

马氏珠母贝雌雄同体和自体受精的研究

王梅芳 余祥勇 刘永 谭亚聪 杨珍义

(广东海洋大学珍珠研究所 湛江 524025)

摘要:对马氏珠母贝(*Pinctada martensii* Dunker)成体的性腺进行外观和切片观察,可把马氏珠母贝雌雄同体的个体分为2种类型,其中A类型可以从性腺外观特征上辨别,而B类型需性腺穿刺或组织切片来确认。对试验群体的性腺的类型进行的初步统计表明,雌雄同体个体比例A类型为4.6%,B类型为3.4%,其中雌雄生殖细胞均接近成熟的个体分别约为1.8%和2.1%。通过解剖、0.07%的氯海水处理,对雌雄同体个体的自体授精及其早期胚胎发育进行了研究,发现自体授精的受精率低于异体授精,同时在发育过程中有较多的卵裂球解体,但仍有部分胚胎可以发育成D型幼虫。

关键词:马氏珠母贝;雌雄同体;自体受精;胚胎发育

中图分类号:Q953 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2006)04-0420-05

马氏珠母贝(*Pinctada martensii* Dunker)是当前生产珍珠的主要母贝,在日本、菲律宾、越南、缅甸、印尼、斯里兰卡、澳大利亚均有分布^[1]。在中国,主要分布在两广、海南和台湾沿海,目前在广西的涠洲岛附近海区及广东的大亚湾等地尚有一定量的野生群体。在广东雷州半岛及北部湾沿岸海域,马氏珠母贝是主要的养殖品种,该区域产出了全国总产量95%以上的海水珍珠。

由于多年来在珍珠生产中,大量繁养了用近缘养殖贝为亲贝培育的贝苗,导致了马氏珠母贝的种质退化,养殖群体生长慢,养殖1—2年,达到60mm以上的个体较少,生产的珍珠质量不佳。这成为影响我国珍珠产业发展的一个主要问题,已引起多方重视。为了培育种质优良的育珠母贝,国内多家机构都开展了马氏珠母贝良种选育的研究,目前已筛选出部分具有优良性状的个体,积累了一些经济性状优良的亲贝材料^[2-3]。如果通过多代群内自繁、定向选择来使优良性状纯合而稳定遗传,会需相当长的时间。从理论上讲,同一个体精卵交配,后代中基因纯化速率最高,而在双壳类中,有相当比例的个体是雌雄同体^[4-6],按Heller的统计,9%的双壳类中已发现有雌雄同体现象^[7],马氏珠母贝雌雄同体和性变现象也有报道^[8,9]。在海湾扇贝(*Argopecten*

irradians)中利用雌雄同体个体建立自交系的研究已取得进展^[10-12]。但在马氏珠母贝中,目前尚未有类似的研究报道。从2002年开始,作者对马氏珠母贝雌雄同体现象进行了研究,并开展了自体授精及其早期胚胎培育的试验。

1 材料与方法

1.1 亲贝来源 试验用马氏珠母贝为广东海洋大学珍珠研究所在雷州珍珠基地的选育母贝和湛江流沙港养殖群体,处于性腺成熟期(4—6月或9—11月),贝龄1.5—2年。取样时,剔除其中过小,壳形异常的个体。第一次取样(样本组1,2003年10月)为400只选育贝,通过检视性腺(不损伤贝体),检出外观特征可以判断为雌雄同体的个体。第二次取样(样本组2,2004年5月)为养殖贝,剔除性腺未发育和可能为A类型的个体,共145只,再通过性腺穿刺、镜检找出具有雌雄两种性细胞的个体。

1.2 性腺观察 解剖样本观察性腺,成熟个体的性腺会充满整个腹腔并包围消化盲囊。

性别类型和各自比例统计,根据以下方法对所选样本进行鉴别:1)性腺外观检查;2)玻璃吸管性腺穿刺取性细胞显微镜检;3)常规石蜡包埋、切片,H

收稿日期:2005-07-21;修订日期:2005-10-30

基金项目:国家“863”项目(2002AA603022);广东省科技计划项目(2003C20330)资助

作者简介:王梅芳(1964—),女,甘肃秦安人;副教授;研究方向:发育生物学及贝类遗传育种

通讯作者:余祥勇,Tel.:0759-2382184;E-mail:yuxyong@tom.com

E 染色 ,显微观察。

1.3 解剖法自体授精 从 400 只选育贝中挑选出 5 只雌雄性腺同时接近成熟的类型 A 个体(见图 1 和结果 2.1 说明) ,作为人工授精的亲贝。解剖后 ,将乳白色的雄性性腺 ,剪下并撕碎(尽可能小) ,用玻璃细管吸取腹崎等处雌性性腺的卵子 ,分别将精、卵分离到装有过滤海水的小烧杯中备用。在 2000mL 的大烧杯中配制终浓度为 0.07 % 的氨海水 1000mL ,然后将卵倒入大烧杯中 ,混匀后 ,用血球计数板计数 ,根据卵子数量 ,再加入不同体积的氨海水调整各烧杯中卵的密度约为 400 个 / mL ;15min 后 ,分别加入对应的同一个体的适量精子 ,用玻棒混匀 ,1h 以后 ,搅拌烧杯中的精卵 ,然后分别吸 1mL 镜检 ,记录总卵数 ,并以其中极体、极叶出现或卵裂开始者为受精卵 ,确定受精率 ,重复取 3 份 ,计算平均数。取成熟的雌雄贝各 1 个 ,以同样方法作对照。

1h 50min 和 3h ,经二次洗卵后轻微充气 ,继续培养 5h ,以同样的方法取样、计数 ,估算发育到担轮幼虫的数量并计算孵化率。

从养殖群体中挑选 145 只软体外观正常、性腺饱满(即剔除性腺未发育和可能为 A 类型的个体)的成贝 ,用细玻璃吸管取性腺内液体涂于玻片中央 ,加一滴 0.07 % 的氨海水 ,在显微镜下观察是否同时具有雌雄配子。对可能为雌雄同体的贝 ,再从其性腺不同部位吸取性腺液观察验证。最后确认为雌雄同体的贝共 5 只 ,尽可能多地吸取性腺液 ,分别移至氨海水中混匀授精 ,搅拌后静止 20min ,倾去上层一半海水 ,加新鲜海水继续培育 ,并每隔 10min 取样观察。以类似上述方法作对照 ,并估算受精率、担轮幼虫和 D 型幼虫孵化率。

1.4 胚胎发育的观察 将人工授精的早期胚胎间断取样 ,显微观察并记录受精卵卵裂、胚胎早期发育过程。

2 结果

2.1 雌雄同体性腺类型

雌雄同体的个体可分成二类 :A 类型个体可通过软体外观颜色分辨 ,黄色的雌性性腺在腹崎和内脏团的外围 ,而雄性性腺在消化盲囊附近及部分外套膜中 ,呈乳白色 ,见图 1(1) ,观察发现 ,卵细胞较成熟而外套膜中的精子活力较差。B 类型的个体外观特征不易辨别为雌雄同体 ,但其性腺多轻微皱缩 ,外观呈暗橘红色 ,当刺破性腺时 ,流出的液体多是乳白色的精液 ,同时也含有卵粒 ,显微观察则可明显发

现精、卵共存 ,其性腺组织切片观察 ,可以清楚看到性腺中有雌雄滤泡并存 ,见图 1(2)。

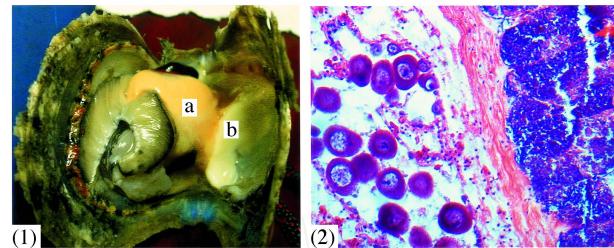


图 1 雌雄同体马氏珠母贝的性腺

(1) A 类型性腺外观 :a. 黄色的雌性生殖腺 ;b. 乳白色的雄性生殖腺 ;
(2) B 类型性腺切片 :左为雌性滤泡 ;右为雄性滤泡。

Fig. 1 Hermaphroditic sexual gonad of *Pinctada martensii*

(1) The gonad of type A : a. ovary (yellow) ;b. spermary (ivory-white)
(2) The gonad section of type B :left , female follicular ;right ,male follicular.

2.2 不同类型亲贝的比例

通过性腺肉眼观查和吸取性细胞镜检 ,确定样本性腺类型并计算各类型的比例。观察结果见表 1、表 2。

表 1 样本组 1 性腺类型和比例

Tab. 1 Gonad forms and their rates in Group 1

性腺类型 Gonad forms	数量 Amount		比例 Rate
	单性 Monosex	雌性 Female	
性腺未发育 Gonad undevolved		28	6.8
单性 Monosex	雌性 Female	169	88.6
雄性 Male		185	
性腺饱满 Matured gonad			
A 型 Type A	卵成熟 , 精子活动差 Ovulation mature , sperm activity poor	9	2.8
A 型 Type A	卵成熟度差 , 精子活动 Ovulation maturity差 , sperm activity	2	
	卵成熟 , 精子活动 Ovulation mature , sperm activity	7	1.8
合计 Total		400	100

在这些随机取样的 400 个选育贝亲贝当中 ,有 18 只贝为 A 型雌雄同体 ,但同时具有成熟的雌雄性细胞的个体只有 7 只 ,比例为 1.8 % 。

表 2 样本组 2 性腺类型和比例

Tab. 2 Gonad forms and their rates in Group 2

性腺类型 Gonad forms	数量 Amount		比例 Rate
	单性 Monosex	雌性 Female	
性腺饱满 Matured gonad		67	96.6
B 型 Type B	雄性 Male	73	
精、卵成熟度均差 (不能受精)		2	1.3
B 型 Type B	卵较成熟 , 精子活动略差 Ovulation relatively mature , sperm activity slightly poor	2	
B 型 Type B	卵成熟 , 精子活动 Ovulation mature , sperm activity	1	2.1
合计 Total		145	100

在 145 只养殖群体样本中检测到 5 只 B 类型的雌雄同体贝,其中能受精的个体有 3 只,比例为 2.1 %。

2.3 受精率及担轮幼虫期的孵化率

2.3.1 从 7 只 A 类型样本中取 5 只(编号 a₁、a₂、…、a₅)进行人工自体授精,受精卵数和受精率、担轮幼虫数量和孵化率的计数和统计结果见表 3。

表中孵化率 1 为担轮幼虫数占卵总数的比例,最高为 2 号亲贝,为 3.0 %,孵化率 2 为担轮幼虫数占受精卵数的比例,各样本差别不大,基本都在 20 % 左右(a₅ 号除外)。这个结果表明,人工自体授精过程中,大量的卵未能受精,而受精后也仅有部分胚胎的发育能正常进行至担轮幼虫,未观察到变态的 D 型幼虫。

表 3 5 只 A 类型样本自体受精的受精率和孵化率

Tab. 3 The rates of fertilized and hatched eggs from 5 hermaphroditic individuals of type A

样本 Specimen	受精卵/个/mL Number of fertilized eggs	受精率/ % Fertilizing rate	担轮幼虫数/个/mL Number of trochophore larva	孵化率 1/ % Hatching rate 1	孵化率 2/ % Hatching rate 2
a ₁	26	6.5	6	1.5	23.1
a ₂	55	13.8	12	3.0	21.8
a ₃	49	12.3	9	2.3	18.4
a ₄	36	9.0	7	1.8	19.4
a ₅	30	7.5	4	1.0	13.3
平均 Average		9.8		1.9	19.2
对照 Control	370	92.5	>300 *	>75	>80

* 因密度较大,游动的担轮幼虫无法精确计数 The number of trochophore larva could not be counted accurately due to the high density of swimming larva

2.3.2 B 类型的雌雄同体贝 5 个,但仅有 3 只能自体受精,统计担轮幼虫及 D 型幼虫存活数,计算幼虫的孵化率(担轮幼虫或 D 型幼虫幼虫数占受精卵数的比例),结果见表 4。

表 4 3 只 B 类型样本自体受精的受精率和孵化率

Tab. 4 The rates of fertilized and hatched eggs from 3 hermaphroditic individuals of type B

样本 Specimen	受精率/ % Fertilizing rate	担轮幼虫孵化率/ % Hatching rate of trochophore larva	D 型幼虫孵化率/ % Hatching rate of D-shaped larva
b ₁	11.1	46.5	23.5
b ₃	10.2	32.3	0
b ₄	8.5	17.8	0
平均 Average	9.9	32.2	23.5
对照 Control	92.5	84.0	80.0

可以看出,B 类型的受精率和幼虫孵化率都比 A 类型高,其中 b₁ 样本的受精卵还有相当比例可以发育到 D 型幼虫期。

2.4 自体受精的早期胚胎发育的观察

以授精时间为起始时刻,记录胚胎发育时间(表 5)。两组实验期间的水温和盐度有差别,但均在马氏珠母贝发育的适宜范围内,类型 A 人工自体受精

后发育相对迟缓,且在卵裂过程中,受精卵的进一步发育有在不同的阶段停止、分裂球破散和胚胎形态异常等的情形。但从受精到担轮幼虫期的整个胚胎发育过程中,各阶段都有形态和活力正常的幼虫。类型 B 人工自体受精后的发育进程与通常(对照组)的异体受精的发育进程相当,在 320min 左右到达担轮幼虫期,并在 25h 后能发育至 D 型幼虫,且 D 型幼虫的活动和摄食均正常。

表 5 雌雄同体类型胚胎发育时间表

Tab. 5 Timetable of embryonic development of hermaphrodites

发育阶段 Developing stages	A 类型/ min A Type		B 类型/ min B Type	对照/ min Reference
精卵混合 Sperm and egg mixed	0		0	0
第一极体 First polar body	60		45	30
2 细胞期 2 cell stage	86		75	70
4 细胞期 4 cell stage	125		95	90
8 细胞期 8 cell stage	145		110	110
16 细胞期 16 cell stage	170		140	130
32 细胞期 32 cell stage	230		180	170
囊胚期 Blastula stage	250		240	230
担轮幼虫期 Trochophore stage	390		320	320
D 形幼虫期 D-shaped larva	/		25h	24h

注: 水温 28, 盐度 28; 水温 26.5, 盐度 30; 水温和盐度同 in seawater of 28 and salinity 28; & in seawater of 26.5 and salinity 30

3 讨论

在良种选育中,使优良性状的基因纯化,从而将性状稳定地遗传给后代,是几乎所有优良品种培育必经的过程。这个过程通常是采用具有亲缘关系的亲本多代近交的方法来实现。但水产动物受性成熟年龄、每年的繁殖次数等限制,大多数良种往往要经过十几年甚至几十年的选育才能获得。另外,在杂交育种中,杂交子代的性状是否优良,也与父母本的各自种质的遗传纯度和相互间的遗传差异密切相关。因此,如何使初选亲本的种质纯化并稳定下来是非常关键的工作。已有研究者尝试利用雌(雄)核发育来培育纯系^[13-16],但目前贝类人工诱导的雌(雄)核发育还处于研究的初步阶段^[17-18]。近交使基因型纯合的速度,随着亲缘关系接近而提高,而最近的则是严格意义上的自交—自体交配,对于单个杂合基因 Aa 而言,自交一代纯合基因的比例就可以达到 50%,但对绝大多数雌雄异体的动物而言,这是几乎不可能达到的选育高效率。而在双壳类中,马氏珠母贝、栉江珧(*Atrina pectinata*)、二色裂江珧(*Pinna bicolor*)、尖紫蛤(*Hiatula acuta*)等都发现性别转换、雌雄同体的现象,这为人们提供了一个这样的可能:利用这个特性,通过研究珍珠贝性别分化的机理和促进雌雄两性别同时成熟的方法等,建立一套珍珠贝自体交配而对其种质快速纯化的技术,这是纯化良种的一条捷径。在鱼类中,已有开展类似研究的报道^[19]。在双壳类中,近来张国范等利用雌雄同体的海湾扇贝也已进行了自交家系的建立和生长等方面的研究,他们的研究显示出该途径对雌雄同体的海湾扇贝有较大的育种价值。

本试验表明通常为雌雄异体的马氏珠母贝中,少量的雌雄同体的个体人工自体交配是可以进行的,受精卵能发育到 D 型期,幼虫形态与活力都很正常,虽然因数量少和试验条件所限,未能继续培养至幼苗期,但通过这个方法,完全可以对已选育珍珠贝良种品系或个体进行快速纯化,使选育过程通过几代自交得以完成。

本试验中,发现的雌雄同体两种类型,其中外观特征上较难判别的类型 B 具有相对较高的受精率和孵化率, b_1 个体发育可得到正常 D 型幼虫,虽仅为单个个体,但至少表明通过人工自体受精的途径是可能得到成体的。对比分析,类型 B 很可能为雌雄性腺同时发育(或雄性略早),且具有分隔的雌雄生殖滤泡;类型 A 则可能是雄性向雌性性转化的类型,当卵细胞发育至有受精能力时,精子则大部分退化而较难受精。因此,

利用类型 B 纯化种质的途径,成功的可能更大。

在本文的试验群体中,成熟的亲贝中有 2.1% 的 B 类型亲贝同时具有成熟两性配子,可以自体受精发育,这对于较小群体而言,要挑选足够用于规模生产的亲贝可能不易,但对于数以千万计的南海养殖的马氏珠母贝而言,则是一个足够高的比例,特别是雷州半岛西部主要养殖区,采取这种方法来培育种苗进行良种纯化在生产上也是可行的;加上珍珠贝单个个体怀卵量可高达数百万,对较快建立一定数量的纯化群体也是非常有利的。

参考文献:

- [1] Wang Z R. Fauna Sinica : Phylum Mollusca , Pterioidea [M]. Beijing : Science Press ,2002. 98 —102[王祯瑞.中国动物志软体动物门.双壳纲,珍珠贝亚目.北京:科学出版社,2002. 98 —102]
- [2] He M X, Jiang W G. The advances of genetics and breeding in *Pinctada martensii* D. [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2000,(1) :75—82[何毛贤,姜卫国.合浦珠母贝遗传育种研究进展.海洋湖沼通报,2000,(1) :75—82]
- [3] Wang M F, Yu X Y, Liu Y, et al. Genetic analysis of isozyme in *Pteria penguin* R. and offspring from self-reproducing and hybridized stocks of *Pinctada martensii* D. [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005 ,13(in press)[王梅芳,余祥勇,刘永,等.马氏珠母贝杂交与自繁后代及企鹅珍珠贝间同工酶差异分析.农业生物技术学报,2005 ,13(6) :777—782])
- [4] Yang Y C, Li F X. The study on the reproductive cycle of *Hiatula acuta* [J]. *Tropic oceanology*, 1994 ,13(2) :61—67[杨耀聪,李复雪.尖紫蛤生殖周期的研究.热带海洋,1994 ,13(2) :61—67]
- [5] Wang M F, Yu X Y, Wang J Y. The hermaphrodites and sex-reversal of *Atrina pectinata* Linnaeus and *Pinna bicolor* Gmelin [J]. *Journal of Zhanjiang Ocean University* , 1999 ,19 (4) :6—11[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—11]
- [6] Wang M F, Yu X Y, Ye F L. The gonad development of *Pinna (Atrina) pectinata* in beibu gulf and adjoining coast [J]. *Guangxi Sciences* , 2000 ,7(2) :140—143,157[王梅芳,余祥勇,叶富良.北部湾及附近海域栉江珧性腺发育研究.广西科学,2000 ,7 (2) :140—143,157]
- [7] Heller J. Hermaphroditism in molluscs[J]. *Biological Journal of the Linnean Society*. 1993. 48(1) :19—42
- [8] Jin Q Z. Seminal biology of pearl oyster [M]. Beijing: Chinese Ocean Press ,1992. 20 —23[金启增.珍珠贝种苗生物学.北京:海洋出版社,1992. 20 —23]
- [9] Shen Y P. The primary study on sex-reversal of *Pinctada martensii* (D.) [J]. *Journal of Wuhan University* , 1990 , (4) :117 —118[沈亦平.合浦珠母贝性变现象的初步研究.武汉大学报,1990 , (4) :117 —118]
- [10] Zhang G F, Liu S X, Liu X, et al. Self-fertilization family establishment and its depression in bay scallop *Argopecten irradians* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China* , 2003 ,10 (6) :441—445[张国

- 范,刘述锡,刘晓,等.海湾扇贝自交家系的建立和自交效应.中国水产科学,2003,10(6):441—445]
- [11] Zheng H P, Zhang G F, Liu X, et al. Comparison of growth and survival between the self-fertilized and hybridized families in *Argopecten irradians irradians* [J]. *Journal of Fishery of China*, 2004, 28(3): 267—272[郑怀平,张国范,刘晓,等.海湾扇贝杂交家系与自交家系生长和存活的比较.水产学报,2004,28(3):267—272]
- [12] Stiles S, Choromanski J. Inbreeding studies on the bay scallop, *Argopecten irradians* [J]. *J. Shelffish Res.* 1995, 14:1—6
- [13] McKone M J, Halpern S L. The evolution of androgenesis [J]. *The American naturalist*, 2003, 161(4):641—656
- [14] Yang S T, Gui J F. Isozyme analysis and preliminary confirmation of the genetic markers in two artificial gynogenetic populations silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23(3):264—268[杨书婷,桂建芳.两个雌核发育白鲢群体同工酶分析及遗传标记的确定.水生生物学报,1999,23(3):264—268]
- [15] Liu J X, Zhou L, Wei L H, Gui J F. Microsatellite marker analysis on artificial gynogenetic pure line of red-white ornamental carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, 27(6):557—562[刘静霞,周莉,魏丽华,桂建芳.红白锦鲤两个人工雌核发育纯系的微卫星标记分析.水生生物学报,2003,27(6):557—562]
- [16] Ye Y Z, Wu Q J. Preliminary studies on artificial haploid breeding of bighead carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, 27(1):106—107[叶玉珍,吴清江.鳙人工单倍体育种研究初报.水生生物学报,2003,27(1):106—107]
- [17] Pan Y, Li Q, Wang R C, et al. Progress and perspectives of gynogenesis research in marine mollusks [J]. *Journal of Fishery of China*, 2002, 26(5):465—471[潘瑛,李琪,王如才,等.海洋贝类雌核发育研究进展和展望.水产学报,2002,26(5):465—471]
- [18] Xu G Q, Lin Y G, Li G, et al. A preliminary study on the induction of gynogenetic diploid and "Hertwig effect" in pearl Oyster *Pinctada martensii* [J]. *Tropic Oceanology*, 1990, 9(2):1—7[许国强,林岳光,李刚,等.人工诱导马氏珠母贝雌核二倍体发生及“Hertwig”效应的初步研究[J].热带海洋,1990,9(2):1—7]
- [19] Liu S J, Yao Z Z, Liu Y. Studies on the gonad structures of hermaphroditisms performing selffertilization in *Clarias Lazera* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1995, 19(1):91—92[刘少军,姚占州,刘筠.能自体受精的雌雄同体黄边胡鲇的性腺结构研究.水生生物学报,1995,19(1):91—92]

STUDY ON HERMAPHRODITES AND SELF-FERTILIZATION OF THE PEARL OYSTER *PINCTADA MARTENSII*

WANG Mei-Fang, YU Xiang-Yong, LIU Yong, TAN Ya-Cong and YANG Zhen-Yi

(Pearl Research Institute, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025)

Abstract: The pearl oyster *Pinctada martensii* Dunker is the main species in Southern China Sea for commercial pearl production in Leizhou Peninsula and other Beibuwan Gulf regions. Observation on gonad of pearl oyster *P. martensii* with naked-eyes and sectioning the gonad, the hermaphrodite adults could be classified as two types: type A could be discriminated by observing the gonad and the affirmation of type B should puncture or section the gonad. The primary statistic results showed that the percentage of type A individual was 4.6% and type B was 3.4% in the specimen group, in which percentage of specimens reaching the bisexual maturation were 1.8% and 2.4% respectively. The self-fertilization and early embryonic development of these 2 types of hermaphrodites were studied by artificial dissecting insemination in the seawater containing 0.07‰ ammonia. Observations on the early embryonic development indicated that self-fertilizing rate were much lower than those between dioecious individuals and many embryos were broken during developing stage while some embryos could develop to D-shaped larvae nonetheless.

Key words: *Pinctada martensii* Dunker; Hermaphrodite; Self-fertilization; Embryonic development