

三倍体牡蛎性腺发育的组织学研究

李霞, 张国范, 王永平, 宋坚, 王金芳, 邬玉净

(大连水产学院 农业部海水增养殖生态学实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要:报道了三倍体牡蛎性腺发育的组织学研究结果。三倍体牡蛎性腺发育与二倍体同步, 可分为增殖期、生长期、成熟期、排放期和休止期, 但产生的成熟雌、雄配子数明显少于二倍体。实验中所发现的染色体条数不足30条的非整倍体个体, 没有成熟配子形成。雌、雄同体现象普遍存在于三倍体中, 雌、雄配子可产生于同一滤泡内, 也可产生于不同滤泡。生殖细胞由生殖嵴形成。

关键词:牡蛎; 三倍体; 性腺发育

中图分类号: S917.4 **文献标识码:** A

贝类多倍体诱导工作国内外做得较多^[1~4], 但多倍体性腺发育方面的研究, 目前仅见 Allen 等^[5,6]对三倍体海螂和太平洋牡蛎异常配子的发生进行了研究, Cox^[7]报道了悉尼岩石牡蛎三倍体性腺发育情况, 姜卫国等^[8]对三倍体合浦珠母贝的生殖腺也做了观察。作者对三倍体牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的性腺发生及发育进行了系统的组织切片观察, 并和二倍体牡蛎进行比较, 总结出三倍体牡蛎性腺的发育特点, 为进一步研究三倍体牡蛎的生长特性奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

材料取自大连湾牡蛎养殖场, 该批牡蛎在1996年春用细胞松弛素B进行三倍体诱导处理, 1997年5月4日~6月6日间在大连水产学院海养楼人工促熟培养, 培养温度为18℃。

1.2 染色体制备方法

每次取10个牡蛎, 用鳃做染色体鉴定, 制片方法参考文献[9]。

1.3 光镜样品制做方法

分上、中、下三个部分取性腺, 每隔3d取一次样, Bouin's液固定, 石蜡包埋, 切

收稿日期: 1998-11-05

基金项目: 大连市科委资助项目

作者简介: 李霞 (1961~), 女, 副教授。

片厚度为 $6\mu\text{m}$, H.E 染色, Olympus 显微镜观察与拍照。

2 结果

2.1 牡蛎倍性鉴定分析结果

二倍体牡蛎染色体条数 $2n = 21$, 三倍体 $3n = 30$, 染色体条数不足 30 条的为非整倍体, 每次取样, 牡蛎染色体倍数见图 1。

2.2 三倍体牡蛎性腺分期及组织学特点

根据生殖细胞类型、比例及分布, 滤泡大小和滤泡间结缔组织的多少, 参考廖承义^[10]的性腺分期特征, 将三倍体牡蛎生殖腺分为增殖期、生长期、成熟期、排放期和休止期, 各期特征如下:

增殖期 雌性滤泡直径较小 ($\Phi 0.014\text{ mm}$), 滤泡腔较大, 滤泡间结缔

组织很多, 卵原细胞数量占 82.7%, 卵黄形成前期卵母细胞占 17.3%, 无卵黄形成后期的卵母细胞。精巢中滤泡直径为 0.010 mm , 具滤泡腔, 滤泡间结缔组织较多, 生精细胞主要为精原细胞和初级精母细胞 (图 2-a)。

生长期 雌性滤泡直径为 0.107 mm , 滤泡内卵原细胞占 41.9%, 卵黄形成前期卵母细胞占 39.9%, 卵黄形成后期卵母细胞占 18.2% (图 2-b)。雄性滤泡直径为 0.107 mm , 滤泡内可同时观察到各种生精细胞, 精子数量极少 (图 2-c)。滤泡腔消失。

成熟期 雌性滤泡直径为 0.128 mm , 卵黄形成后期的卵母细胞占 61.2%, 卵黄形成前期的卵母细胞占 21.5%, 卵原细胞占 17.3% (图 2-d), 细胞排列紧密。雄性滤泡直径为 0.126 mm , 精子数量很多, 呈放射状排列, 滤泡壁上有 2~3 层精原细胞和初级精母细胞 (图 2-e)。

排放期 雌性滤泡体积缩小 ($\Phi 0.110\text{ mm}$), 卵原细胞和卵黄形成前期的卵母细胞分别为 75.0% 和 21.3%, 卵黄形成后期卵母细胞占 3.7%。雄性滤泡直径为 0.100 mm , 精原细胞和初级精母细胞数量增加, 滤泡腔内有少量精子 (图 2-f)。生殖输送管内有大量成熟的精、卵。

休止期 雌性滤泡体积萎缩, 形状不规则, 卵原细胞占 80.2%, 卵黄形成前期卵母细胞占 19.8%, 雄性滤泡壁上有少量精原细胞。

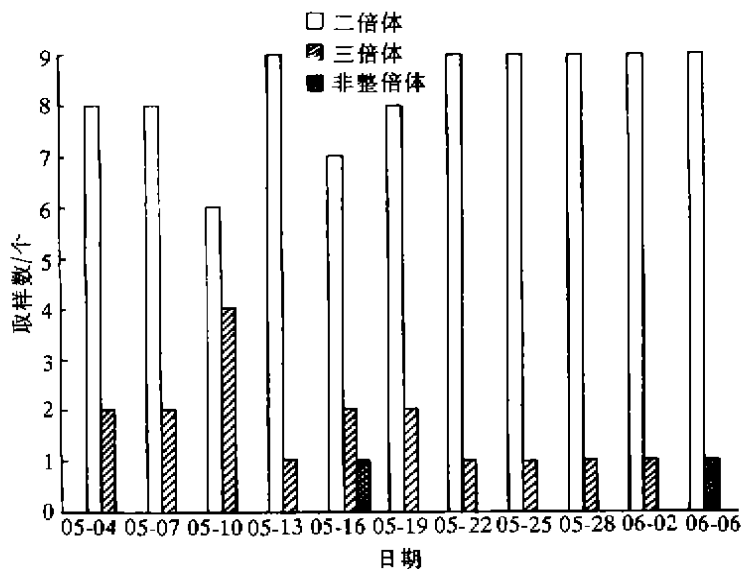


图 1 染色体倍性分析结果

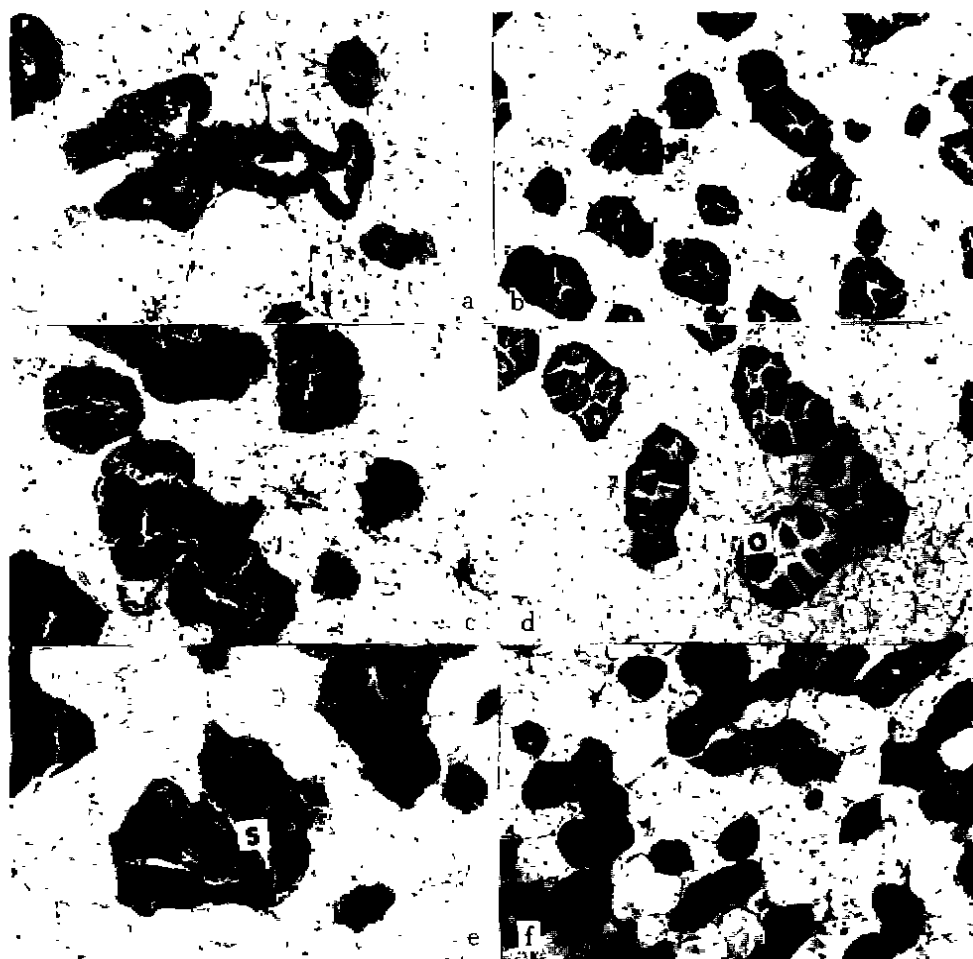


图 2 三倍体牡蛎性腺发育的组织结构

- a 三倍体牡蛎增殖期精巢, ▲示滤泡, $\times 600$; b 三倍体牡蛎生长期卵巢, $\times 500$;
 c 三倍体牡蛎生长期精巢, $\times 500$; d 三倍体牡蛎成熟期卵巢, ○示卵黄形成后期的卵母细胞, $\times 500$;
 e 三倍体牡蛎成熟期精巢, S 示成熟精子, $\times 500$; f 三倍体牡蛎排放期精巢, ▲示少量成熟精子, $\times 200$ 。

2.3 非整倍体的性腺发育

实验中发现染色体条数为 23、26 的非整倍体个体 (图 3-a)。对其生殖腺进行组织学观察可见其滤泡数量远少于三倍体, 且滤泡内生殖细胞数量也较少, 当同批二倍体、三倍体性腺进入成熟期时, 非整倍体仍停留在增殖期, 只有个别细胞发育为卵黄形成前期卵母细胞, 大多数细胞为不定性细胞 (图 3-b)。

2.4 非整倍体、三倍体和二倍体牡蛎性腺发育的比较

对三倍体牡蛎性腺进行组织学观察的同时, 对二倍体也进行了研究比较, 结果见表 1。

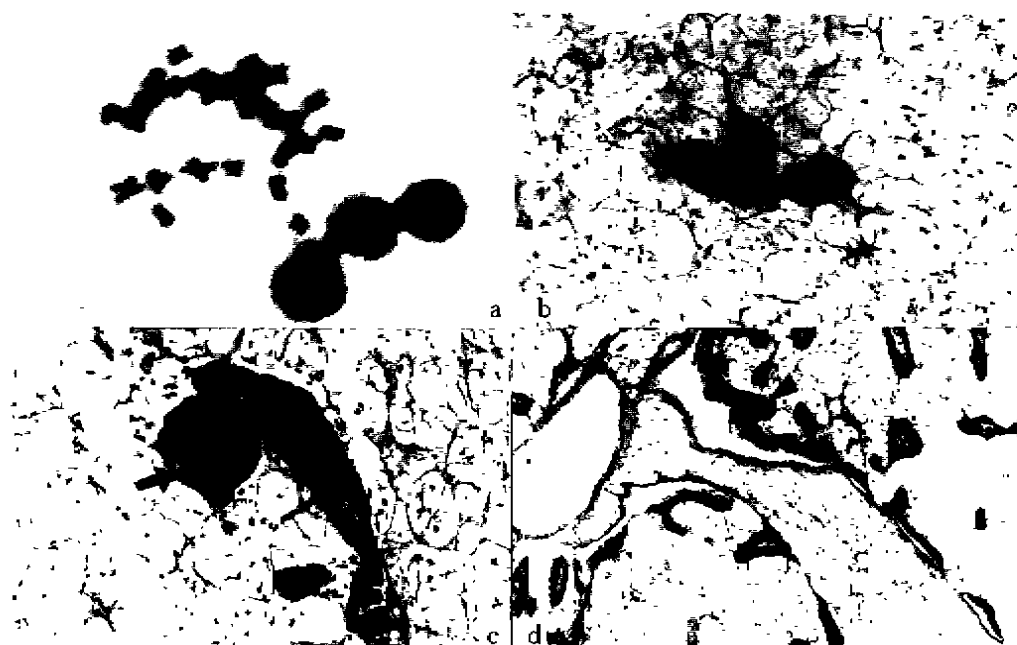


图3 三倍体牡蛎性腺发育的组织结构

- a 非整倍体牡蛎 26 条染色体, $\times 1000$; b 非整倍体牡蛎性腺, $\times 500$;
c 三倍体牡蛎雌、雄同体, ▲示精子, ↑示卵黄形成后期的卵母细胞, $\times 500$;
d 三倍体牡蛎性腺生殖嵴, ▲示生殖细胞, $\times 50$ 。

从表1可看

表1 非整倍体、三倍体和二倍体牡蛎性腺发育的比较

倍性	滤泡直径 /mm	滤泡间结缔 组织数量	滤泡数/视野 ($\times 100$)	卵细胞数 /滤泡	卵发育期
二倍体	0.140	+	10	10	卵黄形成后期
三倍体	0.128	++	5	6	卵黄形成后期
非整倍体	0.020	++++	0.5	1	卵黄形成前期 不定性细胞

注: + 表示结缔组织数量

出, 非整倍体、三倍体和二倍体性腺发育有以下几点不同: (1) 滤泡直径为二倍体 > 三倍体 > 非整倍体; (2) 结

缔组织数量为二倍体 < 三倍体 < 非整倍体; (3) 滤泡及卵细胞数为二倍体 > 三倍体 > 非整倍体; (4) 卵子的发育为二倍体和三倍体同步, 但非整倍体没有成熟卵产生。

2.5 三倍体牡蛎雌、雄同体现象

在切片中观察到大量雌、雄同体现象, 可分为两种情形: (1) 雌、雄配子同时发生在同一滤泡内, 一般滤泡壁为卵黄形成前期或后期卵母细胞, 滤泡腔中为初级精母细胞或成熟精子 (图3-c); (2) 雌、雄配子分别产生于不同的滤泡, 且这两种滤泡相距较远, 这种情形的雄性滤泡发育比雌性滤泡快。

2.6 三倍体牡蛎生殖腺形成过程

生殖腺内分布有许多条生殖输送管,管壁一侧为单层柱状上皮,和泡状结缔组织相连的另一侧为生殖嵴,大量生殖细胞在此增殖形成一条细胞带(图3-d),以后部分细胞脱离生殖嵴,向结缔组织中迁移,结缔组织包围在细胞团外形成一个个滤泡。滤泡刚形成时,主要由精原细胞和卵原细胞组成,也有少量初级精母细胞和卵黄形成前期卵母细胞,随生殖细胞的发育成熟,滤泡变大,滤泡壁变薄。

3 讨论

3.1 三倍体牡蛎性腺发育的分期问题

同大多数双壳贝类一样^[10,11],三倍体牡蛎性腺发育可分为5个时期,即增殖期、生长期、成熟期、排放期和休止期。在增殖期和生长期,肉眼不易分辨二倍体和三倍体,但进入成熟期后,三倍体性腺明显较二倍体薄。这是因为三倍体滤泡和生殖细胞数量少的缘故。姜卫国^[8]报道合浦珠母贝性腺的休止期和增殖期均可见到三倍体个体,但生长期后就很难观察到。牡蛎情形与之不同。在对性腺观察中还发现雌、雄性腺进入排放期后,随大量精、卵的排出,滤泡壁上的卵原细胞和精原细胞马上进入分裂状态,细胞数量增加,并且有些滤泡进入生长期,说明在生殖季节内牡蛎可多次产卵受精。

3.2 三倍体生殖腺的发生

贝类生殖腺的发生目前尚未见报道。据作者观察牡蛎生殖嵴有多处,生殖细胞在生殖嵴形成后,聚集成团向结缔组织中迁移,生殖嵴处的细胞不仅有精原细胞、卵原细胞,还有初级精母细胞或卵黄形成前期的初级卵母细胞,雌雄同体的个体,两类细胞同时存在,这为今后贝类发育生物学研究提供了理论基础。

3.3 雌、雄同体现象

和二倍体一样,三倍体牡蛎雌、雄同体现象非常普遍^[6],切片上观察主要有两种情形:(1)雌、雄配子产生于同一滤泡,曾观察到同一滤泡内精子呈辐射状排列,而成熟卵也进入滤泡腔,更多的情形是卵原细胞位于滤泡壁,而滤泡腔内为成熟精子;(2)雌、雄配子分别产生于相距较远的滤泡,但雄性滤泡较雌性发育快。据报道贝类雌、雄同体现象中,雌、雄配子产于同一滤泡的有栉孔扇贝^[10],产生于不同滤泡的有波纹巴非蛤^[11],而三倍体牡蛎两者均兼有。

3.4 多倍体配子数量及成熟

Allen等^[6]用组织学方法观察了海螂和太平洋牡蛎异常配子的形成过程,提出三倍体性腺发育较二倍体差,产生精、卵的数量少。Cox^[7]报道悉尼岩石牡蛎三倍体性腺结构,没有发现成熟精、卵。姜卫国^[8]、何毛贤^[12]对三倍体合浦珠母贝生殖腺进行了研究,认为雄性三倍体没有成熟精子形成,而卵因为没有经过成熟分裂,所以有少量可达成熟期。作者观察结果同Allen^[6],三倍体和二倍体性腺发育基本同步,但产生的生殖细胞数量三倍体却要少得多。作者还观察到非整倍体,这些个体的染色体数为23,26条,均不足30条,其滤泡数量极少,且目前尚未观察到有形态成熟的配子形成,除少

数生殖细胞进入卵黄形成前期,大多数为不定性细胞,究其原因可能是配子形成过程中,染色体形成10条整倍体的概率较低决定的^[13]。Allen^[6]提出三倍体牡蛎排出的卵没有达到生理成熟,所以不能受精。何毛贤^[12]将合浦珠母贝三倍体产生的精、卵人工受精,结果子一代发育到幼虫就夭折。作者观察到太平洋牡蛎滤泡内有大量成熟精、卵,生殖管道内也有大量精、卵排出,但其受精能力如何,还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 吕隋芬,王如才.细胞松弛素B诱导栉孔扇贝产生三倍体的研究[J].海洋湖沼通报,1992(2):40~45.
- [2] 姜卫国,李刚,林岳光.人工诱导合浦珠母贝多倍体的发生[J].热带海洋,1987,6(4):37~45.
- [3] 王子臣,张国范,王一平.皱纹盘鲍三倍体的研究[J].大连水产学院学报,1990,5(1):1~8.
- [4] Guo X. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: I. ploidy of resultant embryos[J]. Biol Bull, 1992,183:381~386.
- [5] Standish K, Allen S K, Hidu H. Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*) [J]. Biol Bull, 1986,170:198~210.
- [6] Allen S K, Downing S L. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: gametogenesis[J]. Can J Fish Aquat Sci, 1990, 47:1213~1222.
- [7] Cox E S. Studies on triploid oysters in Australia: VI gonad development in diploid and triploid sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley)[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1996,197:101~120.
- [8] 姜卫国,李刚,林岳光.三倍体合浦珠母贝的生殖腺的观察[J].热带海洋,1990,9(1):24~29.
- [9] Moynihan E P. Quantitative karyotype analysis in the mussel *Mytilus edulis* L[J]. Aquaculture, 1983,33:301~309.
- [10] 廖承义.栉孔扇贝性腺发育周期[J].水产学报,1983,7(1):1~5.
- [11] 赵志江,李夏雪,杨才焕.波纹巴非蛤的性腺发育和生殖周期[J].水产学报,1991,15(1):1~8.
- [12] 何毛贤,林岳光,姜卫国.三倍体珠母贝不育性研究[J].热带海洋,1996,15(2):17~21.
- [13] 喻子牛,孔晓瑜,王如才.海洋贝类多倍体操作机理和最新进展[J].海洋湖沼通报,1995(4):72~79.

Histological observations on the developmental gonad of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*

LI Xia, ZHANG Guo-fan, WANG Yong-ping, SONG Jian, WANG Jin-fang, Wu Yu-jing
(Key Laboratory of Maricultural Ecology, Ministry of Agriculture, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: The histological observations on the developmental gonad of triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* were conducted. Compared with diploids, the development of gonad in triploids was synchronously and it was divided into five stages according to the cytological characteristics of the developing sexual cells and the relative amounts of sexual cells in the follicle: proliferating stage, growing stage, maturing stage, spawning stage, resting stage. But both male and female triploids produced less sex gametes than those diploids. Aneuploids, whose chromosome number was more than 20 but less than 30, were also found in this experiment. Otherwise, its gamete formation was absent, which resulted in sterile gonad. Hermaphroditism was frequently exist in the triploid population. Female and male gametes were either produced in the same follicle or in different follicles. And the reproductive cells were formed from reproductive ridge.

Keywords: Pacific oyster; triploid; gonad development ;