

刀鲚精巢发育的组织学研究

徐钢春^{1,2} 聂志娟¹ 张呈祥³ 魏广莲² 徐跑^{1,2} 顾若波¹

1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室,无锡 214081;

2. 南京农业大学渔业学院,无锡 214081; 3. 江苏省江阴市水产指导站,江阴 214431

摘要 采用石蜡切片,HE 组织染色方法研究性成熟刀鲚的精巢结构、精巢发育规律和精子形成过程。结果表明:刀鲚的雄性生殖腺由精巢(生精部)、贮精囊和输精管等组成,精巢为典型的小叶型结构,由精小叶、精小囊、小叶间质、小叶腔和输出管构成。精小叶由各期生精细胞和支持细胞构成,各期生精细胞和支持细胞组成了精小囊,成熟的精子从精小囊中释放出来,进入小叶腔中,经由精小叶间形成的临时通道进入输出管,再由输出管送达贮精囊。贮精囊为网状管腔结构,管腔内壁由分泌细胞组成。精子发生经历了精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞及精子细胞和成熟的精子 5 个阶段,根据精巢的外形、色泽、体积、血管分布状况等特征分为 6 个时期。

关键词 刀鲚; 精巢发育; 形态; 组织学

中图分类号 Q 963 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)02-0247-06

刀鲚 (*Coilia nasus*), 隶属鲱形目 (Clupeiformes)、鳀科 (Engraulidae)、鲚属 (*Coilia*), 又名长颌鲚, 俗称刀鱼, 为我国长江中重要的经济洄游性鱼类^[1-2]。其以丰腴肥满、肉质细嫩鲜美而著称, 是享有“长江三鲜”美誉之一的名贵鱼类。近年来刀鲚天然产量急剧下降, 远远不能满足市场的需求, 而随着灌江纳苗养殖、池塘扩繁、人工繁殖及苗种培育技术的突破^[3], 刀鲚正逐渐成为具有较高经济价值的特种养殖对象; 但刀鲚人工繁殖中尚存在的受精率低下、孵化率不高的问题亟待解决。

早在 20 世纪 70 年代, 南京大学生物系、长江水产研究所、江苏省水产科学研究所等对天然条件下刀鲚的精巢发育进行了详尽的阐述^[4-5]; 近几年, 陈文银等、何为等^[6-7]也报道了生殖洄游季节长江刀鲚精巢发育的细胞学及组织学特征, 闻海波等^[8]则论证了池塘养殖刀鲚中精巢成熟的可能性; 王冰等^[9]报道了长江刀鲚精子的超微结构。笔者研究池塘养殖条件下刀鲚精巢发育的形态和组织学规律, 旨在为优良亲本的培育、人工繁殖中受精率的提高提供科学依据, 为刀鲚的大规模人工繁殖奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及来源

供性腺发育观察的刀鲚是 2005 年 5—6 月从长江江阴申港段灌江纳刀鲚苗进行驯化养殖、经池塘养殖性腺成熟后于 2007 年 4 月繁殖的子一代 (F_1)。2009 年 6 月至 2010 年 6 月间(除 7、8、9 月份), 逐月拉网采样, 各月样本量达到 10~15 尾, 体长 22.5~29.4 cm, 体质量 51.3~88.2 g; 1 龄未成熟刀鲚取自 2009 年 5 月人工繁殖培育所获幼鱼。

1.2 取样及试验方法

样品在新鲜状态下进行体长、体质量等常规生物学数据测量, 解剖并分离出性腺用 Canon IX-US80IS 相机拍照。性腺样品称质量后用 Bouin 氏液固定 24 h 以上, 经正丁醇梯度脱水, 石蜡包埋, 连续组织切片(切片厚度 6 μm), H. E. 染色, 中性树胶封片, 显微镜镜检, 并对精巢的组织切片的典型结构用 Olympus BH-2 连接 Microscope Digital Camera 560 成像系统拍照、测量。

精细胞的发育分析参考楼允东^[10]所述 5 期标准; 精巢分期按刘筠^[11]和王吉桥等^[12]提出的分期

收稿日期: 2011-03-23

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD26B00)、公益性行业(农业)科研专项(201203065)、江苏省科技支撑计划(农业)项目(BE2011411)和中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室开放课题(2010FEA03008)

徐钢春, 助理研究员, 研究方向: 鱼类繁殖生理学及养殖技术. E-mail: xuge@ffrc.cn

通讯作者: 顾若波, 研究员, 研究方向: 水生生物繁育及养殖技术. E-mail: gurb@ffrc.cn

标准,把精巢发育分为Ⅰ~Ⅵ期。性腺成熟系数(GSI)计算公式为: $I_{GS} = m_G/m_B \times 100$,其中, m_G 和 m_B 分别为性腺质量和鱼体纯质量。

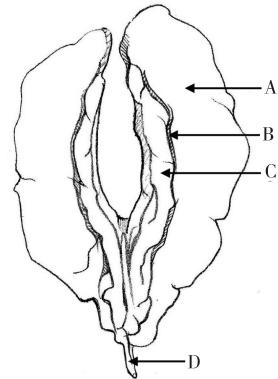
1.3 数据及图像处理

所得数据运用SPSS11.5和Excel 2003软件分析,图片用Photoshop 7.0编辑处理。

2 结果与分析

2.1 刀鲚雄性生殖腺的形态结构

刀鲚的雄性生殖腺由精巢、贮精囊和输精管等组成(图1)。精巢和贮精囊各1对,左右对称,位于鳔侧下方、消化道的两侧,依精巢系膜与体腔背壁相连。前端连于肾脏的外侧缘,后端连于体腔背中线上,止于肠的约2/3处。每侧精巢呈长带状,早期较平整,后期较多大皱褶,外侧边缘有缺刻,贮精囊横切面呈囊状,内有盘曲的输精小管,末端接输精管。左右两侧的输精管至末端合并为一后通于泄殖孔,泄殖孔开口于泄殖乳突基部。



A. 精巢 Testis; B. 输出管 Vas efferens; C. 贮精囊 Seminal vesicle; D. 输精管 Vas deferens.

图1 雄性刀鲚精巢形态结构示意图

Fig. 1 A diagram of the morphology of testis in *Coilia nasus*

2.2 刀鲚精巢发育的组织学分期

刀鲚的精巢属于小叶型,外膜由间皮和疏松结缔组织构成,外膜向精巢实质内伸入而把精巢分隔为许多小叶,小叶呈壶腹状,小叶以含间质细胞、成纤维细胞、微血管组成的小叶间质紧密排列。贮精囊为网状管腔结构,管腔内壁由分泌细胞组成。成熟精子经由精小叶间形成的临时通道进入输出管,再由输出管送达贮精囊。

刀鲚精子的发生与其他鱼类相似,也经历精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞及精子细胞和成熟的精子5个阶段^[10],根据精巢的外形、色泽、体

积、血管分布状况等特征分为6个时期^[11-12]。

Ⅰ期性腺紧贴在鳔的两侧,为1对透明的带状细丝,长约20 mm,被脂肪块包裹,肉眼无法辨别雌雄,约出现在3月龄的刀鲚幼鱼中,且终生只出现1次(图版Ⅰ-1)。切片显示,精原细胞不定向地分散于间质细胞之间。精原细胞是精小叶中个体最大的细胞,呈圆形或卵圆形,核位于中央,胞径5.5~9.0 μm,核径3.5~4.0 μm。贮精囊的小管壁分布着大量的成纤细胞,小管内充满间质细胞(图版Ⅱ-1)。

Ⅱ期精巢有所长粗,呈狭带状,乳白沾黄,血管不清晰,此时精巢宽稍有增加,贮精囊极小,附有少量脂肪(图版Ⅰ-2)。切片显示,精原细胞数目显著增多,5~10个细胞成束排列,细胞仍然为圆形或椭圆形,体积较Ⅰ期精原细胞小,胞径为4.2~7.5 μm,核径1.5~3.0 μm,核膜仍清晰,核质嗜碱性。贮精囊由许多管状囊腔构成,输精小管外存在结缔组织、微血管、成纤细胞及间质细胞,最外层由一层结缔组织基质及其下方的基膜组成,小管的分泌细胞附着在基膜上,中空,无精原细胞(图版Ⅱ-2、3)。

Ⅲ期精巢外观呈乳白沾粉红,呈带状,有皱褶,血管清晰,贮精囊略有增大,但仍为脂肪包裹(图版Ⅰ-3)。切片显示,精细小管已出现管腔,精细小管中除少量精原细胞外,可见初级精母细胞和成熟分裂后形成的次级精母细胞,并向腹壶腔推移,形成多层细胞,细胞体积更小,胞径为2.0~4.0 μm,核径为1.5~2.5 μm,核膜不明显,贮精囊内输精小管仍无精原细胞、精母细胞(图版Ⅱ-4、5)。

Ⅳ期精巢带状,饱满,皱褶增加,呈肉色;贮精囊略呈囊状,脂肪较前期为少,乳白色。涂片观察有精子游动,但活力较弱(图版Ⅰ-4)。切片观察显示,主要由次级精母细胞构成,还有部分初级精母细胞和极个别的精原细胞分布在精小囊壁侧附近。次级精母细胞体积缩小,已完全看不清细胞之间的界限,核膜消失,细胞核嗜碱性增强,染成深蓝色,圆形或椭圆形,直径1.5~3.5 μm。贮精囊内输精小管中充满成熟精子细胞(图版Ⅱ-6、7)。

Ⅴ期精巢继续加宽,皱褶部分重叠,外观肥厚,乳白色;贮精囊极度膨胀,饱满呈囊状,为乳黄色(图版Ⅰ-5)。成熟的精子通过输出管流向贮精囊,贮精囊内输精小管由于精子逐渐增多,管壁变薄;最后,贮精囊内输精小管极度饱满,彼此紧紧相靠,管内全为精子,用力挤压腹部,精液即流出。切片显示,精小囊腔全部为成熟精子,圆形,头部直径约1.5 μm,

染成深蓝色(图版Ⅱ-8~10)。

Ⅵ期精巢逐渐萎缩,充血明显,呈肉红色;贮精囊瘪陷,内有部分未排出的精子,呈乳白色(图版Ⅰ-6)。切片显示,精小囊腔中具有各种时期的精细胞,其中精母细胞、精子细胞位于囊壁附近,少数未排完的精子位于囊腔中间。精子排出后,贮精囊内囊腔空隙明显存在(图版Ⅱ-11、12)。

2.3 刀鲚精巢发育的周年变化

在整个生殖周期内,雄性刀鲚全年的成熟系数一般波动在0.31%~3.82%(图2)。在池塘养殖条件下,从3月下旬开始,部分鱼体精巢发育逐渐成熟,月平均成熟系数1.21%,4月份达2.03%,5月份到最高峰,约为2.82%,排精量最旺盛。7月份有所下降,8月份下降至1.26%,少数雄性刀鲚仍有排精现象,镜检显示精子仍有活力,7月、9月份取样量少,未达到统计条件(属高温期,拉网对亲鱼损伤太大),9月底10月初精巢仍处于产后休整期,其成熟系数下降到0.59%,至11月又开始恢复为Ⅱ期,并以Ⅱ期越冬至翌年2月份,成熟系数变化不大。3月开始,随着水温的上升,精巢开始重新发育,成熟系数也逐渐上升,进行着新一轮的发育。

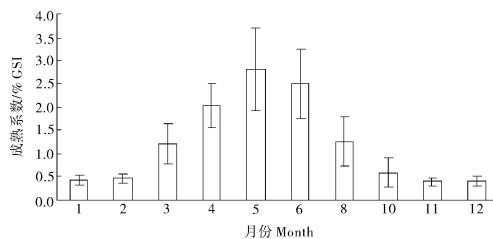


图2 雄性刀鲚成熟系数的周年变化规律

Fig. 2 The annual variation of the mature male *Coilia nasus* GSI

3 讨论

3.1 刀鲚精巢结构的特点

根据Nagahama^[13]和Billard^[14]对硬骨鱼类精巢类型的划分方法,刀鲚精巢为小叶型(lobular type),在生殖季节,充满精子的精小叶相邻的壁也破裂,许多小叶腔相互连通成精子通道,最靠近输出管的小叶腔开口于输出管,成熟精子由此进入输出管。刀鲚精巢的这一精子通道只在生殖季节出现,排精后,破损的精小叶壁得到修复,通道将消失。精子临时通道的形成是与精巢的结构相适应的,因为刀鲚精巢精小叶的排列没有一定的规律性,不像金鱼^[15]的精巢呈辐射状排列,每个精小叶都直接与输

出管相通,与闻海波等^[8]的刀鲚精巢属于壶腹型的说法不一致,与陈文银等^[6]描述的刀鲚V期精巢精小囊外薄层结缔组织破裂形成大的精小叶的结果类似,而与中华乌塘鳢的精巢结构、特征一致^[16]。

硬骨鱼类的精巢形态大多呈长囊状、形成“Y”型,但在形态上不同物种之间存在着差异,如兴国红鲤和黑脊倒刺鲃等的精巢成“Y”型、单侧呈长囊状^[17-18],黄颡鱼的精巢则高度分支^[19],南方鲇^[20]和革胡子鲇^[21]的精巢有少量较短的齿状突起,半滑舌鳎^[22]和中华乌塘鳢^[16]的精巢呈双“T”字形,前端生精部、后端贮精囊结构,海鳗精巢由许多精巢叶片构成,叶片间完全不相连而靠叶片下方的输精导管似串连^[23];而刀鲚精巢为扁带状,靠鳔外侧为带状生精部,连着带状的内缘(即靠鳔内侧)为扁囊状的贮精囊,与上述鱼类精巢结构均不同。文献[4-5]记载中,刀鲚的贮精囊被称为“副睾”,而本试验的组织切片结果显示,刀鲚精子并不在贮精囊中发育成熟,只是在生殖高峰期时精子成熟后排入,不具备附睾的功能,为名符其实的“贮精囊(seminal vesicle)”;张永其等^[24]、Hurk等^[25]认为中华乌塘鳢、非洲鲇贮精囊为精巢的附属腺体,分泌的贮精囊液为粘糖蛋白,具有性外激素的重要作用,体外诱发雌亲鱼产卵。而刀鲚精巢贮精囊中的输精小管中是否能分泌此类细胞及是否具备上述功能有待于进一步研究。

3.2 刀鲚精巢周期发育的特点

在生殖周期中,刀鲚精巢发育的阶段性是很明显的,性成熟刀鲚精巢发育呈周期性变化,但不再遵循第一次性周期内的变化规律。

刀鲚各期生精细胞的特点虽与其他硬骨鱼类类似^[23,26-27],但也有其不同之处,如在精巢发育Ⅱ期的精小叶中出现小叶腔,其他各期小叶腔则不明显。观察不同发育时期刀鲚的精巢组织切片,在Ⅲ期和Ⅳ期中,精原细胞、初级和次级精母细胞、精子细胞和精子交替出现,且不存在精巢(生精部)前后部发育不一致现象,只是在数量比例上有所差异,精小叶内的生精细胞发育趋于同步;在排精后的精小叶中,小叶腔内仍可见少量的精子细胞和精子存在,可见刀鲚属多次排精类型。

刀鲚精小叶中充满精子的时间可长达6个月,只是数量和活力上存在差异,这为刀鲚的人工授精提供了有利时机;同时,群体间个体精巢发育差异显著,这又给刀鲚产业化育苗造成了一定的难度。

参 考 文 献

- [1] WHITEHEAD P J P. FAO species catalogue[M]. Rome: United Nations Development Programme, 1985;470-471.
- [2] 张敏莹,徐东坡,刘凯,等.长江下游刀鲚生物学及最大持续产量研究[J].长江流域资源与环境,2005,14(6):694-698.
- [3] 王威克.长江刀鲚人工繁殖技术获阶段性突破[N].中国渔业报,2009-6-8(4).
- [4] 长江流域刀鲚资源协作组.长江流域刀鲚资源调查报告[R].武汉:出版者不详,1977;1-12.
- [5] 南京大学生物系鱼类科研组,湖北省长江水产研究所,江苏省水产科学研究所.刀鲚性腺解剖和分期的初步研究[R].武汉:长江流域刀鲚资源协作组,1977;165-179.
- [6] 陈文银,李家乐,练青平.长江刀鲚性腺发育的组织学研究[J].水产学报,2006,30(6):773-777.
- [7] 何为,李家乐,江芝娟.长江刀鲚性腺的细胞学观察[J].上海水产大学学报,2006,15(3):292-296.
- [8] 闻海波,张呈祥,徐钢春,等.长江刀鲚与池塘人工养殖刀鲚性腺发育的初步观察[J].动物学杂志,2009,44(4):111-117.
- [9] 王冰,万全,李飞,等.刀鲚精子超微结构研究[J].水生态学杂志,2010,3(3):57-62.
- [10] 楼允东.组织胚胎学[M].2版.北京:中国农业出版社,1996:152-157.
- [11] 刘筠.中国养殖鱼类繁殖生理学[M].北京:农业出版社,1993:29-41.
- [12] 王吉桥,赵兴文.鱼类增养殖学[M].大连:大连理工大学出版社,2000:96-100.
- [13] NAGAHAMA Y. The functional morphology of teleost gonads [M]// HOAR W S, RANDALL D J, DONALDSON E M. Fish physiology. New York: Academic Press, 1983:223-250.
- [14] BILLARD R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species[J]. Reprod Nutr Develop, 1986, 26(4):877-920.
- [15] 管汀鹭,黄丹青,黄国屏.金鱼精巢的细胞构造与精子的发生和形成[J].水生生物学报,1990,14(3):233-237.
- [16] 江襄新,尤永隆,林丹军,等.中华乌塘鳢鱼精巢的形态结构观察[J].福建农林大学学报:自然科学版,2004,33(1):89-93.
- [17] 林光华,张丰旺.兴国红鲤精巢发育的研究[J].江西大学学报:自然科学版,1989,13(8):1-9.
- [18] 林丹军,尤永隆,苏敏.黑脊倒刺鲃精巢结构和精子发生的研究[J].水生生物学报,2003,27(6):563-571.
- [19] 郑小真,林丹军,尤永隆.性成熟黄颡鱼 *Pseudobugrus fulvidraco* (Richardson)精巢的年周期变化 I:生精部的周年变化[J].福建师范大学学报:自然科学版,2000,16(2):97-101.
- [20] 张耀光,谢小军.南方鲇的繁殖生物学研究:性腺发育及周年变化[J].水生生物学报,1996,20(1):8-16.
- [21] 刘少军,姚占州.革胡子鲇成熟精巢超微结构的研究[J].湖南师范大学自然科学学报,1992,15(3):252-256.
- [22] 宋海霞,翁幼竹,刘志刚,等.半滑舌鳎精子发生的组织学研究[J].台湾海峡,2009,28(1):19-24.
- [23] 张克俭,张饮江,郑东勇.海鳗性腺形态和发育的研究[J].水产学报,1999,23(1):13-20.
- [24] 张永其,洪万树,陈仕玺,等.雄性中华乌塘鳢贮精囊的结构与功能[J].动物学报,2004,50(2):269-276.
- [25] HURK R V D, RESINK J W. Male reproductive system as sex pheromone producer in teleost fish[J]. Journal of Experimental Zoology, 1992, 261:204-213.
- [26] 杨家云.瓦氏黄颡鱼精巢发育及精子生物学研究[J].西南师范大学学报:自然科学版,2005,30(4):719-724.
- [27] 张耀光,罗泉笙,钟明超.长吻鮠精巢发育的分期及精子的发生和形成[J].动物学研究,1992,13(3):281-287.

Histological studies on testis development of *Coilia nasus* under artificial farming conditions

XU Gang-chun^{1,2} NIE Zhi-juan¹ ZHANG Cheng-xiang³
WEI Guang-lian² XU Pao^{1,2} GU Ruobbo¹

1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germ plasm
Resources Utilization/Ministry of Agriculture,
Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy
of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. College of Fisheries, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China;

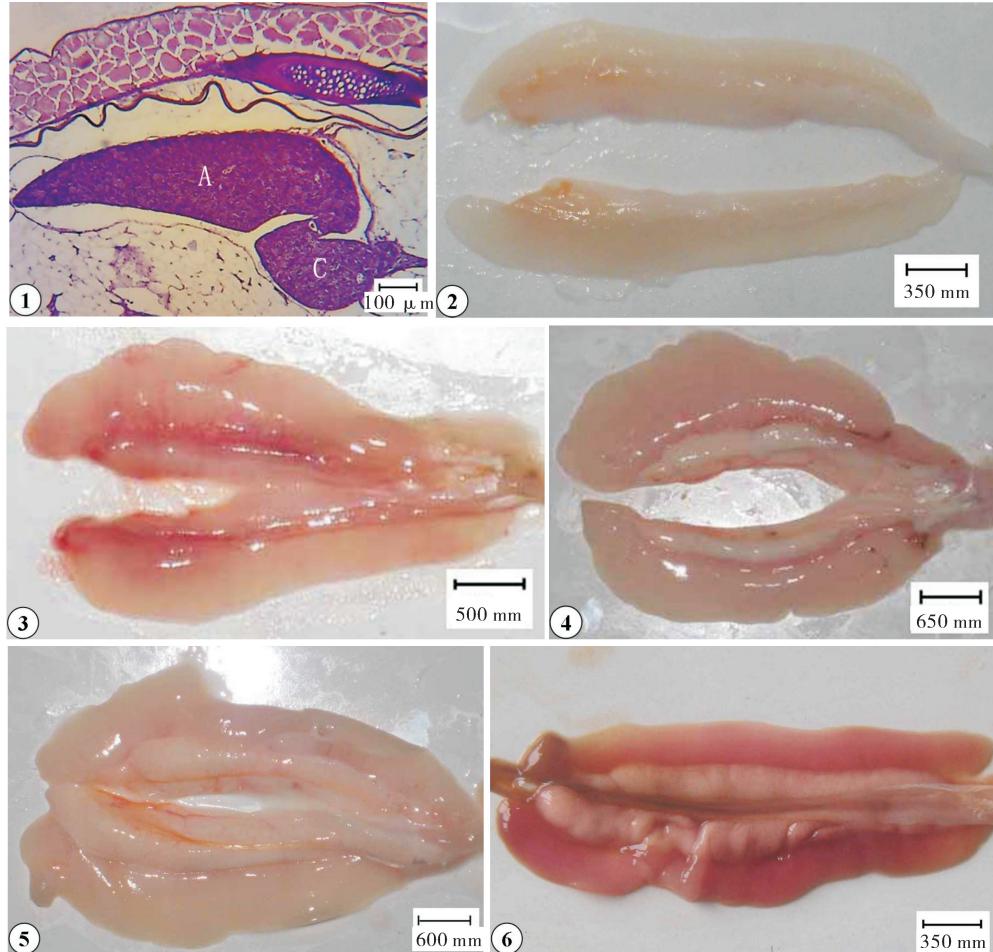
3. Spread Station of Aquiculture Technology of Jiangyin City
of Jiangsu Province, Jiangyin 214431, China

Abstract The testis structure, development regularity and spermiogenesis of sexually mature *Coilia nasus* were studied by using paraffin sections and H. E. staining method. The results indicated that, the

male gonad of *Coilia nasus* was composed of testis (sperm production), seminal vesicle and spermatic duct. The spermary had typical lobular structures, which is composed of seminiferous lobula, follicle, interstitial substance, lobular cavity and efferent duct. The seminiferous lobula was composed of spermatogenic cells of varied stages and supporting cells, and spermatogenic cells of varied stages and supporting cells formed the follicle. The mature sperm was released from the follicle into the lobular cavity, then entered into efferent duct via transient pathway formed between lobes, and then was sent into the seminal receptacle. The seminal receptacle was in reticulated structure, and the inner wall was composed of excreting cells. The sperms develop through 5 stages, including androgone, first spermatocyte, secondary spermatocyte, spermatoblast and mature sperms. Six stages were classified according to the appearance, color, volume and vascular distribution of the spermary.

Key words *Coilia nasus*; development of testis; morphology; histology

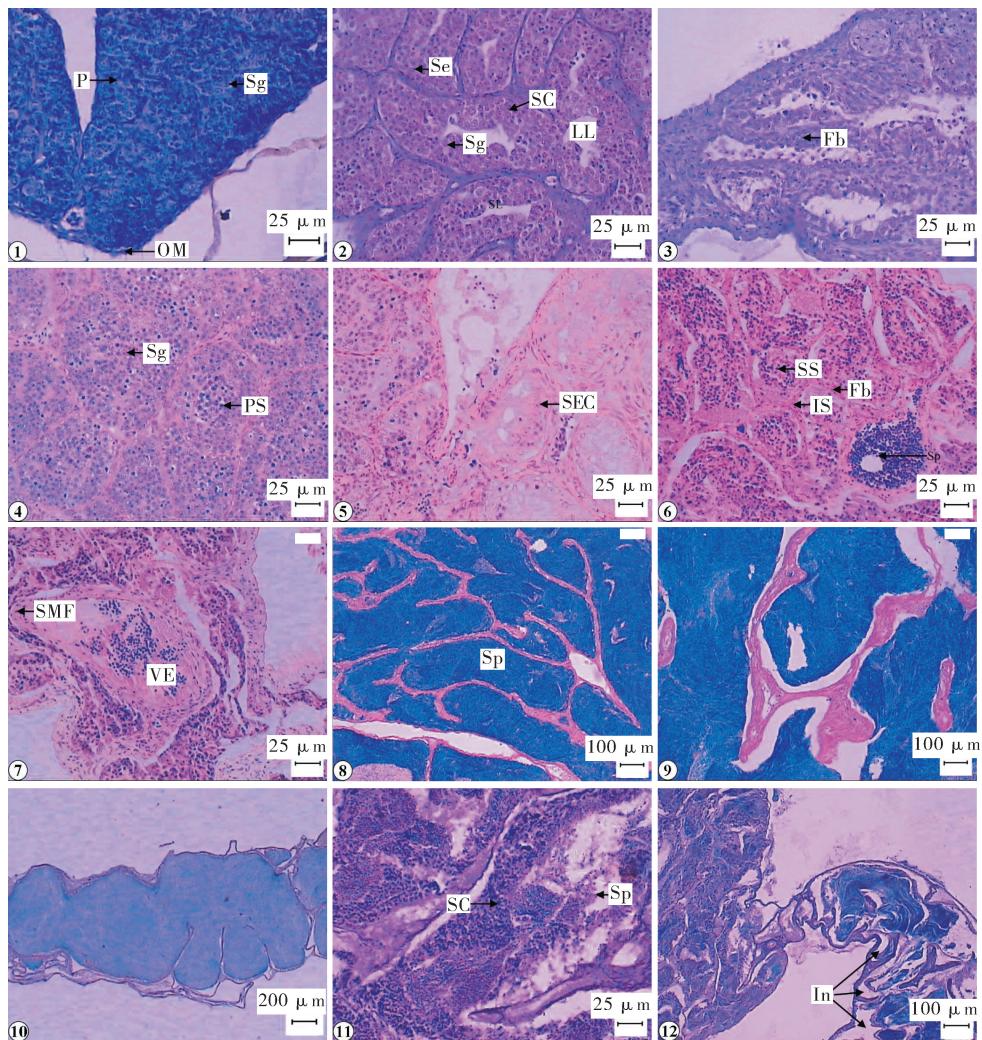
(责任编辑:边书京)



1. I 期精巢横切面整体(A-精巢、C-贮精囊); 2. II 期精巢形态及颜色; 3. III 期精巢形态及颜色; 4. IV 期精巢形态及颜色; 5. V 期精巢形态及颜色; 6. VI 期精巢形态及颜色。1. The testis in the phase I (A-testis, C-seminal vesicle); 2. The testis in the phase II; 3. The testis in the phase III; 4. The testis in the phase IV; 5. The testis in the phase V; 6. The testis in the phase VI.

图版 I 刀鲚性腺发育的解剖学形态特征

Plate I The anatomical characters of gonadal development in *Coilia nasus*



1. I 期精巢, 示外膜、实质和精原细胞; 2. II 期精巢生精部, 示成束排列的精原细胞、支持细胞、精小叶、精小囊和小叶腔; 3. II 期精巢贮精囊, 示输精小管及成纤维细胞; 4. III 期精巢生精部, 示初级精母细胞; 5. III 期精巢贮精囊, 示输精小管及分泌细胞; 6. IV 期精巢生精部, 示小叶间质、次级精母细胞和精子; 7. IV 期精巢贮精囊, 示精子输出管和平滑肌纤维; 8. V 期精巢生精部, 示充满的精子; 9. V 期精巢贮精囊, 示输精小管和饱满的精子; 10. V 期精巢贮精囊的纵切面, 示输精小管; 11. VI 期精巢生精部, 示小叶腔内残存的精子和初级精母细胞; 12. VI 期精巢贮精囊, 示排精后输精小管中的空隙。OM: 外膜, P: 实质, Se: 支持细胞, Sg: 精原细胞, SL: 精小叶, SC: 精小囊, LL: 小叶腔, Fb: 成纤维细胞, PS: 初级精母细胞, SEC: 分泌细胞, SS: 次级精母细胞, IS: 小叶间质, Sp: 精子, SMF: 平滑肌纤维, VE: 输出管, In: 空隙。

1. Section of stage I testis, showing outer membrane, parenchyma and spermatogonium; 2. The spermatogenic part of stage II testis, showing spermatogonium, sertoli, seminiferous lobuli, spermatogenic cyst and lobule lumen; 3. The seminal vesicles of stage II testis, showing vas efferens and fibroblast; 4. The spermatogenic part of stage III testis, showing primary spermatocyte; 5. The seminal vesicles of stage III testis, showing vas efferens and secretion cell; 6. The spermatogenic part of stage IV testis, showing interlobular septum, secondary spermatocyte and spermatozoon; 7. The seminal vesicles of stage IV testis, showing vas efferens and smooth muscle fibers in the connective tissue capsula; 8. The spermatogenic part of stage V testis, showing the lobular lumen is full of spermatozoon; 9. The seminal vesicles of stage V testis, showing vas efferens and spermatozoon; 10. A Cross Section of seminal vesicles in stage V testis, showing vas efferens; 11. The spermatogenic part of stage VI testis, showing lobular lumen with residual spermatozoa after eduction of spermatozoa and a few primary spermatocytes; 12. The seminal vesicles of stage VI testis, showing the interspace in vas efferens after ejaculation. OM: Outer membrane, P: Parenchyma, Se: Sertoli, Sg: Spermatogonium, SL: Seminiferous lobuli, SC: Spermatogenic cyst, LL: Lobule lumen, Fb: Fibroblast, PS: Primary spermatocyte, SEC: Secretion cell, SS: Secondary spermatocyte, IS: Interlobular septum, Sp: Spermatozoon, SMF: Smooth muscle fibers, VE: Vas efferens, In: Interspace.

图版II 刀鲚性腺发育的组织学切片

Plate II The anatomical characters of gonadal development in *Coilia nasus*