

彭泽鲫的受精细胞学

赵振山 高贵琴 黄峰 孙小强

(华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

摘要 对彭泽鲫(♀)与兴国红鲤(♂)受精细胞学所作研究表明,彭泽鲫属雌核发育种群。异源精子能正常进入彭泽鲫卵子内,受精卵中异源精子呈凝缩状态,不形成雄性原核,没有看到两性原核融合。在刚产出的成熟卵子中没有看到极体,受精后12min(水温 $26 \pm 1^\circ\text{C}$)见到唯一的一个极体排出,雌性原核自行发育。雌性彭泽鲫几种交配组合繁殖实验表明,同源精子、异源精子、灭活异源精子均能人卵刺激卵核正常胚胎发育,未见畸形苗和杂种性状,仔鱼生长发育正常。

关键词 彭泽鲫,雌核发育,受精细胞学,精子

中图分类号 S917.4, Q953

雌核发育是鱼类有性生殖中的一种特殊生殖方式。雌核发育依赖于血缘关系相近的雄性提供的精子激活卵子发育,但不发生雌雄原核的融合,是一种无融合或假融合的生殖方式。目前,已发现亚马逊河的花鲢科鱼类 *Poecilia formosa*、欧洲的银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)、*Poeciliopsis* 属的某些类型[范兆廷和宋苏祥 1993]以及我国黑龙江省方正县双风水库的银鲫[周嘉申等 1983, 俞豪祥 1982]、河南省的淇河鲫[楼允东等 1989]、广东省翁源县的缩骨鲫[俞豪祥等 1987]和贵州省普安县的普安鲫(A型)[俞豪祥等 1992]是行雌核发育的鱼类。彭泽鲫 (*Carassius auratus pengzeensis*) 原产于江西省彭泽县丁家湖、芳湖和太白湖等天然水体中,杨兴棋等[1991]曾通过染色体组型研究初步认为彭泽鲫(F₃)是两性型天然雌核发育的生殖方式,而傅永进[1995, 1996]则认为“彭泽鲫是我国第一个直接从二倍体野生鲫中选育出的优良养殖新品种”,属正常的二倍体鱼。本文通过对彭泽鲫(♀)和兴国红鲤(♂)的受精生物学研究,从细胞学角度进一步证实彭泽鲫属雌核发育种群。

1 材料与方方法

1.1 材料

彭泽鲫原种引自江西省九江市水产研究所经6代选育后的后代,兴国红鲤由本校水产试验站提供,属兴国红鲤原种后代。选取体格健壮,性腺发育良好的亲本进行人工催产,雌鱼的催产剂量为 HCG1200IU,雄鱼减半,效应时间12h。

1.2 彭泽鲫(♀)与兴国红鲤(♂)受精细胞学研究方法

催产出的彭泽鲫成熟卵子与兴国红鲤精子进行人工受精, $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 控温孵化。受精前取彭泽鲫末受精卵50粒左右作对照组。受精后每隔3min 取样一次, 直到第一次卵裂完成。取样数量为50粒左右。每组取样后立即用 Bouin 氏液固定编号。受精卵固定20h 后脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 厚度为 $8\mu\text{m}$, Ehrlich 苏木精染色, 伊红复染, 并进行显微摄影。

1.3 彭泽鲫的几个交配组合繁殖实验方法

取彭泽鲫(♀)×彭泽鲫(♂)、彭泽鲫(♀)×兴国红鲤(♂)、彭泽鲫(♀)×兴国红鲤(精子灭活)三种组合的受精卵人工孵化, 计算其受精率、孵化率、仔鱼存活率, 并进行胚胎发育和胚后发育观察。

兴国红鲤精子的灭活方法参照蒋一珪等[1982]的方法, 将精子挤入 Hank 氏液中, 在30W 紫外灭菌灯下照射2h, 照距20cm, 使雄核遗传失活。

2 实验结果

2.1 彭泽鲫(♀)×兴国红鲤(♂)受精生物学

2.1.1 受精之前

彭泽鲫卵呈球形、淡黄色, 遇水后有很强的粘性。卵径约1mm, 在胚盘中央可见卵膜上有一明显凹陷, 凹陷中央有一圆孔, 这就是精子入卵的通道——受精孔(图版-1)。彭泽鲫具单一受精孔。动物极和植物极开始时不明显, 随着卵的发育逐渐明显。

2.1.2 受精后3~9min

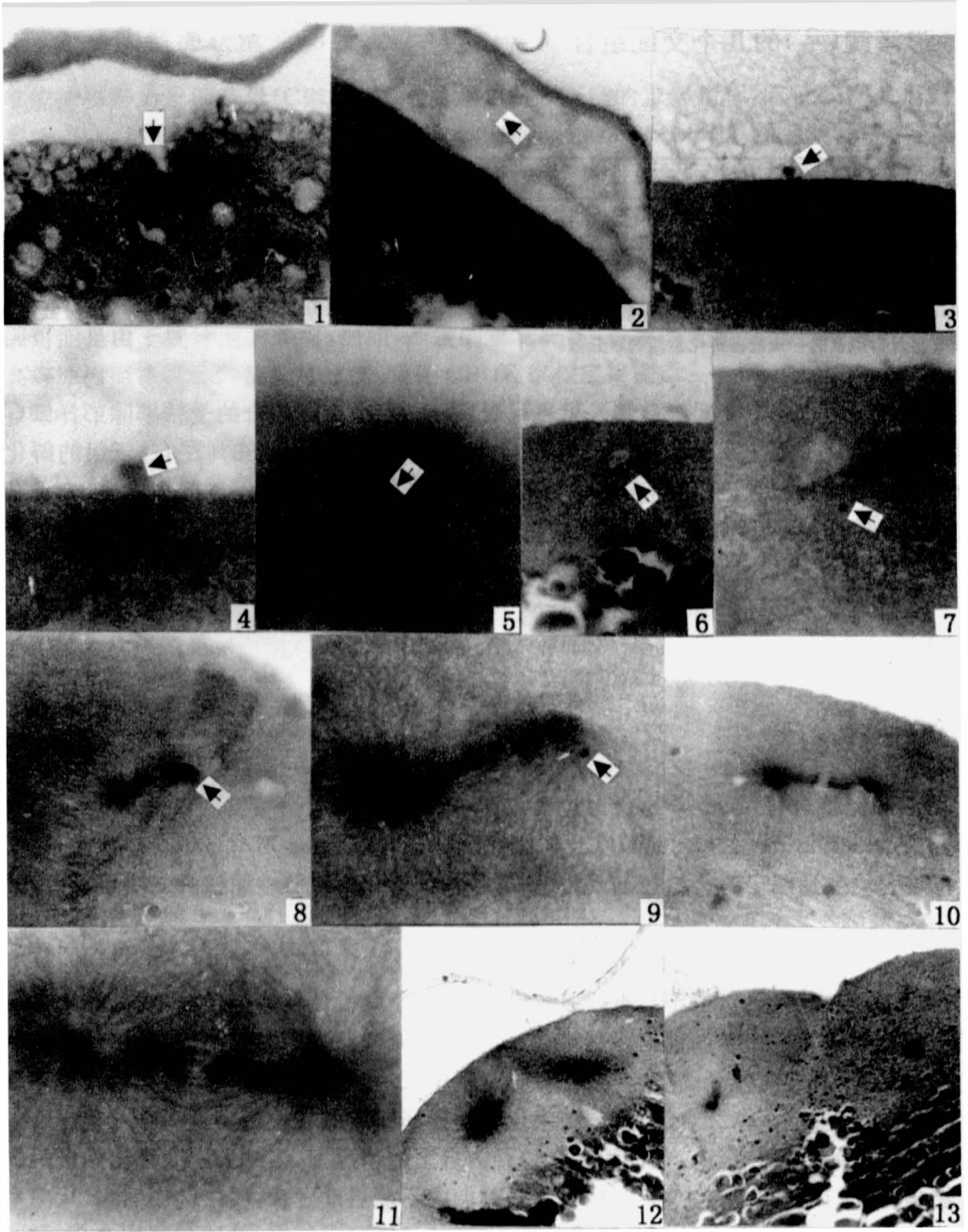
入水3min 的受精卵可见成熟分裂中期的纺锤体, 这时未见外排的极体。6~9min 可见到成熟分裂末期的纺锤体, 染色体分成两组, 仍未见到极体, 也未见到三极纺锤体。

2.1.3 受精后12~24min

受精卵入水12min, 卵周隙约 $55 \sim 74\mu\text{m}$, 在卵周隙内可以看到由卵内排出的物质(图版-2)。受精卵入水后12~15min 清晰可见极体排出, 极体呈圆球状(图版-3~4)。雌性原核旁清晰可见呈凝缩状的精核(图版-5)。受精后18~24min, 雌性原核吸水膨胀成泡状, 长轴约 $16\mu\text{m}$, 核旁精核仍高度固缩, 没有解凝(图版-6~7)。

2.1.4 第一次卵裂在受精后27~51min

受精卵入水30min 后发育至第一次有丝分裂中期, 两纺锤体间距约 $49\mu\text{m}$, 染色体排列在赤道板上清晰可见, 精核仍在纺锤体侧旁呈固缩状(图版-8~9)。受精卵入水33min, 染色体明显分成两组, 进入有丝分裂后期(图版-10~11)。受精卵入水42min, 雌性原核发育到有丝分裂末期, 子核出现(图版-12)。入水51min, 已卵裂至2细胞, 卵裂沟呈凹陷状, 第一次有丝分裂结束(图版-13)。



图版 Plate

1. 未受精的在卵膜凹陷处有一漏斗状的受精孔。 $\times 400$ (箭头)； 2. 受精后12min 卵周隙内充满着由卵内排出的物质。 $\times 400$ (箭头)； 3. 受精后12min, 雌核排出极体。 $\times 400$ (箭头)； 4. 图3的放大。 $\times 1000$ ； 5. 受精后15min, 固缩的精核位于雌性原核旁。 $\times 1000$ (箭头)； 6. 受精后24min, 雌性原核呈椭圆形, 固缩的精核位于雌核一侧。 $\times 400$ (箭头)； 7. 图6的放大。 $\times 1000$ ； 8. 受精后30min, 进入第一次有丝分裂中期, 精核位于纺锤体一侧。 $\times 400$ (箭头)； 9. 图8的放大。 $\times 1000$ ； 10. 受精后33min, 第一次有丝分裂后期, 雌核染色体移向两极。 $\times 400$ ； 11. 图10的放大。 $\times 1000$ ； 12. 受精后42min, 第一次有丝分裂末期。 $\times 200$ ； 13. 受精后51min, 第一次卵裂结束。 $\times 200$ 。

2.2 彭泽鲫(♀)的几个交配组合

表1 雌性彭泽鲫的繁殖试验

Tab. 1 Experiment on reproduction of female *C. auratus pengzesis*

交配组合(♀×♂)	试验卵(粒)	受精卵(粒)	受精率(%)	孵化率(%)	仔鱼存活率(%)
彭泽鲫×彭泽鲫	492	416	84.8	92	87.2
彭泽鲫×兴国红鲤	425	365	85.9	89	89.4
彭泽鲫×兴国红鲤(灭活)	471	307	65.1	84.2	89.0

注:受精率为发育至高囊胚期的受精卵数占试验卵总数的百分数;孵化率为孵化仔鱼数占受精卵的百分数;仔鱼存活率为发育至开口摄食的仔鱼数占孵化鱼苗的百分数。

雌性彭泽鲫的几个交配组合结果见表1。表1表明:三个交配组合的受精率除彭泽鲫(♀)×兴国红鲤灭活精子组的受精率为65.1%外,其他两组基本相近,达85%左右。三组的孵化率依次为92%、89%、84.2%,仔鱼的存活率为87.2%~89.4%,所有子代与母本相似,未见杂种性状,经紫外线照射精液受精组亦未出现辐射雌核发育单倍体综合症,所有受精卵均能进行正常的胚胎发育,仔鱼生长发育良好。

3 讨论

3.1 关于精核

在正常受精过程中,精子的行为包括入卵(Penetration)、精核解凝(Decondensation)、原核形成(Formation of pronucleus)以及与雌性原核融合(Fusion of female pronuclei),所有这些发育过程均受到卵子的严格控制,精核解凝是精核活化形成雄性原核的先决步骤[葛伟和蒋一珪 1985]。

彭泽鲫(♀)与兴国红鲤(♂)的受精细胞学特点是异源精子入卵后精核不解凝,一直呈凝缩状态,不形成雄性原核,也不与雌性原核融合,而位于雌性原核侧旁,这表明彭泽鲫(♀)与兴国红鲤(♂)的细胞生物学过程始终受雌性原核控制,雄性原核不参与细胞有丝分裂,表现为典型的雌核发育过程。从彭泽鲫(♀)与兴国红鲤(精子灭活)杂交的结果来看,其后代也表现为母性性状,并未出现单倍体综合症,这一结果也表明彭泽鲫属雌核发育类型。

葛伟等[1992]研究报道,在种间杂交和种内自繁的情况下,银鲫分别表现出两种不同的受精生物学特征。在种间杂交中,异源精子在银鲫卵中不能启动发育,精核高度固缩,从而呈现出典型的雌核发育过程,而在种内自繁情况下,同源精子则可以解凝,并能与卵核结合,但这种解凝精核不能进一步充分发育转化为雄性原核,可以认为这是一种介于典型的雌核发育和两性融合生殖之间的中间类型。本实验证实彭泽鲫在种间杂交中染色质不解凝,与葛伟和蒋一珪[1985]研究方正银鲫与兴国红鲤的受精生物学结果相类似。另外,彭泽鲫(♀)与兴国红鲤(♂)杂交后代中没有出现杂交性状,进一步证实彭泽鲫卵能够通过抑制异源精子发育,阻止异源物质进入卵核,保证了种的特征的相对稳定。至于彭泽鲫的雌核发育在种内自繁过程中是否会有类似银鲫的部分融合现象,有待进一步研究。

3.2 关于减数分裂的次数

雌核发育鱼类世代间能维持染色体数目的稳定,其生殖细胞学机制相当复杂。日本学者小林弘认为银鲫的卵母细胞在成熟过程中只进行一次同型核分裂,未发现三极纺锤体,因此认为只有一次减数分裂[杨兴棋 1981]。周嘉申等[1983]对黑龙江银鲫的细胞学研究发现,受精后卵子仅排出一个极体,卵子只进行一次减数分裂。Cherfas[1966]却认为雌核发育三倍体银鲫具有两次成熟分裂,但第一次减数分裂时同源染色体之间不配对,形成三极纺锤体,至排卵时进行第二次减数分裂,三极变成两极,接着排出第二极体,卵核的染色体仍保留三套染色体。丁军和蒋一珪[1991]则认为,大多数银鲫卵母细胞是以三极纺锤体扭转、重叠、合并而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现象,并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三倍性的。叶玉珍和吴清江[1994]在研究人工复合三倍体鲤卵的受精生物学时,未发现三级纺锤体结构的存在,在受精卵切片中也只看到一个极体。根据对彭泽鲫(♀)与兴国红鲤(♂)的受精细胞学切片观察,受精卵仅排出一个极体,亦未见三极纺锤体,这与小林弘所作研究,杨兴棋[1981]以及周嘉申等[1983]、叶玉珍和吴清江[1994]的结果相类似。

陈敏容等[1996]证实,彭泽鲫染色体数目变异幅度较大,众数百分数较低,并具有较多小染色体的特殊现象,这种现象可能与其生殖方式和繁殖生物学有某种联系。本结果表明彭泽鲫属典型的雌核发育类型,而傅永进[1995,1996]通过其性比和形态特征认为彭泽鲫属正常二倍体鱼的结论值得探讨,至于彭泽鲫与兴国红鲤杂交是否会出现异育银鲫那样的生长优势现象以及发育过程中染色体数目的变化情况等有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 丁 军,蒋一珪. 1991. 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. 水生生物学报,15(2):97~102
- 叶玉珍,吴清江. 1994. 人工复合三倍体鲤卵的受精生物学研究. 水生生物学报,18(18):17~21
- 范兆廷,宋苏祥. 1993. 鱼类的雌核发育、雄核发育和杂种发育. 水产学报,17(2):179~187
- 杨兴棋(译). 1978. 鲫鱼的分类以及银鲫中所见到雌核发育的细胞遗传学研究. 淡水渔业,1981(1):36~40
- 杨兴棋,陈敏容,俞小牧等. 1991. 江西彭泽鲫生殖方式的初步研究. 水生生物学报,16(3):277~280
- 陈敏容,杨兴棋,俞小牧等. 1996. 两性型天然雌核发育彭泽鲫染色体组型的研究. 水生生物学报,20(1):25~31
- 周嘉申,沈俊宝,刘明华. 1983. 黑龙江一种银鲫(方正银鲫)雌核发育的细胞学初步探讨. 动物学报,29(1):11~16
- 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):481~485
- 俞豪祥,张海明,林莲英. 1987. 广东雌核发育鲫鱼的生物学及养殖试验的初步研究. 水生生物学报,11(3):287~288
- 俞豪祥,徐 皓,关宏伟等. 1992. 天然雌核发育贵州普安鲫(A型)染色体组型的初步研究. 水生生物学报,16(1):87~88
- 葛 伟,蒋一珪. 1985. 雌核发育银鲫卵抑制异源精子原核化的作用模式初探. 水生生物学报,9(3):203~208
- 葛 伟,单仕新,蒋一珪. 1992. 雌核发育银鲫的受精生物学研究——天然雌核发育银鲫繁殖方式的讨论. 水生生物学报,16(2):97~100
- 蒋一珪,俞豪祥,陈本德等. 1982. 鲫鱼的人工和天然雌核发育. 水生生物学集刊,7(4):471~476
- 傅永进. 1995. 彭泽鲫的养殖特点及养殖方法. 江西水产科技,(2/3):55~56
- 傅永进. 1996. 彭泽鲫的生物学性状及养殖技术. 淡水渔业,26(2):25~26
- 楼允东,张英培,翁忠惠等. 1989. 淇河鲫鱼细胞遗传学和同工酶的初步研究. 水产学报,13(3):254~258
- Cherfas N B. 1966. Natural triploid in female of the goldfish (*Carassius auratus gibelio*). Genetica, 12(5):16~24

FERTILIZATION CYTOLOGY OF *CARASSIUS AURATUS PENGZESIS*

ZHAO Zhen-Shan, GAO Gui-Qin, HUANG Feng, SUN Xiao-Qiang
(Fisheries college, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

ABSTRACT The fertilization cytology of *Carassius auratus pengzesis* (♀) and *Cyprinus Carpio* L. red variety (♂) indicates that the population of *C. auratus pengzesis* do reproduce by gynogenesis. The heterologous sperm can normally enter the egg cytoplasm of *C. auratus pengzesis*. The sperm nucleus remains as a condensed mass and can not transform into male pronucleus, and no amphimixis was observed. No polar body was found in the ripe egg cells just after spawning. About 12 minutes after insemination (at water temperature of $26 \pm 1^\circ\text{C}$), only one polar body was extruded. The development of eggs could proceed with gynogenetic way. The experiment of female *C. auratus pengzesis* crossed with male *C. auratus pengzesis* and *C. carpio* L. red variety shows that all the homologous sperm, heterologous sperm and inactive heterologous sperm can enter eggs and stimulate female pronucleus normal development into embryos. No deformed fry and hybridization features were found. The fry developed normally.

KEYWORDS *Carassius auratus pengzesis*, gynogenesis, fertilization cytology, sperm