

诱导栉孔扇贝雌核发育时精子入卵的扫描电镜观察

赵峰^{1,2}, 杨爱国¹, 刘志鸿¹, 周丽青¹, 王清印¹

(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 生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:取栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 精子在 $800 \mu\text{W}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 的紫外线下辐射, 然后与正常卵子受精, 每隔 0.5 min 取“受精卵”固定。在扫描电镜下连续观察精子入卵过程, 然后与正常精子入卵过程进行比较。结果表明, 紫外辐射后的精子可以划分为3种类型: I类精子, 基本无明显变化, 可以激发卵黄膜举起形成受精膜, 同时诱发卵子发生皮层反应, 在受精锥的作用下正常入卵, 但入卵的时间较正常精子晚; II类精子, 顶体膜破裂, 顶体丝伸出; III类精子, 顶体丝伸出, 鞭毛脱落。由于II、III类精子在紫外辐射条件下诱发了顶体反应, 融解卵膜的酶提前释放, 因而不能入卵。精子鞭毛的脱落, 使精子丧失了运动能力, 是导致卵表面附着的精子数量较少的原因之一。无论是正常精子还是辐射后的精子, 入卵后在卵表面都留下一个类似受精孔的通道。实验组中未发现有多精入卵现象。

关键词:栉孔扇贝; 雌核发育; 精子入卵; 扫描电镜

中图分类号: Q959.215 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)04-0281-05

对于鱼类、甲壳类的受精细胞学研究, 国内外已做了大量的研究和详尽的报道。在贝类方面, 国内外学者也进行过大量的研究, 多偏重于生殖细胞的发生、形态及精子入卵后各发育阶段的研究^[1-8], 对于卵膜变化的描述不是很详尽。周丽青等^[9]曾对栉孔扇贝(♀) × 虾夷扇贝(♂) (*Patinopecten yes-soensis*) 杂交中, 虾夷扇贝精子入卵的过程进行过详细的描述。

人工诱导雌核发育技术无论是在遗传学理论研究或是选种育种的生产应用方面都有积极的研究价值。在鱼类中, 利用雌核发育技术已成功培育出许多克隆品系。但这一技术的研究在贝类中起步较晚。近年来不少国内外学者对贝类雌核发育的研究进行过积极的探索, 大多侧重于紫外辐射对精子遗传失活及形态结构影响, 以及精子入卵后精核状态及去向的研究^[10]。赵峰等^[11]、李琪等^[12]、李雅娟等^[13]分别对诱导栉孔扇贝、虾夷扇贝、长牡蛎 (*Ostrea gigas*) 雌核发育时紫外辐射对精子遗传失活及形态结构的变化进行了观察, 但辐射后精子入卵及卵表面的变化情况未进行深入的研究。赵洋^[14]在栉孔扇贝与华贵栉孔扇贝 (*Chlamys nobilis*) 的杂交过程中发现有雌核发育现象, 认为栉孔扇贝精子并

未进入华贵栉孔扇贝的卵黄膜, 仍可以激活卵子继续发育。本研究运用扫描电镜技术, 对诱导栉孔扇贝雌核发育时经辐射处理后的精子及正常精子入卵过程进行了比较观察, 旨在为人工诱导栉孔扇贝雌核发育这一技术提供基础资料及技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 亲贝 (壳高 $7 \sim 8 \text{ cm}$) 取自青岛太平角海域, 雌、雄分开暂养于水族箱中 (海水取自小麦岛海域, 水温 $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$)。逐渐升温至 $17 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 待性腺发育成熟, 采用阴干升温法刺激, 使之排精、产卵。将产出的精、卵分别用过滤海水反复清洗几次, 收集于烧杯中待用。

分别取 3 mL 稀释的精液 (1×10^7 个/ mL) 在辐射强度为 $800 \mu\text{W}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 的紫外线下辐射 0 (对照组)、 50 s , 辐射后立即与 30 mL 稀释的卵子 (4×10^4 个/ mL) 混合, 转入 1000 mL 烧杯 $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵化培养。实验设2组重复。

1.2 样品的固定及制备

精卵混合后每隔 0.5 min 取样 1 次, 至混合后 10 min 。所取样品用 4% 多聚甲醛和 1% 戊二醛^[15]

收稿日期: 2003-11-25; 修订日期: 2004-02-18.

基金项目: 国家“973”重大基础研究规划资助项目 (G1999012009); 国家海洋“863”资助项目 (2001AA620106).

作者简介: 赵峰 (1978-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物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

(50%戊二醛 10 mL,多聚甲醛 20 g,Tris 3.029 g,溶于 500 mL 海水)固定,待材料沉降稳定后,更换 1~2 次固定液,4℃冰箱中保存备用。

上述样品经酒精系列脱水,乙酸异戊酯置换,HCP-零界点干燥仪干燥,IB-3 型离子溅射仪喷金后,于 S-520 型扫描电镜下观察比较、拍照。

2 结果

2.1 辐射后精子形态结构的变化

栉孔扇贝精子为鞭毛型精子,正常成熟精子长 60~70 μm ,由头部、中段和末段 3 部分组成(图版 Ia)。头部长 4.2~5.0 μm ,呈锥形,主要包括顶体和细胞核。中段较短,长 0.9~1.0 μm 。由线粒体围绕中心粒复合体形成主要结构。末段细长。

经紫外辐射 50 s 后的精子(实验组)呈现 3 种类型:I 类,基本无明显变化(图版 Ib);II 类,顶体破裂,顶体丝伸出(图版 Ic);III 类,顶体破裂,鞭毛脱落(图版 Id)。

2.2 精卵的激活

栉孔扇贝的成熟卵子产出后停留在第 1 次减数分裂中期,在被精子或其他物质刺激后才能重新启动继续发育。精子顶体接触卵表面,与卵子表面的受体结合后,激发卵子皮层颗粒胞吐,受精膜举起,卵子成熟分裂被重新启动。精子与卵子表面受体接触后,顶体膜破裂,顶体腔内溶解卵黄膜的酶释放,亚顶体腔游离的球状肌动蛋白分子经聚合作用形成纤维状肌动蛋白,并向前突出,形成顶体丝。

2.3 实验组与对照组精子入卵情况

栉孔扇贝的精子可以从卵子的任何部位入卵。精子识别并附着在卵表面后发生顶体反应,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 IIa)。在精子顶体与卵黄膜接触后,激发卵黄膜举起形成受精膜,同时诱发卵子发生皮层反应。皮层反应的主要表现是皮层颗粒的胞吐现象。皮层颗粒靠近卵质膜,胞吐时无方向性^[19]。随着精卵接触时间的延长,皮层颗粒胞吐现象逐渐加剧,卵表面形成不规则突起(图版 IIb)。卵表面的微绒毛在受精前外观整齐,当精子顶体与卵微绒毛接触后,这些长的微绒毛包围精子的头部并扩大成一受精锥(图版 IIc)^[16],精子头部在受精锥的作用下进入卵内。

在辐射后出现的 3 类精子中,I 类精子经过顶体反应,在受精锥的作用下仍可以正常入卵;II 类和

III 类精子由于发生了顶体反应,顶体腔内溶解卵膜的酶提前释放,不能溶解卵膜进入卵内(图版 Id),在卵表面逐渐降解。在对照组中发现有多精入卵现象(图版 IId),而在实验组中未发现。实验组精子表面的精子附着数也明显少于对照组。

I 类精子入卵的时间明显晚于正常精子,对照组正常精子入卵时间集中在精卵混合后 2~4 min,而 I 类精子则集中在精卵混合后 4~8 min。

2.4 精子入卵后卵膜的变化

无论是正常精子还是辐射后的 I 类精子,精子穿过卵黄膜后,卵黄膜上都留下一个类似受精孔的通道,直径 1~3 μm ,但该通道立刻被卵黄膜的纤维所填充(图版 IIe)。然后,卵表面的突褶融合,封闭精子入卵后的通道,使卵表面呈现不规则形状。卵表面仅留下 1 条精子脱落的鞭毛(图版 IIIf)。

3 讨论

采用光照强度为 800 $\mu\text{W}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 的紫外线辐射 50 s,可以使栉孔扇贝精子的遗传物质完全失活,诱导出雌核发育的单倍体^[11]。李琪等^[12]指出,虾夷扇贝精子经紫外辐射后,分为 4 种类型,与本研究的结果基本相似。实验结果表明:栉孔扇贝精子经紫外线辐射后分为 3 种类型,I 类精子与正常精子一样仍可以穿过卵黄膜进入卵内,II、III 类精子由于提前发生顶体反应,以及部分鞭毛脱落而导致精子不能及时附着于卵表面,不能入卵。

(1)紫外辐射可以诱发精子的顶体反应。成功受精的一个前提是精子顶体反应的诱导。精子的顶体反应包括顶体膜和原生质膜的融合,以及精子亚顶体腔内的肌动蛋白聚合引起精子顶端的伸长,形成顶体丝^[16]。除精子与卵黄膜接触诱发顶体反应外,许多外界因子,如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、pH 值等也可以诱发顶体反应。本实验中采用紫外线对精子进行辐射后,其中 II、III 类精子表现出顶体膜破裂,顶体丝伸出,与精子顶体反应的特征很吻合,证明在紫外辐射的过程中诱发了部分精子的顶体反应。在相同的辐射条件下出现 3 类不同情况的精子,这可能与精子自身的成熟度及辐射均匀程度有关。提示在今后的实验中,紫外辐射处理时应尽量减小精液的厚度,使精子接受均匀的辐射。

(2)紫外辐射对精子入卵的影响。精子的顶体反应与精子的受精能力有直接关系。发生顶体反应的精子在短时间内保持完善的受精能力,随着时间

的延长,受精能力逐渐下降,精子的呼吸及活动能力也随之下降^[16]。贝类的精子是靠顶体颗粒内溶解卵黄膜的酶释放融解卵膜而进入卵内的。II、III类精子在辐射过程中发生了顶体反应,顶体颗粒内融解卵黄膜的酶提前释放。对精子的入卵造成一定的影响,这可能是II、III类精子不能进入卵内的重要原因。

鞭毛和顶体对于精子的游动、入卵及受精十分重要^[17]。III类精子由于紫外辐射而导致鞭毛脱落,极大破坏了精子的运动能力,使精子不能及时附着于卵表面。这是实验组卵子表面精子数量较少的原因之一。

通过观察认为,精子辐射后及时授精,尽量减少精子受精能力的丧失,以及增加精子的浓度可以提高雌核发育时的受精率。

(3)关于多精入卵。在栉孔扇贝受精过程中,存在多个精子同时入卵的现象。多精入卵对大多数动物有害,会导致胚胎早期死亡^[18],但多精入卵在贝类中普遍存在^[2-3,19]。目前,公认的阻止多精入卵的机制有:一是阻止精、卵质膜的融合;二是卵膜的变化以阻止精子的附着和进入^[19]。本实验中实验组未发现多精入卵的现象,除了以上两种阻止机制以外,也可能与精子经紫外线辐射后活力降低有关。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 孙慧玲,方建光,王清印,等. 泥蚶受精过程的细胞学荧光显微镜观察[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 104-107.
- [5] 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.
- [6] Longo F G, Anderson E. Cytological aspects of fertilization in the Lamellibranch, *Mytilus edulis* L. Development of the male pronucleus and the association of the maternally and paternally derived chromosomes[J]. J Exp Zool, 1969, 172: 97-120.
- [7] Longo F J, Anderson E. An ultrastructural analysis of fertilization in the surf clam, *Spisula solidissima*: I. Polar body formation and development of the female pronucleus[J]. J Ultrastruct Res, 1970, 33: 495-514.
- [8] Désilets J, Gicquaud C, Dubé F. An ultrastructural analysis of early fertilization events in the giant scallop, *Placopecten magellanicus* (Mollusca, k Pelecypoda)[J]. Invert Repod Dev, 1995, 27: 115-129.
- [9] 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): 189-192.
- [10] 潘英,李琪,王如才,等. 海洋贝类雌核发育研究进展和展望[J]. 水产学报, 2002, 26(5): 465-471.
- [11] 赵峰,杨爱国,刘志鸿,等. 紫外辐射对栉孔扇贝精子遗传失活及形态结构的影响[J]. 海洋水产研究, 2003, 24(4): 26-31.
- [12] Li Qi, Makoto Osada, Masaru Kashiara, et al. Effects of ultra-violet on genetical inactivation and morphological structure of sperm of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis* [J]. Aquaculture, 2000, 186: 233-242.
- [13] 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.
- [14] 赵洋. 杂交扇贝的细胞遗传学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2003.
- [15] 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.
- [16] 吴宝铃. 贝类繁殖附着变态生物学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1999.
- [17] Hylander B L, Summers R G. An ultrastructural analysis of the gametes and early fertilization in two bivalve mollusks, *Chiloma macerophylla* and *Spisula solidissima* with special reference to gamete binding[J]. Cell Tissue Res, 1977, 182: 69-489.
- [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.
- [19] Gould M C, Jose Luis Stephano. Polyspermy prevention in marine invertebrates [J]. Microsc Res Tech, 2003, 61: 379-388.

Scanning electron microscopic observation on sperm penetrating into eggs during artificial induction of gynogenetic *Chlamys farreri*

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

(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)

Abstract: Normal eggs fertilized with sperms were irradiated by UV at the intensity of $800 \mu\text{W}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$. Then, some of the fertilized eggs were fixed into 4% formaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.5 min. The progress of sperm penetrating into eggs were observed under scanning electron microscope (SEM), and compared with that of normal ones. The results show that after irradiated, the sperms were divided into three types. Type I sperm, no apparent changes, could still induce the cortical reaction of the eggs. The vitelline membrane of eggs was elevated to form jelly membrane. And the sperms penetrated into the eggs with the help of fertilization cone like normal ones. But they need more time than normal sperms to enter into the eggs. Type II sperm underwent acrosomal reaction. Its acrosomal membrane cracked and its acrosomal processes extended. Type III sperm not only extended its acrosomal process, but also lost its flagellum. Both type II and type III could not penetrate into the eggs because they had undergone acrosomal reaction, having released the enzyme which would melt away the egg vitelline coats in advance. The lost of sperm flagellum, which is the main reason why there are rare sperms on the egg surface, makes the sperm lose moving ability. After the sperms penetrating into the eggs, a micropyle-like channel was left on the surface of the eggs in both experimental and control groups. There was no polyspermy in experimental group.

Key words: *Chlamys farreri*; gynogenesis; sperm penetrating eggs; scanning electron microscopy (SEM)

Corresponding author: WANG Qing-yin. E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

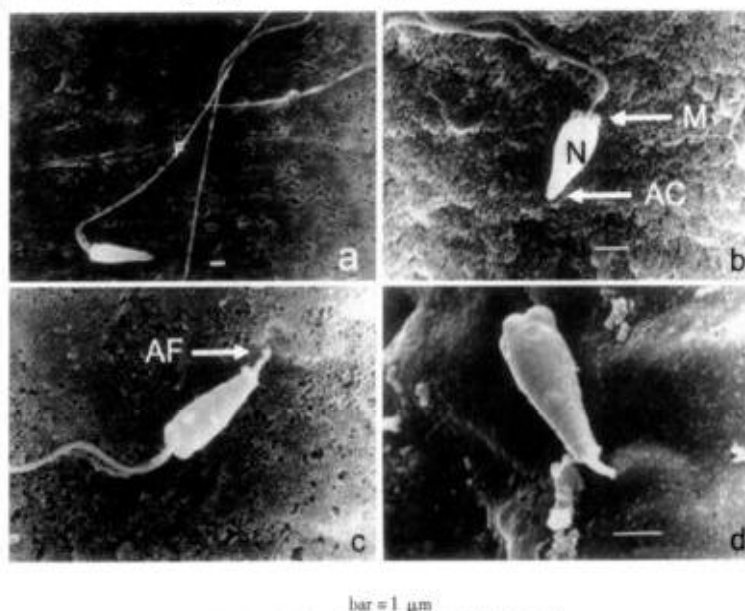
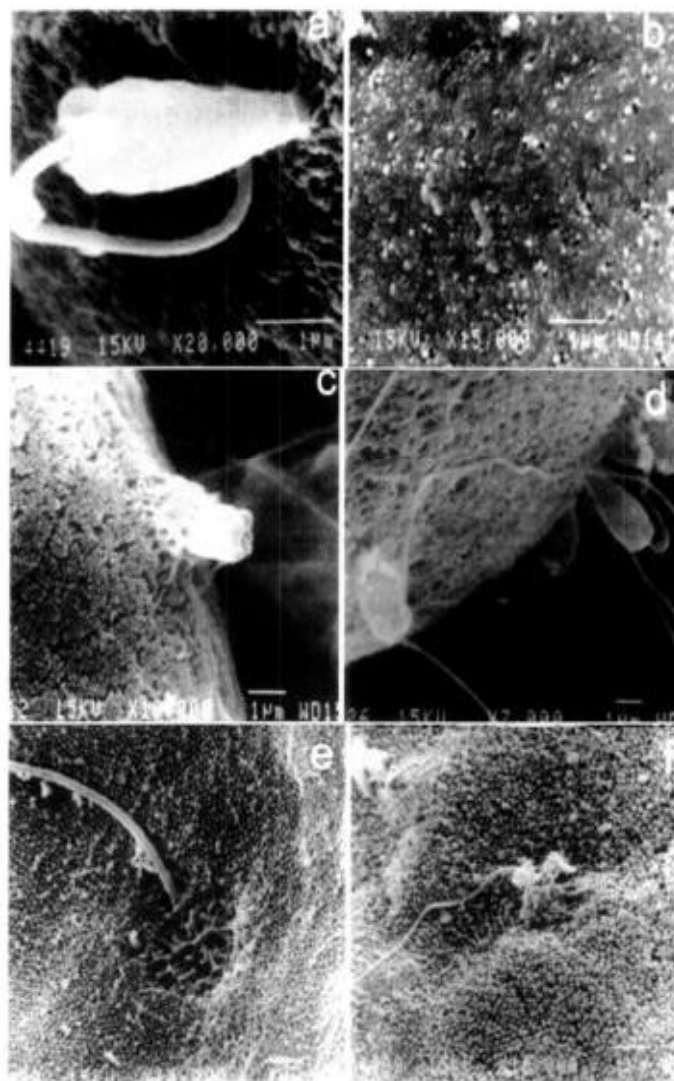


图1 紫外辐射后精子的扫描电镜图片

a, b. 正常精子; c. 紫外线照射后顶体丝伸出的精子; d. 紫外线照射后顶体丝伸出、鞭毛脱落的精子。
AC: 顶体; AF: 顶体丝; F: 鞭毛; M: 线粒体; N: 精核

Plate I SEM micrographs of UV-irradiated spermatozoa of *Chlamys farreri*

a, b. Normal sperm; c. Sperm with acrosomal processes; d. Sperm with no flagellum and acrosomal process extended.
AC: Acrosome; AF: Acrosome filament; F: Flagellum; M: Mitochondria; N: Nucleus



bar = 1 μ m

图 II 紫外照射后精子入卵过程中的电镜图片(图 d 除外)

a. 顶体穿透卵黄膜; b. 皮层反应; c. 受精锥的形成; d. 多精入卵; e. 类似受精孔的通道; f. 入卵通道的恢复

Plate II SEM micrographs in the process of sperm irradiated by UV penetrating into eggs (except Fig. d)

a, Acrosome entry into egg vitelline coats; b, Cortical reaction; c, Fertilization cone formation; d, Polyspermy; e, Micropyle-like channel; f, Recovery of micropyle-like channel