

宽壳全海笋受精及早期卵裂的细胞学研究

董迎辉^{1,2}, 林志华¹, 柴雪良², 肖国强²

(1. 浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江 宁波 315100; 2. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 温州 325005)

摘要:采用 HOECHST 33258 染色荧光显微方法, 对宽壳全海笋 *Barnea dilatata* (Souleyet) 受精卵早期发育中的生发泡破裂、极体排放、两性原核联合、早期卵裂、多精入卵等细胞学事件进行了研究。结果显示, 宽壳全海笋成熟未受精卵呈梨形或卵圆形, 处于第一次成熟分裂前期, 生发泡尚存; 在水温 $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下进行受精, 受精后 6~9 min, 生发泡逐渐萎缩、破裂; 受精后 18、25 min, 受精卵先后排出第一、第二极体, 完成第一次和第二次成熟分裂; 受精后 35 min, 雌、雄原核在卵子中央发生染色体联合; 随后, 联合核的染色体共同排列在纺锤体的赤道板上, 形成第一次有丝分裂的中期分裂相; 受精后 45 min, 形成 2 个大小不等的卵裂球, 完成第一次卵裂; 第二次卵裂过程与第一次卵裂基本相同, 只是卵裂方向与第一次卵裂基本垂直, 在受精后 60~65 min, 第二次卵裂完成, 形成 1 大 3 小 4 个卵裂球。另外, 实验中发现了明显的第一极体分裂现象和极少量的多精入卵现象。

关键词:宽壳全海笋; 细胞学研究; 受精; 早期卵裂; 多精入卵

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)10-0068-05

宽壳全海笋 *Barnea dilatata* (Souleyet) 是海笋科 (Pholadidae) 全海笋属 (*Barnea*) 中个体较大的种类, 其肉味鲜美, 较之牡蛎有过之而无不及^[1]。自 20 世纪 90 年代以来, 随着进口象拔蚌在国内市场上的风靡, 与之口味相似且价格相对低廉的海笋也逐渐受到诸多食客的青睐。市场需求的增加进一步促进了海笋生产实践和基础理论的研究, 如魏利平等^[2]报道了大沽全海笋 *Barnea davidi* (Deshayes) 的生物学习性及人工育苗技术; 闫喜武等^[3]、柴雪良等^[4]研究了宽壳全海笋的繁殖特性和人工繁育技术; 陆荣茂等^[5]、肖国强等^[6]分别对宽壳全海笋的染色体核型和稚贝的生理生态特性进行了研究。作者采用荧光显微技术对宽壳全海笋受精及早期卵裂中的一系列细胞学现象进行了系统观察与分析, 以期对受精机制的深入研究和细胞工程育种的顺利开展提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 材料

宽壳全海笋亲贝取自浙江省海洋水产养殖研究所清江基地养殖塘, 系温州洞头海区野生群体繁殖的第二代, 壳长 4~6 cm。荧光染色试剂盒 HO-

ECHST 33258 购自江苏碧云天生物技术研究 所。

1.2 方法

挑选性腺饱满的亲贝, 置阴凉通风处阴干 2~3 h 进行催产, 单个放入盛有过滤海水的塑料桶里产卵。通过镜检, 选择质量好的精、卵, 在水温 $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下进行人工授精。从受精开始, 20 min 内每隔 3 min 取样一次, 40~90 min 每隔 5 min 取样一次, 每次取卵量不少于 500 粒。样品用 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 配制的 4% 多聚甲醛溶液固定, 更换 2 次固定液, 最后放于 4°C 冰箱中保存。观察时吸取适量样品, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 冲洗 2~3 次, 然后滴于载玻片上, 用 HOECHST 33258 荧光染料在黑暗环境下染色 5~10 min, 滴 1 滴抗淬灭剂, 加盖玻片在 Nikon 80i 荧光显微镜的紫外光 (365 nm) 下观察, CCD 拍照。

收稿日期: 2009-07-15; 修回日期: 2009-08-01

基金项目: 国家科技基础条件平台建设项目 (2007DKA30470-015);

浙江省科技厅重点项目 (2004C22021)

作者简介: 董迎辉 (1980-), 男, 河南洛阳人, 助理研究员, 从事海洋贝类发育生物学和遗传育种研究, E-mail: dongyinghui118@126.com; 林志华, 通信作者, 博士, 研究员, E-mail: zhihua9988@126.com

2 结果

对宽壳全海笋受精至第2次卵裂过程中的核相变化进行了观察。为了便于研究和说明,将其发育过程划分为15个阶段:

S₀ 未受精卵和精子:未受精卵呈梨形或卵圆形,直径45~50 μm,核相处于第1次成熟分裂前期,生发泡大而明显,内部的染色质被荧光染料染成亮蓝色,呈团块状散在分布(图1-1)。精子在荧光显微镜下,仅能看到椭圆形头部的浓缩染色质发出亮蓝色荧光(图1-2)。

S₁ 精子附卵:受精后3 min,精子附着于卵子表面,附着部位随机(图1-3)。

S₂ 生发泡萎缩与破裂:受精后6 min开始,生发泡逐渐萎缩,核膜边缘越来越模糊,染色体的螺旋化程度加剧(图1-5)。受精后9 min左右,核膜已不复存在,生发泡完全破裂,核液与胞质相互混杂,染色体因高度浓缩而变得显而易见(图1-6)。生发泡破裂以后,精子进入卵细胞质,迅速去致密膨胀,形成圆球形的精核,直径约4.0~6.0 μm(图1-7,1-8)。

S₃ 第1次成熟分裂中期:受精后12 min,受精卵染色体粗短鲜明,整齐地排列于纺锤体赤道板中央,纺锤体的一端垂直靠近卵膜,核相进入第一次成熟分裂中期(图1-9)。

S₄ 第1次成熟分裂后期:受精后15 min,位于纺锤体赤道板中央的同源染色体开始分开,一组染色体慢慢向卵膜移动,而另一组染色体向相反方向移动(图1-10,1-11)。

S₅ 第一极体排出:受精后18 min,靠近卵膜处的那组染色体经凝缩后被排出卵膜之外,在受精膜之下形成一个小球状突起,即为第一极体(图1-12)。

S₆ 第2次成熟分裂中期:受精后20 min,留于卵内的那组母本染色体则重新排列于赤道板上,形成第2次成熟分裂的中期分裂相(图1-13)。

S₇ 第2次成熟分裂后期和第二极体排出:受精后20~25 min,以同样的分裂方式在第一极体下方发生第二次成熟分裂,姐妹染色单体分离,其中的一组染色体被排出卵外,形成第二极体。也有些卵

的第一极体发生分裂。在成熟分裂过程中,精核一直位于卵子皮质区一侧,且大小未发生显著变化(图1-14~1-16)。

S₈ 雌、雄原核形成:受精后30 min,精核发生第二次膨胀,形成一团松散的核物质,即为雄原核;卵子的染色体也膨大扩散,形成形状、结构相似的雌原核,雌原核的位置靠近极体。雌、雄原核膨胀到最大时的直径为12~14 μm(图1-17,1-18)。

S₉ 雌、雄原核靠近和联合:受精后30~35 min,雌、雄原核沿一定路线逐渐迁移到卵子中央,虽然两原核互相靠拢,但并不融合,各自形成独立的染色体。随后核膜破裂,两组染色体以联合的方式结合(图1-19~1-22)。

S₁₀ 第1次卵裂中期:受精后35 min左右,染色体完成联合,联合核的染色体整齐地排列在纺锤体的赤道板上,形成第1次卵裂的中期分裂相(图1-23a,1-23b)。

S₁₁ 第1次卵裂后期:受精后35~40 min,联合核的染色体进行分离,纺锤丝将染色体逐渐拉向纺锤体两极(图1-24~1-26)。

S₁₂ 2细胞期:受精后45 min,卵细胞自极体处发生纵向内缢,形成2个大小不等的卵裂球,二者之间的卵裂沟十分明显(图1-27,1-28)。

S₁₃ 第二次卵裂中期:受精后50 min,2个卵裂球中的染色质丝逐渐螺旋变粗,形成清晰可见的染色体,排列于纺锤体的赤道板上,大卵裂球的发育速度相对快些,先发生核分裂(图1-29~1-31)。

S₁₄ 第二次卵裂后期:受精后55 min,2个卵裂球均发生核分裂,与第一次卵裂过程基本相同,在与第一次卵裂垂直的方向发生纵裂(图1-32,1-33)。

S₁₅ 4细胞期:受精后60~65 min,核分裂和胞质分裂都已结束,形成1大3小4个卵裂球。在随后的发育中,大卵裂球的发育速度仍比其他小卵裂球快(图1-34,1-35)。

在宽壳全海笋的受精过程中,发现了较多的第一极体分裂现象(图1-19,1-21,1-32)。基于对200个30~50 min的受精卵的观察和统计,其中有43个受精卵发生第一极体分裂,占21.5%。

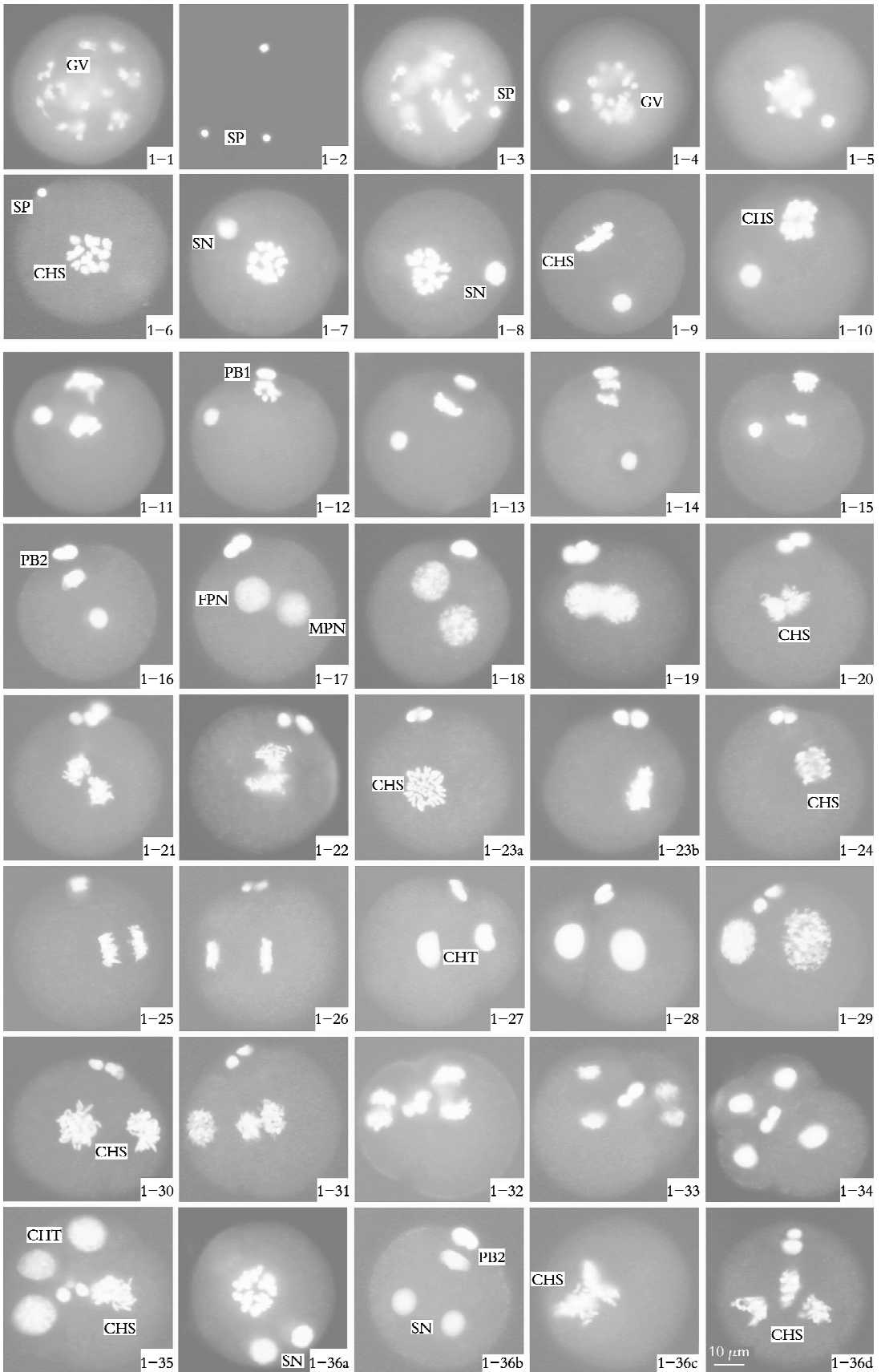


图 1 宽壳全海笋受精及早期卵裂过程的荧光显微观察

Fig. 1 Cytological process of fertilization and early embryonic development in *Barnea dilatata* with fluorescent microscope($\times 400$)

1-1. 生发泡阶段的未受精卵;1-2. 精子;1-3. 精子附卵;1-4,1-5. 生发泡萎缩;1-6. 生发泡破裂;1-7,1-8. 精核第1次膨胀;1-9. 第1次成熟分裂中期;1-10,1-11. 第1次成熟分裂后期;1-12. 第一极体排出;1-13. 第2次成熟分裂中期;1-14,1-15. 第2次成熟分裂后期;1-16. 第二极体排出;1-17,1-18. 雌、雄原核形成;1-19. 雌、雄原核靠近;1-20~1-22. 雌、雄原核的染色体联合;1-23a,b. 第一次卵裂中期;1-24~1-26. 第1次卵裂后期;1-27,1-28. 2细胞期;1-29. 第2次卵裂前期;1-30. 第2次卵裂中期;1-31~1-33. 第2次卵裂后期;1-34. 4细胞期;1-35. 第3次卵裂前期;1-36 a,b. 多精入卵;1-36c,d. 染色体异常分离

GV:生发泡;SP:精子;CHS:染色体;SN:精核;PB1:第一极体;PB2:第二极体;FPN:雌性原核;MPN:雄性原核;CHT:染色体

1-1. Unfertilized egg of germinal vesicle stage; 1-2. Sperm; 1-3. Sperm attaching to the egg; 1-4,1-5. Atrophy of germinal vesicle; 1-6. Germinal vesicle breakdown; 1-7,1-8. The first sperm nuclear expansion; 1-9. Metaphase of the first meiosis; 1-10,1-11. Anaphase of the first meiosis; 1-12. Release of the first polar body; 1-13. Metaphase of the second meiosis; 1-14,1-15. Anaphase of the second meiosis; 1-16. Release of the second polar body; 1-17,1-18. Formation of the female and male pronuclei; 1-19. Approach of the female and male pronuclei; 1-20~1-22. Association of the female and male pronuclei; 1-23a,b. Metaphase of the first cleavage; 1-24~1-26. Anaphase of the first cleavage; 1-27,1-28. 2-cell stage; 1-29. Prophase of the second cleavage; 1-30. Metaphase of the second cleavage; 1-31~1-33. Anaphase of the second cleavage; 1-34. 4-cell stage; 1-35. Prophase of the third cleavage; 1-36a,b. Polysperm; 1-36c,d. Chromosomal abnormalities

GV: Germinal Vesicle; SP: Sperm; CHS: Chromosome; SN: Sperm Nucleus; PB1: Polar Body 1; PB2: Polar Body 2; FPN: Female Pronucleus; MPN: Male Pronucleus; CHT: Chromatin

另外,观察到了极少数的多精入卵现象,一般2~3个精子几乎同时入卵,入卵精子都能发生膨胀(图1-36a),启动卵子进行成熟分裂,排出1个或2两个极体(图1-36b)。但在随后的发育过程中,常因染色体分离异常而导致发育停止(图1-36c,36d)。

3 讨论

不同种类动物成熟未受精卵所处的发育阶段差异很大。海绵、蛔虫和一些多毛类处于初级卵母细胞阶段,成熟分裂没有开始,生发泡尚存;线虫、海星和一些虾蟹类甲壳动物处于第一次成熟分裂中期,同源染色体整齐地排列于纺锤体赤道板上,成熟分裂尚未开始;鱼类、两栖类和多数哺乳动物处于第二次成熟分裂中期,已经完成一次成熟分裂,排出一个极体;海胆则已完成两次成熟分裂,排出两个极体^[7,8]。双壳贝类成熟卵子处于第一次成熟分裂前期或中期,其中大多数贝类如合浦珠母贝 *Pinctada martensii*^[9]、栉孔扇贝 *Chlamys farreri*^[10]、泥蚶 *Tegillarca granosa*^[11]、菲律宾蛤仔 *Ruditapes philippinarum*^[12]、文蛤 *Meretrix meretrix*^[13] 等处于第一次成熟分裂中期,生发泡已经破裂,而有些贝类如大西洋浪蛤 *Sipunculus nudus*^[14]、太平洋牡蛎 *Crasostrea gigas*^[15]、近江牡蛎 *Ostrea rivularis*^[16] 等处于第一次成熟分裂前期,生发泡尚存。本研究发现,宽壳全海笋的成熟未受精卵处于第一次成熟分裂前期,生发泡尚未破裂,必须经过精子入卵的刺激,才能促使生发泡萎缩、破裂,启动卵子成熟分裂进行。

极体是卵母细胞在成熟分裂过程中形成的小细胞,经过两次成熟分裂,形成第一极体和第二极体,第一极体有时亦分裂成两个极体。这些极体内部细胞质极少,缺乏营养物质,在随后的发育中很快被卵细胞吸收而消失。双壳贝类的卵子在排放时处于第

一次减数分裂的前期或中期,经过精子入卵或海水刺激才能激活卵子发育完成成熟分裂,释放两个极体,利用这一延迟的成熟分裂特点,可通过染色体操作对贝类进行多倍体、雌核发育等细胞工程育种。第一极体分裂现象在双壳贝类中报道不多,一般其发生比例较低。本实验中,宽壳全海笋的第一极体分裂现象非常明显,占受精卵数的21.5%。造成这种现象的原因目前还不清楚,需要进一步的研究解释。

多精入卵现象在贝类中普遍存在,被认为是具有不完善的阻止多精入卵的机制。目前,对海胆阻止多精入卵的机制研究得比较透彻,主要包括:(1)快封闭反应:精子进入卵细胞迅速触发膜电位改变,引起膜外精子与卵细胞识别和融合障碍;(2)慢封闭反应:通过皮层反应形成厚而硬的受精膜,防范多余精子入卵^[7]。对贝类多精入卵的研究也发现了相似的机制,如孙振兴等^[17]推测皱纹盘鲍 *Haliotis discus hainai* 受精时也是通过卵膜电位的变化阻止早期入卵精子和皮层反应使后期到达精子失去活力。但有些贝类的阻滞机制相对简单和不完善,如太平洋牡蛎卵子由于缺乏皮层颗粒,而不能通过皮层反应阻止多精入卵;扇贝的卵黄膜薄,其外无胶膜层,卵黄膜举起形成受精膜时,结构和厚度基本无变化,不能有效阻止多精入卵发生^[18]。在宽壳全海笋的受精过程中,也发现了少量的多精入卵现象,对其阻止多精入卵的机制还不清楚,尚待后续深入研究。

参考文献:

- [1] 张玺,齐钟彦,李洁民. 中国的海笋及其新种[J]. 动物学报, 1960, 12(1): 63-87.
- [2] 魏利平,马明正,唐芳,等. 大沽全海笋生物学特性及人工育苗技术[J]. 水产学报, 1997, 21(3): 296-302.
- [3] 闫喜武,张跃环,左江鹏,等. 宽壳全海笋人工育苗技术的初步研究[J]. 渔业现代化, 2007, 34(2): 18-21.

- [4] 柴雪良, 方军, 张炯明, 等. 宽壳全海笋人工繁育技术[J]. 水产学报, 2009, **33**(2): 259-264.
- [5] 陆荣茂, 柴雪良, 董迎辉, 等. 宽壳全海笋的染色体核型分析[J]. 台湾海峡, 2008, **27**(1): 43-46.
- [6] 肖国强, 柴雪良, 张炯明, 等. 宽壳全海笋稚贝呼吸代谢及其对若干环境因子适应性的研究[J]. 海洋科学, 2007, **31**(9): 24-29.
- [7] 樊启昶, 白书农. 发育生物学原理[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002. 321-323.
- [8] 陈锦民, 康现江, 李少菁, 等. 锯缘青蟹受精过程核相变化的研究[J]. 厦门大学学报, 2004, **43**(5): 688-692.
- [9] 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): 115-123.
- [10] 杨爱国, 王清印, 孔杰, 等. 栉孔扇贝受精卵成熟分裂的细胞学观察[J]. 中国水产科学, 1999, **6**(3): 96-98.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 董迎辉, 林志华, 柴雪良, 等. 文蛤受精及早期胚胎发育过程的细胞学观察[J]. 动物学报, 2007, **53**(4): 700-709.
- [14] Chen D Y, Long F J. Sperm nuclear dispersion coordinate with meiotic maturation in fertilized *Spisula solidissima* egg [J]. *Dev Biol*, 1983, 99: 217-224.
- [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. 近江牡蛎受精的细胞学研究[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1995(8): 482-486.
- [17] 孙振兴, 王如才, 姜明, 等. 皱纹盘鲍受精过程的电镜观察[J]. 动物学研究, 1997, **18**(3): 253-257.
- [18] 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): 189-193.

Cytological study on fertilization and early cleavage in *Barnea dilatata*

DONG Ying-hui^{1, 2}, LIN Zhi-hua¹, CHAI Xue-liang², XIAO Guo-qiang²

(1. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;
2. Zhejiang Mari-Culture Research Institute, Wenzhou 325005, China)

Received: Jul., 15, 2009

Key words: *Barnea dilatata*; cytological study; fertilization; early cleavage; polysperm

Abstract: During fertilization and early embryonic development in *Barnea dilatata*, a series of characteristic cytological events, including germinal vesicle breakdown, polar body emission, association of the male and female pronuclei and polysperm, were studied by the fluorescent microscope with HOECHST 33258 stained. The results indicated that unfertilized mature eggs of *B. dilatata* were pear-shaped or egg-shaped and remained at the prophase of the first maturation division with obvious germinal vesicle and nucleolus. At water temperature of $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sperms quickly attached to the surface of the egg after mixing of sperms and eggs. 6~9 min after insemination, germinal vesicle gradually got smaller and brokedown eventually. The fertilized eggs released the first and the second polar bodies at about the 18th min and the 25th min respectively. About 35 min, the male and female pronuclei matched into an association nucleus after their chromosomes formed respectively in the center of egg. Subsequently, the chromosomes of association nucleus arranged on the metaphase plate of first cleavage. Until about 45 min, the chromosomes were separated equally into two daughter cells which are different evidently in size. The process of the second cleavage was fundamentally similar to the first cleavage, but the cleavage direction was almost vertical to the first cleavage furrow. 60~65 min after insemination, the second cleavage has finished and formed four daughter cells, one big and three small. Additionally, the phenomena of the PB1 division and polysperm were also observed in the experiment.

(本文编辑:张培新)