太平洋牡蛎卵子体外发育的研究 *

任素莲　绳秀珍　王如才　冯　鹏　许　红

(青岛海洋大学水产学院养殖系 266003)

提要　研究了太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas* Thunberg)卵子体外发育的过程。解剖性腺获取的卵子大多发育至第 1 次减数分裂前期。在海水、氨海水中浸泡能促使生发泡破裂,促进卵子的继续发育,而且卵子在氨海水中的发育速度要快于在纯海水中的发育速度。

关键词　太平洋牡蛎,卵子,体外发育

卵子的成熟度是受精作用和胚胎发育能否顺利进行的关键因素之一。不成熟或过分成熟的卵子即使能够受精,胚胎发育也不能正常进行。在太平洋牡蛎的苗种生产和科研中,解剖获卵是一种常用的方法,但面临的问题是卵子发育的不同步以及卵子成熟度的问题。已有实验证明,海水浸泡能促进卵子的成熟,提高卵子发育的同步性,从而提高了卵子的受精率,降低了多精入卵的比率[1,2]。但对于卵子体外发育的过程尚不清楚。为此,作者对卵子在海水、氨海水中的发育情况进行了详细的观察。

1　材料与方法

本实验于 1999 年 5 ~ 6 月间进行。实验用太平洋牡蛎取自山东省荣成市俚岛镇海水养殖场,平均壳长 8.8 cm。选择性腺外观丰满的亲贝,解剖法获取卵子,分别放入海水和 0.005 %的氨海水中处理 50 ~ 60 min (海水温度为 23.0 ℃,比重为 1.021 5)。用 Carnoy 氏液(甲醇: 冰醋酸 = 3: 1)进行固定,固定时间为未浸泡时及浸泡后 1 h 内 (30 min 以前每隔 3 min 取样 1 次,30 min 以后改为每隔 5 min 取样 1 次)。待卵沉淀后要连续更换 3 ~ 5 次固定液,以消除海水中的盐类结晶及其他杂质。用铁 - 苏木精染色,45 % 醋酸分色,整体封片进行观察、记录等。

2　实验结果

2.1　卵子体外发育的细胞学变化过程

解剖获取的卵子,多处于第 1 次成熟分裂的前期,在海水或氨海水中浸泡后,可以继续发育到第 1 次成熟分裂中期,其发育过程大致为以下 5 个阶段:阶段 I :卵子呈倒梨形,细胞核圆形或卵圆形,呈空泡状(又称生发泡),着色浅。核仁一个,又大又圆。光镜下,核仁的一部分比较致密,染色深;另一部分则比较疏松,染色浅,称为双质核仁,直径约 7 ~ 8 μm,最大为 10 μm。此时卵子处于第 1 次减数分裂前期的细线期(图 1a)。阶段 II :卵子呈圆球形,生发泡着色稍深,但尚未破裂。核仁形态明显,结构致密。卵子处在第 1 次减数分裂前期(图 1b)。阶段 III: 核膜模糊,生发泡开始破裂。核仁致密,体积逐渐变小,直径约为 6 ~ 7 μm。此时卵子处于第 1 次成熟分裂前期的终变期(图 1c)。阶段 IV: 卵子为圆球形,生发泡已模糊不清,核、质界限不清,相互混合。核仁尚存,在核仁周围,染色体开始出现,形态逐渐明显。卵子此时处于第 1 次成熟分裂前中期(图 1d)。阶段 V: 卵子圆球形。纺锤体形成,染色体形态更加明显,整齐地排列于赤道板上。核仁存在,形态致密,直径为 5 ~ 6 μm。卵子处于第 1 次成熟分裂中期(图 1e)。

2.2　在纯海水和氨海水处理下不同发育阶段卵子的比例变化情况

尽管在纯海水和氨海水中,卵子体外发育的细胞学变化过程是一致的,但卵子的发育速度以及同一时间内不同阶段的卵子所占的比例是不同的。通过以下各图,可以清晰地看到这一变化过程。

图 2 a 显示,在纯海水或氨海水的作用下,阶段 I 卵子的比例随浸泡时间的增加而逐步下降,到 18 min 后其比例处于较低水平,约占卵子总数的 7.1 % (氨海水为 5.8 %);在处理 30 min 的情况下仍有少部分处于阶段 I 的卵子,在纯海水中约占 3.6 % (氨海水中为 3.4 %)。这部分卵子以后无论在氨海水中、还是

* 国家高新技术研究发展计划资助项目 863-819-01-01 号。
收稿日期:2000-06-30;修回日期:2000-07-30

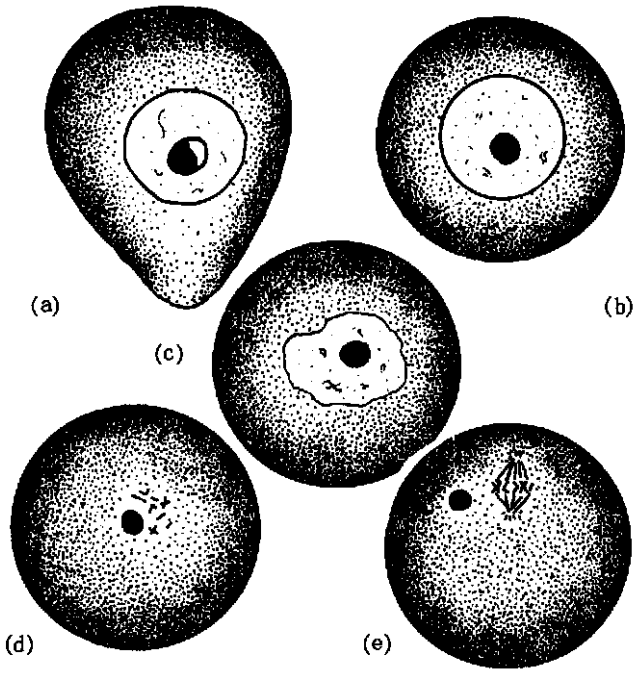

图 1　卵子体外发育的细胞学变化过程

Fig.1　Cytological changes of egg′s ectogensis

a,b,c,d,e 分别为阶段Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ,Ⅴ的卵子

a,b,c,d,e egg of stage Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ,Ⅴ

在纯海水中浸泡多长时间,生发泡都不能破裂,这表明处于阶段Ⅰ的卵子有一小部分不能在体外促熟发育。另外,从图 2 a 可以看出,因为牡蛎性腺成熟度较好,所以阶段Ⅰ的卵子在一开始所占比例就相对较低,约占 20%,而大部分卵子在体内已经发育到阶段Ⅱ、Ⅲ,所占比例分别为 49.2%和 30.2%(图 2b,图 2c),因此纯海水和氨海水对这一阶段卵子的作用相对较小。

图 2 b 示处于阶段Ⅱ的卵子在海水和氨海水中的发育情况。数据表明卵子在氨海水中发育速度较在纯海水中的速度快。在氨海水中浸泡 2 min 后阶段Ⅱ的卵子就明显减少,到 18 min 时此阶段卵子的比例仅占 5.8%;而在纯海水中直到 5 min 后阶段Ⅱ的卵子才开始下降,到 27 min 时其比例才降到较低水平,约为 5.7%。与阶段Ⅰ卵子一样,浸泡 30 min 以后,仍有少部分阶段Ⅱ的卵子处于停滞状态而不能继续发育。

图 2 c 示阶段Ⅲ卵子的发育状况。随着浸泡时间的增加,阶段Ⅲ的卵子开始呈递增的趋势,以后又下降,说明阶段Ⅲ的卵子开始向Ⅳ,Ⅴ阶段转化,曲线同样表明卵子在氨海水中的发育速度要快于在纯海水中的发育速度。

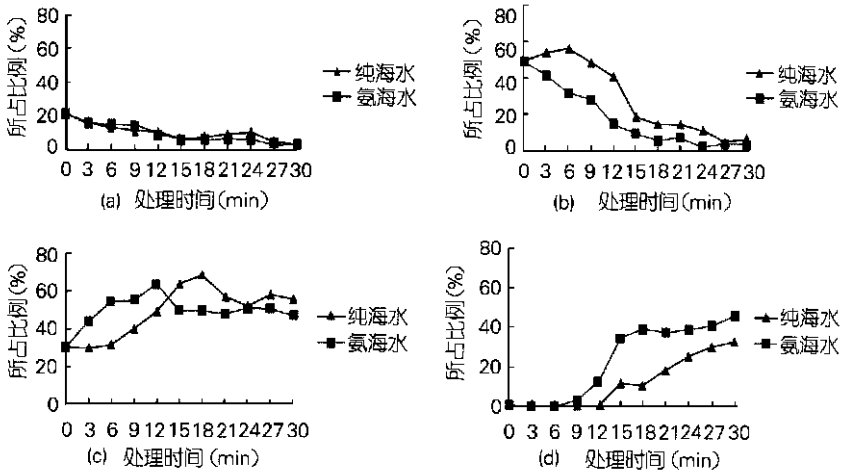

图 2　各发育阶段卵子在海水和氨海水中的比例变化情况的比较

Fig.2　Compare of changes at differental stage dipping in sea water

a,b,c,d 分别为阶段Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ and Ⅴ

a,b,c,d egg of stage Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ and Ⅴ

图 2 d 示阶段Ⅳ、阶段Ⅴ卵子的发育情况。曲线

表明: 在氨海水中浸泡 6 min 后便有阶段Ⅳ和阶段Ⅴ的卵子出现,而在纯海水中则需要 9 min;浸泡 30 min 后,无论是纯海水还是氨海水中,Ⅳ,Ⅴ阶段的卵子所占比例皆达到较大比值,在氨海水中约为 46.3%,纯海水中为 33.1%。

图 3 为卵子在海水中的发育情况。曲线表明在浸泡开始初期,各阶段卵子数目变化较大;海水浸泡 30~40 min 后,各发育阶段的卵子基本处于恒定的数值,所占比例分别约为阶段Ⅰ:7.4%,阶段Ⅱ:4.7%,阶段Ⅲ:51.4%,阶段Ⅳ,Ⅴ:36.6%。之后,伴随着浸泡时间的增加,各阶段卵子的比例基本保持不变。

从右边数据可以看出,解剖获得的卵子多数处于Ⅰ,Ⅱ阶段,即生发泡尚未破裂时期,少部分处于阶段Ⅲ。经海水或氨海水浸泡刺激,卵子开始发育,生发泡开始破裂,海水浸泡 30 min 后,Ⅲ,Ⅳ,Ⅴ期卵子所占比例已达 88%之多,而在氨海水中的比例更大。生发泡破裂是卵子成熟的一个重要标志,海水或氨海水能较好的促进卵子的成熟,而且无论哪个阶段的卵子,在氨海水中的促熟速度和效果,都比纯海水中好。

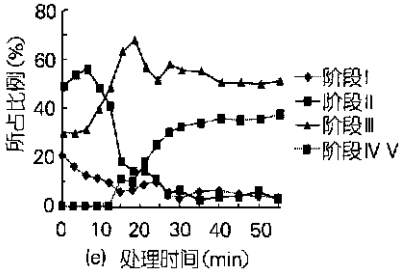

图 3 不同阶段的卵子在海水中的发育曲线

Fig.3 The curve of different developmental stages dipping in sea water

3 讨论

太平洋牡蛎的卵子无论是生发泡破裂之前、还是生发泡破裂之后,精子都可以入卵完成受精作用并能进行正常的胚胎发育,但在生发泡阶段精子入卵完成受精的情况下,通常有较高的多精入卵率[1,3],而海水浸泡能促进卵子的继续发育,提高受精率,减少多精入卵的比例[1,2]。但卵子在海水浸泡多长时间为最佳时间?不同的学者具有不同的观点。王昭萍等 1997 年报道卵子在海水中浸泡 30~90 min 后受精率明显增加,浸泡 30~60 min 有很好效果。Jose 等 1988 年认为: 海水浸泡 1~1.5 h 后其多精入卵的机会大大降低。根据观察结果,作者认为解剖获取的卵子在海水中浸泡 30~40 min 后受精较好,因为此时多数卵子处于Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ发育阶段(88%),生发泡已经破裂,有的卵子已发育到第 1 次成熟分裂中期;并且从此时开始即便再增加浸泡的时间,卵子各阶段的比例基本保持不变。这一结果与王昭萍的观察结果基本一致。

纯海水和氨海水都能促进生发泡的破裂,使卵子发育的同步性提高,提高受精率。作者近期的实验也表明,只有那些经浸泡后生发泡破裂的卵子,才能进行正常的受精和胚胎发育;而浸泡后生发泡仍未破裂(处于阶段Ⅰ,Ⅱ)的卵子,根本不能受精和发育。因此作者认为,生发泡破裂是卵子成熟的标志,只有在生发泡破裂后精子入卵才能有较高的受精率。另外,卵子体外发育的状况也应以卵子在体内的发育状况为基础。只有那些发育到一定程度的卵子才具有较好的体外促熟效果。

因亲贝性腺发育的程度不一样以及卵巢内卵子发育的不同步性,因此解剖获取的卵子的发育程度及各阶段的卵子所占的比例也有较大的差异,但卵子在体外发育的基本过程是一致的。

实验结果证明,离体的卵子在海水和氨海水中都能进一步促熟发育,在氨海水中的发育速度与效果要明显好于纯海水。这一点与沈亦平等 1993 年对合蒲珠母贝的观察结果一致。沈亦平认为,氨海水对卵子的促熟作用,一方面表现在氨提高了卵子周围海水的 pH 值,而 pH 值提高是卵子激活的一个重要因素;另一方面氨分子的通透性大,可增大卵子卵膜的通透性,促进卵子的代谢,从而起到激活卵子的作用。但在贝类的人工育苗过程中氨海水的激活是否完全有必要呢?有人认为在贝类的人工育苗过程中,应提早用氨海水刺激卵子,然后再加入精子,以提高受精率。但作者认为既然纯海水也能促熟卵子能达到较好的效果,那么用氨海水促熟卵子就没有太大的意义,另外从 NH_4^+ 离子对卵和胚胎的安全性方面考虑,人工育苗过程中也应该慎用氨海水。

参考文献

1 王昭萍,王如才,李洪刚等。海洋湖沼通报,1997,2,70~75
2 吴宝铃,王如才等。贝类繁殖变态附着生物学。济南:山东科学技术出版社,1999。54~55
3 任素莲,王德秀,王如才等。海洋湖沼通报,1999,1:34~39

STUDIES ON ECTOGENESIS OF EGGS STRIPPED FROM PACIFIC OYSTER, *Crassostrea gigas*

REN Surlian SHENG Xiurzhen WANG Rurcai FENG Peng XU Hong
(*Fisheries College , Ocean University of Qingdao* , 266003)

Received : Jun.30 ,2000
Key Words : *Crassostrea gigas* ; Eggs ; Ectogenesis

Abstract

The ectogensis of eggs stripped from ovaries of the *Crassostrea gigas* immersed in seawater and ammonia-seawater (0.005 %) . The result show that eggs stripped from ovaries are usually restricted to the stage of prophase of meiosis I, they can have improving maturation and undergo germinal vesicle breakdown when immersed in seawater or ammonia-seawater. The development faster immersed in ammonia-seawater than in seawater. (本文编辑:李本川)