

异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体的微管动态变化

吴彪^{1,2}, 杨爱国¹, 王清印¹, 刘志鸿¹, 周丽青¹

(1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 上海海洋大学 生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要: 采用紫外线遗传灭活的长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 精子激活栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 卵子, 并用 6-DMAP 诱导染色体加倍的方法, 获得第二极体抑制型雌核发育二倍体早期胚胎。多聚甲醛固定、免疫荧光染色后, 运用荧光显微镜观察栉孔扇贝正常发育卵子和异源精子诱导的雌核发育卵子, 对其受精过程中微管的动态变化过程进行观察和分析。结果表明: (1) 正常发育组受精卵内以微管为基础的纺锤体能够顺利地组装并引导卵细胞进行减数分裂和第一、第二极体的排放, 以及雌、雄原核融合和第一次卵裂; (2) 异源精子诱导雌核发育的卵子经 6-DMAP 处理后, 部分微管变得模糊或消失, 纺锤体受到破坏导致染色体的分离无法进行, 第二极体的形成受到抑制并使雌核染色体二倍化; 去除 6-DMAP 作用后, 微管重新组装, 雌核分裂重新启动继而进行卵裂; 精核保持固缩状态或轻微膨胀形成雄性原核, 但卵裂后期则以致密的染色质体 (DCB) 形式存在于分裂沟上或进入一个卵裂球中。结果证实, 长牡蛎精子经紫外线遗传灭活后可顺利进入并激活栉孔扇贝成熟卵子但不参与合子核的形成, 6-DMAP 也可有效抑制第二极体的排放而获得雌核发育二倍体胚胎。本实验结果为研究异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育的可行性提供了细胞学依据。[中国水产科学, 2008, 15(4): 542-549]

关键词: 栉孔扇贝; 异源精子; 雌核发育; 免疫荧光染色; 微管; 动态变化

中图分类号: Q959.215

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)04-0542-08

近年来, 随着染色体组操作技术的迅速发展, 海洋经济贝类人工诱导雌核发育的研究也取得了很大进步。中国海洋经济贝类人工雌核发育研究起步较晚, 研究对象主要集中在栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)^[1-2]、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[3]、皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*)^[4]、华贵栉孔扇贝 (*Chlamys nobilis*)^[5]、虾夷扇贝 (*Patinopekten yessoensis*)^[6-7] 等种类。已经报道的贝类雌核发育研究大都围绕受精卵早期的受精细胞学研究和有效诱导程序的探索, 亚细胞水平的研究却鲜有报道。

微管 (Microtubule) 是细胞骨架体系的重要组成部分。卵母细胞受精过程中伴有大量的动态事件以保证细胞的正常发育, 一般认为, 纺锤体中的微管负责卵母细胞中染色体排列、分离和极体排放, 而胞质微管星体则负责受精后原核的迁移和靠近^[8]。目前, 有关哺乳动物卵母细胞的微管等细胞骨架的研究报道相对较多。近年来, 应用激光扫描共聚焦显微技术和免疫荧光显微技术

研究海洋生物卵细胞微管骨架的报道也日益增多, 主要集中在蛤 (*Spisula solidissima*)^[9-10]、海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*)^[11] 等种类。在国内, 有关牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 雌核发育二倍体和栉孔扇贝四倍体诱导过程中微管骨架的研究已有报道^[12-13]。为证实遗传失活的长牡蛎精子诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体的可行性及进一步探讨雌核发育二倍体的形成机理, 本研究运用免疫荧光染色法对栉孔扇贝正常发育和异源精子诱导雌核发育的卵细胞受精过程中微管的动态变化进行研究。以期研究结果能够进一步丰富其受精细胞学基础研究资料, 为细胞工程育种及相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

栉孔扇贝亲贝于 2007 年 4 月取自青岛志诚水产科技公司, 壳高 6~8 cm。长牡蛎取自青岛即墨岙山卫镇附近海区, 壳高 11~12 cm。6-二甲氨基喹

收稿日期: 2007-08-30; 修订日期: 2007-11-16.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 资助课题 (2006AA10A408); 国家科技支撑计划专题 (2006BAD01A00); 国家自然科学基金资助项目 (30600465).

作者简介: 吴彪 (1982-), 男, 硕士, 主要从事贝类遗传育种研究. E-mail: qmwb1028@163.com

通讯作者: 王清印. Tel: 0532-85822959; E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

呤 (6-dimethylaminopurine, 简称 6-DMAP)、异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, 简称 FITC) 标记的抗 α 微管蛋白抗体 (anti- α -tubulin) 和碘化丙啶 (Propidium iodide, 简称 PI) 均为美国 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 亲贝暂养与精卵收集 栉孔扇贝亲贝取回后洗刷干净, 雌雄亲贝分别暂养于 5 m³ 水泥池中, 沙滤海水, 水温 16 ℃; 牡蛎暂养于 22 ℃ 海水中, 常规管理。使用前挑选性腺饱满个体, 阴干升温法催产获得栉孔扇贝精子和卵子, 解剖法获得长牡蛎精子。采集的精、卵以过滤海水稀释, 并用生物计数皿和血球计数板在显微镜下分别定量至 1.0×10^7 ind/mL 和 1.0×10^5 ind/mL。

1.2.2 异源精子诱导雌核发育 取长牡蛎稀释精液 2.5 mL, 平铺于直径为 9 cm 的亲水塑料培养皿底部。将培养皿置于紫外线照射装置内的摇床上, 摇床摇动速度为 60 次/min。参照李雅娟等^[14]方法, 将精液在辐射强度为 1 500 μ W/cm² 的紫外线下照射 60 s。照射后的精液立即加入盛有 50 mL 栉孔扇贝卵液的烧杯中, 用玻璃棒搅拌均匀并稀释至 200 mL。受精卵在水温 19 ℃ 的海水中黑暗条件下培养。授精后 80~90 min, 显微镜下观察到处理组约 20% 受精卵排出第一极体时, 施加 6-DMAP 母液 (10 mg/mL) 1.2 mL, 使其终质量浓度达到 60 μ g/mL, 持续处理 30 min。之后用 500 目筛绢过滤, 洗卵 2~3 次, 移入装有 200 mL 过滤海水的烧杯中继续培养。栉孔扇贝正常受精组为对照组, 以每个卵子周围观察到 4~6 个精子的比例授精, 受精卵在水温 19 ℃ 的海水中培养。

1.2.3 受精卵的固定及免疫荧光染色 处理组授精后 0~200 min, 每隔 10 min 取样 1 次; 授精后 200~300 min, 每隔 20 min 取样 1 次。对照组授精后 0~100 min, 每隔 5 min 取样一次; 授精后 100~150 min, 每隔 10 min 取样 1 次。所取样品置于 1.5 mL 离心管中, 加入 4% 多聚甲醛固定液 1 mL, 待样品沉降稳定后更换固定液, 固定 30 min; 样品转入 0.1 mol/L PBS (pH7.4) 中, 4 ℃ 保存。染色时, 弃去 PBS, 0.5% Triton X-100 透化处理 40 min, 以增加细胞膜透性, PBS 漂洗 3 遍; 200 μ g/mL 的 RNase 在 20~25 ℃ 下处理 60 min, PBS 漂洗 3 遍; 5% 的 BSA 处理 60 min, 以封闭抗体的非特异性结合位点; 1:50 稀释的 FITC-anti- α -tubulin 染色 60 min, 0.01% Triton X-100 溶液清洗 2 遍; 10 μ g/mL 的 PI 工作液

复染 10 min, 0.01% Triton X-100 溶液清洗 1 遍; 将染色好的样品转移到载玻片上, 滴加 2% DABCO, 加盖玻片, 封片。Nikon 荧光显微镜下观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 正常发育受精卵内微管的动态变化

从精子入卵到第一次卵裂, 受精卵内染色体运动剧烈, 以微管为基础的纺锤体的组装、去组装和运动过程非常复杂。本研究将此过程分为以下几个阶段:

阶段 1 未受精卵。刚产出的栉孔扇贝成熟卵子的染色体处于第一次成熟分裂中期。此时中期纺锤体始终处于聚合和解聚的动态平衡状态, 呈现典型的纺锤样。染色体两侧的动力微管等长, 完成复制的染色体整齐地定位于赤道板上。此时于胞质中可以观察到星体微管 (图版 I-1a、1b)。

阶段 2 第一次减数分裂重新启动。精子入卵后, 减数分裂重新启动。动力微管浓缩变粗, 同源染色体开始向纺锤体两极牵拉, 同源染色体逐渐分离从而产生两组染色体。同时, 被逐渐分开的两组染色体都相对地向受精卵的一端开始移动。此时期, 星体微管信号逐渐减弱 (图版 I-2a~3b)。

阶段 3 第一极体 (PB1) 形成阶段。授精后约 20 min 时, 在纺锤体的牵引下, 同源染色体分开, 靠近质膜的一组染色体首先到达质膜, 并开始外拱排出卵膜, 形成第一极体。此时期, 微管的聚合速度要小于解聚速度, 动力微管变短, 分布于已经去凝集的两组染色体之间。之后, 纺锤体又迅速开始重新组装, 并快速进入第二次成熟分裂。星体微管信号较弱 (图版 I-4a、4b)。

阶段 4 第二次成熟分裂及第二极体 (PB2) 形成。授精后约 35 min 时, 在第一极体的正下方发生第二次成熟分裂。与第一次成熟分裂相似, 纺锤体牵拉姊妹染色单体分开, 靠近质膜的一组染色体排出形成第二极体。此时期, 纺锤体外形较第一次成熟分裂时的纺锤体较小, 动力微管细短, 未观察到星体微管 (图版 I-5a~6b)。

阶段 5 雌、雄原核形成及融合阶段。授精后 50 min 时, 留在胞质内的一组染色体开始膨胀形成雌原核, 同时精核也去浓缩并膨胀形成雄原核。两原核相互靠近融合为合子核。雌、雄原核形成时, 微管信号很弱, 只能在原核表面观察到有少量的微管痕迹。两原核融合之后未检测到微管信号 (图版 I-7a~8b)。

阶段6 第一次卵裂。合子形成后,纺锤体重新组装,动力微管出现,第一次卵裂启动,但星体微管信号较弱。在纺锤体的作用下,染色体分离,其分离移动方向与卵裂方向垂直。核分离之后,卵裂从极体处开始,卵裂完成后最终形成2细胞。在核分裂时,微管清晰可见。卵裂时,染色体靠近卵裂沟的一端和卵裂沟附近有依稀可见的微管信号(图版I-9a~10b)。

2.2 异源精子诱导雌核发育受精卵内微管的动态变化

成熟分裂时期微管的动态变化。免疫荧光染色的观察结果显示,从第一次成熟分裂重新启动到第一极体的排放(即第一次成熟分裂)期间,异源精子诱导雌核发育受精卵内微管的动态变化与正常发育受精卵内的微管变化过程基本是相同的(图版II-1a~4b),但第一次成熟分裂重新启动以后,雌核发育组受精卵的发育过程历时较正常发育组要长。授精后约80 min时,部分受精卵排放第一极体。施加6-DMAP持续处理30 min的染色结果显示:药物处理10 min时,动力微管与染色体的结合受到破坏,动力微管变短,并向染色体方向缩短将染色体包围,纺锤体未能形成,没有检测到星体微管的存在(图版II-5a、5b)。药物处理20 min时,微管呈混乱的雾状或没有规则的管状,纺锤体结构遭受破坏,形状不规则。微管与染色体分离并在其周围呈弥散状分布,所以未能将染色体规则定位在赤道板上(图版II-6a、6b)。

卵裂时期微管的动态变化。药物处理去除后,卵子染色体膨胀形成雌原核,雌原核中微管重新缓慢组装,纺锤体结构形成从而启动染色体的分离(图版II-7a、7b)。精核轻微膨胀形成雄性原核,其周围和内部没有观察到星光的出现,也未见微管的组装,位置没有明显的移动,仅见精核滞留于两组母本染色体之间,卵裂结束后以致密的染色质体(Dense chromatin body, DCB)形式停滞在卵裂沟上(图版II-8a、8b)。但也发现部分精核发生染色体分离的情况,且两组染色体分别进入两个细胞,但没有发现微管的特异性染色。

3 讨论

3.1 异源精子诱导扇贝雌核发育的可行性

在人工诱导鱼类雌核发育的研究中,利用异源精子作为雌核发育的“激活原”已有很多报道^[15-19]。

但是在贝类方面,用异源精子作为“激活原”进行人工诱导雌核发育的研究还较少。任建峰等^[20]在栉孔扇贝(♀)×长牡蛎(♂)的研究中发现,长牡蛎精子可以激活栉孔扇贝卵子并完成受精过程,但是其受精率只有40%左右,杂交后代不能成活且只有个别受精卵能发育到担轮幼虫。这为利用长牡蛎精子来诱导栉孔扇贝雌核发育提供了启示。利用遗传失活的长牡蛎精子诱导栉孔扇贝雌核发育,可以有效避免同源精子诱导雌核发育中因精子遗传失活不完全或光修复等原因而引起的正常发育现象,从而能够保证成活个体为100%的雌核发育后代。本实验通过免疫荧光技术对利用遗传失活的长牡蛎精子诱导的栉孔扇贝雌核发育二倍体卵受精过程中核行为的观察结果表明,遗传失活的长牡蛎精子能够顺利完成精子入卵、激活卵子等事件,第二极体在药物的抑制下没有排出,其过程与董迎辉等^[2]观察同源精子诱导栉孔扇贝雌核发育早期胚胎的核变化过程相似,这证明了异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育是可行的。在异精诱导鱼类雌核发育的研究中,蒋一珪等^[16]、丁军等^[17]、赵俊等^[18]认为,异源精子不仅能够刺激卵子的雌核发育,而且还能影响雌核发育子代的某些性状,使子代的生长速度加快,并将这种现象称之为“异精生物学效应”。但滕春波等^[19]认为,异源精子对雌核发育的贡献仅仅是对卵子的刺激作用,不产生生物学效应。本实验中,作者观察到精核最终形成DCB而没有参与胚胎的发育,但是在更微观的方面有没有父本物质对后代产生影响,是否存在“异精生物学效应”,还需要利用更为灵敏的技术手段(如:分子标记技术等)对后代进行进一步的跟踪检测来加以确定。

3.2 微管的动态变化

免疫荧光染色技术是把血清学和显微镜示踪方法结合起来的一种技术。免疫荧光染色技术在海洋生物卵细胞骨架研究方面的应用相对较少,国外的报道主要集中在蛤^[9-10]、海胆^[11]等种类。本实验利用免疫荧光技术同时检测了栉孔扇贝雌核发育卵细胞激活后微管和核的动态变化,取得了较好的效果。

正常组中,微管为基础的纺锤体呈周期性组装与去组装,染色体定位与移动、极体排放、核融合等事件顺利进行,其微管基本的动态变化过程和Kuriyama等^[9]报道的蛤卵细胞受精过程中微管的周期变化是相似的。有学者报道,哺乳动物包括人

的卵细胞受精过程中纺锤体组装与去组装的过程基本是一致的,其种属的特异性只表现在纺锤体的形状和大小上^[21]。由于不同动物分类地位上的差别,不同海洋生物卵细胞受精过程中微管动态变化的相似性还有待进一步的研究。

6-DMAP 是一种蛋白质磷酸化抑制剂,通过作用于特定的激酶,破坏微管的聚合中心,导致微管解聚,纺锤体不能形成。处理组中,随着 6-DMAP 处理时间的延长,受精卵内微管解聚较快,受到的破坏程度较大;原来拉长的纺锤体不复存在,只有在纺锤体的两极有绿色微管信号,呈现不规则的纺锤体,致使染色体分离和移动中止,第二极体的排放受到抑制从而实现了单倍染色体的加倍。6-DMAP 处理结束后药物被充分清洗,雌原核的微管系统恢复组装而引导了受精卵卵裂的进行。这些结果表明,6-DMAP 处理引起的微管骨架变化非常剧烈,6-DMAP 引起的纺锤体的破坏同 Dufresne 等^[22]的研究结果相同。这充分说明药物 6-DMAP 是雌核发育单倍体染色体加倍的有效诱导剂。但 6-DMAP 处理也可能会导致部分染色体的紊乱分离,李永仁^[13]在利用免疫荧光方法观察 CB 诱导栉孔扇贝四倍体形成过程中的微管变化过程时发现, PB1 排放受抑制的受精卵进入第二次减数分裂时,出现多种类型减数分裂纺锤体及相应的染色体分离形式,其中紊乱分离占到了 23%。这些都证实微管在染色体分离、运动和核分裂中具有重要的调节作用。另外, Combelles 等^[23]认为,卵母细胞为保证受精前后及胚胎发育过程能够按时有序地进行,其胞质结构变化具有精确的时间性和空间性。实验中,药物处理使得栉孔扇贝受精卵内部微管骨架受到破坏,但药物去除后其系统能恢复而使胚胎继续发育,作者认为这种恢复性说明了栉孔扇贝卵细胞同高等生物细胞一样具备某种自我保护和调节机制,随环境的变化而进行自我调节来更好地适应新环境。另外, 6-DMAP 不同的处理起始时间、处理浓度、处理持续时间等能够影响多倍体和雌核发育后代的诱导率和成活率^[24]。所以,6-DMAP 处理后,在多细胞和早期胚胎期,微管系统的组装是不是相对滞后,细胞骨架会不会发生紊乱组装等问题还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 潘英. 人工诱导扇贝雌核发育的研究 [D]. 青岛: 中国海洋

大学, 2003: 1 110.

[2] 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.

[3] Guo X, Hershberger W K, cooper K, et al. Artificial gynogenesis with ultraviolet light irradiated sperm in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Induction and survival [J]. Aquaculture, 1993, 113: 201-214.

[4] Fujino K, Arai K, Iwadare K, et al. Induction of gynogenetic diploid by inhibiting 2nd meiosis in the Pacific abalone [J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1990, 56: 1 755-1 763.

[5] Goswami U. Sperm density required for inducing gynogenetic haploidy in scallop *Chlamys nobilis* [J]. Indian J Mar Sci, 1991, 20: 255-258.

[6] Li Q, Osada M, Kashiwara M, et al. Effects of ultraviolet irradiation on genetical inactivation and morphological structure of sperm of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis* [J]. Aquaculture, 2000, 186: 233 242.

[7] 潘英, 李琪, 于瑞海, 等. 虾夷扇贝人工诱导雌核发育精子遗传失活及紫外线照射对精子形态结构影响的研究 [J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34 (6): 949-954.

[8] Messinger S M, Albertini D F. Centrosome and microtubule dynamics during meiotic progression in the mouse oocyte [J]. J Cell Sci, 1991, 100(2): 289-298.

[9] Kuriyama R, Borisy G G, Masui Y. Microtubule cycles in oocytes of the surf clam, *Spisula solidissima*: an immunofluorescence study [J]. Dev Biol, 1986, 114: 151-160.

[10] Kuriyama R. Effect of taxol on first and second meiotic spindle formation in oocytes of surf clam, *Spisula solidissima* [J]. J Cell Sci, 1986, 84: 153-163.

[11] Harris P, Osborn M, Weber K, et al. Distribution of tubulin-containing structures in the egg of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* from fertilization through first cleavage [J]. J Cell Biol, 1980, 84: 668 679.

[12] 朱香萍. 牙鲆同质雌核发育二倍体诱导的分子细胞生物学机制研究 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2005: 1 97.

[13] 李永仁. 栉孔扇贝四倍体诱导机理初步研究 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2005: 1-56.

[14] 李雅娟, 毛连菊, 李霞, 等. 太平洋牡蛎人工诱导雌核发育精子遗传失活的初步研究 [J]. 大连水产学院学报, 2003, 18(2): 109-113.

[15] 戈文龙, 张全启, 齐洁, 等. 异源精子诱导牙鲆雌核发育二倍体 [J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(6): 1 011-1 016.

- [16] 蒋一珪,梁绍昌,陈本德,等. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应[J]. 水生生物学集刊,1983,8(1): 1-12.
- [17] 丁军,谢岳峰,蒋一珪,等. 异育银鲫及其人工杂种外源遗传物质的检测分析[J]. 水生生物学报,1993,17(1): 22-26.
- [18] 赵俊,崔淼,陈湘麟,等. 异精效应在雌核发育彭泽鲫胚胎发育中的同工酶证据[J]. 水生生物学报,2004,28(1): 33-39.
- [19] 滕春波,孙效文,沈俊宝,等. 利用异源精子激发雌核发育的银鲫及亲本的 RAPD 分析[J]. 水产学报,1999,23(4): 421-423.
- [20] 任建峰,杨爱国,董迎辉,等. 栉孔扇贝♀×长牡蛎♂受精过程的荧光显微观察[J]. 中国水产科学,2005,12(5): 643-647.
- [21] 苏静艳. 小鼠孤雌胚中细胞骨架的动态变化与作用[D]. 哈尔滨: 华北农业大学,2005: 1-23.
- [22] Durfresne L, Néant I, St-Pierre J, et al. Effects of 6-dimethylaminopurine on microtubules and putative intermediate filaments in sea urchin embryos[J]. J Cell Sci, 1991,99(4): 721-730.
- [23] Combelles C M H, Albertini D F. Microtubule patterning during meiotic maturation in mouse oocytes is determined by cell cycle-specific sorting and redistribution of γ -tubulin[J]. Dev Biol, 2001,239(2): 281-294.
- [24] 王清印. 海水养殖生物的细胞工程育种[M]. 北京: 海洋出版社,2007: 57-99.

Dynamic status of microtubule in early developmental stages of gynogenetic diploid induced by heterologous sperm in *Chlamys farreri*

WU Biao^{1,2}, YANG Ai-guo¹, WANG Qing-yin¹, LIU Zhi-hong¹, ZHOU Li-qing¹

(1.Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2.College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Artificial diploid gynogenesis techniques in shellfish have developed rapidly in recent years, however, few studies on the dynamic status of microtubule in this field were reported. This study depicted the microtubule status in early developmental stages of normal fertilized diploids and gynogenetic diploids of scallop *Chlamys farreri*, and, provided cytological bases for cytoengineering breeding and related researches. The meiotic division of the eggs of *Chlamys farreri* was activated by ultraviolet (UV)-irradiated heterogenous sperm of Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the gynogenetic diploids were induced by blocking extrusion of the second polar body from fertilized eggs with 6-dimethylaminopurine (6-DMAP). The dynamic status of microtubule was studied by direct immunofluorescence with FITC-anti- α -tubulin. The results showed that the spindle assembled periodically towed the chromosomes to accomplish the extrusion of the first and second polar bodies, and the female and male pronuclei fused into zygotonucleus in normal fertilized eggs. However, the behavior of microtubule in eggs of gynogenetic diploids was considerably complicated. The microtubule in 6-DMAP treated eggs was destroyed badly and the spindle became anomalistic shape or disappeared, the microtubule became shorter and un conspicuous. The chromosomes arranged irregularly and couldn't move to form the second polar bodies. After relieving the treatment of 6-DMAP, the microtubule reassembled and conducted the diploid female pronuclei's movement to activate the first cleavage. In this process, the sperm nucleus of gynogenesis kept dense or expanded again to become a dense chromatin body (DCB) which didn't join into the karyokinesis. The results of this study suggested that the ultraviolet (UV)-irradiated sperms of *Crassostrea gigas* could enter into the eggs of *Chlamys farreri* and activate the eggs while they did not form the zygocyte. And the 6-DMAP could prohibit the excursion of the second polar body to produce diploids. The feasibility of gynogenesis in *Chlamys farreri* induced by heterologous sperm was demonstrated. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(4): 542-549]

Key words: *Chlamys farreri*; gynogenesis; heterologous sperm; immunofluorescence staining; microtubule; dynamic status

图版 I 栉孔扇贝正常发育卵受精过程中微管的动态变化

1a、1b: 未受精的成熟卵子; 2a、2b: 精子入卵; 3a、3b: 第一次成熟分裂后期; 4a、4b: 第一极体排出; 5a、5b: 第二次成熟分裂后期; 6a、6b: 第二极体排出; 7a、7b: 雌、雄原核的形成; 8a、8b: 雌、雄原核融合成合子核; 9a、9b: 第一次卵裂的前期; 10a、10b: 第一次卵裂的后期。×1 000.

CHS: 染色体; FCHS: 母本染色体; FPN: 雌性原核; MPN: 雄性原核; MT: 微管; OCHS: 子代染色体; PB: 极体; PB1: 第一极体; PB2: 第二极体; SD: 纺锤体; SP: 精核; ZN: 合子核。

Plate I Microtubule behavior of *Chlamys farreri* eggs in normal growing group

1a, 1b: Unfertilized mature egg; 2a, 2b: Sperm penetrated into egg; 3a, 3b: Anaphase of the first meiosis; 4a, 4b: Release of the first polar body; 5a, 5b: Anaphase of the second meiosis; 6a, 6b: Release of the second polar body; 7a, 7b: Formation of the female pronucleus and male pronucleus; 8a, 8b: Female and male pronuclei fused into zygotonucleus; 9a, 9b: Prophase of the first cleavage; 10a, 10b: Anaphase of the first cleavage. ×1 000.

CHS: Chromosome; FCHS: Female chromosome; FPN: Female pronucleus; MPN: Male pronucleus; MT: Microtubule; OCHS: Offspring chromosome; PB: Polar body; PB1: First polar body; PB2: Second polar body; SD: Spindle; SP: Sperm pronucleus; ZN: Zygotonucleus.

图版 II 异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育卵受精过程中微管的动态变化

1a、1b: 未受精的成熟卵子; 2a、2b: 精子入卵; 3a、3b: 第一次成熟分裂后期; 4a、4b: 第一极体排出; 5a-6b: 6-DMAP 处理期; 7a、7b: 第一次卵裂的后期; 8a、8b: 2 细胞期。×1 000.

CF: 卵裂沟; CHS: 染色体; DCB: 致密染色质体; FCHS: 母本染色体; MT: 微管; PB1: 第一极体; SD: 纺锤体; SP: 精核。

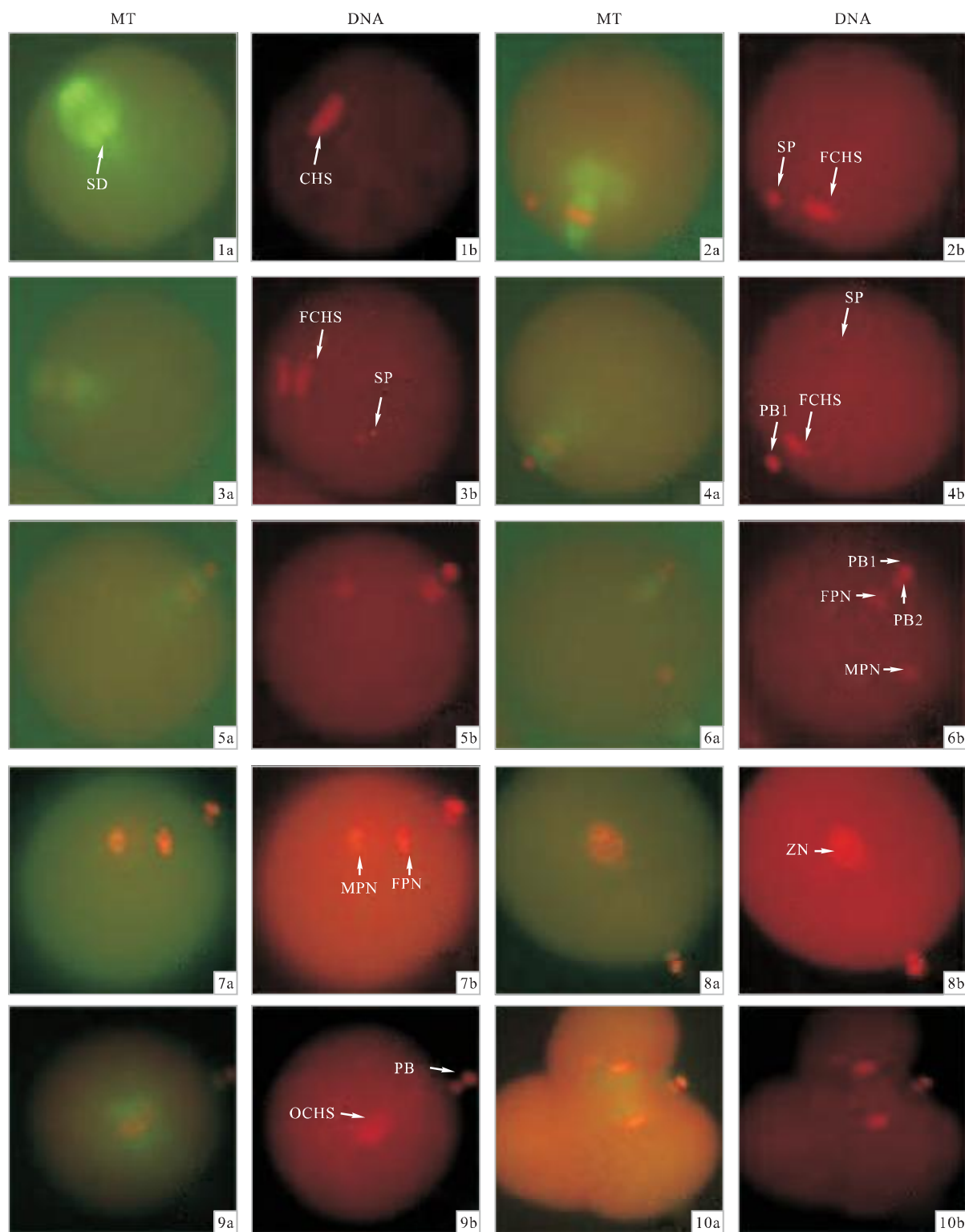
Plate II Microtubule behavior of *Chlamys farreri* eggs in gynogenetic diploids induced by *Crassostrea gigas*' s sperm

1a, 1b: Unfertilized mature egg; 2a, 2b: Sperm penetrated into egg; 3a, 3b: Anaphase of the first meiosis; 4a, 4b: Release of the first polar body; 5a-6b: 6-DMAP treating stage; 7a, 7b: Anaphase of the first cleavage; 8a, 8b: 2cell stage. ×1 000.

CF: Cleavage furrow; CHS: Chromosome; DCB: Dense chromatin body; FCHS: Female chromosome; MT: Microtubule; PB1: First polar body; SD: Spindle; SP: Sperm pronucleus.

吴彪等: 异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体的微管动态变化

WU Biao et al: Dynamic status of microtubule in early developmental stages of gynogenetic diploid induced by heterologous sperm in *Chlamys farreri*

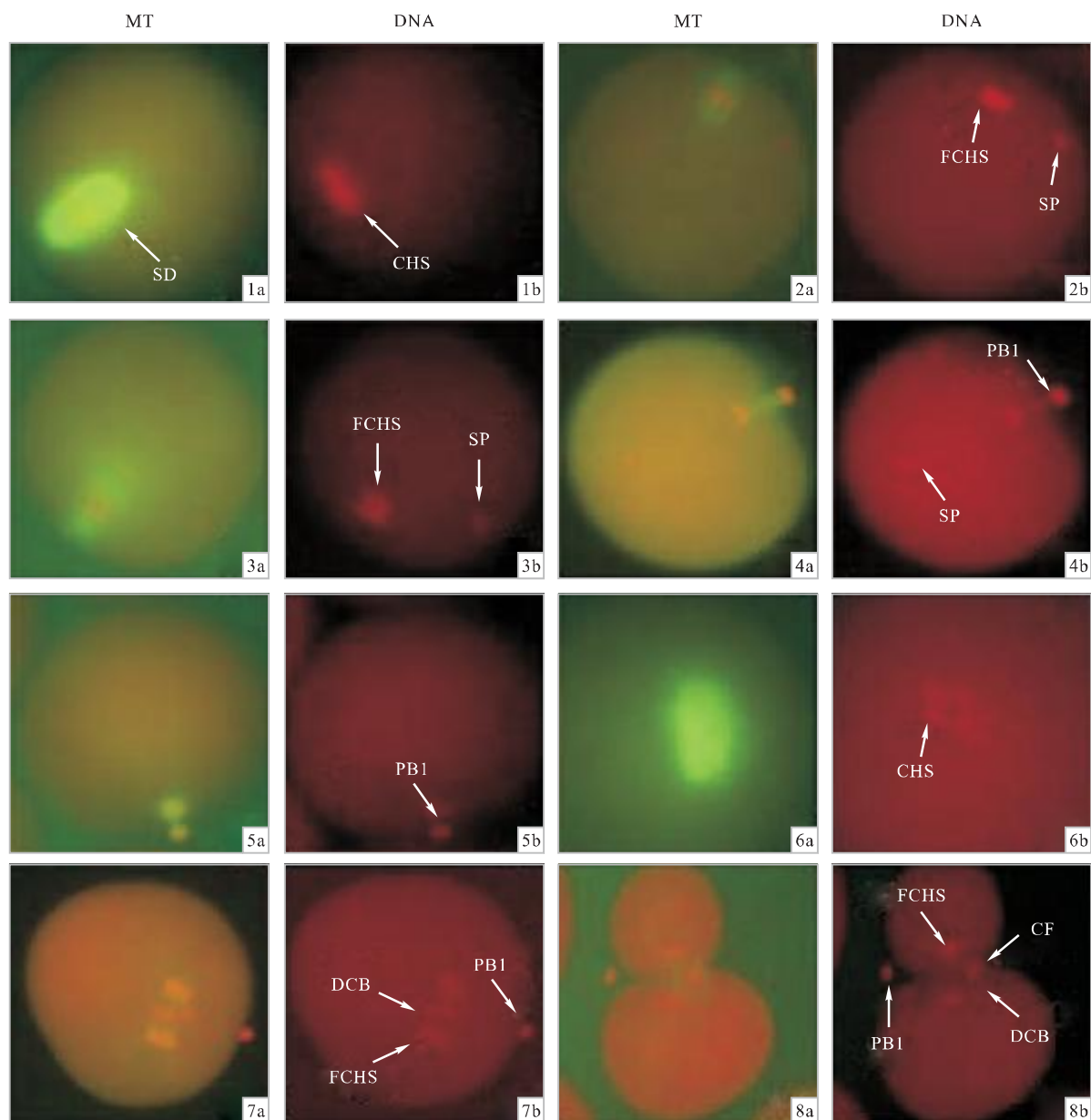


图版 I 栉孔扇贝正常发育卵受精过程中微管的动态变化 (×1 000)

Plate I Microtubule behavior of *Chlamys farreri* eggs in normal growing group (×1 000)

吴彪等：异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体的微管动态变化

WU Biao et al: Dynamic status of microtubule in early developmental stages of gynogenetic diploid induced by heterologous sperm in *Chlamys farreri*



图版 II 异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育卵受精过程中微管的动态变化 (×1 000)

Plate II Microtubule behavior of *Chlamys farreri* eggs in gynogenetic diploids induced by *Crassostrea gigas*' s sperm (×1 000)