

鲫鱼的人工和天然雌核发育*

蒋一珪 俞豪祥 陈本德
梁绍昌 杨德龙 林绥恩

(中国科学院水生生物研究所)

提 要

用照射处理的草鱼或华南鲤的精液授精的鲫鱼卵为单倍体雌核发育;所有单倍体胚胎都是畸形,并在孵化前死亡。如果用照射精液授精的鲫鱼卵在18—19℃的水中放置2分钟,然后在0—3℃的冰水中放置20分钟,再放回室温水中共化,可以从每百颗受精卵中得到4.5—11.9(平均8.34)尾成活的二倍体仔鱼。

根据38尾银鲫(其中33尾捕自黑龙江省方正县双凤水库)的细胞学和胚胎学检查,证实它们是雌核发育繁殖的。

自Ромашов (1960)^[17]在泥鳅和鲤鱼中获得人工雌核发育二倍体子代以来,其方法已先后在10多种鱼类中获得成功。据Черфас^[18]和Nagy^[17]研究,鲤鱼人工雌核发育二倍体子一代(F_1)的基因位点纯合性可达0.03—0.95,平均为0.58。从培育鱼类纯系来看,这个数值表明一次人工雌核发育繁殖的效果相当于连续4代兄妹近交,也就是说,任一鱼类只须经过一代人工雌核发育,其子一代(F_1)就可作为初步纯合亲本用于鱼类育种实践。因此,鱼类人工雌核发育已证实为一种快速培育鱼类纯系的有效方法。

我们从1975年起开展鲫鱼的育种研究。据Stanley等(1974、1975)^[9,10]报道,鲫(*Carassius auratus*)的人工雌核发育二倍体的产生频率很低,成活的仔鱼仅占产出卵数的0.01—0.036%。因此,在培育鲫鱼纯系的工作中能否有效地采用人工雌核发育技术、提高鲫鱼人工雌核发育二倍体的产生频率,是本文探讨的第一个问题。

另外,Никольский (1956)^[16]和余志堂等(1959)^[4]报道,我国黑龙江流域的银鲫是两性种群,Головинская (1954, 1965)^[14,15]报道,在黑龙江同时存在有天然雌核发育繁殖的银鲫种群和正常两性繁殖的银鲫种群,小林弘等(1972)^[5]发现在黑龙江天然雌核发育银鲫种群中同时有二倍体的和三倍体的个体。Lieder (1959)也曾报道过在西欧有天然雌核发育的二倍体银鲫。所以我们在鲫鱼的育种实践中必须弄清它们的繁殖类型,把天然雌核发育繁殖的银鲫(及其倍数性)和正常两性繁殖的鲫鱼(包括银鲫)区别开来,这是本文要解决的第二个问题。

* 本试验得到广东省汕头地区水产局、潮安县鱼苗场和本所试验场热情支持并提供了大量试验条件;由陈敏容同志协助进行银鲫白血球培养,何楚华和谢才葆同志协助拍摄照片和绘图,特此一并致谢。

1981年1月27日收到。

材料与方 法

雌性亲鱼：鲫 (*Carassius auratus*) 来源于武汉东湖；红鲫 (*Carassius auratus* red variety) 来源于武汉东西湖养殖场；银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 来源于黑龙江省方正县双凤水库；兴国红鲤 (*Cyprinus carpio* red variety) 来源于本所试验场。

雄性亲鱼：华南鲤 (*Cyprinus carpio rubrofasciatus*) 来源于广东省汕头地区潮安县；草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 来源于本所试验场。

杂交组合 ($\text{♀} \times \text{♂}$)：红鲫 \times 草鱼；红鲫 \times 华南鲤；红鲫 \times 银鲫；银鲫 \times 草鱼；鲫 \times 草鱼；兴国红鲤 \times 华南鲤。

紫外线 (u.v.) 照射精液：按 Stanley 等^[10]方法进行，但照射时间延长至 2 小时（至精子遇水活动减弱，部分精子呈现“醉汉状游动”为准）。精液用 4 倍冷藏 Hank's 液稀释。把需要照射的稀释精液盛装在一个玻璃培养皿内，精液厚度为 0.5—1 毫米，在一支 30 瓦灭菌紫外线灯（波长 2537 Å，照距 17 厘米）下进行照射。在照射过程中，可在上述玻璃皿下置一盛有碎冰的玻璃皿降温，并用一小摇床摇动精液（每分钟摇动 35 次）。为了确保精液均匀地受到照射，每照射 15 分钟，可把精液皿取下摇动多次，再继续照射。

钴⁶⁰ (Co^{60} - γ 射线) 辐射精液：可直接对精液原液（保持在 0.5—1°C）进行辐射，辐射剂量为 15 万伦琴，剂量率为 130 伦/分。

试验鱼人工催产繁殖：雌亲鱼每公斤体重注射鲤鱼脑下垂体 6—8 毫克，雄亲鱼注射剂量减半。每尾雌鱼产出的卵分为二份，一份用正常精液授精，作为对照组观察；另一份卵用照射处理的精液干法授精，搅拌均匀，再分为若干份，取其中一份直接放入水中孵化，作为照射组观察，其余几份，分别在授精后 1—9 分钟（从干法受精卵放入水中之时算起）放入 0—3°C 冰水中冷处理 15 或 20 分钟，然后取出放回室温水里孵化，作为照射冷处理组观察。

用压片法观察囊胚细胞染色体^[11]。待受精卵发育至高囊胚时放入蒸馏水或 0.4% 的氯化钾溶液中作低渗处理 10—20 分钟；用 1:3 的冰醋酸和 70% 酒精混合液固定 5—20 分钟；用 2% 丙酸地衣红染色。

试 验 结 果

（一）鲫鱼的人工雌核发育

1. 单倍体发育

用紫外线照射的华南鲤（或草鱼）精液授精的红鲫（或兴国红鲤）卵，其平均受精率略低于对照组的平均受精率，两者相差仅 3.3%（表 1），说明经过紫外线照射的精子，它们的授精能力没有受到明显损伤。

用紫外线照射或 Co^{60} 辐射精液授精的鲫、红鲫或兴国红鲤的受精卵呈雌核单倍体发育（图版 I：1，2）。胚胎发育至视泡形成期^[2]，脑部呈现“S”形畸形（图版 II：1，a—b），

这一特征是辐射单倍体胚胎畸形发育的早期症状。当胚胎继续发育时, 经常出现的畸形是尾部短而弯曲, 围心腔扩大, 心脏和血管系统畸形, 一般它们在孵化前的发育过程中死亡, 即使有少部分胚胎能到达孵化, 也都在孵化后死亡 (表 2 前 9 组资料)。这些资料表明, 经过照射处理的精子, 精核已失去与卵核正常结合的能力, 这为卵核的单倍体发育创造了条件。

表 1 对照组和试验组的受精率*

杂 交 组 合 (♀ × ♂)	对 照 组 (正常精液授精, %)	照 射 组 (紫外线照射精液授精, %)
红鲫 × 草鱼 C	58.9	58.1
红鲫 × 草鱼 K	54.9	67.7
红鲫 × 华南鲤 E	84.2	59.8
红鲫 × 华南鲤 F	83.6	74.5
兴国红鲤 × 华南鲤 A	59.4	64.6
平 均	68.2	64.9

* 受精率按发育至胚孔封闭期的卵数占总卵数的百分数计算。

表 2 对照组和照射组的孵化率和仔鱼成活率

杂 交 组 合 (♀×♂)		对照组 (正常精液授精)			照射组 (照射精液授精)			
		受精卵(粒)	孵化率(%)	仔鱼成活率(%)	射线种类	受精卵(粒)	孵化率(%)	仔鱼成活率(%)
兴国红鲤×华南鲤	A	428	64.3	57.5	u. v.	354	17.8	0
	B	—	—	—	u. v.	397	13.9	0
红鲫×草鱼	C	591	78.6	0.17*	u. v.	825	4.3	0
	D	623	83.1	0.16*	u. v.	1073	0	0
	E	—	—	—	u. v.	1219	0	0
	K	280	32.9	0	u. v.	404	0	0
红鲫×华南鲤	F	611	81.0	79.1	u. v.	591	4.2	0
	E	569	86.3	84.7	u. v.	500	1.6	0.4**
	G	696	30.5	27.4	Co ⁶⁰	1194	5.5	0.17**
银鲫×草鱼	I	107	95.3	91.6	u. v.	1071	75.3	72.7
	H	107	95.3	91.6	Co ⁶⁰	891	—	70.7

注: 受精卵按发育至胚孔封闭期的卵粒计数(下同)。孵化率——孵化仔鱼数占受精卵数的百分数。

仔鱼成活率——发育至开口摄食的仔鱼数占受精卵的百分数。

* 各一尾, 二月龄鱼外形如红鲫, 可能是红鲫雌核发育二倍体。

** 各二尾, 在室内养至夏花, 移至室外鱼池饲养, 旋即死亡。

2. 雌核二倍体发育

用紫外线照射精液授精的红鲫或兴国红鲤的受精卵, 在受精后 1—9 分钟, 放入 0—3℃ 冰水中冷处理 20 分钟(或 15 分钟), 可以阻抑卵核排出第二极体, 从而产生一定数量的雌核发育二倍体胚胎 (表 3)。这些胚胎发育正常 (图版 II: 1, d 和 2, b)。

表3 雌核发育二倍体仔鱼成活率(占受精卵的百分数)

杂 交 组 合 (♀×♂)		、 照射冷处理组仔鱼成活率(%)											
		射线 种类	孵化 水温 (℃)	受精后至冷处理的间隔时间、分钟(冷处理的时间、分钟)									
				1(15)*	2(15)	2(20)	3(15)	3(20)	4(20)	5(15)	6(20)	7(20)	9(20)
红鲫×华南鲤	E	u. v.	14.5						4.56		2.6	0.93	0.4
红鲫×华南鲤	G	Co ⁶⁰ -γ	17.5	0.46	0.48		0.05			0.21			
红鲫×草鱼	K	u. v.	18		0	4.56							
红鲫×草鱼	C	u. v.	19			11.9		1.52	0.49				
红鲫×草鱼	G	u. v.	19			8.56							
红鲫×华南鲤	F	u. v.	19.8	0	0		0.14						
兴国红鲤×华南鲤	B	u. v.	19.5							19.6			
兴国红鲤×华南鲤	A	u. v.	21					5.64					

注: 受精卵按发育至胚孔封闭期的卵粒计算。

* 1(15), 前者“1”为授精后至冷处理的间隔时间(分钟); “(15)”为冷处理的时间(分钟)。余同。

产生雌核发育二倍体胚胎的数量与水温及从受精后至开始冷处理之间的间隔时间长短有关。从表3可以看出, 如以红鲫为母本, 在18—19°C水温, 受精后2分钟进行冷处理最好, 最高的C组雌核发育二倍体仔鱼成活率(占受精卵的%)达到11.9%, 如延长间隔时间至4分钟, 仔鱼成活率降低至0.49%; 在14.5°C水温, 受精后4分钟进行冷处理最好, 雌核发育二倍体仔鱼成活率为4.56%, 如延长间隔时间至6—9分钟, 仔鱼成活率降低至0.4%。此外, 冷处理的时间以多少为宜又因母本的种类不同而各异。如兴国红鲤为母本的B组, 水温19.5°C, 经冷处理15分钟, 二倍体仔鱼成活率可达19.6%; 而红鲫为母本, 冷处理时间缩短至15分钟, 仔鱼成活率仅0.48%, 甚至为零(表3)。

(二) 银鲫的天然雌核发育

根据38尾银鲫(33尾来源于方正县双凤水库, 5尾来源于海拉尔或讷河)的试验结果, 证实它们都是天然雌核发育的个体。这些银鲫产的卵用经紫外线照射过的精液(或Co⁶⁰辐射处理的精液)授精, 胚胎发育正常, 不出现辐射雌核发育单倍体胚胎的畸形症状, 仔鱼成活率高达72.7%(表2)。压片观察银鲫受精卵的囊胚细胞染色体, 发现其数目与银鲫白血球细胞的染色体数(图版I: 5, 6)相似($3n \cong 162^{10}$)。这些资料表明: 银鲫卵核的染色体数与体细胞染色体数是一致的; 银鲫受精卵的发育是天然的雌核发育, 不需要精核染色体组的参与。

在方正县双凤水库的银鲫种群中有少数雄性个体(占4.1%)²⁾。我们发现雄性银鲫的精子功能不同于正常两性繁殖鲫鱼的精子功能, 银鲫精子虽能使两性繁殖鱼类(如红鲫、红鲤等)的成熟卵受精发育, 但胚胎发育至尾部游离前后即死亡。如以2尾红鲫的资料为例, 把同尾红鲫产的卵分为3份, 分别用2尾雄性银鲫和1尾兴国红鲤(或红鲫)的精液授精, 红鲫受精卵的胚胎发育结果如表4。

1) 确切的染色体数尚待实验检定。

2) 沈俊宝、刘明华, 1978, 三个鲤鲫杂交组合池塘试养初步报告。黑龙江水产研究所研究报告, (2): 46—55。

表 4 红鲫卵在不同授精条件下的胚胎发育情况

杂交组合 (♀ × ♂)	胚胎发育的卵数 (%)	孵化率 (%)
红鲫 ₁ × 银鲫 ₁	74	0
红鲫 ₁ × 银鲫 ₂	53	0
红鲫 ₁ × 红鲤	89	76
红鲫 ₂ × 银鲫 ₁	85	0
红鲫 ₂ × 银鲫 ₂	77	0
红鲫 ₂ × 红鲫	88	43

讨 论

1. Stanley 等 (1974, 1975)^[9,10] 报道鲫鱼辐射雌核发育二倍体的产生频率很低。然而根据我们的实验结果, 红鲫辐射雌核发育二倍体仔鱼的产生频率可达 11.9%, 平均为 8.34% (4.56—11.9%), 这些二倍体仔鱼的夏花成活率可达 50% 以上。从鲫鱼的育种工作来说, 这二个数值已具实践意义。如果一尾鲫鱼产卵 2 万, 并按受精率为 70%, 雌核发育二倍体仔鱼成活率为 8.34% 及其夏花成活率为 50% 计算, 则最终可得近 600 尾左右雌核发育二倍体夏花, 可以满足选择系数为 1—2% 的选种实践需要。因此, 人工雌核发育技术同样可以作为快速选育鲫鱼优良纯系的有效手段。

2. 实验所用红鲫在幼鱼—鱼种阶段的体色为青灰色, 随着个体继续生长, 才逐渐变为红色。所以在红鲫的胚胎阶段, 不论它是正常两性繁殖的二倍体胚胎, 或是辐射雌核发育单倍体胚胎以及人工雌核发育二倍体胚胎, 都有许多黑色素细胞。如红鲫(♀) × 华南鲤(♂, 正常精液)的杂交二倍体胚胎, 红鲫(♀) × 华南鲤(♂, 照射精液)和红鲫(♀) × 草鱼(♂, 照射精液)杂交发育的单倍体胚胎, 或人工雌核发育二倍体胚胎, 在头及身体的背部都有许多黑色素细胞, 在卵黄囊处的体侧也有黑色素细胞(图版 II: 2, b)。但是, 红鲫(♀) × 草鱼(♂, 正常精液)杂交发育的胚胎及孵出的仔鱼却没有黑色素细胞(少数个体有几颗黑色素细胞出现在头背部)(图版 II: 2, a), 这与初孵出的草鱼仔鱼未出现黑色素细胞的特性相符^[3]。从压片观察囊胚细胞染色体, 也发现它们符合草鱼单倍染色体数 ($n = 24$) (图版 I: 4)。因此, 红鲫(♀) × 草鱼(♂, 正常精液)杂交孵出的可能是草鱼雄核发育的单倍体胚胎。这些胚胎脑形正常(不呈“S”形), 在它们继续发育时, 也不表现辐射雌核发育单倍体胚胎那样的畸形症状; 它们的孵化率较高, 可达 83.1%; 孵化的仔鱼外观正常(图版 II: 2, a), 然而都在卵黄囊消失前后因不能继续发育而死亡(表 2)。

在鲤鱼(♀)与草鱼(♂)的杂交试验中, Stanley(1976)^[11,12] 曾获得雄核发育二倍体草鱼。在讨论其产生的原因时, Stanley 提到下述两个工作: 在鱼类远缘杂交中, 一个亲本(双亲之一)的染色体组有可能在早期卵裂时因迟延(lagging)而被丢失(Pinney, 1928); 在草鱼繁殖的受精卵中约有 5% 的卵是多精受精(Mantelman, 1969)。我们在红鲫(♀)与草鱼(♂)杂交组合中, 也发现了草鱼雄核发育的单倍体胚胎, 虽然因为它们不能发育至开口吃食而死亡, 但胚胎外形正常, 并不呈现因辐射引起的雌核(或雄核)发育单倍体胚胎的畸形症状^[8,12,13,17]。引起我们注意的正是这些单倍体胚胎具有正常的外形; 而且类似的

情况也在两栖类的人工雄核发育实验中发现过。如 Kaylor (1937)^[6] 用微型玻璃针管吸去蝾螈 (*Triturus viridescens*) 受精卵的雌核, 在经此手术的受精卵中有 25% 的卵发育正常, 可孵出外形正常的雄核发育的单倍体蝌蚪。这就表明由辐射引起的雌核(或雄核)发育所出现的单倍体胚胎的典型畸形症状的原因, 主要不在于发育中的雌核(或雄核)本身, 而是由于与之相配合的那个受到辐射损伤的雄核(或雌核)所引起的。由此看来, 受到辐射损伤的配子, 在受精后虽然不能形成原核, 也不和与之配合的那个正常异性配子的原核相结合, 但却能使后者发育成的单倍体胚胎呈现畸形。

参 考 文 献

- [1] 湖北省水生生物研究所, 1976. 用理化方法诱导草鱼(♀)×团头鲂(♂)杂种和草鱼的三倍体、四倍体. 水生生物学集刊, 6 (1): 111—112.
- [2] 李璞等, 1959, 鲫鱼和金鱼胚胎发育的分期. 动物学报, 11 (2): 145—154.
- [3] 易伯鲁等, 1963. 长江草、青、鲢、鳙及其他产漂流性鱼卵鱼类胚胎发育的比较研究. 太平洋西部渔业研究委员会第八次全体会议论文集. 第 37—53 页. 科学出版社.
- [4] 余志堂等, 1959. 黑龙江流域鲫鱼的种群变异和生态资料. 水生生物学集刊, (2): 200—209.
- [5] 小林 弘等, 1972. アムール水系 Silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*)の染色体について, 动物学杂志, 81 (4): 320—321.
- [6] Kaylor, C. T., 1937. Experiments on androgenesis in the newt, *Triturus viridescens*. *J. Experimental Zoology*, 76(3): 375—394.
- [7] Nagy, A. et al., 1978. Investigation on carp, *Cyprinus carpio* L. gynogenesis. *J. Fish. Biol.*, 13 (2): 215—224.
- [8] Rugh, R. & H. Clugston, 1955. Effects of various levels of X-irradiation on the gametes and early embryos of *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Bull.*, 108(5): 318—325.
- [9] Stanley, J. G. et al., 1974. Artificial gynogenesis and its application in genetics and selective breeding of fishes. *Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts*, 5(5): 186.
- [10] Stanley, J. G. et al., 1975. Gynogenesis as a possible method for producing monosex grass carp. *Progressive fish-culturist*, 37(1): 25—26.
- [11] Stanley, J. G. et al., 1976. Morphology of androgenetic and gynogenetic grass carp. *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). *J. Fish Biol.*, 9(6): 523—528.
- [12] Stanley, J. G., 1976. Production of Hybrid, Androgenetic and Gynogenetic grass carp and carp. *Trans. of the Amer. Fish. Society*, 105(1): 10—16.
- [13] Vassileva-Dryanovska, O. et al., 1965. Radiation Gynogenesis in *Salmo irideus* Gibb. Доклады Болгарской Академии Наук, 18(4): 359—362.
- [14] Головинская, К. А., 1954. Размножение и наследственность у серебряного карася. Тр. Всерос. н.-и. ин-та пруд. рыбн. х-ва, Т. VII: 37—57.
- [15] Горовинская, К. А., и т. д., 1965. Однополые и двуполые формы серебряного карася (*Carassius auratus gibelio* Bloch), Вopr. Ихтиологии. Т. 5, вып. 4 (37): 614—629.
- [16] Никольский, Г. В., 1956. Рыбы Бассейна Амур. Изд. АН СССР. стр. 333. Москва.
- [17] Ромашов, Д. Д. и т. д., 1960. О радиационном диплоидном гиногенезе у рыб. Биофизика, V (4): 461—467.
- [18] Черфас, Н. Б., 1977. Исследования по диплоидному радиационному гиногенезу у карпа. Генетика, XIII (5): 811—820.

ARTIFICIAL AND NATURAL GYNOGENESIS IN CRUCIAN CARP

Jiang Yigui Yu Haoxiang Chen Bende
Liang Shaochang Yang Delong and Lin Suien
(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica*)

Abstract

The purpose of this investigation is to examine the feasibility of using ultraviolet irradiation for producing gynogenetic diploid goldfish (*Carassius auratus*) and to look for the naturally gynogenetic population of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) in our country.

The eggs of goldfish inseminated with irradiated milt of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) or Hua-nan carp (*Cyprinus carpio rubrofusus*) began with a haploid gynogenetic development. All haploid embryos, however, were abnormal in development and died before hatching. If goldfish eggs were held for 2 minutes in water of 18°—19°C after addition of irradiated milt, followed by exposure to 0°—3°C water (with crushed ice) for 20 minutes and then incubated at room temperature, we could obtain 4.5—11.9% (average 7.4%) viable diploid fry.

The results of embryonic examination of thirty eight crucian carp (among them thirty three were caught from Shuangfeng reservoir in Fangcheng County, Heilongjiang Province) proved that all of them reproduced by natural gynogenesis.

Finally, the teratogenic effect of irradiated spermatozoon on gynogenetic haploid embryos is discussed.

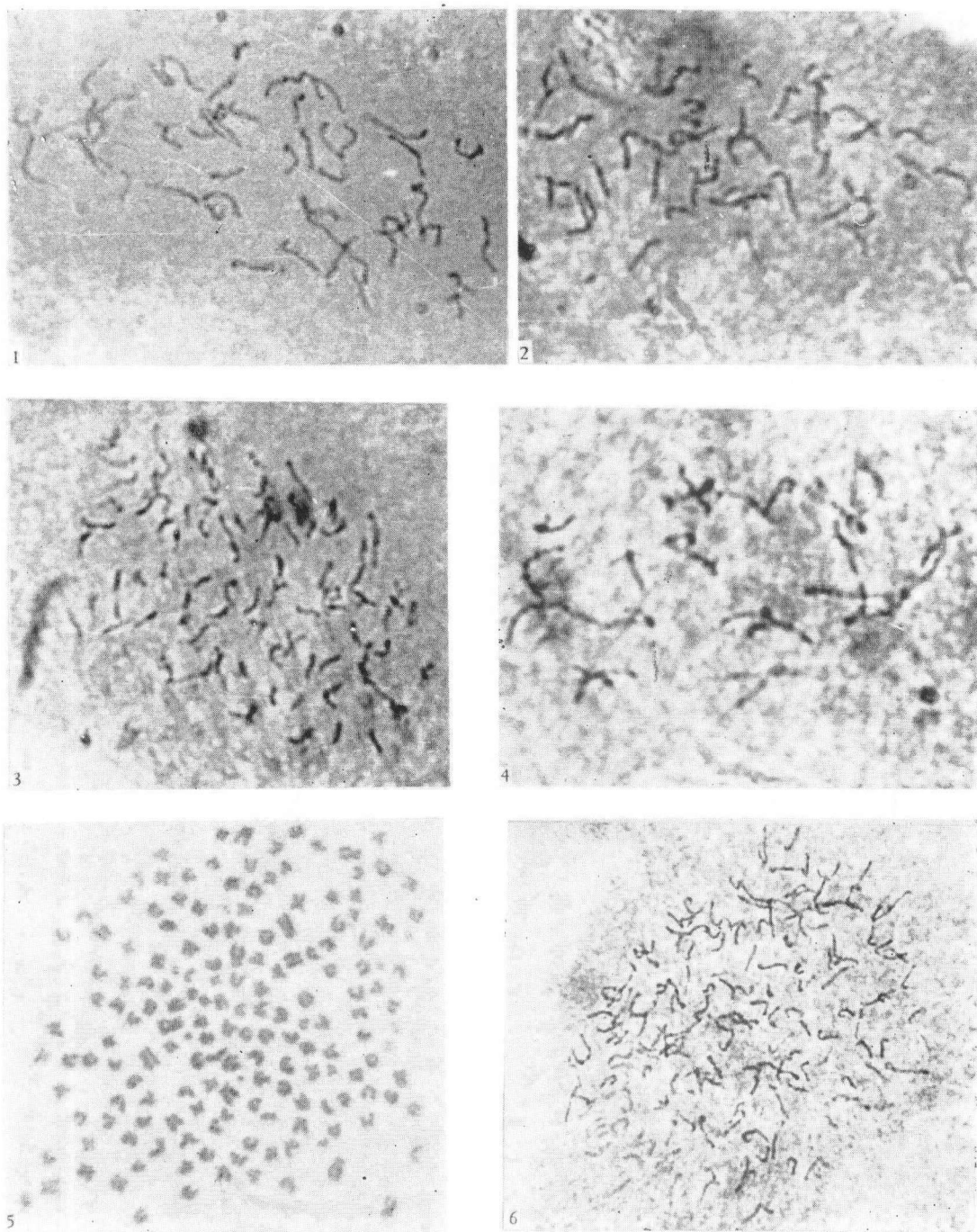


图1 红鲫卵人工雌核发育囊胚细胞单倍染色体组(用 Co^{60} 辐射的华南鲤精液授精)
 图2 红鲫卵人工雌核发育囊胚细胞单倍染色体组(用紫外线照射的草鱼精液授精)
 图3 红鲫(♀)×华南鲤(♂)杂交的囊胚细胞二倍染色体组
 图4 红鲫(♀)×草鱼(♂)杂交的草鱼雄核发育囊胚细胞单倍染色体组
 图5 银鲫白血球染色体组
 图6 银鲫卵天然雌核发育囊胚细胞染色体组 ($3n$)

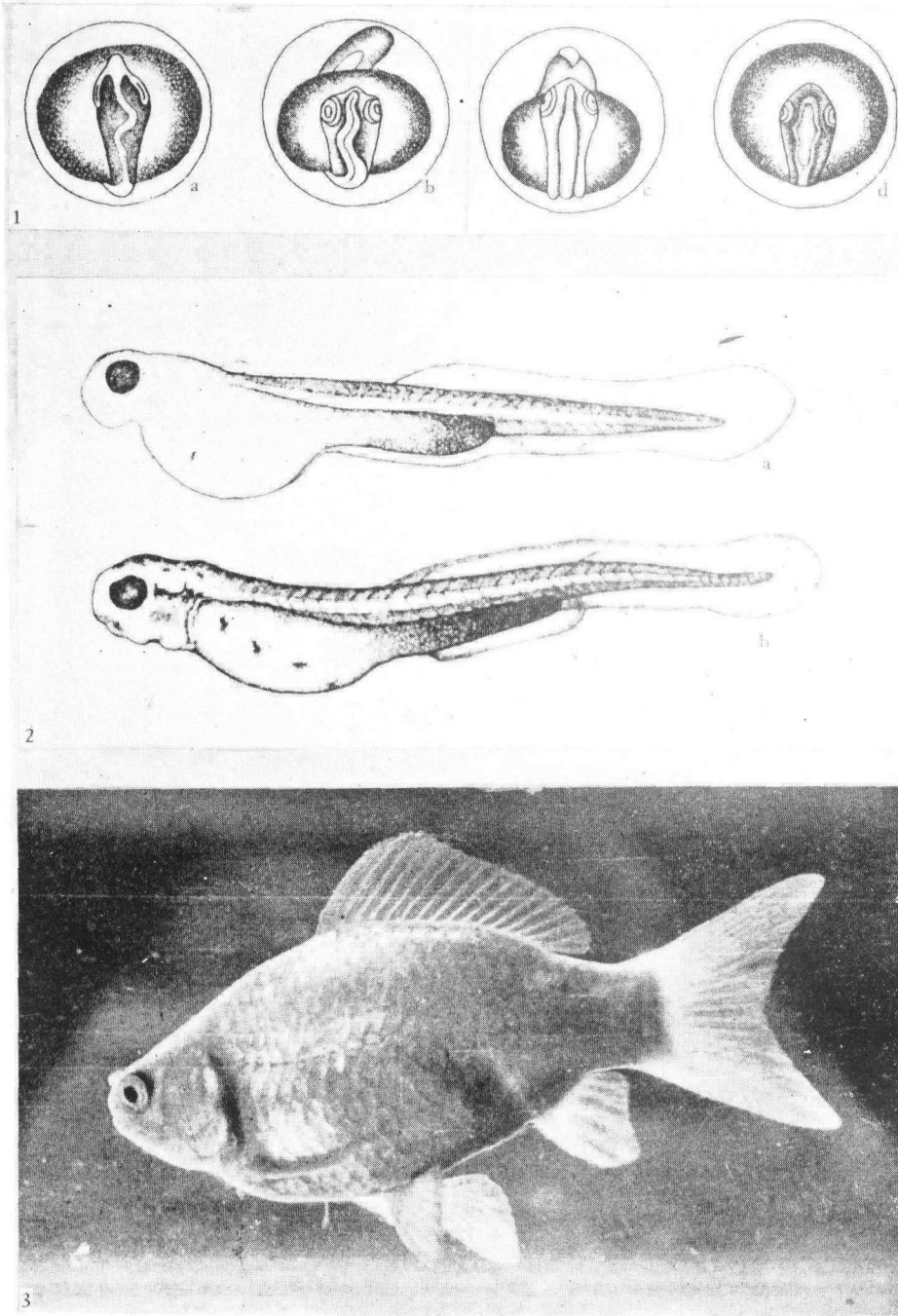


图1 示正常的和“S”形畸形的脑部形态 a. 红鲫卵人工雌核发育单倍体胚胎(用紫外线照射的草鱼精液授精) b. 鲫卵人工雌核发育单倍体胚胎(同上),脑部“S”形畸形 c. 银鲫卵天然雌核发育三倍体胚胎(同上),脑部正常 d. 红鲫卵人工雌核发育二倍体胚胎(同上,受精卵经过冷处理),脑部正常
图2 a. 草鱼雄核发育单倍体胚胎(红鲫♀×草鱼♂),孵出后一天,无色素细胞 b. 红鲫卵人工雌核发育二倍体胚胎(用紫外线照射的草鱼精液授精),孵出后一天,在头背、体背和体侧有许多色素细胞
图3 人工雌核发育二倍体红鲫