

雌核发育银鲫和两性融合发育红鲤卵母细胞成熟的细胞学比较研究*

丁 军 蒋 一 珍

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

对雌核发育银鲫和两性融合发育红鲤的卵母细胞成熟过程, 进行了详细的细胞学比较研究。

在银鲫卵母细胞成熟过程中, 绝大部分卵母细胞的核物质, 在胚泡破裂 (GVBD) 后的第一次成熟分裂时期, 出现明显的不同于红鲤卵母细胞核的行为, 其染色体逐渐清晰地分为三群, 这三群染色体的发育既彼此独立又相互联系, 最终形成一首尾相接的三极纺锤体。随后, 三极纺锤体扭转、重叠、合并成为一个正常的中期纺锤体。但极少数银鲫卵母细胞也出现了类似于红鲤卵母细胞的成熟单星光, 并进而发育成两极纺锤体, 形态类似红鲤第一次成熟分裂中期纺锤体。在银鲫上述两类卵母细胞的成熟过程中均未观察到“第一极体”外排的现象。由此, 我们确认, 银鲫卵是通过第一次成熟分裂异常, 卵核染色体不减数来维持染色体倍性的; 并且, 根据上述特殊现象, 我们对银鲫卵子第一次成熟分裂异常的机制进行了初步分析。

关键词 银鲫, 雌核发育, 红鲤, 两性融合发育, 卵母细胞, 成熟, 细胞学比较

雌核发育 (Gynogenesis) 是一种特殊的生殖现象。鱼类的天然雌核发育是通过控制卵子发生和受精后精核发育这两个过程来完成的^[7,11], 其明显特征是: 〈1〉卵核染色体倍性通过某种特殊方式保持稳定^[8,9,10]; 〈2〉入卵精子受到卵子调控系统的抑制, 精核不能发育^[7], 整个胚胎和个体发育在雌核的基础上进行^[5,6]。

目前, 对雌核发育银鲫卵子发生过程中, 卵核染色体倍性的保持方式还存在着分歧的认识, 对其机制的分析也未见报道。为此, 我们以两性融合发育的红鲤卵为对照, 对银鲫卵母细胞成熟过程进行了详细的细胞学比较研究, 以理清目前存在的分歧认识, 并为今后进一步探讨银鲫雌核发育机理打下基础。

材 料 及 方 法

材料鱼 银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 和红鲤 (*Cyprinus carpio red variety*) 均取自本所关桥试验场。

* 本研究获国家自然科学基金资助(3860590)。
1988年11月15日收到。

银鲫和红鲤的催产 在水温 19—23℃ 时进行,共重复 5 次。

分别选用发育良好的银鲫和红鲤,前后两次注射垂体激素 (GTH) 进行催产。第一次注射 6h 后进行第二次注射。银鲫和红鲤的催产效应时间约为 14—15h (水温 20—23℃)。

为在同一鱼体内得到不同成熟水平的卵母细胞,我们采用挖卵器进行体内挖卵,第一次注射后每隔 2h 取 1 次,第二次注射后每隔 1h 取 1 次,直到产卵为止;将产出的卵子人工受精并与常规催产的卵对照,发现除少数死卵外,其它卵子的受精与孵化均无异常,这说明挖出的卵子所显示的细胞学过程是正常的。将挖出的卵予以 Bouin 液固定,连续石蜡切片 (8—10 μm), De's 苏木精染色,伊红复染,然后进行细胞学观察。

结 果

(一) 红鲤卵母细胞成熟过程的细胞学观察

1. 第 IV 时相卵母细胞

红鲤第 IV 时相卵母细胞的卵核(胚泡 GV:germinal vesicle) 位于整个卵母细胞中央,核膜上有许多凹凸,胚泡周边有大量分散的核仁,整个卵母细胞充塞大量卵黄,卵黄颗粒细小,在卵内边缘部分可见到 1—2 层皮质颗粒(图版 I:1)。

2. 卵母细胞胚泡边移 (GV migration)

在第一次注射垂体激素后 6h 内,胚泡逐渐边移(图版 I:2),在边移过程中,由于核膜通透性的改变^[1],胚泡体积逐渐增加;在第二次注射垂体激素后,卵母细胞成熟进程大大加快,仅 1h,胚泡就移至紧贴受精孔部位,体积更加膨大,核液开始外溢。在胚泡变化的同时,卵母细胞质也开始逐渐向受精孔方向移动,并形成原初的动物极(图版 I:3)。

3. 红鲤卵母细胞胚泡破裂 [GV breakdown (GVBD)]

在第二次注射垂体激素后 1—2h 内,边移至动物极顶端的胚泡破裂,核质同细胞质完全混合,动物极形成。此时,染色质集中并形成一团染色较深的物质,其外围仍有核膜残留,核仁就位于这团染色质的内部,并逐渐聚合(图版 I:4)。

4. 成熟单星光 (Monaster of maturation)

在第二次注射垂体激素 2—3h 内,大部分聚合成较大颗粒的核仁排列成多层环状,环内包着一个由染色颗粒组成并具有较弱星光的团块(图版 I:5)。该染色质团块继续发育 1h 后,成为放射星光的星体,该星体内部具有一团染色体颗粒。围绕这些颗粒向四周发出长而密的星光,是为成熟单星光。此时,核仁大部分消失,少数凝聚成不规则块状存在于星光周围,包围在星光外的核膜残留物质(en.)依然存在(图版 I:6)。

5. 成熟多星光 (Polyaster of maturation)

第二次注射垂体激素 4—5h 内,成熟单星光逐渐裂解成为成熟多星光,后者呈三团放

射光芒并彼此紧密相接,染色体散状地分布于这些星光之间,此时,残留的核膜已完全消失(图版 I: 7)。

6. 第一次成熟分裂完成 (The completion of meiosis I)

第二次注射垂体激素后 5—7h 内,成熟多星光彼此逐渐靠拢,其内部的染色体颗粒开始重新排列,形成一个松散的纺锤体雏形(图版 I:8)。随后,纺锤体雏形中的染色体逐渐按微管引导的方向排列,形成第一次成熟分裂中期纺锤体(图版 I:9);与有丝分裂不同,成熟分裂纺锤体两端不具星光。在形成初期,纺锤体一般在动物极深部,随着卵母细胞的发育,逐渐向动物极前庭区移动,并与细胞表面垂直,最后,从前庭区放出第一极体 (The first polarbody) (图版 I:10),至此,卵母细胞第一次成熟分裂完成。

7. 进入第二次成熟分裂中期 (The metaphase of meiosis II) 并排卵 (Ovulation)

第一次成熟分裂完成后,染色体经迅速变化^[1],很快便进入第二次成熟分裂中期;卵母细胞从滤泡中排出即排卵(图版 I:11)。在第二次注射垂体激素 8—9h 内,红鲤产卵。产出的红鲤卵子受精后,能继续进行第二次成熟分裂并排放第二极体(图版 I:12)。

(二) 银鲫卵母细胞成熟过程的细胞学观察

细胞学观察表明,在胚泡破裂后的各发育阶段,绝大多数银鲫卵母细胞才开始呈现明显不同于红鲤卵母细胞的发育行为。

1. 成熟单星光

第二次注射垂体激素 2—3h 内,原来胚泡区域的染色质团块由聚集状态开始分裂成三群(图版 I:13)并逐渐被星光包围,形成成熟单星光。银鲫的成熟单星光与红鲤明显不同,后者为星光包围着一群染色体,而银鲫则是分离成三群染色体,每群染色体各被小星光包围,这些小星光彼此相联并共同位于一个大星光之内。此外,在成熟单星光周围及内部还可看到尚未分解的聚合成大块不规则形状的核仁物质 (NU.) (图版 I:14)。

在极少数卵母细胞中,我们还观察到类似于红鲤卵母细胞的成熟单星光,所不同的是银鲫卵内的这种单星光中,染色体仍略有分离(图版 I:15)。

2. 成熟多星光

第二次注射垂体激素 3—4h 内,原来的成熟单星光逐渐分解成清晰的三个小星光,为成熟多星光(图版 II:1)。银鲫卵的成熟多星光也与红鲤卵明显不同,后者三团星光彼此间微管联结比较紧密,染色体并未分解成三群;而在银鲫卵中,成熟多星光中的染色体明显分为三群并各自被星光包围,形成三个单独的星光,而三团星光彼此间又以微管松散地联结着。随着卵母细胞的发育,三团多星光又逐渐重新聚拢(图版 II:2)。

3. 三极纺锤体的建成

第二次注射垂体激素 4—6h,逐渐聚拢的多星光形成纺锤体雏形。与红鲤完全不同,银鲫卵的纺锤体雏形具有明显的三极性(图版 II:3,4),这种三极纺锤体雏形中染色体沿

微管走向重排,最终形成三极纺锤体(图版 II:5,6)。银鲫的三极纺锤体是由三个独立的纺锤体结构以首尾相接方式形成的一个等边三角形结构。这种三极纺锤体结构与上述染色体分为三群的现象可能有某些内在的联系。

在极少数银鲫卵母细胞中,我们还观察到类似于红鲤第一次成熟分裂中期纺锤体的两极纺锤体,该纺锤体大小与三极纺锤体基本相同(图版 II:7),都明显大于红鲤卵的纺锤体;与银鲫成熟卵的正常中期纺锤体不同之处是,上述两极纺锤体位于动物极内部,而成熟卵的纺锤体则位于动物极表层前庭区部位(图版 II:13)。

4. 三极纺锤体转变成为成熟卵中的正常中期纺锤体

第二次注射垂体激素 6—8h 内,三极纺锤体逐渐由胞质深部移至前庭区边缘,在这一边移过程中,我们观察到如下一些细胞学图象:〈1〉在同一平面上再未见到三极纺锤体,仅能看到其中两极,而且这两极间的夹角已明显改变,这可能反映了原三极纺锤体平面开始扭转,使得三个纺锤体不再位于同一平面(图版 II:8)。〈2〉一大,一小两个处于叠合状态的纺锤体,其中大的一个很可能是原三极纺锤体中的某两个纺锤体叠合后形成的。这两个大小各异的纺锤体各自呈现一极封闭,另一极开放的状态(图版 II:9)。分别处在这两个纺锤体中的染色体,经微管牵引进行重排,两个纺锤体逐渐叠合(图版 II:10)。〈3〉一个已基本重合的纺锤体,但染色体还不在同一平面,并且纺锤体另一极仍略呈开放状(图版 II:11)。〈4〉正常的中期纺锤体(图版 II:12)。这些细胞学图象表明,银鲫卵母细胞的三极纺锤体是经一系列的扭转,重叠,最终合并成正常的中期纺锤体的。这一转变过程与 Cherfas 推测的过程不同,Cherfas 认为三极纺锤体是通过丝间断裂,最后又重新排列形成正常中期纺锤体的^[8]。

在所有切片中,我们始终未观察到“第一极体”外排的现象。而银鲫卵受精后,均能正常放出一个极体(图版 II:14)。这充分证实,银鲫卵母细胞第一次成熟分裂有其异常的进程。

第二次注射垂体激素 9h 左右,银鲫产卵,未受精卵的核相呈正常中期相(图版 II:13)。

讨 论

(一) 银鲫卵子发生中卵核染色体倍性($3n$)保持的方式

迄今为止,对于雌核发育银鲫卵子发生过程中卵核染色体倍性保持方式的问题还存在着分歧的认识。Leider 认为银鲫卵子是通过在卵裂前进行核内有丝分裂来保持染色体倍性^[1]的,而 Cherfas 和 Kobayasi 则认为染色体倍性的保持是因第一次成熟分裂的中止或缺少所致^[8,9]。由于他们都未能进行详细的细胞学观察,因此,上述观点均缺乏充足的证据。

本实验以红鲤卵为对照,对银鲫卵母细胞成熟过程进行了详细的细胞学比较研究,结

1) 转自俞豪祥,1980。

果表明:绝大多数银鲫卵母细胞是以三极纺锤体扭转、重叠、合并,形成正常中期纺锤体的方式来代替通常的第一次成熟分裂的,在整个转变过程中没有整套染色体丢失或外排的现象;虽然在极少数银鲫卵母细胞中,也出现了形态类似于红鲤卵母细胞第一次成熟分裂中期相的两极纺锤体,但在这类卵母细胞中,也未观察到“第一极体”外排的现象,即未发生染色体数减半;因此,我们确认:银鲫卵子是通过第一次成熟分裂异常,卵核染色体不减数来维持染色体倍性的。

(二) 银鲫卵母细胞第一次成熟分裂异常机制的初步分析

本实验结果表明,银鲫卵母细胞的第一次成熟分裂有着特殊的发育进程:其染色体明显地分为三群,三群染色体间既有相互联系的一面,如彼此间有微管联系,又有其各自独立的一面,如每群染色体最终各自自成纺锤体。从对植物体细胞减数分裂过程的研究中,人们发现染色体分群现象是由于同源染色体不配对导致的^[4]。据此,我们也可以推测,上述银鲫卵染色体独特的分群特征可能也与其同源染色体不配对关系密切。现有资料表明,同源染色体配对的形成和稳定是由联会复合体的形成^[2,11]以及某些胞质蛋白因子的连续合成来决定的;而联会复合体本身的形式也与胞质中某些蛋白质和DNA的合成密切相关^[2];由此,可以初步认为,在银鲫卵中,某些胞质因子可能干预了同源染色体的正常配对。

Kojima 和本实验室的研究结果表明,银鲫精母细胞的同源染色体也不能正常配对^[10,1],但与卵母细胞不同的是,精母细胞的成熟分裂却经历了染色体数减半过程^[3,2]。已知细胞分裂是由细胞中染色体和胞质协同完成的。因此,具有相同染色体组的同胞雌、雄银鲫性细胞在成熟分裂中的不同分裂行为,可能是由于细胞质因子的调控作用所致。

我们的研究资料还表明,银鲫卵第一次成熟分裂中期以后各发育阶段主要包括三极纺锤体形成及其转变。银鲫卵母细胞中的三极纺锤体是由三个几乎等大的纺锤体以首尾相接方式形成,从力学角度看,这三个纺锤体彼此间应力相互抵消,整个结构处于稳定的平衡状态;细胞学观察也发现,在银鲫未受精卵中偶尔亦有三极纺锤体出现,这一图象在受精7min后的卵中仍无变化^[6],表现出一定的稳定性。要使这一稳定的结构发生一系列的转变,就必须有“外力”的作用,而处于三极纺锤体周围的胞质因子的调控作用很可能就是这一“外力”的主要来源。

综上所述,我们可以初步认为,银鲫卵中的胞质因子可能是通过对诸如同源染色体配对、成熟分裂过程纺锤体转变等重要环节进行调控,来达到控制银鲫卵第一次成熟分裂的。

此外,在极少数银鲫卵母细胞中,也出现了类似于红鲤卵母细胞的成熟单星光和两极纺锤体。从成熟单星光中染色体仍略为分群的现象似乎可以推论:上述特殊细胞学图象的产生可能是由于胞质调控因子的活性太低,不足以造成诸如染色体明显分为三群等效应,从而导致了胞质因子的控制作用失败。关于上述两极纺锤体的发育趋势及其生物学意义,我们还不甚了解,从现有资料看,这类卵子也没有极体排放的现象,因此,我们推测,这类纺锤体可能与 Kobayasi 所观察到的中期纺锤体^[9]是同一现象。

1) 本实验室,1990,(未发表资料)。

2) 丁军,1988。雌核发育银鲫和两性融合发育红鲤卵子发生的比较细胞学研究,硕士毕业论文。

上述关于银鲫卵母细胞第一次成熟分裂异常的调控机制仅是一个初步分析，对此还有待深入的研究，这将是最终阐明雌核发育机理的关键之一。

参 考 文 献

- [1] 朱洗、王幽兰,1962。金鱼和鳊鱼卵球成熟的细胞学研究。实验生物学报,8(1): 1—33。
- [2] 王瑞丰译,(伊藤道夫著),1979。减数分裂。科学出版社。
- [3] 沈俊宝、范兆廷、李素文、成汝渲、薛绍白,1984。方正银鲫与扎龙湖鲫体细胞、精子的 DNA 含量及倍性的比较研究。动物学报,30(1): 7—13。
- [4] 郑国锠,1980。细胞生物学。320—321。人民教育出版社。
- [5] 周嘉申、沈俊宝、刘明华,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。
- [6] 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。
- [7] 葛伟,蒋一珪,1985。雌核发育银鲫卵抑制异源精子原核化作用模式初探。水生生物学报,9(3): 203—210。
- [8] Cherfas, N. B., 1966. Natural triploid in females of the unisexual form of goldfish (*Carassius auratus gibelio*). *Genetika*, (5): 16—24.
- [9] Kobayasi, H., 1976. A cytological study on the maturation division in the oogenetic process of the triploid ginbuna (*Carassius auratus longsdorffii*). *Jpn J. Ichthy*, 22: 234—240.
- [10] Kotsuaki kojima, Takao kajishima, Kiyotaka matsumura, and Maho kawashima, 1983. Gametogenesis of the polyploid ginbuna, *Carassius auratus longsdorffii*. *Zool. Magazine*, 92(4): 510. (Abstract, in Jpn.).
- [11] Monaco, R. J., 1984. Apomictic reproduction in the amozon molly: *Poecilia formosa* and its triploid hybrids. In "evolutionary Genetic of Fish" (Turner, J. B., eds), pp 311—325.

COMPARATIVE CYTOLOGICAL STUDIES ON THE OOCYTE MATURATION IN GYNOGENETIC CRUCIAN CARP AND AMPHIMICTIC RED CARP

Din Jun and Jiang Yigui

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan, 430072)

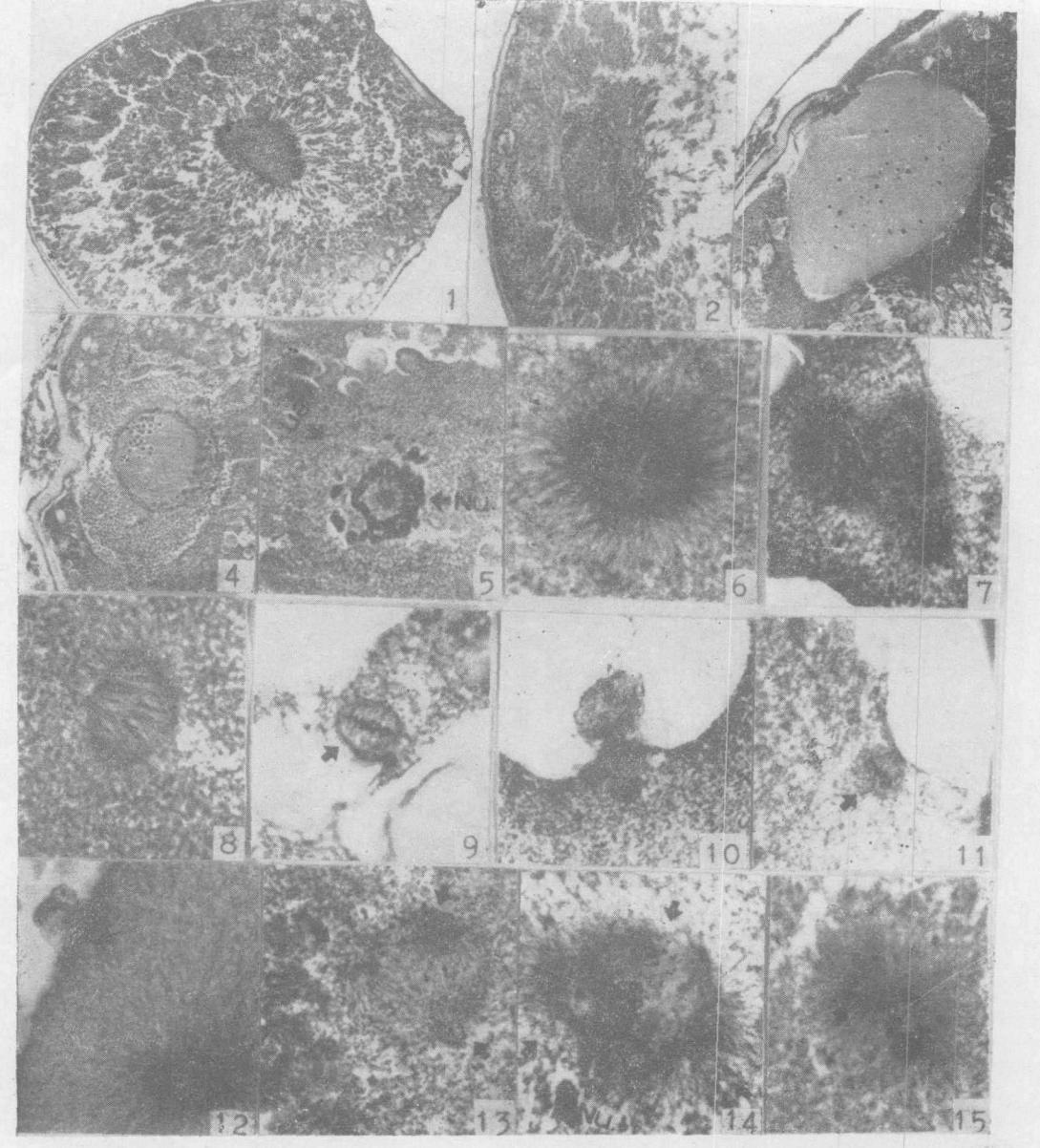
Abstract

The present study compared the oocyte maturation in gynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) and amphimictic red carp (*Cyprinus carpio* red variety).

After GVBD, the GV materials in the most oocytes of crucian carp showed behaviors different from those in the red carp during meiosis I. The chromosomes in the most oocytes of crucian carp were divided into three interrelated, but independent groups. The three groups of chromosomes finally developed into a tripolar spindle. Later, The tripolar spindle twisted, overlapped and finally reunited into a normal spindle. In a few oocytes of crucian carp, however, there were common dipolar spindle similar to that in the red carp.

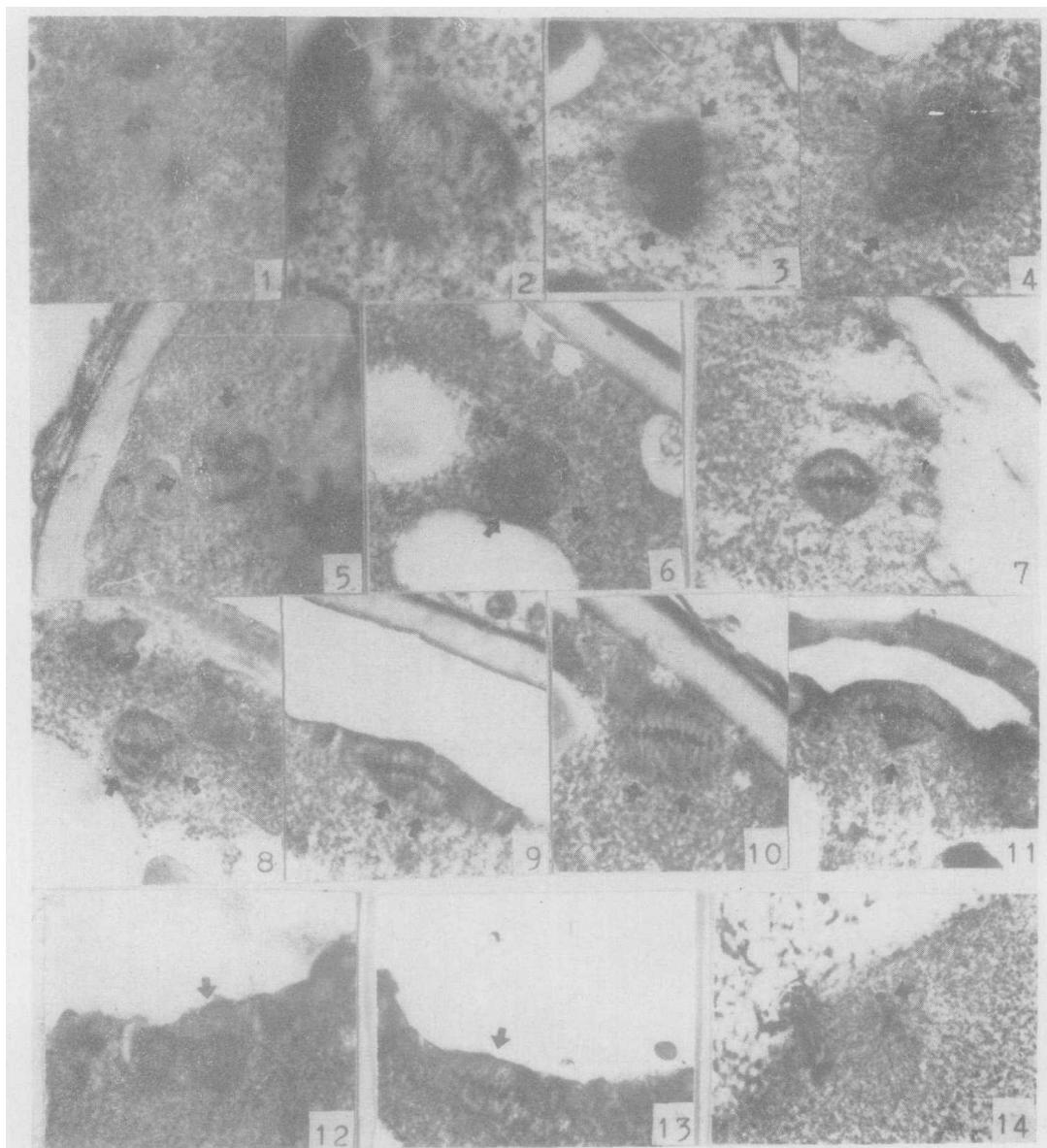
In both types of oocyte maturation in the crucian carp, the extrusion of the first polar-body was not observed. Thus there was no reduction of the chromosomal number in this fish. It was concluded that the stability of chromosomal ploidy in the crucian carp was maintained through the unusual meiosis I during which there was no reduction in the chromosomal number. We speculated that some cytoplasmic factors in the oocyte may play an important role in controlling the meiosis I in the oocyte maturation of crucian carp.

Key words Crucian carp (*Carassius auratus gibelio*), Gynogenesis, Red carp *Cyprinus carpio* red variety), Amphimixis, Oocyte, Maturation, Comparative cytological studies



红鲤卵母细胞(图 1-12): 1.IV 时相卵母细胞, $\times 70$; 2.卵母细胞胚泡边移, $\times 70$; 3.胚泡边移至受精孔下方,且其体积增大,核液外溢, $\times 140$; 4.胚泡破裂,染色质形成团状,核仁开始集群, $\times 140$; 5.核仁(NU.)多层环绕具较弱星光的染色质团块,外围仍存在核膜(en.)的残留物(箭头所示), $\times 280$; 6.成熟单星光, $\times 700$; 7.成熟多星光, $\times 700$; 8.第一次成熟分裂中期纺锤体雏形, $\times 700$; 9.第一次成熟分裂中期纺锤体, $\times 700$; 10.排出第一极体, $\times 700$; 11.第二次成熟分裂中期纺锤体, $\times 700$; 12.排出第二极体, $\times 700$; 银鲫卵母细胞(图 13-15): 13.胚泡破裂后,染色质团块逐渐分成三群(箭头所示), $\times 700$; 14.成熟单星光[箭头示三群染色体和核仁(NU.)], $\times 700$; 15.特殊类型的成熟单星光(箭头示分离的染色体), $\times 700$

Oocyte of red carp (Fig. 1—12): 1. Oocyte in phase IV, $\times 70$; 2. Germinal vesicle migration, $\times 70$; 3. GV migrating under micropyle, its volume increased and the materials in GV overflowed, $\times 140$; 4. GV breakdown (GVBD), the chromatin was formed into a block and nucleolus started to aggregate together, $\times 140$; 5. After GVBD, the polymerizing nucleolus was arranged into poly-layer loops (arrow), the particles of chromosome were surrounded by the loops and radiated light aster, and the residual envelop membrane (en) were still present, (arrow), $\times 280$; 6. Monaster of maturation, $\times 700$; 7. Polyaster of maturation, $\times 700$; 8. The embryonic form of spindle in the metaphase of meiosis I, $\times 700$; 9. The spindle in the metaphase of meiosis I (arrow), $\times 700$; 10. Extrusion of the first polarbody, $\times 700$; 11. The spindle in the metaphase of meiosis II (arrow), $\times 700$; 12. Extrusion of the second polarbody, $\times 700$. Oocyte of crucian carp (Fig. 13—15); 13. After GVBD, the chromatin began to divide into three groups (arrow), $\times 700$; 14. Monaster of maturation (the arrows indicating nucleolus and three groups of chromosome respectively), $\times 700$; 15. A special type of monaster(the arrow indicating the separated chromosome), $\times 700$



银鲫卵母细胞(图 1-14): 1. 成熟多星光, $\times 700$; 2. 成熟多星光的三团染色体在星光牵引下开始聚拢, $\times 700$; 3,4. 三极纺锤体雏形, $\times 700$; 5,6. 三极纺锤体, $\times 700$; 7. 极少数卵母细胞中的两极纺锤体, $\times 700$; 8—12. 示三极纺锤体转变成成熟卵中的正常中期纺锤体的过程, 箭头示转变过程中的纺锤体, $\times 700$; 13. 银鲫未受精卵中的中期纺锤体, $\times 700$; 14. 银鲫卵受精后排出极体, 箭头示固缩的精核, $\times 700$

Oocyte of crucian carp (Fig. 1—14): 1. Polyaster of maturation, $\times 700$; 2. The three groups of chromosome in the polyaster got together gradually by the action of fibers (arrow), $\times 700$; 3,4. The embryonic form of tripolar spindle, $\times 700$; 5,6. Tripolar spindle, $\times 700$; 7. The dipolar spindle in a few of oocytes, $\times 700$; 8—12. The processes of transforming tripolar spindle into the normal spindle (the arrow indicating the spindle in the transforming processes), $\times 700$; 13. The normal spindle in the unfertilized eggs, $\times 700$; 14. The polarbody extrusion after fertilization (the arrow indicating the condensed spermatozoon), $\times 700$