

## 栉孔扇贝(♀)×长牡蛎(♂)受精过程的荧光显微观察

任建峰<sup>1,2</sup>, 杨爱国<sup>1</sup>, 董迎辉<sup>3</sup>, 刘志鸿<sup>1</sup>, 周丽青<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 上海水产大学 生命学院, 上海 200090; 3. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:**采用二氨基苯基吖啶(DAPI)染色荧光显微方法,对栉孔扇贝(*Chlamys farreri* ♀)×长牡蛎(*Crassostrea gigas* ♂)受精过程进行详细观察。结果显示,长牡蛎精子能迅速附着并穿过栉孔扇贝卵膜,精核发生解凝缩而膨胀形成雄性原核;精子入卵后,栉孔扇贝卵子减数分裂重新启动,释放极体并形成雌性原核,最后雌、雄原核融合,受精卵开始第1次卵裂。栉孔扇贝与长牡蛎杂交受精率一般在40%左右,受精卵发育过程中出现了排放2个极体、排放1个极体、不排放极体3种类型,所占受精卵比例约为65%、25%和10%。多数受精卵第1次卵裂后期,染色体发生异常分离,不能平均分配到2个子细胞中,这可能是造成早期胚胎畸形,只能发育到担轮幼虫阶段而全部死亡的主要原因。

**关键词:**栉孔扇贝;长牡蛎;远缘杂交;受精细胞学;荧光显微观察

**中图分类号:**Q959.215 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)05-0643-05

迄今为止,国内外学者已对近江牡蛎(*Outrea rivularis*)<sup>[1]</sup>、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)<sup>[2]</sup>、合浦珠母贝(*Pinctada martensii*)<sup>[3]</sup>、紫贻贝(*Mytilus edulis*)<sup>[4]</sup>、德儒蛤(*Mulinia lateralis*)<sup>[5]</sup>、海滨蛤(*Spisula solidissima*)<sup>[6]</sup>、大叶辐头蛤(*Chama macrophylla*)<sup>[7]</sup>、泥蚶(*Tegillarca granosa*)<sup>[8]</sup>、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hanai*)<sup>[9]</sup>、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)<sup>[10]</sup>、栉江珧(*Atrina pectinata*)<sup>[11]</sup>等贝类的受精过程进行了详细观察与描述。但有关贝类杂交受精过程的细胞学研究相对较少,国内仅杨爱国等<sup>[12]</sup>对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)×栉孔扇贝正、反交,姜卫国等<sup>[13]</sup>对合浦珠母贝、长耳珠母贝(*Pinctada chemnitzii*)和大珠母贝(*Pinctada mazina*)杂交,毕克<sup>[14]</sup>对华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis* ♀)和栉孔扇贝(♂)杂交的受精细胞学过程进行了研究。

栉孔扇贝和长牡蛎是两种重要的海水养殖贝类,分属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、珍珠贝目(Pterioidea)的扇贝科(Pectinidae)和牡蛎科(Ostreidae),两者亲缘关系较远。作者曾对其杂交精子入卵过程进行了扫描电镜观察,证明两种贝类成熟精卵能够相互识别、激活,完成入卵过程<sup>[1]</sup>。为进一步了解异源精子入卵后能否形成雄性原核,远缘杂交过程中雌、雄原核的相互关系等问题,本实验采用DAPI染色方法,对栉孔扇贝(♀)×长牡蛎(♂)受精过

程进行了荧光显微观察。为探讨异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育的技术路线提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

长牡蛎亲贝(壳长8~10 cm)于2004年2月下旬取自青岛海区,暂养于实验室水族箱中,逐渐升温至22℃,促使性腺发育成熟。栉孔扇贝亲贝(壳高7~8 cm)于4月上旬取自山东长岛海域,雌、雄分开暂养于水族箱中,逐渐升温至17℃左右。混合投喂小球藻(*Nannochloropsis oculata*)、夏心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)、三角帽指藻(*Phaeodactylum tricoratum*)、叉鞭金藻(*Dicrateria shanjiangui*)和螺旋藻粉(spirulina powder)等藻类。二氨基苯基吖啶(4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride,以下简称DAPI)为Sigma公司产品。

#### 1.2 方法

采用阴干、升温法刺激栉孔扇贝产卵,长牡蛎精液采用解剖法获得。对获取的精卵分别用300目和500目的筛网过滤,冲洗,除去其组织液,收集。取5 mL稀释的精液( $2 \times 10^7$  /mL)与100 mL稀释的卵子( $4 \times 10^6$  /mL)混合,转入1 000 mL烧杯孵化培养,海水温度为19~21℃。

收稿日期:2004-11-18; 修订日期:2005-01-05.

基金项目:国家“863”高技术研究发展项目(2003AA603022).

作者简介:任建峰(1980-),男,硕士研究生,主要从事贝类遗传育种方面的研究.

通讯作者:杨爱国. Tel:0532-5811982. E-mail: yangag@ysfri.sc.cn

1)任建峰,杨爱国,周丽青,等. 栉孔扇贝(♀)×长牡蛎(♂)精子入卵过程的扫描电镜观察[J]. 高技术通讯,待刊.

精卵混合后每隔5 min取样1次,用已过滤海水配制的2%戊二醛和2.5%多聚甲醛溶液固定,更换固定液一次,保存于4℃冰箱中备用。实验前,将固定的样品用pH 7.4的磷酸缓冲液反复冲洗,加适量DAPI染液于黑暗环境下染色30~60 min,在Nikon E-800荧光显微镜(365 nm)下观察,拍照。

## 2 结果与分析

杂交受精过程中观察到,受精卵发育过程中出现了排放2个极体、排放1个极体、不排放极体3种情况。多数受精卵第1次卵裂时染色体不能均等地分配到2个子细胞中。根据极体排放情况将受精过程分为以下3种类型,并将受精卵中核行为的变化划分为不同阶段。

### 2.1 排放2个极体类型的核行为变化

第1阶段(图版I-A1):未受精的成熟卵子(0 min)。处于第1次减数分裂中期,此时同源染色体配对,整齐地排列在中期赤道板上,染色体形态清晰可见。

第2阶段(图版I-A2、A3):精子(SP)附着及入卵(5~10 min)。异源精卵相互识别后,诱发精子顶体反应,进而精子穿过卵黄膜进入卵质,并轻微膨胀成球形。

第3阶段(图版I-A4):第1次减数分裂及第1极体形成(20~25 min)。精子入卵后减数分裂重新启动,卵细胞同源染色体分为2组,其中靠近卵膜的1组以致密染色质团的形式排出卵外,形成第1极体(PB1),完成第1次减数分裂;另1组染色体仍留在极体之下的卵质内,继而排列在中期赤道板上形成第2次减数分裂中期相。

第4阶段(图版I-A5):第2次减数分裂及第2极体形成(30~35 min)。与第1次减数分裂相似,在第1极体正下方发生第2次减数分裂,姐妹染色单体分离形成第2极体(PB2)。但此次减数分裂经历时间相对较短。

第5阶段(图版I-A6):雌、雄原核形成(40~45 min)。卵子完成第2次减数分裂以后,精核迅速扩散,体积明显膨大,形成雄性原核(MP);同时,卵核也膨大扩散,形成雌性原核(FP)。此时,雌、雄原核均达到最大。

第6阶段(图版I-A7):雌、雄原核靠近(45~50 min)。雌、雄原核沿一定路线向卵中央迁移,相互靠拢。雌、雄原核的大小和亮度,反映了扇贝和牡蛎DNA含量的差异。

第7阶段(图版I-A8):第1次卵裂中期(60~65 min)。雌、雄原核核膜融合,核内染色质相互混合并浓缩,共同排列在中期赤道板上,形成第1次卵裂的中期分裂相。

第8阶段(图版I-A9):第1次卵裂后期(65~70 min)。染色体移向两极,移动方向与卵轴垂直,随着染色体移动,卵质发生流动,植物极凸起形成极叶。

第9阶段(图版I-A10):2细胞期(70~80 min)。胞质分裂结束,卵裂沟很快抵达植物极,将受精卵分裂为2个大小不等的子细胞,同时极叶收缩完成第1次卵裂。

### 2.2 排放1个极体类型的核行为变化

第1极体排放之前核相变化与排放2个极体类型相似,但在第1次减数分裂后,精核发生解凝缩而膨胀形成雄性原核;同时,姐妹染色单体不再分离,而是迅速膨大扩散,形成雌性原核。膨大后的雌、雄原核沿一定路线向卵中央相互靠近(图版I-B1),最后,雌、雄原核融合(图版I-B2)。染色质浓缩形成染色体,排列在中期赤道板上,随后移向卵的两极,方向与卵轴垂直,染色体移动同时,卵质发生流动、分裂,植物极凸起形成极叶(图版I-B3)。胞质分裂结束后,卵裂沟很快抵达植物极,将受精卵分裂为2个大小不等的子细胞,同时极叶收缩完成第1次卵裂(图版I-B4)。

### 2.3 不排放极体类型的核行为变化

少数卵子受精后在未见极体排放的情况下,也完成了卵裂过程。在第1次卵裂后期,染色体沿着与卵轴垂直的方向移动,随着染色体移动,卵质发生流动,植物极凸起形成极叶。极叶相对方向无极体存在(图版I-C1)。第1次卵裂结束后,卵裂沟贯通两极,受精卵分裂为2个大小不等的子细胞,卵裂沟两端都未见极体存在(图版I-C2)。在这种类型的卵中,精子是形成了雄性原核并与雌性原核发生融合,还是仅激活卵子而诱导了雌核发育,有待进一步研究。

## 3 讨论

迄今为止,水产动物远缘杂交工作主要集中在鱼类方面,对贝类研究起步相对较晚,杂交的种类也比较少。1983年Chevassus<sup>[15]</sup>提出了鱼类远缘杂交,“异种受精”杂种发育的机理。该理论认为,鱼类“异种受精”可能产生单倍体、二倍体、多倍体以及雌核发育、雄核发育等多种情况。国内外一些学者的杂交研究也证实了这一理论。鱼类远缘杂交产生二倍体杂种的研究较多,王新成等<sup>[16]</sup>、金万昆等<sup>[17]</sup>成功获得了杂交二倍体。桂建芳等<sup>[18]</sup>、叶玉珍等<sup>[19]</sup>在杂交中发现非整倍体和雌核发育、雄核发育个体。此外,刘思阳<sup>[20]</sup>、吴维新等<sup>[21]</sup>分别在研究鱼类杂交过程中发现四倍体和三倍体。贝类杂交中,杨爱国等<sup>[22]</sup>获得了栉孔扇贝、虹彩扇贝杂交二倍体;毕克<sup>[24]</sup>对华贵栉孔扇贝(♀)和栉孔扇贝(♂)杂交研究所获子代为异源二倍体,同时存在少量雌核发育个体;姜卫国等<sup>[23]</sup>在3种珠母贝种间杂交研究中证实,早期胚胎中存在杂交二倍体、单倍体、近三倍体和非整倍体。这些研究表明,贝类远缘杂交中产生不同倍性个体的机理可能与鱼类相似。本实验中出现了3种极体排放类型受精卵,这就有可能产生复杂的倍性,染色体分析表明,早期胚胎染色体数目分布没有规律性,可出现大量非整倍体<sup>[3]</sup>。

远缘杂交能否成功,关键在于杂交亲本的亲和性。王祖熊等<sup>[25]</sup>曾提出染色体组型相似者亲和性较大,这可能是染色体组型相似,亲本间基因组以及母本细胞质与父本核基因

1) 任建峰,杨爱国,周丽青等. 栉孔扇贝(♀)×长牡蛎(♂)杂交不亲和性的研究. 待发表。

组之间有较小的差异;桂建芳等<sup>[18]</sup>随后提出远缘杂交的亲本与亲本的基因组大小和胚胎发育速度的同步与否密切相关。本实验中,远缘杂交两亲本染色体数目和组型差异较大,早期胚胎发育时序也有较大差别<sup>[2]</sup>,因此两亲本杂交亲和性较差。虽然牡蛎精子入卵后,精核在卵内物质调节下能够膨大形成雄性原核并与雌性原核融合,但由于杂种胚胎雌雄核染色体复制和分裂速度不同,造成细胞分裂节奏不协调和染色体不均等分配。这种现象在第1次卵裂后期的荧光观察中就已显现出来。受精过程观察结果显示,杂交过程中多精入卵现象也很普遍(图版I-D1)。从图版I-D2、D3、D4可以看出,3种类型受精卵第1次卵裂后期,移向两极的染色体荧光面积和强度不同,说明染色体发生异常分离,没有平均分配到2个子细胞中。这可能是造成早期胚胎畸形,只能发育到担轮幼虫阶段而全部死亡的主要原因。

栉孔扇贝与长牡蛎杂交受精率一般在40%左右。卵子受精后经过卵裂、囊胚、原肠胚阶段发育到担轮幼虫,但幼虫不能变态,纤毛越来越长,最后全部死亡。3种类型受精卵,即排放2个极体、排放1个极体和不排放极体,所占比例约为65%、25%和10%。产生3种类型受精卵的形成原因可能是,在卵质对减数分裂起主要调控作用的同时,由于异源精子的进入,不同程度地影响了卵核的减数分裂,如果抑制了第1次减数分裂同源染色体的正常分离、排出,则产生不排放极体的受精卵;如果抑制了第2次减数分裂姐妹染色单体的正常分离、排出,则产生排放1个极体的受精卵;如果异源精子对卵子减数分裂影响较小,不足以抑制染色体的正常分离,则产生排放2个极体的受精卵。此外,精卵的成熟程度、温度等因素也可能对极体的排放有影响,还有待进一步研究。

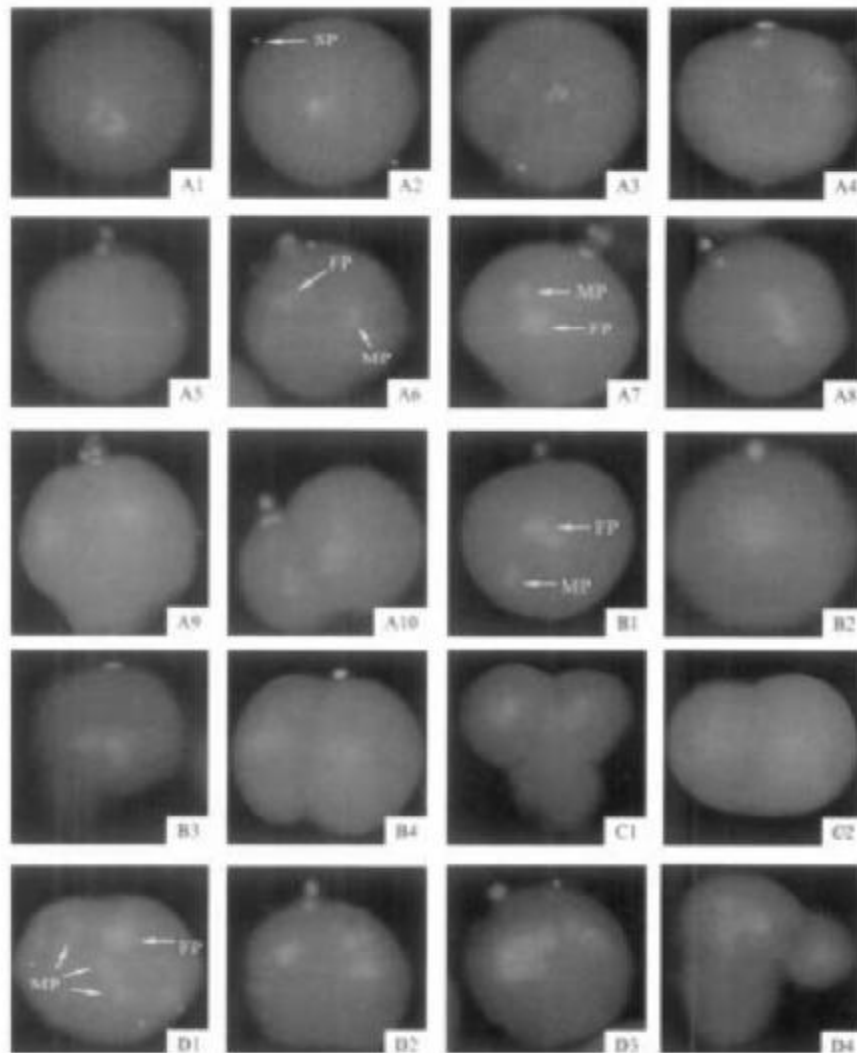
#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 任家莲,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]. 海洋通报,1999(1):34-39.
- [3] 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.
- [4] Longo F J, Anderson E. Cytological aspects of fertilization in the Lamsellibranch, *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.
- [5] Longo F J. Expansion of the sperm nucleus and association of the maternal and paternal genomes in fertilized *Mytilus lateralis* eggs [J]. Biol Bull, 1991,180:56-64.
- [6] 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.
- [7] Lalondes B L, Summers R G. An ultrastructural analysis of the gametes and early fertilization in two Bivalves: *Chama macrophylla* and *Spisula solidissima* with special reference to genete binding[J]. Cell Tissue Res, 1977,182:469-486.
- [8] 孙慧玲,方建光,王德印,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] 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.
- [10] 任家莲,王德秀,姜秀珍,等. 栉孔扇贝受精过程的细胞学观察[J]. 海洋通报,2000(1):24-29.
- [11] 余祥勇,王梅芳. 栉孔扇贝受精过程的细胞学研究[J]. 湛江海洋大学学报,1998,18(4):12-16.
- [12] 杨爱国,王德印,刘志鸿,等. 虾夷扇贝×栉孔扇贝人工受精过程的荧光显微观察[J]. 海洋水产研究,2002,23(3):1-4.
- [13] 姜卫国,魏旭亮,李刚. 合浦珠母贝、长耳珠母贝和大珠母贝间人工杂交的研究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.
- [14] 毕克. 杂交扇贝(华贵栉孔扇贝 *Chlamys nobilis* ♀×栉孔扇贝 *Chlamys farreri* ♂)的分子细胞遗传学分析[D]. 青岛:中国海洋大学,2004.
- [15] Chevanon B. Hybridization in Fish [J]. Aquaculture, 1983,33: 245-262.
- [16] 王新成,尤林,倪高田,等. 石斑(♂)×牙鲆(♀)人工杂交的研究[J]. 海洋科学,2003,27(1):1-4.
- [17] 金万昆,宋振秀,王春英,等. 褶扇贝(♀)×团扇贝(♂)杂交及其杂种F1的形态学特征[J]. 淡水渔业,2003,33(5):16-18.
- [18] 桂建芳,梁培昌,朱直等,等. 鱼类远缘杂交正反交杂种胚胎发育异常的细胞遗传学分析[J]. 动物学研究, 1993, 14(2): 171-177.
- [19] 叶玉珍,吴清江,陈荣禧. 草鱼和鲤鱼杂交的细胞学研究—鱼类远缘杂交核质不同步现象[J]. 水生生物学报,1989,13(3): 234-239.
- [20] 刘思阳. 三倍体草鱼杂种及其双亲的细胞遗传学研究[J]. 水生生物学报,1987,11(1):52-586.
- [21] 吴维新,李传式,刘国安,等. 鲤和草鱼杂交四倍体及其回交三倍体草鱼杂种的研究[J]. 水生生物学报,1988,12(4):355-363.
- [22] 杨爱国,刘志鸿,周丽青,等. 栉孔扇贝×虾夷扇贝杂交及子一代的性状遗传[J]. 海洋水产研究,2004,25(5):1-5.
- [23] 王祖熙,保德霞,靳光琴. 鱼类杂交不亲和性的研究[J]. 水生生物学报,1986,10(2):171-179.

1) 任建峰,杨爱国,周丽青,等. 栉孔扇贝(♀)×长牡蛎(♂)杂交不亲和性的研究. 待发表.

任建峰等:栉孔扇贝(♀)×长牡蛎(♂)受精过程的荧光显微观察

REN Jian-feng et al: Observation on fertilization process of *Chlamys farreri* (♀) × *Crassostrea gigas* (♂) with fluorescent microscope



图版 I 栉孔扇贝(♀)×长牡蛎(♂)杂交受精卵核行为(×500)

A1:第1次减数分裂中期(未受精成熟卵子);A2:精子附卵;A3:精子入卵;A4:第1次减数分裂及第1极体形成;A5:第2次减数分裂及第2极体形成;A6:雌、雄原核形成;A7:雌、雄原核靠近;A8:第1次卵裂中期;A9:第1次卵裂后期;A10:2细胞期;B1:雌、雄原核靠近;B2:雌、雄原核融合;B3:第1次卵裂后期;B4:2细胞期;C1:第1次卵裂后期;C2:2细胞期;D1:多精入卵;D2、D3、D4:染色体异常分离  
FP-雌性原核;MP-雄性原核;SP-精子

Plate I Nuclear behaviors in fertilized eggs of crossing between *Chlamys farreri* (♀) and *Crassostrea gigas* (♂) (×500)

A1: Metaphase of the first meiosis (unfertilized mature egg); A2: Sperm attaching to the egg; A3: Sperm penetrating into the egg; A4: The first meiosis and formation of the first polar body (PB1); A5: The second meiosis and formation of the second polar body (PB2); A6: Formation of the male and female pronuclei; A7: Closing of the male and female pronuclei; A8: Metaphase of the first cleavage; A9: Anaphase of the first cleavage; A10: 2-cell; B1: Closing of the male and female pronuclei; B2: Fusion of the male and female pronuclei; B3: Anaphase of the first cleavage; B4: 2-cell; C1: Anaphase of the first cleavage; C2: 2-cell; D1: Polyspermy; D2, D3, D4: Abnormal chromosomal segregation.  
FP - Female pronucleus; MP - Male pronucleus; SP - Sperm

## Observation on fertilization process of *Chlamys farreri* (♀) × *Crassostrea gigas* (♂) with fluorescent microscope

REN Jian-feng<sup>1,2</sup>, YANG Ai-guo<sup>1</sup>, DONG Ying-hui<sup>3</sup>, LIU Zhi-hong<sup>1</sup>, ZHOU Li-qing<sup>1</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China; 3. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** The fertilized eggs of crossing between *Chlamys farreri* (♀) and *Crassostrea gigas* (♂) stained with DAPI were observed under a fluorescence microscope. The chromosomal behaviors in the fertilization process were examined detailedly. The results showed that *Crassostrea gigas* sperms could attach to and penetrate into *Chlamys farreri* eggs rapidly after insemination. Then, sperm nucleus diffused and formed into male pronuclei. *Chlamys farreri* eggs resumed their meiosis, released polar bodies and formed female pronuclei as they were activated by the heterogenous sperms. Finally, the male and female pronuclei fused and the fertilized eggs began the first cleavage. The rate of crossing fertilization was approximate 40%. Three types of fertilized eggs emerged during developmental process, which were two-polar-body releasing, one-polar-body releasing and none-polar-body releasing, accounting for about 65%, 25% and 10% respectively. The chromosomes in majority of zygotes segregated unconventionally and could not be equally distributed into two daughter cells during the first cleavage, which might be the main reasons why the early embryos developed aberrantly and died entirely at the trochophore stage.

**Key words:** *Chlamys farreri*; *Crassostrea gigas*; remote hybridization; fertilization cytology; observation with fluorescent microscope

**Corresponding author:** YANG Ai-guo. E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

### 欢迎订阅 2006 年《上海水产大学学报》

《上海水产大学学报》是上海水产大学主办的以水产科学为主的综合性学术刊物。主要反映自然科学各学科的科研成果,促进学术与教学研究的交流与繁荣。主要刊载渔业资源、水产养殖和增殖、水产捕捞、水产品保鲜与综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器、渔业经济与技术管理以及基础研究等方面的论文、调查报告、研究简报、综述与评述、通讯等,并酌登学术动态和重要书刊的评价等。

目前,《上海水产大学学报》已同时被中文核心期刊要目总览定为中文核心期刊、中国科学院文献情报中心定为中国科技论文统计源期刊、中国科学技术信息研究所定为中国科技核心期刊。

本刊为双月刊,大16开,国内外公开发行。每期单价10元。全年定价60元(含邮费)。国际标准刊号:ISSN1004-7271,国内统一刊号:CN31-1613/S。国内邮发代号:4-604,国际发行代号:4822Q。读者可在当地邮局订阅,也可直接汇款至编辑部订阅。编辑部还有《上海水产大学学报》(1992-2001年)全文检索光盘,定价50元(含邮费)。欢迎订阅。

编辑部地址:上海市军工路334号,上海水产大学38信箱 邮编:200090

联系电话:021-65710892 传真:021-65710232 E-mail: xuebao@shfu.edu.cn