

雌核发育银鲫卵抑制异源精子 原核化的作用模式初探*

葛 伟 蒋一珪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

雌核发育银鲫卵能抑制异源精子原核化, 其个体发育完全由雌核控制。本实验通过去核、卵质转移和去除卵膜等手段, 初步揭示了银鲫卵抑制异源精子原核化的作用, 提出了双重控制的假说, 即银鲫卵对异源精子具有初级控制和次级控制功能。初级控制可能是由于在精子进入卵子深部的通道上存在着某种特殊的抑制物的缘故, 而次级控制的产生则可能是因为银鲫卵质中缺少某种两性融合生殖鱼类卵质所具有的促精子核化物质。

鱼类雌核发育(gynogenesis)是一种罕见的生殖现象。一般认为, 所谓雌核发育就是精子仅仅刺激卵子发育, 而其本身并不参与胚胎发育过程, 整个个体发育由雌核控制。

三倍体银鲫是行雌核发育的两性种群^[1]。细胞学研究结果表明, 异源精子或银鲫精子进入银鲫卵子以后, 受到抑制, 不能形成雄性原核, 胚胎发育在雌核的基础上进行^[2,3]。

本研究的目的是初步探讨银鲫卵子抑制异源精子的方式及其作用部位, 为进一步深入研究银鲫的雌核发育机理, 并利用银鲫的雌核发育特性培育优良鲫鱼品种开创一条新的途径。

材 料 和 方 法

本实验所用银鲫(*Carassius auratus gibelio*)和兴国红鲤(*Cyprinus carpio L.* red variety)均由本所关桥试验场提供。

(一) 受精卵雌核的去除

用银鲫作母本, 兴国红鲤作父本, 人工催产, 干法授精。卵子入水后1分钟, 用0.5%胰蛋白酶溶液处理, 去除卵膜, 再将裸卵转移到Holtfreter液中。待极体从动物极开始外排时(卵子入水后9—10分钟, 19℃), 立即用微针将极体连同其下方的雌核一起挑除(挑核过程在极体外排后5分钟内进行)。去核卵发育40分钟, 用Bouin液固定。另外固定一批未去核卵作对照。

* 本工作系中国科学院1983年资助课题。吴清江同志提供部分鲤鱼卵, 谨此致谢。
1984年12月27日收到。

(二) 卵细胞质转移

1. 用银鲫作母本, 兴国红鲤作父本。受精后用上法获得裸卵, 用显微注射器从兴国红鲤未受精卵中吸取动物极卵质, 将其注射到银鲫受精卵的动物极部位。注射量为 $0.05\mu\text{l}$ /卵以上, 有时达到受体卵的最大承受量。发育 30 分钟后, 用 Bouin 液固定。

2. 将银鲫未受精卵的卵质注射到兴国红鲤受精卵中。方法同上。

(三) 银鲫卵膜去除后受精

用胰蛋白酶去除银鲫未受精卵卵膜, 在卵膜即将破溃时, 用生理盐水冲掉酶液, 以免酶液损伤卵子。将裸卵移入另一培养皿中, 迅速加入兴国红鲤精液。整个过程在 9—10 分钟内完成。受精后每隔 5 分钟取材一次, Bouin 液固定。

上述各组材料均作连续石蜡切片, 切片厚度 $7\text{--}9\mu$, Delafield 苏木精染色, 伊红复染。

结 果

(一) 人工去除银鲫受精卵雌核

银鲫受精卵雌核去除后发育 40 分钟, 精子星光已分裂为二, 精核位于两极之间, 结构上依然呈固缩状态, 没有表现任何疏松以及染色体向两极牵拉的现象(图版 I:1)。对照组已进入第一次卵裂中期, 固缩的精核位于纺锤体的一极或核板旁(图版 I:2)。

(二) 卵细胞质转移

将鲤鱼卵质注射到银鲫受精卵中, 鲤鱼精核并没有受到任何影响, 仍然保持固缩状态(图版 I:3); 反过来, 将银鲫卵质注射到鲤鱼受精卵中, 也没有对其中的精核产生任何抑制效应, 精核能正常核化形成雄性原核(图版 I:4)。

(三) 银鲫卵子脱膜后受精

卵子脱膜后, 解除了精子入卵的屏障, 结果进入每粒卵中的精子数大多在两个以上。活体观察可见动物极同时形成多个不规则分裂球, 呈现出典型的多精受精 (polyspermy) 现象^[22]。

出乎意料的是, 脱去卵膜的银鲫卵子受精后, 精核表现出明显的活化现象, 但其发育进程和普通两性融合生殖鱼类受精过程相比又有明显的差异^[5-7, 12]

1. 精核的发育

脱膜卵受精后 5 分钟, 卵子表层已有精核存在(图版 I:5)。随后, 致密的精核旁出现精子星光(图版 I:6)。30 分钟后, 精子星光分裂, 形成双生子星光, 构成纺锤体的两极。与此同时, 致密的精核体积增大, 结构逐渐疏松, 可见到颗粒状染色体(图版 I:7)。这里可以看出, 精核的发育落后于精子星光的发育, 两者的发育时相不能吻合。而在正常情况下, 当精核充分核化时, 精子星光才明显地分裂为二。有趣的是, 除少数精核最终可形成泡状

雄性原核外(图版 I:8; II:9)，大多数精核的核化极不完全，与雌核相比差别很大(图版 II: 15)。这表明精核的发育受到明显的阻碍。

受精后 40 分钟，精核在双生子星光的作用下开始分裂。由于核化不完全，精核的分裂也很独特。染色体仍聚集成团，无中期核板等结构；整个精核往往被纺锤丝拉成细长的杆状(图版 II:10)，最后在中部断裂，形成两个染色体团，分别移向两极(图版 II:11)。在向两极牵拉的过程中，精核的核化过程仍在进行(图版 II: 13, 14)。精核分裂产生的染色体团到达两极后立即泡化形成子核，这个过程与正常卵裂无异(图版 II:12)。

2. 雌核的发育

受精后 25 分钟，雌性原核完全形成。雌性原核一般是与一到二个雄核接触，两者体积相差甚远。雄核着色较深，表明精核的发育远远落后于雌核(图版 II:15)。核化完全的雌核和发育不完全的雄核最终可能融合，形成合子核(图版 II:16)。

讨 论

本实验结果表明，人工去除银鲫受精卵的雌核后，精核仍保持致密状态，位于纺锤体中部，并不与纺锤丝发生联系。因此可以认为，精核之不能发育成原核与当时卵核是否存在无关。

当用胰蛋白酶去除银鲫卵膜后再受精，可观察到精核发生一系列有趣的变化，表现出明显的活化特征。这清楚地说明，银鲫卵对精核的抑制随着卵膜的去除而解除。因此，在卵质之外可能存在控制精子的作用因子，其部位很可能位于卵膜上的受精孔(micropyle)区域，因为这是精子入卵的必经之路。迄今为止，人们对硬骨鱼受精孔的研究表明，在受精孔处，卵膜凹陷形成前庭，前庭底部为受精孔道(micropylar canal)的开口。前庭和受精孔道的壁上并没有特殊结构。受精孔似乎只是供精子穿过的机械孔道^[13,14]。但是某些鱼类的受精孔部位的卵膜上却具有作用于精子的生物活性物质。鲱鱼(*Clupea pallasi*)的受精孔区域存在着一些特异性因子，它们能激活并促使精子进入卵中。这种因子的基本组成是蛋白质，很难用机械方法把它们从膜上去掉^[23]。*Rhodeus ocellatus*、*Acheilognathus lanceolata*、*Acheilognathus tabira* 以及 *Sarcocheilichthys variegatus* 等卵子的受精孔附近具有使精子聚集和激活的因子^[47]。这种因子是一种与蛋白质相结合的小分子物质，在卵子发育过程中，与受精孔膜同时形成^[48]。根据这些报道以及本实验结果，银鲫卵子的受精孔区域存在着控制精子原核化的因子是可能的。其次紧邻受精孔内口的局部质膜和卵质也是我们必须考虑的可能控制部位。据报道，在硬骨鱼中，与受精孔内口紧邻的卵子质膜和卵质在结构组成上有一定的特殊性。^[10,13] 这个部位在正常情况下也是精子入卵的必经之处，有可能构成银鲫卵子抑制精核原核化的控制区。当精子穿过该区域进入卵子深部时受到抑制。人工去除卵膜后，精子可以在动物极的任何部位入卵，从而避开了这个特殊的卵质区域。尽管目前我们还不清楚银鲫卵的精子控制位点究竟是存在于受精孔部位还是与受精孔紧邻的局部卵质中；但是有一点可以肯定，即控制位点必定存在于精子进入卵子深部的通道上。

值得注意的是，在银鲫的脱膜再受精卵中，精核虽能活化(解凝)，但其发育明显受到

阻碍,发育进程迟缓,大多不能完全原核化。相比之下,金鱼的脱膜再受精卵中,雄性原核能正常形成^[7]。这表明,银鲫卵子除了在精子入卵通道上具有特殊性外,其卵细胞质也具有不同于两性融合生殖鱼类卵质的特征,从而使得精核不能顺利发育。导致这种现象的原因不外乎下面两个方面:(1)银鲫卵质中具有抑制精核核化的物质(*Inhibitor*);(2)银鲫卵质中缺少两性融合生殖鱼类卵质所具有的促精子核化物质(*Activator*)。我们采取卵质转移的方法来验证这两种假设,即将银鲫卵质注射到鲤鱼受精卵中以及把鲤鱼卵质注射

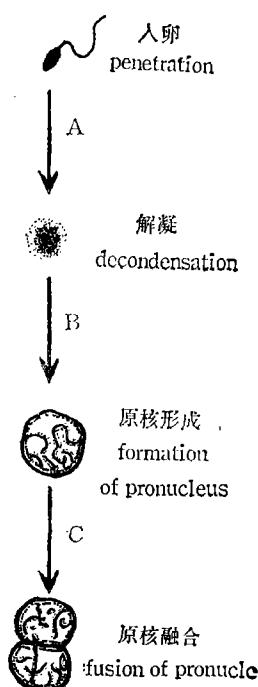


图 1 精子在正常受精过程中的行为

Fig. 1 Behaviour of sperm during normal amphimictic fertilization

到银鲫受精卵中。注射量为 $0.05\mu\text{l}/\text{卵}$ 以上,常达到受体卵的最大承受量。在两栖类, $0.05\mu\text{l}/\text{卵}$ 的卵质转移量足以检测出卵质中微量调节物质的作用^[8,11]。本实验结果显示,银鲫卵质对鲤鱼受精卵中的精核没有表现出任何抑制效应,鲤鱼卵质对银鲫受精卵中的精核也没有任何激活作用。我们因此初步认为,银鲫卵质中可能缺乏两性融合生殖鱼类卵质所具有的某些促精核核化物质,这类物质并非起动精核解凝所必需,然而却具有促进雄性原核形成的作用。

在正常受精过程中,精子的行为包括入卵(*penetration*)、精核解凝(*decondensation*)、原核形成(*formation of pronucleus*)以及与雌性原核融合(*fusion of pronuclei*) (图 1)。所有这些发育进程都受到卵子的严格控制。雄性原核的形成不只是由于渗透压、离子组成的差别而导致的细胞核水合作用的结果,它是由于细胞质蛋白质被摄入细胞核所致,即与卵质中的特异性组成有关^[9,15]。正因为如此,精核在形成雄性原核过程中,其蛋白质组成要发生较大的变换,最终形成的雄性原核所含多肽与雌性原核相似,这些来自卵质的蛋白质将影响精核染色质的结构变化和基因活性^[15,16]。当卵质中缺少某些特定组分时,精核的发育将受到阻碍,分别被阻断在不同的发育时相。这一点已为许多实验所证实^[11,19~21]。

在正常受精的银鲫卵中,精核发育阻断在图 1 所示的 A 时相,其染色质不能发生解凝。人工去除银鲫卵膜后再受精,精核发育大多阻断在 B 时相,大多数精核不能顺利形成原核。少数精核可越过 B 时相,部分核化。解凝的精核可以不经过原核期而和雌核并合。

综上所述,雌核发育银鲫的卵子对精子具有双重控制作用,这里暂且分别称之为初级控制(*primary control*)和次级控制(*secondary control*)。初级控制的作用性较强,导致精子原核化功能完全丧失。其作用位点可能存在于包括受精孔区域在内的精子入卵通道上,且在初级控制的作用部位可能存在某种特殊的抑制物质。向银鲫卵中注射鲤鱼卵质之所以不能激活精核,可能是由于精核在入卵时已受到初级控制抑制的缘故。次级控制的作用性较弱,能阻碍和延缓解凝精核进一步向雄性原核发育。其作用范围是整个卵质。在作用性质上,次级控制可能是由于银鲫卵质中缺少了某种促精子核化物质造成的,而这种物质存在于两性融合生殖鱼类的卵质中。在银鲫的雌核发育中,次级控制可能起辅助性作用,它只有在消除了初级控制后才能表现出来。

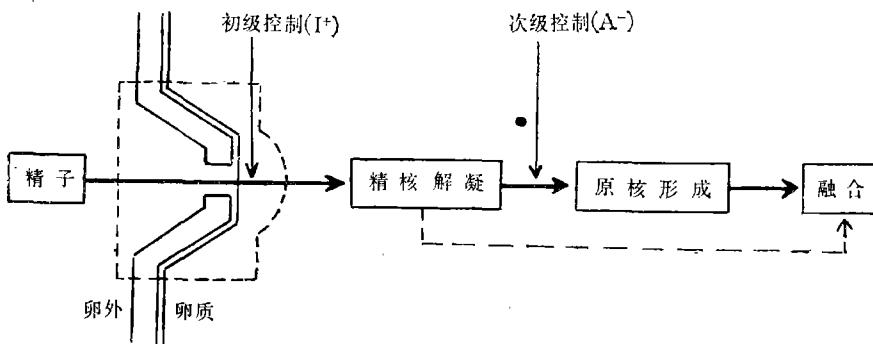


图2 雌核发育银鲫卵抑制精核原核化的作用模式 (I —Inhibitor, A —Activator, +, - 分别表示存在和缺失)

Fig. 2 The mode of action in the egg of the naturally gynogenetic crucian carp for inhibiting heterologous sperm from transforming into male pronucleus

人工去除银鲫卵膜后,精子可以从动物极任何部位入卵,从而避开了初级控制区,结果入卵的精核表现出活化现象,其染色质发生解凝。可是由于卵质中次级控制的存在,使得摆脱了初级控制的精核在银鲫卵中虽能发育,但发育的进程受到明显的影响(图2)。

关于银鲫卵对精子的双重控制作用目前尚处于假设阶段,还需进一步研究证实,这无疑将有助于我们彻底揭开银鲫雌核发育之谜。

参 考 文 献

- [1] 蒋一珪等, 1983. 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, 8(1): 1—13。
- [2] 俞豪祥, 1982. 银鲫雌核发育的细胞学观察。水生生物学集刊, 7(4): 481—487。
- [3] 周嘉申等, 1983. 黑龙江方正银鲫雌核发育的细胞学初步探讨。动物学报, 29(1): 11—16。
- [4] 刘筠等, 1981. 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, 7(3): 329—339。
- [5] 朱洗等, 1960. 金鱼和鱊鱼卵球受精的细胞学研究。实验生物学报, 7(1—2): 29—46。
- [6] 陆德裕等, 1965. 金鱼和中华鳑鲏鱼杂交的研究。实验生物学报, 10(1): 61—65。
- [7] 曲漱惠等, 1964. 金鱼卵的再受精及其时限。实验生物学报, 9(2): 130—144。
- [8] 左嘉客等, 1984. 孕酮诱发蟾蜍卵母细胞成熟作用部位的探讨。实验生物学报, 17(1): 103—113。
- [9] 傅文庆译(布拉舍著), 1981. 分子胚胎学。74页。科学出版社。
- [10] Hart, N. H. and M. Donovan, 1983. Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg of *Brachydanio*. *J. Exp. Zool.*, 227: 277—296.
- [11] Katagiri, C. and M. Moriya, 1976. Spermatozoan response to the toad egg matured after removal of germinal vesicle. *Devel. Biol.*, 50: 235—241.
- [12] Kobayashi, H., 1963. Some cytological aspects of fertilization in the cross between the funa (*Carassius carassius*, Cyprinidae) and the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*, Cobitidae). *Biol. Bull.*, 125: 114—124.
- [13] Kobayashi, W. and T. Yamamoto, 1981. Fine structure of the micropylar apparatus of the chum salmon egg, with a discussion of the mechanism for blocking polyspermy. *J. Exp. Zool.*, 217: 265—275.
- [14] Kuchnow, K. and J. Scott, 1977. Ultrastructure of the chorion and its micropylar apparatus in the mature *Fundulus heteroclitus* (Walbaum) ovum. *J. Fish Biol.*, 10: 197—201.
- [15] Kunkle, M., Magun, B. E. and F. J. Longo, 1978. Analysis of isolated sea urchin nuclei incubated in egg cytosol. *J. Exp. Zool.*, 203: 381—390.
- [16] Kunkle, M., Longo, F. J. and B. E. Magun, 1978. Nuclear protein changes in the maternally and paternally derived chromatin at fertilization. *J. Exp. Zool.*, 203: 371—380.
- [17] Suzuki, R., 1959. Sperm activation and aggregation during fertilization in some fishes III. Non species-specificity of stimulating factor. *Annot. Zool. Jap.*, 32: 105—111.

- [18] Suzuki, R., 1961. Sperm activation and aggregation during fertilization in some fishes VII. Separation of the sperm stimulating factor and its chemical nature. *Jpn. J. Zool.*, 13: 79—100.
- [19] Thadani, V. M., 1979. Injection of sperm heads into immature rat oocytes. *J. Exp. Zool.*, 210: 161—168.
- [20] Thadani, V. M., 1980. A study of heterospecific sperm-egg interactions in the rat, mouse, and deer mouse using in vitro fertilization and sperm injection. *J. Exp. Zool.*, 217: 265—275.
- [21] Usui, N. and R. Yanagimachi, 1976. Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. *J. Ultrastruct. Res.*, 57: 276—288.
- [22] Yanagimachi, R., 1957. Studies of fertilization in *Clupea pallasi* VI. Fertilization of the egg deprived of the membrane. *Jpn. J. Ichthyol.*, 6: 41—47.
- [23] Yanagimachi, R., 1957. Some properties of the sperm-activating factor in the micropyle area of the herring egg. *Annot. Zool. Jpn.*, 30: 114—119.

A PRELIMINARY STUDY ON THE MODE IN THE EGG OF THE NATURALLY GYNOGENETIC CRUCIAN CARP FOR INHIBITING HETEROLOGOUS SPERM FROM TRANS- FORMING INTO MALE PRONUCLEUS

Ge Wei and Jiang Yigui

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Abstract

The egg of naturally gynogenetic crucian carp can inhibit heterologous sperm from transforming into male pronucleus so that ontogenesis is completely controlled by the female nucleus. By removing female nucleus, transferring egg cytoplasm and inseminating the egg after the removal of chorion, the present experiment preliminarily revealed the way the egg inhibits sperm nucleus from transforming into pronucleus. On the basis of the experimental results, a hypothesis of double control is advanced: the gynogenetic egg has primary control and secondary control over the heterologous sperm. The primary control may be accomplished by a certain special inhibitor located in the passage where the sperm enters the egg. The secondary control may be due to the lack of an unknown substance generally existing in the egg cytoplasm of amphimictic fish to promote the formation of male pronucleus.

Key words crucian carp, gynogenesis, double control over pyknotic male nucleus, decondensation

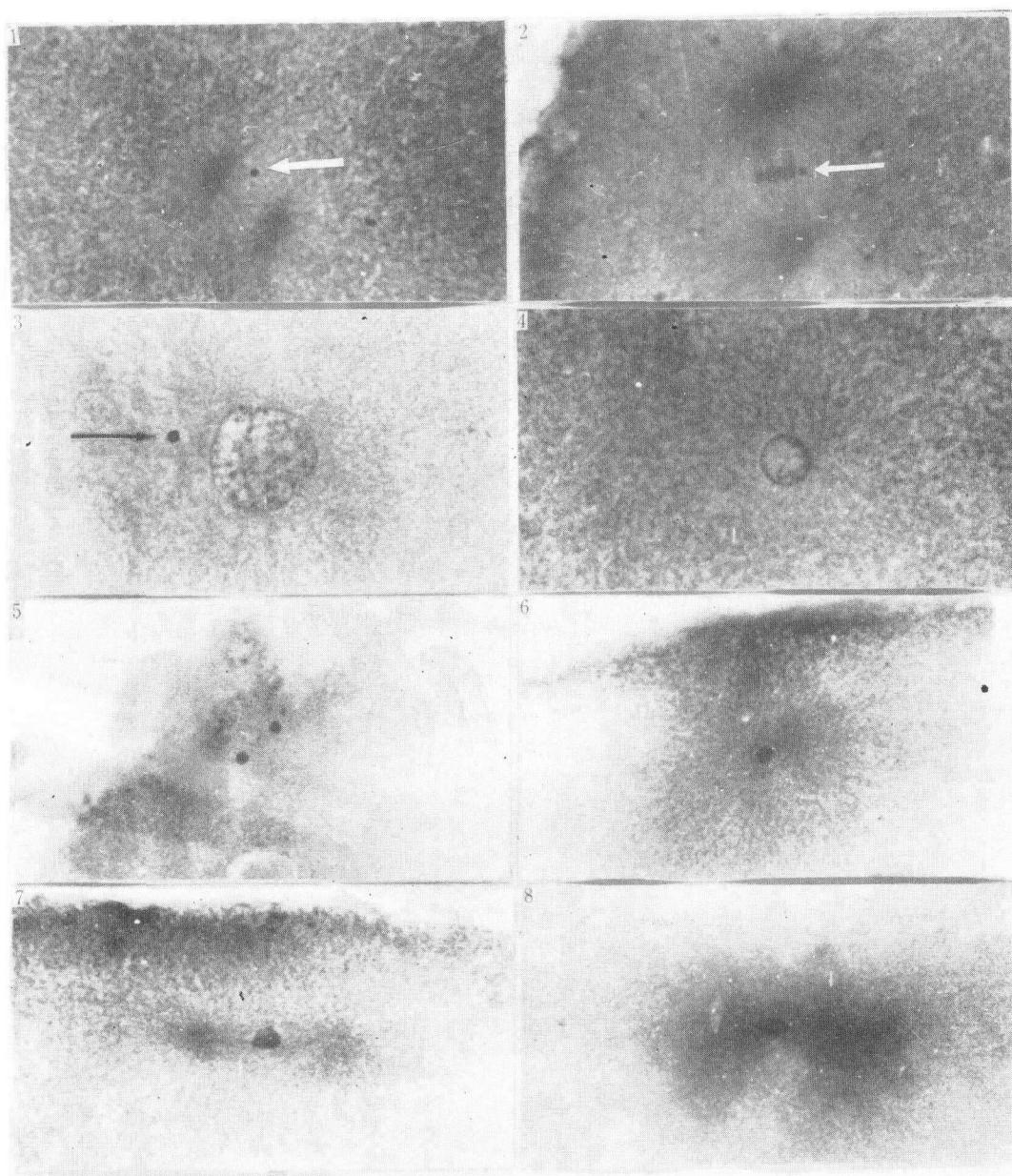


图 1 银鲫(♀)×红鲤(♂)受精卵挑除雌核后,精核仍保持致密状态(箭头所示)。 $\times 1000$; 图 2 银鲫(♀)×红鲤(♂)受精卵,图 1 的对照。致密的精核位于核板旁(箭头所示)。 $\times 1000$; 图 3 银鲫(♀)×红鲤(♂)受精卵接受红鲤卵质后,精核仍保持致密状态(箭头所示)。 $\times 1000$; 图 4 红鲤受精卵接受银鲫卵质后,精核照常核化。 $\times 1000$; 图 5 人工消除银鲫卵膜后再受精,精核刚刚入卵(受精后 5 分钟)。 $\times 1000$; 图 6 精核稍增大,精子星光形成。 $\times 1000$; 图 7—8 精子体积明显增大,出现染色质解凝。 $\times 1000$

- Fig. 1 Sperm nucleus (arrow) remains condensed after removal of the female nucleus from the fertilized egg of gynogenetic crucian carp. $\times 1000$
- Fig. 2 Control, with the arrow showing condensed sperm nucleus located beside the nuclear plate. $\times 1000$
- Fig. 3 Sperm nucleus (arrow) remains condensed after injection of the egg cytoplasm of common carp into the fertilized egg of gynogenetic crucian carp. $\times 1000$
- Fig. 4 Sperm nucleus transforms normally into male pronucleus in the fertilized egg of common carp after receiving the egg cytoplasm of gynogenetic crucian carp. $\times 1000$
- Fig. 5 Sperm nucleus in the periphery of the gynogenetic egg inseminated after removal of the egg chorion. $\times 1000$
- Fig. 6 Sperm nucleus slightly enlarged, with the formation of sperm aster. $\times 1000$
- Fig. 7—8 Enlargement of sperm nucleus and decondensation of sperm chromatin. $\times 1000$

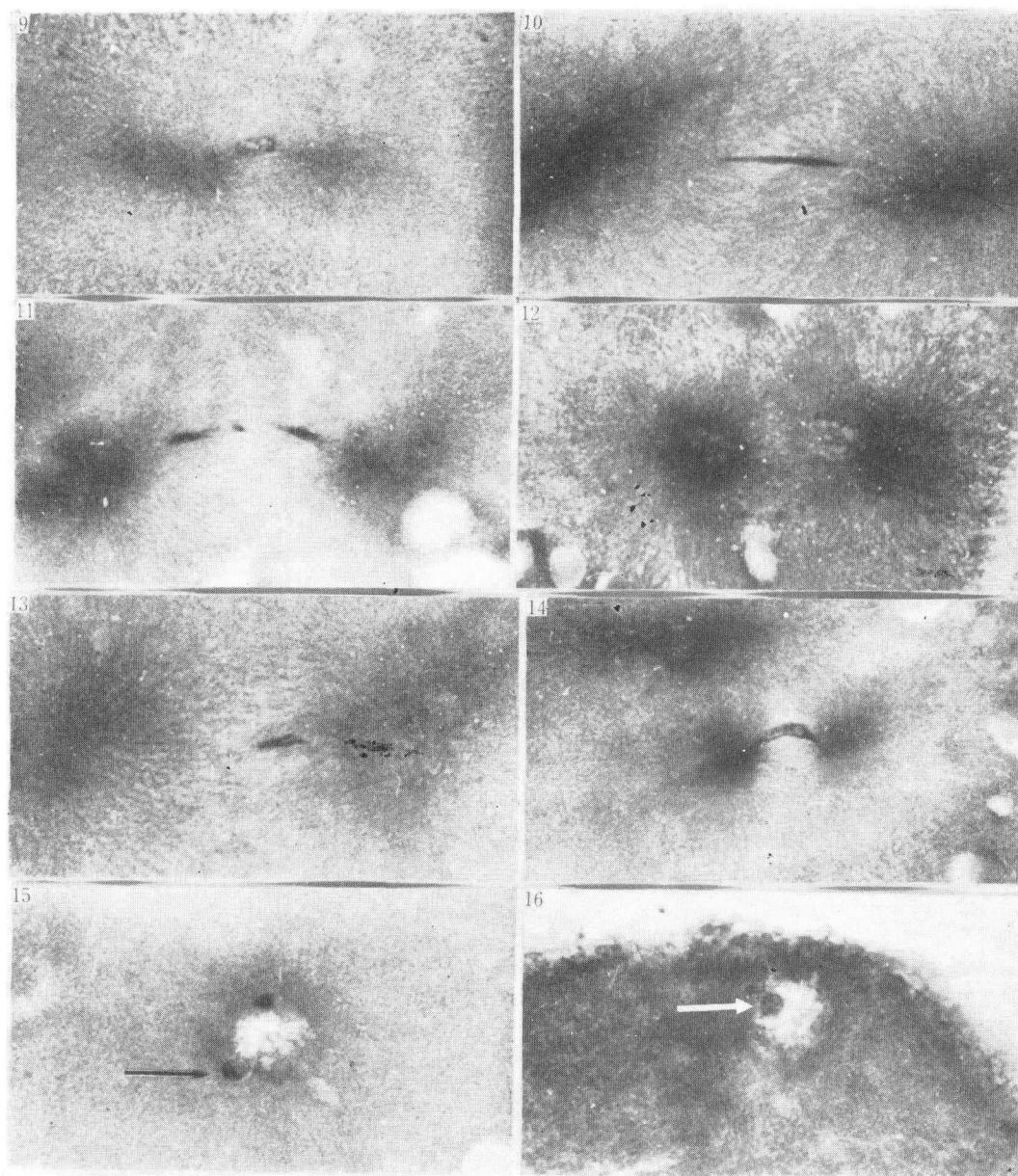


图 9 初步核化的精核。 $\times 1000$

图 10 解凝的精核在精子星光作用下伸长。 $\times 1000$

图 11 伸长的精核中部断裂,形成两个染色质团。 $\times 1000$

图 12 精子染色质团到达两极后迅速核化形成子核。 $\times 1000$

图 13—14 精核伸长和核化同时进行。 $\times 1000$

图 15—16 解凝精核(箭头所示)可与雌核接合并可能融合。 $\times 1000$

Fig. 9 Sperm nucleus partially transforming into male pronucleus. $\times 1000$

Fig. 10 Decondensed sperm nucleus elongated under the action of amphiaster. $\times 1000$

Fig. 11 Elongated sperm nucleus split into two groups of chromatin. $\times 1000$

Fig. 12 Formation of daughter nuclei on the arrival of above chromatin groups at the poles. $\times 1000$

Fig. 13—14 Vesiculation and elongation of sperm nucleus. $\times 1000$

Fig. 15—16 Association or perhaps fusion of decondensed sperm nucleus (arrow) and female pronucleus. $\times 1000$