

异源四倍体鲫鲤的性腺发育研究

李建中 张轩杰 刘少军 周工健 刘 篓

(湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081)

摘要: 采用组织切片技术对异源四倍体鲫鲤的性腺进行了研究。结果表明: 异源四倍体鲫鲤的性腺发育程序和普通鲤鲫鱼相似, 可以分为 6 个时期。雌雄个体都能达到性成熟, 其中雌性个体性成熟年龄为一周年; 雄性个体比雌性个体成熟早, 150 日龄即可达到性成熟。成熟卵巢的成熟系数为 9.25%—15.60%, 成熟精巢的成熟系数为 1.65%—5.19%。成熟期卵径为 1670.4—1780.5 μm 之间, 成熟精子头径为 2.3—2.4 μm 。繁殖期为每年 3—5 月份。该研究证明异源四倍体鲫鲤的性腺发育是正常的, 雌雄个体都能达到性成熟。

关键词: 异源四倍体; 性腺发育; 成熟

中图分类号: Q954.43 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2002)02-0116-007

国内外学者在人工诱导四倍体鱼方面已经做了大量的工作^[1—12], 但是到目前为止, 成功获得遗传性状稳定且能自然繁殖后代的四倍体鱼的研究是少见的。湖南师范大学生命科学学院与湘阴县东湖渔场合作, 在红鲫(*Carassius auratus red variety*, ♂)与湘江野鲤(*Cyprinus carpio L.*, ♂)的杂交一代(F_1)中发现部分可育的后代^[13], F_1 自交获得 F_2 , F_2 自交又产生 F_3 , 目前已繁殖到 F_{10} 。经染色体检查及 DNA 含量测定, 证明 F_1 和 F_2 是二倍体, F_3 以后为遗传性状稳定且能自然繁殖的异源四倍体^[1,2]。关于人工诱导三倍体鱼的性腺发育已有过不少的研究^[14—16], 但有关人工诱导四倍体鱼性腺发育的系统研究至今尚未见报道。为了进一步了解鲫鲤杂种异源四倍体鱼(以下简称异源四倍体鲫鲤)能自然繁殖的生物学基础, 笔者对异源四倍体鲫鲤的性腺发育进行了研究。

1 材料与方法

在湖南湘阴县东湖渔场 1998 年 4 月人工繁殖的异源四倍体鲫鲤 F_8 中(1999 年 3 月后转到湖南师范大学四倍体鱼种质资源保护基地内养殖), 从 1998 年 5 月开始, 按月取材到 1999 年 12 月, 共取 72 号材料, 其中雌性 30 尾, 雄性 42 尾。性腺用 Bouin's 液进行固定(对成熟卵巢用 Smith's 液固定); 系列酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 连续切片厚度为 6—8 μm , H · E 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。性腺分期按刘筠等采用的鲤科鱼类的分期标准^[17]。采用日本尼康公司 E600 显微照相及

收稿日期: 2000-10-20; 修订日期: 2000-12-18

基金项目: 国家“863”计划资助项目(国科生字 1996-182 号); 湖南省重点科技攻关项目资助

作者简介: 李建中(1969—), 男, 湖南省湘乡市人; 博士研究生; 主要从事鱼类生殖生理方面的研究

通讯作者: 刘 篓

图像采集分析仪和 Olympus 显微镜测微尺测定卵径和核径。性腺成熟系数由下式求得: 成熟系数= (性腺重/ 净体重) × 100%。

2 结果

2.1 外形特征

雌性个体卵巢成对地位于鳔腹两侧, 左右对称, 颜色随卵巢发育阶段不同而异, 从浅红色或浅黄色至桔黄色。成熟卵巢松软呈椭球形, 桔黄色, 轻轻挤压其腹部, 可见透明卵粒从泄殖孔排出。卵巢绝大多数发育状态是一致的, 但是在解剖观察的 30 尾雌鱼中有 2 尾有所变化, 约占所观察雌鱼卵巢总数的 6.7%。这 2 尾雌鱼的卵巢都是一边发育正常, 卵巢中充满了大量的桔黄色卵粒, 而另一边卵巢中仅见到几个大小不等的桔黄色卵粒。

雄性个体精巢绝大多数成对地位于鳔腹两侧, 左右对称。成熟精巢呈条块状, 乳白色, 轻轻挤压其腹部, 即有白色精液从泄殖孔流出。在解剖观察的 42 尾雄鱼中, 也发现 3 尾雄鱼精巢有所变化, 约占所观察雄鱼精巢总数的 7.1%。这 3 尾雄鱼精巢均为单边发育, 即一边性腺发育良好, 另一边看不到任何性腺组织。但经组织切片观察, 其发育过程与正常四倍体雄鱼相同, 具有明显的精细小管, 且管腔里充满成熟的精子。

2.2 组织学分期

2.2.1 卵巢 第一期 呈透明的细线状结构, 肉眼分不出雌雄。卵原细胞略呈圆形或椭圆形, 卵径 3.5—18.8 μm。胞质和胞核均透亮, 核染色稍深, 位于细胞中央, 胞核占很大比例, 核径 2.1—14.5 μm, 染色质均匀分布, 切面中有 1—2 个核仁被苏木精染成深蓝色(图版 : 1)。第二期 呈扁带状半透明, 呈浅红色或肉红色。肉眼尚看不清卵粒, 但固定后呈花瓣状的分叶, 这就是切片上看到的蓄卵板, 以时相卵母细胞为主, 也有少量卵原细胞。

时相卵母细胞大多近圆形, 卵径 20.9—305.4 μm, 核径 12.5—113.5 μm。时相卵母细胞最显著的特点是: ①在细胞中出现卵黄核(图版 : 2); ②细胞质呈嗜碱性反应, 被苏木精染成紫蓝色; ③细胞膜外周出现一层滤泡细胞。第三期 浅黄色, 体积有所增大, 血管明显且分支, 透过卵巢膜可见到卵粒, 但不易分离脱落。卵巢成熟系数为 0.95%—4.12%。以时相卵母细胞为主, 细胞大多近圆形或椭圆形。卵径 152.6—580.6 μm, 核径 25.8—179.3 μm。胞质的中间出现零星的脂滴, 而后在卵膜内缘出现一层卵黄泡, 滤泡细胞层由单层变为双层(图版 : 3), 放射膜出现。第四期 浅黄色, 卵巢体积明显增大, 血管粗大且分支血管发达。卵巢壁薄, 卵粒饱满, 易分离脱落。成熟系数 3.56%—10.18%。以时相卵母细胞为主。时相卵母细胞大多近圆形。根据卵母细胞大小、卵黄颗粒充满程度和胞核位置的变化可分为 3 期。早期卵径 299.5—724.6 μm, 核径 138.4—210.5 μm。卵黄颗粒向内扩展至核膜外周, 此时可见到受精孔(图版 : 4—5)。中期卵径增至 381.7—882.9 μm, 核径 147.4—223.5 μm, 大部分卵黄颗粒已被挤到卵膜内缘成为皮质泡, 卵黄颗粒充满胞质, 胞核仍位于细胞的中央(图版 : 6)。晚期卵径增至 567.4—1289.2 μm, 核径 105.2—190.8 μm, 卵核或生殖泡(Germinal vesicle, GV)开始偏位, 卵黄颗粒发育到最大程度, 卵膜的双层滤泡结构和放射膜更加明显清楚(图版 : 7)。第五期 桔黄色, 发育到最大体积, 几乎占据全部腹腔空隙。卵巢松软, 富于弹性, 挤压腹部, 即有透明卵从泄殖孔排出。成熟系数为 9.25%—15.6%。V 时相成熟卵子直径一般在 1670.4—1780.5 μm 之

间,最大卵径可达 $1800\mu\text{m}$ 。卵子透明,卵膜变薄,卵黄颗粒融合呈胶液化。此时卵母细胞生殖泡已破裂(GVBD),达到了生理成熟(图版:8)。排卵时成熟卵由滤泡中释放,游离地储集于卵巢腔中待产卵。第 期 产过卵或自然退化的卵巢。卵巢松软如空袋状,表面皱缩,卵巢充血呈肉红色,不透明。卵巢中除了大量的退化卵外,还有一些 和 时相卵母细胞。成熟系数 4.51%—10.29%。

2.2.2 精巢 第 期为细线状,银白色,不见血管,肉眼不能辨别雌雄。经切片镜检,可以看到无定向的精原细胞分散在结缔组织之间(图版:9)。第 期为细线状,半透明,精原细胞显著增多,开始成束排列(图版:10)。第 期为扁带状,呈淡红色。精细小管出现管腔。在一个精细小管的管腔内,除少数的精原细胞外,多数为初级精母细胞和少量的次级精母细胞。成熟系数为 1.05%—2.84%。第 期为条块状,呈灰白色,表面有明显的血管分布。精细小管中存在有精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞和精子细胞,但这些不同发育阶段的各类精细胞在一个精细小管内往往是以同型的细胞群成堆排列。有的精子细胞开始变态,精细小管中出现少量的精子(图版:11)。成熟系数为 1.53%—3.30%。第 期呈乳白色,精巢表面的血管更加明显。精细小管充满大量成熟的精子(图版:12)。精子头部为圆颗粒状,直径为 $2.3\text{—}2.4\mu\text{m}$,轻压鱼腹有大量乳白色精液流出。成熟系数为 1.65%—5.19%。第 期精巢开始萎缩,成熟系数为 1.29%—4.12%。尚未排出的精子逐渐退化吸收。

2.3 第一次性周期内性腺发育的程序

2.3.1 卵巢的发育程序 当年 4 月孵化的四倍体幼鱼,50—60 日龄的卵巢处于第 期;60—90 日龄的卵巢发育到第 期;120—150 日龄的卵巢发育到第 期;180—210 日龄的卵巢发育到第 期;1 龄鱼越冬期性腺大多发育到⁺⁺期;330—360 日龄(即次年 3、4 月)的卵巢发育到 期。卵子从 时相的生长成熟发育到 时相的生理成熟,遇到适合的生态条件或人工催产时,即可完成成熟排卵和产卵过程。

2.3.2 精巢的发育程序 30—50 日龄的精巢处于第 期;50—70 日龄的精巢发育到第 期;80—120 日龄的精巢发育到第 期;120—150 日龄的精巢发育到第 期,此时精细小管中出现少量精子,挤压雄鱼腹部,可见少量白色精液。150 日龄以后的精巢绝大多数处于第 期,达到性成熟,此时期精细小管的管腔中充满大量成熟的精子。

3 讨论

研究结果表明,异源四倍体鲫鲤的雌性个体卵巢组织可观察到卵原细胞增殖时相(时相)、卵母细胞单层滤泡时相(时相)、卵黄泡出现时相(时相)、卵母细胞充满卵黄时相(时相)和卵母细胞成熟时相(时相)等发育正常的卵细胞;雄性个体成熟精巢都形成了精细小管结构,都完成了由精原细胞 初级精母细胞 次级精母细胞 精子细胞 精子的正常发育过程,而且精细小管中充满了成熟的精子。这有力地证明了异源四倍体鲫鲤的雌雄个体都是可育的,其性腺发育程序与普通鲤鲫鱼是相似的^[17],不同的是,异源四倍体鲫鲤的性成熟年龄较短,雌性个体 1 年可达到性成熟,和普通鲫鱼相似,比鲤鱼早;雄性个体 150 日龄即可达到性成熟,比普通鲫鱼和鲤鱼都早。

人工诱导三倍体鱼类预期是不育的,因为奇数染色体组将导致减数分裂的瓦解以及

性腺发育衰退或非整倍体配子的产生^[18]。对三倍体水晶彩鲫、白鲫、湘云鲫的性腺发育研究证明,三倍体鱼在功能上确实是不育的^[14—16]。人工诱导四倍体鱼则预期是可育的^[8]。Refstie 报道了鉴定为四倍体的若干雄性虹鳟,2 龄时产生了精液。陈敏容等获得的异源四倍体白鲫雄性个体能育,能正常发育产生具有受精能力的精子,而雌性个体都不能达到性成熟。但是,Chourrout 和 Myers 等人工诱导的四倍体虹鳟以及草鲤杂交四倍体和异源四倍体鲫鲤的两性都能达到性成熟,这说明四倍体鱼的性成熟不受亲本的亲缘关系和染色体组型之间差异的影响,而主要是与该四倍体鱼的整倍化程度有关。刘少军等已经报道了异源四倍体鲫鲤含有四套染色体($4n=200$),其中两套来自鲫鱼,两套来自鲤鱼。由于异源四倍体鲫鲤的染色体是整倍体的,因而异源四倍体鲫鲤能和二倍体鱼一样,进行正常的减数分裂,产生可育的二倍体配子($2n=100$),所以异源四倍体鲫鲤的雌雄个体都是可育的。至于前面提到的极少数异源四倍体鲫鲤的雌性个体一边性腺发育不良或雄性个体单边性腺发育的现象,究竟是由于染色体减数分裂异常还是其他原因造成的?有待于今后进一步的研究。

人工诱导四倍体鱼的可育性一直是鱼类育种工作者们关注的问题。人们期望通过诱导能育的四倍体雄鱼与二倍体雌鱼杂交产生出三倍体,应用于生产。但到目前为止,真正应用于生产的除了鲑鳟类、白鲫和异源四倍体鲫鲤以外,其他鱼类尚未见成功的报道。用生物学方法获得的异源四倍体鲫鲤的雌雄个体都是可育的,而且能自然繁殖,已形成了一个染色体数目为 $4n=200$ 的四倍体鱼新种群。有了一个能自然繁殖的四倍体鱼种群,无需专门的设备,即易生产大批量的四倍体鱼,使大规模生产三倍体鱼成为可能。异源四倍体鲫鲤的这种优势是用物理或化学方法诱导的四倍体鱼无法比拟的。异源四倍体鲫鲤和二倍体鲫鱼或鲤鱼杂交,获得了不育的三倍体湘云鲫和湘云鲤,已在全国 20 多个省市推广养殖。异源四倍体鲫鲤的培育成功,不但为探讨自然界鱼类多倍体的起源提供了重要的理论依据,而且为人工诱导鱼类多倍体提供了一条新的途径。

参考文献:

- [1] 刘少军,冯浩,刘筠,等.四倍体湘鲫 F₃—F₄、三倍体湘云鲫、湘云鲤及有关二倍体的 DNA 含量[J].湖南师范大学自然科学学报,1999,22(4):61—68
- [2] 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: 171—186
- [3] 叶玉珍,吴清江.人工四倍体鲤鲫的产生[J].自然科学进展,2000,9(7):658—661
- [4] 陈敏容,杨兴淇,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
- [5] 陈敏容,阎康,刘汉勤,等.人工诱导白鲫(♀)×红鲤(♂)异源四倍体鱼的初步研究[J].水生生物学报,1987,11(1):96—98
- [6] Refstie T. Tetraploid rainbow trout produced by cytochalasin B [J]. *Aquaculture*, 1981, 25: 51—58
- [7] 桂建芳,孙建民,梁绍昌,等.鱼类染色体组操作的研究: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
- [8] 洪云汉.热休克诱导鳙鱼四倍体的研究[J].动物学报,1990,36(1):70—75
- [9] 吴维新,李传武,刘国安,等.鲤鱼和草鱼杂交四倍体及其回交三倍体草鱼杂种的研究[J].水生生物学报,1988,12(4):355—363

- [10] Chourrout D, Chevassus , Krieg F, et al. Production of second generation triploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females—Potential of tetraploid fish [J]. *Theor Appl Genet*, 1986, **72**: 193—206
- [11] Chourrout D, Akayama I. Chromosome studies of progenies of tetraploid female rainbow trout [J]. *Theor Appl Genet*, 1987, **74**: 687—692
- [12] Myers J M, Hershberger W K. Early growth and survival of heat-shocked and tetraploid-derived triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture*, 1991, **96**: 97—107
- [13] 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—107
- [14] 刘少军, 胡芳, 周工健等. 三倍体湘云鲫繁殖季节的性腺结构观察[J]. 水生生物学报, 2000, **24**(4): 301—306
- [15] 桂建芳, 肖武汉, 陈丽, 等. 人工三倍体水晶彩鲫的性腺发育[J]. 动物学报, 1991, **37**(3): 297—304
- [16] 杨兴棋, 陈敏容, 俞小牧, 等. 三倍体白鲫的生物学特性[J]. 水生生物学报, 1994, **18**(2): 156—163
- [17] 刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学[M]. 北京: 农业出版社. 1993, 22—30
- [18] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京: 中国农业出版社. 1999, 138—140

STUDIES ON THE GONADAL DEVELOPMENT IN ALLOTETRAPLOID HYBRIDS OF *CARASSIUS AURATUS RED VAR.*

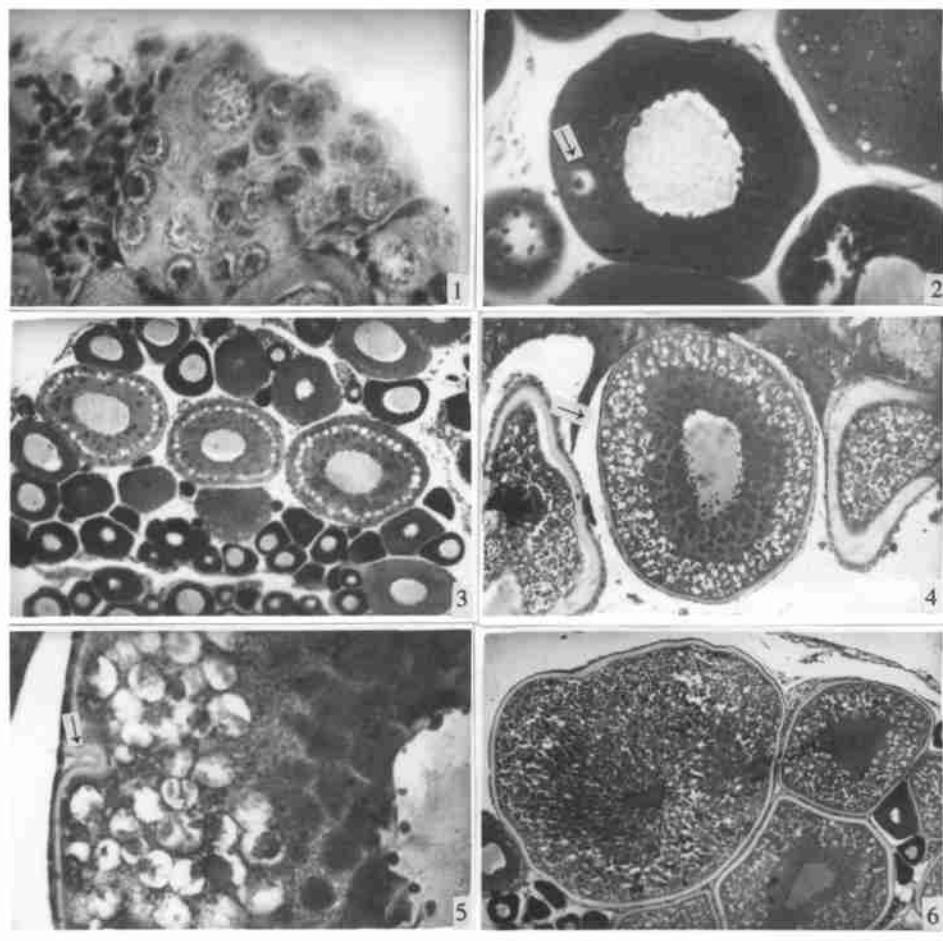
(♀) × *CYPRINUS CARPIO L.* (♂)

LI Jian-zhong, ZHANG Xuan-jie, LIU Shao-jun, ZHOU Gong-jian and LIU Yun

(College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081)

Abstract: The gonadal development of the allotetraploid hybrids of *Carassius auratus red var.* (♀) × *Cyprinus carpio L.* (♂) was studied through tissue section. The gonadal development was similar to that of *Cyprinus carpio* and *Carassius auratus* and could be divided into six stages. Both the male and the female fishes could attain sexual maturity. The male fishes attained earlier sexual maturity than the female fishes. The male fishes attained sexual maturity when they were 150 days old, but the female fishes needed a year. The mature coefficient of testis was 1.65%—5.19% and the mature coefficient of ovaries was 9.25%—15.60%. The diameter of mature oocyte was 1670—1780μm. The diameter of the head of mature sperm was 2.3—2.4μm. The breeding season of the fishes was from March to May. The study proved that the gonadal development of the allotetraploid hybrids was normal and both the female fish and the male fish could be fertile.

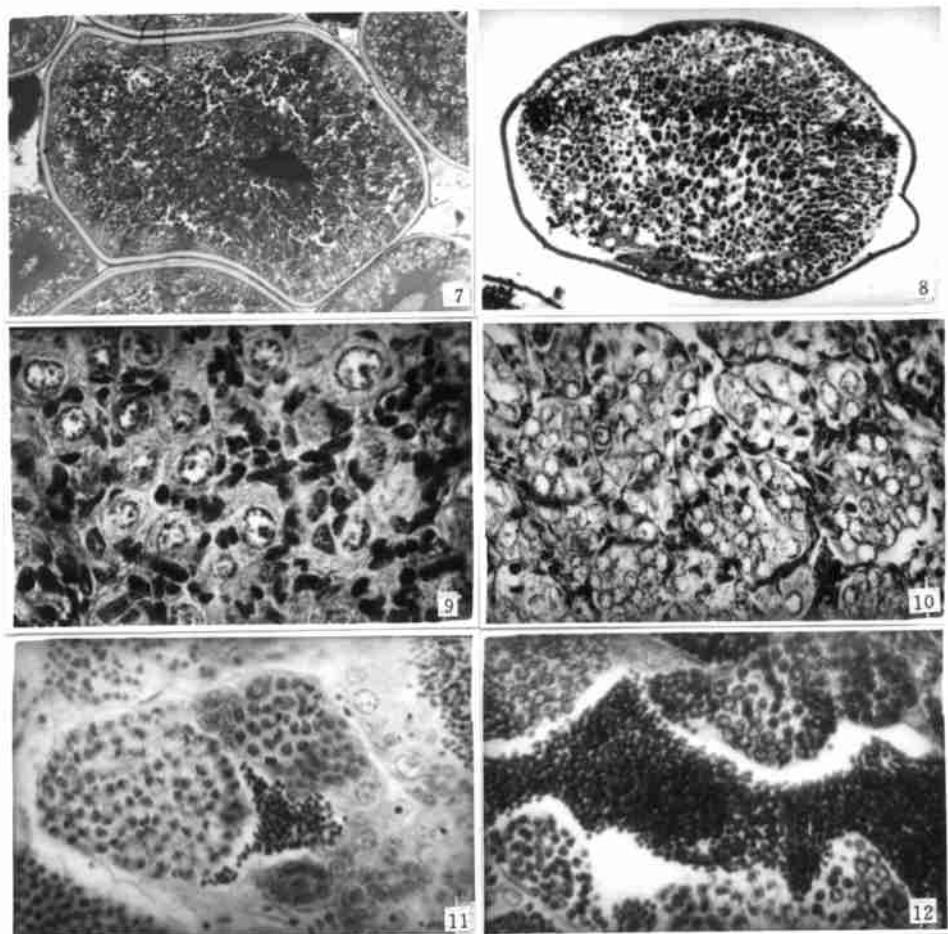
Key words: Allotetraploid; Gonadal development; Maturation



图版

1. 第 期卵巢, 示卵原细胞, $\times 800$; 2. 第 时相卵母细胞, 示卵黄核, $\times 300$; 3. 第 期卵巢, 示第 时相早期卵母细胞中的单层液泡, $\times 100$; 4. 第 + 时相卵母细胞, 示受精孔, $\times 50$; 5. 图 4 的放大, $\times 400$; 6. 第 ++ 时相卵母细胞, 示胞质充满卵黄, $\times 50$

1. The ovary at the stage I. showing oogonia, $\times 800$; 2. Stage I+ oocyte showing yolk nucleus, $\times 300$; 3. The ovary at the stage II, showing unilayer vacuoles , $\times 100$; 4. Stage II+ oocyte, showing micropyle, $\times 50$; 5. The enlargement of Fig. 4, showing micropyle, $\times 400$; 6. Stage III+ oocyte, showing full yolk granules in cytoplasm, $\times 50$



图版

7. + + + 时相卵母细胞, 示核偏位, $\times 50$; 8. 时相卵母细胞, $\times 50$; 9. 第一期精巢, 示精原细胞, $\times 1000$; 10. 第一期精巢, 示精原细胞开始成束排列, $\times 800$; 11. 第二期精巢, 示精子细胞, $\times 400$; 12. 第二期精巢, 示成熟精子, $\times 400$

7. Stage + + + oocyte, showing migrated nucleus, $\times 50$; 8. Stage oocyte, $\times 50$; 9. Stage testis, showing spermatogoniums, $\times 1000$; 10. Stage testis, showing bunchy spermatogoniums, $\times 800$; 11. Stage testis, showing spermatids, $\times 400$; 12. Stage testis, showing mature spermatozoa, $\times 400$