

鳊鱼卵母细胞发育的组织学和超微结构观察

林国辉¹, 方展强²

(华南师范大学 1. 分析测试中心; 2. 生命科学学院, 广东广州 510631)

摘要:对鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)卵巢中的卵母细胞发育的组织学和超微结构进行观察. 按照其生理结构特征将其发育过程分为6个阶段. 卵膜在卵母细胞发育III时相形成, 包括鞘膜、放射膜和卵黄膜. 结果还讨论了鳊鱼卵黄颗粒的发生以及与卵膜形成的关系.

关键词:卵母细胞; 发育; 组织学; 超微结构; 鳊鱼

中图分类号: Q959.499 **文献标识码:** A

HISTOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL OBSERVATION ON THE DEVELOPMENT OF OOCYTES OF SINIPERCA CHUATSI

LIN Guo-hui¹, FANG Zhan-qiang²

(1. Center of Analysis and Test South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

2. School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Histology and ultrastructure of the development of oocytes in female mandarin fish, *Siniperca chuatsi* were investigated in this study. The results indicate that the development of oocytes of mandarin fish is divided into six consequent phases according to their characteristic of physiological structure. Chorion is formed in phase III oocyte which include thecal membrane, radial membrane and yolk membrane. The relationship between the yolk granules and chorion formation in oocyte are also discussed.

Key words: oocytes; development; histology; ultrastructure; *Siniperca chuatsi*

鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)俗称桂花鱼, 属鲈形目, 鲈科, 鳊属. 在我国, 鳊属鱼类资源丰富, 自然水域中包括近20个品种. 鳊鱼肉质鲜美, 营养丰富, 人工养殖获较大的经济效益^[1-2]. 对鳊鱼生物学特性的研究已作了许多报道, 相继解决了鳊鱼的亲鱼培育、人工催产孵化、苗种培育等技术问题, 实现了大批量的鱼苗生产^[3-5]. 已经报道对鳊鱼肝脏和精巢的组织学和超微结构的研究^[6-7], 对于鳊鱼卵巢结构及其发育的组织学观察也已有报道^[8-9], 但对卵母细胞发育的超微结构研究尚未见报. 本文通过对鳊鱼卵母细胞的组织学结构和生长发育过程的光镜和

收稿日期: 2006-06-27

基金项目: 广东省科技计划资助项目(2004B40101015); 农业部渔业生态环境重点开放实验室和广东省渔业生态环境重点实验室开放基金资助项目(2005-9)

作者简介: 林国辉(1960-), 男, 广东揭阳人, 华南师范大学高级实验师, Email: hxf@scnu.edu.cn

透射电镜观察,分析和探讨鳊鱼卵母细胞各时相的形态特征以及卵膜发生、卵黄形成的过程和机制,结果如下.

1 材料与方法

1.1 实验动物

鳊鱼采自省级南海鳊鱼良种场.在鳊鱼的性成熟阶段(3月~5月,华南地区的春季时节)先后获得 16 条成熟的雌性鳊鱼,以便取得各个不同发育阶段的卵细胞.鱼的体长为 25~30 cm,体质量 500~600 g.性腺成熟系数按 $GSI = \text{性腺重} / \text{体重} \times 100\%$ 计算.并计算其怀卵量.

1.2 组织切片制样

活体取出卵巢组织小块,切成 2 mm^3 大小的块状,用生理盐水冲洗后投入波恩氏液中固定 24 h 以上.较大的卵母细胞则逐粒挑散后用解剖针刺穿细胞膜,使固定液能渗入卵细胞内部.然后用乙醇逐级脱水,经二甲苯透明,54 °C 石蜡包埋,连续切片制成 $7 \mu\text{m}$ 的切片,HE 染色,凝胶树脂封片后在显微镜下观察拍照.

1.3 透射电镜制样

取卵巢组织小块经质量分数(下同)为 3% 的戊二醛固定 24 h. 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH = 7.4) 冲洗,置 1% 锇酸后固定,再用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH = 7.4) 冲洗,然后用各级乙醇逐级脱水,包埋、定位、超薄切片、染色,最后置 FEI-Tecnai2 型透射电镜下观察并拍照.

2 结果

本实验被检查的雌性个体其平均成熟系数 (GSD) 为 5.8% 左右,怀卵量 7.2 万粒 /kg. 鳊鱼卵母细胞发育及卵膜发生的一般组织和超微结构的观察结果如下.

2.1 卵母细胞的发育特征

鳊鱼卵巢位于腹腔背部消化管之上,由卵巢系膜悬于腹腔背壁,左右各一,末端愈合开口于泄殖窦.卵巢外腹膜内包被一层结缔组织膜,并从卵巢壁向卵巢腔延伸形成卵巢板 (ovarian lamellae),内有微血管分布,可观察到红血球和扁平的内皮细胞及其它结缔组织;卵巢板内含有各种形态的卵细胞(图版 II-8).鳊鱼卵母细胞发育各个时相的形态特征明显,将其分为 6 个时相,各时相卵母细胞发育的组织学形态和超微结构特点如下.

I 时相 I 时相的卵母细胞是刚刚由卵巢生殖上皮细胞分裂而形成的,因此又称之为卵原细胞.卵原细胞成群地分布在卵巢基质中.早期的卵原细胞呈圆形,细胞器较少,内部结构染色分辨不明显.位于中央的细胞核圆形,染色较深(图版 II-8). I 时相卵母细胞胞径 $5 \sim 20 \mu\text{m}$.

II 时相 从 I 时相到 II 时相卵母细胞体积迅速增大,形状开始变得不规则,细胞质染色深,核圆形,数个核仁分布于核边缘,由卵原细胞过渡为初级卵母细胞(图版 II-8). II 时相的卵母细胞其胞质内线粒体开始增多,并聚集成团,形成染色很深的卵黄核 (yolk nucleus) 结构.在 II 时相末,卵母细胞外出现了一层扁平的滤泡膜,滤泡细胞呈梭形.胞质中开始出现卵黄泡(图版 I-1).卵黄泡也称为液泡或泡内卵黄,卵黄泡内是电子致密度较低的絮状物,在光镜下

可观察到核内染色体已经解体,核膜开始溶解,而部分絮状染色质游离在核区内;细胞基质出现局部松弛,形成“空洞”,将成为卵黄泡. II时相的卵母细胞卵径 20~200 μm .

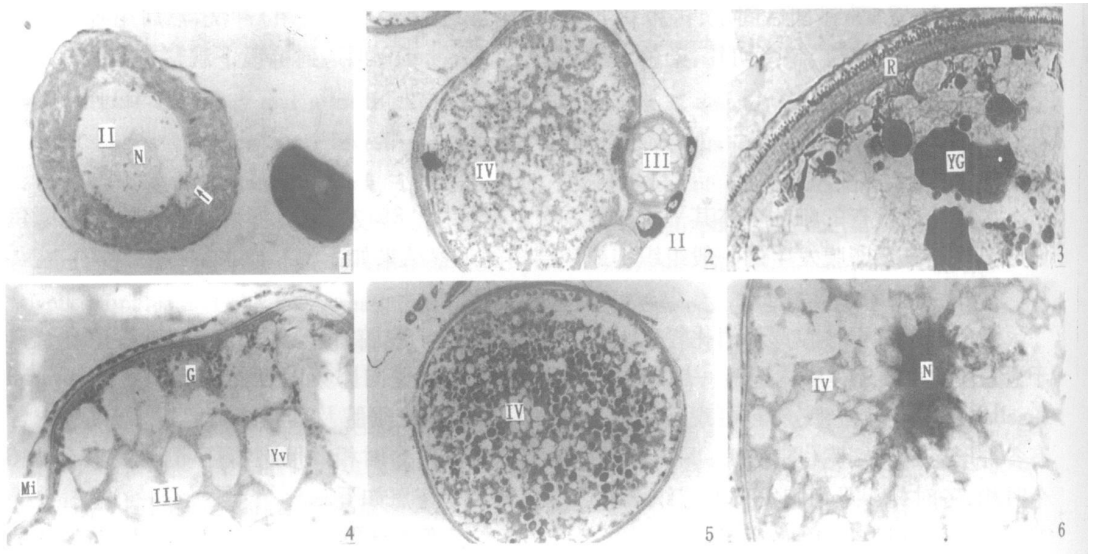
III时相 III时相的卵母细胞开始进入大生长期早期阶段,卵径 200~500 μm ,胞体呈规则的圆形或椭圆形. 在初积脂肪时期,卵母细胞胞质内液泡数量增多(图版 I-2),滤泡膜双层,在质膜与滤泡膜之间已形成放射膜. 进入初积卵黄时期,胞质内液泡数量进一步增多,卵内出现有少量的卵黄颗粒,内层滤泡细胞呈椭圆形(图版 I-3).

IV时相 IV时相卵细胞是处于大生长期晚期的初级卵母细胞,其明显的特征是卵黄颗粒充满胞质空间,这时卵细胞个体迅速增大,卵径在 900 μm 左右. 按照细胞的大小和形态变化,可将其分为早、中、晚 3期.

在早期阶段,卵黄颗粒基本上处于细胞膜附近(图版 I-2),这也是卵黄颗粒外源形成所产生的结果. 放射膜在这个阶段继续增厚.

中期阶段,卵黄颗粒从细胞边缘逐渐移入细胞内,最终充满胞质空间(图版 I-5),小的卵黄颗粒相互融合,形成大的卵黄球. 这时细胞质中分布有大量的线粒体,卵黄颗粒上可以看到清晰的同心多层膜结构.

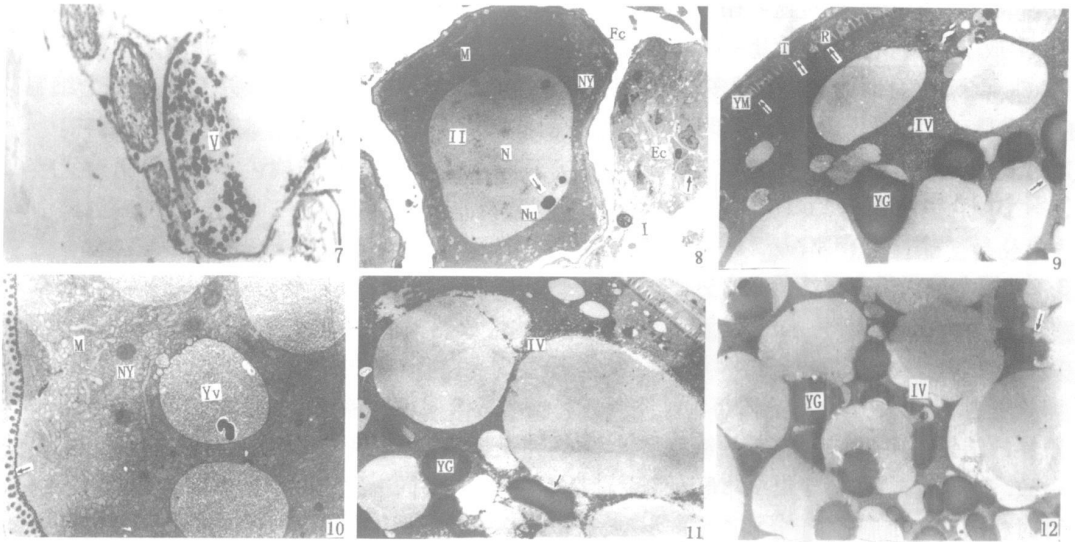
晚期阶段,卵细胞已经基本成熟,卵径最大可达 1 mm. 卵黄颗粒结成块状. 此时卵细胞动物极受精孔形成,是由放射膜、卵膜连同滤泡细胞一起凹陷形成的;细胞核开始偏位,移向动物极(图版 I-6).



图版 I 1: II时相卵母细胞, $\times 132$. Oocyte in phase II $\times 132$. 2: II时相、III时相和 IV时相卵细胞; $\times 33$. Oocyte in phase II III and IV, $\times 33$. 3: III时相的卵细胞,示卵膜已经形成, $\times 132$. Oocyte in phase III showing the formation of chorion $\times 132$. 4: III时相晚期卵母细胞,充满液泡,出现小油滴和卵黄颗粒,可见受精孔, $\times 132$. The later stage of phase III oocyte filled with yolk vesicles oil driplets and yolk granules showing the micropyle $\times 132$. 5: IV时相的卵细胞,示卵黄颗粒开始积累, $\times 33$. Oocyte in phase IV, showing the accumulation of yolk granules $\times 33$. 6: IV时相的卵细胞,示细胞核偏位, $\times 132$. Oocyte in phase IV, showing the nucleus excursion $\times 132$.

V时相 第 V 时相的卵母细胞为成熟卵、卵径可达 1000 μm , 卵内有大量的卵黄颗粒 (图版 II-7). 这时细胞核核膜消失, 只能见到一团核质. V 时相的卵细胞已经发育完成, 可以从生殖孔排出.

VI时相 IV 时相的卵母细胞没有产出, 在卵巢内就会发育成 VI 时相. 此时的卵基本上与卵巢脱离, 用手轻轻挤压鱼腹即有黄色的卵粒从生殖孔排出. 此时的卵细胞已经趋向生理死亡或称自然退化, 卵黄开始液化, 核溃散, 细胞胀大. 本次实验没有观察到 VI 时相卵细胞.



图版 II 7: V 时相的卵母细胞, 充满卵黄颗粒, $\times 33$. Oocyte in phase V, filled with yolk granules $\times 33$. 8: 卵原细胞 (I 时相) 与具单层滤泡细胞的 II 时相卵母细胞, $\times 1000$. Oogonium (phase I) and oocyte with a single layer of follicular cells in phase II $\times 1000$. 9: IV 时相的卵母细胞, 示双层滤泡细胞正在分化, 卵膜结构形成, $\times 1000$. Oocyte in phase IV, showing the formation of two layers of follicular cells and the chorion $\times 1000$. 10: III 时相早期的卵母细胞, 示放射膜上的孔道结构, $\times 2000$. Oocyte in the early stage in phase IV, showing the formation of pore canals in radial membrane $\times 2000$. 11: IV 时相早期的卵母细胞, 形成双层滤泡细胞层, 卵黄颗粒开始积累, $\times 1000$. Oocyte in the early stage in phase IV, showing two layers of follicular cells accumulation of yolk granules $\times 1000$. 12: IV 时相的卵母细胞, 示卵黄颗粒相互融合, $\times 1000$. Oocyte in phase IV, showing the amalgamation of yolk granules $\times 1000$.

Ec: 红细胞 erythrocyte; Fc: 滤泡细胞 follicular cell; I: I 时相卵原细胞 oogonium in phase I; II: II 时相卵原细胞 oocyte in phase II; III: III 时相卵原细胞 oocyte in phase III; IV: IV 时相卵原细胞 oocyte in phase IV; M: 线粒体 mitochondria; Mi: 受精孔 micropyle; N: 细胞核 nucleus; Nu: 核仁 nucleolus; NY: 卵黄核 yolk nucleus; R: 放射膜 radial membrane; T: 鞘膜 thecal membrane; V: V 时相卵原细胞 oocyte in phase V; YG: 卵黄颗粒 yolk granules; YM: 卵黄膜 yolk membrane; Yv: 液泡 yolk vesicles

2.2 卵母细胞卵膜的发生与形成

鳊鱼卵的卵膜在 III 时相业已形成, 在光镜下可以清楚地看到其中的放射膜结构 (图版 I-4). 卵膜分为 3 层, 由外到内依次是鞘膜 (chorin)、放射带 (zone radiata) 和卵黄膜 (vitelline membrane) (图版 II-9). 鞘膜的电子致密度中等, 是卵细胞最外层的一层包膜, 遇水能吸胀, 使细胞浮于水面, 因此是细胞发育过程中由分泌物形成的一层保护层. 放射带的电子致密度比鞘膜大, 又称为基膜、包膜或透明带 (zone pellucida), 从电镜照片上能清楚地看到整齐排列

的辐射状通道. 这些辐射通道与鞘膜层上一些小孔相通, 一起构成卵细胞与外界环境交换的通道(图版 II-10). 卵黄膜紧贴着细胞膜内表面, 厚度不均匀.

2.3 卵母细胞的卵黄发生与卵黄球形成

光镜和电镜下可以观察到 II 时相卵母细胞胞质中由线粒体聚集形成的卵黄核在 III 时相时扩散, 并随着核膜的解体分布到整个细胞中; 接着线粒体膜发生了变化, 脱离了线粒体而形成同心多层膜的结构, 为形成卵黄颗粒提供了场所(图版 I-1; I-3; II-8). 在 IV 时相, 由肝脏合成卵黄蛋白原, 通过血液循环到达卵巢, 被卵母细胞通过胞饮作用吸收. 在同心多层膜沉积, 形成了卵黄颗粒(图版 II-11), 当卵黄蛋白充满了这层膜结构的时候, 就形成了卵黄球(Yolk globule). 卵黄球越积越多, 小的卵黄球融合成大的卵黄球(↓), 最终充满了整个细胞(图版 II-9; II-11; II-12), 这时卵母细胞已基本成熟了.

3 讨论

3.1 鳊鱼卵巢及卵母细胞发育分期

华南地区人工养殖水域中, 鳊鱼雄性 1 冬龄达性成熟, 雌性鱼则在 2 冬龄达性成熟. 根据对实验鱼的检测发现, 每年的 11 月鳊鱼卵巢可达 III 期, 第 2 年的 4 月至 5 月发育至 V 期. 怀卵量可达 7.2 万粒/kg. 因此, 每年雌性鳊鱼进入 4 月份就可以催产. 对鳊鱼卵巢发育组织学观察的结果表明, 华南地区养殖鳊鱼是以 III 期卵巢越冬, 这与保安湖鳊鱼^[8-9]和斑鳊^[10]等相一致. 此外发现, 鳊鱼卵巢中卵母细胞发育是不同步的, 在同一发育时期的卵巢中存在不同发育时相的卵母细胞, 属于分批产卵的类型, 这也与保安湖鳊鱼^[8-9]和斑鳊^[10]所报道的相同.

关于卵母细胞的发育, 有几种主要的分期方法. 早期我国学者多沿用苏联学者 Мейер (1939) 提出的分期标准, 将卵巢分为 I~IV 期. 而后一些学者根据卵母细胞内的各种内含物(主要是卵黄)的数量、大小和分布将其分为卵母细胞生长早期、卵黄泡形成期、卵黄积累期和卵黄积累完成期 4 个时相的分期方法^[11]; 也有将其分为 5 个时期, 如鲇鱼, 分为卵原细胞增殖期、小生长期、大生长期、成熟期和退化期^[12]. 目前随着电镜技术的发展, 卵细胞的发育分期则划分得更细致. 本文根据观察到的实验结果, 将其分为卵原细胞形成期、卵黄核聚积期、放射带形成期、卵黄颗粒期、卵黄球积累期和卵成熟期 6 个时相. 也是以胞内积累物——卵黄的形成作为分期基础的, 目前较多学者采用了这种分法.

3.2 关于卵膜结构及其发生过程

鳊鱼卵的卵膜分为 3 层, 由外到内依次是鞘膜、放射膜和卵黄膜. 在卵发育的 I 时相和 II 时相, 从光镜照片上不容易分辨出卵膜的结构. 发育到第 III 时相, 随着滤泡细胞紧贴着卵并拉长, 可以观察到卵边缘上有细微管道与滤泡细胞相通. 关于放射膜的形成过程, 从细胞发育学的角度分析, 可以认为是随着胞内外物质交换的频繁, 卵表面逐渐形成了一些突起的胞间连丝通往滤泡细胞, 而滤泡细胞也伸出微丝与之相连. 接着两者相互融合, 便形成了胞间相互交换物质的管道. 王爱民^[11]描述到这些管道内有控制胞内外离子进出的“离子泵”. 对鲇成熟卵的观察表明, 鲇卵膜明显区分为内放射带、外放射带和透明带等 3 层结构, 透明带为颗粒细胞分泌形成, 内、外放射带则由卵母细胞本身分泌形成^[12], 由此可见, 硬骨鱼类卵膜结构都是具有相似的形态结构, 并有利于卵黄颗粒的积累及对卵细胞具有保护作用.

3.3 鳊鱼卵黄颗粒的外源性形成方式

本观察从鳊鱼Ⅱ时相卵细胞的照片上可以看到染色较深的卵黄核,而在其后的发育过程中卵黄核消失.王爱民对莫桑比克非鲫卵黄核进行了观察,描述了卵黄核在卵黄形成过程中具有的重要作用^[11].它是由卵细胞发育早期大量的线粒体和多泡体聚集形成的,嗜碱性,又称为巴尔比尼氏体(Balbani's body).组成卵黄核的线粒体大量增殖后,在卵黄发生前逐渐扩散到整个细胞质中.然后这些线粒体的形状发生变化,线粒体膜外突,脱离了线粒体形成一些同心多层膜结构.这些同心多层膜结构为以后卵黄积累提供了一个场所.本实验观察到,在鳊鱼卵细胞发育Ⅳ时相,肝脏分泌的卵黄蛋白原从放射膜进入卵细胞,到达同心多层膜结构,形成卵黄颗粒.小的卵黄颗粒相互融合,成为大的卵黄颗粒,最终形成圆形的成熟卵黄球.多个卵黄球分布在细胞质中,充满了整个卵细胞,为将来分裂增殖储备了能量和原料.所以卵细胞发育Ⅳ时相又称为卵黄积累期.这与已经报道的鲇卵母细胞内卵黄颗粒的形成所经历的几个阶段相似,即经历卵黄蛋白原、卵黄前体颗粒、卵黄中间颗粒,最后形成卵黄颗粒.

对鲇卵母细胞发育的超微结构观察认为,鲇卵母细胞内卵黄颗粒的合成或加工是分别在肝脏、颗粒细胞和卵母细胞内进行^[12].本实验观察到鳊鱼卵黄颗粒的外源性形成方式,其证据为:①从照片上观察,卵细胞发育Ⅳ时相初,卵黄颗粒是先出现在靠近细胞膜的位置;②通过电镜观察发现卵母细胞发育Ⅳ时相初的卵细胞边缘,可以明显地看到卵黄物质通过膜边缘进入细胞形成卵黄颗粒的过程.至于是否存在内源性的形成方式,本实验尚未获得证据,将有待于作进一步研究.

参考文献:

- [1] 周才武,杨春,蔡德霖.鳊亚科 Siniperca 鱼类的分类整理和地理分布[J].动物学研究,1988,9(2):113-125.
- [2] 郑文彪.鳊鱼(桂花鱼)的人工养殖[M].广州:广东高等教育出版社,1993.
- [3] 李达,杨春,徐光龙,等.鄱阳湖鳊鱼生物学[J].江西农业学报,1998,10(4):14-22.
- [4] 张春光,赵亚辉.1999.我国鳊资源的现状及其恢复和合理利用的途径[J].生物学通报,34(12):9-11.
- [5] 孙进全.鳊鱼人工繁殖和苗种培育研究[J].水库渔业,1987(6):42-44.
- [6] 方展强,符路娣,郑文彪.不同生殖期鳊鱼肝脏超微结构变化的观察[J].水生生物学报,2003,27(6):64-70.
- [7] 符路娣,方展强.鳊精巢的显微和超微结构观察[J].华南师范大学学报:自然科学版,2004(2):126.
- [8] 汪小东,严安生,黄峰.保安湖鳊鱼卵巢的周年变化[J].湖泊科学,1997,9(4):343-350.
- [9] 陈红菊,岳永生.保安湖鳊鱼(Siniperca chuatsi)卵巢发育的组织学观察[J].山东农业大学学报:自然科学版,2002,33(3):290-296.
- [10] 曾可为,王青云,高银爱,等.斑鳊的生物学及繁殖生物学的研究[J].内陆水产,2005(2):21-23.
- [11] 王爱民.莫桑比克非鲫卵黄形成的电镜观察[J].水生生物学报,1994,18(1):26-31.
- [12] 方展强,郑文彪,马广智,等.鲇卵膜形成和卵黄发生的超微结构观察[J].华南师范大学学报:自然科学版,2002(2):25-31,119.

【责任编辑 黄玉萍】