

太平洋牡蛎二倍体和三倍体 卵母细胞发育的超微结构

曾志南 林琪 吴建绍 陈朴贤 陈木
(福建省水产研究所病害防治研究室, 厦门 361012)

摘要 本文利用电子显微镜比较研究了太平洋牡蛎二倍体和三倍体卵母细胞发育过程中细胞和各细胞器的超微结构变化。结果表明, 在卵黄形成期, 二倍体卵母细胞呈椭圆形, 细胞器发达, 细胞外布满微绒毛, 卵黄粒多并均匀分布于细胞质中, 卵母细胞生物合成旺盛, 代谢活动强; 而三倍体卵母细胞多呈长条形或不规则形, 细胞器少, 不发达, 细胞外未观察到微绒毛, 卵黄粒少, 有些细胞的卵黄粒畸形, 卵母细胞生物合成及代谢弱。太平洋牡蛎三倍体卵子发生受阻已表现在卵黄形成期卵母细胞发育障碍。

关键词 太平洋牡蛎, 二倍体, 三倍体, 卵母细胞, 超微结构

太平洋牡蛎(*Grassostrea gigas*)是一种重要的海产养殖贝类, 关于太平洋牡蛎三倍体的诱导、培育、生长和生殖腺发育的组织学研究已有过报导[Allen 和 Downing 1986、1990, Downing 和 Allen 1987, Akashige 和 Fushimi 1992], 但进一步在超微结构水平研究三倍体卵子发生迄今尚未见有文献报导。本文比较研究了太平洋牡蛎二倍体和三倍体卵母细胞发育过程中细胞和各细胞器的超微结构变化, 籍以补充太平洋牡蛎三倍体生物学方面的研究资料。

1 材料和方法

1.1 材料

太平洋牡蛎二倍体和三倍体于1997年8月至1998年10月取自厦门同安大嶝牡蛎养殖区。

1.2 方法

活体牡蛎迅速剖壳取出卵巢, 以2.5%戊二醛和1%锇酸双固定(两者均用0.2M, pH7.2的磷酸缓冲液配制), 饱和醋酸双氧铀块染, 系列酒精脱水, Epon 618包埋, 包埋块用LKB-II型超薄切片机切成厚度300~500Å片子, 以柠檬酸铅染色, JEM-100CX II型透射电镜观察和拍照。

2 结果

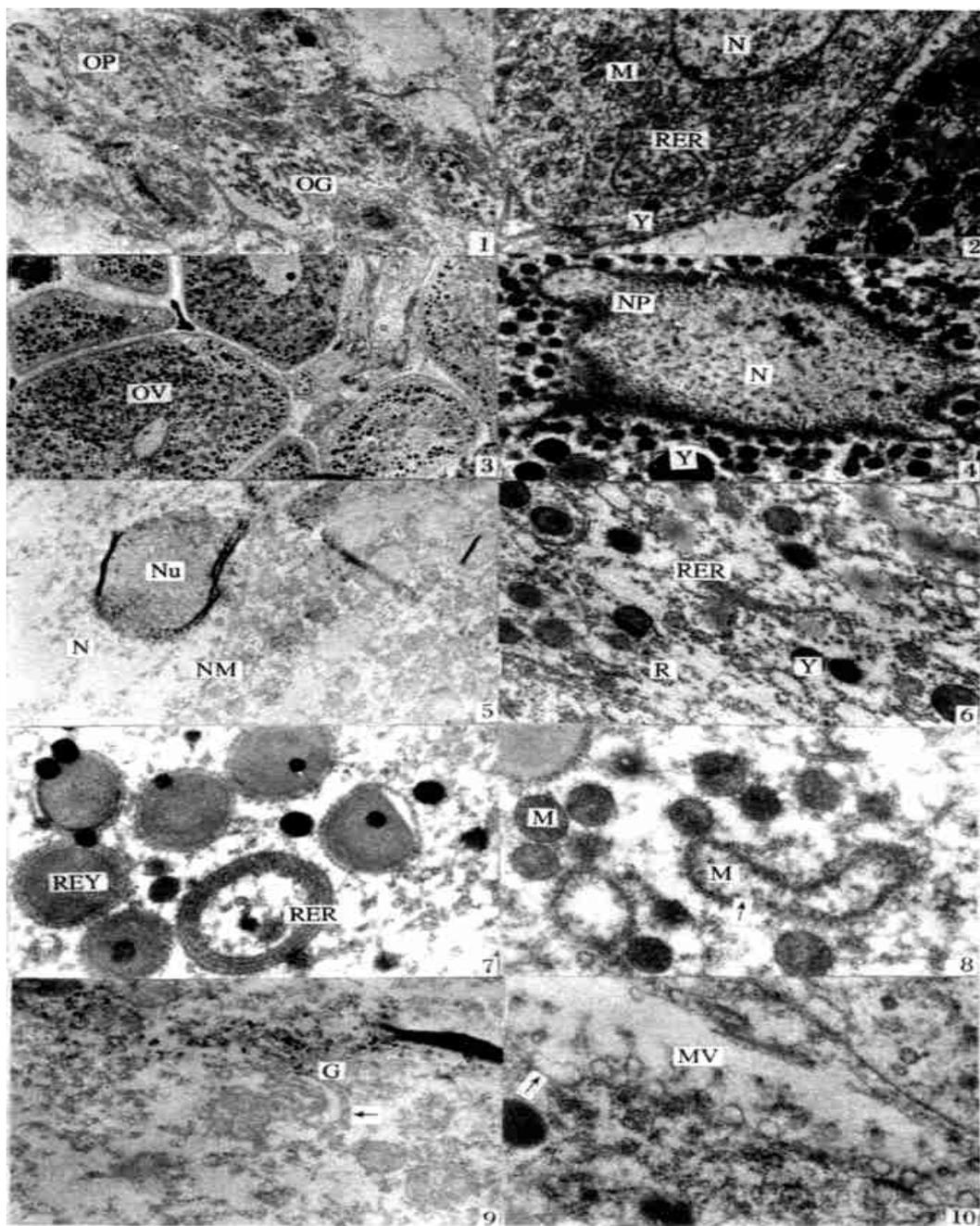
2.1 太平洋牡蛎二倍体初级卵母细胞发育的超微结构

在卵原细胞, 细胞核大, 呈卵圆形。染色质呈丝状, 有的聚结成团状, 分散于细胞核中。核

仁圆形或椭圆形,胞质中细胞器少(图版I-1)。根据卵母细胞体积的大小及营养物质(卵黄)积累的多寡,将初级卵母细胞发育分为两个时期:卵黄形成初期和卵黄形成期。卵黄形成初期的卵母细胞呈椭圆形,细胞核染色质丝状,有的聚结成团状,核膜双层。细胞质中线粒体多,呈椭圆形、长条形,并有“局灶”性分布,线粒体嵴发达,为片层状。核糖体多,粗糙型内质网系统发达,有的呈环状。高尔基复合体数量少,不活跃。细胞膜伸出微绒毛,此期开始出现少量蛋白性卵黄粒,但体积小(图版I-2)。卵黄形成期卵母细胞大量合成和积累卵黄物质。卵母细胞呈椭圆形,细胞紧密排列,细胞间滤泡细胞少(图版I-3)。此期卵母细胞核质体积比例减小,核伸出许多伪足状突起伸入细胞质中,核孔孔径增大,平均为51.2nm(图版I-4)。核仁大,呈网格状或颗粒状聚合结构,且大都靠近核膜(图版I-5)。大部分染色质呈丝状均匀分布于核中,一小部分聚结成团状。细胞内容物丰富,粗糙型内质网系统高度发达,主要有二种排列形式:一种是片层状,内质网彼此平行排列(图版I-6);另一种盘绕多层呈球状或椭球状结构,其内部含有细胞质基质,也有线粒体(图版I-7)。而光滑型内质网少。线粒体数量多,一些线粒体膨胀泡化,呈不规则形状,嵴消失,只剩下残留痕迹(图版I-8)。细胞质中核糖体相当丰富,高尔基复合体数量增多(图版I-9),细胞外布满微绒毛(图版I-10)。此期细胞膜的微吞饮活跃,在质膜周缘分布许多微吞饮泡(图版I-10)。随着细胞的发育,细胞质中形成积累的卵黄粒越来越多,包括蛋白性卵黄粒和脂滴(脂性卵黄),卵黄粒呈椭圆形均匀分布于细胞质中。发育至成熟期卵母细胞,胞体达到最大,多数近圆形,细胞器消失,细胞内充满卵黄粒,有些细胞卵黄粒融成一片。电镜观察还表明,在卵黄形成期卵母细胞,线粒体、粗糙型内质网和微吞饮泡形成卵黄粒,尤其是粗糙型内质网形成卵黄粒非常活跃(图版I-7)。

2.2 太平洋牡蛎三倍体初级卵母细胞发育的超微结构

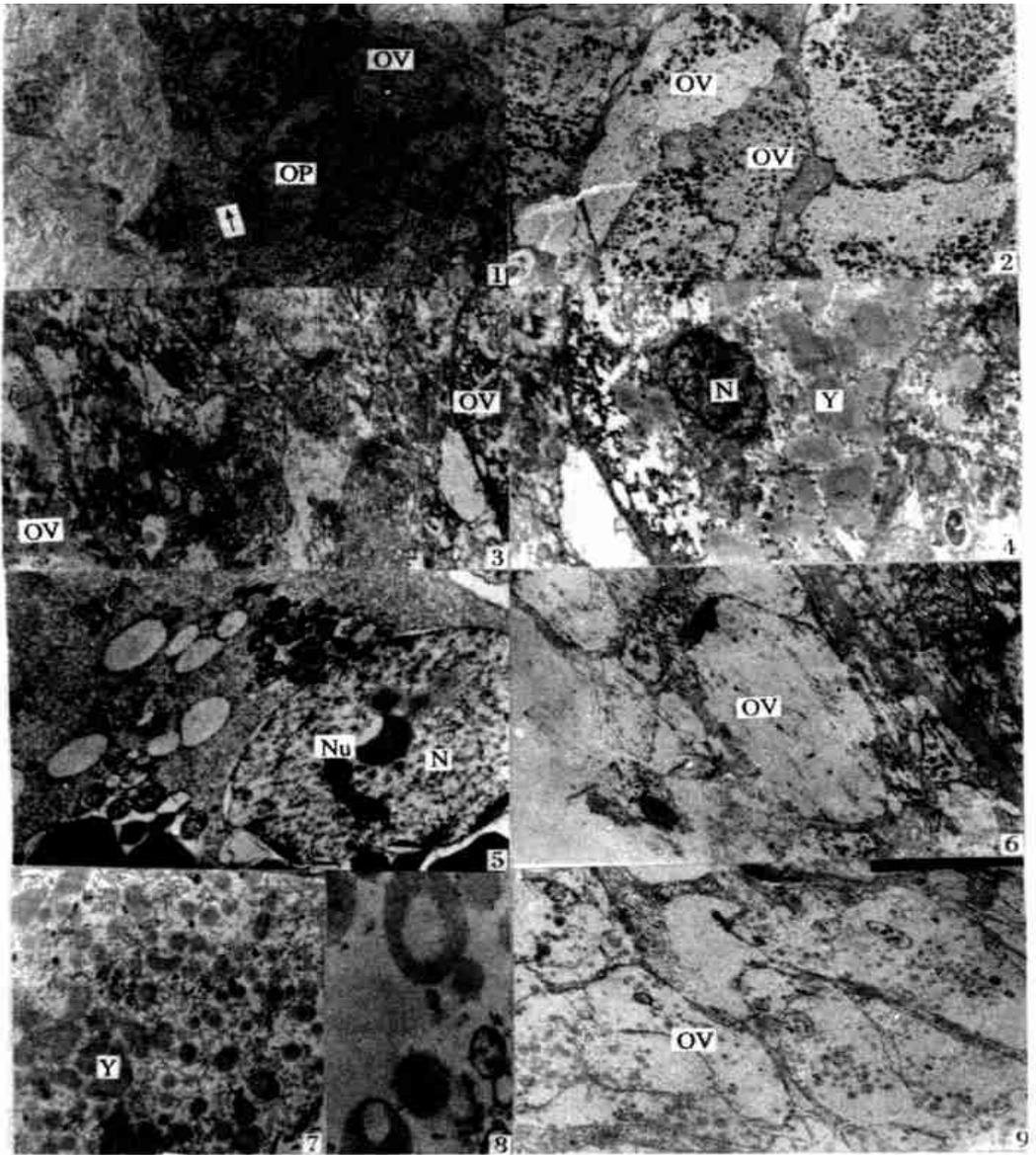
卵黄形成初期卵母细胞呈椭圆形,细胞核大,染色质呈丝状,有的聚集成团状,核仁呈圆形、椭圆形。细胞质中线粒体多,呈椭圆形、长条形,“局灶”性分布明显。核糖体还多,粗糙型内质网不如二倍体细胞发达,细胞膜外无观察到微绒毛。此期开始出现个别蛋白性卵黄粒,但体积小(图版II-1)。在卵黄形成期,大部分卵母细胞呈长条形或不规则形,有的紧密排列(图版II-2),有的分散分布,分散的细胞之间有滤泡细胞、色素细胞等(图版II-3)。细胞核近椭圆形,有一些凸起,但较二倍体细胞核伪足状突起少。染色质聚结成团块状,分布于细胞核及核周(图版II-4),核仁小,电子密度深,且大都位于核中央(图版II-5)。核孔孔径平均为46.1nm。细胞质中线粒体、核糖体及粗糙型内质网数量较二倍体细胞少,尤其是粗糙型内质网。有些线粒体也出现泡化,呈不规则形,嵴逐渐消失。大部分卵母细胞卵黄粒较二倍体少,且卵黄粒大小差异大,大部分沿细胞周缘分布,有些细胞卵黄粒内凹或呈不规则形状(图版II-7,8)。一部分卵母细胞细胞质中仅见一些卵黄粒,其余均是呈丝状的细胞质(图版II-2);有的细胞除少量卵黄粒及细胞核外,内容物基本消失(图版II-9);有些细胞完全呈空泡状,似退化溶解(图版II-6)。三倍体卵母细胞膜外无观察到微绒毛。电镜观察也发现,一小部分三倍体卵母细胞发育与二倍体相似。



图版I Plate I

1. 二倍体卵原细胞和卵母细胞, $\times 2\ 000$; 2. 二倍体卵黄形成前期卵母细胞, 示丰富的细胞器和微绒毛, $\times 8\ 000$; 3. 二倍体卵黄形成期卵母细胞, $\times 1\ 000$; 4. 二倍体卵黄形成期卵母细胞, 细胞核呈伪足状突起, 核孔孔径增大, $\times 6\ 700$; 5. 二倍体卵黄形成期卵母细胞, 核仁呈网格状或颗粒状聚集体且靠近核膜, $\times 8\ 000$; 6. 二倍体卵黄形成期卵母细胞, 示片层状粗糙型内质网及核糖体, $\times 40\ 000$; 7. 二倍体卵黄形成期卵母细胞, 示椭球状粗糙内质网及形成的卵黄粒, $\times 14\ 000$; 8. 二倍体卵黄形成期卵母细胞, 示泡化的线粒体(箭头所示), $\times 20\ 000$; 9. 二倍体卵黄形成期卵母细胞内高尔基复合体(箭头所示), $\times 27\ 000$; 10. 二倍体卵黄形成期卵母细胞膜外微绒毛及微吞吐泡(箭头所示), $\times 20\ 000$

M. 线粒体, G. 高尔基复合体, RER. 粗糙型内质网, REY. 粗糙型内质网形成的卵黄粒, R. 核糖体, N. 细胞核, NM. 核孔, Nu. 核仁, Y. 卵黄粒, MV. 微绒毛, OG. 卵黄形成前期卵母细胞, OV. 卵黄形成期卵母细胞



图版II Plate II

1. 三倍体卵黄形成前期卵母细胞及卵黄形成后期卵母细胞, 箭头所示为卵黄粒, $\times 2\ 000$; 2. 三倍体卵黄形成后期卵母细胞, $\times 1\ 000$; 3. 三倍体卵母细胞之间的滤泡细胞、色素细胞, $\times 5\ 000$; 4. 三倍体卵黄形成后期卵母细胞, 示细胞核, $\times 6\ 700$; 5. 三倍体卵黄形成后期卵母细胞, 示核仁, $\times 10\ 000$; 6. 三倍体卵黄形成后期卵母细胞, 细胞呈空泡状, $\times 40\ 000$; 7. 三倍体卵黄形成后期卵母细胞, 示畸形的卵黄粒, $\times 5\ 000$; 8. 三倍体卵黄形成后期卵母细胞, 示畸形卵黄粒, $\times 20\ 000$; 9. 三倍体卵黄形成后期卵母细胞, 除了少量卵黄粒及细胞核, 内容物基本消失, $\times 2\ 700$

M. 线粒体, G. 高尔基复合体, RER. 粗糙型内质网, REY. 粗糙型内质网形成的卵黄粒, R. 核糖体, N. 细胞核, NM. 核膜, NP. 核孔, Nu. 核仁, Y. 卵黄粒, MV. 微绒毛, OG. 卵黄形成前期卵母细胞, OV. 卵黄形成后期卵母细胞

3 讨论

关于贝类三倍体性腺发育及生殖细胞发生的组织学研究已有过一些报导。Allen 等 [1986] 发现砂海螂 (*Mya arenaria*) 三倍体生殖细胞发生严重受阻, 并且所有的个体均是雌体。Komaru 和 Wada [1989] 对华贵栉孔扇贝 (*Chlamys nobilis*) 的配子发生进行了组织学观察, 发现大多数三倍体性腺中有发育早期的卵母细胞, 没有观察到成熟的卵母细胞。Allen 和 Dowing [1990] 对太平洋牡蛎三倍体生殖腺发育进行了详细的组织学研究, 观察结果与二倍体相比, 雌性三倍体虽然有一些个体产生了相当数量的卵子, 但大多数三倍体卵子发生严重受阻。Cox 等 [1996] 报道了悉尼岩牡蛎 (*Saccostrea commercialis*) 雌性三倍体性腺滤泡的分支化严重受阻, 几乎没有成熟的卵子。迄今已报导的文献仅从组织学研究三倍体贝类配子的发生, 却未见有在超微结构水平观察三倍体卵母细胞的发生过程。

本文详细研究比较了太平洋牡蛎二倍体和三倍体初级卵母细胞发育的超微结构变化。电镜观察表明: 在卵黄形成期二倍体和三倍体卵母细胞发育有明显的不同, 二倍体卵母细胞排列有序, 细胞外布满微绒毛; 而绝大部分三倍体细胞呈长条形或不规则形, 细胞膜外无观察到微绒毛。二倍体细胞核伸出许多伪足状突起伸入细胞质, 增强了核质之间的接触面积; 而三倍体细胞核虽也有突起但不如二倍体多, 且核孔孔径较二倍体小, 这预示着在卵黄形成期二倍体卵母细胞的核质之间物质交换远比三倍体强烈。二倍体卵母细胞核仁大, 呈网格状或颗粒状聚合体; 而三倍体核仁致密且位于核中央, 这表明了二倍体蛋白质合成旺盛, 核仁的最主要功能是合成 rRNA [汪德耀 1988]。在二倍体卵母细胞细胞质中线粒体、粗糙型内质网、高尔基复合体和核糖体等细胞器较丰富, 尤其粗糙型内质网; 而大部分三倍体卵母细胞细胞器少, 不发达。核糖体在细胞中起蛋白质生物合成的“加工厂”作用, 内质网与细胞蛋白质合成、脂类和糖类的代谢以及物质交换、运输密切关系, 而线粒体是细胞进行呼吸作用的主要场所, 即细胞“动力站” [汪德耀 1988]。因此, 可以看出, 卵黄形成期二倍体卵母细胞的蛋白质、脂类合成旺盛, 代谢活动强, 而三倍体细胞代谢较弱。此外电镜观察还表明, 在二倍体卵母细胞, 质膜微吞饮活动活跃, 以吞饮泡形式输送外源蛋白到卵母细胞中作为合成卵黄粒的原料, 而细胞外发达的微绒毛也可直接吸收蛋白质到细胞内 [林加涵和汪德耀 1983], 卵母细胞卵黄粒随着细胞发育而增多, 最后充满整个卵母细胞; 而大部分三倍体卵母细胞卵黄粒较二倍体少, 一部分随着细胞发育, 卵黄粒电子密度越来越低, 细胞质也越来越少, 最后呈空泡状。有关太平洋牡蛎三倍体卵黄形成期卵母细胞代谢活动弱, 卵黄粒少, 细胞发育受阻的机制尚需进一步研究。可以认为太平洋牡蛎三倍体卵子发生受阻表现在卵黄形成期卵母细胞发育障碍, 这也可能从原始生殖细胞发育时就受到三倍体本身的影响。

参 考 文 献

- 汪德耀(主编). 1988. 普通细胞生物学. 上海: 上海科学技术出版社. 133~134, 144~145, 199~201, 305~307
- 林加涵, 汪德耀. 1983. 僧帽牡蛎卵母细胞卵黄发生的超微结构研究. 厦门大学学报(自然科学版), 22(3): 356~363
- Akashige S, Fushimi T. 1992. Growth, survival, and glycogen content of triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the waters of Hiroshima, Japan. Bull Jap Soc Sci Fish, 58(11): 1063~1071
- 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, 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, Downing S L. 1990. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*; gametogenesis. Can J Fish Aquat Sci, 47: 1213~1222
- Cox E S, Smith M S R, Nell J A, et al. 1996. Studies on triploid oysters in Australia. VI. Gonad development in diploid and triploid Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). J Exp Mar Biol Ecol, 197: 101~120
- 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
- Komaru A, Wada K T. 1989. Gametogenesis and growth of induced triploid scallop, *Chlamys nobilis*. Bull Jap Soc Sci Fish, 55(3): 447~452

THE ULTRASTRUCTURE OF DEVELOPMENT IN OOCYTES OF DIPLOID AND TRIPLOID OYSTER, *CRASSOSTREA GIGAS*

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

ABSTRACT Comparative study of ultrastructure of oocytes and various organelles was conducted on diploidy and triploidy oyster, *Crassostrea gigas*, during their oocyte development by means of electronic microscope. The results indicated that, during the period of vitellogenesis, oocytes of diploidy oyster were oval-shaped with developed organelles and numerous yolk granules evenly distributed in cytoplasm. Microvilli circled round oocytes. Biosynthesis and metabolism activated inside. In contrast, most oocytes of triploids were in oblong or irregular shape, with a small amount of organelles and fewer yolk granules, the latter in some oocytes was even deformed. No microvilli were observed outside oocytes. Weak biosynthesis and metabolism occurred. Hindered oogenesis of triploid oyster revealed that development of their oocytes was blocked in vitellogenesis phase.

KEYWORDS *Crassostrea gigas*, Diploid, Triploid, Oocyte, Ultrastructure