

## 栉孔扇贝(♀) × 虾夷扇贝(♂) 精子入卵过程的电镜观察

周丽青<sup>1</sup>, 杨爱国<sup>2</sup>, 刘志鸿<sup>2</sup>, 杜方勇<sup>1</sup>, 王清印<sup>2</sup>

(1. 上海水产大学 渔业学院, 上海 200090;

2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:**采用扫描电镜和透射电镜技术对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*, ♀) × 虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*, ♂)的精子入卵过程进行观察。结果表明,这2种扇贝杂交与亲本自交的精子入卵过程没有本质的区别。成熟的精卵相遇时,相互激活,产生一系列胞间反应,卵子的激活集中表现为皮层反应、受精膜举起、成熟分裂重新启动;精子激活集中表现为顶体反应和受精锥形成。在16~18℃条件下,精子入卵的时间集中在精卵混合后的第6 min。8 min后,精子的线粒体随精核一起进入卵子中。精子入卵后精核略微膨胀,卵细胞中的线粒体在精核附近出现聚集现象。杂交中有多精入卵现象。本研究目的旨在优化扇贝种间杂交技术及探讨种间受精生物学过程提供基础依据。

**关键词:**栉孔扇贝; 虾夷扇贝; 杂交; 精子入卵; 电镜观察

**中图分类号:**Q248; Q321.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**1005-8737-(2003)03-0189-06

近年来,在海水养殖业中应用人工杂交技术开展栉孔扇贝不同种群间<sup>[1]</sup>、栉孔扇贝与虾夷扇贝<sup>[2]</sup>、栉孔扇贝与海湾扇贝<sup>[3]</sup>种间杂交的研究已有报道,有关其后代杂种优势的研究前景看好。但对于扇贝种间杂交精子入卵过程的研究还鲜有报道。国外采用扫描电镜和透射电镜技术对贝类受精过程的研究开展的比较多而且早<sup>[4-5]</sup>,我国采用该技术对鱼类<sup>[6-7]</sup>、甲壳类<sup>[8-9]</sup>生殖细胞结构和精子入卵过程的研究报道较多,但在贝类这方面工作开展较少。受精过程的观察以及受精机理的研究是杂交育种的重要基础工作,而精子入卵是受精过程中的重要内容,对揭示种间杂交的生物学特征,优化杂交技术,获取理想的杂交结果具有重要意义。本研究以我国北方2种重要养殖贝类栉孔扇贝(*Chlamys far-*

*ri*, ♀)与虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*, ♂)为材料,观察分析其杂交过程中精卵的结合及有关生物学特征,旨在优化杂交技术、阐明扇贝种间杂交的受精生物学过程提供基础依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

2002年4月上旬,在山东荣成寻山渔业公司进行扇贝杂交实验,4月下旬于山东长岛水产增殖基地进行补充实验。挑选性腺成熟饱满的栉孔扇贝(♀)5只,壳高7~8 cm;虾夷扇贝(♂)5只,壳高10~12 cm。洗净贝壳后,分开暂养于沙滤海水中。对雌贝进行升温刺激使其排卵,用筛绢多重过滤得干净卵子;并阴干刺激雄贝以获得精子。将精卵按适当比例混合于1 000 mL烧杯中,受精卵密度约为300/mL,受精卵发育温度控制在16~18℃。

#### 1.2 样品的固定

按不同时间间隔取5 mL受精卵固定,每次取2份。所取受精卵用4%多聚甲醛和1%戊二醛<sup>[10]</sup>(50%戊二醛10 mL,多聚甲醛20 g,Tris 3.029 g,溶于500 mL海水)固定,待所取样品沉降稳定后,更

收稿日期:2002-11-11; 修订日期:2002-12-30.

基金项目:国家“九七三”重大基础研究规划资助项目(G1999012004);国家海洋“八六三”资助项目(2001AA620106).

作者简介:周丽青(1974-),女,硕士研究生,主要从事水产动物增殖和遗传育种方面的研究.

通讯作者:王清印, Tel: 0532-5822959, E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

换1次固定液,置4℃冰箱中保存。

### 1.3 制片及染色

固定样品1份经酒精系列脱水,加入乙酸异戊酯,HCP-零界点干燥仪干燥,IB-3型离子溅射仪镀金后,于JSM840型扫描电镜下观察拍照。另1份酒精系列脱水,Epon812包埋,LKB型超薄切片机切片,切片厚度50 nm,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,在JEM-1200EX型透射电镜下观察拍照。

## 2 结果

### 2.1 精卵的激活

**2.1.1 卵子的激活** 卵子的激活集中表现为受精膜举起、皮层反应、卵子的成熟分裂重新启动。精子在卵表面的附着激发受精膜的举起。当精卵比例合适时(卵表面附着有2~5个精子),约在受精后2 min,卵黄膜举起变成受精膜;当卵表面附着10个以上精子时,受精膜在受精后0.5~1 min举起。受精膜尽管没有增厚,但由软变硬。皮层反应主要是皮层颗粒的胞吐现象。皮层颗粒靠近卵质膜,直径为0.5~1.2  $\mu\text{m}$ ,有2~4层。皮层颗粒中含有深浅2种介质,颜色深的一端呈月牙形,浅的一端近似圆球形。皮层颗粒胞吐时,没有方向性,皮层颗粒深浅端或两种介质之间均可向卵质膜外拱,待质膜与皮层颗粒膜完全融合时,就会向卵周隙中释放介质。胞吐的介质形成不规则棘状突起。受精后5~8 min,受精卵皮层颗粒胞吐现象加剧,不规则的棘状突起增多,卵质膜变得不清晰,且多处断裂(图版I-1)。刚产出的卵子停留在成熟第1次分裂中期,卵子被激活时,诱发成熟分裂的进行。

**2.1.2 精子的激活** 精子的激活集中表现为顶体反应。受精前,精子顶体泡饱满,位于精子最前端,线粒体清晰可见(图版I-2)。当精子与卵子接触时,精子的前端结合于卵黄膜上,接着精子顶体泡破裂释放溶解酶,亚顶体腔中立即伸出由肌动蛋白构成的顶体丝,顶体丝长1~3  $\mu\text{m}$ (图版I-3)。精子发生顶体反应后,在短时间内形态正常,呈长圆锥形。4~5 min后,如不能及时入卵,精子多变为球形,鞭毛脱落,线粒体在球形的精子上不太明显。不能入卵的精子,其顶体丝不再伸长,并向偏离卵子的方向弯曲。入卵的精子因蜕去质膜而变得不规则,近似球形。

### 2.2 精子入卵过程

精子首先识别并附着在卵表面(图版I-4)。

扇贝的精子可以从卵子的任何部位入卵。顶体反应时,精子顶体泡释放溶解卵黄膜的酶,使其断裂,变得松散,然后精子亚顶体腔中伸出顶体丝穿透卵黄膜(图版I-5)。卵表面的微绒毛由质膜向外突起形成,内含卵质。微绒毛在受精前外观整齐,其顶部与卵黄膜接触紧密。受精后6 min,顶体丝被暴露的微绒毛突起包围,该部位微绒毛迅速向外伸长变粗,包裹精子头部,并扩大成一受精锥(图版I-6、7),该部位的卵质也一并向外突起。这时精子鞭毛停止摆动或脱落,质膜逐渐往外蜕去,形成不规则突起。精子穿过卵黄膜后,卵黄膜上留下一个类似受精孔的通道(图版I-8),直径1~3  $\mu\text{m}$ ,但该通道立刻被卵黄膜的纤维所填充(图版II-1)。当精子接触到卵质膜,受精锥回缩。受精后约8 min,精子进入卵质,受精锥消失。精子脱落的鞭毛和刚修复的卵黄膜留在受精膜外成为精子入卵的痕迹(图版II-2)。精子线粒体大,呈圆球形,一般4个,有的5个,环状排列在精子头部的后端(图版II-3)。精子入卵后,其线粒体伴随精核一起入卵,精子核膜迅速破裂,精核略微膨胀,线粒体紧靠着精核(图版II-4)。精核接着发生180°旋转,使线粒体端朝内。在精核附近,有大量的线粒体聚集,在卵子其他部位也有线粒体聚集现象。

### 2.3 受精过程中卵子的变化

未受精的卵子直径为60~70  $\mu\text{m}$ ,受精后,未观察到直径的变化。卵黄膜是由纤维状物质构成的一层膜,厚度均匀。受精部位的卵黄膜易被精子释放的酶所溶解,所以卵黄膜很容易破损甚至剥落。未受精时,卵黄膜柔韧性较大,紧贴微绒毛的顶端。在扫描电镜中,由于临界点干燥,卵黄膜易向胞内塌陷,卵表面常常出现凸凹不平的假象。由皮层颗粒胞吐形成的不规则棘状突起会穿透卵黄膜,在卵黄膜上留下小孔,小孔很快自行修复。受精后,皮层颗粒数量减少,由受精前2~4层变为受精以后的1层,且分布稀疏,仍靠近卵质膜,但不再胞吐。卵子质膜因皮层反应由原来较为平缓变得凸凹不平,且质膜多处断裂,胞吐结束后,质膜又趋于平缓而完整。卵黄颗粒数量不变。线粒体数量没有减少,反而出现聚集现象,尤其是在原核附近。无论是受精卵还是未受精卵,其中央都有一亮区,几乎无卵黄颗粒分布。受精卵于受精后15~30 min排出第一极体(图版II-5),第一极体的排出是卵子受精的标志。

### 3 讨论

#### 3.1 线粒体随精核一起入卵

目前有2种观点:一种认为精子线粒体一般不随精核入卵<sup>[11]</sup>;另一种则认为精子线粒体随精核入卵<sup>[12]</sup>。根据本实验观察,扇贝精子的线粒体随精核入卵,且在精核膨大过程中,线粒体仍维持较强的活力。关于精子线粒体在受精过程中的变化有2个问题值得探讨,一是精子线粒体是否随精核入卵,二是随精核入卵的线粒体是否遗传。姜明<sup>[1]</sup>观察到太平洋牡蛎精核穿越卵膜时,有些线粒体溶解消失,只携带个别结构发达的线粒体。Longo<sup>[5]</sup>等发现太平洋牡蛎精核及其线粒体一起穿过卵膜进入卵质内,并停留在那一部位,精核在此部位膨大并扩散,形成丝状染色质。另外,Satta等<sup>[13]</sup>从杂交果蝇中获得父母本双方的mtDNA。这说明线粒体随精核入卵的情况比较普遍。大量的线粒体遗传分析结果认为,只有母本线粒体在后代中检测出来,推测精子线粒体在完成辅助雄原核形成的任务后,便消耗殆尽,而不复制遗传。但Gyllenstein等<sup>[14]</sup>发现,在一种小鼠体内,万分之一的线粒体DNA实际上来自父本。Zouros等<sup>[15]</sup>发现,海洋贻贝 *Mytilus edulis* 和 *Mytilus trossulus* 无论杂交还是自交,一龄以上子代中都含有相当多的父本的线粒体DNA。这些研究表明有些生物种类父本的线粒体是可以复制并遗传的。这对线粒体严格母性遗传的观点提出了挑战。

#### 3.2 受精卵中线粒体聚集现象

卵细胞中的线粒体在原核形成之前,形态一般呈长圆柱形,圆球形线粒体较少,直径较精子线粒体小。但原核形成时,大量长圆柱形线粒体迁移聚集在一起,并靠近将要形成的原核,这些线粒体嵴长而明显,活力很强,这意味着原核的形成和移动需要消耗大量的能量,而未聚集的线粒体易发生泡化,嵴变短小或消失。刘德模等<sup>[16]</sup>认为,这些聚集的线粒体最终将演变为卵黄粒,而且认为卵黄发生后期的卵母细胞大部分线粒体演变为卵黄粒,仅剩小部分维系卵母细胞的呼吸代谢。而在我们实验中观察到,成熟的未受精卵及受精后的卵细胞中线粒体含量都很丰富。任素莲等<sup>[17]</sup>也观察到成熟的卵子中各种细胞器的数量都相对较少,但仍含有丰富的线粒体,

并认为这种现象的存在可能与卵黄的继续合成、受精、发育过程密切相关。

#### 3.3 扇贝杂交精子入卵过程的特点

扇贝的卵黄膜薄,其外无胶膜层。卵黄膜举起形成受精膜时,其结构和厚度基本无变化,这就不能有效阻断多精入卵。扇贝卵细胞的皮层反应没有规律,胞吐不均匀,形成的结构形状不定,也不能有效阻止多精入卵。通过扫描电镜观察,可看到卵表面上2个正在入卵的精子,它们入卵程度相似(图版Ⅱ-6)。当精子活力都很强,而受精膜的举起又需要一定时间时,多精入卵是可能的。多精入卵对大多数动物有害,会导致胚胎早期死亡<sup>[18]</sup>。但多精入卵现象在双壳贝类中普遍存在<sup>[19-20]</sup>。目前,认为有2种阻断多精入卵的机制<sup>[21]</sup>,一种是通过卵子质膜电位改变的初级、快速阻断多精进入机制;另一种是通过受精膜迅速膨胀来实现的次级、永久阻断多精进入机制。本实验结果表明,扇贝卵被激活时,这2种机制均被启动。扇贝的精子无论入卵与否均发生顶体反应,扇贝精子入卵部位是随机的,经常见有多个精子争抢同一入卵部位(图版Ⅱ-7),精子顶体反应释放的溶解酶常造成受精膜破裂(图版Ⅱ-8)。Stephano等<sup>[22]</sup>认为多精入卵与卵子的获取方式和添加的精子量没有显著的相关性,而与授精前卵子在海水中所处的时间长短有关,牡蛎刚产入海水中的卵子受精时容易出现多精入卵现象,而在海水中静置1h后的卵子则很少出现多精入卵现象。扇贝卵为均黄卵,很难区分其动植物极,不象太平洋牡蛎,有1个明显的卵柄<sup>[23]</sup>。扇贝精子入卵时在卵黄膜上留下的通道有大有小,小的直径与精子直径相似,大的直径足以供2个精子同时进入。扇贝精子入卵时,鞭毛不太摆动,易脱落。这2种扇贝远缘杂交与同种扇贝自交具有相同的精子入卵程序,其原因可能是:第一,这2种扇贝虽亲缘关系较远,但二者染色体数目相同,核型区别不太大(另文发表);第二,采用人工催产同步获得这两种扇贝的异性配子,可克服生殖隔离障碍;第三,卵质调控雄原核形成和精子使成熟卵激活均没有种的特异性,两者是相互诱导关系<sup>[24]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 常亚青,刘小林,相建海,等. 栉孔扇贝中国种群与日本种群杂交一代的早期生长发育[J]. 水产学报,2002,26(5):385-390.
- [2] 杨爱国,王清印,刘志鸿,等. 虾夷扇贝×栉孔扇贝人工受精过

1)姜明,汝少国,陶乃蓉,等. 入卵过程中太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)精子超微形态变化的研究[J]. 水产学报(待刊).

- 程的荧光显微观察[J]. 海洋水产研究, 2002, 23(3):1-4.
- [3] 宋志乐, 张玉琨, 张玉山, 等. 栉孔扇贝与海湾扇贝杂交试验初报[J]. 齐鲁渔业, 1986, (7):30-32.
- [4] Lalander B I, Summers R G. An ultrastructural analysis of the gametes and early fertilization in two Bivalves: *Chama macerophylla* and *Spondylia solidissima* with special reference to gamete binding[J]. Cell Tissue Res, 1977, 182:469-486.
- [5] Longo J F, Lori Mathews, Dennis Hedgecock. 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.
- [6] Brummett A R, Dumont J N. Initial stages of sperm penetration into the egg of *Fundulus heteroclitus* [J]. J Exp Zool, 1979, 227(2):277-296.
- [7] 张天荫, 封树芒, 潘忠宗. 金鱼缸精子入卵过程的扫描电镜观察[J]. 动物学研究, 1993, 14(2):166-170.
- [8] Wang Y F, Du N S, Lai W. Cytological study on the mechanism of fertilization in *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea, Decapoda) [J]. Acta Zoologica Sinica, 1998, 44(2):195-202.
- [9] 康现江, 李少菁, 王桂忠. 锯缘青蟹精子入卵过程的扫描电镜观察[J]. 水产学报, 2000, 24(5):403-406.
- [10] 张岩, 王清印, 李健, 等. 中国对虾精子入卵过程的观察[J]. 海洋水产研究, 2001, 22(3):1-5.
- [11] 吴宝铃. 贝类繁殖附着变态生物学③(国家攀登计划B类项目, 海水增养殖生物优良种质和抗病力的基础研究)[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1999. 56-77.
- [12] Müller W A. 发育生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998. 104-116.
- [13] Satta Y, Toyohara N, Ohtaka C, et al. Dubious maternal inheritance of mitochondrial DNA in *Drosophila simulans* and evolution of *D. mauritiana* [J]. Genetical Res, 1988, 52(1):1-6.
- [14] Gyllenstein U, Wharton D, Josefsson A, et al. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice [J]. Nature, 352:255-257.
- [15] Zouros E, Freeman K R, Ball A O, et al. Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus* [J]. Nature, 1992, 359:412-414.
- [16] 刘德模, 洪水根. 栉孔扇贝卵母细胞卵黄发生的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1996, 35(3):412-416.
- [17] 任素莲, 王德秀, 王如才. 栉孔扇贝成熟卵形态与超微结构的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(3):436-440.
- [18] 丁汉波, 全允彬, 黄浙. 发育生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987. 39-65.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] Jaffe L A. Fast block to polyspermy in sea urchin eggs is electrically mediated [J]. Nature, 1976, 261:68-71.
- [22] Stephano J L, Gould M. Avoiding polyspermy in the oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. Aqu, 1988, 73:295-307.
- [23] 田传远, 梁英, 王如才, 等. 太平洋牡蛎配子和精子入卵的扫描电镜观察及胚胎发育的初步研究[J]. 黄渤海海洋, 2000, 18(2):51-55.
- [24] 吴端生, 刘筠. 红鲫与湘江野鲤杂交的受精细胞学研究[J]. 动物学研究, 1993, 14(3):277-282.

## Electron microscope observation on *Patinopecten yessoensis* sperm penetration into *Chlamys farreri* egg

ZHOU Li-qing<sup>1</sup>, YANG Ai-guo<sup>2</sup>, LIU Zhi-hong<sup>2</sup>, DU Fang-yong<sup>1</sup>, WANG Qing-yin<sup>2</sup>

(1. Fisheries College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

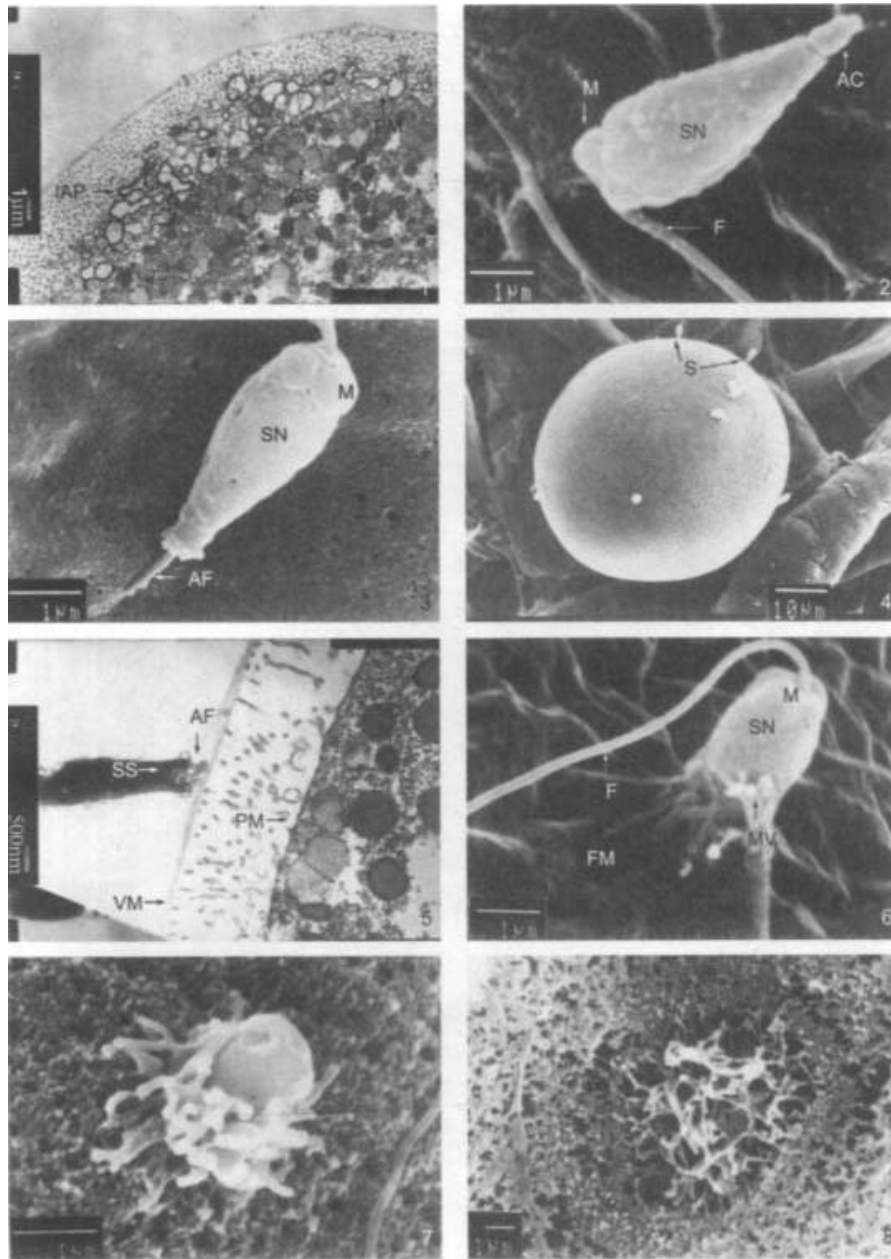
**Abstract:** Two scallop species *Patinopecten yessoensis* ♂ ( $n=5$ ) and *Chlamys farreri* ♀ ( $n=5$ ) were artificially crossbred and inseminated, and the penetration of *P. yessoensis* sperms into the *C. farreri* eggs was observed by both scanning and transmission electron microscopes. The results indicated that there were no significant differences in the process of the sperm entry into the egg between crossbreeding and inbreeding of these two species. As observed, while encountering, the mature eggs and sperms activated mutually, which caused a series of responses such as cortical reaction, fertilization membrane hunching, acrosome reaction and fertilization cone formation. Under the temperature of 16-18 °C, most of the sperms entered into the eggs six minutes after the they were mixed. About eight minutes after the insemination, the sperm mitochondria penetrated into the egg along with the sperm nucleus. A slight increase of the sperm nucleus in size was observed soon after its penetration. It was also found that the egg mitochondria assembled around the sperm nucleus. The polyspermy was observed during the crossbreeding insemination.

**Key words:** *Patinopecten yessoensis*; *Chlamys farreri*; crossbreeding; sperm penetration; electron microscope observation

**Corresponding author:** WANG Qing-yin. Tel: 86-532-5822959. E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

周丽青等：栉孔扇贝（♀）× 虾夷扇贝（♂）精子入卵过程的电镜观察

ZHOU Li-qing et al: Electron microscope observation on *Patinopecten yessoensis* sperm penetration into *Chlamys farreri* egg



图版 I Plate I

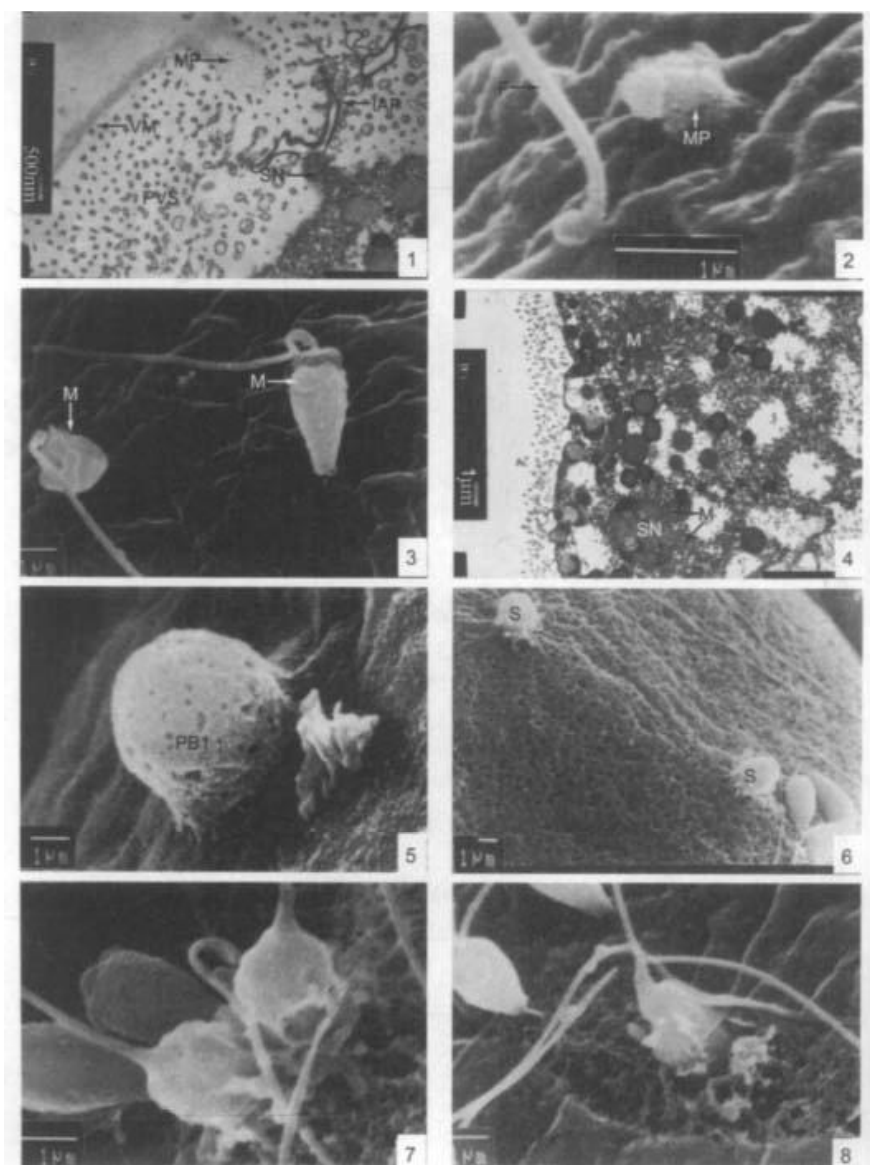
1. 皮层反应。2. 扇贝的精子。3. 精子发生顶体反应。4. 精子附卵。5. 精子顶体丝穿透卵黄膜。6. 精子入卵。7. 受精锥的形成。8. 类似受精孔

1. Cortical reaction. 2. Sperm of scallop. 3. Acrosome reaction. 4. Sperm attaching to the egg. 5. Acrosome filament of sperm penetrating into vitelline membrane. 6. Sperm is penetrating into egg. 7. Fertilization cone formation. 8. A micropyle-like hole.

AC 顶体 Acrosome; AF 顶体丝 Acrosome; CG 皮层反应 Cortical granules; F 鞭毛 Flagellum; FC 受精锥 Fertilization cone; FM 受精膜 Fertilization membrane; IAP 不规则棘状突起 Irregular acanthoid protrusion; M 线粒体 Mitochondria; MP 类似受精孔道 An micropyle-like hole; MPN 雄原核 Male pronucleus; MV 微绒毛 Microvilli; PB1 第一极体 The first polar body; PM 质膜 Plasma membrane; PVS 卵周隙 Perivitelline space; S 精子 Sperm; SN 核 Sperm nucleus; SS 亚顶体腔 Subacrosomal space; VM 卵黄膜 Vitelline membrane.

周丽青等：栉孔扇贝（♀）× 虾夷扇贝（♂）精子入卵过程的电镜观察

ZHOU Li-qing et al: Electron microscope observation on *Patinopecten yessoensis* sperm penetration into *Chlamys farreri* egg



图版 II

Plate II

1. 在卵周隙中的精子。2. 精子入卵后的痕迹。3. 精子线粒体。4. 精核略微膨胀。5. 受精 20 min 左右第一极体排出。6. 多精入卵。7. 多个精子竞争同一部位。8. 卵膜破损。

1. A sperm in the perivitelline space. 2. Marks of sperm entry into egg. 3. Sperm mitochondria. 4. Sperm nucleus size increases slightly. 5. Ejection of the first polar body. 6. Polyspermy. 7. Several sperms competing for the same site. 8. Egg envelope damaged.

AC—顶体 Acrosome; AF—顶体丝 Acrosome; CG—皮层反应 Cortical granules; F—鞭毛 Flagellum; FC—受精锥 Fertilization cone; FM—受精膜 Fertilization membrane; IAP—不规则棘状突起 Irregular acanthoid protrusion; M—线粒体 Mitochondria; MP—类似受精孔道 An micropyle-like hole; MPN—雄原核 Male pronucleus; MV—微绒毛 Microvilli; PB1—第一极体 The first polar body; PM—质膜 Plasmamembrane; PVS—卵周隙 Perivitelline space; S—精子 Sperm; SN—核 Sperm nucleus; SS—亚顶体腔 Subacrosomal space; VM—卵黄膜 Vitelline membrane.