

唇𩚰受精的细胞学研究

甘光明^{1,2} 张耀光² 张贤芳² 王志坚²

(1. 东南大学遗传中心, 南京 210009; 2. 西南师范大学生命科学学院, 重庆 400715)

摘要:唇𩚰精孔器属深凹陷、短孔径型。精子在受精后 2s 到达精孔管, 5s 进入卵子。受精后 8—15min, 卵子进入第二次减数分裂后期。受精后 10min, 开始形成雄性原核。受精后 20min, 进入第二次减数分裂末期。受精后 25min, 雌性原核形成。受精后 30—35min, 雌性原核向雄性原核移动。受精后 40min, 雌雄原核接近。受精后 50min, 雌雄原核结合。受精后 70min, 受精卵进入第一次有丝分裂中期, 受精后 80min, 进入第一次有丝分裂后期, 受精后 120min, 进入末期。卵黄降解与其内部或外周小泡的泡状缺口紧密相关。雌雄原核结合是精子星光扩张、牵引和细胞质流动的共同结果。有多精入卵的现象。

关键词:唇𩚰; 受精细胞学; 雌雄原核结合; 受精膜外举

中图分类号: Q24 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2006)03-0284-08

鱼类受精细胞学包含了雌雄原核形成与结合、受精膜外举、卵黄的初步利用、皮层反应等相关事件。目前, 对金鱼 (*Carassius auratus*) 和鳊鱼 (*Parabramis pekinensis*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)^[2]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[3]、赤𩚰鱼 (*Fundulus heteroclitus*)^[4]、中华鲟 (*Acipenser sinensis* Gray)^[5]、尼罗罗非鱼 (*Tilapia nilotica*)^[6]、彭泽鲫 (*Carassius auratus pengzeensis*)^[1,7]、鲫鲤杂种^[8]等经济鱼类的雌雄原核形成与结合以及合子核的分裂过程已有清晰认识, 并形成了细胞质流动学说^[6]和精子星光牵引学说^[2]以解释雌雄原核结合机制。受精膜外举后, 将发生复杂的形态学和化学组分的变化, 如南方鲇 (*Silurus meridionalis*) 受精膜外举后, 将形成规则的小孔^[9]。鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 卵在受精前后卵膜孔间距和孔径发生大小交替变化^[10], 黄海太平洋鲱 (*Clupea pallasii*) 卵在受精前后受精膜的形态和糖蛋白及 PAS 阳性物质也将发生不同程度的变化^[11]。唇𩚰 (*Hemibarbus labeo*) 是鲤科 (*Cyprinidae*)、𩚰亚科 (*Gobionae*)、𩚰属 (*Hemibarbus*) 的建属种, 广泛分布于东亚各江河平原水系, 是中国 50 种主要淡水经济鱼类

之一, 目前只见胚胎发育^[12]等方面的报道, 本文是对唇𩚰受精细胞学的观察。

1 材料与方法

2001 年 3 月 16—25 日分别从涪江下游合川江段收集唇𩚰生殖群体, 运回室内, 选择健壮无伤、怀卵量大的个体人工催产, 17 下严格干法受精。参照其胚胎发育的进程, 取部分受精卵用 Simth 氏液、Bouin 氏液和 2.5% 戊二醛, 以一定的时间段分别固定, 成熟卵另行固定。经 Simth 氏液、Bouin 氏液固定的材料 24h 后保存于 70% 酒精中, 辨别精孔器或动物极后小心剪下动物极, 正丁醇脱水, 石蜡包埋, 连续切片 5—7 μ m, H. E 染色, 目测微尺量度, 选择有代表性的细胞学特征在 Nikon 显微镜下拍照。经戊二醛固定的受精卵, 以 0.2mol/L (pH7.4) 磷酸缓冲液冲洗 3 次, 系列酒精脱水, 丙酮置换, 国产环氧树脂 650 聚合包埋, LKB-5 型超薄切片机切片, 乙酸双氧铀和柠檬酸铅双染, H-600 型和 JEM-2000EX 透射电镜观察并照相。保留部分受精卵孵化, 经统计其受精率为 97.1%, 孵化率为 85.4%。

收稿日期: 2004-06-01; 修订日期: 2005-07-14

基金项目: 重庆市科委攻关项目 (No. 2001-6630); 三峡库区生态环境教育部重点实验室基金 (No. 03121); 东南大学基础医学院青年科学基金 (No. 2004A106) 资助

作者简介: 甘光明 (1974—), 男, 汉族, 四川邻水人, 硕士。现工作单位: 东南大学, 研究方向: 遗传与发育生物学

通讯作者: 张耀光, E-mail: zhangyg@swnu.edu.cn

2 结果

2.1 成熟卵的形态学观察

成熟卵圆球形,橙黄色或橘黄色。卵径 1.60—1.90mm,平均 1.75mm。受精卵遇水即产生较强黏性,受精后 3min 卵膜开始膨胀,可见小的卵周隙,受精后 15min 至 20min 膨胀速度最快,达 0.0376mm/min,以后逐渐减慢,受精后 40min 卵膜停止膨胀,卵膜径达 2.40—2.70mm,平均 2.55mm。受精后 10—15min 在动物极出现胚盘,可见原生质流向动物极。成熟的未受精卵遇水也会产生较强的黏性、卵膜膨胀等现象,但不会出现细胞分裂。

2.1.1 卵膜和精孔器 卵膜由初级卵膜和次级卵膜组成[图版 :11]。初级卵膜与质膜紧密相连,其外具薄的嗜酸性附属膜。次级卵膜是一层均质的胶质膜,位于卵子最外层,外表凹凸不平,厚薄不均,嗜弱碱性。电镜下,初级卵膜厚 6.37 μ m,由三层弹性纤维的辐射带组成,从内到外,分别称之为辐射带、辐射带、辐射带。辐射带内的空腔是卵膜形成过程中,微绒毛脱落产生,称为辐射管,其内具泡状物质和颗粒成分[图版 :28]。辐射管间的弹性纤维称为弹性亚膜,弹性亚膜在纵切面弯曲成“<”形[图版 :27]。辐射带之间具与质膜平行的弹性纤维束,称为间膜,着色较深并略显弯曲。间膜与弹性亚膜的纤维相互渗透,紧密连接在一起,共同构成辐射带支架。辐射带外侧的附属膜与质膜平行,分为两层,内层是弹性膜,外侧是胶质层。次级卵膜位于初卵膜外,其外侧在扫描电镜中排列规则。

精孔器属于典型的深凹陷、短孔径型[图版 :1],是卵膜在动物极中央下陷形成的漏斗状结构,由前庭和精孔管两部分组成。前庭膨大,是精孔器主体,其最大直径 76.28 μ m,深度为 32.08 μ m。前庭具平缓区和凹陷区,平缓区卵膜凹陷相对平缓,当卵膜凹陷至一拐点后,卵膜以大约 75°角急速下陷,从拐点自精孔器底部均属凹陷区。拐点处的前庭直径为 24.25 μ m。前庭卵膜有较大变异,在平缓区外,次级卵膜厚度逐渐减薄,至平缓区次级卵膜完全消失,与此同时,初级卵膜的辐射管排列趋于紧密,至前庭平缓区辐射管逐渐消失,卵膜变得致密,嗜弱碱性,其厚度在前庭平缓区逐渐增加,在拐点处厚度达到最大,为 10.89 μ m,以后又逐渐减薄,至精孔管 6.16 μ m 处消失。初级卵膜外的附属膜不消失,在辐射管消失处陡然增厚至 2.05 μ m,具极强的嗜酸性,附属膜一直延伸至前庭底部,为精孔管洞穿。精孔

管长 3.21 μ m,直径 2.14 μ m,略大于精子头部直径的 1.44 μ m。精孔管下的细胞质、卵黄均被挤压成漏斗状。

2.1.2 染色体 染色体停留于第二次减数分裂中期[图版 :2]。其分裂相在细胞质浅层,位于精孔器前庭的拐点附近,其长轴 7.27 μ m,与前庭壁成大约 72°角,短轴 4.53 μ m。

2.1.3 卵黄 卵黄在 H. E 染色中分为两种类型。

型:嗜酸性,深红色,位于卵子中央及浅层。卵黄颗粒多呈球形,少数浅层卵黄颗粒外周具弧形缺口。

型:嗜碱性,紫黑色,数量较少,位于卵子细胞质附近,少数卵黄也有弧形缺口,或内具有圆形空泡。卵子中央有数个 87.45—150.16 μ m 球形或不规则嗜强碱性的网状、实质状或泡状区域[图版 :3],被染成深紫色。电镜下,卵黄也有两种类型,二者有明显界限。型:3—5 层,位于皮层小泡内侧,着色深,内有着色深的结晶斑。型:位于型卵黄内侧,着色浅,内不具明显的结晶斑。卵黄颗粒内部多处区域具连成一团的泡状体[图版 :25],颗粒之间具少量细胞质,细胞质内具较多线粒体[图版 :26]、核糖体和内质网。

2.2 受精过程的细胞学观察

受精后 0s 精子没有进入精孔器,精孔管仍然开放。

受精后 1s 精子进入精孔器前庭开口附近,未到达精孔管。

受精后 2s 精子已经到达精孔管附近,但无精子通过精孔管,在一个样本的精孔器切面可见 38 粒精子。

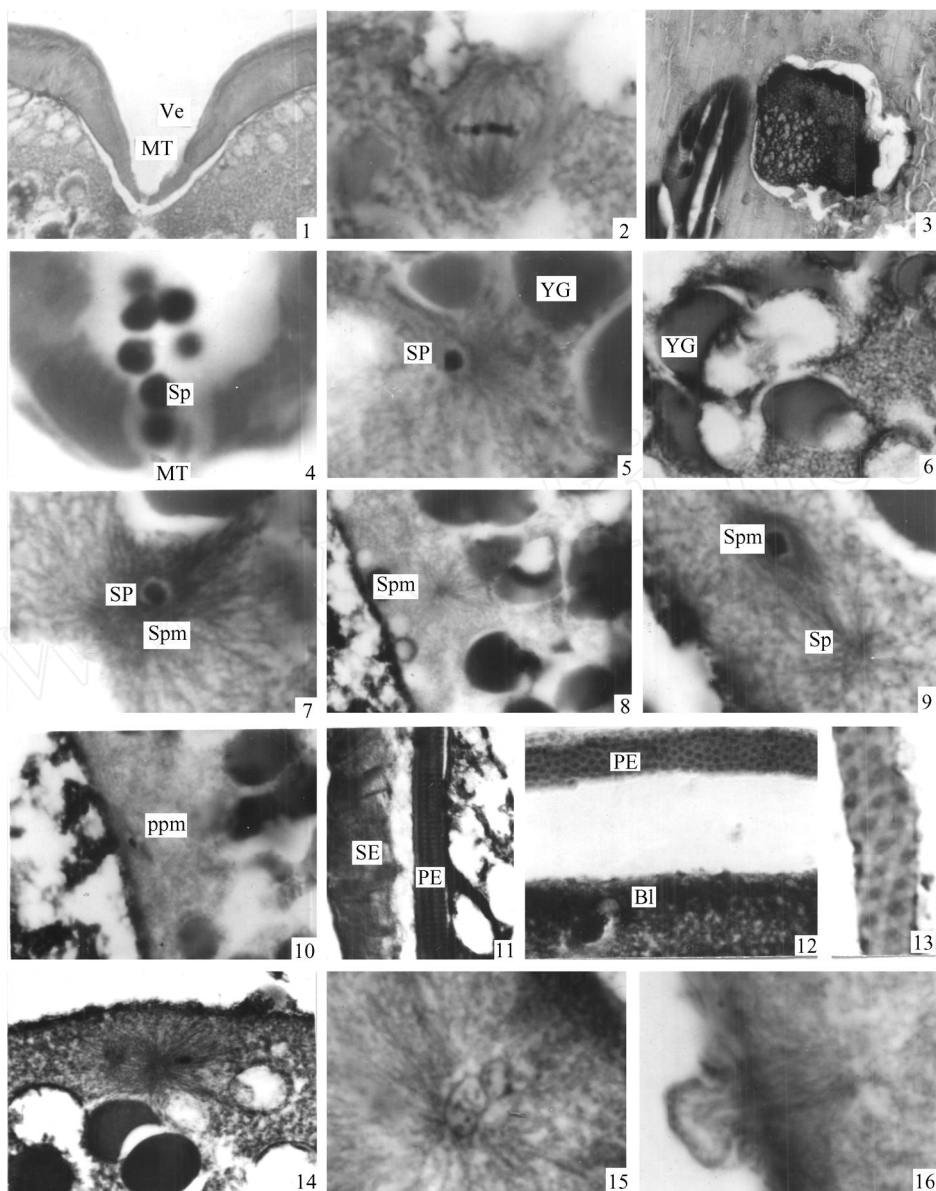
受精后 3s 精子开始穿过精孔管,此时,精孔管中部管腔变得膨大[图版 :4]。

受精后 5s 精孔器内集聚的精子继续增多,精子进入细胞质,距离卵黄 10.05 μ m,距离质膜 5.05 μ m,出现了精子及微弱的精子星光,这是精子入卵释放中心体后产生的结果[图版 :5]。

受精后 15s 涌入前庭底部的精子集结成一团。

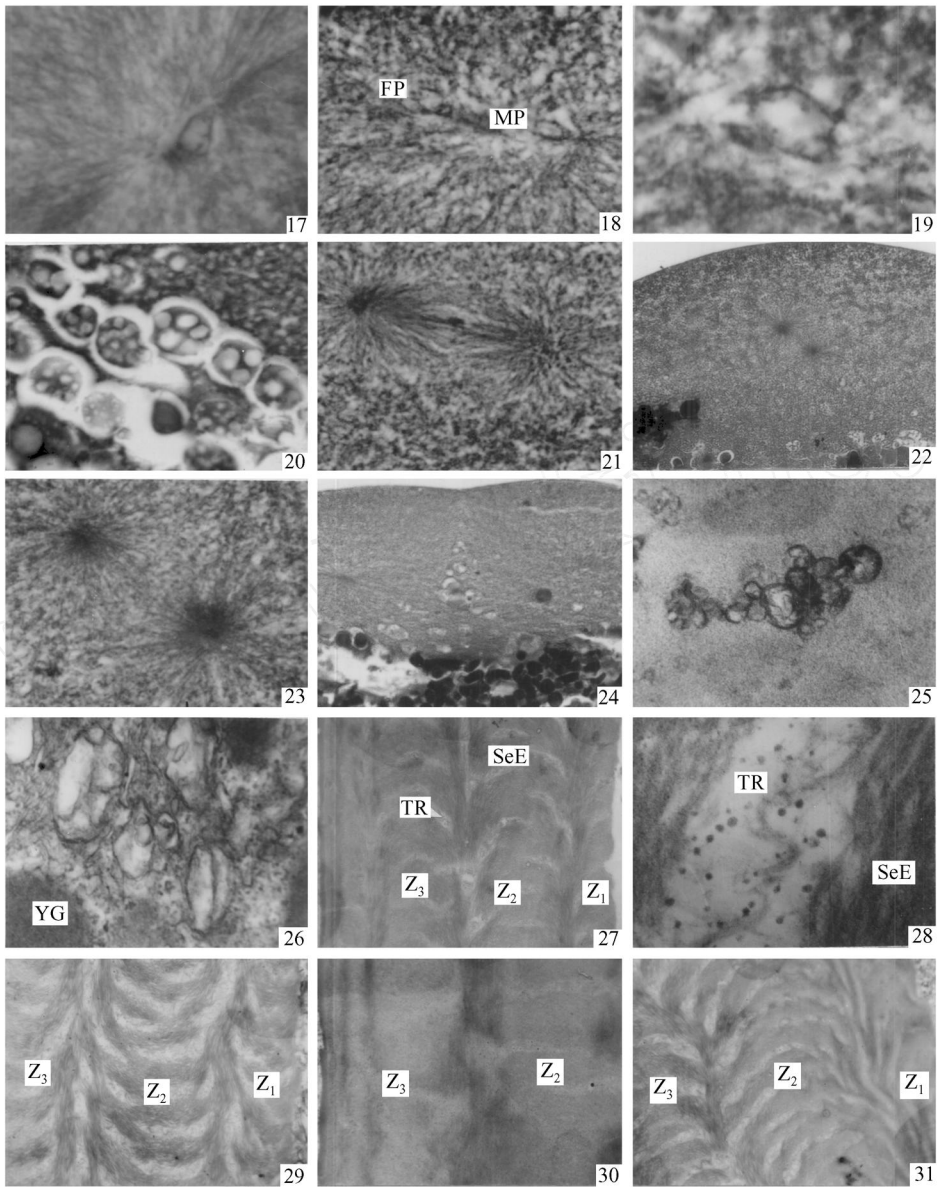
受精后 30s 外围型卵黄颗粒多已形成或即将形成弧形缺口或小泡,其内具嗜碱性内容物,有的卵黄颗粒已经碎裂[图版 :6],与卵黄颗粒接近的细胞质中开始出现直径约为 2.50 μ m 的型卵黄颗粒碎屑。

受精后 35s 精子星光开始形成、扩张,抵近卵黄[图版 :7]。入卵的精子向细胞质深处移动,进入细胞质内的精子距卵黄 8.55 μ m,距离质膜 7.15 μ m。



图版 (Plate)

1. 成熟卵精孔器(MA) . 示精孔管(MT) 和前庭(Ve) . H. E. , $\times 600$; 2. 染色体处于第二次减数分裂中期. H. E. , $\times 2000$; 3. 卵黄内的嗜碱性区. H. E. , $\times 480$; 4. 精子(Sp) 通过精孔管(MT) . H. E. , $\times 4000$; 5. 精子(Sp) 进入细胞质. H. E. , $\times 2000$; 6. 型卵黄颗粒(YG) 降解. H. E. , $\times 800$; 7. 精子(Sp) 形成精子星光(Spm) . H. E. , $\times 2000$; 8. 精子星光位置. H. E. , $\times 800$; 9. 入卵的多余精子(Ppm) . H. E. , $\times 2000$; 10. 图9标本中另一粒入卵的多余精子. H. E. , $\times 800$; 11. 成熟卵的初级卵膜(PE)、次级卵膜(SE) . H. E. , $\times 800$; 12. 显示初级卵膜(PE) 和胚盘(B) . H. E. , $\times 800$; 13. 初级卵膜(PE) . H. E. , $\times 2000$; 14. 精子星光(Spm) . H. E. , $\times 800$; 15. 雄性原核(MP) 形成. H. E. , $\times 2000$; 16. 染色体处于第二次减数分裂后期. H. E. , $\times 2000$.
1. Micropylar apparatus(MA) of ovum, showing micropylar tube (MT) and vestibule (Ve) . H. E. , $\times 600$; 2. Metaphase of the second meiosis. H. E. , $\times 2000$; 3. Area of being addicted to alkalescence in yolk granule. H. E. , $\times 480$; 4. Sperm(Sp) was passing micropylar tube (MT) . H. E. , $\times 4000$; 5. Sperm(Sp) entered into cytoplasm. H. E. , $\times 2000$; 6. some type I of yolk granule (YG) had decomposed. H. E. , $\times 800$; 7. the spermaster (Spm) around the sperm(Sp) . H. E. , $\times 2000$; 8. Location of spermaster (Spm) . H. E. , $\times 800$; 9. Showing polyspermy (Ppm) in a few of the ovum. H. E. , $\times 2000$; 10. In the same specimen of Fig. 9, another polyspermy (Ppm) entered into the ovum. H. E. , $\times 800$; 11. Showing primary envelope (PE) and secondary envelope (SE) of ovum H. E. , $\times 800$; 12. Showing primary envelope (PE) and blastoderm (B) . H. E. , $\times 800$; 13. Showing primary envelope (PE) . H. E. , $\times 2000$; 14. Showing spermaster (Spm) . H. E. , $\times 800$; 15. The male pronucleus (MP) comed into being. H. E. , $\times 2000$; 16. Anaphase in the second meiosis. H. E. , $\times 2000$



图版 (Plate 22)

17. 雄性原核(MP)移至两个中心体之间. H. E., $\times 800$; 18. 雌性原核(FP)形成, 向雄性原核(MP)移动. H. E., $\times 700$; 19. 雌雄原核结合. H. E., $\times 1400$; 20. 胚盘底部出现许多泡状小体. H. E., $\times 1400$; 21. 第一次有丝分裂中期. H. E., $\times 1400$; 22. 第一次有丝分裂后期. H. E., $\times 280$; 23. 图版 22 放大. H. E., $\times 1400$; 24. 第一次有丝分裂末期. H. E., $\times 140$; 25. 卵黄颗粒内部的泡状体. TEM. $\times 66\ 000$; 26. 细胞质内的线粒体(Mt). TEM. $\times 51\ 000$; 27. 成熟卵初级卵膜, 示弹性亚膜(SeE)、辐射管(TR)、辐射带 1(Z_1)、辐射带 2(Z_2)、辐射带 3(Z_3). TEM. $\times 6300$; 28. 图 27 辐射管放大. TEM. $\times 66\ 000$; 29. 初级卵膜内弹性亚膜. TEM. $\times 6600$; 30. 初级卵膜内弹性亚膜. TEM. $\times 14\ 000$; 31. 初级卵膜内弹性亚膜. TEM. $\times 6600$
17. Male pronucleus (MP) elophased between centrosome. H. E., $\times 800$; 18. the female pronucleus (FP) and the male pronucleus (MP). H. E., $\times 700$; 19. The female pronucleus and the male pronucleus conjugated. H. E., $\times 1400$; 20. Alveolus under the blastoderm. H. E., $\times 1400$; 21. Metaphase in the first karyokinesis. H. E., $\times 1400$; 22. Anaphase in the first karyokinesis. H. E., $\times 280$; 23. Magnification of Fig. 22. H. E., $\times 1400$; 24. Metaphase in the second karyokinesis. H. E., $\times 140$; 25. Vesicle inside of yolk granule of ovum. TEM. $\times 66\ 000$; 26. Mitochondria (Mt) inside of cytoplasm. TEM. $\times 51\ 000$; 27. Sub-elasticity envelope (SeE), tube radiate (TR) and flexural zone radiate1(Z_1), zone radiate2 (Z_2) and zone radiate3 (Z_3) in primary envelope of ovum. TEM. $\times 6300$; 28. Magnification of tube radiate in Fig. 27 TEM. $\times 66\ 000$; 29. Sub-elasticity envelope in zone radiatel. TEM. $\times 6600$; 30. Sub-elasticity envelope in zone. TEM. $\times 14\ 000$; 31. Sub-elasticity envelope in zone. TEM. $\times 6600$

受精后 40s 一个样本中有第二个精子通过细胞膜, 进入细胞质。次级卵膜变厚, 吸附的精子开始解

体, 其头部轮廓开始模糊。少数样本有多个精子进入卵周隙的现象。

受精后 55s 精孔器底部精孔管处伸出一些嗜碱性絮状物,进入前庭内的精子多被该絮状物吸附,同时前庭壁也有少许精子附着。

受精后 70s 精子继续接近黄卵,中心体与精子距离拉开,位于精子外侧,其星光四射,直抵卵黄和精孔管下的质膜。前庭内的精子挤成一团,头部开始溶解,变得模糊不清。

受精后 80s 染色体仍停留于第二次减数分裂中期,纺锤体开始伸长,纺锤体长轴 $7.85\mu\text{m}$,短轴 $4.28\mu\text{m}$ 。前庭内的精子更模糊,初级卵膜吸附的精子已完全解体、消失。有弧形缺口或空泡的型卵黄颗粒,其内的缺口和空泡扩大。游离于细胞质的部分型卵黄颗粒,其内的空泡极度扩大,几乎侵蚀了整个卵黄。

受精后 100s、110s 外围的型卵黄碎裂成许多小的卵黄颗粒,散布于细胞质中,型卵黄颗粒内的小泡、缺口扩大、使之大部分被降解。

受精后 120s、150s 前庭内的精子完全模糊。动物极细胞质内,悬游有较多的卵黄碎屑。

受精后 180s 动物极附近的细胞质开始增厚,精子星光继续扩张,并向细胞质深处移动[图版 :8]。

受精后 5min 在一个标本中有三个精子进入细胞质,但是仅仅一个能发出精子星光,此粒精子距卵黄 $8.55\mu\text{m}$,距质膜 $10.25\mu\text{m}$,其余两个精子膨大,不发出精子星光[图版 :9、10]。

受精后 8min 受精膜开始明显外举。染色体向分裂相两极移动,处于第二次减数分裂后期。精子距卵黄 $12.50\mu\text{m}$,距质膜 $10.07\mu\text{m}$ [图版 :14],偏离胚盘中轴线 $34.28\mu\text{m}$ 。胚盘底部开始出现泡状小体。外举的受精膜的初级卵膜厚约 $9.37\mu\text{m}$,其内的辐射管排列成整齐的小孔,每六个小孔排成一列,每列长 $11.87\mu\text{m}$,与卵膜的夹角约为 45° [图版 :12]。

受精后 10min 胚盘初步形成,精子膨胀成原核,由连在一起的三个小区组成[图版 :15]。原核继续向动物极方向移动,距卵黄 $50.71\mu\text{m}$,距质膜 $10.14\mu\text{m}$,其下出现了泡状小体。精子星光仍然和卵黄接触。

受精后 15min 卵黄深处,原成熟卵的中央嗜碱性区域扩大,并形成许多泡状小体。

受精后 20min 第二次减数分裂进入末期[图版 :16],正放出第二极体。极体大小为 $2.59\mu\text{m} \times 3.05\mu\text{m}$,将要形成的雌性原核与雄性原核距离为 $14.00\mu\text{m}$ 。雄原核完全形成,距卵黄 $51.60\mu\text{m}$,距质膜 $15.60\mu\text{m}$,距胚盘中轴线 $31.42\mu\text{m}$,大小为 $1.32\mu\text{m} \times$

$3.50\mu\text{m}$,位于两中心体之间[图版 :17]。

受精后 25min 胚盘继续隆起,第二极体已游离于质膜外,浅紫色。雌性原核形成,并向雄性原核靠近。胚盘底部,泡状小体大量出现,并向质膜方向移动。

受精后 30min、35min 雌性原核继续向雄性原核移动,胚盘基部泡状小体继续增多,有的小泡具较多内含物。精子星光增强,雌性原核更接近雄性原核,二者形状、大小相似,仅可从中心体的位置区别:靠近中心体及其发出的星光处是雄性原核[图版 :18]。

受精后 40min 雌雄原核接近,精子星光直达胚盘底部和细胞膜。

受精后 45min 雌雄原核在胚盘中央中轴线结合成合子核,距卵黄 $55.78\mu\text{m}$,距质膜 $25.78\mu\text{m}$,此时的合子稍微膨大[图版 :19],胚盘底部的泡状小体融合形成多泡小体,每个多泡小体内含 2—6 个更小的小泡[图版 :20]。

受精后 70min 合子核进行第一次有丝分裂,染色体处于分裂中期,分裂相长轴与赤道面成 15° 角[图版 :21]。

受精后 80min 染色体处于有丝分裂后期,两中心体微管向两极收缩[图版 :22、23]。

受精后 120min 染色体处于有丝分裂末期,即将形成两个子细胞,其内尚有未消失的中心体。分裂沟形成,但两分裂球未分开,二者之间隔有多泡小体,分裂球之间的多泡小体内容物少,分裂球基部的多泡小体内容物较多[图版 :24]。受精膜完全外举,初级卵膜内的小孔间距和孔径明显增大,仍然是每六个小孔排成一列,每列长增至 $14.50\mu\text{m}$,与卵膜的夹角减至 17° ,其厚度变薄至 $5.51\mu\text{m}$ [图版 :13]。

受精后 140min 进入第二次有丝分裂中期,具浅的分裂沟,其间仍以多泡小体相隔离,但初次形成的分裂沟加深,沟内多泡小体上移,子细胞之间还渗入了小的卵黄颗粒。

2.3 受精过程中卵膜扩张的超微结构变化

受精后 40s 弹性亚膜弯曲的角度开始增加。

受精后 80s 初级卵膜增厚至 $7.40\mu\text{m}$,其内的弹性亚膜弯曲角度继续增大[图版 :29]。次级卵膜胶质区已被撕开,与初级卵膜胶质层疏松连接。

受精后 110s 初级卵膜增厚至 $8.00\mu\text{m}$,其内的弹性亚膜弯曲角度进一步增大,部分弹性亚膜已拉直,与间膜垂直[图版 :30],同时略显弯曲的间膜也拉直。

受精后 240s 初级卵膜增厚至 $10.18\mu\text{m}$,其中辐射带的弹性亚膜伸直,厚 $3.03\mu\text{m}$,辐射带的弹性亚膜倾斜,与间膜成一定的夹角[图版 :31]。

3 讨论

3.1 雌雄原核发生位移及其结合的因素

3.1.1 现有假说的优点与不足 目前有两种假说解释雌雄原核结合机制。细胞质流动学说^[6]存在的基础是细胞质流动。细胞质流动导致胚盘形成,同时也将在胚盘中轴线形成涡流,中轴线附近的涡流形成的动力促使雄性原核和雌性原核靠近、结合。该学说可以解释雌雄原核结合的部位在胚盘中轴线,但作者认为它不能解释具深凹陷型精孔器的鱼类雌雄原核结合部位在胚盘中央,也不能很好地解释雌雄原核结合。首先,具深凹陷型精孔器的鱼类精子入卵位点深,与卵黄距离近,在受精过程中,入卵精子将远离卵黄,即与细胞质流动方向相反,这是细胞质流动学说不能解释的。其次,精子入卵后要产生精子星光,而精子星光由精子颈部逸出的中心粒与其周围豚胶化的卵质共同组成^[13],其周围的细胞质已豚化成胶质状,不具流体的特征。近年来的细胞生物学研究表明,精子星光实质是中心体微管,是细胞骨架的重要组成部分。根据细胞质流动学说不难解释雌雄原核靠近,但在雌雄原核结合过程中,雌性原核如何突破中心粒周围豚胶化的卵质即中心体微管,细胞质流动学说也不能作合理的解释。第三,雌雄原核在相互靠近和结合过程中,必定有精子星光收缩或降解。假如细胞质流动所产生的动力能使靠近雌性原核的精子星光收缩或降解,使雌雄原核在相互靠近和结合,而精子星光在雌雄原核结合前一直抵近卵黄,那么这种动力也能使胚盘底部的卵黄突破精子星光的干扰,从而导致雄性原核与卵黄贴近,也会导致第一次有丝分裂的分裂相与卵黄贴近,这显然与实际观测的不相吻合。有关唇𩰾的实验表明,在受精过程中,卵黄颗粒与精子星光相接触,但不能与雄性原核贴近,雌性原核也与精子星光相接触,但能使精子星光收缩或降解,可与雄性原核贴近、结合,于是大胆猜测,雌性原核确有被精子星光捕获的位点,即精子星光和雌性原核结合应该是特异性的。

星光引导学说^[2,14]能解释雌雄原核结合,但不能解释雌雄原核结合的部位在胚盘中轴线。该学说认为,估计雄原核的运动是精子星体成长所致。精子星光引导雄性原核向胚盘中央移动,还推进原核向中心轴移动,同时雌性原核受星光吸引向雄原核靠拢,使雌雄性原核结合。但黄永松^[6]认为,雌雄原核所处的环境是流体,在流体中的雌雄原核均无着

力点,雌性原核受星光牵引向雄性原核靠拢过程中将导致二者相向运动。鱼类处于第二次减数分裂中期时相总是偏离胚盘中轴线^[2],根据唇𩰾和其他鱼类受精过程中雌雄原核移动轨迹可知,雌雄原核在结合前均要偏离胚盘中轴线,“相向运动”必然导致雌雄原核脱离胚盘中轴线,进而导致雌雄性原核不能在胚盘中轴线结合。这与唇𩰾和草鱼、异源四倍体鲤鱼^[15]等观察的结果不相吻合。导致二者不同的原因可能是尼罗罗非鱼^[16]具浅凹陷型精孔器或没有精孔器^[17],精子入卵位点浅,精子星光较微弱,细胞质流动作用明显,而唇𩰾、草鱼具深凹陷型精孔器,精子入卵位点深,精子星光发达,星光引导作用有优势。

3.1.2 精子星光扩张使入卵精子悬浮于胚盘中央 对唇𩰾这种具深凹陷型精孔器的鱼类,动物极中央部分细胞质和卵黄因精孔器挤压而成漏斗状,精子入卵的位点很深,如前所述,在受精过程中,入卵精子运动方向与细胞质流动方向相反。故导致精子运动的动力不可能全是细胞质流动。唇𩰾受精后 5s 形成微弱的精子星光,受精后 35s 至雌雄原核形成、融合,精子星光一直抵近卵黄,同时向着卵黄一侧的精子星光一直比向着细胞膜一侧的精子星光长,随着精子星光不断扩张,受到卵黄的反作用力不断加大,而精子星光靠动物极方向没有卵黄,不会有其他力的干扰,于是精子星光携带着精子远离卵黄,使精子悬浮于胚盘(不是中轴线)。具浅凹陷型精孔器的鱼类,如尼罗罗非鱼,其精子星光微弱,精子星光形成前,在细胞质流动的作用下,精子将向胚盘底部移动,但随着精子星光完全形成、扩张,精子星光将阻碍精子进一步向胚盘底部移动,使精子与卵黄保持一定的距离。

3.1.3 精子星光牵引和细胞质流动共同作用使雌雄原核结合在胚盘中轴线 精子核化成雄性原核后,精子星光进一步扩张,抵达并捕获、牵引雌性原核,使雌雄原核互相靠近,在细胞质流动的作用下,精子星光携带着雌雄原核向细胞质丰富的胚盘中央移动,雌雄原核在胚盘中轴线结合。根据唇𩰾雌雄原核形成过程及其运动轨迹的分析,结合其他鱼类的观察结果,我们认为鱼类雌雄原核的结合是精子星光扩张、牵引和细胞质流动共同作用的结果。

3.2 受精膜外举和卵黄在受精初期降解的主要途径

卵周隙形成后,卵膜改称受精膜。唇𩰾皮层小泡释放后不参与受精膜组成,次级卵膜在受精膜外举过程中将断裂,因此受精膜外举、扩张是初级卵膜

自身变化的结果,这与黄海太平洋鲱^[11]不一致。在受精过程中用扫描电镜观察,鲢鱼卵膜内的小孔(辐射管)间距及孔径增大,这一现象在唇^[12]的受精膜内也有发现。唇^[12]初级卵膜将发生先变厚,再变薄,先收缩,再扩张的动态变化,在受精膜急剧外举(受精后 8min)直至完全形成过程中,初级卵膜内的小孔(辐射管)始终整齐排成列,每列由六个小孔组成,只是每列长度增加,与初级卵膜的夹角变小。

本研究发现唇^[12]受精初期,有卵黄颗粒降解的现象,其降解途径有 5 种:小颗粒的 型卵黄,随胞质流悬浮于细胞质中,在细胞质中直接降解;颗粒较大的 型卵黄,其内部形成小泡,卵黄从内部小泡开始降解,碎裂;颗粒较大的 型卵黄,其外部形成弧形缺口,卵黄从弧形缺口开始降解,并进一步碎裂成小颗粒;若干 型卵黄颗粒以一个共同的缺口进行降解; 型卵黄,卵黄颗粒外被囊泡,卵黄在小泡内进行降解。 型卵黄颗粒往往消化不彻底,残存的颗粒将随囊泡以胞吐的形式排于卵周隙。胚盘形成后,其附近仍有少量卵黄颗粒具小泡或缺口,在胚胎发育过程中,卵黄颗粒的降解还可能与卵子内部出现的嗜碱性区域和卵黄颗粒内部的泡状小体密切相关。

参考文献:

- [1] Yang R J, Zhang X J. Cytological studies in *Carassius auratus* var *pengze* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, **28**(1): 1—7 [扬睿蛟, 张轩杰. 彭泽鲫雌核发育的细胞学研究. 水产学报, 2004, **28**(1): 1—7]
- [2] Liu Y, Chen S Q, Wang Y X. Fertilization cytology study on ovum of *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *J. Nat. Sci. Hunan. Nom. Col.*, 1966, **5**(2): 173—184 [刘筠, 陈淑群, 王义钺. 草鱼卵子受精的细胞学研究. 湖南师范学院学报(自然科学版), 1966, **5**(2): 173—184]
- [3] Guo M S, Wang C Y, Kang X J, Han L Q. Apatial and Temporal ariations of Pronucleus of Zebrafish, *Brachdanio rerio* Ham During Fertilization [J]. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 2004, **24**(4): 409—414 [郭明申, 王晨阳, 康现江, 韩力强. 斑马鱼受精过程中原核的时空规律. 河北大学学报(自然科学版) 2004, **24**(4): 409—414]
- [4] Brummett A R, Dumont J N, Richter C S. Later stages of sperm penetration and second polar body and blastodisc formation in the egg of *Fundulus heteroclitus* [J]. *J. Exp. Zool.* 1985, **234**: 423—439
- [5] Xu Y, Xiong Q M. Fertilization cytology of *Acipenser sinensis* Gray [J]. *Acta Zool. Sin.* 1990, **36**(3): 275—278 [许雁, 熊全沫. 中华鲟受精细胞学研究. 动物学报, 1990, **36**(3): 275—278]
- [6] Huang Y S. Cytological study on fertilization of egg in *Tilapia nilotica*. *Acta Zool [J]. Sin.*, 1993, **39**(1): 19—24 [黄永松. 尼罗罗非鱼卵母细胞受精细胞学研究. 动物学报, 1993, **39**(1): 19—22]
- [7] Zhao Z S, Cao G Q, Huang F, Sun X Q. Fertilization cytology of *Carassius auratus pengzeis* [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 1999, **8**(1): 25—30 [赵振山, 高贵琴, 黄峰, 孙小强. 彭泽鲫的受精细胞学. 上海水产大学学报, 1999, **8**(1): 25—30]
- [8] Cao Y C, Liu Y. Cytology study on the autocopulation fertilization of F₁ hybrid of Red Crucian Carp () × Common Carp () [J]. *Life Science Research*, 2000, **4**(3): 255—259 [曹运长, 刘筠. 鲫鲤杂种一代(F₁)自交二代(F₂)的受精细胞学研究. 生命科学研究, 2000, **4**(3): 255—259]
- [9] Zhang Y G, Xie X J. Studies on the histology of development of follicle cell of ovary and egg envelopes in *Silurus meridionalis* Chen [J]. *Zoological Research*, 1995, **16**(2): 166—172 [张耀光, 谢小军. 南方鲇卵巢滤泡细胞和卵膜生成的组织学研究. 动物学研究, 1995, **16**(2): 166—172]
- [10] Guo S H, Chen X L, Zhang Y Q. A scanning electron microscopical study of unfertilized and fertilized eggs surface of the common *Hypophthalmichthys molitrix* [J]. *Acta. Sci. Nat. Nankaiensis. Uni.* 1989, (2): 73—77 [郭淑华, 陈叙龙, 张毓琪. 鲢鱼受精前后卵膜表面结构扫描电镜研究. 南开大学学报(自然科学版), 1989, (2): 73—77]
- [11] Huang S Q, Yan S Z. A study of the VE, FE and plasma membrane of *Cupea pallasi* eggs during the dynamic change process of fertilization [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1997, **27**(2): 196—202 [黄树庆, 阎淑珍. 黄海太平洋鲱受精前后卵膜的动态变化. 青岛海洋大学学报, 1997, **27**(2): 196—202]
- [12] He J S, He X F, Yan T M. Observation on the embryonic development of *Hemibarbus labeo* (Pallas) in lower reaches of Fujiang River [J]. *J. Nat. Sci. SW. Nom. Uni.*, 1999, **42**(2): 225—231 [贺吉胜, 何学福, 严太明. 涪江下游胚胎发育研究. 西南师范大学学报(自然科学版), 1999, **42**(2): 225—231]
- [13] Liu Y. Propagation Physiology of Main Cultivated fish in China [M]. Beijing: Agricultural Publishing House, 1993 [刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学 [M]. 北京: 农业出版社, 1993]
- [14] Li J Z, Zhang X J, Liu S J, et al. Cytological study on fertilization of allotetraploid hybrids of Red Crucian Carp () × Common Carp () [J]. *Acta Zool. Sin.*, 2002, **48**(2): 233—239 [李建中, 张轩杰, 刘少军, 等. 异源四倍体鲫鲤的受精细胞学. 动物学报, 2002, **48**(2): 233—239]
- [15] Liu Y, Chen Q S, Wang Y X. Cytological study on the fertilization of the egg of *Mylopharyngodon piceus* with the sperm of *Megalobrama terminalis* [J]. *Acta Hydrobio. Sin.*, 1981, **7**(3): 329—336 [刘筠, 陈淑群, 王义钺. 三角鲂精子与青鱼卵子的受精细胞学研究. 水生生物学集刊, 1981, **7**(3): 329—336]
- [16] Huang Y S. Ultrastructure of the mature egg and initial stages of sperm penetration in *Tilapia nilotica* [J]. *Acta Zool. Sin.*, 1990, **36**(3): 227—230 [黄永松. 尼罗罗非鱼成熟卵结构及精子入卵早期的电镜观察. 动物学报, 1990, **36**(3): 227—230]
- [17] Liu Y, Zhang X J. Types of sperm structure and corresponding types of ovum structure [J]. *J. Nat. Sci. Hunan. Nom. Uni.*, 1992, **15**(2): 168—174 [刘筠, 张轩杰. 鱼类精子结构和相应的卵子类型. 湖南师范大学自然科学学报, 1992, **15**(2): 168—174]

CYTOLOGICAL STUDY ON FERTILIZATION IN OF HEMIBARBUS LABEO

GAN Guang-Ming^{1,2}, ZHANG Yao-Guang², ZHANG Xian-Fang² and WANG Zhi-Jian²

(1. Genetic research center, southeast university, Nanjing 210009; 2. College of life science, Southwest Normal University, Chongqing 400715)

Abstract : The fertilized eggs of *Hemibarbus labeo* have been observed by TEM and OM, and mostly events of fertilization cytology have been studied, too. The result suggest :

The micropylar apparatus comprising of vestibule and micropylar tube is deeply sunken with a short tunnel, the diameter of the micropylar tube is about 2.143 μm , and the diameter of the sperm is about 1.445 μm . Before sperm penetrates, the chromosomes are at metaphase in the ovum, following prophase and preceding anaphase, during which the chromosomes are aligned along the metaphase plate. About 2s after fertilization in 17, sperms arrive at micropylar tube; 3s, a sperm is penetrating into micropylar tube, 5s, sperms enter into cytoplasm of ovum where the cytoplasm is sunken; 30s, some yolk granules begin to decompose; 35s, the spermaster comes into being; 5min, we find the phenomena of polyspermy in a few of the ovum, which is rare in teleost; but the sperms can't come into being spermaster; 8—15min, the chromosome are at anaphase, and 20min, at telophase of meiosis, later, the second polar body expels, and the blastoderm forms in animal hemisphere; 25min, both the male pronucleus and the female pronucleus can be seen; 30—35min, the female pronucleus move towards the male pronucleus, at the same time, both the pronucleuses move to the pivot of blastoderm; 40min, both the pronucleuses press close, and 50min, conjugate into zygote, and then, the zygotic nucleus expands; 70min, chromosomes are situated at metaphase of the first karyokinesis, 80min, at anaphase, and 120min, at telophase, the oosperm is segmentalized in daughter cells. 140min, chromosomes of the daughter cells are situated at metaphase of the second karyokinesis, while the daughter cells don't separate.

There have two hypothesizes to explain the mechanism how the male pronucleus and the female pronucleus conjugate. One is the Cytoplasm Flowage, which thinks the cytoplasm' flowage in ovum result in the conjugation. The other is the Spermaster Traction, which thinks the conjugation result from the spermaster' traction. We think the both hypothesizes are unilateral, which reason is the difference of the experimental specimen that the researchers use. We infer, there have some sites which the spermaster can identify in the female pronucleus. With the spermaster'elongate, the spermaster will capture and tract the female pronucleus, which make the male pronucleus and the female pronucleus conjugate. The site of conjugation isn't at the pivot of blastoderm, however, cytoplasm's flowage can solve it. This is the Hypothesis on Spermaster's Elongate, Traction and Cytoplasm's Flowage in the paper.

Key words : *Hemibarbus labeo*; Fertilization cytology; Conjugating of the pronucleus; Outspreading of fertilization envelopes