DOI:10.16262/j.cnki.1000-8217.1997.01.003

银鲫天然雌核发育机理研究的回顾与展望

桂建芳

（中国科学院水生生物研究所，武汉 430072）

［摘要］ 银鲫养殖是我国鱼类细胞遗传学和发育生物学研究的认识产物，其天然雌核发育生殖方式的揭示、异育银鲫的培育、高体型异育银鲫的选育、复合四倍体的发现和银鲫雌核发育机制的人工调控，是我国鱼类细胞工程和发育工程育种实践的特色与创新。这独特的生殖方式仍蕴藏有奇异的研究潜力，分子生物学的发展为进一步开发这些潜力提供了新的机会。雌核发育调控因子的鉴定和分离、"异精雌核发育介导的基因转移"和银鲫及其"复合种"的遗传多样性及进化规律，将是三个具有一定理论和应用前景的研究方向。

［关键词］ 银鲫，天然雌核发育，基因组操作，复合种，雌核发育调控因子，异精雌核发育介导的基因转移

理想的研究系统是科学发展的关键，尤其是在生命科学中，许多领域的发展往往总与一些模式物种相关。果蝇与基因论的联系、爪蟾与发育的关联、小鼠与基因转移的发展，都是科学史上有口皆碑的事实。幸运的是，在我们从事鱼类遗传育种研究中，也寻找到一种特殊的对象，并由此进行了近20年的研究，取得了一系列新发现和新认识。这一对象就是具有天然雌核发育这一特殊生殖方式的银鲫（*Carassius auratus gibelio*）。

1 异精雌核发育生殖方式的揭示开拓了雌核发育鱼类的育种实践

自1932年美国鱼类学家Hubbs发现第一种雌核发育单性鱼*Poecilia formosa*至今，在包括鱼类、两栖类和爬行类在内的脊椎动物中已鉴别出了50多个单性物种。这些单性动物有三种不同的生殖方式，即孤雌生殖（parthenogenesis）、雌核生殖（gynogenesis）和杂种生殖（hybridogenesis）[1]。70年代末80年代初，鱼类遗传育种和细胞遗传学的兴起，使我国学者在我国的鱼类中也寻找到一种特殊的对象——银鲫，它是鲫鱼大家族中的一员。

银鲫与具有100个染色体的普通鲫鱼明显不同，其染色体数为156或162，是天然三倍体[2]。有趣的是，它与其他单性物种明显不同，在其自然种群和人工自交繁育群体中，雄性银鲫约占5%--20%，为三倍体两性型种群；当其卵子用其他鱼类的精子授精时，其后代全为雌性，受精生物学研究显示出其生殖方式为雌核发育[3]。因此，银鲫是一种独特的雌核发育的两性型种群。蒋一珪等在揭示这一特殊生殖方式的基础上，用兴国红鲤的精子刺激银鲫卵雌核发育，不但获得了全雌性子代，而且进一步发现了促生长效应，培育出来的异育银鲫[4]很快在全国推广养殖，导致了鲫鱼养殖业的迅速发展，并由此开拓了雌核发育鱼类的育种实践。

本文于1996年4月1日收到。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 银鲫种群遗传异质性的阐明开创了鱼类品系选育的范例

亚马逊莫莉 *Poecilia formosa* 和 *Poeciliopsis* 属的单性鱼中不同雌核发育系的存在[5]，以及银鲫育种实践中所观察到的个体差异，启发我们在银鲫中开展种群异质性的研究，以求从中选出更佳的养殖品系。

供鉴定的群体是1976，1977和1982年由黑龙江方正县双凤水库引进的野生银鲫和它们自交繁殖的后代。朱蓝菲等首先分析比较了它们的血清蛋白和酯酶等8种生化指标，观察到血清蛋白和肝脏酯酶同工酶的遗传异质性，并由此区分出4个不同的雌核发育系(A系，B系，C系和D系)[6]。

为了证实各个雌核发育系内的遗传同质性和不同雌核发育系间的遗传异质性，接着进行了系内和系间的组织相容性检测，即组织移植实验。结果发现，同系内移植的平均接受率为95%（A系为89.5%，C系为100%，D系为97.2%）；异系间移植的平均排斥率为97.1%（A→D为100%，C→A为95.7%，C→D为94.1%，D→C为96.9%）。这些数据表明，同系个体间的组织相容性抗原是相同的，并进一步表明，用生化遗传标记所辨认的各个雌核发育系是真实的[7]。

最后，还对各个雌核发育系的生物学性状，如体型、生长、繁殖、染色体数等进行了分析比较，发现D系体型最高，故称之为高体型，其生长速度最快，卵母细胞最早成熟，染色体数为162，其它三个系的染色体数都为156。养殖试验表明，用D系银鲫为母本人工繁殖的高体型异育银鲫，其养殖产量比未经选育的异育银鲫混合品系的养殖产量提高了20%[2]，使银鲫养殖又上了一个台阶，开创了鱼类品系选育的成功范例。

3 复合四倍体的发现显露出银鲫卵子独特的研究潜力

银鲫的生殖方式是雌核发育的一个特例，可能处于雌核生殖和两性融合生殖之间，既相对稳定又不是一成不变，其卵子对外来精子的应变能力可能也不尽相同，因而在其异精雌核发育子代中有可能出现一些例外的个体。依据这一观点，我们于1990年在异育银鲫人工繁育群体中发现了少数体型和体色产生了一定变化的特殊个体，尤其是在密养的鱼种池中，这些特殊个体要比普通异育银鲫大得多。染色体分析表明，这些特殊个体既保持了银鲫的全部染色体（162个），又融入了红鲤精子的单倍体染色体组（50个染色体），具有212个染色体，有6条携带有核仁组织者的染色体，因而被称为复合四倍体[8]。复合四倍体的基因表达多数偏近于银鲫，即银鲫的染色体组在其基因表达调控中起了主导作用，这与其染色体组占多数有关，同时红鲤的基因也发挥了一定的作用，出现了银鲫原来所没有的区带或原有的区带受到抑制等现象；在复合四倍体不同个体间存在有遗传异质性，这种异质性包含了来自父本红鲤基因组的遗传影响[9]。

复合四倍体鱼能正常产卵，当卵子用其母本种银鲫的精子授精时，胚胎多为畸形，难以孵化出苗。细胞学观察表明，精核入卵后发生了解凝和原核化。染色体分析发现，胚胎细胞多于212个染色体，多数在230—240之间，这种发育方式被称之为拟两性融合发育。当卵子用红鲤或其它鱼类的精子授精时，胚胎发育正常，孵化出正常鱼苗，细胞学观察表明，其精核以固缩状态存在，胚胎细胞含有212个染色体，为典型的异精雌核发育，繁育出正常的复合

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

四倍体子代[10-12]。

复合四倍体的发现,揭示出银鲫的少数卵子不但具有雌核发育保持自身全部染色体的能力,而且还有融合外源精子、将精子的染色体并入协同发育的能力。这种能力对遗传育种具有十分重要的意义,如果不存在种的特异性,将有可能获得携带有不同鱼类基因组的复合四倍体。研究还表明,银鲫的复合四倍体与普通的两性杂种明显不同,它可以通过异精雌核发育的生殖方式突破种间两性杂种不育的障碍,还可克服两性物种后代分离的现象;另一方面,从其与银鲫精子受精所表现出的拟两性融合发育方式,又为银鲫育种提供了新的线索和途径[13]。

复合四倍体卵子所特有的对两类不同精子采用两种不同发育方式的生殖应答机制,在脊椎动物中可能迄今为止还是首例发现,它们可能是银鲫卵对同源精子和异源精子应答机制差异的进一步扩大。因为前期研究曾观察到,银鲫卵子对同源的银鲫精子和异源的红鲤精子具有不同的受精细胞学行为[14]。因此,复合四倍体的发现进一步显露了银鲫卵子独特的研究潜力、确立了银鲫及复合四倍体在单性脊椎动物和多倍体脊椎动物进化遗传学研究中的特殊意义。

4　雌核发育机制的人工调控实现了“复合种”人工合成的构想

复合四倍体的发现,证实了银鲫卵抑制精核发育机制只是相对稳定的观点,说明银鲫卵仍保留有能使异源精核解凝和原核化的潜能。研究还证实,采用人工调控银鲫雌核发育机制的方法,如以胰酶处理异源精子或以冷休克处理银鲫受精卵,均可成功地诱导异源精核在银鲫卵中解凝、原核化和两性融合,获得了融入有鲤鱼基因组或团头鲂基因组的异源四倍体或超三倍体“复合种”[15,16],并可大大提高获得的比率。这就是说,由于银鲫生殖方式的特殊性,银鲫卵子是进行基因组和染色体转移的理想系统。

生长对比和养殖试验初步表明,有一组银鲫“复合种”要比“七五”期间选育出来的生长最快的高体型异育银鲫还要快10%以上,且空壳重比高体型异育银鲫大(未发表的结果)。至此,我们获得的不仅仅是一个“复合种”,而是一系列的整倍体和非整倍体“复合种”,它们皆有很大的选育潜力,实现了“复合种”人工合成的构想。

5　分子发育生物学研究体系的建立为银鲫雌核发育展示了新的研究前景

银鲫雌核发育机理研究之所以不断发展,主要得益于理论与实践的结合,得益于产业的推动,得益于研究的创新。过去的研究还仅仅是通过细胞学手段揭示了部分现象,而隐藏在银鲫中的奥秘还有待于我们采用更新的技术去认识和发掘。为此,作者依据分子生物学的思路和方法,在多方支持下,现已开始筹建探索银鲫雌核发育的分子发育生物学研究体系。我个人认为,除本实验室已进行的部分工作外,下列三个方向可能具有一定的研究前景。

(1)雌核发育调控因子的鉴定和分离

卵母细胞的发育、成熟和受精是生命发生的开端,其调控机制是发育生物学研究的焦点。以天然雌核发育的生殖方式繁衍后代的银鲫,由于其卵母细胞发育、成熟和受精有别于普通两性物种,如一次成熟分裂和精核不解凝等,这些特殊性使其成为独特的研究系统,为揭示卵母细胞的发育、成熟和受精提供了特殊的材料和条件。显然,鉴定和分离这些调控因子不仅对揭示鱼类的雌核发育机制具有重要意义,并有可能揭示出调控卵母细胞发育、成熟和受精这些生命发生基本过程中的某些关键基因,而且具有潜在的应用价值。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

(2) 异精效应和“异精雌核发育介导的基因转移”

异精效应和异精雌核发育，是在异育银鲫的育种实践中，发现异源精子不仅能激动银鲫卵雌核发育，而且还能影响子代的性状（如生长和体色性状等）而提出来的新概念。即银鲫在用异源精子进行雌核发育过程中，精子不仅起着激动卵子雌核发育的作用，而且还与卵核间发生了有限的遗传物质交流[4]。与许多新的学术观点一样，这一观点很长一段时间并没有被多数人所理解。然而，DNA 斑点杂交和 PCR 实验已经证实，异源精核的 DNA 片段可随机地参入银鲫卵核发育，传给子代[17,18]。

有趣的是，随着我们研究的不断深入，西方学者已开始涉足这一领域。1995 年，Schartl 等在一种称为亚马逊莫莉(学名为 *Poecilia formosa*)具有雌核发育生殖方式的小型鱼类中，也发现了类似于银鲫异精效应的现象[19]。这一报道虽然晚了我们 10 多年，其共同性是基本一致的。由此看来，雌核发育具有某些共有的特性，这些特性使其它物种的基因向雌核发育鱼类中发生了转移和交流，从而促进雌核发育物种的进化。

由异精雌核发育导致的这种外源 DNA 的参入，实际上是一种简便易行且行之有效的基因转移途径。我们最近的研究还表明，这种异精雌核发育介导的基因转移还可通过调控银鲫的雌核发育机制来提高其转移、整合和表达效率。因此，开展“异精雌核发育介导的基因转移”研究，不仅可以寻找和鉴定出那些被雌核发育机制摄取的并产生了生长效应的基因或起调控作用的 DNA 片段，而且还有可能为解决当前基因转移研究中有关基因整合和表达的难题寻找到一些有益的启示。

(3) 银鲫及银鲫“复合种”的遗传多样性及其种质评价

按传统的遗传学观点，雌核发育的单性物种由于缺乏基因重组和有害突变的积累，在进化上似乎步入了死胡同，应是短命的。然而，单性物种的进化成功和对生态环境适应性的事实已变更了上述观念。近年来，基因组 DNA 指纹和线粒体 DNA 遗传多样性研究表明，一些单性物种可能已经历了几十甚至几百万年的进化历史[20]。

据悉，方正银鲫的原产地黑龙江方正县的双凤水库是 50 年代末修建的，原来仅有一条小小的山溪。从进化的长远观点看，方正银鲫应发源于这条小溪。事实上，我国具有雌核发育生殖方式的银鲫还存在有许多地方种群，仅已报道的就有云南滇池银鲫、河南淇河鲫、广东缩骨鲫等。加上通过人工调控培育出来的不同“复合种”，应该说我们既有了天然进化而来的资源，又有了在人工控制下形成的品系。因此，研究银鲫的遗传多样性，阐明不同地方品种和人工培育不同品系的种质异同，揭示地方品种的起源年代、进化历程以及人工“复合种”的形成机制和遗传规律，寻求其种质的评价标准，也应是将来研究的主要方向之一。

致谢 本文工作获国家杰出青年科学基金、国家自然科学基金和中国科学院院长基金等资助，部分研究在“淡水生态和生物技术”国家重点实验室进行，一些首次陈述的结果由杨仲安、樊连春、杨书婷、朱蓝菲、梁绍昌等协同完成，特此致谢。

参考文献

[1] 桂建芳．单性脊椎动物的进化遗传学．自然杂志，1989，**12** (2)：116—122.

[2] 朱蓝菲，蒋一珪．银鲫不同雌核发育系的生物学特性比较研究．水生生物学报，1993，**17** (2)：112—120.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[3] 俞豪祥. 银鲫雌核发育的细胞学观察. 水生生物学集刊, 1982, **7** (4): 481-487.

[4] 蒋一珪, 梁绍昌, 陈本德等. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应. 水生生物学报, 1983, **8** (1): 1-13.

[5] Vrijenhock R C. The evolution of clonal diversity in *Poeciliopsis*. In: Turner B J. Evolutionary Genetics of Fishes. New Yock, Plenum Press, 1984, 399-429.

[6] 朱蓝菲, 蒋一珪. 银鲫种内的遗传标记及其在选种中的应用. 水生生物学报, 1987, **12** (2): 105-111.

[7] 朱蓝菲, 蒋一珪. 组织移植对银鲫不同雌核发育系的遗传监测. 水生生物学报, 1990, **14** (1): 16-21.

[8] 桂建芳, 梁绍昌, 朱蓝菲, 蒋一珪. 异育银鲫人工繁育群体中复合四倍体的发现及其育种潜力. 科学通报, 1992, **37** (7): 646-648.

[9] 朱蓝菲, 桂建芳, 梁绍昌, 蒋一珪. 复合四倍体异育银鲫的血红蛋白和红细胞的同工酶分析. 水生生物学报, 1995, **19** (1): 66-69.

[10] 桂建芳, 梁绍昌, 朱蓝菲, 蒋一珪. 人工复合四倍体异育银鲫雌核发育生殖方式的初步证明. 科学通报, 1992, **37** (9): 836-838.

[11] 桂建芳, 梁绍昌, 朱蓝菲, 蒋一珪. 人工复合四倍体异育银鲫卵子应答父本种精子和母本种精子两种不同发育方式的发现. 科学通报, 1992, **37** (11): 1030-1033.

[12] 杨仲安, 桂建芳, 朱蓝菲, 梁绍昌, 蒋一珪. 复合四倍体异育银鲫两种不同生殖方式的细胞学观察. 动物学报, 1994, **40** (1): 69-76.

[13] Gui J F, Yang Z A, Fan L C, Zhu L F, Liang S C. Developmental mode variations and breeding potentialities in multiple tetraploid allogynogenetic crucian carp (♀) × silver crucian carp (♂), *Carassius auratus gibelio*. Fourth Asian Fisheries Forum, 1996, in press.

[14] 丁军, 单仕新, 葛伟, 蒋一珪. 银鲫卵对两类精核发育的初级控制作用模式的研究. 中国科学(B辑), 1991, **11**: 1160-1165.

[15] 丁军, 蒋一珪, 单仕新, 魏丽华. 异源精子质膜蛋白质在银鲫卵雌核发育初级控制中的作用. 科学通报, 1993, **38** (5): 455-458.

[16] 丁军, 蒋一珪, 单仕新, 魏丽华. 雌核发育银鲫卵抑制异源精核发育的作用机制研究. 中国动物学会成立60周年: 纪念陈桢教授诞辰100周年论文集. 北京: 科学出版社, 1994, 224-230.

[17] 丁军, 谢岳峰, 蒋一珪, 单仕新. 异育银鲫及其人工杂合种外源遗传物质的检测分析. 水生生物学报, 1993, **17** (1): 22-26.

[18] 陈洪, 杨靖, 薛国雄, 朱立煌. RAPD技术在异精激发方正银鲫比较研究中的应用. 科学通报, 1994, **39** (7): 661-663.

[19] Schartl M, Nanda I, Schlupp I et al. Incorporation of subgenomic amounts of host species DNA in the gynogenetic Amazon Molly. Nature, 1995, **373**: 68-71.

[20] Smith J M. Age and the unisexual lineage. Nature, 1992, **356**: 661-662.

RETROSPECTS AND PROSPECTS OF STUDIES ON THE MECHANISM OF NATURAL GYNOGENESIS IN SILVER CRUCIAN CARP (*CARASSIUS AURATUS GIBELIO*)

Gui Jianfang

(*Institute of Hydrobiology, CAS, Wuhan* 430072)

Abstract The aquaculture of silver crucian carp was resulted from cytogenetics and developmental biology researches. A series of new discoveries and achievements, such as the revelation of natural gynogenesis, breeding of allogynogenetic silver crucian carp, selection of high body allogynogenetic silver crucian carp, discovery of multiple tetraploid and manipulation of

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

the gynogenetic mechanism, have been performed and obtained through studies on cell engineering and developmental engineering. Introduction of molecular biology will further exploit the special potentialities and opportunities remained in the gynogenetic system. Three major growth points for the research, such as identification and isolation of the gynogenetic regulators, allogynogenesis-mediated gene transfer, as well as genetic diversity and evolutional implications of natural populations and artificial multiple "species", will open up new prospects for developmental biology, evolutional biology and genetic breeding.

Key words *Carassius auratus gibelio*, natural gynogenesis, genome manipulation, multiple species, gynogenetic regulators, allogynogenesis-mediated gene transfer

·资 料·

1996年获国家自然科学基金面上项目资助的前20名高等院校名单

（按资助金额排序）

金额单位：万元

单位名称	项数	资助金额
清华大学	116	1123.00
北京大学	80	817.00
中国人民解放军第二军医大学	71	701.70
浙江大学	63	652.90
南京大学	63	637.30
天津大学	55	537.80
中国农业大学	49	515.60
复旦大学	53	502.80
中国科学技术大学	53	496.60
四川联合大学	45	429.10
南开大学	43	408.70
北京医科大学	45	402.50
上海交通大学	42	391.85
华中理工大学	38	391.50
西安交通大学	42	384.70
武汉大学	40	379.90
华西医科大学	39	378.00
中国人民解放军第三军医大学	38	368.00
中山大学	37	375.30
华中农业大学	28	348.50

（综合计划局信息处供稿）

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net