

红鲫(♀)×鲤(♂)杂交鱼的胚胎染色体组倍性研究

张纯, 刘少军*, 李涛, 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, 湖南长沙 410081)

摘要: 红鲫属于鲤科、鲤亚科、鲫属, 染色体数目为 $2n=100$, 核型为 $22m+34sm+22st+22t$; 鲤属于鲤科、鲤亚科、鲤属, 染色体数目为 $2n=100$, 核型为 $22m+34sm+22st+22t$ 。已有研究表明, 红鲫(♀)×鲤(♂)杂交第一代(F_1)和第二代(F_2)为二倍体, F_2 能产生染色体数不减数的配子, 在第三代(F_3)中形成四倍体鱼。通过对 F_1 和 F_3 进行胚胎染色体制片, 在染色体水平上探讨红鲫和鲤远缘杂交的多倍体发生途径及 F_2 产生不减数配子的潜能。结果表明, F_1 混合胚胎都为二倍性胚胎, 没有发现单倍性和多倍性胚胎, 但 F_3 混合胚胎中则有染色体数为 100, 150, 200 甚至 300 的染色体分裂相, 推测 F_2 生殖细胞发生了一次或多次染色体数加倍, 产生了二倍性和更高倍性的配子, 它们结合形成了不同倍性的 F_3 胚胎。实验证明双亲基因组大小及核型相似的鲫鲤远缘杂交第一代不发生多倍化, 但获得的二倍体杂交后代能产生不减数配子, 在 F_3 中产生多倍体鱼。

关键词: 二倍体杂交鱼; 胚胎染色体; 不减数配子; 远缘杂交

中图分类号: S 917

文献标志码: A

鱼类胚胎染色体研究因其可以快速可靠地检测早期胚胎发育阶段的遗传组成, 已经被广泛应用于人工雌核发育诱导早期胚胎倍性检测^[1-3], 及鱼类远缘杂交早期胚胎倍性检测^[4-8]。在鱼类远缘杂交及杂交后代的倍性研究中, 对杂交第一代(F_1)进行胚胎染色体倍性检测可以准确判断杂交是否导致抑制第二极体排出或者抑制第一次有丝分裂, 最终导致不同倍性的多倍体鱼发生。对杂交第二代(F_2)进行胚胎染色体倍性检测还可以间接判断 F_2 产生配子的倍性分布情况。多倍体鱼发生的细胞学研究已经在生殖细胞染色体数研究和 DNA 含量检测^[9-10]、受精细胞学研究^[11]、成鱼肾细胞染色体数、外周血细胞染色体数及血细胞 DNA 含量测定^[12-16]等方面开展了大量的工作, 但通过杂交鱼早期胚胎的染色体数检测来判断亲本产生配子的倍性的报道还甚少。

本研究室自 20 世纪 80 年代以来, 在红鲫

(*Carassius auratus red var.*)(♀)×鲤(*Cyprinus carpio* L.)(♂)远缘杂交选育多倍体鱼研究方面开展了大量的工作, 通过二倍体红鲫和二倍体鲤杂交获得了二倍体鲫鲤 F_1 , 部分二倍体鲫鲤 F_1 两性可育, 自交后获得了鲫鲤 F_2 , 鲫鲤 F_2 亦部分可育, 两年后达性成熟, 分别能产生染色体数不减半的二倍体卵子和精子, 两者受精后在 F_3 中发现了两性可育的异源四倍体鲫鲤($4n=200$)。异源四倍体鲫鲤一年即达性成熟, 雌、雄部分可育, 分别能稳定产生二倍体卵子和精子, 目前已经繁殖到了 F_{10} , 形成了稳定的异源四倍体鲫鲤群体^[12-16]。本研究将对上述杂交系鱼中的鲫鲤 F_1 和鲫鲤 F_3 进行胚胎染色体制片, 在细胞学水平上探讨红鲫和鲤远缘杂交的多倍体发生途径及鲫鲤 F_2 产生不减数配子的潜能。该双亲基因组相似的远缘杂交鱼产生多倍体的形成途径及相关遗传规律对其他远缘杂交选育多倍体鱼具有重要的指导意义。

收稿日期:2011-05-22 修回日期:2011-07-07

资助项目:国家自然科学基金青年项目(30901100);国家杰出青年科学基金项目(30725028);湖南省教育厅科学研究项目(09B060);国家公益性行业科研专项资金(200903046)

通讯作者:刘少军, E-mail:lsj@hunnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验亲本红鲫、鲤及鲫鲤 F_1 均采自湖南师范大学多倍体鱼繁殖与育种技术教育部工程研究中心。在2005年4—5月,繁殖季节,选择健康可育的亲本进行催产。一般采用使用促排卵素2号(类似物,LRH- A_2),绒毛膜促性腺激素(HCG)和垂体混合催产。以红鲫自交获得20 000个红鲫受精卵;以鲤自交获得20 000个鲤受精卵;以红鲫为母本,鲤为父本,两者交配获得20 000个 F_1 受精卵;两年后,部分已达成熟的 F_1 自交获得 F_2 ;两年后, F_2 自交获得20 000个 F_3 受精卵。

1.2 F_3 胚胎发育观察

受精后,将 F_3 胚胎置入直径为22 cm的玻璃培养皿内进行孵化,在倒置显微镜下观察其胚胎发育的过程,原肠期过后统计受精率,待孵化完成后统计其孵化率。

$$\text{受精率}(\%) = (\text{受精卵数目} / \text{卵子总数}) \times 100;$$

$$\text{孵化率}(\%) = (\text{出苗数} / \text{受精卵数}) \times 100。$$

1.3 混合胚胎染色体制片

对上述获得的红鲫、鲤、鲫鲤 F_1 和鲫鲤 F_3 分别进行混合胚胎染色体制片。制片过程:取原肠期到尾芽期胚胎近100个,用0.4%的胰酶将胚胎去胶膜,捣碎去卵黄后用0.75 mol/L的KCl溶液及0.5%的秋水仙素处理2~3 h,在甲醇和冰醋酸(3:1)混合液中固定3次以上,在冷冻的玻璃片上滴片,火焰干燥;Giemsa染料染色,在显微镜下观察胚胎染色体,采用Pixera pro 600ES(美国)数码显微摄像系统进行拍摄。

2 结果

2.1 孵化及胚胎发育观察

红鲫(♀) × 鲤(♂) F_1 受精率及孵化率都非常高,与对照的红鲫自交和鲤自交的情况相近。相比之下,红鲫(♀) × 鲤(♂) F_2 受精率及孵化率则低得多。各实验鱼的受精率、孵化率及出苗情况见表1。

表1 红鲫、鲤、鲫鲤 F_1 和鲫鲤 F_3 受精率、孵化率及胚胎发育观察

Tab. 1 Fertility rate, hatching rate and embryonic development of red crucian carp, common carp, F_1 and F_3 hybrid fish of red crucian carp(♀) × common carp(♂)

鱼名 sample	受精率/% fertility rate	孵化率/% hatching rate	出苗情况 seedling emergence
红鲫 red crucian carp	98.7	87.3	出苗后的存活率高达80%,鱼苗发育正常。 survival rate after hatching is as high as 80% and the fries grow normally.
鲤 common carp	98.7	86.2	出苗后的存活率高达80%,鱼苗发育正常。 survival rate after hatching is as high as 80% and the fries grow normally.
F_1	99.2	92.7	出苗后的存活率高达80%,有少量畸形苗。 survival rate after hatching is as high as 80% and there are few abnormal fries.
F_3	40.0	6.0	鲫鲤 F_3 脱膜后,除少量正常苗外,大部分呈现不同程度的畸形,畸形苗占90%以上。其中,大部分畸形苗不能发育成为存活的个体(畸形苗外形观察见图1)。 abnormal embryo of F_3 hybrid fish accounting for over 90%, they can not grow up to be survival individuals(Fig. 1).

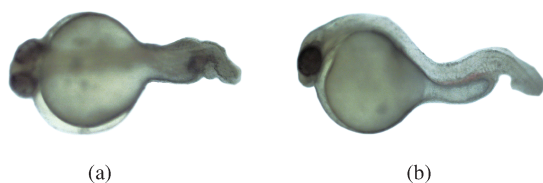


图1 鲫鲤 F_3 胚胎发育畸形苗外形观察

(a) 畸形苗呈现尾端畸形; (b) 畸形苗呈现脊柱弯曲。

Fig. 1 Abnormal embryo of F_3 hybrid fish of red crucian carp × common carp

(a) abnormal caudal end; (b) abnormal spine.

2.2 红鲫、鲤、鲫鲤 F_1 胚胎染色体检测

采用混合胚胎染色体制片结果显示,在统计的100个胚胎染色体分裂相中,鲫鲤 F_1 染色体数为接近100的染色体众数达80%以上,除少量明显发生染色体数丢失的分裂相,都为染色体数接近100的分裂相,与红鲫、鲤的胚胎染色体检测结果一致(图2-a, b),鲫鲤 F_1 被认全部为二倍体胚胎($2n=100$)(图2-c)。

2.3 鲫鲤 F_3 胚胎染色体检测

鲫鲤 F_3 混合胚胎染色体检测显示,鲫鲤 F_3

中既有 $2n = 100$ 的胚胎染色体相,还发现了染色体数为 150,200 甚至是 300 的胚胎染色体分裂相

(图 3)。鲫鲤 F_3 混合胚胎染色体数分布情况见表 2。

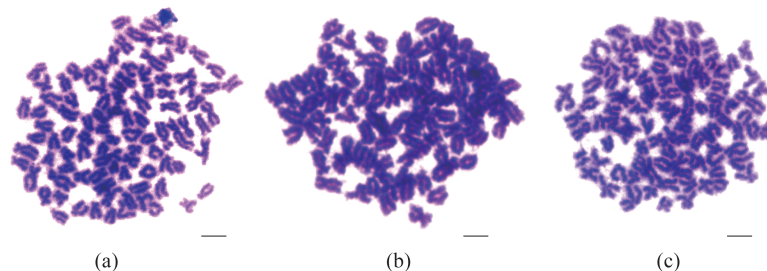


图 2 红鲫、鲤、鲫鲤 F_1 胚胎染色体观察

(a) 红鲫胚胎染色体相, $2n = 100$; (b) 鲤胚胎染色体相, $2n = 100$; (c) 鲫鲤 F_1 胚胎染色体相, $2n = 100$; 标尺 = $3 \mu\text{m}$ 。

Fig. 2 The metaphase chromosome spreads in mitosis of embryo in red crucian carp, common carp and F_1 hybrid fish of red crucian carp \times common carp

(a) chromosome spreads of red crucian carp, $2n = 100$; (b) chromosome spreads of common carp, $2n = 100$; (c) chromosome spreads of F_1 hybrid fish of red crucian carp \times common carp, $2n = 100$; Bar = $3 \mu\text{m}$.

表 2 鲫鲤 F_3 混合胚胎染色体数分布情况

Tab. 2 Distribution of chromosome number in embryonic cells of F_3 hybrid fish

样本 sample	分裂相数 spread number	染色体数分布 chromosome number distribution			
		95 ~ 100	145 ~ 150	195 ~ 200	300 \pm
F_3 混合胚胎 mixed embryos of F_3	100	70	13	14	3

3 讨论

3.1 鲫鲤远缘杂交产生多倍体鱼的途径

在鱼类远缘杂交中,特别是在鲤科鱼类不同亚科的杂交中,出现多倍化现象是屡见不鲜的事实^[17]。如在杂交第一代中就出现三倍体的鲫 (*Carassius auratus*) 和鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 杂交^[6],草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 和三角鲂 (*Megalobrama terminalis*) 杂交^[18],也有在杂交第一代中就发现四倍体鱼的报道,如草鱼和鲤杂交^[19],甚至在红鲫和团头鲂杂交第一代中获得了三倍体和四倍体的报道^[20]。上述杂交组合的双亲间有的基因组大小相似,但染色体核型差异较大,如草鱼 ($2n = 48; 18m + 24sm + 6st$) 与三角鲂 ($2n = 48; 14m + 26sm + 8st$) 杂交;有的基因组大小存在较大的差异,如草鱼和鲤 ($2n = 100; 22m + 34sm + 22st + 22t$) 杂交,鲫 ($2n = 100; 22m + 34sm + 22st + 22t$) 和鲢 ($2n = 48; 18m + 22sm + 8st$) 杂交,鲫与团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) ($2n = 48; 18m + 26sm + 4st$) 杂交等。这种双亲间基因组的较大差异的杂交组合往往在杂交第一代中就发生基因组加倍(抑制第二极体排出产生三倍体鱼,抑制第一次卵裂产生四倍体鱼),导致在 F_1 代中就得到多倍体鱼。亲本基因组大小及核型较相似的鲫、鲤杂交则在第一代中表现出较高的亲和性,皆形成正常发育的二倍体胚胎,没有在杂交第一代中就产生多倍体鱼的报道。此种类型的杂交组合通常通过杂交鱼产生不减数的配子,不减数配子两两结合,在杂交后

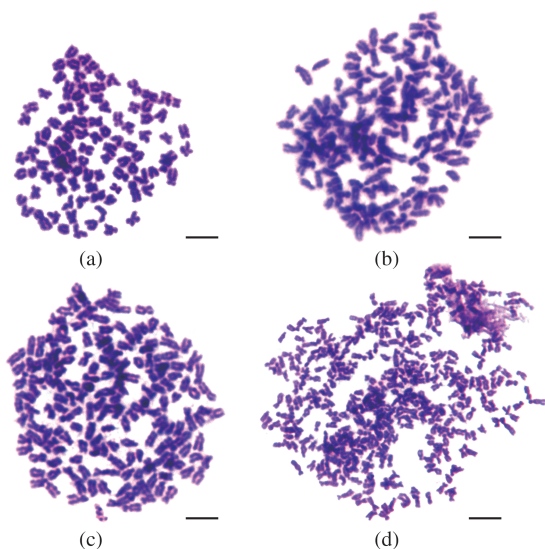


图 3 鲫鲤 F_3 胚胎染色体观察

(a) 染色体数为 100 条; (b) 染色体数为 150 条; (c) 染色体数为 200 条; (d) 染色体数为 300 条; 标尺 = $3 \mu\text{m}$ 。

Fig. 3 The metaphase chromosome spreads in mitosis of embryo in F_3 hybrid fish of red crucian carp \times common carp

(a) chromosome number with 100 in mitosis; (b) chromosome number with 150 in mitosis; (c) chromosome number with 200 in mitosis; (d) chromosome number with 300 in mitosis; Bar = $3 \mu\text{m}$.

代中产生多倍体鱼^[7,12,21],本研究对红鲫(♀)×鲤(♂)的F₁代进行胚胎染色体检测,没有检测到除二倍性胚胎外的其它单倍性或多倍性胚胎,且受精率(99.2%)和孵化率(92.7%)均与亲本自交相似。部分F₁两年后达到性成熟,自交产生二倍体F₂,同理,二倍体F₂自交在F₃胚胎中发现了不同倍性的多倍性胚胎,受精率和孵化率仅为40.0%和6.0%。可见,双亲基因组大小及核型较相似的远缘杂交第一代不发生多倍化,但获得的二倍体杂交后代能产生不减数配子,不减数配子两两交配,在F₃中产生多倍体鱼。该双亲基因组相似的远缘杂交鱼产生多倍体的形成途径及相关遗传规律对其他远缘杂交选育多倍体鱼具有重要的指导意义。

3.2 F₂产生不减数配子的多态性研究

F₃胚胎染色体检测中发现了染色体数为100,150,200甚至是300的胚胎染色体分裂相,说明F₂产生了二倍性和比二倍性更高的不减数配子。染色体数为300的胚胎染色体分裂相确切地说明了F₂生殖细胞发生了不止一次的染色体加倍,且经过多次加倍后的生殖细胞可以完成正常的减数分裂,产生高于二倍体性的多倍体配子。该多倍性配子的结合可以产生高于四倍性的胚胎,但高于四倍性的胚胎不能发育成正常存活的个体,而在胚胎发育阶段呈现畸形最终夭折。这与至今没有在成鱼中获得高于四倍性的多倍体杂交鲫鲤的报道是一致的^[11-16,21]。该结论为与生殖细胞核内有丝分裂或生殖细胞融合相关的多倍体鱼发生机制研究提供了理论依据^[22]。

远缘杂交形成不同倍性鱼的途径和遗传规律的探索在生物演化研究和鱼类遗传育种方面都具有非常重要的意义。鲫鲤远缘杂交获得多倍体鱼的途径和遗传规律的总结将为鲤科经济鱼类或者其它经济鱼类杂交选育更多的优良的多倍体鱼类群提供重要的理论指导。

参考文献:

- [1] THORGAARD G H, JAZWIN M E, STIER A R. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout [J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1981, 110: 546-550.
- [2] 桂建芳,梁绍昌,孙建民,等. 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): 336-344.
- [3] 桂建芳,孙建民,梁绍昌,等. 鱼类染色体操作的研究 II. 静水压处理和静水压与冷休克结合处理诱导水晶彩鲫四倍体[J]. 水生生物学报, 1991, 15(4): 333-342.
- [4] 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.
- [5] 陈敏容,杨兴棋,俞小牧,等. 白鲫(♀)×红鲫(♂)异源四倍体鱼的倍性操作及其生殖力的研究[J]. 水生生物学报, 1997, 21(3): 197-205.
- [6] 桂建芳,梁绍昌,朱蓝菲,等. 鱼类远缘杂交正反交杂种胚胎发育差异的细胞遗传学分析[J]. 动物学研究, 1993, 14(2): 171-177.
- [7] 吴清江,叶玉珍,董新红,等. 由鲫(*Cyprinus carpio*)和鲤(*Carassius auratus*)染色体组叠加构建的两个单性人工多倍体克隆[J]. 中国科学 C 辑, 2003, 33(3): 281-289.
- [8] WU C, YE Y Z, CHEN M R, et al. An artificial multiple carp and its biological characteristics [J]. Aquaculture, 1993, 111: 255-260.
- [9] 张纯,孙远东,刘少军,等. 二倍体雌核发育鱼产生二倍体卵子的证据[J]. 遗传学报, 2005, 32(2): 136-144.
- [10] ZHANG Q Q, ARAI K. Distribution and reproductive capacity of natural triploid individuals and occurrence of unreduced eggs as a cause of polyploidization in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Ichthyological Research, 1999, 46(2): 153-161.
- [11] LIU S J, DUAN W, TAO M, et al. Establishment of the diploid gynogenetic hybrid clonal line of red crucian carp × common carp [J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2007, 50(2): 186-193.
- [12] LIU S J, LIU Y, ZHOU G J, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization [J]. Aquaculture, 2001, 192(2-4): 171-186.
- [13] 孙远东,刘少军,张纯,等. 异源四倍体鲫鲤F₀-F₁₁染色体和性腺观察[J]. 遗传学报, 2003, 5: 414-418.
- [14] 刘少军,曹运长,何晓晓,等. 异源四倍体鲫鲤群体的形成及四倍体化在脊椎动物进化中的作用[J]. 中国工程科学, 2001, 3(12): 33-41.
- [15] 刘筠,周工健. 红鲫(♀)×湘江野鲤(♂)杂交一代生殖腺的细胞学研究[J]. 水生生物学报, 1986, 10(2): 101-108.
- [16] LIU S J. Distant hybridization leads to different ploidy fishes [J]. Science China Series C: Life Sciences, 2010, 53: 416-425.

- [17] 楼允东,李小勤. 中国鱼类远缘杂交研究及其在水产养殖上的应用[J]. 中国水产科学,2006,13(1): 151-158.
- [18] 刘思阳. 三倍体草鲂杂种及其双亲的细胞遗传学研究[J]. 水生生物学报,1987,11(1):52-59.
- [19] 吴维新,林临安,徐大义,等. 一个四倍体杂种—兴国红鲤♀ *Cyprinus carpio* red × 草鱼♂ *Ctenopharyngodon idella* [J]. 水生生物学集刊, 1981,7(3):433-436.
- [20] LIU S J, QIN Q B, XIAO J, *et al.* The formation of the polyploid hybrids from different subfamily fish crossing and its evolutionary significance [J]. *Genetics*,2007,176(2):1023-1034.
- [21] CHERFAS N B, GOMELSKY B I, EMELYANOVA O V, *et al.* Induced diploid gynogenesis and polyploidy in crucian carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch), × common carp, *Cyprinus carpio* L., hybrids[J]. *Aquaculture and Fisheries Management*, 1994,25:943-954.
- [22] GUI J F, ZHOU L. Genetic basis and breeding application on clonal diversity and dual reproduction modes in polyploid *Carassius auratus gibelio* [J]. *Science in China Series C: Life Science*, 2010, 53(4):409-415.

Studies of chromosome sets in embryonic cell of hybrid fish of red crucian carp(♀) × common carp(♂)

ZHANG Chun, LIU Shao-jun*, LI Tao, LIU Yun

(Key Laboratory of Protein Chemistry and Fish Developmental Biology of Education of China, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: In the catalog, the red crucian carp (*Carassius auratus* red var.) with 100 chromosomes belongs to the Cyprinidae, Cyprinidae subfamily, *Carassius*, with karyotype of $22m + 34sm + 22st + 22t$; and the common carp (*Cyprinus carpio* L.) with 100 chromosomes belongs to the Cyprinidae, Cyprinidae subfamily, *Cyprinus*, with karyotype of $22m + 34sm + 22st + 22t$. The previous studies had indicated that the first (F_1) and second generation (F_2) of hybrid fish of red crucian carp (♀) × common carp (♂) were diploid, and F_2 hybrids could produce unreduced eggs and sperms, which mated each other to form fertile allotetraploid hybrid fish (F_3). In order to explore the pathway of polyploidy occurrence in distant crossing of red crucian carp and common carp and the potential of producing unreduced gametes of F_2 hybrids, we studied the chromosome in embryonic cell of F_1 and F_3 hybrid fish. The result showed that the F_1 embryo was diploid, no haploid and polyploidy embryos were observed. While F_3 embryos showed 100, 150, 200 and even 300 chromosomes, and it was inferred that the chromosomes number in germ cells of F_2 had doubled one or more times, and the F_2 produced diploid and polyploidy gametes, which mated each other to form F_3 embryos with different ploidy. Taken together, it was concluded that F_1 hybrids which come from crossing parents with similar genome size and karyotype, have not displayed polyploidization, while the diploid hybrid progenies could produce unreduced gametes, they fertilized to form polyploidy fish in F_3 . The pathway provided important guidance for the study of breeding polyploidy fish by distant crossing.

Key words: diploid hybrid; chromosomes in embryonic cell; unreduced gamete; distant crossing

Corresponding author: LIU Shao-jun. E-mail: lsj@hunnu.edu.cn