

三倍体僧帽牡蛎生殖腺发育观察

曾志南 林 琪 吴建绍 陈 木
(福建省水产研究所, 厦门 361012)

摘 要 在僧帽牡蛎繁殖盛期, 详细观察了二倍体、三倍体僧帽牡蛎生殖腺外部形态特征, 比较了成熟卵母细胞卵径和核径。结果表明, 外观上三倍体生殖腺发育较二倍体差, 三倍体成熟卵母细胞卵径和核径分别比二倍体大 19.6% 和 17.6%, 体积分别比二倍体增加 70.3% 和 64.2%。组织切片检查结果: 二倍体生殖腺发育正常。三倍体生殖腺发育受阻, 大都在增殖期和休止期, 一部分个体可发育至生长期和成熟期, 并能产生成熟的卵子和精子。在三倍体中还观察到 3 个雌雄同体个体。三倍体雌雄性比为 7:1。此外, 本文还就三倍体生殖腺发育受阻和雌雄同体现象进行了讨论。

关键词 僧帽牡蛎, 三倍体, 生殖腺, 组织学

三倍体在许多水产生物的生产中存在着增产的巨大潜力, 因此, 关于贝类三倍体的研究发展很快, 迄今已在十几种双壳类中成功诱导出三倍体[Stanley 等 1981, Tabarini 1984, Arai 等 1986, 姜卫国等 1987, Downing 和 Allen 1987, Cosling 和 Nolan 1989, 曾志南等 1994], 有的已在生产上应用[Allen 和 Shatkin 1989, Allen 和 Bushek 1992]。研究和应用三倍体贝类主要在于三倍体生殖腺发育受阻, 繁殖力低, 因此用于生殖腺发育的能量就可用于生长, 从而加快生长速度, 同时, 在繁殖季节可以避免产卵导致贝类生理活性降低和肉质变劣等问题, 提高商品价值。

关于三倍体贝类生殖腺发育和配子发生的报道比较少, Allen 和 Downing[1986, 1990]、古丸明和田克彦[1989, 1994]、姜卫国等[1990] 分别对三倍体海螂(*Mya arenaria*)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)、华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*) 和日本珠母贝(*Pinctada fucata*) 的生殖腺发育和配子发生进行组织学观察, 而关于三倍体僧帽牡蛎(*Ostrea cucullata*) 的生殖腺发育尚未见过报道。为此, 在僧帽牡蛎繁殖期, 我们详细观察了三倍体僧帽牡蛎生殖腺的外部形态、性比、成熟卵母细胞及细胞核大小, 通过组织切片检查其生殖腺发育状况。现将观察研究结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 试验材料

三倍体僧帽牡蛎是 1993 年 9 月采用 37℃ 高温休克处理, 抑制受精卵第二极体排放诱导产生的, 三倍体诱导率达 57.2%, 在福建漳浦下安海区经过一周年养殖, 壳长达 3~6cm, 壳高 3~8cm。

1.2 生殖腺发育观察

在 1994 年 9~11 月僧帽牡蛎繁殖季节分四次取样, 每次取 26~42 个样品, 样品逐个编

号,在观察生殖腺的外部形态特征后取下生殖腺,切成小块,在 Bouin 氏液固定 24 小时后按常规石蜡切片程序脱水、透明和包埋,切片厚度为 6~ 8 μm ,用 Delafield 苏木精-伊红染色,组织切片用 Olympus BH-2 型显微镜观察、拍照。

1.3 卵母细胞卵径及核径测量

解剖牡蛎生殖腺,涂片在显微镜下测量成熟卵母细胞细胞核核径,后洗卵于盛有砂滤海水的烧杯中,待 30 分钟后吸卵于玻片上,显微镜下测量卵母细胞的卵径。

1.4 倍性确定

在每次取样编号的样品上剪取一小块鳃组织,制备染色体样品,确定倍性。绝大部分样品制片后通过计数染色体数目均能准确确定其倍性。极个别制片失败的样品不再进行生殖腺组织切片观察。

2 结果

2.1 二倍体、三倍体僧帽牡蛎生殖腺及外套膜的外部形态特征

在僧帽牡蛎繁殖盛期,二倍体僧帽牡蛎生殖腺呈乳白色,饱满鼓起,生殖腺柔软,用解剖针刺破,有精子或卵子流出。三倍体僧帽牡蛎生殖腺发育差,包裹于内脏团外的生殖腺层较二倍体薄,且不象二倍体鼓起,生殖腺稍坚实,用解剖针刺破,大都无精子或卵子流出。此外,刚从海区取来的二倍体牡蛎外套膜稍透明,而三倍体外套膜呈乳白色且较二倍体厚,外套膜上的血管清晰可见。外套膜呈乳白色,可能是糖元积累的表现。根据生殖腺及外套膜的外观特征可判别二倍体或三倍体牡蛎,其准确率达 95% 以上。

2.2 僧帽牡蛎个体倍性的确定

通过鳃细胞染色体制片,确定出取样的僧帽牡蛎每个个体的倍性($2n=20$, $3n=30$),在取样的样品中三倍体占 55.17%。

2.3 二倍体、三倍体僧帽牡蛎生殖腺涂片观察和成熟卵母细胞卵径及核径测量

在僧帽牡蛎繁殖盛期,牡蛎生殖腺涂片镜检结果表明:二倍体生殖腺充满成熟的卵母细胞或精子(图版 iv-1),而三倍体大部分未观察到,许多雌性三倍体生殖腺涂片仅见零星卵母细胞(图版 iv-2)。一小部分成熟的三倍体生殖腺其卵母细胞数量也较二倍体少,且细胞之间内含物多。镜检测量结果:二倍体僧帽牡蛎成熟卵母细胞的平均卵径为 55.6 μm ,平均核径 27.9 μm ;三倍体成熟卵母细胞平均卵径为 66.5 μm ,核径 32.8 μm 。三倍体卵母细胞卵径和核径分别比二倍体大 19.6% 和 17.6%,体积分别增加 70.3% 和 64.2%。

2.4 二倍体、三倍体僧帽牡蛎生殖腺发育的组织学观察

在 1994 年 9~11 月僧帽牡蛎繁殖期四次取样(9 月 24 日、10 月 14 日、11 月 4 日和 11 月 27 日),对二倍体和三倍体僧帽牡蛎生殖腺发育进行组织学观察,参照李嘉泳等[1962]对海洋双壳类两种帘蛤生殖腺发育的分期,根据生殖细胞的发育和滤泡腔的大小变化,把僧帽牡蛎生

殖腺发育划分为五期:休止期、增殖期、生长期、成熟期和排放期。而三倍体牡蛎生殖腺发育也可依据这五个期来描述。

iv 休止期:雌雄生殖腺滤泡有很小的空腔,滤泡间充满结缔组织,滤泡壁上有少量不连续的生殖原细胞、精原细胞或卵原细胞。一些雌性生殖腺滤泡内仍有个别游离的卵母细胞(图版 iv-3, 4)。

⊕ 增殖期:与二倍体一样,生殖腺滤泡腔出现,但数量少,体积小,滤泡间有大量的结缔组织。雌性生殖腺滤泡壁上的生殖细胞开始增多,滤泡壁增厚,多数为一层卵原细胞,在卵原细胞之间基本看不到早期卵母细胞。雄性生殖腺滤泡壁上分布多层精原细胞和少数初级精母细胞(图版 iv-5, 6)。

⊖ 生长期:生殖腺滤泡体积增大,滤泡间结缔组织减少。雌性生殖腺滤泡壁上的卵母细胞虽有明显突向滤泡腔,但大都与滤泡壁紧密相连。少数卵母细胞游离于滤泡腔中,有的已退化。雄性生殖腺生殖细胞沿滤泡壁多层排列,有精原细胞、精母细胞和少数精细胞(图版 ⊕ 1, 2)。

⊗ 成熟期:滤泡腔扩大。雌性生殖腺滤泡间空隙基本消失,滤泡腔充满成熟的卵母细胞,但也观察到少数卵母细胞退化萎缩。雄性生殖腺滤泡间还有较大空隙,滤泡内充满精母细胞和一部分精细胞和精子(图版 ⊕ 3, 4)。

⊘ 排放期:雌性生殖腺由于成熟卵母细胞的排放,滤泡内出现大小不等的空腔,滤泡壁薄,有的滤泡壁因排卵而破裂,一些滤泡内尚有未排出的成熟卵母细胞,有些卵母细胞逐渐退化、溶解。雄性生殖腺精子呈流水状排列,滤泡腔中央明显出现空白区,在滤泡内尚存在精母细胞、精细胞和精子(图版 ⊕ 5, 6)。

组织切片观察结果表明:二倍体僧帽牡蛎配子发生及生殖腺发育正常(图版 ⊕ 1, 2),从表 1 可以看出在 9~11 月份,检查 72 个二倍体僧帽牡蛎,其生殖腺分别有 47.2% 和 27.8% 处于成熟期和排放期。

表 1 二倍体和三倍体僧帽牡蛎繁殖期生殖腺组织切片观察结果

Tab. 1 The result of gonadal histological sections observation of diploid and triploid oyster, *Ostrea cucullata* during reproductive period

倍性	检查时间	检查个体数(个)	性别			生殖腺发育分期				
			雌性个体(%)	雄性个体(%)	雌雄同体个体(%)	休止期(iv)(%)	增殖期(⊕)(%)	生长期(⊖)(%)	成熟期(⊗)(%)	排放期(⊘)(%)
二倍体	1994.9~11	72	62(86.1)	10(13.9)	0(0)	8(11.1)	4(5.6)	6(8.3)	34(47.2)	20(27.8)
三倍体	1994.9~11	67	56(83.6)	8(11.9)	3(4.5)	24(35.8)	22(32.8)	7(10.4)	6(9.0)	8(12.0)

图 1 显示四次取样检查结果,9 月 24 日检查,40% 个体处于成熟期,至 10 月 14 日达到成熟期的个体已有 50%,同时已有一部分个体开始排放精卵,占 37.5%。11 月 4 日和 11 月 27 日的取样也均有 80% 以上的个体在成熟期和排放期。而检查三倍体僧帽牡蛎 67 个个体,其生殖腺处于休止期和增殖期的分别占 35.8% 和 32.8%,生长期占 10.4%,成熟期和排放期分别占 9.0% 和 12.0% (表 1)。从图 1 可以看出,9 月 24 日检查的 18 个个体中,77.8% 处于休止期,11.1% 在增殖期,发育到成熟期占 11.1%;10 月 14 日检查 10 个个体,20% 处于排放期,另外 80% 处于增殖期和休止期;11 月 4 日检查 14 个个体,28.6% 在生长期,成熟期的占 14.3%,57.1% 处于增殖期和休止期;11 月 27 日检查 25 个个体,8% 在成熟期,24% 处于排放期,

12% 在生长期, 其余 56% 在增殖期和休止期。

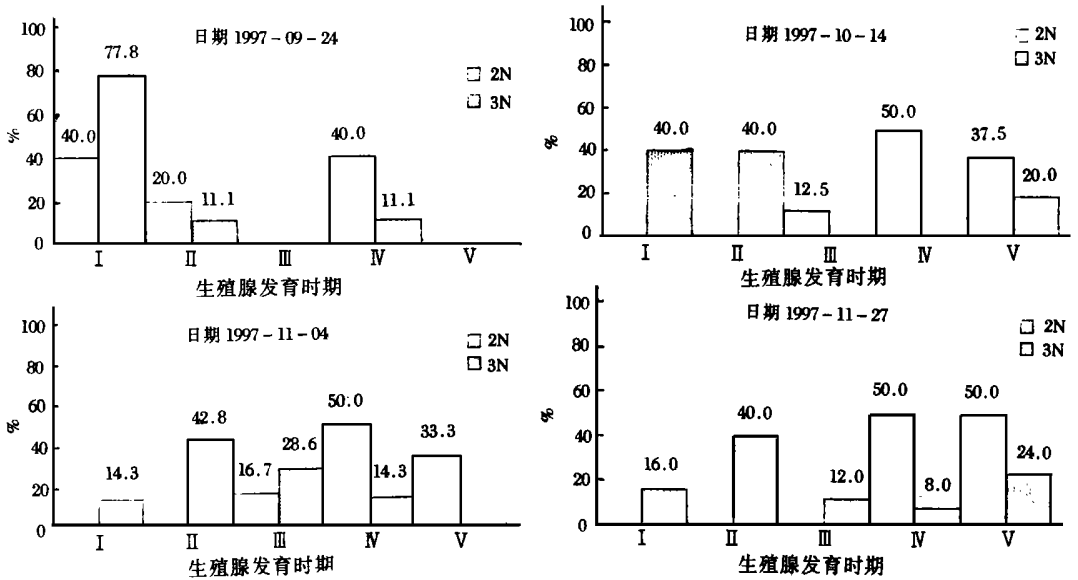


图 1 繁殖期二倍体和三倍体僧帽牡蛎生殖腺发育各期比例

Fig. 1 The rate of gonadal development stage of diploid and triploid oyster, *Ostrea cucullata* during reproductive period

从总体上看, 三倍体僧帽牡蛎生殖腺发育受阻, 大部分处于增殖期和休止期, 占 68.6%, 有一些个体生殖腺虽发育到生长期, 但生殖腺滤泡小、发育差, 雌性滤泡腔仅见少数的卵母细胞(图版 ④3), 雄性比较少观察到精子, 与相同发育期的二倍体相比, 其滤泡生长和生殖细胞的发生显然受阻滞。此外, 有相当一部分雌性个体的生殖腺滤泡仅由卵原细胞和几个卵母细胞组成, 缺乏发育中的卵母细胞(图版 ④4), 有相当多个体整个生殖腺仅观察到零星几个卵母细胞, 其余均为结缔组织(图版 ④5)。

在 9~11 月份四次取样中, 我们观察到三倍体有三个雌雄同体个体(图版 ④6), 其生殖腺为雄性滤泡, 滤泡腔内充满精母细胞、精细胞和一部分精子, 在一些滤泡内分布有零星卵母细胞。而在所取的样品中未观察到二倍体有雌雄同体个体。

组织切片观察统计结果表明: 1 龄三倍体僧帽牡蛎, 雌性占 83.6%, 雄性占 11.9%, 雌雄同体占 4.5%, 性比为 7:1, 二倍体僧帽牡蛎性比为 6.2:1。

3 讨论

三倍体生殖腺发育受阻使得人工诱导三倍体贝类的研究愈来愈受到重视。在僧帽牡蛎繁殖期, 对三倍体僧帽牡蛎生殖腺外观检查和组织切片观察结果表明: 三倍体生殖腺发育差, 虽然有一部分三倍体雌、雄个体生殖腺发育与二倍体相似, 能产生一定数量的卵细胞和精子, 但典型的三倍体僧帽牡蛎生殖腺发育受阻, 大部分生殖腺处于休止期和增殖期, 这与 Tabarini [1984]、Allen 和 Downing [1990] 分别对三倍体海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 和三倍体太平洋牡蛎生殖腺发育的观察结果基本相似。

Chevassus [1983] 把不育性分为三类: 一是性腺不育, 指性腺没有发育; 二是配子不育, 即

配子畸型,且数量很少;三是合子不育,即配子具有活性,能完成受精过程,但其幼虫不能存活。而三倍体僧帽牡蛎与 Allen 和 Downing[1990]报道的三倍体太平洋牡蛎一样,其性腺发育不能归于以上任何一类,一部分三倍体僧帽牡蛎生殖腺能发育至成熟期,因此不是性腺不育,同时能排放精子和卵子,且能完成受精过程,受精后也进行胚胎发育,所以也不属于合子不育或配子不育。至于三倍体僧帽牡蛎生殖腺发育受阻,可能是三倍体本身影响到原始生殖细胞的分化和增殖[姜卫国等 1987],由于三倍体雌性生殖腺卵母细胞发育停留在第一次减数分裂前期,因此生殖腺发育受阻很难用同源染色体无法配对、联合,分裂受阻来解释,有关这方面尚待进一步研究。

在对所取的实验样品牡蛎生殖腺组织切片时,观察到 3 个三倍体僧帽牡蛎为雌雄同体,而在二倍体僧帽牡蛎中未观察到有雌雄同体个体。Coe[1943]把发育中的雌雄同体现象定为:“在发育过程中,由于性别调控机制不能正常发挥作用而出现偏差的结果”。Allen 和 Downing[1990]在对三倍体太平洋牡蛎生殖腺组织学观察后表明三倍体有 29% 为雌雄同体,而二倍体仅 1%,三倍体中雌雄同体明显比二倍体多。他认为雌雄同体不似雌或雄做为一种性别产生的,而是由雌性或雄性转变来的,这可以从三倍体太平洋牡蛎各个采样季节雌雄同体个体出现数量不一样而得到证实。我们观察到三倍体僧帽牡蛎雌雄同体个体其生殖腺都是雄性滤泡,仅在一些滤泡腔中有个别卵母细胞,这可能表明它是雌性向雄性转变的过程。关于性转变现象的产生,许多学者有不同的看法,认为性转变与水温、代谢物质或营养条件等有关。Halley[1977]提出性别是由一组多等位基因决定的。有关牡蛎的性别与性转变有待进一步研究。Allen 和 Downing[1986]报道三倍体太平洋牡蛎成熟的雌体比雄体少,且雄性生殖腺发育较雌性好,他认为,雌性配子发生被高度地阻滞。相反地,我们的观察结果表明,三倍体僧帽牡蛎雌性生殖腺发育比雄性好,且成熟的雌体比雄体多,这可能是三倍体雌性卵母细胞的发育停留在第一次减数分裂前期,不存在减数分裂受阻问题[何毛贤等 1996],因此其生殖腺发育较雄性好。

三倍体僧帽牡蛎由于其细胞核内有 3 组染色体共 30 条,比二倍体多 10 条,因此其细胞和细胞核应比二倍体大,对僧帽牡蛎成熟卵母细胞的测量结果:三倍体卵径(66.5 μm)比二倍体(55.6 μm)大 19.6%,体积增加 70.3%,Guo 和 Allen[1994]报道三倍体太平洋牡蛎的卵径(55.4 μm)比二倍体(47.8 μm)大 15%,体积增加 54%。

本研究为国家自然科学基金资助项目,编号:39170601。

参 考 文 献

- 何毛贤,林岳光,姜卫国. 1996. 三倍体合浦珠母贝不育性研究. 热带海洋, 15(2): 17~ 21.
- 李嘉泳,邹仁林,王 秋等. 1962. 胶州湾两种习见帘蛤(*Venerupis semidecussata* 和 *Venerupis philippinarum*)的生殖周期. 山东海洋学院学报, (1): 43~ 64.
- 姜卫国,李 刚,林岳光. 1987. 人工诱导合浦珠母贝多倍体的发生. 热带海洋, 6(4): 37~ 45.
- 姜卫国,李 刚,林岳光等. 1990. 三倍体合浦珠母贝的生殖腺观察. 热带海洋, 9(1): 24~ 29.
- 曾志南,陈 木,林 琪等. 1994. 僧帽牡蛎三倍体的研究. 海洋通报, 13(6): 34~ 40.
- 古丸明,田克彦. 1989. ² 三倍体の配偶子形成と成長. 日本水产学会志, 55(3): 447~ 452.
- 古丸明,田克彦. 1994. ¹ 三倍体の配偶子形成と成長. 水产増殖, 42(4): 541~ 546.
- Allen S K, Bushek D. 1992. Large scale production of triploid oysters, *Crassostrea virginica*, (Gmelin), using "stripped" ga-

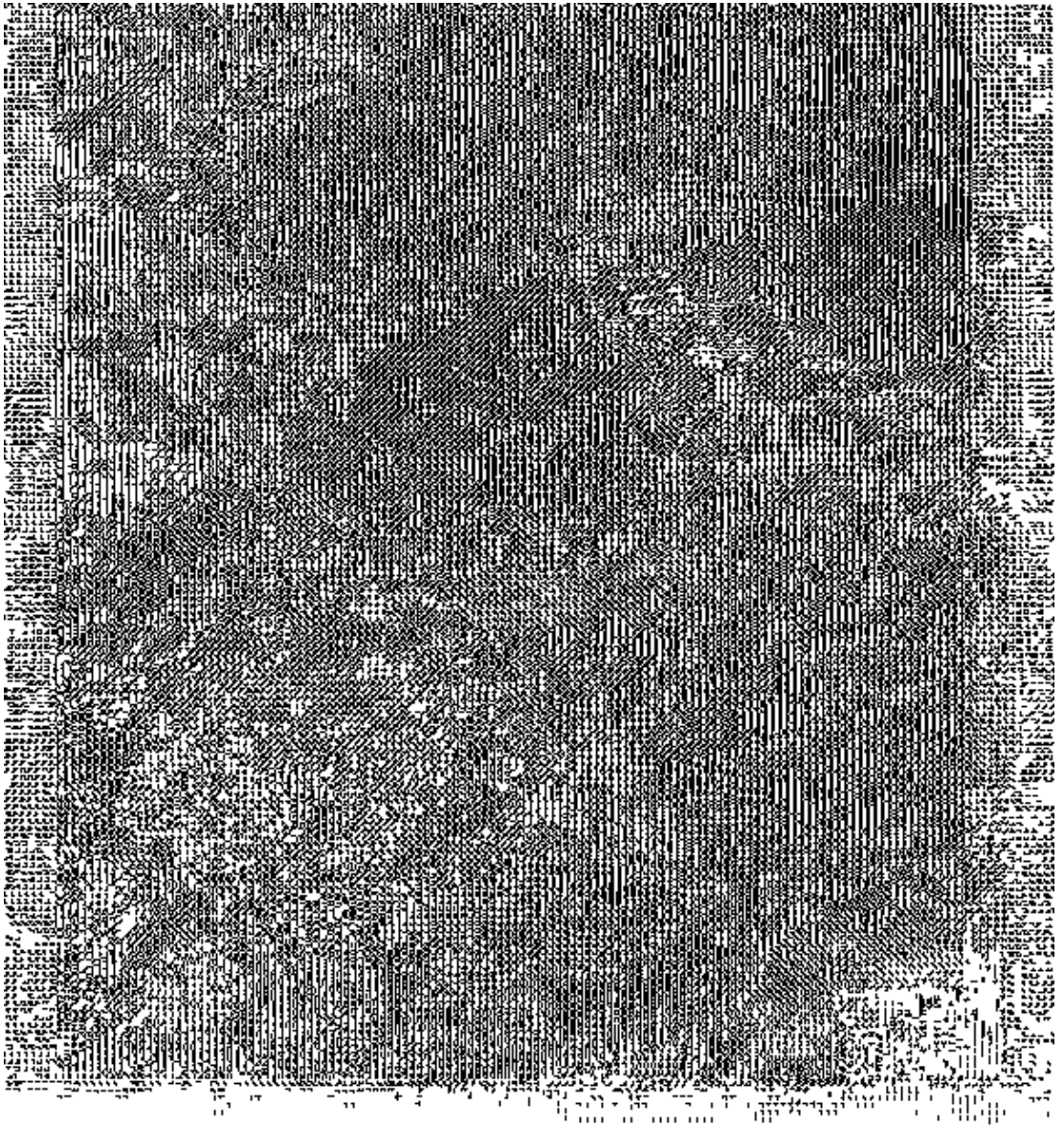
- metes. Aquaculture, 103: 241~ 251.
- Allen S K, Downing S L. 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. J Exp Mar Biol Ecol, 102: 197~ 208.
- Allen S K, Downing S L. 1990. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: gametogenesis. Can J Fish Aquat Sci, 47: 1213~ 1222.
- Allen S K, Hidu H H, Stanley J G. 1986. Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid softshell clam (*Mya arenaria*). Biol Bull, 170: 198~ 210.
- Allen S K, Shatkin G M. 1989. Recommendations for commercial production of triploid oysters. J shellfish Res, 8: 448.
- Arai K, Naito F, Fujino K. 1986. Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatment. Bull Japn Soc Sci Fish, 52(3): 417~ 422.
- Chevassus B. 1983. Hybridization in fish. Aquaculture, 33: 245~ 262.
- Coe W R. 1943. Sexual differentiation in Mollusks I Pelecypods. Quart Rev Biol, 18: 154~ 164.
- Cosling E M, Nolan A. 1989. Triploidy induction by thermal shock in the Manila clam, *Tapes semidecussatus*. Aquaculture, 78: 223~ 228.
- Downing S L, Allen S K. 1987. Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. Aquaculture, 61: 1~ 15.
- Guo X, Allen S K. 1994. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids. Mol Mar Biol Biotech, 3(1): 42~ 50.
- Haley L E. 1977. Sex determination in the American oyster. J Heredity, 68: 114~ 116.
- Stanley J G, Allen S K, Hidu H. 1981. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. Aquaculture, 23: 1~ 10.
- Tabarini C L. 1984. Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. Aquaculture, 42: 151~ 160.

OBSERVATION ON GONADAL DEVELOPMENT IN TRIPLOID *OSTREA CUCULLATA*

ZENG Zhi-Nan, LIN Qi, WU Jian-Shao, CHEN Mu
(Fujian Fisheries Research Institute, Xiamen 361012)

ABSTRACT During the peak period of its reproduction, external morphological features of gonad were under careful observation for diploid and triploid oyster, *Ostrea cucullata*, and with a comparison of mature oocytes and their nuclei in size. The results revealed that gonad in triploids showed poor development relative to diploids by appearances, the diameter of mature oocytes and their nuclei of triploids were 19.6% and 17.6% larger than those of diploids, and with 70.3% and 64.2% larger in volume. Histological sections presented that unlike diploids, gonadal development was retarded in triploids, of which the majority remained in stages of proliferation and spent, and only some of them developed to growth and mature stages and produce mature oocytes and sperm. Three hermaphrodites were observed in triploids sampled, which the sex ratio was female 7: male 1. In addition, retardation of gonadal development and hermaphroditic phenomenon of triploids are discussed in this paper.

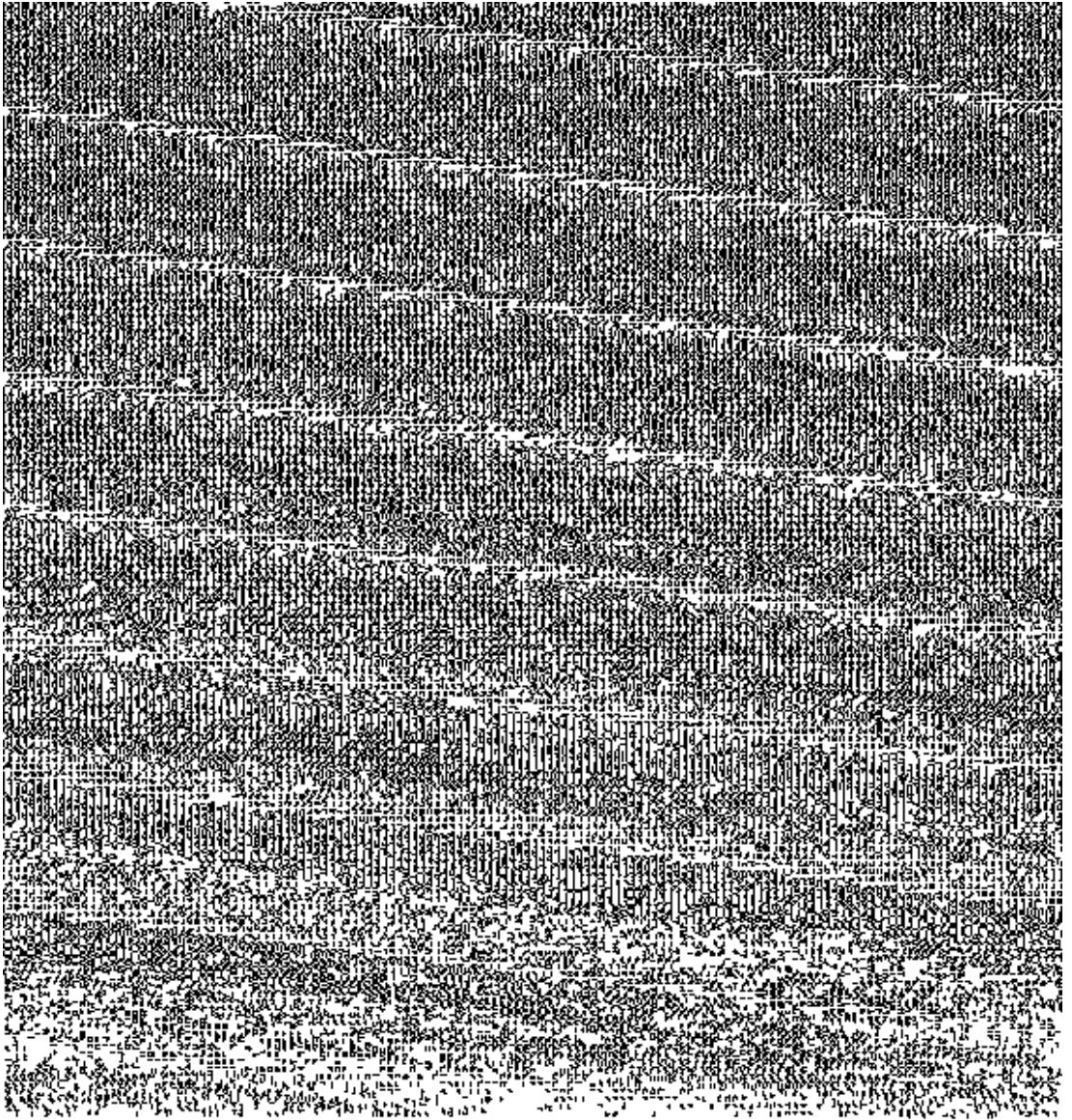
KEYWORDS *Ostrea cucullata*, Triploid, Gonad, Histology



图版 iv Plate iv

1, 2. 僧帽牡蛎二倍体、三倍体雌性生殖腺涂片。× 370;
 5, 6. 僧帽牡蛎三倍体雌、雄性增殖期的生殖腺。× 370

3, 4. 僧帽牡蛎三倍体雌、雄性休止期的生殖腺。× 370;

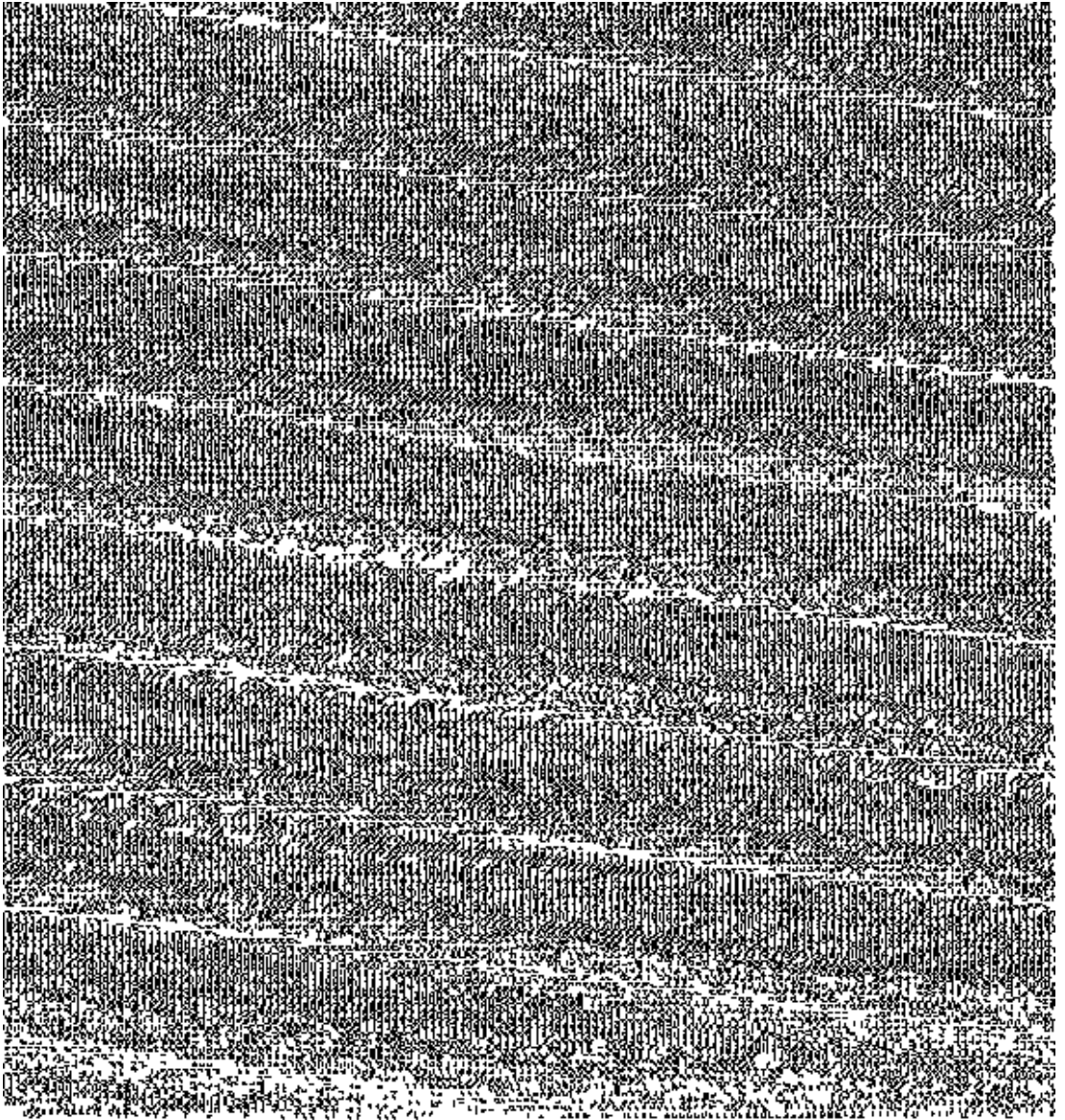


图版 ⑤ Plate ⑤

1, 2. 僧帽牡蛎三倍体雌、雄性生长期的生殖腺。× 340;

3, 4. 僧帽牡蛎三倍体雌、雄性成熟期的生殖腺。× 370;

5, 6. 僧帽牡蛎三倍体雌、雄性排放期的生殖腺。× 280



图版 ④ Plate ④

- 1, 2. 僧帽牡蛎二倍体雌、雄性的成熟期生殖腺。× 370; 3. 僧帽牡蛎三倍体雌性生长期的生殖腺, 滤泡小, 滤泡腔中仅见少数卵母细胞。× 370; 4. 僧帽牡蛎三倍体雌性生殖腺, 滤泡仅由卵原细胞及几个卵母细胞组成, 缺乏发育中的卵母细胞。× 370; 5. 僧帽牡蛎三倍体雌性生殖腺仅见零星卵母细胞。× 370; 6. 僧帽牡蛎三倍体雌雄同体生殖腺, 在雄性滤泡内分布零星卵母细胞。× 370