

繁殖期雌雄同体虾夷扇贝生殖腺组织学观察^①

周丽青^② 杨爱国^③ 王清印 郑言鑫 刘志鸿 吴 彪 孙秀俊 郑利兵

(中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071)

摘 要 历时 3 年,采用 Bouin's 液固定和常规组织切片技术,对照雌性和雄性生殖腺组织结构,研究了繁殖期雌雄同体生殖腺组织的结构特点及形成原因。结果显示:虾夷扇贝雌雄同体的存在与海区养殖环境有关,山东烟台养殖海区的雌雄同体比例高达 19.2%。雌雄同体两性生殖腺滤泡发育不同步且间隔不分明,2-3 月份部分雌性生殖腺中出现迅速增殖的雄性生殖细胞或滤泡,成为雌性为主的雌雄同体;4 月份随着雌雄生殖腺滤泡的共同生长和部分排放,形成以雄性生殖腺为主或雌雄相间的雌雄同体。雌性转化为雄性是主要性逆转方向,229 只虾夷扇贝中仅 1 例推测为雄性向雌性逆转,有些个体存在雌雄两种生殖细胞同时成熟和排放的现象,是否存在两种性别均衡发育有待进一步研究。

关键词 虾夷扇贝,雌雄同体,性逆转,生殖腺,卵子退化,组织学

0 引 言

虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 自上世纪 80 年代初从日本引入我国后,养殖规模逐年扩大,现已发展成为我国北方重要养殖品种。养殖虾夷扇贝性成熟年龄为两龄以上,外形无明显的性别特征,繁殖期生殖腺色泽可显示性别类型,绝大多数为雌雄异体型,雌雄性比接近 1:1,但在养殖环境恶劣的海区会出现一定比例的雌雄同体,且雌雄同体生殖腺表型千变万化。于瑞海等人的粗略统计显示,2006 年养殖成贝中雌雄同体的占 5%~6%,2007 年占 8%~9%,2008-2009 年在 10% 以上,最高可达 18%^[1]。吴洪流发现波纹巴非蛤的雌雄同体均为雌性向雄性逆转^[2],王梅芳等观察了两种江珧的性逆转,逆转方向主要是雄性转向雌性^[3],我们推测虾夷扇贝也存在性逆转现象,性变时机不同使得雌雄同体生殖腺的表型千变万化,具体原因尚待论证。基于此,我们对青岛市南山水产品市场出售的产自辽宁和山东多个养殖海区的虾夷扇贝进行了为期 3 年的繁殖期生殖腺组织学观察,希望能够揭示该物种雌雄同体现象产生的原因,为今后开展雌雄同体

虾夷扇贝的生殖调控使其精卵同时排放的自交试验奠定基础。

1 材 料 和 方 法

1.1 材料来源

虾夷扇贝 2011 年 3-4 月、2012 年 1-4 月、2013 年 2-5 月多批次购自青岛市南山水产品市场,其性别类型及比例详见表 1,样品来源分属山东威海、长岛、荣成、烟台和辽宁大连等海区,均为人工养殖 2-3 龄扇贝。依据生殖腺外观,雌性(♀)93 只;雄性(♂)107 只;雌雄同体(♀♂)87 只;不确定性别 42 只。样品总数 229 只,壳高范围 7.5~10.5cm。

1.2 组织切片的制备及观察

剖离左壳,纵向剖取生殖腺游离端和靠近肝胰腺端 2~3mm 厚组织各一份,Bouin's 液固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋、切片(5μm),苏木精-伊红染色,LeicaDM4000B 型显微镜下观察拍照。数码相机拍摄记录生殖腺及贝壳外形。

① 国家科技基础条件平台(2007DKA30470),黄海水产研究所基本科研业务费(20603022012003)和山东省自主创新专项(2013CX80202)资助项目。
② 女,1974 年生,硕士,副研究员;研究方向:贝类遗传育种和种质资源研究;E-mail: zhoulq@ysfri.ac.cn
③ 通讯作者,E-mail: yangag@ysfri.ac.cn
(收稿日期:2014-03-17)

表 1 雌雄同体取样时间、养殖海区、青岛气温、所占比例及主要类型

观察时间	样品产地	青岛气温	雌雄同体比例	主要类型
2011 年 3 月 24 日	山东烟台	2 - 10℃	12.3%	雌性为主
2011 年 4 月 1 日	山东威海	3 - 14℃	5.0%	雌雄相间
2011 年 4 月 11 日	辽宁大连	6 - 16℃	0	-
2011 年 4 月 21 日	山东威海	7 - 13℃	7.4%	雌雄相间
2012 年 1 月 10 日	山东荣成	-2 - 2℃	0	-
2012 年 3 月 12 日	山东威海	-1 - 7℃	6.5%	雌性为主
2012 年 3 月 21 日	山东烟台	4 - 8℃	15.2%	雌性为主
2012 年 3 月 31 日	山东威海	6 - 14℃	7.3%	雌雄相间
2012 年 4 月 5 日	辽宁大连	5 - 15℃	8.2%	雄性为主
2012 年 4 月 11 日	辽宁大连	8 - 17℃	7.7%	雌雄相间
2012 年 4 月 20 日	山东威海	9 - 13℃	2.4%	雌雄相间
2013 年 2 月 25 日	山东威海	4 - 7℃	8.1%	以雌为主
2013 年 3 月 5 日	山东烟台	6 - 11℃	19.2%	以雌为主
2013 年 3 月 18 日	辽宁大连	3 - 12℃	10.6%	雌性为主和雌雄相间
2013 年 3 月 26 日	山东威海	4 - 8℃	9.7%	以雌为主
2013 年 4 月 2 日	山东威海	6 - 12℃	11.5%	以雌为主
2013 年 4 月 10 日	山东烟台	5 - 14℃	18.7%	雌雄相间
2013 年 4 月 17 日	辽宁大连	6 - 12℃	7.4%	以雄为主
2013 年 4 月 25 日	山东威海	9 - 18℃	13.1%	以雄为主和雌雄相间
2013 年 5 月 7 日	辽宁大连	11 - 17℃	6.8%	以雄为主

2 结 果

2.1 虾夷扇贝生殖腺类型及雌雄同体所占比例

1 月份未见有雌雄同体,养殖条件好的海区生殖腺先成熟,仅见两种性别:雌性(图 1-1)和雄性(图 1-2,3);2 月份偶尔见有雌雄同体,以雌性生殖腺为主,零星分布雄性生殖腺(图 1-4);3 月份,雌

雄同体仍以雌性为主,雄性生殖腺逐渐生长扩散,镶嵌于雌性生殖腺中(图 1-5,6);4 月份,随着雄性生殖腺和雌性生殖腺的共同生长和部分排放,形成雌雄相间(图 1-7)或以雄性生殖腺为主,雌性生殖腺弥散于雄性生殖腺中(图 1-8),有些雄性生殖腺完全包裹雌性生殖腺,外观较难看出雌雄同体(图 1-9);5 月份,雌雄同体现象也少见。表 1 也显示有些

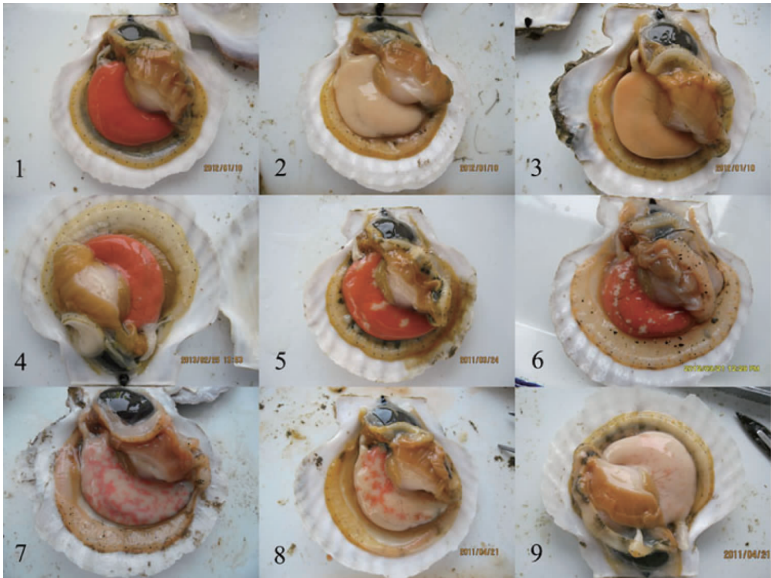


图 1 虾夷扇贝各种生殖腺类型

海区虾夷扇贝中雌雄同体所占比例和类型随着气温的回升呈现递变现象,推测雌雄同体多数是雌性向雄性性逆转的过渡状态。

雌雄同体的存在可能与养殖环境、气候或种质有关,产自大连养殖海区的虾夷扇贝群体中绝大多

数个体外形完整,个体硕大,壳面少有附生物,极少见有雌雄同体;而产自山东烟台和威海养殖海区的扇贝群体中多数个体个头小,壳外形缺刻或畸形,壳面及壳内部常附生或寄生有其他生物,雌雄同体较多,比例高达 19.2% (见表 1 及图 2)。



1. 壳外侧; 2. 壳内侧
图 2 随机展示三种性别类型虾夷扇贝的贝壳

2.2 生殖腺的组织学结构

虾夷扇贝生殖腺左右两侧基本对称,由许多呈树枝状的输精管或输卵管和呈葡萄状的生殖腺滤泡构成,输送管道反复分支形成输精小管和输卵小管,其末端膨大即为滤泡(图 3-1),滤泡中成熟生殖细胞进入输送管道,靠近肉柱部位两个粗大的生殖腺输送总管上下并行,在生殖腺游离端反复折叠,然后

在消化腺附近进入上下两侧的肾生殖管,肾生殖管穿过单侧的肾脏,在肾脏最末端形成一个裂口——肾外孔,成熟精卵皆从这两个肾外孔排出体外。生殖腺外膜从外到内依次由单层柱状上皮、薄层肌肉和薄层结缔组织构成,外膜内侧向生殖腺内延伸包裹着滤泡,使滤泡之间相互粘连。输送管壁由致密的单层柱状上皮构成,管壁内侧柱状上皮细胞膜特

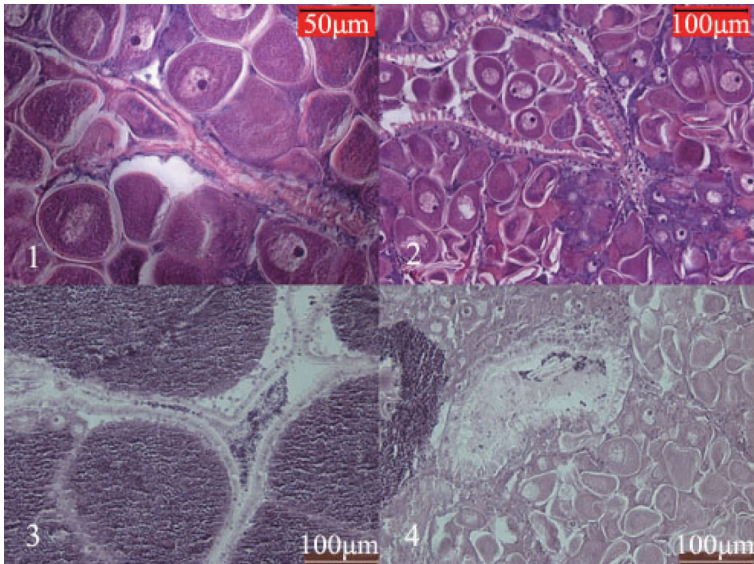


图 3 雌雄同体虾夷扇贝生殖腺中生殖细胞输送管道

化为纤毛,其摆动即是输送生殖细胞的动力。4月份之前,输送管中一般不见有生殖细胞;4月份,输送管中常常见有成熟的精子或卵子,由于同一生殖腺不同滤泡间及同一滤泡中的生殖细胞发育不同步,进入输送管道中的生殖细胞种类便不同,有的输送管中仅见成熟卵子(图 3-2),有的输送管中仅见成熟精子(图 3-3),而有的既有成熟精子也有成熟

卵子(图 3-4)。
各种生殖腺表型切片见图 4。图 4-1 为雌性;图 4-2为雄性;雌性为主,滤泡并存型雌雄同体生殖腺见图 4-3;雄性为主,滤泡并存型雌雄同体生殖腺见图 4-4;雌性为主,滤泡混合型雌雄同体生殖腺见图 4-5;雄性为主,滤泡混合型雌雄同体生殖腺见图 4-6。

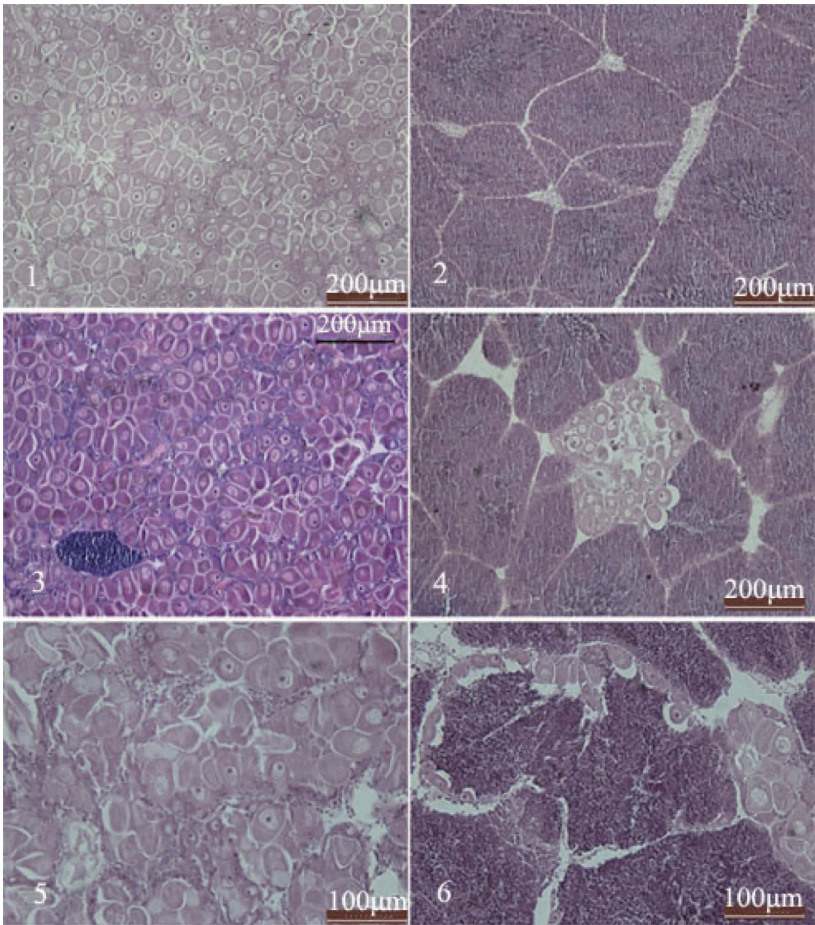


图 4 虾夷扇贝各种类型生殖腺切片

滤泡壁由单层生殖上皮和厚薄不均的结缔组织组成,是产生生殖细胞的主要场所,滤泡内壁的生殖上皮可向滤泡内产生精原或卵原细胞和滤泡细胞,滤泡中生殖细胞分层明显,靠近滤泡壁为生殖原细胞,由外而内依次为生殖母细胞和生殖细胞,当滤泡中充满生殖细胞时,滤泡壁就变得薄而不易识别。雌雄同体虾夷扇贝生殖腺的滤泡存在各种情形(见图 5),绝大多数表现出雌性向雄性逆转的趋势,有些滤泡的卵子部分排放后,未排出的卵子发生退化,滤泡内边缘出现大量的精原细胞(图 5-1);有些滤泡的卵子完全排放后,滤泡腔中出现一些精原细胞(图 5-2);有些雌性滤泡间空隙处新生的雄性生殖

滤泡,或精原细胞在卵子细胞间大量增殖(图 5-3);雌性向雄性逆转过程中,雄性生殖细胞的迅速增殖使得滤泡内残留的卵子被挤压变形(图 5-4),或使未排放的卵子堆积到滤泡口附近(图 5-5)。图 5-6 为一特例,2012 年 4 月 5 日采集到一个生殖腺外观为雄性,有 2-3 个细微红色小点的个体,切片显示雌雄生殖细胞均处于生长期,尤其是雄性滤泡内边缘雌性生殖细胞大量增殖,推测为雄性向雌性性逆转。有些滤泡存在分隔突起的现象(图 5-7);研究中还发现雌雄生殖细胞均处于生长发生状态,也分两种情形,一种是雌雄滤泡相间(图 5-8),另一种是同一滤泡中雌性和雄性生殖腺同步增殖发育(图 5-9),

这两种情形也较少,分别见 2011 年 3 月 24 日和 4 月 21 日采集到的 2 个雌雄相间个体生殖腺的组织切片,其生殖腺外观之一见图 1-8,它是属于性逆转

的中间过渡状态还是属于两种性别同时发展还有待进一步考证。

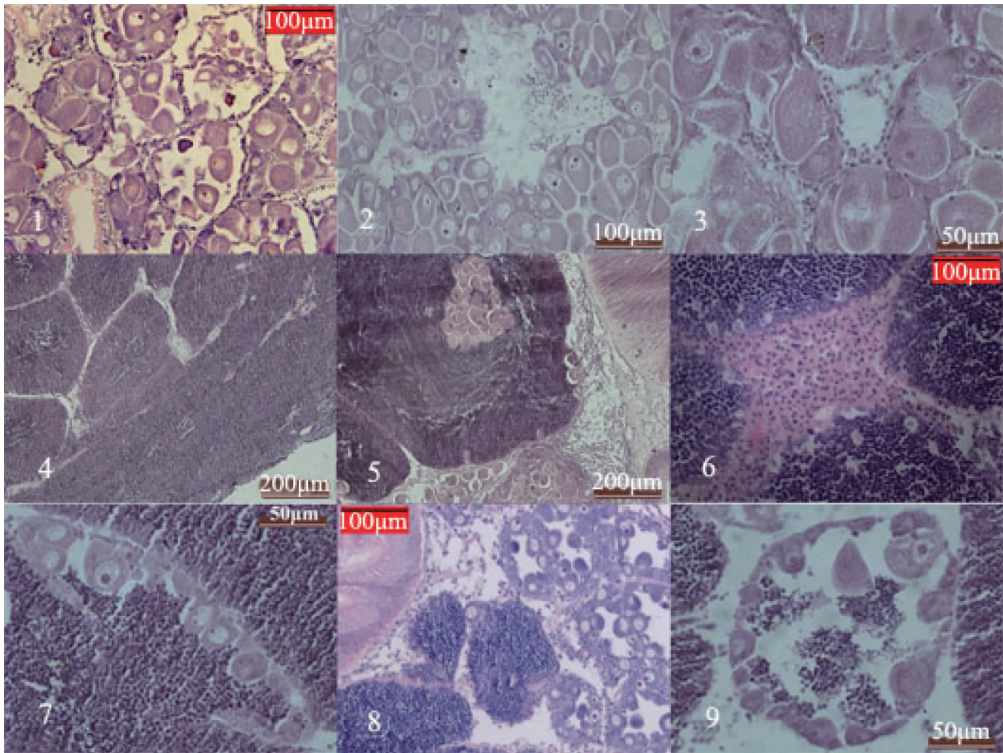


图 5 雌雄同体虾夷扇贝生殖滤泡各种情形

滤泡中生殖细胞发育不同步,滤泡中央成熟卵子卵径为 60 ~ 70 μm ,成熟精子头部长为 2 ~ 3 μm ;贴近滤泡处零星分布有少量的生殖原细胞及母细胞,卵母细胞和卵原细胞大小为 20 ~ 30 μm ;精母细胞和精原细胞大小为 6 ~ 7 μm 。

经组织切片鉴定,性别确定为雌性的 80 只;雄性 111 只,以雌性生殖腺为主的雌雄同体 80 只;以雄性为主的雌雄同体 39 只;雌雄相间的雌雄同体 16 只,仍不能确定性别的有 3 只。因此,实际观察到的雌雄同体有 130 只,占总样本数的 58.95%。

3 讨论

3.1 雌雄同体生殖腺组织结构特点

每年 2 月之前,市场上所售虾夷扇贝生殖腺处于生长期,仅观察到雌性和雄性两种性别类型,但 2 月 1 日至 3 月 31 日期间,平均气温为 5℃ 左右,有些养殖海区的扇贝中出现以雌性生殖腺为主的雌雄同体,雄性生殖腺零星镶嵌于雌性生殖腺中,两种生殖腺之间的边界清晰,大多数生殖腺滤泡中的生殖细

胞仍处于生长增殖期。4 月 1 日至 5 月 7 日期间,平均气温 10 ~ 12℃,有些养殖海区可观察到以雄性生殖腺为主或雌雄相间的雌雄同体,雌性生殖腺弥散分布于雄性生殖腺中,两种生殖腺之间的边界不清晰,此时,大多数虾夷扇贝生殖腺经历生殖细胞的排放。雄性向雌性逆转的情形少见,两种性别同步发育的情况也很少见。2007 年,笔者研究发现栉孔扇贝生殖腺中 DNA 和 RNA 含量随着积温的增高会发生变化,这涉及到 DNA 本身复制、DNA 转录成 RNA、RNA 翻译合成蛋白质等复杂的系列过程^[4],而这些过程容易受到水温等环境因素的影响,从而引起性别表型的变化。多种双壳贝类中存在一定比例的雌雄同体个体,说明雌雄同体和性转化现象并非偶然,而是因为贝类性别分化处于进化地位较低的水平,其性别发育方式多种多样,除受性别决定与分化相关基因等遗传因素影响外,还受环境生态因素的影响。

3.2 养殖虾夷扇贝出现雌雄同体的原因及性逆转现象

Adam 在研究南极双壳贝类 *Lissarca miliaris*

(Philobryidae)繁殖特性时,发现有性逆转情形,他认为雄性向雌性逆转同时拥有较大卵黄可确保孵化成活率更高一些,而相对的产卵数量较少一些,这样可使它在极冷少饵的海水中的繁殖效率最大化^[5]。Marina 发现扇贝 *Mizuhopecten yessoensis* Jay 在洁净海水中雌雄同体比例为 0.3 ~ 0.4%,而在污染海域雌雄同体比例约为 6%^[6]。Andrew 发现海水中不同剂量 17 α -乙炔基雌二醇在不同的作用时间和对不同性别的悉尼岩牡蛎 *Saccostrea glomerata* 的作用是不同的,但都会导致性别和卵黄原蛋白量异常^[7]。生物群体组成变化也会引起性别异常,唐紫薇认为经常受到热胁迫的雌雄同体和雄性线虫种群中,雄性的比例可维持在一个较高的水平,对种群数量的维持有重要的进化意义^[8];南美大西洋沿岸绝大多数牡蛎 *Ostre apuelchana* 在性成熟时会发生雄性、雌雄同体、雌性依次更替,Fernandez 认为雄性早熟是由群体中性成熟个体数偏低造成的^[9];Calvo 发现腹足纲 *Serpulorbis arenarius* 雄性成螺捕获并储存外源精子或精荚后,雄性生殖腺被吸收,雌性生殖腺取而代之,释放卵子与储存的异源精子受精,他认为精荚和卵囊外部结构同源性高是导致雄性成员误捕精荚的重要原因^[10];Fabiola 在两年期间每两周对法国 Rade de Brest 地区自然群体中的牡蛎 *Crassostrea gigas* 进行性别鉴定,认为雌雄同体个体是在两性间转化的中间状态^[11]。综上所述,雌雄同体和性逆转现象是该物种应对生存环境的进化结果。费世民认为雌雄同体生物缺乏性染色体,无法在染色体重组时确定性别,该物种在个体水平上就未发生性别分化,因此它们的生物生态位分化也不明显^[12]。比较进化的雌雄同体种类的精子和卵子分别由精泡和卵泡产生,於宏认为泥螺的精子和卵子由两性腺产生,属于进化地位比较原始的雌雄同体种类^[13],虾夷扇贝也属于这种情形,而其性别类型很大程度上取决于养殖环境,这或许就是近年来随着养殖环境的恶化,虾夷扇贝雌雄同体比例上升的原因。

关于动物性逆转过程中两性生殖细胞来源,Shapiro 提出两种可能的途径:第一,在原始性别发育期间,有一个静止的 2 种生殖细胞的潜在库。性逆转时,潜在库就开始产生适宜的生殖细胞。第二,在早期发育中可能同时存在两种已经分化的生殖干细胞,这两种细胞在第一成体性别期间一直保持着,当第二套分化的细胞扩散到整个性腺时,就发生性逆转^[14]。无论是第一种情况的快速分化和增殖,还是第二种情况的已分化细胞的简单增殖,都可由外

界因素对配子细胞施加影响而诱导产生。我们在虾夷扇贝性别相关 AFLP 分子标记筛选试验中,筛选出几个雌雄同体特异性条带,说明雌雄同体虾夷扇贝可能是一个独立于雌性和雄性的群体^[15]。我们推测 3 月份的雌雄同体虾夷扇贝属于第一种情形,雌雄同体在生殖原基或性别形成前,就已经存在了 2 种生殖细胞的潜在库,当养殖条件恶化,为确保繁衍足够多的后代来保持群体原有规模或壮大规模,雌性潜在库先发育并分化为成熟的卵子,表现为雌性,性成熟过程中,在性比和外界环境的影响下,雄性潜在库开始发生和分化,产生足够的精子用于群体的繁育。通常情况下,精子寿命远远短于卵子寿命,不良环境下,精子寿命更短,雌性先熟,再性逆转为雄性的雌雄同体也是应对不良环境的一种策略。4 月份之后的雌雄同体虾夷扇贝则有点像是属于第二种情形。因为,大部分的虾夷扇贝都已经经历了成熟排放的过程,重新产生的生殖细胞来源于早已分化好的生殖干细胞的增殖,这也就是 3 月份雌雄同体以雌性为主,而 4 月份雌雄同体以雄性或雌雄相间为主,雌雄同体多为雌性向雄性逆转的原因了。类似情形存在于黄鳝性腺自然逆转中^[16]。

4 结 论

历时 3 年,通过对繁殖期雌雄同体虾夷扇贝生殖腺进行组织学观察,确定虾夷扇贝雌雄同体的存在与海区养殖环境有关,雌雄同体是性逆转的中间状态,且雌性转化为雄性是主要性逆转方向,但不排除两种性别均衡发育的情形。本研究结果为今后对雌雄同体虾夷扇贝进行生殖调控使其精卵同时排放开展自交试验奠定基础,也为贝类性别分化的研究提供了资料。

参考文献

- [1] 于瑞海,王昭萍,赵雪琳等. 虾夷扇贝雌雄同体自体受精繁殖生物学研究. 中国海洋大学学报,2011, 41 (11):23-26
- [2] 吴洪流. 波纹巴非蛤性逆转时生殖腺的组织学变化. 海洋科学,2002,26(1):5-8,62
- [3] 王梅芳,余祥勇,王君彦. 两种江珧雌雄同体及性转换现象. 湛江海洋大学学报,1999,19(4):6-10
- [4] 周丽青,杨爱国,刘志鸿等. 不同积温情况下栉孔扇贝雌性生殖腺中磷脂、核酸及水分的含量变化. 海洋科学,2007,31(9):19-23
- [5] Reed A J, Thatje S, Linse K. An unusual hermaphrodite

- reproductive trait in the Antarctic brooding bivalve *Lissarca miliaris* (Philobryidae) from the Scotia Sea, Southern Ocean. *Polar Biol*, 2013, 36(1):1-11
- [6] Vaschenko M A, Syasina I G, Zhadan P M, et al. Reproductive function state of the scallop *Mizuhopecten yessoensis* Jay from polluted areas of Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Hydrobiologia*, 1997, 352:231-240
- [7] Andrew M N, O' Connor W A, Dunstan R H. Exposure to 17 α -ethynylestradiol causes dose and temporally dependent changes in intersex, females and vitellogenin production in the Sydney rock oyster. *Ecotoxicology*, 2010, 19:1440-1451
- [8] 唐紫薇,王云彪. 雄性秀丽隐杆线虫能提高热胁迫下种群生存优势. *应用生态学报*, 2012, 23(8):2036-2040
- [9] Fernandez Castro N, Lucas A. Variability of the frequency of male neoteny in *Ostrea puelchana* (Mollusca: Bivalvia). *Marine Biology*, 1987, 96:359-365
- [10] Calvo M, Templado J. Reproduction and sex reversal of the solitary vermetid gastropod *Serpulorbis arenarius*. *Marine Biology*, 2005, 146:963-973
- [11] Lango-Reynoso F, Devauchelle N, le pennec M, et al. Elements of reproductive strategy in oysters, *Crassostrea gigas*, from the "Rade de Brest" France. *Invertebrate reproduction and development*, 1999, 36(1-3):141-144
- [12] 费世民,何亚平,何飞等. 雌雄异体生物种群的性比失调及其控制研究现状. *四川林业科技*, 2011, 32(2):23-37
- [13] 於宏,王一农,王国良等. 泥螺生殖系统的组织学. *动物学杂志*, 2003, 38(4):5-9
- [14] Shapiro D Y, Differentiation and evolution of sex change in fishes. *Bio Science*, 1987, 37:490-497
- [15] 周丽青,杨爱国,刘志鸿等. 基于遗传连锁图谱筛选虾夷扇贝性别相关 AFLP 标记方法的初探. *渔业科学进展*, 2014, 35(5):
- [16] 吕道远,宋平,陈云贵等. 黄鳍性腺自然逆转过程中 *vassa* 基因的表达分析. *动物学报*, 2005, 51(3):469-475

Histological research on the gonad of hermaphrodite *Patinopecten yessoensis* in breeding period

Zhou Liqing, Yang Aiguo, Wang Qingyin, Zheng Yanxin, Liu Zhihong, Wu Biao, Sun Xiujuan, Zheng Libing
(Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract

A 3-year histological study on the gonad of hermaphrodite *Patinopecten yessoensis* in breeding period by using the techniques of Bouins solution fixing and general tissue slicing was performed according to the organizational structural characteristics of female and male gonads to investigate the cause of hermaphrodites formation. The study shows the existence of hermaphrodites is commonly associated with the aquaculture environment. The proportion of hermaphrodites is up to 19.2% in Yantai marine culture area of Shandong Province. The development of hermaphrodite gonad folliculi is asynchronous and its separation is not clear. Rapidly proliferative male gametes or folliculis are found in female gonads from February to March every year, with the gametes growth together and partly releasing, while in April the gonad of hermaphrodite *Patinopecten yessoensis* is mainly male or intersexed. The sex reversal direction is mainly from female to male, having only one scallop in 229 samples reversing from male to female. In the gonads of a few hermaphrodites, the female and male germs are both found mature and released synchronously. Whether both sexes develop evenly in hermaphrodite gonad or not is still in need of further study.

Key words: *Patinopecten yessoensis*, hermaphrodite, sex reversal, gonad, egg degradation, histology