

不同地理群体魁蚶杂交受精过程的荧光观察

吴彪^{1,2} 于涛³ 杨爱国^{1*} 刘志鸿¹ 周丽青¹

(¹ 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市渔业技术推广站 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(² 中国海洋大学海洋生命学院, 266100)

(³ 中国水产科学研究院长岛增殖实验站, 265800)

摘 要 以韩国统营海区的雌性魁蚶为母本、中国长岛海区雄性魁蚶为父本进行人工授精, 运用 Hoechst 33258 染色、荧光显微观察方法研究了两群体魁蚶杂交受精及早期胚胎发育过程, 并统计了受精率和胚胎发育畸形率。结果表明, 中国魁蚶的精子能够顺利进入韩国魁蚶卵细胞, 并激活成熟分裂活动, 随后卵细胞相继排放出两个极体, 之后雌、雄原核形成, 两原核相互靠近并完成联合形成合子, 启动有丝分裂开始胚胎早期发育, 胚胎能够顺利发育至 D 形幼虫; 受精率为 92%, 胚胎畸形率为 23.5%, 相对较高的畸形率可能由于多精入卵导致染色体分离紊乱所致。

关键词 魁蚶 杂交 受精过程 荧光观察

中图分类号 S968.3 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2013)05-0064-05

Cytological observations on fertilization of *Scapharca broughtonii* from China and Korea

WU Biao^{1,2} YU Tao³ YANG Ai-guo^{1*} LIU Zhi-hong¹ ZHOU Li-qing¹

(¹ Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Fisheries Technology Extension Station, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, 266071)

(² College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266100)

(³ Changdao Enhancement and Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, 265800)

ABSTRACT This paper mainly reports the study on hybridization ($K \text{♀} \times C \text{♂}$) of two different geographic populations of *Scapharca broughtonii* from Korea (K) and China (C). Microscopic observations on the fertilization and early embryonic development stained by fluorescent dyes Hoechst 33258 were done by fluorescence microscope. The fertility rate and embryonic malformation rate were counted respectively. The result showed that the sperm could smoothly enter the eggs and activate meiotic division, then the male and female pronucleus formed after two polar body were released in succession. The two pronuclei then moved to each other to fuse into the zygote, which subsequently started the mitosis and early embryonic development. Most embryos developed into D-larvae successfully. The fertility rate and embryonic malformation

山东省科技攻关项目(2010GHY10513)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2012A0406)共同资助

* 通讯作者。E-mail: yangag@ysfri. ac. cn, Tel: (0532)85811982

收稿日期: 2012-09-22; 接受日期: 2012-12-12

作者简介: 吴彪(1982-), 男, 助理研究员, 主要从事水产动物遗传育种方向的研究。E-mail: wubiao@ysfri. ac. cn, Tel: (0532)85811982

rate were 92% and 23.5% respectively. The relative high malformation rate was probably attributed to polyspermy which disrupted the chromosome separation.

KEY WORDS *Scapharca broughtonii* Hybridization Fertilization process
Fluorescent observation

魁蚶 *Scapharca broughtonii* 是一种冷水性的大型蚶类,又被人们称为赤贝、血贝、大毛蛤等,广泛分布于日本北海道以南、朝鲜、菲律宾、俄罗斯南部等沿海,在我国主要分布于黄海和渤海海域,其中山东、辽宁及河北是其主要产区(刘世禄等 2005)。魁蚶因其个体大、出柱率高,而且营养丰富,不管是生吃还是熟吃都具有较好的味道,所以在很多地方深受人们喜爱,是我国出口创汇的优势贝类之一。但由于魁蚶在国内外市场上的畅销,自 20 世纪末开始,人们对其捕捞力度过大,致使我国魁蚶资源量大幅减少、种质质量严重下降。近些年来,恢复并保护我国魁蚶资源、改良种质质量等工作受到越来越多渔政及科研单位的重视,相关研究也再次兴起。

杂交是进行动植物种质改良的重要有效手段之一。近些年,国内许多单位特别是山东、河北等地的一些育苗企业引进了韩国魁蚶并开展了苗种繁育和养殖方面工作的尝试和探讨(王廷贵等 2012)。生产实践中发现韩国魁蚶一旦适应了当地的水质条件,在生长速度等方面较国内魁蚶会具有一定的优势。吴 彪等(2010)对韩国统营和中国江苏的两个群体魁蚶进行了外形对体质量影响等方面的研究,梁 超等(2010、2011)也对 1 个韩国魁蚶群体和 3 个中国魁蚶群体的形态及遗传特性进行了分析,研究结果表明,韩国魁蚶与中国魁蚶在外形上有一定的差异,遗传距离相对于国内群体之间的遗传距离要大,所以将这两魁蚶群体杂交有可能产生可以利用的杂种优势。为此,要确定两群体魁蚶能否产生杂种优势,能顺利完成受精过程并进行早期胚胎发育是基本前提。

利用显微观察技术对受精过程中双亲遗传物质形态变化过程进行跟踪,能够有效判定受精成功与否。贝类受精生物过程的研究已经在多种贝类中开展,如扇贝(任素莲等 2000)、牡蛎(任素莲等 1999;沈亦平等 1995)、蛤(Hylander *et al.* 1977)等。有关贝类杂交受精过程的观察和描述也有较多报道,主要有虾夷扇贝 *Patinopecten yessoensis* 与栉孔扇贝 *Chlamys farreri* (杨爱国等 2002)、栉孔扇贝与长牡蛎 *Crassostrea gigas* (任建峰等 2005)、栉孔扇贝与华贵栉孔扇贝 *Chlamys nobilis* (毕 克等 2005)、泥蚶 *Tegillarca granosa* 与毛蚶 *Scapharca subcrenata* (朱东丽等 2010)、岩牡蛎 *Crassostrea nippona* 与长牡蛎(滕爽爽等 2009)以及杂色鲍 *Haliotis diversicolor* 与盘鲍 *Haliotis discus discus* (蔡明夷等 2007)等几个种类。为了明确韩国魁蚶与中国魁蚶进行人工杂交育种的可行性,本研究运用荧光显微观察技术研究了中国魁蚶(♂)×韩国魁蚶(♀)的受精生物学过程及早期的胚胎发育,为开展魁蚶种质改良工作提供了参考资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

魁蚶父本来自于中国长岛海区,母本来自于韩国统营。从中选用 20 只韩国魁蚶、10 只中国魁蚶用于本研究,壳长为 8.74 ± 0.56 cm。杂交实验在 2012 年 7 月进行。荧光染色试剂盒 HOECHST 33258 从江苏碧云天生物技术研究所购买。

1.2 方 法

1.2.1 亲贝促熟与授精

亲贝运至长岛后,先在长岛海区暂养 30d 以适应当地的海水环境。6 月初,将亲贝从海区转移至室内进行升温促熟,选用性成熟的雌性韩国魁蚶和雄性中国魁蚶作为亲本进行杂交。亲贝阴干 30 min 后,分别置于比暂养水温高 2℃的水桶内,待排放精卵后,将其移至备用的容量为 100L 的水桶中使其充分产卵排精,以适当比例将精卵混合使其受精,显微镜镜检 1 个卵子周围 5 个精子左右为宜。受精卵在温度 23.5℃的海水中进行孵化。

1.2.2 固定及荧光染色

授精后 0~100 min,每隔 5 min 取样 1 次;授精后 100~200 min,每隔 10 min 取样 1 次。取样时,用筛绢过滤掉多余的海水后将样品转入 10 ml 的离心管中,然后缓缓加入用 0.1 mol/L PBS(pH 7.4)配制的 4%多聚甲醛溶液固定,隔 10min 更换 1 次固定液,更换两次后,4 ℃ 下保存备用。染色时,吸取部分样品至 1.5 ml 离心管,用 0.1 mol/L PBS(pH 7.4)洗 2~3 次后,Hoechst 33258 荧光染料在黑暗环境下染色 15 min,再用 PBS 冲洗 2~3 次将未着色的染料冲干净,然后将卵液滴于载玻片上,加 1 滴抗淬灭剂,盖上盖玻片,在 Leica DM4000B 荧光显微镜下观察拍照。

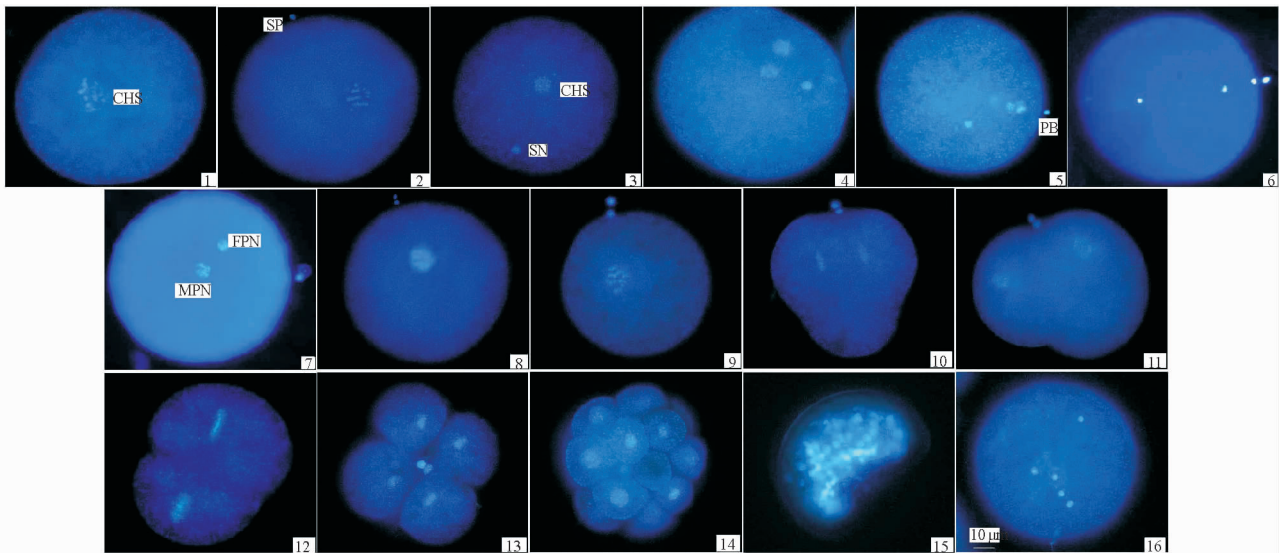
1.2.3 统计受精率、胚胎畸形率

随机选取样品中 100 个以上卵子和胚胎,重复 3 次取样,统计卵子受精率和胚胎畸形率。

2 结果与分析

运用荧光显微镜成功观察到被 Hoechst 33258 染色的中国魁蚶与韩国魁蚶杂交受精过程中的核物质的迁移变化,可以顺利进行精卵识别、精子入卵、成熟分裂、形成合子核、细胞分裂及早期胚胎发育等过程。

荧光显微镜下,魁蚶未受精的成熟卵细胞大多呈圆球形,极少数为不规则的圆球形,卵径约 60 μ m 左右,核物质被染成亮蓝色且具有明显的染色体形态,有的染色体已被纺锤体牵引至赤道,排在同一平面上,核物质的整体位置不是位于卵细胞中央而是稍靠近细胞边端,处于第一次成熟分裂中期(图版-1)。



图版

Explanation of Plate

1. 成熟的未受精卵;2. 精子附卵;3. 精子入卵;4. 第一次成熟分裂后期;5. 释放第一极体;6. 释放第二极体;7. 雌、雄原核形成;8. 合子核形成;9. 第一次卵裂前期;10、11. 第一次卵裂后期;12. 第二次卵裂前期;13. 四细胞期;14. 多细胞期;15. D 形幼虫期;16. 多精入卵

CHS:染色体;SP:精子;SN:精核;PB:极体;FPN:雌性原核;MPN:雄性原核

1. Unfertilized mature egg;2. Sperm attaching to the egg;3. Sperm penetrated into the egg;4. Anaphase of the first meiosis;5. Release of the first polar body;6. Release of the second polar body;7. Formation of the female pronucleus and male pronucleus;8. Female and male pronuclei fused into zygote nucleus;9. Prophase of the first cleavage;10, 11. Anaphase of the first cleavage;12. Prophase of the second cleavage;13. 4-cell stage;14. Multicellular stage;15. D-larvae;16. Several sperms penetrated into one egg

CHS:Chromosome;SP:Sperm;SN:Sperm nucleus;PB:Polar body;FPN:Female pronucleus;MPN:Male pronucleus

授精 10 min 后,游至卵子周围的精子便能与之互相识别,精子附着于卵子表面,与卵膜相互接触诱发顶体

反应,顶体膜与卵膜发生融合(图版-2),精子开始进入卵子。30min后,精子顺利穿过卵黄膜进入卵子,并且第一次轻微膨胀形成精核(图版-3),同时卵母细胞的成熟分裂活动被激活,即将继续进行第一次成熟分裂活动。随后,卵母细胞染色体在纺锤体牵引力下向卵膜方向靠近,并在距离卵表面较近的位置分裂成两个部分(图版-4),靠近卵膜的一部分在纺锤体的牵引下继续向外移动,排出细胞后成为第一极体,这样卵母细胞被分裂成一个次级卵母细胞和一个第一极体。第一极体被排出后,第二次成熟分裂随即启动,留在卵内的另外一组染色体又一分而为二,靠近表面的部分亦随着纺锤体的牵引向第一极体排出的方向移动(图版-5)。授精60min后,这一部分染色体被牵引至卵表面并排出,形成第二极体(图版-6)。至70min后,大部分受精卵排出第二极体,成熟分裂过程基本完成。

此时,最终留在卵内的染色体开始向精子靠近,为后续的发育做准备。在此期间,精核基本没有形态上的变化。卵子完成两次成熟分裂后,染色体迅速分散、膨大,形成形态不规则的雌原核。同时,精核也膨大,形成雄性原核,雄原核直径为15 μm 左右,比雌原核略大(图版-7)。雌、雄原核相互靠近,最终雌雄原核完成融合形成一个合子核,受精过程结束(图版-8)。随着合子核的形成,卵子进入第一次有丝分裂,开始早期胚胎发育。来自父母双亲的染色物质相互融合,致密化形成染色体后重新配对开始有丝分裂(图版-9)。授精75min后,合子染色体向两个方向反向移动,在中间位置受精卵出现明显的卵裂沟,大多数卵裂沟在极体排放处纵向形成(图版-10)。授精80min后,细胞质一分为二,分开的染色体分别进入一个细胞,准备进入第二次有丝分裂(图版-11)。至85min时,染色体再次整齐地排列在赤道,赤道与两细胞切面垂直,开始第二次有丝分裂(图版-12)。90min后,两细胞分裂为大小相同的4个细胞,遗传物质也进入4个细胞中,完成第二次有丝分裂过程(图版-13)。胚胎继续发育,经过多细胞期(图版-14),授精24h后发育至D形幼虫(图版-15)。

杂交受精过程中,发现多精入卵现象(图版-16)。多精入卵往往导致染色物质不平衡分离,致使胚胎畸形发育。随机统计了卵子受精率和胚胎畸形率,分别为92%和23.5%。

3 讨论

杂交能够将具有不同遗传背景的遗传物质进行重新组合,是改良动植物种质的重要手段之一。目前,有关海洋贝类杂交的相关研究也已有很多报道,如牡蛎(滕爽爽等 2009)、扇贝(杨爱国等 2002)、珠母贝(姜卫国等 1983)、鲍鱼(张国范等 2002;蔡明夷等 2007)等,其中已有多个研究成果应用到实际生产中,得到了大规模的推广养殖,取得了良好的效果。有研究表明,在贝类养殖产业中,中国是应用杂交优势解决大问题取得效果最好、得益最多的国家(张国范等 2004)。杂种优势的产生有赖于遗传物质的差异,不同地理种群或者群体的同一物种进行交配也属于杂交范畴,张国范等(2004)提出了这种杂交并利用这种杂交优势的可能性,它与农作物的品系间杂交具有类同性,这为研究贝类群体间杂交奠定了理论基础。研究杂交优势的前提是首先确认杂交的可行性,因为大多数贝类营固着生活或者移动性不强,而幼虫浮游期又比较短暂,地理位置相距较远的群体基因交流机会比较小,所以即便是同一物种间也可能存在生殖隔离现象。中国长岛与韩国统营之间的地理距离相对较远,而且具有一定的地理屏障,两地魁蚶能否受精并正常发育需要实验的验证。本研究运用荧光显微镜观察了这两个不同地理群体魁蚶的受精生物学过程,详细描述了精卵识别、极体排放、雌雄原核融合等过程中遗传物质的形态变化,证实了两群体魁蚶能够顺利完成受精过程并且早期胚胎能够正常发育,这为下一步进行大规模开展魁蚶杂交研究工作奠定了基础。运用荧光显微镜技术观察两群体魁蚶的受精生物过程,结果形象直观、准确可靠,任建峰等(2005)运用该技术证实了长牡蛎精子能够激活栉孔扇贝卵子,并与之受精发育,为它们之间进行远缘杂交,特别是利用异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育的相关研究奠定了坚实基础(吴彪等 2008)。由于本研究选用的亲贝数量有限,杂交后的受精卵和胚胎大多数被固定以用于本研究,所以有关胚胎后期生长发育情况、是否表现出可以利用的杂种优势等还需要进一步扩大规模进行试验性研究。

本研究统计的杂交受精率为92%,胚胎畸形率为23.5%,实验中还发现受精过程中出现了多精入卵现象。虽然由于受到各方面条件的综合影响,贝类受精率也存在差异,但一般而言,在人工控制的育苗条件下,贝类自交受精率都能达到90%以上。本研究所统计的杂交受精率为92%,说明地理隔离没有造成两群体魁蚶生殖隔离,精卵具有较好的互识性,然而胚胎畸形率23.5%却高于正常受精情况。虽然胚胎发育时的外部环境条件

能够引起胚胎发育畸形,但作者认为,本研究中发育畸形的胚胎大部分是由于多精入卵所致。多精入卵现象在贝类受精生物学中十分常见,很多学者报道了这种现象。多精入卵常常会导致染色体分离紊乱,出现不排放极体或者少排放、遗传物质不能均衡分配等情况(任建峰等 2005),所以胚胎发育会出现问题。实验中出现了较高比例的多精入卵现象,说明虽然两群体魁蚶精卵能够互识,但阻止多精入卵的能力相对较弱。

根据受精时成熟卵子的发育阶段可以将动物排出的成熟卵分为四类:第一类,受精发生在初级卵母细胞,如海滨蛤 *Spisula*;第二类,受精发生在第一次成熟分裂中期,如贻贝 *Mytilus*;第三类,受精发生在第二次成熟分裂中期,大多数脊椎动物、文昌鱼等;第四类,受精发生在完成两次成熟分裂之后,如海胆、腔肠动物等。本研究中,核物质被染料染成亮蓝色,魁蚶排放出的成熟未受精卵子核膜已经破裂,染色体形态清晰可见,精子入卵后先后排出两个极体,说明卵处于第一次减数分裂的中期。已有的报道中,大多数贝类受精时卵子处于第一次减数分裂的前期或者中期,谭杰等(2012)发现棘皮动物中的海参排放出的成熟卵子也处在第一次减数分裂中期,证明这种情况在其他海洋无脊椎动物中也可能十分普遍。另外,原核融合与原核联合是动物雌雄原核相结合的两种方式,已有的贝类研究中目前仅发现栉孔扇贝(任素莲等 2000)、鲍(蔡明夷等 2007)属于原核融合类型,泥蚶(孙慧玲等 2000)、太平洋牡蛎(任素莲等 1999)、斧文蛤(董迎辉等 2011)等多种贝类属于原核联合类型。本研究中,两原核核膜消失后相互结合成合子核,没有两核膜的相互融合过程,属于原核联合类型。

本研究利用 Hoechst 33258 染色、荧光显微观察方法,研究了我国魁蚶与韩国魁蚶杂交受精生物学过程,证实了两群体魁蚶可以顺利完成受精过程及早期胚胎发育,为后续的杂交优势及利用等相关研究奠定了基础,对改良魁蚶种质质量具有重要意义。

参 考 文 献

- 王廷贵. 2012. 韩国魁蚶育苗新技术. 河北渔业, 221(5): 27-28
- 孙慧玲, 方建光, 王清印, 张继红, 梁兴明, 燕敬平, 孔杰, 杨爱国, 姜明. 2000. 泥蚶受精过程的细胞学荧光显微观察. 水产学报, 24(2): 104-108
- 刘世禄, 杨爱国. 2005. 中国主要海产贝类健康养殖技术. 北京: 海洋出版社
- 任建峰, 杨爱国, 董迎辉, 刘志鸿, 周丽青. 2005. 栉孔扇贝(♀)×长牡蛎(♂)受精过程的荧光显微观察. 中国水产科学, 12(5): 643-647
- 任素莲, 王德秀, 王如才, 张筱澜. 1999. 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, (1): 34-39
- 任素莲, 王德秀, 绳秀珍, 王如才, 高东阳. 2000. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)受精过程的细胞学观察. 海洋湖沼通报, (1): 24-29
- 朱东丽, 林志华, 董迎辉, 姚韩韩, 柴雪良. 2010. 泥蚶(♀)×毛蚶(♂)受精及胚胎发育过程的初步研究. 渔业科学进展, 31(5): 69-75
- 毕克, 包振民, 黄晓婷, 王珏, 赵洋, 胡景杰. 2005. 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. 中国海洋大学学报(自然科学版), 35(2): 283-286
- 吴彪, 杨爱国, 王清印, 刘志鸿, 周丽青. 2008. 异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体的微管动态变化. 中国水产科学, 15(4): 542-549
- 吴彪, 杨爱国, 刘志鸿, 周丽青, 邱梅, 辛梅, 李靖. 2010. 魁蚶两个不同群体形态性状对体质量的影响效果分析. 渔业科学进展, 31(6): 54-59
- 张国范, 王继红, 赵洪恩, 阙华勇, 刘晓. 2002. 皱纹盘鲍中国群体和日本群体的自交与杂交 F1 的 RAPD 标记. 海洋与湖沼, 33(5): 484-491
- 张国范, 刘晓, 阙华勇, 缪锋. 2004. 贝类杂交及杂种优势理论和技术研究进展. 海洋科学, 28(7): 54-60
- 杨爱国, 王清印, 刘志鸿, 张岩. 2002. 虾夷扇贝×栉孔扇贝人工受精过程的荧光显微观察. 海洋水产研究, 23(3): 1-4
- 沈亦平, 刘汀, 姜海波, 张锡元, 陈晓汉, 叶力, 吴斌. 1995. 近江牡蛎受精细胞学研究. 武汉大学学报(自然科学版), 41(4): 482-486
- 姜卫国, 魏贻尧, 李刚. 1983. 合浦珠母贝、长耳珠母贝和大珠母贝种间人工杂交的研究—II. 受精过程和杂交后代的染色体观察. 热带海洋, 2(4): 316-323
- 梁超, 杨爱国, 刘志鸿, 周丽青, 吴彪. 2010. 魁蚶 4 个地理群体遗传结构的 RAPD 分析. 渔业科学进展, 31(1): 59-64
- 梁超, 杨爱国, 刘志鸿, 周丽青, 吴彪. 2011. 4 个地理群体魁蚶(*Scaapharca broughtonii*)的形态差异与判别分析. 海洋科学, 35(1): 108-113
- 董迎辉, 林志华, 姚韩韩. 2011. 斧文蛤精子超微结构与受精过程的细胞学变化. 水产学报, 35(3): 356-364
- 蔡明夷, 柯才焕, 游伟伟, 王桂忠, 王志勇, 王艺磊. 2007. 杂色鲍♀×盘鲍♂杂交受精的细胞学研究. 厦门大学学报(自然科学版), 46(2): 239-244
- 谭杰, 孙慧玲, 高菲, 燕敬平, 董迎辉, 叶乃好, 王清印. 2012. 刺参受精及早期胚胎发育过程的细胞学观察. 水产学报, 36(2): 272-277
- 滕爽爽, 李琪, 孔令峰. 2009. 岩牡蛎和长牡蛎杂交的受精细胞学观察. 中国海洋大学学报(自然科学版), 39(S1): 338-342
- Hylander BL, Summers RG. 1977. An ultrastructural analysis of the gametes and early fertilization in two bivalves; *Chama macerophylla* and *Spisulla solidissima* with special reference to gamete binding. Cell and Tissue Research 182(4): 469-489