

文章编号: 1004 - 7271(2008)01 - 0001 - 05

## 团头鲂倍间杂交三倍体性腺发育的 多态性观察初报

田 刚, 李思发

(上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

**摘 要:**于 5 月份团头鲂正常繁殖期前夕,以初次性成熟(二足龄)二倍体团头鲂为对照样本,同龄同池培育的同源倍间正交三倍体、同源倍间反交三倍体、异源倍间杂交三倍体为实验样本,分别取性腺,石蜡切片,镜检发育状况。发现团头鲂三倍体的性腺可归纳为三种情况:(1)性腺发育程度很低,表现为雄性二足龄三倍体的性腺外观细小,生殖细胞处于精原细胞水平。(2)性腺发育出现异常,表现在性腺外观畸形,有卵巢单侧不发育,有精巢大部分为细线,局部增粗等情况,还有发现外观无异常,但切片观察为雌雄嵌合体。(3)性腺发育无异常,表现为性腺外观没有异常,切片观察也能观察到各期典型的生殖细胞。

**关键词:**团头鲂; 三倍体; 性腺发育

中图分类号:S 917 文献标识码:A

## Primary report of observation on the diversity of gonad development in the triploid of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) crossbred by tetraploid and diploid

TIAN Gang, LI Si-fa

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquaculture Ecosystem Certificated by the  
Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** Just before the normal reproduction period of the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) in May, the gonad samples were collected from the first matured two-year-old diploid as control group, and from the communal raised triploid (crossbred by tetraploid and diploid, including auto-positive-triploid, auto-negative-triploid, allo-triploid) as checking group, gonads were sliced and observed under microscope. The gonad development of the gonads in triploid could be categorized into three status: (1) very poor develop, for example the two-year-old male triploid's spermary were very small and the spermatid just stay at spermatophore period. (2) abnormal develop, some female triploid's unilateral ovary didn't developed; some male triploid's spermary were most undeveloped but have several nubblly organize on them, and one sample's gonad have the normal appearance, but it's gonad was gynandromorphy. (3) normal develop, it means this type triploid's gonad have a normal appearance and their oocyte and spermatid were all can find the typical pattern in them.

收稿日期: 2007-04-10

基金项目: 上海市农委科技兴农重点攻关项目(03-143)

作者简介: 田 刚(1980-), 男, 湖南常德人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物种苗工程。Tel: 021-65710062

通讯作者: 李思发, Tel: 021-65710333, E-mail: sfli@shfu.edu.cn

**Key words:** blunt snout bream; auto-positive-triploid; auto-negative-triploid; allo-triploid; gonad development

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) “浦江1号”系人工选育的优良品种。鉴于其为二倍体,容易被养殖户自留繁殖而影响种质,为研制可以控制繁殖的良种,本室用热休克方法获得了团头鲂同源和异源四倍体<sup>[1]</sup>,又通过“浦江1号”二倍体与同源四倍体的正、反杂交,以及与异源四倍体的杂交,分别获得团头鲂倍间同源正交三倍体、倍间同源反交三倍体、倍间异源三倍体。为检查这些三倍体团头鲂的繁殖能力,进行了本观察。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

2005年5月上旬,在上海水产大学南汇种质试验站,选取初次“性成熟”的团头鲂同源正交三倍体(以下简称同源 $3n^+$ )、团头鲂同源反交三倍体(以下简称同源 $3n^-$ )、团头鲂异源三倍体为试验鱼(以下简称异源 $3n$ ),具体生长数据见表1。逐尾抽取尾柄部静脉血,经Backman颗粒分析仪将检测,确定倍性无误<sup>[2]</sup>。同时选取与其同期繁育的团头鲂二倍体(以下简称 $2n$ )作为对照。所有鱼均是二足龄。

表1 各样本随机抽样生长数据  
Tab.1 Growth data of the random samplings

染色体倍性类型	样本数	平均体重(g)	平均全长(cm)	平均体长(cm)
$2n$	8	$654.8 \pm 85.4$	$33.6 \pm 2.2$	$27.7 \pm 1.7$
同源 $3n^+$	8	$472.6 \pm 124.2$	$30.4 \pm 2.1$	$24.5 \pm 2.3$
同源 $3n^-$	5	$551.6 \pm 128.2$	$32.4 \pm 2.2$	$26.1 \pm 2.1$

### 1.2 方法

形态学测定后,解剖,取出性腺组织,用Bouin氏液固定。制作成常规石蜡切片,切片厚度 $0.6 \sim 1.0 \mu\text{m}$ ,H.E染色,经Olympus显微镜观察,并拍照<sup>[3]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 二倍体团头鲂的性腺

团头鲂二倍体的性腺已有过有关报道<sup>[4]</sup>,但为同步地比较在同等培育环境里饲养的三倍体与二倍体的异同,仍有必要以二倍体的镜检结果为基础进行比照和叙述。

$2n$ 雌性性腺为IV期卵巢,观察表明卵巢中处于第IV时相的卵细胞数量很多,其卵膜内圈有两层较明显的滤泡,卵黄颗粒丰富,染色后显红色,核深染呈蓝色或紫色,形状不规则,内有数十个明显的核仁;此外在成熟卵细胞聚集部位的间隙能见到许多被深染成蓝色的发育处于II时相的初级卵母细胞,大小不一,多呈卵圆形或圆形,细胞质呈强嗜碱性,细胞核大而圆,核仁较少,规则地列在核的内圈<sup>[5]</sup>(图版-1)。

团头鲂精巢为典型的壶腹型精巢,精巢内部由数量众多的形状不规则的精小叶构成,精小叶内又有若干精小囊,精小囊是雄性生殖细胞生长发育直到成熟的场所<sup>[6]</sup>。观察表明该样本的精巢已经发育到第IV期末,在精巢内已存在数量较多的变态精子、精子细胞、初级精母细胞等发育中的雄性生殖细胞(图版-2)。

### 2.2 三倍体团头鲂的性腺

#### 2.2.1 性腺发育程度很低

在三倍体样品中发现了符合理论期望的三倍体性腺组织,即在外观呈精巢的性腺组织切片中,雄性生殖细胞的发育程度明显比二倍体要低得多,停留在精原细胞、初级精母细胞阶段而不再发育,且染色

浅,相当分散,其间大量充斥着不能被染色的结缔组织或空隙(图版-3)。

### 2.2.2 性腺发育出现异常

在同源和异源三倍体中发现了两性嵌合体的性腺,并且发现总是卵巢组织发育较充分,精巢组织少量嵌合于其中。这类嵌合体其外观为卵巢,一大一小畸形不对称发育。根据其卵母细胞的发育水平可知其相当于第Ⅳ期卵巢,但在卵细胞团的间隙发现有少量的精巢组织。这些精巢组织染色浅,精小叶结构不能清晰辨别,无法确定其在性腺中所占比例,雄性生殖细胞发育水平处于精原细胞、初级精母细胞等阶段,且数量稀少,稀疏分散于结缔组织中(图版-4~图版-6)。

### 2.2.3 镜检未见异常

在实验中能观察到没有异常的性腺。有的卵巢外观正常,同对照样本 $2n$ 的组织结构一致;即雌性生殖细胞均可见,大的卵细胞中卵黄丰富,被伊红染成红色,中间可清晰见到被染成较深兰紫色的不规则的核,且核中可见更深色的核仁颗粒。这和二倍体雌鱼的成熟卵细胞观察结果一致,这样的成熟卵细胞正是第Ⅳ时相的典型,由此可以将这样的卵巢定义为雌性卵巢。

另外通过与二倍体雄鱼对照,三倍体部分样本不仅其外观与二倍体一致,且在显微镜下也显得正常,不仅有大量的雄性生殖细胞,而且各个精小囊中的精细胞的发育阶段清晰可分,可认为是雄性精巢。按正常二倍体精巢发育时段标准可划分为第Ⅳ期精巢。

## 3 讨论

对三倍体鱼的性腺发育和繁殖,国内外前人已有不少相关报道,如三倍体鲤(*Cyprinus carpio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[7]</sup>、鲇(*Ictalurus punctatus*)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)<sup>[8]</sup>、湘云鲫<sup>[9]</sup>等。在这些研究得出的结果中,三倍体鱼的性腺可归纳为精巢型和卵巢型两种,但三倍体鲤、鲇、泥鳅的雌雄个体都是不育的,不产生配子。

对于精巢型性腺,刘少军等<sup>[9]</sup>报道“三倍体湘云鲫”在繁殖季节,精巢型的性腺只能发育到精子细胞时期,精子细胞出现退化现象,不能变态为成熟的正常精子。本实验中也发现了类似的情况。众所周知在雄性生殖细胞的两类分裂过程中,第一次正常分裂只是常规的染色体加倍再均分,雄性生殖细胞大都能顺利进行分裂,发育到精母细胞甚至是精子细胞,但三倍体鱼的雄性生殖细胞在第二次分裂时,因为染色体对数为奇数,配对困难,无法再继续下去,并且由于基因组或者其它生理上的原因,一开始即有相当部分的精原细胞和初级精母细胞的发育难以顺利进行,在本实验可以见到这样的现象:切片照片中精原细胞和初级精母细胞显得非常稀疏。比较其它雌性配子的发育程度,可以认为,团头鲂的人工三倍体是雄性不育的。

对于卵巢型性腺,刘少军等<sup>[9]</sup>报道性腺中大部分细胞为分化程度较低的小细胞,但在电镜下也不能确定究竟是精原细胞还是卵原细胞,这种性腺被认为是一种两性嵌合体。本实验中也观察到了类似的情况:部分个体性腺外观呈卵巢,但在发育较好的卵细胞和早期的初级卵母团的周隙有少量精巢样组织,并在其中见到不能继续发育下去的雄性生殖细胞。对于这样的情况,虽然在以往的研究中多数被认为是不育的,但就本试验来说,尚不能肯定该例就是不育的,因为尽管雄性生殖细胞不能发育成变态精子,但其卵细胞也可能发育成熟,接下来,是否能正常排出?排卵后能否正常受精?受精后能否正常发育?发育后能否出苗?个体能否长大?等等。这一系列问题,还有待大量实验来检验。

刘少军等<sup>[9]</sup>在湘云鲫人工三倍体鱼中发现“脂肪型”性腺,是一种完全败育的个体。这样的情况在本实验中没有发现,可能是因为本实验的取样数量还不够多的缘故。

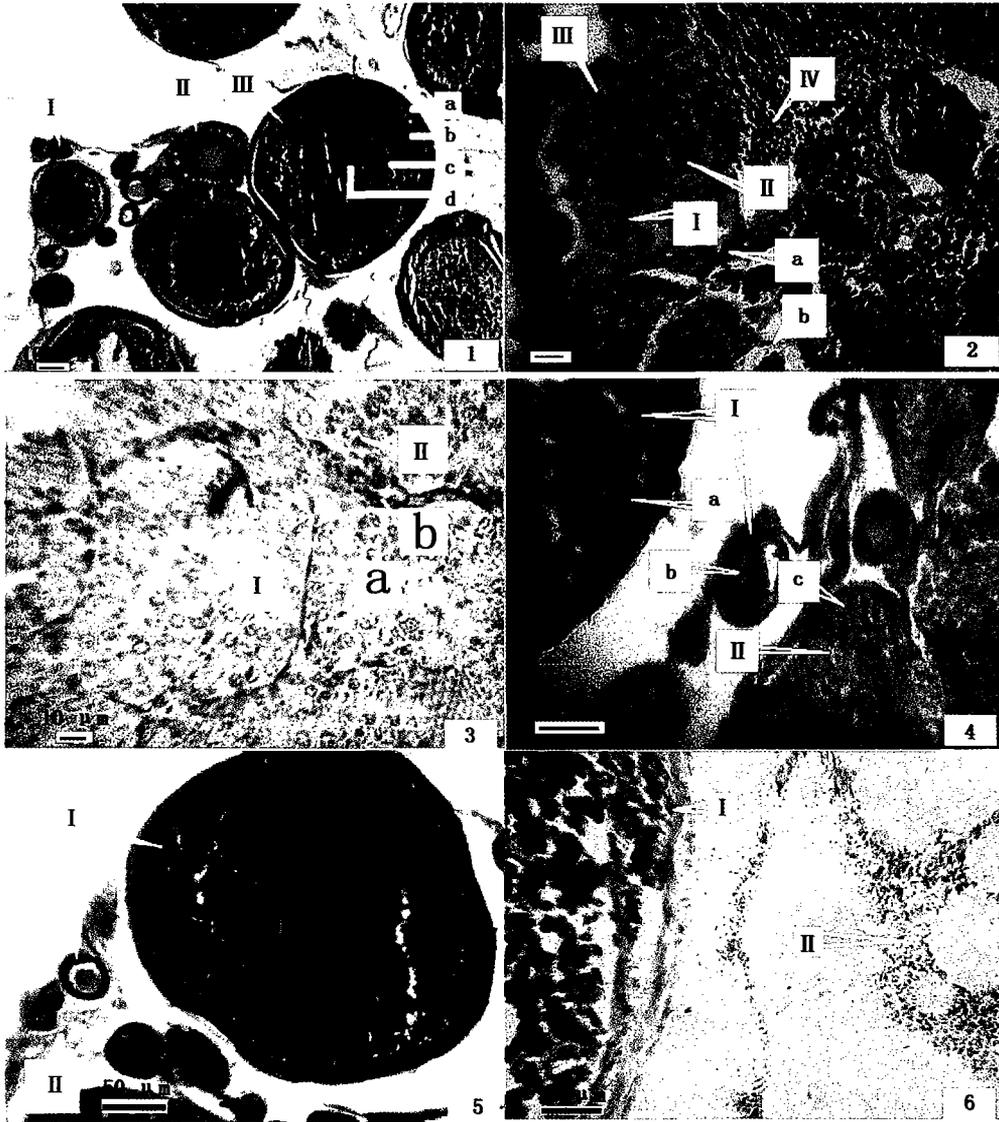
在三倍体的鲮、罗非鱼、虹鳟<sup>[10]</sup>中,雌性个体都是不育的,只有少量的雄性三倍体鱼能产生少量精子,但是这些精子与正常的卵子结合后,并不能产生存活的后代,因而这些三倍体鱼仍然是不育的<sup>[11]</sup>。这样看来,本实验中看似正常的精巢是否能执行雄性个体的生殖使命亦要在繁育实践中才能确认。即便是它们的性腺在组织结构上仍顽强地向成熟方向发展,但是其雌、雄生殖细胞的发育可能因为染色体无法均分而最终不能形成可用的卵子和精子,或者因为染色体配对紊乱而造成卵子和精子内部细胞器

缺失而终将不能形成子代个体;或者,即使能够与卵子结合形成子一代,但极其不稳定的遗传性终将使其在天然环境中没有繁衍的可能。

本实验发现团头鲂四倍体和二倍体杂交所产生的三倍体鱼的性腺发育存在多态性,表明了人工诱导倍性变化所导致的性腺十分复杂而多样,虽然因为样本量不够大,尚难以得出有统计学意义的精确结论,但给倍性育种研究提出了更多的问题去思考。

#### 参考文献:

- [1] Li S F, Zou S M, Cai W Q, *et al.* Production of interploidy triploids by  $4n \times 2n$  blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) and their first performance data[J]. *Aquaculture Research*, 2006, 37: 1165 - 1171.
- [2] Zou S M, Li S, Cai W Q, *et al.* Establishment of fertile tetraploid population of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Aquaculture*, 2004, 238: 155 - 164.
- [3] 郑国辑. 生物显微技术(第1版)[M]. 北京:人民教育出版社, 1978.
- [4] 邹曙明. 团头鲂人工同源和异源四倍体繁育群体建立及其不同倍性后代的生物特征分析[D]. 上海:上海水产大学, 2004: 33.
- [5] 朱洗. 鱼类的生殖及子代的发育、生长与变态(第1版)[M]. 北京:科学出版社, 2000: 96 - 98.
- [6] 楼允东. 组织胚胎学(第1版)[M]. 北京:中国农业出版社, 1980: 128 - 129.
- [7] Lincoln R F, Scott A P. Sexual maturation in triploid rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson [J]. *Fishbiol*, 25: 385 - 392.
- [8] Hussian M G, Penman D J, Mcardrew B J. Effects of triploidy on sexual maturation and reproduction in Nile Tilapia, *Oerochromis niloticus* L. [C]//The third international symposium on tilapia in aquaculture. ICLARM Conf Proc, 1996, 41: 320 - 325.
- [9] 刘少军, 胡芳, 周工建, 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 - 304.
- [10] Benfy T J, Solar I I, De Jong G, *et al.* Flow-Cytometric confirmation of aneuploidy in sperm from triploid rainbow trout [J]. *Trans Am Fish Soc*, 1986, 115: 838 - 840.
- [11] Kobayashi T, Fushiki S, Sakai N, *et al.* Oogenesis and changes in the levels of reproductive hormones in triploid female rainbow trout [J]. *Fisheries Science*, 1998, 64(2): 206 - 215.



图版 Plate

1. 团头鲂  $2n \text{♀}$  ( I. 为 I 时相初级卵母细胞, II. 为 III 时相初级卵母细胞, III. 为第 IV 时相卵细胞; a. 卵膜, b. 滤泡膜, c. 卵黄, d. 卵核)。2. 团头鲂  $2n \text{♂}$  ( I. 初级精母细胞, II. 次级精母细胞, III. 精子细胞, IV. 精子; a. 血细胞, b. 精小叶)。3. 团头鲂  $3n + \text{♂}$  不育个体照片 ( I. 精原细胞, II. 初级精母细胞; a. 小叶壁, b. 血细胞)。4. 团头鲂  $3n + \text{♀}$  嵌合体 1 ( I. 卵巢组织, II. 精巢组织; a. 第 IV 时相卵细胞, b. 第 II 时相初级卵母细胞, c. 精子)。5. 团头鲂  $3n + \text{♀}$  嵌合体 2 ( I. 卵细胞, II. 精子细胞)。6. 团头鲂异源  $3n$  嵌合体 ( I. 第 IV 时相卵细胞, II. 精子)。