

暗纹东方鲀精、卵超微结构 及精子入卵早期电镜观察

卢敏德 葛志亮 倪建国

(苏州大学水产学院, 苏州 215151)

高伟建 诸葛兰剑

叶金明

(苏州大学测试中心, 苏州 215006)

(扬州市郊区水产技术推广指导站, 扬州 225007)

摘要 本文对暗纹东方鲀精、卵结构和精子早期入卵进行了电镜观察。观察结果: 精子为鞭毛型结构, 头部两端呈椭圆长柱形, 核凹窝较深, 颈部含8个线粒体, 尾部微管束为“9+2”结构, 双尾丝裸露; 卵为圆球形, 卵膜表层有许多嵴、沟、微孔和一个受精孔; 受精方式为单精或多精入孔入卵, 单精受精。本文还对受精方式、人工繁殖技术等进行了讨论。

关键词 暗纹东方鲀, 精子, 卵子, 超微结构, 受精

暗纹东方鲀(*Fugu obscurus*)是长江下游海淡水洄游鱼类, 肉质鲜美, 河鲀毒素具有极高的医疗价值, 发展前景十分可观。近年竞相进行人工繁殖, 但成功率不高, 受精率、孵化率不甚理想。本文报道了暗纹东方鲀的精子、卵子、精子入卵早期的扫描、透射电镜观察结果, 为改进东方鲀人工繁殖技术, 提高受精率和孵化率, 丰富鱼类受精细胞生物学及其进化、分类的研究提供依据。

1 材料与方法

暗纹东方鲀: 在繁殖季节(3~5月)从扬中市水产品市场选购健康、性成熟的活雌雄亲鱼。按常规人工繁殖方法进行亲鱼催产, 获得精子、未受精的卵子和不同受精时间的受精卵。取出少量精液, PBS液稀释并离心, 弃去上清液, 2%戊二醛前固定; 同时取出少量卵子和受精卵, 用2%戊二醛前固定。

扫描电镜样品: 经前固定后, 漂洗, 1%锇酸后固定, 再漂洗, 乙醇逐级脱水和醋酸异戊酯脱水, 临界点干燥, 离子溅射。透射电镜样品: 经前固定后, 漂

洗, 乙醇逐级脱水, 块染, 用环氧丙烷置换, 618包埋液与环氧丙烷浸透, 包埋, 超薄切片(LKB型), 在JSM-840扫描电镜和HITACHI H-500透射电镜下观察和拍片。

2 结果

2.1 成熟精子

暗纹东方鲀成熟精子, 由头部、颈部和尾部构成, 是典型的鞭毛型结构。精子全长 $28.57\mu\text{m}$ 。

2.1.1 头部 头部无顶体, 两端呈椭圆的长柱形(图版I-1), 与一般硬骨鱼类精子形态不同。头部长 $2.81\mu\text{m}$, 宽 $1.19\mu\text{m}$ 。由透射电镜图象看头部核纵面观, 前窄后宽似塞形, 头部除中间凹窝外都被细胞核充塞, 核内由高度致密、对电子不透明的染色质构成, 核凹窝长 $0.6867\sim 0.8173\mu\text{m}$, 占全核长的30.15%~32.35%, 核凹窝宽 $0.2986\sim 0.3867\mu\text{m}$, 占全核宽的30.06%~38.93%, 中心粒位于核窝前端(图版I-2)。

2.1.2 颈部 颈部长 $0.4\mu\text{m}$, 宽 $0.94\mu\text{m}$, 较头部略粗(图版I-2)。横向切面可见颈部含有8个相等的线粒体, 组成对称的环形(图版I-3), 这是供

收稿日期: 1998-05-25

给精子运动能量的源泉。

2.1.3 尾部 由头部核凹窝中的中心粒,向后延展出轴丝,并经原生质鞘包裹,形成细长的尾部(鞭毛)(图版I-2,3)。尾部轴丝纤维管束,外周有9束微管,中心是1对中央微管,呈典型的“9+2”型双联微管结构(图版I-4)。尾部末端有2根裸露的尾丝(图版I-5)。尾部全长 $26.04\text{ }\mu\text{m}$ 。尾中段与主段宽度无显著差异,为 $0.20\text{ }\mu\text{m}$ 。尾部全长为头部长度的11.28倍,为尾(中一段)宽度的94.26倍;头部宽度为尾部(中一段)宽度的9.17倍。

2.2 成熟卵子

成熟的卵为圆形,与硬骨鱼类相同。卵球直径 $0.88\sim 1.21\text{ mm}$ 。卵膜较厚,不易剥开,卵膜表层形成许多嵴和沟,其数量及走向难以确定(图版I-6)。卵膜表层还遍布着很多微孔,呈经纬走向均匀分布(图版I-7),微孔密度约 $418\ 474\text{ 个}/\text{mm}^2$,经线走向的两微孔距离为 $1.61\text{ }\mu\text{m}$,纬线走向的两微孔距离为 $1.97\text{ }\mu\text{m}$ 。微孔直径 $0.16\sim 0.18\text{ }\mu\text{m}$ 。

从扫描电镜可见,成熟卵子在动物极附近卵膜上有一漏斗形凹陷孔洞,为卵膜孔,由前庭(坡形凸起)和精孔组成(图版I-6)。前庭口径 $12.80\text{ }\mu\text{m}$,精孔外径 $6.73\text{ }\mu\text{m}$,底部口径 $1.88\text{ }\mu\text{m}$,精孔径深约 $4.17\text{ }\mu\text{m}$ 。精孔内壁呈螺旋嵴,向孔深处延伸(图版I-9,10)。经近百粒卵球高倍扫描观察,卵球表面除受精孔和微孔外,无其它孔洞,也未见精孔细胞。

2.3 受精早期

受精1 s,卵膜表面密布大量精子(图版I-8)。受精孔口呈开放态,无精子进入(图版I-9)。

受精2~3 s,单个或多个精子头部进入受精孔深处,尾部留在受精孔外面(图版I-10,11)。

受精10~30 s,从受精孔底长出块状受精塞堵住受精孔口(图版I-12)。

受精1 min,卵膜表面和受精孔周围的精子已被解体,留有精子头、尾的残迹(图版I-13)。

3 小结与讨论

3.1 精、卵结构特征

通过电镜扫描和透射观察,暗纹东方鲀成熟精子为典型鞭毛型结构,由头、颈、尾3部分组成。头部无顶体,两端呈椭圆长柱形,核凹窝较深,双尾丝细长、裸露,为硬骨鱼类精子又一新形态;精子头长 $2.81\text{ }\mu\text{m}$ 、宽 $1.19\text{ }\mu\text{m}$,比四大家鱼^[1]、鲂^[2]、革胡子

鲶^[3]、金鱼^[4]、中华鲟^[5]、文昌鱼^[6]、长吻鲈^[7]等的精子头窄 $0.2\sim 1.3\text{ }\mu\text{m}$;精子颈部粗短,线粒体发达,由8个线粒体构成环形结构;精子尾部为“9+2”型双联微管结构;精子全长 $28.57\text{ }\mu\text{m}$,比多数硬骨鱼类精子全长短 $1.5\sim 21.4\text{ }\mu\text{m}$ ^[8];尾部长度为头部长度的11.28倍,头宽是尾宽的9.17倍。

暗纹东方鲀成熟卵子呈圆形,与多数硬骨鱼类卵子类型相同。卵球直径 $0.88\sim 1.21\text{ mm}$,比四大家鱼卵径小 $3.8\sim 5.8\text{ mm}$,也显著小于一般硬骨鱼类卵径^[8]。卵膜较厚,表层有许多嵴、沟、微孔及唯一的精子入孔通道——卵膜孔。卵膜孔外径 $6.73\text{ }\mu\text{m}$,比鲮、金鱼精孔分别大 $2.9\sim 3.2\text{ }\mu\text{m}$ 和 $2\text{ }\mu\text{m}$ ^[4,9],精孔底内径约 $1.88\text{ }\mu\text{m}$ 。微孔口径 $0.16\sim 0.18\text{ }\mu\text{m}$,与尼罗罗非鱼微孔口径相近^[10]。

3.2 受精方式

暗纹东方鲀受精孔口径较大,孔径容量也较大,电镜扫描观察,受精2~3 s有单精或多精进入孔内,仅尾部留露在受精孔外,此时尚未见长出受精塞,表明这些精子已进入卵内;受精10~30 s,显示受精孔被受精塞堵塞,当从受精孔底长出受精塞时,即阻止入孔的精子入卵(图版I-14)。从测量可知,精孔底部口径(约 $1.88\text{ }\mu\text{m}$)只可让1个精子头通过入卵。这组电镜观察记录提示,暗纹东方鲀受精方式,既有单精入孔入卵受精,又有与中华鲟相似的多精入孔入卵(一个个按序而入)、单精受精的表现特征^[5]。

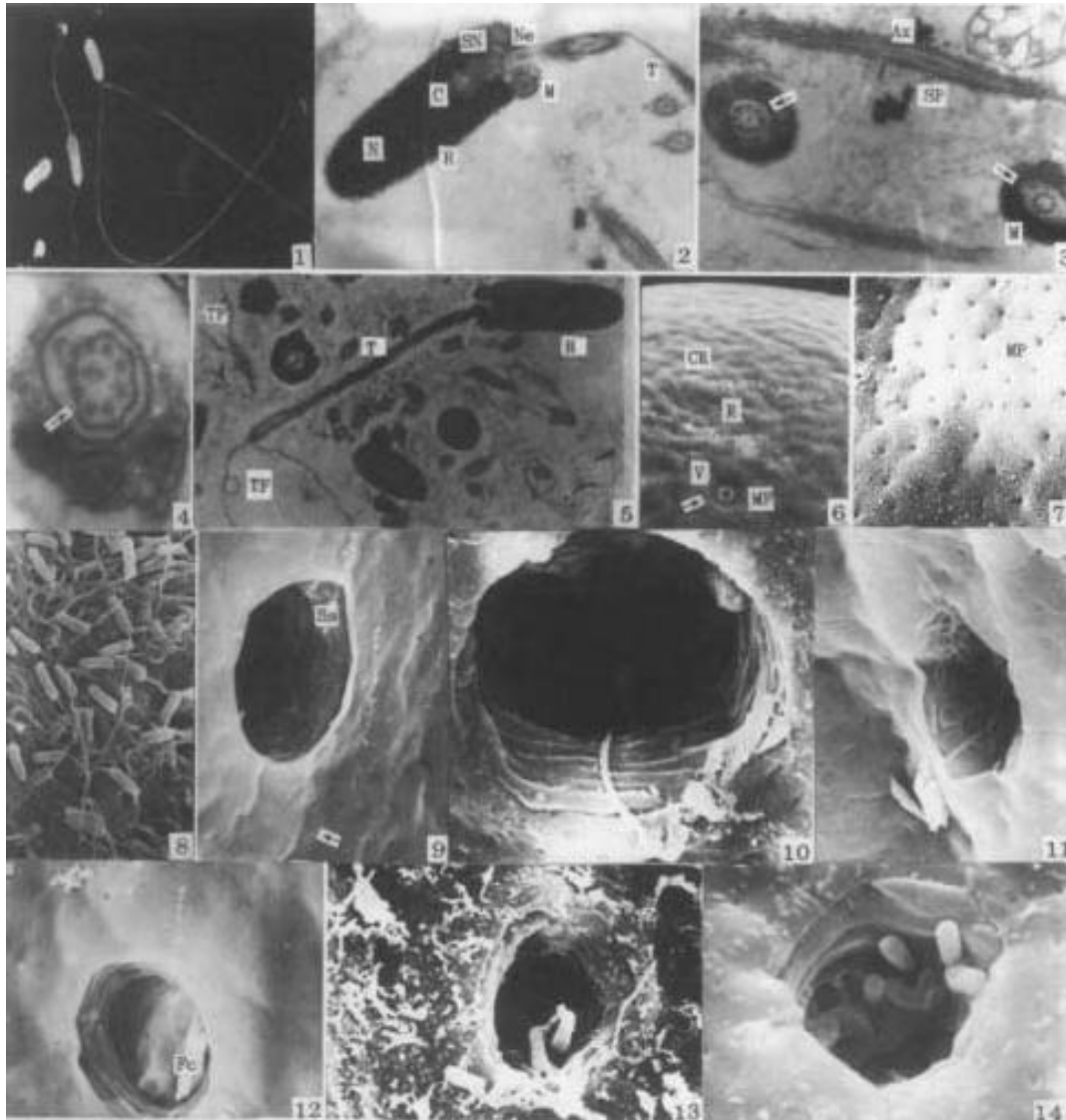
3.3 暗纹东方鲀精子的尾丝

一些研究者认为,动物鞭毛型精子末段结构是1根短而细的尾丝^[11]。我们观察的暗纹东方鲀精子尾部末端则有2根细而长的裸露尾丝,可视为暗纹东方鲀精子的一大特征和鉴别标志。

3.4 受精时间与人繁技术操作

暗纹东方鲀从精子进入受精孔到受精塞堵塞受精孔以及从精子入水活动到解体,表明精子参与受精时间仅有10~30 s,精子存活时间不足1 min。这比家鱼、尼罗罗非鱼等都短^[1,10],这提示在进行暗纹东方鲀人工繁殖时,采用干法受精较妥,精卵拌和要快速完成,在亲鱼组配时,雄鱼量适当增多,提供较多的优良精子,以利提高受精率和孵化率。

致谢:本文承中国科学院动物研究所陈大元教授审阅并提出宝贵意见,谨此敬谢。



图版 I plate I

- 1 暗纹东方鲀精子外部形态, $\times 3600$ 。Appearance of sperms of *F. obscurus*.
- 2 精子头部(H)、颈部(Ne)、尾部(T)纵切面, 示核(N)、核凹窝(SN)、中心粒(C)、线粒体(M), $\times 135\ 000$ 。Logitudinal section through the head (H), neck (Ne) and tail (T) of sperm, showing nucleus (N), sunken section of the nucleus (SN), central granule (C) and mitochondria (M).
- 3 精子颈部横切面、尾部纵切面, 示 9+2 型双联微管结构(↑)、原生质鞘(SP)、轴丝(Ax), $\times 15\ 300$ 。Transverse section through the neck of sperm, logitudinal section through the tail, showing double fibril microtubules 9+2 structure (↑), mitochondria (M) sheath of protoplasm (SP) and filamentous axialis (Ax).
- 4 示 9+2 型双联微管结构(↑), $\times 4\ 500$ 。Showing double fibril microtubules 9+2 structure (↑).
- 5 精子外形, 示 2 条裸露的尾丝(TF), $\times 9\ 000$ 。Appearance of sperm, showing 2 naked tail fibers (TF) at the rear of sperm tail.
- 6 卵的表层形态, 示卵膜孔处于漏斗状凹陷处(↑)、前庭(V)、精孔口(MF)、嵴(CR)、沟(R), $\times 270$ 。Appearance of eggs, showing the micropyle located at the funnel-shaped sunken section (↑), vestibule (V), mouth of fertilization passage (MF), cristae (CR), rill (R).
- 7 卵膜表层微孔(MP)呈经、纬线走向分布, $\times 4\ 500$ 。Micropores (MP) of the surface layer of the membrana ovi, showing their distribution in warp and woof.
- 8 受精 1 s, 示卵球表面密布着精子, $\times 3\ 600$ 。First second after fertilization, the surfaces of membrana ovi are covered with dense sperms.

- 9 未进入精子前开放的受精孔, 示前庭凸突起坡面(↑)、受精孔壁螺旋结构(Ss), ×4 500。Fertilized aperture of egg opening before sperm penetration, showing the surface of vestibule protrusion in the fertilized hole (↑) and the spiral structure of the wall inside the fertilized hole (Ss).
- 10 受精 2~3 s 单精入卵, 示单精入卵后精子尾部留露在受精孔外, ×9 000。Single-sperm penetration occurred 2~3 s later after fertilization, showing the tail part of sperm at or outside the fertilized aperture.
- 11 受精 2~3 s 单精入卵, 示精子尾部留露在受精孔口、孔外, ×4 500。Multiple-sperm penetration occurred 2~3 s later after fertilization, showing the tail part of sperms at or outside fertilized aperture.
- 12 受精 10~30 s 精子入卵受精后, 由受精孔底部长出受精塞(Fc), ×4 500。Fertilized 10~30 s after fertilization, showing fertilization cone (Fc) grew up from the interior of fertilized aperture after sperm penetration.
- 13 受精 1 min 卵膜表层精子解体, 示解体精子头尾残迹, ×4 500。Eggs fertilized 1 min, the sperms broke up in the surfaces of membrana ovi, showing residues of heads and tails of sperms.
- 14 进入受精孔, 没有参加受精的多余精子, ×7 200。Surplus sperms, having penetrated into the micropyle but not joined in the fertilization.

参 考 文 献

- 1 上海水产研究所. 家鱼人工繁殖. 上海: 上海人民出版社, 1976. 64~65
- 2 王瑞霞, 等. 鲂鱼受精早期精子入卵的扫描电子显微镜观察. 水产学报, 1982, 6(4): 313~320
- 3 郑文彪, 等. 草胡子鲇受精过程的扫描电镜观察. 动物学研究, 1991, 12(2): 111~115
- 4 张天荫, 等. 金鱼精子入卵过程的扫描电镜观察. 动物学研究, 1993, 14(2): 166~169
- 5 许 雁, 等. 中华鲟受精过程扫描观察. 动物学报, 1982, 28(4): 325~326
- 6 陈大元, 等. 文昌鱼精子的超显微结构. 动物学报, 1988, 34(2): 106~109
- 7 张耀光, 等. 长吻鮠精巢发育的分期及精子发生和形成. 动物学研究, 1992, 13(3): 281~287
- 8 孟庆闻, 等. 鱼类比较解剖. 北京: 科学出版社, 1987. 269~273
- 9 张天荫, 等. 鳊鱼受精早期扫描电镜研究. 动物学报, 1992, 37(3): 293~296
- 10 黄永松, 等. 尼罗罗非鱼成熟卵结构及精子入卵早期的电镜观察. 动物学报, 1990, 36(3): 227~229
- 11 上海水产学院主编. 组织胚胎学. 北京: 农业出版社, 1981. 201~221
- 12 Amanze D, Iyengar. The micropyle: a sperm guidance system in teleost fertilization. Development, 1990, 109(2): 495~500
- 13 Iwamatsu T, T ohta. Scanning electron microscopic observations on sperm penetration in teleostean fish. J Exp Zool, 1981, 218(2): 261~277
- 14 Kudo S. Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg. Dev Growth Diff, 1980, 22(2): 403~414

Ultrastructura observation on sperm egg and early sperm - penetration in *Fugu obscurus*

Lu Minde Ge Zhiliang Ni Jianguo

(College of Aquaculture Suzhou University, Suzhou 215151)

Gao Weijian Zhuge Lanjian

(Measurement Center of Suzhou University, Suzhou 210056)

Ye Jinming

(Fishery Technique Extention Station in Suburbs of Yangzhou, Yangzhou 225007)

Abstract The ultrastructure of sperm and egg of *Fugu obscurus* and the early process of sperm - penetration were studied with electronic microscopy. The results show that the sperm is a type of flagellum, with a nucleus in its more - deeply sunken head and with 8 mitochondria in its neck; both ends of the head are in the shape of long elliptic column; the tail presents a "9 + 2" axoneme structure with 2 naked tail fibers; the eggs are characterized by the ball - shape with many cristae, rills, micropores and a funnel - shaped micropyle on their surfaces. Studies on the fertilization revealed that fertilization may be in the patterns of single - sperm fertilization and single - sperm or multiple - sperm penetration. The way of fertilization and the technique of artificial reproduction are discussed.

Key words *Fugu obscurus*, sperm, egg, ultrastructure, fertilization