

草鱼和鲤杂交的细胞学研究——鱼类远缘杂交核质不同步现象*

叶玉珍 吴清江 陈荣德

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

以草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 为母本、鲤 (*Cyprinus carpio*) 为父本进行人工杂交, 杂种胚胎发育至孵化期全部死亡; 同时获得了少数雌核发育草鱼和雄核发育的鲤。

分析比较了草鲤杂种胚胎染色体变化及胚胎发育情况。发现杂种胚胎染色体数目变化较大, 一般在 24—73 之间, 绝大部分细胞染色体在发育过程中不断丢失而出现非整倍体; 极少数细胞在受精后雌性原核和雄性原核不结合而引起雌核发育和雄核发育; 草鱼和鲤胚胎发育时序有较大差别; 因此细胞分裂不能同步。可能是杂种胚胎染色体不断丢失的主要原因。

关键词 远缘杂交, 非整倍体, 不相容, 不同步, 雌核发育, 雄核发育

在鱼类人工杂交中, 出现多倍体、雌核发育和雄核发育的现象已屡见不鲜^[1,2,7,8,11,12]。最早是苏联的 Крыжановский (1956)^[14] 在鲱科的 *Alburnus alburnus* × *Caspialora kessleri pontioa* 中发现有雌核发育现象。1968 年, 他又发现科间——条鳅 (*Nemachilus dorsalis*) × 裂腹鱼 (*Schizothorax pseudakxaiensis issykkulir*) 及亚科间——*Leuciscus schmidtii* × *Diptychus dybowskii* 有雌核发育现象; 接着, Нчколюкин (1972)^[13] 在红眼鱼 (*Scardinius erythrophthalmus*) × 狗鱼 (*Esox lucius*)、欧鲫 (*Carassius carassius*) × 雅罗鱼 (*Leuciscus*)、欧鲫 × 红眼鱼中也观察到雌核发育现象; Stanley (1976)^[11] 在进行鲤(♀) × 草鱼(♂)的杂交中亦发现多倍体、雌核发育和雄核发育的个体; 1982 年, Beck & Biggers^[7] 发现雌草鱼和雄鳊杂交组合中有三倍体杂种。国内吴维新等^[1] 1980 年也获得了草鲤杂种四倍体。虽然国内外许多育种工作者都进行了这项工作的研究, 但迄今报道的多倍体、雌核发育和雄核发育都只是根据杂交后代的形态、特征、血球体积大小来判断的, 并未进行细胞学的详细分析鉴定。

为了探讨草鲤杂交不相容以及出现雄核发育和雌核发育的原因和机理, 本文将着重对两亲本和杂种胚胎进行染色体的细胞学检查分析研究和胚胎发育的比较研究。这一工作不仅有助于对鱼类杂交育种工作的深入了解, 而且为今后鱼类遗传工程研究提供了实验上的可能依据。

* 本研究由中国科学院基金资助(852160 生 85-343)。
1987 年 11 月 9 日收到。

材 料 与 方 法

按吴清江等(1981)^[3]的方法获得雌核发育草鱼和鲤的单倍体胚胎。

杂交组合以草鱼为母本、鲤(兴国红鲤或镜鲤)为父本;对照组为正常的草鱼和鲤。亲鱼材料取自于本所官桥试验场。用 LRH-A 释放激素注射雌、雄草鱼, 剂量为每公斤鱼注射 25 微克以获取质量好的卵进行人工授精。受精卵放入恒温(25—26℃)的孵化水中孵化, 进行胚胎发育的观察。

囊胚时期染色体的制备按以前报道的方法^[4]。胚胎发育至原肠中期或晚中期取 50 枚左右的受精卵用 0.25% 胰酶消化卵膜、秋水仙碱溶液处理, 0.075mol/L KCl 液低渗, 然后固定、滴片、染色。在光学显微镜下观察计数, 挑选形态好、清晰的中期分裂相进行显微摄影、放大, 再计算染色体的相对长度和臂比指数, 按 Levan(1964)^[5] 的染色体分类标准排列组型图。

结 果

1. 杂交

自 1983 年开始进行了多次杂交实验, 每次用于杂交的鱼卵都是 10—20 万粒, 但均未获得杂交鱼苗。杂交胚胎发育到孵化期前后全部死亡。意外的是获得了雌核发育草鱼和雄核发育的鲤。其鱼苗的出现率约为 10 万分之 1。

2. 两亲本和杂交胚胎的染色体数目及组型

草鱼的染色体组型和鲤的染色体组型与刘凌云(1980)^[5]、吴政安等(1980)^[6]报道的结果基本相同。两种鱼的染色体及组型都有较大的差别(表 1, 图 1、2)。

表 1 两亲本的染色体比较

Tab. 1 Comparison of chromosomes between parents

种类 Species	单倍体数目 (N)	染色体组			单倍体臂数 Arm number of haploid
		M	SM	ST and T	
草鱼 Grass carp	24	8	16		48
鲤 Common carp	50	6	20	24	76

草鱼单倍体染色体数目为 24, 鲤单倍体染色体数目为 50, 杂种胚胎中除少数雌核发育单倍体 ($1n = 24$) 外, 其余的细胞染色体几乎全部为非整倍体, 染色体数目不尽一致, 变化范围在 25—73 (表 2)。

以两亲本的单倍体组型为模版,比较分析了杂种胚胎的染色体组型。草鱼单倍体的 24 个染色体分 A、B 两组,其中 A 组有 8 个中部着丝点 (M) 染色体, B 组有 16 个亚中部着丝点 (SM) 染色体,无端部和亚端部着丝点 (ST 和 T) 染色体(图 1)。鲤单倍体的 50 个染色体分 A、B、C 3 组, A 组有 6 个中部着丝点 (M) 染色体, B 组有 20 个亚中部着丝点 (SM) 染色体, C 组有 24 个端部或亚端部着丝点 (T 和 ST)(图 2)。

具有 24 个染色体的细胞经鉴定全部是草鱼的染色体,为草鱼雌核发育胚胎细胞。图 3 是一个杂种细胞的分裂图相,通过鉴定有 24 个来自草鱼, 1 个来自鲤, 箭头“↑”所指的那个染色体臂比指数等于 3.25,为亚端部着丝点染色体,显然是鲤所特有的,因为草鱼根本没有这种形态的染色体。图 4“/”指的一个染色体臂比指数为 3.13,无疑是来自鲤;“↑”指的一个染色体的相对长度为 5.806,而臂比指数却很小,为 1.01,与草鱼单倍体组型图分析比较,初步判定是来自鲤。图 5 是不同数量的染色体分裂相,不管是经测量计算鉴定还是直观染色体形态都可以很明显地看出杂种细胞都带有两个亲本的染色体,并且绝大部分染色体都是具中部和亚中部着丝点染色体,而鲤的端部和亚端部着丝点染色体很少甚至完全没有。这就说明在草、鲤胚胎发育过程中所丢失的都是鲤的染色体。因而,非整倍体细胞都是以草鱼 24 个染色体为主同时带有鲤染色体的杂种细胞(表 2)。由于雄核发育鱼苗的出现率极低,约 10 万分之 1,估计雄核发育的囊胚的出现机率不超过 5%,因此在制备染色体标本时就很难遇到。

表 2 不同杂种细胞染色体组型比较

Tab. 2 Karyotype comparison between different hybrid cells

染色体数 Number of chromosomes	中部着丝点染色体 M	亚中部着丝点染色体 SM	亚端部和端部着丝点染色体 ST + T
24	8	16	
25	8	16	1
25	8	16	1
25	8	16	1
26	9	16	1
53	13	29	11
54	18	25	11
69	22	34	13
73	22	34	17

3. 胚胎发育

一般情况下,草、鲤杂交受精率很高,在 90% 左右,而且杂种胚胎在细胞分裂期相当整齐一致,囊胚期、原肠期、神经胚期也都很正常。可是发育到肌肉效应期时只有 10—20% 的活胚胎,这些胚胎再往下发育到出膜期,鱼苗出现弯尾、围心腔扩大等病症而陆续死亡,只有极个别雌核发育或雄核发育的鱼苗能幸存下来。

从胚胎发育观察的结果可以看出,草鱼和鲤的胚胎发育速度相差很大(表 3)。水温在 25℃ 左右时,自受精至原肠晚期,鲤比草鱼慢 3 小时左右。自受精至孵化草鱼只需 21

小时 31 分,鲤则需 56 小时,杂种胚胎的发育速度基本同于草鱼,需 21 小时 54 分。在这种情况下,鲤的雄核染色体的分裂由于与卵裂不同步而不断被排斥。因此胚胎发育期间核质不能同步可能是染色体丢失形成非整倍体胚胎的主要原因。

表 3 草鱼、鲤及杂种的胚胎发育速度的比较(水温 25—26℃)
Tab. 3 Comparison of rate of embryonic development in grass carp, carp
and their hybrid (water temperature: 25—26℃)

发育阶段 Developmental stage	从受精至各胚胎发育阶段所需的时间(时:分) Time from fertilization to each developmental stage (h:min)		
	鲤 Carp	杂种 Hybrid	草鱼 Grass carp
二胞期 2 Cells	45min	44min	45min
囊胚期 Blastula	3:30	3:19	3:13
原肠早期 Early-gastrula	5:40	5:09	4:43
原肠中期 Middle-gastrula	6:45		5:18
原肠晚期 Late-gastrula	9:15	7:33	6:28
神经胚期 Nerve embryo	10:40	8:22	7:08
肌节出现期 Myocomma appearence	25:40	9:54	9:13
肌肉效应期 Muscle contract	33:15	16:04	15:37
孵化期 Hatching	56:05	21:54	21:31

讨 论

1. 草、鲤杂交不能获得鱼苗,出现雌、雄核单倍体、非整倍体的根本原因可能是两亲本的核质不完全相容及核质的分裂节奏不同所致。从理论上可以解释为草鱼卵和鲤的精子受精后,雌、雄性原核很快结合,但随着杂种胚胎雌雄核染色体的复制速度快慢不一,也就是核质的分裂节奏不协调,因此作为雄核的鲤染色体不断丢失,最后导致以雌核为主的非整倍体的杂种胚胎。

由于细胞分裂不同步,因而出现的另一种情况是杂交后雌雄原核完全不融合。如果是雌核排斥或抑制雄核,那么就出现雌核发育单倍体,如果是雄核排斥或抑制雌核,那么就出现雄核发育单倍体。Stanley (1976) 认为出现的雄核发育可能是双精受精^[1]。这大概是不可可能的,很多实验已证明,鲤科鱼类都是单精入卵。

一般鱼类的正反交结果基本相同,然而,草、鲤正反交则不然。本研究 and 吴维新、Stanley^[1,11] 等用草鱼作母本,鲤作父本都没有得到杂交种,而吴维新^[1]用这组反交却获得了杂交多倍体鱼。目前这种遗传机理还不清楚。

2. 迄今所知自然界存在的雌核发育鱼类有银鲫 (*Carassus auratus gibelio*)、关东鲫 (*C. auratus langsdorffii*)、西班牙斜齿鲃 (*Rutilus alburnoides*) 和一种美洲的帆鳍鱼 (*Poecilia formosa*)。60 年代以后,许多遗传工作者对鱼类雌核发育作了大量的研究,并利用各种理化方法人工诱发雌核发育,企图人为控制鱼类性别、提高食物转换率、快速建立鱼类纯系。

自从 Крыжановский (1956, 1968)^[14,15] 分别在科间、亚科间杂交中发现雌核发育现象以后,Stanley (1976)^[11] 又在草、鲤杂交中获得了雄核发育的鲤和雌核发育草鱼。本研究亦获得 2 尾雌核发育草鱼和 1 尾雄核发育鲤。可见获得单性发育鱼并不罕见,因此认为,利用杂交的方法生产单性发育鱼可能是一种可行的方法。而采用杂交的方法生产单性发育鱼出现率相当低,可在鱼卵受精后用极限温度、静水压、秋水仙碱等理化方法进行人工加倍处理,以提高纯合二倍体的比例。

3. 在遗传学方面,利用体细胞杂交、细胞融合作基因定位已取得很大进展,目前已在人体染色体的基因定位作了大量的工作。人的基因定位是借助中国仓鼠的细胞和人的体细胞融合的杂种细胞在传代培养过程中不断排斥人的染色体的现象进行的。基因定位大大地推动了遗传学研究的发展,加快了人的基因图的绘制,并将广泛地应用于诊断、预防和治疗人的各种遗传疾病。Ojima (1986)^[10] 最近应用细胞融合技术将鱼的微细胞转移到老鼠细胞里并获得了杂种细胞系。这一实验的成功,对于鱼类遗传育种提供了新方法,同时为在鱼类进行基因定位提供了理论基础。

我们在草、鲤杂种胚胎中发现鲤的染色体受到草鱼染色体的排斥而不断丢失,有些杂种细胞只剩下为数极少的鲤染色体,而草鱼的染色体则全部保留下来。这就预示着有可能利用鱼类远缘杂交中染色体的丢失现象而建立各种细胞系,从而达到基因定位的目的。

参 考 文 献

- [1] 吴维新、林临安、徐大义, 1981. 一个四倍体杂种——兴国红鲤 (*Cyprinus carpio* L.) × 草鱼 (*Ctenopharyngodon idella* Cuv. et Val.). 水生生物学集刊, 7(3): 433—436.
- [2] 湖北省水生生物研究所第二室育种组家鱼研究小组, 1976. 用理化方法诱导草鱼(♀) × 团头鲂(♂) 杂种和草鱼的三倍体、四倍体. 水生生物学集刊, 6(1): 111—112.
- [3] 吴清江、陈荣德、叶玉珍、柯鸿文, 1981. 鲤鱼人工雌核发育及其作为建立近交系新途径的研究. 遗传学报, 8(1): 50—55.
- [4] 吴清江、叶玉珍、陈荣德, 1986. 鲤鱼染色体组人工调控的核型证明. 水生生物学报, 10(3): 265—270.
- [5] 刘凌云, 1980. 草鱼染色体组型的研究. 动物学报, 26(2): 126—131.
- [6] 吴政安、杨慧一, 1980. 鱼类细胞遗传学的研究. II. 鱼类淋巴细胞的培养及其染色体组型分析. 遗传学报, 7(4): 370—375.
- [7] Beck, M. L. and Biggers, C. J., 1982. Chromosomal investigation of *Ctenopharyngodon idella* × *Aristichthys nobilis* hybrids. *Experientia*, 38: 319.
- [8] Gervai, J., Peter, A., Nagy, A., Horvath, Land Csanyi. V., 1980. Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio*. *J. Fish. Biol.*, 17(6): 667—671.
- [9] Levan, A., Ferdga, K. and Sandberg, A. A., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 210—220.

- [10] Ojima, Y., Takarada, Y. and Takai, A., 1986. Microcell-mediated transfer of fish chromosomes into mouse cells. *Proc. Japan Acad.*, **62**(3): 91—94.
- [11] Stanley, J. G., 1976. Production of hybrid, androgenetic, and gynogenetic grass carp and common carp. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **105**(1): 10—16.
- [12] Wolters, W. K., Libey, G. S. and Chrisman, C. L., 1981a. Induction of triploidy in channel catfish. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **110**(2): 310—312.
- [13] Николукин, Н. И., 1972. Отдаленная гибридизация осетровых и костистых рыб. Пищевая промышленность, Москва.
- [14] Крыжановский, С. Т., 1956. Материалы по развитию сельдевых рыб. *Труды Института Морфологии Животных. АН СССР*, **17**:1—254.
- [15] Крыжановский, С. Г., 1968. Закономерности развития гибридов рыб различных систематических категории. М., Изд-во "Наука".

STUDIES ON CYTOLOGY OF CROSSES BETWEEN GRASS CARP AND CARP —ASYNCHRONIZATION BETWEEN NUCLEUS AND CYTOPLASM IN DISTANT HYBRIDIZATION OF FISHES

Ye Yuzhen, Wu Qingjiang and Chen Rongde

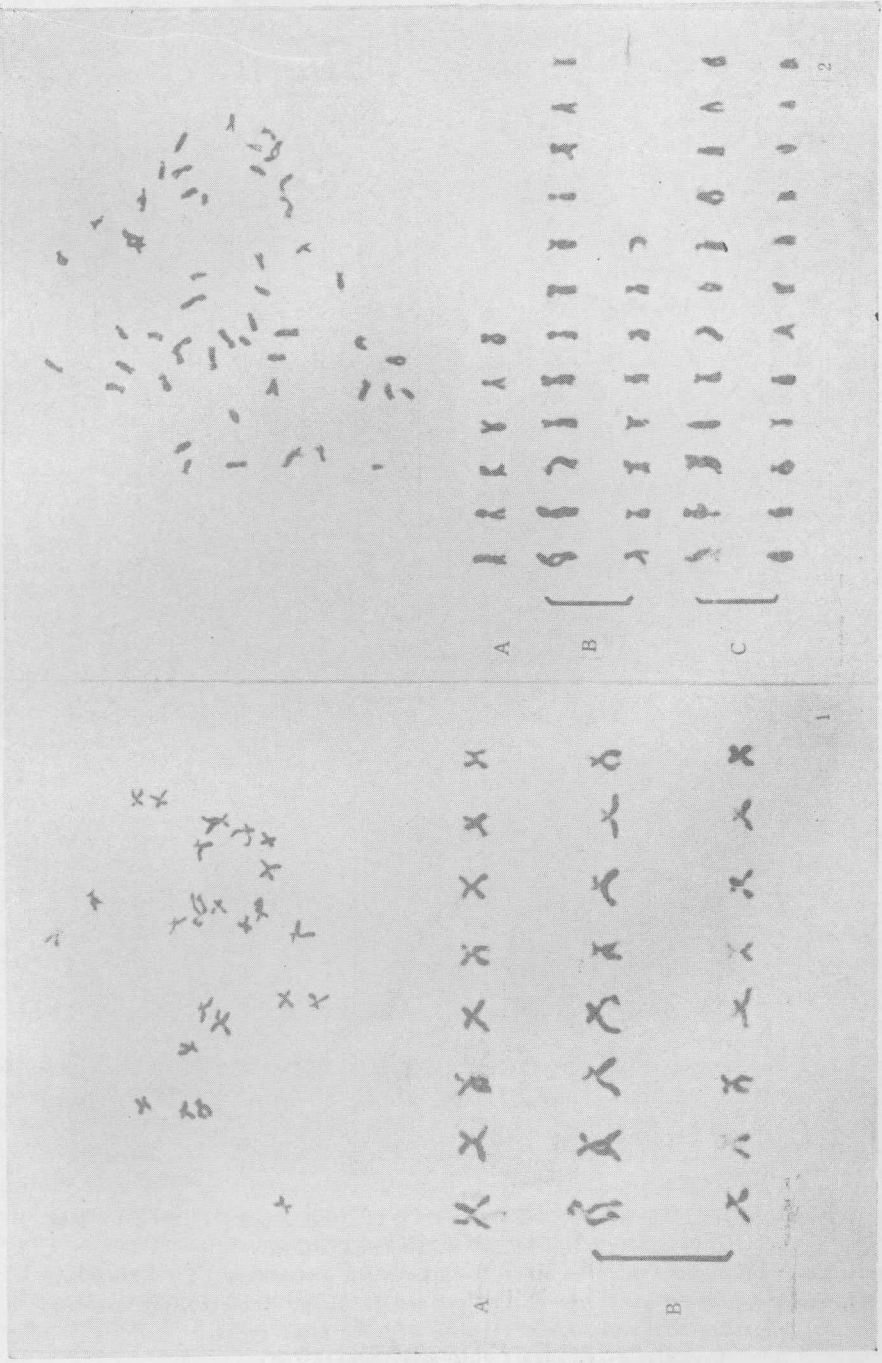
(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan*)

Abstract

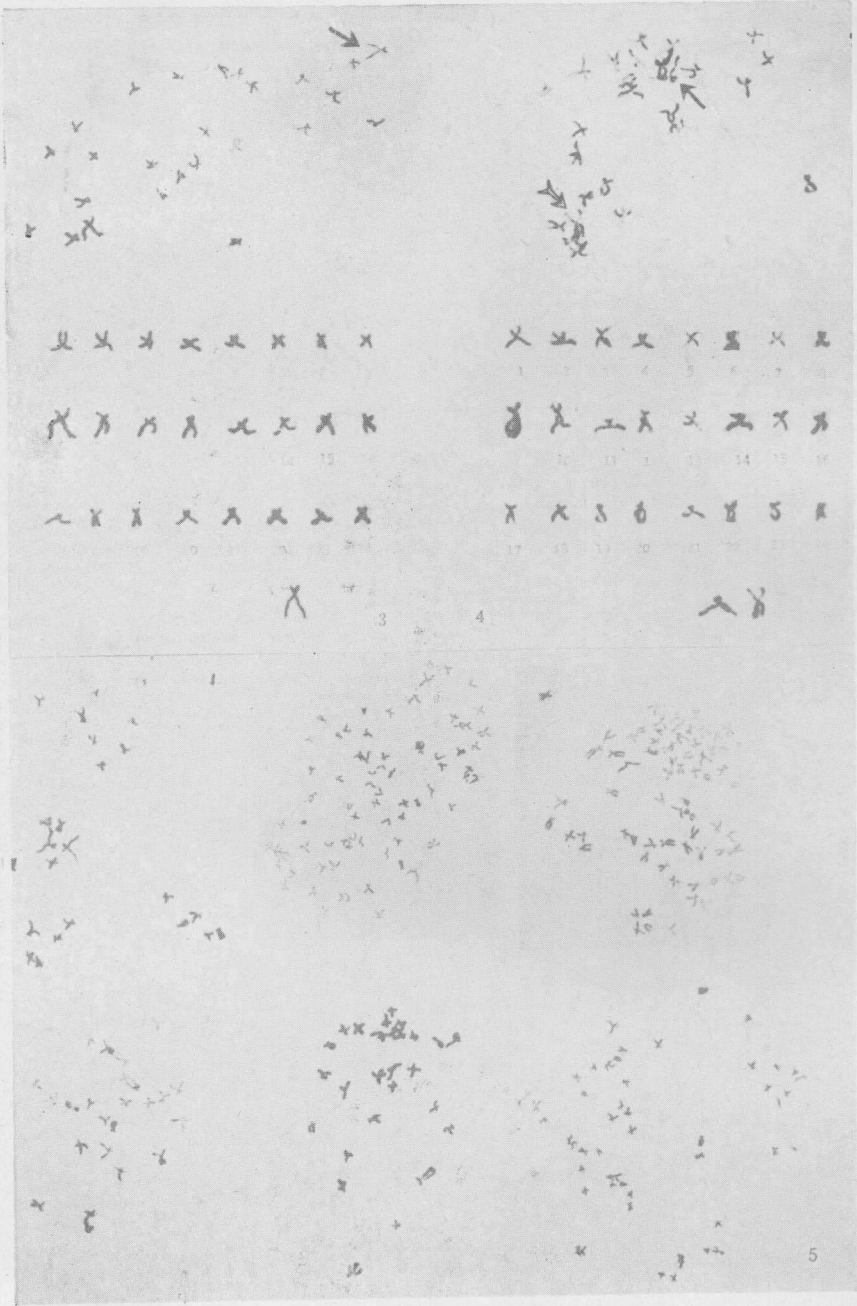
In the artificial hybridization between female grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and male common carp (*Cyprinus carpio*), no hybrid embryos survived to hatching except a few gynogenetic grass carp and androgenetic common carp.

Comparisons of karyotype and embryonic development between the hybrid and its parents (grass carp and common carp) showed that the chromosome number of hybrid embryos varied considerably, usually ranging from 24 to 73. Most chromosomes of common carp were gradually lost and aneuploid appeared in almost all the hybrid embryonic cells. A few embryos developed by means of gynogenesis or androgenesis. The difference in the rate of embryonic development between grass carp and common carp was distinct, and the characters of hybrid embryonic development were much closer to those of grass carp. Asynchronous development between plasma and male nucleus may be the cause for the continuous loss of chromosomes in the hybrid cells.

Key words Distant hybridization, Aneuploid, Incompatibility, Asynchronization, Gynogenesis, androgenesis



1. 草鱼单倍体中期分裂相及组型; 2. 鲤单倍体中期分裂相及组型
1. Metaphase and karyotype of haploid grass carp; 2. Metaphase and karyotype of haploid common carp



3.4.草鱼(♀)×镜鲤(♂)杂交后杂种胚胎的中期分裂相,“↑”“↑”示鲤鱼染色体;5.草鱼(♀)×镜鲤(♂)杂交后细胞不同程度丢失染色体的中期分裂相

3,4. Metaphase of hybrid embryos after cross between grass carp (♀) X Mirror carp (♂), arrow “↑” “↑” indicates chromosomose of carp; 5. Metaphase of cells lossing chromosome in varying degreeer after cross between grass carp (♀)X mirror carp (♂)