

# 三倍体皱纹盘鲍 (*Haliotis discus Hannai*) 性腺发育的生物学研究\*

李霞 阎松 张国范<sup>†</sup> 王子臣

(农业部海洋水产增养殖与生物技术重点开放实验室 大连水产学院 大连 116023)

<sup>†</sup>(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**提要** 采用光镜和电镜方法,观察了吊笼式人工养殖三倍体皱纹盘鲍性腺发育情况,并与二倍体进行比较。结果表明,三倍体鲍性腺发育分期基本与二倍体相同,但雄性腺发育停止在生长期,雌性腺少数可达成熟期,没有发现排放期。三倍体鲍性腺发育较二倍体差,表观看其性腺薄,只包围肝胰腺 1/3—1/2,颜色浅。7—10 月间检查的 86 个二倍体个体中成熟期的占 24.4%,休止期占 11.6%。而 83 个三倍体个体中,成熟期占 1.2%,休止期占 72.3%。三倍体成熟卵母细胞直径、核径、线粒体直径、胶膜厚度较二倍体大,但卵黄颗粒、线粒体、粗面内质网等细胞器较二倍体少。

**关键词** 三倍体皱纹盘鲍,性腺发育,生物学

**中图分类号** Q954.43

近年来,三倍体贝类的研究发展很快,尤其是诱导方法和一些生物学特性的研究(周一兵等, 2002);性腺发育和配子形成也有报道,如僧帽牡蛎 *Saccostrea cucullata* (曾志南等, 1998)、悉尼岩牡蛎 *Saccostrea commercialis* (Cox et al., 1996)、砂海螂 *Mya arenaria* (Allen et al., 1986)、太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* (Allen et al., 1990)、合浦珠母贝 *Pinctada martensi* (何毛贤等, 1996)、杂色鲍 *Haliotis diversicolor* (工藤真弘等, 1994)等。

皱纹盘鲍是我国北方主要经济养殖贝类,其营养需求和遗传特性分析等研究有一些报道(周歧存等, 2001, 张国范等, 2002)。皱纹盘鲍三倍体的研究主要集中在三倍体的制备技术方面(Zhang et al., 1998; 毛连菊等, 2000),而有关性腺发育生物学的研究尚未见系统报道。本文采用光镜和电镜技术,通过切片观察,对三倍体皱纹盘鲍雌、雄性腺的发育进行了系统研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用皱纹盘鲍(*Haliotis discus Hannai*)取自大连碧龙海珍品有限公司,在海上以笼养的方式养殖,

喂以海带和少量配合饵料。于 2001 年 7—10 月皱纹盘鲍性腺发育繁殖期分 8 次取样(7 月 7 日、7 月 21 日、8 月 1 日、8 月 16 日、9 月 1 日、9 月 19 日、10 月 9 日、10 月 31 日),共处理样品 169 个。三倍体皱纹盘鲍是 1997 年春用咖啡因加热休克诱导第一极体产生的,成体三倍体率为 50%,壳长为(5.15 ± 0.07)cm。二倍体为未经诱导的同批皱纹盘鲍,壳长为(5.68 ± 0.07)cm。

### 1.2 倍性确定

根据性腺发育情况,每次随机取诱导过的皱纹盘鲍 10—30 个,剪取 2—3 个上足触角,加入适量 DAPI,切碎,用 Vortex 震荡器震荡,经 20—40 $\mu$ m 的筛网过滤后,细胞悬液加入测试管中,以正常二倍体细胞为标准,用流式细胞仪检测倍性。

### 1.3 光镜样品制备

观察每个鲍生殖腺的外部形态特征后,将性腺切成 0.5cm<sup>3</sup> 小块, Bouin's 液固定,常规石蜡切片,切片厚度 5 $\mu$ m, H.E 染色, Olympus 显微镜观察、拍照。

### 1.4 电镜样品制备

将性腺切成 0.2cm<sup>3</sup> 小块, 3% 戊二醛固定, 1% 锇酸后固定, 各级酒精脱水, EPON812 包埋, 醋酸铀和柠檬酸

\* 国家自然科学基金资助项目, 39870700 号。李霞, 教授, E-mail: dbswq@mail dlptt.ln.cn

1) 通讯作者: E-mail: gzhzhang@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2002-08-16; 收修改稿日期: 2003-01-02

铅染色, JEM-1200 型透射电镜观察和拍照。

### 1.5 卵径、核径、线粒体直径的测定

在光学显微镜下随机测定 200 个二倍体和三倍体成熟卵母细胞直径、核径、胶膜厚度, 在电子显微镜下分别测定二倍体和三倍体卵母细胞中线粒体的长径, 各 200 个。

## 2 结果

### 2.1 性腺发育表现特征

皱纹盘鲍二倍体生殖腺呈刀鞘状, 覆盖在肝胰腺外表面, 在发育繁殖期性腺饱满, 几乎覆盖整个肝胰腺, 但在非发育繁殖期不易见。雄性生殖腺为奶黄色, 雌性生殖腺为灰绿色。三倍体生殖腺发育程度差, 多数个体生殖腺肉眼不可见或仅有薄薄一层, 雄性腺为浅黄或灰黄色, 长度仅可覆盖肝胰腺的一半, 雌性腺为浅绿色, 长度仅为肝胰腺的 1/3。根据生殖腺表现特征即可初步鉴别倍性。

### 2.2 生殖腺发育的组织学观察

**2.2.1 三倍体皱纹盘鲍性腺发育分期** 于 2001 年 7—10 月对二倍体和三倍体皱纹盘鲍生殖腺发育进行组织学观察, 参照刘永峰等(1985)对二倍体皱纹盘鲍性腺发育分期方法, 即根据性腺中生殖细胞本身的发育规律及其所占的比例, 将皱纹盘鲍生殖腺发育分为 5 期: 休止期、增殖期、生长期、成熟期和排放期。三倍体皱纹盘鲍生殖腺发育也可依据这 5

个期来划分, 但雌性腺没有发现排放期, 雄性腺只达生长期。各期主要特征如下:

**休止期(I):** 生殖腺外观不易看出, 其内有少量的精原细胞或卵原细胞, 一些雌性生殖腺内可见个别卵黄形成前期卵母细胞(图 1a)。

**增殖期(II):** 生殖腺外观分不出雌雄。性腺内生殖细胞数量明显增加。精巢内间隙变小, 主要为精原细胞和初级精母细胞(图 1b)。卵巢内卵原细胞数量增多, 能见到少量卵黄形成前期的初级卵母细胞(图 1c)。

**生长期(III):** 生殖腺增厚, 性别肉眼可辨。精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞呈多层排列, 并可见少量具团块状或长柱形滞育精子细胞(SD)、无精子(S)(图 1d、图 1e)。雌性生殖腺内除大量卵原细胞外, 开始出现少量的卵黄形成后期的初级卵母细胞(图 1f)。

**成熟期(IV):** 三倍体雄体无一达到此期。三倍体卵巢内可见一定数量的卵黄形成后期的初级卵母细胞(O), 这些细胞呈游离状, 外被较厚的胶膜(J)(图 1g、图 1h)。

**2.2.2 三倍体鲍成熟卵母细胞的结构特点** 由表 1 可知, 三倍体成熟卵母细胞卵径、核径分别比二倍体长 29.7% 和 21.3%, 胶膜增厚 80.6%。计算可知三倍体卵母细胞和核的体积分别增加 118.5% 和 78.5%。

表 1 三倍体和二倍体成熟卵母细胞的比较

Tab. 1 Comparison of mature oocyte between triploid and diploid abalone

倍性	卵径( $\mu\text{m}$ )	核径( $\mu\text{m}$ )	胶膜厚度( $\mu\text{m}$ )	线粒体直径( $\mu\text{m}$ )
3N	216.2 ± 2.79	96.2 ± 1.91	12.1 ± 0.35	0.66 ± 0.01
2N	166.6 ± 2.09	79.3 ± 1.58	6.7 ± 0.27	0.53 ± 0.01

电镜下, 三倍体成熟卵母细胞结构与二倍体基本相同, 具有较厚、着色很浅的胶膜(J), 其内还有较薄的卵膜。大量的囊泡(V)深入到胶膜中, 线粒体(M)较二倍体卵母细胞的体积大, 滑面内质网丰富, 但粗面内质网较少, 卵黄颗粒(Y)和脂滴(L)数量也较少, 核膜溶解(图 1i、图 1j)。

**2.2.3 三倍体鲍精巢滞育细胞的结构** 光镜下, 在生长期的精巢中有一些形态多样、核染色很深的体积较小的畸形细胞, 这些均为精子细胞。电镜下畸形细胞表现为线粒体、内质网数量很少, 但溶酶体(LY)、游离核糖体数量明显增多, 细胞核(N)形态多样, 呈锥形、泡状等, 没有出现顶体(A)和辐射对称

排列的线粒体(M)(图 1k、图 1l)。

**2.2.4 二倍体与三倍体鲍性腺发育各期的比例比较** 7—10 月份检查皱纹盘鲍性腺发育情况, 各个时期及其所占比例见表 2 和表 3。

二倍体皱纹盘鲍性腺 7 月份处于增殖期、生长期的个体分别占 32.3% 和 35.5%, 没有个体处于成熟期; 8 月份以生长期为主, 占 58.3%, 有 12.5% 的个体发育到成熟期; 9 月份以成熟期个体占多数, 达 73.3%; 10 月份 43.8% 的个体处于成熟期, 并有 50% 的鲍已排放精卵。7 月份检查 18 个三倍体个体全部处于休止期; 8 月份的 21 个个体中, 只有 14.3% 在增殖期, 其余仍为休止期; 9 月份共检查了



图1 三倍体皱纹盘鲍性腺发育

Fig.1 The gonadal development of triploidy abalone

a. 三倍体皱纹盘鲍休止期的卵巢,  $\times 200$ ; b. 三倍体皱纹盘鲍增殖期的精巢,  $\times 200$ ; c. 三倍体皱纹盘鲍增殖期的卵巢,  $\times 100$ ; d, e. 三倍体、二倍体皱纹盘鲍生长期的精巢,  $\times 200$ ; f. 三倍体皱纹盘鲍生长期的卵巢,  $\times 100$ ; g-j. 三倍体、二倍体皱纹盘鲍卵黄形成后期的初级卵母细胞: g. 三倍体,  $\times 100$ ; h. 二倍体,  $\times 100$ ; i. 二倍体,  $\times 10\ 000$ ; j. 三倍体,  $\times 12\ 000$ ; k. 二倍体皱纹盘鲍的精子,  $\times 15\ 000$ ; l. 三倍体皱纹盘鲍滞育精子细胞,  $\times 400$

26 个个体, 53.8% 处于休止期, 23.1% 处于增殖期, 23.1% 处于生长期; 10 月份检查的 18 个个体中, 休止期占 55.5%, 增殖期占 22.2%, 生长期占 16.7%, 只有一个雌性个体发育到成熟期, 占 5.6%。

三倍体皱纹盘鲍发育受阻, 大部分处于休止期。

三倍体雄性腺增殖期发育状况与二倍体相似, 达到生长期的比例高于雌性个体, 但发育停滞在精子细胞阶段, 没有成熟精子形成。三倍体雌性腺少数可达成熟期, 但仍以卵原细胞占多数, 卵黄形成后期卵母细胞数量少。

表 2 二倍体和三倍体皱纹盘鲍生殖腺发育时期比例

Tab.2 The rate of development stage on gonads of diploid and triploid abalone

倍性	总数	生殖腺发育分期				
		I (%)	II (%)	III (%)	IV (%)	V (%)
2N	86(42♀, 44♂)	10(11.6)	17(19.8)	30(34.9)	21(24.4)	8(9.3)
3N	83(40♀, 43♂)	60(72.3)	13(15.7)	9(10.8)	1(1.2)	

注:括号内数据为百分比(%),表 3 同

表 3 发育繁殖期二倍体和三倍体皱纹盘鲍生殖腺发育各期比例

Tab.3 The rate of gonadal stage of diploid and triploid abalone during developing and reproductive period

月份	2N					3N					
	总数	I	II	III	IV	V	总数	I	II	III	IV
7	31	10(32.3)	10(32.3)	11(35.5)			18	18(100)			
8	24		7(29.2)	14(58.3)	3(12.5)		21	18(85.7)	3(14.3)		
9	15			4(26.7)	11(73.3)		26	14(53.8)	6(23.1)	6(23.1)	
10	16			1(6.2)	7(43.8)	8(50)	18	10(55.5)	4(22.2)	3(16.7)	1(5.6)

### 3 讨论

#### 3.1 三倍体贝类的性腺发育

从已有的研究来看,三倍体贝类性腺发育可分为两种情况:(1)性腺发育受到抑制,没有成熟、发育正常的精子和卵子形成,如海湾扇贝(Tabarini, 1984)、砂海螂(Allen *et al.*, 1986)、华贵栉孔扇贝(Komaru *et al.*, 1989)、悉尼岩牡蛎(Cox *et al.*, 1996)。(2)性腺发育部分受到抑制,虽有成熟的雌或雄配子形成,但数量较少,如三倍体太平洋牡蛎(Allen *et al.*, 1990)、合浦珠母贝(何毛贤等, 1996)、美洲牡蛎(Barber *et al.*, 1991)等。三倍体皱纹盘鲍性腺发育情况与后者相似,能产生少量成熟的卵母细胞,但没有精子形成。工藤真弘等(1994)对三倍体杂色鲍性腺发育的研究结果与皱纹盘鲍一致。从理论上讲,三倍体贝类性腺发育和配子发生受阻是因为三套同源染色体在成熟分裂的第一次分裂时随机分裂造成非整倍体的次级精(卵)母细胞,这样的非整倍体次级精(卵)母细胞不能产生正常倍性的精子细胞和卵子,所以三倍体贝类生殖细胞的最终命运都是要停止发育或败育的,只是阶段不同而已,这在精子形成过程中明显,而卵母细胞需要受精以后乃至胚胎发育阶段才能表现出来,何毛贤等(2000)对合浦珠母贝的研究也说明了这一点。只有极少的整倍体精子和卵子,才能正常存活下来。非整倍体是影响三倍体贝类配子发生和胚胎发育的主要原因。

#### 3.2 三倍体皱纹盘鲍成熟卵母细胞

三倍体皱纹盘鲍卵巢中虽能形成一定数量的卵黄形成后期的卵母细胞,但这些细胞结构上与二倍

体卵母细胞有所不同,表现在卵体积、核体积较大,胶膜比较厚,线粒体、粗面内质网等细胞器以及卵黄颗粒的数量较少等,与三倍体太平洋牡蛎(曾志南等, 1999)、合浦珠母贝(何毛贤等, 2000)的报道相似。由于参与卵黄合成的线粒体和粗面内质网数量少,使得卵母细胞内卵黄颗粒数量少,卵子营养物质积累不足,这样的个体在幼虫发育阶段极易死亡。所以引起三倍体贝类子一代死亡的原因除非整倍体外(何毛贤等, 2000),还与营养积累有关。有关三倍体皱纹盘鲍卵受精能力以及幼虫发育还有待进一步研究。

#### 3.3 三倍体皱纹盘鲍精巢中滞育细胞

在已报道的三倍体贝类中,悉尼岩牡蛎(Cox *et al.*, 1996)、砂海螂(Allen *et al.*, 1986)、九孔鲍(工藤真弘等, 1994)等雄配子发生停留在精子细胞阶段,没有成熟的精子形成。关于贝类滞育精子细胞的结构特点未见系统报道。本文研究了三倍体皱纹盘鲍精巢的超微结构,在精子细胞阶段,出现许多染色很深的畸形细胞,电镜下这些细胞的线粒体、粗面内质网等细胞器减少,溶酶体的数量增加,细胞核固缩、染色致密或中央出现大空泡,形态多样,没有发现顶体和呈玫瑰花样排列的线粒体。三倍体湘云鲫滞育的精子细胞内出现空泡,细胞内的物质解体或消失(刘少军等, 2000),与皱纹盘鲍有相似之处。比较二倍体贝类精子细胞中各细胞器的作用,可得出这样的结论:线粒体数量减少,影响了精子细胞的能量转换;而粗面内质网的减少,使得顶体的形成受到影响,就不能完成由精子细胞到精子的变态分化过程。染色体与

细胞器之间的关系还有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- 毛连菊, 王子臣, 刘相全等, 2000. 咖啡因加热休克诱导皱纹盘鲍多倍体的研究. 遗传学报, 27(11): 959—965
- 刘永峰, 刘永襄, 隋锡林等, 1985. 大连海区皱纹盘鲍生殖周期的研究. 水产学报, 9(4): 311—319
- 刘少军, 胡芳, 周工建等, 2000. 三倍体湘云鲫繁殖季节的性腺结构观察. 水生生物学报, 24(4): 301—306
- 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
- 何毛贤, 沈琪, 林岳光等, 2000. 合浦珠母贝三倍体的卵诱导四倍体. 水产学报, 24(1): 22—27
- 张国范, 王继红, 赵洪恩等, 2002. 皱纹盘鲍中国群体和日本群体的自交与杂交 F<sub>1</sub> 的 RAPD 标记. 海洋与湖沼, 33(5): 484—491
- 周歧存, 麦康森, 谭北平等, 2001. 维生素 E 对皱纹盘鲍幼鲍生长、存活及体成分的影响. 海洋与湖沼, 32(2): 125—131
- 周一兵, 李晓艳, 屈英等, 2002. 太平洋牡蛎三倍体与二倍体特殊动力代谢的比较. 海洋与湖沼, 33(6): 663—672
- 曾志南, 林琪, 吴建绍等, 1998. 三倍体僧帽牡蛎生殖腺发育观察. 水产学报, 22(2): 97—106
- 曾志南, 林琪, 吴建绍等, 1999. 太平洋牡蛎二倍体和三倍体卵母细胞发育的超微结构. 水产学报, 23(2): 109—114
- 上藤真弘, 荒井克俊, 木本巧等, 1994. フクトコブシんが三倍体の生残、生長および成熟. 水产増殖, 42(4): 605—613
- Allen S K, Hidu H H, Stanley J G, 1986. Abnormal gametogenesis and sex ration in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*). Biol Bull, 170(2): 198—210
- Allen S K, Downing S L, 1990. Performance of triploid Pacific oysters. *Crassostrea gigas*: gametogenesis. Can J Fish Aquat Sci, 47: 1213—1222
- Barber B J, Mann R, 1991. Sterile triploid *Crassostrea virginica* Genelin grow faster than diploids but are equally susception to *Perkinsus marinus*. J Shellfish Res, 10: 445—450
- Cox E S, Smith M S R, Nell J A *et al*, 1996. Studies on triploid oysters in Australia: IV gonad development in diploid and triploid sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). J Exp Mar Biol Ecol, 197: 101—120
- Komaru A, Wada K T, 1989. Gametogenesis and growth of induced triploid scallops, *Chlamys nobilis*. Bull Jap Soc Fish, 55(3): 447—452
- Tabarini C L, 1984. Induced triploid in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. Aquaculture, 42: 151—160
- Zhang Guofan, Wang Zichen, Chang Yaqing *et al*, 1998. Triploid induction in Pacific abalone *Haliotis discus Hannai* by 6-DMAP and the performance of triploid juveniles. J Shellfish Res, 17(3): 783—788

## THE BIOLOGY OF GONADIAL DEVELOPMENT OF TRIPLOIDY ABALONE (*HALIOTIS DISCUS HANNAI*)

LI Xia, YAN Song, ZHANG Guo-Fan<sup>†</sup>, WANG Zi-Chen

(Key Lab. of Mariculture & Biotechnology Agriculture Ministry, Dalian Fisheries University, Dalian, 116023)

<sup>†</sup> (Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

**Abstract** Contrary to most previous research, which focused on methods of inducing triploid, growth and hereditary features of abalone (*Haliotis discus Hannai*), this work investigated gonadal development of triploid and diploid disk abalone cultured artificially in cages with light microscopy and electromicrocopy. During 1997, triploid disk abalones were induced by caffeine and heat shock. The results showed that gonadal development stages of the triploid abalones were the same as that of the diploid, but testis development stopped during the growth period while the ovary developed to the mature stage. The spawning stage was not found. The triploid gonad was thin and light in colour, the length was only about the 1/3—1/2 length of the pancreance. The percentage of mature individuals were 24.4% and 11.6% in the resting period in diploid abalones, but 1.2% in the mature stage and 72.3% in the resting stage in triploid abalones. Gonad development of triploid was prevented. The diameter of the oocyte, nuclei, mitochondria of triploid abalone were longer than that of the diploid as was the jelly coat. The mount of yolk granula, however, the mitochondria and the endoplasmic reticulum of the oocyte in the triploidy gonad were less than that of the diploid. This may influence the development of early life and result in larvae death. The structure of spermatid and spermiogenesis were observed in the diploid of abalones but no mature sperm in the testis of the triploid abalone was found. There was also a lot of deformed spermatid with abnormal cell organs, such as the mount of mitochondria and endoplasmic reticulum decreased and the lysosome increased and multiple holes in the nuclei. In addition, the mitochondria was not arranged in a rose-like style which, while distinct from *Crassostrea gigas* Thunberg and *Pinctada martensii* (Dunker), was common to that found in *Saccostrea commercialis*, *Mya arenaria* and *Haliotis diversicolors*.

**Key words** Triploidy abalone, Gonad development, Biology