

草鱼卵子和三角鲂精子杂交的 受精细胞学研究*

刘 思 阳

(武汉大学生物系)

提要 本实验观察了两种不同亚科鱼——草鱼(♀)和三角鲂(♂)杂交的受精细胞学过程,证实异源的三角鲂精子能够进入到草鱼卵子中,诱导星光并形成雄性原核。卵子在精子的作用下,继续完成了第二次减数分裂、排出第二极体,最后雌雄原核相互接触而融合。全部过程有正常的受精细胞学程序和卵裂方式,由此产生的后代兼具父、母本双方的遗传性状。

主题词 草鱼,三角鲂,鱼类杂交,受精细胞学

本文对远缘鱼类杂交受精过程和杂交种的生活能力等问题进行了探讨。作者曾对草鱼、三角鲂及其杂交子一代(简称草鲂杂种)的染色体进行了研究,发现草鲂杂种是三倍体,染色体数目为 72 条,而双亲均是二倍体,数目为 48 条。近几年来,人们应用人工授精技术进行鱼类之间的杂交,获得了不少多倍体后代^[15,19,20]。探讨鱼类杂交染色体加倍的原因和机理,对于研究鱼类雌核发育和多倍体育种的理论和实践均有很重要的意义,目前已经引起越来越多的学者们的注意。

材 料 和 方 法

材料是于 1984 年 5 月 12—13 日在湖南湘阴县鱼类良种繁育场经人工授精取得。

选择性腺发育良好的雌性草鱼两尾,雄性一尾,另选择两尾雄性三角鲂。采用一次注射催产,催产药物为 LRH-A。雌性草鱼注射剂量为 25 微克/公斤,雄性草鱼和三角鲂剂量减半。在两尾雌性草鱼的背鳍条上做上不同的标记,然后同其它鱼一起放到水质清澈的产卵池中,这样可以清楚地看到被标记鱼的活动。

在 20~22°C 水温下,经过约 18 小时效应时间,发现一尾被标记的雌性草鱼在雄性草鱼的追逐下开始发情,很快便交配受精。不久,再次追逐,准备第二次产卵,随即捕起发情的草鱼和三角鲂,先进行草鱼卵子和三角鲂精子的人工授精,剩余的草鱼卵子进行本交以作对照,将受精卵分别放到两个环道中孵化。

采用 Bouin 氏液固定,从刚挤出的卵子开始,在前面 5 分钟内每隔 1 分钟固定一批,以后每隔 5 分钟固定一批,直到第一次卵裂沟出现为止(以受精开始大约经过 45—50 分钟)。受精卵固定 20 个小时后脱水,用石蜡包埋,连续切片厚度为 6—8 微米,苏木精——

* 本实验经刘筠教授、陈淑群副教授指导完成,周工建老师协助进行人工授精工作。在此谨表谢意。

伊红染色,并进行显微摄影。

实 验 结 果

草鱼和三角鲂的受精细胞学过程根据受精卵发育的时间和状态,可分为七个阶段。

1. 受精之前 草鱼未受精的成熟卵子直径约 8.2—10.7 毫米。这时的卵子极性已经明朗,植物极多为染成紫红色的卵黄颗粒填充。动物极主要集中了染成蓝紫色的细胞质。胚盘已经隆起,在胚盘中央可看到卵膜上有一明显的凹陷,凹陷中央有一个圆孔,这就是硬骨鱼类精子入卵的唯一通道——受精孔,周围没有精孔细胞存在(图 1)。卵子内表面分布着 2—3 排白色的颗粒,一般认为它们的成分是粘多糖。

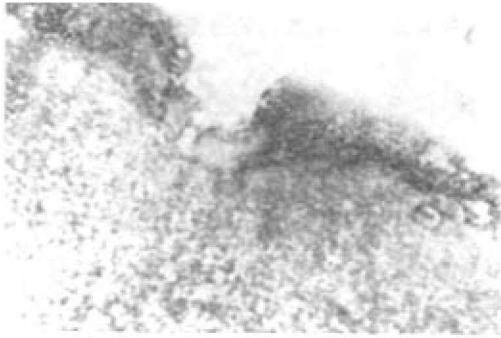


图 1 未受精的成熟卵,在卵膜凹陷处有一漏斗状的受精孔 ×1,000

Fig. 1 A mature egg with a fertilization pore in its egg envelope. ×1,000

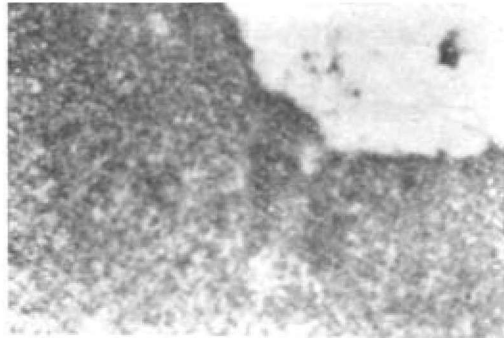


图 2 受精后 3 分钟,卵核仍处于第二次减数分裂中期。×1,000

Fig. 2 Three minutes after fertilization, egg nucleus remains at the metaphase II. ×1,000

2. 精子入卵,卵子被激动(受精至受精后 5 分钟) 受精后 3 分钟的卵子,在受精孔附近可见到仍呈第二次减数分裂中期状态的卵核,染色体着色很深,排列在赤道板中央,纺锤体的长轴与卵表面垂直(图 2)。卵黄膜从卵表升起成为受精膜,围卵腔也由此而产生。受精后 5 分钟,从受精孔进入的精子尚未膨胀,但已产生较小的星光体。此处的卵膜向外突出构成受精锥,旁边可见到刚被排出的第一极体(图 3)。同时,在卵子的内表面有许多颗粒和空泡与卵膜融合,正在排出。卵核进入到第二次减数分裂的后期时,染色体被纺锤丝牵引到两端(图 4)。在所有的组织切片中都只看到一个精子入卵,所以草、鲂杂交也遵循单精受精的规律。

3. 雄性原核形成(受精后 5—10 分钟) 这时胚盘较以前更加扩大,精子和星光体离开卵表面,并渐自膨胀核化(图 5)。图 6、7 表明卵核已进入第二次减数分裂末期,一部分(半数)染色体已排出到卵的外表面,但仍由纺锤丝与卵内的半数染色体相连。这时卵子内表面的颗粒和空泡已经减少。

4. 第二极体的排出和雌性原核的形成(受精后 10—16 分钟) 在卵内,雄性原核已经形成,并为星光射线所簇拥。雌核在完成了第二次减数分裂以后开始核化并向卵子内

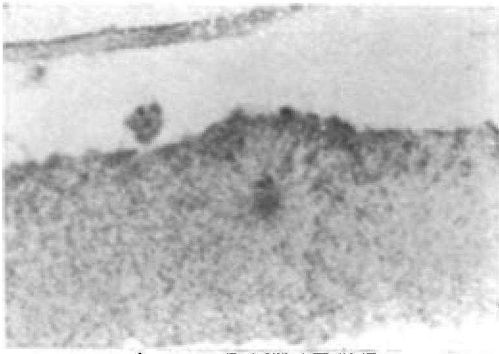


图3 受精后5分钟,精子离开卵子内膜并产生星光体,左上方为第一极体。 ×1,000

Fig.3 Five minutes after fertilization, the sperm leaves the egg envelope and produces aster, the first polar body is shown on the left above hand corner. ×1,000

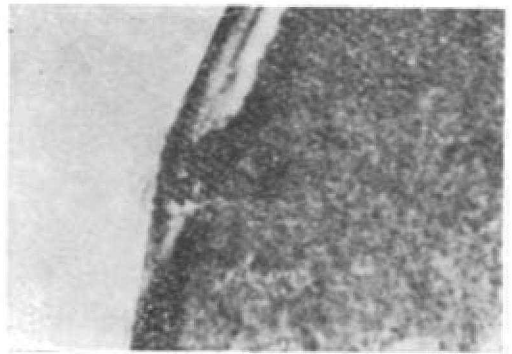


图4 受精后5分钟,卵核进入第二次减数分裂后期。 ×1,000

Fig.4 Five minutes after fertilization, the egg nucleus enters anaphase II. ×1,000

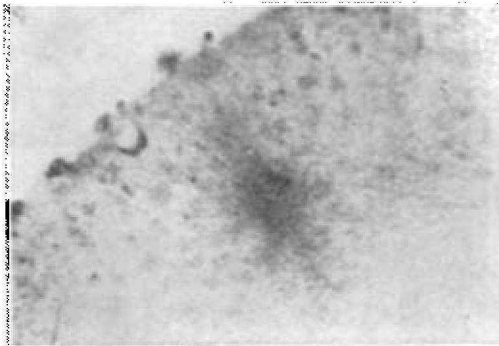


图5 受精后8分钟,雄性原核开始形成。 ×1,000

Fig.5 Eight minutes after fertilization, male pronucleus comes into being. ×1,000

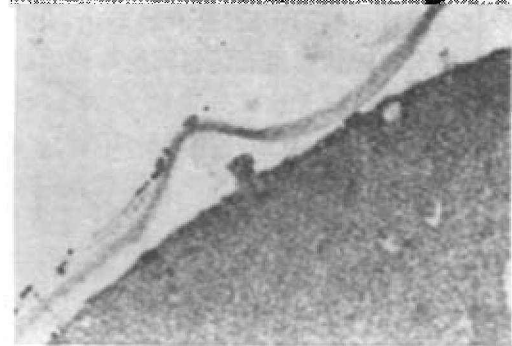


图6 受精后10分钟,卵核进入第二次减数分裂末期。 ×500

Fig.6 Ten minutes after fertilization, the egg nucleus enters telophase II. ×500

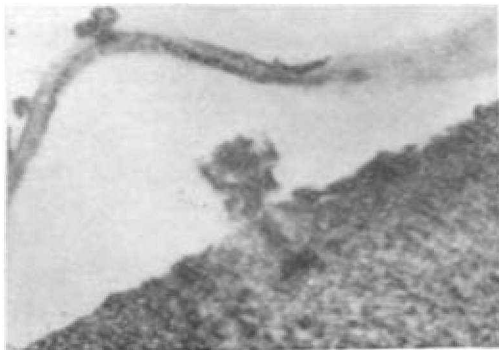


图7 图6的放大 ×1,500
Fig.7 Magnification of Fig 6. ×1,500

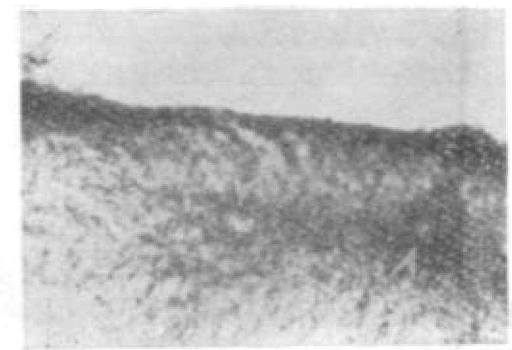


图8 受精后13分钟,雌性原核形成 ×700
Fig.8 Thirteen minutes after fertilization, female pronucleus appears. ×700



图9 受精后16分钟,第二极体已排出。 $\times 600$

Fig. 9 Sixteen minutes after fertilization, the second polar body has been. $\times 600$

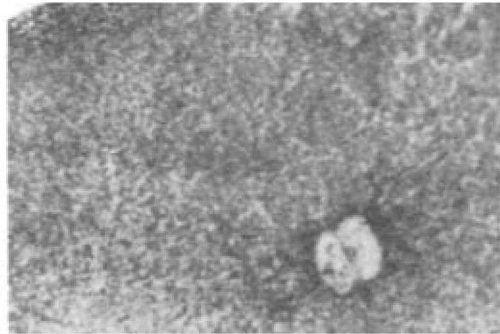


图10 与图9同一时间,雌雄原核相互靠近。 $\times 700$

Fig. 10 At the same time with Fig. 9, female and male pronucleus approach with each other. $\times 700$

部移动,逐渐靠近雄性原核(图8),被排出的第二极体呈椭圆形,核位于中央(图9)。

5. 雌雄原核的接触(受精后16—24分钟) 雌雄性原核在星光射线的牵引下相向运动,此时尚可辨认受星光体包围的雄性原核,它位于雌性原核的内面(图10)。不久,雌雄原核更加靠近,已无法区分二者(图11)。最后它们彼此紧密接触,仅为一条称为接合线的狭缝相隔(图12)。从照片中可看出两核都呈扁平囊状,似乎有一股压迫的力量使二者结合,处于分裂状态的星光体很难看到。

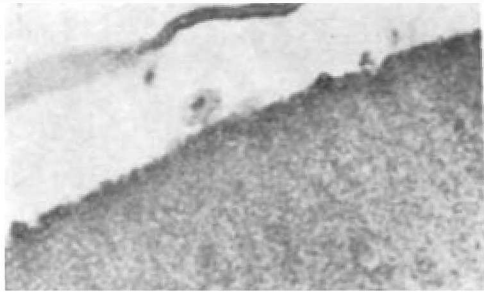


图11 受精后20分钟,雌雄原核彼此接触。 $\times 600$

Fig. 11 Twenty minutes after fertilization, male and female pronucleus get in touch with each other. $\times 600$

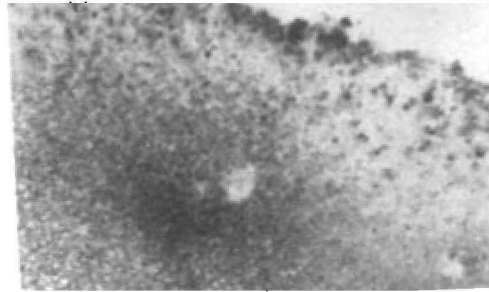


图12 受精后24分钟,雌雄原核紧密结合。 $\times 700$

Fig. 12 Twenty-four minutes after fertilization, male and female pronucleus get closely combined only except a narrow gap. $\times 700$

6. 雌雄原核的融合(受精后24—32分钟) 雌雄原核在胚盘中央融合成一个合子核。中心粒、星光体已一分为二,呈短棒状位于合子核的两侧,其连线与卵表面平行(图13),星光体的空间位置决定了第一次卵裂只能是纵裂。

7. 第一次卵裂(受精后32—45分钟) 雌雄原核融合不久便开始进行第一次卵裂。首先是核分裂,染色体受纺锤丝的牵引排列到赤道板上,合子核处于第一次有丝分裂中期

(图 14、15)。随之,染色体离赤道板而去,向两极移动,星光射线散布更为开阔(图 16)。最后染色体被拉到两极,形成两子核,两核之间的细胞质似乎也受到纺锤丝的影响而开始分离,形成一条白色的空隙(图 17),然后在卵表面发生细胞质溢缩,形成肉眼可见的卵

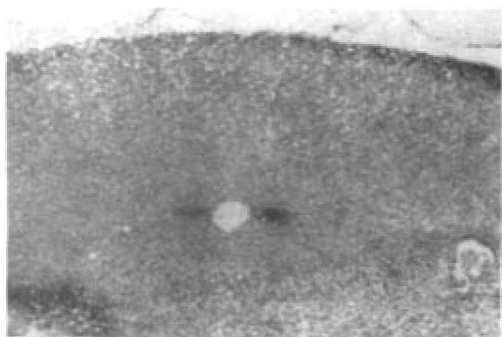


图 13 受精后 32 分钟,雌雄原核融合成合子核。× 300

Fig. 13 Thirty-two minutes after fertilization, male and female pronucleus get fused into zygotic nucleus. × 300

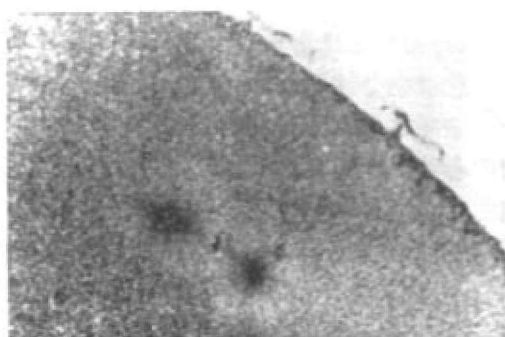


图 14 受精后 36 分钟,卵子开始第一次有丝分裂。× 300

Fig. 14 Thirty-six minutes after fertilization, the egg begins the first mitotic division. × 300

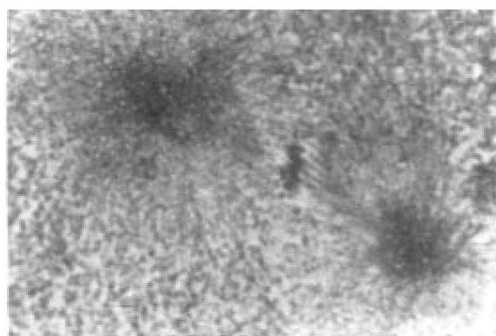


图 15 图 14 的放大, × 1,000

Fig. 15 Magnification of Fig 14. × 1,000

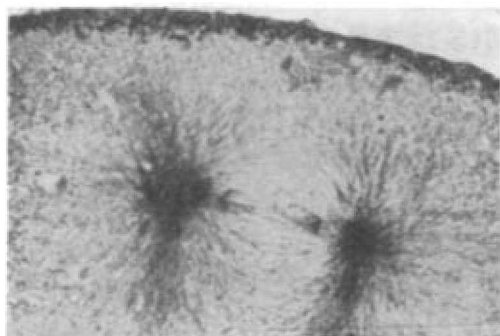


图 16 受精后 40 分钟,第一次卵裂进入后期。× 500

Fig. 16 Forty minutes after fertilization, the first egg division enters into anaphase. × 500

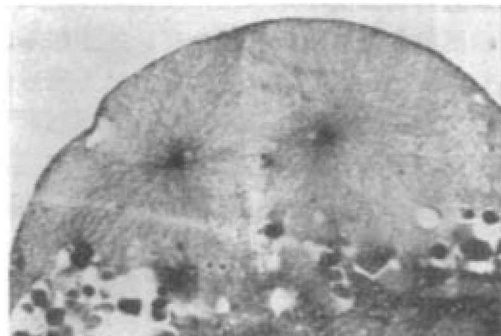


图 17 受精后 45 分钟,第一次卵裂结束。× 100

Fig. 17 Forty-five minutes after fertilization, the first egg division ends. × 100

裂沟。

讨 论

1. 关于远缘鱼类杂交受精的异质性和杂种的生活能力 高等动物以及无尾两栖类进行远缘杂交试验获得成功的机率很小,一般认为异种动物杂交后的受精卵每向前发育一步无疑都是对精子或卵子的一个考验。有时精子能够入卵,但不能形成星光,因为异种的中心粒难以诱发细胞质形成微丝、微管。或者即使产生了星光,但精子头部在异质的环境中难于实现水合作用,或不能摄入蛋白质而膨胀核化,这样仅由卵核发育而导致单性生殖。某些动物的杂交受精中,雌雄原核都能形成并相互融合,但由于二者细胞分裂周期的差异性、染色体分裂节奏的快慢不同,造成着丝点和纺锤丝之间的配合失调,最终导致畸形胚胎^[4]。在鱼类杂交研究中,有些学者认为杂种鱼正常者仅仅是由于异种精子的激动,由卵子单性生殖的结果,因此杂交受精过程中并无精、卵核的结合,亦即没有真正的受精作用^{[1],[18]}。作者认为,这一理论有一定局限性,许多作者都曾报道了亲缘关系较远的鱼类,甚至不同科间杂交存在正常雌雄原核结合的事实^{[5],[12],[14]}。对青鱼(♀)×三角鲂(♂)以及本实验得到的杂种进行细胞遗传学研究的结果表明,杂种细胞同时保留了父、母本的染色体^[7]。鱼类远缘杂交受精过程易于完成的原因可能与卵子具有特殊的受精孔结构使异种精子容易入卵有关;并且,作为较低等的脊椎动物,不同鱼类的生殖隔离或遗传隔离有较大的可塑性。鱼类的受精作为一个发生生理学的过程至多是一个细胞水平的行为,这一行为以及早期的胚胎发生主要受卵子中业已存在的细胞质基因(mRNA)调控,而雌雄配子的细胞核基因处于“关闭”状态,因而不能对这阶段的发育施加影响,而且父母双方遗传物质的矛盾也未显示出来。由此表明,父母本亲缘关系的远近一般与受精过程无直接联系。但是,受精卵后期的发育,即杂种的生活能力却与之密切相关。亲缘关系愈近,杂种的生活能力愈强,反之就愈弱。发育生物学理论认为,胚胎细胞开始分化,器官原基开始建立,是由于各自被决定的细胞核基因有选择地开启并指导合成特异蛋白质的结果。这时双亲染色体(基因)相互协调、共同控制着胚胎向预定方向发育^[8]。对于杂种胚胎,由于双亲遗传物质的不亲和性,使控制作用失去调节。乳酸脱氢酶同工酶的电泳分析表明,将酶谱图象相近的鱼类进行杂交,如细鳞斜颌鲷(♀)×黄尾密鲷(♂)、鳊鱼(♀)×白鲢(♂),不仅杂种的成活率高,而且能繁殖后代;当酶谱图象相差甚远的鱼类杂交,如草鱼(♀)×团头鲂(♂)等,杂种成活率就很低^{[9],[6]}。这是由于双亲酶谱图象的不同反映出亲本基因组的差异,不同基因组合在一起将导致遗传调节因素的干扰,最后致使杂种夭折。总之,这些杂交组合的结果表明了远缘鱼类杂交的障碍不在受精环节,而是在后期的胚胎发育过程。

2. 关于草鲂杂种三倍体形成机理的探讨 作者曾对草鲂杂种及其双亲的染色体组型进行了分析,发现草鲂杂种为三倍体,其中草鱼提供了双份染色体(48条)。三角鲂提供了单份染色体(24条)。对三种鱼红细胞(核)大小和DNA含量测定的结果也间接地证实

(1) 武汉大学生物系动物教研室等,1974,草团杂交夏花成活率不高的原因初探。试验研究报告,1(1):1--18。

了这一事实^[1]。自然界的一些种和人工杂交的后代也有不少多倍体的例子,如银鲫^[11,12]、鲮科鱼类^[21]、草鱼(♀)×鳊鱼(♂)^[15,20]、兴国红鲤(♀)×草鱼(♂)等等^[8]。对于鱼类染色体加倍的原因,目前一个流行的论点认为卵子在成熟或受精过程中未能完成减数分裂,只排出了第一极体,因而使后代加倍。但是,对另一极体保留的机制说法不一。Beck(1980)在寻求草鳊杂种三倍染色体来源时,认为杂种承受了两份草鱼(母本)染色体和一份鳊鱼(父本)染色体,并推测加倍的机制是受精时保留了极体^[15]。受精时温度的变化产生的热休克或冷刺激及其卵子排出时的成熟状态都影响着极体的排出^[17]。有趣的是, Yamamoto 在哺乳动物的受精实验中,推迟给排出的成熟卵子受精,导致了形成三倍体比率的增加^[22]。作者对草鱼和三角鲂杂交的数百个受精卵连续切片的观察结果却说明,杂交受精过程与草鱼本交基本相同^[1],卵子在异源精子的激动下,继续完成了第二次减数分裂,第二极体确已排出(见前图 9),这似乎和杂种染色体的加倍相矛盾。推测有几种可能性,其一,如同草鱼(♀)×鳊鱼(♂)的杂交组合结果^[16],草鲂杂种中也可能同时存在二倍体和三倍体,但是由于存在某种未知因子,导致了二倍体在胚胎发育或鱼苗期间发生选择性死亡,因而在鱼种和成体时只剩下三倍体个体;其二,草鲂杂种三倍体的产生也可能是第二极体的保留,但是,在正常受精情况下,异源精子是如何刺激卵子未能完成第二次减数分裂或者收回了极体呢?目前尚无令人信服的解释;其三,动植物界中的一些细胞,如花药毡尾细胞等,还可以核内有丝分裂的方式使染色体加倍^[9]。在某些因子(低温、辐射或化学药物)的诱导下,细胞有丝分裂的前、中、后期都在核膜内进行,加倍的染色体就留在一个核内,核和细胞复制都省略了^[10]。草鲂杂种的三倍染色体来源也不能排除这种方式,在雌雄原核融合的前后,由于三角鲂精子的刺激或异种精卵细胞周期的不同步性,可能促使卵子的染色体重复,而没有伴随核的分裂。染色体分开后则成为二倍体,加倍的卵核与单倍的雄核结合便产生了三倍体。因为这一过程没有明显的细胞分裂行为,所以组织切片中不易看到。为了探索这些问题,除了应继续进行杂交受精细胞学的研究外,有必要用同位素示踪原子标记精子或卵子,或者在两性原核融合前后测定卵子的 DNA 含量变化以追踪加倍的线索。

参 考 文 献

- [1] 刘均等, 1964。草鱼卵子受精的细胞学研究。湖南师范学院学报(自然科学版), 4:1—12。
- [2] 童允桐, 1983。发育生物学,127—142。兰州大学出版社。
- [3] 米兰菲, 1982。几种鲤科鱼类及杂种的乳酸脱氢酶同工酶的比较。水生生物学集刊, 7(4): 539—545。
- [4] 朱洗, 1961。从受精过程讨论动物远缘杂交问题。科学通报, 7:1—7
- [5] 朱洗等, 1960。金鱼和鳊鱼卵球受精的细胞学研究。实验生物学报, 7(1—2):29—46。
- [6] 李万程, 1985。草鱼、三角鲂及其杂种一代乳酸脱氢酶同工酶电泳分析。湖南师范大学学报(自然科学版)。1:31—35。
- [7] 陈淑群, 1984。青鱼(♀)和三角鲂(♂)不同亚科之间的杂交研究(I)。湖南师范大学学报(自然科学版), 4:71—80。
- [8] 吴维新等, 1981。一个四倍体杂种——兴国红鲤×草鱼。水生生物学集刊, 7(3):433—436。
- [9] 郑国锷, 1980。细胞生物学, 281—323。人民教育出版社。

- [10] 郝水, 1982. 有丝分裂与减数分裂, 74—75. 高等教育出版社。
- [11] 俞豪祥, 1984. 银鲫雌核发育的细胞学观察. 水生生物学集刊, 7(4):481—488.
- [12] 湖南师范学院生物系鱼类研究小组, 1973. 鳊鱼(♀)×草鱼(♂)杂交试验的初步结果和受精细胞学的研究. 淡水渔业, 6:2—4.
- [13] 小林弘, 1971. 9倍体ギンブナの gynogenesis にかんする 细胞学的研究. 动物学杂志, 80:316—322.
- [14] 铃木亮, 1966. 育种学的にみた鱼类の交雑. 日本水产学会志, 32(8):677—688.
- [15] Beck, M. L.; J. C. Biggers., 1988. Karyological analysis of *Ctenopharyngodon idella*, *Aristichthys nobilis* and their F₁ hybrid. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 109: 433—438.
- [16] Beck, M. L.; J. C., 1983. Ploidy of hybrids between Grass carp and Bighead carp determined by morphological analysis. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 112: 808—811.
- [17] Cuce Uar, O.; T. Uyeno., 1972. Triploidy in rainbow trout. *Cytogenetics.*, 11: 508—515.
- [18] Loeb, J., 1912. Heredity in heterogamous hybrids. *J. Morph.*, 23: 1—6.
- [19] Marian, T.; Z. Krasznai., 1978. Karyological investigations on *Ctenopharyngodon idella* and *Hypophthalmichthys nobilis* and their Cross-Breeding. *Aquacultura Hungarica.*, 17(1): 44—50.
- [20] Marian, T.; Z. Krasznai., 1979. Comparative karyological studies on Chinese carp. *Aquacultura.*, 18(4): 325—336.
- [21] Thogaard, G. H., G. A. E. Gall., 1979. Adult triploids in a rainbow trout family. *Genetics.*, 93: 961—973.
- [22] Yamamoto, M.; T. H. Ingalls., 1972. Delayed fertilization and Chromosome anomalies in the hamster embryo. *Science.*, 176: 518—531.

STUDIES OF INSEMINATION CYTOLOGY IN HYBRIDIZATION BETWEEN GRASS CARP AND FRESHWATER BREAM

Liu Siyang

(Department of Biology, Wuhan University)

ABSTRACT This paper presents studies of insemination cytology on hybridization between grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and freshwater bream (*Megalobrama terminalis*). The experiment reveals that the spermatozoon of the bream can enter the egg cytoplasm of grass carp, then induces the emergence of the aster and finally forms the male pronucleus. At the same time, the activated egg begins to complete the second polar-body. After the male and female pronuclei come into being, they become contacted and fused.

The author has ever studied the chromosomes of grass carp, the freshwater bream and the F₁ hybrid. It has been found that the F₁ hybrid belongs to triploid although the parents are diploid. Hence it is guessed that the reason for producing triploid is to emerge mitosis at the time of fertilization or to reserve second polar-body.

KEY WORDS Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), Freshwater bream (*Megalobrama terminalis*), Fish hybridization, Fertilization cytology