

兴国红鲤同草鱼杂交的受精细胞学研究

刘国安 吴维新 林临安 徐大义 郑远刚

(湖南省水产科学研究所)

提要 兴国红鲤与草鱼杂交虽属亚科间的远缘杂交,却符合鲤科鱼类一般的受精规律,精子由唯一的受精孔道进入卵内,单精入卵。受精的适当时间是在卵细胞第二次成熟分裂的中期。受精后7分钟形成精子星光。接着雄性原核、雌性原核先后形成,并逐渐靠拢;受精后40分钟两性原核结合(水温21°C);受精后45—50分钟出现新个体的第一次卵裂。说明草鱼精子对兴国红鲤成熟卵细胞不仅起激动作用,而且参与了遗传物质的组成。此系亚科间远缘杂交具有生活力的生物学基础。实验发现:在特定的条件下,同一批受精卵中,多倍体,单倍体,雌发育可能同时存在。本文还比较分析了常见的几种鲤科鱼类及其杂种受精的过程。

主题词 兴国红鲤、草鱼、杂交、受精细胞学、单倍体、多倍体。

前 言

野鲤与草鱼的杂种, Васильев 等报导是三倍体,三倍体是不育的^[1]。本所1978—1982年进行的兴国红鲤同草鱼的杂交试验表明,其杂种染色体为异源四倍体。为了进一步了解杂种能育的生物学基础,于1981年—1982年进行了鲤草杂交受精细胞学的研究。本文报导鲤草杂交受精细胞学的研究结果。

材 料 与 方 法

1981年4月27日,晚上23:45—12:00,对一尾体重15kg雄草鱼,用脑垂体催情。剂量为1.5个垂体/kg。同时对6尾雌性兴国红鲤催产。兴国红鲤的平均体重为0.7kg/尾,所用剂量为3个垂体/尾。试验时的水温为19—21°C。次日11:30—15:40,分3次用人工干导法授精。草鱼精液充沛,乳白色,兴国红鲤产卵正常,共获受精卵50万粒(1尾流产不计在内)。平均受精率为88.1%。每次人工授精前选取V时相卵固定,部分受精卵用清水脱粘。每隔1分钟或5分钟取卵固定,直到第一次细胞分裂为止。Smith或Bouin液固定,石蜡切片厚度为8微米,H. E.染色,显微观察和描写,部分显微摄影。

实 验 结 果

1. 异种精子入卵前后卵细胞的形态变化

受精前的卵 刚产下来的卵,一般直径为1,100微米,晶莹发亮,有一定粘滞性,但不透明,符合适当成熟的一般生理指标,即(1)原生质向动物极集中;(2)卵子处于第二次成

熟分裂的中期:(3)在受精孔的下方形成便于精子入卵的“新月池”;(4)卵子最外的两层滤胞已经脱掉;(5)受精孔成为精子入卵的唯一通道。在受精前卵的切片上未见到第一极体,可能是因为切片等操作过程中失掉落的缘故。卵膜与卵体紧密相贴(附图1,2),一旦与水接触,卵表即刻产生胶粘性。

受精膜形成 受精后3分钟,受精膜开始举起。在卵黄膜(即放射膜)与原生质膜之间(即围卵腔)出现许多大小不等的空泡(称为皮质颗粒)。随着时间的推移,空泡的层数越来越多,围卵腔的空间也越来越大(附图3),但鲤草杂交受精卵的围卵腔比家鱼卵的小得多。从原生质膜到卵黄及其夹在中间的皮质液泡统称为受精膜。受精后25—30分钟,受精膜达到最终大小,厚度一般为260微米左右。鲤鱼和草鱼杂交受精卵和家鱼受精卵一样,受精膜膨胀迅速,并达到一定的厚度的,则卵子受精良好,发育正常。不然多在原肠期以前夭亡。

胚基形成 V时相的卵,在切面上已能看到分散在卵黄颗粒之间的细胞质在向动物极集中,使动物极的顶端成为一个比较明亮,无卵黄分布的帽状区域,此即胚盘。受精后40分钟,胚盘明显的向上突起,受精后45—50分钟,胚盘分成2等份,细胞分裂开始。

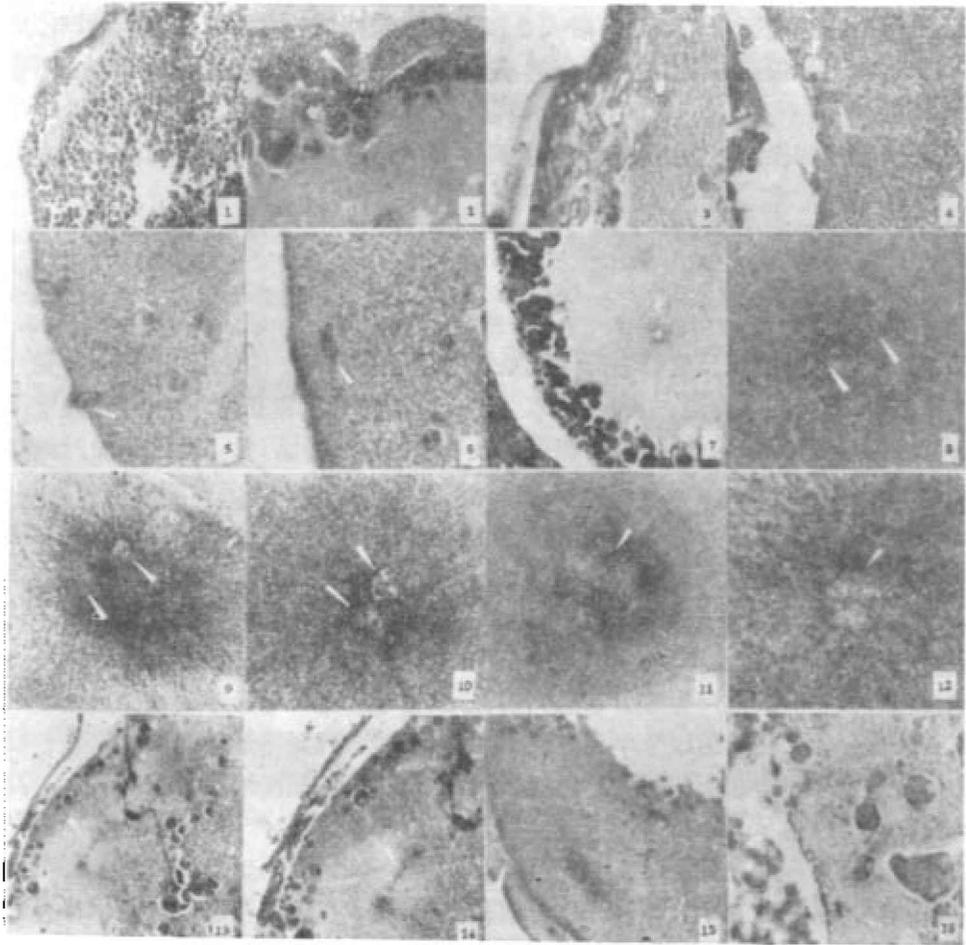
2. 异种精子进入卵内

受精后4分钟,在受精孔附近,即第二次成熟分裂处的侧旁(附图4),可见到精子已经进入胚盘,受精处收缩成团块状,并在它的外周形成一个小囊。观察到的都是一个精子进入胚盘中,未见异常现象。

受精后7分钟,精子周围出现星光,光芒呈辐射状射向胚盘的四周。星光的中心距离纺锤体的赤道中点10.2微米(附图6)。星光不断扩大范围并逐步移向胚盘的中央和深处,精子头部逐渐膨大,居于星光的中心,此即雄性原核形成。这时的卵子完成第二次成熟分裂后,排在赤道上的染色体向两极分成两队,一份向胚盘外排出第二极细胞,渐自消亡,留在胚盘内的那一份染色体形成雌性原核(附图5)。

由于胚盘中液体的近心运动^[1],或者是星光的推进和吸引^[6],使雌雄两性原核向胚盘的中轴靠近(附图7)最初两性原核距离约为33微米。受精后20分钟,星光减少,两性原核进一步靠近,并形成新生的子星光,两性原核距离为25微米,受精后25分钟两性原核更加靠近,相距10—15微米(附图8—10)。这时卵子的皮质液泡已经接近排完,皮质层的最大厚度约266微米。受精后30分钟,两性原核互相接触(附图11),再向前发育5—10分钟,两性原核已经结合,两核结合位置正在胚盘中央,两核结合线与卵的中轴并未重合,而是构成一定的夹角。受精后40分钟两核结合得更加紧密,彼此的界限已分辨不清了(图版12)这时母本兴国红鲤的单倍染色体与父本草鱼的单倍染色体,是先经过自动加倍,然后结合为新个体的合子核,还是先结合后再自动加倍,尚不清楚,但鲤草杂交子一代是四倍体这是证明了的。

受精后40—45分钟,合子核的核膜消失。两旁出现新的星光,染色体排在卵的中轴线上,两旁星光的长轴恰与卵的中轴垂直(附图13—14)在同一个切面上可以清楚地看到新个体第一次细胞分裂的开始,两细胞的分裂沟和细胞核均可见(附图15)。受精后45—50分钟,胚胎发育开始,受精卵进入2细胞期。受精后65分钟,受精卵又开始了第二



附图 鲤鱼♀×草鱼♂的受精过程和受精卵发育

1. V 时相卵母细胞, 箭头示受精孔; 2. 受精孔放大; 3. 受精后 4 分钟的卵子, 箭头示皮质层; 4. 同 3 下, 箭头示第二次成熟分裂期的纺锤体, 上箭头示精子; 5. 受精后 7 分钟的卵子, 箭头示第二次成熟分裂末期状况; 6. 受精后 7 分钟卵子, 箭头示精子星光和雄原核; 7. 受精后 10 分钟卵子, 雄原核深入卵质, 箭头示雄原核; 8. 受精后 20 分钟卵子, 雌雄原核靠拢; 9. 受精后 30 分钟卵子, 两原核更接近; 10. 受精后 35 分钟卵子, 雌雄核接触; 11. 雌雄核靠紧; 12. 受精后 40 分钟, 雌雄原核结合, 箭头示合子核; 13. 同上, 箭头示第一次细胞分裂中期相; 14. 13 的放大; 15. 受精后 45 分钟的卵子, 2 细胞雏形, 箭头示 2 细胞分裂沟; 16. 同 4, 箭头示第二次成熟分裂的纺锤体和精子。

Attached Fig. Fertilization and egg developing of Common carp ♀ × Grass carp ♂

1. Oocyte in phase V, white arrow shows microphyle ($\times 125$); 2. Magnified microphyle ($\times 1200$), white arrow shows microphyle; 3. Ovum following fertilized for 4 minutes, white arrow shows cortical layer ($\times 1000$); 4. Ovum following fertilized for 4 minutes, the lower arrow shows spindle in middle of second mature division; the upper arrow shows spermatozoon ($\times 1000$); 5. Ovum following fertilized for 7 minutes, white arrow shows last phase in second mature division ($\times 1000$); 6. Same as 5, white arrow shows spermatozoon ray and male pronucleus ($\times 1000$); 7. Ovum following fertilized for 10 minutes, white arrow shows male pronucleus that goes deeper into the ovum, white arrow shows male pronucleus ($\times 800$); 8. Ovum following fertilized for 20 minutes, the male and female pronuclei were neared mutually ($\times 1000$); 9. Ovum following fertilized 30 minutes, male and female pronuclei were more neared, two white arrow showing male and female pronuclei separately ($\times 900$); 10. Ovum following fertilized for 35 minutes, two pronuclei that showed by white arrow to come into contact ($\times 1000$); 11. Same as 10, male and female pronuclei were more close contacted ($\times 1000$); 12. Ovum following fertilized for 40 minutes, two pronuclei fully merged, white arrow shows merged nucleus ($\times 1200$); 13. Same as 12, white arrow showing metaphase in first cell division ($\times 200$); 14. Magnified picture of 13 ($\times 500$); 15. Ovum following fertilized for 45 minutes, the embryonic form of 2 cells, white arrow showing division canal between two cells; 16. Same as 4, the upper arrow showing spermatozoon, lower arrow showing spindle in middle of second mature division ($\times 800$).

次细胞分裂。在连续两个切面上可看到2细胞的细胞核都处在有丝分裂的中期,染色体都排在赤道线上。以后每隔15—20分钟,细胞进行一次分裂,这便是鲤草杂交四倍体子一代发育时开始。

上述受精的程序与一些主要鲤科鱼类基本相同。这是它成为一个两性结合体的基础。

讨 论

1. 几种鲤科鱼类以及它们之间杂交受精的过程是一致的。金鱼^[1]、鳊鱼^[5]、白鲢^[1]、花鲢^[4]、三角鲂×青鱼^[6],鲤鱼×草鱼杂交的受精过程和受精卵发育,包括精子星光形成、两性原形成、原核结合、第一次卵裂以及以后的每次分裂,它们所经历的时间都极相近。但是水温不同,受精过程和受精卵的发育速度不同。但并不显示相关的关系。由此可见,鲤草杂交虽属亚科之间的远缘杂交,但受精的程序都基本符合一般鲤科鱼类受精的规律,获得青鱼×三角鲂杂交受精的相同结果^[5]。

2. 实验看到草鱼精子经卵子唯一受精孔道。经游渡星月池,达受精孔附近、胚盘的近沿。最初收缩成团块状,它的周围形成一个囊状的小腔,逐渐向胚盘的深处前进,接着团块渐自胀大,它的周围产生放射状的光芒,形成精子星光,继而形成雄性原核和雌性原核,两核结合。此为受精的细胞学证据。如果是雌核发育,则精子不能形成星光和雄性原核,即使精子进入卵中激动卵的发育,而精子自己始终只能呈凝缩状态^[8]。因此,我们的试验证明,兴国红鲤♀×草鱼♂是两性结合,而不是雌核发育。

3. 实验看到一些例外的情况,如受精后10分钟的卵,它的染色体一直停留在第二次成熟分裂的中期,不见精子星光和雄性原核的形成,精子呈凝缩状态。但卵体却有正常的激动(如形成受精膜、围卵腔、胚盘等)。此种卵的前途有可能是雌核发育。这样就为我们在子一代的选种上提出了一个问题,即那些纯母性状的个体(存活鱼中确实存在,体色是红的)应予以淘汰,保存那些具有双亲特性的个体。实验还看到受精后10分钟的卵,染色体因为精子的激活,已经完成了第二次分裂,染色体已经向两极分成两队,但精子一直呈凝缩状态,不见星光和雄性原核的形成。对此我们推断,此种卵的前途可能成为单倍体。单倍体是不能存活的,此与本所近5年在鲤草杂交中出现的受精率高,孵化率低,出苗率低,仔鱼存活率低的原因。此外,停留在中期板的染色体(有丝分裂)的数量上,也出现两种情况,一种数目显著地大,一种数目显著很少。但具体数目不清,所以进一步研究鲤草杂交胚胎和仔一代鱼的染色体是一个饶有兴趣的问题。根据上述事实,我们认为:鱼类亚科间的边缘杂交,在一些特定的条件下,在同一批受精卵中,多倍体、单倍体、雌核发育可能同时存在。这个问题有待继续研究。

4. 选育草鱼抗病品种的可能性。本所进行的鲤(♀)×草(♂)杂交,旨在采用远缘杂交、回交,人工选择等手段,选出一个具有草鱼优良性状而又有抗病力的新品种来,我们知道,未受精的成熟卵与水接触后便会发生激动的作用,而且也有细胞分裂,但是单纯受激动的卵,只能发动单星光的分裂,卵核和卵都不能正常分裂,我们在实验中看到,鲤鱼和草鱼杂交的受精卵的分裂是具有双星光和纺锤体等细胞学结构的。是正常的细胞分裂——

有丝分裂。于是证实,草鱼精子对兴国红鲤卵子不但起了激动作用,而且真实时参与了遗传物质的组成,使草鱼的性状得以在杂种中保存下来,这是子代具有父本和母本特性的生物学基础。它为我们展示了选育草鱼抗病品种的可能性。

参 考 文 献

- [1] 朱洗、王幽兰等,1959。金鱼和鳊鱼卵球受精的细胞学研究。家鱼人工生殖的研究,253—267,科学出版社。
- [2] 刘筠等,1968。草鱼卵子受精的细胞学研究。实验动物学会论文汇编,55—56。
- [3] 俞豪祥,1979。银鲫雌核发育的细胞学观察。水生生物集刊,7(4):481—482。
- [4] 王幽兰,1980。花鲢卵球受精的细胞学研究。水生生物集刊,7(2):189—196。
- [5] 刘筠等,1981。三角鲂与青鱼卵子的受精细胞学研究。水生生物集刊,7(3):329—335。
- [6] 吴维新等,1981。一个四倍体杂种——兴国红鲤×草鱼。水生生物集刊,7(3):433—436。

A CYTOLOGICAL STUDY ON THE CROSS FERTILIZATION OF RED COMMON CARP WITH GRASS CARP

Liu Guoan, Wu Weixin, Lin Linan, Xu Dayi and Zheng Yuangang

(Hunan Fisheries Research Institute)

ABSTRACT This paper deals with the cross fertilization between the female red carp (*Cyprinus carpio* L.) and the male grass carp (*Otenapharyngoden idellus* Cuv et Val). Even though the red carp and grass carp belong to different subfamilies, the fertilization agrees with the general law of cyprinidae fish. A single sperm enters the egg through the micropyle. The appropriate time of fertilization is at the metaphase of the second meiosis. Seven minutes after fertilization, the sperm-aster appears, then the male and female pronuclei form respectively and draw close gradually. Forty minutes after fertilization, the male and female pronuclei fuse to form the nuclear zygote (at the water temperature of 21°C). By the 45—50 minutes, the first cleavage occurs. This indicates that the sperm of grass carp can not only activate the matured egg of the red carp but also attends the composition of hereditary matter, which is biological basis for the vitality of the hybrid. In the experiment, it is found that polyploid, monoploid and gynogenesis may occur at the same time among the same group of the fertilized eggs under some specific conditions. Finally, a comparative study on the fertilizing process of some common carps as well as their hybridization is also made.

KEY WORDS Red carp (*Cyprinus Carpio* L.), Grass carp (*Otenapharyngoden idellus* Cur et al.), Hybridization, Fertilization cytology, Monoploid, Polyploid