

# 雌核发育和两性融合发育鱼卵调控精核 受精发育的生化特性研究\*

岳振宇 蒋一珪 单仕新

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

## 提 要

两性融合生殖的鱼卵受精后, 精核能疏松、解凝, 形成雄性原核; 雌核发育银鲫卵子受精后, 精核发育受到抑制, 无法形成原核。采用显微注射去膜精核以及细胞学和电镜观察的方法, 本文对两类鱼卵受精后精核早期发育的生化性质进行了初步探讨, 并着重研究了雌核发育银鲫卵子控制精核发育的生化特征。实验结果显示, 两性融合生殖鱼类卵质中, 一定量的  $\text{Ca}^{2+}$  的存在, 二硫键的还原作用对于精核的发育显然是必要的; 而在雌核发育银鲫卵中,  $\text{Ca}^{2+}$  的功能和二硫键的还原作用与精核发育受到抑制之间并无直接联系。银鲫卵质中似乎显示出异常的磷酸酶脂解活性, 导致磷酸化过程无法进行, 使精核解凝受到阻碍。另外, 两性融合生殖的鱼卵重质层中具有大量诱导精核原核化的有关因子, 而银鲫卵质中则缺少该因子(或活性极低)。银鲫卵质中还可能缺乏某些与雄性原核的核膜重组装有关的大分子物质。

**关键词** 雌核发育, 两性融合生殖, 受精, 精核, 卵质

在两性融合生殖(Bisexual reproduction)的受精过程中, 入卵精子的核膜先行解体, 精核致密的染色质与特异碱性蛋白去组装, 然后与卵质内组蛋白重新组合, 以保证染色质合成与复制; 另外, 在原核周围, 利用卵子中膜材料重新形成核膜。在细胞形态上精核的变化则表现为疏松、解凝, 进而形成泡状的雄性原核, 最后与雌性原核结合, 完成受精过程。目前, 对于在受精早期过程中精核上述发育的有关生化性质的研究还表明, 卵子的重质层组分能诱导精核的解凝和原核化发育<sup>[1]</sup>, 精核在卵质内形成雄性原核过程中还需要有  $\text{Ca}^{2+}$  的激活作用<sup>[2,3]</sup>, 同时与二硫键(S-S)的还原<sup>[4,5]</sup>、磷酸化作用有关<sup>[6,7,8]</sup>。但是以上研究主要集中在哺乳类动物、两栖类和无脊椎动物的海胆等材料<sup>[4,8-10]</sup>。关于鱼卵受精早期的卵子诱导精核的生化性质尚未见报道。

银鲫成熟卵受精后, 入卵精核发育受到抑制, 无法形成原核, 表现为雌核发育(gynogenesis)的生殖方式<sup>[11,13]</sup>。显然, 这一独特的生殖方式中, 精核入卵后的行为与两

\* 本研究得到国家自然科学基金(39170602)和湖北省自然科学基金(89J17)以及淡水生态和生物技术国家开放实验室的经费资助。

1995年12月17日修回。

性融合生殖型的受精差异显著,也使作者有兴趣对银鲫卵质的诱导功能与精核发育之间的关系进行探讨。采用显微注射去膜精核的方法,对去膜精核在雌核发育和两性融合生殖鱼类受精卵的发育行为进行比较,尝试从受精生物学角度来揭示鱼类雌核发育过程中的生化特征。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 本实验所用实验鱼都由本所关桥试验场提供,包括银鲫(*Carassius auratus gibelio*),红鲫(*Carassius auratus* red variety),红鲤(*Cyprinus carpio* red variety)。均采用人工催产获得实验所需鱼卵和精子。

**1.2 去膜精核的制取和脱膜卵的获得** 用Hank's液洗涤新鲜精液,离心收集沉淀,加入去膜液(0.05% Triton-X100, 0.85% NaCl)处理15min,以悬浮液(含8mmol/L CaCl<sub>2</sub>的生理盐水)洗涤后,再次悬浮,使精核对最终注射浓度为10<sup>6</sup>/ml。鱼卵(受精或未受精)均用脱膜液(0.25% trypsin, 0.4% urea, 0.85% NaCl)处理4—5min,除去卵壳,获得裸卵,经Holtfreter's液洗涤,备用。

**1.3 显微注射实验** 通过微量注射仪将去膜红鲫精核注入红鲫成熟未受精卵中,注射后鱼卵在Holtfreter's液中发育,每隔10min取材,固定。将红鲫去膜精核注入不同发育时期的红鲫受精卵(干法受精,水温18℃)的动物极,如分别在10、20、30、40、50min和2-cell和4-cell时注入,待其发育30min后固定,固定液为Bouin's液。

取红鲫去膜精核悬浮液,分为两组:一组加入100mmol/L DTT(Dithiothreitol, Serva)处理20—30min,另一组加入10mmol/L EGTA(湖州生化厂)混合均匀。将两组去膜精核液分别注入红鲫受精卵中,在受精后20min内完成显微注射。注射后的受精卵在Holtfreter's液中发育,每隔5min取材,Bouin's液固定。

### 1.4 用红鲫作材料重复实验

取红鲤去膜精核悬浮液,分为三组:第一组即为含Ca<sup>2+</sup>(8mmol)的生理盐水,第二组中加入100mmol/L DTT处理20—30min,第三组加入250mmol β-磷酸甘油(β-glycerophosphate, Merck)混合均匀。然后将三组去膜精核液分别注入银鲫受精卵(银鲫♀×红鲤♂,干法授精,水温19—20℃)。在受精后20min内完成显微注射。注射后在Holtfreter's液中培育40min,用Bouin's液固定。

**1.5 成熟未受精卵(红鲫、红鲤、银鲫)** 用冷的卵质缓冲液<sup>[14]</sup>(Ooplasmic buffer, OB. 250m Sucrose, 100mmol KCl, 30mmol MgSO<sub>4</sub>, 25mmol Tris, HCl调pH至7.4)。漂洗一次后,装满于含冷的OB液的2mmol离心管中,吸去多余的溶液,在Eppendorf离心机常温下离心15min(7000—9000g),收集卵子的重

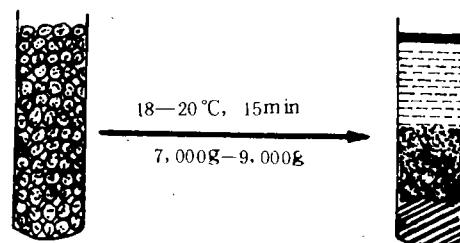


图1 卵子重质层的提取过程

Fig.1 Extraction of heavy ooplasmic fraction

- 脂质层 Lipid
- ▨ 轻质层 Light ooplasmic fraction
- ▨ 重质层 heavy ooplasmic fraction
- ▨ 皮层、卵壳、卵黄、色素粒 cortex, chorion, yolk, pigment.

质层(含蓝色色素),再用 OB 液稀释约 100 倍,4℃保存备用(图 1)。

将红鲫、红鲤和银鲫重质层稀释液分别与红鲫或红鲤去膜精核混合,然后分别注入银鲫受精卵中,各发育 40min, Bouin's 液固定。另外,注射 OB 液与去膜精核的混合液作为对照。

**1.6 细胞学观察** Bouin's 液固定的鱼卵在 24h 内换入 70% 酒精中。用酒精逐级脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。切片厚度 9μm, Delafields hematoxylin 染色, Eosin 复染,镜查。

**1.7 红鲫、红鲤和银鲫成熟卵子重质层的透射电镜观察** 吸取红鲫、红鲤和银鲫卵子重质层提取物,用 2.5% 戊二醛(0.1mol / L PBS 配制, pH = 7.2)固定。制片时,以 PBS 漂洗,1% OsO<sub>4</sub> 固定 2h,丙酮脱水,Epon 812 树脂包埋,醋酸钠、柠檬酸铅染色,H-300 透射电镜观察。

## 2 结果

### 2.1 红鲫去膜精核在红鲫未受精卵和受精卵中的发育

根据细胞学观察,为了叙述的方便,将去膜精核注入卵质后发育过程分为五级:

Grade 0: 与受精前核大小类似,保持固缩的圆点状,染色很深;

Grade 1: 精核形态开始变化,为不规则状,有低程度解凝,染色依然很深;

Grade 2: 精核疏松、膨大,形态为不规则,着色变浅,高程度的解凝;

Grade 3: 精核形态逐渐变圆,透明性增加,体积较前略有增大,膜不十分清楚,原核化发育程度低;

Grade 4: 精核为较大的泡状结构,可以观察到其中点状或丝状染色成分,膜边缘光滑、清晰,原核化发育程度高。

#### 2.1.1 去膜精核在红鲫未受精卵中的发育

去膜精核被注入红鲫卵质后,发育 10min 时,无精子星光,精核体积略有增加(Grade 1)[图版 I: 1];发育至 20min 时,精子星光出现,精核体积变大(Grade 2);30min 后,精核形成原核(Grade 3—4)[图版 I: 2],受精 40min 时精核体积与 30min 时没有多少改变。

#### 2.1.2 在红鲫受精卵不同发育时期注入去膜精核的发育行为

细胞学观察结果(表 1)表明,在红鲫卵受精后 30min 内注入的去膜精核,经过约 30min 的发育,均能发育成原核[图版 I: 3],受精 40min 到 4-cell 期注入的精核,尽管体积增大许多,并且高度解凝(Grade 2),但始终不能形成原核[图版 I: 4]。

#### 2.2 在红鲫受精卵质中 DTT、EGTA 对去膜精核发育的影响

实验结果显示,用 DTT 处理的去膜精核注入到红鲫卵质中发育 15—20min,就已形成原核(Grade 3—4)[图版 I: 4];未用 DTT 处理的去膜精核发育 20min,仅能高度解凝(Grade 2),没有观察到原核的形成,30min 后才开始形成原核。

当去膜精核与 EGTA 混合后注入红鲫受精卵,精核在 40min 的发育过程中,始终维持致密的状态(Grade 0—1),形态与注入前相比稍有变化,没有发现明显的星光[图版 I: 6]。在红鲫受精卵质中注射的去膜红鲤精核也得到类似的结果。

表1 在红鲤受精卵不同发育时期注入去膜精核的发育行为

Tab.1 Development of sperm nuclei injected into eggs of *Carassius auratus* red variety at different stages

受精卵的发育时期 Stage of fertilized eggs	10'	20'	30'	40'	50'	60'	70'
注入精核发育特征 Development of injected sperm nuclei	Grade 4	Grade 4	Grade 3—4	Grade 2	Grade 2	Grade 2	Grade 1—2
注入精核形成原核能力 Ability of injected sperm nuclei in forming pronuclei	++	++	+	-	-	-	-

### 2.3 在银鲫受精卵质中 $\text{Ca}^{2+}$ 、DTT 和 $\beta$ -磷酸甘油对红鲤去膜精核发育的影响

去膜精核与含  $\text{Ca}^{2+}$  (8mmol/L) 的悬浮液混合注入银鲫受精卵质中, 精子携带的星光都能发育, 而大多数精核仍然染色较深, 略微解凝(Grade 1)或解凝程度较高(Grade) [图版 I: 7], 极少数的精核也初步形成了原核(Grade 3); 经过 DTT 预先处理的去膜精核注入银鲫卵质, 精核仅处于解凝状态(Grade 1—2), 形态呈现不规则的多角、条状等, 着色深[图版 I: 8], 精核平均大小较  $\text{Ca}^{2+}$  组略有增加, 但不十分明显; 观察中发现, 注入含  $\beta$ -磷酸甘油的去膜精核后, 精核的体积逐渐增大, 着色降低。发育到 40min, 大部分精核高度疏松解凝(Grade 2), 部分精核着色性进一步降低, 出现泡状结构, 初步形成原核(Grade 3)[图版 I: 9], 精核的平均大小明显高于前二组(图 2)。

### 2.4 在银鲫受精卵质中红鲤、红鲤和银鲫卵质提取物对红鲤去膜精核的影响

红鲤、红鲤和银鲫的成熟卵子, 经由离心作用的挤压而达到匀浆的效果, 其分层结果见示意图(1)。将絮状重质层提取出来后经 OB 液稀释, 分别与去膜红鲤精核混合注入银鲫受精卵。结果发现, 经过 40min 的发育, 去膜精核大部分已发育成原核, 核中依稀可见丝状和颗粒状的染色成分, 核膜清晰(Grade 4)[图版 I: 10]。以 OB 液作为对照的注射材料中, 精核不能或极少形成原核, 只表现出解凝(Grade 1—2)[图版 I: 11]。

银鲫卵子重质层与去膜精核混合后注入银鲫受精卵中, 精核的发育出现了较复杂的情况。作者发现, 一些精核也能发育成原核[图版 I: 12], 初步统计, 原核化精核的相对数量远低于红鲤或红鲤重质层组(表 2)。多数注入精核呈解凝状态(Grade 1—2)。

### 2.5 红鲤、红鲤和银鲫卵重质层透射电镜观察

电镜观察结果表明, 在三种卵子重质层中均有大量的囊泡结构、以及细小的颗粒和絮状的物质[图版 I: 13—15]。所有的囊泡均为双层膜结构, 呈圆形或椭圆形, 平均直径为 5000A。有些囊泡中具嵴样结构, 估计为经粒体。颗粒状结构直径约在 200—250A, 据它们大小判断, 可能是核糖体<sup>[15]</sup>。三种鱼卵重质层的超微结构未见有明显差别。

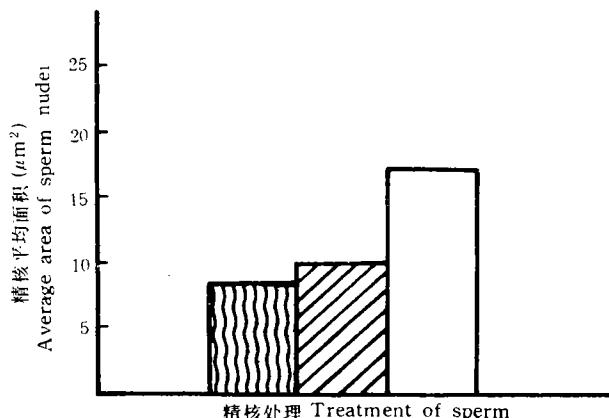


图2 不同处理条件下的去膜精核注入银鲫卵后其大小变化

Fig.2 Variations of average area in treated sperm nuclei injected into eggs of gynogenetic crucian carp

图中左为  $\text{Ca}^{2+}$ ; 中为 DTT; 右为  $\beta\text{-glycerophosphate}$ 

表2 在银鲫卵中注射不同重质层组分诱导精核发育的百分率

Tab.2 Percentage of sperm nucleus development in eggs of gynogenetic crucian carp after injected with individual heavy ooplasmic fraction

重质层组分 Heavy ooplasmic fraction	精核观察数 No. of sperm nuclei observed	精核百分率(%) percentage of sperm nuclei		
		Grade 0	Grade 1—2	Grade 3—4
红鲫重质层 Eggs of crucian carp (red)	195	6.5	25.8	67.7
银鲫重质层 Eggs of gynogenetic crucian carp	155	5.1	83.8	11.3
对照组(OB液) Control (OB solution)	110	7.5	90.4	2.1

### 3 讨论

葛伟等<sup>[8]</sup>对银鲫脱膜卵受精进行细胞学观察时,发现入卵的异源精核出现了活化现象,表现出一定的解凝;作者认为,由于银鲫卵质内部缺乏有关活性因子,异源精核仍然不能形成原核。可见银鲫卵质在诱导核发育的功能上是非常特殊的,有别于两性融合生殖型的卵质功能。

#### 3.1 两性融合生殖鱼类卵质诱导去膜精核发育的特征

大量的实验证据表明<sup>[16]</sup>,受精后卵质内  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度增加,靠激活胞质有关蛋白来触发

一系列发育事件,包括诱导精核的解凝、原核的膜系统重组、形成原核等。EGTA 为  $\text{Ca}^{2+}$  的螯合物,受精后注射 EGTA 可以防止  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度增加,从而抑制了有关发育事件<sup>[2]</sup>。

向两性融合生殖鱼类红鲫和红鲤受精卵注射含  $\text{Ca}^{2+}$  的去膜精核悬浮液,精核在卵中逐渐疏松、解凝,经过约 30min 的发育,形成原核。而注射含 EGTA 的精核没有能发育成原核,星光发育也异常,表明  $\text{Ca}^{2+}$  作用在鱼类精核的解凝和原核化发育中是必要的,同时星光的形成也需要  $\text{Ca}^{2+}$  的维持。有研究表明,精核碱性蛋白质中半胱氨酸的-SH 被氧化成二硫键(S-S),是导致精核染色质致密结构的原因之一<sup>[17]</sup>。人为地用二硫键(S-S)的还原剂 DTT 能打开其二硫键<sup>[18]</sup>。银鲫或红鲤精核经过 DTT 预先处理,进入卵质内发育速度比对照组明显加快。Perreault<sup>[6]</sup>在研究两栖类精核的解凝、形成原核所需时间与二硫键相对含量之间的关系时曾经指出,精核碱性蛋白二硫键含量与精核形成原核所需时间成正相关性。红鲫或红鲤精核碱性蛋白一定含量的二硫键被 DTT 还原,因而发育速度明显加快,这也反映出红鲫或红鲤精核碱性蛋白中二硫键的还原作用是精核解凝和原核化发育过程中不可缺少的。

卵质中有关活性因子对精核的促发育作用仅出现在卵细胞周期的一定时间内<sup>[9,10]</sup>。本实验观察发现,在红鲫受精卵不同发育时间注入的去膜精核存在明显发育差异(图 2),精核的解凝(Grade 1—2)和原核化(Grade 3—4)表现为既连续但又明显不同的两个过程。该现象提示在两性融合生殖鱼类受精卵质内存在的两类不同的诱导精核发育因子:精核解凝因子(SNDFs, sperm nucleus decondensation factor)和精核原核化因子(SPDFs, sperm pronucleus development factors)<sup>[6]</sup>,其中 SNDFs 从受精开始到第二次卵裂(或更长)在卵质内一直维持较高活性,它使注入精核的旧核膜解体,染色质疏松;而 SPDFs 仅能使在原核融合期或早中期之前注入的精核形成原核,使精核最终完成碱性蛋白的转换和新的核膜组装。

### 3.2 雌核发育银鲫卵质诱导去膜精核的发育及有关生化性质

实验结果显示,在有一定浓度的  $\text{Ca}^{2+}$  存在以及经过 DTT 预先处理的情况下,注入银鲫卵质的去膜精核尽管表现出一定程度的解凝,但发育仍然受到阻碍,很少能形成原核。这似乎说明,在银鲫卵质中有关  $\text{Ca}^{2+}$  的激活功能和二硫键的还原作用与精核发育受到抑制并无直接联系。然而当加入  $\beta$ -磷酸甘油时,注入的去膜精核发育程度有明显提高。这一现象暗示,在银鲫卵质中磷酸化过程可能是异常的。众多的资料对精核受精早期磷酸化作用进行过报道<sup>[6,8]</sup>。一般认为,精核染色质解凝过程中碱性蛋白的置换首先要经过磷酸化,随着精核进入卵质,磷酸酶(Phosphatase)脂解活性降低,而激酶(Kinase)作用加强,从而导致碱性蛋白的磷酸化<sup>[7]</sup>。有研究表明<sup>[6]</sup>,当加入碱性磷酸酶(AP, alkaline Phosphatase)时,精核的解凝受到阻碍,而  $\beta$ -磷酸甘油与 AP 具有高亲合力,它能解除该阻碍过程。从本实验结果不难想象,银鲫的受精卵卵质中似乎存在较高的磷酸脂解活性,它抑制了精核的碱性蛋白磷酸化这一重要过程,因而阻碍了精核的正常发育,当加入  $\beta$ -磷酸甘油后,解除了 AP 的脂解活性,使磷酸化作用能正常进行。

应强调的是,尽管碱性蛋白的磷酸化过程在精核的发育中是非常重要的,但不能保证精核最终形成雄性原核。将两性融合生殖鱼卵重质层组分与去膜精核混合注入银鲫卵中时,注入精核能形成类似正常的原核。这充分表明在银鲫卵质中还缺乏促原核化形成的

有关因子(SPDF 类),而该类因子则大量存在于两性融合生殖鱼类重质层中,以保证精核的原核化发育。

使人意外的是,将银鲫卵重质层组分与去膜精核混合注入银鲫卵子时,也发现少量注入精核表现为原核。对此有两点值得讨论:1.提取过程中激活了有关诱导因子,而该因子在银鲫卵的正常状态下缺乏活性;2.提取方法是对大量卵子进行操作,使得原来卵质中极少量的活性因子被“浓缩”。然而,无论哪一点都说明在正常情况下,银鲫卵质内缺少存在两性融合生殖鱼类卵质内的有关活性因子(或活性极低)。

对重质层电镜的观察表明,两类鱼卵重质中均有大量膜状结构。该膜状结构为形成雄性原核提供核膜原材料<sup>[1]</sup>,而在通常情况下,银鲫卵却无法利用这些材料形成雄性原核的核膜。这也表明,两类卵质的差异很可能还表现在一些大分子水平上(如蛋白质、肽等),在银鲫卵质中,可能缺乏相应的分子,使膜的组装不能进行。

综上所述,可以初步推论,雌核发育银鲫卵质控制精核发育与  $\text{Ca}^{2+}$  的激活和二硫键的还原作用并无直接的联系。在银鲫卵质中一方面由于异常的磷酸酶脂解活性导致磷酸化过程无法进行,使精核解凝受到抑制;另一方面银鲫卵质中可能还缺乏某些大分子物质阻碍了雄性原核的形成。

### 3.3 两性融合生殖鱼类和雌核发育银鲫受精的早期生化行为研究的意义

基于鱼类进化的特殊地位,以及利用鱼类配子体外操作的便利条件,开展对鱼类的受精生化行为的研究无疑是有意义的,这将极大丰富发育生物学内容;另外,在本实验基础上,深入地研究两性融合生殖鱼类和雌核发育银鲫的卵质组分上的差异,通过比较,找出有关精核发育的调控蛋白,人们最终能揭开鱼类天然雌核发育的分子学机制。

### 参 考 文 献

- [1] Lohka M J, Masui Y. Roles of cytoplasmic particles in nuclear envelope assembly and sperm pronuclear formation in cell-free preparation from amphibian eggs. *J. of Cell Biol.*, 1984a, **98**:1222—1230.
- [2] Masui Y, et al. Roles of divalent cation in maturation and activation of vertebrate oocytes. *Differentiation*, 1977, **9**:49—57.
- [3] Steinhard R. Is calcium ionophore a universal activator for unfertilized eggs? *Nature* (Lond.) 1974, **252**:41.
- [4] Ohsumi K R, et al. Development of sperm pronuclei from human spermatozoa injected microsurgically into frog (*Xenopus*) eggs. *J. of Exp. Zool.*, 1986, **237**:319—325.
- [5] Perreault S D, et al. The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content. *Biol. of Reprod.* 1987, **36**:239—244.
- [6] Brown D B, et al. Chromatin decondensation and DNA synthesis in human sperm activated in vitro by using *Xenopus laevis* egg extracts. *J. of Exp. Zool.*, 1987, **242**:215—231.
- [7] Poccia D L. Reactivation and remodeling of the sperm nucleus following fertilization. in "The Molecular Biology of Fertilization", 1988; 115—131.
- [8] Vacquier V D, et al. Egg jelly induces the phosphorylation of histones Hs in spermatozoa of the sea urchin *Arbacia punctulata*. *Dev. Biol.*, 1989, **133**:111—118.
- [9] Luttmer S J, Longo F J. Rates of Male pronuclear enlargement in sea urchin zygotes. *J. of Exp. Zool.*, 1987, **243**:289—298.
- [10] Usui N, yanagimachi R. Behavior of hamster nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. *J. of Ultrastruct. Res.* 1978, **57**:276—288.
- [11] 小林弘(杨兴棋译).鲫鱼的分类以及银鲫中所见的雌核发育的细胞学遗传学研究.淡水渔业,1981,(1):36—40.

- [12] 俞豪祥.银鲫雌核发育的细胞学观察.水生生物学集刊,1983,(7):481—487.
- [13] 蒋一珪等,异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应.水生生物学集刊,1982,8(1):1—13.
- [14] Iwao Y, Katagiri C. In vitro induction of sperm nucleus decondensation by cytosol from mature toad eggs. *J. of Exp. Zool.*, 1984,230:115—124.
- [15] Lewin B. Ribosomal proteins interact with rRNA. In "Genes" (2nd edition). 1987,p147, New York.
- [16] 庞诗宜等译(B.艾伯茨著).细胞分子生物学,北京:科学出版社.1990:41.
- [17] 故光明译(腰原英利著).发育和基因,北京:科学出版社.1984:40—43.
- [18] Perreault S D, et al. The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Dev. Biol.* 1987, 101:160—167.

## BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF GYNOGENETIC AND BISEXUAL REPRODUCTIVE FISH EGGS REGULATING THE DEVELOPMENT OF SPERM NUCLEI DURING EARLY FERTILIZATION

Yue Zhenyu, Jiang Yigui and Shan Shixin

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072)

### Abstract

Sperm nuclei have the ability of swelling and forming male pronuclei immediately after fertilization in eggs of bisexual reproductive fish. By contrast, the fertilized eggs of gynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) suppressed the appearance of male pronuclei. Using the method of demembranated sperm injection together with cytological and ultrastructural observation, we made a preliminary examination on the biochemical characteristics in sperm nucleus development at early fertilization of two kinds of fish eggs, and focused mainly on the egg of gynogenetic crucian carp which regulated the unique reproduction via fertilization. The result that in cytoplasm of bisexual eggs the presence of certain concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  and the reduction of disulfide bond is of necessity at the development of sperm nucleus. But in ooplasm of gynogenetic crucian carp the  $\text{Ca}^{2+}$  and disulfide bond reduction was not directly related to the inhibition of sperm nuclear development. On the other hand, the cytoplasm in gynogenetic eggs abnormally high activity of phosphatase. Further research showed that there are plenty of relative factors which induce the forming of pronuclei from sperm nuclei in heavy ooplasmic fraction of bisexual eggs but none or less in gynogenetic eggs. The ooplasm of gynogenetic crucian carp may also lack some high molecules responsible for membrane assembly of male pronucleus.

**Key words** Gynogenesis, Bisexual reproduction, Fertilization, Spermnucleis, Ooplasm

## 图 版 说 明

### 图 版 I

1.注入精核发育 10min 为凝聚状态。750×；2.注入精核发育 30min 形成原核。750×；3.受精 20min 时注入的精核形成原核。750×；4.受精 40min 时注入的精核表现解凝。750×；5.经 DTT 处理的精核发育 15min 形成原核。750×；6.注入精核在有 EGTA 存在时保持凝聚状态。750×；7.注入精核(箭头所示)在有  $\text{Ca}^{2+}$  存在时发育状况。750×；8.经 DTT 处理精核(箭头所示)发育状态。750×；9.注入精核在有  $\beta$ -磷酸甘油存在时体积增大。750×；10.注入精核在有红卿卵重质层存在时发育成原核。750×；11.注入精核(箭头所示)在有 OB 液存在时发育状况。750×；12.当精核与银卿卵重质层一同注入时, 少数形成原核(箭头所示)。750×；13.银卿。20000×；14.红卿。20000×；15.红鲤。20000×。

1. Injected sperm nuclei condensed after 10min. development. 750× ; 2. From injected sperm nuclei forming pronuclei after 30min. development. 750× ; 3. Sperm nuclei were transformed into pronuclei when injected at 20min. after fertilization. 750× ; 4. Sperm nuclei decondensed when injected at 40min. after fertilization. 750× ; 5. Forming of pronuclei from the DTT-treated sperm nuclei after 15min. development. 750× ; 6. In presence of EGTA, the injected sperm nuclei remained condensed. 750× ; 7. The morphology of sperm nucleus (arrow) when injected with  $\text{Ca}^{2+}$ . 750× ; 8. The morphology of the DTT-treated sperm nuclei (arrow). 750× ; 9. Injected sperm nuclei enlarged in presence of  $\beta$ -glycerophosphate. 750× ; 10. Sperm nuclei transformed into pronuclei when injected with heavy ooplasmic fraction of bisexual egg. 750× ; 11. The morphology of the sperm nuclei (arrow) when injected with OB. 750× ; 12. Forming of pronuclei (arrow) in few of sperm nuclei when injected with heavy ooplasmic fraction of gynogenetic eggs. 750× ; 13. *Carassius auratus gibelio*. 20,000× ; 14. *Carassius auratus* red variety. 20,000× ; 15. *Cyprinus carpio* red variety. 20,000× .