

雄核发育异育银鲫及其初步应用

俞豪祥 吴锦忠 李 平 关宏伟 徐 皓 张世俊
(上海市水产研究所鱼类品种室, 200433)

摘 要 用鲫($2n=100$)卵与异育银鲫($3n=156$)正常精子进行人工授精,产生了部分的雄核发育异育银鲫($3n=156$)。池塘中饲养的雄核发育异育银鲫性腺不仅能成熟,而且也能生殖。它与父本异育银鲫回交可以产生回交子一代(B_1)。雄核发育异育银鲫、回交子一代异育银鲫与父本异育银鲫非常相似。它们均具有相同的染色体数目($3n=156$),红细胞核的体积是鲫红细胞核体积的 1.6 倍。另一方面,用随机扩增多态 DNA (RAPD) 标记检测了雌鲫、雄异育银鲫、雄核发育异育银鲫、回交子一代、雄红鲤的遗传多态性。RAPD-PCR 分子遗传标记结果表明与细胞学、细胞遗传学部分研究的结果相一致。因此,雄核发育异育银鲫存在于鲫(♀)与 $3n=156$ 异育银鲫(♂)杂交的部分 F_1 之中。

关键词 雄核发育, 异育银鲫, 鲫, 随机扩增多态 DNA

The androgenetic allogynogenetic silver crucian carp and its preliminary application

Yu Haoxiang, Wu Jinzhong, Li Ping, Guan Hongwei, Xu Hao, Zhang Shijun
(Fish Species Laboratory, Shanghai Fisheries Research Institute, 200433)

ABSTRACT In this study part androgenetic $3n=156$ allogynogenetic silver crucian carp ($3n$ AASCC) using *Carassius auratus* eggs artificially fertilizing with normal sperm from $3n=156$ allogynogenetic silver crucian carp ($3n=156$ ASCC) were produced. The $3n$ ASCC fed in pond can not only reach sexual maturity, but be reproduced. Meanwhile, backcrossing females $3n$ AASCC (F_1 - similar to ASCC) to paternal parent $3n=156$ ASCC could produce first backcross generation (B_1 ASCC being very similar to paternal parent ASCC). These have the same chromosomal numbers, e. g. $3n=156$, and volume of the erythrocyte nuclei is about 1.6 time which is as big as that of *C. auratus*. On the other hand, genetic variations in females *C. auratus*, males $3n=156$ ASCC, $3n$ AASCC, backcross generation B_1 and red common carp (*Cyprinus carpio* red variety) were detected using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. The result of molecular genetic markers indicated by the RAPD-PCR is consistent with that of the studies on cytology and cytogenetics (chromosomes). Therefore, androgenetic $3n=156$ ASCC exists in the part of F_1 of *C. auratus* $\text{♀} \times 3n=156$ ASCC ♂ .

KEYWORDS androgenesis, allogynogenetic silver crucian carp (ASCC), *Carassius auratus*, RAPD

雄核发育 (Androgenesis) 是指用精子生产只带父系遗传物质个体的繁殖方式^[1]。雄核发育的繁殖方式恰好与雌核发育 (Gynogenesis) 的繁殖方式相反, 显得更为特殊和罕见。

就鱼类的雄核发育而言, 大多数是人工诱导产生, 如用 γ 、 X 射线或紫外线 (UV) 破坏卵子 DNA 的活性后, 与正常单倍体精子授精, 然后再用温度休克或静水压处理抑制合子第一次卵裂, 使单倍体的合

上海市科学技术委员会资助项目(鲫的应用研究), 903213056 号。

作者简介: 俞豪祥, 男, 1936 年 9 月出生, 研究员。Tel: 021-65483215 转 8017

收稿日期: 1998-06-05

子二倍化。此外,也可用热休克(或静水压)处理后产生四倍体或天然四倍体雄鱼产生的二倍体精子和 DNA 已无活性的卵子结合^[1~4]。直至今日,人工诱导雄核发育仍是较新的技术,在选种、保种和育种方面都显示出它的价值,但还没有在商业生产上使用^[1]。然而,我们在 1991 年用鲫(*Carassius auratus*)卵与天然雌核发育异育银鲫精子进行人工授精、孵化率约 5%~8% 的子代中,意外地发现约有 5% 左右的雄核发育个体。它们不但能存活、性成熟和产卵,并能与其父本精子受精,产生十分正常的鱼苗、鱼种。与此同时,我们将它们初步应用到生产单位饲养。因此,本研究的初步结果可为鱼类遗传育种工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验鱼来源

鲫(*Carassius auratus*)产自上海青浦区淀山湖,染色体数目为 $2n=100$; 兴国红鲤(*Cyprinus carpio* red variety)原产江西省兴国县,现取自本所试验池; 异育银鲫为中科院水生生物研究所于 1981 年惠赠的夏花鱼种在上海繁衍的后裔,体色为银灰黑色,染色体数目为 $3n=156$ 。

1.2 主要生物学的特性

主要形态特征按常规方法测量鱼的各个部位,色素细胞形态的观察是沿侧线取下第 10 片的侧线上鳞,置载玻片上加少许水,在 Olympus BH-2 显微镜下观察和照相。细胞学和细胞遗传学部分按楼允东等^[5]的方法。

1.3 人工繁殖及 B_1 的初步应用

1991~1995 年,在青浦区西岑、莲盛的本所试验场进行人工繁殖和鱼苗鱼种培育。杂交组合为: 鲫(♀) × 异育银鲫(♂) $\rightarrow F_1$, F_1 (似父本者♀) × 异育银鲫♂ $\rightarrow B_1$ 。 B_1 鱼种供少数水产养殖场饲养。

1.4 随机扩增多态性 DNA(RAPD)-PCR 检测

解剖活鱼后,立即取出其肝脏,液氮冻存。然后,分别进行基因组 DNA 的提取,并进行 RAPD 检测。150 个 RAPD 扩增用随机序列寡核苷酸引物(10 nt, 0.5 OD/0.5 mL)购自浙江省博联营养与工程科学研究所生命技术中心。PCR 扩增仪为上海复日生物技术公司生产的 FR-800 型扩增仪。耐高温 DNA 聚合酶为复华实业公司生物技术部提供的 FD-Taq 酶,4U/μL。聚合酶链式反应(PCR)是参照 Williams 等^[6]的方法进行。最后取 10~20 μL 的扩增产物,用 2%~3% 含 EB 的琼脂糖凝胶电泳检测,紫外灯下观察、照相^[7]。

2 结果

2.1 F_1 的一些繁殖生物学特性

当鲫卵与异育银鲫($3n=156$)精子人工授精时,受精率可达 80.4%~87.1%,但孵化率只有 5%~8%^[8]。将仔鱼饲养成体重约 25 g 的鱼种时,约有 5% 的鱼种体色呈银灰黑色,酷似父本异育银鲫,简称 F_1 (下同)。鱼种饲养至翌年 4 月,5 尾鱼的卵巢成熟系数平均为 11.58% (体长 19.8~20.0 cm,体重 303~324 g)。群体中亦有少量雄鱼(♀:♂=153:17),且达性成熟。雌鱼的怀卵量,平均每尾 37038 粒。达性成熟的雌鱼经催情后,排出的卵子淡灰黄色,呈圆球形,粘性,每克卵子约含 1610 粒。卵与父本精子回交的受精率为 76.8%~87.1%,平均为 83.2%,平均孵化率为 86.4% (85.3%~87.4%),孵出的仔鱼简称为 B_1 (下同)。

2.2 F_1 与其亲本的主要形态性状

F_1 与其亲本(鲫、异育银鲫)或与 B_1 , 在主要形态性状方面均属低-中背型的体型, 体高/体长(%)依次为: 38.74 ± 0.66 , 38.08 ± 1.19 , 37.10 ± 0.50 , 38.60 ± 0.39 , 其它可数性状也比较接近。惟有体色可把鲫、异育银鲫(包括 F_1 、 B_1) 很容易区分开来, 因为鲫的体色大多数呈淡灰黄黑色, 而异育银鲫、 F_1 和 B_1 的体色则呈银灰黑色。究其原因, 可能与黄色素、黑色素细胞等分布及组合不同有关。淀山湖的野生鲫鳞片后区有较多黄色素粒, 黑色素细胞的黑色素略呈不规则的放射状分散地分布(图版-1)。而异育银鲫($3n=156$)及 F_1 似父本异育银鲫鳞片后区的黄色素粒相对地少一些, 黑色素细胞的黑色素多数呈较规则的放射状分布, 形似菊花(图版-2, 3)。 B_1 的黑色素细胞的黑色素及黄色素粒的分布则似亲本。

2.3 回交子代 B_1 异育银鲫的生长情况

试验期间, F_1 (似异育银鲫者)与父本回交的子代 B_1 共生产了约 120 万的夏花及体重约 10~50 g 的鱼种, 分别在一些水产养殖场和个体养殖户进行推广试养。1994 年 6 月 20 日, 我们将 15 000 尾夏花鱼种放养在一口 $5\,332.8\text{ m}^2$ 成鱼池与草、鲢、鳙、团头鲂、异育银鲫(徐泾乡生产的)大规格鱼种(体重为 41.7~750 g)混养, 至年底干池起捕, 获 89% 的成活率, 平均每尾规格达 50 g, 占全池成鱼总产量的 15.29%。这些规格比较一致的鱼种于 1995 年 1 月 20 日又放养在一口 666.6 m^2 的成鱼池中, 再与草鱼(71.4~900 g/尾)、白鲢(200~450 g/尾)、鳙(200~450 g/尾)、团头鲂(200 g/尾)和 B_1 夏花鱼种混养。至 12 月 24 日干塘起捕时, 原 B_1 鱼种体重平均达 180 g/尾, 成活率达 92%, 占全池总产量(13 220.5 kg)的 25.05%。而同池混养的 B_1 夏花鱼种, 其平均每尾体重达 45.5 g, 成活率达 90% 的, 占全池塘总产量的 6.19%。假如混养的其它鱼种规格小一些, 可能会更有利于 B_1 的生长。

此外, B_1 的生长是属于匀速生长的类型, 其体重 W 和体长 L 呈幂函数增长, 相关式为 $W = aL^b$, $W = 0.04128 L^{3.01206}$ 。

2.4 细胞大小与染色体数目测定

红血细胞: 异育银鲫、似父本的 F_1 及 B_1 的红血细胞核大小较相似(图版-4, 5), 它们的核体积各为鲫(图版-6)的 1.6 倍。

肝细胞: 异育银鲫、 F_1 及 B_1 的肝细胞较大, 长轴各约 46 μm , 而鲫肝细胞的长轴只 27 μm 左右(图版-7, 8, 9)。

染色体数目: 似父本的 F_1 、 B_1 肾细胞的染色体数目与父本异育银鲫均各具有 $3n=156$ 的数目(图版-10, 11, 12)。

2.5 分子遗传学检测

引物筛选: 筛选了 150 个随机引物(10nt), 发现半数以上的引物可扩增出 2~14 条 DNA 片段, 绝大部分扩增片段的大小在 300~2 500 bp 之间。在 150 个引物中有 9 个引物(A15, B19, B20, C9, F9, G3, G15, I4, I16)可以扩增出 36 个具多态性的 DNA 片段用来作为分子标记。图版-13、图版-14 为其中 2 个引物 B20 和 A15 分别扩增的图谱^[7]。

RAPD 多态性条带的分布: 在母本鲫、父本异育银鲫及其杂交 F_1 (似父本者)、 F_1 与父本回交 B_1 的 RAPD 图谱进行比较时, 可以发现在绝大多数扩增带型完全相同的情况下, 存在 1~6 条多态性片段表现为“有无”或“位置”多态。在 36 个多态性标记中, 22 条带属父本显性标记(母本为隐性纯合子)均遗传给 F_1 , 部分条带在回交 B_1 中发生了分离。母本鲫的 14 条显性标记条带, 均不遗传给 F_1 或 B_1 。似乎子代受了父本异育银鲫的显性控制, 因而无法表现母本性状标记^[7]。另外, 有 3 条父本异育银鲫的显性 RAPD 标记同时出现于红鲤的扩增带中, 这表明异育银鲫基因组中很可能掺入了红鲤的遗传信息。

3 讨论

在自然界中,雌核发育是动物界一种少有的有性繁殖方式,方正银鲫就属其中之一。它与兴国红鲤人工授精产生的异育银鲫,也继承了母本雌核发育的特性。然而,鱼类雌核发育作为一种特化的繁殖适应机制,它的进化地位与有性繁殖和孤雌生殖保持联系。因此,雌核发育机制只具有相对的稳定性^[8]。由于此因,当雌核发育银鲫或异育银鲫与鲤科等鱼类婚配的子代中,出现很少一部分的杂交种或雄核发育的个体是不可避免的,这是由于雌核发育只具有相对的稳定性所致。人工诱导获得酷似母本的异育银鲫四倍体杂种^[9]和具有一整套父本红鲤染色体的复合四倍体异育银鲫(出现率仅 0.2%)^[9,10]便是例证。后来,丁军等观察到复合四倍体异育银鲫产生时,各有 0.33% 的受精卵发生了两性融合或两性接合发育,他们进而推论银鲫卵的雌核发育控制系统很可能是由一个可以开启和关闭的基因操纵系统控制的,所以,银鲫雌核发育只具有相对的稳定性^[10]。

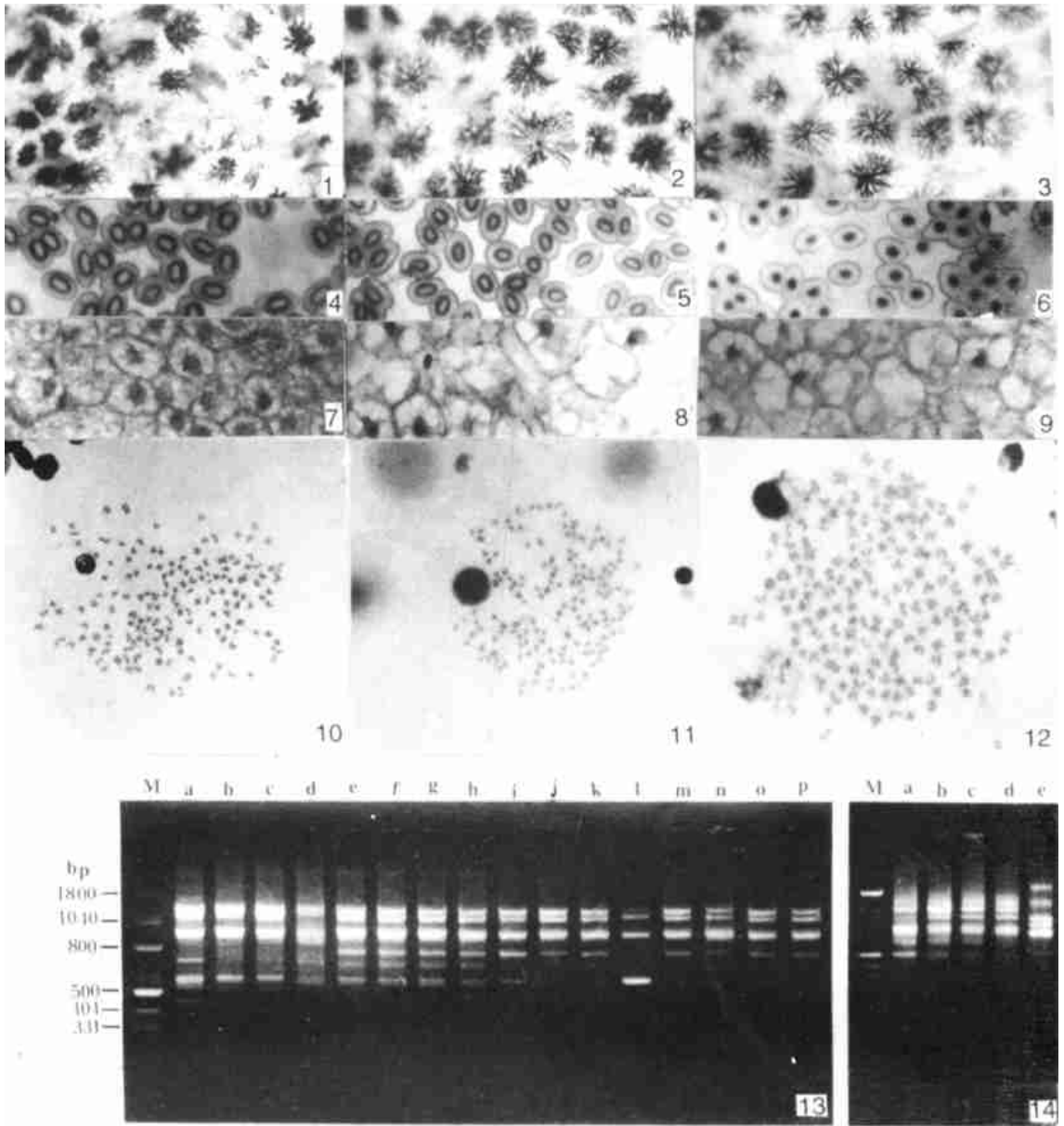
在自然界中,迄今尚未有真正天然雄核发育的鱼类及其应用报道。可是实际上,在鱼类的远缘杂交中,雄核发育的现象确实存在。不过,常为人们所忽视。如在鲤(♀)×草鱼(♂)杂交中获得了雄核发育二倍体草鱼^[11]。在红鲫(♀)×草鱼(♂)的杂交中也发现过草鱼雄核发育的单倍体胚胎^[12]。四川南充县于 1981 年 12 月在兴国红鲤(♀)和草鱼(♂)的杂交 F₁代中,分别发现 3 尾红草鱼,其中 2 尾体重分别为 2.1 kg 和 5 kg^[13]。在 1985 年进行异育银鲫(♀)×兴国红鲤(♂)人工授精中,获得占 0.61% 的杂交种,其中 1 尾无须鲤性成熟后产卵与鲫(♂)杂交时,获得了大量正常的鲤鲫杂交种,有的水产养殖场饲养后反映良好^[14]。此外,单仕新等也报道在三倍体方正银鲫(♂)同二倍体红鲫(♀)杂交中,获得 2 尾室内饲养至 4 cm 左右、体色青灰色的鲫鱼^[15]。因他们对 2 尾鲫鱼没有进行遗传背景的分析,故不能排除雄核发育的可能性。李传武等从 10 万个以草鱼精子受精的鲤鱼卵中得到了 1 尾能正常存活的“草鱼型杂种”,经形态和染色体组型测定,证实为雄核发育二倍体草鱼^[16]。许多鱼类的育种实践表明,经济杂交时两种杂交类型是可能的:①将雌核发育雌鱼与非亲缘的远缘雄鱼杂交(一种‘顶交’);②两种近亲亲鱼的杂交。如果获得雄核发育(只有父本遗传性状的鱼类后代),第二种方式是可能的^[17]。

至此,我们推测营独特的天然雌核发育生殖背景的异育银鲫,其部分精子在既脱离了卵质的抑制作用,同时又得益于近亲鲫(鲫属中的不同亚种)相似的遗传背景的特殊条件,故很可能受到雌核发育调控系统和两性生殖调控系统的双重影响,其结果表现出一定比例(约 5%)的 F₁只接受父本遗传的雄核发育。这一现象,可以圆满地解释为什么父本显性 RAPD 标记在子一代中表现父本遗传而不分离,而母本显性 RAPD 标记则不出现。在回交 B₁中,父本显性的 RAPD 标记出现了分离,这正是两性融合生殖的产物。此外,在提供 RAPD 标记实验证据的同时,结合根据对亲本和子代间的相似系数分析、聚类分析结果^[7],以及有关细胞学和细胞遗传学的研究结果,它们基本上是一致的。因此,以上结果表明,在鲫卵与异育银鲫精子人工授精的子代中,存在有雄核发育的异育银鲫。由于雄核发育子代不但可以获得父本的优良性状,而且也可以获得母本卵质基因遗传或影响。所以,雄核发育的异育银鲫及 B₁很有应用的价值。

感谢上海市水产研究所莲盛淡水试验场大力支持和帮助;复旦大学生命科学院生化系黄伟达教授、王俐硕士热情帮助将试验鱼进行 RAPD-PCR 检测及惠赠 RAPD 检测的相片;上海青浦县徐泾乡、莲盛乡、朱家角镇的一些水产养殖场和个体养殖户为试验鱼的推广试养给予支持。

参 考 文 献

- 1 陈乐才. 雄核发育在水产良种上的应用. 中国台湾: 中国水产, 1996, (11) 3~ 5
- 2 Thorgass G H, Scheerer P D, Hershberger W K. Androgenetic rainbow trout produced using sperm from tetraploid males improved survival. Aquac, 1990, 85 215~ 216.
- 3 Arai K, Ikeno M, Suzuki R. Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* using spermatozoa of natural tetraploids. Aquac, 1995, 137 131~ 138
- 4 Masaoda T, Arai K, Suzuki R. Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* from UV irradiated eggs by suppression of the first cleavage. Fish Sci, 1995, 61(4): 716~ 717
- 5 楼允东, 张英培, 翁忠惠等. 淇河鲫鱼细胞遗传学和同工酶的初步研究. 水产学报, 1989, 13(3): 254~ 258
- 6 Williams, J G K, Kubelik A R, Livak K L, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res. 1990, 18(22): 65316~ 535
- 7 王 俐, 吴 衡, 卢子靖等. 鲫鱼人工杂交试验中雄核发育现象的 RAPD 实验证据. 复旦学报(自然科学版), 1997, 36(5): 565~ 570
- 8 蒋一珪, 梁绍昌, 陈本德等. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应. 水生生物学集刊, 1983, 8(1): 1~ 13
- 9 俞豪祥, 徐 皓, 关宏伟等. 鱼类染色体组工程的研究——人工诱导天然雌核发育异育银鲫四倍体杂种. 全国生物农业应用学术讨论会论文集. 北京: 中国科学技术协会学会部. 1995. 309~ 313
- 10 丁 军, 蒋一珪, 单仕新等. 复合四倍体异育银鲫产生的细胞学机制. 水生生物学报, 1992, 16(2): 186~ 188
- 11 Stanley JG, Jones J B. Morphology of androgenetic and gynogenetic grass carp, *Ctenopharyngodon idlla* (Valenciennes). J Fish Biol, 1976, 9(6) : 523~ 528
- 12 蒋一珪, 俞豪祥, 陈本德等. 鲫鱼的人工和天然雌核发育. 水生生物学集刊, 1982, 7(4): 471~ 479
- 13 廖清立. 1982. 南充县培育出红草鱼. 水产科技情报, 1982, (2): 11
- 14 俞豪祥, 张海明. 雌核发育银鲫出现杂交种. 水产科技情报, 1994, 21(3): 131
- 15 单仕新, 梁绍昌, 蒋一珪等. 三倍体方正银鲫(♂) 同二倍体红鲫(♀) 杂交胚胎的非整倍体发育. 水产学报, 1985, 9(2): 199~ 201
- 16 李传武, 吴维新, 徐大义等. 鲤和草鱼杂交中雄核发育子代的研究. 水产学报, 1990, 14(2): 153~ 156
- 17 张兴忠, 仇潜如, 陈曾龙等. 鱼类遗传与育种. 北京: 农业出版社, 1998. 212~ 216



1~ 3. 侧线上鳞片后区的黑色素细胞, $\times 50$, 依次: 1. 鲫, 2. 异育银鲫, 3. 鲫 \times 异育银鲫似父本的 F_1 (简称雄核发育的异育银鲫 AASCC);
 4~ 6. 红血细胞, $\times 400$, 依次: 4. 鲫, 5. 异育银鲫, 6. AASCC; 7~ 9. 肝细胞, $\times 400$, 依次: 7. 鲫, 8. 异育银鲫, 9. AASCC; 10~ 12. 肾细胞
 染色体, $3n=156$, $\times 500$, 依次: 10. 异育银鲫, 11. AASCC, 12. AASCC \times 异育银鲫 B_1 ; 13. 引物 B20 的扩增产物图谱。样品 NO. a~ d 为野
 鲫(♀), No. e~ h 为异育银鲫($3n=156$, ♂), No. i~ k 为 F_1 (似父本者), No. l~ p 为回交 B_p 。左侧为分子量标记(M)。 14. 野鲫(♀, No. a
), 异育银鲫($3n=156$) ♂ 为 No. b, F_1 (似父本, No. c)、回交 B_1 (No. d), 以及兴国红鲤(♂, No. e) 的单引物 A15 扩增产物图谱比较。左列为
 分子量标记(M)。