

用团头鲂精子诱导金鱼雌核发育研究

肖俊 彭德姣 段巍 刘少军 孙远东 龙昱
申佳珉 张纯 陶敏 刘筠

(湖南师范大学生命科学学院,教育部蛋白质化学及鱼类发育生物学重点实验室,长沙 410081)

摘要:用紫外灭活的团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)精子激活金鱼 (*Carassius auratus* Goldfish)卵子,用 0—4℃ 冷水休克处理卵子使其染色体加倍,得到成活的雌核发育金鱼。使用与金鱼不同亚科的团头鲂精子作为激活源能极大提高雌核发育后代的鉴定效率,只需依据外形特征、染色体数目和性腺发育程度,就能容易地将雌核发育金鱼和与团头鲂杂交后代区分开。雌核发育金鱼有两种体色不同的后代,但都为双尾,体形似金鱼,染色体数目为 $2n=100$,全雌,性腺发育正常;而杂交后代为单尾,体形似鲫鱼,染色体数目为 $3n=124$,性腺发育滞后。本实验为证明金鱼的性别决定方式为 XX/XY 型提供了细胞遗传学证据。得到两种体色皆不同于母本体色的后代,可能是基因座位纯化导致后代性状分化,也可能是异精效应导致。

关键词:金鱼;团头鲂;人工雌核发育;性别决定

中图分类号: Q324 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)01-0076-06

金鱼 $2n=100$,属于鲤科 (Cyprinidae),鲤亚科 (Cyprininae),鲫属 (*Carassius*),鲫种 (*Carassius auratus*),是鲫鱼的一个变种。而团头鲂 $2n=48$,属于鲤科 (Cyprinidae),鲃亚科 (Culterinae),鲂属 (*Megalobrama*)。两者分属不同的亚科,亲缘关系较远,且染色体数目明显不同。金鱼是一种深受人民群众喜爱的观赏鱼,在我国有着悠久的养殖传统。早在晋朝时就有史料记载,至今已有 1000 多年的历史。在长期以来有目的的人工选种的情况下,品种层出不穷。目前已达到 240 多个品种,我国主要有 140 多种,在我国观赏鱼的养殖中占有非常大的比重^[1-3]。在生产应用上,有报道利用金鱼 (♀) × 异源四倍体鲫鲤 (♂) 交配可以得到体背高、肉质好、生长速度快的改良新型三倍体鱼^[4]。但现有的金鱼品种由于频繁的人工杂交选育等原因,导致变异大,纯度差,抗逆性差,远远不能满足观赏和生产的需要。因此,为了优化金鱼的性状,缩短选种时间,本研究用团头鲂精子诱导金鱼人工雌核发育的方法对金鱼进行遗传改良。

自 Oppeman^[5]首次证明鱼类雌核发育可以人工诱导以来,人工雌核发育的研究十分活跃,进展也很快,这在鱼类纯系的快速构建、性别决定和性别人工控制以及基因图谱的建立等方面都有着重要的意义和价值。一次人工诱导雌核发育的纯度约相当于 14 个世代全同胞交配选育的结果,任何鱼类经过连续两次雌核发育就可以作为纯系亲本用于育种生产。因此人工雌核发育成为鱼类遗传育种工程中的一个热点^[6-18]。已有实验证明远缘激活源不仅能提高雌核发育鱼的成活率,还能极大简化雌核发育鱼的鉴定问题。团头鲂精子就是这样一种诱导鲤鲫鱼雌核发育的较好诱导源^[17,18]。本研究使用遗传灭活的团头鲂精子诱导金鱼进行雌核发育,有效地提高了金鱼雌核发育的操作效率,获得了性状明显分化的雌核发育后代,为后续的遗传改良工作奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 性成熟的雌性金鱼、雄性团头鲂均

收稿日期: 2007-03-09; 修订日期: 2008-02-01

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 30330480、30571444); 湖南省自然科学基金 (批准号: 05JJ40049); 教育部高等学校博士学科专项科研基金 (批准号: 200405422001); 教育部长江学者及创新团队计划基金 (批准号: RT0445) 资助

作者简介: 肖俊 (1982—), 男, 湖南湘潭人; 博士; 研究方向为鱼类发育生物学。E-mail: 8391627@sina.com

通讯作者: 刘少军, E-mail: lsj@hunnu.edu.cn

取自湖南师范大学教育部多倍体鱼繁殖及育种工程中心。

1.2 实验方法 在繁殖季节,选取已达性成熟的雌金鱼和雄性团头鲂,注射促黄体素释放激素 A_2 (LRH- A_2) $3\mu\text{g}/\text{尾}$,人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 300 单位/尾。雄鱼剂量减半,按常规方法获取卵子和精子。

1.2.1 精子灭活 按以前描述的方法^[17-19]用 Hank's 氏液 (1:3) 稀释精液,均匀的涂在 4 预冷的培养皿中,精液厚度控制在 0.1mm 左右,放置于盛有碎冰块的容器上。用两支 15W 的紫外灯照射处理精子,灯管与精液面的距离为 $13-14\text{cm}$,照射时间为 $28-32\text{min}$ 。照射过程中用摇床不停地缓慢摇动以使精子被均匀照射,并每隔一段时间手工摇动几次。当快达到适宜的照射剂量时,每隔 $2-4\text{min}$ 在显微镜下观察精子活力以决定照射的时间长度。处理过的精液盛在遮光的瓶子中置于 4 备用。

1.2.2 卵子染色体加倍 金鱼卵子用事先准备好的遗传灭活的团头鲂精子激活,待激活 $1-2\text{min}$ 后将受精卵进行染色体加倍处理,即在 $0-4^\circ\text{C}$ 低温条件下处理 $51-58\text{min}$,抑制第二极体的排出的方法使卵子的染色体加倍。全部金鱼卵子在室温 (20 ± 2) 下静水孵化,每隔 $3-4\text{h}$ 换水一次,直至鱼苗孵出。统计受精率、孵化率及成活率。受精率 = (被激活卵子数目/卵子总数) $\times 100\%$,孵化率 = (出苗数/卵子总数) $\times 100\%$,成活率 = (健康苗/卵子总数) $\times 100\%$ 。

1.2.3 外部形态比较 得到的实验鱼饲养 7 个月后,分别对父本团头鲂、母本花镏金和两种雌核发育金鱼形态学性状进行测量和比较。

1.2.4 染色体数目检测 随机取 4 尾雌核发育金鱼进行肾细胞染色体制备^[20]。其制备过程如下:实验鱼在 $18-22^\circ\text{C}$ 水温下培育 $1-3\text{d}$ 后,注射 PHA $1-3$ 次,每次剂量为 $2-8\mu\text{g}/\text{g}$ 体重,间隔时间为 $12-24\text{h}$,在解剖取材前 $2-6\text{h}$,注射秋水仙素,剂量为 $2-4\mu\text{g}/\text{g}$ 体重;解剖取出肾组织,在生理盐水下研磨,20 下用 0.075mol/L 的 KCl 溶液低渗处理 $40-60\text{min}$;然后用冰醋酸:甲醇 (1:3) 固定肾细胞 $1-3$ 次;冰冻载玻片滴片。显微镜下观察染色体的形态和数目,统计其染色体数分布情况。

1.2.5 性腺结构观察 取 7 月龄雌核发育金鱼 4 尾,性腺用 Bouin's 液进行固定,酒精梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,连续切片厚度为 $6-8\mu\text{m}$,HE 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。性腺发育分期参考刘筠等采用的鲤科鱼类性腺分期标准^[21]。

2 结 果

2.1 成活率

在上述条件下,对雌核发育金鱼发育到囊胚期的成活率(受精率)、孵化率以及孵化后第 7 天开始摄食时正常鱼苗的比率(成活率)进行统计。受精率为 $(62.7 \pm 2.7)\%$,孵化率为 $(30.1 \pm 4.3)\%$,成活率 $(6.2 \pm 1.1)\%$ 。

2.2 外部形态

母本花镏金、两种雌核发育后代分别如图 1 中 A、B、C 所示。雌核发育后代仍为双尾,体形保持金鱼的特征,但体色皆不同于母本。体形特征数据(表 1)。从表 1 中可以看出,在体高/体长、尾鳍数目、背鳍和侧线鳞数目方面,雌核发育金鱼极似母本,而与父本团头鲂相差较大。



图 1 雌核发育金鱼母本与后代外形

Fig. 1 The appearance of maternal goldfish, red gynogenetic goldfish and black gynogenetic goldfish

A. 母本金鱼; B. 雌核发育金鱼 (红色); C. 雌核发育金鱼 (黑色)

A. The maternal goldfish; B. The gynogenetic goldfish (red); C. The gynogenetic goldfish (black)

表 1 雌核发育金鱼与亲本的形态特征比较

Tab. 1 Comparison of appearance traits in blunt snout bream, maternal goldfish, red gynogenetic goldfish and black gynogenetic goldfish

鱼名 Name	体高 /体长 Body height/body length	体色 Body color	尾鳍 Tail	侧线鳞式 Lateral scale fomula	背鳍 Dorsal fin formula
团头鲂 Blunt snout bream	0.41 ±0.01	银 Silver	单尾 Single tail	52-59 9/10	3 + 8-9
母本金鱼 Maternal goldfish	0.69 ±0.00	花 Colorful	双尾 Double tails	25 6/7	1 + 19
雌核发育金鱼 Red gynogenetic goldfish	0.72 ±0.03	红 Red	双尾 Double tails	25 6/7	1 + 19
雌核发育金鱼 Black gynogenetic goldfish	0.64 ±0.02	黑 Black	双尾 Double tails	26 6/7	1 + 20

2.3 染色体数目检测

对随机选取的 4 条雌核发育金鱼中期染色体分裂相 (50 个 /尾鱼) 进行计数及统计分析,雌核发育金鱼染色体众数 95—100,处于众数范围内的细胞占观察细胞总数的 90.4% (图 2A)。确定为二倍体, $2n = 100$ 。

2.4 性腺结构观察

对 7 月龄的雌核发育金鱼进行检查发现无一尾鱼能挤出精液。解剖后,肉眼观察能看清卵粒。对其性腺进行组织学切片观察后发现:雌核发育金鱼的性腺都处于 期卵巢,其中可见许多 时相的卵母细胞,发育正常 (图 2B)。

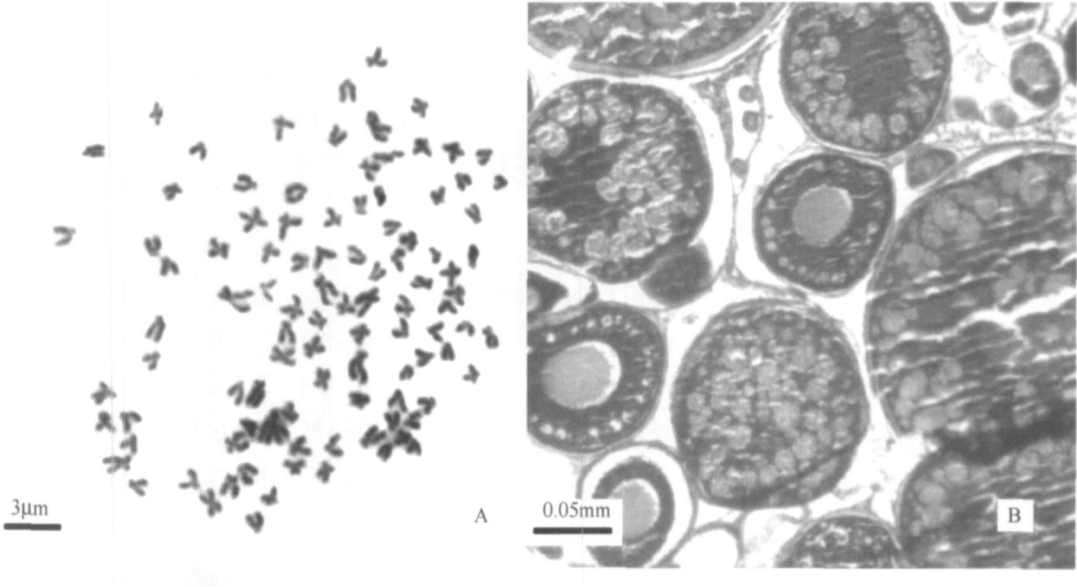


图 2 雌核发育金鱼染色体数目及性腺结构

Fig. 2 Chromosome number and gonadal structure of gynogenetic goldfish

A. 雌核发育金鱼染色体中期分裂相 ($2n = 100$); B. 雌核发育金鱼的性腺结构,示 期卵巢

A. Metaphase spread of a cell from the gynogenetic goldfish ($2n = 100$); B. Gonadal structure of the gynogenetic goldfish, showing the ovary at stage

3 讨论

3.1 团头鲂精子是激活金鱼雌核发育的一种较好激活源

人工雌核发育研究,目前主要存在两个方面的问题:一是存活率低下,二是雌核发育后代鉴

定困难^[22,23]。本文使用与金鱼亲缘关系较远的灭活的团头鲂精子激活金鱼雌核发育能较好地解决这两个问题。有报道称远缘杂交可能诱导天然雌核发育^[24,25],而且也有报道表明使用远缘灭活精子来诱导雌核发育能明显地提高人工雌核发育鱼成活率^[17,18]。本研究使用远缘灭活的

团头鲂精子也是希望能提高雌核发育金鱼的成活率。在本次实验中雌核发育金鱼的成活率虽较普通鲤鲫鱼雌核发育成活率要低,但考虑到金鱼繁殖能力低下,成活率就远远低于一般鲤鲫鱼。而且金鱼产卵方式较为特殊(产卵量少,多次产卵),也有可能冷冻休克所采用的条件并不是加倍的最佳条件,从而使得卵子受到一些损伤,使成活率有一定程度的降低。应该说使用灭活团头鲂精子激活还是一定程度上提高了雌核发育金鱼的成活率。使用远缘精子诱导的最大优势在于极大的简化了雌核发育鱼的鉴别。首先,远缘杂交的杂交后代在外型特征上与父母本都有较大差别,这是因为受到了父母本的共同影响^[17,20,26]。仅仅在外形上,雌核发育个体就很容易与杂交个体区分开来。雌核发育个体体形上与母本金鱼极为相似,体较高,且为双尾,仅体色上有所区别。而杂交个体在体形上类似于鲫鱼,单尾,体色青灰色;其次,金鱼染色体数目为 $2n=100$,团头鲂染色体数目为 $2n=48$ ^[27],染色体数目有显著不同。雌核发育后代和杂交后代的染色体数目上有很大的差别。雌核发育后代的染色体数目和母本金鱼的染色体数目一致,为 $2n=100$ 条。而杂交后代染色体数目为 $3n=124$ 条;此外,在性腺结构和可育性上,雌核发育后代与其母本金鱼一样,发育良好,且龄性成熟。而杂交后代由于是远缘杂交的关系,未发现性成熟个体。根据本文的研究及以前的研究,进一步证明了远缘的团头鲂精子是激活鲤鲫鱼雌核发育的一种较好的激活源。

3.2 关于雌核发育金鱼的生物学特征

本次实验得到的雌核发育金鱼性状出现分化,个体发育正常,且全雌可育。为金鱼的进一步遗传改良打下了一个良好的基础。长期以来人为的在各个金鱼品种之间进行的杂交选种直接导致了金鱼的遗传背景极为复杂,在雌核发育金鱼中出现了红色和黑色两种体色的个体反映了金鱼遗传背景的复杂性。它们在体色上都与母本花镏金有了较大的差异,但仍然属于镏金的一种。这种差异很可能是基因座位纯化导致性状分化的结果。经过一次基因座位的纯化导致体色红色和黑色这两种性状表现出来。出现这种差异也从一个方面证明了雌核发育的成功。当然,也不能排除是因为异精效应受到父本的遗传物质影响的原因。需要再对雌核发育后代进行一次雌核发育,如果这两种体色的后代性状不出现分离,那就基本可以确定是基因座位纯化的原因,也可将这两种金鱼二次雌核发育的后代看做是纯系

来进行下一步的育种工作;鱼类的性染色体处于进化的原始状态,大多数鱼类的性染色体与常染色体在形态上无法区分,目前仅仅发现了极少数鱼的性染色体。而鱼类的性染色体又具有多样性,除了较为常见的XX/XY型、ZZ/ZW型外,还有XO/XX型和复性染色体型。所以,常常需要使用其他的方法来确定鱼类的性别决定方式,人工雌核发育无疑就提供了这样一种方法。本次实验得到的所有雌核发育金鱼均为全雌的后代,并未发现一尾雄性,从一个方面说明了金鱼的性别决定方式为XX/XY型。这也与王春元通过性反转的方法得到的金鱼的性别决定方式一致^[28]。从观赏的角度上来说,雌性金鱼一般都比雄性长得快、胖,且动作缓慢,姿态优雅,体型更美,色泽更为艳丽。因此,雌鱼在市场上比雄鱼更受欢迎,养殖全雌的群体将会有更高的经济效益。

3.3 全雌可育雌核发育金鱼的获得有利于新型三倍体鲫鱼的进一步改良和推广

有报道利用金鱼(♀)与异源四倍体鲫鲤(♂)交配可以得到一种具有一定改良性状的新型三倍体鲫鱼^[4]。但由于金鱼具有抗逆性较差等缺点使得这种新型三倍体鲫鱼大规模推广受到限制。然而经过雌核发育,由于基因座位的纯化,有害隐性基因控制的性状就会表达出来,因此很容易从群体中除去这些带有有害隐性基因的个体,致死隐性基因也会被自然淘汰。Inada在研究雌核发育香鱼(*Plecoglossus altivelis*)中也发现经过两次雌核发育的后代抗病力大大高于对照鱼^[29]。也有报道随着雌核发育鱼个体的发育,生活力逐渐提高^[30]。在雌核发育金鱼中也观察到类似的抗逆性比普通金鱼增强的现象。而且制备新型三倍体鲫鱼仅仅需要雌性金鱼,全雌的且性状得到改良的雌核发育金鱼为进一步大规模生产推广这种新型三倍体鲫鱼打下了一个良好的基础。

参考文献:

- [1] Chen Z. Domestication and variation of goldfish, *Carassius auratus* [M]. Beijing: Science Press 1959 [陈桢. 金鱼的家化与变异. 北京:科学出版社. 1959]
- [2] Chen Z. History of domestication and factors of varietal formation of the common goldfish, *Carassius auratus* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1954, 6(2): 89—116 [陈桢. 金鱼的家化史与品种形成的因素. 动物学报, 1954, 6(2): 89—116]
- [3] Wang C Y, Li Y L. Studies on the karyotype of goldfish (*Carassius auratus*) I [J]. *Acta Genetica Sinica*, 1982, 9(3): 238—242 [王春元, 李延龄. 金鱼染色体组型的研究 I 遗传学报, 1982, 9(3): 238—242]

- [4] Liu S J, Sun Y D, Zhang C, *et al* Triploid Crucian carp-allotetraploid hybrids (♂) × goldfish (♀) [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, **31**(1): 31—38 [刘少军,孙远东,张纯,等.三倍体鲫鱼异源四倍体鲫鲤(♂)×金鱼(♀).遗传学报,2004,31(1):31—38]
- [5] Oppemann K Die entwicklung von forelleneiem nach Befruchtung mit radiumstrahlen Samenfasen [J]. *Arch Mikrosk Anat*, 1913, **83**: 141—189
- [6] Pandian T J, Koteeswaran R. Ploidy induction and sex control in fish [J]. *Hydrobiologia*, 1998, **384**: 167—243
- [7] Wu Q J, Gui J F. Fish genetics and breeding engineering [M]. Shanghai: Scientific and Technology Publisher 1999 [吴清江,桂建芳.鱼类遗传育种工程.上海:上海科学技术出版社.1999]
- [8] Streisinger G, Walker C, Dower N, *et al* Production of homozygous diploid zebra fish [J]. *Nature*, 1981, **291**: 293—296
- [9] Peruzzi S and Chatain B. Induction of tetraploid gynogenesis in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *Genetica*, 2003, **119**(2): 225—228
- [10] Van Ep S H, Egberts E and Stet R J. Characterization of class II A and B genes in a gynogenic carp clone [J]. *Immunogenetics*, 1996, **44**(3): 192—202
- [11] Zou S M, Li S F, Cai W Q, *et al* Establishing gynogenetic groups of genetic improved *Megabrama amblycephala* and its genetic analysis [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, **25**(4): 311—316 [邹曙明,李思发,蔡完其,等.团头鲂良种雌核发育群体的建立及其遗传变异.水产学报,2001,25(4):311—316]
- [12] Dabrowski K, Rinchar J, Lin F, *et al* Induction of gynogenesis in muskellunge with irradiated sperm of yellow perch proves diploid muskellunge male homogamety [J]. *J Exp Zool*, 2000, **287**(1): 96—105
- [13] Xia D Q, Wu T T, Yang H. Artificial gynogenesis and sex reversal in hypophthalmichthys molitrix [J]. *Developmental and Reproductive Biology*, 2000, **9**(2): 31—36
- [14] Gui J F, Sun J M, Liang S C, *et al* Studies on genome manipulation fish. Tetraploid induced by hystostatic pressure treatment and a combination of hystostatic pressure treatment and cold treatment in transparent colored crucian carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1991, **5**(4): 333—342 [桂建芳,孙建明,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.水生生物学报,1991,5(4):333—342]
- [15] Wu Q J, Chen D R, 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,陈容德,叶玉珍,等.鲤鱼人工雌核发育作为建立近交系新途径的研究.遗传学报,1981,8(1):50—55]
- [16] Yu H X, Zhang H M, Lin L Y. A preliminary study on the biology and culture experiment of the gynogenetic crucian carp *Carassius auratus* of Guangdong [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1987, **11**(3): 287—288 [俞豪祥,张海明,林莲英.广东雌核发育鲫鱼的生物学及养殖试验的初步研究.水生生物学报,1987,11(3):287—288]
- [17] Sun Y D, Zhang C, Liu S J, *et al* Induction of gynogenesis in Japanese crucian carp (*Carassius cuvieri*) [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, **33**(5): 405—412 [孙远东,张纯,刘少军,等.人工诱导雌核发育日本白鲫.遗传学报,2006,33(5):405—412]
- [18] Sun Y D, Tao M, Liu S J, *et al* Induction of gynogenesis in red crucian carp using spermatozoa of blunt snout bream [J]. *Progress in Natural Science*, 2006, **16**(12): 1633—1638 [孙远东,陶敏,刘少军,等.用团头鲂精子诱导红鲫雌核发育的研究.自然科学进展,2006,16(12):1633—1638]
- [19] Liu S J, Sun Y D, Zhang C, *et al* Production of gynogenetic progeny from allotetraploid hybrids red crucian carp × common carp [J]. *Aquaculture*, 2004, **236**: 193—200
- [20] Shen J M, Liu S J, Sun Y D, *et al* A new type of triploid crucian carp-red crucian carp (♀) × allotetraploid (♂) [J]. *Progress in Natural Science*, 2006, **16**(8): 947—952 [申佳珉,刘少军,孙远东,等.新型三倍体鲫鱼—红鲫(♀)×四倍体鲫鲤(♂).自然科学进展,2006,16(8):947—952]
- [21] Liu Y. Propagation physiology of main cultivated fish in China [M]. Beijing: Agricultural Publishing House 1993, 135—137 [刘筠.中国养殖鱼类繁殖生理学.北京:农业出版社.1993,135—137]
- [22] Lou Y D. Artificial gynogenesis and its application on genetic and breeding aquatics [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1986, **10**(1): 111—123 [楼允东.人工雌核发育及其在遗传学和水产养殖上的应用.水产学报,1986,10(1):111—123]
- [23] Fan Z T, Song S X. Gynogenesis, antogogenesis and hybridogenesis in fishes [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1993, **17**(2): 179—186 [范兆廷,宋苏祥.鱼类的雌核发育、雄核发育和杂种发育.水产学报,1993,17(2):179—186]
- [24] Lou Y D. Fish breeding [M]. Beijing: China Agriculture Press 199, 153—190 [楼允东.鱼类育种学.北京:中国农业出版社.199,153—190]
- [25] Yang Y Q. The research on the introduction of gynogenesis of fish [J]. *Freshwater Fishery*, 1981, **4**: 1—4 [杨永铨.人工诱导鱼类雌核发育的实验研究.淡水渔业,1981,4:1—4]
- [26] Kusunoki K, Arai K and Suzuki R. Production of viable gynogens without chromosome duplication in the spinous loach *Cobitis biwa* [J]. *Aquaculture*, 1994, **119**: 11—23
- [27] Li S F. Genetical characterization of major freshwater culture fishes in China [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers 1998, 189—193 [李思发.中国主要淡水养殖鱼类种质研究.上海:上海科学技术出版社.1998,189—193]
- [28] Wang C Y. Sex determination and control in goldfish [J]. *Bulletin of Biology*, 1994, **29**(11): 1—3 [王春元.金鱼性别的决定及其控制.生物学通报,1994,29(11):1—3]
- [29] Inada Y, Chikushi Y, Tsujimura A, *et al* Selection response of resistance to vibriosis in gynogenetic ayu *Plecoglossus altivelis* [J]. *Bull Jap Fish Soc Sci*, 1997, **63**(5): 722—727
- [30] Chervas N B. Investigation of radiation-induced diploid gynogenesis in the carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Soviet Genetics*, 1975, **11**(7): 864—874

INDUCTION OF GYNOGENESIS IN GOLDFISH USING SPERMATOZOA OF BLUNT SNOUT BREAM

XIAO Jun, PENG De-Jiao, DUAN Wei, LI Shao-Jun, SUN Yuan-Dong, LONG Yu, SHEN Jia-Min, ZHANG Chun, TAO Min and LI Yun

(Key Laboratory of Protein Chemistry and Developmental Biology of State Education Ministry of China, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: Our previous studies reported that a new triploid fish was produced by crossing the females of goldfish (*Carassius auratus* Goldfish) with the males of allotetraploid hybrids of red crucian carp (♀) × common carp (♂). Compared this new triploid fish with Xiangyun crucian carp (Japanese crucian carp (♀) × allotetraploid hybrids (♂)), the new type of triploid crucian carp not only presented some advantages which the Xiangyun crucian carp had, such as faster growth rate, wider adaptability, sterility and stronger anti-disease ability, but also got some new good performances like the high ratio of the width to the length of the body and sweet flesh.

Goldfish is a kind of the most important species of ornamental fish in China that has centuries-old feeding history, but it has poor capacity of disease resistance and adaptability and so on. As the female parent of the new type triploid hybrids, goldfish was highly expected to be genetically improved. In order to reach the aims, we used sperm from blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) which were genetically inactivated by an appropriate UV dosage to activate the development of the egg of goldfish to artificial gynogenesis. In this paper, gynogenetic diploid was induced in goldfish eggs to gynogenesis using UV-irradiated spermatozoa from blunt snout bream, then the maternal DNA was duplicated with cold shock in the 0—4 °C cold water for 51—58 min to retain the second polar body. The experiment could obtain survivable individuals, and the fertilization rate, hatching rate and survival at the first feeding were (62.7 ± 2.7) %, (30.1 ± 4.3) % and (6.2 ± 1.1) %, respectively. In this paper, we checked the individuals by morphological characteristics, chromosome number and the degree of gonadal development. Because blunt snout bream and goldfish belong to different subfamilies in zootaxy, using UV-irradiated spermatozoa of blunt snout bream not only can make the evaluation of gynogenetic status more easily, but also more easily to distinguish gynogenetic goldfish from the control hybrids just according to the chromosome number, the morphological characteristics and the degree of gonadal development. The successful gynogenetic goldfish generated offspring with 100 chromosomes, all of which were female that had double tails, looked like the goldfish and had normal gonadal. However, the individuals with 124 chromosomes were generated by hybrids of goldfish × blunt snout bream. They had single tail looked like the crucian, and the gonadal development was delayed. In the present study, it suggested that the spermatozoa of blunt snout bream were an effective activation source for inducing gynogenesis in crucian carp, and we could avoid exploring the genetic markers at the biochemic or molecular levels. This research obtained gynogenetic goldfish that no male was found in all gynogenetic goldfish examined randomly, and the presence of all female gynogenetic diploids matured at one year old provided cell genetics evidence to the goldfish's sex determination mode-XX/XY. Furthermore, the gynogenetic individuals had two types of offspring which had two kinds of color that were different from their female parent, and it might be conducted by allele homologizing or by allogynogenesis.

Key words: *Carassius auratus* Goldfish; *Megalobrama amblycephala*; Artificial gynogenesis; Sex determination