

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00250

胭脂鱼受精过程的细胞学观察

李萍, 刘晓蕾, 李勇, 江星, 金丽, 张耀光

淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 水产科学重庆市市级重点实验室, 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715

摘要: 采用人工授精, 组织学、超微结构技术等方法对胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)受精卵进行细胞学观察。结果表明: 胭脂鱼卵子动物极卵壳仅有一受精孔, 属单精受精。精孔器为深凹陷, 短孔道型。在 17~18℃ 水温条件下, 受精后 3 s 精子开始穿过精孔管, 受精后 5 s 进入卵子; 受精后 10 s 形成精子星光; 受精后 15 min, 卵子处于第二次减数分裂后期; 受精后 20 min, 第二极体形成; 受精后 90 min, 雌雄原核融合; 受精后 140 min, 受精卵进入第一次有丝分裂中期; 受精后 180 min, 第一次有丝分裂结束, 二细胞形成。研究发现: 成熟卵子精孔器内无精孔细胞及其他物质, 和其他大多数硬骨鱼相似, 精孔管内径 2.42 μm , 而精子头部直径与其接近; 同时精孔器前庭内壁有许多峭突, 孔洞顺螺旋排列, 这些结构特点提示其是造成胭脂鱼单精受精的原因之一。本研究旨在为胭脂鱼人工繁殖技术的研究及其保护管理提供基础资料。

关键词: 胭脂鱼; 精孔器; 受精过程; 细胞学

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)02-0250-10

受精是两个细胞融合的过程^[1], 包含精子和卵子从接触到最后二者的细胞核融合。处于第二次减数分裂中期的成熟卵子在精子入卵的激活下完成减数分裂释放第二极体。因此受精过程包含一系列的事件: 卵质膜的去极化, 精子渗入, 皮层小泡破裂, 卵周隙形成和第二次减数分裂完成^[2]。

大多数硬骨鱼类一般为单精受精^[3]。当第一个精子进入卵子后, 单精受精机制将阻止其余的精子进入。这包括了机械屏障, 如精孔器内部开口的关闭^[3-6], 受精锥形成^[6-8], 及为了排除多余精子的皮层反应激活^[7,9]。大多数硬骨鱼类卵子动物极具有一个精孔器, 精子通过打开的精孔管进入卵子^[3,6]。第一个精子到达位于卵子质膜上的精孔器并渗入进去^[5]。

鱼类的受精生物学方面的研究已有报道, 如

鳊鱼(*Rhodeus ocellatus ocellatus*)^[1]、大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)^[3]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[6]、匙吻鲟(*Polyodon sphenus*)^[8]、青鳉(*Oryzias latipes*)^[9]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[10]、欧洲巨鲇(*Silurus glanis*)^[11]、唇鲮(*Hemibarbus labeo*)^[12]、中华乌塘鳢(*Bostrichthys sinensis*)^[13]。并且对受精过程中精子入卵的过程, 及随后的皮层反应, 雌雄原核形成及融合机制有一定的了解^[14]。总结以往研究不难发现, 研究鱼类受精生物学对于鱼类资源保护和人工繁殖, 尤其是濒危物种的保护有重要意义。

胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)属鲤形目, 亚口鱼科, 胭脂鱼属, 是亚口鱼科鱼类在亚洲大陆唯一分布的单型属、种。据推测, 胭脂鱼类起源于 5 000 万年以前脂鲤的原始类型, 是一种由二

收稿日期: 2012-10-08; 修订日期: 2012-11-08.

基金项目: 重庆市自然科学基金重点项目(CSTS, 2009BA1053).

作者简介: 李萍(1981-), 女, 博士研究生, 从事渔业生物学研究. E-mail: liping8111@yahoo.com.cn

通信作者: 金丽, 教授. E-mail: jinll@swu.edu.cn

倍体向四倍体过渡的鱼类,它是研究鱼类起源进化和地理变迁的重要物种^[15-16],主要分布于中国的长江和闽江流域。胭脂鱼生长快,个体大,肉质鲜美,具有很高的观赏价值,是我国的名优经济鱼类之一。由于多年的滥捕以及环境恶化,目前中国胭脂鱼野生种群处于濒危状态,被列为国家Ⅱ级保护动物^[17]。鉴于胭脂鱼的保护现状和上述鱼类受精生物学研究情况,而有关胭脂鱼受精生物学的研究尚未见报道,本研究采用组织学和电镜技术等对胭脂鱼受精的细胞学特点进行研究,以期对胭脂鱼的人工繁殖及其保护提供参考依据。

1 材料与方法

2005年、2007年、2011年和2012年每年3月分别从万州水产研究所获取人工催产得到的成熟卵子和精子,干法受精。受精卵的激活水温17℃,胚胎在水温17~18℃下孵化,取成熟卵及精卵相遇后不同时间段的受精卵样品分别用Smith氏液和2.5%戊二醛固定。经Smith氏液固定24h后换至70%的乙醇中保存。正丁醇脱水,松油醇透明,石蜡包埋,连续切片5μm,HE和AB-PAS染色,Nikon数码显微照相系统拍照,Image-Pro Plus 6.0专业图像分析软件对精子及卵子大小及受精卵的卵膜及皮层颗粒的变化进行测量。经戊二醛固定的受精卵,一部分用0.20 mol/L(pH7.4)磷酸缓冲液冲洗3次,系列酒精脱水,丙酮置换,环氧树脂650聚合包埋,LKB-5型超薄切片机切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染,H-7500透射电镜观察并照相。另一部分受精卵去除卵膜,以0.10 mol/L二甲胍酸钠溶液固定5 min,梯度乙醇脱水,醋酸异戊酯置换,CO₂临界点干燥,标本定位,Jeoljsm-35CF喷镀、Hitachi-S-3400N扫描电子显微镜观察并拍照。保留部分受精卵于水族箱内进一步孵化,统计其受精率和孵化率分别为95%和96.2%。

2 结果与分析

2.1 成熟卵的形态学观察

胭脂鱼成熟卵黄色,圆球形,平均直径约

2.50 mm(图版 -1),受精卵遇水后产生弱黏性,在水温17~18℃时,受精后4 min卵膜开始膨胀,变透明,动物极明显(图版 -2)。受精后100 min开始形成胚盘,150 min胚盘隆起最高,受精后175 min开始细胞分裂。成熟的未受精卵遇水也会膨胀,并能够进行卵裂至囊胚期,但不能完成后续的胚胎发育。

2.1.1 卵膜 卵膜与质膜相连,属初级卵膜。卵膜厚约12.03 μm,光镜下呈竖条纹状,HE染色可观察到两层亚结构,靠近卵黄层厚约2.67 μm,染色较深,为卵膜内层;外层厚约9.34 μm,染色深红色,为卵膜外层。卵膜外有绒毛结构,被伊红染成红色(图版 -3)。经AB-PAS染色,卵膜为中性。

胭脂鱼的精孔器为深凹陷,短通道型。由前庭和精孔管组成,前庭是精孔器的主体,呈漏斗状,最大直径64.94 μm,深78.64 μm。卵膜在精孔器前庭形成部位逐渐加厚,最厚处为29.35 μm,随后逐渐变薄,由拐点处开始至精孔器底部为精孔器的凹陷区。精孔管贯穿前庭底部和胞质,长2.55 μm,直径2.42 μm,与精子头部直径2.40 μm接近(图版 -3)。

扫描电镜下,胭脂鱼卵子表面分布很多绒毛状结构,动物极处有深陷的孔洞,为精孔器。精孔器周围直径约100 μm的范围内,无绒毛状结构,分布有小突起(图版 -23)。精孔器前庭为涡旋状结构,底部为精孔管(图版 -24)。去卵膜观察,卵子表面覆盖一层薄的质膜,同时可以看到细胞膜表面由其内方的皮层小泡填充形成的均匀凸起。位于动物极上的精孔器去卵膜后内壁结构与细胞膜表面相似(图版 -25),但缺少皮层小泡形成的凸起(图版 -26)。卵黄颗粒在扫描电镜下呈球状,紧密聚集在一起(图版 -27)。

胭脂鱼卵子成熟后滤泡细胞和卵母细胞伸出的微绒毛回缩后留下的孔道为卵膜孔,透射电镜下,卵膜孔在卵膜切面呈规则排列。卵膜由内向外分为2层,分别称为内层和外层。内层与质膜紧连,透射电镜下电子致密度高,染色深。外层较厚,可再分为两个亚层,每个亚层内有呈弧形排列的弹性亚膜结构,为卵膜的弹性支架。卵膜表

面有绒毛状结构,绒毛无特殊结构,切面电子致密度低,染色浅(图版 -29)。卵子质膜与卵膜内层联系紧密。卵子细胞质较少,主要分布于皮层小泡之间,细胞器多为线粒体、溶酶体,它们共同组成了卵子的内膜系统。

2.1.2 卵黄 卵黄多呈颗粒状,位于卵子中央。由膜包被,颗粒大小不等。绝大多数卵黄颗粒为嗜酸性,HE染色呈鲜红色(图版 -3)。有少数嗜碱性HE染色呈蓝紫色,内部有空泡,内含物在外推过程中逐渐降解,颗粒由粗大变为细小,参与IV型皮层小泡形成(图版 -4)。电镜下,卵黄颗粒与细胞质界限明显,可分为两类(图版 -30):一类分布于皮层下,占卵子的绝大部分,卵黄颗粒直径较大,染色深且均匀,之间细胞质分布较少,或分布有少量脂质。此类卵黄与光镜下嗜酸性卵黄颗粒相对应。二类分布于皮层区内,染色均匀,内有染色深的颗粒状物质存在,即为结晶斑。紧连皮层区的卵黄颗粒,在皮层反应中有外排现象,且电子致密度逐渐降低。此类卵黄与光镜下嗜碱性卵黄颗粒相对应。

2.2 受精过程的细胞学观察

受精后0 s卵子周围粘附大量精子,精孔器处精子密集(图版 -5),精孔管打开,并有精子开始向精孔器内运动。未见精孔细胞或絮状物堵塞精孔器。

受精后1 s大量精子聚集在精孔器前庭口,部分精子到达前庭的1/2处(图版 -6),卵细胞处于第二次减数分裂中期,染色体排列在赤道板上(图版 -7)。

受精后3 s有精子开始穿过精孔管(图版 -8),通过精子穿过精孔管前所移动距离和所花费时间,大致计算出精子运动速度约为 $18.68\ \mu\text{m/s}$ 。在一个标本上有22粒精子聚集在精孔器前庭处(图版 -9)。类似现象在扫描电镜中也观察到(图版 -28)。

受精后5 s精子穿过精孔管进入皮层达 $3.64\ \mu\text{m}$ (图版 -10)。仍有精子向精孔器底部运动,多数已经到达精孔器前庭的1/2处。

受精后8 s进入卵子皮层的精子,头部开始膨

大,染色体开始解聚,HE染色较浅。动物极最外层皮层小泡开始破裂,释放内含物。

受精后10 s进入皮层区的精子释放中心粒,产生微弱精子星光(图版 -11),染色体进一步解聚。皮层反应开始出现。

受精后20 s进入皮层的精子星光开始延长(图版 -12)。卵子的染色体仍然处于第二次减数分裂中期。

受精后25 s精孔器内仍聚集精子,有精子已经接近精孔管,且将要通过精孔管。深层皮层小泡开始向外移动(图版 -13)。

受精后30 s大量精子聚集在精孔器内,有精子进入精孔管,精孔管下方有皮层小泡出现,阻止后续精子的进入(图版 -14)。

受精后45 s雌核仍然处于第二次减数分裂中期,染色体靠近质膜,与精孔器中轴呈30度方向,染色体排列在赤道板上(图版 -15)。

受精后70~90 s精孔器内仍然残存大量精子。

受精后100~150 s雄性原核仍然具有不明显的星光。

受精后15 min第二次减数分裂进入后期,染色体已经向两极移动(图版 -16),第二极体略突出于质膜表面。细胞质向动物极流动,胚盘区开始加厚。

受精后20 min第二次减数分裂到达末期,极体形成,突出于卵表面,染色质已经分布到极体内(图版 -17)。动物极皮层区明显厚于其他区域,胚盘形成。

受精后25 min卵子排出第二极体,极体直径 $18\sim 20\ \mu\text{m}$ 。卵子内剩余的一半染色质核化。精子星光没有明显变化(图版 -18)。

受精后30~40 min精子星光开始延长,雌雄原核在胚盘底部相互靠近(图版 -19)。受精后50~60 min精子星光继续延长,雌雄原核开始相向运动。动物极明显隆起,原生质不断向动物极流动,有大量卵黄颗粒进入动物极,降解转化后,使动物极两侧出现皮层小泡。

受精后70~80 min雌雄原核不断接近。

受精后90 min雌雄原核已经靠近,开始融合,

核膜开始解体, 呈囊泡状, 形状不规则。精子星光明显(图版 -20)。进入动物极的卵黄颗粒解体后形成大量皮层小泡。

受精后 140 min 处于第一次有丝分裂中期, 染色体排列在纺锤体中间, 动物极顶部开始凹陷(图版 -21)。

受精后 180 min 处于第一次有丝分裂末期, 染色体平均分配到两个子细胞中, 胚盘分裂成两个细胞, 但细胞底部仍然与卵黄物质连接, 形成合胞体(图版 -22)。

2.3 受精过程中卵膜结构的变化

受精后 1 s 卵膜内、外层中的弹性纤维呈弧形结构。卵膜外层弹性亚膜的弧形结构较弱, 遇水后卵膜有膨胀趋势。卵膜与卵质膜结合紧密(图 I-5)。

受精后 10 s 卵膜外层的弹性亚膜的弧形曲度开始减小, 卵膜开始外举, 卵质膜开始与卵膜脱离, 形成较小的卵周隙(图 -11)。

受精后 20 s 卵膜表面的绒毛状结构中可见精子, 并且精子头部开始解体, 卵膜外层的弹性亚膜中弹性纤维的曲度为零(图版 -31)。

受精后 40 s 卵膜不断膨胀, 卵周隙变宽, 卵膜中辐射带的间的弧形曲度变小。

3 讨论

3.1 卵膜的形态与功能

胭脂鱼成熟卵遇水后产生弱黏性。扫描电镜观察发现, 卵子表面精孔器周围直径约 100 μm 的范围以外的区域密布大量绒毛状结构。光镜下观察, 微绒毛与卵膜相连, 但是在透射电镜下观察, 微绒毛是卵膜的附属结构, 并且与卵膜发生实质性联系。鱼类卵膜表面形态多样, 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、红鳍东方鲀(*Fugu xanthopterus*)^[18] 卵子表面光滑; 三倍体鲤^[19] 卵子表面凹凸不平; 暗纹东方鲀(*Fugu obscurus*)^[20]、大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)^[21] 卵子表面具沟和微孔结构; 中华乌塘鳢卵子表面卵膜孔区有黏着器围绕, 精子通过黏着器的基底的穿孔, 筛状圆柱体的筛孔才能到达卵膜孔区^[13]。胭脂鱼卵子表面

具绒毛状结构, 且排列无规则。稀有鮎鲫(*Gobiocypris rarus*)的卵膜也具有此现象^[22]。此外, 研究发现在胭脂鱼精孔器附近微绒毛明显短小变为峭突, 推测绒毛有两方面的作用: 一方面精子接近卵子时, 绒毛的摆动可以加速精子运动, 为精子提供辅助动力, 使之在最短的时间内接近精孔器, 并保证足够数量的精子接近精孔器, 确保卵子受精。另一方面对蜂拥而至的精子起到阻碍作用, 将多余精子阻止在精孔器有效范围以外, 限制进入精孔器精子的数量, 这样可以保证胭脂鱼的单精受精机制; 扫描电镜观察发现多数绒毛的端部聚集在一起, 并有精子深陷在绒毛内的现象, 亦是很好的证明。

3.2 精孔器的结构与功能

精孔器是硬骨鱼类精子入卵的唯一通道, 不同鱼类的精孔器形态结构也有所不同。精孔器据其形状大致可以分为 3 种类型: 深凹陷、短孔道型; 浅凹陷、长孔道型; 无凹陷、长孔道型。大多数鱼类属于第一种类型, 如唇鲮^[23]、稀有鮎鲫^[22]、牙鲆^[18]的精孔器为浅凹陷、长孔道型; 红鳍东方鲀^[18]的为无凹陷、长孔道型。暗纹东方鲀^[20]、大鳞副泥鳅^[21]精孔器内部呈螺旋形, 唇鲮^[23]精孔器内部是沟嵴状结构; 鲂(*Megalobrama terminalis*)^[24]则为平滑形结构; 尼罗罗非鱼^[10]为阶梯结构; 泥鳅的呈涡旋状结构。胭脂鱼精孔器属于深陷型, 其前庭区呈现螺旋形结构, 与鳙^[14]相似。吴坤明等^[25]认为规则的螺旋形结构, 不仅对精子云集提供了有利条件, 而且还存在一种数学物理的动力因素, 有效的加速精子运动, 提高受精率, 但是否确有这种作用还有待进一步研究。胭脂鱼精孔器前庭内壁有许多峭突, 孔洞顺螺旋排列, 精子入卵后卵子通过空洞释放某种物质或皮层反应物, 可以起到使后续精子凝集, 阻止多余精子入卵的作用。这是精孔器最重要的功能。此外, Akio^[26]对 9 种海洋鱼类浮性卵精孔区的超微结构进行了研究, 认为精孔器的形态及孔径的特征可以作为鱼类鉴定的依据。Lönning^[27]提出卵壳的结构更多是由物种的繁殖生物学特征决定, 而不是分类亲缘关系。同样, 受精孔似沟渠结构

和其起伏特征在亲缘关系较远的物种中却表现出相似的特点。相反,亲缘关系较近的两个物种其精孔器比其他物种的差异要大。同时,他又描述了同一物种不同地区的卵子的超微结构,结果发现其壳膜厚度不同,精孔器结构也存在变化。因此,胭脂鱼卵子精孔器结构可能具有物种鉴定和亲缘关系识别的功能,但需要对更多亚口鱼科鱼类卵子结构的研究来提供证据。

3.3 精卵识别

精卵识别机制是鱼类受精生物学中存在困难较大,且尚未解决的问题。在海胆中,有研究认为其卵子表面存在精子受体^[28]。Yanagimach^[29]在太平洋鲱的精孔器中发现有某些特殊物质,这些物质基本上是蛋白质,它们能够激活并促使精子进入卵内。成熟的卵子含有两种物质:加速精子运动和吸引精子至精孔器的雌性交配素 I (Gynogamone I) 和当第一个精子进入卵子内后能凝集其他精子于卵子表面并融化精子的雌性交配素 II (Gynogamone II)。从本研究中扫描电镜观察发现,胭脂鱼成熟卵子精孔器内无精孔细胞及其他物质,推测可能是卵子产出时,携带母体分泌的某种蛋白作为识别的信号分子,完成精卵识别过程的;也可能是卵子的某个基因表达,产生信号识别分子。但此过程尚不清楚,其精卵识别机制有待更进一步的研究。

3.4 精子入卵时间与精子活力

不同鱼类精子入卵时间有所差异,暗纹东方鲀受精后 2~3 s 时精子头部进入精孔器深处^[20],泥鳅需要 5~30 s^[30],兴国红鲤受精后 1~5 s 精子进入精孔器^[31],唇鱼精子在受精后 3 s 精子开始穿过精孔器,受精后 5 s 进入皮层区^[12]。胭脂鱼卵子在受精后 3 s 开始穿过精孔管,5 s 即可见有精子进入皮层区,与唇鱼精子入卵的时间相近而早于其他种,这种差异的产生可能与精子运动能力的强弱有关。不同种鱼的精子活力持续时间也有所不同,胭脂鱼精子快速运动时间 22.30 s,慢速运动时间 25.90 s^[32]。有许多研究表明精子活力与受精率往往有正相关关系,活力高的精子受精能力也强,如:虹鳟精子的受精能力与精子鞭毛摆

动频率有正相关性,鞭毛摆动频率为 10 Hz 时,受精率< 25%,鞭毛摆动频率为 60 Hz 时,受精率> 70%,但也有例外,例如在大西洋鲑中,精子活力似乎与受精率关系不大。本研究中胭脂鱼精子鞭毛摆动频率尚不清楚,但可以推断的是胭脂鱼精子快速运动时间长,说明活力较强,因此受精率较高。

3.5 受精方式及单精受精

大多数硬骨鱼类的卵子有相对较厚的卵膜,并且在动物极处具有一个精孔器,其受精方式为单精受精,而哺乳动物卵子却没有精孔器这一结构。很多学者研究认为单个精孔器的出现是大多数硬骨鱼类阻止多精入卵的一种结构。然而,精孔器的数量并非是解释大多数硬骨鱼单精受精的唯一证据。有研究发现,在鲟类很多物种的卵子中具有一至多个精孔器,如超微结构显示匙吻鲟 (*Polyodon spathala*) 的卵子有 4~12 个受精孔^[8]。但它们仍然表现的是单精受精。研究发现,精孔器内径的大小对阻止多精受精具有一定的作用。在鲟类中,精孔管内部为囊状,末端延伸,但其不能过度延伸超过精子头部的宽度^[33]。相反,一些鲤鱼卵子的受精孔可以一次允许多个精子进入^[34],而鲤鱼也是单精受精。这就说明阻止多精受精还有其他机制。此外,大多数硬骨鱼精孔管直径都略大于其精子头部直径,胭脂鱼和其他大多数硬骨鱼相似,精孔管内径 2.42 μm ,而精子头部直径与其接近,所以允许其进入卵质中。研究发现当第一个精子进入卵子后,在受精卵的外围有大量精子,而在受精后 30 s 观察到又一个精子进入。这种现象在鲤鱼和唇鱼都有报道。所以推测精孔器中精孔管内径的大小并非是精子入卵屏障的主要因素。很多研究者报道了一个完整卵膜(由绒毛膜、卵黄膜、透明带、辐射带组成)在维持单精受精的重要性。去除卵膜的卵子进行人工受精,其会变成多精受精^[35]。

此外,皮层颗粒渗出液至卵周隙中也可以将多余的精子凝集。研究发现卵子表面精孔管特有的构象是许多鱼正常受精中精卵接触的定向位置^[4-5, 11, 34]。基于这种情况,该位置为精子入卵特

殊的靶位, 尽管在不同物种中该处的超微结构因种而异^[36]。而关于胭脂鱼精子入卵的靶位点目前尚未做研究, 这是一项研究该种类单精受精机制不可或缺的内容, 因此是下一步胭脂鱼受精细胞学研究的方向。

致谢: 感谢重庆万州水产研究所提供的实验材料和其他帮助与支持, 感谢本实验室的王志坚老师、彭作刚老师、蒲德勇老师对本实验提供的帮助。

参考文献:

- [1] Ohta T. Initial stages of sperm-egg fusion in the freshwater teleost, *Rhodeus ocellatus ocellatus*[J]. Anat Rec, 1991, 229: 195–202.
- [2] Ohta T, Nashirozawa, C. Sperm penetration and transformation of sperm entry site in egg of the freshwater teleost *Rhodeus ocellatus ocellatus*[J]. J Morph, 1996, 229: 191–200.
- [3] Kobayashi W, Yamamoto T S. Light and electron microscopic observations of sperm entry in the chum Salmon egg[J]. J Exp Zool, 1987, 243: 311–322.
- [4] Brummett A R, Dumont J N. Initial stages of sperm penetration into the egg of *Fundulus heteroclitus*[J]. J Exp Zool, 1979, 210: 417–434.
- [5] Hart N H, Donovan M. Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg of *Brachydanio*[J]. J Exp Zool, 1983, 227: 277–296.
- [6] Kudo S. Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg[J]. Dev Growth Differ, 1980, 22(3): 403–414.
- [7] Iwamatsu T, Onitake K, Yoshimoto Y, et al. Time sequence of early events in fertilization in the Medaka egg[J]. Dev Growth Differ, 1991, 33(50): 479–490.
- [8] Linhart O, Kudo S. Surface ultrastructure of paddlefish egg before and after fertilization[J]. J Fish Biol, 1997, 51: 573–582.
- [9] Iwamatsu T, Ishijima S, Nakashima S. Movement of spermatozoa and changes in micropyles during fertilization in medaka eggs[J]. J Exp Zool, 1993, 266: 57–64.
- [10] 黄永松. 尼罗罗非鱼卵母细胞受精细胞学研究[J]. 动物学报, 1993, 39(1): 19–21.
- [11] Kudo S, Linhart O, Billard R. Ultrastructural studies of sperm penetration in the egg of the European catfish, *Silurus glanis*[J]. Aquatic Living Resour, 1994(7): 93–98.
- [12] 甘光明, 张耀光, 张贤芳, 等. 唇鲮受精的细胞学研究[J]. 水生生物学报, 2006, 30(3): 284–290.
- [13] 何振帮, 洪万树, 陈仕玺, 等. 中华乌塘鳢精子入卵过程的扫描电镜观察[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2009, 48(1): 128–133.
- [14] 王瑞霞, 张毓人, 傅仓生, 等. 家养鱼类受精生物学的研究 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[J]. 水生生物学集刊, 1984, 8(2): 171–176.
- [15] 李树深, 王蕊芳, 刘光佐, 等. 中国胭脂鱼的核型研究[J]. 动物学研究, 1983, 4(2): 182.
- [16] 熊全沫, 夏盛林. 中国胭脂鱼同工酶的研究[J]. 动物学报, 1985, 31(1): 20–27.
- [17] 张春光, 赵亚辉, 康景贵. 我国胭脂鱼资源现状及其资源恢复途径的探讨[J]. 自然资源学报, 2000, 15(2): 155–159.
- [18] 张筱兰, 郭恩棉. 3 种海产经济鱼类成熟卵膜形态的比较研究[J]. 海洋科学, 1999(6): 48–51.
- [19] 叶玉珍, 吴清江. 人工复合三倍体鲤卵的受精生物学研究[J]. 水生生物学报, 1994, 18(1): 17–21.
- [20] 卢敏德, 葛志亮, 倪建国. 暗纹东方鲀精、卵超微结构及精子入卵早期电镜观察[J]. 中国水产科学, 1999, 6(2): 5–8.
- [21] 姚纪花, 周平凡. 大鳞副泥鳅卵子壳膜结构与受精过程的扫描电镜观察[J]. 上海水产大学学报, 1998, 7(1): 65–68.
- [22] 王永明. 稀有鮡鲫受精生物学研究[D]. 重庆: 西南大学, 2011: 1–59.
- [23] 甘光明, 张耀光. 唇鲮受精卵的皮层反应及其引发机制[J]. 水生生物学报, 2005, 29(5): 479–487.
- [24] 王瑞霞, 张毓人, 傅仓生, 等. 鲂鱼受精早期精子入卵的扫描电子显微镜观察[J]. 水产学报, 1982, 6(4): 313–320.
- [25] 吴坤明, 沈其璋, 刘根洪. 泥鳅成熟卵受精孔涡旋状的研究[J]. 科学通报, 1991, 39(15): 1175–1178.
- [26] Akio Hirai. Fine structures of the micropyles of Pelagic eggs of some marine fishes[J]. Jpn J Ichthy, 1988, 35(3): 351–357.
- [27] Lönning S. Comparative electron microscopic studies of teleostean eggs with special reference to the chorion[J]. Sarsia, 1972, 49: 41–48.
- [28] 王宏田, 张培军. 体外受精动物的精卵识别[J]. 海洋科学, 2000, 24(5): 20–22.
- [29] Yanagimachi R. Studies of Fertilization in Clupea Pallasi VI. Fertilization of the egg deprived of the membrane[J]. Jpn J Ichthy, 1957, 6: 41–47.
- [30] 高令秋, 高书堂, 岳朝霞, 等. 泥鳅精子入卵程序的扫描电镜观察[J]. 武汉大学学报: 自然科学版, 1995, 41(6): 740–744.

- [31] 洪一江, 胡成钰, 林光华, 等. 兴国红鲤受精早期精子入卵及卵子变化的研究[J]. 南昌大学学报: 理科版, 1994, 18(1): 58–64.
- [32] 谭娟, 李勇, 周传江, 等. 胭脂鱼精子活力观察. 西南地区动物学会摘要[A]. 2005.
- [33] Dettlaff T A, Ginsburg A S, Schmalhausen O I. Sturgeon Fishes: developmental biology and aquaculture [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1993.
- [34] Kudo S. Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg[J]. Dev Growth Differ, 1980, 22: 403–414.
- [35] Iwamatsu T. A new technique for dechoriation and observations on the development of the naked egg in *Oryzias latipes*[J]. J Exp Zool, 1983, 228: 83–89.
- [36] Kudo S. Ultrastructural modifications of fertilization envelope in the carp egg[J]. Annot Zool Jpn, 1982b, 55: 224–235.

Cytological study on fertilization process of *Myxocyprinus asiaticus*

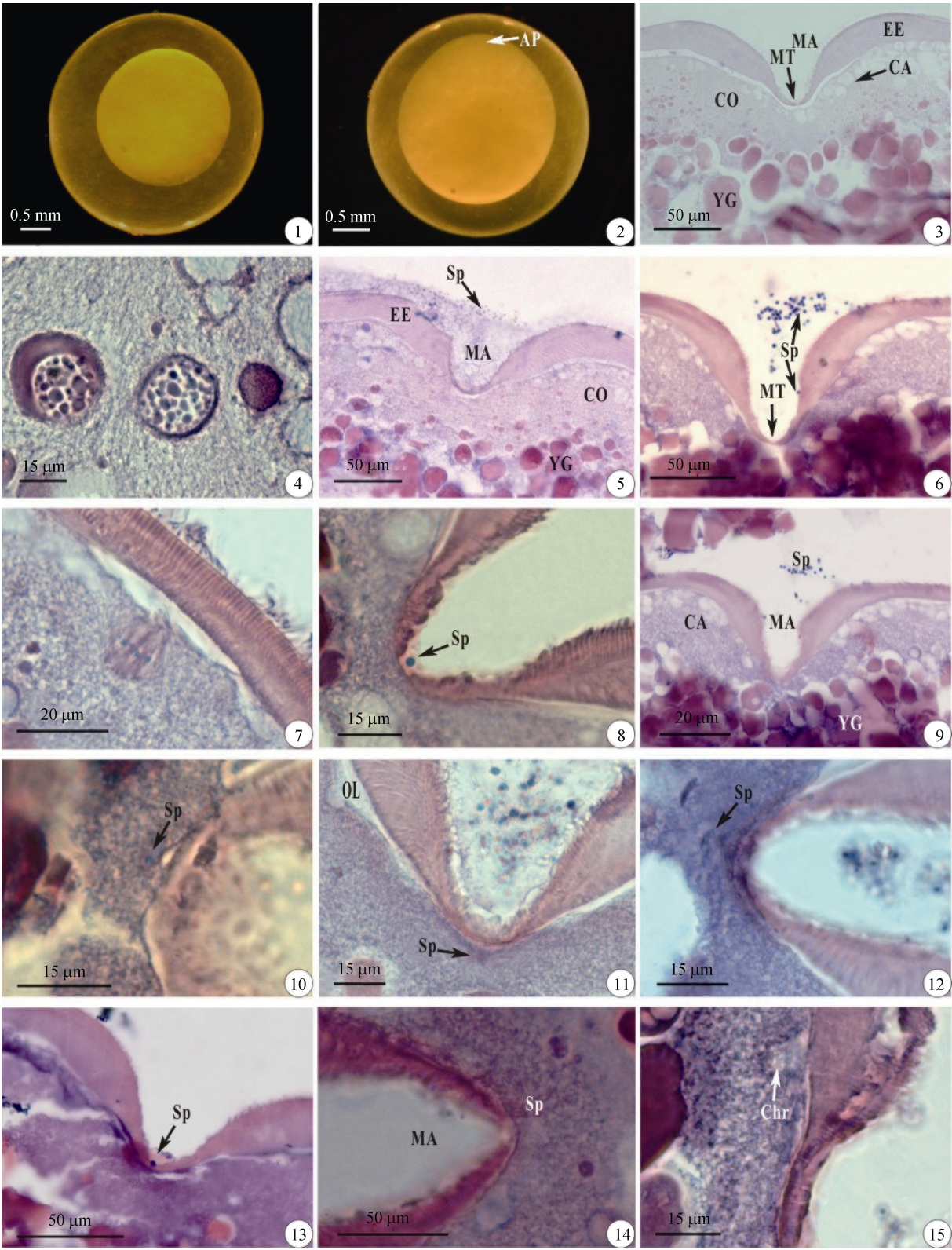
LI Ping, LIU Xiaolei, LI Yong, JIANG Xing, JIN Li, ZHANG Yaoguang

Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, School of Life Science, Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Education of Ministry, Southwest University, Chongqing 400715

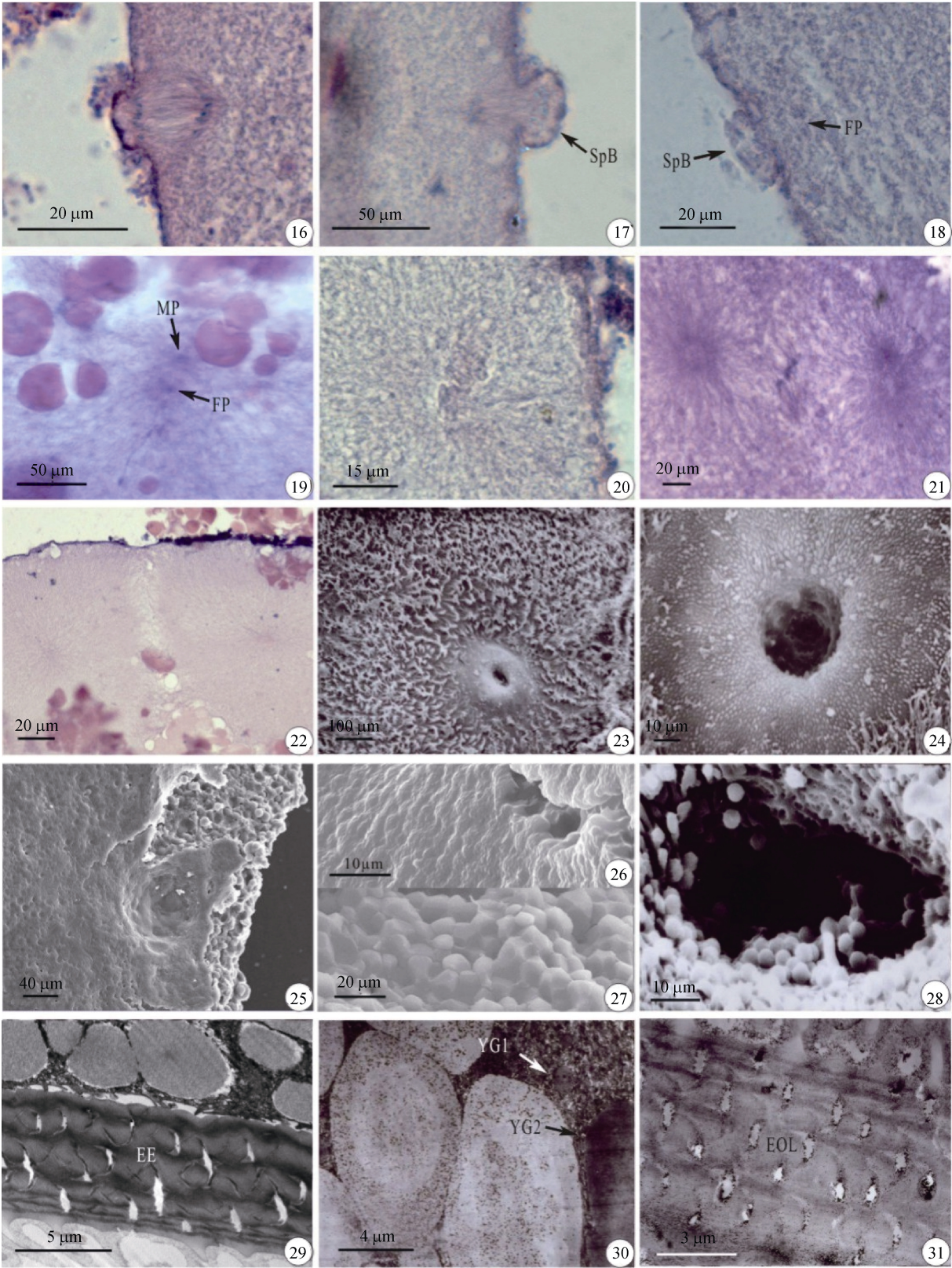
Abstract: The insemination process of *Myxocyprinus asiaticus* egg was studied using artificial fertilization, histology, ultrastructural technology methods etc. The observation showed that there is only one micropyle in shell of egg's animal pole of *M. asiaticus*. Micropylar apparatus of *M. asiaticus* belongs to the type of deep concave and short channel. At water temperature of 17–18°C, sperm passed through micropylar apparatus at 3 s after insemination and entered ovum at 5 s. Sperm star light was formed at 10 s after insemination. After 15 min after insemination ovum was in late time of second meiotic division and second polar body appeared. Ovum was in telophase after 20 min and second meiotic division was formed. Male and female pronucleus was fused after 90 min. Ovum was in metaphase of first karyokinesis at 140 min after insemination. At 180 min after insemination first karyokinesis was over and second cell was formed. The results showed that in micropylar apparatus of mature egg there is no micropylar cell and other stuff, which is similar to that of most other teleost. The inner diameter of micropylar apparatus is 2.42 μm and near to the diameter of sperm head. There are many spines in inner walls of anterior micropylar apparatus and holes are arranged in spiral way, which was one of the reasons for monospermy. This study aims to provide basic data for the research of artificial reproduction technology of *M. asiaticus*.

Key words: *Myxocyprinus asiaticus*; micropylar apparatus; fertilization; cytology

Corresponding author: JIN Li. E-mail: jinll@swu.edu.cn



图版 I (1~15)
Plate I (1-15)



图版 I (16~31)
Plate I (16—31)

图版 I 说明

图 1–15: 光镜图像; 1. 成熟卵的结构, 侧面观; 2. 受精后 240 s 的受精卵, 动物极明显, 侧面观; 3. 精孔器结构; 4. IV 型皮层小泡的转化形态; 5. 受精后 1 s 受精孔附近卵质的结构; 6. 受精后 1 s, 精子进入精孔器; 7. 受精后 1 s 卵子处于第二次减数分裂中期; 8. 受精后 3 s, 精子通过精孔管; 9. 受精后 3 s, 精孔器附近聚集大量精子; 10. 受精后 5 s, 精子进入皮层区; 11. 受精后 10 s, 精子发出微弱星光; 12. 受精后 20 s, 精子星光; 13. 受精后 25 s 精孔器内仍聚集精子, 有精子已经接近精孔管, 且将要通过精孔管。深层皮层小泡开始向外移动; 14. 受精后 30 s 大量精子聚集在精孔器内, 有精子进入精孔管, 精孔管下方有皮层小泡出现, 阻止后续精子的进入; 15. 受精后 45 s 雌核仍然处于第二次减数分裂中期, 染色体靠近质膜。

图 16–22: 光镜图像; 16. 受精后 15 min, 第二次减数分裂后期; 17. 受精后 20 min, 第二次减数分裂末期; 18. 受精后 25 min 排出第二极体; 19. 受精后 40 min, 雌雄原核靠近; 20. 受精后 90 min, 雌雄原核结合; 21. 受精后 140 min, 第一次有丝分裂中期; 22. 受精后 160 min, 第一次有丝分裂末期。

图 23–28: 扫描电镜图像; 23. 卵子表面结构; 24. 精孔器结构; 25. 去卵膜后精孔器结构; 26. 质膜表面结构; 27. 卵黄颗粒形态; 28. 受精后 3 s 大量精子位于精孔器内。

图 29–31: 透射电镜图像; 29. 卵膜结构; 30. 受精后 1 s 中卵黄颗粒结构; 31. 受精后 20 s 卵膜层外层的结构。

CA: 皮层小泡; CO: 皮层区; EE: 卵膜; EOL: 卵膜层外层; FP: 雌性原核; MA: 精孔器; MP: 雄性原核; MT: 精孔管; OL: 卵周隙; Sp: 精子; SpB: 第二极体; YG: 卵黄; YG1: 一型卵黄; YG2: 二型卵黄。

Explanation of Plate I

Nos. 1–15: Light microscope images. 1. Structure of mature eggs, lateral view; 2. 240 s after insemination, animal pole obvious, lateral view; 3. Structure of micropylar apparatus; 4. Transfer shape of type IV alveoli; 5. Archiblastic structure near micropylar apparatus at 1 s after insemination; 6. 1 s after insemination, sperm entered micropylar apparatus; 7. 1 s after insemination, ovum in metaphase of second meiotic division; 8. 3 s after insemination, sperm passed through micropylar apparatus; 9. 3 s after insemination, abundant sperms gathered near micropylar apparatus; 10. 5 s after insemination, sperm entered cortex; 11. 5 s after insemination, sperm set off weak star light; 12. 20 s after insemination, star light of sperm; 13. 25 s after insemination, sperms still gathered in micropylar apparatus, some close to it and ready to go through it; 14. 30 s after insemination, plenty of sperms stayed in micropylar apparatus, some entered it, cortical alveoli appeared below it and prevented the entry of others sperms; 15. 45 s after insemination, female nucleus in metaphase of second meiotic division; chromosome close to plasmalemma.

Nos. 16–22: Light microscope images. 16. 15 min after insemination, middle period of second meiotic division; 17. 20 min after insemination, telophase of second meiotic division; 18. 25 min after insemination, second polar body extruded; 19. 40 min after insemination, male and female pronucleus approached; 20. 90 min after insemination, male and female pronucleus combined; 21. 140 min after insemination, metaphase of first meiotic division; 22. 160 min after insemination, telophase of first meiotic division.

Nos. 23–28: SEM images. 23. Structure of ovum surface; 24. Structure of micropylar apparatus; 25. Structure of micropylar apparatus after the remove of egg envelope; 26. Structure of plasmalemma surface; 27. Yolk protein; 28. 3 s after insemination abundant sperms lie in micropylar apparatus;

Nos. 29–31: TEM image: 29. structure of egg envelope; 30. Structure of yolk protein at 1 s after insemination; 31. 20 s after insemination, structure of egg outer layer.

CA: cortical alveoli; CO: cortex; EE: egg envelopes; EOL: egg outer layer; FP: the female pronucleus; MA: micropylar apparatus; MP: the male pronucleus; MT: micropylar tube; OL: ovum lacuna; Sp: sperm; SpB: second polar body; YG: yolk granule; YG1: type I of yolk granule; YG2: type II of yolk granule.