

诱导鲤雌核发育时精子入卵的扫描电镜观察

潘光碧 邹世平 邹桂伟 胡德高

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000)

摘要 以雌核发育性成熟鲤(*Cyprinus carpio*)卵子和经紫外线照射处理遗传失活的鲫鱼(*Carassius auratus*)精子为材料,在再次诱导其雌核发育时,通过扫描电镜和光学显微镜对比观察诱导组和正常受精组精子入卵的情况及鲤鱼成熟卵受精过程中精孔区的外部形态变化。结果表明,无论试验组或对照组在受精后2 s精子就能迅速到达精孔区。精子入孔后,受精孔便被絮状物质堵塞;受精后35~40 s壳膜表面开始模糊;60 s后,精孔区絮状物及精子均消失。

关键词 鲤(雌核发育), 鲫, 精子入卵, 扫描电镜

关于鱼类受精细胞学,国内外学者都作了大量研究和详尽的报道,但多偏重于精子入卵后各发育阶段的研究。对于受精前和受精时精子入卵的情况,国外 Brummett 等^[1]对底鳉, Hosokawa 等^[2]对真鲷, W. Kobayashi 等^[3]和 K. P. Kuchnow 等^[4]对各种鲑属作了报道。国内王瑞霞等^[5]对草鱼、鲢、鳙、团头鲂, 黄永松^[6]对尼罗罗非鱼作过报道。关于诱导鲤雌核发育时,失活的异源精子入卵情况还未见报道。由人工诱导鱼类雌核发育这一育种新技术,无论在遗传学理论研究方面或是选育良种、单性养殖的生产应用方面都具有积极的研究价值。所以,80年代至今,这一育种技术越来越广泛用于鱼类的育种实践中。中国水产科学研究院长江水产研究所应用此技术获得了批量有选育价值的性成熟草鱼和鲢;中国科学院水生生物研究所采用此技术研制成功了全雌鲤;中国水产科学研究院淡水渔业研究中心应用此技术加速了荷元鲤的选育获得了建鲤。但目前因诱导率低,在生产应用中仍受到较大限制。本文只报道有关受精孔及受精后1 min内壳膜的变化情况,旨为这一育种新技术提供基础资料。

1 材料与方法

试验材料为课题组诱导的第2代雌核发育性成

熟鲤和性成熟的雄鲫(或雄白鲫)。将雌鲤、雄鲫按体重注射一定量的催情剂。雌鲤产卵后将同尾鱼的卵分为2组,分别进行干法人工授精。试验组用经紫外线照射,遗传失活的鲫(或白鲫)的精子“受精”;对照组用鲫或白鲫正常精子受精。试验组中,分别将受精后1 s、2 s、3 s、5 s~1 min(每间隔5 s固定1次)的受精卵,先用2.5%戊二醛(用pH 7.2磷酸缓冲液配制)固定2~4 h或过夜,然后用上述缓冲液小心洗去戊二醛(30 min内换新液3次),再用1%锇酸(用pH 7.2磷酸缓冲液配制)固定1 h,以磷酸缓冲液洗去锇酸。梯度酒精(30%~80%酒精)脱水,在80%酒精中保存。临界干燥前用95%酒精脱水后再经2次丙酮脱水,然后用导电胶将卵球粘在样品台上,粘样时受精孔向上。HCP-2型临界干燥器干燥, EIKO-IB5型真空喷涂仪喷金, S-530扫描电子显微镜观察摄影,加速电压20 kV。

光学显微镜观察的材料与上述相同,将未受精的卵和受精后各时期至第1次卵裂完成的卵子用Bouin氏液固定(受精后1~20 min,每间隔1 min固定1次;20~40 min,每间隔2 min固定1次;40 min至第1次卵裂完成,每间隔5 min固定1次)。石蜡包埋切片,厚度8 μ m, H.E染色, Olympus显微镜观察拍照。

收稿日期:1998-09-07

2 观察结果

2.1 受精孔部位及形态结构

用低倍扫描电镜观察,在动物极的壳膜上有一凹陷的小区域,即精孔区。此区在高倍扫描电镜下呈漏斗状,受精孔位于此漏斗状凹陷的底部中央,孔口径 $3.62\sim 4.24\ \mu\text{m}$,孔的周围呈平滑的环状结构。漏斗壁和壳膜表面布满大小不等、形态各异的孔。壳膜表面附有粘性物质。受精孔未见精孔细胞(图版 I-1)。

对成熟未受精卵精孔区的切片观察(图版 I-2)可见,受精孔为穿过壳膜的喇叭形管状结构,称为精孔管(Micropylar canal)。精孔管的内孔较小,开口于卵球动物极的卵黄膜(Vitellinemembrane)表面,直径约 $2.58\ \mu\text{m}$,精孔管外孔较大,为 $3.35\ \mu\text{m}$,精孔管长为 $3.30\ \mu\text{m}$ 左右,漏斗壁纵切面可看到壁上有突出的棱,这与扫描电镜下精孔区呈环状阶梯形漏斗相一致(图版 I-3)。漏斗的底壁与受精孔相接。

2.2 试验组与对照组精子入卵情况

在扫描电镜下观察到,精子入卵十分迅速。从受精后 $2\sim 25\ \text{s}$ 之间,均可看到精子直接从受精孔入卵的图象, $30\ \text{s}$ 后受精孔便被一团絮状物或一些网状物所堵塞(图版 I-4)。试验组的精子虽经紫外线照射后,出现头部收缩、尾部有断裂的现象,但仍与对照组一样可迅速到达受精孔,并在精孔区大量聚集(图版 I-5)。图版 I-6 示对照组受精后 $3\ \text{s}$,精子到达受精孔的情况。本试验中正常鲫精子的直径(短径)为 $2.28\sim 2.40\ \mu\text{m}$,照射后鲫精子的直径为 $1.39\sim 1.90\ \mu\text{m}$,平均为 $1.66\ \mu\text{m}$,其收缩程度为 29.06% 。

2.3 “受精”后精孔区及壳膜外部形态变化

无论对照组或试验组,精子入卵后受精孔便被絮状物质所堵塞(图版 I-4)。“受精”后 $35\sim 40\ \text{s}$ 壳膜表面的孔与孔之间的隆起(即突褶)部分融合在一起(图版 I-7), $60\ \text{s}$ 后突褶进一步融合,使壳膜表面呈疏松的鱼鳞状结构。精孔区已看不到环状阶梯形漏斗结构、絮状物和精子(图版 I-8)。

3 讨论

(1)根据我们的观察,鲤成熟卵球的受精孔位于动物极上一个漏斗状凹陷的底部中央,是一穿过壳膜的管状结构。管的外孔开口于漏斗底部中央,内

孔开于卵球动物极的卵黄膜表面。这与王瑞霞、黄永松、Brummett A R 等、Hart N H 等^[7]的观察一致。国外学者^[8]把这个漏斗状凹陷称为精孔器。我们认为将精孔器和受精孔所在区域称之为精孔区较为合适。黄永松和 Riehl R 等^[9]称之为卵膜孔。

(2)不同鱼的精孔区形态和受精孔大小都具有其特异性。Rienhl R 等把鱼的精孔区分为 3 种类型:①深的凹陷和短的孔道;②浅的凹陷和长的孔道;③只有一孔道而无明显的凹陷。鲤则属于第①类(鲮与之相似)。团头鲂和罗非鱼则介于①和②之间,即有浅的凹陷和短的孔道(精孔管)。鲤受精孔口径($3.62\sim 4.24\ \mu\text{m}$),比草鱼和鲢大($3\sim 3.5\ \mu\text{m}$),而与团头鲂($4\sim 4.5\ \mu\text{m}$)相似,但其孔的周边却与草鱼、鲢相似,为平滑的环状结构。

(3)本文中扫描电镜观测到的受精孔口径大于切片中精孔管的外孔口径($3.35\ \mu\text{m}$),这可能主要是处理方法不同所造成的误差。

(4)鲫的精子大小,无论是未经紫外线照射过的或是经过照射的,均与鲤精孔管内孔口径相配。精孔管内孔口径仅够 1 个精子通过,而且精子入卵后精孔便被絮状物堵塞,这是单精受精鱼类防止多精受精的机制之一。

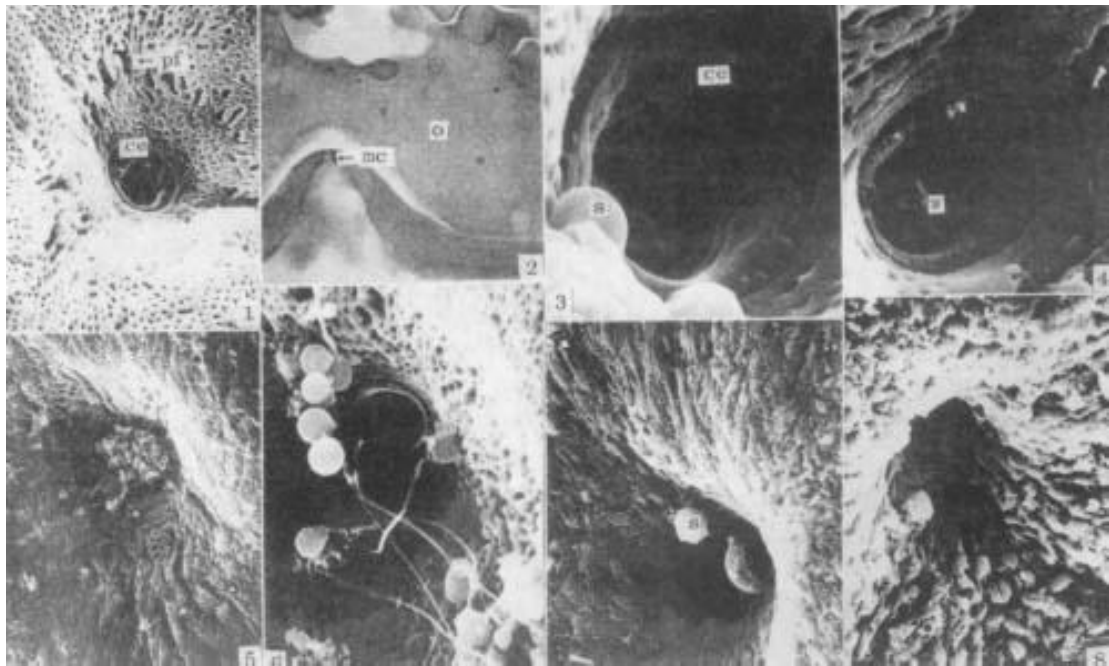
(5)因我们只观察了鲤成熟离巢的卵球,在受精孔附近未见到精子细胞。根据王瑞霞等在团头鲂、草鱼、鲢、鳊上的观察,Hosokawa K 等在真鲷上和刘筠^[10]、傅朝君等^[11]在草鱼上的观察,其精孔细胞在卵球发生过程中曾出现过,而在卵球成熟离巢后才消失。鲤的情形可能与之相似。在我们所有切片上都观察到漏斗壁上有一层絮状物。这些物质可能为蛋白质^[12]。此物质有何作用有待进一步研究。

(6)鲤鱼卵“受精”后 $40\ \text{s}$,壳膜表面就明显模糊,部分突褶融合; $60\ \text{s}$ 后壳膜上的突褶进一步融合使表面的孔变形,结构疏松。在我们的观察中,鲤受精过程是在 $30\ \text{s}$ 之内迅速完成的。故在人工授精时必须抓好受精过程中的前 $30\ \text{s}$,长时间受精是无用的。这为鲤人工繁殖及人工诱导雌核发育提供了依据。

参 考 文 献

- 1 Brummett A R, J N Dumont. Initial stages of sperm penetration into egg of *Fundulus heteroclitus*. J Exp Zool, 1979, 210(3):417~433
- 2 Hosokawa K, Fusin T T Matswsato. Electron microscopic observation of the chorion and micropylar apparatus of the porgy pagrus major. Japan J Ichthyology, 1981, 27(3):339~343

- 3 Kobayashi W, T Yamamoto. Fine structure of micropylar apparatus of the chum salmon egg, with a discussion of the mechanism for blocking polyspermy. *J Exp Zool*, 1981, 217: 265~275
- 4 Kuchnow K P, Scott J R. Ultrastructure of the chorion and its micropylar apparatus in the mature *Fundulus heteroclitus* (Walbaum) ovum. *J Fish Biol*, 1977, 10(3): 197~201
- 5 王瑞霞, 张毓人. 家养鱼类受精生物学研究 II — 几种淡水鱼类成熟卵球的精孔器与精子入卵通路的光镜与扫描电镜观察. *水生生物学集刊*, 1984, 8(2): 171~181
- 6 黄永松. 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
- 7 Hart N H, M Donovan. Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg of *Brachydanio*. *J Exp Zool*, 1988, 247: 227~296
- 8 Kagan B M. The fertilization period of the eggs of *Fundulus heteroclitus* and some associated phenomena. *Biol Bull*, 1935, 69: 185~201
- 9 Riehl R, K Gottung. Zu structure und vorkommen der mikropyle an eizellen und eiern von konchenfischen. *Arch Hydrobiol*, 1974, 74: 393~402
- 10 刘 筠. 草鱼卵球受精的细胞学研究. *湖南师范学院自然科学学报*, 1963(5): 1~12
- 11 傅朝君, 等. 草鱼卵球成熟细胞学的研究. *淡水渔业*, 1981(5): 5~8
- 12 Kaighn M E. A biochemical study of the hatching process in *Fundulus heteroclitus*. *Dev Biol*, 1964, 9: 56~80



图版 I Plate I

- 1 成熟未受精卵精孔区形态, $\times 2\,000$. Morphology of the micropylar region on the matured unfertilized egg Ce - 环状突起 circular extrusion; pf - 突褶 prominent fold.
- 2 通过精孔管的纵切面, $\times 800$. A vertical section through the micropylar canal. Mc - 精孔管 micropylar canal; O - 卵质 ovoplasm.
- 3 “受精”后 3 s 的精孔区形态, $\times 8\,000$. Morphology of the micropylar region at second 3 after fertilization S - 精子 sperm.
- 4 “受精”后 40 s, 精孔被一团絮状物(w)所阻塞, $\times 5\,000$. The micropylar canal is sealed by a mass of wadding materials (w) at second 40 after fertilization.
- 5 “受精”后 2 s, 漏斗状凹陷内聚集大量精子, 精子头部被照射后有收缩现象, $\times 1\,000$. A lot of sperms are aggregated in the micropylar canal at second 2 after fertilization. The head of sperm has been contractive after the irradiation in the experimental group.
- 6 对照组受精后 3 s, 示正常精子到达精孔器的情形, $\times 3\,000$. Normal sperms reach the micropylar apparatus at second 3 after fertilization in control group.
- 7 “受精”后 35 s, 壳膜上的突褶部分融合, 精子被阻在受精孔外面, $\times 1\,000$. Prominent fold has fused and sperm is blocked outside the micropylar canal at second 35 after fertilization.
- 8 “受精”后 60 s, 精孔区已见不到精子及絮状物, 突褶进一步融合, $\times 1\,000$. Sperms and wadding materials vanish and the prominent folds be-

come further fused at second 60 after fertilization.

Scanning electron microscopic observation of penetration of sperm into the eggs of gynogenesis – matured *Cyprinus carpio*

Pan Guangbi Zou Shiping Zou Guiwei Hu Degao

(Yangzhi River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000)

Abstract Eggs of gynogenesis – matured *Cyprinus carpio* were activated with UV – irradiated *Carassius auratus* sperm and fertilized with normal *C. auratus* sperm respectively, when the observation was performed with scanning electron microscopy (SEM). A small depression, so – called micropylar apparatus, was found on the animal pole of the egg by light power SEM. With light power SEM, the micropylar apparatus showed a funnel – like depression and the micropylar pore situated at the central bottom of the depression. Under light microscope, the section through the micropylar apparatus showed a pipe – like structure. The diameter of the outer opening of the micropylar canal was $3.88 \sim 4.28 \mu\text{m}$. A smooth ring – like structure surrounded the micropylar canal. Different size and morphology of the pores were noticed on the surface of the funnel – like depression and chorion. Variations in the condition of the pores at different time of post – fertilization were also observed. Compared to normal sperm, the head of inactive sperm became contracted. However, the sperm still had ability to arrive at the micropyle (second 2 after fertilization) rapidly. The micropylar canal became sealed after sperm penetrates into the egg.

Key words *Cyprinus carpio* (gynogenesis), *Carassius auratus*, sperm penetrating egg, scanning electron microscopy (SEM)