

## 斧文蛤精子超微结构与受精过程的细胞学变化

董迎辉, 林志华\*, 姚韩韩

(浙江万里学院生物与环境学院, 浙江宁波 315100)

**摘要:** 采用电镜和荧光显微镜技术,对斧文蛤精子超微结构与受精过程的细胞学变化进行了系统研究。电镜观察表明,斧文蛤精子为鞭毛型,全长45.2~47.7  $\mu\text{m}$ ,由头部、中段和尾部三部分组成。头部呈稍弯曲的狭茧形,长约2.5  $\mu\text{m}$ ,由顶体和细胞核组成,顶体呈圆锥形,内部中轴处有亚顶体腔;细胞核为长锥形,有核前窝和核后窝。中段由线粒体围绕中心粒复合体构成,5个近球形的线粒体呈单层梅花状排列;中心粒复合体由近端中心粒和远端中心粒组成,远端中心粒延伸出尾部的轴丝。尾部为细丝状鞭毛,内部的轴丝呈典型的“9+2”结构,外周有波浪状质膜包被。用荧光显微镜观察了斧文蛤受精及早期卵裂过程的细胞学变化,结果发现,斧文蛤成熟未受精卵呈圆球形,核相处于第一次成熟分裂中期;在水温27~28  $^{\circ}\text{C}$ 条件下受精,受精后6 min,精子入卵并膨胀成球形;受精后12~15 min、20~25 min 受精卵排出第一、第二极体;30 min 左右,精、卵核膨胀形成雄、雌原核;35 min,两性原核在卵子中央发生染色体联合;40~45 min,受精卵进行第一次卵裂,形成2个大小不等的分裂球;55~60 min,第二次卵裂结束,形成1大3小4个卵裂球,核相变化与第一次卵裂基本相同;75~80 min,第三次卵裂完成,自此次起开始进行螺旋分裂。另外,在斧文蛤受精过程中发现了约1%的多精入卵现象,其对成熟分裂和早期卵裂过程影响很大,常造成成熟分裂紊乱和第一次卵裂染色体分离异常。

**关键词:** 斧文蛤; 精子; 超微结构; 受精; 多精入卵

**中图分类号:** Q 954.4; S 917

**文献标识码:** A

斧文蛤 (*Meretrix lamarkii* Deshayes) 隶属于瓣鳃纲 (Lamellibranchia)、帘蛤目 (Veneroidea)、帘蛤科 (Veneridae)、文蛤属 (*Meretrix*), 为暖水性海产双壳贝类, 主要分布于日本和中国南海, 在我国的广东、海南、广西等省份沿海均有分布, 埋栖于潮下带至水深 20 m 浅海的沙质海底<sup>[1-3]</sup>。由于斧文蛤具有个体大、生长快、味道鲜美等优点, 潜在的养殖开发前景十分广阔。然而, 目前, 斧文蛤人工繁、养殖技术不成熟, 自然资源量稀缺, 且有关斧文蛤生产开发和基础研究的报道均十分匮乏, 仅见潘宝平等<sup>[4]</sup>、CHEN 等<sup>[5]</sup> 利用线粒体 16S rRNA、CO I 基因片段及核糖体 DNA 转录间隔区 (ITS) 进行系统分类的研究, 而对其发育生

物学方面的研究尚未见报道。发育生物学中的受精生物学研究, 是开展人工繁殖和育种工作的基础和保障, 而精子超微结构观察和受精过程的细胞遗传学变化研究是受精生物学的重要内容。近年来, 国内外学者已利用电镜、荧光显微镜、石蜡切片等多种技术手段对贝类的精子结构、受精过程、早期发育等进行了大量的研究<sup>[6-11]</sup>, 为贝类的种类鉴别、生殖进化、受精机理研究及人工育苗、杂交育种实践提供了重要资料。本课题组自 2007 年开始斧文蛤的人工育苗和增殖放流工作, 已在亲贝促熟、人工催产、苗种培育、人工养殖等方面取得了突破性进展。作者在人工育苗中对其精子的超微结构和受精的细胞遗传学过程进行了

收稿日期:2010-11-11 修回日期:2010-12-13

资助项目:国家自然科学基金项目(30972255);国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A410);宁波市科技局农业择优委托项目(2010C10011)

通讯作者:林志华, Tel:0574-88222015, E-mail:zhihua9988@126.com

系统观察,以期为斧文蛤受精机理的深入研究、种质资源保护以及规模化人工育苗提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

斧文蛤亲贝于2009年7月取自浙江温州苍南县自然海区,贝龄2~3年,壳长5~8 cm。暂养在浙江省海洋水产养殖研究所清江科研基地,足量轮换投喂新鲜的小球藻(*Nannochloropsis oculata*)、亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)、叉鞭金藻(*Dicrateria zhanjiangesi*)等单胞藻藻液,以促进其性腺发育成熟。

### 1.2 方法

精子形态结构的透射电镜和扫描电镜观察活体解剖取发育成熟的雄性斧文蛤精巢,剪切成2 mm<sup>3</sup>左右小块,用冷的2.5%戊二醛固定2次,置4℃冰箱中保存。固定样品经0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗,1%锇酸后固定,丙酮系列脱水,Epon 812环氧树脂包埋,LKB-III型超薄切片机切片,切片厚度约50 nm,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,在日立H-7500型透射电镜下观察并拍照。

扫描电镜观察样品是取刚产出的斧文蛤浓密精液,用冷的2.5%戊二醛固定,4℃保存。样品经酒精系列脱水,叔丁醇置换,临界点干燥,离子溅射仪镀金,在日立S-3000N型扫描电镜下观察,CCD拍照。

受精及早期卵裂过程的荧光显微镜观察选择性腺成熟的斧文蛤亲贝,利用阴干、流水刺激的方法催产,分别挑出刚产的雌、雄个体,雄性排精呈烟雾状,雌性产卵为颗粒状。亲贝经淡水冲洗后单个放入1 L的烧杯中,加入800 mL过滤海水,让其产卵、排精。通过镜检挑选质量好的精、卵,在水温27~28℃条件下进行人工授精和培养。

从受精开始,20 min内每隔3分钟取样一次,30~90 min,每隔5分钟取样一次,每次取卵量1 000粒以上。样品用4%多聚甲醛溶液固定2次,保存于4℃冰箱中。观察前用0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.2)冲洗样品2~3次,滴加Hoechst 33258荧光染料(江苏碧云天生物技术研究所在黑暗环境下染色10 min,再用磷酸缓冲液冲洗2次,然后将卵液滴于载玻片上,加1滴抗

淬灭剂,用盖玻片轻微压片,在Nikon 80i荧光显微镜的紫外光下观察,CCD拍照,每个样品观察卵数100粒以上。

以上实验重复3次。

## 2 结果

### 2.1 斧文蛤精子的形态和超微结构

斧文蛤精子属于鞭毛型,由头部、中段和尾部三部分组成,全长45.2~47.7 μm。

精子头部外形呈稍弯曲的狭茧形,长度约2.5 μm,由顶体(acrosome)和细胞核(nucleus)组成(图版I-1~3)。顶体位于头部的最前端,长0.7~0.8 μm,圆锥形,顶部前端明显突出为短柱状。整个顶体电子密度不均匀,前部的顶体突电子密度小,顶体后部稍大。顶体内面中轴处有一圆柱形的亚顶体腔(subacrosomal space)(图版I-4)。顶体后方为长圆柱形细胞核,长约1.7 μm,由后向前逐渐变细,前端直径约0.65 μm,后端直径约1.2 μm,核内含有高度浓缩的染色质,电子密度最高,偶尔有着色浅的、形状不规则的核泡存在(图版I-2,3,5),核前端有核前窝(front nuclear pocket),核后端与近端中心粒相邻的凹陷形成核后窝(posterior nuclear pocket),与线粒体嵌入形成的凹陷为植入窝(implantation pocket)(图版I-4,8)。

中段由核后端的线粒体(mitochondria)和中心粒复合体(centriolar complex)构成。斧文蛤精子有5个近球形或椭圆形的线粒体,呈单层梅花状排列,围绕在中心粒复合体周围(图版I-6)。线粒体直径0.55~0.65 μm,内部为双层膜结构,内膜向腔内折叠成嵴,呈片层状排列,清晰可见(图版I-7)。中心粒复合体由近端中心粒(proximal centriole)和远端中心粒(distal centriole)组成,两中心粒为相互垂直的短筒状结构。近端中心粒位于精子核后端的核后窝内,与精子的长轴方向垂直,远端中心粒紧接于近端中心粒之后,与尾部鞭毛的轴丝相连(图版I-8)。

尾部鞭毛从远端中心粒末端引发出,长度为42.8~45.4 μm(图版I-1,8),横切面呈圆形,直径约0.25 μm,外周包被有小波浪状质膜(plasma membrane),内部的轴丝(axoneme)呈典型的“9+2”结构,鞭毛末端变细,中部轴丝的单体微管逐渐消失(图版I-1,9,10)。

## 2.2 斧文蛤受精及早期卵裂过程的荧光显微观察

**精卵形态和精子入卵** 在荧光显微镜下,斧文蛤成熟未受精卵呈圆球形,卵径 86.9 ~ 95.2  $\mu\text{m}$ , 卵内的双价染色体被 Hoechst 染料染成亮蓝色,粗短鲜明,卵质呈浅蓝色,核相处于第一次成熟分裂中期(图版 II-1)。精子则仅能观察到头部内浓缩的染色质发出亮蓝色荧光(图版 II-2)。

在水温 27 ~ 28  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.0 ~ 8.2 的条件下进行人工授精,控制适宜的精卵比例。精、卵混合后,精子借助尾巴的摆动迅速附着于卵子表面,附着部位随机(图版 II-3)。受精后 6 min,精子的头部已完全进入卵胞质中,并逐渐膨大成直径为 4 ~ 6  $\mu\text{m}$  的近球形结构(图版 II-4 ~ 5)。

**两次成熟分裂** 精子入卵启动卵子的成熟分裂,在受精后 12 ~ 15 min,受精卵进行第一次成熟分裂,同源染色体被分为两组,一组被拉向卵膜,另一组拉向卵子中央(图版 II-6 ~ 7)。靠卵膜的那组染色体逐渐向卵膜外拱,最后经浓缩被排出卵膜之外,形成第一极体,完成第一次成熟分裂(图版 II-8)。受精后 20 ~ 25 min,留于卵内的另一组染色体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 II-9),随后以同样的方式在第一极体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,完成第二次成熟分裂(图版 II-10 ~ 12)。

**雌、雄原核的形成与结合** 两次成熟分裂结束之后,卵子染色体逐渐膨胀扩散,形成一团由核膜包围的、松散的染色质,即为雌原核。与此同时,精核也发生第二次膨胀,形成与雌原核形状相似的雄原核。一般雌原核的位置靠近极体(图版 II-13)。受精后 30 min 左右,多数雌雄原核体积达到最大,呈直径 16  $\mu\text{m}$   $\times$  18  $\mu\text{m}$  的椭圆形结构(图版 II-14)。雌、雄原核形成以后,均向卵子中央迁移,并逐渐靠近(图版 II-15)。随后两原核的核膜破裂,染色质凝缩成两组染色体(图版 II-16 ~ 17)。受精后 35 min,形态鲜明的两组染色体在卵子中央合并,以染色体联合的方式结合(图版 II-18)。

**早期卵裂** 联合核的染色体整齐地排列在与卵轴垂直的纺锤体的赤道板上,形成有丝分裂的中期分裂相,第一次卵裂行将开始(图版 II-19)。受精后 40 ~ 45 min,纺锤丝将染色体拉向

两极(图版 II-20 ~ 21),随着核分裂的进行,卵细胞外形在横向上被拉长,然后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(图版 II-22 ~ 23)。在卵裂过程中,植物极的极叶伸缩不太明显。第一次卵裂结束后,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 II-23)。

受精后 50 min 左右,两个卵裂球中的染色体细丝逐渐螺旋变粗,形成清晰可见的染色体,核膜破裂,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(图版 II-24)。第二次卵裂与第一次卵裂过程基本相同,在与第一次卵裂垂直的纵轴方向上发生不等全裂,其中大卵裂球的染色体分裂速度较快(图版 II-25 ~ 29)。结果在受精后 55 ~ 60 min,卵裂基本结束,形成 3 小 1 大 4 个卵裂球(图版 II-30)。70 min 左右,胚胎开始第三次卵裂,大卵裂球的染色体仍分裂较早(图版 II-31)。75 ~ 80 min,第三次卵裂完成,仍为不等全裂,自此次卵裂起已开始进行螺旋分裂(图版 II-32)。

**多精受精与染色体异常分离** 在受精后 10 ~ 15 min,观察到极少量受精卵有多精入卵(polyspermy)现象(图版 II-33 ~ 34),多精入卵可以引起有些卵子成熟分裂异常,排出 1 个极体或不排极体(图版 II-36,39)。受精后 30 ~ 40 min,入卵精核也都能发生解凝缩膨胀,形成多个雄原核,由于入卵时间的差异造成了精核的原核化速度有所不同(图版 II-35 ~ 36)。在第一次卵裂的核分裂过程中,因多个染色体组不能均等分离而产生异常的多极分离现象(图版 II-37),结果导致早期卵裂的畸形(图版 II-38 ~ 40)。

## 3 讨论

### 3.1 斧文蛤精子超微结构及其所反映的生殖进化特征

贝类精子的形态结构在不同属种之间表现出一定的差异,这为贝类系统分类研究和生殖进化分析提供了重要依据<sup>[7,9]</sup>。已有的研究表明,精子的形态结构特别是顶体结构,在不同目之间差别较大,而同一科内差别较小<sup>[12]</sup>,如帘蛤科的菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、青蛤(*Cyclina sineusis*)、沟纹巴非蛤(*Paphia exarata*)和斧文蛤等精子头部均为长辣椒状或圆锥形,且

精子中部多有一定弧度的弯曲<sup>[13-15]</sup>;贻贝科的紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 和翡翠贻贝 (*Perna viridis*) 精子都为锥形<sup>[6,16]</sup>;蚌科的褶纹冠蚌 (*Cristaria plicata*) 和三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 精子呈子弹头形<sup>[13,17]</sup>。然而,同科不同种贝类的精子在体尺参数、顶体结构、细胞核形状、线粒体数目等方面存在或大或小的差别,如 HODGSON 等<sup>[6]</sup>对 3 种贻贝的精子结构进行了详细比较,认为顶体形态可以作为种间区分的依据;柯才焕等<sup>[8]</sup>根据精子超微结构差别能将同种不同亚种的盘鲍 (*Halotis discus discus*) 和皱纹盘鲍 (*H. discus hannai*) 区分开来;竺俊全等<sup>[9]</sup>利用毛蚶 (*Scapharca subcrenata*)、青蚶 (*Barbatia virescens*) 和泥蚶 (*Tegillarca granosa*) 精子顶体、细胞核及中段等结构上的明显差异来探讨蚶科贝类的进化关系。文蛤属贝类种间划分一直存在较大争议,通过研究和对比我们发现文蛤与斧文蛤精子的顶体形态、精核的核前窝结构存在明显差别,文蛤顶体前端突出为短柱状而斧文蛤顶体前端呈灯泡状,文蛤精核的核前窝不明显而斧文蛤精核的核前窝明显呈浅“V”字形,这些精子超微结构的差别可为其物种鉴别提供有价值的信息。

顶体位于精子的最前端,由高尔基体生发而来,其中包含了与卵细胞结合需要的重要酶类,在精卵识别、结合、顶体反应中发挥着重要作用。大多数双壳贝类精子顶体的外形呈长短宽窄不一的圆锥形或倒“V”字形,顶体结构的复杂程度与精卵结合的难易有关。对于卵膜较薄或卵子具有受精孔的种类如淡水蚌类中的背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana*)、褶纹冠蚌 (*Cristaria plicata*) 和三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*),受精时不需要经过复杂的顶体反应,顶体退化成几个小的顶体囊泡甚至消失<sup>[13,17-18]</sup>;而对于斧文蛤等大多数双壳贝类,卵外被有一层厚的胶膜,卵膜上无专门的受精孔,精子入卵部位随机,故而进化出顶体前端较尖、顶体腔内储存有大量溶解酶的结构与其受精难度相适应。顶体的亚顶体腔中有颗粒状的球状肌动蛋白,其在顶体反应中可聚合成顶体突,引导精核进入卵细胞<sup>[19]</sup>,在海胆的顶体突上有结合蛋白 (bindin),该蛋白具有高度的种间特异性,只能与同物种卵细胞膜上的 bindin 受体结合,保证受精严格的物种特异性<sup>[20]</sup>;而有关双壳贝类精子识别蛋白的研究,仅对长牡蛎

(*Crassostrea gigas*)、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 等贝类的精子膜蛋白进行了分离和初步鉴定<sup>[21-22]</sup>,至于各种蛋白的纯化和功能鉴定还需开展大量的深入研究。

精核是精子的最主要组成部分,精核形状和其特殊结构核前窝、核后窝的有无可以反映出物种间的差别和亲缘关系的远近。双壳贝类精核的形状多为圆筒状或圆柱状,不同种间有些许差别,如菲律宾蛤仔的精核呈前窄后宽的圆锥形<sup>[13]</sup>,青蛤的精核呈稍弯曲的圆柱形<sup>[14]</sup>,西施舌 (*Coelomactra antiquata*)、波纹巴非蛤 (*Paphia undulata*) 的精核近椭圆形<sup>[23-24]</sup>,褶纹冠蚌和三角帆蚌的精核呈子弹头形<sup>[13]</sup>。核前窝是顶体丝突起的结构基础,而核后窝是精子尾部赖以形成的重要基础,这两种结构的有无能影射出种间的亲缘关系<sup>[9]</sup>。扇贝科的栉孔扇贝和虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 的精核都有核前窝和核后窝;蚌科的褶纹冠蚌和三角帆蚌的精核都有核后窝而无核前窝;蚶科的泥蚶和毛蚶的精核只有核后窝、无核前窝,而青蚶精核具有核前窝和核后窝,据此认为泥蚶和毛蚶之间的亲缘关系近于青蚶<sup>[9]</sup>;帘蛤科的菲律宾蛤仔、沟纹巴非蛤、西施舌、斧文蛤的精核具有核前窝和核后窝<sup>[13,15,23]</sup>,而青蛤、硬壳蛤 (*Mercenaria mercenaria*)、波纹巴非蛤的精核无核前窝<sup>[15,24-25]</sup>,但并非前者或后者组内种间亲缘关系近,故单凭核前窝和核后窝的有无难以判别物种间的亲缘关系。

### 3.2 斧文蛤的雌雄原核结合方式和多精入卵现象

贝类雌、雄原核的结合方式有原核融合和原核联合两种。原核融合是指雌、雄原核在结合时核膜相互融合,其内的染色质融为一体后才形成合子染色体组,目前仅发现栉孔扇贝<sup>[27]</sup>、鲍<sup>[28]</sup>等少数贝类属此结合方式。原核联合是指两性原核相互靠拢时核膜相嵌但不融合,随后两原核都形成各自的染色体组,待原核核膜消失后,两组染色体联合起来形成合子染色体组,已知太平洋牡蛎<sup>[28]</sup>、泥蚶<sup>[10]</sup>、菲律宾蛤仔<sup>[29]</sup>、文蛤<sup>[11]</sup>等多种贝类属此类型。本研究用 Hoechst 33258 染色、荧光显微观察方法,对斧文蛤雌、雄原核的结合过程进行了仔细观察,发现雌、雄原核靠近、结合时核膜一直存在,直到两原核都形成各自的染色体组,证明其结合方式为原核联合。有关雌雄原核联合或

融合的机制至今仍不清楚,但大量的实验观察表明,卵内的微管以及精核带入卵内的中心粒在此过程中发挥着重要作用<sup>[30]</sup>。

贝类在正常受精的情况下,大多数卵子为单精入卵、单精受精,精子不仅为卵子带来单倍体的遗传物质保持物种正常二倍体的细胞核,而且还带有有丝分裂所必需的中心粒。然而,多精入卵现象在双壳贝类中普遍存在,在已有报道的几乎所有贝类如近江牡蛎(*Ostrea rivularis*)<sup>[31]</sup>、太平洋牡蛎<sup>[28]</sup>、栉孔扇贝<sup>[32]</sup>、菲律宾蛤仔<sup>[29]</sup>、文蛤<sup>[11]</sup>、宽壳全海笋(*Barnea dilatata*)<sup>[33]</sup>、泥蚶<sup>[34]</sup>等均有多精入卵发生。根据 PARKER 等<sup>[36-37]</sup>的受精动力学理论和其他学者的研究结果<sup>[37-38]</sup>,多精入卵的发生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、Na<sup>+</sup>等诸多环境因素关系密切。在太平洋牡蛎中,用刚从卵巢中取出的卵子受精,可出现大量的多精入卵<sup>[37]</sup>;泥蚶的精卵比例达到 $2 \times 10^2:1$ 以上时,多精入卵比例显著增加<sup>[34]</sup>;近江牡蛎在 25℃ 的低温环境下受精,比 28.8℃ 水温下多精入卵明显增加<sup>[31]</sup>;贻贝在低 Na<sup>+</sup> 海水中受精,易导致较高比例的多精入卵<sup>[38]</sup>。本研究中,作者也毫不例外地在斧文蛤受精卵中观察到极少数(约 1%)多精入卵现象。由于本实验是在适宜的精卵浓度、水温、pH 等条件下进行授精,所以推测这些多精入卵的发生很有可能是个别卵子不够成熟或过熟造成的。有关斧文蛤多精入卵胚胎的进一步发育,我们观察到了多个雄原核的形成和早期卵裂时的染色体异常分离,至于其发育过程的细节以及发育失败的机理还不清楚,尚待后续深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 庄启谦. 中国动物志 - 软体动物门 双壳纲 帘蛤科 [M]. 北京:科学出版社,2001.
- [2] 徐凤山,张素萍. 中国海产双壳类图志[M]. 北京:科学出版社,2008.
- [3] 王如才,王昭萍. 海水贝类养殖学[M]. 青岛:中国海洋大学出版社,2008.
- [4] 潘宝平,吴琪,张素萍,等. 文蛤属(*Meretrix*) 16S rRNA 基因及 ITS1 序列的系统学分析[J]. 海洋与湖沼,2006,37(4):342-347.
- [5] CHEN A H, LI Z X, FENG G N. Phylogenetic relations of the Genus *Meretrix* (Mollusca: Veneridae) based on mitochondrial CO I gene sequences[J]. Zoological Research, 2009, 30(3): 233-239.
- [6] LONGO F J, DOMFELD E J. The fine structure of spermatid differentiation in mussle, *Mytilus edulis* [J]. J Ultrastruct Res, 1976, 20:462-480.
- [7] HODGSON A N, BERNARD R T. Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis of three species of Mytilidae (Mollusca, Bivalvia) [J]. Gamete Res, 1986, 15:123-135.
- [8] 柯才焕,周时强,田越,等. 三种鲍精子超微结构的比较[J]. 海洋学报,2003,25(3):138-142.
- [9] 竺俊全,杨万喜. 毛蚶与青蚶精子超微结构及其所反映的蚶科进化关系[J]. 动物学研究,2004,25(1):57-62.
- [10] 孙慧玲,方建光,王清印,等. 泥蚶受精过程的细胞学荧光显微观察[J]. 水产学报,2000,24(2):104-107.
- [11] 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.
- [12] 邓道贵,谈奇坤. 褶纹冠蚌精子的超微结构研究[J]. 水生生物学报,2001,25(5):481-485.
- [13] 代培芳,饶小珍,陈寅山. 菲律宾蛤仔的精子发生和精子超微结构[J]. 动物学杂志,2004,39(2):26-32.
- [14] 高悦勉,白胡木吉力图,孙静娴. 青蛤精子的超微结构[J]. 水产科学,2007,26(2):95-98.
- [15] 陈寅山,饶小珍,柯佳颖,等. 沟纹巴非蛤精子发生过程的超微结构观察[J]. 海洋科学,2006,30(8):28-33.
- [16] 柯佳颖,饶小珍,陈寅山. 翡翠贻贝精子的超微结构[J]. 动物学杂志,2005,40(2):66-70.
- [17] 郭延平,谈奇坤,陈士超. 三角帆蚌精子的形态及超微结构[J]. 动物学杂志,2002,37(2):10-13.
- [18] 石安静. 背角无齿蚌生殖细胞及钩介幼虫的扫描电镜观察[J]. 动物学杂志,1995,30(1):10-13.
- [19] 焦海峰,尤仲杰,竺俊全. 软体动物精子的超微结构及其分类学意义[J]. 宁波大学学报:理工版,2004,17(4):414-418.
- [20] 樊启昶,白书农. 发育生物学原理[M]. 北京:高等教育出版社,2002:45-47.
- [21] 刘丽燕,杨爱国,王清印,等. 长牡蛎精子膜蛋白的提取及其部分生化性质的研究[J]. 中国水产科学,2007,14(6):889-895.
- [22] 刘丽燕,杨爱国,王清印,等. 栉孔扇贝精子膜蛋白的提取分离及初步鉴定[J]. 海洋水产研究,2008,29(2):73-81.
- [23] 饶小珍,陈寅生,陈文列,等. 西施舌精子发生过程的超微结构观察[J]. 水产学报,2002,26(2):

- 97 - 103.
- [24] 赵志江,李复雪. 波纹巴非蛤精子发生的超微结构[J]. 台湾海峡,1992,11(3):238 - 243.
- [25] YING X P, YANG W X, DAHMS H U, *et al.* Spermatozoa and spermatogenesis in the northern quahaug *Mercenaria mercenaria* (Mollusca, Bivalvia) [J]. *Helgol Mar Res*, 2008, 62:321 - 329.
- [26] 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.
- [27] 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,2007,46(2):239 - 243.
- [28] 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.
- [29] 毕克,包振民,黄晓婷,等. 菲律宾蛤仔受精及早期胚胎发育过程的细胞学观察[J]. 水产学报,2004,28(6):623 - 627.
- [30] 李永仁,阙华勇,张国范. 海水双壳类受精生物学研究进展[J]. 海洋科学,2005,29(4):68 - 72.
- [31] 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,1993,39(5):115 - 120.
- [32] 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.
- [33] 董迎辉,柴雪良,陆荣茂,等. 宽壳全海笋受精和早期胚胎发育过程的细胞学观察[J]. 海洋学报,2009,31(1):125 - 131.
- [34] 姚韩韩,林志华,董迎辉,等. 泥蚶受精和早期卵裂核行为的细胞学观察[J]. 上海海洋大学学报,2010,19(5):668 - 672.
- [35] PARKER G A, BALL M A, STOCKLEY P, *et al.* Sperm competition games; individual assessment of sperm competition intensity by group spawners [J]. *Proc R Soc Lond, B*, 1996, 263:1291 - 1297.
- [36] PARKER G A, BEGON M E. Sperm competition games—sperm size and number under gametic control [J]. *Proc R Soc Lond, B*, 1993, 253:255 - 262.
- [37] STEPHANO J L, GOULD M. Avoiding polyspermy in the oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. *Aquaculture*, 1988, 73:295 - 307.
- [38] TOGO T, OSANAI K, MORISAWA M. Existence of three mechanisms for blocking polyspermy in oocytes of the mussel *Mytilus edulis* [J]. *Biol Bull*, 1995, 189:330 - 339.

## 附:图版 II 说明

1. 成熟未受精卵; 2. 精子; 3. 精子附卵; 4~5. 精子入卵; 6~7. 第一次成熟分裂后期; 8. 第一极体排出; 9. 第二次成熟分裂中期; 10~11. 第二次成熟分裂后期; 12. 第二极体排出; 13~15. 雌、雄原核形成与靠近; 16~17. 雌、雄原核联合; 18~19. 第一次卵裂中期; 20~21. 第一次卵裂后期; 22. 第一次卵裂末期; 23~24. 2 细胞期; 25~27. 第二次卵裂后期; 28~29. 第二次卵裂末期; 30. 4 细胞期; 31. 第三次卵裂后期; 32. 8 细胞期; 33. 双精入卵; 34. 三精入卵; 35~36. 多个原核膨胀; 37~38. 染色体分离紊乱; 39~40. 畸形卵裂。  
CHS. 染色体; CHT. 染色质; FPN. 雌性原核; MPN. 雄性原核; PB1. 第一极体; PB2. 第二极体; SN. 精核; SP. 精子。

## Explanation of Plate II

1. Unfertilized mature egg; 2. Sperm; 3. Sperm attaching to the egg; 4 - 5. Sperm penetrated in egg; 6 - 7. Anaphase of the first maturation division; 8. Release of the first polar body; 9. Metaphase of the second maturation division; 10 - 11. Anaphase of the second maturation division; 12. Release of the second polar body; 13 - 15. Formation and approach of the female and male pronuclei; 16 - 17. Chromosomes association of the female and male pronuclei; 18 - 19. Metaphase of the first cleavage; 20 - 21. Anaphase of the first cleavage; 22. Telophase of the first cleavage; 23 - 24. 2-cell stage; 25 - 27. Anaphase of the second cleavage; 28 - 29. Telophase of the second cleavage; 30. 4-cell stage; 31. Anaphase of the third cleavage; 32. 8-cell stage; 33. Two sperm entry into the egg; 34. Three sperm entry into the egg; 35 - 36. Multi-male pronuclei formed; 37 - 38. Disordered chromosome separation; 39 - 40. Abnormal cleavage.

CHS. chromosome; CHT. chromatin; FPN. female pronucleus; MPN. male pronucleus; PB1. the first polar body; PB2. the second polar body; SN. sperm nucleus; SP. sperm.

## Studies on ultrastructure of spermatozoon and cytological change of nuclear behavior on fertilization in *Meretrix lamarkii*

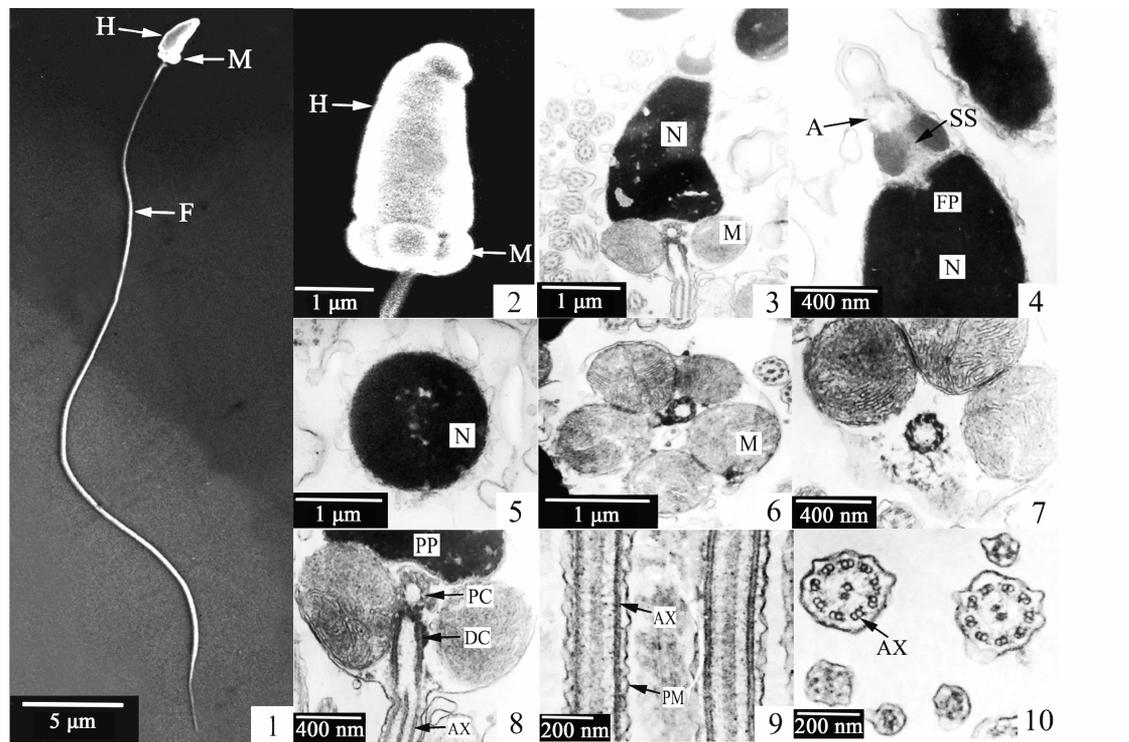
DONG Ying-hui, LIN Zhi-hua\*, YAO Han-han

(College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

**Abstract:** The ultrastructure of spermatozoon and the cytological change of fertilization process in *Meretrix lamarkii* were systematically studied by electron microscope and fluorescence microscope. The results indicated that the mature spermatozoon (45.2 – 47.7  $\mu\text{m}$  in total length) of *M. lamarkii*, belonging to the primitive type, consists of head, middle piece and tail. The head, like a long cocoon in shape (2.5  $\mu\text{m}$  in length), is composed of acrosome and nucleus. The acrosome is conical in shape and has a subacrosomal space inside. Nucleuses are cylindrical with fine-grained dense chromatin, having front nuclear pocket and posterior nuclear pocket. The centriolar complex, including proximal and distal centrioles, and surrounding 5 spherical mitochondrias, make up the short middle piece. The tail, a whip-like flagellum, consists of axoneme that is a typical “9 + 2” microtubular structure and wrapped by an wavy plasma membrane. The cytological change of nuclear behavior during fertilization and early cleavage was observed under the fluorescence microscope. Like most of marine mollusks, the unfertilized mature eggs of *M. lamarkii* were globular and remained at the metaphase of the first maturation division. At water temperature of 27 – 28  $^{\circ}\text{C}$ , artificial insemination was conducted. 6 min after fertilization, sperm has penetrated into cytoplasm of egg and activated the maturation division. The fertilized eggs released the first polar body about 12 – 15 min and the second polar body about 20 – 25 min after fertilization. About 30 min, sperm nucleus and the haploid female nucleus developed into the male and female pronuclei. 35 min, the male and female pronuclei matched into an association nucleus after their chromosomes formed respectively in the center of egg. 40 – 45 min, the chromosomes were separated equally into two daughter cells which are different obviously in size. 55 – 60 min, the second cleavage finished and formed four daughter cells, one big and three small. The process of the second cleavage was fundamentally similar to the first cleavage. 75 – 80 min, the third cleavage which belongs to the type of spiral holoblastid cleavage was completed. In addition, the polyspermy with an incidence of about 1% in the process of fertilization was also observed. Though the polyspermy didn't affect the formation of male pronuclei, it significantly affected the process of the maturation division and the first cleavage as a result of abnormal chromosome division.

**Key words:** *Meretrix lamarkii*; spermatozoon; ultrastructure; fertilization; polyspermy

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



图版 I 斧文蛤精子超微结构的电镜观察

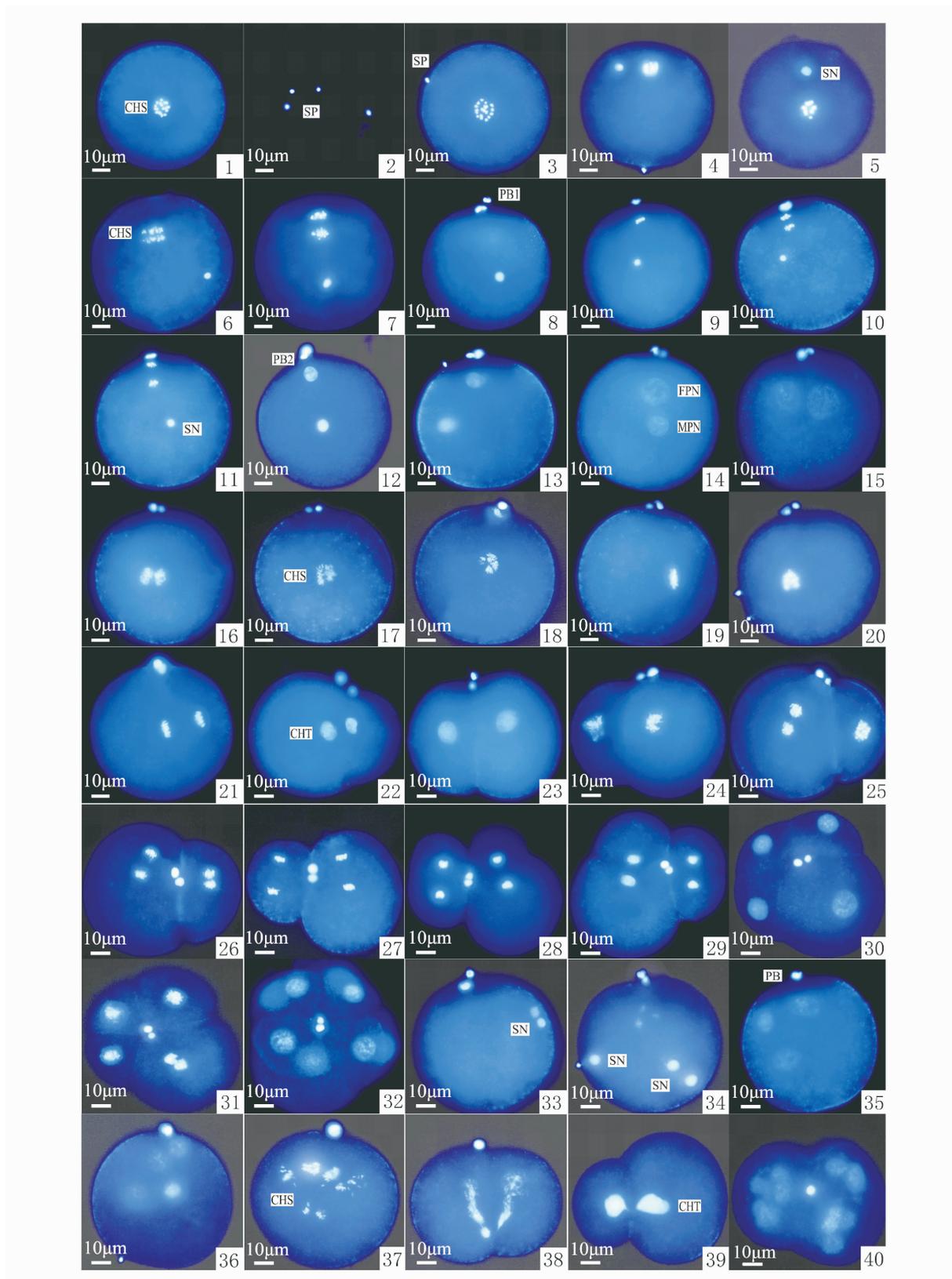
1. 精子外形(×3 000); 2. 头部和中段外形(×20 000); 3. 精子纵切面(×20 000); 4. 顶体纵切面(×30 000); 5. 细胞核横切面(×20 000); 6. 中段横切面(×30 000); 7. 近端中心粒横切(×60 000); 8. 中段纵切面(×50 000); 9. 尾部鞭毛纵切面(×70 000); 10. 尾部鞭毛横切面(×80 000).

A. 顶体; Ax. 轴丝; DC. 远端中心粒; F. 鞭毛; FP. 核前窝; M. 线粒体; N. 细胞核; PC. 近端中心粒; PP. 核后窝; PM. 质膜; SS. 亚顶体腔。

### Plate I Spermatozoon ultrastructure of *M. lamarkii* with SEM and TEM

1. External shape of sperm(×3 000); 2. External shape of head and mid-piece(×20 000); 3. Longitudinal section of sperm(×20 000); 4. Longitudinal section of acrosome(×30 000); 5. Transverse section of nucleus(×20 000); 6. Transverse section of mid-piece(×30 000); 7. Transverse section of proximal centriole(×60 000); 8. Longitudinal section of mid-piece(×50 000); 9. Longitudinal section of flagellum(×70 000); 10. Transverse section of flagellum(×80 000).

A. acrosome; Ax. axoneme; DC. distal centriole; F. flagellum; FP. front nuclear pocket; M. mitochondria; N. nucleus; PC. proximal centriole; PP. posterior nuclear pocket; PM. plasma membrane; SS. subacrosomal space.



图版 II 斧文蛤受精及早期卵裂过程的荧光显微观察(×400)

Plate II Cytological observation on the process of fertilization and early cleavage in *M. lamarkii* under fluorescent microscope(×400)