

人工诱导栉孔扇贝雄核发育早期的荧光显微镜观察

袁媛, 李琪, 于瑞海

(中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:利用荧光显微镜观察栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)正常卵子与雄核发育卵子在减数分裂、受精过程和卵裂早期中的核相变化。雄核发育单倍体是将强度为 $2.8 \text{ mW}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 的紫外线照射20 s的卵子与正常精子受精后得到的。结果表明,尽管紫外线照射并没有影响卵子的成熟分裂及雌性、雄性原核的形成,但它们的发生过程滞后。在第1卵裂中期,雄核发育卵子中雌性原核并不像雄性原核一样形成染色体,而是形成1个浓缩的染色质小体(DCB)。第1卵裂后期,DCB不参与核分裂。第1卵裂结束时,DCB位于2个分裂球其中之一细胞质内或在赤道板处被分割成两部分。实验结果首次提供了栉孔扇贝雄核发育的细胞学证据。

关键词:栉孔扇贝;雄核发育;人工诱导;显微观察

中图分类号:Q959.215

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2003)05-0419-06

雄核发育是指卵子的遗传物质失活而只依靠精子DNA发育成胚胎的一种发育方式。由于雄核发育二倍体后代染色体的基因位点均处于纯和状态,因而可用于快速建立纯系^[1-3]、进行遗传分析^[2]。雄核发育技术与精子冷藏技术相结合还可以成为物种保护的重要手段^[4-5]。在许多鱼类品种如泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)^[6]、虹鳟(*Salmo gairdneri*)^[2-3,7]、斑马鱼(*Brachydanio rerio*)^[5]、马苏大麻哈鱼(*Oncorhynchus masou*)^[1]、鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)^[8]中已相继成功诱导出雄核发育二倍体。由雄核发育单倍体诱导产生二倍体的主要方法为利用温度、压力刺激或化学诱变剂阻止第1卵裂,但已有的报道表明,通过这种方法获得二倍体的存活率极低^[1-3,6]。此外,关于雄核发育卵子发育早期的细胞学方面的研究进行得很少,雄核发育的机制并不清楚。在贝类中,目前只有关于1种生活在河口区的

天然雄核发育的蚬类(*Corbicula leana*)的细胞生物学研究方面的报道^[9-10],而人工诱导贝类雄核发育的研究资料非常罕见。作者前一阶段以栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)为对象,研究了紫外线照射对栉孔扇贝卵子遗传失活的影响,成功诱导出雄核发育单倍体,但单倍体率不高(49.2%,待发表)^[1]。因此,对遗传失活卵子内的染色体动态进行详细研究,有助于弄清雄核发育的细胞学机制,有利于改善雄核发育诱导技术,提高诱导效率。

本实验利用DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)染色,通过荧光显微镜观察栉孔扇贝正常卵子与雄核发育卵子在减数分裂、受精过程和卵裂早期中的核相变化,旨在研究贝类雄核发育的细胞学机制提供证据。

1 材料与方法

成熟栉孔扇贝200个,壳高 $(6.67 \pm 0.28) \text{ cm}$,壳长 $(6.20 \pm 0.32) \text{ cm}$,取自山东威海北海养殖海区。采用阴干升温的方法获得精子和卵子,采集的精卵分别用海水稀释。

4 mL卵悬液($1.0 \times 10^4/\text{mL}$)置于直径9.0 cm的塑料培养皿(Nunc, Nunc Co. Inc.)中,轻微振荡使卵子均匀地分布于培养皿底部。将培养皿置于15 W紫外杀菌灯(Toshiba GL15, 254 nm; Toshiba

收稿日期:2003-04-25; 修订日期:2003-06-23.

资助项目:国家自然科学基金项目(30170735);教育部留学回国人员科研启动基金项目。

作者简介:袁媛(1978-),女,硕士研究生,主要从事贝类遗传育种研究。E-mail: yy97aqu@hotmail.com

通讯作者:李琪, E-mail: qili66@mail.ouc.edu.cn

1)袁媛,李琪,于瑞海,等.紫外线诱导栉孔扇贝雄核发育的研究[J],水产学报,待刊。

Inc.) 下 15 cm 处, 紫外线强度为 $2.8 \text{ mW}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 。卵子经紫外线照射 20 s。以前的研究表明, 当紫外线强度为 $2.8 \text{ mW}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 时, 这一照射时间能够有效地诱导栉孔扇贝雄核发育单倍体¹⁾。经过处理的卵子和未经处理的卵子(对照)分别与 0.5 mL 精悬液($1.0 \times 10^6/\text{mL}$)充分混合以受精, 然后在 19 °C 的温度条件下培养。

精卵混合后 2 h 内每隔 5 min 从 2 组内取卵子样品, 按 Li 等^[11]的方法用 2% 福尔马林海水溶液固定, 经含 8% 蔗糖的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 清洗 3 次后, 进行 DAPI 染色, 然后在荧光显微镜下观察。

实验重复 3 次。

2 结果

2.1 正常卵子的核相变化

对受精至第 2 次卵裂过程中染色体的变化进行了观察。并将受精至卵裂过程中卵内核的形态变化分为 11 个阶段(图版 I), 以说明受精后发育时间与核相的关系。

图版 I - 0 表明栉孔扇贝未受精成熟卵子处于第 1 次减数分裂中期, 此时同源染色体配对, 排列在中期赤道板上。

第 1 阶段(图版 I - 1, 受精): 卵子染色体仍处于浓缩状态, 排列于赤道板上。精子穿过卵膜, 其锥形头部进入细胞质膜后略微膨大成为圆形。

第 2 阶段(图版 I - 2, 第 1 次减数分裂后期): 2 组分开的母本染色体位于卵子皮层。

第 3 阶段(图版 I - 3, 第 1 极体的形成): 第 1 极体(first polar body, PB1)以致密染色质团的形式排出卵子, 剩余的母本染色体排列在赤道板上形成第 2 次减数分裂的中期相。

第 4 阶段(图版 I - 4, 第 2 次减数分裂后期): 母本染色体再次分为 2 组, 每组的染色体荧光强度比 PB1 低, 表明了 DNA 量的减少。精核再次膨胀。

第 5 阶段(图版 I - 5a、b, 第 2 极体以及雌性、雄性原核的形成): 靠近 PB1 的一组染色体形成第 2 极体(second polar body, PB2)排出并位于 PB1 的下方。精核膨胀形成雄性原核。随后卵内剩余的母本染色体膨胀形成雌性原核。雌、雄原核大小、形状相

似, 并沿一定路线移动, 相互靠拢。

第 6 阶段(图版 I - 6, 第 1 卵裂中期): 雌性原核与雄性原核内的染色体相互融合, 共同排列于赤道板上, 形成第 1 卵裂的中期相。

第 7 阶段(图版 I - 7, 第 1 卵裂后期): 染色体移向卵的两极, 此时还观察不到卵裂沟。

第 8 阶段(图版 I - 8, 2 细胞期): 胞质分裂结束, 形成 2 个大小不等的分裂球。

第 9 阶段(图版 I - 9, 第 2 卵裂后期): 在 2 个分裂球中均出现染色体的分离。

第 10 阶段(图版 I - 10, 4 细胞期): 胞质分裂结束, 形成 4 个分裂球。

表 1 显示了受精后正常卵子的发育情况。在减数分裂和卵裂过程中表现出了发育的不同步。处于

表 1 正常卵子各发育阶段受精卵数目

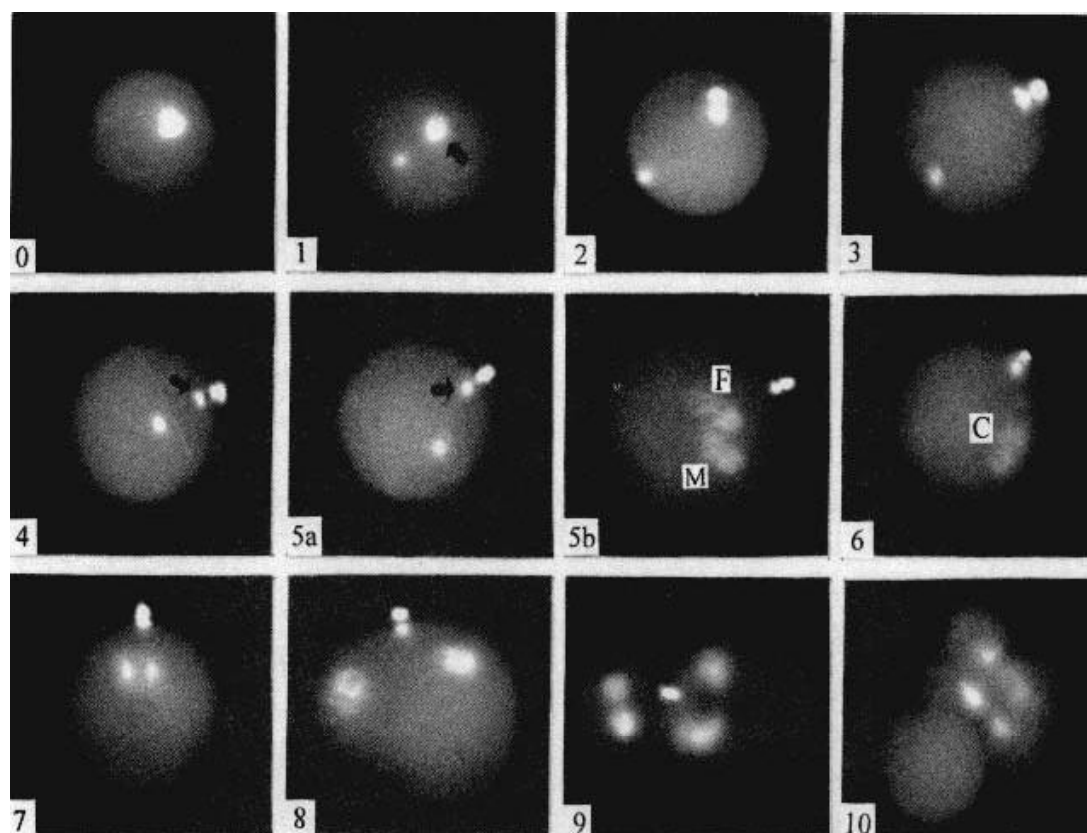
Table 1 Number of zygotes at each developmental stage of normal eggs

受精后时间/min Time after insemination	发育阶段* Developmental stage										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	104	6									
10	2157	3									
15	924	10									
20	1053	59	2								
25	10	32	11								
30	5	15	44	6							
35		5	55	19							
40			79	63	15	1					
45			35	37	26	1					
50			27	35	32	4					
55			17	28	60	4					
60			7	17	68	9					
65				5	57	10					
70				3	52	23	1				
75					48	76	5				
80					10	58	10				
85						6	43	12			
90						3	52	31	1		
95							23	34	2		
100							12	50	5	1	
105							10	34	9	4	
110							12	32	19	6	1
115							9	14	23	8	3
120							5	11	27	6	3

* 数字 0 - 10 与图版 I 中的发育阶段相对应。受精后 4 h 的卵裂率为 77.6%。

Numbers 0 - 10 correspond to the developmental stages of Plate I. The cleavage rate at 4 h after postinsemination was 77.6%.

1) 袁媛, 李琪, 于瑞海, 等. 紫外线诱导栉孔扇贝雄核发育的研究[J], 水产学报, 待刊.



图版 I 栉孔扇贝正常卵子减数分裂和卵裂过程(×60)

Plate I The process of meiosis and cleavage in normal eggs of *Chlamys farreri* (×60)

0. 第1次减数分裂中期(未受精卵子); 1. 受精; 2. 第1次减数分裂后期; 3. 第1极体的形成; 4. 第2次减数分裂后期; 5a. 第2极体的形成; 5b. 雌性原核(F)和雄性原核(M)的形成; 6. 第1卵裂中期; 7. 第1卵裂后期; 8. 2细胞期; 9. 第2卵裂后期; 10. 4细胞期。箭头表示卵核; C代表染色体。

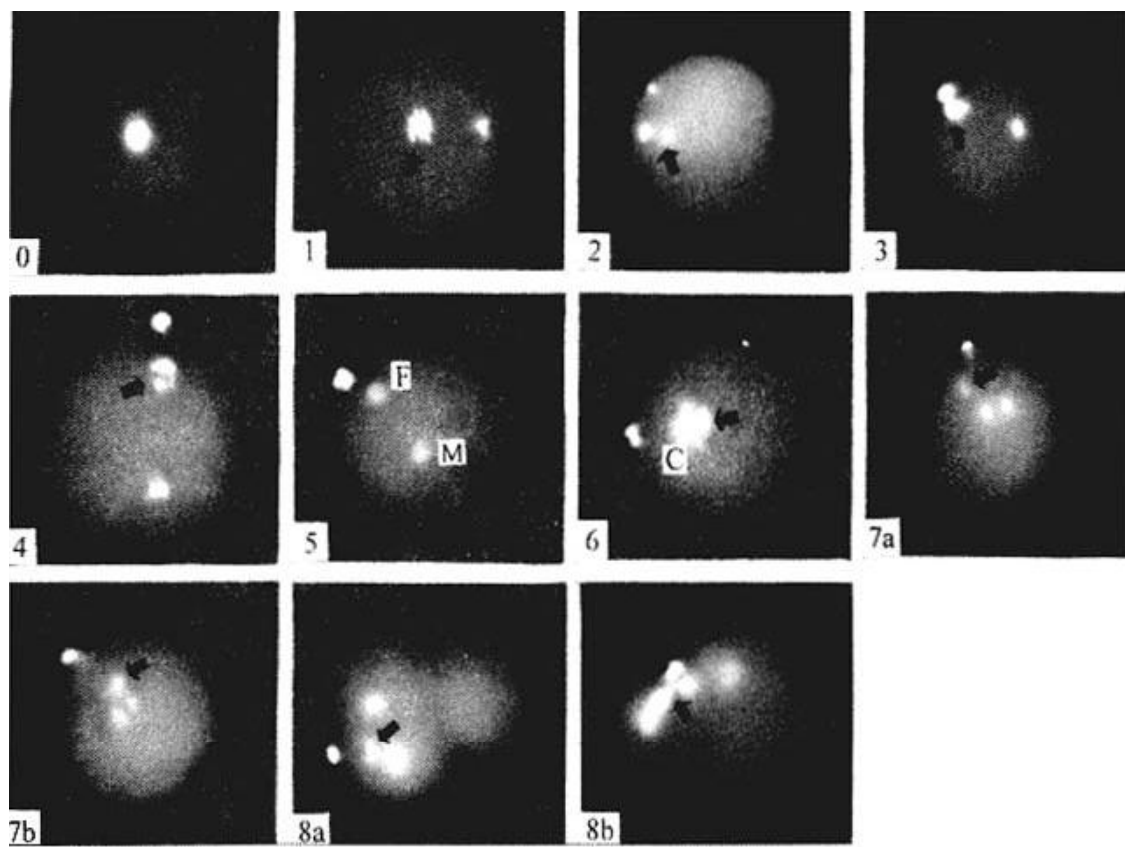
0, Metaphase of the first meiosis (unfertilized egg); 1, Insemination; 2, Anaphase of the first meiosis; 3, Formation of the first polar body; 4, Anaphase of the second meiosis; 5a, Formation of the second polar body; 5b, Formation of the female (F) and male (M) pronuclei; 6, Metaphase of the first cleavage; 7, Anaphase of the first cleavage; 8, 2-cell; 9, Anaphase of the second cleavage; 10, 4-cell. Arrows indicate the egg nucleus; C represents the chromosomes.

第1次减数分裂后期(第2阶段)的卵子出现于受精后10~35 min,而处于第2次减数分裂后期(第4阶段)的卵子出现于受精后30~70 min。

2.2 雄核发育卵子的核相变化

雄核发育卵子的减数分裂和雌性原核的形成过程与正常卵子相同,能够排出PB1和PB2,形成的雌性原核的大小、形状与正常卵子中的相似(图版II-1~5)。精子入卵后,精核同样经过2次明显的膨胀并最终形成与正常卵子内大小、形状相似的雄性原核。但在第1卵裂中期,雄核发育卵子内的雌

性原核并不能浓缩形成染色体,而是形成致密的染色质小体(dense chromatin body, DCB, 图版II-6),位于父本染色体近旁,没有与父本染色体融合。在第1卵裂后期,或随着精核由来的一组染色体移动(图版II-7a),或滞留在2组精核由来的染色体之间伸长(图版II-7b)。当胞质分裂结束后,可以观察到DCB存在于2个分裂球其中之一细胞质中(图版II-8a)或被第1卵裂沟分割为2个部分而同时存在于2个分裂球的细胞质之中(图版II-8b)。



图版 II 栉孔扇贝雄核发育卵子减数分裂和卵裂过程 (×60)

Platy II The process of meiosis and cleavage in UV-irradiated eggs of *Chlamys farreri* (×60)

0. 第1次减数分裂中期(未受精卵子); 1. 受精; 2. 第1次减数分裂后期; 3. 第1极体的形成; 4. 第2次减数分裂后期; 5. 第2极体以及雌性原核(F)和雄性原核(M)的形成; 6. 第1卵裂中期; 7a,b. 第1卵裂后期; 8a,b. 2细胞期。箭头表示经过紫外线照射的卵核; C代表染色体。
0, Metaphase of the first meiosis (unfertilized egg); 1, Insemination; 2, Anaphase of the first meiosis; 3, Formation of the first polar body; 4, Anaphase of the second meiosis; 5, Formation of the second polar body, the female (F) and male (M) pronuclei; 6, Metaphase of the first cleavage; 7a,b, Anaphase of the first cleavage; 8a,b, 2-cell. Arrows indicate the UV-irradiated egg nucleus; C represents the chromosomes.

表2显示了雄核发育卵子的发育情况。与正常卵子一样,雄核发育卵子也存在发育不同步的现象。而且,发育速度比正常卵子要慢。与正常卵子的发育相比,大多数卵子达到第3、5、7阶段所需要的时间要分别多10、15、15 min。

3 讨论

研究表明,栉孔扇贝的成熟卵子受精前处于第1次减数分裂中期。正常卵子减数分裂与受精的过程与杨爱国等^[12]的观察基本相同。雌性、雄性原核的出现是不同步的,雄性原核稍早于雌性原核,且发

生在第2次减数分裂完成后,这与任素莲等^[13]的研究结果是一致的,说明栉孔扇贝雌、雄原核的形成与太平洋牡蛎等^[11]不同。任素莲等^[13]认为,在栉孔扇贝的受精过程中,雌、雄原核中的染色质是弥散的,原核融合后形成致密的染色体,因而两性原核形成了合子核。这与太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[11]、日本珍珠贝(*Pinctada fucata marten-sii*)^[14]、大扇贝(*Placopecten magellanicus*)^[15]有所不同,在这几个种类的受精过程中,雌、雄原核沿一定路线移动、靠拢,核膜紧密接触。然后染色体浓缩,与此同时两性原核的核膜破裂,染色体共同排列于

表2 雄核发育卵子各发育阶段受精卵数目
Table 2 Number of zygotes at each developmental stage of androgenetic eggs

受精后时间/min Time after insemination	发育阶段* Developmental stages									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9 10
5	104	6								
10	83	3								
15	54	11								
20	31	22	1							
25	1259	48	14							
30	29	26	21							
35	20	32	22							
40	10	17	38	2						
45	8	9	43	3						
50	12	15	37	9						
55	4	9	24	18	6					
60	2	5	17	36	13	1				
65	4	16	34	16	3					
70	4	9	24	25	2					
75		9	16	37	6	1				
80		8	11	44	7	3				
85		5	17	27	13	3	1			
90		4	12	24	17	6	2			
95		8	14	26	9	3				
100		3	11	42	15	3				
105			5	22	29	8				
110			3	19	28	11				
115				7	36	10				
120				6	18	27	1			

* 数字0~10与图版I中的发育阶段相对应。受精后4h的卵裂率为77.6%。

Numbers 0~10 correspond to the developmental stages of Plate I. The cleavage rate at 4 h after postinsemination was 77.6%.

赤道板上。因此并没有形成合子核。在本次实验中,虽然观察到雌雄原核的接近、融合,染色体最终浓缩排列于赤道板上形成第1卵裂的中期相,但由于染色方法和观察方式的限制,无法研究雌雄原核在接近、融合的过程中各自染色质状态、核膜状态的变化以及两者在时间上的先后关系。所以不能确定在栉孔扇贝的受精过程中是否形成合子核。

从表1可以发现实验中正常卵子的发育具有不同步的特点。这可能与采卵方法、亲贝成熟程度、培养水温等因素有关。以前的研究表明,自然排放获得的卵子及适温范围内较高水温下培养的受精卵发育的同步性较高^[16]。在对其他贝类如太平洋牡蛎^[11]、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)^[17]的人工诱导单性发育的研究中也存在发育不同步的现象,这可能是贝类受精过程的一个共性。这一现象也解释

了雄核发育单倍体诱导过程中单倍体率在理论上不可能达到100%的原因。

实验结果显示,紫外线照射并不影响卵子减数分裂的完成和雌性、雄性原核的形成,但使其发生滞后。这可能是由于紫外线照射影响了卵子染色体的正常活动;或者因为紫外线照射而影响到卵细胞质中一些在受精、胚胎发育过程中具关键作用的因子。在卵裂阶段,与雄性原核不同的是,受到紫外线照射的卵子染色质形成的雌性原核并不能进一步形成染色体参与有丝分裂,而是变为致密的染色质小体(DCB)。由于没有观察到DCB的分离,表明经紫外线照射的卵子染色体没有参与第1卵裂过程中的核分裂。这从细胞学角度证实,卵子经强度为 $2.8 \text{ mW}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 的紫外线照射20 s可用于诱导栉孔扇贝雄核发育单倍体。

参考文献:

- [1] Nagoya H, Okamoto H, Nakayama I, et al. Production of Androgenetic diploids in amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae* [J]. Fish Sci, 1996, 62(3): 380-383.
- [2] Scheerer P D, Thorgaard G H, Allendorf F W. Genetic analysis of androgenetic rainbow trout [J]. J Exp Zool, 1991, 260: 382-390.
- [3] Young W H, Wheeler P A, Fields R D, et al. DNA fingerprinting confirms isogenicity of androgenetically derived rainbow trout lines [J]. J Hered, 1996, 87:77-81.
- [4] Gwo J C, Ohta H, Okuzawa K, et al. Cryopreservation of sperm from the endangered formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*) [J]. Theriogenol, 1999, 51: 569-582.
- [5] Corley-Smith G E, Lira C J, Brandhorst B P. Production of androgenetic Zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Genetics, 1996, 142: 1265-1276.
- [6] Masaoka T, Arai K, Suzuki R. Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* from UV irradiation eggs of the first cleavage [J]. Fish Sci, 1995, 61(4): 716-717.
- [7] Parsons J E, Thorgaard G E. Production of androgenetic diploid rainbow trout [J]. J Hered, 1985, 76: 177-181.
- [8] Bongers A B J, in't Veld E P C, Abo-Hashema K, et al. Androgenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using UV irradiation in a synthetic ovarian fluid and heat shocks [J]. Aqu, 1994, 122: 119-132.
- [9] Ishibashi R, Komaru A, Ookubo K, et al. The second meiosis occurs in cytochalasin D-treated eggs of *Corbicula leana* even though it is not observed in control androgenetic eggs because the maternal chromosomes and centrosomes are extruded at first meiosis [J]. Dev Bio, 2002, 244:37-43.
- [10] Komaru A, Kawagishi T, Konishi K. Cytological evidence of spontaneous androgenesis in the freshwater clam *Corbicula leana* Prime

- [J]. *Dev Genes Evol*, 1998, 208(1): 46–50.
- [11] Li Q, Osada M, Kashiwara M, et al. Cytological observations on nuclear behavior in normal and gynogenetic eggs of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *SUISANZOSHOKU*, 2000c, 48(2): 193–198.
- [12] 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.
- [13] 任素莲, 王德秀, 绳秀珍, 等. 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 受精过程的细胞学观察 [J]. *海洋湖沼通报*, 2000, 1: 24–29.
- [14] 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): 425–430.
- [15] Desilet J, C Gicquaud, F Dube. An ultrastructural analysis of early fertilization events in the giant scallop, *Placopecten magellanicus* (Mollusca Pelecypoda) [J]. *Invert Reprod Develop*, 1995, 27: 115–129.
- [16] 杨爱国, 王清印, 孔杰, 等. 6-二甲基氨基嘌呤诱导栉孔扇贝三倍体 [J]. *水产学报*, 1999, 23(3): 241–247.
- [17] Li Q, Osada M, Kashiwara M, et al. Cytological studies on artificially induced gynogenesis in the Pacific abalone [J]. *Fish Sci*, 2000, 66: 701–707.

Observation on early development of artificially induced androgenesis in *Chlamys farreri*

YUAN Yuan, LI Qi, YU Rui-hai

(The Key Laboratory of Mariculture Certificated by the Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Nuclear changes in normal and androgenetic eggs of *Chlamys farreri* (body height 6.67 cm, body length 6.20 cm) were examined under a fluorescence microscope during their meiosis, fertilization and early development. The haploid androgenesis was induced by the eggs which were ultraviolet (UV)-irradiated for 20 s at an intensity of 2.8 mW/(cm² · s). Although UV irradiation did not impact either meiotic maturation or formation of the male and female pronuclei, their developmental progress was delayed. At metaphase of the first cleavage, the female pronucleus in UV-irradiated eggs inseminated with the normal sperm did not form chromosome, unlike the male pronucleus, but became a dense chromatin body (DCB), which did not participate in the karyokinesis at anaphase of the first cleavage. At completion of cytokinesis of the first cleavage, the DCB was seen either in the cytoplasm of one of the two blastomeres or on the equatorial plate as two partitional parts. The cytological evidence of the induction of androgenesis in *Chlamys farreri* was demonstrated.

Key words: *Chlamys farreri*; androgenesis; artificially induction; microscopic observation

Corresponding author: LI Qi. E-mail: qili66@mail.ouc.edu.cn