

奥利亚罗非鱼与鳊杂交的受精细胞学及胚胎发育研究

唐永凯 杨弘 吴婷婷 贾永义 夏德全

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心、农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 无锡 214081)

摘要: 通过对奥利亚罗非鱼(♀)和鳊(♂)杂交的受精细胞学观察发现: 异源精子入卵后产生星光, 并核化成雄性原核, 与雌原核互相靠近, 接触最终完全融合为一个合子核, 合子核继续分裂。分析比较了奥利亚罗非鱼、鳊以及奥鳊杂种胚胎发育情况, 发现杂种胚胎的发育速度在囊胚早期与母本奥利亚罗非鱼基本一致, 到囊胚后期速度有所减慢, 但与鳊胚胎发育速度相差很大。这表明奥利亚罗非鱼和鳊虽属不同科间的远缘杂交, 但有正常的受精细胞学程序和常规的细胞分裂(卵裂)方式。

关键词: 奥利亚罗非鱼; 鳊; 远缘杂交; 受精细胞学; 胚胎发育

中图分类号: S961.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2006)05-0559-04

奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aurea*)属鲈形目、鳊鱼科, 鳊(*Siniperca chuatsi*)属鲈形目、鳊科。本研究采用奥利亚罗非鱼(♀)和鳊(♂)进行科间杂交, 获得了能正常发育的杂交子代, 但仅有0.2%—0.3%的胚胎能成活。杂交子代与亲本奥利亚罗非鱼的形态学研究表明, 它们之间可数性状无显著差异^[1], 而RAPD分析显示, 杂交子代与奥利亚罗非鱼有85.8%的遗传相似性, 但与鳊却只有4.9%的遗传相似性^[2]。目前, 有关鱼类远缘杂交的受精细胞学研究已见于金鱼(*Carassius auratus* L.)×鳊鱼(*Megalobrama terminalis*)^[3], 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)×三角鲂(*Megalobrama terminalis*)^[4], 青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)×三角鲂(*Megalobrama terminalis*)^[5], 大鳞副泥(*Paramisgurnus dabryanus*)×泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)^[6], 大口胭脂鱼(*Ictiobus cyprinellus*)×银鲫[*Carassius auratus gibelio*(Bloch)]^[7]等。本研究不仅获得了科间杂交子代, 而且子代还能正常繁殖后代^[1], 因此, 对奥利亚罗非鱼(♀)与鳊(♂)科间杂交的受精细胞学和胚胎发育进行研究, 不仅对探讨鱼类科间杂交的理论具有重要意义, 而且也为鱼

类品种改良提供了理论依据。

1 材料与方法

在繁殖季节(6—9月), 挑选成熟度好的奥利亚罗非鱼(♀)和鳊(♂), 使用鲤垂体、LRH-A、HCG、地欧酮等进行罗非鱼的人工催产, 将成熟的罗非鱼卵子与鳊精子进行干法受精。以正常的奥利亚罗非鱼和鳊各自的自交为对照, 将它们的受精卵和奥利亚罗非鱼(♀)×鳊(♂)受精卵分别于培养皿中孵化, 进行胚胎发育的观察。定时取奥利亚罗非鱼(♀)×鳊(♂)受精卵, 用Smith氏液固定。取样顺序为: 受精后10s, 20s, 30s, 1min, 2min, 3min, …(每隔1min), 10min, 15min, 20min, …(每隔5min), 60min, 90min 每次固定的卵粒数在20粒左右。卵粒固定12h后, 梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 连续切片(厚度6—8 μ m), 苏木精—伊红染色, 中性树胶封片, Olympus显微镜下观察并摄影。

2 结果

2.1 受精过程的细胞学观察

2.1.1 精子入卵和卵激动反应 受精后20s, 精子

收稿日期: 2005-03-08; 修订日期: 2006-05-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371116); 国家“十五”攻关专题(2004BA526B0110); “863”课题(2001AA243061)资助

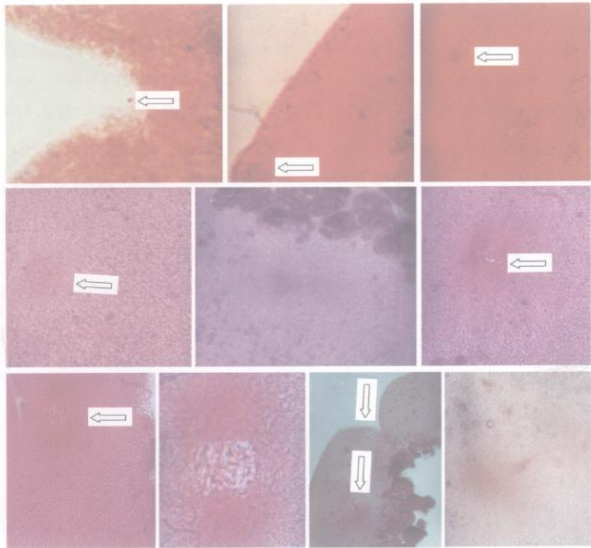
作者简介: 唐永凯(1978—), 男, 硕士, 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: tangyk@ffrc.cn

贾永义在南京农业大学无锡渔业学院工作

通讯作者: 夏德全。E-mail: xia dq@ffrc.cn

刚到达卵质边缘(图版 I : 1), 从多张切片上均观察到这一现象, 这说明了奥利亚罗非鱼和鳊杂交属于单精受精。受精后 3 min, 核染色体被拉向两极, 受精卵已处于减数分裂末期(图版 I : 2)。精子入卵

后, 卵子即被激动, 皮质小泡破裂并释放到卵周隙中, 卵质向动物极流动形成胚基物质, 卵子逐渐变得透明。



图版 I

1 受精后 20s, 到达卵质边缘的精子。白箭头示精子, $\times 1000$; 2 受精后 3min, 受精卵处于减数分裂末期, 白箭头示留在卵内将来形成雌性原核的遗传物质, $\times 1000$; 3. 受精后 4min, 精子进入卵质, 白箭头示精子, $\times 1000$; 4. 受精后 10min, 精子星光形成, 白箭头示星光, $\times 400$; 5. 受精后 20min, 精子头部开始核化, $\times 400$; 6 受精后 25min, 雄原核形成, 白箭头示雄原核, $\times 1000$; 7 受精后 45min, 雌雄原核已融合成合子核, 白箭头示合子核, $\times 400$; 8 图 7 放大, $\times 1000$; 9. 受精后 90min, 白箭头示子核, 黑箭头示分裂沟, $\times 400$; 10. 图 9 放大, $\times 1000$

1 20 sec after insemination, a sperm arrived at the edge of ooplasm, white arrow showing a sperm, $\times 1000$; 2 3 min after insemination, the egg developed into the anaphase of secondary maturation division, white arrow showing the genetic material which would become female pronucleus, $\times 1000$; 3. 4 min after insemination, a sperm entered the ooplasm, white arrow showing the sperm, $\times 1000$; 4. 10 min after insemination, the spermaster appeared, white arrow showing the spermaster, $\times 400$; 5. 20 min after insemination, the spermaster nucleus became vesicular nuclear, $\times 400$; 6. 25 min after insemination, male pronucleus formed, white arrow showing male pronucleus, $\times 1000$; 7. 40 min after insemination, female pronucleus and male pronucleus fused into a zygotic nucleus, white arrow showing a zygotic nucleus, $\times 400$; 8. Magnification of picture 7, $\times 1000$; 9. 90 min after insemination, white arrow showing the daughter cell nucleus, black arrow showing the cleavage furrow, $\times 400$; 10. Magnification of picture 9, $\times 1000$

2.1.2 精子星光与核化 受精后 4min, 精子更加深入卵质(图版 I : 3), 随着精子向卵质的深入推进, 受精后 10min, 精子开始产生星光(图版 I : 4), 受精后 20min, 精子星光更为发展, 精子核开始膨大, 趋向核化(图版 I : 5)。受精后 25min, 精子头部完全核化形成雄性原核(图版 I : 6)。精子星光的形成和发展以及精子头部的核化是卵子正常受精的标志。

2.1.3 雌雄原核融合 在雄性原核星光的吸引下, 雌性原核向雄性原核靠近, 而星光也推动雄性原核向中轴移动, 在双星光的作用下, 雌雄原核靠近, 接触, 融合。受精后 45min, 雌雄原核完全融合成一个

合子核(图版 I : 7), 此时合子核中央染色体嗜碱性大为增强, 可以看到许多染色体被染成黑紫色(图版 I : 8)。而星光则排列在合子核的两旁, 两侧星光的长轴连线与动植物极的中轴垂直, 其方向决定了第一次卵裂只能是纵裂。

2.1.4 第一次卵裂 雌雄原核融合不久, 便开始进行第一次卵裂。首先是核分裂, 均匀地排列在赤道板中央的染色体在纺锤丝的牵引下分开, 向两极移动, 染色体被拉到两极形成两个子核。受精后 90min, 两子核之间的细胞质向两端收缩成卵裂沟(图版 I : 9)。分裂形成的两子核并不停止活动, 紧

接着进行第二次卵裂。在图版 I : 10 上可以明显的看见第二次卵裂的分裂中期相, 而且二个子细胞分裂图像的纺锤体长轴与第一次卵裂的分裂沟是平行的, 说明第二次卵裂的分裂沟与第一次卵裂的分裂沟是垂直的, 因此第二次卵裂的方向也是纵向的。

2.2 杂种胚胎与亲本胚胎发育比较

从胚胎发育观察的结果看出(表 1), 奥利亚罗非鱼和鳊的胚胎发育速度相差很大。水温在 26—28℃左右时, 自受精至原肠晚期, 奥利亚罗非鱼比鳊慢约 23h。自受精至孵化出膜, 奥利亚罗非鱼需约 78h, 而鳊只需约 48h。杂种胚胎的发育速度在囊胚早期之前与母本奥利亚罗非鱼基本一致, 但从囊胚后期开始, 速度有所减慢, 自受精到出膜需 85h。从这可看出, 杂种胚胎的发育速度受到精子的影响, 速度减慢了。

表 1 奥利亚罗非鱼、鳊及杂种的胚胎发育速度的比较			
Tab. 1 Comparison of embryonic development rate in <i>O. aurea</i> , <i>S. chuatsi</i> and <i>O. aurea</i> <i>S. chuatsi</i>			
从受精到各胚胎发育阶段所需的时间(h; min)			
发育阶段	Time from fertilization to each developmental stage		
Development stage	奥利亚罗非鱼	杂交子代	鳊
	<i>O. aurea</i>	<i>Hybrid</i>	<i>S. chuatsi</i>
胚盘形成 Formation of blastoderm	0; 30	0; 30	0; 40
2细胞期 2-cell stage	1; 40	1; 45	1; 00
高囊胚期 Early blastula	8; 45	9; 32	5; 05
平囊胚期 Late blastula	11; 10	13; 35	6; 45
原肠早期 Early gastrula	20; 50	21; 35	8; 45
原肠中期 Middle gastrula	26; 50	27; 40	11; 00
原肠晚期 Late gastrula	35; 40	36; 45	12; 45
视泡形成期 Eye radicle formation	38; 10	48; 40	18; 35
心脏搏动期 Heart pulsate	52; 40	54; 35	29; 45
血液循环期 Blood circulation	60; 17	64; 00	35; 45
出膜 Hatching	78; 00	85; 20	48; 00

3 讨论

奥利亚罗非鱼和鳊隶属于不同的科, 但这个杂交组合的受精过程却符合常规受精细胞学程序。本实验中, 通过连续石蜡切片, 观察到鳊精子进入奥利亚罗非鱼卵内, 精子解凝发出星光, 产生星光体, 精子头部膨胀核化为雄性原核, 与雌原核接触, 融合成合子核, 合子核能够进行正常的有丝分裂。这一可见的细胞学行为与刘筠等^[5]在三角鲂与青鱼以及朱

洗^[3]等在金鱼和鳊鱼杂交中观察到的结果相似, 说明鳊精子可以与奥利亚罗非鱼卵子受精。

本次实验还观察了奥鳊杂交的胚胎发育情况, 其胚胎能顺利进入原肠中期, 但绝大多数胚胎在此期间发育停滞, 出现了第一次死亡高峰, 仅有少数胚胎能继续发育进入原肠晚期, 此后胚胎发育极不同步, 在孵化期和出膜后陆续死亡, 最后仅有 0.2%—0.3%的胚胎成活。这可能是奥利亚罗非鱼和鳊胚胎发育速度相差较大, 导致杂种胚胎在以后的细胞分裂中出现了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, 因此作为雄核的鳊染色体不断丢失, 最后导致以雌核为主的非整倍体的杂种胚胎。由于鳊染色体在各子代胚胎中丢失的程度不可能完全一致, 所以子代胚胎的发育速度也不一致, 死亡也有先有后, 只有鳊染色体整套丢失而奥利亚罗非鱼染色体得到自然加倍的个体才可以得到存活, 因此杂交子代很可能是受鳊精子刺激的雌核发育个体。由于自然加倍的概率较低, 所以子代存活率也较低。这与叶玉珍等^[8]用草鱼和鲤杂交得到的结果相似。对存活下来的后代, 从其形态学方面证明其可能为异精雌核发育奥利亚罗非鱼^[1], 从遗传标记方面证明杂交子代在继承大部分母本罗非鱼遗传物质的同时, 也融合了部分来自父本鳊的遗传物质, 因此可能为异精雌核发育^[2]。

参考文献:

[1] Yu J H, Xia D Q, Yang H, *et al.* Morphology of the progenies of *Oreochromis aurea* (♀) × *Siniperca chuatsi* (♂) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2003, 27(5): 431—435[俞菊华, 夏德全, 杨弘, 等. 奥利亚罗非鱼与鳊杂交后代的形态. 水产学报, 2003, 27(5): 431—435]

[2] Yang H, Xia D Q, Liu L, *et al.* Studies on hereditary relationship between *Oreochromis aurea* (♀) × *Siniperca chuatsi* (♂) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(5): 594—598[杨弘, 夏德全, 刘蕾, 等. 奥利亚罗非鱼(♀)、鳊(♂)及其子代间遗传关系的研究. 水产学报, 2004, 28(5): 594—598]

[3] Zhu X, Chen Z X, Wang Y L, *et al.* Cytological study of fertilization in *Carassius auratus* L. × *Megalobrama teminalis* [J]. *Acta Biologica Experimentalis Sinica*, 1960, 7(1): 29—46[朱洗, 陈兆熙, 王幽兰, 等. 金鱼和鳊鱼卵球受精的细胞学研究. 实验生物学报, 1960 7(1): 29—46]

[4] Liu S Y. Cytological study on fertilization of *Ctenopharyngodon idellus* (♀) × *Megalobrama teminalis* (♂) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1987, 11(3): 225—232[刘思阳. 草鱼卵子和三角鲂精子杂交的受精细胞学研究. 水产学报, 1987, 11(3): 225—232]

[5] Liu Y, Chen S Y, Wang Y X. Cytological study on the fertilization of the egg of *Mylopharyngodon piceus* with the sperm of *Megalobrama*

- termianalis* J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1981, 7(3): 329—339
- [刘筠, 陈淑群, 王羲铎. 三角鲂精子与青鱼卵子的受精细胞学研究. 水生生物学集刊, 1981, 7(3): 329—339]
- [6] Zhao Z S, Gao G Q, Sun W X, *et al*. Studies on Insemination Cytology in Hybridization between *Paramisgurnus dabryanus* and *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1999, 18(1): 75—77[赵振山, 高贵琴, 孙文学, 等. 大鳞副泥鳅卵和泥鳅精子杂交受精细胞的观察. 华中农业大学学报, 1999, 18(1): 75—77]
- [7] Wu L H, Yuan J L, Zhang W. Phenotype analysis of isoenzyme in the different tissues of *Carassius auratus*, *Myxocyprinus asiaticus* and their F1 generation [J]. *Journal of Biology*, 2003, 20(2): 19—22[吴琅虎, 袁均林, 张伟, 高背银卿, 大口胭脂鱼及胭脂鲫(F1)不同组织的同工酶的表型分析. 生物学杂志, 2003, 20(2): 19—22]
- [8] Ye Y Z, Wu Q J, Chen R D. Studies on cytology of crosses between grass carp and carpasynchronization between nucleus and cytoplasm in distant hybridization of fishes [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1989, 13(3): 234—239[叶玉珍, 吴清江, 陈荣德. 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. 水生生物学报, 1989, 13(3): 234—239]

STUDY ON FERTILIZATION CYTOLOGY AND EMBRYONIC DEVELOPMENT IN HYBRIDIZATION BETWEEN *OREOCHROMIS AUREA* (♀) AND *SINIPERCA CHUATSI* (♂)

TANG Yong-Kai, YANG Hong, WU Ting-Ting, JIA Yong-Yi and XIA De-Quan

(Key open laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture

Biology of the Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center,

Chinese Academy of Fishery Sciences, WuXi 214081)

Abstract: Tilapia are native to Africa, but have been introduced into many countries around the world. They are disease-resistant, reproduce easily, eat a wide variety of foods and tolerate poor water quality with low dissolved oxygen levels, but are not able to bear low temperature. Mandarin fish, a carnivore freshwater fish, is popular with the advantage of rich nutrition and delicious tasty. So we want to obtain a new breed through hybridization between *Oreochromis aurea* (♀) and *Siniperca chuatsi* (♂). And we finally got some progenies through this experiment.

The insemination biology in hybridization between *O. aurea* (♀) and *S. chuatsi* (♂) reveals that the sperm of *S. chuatsi* can enter the egg cytoplasm of *O. aurea*, then grow into spermaster and finally form the male pronucleus. After a while, the female and male pronucleus contact and fuse each other, and ultimately became zygote nucleus. Observing the embryonic development between the hybrid and its parents (*O. aurea* and *S. chuatsi*), we discover that the embryonic development rate of the hybrid is much closer in the early-blastula and is little slower in the late-blastula to that of *O. aurea*, but is considerably different to that of *S. chuatsi*. Although the hybridization between *O. aurea* (♀) and *S. chuatsi* (♂) is distant hybridization, this study shows that the whole process obeys the normal fertilization process and cleavage.

Key words: *Oreochromis aurea*; *Siniperca chuatsi*; Distant hybridization; Fertilization Cytology; Embryonic development