

文章编号:1000-0615(2006)01-0029-07

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董迎辉^{1,2}, 杨爱国¹, 刘志鸿¹, 任建峰^{1,3}, 周丽青¹, 李 贇²

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003; 3. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:采用 Bouin 氏液固定、石蜡切片和苏木精-伊红染色方法,在光镜下对栉孔扇贝正常发育和 6-DMAP 第二极体抑制型雌核发育二倍体卵在受精和第一、二次卵裂过程中的核相变化进行了详细观察。结果表明,正常发育卵内的雌、雄原核能融合为合子核,而雌核发育卵内的精核、雌核变化相当复杂。精核至少存在两种状态:(1)精核只在刚入卵时发生轻微膨胀,以后保持固缩状态,不膨大形成雄原核;(2)在第二次成熟分裂之后,精核再次去浓缩膨胀,但其体积并未达到正常雄原核的大小。在第一、第二次卵裂过程中,此精核不参与核分裂,以致密的染色质体(DCB)存在于两组分开的母本染色体之间,卵裂结束时滞留于两卵裂球的分裂沟上或进入其一的细胞质中。受精卵经 6-DMAP 处理,雌核形成第二极体的过程受到有效抑制,导致雌核二倍化。此外,作者对实验中出现的多精入卵和多极分离现象进行了观察和分析。

关键词:栉孔扇贝;正常发育;雌核发育二倍体;细胞学观察**中图分类号:**S917 **文献标识码:**A**Cytological observation of nuclear behavior in early development of normal and artificially induced gynogenetic diploid in *Chlamys farreri***DONG Ying-hui^{1,2}, YANG Ai-guo¹, LIU Zhi-hong¹, REN Jian-feng^{1,3}, ZHOU Li-qing¹, LI Yun²

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

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

3. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Artificial diploid gynogenesis, a form of all-female inheritance, was considered as one of the most effective techniques for the rapid establishment of inbred lines, mono-sexual broods or clones, as well as for examining sex-determination and gene-centromere recombination. Induction of gynogenetic diploid in many mollusks has been performed recently, but few cytological studies have depicted the fertilization and early cleavage events in eggs inseminated with ultraviolet (UV)-irradiated sperms. The aim of the experiment was expected to examine the differences of nuclear behavior on early development between normal and artificially induced gynogenetic diploid eggs of *Chlamys farreri*. In this study, a large number of gynogenetic diploids in *Chlamys farreri* were generated by activation of eggs with UV-irradiated spermatozoa and subsequent diploidization of the maternal chromosome set by blocking the second polar body extrusion. The optimal dose of UV light irradiation at intensity of $800 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}$ for 50 s and the best treatment condition of $60 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) for 20 min were obtained on the basis of the preceding trials. Then, to treat normal and gynogenetic diploid eggs of *C. farreri* fixed in Bouin's fixative, nuclear changes were observed carefully under an optical microscope during fertilization and early cleavage. The results of cytological observation indicated that the female and male pronuclei of normal eggs fused into zygotonucleus, but their behaviors of gynogenetic diploid eggs were considerably complicated. The sperm nucleus of gynogenesis had at least two situations: One was that it kept dense and could not develop into male pronucleus, and

收稿日期:2004-11-22

资助项目:国家海洋“863”项目(2003AA603022)

作者简介:董迎辉(1980-),男,河南洛阳人,硕士研究生,从事海洋贝类遗传育种研究。E-mail: dongyinghui118@tom.com

通讯作者:杨爱国, Tel: 0532-5811982, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

another was that it expanded again after the second meiosis but did not reach its maximum as a normal male pronucleus. In the process of the first and second cleavages. The sperm nucleus of gynogenesis, which became a dense chromatin body (DCB), did not participate in the karyokinesis and was located between the two maternal chromosomes. At the completion of cleavage, DCB was seen either in the region of the first cleavage furrow or in the cytoplasm of one of the two blastomeres. Treatment with 6-DMAP, the formation of the second polar body was inhibited effectively and diploid female pronucleus was formed. In addition, the phenomena of polysperm and polyspindles in the experiment were also observed and analyzed.

Key words: *Chlamys farreri*; normal development; gynogenetic diploid; cytological observation

人工雌核发育二倍体的诱导是用遗传失活的精子去激活成熟卵子产生雌核发育单倍体,然后通过阻止第二极体排出或第一次卵裂使染色体加倍而发育成具有存活能力的二倍体个体。与正常发育相比,雌核发育二倍体完全继承母本的遗传物质,各基因位点均处于纯合状态,因而常用于快速建立纯系,并通过纯系间杂交选育出个体大、生长快、抗逆性强的优良新品种^[1]。另外,雌核发育还用于基因定位、基因-着丝粒重组、性别的遗传控制等遗传学研究中^[2]。人工雌核发育研究在鱼类开展的较早,但近年来在贝类遗传育种研究中也逐渐活跃起来,如皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)^[3]、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[4]、地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)^[5]、贻贝(*Mytilus edulis*)^[6]、侏儒蛤(*Mulinia laterlis*)^[7]、合浦珠母贝(*Pinctada martensii*)^[8]、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[9]等近十种经济贝类诱导出雌核发育二倍体。然而,对贝类雌核发育的细胞学研究较少,且多采用荧光显微观察方法,研究雌核发育卵内核相变化^[6,9,10]。赵峰等^[11]用扫描电镜对栉孔扇贝雌核发育精子入卵过程进行了观察;Li等^[12]用组织切片法研究了人工诱导皱纹盘鲍雌核发育卵的细胞学机理。本文以北方重要经济贝类栉孔扇贝为研究对象,采用组织切片法,在光镜下对其正常发育和人工诱导雌核发育二倍体卵在受精和第一、第二次卵裂过程中的核相变化进行了详细观察和对比,旨在探明贝类雌核发育产生的细胞学和遗传学机制,同时为摸索适宜的诱导条件提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验于2004年5月在山东青岛黄海水产研究所进行。所用栉孔扇贝亲贝取自青岛太平角养殖海区,壳高7~9 cm。6-二甲基氨基嘌呤(6-DMAP)为美国Sigma公司产品。

1.2 方法

亲贝暂养与精卵收集 亲贝取回后洗刷干净,雌、雄分开,在16℃水温下暂养。使用前挑选性腺饱满个体,阴干升温法催产。采集的精、卵分别以过滤海水稀释,并用生物计数皿和血球计数板在显微镜下定量至 1.0×10^7 ind·mL⁻¹和 5.0×10^4 ind·mL⁻¹。

人工雌核发育二倍体的诱导 取稀释精液3 mL,置于直径为9 cm的亲水塑料培养皿中,轻微振荡使之平铺于培养皿底部。参照赵峰等^[13]方法,将精液放在辐射强度为 $800 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}$ 的紫外线下照射50 s。照射后的精液立即加入盛有30 mL卵液的大烧杯中,用玻璃棒搅拌均匀并稀释至200 mL。受精卵在水温20℃的黑暗条件下培养。授精后30~40 min,显微镜下观察到20%~30%卵子排出第一极体时,向处理组中施加6-DMAP至终浓度为 $60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,持续处理20 min。处理结束后用500目筛绢过滤,洗卵3~4次,最终移入1 000 mL清洁的过滤海水中培养。设正常发育二倍体对照组。

受精卵早期发育过程的细胞学观察 授精后0~60 min,从正常发育和处理组中每隔5 min取样一次;60~180 min,每隔10 min取样一次。样品置于Bouin氏液中固定,待沉降稳定后,更换固定液两次。固定5 h后,移入70%酒精中,放于4℃冰箱保存备用。切片前,将样品用梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,LeicaRM2145型切片连续切片,厚度约5 μm。H.E染色,中性树胶封片,Nikon显微镜油镜下(10×100)观察并拍照。

2 结果

2.1 正常发育卵子的核行为特征

从精子入卵到第二次卵裂结束,栉孔扇贝卵内核相发生了一系列明显变化。为了便于研究,将此过程分为以下9个时期:

时期0 未受精卵。栉孔扇贝的成熟卵子

处于第一次成熟分裂中期,深蓝色的双价染色体粗短鲜明,在纺锤丝的牵引下整齐地排列于赤道板中央。纺锤体清晰可见,一端靠近卵子动物极的质膜。卵质均匀,含量丰富的卵黄颗粒被染成红色(图版 I-1)。

时期 1 精子附着及入卵。精卵混合后,精子头部迅速附着于卵子表面,诱发顶体反应,继而精子黑色的锥形头部进入胞质,并轻微膨胀成球形(图版 I-2)。

时期 2 第一次成熟分裂后期及第一极体形成。精子入卵后成熟分裂重新启动,排列于赤道板上的卵细胞染色体在纺锤丝的牵拉下,同源染色体分开,靠质膜一端的那组染色体逐渐向卵膜外拱,到分裂后期凝聚成团块,排出卵膜,形成第一极体。留于卵内的另一组染色体,由纺锤丝牵引重新排列于赤道板上,形成第二次成熟分裂的中期分裂相(图版 I-3~5)。

时期 3 第二次成熟分裂后期及第二极体形成。与第一次成熟分裂相似,在第一极体正下方发生第二次成熟分裂,姐妹染色单体分离产生第二极体。但此次分裂经历时间短,纺锤体细短。有些第一极体有分裂现象(图版 I-6~7)。

时期 4 雌、雄原核的形成、靠近与融合。第二次成熟分裂完成之后,精核迅速膨胀,染色质丝弥散,着色较卵黄浅,光镜下呈一浅蓝色透亮空泡,标志着雄原核的形成;继而,卵核膨大扩散,形成大小、形状相似的雌原核。此时,两原核均达到最大体积。从所处位置可以确认,靠极体的为雌原核。随后,两原核彼此吸引,在卵中轴线上靠近,核膜逐渐融合,两组染色体以融合的方式形成一个具有双倍染色体的合子核(图版 I-8,9)。

时期 5 第一次卵裂的前期、中期、后期。合子核内的染色体经过复制,开始进行有丝分裂。在前期,核膜逐渐消失,染色体细丝发生螺旋化,缩短变粗,清晰可见。分裂中期,形成的纺锤体与卵中轴垂直,染色体整齐地排列于纺锤体的赤道板上,染色体分离行将开始。分裂后期,纺锤丝将染色体拉向两极,移动方向与卵轴垂直,随着染色体移动,卵质发生流动,植物极凸起形成极叶(图版 I-10~12)。

时期 6 2 细胞期。核分裂结束后,从极体处出现卵裂沟,开始进行胞质分裂。当卵裂沟抵达植物极,胞质分裂完成,受精卵被卵裂沟分成两

个大小不等的子细胞,同时极叶收缩。接着,染色体变为染色质,有丝分裂所需的 RNA 与蛋白质、DNA 相继复制合成,为下一次卵裂奠定物质基础(图版 I-13)。

时期 7 第二次卵裂的前期和中期。与第一次卵裂过程相同,两卵裂球中的染色体重新出现,并逐渐排列于纺锤体中央的赤道板上,核分裂即将进行(图版 I-14~15)。

时期 8 4 细胞期。胞质分裂结束,第二卵裂沟出现,与第一次分裂的卵裂沟几乎垂直,第二次卵裂完成,形成 4 个分裂球(图版 I-16)。

另外,我们在正常发育卵中发现了多精入卵现象(图版 I-17),并看到多个精核都能发生原核化(图版 I-18),甚至多个原核靠近融合(图版 I-19)。在染色体分离时,也观察到多极分离,多组纺锤体清晰可见(图版 I-20)。

2.2 6-DMAP 第二极体抑制型雌核发育二倍体卵子的核行为特征

成熟分裂及原核形成期的核行为 切片结果显示,雌核发育卵子第一次成熟分裂的核相与正常发育卵的核相比并无明显差别。虽然精子经紫外线照射后受精率明显下降,但入卵精子同样启动成熟分裂,形成和排出第一极体,精核也能轻微膨胀(图版 II-1~4)。授精后 35~40 min,受精卵处于第一次成熟分裂末期到第二次成熟分裂后期(图版 II-4~6)时,施加 6-DMAP 处理 20 min,纺锤丝遭到明显破坏,第二次成熟分裂被抑制。到原核形成期,二倍性雌核未分离(图版 II-7),或发生分离(图版 II-8)而不能排出卵外最终融合。此时,精核变化也很复杂,有些一直处于凝缩状态(图版 II-8a),有些发生一定程度膨胀(图版 II-8b),可能还有的形成了雄原核,这与紫外线照射不匀有关。这些精核的共同特征是都能向雌原核靠近,但并不融合。

两次卵裂过程中的核行为 雌原核与精核向卵轴中央相向迁移,最终靠拢在一起。到第一次卵裂后期,由雌核形成的染色体在纺锤丝的牵拉下向两极移动,而精核则以致密的染色质体(dense chromatin body, DCB)形式滞留于两组母本染色体之间(图版 II-9)。卵裂末期,精核多数位于两卵裂球之间的卵裂沟上(图版 II-10,11),也有些进入其中一个卵裂球的细胞质中,紧靠卵裂沟(图版 II-12)。有些精核在卵裂沟上还能发生

轻微解凝,部分变成疏松染色质(图版Ⅱ-11)。第二次卵裂过程中,精核的位置与第一次卵裂基本相同(图版Ⅱ-13,14)。在雌核分裂的同时,有些精核变得狭长向两极伸展(图版Ⅱ-9~11),表明它与纺锤丝之间可能有一定联系。

3 讨论

3.1 研究方法的探讨

对贝类受精及早期胚胎发育的细胞学观察已有许多研究者涉足,所用手段主要有普通光镜、荧光显微镜和电子显微镜。普通光镜以其操作简便、费用低廉、染色和固定方法多样等优点而得以广泛应用,如沈亦平等^[14,15]对合浦珠母贝、近江牡蛎不同发育时期的受精卵用 Carnoy 氏液固定,醋酸-地衣红染色,直接封片观察其受精细胞学过程;任素莲等^[16,17]以 Carnoy 氏液固定,铁-苏木精染色和 45% 醋酸分色,对太平洋牡蛎、栉孔扇贝的受精过程进行了详细观察;Li 等^[12]采用 Bouin 氏液固定、石蜡包埋、切片, H. E 染色,对太平洋鲍正常发育和雌核发育卵的核行为进行了观察和对比。荧光显微观察法,是用荧光染料(如 DAPI, Hoechst)对受精卵的染色体(或染色质)进行染色,在紫外光下直接观察其行为变化,用此方法已对侏儒蛤^[18]、紫贻贝^[6]、太平洋牡蛎^[10]、栉孔扇贝^[9, 19, 20]等正常发育、雌核发育及三倍体的核相变化进行了研究。扫描和透射电镜则以其高分辨率而分别用于观察贝类精、卵外部形态和内部精细结构的变化^[11,21]。

实际上,用常规组织切片法在光镜下进行鱼类受精细胞学研究由来已久,用于雌核发育的研究也有不少报道^[22-24]。然而,在贝类受精细胞学研究中仅见 Li 等^[12]及周丽青等^[25]进行过尝试。本研究参照周丽青等^[25]的组织切片法,在光镜下清楚地观察到了受精卵外部形态和内部结构的变化,尤其是纺锤体的消长和合子核形成时的核膜融合,这使该方法具有不同于电镜和荧光显微镜的独特优势,其结果证实和补充了杨爱国等^[19]、董迎辉等^[26]的栉孔扇贝正常发育、雌核发育的荧光显微镜观察。然而,由于方法的局限,我们的观察只能进行到第二次卵裂之前,对于胚胎发育的进一步研究还需探索新方法。

3.2 正常发育和雌核发育核相之异同

从切片结果来看,正常发育卵子的受精过程

与杨爱国等^[19]、任素莲等^[17]的描述基本相同。而人工诱导雌核发育二倍体因为经过了精子遗传失活和卵子染色体二倍体化的双重处理,精核和卵核行为均有明显变化。观察发现,紫外线照射精子在卵内至少存在两种情况:(1)精核只在刚入卵时发生轻微膨胀,以后保持固缩状态,并不膨大形成雄原核,这与俞豪祥^[22]描述的异源精子进入银鲫卵子诱导雌核发育的行为相似;(2)精核在第二次成熟分裂之后,再次去浓缩膨胀,但其体积并未达到正常雄原核的大小。产生这种现象,可能是精子在遗传失活过程中受紫外线照射程度不同所致,而在正常两性融合生殖中,雄原核的形成是卵内物质对精核调节作用的结果,这种调节作用与精核核蛋白关系密切^[27]。故可推测,精子经紫外线处理后,不仅核 DNA 被破坏,核蛋白等成分也遭到不同程度的损伤。精子入卵后,卵内诱导精核发育成雄原核的因子对精核不起作用或作用不大,造成精核解凝程度不同、大小不一。当然,有些精核的 DNA 没有完全失活,部分片断随机参入卵子染色体中也是在所难免的,图版Ⅱ-11 中的精核能再次部分解凝也正说明了这一点。

关于精核在雌核发育卵子中的最终归宿和作用,一直是众多研究者追踪的焦点问题,然而,限于方法的原因,此次只能对二细胞前的精核行为进行研究,此次实验也仅能观察到四细胞期的胚胎。研究表明,无论在第一还是第二次卵裂过程中,精核多以致密的染色质体(DCB)状态存在,不能形成染色体而参与有丝分裂,到二、四细胞期 DCB 滞留于两卵裂球的分裂沟上或进入其一的细胞质中。此结果与其他贝类雌核发育^[4,6,10,12]两细胞时 DCB 的位置相似。Pan 等^[9]认为,DCB 会影响栉孔扇贝受精卵第一次有丝分裂的正常进行,但作者用组织切片法观察到正常四细胞的雌核发育胚胎,并用荧光显微镜观察结果加以佐证^[26],这表明 DCB 至少对部分胚胎第二次有丝分裂没有影响。

受精卵经 6-DMAP 处理后,纺锤体因微管蛋白解聚而被破坏,第二次成熟分裂受到有效抑制。从此期的切片来看,雌核发育卵大致呈现 2 种核相:(1)1 个未分离的二倍性雌原核和 1 个精核;(2)2 个分离的单倍性雌原核和 1 个精核。这表明在 6-DMAP 处理前受精卵的发育速度不一致,多在第一次成熟分裂末期到第二次成熟分裂后期,

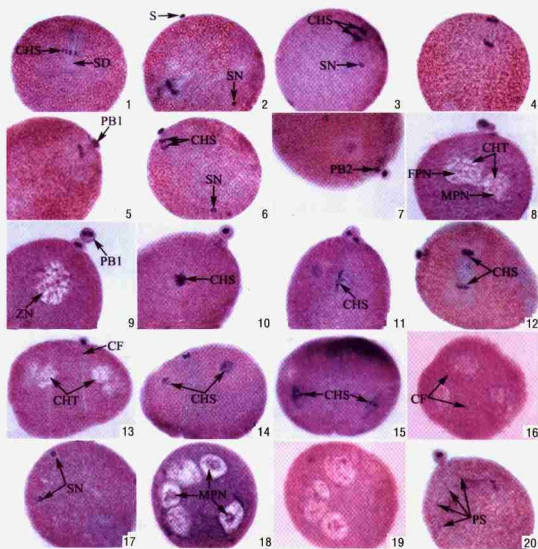
当然有些发育快而排出第二极体的将不能发育成雌核发育二倍体。所以,欲提高雌核发育二倍体的诱导率,一方面要获得大量同步发育的受精卵,另一方面应准确把握适当的加倍时间。

3.3 多精入卵及多极分离

多精入卵(polyspermy)在一些软骨鱼类、两栖类、鸟类、昆虫类和软体动物中被认为是正常现象,最终由一个精子发育成的雄原核与雌原核融合而起到真正的受精作用。然而,对大多数动物来说,多精入卵往往导致早期胚胎死亡。在贝类中,已见近江牡蛎^[15]、太平洋牡蛎^[16]、栉孔扇贝^[17,19]等有过多精入卵的报道,但关于这些受精卵的进一步发育尚无深入研究,一般认为这些胚胎因染色体分离紊乱而最终死亡。所以,许多动物都有一套完整的阻断多精入卵的机制。例如,鱼类靠卵膜上的受精孔控制精子入卵;海胆的卵子则能在精子入卵后,细胞膜去极化快速阻断多精入卵^[28]。然而,关于贝类卵子保证单精入卵的机理尚不清楚。沈亦平等^[15]在近江牡蛎的受精生物学研究中发现,精卵刚混合时大量精子附着于卵子表面,精子入卵后,卵上的精子数就大大减少。本试验中也发现同样的现象,这可能是精子入卵启动某种机制,使未入卵精子溶化或脱落。另外,作者还发现在雌核发育受精卵中多精入卵现象略有增加,这可能是精子比例加大的缘故,也可能是照射精子入卵后抑制多精受精的反应不太强烈所致。关于多精入卵受精卵的发育,我们观察到了多个精核解凝形成雄原核,且能与雌原核靠近融合,在染色体分离时也发现了多极分离现象,这与任素莲等^[17]的报道一致,但胚胎的进一步发育本实验未作重点研究。

参考文献:

- [1] Purdom C E. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes[J]. Aquac, 1983, 33: 287-300.
- [2] 潘英,李琪,王如才,等. 海洋贝类雌核发育研究进展和展望[J]. 水产学报, 2002, 26(5): 465-471.
- [3] Fujino K, Arai K, Iwadare K, et al. Induction of gynogenetic diploid by inhibiting 2nd meiosis in the Pacific abalone[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1990, 56: 1755-1763.
- [4] Guo X, Hershberger W K, Cooper K, et al. Artificial gynogenesis with ultraviolet light irradiated sperm in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* I. Induction and survival[J]. 1993, 113: 201-214.
- [5] Scarpa J, Komaru A, Wada K T. Gynogenetic induction in the mussel, *Mytilus galloprovincialis* [J]. Bull Natl Res Inst Aquac, 1994, 23: 33-41.
- [6] 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.
- [7] Scarpa J, Bolton E T. Experimental production of gynogenetic and parthenogenetic *Mulinia lateralis* (Say) [J]. Shellfish Res, 1988, 7: 132 (Abstract).
- [8] 许国强,林岳光,李刚,等. 人工诱导合浦珠母贝雌核二倍体发生及“Hertwig”效应的初步研究[J]. 热带海洋, 1990, 9(2): 1-7.
- [9] Pan Y, Li Q, Yu R H, et al. Induction of gynogenetic diploids and cytological studies in the zhikong scallop, *Chlamys farreri* [J]. Aquat Living Resour, 2004, 17: 201-206.
- [10] Li Q, Osada M, Kashihara M, et al. Cytological observations on nuclear behavior in normal and gynogenesis eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Suisanzoshoku, 2000, 48(2): 193-198.
- [11] 赵峰,杨爱国,刘志鸿,等. 诱导栉孔扇贝时精子入卵的扫描电镜观察[J]. 中国水产科学, 2004, 11(4): 281-285.
- [12] Li Q, Makoto Osada, Masaru Kashihara, et al. Cytological studies on artificially induced gynogenesis in the Pacific abalone [J]. Fisheries Science, 2000, 66: 701-707.
- [13] 赵峰,杨爱国,刘志鸿,等. 紫外辐射对栉孔扇贝精子遗传失活及形态结构的影响[J]. 海洋水产研究, 2003, 24(4): 26-31.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 任素莲,王德秀,绳秀珍,等. 栉孔扇贝受精过程的细胞学观察[J]. 海洋湖沼通报, 2000, (1): 24-29.
- [18] Longo F J, Scarpa J. Expansion of sperm nucleus and association of the maternal and paternal genomes in fertilized *Mulinia lateralis* eggs [J]. Biol Bull, 1991, 180: 56-65.
- [19] 杨爱国,王清印,孔杰. 栉孔扇贝受精卵成熟分裂的细胞学观察[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3): 96-98.
- [20] 杨爱国,王清印,孔杰,等. 6-甲氨基嘌呤诱导栉孔扇贝三倍体的细胞学机理[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(1): 22-26.
- [21] 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.
- [22] 俞豪祥. 银鲫雌核发育的细胞学观察[J]. 水生生物学集刊, 1982, 7(4): 481-487.
- [23] 葛伟,单仕新,蒋一珪. 雌核发育银鲫的受精生物学研究-天然雌核发育银鲫繁殖方式的讨论[J]. 水生生物学报, 1992, 16(2): 97-100.
- [24] 杨睿姣,张轩杰. 彭泽雌核发育的细胞学研究[J]. 水产学报, 2004, 28(1): 1-7.
- [25] 周丽青,杨爱国,刘志鸿,等. 栉孔扇贝(♀) × 虹蜆扇贝(♂)受精细胞学观察[J]. 动物学杂志, 2003, 38(4): 20-23.
- [26] 董迎辉,杨爱国,任建峰,等. 6-DMAP诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体的细胞学观察[J]. 高技术通讯, 2004, 14(增刊): 4-9.
- [27] Brown D B. Chromatin decondensation and DNA synthesis in human sperm activated *in vitro* by using *Xenopus laevis* egg extracts [J]. J Exp Zool, 1987, 242: 215-231.
- [28] 桂建芳,易梅生. 发育生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2002.



图版 I 栉孔扇贝正常发育卵子的核行为变化

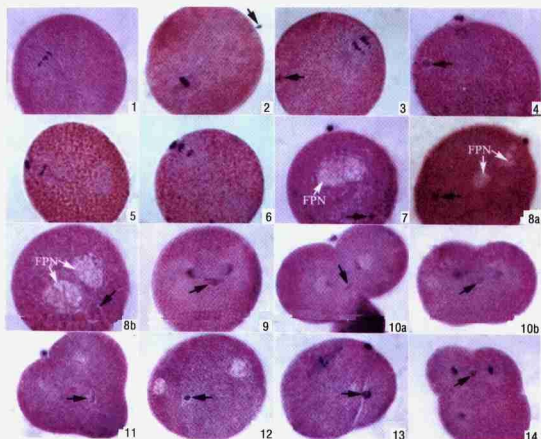
Plate I Nuclear behavior of *Chlamys farreri* eggs in normal development group

1. 未受精的成熟卵子; 2. 精子附着及入卵精子; 3-4. 第一次成熟分裂后期; 5. 第一极体排出; 6. 第二次成熟分裂后期; 7. 第二极体排出; 8. 雌、雄原核的形成; 9. 雌、雄原核融合成合子核; 10-12. 第一次卵裂的前期、中期、后期; 13. 2细胞期; 14-15. 第二次卵裂的前期、中期; 16. 4细胞期; 17-19. 多精入卵之精子进入、精核原核化和多核融合; 20. 多极纺锤体形成。(×1000)

CF: 卵裂沟; CHS: 染色体; CHT: 染色质; FPN: 雌性原核; MPN: 雄性原核; PB: 极体; PB1: 第一极体; PB2: 第二极体; PSD: 多极纺锤体; S: 精子; SD: 纺锤体; SN: 精核; ZN: 合子核

1. Unfertilized mature egg; 2. Sperm attaching to the egg and penetrated sperm in egg; 3, 4. Anaphase of the first meiosis; 5. Release of the first polar body; 6. Anaphase of the second meiosis; 7. Release of the second polar body; 8. Formation of the female pronucleus and male pronucleus; 9. The female and male pronuclei fused into zygotonucleus; 10-12. Prophase, metaphase and anaphase of the first cleavage; 13. 2-cell stage; 14, 15. Prophase and metaphase of the second cleavage; 16. 4-cell stage; 17-19. Polysperm, many of male pronuclei formed and fused; 20. Polyspindles formed. (×1000)

CF: The cleavage furrow; CHS: Chromosome; CHT: Chromatin; FPN: Female pronucleus; MPN: Male pronucleus; PB: Polar body; PB1: The first polar body; PB2: The second polar body; PSD: Polyspindle; S: Sperm; SD: Spindle; SN: Sperm nucleus; ZN: Zygotonucleus



图版 II 栉孔扇贝第二极体抑制型雌核发育二倍体卵的核行为

Plate II Nuclear behavior of *Chlamys farveri* eggs in the 6-DMAP-treated G2N group

1. 未受精的成熟卵子; 2. 精子附卵; 3. 第一次成熟分裂后期; 4. 第一极体排出; 5. 第二次成熟分裂中期; 6. 第二次成熟分裂后期; 7. 二倍性雌核和精核; 8 a-b. 抑制极体后形成的两个单倍性雌核和精核; 9. 第一次卵裂后期(精核位于两组分开的母本染色体之间); 10 a-b. 第一次卵裂末期(精核位于卵裂沟上); 11. 第一次卵裂末期(精核部分变为染色质); 12. 2细胞期纵切(精核进入一个卵裂球中); 13. 第二次卵裂中期(精核位于卵裂沟上); 14. 4细胞期(精核位于卵裂沟上)
FPN: 雌性原核; 黑色箭头指示精子或精核(×1000)

1. Unfertilized mature egg; 2. Sperm attaching to the egg; 3. Anaphase of the first meiosis; 4. Release of the first polar body; 5. Metaphase of the second meiosis; 6. Anaphase of the second meiosis; 7. Big diploid female pronucleus and sperm nucleus; 8a, 8b. Two haploid female pronucleus and sperm nucleus; 9. Anaphase of the first cleavage (sperm nucleus between the separated maternal chromosomes); 10a-b. Telophase of the first cleavage (sperm nucleus on the cleavage furrow); 11. Telophase of the first cleavage (sperm nucleus becomes partly into chromatin); 12. Longitudinal section at 2-cell stage (sperm nucleus in the one blastomere near the cleavage furrow); 13. Metaphase of the second cleavage (sperm nucleus on the cleavage furrow); 14. 4-cell stage (sperm nucleus on the cleavage furrow).
FPN: Female pronucleus. Black arrows indicate the sperm or sperm nucleus. (×1000)