

# 家养鱼类受精生物学的研究

## II. 几种淡水鱼类成熟卵球的精孔器与精子入卵通路的光镜与扫描电镜观察\*

王瑞霞 张毓人

(上海水产学院)

傅仓生 李振兰 吴宜章 张福顺 郝宏京

(中国农业科学院原子能所)

### 提 要

作者对我国四种淡水养殖鱼类——团头鲂、草鱼、白鲢和花鲢卵球的精孔器作了光学显微镜和扫描电子显微镜的比较描述,在扫描电子显微镜下观察到这几种鱼类的精子均直接经精孔器前庭穿过精孔管进入卵内,并对精孔细胞、受精孔与精子入卵的关系以及精孔的位置进行了讨论。

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala* Yih); 草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus* (C. et V.)); 白鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix* (C. et V.)) 和花鲢 (*Aristichthys nobilis* (R.)) 的卵球与其他硬骨鱼类一样均被一较厚的壳膜所紧包,在动物极的壳膜中都有一条短小的精孔管道,是无顶体精子入卵的唯一通路,对防止多精入卵起着重要作用。关于鱼类受精细胞学,前人已进行过详尽的研究,但多偏重于精子入卵以后,原核的形成、结合与卵质运动等方面的研究。而对于受精前和受精时,精子入卵的细节活动,资料颇少。国外学者 A. R. Brummett 等<sup>[2]</sup>对底鲮精子入卵的早期进行过扫描电镜观察; K. Hosokawa 等<sup>[6]</sup>对真鲷卵球的壳膜与精孔器的结构作过电子显微镜研究;国内尚无此类专题报道。朱洗和王幽兰<sup>[1]</sup>在论述金鱼和鳊鱼卵球成熟受精时,认为精虫不但要穿过精孔细胞,而且要穿过这一细胞核,然后才能进入卵中。刘筠等<sup>[2]</sup>认为草鱼第 IV 期卵,受精孔内嵌合着一个精孔细胞,但是催青以后,即将受精的卵子,其精孔细胞已溶化消失。王幽兰等<sup>[3]</sup>认为,在花鲢即将受精的卵球上,仍看到精孔细胞的存在,认为精孔细胞是精虫入卵不可缺少的通路。傅朝君等<sup>[4]</sup>论述过草鱼精孔细胞的退化问题。可见迄今对硬骨鱼类成熟卵细胞是否存在精孔细胞?精子直接由精孔管入卵?还是必经精孔细胞入卵?以及受精孔的形态结构与部位等方面诸学者存在不同看法。由于受精孔和精子极其微小,弄清这些问题单靠光学显微镜是有困难的,为此我们兼用了扫描电子显微镜和光学显微镜对以上问题进行

\* 本文承王义强副教授审阅指正,光镜照片由张敏与周平凡摄制,特此致谢。

编辑部收到稿件日期: 1982年10月5日。

了初步探讨,这不仅对鱼类受精生物学的研究(了解硬骨鱼类受精的全过程)提供基础资料,而且对了解鱼类卵球的生理成熟过程也很有意义。

## 材料与方 法

扫描电子显微镜研究材料是1981年6—7月间取自北京市海淀养殖场和万泉庄渔场。首先选择性成熟的雌雄亲鱼,按体重注射一定量的催情剂后,放入流水池或环道中,待雄鱼发情,剧烈尾追雌鱼时,将亲鱼捕起,取得雌雄生殖细胞;所得卵子以干法人工授精,分别将授精后1秒、2秒、5秒—1分钟(每间隔5秒钟固定一次)的受精卵,先用2.5%戊二醛(用pH7.2的磷酸缓冲液配制)固定2—4小时或过夜,然后用上述缓冲液小心地洗去戊二醛(30分钟内换新液3次),再用1%锇酸固定2小时,以同样方法洗去锇酸。梯度酒精(30—100%酒精)脱水,醋酸异戊酯取代(以上各步骤均在4℃下进行)。再用导电胶将卵球粘在样品台上,HCP-2临界点干燥器干燥,HUS-5GB真空喷涂仪喷金,S-450扫描电子显微镜观察摄影,加速电压15kV。

光学显微镜研究材料取自上海市水产研究所,取材步骤同上。各批材料均用Smith氏固定液固定16—24小时,后用换水法洗去固定液(16小时内换水多次),30%甘油酒精保存,石蜡切片,厚4—5 $\mu\text{m}$ ,H. E.染色,万能显微镜观察摄影。

## 观 察 结 果

### 1. 成熟和未成熟卵球精孔器部位与形态结构

在低倍扫描电镜下(图版 I:1—3)可见在动物极的壳膜(chorion)上有一小凹陷,即精孔区(受精孔的所在地)。由精孔区的高倍扫描特写镜头(图版 I:4—6)所示,此凹陷为漏斗状,受精孔位于此漏斗状凹陷的底部中央。通过对成熟未受精卵精孔区的切片(图版 III:12—14)观察,可见受精孔为穿过卵膜的管状结构,称之为精孔管(micropylar canal),精孔管的内孔开口于卵球动物极的质膜(plasma membrane)表面。卵球外层的放射膜(radial membrane)在近精孔区逐渐变薄,在漏斗的底壁表层仅呈薄膜状,而漏斗的底壁内层则为较厚的卵黄膜(vitelline membrane)。

团头鲂卵球精孔管的外口较大,口径约4—4.5 $\mu\text{m}$ ,其边缘呈串珠状结构(图版 II:7)。漏斗状凹陷边缘上有大小不等的中型孔(与卵膜表面的微型孔和大型的受精孔比较而言)排列成环(图版 I:4)。而草鱼与白鲢精孔器的形态结构及精孔管大小似乎完全相同,精孔管的外口径约3—3.5 $\mu\text{m}$ ,孔的周边均呈平滑的环状结构。漏斗壁上布满大小不等,形状不同的中型孔,并排列成“雪花”型图案(图版 II:8,9)。精孔器的这种特殊构造的作用尚不明了。

观察了这4种鱼的大量的成熟卵球的精孔器,均未发现精孔细胞,而精孔管均敞开着,在高倍扫描时,可通过精孔管直接观察卵球的质膜表面。同时用光学显微镜也观察了更多的成熟卵球精孔管的石蜡切片,也均未发现有精孔细胞。可见成熟卵球的精孔管都是畅通无阻的。

观察了团头鲂第 IV 时相的初级卵母细胞和从第 IV 时相向第 V 时相过渡的未成熟卵母细胞石蜡连续切片。在第 IV 时相的早期阶段,可看到在卵球一极的卵表面精孔细胞以其巨大的体积区别于卵周的滤泡细胞,它的核与核仁均清楚可见,但未看到精孔细胞及其核内有任何沟道结构,这时精孔细胞区的卵膜凹陷较浅(图版 III:15)。以后随着营养物质的积累,卵球体积增大,精孔细胞区的卵膜凹陷加深形成明显的漏斗状,在精孔细胞的底部可见一粗大的精孔细胞质突被较厚的卵黄膜所包围(图版 II: 10)。当卵母细胞长足体积开始离巢时,精孔细胞随同卵球周围的滤泡细胞一起离开卵球表面并解体(图版 III: 11)。原精孔细胞占据的地位便是精孔器的前庭(即漏斗状凹),其底壁中央便是精孔管的外口(图版 III: 12—14)。

## 2. 精子入卵的通路

在高倍扫描电镜下,观察了大量刚受精后不久的卵球,在精孔区发现精子入卵相当迅速,从受精后 2 秒钟开始到 30 秒之间,均可看到精子直接从受精孔入卵的图象,例如有的卵球上精子已达精孔管口正要入卵(图版 IV:16, 19);在另些卵球上可见精子头已进入精孔管内,只有尾部露在精孔外(图版 V: 18, 20, 21);还有些卵球的精孔漏斗区聚集了大量精子(图版 IV: 17);在已受精的卵球上可见精孔管的内孔由于被某种物质——受精塞(fertilization plug)堵塞而其他精子被阻止于精孔管内孔之外(图版 VI: 24)等情况。但从未见到精孔漏斗区内有精孔细胞存在。

精子入卵后,精孔管的内孔立即被一种物质堵塞(非闭合),堵塞物在团头鲂呈絮状物(图版 VI: 24);而在草鱼和白鲢则为薄膜状(图版 V: 22, 23),这种物质是何性质?由何而来?有待研究。

由以上观察,离巢后的成熟卵其受精孔的形态结构均无变化(图版 I:4—6;图版 III: 12—14),甚至在离巢后很久的过熟卵球上(图版 VI: 25—27),受精孔也未被其他物质所充塞或挤压变形,而精孔管依旧。

## 讨 论 与 小 结

1. 根据高倍扫描电镜观察所提供的精孔区的构造细节及成熟卵球精孔管切片的高倍光镜照片表明,这 4 种淡水养殖鱼类的受精孔均位于卵球动物极上一个漏斗状(或喇叭口状或锥状)凹陷的底部中央,是一穿过卵膜的管状结构,这与 A. R. Brummett 等<sup>[5]</sup>的看法一致,管的外孔开口于漏斗底部中央,内孔开口于卵球动物极的质膜表面。我们认为漏斗状凹陷并非受精孔,如前所述,它是卵球离巢前第 IV 时相卵母细胞外的一个特大的精孔细胞所占据的空间,当卵球长足而成熟离巢时,精孔细胞随之消失而留下的一个漏斗状结构,由此证明精孔细胞与受精孔的形成有关,故称之为精孔细胞。但有的学者<sup>[2]</sup>认为在第 IV 时相卵母细胞中受精孔内嵌合着一个精孔细胞;另有学者<sup>[4]</sup>认为精孔细胞和受精孔只不过是紧密的嵌合关系。他们都把精孔细胞所占据的空间——漏斗状凹陷看作为受精孔是否恰当,值得商榷。国外学者<sup>[7]</sup>把底鲮成熟卵的这个漏斗状前庭称为精孔器,它是精子入精孔管必经之处,我们同意这种看法。

2. 观察结果证实团头鲂、草鱼、白鲢和花鲢的成熟离巢后的卵球,精孔细胞均已消失,这与 K. Hosokawa 等<sup>[6]</sup>在真鲷上和刘筠等<sup>[2]</sup>、傅朝君等<sup>[4]</sup>在草鱼上的观察结果一致。但另外的学者<sup>[3]</sup>认为精孔细胞有可能在样品处理中丢失。然而我们对这些鱼类卵球授精早期的扫描电镜观察结果表明,精子入卵相当迅速,由授精后 2 秒钟到 30 秒钟间,已看到了精子直接由受精孔入卵的各种时态。如前所述,在有些卵球上精子已进入精孔管,只有尾部露在卵外;有些卵球的精孔区凹陷内聚集了许多待进的精子;有的卵球上精子已抵达精孔管口正准备入卵;有些已受精的卵球上虽另有精子已进入精孔管,但由于卵球受精后精孔管的内孔立即被受精塞堵住而被阻止在精孔管的外口处;另外在花鲢受精早期的石蜡切片中,同样看到许多卵球的精孔区内有精子直接穿过精孔管入卵的图象。以上图象证实了团头鲂、草鱼、白鲢和花鲢的无顶体精子均是直接经精孔管入卵受精的。这与朱洗和王幽兰<sup>[1]</sup>在金鱼和鳊鱼上;王幽兰等<sup>[3]</sup>在花鲢上描述的情况不同。他们认为排离卵巢即将受精的卵球上,仍能观察到精孔细胞的存在;并认为精子进入卵时,必须穿过精孔细胞及精孔细胞的核,以抵达卵内。

3. 我们认为精子入卵与精孔细胞无关,那么在卵球发生过程中出现的精孔细胞的生理意义何在?生物有机体的每一结构都担负着一定的生理任务,就真骨鱼类卵球来说,在其发生过程中,结构的出现和变化都与其体外受精和发育相适应,例如排离卵巢的成熟卵球,都被厚厚的韧膜所包围,此膜不仅对体外发育的胚胎有着保护作用,而且膜内的小微管有利于胚胎与外界进行物质交换。根据卵球发生与成熟过程的观察,可知精孔细胞的出现和消失有其独特的历史使命。如前所述,在卵细胞发生过程中,精孔细胞向卵球表面伸出一个细胞质突,在卵膜形成中,逐渐被卵球分泌的物质所围绕(这些物质形成了卵球的初级卵膜——卵黄膜),当卵球长足体积离巢时,精孔细胞随同滤泡细胞一起离开卵球表面并解体,结果在卵膜中原来质突的位置上留下了一个管状结构即精孔管,它是精子入卵的唯一门户。假如在卵膜形成过程中,没有精孔细胞伸出的细胞质突在卵母细胞壳膜内占据一定的位置,精孔就不能形成,成熟卵球将被厚韧的壳膜所封闭;或者离巢后的卵细胞上仍有精孔细胞存在,则精孔管仍被精孔细胞的质突所堵塞,微小的、能量有限的入水后寿命极短的精子便无法入卵,迅速的受精作用就不可能实现。由此我们认为精孔细胞与受精孔的形成有关,对精子入卵起着历史性的间接作用。这与某些学者<sup>[2,4]</sup>在草鱼上的论述不同,他们认为精孔是由厚实的放射膜向卵内开口的特殊构造,精孔细胞嵌合在这里面,这就可以保证受精孔不被其他物质所充塞或被挤压,并认为精孔细胞的存在对精孔起着保护作用。但我们在大量精孔细胞已不存在的成熟卵上和离巢很久的过熟卵球上,没有看到受精孔被充塞或被挤压变形的情况,因此我们认为把精孔细胞看作对受精孔起着保护作用 and 把精孔细胞与受精孔之间仅看作是紧密地嵌合关系等论点似有商榷的必要。

4. 由精孔区高倍扫描图象所示;卵球受精后,精孔管的内孔均立即被堵塞,这是单精受精鱼类防止病理多精受精的机制。由此可知,细小的精孔管对防止多精入卵具有重要意义。由以上图象还表明,堵塞物在团头鲂为絮状物,而在另 3 种鱼则为薄膜状。这种物质是何性质?由何而来?有的学者<sup>[5]</sup>推测这种物质是由卵球的皮质泡释放出来的粘多糖。我们尚未获得直接证明。

## 参 考 文 献

- [1] 朱洗、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。
- [2] 刘筠等, 1963。草鱼卵球受精的细胞学研究。湖南师范学院自然科学学报, (5): 1—12。
- [3] 王幽兰等, 1980。花鲢卵球受精的细胞学研究。水生生物学集刊, 7(2): 189—196。
- [4] 傅朝君等, 1981。草鱼卵球成熟细胞学的研究。淡水渔业, (5): 5—8。
- [5] Brummett, A. R. and J. N. Dumont, 1979. Initial stages of sperm penetration into the egg of *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Zool.*, **210** (3): 417—433.
- [6] Hosokawa, K., Fusim T. and T. Matswato, 1981. Electron microscopic observation of the chorion and micropyle apparatus of the Porgy *Pagrus major*. *Japan J. Ichthyology*, **27** (3): 339—343.
- [7] Kuchnow, K. P. and J. R. Scott, 1977. Ultrastructure of the chorion and its micropyle apparatus in the mature *Fundulus heteroclitus* (Walbaum) ovum. *J. Fish Biol.*, **10** (3): 197—201.

SCANNING ELECTRON MICROSCOPIC AND LIGHT MICROSCOPIC OBSERVATIONS ON THE MICROPYLE APPARATUS AND THE PATHWAY OF SPERM PENETRATION INTO THE MATURED EGG IN FOUR FRESH-WATER FISHES (WUCHANG FISH, GRASS CARP, SILVER CARP AND BIG HEAD)

Wang Ruixia, Zhang Yuren

(Shanghai Fisheries College)

Fu Cangsheng, Li Zhenlan, Wu Yizhang, Zhang Fushun and Hao Hongjing

(Institute of Atomic Energy, Chinese Academy of Agriculture)

Abstract

Surrounding membranes (chorion) of the matured eggs in these four Chinese pond fishes (*Megalobrama amblycephala*, *Ctenopharyngodon idellus*, *Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) are all tough. The sperm penetration into the matured egg is restricted to the micropylar canal of the chorion, but there is no micropylar cell above the canal.

There is a funnel-like depression in front of the micropylar canal; an outer opening of the canal is situated on the bottom of the depression, so that this depression is the vestibule of the micropyle apparatus. While the micropyle itself is a canal-like structure surrounded by the chorion and opens to the surface of plasma membrane on the animal pole directly, therefore, it is called the micropylar canal. The diameters of the outer and inner openings of the micropylar canal are different from each species, the outer opening being 4 to 4.5  $\mu\text{M}$  in Wuchang fish and about 3 to 3.5  $\mu\text{M}$  in grass carp and silver carp, while the inner opening of the canal being always smaller than the outer one.

In short, the micropyle apparatus of matured eggs in these studied fishes are all formed of one funnel-like vestibule and an outer circular opening of the micropylar canal at its bottom, while the pathway of sperm penetration into the matured egg is only the micropylar canal.

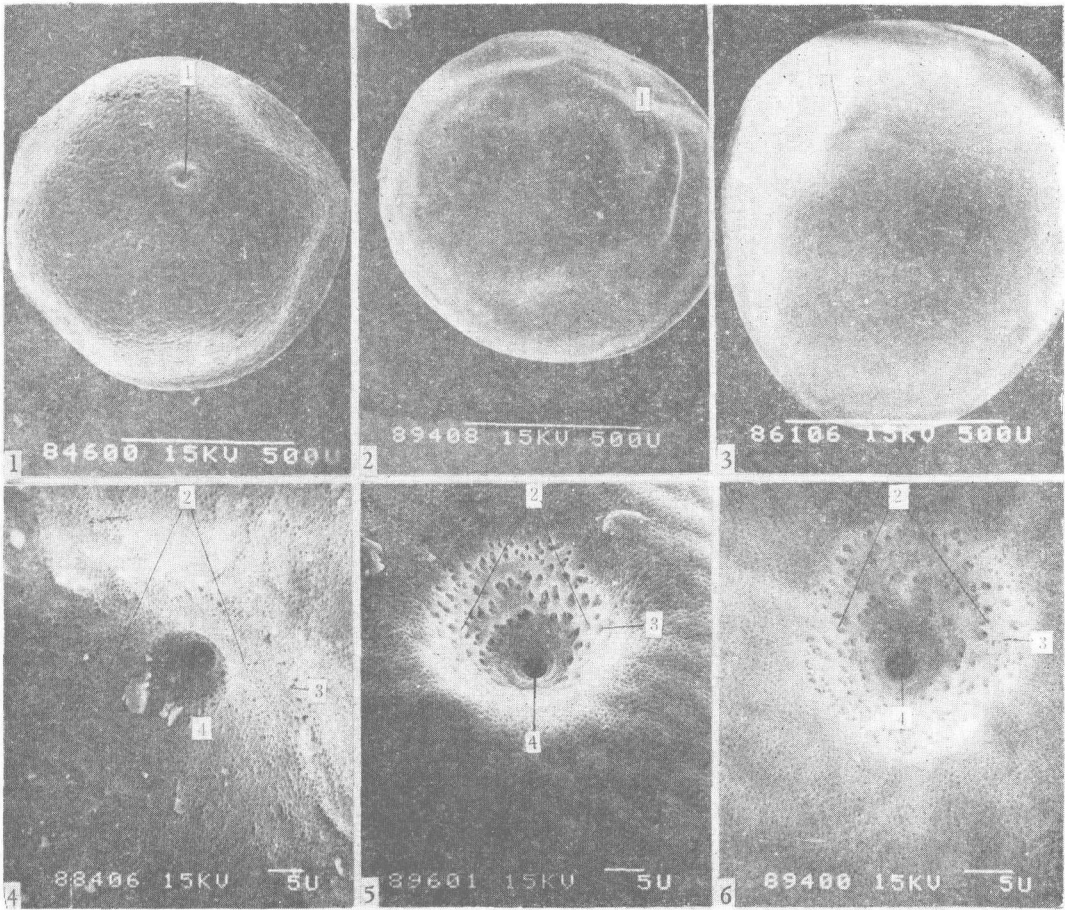


图 1—3 成熟未受精卵的低倍扫描电镜观察。示卵子动物极上有一小凹陷，即精孔区。图 1 团头鲂；图 2 草鱼；图 3 白鲢。

图 4—6 精孔区的高倍扫描电镜观察。示精孔区是一漏斗状凹陷，受精孔位于凹陷的底部。图 4 团头鲂图 5 草鱼；图 6 白鲢。

1. 小凹陷(精孔区)；2. 漏斗状凹陷；3. 中孔；4. 精孔管外孔。

Fig. 1—3 Low magnification SEM observation on the matured but unfertilized egg. There is a small depression on the animal pole of the egg; this is the micropylar apparatus, fig. 1 Wuchang fish; fig. 2 Grass carp; fig. 3 Silver carp.

Fig. 4—6 High magnification SEM observation on the micropylar apparatus. The micropylar apparatus is a funnel-like depression and the outer opening of micropylar canal situated at the bottom of the depression; fig. 4. Wuchang fish; fig. 5 grass carp; fig. 6 Silver carp.

1. a small depression (micropylar region); 2. a funnel-like depression; 3. middle pore; 4. outer opening of micropylar canal.

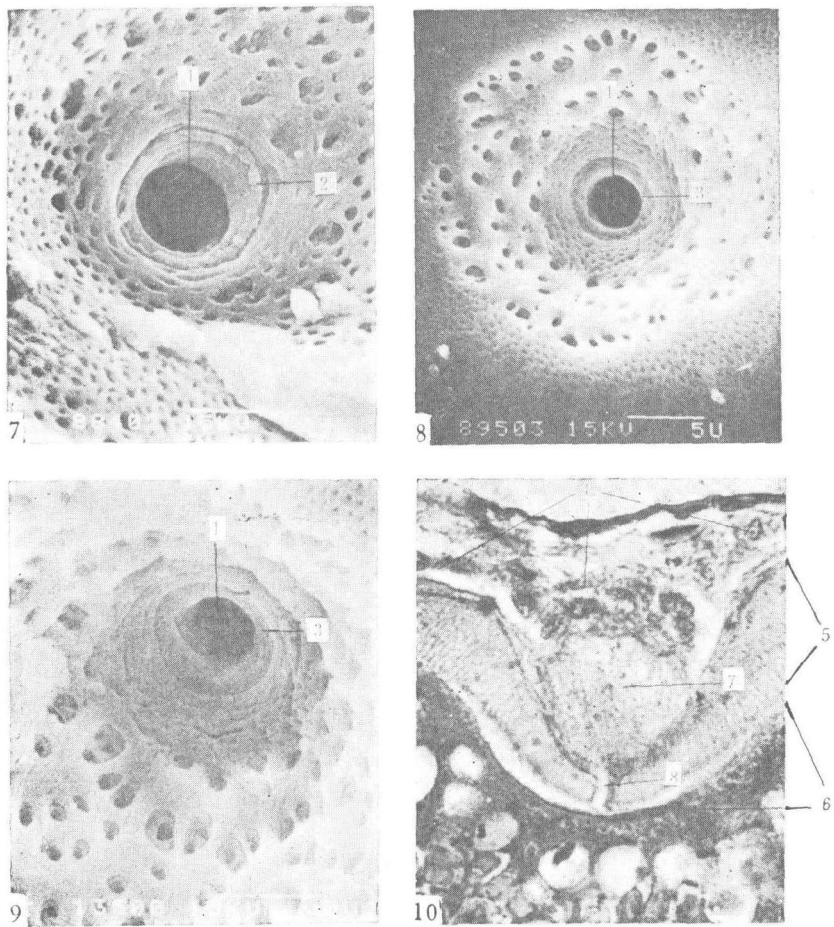


图 7—9 精孔区表面形态的高倍扫描电镜照片。 图 7 团头鲂； 图 8 草鱼； 图 9 白鲢。

图 10 团头鲂第 IV 时相卵母细胞的精孔细胞切片的光镜照片。示精孔细胞质突。

1.受精孔； 2.团头鲂精孔管口呈链状结构； 3.草鱼与白鲢的精孔管口呈平滑的环状结构； 4.滤泡细胞； 5.卵黄膜； 6.质膜； 7.精孔细胞； 8.质突。

Fig. 7—9 High magnification SEM observation showing the surface morphology of the micropylar region. fig. 7 Wuchang fish; fig. 8 Grass carp; fig. 9 Silver carp.

Fig. 10 Light micrograph of the section through the micropylar cell in an oocyte (stage IV) of Wuchang fish. Showing the protoplasmic protrusion.

1. micropyle; 2. chain-like structure; 3. ring-like structure; 4. follicular cell; 5. vitelline membrane; 6. plasma membrane; 7. micropylar cell; 8. protoplasmic protrusion.

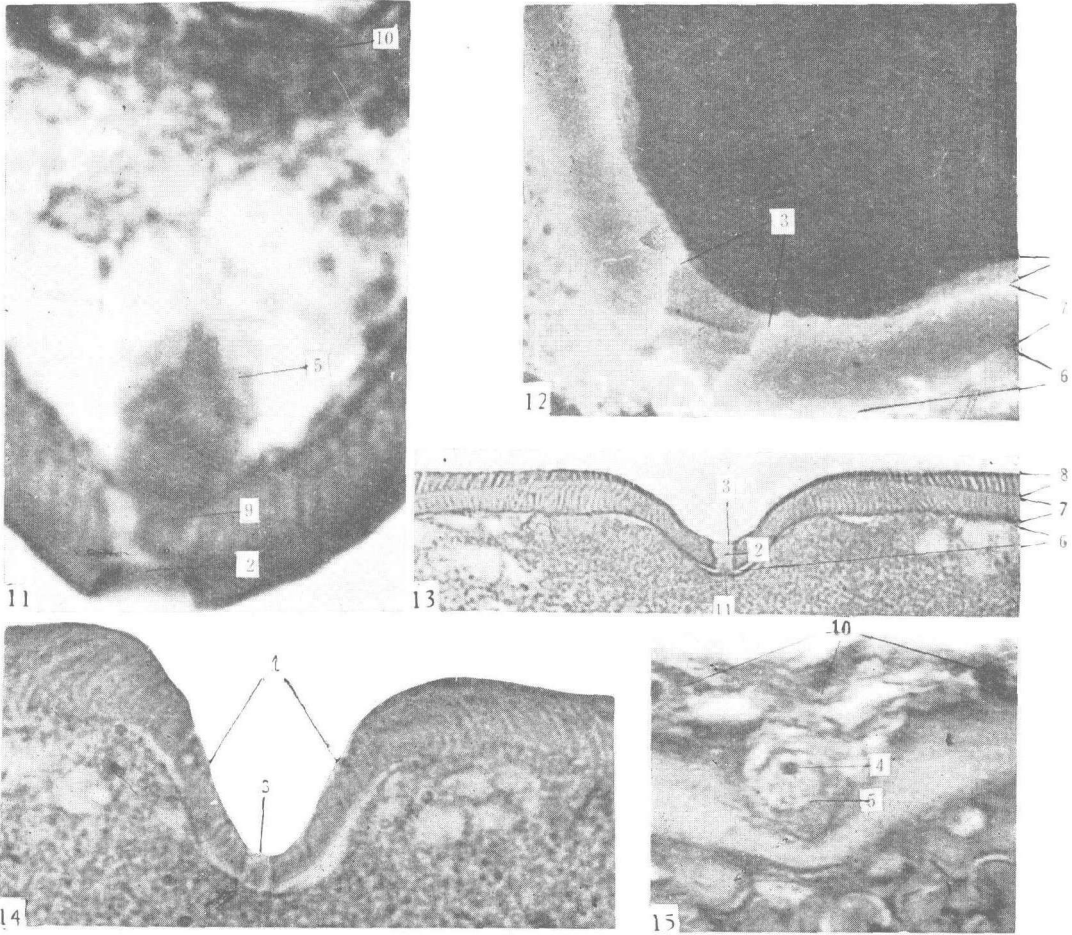


图 11 团头鲂的 IV 时相向 V 时相过渡卵母细胞之精孔细胞切片的光镜照片。示精孔细胞开始解体。

图 12 团头鲂成熟卵球 (V 时相) 精孔管切片的高倍扫描电镜观察。示精孔区结构。

图 13、14 成熟卵球 (V 时相) 的精孔管切片的光镜照片。示精孔区结构。图 13 团头鲂；图 14 花鲢。

图 15 团头鲂 IV 时相卵母细胞的精孔细胞切片的光镜照片。示精孔细胞及其核。

1. 漏斗状凹陷；2. 精孔管；3. 受精孔 (即精孔管外孔)；4. 精孔细胞核；5. 精孔细胞；6. 质膜；7. 卵黄膜；8. 放射膜；9. 质突；10. 滤泡细胞；11. 精孔管内孔。

Fig. 11 High magnification light micrograph of the section through the micropylar cell of a phase IV—V oocyte of a Wuchang fish. Showing the micropylar cell beginning to dissolve.

Fig. 12 High magnification SEM observation of the section through the micropylar canal of the ripe egg (phase V) of the Wuchang fish. Showing the inner structure of the micropylar region.

Fig. 13—14 Light micrograph of the section through the micropylar canal of the ripe egg (phase V) of a Wuchang fish (Fig. 13) and a Grass carp (Fig. 14).

Fig. 15 Light micrograph of the section of the micropylar cell of a phase IV oocyte. Showing the micropylar cell and its nucleus.

1. funnel-like depression; 2. micropylar canal; 3. micropyle (outer opening of micropylar canal); 4. nucleus of the micropylar cell; 5. micropylar cell; 6. plasma membrane; 7. vitelline membrane; 8. radial membrane; 9. protoplasmic protrusion; 10. follicular cells; 11. inner opening of micropylar canal.

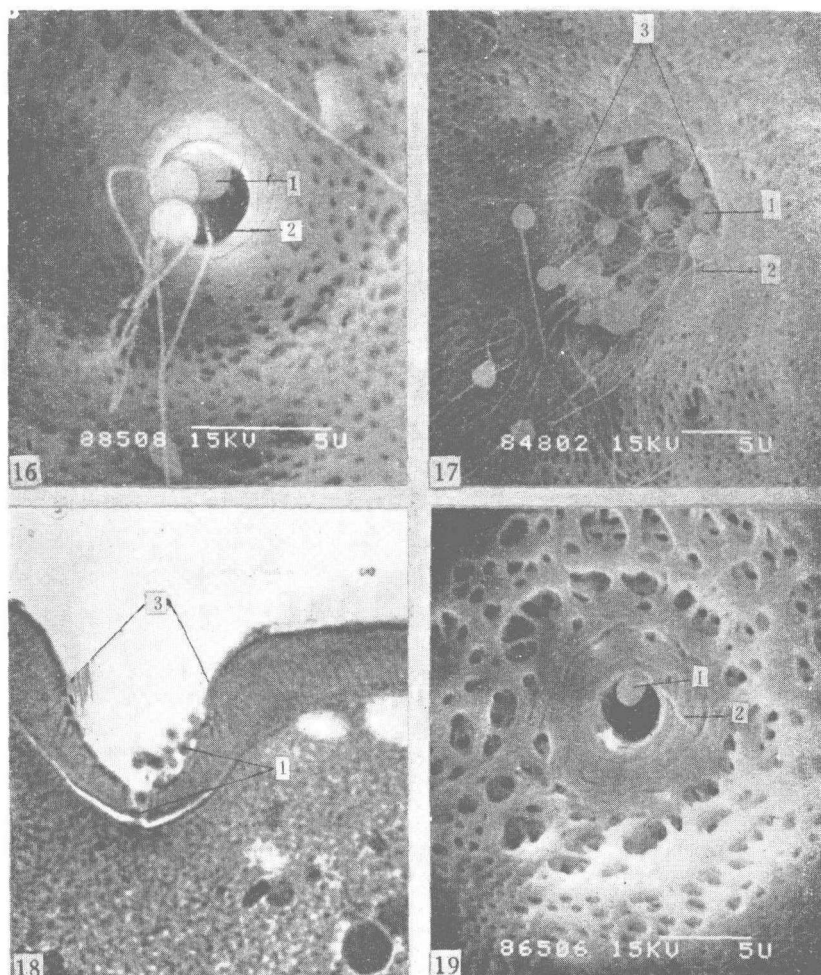


图 16 授精后 5 秒钟固定的卵子,精孔管口的扫描电镜观察。示几条精子正在进入精孔管(团头鲂)。  
 图 17 授精后 5 秒钟固定的卵子精孔区的扫描电镜照片。示漏斗状凹陷内聚集大量精子(团头鲂)。  
 图 18 授精后 15 秒钟卵子精孔管切片的光镜照片。示精子穿过精孔管入卵(花鲢)。  
 图 19 授精后 1 秒钟固定的卵子精孔管外孔的扫描电镜观察。示一条精子已抵达精孔管的外孔(白鲢)。

1. 精子; 2. 精子尾巴; 3. 漏斗状凹陷。

Fig. 16 SEM observation on the opening of the micropylar canal of an egg fixed 5 seconds after insemination. Showing several sperms are just entering the micropylar canal (Wuchang fish).

Fig. 17 SEM observation on the micropylar region of an egg fixed 5 seconds after insemination. Showing a lot of sperms aggregate in the funnel-like depression (Wuchang fish).

Fig. 18 Light micrograph of the section through the micropylar canal of an egg fixed 15 seconds after insemination. Showing the sperm entered into the ovoplasm through the canal (Bighead carp).

Fig. 19 SEM observation on the micropylar region of an egg fixed 1 second after insemination. Showing one sperm has reached the outer opening of the micropylar canal (Silver carp).

1. spermatozoon; 2. the tail of a spermatozoon; 3. funnel-like depression.

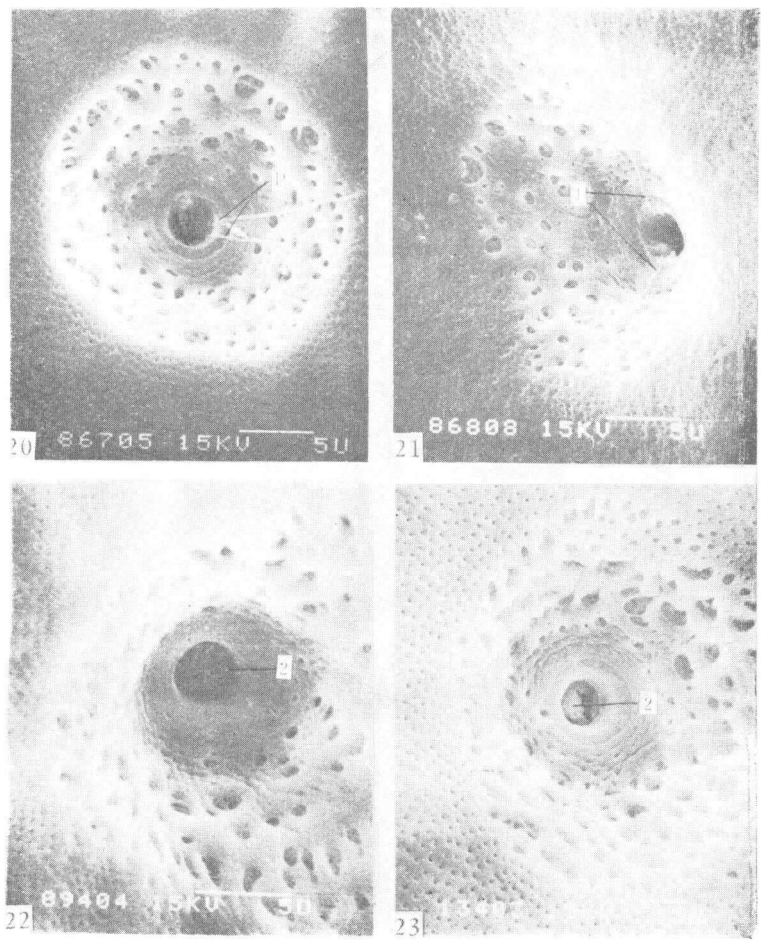


图 20, 21 授精后 2 秒钟卵子精孔管外孔的扫描电镜观察。示 2 条精子的头部已完全消失于精孔管内,从外面只能看到尾部。图 20 白鲢; 图 21 草鱼。

图 22, 23 受精后卵子精孔管口的扫描电镜观察。示精孔管的内孔已被物质堵塞。图 22 白鲢; 图 23 草鱼。

1. 精子的鞭毛(尾部); 2. 堵塞物质(受精塞)。

Fig. 20, 21 SEM observation on the outer opening of the micropylar canal of the egg fixed 2 seconds after insemination. Showing heads of spermatozoon totally entered the canal and only two flagella (or tails) were visible from the outside. Fig. 20 Silver carp; fig. 21. Grass carp.

Fig. 22, 23 SEM observation on the opening of the micropylar canal of the eggs after fertilization. Showing the inner opening of the micropylar canal has been sealed by a material. Fig. 22. Silver carp; fig 23. Grass carp.

1. the flagellum of a spermatozoon; 2. sealed material (fertilization plug)

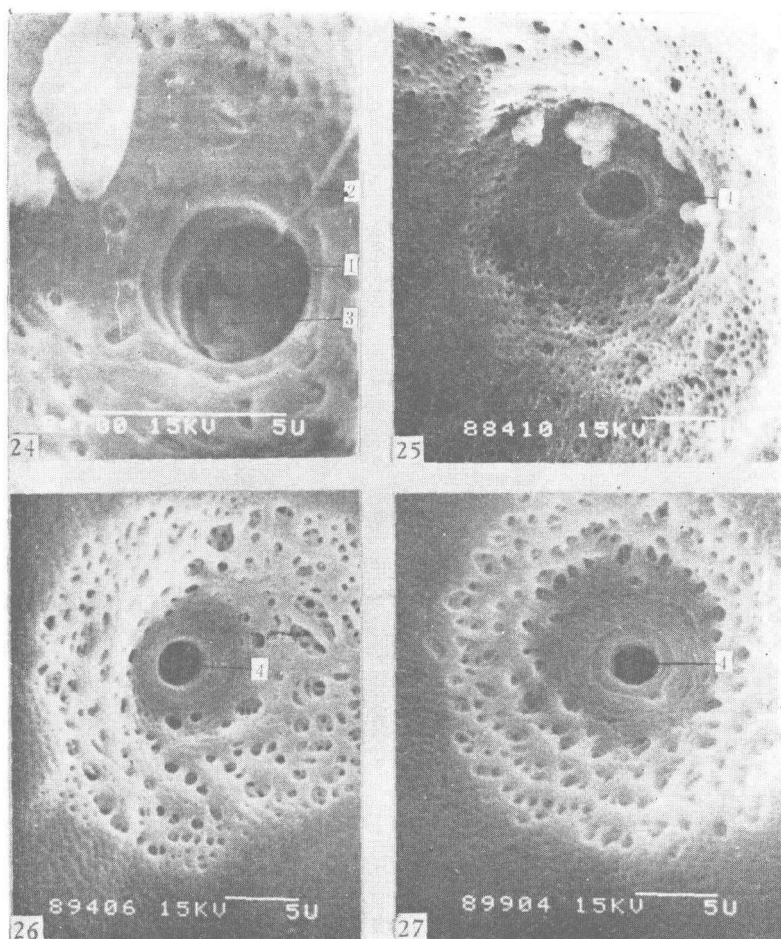


图 24 团头鲂卵子受精后的扫描电镜观察，示精孔管的内孔已被一种物质堵塞，一条精子被阻止于精孔管之外孔处。

图 25—27 过熟未受精卵精孔区的扫描电镜观察。示精孔管仍敞开着。图 25 团头鲂；图 26 白鲢；图 27 草鱼。

1. 精子；2. 精子尾部；3. 受精塞；4. 受精孔。

Fig. 24 High magnification SEM observation on an egg after fertilization of a Wuchang fish. Showing the inner opening of the micropylar canal has been sealed by a material, and one spermatozoon is prevented in the outer hole of the micropylar canal.

Fig. 25—27 SEM observation on the micropylar region of the over-matured egg. Showing the micropylar canal still keeps open. fig. 25 Wuchang fish; fig. 26 silver carp; fig. 27 Grass carp.

1. spermatozoon; 2. the tail of a spermatozoon; 3. the fertilization plug.