

杂色鲍 ♀ × 盘鲍 ♂ 杂交受精的细胞学研究

蔡明夷^{1*}, 柯才焕^{1**}, 游伟伟¹, 王桂忠¹, 王志勇², 王艺磊²

(1. 厦门大学海洋学系, 近海海洋环境科学国家重点实验室(厦门大学), 福建 厦门 361005;

2. 集美大学水产生物技术研究所, 福建 厦门 361021)

摘要: 应用组织学方法, 研究了杂色鲍 ♀ × 盘鲍 ♂ 种间杂交受精过程的核相变化, 结果表明杂色鲍 ♀ × 盘鲍 ♂ 种间杂交受精主要表现出两性融合的特点. 盘鲍精子进入杂色鲍卵子, 9 min 后中心粒发育为星光; 精子头部逐渐膨大、液化形成雄性原核, 39 min 后与雌性原核会合, 而后融合. 约 3.2 % 的受精卵中观察到 1 个受精卵中同时存在 3 个即将融合的原核, 这可能是多精入卵或卵子染色体组自发加倍的结果. 42 min 后开始第 1 次有丝分裂, 此时在极个别发育卵中发现固缩的染色质小体、微核、或分离不同步的染色体.

关键词: 种间杂交; 受精细胞学; 杂色鲍; 盘鲍; 雌核发育

中图分类号: Q 32; Q 959.215 **文献标识码:** A

文章编号: 0438-0479(2007)02-0239-05

由于不同亲本基因组可能存在复杂的相互作用, 种间杂交 F₁ 可能是含有双亲基因的异源二倍体、三倍体或四倍体, 也可能是雌核发育和雄核发育. 遗传本质不同的杂交后代在水产生物育种和种质创新中有着不同的用途, 如引入其他物种的优良基因, 创造新的物种, 诱导雌核发育, 生产不育群体等^[1-4]. 因此, 要分析种间杂交后代的应用前景、确定管理方法, 首先要判断杂交后代的遗传本质. 杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 和盘鲍 (*H. discus discus*) 是我国最重要的两种养殖鲍, 经济价值极高. 柯才焕等^[5] 进行杂色鲍和盘鲍种间杂交试验, 并培育了种间杂交 F₁. 对杂色鲍 ♀ × 盘鲍 ♂ 杂种 F₁ 形态学及分子遗传学分析结果表明, 杂交 F₁ 在形态和遗传上接近母本的特点, 推测为雌核发育体^[6]. 因此, 本文研究了杂色鲍 ♀ × 盘鲍 ♂ 杂交受精过程的核相变化, 为确定杂色鲍 ♀ × 盘鲍 ♂ F₁ 的遗传本质及其发生机理提供细胞学依据.

1 材料与方法

1.1 材料

杂交亲本杂色鲍和盘鲍均取自福建省东山海田有限公司. 雌性亲本杂色鲍为台湾省引进并多代自繁后代, 平均壳长 59 mm. 雄性亲本盘鲍为日本引进并多代自繁后代, 平均壳长 92 mm.

1.2 方法

杂交授精于 2004 年 10 月下旬在福建东山海田有限公司东山亲育苗室进行, 水温 24 °C. 亲贝催产采用阴干、紫外线照射过海水刺激和流水刺激的方法. 配子开始排放时, 将正在排放的亲鲍分别转移到单独的容器中产卵、排精. 精子排放到一定浓度后, 收集精子, 并用血球计数板计数后备用. 卵子一排放立即收集, 并立刻与新鲜盘鲍精子混合, 杂交授精精子浓度控制在 10⁷ 个/mL 左右. 精卵混合前, 取 2~3 mL 未授精的卵子固定; 精卵混合后 60 min 内, 每 3 min 取 2~3 mL 受精卵固定. 所取样品均用 Bouin's 液固定; 样品沉降稳定后, 更换一次固定液. 按张中英^[6] 方法进行脱水, 石蜡包埋, 连续切片厚度 6 μm, Harris 氏苏木精染色, 伊红复染, 中性树胶封片, 显微镜观察拍照.

2 结果

2.1 配子与受精率

杂色鲍卵子呈圆球状, 直径约 180~210 μm, 处于第一次成熟分裂中期, 染色体染成深蓝色, 整齐地排列在赤道板中央. 纺锤体一端靠近卵子动物极的质膜, 并与该部位卵膜垂直 (图版 F1). 卵外未发现极体. 个别卵子胚泡未破裂, 卵核位于胚泡中央. 卵膜外的盘鲍精子头部被染成深蓝色, 长轴约 3.2 μm 长, 颈部着浅红色. 杂交受精率为 26.0 % ± 8.7 %.

2.2 精子附卵与入卵

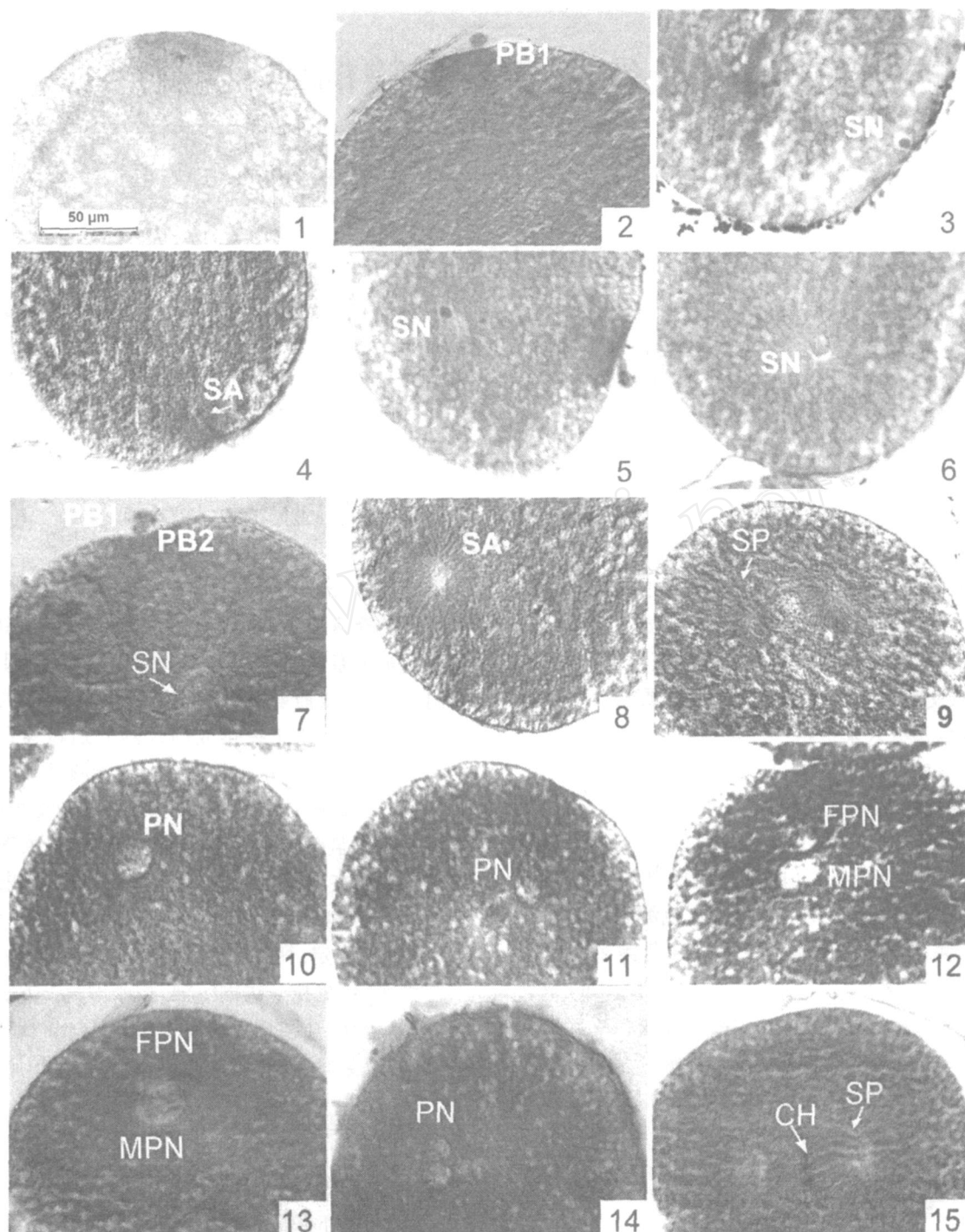
授精后 3 min, 精子粘附在卵子表面, 并表现出粘附不均匀的特点. 不同卵子粘附的精子数量不同; 同一个卵子表面不同位置粘附的精子数量也不同.

收稿日期: 2006-10-23

基金项目: 国家 863 计划课题 (2003AA603240) 资助

* 现在集美大学水产生物技术研究所工作

** 通讯作者: chke@xmu.edu.cn



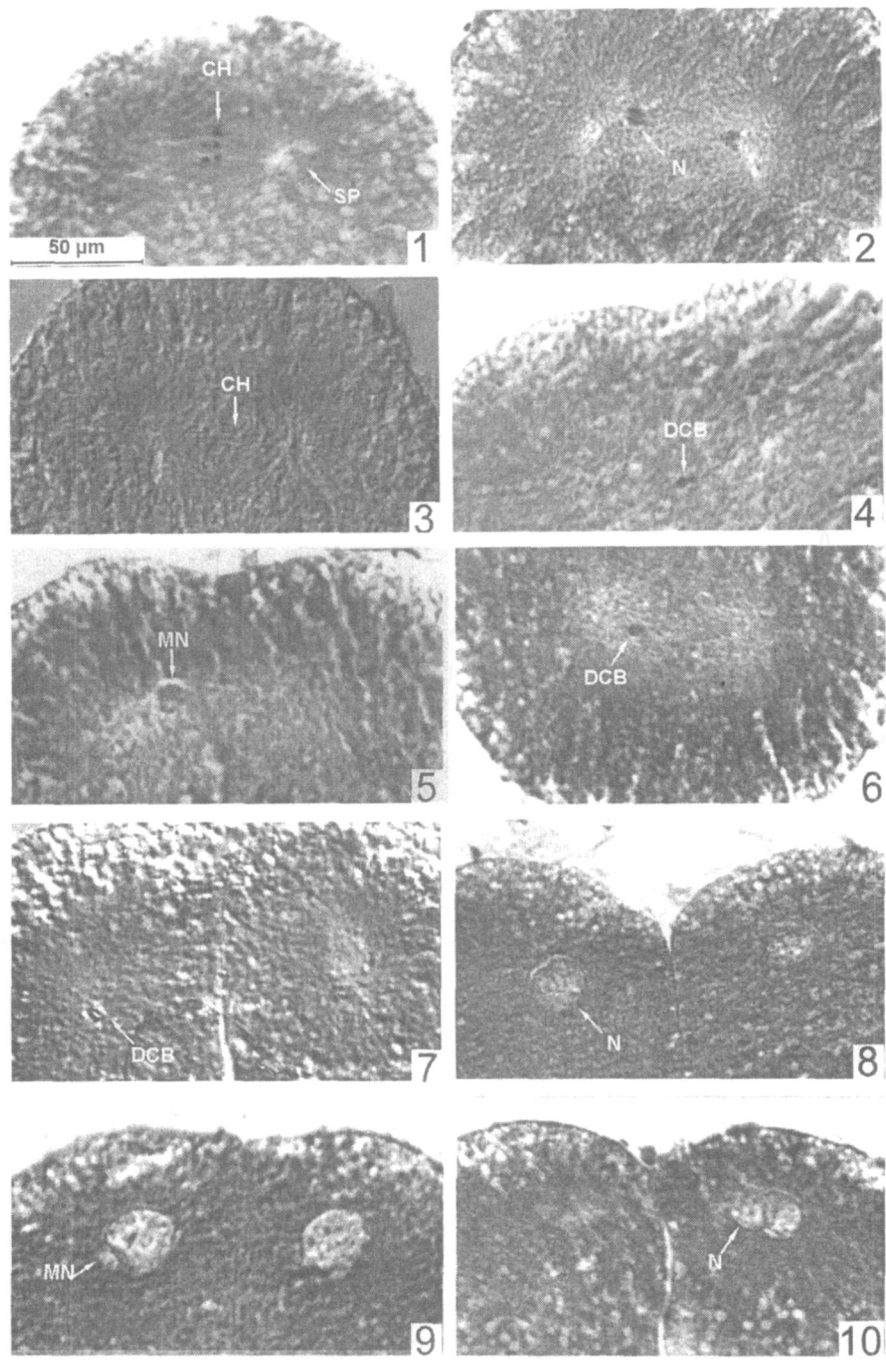
图版 I 杂色鲍♀×盘鲍♂杂交的受精过程

PB1, 第一极体; PB2, 第二极体, SN, 精核; SA, 精子星光; SP, 纺锤体; PN, 原核; FPN, 雌性原核; MPN, 雄性原核

Plate I Process of insemination for the cross of *Haliotis diversicolor* ♀ × *H. discus discus* ♂

授精后 6 min, 入卵精子头部膨大为圆球状(图版 F3), 外包液泡状结构. 此时, 卵子已排出第 1 极体(图版 F2). 授精后 9 min, 精子附近出现幼稚星光, 精子头部已开始解凝为着色深的不规则形结构(图版 F4). 授精后 15~21 min, 卵子完成第二次减数分裂, 排出第二极体; 精核与星光(SA)移动到卵中部(图版 F5). 授

精后 18 min, 精核(SN)逐渐膨大(图版 F6, 7), 此时大部分有极体的卵子上只观察到单个极体, 只在少数卵子上同时存在两个极体. 与此同时, 精子星光不断发育, 授精后 24 min, 双生子星光体增大(图版 F8). 授精后 27 min, 双生子星光分开, 分列于雄性原核的两侧(图版 F9).



图版 II 杂色鲍 ♀ × 盘鲍 ♂ 杂交第一次有丝分裂的细胞核行为
DCB, 固缩染色质小体; CH, 染色体; N, 细胞核; MN, 微核
Plate II Nuclear behavior of the first mitosis of interspecific hybridization between *Haliotis diversicolor* ♀ × *H. discus discus* ♂

2.3 雌雄原核的形成与融合

授精后 27~30 min,可观察到单个原核,直径约为 28 μm. 原核附近未发现类似染色质小体的致密深染结构(图版 F9,10).

授精后 30 min,雌、雄原核彼此接近,个别受精卵中雄性原核液化程度弱于雌性原核(图版 F11,12). 授精后 33~39 min,观察到雌雄原核已接触,部分两原核已紧密结合在一起,呈两个紧靠的半月状结构,长轴

约 24 μm 长,短轴约 14 μm 长. 两原核液化和着色程度一致,星光位于接触面相对两边. 双原核附近未发现类似染色质小体致密的深染结构(图版 F13,14). 约在 3.2 %受精卵中观察到 1 个受精卵并存到 3 个即将融合的原核(图版 F14).

2.4 第一次有丝分裂

授精后 42 min,核膜消失,有丝分裂纺锤体已形成,染色体排列在赤道板上,进入第一次减数分裂中期

(图版 F15). 授精后 42~45 min, 姐妹染色单体分开, 逐渐向两极移动, 进入第一次有丝分裂后期(图版 IF-1, 2). 在个别发育卵中观察到染色体向两极移动的速度不等, 部分染色体滞后(图版 IF-3). 授精后 48 min, 开始卵裂, 进入第一次有丝分裂末期. 在个别切片中观察到在 2 个核区之间出现固缩染色质小体(图版 IF-4, 6, 7). 授精后 45~60 min, 卵球完全分裂, 形成新的核膜(图版 IF-8). 此时在个别切片中, 发现细胞核旁存在微核(图版 IF-5, 9, 10).

3 讨论

3.1 杂交受精细胞学表现出拟两性融合的特点

由于种间生殖隔离, 远缘杂交受精过程可能出现的不亲和现象. 例如, 入卵异种精子的中心粒无法诱发细胞质形成微丝、微管, 结果无法形成星光^[7]; 精子无法在异质的环境中膨大形成雄性原核, 而是以固缩状态存在, 导致雌核发育生殖, 如银鲫 ♀ × 兴国江鲤 ♂ 的杂交^[8]. 但是也有许多鱼类或贝类的远缘杂交组合中, 精子入卵后正常形成星体和雄性原核, 继而实现雌雄原核融合, 表现出两性融合生殖特点^[9-13]. 本研究结果证明, 杂色鲍 ♀ × 盘鲍 ♂ 杂交, 盘鲍精子进入了杂色鲍卵子, 入卵后, 精核逐渐膨大、液化最终形成雄性原核, 并与雌性原核结合. 授精后 33 min, 观察到雌雄原核紧靠在一起. 虽然通过抑制极体排放也可能形成两个原核^[13], 但根据极体位置或星光(方法参考文献[15])及原核发育的时序, 加上在原核附近未发现固缩的精核, 可以推断两个原核应为一雌一雄. 另外, 在有丝分裂中期, 染色体排列在赤道板上, 没有发现类似雌核发育中常见的固缩的染色质小体; 分裂后期大多受精卵的染色体正常分配到两个分裂球中, 仅在个别受精卵中发现有染色质小体. 可见, 杂色鲍 ♀ × 盘鲍 ♂ 杂交受精细胞学主要表现出拟两性融合的特征, 即盘鲍精子不仅启动卵子的发育, 而且它的遗传物质与卵子遗传物质融合. 目前, 贝类远缘杂交受精细胞学研究的报道较少, 太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*) × *C. rivularis*^[16]、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) × 虾夷扇贝(*Patinopecten yesoensis*)^[12-13], 这两个杂交组合的受精细胞学同样也表现拟两性融合特征. 此外, 姜卫国等^[18]对合浦珠母贝(*Pinctada fucata*) ♀ × 长耳珠母贝(*P. chemnitzii*) ♂ 杂交 F1 进行核型分析结果表明, 在胚胎发育初期, 染色体数目为两亲本的中值. 万俊芬等^[18]用 ISSR 标记证明栉孔扇贝 ♀ 和华贵栉孔扇贝(*C. nobilis*) ♂ 全同胞 F1 幼虫同时具有双亲的遗传物

质. 可见, 以两性融合的方式受精在贝类种间杂交中较为常见.

3.2 早期两性融合向成体雌核发育发展的可能机制

杂色鲍 ♀ × 盘鲍 ♂ 杂交 F1 受精细胞学具有拟两性融合的特点, 但形态学及分子遗传学分析表明杂色鲍 ♀ × 盘鲍 ♂ 杂交 F1 成体只表现出母本的特点. 为什么杂色鲍 ♀ × 盘鲍 ♂ 杂交在受精时为两性融合, 而杂交 F1 在成鲍阶段却表现出雌核发育的特征? 在发育的过程中, 卵子的染色体组又是如何加倍的? 精子的染色体是如何排除的? 本研究中, 约在 3.2% 受精卵中观察 1 个受精卵并存的 3 个即将融合的原核, 这可能是多精入卵或母本染色体组自发加倍的结果. 在贝类和贝类的受精过程中都有母本染色体组自发加倍现象, 如太平洋牡蛎染色体组自发加倍的概率约为 1.3%^[13]. 杂盘鲍杂交幼体核型分析也证明, 证实杂色鲍 ♀ × 盘鲍 ♂ 杂交 F1 可能发生母本染色体组加倍, 产生异源三倍体(约占总数的 5.8%~17.9%)^①. 另一方面, 叶玉珍等^[20]在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)和鲤(*Cyprinus carpio*)杂种囊胚中发现被检查的染色体中期相含有草鱼的全部染色体和条数不等的鲤染色体, 认为在杂交胚胎发育过程中, 父本染色体逐渐丢失. 本研究在少数受精卵中观察到染色体分离不同步、两极之间存在固缩染色质小体等现象, 在有丝分裂末期的子细胞中观察到微核、双核的形成. 这些结果提示, 染色体分离不平衡可能是父本染色体在发育过程中逐渐丢失所导致的, 并最终形成只含有母本染色体的雌核发育体.

如果具有雌核发育特征的杂色鲍是异源三倍体丢失父本染色体的结果, 可以预计, 某些存活的杂交个体中可能含有个别父本染色体. 因此, 通过杂色鲍 ♀ × 盘鲍 ♂ 不仅可能得到雌核发育后代, 还可能得到异附加系、代换系和易位系等在遗传学研究和育种实践中有重要作用的宝贵材料.

参考文献:

- [1] Bartley D M, Rana K, Immink A J. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries[J]. Rev Fish Biol Fisheries, 2000, 10 (3): 325 - 337.
- [2] 吴维新. 一个四倍体杂种——兴国红鲤 × 草鱼[J]. 水生

① 蔡明夷, 柯才焕, 王桂忠, 等. 杂色鲍 ♀ × 盘鲍 ♂ 杂交幼体细胞遗传学研究[C]//福建省海洋学会. 福建省海洋学会 2005 年学术年会暨福建省科协第五届学术年会分会场论文集. 2005: 66 - 71.

- 生物学集刊,1981,7(3):433-436.
- [3] Beck M L, Biggers C J. Chromosomal investigation of *Ctenopharynodon idella* × *Aristichthys nobilis* hybrids [J]. *Experientia*, 1982, 38:319.
- [4] Stanley J G. Production of hybrid, androgenetic and gynogenetic grass carp and common carp [J]. *Trans Am Fish Soc*, 1976, 105:10-16.
- [5] 柯才焕, 田越, 周时强, 等. 杂色鲍与皱纹盘鲍、盘鲍杂交的初步研究[J]. *海洋科学*, 2000, 24:39-41.
- [6] 张中英. 鱼卵切片技术[J]. *动物学杂志*, 1980(2):45-46.
- [7] 朱洗. 从受精过程讨论动物远缘杂交问题[J]. *科学通报*, 1961, 7:1-7.
- [8] 朱蓝菲, 蒋一珪. 银鲫不同雌核发育系的生物学特性比较研究[J]. *水生生物学报*, 1993, 17(2):112-120.
- [9] 刘筠. 三角鲂精子与青鱼卵子的受精细胞学研究[J]. *水生生物学集刊*, 1981, 7(3):329-339.
- [10] 吴端生, 刘筠. 红鲫与湘江野鲤杂交的受精细胞学研究[J]. *动物学研究*, 1993, 14(3):277-283.
- [11] 高贵琴, 孙文学, 罗宇良, 等. 大鳞副泥鳅卵和泥鳅精子杂交受精细胞的观察[J]. *华中农业大学学报*, 1999, 18(1):75-77.
- [12] 周丽青, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 栉孔扇贝(♀)×虾夷扇贝(♂)受精细胞学观察[J]. *动物学杂志*, 2003, 38:20-23.
- [13] 杨爱国, 王清印, 刘志鸿, 等. 虾夷扇贝×栉孔扇贝人工受精过程的荧光显微学观察[J]. *海洋水产研究*, 2002, 23:1-4.
- [14] Li Q, Osada M, Kashihara M, et al. Induction of gynogenetic diploids and cytological studies in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Fisheries Sci*, 2000, 48:185-191.
- [15] 康现江, 王所安, 塔南山, 等. 中国对虾受精过程中精卵核的细胞学变化[J]. *动物学报*, 2001, 47(2):182-189.
- [16] Scarpa J, Allen S K. Comparative kinetics of meiosis in hybrid crosses of pacific oyster *Crassostrea gigas* and suminoe oyster *C. rivularis* with the American oyster *C. virginica* [J]. *J Exp Zool*, 1992, 263:316-322.
- [17] 姜卫国, 魏贻尧, 李刚. 合浦珠母贝、长耳珠母贝和大珠母贝种间人工杂交的研究 II. 受精过程和杂交后代的染色体观察[J]. *热带海洋*, 1983, 2:316-320.
- [18] 万俊芬, 包振民, 刘广旭, 等. 扇贝种间单对杂交一代幼虫 ISSR 标记的分离方式[J]. *高技术通讯*, 2004, 14(5):82-87.
- [19] Guo X, Cooper K, Hershberger W K, et al. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*: I. ploidy of resultant embryos [J]. *Biol Bull*, 1992, 183:381-386.
- [20] 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[J]. *水生生物学报*, 1989, 13(3):234-239.

Cytological Studies on the Fertilization of the Cross Between *Haliotis diversicolor* ♀ and *H. discus discus* ♂

CAI Ming-yi^{1*}, KE Cai-huan^{1**}, YOU Wei-wei¹,
WANG Gui-zhong¹, WANG Zhi-yong², WANG Yi-lei²

(1. Department of Oceanography, State Key Laboratory of Marine Environmental Science,
Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Institute of Aquaculture Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: To obtain useful information about the genetic essence of the progenies of the interspecific cross between the small abalone (*Haliotis diversicolor*) ♀ and the Japanese abalone (*H. discus discus*) ♂, nuclear behavior in hybrid eggs was examined during meiosis and first cleavage under a light microscope. The results showed that the nucleus in hybrid eggs behaved like those in amphimictic eggs. After the sperm of the Japanese abalone incorporated into the egg cytoplasm of the small abalone, the sperm nucleus gradually dispersed and developed into the male pronucleus. The female pronucleus eventually merged with the female pronucleus, since that few dense chromatin bodies were observed. Trippronucleus was observed in about 3.2% zygotes, which may result from polyspermy or spontaneous diploidization of maternal chromosome set. At anaphase of mitosis I, some abnormal phenomena were observed in several eggs, such as asynchronous segregation of chromosome and formation of micronuclei.

Key words: interspecific hybridization; fertilization cellular biology; *Haliotis diversicolor*; *Haliotis discus discus*; gynogenesis