

银鲫精子在两性融合生殖鱼类 卵质中的受精特征*

葛 伟 蒋 一 珪

(中国科学院水生生物研究所)

提 要

红鲤(♀)×银鲫(♂)的杂种胚胎均不能成活。受精细胞学研究结果表明,雌核发育银鲫的精核在两性融合生殖的鲤鱼卵质中能转化为雄性原核,并和雌性原核融合成合子核。但在卵裂开始后,可观察到某些异常现象,如染色体丢失,多极纺锤体形成,以及第二次卵裂时受精卵的两分裂球的非同步性分裂等。我们初步认为,雌核发育银鲫的染色体和两性融合生殖的鱼类染色体之间存在某种不相容性,表现为彼此间的互相排斥。出现这种现象可能和银鲫染色体组的雌核发育遗传背景有关。

黑龙江省方正县双凤水库的银鲫(*Carassius auratus gibelio*)种群(简称方正银鲫)已知为行雌核发育(gynogenesis)的三倍体两性群体^[4-7]。该群体中,雄鱼占10%。^[4] 雄性方正银鲫能产生有活力的精子,用它和雌性方正银鲫卵子受精,可得到雌核发育的银鲫后代。细胞研究表明,银鲫精核在银鲫卵质中保持致密状态,不转变为雄性原核,也不和雌性原核相融合。^[4] 但如果用雄性方正银鲫精子和红鲤、红鲫等两性融合生殖鱼类卵子受精,虽然胚胎发育率可达85%,但胚胎发育至尾部游离前后死亡。^[6] 单仕新等进行了红鲤(♀)×方正银鲫(♂)胚胎细胞染色体观察,发现胚胎细胞间的染色体数差别显著¹⁾。所有这些资料启示,雄性方正银鲫的精子进入两性融合生殖鱼类的卵质中后,显然经历了另样的发展进程,即不同于在银鲫受精卵中发生的进程。为此,我们进行了红鲤(♀)×方正银鲫(♂)的受精细胞学观察,以了解这一进程的具体情况,并探究其产生非整倍体胚胎发育的原因。

材 料 和 方 法

银鲫取自黑龙江省方正县双凤水库,红鲤(*Cyprinus carpio* L. red variety)取自本所天桥试验场。杂交采用人工催产,干法授精。精卵混匀后均匀洒在水中的玻璃纸上,水温24℃。其后,定期取一定数量的受精卵,用Bouin's液固定。在受精后40分钟内,每2分

* 中国科学院 1983 年资助课题。

本所梁绍昌同志协助亲鱼催产,谨此致谢。

1) 引自“银鲫(♂)×红鲤(♀)杂交胚胎的非整倍体发育”(将在水产学报发表),
1984年6月8日收到。

钟固定一批受精卵,受精后40—60分钟内,每5分钟固定一批,直到第二次卵裂完成。余留的受精卵继续观察其发育情况。固定的受精卵采用石蜡切片,切片厚度为10—11微米, H-E 染色。

结 果

受精卵都发育到尾芽出现,此时可见心跳,但血管中无血液,最后在出膜前死亡。

卵子受精后,除发育速率外,外形上发生的一系列变化和某些产粘性卵的鱼类相比无明显特异之处^[1,2]。受精卵连续切片的观察结果如下:

受精后2分钟,受精卵的动植物极区别不明显。随着精核向深部移动,动物极卵质逐渐丰富。卵子的浅表部分分布有很多大小不同的皮层颗粒,这些颗粒从精子进入卵子后即开始向卵周隙中排放内容物,受精膜随之形成。

(一) 雄性原核的形成

精子刚入卵时,精核直径约3.0微米,无精子星光。稍后,在精核周围出现一染色淡的泡状结构(图版 I:1)。这和朱洗在金鱼中描述的情况一致^[1]。受精后6分钟,精子星光(sperm aster)形成(图版 I: 2)。受精后14分钟,致密的精核开始核化,逐渐形成泡状原核,直径约5.0—7.6微米。核中可见到颗粒状和丝状的染色质。核表面不平整(图版 I: 3)。雄性原核形成后,体积逐渐增大,同时不断向胚盘中央移动。原核到达胚盘中央后,直径6.5—8.0微米。核周围卵质着色深,星光射线由此向四周发出。

(二) 雌性原核的形成

精子入卵后,刺激卵子开始发育。在动物极浅表部位可见到处于第二次成熟分裂中的卵子染色体。受精后12分钟,极体完全形成,直径8.0微米,其中染色体清晰可见。极体距精核约10.0—30.0微米。在紧靠极体的卵质中,可见到一团卵核染色体,无核膜形成(图版 I: 4)。随后,卵核染色体逐渐离开卵表面向胚盘中央雄核所在部位移动。受精后16分钟,雌性原核形成,直径约6.8—8.0微米。此时,雌雄原核已很接近(图版 I: 5)。

(三) 雌雄原核的相互融合

受精后16分钟,有些受精卵雌雄原核已相互接触。星光中心位于雄性原核一侧(图版 I: 6)。随后,雌雄原核的体积逐渐增大,双方接触越来越紧密,形成一卵圆形联结体。两核接触初期,接触面往往与卵表面成一定的角度,待完全接触后,则大多与卵表面平行,这和将来的卵裂纺锤体的取向是一致的,所以雌雄原核接触后要进行必要的方位调整。雌雄原核接触的同时,在核的周围形成一着色深的细胞质区域,其范围随发育的进行而增大。区域界限明显,无星光射线。朱洗认为该区域为精子星光发展到极限后,由其中央的胼态(gel)物质液化而成^[1]。合子核的形成过程即发生在该区域中央部位。待雌雄原核完全接触时,可在上述的特殊区域中看到新的双生子星光(amphiaster),分别位于切面上两原核接触线的两端(图版 I: 7)。受精后26分钟,雌雄原核间的隔膜消失,两核融合,形成合子核(zygotic nucleus)。合子核呈椭圆形,长轴约20.0微米,短轴约15.0微米,长轴平行于卵表面。双生子星光位于长轴的两端(图版 I: 8)。

(四) 卵裂

受精后 28 分钟,合子核膜消失,染色体散布在两极星光之间,两极相距 35.0 微米。纺锤体形成。在纺锤体中部,染色体明显地分成两群(图版 I: 9, 10)。这表明,虽然在合子形成时,来自雌雄原核的染色体曾共处于同一核中,但它们并未完全混合在一起。受精卵随后进入第一次卵裂中期,染色体集中于纺锤体中部形成核板(nuclear plate),上述两群染色体已彼此靠拢,难以区分(图版 II: 11)。接着,卵裂进入后期,染色体分裂成子染色体,分别向两极移动。随着子染色体间距离的增大,在两者之间出现一着色浅或不着色的条带,为未来分裂沟所在部位(图版 II: 12)。子染色体到达两极后,集中在空泡状结构中,未见有核膜。然后,子核开始形成。刚开始时,子核由若干小核堆积而成,随后小核彼此融合。

在处于卵裂中期的受精卵中(受精后 30 分钟),我们观察到在核板旁有染色体丢失现象(图版 II: 13)。至于丢失的染色体是方正银鲫的还是红鲤的则不清楚。Morris (1914) 在 *Fundulus heteroclitus* × *Ctenolabrus adspersus* 的受精细胞学观察中也发现过这种现象^[10],其情形和我们所得结果极为相似。

在受精后 36 分钟、45 分钟时,我们分别在不同受精卵的横向连续切片中,观察到三极、四极纺锤体的形成。从整体上看,三极纺锤体为三角形,其中染色体分为 3 群,分别向每极移动。三极之间可见有“Y”形淡染色带,为未来分裂沟所在部位。在三极纺锤体的中央部位,可见到未拉向任何一极的丢失的染色体,其性质尚不清楚。这样产生的子细胞必定具有不同的染色体组成(图版 II: 15, 16)。四极纺锤体的子核已经形成,分别位于各极,在核的两端出现新的子星光(图版 II: 14B)。整个四极纺锤体并非“十”形,其中三极形成和上述三极纺锤体情况相似的三角形(图版 II: 14a、b、c 极),另一极出现在侧旁,和三角形中的一角相对(图版 II: 14d 极)。对于这种四极纺锤体的产生,可以基本排除双精受精的可能性。首先,我们在大量受精卵切片中并未发现双精受精现象;其次,我们在另一涉及多精受精的实验中,观察到由双精受精引起的四极纺锤体,其布局和本实验中观察到的四极纺锤体是不同的,呈现出典型的“十”形。

受精后 55 分钟,受精卵已进入第二次卵裂。在一受精卵中,两分裂球的分裂表现出某种非同步性,其中一个处于中期,极间距 62.0 微米,另一个则已进入后期,极间距 72.0 微米。

讨 论

(1) 银鲫精子进入银鲫卵子后,受到抑制,从而保持致密状态。而进入鲤鱼这样的两性融合生殖鱼类的卵质后,却照常核化,转变为雄性原核,这可能是因为鲤鱼卵中不存在任何抑制因素的缘故。

动物的胚胎发育早期,雌雄原核接合的方式不完全一样。有的是原核融合,有的是原核联合^[3]。在金鱼、鲤鱼、泥鳅、欧鲫×泥鳅等中,两性原核均未发生融合,仅紧靠在一起形成联合^[1,2,9,11]。我们观察到,银鲫的雄性原核和鲤鱼的雌性原核是能够融合的。

值得注意的是,银鲫卵子对精核具有某种抑制效应。而在红鲤(♀)×方正银鲫(♂)杂交中,雄性原核先于雌性原核形成,但雄性原核对雌性原核却没有抑制作用。这暗示,

银鲫卵子对精核的抑制可能体现在细胞质中,而不是细胞核内。这有待进一步证明。

(2) 普通鲫鱼 (*Carassius auratus*) 和鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 正反杂交所得杂种的成活率是很高的。可是方正银鲫(♂)和鲤鱼(♀)以及和更近缘的红鲫(♀)杂交所得的胚胎均不能成活。单仕新等对红鲫(♀)×方正银鲫(♂)的胚胎染色体进行研究的结果,胚胎细胞染色体数倾向于接近两亲本之一的配子染色体数,而不是两者之和¹⁾。这可能正是胚胎死亡的原因所在。

本实验结果表明,在红鲫(♀)×方正银鲫(♂)杂交中,合子核形成以前的早期发育和一般动物没有什么差别。但在随后的发育过程中,可观察到某些不正常现象,如染色体丢失,第一次卵裂时三极、四极纺锤体的形成,第二次卵裂时两分裂球的非同步性分裂等。

关于这些现象出现的原因,我们目前还难以得出确切的答案。根据现有的一些实验结果,考虑到银鲫的雌核发育这一特殊方面,我们认为,银鲫染色体和别种染色体之间具有某种不相容性,两者难以共存于同一细胞之中,从而表现为相互排斥。

银鲫雄鱼是从同一雌鱼所产的卵中分化出来的,尽管目前我们还不知道银鲫雄鱼是如何产生的,但毫无疑问,在染色体组成上,雌雄银鲫不会有根本差别。因此,由银鲫精核核化而成的雄性原核亦具有潜在的排它性。当它和红鲫的雌性原核融合后,这种排它性就会表现出来,使两者的染色体难以混合,尽管它们共处于同一细胞核中。我们观察到的染色体分群和染色体丢失现象可能就是这种不相容性的体现。朱洗(1960)、Morris(1914)也观察到类似的分群现象,但他们在实验中仅仅观察到原核的联合,由此导致产生的染色体分群与我们观察到的类似现象在产生的机制上是不一样的。

银鲫染色体和红鲫染色体在中期结束时的着丝点分裂方面可能存在着非同步性。如果在第一次卵裂中,由于染色体的不相容性导致两亲本的染色体各趋向一极,而不是通常的染色单体分离,那么在第二次卵裂中,两亲本染色体分裂的非同步性就会表现出来。我们在同一受精卵中观察到的两分裂球非同步分裂现象可能就是这种情况。

三极、四极纺锤体的形成可能是方正银鲫和红鲫染色体的不相容性和着丝点分裂的非同步性共同作用的结果。由此而产生的细胞必然具有彼此不同的染色体组成,细胞之间的平衡性就会受到影响。有人假设,在远缘杂交中,染色体排除的方式之一是形成多极纺锤体(multiple spindles),随后是产生不平衡细胞的排除^[8]。这样,细胞中的染色体也随之丢失。

(3) 在进化上,银鲫的雌核发育处在有性生殖向孤雌生殖特化的阶段^[7]。这种特殊的生殖方式必定受控于独特的调节体系,而这种调节控制很可能体现在个体、细胞和染色体等不同层次水平上。在卵子发生过程中,通过抑制第一次成熟分裂,阻止了遗传重组和染色体分离;受精后,精子的核化又受到抑制,从而避免了外源染色体渗入到银鲫染色体组中;本文揭示的银鲫染色体和异源染色体之间的不相容性可能是雌核发育的控制机制在染色体水平上的表现,这只有当两者由于某种特殊原因而混合时才表现出来。所有这些调控的结果都是保持了银鲫世代之间染色体组成的同一性。

综上所述,在红鲫(♀)×方正银鲫(♂)杂交所得受精卵的发育过程中,多极纺锤体的

1) 引自“银鲫(♂)×红鲫(♀)杂交胚胎的非整倍体发育”(将在水产学报发表)。

形成和染色体丢失的机制同一般远缘杂交中发生的类似现象可能是不同的。进一步研究这种染色体分裂分离混乱的现象对于我们揭示银鲫的雌核发育机理无疑是有益的,而后者无论在理论上或实际应用上都有很大意义。

由于我们的实验工作仅进行到二细胞期,大部分受精卵的发育到此期都是正常的,没有发现不正常表现。但可以预料,在以后的胚胎发育过程中,前面所述的各种异常现象仍将继续发生,这是一个逐步发生的过程,最终导致所有胚胎死亡。

参 考 文 献

- [1] 朱 洗等, 1960. 金鱼和鲢鱼卵球受精的细胞学研究. 实验生物学报, **7**(1—2): 29—46.
- [2] 吴静仪等, 1964. 泥鳅卵子受精的细胞学观察. 高等学校自然科学学报(生物学版), 试刊第一期: 36—49.
- [3] 曲漱惠等, 1980. 动物胚胎学. 36 页. 科学出版社.
- [4] 周嘉申等, 1983. 黑龙江方正银鲫雌核发育的细胞学初步探讨. 动物学报, **29**(1): 11—16.
- [5] 俞豪祥, 1982. 银鲫雌核发育的细胞学观察. 水生生物学集刊, **7**(4): 481—487.
- [6] 蒋一珪等, 1982. 鲫鱼的人工和天然雌核发育. 水生生物学集刊, **7**(4): 471—477.
- [7] 蒋一珪等, 1983. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应. 水生生物学集刊, **8**(1): 1—13.
- [8] Jürgen Schulz-Schaeffer, 1980. Cytogenetics 267—268. Springer-Verlag.
- [9] Kobayasi, H., 1963. Some Cytological Aspects of Fertilization in the Cross between the Funa (*Carassius carassius*, Cyprinidae) and the Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*, Cobitidae). *Biol. Bull.*, **125**(1): 114—124.
- [10] Morris, M., 1914. The Behavior of the Chromatin in Hybrids between *Fundulus* and *Ctenolabrus*. *J. Exp. Zool.* **16**(4): 501—521.
- [11] Ozima, Y., 1943. Cytological Observation on Fertilization in the Carp, *Cyprinus carpio* L. *Jap. J. Genet.*, **19**(5): 219—228.

FERTILIZATION CHARACTERISTICS OF THE SPERM OF GYNOGENETIC CRUCIAN CARP (*CARASSIUS AURATUS GIBELIO*) IN THE EGG OF AMPHIMICTIC FISH

Ge Wei and Jiang Yigui

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica*)

Abstract

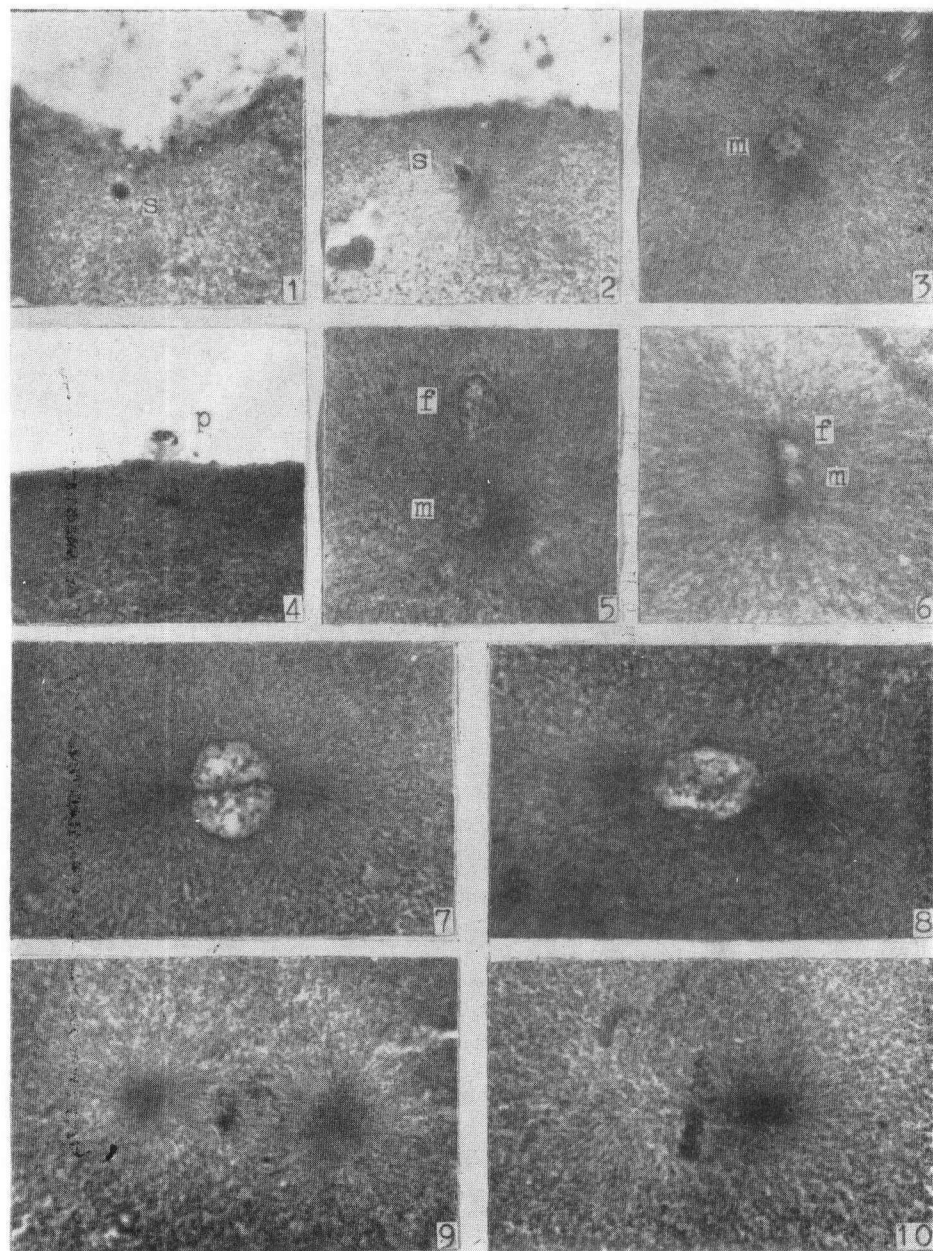
Cytological study on the fertilization with sperms of gynogenetic crucian carp and eggs of amphimictic common carp has been made in order to reveal the mechanism which leads to the death of the hybrid embryos. It showed that the sperms were able to transform into male pronuclei and fuse with female pronuclei, so that the zygotic nuclei were formed. However, after the beginning of cleavage, some unusual phenomena, such as the elimination of chromosomes, the formation of multiple spindles and the asynchronous division of the two blastomeres of the same egg, were observed. From these results, the authors are preliminarily of the opinion that, between gynogenetic crucian carp and other fishes, there exists a certain chromosome incompatibility which leads to the repelling of chromosomes in the hybrid embryonic cells. probably, this reflects the unique genetic background of the chromosome complement of gynogenetic crucian carp.

Key words Crucian Carp, Gynogenesis, Chromosome incompatibility, Elimination of chromosomes.

图版 I 说明

- 图 1 受精后 4 分钟, 银鲫的精核 (s)
图 2 受精后 6 分钟, 银鲫的精核(s)和精子星光
图 3 正在形成中的雄性原核(m)
图 4 正在外排的第二极体(p)
图 5 雌性原核形成(f), 正向雄性原核移动
图 6 雌雄原核开始接合
图 7 雌雄原核紧密接合
图 8 两性原核融合, 形成合子核
图 9 合子核膜消失, 染色体在纺锤体中部分成两群
图 10 同图 9

- Fig. 1 Sperm nucleus (s). 4 minutes after insemination.
Fig. 2 Sperm nucleus (s) and sperm aster. 6 minutes after insemination.
Fig. 3 Male pronucleus (m) in the process of metamorphosis. 14 minutes after insemination.
Fig. 4 Extrusion of the second polar body (p).
Fig. 5 Female pronucleus (f) formed and moving toward male pronucleus.
Fig. 6 Two pronuclei at the beginning of conjugation.
Fig. 7 Two pronuclei close conjugation.
Fig. 8 Fusion of the two pronuclei leading to the formation of the zygotic nucleus.
Fig. 9 Disappearance of the zygotic nuclear membrane with the chromosomal groups formed in the middle of the spindle
Fig. 10 The same as Fig. 9.



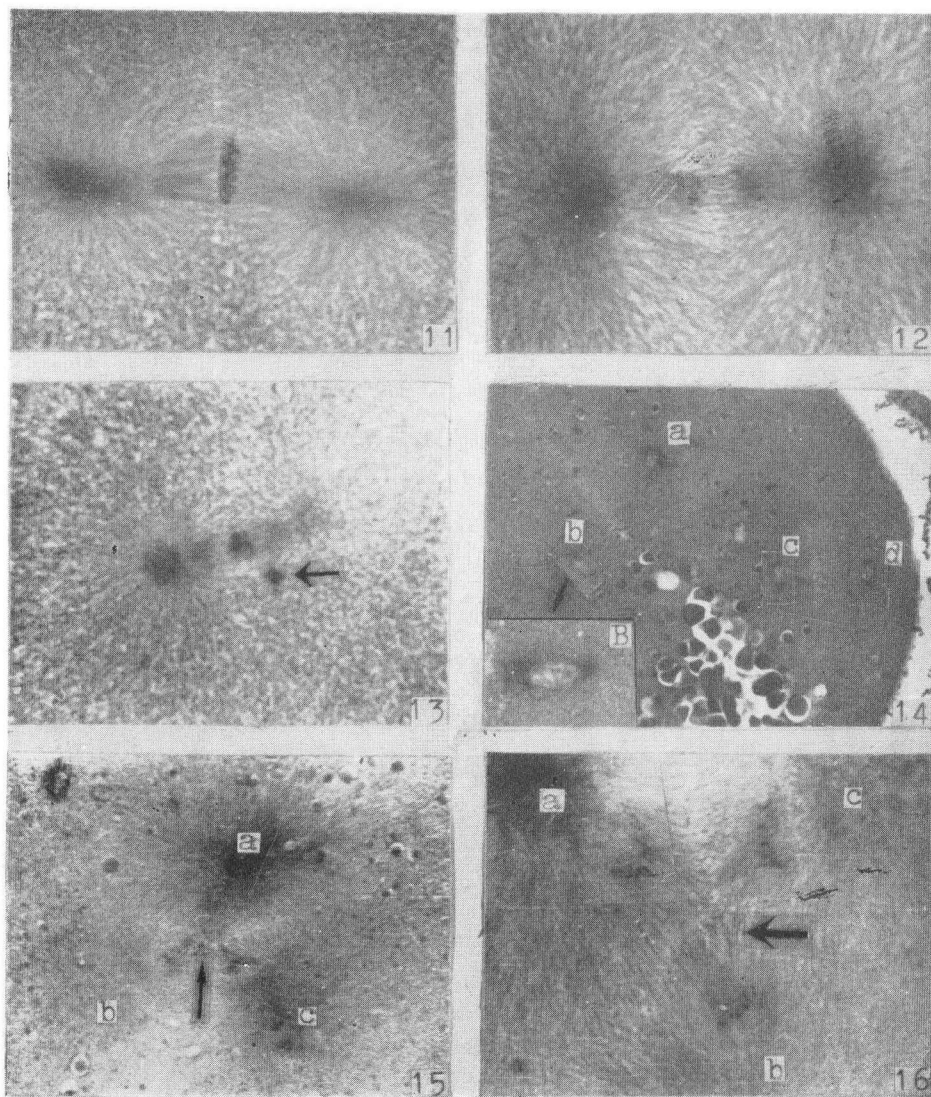


图 11 第一次卵裂中期

图 12 第一次卵裂后期

图 13 第一次卵裂中期,箭头所示为排斥的染色体。

图 14 第一次卵裂完成,形成四个子核

图 15 三极纺锤体,箭头所示为三极纺锤体中部落后的染色体。

图 16 图 15 的进一步放大

注: 图 14 由三张连续切片拼接而成;图 16 由另二张连续切片拼接而成

Fig. 11 Metaphase of the first cleavage.

Fig. 12 Anaphase of the first cleavage.

Fig. 13 Metaphase of the first cleavage with the arrow showing chromosome elimination.

Fig. 14 Completion of the first cleavage with the formation of four daughter nuclei.

Fig. 15 Tripolar spindle With the arrow indicating the lagging chromosomes in the middle of the tripolar spindle.

Fig. 16 Further amplification of Fig. 15.

Note: Fig. 14 formed by piecing three serial sections together and Fig. 16 formed by other serial sections.