

大菱鲂受精过程的细胞学观察

吴莹莹^{1,2}, 柳学周¹, 王清印¹, 马爱军¹, 包振民²

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学 生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003)

摘要:采用人工授精和组织切片技术对大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.)受精过程进行细胞学观察。大菱鲂成熟卵处于第二次成熟分裂的中期。精子入卵后, 卵子被激活, 第二次成熟分裂继续进行, 同时发生皮层反应; 受精后 15 min 出现精子星光; 受精后 20 min 雌原核早于雄原核形成, 然后两性原核逐渐靠拢; 受精后 30 min 两原核相互靠拢, 结合线清晰; 受精后 40 min 两原核结合线逐渐消失联合成合子核, 之后合子核核膜消失; 受精后 50 min 合子核处于第一次有丝分裂中期; 受精后 60 min 第一次卵裂完成。[中国水产科学, 2006, 13(4): 555-560]

关键词:大菱鲂; 受精; 细胞学

中图分类号:Q959.486 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)04-0555-06

鱼类受精生物学早期研究比较少, 直到 20 世纪中期左右, 有关鱼类的研究逐渐增多, 研究对象主要包括金鱼(*Carassius auratus*)^[1-2]、鲮鱼(*Megalobrama terminalis*)^[1]和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[3]等。从 20 世纪后期开始, 研究方法和技术手段得到不断改进和发展, 对鱼类受精过程的研究由光镜观察到使用复杂的透射电镜、扫描电镜以及激光共聚焦显微镜观察, 研究观察逐渐深入到更加细微的超微结构方面。研究对象也逐渐丰富起来, 包括淡水鱼类^[4-11]、海水鱼类^[12-14]及杂交鱼种^[15-18]。获得的研究成果包括精卵识别、受精孔的结构和功能、受精膜的举起及其变化、皮层反应的发生和皮层小泡的形态变化、单精入卵机制及雌雄原核的结合过程等方面。但目前对鱼类受精过程中主要事件的发生机制、生理调控研究相对较少, 至今雌雄原核结合的机理还停留于假说阶段, 尚未得到准确论证。海水鱼类, 受精细胞学方面研究尚欠缺, 目前已知的研究种类仅有黑鲷(*Sparus macrocephalus*)^[12]、黄海太平洋鲱(*Clupea pallasii*)^[13]等少数几个, 研究内容也仅限于精子入卵早期的观察及卵膜结构在受精前后的变化等。

大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.)为世界公认的名优海水养殖鱼类, 属鲆科、菱鲆属, 是原产于

欧洲北海、波罗的海和地中海沿岸的一种名贵比目鱼。1992 年中国首次引进^[19], 1998-1999 年对大菱鲂的繁育生物学研究取得巨大突破, 苗种培育技术随之迅速提高。目前大菱鲂已成为中国北方鲆类养殖的重要种类, 经济效益可观。深入研究大菱鲂受精生物学, 对其产业的持续发展具有重要意义。本研究运用人工授精和组织切片技术对大菱鲂的受精过程做了较详细的细胞学观察, 以期丰富鱼类受精生物学内容, 并为大菱鲂生殖调控和育苗生产提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

2005 年 4 月在青岛市忠海水产养殖有限公司取大菱鲂亲鱼, 经人工控温控光后达到性成熟, 通过按摩亲鱼腹部分别采集精卵, 人工授精。将受精卵置于 15.8℃ 过滤海水中孵化。将受精后不同时间段的受精卵分别取样, 用 Bouin 氏液固定, 换新固定液固定 12 h 左右后转入 70% 酒精内保存。

1.2 方法

由于海水鱼类受精卵壳膜(chorion)通透性比较差, 在脱水前先用特制的尖头镊子将壳膜剥掉, 同时为了在处理过程中方便观察和操作, 将样品在脱水

收稿日期: 2005-10-10; 修订日期: 2006-01-04.

基金项目: 国家“863”高技术研究与发展项目(2002AA603011, 2004AA603320); 农业部农业结构调整重大技术研究专项(04-11-01B).

作者简介: 吴莹莹(1981-), 女, 博士研究生, 从事鱼类受精生物学研究. E-mail: yingyingwu968@sobu.com

通讯作者: 王清印. E-mail: qywang@public.pd.sd.cn

前用醇溶性的伊红染成红色,并用琼脂进行预包埋。70%酒精开始梯度脱水,二甲苯或叔丁醇透明,石蜡包埋,连续切片厚度6~8 μm ,HE染色,中性树脂封片,Nikon显微镜下观察摄影。

2 结果

2.1 成熟大菱鲆卵的观察

刚产出的大菱鲆成熟卵呈圆球形,微黄色透明,中央有1个无色透明的油球,为浮性卵。卵径为 (0.98 ± 0.03) mm,油球径为 (0.13 ± 0.02) mm。光镜下观察可以发现看似光滑的壳膜实际上呈现为网状结构,并且布满了排列相对规则的微小孔(micropore),在动物极的中央有1个受精孔(micropyle),也称为卵膜孔(图版I-1);通过壳膜可以看到大量的圆形皮层小泡(cortical alveoli)(图版I-2)。由于Bouin氏固定液的作用,样品固定以后壳膜以内的卵物质产生收缩现象,所以产生卵间隙。

对成熟卵进行组织切片,可以看到此时的卵子处于第二次减数分裂中期,纺锤体位于胚盘外侧质膜下方,纺锤体长轴与质膜垂直,纺锤丝比较清晰(图版I-3)。这时的胚盘相对比较薄,但动物极相对比植物极厚一些。其中,胚盘被苏木精染成蓝紫色,紧挨质膜下有许多皮层小泡,也有少数大的空泡跨过胚盘。卵黄物质基本呈粉红色,细看切片会发现中间夹杂着少许蓝紫色颗粒,并且卵黄中也会偶尔有部分圆球状颗粒被染成淡淡的蓝紫色,卵黄中还有大片圆形或不规则形状的空泡。

2.2 精子入卵(受精开始至受精后15 min)

精子入卵,受精开始至受精后15 min,卵子被激动,皮层反应随即发生。在质膜表面可以看到许多大小不一的小泡,有的已经破裂开口(图版I-4)。皮层反应的发生在各个部位不是同步的。同时还可以看到胚盘中仍有皮层小泡继续往质膜下方移动聚集,但纺锤体附近几乎没有皮层小泡。受精后3 min,质膜下方皮层小泡大为减少,只有少数仍在胞吐。受精后6 min,质膜表面不再有破裂的皮层小泡,下方的皮层小泡也明显减少,质膜基本完全恢复(图版I-6)。卵核已发育到第二次减数分裂的中后期,朝向质膜的一极将质膜微微向外拱起,这种状态一直持续到受精后10~15 min(图版I-5~7)。动物极胚盘继续缓慢增厚。胚盘和卵黄中仍然有比较大的空泡存在。

2.3 雌雄原核的形成及其结合(受精后15~40 min)

此时的胚盘较以前更加扩大。受精后15 min,可以观察到精子星光已经形成,卵核处于第二次减数分裂中后期,而后染色体被纺锤丝牵引到两端,其靠近质膜的一端逐渐被排到外面,形成第二极体(图版I-8)。受精后20 min,胚盘中心已经向内隆起,此时雄原核先于雌原核出现在胚盘中心位置(图版I-9、10)。受精后30 min,雌雄原核较之前的体积都有所膨大,相互靠拢并接触,此时可以清楚地看到与质膜平行的两原核的结合线(图版I-11)。受精后40 min,两原核位置没有大的变化,只是此时的结合线与质膜产生了1个大约25°的夹角(图版I-12),说明两原核发生了旋转,结合线开始变得模糊。此时两原核内已经各自形成2套染色体(图版I-13),说明大菱鲆的原核以联合方式形成合子。之后结合线完全消失,雌雄原核联合成为一个合子,合子两端形成2个相对的星光,星光的连线与质膜平行。这一段时间内,还可以看到有少量的皮层小泡不均匀地散布在胚盘内。

2.4 第一次卵裂(受精后40~60 min)

此时细胞质由植物极向动物极的集中达到极限。合子核的核膜消失,染色质凝集成染色体,第一次卵裂开始。首先是核分裂。染色体受纺锤丝的牵引排列到赤道板上,合子核处于第一次有丝分裂中期,纺锤体的长轴与质膜平行(图版I-14)。随后染色体被拉向两极,形成2个子核。稍后两核之间的细胞质也开始分离,形成1条白色的空隙,最后在卵表发生细胞质溢缩,形成卵裂沟(图版I-15),第一次卵裂完成。

分裂形成的2个子核并未停止活动,紧接着进行第二次分裂,第二次分裂的纺锤体长轴与质膜垂直(图版I-15)。

3 讨论

3.1 皮层反应

同其他硬骨鱼类一样,大菱鲆的精子一旦与卵子质膜相接触,卵子就开始发生一系列的变化,其中最明显的变化就是皮层反应。在不同种类的硬骨鱼类中,皮层反应开始发生的时间有所不同。大菱鲆精子入卵速度非常快,皮层反应在受精后0~2 s内就已经发生,类似于鲻(*Aristichthys nobilis*)^[4]和底鳉(*Fundulus heteroclitus*)^[20]。其他如鲤(*Cyprinus*

carpio)为受精后 20 s^[10]、斑马鱼(*Oncorhynchus keta*)30 s^[21]、圆尾鲱鱼(*Oryzias latipes*)30 s^[22]、黑鲷(*Sparus macrocephalus*)15~54 s^[12]、金鱼 30~60 s^[23]、兴国红鲤(*Cyprinus carpio* var. *Singuenensis*)30~60 s^[24]、高体鲈鲈(*Rhodeus ocellatus*)40~60 s^[25]。黄鲈(*Monopterus albus*)因为精子入卵速度非常缓慢,受精后 3 min 精子才聚集于精孔区周围,因此它的皮层反应在受精后 3~4 min 才开始发生^[5]。一些杂交种类的鱼类皮层反应发生的时间都比较晚,一般在受精后 3 min 才开始^[15-16]。由此可见,大部分鱼类的皮层颗粒是在受精后经过一段时间才开始破裂的。

3.2 受精方式

正常情况下,多数硬骨鱼类的受精方式为单精入卵、单精受精^[4,6-8,12,26]。但中华鲟(*Acipenser sinensis*)^[9]卵母细胞有多个受精孔,往往导致多精入卵,但受精方式仍然为单精受精。在本研究中,在精子星光形成以后每个卵中都只有 1 个雄原核,并与雌原核结合成为合子核,说明大菱鲆的受精方式为单精入卵、单精受精。受精程序也与其他硬骨鱼类基本相同,即精子入卵、卵子激动、产生星光、形成雌雄原核到形成合子核,最终完成第一次卵裂。

3.3 雌雄原核的结合

鱼类受精过程中两性原核如何由最初的位置迁移到最终结合位置至今仍然是个谜。目前学术界基本有 2 个假说:①细胞质流学说,猜测细胞质流动可能影响两性原核的运动,细胞质流学说可由金鱼^[11]、尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)^[8]的两性原核移动轨迹证明;②星光引导学说,估计雄原核的运动与精子星体成长有关。精子星光引导雄性原核向胚盘中央移动,同时雌性原核受星光吸引向雄原核靠拢,使雌雄原核结合。星光引导学说可在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、三角鲂(*Megalobrama terminalis*)和青鱼(*Myxopharyngodon piceus*)杂合体的受精卵中^[3,15]找到例证。此外,陈大元等^[14]通过秋水仙素(Col)与细胞松弛素 B(CB)实验对文昌鱼受精机理的研究,认为原核的移动受微丝控制。

通过对观察结果的综合分析,作者认为,在大菱鲆受精过程中,两性原核的运动可能是由来自细胞质流动对其产生的推动力、由精子星光产生的引力和散布于胞质中的微丝对其产生的牵引力共同作用的结果。细胞质由植物极向动物极流动,到达动物极时压迫质膜隆起,同时也受到动物极质膜的反作

用力,迫使细胞质沿卵轴向胚盘底部流动,从而带动两性原核向胚盘底部中央运动;其次,精子的微管组织中心—中心体在进入卵子后,产生星光引导雌雄原核的迁移靠近;再者,在原核迁移阶段,原核周围有可能散布着核周微丝束,它们也促使原核相互靠近。

参考文献:

- [1] 朱 亮,陈兆周,王丽兰. 金鱼和鲢鱼卵球受精的细胞学研究[J]. 实验生物学报,1960,7(1):29-46.
- [2] 曲淑惠,张天爵,周淑珍,等. 金鱼的再受精及其时程[J]. 实验生物学报,1964,9(2):130-144.
- [3] 刘 筠. 草鱼卵球受精的细胞学研究[J]. 湖南师范学院自然科学学报,1963,(5):1-12.
- [4] 张天爵,封树芒,潘志宗,等. 鲢鱼受精早期扫描电镜研究[J]. 动物学报,1991,37(3):293-297.
- [5] 周定刚,温安评. 黄鲈精子活力检测和精子入卵早期过程观察[J]. 水产学报,2003,27(5):398-402.
- [6] 王瑞霞,张毓人,傅金生,等. 鲈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.
- [7] 郑文彪,潘炳华,安 东,等. 草胡子鲇受精过程的扫描电镜观察[J]. 动物学研究,1991,12(2):111-115.
- [8] 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.
- [9] 许 愿,熊全陈. 中华鲟受精细胞学研究[J]. 动物学报,1990,36(3):275-279.
- [10] Kudo S, Sato A. Fertilisation cone of carp eggs as revealed by scanning electron microscopy [J]. Dev Growth Diff, 1985,27:121-128.
- [11] 王瑞霞,张毓人. 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.
- [12] 张振兰,吕桥日,姚 雯,等. 黑鲷成熟精、卵和精子入卵早期过程的初步观察[J]. 海洋湖沼通报,1998,4:62-68.
- [13] 黄树庆,周淑珍. 黄海水产学院受精前后卵膜的动态变化[J]. 青岛海洋大学学报,1997,27(2):196-202.
- [14] 陈大元,宋祥芬,赵学坤,等. 文昌鱼受精机理研究—受精卵的超显微结构[J]. 动物学报,1991,37(4):422-6.
- [15] 刘 筠,陈淑群,王敬祺. 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):329-336.
- [16] 刘国安,吴维新,林松安,等. 兴国红鲤同草鱼杂交的受精细胞学研究[J]. 水产学报,1987,11(1):17-21.
- [17] 李建中,张轩杰,刘少军,等. 异源四倍体鲫鲤的受精细胞学[J]. 动物学报,2002,48(2):233-239.
- [18] 刘恩阳. 草鱼卵子和三角鲂精子杂交的受精细胞学研究[J]. 水产学报,1987,11(3):225-232.
- [19] 雷霖林,刘新富. 大菱鲆引进养殖的初步研究[J]. 现代渔业信息,1995,10(11):1-3.
- [20] Brannmet A, Dumont J. Initial stages of sperm penetration into

- the egg of *Fundulus heteroclitus* [J]. *J Exp Zool*, 1979, 210: 417-434.
- [21] Hart N, Donovan M. Cortical granule exocytosis and cell surface organization in eggs of *Brachdanio* [J]. *J Exp Zool*, 1980, 213: 137-157.
- [22] Iwamatsu T, Ohta T. Scanning electron microscope observations on sperm penetration in teleostean fish [J]. *J Exp Zool*, 1981, 218(2): 261-277.
- [23] 张天爵, 封树杰, 曹忠宗, 等. 金鱼精子入卵过程的扫描电镜观察[J]. 动物学研究, 1993, 14(2): 166-172.
- [24] 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.
- [25] Ohta T, Iwamatsu T. Electron microscopic observation on sperm entry into the rose bitterling, *Rhodnius orlatus* [J]. *J Exp Zool*, 1983, 227(1): 109-119.
- [26] Kobayashi W, Yamamoto T S. Light and electron microscopic observation of sperm entry in the chum salmon egg [J]. *J Exp Zool*, 1987, 243(2): 311-322.

Cytological observation on the fertilization process in *Scophthalmus maximus* L.

WU Ying-ying^{1,2}, LIU Xue-zhou¹, WANG Qing-yin¹, MA Ai-jun¹, BAO Zhen-min²

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071; 2. College of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

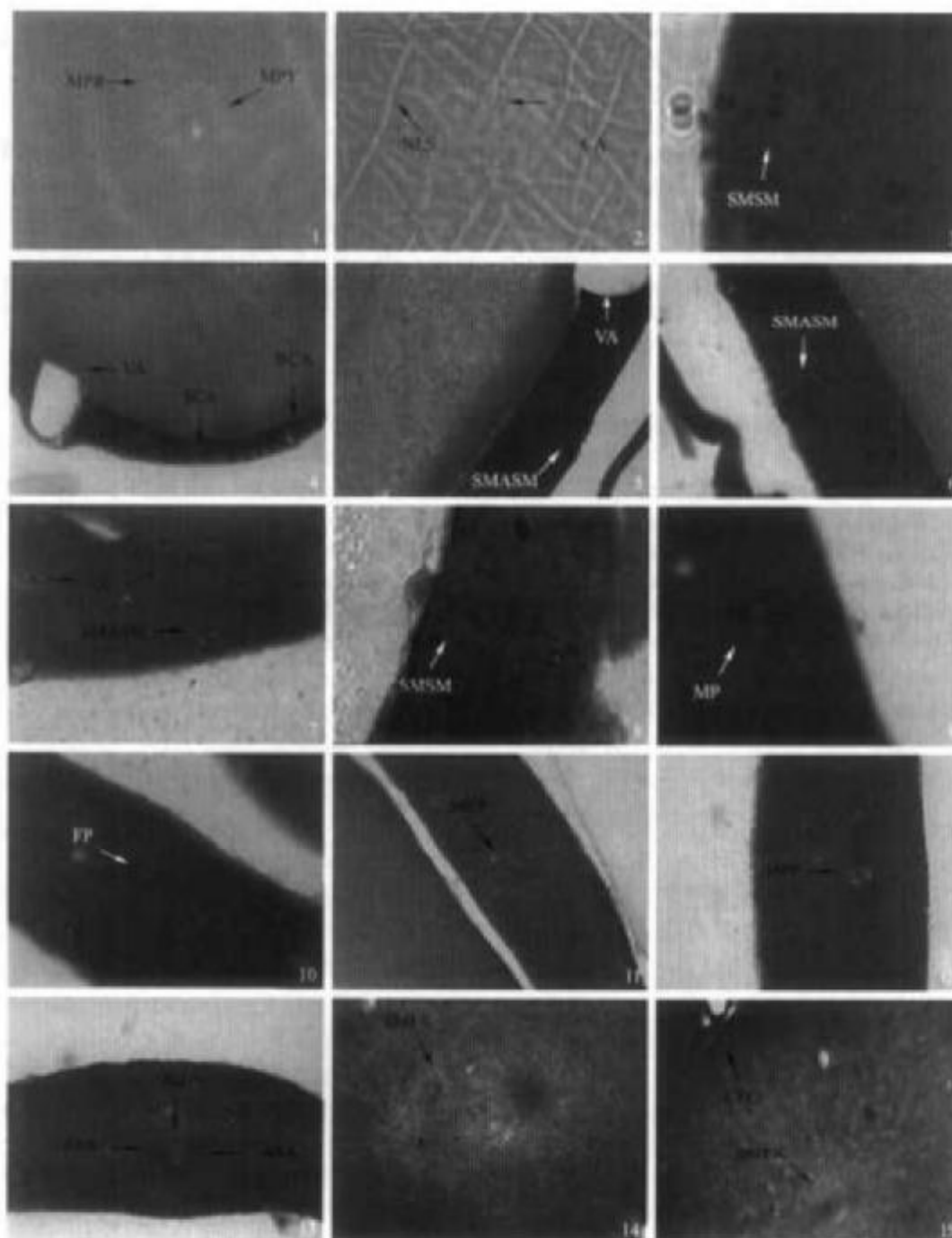
Abstract: This paper deals with the results of cytological observation on the fertilization process in turbot *Scophthalmus maximus* L. Artificial insemination and histological section techniques were used in this study. The fertilized eggs at different time after insemination were fixed in Bouin's solution and dehydrated by alcohol. The thickness of the tissue sections was from 6 to 8 μm . Then the tissue sections were stained with hematoxylin and eosin. Observation results showed that the mature eggs of the *Scophthalmus maximus* L. remained at the metaphase of the second maturation division. The egg was activated as the sperm penetrating into the egg, with the development of the second maturation division and the cortex reaction. At 15 minutes after insemination, the sperm-aster appeared. At 20 minutes after insemination, the male pronucleus was formed prior to the formation of female pronucleus, and later they got closer to each other. At 30 minutes after insemination, the male and female pronuclei combined together and a clear junction line was observed. At 40 minutes after insemination, the zygote nucleus formed and later the karyotheca became faint. At 50 minutes after insemination, the zygote nucleus developed into the metaphase of the first mitosis, and then at 60 minutes, the first karyokinetic division was finished. From the results, it was concluded that the fertilization type of *Scophthalmus maximus* L. was monospermism and the combine type of male and female pronuclei was conjugation. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(4): 555-560]

Key words: *Scophthalmus maximus*; fertilization process; cytological observation

Corresponding author: WANG Qing-yin. E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

吴莹莹等:大菱鲆受精过程的细胞学观察

WU Ying-ying et al: Cytological observation on the fertilization process in *Scophthalmus maximus* L.



图版 I Plate I

(图版 I 说明见第 560 页 Explanation of Plate I at page 560)

图版 I 说明

1-2: 光镜下成熟大菱鲆卵的壳膜表面, 整个卵表均匀密布着微小孔; 3: 成熟卵子; 4: 受精后 0-5 s 的卵子; 5: 受精后 3 min 的卵子; 6: 受精后 6 min 的卵子, 粉红色的卵黄中可以看到夹杂少许蓝紫色颗粒; 7: 受精后 12 min 的卵子; 8: 受精后 15 min 的卵子; 9: 受精后 20 min 的卵子; 10: 受精后 20 min 的卵子; 11: 受精后 30 min 的卵子; 12: 受精后 40 min 的卵子; 13: 受精后 45 min 的卵子; 14: 受精后 50 min 的卵子; 15: 受精后 60 min 的卵子。

BCA—大的皮层小泡; CA—皮层小泡; CFC—二细胞分裂沟; FP—雌原核; MFP—雌原核和雌原核; MPR—微小孔; MP—雄原核; MPY—受精孔; NLS—网状结构; NZ—合子核; SA—精子星光; SASM—第二次减数分裂后期的纺锤体; SCA—小的皮层小泡; SMASM—第二次减数分裂中后期的纺锤体; SMFK—第一次有丝分裂中期纺锤体; SMSK—第二次有丝分裂中期纺锤体; SMSM—第二次减数分裂中期纺锤体; SSA—子星光; VA—空泡。

Explanation of Plate I

1-2: The mature egg surface with unnumbered and orderly arranged micropore under optics microscope; 3: Mature egg; 4: The egg at 0-5 seconds after insemination; 5: The egg at 3 minutes after insemination; 6: The egg at 6 minutes after insemination, and in the pink yolk there were a few royal purple granules; 7: The egg at 12 minutes after insemination; 8: The egg at 15 minutes after insemination; 9: The egg at 20 minutes after insemination; 10: The egg at 20 minutes after insemination; 11: The egg at 30 minutes after insemination; 12: The egg at 40 minutes after insemination; 13: The egg at 45 minutes after insemination; 14: The egg at 50 minutes after insemination; 15: The egg at 60 minutes after insemination.

BCA—Big cortical alveoli; CA—Cortical alveoli; CFC—Channel of the first cell cleavage; FP—Female pronucleus; MFP—Male and female pronuclei; MPR—Micropore; MP—Male pronucleus; MPY—Micropyle; NLS—Netlike structure; NZ—Nucleus of zygote; SA—Sperm-aster; SASM—Spindle at anaphase of the second meiosis; SCA—Small cortical alveoli; SMASM—Spindle at meta-anaphase of the second meiosis; SMFK—Spindle at metaphase of the first karyokinesis; SMSK—Spindle at metaphase of the second karyokinesis; SMSM—Spindle at metaphase of the second meiosis; SSA—Son-sperm-aster; VA—Vacuole.