

文章编号:1000 - 0615(2004)06 - 0623 - 05

菲律宾蛤仔受精及早期胚胎发育过程的细胞学观察

毕 克¹, 包振民¹, 黄晓婷¹, 王 珏¹, 方建光², 刘 慧²

(1. 中国海洋大学生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:利用 HOECHST 33258 荧光染料对已固定的菲律宾蛤仔受精卵及早期胚胎样品进行染色的方法,连续观察记录了菲律宾蛤仔受精及早期胚胎发育的细胞生物学过程。结果表明,菲律宾蛤仔的成熟未受精卵处于第一次成熟分裂中期;精卵混合后精子迅速结合于卵子周围并开始进行顶体反应;精子入卵后去致密并且激发卵子恢复两次成熟分裂,释放出第一及第二极体,完成成熟分裂;受精卵完全释放出第二极体的同时早期的精卵原核形成,随后二者相互靠拢,体积扩散膨大,在细胞中央位置形成各自的染色体组后完成联合;菲律宾蛤仔早期胚胎发育速度进程较快;在受精过程中存在极少数的多精受精现象。

关键词:菲律宾蛤仔;受精;早期胚胎;荧光显微术

中图分类号:Q132.4;S917

文献标识码:A

Cytological observations on fertilization and early embryonic development in *Ruditapes philippinarum*

BI Ke¹, BAO Zhen-min¹, HUANG Xiao-ting¹, WANG Jue¹, FANG Jian-guang², LIU Hui²

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

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

Abstract: The cytology of the fertilization and early embryonic development in *Ruditapes philippinarum* were consecutively observed by the fluorescent microscope with HOECHST 33258 stained. The results showed that the mature eggs were at metaphase of meiosis. Sperms bound to the eggs and began the acrosomal reaction quickly after mix of sperms and eggs. With the activation of the dispersed sperms, the eggs released their first and second polar bodies and finished their meiotic division. The early male and female pronuclei were formed when the second polar body was released. The two pronuclei were expanded and closed to each other, finally associated with each other after the chromosomes formed in the central of the egg respectively. The development is quick in the early embryogenetic stage. There are a few of polyspermy phenomena in the fertilization process in *Ruditapes philippinarum*.

Key words: *Ruditapes philippinarum*; fertilization; early embryo; fluorescent microscopy

菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 又称花 瓣鳃纲 (Lamellibranchia), 异齿亚纲 (Heterodonta), 蛤, 蛤仔, 在分类学上隶属于软体动物门 (Mollusca), 帘蛤目 (Veneroida), 帘蛤科 (Veneridae)。菲律宾

收稿日期:2003-07-14

资助项目:国家十五“863”项目“菲律宾蛤仔大规模人工育苗技术”(2002AA603015)

作者简介:毕 克(1978-),男,辽宁丹东人,硕士研究生,从事海洋贝类遗传育种研究。E-mail:bike22@263.sina.com

通讯作者:包振民。Tel:0532-2032059, E-mail:zmbao@ouc.edu.cn

蛤仔广泛分布于我国南北海区。由于它生长迅速,适应及抗病力强,生长周期短,养殖方法简便,并且具有投资少收益大等特点,已经成为我国主要的经济贝类之一,也是捕捞和滩涂贝类养殖的主要对象^[1]。目前国内外曾有很多学者从形态组织、生理生态、生物化学、病害等各个不同的角度针对菲律宾蛤仔进行过研究^[2-6],但对于菲律宾蛤仔受精的细胞生物学过程等相关研究还未见报道。本文通过 HOECHST 33258 荧光染色的方法针对菲律宾蛤仔受精过程中的精子入核时机、极体排放时间、精卵原核结合方式、第一次卵裂的时间以及多精受精等一系列细胞生物学现象进行了连续观察记录,以期今后菲律宾蛤仔的苗种培育和发育生物学研究提供基础知识和相关资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料及主要试剂

材料:菲律宾蛤仔取自青岛城阳红岛蛤仔养殖基地。

试剂:HOECHST 33258 试剂,购自江苏碧云天公司。

1.2 方法

实验于青岛城阳红岛蛤仔养殖基地进行。预先准备两个盛有 24 过滤海水的水槽,槽内充气。取性腺发育成熟的雌雄菲律宾蛤仔数十只,阴干刺激 12h 后,立即置入其中的 1 个水槽中。待雌雄蛤仔普遍刚开始排卵产精时,迅速将蛤仔移至另 1 个水槽中使其继续排放以保证其受精及受精卵发育的同步性。从受精过程开始 100min 内每隔 5min 取样 1 次。取出的样品,尽量拭平海水,迅速在 2% 戊二醛和 2.5% 多聚甲醛,0.1mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH 为 7.2)中固定。观察时吸取少量样品到载玻片上,受精卵及早期胚胎经 0.1 μg·mL⁻¹ HOECHST 33258 荧光染料黑暗中染色 5min 后,在 Nikon E-600 荧光显微镜、紫外(365nm)激发光下进行观察,得到的数字图象数据通过 CCD 摄相机(CHCO)进行拍摄及记录分析。

2 结果

2.1 菲律宾蛤仔受精及早期胚胎发育的观察

雌雄配子、受精卵及胚胎中的 DNA 物质被 HOECHST33258 染色后在 365nm 激发光下呈现出

亮蓝色荧光,核物质清晰可见,胞质等背景干扰较小(图版-1~12)。受精卵发育过程中的染色体形态及行为可以被很好地观察到。我们对 20 组已固定样品进行了连续性观察,结果发现在水温 24 的环境条件下,菲律宾蛤仔受精率达到了 90% 以上。受精卵及早期胚胎发育速度很快,同步性较好。

菲律宾蛤仔的精卵混合后,精子借助鞭毛迅速地游动并附着于卵子的周围。受精后约 5min,精子基本完成入卵过程。精子入卵后精核在卵子胞质作用下核膜破裂,染色质去致密,体积明显膨大。精子入卵后,卵子恢复成熟分裂并且依次排放出第一及第二极体。完全发育成熟的精卵原核形成后相互靠近,在位于卵子中央处形成各自独立的染色体组,随后完成联合形成合子核。精卵原核联合的结束,标志着受精过程结束和早期胚胎发育的开始。胚胎从第 1 次卵裂至发育到 8 细胞卵裂球依然保持着很快的发育速度,其发育进程归纳如下。

受精后 2min: 精子迅速附着并结合于成熟卵子周围,此时卵子处于第一次成熟分裂中期(图版-1)。

受精后 5min: 绝大部分精子完成顶体反应进入卵子,入卵的位置随机(图版-2);精子入卵后由于卵子胞质作用而致使精核染色质去致密,体积明显膨大。同时精子核内开始进行核蛋白重建,精子型染色质开始逐渐重组为体细胞型染色质^[7,8],同时卵子恢复第一次成熟分裂。

受精后 5~10min: 受精卵处于第一次成熟分裂阶段,开始排放第一极体(图版-3)。

受精后 15min: 绝大多数受精卵第一极体完全排出(图版-4)。

受精后 15~20min: 受精卵处于第二次成熟分裂阶段,并且开始排放第二极体(图版-5)。

受精后 25min: 受精卵第二极体完全排出。同时精子核内核蛋白构建基本完成,精子型染色质重组完成,形成体细胞型染色质^[8],核膜重新构建,形成早期精原核;卵核完成两次减数分裂,核膜形成,卵核开始膨大,形成早期卵原核(图版-6)。

受精后 25~30min: 精卵原核继续膨大扩散,并且彼此逐渐靠近,在细胞中央位置形成各自的染色体组(图版-7)。

受精后 35min: 绝大部分精卵原核并完成联合, 形成合子核, 完成受精过程(图版-8)。此时胚胎开始进入第一次卵裂前期。

受精后 35 ~ 40min: 胚胎普遍处于第一次卵裂阶段(图版-9)。

受精后 40 ~ 50min: 大部分胚胎完成第一次卵裂呈两细胞状态, 并且进入第二次卵裂前期(图版-10)。

受精后 50 ~ 60min: 胚胎普遍处于第二次卵裂阶段, 外观上仍然呈现两细胞状态(图版-11)。

受精后 65 ~ 70min: 绝大多数胚胎完成第二次卵裂呈四细胞状态(图版-12)。

受精后 70 ~ 95min: 胚胎进入第三次卵裂阶段。

受精后 95 ~ 100min: 胚胎完成第三次卵裂呈 8 细胞状态。

2.2 菲律宾蛤仔多精受精现象的荧光显微观察

在观察过程中发现了有少数受精卵具有多精受精现象, 其中两精受精的情况又占绝大多数(图版-13 ~ 15), 即两个精子可以进入同一卵子并且都可去致密。当卵子完成两次成熟分裂时, 两精核几乎同时弥散膨大, 并且同时向卵原核方向靠拢。当全移动到细胞中央时, 3 个原核分别形成独立的染色体组随之完成联合。

3 讨论

3.1 精卵原核的形成及结合方式

菲律宾蛤仔的成熟未受精卵处于第一次成熟分裂中期, 此时同源染色体配对, 染色体形态清晰, 数目可辨。这和泥蚶^[9]、栉孔扇贝^[10]、虾夷扇贝^[11]、海滨蛤^[7,8]等几种双壳贝类类似。但此时的卵子并非处于真正的休眠状态, 其中期纺锤体始终处于聚合/解聚的动态平衡之中, 其他许多代谢过程也都是十分旺盛。受精过程一旦开始, 卵子也立即被激活, 启动恢复成熟分裂, 极体排放等一系列生化过程和形态变化。当卵子完全排放出第二极体的同时, 早期的卵原核也随之形成, 并与精原核一起向卵子的中央靠拢, 在此期间精卵原核形态弥散, 体积迅速膨大。当二者达到卵细胞中央时体积达到最大。精卵原核相遇后即通过相互融合或者联合的方式, 以建立合子的染色体组, 而使受精过程告终。然而不同类型的动物原核的结合方式不完全一样, 有的是原核的融合, 有的则

是原核的联合。原核融合是指相互靠拢的两个原核紧贴在一起, 核膜相互融合, 融合过程首先开始于原核的一侧, 先是两者核膜的外膜融合, 随后是内膜相融合, 从而形成合子核, 随之进入第一次卵裂过程。日本珍珠贝^[12]、太平洋牡蛎^[13]和栉孔扇贝^[10]的精卵原核就是以这种方式结合到一起的。原核的联合则是指两原核核膜不融合, 而是两者的膜以指状形式相嵌, 以后两原核染色体组各自独立形成, 随后原核核膜消失, 染色体组移动到一起组成合子染色体组。在 2 细胞卵裂球中, 亲本基因组才首次存在于同一核中。在双壳贝类中, 这种情况已经被证实出现在紫贻贝, 海滨蛤等的受精过程中^[14]。本研究对菲律宾蛤仔受精过程的观察结果同样表明, 其精卵原核的结合也以联合的方式完成(图版 7, 图版-15-a)。

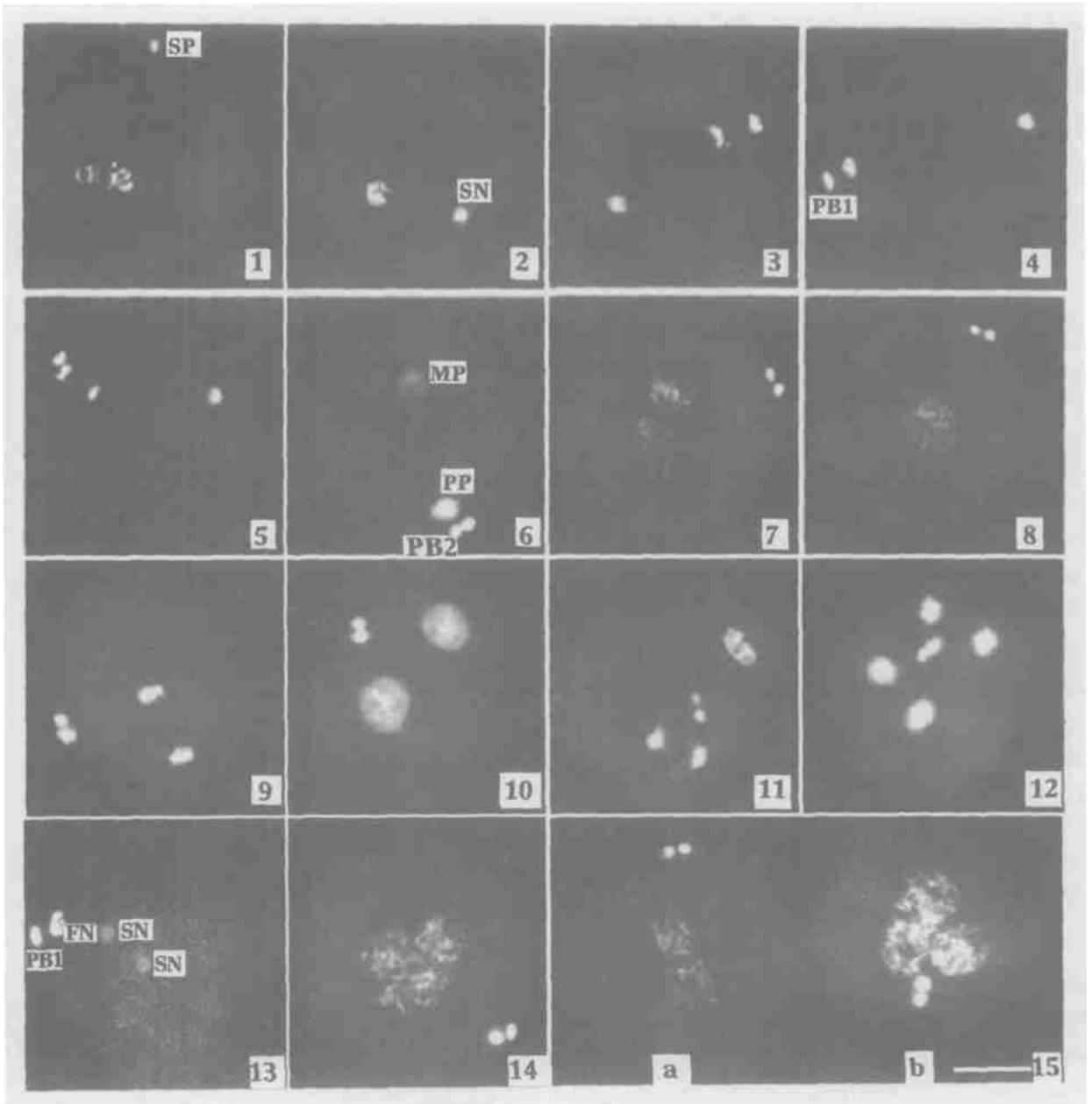
3.2 多精受精现象

单精受精的卵和精子接触, 其质膜立即发生电位变化, 迅速阻止第二个精子入卵, 当受精膜形成后卵就建立了一个完善的阻止多精入卵的屏障^[15]。但是在少数物种的受精过程中也存在着多精受精的现象, 这种情况大多出现在两栖类动物中, 如盘古蟾^[16]、蝶螈^[17,18]等, 而在太平洋牡蛎^[13,19]、栉孔扇贝^[10]等某些双壳贝类中也普遍存在。我们在对菲律宾蛤仔受精过程的研究中也发现了有 2% 左右的受精卵出现了 2 ~ 3 个精子同时入卵的情况。Fankhauser^[20]认为在多精受精的受精卵中, 当 1 个精原核(最靠近卵原核的)与卵原核发生结合形成合子核后, 其余的精原核都将在第一次卵裂前退化。但在菲律宾蛤仔中, 同时入卵的精子在卵子完成第二次成熟分裂时几乎同时形成早期的精原核, 并且同时向卵原核方向移动、彼此靠拢直至最后的联合, 即组成了三倍体的合子核, 这与任素莲等^[10]在对栉孔扇贝多精受精过程的观察结果类似, 但是, 这部分多精受精的胚胎是否能够正常发育下去, 不同学者提出过不同的观点。任素莲等^[13]认为在太平洋牡蛎的受精卵中当有多个精原核存在的条件下, 尽管有多套染色体组形成, 但胚胎不能完成正常的卵裂。在豹蛙、林蛙等无尾两栖类动物中也有千分之几的多精受精现象, 但是第一次卵裂的纺锤丝常出现多极现象, 卵裂时染色体分布混乱, 发育至囊胚时终止。在哺乳类中多精受精个别可产生三倍体胚胎, 但也只能发育到怀孕中期^[15]。但并不是所有

存在多精受精现象的物种的胚胎都不能够存活下去,如盘古蟾多精受精率最高可达33%,并大部分胚胎都可以正常发育^[15]。而对于菲律宾蛤仔中小部分多精受精的胚胎是否能够发育下去目前尚不能定论,这还需要进一步深入的研究。

参考文献:

- [1] Wang R C, Wang Z P, Zhang J Z. Breeding of marine shellfish [M]. Qingdao: Ocean University of Qingdao Press, 1993. 302 - 303. [王如才,王昭萍,张建中. 海水贝类养殖学[M]. 青岛:青岛海洋大学出版社,1993. 302 - 303.]
- [2] Paillard C, Maes P. The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* II. Microscopic study of the brown ring syndrome [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1995, 65(2): 101 - 110.
- [3] Usero J, Gonz áez-Regalado E, Gracia I. Trace metals in the bivalve molluscs *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from the Atlantic Coast of Southern Spain [J]. Environment International, 1997, 23(3): 291 - 298.
- [4] Durocher Y, Guerrier P. Activation of a 85 kDa ribosomal S6 kinase during serotonin-induced oocyte maturation in the clam *Ruditapes philippinarum* [J]. Biology of the Cell, 1995, 84(1 - 2): 84.
- [5] Wang J, Wang Z S, Dong Y, et al. The effect of salinity on growth and survival of *Ruditapes philippinarum* floating larva [J]. Fisheries Science, 2003, 22(2): 12 - 14. [王军,王志松,董颖,等. 盐度对菲律宾蛤仔浮游幼体存活和生长的影响[J]. 水产科学, 2003, 22(2): 12 - 14.]
- [6] Liu R Y, Zhang X C, Ma C D, et al. Study on the correlation between morphological characters and genetic variation of *R. philippinarum* [J]. Marine Environmental Science, 1999, 18(2): 6 - 10. [刘仁沿,张喜昌,马成东,等. 菲律宾蛤仔形态性状与遗传变异的关系研究[J]. 海洋环境科学, 1999, 18(2): 6 - 10.]
- [7] 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.
- [8] Luttmner S J, Longo F J. Sperm nuclear transformations consist of enlargement and condensation coordinate with stages of meiotic maturation in fertilized *Spisula solidissima* oocytes [J]. Dev Biol, 1988, 128: 86 - 96.
- [9] Sun H L, Fang J G, Wang Q Y, et al. Cytological observation on fertilization of *Tegillarca granosa* with fluorescent microscope [J]. J Fish China, 2000, 24(2): 104 - 108. [孙慧玲,方建光,王清印,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 - 108.]
- [10] Ren S L, Wang D X, Sheng X Z, et al. Cytological observation on fertilization of *Chlamys farreri* [J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2000, 1(1): 24 - 29. [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(1): 24 - 29.]
- [11] Yang A G, Wang Q Y, Liu Z H, et al. Cytological observation on cross fertilization of *Chlamys farreri* and *Patinoptecten yesoensis* with fluorescent microscope [J]. Marine Fisheries Research, 2002, 23(3): 1 - 4. [杨爱国,王清印,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.]
- [12] Akira Komaru, Hirokazu Matsuda, Takashi Yamakawa, et al. Meiosis and fertilization of the Japanese pearl oyster eggs at different temperature observed with a fluorescence microscope [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1990, 56(3): 425 - 430.
- [13] Ren S L, Wang D X, Wang R C, et al. Sperm nuclear dispersion and meiotic maturation in fertilized eggs of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) [J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 1999, (1): 34 - 39. [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.]
- [14] Chen D Y, Sun Q Y, Li G P. Fertilization biology-fertilization mechanism and reproduction engineer [M]. Beijing: Science Press, 2000. 35 - 38. [陈大元,孙青原,李光鹏. 受精生物学-受精机制与生殖工程[M]. 北京:科学出版社, 2000. 35 - 38.]
- [15] Chen D Y, Sun Q Y, Li G P. Fertilization biology-fertilization mechanism and reproduction engineer [M]. Beijing: Science Press, 2000. 44 - 45. [陈大元,孙青原,李光鹏. 受精生物学-受精机制与生殖工程[M]. 北京:科学出版社, 2000. 44 - 45.]
- [16] Talevi R. Polyspermic eggs in anceran *Discoglossus pitus* develop normally [J]. Development, 1989, 105: 343 - 349.
- [17] Iwao Y, Yamasaki H, Katagiri C H. Experiments pertaining to the suppression of accessory sperm in fertilized newt eggs [J]. Dev Growth Differ, 1985, 27(3): 323 - 331.
- [18] Wakimoto B T. DNA synthesis after polyspermic fertilization in the axolotl [J]. J Exp Morphol, 1979, 52: 39 - 48.
- [19] Jose Louis. Avoiding polyspermy in the oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. Aquac, 1988, 73: 295 - 307.
- [20] Fankhauser G. The organization of the amphibian egg during fertilization and cleavage [J]. Ann NY Acad Sci, 1948, 49: 486 - 708.



图版 Plate

1. 精卵结合;2. 精子入卵;3. 卵子的第一次成熟分裂后期;4. 释放第一极体;5. 卵子的第二次成熟分裂后期;6. 释放第二极体及雌雄原核形成;7. 雌雄原核染色体组形成;8. 雌雄原核联合;9,10. 第一次卵裂过程;11,12. 第二次卵裂过程;13. 两个精子进入同一个卵子;14. 两个精原核和一个卵原核的联合;15 - a:单精受精情况下精卵原核的联合;15 - b:多精受精时精卵原核的联合;SP:精子;CH:染色体;SN:精核;FN:雌核;PBI:第一极体;PB2:第二极体;MP:雄性原核;FP:雌性原核;标尺 = 20μm

1. sperm binded to the egg; 2. sperm penetrated into the egg; 3. meiosis anaphase of the egg; 4. releasing first polar body; 5. meiosis anaphase of the egg; 6. releasing second polar body and forming female and male pronucleus; 7. forming chromosomes of female and male pronucleus; 8. association of female and male pronucleus; 9,10. first cleavage division; 11,12. second cleavage division; 13. two sperms penetrated into the same egg; 14. association of two male pronuclei and one female pronucleus; 15 - a:association of male and female pronuclei in monospermy; 15 - b:association of male and female pronuclei in polyspermy; SP:sperm; CH:chromosome; SN: sperm nucleus; FN:female nucleus; PBI: first polar body; PB2:second polar body; MP:male pronucleus; FP:female pronucleus; Bar = 20μm