

牙鲆性腺分化的组织学研究

孙 鹏^{1,2}, 尤 锋¹, 张立敬³, 文爱韵¹, 吴志昊¹, 徐冬冬¹, 李 军¹, 徐永立¹, 张培军¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049; 3. 中国水产科学院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266061)

摘要:运用组织学方法对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的性腺分化和发育过程进行了观察。结果表明,牙鲆的性腺发育可分为3个阶段,即原始性腺阶段、性腺分化阶段和性腺分化后阶段。培育水温为18℃~20℃下,孵化后第45天、平均全长为22.0 mm±2.8 mm的牙鲆,其性腺分化尚未开始,属于原始性腺。70日龄、平均全长为38.0 mm±1.7 mm的牙鲆,部分个体中观察到卵巢的雏形,其余个体中性腺变化并不大;到了第110天、平均全长达到86.5 mm±5.9 mm时,雌性个体卵巢的卵巢腔进一步增大,并出现卵原细胞向卵母细胞的转变。精巢的分化开始于90日龄、平均全长为63.5 mm±3.4 mm的幼鱼,此期精原细胞快速增殖,体细胞进行有丝分裂并逐渐形成输精管原基;进一步的细胞学分化则出现在100日龄、平均全长为76.0 mm±8.6 mm的个体中,此时可以看到精小叶的形成;在平均全长为140.0 mm±15.2 mm时,精巢中出现初级精母细胞,标志着性腺分化的基本完成。

关键词:牙鲆(*Paralichthys olivaceus*); 性腺分化; 组织学

中图分类号: Q347

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)03-0053-06

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是一种名贵的海产鱼类,其工厂化育苗和养殖始于20世纪80年代。目前,牙鲆已成为中国最重要的海洋养殖鱼类之一^[1]。

随着牙鲆养殖规模的扩大,对繁育技术进一步改良及其良种的需求越来越迫切,有关育种的报道目前已有许多,如牙鲆的雌核发育诱导及杂交等方面的研究^[2~4],近1~2 a来开展的选育研究等。鱼类性腺分化和发育的研究是其繁育技术和育种研究深入发展的基础,但牙鲆的繁殖及性腺发育的研究一直以来都集中于其性腺的发育和促熟方面,如有关其卵巢发育及注射LHRA-A2和HCG对其卵巢发育影响的研究^[5],还有LHRA-A2和HCG对牙鲆精巢发育影响的研究^[6]等。有关牙鲆性腺的早期发育与分化的研究在国内未见到报道,仅在国外有相关报道,但结果并不相同。日本学者Tabata^[7]发现牙鲆卵巢腔的出现在全长50~60 mm时期,另一位日本学者Yamamoto^[8]认为其发生在28~40 mm的幼鱼中,而韩国学者Lee^[9]等则认为牙鲆性腺分化发生在全长为15~30 mm时期的幼鱼。因而对于牙鲆性腺分化的具体时期还不明确,需要进一步的研究以明确性腺分化规律。

本研究采用组织学方法,以室内培育的牙鲆稚幼鱼为研究材料,着重研究牙鲆性腺分化过程,旨在丰富牙鲆繁殖生物学知识,并为今后进行性别调控研究和应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 牙鲆稚幼鱼的培育

实验所用的牙鲆稚鱼鱼苗取自山东省荣成林家流养殖场,之后饲养于中国科学院海洋研究所水族楼实验室内容积90 L的水族箱中。每箱300尾,采用自然光照,培育水温为18℃~24℃、盐度为29~32。待幼鱼全长大于60.0 mm后转至1 t的水族缸中饲养。实验稚鱼的初始全长平均为14.1 mm±1.6 mm,从培育的第1天开始,每5 d取样1次;全长60.0 mm后,每10 d取样1次。

1.2 组织学切片与观察

所取样本于Bouin's液中固定24 h,然后转入70%乙醇中保存。其中全长<30.0 mm的仔鱼直接进行全鱼固定,全长30.0~60.0 mm的幼鱼取其整个腹部固定,而全长>60.0 mm的幼鱼则直接解剖,取出性腺固定。固定的样品用石蜡包埋,做连续切片,切片厚度5~6 μm, H. E. 染色,用Nikon显微镜观察,并拍照记录。

收稿日期: 2008-12-01; 修回日期: 2008-12-25

基金项目: 国家863计划重大项目(2006AA10A404); 国家自然科学基金资助项目(30571445)

作者简介: 孙鹏(1980-), 男, 山东枣庄市人, 博士生, 研究方向为鱼类内分泌和细胞生物学, 电话: 0532-82898560, E-mail: sunpeng1128@163.com; 尤锋, 通信作者, E-mail: youfeng@ms.qdio.ac.cn

2 结果

2.1 原始性腺的发育

全长 33.5 mm 的牙鲆个体,其性腺的组织切片见图 1。由图 1 可见,全长平均为 $12.5\text{ mm} \pm 1.3\text{ mm}$ 、35 日龄的稚鱼已进入变态末期,大多开始爬底,此时为生殖腺形成的初期。生殖腺位于腹腔的后部,肾脏的后端,与体腔壁相连。原生殖细胞呈椭圆形,细胞核较大,为圆形或椭圆形。核仁 1 个,染色较深,多沿核膜内侧分布,少数位于核中央,核中的染色质为网状(图 1-1,1-2)。

全长平均为 $22.0\text{ mm} \pm 2.8\text{ mm}$ 、45 日龄的幼鱼已完成变态,体表色素发达,生殖腺增大,原生殖细胞仍排列在生殖腺中,核仁染色较深,核中的染色质为丝状(图 1-3,1-4)。

全长 $24.0 \sim 26.5\text{ mm}$ 、44~55 日龄的幼鱼,性腺明显增长、变宽,原生殖细胞数量增加,排列变得稍微紧密,细胞直径变大(图 1-5~图 1-8)。

全长 $30.0 \sim 33.5\text{ mm}$ 、60~65 日龄的幼鱼,性腺进一步增长,生殖细胞数量大大增加,在性腺中紧密排列(图 1-9~图 1-12)。

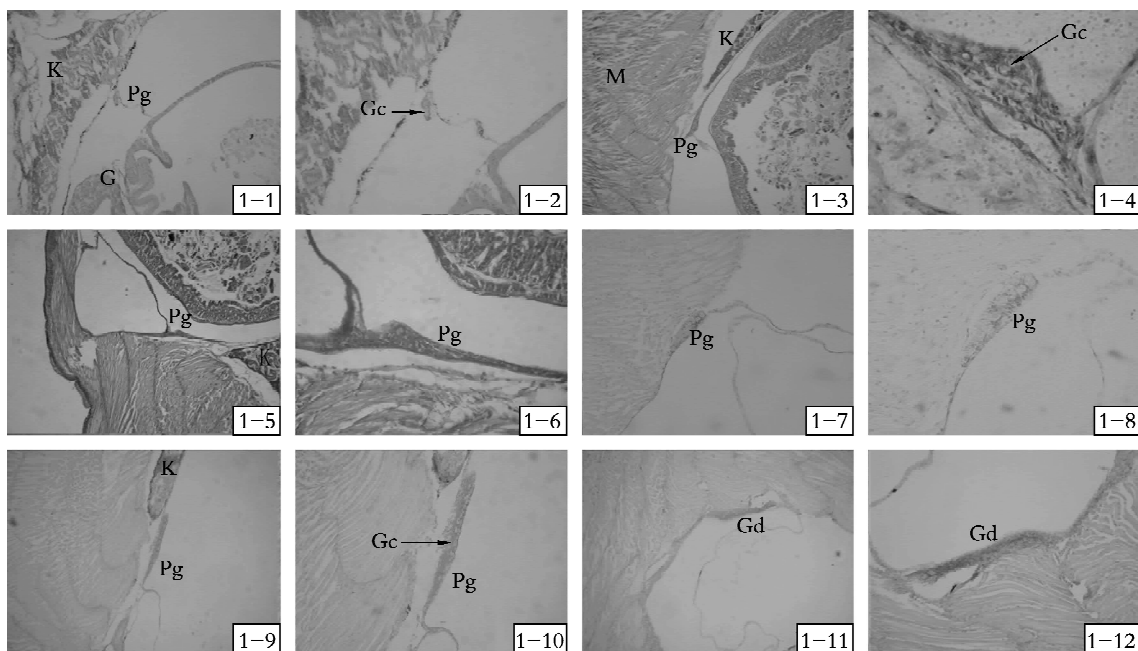


图 1 牙鲆原始性腺的发育

Fig. 1 Development of primordial gonad in *Paralichthys olivaceus*

1-1. 全长为 12.0 mm 稚鱼的性腺($\times 200$);1-2. 图 1-1 的放大($\times 400$);1-3. 22.0 mm 幼鱼的性腺($\times 100$);1-4. 图 1-3 的放大($\times 1000$);1-5. 24.0 mm 幼鱼的性腺($\times 100$);1-6. 图 1-5 的放大($\times 400$);1-7. 26.5 mm 幼鱼的性腺($\times 100$);1-8. 图 1-7 的放大($\times 400$);1-9. 30.0 mm 幼鱼的性腺($\times 200$);1-10. 图 1-9 的放大($\times 400$);1-11. 33.5 mm 幼鱼的性腺($\times 200$);1-12. 图 1-11 的放大($\times 400$);G. 肠;Gc. 生殖细胞;Gd. 性腺;K. 肾;M. 肌肉;Pg. 原始性腺(下同)

1-1. gonad of 12.0 mm TL larva ($\times 200$); 1-2. magnification of picture 1-1 ($\times 400$); 1-3. gonad of 22.0 mm TL juvenile ($\times 100$); 1-4. magnification of picture 1-3 ($\times 1000$); 1-5. gonad of 24.0 mm TL juvenile ($\times 100$); 1-6. magnification of picture 1-5 ($\times 400$); 1-7. gonad of 26.5 mm TL juvenile ($\times 100$); 1-8. magnification of picture 1-7 ($\times 400$); 1-9. gonad of 30.0 mm TL juvenile ($\times 200$); 1-10. magnification of picture 1-9 ($\times 400$); 1-11. gonad of 33.5 mm TL juvenile ($\times 200$); 1-12. magnification of picture 1-11 ($\times 400$); G. gut; Gc. germ cell; Gd. gonad; K. kidney; M. muscle; Pg. primordial gonad

2.2 卵巢的发育

牙鲆幼鱼性腺分化为卵巢的过程见图 2。全长平均为 $38.0\text{ mm} \pm 1.7\text{ mm}$ 、70 日龄的幼鱼,性腺在组织学上出现了两种结构:一些个体的性腺中出现

新月形的裂隙,这是卵巢腔的雏形,卵巢腔的出现标志着卵巢分化的开始(图 2-1,2-2);而另一些个体中则没有。

全长 $50.0 \sim 65.2\text{ mm}$ 、70~85 日龄的幼鱼,性腺

在组织学上并没有明显的变化,只是具有卵巢腔的个体其性腺卵巢腔有所增大,生殖细胞排列在裂隙的周围(图 2-3~图 2-10)。

全长平均为 86.5 mm±5.9 mm、110 日龄的雌性幼鱼,卵巢腔的裂隙进一步变大,卵巢小叶形成,并出现了卵原细胞向卵母细胞的过度形态。这时卵巢的特征已经十分明显,其外由一层结缔组织包裹,

其中的卵原细胞多分布于卵巢小叶的周边(图 2-11, 2-12)。

随着个体的生长,卵巢继续发育,在全长>158.0 mm 的幼鱼中,卵巢基本由卵母细胞填充。卵母细胞较卵原细胞大,核大,核仁多个,分布于核周边,胞质弱嗜碱性(图 2-15,2-16)。

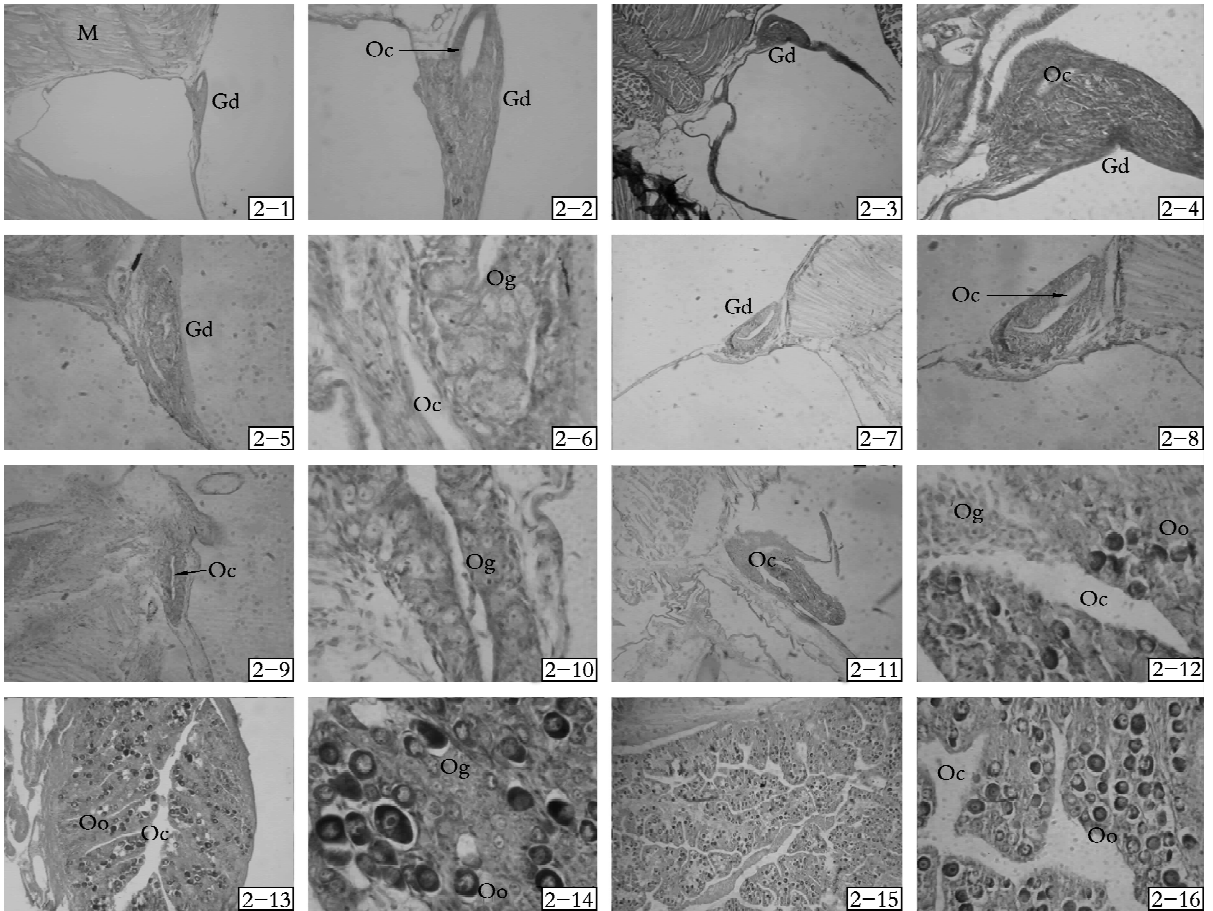


图 2 牙鲆卵巢的发育

Fig. 2 Development of ovary in *P. olivaceus*

2-1. 全长为 38.0 mm 幼鱼的卵巢(×100);2-2. 图 2-1 的放大(×400);2-3. 50.0 mm 幼鱼的卵巢(×100);2-4. 图 2-3 的放大(×1 000);2-5. 55.0 mm 幼鱼的卵巢(×200);2-6. 图 2-5 的放大(×1 000);2-7. 57.0 mm 幼鱼的卵巢(×100);2-8. 图 2-7 的放大(×400);2-9. 65.2 mm 幼鱼的卵巢(×200);2-10. 图 2-9 的放大(×1 000);2-11. 86.5 mm 幼鱼的卵巢(×200);2-12. 图 2-11 的放大(×1 000);2-13. 90.5 mm 幼鱼的卵巢(×200);2-14. 图 2-13 的放大(×1 000);2-15. 158.0 mm 幼鱼的卵巢(×200);2-16. 图 2-15 的放大(×400);Oc. 卵巢腔;Og. 卵原细胞;Oo. 卵母细胞(下同)

2-1. ovary of 38.0 mm TL juvenile (×100); 2-2. magnification of picture 2-1 (×400); 2-3. ovary of 50.0 mm TL juvenile (×100); 2-4. magnification of picture 2-3 (×1 000); 2-5. ovary of 55.0 mm TL juvenile (×200); 2-6. magnification of picture 2-5 (×1 000); 2-7. ovary of 57.0 mm TL juvenile (×100); 2-8. magnification of picture 2-7 (×400); 2-9. ovary of 65.2 mm TL juvenile (×200); 2-10. magnification of picture 2-9 (×1 000); 2-11. ovary of 86.5 mm TL juvenile (×200); 2-12. magnification of picture 2-11 (×1 000); 2-13. ovary of 90.5 mm TL juvenile (×200); 2-14. magnification of picture 2-13 (×1 000); 2-15. ovary of 158.0 mm TL juvenile (×200); 2-16. magnification of picture 2-15 (×400); Oc. ovarian cavity; Og. oogonium; Oo. oocytes

2.3 精巢的发育

牙鲆幼鱼精巢分化和发育过程见图 3。全长 38.0~60.0 mm、70~80 日龄的幼鱼中,没有出现裂缝(卵巢腔)的那一类型的性腺则没有明显的组织学和细胞学变化,整个性腺呈长条状,位于肾脏的后面,与体腔壁相连(图 3-1,3-2)。

全长平均为 63.5 mm±3.4 mm、90 日龄的幼鱼,生殖细胞开始集中分布,形成了裂隙状的输精管原基结构(图 3-3)。全长平均为 76.0 mm±8.6 mm、100 日龄的幼鱼,精原细胞的数目增加,并开始形成精小叶(图 3-4~图 3-6)。

比较分析,牙鲆精巢的分化较卵巢晚,输精管和精小叶的出现是精巢分化的重要特征。

在全长大于 140.0 mm 的幼鱼中,精小叶已经十分明显,精原细胞在精小叶中集中分布,并出现了精原细胞向精母细胞的转变(图 3-7,3-8)。

3 讨论

在牙鲆性腺发育的早期,原始生殖腺呈细长的带状,紧贴腹腔后部。体壁的两侧与体腔壁相连,其中存在少量原始生殖细胞。随着牙鲆个体的生长,当幼鱼全长达 26.5 mm 左右,性腺增大,生殖细胞开始分裂变多。但是在幼鱼生长到 37.0 mm 之前,雄性和雌性性腺没有较大的组织学和形态学差别,不能分辨雌雄。

根据组织切片观察,孵化后第 70 天左右、全长约 38.0 mm 的幼鱼,性腺被分为两类,一类性腺具有新月形裂隙,这种裂隙即是卵巢腔的雏形;另一类型的性腺则不具有裂隙。对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)和石鲈(*Kareius bicoloratus*)性腺分化的研究也得到了类似的结果^[10,11]。卵巢腔的形成可以看作是牙鲆雌性性腺分化开始的标志。

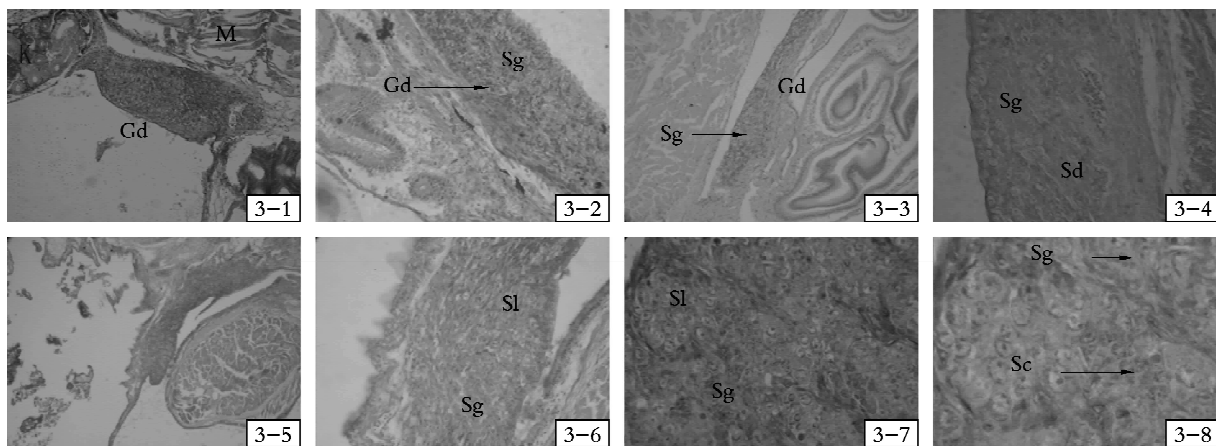


图 3 牙鲆精巢的发育

Fig. 3 Development of testis in *P. olivaceus*

3-1. 全长为 44.0 mm 幼鱼的精巢(×200);3-2. 56.0 mm 幼鱼的精巢(×400);3-3. 63.5 mm 幼鱼的精巢(×400);3-4. 76.0 mm 幼鱼的精巢(×400);3-5. 77.0 mm 幼鱼的精巢(×100);3-6. 图 3-5 的放大(×400);3-7. 159.8 mm 幼鱼的精巢(×400);3-8. 图 3-7 的放大(×1 000); Sc. 精母细胞;Sd. 精小管;Sg. 精原细胞;Sl. 精小叶

3-1. testis of 44.0 mm TL juvenile(×200); 3-2. testis of 56.0 mm TL juvenile(×400); 3-3. testis of 63.5 mm TL juvenile (×400); 3-4. testis of 76.0 mm TL juvenile (×400) 3-5. testis of 77.0 mm TL juvenile(×100); 3-6. magnification of picture 3-5(×400); 3-7. testis of 159.8 mm TL juvenile (×400); 3-8. magnification of picture 3-7 (×1 000)

随着牙鲆性腺的继续发育,裂隙不断扩大,最后形成完整的卵巢腔。卵原细胞向初级卵母细胞的转变,标志着雌性性腺分化的完成。雄性牙鲆的性腺分化时间较雌性个体晚,这是多种鲆鳎鱼类的共同特征^[10~12]。在全长 60.0 mm 之前,性腺在组织学上没有较大的变化,孵化后大约 90 d,全长 63.5 mm 左

右的幼鱼性腺中开始形成输精管原基。在大约 100 日龄、76.0 mm 的牙鲆幼鱼中首先发现了形成中的精小叶。输精管和精小叶的出现可以看作是雄性牙鲆性腺分化的重要特征。之后,随着个体发育的进行,精小叶逐渐明显,并出现精原细胞向初级精母细胞的转变,标志着雄性性腺分化的完成。

不同鱼类的性腺分化的时间存在较大差异,在南方牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)中,卵巢腔出现于全长 75.0~100.0 mm 的幼鱼中^[13];在石鲷中,卵巢腔的形成开始于全长 32.5 mm 的幼鱼中^[11];在半滑舌鲷中,性腺分化则出现在全长 40.5 mm 的幼鱼中^[10]。对于牙鲆的性腺分化和性腺发育也有过相关的报道,但是其结果并不相同。本研究结果显示牙鲆性腺分化发生在全长 26.5~38.0 mm 的幼鱼中,与日本学者 Yamamoto 研究的结果(28~40 mm)相近,但与另外一位日本学者 Tabata^[7](50.0~60.0 mm)和韩国学者 Lee^[8](15~30 mm)不同。作者推测不同的批次、养殖环境(如温度、饵料等)和取样密度均可能造成研究结果的差异。

环境因子影响鱼类的性别决定和性腺分化^[14],近年来,越来越多的鱼类如半滑舌鲷^[15]、南方牙鲆^[13]、庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)^[16]等被证明性腺分化受环境和基因双重调节,牙鲆也是如此。为了有效将外界因素应用于牙鲆的性别控制研究中,首先需要掌握牙鲆性腺分化的精确时间,针对性腺分化的敏感时期进行诱导处理,以得到最佳的结果。本研究认为牙鲆性腺分化起始于全长为 26.5 mm 左右、原始生殖细胞开始分裂增殖的幼鱼,到全长 38.0 mm 左右卵巢腔初步形成,标志着性腺已经分化。因此,若利用温度和外源性激素等外界因素处理牙鲆达到性逆转的目的,开始处理的牙鲆幼鱼的最有效时间应该是全长小于 26.5 mm 的阶段,处理的时间越早处理的效果应该越好。如果处理的时间在全长 38.0 mm 之后,则可能达不到预期的目的。

雌性牙鲆较雄性个体生长快^[17],单性牙鲆培育能大大提高养殖效益。本研究应用组织学方法研究了牙鲆早期性腺的性腺分化,明确了牙鲆性腺分化的具体时间,这些结果不但丰富了鲆鲽鱼类性腺发育的内容,而且为今后牙鲆的性别调控提供了理论依据。

参考文献:

[1] 田永胜,陈松林,严安生,等. 牙鲆的胚胎发育[J]. 水产学报,2004, 28(6): 609-615.
 [2] 尤锋,许建和,倪静,等. 牙鲆同质雌核发育人工诱导研究[J]. 高技术通讯,2008,18(8): 874-880.
 [3] 王新成. 全雌牙鲆种苗培育技术[J]. 海洋科学,1994, 6: 63.

[4] 王新成,尤锋,倪高田,等. 石鲷与牙鲆人工杂交的研究[J]. 海洋科学,2003,27(3): 1-4.
 [5] 宋海霞,温海深. 养殖牙鲆卵巢发育及其调控的组织学研究[J]. 海洋湖沼通报,2005,4: 75-83.
 [6] 温海深,宋海霞. 注射外源激素对养殖牙鲆精巢发育的影响[J]. 中国海洋大学学报,2007, 37(2): 229-234.
 [7] Tabata K. Artificial feminization of hirame *Paralichthys olivaceus* by administration of beta-estradiol, and estimation of stage of sexual differentiation[J]. **Bulletin of Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station**, 1989, 26: 19-36.
 [8] Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Sehlegel)[J]. **Bulletin of the Tottori Prefectural Fisheries Experimental Station**, 1995, 34: 1-145.
 [9] Lee Y D, Lee T Y. Sex differentiation and development of the gonad in the flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Sehlegel)[J]. **Bulletin of the Marine Research Institute, Cheju National University**, 1990, 14: 61-86.
 [10] 马学坤,柳学周,温海深,等. 半滑舌鲷性腺分化的组织学观察[J]. 海洋水产研究,2006,27(2): 55-61.
 [11] 王文君,王开顺,邵明瑜,等. 石鲷仔、幼鱼性腺发育的组织学观察[J]. 中国水产科学,2007,14(5):843-848.
 [12] Hendry C I, Martin-Robichaud D J, Benfey T J. Gonadal sex differentiation in Atlantic halibut[J]. **Journal of Fish Biology**, 2002, 60: 1 431-1 442.
 [13] Luckenbach J A, Godwin J, Daniels H V, et al. Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*)[J]. **Aquaculture**, 2003, 216: 315-327.
 [14] Baroiller J F, DCotta H. Environment and sex determination in farmed fish[J]. **Comparative biochemistry and physiology part C**, 2001, 130: 399-409.
 [15] 邓思平,陈松林,田永胜,等. 半滑舌鲷的性腺分化和温度对性别决定的影响[J]. 中国水产科学,2007, 14(5): 714-719.
 [16] Hughes V, Benfey T J, Martin-Robichaud D J. Effect of rearing temperature on sex ratio in juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*[J]. **Environmental Biology and Fish**, 2008,81: 415-419.
 [17] Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Sehlegel)[J]. **Aquaculture**, 1999, 173: 235-246.

Histological evaluation of gonadal differentiation in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

SUN Peng^{1, 2}, YOU Feng¹, ZHANG Li-jing³, WEN Ai-yun¹, WU Zhi-hao¹, XU Dong-dong¹, LI Jun¹, XU Yong-li¹, ZHANG Pei-jun¹

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266061, China)

Received: Dec. ,1,2009

Key words: *Paralichthys olivaceus*; gonadal differentiation; histology

Abstract: Gonadal differentiation and development in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) were studied by histological observation. A gonad development process could be divided into three phrases, i. e. , primary gonad stage, gonadal differentiation stage and post-differentiation stage. When fish were raised at temperature of 18~20°C, gonad formed and remained undifferentiated till the 45th day post hatching (D45). When juveniles reached about 38.0±1.7 mm of mean total length (TL) on the D70, ovarian cavity was observed in presumptive ovary. On the D110, when mean total length reached about 86.5±5.9 mm, ovarian cavity grew bigger, and oocytes were firstly detected. Differentiation of testis was firstly observed in juvenile flounder with mean total length of 63.5±3.4 mm on the D90, when spermatogenous cell proliferated rapidly and spermaduct formed. Seminal lobule appeared on the D100 when juveniles reached about 76.0 mm of total length. And when flounders reached total length about 140.0 mm, appearance of spermatocyte indicated the completion of gonadal sex differentiation.

(本文编辑:谭雪静)