

文章编号: 1674-5566(2010)05-0596-05

## 泥蚶受精和早期卵裂过程核行为的细胞学观察

姚韩韩<sup>1,2</sup>, 林志华<sup>1</sup>, 董迎辉<sup>1</sup>, 朱东丽<sup>3</sup>, 沈和定<sup>2</sup>

(1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 利用石蜡切片技术,对泥蚶受精和早期卵裂过程核行为进行了系统地细胞学观察。泥蚶成熟未受精卵核相处于第一次成熟分裂中期;精卵混合后,精子迅速附着于卵子周围,受精后 3 min左右精子入卵,启动成熟分裂,9~12 min排出第一极体、18~20 min排出第二极体,完成第一次和第二次成熟分裂;受精后 25 min左右雌、雄性原核形成;受精后 30 min左右雌、雄原核以原核联合的方式结合;受精后 35 min左右第一次卵裂结束,形成 2个大小不等的卵裂球;受精后 45 min左右第二次卵裂结束,形成 1大 3小 4个卵裂球。本研究发现了多精入卵现象,多个精子入卵可启动成熟分裂,排出第一、第二极体,形成多个雄性原核并与雌性原核联合,染色体分离紊乱形成多极纺锤体;对多精入卵的成因、发育结局进行了初步探讨。

**关键词:** 泥蚶; 受精; 早期卵裂; 核行为; 多精入卵

**中图分类号:** S 917 **文献标识码:** A

## Cytological observation on nuclear behavior in fertilization and early cleavage in *Tegillarca granosa*

YAO Han-han<sup>1,2</sup>, LIN Zhi-hua<sup>1</sup>, DONG Ying-hui<sup>1</sup>, ZHU Dong-li<sup>3</sup>, SHEN He-ding<sup>2</sup>

(1. College of Biological and Environmental Sciences Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

2. College of Fishery and Life Sciences Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. College of Fisheries Ocean University of China Qingdao 266003, China)

**Abstract:** The cytology of the fertilization and early embryonic development of *Tegillarca granosa* were consecutively observed by optical microscope and paraffin section method. The unfertilized mature eggs were at metaphase of first meiosis. After mixing of sperms and eggs, sperms quickly attached to the surface of the egg and the maturation division began. At about 9-12 min and 18-20 min, the fertilized eggs released the first and the second polar bodies respectively in the progress of maturation division. After completion of second maturation division, at about the 20 min, sperm nucleus and the haploid female nucleus expanded immediately and developed into the male and female pronuclei, and the male pronucleus formed earlier than the female pronucleus. At about 25 min, the two pronuclei combined and their chromosomes formed respectively. At about 35 min, the chromosomes were separated equally into two daughter cells which are different evidently in size. At about 45 min, the second cleavage was completed with the result of forming four

收稿日期: 2009-11-14

基金项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A410); 国家现代贝类产业技术体系(nycytx-47); 浙江省科院所优秀青年科技人才资助计划(2008R20006)

作者简介: 姚韩韩(1985-),女,硕士研究生,专业方向为贝类遗传育种。E-mail: yaohanhan1020@126.com

通讯作者: 董迎辉, E-mail: dongyinghui118@126.com

daughter cells one big and three small. Additionally, polyspermy were observed in the experiment and several male pronuclei can combine with the female pronucleus and form polyspindles. The reasons of polyspermy and results of embryonic development of *Tegillarca granosa* were also discussed deeply.

**Key words:** *Tegillarca granosa*; fertilization; early cleavage; nuclear behavior; polyspermy

泥蚶 (*Tegillarca granosa*) 隶属于软体动物门 (Mollusca), 瓣鳃纲 (Lamellibranchia), 蚶目 (Arcoida), 蚶科 (Arcidae), 泥蚶属 (*Tegillarca*), 俗称花蚶、血蚶、粒蚶等, 是我国沿海重要的养殖贝类。深入开展泥蚶繁殖生物学的研究, 对泥蚶人工繁育和增殖产业的可持续发展具有重要意义。郑家声等<sup>[1]</sup>利用组织学方法对泥蚶的性腺发育和生殖周期进行了研究; 郑家声等<sup>[2]</sup>、陆荣茂等<sup>[3]</sup>对泥蚶染色体组型进行了研究; 孙慧玲等<sup>[4]</sup>、竺俊全等<sup>[5]</sup>对泥蚶精子超微结构进行了电镜观察; 陆彤霞等<sup>[6]</sup>利用透射电镜研究了泥蚶精母细胞与精细胞的超微结构变化; 孙慧玲等<sup>[7]</sup>对泥蚶的受精过程进行了荧光显微镜观察。

本研究利用人工受精和石蜡切片技术对泥蚶受精和早期胚胎发育的细胞学过程进行了详细的细胞学观察, 较为准确地确定了泥蚶胚胎发育时序, 首次发现泥蚶多精入卵现象并对其发生原因及发育结局进行了初步探讨, 丰富了双壳贝类受精生物学内容, 可为泥蚶的规模化人工育苗生产提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

泥蚶亲贝取自温州乐清湾养殖塘, 壳高 4~5 cm, 外观无破损或伤病。受精和早期培育实验于 2009 年 7 月在浙江省海洋水产养殖研究所清江实验基地进行。苏木精和伊红染料为 AMRESCO 公司生产。

### 1.2 方法

取性腺成熟的雌、雄泥蚶亲贝, 阴干结合流水刺激催产, 将单个泥蚶亲贝分别放入盛有过滤海水的 500 mL 烧杯中, 使其产卵排精。镜检, 选择质量好的精、卵, 筛绢网过滤后进行混合受精, 孵化发育温度为 28℃。受精开始计时, 20 min 内每隔 3 min 取样 1 次, 之后每隔 5 min 取样 1 次, 每次取卵量不少于 1 000 粒。所取样品用 Bouin 氏液充分固定, 梯度酒精系列脱水、二甲苯

透明、石蜡包埋, 金华益迪 YD-1508A 型切片机连续切片, 切片厚度约 5 μm, HE 染色, 中性树脂封片, Nikon 显微镜下观察并拍照。实验重复 3 次。

## 2 结果

本实验观察了泥蚶受精卵核相的变化, 较为准确地确定了胚胎发育时序。为说明受精后发育时间与核相间的关系, 将其发育过程划分为以下几个阶段:

未受精的成熟卵和精子: 泥蚶成熟卵多数呈卵圆形, 核相处于第一次成熟分裂中期, 纺锤体已形成, 同源染色体配对排列在赤道板上, 纺锤体长轴垂直于卵膜 (图版 -1)。精子仅能看到头部, 被苏木精染成小黑点状, 大小均一 (图版 -2)。

精子入卵: 精卵混合后, 约 3 min 左右, 精子迅速附着于卵子表面, 附着位置随机 (图版 -3)。之后精子进入卵内, 轻微膨胀成球形。

第一次成熟分裂后期: 精子入卵受精后约 6 min 左右, 启动成熟分裂。精核迅速发生轻微膨胀, 呈球形, 卵细胞的同源染色体在纺锤丝的牵引下已经分开, 分别移向纺锤体的两极 (图版 -4~5)。

第一极体排出: 受精后 9 min 左右, 靠近卵膜处的那组染色体经凝缩后, 将质膜顶起, 作为第一极体释放出来, 极体位于卵膜之外, 受精膜之内; 另一组染色体仍然保留在极体之下的卵质内, 完成第一次成熟分裂 (图版 -6)。

第二次成熟分裂中期: 受精后 12 min 左右, 保留卵质内的染色体重新排列在赤道板上, 形成第二次成熟分裂的中期分裂相 (图版 -7)。

第二次成熟分裂后期: 受精后 15 min 左右, 排列在赤道板上的姐妹染色单体开始分离, 分别移向纺锤体的两极, 精核无明显变化 (图版 -8)。

第二极体排出: 受精后 18 min 左右, 以同样的分裂方式, 靠近卵膜的那组染色体作为第二极体排出, 位于第一极体的下方, 另一组染色体留在卵质内, 完成第二次成熟分裂 (图版 -9)。

雌、雄性原核形成:受精后 20 min 左右,在第二次成熟分裂之后,精核发生第二次膨胀扩散,体积明显膨大,形成雄性原核;卵子的染色体也膨胀扩散,形成与雄性原核形状、结构相似的雌性原核,一般雌性原核的位置靠近极体,并且体积比雄原核略小。此时雌、雄性原核都膨胀到最大(图版-10)。

雌、雄性原核联合:受精后 25 min 左右,膨胀到最大体积的雌、雄性原核,按照一定的路线逐渐靠近联合。但是两者的核膜清晰可见,并不发生融合(图版-11)。随后雌、雄性原核的核膜破裂,染色质各自形成独立的染色体并发生联合(图版-12~13)。

第一次卵裂后期:受精后 30 min 左右,两组染色体完全联合之后,整齐地排列在纺锤体的赤道板上(图版-14),之后在纺锤丝的牵引下,向两极移动,移动方向与卵轴垂直,形成第一次卵裂后期分裂相(图版-15)。随着染色体的移动,整个受精卵的形状也发生了改变,由于卵质的流动,植物极凸起,形成了极叶,此时还观察不到卵裂沟(图版-16~19)。

二细胞期:受精后 35 min 左右,极叶收缩,卵细胞自极体处发生纵向内缢,形成大小不均等的两个分裂球,卵裂沟明显可见,完成第一次卵裂。之后两个卵裂球的染色体变为染色质,进行核膜重建,为进行第二次卵裂做准备(图版-20)。

第二次卵裂中期:受精后 40 min 左右,在完成第一次卵裂后,两个卵裂球的染色质凝缩成染色体(图版-21),排列在纺锤体的赤道板上,大小卵裂球的发育速度基本上一致,几乎同时发生核分裂(图版-22)。

四细胞时期:受精后 35 min 左右,两个卵裂球均发生核分裂,染色体平均分配到纺锤体的两极,其过程与第一次卵裂基本相似,与第一次卵裂垂直的方向发生纵裂(图版-23)。核分裂和胞质分裂结束以后,卵裂沟明显,形成 4 个卵裂球,其中 1 个大卵裂球,其余 3 个较小,完成第二次卵裂。4 个卵裂球的染色体变为染色质,重建核膜,进入有丝分裂间期,为第三次卵裂,即八细胞时期做好准备(图版-24)。

另外,在泥蚶受精及胚胎发育过程中,首次发现了多精入卵现象。同时入卵的多个精子大多膨胀成精核,启动成熟分裂,排出极体(图版-25

~26)。雌、雄性原核形成期,多个精核膨胀、原核化形成雄性原核,但是各个精核的原核化的程度不同,核大小、核物质松散程度有区别(图版-27~28)。在随后的发育过程中,多个雄性原核和雌性原核联合,形成多极纺锤体,造成染色体多级分离、分裂紊乱等异常核相(图版-29~30),可能会形成畸形胚胎而导致发育停止。

## 3 讨论

### 3.1 泥蚶受精生物学特点和胚胎发育时序

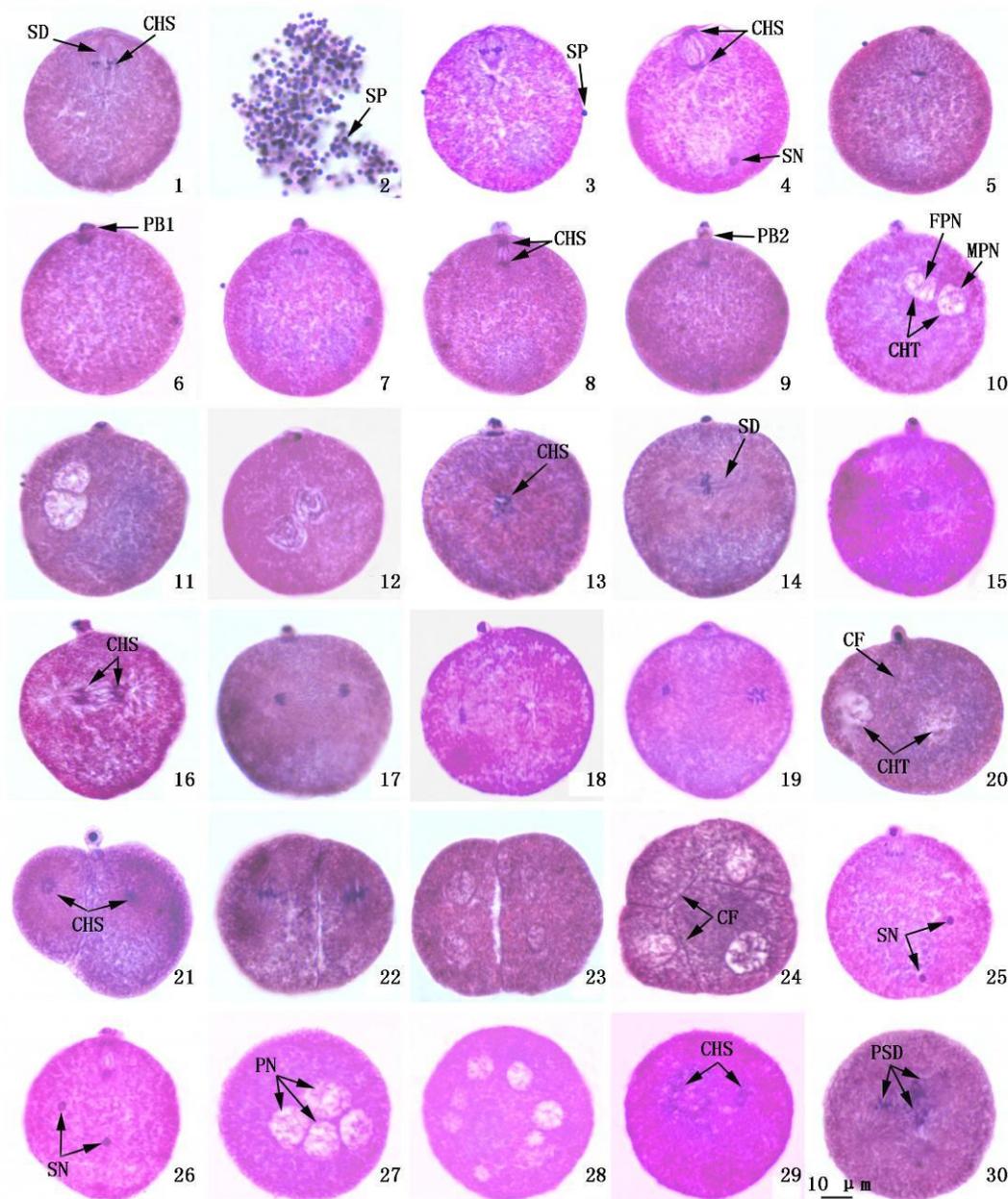
孙慧玲等<sup>[7]</sup>的研究较为详细地描述了泥蚶成熟未受精卵的核相是处于第一次成熟分裂中期,精子入卵位置随机,雌、雄性原核以联合的方式结合,本研究在此基础上得到了进一步证实与完善。

本研究通过对受精卵核相变化的跟踪观察,确定了受精后发育时间与核相间的关系,对指导泥蚶人工育苗生产意义重大;研究贝类受精过程及胚胎发育时序对于借助染色体组操作进行细胞工程育种具有重要价值。通过染色体组操作进行多倍体育种,确定胚胎发育时序是前提和关键<sup>[8]</sup>。泥蚶受精后 9 min 左右第一极体排出,18 min 左右第二极体排出,25~30 min 第一次卵裂,通过一定的诱导技术干预受精卵的成熟分裂,阻止第一、第二极体排出或第一次卵裂使染色体加倍,开展多倍体、雌核发育二倍体等细胞工程育种研究,有助于选育出个体大、品质优、抗逆性强的优良品种。人工诱导雌核发育二倍体在长牡蛎(*Crassostrea gigas*)<sup>[9-10]</sup>、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)<sup>[11]</sup>、合浦珠母贝(*Pinctada martensi*)<sup>[12]</sup>等已有报道。

雌、雄性原核形成的先后性,一直是贝类受精生物学研究的热点。在双壳贝类中,通常雄性原核形成的时间略早于雌性原核。在受精后约 20~25 min 受精卵排出第二极体完成成熟分裂后,逐渐形成雌、雄性原核,靠近极体的为雌性原核,而远离极体的为雄性原核。经过大量的受精卵组织切片和显微镜观察,发现在原核形成早期,雄性原核总比雌性原核大,到原核形成后期,两个原核膨胀到体积差不多大小,推测雄性原核的形成要早于雌性原核,这与栉孔扇贝<sup>[13]</sup>、合浦珠母贝<sup>[14]</sup>等相似。有研究表明,雄性原核的形成

是卵内物质对精核调节的结果,这种调节作用与精核核蛋白密切相关<sup>[15]</sup>,可以推测雌、雄性原核

形成的先后与受精卵内部生理及结构变化密切相关。



图版 泥蚶受精和早期卵裂过程核行为的细胞学观察

Plate Cytoplogical observation of nuclear behavior in fertilization and early cleavage in *Tegillarca granosa*

1. 未受精卵; 2. 精子; 3. 精子卵; 4~5. 第一次成熟分裂后期; 6. 第一极体排出; 7. 第二次成熟分裂中期; 8. 第二次成熟分裂后期; 9. 第二极体排出; 10. 雌、雄性原核形成; 11. 雌、雄性原核靠近; 12~13. 雌、雄性原核的染色体联合; 14. 第一次卵裂中期; 15~19. 第一次卵裂后期; 20. 2细胞时期; 21~22. 第二次卵裂中期; 23. 第二次卵裂后期; 24. 4细胞时期; 25~28. 多精入卵; 29. 染色体分离紊乱; 30. 多级分离; SD为纺锤体; CHS为染色体; SP为精子; SN为精核; PB1为第一极体; PB2为第二极体; CHT为染色质; FPN为雌性原核; MPN为雄性原核; CF为卵裂沟; PSD为多极纺锤体。

### 3.2 泥蚶多精入卵研究及对人工育苗生产的指导作用

多精入卵现象在双壳贝类中较为常见,如栉

孔扇贝<sup>[11]</sup>、宽壳全海笋 (*Bamea dilatata*)<sup>[16]</sup>、近江牡蛎 (*Crassostrea rivularis*)<sup>[17]</sup>、合浦珠母贝<sup>[14]</sup>、菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinum*)<sup>[18]</sup>、太平洋

牡蛎<sup>[19]</sup>等都存在多精入卵。本研究最新发现,泥蚶也具有多精入卵的异常现象。

根据目前研究结果来分析多精入卵的原因,一方面是内在因素,即可能是泥蚶缺乏或者具有不完善的阻滞多精入卵的机制,另一方面是外界受精条件,如受精时的水温、pH值及精卵比例等。一般认为,受精温度、卵子成熟度及精卵比例与多精入卵现象密切相关。沈亦平等<sup>[17]</sup>通过比较近江牡蛎在25℃和28.8℃水温条件下的受精情况,发现25℃组中出现多精入卵的胚胎数明显高于28.8℃组,从而认为受精温度是引起多精入卵的原因之一。精卵比例或精液浓度一直被认为是造成多精入卵和影响贝类胚胎发育进程的重要因素之一,然而目前在贝类中尚未用实验手段证实。本研究通过控制严格的精液浓度梯度受精,发现随着精液浓度的升高,早期胚胎、担轮幼虫和D形幼虫的畸形率显著增加,当精卵比例达到 $2 \times 10^4:1$ 时,D形幼虫率下降至1%~4%;并利用荧光显微技术和石蜡切片技术,在高浓度精液组的早期受精卵中找到了大量的多精入卵、多极纺锤体、分裂紊乱等异常现象,从而充分证明了精液浓度对胚胎和幼虫发育的巨大影响,具体研究结果见另文发表。

泥蚶多精入卵现象的成因、发育过程和结局的深入研究和探讨,对其人工育苗的生产实践具有重要的指导作用。随着精卵比例的增大,多精入卵现象明显增多,胚胎畸形率升高,幼虫大批死亡,泥蚶育苗生产中时常出现的大批担轮幼虫不能变态为D形幼虫可能主要与精液浓度过高有关。那么,在规模化人工育苗过程中,可以在泥蚶产卵排精时挑出部分雄贝,有效控制精卵比例,这对保证人工育苗的成功无疑大有帮助。泥蚶多精入卵这一现象的发现,对人工育苗生产提供了技术指导。通过控制受精时精卵比例大小,降低多精入卵比例,提高幼虫成活率,实现担轮幼虫向D形幼虫的成功转变,有助于人工育苗获得高产、稳产。

#### 参考文献:

- [1] 郑家声,王梅林,王志勇,等. 泥蚶性腺发育和生殖周期[J]. 青岛海洋大学学报, 1995, 25(4): 503—510.
- [2] 郑家声,王梅林,郭丹红,等. 3种蚶染色体组型的比较研究[J]. 海洋学报, 1996, 18(3): 78—85.
- [3] 陆荣茂,林志华,张永普,等. 毛蚶、泥蚶、橄榄蚶的核型比较分析[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(5): 625—629.
- [4] 孙慧玲,方建光,王清印,等. 泥蚶精子的超微结构[J]. 水产学报, 2000, 24(4): 297—302.
- [5] 竺俊全,杨万喜,石刚德. 泥蚶精子的超微结构[J]. 浙江大学学报:理学版, 2002, 29(3): 324—328.
- [6] 陆彤霞,竺俊全,於宏. 泥蚶精母细胞与精细胞的超微结构[J]. 浙江海洋学院学报:自然科学版, 2003, 22(1): 12—15.
- [7] 孙慧玲,方建光,王清印,等. 泥蚶受精过程的细胞学荧光显微观察[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 104—107.
- [8] 李永仁,阙华勇,张国范. 海水双壳类受精生物学研究进展[J]. 海洋科学, 2005, 29(4): 68—72.
- [9] Li Q, Osada M, Kashihara M, et al. Cytological observation on nuclear behavior in normal and gynogenesis eggs of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Suisanzoshoku*, 2000, 48(2): 193—198.
- [10] Li Q, Osada M, Kashihara M, et al. Effects of ultra-violet irradiation on genetical inactivation and morphological features of sperm of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Fisheries Science*, 2000, 66(1): 91—96.
- [11] 董迎辉,杨爱国,刘志鸿,等. 栉孔扇贝正常发育和人工雌核发育二倍体早期胚胎核行为的细胞学观察[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 29—35.
- [12] 何毛贤,姜卫国,潘金培. CB抑制合浦珠母贝受精卵第一极体释放的染色体分离[J]. 水产学报, 2002, 26(1): 15—20.
- [13] 任素莲,王德秀,绳秀珍,等. 栉孔扇贝受精过程的细胞学观察[J]. 海洋湖沼通报, 2000, (1): 24—29.
- [14] 沈亦平,刘汀,姜海波,等. 合浦珠母贝受精细胞学观察[J]. 武汉大学学报:自然科学版, 1993, 39(5): 115—120.
- [15] Brown D B. Chromatin decondensation and DNA synthesis in human sperm activated in vitro by using *Xenopus laevis* egg extracts[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1987, 242: 215—231.
- [16] 董迎辉,柴学良,陆荣茂,等. 宽壳全海笋受精和早期胚胎发育过程的细胞学观察[J]. 海洋学报, 2009, 31(1): 125—131.
- [17] 沈亦平,刘汀,姜海波,等. 近江牡蛎受精细胞学研究[J]. 武汉大学学报:自然科学版, 1995, 41(4): 482—486.
- [18] 毕克,包振民,黄晓婷,等. 菲律宾蛤仔受精及早期胚胎发育过程的细胞学观察[J]. 水产学报, 2004, 28(6): 623—627.
- [19] Longo F J, Mathews L, Hedgecock D. Morphogenesis of maternal and paternal genomes in fertilized oyster eggs (*Crassostrea gigas*): effects of cytochalasin B at different periods during meiotic maturation[J]. *Bio Bull* 1993, 185: 197—214.