

花鲢卵球受精的细胞学研究

王幽兰 徐国江

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

提 要

花鲢卵球属端黄卵，局部分裂。正常情况下，为单精虫受精；接受精虫的适当时期，从细胞核的标帜来说，是卵母细胞第二次成熟分裂中期。在排离卵巢的成熟卵母细胞上，有精孔、精孔细胞以及精孔细胞和卵母细胞之间的通路。精虫是经过精孔细胞进入卵球的。

在26—27℃时，受精5—10分钟，精虫头部逐渐核化，星光发展，卵球第二次成熟分裂进入后期和末期，皮质小泡大量外排；10—15分钟，雌雄原核形成，精虫星光扩大，并移向胚盘中央区域，皮质小泡已排除殆尽；15—20分钟，雌雄原核在胚盘中央区接合，一对新发展的子星光出现；20—25分钟，第一次胚胎分裂图形建成；30分钟左右，卵裂开始；续后的分裂，大概每次间隔10分钟。

本文比较分析了花鲢、白鲢、金鱼、鳊鱼和草鱼五种鲤科鱼类的受精过程，为它们之间杂交的可能性和困难性，提供了实验依据。

自从 Houssay (1930) 应用鱼类垂体前叶促性腺激素，在硬骨鱼的人工催产方面获得一些结果后^[1,3]，近四十多年来，有关各种不同鱼类卵球受精的形态学和生理学研究工作，不断有所报道。但是，对于生活在淡水里的鲤科 (Cyprinidae) 鱼类来说，过去的工作，都偏向于形体较小，或实验室里比较容易饲养管理的鲤鱼 (*Cyprinus carpio L.*)^[1,5]、三角鲂 (*Megalobrama terminalis*) 和金鱼 (*Carassius auratus L.*)^[1,2,9,10]。至于个体较大，经济价值较高的鲤科鱼类，如白鲢、花鲢等，即使是在人工繁殖问题解决之后^[3]，迄今也只看到很少几篇简报^[5,7]。为了比较分析鲤科鱼类卵母细胞的结构及其受精过程，以丰富鱼类细胞生物学研究资料，现将1960年8月底在诸暨丫江阳鱼苗繁殖场进行的花鲢 (*Aristichthys nobilis R.*) 卵球人工授精实验的细胞学研究整理发表。

材料和方法

池养性腺成熟的花鲢，经绒毛膜促性腺激素 (HCG) 腹腔注射催产，雌鱼每公斤注射600国际单位左右，雄鱼减半。在流水的小池塘中，水温26—27℃，约经12小时雌、雄鱼即开始发情追逐。待雄鱼尾追雌鱼渐趋剧烈，后者有产卵动作时，将雌、雄鱼捕起，进行人工授精；且立刻在解剖镜下，连续观察受精卵的外部形态变化，并按发育时序用巴德荣氏液 (Bataillon's) 固定，石蜡切片，番红和亮绿染色，以追踪卵球受精过程中的细胞学动态。

实 验 结 果

1. 活体观察

花鲢卵巢囊内游离的成熟卵母细胞呈橙黄色，直径约 1.5 毫米左右，和其他鲤科鱼类一样，含有大量的卵黄颗粒，集中于植物极，属端黄卵。用较高倍的解剖镜，在动物极上端，可以看到含细胞质较丰富的、较透明的盘形区域(固定后，此一区域色泽稍淡，极性更为明显)。卵母细胞表面围有一层薄薄的外膜——放射膜，它与卵球本身相紧贴，几乎难以分辨。仔细观察，在动物极的放射膜上，有一个折光性异样的小凹，这就是精虫入卵必经的通路——精孔。

受精以后，卵球立时表现急骤的反应：收缩体积，排弃大生长时期所积累的某些代谢产物，吸收水份，卵膜外举，卵周隙扩大，细胞质流陆续向动物极集中，等等。卵球皮质层的排弃活动在受精 15 分钟以内(26—27℃)最为活跃，卵周隙的膨胀也在这段时间里最显目。受精 15 分钟左右，卵球的直径可达 4—5 毫米，相当于卵球受精前直径的三倍左右。

随着细胞质流的逐渐集中，胚盘渐渐形成，这是未来胚胎细胞分裂和分化的中心。至于胚盘下方，绝大部分差不多全为卵黄所充塞，细胞质含量很少，不能分裂。这就决定了花鲢卵球分裂的方式是局部分裂，或称盘状分裂。第一次的卵裂是经裂，约出现于受精 30 分钟左右；通过这次分裂，胚盘被切割为左右两个大小相似的分裂球。以后，大约每隔 10 分钟分裂一次。

卵膜与水接触后，全无粘着性，卵球粒粒分散。由于卵球本身和水的比重关系，在自然产卵情况下，卵球离母体与受精后，在流水中初沉后浮，习惯上称之为漂浮性卵。倘在实验室培养皿中静水孵育，则全沉皿底。

2. 细胞学研究

精子入卵前后，迄第一次卵裂，卵球的细胞学变化，可分五个阶段描述：

(1) 即将受精的次级卵母细胞 切片检查了 50 颗已经脱出卵巢膜而游离的成熟卵母细胞，它们全部都停留在第二次成熟分裂中期(图版 I: 1a, 4)。可知，卵母细胞成熟分裂的过程，大半在卵巢内进行。花鲢如同其他鱼类，或其他脊椎动物一样，受精是在卵母细胞第二次成熟分裂中期进行的。

游离的次级卵母细胞外被一层厚约 5—7 微米、嗜碱性的辐射条纹状放射膜，惟有在精孔的位置上，存有孔道，可与卵外交通(图版 I: 2, 3)。精孔处于卵球动物极，卵膜下陷的漏斗形区域的底部。在精孔的四周，放射膜逐渐变窄，抵精孔处，放射膜的厚度仅约 2 微米左右，嗜碱性则大大加强，在着色的切片上呈深红色(图版 I: 2, 3)。在少数卵球的纵切面上，在精孔附近，可以看到精孔细胞；还能够清楚地看到精孔细胞和卵细胞之间的通路(图版 I: 1b, 2)。但当卵母细胞排离卵巢后，便失去了外围的防护组织——卵巢膜和滤泡膜，使精孔细胞裸露于外，从而在采卵或固定、脱水以及切片等操作过程中容易脱落。因此当卵球脱离卵巢，或由母体产出体外时，精孔细胞就没有像在卵巢里时那样容易见到，但是它确实还是存在的。

卵母细胞在成熟分裂期间，由于核膜的崩解，核液的外流，和卵质本身的运动，已经在动物极形成一个未来胚盘的基础，那里含细胞质较多，含卵黄粒较少。这一富有活动性的

盘形区域，与卵周的一薄层细胞质相连，就成为一般所说的外质层或皮质部分。在皮质层中，特别是在上述盘形区域以外的地方，都含有许多大小不等的皮质小泡，重重迭迭地排列在卵边。皮质小泡里的物质，大部全呈碱性反应，为亮绿染成绿色；亦有中央部分呈酸性反应，为番红染成红色，边周属碱性反应的（图版 I：1a、b、c）。

花鲢的染色体数目众多，形体细小而又相似，在卵母细胞第二次成熟分裂赤道极的横切面上很难数清楚（在图版 I：4 的切面上，可以数出 38 个“V”形的染色体切口）。

（2）受精 5—10 分钟 精虫由精孔穿过卵球外膜进入卵球后，即发生一系列变化。在受精 5—10 分钟卵球的纵切面上，可以看到精虫头部核化，精虫星光形成和发展，以及精虫和星光在卵球内开始转移位置的过程（图版 II：6—8）。花鲢属单精虫受精的卵子，生理上达到适当成熟阶段的卵母细胞，在正常受精环境条件下，只接受一条精虫。精虫入卵的地点，通常和卵球成熟分裂纺锤体所在地很接近（图版 II：6—8）。精虫入口处有无小突起，精虫的尾巴是否进入卵中，还是断在卵外，因为我们固定切片、观察的实验材料已稍迟，很难作出肯定的判断。当中心体出现，星光逐渐发展时，靠近中心体的卵表向外隆起，则是常见的现象（图版 II：8）。

精虫入卵后，刺激卵细胞本身也产生相应的反应。卵球皮质层里的皮质小泡陆续向外倾泄其内容物。排泄的动作十分迅速，自精虫入口处开始发动，依次经过整个胚盘，然后及于全卵。在受精 5—10 分钟的切面上，尚能见到少数未曾排出或正在排弃的小泡（图版 I：5）；迄 15 分钟后，排泄时期濒临结束，卵表的皮质小泡亦几乎不复可寻（图版 II：10, 11）。与此同时，由大量排泄物引起的水份渗入，使卵周隙增厚，受精膜外举（图版 I：1c, 5）。在卵周隙中，可以看到一些排出的细小颗粒状物。上述受精卵内部的细胞学动态，完全和解剖镜下的活体观察相一致。

此时，卵球第二次成熟分裂纺锤体上的染色体已分列两队，各趋一端，准备排出第二极体（图版 II：6—8）。细胞质则不断流向胚盘方面集中，胚盘因此逐渐增大（图版 I：1a；图版 II：8—11）。这种运动与卵内物质的定向安排及与今后胚胎的分化发育有关。

（3）受精 10—15 分钟 这是雌、雄原核逐渐形成，和准备接合的阶段。精虫头部已经核化，丝条状的染色体虽然嗜碱性很弱，但仍可分辨。精虫星光继续扩大范围，并移向胚盘中央和深处，已核化的精虫头部，也随星光而迁移，并且转动了 180°（图版 II：9）。中心体很清楚，在所检查的 20 颗卵中，都未能找到明显的中心粒；这大概是因为切片染色后，未能及时观察，切片上卵球的颜色有所消退，不易辨别的缘故。

此时，卵母细胞第二次成熟分裂已经结束，第二极体已经向外排出，雌性原核亦已形成，并正脱离卵球的边周，向中心体所在区域前进。在第二极体与卵球边缘相连接的地方，残留的纺锤丝尚可追踪。

（4）受精 15—20 分钟 一切活动继续向前演进。第一个星光一再扩大，不久就占领了整个胚盘；后者本身也因细胞质的集中，而增加了宽度与厚度。星光中央部分的胨态物质因液化而益形拓大，光芒也渐消失；最后，在这一广腔之内，出现一对新发展的子星光，以及雌、雄两原核的结合。在这样的图形上，有时看到中心粒（图版 II：10），有时看不清楚。雌、雄两核接合的位置适在胚盘的中央，接合线与卵的中轴构成接近 45 度的角。雌、雄原核染色体的嗜碱性增强，染色体丝条，和所附染色较深的小粒更显得明朗化（图版

II: 10)。至于孰为雌性原核,孰为雄性原核,此时已无法分辨。

(5) 受精 20—25 分钟 雌、雄原核接合益形紧密,彼此界限更难分辨。核中染色体的酸性反应大大增强并逐渐浓缩,呈现为深红色。不久,核膜崩解,遂出现第一次卵裂的图形(图版 II: 11)。在 26—27°C 的水温中,受精 20—25 分钟的卵球,多数停留在这一阶段。这次分裂的纺锤体中轴与胚盘的长轴相平行,与卵的中轴垂直;因此,第一次卵裂对于胚盘来说,确是一次平均分裂。仔细观察便会知道,这次分裂的纺锤体显然是由两个来自雌性原核和雄性原核的小纺锤体合组而成,各个赤道部都有自己的一份染色体,并不混淆。待受精 30 分钟左右,胚盘上出现卵裂缝时,卵球内部已经出现准备第二次胚盘分裂的图形了。第二次卵裂时,这种复式的纺锤体就不再出现。

讨 论 与 结 论

已研究过的几种鲤科鱼类卵球都属端黄卵,并在正常情况下,都是单精虫受精的;接受精虫的适当时期,从细胞核的形态来看,都在卵母细胞第二次成熟分裂的中期,和一般高等脊椎动物卵球上所见到的一样。同时,这几种鱼类卵球的放射膜上,都有一个小小的精孔,为精虫入卵的通路。在金鱼、鳊鱼和草鱼卵巢内卵母细胞成熟分裂过程中,精孔细胞、精孔细胞核,精孔细胞与卵母细胞间的通道,以及精孔细胞周围的附属细胞等结构都明白可见^[4,6]。在花鲢排离卵巢即将受精的卵球上,仍旧能够观察到精孔细胞的存在。它们的细胞轮廓,细胞核所在区域,它们和卵母细胞间的通路,在细胞学切片上都十分清楚。既然在即将受精的卵球上,精孔细胞以及它与卵球间的通道仍可追踪,那么,精孔细胞是精虫入卵的不可缺少的通路,应该是无可置疑的。这就是说,花鲢和金鱼、鳊鱼一样,精虫进入卵球的时候,必须穿过精孔细胞,逐步通过小沟道,以抵达卵内。依靠这一通路,才能保证两性生殖细胞的结合和子代的发生。刘筠等(1963)根据草鱼卵球的切片观察,曾提出“催青以后即将受精的卵子,精孔细胞退化消失”的结论是否可靠,我们表示疑问。

受精之后,花鲢卵球受到极大刺激,立时急骤收缩。收缩的运动,自精虫入门处开始,很快向各个方面如波浪一般地展开,直达植物极,以至遍及全卵。在细胞学切片上,可以看到,原来重重迭迭排列在卵周皮质层的皮质小泡相继崩解,倾其内容物于卵周隙中;在水温 26—27°C 中,受精 5—10 分钟,皮质小泡已经大部外排;15 分钟以后,在皮质层中就很难再找到它们的影踪。这一现象,本世纪初 Bataillon (1901) 在八目鳗 (*Petromyzon planeri*) 的卵球上,第一次发现到^[12],在各类动物的卵球上,尤其是在海胆、硬骨鱼和八目鳗的卵球上,也已经引起重视。当卵球受精或人工激动后,靠近精虫入口处或卵球受到刺激的地点上的皮质小泡或皮质颗粒(海胆)首先崩解,邻近者随即相继崩溃^[11]。皮质小泡崩溃持续时间的长短,随动物品种的不同而不同,亦因环境条件的改变而改变,例如金鱼约需 30 分钟(25°C 左右),鳊鱼约需 40 分钟(22°C 左右)^[1]。皮质小泡向外排弃的物质可能是多种多样的,如粘多糖、蛋白质和二氧化碳等等^[14]。皮质小泡向外倾其内容物的细胞生物学机制还不太清楚;但就其主要的生理意义来说,可能是一致的——那就是 Bataillon 和朱洗教授常常提到的解除“卵球自我中毒”的危机的理论。

与此同时,整个卵质内部也发生相应的运动,细胞质流按一定的顺序不断向卵球动物

极集中，渐渐形成胚盘，为将来的卵裂和进一步的分化发育奠定基础。这种运动与卵内造形物质的安排是分不开的。这是鲤科鱼类卵球受精的普遍现象。

致于花鲢卵球受精过程中，卵核、精核和星光等的变化，与金鱼、鳊鱼^[1]以及白鲢（庞诗宜和林秀媛，未发表记录）上所看到的情况基本相似，但发育的速度不尽相同。花鲢精虫入卵后5—10分钟，头部即逐渐核化，星光不断发展，卵球第二次成熟分裂图形自中期进入后期和末期。10—15分钟，雌、雄原核形成，第二极体外排，精虫星光拓大，并移向胚盘中央区域。15—20分钟，雌、雄二原核在胚盘中央区接合；接合缝与卵的中轴构成接近45°的角，第一个星光继续拓大，光芒渐消失，一对新发展的子星光出现。20—25分钟，第一次卵裂图形建成，纺锤体呈复式结构，纺锤体中轴与胚盘长轴相平行。30分钟左右，胚盘上出现分割缝，将胚盘平均分割成两个分裂球。续后的分裂大概每次间隔10分钟。在25°C左右金鱼卵球受精6—7分钟，精虫星光开始发展；20分钟左右，雌、雄两原核形成，第二极体外排，子星光出现；30分钟，雌、雄原核结合；50分钟，在胚盘上出现第一次分裂缝；续后每次分裂相隔的时间大约是10分钟。在同一温度下，白鲢卵球的受精过程，比金鱼稍快，受精后40分钟，即出现第一次分裂缝。鳊鱼受精后，准备分裂的时间虽与金鱼相差不远，自精虫入卵到第一次卵裂需要50分钟（22°C左右）；可是此后每次分裂相隔的时间大概是20分钟，要比金鱼的卵裂慢一倍。和金鱼、白鲢、鳊鱼相比较，花鲢卵球的受精发育过程最快速，不过实验温度比其他三种鱼也稍高。

综上所述，花鲢、白鲢、金鱼和鳊鱼四种鲤科鱼类，从繁殖季节，发育温度，卵球与卵膜的结构和性状，受精的过程与时序，受精的生理生化机制等方面来说，既反映了它们之间的一些共同性，也反映了各自的特异性。这就容易理解，为什么它们之间的杂交，既有成功的可能性，也可能会碰到困难，甚至失败。花鲢和白鲢杂交的实验结果^[2]，就是一例。

参 考 文 献

- [1] 朱洗、陈兆熙和王幽兰，1960。金鱼和鳊鱼卵球受精的细胞学研究。实验生物学报，7：29—46。
- [2] 朱洗、王幽兰和林志春，1960。金鱼、鲤、鳊的不同成熟程度卵球的受精和胚胎发育的关系。实验生物学报，7：47—58。
- [3] 朱洗等，1962。家鱼人工生殖的研究。1—324页。科学出版社。
- [4] 朱洗和王幽兰，1962。金鱼和鳊鱼卵球成熟的细胞学研究。实验生物学报，8：1—33。
- [5] 刘筠、陈淑群和王义钦，1963。草鱼卵子受精的细胞学研究。实验动物学会议论文汇编，55—56。
- [6] 刘元楷、许谷星和叶盛钟，1966。绒毛膜促性腺激素对草鱼卵巢排卵和卵球成熟的作用。水产学报，3：26—40。
- [7] 庞诗宜和林秀媛，1963。不同成熟程度的白鲢卵球的受精与发育。实验动物学会议论文汇编，114。
- [8] 林志春和高振义，1965。鳙、鲢杂交种的形态学研究。水产学报，2：35—46。
- [9] Tchou Su (朱洗) 和 Chen Chao-hsi (陈兆熙)，1936a. Fertilization in goldfish. *Contrib. Instit. Zool. Nat. Acad. Peiping.* 3：35—58.
- [10] Tchou Su (朱洗) 和 Chen Chao-hsi (陈兆熙)，1936b. Recherches sur l'activabilité et la fécondabilité de l'oeuf du poisson osseux (*Carassius auratus*). *Chin. J. Exp. Biol.*, 1: 169—188.
- [11] Afzelius, B. A., Nicander L. and I. Sjödén, 1968. Fine structure of egg envelopes and the activation changes of cortical alveoli in the river lamprey, *Lampetra fluviatilis*. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 19: 311—318.
- [12] Bataillon, E., 1901. La pression osmotique et les grands problèmes de la biologie. *Roux' Arch.*, 11: 149.
- [13] Houssay, B. A., 1930. Acción sexual de la hipófisis en los peces y reptiles. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, 6: 686—688 (引自“*The physiology of the pituitary gland of fishes*”, Pickord, G. E. and J. W. Atz. 1957).

- [14] Kusa, M., 1956. Studies on cortical alveoli in some teleostean egg. *Embryol.*, **3**: 105—129.
 [15] Ozima, Y., 1943. Cytological observations on fertilization in the carp, *Cyprinus carpio* L. Jap. *J. Genet.*, **19**: 219—228.

CYTOTOLOGICAL STUDY OF FERTILIZATION IN A FRESHWATER TELEOST, *ARISTICHTHYS NOBILIS* R.

Wang Youlan and Xu Guojiang

(*Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica*)

Abstract

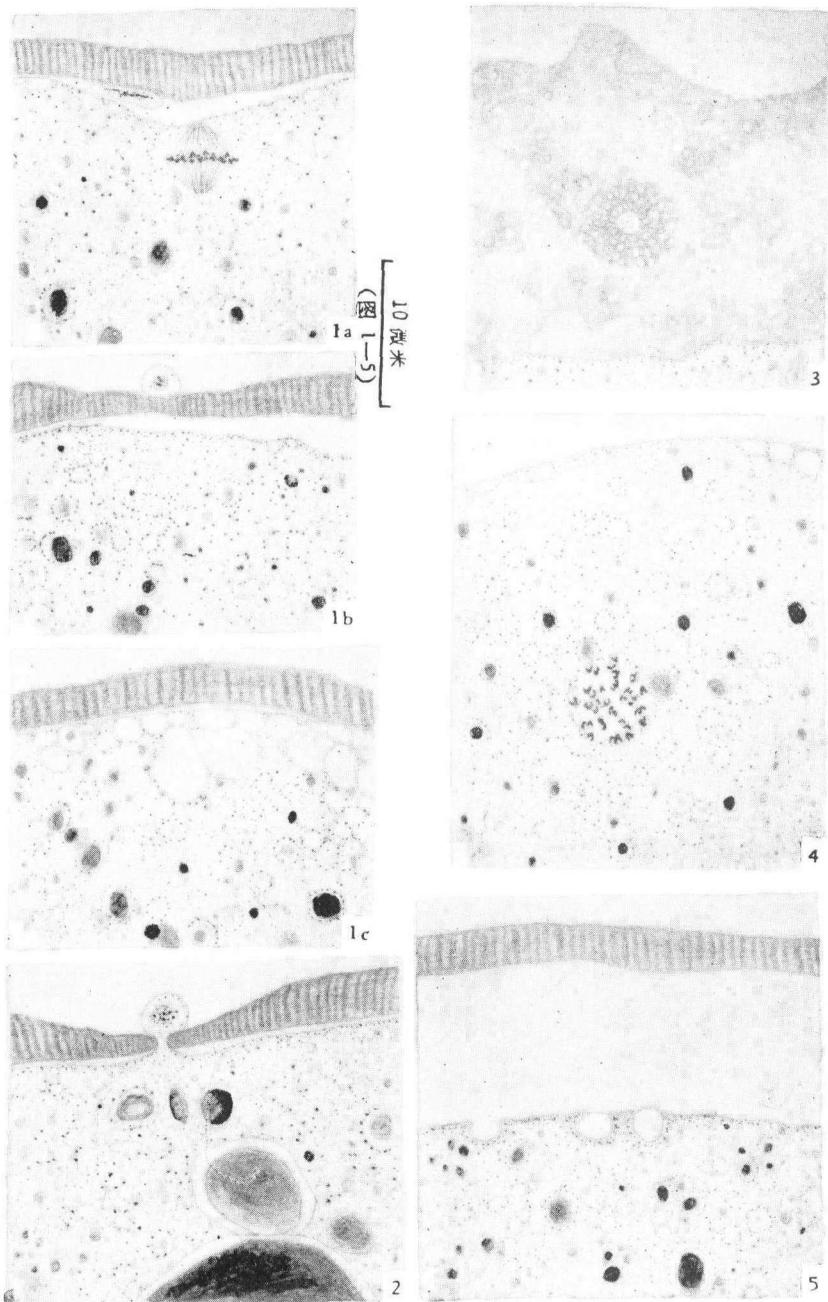
Because of the difficulties of obtaining oocytes of optimal degree of maturation, only few investigations of fertilization in Chinese fresh water teleosts have been reported. It is therefore of great interest to study the cytological behavior of fertilization in *Aristichthys nobilis*. The main cytological features that we have observed are summarized as follows:

1. Fertilization was found to take place in the egg at the metaphase of the second maturation division and to be monospermic. Micropyle and micropylar cell were found in the animal pole of the ovulated oocyte (Fig. 1—4). Without the small opening of micropyle and the canal leading from micropyle cell to the egg proper, the penetration of spermatozoon seems impossible.

2. Rows of cortical alveoli were observed to be lying in the cortex of mature oocyte close to the plasma membrane (Fig. 1e). A successive breakdown of cortical alveoli lasting 10 minutes was induced after artificial fertilization (26—27°C). In the process of breakdown, each alveolus formed an aperture at the point of contact with the plasma membrane. Through the aperture the content of alveolus was emptied into the perivitelline space beneath the fertilization membrane (Fig. 5). The cortical reaction has been regarded as a general phenomenon accompanying fertilization and parthenogenesis. The contents of cortical alveoli may differ in different species of animals, but the physiological significance of the cortical reaction is the same, as proposed by the "Epuration" theory of Prof. Bataillon and Prof. Tehou-Su.

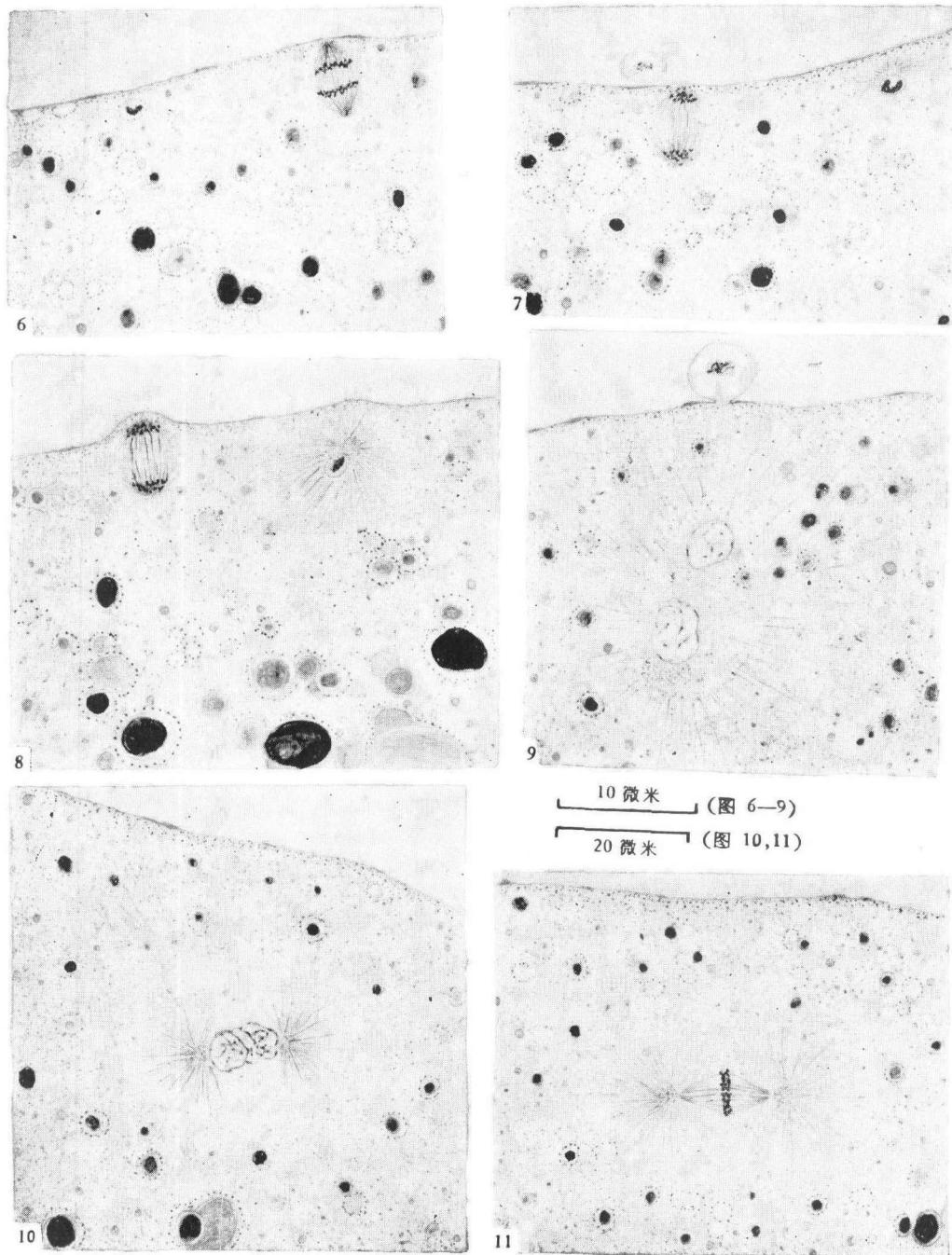
3. The expansion of sperm aster, the migration of sperm head, the completion of the second meiotic division of the oocyte and the elimination of the second polar body were all accomplished at the end of 5—10 minutes after fertilization (Fig. 6—8). The formation of male and female pronuclei was found about 5 minutes later (Fig. 9). Subsequently, the conjugation of male and female pronuclei (Fig. 10) and the formation of the double spindle of the first cleavage (Fig. 11) were observed. The first cleavage furrow of the blastodisc appeared at about 30 minutes after artificial insemination. The intervals between the successive divisions were found to be about 10 minutes.

A lot of common features were observed during the fertilization processes of *Aristichthys* and other species of bony fishes belonging to Cyprinidae (e. g. *Carassius auratus*, *Megalobrama terminalis*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Ctenopharyngodon idella*, etc.). However, there are species-specific features, so that the hybridization among them may or may not be realized successfully.



花鲢的成熟卵母细胞及其卵球受精后皮质部分和卵膜的变化。

图1 成熟卵母细胞的纵切面观：a) 卵母细胞停留在第二次成熟分裂中期，在其外方可见第一极体和具有辐射状条纹的放射膜；b) 同一卵母细胞的另一切面，示精孔附近的卵膜结构和精孔细胞；c) 同一卵母细胞的另一切面，在卵周皮质部分有许多层次的皮质小泡
图2 另一颗成熟卵母细胞的纵切面，精孔细胞和它与卵间的通道明白可见
图3 精孔的横切面观
图4 成熟卵母细胞第二次成熟分裂中期赤道板的横切面，“V”字形的染色体粒粒可数
图5 受精5—10分钟的卵球，卵周皮质小泡已崩解殆尽，卵周隙增厚，受精膜外举



花鮰卵球受精以后,到第一次细胞分裂前,各个阶段的变化

图 6 受精 5—10 分钟, 精虫已进入卵细胞, 精虫星光尚未出现, 卵球第二次成熟分裂已抵达后期, 纺锤体上的染色体, 已经列成两队, 分别各向一端移动
 图 7 另一颗受精 5—10 分钟的卵球, 精虫头部开始核化, 弱小的精虫星光已经出现, 卵球第二次成熟分裂已进展至末期, 第一极体尚留在卵边
 图 8 另一颗受精 5—10 分钟的卵球, 精虫星光逐渐拓大, 中心体已清楚可辨, 精虫头部与其后方的中心体和星光正在移动位置, 卵球正在准备向外排出第二极体
 图 9 受精 10—15 分钟, 雌、雄原核皆已形成, 雌核正脱离卵细胞边缘, 向雄核和中心体所在区域前进; 第二极体已经形成, 卵球第二次成熟分裂后所残留的纺锤丝, 尚可追踪
 图 10 受精 15—20 分钟, 雌、雄两原核在第一个星光的中央部分接合, 它们的接合缝与卵边切线约成 45° 角; 二子星光出现, 中心粒隐约可见
 图 11 受精 20—25 分钟, 雌、雄原核的核膜崩解, 第一次卵裂的纺锤体出现, 它是复合式的。在左侧星光的内部, 有两个中心粒