

云纹石斑鱼(♀)×七带石斑鱼(♂)受精过程的观察

李炎璐^{1,2}, 王清印^{1,2}, 陈超^{1,2}, 宋振鑫^{1,2}, 吴雷明^{1,2}, 贾瑞锦^{1,2}, 王晓梅³, 李文升³

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 3. 莱州明波水产有限公司, 山东 烟台 261418)

摘要: 为研究杂交过程中精卵的结合以及相关生物学特征, 作者利用扫描电镜观察了云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)卵子形态结构以及云纹石斑鱼♀×七带石斑鱼(*E. septemfasciatus*)♂杂交时的精子入卵过程。结果发现, 云纹石斑鱼(♀)×七带石斑鱼(♂)杂交与亲本自交的精子入卵过程没有本质的区别。云纹石斑鱼卵表面布满纵横交错、走向不确定的网纹, 在受精孔区可观察到前庭、受精孔和微小孔。成熟的精卵相遇时相互激活, 产生一系列胞间反应。受精后 0~25 s, 可观察到精子附着在卵子受精孔周围; 受精 30~45 s, 已有精子进入卵子, 并且明显可见精子尾部留在受精孔外; 精子入卵后, 受精孔内有受精锥形成, 周围可观察到絮状的受精塞, 将受精孔封闭; 授精 90 s~3 min, 卵表面处于修复状态。整个过程未发现有多精入卵的现象。

关键词: 云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)(♀); 七带石斑鱼(*E. septemfasciatus*)(♂); 杂交; 精子入卵; 扫描电镜
中图分类号: S917.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2014)04-0039-05
doi: 10.11759/hyxx20130124001

国内外有关利用扫描电镜对鱼类卵子结构及其受精过程的形态学观察已有不少报道^[1-12]。主要研究内容是对鱼的卵子结构、受精孔及其周围的形状、结构的观察以及精卵激活发生的一系列反应、精子如何进入受精孔, 并对受精前后精卵的变化等过程进行了较为详细的描述。

近年来, 在海水养殖过程中应用人工杂交技术开展石斑鱼种间杂交的研究已有不少报道, 但有关其精子入卵过程的研究还未见报道。云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)和七带石斑鱼(*E. septemfasciatus*)同属于鲈形目(Perciformes)、鲷科(Serranidae)、石斑鱼亚科(Epinephelinae)、石斑鱼属(*Epinephelus*), 云纹石斑鱼具有生长快、肉质好、耐高温、可在中国南方养殖的特性; 七带石斑鱼具有耐低温特性, 是可在北方沿海开展养殖生产的优良品种^[13-17]。作者以云纹石斑鱼(♀)和七带石斑鱼(♂)为材料进行杂交^[18], 并利用扫描电镜观察了云纹石斑鱼卵子形态结构以及云纹石斑鱼(♀)×七带石斑鱼(♂)的精子入卵过程, 分析了杂交过程中精卵的结合以及相关生物学特征, 为阐明石斑鱼种间杂交的受精生物学过程提供基础依据。

1 材料与方 法

1.1 取材

试验材料于 2011 年 6 月 13 日取自莱州明波水

产有限公司, 挑选性腺成熟饱满的 5~6 龄云纹石斑鱼亲鱼母本与 4~5 龄七带石斑鱼亲鱼父本进行人工授精, 受精卵孵化温度为 21~22.5℃。

1.2 样品的固定

精卵混合后每间隔 5 s 取样 1 次, 至混合后 3 min, 所取样品用 5%的戊二醛固定, 次日, 更换一次固定液, 置于 4℃冰箱保存。

取 1 mL 已激活的七带石斑鱼精液, 用等体积的 5%的戊二醛固定, 置于 4℃冰箱保存。

1.3 样品的制备

将固定的样品用磷酸缓冲液冲洗, 经酒精系列脱水, 加入乙酸异戊酯进行置换, 放入型号为 Eiko.Model No.DX-1 的零界点干燥仪中干燥, 经 Eiko IB-3 型离子溅射仪喷金后, 于 JEOL JSM-840 型扫描电镜下观察和拍照。精子扫描电镜样品的制备方法与受精卵相同。

收稿日期: 2013-01-24; 修回日期: 2013-07-16

基金项目: 科技部国际合作项目(2012DFA30360); 国家科技支撑项目(2011BAD13B01)

作者简介: 李炎璐(1986-), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, 电话: 0532- 85844459, E-mail: ysfriilianlu@126.com; 陈超, 通信作者, 电话: 0532- 85844459, E-mail: ysfriichenchao@126.com

2 结果

2.1 云纹石斑鱼卵子的形态结构

云纹石斑鱼(♀)×七带石斑鱼(♂)杂交的成熟卵子呈圆球形,无色透明,浮性,卵径(862.7±31.2) μm。卵膜包被于卵子外层,卵表面凹凸不平,布满纵横交错、走向不确定的网纹,网纹较浅(图 1-1)。在扫描电镜下可观察到卵膜表面有一个较小、较浅的凹陷区域,为精孔区,呈漏斗状;在凹陷区域中央位置的是受精孔(Micropyle),受精孔完全敞开(图 1-2,图 1-3);周围有呈放射状排列的微小孔(Micropore);受精孔是穿过卵膜的管状结构,称为精孔管,管道上粗下细,管壁呈环纹螺旋状。

2.2 七带石斑鱼精子的形态结构

七带石斑鱼精子(图 2-1,图 2-2)由头部和尾部两部

分组成。头部无顶体,呈椭圆形,头部前端主要分布有高电子密度染色质的球形细胞核,细胞核由核膜包围,将其与细胞质分开;头部后端是由质膜包围的延伸至后部袖套结构,其中分布有线粒体、中心粒复合体和囊泡等。尾部(鞭毛)细长,与头部细胞核紧密连接,主要结构为轴丝,轴丝与鞭毛间的质膜空隙狭窄,仅有少量细胞质^[19]。

2.3 精子入卵过程的观察

精子与卵子接触,卵子本身发生一系列的变化。卵子的变化主要表现为受精膜举起及皮层反应。精子与卵子表面接触后,与卵子表面的受体相结合,并激发卵黄膜举起。卵黄膜举起变成受精膜,受精膜尽管没有增厚,但由软变硬。皮层颗粒胞吐时,没有方向性。胞吐的介质形成不规则棘状突起。

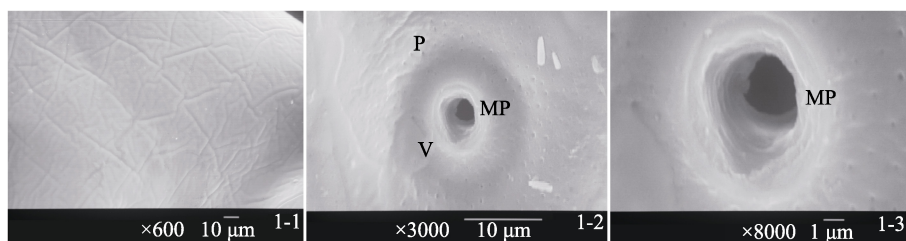


图 1 云纹石斑鱼卵子

Fig.1 Mature egg of *E.moara*

1-1. 云纹石斑鱼卵子表面布满网纹 ×600; 1-2. 卵子受精孔区 ×3000, 图示前庭、受精孔和微小孔; 1-3. 受精孔 ×8000; MP. 受精孔; V. 前庭; P. 微小孔

1-1. reticular surface of chorion of *E.moara* ×600; 1-2. vestibule, micropyle and micropore of *E.moara* ×3000; 1-3. micropyle of *E.moara* ×8000; MP. micropyle; V. vestibule; P. micropore

从扫描电镜的结果发现,精子入卵的过程大致可分为 4 个阶段:即卵膜对精子的吸引、精子对内膜的锚定、精核的进入和受精孔封闭等。精子入卵的速度很快。授精后 0~25 s,可观察到精子附着在卵子受精孔周围(图 2-3);授精 30~45 s,已有精子进入卵子,明显可见精子尾部留在受精孔外(图 2-4);精子入卵后,授精 50~60 s,卵表面的微绒毛将精子的头部包裹,形成受精锥(图 2-5),可协助精子入卵,周围可观察到呈絮状的受精塞,将受精孔封闭(图 2-6);授精 70~80 s,受精孔周围呈蜂窝状,并可看到大小不一的分泌物(图 2-7);授精 90 s~3 min,卵表面处于修复状态,逐渐变平坦(图 2-8)。整个过程未发现有多精入卵的现象。

3 讨论与结论

3.1 异源精卵的相互识别与结合

精卵的相互识别与结合是受精过程发生的前提

条件,其实质是性细胞表面的糖蛋白及其受体的相互作用。据报道,在一些双壳类如牡蛎(*Concha ostreae*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)和珍珠贝(*Pinctada*)等的远缘杂交中,受精一般没有问题^[20]。本实验也可正常受精,说明异源精卵能够互相识别,其机理可能是异源精卵接触后,精卵表面的识别分子间启动了一系列复杂的分子水平上的变化,精子结合素与受体蛋白之间相互诱导,造成蛋白质构象的变化,使结合素与受体紧密结合。异源精卵相互识别机制的深入研究,将有助于对远缘杂交的认识和更广泛深入的利用。

从染色体组型方面来看,云纹石斑鱼与七带石斑鱼染色体数目均为 $2n = 48$,但在核型上存在一定差异。七带石斑鱼染色体的核型为 $2n=48t$, $NF=48$,属于原始类群,染色体均为单臂染色体^[21];云纹石斑鱼染色体的核型为 $2n = 2st + 46t(st, \text{亚端着丝粒})$

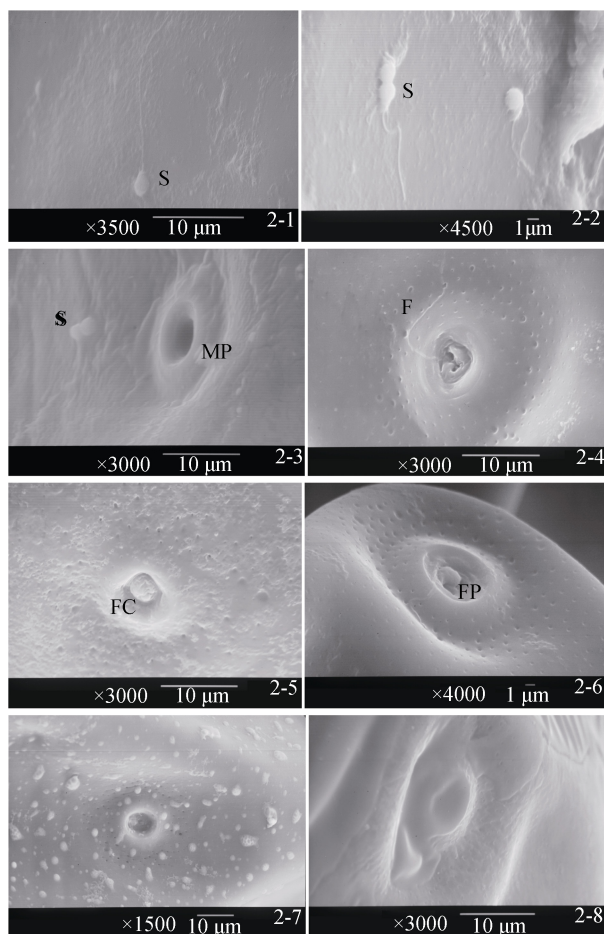


图 2 七带石斑鱼精子及精子入卵过程

Fig.2 Sperm and initial stages of penetration of *E. Septemfasciatus*

2-1.七带石斑鱼精子 ×3500; 2-2.精子附卵 ×4500; 2-3.精子附着在卵子受精孔周围 ×3000; 2-4.精子入卵,尾部留在受精孔外 ×3000; 2-5.受精孔内的受精锥 ×3000; 2-6.受精塞将精子堵在受精孔处 ×4000; 2-7.受精孔周围呈蜂窝状的分泌物 ×1500; 2-8.卵表面开始修复 ×3000;F.鞭毛; FC.受精锥; FP.受精塞; S.精子

2-1.appearance of sperm of *E. Septemfasciatus* ×3500; 2-2.sperm attaching to the egg ×4500; 2-3.sperm attaching to the micropyle ×3000; 2-4. the spermatozoon entering into the egg and the flagellum from outside of micropyle ×3000; 2-5. fertilization cone in the micropyle ×3000; 2-6. the spermatozoon being block out of the micropyle by fertilization plug ×4000; 2-7. the egg surface looked like a honeycomb ×1500; 2-8. the egg surface begin to repair ×3000;F. flagellum; FC. fertilization cone; FP. fertilization plug; S. sperm

染色体; t, 端着丝粒染色体), 染色体臂数 $NF = 50$, 属于特化类群, 有 1 对特征性的双臂染色体^[22]。据有关报道, 鱼类杂交育种中核型越相近杂交成功的可能性越大^[23]。在本实验中, 云纹石斑鱼与七带石斑鱼虽属不同类群, 但杂交依然成功, 说明云纹石斑鱼与七带石斑鱼具有相近的亲缘关系。

3.2 云纹石斑鱼(♀)×七带石斑鱼(♂)精子入卵过程的特点

云纹石斑鱼卵壳膜表面布满纵横交错、走向不

确定的网纹结构, 并且均匀分布着微小孔, 微小孔内未发现其他物质。大量研究表明, 多数硬骨鱼类的卵表面均有微孔分布^[24], 但不同鱼种的卵表面形态和结构具有一定差异, 例如金鱼(*Carassius auratus*)卵动物极壳膜表面有 5~10 条宽度不一的沟和脊, 并向卵膜孔汇集^[7]; 鲃鱼(*Barbus conchoniuis*)卵膜孔区也有 7~10 条沟和脊的特异结构, Amanze^[25]指出精子一旦位于该区, 其受精率就能提高到 99.7%, 这种结构可能与数学物理的动力因素有关, 为精子集中于卵膜孔区提供了有利条件; 赤眼鲮(*Squaliobarbus curriculus*)卵表面平滑光洁, 除了均匀分布着微小孔外, 无明显的沟或嵴^[10]。

扫描电镜观察显示, 云纹石斑鱼(♀)×七带石斑鱼(♂)的受精过程中精子入卵是相当迅速的, 在授精 30 s 后已有精子开始进入, 授精 60 s 受精孔完全被堵塞, 因此, 在做人工授精时操作要迅速。云纹石斑鱼(♀)×七带石斑鱼(♂)的受精与其他硬骨鱼一样, 精子是通过卵子独有的一个卵膜孔入卵。有学者认为, 卵膜孔区有一种小肽物质能吸引精子进入^[26]; Laale^[27]认为精子是被卵膜孔释放的一种物质吸引入卵的。整个受精过程未发现有多精入卵的现象。据报道其原因是精孔管内孔直径比精子头部直径略大, 只能允许一个精子进入, 这一特点保证了单精受精, 第一个精子入卵后精孔管内立刻形成有一团絮状物质, 能堵塞受精孔, 阻止其他精子的进入^[1, 8, 28-37], 是保证单精入卵的有力屏障。受精锥是在精子入卵处形成的形状不同的细胞质突起, 并不是所有鱼类的受精过程都会出现受精锥。吴莹莹^[35]等发现大菱鲆(*Psetta maxima*)的精子入卵时会形成受精锥; Kudo^[2]发现鲤鱼(*Cyprinus carpio*)在精子入卵时有受精锥的形成; 张天荫等^[7]在鳙鱼(*Hypophthalmichthys nobilis*)精卵结合过程未观察到明显的受精锥; 孙际佳^[10]等观察赤眼鲮精卵结合过程的观察中也未发现有明显的受精锥形成。

参考文献:

- [1] Brummett A, Dumont J. Initial stages of sperm penetration into the egg of *Fundulus heteroclitus*[J]. Journal of Experimental Zoology, 1979, 210(3): 417-433.
- [2] Kudo S. Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg[J]. Growth Diff, 1980, 22(3): 403-414.
- [3] Hart N H, Yu S F. Cortical granule exocytosis and cell

- surface reorganization in eggs of *Brachydanio rerio*[J]. *Zool*, 1980, 213(1): 137-157.
- [4] Ohta T, Iwamatsu T. Electron microscopic observations on sperm entry into eggs of the rose bitterling, *Rhodeus ocellatus*[J]. *Zool*, 1983, 227(1): 109-119.
- [5] Wolenski T, Hart N. Scanning electron microscope studies of sperm incorporation into the zebrafish *Brachydanio* eggs[J]. *Zool*, 1987, 243: 259-273.
- [6] Kobayashi W, Yamamoto T S. Light and electron microscopic observation of sperm entry in the chum salmon egg[J]. *Zool*, 1987, 243(2): 311-322.
- [7] 张天荫, 封树芒, 潘忠宗, 等. 鳙鱼受精早期扫描电镜观察[J]. *动物学报*, 1991, 37(3): 293-296.
- [8] 高洪娟, 张天荫, 刘廷礼, 等. 金鱼卵的皮层反应[J]. *山东大学学报(自然科学版)*, 1996, 31(1): 82-89.
- [9] 陈军, 刘伟, 赵春刚, 等. 杂交鲢精子入卵扫描电镜观察[J]. *吉林农业大学学报*, 2004, 26(3): 343-346.
- [10] 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): 740-743.
- [11] 王永玲, 杨彩根, 宋学宏, 等. 黄颡鱼精子入卵的扫描电镜观察[J]. *淡水渔业*, 2007, 37(4): 41-44.
- [12] 何振邦, 洪万树, 陈仕玺, 等. 中华乌塘鳢精子入卵过程的扫描电镜观察[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2009, 48(1): 128-133.
- [13] Nagano N, Hozawa A, Fujiki W, et al. Skeletal development and deformities in cultured larval and juvenile seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*(Thunberg)[J]. *Aquacult Res*, 2007, 38(2): 121-130.
- [14] 王新安, 马爱军, 陈超, 等. 七带石斑鱼两个野生群体形态差异分析[J]. *海洋与湖沼*, 2008, 39(6): 655-660.
- [15] 陈超, 赵明, 柳学周, 等. 七带石斑鱼胚胎及仔稚鱼形态观察[J]. *渔业科学进展*, 2011, 32(5): 24-31.
- [16] 程波, 陈超, 王印庚, 等. 七带石斑鱼肌肉营养成分分析与品质评价[J]. *渔业科学进展*, 2009, 30(5): 51-57.
- [17] 谢菁, 区又君, 李加儿, 等. 七带石斑鱼胚体和卵黄囊期仔鱼的发育[J]. *海洋通报*, 2009, 28(2): 41-49.
- [18] 李炎璐, 王清印, 陈超, 等. 云纹石斑鱼(♀)×七带石斑鱼(♂)杂交子一代胚胎发育及仔稚幼鱼形态学观察[J]. *中国水产科学*, 2012, 19(5): 1-12.
- [19] 廖光勇, 区又君, 李加儿, 等. 七带石斑鱼精子的超微结构[J]. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(1): 71-75.
- [20] 陈来钊, 王子臣. 温度对海湾扇贝与虾夷扇贝及其杂交受精、胚胎和早期幼体发育的影响[J]. *大连水产学院学报*, 1994, 9(4): 1-9.
- [21] 钟声平, 陈超, 王军, 等. 七带石斑鱼染色体核型研究[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(1): 150-155.
- [22] 郭丰, 王军, 苏永全, 等. 云纹石斑鱼染色体核型研究[J]. *海洋科学*, 2006, 30(8): 1-3.
- [23] 王祖熊, 张锦霞. 鱼类杂交不亲和性的研究[J]. *水生生物学报*, 1986, 10(2): 171-179.
- [24] 洪一江. 兴国红鲤成熟卵子卵膜的扫描电子显微镜观察[J]. *江西大学学报(自然科学版)*, 1990, 14(3): 97-102.
- [25] Amanze D, Iyengar, A. The micropyle: a sperm guidance system in teleost fertilization[J]. *Development*, 1990, 109(2): 495-500.
- [26] Yamamoto T. Physiology of fertilization in fish egg[J]. *Inter Reu Cytol*, 1961, 12: 361-405.
- [27] Laale H W. The perivitelline space and egg envelopes of bony fishes: A review[J]. *Copcia*, 1980, 2: 210-226.
- [28] Hart N, Donovan M. Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg of *Brachydanio*[J]. *Zool*, 1983, 227(2): 277-296.
- [29] 王瑞霞, 张毓人, 傅仑生, 等. 鲂鱼受精早期精子入卵的扫描电镜观察[J]. *水产学报*, 1982, 6(4): 313-320.
- [30] Hart NH. Fertilization in the teleost fishes: mechanisms of sperm egg interaction[J]. *Int Rev Cytol*, 1990, 121: 1-66.
- [31] 黄永松. 尼罗罗非鱼成熟卵结构及精子入卵早期电镜研究[J]. *动物学报*, 1990, 36(3): 227-230.
- [32] 郑文彪, 潘炯化, 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): 111-115.
- [33] Ginsberg A. Sperm egg association and its relationship to the activation of the egg in salmonid fishes[J]. *Morpho*, 1963, 1(1): 13-33.
- [34] 高令秋. 泥鳅精子入卵程序的扫描电镜观察[J]. *武汉大学学报(自然科学版)*, 1995, 41(6): 741-744.
- [35] 吴莹莹, 柳学周, 王清印. 大菱鲆成熟精子、卵子及精子入卵早期过程的电镜观察[J]. *渔业科学进展*.

2012, 33(3): 42-47.

62-68.

[36] 张筱兰, 丛娇日, 姚斐, 等. 黑鲷成熟精、卵和精子入卵早期过程的初步观察[J]. 海洋湖沼通报, 1998, 4:

[37] 黄树庆, 阎淑珍. 黄海太平洋鲱受精前后卵膜的动态变化[J]. 青岛海洋大学学报, 1997, 27(2): 196-202.

Observation of the fertilization process of F₁ by *Epinephelus moara* (♀)×*E. septemfasciatus*(♂)

LI Yan-lu^{1, 2}, WANG Qing-yin^{1, 2}, CHEN Chao^{1, 2}, SONG Zhen-xin^{1, 2}, WU Lei-ming^{1, 2}, JIA Rui-jin^{1, 2}, WANG Xiao-mei³, LI Wen-sheng³

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Fisheries and Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Laizhou Mingbo Fisheries Limited Company, Yantai 261418, China)

Received: Jan., 24, 2013

Key words: *Epinephelus moara* (♀); *E.septemfasciatus*(♂); crossbreeding; sperm penetration; scanning electron microscopy

Abstract: To study the sperm penetration during hybrid process and the biological characteristics, the morphology of mature egg of *Epinephelus moara* and the fertilization process of F₁ by *E.moara* (♀)×*E.septemfasciatus*(♂) were observed by using scanning electron microscopy. The results showed that there were no significant differences in the process of fertilization between crossbreeding and inbreeding of these two species. Some reticulate structures with Criss-cross and uncertain towards were found on the outer chorionic surface of *E.moara*. Vestibule, micropyle and micropore can be observed in the micropyle area. When the mature eggs and sperms encountered, they activated mutually and caused a series of responses. During 0~25 seconds post insemination, sperm attaching to the micropyle of mature egg was observed; during 30~45 seconds post insemination, the spermatozoon entering into the egg and the flagellum from the outside of micropyle were observed; The fertilization cone was formed in micropyle after the spermatozoon entered into the egg, and the fertilization plug was observed around the fertilization cone, and close to the micropyle. During 90 seconds~3 minutes post insemination, the egg surface began to repair. The polyspermy was not observed during the crossbreeding insemination.

(本文编辑: 谭雪静)