

中华乌塘鳢精子入卵过程的扫描电镜观察

何振邦, 洪万树*, 陈仕玺, 张其永, 戈 薇, 陈筠筠

(厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用扫描电镜观察中华乌塘鳢精子和成熟卵的形态结构及精子入卵过程。精子由头部、颈部和尾3部分组成, 全长17.0~19.0 Lm。成熟卵呈圆球形, 直径在600~670 Lm之间, 动物极端有一黏着器, 黏着器围绕着卵膜孔区, 卵膜孔区中间有一凹陷的卵膜孔。黏着器由黏着丝、筛状圆柱体和基底三部分组成。卵膜孔呈漏斗状结构, 由前庭以及卵孔管组成。精子通过基底的穿孔以及筛状圆柱体的筛孔到达卵膜孔区, 进入卵膜孔。受精前, 纬状物覆盖整个基底和卵膜孔区, 并堵住卵膜孔。当精子接触卵膜孔区时, 纬状物消失, 但卵膜孔还被精孔细胞堵塞; 当精子进入卵孔管时, 精孔细胞消失; 精子入卵后, 卵膜孔被纬状物质堵塞, 精子入卵过程完成。

关键词: 中华乌塘鳢; 精子入卵; 卵膜孔; 受精; 黏着丝

中图分类号: Q 959.483

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2009)01-0120-06

中华乌塘鳢(*Bostrichthys sinensis* Lac p de)隶属于鰕虎鱼亚目(Gobioidei)、塘鳢科(Eleotridae)、乌塘鳢属(*Bostrichthys*), 系暖水肉食性鱼类。广泛分布于日本、泰国、斯里兰卡、印度、澳大利亚、马来西亚、菲律宾、印度尼西亚等国家及中国的广西、广东、福建、浙江等省沿海河口、港湾, 栖息于滩涂洞穴中^[1-3]。中华乌塘鳢具有生命力强、生长快、易饲养等特点, 其肉质细腻、味道鲜美、营养丰富并便于鲜活运输, 是一种优良的养殖品种, 并作为名贵的海产滋补鱼类而畅销中国大陆、台湾和港澳等地区^[1-2]。

中华乌塘鳢成熟卵子为黏性卵, 呈圆球形, 无油球^[1-4]。自然条件下, 成熟雌雄个体生殖期间择偶配对进入洞穴中交配产卵, 卵子排出后遇水即黏附于洞壁, 受精后膨胀为长瓜形, 附着端有许多黏着丝^[3]。根据其生殖习性, 在进行中华乌塘鳢人工繁殖时, 采用陶瓷或塑料管道诱导亲鱼在管道内产卵和受精^[5]。

国内外对鱼类精子入卵前后的扫描电镜观察已有一些研究报道^[6-28], 但对卵膜上有黏着丝的成熟卵的精子入卵前后的研究国内未见文献报道。国外学者Giulianini等^[6]观察了卵膜具有黏着丝的蜥头鰕虎鱼(*Zosterisessor ophiocephalus*)精子入卵过程。本文对中华乌塘鳢精子和成熟卵的形态结构以及受精过程进行扫描电镜观察, 研究结果可为人工繁殖提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

生殖季节采捕九江江口的野生中华乌塘鳢雌鱼和雄鱼各10尾, 体长为(16.94±1.10)cm, 体质量为(117.25±28.52)g。以人绒毛膜促性腺激素(HCG)和促黄体素释放激素类似物(LRH2A₃)(宁波市激素制品有限公司产品)混合注射催熟。催熟期间水温(25±0.5)℃, 盐度15, 微充气。激素注射65 h后轻压雌鱼腹部获取成熟卵子, 解剖雄鱼取出精巢和贮精囊置于研钵中切碎研磨获得成熟的精子, 进行半干法人工受精, 分别取成熟卵和受精后30、60、120 s的受精卵固定, 每次取样80~100粒。

1.2 方法

样品先以海水配置的0.01%十二烷基硫酸钠溶液处理1 min, 阻断精子的游动^[6]; 再用4%的戊二醛固定2 h; 固定后用缓冲液(0.1 mol/L PBS, pH=7.4)冲洗3次, 并置于缓冲液中保存。根据观察需要, 用解剖针剥离黏着器。经50%、70%、80%、90%、95%、100%乙醇梯度脱水, 每级脱水10 min, 乙酸异戊酯置换后, 用导电胶将卵子粘在样品台上, 粘样时卵膜孔向上。临界点干燥, 真空镀金, 扫描电镜XL230ESEM(PHILIP公司, 荷兰)下观察拍照。加速电压为20 kV。有关精子和受精卵的相关参数依照电镜照片给定的标准尺寸经换算求得。

2 实验结果

2.1 精子的外部形态

中华乌塘鳢精子由头部、颈部和尾3部分组成,全长17.0~19.0 Lm。头部为圆形,直径为1.5~2.0 Lm,颈部很短,尾部长15.5~17.5 Lm(图版N21)。

2.2 成熟卵的外部形态

中华乌塘鳢成熟卵呈圆球形,直径在600~670 Lm之间(图版N22)。黏着器(adhesion apparatus)位于动物极一端,由黏着丝(adhesive filament)、筛状圆柱体(cribriform column)和基底(basal plate)三部分组成,黏着器围绕着卵膜孔区(micropylar region)(图版N22,3)。

黏着丝最长可达600 Lm。筛状圆柱体高度为32~40 Lm,厚为8.7~9.0 Lm,有4~6层网状筛孔(cribriform perforation),筛孔短径为1.80~3.33 Lm,长径可达7 Lm(图版N24)。基底与卵膜连接处有1~2层开口较大的穿孔(perforation)。穿孔外径可达6~7 Lm,内径为3.5~4.5 Lm,孔道全长约25 Lm,宽为3.5~5.2 Lm(图版N25)。

卵膜孔区的正中央有一漏斗形的凹陷,为卵膜孔(micropyle)。卵膜孔可分为凹陷的前庭(vestibule)和管道状的卵孔管(micropylar canal)两部分。前庭直径为14~19 Lm,其外周与基底内缘相接,内周与卵孔管相连,卵孔管外周直径为3.5~6.2 Lm。卵孔管的内部开口即为受精孔(fertilized aperture),直径为1.8~2.2 Lm。前庭壁外口与基底连接处有12~16条由基底隆起而形成的嵴状结构,以卵膜孔为中心呈辐射状分布,称辐射嵴(radiate ridge)。辐射嵴在不同成熟卵之间数量和形态上有差异。辐射嵴延伸到筛状圆柱体底部,与其融合,形成一个以卵膜孔为中心的圆形嵴隆起,直径为48~58 Lm,包围整个卵膜孔区。各辐射嵴间组成若干个扇形区。辐射嵴高为2.3~3.5 Lm,长为14.7~19.0 Lm(图版N26)。

2.3 精子入卵过程

未受精卵的筛状圆柱体、基底以及卵膜孔区表面被絮状物(flocculent material)覆盖(图版O21)。受精后30 s,絮状物消失,但可以清晰地观察到卵膜孔被精孔细胞(micropylar cell)塞住(图版N21,6)。此时,个别精子已经到达卵膜孔附近,多数精子到达扇形区或正在通过穿孔和筛孔。穿孔处的精子密度比筛孔处的高。精子头部多数朝向卵膜孔(图版N26)。

受精后60 s,多个精子聚集在卵膜孔周围,已有精子进入卵孔管并将尾部留在卵膜孔外(图版O22),卵孔管开始闭合。受精后卵膜孔阻塞,多余的精子滞留在卵膜孔外面,尾部相互缠绕。精子间出现絮状粘性物质,形成了一个线团样的结构(图版O23)。

受精后120 s,卵膜孔区的精子开始解体,先是尾

部解体,而后是颈部和头部。卵膜孔被絮状物堵塞(图版O24)。

精子入卵的途径:从穿孔和筛孔进入卵膜孔区,再沿着扇形区到达漏斗状凹陷,最后进入卵膜孔。

3 讨论

中华乌塘鳢卵为粘性卵,当成熟卵产出遇到水后,表现出较强的粘性,使产出的卵子能粘附在某些固体支持物上完成孵化过程。此粘性来源于壳膜(或称胶膜)中的主要组成成分粘蛋白(或称糖蛋白)^[29]。观察发现,卵子在接触水后,黏着丝会粘结缠绕在一起,这种现象与其生活环境及生殖方式相适应,有助于隔离和吸附外界较大颗粒的碎屑,保证卵膜孔区的洁净。

蜥头鰕虎鱼具有和中华乌塘鳢相类似的黏着器结构和生活习性^[30~31]。据Giulianini等^[6,31]报道,蜥头鰕虎鱼卵子黏着丝紧紧地粘附在底质上,且缠绕在一起,一旦精子接触到黏着丝后会被粘附而无法游动,是精子入卵的主要障碍,认为蜥头鰕虎鱼卵子黏着丝下方的筛孔是精子到达卵膜孔的唯一路径。蜥头鰕虎鱼之所以具有很高的受精率(接近100%),是因为它的筛孔直径(2~7 Lm)较大,足够让精子穿过到达卵膜孔^[31]。中华乌塘鳢黏着器不仅有筛孔,而且还有穿孔,穿孔的孔径大于筛孔,更有利于精子进入卵膜孔区,受精率可达到99%^[32]。

位于卵膜表面的卵膜孔,是无顶体鱼类精子入卵的唯一通道。不同鱼类的卵膜孔区结构和卵膜孔形态结构不尽相同。玫瑰鲃(Barbus conchonius)^[7]、大银鱼(Protosalanx hyalocaranius)^[8]、金鱼(Carassius auratus)^[9]和大头丽脂鲤(Astyanax bimaculatus lacustris)^[33]的卵膜孔区具有放射状沟和嵴的特异结构。泥鳅(Misgurnus anguillicaudatus)^[10]卵膜孔区侧壁呈左涡旋状,尼罗罗非鱼(Tilapia nilotica)^[11]的卵膜孔区则略呈螺线状排列。黄鳝(Monopterus albus)^[12]、三角鲂(Megalobrama terminalis)^[13]和鲤鱼(Cyprinus carpio)^[14]卵膜孔区的侧壁无放射状沟嵴和涡旋状纹路,只呈现平滑漏斗状凹陷,怀头鲇(索氏六须鲶)(Silurus soldatovi)^[15~16]动物极有辐射嵴的构造。宋慧春等^[8]认为,卵膜孔区的沟嵴结构和螺旋状结构一样,为精子云集和导入精孔管提供了有利的条件,是一种不容忽视的机械动力因素。Amanze和Iyenga^[7]认为这种结构有利于捕获及引导精子,促进受精。陈军等^[16]认为怀头鲇辐射嵴间组成的扇形区域具有空间和方位的引导作用,可使精子以最佳路径和均等机会聚集到卵膜孔区,起加速受精的作用。中华乌塘鳢卵膜孔区也具有辐射嵴构造,以卵膜孔为中心的扇

形辐是受精早期大量精子积聚的区域。卵膜孔区的存在,扩大了卵膜孔收集精子的面积,使它成为/捕捉0精子的区域,由于卵膜孔区呈现放射状的结构,使得达到卵膜孔区的精子能优先被导引入精孔管^[8]。同时,卵膜孔有凹陷的前庭和管道状的精孔管两个构造,也起了引导和加速受精的作用^[8, 13]。

多数硬骨鱼类的卵孔管只允许一个精子通过,属于单精入卵单精受精。卵细胞受精孔口径与精子的大小是判断是否为单精受精的重要依据之一。中华乌塘鳢卵膜表面仅有一个受精孔,属单受精孔型。虽然卵孔管的外部开口直径为3.5~6.2 Lm,会出现多个精子同时聚集在卵孔处,但卵孔管的内部开口(受精孔),直径为1.8~2.2 Lm,仅够一个精子进入。而受精前,卵孔管中有精孔细胞的存在,受精后絮状物出现以及卵孔管的收缩,会阻止多余精子入卵,因此推测中华乌塘鳢为单精受精类型。精子和卵细胞之间的有效识别和成功结合是受精过程能发生的前提条件。Yamamoto^[34]研究鳑鲏鱼(*Rhooeus ocellatus*)、鯈鱼(*Sarcocheilichthys variegatus*)和矛鱊(*Acheilognathus lanceolatum*)等鱼类后指出,卵膜孔附近有一种小肽物质,能诱导精子入卵;革胡子鲶^[17](*Clarias lazera*)、怀头鮰^[15, 18]、尼罗罗非鱼^[11](*Oreochromis niloticus*)刚产出的成熟卵子精孔区内的絮状物,能吸引精子。张筱兰等^[19]发现黑鲷(*Sparus macrocephalus*)卵膜管内外也存在絮状物,不仅具有引诱精子入卵的作用,还具有遇水溶解、遇药物凝固的特性,并称之为前絮状物。前絮状物出现在精子入卵前,可能是一些小肽类的物质,具有激活精子和诱导精子入卵的功能。

在精子入卵之后,由皮质颗粒分泌可能含有皮质颗粒凝集素(cortical granule lectin)的胶状物质,涌向卵孔管外,遇水或药物凝聚成棉絮状,称为后絮状物,可使精子失去活性,阻止多余精子继续入卵,是构成受精屏障的重要物质之一^[19]。精子入卵后,卵周隙液流经卵孔管将多余的精子推出卵膜孔,在前庭外面形成球状结构,称之为受精塞(fertilization plug),这在大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)^[20-21]、施氏黄盖鲽(*Limanda schrenki*)^[22]、中华青鳉(*Oryzias latipes*)^[23]、印度斑马鱼(*Brachydanio rerio*)^[24]、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[25]、黑点青鳉(*Oryzias melastigma*)^[26]、革胡子鲶^[17]、怀头鮰^[16-18]、华鲮(*Sinilabeo rendahli*)^[27]和赤眼鳟(*Squaliobatus curriculus*)^[28]都有报道。

在同一种鱼类的精子入卵过程中,出现这两种功能迥然相悖的絮状物,目前仅见于黑鲷、鲶鱼、华鲮等。中华乌塘鳢除了有这两种絮状物的出现外,还观察到了卵孔管收缩现象,这和怀头鮰^[18]相似。前絮状物的

出现有助于诱导精子入卵,后絮状物及卵孔管的收缩都有助于阻止多精入卵。

参考文献:

- [1] 钟爱华, 李明云. 中华乌塘鳢的生物学特性及人工育苗研究进展[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2002, 21(3): 269- 272.
- [2] 李慧梅, 张丹, 施品华. 中华乌塘鳢胚胎及仔稚鱼胚发育的初步研究[J]. 海洋学报, 1987, 9(4): 480- 488.
- [3] 张健东, 叶富良. 中华乌塘鳢生物学及其养殖[M]//简明中国水产养殖百科全书. 北京: 中国农业出版社, 2001: 694- 702.
- [4] 阮锦水, 吴望星. 中华乌塘鳢胚胎发育研究[J]. 浙江水产学院学报, 1998, 17(4): 308- 313.
- [5] 李生, 肖锦平, 余忠明, 等. 中华乌塘鳢的育苗技术[J]. 上海水产大学学报, 1990, 8(1): 48- 52.
- [6] Giulianini P G, Ota D, Marchesan M, et al. Can goby spermatozoa pass through the filament adhesion apparatus of laid eggs[J]. Journal of Fish Biology, 2001, 58(6): 1750- 1752.
- [7] Amange D, Iyengar A. The micropyle: a sperm guidance system in teleost fertilization[J]. Development, 1990, 109(2): 495- 500.
- [8] 宋慧春, 吴坤明, 沈其璋, 等. 大银鱼卵膜孔结构的电镜观察[J]. 动物学报, 1999, 44(1): 8- 14.
- [9] 张天荫, 封树芒, 潘忠宗. 金鱼精子入卵过程的扫描电镜观察[J]. 动物学研究, 1993, 14(2): 166- 170.
- [10] 吴坤明, 沈其璋, 刘根洪. 泥鳅成熟卵受精孔涡旋状结构的研究[J]. 科学通报, 1991(15): 1175- 1178.
- [11] 黄永松. 尼罗罗非鱼成熟卵结构及精子入卵的早期电镜观察[J]. 动物学报, 1990, 36(3): 227- 230.
- [12] 周定刚, 温安祥. 黄鳝精子活力检测和精子入卵早期过程观察[J]. 水产科学, 2003, 27(5): 398- 402.
- [13] 王瑞霞, 张毓人, 傅仓生, 等. 鲻鱼受精早期精子入卵的扫描电子显微镜观察[J]. 水产学报, 1982, 6(4): 314- 320.
- [14] 潘光碧, 邹世平, 邹桂伟. 诱导鲤雌核发育时精子入卵的扫描电镜观察[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3): 28- 31.
- [15] 刘伟, 陈军, 潘伟志, 等. 怀头鮰成熟卵膜表面扫描电镜观察[J]. 动物学报, 2005, 51(5): 940- 946.
- [16] 陈军, 刘伟, 赵春刚, 等. 杂交鲶精子入卵扫描电镜观察[J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(3): 343- 346.
- [17] 郑文彪, 潘炯华, 安东, 等. 革胡子鲶受精过程的扫描电镜观察[J]. 动物学研究, 1991, 12(2): 111- 114.
- [18] 尹洪滨, 孙中武, 潘伟志. 索氏六须鲶受精早期精子入卵的扫描电镜观察[J]. 中国水产科学, 2000, 7(2): 1- 4.
- [19] 张筱兰, 从娇日, 姚斐, 等. 黑鲷(*Sparus macrocephalus*)成熟精、卵和精子入卵早期过程的初步观察[J]. 海洋湖沼通报, 1998(4): 62- 68.

- [20] Yamamoto K. Studies of the fertilization in the dog salmon^{on} (*Oncorhynchus keta*) (1). Morphology of normal fertilization [J]. *Fac Sci Hokkaido Univ (Ser VI, Zool)*, 1952, 11: 81- 94.
- [21] Kobayashi W, Yamamoto T S. Fine structure of the micropylar canal in the chum salmon egg, with a discussion of the mechanism for blocking polyspermy [J]. *J Exp Zool*, 1981, 217: 265- 275.
- [22] Yamamoto K. Studies of the fertilization in the egg of the flounder. II. The morphological structure of the micropyle and its behavior in response to sperm entry [J]. *Cytologia (Tokyo)*, 1952, 16: 302- 306.
- [23] Sakai Y T. Method for removal of chorion and fertilization of the naked egg in *Oryzias latipes* [J]. *Embryologia*, 1961, 5: 357- 368.
- [24] Hart N H, Donovan M. Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg cortex of *Brachyrhynchus reario* [J]. *Cell Tissue Res*, 1983, 265: 317- 328.
- [25] Kudo S, Sato A. Fertilization cone of carp eggs revealed by scanning electron microscopy [J]. *Dev Growth Differ*, 1985, 27: 121- 128.
- [26] Iwamatsu T, Onitake K, Matsuyama K, et al. Effect of micropylar morphology and size on rapid sperm entry into the eggs of medaka [J]. *Zool Sci*, 1997, 14: 626- 628.
- [27] 郑曙明, 吴青, 刘筠筠. 华鲮受精早期的电镜观察 [J]. 四川动物, 2006, 25(4): 822- 825.
- [28] 孙际佳, 郭云贵, 李桂峰, 等. 赤眼鳟精子入卵的扫描电镜观察 [J]. 中国水产科学, 2006, 13(5): 740- 744.
- [29] Segall G K, Lennarz W J. Chemical characterization of the component of the jelly coat from sea urchin eggs responsible for induction of the acrosome reaction [J]. *Dev Biol*, 1979, 71: 33- 48.
- [30] Ota D, Marchesan M, Ferrero E A. Sperm release behavior and fertilization in the grass goby [J]. *Journal of Fish Biology*, 1996, 49: 246- 256.
- [31] Giulianini P G, Ferrero E A. Ultrastructural aspects of the ovarian follicle and egg envelope of the seagrass goby *Zosterisessor ophiocephalus* (*Osteichthyes, Gobiidae*) [J]. *Ital J Zool*, 2000, 68: 29- 37.
- [32] 洪万树, 张其永, 陈仕玺, 等. 性激素诱发中华乌塘鳢(*Bostrichthys sinensis*)产卵的应用研究 [J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(6): 541- 547.
- [33] Rizzo E, Sato Y, Barreto B P, et al. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts [J]. *Journal of Fish Biology*, 2002, 61: 615- 632.
- [34] Yamamoto T. Physiology of fertilization in fish eggs [J]. *Int Rev Cytol*, 1961, 12: 361- 450.

Scanning Electron Microscopic Observations on Sperm Penetration of Micropyle in Chinese Black Sleeper (*Bostrichthys sinensis* Lacepede)

H E Zhen2bang, H ONG Wan2shu*, CHEN Sh2xi,

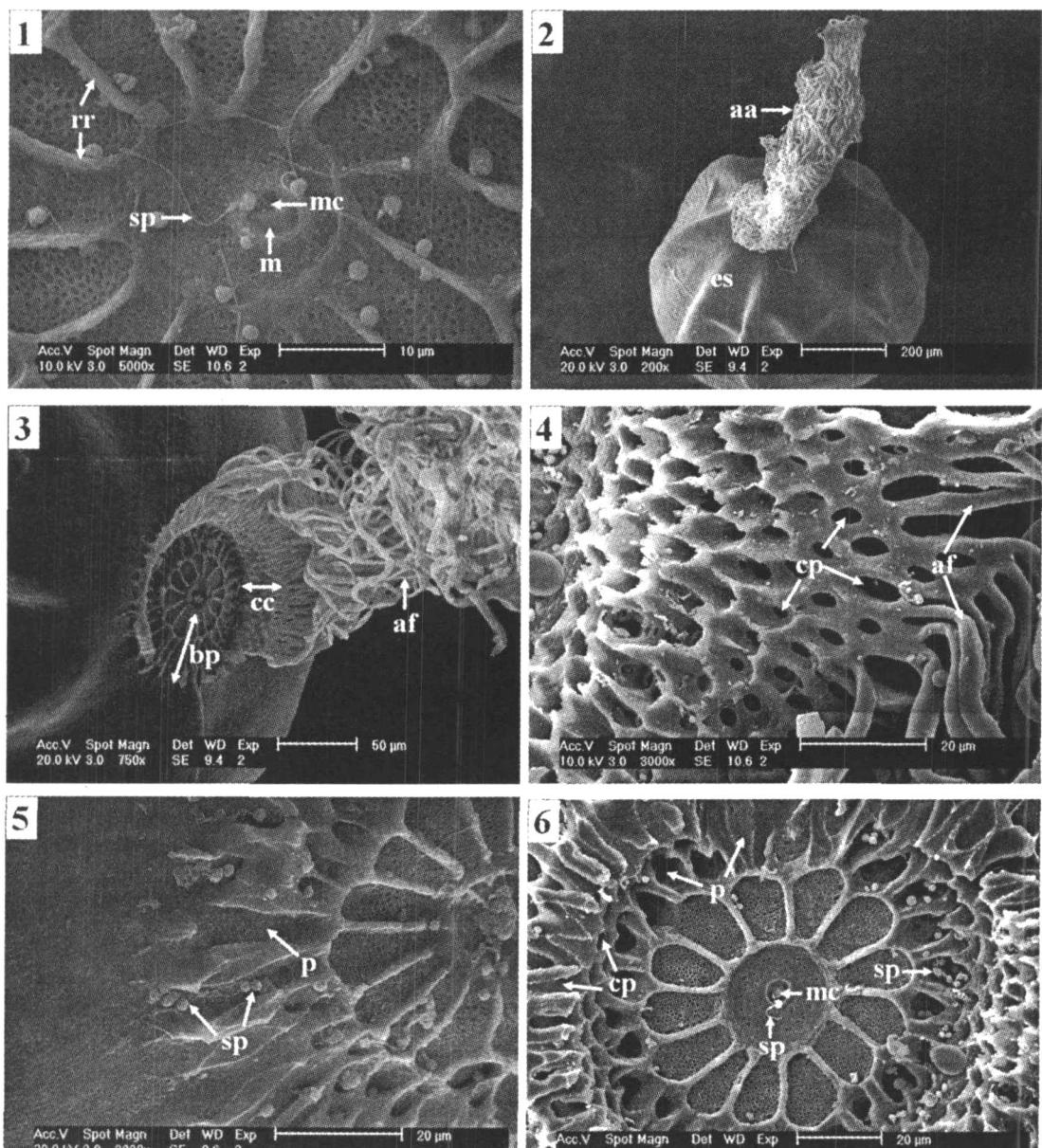
ZH ANG Q2yong, GE Wei, CHEN Yun2yun

(College of Oceanography and Environmental Science,

Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The scanning electron microscope was applied to observe the morphology of sperms and eggs as well as the process of sperm penetration of micropyle in Chinese black sleeper (*Bostrichthys sinensis* Lacepede). Spermatozoon, 17.0~19.0 Lm in length, was composed of a head, a short midpiece and a long flagellum. The mature egg was spherical in shape, with a diameter of 600~670 Lm. The micropyle was located at the centre of the filaments apparatus. The adhesion apparatus was composed of a basal plate, a cribriform column and a clump of adhesive filaments. Spermatozoa passed through the basal perforations and the cribriform perforations toward the micropylar. The micropyle was a funnel-shaped structure that consisted of a vestibule and a micropylar canal. Before fertilization, flocculent material spread on the basal plate, micropylar region and miropyle. As soon as sperm attached to the oocyte plasma membrane, the flocculent material disappeared, but micropyle was plugged by micropylar cell. After sperm entered the micropylar canal, the micropylar cell disappeared. The micropyle was plugged by flocculent material after fertilization.

Key words: *Bostrichthys sinensis*; sperm penetration; micropyle; fertilization; adhesive filaments



图版N 中华乌塘鳢精子及成熟卵的形态结构

Plate N Morphology of sperm and mature egg

1. 中华乌塘鳢精子形态、卵膜孔区结构及精孔细胞(受精后 30 s)

Morphology of sperm, micropylar region and micropylar cell

2. 中华乌塘鳢成熟卵及其黏着丝的外部形态

External morphology of mature egg and adhesive filaments

3. 黏着器及卵膜孔区的形态结构(打开黏着器观察)

Structure of adhesion apparatus and micropylar region of an opened&up adhesion apparatus

4. 篦状圆柱体的网状筛孔

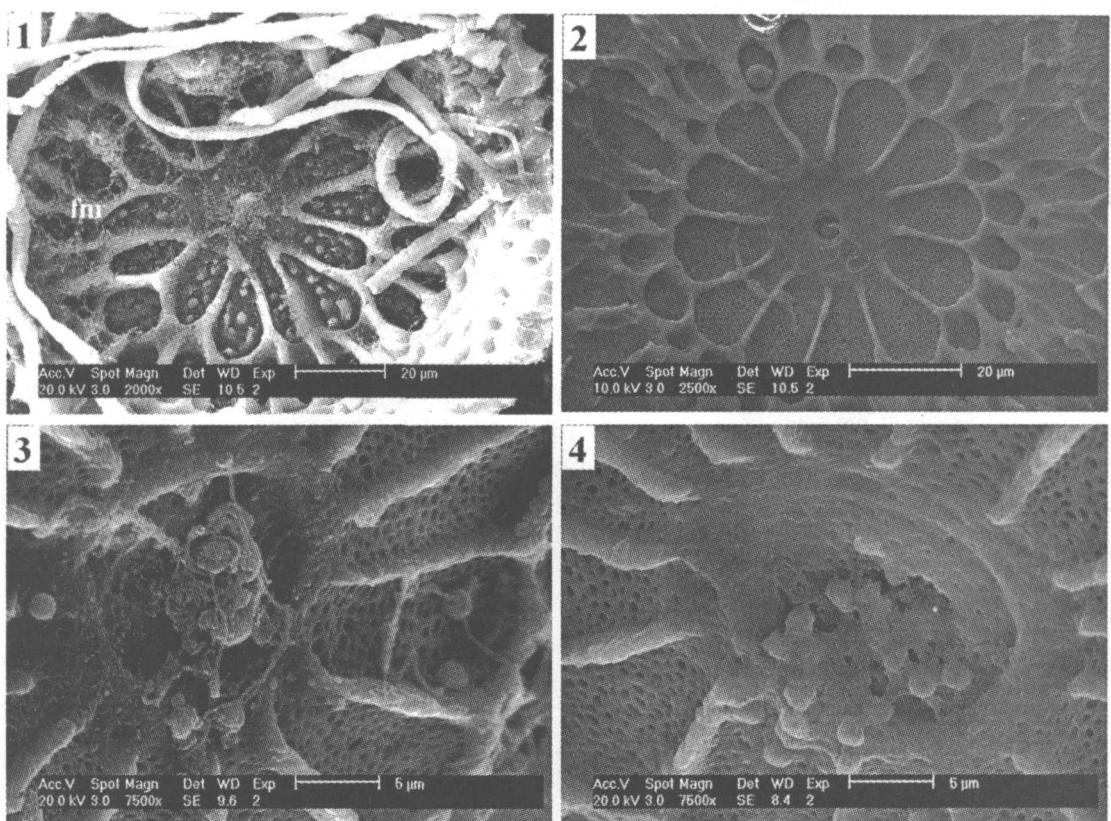
Netted cribriform perforations of cribriform column

5. 基底穿孔, 示精子通过穿孔进入卵膜孔区

Showing sperms entering the micropylar region along the basal plate pores

6. 示辐射嵴和扇形区. 受精后 30 s, 个别精子已经到达卵膜孔附近, 多数精子到达扇形区或正在穿越穿孔和筛孔

30 s after fertilization, some sperms approaching the micropyle, most of sperms passing through the basal plate pores



图版0 中华乌塘鳢精子入卵过程

Plate 0 Process of sperm penetration

1. 未受精卵中, 篩状圆柱体、基底以及卵膜孔区表面被絮状物覆盖

Before fertilization, the cribriform column, basal plate and micropylar region were covered by flocculent material

2. 受精后 60 s, 精子进入卵孔管

60 s after fertilization, spermatozoan penetrating the micropylar canal

3. 精子入卵后, 多余的精子在卵膜孔的前庭处聚集, 絮状粘性物质已形成了一个线团样的结构

60 s after fertilization, redundant sperms pliling up around the micropylar vestibule

4. 受精后 120 s 后, 精子开始解体

120 s after fertilization, sperms began to break down

aa: adhesion apparatus 黏着器;

af: adhesive filaments 黏着丝;

bp: basal plate 基底;

cc: cribriform column 篩状圆柱体;

cp: cribriform perforation 篩孔;

es: egg surface 卵膜表面;

fm: flocculent material 絯状物;

m: micropyle 卵膜孔;

mc: micropylar cell 精孔细胞;

p: perforation 穿孔;

rr: radiate ridge 辐射嵴;

sp: sperm 精子.