

栉孔扇贝(♀) × 虾夷扇贝(♂)受精细胞学观察*

周丽青^{①②} 杨爱国^① 刘志鸿^① 杜方勇^② 张立敬^① 王清印^{①**}

(①中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; ②上海水产大学渔业学院 上海 200090)

摘要: 采用 Bouin 氏液固定、石蜡包埋、切片,用苏木精-伊红染色,在光学显微镜下观察栉孔扇贝(♀)与虾夷扇贝(♂)杂交的受精细胞学过程。尽管栉孔扇贝与虾夷扇贝同科不同属,但它们的杂交仍具有正常的受精细胞学程序。栉孔扇贝卵子处于第一次成熟分裂中期时接受虾夷扇贝的精子入卵,精卵混合后 6 min 精子入卵;8~10 min 精核略微膨胀;25~30 min 排出第一极体;1 h 左右,雌雄原核同时形成;1 小时 30 分钟左右,雌雄原核融合;2 h 左右开始卵裂。杂交过程中的精子入卵行为较本交迟缓,但杂交后代仍能正常发育。

关键词: 栉孔扇贝; 虾夷扇贝; 杂交受精; 细胞学观察

中图分类号: Q952 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2003)04-20-04

Cytological Observations on Cross Fertilization between *Chlamys farreri* (♀) and *Patinopecten yessoensis* (♂) Scallops

ZHOU Li-Qing^{①②} YANG Ai-Guo^① LIU Zhi-Hong^① DU Fang-Yong^②
ZHANG Li-Jing^① WANG Qing-Yin^①

(① Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

② College of Fisheries, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Cytological observations on cross fertilization between *Chlamys farreri* (♀) and *Patinopecten yessoensis* (♂) were carried out. As observed, the process of cross fertilization between these two species was similar to intraspecific fertilization even though they belong to the different genera. The appropriate time of insemination was at the metaphase of the meiosis. By the sixth minute postinsemination, sperm was seen entering the egg cytoplasm. By the eighth to tenth minute postinsemination, the size of the sperm nucleus had increased slightly. By the 25 - 30th minute postinsemination, the first polar body was ejected. By the 60 th minute postinsemination, the male and female pronuclei were formed. By the 90 th minute postinsemination, the male and female pronuclei were fused to form the nucleus of the zygote. By the second hour postinsemination, zygote cleavage began. Embryogenesis in crossbreeding seemed to be slower than that in intraspecific fertilization.

Key words: *Chlamys farreri*; *Patinopecten yessoensis*; Cross fertilization; Cytological observations

* 国家重点基础研究专项课题(No. G1999012004), 国家海洋“863”项目(No. 2001AA620106)资助;

** 通讯作者, qywang@public.qd.sd.cn;

第一作者简介 周丽青,女,28岁,硕士研究生;研究方向:水产动物增殖和遗传育种。

收稿日期:2003-04-18

受精细胞学是发育生物学的重要组成部分。开展海洋经济种类受精细胞学的研究能为苗种生产过程中的人工授精操作、品种改良以及新品种培育提供理论依据。我国在贝类受精细胞学研究方面,与国外一些水产强国比较^[1-4],不仅起步晚、起点低,而且所涉及的种类也较少,已有的报道为太平洋牡蛎(*Grassostrea gigas*)^[5]、合浦珠母贝(*Pinctada martensii*)^[6]、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[7,8]和毛蚶(*Tegillarca granosa*)^[9]等为数有限的几个种类。我国在贝类种间杂交研究方面主要集中在牡蛎^[10]、珠母贝^[11]和鲍鱼^[12]等种类,而扇贝杂交的受精细胞学研究报道较少。

杂交育种是培育新品种的传统手段,具有操作简便、能综合双亲的优良性状等特点,是最有效的、常用的育种手段。目前,人工养殖和野生栉孔扇贝群体均出现不同程度的种质退化现象,养殖栉孔扇贝疾病频发和大面积死亡现象时有发生,扇贝种质复壮和新品种的培育将是保证扇贝增殖养殖业持续发展的有效途径之一。

本研究以栉孔扇贝为母本、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)为父本,进行这两种扇贝杂交的受精细胞学观察,以期探讨杂种优势的利用和新品种的培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 2002年4月上旬,杂交实验于山东荣成寻山渔业公司育苗场进行,4月下旬在山东长岛水产增殖基地进行补充实验。杂交实验所选用的亲本及其生物学资料如表1所示。

表1 杂交亲本及其生物学资料

种类	亲本性别	年龄	平均壳高 (cm)	性腺发育情况
栉孔扇贝	雌	2~3	7~8	成熟、饱满
虾夷扇贝	雄	2~3	10~12	成熟、饱满

Bouin氏液的配制参照芮菊生等^[13]的方法(甲醛25 ml,冰醋酸5 ml,苦味酸饱和液75 ml)。

1.2 方法 将亲贝洗净后,雌雄分养于盛有沙滤海水的50 L水槽中。人工诱导亲贝使其排放精卵。用不同规格的筛绢过滤、富集和冲洗

精卵,按适当比例混合精卵,使每个卵子表面在显微镜下可见有2~5个精子。受精卵置于1000 ml烧杯中发育,沙滤海水温度为17~18℃。

精卵混合前,取2~3 ml干净的卵子固定;精卵混合后20 min内,每2 min取2~3 ml受精卵固定;20 min后,每5 min取2~3 ml受精卵固定,以供受精细胞学观察。精卵混合2 h后,每15~30 min取样1次在光镜下观察受精卵的发育状况,以便能准确地采集到早期胚胎发育的各个阶段样品用于胚胎发育的观察。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。样品固定5 h左右,移入70%酒精中,并置4℃冰箱保存备用。

精卵混合后的2 h内,受精卵尚未卵裂,这一时间段内所固定的样品用酒精系列脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,LeicaRM 2145型切片机切片,切片厚度为5 μm。Harris氏苏木精-伊红染色,中性树脂封片,Nikon显微镜油镜下(10×100)观察并拍照。

2 结果

2.1 栉孔扇贝的卵子 栉孔扇贝的成熟卵子处于第一次成熟分裂中期,双价染色体粗短鲜明,着深蓝色,整齐地排列在赤道板中央。纺锤体清晰可见,其一端靠近卵子动物极的质膜,并与该部位卵膜垂直(图版I:1)。卵质均匀,卵黄颗粒被染成红色,线粒体则被染成黄色。卵黄颗粒和线粒体含量丰富。此外,卵子内还含有许多着深蓝色的细小颗粒,表明核酸含量较为丰富。

2.2 精子入卵 精卵混合后,精子觅得卵子并附着在卵子表面,然后斜着插入卵黄膜。卵细胞成熟分裂重新启动,染色体排列不太整齐(图版I:2)。在精卵混合后6 min左右,精子便进入卵质中。观察表明,大部分精子在卵子动物极附近入卵。受精膜举起也不明显,仅由卵黄膜变成受精膜。光镜下,精子头部呈圆锥形小黑点。

2.3 成熟分裂的继续 精卵混合后8~10

min, 入卵的精核轻微膨胀(图版 I:3,4)。配对的同源染色体被缩短的纺锤丝拉开, 卵细胞的染色体明显分为两组。纺锤体靠近质膜的一端逐渐向卵膜外拱(图版 I:3), 它将形成第一极体。精卵混合后 25 ~ 30 min, 受精卵排出第一极体, 完成了第一次减数分裂。第一极体和受精卵各含一套染色体组(图版 I:4,5)。第二次成熟分裂的纺锤体长度几乎是第一次成熟分裂的一半(图版 I:6), 第二极体多集中在精卵混合后的第 55 min 排出。

2.4 雌雄原核的形成 精核轻微膨胀的过程大约停滞了 20 min, 精卵混合后 30 ~ 60 min, 精核继续膨胀, 形成雄原核。雌雄原核几乎是同时形成的, 且大小相似(图版 I:7)。刚形成的原核边界不清晰, 只能通过染成浅蓝色的染色质予以甄别。雄原核附近的星光隐约可见, 大致位于雌雄原核之间, 说明雄原核在形成过程中发生了 180° 的旋转(图版 I:7)。精卵混合后 1 h 左右, 原核边界逐渐清晰, 核腔被染成浅黄色, 但核腔内的染色质呈深蓝色(图版 I:8)。雌雄原核体积较大, 其直径约为受精卵直径的 1/5。

2.5 雌雄原核的靠近与融合 第二极体排出后, 和从第一极体分裂出的另一极体并排于第一极体的正下方(图版 I:9)。每个极体都由一层质膜包被, 并含有少量的卵子细胞质, 这些极体均位于受精膜之下。雄原核依靠卵细胞中线粒体提供的能量, 在星光的牵引下, 以伸出伪足的方式向雌原核靠近(图版 I:8)。雌雄原核彼此接触的核膜发生融合, 精卵混合后 1 小时 20 分钟到 1 小时 40 分钟, 雌雄原核完全融合形成合子核(图版 I:9)。由于雌原核在卵内位置基本上不变, 因此刚形成的合子核与雌原核所处的位置大致相同, 即位于极体正下方。精卵混合后 1 小时 55 分钟, 合子核周围的卵质分布变得不太均匀, 这可能与卵质的流动有关, 为第一极体的伸出和卵裂作好准备。此时, 合子核膜逐渐模糊, 染色质出现凝集, 卵裂行将开始(图版 I:10)。

2.6 个别特殊现象 三极纺锤体共存于同一

个受精卵中(图版 I:11)。三个原核相互融合(图版 I:12)。

3 讨论

3.1 远缘杂交的受精细胞学程序 理论上, 不同种类的精子结合素结构不同, 难以与异种卵膜对应的结合受体亲和, 换言之, 只有同种精子的结合素和结合素受体才能相互识别。但是, 对于栉孔扇贝和虾夷扇贝这两种同科不同属的贝类, 在杂交组合中, 无论是正交还是反交, 都和本交有着非常相似的受精细胞学程序, 出现个别特殊现象可能是由多精入卵现象造成的。杨爱国等^[14]对这两种扇贝的杂交受精细胞学研究结果表明, 正反交中精子均可正常入卵, 说明这两种扇贝间的精卵识别无种间特异性。根据本实验观察, 杂交过程中的精子入卵行为较本交迟缓 2 ~ 4 min^[8], 这说明远缘杂交的精卵结合可能存在着从相互排斥到相互协调的变化过程。此外, 卵质调控雄原核形成和精子使成熟的受精卵激活均没有种的特异性, 彼此可相互诱导。扇贝受精过程的调控可能与鱼类类似, 不受父本基因的干扰, 仅由母本基因调控。例如, 受精卵蛋白质合成与卵裂速率等均由卵内的基因产物控制^[15]。

3.2 受精细胞学的观察方法 用于贝类受精细胞学的观察方法有三类^[8,9,14,16]: (1) 扫描和透射电镜观察; (2) 荧光显微镜观察; (3) 普通光镜观察。其中, 扫描电镜能观察到受精过程中卵子表面和精子的形态变化; 透射电镜能对受精卵和精子内部精细结构及其变化进行观察; 电镜观察所需的样品处理难度大(容易变形或丢失)、费用高。另外, 扇贝的精子 and 卵子较小, 难以固定它们的方向, 加大了电镜观察的难度。荧光显微镜的观察操作相对简单, 只要将固定的样品用磷酸缓冲液冲洗干净后, 采用 DAPI 对核酸进行染色就可以直接在荧光显微镜下观察, 但 DAPI 具毒性, 又必须在红光或黄光下迅速观察, 该法只能进行核相分析, 无法观察具体结构。普通光镜的观察具有操作简便、费用低等特点, 而且还可以根据需要调整或改变固定

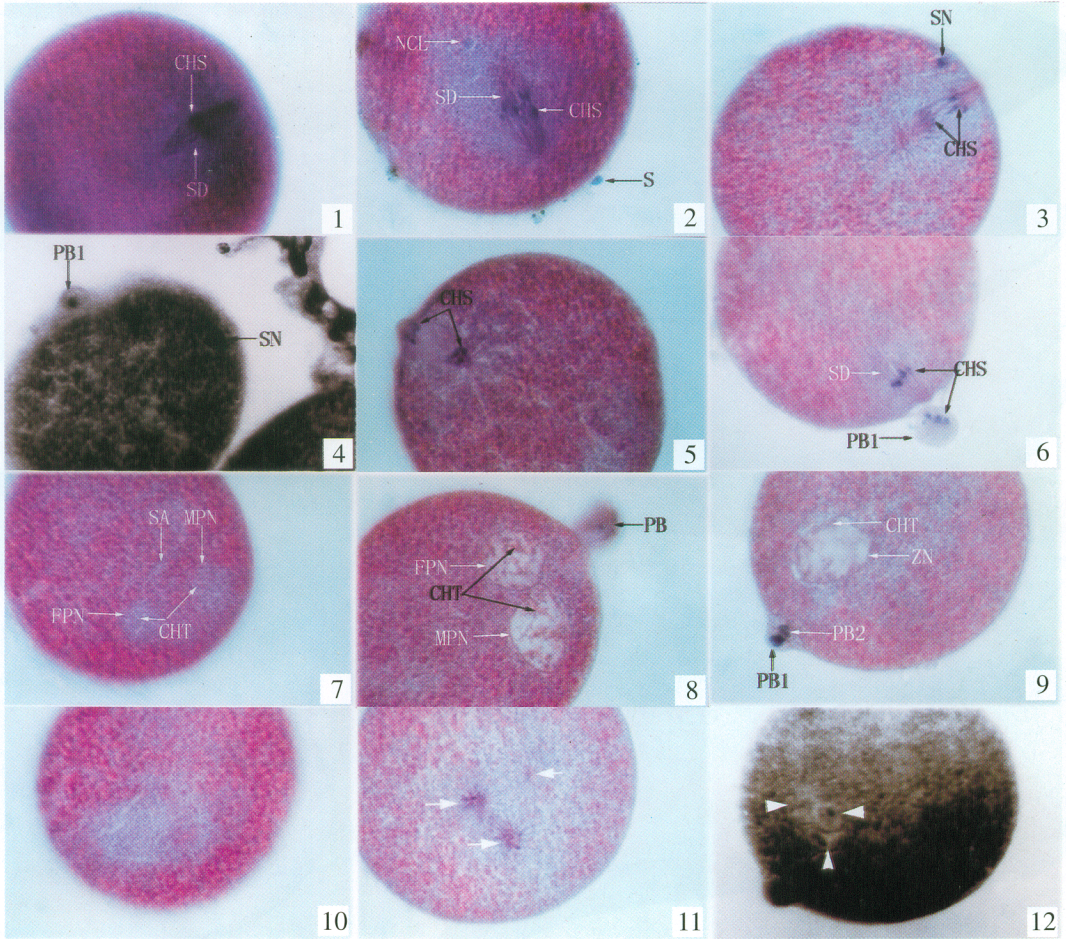
和染色方法,例如,任素莲等^[8]用 Caroy 氏液固定不同发育时期的受精卵,通过铁-苏木精染色和 45% 醋酸分色,不经压片直接封片观察太平洋牡蛎受精过程中的精核扩散与成熟分裂;沈亦平等^[6]用 Caroy 氏液固定不同发育时期的受精卵,用醋酸-地衣红染色,直接封片观察合浦珠母贝的受精细胞学过程,这两项研究实际上是针对细胞核相的观察。本研究所采用的方法不仅可以观察到受精卵内部的变化,还可以对细胞的外部形态进行观察,证实和补充了杨爱国等^[14]关于虾夷扇贝与栉孔扇贝人工授精过程的荧光显微镜观察。

3.3 杂种优势的问题 虾夷扇贝具有个体大、生长快等特点,是冷水、狭温性贝类,由于无足丝附着,人工养殖需特殊器材或采用人工底播的方法,局限在我国北方的少数海区进行养殖。栉孔扇贝是我国北方扇贝养殖的主要种类,适温范围较广,生长较慢,以足丝附着在坚硬的物体上生活,养殖成本较低,几乎可以在北方所有海区进行养殖。这两种扇贝的地理分布、生态类型和主要性状差异明显,如果它们在经济性状方面所表现出来的优缺点能够互补,其杂交育种就有推广应用的潜力。但是,杂交后代往往按自由组合规律进行重组,可能出现的变异十分广泛,初步观察表明,除了适温范围变广外,这两种扇贝的杂交后代杂种优势并不明显,而且性状表达有趋于母本的倾向^[14]。在加拿大有人用当地的西北扇贝 (*Patinopecten canrinus*) 和虾夷扇贝杂交,产生的杂种具有较强的抗派金氏虫 (*Perkinus* spp.) 病的能力^[17]。Gruz 在对二个不同地区扇贝 (*Argopecten ventricosus*) 杂交分析时发现,杂交种在一定的选择压力下才表现出杂种优势。所以,这两种扇贝杂交能否取得更实际的杂种优势还有待进一步实验。

致谢 黄海水产研究所的庄志猛老师为本文修改提出了宝贵意见,特致谢意。

参 考 文 献

- [1] Akira K, Hirokazu M, Takashi Y, et al. Meiosis and fertilization of the Japanese pearl oyster eggs at different temperature observed with a fluorescence microscope. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1990, **56**(3): 425 ~ 430.
- [2] Chen D Y, Frank J L. Sperm nuclear dispersion coordinate with meiotic maturation in fertilized *Spisula solidissima* eggs. *Developmental Biology*, 1983, **99**: 217 ~ 224.
- [3] Lalander B I, Summers R G. An ultrastructural analysis of the gametes and early fertilization in two Bivalves: *Chama macerophylla* and *Spisula solidissima* with special reference to gamete binding. *Cell Tissue Res*, 1977, **182**: 469 ~ 486.
- [4] Long F G, Anderson E. Cytological aspects of fertilization in the Lamellibranch, *Mytilus edulis* II. development of the male pronucleus and the association of the maternally and paternally derived chromosomes. *J Exp Zool*, 1969, **172**: 97 ~ 120.
- [5] 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.海洋湖沼通报,1999(1)34 ~ 39.
- [6] 沈亦平,刘汀,姜海波等.合浦珠母贝受精细胞学观察.武汉大学学报(自然科学版),1993(5):115 ~ 123.
- [7] 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.中国水产科学,1999,6(3):96 ~ 98.
- [8] 任素莲,王德秀,绳秀珍等.栉孔扇贝受精过程的细胞学观察.海洋湖沼通报,2000(1):24 ~ 29.
- [9] 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.水产学报,2000,24(2):104 ~ 107.
- [10] 周茂德,高允田,吴融.太平洋牡蛎与近江牡蛎、褶牡蛎人工杂交的初步研究.水产学报,1982,6(3):236 ~ 241.
- [11] 魏贻尧,姜卫国,李刚.合浦珠母贝、长耳珠母贝和大珠母贝种间人工杂交的研究 I. 人工杂交和杂交后代的观察.热带海洋,1983,2(4):309 ~ 315.
- [12] 燕敬平,孙慧玲,方建光等.日本盘鲍与皱纹盘鲍杂交育种技术研究.海洋水产研究,1999,20(1):35 ~ 39.
- [13] 芮菊生,杜慧琴,陈海明等.组织切片技术.北京:人民教育出版社,1980.7 ~ 19.
- [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镜观察.海洋水产研究,2002,23(3):1 ~ 4.
- [15] 吴端生,刘筠.红鲫与湘江鲤杂交的受精细胞学研究.动物学研究,1993,14(3):277 ~ 282.
- [16] 孙振兴,王如才,姜明等.皱纹盘鲍受精过程的电镜观察.动物学研究,1997,18(3):253 ~ 257.
- [17] Heath W A. Developments in shellfish culture in British Columbia. *Journal of Shellfish Research*, 1995, **14**(1):228.



1. 未受精的成熟卵子; 2. 精子入卵; 3. 刚入卵的精子; 4. 精核略微膨胀; 5. 第一极体正在排出; 6. 开始第二次减数分裂; 7. 雌雄原核正在形成; 8. 雄原核向雌原核靠近; 9. 雌雄原核融合形成合子核; 10. 合子核散开; 11. 三极纺锤体; 12. 三个原核即将融合 (均 × 600)

CHS:染色体; CHT:染色质; FPN:雌原核; MPN:雄原核; NCL:核仁; PB:极体; PB1:第一极体; PB2:第二极体; S:精子; SA:星光; SD:纺锤体; SN:精子核; ZN:合子核