

# 曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)副缠卵腺的组织学及超微结构\*

王春琳<sup>1,2</sup> 王津伟<sup>1,2</sup> 余红卫<sup>1,2</sup> 宋微微<sup>1,2</sup> 宋超霞<sup>1,2</sup>

(1. 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211; 2. 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211)

**提要** 采用组织学和电镜技术对曼氏无针乌贼的副缠卵腺及腺体细胞进行了研究。结果表明,副缠卵腺由副缠卵腺壁、腺体小管和结缔组织构成。腺体小管由一层上皮细胞排列围成,各个管道之间通过典型的结缔组织复合体连接在一起;结缔组织复合体由肌肉纤维和血管等构成。小管上皮细胞靠近管腔面着生有微绒毛和纤毛,胞质中有大量的球状小泡分泌物,有的球状小泡被囊泡包裹,通过胞吐作用释放到细胞外,并在纤毛摆动的作用下运送出管道外;腺体管道内存在着大量的共生细菌,呈棒状或者杆状;推测其共生细菌来自于乌贼生活水域的“水平传递”。

**关键词** 曼氏无针乌贼,副缠卵腺,组织学,超微结构,共生细菌

**中图分类号** S959.216

曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni* de Rochebrune), 属软体动物门(Mollusca)、头足纲(Cephalopoda)、十腕目(Decapoda)、乌贼科(Sepiidae)、无针乌贼属(*Sepiella*)。雌性乌贼的副性腺由缠卵腺(nidamental gland)和副缠卵腺(accessory nidamental gland)组成,是乌贼生殖器官的附属腺体,与生殖活动密切相关,在乌贼产卵时,两种腺体分泌的凝胶状物质和墨汁一起形成受精卵的卵膜(Boletzky, 1986),其中副缠卵腺所分泌的胶状物质中含有某些细菌,这些细菌产生的抗生素可以保护卵免受病原体侵害(Grigioni *et al.*, 2000)。

目前国内外对于头足类中副缠卵腺的研究较少,其中蒋霞敏等(2008)对曼氏无针乌贼副缠卵腺的组织学做过初步研究,指出副缠卵腺为一对较小的腺体,着生于缠卵腺的前方,紧连缠卵腺;Lum-Kong(1992)在对福氏枪乌贼(*Loligo forbesi*)的组织学研究中揭示了副缠卵腺是由许多的小的管道组成。Bloodgood(1977)最早对头足类的副缠卵腺进行了电镜观察,指出副缠卵腺管小管是由单层的上皮细胞构成。Nair

等(2005)在对虎斑乌贼(*Sepia pharaonis*)副缠卵腺的超微结构研究中发现小管上皮细胞内侧着生有微绒毛和纤毛。此外, Pierantoni(1918)最先在头足类的某些物种的副缠卵腺中检测出有细菌存在,随后一些学者陆续研究发现副缠卵腺的小管管腔内充满着大量细菌(Vanden Branden *et al.*, 1980; Lum-Kong, 1992; Barbieri *et al.*, 1997; Pichon *et al.*, 2005)。总体来说,目前对副性腺的组织学和超微结构的研究还未成系统,本文研究曼氏无针乌贼副缠卵腺的组织结构及超微结构,旨在为揭示副缠卵腺的作用提供进一步的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验所用 12 只活体曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)于 2008 年 3—4 月间取自福建霞浦水产养殖场,平均胴长 8.0—12.0cm。

### 1.2 方法

**1.2.1 曼氏无针乌贼的解剖** 将乌贼腹部沿腹中线剪开,在直肠两侧内脏囊壁上可见有一对大的缠

\* 国家自然科学基金资助项目, 40646030 号、40776076 号; 教育部长江学者和创新团队发展计划, IRT0734 号; 教育部重点科研项目, 207045 号; 浙江省重大科技专项资助, 2006C13040 号、2007C1206 号、2009C03017-3 号。王春琳, 教授, 博士生导师, E-mail: wangchunlin@nbu.edu.cn

收稿日期: 2009-04-16, 收修改稿日期: 2009-08-25

卵腺,在缠卵腺的上端有一对小型的副缠卵腺,呈橙黄色,开口于外套腔。

**1.2.2 组织学切片样品的制备** 取曼氏无针乌贼副缠卵腺,按照常规组织学研究方法进行 Bouin's 液固定、脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋,然后进行切片,厚度为 5 $\mu$ m,继续脱蜡、H.E 染色、封片,最后切片晾干后于光学显微镜下进行观察拍照。

**1.2.3 透射电镜样品的制备** 取副缠卵腺组织块,体积为 0.5—1mm<sup>3</sup>,用 4 $\times$  的 2.5%戊二醛固定 24h,再经 4 $\times$  的 1%四氧化锇后固定 1h(戊二醛和四氧化锇由 pH 7.4 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液配制)经 0.1mol/L 磷酸缓冲液漂洗,梯度酒精脱水, Epon812 环氧树脂包埋, LKB28800 超薄切片器切片,厚度约 70nm。切片经醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, HitachiH-7650 透射电子显微镜观察并拍照,拍照时电压 80kV。

## 2 结果

### 2.1 副缠卵腺的组织学观察

曼氏无针乌贼副缠卵腺是位于墨囊上端两侧、缠卵腺前端的一对小型腺体,呈卵状,在乌贼幼体时呈白色,性成熟时变为橙黄色,开口于外套腔。副缠卵腺由腺壁、腺体小管和结缔组织组成。副缠卵腺壁由外膜层、肌肉层构成。外膜层是由单层柱状上皮细胞组成;肌肉层为平滑肌,约为 3—4 层,主要为环肌,其中有一些为斜肌(图 1a);腺体小管数量众多,内径大小不一,各小管之间不是平行排列,而是相互交错;小管由单层上皮细胞排列围成,细胞扁平状,细胞核大,位于细胞中部;在细胞的近腔表面可见微绒毛;腺体小管之间由致密结缔组织连接,结缔组织中分布有血管和肌纤维,血管多为两个上皮细胞构成的毛细血管,肌纤维为平滑肌(图 1b、c、d)。

### 2.2 副缠卵腺管道的超微结构观察

**2.2.1 小管上皮细胞** 在细胞靠近管腔表面上着生有大量致密排列的微绒毛(microvilli),长度约为 1—2 $\mu$ m,有些区域还着生有纤毛(cilla),具有典型的“9+2”结构(图 2a、b);细胞的基底膜平滑,由细胞外基质(extracellular matrix)与结缔组织相连;上皮细胞细胞核较大,扁长形(图 2a);细胞质密度均一,胞质中有大量的线

粒体,呈圆形或椭圆形,嵴的数量多;高尔基体由 5—7 个膜囊(sacculles)平叠而成(图 2c);在胞质内还存在大量分散的滑面内质网(图 2d)。此外,在胞质中还观察到大量圆形囊泡结构,有的很大,部分已经破裂(图 2a),有的囊泡中有内含物,内含物为球状小泡,电子密度低,囊泡包裹着球状小泡向细胞膜方向移动,与细胞质膜融合并将球状小泡以胞吐的方式释放出去(图 2a、c、d、f)。

**2.2.2 小管管腔** 副缠卵腺的管腔中共生着大量的细菌,几乎占据整个管道内腔,在同一个管道中的细菌有许多形态种类,有的呈棒状,有的呈杆状(图 2e、g),在有些切片中还发现了正在分裂的细菌(图 2h)。在管腔内还观察到上皮细胞的球状小泡状分泌物(图 2g)。

## 3 讨论

### 3.1 副缠卵腺结构

曼氏无针乌贼的副缠卵腺是一种“管道”状腺体,这种腺体比较少见,它与乌贼缠卵腺和蛋白腺的“书页状”腺体(Lum- Kong, 1992)、墨囊的索状腺体(王

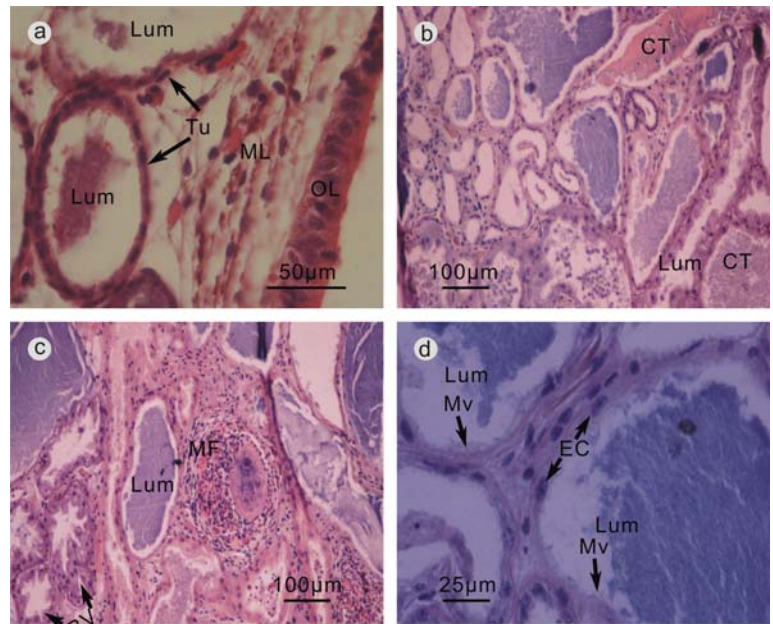


图 1 曼氏无针乌贼副缠卵腺的组织学观察

Fig.1 Histology of accessory nidamental gland of *S. maindroni*  
a. 副缠卵腺横切面, H.E  $\times$  200; b. 副缠卵腺纵切面, H.E  $\times$  100; c. 副缠卵腺切片, 示腺体小管和小管间结缔组织, H.E  $\times$  100; d. 腺体小管横切面, 示管道上皮细胞及微绒毛, H.E  $\times$  400. Tu. 腺体管道; Lum. 管腔; BV. 血管; MF. 肌肉纤维; OL. 副缠卵腺壁; ML. 肌肉层; EC. 上皮细胞; Mv. 微绒毛; CT. 结缔组织



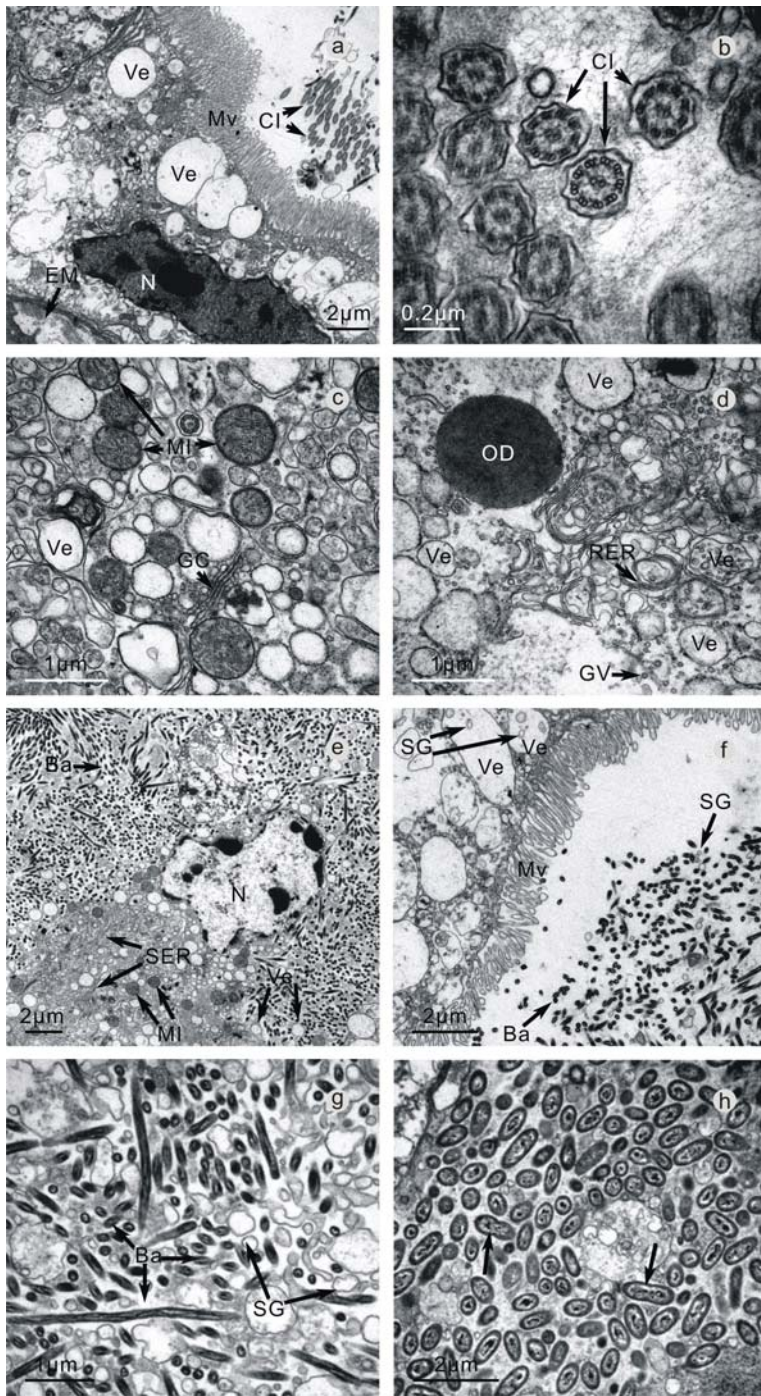


图 2 曼氏无针乌贼副缠卵腺管道的超微结构

Fig.2 Ultrastructure of accessory nidamental gland of *S. maindroni*

a. 小管上皮细胞, b. a 中纤毛横切面放大, c. 上皮细胞细胞质, 示线粒体和  
 高尔基复合体, d. 上皮细胞细胞质, 示滑面内质网和囊泡, e. 小管上皮细胞和  
 管腔, 示管腔内细菌, f. 小管上皮细胞近腔表面, 示细胞分泌物和管腔内细  
 菌, g. 腺体小管管腔, 示共生细菌和球状分泌物, h. 腺体小管管腔内正在分  
 裂的细菌, 箭头所示。N. 细胞核; Cl. 纤毛; EM. 细胞外基质; SER. 滑面内  
 质网; Mv. 微绒毛; OD. 嗜钺性颗粒; MI. 线粒体; GC. 高尔基复合体; Ve. 囊  
 泡; Ba. 细菌; SG. 分泌球状体

春琳等, 2008)不同, Bloodgood(1997)在对皮氏枪乌贼副缠卵腺超微结构观察中发现了这种独特的腺体结构, 它指出副缠卵腺具有许多分泌器官的结构特征, 是一种起分泌作用的腺体, 本实验对乌贼副缠卵腺观察也支持这一观点, 首先, 副缠卵腺中管道的数量众多, 各个管道之间由发达的结缔组织连接, 结缔组织中充满毛细血管, 为腺体上皮细胞提供营养, 结缔组织及毛细血管的发达程度很好地说明了副缠卵腺代谢活动的活跃; 其次, 腺体管道由多个单层上皮细胞围成, 本实验在腺体细胞胞质中和内表面上观察到许多球状小泡, 有的已经分泌到管腔中(图 2f、g), 清楚地说明了球状小泡的形成、迁移、外排过程; 再次, 在上皮细胞的靠近管腔面上, 着生有微绒毛和纤毛, 微绒毛和纤毛通过共同协助运动, 可以使管腔内的分泌物及共生细菌产生流动, 从而运出管道外, 而上皮细胞的细胞胞质中线粒体比较发达, 可以为微绒毛和纤毛的活动提供充分能量。这些都可以说明副缠卵腺是一种分泌型的腺体, 其中具分泌功能的是小管上皮细胞。此外, 本实验还观察到纤毛与微绒毛的着生部位不同, 微绒毛在上皮细胞的表面连续分布, 而纤毛只是在特定的区域着生, Nair 等(2005)在研究虎斑乌贼副缠卵腺的超微结构时发现纤毛的着生部位也是不连续的。但 Bloodgood(1997)在对皮氏枪乌贼研究时发现纤毛的着生位置在细胞表面是连续的, 这和曼氏无针乌贼和虎斑乌贼不同, 推测可能是乌贼科和枪乌贼科种群之间发育上的差别。

3.2 球状小泡的形成和分泌

目前, 国内外还没有对副缠卵腺分泌物分泌过程的相关报道, 本实验在对副缠卵腺超微结构观察中发现在腺体管道上皮细胞中存在大量的滑面内质网, 在滑面内质网周围有球状小泡形成, 其中部分球状小泡包裹在囊泡之中, 随着囊泡逐步向细胞边缘移动, 本实验中并未在细胞外发现大型囊泡, 球状小泡是呈颗粒状在细胞外

散布,因此推断上皮细胞囊泡可能通过胞吐的方式释放分泌物。球状小泡分泌到管腔内后,通过微绒毛和纤毛的摆动产生的动力,运出管道。这与 Kaufman 等(1998)研究枪乌贼副缠卵腺的发生时观察到的类似。关于球状小泡的成分,有的学者推测可能是某些脂类物质(Lum-Kong, 1992),本文作者认为分泌物(球状小泡)是管内共生细菌生存必需的营养物质,其具体成分还有待进一步研究。

### 3.3 管内细菌的来源及作用

在副缠卵腺的管腔中,共生着大量的细菌,这些细菌在管道内密集分布。关于细菌共生体的来源,有两个不同的观点,一个是由 Pierantoni(1918)和 Buchner(1965)等提出的垂直传递(Vertical transmission),即细菌来自上一代亲体的副缠卵腺,在产卵时,亲体通过副缠卵腺将细菌分泌到卵膜上,再通过卵膜到达胚胎,从而进入子代的副缠卵腺。另一个是由 Kaufman 等(1998)提出的水平传递(Horizontal transmission),即细菌并非来自与上一代的亲体,而是在幼体孵化出来后,生活水体中的某些细菌进入到副缠卵腺中。本实验取样时观察到乌贼在发育到一定时期才出现副缠卵腺的分化,此外在对曼氏无针乌贼的其他组织,如墨囊(王春琳等, 2008)和卵巢(蒋霞敏等, 2007)等结构的观察中,并没有发现共生细菌,因此推测共生细菌是在副缠卵腺的管道形成后,在乌贼的吸水的过程中进入副缠卵腺的管道中,即通过水平传递的方式;亲体副缠卵腺中有些产抗生素的细菌或其次生代谢产物在亲体产卵时带到卵的三级卵膜上起抑制外界细菌作用,这些细菌不再进入子代副缠卵腺中。

副缠卵腺在性成熟时由白色变为橙红色,这与某些共生细菌可以生成色素有关,推测细菌的产生色素活动与乌贼的性成熟有密切的相关,可以把它看做乌贼性成熟的“信号灯”。Richard 等(1979)提出某些头足类副缠卵腺随着雌性个体的性成熟颜色由白色变为红色,这个与本实验观察到的副缠卵腺的颜色变化不同,可能是物间差异所致,也可能是共生细菌所产生的色素种类不同;Declair 等(1972)在对欧洲横纹乌贼(*Sepia officinalis*)副缠卵腺研究中指出,其颜色的变化是与一种类胡萝卜素有关,并将其命名为“sepiaxanthin”。关于共生细菌的作用的推测可分为两种:一方面,某些特定菌株通过副缠卵腺的分泌物附着在卵膜上,可以分泌抗生素类物质从而提供保护。有的学者研究发现皮氏枪乌贼副缠卵腺的共

生细菌可以产生抗生素和某种细菌毒素(Barbieri *et al*, 2001)。章鱼类体内没有副缠卵腺,其所产的卵容易迅速的被藻类、真菌、细菌所侵蚀,而乌贼的卵则表现出了较强的抗感染能力(Biggs *et al*, 1991)。另一方面,乌贼的内骨骼中含有气体  $N_2$  (Denton, 1974),是由于乌贼体内氨的低排除率导致副缠卵腺共生细菌驱动氨基态氮转化而来,然后进入乌贼的内骨骼从而产生浮力(Boucher-Rodoni *et al*, 1994)。

### 参 考 文 献

- 王春琳, 樊晓旭, 余红卫等, 2008. 曼氏无针乌贼墨囊组织学及墨汁形成的超微结构. 动物学报, 54(2): 366—372
- 蒋霞敏, 符方尧, 李正等, 2007. 曼氏无针乌贼的卵子发生及卵巢发育. 水产学报, 31(5): 607—617
- 蒋霞敏, 符方尧, 李正等, 2008. 人工养殖曼氏无针乌贼生殖系统的解剖学与组织学研究. 中国水产科学, 15(1): 63—69
- Barbieri E, Barry K, Child A *et al*, 1997. Antimicrobial activity in the microbial community of the accessory nidamental gland and egg cases of *Loligo pealei* (Cephalopoda: Loliginidae). Biol Bull Mar Biol Lab, Woods Hole, 193: 275—276
- Barbieri E, Paster B J, Hughes D *et al*, 2001. Phylogenetic characterization of epibiotic bacteria in the accessory nidamental gland and egg of the squid *Loligo pealei* (Cephalopoda: Loliginidae). Environ Microbiol, 3: 151—167
- Biggs J, Epel D, 1991. Egg capsule sheath of *Loligo opalescens* Berry: structure and association with bacteria. Journal of Experimental zoology, 259: 263—267
- Bloodgood R A, 1977. The squid accessory nidamental gland: ultrastructure and association with bacteria. Tissue Cell, 9(2): 197—208
- Boletzky S V, 1986. Encapsulation of cephalopod embryos: a search for functional correlations. Am Malacol Bull, 4: 217—227
- Boucher-Rodoni R, Mangold K, 1994. Ammonia production in cephalopods, physiological and evolutionary aspects. Mar Freshwat Behav Physiol, 25: 53—60
- Buchner P, 1965. Symbiosis in Luminous Animals. Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms. Interscience Publishers, New York, 543—571
- Declair W, Richard A, 1972. A study of the orange-red pigment from the accessory nidamental glands of the cephalopod *Sepia officinalis* L.. Biologisch Jaarboek, 40: 188—197
- Denton E J, 1974. On buoyancy and the lives of modern and fossil cephalopods. Proc R Soc Lond (Ser B), 185: 273—299
- Grigioni á S, Boucher-Rodoni R, Demarta A *et al*, 2000. Phylogenetic characterisation of bacterial symbionts in the accessory nidamental glands of the sepioid *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Decapoda). Marine Biology, 136: 217—222
- Kaufman M R, Ikeda Y, Patton C *et al*, 1998. Bacterial symbionts colonize the accessory nidamental gland of the squid *Loligo*

- opalescens* via horizontal transmission. Biol Bull, 194: 36—43
- Lum-Kong A, 1992. A histological study of the accessory reproductive organs of female *Loligo forbesi* (Cephalopoda: Loliginidae). Zoology, London Zool, Lond, 226: 469—490
- Nair J R, Devika P, George M C *et al*, 2005. Accessory nidamental gland of *Sepia pharaonis* Ehrenberg (Mollusca: Cephalopoda): ultrastructure and function. Asian Fisheries Science, 18: 255—263
- Pichon D, Gaia V, Norman M D *et al*, 2005. Phylogenetic diversity of epibiotic bacteria in the accessory nidamental glands of squids (Cephalopoda: Loliginidae and Idiosepiidae). Marine Biology, 147: 1323—1332
- Pierantoni U, 1918. Organi luminosi, organi simbiotici e ghiandola nidamentale accessoria nei cephalopodi. Bull Soc Nat Napoli, 30: 30—36
- Richard A, Van den Branden C, Declair W, 1979. The cycle of activity in the nidamental glands from cephalopods. Cyclic Phenomena in Marine Plants and Animals, 173—180
- Vanden Branden C, Gillis M, Richard A, 1980. Carotenoid producing bacteria in the accessory nidamental glands of *Sepia officinalis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 66: 331—334

## HISTOLOGY AND ULTRASTRUCTURE OF THE ACCESSORY NIDAMENTAL GLAND OF *SEPIELLA MAINDRONI*

WANG Chun-Lin<sup>1,2</sup>, WANG Jin-Wei<sup>1,2</sup>, YU Hong-Wei<sup>1,2</sup>, SONG Wei-Wei<sup>1,2</sup>, SONG Chao-Xia<sup>1,2</sup>

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211;

2. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo, 315211)

**Abstract** Histology and ultrastructure of the accessory nidamental gland (ANG) of *Sepiella maindroni* were investigated using light and transmission electron microscopy. The ANG was found to consist of an accessory nidamental wall, connective tissue, and many tubules, manifesting certain structural features of a secretory organ that contain many tubules harboring dense populations of coccoid- and rod-shaped bacteria. The tubule wall was found to be lined by epithelial cells containing many cytoplasmic vesicles. Based on the ultrastructural observation, we postulated that these vesicles might be secreted through exocytosis. We hold the ANG may play a secretory role in the reproductive cycle and coat the ovulated eggs with a layer of symbiotic bacteria that can ward off egg pathogens; and moreover the symbiotic bacteria may come from environmental seawater rather than from the proceeding *S. maindroni* through vertical transmission via the egg case sheath.

**Key words** *Sepiella maindroni*, Accessory nidamental gland, Histology, Ultrastructure, Symbiotic bacteria