

三倍体鲢鱼的性腺发育研究*

尹洪滨 孙中武[†] 潘伟志 陈海燕

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 哈尔滨 150070)

[†](东北林业大学野生动物资源学院 哈尔滨 150040)

摘要 于1996年5月和10月在黑龙江省肇东市东发渔场两次对1995年5月用静水压休克法人工诱导并在池塘养殖的三倍体鲢鱼以及对照组二倍体鲢鱼随机取样进行性腺组织解剖和显微观察。结果表明,雄性三倍体鲢鱼的精巢发育与对照组二倍体鲢鱼基本保持在相同的发育水平上,均能完成从精原细胞、初级精母细胞经减数分裂形成精子细胞的过程,但是,三倍体鲢鱼精巢的壶腹腔中精子细胞和成熟精子都明显少于二倍体鲢鱼,而且尚能见到少量畸形精子。雌性三倍体鲢鱼的卵巢处于未分化的卵原细胞阶段,而二倍体鲢鱼卵巢发育正常,已达到卵黄泡出现时相(第III时相)。此外,雌性二、三倍体鲢鱼的卵巢重量明显不同,GSI(性腺成熟系数)差异显著。

关键词 三倍体鲢鱼 精巢 卵巢

学科分类号 Q954

利用染色体组加倍技术诱导鱼类多倍体近年来格外引人注目(楼允东,1984),尤其是三倍体鱼表现出的不育性更使人饶有兴趣。尽管国内外已先后诱导出鲤(Gervai *et al*, 1980)、鲑(Benfey, 1984)、草鱼(Allen *et al*, 1986, 1987)等20余种鱼的三倍体,但三倍体鱼不育的机理尚不清楚。为此, Lincoln(1981a, b)对鲮鱼和鲮鱼 × 川鲮杂种做了人工诱导三倍体的性腺发育研究。而后, Lincoln等(1984)和 Solar等(1985)对虹鳟、Suzuki等(1985)对泥鳅、Johnson等(1986)对银大马哈鱼、Allen等(1986)对草鱼、桂建芳等(1991)对水晶鲫、Sugama等(1992)对真鲷、陶炳春等(1995)对鲤鱼三倍体的性腺发育陆续做了研究报道。作者于1994年采用静水压休克法成功地诱导出鲢鱼三倍体(Yin *et al*, 1997),并于1995年对此诱导工艺进行了中试放大和池塘养殖实验,完成了三倍体鲢鱼的核型检测分析和三倍体鲢鱼胚胎及仔鱼的发育观察,1996年对饲养的三倍体鲢鱼性腺发育进行了组织解剖和显微观察(尹洪滨, 1996, 1997)。本文报道有关三倍体鲢鱼性腺发育观察结果,以期三倍体鱼性腺发育与繁殖机理的深入研究提供参考依据。

1 材料与方 法

1995年5月采用静水压休克法(1994年筛选出的最佳诱导条件)在黑龙江省肇东市东发渔场进行人工诱导三倍体鲢鱼(*Silurus asotus* L.)的中试放大和池塘养殖实验,同年10

* “八五”农业部重点生物技术项目,生85-02-04-02号。尹洪滨,女,出生于1954年12月,副研究员, E-mail:hfish@mail.hrb.hl.cninfo.net

收稿日期:1998-01-20,收修改稿日期:1998-10-10

月在实验地通过专家验收。1996年5月和10月两次随机取样对三倍体鲢鱼的性腺发育进行组织解剖和显微观察,同时与对照组二倍体鲢鱼进行了对比研究。5月份取样18尾(为12月龄鱼),三倍体和二倍体各9尾。10月份取样26尾(为17月龄鱼),二、三倍体鱼各13尾。通过染色体分析和红细胞核测量两种方法(Yin *et al.*, 1997)确认鱼样倍性。解剖后,取出性腺,称重,然后固定于Bouin氏液中。经系列酒精脱水,石蜡包埋,切片4—5 μm , H.E染色,中性树脂封片, Olympus 显微观察并摄影。性腺发育的分期划分参考张耀光等(1996)。

2 结果

2.1 精巢发育

从12月龄鲢鱼精巢的观察结果可知,三倍体鲢鱼精巢发育与对照二倍体鲢鱼基本保持同步。精巢为叶型,由外膜和实质两部分构成。外膜由三层组成:外层为扁平上皮细胞,第二层为疏松结缔组织,第三层为间质组织。生殖上皮随结缔组织向内伸入实质形成许多壶腹。壶腹腔内有不同发育阶段的生殖细胞,以初级精母细胞和次级精母细胞为多,精原细胞相对较少,精巢发育至初级精母细胞时相(第II时相)和次级精母细胞时相(第III时相)或介于两时相之间(图1a)。而二倍体鲢鱼精巢发育比较一致,次级精母细胞多于初级精母细胞,精原细胞则更少(图1b)。

在对17月龄鲢鱼精巢解剖的观察中,作者观察到三倍体鲢鱼精巢略小于二倍体, GSI 为 0.30 ± 0.09 ; 二倍体鲢鱼 GSI 为 0.49 ± 0.07 。切片观察到,三倍体鲢鱼精巢的发育水平仍与二倍体相近,处于精子细胞成熟时相(即第IV时相)。将二者比较看,二倍体鲢鱼精巢的壶腹中充满(大量)精子细胞(直径为2.0—2.4 μm)和(少量)成熟精子(精子直径约为1.0 μm) (图1e, f)。三倍体鲢鱼精巢的壶腹腔中精子细胞(直径为2.9—3.5 μm)和成熟精子(精子直径约为1.4 μm) (图1c, d)都明显地少于二倍体,而且尚可见到体积较大的异形精子和无核的败育精子(图1d)。

2.2 卵巢发育

12月龄三倍体鲢鱼的卵巢是白色细带状,显微观察,卵巢细胞呈不规则的条索状排列,处于未分化的卵原细胞阶段(图2a)。二倍体鲢鱼的卵巢发育在整体上处于卵母细胞单层滤泡时相,即第II时相(图2b)。在视野中可见到处于此时相早、中、晚不同时期的卵母细胞,甚至能见到少量第III时相(卵黄泡出现时相)的各期细胞。卵母细胞大小不一,相差数倍或数十倍。上皮细胞及结缔组织突入卵巢腔形成产卵板,卵母细胞沿产卵板排列。第II时相早期的卵母细胞质嗜碱性极强,核区无色或染色很浅,核仁12—24个,分散排列,每个核仁大小相近。中期的卵母细胞胞质碱性增强,卵母细胞呈椭圆形、圆形或不规则形,胞核为椭圆形,核仁明显集中于核中央。晚期卵母细胞体积增大,嗜碱性减弱,胞质内出现少量卵黄泡。核仁数目增加,大小不等,排列于核膜内缘。

17月龄鲢鱼卵巢解剖观察,三倍体鲢鱼卵巢明显地小于二倍体, GSI 为 0.23 ± 0.12 , 而二倍体鲢鱼 GSI 为 2.71 ± 0.78 , 二者相差10倍有余。切片观察到,三倍体鲢鱼卵巢仍处于未分化的卵原细胞阶段,接近不发育,卵巢中是大量没分化的卵原细胞和少量开始分化的细胞(图2c, d, e)。未分化的卵原细胞形态不规则,大多数呈多边形,胞质淡,核小,核内仅一个核仁(图2d)。开始分化的细胞数量极少,低倍镜下几个视野才可见到1—2个分化

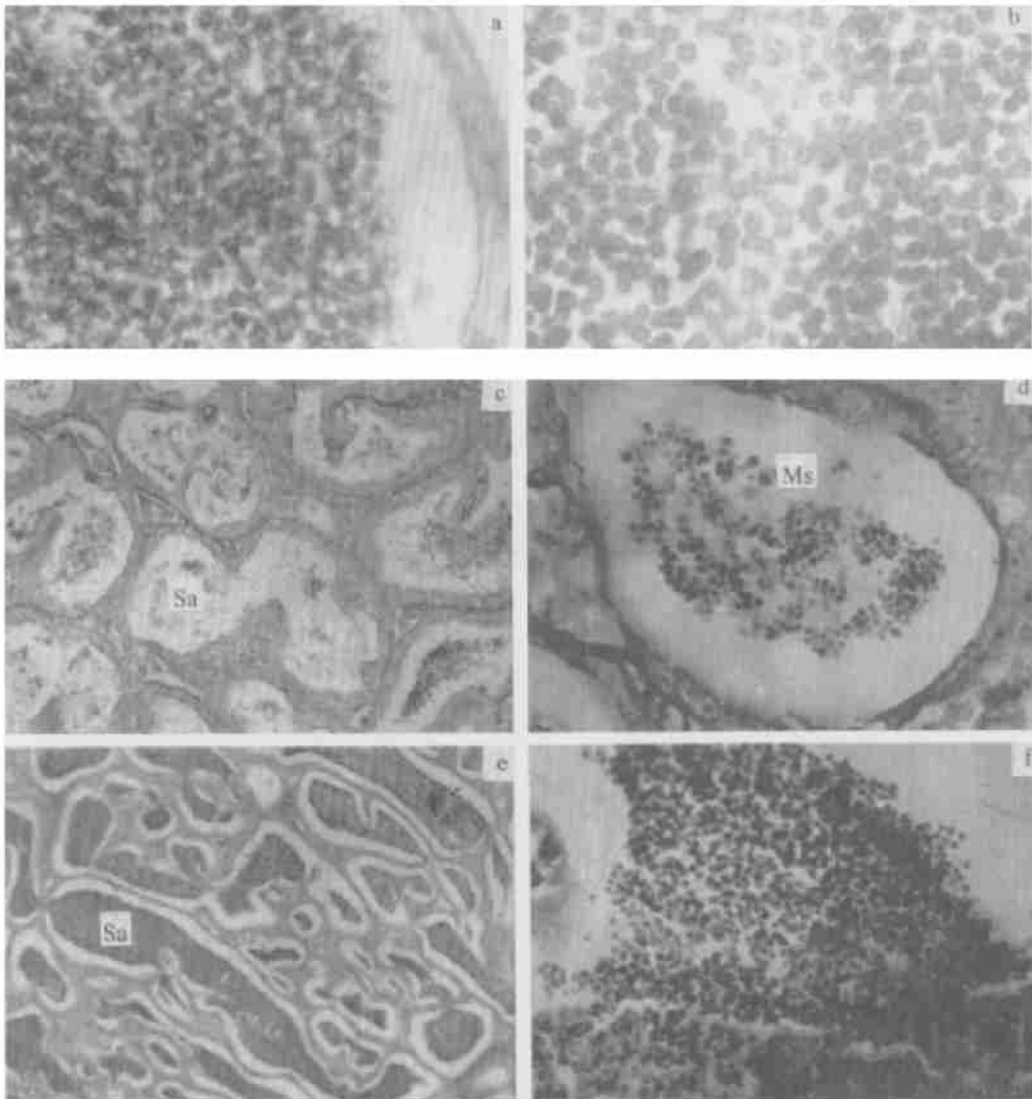


图 1 三倍体鲢鱼及对照二倍体鲢鱼精巢组织显微切片

Fig.1 Micrographs of histological sections of testes of triploid and contrast diploid catfish

a.三倍体,示精母细胞,×100; b.二倍体,示精母细胞,×100; c.三倍体,示精子细胞及精子(Sa),×100; d.三倍体,示精子及畸形精子(Ms),×400; e.二倍体,示精子细胞及精子(Sa),×40; f.二倍体,示精子,×400

细胞。分化细胞(直径为 $96-160\mu\text{m}$)大小不等,体积相差甚大,这些细胞处于第II时相和第III时相的不同分化阶段,与二倍体细胞形态有所不同,有的细胞胞质极少,核极大(核直径为 $96\mu\text{m}$,细胞直径为 $128\mu\text{m}$;核直径与细胞直径的比值为0.75;而二倍体的比值平均为0.38)(图2e),有的细胞在第III时相向第IV时相发育受阻,放射层脱离滤泡膜细胞,两者之间出现胶体,最终导致细胞夭折(图2f),有的细胞核仁胶体化失去嗜碱性能力,趋于解体(图2g),而二倍体卵母细胞核仁有嗜碱性,着色深(图2i),因此认为它们是畸形卵母细胞。二倍体鲢鱼卵巢发育处在第III时相,视野中可见此时相不同发育期的卵母细胞(细

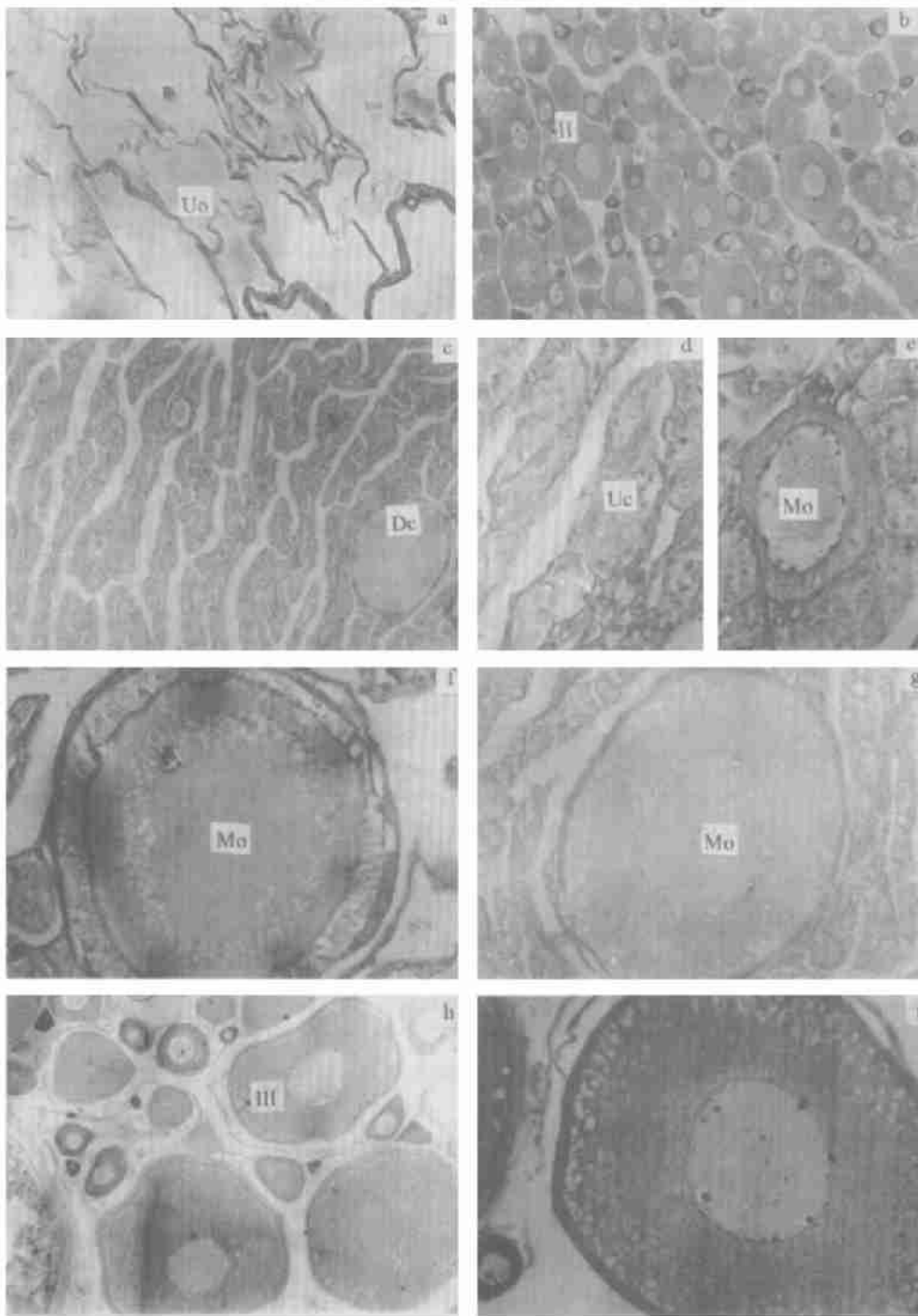


图2 三倍体鲢鱼及对照二倍体鲢鱼卵巢组织显微切片

Fig.2 Micrographs of histological sections of ovaries of triploid and contrast diploid catfish

- a. 三倍体, 示未分化卵原细胞(Uo), $\times 20$; b. 二倍体, 示II时相卵母细胞(II), $\times 10$; c. 三倍体, 示分化细胞(De), $\times 40$; d. 三倍体, 示未分化细胞(Uc), $\times 200$; e—g. 三倍体, 示畸形卵母细胞(Mo), $\times 200$; h. 二倍体, 示III时相早期卵母细胞(III), $\times 40$; i. 二倍体, 示III时相中期卵母细胞, $\times 100$

胞直径为 60—592 μm , 细胞核直径为 26.4—192 μm)。早期嗜酸性增强, 胞质染成淡紫红色, 核膜清楚, 滤泡细胞双层, 卵黄泡小, 分布于胞质边缘(图 2h); 中期卵母细胞外层放射带更清晰, 卵黄泡排列在胞质边缘, 呈整齐的 1—5 圈不等, 尚无卵黄积累(图 2i)。

3 讨论

3.1 精子细胞的发育过程

两次组织学切片观察表明, 雄性三倍体鲢鱼的精巢发育能够保持在与二倍体鲢鱼基本同步水平, 而且被观察的 22 个精巢样品发育比较一致, 都能完成从精原细胞、初级精母细胞经减数分裂形成精子细胞的发育过程。但是, 与二倍体鲢鱼相比, 三倍体鲢鱼精巢中发育的精子细胞以及成熟精子明显少于二倍体, 同时, 尚可见到异形精子和败育精子。而对照组二倍体鲢鱼则壶腹腔中充满精子细胞和成熟精子, 发育至精子细胞成熟时相。有关三倍体雄鱼能否繁殖, 目前多数研究报道认为是不育的, 其理由是三倍体鱼的精巢发育和精子形成受到第一次减数分裂、第二次减数分裂和精子变态三个阶段的障碍影响, 只能形成畸形精子或败育精子, 因此三倍体雄鱼是不育的。但是, Benfey 等(1986)和 Allen 等(1986)的研究结果却表明, 雄性三倍体虹鳟和草鱼能够经过人工催产诱导精子成熟并排精, 其精子能与二倍体雌鱼卵子受精, 但胚胎发育几乎全部畸形。从本实验的观测结果来看, 三倍体鲢鱼精巢能与二倍体保持等同的发育水平, 但是, 壶腹腔中发育的精子细胞明显少于二倍体, 很大可能是精巢发育到第 III 时相出现发育滞止, 精子细胞或精子逐渐解体吸收, 导致败育。尽管观察中只见到少量畸形精子和败育精子, 多为正常发育的精子细胞和精子, 但它们在后期发育过程中能否转变成畸形精子或者败育精子, 或者其精子与二倍体鱼卵子受精后胚胎发育是否畸形, 尚需进一步研究确定。

3.2 雌性不育

雌性三倍体鲢鱼卵巢发育与二倍体截然不同, 所有被观察的卵巢样品均处于未分化的卵原细胞阶段。在几个视野中偶见 1—2 个介于第 II、III 时相的分化细胞, 被认为是畸形卵母细胞。这一观察结果与 Lincoln 等(1984)对虹鳟, Johnson 等(1986)对银大马哈鱼、Allen 等(1987)对草鱼的研究报道是一致的。观察中没有见到其它不同的发育类型。因此, 雌性三倍体鲢鱼是不育的。

3.3 初步判定二、三倍体雌鱼的直观参数

在解剖时还观察到, 雌性三倍体鲢鱼的卵巢由于不发育而特别小, 其重量仅占体重的 0.08%, 而二倍体鲢鱼卵巢则为其体重的 1.43%, 二者的比值相差近 20 倍。作者认为解剖时可以用 GSI 直观准确地判定雌性鲢鱼的倍性, 这已通过染色体分析和红细胞核测量等方法予以验证。但是, 雄性二、三倍体鲢鱼 GSI 却没有显著差异。

本研究的观察结果显示, 三倍体鲢鱼精巢发育水平与二倍体基本一致, 到完全性成熟时能否繁育, 有待继续观察确证。而三倍体鲢鱼的卵巢始终处于不分化的原始阶段, 可断定雌性三倍体鲢鱼是不育的。

参 考 文 献

尹洪滨, 1996. 三倍体鲢鱼的核型研究. 水产学报, 20(2): 178—182

尹洪滨, 1997. 三倍体鲢鱼胚胎及仔鱼发育的观察. 鱼类学论文集(第六辑). 北京: 科学出版社, 44—49

- 张耀光, 谢小军, 1996. 南方鲶的繁殖生物学研究: 性腺发育及周年变化. 水生生物学报, 20(1): 8—15
- 桂建芳, 肖武汉, 陈 丽等, 1991. 人工三倍体水晶彩鲫的性腺发育. 动物学报, 37(3): 297—304
- 陶炳春, 董 仕, 乔秀亭, 1995. 二、三倍体鲤性腺发育的比较研究. 中国水产科学, 2(5): 40—48
- 楼允东, 1984. 国外对鱼类多倍体育种的研究. 水产学报, 8: 343—356
- Allen S K, Thiery Jr R G, Hagstron N T, 1986. Cytological evaluation of the likelihood that triploid grass carp will reproduce. Trans Amer Fish Soc, 115: 841—848
- Allen S K, Wattendorf R J, 1987. Triploid grass carp: status and management implications. Fisheries, 12(4): 20—24
- Benfey T J, 1984. Use of erythrocyte measurements to identify triploid Salmonids. Can J Fish Aquat Sci, 41: 981—984
- Benfey T J, Solar I I, De Jong G, 1986. Flow cytometric confirmation of aneuploidy in sperm from triploid rainbow trout. Trans Amer Fish Soc, 115: 838—840
- Gervai J, Peter S, Nagy A, 1980. Induced triploidy in carp. *Cyprinus carpio* L. J Fish Biol, 17: 667—671
- Johnson O W, Dickhoff W, Utter F M, 1986. Comparative growth and development of diploid and triploid coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Aquaculture, 57: 329—336
- Lincoln R F, 1981a. Sexual maturation in triploid male plaice (*Pleuronectes platessa*) and plaice × flounder (*Platichthys flesus*) hybrids. J Fish Biol, 19: 415—426
- Lincoln R F, 1981b. Sexual maturation in female triploid, pleuronectes platessa, and plaice × flounder, platichthys flesus, hybrids. J Fish Biol, 19: 499—507
- Lincoln R F, Scott A P, 1984. Sexual maturation in triploid rainbowtrout, *Salmo gairdneri* Richardson. J Fishbiol, 25: 385—392
- Solar I I, Donaldson E M, 1985. Studies on genetic and hormone-sex control in domesticated rainbow trout. I. The effect of heat shock treatment for induction of triploidy in cultured rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Tech Rep Fish Aquat Sci, 1379: 15
- Suzuki R, Nakanishi T, Oshiro T, 1985. Survival, growth and sterility of induced triploids in the cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). Bull Jpn Soc Sci Fish, 51(6): 889—894
- Sugama K, Taniguchi N, Seki S, 1992. Survival, growth and gonad development of triploid red sea bream, *Pagrus major* (Temminck et schlegel): use of allozyme markers for ploidy and family identification. Aquacul Fish Management, 23: 149—159
- Yin Hongbin, Sun Zhongwu, Pan Weizhi, 1997. Study on Triploid of Catfish (*Silurus asotus*) Induced by Hydrostatic Pressure Shock and Its Cytogenetics. The Fourth Asian Fisheries Forum China Ocean Press, 401—404

STUDY ON GONADAL DEVELOPMENT OF TRIPLOID CATFISH (*SILURUS ASOTUS* L.)

YIN Hong-bin, SUN Zhong-wu[†], PAN Wei-zhi, CHEN Hai-yan

(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin, 150070)

[†](College of Wildlife Resource, Northeast Forestry University, Harbin, 150040)

Abstract Triploid catfish (*Silurus asotus* L.) were induced by hydrostatic pressure shock and raised in fishpond in Dongfa Fishery in Zhaodong City of Heilongjiang Province in May, 1995. In May, 1996, 18 catfish including 9 triploid and 9 diploid and in October, 1996, 26 catfish (including

13 triploid and 13 diploid) were sampled randomly. The gonad of the sample triploid catfish was dissected and observed histologically through microscope and compared with that of the control diploid catfish. The fish ploidy was determined by chromosome analysis and erythrocyte nuclear measurement. After the fish was dissected, the gonad was taken out and weighed and immobilized in Bouin solution before a series of alcohol dehydration, then embedded in paraffin, cut into 4—5 μ m sections, dyed with H. E dye and sealed with neutral resin, and finally observed through Olympus microscope and photomicrographed.

The results of the gonadal observation indicate that the testis development of male triploid catfish could keep up with that of diploid catfish, and meiotic course, i. e. development from spermatogonia, primary spermatocytes to spermatoblasts could be finished in male triploid catfish. However, developing sperms and mature sperms in the cavity of testis of triploid catfish were obviously less than those in diploid catfish, and a small amount of heteromorphic sperms and sterile sperms could be detected. Whether the triploid catfish could reproduce after attaining complete sexual maturation remained a question to be clarified.

The ovary development of female triploid catfish was entirely different from that of diploid catfish: for all the sample female triploid catfish, the ovary was at the undifferentiated oogonium stage, while the ovary of the control diploid catfish developed normally and reached phase III. Therefore, female triploid catfish may be sterile.

Moreover, during the course of dissecting and observing, the ovary of female triploid catfish was excessively small due to underdevelopment; its weight only accounted for 0.08% of its body weight, while the ratio for female diploid catfish was up to 1.43%, nearly 20 times of the former, so the ploidy of female catfish can be determined directly and accurately by GSI, as has been proved by chromosome analysis and erythrocyte nuclear measurement. However, no marked difference of GSI between male diploid catfish and male triploid catfish was observed.

Key words Triploid catfish (*Silurus asotus* L.) Testis Ovary

Subject classification number Q954