

半滑舌鲷卵巢发育的组织学和形态数量特征研究

柳学周¹ 徐永江¹ 刘乃真² 曲建忠³ 倪娜¹ 赵明¹

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²日照市东港区海珍品研究所, 276826)

(³青岛忠海水产有限公司, 266414)

摘要 采用组织学方法系统研究了人工养殖条件下半滑舌鲷亲鱼卵巢的组织发育周年变化特征。结果表明, 卵母细胞发育可分为6个时相, 卵巢发育分为6期。卵巢不同发育时期都由不同类型的卵母细胞组成, 半滑舌鲷为非同步分批多次产卵类型。周年发育过程中, 6月龄前的鱼卵巢发育处于第Ⅰ期; 9~12月龄卵巢可发育至第Ⅱ期; 12月龄半滑舌鲷性腺可发育达到Ⅲ期, 并一直保持至24月龄。3龄雌鱼达到性成熟, 卵巢可发育至第Ⅳ期; 随着水温和光周期的调控, 卵巢发育进入成熟期(Ⅴ期), 发生水合现象是卵母细胞成熟并准备排卵的信号; 产卵结束后卵巢退化至第Ⅵ期, 排出的卵母细胞退化吸收, 以Ⅲ期卵巢越冬后, 卵巢退化至Ⅱ期并持续至下一个繁殖周期。人工养殖条件下, 卵巢内存在卵母细胞闭锁现象。性腺周年发育过程中, 性腺指数(GSI)在性腺达到成熟期时达到峰值, 产卵结束后性腺快速退化, GSI值各月份差异显著($P < 0.05$), 亲鱼性腺重量在卵巢发育成熟过程中一直处于生长状态。亲鱼肝脏指数(HSI)在产卵前7~8月份(性腺达到成熟期前30d左右)达到最大, 表明7~8月份是性腺进行卵子发育、卵黄能量储备的重要时期, 亲鱼在产卵前通过积极摄食储备体内能量, 肝脏在卵母细胞卵黄积累方面具有重要的生理作用。肥满度(CF)值在繁殖盛期10~11月份达到最大, 表现出与GSI类似的变化趋势。

关键词 半滑舌鲷 卵巢发育 组织学

中图分类号 Q959.4; S961.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)06-0025-11

Study on histological and morphometric characters of gonad development of *Cynoglossus semilaevis* Günther

LIU Xue-zhou¹ XU Yong-jiang¹ LIU Nai-zhen²

QU Jian-zhong³ NI Na¹ ZHAO Ming¹

(¹ Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² Rare Marine Species Research Institute of Donggang, 276826)

(³ Qingdao Zhonghai Fishery Co., Ltd., 266414)

ABSTRACT The temporal dynamics of oocyte growth and ovary development were examined during a 12-month ovarian maturation cycle in captive *Cynoglossus semilaevis* Günther using light microscopy method. Results showed that the oocyte growth could be divided into 6 phases

国家 863 计划项目(2006AA10A414、2002AA603011)、农业部公益性行业专项(nyhyzx07-046)、农业科技成果转化资金项目(2008GB23260382)、鲆鲽类现代产业技术体系(nycytx-50)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目共同资助

收稿日期: 2009-01-15; 接受日期: 2009-03-20

作者简介: 柳学周(1959-), 男, 研究员, 主要从事海水鱼类繁殖生物学及增养殖学研究。E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85830506

and ovary development consisted of 6 periods accordingly. Two or three distinct batches of vitellogenic oocytes were found in *Cynoglossus semilaevis* Günther ovaries at one development stage, indicating that this species are a non-synchronized multiple batch spawners. The ovaries are in stage I when the fish are less than 6-month old, which only appears once in their whole life. As fish grew, the ovaries enter into stage II when they are 9 to 12 months old. The stage III which were characterized by cortical alveoli accumulation was attained when the fish were 12-month old and maintained until 24-month old. Deposition of lipids and vitellogenesis began to happen in ovaries of stage IV when the fish were over 3 years old. The ovaries could be matured (stage V) under artificial photothermal control from May to August and fish spawned between September and November. Hydration observed in oocytes indicates that the fish were completely matured for ovulation. After spawning period, the ovaries retrogressed to stage III via stage VI, then continued regressing to stage II and was maintained until the next reproductive season. Gonadosomatic index (GSI), hepatosomatic index (HSI) and condition factor (CF) were all found to increase prior to, or during the peak phase of vitellogenic growth corresponding to the gonad development, which are important indices for evaluating the reproductive condition of the parental fish. *Cynoglossus semilaevis* Günther appear to strategically utilize episodes of high feeding activity to accrue energy reserves early in the reproductive cycle prior to its deployment during periods of rapid ovarian growth. In the developing ovaries (mainly after stage IV), some post-vitellogenic follicles failed to undergo final maturation, resulting in widespread preovulatory atresia, which may depress the fecundity or be an indicator of capacity of multiple spawns.

KEY WORDS *Cynoglossus semilaevis* Günther Gonadal development
Histological observation

半滑舌鳎 *Cynoglossus semilaevis* Günther 属鲽形目 Pleuronectiformes、舌鳎科 Cynoglossidae、舌鳎属 *Cynoglossus*, 为我国近海常见的暖温性底栖大型鱼类, 我国沿海都有分布, 以黄、渤海为多, 是近年新兴的重要海水养殖鱼类。其具有形体大、生长快、适应性广、味道鲜美和经济价值高等优点, 已在全国沿海形成了较大规模的养殖产业。相关学者在半滑舌鳎繁殖生物学和人工繁育技术方面已开展了亲鱼培育采卵(柳学周等 2006)、性腺分化(马学坤等 2006)、精子发生及超微结构(吴莹莹等 2007; Wu *et al.* 2008)、摄食特性和摄食机理(马爱军等 2005)和苗种培育(柳学周等 2006)等系列研究, 半滑舌鳎在人工调控条件下自然产卵技术已获突破, 但成功产卵的亲鱼多来源于野生亲鱼经人工驯化后的群体, F₁ 代人工培育亲鱼产卵效果不太理想(柳学周等 2006), 影响了苗种生产。

关于鲽鱼类性腺发育的组织学特征和规律研究, 国外已对塞内加尔鳎 *Solea senegalensis* (García-López *et al.* 2007)、丹佛鳎 *Solea vulgaris* Quensel (Ramsay *et al.* 1996)、美洲拟庸鲽 *Hippoglossoides platessoides* Fabricius (Maddock *et al.* 1999)、欧洲黄盖鲽 *Pleuronectes limanda* L. (Htun-Han 1978)、欧川鲽 *Pleuronectes flesus* L. (Janssen *et al.* 1995)、褐牙鲆 *Paralichthys olivaceus* (Yamamura 1995)、大西洋牙鲆 *Paralichthys dentatus* (Merson *et al.* 2000)、冬鲽 *Pseudopleuronectes americanus* Walbaum (Harmin *et al.* 1995)、扁海鲽 *Pleuronectes platessa* L. (Scott *et al.* 1998)、菱鲽 *Rhombosolea tapirina* Günther (Sun *et al.* 2004) 和副眉鲽 *Parophrys vetulus* Girard (Sol *et al.* 1998) 等进行了性腺发育规律研究。我国学者仅对牙鲆(宋海霞等 2005)卵巢发育组织学特征进行了初步研究, 温海深等(2007)对石鲽 *Kareius bicoloratus* 卵巢中性类固醇激素及其受体进行了免疫组织化学研究, 相关资料较为匮乏。在半滑舌鳎性腺发育的研究方面, 仅见于柳学周等(2005)的形态观察报道, 但对卵巢发育的生理学研究报道很少, 有关卵巢发育规律, 至今

尚未有精确的组织学及相关数量形态特征划分依据。

本文采用常规组织切片方法、形态测量法详细研究了人工养殖条件下半滑舌鳎卵巢周年发育的组织学和数量形态学规律,以期为半滑舌鳎亲鱼生殖调控和人工繁育提供技术参数。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼

实验于2007~2008年在青岛忠海水产有限公司和日照市东港区海珍品研究所进行。实验鱼来自于野生亲鱼自然产卵后,人工育苗得到的健康苗种,以及经室内人工养成达到性成熟年龄的 F_1 代亲鱼。

亲鱼培育条件:周年开放流水培育,水温 $10\sim 25\text{ }^\circ\text{C}$,盐度 $27\sim 31$,pH $7.8\sim 8.4$,溶解氧 5 mg/L 以上。苗种培育条件:早期培育水温 $21\sim 23\text{ }^\circ\text{C}$,中间培育水温 $17\sim 20\text{ }^\circ\text{C}$ (全长 3 cm 以上),养殖水温 $14\sim 25\text{ }^\circ\text{C}$,盐度 $27\sim 31$,pH $7.8\sim 8.4$,溶解氧 5 mg/L 以上。

1.2 取样方法及样品处理

苗种取样时间分别为3、6、9、12和24月龄,苗种每次取样10尾。达到性成熟(3龄以上)的 F_1 代亲鱼取样为每月1次,每次取样3~4尾。根据人工控制水温和光照周期条件下亲鱼性腺发育成熟过程,在不同发育期分别取样。3月龄苗种取样后,去除头部和尾部,将躯干中部整体固定。其他实验鱼使用致死剂量的MS222(300 mg/L)麻醉后解剖,取出性腺,幼鱼取性腺的整体,亲鱼分别取性腺的前中后部,样品在Davis固定液中固定24h后转入70%酒精保存。

1.3 组织切片和观察

样品自70%酒精取出后,首先经酒精梯度(100%~70%)脱水,石蜡包埋后,切成 $5\sim 7\text{ }\mu\text{m}$ 厚的切片,苏木精伊红染色后,中性树胶封片,在显微镜下观察(NIKON 90i)、拍照。以目微尺测量卵母细胞直径、核直径和核仁直径,统计不同发育时期的核仁数量和核质比。

1.4 性腺分期划分

亲鱼性腺发育的划分按照Мейен的标准(Мейен 1939),根据卵母细胞和细胞核直径大小、卵母细胞内容的沉积变化和形态特征将卵母细胞分为6个时相。卵巢发育分期:依卵巢切面中所占面积超过50%或居最高比例的卵母细胞的时相对应,用平均百分数表示,统计视野为30个。

1.5 测量和数据统计分析

对实验鱼进行生物学特性测量,测量指标包括体重、体长、体高、内脏重、性腺重、肝脏重、性腺表观长度和解剖长度。每尾鱼均做连续切片,随机选取30个视野,测量每个视野中所有包含细胞核的卵母细胞。卵母细胞和细胞核直径的观察与计数:测量卵母细胞的最大直径和胞核直径,将每次取样的所有鱼的数据求平均值作为该时相卵母细胞的数值参数,用 t 检验法检验其差异。

性腺发育的表观计算公式:体表可见性腺隆起长度/全长;

性腺指数 $GSI=(GW/BW-VW)\times 100$;

肝脏指数 $HSI=(LW/BW-VW)\times 100$;

肥满度 $CF=(BW/(BL)^3)\times 100$ 。

(BW :体重, VW :内脏重, GW :性腺重, LW :肝脏重)。

统计分析:利用SPSS统计软件对 GSI 、 HSI 和 CF 进行单因素方差(ANOVA)统计分析,多重比较采用Duncan氏法,取差异显著性指数 P 为0.05, $P\leq 0.05$ 视为差异显著, $P>0.05$ 视为差异不显著。

2 结果

2.1 卵母细胞发育过程的形态学变化和卵巢发育分期

2.1.1 卵母细胞发育时相划分

本研究发现,卵母细胞在各个发育时期的卵径、体积和内含物特征变化较大,根据其形态特征,参照 Meijen (1939)的分类标准将卵母细胞生长发育过程分为6个时相,经方差分析表明,卵母细胞的直径和核径在各时相间的变化差异显著($P < 0.05$)。不同时相卵母细胞的直径、核径、核仁数和核质比见表1。

第I时相卵原细胞 由生殖上皮细胞分生而来。细胞大,形状圆形或者椭圆形,卵原细胞以细胞团或者卵索的结构不断进行有丝分裂,增殖,数量不断增加(图版I-A)。卵原细胞直径 $8.5 \sim 13 \mu\text{m}$,核径 $6.3 \sim 9.5 \mu\text{m}$,切面可见核中央部位大核仁1~2个,核质比 $62\% \sim 75\%$ 。

第II时相卵母细胞 卵母细胞的细胞质(嗜碱性反应)和细胞核的增长期,即小生长期,主要特点是细胞质出现数目不等(1~5个)的卵黄核,细胞膜外包围一层滤泡膜。卵母细胞直径 $43.2 \sim 72 \mu\text{m}$,核径 $28 \sim 34 \mu\text{m}$,核仁数量1~14个,核质比 $45\% \sim 60\%$ 。根据本时相卵母细胞和核的直径以及核仁、卵黄核数量变化特征,将本时相划分为两个时期,(1)早期:核仁1个或多个,体积较大,位于核中央,胞质内可见染色质呈网状结构,细胞外有单层滤泡膜包被(图版I-B)。(2)晚期:核仁多个,体积减小,主要分布在核仁膜周围,也称核仁周期,卵黄核可见1个以上(图版I-C)。

第III时相卵母细胞 双层滤泡膜期。初级卵母细胞进入大生长期,其形态基本呈圆球形,细胞体积明显增大。一个较为明显的特征是皮质液泡的出现、增加和移位。液泡出现在细胞质外缘,逐渐向内缘移位。卵黄颗粒出现并不断增加。本时相卵母细胞依据其大小、液泡分布和数量变化、卵母细胞中卵黄沉积的多少以及放射膜的有无,分为早、中、晚3个时期:

早期 液泡首先在胞质边缘出现,数量较少,形成环形带状(图版I-D)。卵母细胞直径 $105 \sim 204 \mu\text{m}$,核径 $65 \sim 120 \mu\text{m}$,核仁数量4~29个,核质比 $42\% \sim 50\%$ 。

中期 液泡增多,几乎充满整个胞质(图版I-E)。卵母细胞直径 $160 \sim 275 \mu\text{m}$,核径 $68 \sim 117 \mu\text{m}$,核仁数量 $13 \sim 27$ 个,核质比 $43\% \sim 55\%$ 。

晚期 液泡向核膜附近聚集,卵黄颗粒出现在胞质周边(图版I-F)。卵母细胞直径 $280 \sim 360 \mu\text{m}$,核径 $77 \sim 116 \mu\text{m}$,核仁数量 $14 \sim 26$ 个,核质比 $35\% \sim 50\%$ 。

第IV时相卵母细胞 本时相卵母细胞中卵黄颗粒体积不断增大,数量不断增加,由边缘逐渐向内扩展,同时油滴出现,体积不断增大。本时相卵母细胞依据形态学特征划分为早、中、晚期3个时期。

早期 卵黄颗粒逐渐增多,将液泡挤到核膜附近(图版I-G)。放射膜形成增厚,可见受精孔的结构(图版I-J),粒层细胞明显(图版I-K)。卵母细胞直径 $350 \sim 435 \mu\text{m}$,核径 $76 \sim 106 \mu\text{m}$,核仁数量 $19 \sim 41$ 个,核质比 $25\% \sim 37\%$ 。

中期 卵黄颗粒增多,逐渐充满整个细胞。卵黄颗粒体积逐渐增大,核位于卵母细胞中央,核膜开始崩解(图版I-H)。卵母细胞直径 $410 \sim 540 \mu\text{m}$,核径 $77 \sim 116 \mu\text{m}$,核仁数量 $7 \sim 40$ 个,核质比 $15\% \sim 26\%$ 。

晚期 卵母细胞整体被卵黄颗粒填充,其间夹杂着较多的油滴,将来发展为油球。核偏位,移向卵母细胞一端,核膜崩解,偶尔可见切面有核仁,数量不等(图版I-I)。卵母细胞直径 $450 \sim 550 \mu\text{m}$,核径 $96 \sim 125 \mu\text{m}$,核仁数量 $21 \sim 38$ 个,核质比 $5\% \sim 13\%$ 。

第V时相卵母细胞 本时相卵母细胞核膜和核仁逐渐崩解,核仁数量大为减少或者消失,卵黄颗粒直径逐渐增大,发生水合作用,融合为大的卵黄板。本时相卵母细胞依据卵黄颗粒的融合程度以及水化作用的发生特征可划分为早、中、晚3个时期。

早期 卵母细胞直径 $460 \sim 560 \mu\text{m}$,核和核仁大部分消失,部分卵母细胞中仍可见。卵黄颗粒充分发育,油滴夹杂在卵黄颗粒中间(图版I-L)。

中期 卵母细胞直径 $480 \sim 560 \mu\text{m}$,卵黄颗粒开始融合,形成较大的卵黄板块(图版I-M)。

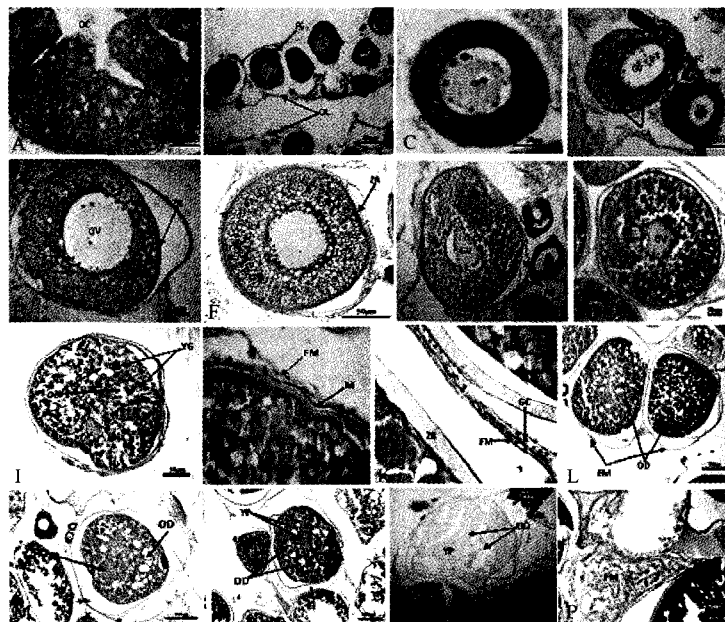
晚期(完全水合期) 卵母细胞直径 540~630 μm ,卵黄颗粒水合作用明显,大多数卵黄颗粒融合成完整的卵黄板。发生完全水合的卵母细胞直径 590~770 μm ,卵黄颗粒完全融合成卵黄板,直径增加显著,成为最后成熟的状态,油滴聚合,清晰(图版 I -N、图版 I -O)。卵母细胞脱离滤泡膜即将排出。

第 VI 时相卵母细胞 卵母细胞排出后残留的滤泡细胞为主要特征(图版 I -P)。

表 1 不同时相的卵母细胞数量特征($n=30\sim50$)

Table 1 The quantitative characters of oocytes at different developmental phases

卵母细胞时相 Development phase of oocyte	卵母细胞直径(μm) Diameter of oocyte	核直径(μm) Nucleus diameter	切面核仁数(个) Number of nucleolus	核质比(%) Ratio of nucleus to plasma
I	8.5~13	6.3~9.5	1~2	62~75
II	43.2~72	28~34	1~14	45~60
III 早期 Early stage	105~240	65~120	4~29	42~50
	中期 Mid stage	160~275	68~117	13~27
	晚期 Late stage	280~360	77~116	14~26
IV 早期 Early stage	350~435	76~106	19~41	25~37
	中期 Mid stage	410~540	77~116	7~40
	晚期 Late stage	450~550	96~125	21~38
V 早期 Early stage	460~560	62~102	8~19	5~13
	中期 Mid stage	480~560	—	—
	晚期 Late stage	540~630	—	—
完全水合期 Hydration stage	590~770	—	—	—



A. 卵原细胞期: 卵巢腔(OC)内卵原细胞,核较大; B. 2 时相早期: 卵母细胞排列在产卵板(OL)内,胞外可见单层滤泡膜(FM),核仁大(n); C. 2 时相晚期(核仁周期): 胞质中卵黄核(YN),示生殖泡(GV); D. 3 时相早期: 皮质液泡(CA)生成,滤泡膜变为双层; E. 3 时相中期: 液泡(CA)增多,放射膜(ZR)形成; F. 3 时相晚期: 皮质液泡间出现卵黄颗粒(YG),放射膜(ZR)增厚; G. 4 时相早期: 卵黄颗粒增多,示生殖泡(GV)、卵黄颗粒(YG)和滤泡膜(FM); H. 4 时相中期: 卵黄颗粒(YG)逐渐充满胞质,油滴(OD)出现; I. 4 时相晚期: 核偏位,移向胞质的边缘,核膜崩解,油滴(OD)数量增加; J. 受精孔: 受精孔(M)形成,示滤泡膜(FM)和卵黄颗粒(YG); K. 放射膜和粒层细胞: 示放射膜(ZR)和滤泡膜(FM)粒层细胞(G); L. 5 时相早期: 核仁崩解,卵黄颗粒(YG)充满胞质,油滴(OD)数量增加; M. 5 时相中期 卵黄颗粒开始融合为卵黄板(YP),油滴(OD)体积变大; N. 5 时相晚期: 卵黄板(YP)体积增大; O. 完全水合期: 卵黄颗粒完全融合为卵黄板(YP),水合作用明显; P. 排空后的滤泡细胞: 卵母细胞排空后的滤泡膜(FM)

图版 I 不同时相卵母细胞发育形态特征

Plate I The morphological characters of oocytes at different developmental phases

2.1.2 卵巢发育分期

根据卵母细胞不同发育时相,以各期切片视野中数量或者面积占优势的卵母细胞类型作为卵巢划分依据,将性腺发育划分为6期:

I期卵巢 卵巢呈细线状,银白色,透明(图版II-A),开始向腹腔壁后体腔两侧延伸,肉眼不能辨别雌、雄。卵巢分化已经完成,卵巢腔形成,卵巢壁主要由结缔组织和生殖上皮构成,产卵板尚未形成。卵巢中主要是由生殖上皮细胞分生而来的第1时相卵原细胞,卵原细胞排列杂乱无章,多为圆形或椭圆形,细胞核较大,位于细胞中央。此期卵巢的性腺成熟系数为0.412,肝脏系数为0.315,肥满度为0.445。

II期卵巢 卵巢长度增加,呈前部钝圆逐渐往后细长延伸的圆锥形,肉红色,表面被覆一层淡红色被膜,表面可见微细的血管(图版II-B),肉眼可初步辨别雌、雄。卵巢中主要是2时相卵母细胞,胞质深染为紫色,细胞核较大,核质中可见灯刷状染色质,核仁较大,染色较深。此期卵巢的GSI为1.15,HSI为0.639,CF为0.54。

III期卵巢 卵巢呈亮乳白色,表面血管丰富。卵巢体积明显增大,总体仍为扁平状,前部膨胀延长,呈三角形(图版II-C、II-D)。卵巢中卵母细胞类型主要包括2时相、3时相和4时相的卵母细胞,其在卵巢中的比例为:2时相:3时相:4时相=35%:52%:13%,3时相卵母细胞占主导地位。此期卵巢的GSI为6.59,HSI为1.14,CF为0.66。

IV期卵巢 卵巢表面血管发达,前部变为丰盈的三角形,在卵巢腔内向后延伸明显,体表可见明显隆起。卵巢内部卵细胞颗粒明显,可见少量透明卵粒(图版II-E),卵巢内部形成明显的通路。卵巢内卵母细胞组成为5时相卵母细胞、4时相卵母细胞、3时相卵母细胞和2时相卵母细胞,比例为2时相:3时相:4时相:5时相=27.9%:15%:43.6%:13.5%,4时相卵母细胞占优势地位。此期卵巢的GSI为13.97,HSI为1.03,CF为0.75。

V期卵巢 卵巢极度发育,体表可见圆柱形隆起。卵巢内部透明卵粒较多(图版II-F),主要集中在卵巢前中部,卵巢端部较少。卵巢内卵粒呈游离状,卵巢的中间部形成一个通道(内腔),成熟(完全水合)的卵母细胞与其他批次的卵母细胞脱离进入卵巢内腔,通过流体力学作用排放到卵巢前部的卵巢腔,轻压雌鱼的腹部有卵流出,遇水后迅速膨胀而呈圆形。卵巢内卵母细胞组成为5时相、4时相、3时相和2时相卵母细胞,比例为2时相:3时相:4时相:5时相=10%:20%:23.4%:46.6%,5时相卵母细胞占优势地位。此期卵巢的GSI为19.78,HSI为1.05,CF为0.799。卵巢的前部透明卵粒较多,约占40%,中部约30%,后部继续减少,至端部几乎不存在,少于2%。

VI期卵巢 卵巢退化,体积和重量大为减小,松软瘪塌,卵巢腔萎缩,卵巢后部空虚,暗红色,卵巢膜松弛变厚(图版II-G),前、中部尚有未成熟卵母细胞和少量未排出的成熟卵母细胞。卵巢中可见卵母细胞排空后的滤泡膜(6时相),另外,5时相、4时相和2时相卵母细胞同时存在卵巢中。卵母细胞组成为2时相:3时相:5时相:6时相=47%:12%:23%:15%。此期卵巢的GSI为4.65,HSI为0.65,CF为0.573。

卵巢中周年卵母细胞组成和不同发育期的卵巢中卵母细胞的类型组成见图1和图2。

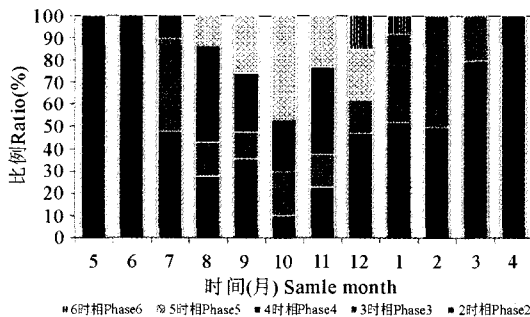


图1 卵巢周年发育过程不同时相卵母细胞组成

Fig. 1 Year round composition of oocyte at different phases

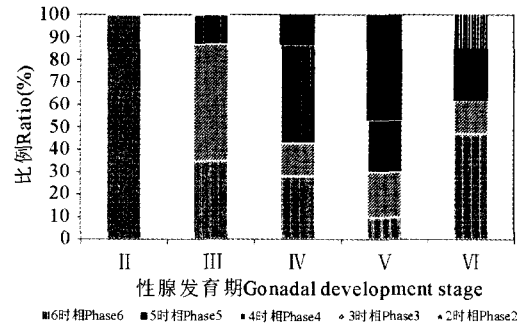


图2 不同发育时期卵巢中卵母细胞类型组成

Fig. 2 Composition of oocytes at different phases in different developmental gonad

2.1.3 卵巢发育的周年变化规律

本研究表明,半滑舌鳎卵巢 200 日龄左右分化完成,达到 I 期卵巢,卵巢内主要由卵原细胞组成。9 月龄时卵巢可达到 II 期。12 月龄半滑舌鳎性腺可发育达到 III 期,并一直保持至 24 月龄。此后,卵巢发育随着温度和光周期的调控进入成熟时期,达到 IV 期、V 期的成熟期。达到性成熟后的亲鱼,6 月份开始,人工进行温光调控亲鱼性腺发育,随着水温的升高和光照时间的增加,亲鱼性腺逐渐发育历经 III 期(图版 III-D)、IV 期,随着积温的增加和光照时间的延长,性腺发育成熟,在 8 月中旬后达到完全成熟的 V 期,9 月份开始进入产卵期,卵巢发育保持在 V 期至 11 月份产卵结束后,12 月份后卵巢进入 VI 期,以 III 期卵巢(图版 III-C)越冬(1~3 月)后逐渐退化为休整期(II 期)。人为调控的性腺发育过程中,可达到 III 期卵巢的亲鱼比例约为 96.2%,能发育至 IV 期卵巢的约 92.5%,能达到最终成熟排卵的大约为 68.5%~87.2%。雌鱼性成熟的最小体长达到 35cm 以上,体重大约 600~700 g。

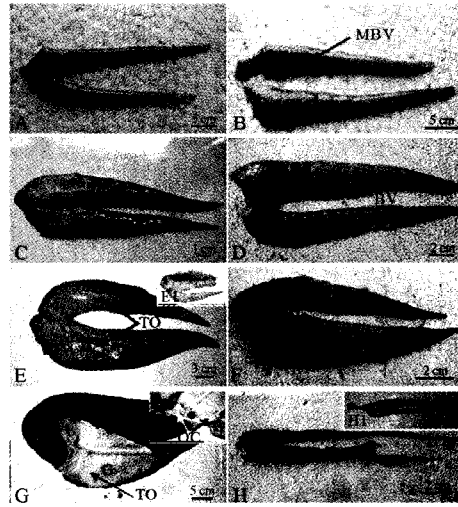
2.1.4 卵巢闭锁现象

卵巢闭锁的显著特征是卵膜的凝结和增生、空泡化,核仁破裂,卵黄颗粒合成减少,卵膜增生变厚,细胞质瓦解和卵黄物质被增生的细胞吸收和吞噬等。本研究发现,人工养殖条件下半滑舌鳎亲鱼性腺发育过程中存在卵巢闭锁的现象,且多发生在成熟的卵母细胞,应与不成熟的卵母细胞区分开。闭锁的一个特征是粒层细胞的增生和肥大,像是含有吞噬物质颗粒。本研究发现,半滑舌鳎卵巢闭锁现象发生比率较低,低于 13.6%,且都发生在成熟的 4 时相以后卵母细胞,闭锁卵母细胞与其他成熟的卵母细胞互相包围、镶嵌。3 时相前的卵母细胞中未见发现。根据其发生的频率和程度,将其分为 3 种类型。

轻度闭锁 放射膜增厚,向胞质内侵蚀(图版 III-A)。

中度闭锁 放射膜增厚较多,部分出现断裂,侵入胞质内较多,胞质内含物萎缩退化(图版 III-B;图版 III-C)。

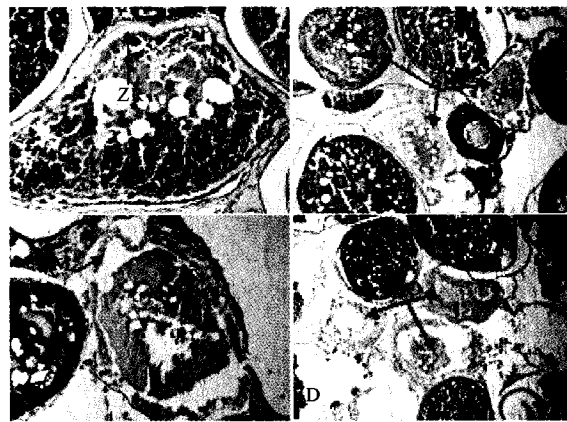
重度闭锁 放射膜消失,滤泡膜增厚,内容物基本吞噬完毕(图版 III-D)。



A. I 期卵巢,颜色透明; B. II 期卵巢,颜色为粉红色,表面可见少许细微血管(BV)分布; C. 产后恢复期的 III 期卵巢,表面颜色较暗,体积小; D. 正在发育的 III 期卵巢,表面血管(BV)充盈粗大,表明卵巢生长活跃; E. IV 期卵巢,卵巢中部可见部分透明卵粒(TO),右上角示性腺内部结构,有充血; F. IV 期末的卵巢,表面血管丰富,性腺内腔有较多的透明卵粒; G. V 期卵巢在体腔内位置,右上角示卵巢的腔(OC); H. 排空后的 VI 期卵巢,黄灰色,松软,极度萎缩,右上角为暗红色的 VI 期卵巢

图版 II 半滑舌鳎性腺发育的解剖学特征

Plate II The anatomical characters of gonadal development in *Cynoglossus semilaevis* Günther



A. 轻度闭锁卵母细胞,卵膜(ZR)增生,向内吞噬卵黄颗粒; B. 中度闭锁卵母细胞,胞质物质(**)吞噬严重; C. 中度闭锁卵母细胞,体积缩小,卵膜解体(PM),胞质出现空隙(**); D. 重度闭锁卵母细胞,滤泡膜严重增生,胞质和卵黄物质仅剩少量残余

图版 III 卵巢闭锁形态特征

Plate III Morphological characters of atresia in gonad

2.2 GSI、HSI 和 CF 的季节变化

研究发现,在不同的季节,半滑舌鲷性腺成熟指数(GSI)各月份差异显著($P < 0.05$),尤其在12月、1月和2月,GSI值与其他月份差异极为显著($P < 0.001$),表明产卵结束后性腺(VI期)处于快速退化期。在繁殖期9~11月GSI值均很高,10~11月(V期卵巢)达到最大19.78和20。产卵结束后12月份,GSI迅速下降到4.65,并保持较低的水平至翌年7月,8月份后,随着人工调控措施的调整,亲鱼性腺不断发育,GSI迅速增加(图3)。

亲鱼肝脏指数(HSI),在产卵前7~8月份(III期卵巢时)达到最大,统计分析表明,7和8月HSI与其11月~翌年6月HSI值差异显著($P < 0.05$),表明7~8月份是性腺进行卵子发育、卵黄能量储备的重要时期(图4),此后在卵巢发育至IV和V期时,HSI值保持较高的水平,产卵结束后(VI期卵巢)HSI值下降。

统计分析表明,肥满度(CF)值在4~6月与其他各月份差异显著($P < 0.05$),表明这段时间可能是亲鱼调整体内能量分配,进行生殖周期开始前相关营养储备的重要时期,CF值在繁殖盛期10~11月份达到最大,其变化呈现与GSI一致的规律。这些研究结果与组织学观察结果相一致(图5)。

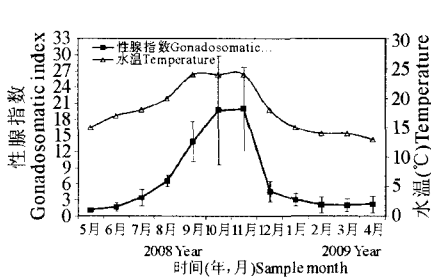


图3 亲鱼性腺指数的周年变化
Fig. 3 Year round gonadosomatic index variation in broodstocks

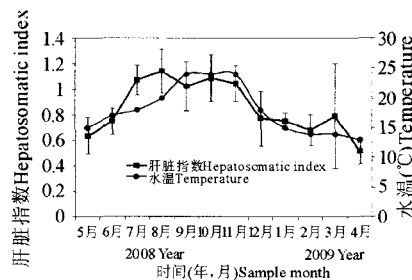


图4 亲鱼肝脏指数的周年变化
Fig. 4 Year round hepatosomatic index variation in broodstocks

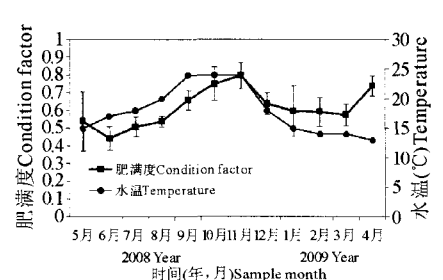


图5 亲鱼肥满度的周年变化
Fig. 5 Year round condition factor variation in broodstocks

3 讨论

3.1 半滑舌鲷卵巢发育模式和产卵类型

鱼类繁殖的周期性活动可分为3种类型:完全同步型、分批同步型和分批非同步型。不同月份和不同发育期半滑舌鲷卵巢内均存在不同时相的卵母细胞,而且同一期卵巢内卵母细胞发育的非同步性很明显,尤其是产卵前后的卵巢(图4和图5)。如IV期卵巢中,除IV时相卵母细胞(43.6%)外,还有大量II时相(27.50%)和III时相(15.0%)以及少量V时相(13.5%)的卵母细胞。在V期卵巢中,除主要细胞群V时相卵母细胞(62.7%)外,还有一定数量的III时相(20.0%)、IV时相(7.3%)和II时相(10.0%)的卵母细胞,据此推断半滑舌鲷卵巢属非同步发育分批产卵类型,与塞内加尔鲷研究结果一致。

在半滑舌鲷所有发育期的卵巢横切面上,都可以发现占有较高比例的II时相卵母细胞,这在其他硬骨鱼类中也有报道(Janssen *et al.* 1995)。这种现象表明,卵巢中卵母细胞发育的可持续性和潜能,对于非同步多次产卵鱼类的分批次发育成熟产卵具有重要意义(Coward *et al.* 1998)。另外,在性腺发育但未产卵的鱼类中也有这种现象。因此,笔者认为这些数量众多的II时相卵母细胞可能会停滞在核仁周期状态至下一个生殖季节重新进入卵子生长阶段而达到成熟排放(Bromage *et al.* 1988)。本研究还发现,在排卵后的VI期卵巢中,除了排卵后残留的空滤泡膜外,还有一定数量的、发育正常的III时相(18.6%)、IV时相(13.6%)卵母细胞,但其在卵巢切面中所占的面积比例较小。卵巢中出现排空后的滤泡细胞是排卵基本结束的信号,同时表明卵巢中正在发育的卵母细胞将会崩解和被吸收(Maddock *et al.* 1999)。

研究发现,在半滑舌鳎V期卵巢中有较多比例(约30%)的水合卵母细胞,即卵母细胞卵黄球的融合水化,此时的卵母细胞透明,直径接近于成熟卵子。卵母细胞水合现象在大西洋牙鲆、沙丁鱼、美洲鳎和塞内加尔鳎等鱼种中均有报道,发生水合作用是成熟卵子即将排出的信号(Witthames *et al.* 1995),至于卵巢内未发生水合的其他时相的卵母细胞,也即将经历水合作用而排出。国内研究中,虽有关于卵母细胞内卵黄融合的报道(董玉兰等 2006),但水合作用的概念未有提及。Kjesbu (1991) 在研究大西洋鳕鱼 *Gadus morhua* 时认为,发生水合作用的卵母细胞排出后,在卵巢腔内还将停留很短的一段时间才产出体外,这可能是吸水膨胀的过程。卵巢内剩余批次的卵母细胞还将经过一段时间才能进入水合作用阶段。因此,发生水合作用是卵母细胞完全成熟即将排出的标志。

卵黄发生期的主要特征是卵母细胞胞质中合成卵黄颗粒,根据卵黄形成前卵母细胞胞质中脂肪泡和卵黄泡(皮质泡)的分布位置和发生顺序,半滑舌鳎卵母细胞的卵黄积累是按照皮质泡(卵黄泡)、卵黄球和油球(脂肪泡)的顺序,这与其他已报道的比目鱼类不同,如欧洲黄盖鳎(Htun-Han 1978),大西洋牙鲆(Merson *et al.* 2000)和副眉鳎(Johnson *et al.* 1991)的卵黄积累方式是液泡和脂滴在卵黄发生期同时出现。半滑舌鳎这种卵黄发生积累方式可能与其种的特异性和多油球的特征有关。半滑舌鳎卵子为多油球类型(柳学周等 2006),因此在4时相卵母细胞卵黄球中间出现数量较多的油滴,可能为油球的前体。随着卵母细胞成熟,视野中可见油滴体积增大而数量减少,可能是油滴重新融合和卵黄颗粒体积增大遮盖的双重作用而导致不可见所致。卵巢切片视野中卵母细胞中可见油滴数量与排出体外的卵子100余个油滴的数量差异的具体原因有待于免疫组织化学和生理学的进一步阐述。

本研究发现,IV时相卵母细胞出现一般硬骨鱼具有的受精孔与精孔细胞。吴莹莹等(2007)报道半滑舌鳎精子为非顶体型,卵母细胞均有受精孔结构,当亲鱼达到生理成熟和排卵时,精孔细胞会自行消失,受精孔敞开,等待精子入卵受精,这与雄性精子有无顶体是相适应的。

3.2 卵巢闭锁现象

鱼类卵巢闭锁现象最早是由Ryan(1981)提出来的,发生闭锁是卵巢生殖力下降,卵母细胞发育异常的表现。这种现象可以在亲鱼性腺发育的任何一个阶段出现,并在鉴定卵母细胞是否可连续发育成熟的过程中起着重要的作用,影响着可达到最终发育成熟细胞的数量,因此可作为计算鱼类繁殖力的一个指标。在虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* 性腺发育过程中,能连续发育成熟的卵母细胞数量不断减少,Bromage(1988)认为这是由于卵巢闭锁造成的。关于卵巢闭锁卵母细胞发生比例与繁殖力的具体数量关系,目前相关研究较少,尚无定论。

卵巢闭锁现象的发生原因多样。很多研究者认为,这是上个产卵季节未能排出也未能吸收的卵母细胞(Wallace *et al.* 1979)。其他学者报道,包括鲑鱼类在内,只要养殖条件合适,卵巢闭锁现象是不会发生的(Tyler *et al.* 1990b)。还有一些研究者认为,操作压力如产卵诱导、挤压采卵等可能会引发闭锁发生(Wallace *et al.* 1993)。Bromage等(1988)报道,在非最佳条件下养殖鲑鱼类,饵料投喂不足可引起亲鱼不能完全吸收,产卵结束后未排出的成熟卵母细胞而出现卵巢闭锁现象,但目前还很难区分一个上个产卵季节达到成熟大小后未排出的滤泡细胞和一个发育中的达到成熟大小的闭锁卵母细胞,因此,这种说法没有得到广泛认可。卵巢闭锁现象在野生鱼类种群中也有发现,如野生大西洋鲭 *Scomber scombrus* 也有类似报道,但发生的机率较低(Hsiao *et al.* 1994),因此,多数研究者认为其发生的主要原因是环境胁迫。另有学者报道,如果繁殖季节血浆睾酮(T)含量低,亲鱼血浆 E_2/T 的比值的升高可能导致高比例卵巢闭锁现象的发生(Webb *et al.* 2001; Clark *et al.* 2005)。本研究使用的亲鱼虽为人工亲鱼,已经历1~2次产卵期,但观察到卵母细胞闭锁现象发生的比率较低,这可能与本实验养殖条件优良,调控产卵措施适宜有关。今后半滑舌鳎亲鱼培育过程中,应该采取适宜的环境因子调控措施培育亲鱼,减少环境胁迫对亲鱼生殖力的影响,提高产卵效率。

3.3 性腺指数、肝脏指数和肥满度的变化与卵巢发育的关系

性腺指数、肝脏指数和肥满度是评价鱼类性腺发育的重要数量指标。GSI值的快速变化可直接反映出在产卵调控过程中亲鱼性腺的快速发育和生长。半滑舌鳎GSI在V期卵巢时达峰值,在产卵结束后的VI期,迅

速下降,这种变化趋势与塞内加尔鳎(García-López *et al.* 2007)相同。另外,在高体鲷 *Seriola dumerili* Risso (Micale *et al.* 1999)和花鲈 *Lateolabrax japonicus* Cuvier(Lee *et al.* 2002)中同样表现出产卵期 GSI 的快速升高,在产卵期间随着卵巢闭锁等现象的发生,GSI 开始降低并在产卵结束后的非生殖期保持较低的水平,表明性腺对人工环境因子调控应答机制较好。

HSI 与卵黄发生关系密切,它的变化可反映出亲鱼的摄食情况和肝脏卵黄蛋白原合成的动态变化(Tyler *et al.* 1976)。本研究发现,半滑舌鳎的 HSI 在卵巢发育至Ⅲ期达到峰值,并在Ⅳ期、Ⅴ期卵巢保持较高水平,产卵结束后下降。亲鱼在产卵期前摄食水平较高而积极能量积累储备,在卵黄发生期,肝脏的卵黄蛋白原合成和分泌旺盛,鱼体储能的一大部分被肝脏用于蛋白质的合成和运输(Johnson *et al.* 1991),因此,HSI 值在卵巢发育成熟期保持较高的水平。产卵结束后,卵母细胞卵黄积累作用停止,肝脏代谢活动降低,HSI 值随之降低。这在其他比目鱼中如副眉鲽、美洲拟庸鲽和大西洋鳕鱼 *Gadus morhua* L. (Dahle *et al.* 2003; Tomkiewicz *et al.* 2003)中有相同的报道。

半滑舌鳎 CF 在Ⅴ期卵巢达到峰值,在产卵结束后的Ⅵ期,CF 降低,这与塞内加尔鳎(García-López *et al.* 2007)和大西洋庸鲽(Zamarro 1992b)在繁殖期的肥满度变化研究结果相同,而在美洲拟庸鲽、欧洲黄盖鲽,繁殖期肥满度最低,同时摄食水平降低,这可能是由于鱼种生殖策略的差异导致生殖耗能的差异所致。

参 考 文 献

- 马学坤,柳学周,温海深,徐永江,张立敬. 2006. 半滑舌鳎性腺分化的组织学观察. 海洋水产研究, 27(2): 55~61
- 马爱军,柳学周,徐永江,梁友,庄志猛,翟介明,李波. 2005. 半滑舌鳎 *Cynoglossus semilaevis* 早期发育阶段的摄食特性及生长研究. 海洋与湖沼, 36(2): 130~138
- 吴莹莹,柳学周,王清印,徐永江,包振民. 2007. 半滑舌鳎精子的超微结构. 海洋学报, 29(6): 167~171
- 宋海霞,温海深. 2005. 养殖牙鲆卵巢发育及其调控的组织学研究. 海洋湖沼通报, 4: 75~81
- 柳学周,孙中之,马爱军,梁友,庄志猛,兰功刚. 2006. 半滑舌鳎亲鱼培育及采卵技术研究. 海洋水产研究, 27(2): 25~32
- 柳学周,庄志猛,马爱军,陈四清,孙中之,梁友,刘寿堂,翟介明,曲建忠. 2006. 半滑舌鳎苗种生产技术的开发研究. 海洋水产研究, 27(2): 17~24
- 柳学周,庄志猛,马爱军,陈四清,孙中之,梁友,徐永江. 2005. 半滑舌鳎繁殖生物学及繁育技术研究. 海洋水产研究, 26(5): 7~14
- 温海深,高玲. 2007. 石鲽卵巢雌二醇及其受体和睾酮受体免疫组织化学研究. 海洋学报, 29(4): 161~164
- 董玉兰,王树迎. 2006. 泰山鳞鱼卵巢年周期中卵母细胞发育及其性腺类固醇激素作用. 中国农业科学, 39(6): 1264~1271
- Bromage, N. R., and Cumaranatunga, R. R. T. 1988. Egg production in rainbow trout. In Muir, J. E and Roberts, R. J., eds. Recent Advances in Aquaculture. London and Sydney: Croom, Helm. 65~138
- Clark, R. W., Henderson-Arzapalo, A., and Sullivan, C. V. 2005. Disparate effects of constant and annually-cycling daylength and water temperature on reproductive maturation of striped bass (*Morone saxatilis*). Aquaculture, 249: 497~513
- Coward, K., and Bromage, N. R. 1998. Histological classification of oocyte growth and the dynamics of ovarian recrudescence in *Tilapia Zillii*. J. Fish Biol. 53: 285~302
- Dahle, R., Taranger, G. L., Karlsen, Ø. *et al.* 2003. Gonadal development and associated changes in liver size and sexual steroids during the reproductive cycle of captive male and female Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Comp. Biochem. Physiol. 136: 641~653
- García-López, A., Couto E., Canario A. V. M. *et al.* 2007. Ovarian development and plasma sex steroid levels in cultured female Senegalese sole *Solea senegalensis*. Comp. Biochem. Physiol. Part A. 146: 342~354
- Harmin, S. A., Crim, L. W., and Wiegand, M. D. 1995. Plasma sex steroid profiles and the seasonal reproductive cycle in male and female winter flounder, *Pleuronectes americanus*. Mar. Biol. 121: 601~610
- Hsiao, H.-M., Greerley, M. S., and Wallace, R. A. 1994. Reproductive cycling in female *Fundulus heteroclitus*. Biol. Bull. 186: 271~284
- Htun-Han, M. 1978. The reproductive biology of the dab *Limanda limanda* (L.) in the North Sea; Seasonal changes in the ovary. J. Fish Biol. 13: 351~359
- Janssen, P. A. H., Lambert, J. G. D., and Goos, H. J. T. 1995. The annual ovarian cycle and the influence of pollution on vitellogenesis in the flounder, *Pleuronectes flesus*. J. Fish Biol. 47: 509~523
- Johnson, L. L., Casillas, E., Myers, M. S. *et al.* 1991. Patterns of oocyte development and related changes in plasma 17- β -estradiol, Vitellogenin, and plasma chemistry in English sole *Parophrys vetulus* Girard. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 152: 161~185
- Kjesbu, O. S., Klungsoyr, J., Kryvi, H. *et al.* 1991. Fecundity, atresia, and egg size of captive Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to prox-

- imate body composition. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 2 333~2 343
- Lee, W. K., and Yang, S. W. 2002. Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones, and induction of oocyte maturation and ovulation in the cultured female Korean spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* (Jeom-nong-eo). *Aquaculture*, 207: 169~183
- Maddock, D. M., and Burton, P. M. 1999. Gross and histological observations of ovarian development and related condition changes in American plaice. *J. Fish Biol.* 53: 928~944
- Merson, R. R., Casey, C. S., Martinez, C. *et al.* 2000. Oocyte development in summer flounder: Seasonal changes and steroid correlates. *J. Fish Biol.* 57: 182~196
- Micale, V., Maricchiolo, G., and Genovese, L. 1999. The reproductive biology of the amberjack, *Seriola dumerilii* (Risso 1810). I. Oocyte development in captivity. *Aquac. Res.* 30: 349~355
- Ramsay, K., and Witthames, P. 1996. Using oocyte size to assess seasonal ovarian development in *Solea solea* (L.). *J. Sea Res.* 36: 275~283
- Ryan, R. J. 1981. Some speculations of biochemical marks and mechanisms. In Schwartz, N. B. and Hunziker-Dunn, M., eds. *Dynamics of Ovarian Function*. New York: Plenum Press:1~12
- Scott, A. P., Witthames, P. R., Turner, R. J. *et al.* 1998. Plasma concentrations of ovarian steroids in relation to oocyte final maturation and ovulation in female plaice sampled at sea. *J. Fish Biol.* 52: 128~145
- Sol, S. Y., Olson, O. P., Lomax, D. P. *et al.* 1998. Gonadal development and associated changes in plasma reproductive steroids in English sole, *Pleuronectes vetulus*, from Puget Sound, Washington. *Fish. Bull.* 96: 859~870
- Sun, B., and Pankhurst, N. W. 2004. Patterns of oocyte growth, vitellogenin and gonadal steroid concentrations in greenback flounder. *J. Fish Biol.* 64: 1 399~1 412
- Tomkiewicz, J., Tybjerg, L., and Jespersen, Å. 2003. Micro- and macroscopic characteristics to stage gonadal maturation of female Baltic cod. *J. Fish Biol.* 62, 253~275
- Tyler, C. R., Sumpter, and J. E., Witthames, P. R. 1990b. The dynamics of oocyte growth during vitellogenesis in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Biol. Rep~vd.* 43: 202~209
- Wallace, R. A., and Selman, K. 1979. Physiological aspects of oogenesis in two species of sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus* (L.) and *Apeltes quadracus* (Mitchill). *J. Fish Biol.* 14: 551~564
- Wallace, R. A., Boyle, S. M., Grier, H. J. *et al.* 1993. Preliminary observations on oocyte maturation and other aspects of reproductive biology in female snook, *Centropomus undecimalis*. *Aquaculture*, 116: 257~273
- Webb, M. A. H., Van Eenennaam, J. P., Feist, G. W. *et al.* 2001. Effects of thermal regime on ovarian maturation and plasma sex steroids in farmed white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture*, 201: 137~151
- Witthames, P. R., and Greer Walker, M. 1995. Determinancy of fecundity and atresia in sole (*Solea solea*) from the Channel, the North Sea and the Irish Sea. *Aquatic Living Resources*, 8: 91~109
- Yamamura, J. I., Adachi, T., Aoki, N. *et al.* 1995. Precursor-product relationship between chicken vitellogenin and the yolk proteins: The 40 kDa yolk plasma glycoprotein is derived from the C-terminal cysteine-rich domain of vitellogenin II. *Biochim. Biophys. Acta.* 1244: 384~394
- Wu, Y. Y., Liu, X. Z., Wang, Q. Y. *et al.* 2008. Ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoon in tongue fish, *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Aquaculture Research*, 39: 1 467~1 474
- Zamarro, J. 1992b. Feeding behavior of the American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) on the southern Grand Banks of Newfoundland. *Netherlands J. Sea Res.* 29: 229~238
- Мейен, В.А.К. 1939. вопросу годовом цикле костистых рыб. цэв. АН СССР. Бюл., 3: 389~420