

# 大菱鲂成熟精子、卵子及精子入卵 早期过程的电镜观察

吴莹莹<sup>1,2</sup> 柳学周<sup>2</sup> 王清印<sup>2\*</sup> 邱兆星<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>山东省海水养殖研究所, 青岛 266002)

(<sup>2</sup>农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

**摘 要** 通过人工授精和电镜技术, 观察和描述了大菱鲂 *Scophthalmus maximus* 成熟精卵的形态、精子入卵的早期过程及精子入卵过程发生的一系列形态结构变化。大菱鲂卵子表面均匀地布满纵横交错的网纹, 并整齐地分布许多微小孔, 在动物极有一个受精孔。大菱鲂精子为无顶体类精子, 由头部、中片和尾部三部分组成, 中片有 9~14 个圆形线粒体。大菱鲂精子入卵速度非常快, 授精后 0~5 s 已经有精子通过受精孔(Micropyle)进入卵子。精子入卵过程还伴随着其他一些结构的变化, 如精孔管管壁边缘由锯齿状变为平滑的环状等。

**关键词** 大菱鲂 卵子 精子 精子入卵 扫描电镜

**中图分类号** S961.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)03-0042-06

## Electronic microscopic observations on the sperm, egg and initial stages of fertilization of *Scophthalmus maximus*

WU Ying-ying<sup>1,2</sup> LIU Xue-zhou<sup>2</sup> WANG Qing-yin<sup>2\*</sup> QIU Zhao-xing<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Mariculture Institute of Shandong Province, Qingdao 266002)

(<sup>2</sup> Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**ABSTRACT** The morphology of mature egg and sperm of *Scophthalmus maximus*, and initial stages of sperm penetration were observed under scanning electron microscopy(SEM). The cortex had been observed with TEM. The micropyle consists of a depressed vestibule and a canal. A lot of small holes were found on the vestibule and the outer chorionic surface. Spermatozoon of *S. maximus* consists of an acrosome-less head, a short midpiece containing 9~14 mitochondria, and a long tail. The speed of sperm penetration was very fast. During 0~5 seconds post insemination, sperm entered the eggs. During the sperm penetration, there were some structure changes, for example, the sperm became bigger, the mitochondria disappeared, and the jagged circle in the inner wall of the micropyle tunnel turned into slippery circle.

**KEY WORDS** *Scophthalmus maximus* Egg Spermatozoon Sperm penetration SEM

山东省博士后创新项目专项资金和国家 863 高技术研究发展计划项目(2002AA603011、2004AA603320)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: qdwang@public.qd.sd.cn

收稿日期: 2011-05-06; 接受日期: 2011-08-29

作者简介: 吴莹莹(1981-), 女, 博士, 主要从事海水养殖品种的繁育生物学和遗传育种研究。E-mail: yingyingwu9688@126.com

国内外有关硬骨鱼类受精早期的扫描电镜观察已有很多报道(Ohta *et al.* 1983; Brummentt *et al.* 1979; Kudo *et al.* 1985; Hart *et al.* 1980; Kobayaski *et al.* 1987; 王瑞霞等 1982、1984; 张天荫等 1991、1993; 陈军等 2004; 洪一江等 1994; 孙际佳等 2006; 王永玲等 2007; 何振邦等 2009)。研究内容包括精子入卵方式及其速度、受精锥的形成及其形态变化、皮层反应的发生及其规律、卵膜的举起及其表面形态的变化、精孔管道的变化、单精入卵机制等。这些研究对象多数集中于淡水鱼。近几年逐渐开始关注海水鱼类受精过程的观察,例如黑鲷 *Sparus macrocephalus* (张筱兰等 1998)、黄海太平洋鲱 *Clupea pallasii* (黄树庆等 1997)等。

大菱鲆 *Scophthalmus maximus* L. 为世界公认的名优海水养殖鱼类,属鲆科 Bothidae、菱鲆属 *Scophthalmus*, 是原产于欧洲北海、波罗的海和地中海沿岸的一种名贵比目鱼(Jones *et al.* 1995; Bromley 1980a, b)。我国 1992 年首次引进,目前已成为我国北方鲆鲽类养殖的重要品种,产生了可观的经济效益。吴莹莹等(2006)在显微水平对大菱鲆受精过程进行了较为详细的细胞学研究,但对大菱鲆精子入卵早期的研究尚未见报道。本研究运用人工授精和电镜技术对大菱鲆成熟精卵和精子入卵早期过程进行超微结构观察,以期丰富鱼类受精生物学内容,并为改进大菱鲆苗种培育和雌核发育研究提供基础参考资料,同时可以更有效地提高大菱鲆人工繁殖效率和促进我国大菱鲆养殖业的健康发展。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

本研究材料于 2008 年 4 月取自青岛市忠海水产养殖公司。亲鱼经人工控温控光后达到性成熟。取卵时,双手托住雌性亲鱼置于垫有干净湿毛巾的木板或泡沫板上,并用另外的湿毛巾将鱼头部盖住。用吸水纸或医用脱脂棉将其生殖孔及周围区域轻轻擦净。一人用手轻轻按住雌鱼头部,另一人双手按照由后向前的顺序向生殖孔方向用力,轻轻挤压鱼的生殖腺部位,将卵挤出。挤出液体后先弃去粪便等污物,待流出的卵在灯光照射下呈明亮的油状时,将卵盛在事先准备好的干净白瓷盆内。稍后用同样的方法处理雄鱼。精液挤出后,先弃去粪便等污物,待流出精液呈较纯的乳白色后,用经过消毒的干燥玻璃吸管将精液吸入干净的烧杯内。如果精液量不够,多挤几条雄鱼,将其精液混在一起。

先检查精液质量。取 1  $\mu$ l 精液,用 50  $\mu$ l 海水稀释、激活后,在显微镜(尼康,日本)下观察运动精子的比活力,并观察精子在室温(20  $^{\circ}$ C)下的存活时间。将精液以海水稀释 2 000  $\times$  后,用血球计数板(ERMA 公司,日本)计算精子浓度。只有精子运动率在 75% 以上的、没有被污染的精液样本才用于实验。

精卵都准备好后,行人工干法授精,将受精卵置于 15.8  $^{\circ}$ C 过滤海水中孵化。受精卵和海水接触即开始计时,并不间断取样固定。

### 1.2 扫描电镜样品的制作和观察

扫描电镜样品的固定、制作方法和观察均参考吴莹莹等(2007)。

### 1.3 透射电镜样品的制作

透射电镜样品的固定、制作方法和观察均参考吴莹莹等(2007)。

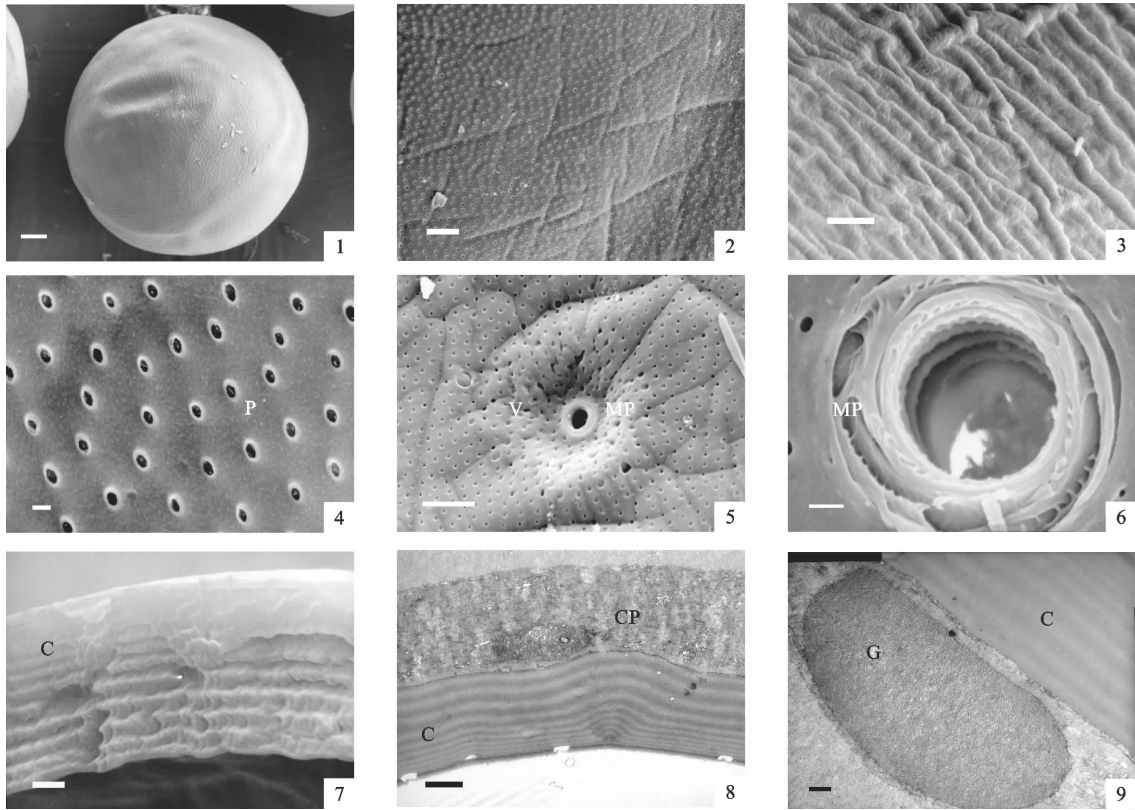
## 2 结 果

### 2.1 成熟生殖细胞的形态结构

#### 2.1.1 卵 子

大菱鲆的成熟卵为圆球形,直径 0.91~1.20 mm(图 1-1)。肉眼可见卵子外包一层透明的壳膜。卵内仅有一粒油球,直径 0.15~0.22 mm。整个壳膜上还布满比较浅的网纹,网纹纵横交错,走向不确定(图 1-2)。

壳膜内表面也布满网纹,皱褶更加致密清晰(图 1-3)。壳膜上,较整齐地分布着众多微小孔(Micropore),这些小孔基本呈圆形,大小不一,直径 $0.52\sim 0.67\ \mu\text{m}$ (图 1-4)。微小孔在动物极与植物极间没有明显差异。扫描电镜下可以看到壳膜的动物极表面有一个很小、很浅的凹陷区域,这就是精孔区。受精孔(Micropyle)位于精孔区的中央位置(图 1-5)。受精孔是完全敞开的,没有观察到类似精孔细胞的结构,其外口直径大约 $9.2\ \mu\text{m}$ ,内口直径大约 $4.1\ \mu\text{m}$ (图 1-6)。受精孔的前庭较其他壳膜表面稍微凹陷,前庭内分布着排列大小不等、形态各异的微小孔,直径为 $0.22\sim 1.1\ \mu\text{m}$ 。精孔管的管道呈现出与壳膜断面一样的层次,但除外面第一层边缘呈平滑的环状结构外,往里各层边缘上均有锯齿状的突出。



1. 大菱鲂卵子(标尺:100 $\mu\text{m}$ ); 1. Appearance of egg of sperm of *S. maximus* L. (Scale bar: 100 $\mu\text{m}$ )
2. 大菱鲂卵子壳膜表面布满网纹(标尺:10 $\mu\text{m}$ ); 2. Reticular surface of chorion of *S. maximus* L. (Scale bar: 10 $\mu\text{m}$ )
3. 大菱鲂卵子壳膜内表面的褶皱(标尺:10 $\mu\text{m}$ ); 3. Inner surface of chorion with clear ridges(Scale bar: 10 $\mu\text{m}$ )
4. 大菱鲂卵子壳膜表面的微小孔(标尺:1 $\mu\text{m}$ ); 4. Micropore in chorion of *S. maximus* L. (Scale bar: 1 $\mu\text{m}$ )
5. 大菱鲂卵子的受精孔区,示前庭和受精孔(标尺:10 $\mu\text{m}$ ); 5. Micropyle and vestibule of *S. maximus* L. (Scale bar: 10 $\mu\text{m}$ )
6. 大菱鲂受精孔(标尺:1 $\mu\text{m}$ ); 6. Micropyle of *S. maximus* L. (Scale bar: 1 $\mu\text{m}$ )
7. 大菱鲂壳膜的横断面(标尺:1 $\mu\text{m}$ ); 7. Cross section of chorion of egg(Scale bar: 1 $\mu\text{m}$ )
8. 大菱鲂壳膜的透射电镜切片(标尺:2 $\mu\text{m}$ ); 8. Transverse section of chorion of egg(Scale bar: 2 $\mu\text{m}$ )
9. 大菱鲂壳膜的透射电镜切片,示壳膜下的细胞质(标尺:500nm); 9. Transverse section of chorion of egg, showing cytoplasm below chorion(Scale bar: 500nm)

C:壳膜;CP:细胞质;G:质膜内的大颗粒;MP:受精孔;P:微小孔;V:前庭;C:Chorion;CP:Cytoplasm;G: Big granule in cytoplasm; MP: Micropyle;P: Micropore;V: Vestibule;

图1 大菱鲂卵子

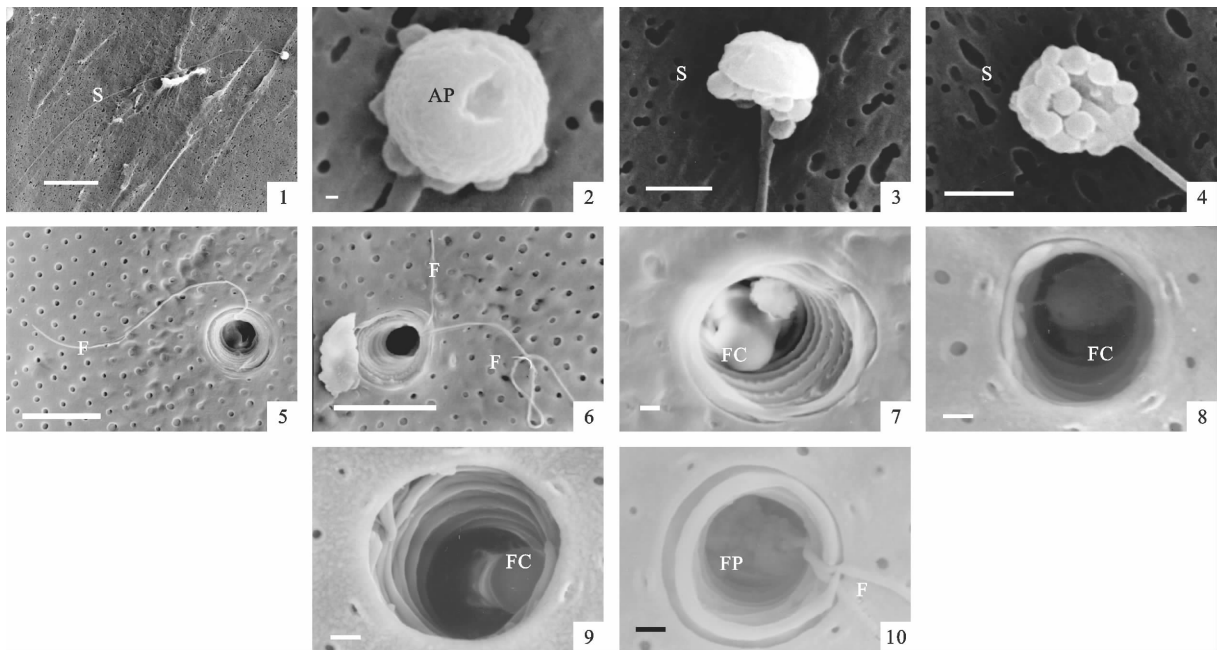
Fig. 1 Mature egg of *S. maximus*

扫描电镜观察显示,卵子壳膜断面厚 $4.77\ \mu\text{m}$ ,分8~10层,各层间均有小分枝相互连接,未观察到微小孔穿过卵膜(图 1-7)。透射电镜观察显示,大菱鲂壳膜为板层状结构,高电子密度区与低电子密度区交错、平行排列,约10层,各层之间紧密结合无空隙(图 1-8)。每两层间的间隔由外到里逐渐增厚。其中由外到里的第2

层电子密度最深。透射切片中同样未观察到微小孔结构。由图 1-9 还可观察到,壳膜下的卵质内含有膜包被着的染色较深的大颗粒。

### 2.1.2 精子

扫描电镜下观察,大菱鲂精子由头部、中片和尾部三部分组成,全长约  $55\ \mu\text{m}$ ,属无顶体精子(图 2-1)。头部从顶面观为圆形,直径为  $1.58\ \mu\text{m}$ (图 2-2);侧面观约为半球形,高约  $0.89\ \mu\text{m}$ (图 2-3)。细胞核的前后均呈现凹陷,核前凹陷(Anterior pit of nucleus)直径约  $0.42\ \mu\text{m}$ ,凹陷外口为不规则的圆形(图 2-2)。中片由围绕鞭毛的 9~14 个数目不等的圆形线粒体组成(图 2-4)组成。精子的尾部从头部下方的凹陷中伸出。



1. 大菱鲂精子(标尺:  $10\ \mu\text{m}$ ); 1. Appearance of sperm of *S. maximus* L. (Scale bar:  $10\ \mu\text{m}$ )
2. 大菱鲂精子头部的顶面(标尺:  $100\ \text{nm}$ ); 2. Top view of head of sperm of *S. maximus* L. (Scale bar:  $100\ \text{nm}$ )
3. 大菱鲂精子头部的侧面(标尺:  $1\ \mu\text{m}$ ); 3. Side view of head of sperm of *S. maximus* L. (Scale bar:  $1\ \mu\text{m}$ )
4. 大菱鲂精子头部的底面(标尺:  $1\ \mu\text{m}$ ); 4. Downside view of head of sperm of *S. maximus* L. (Scale bar:  $1\ \mu\text{m}$ )
5. 授精后授精 0~5s, 单精入卵, 示正在入卵的精子, 尾部留在受精孔外(标尺:  $10\ \mu\text{m}$ ); 5. 0~5s after insemination, showing the spermatozoon entering into the egg and the flagellum from outside of micropyle (Scale bar:  $10\ \mu\text{m}$ )
6. 授精后授精 0~5s, 双精入卵, 尾部留在受精孔外(标尺:  $10\ \mu\text{m}$ ); 6. 0~5s after insemination, showing two spermatozoa entering into the egg and the flagella from outside of micropyle (Scale bar:  $10\ \mu\text{m}$ )
7. 授精后授精 10s, 示受精孔内的受精锥和受精塞(标尺:  $1\ \mu\text{m}$ ); 7. 10s after insemination, showing fertilization cone and fertilization plug in the micropyle (Scale bar:  $1\ \mu\text{m}$ )
8. 授精后授精 15s, 示受精孔内的受精锥(标尺:  $1\ \mu\text{m}$ ); 8. 15s after insemination, showing fertilization cone (Scale bar:  $1\ \mu\text{m}$ )
9. 授精后授精 35s, 示受精孔内的受精锥和受精塞(标尺:  $1\ \mu\text{m}$ ); 9. 35s after insemination, showing fertilization cone and fertilization plug in the micropyle (Scale bar:  $1\ \mu\text{m}$ )
10. 授精后 2min30s, 示被受精塞堵在受精孔处的精子(标尺:  $1\ \mu\text{m}$ ); 10. 2min30s after insemination, showing the spermatozoon being block out of the micropyle by fertilization plug (Scale bar:  $1\ \mu\text{m}$ )

AP: 精子头部的核前凹陷; F: 鞭毛; FC: 受精锥; FP: 受精塞; S: 精子; AP: Anterior pit of nucleus; F: Flagellum; FC: Fertilization cone; FP: Fertilization plug; S: Sperm

图 2 大菱鲂精子及精子入卵

Fig. 2 Sperm and initial stages of penetration of *S. maximus*

## 2.2 精子入卵

大菱鲂精子入卵速度非常快,授精后 0~5s 即可观察到有精子头部进入受精孔,尾巴留在受精孔管道外

(图 2-5)。观察此时间段内约 20 粒受精卵,大部分受精孔处都只观察到一个精子进入卵子,但个别受精孔外可观察到两条精子尾巴,说明可能有两个精子进入受精孔内(图 2-6)。精子入卵后,其头部被受精卵表面原生质包围,形成表面光滑的受精锥(Fertilization cone)(图 2-7)。

授精后 10~35s 依然能在受精孔内观察到受精锥,受精锥周围可以观察到絮状的受精塞(Pertilization plug)(图 2-7、图 2-8、图 2-9)。

授精后 2 min30s,受精孔内的受精锥消失不见,但仍有絮状的受精塞阻止多余精子的进入(图 2-10)。

精子入卵后,大多受精孔管道内各层边缘的锯齿状突出消失,变为光滑的环状(图 2-8、图 2-9、图 2-10)。

### 3 讨论

#### 3.1 大菱鲆成熟卵结构

大菱鲆受精孔内孔直径平均为  $4.1 \mu\text{m}$ ,是精子头部平均直径  $1.58 \mu\text{m}$  的两倍还多,因此完全有可能两个精子同时进入卵子(图 2-6)。但本研究发现,大菱鲆受精孔处一般不会聚集大量精子,这可能就减少了多精入卵的几率,这可能与其前庭结构有关系。大菱鲆受精孔前庭较浅,没有其他硬骨鱼类受精孔处的明显特征。Amanze 等(1990)对鲃鱼卵子受精孔区的沟和脊结构的研究,沈其璋等(1990)和吴坤明等(1991)对泥鳅 *Misgurnus anguillicaudatus* 成熟卵受精孔的漩涡状研究,以及宋慧春等(1999)对大银鱼 *Protosalanx hyalocranius* 成熟受精孔的光滑放射状沟脊结构的研究,都证明受精孔的这些结构为精子的云集和导引进入受精孔提供了有利的条件。与此理论相对应的,类似于大菱鲆的很浅的前庭不利于精子在此处的云集,但从另一角度来说,这种情况可以防止多精入卵。

大菱鲆壳膜表面布满纵横交错、走向不定的网纹结构,且均匀地布满微小孔,微小孔内无其他物质。目前的大量研究表明,大多硬骨鱼类卵表均有微小孔存在(洪一江 1990;孙际佳等 2006),但不同的鱼种,其卵表形态和结构还是有差异的,比如天津大银鱼卵表则具胚孔的半球表面无小孔,对极半球表面有小孔,其胚孔内生出 30 多根卵膜丝,以胚孔为中心向四周辐射分布(荣长宽等 1998);金鱼 *Carassius auratus* 卵动物极壳膜表面有 5~10 条不同宽度的沟和脊,并向卵膜孔汇集(张天荫等 1993);鲃鱼 *Barbus conchoniuis* 卵膜孔区壳膜也有 7~10 条沟和脊的特异结构,并指出一旦精子位于该区,其精子的受精率就能提高到 99.7%(Amanze et al. 1990),这种结构可能存在一种数学物理的动力因素,对于精子云集于卵膜孔区提供有利条件;索氏六须鲶 *Silurus soldatovi* 卵子表面呈现有规则的类似叶片的网状,在高倍镜下可以见有很多的沟和嵴,嵴上有  $0.1\sim 0.2 \mu\text{m}$  的缝隙,被认为是与外界进行气体和离子交换的通道(陈 军等 2004);赤眼鲱 *Squaliobarbus curriculus* 卵壳表面平滑光洁,除了均匀地分布着微小孔外,无明显的沟或嵴(孙际佳等 2006)。

#### 3.2 大菱鲆精子的核前凹陷

本研究通过观察多个大菱鲆精子,均显示大菱鲆精子头部具核前凹陷,这与 Suquet 等(1993)和张世奎等(2010)的观察结果是一致的。同样的,圆斑星鲽 *Verasper variegates* 和条斑星鲽 *Verasper moseri* 精子头部也存在核前凹陷(张永忠等 2004;张世奎等 2010)。对大菱鲆、牙鲆、条斑星鲽和圆斑星鲽精子表面形态结构进行比较,大菱鲆核前凹陷位于精子顶端,牙鲆、条斑星鲽和圆斑星鲽精子核前凹陷位于核前端稍偏处,显示出鲆鲽鱼精子结构在种属间的差异(张永忠等 2004;张世奎等 2010)。核前凹陷在其他硬骨鱼类精子中很少见。张永忠等(2004)认为这种特殊结构可能是顶体的一种遗迹,同时也不排除是向外释放核内物质的一种途径。本研究基本认同这个观点,因为核前正好是顶体类精子中顶体的存在位置,而且紧靠精子的核物质,但具体机理仍需进一步的研究和论证。

#### 3.3 精子入卵及卵子的变化

大菱鲆在授精 0~5 s 即可在受精孔位置发现有精子进入,比其他大多鱼类的入卵速度快,如鲟鱼(王瑞霞等 1982)、鲟鱼等(许 雁等 1988)需 30 s 左右,革胡子鲶(郑文彪等 1991)约 1 min,金鱼(张天荫等

1993)1 min50 s左右。

本研究发现,大菱鲂受精孔结构在精子进入前后会有变化。精子入卵后,受精孔管道内各层之前的锯齿状突出消失,各层变为光滑的环状。目前没有其他文献对此类问题进行研究说明。这可能与精子入卵前后受精卵发生皮层反应等一系列变化有关。目前尚没有其他学者对此类问题进行研究说明。

受精锥是精子入卵时,在精子入卵处形成的不同形状的细胞质突起,并不是所有鱼类受精过程均可出现明显受精锥。Kudo(1980)发现鲤鱼会在精子入卵同时形成受精锥;张天荫等(1991)在鳙鱼 *Aristichthys nobilis* 精卵结合时序观察中未发现有明显的受精锥形成;孙际佳等(2006)观察赤眼鳟精卵结合过程也未观察到明显的受精锥。本研究中,大菱鲂精子入卵后受精锥随之出现,从而堵塞受精孔以阻止多余精子的进入,成为除了受精孔外,又一道保证单精入卵的有力屏障。

## 参 考 文 献

- 王永玲,杨彩根,宋学宏,王建伟. 2007. 黄颡鱼精子入卵的扫描电镜观察. 淡水渔业, 37(4): 41~44
- 王瑞霞,张毓人,傅仓生,李振兰,吴宜章,张福顺,郝宏京. 1982. 鲈鱼受精早期精子入卵的扫描电子显微镜观察. 水产学报, 6(4): 313~320
- 王瑞霞,张毓人,傅仓生,李振兰,吴宜章,张福顺,郝宏京. 1984. 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. 水生生物集刊, 8(2): 171~182
- 孙际佳,郭云贵,李桂峰,赵会宏. 2006. 赤眼鳟精子入卵的扫描电镜观察. 中国水产科学, 13(5): 740~743
- 许雁,熊全沫. 1988. 中华鲟受精过程扫描电镜观察. 动物学报, 34(4): 325~328
- 陈军,刘伟,赵春刚,王丙乾,潘伟志. 2004. 杂交鲢精子入卵扫描电镜观察. 吉林农业大学学报, 26(3): 343~346
- 吴坤明,沈其璋,刘根洪. 1991. 泥鳅成熟卵受精孔涡旋状结构的研究. 科学通报, 36(15): 1175~1178
- 吴莹莹,柳学周,王清印,马爱军,包振民. 2006. 大菱鲂受精过程的细胞学观察. 中国水产科学, 13(4): 555~560
- 吴莹莹,柳学周,王清印,徐永江,包振民. 2007. 半滑舌鳎精子的超微结构. 海洋学报, 29(6): 167~171
- 何振邦,洪万树,陈仕奎,张其永,戈薇,陈筠筠. 2009. 中华乌塘鳢精子入卵过程的扫描电镜观察. 厦门大学学报(自然科学版), 48(1): 128~133
- 张天荫,封树芒,潘忠宗,翟玉梅. 1991. 鳙鱼受精早期扫描电镜研究. 动物学报, 37(3): 293~297
- 张天荫,封树芒,潘忠宗. 1993. 金鱼精子入卵过程的扫描电镜观察. 动物学研究, 14(2): 166~172
- 张世奎,刘海金,李忠红,张晓燕,王玉芬. 2010. 3种鲢鳙鱼精子和卵子表面形态结构的比较研究. 水产科学, 29(2): 63~68
- 张筱兰,丛娇日,姚斐,范瑞青,高澜,郭恩棉,姚善成. 1998. 黑鲫成熟精、卵和精子入卵早期过程的初步观察. 海洋湖沼通报, 4: 62~68
- 沈其璋,吴坤明,蔡振岩. 1990. 泥鳅精子入卵的动力作用. 动物学研究, 11(3): 179~184
- 宋慧春,吴坤明,沈其璋,张晓东,王永玲,杜开和,王文. 1999. 大银鱼卵膜孔结构的电镜观察. 动物学报, 45(1): 8~14
- 郑文彪,潘炯华,安东,刘文生. 1991. 革胡子鲶受精过程的扫描电镜观察. 动物学研究, 12(2): 111~115
- 洪一江. 1990. 兴国红鲤成熟卵子卵膜的扫描电子显微镜观察. 江西大学学报(自然科学版), 14(3): 97~102
- 洪一江,胡成钰,林光华,张丰旺,马小平. 1994. 兴国红鲤受精早期精子入卵及卵子变化的研究. 南昌大学学报(理科版), 18(1): 58~64
- 黄树庆,阎淑珍. 1997. 黄海太平洋鲱受精前后卵膜的动态变化. 青岛海洋大学学报, 27(2): 196~202
- Amanze, D., and Iyengar, A. 1990. The micropyle: a sperm guidance system in teleost fertilization. Development, 109(2): 495~500
- Bromley, P. J. 1980a. Effect of dietary protein, lipid and energy content on the growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture, 19(4): 359~369
- Bromley, P. J. 1980b. The effect of dietary water content and feeding rate on the growth and food conversion efficiency of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture, 20(2): 91~99
- Hart, N. H., and Yu, S. F. 1980. Cortical granule exocytosis and cell surface reorganization in eggs of *Brachudanio*. J. Exp. Zool. 213(1): 137~157
- Jones, A., Howell, B. 1995. The Marine Flatfishes. In: Nash, C. E., Novotny, A. J. ed. World Animal Science, C8. Production of Aquatic Animals; Fishes. Elsevier, 275~27
- Kobayaski, W., and Yamamoto, T. S. 1987. Light and electron microscopic observation of sperm entry in the chum salmon egg. J. Exp. Zool. 243(2): 311~322
- Kudo, S. 1980. Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg. Dev. Growth Diff. 22(3): 403~414
- Kudo, S., and Sato, A. 1985. Fertilization cone of carp eggs as revealed by scanning electron microscopy. Dev. Growth Diff. 27(2): 121~128
- Ohta, T., and Iwamatsu, T. 1983. Electron microscopic observations on sperm entry into eggs of the rose bitterling, *Rhodeus ocellatus*. J. Exp. Zool. 227(1): 109~119
- Suquet, M., Dorange, G., Omnes, M. H., Normant, Y., Le Roux, A. and Fauvel, C. 1993. Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus maximus*). Journal of Fish Biology, 42(4): 509~516