

# 泥蚶受精过程的细胞学荧光显微观察

孙慧玲 方建光 王清印 张继红 梁兴明 燕敬平 孔 杰 杨爱国  
(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

姜 明  
(青岛海洋大学测试中心, 266003)

**摘 要** 采用荧光染色剂 DAPI 已固定的泥蚶成熟卵和受精卵进行染色的方法, 在显微镜下观察泥蚶受精细胞学过程。通过 DAPI 的染色, 在荧光显微镜下可清楚观察到, 泥蚶的成熟未受精卵处于第一次成熟分裂的中期, 精子入卵后成熟分裂再次启动, 释放出第一和第二极体, 完成成熟分裂。部分受精卵的第一极体有极明显的分裂现象。精子入卵的部位是随机的, 且自精子入卵至成熟分裂完成, 入卵的精子在形态等方面将发生一系列变化, 形成雄性原核。雌雄原核形成后均具有极明显的膨大现象。并且在系列的样品中可观察到, 在雌雄原核联合的过程中具有雄性原核向雌性原核移动的趋势。

**关键词** 泥蚶, 受精, 荧光显微观察

## Cytological observation on fertilization of *Tegillarca granosa* with fluorescent microscope

Sun Huiling, Fang Jianguang, Wang Qingyin, Zhang Jihong  
Liang Xingming, Yan Jingping, Kong Jie, Yang Aiguo  
(Yellow Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Qingdao 266071)  
Jiang Ming  
(Test Centre, Ocean University of Qingdao, 266003)

**ABSTRACT** The fertilized eggs of *Tegillarca granosa* stained with DAPI were observed by fluorescent microscope. The result shows that the mature eggs were at metaphase of first meiosis. After sperm penetrating, the eggs released their first and second polar bodies and finished their meiotic division. Some first polar bodies divided into two small cells. The eggs *Tegillarca granosa* became monospermic. While the male and the female pronucleus were produced, they expanded to their maximal size. And the male pronucleus moved to the female pronucleus during the period of associating of the two pronucleus.

**KEYWORDS** *Tegillarca granosa*, fertilization, fluorescent microscope

水生生物受精过程细胞学的观察和研究是水生生物发育生物学的一个主要内容。它不仅可以揭示其发生发育规律, 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。有关软体动物受精生物学的研究较少, 应用电镜观察对贻贝(*Mytilus edulis*)及 *Mulinla lateralis* 精子的细微结构以及卵子受精后精卵原核的一系列超微变化做过报道<sup>[1~4]</sup>; 近几年, 日本学者古丸明等用荧光染色的方法对日本的合

国家攀登 B 计划资助项目(海水增殖生物优良种质和抗病力的基础研究), PDB-6-3-2 号。

第一作者简介: 孙慧玲, 女, 1958 年 7 月生, 副研究员。Tel: 0532-5822957, E-mail: mcdel@public.qd.sd.cn

收稿日期: 1999-02-08

浦珠母贝(*Pinctada martensii*) 卵子减数分裂和受精过程进行了观察描述; 国内武汉大学沈亦平等用醋酸-地衣红染色制片法对合浦珠母贝(*Pinctada martensii*) 的受精过程进行了细胞学观察<sup>[5,6]</sup>; 孙振兴等用电子显微镜对皱纹盘鲍(*Haliotis discus hanai* Ino) 的卵子以及受精细胞学过程的超微结构进行了观察<sup>[7]</sup>。

泥蚶属瓣鳃纲(Lamellibranchia), 翼形亚纲(Pterimorphia), 蚶目(Arcoidea), 蚶科(Arcidae), 是我国海产的重要经济贝类之一。有关泥蚶的繁殖习性, 胚胎及幼体发育等生物学方面已有较为系统的报道, 但有关受精过程的细胞学观察尚未见报道。本文采用了荧光染色显微镜观察的试验手段, 对泥蚶成熟卵及受精卵进行了研究。现将结果报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

泥蚶(*Tegillarca granosa*) 亲贝: 1997年7月取自山东省文登沿海, 在黄海水产研究所青岛实验基地进行暂养。荧光染色剂 DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) 为美国 Sigma 公司产品。固定液由多聚甲醛与戊二醛配制而成。

### 1.2 方法

取性腺成熟期的泥蚶亲贝刺激催产, 其方法为用阴干低温刺激一定时间之后, 以个体为单位把泥蚶亲贝分别放入比原培育水温高 2~3℃ 的容器内, 使雌雄亲贝分别产卵排精, 取适量精液与卵子混合。受精前取未受精卵样一次, 受精后 5min 之内每分钟取样一次, 5至 15min 内每 3min 取样一次, 之后每 5min 取样一次直到第一次卵裂。所取样品用固定液固定两次, DAPI 染色, 用荧光显微镜在 365nm 下观察受精及发育过程。

## 2 结果

### 2.1 卵子的受精时机和精子入卵部位

泥蚶与多数贝类相同, 卵子受精前停留在第一次成熟分裂的中期, 荧光显微观察, 卵内未见胚泡存在, 极体尚未排出。此时同源染色体配对, 染色体形态明显可见, 核区位于卵膜附近, 等待精子进入, 精子一旦进入, 卵子便开始继续完成成熟分裂过程。此时在荧光显微镜下可清晰地观察到结构比较明显且集中分布的泥蚶成熟未受精卵内的染色体(图版-1)。

荧光显微镜下从多数样品的观察中发现精子入卵并无固定位置, 据此认为泥蚶的精子亦属于随机地从卵子周围的任何部位进入, 但多偏远于极体释放处(图版-2, 3, 4)。在荧光显微镜下可见到有受精锥形成但不甚明显。从本实验观察到的众多样品中, 可以清楚地看到受精卵周围粘附的许多精子, 但未观察到有明显的多精入卵和多精受精现象。

### 2.2 极体的排放

泥蚶的受精时间与软体动物许多种类相同, 荧光显微镜下观察精子在卵子第一次成熟分裂中期入卵, 精子入卵后成熟的卵子受激动, 位于卵膜附近的同源染色体开始分开, 分开的同源染色体沿纺锤丝向纺锤体的两极移动, 其结果一半的染色体以第一极体的形式释放出去, 镜下可明显看到染色体被牵拉及第一极体的排放过程(图版-3, 4)。在 28~29℃ 条件下, 受精后 5~6min, 少量受精卵可见到第一极体排出, 约 10min 半数以上出现第一极体; 15min 多数受精卵放出第二极体(图版-5), 第二极体位于第一极体的下方或旁边, 从而完成卵子的两次成熟分裂。与此同时, 在部分受精卵中可观察到第一极体能再次

分裂为两个极体(图版-6, 7), 但这一现象不是在所有的受精卵中都可观察到。

## 2.3 雌性原核和雄性原核的形成

荧光显微镜下泥蚶的精子呈一圆形亮点, 入卵后, 精核泡状化体积稍有膨大成球形。在卵子完成两次成熟分裂过程中, 进入卵内的精子核发生一系列的变化(图版-5, 6, 8), 精核内的染色质由密集状态而稀疏开来, 进入卵内的精子部分体积逐渐膨大, 卵子两次成熟分裂完成的同时, 精核迅速扩散体积明显膨大, 形成雄性原核(male pronucleus)。雌性原核(female pronucleus)是在完成两次成熟分裂之后, 由留在卵内的单倍染色体去浓缩, 卵核扩散膨大而形成的; 此时, 雌雄原核膨胀到最大程度(图版-8)。关于雌雄原核相互融合或联合过程, 一般认为有三种情形, 一是两核同时向对方移动, 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, 泥蚶受精卵雌性原核形成后稍微离开卵子的表面, 从荧光显微镜下观察, 在雌雄原核联合的过程中, 雌性原核向雄性原核移动的趋势不明显, 雄性原核有明显向雌性原核移动接近的趋势, 最终两核联合(图版-9, 10)。随后是联合的核进行分裂, 进行第一次卵裂。

## 2.4 第一次卵裂

雌性原核与雄性原核相互接近、联合之后, 两原核染色体集中在赤道板上, 随后染色体在纺锤丝的牵引下向纺锤体两极移动, 移动方向与卵轴垂直, 最终形成两个子核(图版-11)。与此同时受精卵由于卵质的流动形成极叶, 此时可在植物极明显的观察到极叶的突出, 但其形态与扇贝的非常规则的三叶期有所不同(图版-10), 在第一次卵裂完成的同时极叶收回, 形成两个大小不均等的分裂球(图版-12), 受精卵的第一次有丝分裂完毕。

# 3 讨论与结语

## 3.1 精子的入卵时机和入卵位置

各种水生动物精子入卵的时机具有种的差异性。对于卵子来说, 在完成它的生长期之后, 即在第一次成熟分裂开始之前直到第二次成熟分裂完成以后的这一段时间内都可以接受精子, 但种类不同精子入卵的时机亦不同, 人工受精过早或过晚均不能使受精取得成功, 这主要取决于卵子的成熟程度。鱼类的精子是在卵子进行第二次成熟分裂中期入卵的, 此时第一极体已经排出; 而行体外受精的软体动物精子入卵的时机有两种情形, 一种是初级卵母细胞处于第一次成熟分裂之前, 此时胚泡尚存在; 另一种是初级卵母细胞处于第一次成熟分裂中期, 胚泡消失, 但极体尚未排出<sup>[8]</sup>, 从荧光显微观察证实了泥蚶属后一种, 即精子入卵前, 卵内胚泡已经消失, 精子入卵之后第一极体排出。

精子入卵的部位与卵子的结构类型密切相关, 卵黄多的种类或者端黄卵, 精子一般从卵子特有的受精孔即卵膜孔或动物极入卵, 而对于少黄卵或均黄卵, 精子一般可以从卵的任何部位入卵。一般鱼类精子属于前一种, 入卵有专门的受精孔, 贝类却没有。大量样品的观察中, 泥蚶的卵子具有少而均匀的卵黄, 又没有特定的受精孔, 因此决定了精子入卵部位是随机的; 在泥蚶的受精卵中尚未见到多精入卵的现象, 认为这可能也是由于泥蚶属于均黄卵且是少黄卵所致, 可以说均匀且少量的卵黄使得泥蚶卵子周围卵膜的电位相等, 因此使得精子在卵子表面任何部位入卵的可能性都是均等的。也正是由于这一特点, 一旦有一个精子入卵之后, 由于卵内卵黄少且均匀, 受激动的卵子使得等值的质膜电位同时并迅速的发生改变, 产生屏蔽作用, 因此卵膜外的其它精子均被阻滞, 形成了单精入卵受精的现象, 因此说卵子的单精或多精入卵甚至是单精受精还是多精受精, 主要是由卵的结构决定的; 另一方面单精入卵受精的现象还与受精时精卵的生理状态等有关。泥蚶与同是贝类的鲍不同<sup>[7]</sup>, 鲍为多精入卵单精受精, 认为与鲍的卵子结构及卵黄多少也有直接的关系。

### 3.2 极体的排放时间

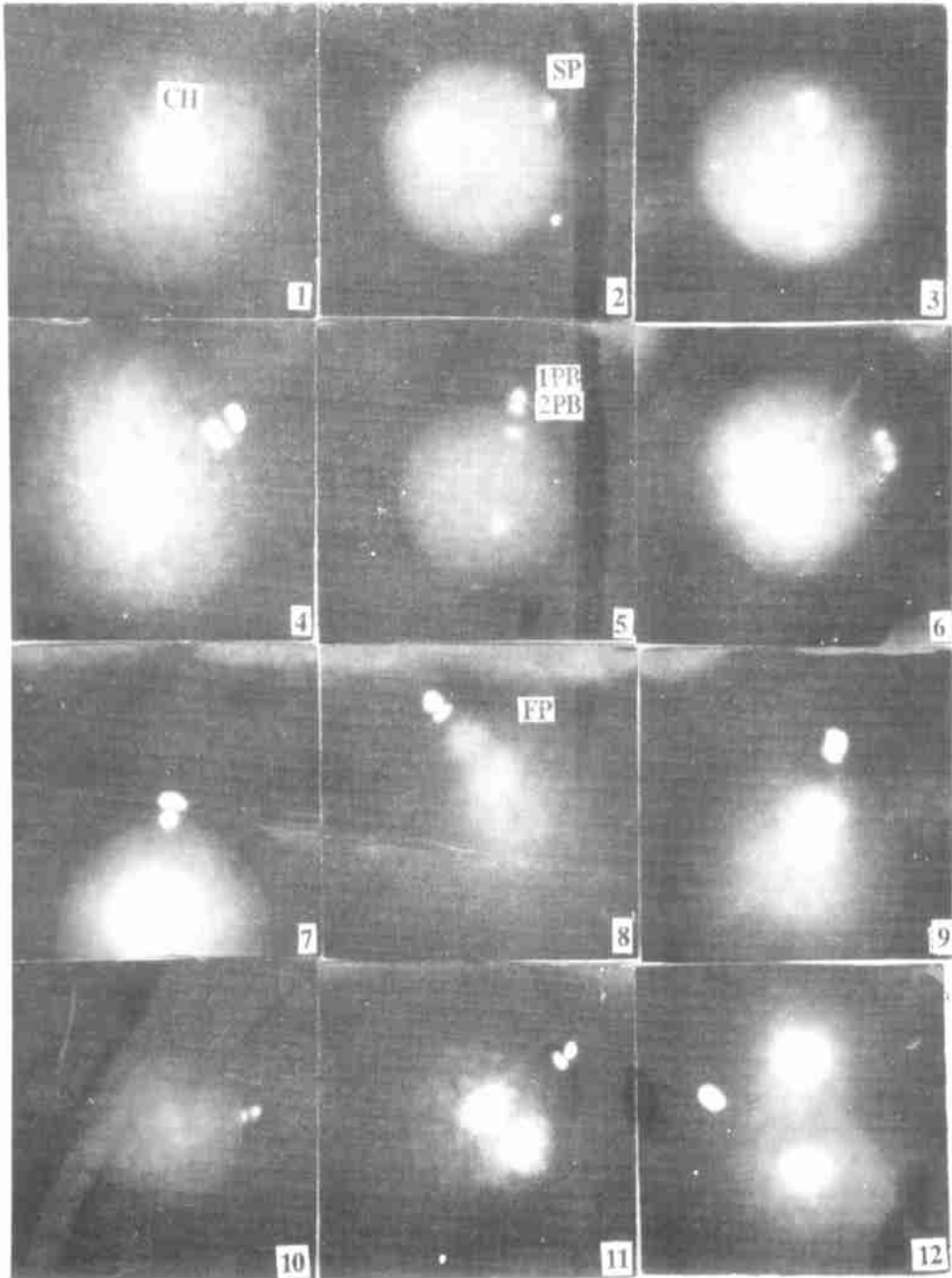
不同水生生物之间成熟卵子极体的排放时间有差异, 确定极体的排放时间对染色体的操作极为重要。鱼类的成熟卵是在放出第一极体之后精子才进入卵子的, 而多数软体动物的卵子是在极体放出之前受精, 泥蚶的极体排放时间与多数贝类相同, 精子入卵之后卵子方能继续完成它的成熟分裂, 释放第一和第二极体, 这一特点极有利于染色体的操作。关于第一极体的命运, 在有些生物中第一极体具有分裂现象, 有些则没有明显地分裂现象, 但在同一个物种中是否同时存在两种现象, 还是因观察部位不同所致, 有待进一步研究。

### 3.3 受精细胞学的荧光显微观察

采用荧光显微镜观察方法对泥蚶的受精过程进行研究, 以简洁、清晰及直观的方法显示了泥蚶的精、卵以及受精过程中核的变化过程, 初步揭示了泥蚶受精及成熟分裂的主要细胞学过程。荧光显微染色体的特异性使得染色体的变化过程表现的十分明显, 但其微管等其它系统的变化不甚显著, 因此本实验所采取的观察研究方法即有其优越性同时也有其局限性, 所以仍将进一步结合不同的观察手段对泥蚶的受精机理进行更全面的研究。

## 参 考 文 献

- 1 Longo F J, Anderson E. Cytological aspects of fertilization in the Lamel libbranch, *Mytilus edulis*. I. Polar body fomation and development of female pronucleus. J Exp Zool, 1969, 172: 69~ 96
- 2 Longo F J, Anderson E. Cytological aspects of fertilization in the Lamel libbranch, *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
- 3 Longo F J, Dornfeld E J. The fine structure of spermatid differentiation in the mussle, *Mytilus edulis*. J Ultrastr Res, 1967, 20: 275~ 282
- 4 Longo F J. Expansion of the sperm nucleus and association of the maternal and paternal genomes in fertilized *Mulinla lateralis* eggs. Biol Bull, 1991, 180:56~ 64
- 5 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~ 120
- 6 沈亦平, 刘汀, 姜海波等. 合浦珠母贝卵子成熟的细胞学观察, 武汉大学学报(自然科学版), 1993, (5): 109~ 114
- 7 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
- 8 楼允东. 组织胚胎学, 北京: 农业出版社. 1981, 212~ 217



图版 泥蚶受精过程的荧光显微观察

Plate Observation on fertilization of *Tegillarca granosa* with fluorescent microscope

1. 泥蚶成熟卵; 2. 卵子受精; 3. 第一次成熟分裂; 4. 第一极体释放; 5. 第二极体释放; 6. 第一极体分裂; 7. 第二极体分裂; 8. 雌雄原核形成; 9. 雌雄原核联合; 10. 两核联合后, 第一次卵裂前期; 11. 第一次卵裂; 12. 两细胞期。

SP: 精子 sperm CH: 染色体 chromatin MP: 雄性原核 (male pronucleus) FP: 雌性原核 (female pronucleus) 1PB: 第一极体 (first polar body) 2PB: 第二极体 (second polar body)