

泥鳅雄核发育纯合二倍体的产生*

刘汉勤 易泳兰 陈宏溪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

以机械方法挑去泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) (♂) × 大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) (♀) 属间杂交受精卵的雌核, 得到泥鳅雄核发育单倍体胚胎。将这种单倍体胚胎的囊胚细胞核移植到大鳞副泥鳅去核卵中, 获得了 243 个原肠胚胎, 其染色体鉴定表明, 29.6% 的核移植体的染色体发生了加倍。在另一实验组中, 从 769 个核移植卵得到了 5 尾 2 cm 以上的个体。尾鳍染色体鉴定、肌肉 LDH 同工酶电泳和形态鉴别表明, 这 5 尾核移植体为泥鳅雄核发育纯合二倍体。

关键词 雄核发育单倍体, 细胞核移植, 染色体加倍, 雄核发育纯合二倍体, 性决定。

人工诱导雌核或雄核发育, 然后通过染色体的加倍得到纯合二倍体, 对于鱼类的遗传育种工作具有重要的意义。它既能纯化优良品种, 又能大量提供选种的原始材料, 还是生产单性鱼的有效途径。从 50 年代至今, 人工产生鱼类雌核发育工作已在几十种鱼类获得了成功。目前, 在鱼类广泛采用的方法是: 以遗传物质失活的精子激活鱼卵, 得到雌核发育单倍体。用冷休克、热休克或静水压等方法处理卵子, 抑制第二极体的排出, 产生雌核发育二倍体。然而, 由于在第一次减数分裂中染色体的交换, 由此得到的二倍体并不是完全纯合的。Streisinger 等用物理方法阻断雌核发育卵子的第一次有丝分裂, 获得了大量的纯合二倍体的斑马鱼^[1]。是成功地获得鱼类纯合二倍体的唯一报道。Porter 以机械方法挑去蛙受精卵的雌核, 得到了雄核发育单倍体胚胎^[10]。Subtelny 将蛙雄核发育单倍体胚胎细胞的核移植到去核卵中, 染色体自行加倍而产生了纯合二倍体的幼体^[12]。Parsons 等以辐射使雌核失去活性产生了鱼类雄核发育单倍体胚胎^[9]。我们以泥鳅为材料, 借鉴两栖类的方法, 成功地获得了泥鳅雄核发育纯合二倍体的成鱼。本文报道实验的部分结果。

材 料 与 方法

实验材料 泥鳅和大鳞副泥鳅来自武汉和广州, 其染色体数目参考武汉大学细胞生物学实验室的实验结果^[1]。根据我们的工作经验鉴别形态。根据胸鳍的形状鉴别雌雄。

* 工作中得到陈敏容、杨兴棋、陈景新、阎康、邓初夏和聂光风等同志的帮助, 在此表示衷心的感谢。
1986年5月19日收到。

雄核发育单倍体的产生 参照 Porter 的方法, 在水温 18—21℃条件下, 泥鳅精子与大鱗副泥鳅卵受精后 7—15 分钟内挑去雌核, 得到具有泥鳅雄核, 大鱗副泥鳅卵质的单倍体胚胎。

细胞核移植 按鱼类细胞核移植方法^[2]。将泥鳅雄核发育单倍体囊胚细胞的核移植到大鱗副泥鳅去核卵中, 由此发育成雄核单倍体或纯合二倍体。将泥鳅(♂) × 大鱗副泥鳅(♀)的杂交囊胚细胞的核移入去核的大鱗副泥鳅卵中, 由此得到的核移植体作为对照。

核移植体的检查及鉴定 原肠期胚胎细胞用秋水仙素处理后, 按常规气干法制片, 检查其染色体的数目。对仔鱼或成鱼则根据我们的方法(待发表), 将尾鳍细胞放入添加 20% 小牛血清的 TC 199 培养液中培养 6—7 天, 然后以气干法制片, 检查其染色体。成鱼肌肉乳酸脱氢酶(LDH) 同工酶电泳按常规淀粉凝胶垂直平板方法进行。

结 果

两组单倍体细胞核移植体和杂交细胞核移植体的发育见表 1。第一组中的 243 个原肠胚胎来自 11 批核移植卵。对它们进行单个胚胎染色体制片检查表明, 大多数胚胎的染色体数目在 50 左右(图版 I: 1), 为单倍体; 少数胚胎的染色体数目在 90—102 之间(图版 I: 2), 发生了染色体的加倍。表 2 是对单倍体细胞核移植体染色体加倍率检查的结果。在 243 个原肠胚胎中, 我们观察了 61 个核移植胚胎的第一次卵裂出现的情况, 其中有 41 个胚胎的第一次卵裂出现在核移植后 50 分钟以内; 另外 20 个是在核移植 50 分钟以后才陆续进行第一次卵裂。这两群胚胎的细胞染色体加倍率分别为 14.6% 和 30%。在细胞核移植过程中, 我们发现鱼类囊胚细胞具有单核的和双核的。以单核囊胚细胞作供体的核移植卵的第一次卵裂一般比用双核囊胚细胞作供体的稍晚(待发表)。

表 1 细胞核移植体的发育

Tab. 1 Development of nuclear transplants

	移核卵数目 No. of Transplanted eggs	全囊胚 Blastula		原肠胚 Gastrula		体长达到 2 厘米个体 2cm fry		
		数目 No.	(%) ^{a)}	数目 No.	(%) ^{b)}	数目 No.	(%) ^{b)}	(%) ^{c)}
第一实验组 First experimental group	781	484	62.0	243	50.2			
第二实验组 Second experimental group	769	456	59.3	200	43.9	5	1.1	2.5
对照 Control	140	90	64.3	45	50.0	11	12.2	24.4

a. 相对于移核卵数目的百分比; b. 相对于全囊胚数目的百分比; c. 相对于原肠胚数目的百分比。

a. Percentages of blastulas in relation to the number of transplanted eggs.

b. Computed from the number of blastulas (100%).

c. Computed from the number of gastrulas (100%).

表2 单倍体细胞核移植体的染色体加倍率

Tab. 2 Doubling rate of chromosome of haploid nuclear transplants

批号 Batch no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	合计 Total no.
原肠胚数目 Number of Gastrula	20	15	16	31	24	20	18	25	16	14	44	243
染色体加倍胚胎数目 Number of Doubled embryo	2	2	6	12	5	3	2	11	7	5	17	72
加倍率 Doubling rate(%)	10.0	13.3	37.5	38.7	20.8	15.0	11.1	44.0	43.8	35.7	38.6	29.6

在第二组实验中得到了5尾2厘米以上稚鱼，其中一尾存活了14个月。经下述几种标准鉴定，确定这5尾鱼为纯合二倍体泥鳅 (*Homozygous diploid loach*) 以下简称HDL。

肌肉乳酸脱氢酶 (LDH) 同工酶电泳结果表明，两尾实验鱼 (HDL 4 和 HDL 5) 的酶谱与泥鳅自交的相似，而不同于泥鳅 (♂) × 大鱗副泥鳅 (♀) 杂交鱼的酶谱 (图版 I: 3)。对 HDL 1 和 HDL 2 两尾实验鱼进行了尾鳍染色体制片检查，对染色体分散均匀、图象清晰的分裂相中染色体计数表明，染色体数目都为 100，其中 HDL 1 有 8 个分裂相，HDL 2 有 6 个分裂相 (图版 I: 4, 5)。5尾实验鱼在形态上都表现出泥鳅的特征。它们的尾鳍基部都有一黑斑，尾柄长大于高，皮褶棱不很发达 (图版 I: 6, 7)。两尾实验鱼 (HDL 2 和 HDL 3) 的胸鳍形状与正常雌性一样，呈扇形。另三尾 (HDL 1, HDL 4 和 HDL 5) 因个体较小尚难断定性别。

讨 论

1. Subtelny 将蛙雄核发育单倍体细胞核移植到去核卵中，发现在全囊胚总数中有 37.2% 是来自第一次卵裂延迟了大约一个分裂周期的核移植卵。这些囊胚在以后的发育中经过鉴定被确认为纯合二倍体，而其余按正常时间第一次卵裂的核移植体绝大多数为单倍体。他认为：移植核染色体的加倍发生在第一次卵裂的延迟过程中。然而，在本实验中没有发现类似的规律。①部分核移植体第一次卵裂的时间虽有延迟，但延迟的时间不是一个完全的卵裂周期；②延迟卵裂的核移植体中染色体加倍机率并不很高；③单核和双核囊胚细胞供体对核移植体的第一次卵裂时间有较大的影响。根据鱼类胚胎发育的特点，我们作出如下推测：鱼类胚胎发育较两栖类快，囊胚期细胞周期比两栖类的短。按照细胞周期的规律，通常增殖型细胞周期的时间越短，G1 期时间越短，G1 期细胞在细胞群体中的比例相应要小，G2 期和 M 期细胞比例就大。经过了染色体复制 ($1n \rightarrow 2n$) 的 G2 期细胞核被移植进卵细胞质后，进行一次受精卵必须进行的 DNA 合成 ($2n \rightarrow 4n$)，以正常或稍延迟的时间进行第一次卵裂 ($4n \rightarrow 2n$)，染色体却加倍了。从早期的同步卵裂逐渐趋于异步性分裂而形成的囊胚细胞群体，其中细胞所处周期的时相处于动态变化中，随时都可能具有不同的比例。在不同的时期取囊胚细胞作为核移植的供体，细胞核在移植后染色体加倍的机率就可能有差异。这可能是表 2 中每一批核移植体染色体加倍机率差异的原因。

2. 我们选择泥鳅和大鱗副泥鳅作为实验材料, 是考虑到两种鱼的亲缘关系较近, 而染色体数目相差很大, 以便于对核移植体进行染色体分析。如果在核移植以前未去掉雌核, 核移植体的染色体数目为 $24 + 50 = 74$; 如果去核成功, 染色体未加倍, 则染色体数目为 50; 染色体加倍后, 数目即为 100。

3. 高等动物单倍体, 无论是来自雌核或雄核发育, 无一例外只能活到摄食期。5 尾实验鱼都存活了数月, 显然不是单倍体。从表面形态看来, 它们都是典型的泥鳅, 尾柄长而窄, 皮褶棱不很发达。我们检查了 2 尾实验鱼的肌肉 LDH 同工酶。它们 (e,f) 的图谱显然与泥鳅 (c) 的相同。虽然以泥鳅为母本的杂交鱼 (b) 也表现出同样的图谱, 但由于实验是以大鱗副泥鳅为母本, 如果雌核未挑去, 实验鱼只可能表现出大鱗副泥鳅为母本的杂交鱼 (a) 或大鱗副泥鳅自交鱼 (d) 的图谱。我们鉴定了两尾鱼的尾鳍细胞染色体, 其数目都是 100, 这两尾鱼中就有存活了 14 个月的 HDL 2。这些证据充分表明了它们是雄核发育纯合二倍体, 证明了这种产生雄核发育纯合二倍体的方法是可行的。

4. 对实验组原肠期胚胎的染色体制片检查表明: 染色体加倍的核移植体为 29.6%。而长到 2 厘米以上的个体(纯合二倍体)却只占原肠胚总数的 2.5%。这意味着只有 8.4% ($2.5\% \div 29.6\% = 8.4\%$) 纯合二倍体原肠胚胎存活下来。绝大部分纯合二倍体死亡的原因可能有两方面: ①对照核移植体中, 2 厘米以上个体只占原肠胚胎总数的 24.4%, 其余 75.6% 的核移植原肠胚胎在以后的发育过程中死亡。引起这些胚胎死亡的原因可能是核移植过程中对细胞核的损伤; 供体细胞核与受体细胞质之间细胞周期时相上的差异或供体与受体不同属的矛盾等。②大约 16% ($91.6\% - 75.6\% = 16\%$) 的纯合二倍体原肠胚胎则由于细胞核的纯合状态, 隐性基因的表达而死亡。

5. 对于高等动物单倍体胚胎的死亡已提出了多种解释^[4-8], 如隐性基因的表达, 核质比例失调和活性物质浓度的临界水平等。我们的实验表明: 虽然纯合的核状态对纯合二倍体的发育产生了一定的影响, 但纯合二倍体能发育到成鱼阶段的事实否定了隐性基因的表达是单倍体胚胎死亡的根本原因。

6. 以胸鳍为标志的性别鉴定判断 HDL 2 和 HDL 3 两尾实验鱼应为雌性。据此推测泥鳅的性决定机制可能为雌性同型配子 (XX), 雄性异型配子 (XY)。因为所得成鱼很少, 没有发现超雄个体 (YY) 并不意味着泥鳅超雄个体不能存活。哺乳类 YY 合子是不能存活的。在进化过程中, 基因的不断缺失使得哺乳类的 Y 染色体比较短小。YY 合子缺乏 X 染色体上的许多伴性遗传基因, 因而不能存活。然而, 鱼类属于低等脊椎动物, 性染色体的分化还不明显, 性决定机制也有多种类型。在众多的鱼类染色体组型研究中难以发现异型性染色体。在某些鱼类已获得了超雄个体^[3,13,14]。由此看来, 泥鳅超雄能否存活, 还有待今后进一步研究。

雄核发育纯合二倍体在鱼类育种工作中具有重要的意义。通过这种方法可直接建立纯系。由于每个纯合二倍体都是一个独立的纯系, 就可大量提供选种的原始材料。如果超雄能存活, 就可以产生全雄个体, 进行单性鱼生产。然而, 以我们这种方法产生纯合二倍体的效率很低。如果能够提高移植核的加倍率和纯合二倍体的存活率, 那么这种技术在鱼类育种应用上的意义就会更大。

参 考 文 献

- [1] 武汉大学细胞生物学实验室, 1981。七科、二十二种鱼的染色体组型研究初报。武汉大学学报(自然科学版), (3): 14。
- [2] 童第周等, 1963。鱼类细胞核的移植。科学通报, (7): 60—61。
- [3] 杨永铨等, 1979。莫桑比克罗非鱼 YY 型超雄鱼的生物学研究。淡水渔业, (10, 11): 1—4。
- [4] Briggs, R., 1949. The influence of egg volume on the development of haploid and diploid embryos of the frogs, *Rana pipiens*. *J. Exp. Zool.*, 111(2): 255—293.
- [5] Fankhauser, G., 1945a. The effects of changes in chromosome number on amphibian development. *Quart. Rev. Biol.*, 20(1): 20—78.
- [6] Hamilton, L., 1963. An experimental analysis of the development of the haploid syndromes in embryos of *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 11: 267—278.
- [7] Hamilton, L., 1965. The development of haploid and diploid embryos of *Xenopus laevis* after treatment with sodium thiocyanate and lithium chloride. *Exp. Cell Res.*, 38: 684—685.
- [8] Hamilton, L., 1966. The role of the genome in the development of the haploid syndrom in Anura. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 16: 559—568.
- [9] Parsons, L. E. & Thorgard, G. H., 1984. Induced androgenesis in Rainbow trout. *J. Exp. Zool.*, 231: 407—412.
- [10] Porter, K. R., 1939. Androgenetic development of the egg of *Rana pipiens*. *Biol. Bull.*, 77: 233—257.
- [11] Streisinger, G., et al., 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291(5813): 293—296.
- [12] Subtelny, S., 1958. The development of haploid and homozygous diploid frog embryos obtained from transplantations of haploid nuclei. *J. Exp. Zool.*, 139 (2): 263—395.
- [13] Yamamoto, T., 1964. The problems of viability of YY zygotes in the medaka, *Oryzias latipes*. *Genetics* 50(1): 45—58.
- [14] Yamamoto, T., 1975. A YY male gold fish from mating estrone-induced XY female and normal male. *J. Hered.*, 66(1): 2—4.

THE BIRTH OF THE ANDROGENETIC HOMOZYGOUS DIPLOID LOACH

(*Misgurnus anguillicaudatus*)

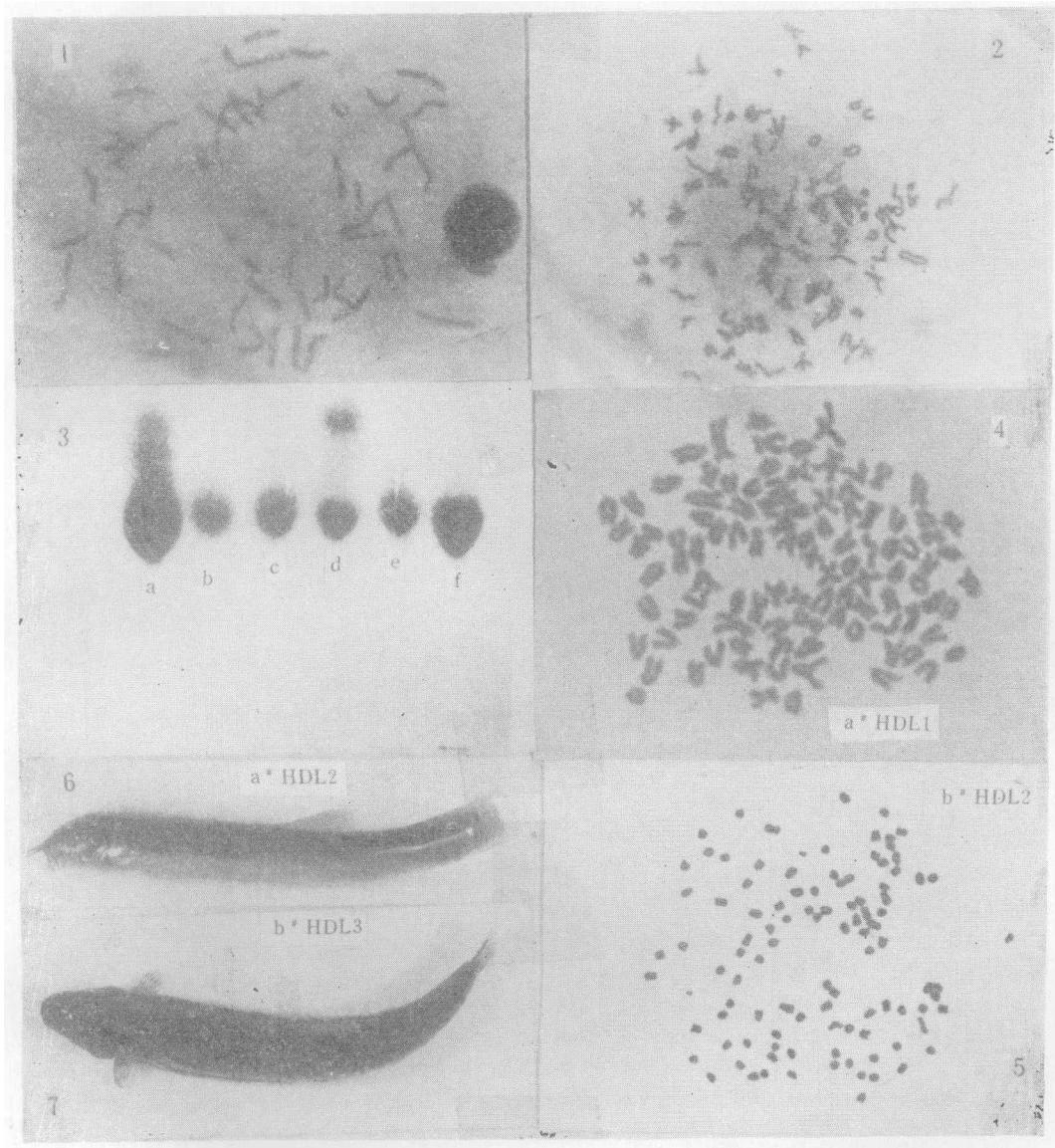
Liu Hanqin, Yi Yonglan and Chen Hongxi

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan*)

Abstract

Studies on unisexual development and homozygous diploid are important in fish genetics and breeding. It is an effective way to purify and improve breeds and to produce monosexual fish. Gynogenesis were successful in many fishes, and gynogenetic homozygous diploid adult fish were obtained. But the reports in relation to fish artificial androgenesis are still rare. Androgenetic haploid loach embryos were produced by mechanically removing female nuclei of *Paramisgurnus dabryanus* eggs which had been fertilized by loach milt. Transplanting these haploid blastula nuclei into *P. dabryanus* enucleated eggs resulted in 243 gastrula embryos. Chromosome examination of these nuclear transplants indicated that 29.6% of them had duplicate chromosome number. In another experimental group, 5 adults were obtained from 769 nuclear transplanted eggs. Tail fin chromosome examination, muscle lactate dehydrogenase isoenzyme electrophoresis and morphological character all showed that they were androgenetic homozygous diploid loach. On the basis of the characteristics of fish embryonic mitotic cycle, we are of the opinion that the doubling mechanism of the transplanted haploid nuclei is the presence of a DNA duplication in G2 nuclei after being transplanted into the eggs and then their first cleavage occurs. Due to the fact that the shape of pectoral fins indicated two of the five nuclear transplants being female, we are inclined to believe that the sex determination mechanism of loach is female homogamety and male heterogamety. Discussions concerning the reasons for the high mortality of fish haploid embryos and the possibility of applying the androgenetic homozygous diploid method to fish breeding are presented.

Key words Androgenetic haploid nuclear transplantation, chromosome doubling, androgenetic homozygous diploid, sex determination



1 泥鳅雄核发育单倍体原肠胚胎染色体 ($1n = 50 \pm$)。 $\times 600$; 2 泥鳅雄核发育纯合二倍体原肠胚胎染色体 ($2n = 100 \pm$)。 $\times 500$; 3 肌肉 LDH 同工酶图谱。a. 大鳞副泥鳅 (♀) \times 泥鳅 (σ^+); b. 泥鳅 (♀) \times 大鳞副泥鳅 (σ^+); c. 泥鳅; d. 大鳞副泥鳅; e. HDL5; f. HDL4; 4,5 纯合二倍体泥鳅尾鳍染色体 ($2n = 100$)。HDL1 $\times 1500$; HDL2 $\times 600$; 6,7 纯合二倍体泥鳅。HDL2; HDL3

1 Chromosomes of loach androgenetic haploid gastrula ($1n = 50 \pm$). $\times 600$; 2 Chromosomes of loach androgenetic homozygous diploid gastrula ($2n = 100 \pm$). $\times 500$; 3 Muscle LDH isoenzyme Patterns. a. *P. dabryanus* (♀) \times loach (σ^+); b. Loach (♀) \times *P. dabryanus* (σ^+); c. Loach; d. *P. dabryanus*; e. HDL5; f. HDL4; 4,5 Chromosomes of tail fin of homozygous diploid loach ($2n = 100$). HDL1 $\times 1500$; HDL2 $\times 600$; 6,7 Homozygous diploid loach. HDL2; HDL3