

赤眼鲮精子入卵的扫描电镜观察

孙际佳, 郭云贵, 李桂峰, 赵会宏

(华南农业大学 动物科学学院水产养殖系, 广东 广州 510642)

摘要:选取性成熟的赤眼鲮(*Squaliobarbus curriculus*)亲鱼, 体质量 800~2 300 g, 经人工催产后, 在 27℃ 条件下进行干法人工授精。取成熟卵及相遇后不同时间段的精卵用扫描电镜对赤眼鲮成熟精、卵及精子入卵早期过程进行观察。结果显示, 赤眼鲮成熟精子为鞭毛型形态, 全长 19.6~22.4 μm。头部直径约 1.65 μm, 鞭毛长 17.8~20.6 μm, 头径与鞭毛长度之比为(1:9.89)~(1:11.4)。赤眼鲮成熟卵呈圆形, 具单一受精孔。卵膜厚度约为 2.78 μm, 卵膜表面平滑光洁; 无明显的沟或嵴, 卵膜表面可见均匀分布有很多孔小管, 直径约 0.14 μm。在动物极具一漏斗状凹陷卵膜孔, 直径 12.46~14.10 μm, 其底部为圆环状的受精孔, 受精孔的周边平滑, 向四周呈辐射状隆起, 外孔径约 5.21 μm, 内孔径约 2.71 μm。在 27℃ 时, 赤眼鲮精子 18 s 内可完成入卵过程; 约 60 s 后受精孔外的精子全部解体。通过对精子、卵及精孔管的测量和扫描电镜观察, 确定赤眼鲮受精方式为单精受精。[中国水产科学, 2006, 13(5): 740~744]

关键词:赤眼鲮; 受精; 扫描电镜

中图分类号: Q959.499 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)05-0740-05

赤眼鲮(*Squaliobarbus curriculus*), 属于鲤形目, 鲤科, 亚罗鱼亚科。是广布中国主要水系的野生经济鱼类, 由于其具有抗病力强、适应性广的特点, 因而极具开发价值。硬骨鱼类精子入卵的研究已有较多报导, 硬骨鱼类精子入卵的方式和途径基本相似, 但不同种类之间仍有特异性。有关鲤科鱼类受精早期扫描电镜的受精生物学研究在鳊(*Aristichthys nobilis*)^[1]、金鱼(*Carassius auratus*)^[2]等方面已做过报道。鳊受精卵壳膜表面有一漏斗状的卵膜孔和大量的孔小管; 金鱼受精卵的卵膜孔区有 5~10 条沟和嵴, 受精方式为单精受精^[1-2]。暗纹东方鲀(*Fugu obscurus*) 鲀卵膜较厚, 表层有许多嵴、沟及微孔结构, 受精孔口径及容量较大, 受精方式为单精或多精入孔入卵, 受精方式亦为单精受精^[3]。大鲵(*Andrias davidianu*) 受精卵壳膜随着受精时间的变化而出现皱褶、沟、嵴, 受精完毕后皱褶消失, 受精方式为多精入卵^[4]。索氏六须鲶(*Silurus soldatovi*) 卵细胞受精孔被絮状壳膜覆盖, 受精后 30~60 s 完成精子入卵过程, 受精方式为单精受精^[5]。目前有关赤眼鲮受精生物学方面的研究尚未见报

道。本实验通过对赤眼鲮精、卵及精子入卵过程的扫描电镜的观察研究, 旨在了解其精子入卵过程的生物学现象, 为赤眼鲮繁殖生物学理论研究及赤眼鲮人工繁殖提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

选取性成熟的赤眼鲮亲鱼, 体质量 800~2 300 g, 经人工药物催产后, 在 27℃ 条件下, 进行干法人工授精。取成熟卵及精卵相遇后不同时间段(2 s, 4 s, 6 s, 8 s, 10 s, 12 s, 14 s, 16 s, 18 s, 20 s, 25 s, 28 s, 30 s, 35 s, 40 s, 55 s, 60 s)的受精卵样品, 每个时段取 50~80 粒。

1.2 实验方法

受精卵样品用 2.5% 戊二醛和 1% 的锶酸双重固定, 酒精梯度脱水, 入丙酮、醋酸异戊酯, 临界点干燥仪干燥, 镀金后, 于 S-520 型扫描电镜观察拍照, 每个时段分别观察 12 个样本。有关精子、成熟卵细胞相关参数依照电镜照片给定标准尺寸经测量换算求得。

收稿日期: 2005-11-25; 修订日期: 2006-04-14。

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划(2004BA508B18); 广东省科技计划项目重大专项(2005A20105001); 广东省科技攻关项目(2005E20301003)。

作者简介: 孙际佳(1976-), 女, 实验师, 主要从事水产动物种质资源及病害方面的研究。

通讯作者: 赵会宏, E-mail: zhuohh@scsu.edu.cn

2 结果

2.1 赤眼鳟精子的外部形态

赤眼鳟成熟精子为典型的鞭毛型形态,无顶体。精子头部呈椭圆形,全长 $19.6\sim 22.4\ \mu\text{m}$ 。头部直径约 $1.65\ \mu\text{m}$,颈部短,鞭毛长 $17.8\sim 20.6\ \mu\text{m}$,头径与鞭毛长度之比为 $(1:9.89)\sim (1:11.4)$,见图版 I-1、2。

2.2 成熟卵细胞外部形态

赤眼鳟成熟卵呈圆形,成熟卵细胞经临界点干燥后呈灰白色。低倍扫描镜下可看清整个卵细胞,卵膜厚度约为 $2.78\ \mu\text{m}$,卵膜表面平滑光洁(图版 I-3),高倍镜下观察,表面无明显的沟或嵴,可见卵膜表面较均匀地分布有很多孔小管,直径约 $0.14\ \mu\text{m}$ (图版 I-1)。在卵膜孔附近的漏斗状凹陷壁上孔小管相对则较大,直径约 $1.1\ \mu\text{m}$ (图版 I-4)。在动物极具一漏斗状凹陷卵膜孔,直径 $12.46\sim 14.10\ \mu\text{m}$,其底部为圆环状的受精孔,受精孔的周边平滑,向四周呈辐射状隆起(图版 I-3、4),外孔径约 $5.21\ \mu\text{m}$,内孔径约 $2.71\ \mu\text{m}$ (图版 I-7)。

2.3 精子入卵的时序

受精 $2\sim 4\ \text{s}$,已有精子到达受精孔附近,并且头部与受精孔相向,受精孔表面光滑无堵塞物出现(图版 I-5)。

受精 $8\sim 18\ \text{s}$,可见有多个精子聚集在受精孔周围,并有精子开始穿入受精孔,进入卵内将尾部留在受精孔外。这一阶段初期没有絮状物堵塞受精孔。随时间推移受精孔因受精卵结合发生皮层反应导致大量颗粒状的皮层颗粒外排,逐渐填充受精孔阻止其他的精子进入,最终将其堵塞,表明精子入卵过程结束(图版 I-6、7、8)。

受精 $20\sim 28\ \text{s}$,大部分样品的精子 and 一团絮状物堵塞在卵膜孔内。在此阶段,可见受精管口被封闭(图版 I-9)。

在受精 $30\sim 60\ \text{s}$ 阶段,卵膜孔内的絮状物增大,到达受精孔外的精子被受精卵外排的颗粒物堵塞在卵膜孔内,精子失去自主运动,随受精孔逐渐外排的颗粒物一起,移向卵膜孔外(图版 I-10)。40 s 时可见部分精子解体,至 55 s 时,所有受精孔均被由受精孔排出的颗粒堵塞物填实,此时在堵塞物中可见大块碎瓦状的颗粒,受精孔外的精子完全解体(图版 I-11)。

3 讨论

3.1 精卵形态

赤眼鳟精子为典型鞭毛型结构,头部呈椭圆形,无顶体;颈部短,尾部为鞭毛。与鲤科鱼类的鲃(*Megalobrama terminalis*)^[6]、鲢(*Aristichthys nobilis*)^[11]等鱼类的精子形态相似。

赤眼鳟成熟卵呈圆形,动物极一端具一卵膜孔,卵膜孔底部为受精孔。孔小管均匀分布于卵膜的表面,与鲢^[11]、黑鲟(*Spatus macrocephalus*)^[7]等类似。在卵膜孔前庭处孔小管的直径明显增大。卵壳表面无明显的沟或嵴。这与鲢卵细胞形态相似^[11],而有别于金鱼(*Carassius auratus*)^[2]、暗纹东方鲀(*Fugu obscurus*)^[3]、黑鲟^[7]的表面存在的沟或嵴,以及索氏六须鲶(*Silurus soldatovi*)^[5]卵表面类似叶片的网状结构。

3.2 关于赤眼鳟的受精方式和精子入卵时间

卵细胞受精孔口径与精子的大小是判断是否单精受精的重要依据之一。

赤眼鳟卵壳膜表面具一受精孔,属单受精孔型。从图版 I 均可看出,精孔区聚集了较多精子,四周精子则相对较少,说明精孔区和精子有相互吸引的机制,精子和卵细胞之间的有效识别与成功结合是受精过程能够发生的前提条件。

赤眼鳟受精孔在受精之前是敞开的。受精孔内径约 $2.71\ \mu\text{m}$,而赤眼鳟的精子头部直径约为 $1.65\ \mu\text{m}$,说明不可能有 2 个以上的精子同时进入受精孔。鲤(*Cyprinus carpio*)^[8]精孔管内径为 $5\ \mu\text{m}$,比精子头部直径 $2.4\ \mu\text{m}$ 大得多,可允许 2 个精子进入,但由于较早形成的受精锥具有拒绝多余精子入卵的能力,因此只发生单精受精。索氏六须鲶^[5]精孔管直径为 $2.6\sim 3.0\ \mu\text{m}$,精子头部直径 $1.6\sim 2.0\ \mu\text{m}$,每次只允许 1 个精子通过。当第一个精子进入后,精孔管立刻被丝絮状受精塞所堵塞。暗纹东方鲀^[3]卵受精孔口径较大,受精 $2\sim 3\ \text{s}$ 有单精或多精进入孔内,但精孔底部口径只可让 1 个精子入卵。其他鱼类如底鳉(*Fundulus heteroclitus*)^[9]、阔尾鲮鱼(*Oryzias latipes*)^[10]、高体鲮鱼(*Rhodeus ocellatus ocellatus*)^[11]、斑马鱼(*Brachydanio rerio*)^[12]、鲃^[6]、尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)^[13]、鲢^[11],受精孔直径亦小于精子直径的 2 倍,受精方式为单精受精。

不同鱼类在受精后精子入卵时间亦有差异。鲤

(*Cyprinus carpio*)^[14]需 2~25 s,大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)^[15]需 5~30 s,施氏鲃^[16](*Acipensers chrencki*)需 50~120 s,大鲵^[4](*Andrias davidianu*)需 75~90 s,索氏六须鲶^[5]受精后 30~60 s 完成精子入卵过程。赤眼鲫卵在 27℃ 条件下,受精 18 s 内卵膜孔即可出现皮层反应的颗粒状堵塞物,随后将多余精子及堵塞物排出受精卵的卵膜孔外的特征,说明赤眼鲫受精时间较短,与同属鲤科的鲤鱼类似。

上述结果提示,开展赤眼鲫人工授精时,人工操作精卵结合过程应尽快完成。为提高受精率还应在亲鱼组配时适当增加雄鱼的比例,为人工授精提供更多的精子以提高受精率。

3.3 关于受精锥的形成

受精锥是精子与卵质膜结合和融合时由于卵细胞质的收缩活动,在该处形成的不同形状的细胞质突起。并不是所有鱼类受精过程均可出现明显受精锥,Kudo 等^[8,17]发现鲤受精锥在精子入卵的同时形成;张天荫等^[1]在鳊鱼的精卵结合时序观察中没有发现明显的受精锥形成。本研究观察也显示,赤眼鲫在精卵结合时不产生明显的受精锥,这与张天荫等在鳊的观察结果是一致的。

参考文献:

- [1] 张天荫,封树芒,潘忠宗,等.鳊鱼受精早期扫描电镜研究[J].动物学报,1991,37(3):293-296.
- [2] 张天荫,封树芒,潘忠宗.金鱼精子入卵过程的扫描电镜观察[J].动物学研究,1993,14(2):166-170.
- [3] 卢敏德,葛志亮,倪建国,等.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.
- [4] 邓凤娟,肖汉兵,熊定荣,等.大鲵精子入卵过程的扫描电镜观察[J].武汉大学学报(自然科学版),1998,44(6):742-744.
- [5] 尹洪滨,孙中武,潘伟志,等.索氏六须鲶受精早期精子入卵的扫描电镜观察[J].中国水产科学,2000,7(2):1-4.
- [6] 王瑞霞,张毓人,付仓生,等.鲢鱼受精早期精子入卵的扫描电镜观察[J].水产学报,1982,6(4):313-320.
- [7] 张敬兰,从桥日,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.
- [8] Kudo, S. Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg[J]. Dev Growth Diff, 1980, 22(3):403-414.
- [9] Brunnett A, Darnott J. Initial stages of sperm penetration into the egg of *Fundulus heteroclitus* [J]. J Exp Zool, 1979, 227(2):277-296.
- [10] Iwamatsu T, Ohta T. Scanning electron microscopic observations on sperm penetration in teleostan fish[J]. J Exp Zool, 1981, 218(2):261-277.
- [11] Ohta, T, Iwamatsu T. Electron microscopic observations on sperm entry into eggs of the rose bitterling, *Rhodeus ocellatus* [J]. J Exp Zool, 1983, 227(1):109-119.
- [12] Wolinski T S, Hart N H. Scanning electron microscope studies of sperm incorporation into the zebrafish (*Brachydanio*) egg[J]. J Exp Zool, 1987, 243(2):259-273.
- [13] 黄永松.尼罗罗非鱼成熟卵结构及精子入卵早期的电镜研究[J].动物学报,1990,36(3):227-230.
- [14] 潘光碧,邹世平,邹桂伟,等.诱导雌鲤核发育时精子入卵的扫描电镜观察[J].中国水产科学,1999,6(3):28-31.
- [15] 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.
- [16] 曲秋芝,孙大江,马国军,等.史氏鲃精子入卵过程的扫描电镜观察[J].水产学报,2003,27(4):377-380.
- [17] Kudo S, Sato A. Fertilization cone of carp eggs as revealed by scanning electron microscopy [J]. Dev Growth Diff, 1985, 27(2):121-128.

An observation on the early fertilization of *Squaliobarbus curriculus* by scanning electron microscope

SUN Ji-jia, GUO Yun-gui, LI Gui-feng, ZHAO Hui-hong

(College of Animal Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The mature eggs, spermatozoa of *Squaliobarbus curriculus* and the early fertilization have been observed under scanning electron microscope (SEM). The spermatozoon consists of two parts: the head and the tail. The total length of the spermatozoon is 19.6 to 22.4 μm . Diameter of the spermatozoon head is 1.65 μm , and the length of the tail is 17.8 to 20.6 μm . The mature egg of *Squaliobarbus curriculus* is elliptic and has a single micropyle on the animal pole. The micropyle is funneled with an annular fertilized aperture on the bottom. The diameter of the micropyle is 12.46 to 14.10 μm ; the thickness of egg membrane is 2.78 μm . The egg membrane is watched smooth under the lower magnification of SEM; under the high magnification of SEM, there are no fossae and ridges found but many pore canals distributing on the egg membrane homogeneously. The diameter of the pore canals is 0.14 μm . Around the smooth fertilized aperture, there are some radiating bulking. The inner diameter of the fertilized aperture is 2.71 μm , and the outer is 5.21 μm .

The process of spermatozoa penetrating eggs is observed at 27 $^{\circ}\text{C}$ and described as follows: 2 to 4 second after spermatozoa penetrating eggs, the spermatozoa arrive the certain area of egg near the micropyle, the head of the spermatozoon is opposite to the micropyle. From 8 to 18 second, there are many spermatozoa around the micropyle, one of them begin entering the fertilized aperture and left the tail out of it. During this period, there isn't any fiberized embolus blocking the micropyle. Then, along with the cortical reaction caused by fertilization, the micropyle is gradually blocked by many cortical granules. At this time, the process of spermatozoon penetrating egg is finished. From 20 to 28 second, the micropyle is blocked by fiberized embolus; the fertilized aperture is closed too. From 30 to 60 second, the fiberized embolus in the micropyle is becoming more and more, the spermatozoa outside the micropyle can not enter the egg, and lose the capability of voluntary movement. In 40 second, the disorganized spermatozoa can be seen under the SEM; in 55 second, the micropyle is blocked with some large embolus, the spermatozoa are disorganized completely.

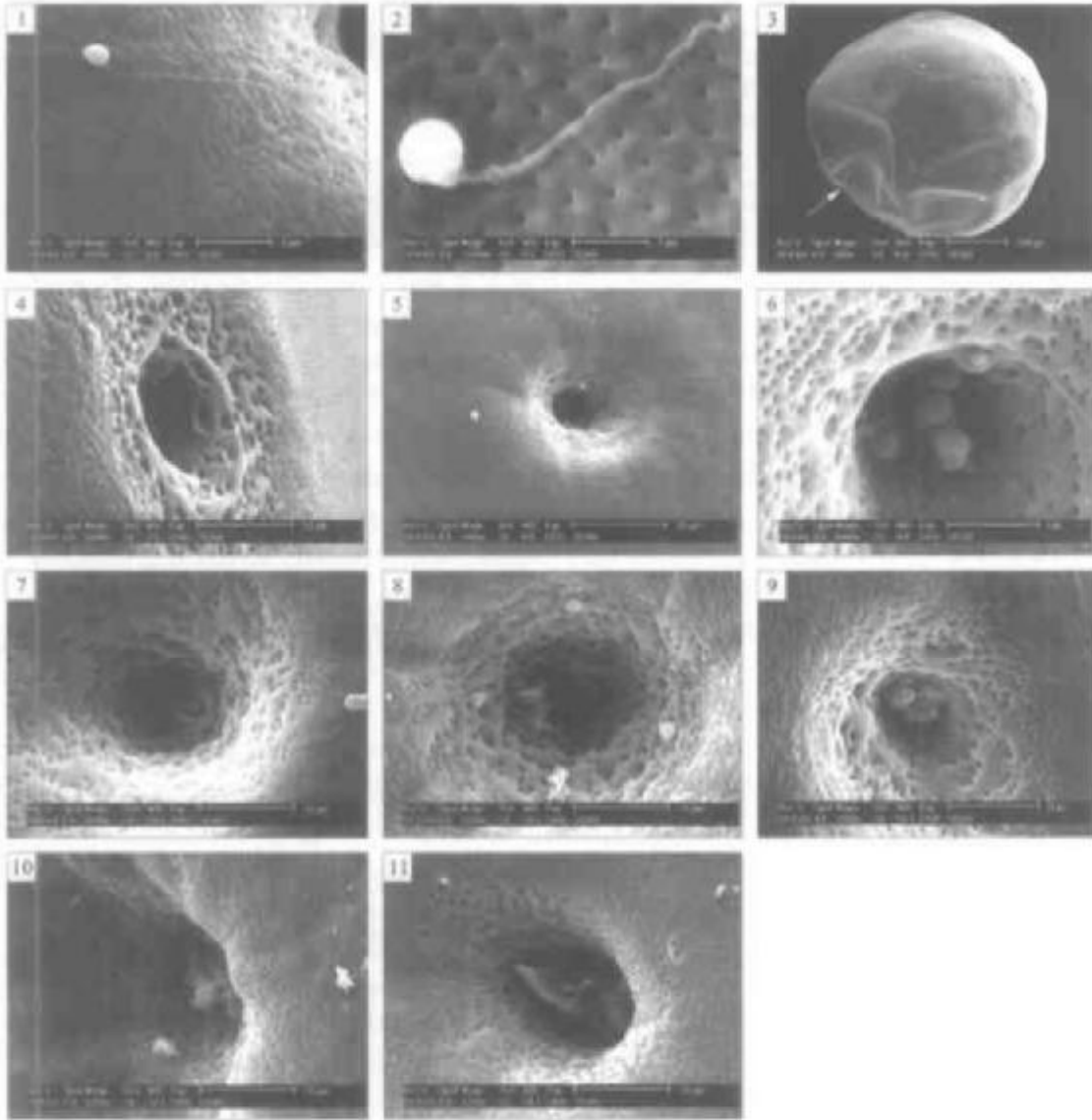
Above all, these conclusions are drawn: Mechanism of *Squaliobarbus curriculus*'s fertilization follows monospermy. Only one spermatozoon can get through the micropyle canal of one egg and enter it, while the others will be disorganized automatically. In 18 second after a spermatozoon goes into an egg, the embolus will be formed to prevent the other sperms getting into the egg, which insures the mechanism of monospermy. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(5): 740-744]

Key words: *Squaliobarbus curriculus*; fertilization; scanning electron microscope

Corresponding author: ZHAO Hui-hong. E-mail: zhaohh@scau.edu.cn

孙际佳等:赤眼蝇精子入卵的扫描电镜观察

SUN Ji-jia et al:An observation on the early fertilization of *Squaliobarbus curriculus* by scanning electron microscope



图版 I

1,2:赤眼蝇精子形态,及卵表面的孔小管;3:赤眼蝇卵,白色箭头示卵膜孔;4:卵膜孔及卵膜孔周边孔小管;5:精子到达受精孔附近,并且头部与受精孔相向,受精孔表面光滑无堵塞物出现;6:精子聚集在受精孔周围;7:精子开始穿入受精孔,进入卵内并将尾部留在受精孔外;8:受精孔因受精卵结合发生皮层反应导致大量颗粒状的皮层颗粒外排;9:受精管口被封闭起来,絮状物增多,并将所有精子推向卵膜孔外;10:受精孔外的精子被外排的颗粒物质堵塞在卵膜孔内,与受精孔逐渐外排增多的颗粒物质一起,移向卵膜孔外;11:受精孔被皮层颗粒堵塞物填实,可见碎瓦状的颗粒,受精孔外的精子完全解体。

Plate I

1,2:The spermatozoon of *Squaliobarbus curriculus* and the pore canal on the egg surface;3:The egg of *Squaliobarbus curriculus*, the white arrows show the location of the micropyle;4:The micropyle and the pore canal around it;5:The spermatozoa around fertilized aperture, the appearance of fertilized aperture are smooth and no embolus;6:The spermatozoa in the fertilized aperture;7:The sperm entering the fertilized aperture left the tail out of the fertilized aperture;8:The cortical granules are excluded from the fertilized aperture by cortical reaction during fertilization;9:The fertilized aperture is closed while the fiberized embolus becoming more and more;10:The micropyle is blocked by many cortical granules;11:The fertilized aperture is blocked by cortical granules;the spermatozoa out of the fertilized aperture are disorganized.