

## 多倍体育种

Whole genome duplication(整套染色体发生复制的现象)

**多倍体**：是指体细胞中含有三套或三套以上染色体的个体。

一、动植物种中多倍体存在的情况？

100%的被子植物，其他植物中大量存在，鱼类中部分存在，裂腹鱼，银鲫

二、多倍体与二倍体在有哪些差异特性？

生长快、个体大、性腺发育异常、寿命延长和遗传特性改变等。

三、多倍体具有的竞争优势？

全基因组复制事件 减少物种灭绝的风险，增加物种多样性，推进物种进化

四、多倍体的分类情况？

天然，人工多倍体，同源，异源多倍体，异源二倍体和四倍体育性

五、如何获得多倍体鱼？

远缘杂交、核移植及细胞融合，温度休克法，静水压法和电休克，秋水仙素，

细胞松弛素B(CB)

六、多倍体鱼获得的潜在调控机制？

染色体加倍,不减数配子的形成及融合以及多精受精

七、如何鉴定鱼类多倍体的倍性？

水产中的应用：控制过度繁殖，提高

染色体计数和DNA含量测定

生长速度，延长寿命，

## 第六章 雌核发育和雄核发育育种技术

### 黄鳝是不是鱼？

黄鳝（学名：*Monopterus albus*）：又名鳝鱼。体细长呈蛇形，体长约20-70厘米，最长可达1米。各鳍不发达基本消失，全身只有一根三棱刺，体表有一层光滑的粘膜保护，无鳞。



黄鳝为肉食凶猛性鱼类

原产地：东亚和东南亚  
引进：美国



黄鳝生殖季节约在6-8月，在其个体发育中，具有**雌性逆转**的特性，即从胚胎期到初次性成熟时都是雌性（即体长在35厘米以下的个体的生殖腺全为卵巢）；产卵后卵巢逐渐变为精巢；体长在36-48厘米时，部分性逆转，雌雄个体几乎相等；成长至53厘米以上者则多为精巢。



黄鳝的性逆转现象，是属于在生物进化演变过程中，为保护自身繁衍而自然发生的，而**石斑鱼**、**黑鲷鱼**也都会发生性逆转现象。

据《本草纲目》记载，黄鳝有补血、补气、消炎、消毒、除风湿等功效。  
黄鳝肉性味甘、温，有补中益血，治虚损之功效，

### 毒性

黄鳝的血液有毒，误食会对人的口腔、消化道黏膜产生刺激作用，严重的会损害人的神经系统，使人四肢麻木、呼吸和循环功能衰竭而死亡。

鳝鱼血清有毒，但毒素不耐热，能被胃液和加热所破坏，一般煮熟食用不会发生中毒。



### 人工养殖

黄鳝的活动习性是昼伏夜出，即白天静卧洞内，晚上出洞觅食。可根据此习性进行夜间捕捉。黄鳝的鳃呈退化状态，主要依靠表皮和辅助呼吸器官直接从空气中呼吸氧气。因此在氧气含量很低的水中也能正常生活，据此，人工养殖的密度可以加大。黄鳝体表的粘液丰富，只要保持体表潮湿，就不会死亡，因此运输十分方便。

黄鳝的食性以底栖动物性食物为主，如水蚯蚓、螺蚌、蝌蚪、小型鱼虾等。另外也摄食一些腐屑和藻类、瓜菜等。



## 特殊的有性生殖方式

### 一、鱼类的雌核发育

### 二、鱼类雌核发育的人工诱导

### 三、雌核发育鱼的鉴定

### 四、雌核发育二倍体鱼的性别

### 五、雌核发育鱼的生长和发育

### 六、雌核发育在水产养殖中的应用

### 七、鱼类的雄核发育

#### 研究回顾：

**性别决定系统：**有环境决定型；有年龄决定型；有染色体数目决定型；有**染色体形态决定型（基因决定型）**。

1. **XY型**，特点是雌性动物体内有两条同型的性染色体XX，雄性个体内有两条异型的性染色体XY。
2. **ZW型**，特点是雌性动物体内有两条异型的性染色体ZW，雄性个体内有两条同型的性染色体ZZ，如**蝴蝶、鱼和鸟类**等。性别由卵子中所带有的性染色体是Z还是W决定。
3. **XO型**，O代表缺少一条性染色体，雌性具有两条X染色体（XX），而雌性只有一条X染色体，其基因型为XO，雄性产生两种配子：具有一条X染色体，或者没有性染色体，精子在受精过程中决定子代的性别。**雄虫、蟋蟀等直翅目昆虫和雄蜂等少数动物**。
4. **ZO型**，雄性有两条Z染色体（ZZ），而雌性只有一条Z染色体（ZO）。**鳞翅目昆虫中的少数个体**。

XO和ZO型性别决定方式分别是XY和ZW型性别决定方式的**特殊形式**。

## 1、孤雌生殖

### 孤雌生殖（Parthenogenesis）：

在一些有性生殖的动物中，有时动物的卵不经受精过程，也能单独发育成幼体的现象，叫**孤雌生殖**。**只有真正不存精子参与的生殖称为孤雌生殖**。

主要见于**无脊椎动物**，在**甲壳类和昆虫纲动物**是很普遍的，在软体动物和棘皮动物也存在。

### 特殊的有性生殖方式：

- ◆ 孤雌生殖
- ◆ 雌核发育
- ◆ 雄核发育

**报道：**很多种生物都有孤雌生殖现象的记录，甚至在**鲰头鲨**这种较为原始的软骨鱼类身上竟也曾出现过**孤雌生殖**的现象。植物中**黄瓜不经过传粉受精就能结果**。而在英国的切斯特郡立动物园在2006年5月期间，一只单独饲养的**雌性科莫多龙**居然发生了**孤雌生殖**的奇特现象——也算是称得上是孤雌生殖现在在蜥蜴中的最高等的表现。

#### 这类动物为什么还要性别之分了？

（一）**偶发性孤雌生殖**（sporadic parthenogenesis）：偶发性孤雌生殖是指某些昆虫在正常情况下行两性生殖，但雌成虫偶尔产出的未受精卵也能发育成新个体的现象。

（二）**经常性孤雌生殖**（constant parthenogenesis）：经常性孤雌生殖也称永久性孤雌生殖。这种生殖方式在某些昆虫中经常出现，而被视为正常的生殖现象。

（三）**周期性孤雌生殖**（cyclical parthenogenesis）：周期性孤雌生殖也称循环性孤雌生殖。

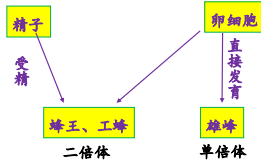
## 孤雌生殖

### 孤雌生殖类型：

- ◆ **产雌孤雌生殖**（水蚤、轮虫等）
- ◆ **产雄孤雌生殖**（蜜蜂）
- ◆ **周期性孤雌生殖**（蚜虫）
- ◆ **偶然孤雌生殖**（家蚕中的某些品种，一些爬行类和鸟类）
- ◆ **人工孤雌生殖**（鱼类、海胆、蟾蜍等的人工孤雌生殖）



蜜蜂



通常**雌性**以**血液**作为食物，从而**传播**黄热病、登革热和其他一些**疾病**，而**雄性**则**吸食植物的汁液**：

科学家在几十年前便已知道，至少有一种基因能够使埃及伊蚊雄性胚胎位于1号染色体的一段脱氧核糖核酸（DNA）上。他们将该区域称为M基因座。由于研究手段的有限，直到2007年，才有突破进展。为了找到这个基因，Adelman和他的同事对分属于两种不同埃及伊蚊的雌蚊和雄蚊的数千个DNA片段进行了测序，最终在剩下的24个序列中，研究人员找到了一个新基因，他们称其为Nix基因。

中山大学建成世界最大“蚊子工厂”



中山大学教授吴志勇

吴志勇团队就在广州南沙沙仔岛陆续释放“绝育”蚊子，每个车间每周能够生产500万只雌蚊。

携带**沃尔巴克氏体**的实验室雄蚊与自然界非携带沃尔巴克氏体雌蚊交配所产的**卵不能发育**。

## 2、雌核发育

**雌核发育（Gynogenesis）**：是指卵子在**精子的刺激下**，依靠自身的细胞核发育成**具有母系遗传物质**的个体的一种有性生殖方式。（修订）

同种或异种精子进入卵内只起刺激卵子发育的作用，不形成雄性原核和提供遗传物质，其子代的遗传物质完全来自雌核，因此雌核发育产生的后裔一般为雌性，只具有母本的性状。

三倍体银鲫



通常在自然环境中，一种鱼的性比约为1:1。普通鲫鱼为4:1，而银鲫则为9:1。

**银鲫**的群体中含有100和162个染色体个体的群体，后者称为三倍体鱼。鱼类“女儿国”

### 雌核发育与孤雌生殖的异同点

#### 相同点：

- 都是特殊的有性生殖方式

#### 不同点：

- 雌核发育是需要精子对卵子激活的**孤雌生殖**
- 孤雌生殖是由各种外界刺激所引起的，不需精子参与

### 3、雄核发育

#### 雄核发育 (androgenesis):

通过用放射线照射等方法完全破坏卵核遗传物质，仅把卵子作为营养源，依靠精子产生只带父系遗传物质个体的繁殖方式。

- ◆ 尚未天然雄核发育鱼的报道；
- ◆ 鱼类间的人工杂交会自发产生**极少量**的雄核发育个体

### 一、鱼类的雌核发育

#### 1、天然雌核发育

#### 2、人工雌核发育

#### 1. 天然雌核发育鱼类

亚马逊花鲤



孔雀鱼



#### 天然雌核发育鱼类—彭泽鲫



彭泽鲫

- ◆ 源自江西省彭泽县丁家湖、芳湖和太白湖等自然水域经长期人工选育而成的一个鲫鱼养殖品系；
- ◆ 生长速度比普通鲫鱼快249.8%；
- ◆ 染色体数为 $3n=150 \pm$ ；
- ◆ 群体中有雄性，雌核发育

#### 天然雌核发育鱼类—滇池高背鲫



滇池高背鲫

- ◆ 上世纪70年代中期在云南滇池及其水系发展起来的一个优势种群，个体大、生长快、繁殖力强；
- ◆ 因背脊高耸而得名；
- ◆ 染色体数为 $3n=162$ ；
- ◆ 群体中无雄性，雌核发育

#### 天然雌核发育鱼类—淇河鲫



淇河鲫

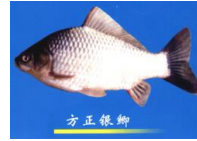
- ◆ 产自河南省淇河；
- ◆ 生长速度为普通鲫鱼的2.5倍；
- ◆ 脊背厚度为普通鲫鱼的2倍，因而被称为双背鲫鱼；
- ◆ 染色体数为 $3n=162$ ；
- ◆ 雄性个体少，天然雌核发育；
- ◆ 与兴国红鲤精子受精产生的雌核发育子代称为“异育淇鲫”

### 天然雌核发育鱼类—方正银鲫



- ◆ 产自黑龙江方正县双凤水库，是鲫鱼的一个地方品种；
- ◆ 生长快、性腺成熟迟、起捕率高；
- ◆ 染色体数为 $3n=156$ ，雌核发育；
- ◆ 群体中雌性占15%左右

### 天然雌核发育鱼类—方正银鲫



#### ◆ 后代雌性比例与精子种类有关

- 如果是鲤鱼精子，雌性后代为0
- 如果是二倍体鲫鱼精子，雌性后代为2.5%
- 如果是三倍体银鲫精子，雌性后代为15%

☆ 说明**银鲫的性别是由父本的遗传物质**所决定的；

☆ 父本的基因组由于雌核发育而被整体排斥，但部分父本遗传物质进入卵子并传递给了子代；

☆ 但进入的是mtDNA、染色体DNA还是微小染色体DNA，目前还不清楚，但子代中没有50%的父本染色体

### 银鲫雌核发育的“异精效应”

雌核发育中精子仅仅起着激活卵子发育的作用，但在银鲫的产生过程中，鲤鱼精子不仅刺激方正银鲫卵的发育，而且还对后代的性状产生影响，这些影响包括：

1. 用鲤鱼精子受精繁殖的异精雌核发育银鲫后代生长速度快；
2. 由不同类型异源精子引起的异精雌核发育后代雌性所占比例不同；
3. 与银鲫相比，异域银鲫的肝脏LDH同工酶谱带染色反应较快，且第二、三条谱带活性相对较高。



☆ 这也说明虽然父本的基因组由于雌核发育而被整体排斥，但部分父本遗传物质仍然传递给了后代！

### 2. 天然雌核发育鱼类的特点

1) 卵子具有与母本完全相同的染色体组型

2) 卵子与近缘两性型雄鱼的精子激活后才能发育，但**精子只起激活的作用，并不发生雌、雄原核的融合**。因此后代一般不具父本性状。

卵子提供核遗传物质，精子只起着激活卵子发育的作用

3) 雌核发育后代全部为雌性（少数种类除外）

通常在自然环境中，一种鱼的性比约为1:1。普通鲫鱼为4:1，而银鲫则为9:1

4) 后代基因型为母体的，表现型似母体

银鲫所生下的后代，从外部特征到内部结构和母亲一模一样，形成一个独特的鱼类“女儿国”。

5) 绝大多数为三倍体，少数为二倍体和四倍体

### 3. 天然雌核发育鱼类的形成机制

#### 1) 天然雌核发育型卵子的发生

初级卵母细胞只进行一次成熟分裂，排出的卵子处于**第一次成熟分裂中期**，卵核染色体不减数来保持其染色体倍性。

#### 4. 天然雌核发育鱼类的起源

## 2) 受精细胞学及其机制

精子的唯一作用是刺激卵子发育，精核始终受到控制而不形成雄性原核，保持**固缩状态**

银钾卵质促使精核膜解体的功能异常,使复盖精子头部的核膜不能象在两性融合生殖受精卵中那样进行崩解,所以精核始终受到抑制不能发育成雄性原核,保持固缩状态。

### 杂交起源假说



雌核发育方式繁殖的鱼类起源于两个物种的杂交,

如：方正银鲫可能是由二倍体鲫鱼和鲤鱼杂交产生的

## 二、鱼类雌核发育的人工诱导

人工雌核发育：依照人们的需要，通过某些人为因素使一般在自然界进行有性生殖的种群中获得雌核发育的后代。

### 1. 人工诱导雌核发育的原理

成熟的卵→失活精子刺激→“受精卵”→染色体加倍→  
雌核发育个体

## 2. 诱导鱼类雌核发育的关键步骤:

- ◆ 精子染色体的遗传灭活
- ◆ “受精卵”染色体的二倍体化

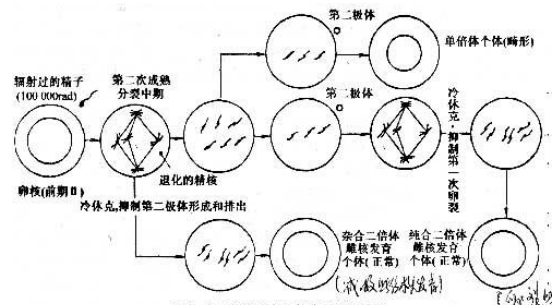


图 6-6 雌核发育二倍体形成的机制  
(Purdum, 1983, 略作修改)

### (一) 精子染色体的遗传灭活

一方面必须首先使精子染色体失活，另一方面还得保持精子穿透和激活卵细胞启动发育的能力。

1. 辐射线处理：如 $\gamma$ 射线、X射线和UV射线等。精子遇水就活动，遗传失活的精子在水中呈“醉汉状运动”。

1)  $\gamma$ 射线、X射线：主要起诱发染色体断裂的作用。

优点：穿透力强，可同时处理大量的精子。

**缺点：**需要特别安全的防护设备，且费用昂贵而有許多不便。

2) UV射线：主要是作用是使精核DNA氢键断裂，形成胸腺嘧啶二聚体，使DNA双链间的键减弱，导致DNA局部变形，从而破坏DNA的正常复制和转录。

优点：设备简单，操作容易，且比较安全。

缺点：穿透力较弱

注意：用紫外线照射精液时应在暗处进行，

对处理大量精液较为困难，被照的精子不大可能全部失活。

**照射鲤鱼精液:**用4倍冷藏Hank's液稀释

精液,定量移入一只平底小玻璃培养皿内(精液厚度约0.5至1mm),皿下垫放一只装有**碎冰块**的大玻璃皿**降温**。为了确保精液均匀地受到照射,用一只以**每分钟摇动35次**的小摇床摇动精液。在一支30W灭菌紫外线灯(波长2537Å)下,照距17cm,照射2h。照射期间,最好每隔15min将受照精液的小皿轻摇数次后再继续照射。直至镜检精子遇水活动减弱,且呈“醉汉状游动”为准。



紫外线照射仪器

**2. 化学药品处理:**

**常用试剂:** 甲苯胺蓝、乙烯脲、二甲基硫酸盐、吡啶黄、噻嗪等

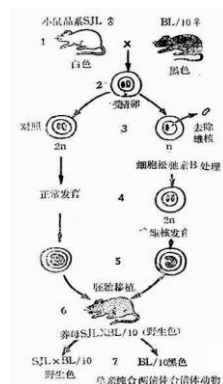
◆ 药物的浓度

◆ 处理的时间

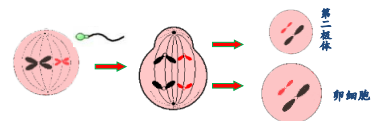
**3. 显微手术法**

**显微手术法:** 采用显微操作的方法,直接去除受精卵中的雄性原核

- ◆ 将两个不同品系的近交系进行杂交。
- ◆ 交配后,在精核与卵核尚未融合之前,从母鼠子宫内冲取受精卵,并用极细的吸管将精核去掉。
- ◆ 在细胞松弛素B的处理下使雌核加倍,形成二倍体细胞。
- ◆ 二倍体细胞在体外培养到囊胚期后,移植到养母的子宫内,使胚胎继续发育,直至出生。

**(二) 激活卵染色体的二倍体化**

一般来说,绝大多数鱼类排出的卵子处于第二次减数分裂的中期,精子入卵后排出第二极体,此时的卵子仅剩减半的染色体数目。若用遗传失活的精子受精,将产生单倍体。



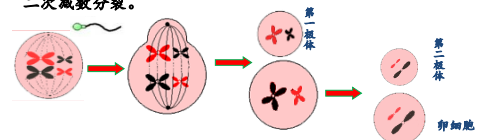
雌核发育的胚胎是单倍体,孵化时呈现显著的畸形,具有典型的“单倍体综合症”,没有存活能力。通过加倍卵子的染色体使其恢复二倍性后,便成为外观正常的具有存活能力的雌核发育二倍体。

**1. 水产动物染色体加倍的原理**

- ◆ 抑制第一极体排出
- ◆ 抑制第二极体排出
- ◆ 抑制第一次卵裂

**1) 抑制第一极体释放**

海产贝类排出的成熟卵子一般停留在**第一次减数分裂的中期**,只有在受精或经激活后卵子才完成第一次减数分裂和第二次减数分裂。

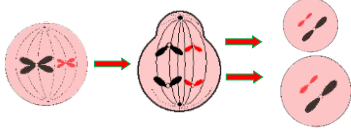


- ◆ 抑制第一极体排出,即阻止了同源染色体的分离。



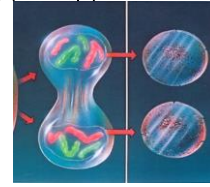
## 2) 抑制第二极体释放

鱼类产出的成熟卵子一般处于第二次减数分裂的中期，第一极体在卵子产出前已排出。



◆ 抑制第二极体排出，即阻止了姐妹染色单体的分离。

## 3) 抑制第一次卵裂



一般来讲，雌核发育二倍体的纯合度以第一卵裂抑制型为最高，其次为第二极体抑制型，第一极体抑制型最低。

## 雌核发育的分类

- ◆ **减数雌核发育 (Meiotic gynogenesis)**：抑制激活卵第二次成熟分裂后期第二极体的形成和排出产生的二倍体雌核发育称为减数雌核发育，为**杂合的**。
- ◆ **卵裂雌核发育 (Mitotic gynogenesis)**：抑制激活卵第一次卵裂产生二倍体称为卵裂雌核发育，为**纯合的**

## 2. 卵子二倍体化的诱导方法

在细胞分裂周期中施加物理、化学等影响、干预细胞的正常分裂，以达到染色体加倍、细胞不分裂的目的。

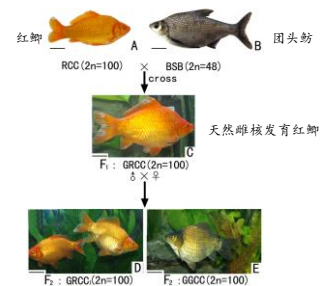
- ◆ **物理方法** 温度休克和静水压法
- ◆ **化学方法** CB和秋水仙素
- ◆ **生物方法** 远源杂交

## 远源杂交诱导雌核发育

- ◆ 远源杂交往往会抑制第二极体释放



## 远源杂交诱导雌核发育



天然雌核发育后代中同时存在**雌性**和**雄性**后代



### 远源杂交诱导雌核发育的优势

- 1) 远源精子不需要紫外线灭活，保证了精子的活力，提高了受精率和雌核发育成功率；
- 2) 简化了实验步骤，省去了摸索精子处理条件的繁琐步骤；
- 3) 雌核发育后代容易鉴别
  - ✓ 形态学上的差异
  - ✓ 染色体数目的差异
  - ✓ 性腺分化的差异

不足之处：只在少数特殊鱼类中存在，大部分可控性差，成功率低。

### 3. 人工诱导雌核发育的形成机制

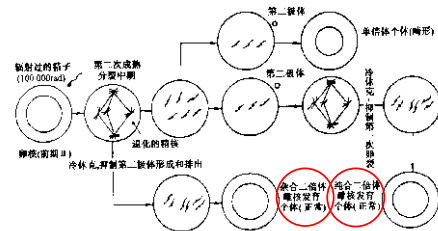


图 6-6 雌核发育二倍体形成的机制  
(Furdon, 1983; 略作修改)

过程可控，易于实现标准化操作，可稳定获得一定数量的雌核发育后代

### 三、雌核发育鱼的鉴定

#### 1. 天然雌核发育鱼类的鉴别（以方正银鲫为例）

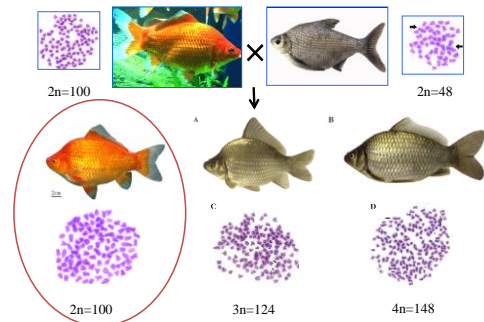
- ① 人工繁殖，仔鱼没有父本特征
- ② 灭活精子人工受精，仔鱼不出现“单倍体综合症”
- ③ 受精卵的细胞学观察，精核不解凝
- ④ 视泡期胚胎脑部形态观察，单倍体脑部呈S型畸形



正常和“S”型畸形的脑部形态

- ⑤ 红细胞大小，天然雌核发育鱼类多为三倍体
- ⑥ 肝脏及肝细胞大小，天然雌核发育鱼肝脏、肝细胞大
- ⑦ 体细胞染色体计数，天然雌核发育鱼类染色体多为150 ±
- ⑧ 侧线鳞的数目，雌核发育银鲫侧线鳞30.4-31.11，普通鲫鱼为28.65-29.22

### 红鲫和团头鲂远缘杂交





## 异育银鲫

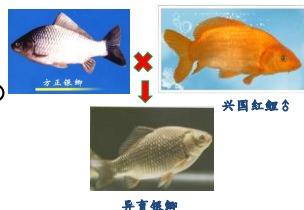
### 1. 育种原理

兴国红鲤的精子只起诱导作用，其精核不与方正银鲫的卵核相融合，其子代性状不分离。但有可能交换极为有限的DNA片段，产生“异精效应”。

### 2. 亲本

母本：方正银鲫（三倍体）

父本：兴国红鲤



## 雌核发育二倍体鲫鲤克隆体系建立



## 改良四倍体鱼比普通四倍体鱼更具优势

内容	普通四倍体鲫鲤	改良四倍体鲫鲤
精液量	1-3毫升/尾	3-5毫升/尾
产卵率	40%	70%
繁殖期	3月-5月	3月-7月
生长速度	100-150克	120-200克(提高13%)
体型	0.3(体高/体长)	0.4(体高/体长)
抗逆性	一般	提高10-15%
四倍体鱼产量	2万尾/年	10万尾/年



改良四倍体鲫鲤

## 七、鱼类的雄核发育

### 1. 人工雄核发育的诱导

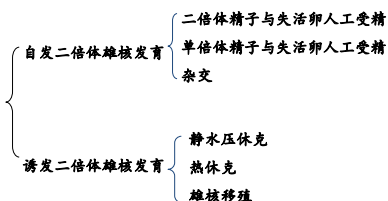
如果要获得人工雄核发育的鱼类，通常是用放射线破坏卵子DNA的遗传活性，然后用正常单倍体精子与这种遗传失活的卵子进行人工授精后，再用人工方法处理使卵子内精核的单倍染色体二倍体化。

- ◆ 卵子染色体的遗传失活
- ◆ 精子遗传物质的二倍体化

### ◆ 卵子染色体的遗传失活

- 放射线处理 UV射线，γ射线和X射线；
- 卵子的过熟和老化（虹鳟）

### ◆ 精子遗传物质的二倍体化



## 2. 雄核发育在水产养殖业中的应用

- ◆ 单性鱼的养殖 (XX-XY)
- ◆ 建立纯系
- ◆ 保种、选种和育种
- ◆ 提供水产养殖的优良品种

