染色体众数值分布在95~100范围内, 所占比例为96%, 表明它们是二倍体( $2n=100$ )(图1(c)).

表 1  $A_1-4n$ ,  $A_1-3n$ ,  $A_1-2n$  的染色体分布情况

鱼种	鱼的数目	分裂相数目	染色体分布						
			<95	95~100	<145	145~150	<195	195~200	>200
$A_1-4n$	34	1700					60	1640	
$A_1-3n$	4	200			5	195			
$A_1-2n$	2	100	4	96					

图 1  $A_1-4n$ ,  $A_1-3n$  以及  $A_1-2n$  的染色体(a)  $A_1-4n$  的染色体,  $4n=200$ ; (b)  $A_1-3n$  的染色体,  $3n=150$ ; (c)  $A_1-2n$  的染色体,  $2n=100$ 

## 2.2 外形特征

结合染色体检测, 我们发现  $A_1$  中的四倍体(图 2(a))、三倍体(图 2(b))和二倍体后代(图 2(c))在外形上也存在一定差异.  $A_1-4n$  有两对很短的口须而  $A_1-3n$ 、 $A_1-2n$  没有口须.  $A_1-4n$  的体侧扁, 近似纺锤形, 被圆鳞, 背部青灰色, 腹部黄白色, 而  $A_1-3n$  与  $A_1-2n$  的背部颜色分别为银白色和灰色. 所以, 通过外形特征的差别能很容易地将它们区分开.

## 2.3 可数性状和可量性状分析

表 2 和表 3 分别列出了  $A_1$  中三种不同倍性的鱼、异源四倍体鲫鲤(AT)和红鲫的可量比例性状和可数性状. 从表中可以看出, 与异源四倍体鲫鲤相比,  $A_1-4n$  在外型上有了显著的改良, 其中在体高/体长、尾柄高/尾柄长、头高/体高方面尤为突出, 充分体现了  $A_1-4n$  体背高、尾柄短、头部小的优良性状.

## 2.4 性腺显微结构观察

结合染色体检测结果, 发现凡是 10 月龄雄性  $A_1-4n$  都能挤出白色精液, 凡是 10 月龄雌性  $A_1-4n$  都能挤出卵子. 相反, 10 月龄  $A_1-2n$  和  $A_1-3n$  都不能挤出任何生殖细胞.  $A_1-4n$  的精巢位于鳃腹两侧, 左右对称, 外表呈乳白色, 它们由许多精细小管组成, 精细小管间分布有体积较小的间质细胞, 在精细小管

内可以观察到精原细胞、精母细胞、精子细胞和大量的成熟精子(图 3(a));  $A_1-4n$  的卵巢位于鳃腹两侧, 左右对称, 发育饱满, 外表呈浅黄色, 血管密布, 肉眼能看清卵粒; 10 月龄的卵巢处于 III 期向 IV 期过渡时期, 其中含有大量 II、III 和 IV 时相的卵母细胞, IV 时相的卵母细胞中充满了卵黄颗粒(图 3(c)), 在高倍显微镜下可以清楚地看到卵母细胞外有 2 层滤泡细胞, 滤泡细胞内有较厚的放射膜, 在放射膜上能观察到受精孔(图 3(d)).

在  $A_1-3n$  中发现 2 种类型的性腺: (1)卵巢型, 性腺呈浅黄色, 固定后呈花瓣状的分叶, 卵巢的大部分被发育程度不高、体积较小的卵原细胞样细胞占据, 其中有些细胞内出现空泡状结构, 呈现出退化的特征(图 3(e)); (2)精巢型, 性腺呈白色, 剪刀剪开没有精液流出, 而同时期的  $A_1-4n$  和红鲫的精巢剪破后有精液流出, 这样的精巢主要由许多精细小管组成, 有的精细小管内没有精子细胞, 有的精细小管内可见一些精子细胞, 但这些精子细胞的形状不规则, 外表面轮廓不清晰, 呈现退化解体现象, 没有观察到成熟精子(图 3(f)).  $A_1-2n$  的卵巢处于卵原细胞的增殖时期, 卵巢内大部分是发育程度不高、体积较小的卵原细胞, 未见明显的卵母细胞.  $A_1-2n$  的精巢看不到明显的精细小管结构, 精巢内绝大部分是分散的精原细胞和少量的精子细胞, 没有成熟的精子.

### 2.5 成熟性腺的超显微结构观察

10月龄  $A_1-4n$  的成熟精巢由许多小叶组成, 每个小叶内充满了成熟精子(图4(a)), 在小叶中还有精原细胞和精子细胞.  $A_1-4n$  产生的精子由头部和尾部组成, 头部外周有膜包围, 其内充满了致密核物质(图4(b)), 头部与尾部交接处有多个线粒体(图4(c)), 精子尾巴的中央轴有典型的“9+2”微管结构, 即中央为

2个单体微管, 外围为9个二联体微管(图4(d)). 精子细胞的大部分被细胞核所占有, 细胞质内的细胞器较少. 支持细胞附着在精原细胞旁边, 其细胞质内可见一些醒目的、大小不一的颗粒物质(图4(e)). 精原细胞质内可观察到核糖体、内质网、线粒体和电子致密物质, 电子致密物常出现在细胞膜附近并与线粒体一起形成复合体(图4(f)).

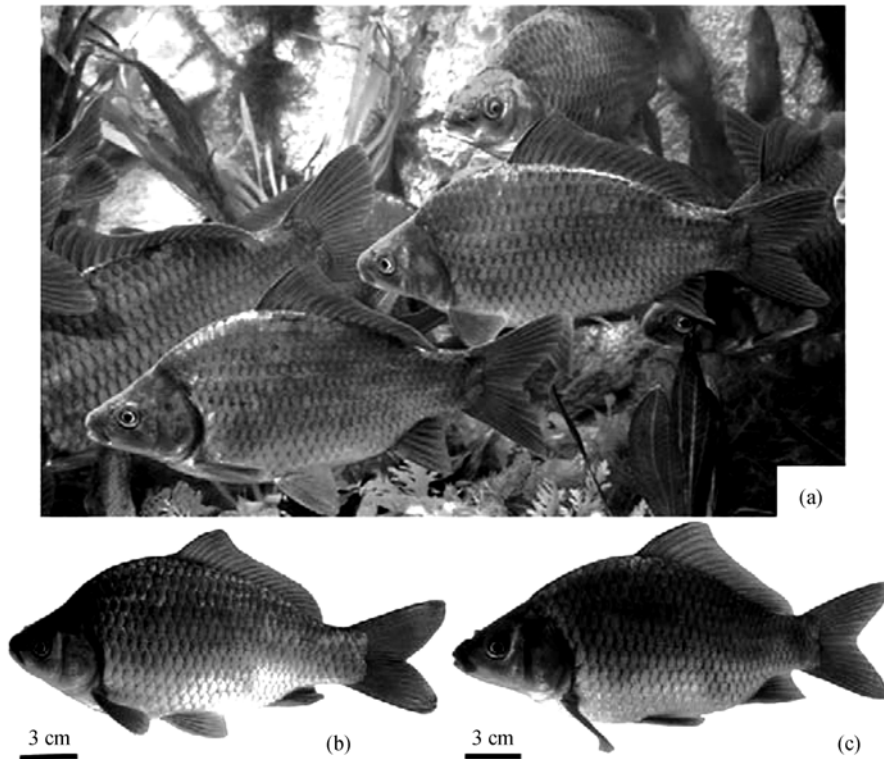


图 2  $A_1$  的外型

(a)  $A_1-4n$  群体的外型图; (b)  $A_1-3n$  的外型图; (c)  $A_1-2n$  的外型图

表 2  $A_1-4n$ ,  $A_1-3n$ ,  $A_1-2n$ , AT 以及红鲫的可量比例性状

	体长/全长	体高/体长	头长/体长	头高/头长	尾柄高/尾柄长	头高/体高
$A_1-4n$	0.81	0.42	0.25	0.90	1.05	0.55
$A_1-3n$	0.82	0.43	0.26	0.81	0.99	0.52
$A_1-2n$	0.82	0.41	0.26	0.88	1.07	0.56
AT	0.80	0.37	0.28	0.80	0.95	0.83
红鲫	0.82	0.46	0.27	0.93	1.20	0.54

表 3  $A_1-4n$ ,  $A_1-3n$ ,  $A_1-2n$ , AT 以及红鲫的可数性状

	侧线鳞	侧线上鳞	侧线下鳞	背鳍条	腹鳍条	臀鳍条	口须
$A_1-4n$	30~32	5~6	6~7	III+18~19	8~9	III+6~7	2对
$A_1-3n$	31~32	5~6	6~7	III+17~18	8~9	III+6~7	无
$A_1-2n$	31~32	5~7	6~7	III+18~19	7~9	III+6	无
AT	30~34	5~7	5~8	III+17~18	7~9	III+6	2对
红鲫	28~30	5~6	5~6	III+18~19	8~9	III+5~6	无

III代表硬鳍条的数目

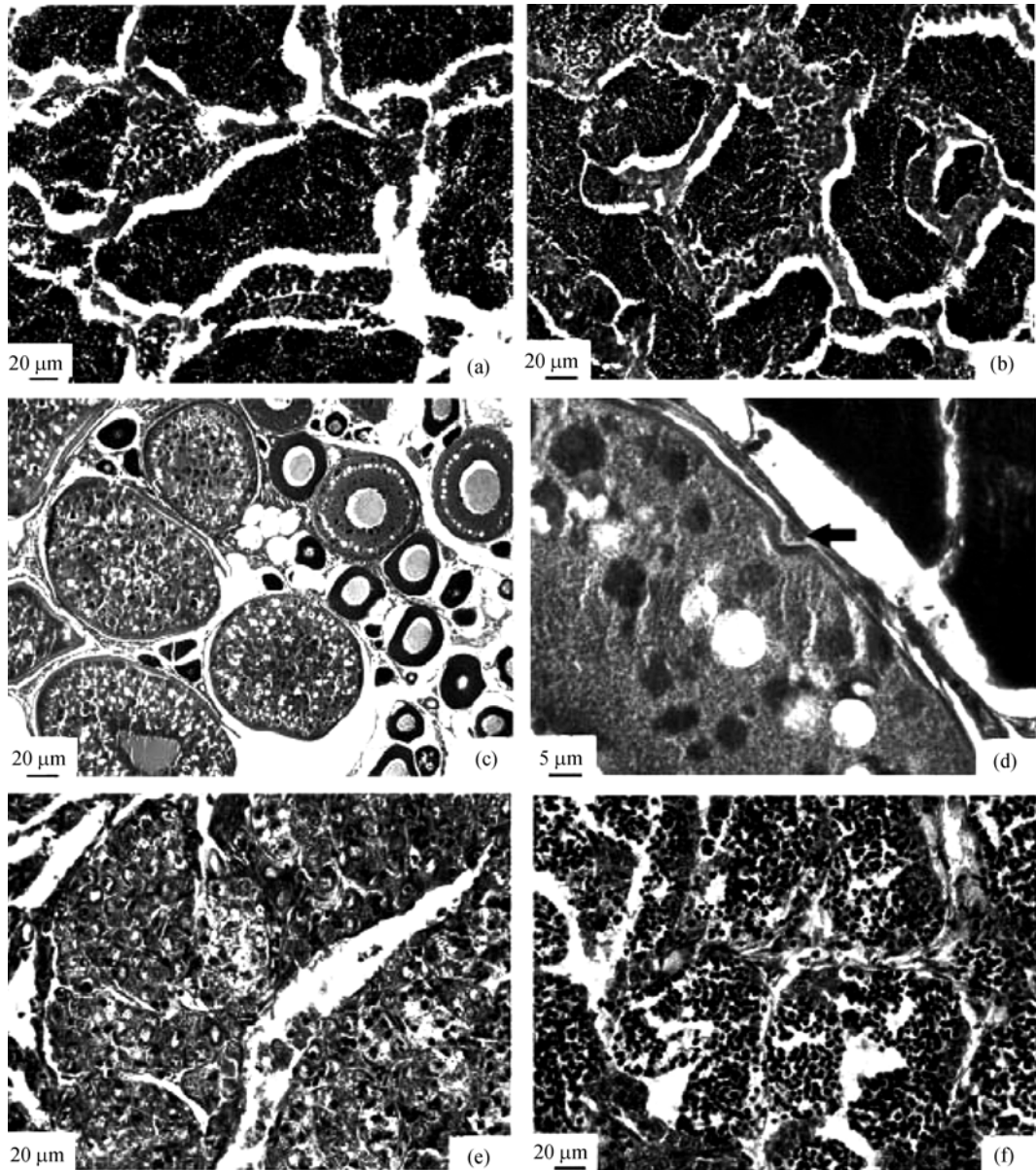


图 3  $A_1-4n$  与  $A_1-3n$  的性腺结构

(a)  $A_1-4n$  的精巢结构; (b) 红鲫精巢; (c)  $A_1-4n$  的卵巢, 示卵质中充满卵黄颗粒; (d)  $A_1-4n$  的卵巢, 箭头示受精孔; (e)  $A_1-3n$  的卵巢; (f)  $A_1-3n$  的精巢

$A_1-4n$  的卵巢内主要包括 II、III 和 IV 时相的卵母细胞, IV 时相的卵母细胞外围有内、外两层滤泡细胞包围。外层的滤泡细胞为一些平细胞, 细胞核占据细胞的大部分空间, 细胞质所占比例较小; 内层滤泡细胞的形态不规则, 细胞质朝卵子方向伸出一些微绒毛(图 5(a)), 在内层滤泡细胞之内, 卵黄膜之外, 有一层染色比卵黄膜浅的透明带。卵黄膜中都有许多孔道, 孔道内有许多微绒毛穿过, 微绒毛一直延伸到细胞质内。细胞质内的卵黄分为 2 种, 一种卵黄块是

处在囊泡结构内, 卵黄和囊泡之间存在空隙; 另一种卵黄块没有囊泡, 卵黄直接和细胞质相接(图 5(c))。IV 时相的卵母细胞的细胞质内充满了卵黄, 但是在卵黄颗粒周围仍分布有丰富的内质网样结构(图 5(d))。

对  $A_1-4n$  和红鲫的精子进行扫描电子显微镜观察, 发现  $A_1-4n$  的精子头部明显比红鲫的精子头部大, 红鲫的单倍体精子头径为  $1.90 \mu\text{m}$  左右(图 6(a), (c)),  $A_1-4n$  的二倍体精子头径为  $2.4 \mu\text{m}$  左右(图 6(b), (d))。



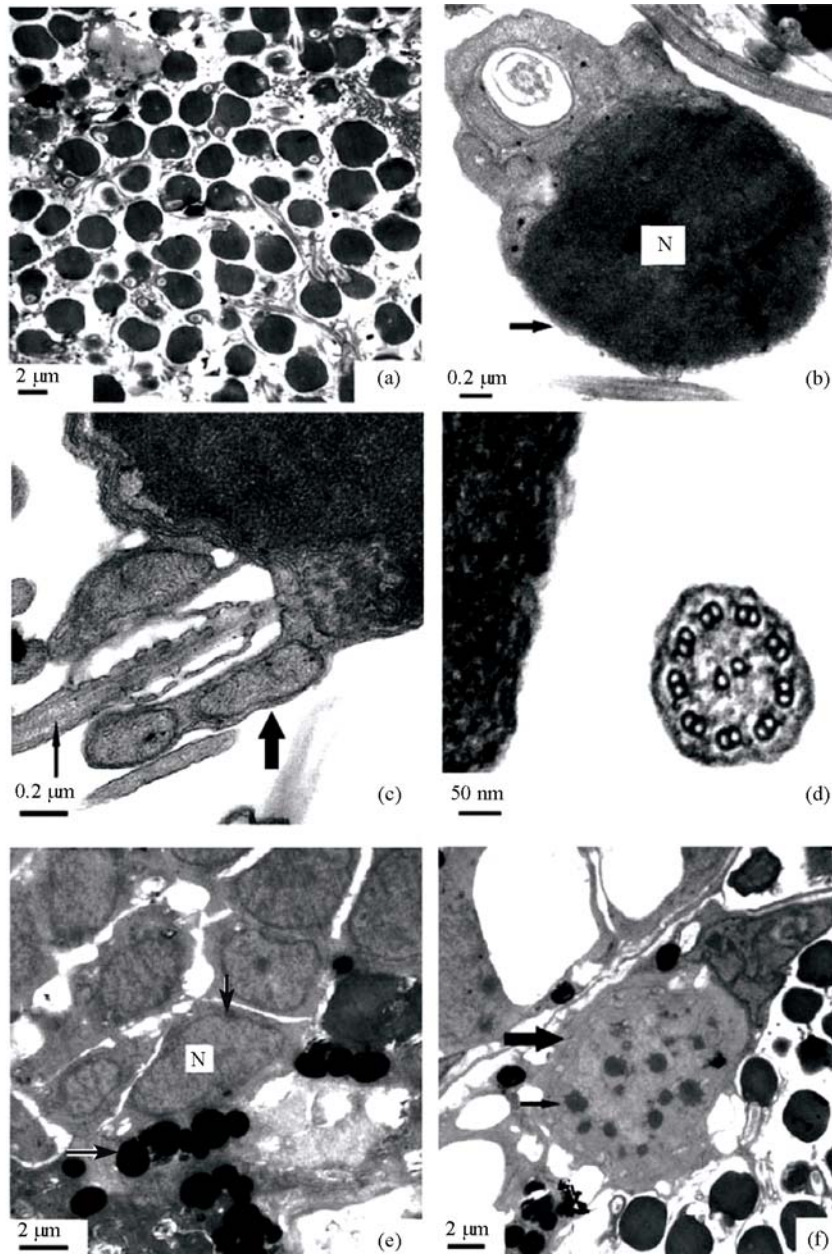


图 4  $A_1-4n$  的精巢超微结构

(a)  $A_1-4n$  的成熟精巢, 示精巢小叶内各种切面成熟精子的头部和尾部; (b)  $A_1-4n$  二倍体精子, 示精子头部和尾部, 头部大部分被核(N)所占据, 箭头示精子头部质膜; (c)  $A_1-4n$  二倍体精子, 大箭头示精子头部与尾部连接处的线粒体, 小箭头示精子尾部轴丝; (d)  $A_1-4n$  二倍体精子尾部中的“9+2”微管结构; (e)  $A_1-4n$  成熟精巢小叶周边的精原细胞(小箭头)和附着在周围的支持细胞, 在支持细胞的细胞质内明显可见可能与性激素合成有关的颗粒物(大箭头); (f)  $A_1-4n$  成熟精巢内的精原细胞(大箭头)以及其细胞质内的复合体(小箭头)

### 3 讨论

#### 3.1 二倍体精子雄核发育的优势及其改良四倍体鲫鲤形成的原理

雌核发育和雄核发育技术在鱼类的性别决定机制研究、单性养殖以及遗传纯系的建立等方面都具有

重要作用<sup>[11]</sup>. 对于基因型为♀XX-♂XY的二倍体鱼类群体来说, 其雌性个体产生的单倍体卵子的雌核发育后代将为全雌后代, 因缺乏雄性个体, 这将会为其后代的繁衍带来困难. 而雄性个体产生的单倍体精子的雄核发育后代将会形成♀(XX):♂(YY)=1:1的群体, 这样有利于他们的后代进行进一步的

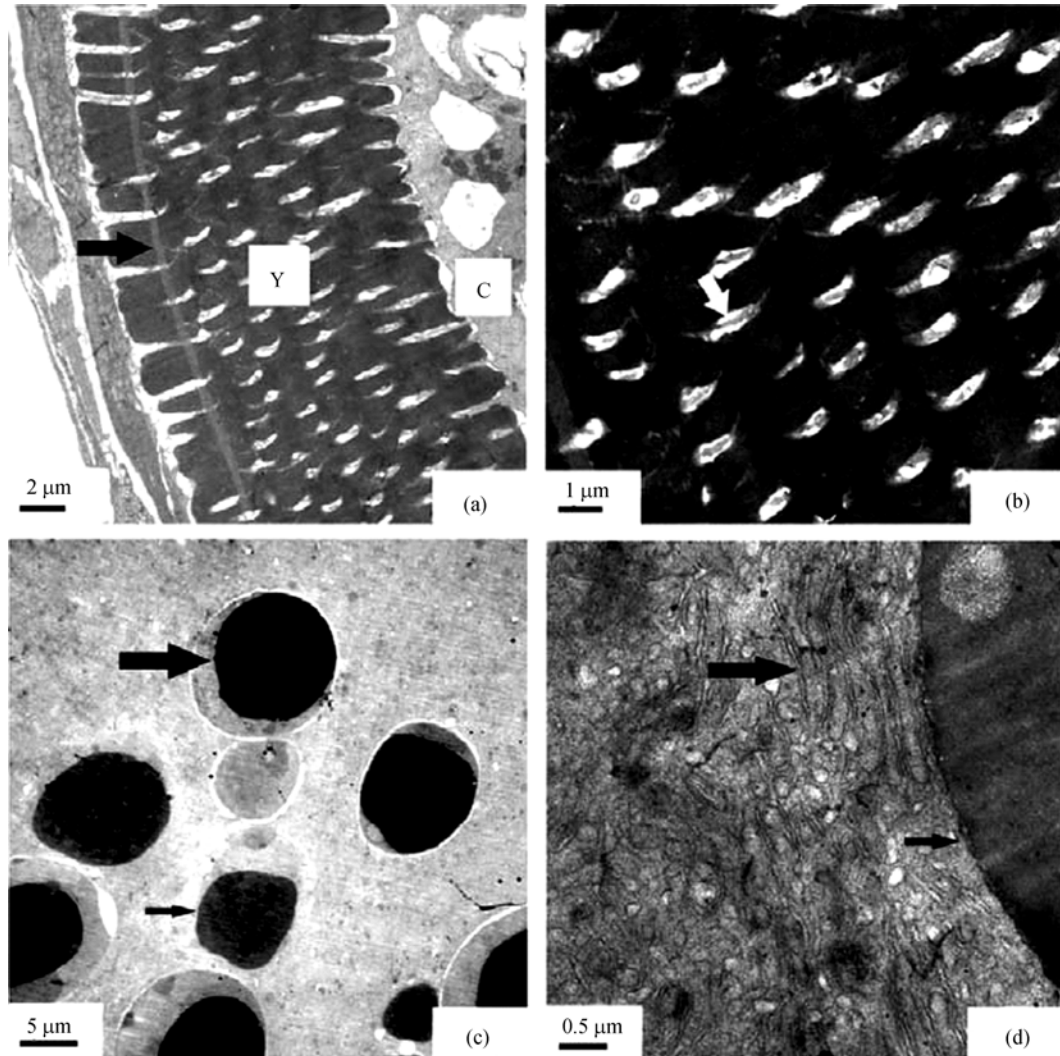
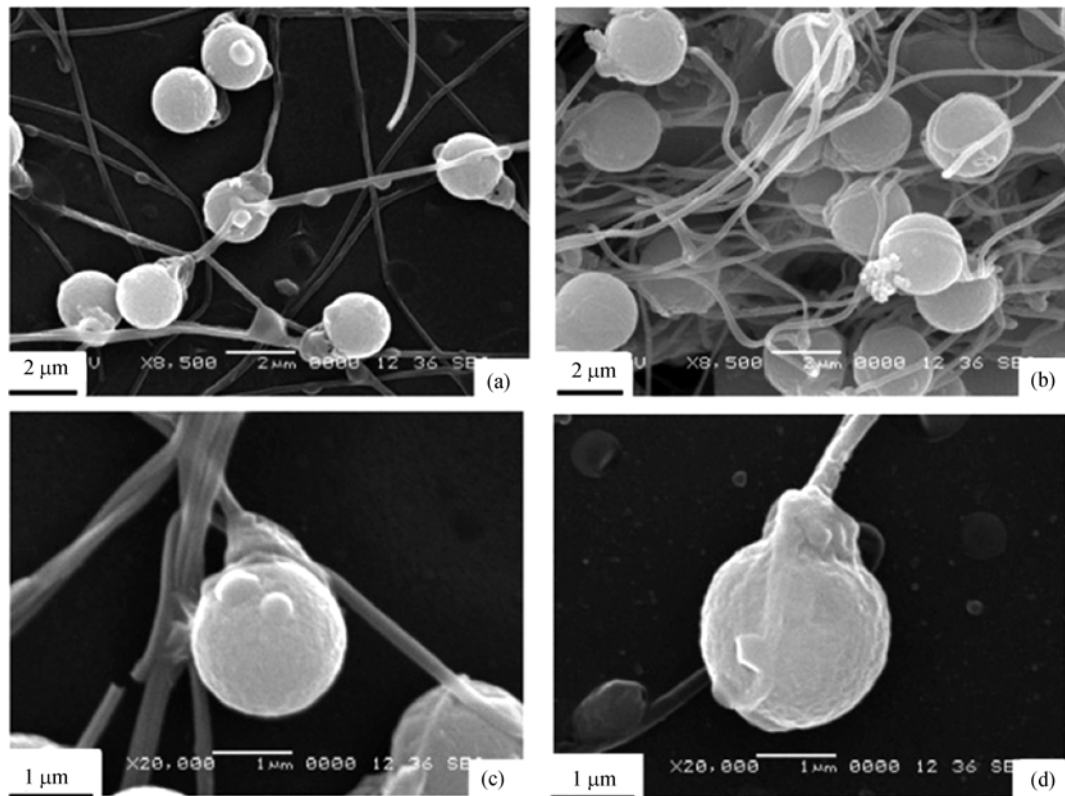


图 5  $A_1-4n$  的卵巢超微结构

(a)  $A_1-4n$  卵巢中 IV 时相卵母细胞外围具有两层滤泡细胞, 内层滤泡细胞伸出微绒毛深入透明带(箭头)内并穿过卵黄膜(Y), 最后达到细胞质(C)内; (b) 为(a)图中卵黄膜的放大, 白箭头示卵黄膜的孔状结构和其中的微绒毛; (c)  $A_1-4n$  IV 时相卵母细胞质中的 2 种卵黄颗粒, 一种外面有囊泡包围(大箭头), 另一种外面没有囊泡包围(小箭头); (d)  $A_1-4n$  IV 时相卵母细胞质内的卵黄颗粒(小箭头)附近有丰富的内质网样结构(大箭头)

遗传选育. 然而对于  $\text{♀XX}-\text{♂XY}$  类型的二倍体鱼群体的雌核发育和雄核发育来说, 都需经历卵子和精子染色体的加倍处理过程, 而这样的处理对后代胚胎的发育有很大的损伤作用, 因此二倍体鱼产生的单倍体卵子的雌核发育后代和单倍体精子的雄核发育后代的存活率是较低的, 尤其是单倍体精子的雄核发育成功的机率更小. 因此, 省掉染色体加倍处理过程的二倍体卵子的雌核发育和二倍体精子的雄核发育在生物学技术方面更有优势. 刘少军等人<sup>[2]</sup>用灭活的散鳞镜鲤精子诱导异源四倍体鲫鲤产生的二倍体卵子, 无需雌核加倍, 成功获得了能产生二倍体卵子

的雌核发育二倍体鲫鲤杂交鱼(简称  $G_1$ ). 继而形成了一个能大量产生二倍体卵子的雌核发育二倍体鲫鲤杂交克隆品系( $G_1, G_2, G_3$ )<sup>[3]</sup>. 本研究中的二倍体雄核发育后代( $A_0$ )自交产生的后代中存在四倍体( $A_1-4n$ )和三倍体( $A_1-3n$ )的事实说明雌性和雄性  $A_0$  能产生二倍体卵子和二倍体精子. 二倍体  $A_0$  尽管是雄核发育后代, 但是仍然保持有鲫鲤杂交的性状, 如具有 2 对很短的口须, 处在其原始母本-红鲫(无须)和原始父本-鲤鱼(具有 2 对明显的口须)的性状之间. 以前我们获得雌核发育二倍鲫鲤( $G_1, G_2, G_3$ )也保持有鲫鲤杂交的特性, 如具有 2 对很短口须. 由于二倍体  $A_0$  和

图6  $A_1-4n$  红鲫的精子外部形态

(a), (c)为不同放大倍数的红鲫精子; (b), (d)为不同放大倍数的  $A_1-4n$  精子

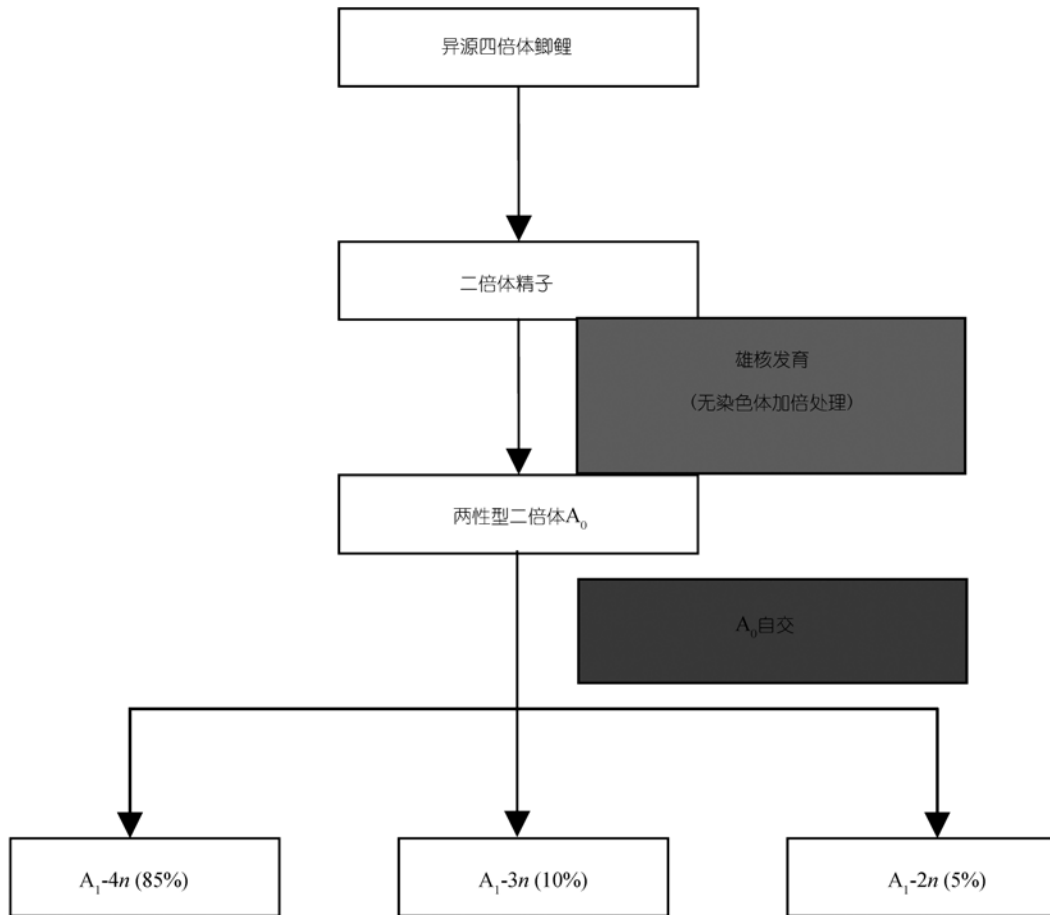
$G_1$ ,  $G_2$  以及  $G_3$  都是远源杂交的后代, 同时具有红鲫和鲤鱼的特点, 因此它们的生殖细胞的发育会发生异常. 我们已经在  $G_1$  和  $G_2$  中证明二倍体  $G_1$  和  $G_2$  能产生二倍体卵子是由于他们的早期生殖细胞进行了核内复制 [1-3], 即生殖细胞的DNA在进行减数分裂前进行了一次复制形成了  $4n$  的生殖细胞,  $4n$  的生殖细胞再进行正常的减数分裂行为, 即可形成  $2n$  的配子. 我们研究的另一种四倍体鱼——四倍体鲫鲂中也具有产生不减数卵子的特征 [12]. 在我们以前的研究中 [3] 已证明了  $G_1$  和  $G_2$  产生的二倍体卵子具有明显的第二极体排出, 为核内复制机制来解释二倍体卵子的形成提供了重要的细胞学证据. 本研究中雌性  $A_0$  和雄性  $A_0$  分别产生二倍体卵子和二倍体精子的原理与  $G_1$  和  $G_2$  形成二倍体卵子的机制应当是一致的. 另外我们在二倍体鲫鲤  $F_2$  中分别发现了能产生二倍体卵子和二倍体精子的雌性和雄性个体, 这两种配子受精在  $F_3$  中形成了四倍体鲫鲤 [4], 目前已连续繁殖了 14 代四倍体鲫鲤, 形成了一个两性可育、遗传性状稳定的异源四倍体鲫鲤群体 ( $F_3 \sim F_{16}$ ) [11,9]. 上述研究结果证明一

个问题, 即二倍体鲫鲤杂交鱼可以产生二倍体配子. 另一方面我们注意到无论是二倍体  $G_1$ ,  $G_2$  还是雌雄二倍体鲫鲤  $F_2$ , 乃至雌雄二倍体  $A_0$ , 他们都必须达到 II 龄才能性成熟, 而它们的原始母本红鲫在 I 龄时就能达到性成熟, 这证明了核内复制推迟了鲫鲤杂交鱼的性成熟年龄. 改良四倍体 ( $A_1-4n$ ) 群体的形成过程见图 7.

### 3.2 $A_1$ 的倍性与可育性

本文对 10 月龄  $A_1$  进行检测,  $A_1-4n$ ,  $A_1-3n$  以及  $A_1-2n$  所占比例分别为 85%, 10% 和 5%, 这说明二倍体  $A_0$  产生的配子中, 二倍体配子的比例是占绝大多数的.  $A_1-4n$  为两性可育, 而同一时期的  $A_1-2n$  和  $A_1-3n$  表现为两性不可育. 对于  $A_1-2n$  的不育性, 由于  $A_1-2n$  为杂合个体, 其性腺发育可能类似于鲫鲤  $F_1 \sim F_2$  和雌核发育二倍体鲫鲤 (如  $G_1$ ,  $G_2$ ), 这些二倍体鲫鲤杂交鱼在 I 龄都是不育的, 只有到 II 龄才达到性成熟, 表现出性腺发育迟缓的特征, 这也是他们产生二倍体配子所必需的, 因为二倍体远源杂交后代



图 7  $A_1$  的形成过程

要经历核内复制过程, 使得其性腺成熟年龄推迟。 $A_1-3n$ 的不育性与其为远源杂交三倍体有关。通过对 $A_1-4n$ 性腺的显微和亚显微结构的观察, 可以看出其卵巢内充满了大量接近成熟的IV时相卵母细胞, 所以用手可以挤出卵粒; 其精巢的精细小管内已充满大量的成熟精子, 所以用手可轻易挤出白色精液。 $A_1-4n$ 中的生殖细胞除体积比二倍体鱼中的生殖细胞的体积大一些外, 其他结构两者都很相似, 如IV时相卵母细胞外一般都是具有2层滤泡细胞, 在放射膜上具有受精孔等。 $A_1-4n$ 产生的二倍体精子主要由头部和尾部组成, 尾部保持有“9+2”微管结构, 保证了 $A_1-4n$ 的精子能够正常运动, 精子尾部前端的线粒体可为精子运动提供能量。在以往研究中, 刘少军等人<sup>[4]</sup>观察到异源四倍体鲫鲤产生的二倍体精子头部直径约为  $2.4 \mu\text{m}$ , 野鲤产生的单倍体精子头部直径约为  $1.90 \mu\text{m}$ , 本文作者通过扫描电子显微镜也观察到 $A_1-4n$ 产生的二倍体精子头径也为  $2.4 \mu\text{m}$ 明显比

红鲫单倍体精子的头径( $1.90 \mu\text{m}$ )要大, 观察结果与以前的报道一致。以上结果说明, 通过雄核发育能获得两性可育的四倍体鱼, 并且这种四倍体鱼能产生正常的二倍体配子, 这将有力地保证 $A_1-4n$ 能稳定繁殖四倍体后代, 并在将来形成一个新的四倍体鱼群体。通过染色体组调控技术制备四倍体鱼在国内外已有报道<sup>[13]</sup>, 但是通过雄核发育获得两性可育并能产生二倍体配子的四倍体鱼, 这在世界上尚属首次。

### 3.3 雄核发育对异源四倍体鲫鲤的改良

异源四倍体鲫鲤的原始亲本是雌性的红鲫和雄性的鲤鱼。异源四倍体鲫鲤产生的二倍体精子是一种杂合精子, 它既有鲤鱼的遗传基因又具有红鲫的遗传基因。将该种二倍体精子与经紫外线灭活的金鱼卵子结合, 在无染色体加倍处理的情况下, 获得了具有明显杂交性状的二倍体雄核发育鱼( $A_0$ )。本实验中 $A_0$ 自交所获得 $A_1-4n$ 有2对很短的口须,  $A_1-2n$ ,

$A_1-3n$  则没有口须. 从表 2, 3 的可量比例性状和可数性状中可以看出, 与普通异源四倍体相比,  $A_1-4n$  的外形特征已得到改良, 其中在体高/体长、尾柄高/尾柄长、头高/体高方面尤为突出. 这充分说明运用雄核发育方法能很好地对异源四倍体鲫鱼进行遗传改良. 这种体型更好的四倍体鱼不仅丰富了现有的四倍体鱼资源, 而且为制备三倍体鱼提供了更优良的亲本.

### 参 考 文 献

- Liu S J, Liu Y, Zhou G J, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp  $\times$  common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization. *Aquaculture*, 2001, 192: 171—186[DOI]
- Liu S J, Sun Y D, Zhang C, et al. Production of gynogenetic progeny from allotetraploids hybrids red crucian carp  $\times$  common carp. *Aquaculture*, 2004, 236: 193—200[DOI]
- 刘少军, 段巍, 陶敏, 等. 雌核发育二倍体鲫鱼杂交克隆品系建立. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2007, 37(1): 28—34
- Sun Y D, Zhang C, Liu S J, et al. Induced interspecific androgenesis using diploid sperm from allotetraploid common carp  $\times$  red crucian carp hybrids. *Aquaculture*, 2007, 264: 47—53[DOI]
- 李建中, 张轩杰, 刘少军, 等. 异源四倍体鲫鲤的形态特征研究. *湖南师范大学自然科学学报*, 2001, 24(2): 64—66
- 孙远东, 刘少军, 张纯, 等. 异源四倍体鲫鲤  $F_9 \sim F_{11}$  染色体和性腺观察. *遗传学报*, 2003, 30(5): 414—418
- Shen J M, Liu S J, Sun Y D, et al. A new type of triploid crucian carp-red crucian carp ( $\text{♀}$ )  $\times$  allotetraploid ( $\text{♂}$ ). *Prog Nat Sci*, 2006, 16(12): 1348—1352[DOI]
- 刘少军, 孙远东, 周工建, 等. 异源四倍体鲫鲤成熟性腺和红细胞超微结构观察. *自然科学进展*, 2003, 13(2): 194—197
- 刘少军, 孙远东, 罗凯坤, 等. 二倍体鲫鲤  $F_2$  产生不同倍性卵子的证据. *遗传学报*, 2006, 33(4): 304—311
- 李思发. 中国淡水主要养殖鱼类种质研究. 上海: 上海科学技术出版社, 1998
- 赵振山, 吴清江, 高贵琴. 鱼类雄核发育的研究进展. *遗传*, 2000, 22(2): 109—113
- Liu S J, Qin Q B, Xiao J, et al. The formation of the polyploid hybrids from different subfamily fish crossings and its evolutionary significance. *Genetics*, 2007, 176: 1023—1034[DOI]
- 吴清江, 叶玉珍, 董新红. 由鲤和鲫染色体组叠加构建的两个单性人工多倍体克隆. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2003, 33(3): 281—288