

人工诱导雌雄同体革胡子鲶自体受精 后代的胚胎发育研究

刘少军 王跃群 姚占州

(湖南师范大学生物系, 410006)

刘 万

(长沙市水产科技推广站, 长沙 410003)

摘 要 本文研究了革胡子鲶自体受精后代的胚胎发育过程。用每克含 $30\mu\text{g}$ 甲基睾丸酮的饲料投喂革胡子鲶仔鱼 60 天, 获得具自体受精功能的雌雄同体革胡子鲶, 对雌雄同体鱼人工催产, 获得自体受精的胚胎、仔鱼及全雌的成鱼。自体受精后代的受精率、孵化率都较高, 说明人工诱导雌雄同体革胡子鲶产生的后代的自体受精过程及胚胎发育过程没有生理障碍。

关键词 革胡子鲶, 雌雄同体, 自体受精, 胚胎发育

用外源激素处理试验鱼以获得性反转鱼研究, 在国内外已有较多的报告^[2-4, 9-11], 然而, 通过性转化获得具自体受精功能的雌雄同体鱼的研究在国内外却属罕见。作者用每克含 $30\mu\text{g}$ 甲基睾丸酮(简称 MT)的饲料投喂革胡子鲶 (*Clarias lazera*) 仔鱼 60 天, 获得了能自体受精的雌雄同体革胡子鲶^[1, 8]。雌雄同体革胡子鲶的精巢和卵巢能同步发育成熟; 通过显微镜观察在刚挤出的成熟卵子的周围发现有许多能游动的精子。MT 诱导的雌雄同体革胡子鲶经自体受精后产生的后代能发育成熟且全部为雌性, 为证明普通雌性革胡子鲶具有同型配子(XX)提供了证据^[8]。作者利用透射电镜、扫描电镜及光学显微镜对雌雄同体革胡子鲶的成熟卵巢、精巢和自体受精过程及自体受精后代的性腺进行了亚显微和显微结构的研究已有报道^[8]。本文对雌雄同体革胡子鲶自体受精后代的受精率、孵化率及胚胎发育过程的研究, 进一步充实和丰富了人工诱导具自体受精功能的雌雄同体革胡子鲶的研究。

1 材料和方法

用每克含 $30\mu\text{g}$ MT 的饲料投喂脱膜后第 2 天的 400 尾革胡子鲶仔鱼 60 天。在所剩的 15 尾达到性成熟的试验鱼中, 有 6 尾能自体受精的雌雄同体鱼^[8], 检测能自体受精的雌雄同体革胡子鲶的依据为: (1) 在外形上, 雌雄同体革胡子鲶的生殖突的长度和生殖突末端开

收稿日期: 1996-08-01。

口的大小介于普通性成熟的雌、雄革胡子鲶之间(普通性成熟的雄性革胡子鲶的生殖突较长,末端开口较小;普通性成熟的雌性革胡子鲶的生殖突较短,末端开口较大)。(2)在没有任何雄鱼的情况下,通过显微镜可观察到在刚挤出的成熟卵子的周围有许多能游动的精子。

在 1992-1995 年的 5 月下旬至 9 月上旬,对上述雌雄同体鱼进行了 4 次人工催产,催产药物 HCG,剂量为每公斤亲鱼注射 1000 单位 HCG。在产卵池内放入干净的纱窗布,当发现纱窗布上有少量的卵子时,逐尾捕起试验鱼,挤出卵子(内含有肉眼难以观察到的精子),卵子放入培养皿内进行孵化。从每尾试验鱼挤出的卵子中,取一部分放在显微镜下观察,检查卵子周围的精子运动情况。在显微镜下观察自体受精及胚胎发育过程,记录胚胎发育的程序及水温,检查受精率及孵化率。用日本产 OLYMPUS 显微镜对胚胎发育过程摄影。

2 结果

2.1 催产结果

4 次雌雄同体革胡子鲶人工自体受精后代的受精率在、孵化率、孵化时间、水温等数据如表 1。

表 1 4 次雌雄同体革胡子鲶自体受精后代的受精率、孵化率
Table 1 The rates of fertilization and hatching of offspring produced by self-fertilizing of hermaphrodites of *Clarias lazera* in four experiments

试验时间 Date of making experiment	卵数(粒) Number of ova	受精率 Rate of fertilization (%)	孵化率 Rate of hatching (%)	水温 Water temperature (℃)	孵化时间 Period till hatching (hour)
1992 年 6 月 23 日	12473	91	88	20-23	37-40
1993 年 5 月 18 日	6789	89	85	19-20	38-41
1994 年 7 月 25 日	9887	87	81	27-28	21-25
1995 年 9 月 2 日	7562	85	78	25-27	23-26

2.2 卵子与精子的形态

人工诱导具自体受精功能的雌雄同体革胡子鲶的成熟卵子与普通雌性革胡子鲶的成熟卵子相似,具粘性,颜色为绿色,卵径为 0.98-1.09mm,卵子吸水后的卵径为 1.11-1.23mm。在显微镜下观察,没有发现刚挤出的成熟卵子有卵裂现象。在刚挤出的成熟卵子的周围具有许多能游动的精子,大部分的精子与普通性成熟的雄性革胡子鲶的精子相似,但有些精子的头部明显较大,还有一些精子具有双头。自体受精后的胚胎的卵裂现象清晰而明显。

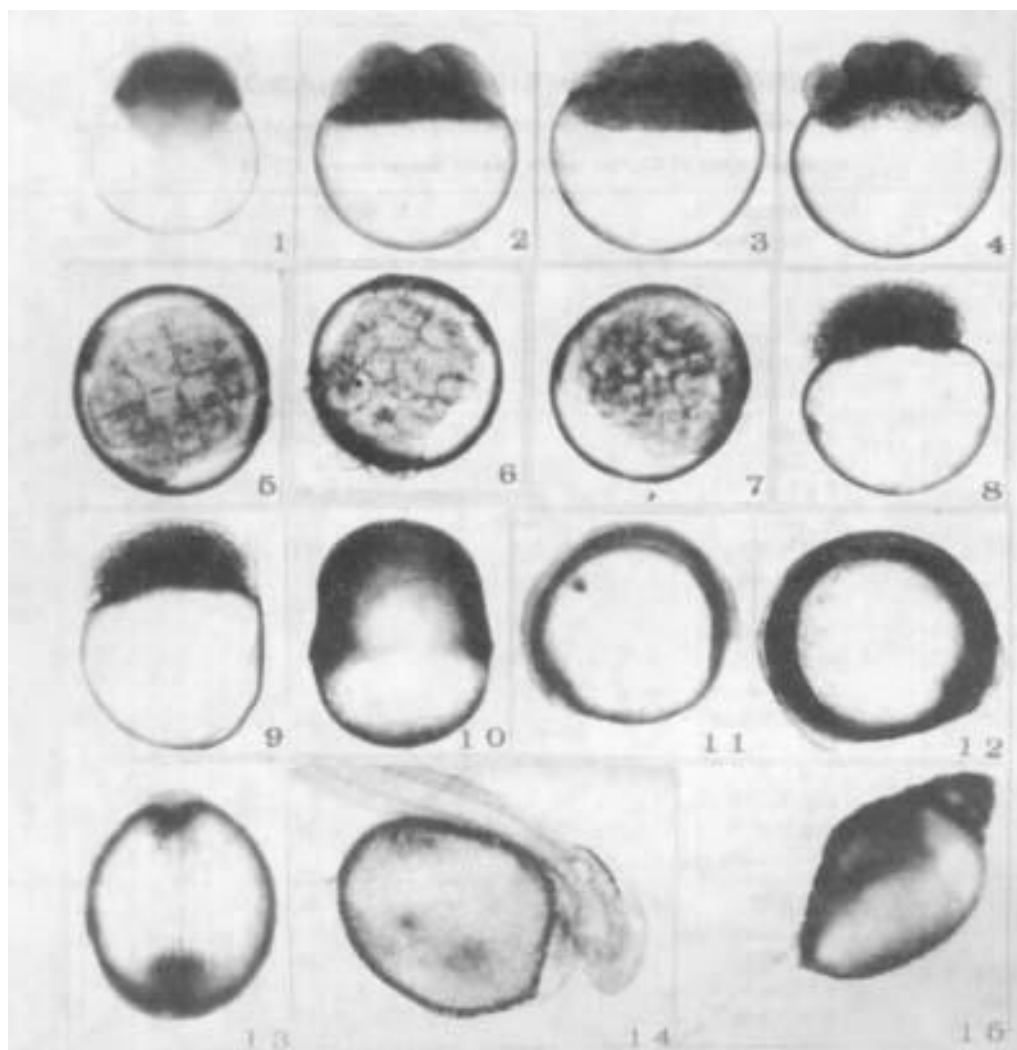
2.3 胚胎发育

水温为 27-28℃,雌雄同体革胡子鲶自体受精后代的胚胎发育程序如表 2。

表 2 雌雄同体革胡子鲶自体受精后代的胚胎发育程序(水温:27-28℃)

Table 2 The processes of embryo development of offspring produced by self-fertilizing of hermaphrodites of *Clarias lazera* (water temperature: 27-28℃)

	胚胎发育时期 Stage of embryo development	距受精的时间 Time after fertilization	图 序 Number of figure
受精阶段 Fertilization stage	受 精 Fertilization stage	0	
	胚盘形成 Blastodisc formation stage	0:10'	1
卵裂阶段 Cleavage stage	2 细胞期 2-cell stage	0:20'	2
	4 细胞期 4-cell stage	0:40'	3
	8 细胞期 8-cell stage	1:05'	4
	16 细胞期 16-cell stage	1:30'	5
	早期多细胞期 Early polycellular stage	2:05'	6
	晚期多细胞期 Late polycellular stage	3:10'	7
	高囊胚期 High blastula stage	3:50'	8
	低囊胚期 Low blastula stage	4:18'	9
原肠胚阶段 Gastrula stage	原肠早期 Early gastrula stage	5:36'	
	原肠中期 Middle gastrula stage	7:25'	
	原肠中晚期 Middle-late gastrula stage	9:44'	10
	原肠晚期 Late gastrula stage	10:30	
神经胚阶段 Neurula stage	神经胚期 Neurula stage	11:20'	11
	胚孔闭合期 blastopore closure stage	12:00'	12
器官形成阶段 Organ formation stage	视泡形成期 Optic vesicle formation stage	12:30'	
	体节出现期 Somite formation stage	13:10'	13
	尾芽期 Tail bud stage	16:40'	
	肌肉效应期 Muscular response stage	19:45	
孵化阶段 Hatching stage	孵化脱膜期 Hatching stage	21-25 hours	14
	孵化脱膜后两天 Two days after hatching		15



图版说明 Explanation of Plate

1. 受精后 10 分, 胚盘形成时期。×27.75 10 minutes after fertilization, blastodisc formation stage.
2. 受精后 20 分, 2 细胞期。×27.75 20 minutes after fertilization, 2 - cell stage.
3. 受精后 45 分, 4 细胞期。×27.75 45 minutes after fertilization, 4 - cell stage.
4. 受精后 1 小时 05 分, 8 细胞期。×27.75 One hour and 5 minutes after fertilization, 8 - cell stage.
5. 受精后 1 小时 30 分, 16 细胞期。×27.75 One hour and 30 minutes after fertilization, 16 - cell stage.
6. 受精后 2 小时 05 分, 早期多细胞期。×27.75 Two hours and 5 minutes after fertilization, the early polycellular stage.
7. 受精后 3 小时 10 分, 晚期多细胞期。×27.75 Three hours and 10 minutes after fertilization, the late polycellular stage.
8. 受精后 3 小时 50 分, 高囊胚期。×27.75 Three hours and 50 minutes after fertilization, high blastula stage
9. 受精后 4 小时 18 分, 低囊胚期。×27.75 Four hours and 18 minutes after fertilization, low blastula stage.
10. 受精后 9 小时 44 分, 原肠中晚期。×27.75 Nine hours and 44 minutes after fertilization, middle - late gastrula stage.
11. 受精后 11 小时 20 分, 神经胚期。×27.75 Eleven hours and 20 minutes after fertilization, neurula stage.
12. 受精后 12 小时, 胚孔闭合期。×27.75 Twelve hours after fertilization, blastopore closure stage.
13. 受精后 13 小时 10 分, 体节形成期。×27.75 Thirteen hours and 10 minutes after fertilization, somite formtion stage.
14. 受精后 21 - 25 小时, 孵化脱膜期。×32.29 Twenty one - Twenty five hours after fertilization, hatching stage.
15. 脱膜后两天的仔鱼。×27.75 The fry at the stage of tow days after hatching.

2.3.1 胚盘的形成 水温为 27-28℃ 时, 卵子受精后 1-5 分钟, 卵膜吸水膨胀; 受精后 10 分钟, 受精卵的细胞质向动物极集中, 形成胚盘(图版 1)。

2.3.2 卵裂期 受精后 20 分钟, 胚盘进行第一次卵裂(纵裂)形成 2 细胞期(图版 2); 受精后 45 分钟, 第二次卵裂(纵裂)完成, 形成 4 细胞期(图版 3), 第二次卵裂的平面与第一次互相垂直; 受精后 1 小时 05 分钟, 第三次卵裂(两次纵裂)完成, 形成 8 细胞期(图版 4); 受精后 1 小时 30 分钟, 第四次卵裂(两次纵裂)完成, 形成 16 细胞期(图版 5); 受精后 2 小时 05 分钟, 第五次卵裂(横裂)完成。从第五次卵裂开始, 分裂面逐渐不整齐, 细胞大小不规律, 细胞数目的增长也表现不规律。卵裂到早期多细胞期, 细胞的体积已明显变小(图版 6); 随着卵裂的继续进行, 卵裂球继续增多, 受精后 3 小时 10 分钟, 发育为晚期多细胞期(图版 7)。

2.3.3 囊胚期 受精后 3 小时 50 分钟, 卵裂细胞隆起, 形成高囊胚(图版 8), 此时的卵裂球(细胞)体积变得更小; 受精后 4 小时 18 分钟, 高囊胚的细胞向下扩展后形成低囊胚(图版 9)。

2.3.4 原肠胚期 受精后 5 小时 36 分钟, 胚盘进一步向植物极下包, 下包卵黄 1/3 处形成原肠早期; 受精后 7 小时 25 分钟, 胚盘下包二分之一处形成原肠中期; 受精后 9 小时 44 分钟, 胚盘下包卵黄三分之二处, 达到原肠中晚期(图版 10); 受精后 10 小时 30 分钟, 胚盘下包卵黄四分之三处达到原肠晚期。

2.3.5 神经胚期 受精后 11 小时 20 分钟, 形成神经胚, 从外形上看在胚盘的背面可见神经管已形成(图版 11), 但此时胚孔尚未闭合; 受精后 12 小时, 胚孔闭合, 胚体形成(图版 12)。

2.3.6 器官形成期 受精后 12 小时 30 分钟, 胚体脑部出现膨大的视泡; 受精后 13 小时 10 分钟, 胚体上可见明显的多对体节(图版 13); 受精后 16 小时 40 分钟, 出现尾芽。

2.3.7 孵化期 受精后 21 小时胚体开始脱膜孵化, 受精后 25 小时, 大多数胚胎已孵化出膜(图版 14)。孵化脱膜后 1-2 天, 仔鱼即能游动(图版 15)。

3 讨论

普通革胡子鲶为雌雄异体, 异体受精^[5,6]。投喂激素饲料人工诱导能自体受精的雌雄同体革胡子鲶的研究, 除作者所做的工作外^[1,8], 国内外尚未见其它报道。实验证明, 用每克含 30μg MT 的饲料人工诱导形成的雌雄同体革胡子鲶, 不但能形成同步发育成熟的精巢和卵巢, 而且能形成完整的输卵管^[1,8]。如果没有完整的生殖导管, 依靠解剖来进行人工授精, 不但增加了授精难度, 而且解剖的试验鱼不能重复利用。在显微镜下观察刚挤出的成熟的卵子没有卵裂现象, 说明自体受精是在体外进行的。自体受精的受精率、孵化率都较高(表 1), 且胚胎能正常发育(表 2), 说明试验鱼的自体受精过程中没有生理障碍。在一定的温度范围内(19-28℃), 随着水温的升高, 自体受精的胚胎发育到脱膜的时间愈短(表 1)。自体受精的后代能发育到性成熟且全部是雌性, 说明自体受精的后代是能存活的, 也说明普通雌性革胡子鲶具有同型配子(XX)^[8]。

人工诱导能自体受精的雌雄同体鱼的成熟卵子与普通雌性革胡子鲶的成熟卵子相似, 说明 MT 的诱导对卵巢的发育没有质的影响。通过透射电镜观察雌雄同体鱼的成熟精巢, 发现在雌雄同体鱼的精巢中不但存在有正常的精子, 还存在有双头精子^[8]; 通过透射电镜、扫描电镜及光学显微镜观察自体受精过程, 在刚挤出的成熟卵子的周围不但发现有正常的精子, 还发现有双头精子和大头精子^[8]; 这说明在 MT 的作用下, 原来的雌性个体(XX)中的

精子发生过程出现了一些变异。这些大头精子及双头精子能否促成后代形成多倍体?有待进一步的研究。

本文对人工诱导的雌雄同体革胡子鲶的自体受精的受精率、孵化率及胚胎发育过程进行研究,说明原来为雌雄异体进行异体受精的鱼通过人工性转化转变为雌雄同体进行自体受精的鱼的方法是可行的,这项研究填补了国内外在该研究领域内的空白。利用人工诱导雌雄同体鱼的自体受精来检测其后代的性别比,从而推断试验鱼的性别遗传方式,这种方法既节省时间、场地,准确性也较高。

参 考 文 献

- [1] 刘少军等, 1995. 能自体受精的雌雄同体黄边胡鲶的性腺结构研究. 水生生物学报, 19(1): 92-93.
- [2] 陈本德, 1982. 甲基睾丸酮诱导鲫鱼雌核发育子代性反转的研究. 水产学报, 6(2): 147-152.
- [3] 邹国民等, 1976. 应用甲基睾丸酮诱导莫桑非洲鲫鱼雄性化的研究. 遗传, 6: 36-39.
- [4] 刘少军等, 1994. 雌二醇诱导革胡子鲶性转化及性腺观察. 湖南师范大学自然科学学报, 17(1): 76-79.
- [5] 刘少军, 1991. 革胡子鲶原始生殖细胞的起源、迁移及性腺分化. 水生生物学报, 15(1): 1-7.
- [6] 刘少军, 1993. 革胡子鲶人工繁殖及幼鱼培育. 内陆水产, 1: 16-17.
- [7] 刘少军, 1992. 革胡子鲶成熟精巢超微结构的研究. 湖南师范大学自然科学学报, 15(3): 252-256.
- [8] Liu Shaojun and Yao Zhanzhou, 1995. Self-fertilization of hermaphrodites of the teleost *clarias lazera* after oral administration of 17- α -Methyltestosterone and their offspring. J. Exp. Zool., 273(6): 527-532.
- [9] Takahashi, H. 1975. Functional masculinization of female guppies, *Poecilia reticulata*, influenced by methyltestosterone before birth. Bull. Jpn. Soc. Fish., 41: 499-506.
- [10] Yamazaki, F. 1983. Sex control and manipulation in Fish. Aquaculture, 33: 329-354.
- [11] Yamamoto, T. 1953. Artificially induced sex reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). J. Exp. Zool. 123: 571-594.

STUDIES ON THE EMBRYONIC DEVELOPMENT OF OFFSPRING PRODUCED BY SELF-FERTILIZING OF INDUCED HERMAPHRODITES OF THE TELEOST *CLARIAS LAZERA*

Liu Shaojun Wang Yuequn Yao Zhanzhou

(Department of Biology, Hunan Normal University, Changsha 410006)

Liu Wan

(Station of Spreading Fishery Science and Technology of Changsha, 410003)

ABSTRACT The fry of *Clarias lazera* were administered orally with 17- α -methyltestosterone at a dose of 30 μ g/g of diet for 60 days. The hermaphrodites which performed self-fertilization were obtained. After injected with HCG (Human Chorionic Gonadotrophin), the hermaphrodites produced the self-fertilized embryos, fry and all-female adults. This paper mainly described the processes of embryonic development of offspring produced by self-fertilizing of hermaphrodites. The rates of fertilization and hatching were relatively high, indicating that there were no physiological obstacles to self-fertilization and embryonic development of offspring produced by self-fertilizing of hermaphrodites.

KEYWORDS *Clarias lazera*, Hermaphrodites, Self-fertilization, Embryonic development