

研究简报

鳙人工单倍体育种研究初报

叶玉珍 吴清江

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

PRELIMINARY STUDIES ON ARTIFICIAL HAPLOID BREEDING OF BIGHEAD CARP

YE Yur zhen and WU Qing jiang

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology Wuhan 430072)

关键词: 鳙; 雌核发育; 单倍体; 育种

Key words: Bighead carp; Gynogenesis; Haploid; Breeding

中图分类号: S961.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)01-0106-002

应用生物技术方法能大大缩短鱼类育种期限, 降低生产成本, 快速培育纯系或近交系, 进而选育出遗传性状优良的品系。同时, 它也可以按照人们的需求培育新品种。鱼类单倍体育种虽然已有许多研究^[1-6], 但关于鳙人工雌核发育单倍体的研究至今未见报道。近年来, 本实验室开展了鳙人工雌核发育单倍体育种研究, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料 鳙[*Aristichthys nobilis* (Richardson)] 成熟卵和兴国红鲤(*Cyprinus capio* Var. *Xingguo*) 精液取自水生所试验基地。

1.2 精子遗传失活与卵子激活 以紫外线(UV)辐射处理的兴国红鲤精子作为人工雌核发育单倍体鳙的激活源。具体灭活精子参照以前的方法^[7], 并略有改进。兴国红鲤的精液用 Hank's 保存液以 1:3 比例稀释, 用吸管将其吸入玻璃培养皿中, 液体厚度大约控制在 1.5—2.5mm, 然后置于冰浴摇床上进行 UV 照射, 照射时间 10—30min, 照射液面距紫外灯管 16—17cm。对照组的精液不照射, 但与试验组同时采卵采精进行人工受精。按常规方法催产。一般在催产效应时间内将成熟卵挤出后, 立刻以经 UV 射线照射遗传失活的精子进行人工“授精”使其雌核发育, 胚胎发育至原肠期计算单倍体激活率, 发育至孵化期计算雌核二倍体产量。

1.3 细胞遗传学鉴定 胚胎发育至原肠期, 按常规方法制作染色体永久片, 鉴定鳙单倍体、雌核二倍体、鳙与兴国红鲤的杂种。雌核发育二倍体鳙培育至鱼种期, 取肾细胞制作染色

体标本鉴定倍性。

1.4 性别转化 取 100 尾雌核发育二倍体鳙夏花在室内进行人工性别转化。材料鱼平均体长为 1.8—2.0cm, 平均体重为 2—2.5g。转性药物用甲基睾丸素(Methyltestosterone)。设计两种药物剂量: 30mg/kg 和 50mg/kg 饲料, 用混合药料饲喂 60—90d。每日按鱼体重 5% 分两次定时投喂: 上午 8:00, 下午 17:00。转性鱼池专门配备冲气、光照和注水条件。

2 结果与讨论

2.1 雌核发育

试验共用鳙成熟卵约 20 万粒进行人工雌核发育单倍体研究, 结果成功地获得了 230 尾雌核发育二倍体个体。重复研究发现, 鳙的雌核发育激活率为 75.9%—91.3%, 雌核二倍体产量比鲤高^[8], 以前的研究中, 鲤雌核二倍体最高产量为 1.5‰, 而鳙最高则可达 2‰。在光学解剖镜下观察胚胎发育情况, 试验组与对照组在胚胎发育前期无明显差异, 卵裂期、细胞分裂整齐一致, 原肠期、胚孔封闭期发育正常, 而从尾芽期开始, 试验组绝大多数胚体由于单倍体本身生理和发育上的障碍, 血液循环发育不全、水肿、围心腔扩大等单倍体综合症状, 继续发育至孵化期, 大部分胚胎无法出膜而在膜内夭折, 另一部分胚胎出膜后为畸形鱼苗; 只有约 2‰的胚胎能发育成正常鱼苗。观察对照组的鱼苗, 全部为杂交个体, 且绝大多数个体明显出现脊椎骨弯曲, 结果无一存活。

2.2 自然加倍

由于人工雌核发育的胚胎都为单倍体, 因此获得雌核发

收稿日期: 2002-04-18; 修订日期: 2002-06-10

基金项目: 国家自然科学基金重点课题(编号: 39830300); 国家“十五”攻关课题(编号: 2001BA505B0508)资助

作者简介: 叶玉珍(1953—), 女, 江苏省张家港市人; 高级工程师; 主要从事鱼类遗传与育种研究

育二倍体一般可采用人工冷休克或热休克、或用秋水仙素化学药物处理等方法,但这些方法很容易导致鱼的染色体发生异位、断裂、丢失等,进而形成非整倍体影响其性腺发育。因此在进行每尾鱼成熟卵人工雌核发育的过程中,采取自然加倍的方法获得雌核二倍体,而不采用任何物理或化学方法进行人工加倍,并以自然加倍的方法获得鳙人工雌核发育群体。试验表明:少数胚胎不仅安全通过了孵化期、鱼苗、鱼种期,而且能正常生长发育。观察这些成鱼的外部形态特征,与亲代母本鳙完全相同,而无父本兴国红鲤的遗传特征,也没有任何杂合型的性状。

2.3 细胞遗传学分析

根据观察计数 100 个雌核发育单倍体鳙细胞分裂相的结果,染色体数目波动在 21—25,而众数在 24,确定鳙单倍体为 24(图 1)。观察计数 100 个雌核发育二倍体鳙细胞分裂相,染色体波动在 45—50,众数在 48,因此确定鳙二倍体为 48(图 2)。观察计数 100 个鳙和兴国红鲤的杂种细胞分裂相,染色体波动都在 28—75 之间,因此确定杂种染色体为异倍体。



图 1 鳙单倍体细胞染色体

Fig. 1 Cell chromosomes of haploid bighead

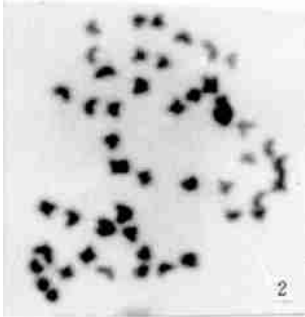


图 2 鳙雌核二倍体细胞染色体

Fig. 2 Cell chromosomes of gynogenetic diploid bighead Carp

2.4 雌核发育系的建立

众所周知,鲤科鱼类的性别都属于雄性异配型,雄性性染色体为 XY,雌性为 XX。因此雌核发育二倍体个体都是雌性,

如果要建立纯系,还必须进行性别人工控制,将一部分遗传型 XX 雌性个体转变成为 XX“生理型雄性”,这种雄鱼成熟后可以产生有功能的精子,再以这种遗传型为 XX 的“生理雄性”个体与同胞姊妹交配,才能获得大量遗传特性相似的个体。作者已在鳙雌核二倍体群体中取部分个体进行人工转性获得了数十尾人工性别控制的“生理型雄性”个体,预计培育 3—4 年就可进行同胞兄妹交配产生近交系,并可望在生产实践中产生较大的经济效益。

参考文献:

[1] Li S F, Lu G Q, Zhou B Y. Feasibility studies on genetic conservation of Chinese carps in swan oxbow of the Changjiang River[J]. *Journal of Fisheries of China.*, 1995, **19**(3): 194—202. [李思发, 吕国庆, 周碧云. 长江天鹅洲故道“四大家鱼”种质资源天然生态库可行性研究. 水产学报, 1995, **19**(3): 194—202]

[2] Li S F, Lu G Q. Diversity of mitochondrial DNA in the populations of silver carp, bighead carp, glass carp, and black carp in the middle and lower reaches of the Yangtze River[J]. *Acta Zoologica Sinica.*, 1998, **44**: (1) 82—93. [李思发, 吕国庆. 长江中下游鲢、鳙、草、青鱼四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析. 动物学报, 1998, **44**: (1) 82—93]

[3] Yu L N, Fang Y L. Correlation between patterns of esterase isozyme and growth in silver carp(*Hypophthalmichthys molitrix*) from Yangtze river and its application to original bred preservation [J]. *Journal of fishery sciences of China.*, 1995, **2** (5): 8—14. [余来宁, 方耀林. 长江白鲢酯酶同工酶的类型与生长的相关性及其在原种保存中的应用. 中国水产科学, 1995, **2**(5): 8—14]

[4] Wu Q J, Ye Y Z, Chen R D, et al. The production of pure line red carp 8305 and its biological characteristics[J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica.*, 1991, **22** (4): 295—299. [吴清江, 叶玉珍, 陈荣德, 等. 雌核发育系红鲤 8305 的产生及其生物学特性. 海洋与湖沼, 1991, **22**(4): 295—299]

[5] Galbreath P F, Adams k J, Wheeler P A, et al. Clonal Atlantic salmon X brown trout hybrids produced by gynogenesis. *J. Fish Biol.*, 1997, **50**: 1025—1033

[6] Xia. D. Q, Wu. T. T. and Yang. H. Artificial gynogenesis and reversal in *Hypophthalmichthys molitrix*. *Chin. Dev. & Reprad. Biol. Socs.* 2000, **9**(2): 31—36

[7] Wu Q J, Ye Y Z, Chen R D, et al. Production of all female carp and its application in fishcultivation. *Aquaculture.*, 1990, **85**: 327

[8] Wu Q J, Chen R D, Ye Y Z, et al. Investigation on the carp gynogenesis with reference to establishing a pure line[J]. *Acta Genetica Sinica.*, 1981, **8**(1): 50—55. [吴清江, 陈荣德, 叶玉珍, 等. 鲤鱼雌核发育及其作为建立近交系新途径的研究. 遗传学报, 1981, **8**(1): 50—55]