

海水双壳类受精生物学研究进展

Progress in fertilization biology in marine bivalves

李永仁, 阙华勇, 张国范

(中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2005)04-0068-05

1 研究概况

在海水双壳类中开展的大量受精生物学研究表明, 绝大部分的海水双壳类为卵生型, 雌雄配子被排放到海水中完成受精。排放的卵子处于第一次减数分裂前期(生发泡期)或中期。精子入卵后, 受精卵恢复减数分裂, 先后排放出两个极体, 形成雌雄原核并最终启动卵裂。

国内外学者已经对牡蛎、珠母贝、贻贝、扇贝等主要经济双壳类的受精过程进行了细致的观察与研究, 研究手段从普通光学显微镜发展到荧光显微镜、电子显微镜, 研究内容涉及双壳类受精事件的过程和机制。近年来, 双壳类受精过程中亚细胞结构(如纺锤体)动态的研究取得了一定进展。

20世纪80年代以来, 海水双壳类的染色体操作得到广泛研究, 先后获得了三倍体、四倍体和非整倍体, 多倍体和非整倍体形成的受精生物学机制研究取得了许多进展。此外双壳类杂交受精研究取得了一些进展。双壳类受精生物学的研究, 一方面加深了对贝类受精机制的认识, 另一方面加速了经济贝类育种技术的完善。迄今为止, 国内外尚未见海水双壳类受精生物学研究的综述报道。

2 受精事件及其发生机制

2.1 精子进入卵子

绝大部分的双壳类将雌雄配子排放到海水中完成受精, 排放的卵子处于第一次减数分裂前期或中期。部分种类的受精发生在生发泡破裂以前, 即第一次减数分裂前期, 代表的种类有大西洋浪蛤(*Spisula solidissima*)^[1-2]; 精子入卵时机的第二种

类型是卵子处于第一次减数分裂中期等待受精, 如长牡蛎(*Crassostrea gigas*), 这种类型中也有个别卵子处于前期的终变期或双线期, 但随着卵母细胞在海水中浸泡时间的延长, 发育至第一次减数分裂中期的卵母细胞的比例显著增加^[3]。

一般认为, 精卵由于精子的自由运动而随机相遇。但某些种类的卵子能够分泌多肽类物质吸引精子, 在海水中该类物质的密度以卵子为中心从外向内逐渐递增, 诱导精子作趋向卵子的向心性运动^[4]。

顶体反应是精子入卵的关键。浪蛤的精卵相遇时, 精子以一定的倾角与卵子的卵黄膜接触, 引起精子的顶体膜与其外的质膜在多处融合, 形成一系列囊泡, 顶体消失, 释放水解酶等内含物。同时, 顶体下腔内的球状肌动蛋白聚合形成纤维状肌动蛋白, 并组成微丝束, 形成顶体突, 其后端固着于精核膜表面。顶体反应导致精子附着于卵黄膜, 而后精子在顶体突的引导下穿过卵黄膜, 与卵质膜表面的微绒毛相接触。精子接触点周围的微绒毛伸长包

收稿日期: 2004-02-12; 修回日期: 2004-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30100141, 30471326); 国家863青年基金项目(2001AA628060); 山东省博士基金项目(20000410)

作者简介: 李永仁(1978-), 男, 硕士研究生, 主要从事海水贝类遗传研究; 阙华勇, 通讯作者, E-mail: hque@ms.qdio.ac.cn

围精子的头部并扩大形成向外突起的受精锥，吸引精子的头部和中段(精子核和线粒体)进入卵子^[1~2]。长牡蛎精子入卵过程基本与浪蛤相似^[5]。

关于精子入卵的部位，一般认为双壳类精子入卵的部位是随机的，可以从卵子的任意部位入卵，这在合浦珠母贝、栉孔扇贝和泥蚶中均得到证实^[6~8]。

双壳类一般为单精受精。双壳类的卵子在受精后短时间内就能阻遏多精受精，但阻遏机制尚不完全清楚。长牡蛎精卵接触后诱发皮质反应，皮质颗粒与卵质膜融合，导致皮层颗粒发生胞吐作用，卵皮层变硬，受精膜举起，皮质反应是阻止多精受精的主要机制之一^[9]。但是在另一些种类，如大西洋浪蛤和紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 的受精过程中并未发生皮质反应，这 2 个种类的卵子受精后，表面的微绒毛结构和卵膜内的颗粒物质的分布和数量均发生显著变化，估计与阻止多精受精有关^[1,10]。

2.2 第一次减数分裂 (MI)

精子的进入，重新启动了卵子的成熟分裂。此时卵内核膜消失，纺锤体明显，染色体(四分体)整齐排列在纺锤体的赤道板上。紫贻贝 MI 纺锤体位于卵母细胞的边缘，其长轴与卵表面垂直，包含 2 个星体，每个星体具有一对中心粒^[10]。长牡蛎 MI 纺锤体中期赤道板长轴 11.4~13.4 μm ，短轴 4.9~6.0 μm ，长轴垂直于卵细胞表面^[3]。精核偏于一侧，迅速膨胀，并不参与减数分裂纺锤体的装配。

在后期 I，排列在赤道板上的四分体在纺锤丝的牵引下分开，每一个四分体形成 2 个二分体，分别移向纺锤体的两极。末期 I，卵膜上的肌动蛋白丝收缩，将靠近卵膜的二分体组和少量胞质分离出去，形成第一极体 (PB1)^[3]。一般认为，双壳类两次分裂紧密相连，并没有一个明显的间期^[11]。

2.3 第二次减数分裂 (MII)

在中期 II，纺锤体重新出现，卵子染色体重新致密化并排列于赤道板。紫贻贝 MII 纺锤体两端的星体，仅各含有一个中心粒^[10]。到了后期 II，姊妹染色单体分离并被纺锤体丝牵引至纺锤体的两极，靠近卵膜和 PB1 的一组染色体作为第二极体 (PB2) 被排出。但紫贻贝的 PB2 通过一个胞质桥的中体机构与卵子相连，直至第一次卵裂期二者才完全分开。目前还未在双壳类中发现 PB2 排出的位置在 PB1 排出位置之外的现象。

长牡蛎 MII 纺锤体的体积大约只有 MI 的一半，

其中期赤道板长轴 6.8~8.0 μm ，短轴 2.6~3.2 μm ，长轴起初平行于卵子表面，在即将进入后期 II 时，纺锤体发生旋转使其长轴垂直于卵子的表面^[3]。栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) MII 的纺锤体略小于 MI 的纺锤体，但与长牡蛎不同的是，其长轴开始就垂直于卵子表面^[12]。

2.4 雌雄原核的形成

卵子减数分裂接近完成时，雄原核与雌原核渐次形成。精核核膜囊泡化并逐渐消失，染色质去致密并分散，这一过程在精子入卵以后就已经开始，在中期 II 至后期 II 精子头部膨胀至最大。两个极体形成后，精核染色质周围重新形成核膜，形成雄原核^[13]。成熟分裂完成后，来自卵细胞的一套染色体去致密、膨胀并被核膜包被形成雌原核^[6]。

精核去致密的机制还存在争议，大西洋浪蛤卵子生发泡的破裂是精核去致密的先决条件^[2]；全海笋 (*Barnea candida*) 精核的去致密却并不依赖于卵子生发泡的破裂，而与卵内 pH 的升高密切相关^[14]。长牡蛎精核的扩张及雌雄原核的融合与卵细胞成熟分裂的一系列事件有关^[3]。在精核去致密的调节因素中究竟谁是主导仍悬而未决。

精核在卵内的膨胀速度并不恒定，大西洋浪蛤受精卵内精核膨胀的速度与母本染色质的状态相关，可分为 4 个阶段：(1) 生发泡破裂以前，精核低速膨胀；(2) 生发泡破裂，精核迅速扩增；(3) 随着 MI 纺锤体的形成，精核扩增速度锐减，持续到减数分裂完成；(4) 减数分裂接近尾声，精核经历第二次快速膨胀，并形成雄原核^[2]。栉孔扇贝和长牡蛎入卵的精核经历类似的膨胀扩散过程^[12,15]。

雌雄原核形成的时间以及先后顺序是研究的焦点之一。在双壳类中，通常雄原核形成的时间略早。栉孔扇贝雌原核是在雄原核形成的下一期中形成^[12]，长牡蛎在 PB2 形成之后，雌雄原核几乎同时出现^[15]，近江牡蛎的雄原核出现的时期非常早，甚至有很多受精卵在中期 II 雄原核就已经出现^[16]。

2.5 雌雄原核的联合或融合

雌雄原核的联合或融合从两原核形成之后启动，两原核沿着一定的路线向卵中央移动、相互靠近，长牡蛎雌雄原核以联合的方式结合，两原核各自进入卵裂前期，而后来自雄原核和雌原核的染色体重新排列在第一次卵裂的中期赤道板上，准备卵裂^[15]。栉孔扇贝两原核相互靠近后，核膜融合，染



色质相互合并,形成致密的、直径约 $8\ \mu\text{m}$ 的块状颗粒,以融合的方式形成合子^[12]。

雌雄原核联合或融合的机制至今仍不清楚,但是大量的实验观察表明卵内的微管以及精核带入卵内的中心粒在此过程中发挥重要的作用。长牡蛎雌雄原核融合之前在雌原核的周围出现微管束的有序排列并且很快退化,与此同时,在雄原核周围出现星光^[3]。合浦珠母贝雌雄原核融合前,在雄原核周围出现星光并逐渐增强,之后雌雄原核靠拢^[6]。

卵裂需要 DNA 完成复制才能经过有丝分裂 S/G₂ 检验点,但双壳类 DNA 复制的确切时间迄今尚不确定。一般认为, DNA 复制于第二极体排出之后的原核期^[11],在此期间内, DNA 以松散的染色质形式存在,为 DNA 复制提供了形态学基础。

3 异常受精现象

3.1 多精受精

多精受精在双壳类中较为常见,在栉孔扇贝、全海笋、长牡蛎、美洲牡蛎 (*C. virginica*) 等种类存在多精受精现象,入卵精核在卵质中形成多个雄原核^[17]。

多精受精的受精卵通常不能正常发育。一般认为,卵裂的纺锤体是由精子带入的一对中心粒组织的,正常的受精卵只有一对中心粒,而多精受精的卵细胞内存在多对中心粒,导致纺锤体形成异常,细胞缺乏平均分配染色体的机制,形成非二倍体胚胎或畸形胚胎。

避免多精受精对双壳类胚胎的正常发育至关重要。研究表明,与随着卵子在海水中的孵育时间的延长,长牡蛎卵子的多精受精率显著降低。长牡蛎的卵子经化学诱导排出后 15 min 内受精,精卵比低于 30:1,多精受精率仍达到 54%;当卵子在海水中孵育 1 h 之后,即使在精卵比 1000:1 的情况下受精,多精受精率也不会超过 7%^[3]。此外,人工获取的牡蛎卵在受精中的多精受精率明显高于自然排放的卵子,估计与卵子成熟度不好有关。

3.2 减数分裂的不同步性

其具体表现因种类不同而异。在马氏珠母贝观察到两类频率较高的染色体异常行为。第一类是未受精卵发育至第二次减数分裂中期;第二类现象是 PB2 的染色质仍留在已经进入第一次卵裂的受精卵中。研究表明,在适温范围内,提高受精的温度有

助于提高受精卵发育的同步性^[18]。

贝类卵母细胞在成熟分裂上的不同步性,导致贝类产生非二倍体胚胎。在蛤类、牡蛎、贻贝中均观察到一定比例的单倍体、多倍体以及非整倍体等异常胚胎^[19-21]。

4 育种受精生物学

4.1 染色体操作的受精生物学研究

自 20 世纪 80 年代,贝类多倍体诱导技术受到广泛重视,通过对染色体组进行定向改造,培育多倍体已经在多种双壳类中相继获得成功。比较成熟的多倍体诱导技术是采用物理或化学手段干预受精卵的减数分裂,抑制 PB1 或 PB2 的排放。多倍体诱导的受精生物学研究成为多倍体技术研发的核心内容之一。

采用染色体压片技术,揭示出 PB1 的抑制显著改变了长牡蛎第二次减数分裂的染色体行为。大部分受精卵(占 68%)在 MII 期染色体发生三极分离。另两种染色体分离方式分别是联合二极分离(占 7%)和独立二极分离(占 12%)^[22]。

采用免疫荧光显微技术研究细胞松弛素 B(CB)对长牡蛎受精事件的影响表明,在减数分裂 I 前实施 CB 处理,受精卵没有形成 PB1,所有的二分体均被留在卵母细胞。进入 MII,二分体排列在一个三极纺锤体的赤道板上,减数分裂完成后形成 3-6 个雌原核。在 MII 期施加 CB,并未改变 MII 纺锤体的特征,但受精卵没有形成 PB2 而形成 2 个雌原核^[3]。

利用长牡蛎三倍体产生的卵子与二倍体产生的精子受精,抑制 PB1 的排出,得到了四倍体长牡蛎。对发育受精卵的连续取样观察表明, PB1 受抑制的受精卵进入 MII,出现四种典型的染色体分离类型:三极分离(54.5%),联合二极分离(12%),独立二极分离(2.5%)和不完全联合二极分离(4%)。其余 23% 受精卵染色体分离行为不规律,呈现不同程度的紊乱。联合二极分离是四倍体产生的主要机制^[23]。

PB1 发育受阻的栉孔扇贝受精卵,在 MII 期观察到 4 种不同的染色体分离形式:二极分离(11.4%)、三极分离(40.9%)、四极分离(15.7%)和非同步分离(4.0%)等,从而造成了三倍体、四倍体、五倍体以及非整倍体胚胎^[24]。

CB 抑制合浦珠母贝受精卵 PB1 释放的染色体

分离行为研究揭示出在 MII 中出现了多种分离模式,主要有二极分离(28.67%)、三极分离(40.56%)及四极分离(23.78%)等三种模式^[25]。

上述研究结果表明双壳类受精过程受到人为干扰后,受精过程发生显著变化,从一个侧面反映出双壳类受精机制的复杂性。

4.2 杂交的受精生物学研究

双壳类的杂交一直是贝类遗传育种的重要工作之一。杂交成功与否,首先需要考察杂交受精是否可行。国内外学者采用光镜或电镜结合细胞化学和组织化学技术对双壳类杂交的受精生物学进行了研究。

合浦珠母贝、长耳珠母贝和大耳珠母贝种间杂交受精过程的观察表明,母本卵细胞内出现异种的父本精核染色体,并且卵裂的有丝分裂器出现不同的二套染色体,证实了杂交组合实现了异种受精^[26]。

长牡蛎和近江牡蛎(*C. rivularis*)分别与美洲牡蛎(*C. virginica*)杂交受精表明,长牡蛎与美洲牡蛎的杂交组的受精率显著低于自交组,但近江牡蛎与美洲牡蛎的杂交与自交之间的受精率无显著差异。各个杂交组合从减数分裂发育到卵裂的时间无显著差异^[27]。

阙华勇^[28]关于长牡蛎(二倍体和四倍体)与近江牡蛎(二倍体)杂交研究的报道表明,直至人工授精后 180 min,杂交组观察不到极体的排放或卵裂等受精迹象。细胞学观察表明,杂交组中绝大部分的卵子在人工授精后 180 min,仍滞留在减数分裂前期 I 或中期 I。仅在四倍体长牡蛎与二倍体近江牡蛎的杂交组中发现 2%的卵母细胞进入后期 I。尽管如此,经过遗传学鉴定,该项研究仍获得了少量长牡蛎与近江牡蛎的杂种后代(包括二倍体和三倍体),可见,这 2 个近缘种的杂交是可行的,但受精率极低且完成受精的时间超过 3 h。

以栉孔扇贝为母本、虾夷扇贝为父本进行杂交,表明杂交受精能正常进行,完成减数分裂后进入卵裂,但杂交的精子入卵较对照的迟缓,杂交受精的电镜观察证实精子发生顶体反应,卵子发生皮质反应、受精膜举起等典型的受精生物学事件^[29,30]。

5 研究展望

受精机制是贝类学最重要的研究内容之一,研究的范围几乎涵盖已发现的双壳类。但是,由于研

究手段的局限,以前对于这方面的研究一直停留在形态观察上,基因水平上阐述双壳类受精机制的报道匮乏。随着贝类染色体操作技术的不断深入,迫切要求加深了解双壳类受精机制。例如,要解决贝类四倍体诱导技术研发中面临的许多问题,都需要掌握深层次的受精机理。在基因表达调控等分子生物学水平上对贝类受精过程加以研究,是双壳类受精生物学未来发展的一个重要方向。

最近的十几年,生物技术获得了迅猛的发展,为包括受精生物学在内的众多领域的研究提供了新的契机。比如 mRNA 差显技术能灵敏地检测配子结合以及早期胚胎发育过程中基因的时序表达,是研究受精卵发育机理的重要手段;通过基因敲除,可以明确地阐明特定基因在受精及胚胎发育过程中的作用;激光扫描共聚焦显微技术和量子点荧光分析技术具有分辨率高、特异性强等优点,是观察受精期间染色体以及纺锤体的有效手段。膜电位检测技术和膜片钳位记录技术等细胞生理学技术取得的长足进展,也为深层次揭示受精过程中的生理变化提供了有力的研究手段。随着这些新技术的应用,双壳类受精生物学研究中存在的许多疑难问题将会逐步得到解决,研究水平将得到显著提高。

参考文献:

- [1] Longo F J. Ultrastructural aspects of fertilization in Spiralian eggs[J]. *Amer Zool*, 1976, 16: 375-394.
- [2] Chen D Y, Longo F J. Sperm nuclear dispersion coordinate with meiotic maturation in fertilized *Spisula solidissima* eggs[J]. *Dev Biol*, 1983, 99: 217-224.
- [3] 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]. *Biol Bull*, 1993, 185: 197-214.
- [4] Ward G, Review R. Molecular events mediating sperm activation[J]. *Dev Biol*, 1993, 158: 9-34.
- [5] 姜明, 汝少国, 陶道蓉, 等. 入卵过程中太平洋牡蛎精子超微结构的变化[J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(4): 551-556.
- [6] 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, 5: 115-120.
- [7] 杨爱国, 王清印, 孔杰, 等. 栉孔扇贝受精卵减数分裂的细胞学研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3): 96-98.
- [8] 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.
- [9] Stephano J L, Gould M. Avoiding polyspermy in the oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. **Aquaculture**, 1988, 73: 295-307.
- [10] Longo F J, Anderson E. Cytological aspects of fertilization in the lamellibranch, *Mytilus edulis*. I. Polar body formation and development of the female pronucleus[J]. **J Exp Zool**, 1969, 172: 69-96.
- [11] Longo F J, Scarpa J. Expansion of sperm nucleus and association of the maternal and paternal genomes in fertilized *Mulinia lateralis* eggs[J]. **Biol Bull**, 1991, 180: 56-64.
- [12] 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, 5(1): 24-29.
- [13] Longo F J, Anderson E. Cytological aspects of fertilization in the lamellibranch, *Mytilus edulis*. II. Development of the male pronucleus and the association of the maternally and paternally derived chromosomes[J]. **J Exp Zool**, 1969, 172: 97-120.
- [14] Dube F, Dube L D, Guerrier P. Sperm nuclear decondensation in *Barnea candida* (Mollusca Pelecypoda) oocytes does not require germinal vesicle breakdown[J]. **J Exp Zool**, 1982, 221: 383-387.
- [15] 任素莲, 王德秀, 王如才, 等. 太平洋牡蛎受精过程中的精核扩散与成熟分裂[J]. 海洋湖沼通报, 1999, 1: 34-39.
- [16] 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.
- [17] Stiles S S, Longwell A C. Fertilization, meiosis and cleavage in eggs from large mass spawnings of *Crassostrea virginica* Gmelin, the commercial American oyster[J]. **Caryologia**, 1973, 26: 253-262.
- [18] Komaru A, Matsuda H, Yamakawa T *et al.* Meiosis and fertilization of the Japanese pearl oyster eggs at different temperature observed with a fluorescence microscope[J]. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 1990, 56 (3): 425-30.
- [19] Menzel R W and Menzel M Y. Chromosomes of two species of quahog clams and their hybrids[J]. **Biol Bull**, 1965, 129 (1): 181-188
- [20] Longwell A C, Stiles S S and Smith D G. Chromosome completion of the American oyster *Crassostrea virginica*, as seen in meiotic and cleaving eggs[J]. **Can J Genet Cytol**, 1967, 9: 845-856.
- [21] Ahmed M, Sparks A K. Chromosome number, structure and autosomal polymorphism in the marine mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*[J]. **Boil Bull**, 1970, 138 (1): 1-13.
- [22] Guo, X, Hershberger, W K, Cooper, K, *et al.* Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: II. Segregation of chromosomes[J]. **Biol Bull**, 1992, 183: 387-393.
- [23] Que H, Guo X, Zhang F, *et al.* Chromosome segregation in fertilized eggs from triploid pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), following inhibition of polar body I[J]. **Biol Bull**, 1997, 193: 14-19.
- [24] Yang H, Que H, He Y, *et al.* Chromosome segregation in fertilized eggs from zhikong scallop *Chlamys farreri* following polar body I inhibition with CB[J]. **J Shellfish Res**, 2000, 19(1): 101-105.
- [25] 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.
- [26] 姜卫国, 魏贻尧, 李刚. 合浦珠母贝、长耳珠母贝和大耳珠母贝种间杂交的研究. II. 受精过程和杂交后代的染色体观察[J]. 热带海洋, 1983, 2(4): 316-320.
- [27] Scarpa J, Allen S K Jr. Comparative kinetics of meiosis in hybrid crosses of Pacific oyster *Crassostrea gigas* and Suminoe oyster *C. rivularis* with the American oyster *C. virginica*[J]. **J Exp Zool**, 1992, 263: 316-322.
- [28] Que H and Allen S K Jr. Hybridization of tetraploid and diploid *Crassostrea gigas* (Thunberg) with diploid *C. ariakensis* (Fujita) [J]. **J Shellfish Res**, 2002, 21(1): 137-143.
- [29] 周丽青, 杨爱国, 刘志鸿等. 栉孔扇贝(♀) × 虾夷扇贝(♂)受精细胞学观察[J]. 动物学杂志, 2003, 38(4): 20-23.
- [30] 周丽青, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 栉孔扇贝(♀) × 虾夷扇贝(♂)精子入卵过程的电镜观察[J]. 中国水产科学, 2003, 10(3): 189-192.

(本文编辑: 张培新)