

人工诱导鱼类三倍体的试验*

李 群¹⁾ 宁小军¹⁾ 刘恩阳²⁾

张平石

(武汉大学生物系, 430072)

(武汉市东西湖区科委)

摘要 本试验利用大鳞副泥鳅的受精卵为材料, 温度处理诱导大鳞副泥鳅同源三倍体, 获得三倍体的胚胎和幼鱼。通过受精细胞学观察, 初步提出了人工诱导鱼类三倍体过程中, 染色体加倍的几种细胞学途径。

关于鱼类天然雌核发育和远缘杂交三倍体的细胞学机制已有文章报道^[1, 6]。基于相关原理, 人们利用物理、化学的等手段进行了雌核发育和三倍体的人工诱导^[7, 8, 9], 其目的都在于中止卵子的第二次减数分裂, 保留第二极体, 从而产生雌核发育二倍体和三倍体。本文就三倍体形成过程中第二极体的收回方式, 以及最后导致三倍体合子核形成的过程与机理作了初步描述。这一研究的某些原理或许是显而易见的, 但其证据尚属首次提出。

材 料 和 方 法

本实验于 1989 年 3 月 10 日至 4 月 10 日进行。

(一) 催青 材料购自武汉市交通路市场, 经鉴定为大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabrya-*

表 1 诱导三倍体的时间、温度及受精率

组 别	受精至开始冷处理时间(分)	热处理温度(°C)	高温持续时间(分)	受精率(%)	孵化水温(°C)
I	5	36	1	15	20
II			5	10	
III			10	5	
IV(对照)				65	

nus)。选择雌雄各 6 尾, 背部注射脑垂体和绒毛膜促性腺激素, 于 20°C 水温中暂养, 约经 12 小时挤卵取精。

(二) 受精和温度处理 经解剖取出精巢,

* 本论文部分实验, 得到武汉大学生物系周敏教授、中科院水生生物研究所陈敏容高级工程师的热情指导, 在此表示衷心感谢。

1) 系武汉大学生物系 89 届细胞学专业毕业生,

2) 论文指导者。

剪碎后与卵子受精。从受精开始到处理的时间、温度及温度持续时间见表 1。

(三) 染色体制片及组织切片 采用胚胎染色体制片法^[1], 检查发育至原肠中期以后胚胎的细胞染色体数目。组织切片的材料以 III 组为主, 从受精开始到热处理结束, 每隔 3—5 分钟取材一次, 以后间隔时间逐步延长, 直到二细胞期。材料的固定、包埋、染色等均采用作者过去的工作经验^[1], 部分切片作显微摄影。

实验结果

(一) 受精率 受精卵在 20℃ 水温下经 10 小时发育至原肠中期。经检查, 对照组胚胎的受精率和试验组的“受精率”结果见表 1, 各组均有幼鱼孵出。

(二) 三倍体胚形成的细胞学程序 整个切片中, 除死卵外, 许多经过高温处理的卵子切片显示出具有正常的受精细胞学程序, 与泥鳅试验的结果相似^[1], 表明这些卵若继续发育下去, 将成为正常的二倍体胚。这里我们仅提供部分将要发育成三倍体胚的受精卵切片的照片(图 1—6, 见封 2 下)。图 1 为所获得的三倍体的胚胎染色体分裂相, 数目 72—75 条(大鳞副泥鳅体细胞染色体数目 $2n = 48—50$ ^[2])。图 2 为受精后 15 分钟, 亦即高温处理刚结束时精核的图象。图 3 为受精后 25 分钟(热处理后 10 分钟)第二极体刚形成的图象, 与常温下发育的泥鳅受精卵比较, 发育时间明显延缓, 它们未来发育的结果难以预料。与图 3 同一发育时期的图 4 示另一卵的二个雌性原核开始核化的图象。图 5 为受精后 40 分钟(热处理后 25 分钟)的切片, 示三个单倍体核已经紧密接触, 但各自的轮廓还依然可见。图 6 为受精后 50 分钟(热处理 35 分钟)的切片, 箭头所示一大一小的两个雌雄原核已紧密接触。

小结与讨论

(一) 借鉴吴静仪(1962)在泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 中观察到的结果, 从受精卵早期的发育看, 经过高温处理的三倍体受

精卵在相同孵化水温(20℃)条件下, 发育时间略有推迟, 约晚 10 分钟, 说明持续的高温处理(36℃、10 分钟), 卵子的发育受到了阻碍。当然也不排出另一种现象, 如果高温处理的时间较短, 有可能反而加快受精卵的发育速度。

(二) 温度的急剧变化(从常温 20℃ 上升到 36℃)破坏了纺锤体, 阻止了第二极体的形成, 但影响方式依卵子的不同而有差异, 亦即人工诱导三倍体的产生可能有几种方式: 1. 温度的影响使卵子第二次减数分裂中期将要或已经形成的纺锤体破坏, 排列于赤道板中央的 $2n$ 数目染色体未能分开, 一旦恢复常温, 便一并发育成雌性原核, 再与单倍的雄性原核结合成三倍体(图 6 所示); 2. 也有部分卵子的纺锤体在卵发育至第二次减数分裂后(末)期时方被破坏, 形成了两个单倍体雌性原核, 以后分别与雄性原核结合成三倍体(图 4、5 所示)。这两种方式的存在表明: 其一, 可能暗示着第二极体的形成有一定的时期限制^[3]; 其二, 卵子对高温处理敏感的程度和时期与各个卵子的成熟程度和质量有密切关系, 这提示我们欲提高三倍体胚的出现率, 除了需要恰当掌握处理的时间、温度等外部条件外, 还要特别重视卵子的质量和成熟程度的同步性这一内在因素。

参 考 文 献

- [1] 刘思阳 1987 草鱼卵子和三角鲂精子杂交的受精细胞学研究 水产学报 11(3): 225—232。
- [2] 刘筠 1981 三角鲂精子与青鱼卵子的受精细胞学研究 水生生物学集刊 7(3): 329—336。
- [3] 李渝成等 1983 十四种淡水鱼类的 DNA 含量遗传学报 10(5): 384—389。
- [4] 吴静仪等 1962 泥鳅卵子受精的细胞学考察 武汉大学学报(2): 119—132。
- [5] 曾瑞光 1979 草鱼、团头鲂染色体组型的分析比较 遗传学报 6(2): 433—436。
- [6] 俞藏祥 1982 银鲫雌核发育的细胞观察 水生生物学集刊 7(4): 481—487。
- [7] 蒋一建 1983 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应 水生生物学集刊 8(1): 1—13。
- [8] Ojima, Y., 1978 Triploid induced by cold shock in fertilized eggs of the carp. *Proc. Japan Acad.*, 54, Ser B: 359—362.
- [9] Taniguchi, N., 1986 Condition to induce triploid and gynogenetic diploid in ayu. 日本水产学会志, (52): 49—53。