

文章编号:1005-8737(2001)02-0001-04

红鲫(♀)×湘江野鲤(♂)F₂和F₃的染色体研究

冯浩,刘少军,张轩杰,罗琛,周工健,姚占洲,刘筠
(湖南师范大学生命科学院,湖南长沙410081)

摘要:采用血细胞培养制片法和肾脏细胞直接制片法对红鲫(♀)×湘江野鲤(♂)杂交种F₂和F₃代的染色体数目和核型进行了比较分析,得出F₂代染色体数目为100条,染色体组型为:22m+34sm+22st+22t, NF=156;F₃代染色体数目为4n=200,染色体组型为:44m+68sm+44st+44t, NF=312。为证明红鲫×湘江野鲤杂交后代由异源二倍体转变为异源四倍体发生于F₂与F₃代之间提供了直接证据。

关键词:红鲫;湘江野鲤;杂交种;染色体组型;异源二倍体;异源四倍体
中图分类号:Q953⁺.3;Q343.2⁺3 **文献标识码:**A

80年代中期,刘筠等以红鲫(*Carassius auratus red var.*)为母本,湘江野鲤(*Cyprinus carpio*)为父本进行杂交,获得了具有明显杂种优势的杂种一代湘鲫F₁,同时发现F₁有4.67%的可育性^[1]。F₁代自交获得F₂代,F₂代自交获得F₃代,至今已培育至F₁₀代。湘鲫后代已证明为两性可育的异源四倍体鱼种群,遗传性状稳定,自身可繁殖后代。湖南师范大学已经将湘鲫后代异源四倍体鱼种群作为一种基因库进行培育,建成了异源四倍体鱼种质资源保护基地。在此基础上,并以异源四倍体鱼作为父本分别与二倍体日本白鲫(*C. auratus cuvieri*)和鲤杂交,获得了两种鲫鲤杂交异源三倍体后代,分别命名为湘云鲫和湘云鲤^[2]。由于湘云鲫和湘云鲤接受了异源四倍体鱼的遗传物质,并且自身为完全不育的三倍体,因此与普通鲤、鲫相比,表现为生命力强、个体生长速度快、肉质细嫩,颇受消费者的青睐^[3,4]。湖南师范大学生命科学学院鱼类发育生物学研究室已在异源四倍体鱼的形态、受精生物学、红细胞DNA含量、mtDNA方面做了大量工

作^{1),2)[5,6]}。为了对湘鲫后代异源四倍体的发生阶段有深入的了解,作者采用血细胞培养制片法和肾脏细胞直接制片法,对F₂和F₃代的染色体数目和核型进行了比较分析研究。

1 材料和方法

1.1 材料

湘鲫F₂和F₃取自湘阴东湖渔场,均为1~3龄鱼,其中F₂15尾(雌性3尾,雄性12尾),F₃32尾(雌性10尾,雄性22尾),放入鱼池喂养备用。实验选择4~6月和9~11月这两个时间段进行,此段时间内水温为18~24℃,温度适宜,鱼生长代谢旺盛,细胞有丝分裂相较多,并可防止制片过程中由于温度过高而导致分裂相模糊的现象。

1.2 方法

1.2.1 血细胞培养法 配制培养液,无菌采血,微量全血培养,在收集细胞前1~3h,用注射器向青霉素培养小瓶中滴加秋水仙素溶液,使其终质量浓度为0.1~0.5 μg/ml。收集悬浮培养细胞时,先轻轻摇动小瓶,使沉淀在瓶壁上的细胞重新悬浮,再倒入

收稿日期:2000-10-30

基金项目:湖南省重点科研课题资助项目(01-961-08);国家“八六三”高新技术资助项目(1996182)

作者简介:冯浩(1971-),男,博士,从事鱼类发育生物学研究。

1) 李建中,等. 鲫鲤杂种异源四倍体鲫鲤的受精细胞学研究[J]. 动物学报(待发表).

2) 李建中,等. 鲫鲤杂种异源四倍体鱼鲫鲤的性腺发育研究[J]. 水生生物学报(待发表).

10 ml 离心管,用吸管吸取少量生理盐水冲洗培养瓶,将残液倒入离心管,染色体制片,蒸馏水冲洗,晾干,镜检。

1.2.2 肾脏细胞直接制片法 实验前1天按质量比5 $\mu\text{g/g}$ 体重给实验鱼腹腔注射 PHA;实验前6~8 h,按4 $\mu\text{g/g}$ 体重再次给实验鱼腹腔注射 PHA;处死实验鱼前1 h左右,按1~2 $\mu\text{g/g}$ 体重给实验鱼腹腔注射秋水仙素,取出肾脏(头肾)放入培养皿中,用生理盐水清洗2~3遍,剔除脂肪组织和血块;再置入装有少量生理盐水的培养皿中,剪碎,吸入10 ml 离心管,用吸管充分吹打(100次以上);加入生理盐水,混合均匀,静置5 min后,吸取上层细胞悬液至另一离心管,制片,蒸馏水冲洗,晾干,镜检。

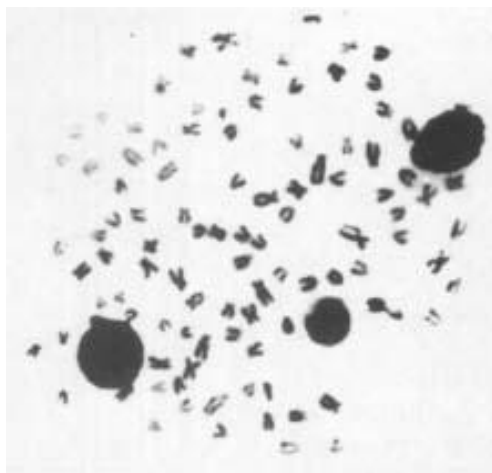


图1 F_2 代中期染色体分裂相($\times 1500$) $2n=100$

Fig.1 The chromosome of F_2 in metaphase

1.2.3 观察与分析 在每尾鱼的染色体制片中选择20个染色体分散良好的中期分裂相,在显微图像分析仪(Nikon Eclipse E600)上观察,利用Optimas软件系统确定每个分裂相中的染色体数目,进行染色体数目统计。 F_2 代和 F_3 代各选择5个数目完整、分散良好、长度适中、着丝粒清楚、两条染色体单体和形态清晰的分裂相,按Levan[1964]标准对染色体进行分类、组型,并用SONEY GRAPHIC DIGITALPRINTER 打印机打出照片。

2 结果

2.1 F_2 和 F_3 的染色体数目

F_2 、 F_3 代的中期染色体分裂相分别见图1,2。

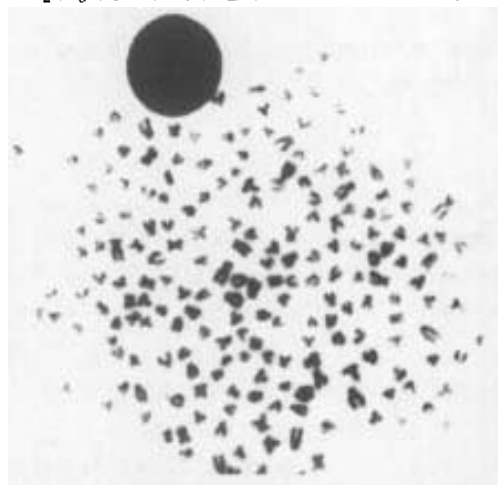


图2 F_3 代中期染色体分裂相($\times 1500$) $4n=200$

Fig.2 The chromosome of F_3 in metaphase

表1 F_2 代和 F_3 代的染色体数目表

Table 1 The chromosome number of F_2 and F_3

染色体数目(CN) Chromosome numbers	F_2	染色体数目 Chromosome numbers	F_3
<50	0	<150	0
50	1	150~190	21
91~95	10	191~195	49
96	7	196	20
97	7	197	18
98	8	198	23
99	12	199	9
100	255	200	478
>100	0	>200	2
总分裂相/个 Total counts	300		640
众数百分率/% Percentage model	85		74.69
标准染色体数目 Standard CN	$2n=100$		$4n=200$

F_2 和 F_3 代染色体数目统计见表1。 F_2 代染色体数目主要集中在90~100之间; F_3 代染色体数目主要集中在190~200之间。 F_2 和 F_3 代染色体数目 $2n=100$ 的众数百分率分别为85%和74.7%。由此可以确定 F_2 代为整二倍体, F_3 代为整四倍体。其中 F_3 代的众数百分率较低,笔者认为这是由于 F_3 代染色体数目多,制片过程中染色体容易丢失造成的。

2.2 F_2 和 F_3 代的染色体组型

F_2 和 F_3 代的染色体组型分别见图3、图4,分析得出两种鱼的染色体类型基本一致。它们的单倍染色体组均由11条中部着丝粒染色体、17条亚中部着丝粒染色体、11条端部着丝粒染色体和11条端部着丝粒染色体构成。 F_2 代的染色体组型公式为:

22m + 34sm + 22st + 22t, NF = 156; F₃ 代染色体组型公式为: 44m + 68sm + 44st + 44t, NF = 312; 结合 F₂ 代和 F₃ 代红细胞 DNA 含量之比为 1:2^[2], 可以确定 F₂ 代为异源二倍体, F₃ 为异源四倍体。在 F₂ 代

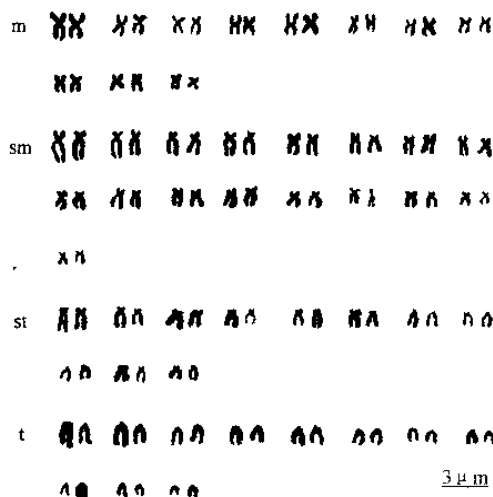


图3 F₂ 代的染色体组型

Fig.3 The karyotype of F₂

和 F₃ 代雌雄个体之间, 尚未发现与性别决定有关的异型染色体; 两种鱼都未发现带有特殊标志性特征(如随体、次缢痕)的染色体。



图4 F₃ 代染色体组型

Fig.4 The karyotype of F₃

3 讨论

80 年代以来, 通过染色体组调控技术诱导四倍体, 在鱼类遗传育种领域已经得到广泛应用, 并在多种鱼类取得成功^[7-10], 如在虹鳟 (*Salmo gairdneri*), 白鲫 (♀) × 红鲫 (♂), 虹鳟 × 褐鳟 (*S. trutta*), 尼罗罗非鱼 (*Orochromis niloticus*) 和莫桑比克罗非鱼 (*O. mossambicus*) 获得了异源四倍体或同源四倍体。人工诱导四倍体, 再通过能育的四倍体雄鱼与二倍体雌鱼配交生产三倍体后代已经成为当代鱼类多倍体育种的主攻方向。Chourrout 和 Myers 等^[11, 12]在这方面做了大量的工作。但是获得一个能自身繁殖、遗传性状稳定的四倍体种群并用于大量繁殖三倍体鱼的报道却只有这一例。

根据对 F₂ 和 F₃ 代的染色体数目和核型进行的比较分析, 可以初步确定红鲫 (♀) × 湘江野鲤 (♂) 后代异源四倍体鱼发生于 F₂ 代自交形成 F₃ 代这个过程中。至于 F₃ 代的染色体中, 哪些来源于红鲫, 哪些来源于湘江野鲤, 或是在这些染色体中发生了哪些变异, 则有待于在今后的工作中采用染色体显带技术和染色体原位杂交技术做进一步的研究。在 F₂ 代雄性个体的精子中发现大头精子和在 F₂ 代雌

性个体卵子中发现大卵子则为研究异源四倍体 F₃ 代的产生原因提供了进一步的素材与思路。在鱼类染色体操作中, 经常用到不同的物理方法来得到多倍体鱼。如桂建芳^[13]等用静水压与冷休克法诱导获得了批量三倍体和四倍体的水晶彩鲫, 其原理为卵子受精后在不同的时间处理受精卵促使第二极体保留诱导三倍体的形成或者抑制第一次卵裂诱导四倍体的形成; 陈敏容等^[14]用热休克调控技术诱导出白鲫 (♀) × 红鲫 (♂) 异源四倍体鱼, 其原理为用热休克法抑制受精卵的第 1 次卵裂而形成异源四倍体鱼。与以上不同, 红鲫 (♀) × 湘江野鲤 (♂) F₂ 代自交形成异源四倍体鱼 F₃ 代, 完全没有人工操作的成分, 笔者分析可能有如下几种染色体加倍原因: (1) F₂ 代产生的 2n 的大头精子进入卵细胞, 卵细胞完成第 2 次减数分裂, 但是其第二极体仍然保留在卵子中, 导致四倍体鱼的形成。(2) F₂ 代雄性个体产生 2n 的配子, 当 2n 的大头精子与 2n 的大卵子结合时, 就产生了异源四倍体 F₃ 代。(3) F₂ 代雄性个体产生单倍体精子与 F₂ 代雌性个体产生单倍体卵子结合, 第 1 次卵裂异常, 整个过程中都没有核膜的解体和纺锤体的出现, 其分裂结果仍旧是 1 个细胞, 核内染色体倍数加倍为 4n, 从而导致了异源四倍体的

发生。(4) F_2 代雄性个体产生两个单倍体精子进入卵细胞,行双精受精,卵细胞完成第2次减数分裂,但是其第二极体仍然保留在卵子中,导致四倍体鱼的形成。至于到底是何种原因导致加倍,作者认为需要在今后的工作中对 F_2 代的受精过程做进一步的组织学、细胞学及分子生物学方面的研究工作。

参考文献:

- [1] 刘 筠,周工健,等.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):102-108.
- [2] 刘少军,冯 浩,刘 筠,等.四倍体湘鲫 F_3 - F_4 代、三倍体湘云鲫、湘云鲤及有关二倍体的DNA含量[J].湖南师范大学学报(自然科学版),1999,22(4):61-68.
- [3] 刘少军.优质高产鱼类—工程鲫[J].内陆水产,1993,1:17.
- [4] 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.
- [5] Shaojun Liu, Yun Liu, Gongjian Zhou, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp×common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization[J].Aqua, 2000,192(2-4):171-186.
- [6] 黎双飞,刘少军,张轩杰,等.异源四倍体鲫鲤肝组织线粒体DNA的研究[J].水产学报,2000,24(6):489-493.
- [7] Chourrout D. Tetraploid induced by heat shock in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R)[J]. Reprod Nutr Develop, 1982, 22: 569-574.
- [8] Chourrout D. Pressure - induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbowtrout[J]. Aqua, 1984, 36:111-126.
- [9] Refsate T. Tetraploid rainbow trout produced by cytochalasin[J]. Aqua, 1981, 25:52-58.
- [10] Valenti R G. Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (steindachner) by means of temprature shock treatment[J]. J Fish Biol, 1975, 7: 519-528.
- [11] Chourrout D. Chromosome studies of progenies of tetraploid female rainbow trout[J]. Theor Appl Genet, 1987, 74:687-692.
- [12] Mayers J M, Hershberger W K. Early growth and survival of heat - shocked and tetraploid - derived triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Aqua, 1991, 96:97-107.
- [13] 桂建芳,孙建民,梁绍昌,等.鱼类染色体组操作的研究Ⅱ.静水压处理和静水压与冷休克诱导水晶彩鲫四倍体[J].水生生物学报,1991,15(4):333-341.
- [14] 陈敏容,俞小牧,杨兴祺,等.人工诱导异源四倍体、新四倍体及异源三倍体的细胞学研究[J].水生生物学报,1998,22(3):209-216.

Chromosome study on F_2 and F_3 hybrids of *Carassius auratus red* var. (♀) × *Cyprinus carpio* (♂)

FENG Hao, LIU Shao-jun, ZHANG Xuan-jie, LUO Chen,

ZHOU Gong-jian, YAO Zhan-zhou, LIU Yun

(College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: The chromosome technology was introduced to study the F_2 and F_3 hybrids of *Carassius auratus red* var. (♀) × *Cyprinus carpio* (♂). The results show that the F_2 hybrid is the allodiploid fish and has the chromosome numbers of 100 and the karyotype of $22m + 34sm + 22st + 22t$, $NF = 156$; the F_3 hybrid is the allotetraploid fish and has the chromosome numbers of 200 and the karyotype of $44m + 68sm + 44st + 44t$, $NF = 312$.

Key words: *Carassius auratus red* var.; *Cyprinus carpio*; hybrid; karyotype; allodiploid; allotetraploid