

皱纹盘鲍卵的形态与超显微结构*

孙振兴 王如才 姜明 刘晓云 高澜 范瑞青

(青岛海洋大学, 266003)

摘要 本文用扫描电镜和透射电镜观察了皱纹盘鲍成熟未受精卵和受精卵的形态及超显微结构。皱纹盘鲍的成熟卵无卵极标志, 卵质中含有线粒体、内质网和高尔基复合体等细胞器, 未发现中心粒。皮层中有皮质小泡, 受精后发生皮层反应。在鲍的受精卵中, 线粒体、高尔基复合体和内质网的数量明显减少。在鲍的成熟卵和受精卵中, 均观察到光滑内质网合成脂滴以及脂滴形成卵黄粒的现象。

关键词 皱纹盘鲍, 成熟卵, 受精卵, 超显微结构

皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 主要分布于我国黄渤海以及日本北部、朝鲜半岛沿海, 是名贵的海产珍品, 有着重要的经济价值, 近年来已在我国北方普遍开展了鲍的人工育苗和养殖^[2,3]。

动物雌雄两性生殖细胞的形态结构与受精过程密切相关, 是受精生物学的重要内容之一。迄今为止, 对鲍科软体动物的精子的研究虽有一些报道^[13,14], 但对鲍卵的研究报道, 仅限于在光镜水平上对形态的简单描述^[5,11], 而有关鲍卵的超显微结构, 尚未见报道。卵与精子均系遗传载体, 是后续个体发育的基础, 从某种意义上讲, 卵的发育或更重要。为此, 我们研究了皱纹盘鲍成熟卵和受精卵的形态及其超显微结构, 以期丰富贝类受精生物学基础理论提供一些资料。

1 材料与方 法

1.1 取材 将性腺成熟的雌、雄亲鲍分别放入经紫外线照射过的海水中诱导产卵、排精^[2], 取出少量未受精卵固定, 然后混合授精(3♀×3♂), 受精卵在20℃海水中发育, 授精后立即取材一次, 以后每隔1~5min取部分受精卵固定, 取材至授精后80min结束。

1.2 样品制备、观察 供透射电镜(TEM)观察的样品经2.5%戊二醛预固定, 1%锇酸后固定;乙醇梯度脱水后, Epon812环氧树脂包埋;LKB超薄切片机切片, 切片经醋酸铀和柠檬酸铅双重染色。最后在日立H-7000型透射电镜下观察。

收稿日期:1996-04-16。

* 国家科委“攀登”计划B项目子专题的部分内容, 专题编号:PD-B6-3-1。

供扫描电镜(SEM)观察的样品经2.5%戊二醛固定;乙醇梯度脱水后入100%醋酸异戊酯中置换;日立HCP-2型临界点干燥仪干燥,IB-3型离子溅射仪喷金。最后在剑桥S-250MK3型扫描电镜下观察。

2 结果

2.1 成熟未受精卵的形态与超显微结构

皱纹盘鲍排出体外的成熟卵呈圆球形,在光镜下观察卵膜外是很厚的胶膜(Jelly coat),透射电镜下可见胶膜内有许多电子密度很低的纤维状细丝,分布稀疏,胶膜的内侧与卵膜形成明显的分界(图版I:1)。溶去胶膜后的卵,直径约160-180 μm ,在扫描电镜下观察,整个卵的表面光滑而稍有起伏,动物极与植物极无明显的标志(图版I:2)。

卵膜(Egg membrane) 位于胶膜的内侧,也称卵黄膜(Vitelline membrane)可分为三层,各层的电子密度和厚度不同,由内向外,厚度分别为0.2~0.3 μm ,0.6~1.0 μm 和0.1~0.15 μm 。内、外两层是由一些极细微的纤维状丝构成,电子密度较低。中间的基质部分,电子密度致密,其中有许多斑点样的泡状小孔(图版I:3)。

质膜(Plasma membrane) 即细胞膜(Cell membrane),位于卵膜之下,卵膜与质膜之间的空隙称为卵周隙(Perivitelline space),成熟未受精卵的卵周隙狭窄,仅为0.6~1.2 μm (图版I:1)。鲍排出体外的成熟卵,由于卵内部卵黄的不断合成和积累,此时观察到的质膜是一层极薄的单层膜。在质膜上有许多长约0.2-0.8 μm 的细小触手状突起,向卵周隙内突出,即为微绒毛(microvilli)。微绒毛的膜外形成一层粘膜外衣,微绒毛膜的内面与细胞质相连(图版I:3)。

卵核(Egg nucleus) 皱纹盘鲍的成熟卵是处于第一次成熟分裂之前的初级卵母细胞时期,在光镜(LM)下观察鲍的卵巢切片,成熟的初级卵母细胞呈圆形、椭圆形等多种形态,中央有一大而透亮的卵圆形的胚泡(Germinal vesicle),即为卵核(图版I:4),卵核约占整个初级卵母细胞的2/3,其长径为90~100 μm ,短径为65~75 μm 。在透射电镜下可见核内均匀分布着常染色质,核的边缘呈不规则的伪足状或乳头状的突起,伸入到细胞质内(图版I:5)。另外,还可观察到在核膜上有间距不等的间隙,间隙处的核膜两端内外相连接而形成核孔(Nuclear pore)。卵核与卵质间通过核孔,进行物质交换(图版I:6)。

卵质(Egg plasm)与细胞器 鲍的成熟卵为均黄卵,卵黄颗粒(Yolk granules)均匀分布在卵质中。卵黄颗粒的大小不等,小的直径仅0.5 μm ,大的可达10 μm 之多,其分布区域也略有不同,较小的卵黄颗粒分布在卵的中央部,较大的则分布在卵的外周部。

鲍的卵质中有丰富的线粒体,呈长短轴近乎相等的卵圆形,外膜明显,内膜内褶形成短管状的嵴,线粒体内部充满电子密度较小的基质,基质中含有致密的嗜锇颗粒(图版I:6)。

在卵核附近,还可观察到由多个扁囊构成的高尔基复合体(Golgi apparatus),扁囊数目为4-8个,呈弓形排列,每一个扁囊是由两层平行的膜构成。在高尔基复合体扁囊的一面,可见数个体积较大的分泌泡;在扁囊的另一面,有许多微泡紧贴着扁囊的膜(图版II:7)。卵质中还有许多内质网,光滑内质网(SER)形状不规则或呈同心圆状,经常分布在脂滴(Lipid droplet)附近(图版II:8),这是因为光滑内质网与脂肪的合成有密切关系。粗面内质网(RER)见于卵核附近,其外表面附有大量核糖体颗粒(图版I:6)。在鲍的成熟卵中,未发现中心粒(Centriole)。

在质膜之下,卵质的表层即所谓皮层(Cortex)中,还分布着一种单层膜包的细胞器,即

皮质小泡(Cortical alveoli),亦称皮层颗粒(Cortical granule)。本文观察到皮质小泡有两种形态,一种是小泡的大小在 $1.0\sim 4.0\mu\text{m}$ 之间,形状不规则,泡内含有中等电子密度的絮状或微细颗粒物质(图版I:3),另一种是小泡的大小在 $1.5\sim 5.0\mu\text{m}$ 之间,形状不规则,泡内为电子明区物质,呈空泡状(图版II:9)。较大的皮质小泡一般靠近质膜,较小的皮质小泡位于距质膜较远的深部。

2.2 受精卵的超显微结构

鲍的受精时间是在初级卵母细胞处于第一次成熟分裂之前,受精后完成两次成熟分裂。有关皱纹盘鲍的受精过程,我们将在另文专题报道,本文报道受精后卵的变化。

精子入卵之后,卵子发生皮层反应,皮质小泡膜与卵的质膜相融合(图版II:10),在融合处皮质小泡发生胞吐而破裂,其内含的微小颗粒逸出到质膜和卵膜之间的卵周隙中,与卵膜一起参与受精膜的形成,使受精膜举起。卵周隙的宽度扩大至未受精时的数倍(图版II:11)。此时,将受精后2min的受精卵去除卵膜置于扫描电镜下观察,可看到卵子表面的皮质小泡破裂后留下的空洞而呈蜂窝状(图版II:12)。据我们初步观察,受精后5min卵的表面基本修复平整,不再留有空洞。

在鲍受精卵的卵质中,仍有大量大小不一、电子密度深浅不同的卵黄颗粒、脂滴,还有许多核糖体颗粒。线粒体、高尔基复合体和内质网的数量明显减少,但线粒体、高尔基复合体等胞器的结构,与受精前相比并无明显地变化。

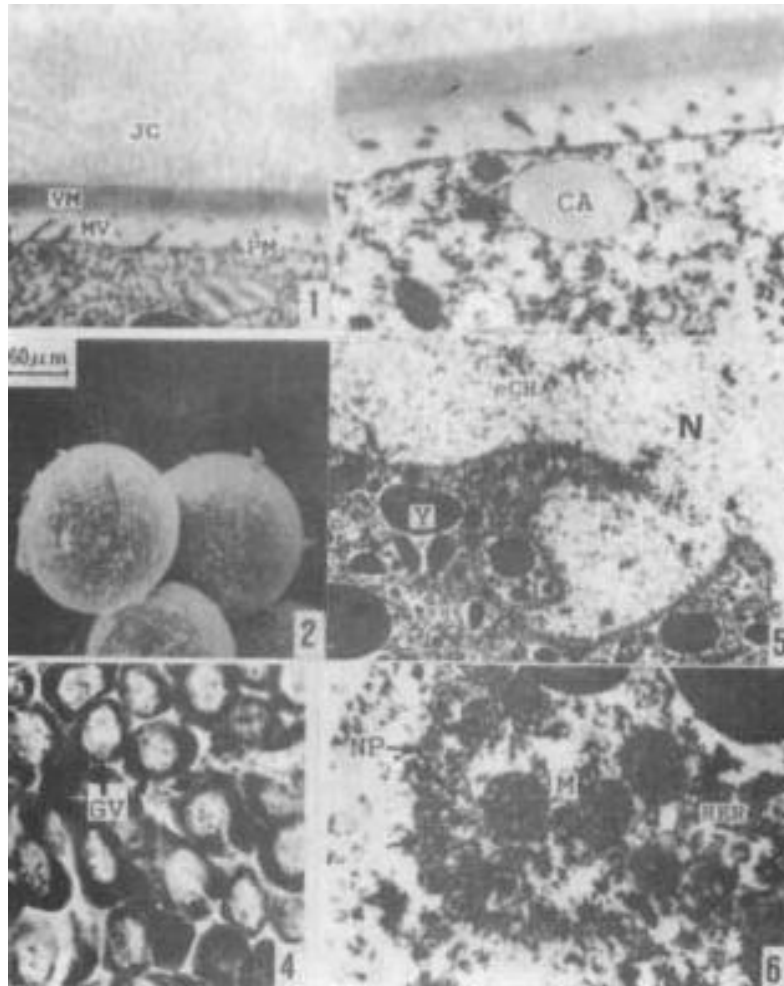
在鲍的成熟卵和受精卵中,均可观察到一些光滑内质网泡内逐渐变为浅灰色,并相互融合(图版II:13),最后形成无定形膜包裹的脂滴。同时还可见到部分脂滴中央逐渐沉积电子密度较高的蛋白质(图版II:14),这种脂滴进一步发育就成为脂质卵黄粒(Lipoprotein yolk)。

3 讨论

从上述结果看,皱纹盘鲍的成熟卵和受精卵的超微结构,与其它动物基本一致^[4,10],但在卵子发育的不同阶段,细胞器的数量有所变化。软体动物的卵母细胞在发生过程中,由于线粒体、内质网和高尔基复合体等多种细胞器都参与卵黄的形成,因此在观察卵子发生时,可见到以多种形式存在的各种细胞器^[7,8]。当卵母细胞发育到可受精的成熟卵阶段,由于卵子内贮存了大量的卵黄颗粒,所以卵质中的细胞器,特别是内质网和高尔基复合体大大减少^[7]。我们在观察中发现,鲍成熟卵中的内质网和高尔基复合体数量很少,而在受精卵中则更少。我们认为这种现象与卵黄的继续合成有关,说明鲍排出体外或已受精的卵子,卵黄的合成并没有结束,以适应卵子自身和早期胚胎进一步发育的能量需要。与大多数双壳贝类的受精卵在受精后24小时左右即可发育为能主动摄取外源食料的D形幼虫相比,鲍的受精卵在受精72小时后才能发育为能摄取外源食料的匍匐幼虫,而在此之前,则完全靠自身的卵黄颗粒营养^[2],因此对鲍而言,卵子中卵黄的不断合成更具有重要意义。

一般认为光滑内质网与脂类或脂蛋白合成有关^[6],本研究中观察到的光滑内质网形成脂滴,可以充分证明这一点,脂滴形成卵黄在双壳类卵子发育中已有报道^[7],我们认为,这种光滑内质网形成脂滴以及脂滴形成卵黄的现象不是孤立的,二者之间有一定的联系,可能是光滑内质网通过脂滴这一中间形式,最终转变为卵黄粒,这也是鲍的卵子继续合成卵黄的途径之一。

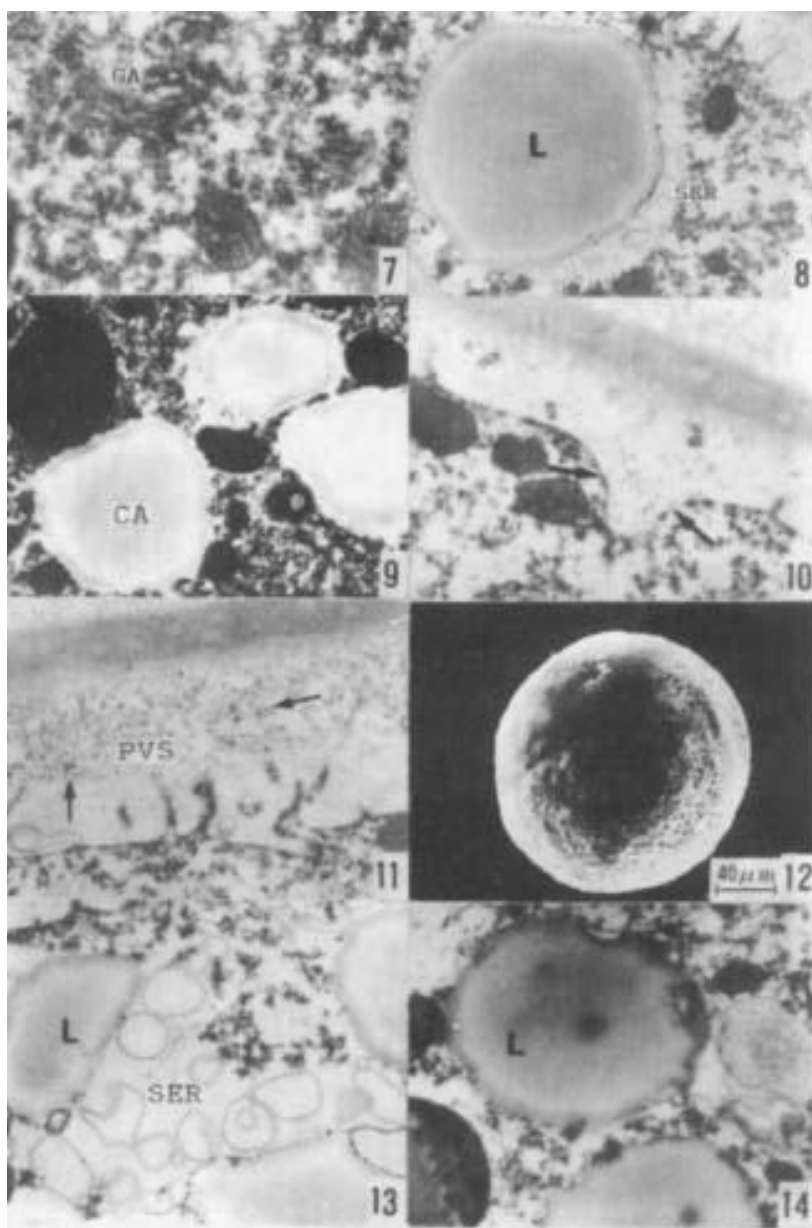
此外,粗面内质网、高尔基复合体、线粒体仍然参与卵黄的继续合成,这也是导致卵子中



图版 I

Plate I

1. 鲍成熟未受精卵的膜结构, 示胶膜(JC)、卵黄膜(VM)、质膜(PM)以及微绒毛(MV), $\times 6\ 500$ (TEM)
The ultrastructure of membrane of the abalone mature unfertilization eggs, showing the jelly coat (JC), vitelline membrane (VM), plasma membrane (PM) and microvilli (MV), $\times 6\ 500$ (TEM)
2. 溶去胶膜后的鲍卵, $\times 170$ (SEM)
The jelly coat of abalone eggs dissolved. $\times 170$ (SEM)
3. 皮质小泡(CA)的一种形态, 箭头示卵膜基质上的泡状小孔, $\times 13\ 000$ (TEM)
A morphology of the cortical alveoli (CA), the arrowhead indicates many alveoli on the base. $\times 13\ 000$ (TEM)
4. 成熟的初级卵母细胞, 箭头示胚泡(GV), $\times 100$ (LM)
The matured primary oocyte, arrowhead showing the germinal vesicle (GV), $\times 100$ (LM)
5. 卵核(N)边缘呈伪足状突起伸入到胞质中, cCh 为常染色质, Y 为卵黄颗粒, $\times 4\ 000$ (TEM)
Egg nucleus (N) protruding into the egg plasm cch - chromatin, Y - yolk granules. $\times 4\ 000$ (TEM)
6. 核膜附近的线粒体(M), 箭头示核孔(NP), RER 为粗面内质网, $\times 22\ 500$ (TEM)
Mitochondria (M) near the nuclear membrane, arrowhead showing nuclear pore (NP), RER - rough endoplasmic reticulum. $\times 22\ 500$ (TEM)



图版 II

Plate II

7. 高尔基复合体(GA), $\times 27\ 000$ (TEM)
The golgi apparatus (GA). $\times 27\ 000$ (TEM)
8. 分布在脂滴(L)附近的光滑内质网(SER), $\times 10\ 500$ (TEM)
The smooth endoplasmic reticulum (SER) near the lipid droplet (L). $\times 10\ 500$ (TEM)
9. 皮质小泡(CA)的一种形态, $\times 13\ 600$ (TEM)
A morphology of the cortical alveoli (CA), $\times 13\ 600$ (TEM)
10. 箭头处示皮质小泡膜与卵的质膜相融合, $\times 14\ 000$ (TEM)
Arrowhead indicates the fusion of the cortical alveoli membrane and plasma membrane. $\times 140\ 000$ (TEM)
11. 受精卵的卵周隙(PVS)加宽, 箭头示皮质小泡破裂后逸出的微小颗粒, $\times 14\ 000$ (TEM)
The perivitelline space (PVS) of fertilized egg become width, arrowhead showing particle from the ruptured cortical alveoli.

× 14 000(TEM)

12. 授精后 2min, 由于皮质小泡破裂整个卵子表面呈蜂窝状, × 250(SEM)

At 2 minutes after insemination, the egg surface becoming silveolate with the rupture of cortical alveoli. × 250(SEM)

13. 光滑内质网(SER)泡内变为浅灰色, 并相互融合形成脂滴(L), × 17 000(TEM)

The smooth endoplasmic reticulum (SER) was going grey, become lipid droplet (L) for fusion from each other. × 17 000 (TEM)

14. 脂滴(L)中央沉积着电子密度较高的蛋白物质, × 19 000(TEM)

In the center of lipid droplet (L) accumulating albuminoid matter. × 19 000(TEM)

上述胞器数量减少的原因。虽然在文昌鱼的成熟卵和受精卵的卵质中有丰富的线粒体、高尔基复合体及内质网等胞器^[4], 但我们的观察结果也许表明无脊椎动物与脊索动物在卵子发育上有一定的差异。

关于皮质小泡, 一般认为在软体动物中, 皮质小泡可见于双壳类, 而不见于腹足类^[1]。但根据我们观察, 鲍的成熟卵中确实存在着皮质小泡。虽然鲍是一种原始腹足类, 但无论从卵子发生还是繁殖方式, 都与双壳类更为相似, 而与高等腹足类有很大差异, 因此卵质中的胞器可能更接近双壳类。皮质小泡是在卵子发生过程中由高尔基复合体形成的^[1], 我们观察到鲍的皮质小泡有两种形态, 第二种形态的皮质小泡(图版 II: 9)可能是高尔基复合体参与形成早期的一种过渡形态, 说明两种形态的皮质小泡有着内在的联系。

无脊椎动物受精过程中受精膜的形成, 海胆是皮质小泡以胞吐方式释放透明素物质^[12]; 中华绒螯蟹是皮质小泡破裂后释放出来的颗粒小体与卵膜内层结合形成受精膜^[9]。我们观察皱纹盘鲍卵的受精膜形成过程, 与上述研究结果大致相同。

参 考 文 献

- [1] 丁汉波、全允栩、黄 浙主编, 1987。发育生物学, 66~149。高等教育出版社。
- [2] 王如才、王昭萍、张建中, 1993。海水贝类养殖学, 331~359。青岛海洋大学出版社。
- [3] 孙振兴, 1994。室内养殖皱纹盘鲍若干问题探讨。海洋科学, (5): 6~9。
- [4] 陈大元等, 1991。文昌鱼受精机理研究——受精卵的超显微结构。动物学报, 37(4): 422~426。
- [5] 陈 木等, 1977。皱纹盘鲍人工育苗的初步研究。动物学报, 23(1): 35~46。
- [6] 汪德耀主编, 1988。普通细胞生物学, 133~208。上海科技出版社。
- [7] 沈亦平等, 1993。合浦珠母贝卵子发育的超微结构研究。武汉大学学报(自然科学版), (5): 101~108。
- [8] 林加涵、汪德耀, 1983。僧帽牡蛎卵母细胞卵黄发生的超微结构研究。厦门大学学报(自然科学版), 22(3): 355~363。
- [9] 堵南山等, 1992。中华绒螯蟹受精的细胞学研究。中国科学(B辑), (3): 260~265。
- [10] 堵南山等, 1995。中华绒螯蟹成熟卵形态和超微结构的研究。动物学报, 41(3): 229~234。
- [11] 猪野 峻, 1952。邦産アワビ属の増殖に關する生物学的研究。东海水研研究报告。(5): 1~102。
- [12] Endo, Y., 1961. Changes in the cortical layer of sea urchin eggs at fertilization as studied with the electron microscope. I, *Clypeaster Japonicus*. Exp. Cell Res. 25: 383~397。
- [13] Lewis, D.A., C.F. Talbot & V.D. Vecquier, 1982. A protein from abalone sperm dissolves the egg vitelline layer by a nonenzymatic mechanism. Develop. Biol., 92: 227~239。
- [14] Shiroya, Y. & Y. T. Sakai, 1984. Ultrastructural changes of the "Truncated cone" during the acrosome reaction in Japanese abalone spermatozoa. Develop. Growth and Differ., 26(1): 25~32。

MORPHOLOGY AND ULTRASTRUCTURE OF EGG OF *HALIOTIS DISCUS HANNAI*

Sun Zhenxing Wang Rucai Jiang Ming Liu Xiaoyun Gao Lan Fan Ruiqing

(Ocean University of Qingdao, 266003)

ABSTRACT The morphology and ultrastructure of the mature unfertilized eggs and fertilized eggs of the abalone (*Haliotis discus hannai*) were studied with scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscope (TEM). The sign of egg pole in the unfertilized abalone eggs are absent. The egg plasm of unfertilized abalone eggs possesses mitochondria (M), endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus (GA) etc. Centriole not been found. Cortexes possess cortical alveoli. Cortical reactions have taken place after fertilization. In the fertilized abalone eggs, quantities of the M, GA and ER evidently reduced. In the mature unfertilized eggs and fertilized eggs of the abalone, it is observed that the smooth ER synthesizes the lipid droplet and the lipid droplet forms lipoprotein yolk.

KEYWORDS *Haliotis discus hannai*, Mature egg, Fertilized egg, Ultrastructure