

管角螺受精过程的荧光显微观察及保育卵形成分析

杨泽琴, 李荣华, 母昌考, 宋微微, 王春琳*

(宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211)

摘要: 为了研究管角螺受精卵在受精和早期卵裂过程中的核相变化以及保育卵的形成, 实验通过Hoechst 33258染色、荧光显微观察方法, 对管角螺受精和早期卵裂过程中核行为的细胞学变化进行了详细观察, 并对其胚胎发育过程中的数量变化进行统计分析。结果显示, 管角螺的成熟未受精卵呈卵圆形, 平均卵径(0.33±0.03) mm, 核相处于第一次成熟分裂中期, 在水温为(26±2) °C条件下, 1 h精子入卵, 2~3 h受精卵先后排出第1、第2极体, 完成第一次和第二次成熟分裂, 6 h雌、雄性原核形成, 靠近融合, 第一次卵裂形成2细胞, 12~24 h时2细胞继续分裂生成4细胞。研究表明, 管角螺受精卵在成熟分裂和卵裂过程中表现出发育的不同步性, 同个卵荚内多个发育阶段共存, 受精率为43.14%, 而受精卵正常发育概率仅5.70%。卵荚内多数卵子不受精或者受精卵停止发育, 成为营养卵(保育卵), 为正常可育卵消化利用, 这两种来源的保育卵比率约为3:2。管角螺胚胎发育过程中, 1~6 d内胚胎数减少明显, 担轮幼虫发育率为0.48%, 之后数量稳定, 直至稚螺出膜。

关键词: 管角螺; 受精; 核行为; 保育卵; 荧光显微观察

中图分类号: S 968.3

文献标志码: A

管角螺(*Hemifusus tuba* Gmelin)属腹足纲(Gastropod)、盔螺科(Galeodidae), 是浅海较大型经济螺类, 俗称角螺、响螺, 主要分布在我国浙江以南、广东、广西和海南沿海, 生活在潮下带近海11~40 m的软泥和泥沙质海底, 其肉肥大、味美、营养丰富, 属名贵海鲜, 深受国内外市场欢迎。但是近年来由于野生管角螺的过度捕捞, 再加上海洋环境污染等影响, 管角螺的自然种质资源量呈现日益减少的趋势。因此, 有必要开展相应的经济贝类开发利用以及资源保护活动, 而繁殖与胚胎发育作为贝类动物繁殖生物学的重要研究内容, 故了解管角螺的繁殖生物学习性是开展资源保护活动的前提。近年来, 有关管角螺各方面的研究报道较多, 林志华等^[1]观察到管角螺的繁殖为一年一期, 在4—6月进入繁殖季节, 雌雄个体交配后

产卵; 潘英等^[2]研究了管角螺的胚胎和幼虫发育过程, 其整个过程都在卵囊内进行, 受精卵依次发育分裂形成2细胞、4细胞、8细胞、多细胞和担轮幼虫, 发育时间持续较长, 出膜即为稚螺; 此外, 在管角螺的物质代谢、生长相关因子及养殖技术方面也有研究人员进行了相关探索^[3-7]。

利用荧光显微观察技术可以对受精过程中的父母双亲的遗传物质形态变化进行追踪观察, 能够有效判定是否受精成功。目前, 有关贝类受精过程的细胞学研究已经在多种贝类中开展^[8-19]。

本实验利用显微荧光染色方法对管角螺受精细胞的生物学变化进行进一步观察, 并对受精和未受精的卵粒数进行统计分析, 旨在探索管角螺受精过程和早期胚胎发育的特点及保育

收稿日期: 2016-01-20 修回日期: 2016-07-22

资助项目: 国家自然科学基金(41206113); 浙江省教育厅科技计划(Y201224623); "十二五"农村领域国家科技计划课题(2011BAD13B0903); 浙江海洋高效健康养殖协同创新中心

通信作者: 王春琳, E-mail: wangchunlin@nbu.edu.cn

卵的形成机制, 为管角螺人工繁殖及资源保护提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

实验于2013年2—8月在宁波兢业水产养殖有限公司进行。管角螺亲本从浙江省象山县石浦码头购买。繁殖实验前对管角螺亲本进行育肥暂养, 暂养期间, 投喂开壳的花蛤和蛭等鲜活饵料, 每天换水1/2, 隔天全量换水。水温达到(26±2) °C时开始进行定向交配实验, 跟踪观察产卵情况。

1.2 方法

根据潘英等^[2]对管角螺胚胎发育的分期, 跟踪观察3个成功产卵的雌性管角螺, 从雌体产卵开始至产卵结束(一般24 h以内), 分别于产卵后第0 h、1 h、3 h、6 h、9 h、12 h、24 h(1 d)、6 d、12 d、18 d、24 d、30 d采样, 每次取卵囊3个。取样时, 用剪刀剪开卵囊, 将囊内体液以及胚胎倒入2 mL离心管中静置数秒, 待上下分层后, 用移液枪吸出上层体液, 下层胚胎用灭菌海水稀释配制的2%甲醛溶液固定。

精卵受精过程观察 0~24 h的卵粒经0.1 mol/L磷酸缓冲液PBS (pH 7.4)清洗3~5次后, 用Hoechst 33258荧光染料(上海碧云天生物技术有

限公司, 上海)在黑暗环境下染色6 min, 再用PBS清洗3次, 然后放到Olympus DP-73荧光显微镜(UV365nm, 10×20)下, 对管角螺的受精和早期卵裂过程进行观察拍照, 统计24 h内处于各发育阶段的受精卵情况, 并计算受精率。

胚胎发育观察 将1~30 d的胚胎置于Novel N-300M生物显微镜(10×)下观察管角螺的胚胎发育过程, 每个样品计数3次, 统计各阶段的胚胎数量。

数据分析 实验数据用SPSS 13.0软件进行分析, 并采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 代表差异显著和差异极显著。

2 结果

2.1 管角螺卵子受精和早期卵裂过程的观察

潘英等^[2]于2008年对管角螺卵囊内的胚胎发育过程进行了观察, 受精卵依次分裂形成2细胞、4细胞、8细胞、多细胞和担轮幼虫, 出膜即为稚螺。本实验以此发育分期为基础进行取样点设定, 采用荧光显微镜对管角螺卵子受精和早期卵裂的发育过程的核行为进行进一步观察(表1, 图版)

2.2 管角螺卵子受精和受精卵卵裂的统计

荧光显微观察发现, 管角螺产卵后, 其受

表1 荧光显微镜下观察管角螺卵子受精和早期卵裂的发育过程

Tab. 1 Developmental process of fertilization and early cleavage of *H. tuba* Gmelin with fluorescent microscope

发育阶段 developmental stage	发育过程 developmental process
0(未受精卵)	管角螺的成熟未受精卵呈卵圆形, 平均卵径 0.33 ± 0.03 mm, 核相处于第一次成熟分裂中期, 此时同源染色体配对, 整齐地排列在纺锤体赤道板上(图版-0)。
1(精子附卵)	在荧光显微镜下的管角螺精子, 仅能看到点状头部发出亮蓝色荧光, 精子附着于卵子表面, 附着部位随机(图版-1)。
2(精子入卵)	母本染色体处于浓缩状态并排列于赤道板上。精子穿过卵膜, 其锥形头部进入细胞质膜后, 精核略微膨大扩散形成球形, 并启动卵子成熟分裂(图版-2)。
3(第一次成熟分裂)	排列于赤道板上的同源染色体开始分离, 一组染色体移向卵膜, 另一组染色体向相反方向移动, 形成第一次成熟分裂后期核相(图版-3)。
4(第1极体排出)	移向卵膜的那组染色体将质膜顶起, 并逐渐浓缩形成第一极体。留在卵内的那组染色体, 重新排列在纺锤体赤道板上, 形成第二次成熟分裂中期的分裂相(图版-4)。
5(第2极体排出)	位于第一极体下方的那组染色体以同样的方式进行第二次成熟分裂, 姐妹染色单体发生分离, 其中一组染色体被排出卵外, 形成第二极体, 另一组染色体保留在卵质内(图版-5)。
6(雌雄原核形成, 融合)	第二次成熟分裂之后, 精核膨胀, 形成一团松散的核物质, 即雄性原核。卵子染色体也膨大扩散, 形成与雄性原核形状、结构相似的雌性原核(图版-6-1)。雌、雄性原核膨胀到最大体积并相互靠近, 发生融合(图版-6-2)。
7(第一次卵裂)	染色体在纺锤丝的牵拉下向纺锤体两极移动, 形成第一次卵裂后期分裂相, 此时还观察不到卵裂沟(图版-7)。
8(有丝分裂)	随着染色体的迁移, 受精卵的形状也发生了显著变化, 植物极凸起, 极叶伸出, 染色体继续分离, 极叶愈加明显, 整个受精卵形似“三叶草”形状, 可以观察到卵裂沟(图版-8)。
9(2细胞期)	随着胞质分裂结束, 形成2个大小不均等的分裂球, 卵裂沟清晰(图版-9)。
10(4细胞期)	随后, 2个卵裂球各自均发生核分裂。胞质分裂结束形成4个分裂球(图版-10)。

精卵在成熟分裂和卵裂过程中表现出发育的不同步性, 同个卵囊内多个发育阶段共存, 0~24 h各个发育阶段均有未受精卵粒存在, 随着发育过程其数量逐渐减少。0 h少数精子附在卵粒上, 极个别开始入卵现象, 96.38%±0.09%为未受精卵; 1h精子附卵、入卵现象增多; 3h时, 13.37%±0.02%的卵子排出第1极体, 12.74%±0.01%的排出第2极体, 较慢的才开始发生精子入卵; 6 h有6.05%±0.01%的受精卵完成雌雄原核融合, 5.86%±0.00%分裂成2细胞, 而11.39%~14.78%的还是处于排出极体状态, 仅1.37%±0.00%处于精子入卵状态, 未发现附卵现象; 9~24 h, 受精卵逐渐分裂生成2细胞和4细胞, 精子附卵、入卵现象减少。管角螺产卵6 h之后, 未观察到精子附卵、入卵现象(表2)。

管角螺亲本产下卵荚后, 卵荚内的卵粒开始受精发育。统计各阶段的受精率发现: 0 h时, 卵囊内大多为未受精卵, 受精率仅0.08%, 表明受精基本还未开始; 1 h精子附卵、入卵现象增多, 受精率为10.96%, 受精过程逐渐开始; 3 h排出极体, 受精率为38.84%; 6 h发生雌雄原核融合, 此时受精率为39.16%; 9~24 h受精卵逐渐卵裂形成2细胞和4细胞。截止产卵后24 h, 大多受精卵已卵裂至4细胞, 此时受精率为43.14%, 而4细胞的发育率仅5.70%。单因素方差分析结果表明, 各时间点受精率的差异性均极显著($P<0.01$), 其中0~3 h的受精率变化显著($P<0.05$), 而3~24 h的受精率的差异性不显著($P>0.05$)(表3)。

2.3 管角螺胚胎的发育情况统计

管角螺属直接发生型, 整个胚胎发育阶段都在卵囊内进行, 出膜后即为稚螺, 其繁育过程没有自由生活的浮游幼虫阶段。观察发现, 管角螺胚胎发育过程中, 产卵6 h内, 基本完成受精过程, 1 d(即24 h)内可以正常发育的胚胎已发育至4细胞期, 此时胚胎数约(194.53±54.77)个; 6 d发育至大颗粒期, 胚胎数减少较多, 下降至(16.25±2.28)个; 12 d时, 胚胎发育呈哑铃状, 数量约(14.50±1.14)个; 发育至18 d, 胚胎幼体后端形成一个螺层的初生壳, 足部已形成, 约(13.54±1.94)个; 长至24 d时, 初生壳形成2个螺层, 足部长出完整的厣, 头部、足部能收缩, 并能缩进初生壳内, 此时幼体已发育稳定, 具成体螺雏形, 约(13.26±2.05)个; 30 d时, 卵荚内稚螺先后破膜而出, 约(13.20±1.87)个(表4)。统计发现, 管角螺胚胎发育过程中, 6 d内胚胎数减少最为显著, 之后6~30 d, 直至稚螺出膜, 胚胎数趋于稳定, 差异不大(图1)。

3 讨论

3.1 雌雄原核结合方式

贝类物种不同, 其雌、雄原核的结合方式也不同, 一般有原核融合和原核联合两种: 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[9]属原核融合, 雌、雄原核相互靠拢后, 核膜融合, 染色质也融为一体, 形成合子染色体组; 而原核联合是指雌雄原核相互靠拢但不融合, 各自形成染色体组,

表2 管角螺卵子受精后处于各发育阶段的卵粒百分比

Tab. 2 The percentage of eggs of *H. tuba* Gmelin in different developmental stages after fertilization

受精时间 time after insemination	发育阶段 developmental stage							
	0(未受精卵)	1(精子附卵)	2~3(精子入卵)	4(PB1排出)	5(PB2排出)	6(雌雄原核融合)	7~9(2细胞期)	10(4细胞期)
0 h	96.38±0.09%	3.40±0.00%	0.23±0.00%					
1 h	77.61±0.07%	11.40±0.01%	10.99±0.02%					
3 h	60.84±0.10%	0.57±0.00%	12.48±0.02%	13.37±0.02%	12.74±0.01%			
6 h	60.55±0.13%		1.37±0.00%	11.39±0.01%	14.78±0.02%	6.05±0.01%	5.86±0.00%	
9 h	60.84±0.06%			9.18±0.01%	14.87±0.02%	7.95±0.01%	6.85±0.01%	0.31±0.00%
12 h	60.33±0.04%			7.99±0.01%	16.05±0.02%	8.20±0.00%	6.58±0.00%	0.85±0.00%
24 h	56.96±0.08%			4.37±0.02%	19.37±0.03%	7.85±0.01%	5.76±0.01%	5.70±0.01%

注: 发育阶段中的0~10与表1中的0~10阶段相对应

Notes: The partition of development stage corresponds to the 0~10 phase in Tab.1

表 3 管角螺卵子受精后处于各发育阶段的受精率

Tab. 3 Fertilization ratio of eggs of *H. tuba* Gmelin in different developmental stages after fertilization

受精时间/h time after insemination	受精率/% fertilization ratio
0	0.08±0.14 ^c
1	10.96±1.08 ^b
3	38.84±2.27 ^a
6	39.16±2.92 ^a
9	39.20±2.33 ^a
12	39.68±2.26 ^a
24	43.14±5.92 ^a

注: 字母不同表示各时间点存在显著性差异($P<0.05$)Notes: The different letters mean significant difference ($P<0.05$)

表 4 管角螺胚胎发育阶段计数

Tab. 4 Number of embryos of *H. tuba* Gmelin in different developmental stages

发育时间/d developmental time	发育形态 developmental process	平均胚胎数/个 number of the embryos	标准方差 std. deviation
1	4细胞	194.53	54.77
6	大颗粒状	16.25	2.28
12	哑铃状	14.50	1.14
18	1个螺层的初生壳	13.54	1.94
24	2个螺层的初生壳	13.26	2.05
30	稚螺, 具成螺雏形	13.20	1.87

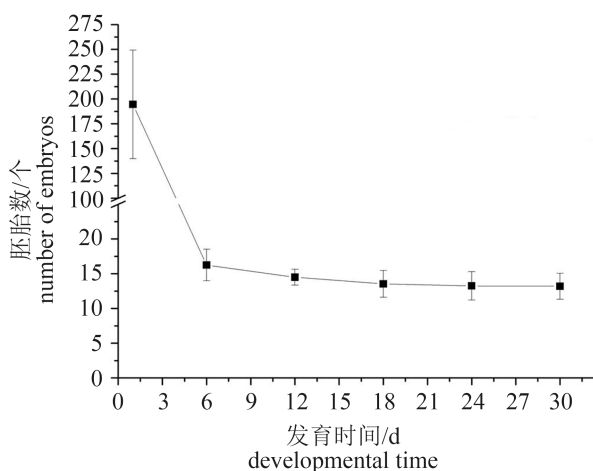


图 1 管角螺胚胎发育过程中数量的变化

Fig. 1 Number of embryos during the embryonic development of *H. tuba* Gmelin

联合形成合子染色体组, 例如文蛤(*Meretrix meretrix*)^[20]。本研究用Hoechst 33258染色以及荧光显

微观察方法, 对管角螺的雌、雄原核的结合过程的核相变化进行了仔细观察, 发现在卵细胞第二次成熟分裂后期, 第二极体排出, 雌、雄原核形成, 相互靠拢, 最终完全融合为一体形成合子染色体组, 而两核接触位置也偏向动物极, 故可确定其结合方式为原核融合。

3.2 管角螺的受精过程

卵子受精过程包括精子入卵、排出极体以及精卵雌雄原核的融合。贝类受精细胞学和胚胎发育过程是其繁殖生物学的重要内容, 在遗传育种中均为重点研究领域。贝类繁殖发育的研究对象主要是双壳类, 如毛蚶(*Scapharca subcrenata*)^[8]、泥蚶(*Tegillarca granosa*)^[21]、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)^[22]等, 其研究已经深入到超微结构。在双壳类的受精研究中, 发现其受精率普遍较高, 如菲律宾蛤仔的受精率达到90%以上^[22], 牡蛎可以高达100%, 即所有的卵子都可以受精发育^[18, 23], 不同地理群体的魁蚶(*Scapharca broughtonii*)杂交受精率也高达92%^[13]。关于腹足类的受精细胞学研究较少。潘英等^[2]在管角螺繁殖生物学方面的研究发现, 管角螺受精率低, 亲本一次性产卵很多, 可是最终正常发育的个体不多^[2]。本实验通过定时取样, 荧光显微技术观察计数研究发现, 管角螺亲本产下卵囊后24 h内, 一个卵囊内的卵子受精率约43.14%, 同双壳类相比, 其受精率较低, 但高于同为腹足类的杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)和盘鲍(*Haliotis discus discus*)杂交的受精率26.00%^[19]。这一受精率的明显差异是否与受精过程及幼虫发育所需条件等有关还有待进一步研究。

3.3 保育卵的形成来源分析

在腹足纲很多产卵囊种类的胚胎发育过程中都观察到保育卵的存在^[24-29], 保育卵在产出时外观与正常卵没有差别, 但是并不发育并且会被卵囊中正常发育的胚胎摄入, 成为胚胎发育重要的外部营养来源之一^[30], 故又称营养卵。虽然保育卵形成的机制尚不清楚, 但是有学者根据细胞学特征判断, 保育卵可能是早期停止发育的卵细胞^[31-32]。早在1987年, Morton^[33]就发现管角螺在胚胎发育中存在保育卵现象。本实验中, 管角螺一次性产卵数约3418.75个/卵囊, 卵囊内的卵粒受精以及发育过程有先有后, 同个

卵囊中多个发育阶段共存, 6h内完成受精过程, 24h后仍存在56.96%±0.08%的未受精卵, 23.74%±0.05%的卵子处于排出极体, 7.85%±0.01%处于雌雄原核状态, 推测此时尚未发育至4细胞的受精卵(包括排出极体、雌雄原核融合及2细胞期的受精卵)已终止发育, 均属保育卵。其中一开始未受精的卵子(56.95%)与后来发育终止的受精卵(37.31%)两者比率约3:2, 最终均作为胚胎发育的营养来源。

管角螺产卵后24 h, 大多受精卵已卵裂至4细胞, 此时受精率为43.14%, 而4细胞的发育率仅5.70%; 6 d时正常发育至大颗粒期胚胎的比率仅0.48%; 30 d时, 稚螺出膜总体孵化率仅0.39%, 由此可见, 管角螺的卵子受精率特别是发育率极低, 一个卵囊内大部分卵子成为提供营养的保育卵。管角螺保育卵的形成原因推测有以下3种: ①外部原因: 一个卵囊内营养有限, 每个卵子正常受精发育所需的营养较多, 卵子间相互竞争, 特别是发育时间上, 发育较快的个体占优势, 大多数卵子遭到淘汰, 成为其他正常可育卵的营养来源; ②内部原因: 有些卵子在受精发育过程中, 由于自身因素, 导致受精受阻或者发育过程终止, 无法继续发育, 成为保育卵被消化利用; ③以上两种原因共存^[29-32, 34-35], 究其是何种原因形成保育卵, 导致管角螺孵化率低, 需要进一步研究。

本实验通过荧光显微镜、光学显微镜观察及统计的方法, 研究了管角螺卵子受精和胚胎发育过程, 表明了管角螺的受精细胞学过程, 以及卵囊内保育卵的形成机制, 为后续的管角螺胚胎发育营养摄取利用等奠定基础, 对管角螺乃至腹足类的繁殖生物学研究提供参考资料。

参考文献:

- [1] 林志华, 王铁轩, 夏彩国. 管角螺生态及繁殖习性观察[J]. 海洋科学, 1998, 13(5): 11-12.
Lin Z H, Wang T X, Xia C G. Study on ecology and reproduction of *Hemifusus tuba* (Gmelin)[J]. Marine Sciences, 1998, 13(5): 11-12 (in Chinese).
- [2] 潘英, 庞有萍, 罗福广, 等. 管角螺的繁殖生物学[J]. 水产学报, 2008, 32(2): 217-222.
Pan Y, Pang Y P, Luo F G, et al. Reproductive biology of *Hemifusus tuba* (Gmelin)[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(2): 217-222 (in Chinese).
- [3] 潘英, 吴雪萍, 陈德金, 等. 管角螺网笼养殖技术的研究[J]. 海洋湖沼通报, 2012(4): 84-88.
Pan Y, Wu X P, Chen D J, et al. Studies on reared in suspended-cage of *Hemifusus tuba* (Gmelin)[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2012(4): 84-88 (in Chinese).
- [4] 张林林, 母昌考, 李荣华, 等. 管角螺育苗及种螺物质代谢规律研究[J]. 生态科学, 2012, 31(5): 525-529.
Zhang L L, Mu C K, Li R H, et al. Study on breeding and material metabolism of *Hemifusus tuba* Gmelin[J]. Ecological Science, 2012, 31(5): 525-529 (in Chinese).
- [5] 罗杰, 刘楚吾, 黄翔鹤. 盐度对管角螺*Hemifusus tuba* (Gmelin)胚胎发育的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(3): 24-28.
Luo J, Liu C W, Huang X H. Effects of salinity on embryonic development of *Hemifusus tuba* (Gmelin)[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2007, 27(3): 24-28 (in Chinese).
- [6] 陆珠润, 蒋霞敏, 段雪梅, 等. 不同温度、底质和饵料对管角螺孵化和稚、幼螺生长的影响[J]. 南方水产, 2009, 5(3): 10-14.
Lu Z R, Jiang X M, Duan X M, et al. Effects of temperature, sediment and food on hatching and growth of juvenile, young *Hemifusus tuba*[J]. South China Fisheries Science, 2009, 5(3): 10-14 (in Chinese).
- [7] 杜涛, 罗杰, 刘楚吾, 等. 温度对管角螺*Hemifusus tuba* (Gmelin)胚胎发育的影响[J]. 海洋科学, 2010, 34(6): 44-49.
Du T, Luo J, Liu C W, et al. Influence of temperature on embryo development of *Hemifusus tuba* (Gmelin)[J]. Marine Sciences, 2010, 34(6): 44-49 (in Chinese).
- [8] 董迎辉, 张晓, 姚韩韩, 等. 毛蚶受精和早期卵裂过程核行为的荧光显微镜观察[J]. 台湾海峡, 2011, 30(2): 223-228.
Dong Y H, Zhang X, Yao H H, et al. Cytological observation of nuclear behavior in fertilization and early cleavage in *Scapharca subcrenata*[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2011, 30(2): 223-228 (in Chinese).
- [9] 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.
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): 24-29 (in Chinese).
- [10] 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.
- 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 (in Chinese).
- [11] 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.
- Shen Y P, Liu T, Jiang H B, *et al.* A cytological study on fertilization of eggs in *Ostrea rivularis* Gould[J]. Journal of Wuhan University (Natural Science Edition), 1995, 41(4): 482-486 (in Chinese).
- [12] Hylander B L, Summers R G. An ultrastructural analysis of the gametes and early fertilization in two bivalve molluscs, *Chama macerophylla* and *Spisula solidissima* with special reference to gamete binding[J]. Cell and Tissue Research, 1977, 182(4): 469-489.
- [13] 吴彪, 于涛, 杨爱国, 等. 不同地理群体魁蚶杂交受精过程的荧光观察[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 64-68.
- Wu B, Yu T, Yang A G, *et al.* Cytological observations on fertilization of *Scapharca broughtonii* from China and Korea[J]. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(5): 64-68(in Chinese).
- [14] 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.
- Yang A G, Wang Q Y, Liu Z H, *et al.* Cytological observation on cross fertilization of *Chlamys farreri* and *Patinopecten yesoensis* with fluorescent microscope[J]. Marine Fisheries Research, 2002, 23(3): 1-4 (in Chinese).
- [15] 任建峰, 杨爱国, 董迎辉, 等. 栉孔扇贝(♀)×长牡蛎(♂)受精过程的荧光显微观察[J]. 中国水产科学, 2005, 12(5): 643-647.
- Ren J F, Yang A G, Dong Y H, *et al.* Observation on fertilization process of *Chlamys farreri* (♀)×*Crassostrea gigas* (♂) with fluorescent microscope[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(5): 643-647 (in Chinese).
- [16] 毕克, 包振民, 黄晓婷, 等. 栉孔扇贝♀×华贵栉孔扇贝♂受精及早期胚胎发育过程的细胞学荧光显微观察[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(2): 283-286.
- Bi K, Bao Z M, Huang X T, *et al.* Cytological observation on cross fertilization and the development of early embryos of *Chlamys farreri* ♀×*C. nobilis* ♂ with fluorescent microscope[J]. Periodical of Ocean University of China, 2005, 35(2): 283-286 (in Chinese).
- [17] 朱东丽, 林志华, 董迎辉, 等. 泥蚶(♀)×毛蚶(♂)受精及胚胎发育过程的初步研究[J]. 渔业科学进展, 2010, 31(5): 69-75.
- Zhu D L, Lin Z H, Dong Y H, *et al.* Preliminary study on fertilization and embryonic development of *Tegillarca granosa* (♀)×*Scapharca subcrenata* (♂)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2010, 31(5): 69-75 (in Chinese).
- [18] 滕爽爽, 李琪, 孔令峰. 岩牡蛎和长牡蛎杂交的受精细胞学观察[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(S): 338-342.
- Teng S S, Li Q, Kong L F. Cytological observations on nuclear behavior in the eggs of reciprocal hybrid crosses between *Crassostrea gigas* and *C. nippona*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2009, 39(S): 338-342 (in Chinese).
- [19] 蔡明夷, 柯才焕, 游伟伟, 等. 杂色鲍♀×盘鲍♂杂交受精的细胞学研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2007, 46(2): 239-243.
- Cai M Y, Ke C H, You W W, *et al.* Cytological studies on the fertilization of the cross between *Haliotis diversicolor* ♀ and *H. discus discus* ♂[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2007, 46(2): 239-243 (in Chinese).
- [20] 董迎辉, 林志华, 柴雪良, 等. 文蛤受精及早期胚胎发育过程的细胞学观察[J]. 动物学报, 2007, 53(4): 700-709.
- Dong Y H, Lin Z H, Chai X L, *et al.* Cytological observation on fertilization and early embryonic development in the clam *Meretrix meretrix*[J]. Acta Zoologica Sinica, 2007, 53(4): 700-709 (in Chinese).
- [21] 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): 104-107.
- Sun H L, Fang J G, Wang Q Y, *et al.* Cytological observation on fertilization of *Tegillarca granosa* with fluorescent microscope[J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(2): 104-107 (in Chinese).
- [22] 毕克, 包振民, 黄晓婷, 等. 菲律宾蛤仔受精及早期胚胎发育过程的细胞学观察[J]. 水产学报, 2004, 28(6):

- 623-627.
- Bi K, Bao Z M, Huang X T, *et al.* Cytological observations on fertilization and early embryonic development in *Ruditapes philippinarum*[J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(6): 623-627 (in Chinese).
- [23] 滕爽爽, 李琪, 李金蓉. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)与熊本牡蛎(*C. sikamea*)杂交的受精细胞学观察及子一代的生长比较[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(6): 914-922.
- Teng S S, Li Q, Li J R. Cytological observations of nuclear behavior and comparative growth of the hybrids between *Crassostrea gigas* and *C. sikamea*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(6): 914-922 (in Chinese).
- [24] Natarajan A V. Studies on the egg masses and larval development of some prosobranchs from the Gulf of Mannar and the Palk Bay[J]. Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B, 1957, 46(3): 170-228.
- [25] Collin R. Worldwide patterns in mode of development in calyptraeid gastropods[J]. Marine Ecology Progress Series, 2003, 247: 103-122.
- [26] Cumplido M, Pappalardo P, Fernández M, *et al.* Embryonic development, feeding and intracapsular oxygen availability in *Trophon geversianus* (Gastropoda: Muricidae)[J]. Journal of Molluscan Studies, 2011, 77(4): 429-436.
- [27] Lahbib Y, Abidli S, Trigui El Menif N. Laboratory study of the intracapsular development and juvenile growth of the banded murex, *Hexaplex trunculus*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2010, 41(1): 18-34.
- [28] Segura C J, Chaparro O R, Paschke K A, *et al.* Capsule walls as barriers to oxygen availability: implications for the development of brooded embryos by the estuarine gastropod *Crepidatella dilatata* (Calyptraeidae)[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2010, 390(1): 49-57.
- [29] Gallardo C S, Garrido O A. Nutritive egg formation in the marine snails *Crepidula dilatata* and *Nucella crassilabrum*[J]. International Journal of Invertebrate Reproduction and Development, 1987, 11(3): 239-254.
- [30] Gallardo C S, Manque C, Filun M. Comparative resistance to starvation among early juveniles of some marine muricoidean snails[J]. The Nautilus, 2004, 118(3): 121-126.
- [31] Fretter V, Graham A. British prosobranch molluscs[M]. London: Ray Society, 1962: 755.
- [32] Smith H L, Gibson G D. Nurse egg origin in the polychaete *Boccardia proboscidea* (Spionidae)[J]. Invertebrate Reproduction & Development, 1999, 35(3): 177-185.
- [33] Mortem B. Juvenile growth of the South China Sea whelk *Hemifusus tuba* (Gmelin) (Prosobranchia: Melongenidae) and the importance of sibling cannibalism in estimates of consumption[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1987, 109(1): 1-14.
- [34] 楼允东. 组织胚胎学[M]. 2版. 北京:中国农业出版社, 1999: 224-225.
- Lou Y D. Histology and embryology[M]. 2nd ed. Beijing: Agriculture Press Chinese, 1999: 224-225 (in Chinese).
- [35] Rivest B R. Development and the influence of nurse egg allotment on hatching size in *Searlesia dira* (Reeve, 1846) (Prosobranchia: Buccinidae)[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1983, 69(3): 217-241.

Cytological observation of fertilization and analyse of the nurse eggs in *Hemifusus tuba* (Gmelin)

YANG Zeqin, LI Ronghua, MU Changkao, SONG Weiwei, WANG Chunlin*

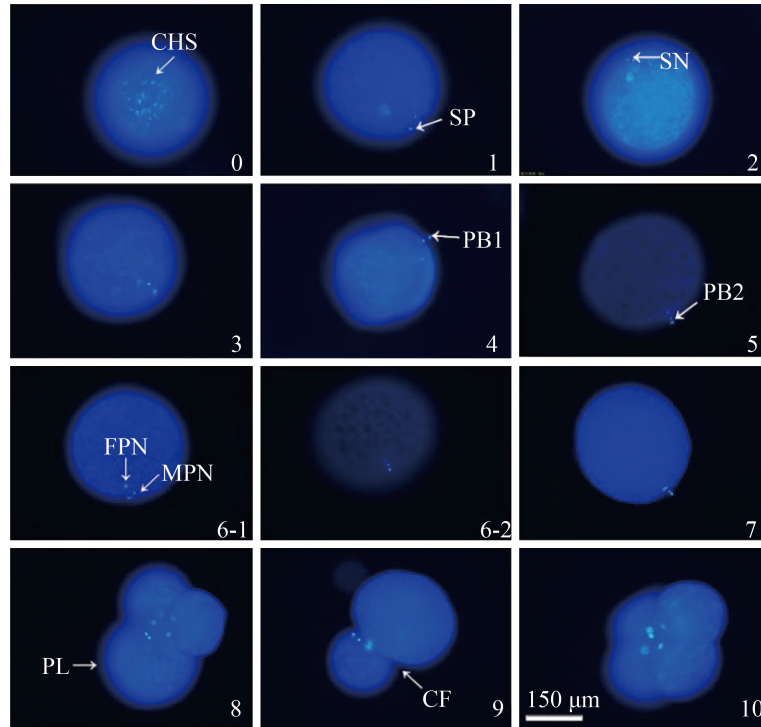
(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The cytological changes of nuclear behavior during the process of fertilization and early cleavage of *Hemifusus tuba* (Gmelin) were continually observed by fluorescent microscope. The numbers of eggs and embryos were also calculated for the whole embryonic development stages. The results showed that mature unfertilized eggs of *H. tuba* were oval and the average diameter was 0.33 ± 0.03 mm. The nuclear phase was at the metaphase of the first maturation division. At water temperature of 27–28 °C, sperm penetrated into cytoplasm of egg 1h after fertilization. The fertilized eggs released the first polar body and the second polar body at 2~3 h. The female pronuclei and male pronuclei formed at 6 h, followed by the first cleavage. The second cleavage happened at 12–24 h, formed 4-cells. The study showed that the zygotes of *H. tuba* were asynchronous during meiosis and cleavage. In total, the fertilization ratio was about 43.14%, but the zygotes which could develop to 4-cell stage were only 5.70%. In a capsule, many eggs were not fertilized, or stopped developing, and both of them were inferred as the sources of nurse eggs which were consumed by developing embryos. The ratio of eggs unfertilized to eggs that stopped developing was 3 to 2. During the embryonic development, the number of eggs reduced significantly during the 1st to 6th day, only 0.48% of eggs developed to trochophore stage, and this ratio maintained until the juveniles left the capsules for natural environment.

Key words: *Hemifusus tuba*; fertilization; nuclear behavior; nurse egg; fluorescent microscope observation

Corresponding author: WANG Chunlin. E-mail: wangchunlin@nbu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (41206113); Scientific Research Fund of Zhejiang Provincial Education Department (Y201224623); National Key Technology Support Program (2011BAD13B0903); Collaborative Innovation Center of Mariculture in Zhejiang



图版 管角螺受精和早期卵裂过程核行为的荧光显微镜观察(10×20)

0.未受精卵, 1.精子附卵, 2.精子入卵, 3.第一次成熟分裂后期, 4.第1极体排出, 5.第2极体排出, 6-1.雌雄原核形成, 6-2.雌雄原核融合, 7.第一次卵裂后期, 8.有丝分裂, 9.2细胞期, 10.4细胞期。

CHS: 染色体, CF: 卵裂沟, FPN: 雌性原核, MPN: 雄性原核, SP: 精子, SN: 精核, PB1: 第1极体, PB2: 第2极体, PL: 极叶

Plate Nuclear behavior in fertilization and early cleavage of

H. tuba Gmelin viewed with fluorescent microscope (10×20)

0. Unfertilized egg, 1. Sperm attaching to the egg, 2. Sperm penetrating into the egg, 3. The anaphase of the first maturation division, 4. Releasing the first polar body, 5. Releasing the second polar body, 6-1. Forming female and male pronuclei, 6-2. Fusion of female and male pronuclei, 7. The anaphase of the first cleavage, 8. Mitosis, 9.2-cell, 10.4-cell.

CHS: Chromosome, CF: Cleavage furrow, FPN: Female pronucleus, MPN: Male pronucleus, SP: Sperm, SN: Sperm nucleus, PB1: The first polar body, PB2: The second polar body, PL: Polar lobe