

## 缢蛏受精和早期卵裂过程的细胞学变化观察

董迎辉<sup>1</sup>, 姚韩韩<sup>1</sup>, 张佩云<sup>1</sup>, 沈庞幼<sup>3</sup>, 刘浩明<sup>2</sup>, 林志华<sup>1\*</sup>

(1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100;

2. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;

3. 宁波市海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315012)

**摘要:** 采用普通光镜、荧光显微镜和石蜡切片技术,对缢蛏受精和早期卵裂过程中的精子入卵、减数分裂、雌雄原核形成与结合、早期卵裂以及多精入卵等细胞学事件进行了显微观察。结果表明,缢蛏成熟未受精卵多呈圆球形或卵圆形,少数呈梨形,卵径为82~88 μm,核相处于第一次成熟分裂中期;精子为典型的原生型,全长55~58 μm,头部呈保龄球形,顶体前端的顶体杆呈特别细长的花丝状;在水温21~22 ℃、盐度10的条件下进行人工授精,精、卵混合后,精子迅速附着于卵子表面,启动卵子发育;受精后4~6 min,精子的头部已进入卵内并明显膨胀,卵子外形变圆,卵外附着的精子量明显减少;在受精后12~15 min、20~25 min,受精卵先后排出第一极体、第二极体,完成两次成熟分裂;第二次成熟分裂结束以后,精、卵核体积迅速膨胀,雄原核的膨胀早于雌原核,核膜重建,在受精后约30 min形成雌、雄原核;雌、雄原核均向卵子中央移动,雄原核旁边的精子星光清晰可见,随后二者在卵子中央以染色体联合的方式结合,联合核的染色体共同排列在纺锤体的赤道板上,形成第一次有丝分裂的中期分裂相;受精后40 min左右,受精卵进行第一次卵裂,染色体在纺锤丝的牵引下向两极移动,结果形成2个大小不等的卵裂球;受精后45~50 min,卵子进行第二次卵裂,核相变化与第一次卵裂相同,在与第一次卵裂垂直的纵轴方向上发生不等全裂,最终形成3小1大4个卵裂球;受精后60~70 min,胚胎进行第三次卵裂,仍为不等全裂,但自此次卵裂起已开始进行螺旋分裂。此外,对实验中发现的缢蛏极少量多精入卵、多极分离等异常细胞学现象进行了分析,并探讨了海洋贝类卵子阻止多精入卵发生的机制。

**关键词:** 缢蛏; 受精; 早期卵裂; 多精受精

**中图分类号:** Q 246; S 917

**文献标志码:** A

缢蛏(*Sinonovaula constricta*)属于广温性滩涂埋栖型贝类,在我国南北沿海广泛分布,是我国传统四大养殖贝类之一,养殖区主要集中在浙、闽沿海。近年来,缢蛏养殖业呈快速发展趋势,养殖区从浙江、福建向周边的江苏、山东、广东等省份迅速扩展。据统计,2010年蛏类(主要是缢蛏)全国总产量达到 $71.44 \times 10^4$ t,养殖面积约 $7.57 \times 10^4$ hm<sup>2</sup>,其中浙江省的养殖产量和养殖面积分别达到 $22.85 \times 10^4$ t和 $1.04 \times 10^4$ hm<sup>2</sup>,位居全国第一,其次为福建和山东<sup>[1]</sup>。缢蛏养殖业的稳定快

速发展主要得益于优质充足的苗种供应,为了提高缢蛏苗种的生产能力,我国科研和技术人员已对缢蛏性腺发育的周期变化<sup>[2]</sup>、人工催产方法<sup>[3-4]</sup>、幼虫生长发育的生态需求<sup>[5-7]</sup>、食性与饵料<sup>[8]</sup>以及稚贝日常管理技术<sup>[9-10]</sup>等进行了深入地研究和探索,大大促进了缢蛏规模化人工育苗技术的发展,而缢蛏精子、卵子、卵母细胞卵黄的发生过程<sup>[11-13]</sup>以及成熟配子的超微结构观察<sup>[13-15]</sup>等一系列基础研究的开展,也为缢蛏繁殖生理机制的阐明和人工育苗生产的顺利进行提供

收稿日期:2011-11-14 修回日期:2012-04-21

资助项目:国家现代贝类产业技术体系专项(nycytx-47);宁波市科技局农业择优委托项目(2010C10011);宁波市自然科学基金(201001A6004021)

通讯作者:林志华,E-mail:zhihua9988@126.com

了理论指导。然而,在缢蛏育苗生产中仍存在人工催产困难、胚胎发育畸形率高、幼虫变态期成活率低等问题,究其原因在于对其受精、发育机理的基础研究相对欠缺所致。因此,开展受精、发育生物学方面的研究对于解决当前缢蛏人工育苗中遇到的诸多难题以及进行遗传改良、细胞工程育种等均具有重要意义。

荧光显微术和石蜡切片法是贝类受精细胞学研究的重要手段,已被广泛用于多种海洋经济贝类正常发育、杂交、多倍体、雌核发育等受精过程的核行为变化研究<sup>[16-22]</sup>,为贝类受精机理研究以及人工育苗、杂交育种实践积累了重要资料。然而,有关缢蛏的受精和早期发育的研究,仅在少数文献中用普通光镜进行过简单观察和描述<sup>[8]</sup>,未见用其它技术方法进行深入系统研究的报道。本研究组在进行缢蛏大规模人工育苗和构建育种家系中,利用普通光镜、荧光显微镜和石蜡切片技术,对缢蛏受精和早期卵裂的细胞学过程进行了连续观察,以期对缢蛏受精机制的深入研究以及进一步利用现代生物技术进行遗传育种提供有益参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

2010年10月在宁波甬盛水产种业有限公司进行亲贝培育和受精实验。所用缢蛏亲贝取自宁波宁海县长街镇沿海滩涂,壳长6~7 cm。荧光染色试剂盒Hoechst 33 258购自江苏碧云天生物技术有限公司,苏木精和伊红染料(H. E)为AMRESCO公司产品,其它药品均由上海生工生物工程股份有限公司生产。

### 1.2 实验方法

取性腺发育成熟的缢蛏亲贝,冲洗消毒后,置于阴凉通风处阴干3~4 h,于晚上20:00~21:00点开始流水刺激,水温21~22℃、盐度10,反复流水刺激2~3 h,一般夜间23:00点至翌日凌晨产卵、排精。分别挑出刚产的雌、雄个体,经淡水冲洗后单个放入盛有过滤海水的烧杯中产卵、排精。选择镜检质量好的精、卵进行人工授精和孵化,控制精卵比例在10:1左右。

受精后20 min内每隔3 min取样一次,20~60 min每隔5 min取样一次,60~120 min每隔10 min取样一次,每次取卵量均在1 000粒以上。样

品用冷的4%多聚甲醛溶液[用0.1 mol/L PBS(pH=7.4)配制]固定2次,保存于4℃冰箱中。普通光镜观察的样品直接滴于载玻片上,加盖玻片制成水装片,在可见光下观察、拍照,并用DT2000软件测量精、卵大小。荧光显微镜观察的样品观察前用0.1 mol/L PBS(pH 7.4)冲洗样品2次,滴加Hoechst 33 258荧光染料在黑暗环境下染色6~8 min,再用PBS冲洗2次,然后将卵液滴于载玻片上,吸水纸吸干多余水分,上覆1滴抗淬灭剂,用盖玻片封片。在Olympus BX51荧光显微镜下(UV,365 nm)观察,冷CCD图像采集系统拍照。

石蜡切片样品的采集方法同上。将缢蛏精、卵及不同发育时期的胚胎样品用Bouin氏液固定,70%酒精置换,4℃保存。切片前,将样品用梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,金华益迪YD-1508A型切片机连续切片,切片厚度约5 μm。H. E染色,中性树胶封片,在显微镜的油镜下(×1 000)观察并拍照。具体操作参照董迎辉等<sup>[22]</sup>的方法。

以上实验均重复3次,每个发育阶段观察卵或胚胎数不少于100粒。

## 2 结 果

### 2.1 成熟精、卵形态和精子入卵

在光镜下可看到,缢蛏的精子属于典型的鞭毛型,由头部、中段和尾部组成,全长55~58 μm。头部包括顶体和细胞核两部分,顶体呈细长的花丝状,尤为明显,长度为6.0~6.5 μm,细胞核为1.0 μm左右的扁球形;中段仅看到一层紧贴于细胞核之后的透亮的线粒体;尾部为长约50 μm的细长鞭毛(图版I-1)。在荧光显微镜下仅能观察到精子头部内的染色质发出亮蓝色荧光(图版II-1),而从石蜡切片中则可见到被苏木精染成蓝黑色的精子头部(图版III-1)。

缢蛏成熟未受精卵多呈圆球形或卵圆形,少数呈梨形,卵径为82~88 μm(图版I-2),核相处于第一次成熟分裂中期,蓝黑色的染色体粗短鲜明,在纺锤丝的牵拉下整齐地排列于纺锤体赤道板中央,纺锤体长度为33~35 μm,位置未在卵子中央,而是一端靠近动物极的质膜,并与该部位质膜垂直,卵质内的卵黄颗粒被伊红染成红色(图版III-2)。在荧光显微镜下,染色体被染成亮蓝

色,卵质为浅蓝色(图版Ⅱ-2)。

精、卵混合后,精子借助尾巴的摆动迅速游到卵子周围,借助长长的顶体附着于卵子表面,附着部位随机(图版Ⅰ-3,图版Ⅱ-3,图版Ⅲ-3)。受精后6 min,精子的头部已穿过卵膜进入卵胞质中,并解凝缩膨大成直径为4~5 μm的近球形精核(图版Ⅱ-4,图版Ⅲ-4),此时卵子形态都变得很圆,卵外附着的精子量明显减少。

## 2.2 两次成熟分裂过程

精子入卵膨胀以后,迅速启动卵子的成熟分裂,在受精后12~15 min,携带卵子染色体的纺锤体锚定于卵膜上,依靠纺锤丝的牵拉将卵子的同源染色体分成两组,靠卵膜的一组染色体逐渐向卵膜移动,而另一组染色体则被拉向卵子内部(图版Ⅱ-5,图版Ⅲ-5,6),最终靠卵膜的那组染色体向卵膜外拱,浓缩成染色质团后被排出卵膜之外,形成第一极体(直径5~6 μm),完成第一次成熟分裂(图版Ⅰ-4,图版Ⅱ-6,图版Ⅲ-7)。受精后20~25 min,在第一极体下方的卵内重新形成纺锤体结构,纺锤体长度为25~27 μm,约为第一次成熟分裂纺锤体的四分之三,留于卵内的另外一组染色体重新排列于纺锤体赤道板上,形成第二次成熟分裂的中期分裂相(图版Ⅱ-6,图版Ⅲ-8),随后以同样的分裂方式进行第二次成熟分裂,姊妹染色单体分离,靠卵膜的那组染色体形成第二极体,完成第二次成熟分裂(图版Ⅰ-5,图版Ⅱ-7~9,图版Ⅲ-9~11)。在此过程中,精核的大小未发生明显变化。

## 2.3 雌、雄原核的形成与结合

第二次成熟分裂结束以后,精核首先发生第二次膨胀,形成一团由核膜包围的、松散的核物质,即为雄原核;卵子染色体也逐渐靠拢并转变成染色质,继而膨大扩散,形成形状相似的雌原核;雄原核的形成早于雌原核,雌原核的位置更靠近极体(图版Ⅱ-10~12,图版Ⅲ-12,13)。受精后30 min,多数雌、雄原核体积达到最大,呈直径18 μm×20 μm的近球形结构。雌、雄原核形成以后,二者相向靠近,均向卵子中央移动(图版Ⅱ-13,14),雄原核旁边的精子星光清晰可见(图版Ⅲ-14)。在卵子中央雌、雄原核相遇,靠得很近,但仍可看到中间的隔膜(图版Ⅱ-15,图版Ⅲ-15,16),随后两原核的核膜破裂,染色质各自凝缩成染色体,在卵子中央以染色体联合的方式结合

(图版Ⅱ-16~20,图版Ⅲ-17,18)。

## 2.4 第一次卵裂

受精后35 min,有丝分裂纺锤体形成,纺锤体长度40~42 μm,位置与卵轴垂直,纺锤体一端偏向卵膜一侧,联合核的染色体整齐地排列在纺锤体的赤道板上,形成第一次有丝分裂的中期分裂相(图版Ⅱ-21,图版Ⅲ-19,20)。随后,纺锤丝将染色体拉向两极,同时卵细胞外形在横向上被拉长,卵内由于卵质流动而在植物极形成不太明显的极叶(图版Ⅰ-6,7,图版Ⅱ-22~24,图版Ⅲ-21,22)。受精后40 min左右,核分裂已完成,卵细胞自极体处发生纵向内缢,形成明显的卵裂沟,将卵细胞分割成2个大小不等的卵裂球,两个卵裂球中的染色体又解凝为染色质,核膜重建,进入有丝分裂的间期(图版Ⅰ-8,图版Ⅱ-25,26,图版Ⅲ-23)。

## 2.5 第二、三次卵裂

受精后45 min,两个卵裂球中的染色体细丝开始螺旋变粗,核膜破裂,染色体形态逐渐清晰(图版Ⅱ-27,28),第二次有丝分裂的纺锤体正在形成,其中大卵裂球的发育速度稍快(图版Ⅲ-24)。继而,染色体排列于纺锤体的赤道板上,形成第二次有丝分裂中期的核相,第二次卵裂行将开始(图版Ⅱ-29,图版Ⅲ-25)。第二次卵裂的方式与第一次卵裂基本相同,也是纵裂,在与第一次卵裂垂直的纵轴方向上发生不等全裂(图版Ⅰ-9,10,图版Ⅱ-30~32,图版Ⅲ-26)。在受精后50 min左右,卵裂结束,形成3小1大4个卵裂球(图版Ⅰ-11,图版Ⅱ-33,图版Ⅲ-27)。

受精后60 min,胚胎开始进行第三次卵裂,染色质又变为染色体(图版Ⅱ-34,35)。受精后70 min,第三次卵裂完成,仍为不等全裂,但自此次卵裂起已开始进行螺旋分裂(图版Ⅰ-12)。

## 2.6 多精受精和多极分离

在受精后10~20 min,荧光显微镜下可以观察到2%~3%的缢蛏受精卵存在多精入卵现象(图版Ⅲ-28),多精入卵可以引起有些卵子成熟分裂紊乱,从而排出1个极体或不排极体(图版Ⅱ-36,40)。受精后30~40 min,入卵的多个精核也都能发生原核化膨胀而形成雄原核,一般形成2~3个雄原核的较为常见(图版Ⅱ-36,图版Ⅲ-29),也有少数能形成5个以上雄原核(图版Ⅱ-37)。这些多余的雄原核也能形成各自的染色

体,发生染色体联合(图版 II-38),但在后续的第一次卵裂过程中,往往由于多组染色体不能均等分离而产生异常的多极分离现象(图版 II-39,40,图版 III-30),最终导致早期卵裂畸形和胚胎发育停止。

### 3 讨论

#### 3.1 雌、雄原核结合的动力和机制

雌、雄原核形成以后均向卵子中央移动,为随后发生的原核结合创造条件,对不同动物两性原核运动的研究基本形成了两种假说:(1)细胞质流动学说,推测原生质流动可能影响雄原核的运动,而雌原核朝着雄原核的方向移动是由于细胞质流动所致,雌原核随着当时四周液体近心运动向下移动<sup>[23]</sup>; (2)星光引导学说,认为精子星光有引导雌性原核向胚盘中央移动的作用,而雌性原核受星光吸引向雄原核靠拢<sup>[24]</sup>。在哺乳动物小鼠(*Mus musculus*)和大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)中,已经证实了原核运动受微丝控制<sup>[25-26]</sup>。脊索动物青岛文昌鱼(*Branchiostoma belcheri tsingtauense*)原核的运动也依赖于微丝的存在,当用秋水仙素和细胞松弛素 B 解聚微丝后,雄原核只能位于卵皮层中而不能迁移到卵中央<sup>[27]</sup>。在鱼类中,黄永松<sup>[28]</sup>发现尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)还未见星光时精核已向内迁移了一段距离,星光还未拓长到雌原核时,雌原核已向内迁移了,因此推测其原核运动主要由细胞质流动造成。在甲壳动物中,中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)中心粒随精子入卵,在雌、雄原核移动时,雄原核附近出现星光而雌原核未出现,推测雄原核的移动与中心粒形成的星光有关<sup>[29-30]</sup>。海胆中,精核入卵后,中心体发生 180° 旋转而调整到雄原核和雌原核中间,然后中心体装配成星状体,连接并牵动雌、雄原核相互靠近、结合<sup>[31]</sup>。在贝类中,太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)雌、雄原核融合之前,在雌原核的周围出现微管束的有序排列且很快退化,同时在雄原核周围出现星光<sup>[32]</sup>;合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)两性原核融合前,在雄原核周围出现星光并逐渐增强,之后雌雄原核靠拢<sup>[33]</sup>;文蛤(*Meretrix meretrix*)雄性原核迁移时能观察到旁边的精子星光<sup>[21]</sup>;蔡明夷等<sup>[34]</sup>在研究杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)♀ × 盘鲍(*H.*

*discus discus*)♂ 杂交受精过程中,观察到精子中心粒发育为星光,两性原核靠近之前,在雄原核两侧看到双生子星光;杨凤影等<sup>[35]</sup>用免疫荧光染色法观察栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)雌核发育二倍体雌、雄原核移动时发现,用 6-DMAP 处理抑制微管形成过程中,受精卵中的精核始终处于皮层区域,雌原核和精核几乎不移动,去除 6-DMAP 后雌原核和精核恢复移动。目前,虽然有关贝类雌、雄原核运动的机制还不清楚,但大量的实验观察表明,多数贝类的原核运动主要受卵内微管和入卵精子中心粒诱发形成的精子星光的影响。

本实验的组织切片观察发现,在缢蛏雄原核两侧也看到了清晰的双生子星光,而在雌、雄原核靠近、联合时精子星光依然存在(图版 III-30),据此判断,精子星光至少在缢蛏雄原核运动中发挥了重要作用。至于雌原核的运动是细胞质流动所致,还是受星光吸引造成,尚待进行大量实验观察加以鉴别。相对而言,研究体积微小的贝卵细胞质的运动较为困难,而采用免疫荧光染色法大量观察受精卵内微管变化和迁移的过程,将是阐明贝类原核运动动力和机制的有效可行办法。目前,国内外已有利用免疫荧光染色法开展贝类受精过程中纺锤体微管变化的研究报道<sup>[35-36]</sup>,但至今仍缺乏针对原核运动中微管变化的详细系统研究。

#### 3.2 贝类受精的惟一性和卵子阻止多精受精发生的机制

受精的惟一性是指每个卵细胞只能接受一个精子的遗传物质,从而保证胚胎后续发育的正常进行<sup>[31]</sup>。在正常受精情况下,绝大多数动物为单精入卵、单精受精,精子为受精卵提供单倍的遗传物质保持物种正常二倍体的细胞核,并且带入有丝分裂所必需的中心粒。然而,有些动物如昆虫、软骨鱼、有尾两栖类、爬行类和鸟类等存在天然的多精入卵现象,但最终仅有一个雄原核与雌原核结合,多余的精子在卵内被破坏消解<sup>[30]</sup>。多精入卵是双壳贝类普遍存在的极少数异常受精现象,它不仅与精子运动能力、卵子质量和精卵浓度等密切相关,还与外界的受精条件如水温、pH 值、Na<sup>+</sup> 等诸多环境因素关系密切<sup>[37]</sup>,如用太平洋牡蛎刚从卵巢中取出的卵子受精,易产生大量的多精入卵胚胎<sup>[38]</sup>;近江牡蛎(*Ostrea rivularis*)在较低水温下受精,多精入卵数明显增加<sup>[39]</sup>;贻贝



(*Mytilus edulis*) 在低  $\text{Na}^+$  海水中受精, 可导致很高比例的多精入卵<sup>[40]</sup>; 大西洋浪蛤 (*Spisula solidissima*) 精卵比例大于 500:1、泥蚶 (*Tegillarca granosa*) 精卵比例大于 200:1 时, 多精入卵显著增加<sup>[41]</sup>。本实验发现, 缢蛏在适宜的精子浓度、水温、pH 值等条件下受精, 仍可观察到约 2% 的胚胎发生多精入卵, 推测其与个别卵子不成熟、过熟或者机械损伤有关, 具体成因和机制尚待进一步研究证实。

在双壳贝类中, 多精入卵往往引起早期卵裂异常, 进而导致胚胎发育畸形而最终死于变态期之前。因此, 为了确保卵子受精的惟一性, 贝类长期进化形成了一系列天然阻止多精入卵发生的机制和手段, 然而具体阻止方式具有一定的种属特异性, 如太平洋牡蛎卵子在海水中浸泡 1 h 后受精, 多精受精率显著下降, 推测与卵子发育成熟度有关<sup>[38]</sup>, 后来发现太平洋牡蛎可以通过卵细胞膜电位改变和抑制质膜融合来阻止多精入卵<sup>[40]</sup>; 贻贝阻止多精入卵的机制包括快速电位阻滞、皮层反应抑制、抑制质膜融合 3 种途径<sup>[40]</sup>; 大西洋浪蛤也存在明显的抑制质膜融合的机制<sup>[42]</sup>; 皱纹盘鲍是通过卵膜电位的迅速变化阻止早期入卵精子和皮层反应失活后期进入精子, 来实现阻止多精受精发生的<sup>[43]</sup>。然而, 至今对水生动物多精受精研究较为透彻的主要集中在模式动物海胆<sup>[44-45]</sup>上, 而对贝类多精入卵阻止机制研究相对较少。本研究发现, 在缢蛏受精后 3 min 内卵子周围附着有大量精子, 到受精后 4~6 min, 卵子形态很快变圆, 卵外附着精子量明显减少, 由此推测缢蛏阻止多精入卵的机制主要依赖质膜变化来实现, 而详细的作用过程还需通过透射电镜观察验证。

#### 参考文献:

- [1] 黄建光. 2011 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 29-60.
- [2] 闫红伟, 李琪, 孔令锋, 等. 山东沿海缢蛏的繁殖生物学研究[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(9): 343-346.
- [3] 周学家, 刘信艺, 贺先明, 等. 缢蛏亲贝暂养及人工催产方法的初步研究[J]. 海洋与湖沼通报, 1995, 2: 24-29.
- [4] 欧俊新. 缢蛏室内育苗亲贝的选择和催产方法[J]. 水产养殖, 2002, 2: 8-9.
- [5] 黄加祺, 许振祖. 环境因素对维蛙受精卵孵化率影响的研究[J]. 生态学报, 1989, 9(4): 310-314.
- [6] 林笔水, 吴天明. 温度与盐度和缢蛏幼体生存生长及发育的关系[J]. 水产学报, 1990, 14(8): 171-178.
- [7] 许章程, 韦信敏, 何进金. 若干生态因子对缢蛏稚贝生长和存活的影响[J]. 台湾海峡, 1990, 9(1): 62-68.
- [8] 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, 2008: 306-307.
- [9] 吴洪喜, 徐爱光. 缢蛏人工育苗试验[J]. 海洋科学, 2000, 24(2): 15-17.
- [10] 姚国兴, 陈爱华, 高继先. 缢蛏室内人工育苗技术[J]. 水产养殖, 2001, 3: 24-25.
- [11] 刘正琮, 上官步敏, 许振祖. 缢蛏精子发生的超微结构研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1990, 29(1): 81-84.
- [12] 上官步敏, 刘正琮, 许振祖. 缢蛏 *Sinonovaula constricta* 卵子发生的超微结构分析[J]. 台湾海峡, 1992, 11(2): 174-179.
- [13] 上官步敏, 刘正琮. 缢蛏卵母细胞卵黄发生过程的超微结构研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(1): 48-53.
- [14] 竺俊全, 丁理法, 冯坚, 等. 缢蛏精子的形态结构[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2008, 21(3): 310-313.
- [15] 黄瑞, 黄标武, 李林春, 等. 近江蛏精子超微形态结构观察及与缢蛏精子的比较[J]. 水产学报, 2011, 35(1): 58-65.
- [16] Longo F J, Scarpa J. Expansion of sperm nucleus and association of the maternal and paternal genomes in fertilized *Mulinia lateralis* eggs [J]. Biology Bulletin, 1991, 180: 56-65.
- [17] Fairbrother J E. Viable gynogenetic diploid *Mytilus edulis* (L.) larvae produced by ultraviolet light irradiation and cytochalasin B shock [J]. Aquaculture, 1994, 126: 25-34.
- [18] 杨爱国, 王清印, 孔杰, 等. 栉孔扇贝受精卵减数分裂的细胞学观察[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3): 96-98.
- [19] 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, 2000, 23(3): 1-4.
- [20] 董迎辉, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 栉孔扇贝正常发育和人工雌核发育二倍体早期胚胎核行为的细胞学观察[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 29-35.
- [21] 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.
- [22] 董迎辉, 林志华. 一种海洋贝类卵细胞石蜡切片方

- 法[P]. 中国,2011,CN 101650273 B.
- [23] 朱洗,陈兆熙,王幽兰,等. 金鱼和鳊鱼卵球受精的细胞学研究[J]. 实验生物学报,1960,7(1):29-46.
- [24] 刘筠,陈淑群,王义铤,等. 草鱼卵子受精的细胞学研究[J]. 湖南师范学院学报:自然科学版,1966,5:73-84.
- [25] Longo F J, Chen D Y. Development of cortical polarity in mouse eggs; involvement of the meiotic apparatus[J]. *Developmental Biology*, 1985, 107:382-394.
- [26] 陈大元,石其贤,宋祥芬,等. 大熊猫精子与金黄地鼠卵子异种体外受精的研究[J]. 动物学报,1989,35(4):376-380.
- [27] 陈大元,宋祥芬,赵学坤,等. 文昌鱼受精机理研究——受精卵的超微结构[J]. 动物学报,1991,37(4):422-425.
- [28] 黄永松. 尼罗罗非鱼卵母细胞受精学研究[J]. 动物学报,1993,39(1):19-22.
- [29] 康现江,王所安,堵南山,等. 中国对虾受精过程中精卵核的细胞学变化[J]. 动物学报,2001,47(2):182-189.
- [30] 陈锦民,康现江,李少菁,等. 锯缘青蟹受精过程核相变化的研究[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2004,43(5):688-691.
- [31] 樊启昶,白书农. 发育生物学原理[M]. 北京:高等教育出版社,2002:48-55.
- [32] Longo F J, Mathews L, Hedgecock D. Morphogenesis of maternal and paternal genomes in fertilized oyster eggs (*Crassostrea gigas*): effects of cytochalasin B at different periods during meiotic maturation [J]. *Biology Bulletin*, 1993, 185:197-214.
- [33] 沈亦平,刘汀,姜海波,等. 合浦珠母贝受精细胞学观察[J]. 武汉大学学报:自然科学版,1993(5):115-123.
- [34] 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.
- [35] 杨凤影,杨爱国,刘志鸿,等. 6-DMAP 诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体机理研究[J]. 水产学报,2007,31(5):583-590.
- [36] Kuriyama R, Borisy G G, Masui Y. Microtubule cycles in oocytes of the surf clam, *Spisula solidissima*: an immunofluorescence study [J]. *Developmental Biology*, 1986, 114:151-160.
- [37] 董迎辉,林志华,姚韩韩. 斧文蛤精子超微结构与受精过程的细胞学变化[J]. 水产学报,2011,35(3):356-364.
- [38] Stephano J L, Gould M. Avoiding polyspermy in the oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. *Aquaculture*, 1988, 73:295-307.
- [39] 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):482-486.
- [40] Togo T, Osanai K, Morisawa M. Existence of three mechanisms for blocking polyspermy in oocytes of the mussel *Mytilus edulis* [J]. *Biology Bulletin*, 1995, 189:330-339.
- [41] Clotteau G, Dubé F. Optimization of fertilization parameters for rearing surf clams (*Spisula solidissima*) [J]. *Aquaculture*, 1993, 114:339-353.
- [42] Ziomek C, Epel D. Polyspermy block of *Spisula* eggs is prevented by Cytochalasin B [J]. *Science*, 1995, 189:139-141.
- [43] 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.
- [44] Shen S, Buck W. Sources of calcium in sea urchin during the fertilization potential [J]. *Developmental Biology*, 1993, 157:157-169.
- [45] Wessel G M, Brooks J M, Green E, et al. The biology of cortical granules [J]. *International Review of Cytology*, 2001, 209:117-126.

## Cytological observation on fertilization and early cleavage in *Sinonovaula constricta*

DONG Ying-hui<sup>1</sup>, YAO Han-han<sup>1</sup>, ZHANG Pei-yun<sup>1</sup>, SHEN Pang-you<sup>3</sup>, LIU Hao-ming<sup>2</sup>, LIN Zhi-hua<sup>1\*</sup>

(1. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

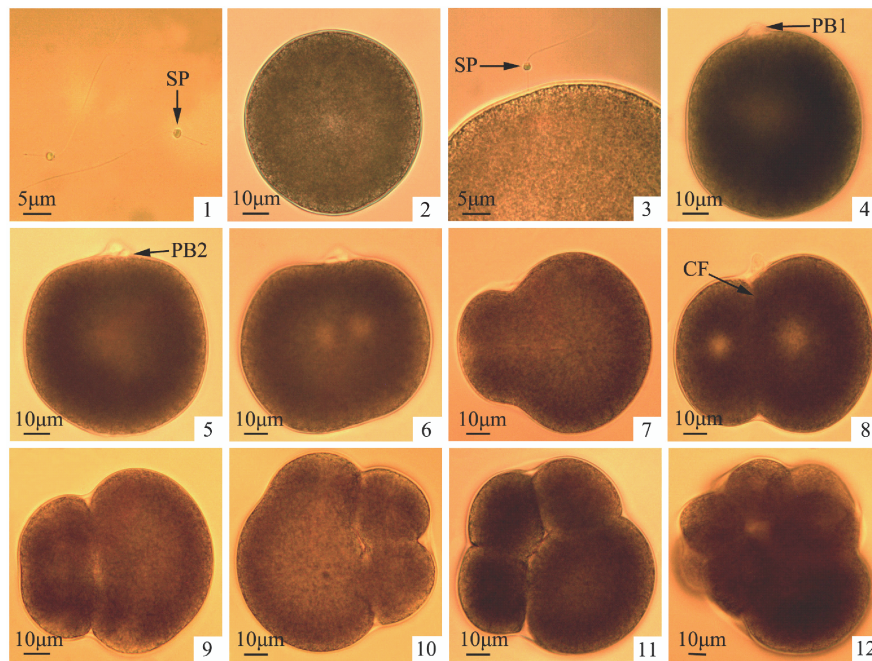
2. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

3. The Ocean and Fishery Institute of Ningbo, Ningbo 315012, China)

**Abstract:** The artificially-induced spawning and fertilization experiment of the razor clam (*Sinonovaula constricta*) was carried out at Ningbo Yongsheng Aquatic Seed Corporation Limited in October 2010. More than 1 000 fertilized eggs and early embryos of all developmental stages were collected and more than 100 were carefully observed to investigate a series of cytological events, including sperm penetration, maturation division, formation and chromosome association of the female and male pronuclei, early cleavage and polyspermy. Three techniques, including light microscopy, fluorescence microscopy by Hoechst 33 258 staining, paraffin section and hematoxylin-eosin staining, were used in the experiment to clarify the mechanisms of fertilization and embryonic development, which provided an important reference for research into its artificial reproduction and chromosome engineering breeding. The results of cytological observation indicated that most of unfertilized mature eggs of *S. constricta* were globular or oval (82 – 88  $\mu\text{m}$  in diameter) and a few were pear-shaped and the nuclear phase of them remained at the metaphase of the first maturation division. The sperms were the type of flagellum (55 – 58  $\mu\text{m}$  in total length), with the bowling-shaped head and particularly slender acrosome rod like filament of flower. At water temperature 21 – 22  $^{\circ}\text{C}$  and salinity 10, after mix of sperms and eggs, sperms quickly attached to the surface of the eggs and activated the process of egg development. From 4 min to 6 min after insemination, sperm has penetrated into cytoplasm of egg and significantly expanded, while the shape of eggs become more round and the number of sperms outside the egg was significantly reduced. The fertilized eggs released PB1 at 12 – 15 min and PB2 at 20 – 25 min in the process of maturation division. After completion of the second maturation division, the sperm nucleus and the female nucleus expanded immediately, nuclear membrane reconstructed and developed into the male and female pronuclei 30 min after fertilization. Expansion of the sperm nucleus was earlier than that of the female nucleus. At formation of the female and male pronuclei, they approached gradually and all moved to the center of egg. At that time, the spermaster beside the male pronucleus was visible obviously. And then, the two pronuclei matched into an association nucleus after their chromosomes formed respectively. Subsequently, the chromosomes of association nucleus arranged on the metaphase plate of first mitosis. About 40 min, fertilized eggs carried out the first cleavage and the chromosomes were separated equally into two daughter cells which are different evidently in size. 45 – 50 min after fertilization, embryos underwent the second cleavage which was fundamentally similar to the first cleavage, but the cleavage direction was almost vertical to the first cleavage furrow, and ultimately formed four daughter cells, three small and one big. 60 – 70 min, embryos completed the third cleavage. Though the cleavage is also unequal division, embryos began spiral cleavage from the third cleavage. Additionally, the abnormal phenomena, such as polysperm and polyspindles, in the experiment were analyzed and the mechanisms of polyspermy prevention in marine mollusks were discussed and studied.

**Key words:** *Sinonovaula constricta*; fertilization; early cleavage; polyspermy

**Corresponding author:** LIN Zhi-hua. E-mail: zhihua9988@126.com



图版 I 缙蛭受精和早期卵裂过程的光镜观察

1. 精子; 2. 成熟未受精卵; 3. 精子附卵; 4. 第一极体排出; 5. 第二极体排出; 6~8. 第一次卵裂; 9~11. 第二次卵裂; 12. 8 细胞期。  
SP: 精子; PB1: 第一极体; PB2: 第二极体; CF: 卵裂沟。

**Plate I Microscopic observation on the process of fertilization and early cleavage in *S. constricta***

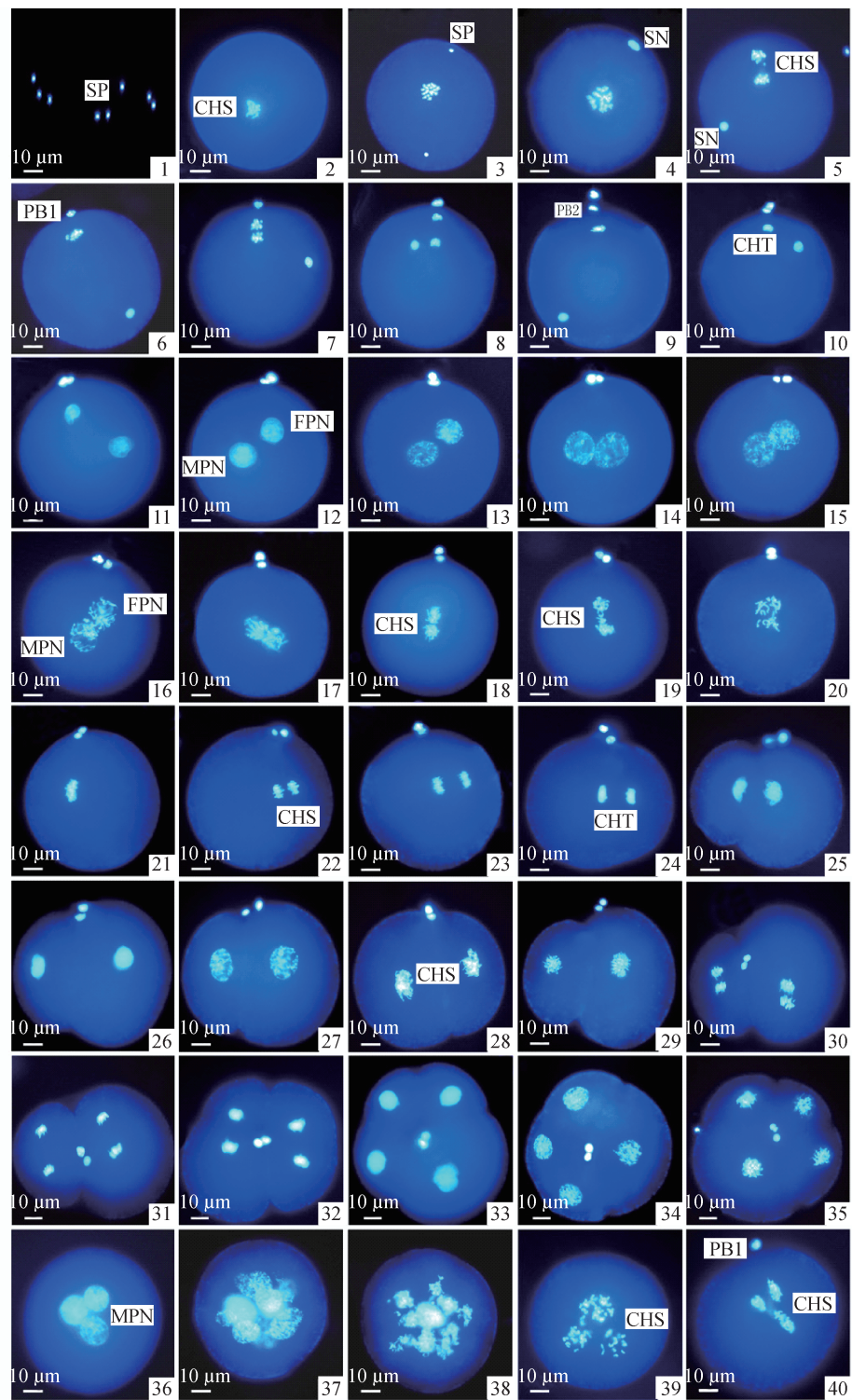
1. unfertilized mature egg; 2. sperm; 3. sperm attaching to the egg; 4. release of the first polar body; 5. release of the second polar body; 6-8. the first cleavage; 9-11. the second cleavage; 12. 8-cell stage.  
SP: sperm; PB1: polar body 1; PB2: polar body 2; CF: cleavage furrow.

**图版 II 说明**

1. 精子; 2. 未受精的成熟卵子; 3. 精子附卵; 4. 精子入卵; 5. 第一次成熟分裂后期; 6. 第一极体排出; 7~8. 第二次成熟分裂后期; 9. 第二极体排出; 10~12. 雌、雄原核形成; 13~15. 雌、雄原核靠近; 16~20. 雌、雄原核联合; 21. 第一次卵裂的中期; 22~24. 第一次卵裂后期; 25~26. 2 细胞期; 27~28. 第二次卵裂前期; 29. 第二次卵裂的中期; 30~32. 第二次卵裂后期; 33. 4 细胞期; 34~35. 第三次卵裂前期、中期; 36. 形成两个雄性原核; 37. 形成多个雄性原核; 38. 多精入卵的染色体凝缩; 39~40. 染色体异常分离。  
CHS: 染色体; SP: 精子; SN: 精核; PB1: 第一极体; PB2: 第二极体; FPN: 雌性原核; MPN: 雄性原核; CHT: 染色质。

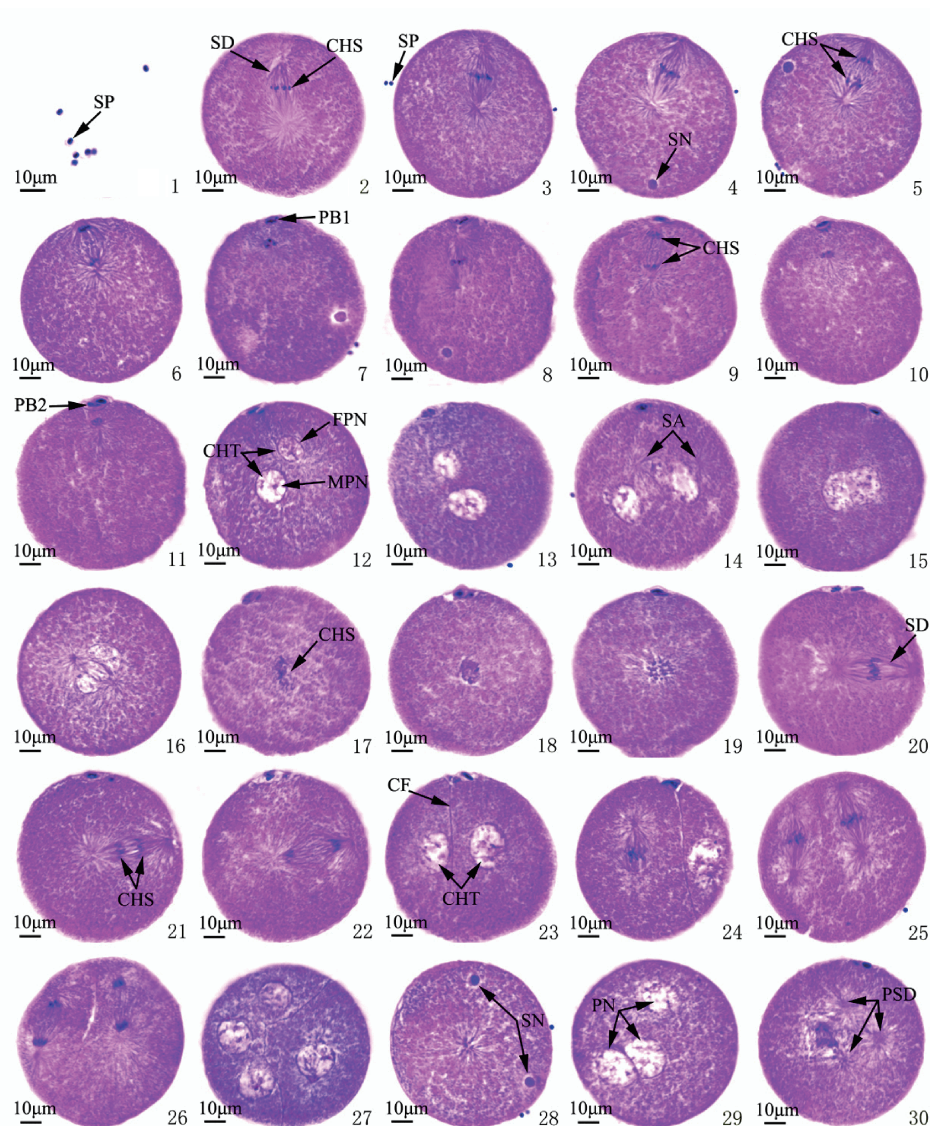
**Explanation of Plate II**

1. unfertilized mature egg; 2. sperm; 3. sperm attaching to the egg; 4. Sperm penetrated into egg; 5. anaphase of the first meiosis; 6. release of the first polar body; 7-8. anaphase of the second meiosis; 9. release of the second polar body; 10-12. formation of the female and male pronuclei; 13-15. approach of the female and male pronuclei; 16-20. association of the female and male pronuclei; 21. metaphase of the first cleavage; 22-24. anaphase of the first cleavage; 25-26. 2-cell stage; 27-28. prophase of the second cleavage; 29. metaphase of the second cleavage; 30-32. anaphase of the second cleavage; 33. 4-cell stage; 34-35. prophase and metaphase of the third cleavage; 36. formation of the two male pronuclei; 37. formation of more than two male pronuclei; 38. chromosome condensation of the polyspermic egg; 39-40. disordered chromosome separation.  
CHS: Chromosome. SP: Sperm. SN: Sperm nucleus. PB1: Polar body 1; PB2: Polar body 2; FPN: Female pronucleus. MPN: Male pronucleus. CHT: Chromatin.



图版 II 缢蛏受精和早期卵裂过程核行为的荧光显微观察  
 Plate II Nuclear behavior of fertilization and early cleavage in  
*S. constricta* with fluorescent microscope





图版 III 缙蛭受精和早期卵裂过程核相的组织切片观察

1. 精子; 2. 未受精的成熟卵子; 3. 精子附着; 4. 精子入卵; 5~6. 第一次成熟分裂后期; 7. 第一极体排出; 8. 第二次成熟分裂中期; 9~10. 第二次成熟分裂后期; 11. 第二极体排出; 12~13. 雌、雄原核的形成; 14~15. 雌、雄原核靠近并移至卵子中央; 16~18. 雌、雄原核的染色体联合; 19、20. 第一次卵裂的中期; 21~22. 第一次卵裂的后期; 23. 2 细胞期; 24~25. 第二次卵裂中期; 26. 第二次卵裂后期; 27. 4 细胞期; 28. 多精入卵; 29. 多个精核原核化; 30. 多极分离。

CHS: 染色体; SD: 纺锤体; SP: 精子; SN: 精核; PB1: 第一极体; PB2: 第二极体; FPN: 雌性原核; MPN: 雄性原核; SA: 精子星光; CF: 卵裂沟; CHT: 染色质; PN: 原核; PSD: 多极纺锤体。

**Plate III Nuclear behavior of fertilization and early cleavage in *S. constricta* by paraffin section method**

1. unfertilized mature egg; 2. sperm; 3. Sperm attaching to the egg; 4. sperm penetrated in egg; 5 - 6. anaphase of the first maturation division; 7. release of the first polar body; 8. metaphase of the second maturation division; 9 - 10. anaphase of the second maturation division; 11. release of the second polar body; 12 - 13. formation of the female and male pronuclei; 14 - 15. female and male pronuclei approaching and moving to the center of egg; 16 - 18. chromosome association of the female and male pronuclei; 19 - 20. Metaphase of the first cleavage; 21 - 22. anaphase of the first cleavage; 23. 2 - cell stage; 24 - 25. metaphase of the second cleavage; 26. anaphase of the second cleavage; 27. 4 - cell stage; 28. polysperm; 29. formation of more than two male pronuclei; 30. polyspindles formed.

CHS: chromosome; SD: spindle; SP: Sperm; SN: sperm nucleus; PB1: polar body 1; PB2: polar body 2; FPN: female pronucleus; MPN: male pronucleus; SA: spermaster; CF: cleavage furrow; CHT: chromatin; PN: pronucleus; PSD: polyspindle.