

细鳞鱼的卵黄发生

徐革锋¹, 陈松波², 牟振波¹

(1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 东北农业大学 动物科技学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:从发育生物学—卵黄发生角度,通过光镜和透射电镜对细鳞鱼(*Brachymystax lenok*)卵黄发生进行观察。结果表明,细鳞鱼的卵黄发生主要集中在初级卵母细胞阶段完成,可分为4个特征时期:初级生长期,皮质泡期,卵黄积累期,卵黄积累完成期。当卵母细胞进入初级生长早期,卵子发生特征物——类核周体出现;进入皮质泡期,其主要特征是皮质泡、卵黄外膜和巴尔比亚尼体结构;处于卵黄积累期,位于其外周细胞质附近会出现卵黄颗粒;进入卵黄积累完成期,卵黄颗粒不断融合增大,占据细胞绝大部分。以上结果为细鳞鱼的卵巢发育分期提供了理论基础,并深入探讨其发育的规律性、特殊性和复杂性,从而指导细鳞鱼的人工繁殖、选育种工作及野生群体的资源保护和合理利用。[中国水产科学, 2007, 14(3): 377—382]

关键词:细鳞鱼;卵巢;卵黄发生

中图分类号:Q959

文献标识码:A

文章编号:1005—8737—(2007)03—0377—06

细鳞鱼(*Brachymystax lenok*)是中国名贵的冷水经济鱼类。由于人口增长、生物资源的过度开发利用、环境污染等原因,其生存受到了严重威胁,目前该物种在中国的分布区域日益缩小,种群数量逐渐减少。对于细鳞鱼卵黄发生的研究,有助于掌握其性腺成熟及发育规律,并指导人工繁育,做好其群体复壮工作,具有重要的理论和生产实践意义。国内外学者对硬骨鱼类初级卵母细胞发育过程中卵膜、卵黄发生、滤泡细胞及卵泡闭锁的结构与变化等做了大量研究^[1-7],主要探讨了卵母细胞在卵黄发生过程中的功能和作用机制,以及该时期的闭锁卵泡的变化特征和基本功能等。但该方面的研究尚未在细鳞鱼中展开,本研究探讨了细鳞鱼的卵黄发生与发生过程中卵细胞内的结构变化。

1 材料与方法

1.1 材料

细鳞鱼取自黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼试验站。幼鱼为上浮后40~45 d、80 d和125 d;叉长3.75~6.57 cm,体质量0.44~2.57 g,每个日龄段各10尾;雌性成鱼分别为人工养殖(3龄)和野生采捕的(3龄和4龄),叉长26.20~36.40 cm,体质量

178.00~610.00 g,共10尾,分别于2004年10月至2005年5月份进行样品采集。

1.2 样品制备

取健康的实验鱼活体解剖,获得性腺样品,用pH 7.2的磷酸缓冲液(PBS)清洗。一部分样品立即用2.5%戊二醛固定,之后用锇酸再固定, Epon812包埋,恒温培养箱中聚合, Ultracut E型超薄切片机切片,切片经培养后用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, JEM—1200EX型电子显微镜观察,照相;另一部分样品用Bouin's氏液固定,常规石蜡切片, HE染色,光镜下观察,并照相。

1.3 初级卵母细胞的时相划分

组织学切片观察,参照刘筠^[8]关于初级卵母细胞时相划分的标准,确定卵原细胞和Ⅱ~Ⅳ时相的卵母细胞以及相应细胞学特征;电镜下对初级卵母细胞分期参照王爱民^[9]的方法,即根据其细胞内各种所含物质(特别是卵黄)出现的时间、数量、大小和分布状况以及细胞形态变化来进行时相划分。

依据细鳞鱼卵母细胞不同发育时期的卵黄积累特征,本实验将初级卵母细胞分成4个时期:初级生长期;皮质泡期;卵黄积累期;卵黄积累完成期。

收稿日期:2006—05—30; 修订日期:2006—08—14.

基金项目:黑龙江省科技攻关项目(GC03B511).

作者简介:徐革锋(1979—),男,硕士,从事鱼类育种方面的研究. E-mail: xgffish@yahoo.com.cn

通讯作者:牟振波. E-mail: hfshzmzb@hotmail.com

2 结果与分析

上浮40~45 d的幼鱼性腺开始分化,卵原细胞分布于卵巢腔生殖上皮内表面同质层,细胞直径8~10 μm (图版 I-1);上浮80 d的卵原细胞处于增殖期,细胞直径为15~35 μm ,靠近核旁可见到少量典型非晶体物质聚集物—类核周体,简称“Nu-age”(图版 I-2);上浮125 d的卵出现Ⅱ时相卵母细胞,其直径为40~80 μm (图版 I-3)。10月份至翌年5月份人工养殖3龄和野生3~4龄雌鱼卵巢处于Ⅱ—Ⅳ期,正处于卵黄发生时期。

2.1 初级生长期

初级生长期主要是指从卵母细胞早期发育至卵黄物质开始积累这一特征时期。Ⅱ期卵巢产卵板基部有大量卵原细胞,个别的已开始向中央迁移,发育成早期卵母细胞,靠近其核旁的非晶体物质聚集物——核仁样体(Nucleolus-like bodies)早期为“空心的环状板”结构(图版 I-4),其附近有大量线粒体出现。卵母细胞呈圆形,细胞直径为55~125 μm ,核直径30~55 μm ,有8~10核仁。胞质内质网少,高尔基体不发达。卵母细胞发育至Ⅱ时相中后期,在其外围是滤泡层、粗纤维层和鞘膜层(图版 I-5),形成功能性单位,即单层的卵巢—卵泡。

2.2 皮质泡期

皮质泡是卵母细胞发育至Ⅲ时相的主要结构特征,此时细胞近圆形或不规则形,细胞直径200~500 μm ,核直径100~220 μm ,沿核膜附近分布着7~17个大小各异的核仁。该时期有3个特征:1)皮质泡(Cortical alveoli);2)卵黄外膜;3)巴尔比亚尼体(Balbani's body)(图版 I-6)。随着滤泡细胞数量增多,滤泡已发育到2~3层,其细胞内具有丰富的内质网和高尔基体。在一层富含胶原纤维的基膜与细胞质膜之间开始形成单层扁平细胞层,且与质膜连接十分紧密,两者之间不存在非细胞的结构物质。在此时期,卵母细胞不断向质膜与滤泡层之间伸出微绒毛,并连同滤泡细胞一起在他们之间分泌一些电子致密高的物质,形成放射带(图版 I-7)。

2.3 卵黄积累期

当卵巢发育至Ⅳ期,卵母细胞进入卵黄大量积累时期。该时期卵母细胞直径为300~1 000 μm ,核直径为100~400 μm 。随着卵母细胞继续发育,外源性卵黄积累开始。胞质内分布着许多囊泡状的线粒体和卵黄核,在其放射带内缘出现了许多结晶

的致密核小泡和微胞饮小泡(图版 I-8),内质网和高尔基体也大量出现(图版 I-9)。外源性卵黄前体物质不断经过血液汇集于鞘膜层,后穿越纤维层通过多泡体作用转运至颗粒细胞内,经过加工和修饰,再穿越质膜间隙进入卵母细胞(图版 I-10、11),并开始出现卵黄中间颗粒(Yolk intermediate granules)(图版 I-12)。位于胶原纤维层与滤泡层之间的微绒毛基部出现许多小的卵黄蛋白颗粒(图版 I-13),这些颗粒数量急剧增加,不断进入滤泡细胞。此时滤泡细胞已变为不规则形状或是长的扁平形,胞内具有分泌颗粒,进入颗粒细胞期。颗粒细胞层包围着卵母细胞,且与卵母细胞之间有许多具有连接作用的微绒毛通道(图版 I-14)。

2.4 卵黄积累完成期

卵黄积累完成期即卵巢发育至Ⅳ期末期,卵黄积累基本完毕。该时期卵母细胞呈球形,直径大于1.00 mm。卵黄蛋白原经微胞饮作用进入由众多线粒体汇集形成的囊泡化空泡内,泡内有大量小颗粒和泡状体(图版 I-15)。这些泡状体汇集成团,呈层结构,其自身扭转环绕形成弯曲的类似髓磷脂的结构(图版 I-16)。这些膜不断合龙缩小成为一个致密核心,致密核不断积累,由卵黄中间颗粒变大填满空泡变成卵黄颗粒(图版 I-17)。许多小的卵黄颗粒不断融合积成体积大的卵黄颗粒(图版 I-18)。当卵母细胞继续发育成为排卵前卵母细胞,其卵黄发生进入尾声,卵黄积累完毕,卵黄占据着卵母细胞的绝大部分。

3 讨论

3.1 卵原细胞和卵母细胞的区分

在光镜下很难区分细鳞鱼的卵原细胞和早期初级卵母细胞,其形态相似,都具有一个核仁。但在电镜下它们细胞大小有明显区别,后者是前者的1~3倍,其内部超微结构也相差很大,在卵原细胞中只能观察到线粒体,而在卵母细胞中除有线粒体外,已经有主要参与卵黄合成的重要细胞器,即内质网和高尔基体。这与Grier^[10]描述的卵母细胞时期的特征一致。细鳞鱼在性腺分化至出现卵母细胞期间没有卵黄发生迹象,这也说明早期卵母细胞发育还不充分,外部结构和内部细胞器仍处在变化过程当中。在性成熟细鳞鱼的卵巢中十分容易观察到卵黄积累的痕迹。

3.2 卵子发生的早期特征

在硬骨鱼卵母细胞发育中,魏刚等^[4]、王爱民^[9]、Ravaglia等^[3]和 Grier^[10]对与卵黄物质相关的许多结构如巴尔比亚尼体,脂滴,皮质泡等进行了大量描述。细鳞鱼卵黄发生开始于卵巢—卵泡功能单位的基本形成时期。用光镜观察该时期,只能在Ⅲ时相卵母细胞中最早鉴别出“Nuage”—卵子发生早期特征,而该结构在卵原细胞中也很典型,但只能在电镜下辨别出来。随着卵母细胞的继续发育,胞内脂滴和皮质泡几乎是同步出现的一卵黄发生中出现的第一个特征,它们最早出现在卵质边缘带,都是大小不同的圆形小囊泡,在光镜下很难区分它们。在皮质泡形成初期,其内部为电子致密度低的絮状物,同时在其周围有大量线粒体出现,随后其形态发生很大变化,首先从内部某一点开始松弛,基质密度降低,脊消失,并形成多层膜结构的“腔”,膜向胞质突起,形成突出“泡”,而后形成一个同心圆的多层膜结构。在每个层中不断有显著小的电子致密颗粒沉积,最后形成一个模糊的电子致密球体—皮质颗粒。在该时期的后期,皮质颗粒从卵质外周迁移到质膜下,可防止多精入卵^[11]。

3.3 卵黄物质的来源及积累机制

卵黄物质来源有内源性和外源性。内源性物质首先在内质网上合成,而后在高尔基体中得到加工和修饰^[12]。细鳞鱼卵黄物质的内源性积累十分短暂,而且只有在早期卵母细胞中才能观察到。王爱民^[9]推测卵黄核参与了卵黄的形成,但具体过程并不清楚。细鳞鱼卵黄核是多种细胞器(线粒体、高尔基体和内质网等)形成、增殖和聚集的中心,其主要组成是线粒体。在线粒体大量增殖后和外源性卵黄开始积累前这段时间里,卵黄核就逐渐扩散或溶解到细胞质中。卵黄核主要呈蛋白结晶体,该结构有不断积累蛋白的功能,掩盖了参与合成蛋白的线粒体、高尔基体和内质网,所以造成了具有生物合成功能的假象。

Amor等^[5]认为,外源性卵黄是来源于滤泡细胞并积累在两质膜空隙间(滤泡膜和卵母细胞膜)的物质。Pfannesitie等^[12]认为卵母细胞质膜中微卵黄物质是由 Endocytosis 而进入卵母细胞膜的。Landim等^[13]认为,这些外源性卵黄经血液循环到达卵巢后,先通过滤泡细胞间隙,然后通过卵母细胞表面的 Pynocitic 作用被吸收。笔者认为细鳞鱼与其他硬骨鱼类一样,其卵黄前物质——卵黄蛋白原

是由肝细胞合成的^[9,14],之后通过血液循环输送到卵巢,在颗粒细胞层进行加工修饰成颗粒物质,再经由质膜间隙到达卵母细胞膜,最后经微泡饮作用被卵母细胞吸收。Amor等^[15]认为,卵黄生成物质进入卵母细胞空泡时,有一组 Thiery positive 膜包围它们,并发生缠绕变成拱形结构,本研究得到了相同的结果。来自于胞外的卵黄蛋白原进入囊泡化线粒体后,会积累、粘合形成小的致密颗粒,这些颗粒将被聚集到由同心多层膜形成的泡体内,形成卵黄前体物质,经过不断积累形成卵黄颗粒,之后大量融合形成大的卵黄颗粒,随机分布于外周的卵母细胞质中,并不断充满细胞质。

参考文献:

- [1] 张耀光,杨桂枝,金丽. 南方鲇卵巢细胞和卵膜生成的超微结构研究[J]. 西南师范大学学报,2004,29(6):1 009—1 015.
- [2] Cruz-Höfling M A, Cruz-Landim C. Differentiation of the follicular epithelium during oocyte growth in the Amazonian fish, *Crenicichla Johanna* [J]. Zool J Anat. 1993,123:59—74.
- [3] Ravaglia M A, Maggese M C. Oogenesis in the swamp eel *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795): Ovarian anatomy, stages of oocyte development and microple structure [J]. Biocell, 2002,26(3):325—337.
- [4] 魏刚,戴大临,黄林,等. 大鳞 初级卵母细胞的超微结构[J]. 西南农业大学学报,2003,25(4):339—341.
- [5] Amor M J, Ramó M, Durfort M. Ultrastructural studies of oogenesis in *Bolinus brandaris* [J]. Scientia Marina, 2004, 68 (3):343—353.
- [6] 方永强, Welsch U. 文昌鱼卵巢中滤泡细胞超微结构及功能的研究[J]. 中国科学(B集),1995,25(10):1 079—1 085.
- [7] Miranda A C, Bazzoli N, Rizzo E, et al. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study [J]. Tissue Cell, 1999,31(5):480—488.
- [8] 刘筠. 养殖鱼类繁殖生理学 [M]. 北京: 农业出版社,1993:23—32.
- [9] 王爱民. 莫桑比克非鲫卵黄形成的电镜观察[J]. 水生生物学报,1994,18(1):26—31.
- [10] Grier H. The ovarian germinal epithelium and folliculo genesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* [J]. J Morphol, 2000,243:265—281.
- [11] Nagahama Y. The functional morphology of teleost gonads [M]. Fish Physiology, Vol. IX-part A. New York: Academic Press, 1983:223—275.
- [12] Pfanestiel H, Grunig C. Yolk formation in an annelid (*Ophiotrocha puerilis*), polychaeta [J]. Tissue Cell, 1982,14:669—680.
- [13] Cruz-Landim C, Cruz-Höfling M A. Ultrastructure of ovarian follicular epithelium of the amazonian fish *Pseudotrylosurus microps*: Morphological and histochemical characterization of the in-

- ter cellular deposits[J]. Rev Brasil Biol, 1999, 61(1): 133—140.
- [14] Bruslé S. Fine structure of early previtellogenic oocytes in *Mugil auratus* (Risso, 1810) [J]. Cell Tissue Res, 1980, 207: 123—134.
- [15] Durfort A M. Changes in nuclear structure during eupyrene spermatogenesis in *Murex brandaris* [J]. Reprod Develop, 1990, 25: 348—356.

Vitellogenesis in *Brachymystax lenok*

XU Ge-feng¹, CHEN Song-bo², MU Zhen-bo¹

(1. Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Harbin 150070, China; 2. Department of Aquaculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: *Brachymystax lenok* is a valuable fish of cold water in China. Because of population growth, biological resources over-exploitation, environmental pollution and so on, their habitats and living ambience have been threatened. Now the distribution areas of *B. lenok* has decreased gradually in China, and population quantity falls off gradually. Therefore, the research on phylogenetic development and breeding of *B. lenok* appears especially important. And some scholars at home and abroad have made a great quantity of research on the structure and change of egg membrane, vitellogenesis, follicle cells and atresia folliculi during primary oocyte development process of teleostei, and has mainly discussed oocyte function and mechanism of action in the course of the vitellogenesis, and characteristic change and fundamental function of corpora atretica etc. But there is not the research about the aspect of *B. lenok*. From the developmental biology point of view, this paper focuses on the vitellogenesis of *B. lenok* by the light and transmission electron microscope. The results indicate that the vitellogenesis is concentrated mainly on primary oocyte phase, and might be divided into four phases: primary growth phase of oocyte; cortical vesicle phase; vitelline accumulation phase and complete phase of vitelline accumulation. When the oocyte enters into the primary growth phase, the character substance of oogenesis (for short Nuage) occurs. At the cortical vesicle phase, it is the central character that there are the cortical vesicle, vitelline ectoblast and Balbiani's body. At the vitelline accumulation phase, the vitelline granule appears near the cytoplasm. When the oocyte enters into the complete phase of vitelline accumulation, the vitelline granules are fused and augmented continuously, and occupied most cell space. The results provide theoretical reference for the development stage of ovaries in *B. lenok*, and the regularity, particularity and complexity of ovaries development have been investigated, thereby rational instruction has been provided for the artificial propagation and selection and breeding of *B. lenok*, and resource protection and reasonable utilization of wild population. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 377—382]

Key words: *Brachymystax lenok*; oocyte; vitellogenesis

Corresponding author: MU Zhen-bo. E-mail: hfishmzb@hotmail.com

图版 I 说明

1:上浮40~45 d 鱼苗卵巢中的卵原细胞;2:80 d 鱼苗卵巢中卵原细胞(箭头:类核周体);3:125 d 鱼苗卵巢中卵母细胞及其滤泡上皮;4:早期卵母细胞中的类核周体;5:两个相邻卵母细胞外的滤泡层和鞘膜层,以及内层交叉部的血管;6:Ⅲ时相卵母细胞,出现特征结构——皮质泡和巴尔比亚尼体;7:卵母细胞质膜外的放射带开始形成;8:卵母细胞放射带内缘的结晶致密核小泡和微胞饮小泡(箭头:微胞饮的多泡体);9:卵母细胞中出现的大量的高尔基体和内质网;10:外源性卵黄前体物质不断经过血液汇集于鞘膜层;11:外源性卵黄物质进入卵母细胞(箭头:卵膜);12:外源性卵黄物质进入卵母细胞形成卵黄中间颗粒;13:胶原纤维层与滤泡层之间的微绒毛基部出现的许多小卵黄蛋白颗粒(△:多泡体和大的囊泡);14:卵母细胞与滤泡细胞之间具有连接作用的微绒毛通道;15:卵黄蛋白原经微胞饮作用进入由众多线粒体汇集形成的囊泡化空泡内,泡内有大量小颗粒和泡状体(▲:微小颗粒,■:泡状体);16:处于卵黄积累完成期的泡状体汇集成团,呈层结构,其自身扭转环绕形成弯曲的类似髓磷脂的结构;17—18:处于卵黄积累完成期的髓磷脂结构不断合龙缩小成一个致密核心,其不断积累变大填满空泡变成卵黄前体物质。

BB—巴尔比亚尼体;BV—血管;CA—皮质泡;CF—胶原纤维;F—滤泡层;FC—滤泡细胞;G—卵黄蛋白颗粒;Gc—高尔基体复合体;M—线粒体;Mv—微绒毛;N—细胞核;N_(FC)—滤泡层细胞核;NLB—类核周体;N_(TE)—鞘细胞核;Nu—核仁;Ooc—卵母细胞;Oog—卵原细胞;PM—卵母细胞质膜;SER—滑面内质网;TL—鞘膜层;YG—卵黄颗粒;YIG—卵黄中间颗粒;YPB—卵黄前体颗粒;ZR—放射带。

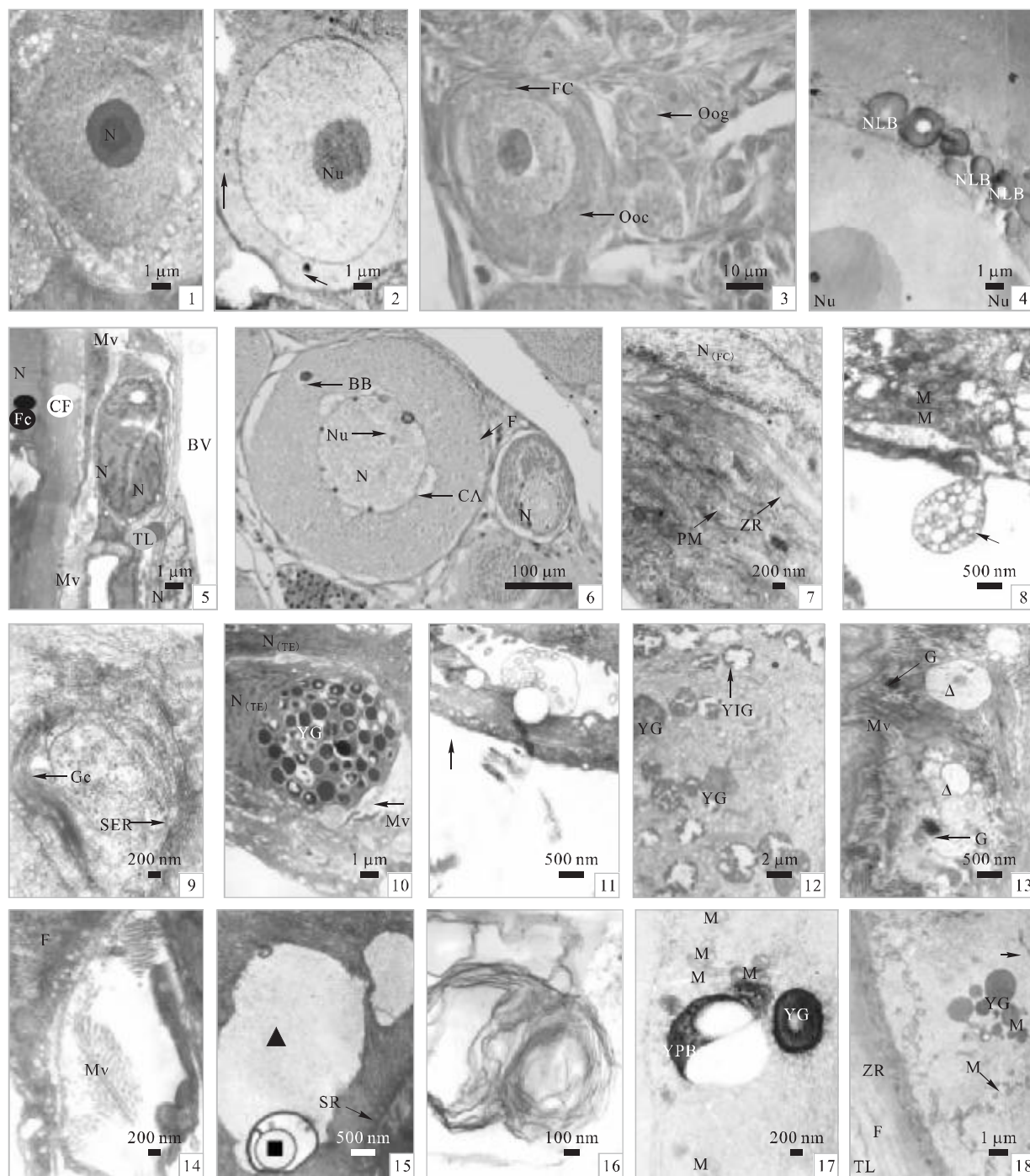
Explanation of Plate I

1: Oogonium of the fry after swimming up for 40—45 d; 2: Oogonium in the ovary of 80-day-old juvenile (Arrow: Similar pericaryon); 3: Oocytes and follicle cells of the ovary at phase II after swimming up for 125 d; 4: The nuage in the oocyte of early small scale growth phase; 5: Follicle cells layer and tunica vaginalis of two adjacent oocyte; 6: Cortical aveoli and Balbiani body of oocyte at phase III; 7: Zona radiata b formed outside of oocyte membrane; 8: Crystalline dense nucleus vesicles and microendocytic vesicles of internal zona radiata (Arrow: micro-endocytic poly-vesicle); 9: A lot of Golgi body complex and endoplasmic reticulum in the oocyte; 10—11: Exogenesis per-vitellus continuously sequestering tunica vaginalis layer via blood; 12: Exogenesis yolk entering into oocyte, and forming yolk intermediate granule; 13: A lot of small vitellogenin particles in the bottom of microvillus between collagenous fiber and follicle cell layer (△: multivesicular body and big vesicular,); 14: Microvillus path with conjunctive function between oocyte and follicle cell; 15: Vitellogenin via microendocytosis into the vacuole with sequestering mitochondria (▲: mica, ■: vesicle); 16: Vesicle sequestering mass like layer structure at vitellus cumulating-over phase, twisting cycle and curved structure like myelin; 17—18: Myelin structure closing and shrinking a dense core, and becoming yolk per-body stuffing the vacuole.

BB—Balbiani bodies; BV—Blood vessel; CA—Cortex vesicle; CF—Collagen fibers; F—Follicle layer; FC—Follicle cell; G—vitellogenin particle; Gc—Golgi' body complex; M—Mitochondrion; Mv—Microvillus; N—Nucleus; N_(FC)—Nucleus of follicle cell; NLB—Nucleoli-like body; N_(TE)—Nucleus of tunica vaginalis; Nu—Nucleoli; Ooc—Oocyte; Oog—Oogenesis; PM—Plasma lemma; SER—Smooth endoplasmic reticulum; TL—Tunica vaginalis layer; YG—Yolk granule; YIG—Yolk intermediate granule; YPB—Yolk per-body; ZR—Zona radiata.

徐革锋等:细鳞鱼的卵黄发生

XU Ge-fen et al: Vitellogenesis in *Brachymystax lenok*



图版 I Plate I

(图版 I 说明见文末 **Explanation of Plate I at the end of the text**)