

文章编号:1000-0615(2007)06-0705-06

人工诱导杂色鲍雌核发育受精细胞学观察

陈菲¹, 沈铭辉², 柯才焕¹, 蔡明夷¹, 游伟伟¹

(1. 厦门大学海洋系, 近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 海南省水产研究所, 海南 海口 570206)

摘要:应用组织切片方法,比较观察了杂色鲍普通二倍体、人工诱导三倍体、人工诱导雌核发育单倍体和雌核发育二倍体在成熟分裂和第一次卵裂期间的细胞学变化,以探讨人工诱导杂色鲍雌核发育的细胞学机制。结果表明,精子经紫外线辐射进行遗传失活处理后,仍然能够进入卵子,并激动卵子发育,卵子能够正常完成两次减数分裂,与普通受精卵没有明显差别。精子入卵后形成精核,大多能够逐渐解凝、液化并膨大,最终形成形态正常的雄性原核,但在第一次卵裂早期退化成浓缩的染色质小体(DCB),并在胞质分裂时随机地分配到其中一个子细胞里的分裂沟附近。在人工诱导三倍体和雌核发育二倍体受精卵中,受精卵经细胞松弛素B处理后,染色单体在第二次成熟分裂期分离,但胞质分离受抑制,留在卵质中的两套染色体形成两个染色质团,并发育成两个雌性原核。

关键词:杂色鲍;雌核发育;受精细胞学;紫外线辐射;细胞松弛素B

中图分类号:S 917

文献标识码:A

Cytological studies on artificially gynogenetic *Haliotis diversicolor*

CHEN Fei¹, SHEN Ming-hui², KE Cai-huan¹, CAI Ming-yi¹, YOU Wei-wei¹

(1. Department of Oceanography, State Key Laboratory of Marine Environmental Science,

Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Fisheries Institute of Hainan Province, Haikou 570206, China)

Abstract:To obtain useful information about the mechanism of the artificial induction of gynogenesis in *Haliotis diversicolor*, we observed the cytological images of diploid control group, triploid group, haploid gynogenetic group and diploid gynogenetic group during meiosis and first cleavage. After being incorporated into the egg cytoplasm, the UV-irradiated sperm nuclei could activate eggs to complete meiosis, and sperm nuclei discondensed gradually, liquefied and expanded. Most sperm nuclei eventually developed into the male pronuclei, just like the normal sperms, except that sperm nuclei in a few zygotes kept dense throughout the fertilization process. Dense chromosome body (DCB) was seen at the nuclear area during the prophase of first mitosis, and in the middle of spindle at metaphase of first mitosis. At completion of cytokinesis of first cleavage, the DCB was seen in the cytoplasm of one of the two blastmeres near the cleavage furrow. In the cytochalasin B-treated group, both sets of female chromosomes hold in cytoplasm for chromosomes segregated as in normal zygote but the cytoplasm division was inhibited, formed two

收稿日期:2007-01-29

资助项目:国家“八六三”高技术发展计划(2006AA10A407)

作者简介:陈菲(1983-),女,福建福州人,硕士研究生,从事海洋贝类分子遗传学研究。E-mail: sandy@xmu.edu.cn

通讯作者:柯才焕, Tel: 0592-2187420, E-mail: chke@xmu.edu.cn

chromatin bodies and eventually developed into two pronuclei.

Key words: *Haliotis diversicolor*; gynogenesis; cytology; UV-irradiation; cytochalasin B

受精过程的细胞学观察和研究是水生动物发育生物学的一个重要内容。它不仅可以揭示水生动物发生发育规律,而且可为利用现代生物技术,改良和培育新品种奠定理论基础。杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)是我国南方最重要的海水养殖贝类,虽然对于其繁殖习性、胚胎及胚后发育、人工培育苗种等方面,已有较详细的研究报道^[1-2],但关于受精细胞学研究尚未见报道,另一方面,人工诱导雌核发育的细胞学研究,可以为改进雌核发育理化诱导技术提供理论依据。本研究观察了杂色鲍受精过程的细胞学变化以及紫外线辐射精子和细胞松弛素 B(cytochalasin B, CB)诱导对杂色鲍受精过程细胞核相变化的影响。

1 材料与方法

1.1 亲鲍与催产

实验用亲鲍系从台湾省引进并已在福建养殖数代的成熟杂色鲍。亲贝催产采用阴干、紫外线照射过海水刺激和流水刺激的方法。新鲜精子用膜滤海水稀释至约 $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,卵子用膜滤海水洗涤后备用。试验水温(23 ± 1) °C。

1.2 精子遗传失活与卵子染色体组加倍处理

本研究共设置 4 个实验组,分别记为 N-2n、N-3n、G-n 和 G-2n。其中, N-2n 为普通对照组,用普通精子授精且受精卵未进行处理; N-3n 组为普通三倍体组,用普通精子授精,受精卵用细胞松弛素 B 处理; G-n 组为雌核单倍体组,用紫外线(UV)失活精子授精,受精卵未处理; G-2n 组为雌核二倍体组,用 UV 失活精子授精,受精卵用 CB 处理。精子失活和染色体加倍按 Cai 等^[3]报道的方法处理。

1.3 样品固定与组织切片

授精前取数百个卵子固定作为参照,授精后 70 min 内每隔 3 min 取几百个受精卵固定。所取样品均用 Bouin 氏液固定;样品沉降稳定后,更换一次固定液,按张中英^[4]方法进行脱水、包埋、切片和染色,光镜下观察并拍照。

1.4 染色体计数

取担轮幼体按 Cai 等^[3]所描述方法制备染色体制片,在显微镜(Olympus BX51)下镜检、拍照。

对分散良好的分裂相进行染色体计数。

2 结果

2.1 杂色鲍受精过程的细胞学变化

杂色鲍未受精卵处于第一次成熟分裂中期,可以看到中期相染色体排在赤道面上(图版 I-1)。授精后 5 min,精子入卵后形成致密精核(图版 I-2),同时母本同源染色体在纺锤丝的牵引下开始离开中期板向两极移动(图版 I-3),近外端的核物质将卵膜顶起,然后纺锤体消失,一组染色体进入极体,另一组染色体仍位于卵质内(图版 I-4)。授精后 5~10 min,形成第一极体(PB1)。授精后 10 min,受精卵进入第二次成熟分裂中期,纺锤体的位置与第一次成熟分裂不同(图版 I-5),Pb2 排放时间在授精后 12~21 min, Pb1 和 Pb2 内含有浓缩的呈深蓝色的染色体, PB2 着蓝色明显淡于 PB1(图版 I-6)。在成熟分裂的过程中,精核体积不断增大,结构逐渐疏松,形态从致密的小黑点逐渐变为空泡状,精子星光形成,膨胀精核在星光的引导下逐渐向卵子深部移动(图版 I-7~8)。授精后 24~27 min,雌雄原核形成,并紧挨在一起。在大部分卵中,雌雄原核液化和着色程度一致,大小和形状相当,可借极体位置或星光判断。两个星光体连线与雌雄原核连线垂直,分列两边(图版 I-9)。授精后 36~39 min,受精卵进入第一次有丝分裂中期,染色体直线排列在中期板上(图版 I-11)。在有丝分裂后期,姐妹染色单体在纺锤丝的牵引下各自向两极移动,到达两极的染色体又再次解凝,液化和膨胀,重新形成细胞核,与此同时卵膜中部内凹形成分裂沟,沿着分裂沟细胞质发生缢裂形成两个子细胞(图版 I-12)。

2.2 紫外线辐射精子对受精卵核相变化的影响

雌核发育受精卵(G-n 和 G-2n)成熟分裂和雌性原核形成的方式与与普通受精卵没有明显区别。UV 辐射的精子入卵后,大多能够正常液化形成雄性原核,大小、形状和着色方面与正常受精卵的雄性原核没有差异(图版 II-1)。也有少数精核无法正常液化形成雄性原核(图 II-2)。在第一次有丝分裂早期,可以观察到固缩的染色质小体

(dense chromatin body, DCB) 出现于核区(图版 II-3~4), DCB 在有丝分裂过程中居于纺锤体中(图版 II-5),并在有丝分裂末期时随机地分配到其中一个子细胞里的分裂沟附近(图版 II-6)。

2.3 CB 处理对受精卵核相变化的影响

图版 III 示 N-3n 组受精过程的细胞学特征, N-3n 组精核的变化与普通受精卵相同,但卵核变化表现出与普通受精卵不同的细胞学特征。图版 III-1 示染色单体刚刚分开,但纺锤体已消失。图版 III-1 中分离的两组染色体形成两个染色质团均保留于卵质中。原核期,常常在一个卵子中同

时存在 3 个原核(图版 III-3);有丝分裂期出现三极纺锤体的频率高于普通受精卵(图版 III-4)。在 G-2n 组卵子核相变化特征与 N-3n 组相同,同样频现 3 原核和三极纺锤体。

2.4 染色体计数

图 1~图 4 为杂色鲍对照组、三倍体组、雌核发育单倍体组和雌核发育二倍体组的染色体数目直方图。N-2n 组中,染色体众数为 32。N-3n 组中,染色体众数为 48。G-n 组中,染色体众数为 16。G-2n 组中,染色体众数为 32。在三个实验组中均有一定比例的非整倍体。

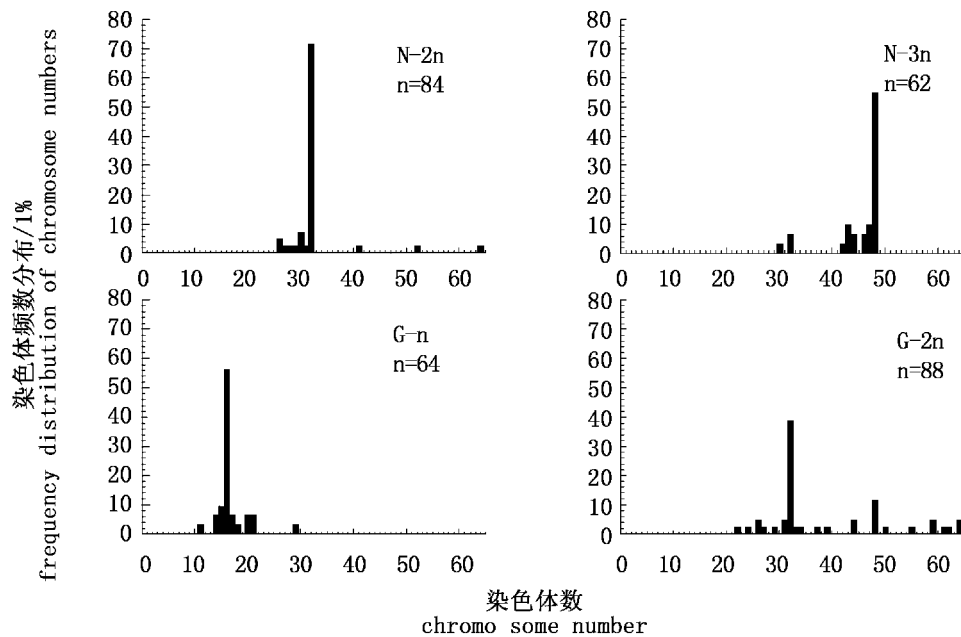


图 4 试验组和对照组幼体染色体频率分布

Fig. 4 Frequency distribution of chromosome numbers in larval cells in experiment and control groups

N-2n: 杂色鲍对照组; N-3n: 诱导三倍体组; G-n: 诱导雌核发育单倍体组; G-2n: 诱导雌核发育二倍体组

N-2n: diploid control; N-3n: induced triploid group; G-n: induced gynogenetic haploid group; G-2n: gynogenetic diploid group

3 讨论

3.1 杂色鲍受精过程的细胞学变化

杂色鲍受精过程与其他贝类基本相似,都包括了精子入卵、精核解凝、原核形成、雌雄原核融合和第一次有丝分裂等过程。杂色鲍成熟卵子排出体外后处于第一次成熟分裂中期,授精后排出两个极体,与皱纹盘鲍 *Haliotis discus hanai* 相同^[5]。有些贝类卵子排出体外后处于第一次成熟分裂的前中期,胚泡尚未破裂,精子入卵后经胚泡破裂才完成两次成熟分裂,如牡蛎^[6]。本研究中也发现胚泡尚未破裂的卵子,但这些卵子一般

无法受精,推测为这种卵子尚不够成熟。

关于雌雄原核相互融合或联合过程,一般认为 3 种情形:一是两核同时向对方移动,如太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[6];二是雌性原核向雄性原核移动;三是雄性原核向雌性原核移动,如泥蚶 (*Arca granosa*)^[7]。杂色鲍雌性原核形成后,稍稍向卵子深部移动,雄性原核有明显向雌性原核移动的趋势。雌雄原核的结合有两种形式,一是融合形成合子核,即核膜相互融合,染色质混合。二是嵌合(或联合)式,即两原核的膜以指状形式相嵌,以后两原核染色体各自形成。前者一般发生于受精前已完成成熟分裂的卵子,而后者大都发

生于受精前尚未完成减数裂的卵子。杂色鲍雌雄原核紧贴后,核内物质融合,但核膜结构不明显,可以初步推断以嵌合(或联合)方式融合。

在普通受精卵原核期也会观察到多个原核和多个星光并存的现象,这可能与多精入卵有关。软体动物受精存在多精入卵现象,但一般仅有一个精子发育成雄原核并参与后续发育^[8],在一些物种中,多个人卵精核都会发育为雄性原核的现象^[9-10]。

3.2 紫外线辐射对精子受精过程的影响

贝类雌核发育诱导一般采用 UV 辐射失活精子的遗传物质,精子 DNA 经紫外线照射后形成胸腺嘧啶二聚体(thymine dimers),使 DNA 双螺旋的两链间的氢键减弱,从而使 DNA 结构局部变形,阻碍 DNA 的正常复制和转录^[11]。本研究中,经 UV 辐射后精子入卵后一般能够正常发育为雄性原核,但也有少数入卵精核不能正常膨大,始终呈固缩状态。精核不能正常原核化的现象同样见于对虾的人工诱导雌核发育中^[12],推测出现这种情况的原因可能紫外线照射同时也破坏了精子内与液化相关的酶类。在第一次卵裂过程中,G-n 和 G-2n 组均观察到固缩的染色质小体(DCB)。DCB 在皱纹盘鲍^[13],太平洋牡蛎^[14],虹鳟(rainbow trout)^[15]等的人工诱导雌核发育受精细胞学研究中也有报道,普遍认为 DCB 是由精核染色体退化而来。可见,理化方法诱导雌核发育的细胞学机理是雄性遗传物质无法正常形成染色体,这可能与紫外线导致精子 DNA 分子之间发生交联有关。

3.3 CB 处理对受精过程的影响

CB 是最有效也是最早应用于贝类的多倍体诱导剂,它是一类真菌代谢产物,通过特异性破坏微丝,最终导致由微丝构成的收缩环解体,抑制细胞质分裂,阻止极体的释放,从而实现染色体组加倍^[16]。本研究中,N-3n 组和 G-2n 组受精卵在第二次成熟分裂后期的细胞学特征是染色单体刚刚分离,纺锤体已经消失,分离的染色单体无法正常向两极移动,而是形成两个染色质团。在其他贝类染色体组加倍诱导中,同样也观察到姐妹染色单体分离,但胞质没有分裂的现象^[17-20],在太平洋牡蛎三倍体诱导细胞学研究中观察到保留在卵质中的两个母本染色体组形成两个雌性原核^[18]。CB 的作用机理是阻止胞质的分离而实现

染色体组加倍,因此适时的 CB 处理对于成功诱导染色体组加倍非常重要。处理太早可能影响染色单体的分离,太晚则无法抑制胞质的分离。

参考文献:

- [1] 杨瑞琼,游锦华,蔡天来. 杂色鲍人工繁殖的初步研究[J]. 动物学杂志,1975,(1):9-12.
- [2] 吕军仪,陈志胜,吴金英,等. 杂色鲍的胚胎发育[J]. 动物学报,2001,147(3):317-323.
- [3] Cai M Y, Ke C H, Wang Z Y, et al. Induction of gynogenetic diploids in the small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* [J]. Shellfish Res, 2004, 23(4):1115-1121.
- [4] 张中英. 鱼卵切片技术[J]. 动物学杂志,1980,(2):45-46.
- [5] 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.
- [6] 任素莲,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]. 海洋湖沼通报,1999,(1):34-39.
- [7] 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.
- [8] 沈亦平,刘汀,姜海波,等. 近江牡蛎受精的细胞学研究[J]. 武汉大学学报(自然科学版),1995,8(4):482-486.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 楼允东. 人工雌核发育及其在遗传学和水产养殖上的应用[J]. 水产学报,1986,10(1):111-123.
- [12] 蔡难儿,林峰,柯亚夫,等. 中国对虾人工诱导雌核发育的研究 I——四步诱导法[J]. 海洋科学,1995,(3):35-41.
- [13] Li Q, Osada M, Kashihara M, et al. Cytological studies on artificially induced gynogenesis in the Pacific abalone [J]. Fisheries Sci, 2000, 66: 701-707.
- [14] Li Q, Osada M, Kashihara M, et al. Cytological observation on nuclear behavior in normal and gynogenetic eggs of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Suisanzoshoku, 2000, 48: 193-198.
- [15] Kobayashi T. Cytological observation on behavior

- of the nuclei after chromosome manipulation during early development of rainbow trout [J]. *Fisheries Sci*, 1998, 64: 782 - 791.
- [16] Scarpa J, Toro J E, Wada K T. Direct comparison of six methods to induce triploidy in bivalves [J]. *Aquaculture*, 1994, 119, 119 - 133.
- [17] Li Q, Osada M, Kashihara M, *et al.* Induction of gynogenetic diploid and cytological studies in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. *Suisanzoshoku*, 2000, 48: 185 - 191.
- [18] Longo F J. The effects of cytochalasin B on the events of fertilization in the surf clam, *Spisula soldissima* I. Polar body formation [J]. *J Exp Zool*, 1972, 182, 321 - 344.
- [19] Komaru A, Matsuda H, Yamakawa T, *et al.* Wada: Chromosome behavior of meiosis inhibited eggs with cytochalasin B in Japanese pearl oyster [J]. *Bull Jap Sci Soc Fish*, 1990, 56(9): 1419 - 1422.
- [20] Komaru A, Wada K T. Different processes of pronuclear events in pressure-treated and CB-treated zygotes at the second meiosis in scallop [J]. *Bull Jap Sci Soc Fish*, 1991, 57(7): 1219 - 1223.

图版 I 杂色鲍受精卵在成熟分裂和第一次卵裂期间的细胞学变化过程

Plate I The process of meiosis and cleavage in the developed eggs

of *Haliotis diversicolor*

1. 未受精卵; 2. 入卵精核; 3. 第一次成熟分裂后期; 4. 第一次成熟分裂末期; 5. 第二次成熟分裂中期; 6. 第二次成熟分裂末期; 7. 精子星光和精核; 8. 开始液化的精核; 9. 雌雄原核; 10. 雌雄原核融合; 11. 第一次有丝分裂中期; 12. 第一次有丝分裂末期
CH: 染色体; FPN: 雌性原核; MPN: 雄性原核; N: 细胞核; Pb 1: 第一极体; Pb 2: 第二极体; SN: 精核; SP: 纺锤体; S: 星光; ZN: 合子核。标尺 = 10 μm

1. unfertilized egg; 2. a sperm nucleus incorporated into the egg cytoplasm; 3. anaphase of meiosis I; 4. telophase of meiosis I; 5. metaphase of meiosis II; 6. telophase of meiosis II; 7. sperm nucleus moving into deep cytoplasm with a star ahead; 8. a forming male pronucleus; 9. two adjacent pronuclei with two stars; 10. two merged pronuclei; 11. metaphase of mitosis I; 12. telophase of Mitosis I
CH: chromosome; FPN: female pronucleus; MPN: male pronucleus; N: nucleus; Pb 1: first polar body; Pb 2: second polar body; SN: sperm nucleus; SP: spindle; S: star; ZN: zygotes nucleus. Scale bar = 10 μm

图版 II UV 失活精子激活杂色鲍卵子的细胞学特征 (G-n 组)

Plate II The cytological characters of the eggs activated by genetically

inactivated sperm with UV in *Haliotis diversicolor* (G-n group)

1. 雌雄原核; 2. 原核期呈固缩状态的精核; 3. 第一次有丝分裂前期; 4. 第一次成熟分裂前期的 DCB; 5. 第一次有丝分裂后期; 6. 第一次有丝分裂晚后期

FPN: 雌性原核; MPN: 雄性原核; DCB: 浓缩的染色质小体。比例尺 = 20 μm

1. female and male pronuclei; 2. dense sperm nuclei at pronuclear phase; 3. prophase of first mitosis; 4. DCB at prophase of first mitosis; 5. mid-anaphase of first mitosis; 6. late anaphase of mitosis

FPN: female pronucleus; MPN: male pronucleus; DCB: dense chromosome body. Scale bar = 20 μm

图版 III CB 诱导杂色鲍发育卵的细胞学特征 (N-3n 组)

Plate III The cytological characters of developed eggs treated

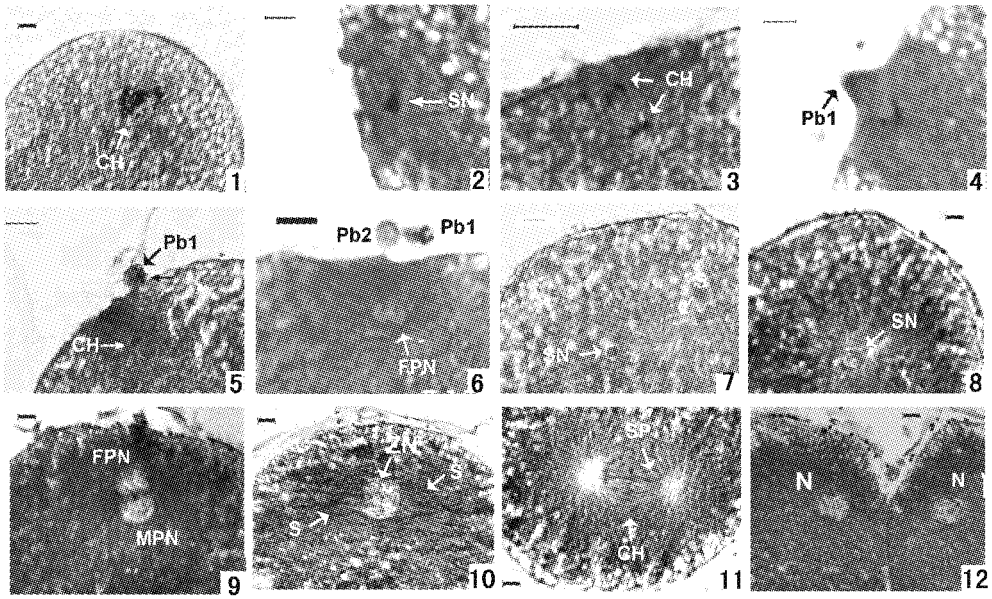
with CB in *Haliotis diversicolor* (N-3n group)

1. 染色单体分开, 纺锤丝消失; 2. 两个分离染色质团滞留于卵中; 3. 三个原核并存; 4. 三极纺锤体

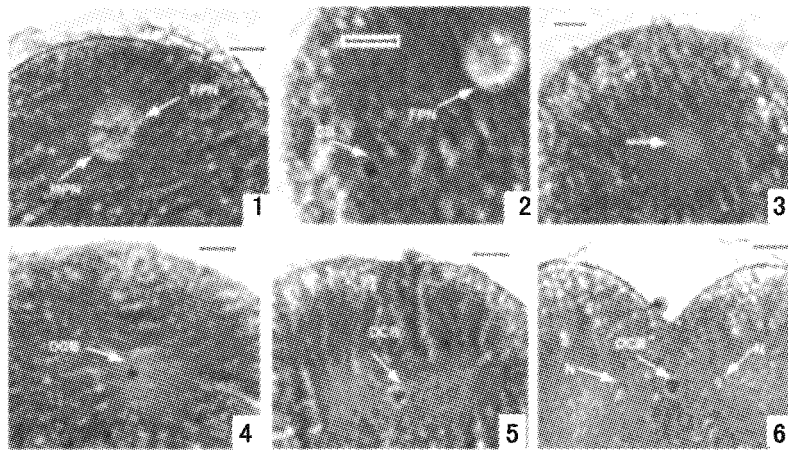
CH: 染色体; PB 1: 第一极体; CB: 染色质小体; PN - 原核; Sp: 纺锤体。比例尺 = 20 μm

1. sister chromatid just segregated, but the spindle disappeared; 2. two segregated chromatin body were retained in the egg at telophase of Meiosis II; 3. three pronuclei in an egg; 4. tripolar spindle

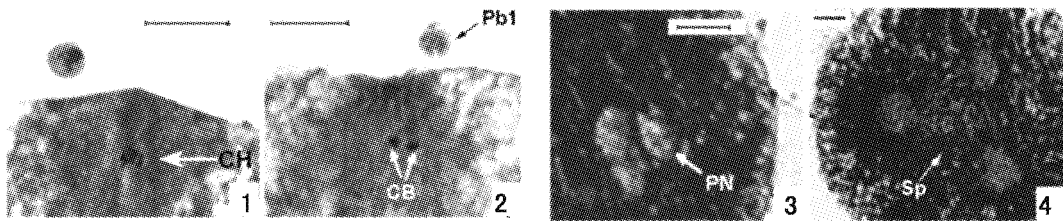
CH: chromosome; PB 1: the first polar body; CB: chromatin body; PN: pronucleus; Sp: spindle. Scale bar = 20 μm



图版 I Plate I



图版 II Plate II



图版 III Plate III