

人工诱导雌核发育牙鲆的染色体及核型证明*

刘静 尤锋 王新成 徐永立 张培军

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 于1994—1996年,分别在威海海洋渔业捕捞公司(石岛)和鸿洋实业总公司龙须岛育苗场采集人工培育的3—5龄牙鲆亲鱼,采用紫外线照射法使牙鲆精子遗传物质失活,并用冷休克法抑制受精卵第二极体释放,从而获得雌核发育二倍体牙鲆。原肠期采用空气干燥法、Giemsa染色,得到雌核发育二倍体、正常二倍体及单倍体的染色体制片,进行染色体和核型的分析。结果表明,牙鲆的雌核发育二倍体和正常二倍体的染色体数均为 $2n = 48$,核型为48t,即48条端部着色点染色体,臂数 $NF = 48$,两者的核型没有明显差异;单倍体为24条端部着色点染色体;在3个组别中,第一号染色体上都有一明显的次缢痕。雌核发育二倍体牙鲆的诱导率为98%。

关键词 牙鲆 雌核发育 二倍体 单倍体 核型 染色体

学科分类号 Q789

鱼类雌核发育的研究始于50年代,在随后的40多年里发展迅速(Hollebecq *et al.*, 1986; Nagy *et al.*, 1978; Na-Nakorn *et al.*, 1993; Pongthana *et al.*, 1995)。尽管中国淡水鱼类雌核发育研究已取得一定进展(吴清江, 1981, 1986, 1990; 蒋一珪等, 1982; 陈宏溪, 1983; 周嘉申等, 1983),但有关中国海水鱼类雌核发育的研究所见报道甚少。牙鲆属近海温水性底栖鱼类,在中国沿海分布很广,具有较高的经济价值。本文报告对人工诱导雌核发育牙鲆的染色体及核型的分析结果,以期为进一步开展雌核鱼类育苗及遗传育种研究提供科学依据。

1 材料与方 法

实验于1994—1996年进行,人工培育的3—5龄牙鲆 [*Paralichthys olivaceus* (T. et S.)]亲鱼分别取自威海海洋渔业捕捞公司(石岛)和鸿洋实业总公司龙须岛育苗场。

1.1 紫外线照射和冷休克处理

轻轻挤压雄性亲鱼的腹部,将获得精液中的一部分与刚刚挤出的牙鲆卵子人工授精,经2min后放入正常海水中培育,作为对照组I;其余的精液用格氏液稀释50倍,放入玻璃容器内,置于30W紫外线灯下照射3min后,与刚刚挤出的牙鲆卵子授精,取出一小部分受精卵放入正常海水中培育,作为对照组II;剩余的经遗传物质失活的精子激动过的卵子,3—

* 国家“863”计划资助项目,963052号。刘静,女,出生于1965年8月,副研究员, E-mail:museum@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:1996-07-10, 收修改稿日期:1998-04-20

4min 后放入 0—2℃ 的海水中冷休克处理 45min, 然后放入正常海水中培育, 作为实验组。

1.2 染色体制片与分析

分别取对照组 I、对照组 II 和实验组的中期原肠胚 100—200 粒, 按常规空气干燥法制片、Giemsa 染色、镜检。选出 100 个左右较清晰的染色体中期分裂相进行染色体计数, 再从中选出 10 个较好的分裂相进行显微照相、放大和测量, 染色体的命名按 Levan (1964)。

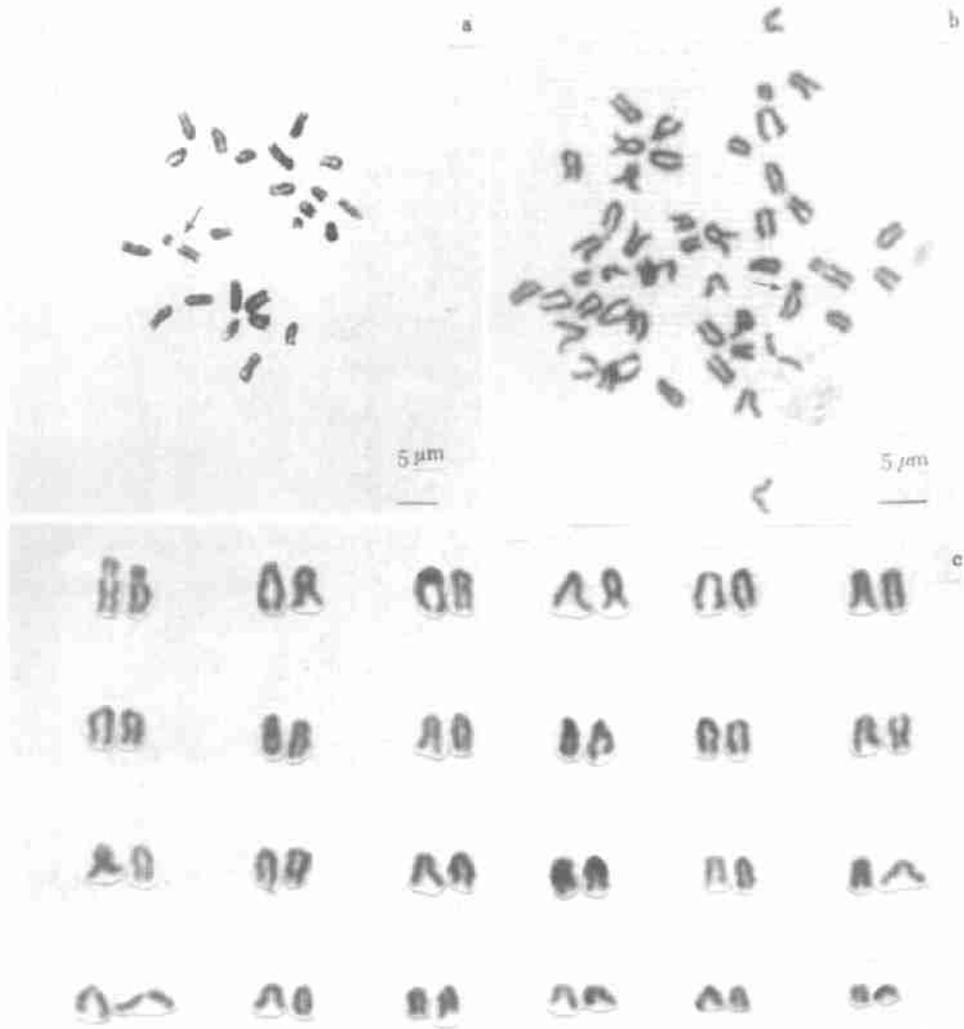


图1 牙鲆单倍体中期分裂相和雌核发育二倍体中期分裂相及核型

Fig.1 The metaphase chromosomes of haploidy and gynogenetic diploidy and its karyotype in *Paralichthys olivaceus* (T. et S.)

- a. 单倍体染色体中期分裂相(箭头示次缢痕); b. 雌核发育二倍体染色体中期分裂相(箭头示次缢痕);
c. 雌核发二倍体的核型

2 结果

在对照组 I 中, 观察了 100 个中期分裂相, 皆为正常二倍体, 染色体众数 $2n = 48$, 臂数

$NF = 48$, 核型为 $48t$, 全部为端部着丝点染色体, 第一号染色体上有一明显的次缢痕(表 1)。在对照组 II 中, 观察了 101 个中期分裂相, 其中 2 个为二倍体, 即 $2n = 48$, 其余 99 个为单倍体分裂相, 染色体众数 $n = 24$, 均为端部着丝点染色体, 在第一号上有一明显的次缢痕(图 1: a)。在实验组中, 观察了 103 个中期分裂相, 全部为二倍体, 染色体众数 $2n = 48$, 臂数 $NF = 48$, 核型为 $48t$, 均为端部着丝点染色体, 在第一号上也有一明显的次缢痕(图 1: b, c)。

表 1 牙鲆雌核发育二倍体、正常二倍体及单倍体的染色体分析

Tab.1 Chromosome analyses of gynogenetic diploid, normal diploid and haploid in *Paralichthys olivaceus* (T. et S.)

项 目	对照组 I	对照组 II	实验组
精液处理	直接与卵子授精	稀释并经 UV 照射后与卵子授精	稀释并经 UV 照射后与卵子授精
受精卵处理	正常海水中培育	正常海水中培育	0—2℃ 海水中冷休克 45min 后, 于正常海水中培育
观察分裂相数	100	101	103
染色体众数	48	24	48
染色体倍性	$2n$	n	$2n$
核型	$48t$	$24t$	$48t$
第一号染色体上有无次缢痕	有	有	有

3 讨论与结语

本研究得到的牙鲆正常二倍体核型为 $48t$, 即 48 条端部着丝点染色体, 与刘静(1994)和尤锋等(1995)报道的结果相同; 而单倍体的染色体、雌核发育二倍体及核型属国内首次报道。从核型分析结果来看, 牙鲆雌核发育二倍体核型与正常二倍体核型无明显差异, 二者都没发现性染色体存在(刘静, 1994)。今后有待进一步进行染色体银染或分带研究, 可望找出其差异。

人工诱导鱼类雌核发育的方法有许多种, 如用物理或化学因子处理授精前的精液、用带血的玻璃针激活卵子发育及杂交等, 但这些方法都要经过两个步骤: 一是用遗传物质失活的精子激活卵子并启动卵子胚胎发育; 二是使激活的卵子在第一次卵裂前二倍体化。只完成第一个步骤所产生的个体是单倍体, 由于只有一套染色体组, 胚胎不能正常发育, 孵化后个体不能存活, 因此不能象植物那样直接用于单倍体育种(吴仲庆, 1991)。雌核发育卵子一旦在第一次卵裂前二倍体化, 所产生的后代即为雌核发育二倍体。本研究通过对牙鲆人工授精前的精液进行紫外线照射, 使其遗传物质失活, 仍能激发卵子胚胎发育。被激动的卵子经过冷休克(0—2℃)处理 45min, 阻止了第二极体的排出, 受精卵由原来只来自母体的一套染色体组加倍而变成了两套染色体组, 即产生了雌核二倍体。

牙鲆性别的决定机制是 XX/XY 型, 日本学者已对此作过详细研究和报道(山本荣一等, 1990; 山本荣一, 1992; Tabata, 1991)。在雌性同配($XX \text{♀} - XY \text{♂}$)的情况下, 每个卵子都含有一条 X 染色体, 经过人工单性生殖后, 雌核生殖的二倍体均含有两条 X 染色体, 都是遗传上的雌体, 其表型也是雌性。

从本实验中对照组 II 的染色体计数结果看, 单倍体的诱导率为 98%, 有 2% 的正常二倍体出现, 说明仍有极少数精子的遗传物质没有灭活, 以致于与卵子结合出现了正常二倍

体,因此雌核发育二倍体的诱导率可达到 98%。然而日本曾报道过牙鲈雌核发育二倍体的诱导率达到 100%,这可能是实验条件不同造成的。因此,要想使雌核发育二倍体的诱导率达到 100%,即对照组 II 中单倍体率达到 100%,必须再适当调整诱导条件,特别是紫外线强度及精液稀释浓度等。

自发现鱼类中也有 Hertwig 效应的雌核发育以来,已有许多种经济鱼类人工雌核发育诱导成功(陈宏溪,1983),并带来很大经济效益。人工雌核发育无疑已成为现实的新技术之一。雌核发育二倍体没有精子带来的遗传物质,染色体完全以雌核为基础,各基因点有较多的纯合机会,可以建立纯系,因此它在鱼类遗传育种研究与应用上具有重要意义。

致谢 王 勇、相 渊、刘宗柱等同志帮助实验,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王新成,1994. 全雌牙鲈种苗培育技术. 海洋科学, (6): 63
- 尤 锋,刘 静,1995. 三倍体牙鲈的核型证明. 海洋与湖沼(增刊),26(2): 115—118
- 刘 静,1994. 牙鲈染色体组型的研究. 海洋科学, (2): 65—67
- 吴仲庆,1991. 水产生物遗传育种学. 厦门: 厦门大学出版社, 152—157
- 吴清江,1981. 鲤鱼人工雌核发育及其作为建立近交系新途径的研究. 遗传学报,8(1): 50—55
- 吴清江,1986. 鲤鱼染色体组人工调控的核型证明. 水生生物学报,10(3): 265—270
- 吴清江,1990. 全雌鲤鱼的培育及其养殖效果,水利渔业,3: 21—23
- 陈宏溪,1983. 鱼类的雌核生殖. 见: 中国鱼类学会编. 鱼类学论文集(第3卷). 北京: 科学出版社, 135—146
- 周嘉申,沈俊宝,刘明华,1983. 黑龙江方正银鲫雌核发育的细胞学初步探讨. 动物学报, 29(1), 11—16
- 蒋一珪,俞豪祥,陈本德等,1982. 鲫鱼的人工和天然雌核发育. 水生生物学集刊,7(4): 471—480
- 山本荣一,增谷龙一郎,1990 ヒラメの雌性化種苗生産. 养殖,27(5): 80—85
- 山本荣一,1992. ヒラメ. 养殖, 29(12): 60—62
- Hollebecq M G, Chourrout D, Wohlfarth G *et al*, 1986. Diploid gynogenesis induced by heat shocks after activation with UV-irradiated sperm in common carp. Aquaculture, 54: 69—76
- Levan A, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52: 201—220
- Nagy A, Rajki K, Horvath L *et al*, 1978. Investigation on carp, *Cyprinus carpio* L., gynogenesis. J Fish Biol, 13: 215—224
- Na-Nakorn V, Sidthikrawong P, Tamchalanukit W *et al*, 1993. Chromosome study of gynogenetic offspring of artificial crosses between members of the catfish families Clariidae and Pangasiidae. Environ Biol Fish, 37: 317—322
- Pongthana N, Penman D, Karnasuta J *et al*, 1995. Induced gynogenesis in the silver barb (*Puntius gonionotus* Bleeker) and evidence for female homogamety. Aquaculture, 135: 267—276
- Tabata K, 1991. Induction of gynogenetic diploid males and presumption of sex determination mechanisms in the hirame *Paralichthys olivaceus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 57(5): 845—850

CHROMOSOME AND KARYOTYPE EVIDENCE OF ARTIFICIAL-INDUCED GYNOGENESIS IN THE OLIVE FLOUNDER *PARALICHTHYS OLIVACEUS* (T. ET S.)

LIU Jing, YOU Feng, WANG Xin-cheng, XU Yong-li, ZHANG Pei-jun

(*Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

Abstract Since there exist obvious growth differences between the male and female olive flounder, i. e., the female grows faster than the male, and the number of the female is smaller than the male, the production of the olive flounder is limited. Gynogenesis is considered to be an efficient method to solve these problems. For this purpose, gynogenetic induction of the olive flounder was carried out by cold shock 3—4min after activation of the eggs with sperm which had been inactivated with UV irradiation during 1994 to 1996. The normal diploidy, gynogenetic diploidy and haploidy olive flounder were obtained and cultured under normal conditions. Chromosome samples of the three groups were prepared by air-dried method. Observations and analyses of chromosome spreads show that there are 48 acrocentric chromosomes in both normal and gynogenetic diploid. Their karyotype formula were $48t$, $NF = 48$. In haploid there were 24 acrocentric chromosomes. A secondary constriction was observed in No.1 chromosomes in all groups. There was no obvious difference in karyotype between normal and gynogenetic diploids.

The sex determination in olive flounder is of the female homogametic (XX) and male heterogametic (XY) type. Manipulation of such a system using gynogenesis gives diploid fish that are both genetically and phenotypically female, because the homogametic haploid gynogenetics is produced when the irradiated sperm is used to fertilize eggs, and diploidisation of the gynogenetic genome is achieved by temperature shocks. The present study also shows that the induction rate of the gynogenetic diploid in olive flounder was 98%; elsewhere, it was reported that a 100% production of all-female gynogenesis was obtained in the same species in Japan. The failure to produce 100% gynogenesis might be due to the limited conditions of treatment of sperm. By the optimization of inducing conditions, the results may be further improved.

Key words *Paralichthys olivaceus* (T. et S.) Gynogenesis Diploid Haploid Karyotype Chromosome

Subject classification number Q789