

# 泥蚶初级卵母细胞发育及卵黄发生的超微结构研究

顾海龙<sup>1,2</sup>, 林志华<sup>2</sup>, 沈伟良<sup>3</sup>, 陈彩芳<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江 宁波 315100; 3. 宁波市海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315100)

**摘要:** 利用透射电镜技术观察了泥蚶(*Tegillarca granosa*)初级卵母细胞发育期间各细胞器的特征及卵黄粒的形成过程。结果显示: 泥蚶初级卵母细胞的发育过程可以分为卵黄合成前期、卵黄合成期及卵黄合成后期三个时期。在卵黄发生过程中, 线粒体、高尔基体、粗面内质网、微吞饮泡等都参与了卵黄粒的形成, 且线粒体和粗面内质网是形成卵黄粒的主要胞器。卵黄发生的原料以外源性合成为主, 外源性营养物质主要来自消化腺。

**关键词:** 泥蚶(*Tegillarca granosa*); 卵黄发生; 超微结构; 初级卵母细胞

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)01-0049-05

滩涂贝类养殖在我国有着悠久的历史, 已成为我国海水养殖业的一个生长点。我国海岸线漫长, 沿海滩涂面积约 200 万 ha, 发展滩涂贝类养殖空间十分广阔。但近年来, 由于烂采酷捕, 再加上环境污染, 致使滩涂贝类天然资源日趋衰竭, 因此, 需大力开展滩涂贝类的人工增养殖。而目前, 国内外关于滩涂贝类繁殖生物学方面的研究资料很少<sup>[1-3]</sup>。

在双壳贝类的卵子发生中, 除卵原细胞期外, 其他各期细胞均属初级卵母细胞阶段。此阶段为卵母细胞的生长时期, 在此时期, 卵子的各个不同的发育阶段, 主要的区分标志是卵黄颗粒的形成<sup>[4]</sup>。然而至今, 对初级卵母细胞的发育过程分期尚未形成统一论, 但基本大同小异, 大致可分为卵黄合成前期、卵黄合成期及卵黄合成后期<sup>[1,5-7]</sup>。

泥蚶(*Tegillarca granosa*)是我国重要的传统经济贝类之一, 是东南沿海地区的主要滩涂增养殖对象。近年来对于泥蚶的研究报道较多, 但主要集中在遗传育种<sup>[8-10]</sup>、免疫学<sup>[11-13]</sup>和生态毒理学<sup>[14-16]</sup>等方面, 而与繁殖相关的生殖细胞生物学研究仅见泥蚶精子超微结构的报道<sup>[17]</sup>。本文利用透射电镜对泥蚶初级卵母细胞发育及其卵黄发生过程进行了观察研究, 以期进一步丰富泥蚶的繁殖发育生物学基础理论。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

泥蚶采自浙江省宁波市甬盛水产种业有限公司,

分别于 2011 年 6 月、7 月及 8 月采样 3 次, 此时泥蚶正处于繁殖期, 每次取 10 只泥蚶, 解剖得到其卵巢。将卵巢一分为二, 一部分用于做组织切片观察, 进行性腺各发育期的鉴定; 另一部分用于进行电镜观察。

### 1.2 方法

利用组织切片观察, 获得性腺发育期处于间期、增殖期、生长期和成熟期的卵巢样品, 将其相应的另一部分卵巢组织用 2.5% 戊二醛固定后, 用 1% 锇酸进行二次固定, 乙醇系列脱水, Epon812 环氧树脂包埋, RMC POWER-TOME XL 超薄切片切片机切片, 醋酸铀柠檬酸铅双重染色, 日立 H-7650 型透射电镜观察、拍照。

## 2 结果

### 2.1 卵母细胞发育分期

根据透射电镜观察到的各时期卵巢样品中卵母细胞内各细胞器的变化和卵黄粒的形成与否, 将泥蚶卵母细胞的发育过程分成三个时期, 分别为卵黄合成前期、卵黄合成期、卵黄合成后期。

收稿日期: 2012-07-28; 修回日期: 2012-10-17

基金项目: 国家贝类产业技术体系项目(CARS-48); 宁波市科技创新团队项目(2011B82017); 宁波市自然科学基金项目(2011A610016)

作者简介: 顾海龙(1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向为海洋贝类养殖生物学, E-mail: ghl2006-happy@163.com; 陈彩芳, 通信作者, 讲师, 研究方向为海洋贝类环境生物学, E-mail: chencaifang@zwu.edu.cn

### 2.1.1 卵黄合成前期

此期卵母细胞形状不规则,胞体表面呈现大量的微绒毛(图 1-1,MV)。胞内细胞器较少,细胞核多呈球形或椭球形(图 1-3,N),一部分卵母细胞的细胞核形状开始发生变化,细胞核形成“伪足”状外凸(图 1-2,箭头示)。染色质聚集成块分布于核基质中(图 1-3)。细胞中线粒体较多,呈圆形或椭圆形(图 1-3,M)。粗面内质网不发达,其上布满核糖体(图 1-4,RER),周围分布少量的囊泡。高尔基复合体很少且不发达(图 1-4,G)。胞内溶酶体丰富,并存在少量电子密度较高的卵黄物质(图 1-4,箭头示)。质膜向内凹陷(图 1-5,箭头示)。

### 2.1.2 卵黄合成期

泥蚶卵黄合成时期,卵母细胞大量合成卵黄物质。细胞体积变大,仍为不规则形状。细胞质膜内侧有大量小泡(图 1-6,MP)。细胞核发生变化较大,核膜向内凹陷,内陷处的电子密度较高(图 1-5,双箭头示)。细胞边缘出现少量脂滴(图 1-6,L)。细胞中出现很多卵黄粒(图 1-7,Y)。线粒体数量明显增加,一部分线粒体开始膨大、泡化,内部嵴消失(图 1-8,箭头示),另一部分则保持原状(图 1-8,M)。粗面内质网非常发达,片层很多,可分为片层状(图 1-8,RER)和重叠的环状(图 1-9,RER)两种形态。高尔基复合体增多,其两端膨大、分离、融合形成大量的高尔基体囊泡分布于胞质中(图 1-10,GV)。

### 2.1.3 卵黄合成后期

卵黄形成后期,卵母细胞发育成熟,细胞体积达到最大。细胞内线粒体数量较多,内部嵴不甚发达,电子密度较低(图 1-11,M)。粗面内质网不发达,多为单层(图版 1-11,RER)。高尔基复合体不发达(图 1-11,G)。形态各异的卵黄粒分布于整个卵母细胞(图 1-11,Y)。

## 2.2 卵黄粒的来源

电镜观察发现,泥蚶卵母细胞发育过程中,线粒体、高尔基体、粗面内质网、微吞饮泡等都参与了卵黄的发生和卵黄粒的形成。

### 2.2.1 线粒体

卵黄发生过程中,散布于细胞质中的一部分线粒体外膜皱褶,体积膨胀、泡化,内部只残余少量短嵴,随后高电子密度的卵黄物质沉积于其中并逐渐充满整个线粒体,形成卵黄粒(图 1-12,MY)。线粒体演变成的卵黄粒初期仍具有线粒体的双层膜特征,

外膜呈波浪状。

### 2.2.2 高尔基复合体

泥蚶卵黄发生时,高尔基复合体数量增多,其扁平囊末端膨大、分离形成小泡,小泡随即互相融合形成高尔基体囊泡。胞质内的脂类和蛋白质在高尔基体囊泡内沉积、浓缩并最终演变为卵黄粒(图 1-10,GVY)。

### 2.2.3 粗面内质网

卵黄发生期间,粗面内质网很发达,一部分仍保持片层状结构,表面布满核糖体,另一部分则呈多层重叠的环状结构。片层状的内质网两端膨大形成小囊泡,小囊泡互相融合形成大泡,卵黄物质在其内沉积形成卵黄粒(图 1-13,Y);环状的内质网则包绕在线粒体、脂滴等物质周围形成卵黄粒(图 1-14,箭头示)。

### 2.2.4 微吞饮泡

微吞饮泡也是卵黄粒的来源之一。卵黄发生时,质膜内陷,形成吞饮泡,随着卵黄物质在其内沉积,吞饮泡逐渐成为电子密度较高的卵黄粒(图 1-6,MPY)。

## 3 讨论

### 3.1 泥蚶卵黄发生的特点

泥蚶初级卵母细胞卵黄发生期间,大多数细胞器的数量和形态都发生了明显的变化。卵黄合成前期,细胞内细胞器数量较少,粗面内质网、高尔基体等细胞器均不甚发达。随着卵黄合成的进行,线粒体等细胞器明显增多,质膜内部出现大量的微吞饮泡,内质网、高尔基复合体等片层增加,它们都以各自的形式参与着卵黄粒的形成。到卵黄形成后期,细胞器数量急剧减少,大量的卵黄粒充满整个细胞,卵母细胞发育成熟。由此可见,本研究发现泥蚶卵黄发生期间细胞内部的一系列变化与其他软体动物的研究结果基本一致<sup>[1-3,5-6,18-25]</sup>。

线粒体直接转变为卵黄粒的现象自从被 Favard 等在扁卷螺(*Planorbis*)中发现<sup>[22]</sup>后,已在文蛤(*Meretrix meretrix*)<sup>[11]</sup>、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)<sup>[2]</sup>、太平洋牡蛎(*Crassostrea giga*)<sup>[5]</sup>等多个物种中得到论证。泥蚶卵黄发生过程中也存在这一现象,上官步敏等将线粒体分为型和型两种<sup>[2]</sup>,本实验中观察到泥蚶卵母细胞内参与卵黄颗粒形成的线粒体多为球状或椭球状的型(图 1-3,M)。

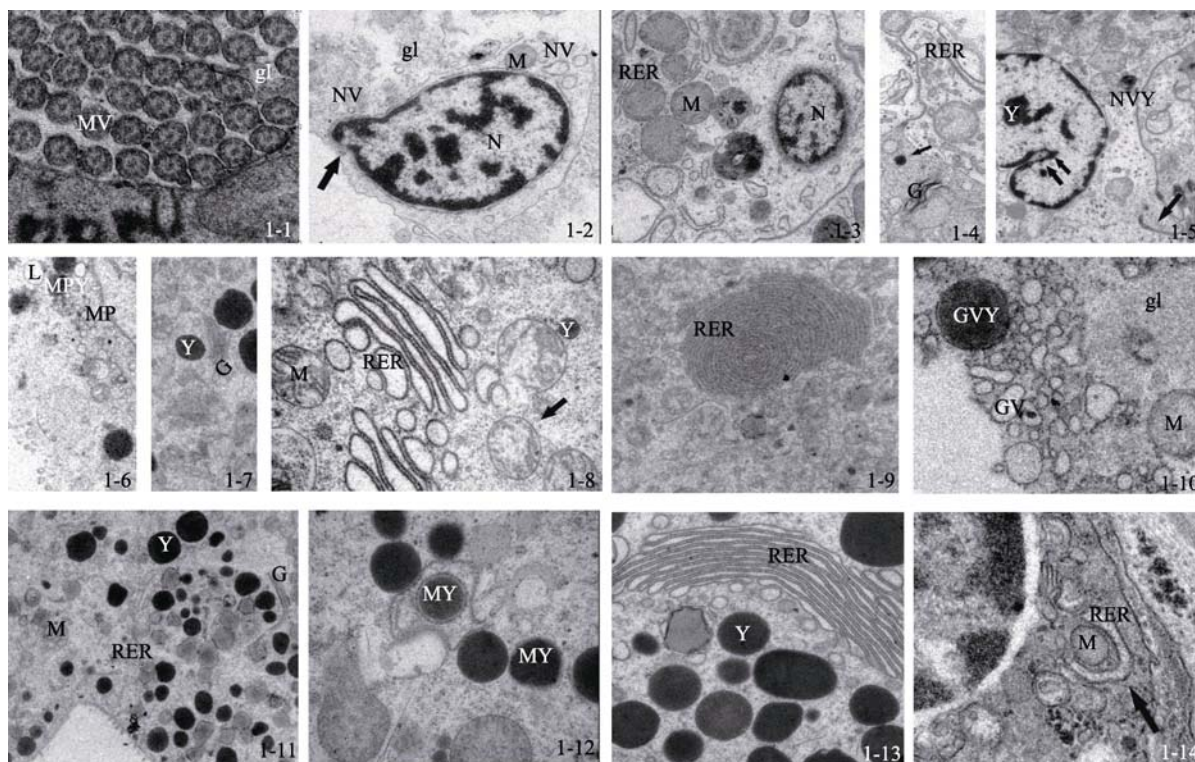


图 1 卵母细胞发育的组织学和超微结构观察

Fig. 1 Histology and ultrastructure observation of oocyte development

1-1.卵黄合成前期,示微绒毛及其周围糖原颗粒, × 25000; 1-2.卵黄合成前期,示伪足、核膜泡, × 30000; 1-3.卵黄合成前期,示椭圆形细胞核、线粒体, × 20000; 1-4.卵黄合成前期,示粗面内质网、高尔基体、卵黄颗粒, × 20000; 1-5.卵黄合成前期,示质膜内陷、细胞核“内吞”、核膜泡形成卵黄粒, × 20000; 1-6.卵黄合成期,示微吞饮泡、微吞饮泡形成卵黄粒、脂滴, × 7000; 1-7.卵黄合成期,示高尔基体形成高尔基液泡、卵黄颗粒, × 7000; 1-8.卵黄合成期,示片层状粗面内质网两端膨化、线粒体空泡化, × 40000; 1-9.卵黄合成期,示环状内质网包绕脂滴形成卵黄粒, × 7000; 1-10.卵黄合成期,示高尔基液泡形成卵黄粒, × 15000; 1-11.卵黄合成后期,示粗面内质网、高尔基体、线粒体、卵黄粒, × 7000; 1-12.卵黄合成后期,示线粒体形成卵黄粒, × 40000; 1-13.卵黄合成期,示片层状内质网两端膨化形成卵黄粒, × 30000; 1-14.卵黄合成期,示环状内质网包绕线粒体形成卵黄粒, × 50000

1-1. At previtellogenic stage, shows microvilli and its surrounding glycogen-like granules, × 25000; 1-2. At previtellogenic stage, shows pseudopodia and nucleus vesicle, × 30000; 1-3. At previtellogenic stage, shows oval nucleus and mitochondria, × 20000; 1-4. At previtellogenic stage, shows rough endoplasmic reticulum, golgi complex and yolk granules, × 20000; 1-5. At previtellogenic stage, shows the plasma membrane invagination, the nucleus endocytosis and the Nucleus vesicle forming yolk granules, × 20000; 1-6. At vitellogenic stage, shows micropinocytes vesicle, yolk formed by micropinocytes vesicle and lipid droplet, × 7000; 1-7. At vitellogenic stage, shows golgi complex forming golgi vesicle and yolk granules, × 7000; 1-8. At vitellogenic stage, shows both ends of the lamellar rough endoplasmic reticulum expanding and mitochondrial vacuolization, × 40000; 1-9. At vitellogenic stage, shows the ring rough endoplasmic reticulum surrounding the lipid droplets to form yolk granules, × 7000; 1-10. At vitellogenic stage, shows yolk formed by golgi vesicle, × 15000; 1-11. At potavitellogenic stage, shows rough endoplasmic reticulum, golgi complex, mitochondria and yolk granules, × 7000; 1-12. At postvitellogenic stage, shows yolk formed by mitochondria, × 40000; 1-13. At vitellogenic stage, shows yolk formed by the lamellar rough endoplasmic reticulum expanding, × 30000; 1-14. At vitellogenic stage, shows yolk formed by the ring rough endoplasmic reticulum surrounding the mitochondria, × 50000

MV.微绒毛; MP.微吞饮泡; MPY.微吞饮泡形成卵黄粒; M.线粒体; MY.线粒体形成卵黄粒; RER.粗面内质网; L.脂滴; Y.卵黄粒; N.细胞核; NV.核膜泡; NVY.核膜泡形成卵黄粒; G.高尔基复合体; GV.高尔基液泡; GVY.高尔基液泡形成卵黄粒; gl.糖原颗粒

众学者对粗面内质网参与卵黄粒形成的方式所持观点较多,概括起来可分为两种:一种是呈环状包绕在线粒体、脂滴、小囊泡或卵黄颗粒周围形成卵黄粒;另一种是内质网两端膨大形成小囊泡,小囊泡互相融合形成大泡,卵黄物质在大泡内沉积形

成卵黄粒。各物种的观察结果不尽相同:文蛤<sup>[1]</sup>、缢蛏<sup>[2]</sup>、青蛤<sup>[3]</sup>、太平洋牡蛎<sup>[5]</sup>、栉孔扇贝<sup>[23]</sup>中两种形式均有;贻贝<sup>[18,24]</sup>、僧帽牡蛎<sup>[21]</sup>、皱纹盘鲍<sup>[25]</sup>中只存在第一种形式;墨西哥湾扇贝<sup>[6]</sup>只存在第二种形式。在泥蚶中的观察结果与大多数贝类相同,粗面内

质网以两种形式参与卵黄粒的形成。

高尔基体在卵黄形成的过程中也较活跃, 与其他物种一样, 泥蚶卵母细胞中的高尔基体主要以分离成大量的高尔基液泡的形式来形成卵黄粒。高尔基体是对细胞分泌物进行最后加工和包装的细胞器, 这可能是高尔基体在卵黄合成前期数量很少, 而后期相对较多的主要原因。

与其他参与卵黄粒形成的细胞器相比, 线粒体和内质网的作用更为明显。卵黄发生期间, 线粒体的数目急剧增加, 且大部分的线粒体内部嵴逐渐溶解消失, 形成卵黄粒; 内质网高度发达, 到卵黄合成后期, 细胞内仍可见相当数量的内质网潴泡。因此, 我们认为, 线粒体和粗面内质网是泥蚶卵黄发生过程中形成卵黄粒的主要胞器。

### 3.2 卵黄发生的物质来源

众所周知, 卵黄发生的物质来源分为内源性和外源性两种<sup>[26]</sup>。卵黄发生期间卵母细胞内的卵黄物质非常丰富, 这显然是内源性和外源性两种途径共同作用获得的。

内源性卵黄发生主要由线粒体、粗面内质网及其他细胞器完成。外源性卵黄发生则依靠卵母细胞表面的受体介导内吞作用<sup>[27]</sup>, 将卵母细胞外的营养物质运送至卵母细胞内, 为卵黄的发生提供原料。随着发育的进行, 卵母细胞逐渐脱离滤泡细胞, 仅通过桥粒结构与滤泡细胞相连<sup>[28]</sup>。本研究中卵母细胞表面产生大量的微绒毛, 电镜下的微绒毛横截面管腔清晰可见(图 1), 且微绒毛伸入滤泡细胞内, 其基部膨大, 周围聚集大量的糖原颗粒(图 1-1, gl), 通过微绒毛管腔以吞饮泡的形式进入卵母细胞。滤泡细胞虽然通过这种方式参与了卵黄的发生, 但它数量少、体积小并且卵黄发生期间的自身变化不大, 这都决定了它作为外源性原料的局限性。泥蚶与其他双壳贝类一样<sup>[1,5,29]</sup>, 营养物质主要贮存于消化腺, 生殖期间, 性腺紧紧包绕在消化腺的周围, 而肠道组织穿过性腺, 且解剖泥蚶时发现, 性腺越好的泥蚶消化腺相对越小。所以, 作者认为泥蚶卵黄发生时期外源性营养物质主要来源于消化腺。

参考文献:

- [1] 应雪萍. 文蛤卵母细胞卵黄发生的超微结构[J]. 中国水产科学, 2002, 9(2): 125-128.
- [2] 上官步敏, 刘正琮. 缢蛏卵母细胞卵黄发生过程的超微结构研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(1): 48-52.
- [3] 曾志南, 李复雪. 青蛤卵母细胞发育过程和卵黄发生的超微结构研究[J]. 海洋学报, 1991, 13(5): 679-683.
- [4] 廖承义, 徐应馥, 王远隆. 栉孔扇贝的生殖周期[J]. 水产学报, 1983, 7(1): 1-13
- [5] 任素莲, 王德秀, 王如才. 太平洋牡蛎卵母细胞发育及卵黄发生的超微结构[J]. 中国水产科学, 1999, 6(4): 1-5.
- [6] 袁秀堂, 周一兵, 王丽丽. 墨西哥湾扇贝初级卵母细胞发育及卵黄发生超微结构的初步研究[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(1): 16-19.
- [7] 高岩, 侯林, 周革. 软体动物腹足类卵子发生的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2008, 14(11): 43-45.
- [8] 姚韩韩, 董迎辉, 林志华, 等. 泥蚶 4 个快速生长家系的遗传变异分析[J]. 水产学报, 2011, 35(3): 340-347.
- [9] 孙长森, 林志华, 董迎辉, 等. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)主要经济性状遗传参数的估算[J]. 海洋与湖沼, 2011, 41(6): 907-913.
- [10] 顾晓英, 曾庆国, 尤仲杰, 等. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)6 个微卫星引物的分离和鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(6): 661-664.
- [11] 朱泽闻, 徐立蒲, 吴信忠, 等. 泥蚶血细胞的形态结构特征及部分免疫功能[J]. 水产学报, 2011, 35(10): 1494-1502.
- [12] 潘沙芳, 李太武, 苏秀榕. 泥蚶血细胞耐饥饿及抗菌力特性的研究[J]. 水产科学, 2007, 26(1): 22-25.
- [13] Bao Y B, Wang Q, Liu H M, et al. A small HSP gene of bloody clam (*Tegillarca granosa*) involved in the immune response against *Vibrio parahaemolyticus* and lipopolysaccharide[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(2): 729-733.
- [14] 解家松, 许婷, 刘玮, 等. 泥蚶金属硫蛋白的鉴定、原核重组表达及其组织细胞分布[J]. 中国水产科学, 2011, 18(5): 955-964.
- [15] Jin C H, Li C H, Su X R, et al. Identification and characterization of a *Tegillarca granosa* ferritin regulated by iron ion exposure and thermal stress[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2011, 35(7): 745-751.
- [16] 李学鹏, 励建荣, 等. 泥蚶对重金属铜、铅、镉的生物富集动力学[J]. 水产学报, 2008, 32(4): 592-600.
- [17] 孙慧玲, 方建光, 等. 泥蚶精子的超微结构[J]. 水产学报, 2000, 24(4): 297-301.
- [18] Pipe R K. Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis*: an ultrastructural study[J]. Mar Biol, 1987, 95:

- 405-414.
- [19] Galtsoff P S. The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin[J]. Fish Bull US, 1964, 64: 1-480.
- [20] Dorange G L, Pennec M. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieu[J]. Mar Biol, 1989, 103: 339-348.
- [21] 林加涵, 汪德耀. 僧帽牡蛎卵母细胞卵黄发生的超微结构研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1983, 22(3): 354-363.
- [22] Favard P, Carasso N. Origine et ultrastructure des plaquettes vitellines de la Planorbe[J]. Arch Anat Pathol (Paris), 1958, 47(2): 211-234.
- [23] 刘德模, 洪水根. 栉孔扇贝卵母细胞卵黄发生的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1996, 35(3): 412-416.
- [24] 陈立江, 李春茂, 迟庆宏, 等. 贻贝卵巢超微结构的研究[J]. 大连水产学院学报, 1999, 14(2): 14-19.
- [25] 阎松, 李霞, 穆军, 等. 皱纹盘鲍卵母细胞发育的超微结构和组织化学观察[J]. 动物学报, 2010, 4(1): 12-25.
- [26] Eckelbarger K J, Bogan E V, Coan F G. Structure of the ovotestis and evidence for hetero-synthetic incorporation of yolk precursors in the oocytes of the nudibranch mollusk, *Spurilla neapolitana*[J]. Journal of Morphology, 1989, 201: 105-118.
- [27] Schechtman A M. Ontogeny of blood and related antigens and their significance for the theory of differentiation [M]. Princeton: Princeton University Press, 1955:3-31.
- [28] Kevin J E, Craig M Y. Ultrastructure of the Ovary and Oogenesis in the Methane-Seep Mollusc *Bathynnerita naticoidea* (Gastropoda: Neritidae) from the Louisiana Slope[J]. Invertebrate Biology, 1997, 116(4): 299-312.
- [29] Eckelbarger K J, Davis C V. Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. I. Ovary and oogenesis[J]. Marine Biology, 1996, 127: 79-87.

## Ultrastructural studies on the development of primary oocytes and vitellogenesis of *Tegillarca granosa*

GU Hai-long<sup>1,2</sup>, LIN Zhi-hua<sup>2</sup>, SHEN Wei-liang<sup>3</sup>, CHEN Cai-fang<sup>2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China; 3. Ningbo Academy of Ocean and Fishery, Ningbo 315100, China)

**Received:** Jul., 28, 2012

**Key words:** *Tegillarca granosa*; vitellogenesis; ultrastructure; primary oocyte

**Abstract:** The ultrastructural features of the oogenesis and the formation of yolk granules of *Tegillarca granosa* are using transmission electron microscope. The primary oocyte developmental process is divided into three stages: previtellogenic stage, vitellogenic stage and postvitellogenic stage. Mitochondria, golgi complex, rough endoplasmic reticulum and micro-pinocytosis bubble all participate in the formation of yolk granules and the rough endoplasmic reticulum and mitochondria are key organelles in this process. The heterosynthetic process is the main form of oogenesis, and the exogenous nutrients are mainly from the digestive gland.

(本文编辑: 梁德海)