

雄性三倍体长牡蛎繁殖潜力的初步研究*

PRELIMINARY STUDIES ON REPRODUCTION POTENTIALITY OF MALE TRIPLOIDY PACIFIC OYSTER, *Crassostrea gigas*丁君¹ 张国范² 常亚青¹ 李霞¹ 巩宁¹¹大连水产学院,农业部海水增养殖生态学重点实验室 116023)²中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

关键词 长牡蛎,繁殖潜力,流式细胞仪

国内外很多人做过三倍体长牡蛎的诱导工作,但在三倍体性腺发育及配子活力方面的研究,目前仅见Allen等1986年和1990年对三倍体的海螂和长牡蛎异常配子的发生报道。Cox 1996年研究了悉尼岩牡蛎三倍体性腺发育情况,姜卫国等对三倍体合浦珠母贝的生殖腺进行了观察,李霞¹对三倍体长牡蛎的性腺发育做了较系统的分析和总结。作者用流式细胞仪对长牡蛎 *Crassostrea gigas* 二、三倍体的性腺细胞进行了初步分析,回答了三倍体长牡蛎生殖潜力及性比方面的一些问题,为进一步研究三倍体长牡蛎的生长、繁殖、杂交奠定了理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

材料取自大连红星养殖公司,其中三倍体长牡蛎在1999年春用6DMAP进行诱导处理,2000年4~5月在大连水产学院海养楼人工促熟培养。

1.2 倍性鉴定方法

取少量鳃丝,PartecPAS-III型流式细胞仪测其倍性。

1.3 性腺观察方法

将长牡蛎剖开,观察其性腺发育情况,在显微镜下辨雌雄。

1.4 利用流式细胞仪对生殖细胞进行分析

用手术刀片割开性腺,DAPI染液冲洗性腺,收集、制样。用PartecPAS-III型流式细胞仪进行测试。

2 结果

2.1 长牡蛎倍性鉴定结果

分析鉴定长牡蛎共145个,其中三倍体38个,二倍体107个,三倍体倍化率为26.2%。二倍体长牡蛎中雌雄比接近1:1。三倍体雌雄比为1:18。二者都有雌雄同体现象。三倍体的雌雄同体率为4%。

2.2 二倍体长牡蛎的性腺观察及利用流式细胞仪对其生殖细胞分析结果

所检测的107个二倍体长牡蛎中,有105个达到性成熟,占98%。性成熟的二倍体长牡蛎生殖腺很饱满,性腺几乎覆盖整个内脏囊,外观呈乳白色或淡黄色,性腺表面叶脉状生殖输送管清晰可见,镜下观察精子活力极强。

把正常二倍体长牡蛎鳃细胞的DNA含量定为200,图1为一典型的二倍体雄性生殖细胞DNA的相对含量直方图,其中横轴代表DNA的相对含量,纵轴代表细胞数。峰1代表此时精巢中的大部分细胞已完成减数分裂,成为精子细胞或精子,其DNA相对含量为100。峰2显示精巢中有部分细胞已经过减数第1次分裂,DNA含量减半至正常体细胞水平,DNA相对含量为200,为次级精母细胞。峰3显示精巢中有一些细胞的DNA刚完成复制,为初级精母细胞,其DNA的相对含量为400。实验证明峰1所占的比例越大,精子的活力越强。当食物不足或其他原因造成长牡蛎性腺退化时,不但性腺外观饱满度下降,在流仪图上也显示峰1的比例大大降低,而峰2的比例则增加。因此,定期用流式细胞仪监测长牡蛎性腺的发育情况可较好地掌握其人工授精时间。

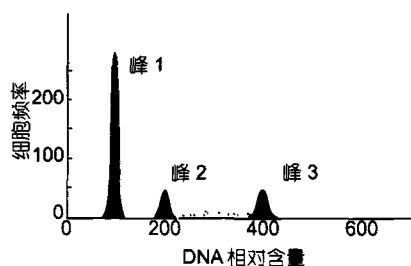


图1 正常二倍体长牡蛎生殖细胞DNA相对含量
Fig. 1 Flow cytometer analysis of gonad in male diploidy Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

* 国家自然科学基金资助项目39870602号。
收稿日期:2000-10-18;修回日期:2000-11-20

2.3 三倍体性腺观察及利用流式细胞仪对其生殖细胞分析结果

所检测 38 个三倍体长牡蛎中有 36 个生殖腺消瘦, 内脏团囊表面部分有淡淡一层灰白色生殖腺, 主要分布于背消化腺周围, 可微见消化囊的颜色。镜检有少量精子状细胞, 无活力, 不能使正常卵受精。以正常二倍体长牡蛎鳃丝细胞的 DNA 含量为标准, 图 2、图 3 显示这些三倍体性腺中的生殖细胞仍停留在初级精母细胞和次级精母细胞时期, 其细胞的 DNA 相对含量分别为 600 和 300。

另外, 有两个三倍体长牡蛎性腺较饱满, 性腺覆盖于内脏囊上, 可见表面的叶脉状生殖管。产生的配子细胞有活力, 可使正常卵受精, 但受精卵排出极体的时间及细胞开始分裂时间都较正常受精卵迟。把正常二倍体长牡蛎鳃丝细胞的 DNA 含量定为 200, 流式检测这两个长牡蛎性腺细胞的 DNA 相对含量为 150, 结果显示其精细胞或精子 DNA 的相对含量为 150(图 4), 说明其已完成减数分裂, 形成了成熟的精细胞或精子。用流式检测其受精卵发育的担轮幼虫, 发现细胞中 DNA 的相对含量为 250, 为非整倍性。

3 讨论

3.1 三倍体长牡蛎精子的发生

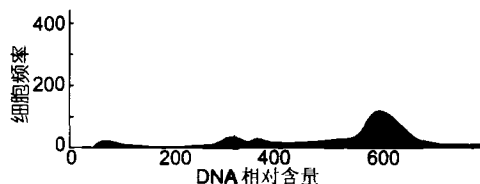


图 2 三倍体长牡蛎生殖细胞 DNA 相对含量 (示初级精母细胞)

Fig. 2 Flow cytometer analysis of gonad in male triploidy Pacific oyster, *C. gigas* (Primary oocyte)

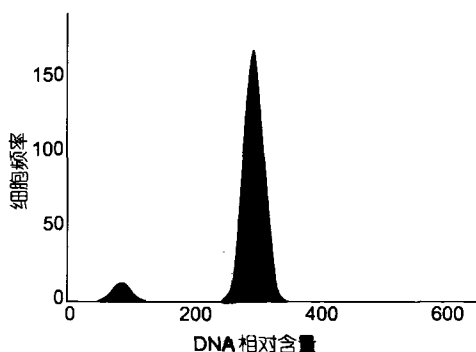


图 3 三倍体长牡蛎生殖细胞 DNA 相对含量 (示次级精母细胞)

Fig. 3 Flow cytometer analysis of gonad in male triploidy Pacific oyster, *C. gigas* (Secondary oocyte)

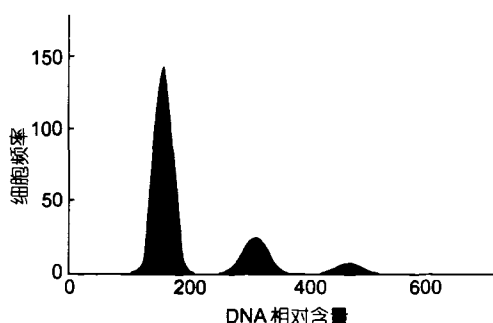


图 4 三倍体长牡蛎生殖细胞 DNA 相对含量 (示精子细胞或精子)

Fig. 4 Flow cytometer analysis of gonad in male triploidy Pacific oyster, *C. gigas* (sperm or Sperm cell)

Allen 等在 1990 年用组织学方法观察了海螂和太平洋长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, 产精、卵的数量少。Cox 1996 年报道悉尼岩石长牡蛎三倍体性腺结构, 没有发现成熟精、卵。姜卫国、何毛贤 1990 年对三倍体合浦珠母贝生殖腺进行研究, 认为雄性三倍体没有成熟精子形成, 而李霞^[1]观察到三倍体长牡蛎在成熟期, 滤泡内有大量成熟精、卵, 生殖管道内也有大量精、卵排出。作者认为在适当的条件下, 雄性三倍体长牡蛎能通过减数分裂产生有活力的精子, 但其雄配子的发生明显滞后于二倍体, 且发生极不同步。三倍体精子能使正常的卵受精, 产生非整倍体的幼虫。非整倍体受精卵较正常受精卵在发育上滞后。

3.2 三倍体长牡蛎的性别问题

Allen 等 1986 年发现三倍体海螂中雌性占 77%, 有 16% 可能为雌性或雌雄同体, 6% 不能确定性别, 没有见到雄性个体。姜卫国等在 53 个合浦珠母贝中观察到 3 个雄性 (5.66%), 50 个雌性 (94.34%), 没有见到雌雄同体。王永平 1998 年研究认为在二倍体长牡蛎的雌雄性别接近 1:1 时, 三倍体长牡蛎的雌雄性别比为 1:19, 有少量雌雄同体 (6.4%)。在此次实验中也发现二倍体的雌雄比为 1:1 时, 三倍体长牡蛎的雌雄性别比 1:18, 雌雄同体占 4%。三倍体软体动物性别异常的问题极为普遍, 除了外界环境的影响 (如食物, 水温) 外, 作者认为还和染色体的增加有关。

海洋动物性别决定的机理十分复杂^[2], 细胞学和遗传学研究表明海洋动物一般缺乏性染色体或处于性染色体进化的初级阶段, 不少种类性别受多基因影响, 这些基因分布在不同的染色体上, 存在着一种数量平衡。其次, 大部分海洋无脊椎动物无异形性染色体, 它们更多地表现为数量性状的特点, 即对环境变化比较敏感, 易受环境变化的影响, 如食物, 水温等都会对它的性别产生影响, 表现为彷徨变异。而三倍体长牡蛎染色体的加倍会破坏原有的数量平衡, 造成性

比紊乱。另外,也由于三倍体长牡蛎在繁殖季节,能量分配和二倍体不同,它的大部分能量用于生长,造成实际上三倍体用于性腺发育的能量远远少于二倍体,为间接性食物影响性别。综上所述,三倍体长牡蛎的性比变化可能是由以上两个原因共同引起的。🌿

参考文献

- 1 李霞、张国范。大连水产学院学报 1999, 14(2):1~6
- 2 张 璿、马军英、范 晓。海洋生物技术原理和应用。北京:海洋出版社, 1997, 59~62

PRELIMINARY STUDIES ON REPRODUCTION POTENTIALITY OF MALE TRIPLOIDY PACIFIC OYSTER, *Crassostrea gigas*

DING Jun¹ ZHANG Guo-fan² CHANG Ya-qing¹ LI Xia¹ GONG Ning²
(¹Key Lab of Maricultural Ecology Ministry of Agriculture Dalian Fisheries University, 116023)
(²Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Oct., 18, 2000

Key Words: Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Reproduction potentiality, Flow Cytometric

Abstract

The reproductive cell of diploidy and triploidy Pacific oyster, *Crassostrea gigas* were analyzed. The results show that small part of male triploidy oyster can produce living sperms and there sperm can make the normal diploidy eggs fertilize and yield aneuploidy embryo, but large part of them can only produce immature sperm cell. The test also find that the mature time of male triploidy gonad occurs later than normal diploidy, and their synchronization is not as good as diploidy.

(本文编辑:李本川)