

# 鲂鱼受精早期精子入卵的扫描 电子显微镜观察\*

王 瑞 霞 张 毓 人

(上海水产学院)

傅 仓 生 李 振 兰 吴 宜 章 张 福 顺 郝 宏 京

(中国农业科学院原子能利用研究所)

## 提 要

用光学显微镜观察精子进入活卵是相当困难的。作者用扫描电子显微镜初步揭示了鲂鱼受精早期精子入卵的程序,讨论了精子入卵的路径、时间和时限,并初步分析了单精入卵的机制。

鲂鱼(*Megalobrama terminalis* Richardson)属真骨鱼类(teleost)鲤科(Cyprinidae),是我国的主要养殖经济鱼类之一。

鲂鱼卵球属粘性端黄卵。成熟未受精的卵球圆球形,质膜外紧包一厚度约 $10\mu$ 的卵膜,壳膜上遍布许多直径约为 $0.5\mu$ 的微孔。无顶体的鲂鱼精子必须穿过动物极壳膜上直径约为 $4.5\mu$ 的小孔——受精孔进入卵内。在正常情况下为单精受精。鲂鱼精子入卵迅速。在 $21-23^{\circ}\text{C}$ 的水温下,精子于授精后2秒钟开始进入精孔管,授精后30秒钟所有卵球的精孔管全部被絮状物——受精塞(fertilization plug)堵住,同时卵球表面的精子解体而失去受精能力。

对无脊椎动物<sup>[4,5]</sup>和哺乳动物<sup>[6]</sup>受精形态学的电子显微镜研究,已有丰富的资料。但对鱼类受精现象,近年来国外学者<sup>[7,8]</sup>虽已进行过电子显微镜观察,但研究材料多偏于个体小的室内饲养的观赏鱼类。在国内,朱洗等(1960)<sup>[1]</sup>对金鱼和鲂鱼(*Megalobrama terminalis*),刘筠等(1963)<sup>[2]</sup>对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*),王幽兰等(1980)<sup>[3]</sup>对花鲢(*Aristichthys nobilis*)等的受精形态学虽已有详尽的光学显微镜研究,但对精子入卵早期程序的显微与亚显微观察以及对经济价值较高的养殖鱼类受精形态学的电子显微镜观察,迄今尚未见有报导。本文通过对鲂鱼的早期受精机制的观察,为鱼类受精生物学与细胞学提供了新的资料,同时为改进人工繁殖操作技术提供理论依据。

\* 本文承王义强副教授审阅,特此致谢。

## 材 料 与 方 法

研究的材料是在 1981 年 6 月鲂鱼繁殖季节,取自北京海淀养殖场和万泉庄渔场。选择性成熟的雌雄亲鱼,按体重注射一定量的催情剂后,放入流水池的网箱内。在水温 21—23°C,注射后约 10 小时,亲鱼开始发情,待雄鱼追逐雌鱼剧烈时,将亲鱼捕起。这时,雌鱼的卵巢腔中已有大量的游离成熟卵球,轻压腹部即有大量卵球流出;雄鱼的精液比注射前更加充沛,稍挤腹部精液即喷射而出。将获得的部分成熟雌雄生殖细胞,用戊二醛固定,以观察未受精卵的形态结构,其他的进行干法人工授精。授精后每隔一定时间用 2.5% 的戊二醛固定(4°C)一批受精卵。在 2—4 小时以后用磷酸缓冲液洗 2—3 次(30 分钟内换新液 2—3 次),再用 1% 锶酸固定 2 小时,然后再经磷酸缓冲液洗 2—3 次(30 分钟内换新液 2—3 次)后,用梯度酒精脱水(以上步骤均在 4°C 下进行),最后用醋酸异戊酯取代,临界点干燥器中干燥后,真空喷涂仪中喷涂黄金, S450 扫描电子显微镜观察摄影,加速电压为 15KV。

## 观 察 结 果

### (一) 成熟生殖细胞的形态结构

(1) 成熟未受精卵 鲂鱼的成熟卵为圆球形(图 1),直径约 1 毫米左右,在动物极的壳膜上有一小的漏斗形凹陷为受精孔的所在地,由受精孔区的特写镜头(图 2)可以看到在漏斗状凹陷的底部中央是一受精孔,卵膜表面遍布许多小微孔(图 2, p)。通过受精孔区的切片观察可知受精孔同穿过壳膜的管状结构——精孔管(micropylar canal)相连,它的内孔开口于原生质集中的胚盘(图 3A)。当高倍扫描时,可通过精孔管看到卵的质膜表面。

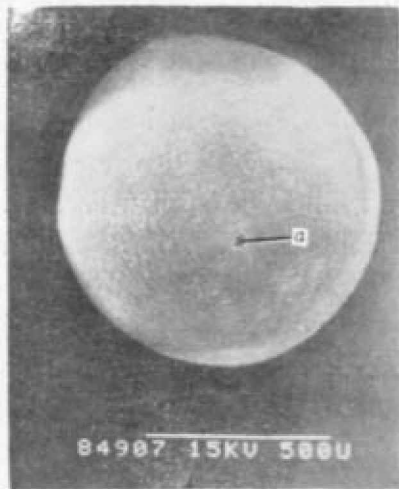


图 1 成熟未受精卵(由动物极观)

a 示卵膜上漏斗状凹陷,受精孔的所在。



图 2 受 精 孔 区

b 示精孔位于漏斗状凹陷的底部,孔的内部是穿过卵膜的管状结构——精孔管; p 示卵膜表面的许多小微孔。

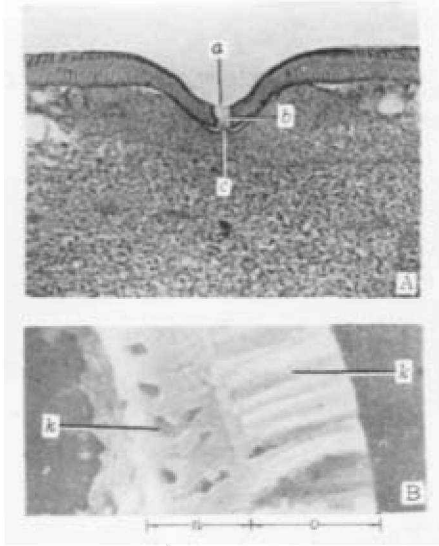


图3 受精孔区的切片

A. 通过受精孔区的切片; b 示管状结构; c 示其内孔;  
B. 卵膜切片: n 为内层; o 为外层; k 示放射排列的小管。

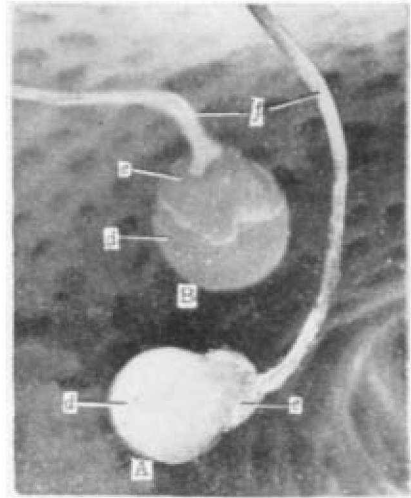


图4 鲂鱼精子

A 为侧面观; d 示精子头部; e 示精子颈部; f 示精子鞭毛。B 为鞭毛端观; 示颈部粗大的线粒体区。

在精孔区和精孔管内均未发现精孔细胞, 可知精孔及精孔管是鲂鱼精子入卵的唯一通路。由切片(图 3B)。观察可见鲂鱼卵膜由两层组成, 内层较薄厚约  $4\sim 4.5\mu$ , 是由卵球本身分泌而成的初级卵膜(又称卵黄膜 vitelline membrane), 外层较厚约  $5\sim 12\mu$ , 是由滤胞细胞分泌而成的次级卵膜(又称壳膜 chorion)。在高倍扫描时可见壳膜表面遍布许多小微孔直径约  $0.25\mu$ , 这些小微孔与穿行于壳膜的小微管相连, 小微管呈放射状排列构成放射膜(radio membran), 并与卵黄膜中的小微管相通。

(2) 精子 鲂鱼精子同其他真骨鱼类的精子一样也由头, 颈和尾(鞭毛)组成, 无顶体。头部为圆球状, 直径约  $2.5\mu$ , 颈部较粗大, 为精子能量之发源地——线粒体区, 由颈部线粒体区伸出一细长的鞭毛(图 4)

## (二) 精子入卵程序

在授精后 1 秒钟固定制备的 52 个样品中, 观察到 20 个卵球的受精孔区, 显示了这些卵球的受精孔都敞开着, 尚无精子进入(图 6)。并发现所有卵球的表面均附着数千条精子(图 5)。

在授精后 2 秒钟固定制备的 50 个样品中, 观察到 18 个卵球的受精孔区, 其中有 16 个卵球精孔区的漏斗状凹陷内都有精子集聚(图 7), 另外两个卵球的精孔管内已有精子进入, 仅精子的鞭毛露在精孔的外面(图 8)。

在授精后 5 秒钟固定制备的 52 个样品中, 观察到 22 个卵球的受精孔区, 在这些卵球上可以看到不同的受精时态。有些卵球的受精孔仍敞开着, 似乎正在等待精子前来受精(图 9a); 有些卵球精孔区的漏斗状凹陷内聚集着正要入卵的精子(图 10); 另一些已受精的卵球, 其精孔管内已被絮状物——受精塞所堵塞, 其中一个卵球显示一条精子虽已进入

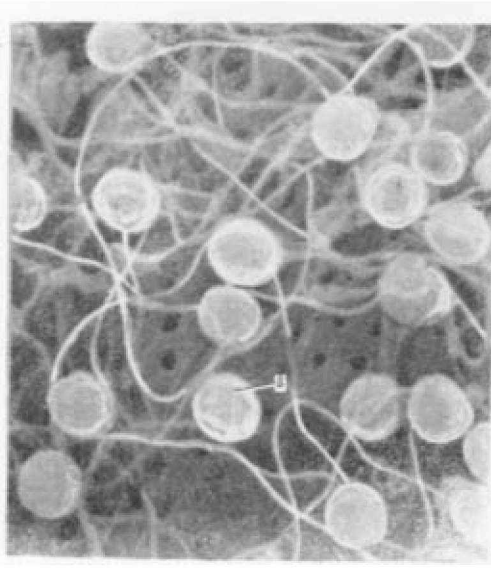


图5 授精后1秒钟的卵球表面

b 示附着于卵球表面的精子

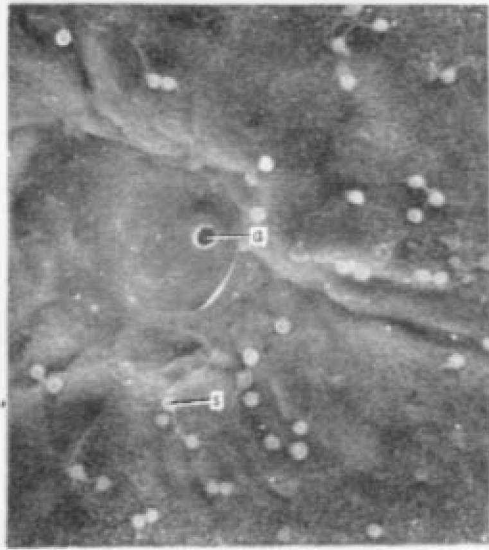


图6 授精后1秒钟的卵球的受精孔区

b 示附着于卵球的精子; a 示精孔敞开着, 尚未有精子进入。

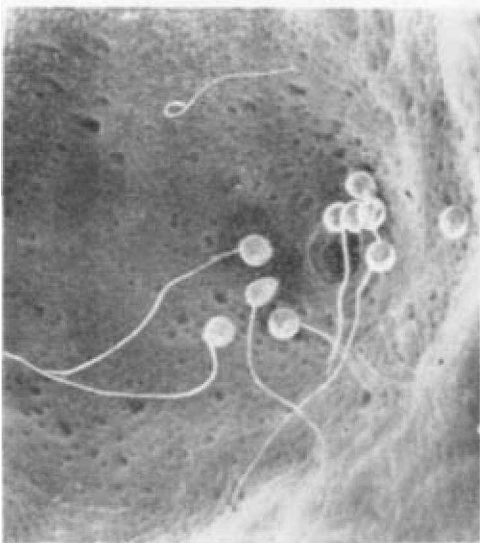


图7 授精后2秒钟卵球的受精孔区

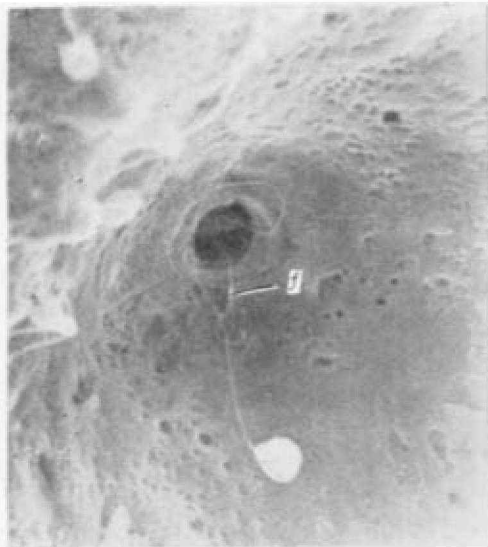


图8 授精后2秒钟的卵球的受精孔区

f 示精子入卵后露在受精孔外的鞭毛。

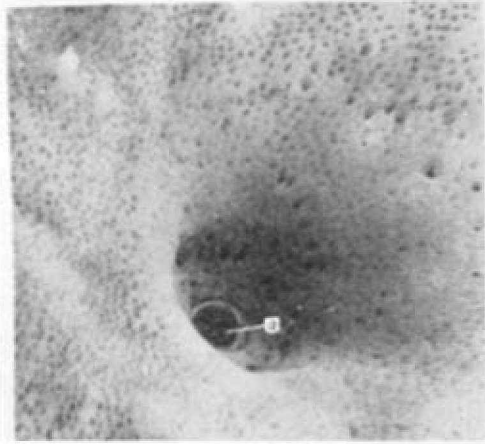


图9 授精后5秒钟卵球的受精孔区

a 示精孔仍敞开着。

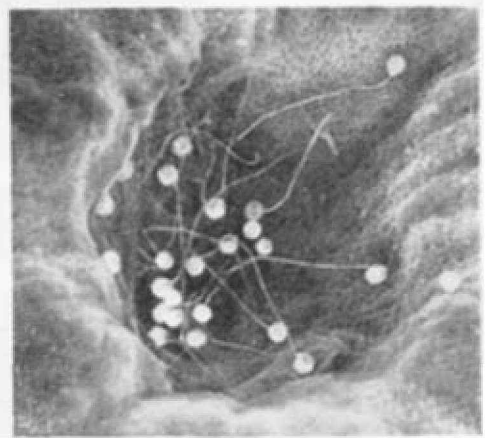


图10 授精后5秒钟卵球的受精孔区

精孔管内,但因受到受精塞的阻止而不能入卵(图11);另外一个受精卵上有三个精子虽已到达精孔管口,也因受精塞的产生而被阻止于卵外(图12)。

在授精后15秒钟固定制备的32个样品中,观察到14个卵球的受精孔区,仍处在不同的受精时态,其中有些卵球的精孔仍开着,有些卵球的受精孔已被堵塞,而另一些卵球的精孔外聚集着许多精子(图13)。

在授精后30秒钟固定制备的41个卵球中,发现附着在卵球表面的精子已全部解体,鞭毛消失不见,头部已破碎,表明此时精子已失去了受精能力(图14s)。在这组样品中观察到12个卵球的受精孔区,它们的精孔管完全被堵塞,精孔管的边缘可看到破碎的精子头部残物(图15)。

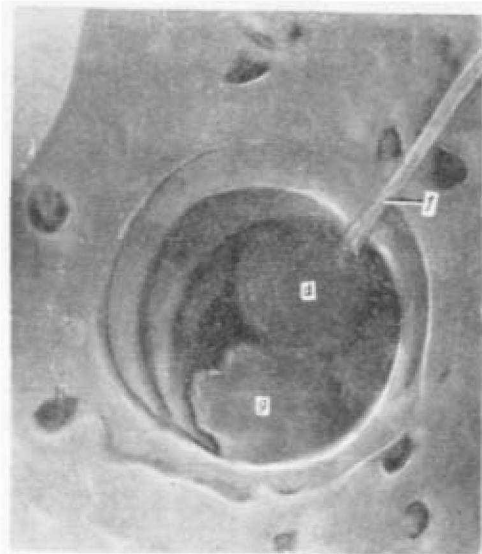


图11 授精后5秒钟卵球的受精孔区

g 示受精塞;d 示精子头部;f 示精子鞭毛。

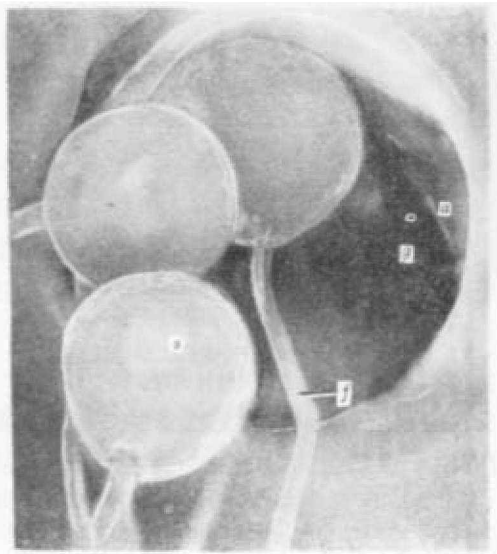


图12 授精后5秒钟卵球的受精孔区

a 示受精孔;g 示受精孔塞;s 示精子头部;f 示精子鞭毛。

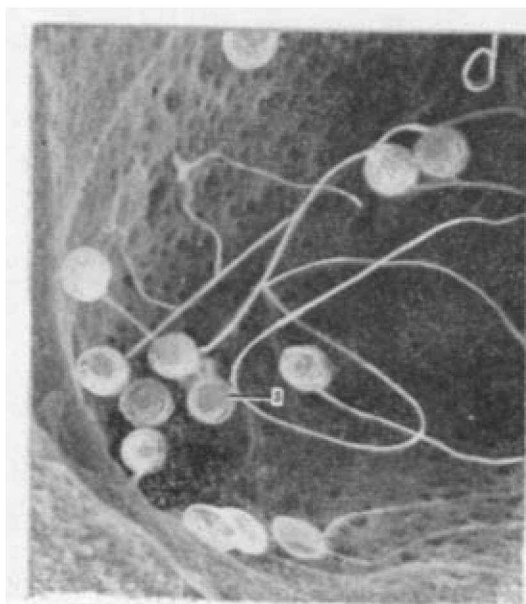


图 13 授精后 15 秒钟卵球的受精孔区

■ 示聚集于受精孔周围的许多精子。

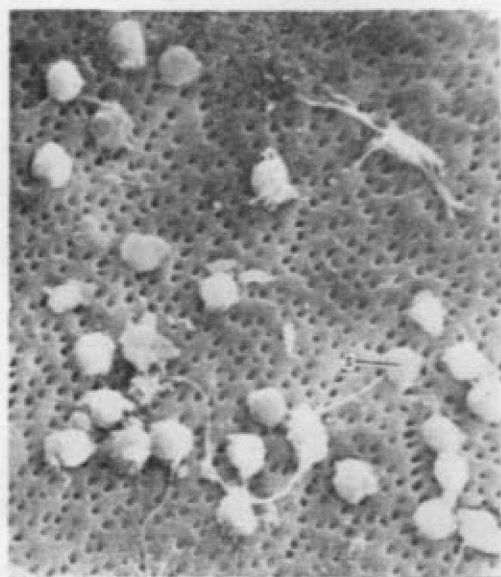
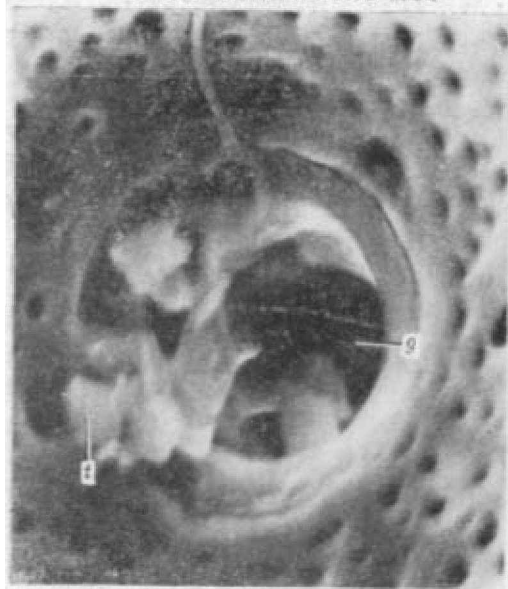
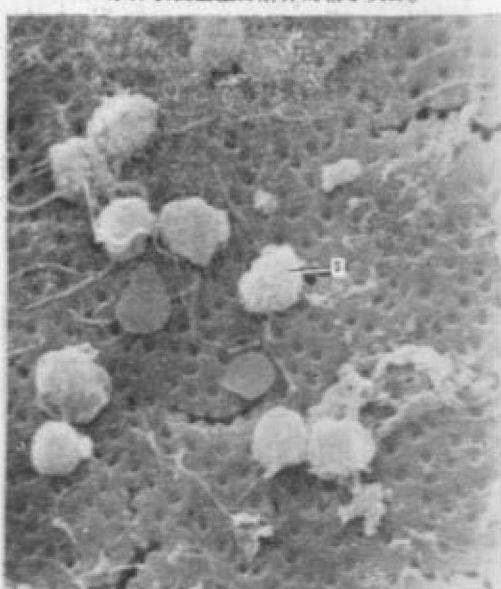


图 14 授精后 30 秒钟卵球表面局部

■ 示卵表面已全部解体的精子头部。



♣ 示精孔管外口边缘堆积许多破裂解体的精子; Ⓢ 示精孔管已被受精塞堵住。



■ 示卵表面已解体的精子。

在授精后 1 分钟固定制备的 32 个样品中,可观察到精孔管完全被堵塞,卵球表面附着的精子也已全部解体失去受精能力(图 16s)。

## 讨论与小结

1. 作者用扫描电子显微镜观察了大量成熟未受精第 V 时相的卵母细胞精孔区,同

时也用光学显微镜观察了 100 多个卵球受精孔区的石蜡切片均未发现精孔细胞, 且在高倍扫描电子显微镜下通过精孔管可直接观察到卵球的质膜表面, 在授精后 2 秒钟的卵球上观察到了进入精孔管的精子, 只有鞭毛留在受精孔外(图 8)。这项观察证实第 V 时相的卵母细胞不存在精孔细胞, 精孔管是畅通无阻的, 它是无顶体鲂鱼精子入卵的唯一通路。这同我们对白鲢和草鱼卵球授精前后的扫描电镜观察结果一样, 也同刘筠等(1963)<sup>[2]</sup>对第 V 时相的草鱼卵母细胞切片的光学显微镜观察结果和同 Annas Ruth Brummett 与 Janes, N. Dumont (1979)<sup>[3]</sup>对 *Fundulus heteroclitus* 的电镜观察结果一致。但同朱洗等(1960)在金鱼和鲂鱼卵上, 王幽兰等(1980)在花鲢卵上所描述的情况不同, 他们认为精孔细胞普遍存在于一切卵上, 并强调在受精时精子不但要穿过精孔细胞而且要穿过它的细胞核然后入卵受精。

2. 根据用扫描电子显微镜的观察揭示, 鲂鱼受精早期精子入卵程序是相当快的, 授精后 2 秒钟精子已开始进入精孔管, 授精后 30 秒钟精孔管完全被堵塞, 而且这时附着在卵球表面的精子已全部解体失去了受精能力。鉴于上述情况, 作者认为在进行鱼类人工繁殖的工作中应注意下列几点:

(1) 由于鲂鱼精子入水后寿命极短, 人工授精操作要迅速, 不宜用湿法授精。

(2) 人工授精时, 精卵拌和时间不应超过 30 秒钟, 以减少卵球互相碰撞受伤而引起胚胎发育的败育。

(3) 在人工催情自然产卵时, 配组雄鱼不宜过少, 以保证产卵时有足够的精液增加精子与卵子相遇的机会, 以提高受精率。

3. 观察结果表明, 虽然鲂鱼与其他脊椎动物一样, 在正常情况下为单精入卵, 但授精时有几千个精子附着在卵球壳膜的表面, 这些多余的精子对于保证至少有一个精子进入卵内是必需的, 但是如果有多条精子入卵, 染色体数目将超出正常染色体组而引起胚胎发育的败育。我们的观察证实, 当第一条精子入卵以后, 卵球的精孔管内立即被一种絮状物质——受精塞堵住, 如图 11、12 所示, 因此我们推测受精塞的形成就是鲂鱼卵为阻止多精受精而出现的一种机制。但受精塞物质由何而来尚未研究, Syvollosi 和 Billard (1974)<sup>[4]</sup>认为这种物质是由卵球内的皮质泡释放出来的。

4. 在人工授精过程中, 精液同时授于卵球, 而这些卵球是否同时受精而无分秒之差呢? 光学显微镜观察很难回答这一问题, 根据扫描电子显微镜揭示, 授精时虽然精液中的精子数量很多而又同时授于卵球, 但精子入卵的时间是稍有快慢的, 前后相差 15 秒钟之多, 但最多不超过 30 秒钟, 这可作为人工授精时精卵适当拌和时间的依据。但这种差异的原因尚无从判断。

## 参 考 文 献

- [1] 朱洗等, 1960. 家鱼人工生殖的研究, 253—272, 科学出版社。
- [2] 刘筠、陈淑群、王文先, 1963. 草鱼卵子受精的细胞学研究, 湖南师范学院自然科学学报 5:1—15。
- [3] 王幽兰、徐国江, 1980. 花鲢卵球受精的细胞学研究, 水生生物学集刊, 7:189—193。
- [4] Longo, F. J. and E. Anderson, 1968, The fine structure of pronuclear development and fusion in the sea urchin, *Arbacia punctulata*. *J. Cell Biol.* 39 339—368.
- [5] Franklin, L., 1965. Morphology of gamete membrane fusion and of sperm entry into Oocytes

- of the Sea urchin. *J. Cell Biol.*, **25**: 81~100.
- [6] Barros, C., and L. E. Franklin, 1968. Behavior of the gamete membranes during sperm entry into the mammalian egg. *J. Cell Biol.*, **37**: C13~C18.
- [7] Iwamatsu, T. and T. Ohta, 1978. Electron microscopic observation in the fish egg. *J. Exp. Zool.*, **205**: 157~180.
- [8] Anna Ruth Brummott and James N. Dumont, 1979. Initial stage of sperm penetration into the egg of *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Zool.*, **210**: 417~434.
- [9] Szollosi, D., and R. Billard, 1974. The micropyle of trout eggs and its reaction to different incubation media. *J. Microsc. (Paris)*, **21**: 55~62.

## THE OBSERVATION ON THE INITIAL FERTILIZATION OF FRESHWATER BREAM BY ELECTRONIC SCANNING MICROSCOPE

Wang Ruixia and Zhang Yuren

(Shanghai Fisheries College)

Fu Cansheng, Li Zhenlan, Wu Yizhang,  
Zhang Fushun and Hao Hongjing

(Institute of Atomic Energy Utilization, Chinese Academy of Agricultural Science)

### Abstract

In generally, to make sure of the sperm enter into living egg is considerable difficult. We have got excellent observations by use of the electronic scanning microscope. The results can be summarized as follows:

1. The matured egg of the bream (*Megalobrama terminalis* Richardson) is surrounded by the thick chorion. There is a funnel-like depression on the chorion nearby the animal pole. A micropyle is at the bottom of the depression. A micropylar tube, 5  $\mu$  in diameter, connects the micropyle into the protoplasmic germinal disc. The acrosomless sperm contact with the egg cytoplasm through this micropylar tube. In addition, there are numerous infinitesimal pores are found all over the surface of chorion.

2. The sperm of the bream enter into the egg instantly, and all micropylar tubes are sealed by the fertilized plug within 30 seconds after insemination, the sperm enters the egg and cast off the flagellum.

3. Although only one sperm is allowed to enter into the egg normally, but a great quantity of supernumerary sperms is necessary to raise the rate of fertilization. However, if more than one sperm enters into the egg, the number of chromosomes will be raised than the normal and cause abortion in early embryogenesis, thus a fertilized plug is formed at the inner opening of the micropylar tube.