

唇鱈受精卵的皮层反应及其引发机制

甘光明 张耀光

(西南师范大学生命科学院,重庆 400715;东南大学遗传研究中心,南京 210009)

摘要:唇鱈皮层小泡1—4层,在光镜和透射电镜下均具5种形态,由外及内,小泡内颗粒直径逐渐减少。在H.E染色中,动物极低纬度区和精孔器附近的卵膜和质膜之间,具少量均匀的着色非常深的紫色斑点,与I型皮层小泡内容物形态结构相似,在透射电镜下,这些斑点和卵膜、质膜有明显的界限,其外没有包被膜相结构,我们称之为皮层反应引发斑,这是在鱼类受精卵中发现的一个新的结构。扫描电镜下,引发斑成絮状。引发斑对皮层反应的引发具有重要作用。皮层反应可分为潜伏期、始发期、高潮期、衰退期四个时期,潜伏期没有皮层反应发生,始发期只是位于受精卵外围的少量皮层小泡释放,高潮期为多个皮层小泡相互融合形成一个大的泡状体,泡状体再与质膜接触、融合后,随后破裂,释放内容物,可分为两个阶段,衰退期释放V型皮层小泡和其他残存的皮层小泡以及未完全降解卵黄颗粒碎屑;皮层反应是由I型皮层小泡和引发斑诱导的爆发性的链式反应,卵子外侧的皮层反应可以诱导内侧皮层反应。皮层反应有两个起始区域,在受精后35s开始于动物极低纬度区,稍后出现在精孔器前庭附近,随后在这两个始发区向四周扩散,并在前庭以外的区域愈合、打通。皮层小泡分批多次释放,质膜多次重组。精子入卵位点附近没有皮层小泡,不发生皮层反应,这提示皮层反应对鱼类多精受精的抑制效应有限。

关键词:唇鱈;皮层小泡;皮层反应;引发斑;引发机制

中图分类号:Q242 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2005)05-479-09

鱼类成熟卵子皮层小泡积累了代谢产生的酸性粘多糖和酸性磷酸酶等成分,在PAS反应成阳性,在不同的位置,皮层小泡大小和其内含物也有所差异^[1]。在精子入卵或其他物理化学因子的刺激下,卵子受到刺激,皮层小泡以胞吐的方式释放至卵周隙,这就是皮层反应。在皮层反应过程中需要Ca²⁺的参与^[2-3],并将释放细胞质内多余的膜结构^[1],皮层小泡释放的物质能使精子凝集^[4],对多精入卵有抑制作用,同时,皮层反应还可形成受精锥,也可以阻止多精入卵^[4-6]。皮层反应的起始时间和高潮持续时间在不同鱼类有所不同,在临近结束时将对质膜进行修复^[1,6-7]。一般而言皮层反应是从动物极开始并向植物极快速移动,但是鱊鱼(*Rhooeus ocellatus*)^[8]则相反,赤鱲鱼(*Fundulus heteroclitus*)^[9]和兴国红鲤(*Cyprinus carpio var. singuonensis*)^[6]精孔器下没有皮层反应发生。本文通过组织切片、透射电镜和扫描电镜对唇鱈受精卵的皮层反应全过程进行观察,发现唇鱈皮层反应起始于动物极低纬度区,

同时还发现与皮层反应引发密切相关的引发斑,首次把鱼类皮层反应分为四个时期,并从形态学上展示了鱼类皮层反应发生机制。

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鱈(*Hemibarbus labeo*)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。取部分受精卵以Smith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Smith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—7μm, H.E染色,目测微尺量度,Nikon显微镜下观察拍照。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

收稿日期:2004-09-14;修订日期:2004-10-19

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.2004A06)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@swu.edu.cn

片机切片,醋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。部分受精卵去除卵膜,以0.1mol/L二甲肿酸钠溶液固定5min,梯度乙醇脱水,醋酸异戊酯置换,CO₂临界点干燥,标本定位,喷镀Jeoljsm-35CF、Hitachi-S-250扫描电子显微镜观察、拍照。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%。

2 结果

2.1 成熟卵皮层小泡的形态学观察

唇鱗成熟卵细胞质外周围有1—4层皮层小泡,大小不一,外被单层膜,离精孔管愈远,皮层小泡直径愈大,层数愈多,着色愈深。在精孔器形成区域,皮层小泡直径平均为14.667μm,到精孔器急剧凹陷区域皮层小泡平均直径减少至5.357μm,在精孔管附近,皮层小泡完全消失。

根据皮层小泡的位置、大小和内含物的性质,可分为5种类型,I型:紧贴于质膜,主要分布动物极低纬度区,直径小于1.920μm,数量很少,其内充满着色很深、颗粒大的内容物。光镜下I型小泡表现为泡状紫色小斑点[图版I:4],在透射电镜下,可见I型小泡多已经破裂[图版II:17]。II型:紧贴于质膜,多分布在动物极低纬度区,平均直径4.123μm,数量少,其内的颗粒直径较大,着色深[图版I:33]。III型:与质膜接近,1—2层,平均直径18.333μm,数量较多,其内的颗粒直径小,着色较浅[图版I:3、4、5],精孔器附近的皮层小泡主要为III型[图版I:1]。IV型:一般离质膜较远,分布广,2—3层,平均直径24.510μm,数量最多,在透射电镜下,其内具少量直径小的颗粒和大量细线状的物质,着色浅,在H.E染色中为空泡状,但小泡的植物极端被膜内侧往往附有嗜碱性颗粒物[图版I:4、5]。V型:多分散于卵黄附近,也有极少数位于卵膜附近[图版I:5],数量少,内含1—2个大小不一的固体颗粒。

在H.E染色中,动物极低纬度区和精孔器附近的卵膜和质膜之间,具少量均匀的着色非常深的紫色斑点,与I型皮层小泡内容物形态结构相似[图版I:1、2],在透射电镜下,这些斑点和卵膜、质膜有明显的界限,其外没有包被膜结构[图版II:18],这种结构在国内外尚未见报道,称之为皮层反应引发斑。扫描电镜下,引发斑成絮状[图版II:25]。

扫描电镜下,去卵膜的卵子保持正常形态,其表面覆盖一层极薄的质膜,质膜外被浓密的微绒毛[图版II:26],内具排列紧密、大小不一的皮层小泡。去

除质膜,皮层小泡被撕裂,蜂窝状,内具球状或絮状内容物[图版II:27],但不能观察到皮层小泡的被膜,质膜内表面往往和表层皮层小泡被膜接近或融合,使其也成蜂窝状[图版II:28],精孔管附近没有皮层小泡,质膜光滑,不具微绒毛。

2.2 受精过程中皮层小泡的释放

2.2.1 组织学观察 受精后35s II型皮层小泡在卵子低纬度区已经破裂,其内容物排于初级卵膜和质膜之间,立即变成深紫色斑点[图版I:6]。精孔器前庭附近的皮层小泡也开始破裂,形成了若干深紫色斑点[图版I:8]。

受精后40s II型皮层小泡附近的皮层小泡随之破裂[图版I:7],在有些标本中还形成了卵周隙[图版I:9]。

受精后50s 卵周隙向周围延伸,皮层小泡大量破裂,排出深紫色的内容物,破裂的皮层小泡被膜和质膜重组形成着色很深的新膜,其外吸附着少量皮层小泡释放物,新膜内侧仍然具大量未破裂的皮层小泡。

受精后55s 皮层反应高潮即将来临。皮层反应从卵子低纬度区向高纬度区(精孔器)延伸[图版I:10、11]。精孔器前庭附近,皮层小泡继续破裂,形成较大的紫斑。

受精后60s 皮层反应继续向卵子高纬度区延伸,卵周隙继续扩大。精孔器附近皮层反应继续扩大,也形成了卵周隙。

受精后70s 皮层反应继续向卵子高纬度区延伸,精孔器附近的皮层反应达到高潮,除精孔管外,精孔器附近已经形成了卵周隙,其内具深紫色的皮层小泡释放物,但精孔器前庭附近发生的皮层反应局限于前庭附近,向外扩张的面积少。

受精后80s 动物极低纬度区皮层反应的高潮期第一阶段结束,外侧皮层小泡大量破裂,质膜随之修复[图版I:12],新形成的质膜凹凸不平,内侧仍有大量1—3层皮层小泡,并多已互相融合。随后,皮层小泡释放物在卵周隙爆炸式扩散,厚达37.520μm。

受精后120s、150s 皮层反应继续向四周延伸,但未与前庭处的卵周隙打通。精孔器附近的皮层反应接近尾声,精孔器明显举起[图版I:13],精孔管附近始终无皮层反应发生。

受精后180s 精孔器附近的皮层反应基本结束。其他区域的皮层反应继续进行。一方面,未进行皮层反应的区域继续进行。另一方面,已进行皮

层反应的区域进入皮层反应高潮期第二阶段。第二阶段皮层反应的过程是:新形成的质膜内侧,皮层小泡继续集聚并互相融合成一大型的泡状体,该泡状体再与质膜融合释放内容物,进而在受精卵表面形成直径达 $78.100\mu\text{m}$ 的凹陷[图版 I :14]。第二阶段皮层反应往往在受精卵若干区域同时发生。

受精后 5min 皮层反应的高潮期第二阶段结束,再次形成的新质膜内侧仅有 V 型皮层小泡、其他残余的皮层小泡和卵黄碎屑,至此,皮层反应高潮基本完成[图版 I :15]。精孔器外举,附近质膜已修复平整,成弧形,其下具丰富的细胞质[图版 I :16]。

受精后 8min 皮层反应结束,未释放的皮层小泡和卵黄碎屑释放于卵周隙,已经释放的皮层反应释放物向卵周隙扩散,胚盘初步形成,受精膜外举。

2.2.2 超微结构观察 受精后 10s 外侧皮层小泡多已互相融合,即将形成泡状体[图版 II :19]。

受精后 40s II 型皮层小泡破裂,随着皮层小泡的释放,微绒毛和部分膜结构逸失于卵周隙[图版 II :20]。释放的皮层小泡在底部重组形成新质膜,其外表面具凹凸不平,吸附着未完全脱离的颗粒。内侧皮层小泡也开始融合[图版 II :21],融合的一般过程为:相邻的皮层小泡向质膜移动过程中互相靠近,细胞质因皮层小泡的相互挤压而使细胞基质成分流于他处,使溶酶体和线粒体等细胞器相对聚集于小泡之间,细胞器膜结构与小泡融合,同时小泡被膜也因挤压变形而撕裂,使相邻的皮层小泡相互愈合,形成了互相连通的泡状体。

受精后 80s 外侧皮层小泡相继破裂,初步形成卵周隙。引发斑扩张也可以形成卵周隙,一些没有发生皮层反应的区域,引发斑颗粒扩散,也能使卵膜和质膜分离。

受精后 110s 外侧皮层小泡释放完毕,保留着皮层小泡 $1/3$ 的形状,皮层小泡底部又一次发生重组形成新质膜,其表面相对平滑。皮层小泡释放要损失较多的膜结构,损失的膜结构由皮层小泡被膜补充。新质膜内侧细胞质内,集结着大量的内膜系统,包括溶酶体、线粒体、内质网等[图版 II :22]。

受精后 240s 皮层反应高潮期已临近尾声,尚残存即将释放的 V 型皮层小泡[图版 II :23]。皮层反应损失的膜结构直到高潮期结束,没有渗入到受精膜、参与受精膜的形成。

2.2.3 扫描电镜观察 受精 40s 皮层反应已经发生,排出絮状内容物,可以观察到皮层小泡释放后残余的被膜[图版 II :28],以此作为皮层反应发生的标志。

受精 60s 皮层反应从发生区域向四周扩散,发生皮层反应和未发生皮层反应的区域有明显界限,发生皮层反应区域,皮层小泡释放出絮状内容物,未发生皮层反应的区域,质膜完整,具浓密的微绒毛[图版 II :29]。

受精 100s 皮层反应扩散至卵子大部分区域,初级卵膜内表面吸附有皮层小泡释放物[图版 II :31],精孔管附近质膜仍然光滑,没有皮层反应发生,精孔管附近卵膜内表面也没有皮层小泡释放物吸附的迹象[图版 II :30]。

受精 240s 大部分区域的第二次皮层反应高潮结束,其内仍有少量皮层小泡释放[图版 II :32],附近微绒毛稀疏,修复完好的质膜柔弱,其表面微绒毛较浓密[图版 II :33],原精孔器附近区域的质膜也开始伸出微绒毛[图版 II :34]。

3 讨论

3.1 皮层反应的分期

大量研究表明,鱼类皮层反应有一定的起始时间和持续的高潮期,为了研究方便,可以把皮层反应分为潜伏期、发展期、高潮期、衰退期四个不同的时期。与赤鱈鱼^[1]类似,唇鱈皮层小泡成梯度分布,不同类型的皮层小泡逐层向外释放。潜伏期与发展期以皮层反应起始点作为分界线,发展期和高潮期无明显界线,但前者释放总数较少的 I 型和 II 型皮层小泡,后者释放大量的 III 型和 IV 型皮层小泡,衰退期主要释放 V 型和其他残存的皮层小泡。金鱼(*Carassius auratus*)^[7]和唇鱈一样,不同时期皮层小泡释放物不一致,这源于它们的内含物性质不同。

潜伏期 皮层小泡释放前都可视为皮层反应的潜伏期,在潜伏期,皮层小泡没有释放内容物,也没形成卵周隙,只有外移的趋势,有的皮层小泡开始融合,为其释放作准备。潜伏期长短受水的影响极大,在无水条件下,成熟卵有较长的有效受精时间,如草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[10]成熟卵在无水和 20—27℃条件下,其受精的有效时间可达 1—1.5h,可以推测其潜伏期可以保持 1—1.5h 以上。精子入卵后,潜伏期迅速缩短,一般在 1s(底鱈)到 2—3min(鲱鱼)后皮层小泡开始破裂,形成卵周隙,进入发展期。金鱼^[7]受精后潜伏期 10s,斑马鱼(*Brachydanio rerio*)^[11]为 30s,鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[4]为 20s。在水温 17℃时,唇鱈潜伏期为 35s。在生产上常采用干法授精就是为了延长皮层反应的潜伏期,让卵子能保存较长时间,以使精子和卵子充分接触。同时,不

同的研究者对金鱼潜伏期时间有不同的认识^[7,12]，这可能与研究者的实验条件如温度有关。而且，唇鱗卵周隙形成时间，在活体观察和固定标本中也有较大差异，前者在受精后3min^[13]，卵膜开始膨胀，出现小的卵周隙，本研究在受精40s的固定标本中即观察到了将形成的卵周隙。

发展期 质膜附近内含物颗粒直径较大，着色深的Ⅰ型和Ⅱ型皮层小泡外移、破裂，形成卵周隙后，皮层反应就进入发展期。刚形成的卵周隙并非卵膜外举所致，而是皮层小泡破裂导致卵子坍塌凹陷，使质膜与卵膜之间形成空隙。释放单个、少量的皮层小泡是发展期的典型特征。皮层小泡内含有酸性粘多糖，释放后在H.E染色中成深紫色。最初释放的皮层小泡数量少，并形成一小块深紫色斑点。因此有无紫色斑点和是否形成卵周隙是进入发展期的标志，也视为皮层反应开始的标志。唇鱗皮层反应发展期在受精后35—55s左右。

高潮期 高潮期的典型特征是：几个皮层小泡相互融合形成一个大的泡状体，泡状体再与质膜接触、融合后，随后破裂，释放内容物。处于外围的1—3层皮层小泡相互融合形成的泡状体释放后，内侧的1—3层皮层小泡才融合成泡状体，然后再释放内容物，所以高潮期可以分为两个阶段。第一阶段，外围皮层小泡形成泡状体释放，第二阶段，内层皮层小泡形成泡状体释放。内层皮层小泡体释放后，皮层反应的高潮期结束，细胞质内仅余少数残留的皮层小泡和未完全降解的卵黄颗粒。唇鱗皮层反应高潮期持续大约4min，金鱼持续2min^[7]，斑马鱼持续1—3min^[14]。

衰退期 继续释放V型皮层小泡和其他残存的皮层小泡以及未完全降解卵黄颗粒碎屑，受精8min后，皮层小泡完全释放，胚盘初步形成。

3.2 皮层反应的起始位点

一般而言，鱼类皮层反应是从精子入卵位点开始，并从动物极向植物极快速移动，这有助于阻止多精入卵。但是鱊鱼^[8]的皮层反应是从植物极开始并向动物极快速移动，而且赤鱊鱼^[9]、兴国红鲤^[6]精孔器下的卵子表面下陷区质膜内侧无皮层颗粒，据四倍体鲤鱼受精^[15]的照片，其精孔器下的卵子表面下陷区质膜内侧也无皮层颗粒，据此可推测，至少这4种鱼皮层反应的起始点不在精子入卵位点。通过H.E染色和扫描电镜对唇鱗受精过程中精孔管附近区域追踪，也未发现皮层反应。唇鱗皮层反应最先出现在动物极低纬度区，稍后出现在前庭形成区域。随后皮层反应从这两个区域向四周扩散，二者在精

孔器前庭外相遇、愈合。唇鱗受精卵的皮层反应从动物极低纬度区开始，这是继鱊鱼后又一种皮层反应的新形式，这也提示某些鱼类的皮层反应对多精入卵的阻碍作用是有限的。

深凹陷型精孔器的卵子，其精孔管附近无皮层小泡，这使精子入卵时无皮层小泡的阻挡。皮层反应引起卵子剧烈激动、收缩，金鱼卵^[16]在皮层反应中其体积要收缩1/4。精子入卵区无皮层反应，可以避免入卵精子随皮层反应排出，因此具深凹陷型精孔器的兴国红鲤^[6]、唇鱗，其入卵位点无皮层反应对精子快速、顺利入卵有积极意义。但这可能导致多精入卵或多精受精，这要依赖其他机制来协调单精受精。

3.3 引发斑和释放的皮层小泡可以加快皮层反应的进程

在有水无精子的条件下，鱼卵仍然可以发生激动^[17]，在斑马鱼中，卵子的激动与精子入卵与否无关^[11]。只要有水，一些物理、化学因子也可促使卵子发生激动^[16]。皮层小泡内含有酸性黏多糖等高渗物质，可导致皮层小泡的破裂，尽管Ca²⁺或卵膜内的糖蛋白^[18]可诱导皮层反应，但在受精过程中，只要增加水分子与质膜接触面积，同样会促进皮层反应的进行。逐层释放的皮层小泡和质膜与受精膜间的引发斑充当了这一角色。

I型皮层小泡释放的引发 I型皮层小泡与质膜最贴近，且在潜伏期多已破裂，释放酸性黏多糖，低渗的水可以快速、顺利通过卵膜，增大质膜与水的接触面积，为其他皮层小泡的释放作准备。皮层小泡在严格干法受精的唇鱗成熟卵破裂，这和在自然产卵的黄海太平洋鲱(*Clupea Pallasi*)^[19]的实验结果一致。I型皮层小泡的破裂表明，未受精或未遇水的成熟卵子看似平静，其内仍然进行着复杂的变化。

引发斑的引发 唇鱗成熟卵质膜和卵膜之间的引发斑，其形态结构与I型皮层小泡内容物相似，但其外周没有被膜系统。在透射电镜下，引发斑也可与质膜和受精膜隔离，使外界的水分子进入后，增大质膜与水的接触面积，促进了皮层小泡的释放。在H.E染色和透射电镜下，引发斑的形态结构与I、II型皮层小泡相似，其内是否含有酸性黏多糖还待深入研究。

皮层反应高潮期的引发 唇鱗皮层反应开始于受精后35s、80s左右完成高潮期第一阶段反应，皮层小泡快速、大量释放。皮层反应高潮期的引发机制是：I型皮层小泡的释放和引发斑的引发，使较多水分渗入卵膜，扩大了水分与其他皮层小泡接触的机会，同时，其他皮

层小泡大量融合形成大的泡状体,一旦高渗的泡状体任何部位与水接触或接触,泡状体就会破裂,释放内容物,这样一个皮层小泡破裂可引发多个皮层小泡破裂。泡状体的破裂又进一步增大水与皮层小泡或泡状体接触机会,进而引发更多的皮层小泡破裂。所以,作者认为,皮层反应的高潮期是由I型皮层小泡和引发斑所引发,在水或低渗环境作用下的爆发性的链式反应,在金鱼^[16]中这种反应肉眼可见。

3.4 皮层反应伴随质膜的修复

随着皮层小泡分批释放,质膜也不断被破坏,又不断进行修复。皮层小泡与质膜融合前,质膜外具浓密的微绒毛。皮层反应发展期,单个的皮层小泡与质膜融合形成镶嵌膜,随后镶嵌膜破裂,释放出皮层小泡,部分外侧镶嵌膜随皮层小泡内容物释放于卵周隙,刚形成的质膜凹凸不平,外不具微绒毛。在皮层反应高潮期,部分外侧镶嵌膜释放于卵周隙,部分皮层小泡被膜将逸失在泡状体中,镶嵌膜破裂释放出皮层小泡内容物,高潮期结束后,质膜基本修复完成,在扫描电镜下,新修复的质膜非常柔弱,外被稀疏的微绒毛。在衰退期,残存的皮层小泡和卵黄碎屑仍可突破柔弱的质膜。唇鱗、斑马鱼^[14]和兴国红鲤^[6]形成镶嵌膜是暂时的,一部分随皮层小泡的释放进入卵周隙,另一部分通过内吞作用缩回细胞质内。后来对斑马鱼^[20]的研究表明质膜的修复是具有选择性的。在透射电子显微镜下,唇鱗皮层小泡释放的内容物与受精膜直接接触,扩散于卵周隙,皮层小泡膜系统不与受精膜直接接触,也不参与受精膜的形成。

3.5 精孔器附近的受精膜最先外举

唇鱗精孔器附近的皮层反应发生相对较晚,但是精孔器附近的受精膜最先举起,其原因有三:(1)精孔器呈漏斗状,表面积大,其内侧的细胞质可容纳更多的皮层小泡。(2)精孔器内具单层皮层小泡,皮层小泡绝对数量多,释放时间短,所以皮层反应更激烈(但以单位面积计则比其他部位弱的多),短时间内释放皮层小泡内容物更多,使卵周隙的渗透压更高,水更易进入卵周隙,促使精孔器附近的受精膜快速外举,在组织切片中形成李建中等人所观察到的新月池^[15]。(3)精孔器呈漏斗状,如果把卵膜看成是弹性物质,因卵膜与质膜接触面积大,使卵膜张力增大,卵膜更易于外举。受精膜快速外举有利于减少多个精子入卵。

参考文献:

[1] Brummett A R, Dumont J N. Cortical vesicle breakdown in fertilized eggs of *Fundulus heteroclitus* [J]. *J. Exp Zool*, 1981, 216(1):63—79

- [2] Fluck R A, Miller A L, Jaffe L F. Slow calcium waves accompany cytokinesis in medaka eggs [J]. *J. Cell Biol*, 1991, 115:1259—1265
- [3] Gillot I, Ciapa B, Payan P, et al. The calcium content of cortical granules and the loss of calcium from sea urchin eggs at fertilization [J]. *Dev. Biol*, 1991, 146(2):396—405
- [4] Kudo S, Sato A. Fertilization cone of carp eggs as revealed by scanning electron microscopy [J]. *Dev. Growth Differ*, 1985, 27(2):121—128
- [5] Kudo S. Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg [J]. *Dev. Growth Differ*, 1980, 22:403—414
- [6] Hong Y J, Hu C Y, Zhang F W, et al. Studies on CG release and reorganization of the plasma membrane in the fertilized Sin-Guo Red Carp [J]. *Journal of Nan-Chang University (Natural Science)*, 1994, 18(1):58—64 [洪一江, 胡成钰, 张丰旺, 等. 兴国红鲤受精早期精子入卵及卵子变化的研究. 南昌大学学报(理科版), 1994, 18(1):58—64]
- [7] Gao H J, Zhang T Y, Liu T L. The cortical reaction of Goldfish egg [J]. *Journal of Shan-Dong University (Natural Science)*, 1996, 31(1):82—89 [高洪娟, 张天荫, 刘廷礼. 金鱼卵的皮层反应. 山东大学学报(自然科学版), 1996, 31(1):82—89]
- [8] Ohta T, Iwamatsu M, Tanaka Y, et al. Cortical alveolus breakdown in the eggs of the freshwater teleost *Rhodeus ocellatus* [J]. *Anat. Rec*, 1990, 227(4):486—496
- [9] Brummett A R, Dumont J N. Initial stages of sperm penetration into the egg of *Fundulus heteroclitus* [J]. *J. Exp Zool*, 1979, 210:417—434
- [10] 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. 北京: 农业出版社, 1993]
- [11] Wolenski 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
- [12] Zhang T Y, Feng S M, Pan Z Z. Scanning electron microscopic observation on the sperm entry into the eggs of Goldfish *carassius auratus* [J]. *Zoological Research*, 1993, 14(2):166—171 [张天荫, 封树芒, 潘忠宗. 金鱼入卵过程扫描电镜观察. 动物学研究, 1993, 14(2):166—171]
- [13] 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. Uni*, 1999, 42(2):225—231 [贺吉胜, 何学福, 阎太明. 沔江下游唇鱗胚胎发育研究. 西南师范大学学报(自然科学版), 1999, 42(2):225—231]
- [14] Hart N H, Yu S F. Cortical granules exocytosis and cell surface reorganization in eggs of *Brachydanio* [J]. *J. Exp Zool*, 1980, 213(1):137—159
- [15] 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]
- [16] Zhu X, Chen Z X, Wang Y L. Fertilization cytology study on ovum of *Carassius auratus* and *Parabramis pekinensis* [J]. *Acta Biol. Experi. Sin*, 1960, 7(1—2):29—46 [朱洗, 陈兆熙, 王幽兰. 金鱼和鮰鱼卵球受精的细胞学研究. 实验生物学报, 1960, 7(1—2):29—46]

- [17] Liu Y, Chen S Q, Wang Y X. Fertilization cytology study on ovum of *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *J. Nat. Sci. Hunan. Norm. Col.*, 1966, 5(2): 173—184 [刘筠, 陈淑群, 王义锐. 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]
- [18] Cherr G N, Clark W H Jr. An egg envelope component induces the acrosome reaction in sturgeon sperm [J]. *J Exp Zool*, 1985, 234(1): 75—85
- [19] Huang S Q, Yan S Z. A study of the VE, FE and plasma membrane of *Clupea 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]
- [20] Hart N H, Collins G C. An electron-microscope and freeze-fracture study of the egg cortex of *Brachydanio rerio* [J]. *Cell Tissue Res*, 1991, 265(2): 317—328

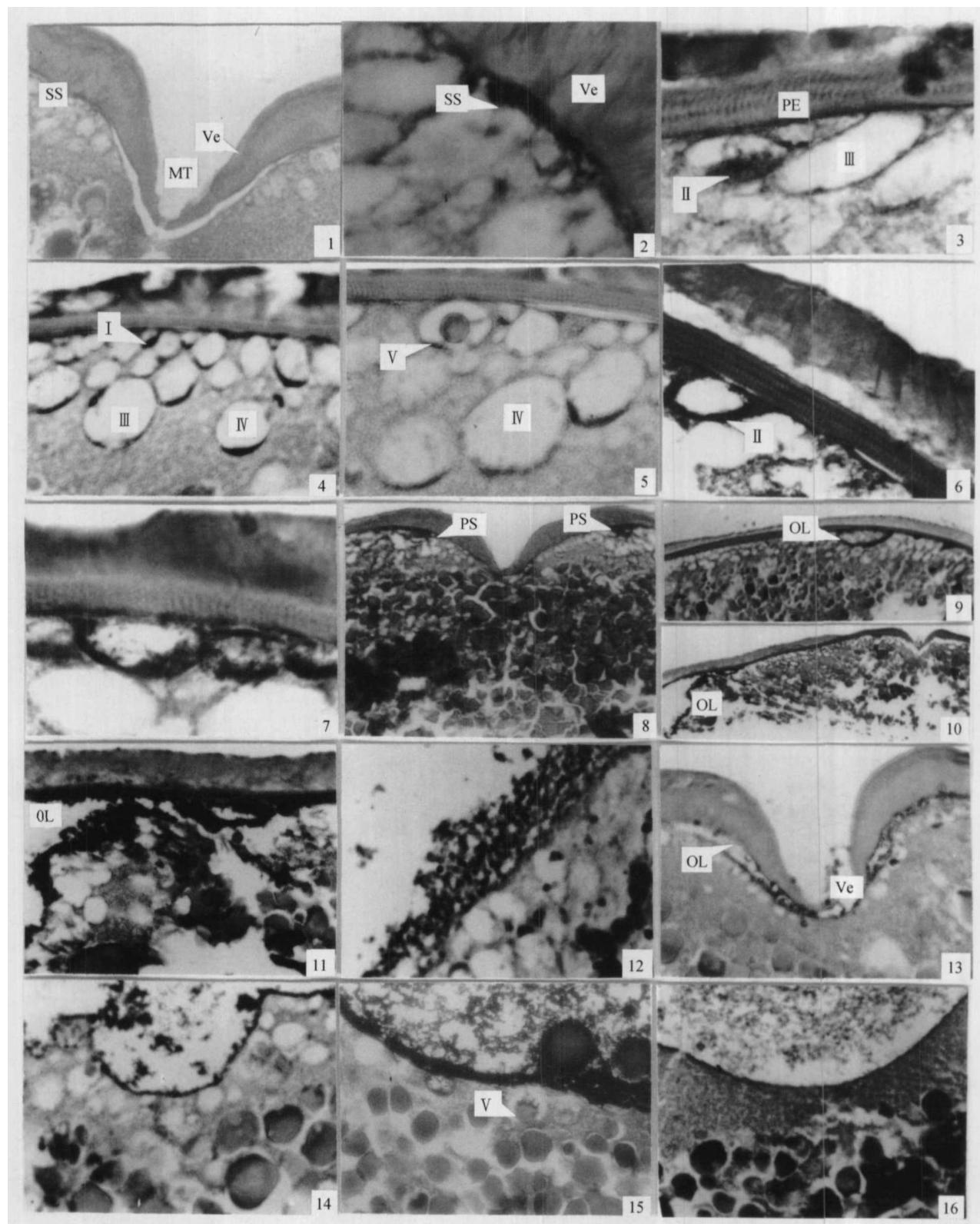
THE SOLICITATION MECHANISM OF THE CORTICAL REACTION IN *HEMIBARBUS LABEO* EGG

GAN Guang-Ming and ZHANG Yao-Guang

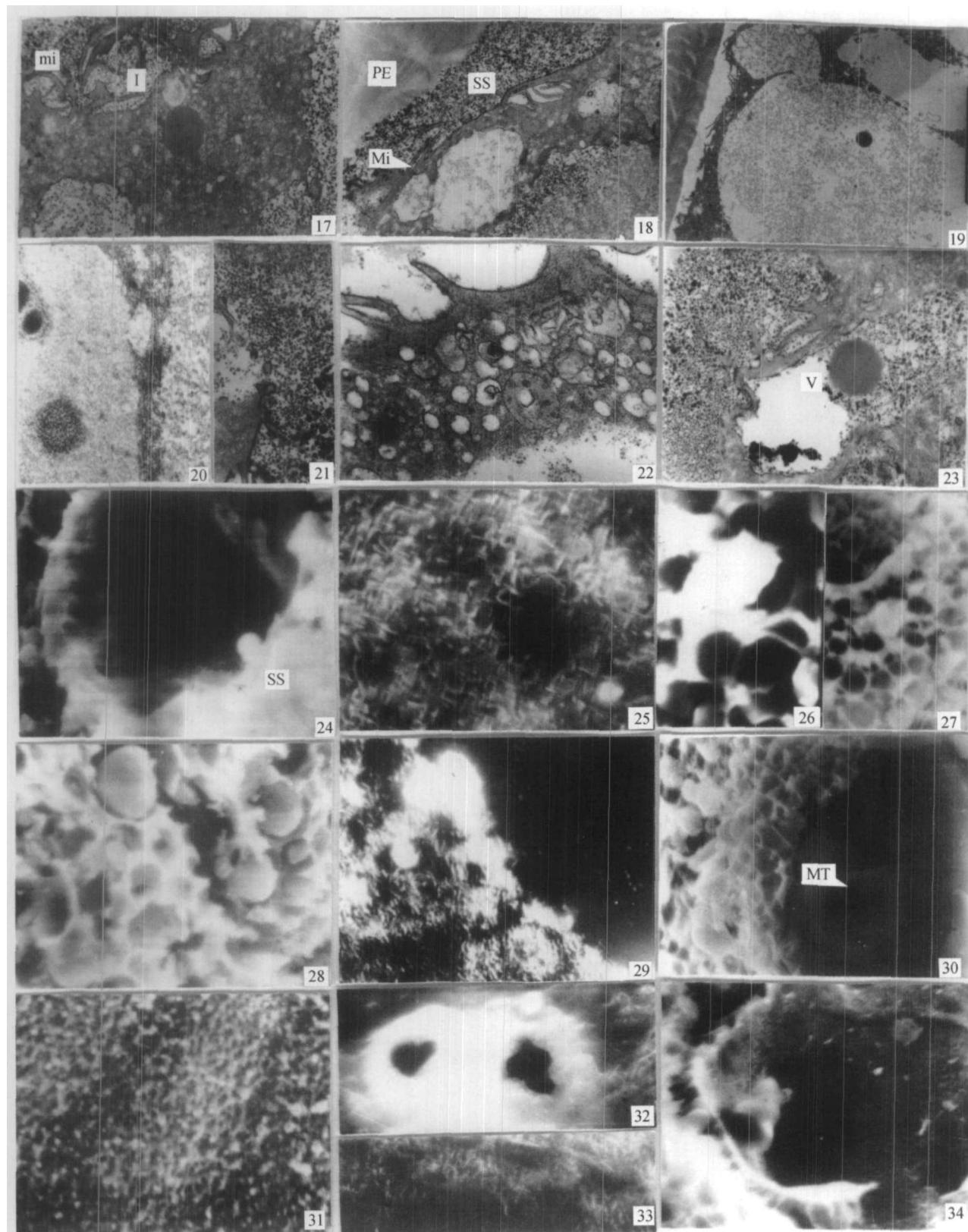
(Department of Life Science, Southwest China Normal University, Chongqing 400715; Genetics Research Center, Southeast University, Nanjing 210009)

Abstract: There are 1 to 4 rows and five types of cortical alveoli in the cortex of the pallas, *Hemibarbus labeo* egg. From inner to outer of the cortex, the diameter of cortical alveoli decreases gradually. We find a new structure named solicitation speckle at low latitude of animal polar and near micropylar apparatus between envelope of ovum and plasma membrane, in zygote of fish. The solicitation speckle is very purple in H.E, that is similar to type I of cortical alveoli. In TEM, the solicitation speckle has not obvious bound with envelope of ovum and plasma membrane, and no membrane around the solicitation speckle too. In SEM, the solicitation speckle looks as garrulous. During cortical reaction, the solicitation speckle plays very important initiative function. About 35s after fertilization, cortical alveolus begin to discharge from the low-latitudes of the animal hemisphere, later, the same thing happens in the near of micropylar apparatus, and then cortical reaction extends to the animal hemisphere and the vegetal hemisphere. Cortical reaction comprises latent period, developmental period, climactic period and declining period. In latent period, no cortical reaction, in developmental period, a few cortical alveolus discharge outer of the cortex, in climactic period, many cortical alveolus discharge, before discharging several cortical alveolus fuse into a big vesicle, and in declining period, type V of cortical alveoli inner of the cortex discharges. 5min after fertilization, cortical alveoli has discharged entirely in the animal hemisphere, the residual cortical alveolus will entirely discharge in 8min. We think cortical reaction is a fulminic chain reaction abducted by solicitation speckle and type I of cortical alveoli, the outer cortical reaction can accelerate the inner cortical reaction. While cortical alveoli discharges in batches, the plasma membrane has been reorganized time after time. No cortical alveoli below the micropylar tube where sperm enter into, this suggests it is finite that the cortical reaction prevents polyspermy.

Key words: *Hemibarbus labeo*; Cortical alveoli; Cortical reaction; Solicitation speckle; Solicitation mechanism



图版 I



图版 II

图版 I

1. 示精孔器前庭(Ve)处的引发斑(SS)、精孔管(MT),H.E., $\times 600$;2. 图1放大,示引发斑(SS),H.E., $\times 2000$;3. 示初级卵膜(PE)、次级卵膜(SE)、Ⅱ型皮层小泡(Ⅱ)、Ⅲ型皮层小泡(Ⅲ),H.E., $\times 1400$;4. 示Ⅰ型皮层小泡(Ⅰ)、Ⅲ型皮层小泡(Ⅲ)和Ⅳ型皮层小泡(Ⅳ),H.E., $\times 800$;5. 示Ⅳ型皮层小泡(Ⅳ)和V型皮层小泡(V),H.E., $\times 1200$;6. Ⅱ型皮层小泡(Ⅱ)在动物极低纬度区破裂,H.E., $\times 1200$;7. Ⅱ型皮层小泡附近的皮层小泡破裂,H.E., $\times 1400$;8. 精孔器前庭附近形成的紫色斑点(PS),H.E., $\times 240$;9. 动物极低纬度区形成卵周隙(OL),H.E., $\times 200$;10. 皮层反应扩张,示精孔器和卵周隙(OL),H.E., $\times 96$;11. 图10放大,示卵周隙(OL),H.E., $\times 480$;12. 皮层反应高潮期第一阶段完成,H.E., $\times 560$;13. 精孔器附近形成卵周隙(OL),H.E., $\times 480$;14. 动物极低纬度区皮层反应高潮期第二阶段开始,H.E., $\times 560$;15. 示残留的V型皮层小泡,H.E., $\times 480$;16. 精孔器区域皮层反应完成,H.E., $\times 480$

1. Showing solicitation speckle (SS) near vestibule (Ve) and micropylar tube (MT). H. E., $\times 600$; 2. Magnification of fig. 1, showing solicitation speckle (SS). H. E., $\times 2000$; 3. Showing primary envelope (PE), secondary envelope (SE) and type Ⅱ, Ⅲ of cortical alveoli. H. E., $\times 1400$; 4. Showing type Ⅲ and Ⅳ of cortical alveoli. H. E., $\times 800$; 5. Showing type Ⅳ and V of cortical alveoli. H. E., $\times 1200$; 6. The type Ⅱ of cortical alveoli breakdowns near low latitude of animal polar. H. E., $\times 1200$; 7. The cortical alveoli breakdowns near the type Ⅱ of cortical alveoli. H. E., $\times 1400$; 8. Purple speckle (PS) comes into being near micropylar apparatus of vestibule H. E., $\times 240$; 9. Ovum lacuna (OL) comes into being near cortical alveoli near low latitude of animal polar H. E., $\times 200$; 10. Showing micropylar apparatus (MA) and ovum lacuna (OL). H. E., $\times 96$; 11. Magnification of fig. 10, showing ovum lacuna (OL) H. E., $\times 480$; 12. Cortical reaction of the first climactic period finishes. H. E., $\times 560$; 13. ovum lacuna (OL) comes into being near micropylar apparatus. H. E., $\times 480$; 14. Cortical reaction of the second climactic period begins. H. E., $\times 560$; 15. Showing the rudimental V of cortical alveoli. H. E., $\times 480$; 16. Cortical reaction near micropylar apparatus finishes. H. E., $\times 480$

图版 II

17. 示Ⅰ型皮层小泡(Ⅰ)和微绒毛(Mi),TEM, $\times 15000$;18. 示初级卵膜(PE)、引发斑(SS)和微绒毛(Mi),TEM, $\times 20000$;19. 外侧皮层小泡融合,TEM, $\times 4500$;20. 内侧皮层小泡融合,TEM, $\times 15000$;21. 外侧皮层小泡破裂,TEM, $\times 44000$;22. 皮层反应高潮期第一阶段完成,TEM, $\times 10000$;23. 示残留的V型皮层小泡(V)TEM, $\times 10000$;24. 精孔器下的细胞质中没发现皮层小泡,SEM, $\times 1500$;25. 细胞质膜外被浓密的微绒毛,SEM, $\times 3000$;26. 质膜下具大量皮层小泡,SEM, $\times 1500$;27. 质膜内表面附着大量皮层小泡,SEM, $\times 1500$;28. 皮层反应发生,SEM, $\times 1500$;29. 皮层反应扩张,SEM, $\times 1500$;30. 初级卵膜内表面吸附有皮层小泡释放物,示精孔管(MT),SEM, $\times 6000$;31. 精孔器附近,其内表面没有皮层小泡释放物吸附,SEM, $\times 1500$;32. 皮层反应衰退期,SEM, $\times 3000$;33. 修复完好的质膜表面,SEM, $\times 3000$;34. 精孔器下的质膜表面开始出现微绒毛,SEM, $\times 1500$

17. Showing type I of cortical alveoli and microvilli (Mi). TEM, $\times 15000$; 18. Showing primary envelope (PE), solicitation speckle (SS) and microvilli (Mi). TEM, $\times 20000$; 19. The outer cortical alveoli begin to syncretize. TEM, $\times 4500$; 20. The inner cortical alveoli begin to syncretize. TEM, $\times 15000$; 21. The outer cortical alveoli breakdowns. TEM, $\times 44000$; 22. Cortical reaction of the first climactic period. TEM, $\times 10000$; 23. The rudimental type V of cortical alveoli. TEM, $\times 10000$; 24. No cortical alveolus below plasma membrane near micropylar apparatus. SEM, $\times 1500$; 25. There have bushy microvilli on the plasma membrane. SEM, $\times 3000$; 26. There have abundant cortical alveolus below plasma membrane. SEM, $\times 1500$; 27. There have abundant cortical alveolus below the inner plasma membrane. SEM, $\times 1500$; 28. Cortical reaction happens. SEM, $\times 1500$; 29. Cortical reaction expands. SEM, $\times 1500$; 30. There have something that cortical alveolus release in the inner primary envelope, showing micropylar tube (MT). SEM, $\times 6000$; 31. There haven't something that cortical alveolus release in the inner surface of micropylar apparatus. SEM, $\times 1500$; 32. The remnant cortical alveoli pierce into the new plasma membrane on which have sparse microvilli. SEM, $\times 3000$; 33. The new plasma membrane that is restored fully have relatively bushy microvilli. SEM, $\times 3000$; 34. Sparse microvilli appear on the plasma membrane below micropylar apparatus. SEM, $\times 1500$