

文章编号:1000-0615(2007)05-0607-11

曼氏无针乌贼的卵子发生及卵巢发育

蒋霞敏, 符方尧, 李 正, 冯宪栋

(宁波大学生命学院, 浙江 宁波 315211)

摘要:采用组织学方法对人工养殖曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)卵子发生、卵巢发育周期进行组织学、细胞学观察。根据细胞大小、胞核形态及卵母细胞与滤泡细胞的关系,将曼氏无针乌贼卵子发生划分为卵原细胞期、卵母细胞期、成熟期和退化吸收期 4 个阶段,并阐述了各期卵母细胞的组织学特征。曼氏无针乌贼卵子发生过程具有种的特异性,大约孵化出膜 12 d 的乌贼可见有卵原细胞,此后进入增殖期。卵母细胞属于典型的滤泡型,发育过程中同时存在同步性与异步性;卵母细胞无初级卵膜,只有次级卵膜和三级卵膜,次级卵膜由滤泡细胞分泌,三级卵膜由输卵管腺、缠卵腺以及墨囊分泌物共同构成。通过对卵巢的外观形态和组织学观察,将曼氏无针乌贼卵巢发育划分为 6 个时期。

关键词:曼氏无针乌贼;卵子发生;卵巢发育

中图分类号:S 917.4

文献标识码:A

Study on the oogenesis and ovarian development of *Sepiella maindroni*

JIANG Xia-min, FU Fang-yao, LI Zheng, FENG Xian-dong

(Life Sciences Institute, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The oogenesis and ovarian development cycle of *Sepiella maindroni*, artificial breeding, were observed on histological and cytological characteristics by using routine histological techniques. According to the size of oocytes, the morphology of nucleus and the relationship between oocytes and follicle cells, the oogenesis can be divided into four stages as follows: oogonium stage, oocytes stage, maturation stage and resorbing oocytes stage. Moreover, the histological characteristics and variational disciplinarian of oocytes at each stage is described in detail. On the basis of the observation of oogenesis, the results illuminate that this cuttlefish's oogenesis is provided with particularity. About twelve days after hatching, there is oogonium in the ovary, and then the oogonium proliferate quickly. Examined with a light microscope, the oocytes are of follicular type, and their development is not at the same developmental stage in the ovary. According to the oogenesis, the eggs have no primary membrane, there are only secondary membrane and tertiary membrane. The secondary membrane is excreted by follicle cells; and the tertiary membrane is made by the secretion of albumen gland, nidamental gland and ink sac. On the basis of the morphological characteristics and variational disciplinarian through histological observation, the process of ovarian development of breeding *Sepiella maindroni* can be divided into 6 stages.

Key words: *Sepiella maindroni*; oogenesis; ovarian development

收稿日期:2006-12-19

资助项目:国家自然科学基金(40646030);浙江省重大项目(2006 C13404);宁波市重点攻关项目(2005C100021)

作者简介:蒋霞敏(1957-),女,浙江舟山人,教授,主要从事水产动物种苗繁育的研究。Tel:0574-87600171, E-mail:jiangxiamin@sina.com

曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)俗称墨鱼,是我国重要的海洋头足类经济动物,隶属软体动物门、头足纲、二鳃亚纲、十腕目、乌贼科、无针乌贼属,为沿海广温广布种。由于过度捕捞,产量下降,资源衰竭,对其资源的保护已迫在眉睫^[1]。所以,开展对曼氏无针乌贼卵子发生、卵巢发育的组织学研究,其结果不仅可直接指导人工育苗生产,其理论知识也能够充实我国乌贼类的生殖生理学内容。对该乌贼的研究工作,主要集中于形态描述^[2]、洄游分布^[3]、生态生理^[4]以及遗传多样性^[5-6]等方面,而关于该种乌贼的性腺发育资料,仅见浙江东海自然群体卵巢周年变化^[7],而尚未见关于池塘人工养殖条件下曼氏无针乌贼的卵子发生过程以及卵巢的周期发育的研究报道。本文利用常规的石蜡切片技术,详细描述了曼氏无针乌贼的卵子发生、卵巢发育的动态过程,旨在深入了解该乌贼的生殖特性,为其人工繁育、资源增殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料于2004年9月至2005年12月采自浙江省宁波市奉化臭皮匠水产养殖场,从刚孵化出膜的小乌贼开始,1 d取材一次,孵化20 d后每隔3 d取材一次,30 d后,每隔15 d取材一次。

1.2 方法

解剖学方法参考文献[8]、组织学方法参考文献[9]。

取材 对同一批次卵所孵化的曼氏无针乌贼小苗随机取样30尾,记录日龄,测量全长、胴长、体重等,波恩氏液固定10~24 h后更换新鲜波恩氏液于4℃保存。

根据不同发育阶段采取不同的取材方法:①对于肉眼分辨不出性腺的个体,采取整尾固定、切取胴部内脏团及稍后一段组织一起固定;②对能够分辨得出性腺的个体直接取其性腺固定。

目测等级法 根据卵子大小、卵巢的体积、色泽等外部特征,目测并记录卵子及卵巢发育。

组织学观察 对固定好的材料进行系列梯度酒精脱水,二甲苯或松油醇透明,石蜡包埋,切片厚度5~8 μm, H. E染色。用Olympus BX-60荧光显微镜观察,显微拍照,并在显微镜下用目微米尺测量性腺以及不同时相生殖细胞的大小。

曼氏无针乌贼卵母细胞时相划分,以龚启祥等^[7]分期标准为基础,结合作者的观察结果进行描述;卵巢发育分期,则是根据卵巢切面上所占面积超过50%的生殖细胞时相为划分标准;生殖细胞的形态学特征及规律是通过胞径、核径、核仁数目、核质比等形态参数来进行描述,其中,核质比参考倪海儿等^[10]提出的计算公式。

2 结果与分析

2.1 卵子发生的分期

根据细胞的大小、胞核的形态及卵母细胞与滤泡细胞的关系,曼氏无针乌贼卵子发生可划分为卵原细胞期、卵母细胞期、成熟期和退化吸收期4个阶段。其中,卵母细胞期根据生殖细胞大小、核仁数目、核膜变化、H. E染色情况、卵黄物质积累以及其与滤泡细胞层关系可进一步划分为5个时相:第1时相(无滤泡期)、第2时相(单层滤泡期)、第3时相(两层滤泡期)、第4时相(滤泡增厚期)、第5时相(滤泡内折期)。

卵原细胞期 曼氏无针乌贼卵巢由原始生殖细胞(PGCs)迁移入生殖嵴并一起发育而来,卵巢基质上含有两种形态、大小各不相同的细胞,其中形态较规则的一种为卵原细胞,由原始生殖细胞发育而来(图版 I -1);而形态不规则的一种为滤泡细胞,由卵巢基质上的生殖上皮细胞分化而来(图版 II -1)。

卵原细胞直径为8.5~12.8 μm,圆形或近椭圆形,几乎看不见细胞质,核大而明显,核膜清晰,光滑平整,核内有1~4个较为疏松的核仁,位于胞核的中央位置, H. E染色核嗜酸性,核仁染色深于核本身(图版 I -2)。

卵母细胞期 随着细胞增殖,卵原细胞发育为卵母细胞,特点是胞核增长、胞质积累,细胞体积大幅度增大。在此过程中,核仁、核膜等发生了一系列剧烈的变化,滤泡细胞不断增殖、包裹、内折入卵母细胞,同时卵黄逐渐积累。根据卵细胞大小、核仁数目、核膜变化、卵黄物质积累以及其与滤泡细胞层之间的相互关系,将其划分为5个时期。

①第1时相(无滤泡期) 即卵原细胞经有丝分裂增殖转化为初级卵母阶段。此时相卵母细胞大幅度增殖,胞质增多,质膜逐渐明显。胞体圆形或椭圆形,极少数由于排列紧密而挤压变形。

胞体大,22.3~31.9 μm ;核大而明显,平均直径17.5~20.4 μm ,核膜明显而光滑规则,核质染色浅,嗜酸性,核内散布1~8个着色较深的椭圆形核仁,被染成深、浅两部分,即双质核仁(amphinucleous),染色深的部分处在核仁的周边,中央部分染色相对较浅,且较为明亮,占核仁面积的90%以上(图版I-3)。双质核仁大小不一,平均直径0.4~1.9 μm ,沿核膜内侧呈环行分布,即外周核仁。此时,胞质积累、增殖,平均厚2.6~4.3 μm ,H.E染色呈粉红色嗜酸性,在胞体外包有“双轨道”形卵膜双层结构,胞膜上未出现滤泡细胞(图版I-4、5)。滤泡细胞呈单个游离状态,形态规则,扁平、长梭形或长椭圆形,长径为6.57~9.03 μm ,短径为1.37~1.69 μm (图版II-2)。由于胞质增长,此时卵母细胞核质比为2.1~3.6。

②第2时相(单层滤泡期) 早期有个别滤泡细胞靠拢、附着卵母细胞(图版I-6),中期有零散的滤泡细胞纳入卵母细胞的“双轨道”膜内(图版I-7),晚期单层滤泡细胞将卵母细胞包裹成一层(图版I-8)。滤泡细胞扁平状、长梭形(长径为6.07~8.18 μm ,短径为1.19~1.61 μm),滤泡细胞膜明显,核不明显,H.E染色嗜酸性(图版II-3)。

早期卵母细胞排列紧密,紧贴产卵基的卵原细胞,形态单一,椭圆形,卵径39.6~45.2 μm 。胞核透亮,直径22.3~28.5 μm ,核膜波浪状,界限清晰,具3~6个外周核仁,不甚明显。胞质均匀,呈嗜酸性,核质比1.8~2.7。中期开始,卵母细胞排列较前面有所松弛,随着滤泡细胞的包围,胞质积累,卵径56.3~65.8 μm 。核大,圆球形,中位,直径29.3~32.6 μm ,核仁2~5个,已不明显,切片正中,核仁比较集中地向核膜内侧的一个方向移动,核膜内侧则表现出丝状。胞质进一步增多,嗜酸性。晚期卵母细胞的形态特征是,细胞椭圆或近球形,胞径69.9~82.3 μm ,核径32.7~35.8 μm ,正中切面上,胞核椭圆,H.E染色呈弱嗜碱性,核仁消失,解体成许多丝块状或絮状的小颗粒到核间,染色质不均匀,靠中间的絮状,染色质不均匀,此时期的核膜界限不明显。胞质增长,分布不均匀,呈现不同的2个区域,靠近核膜的细胞质区域胞质致密,出现浅蓝紫色细颗粒为弱嗜碱性物质,而靠近外层的胞质则比较疏松,染成浅

紫色,嗜碱性偏弱(图版I-8)。这些迹象表明,核仁正在溶解并外溢到胞质中。

③第3时相(两层滤泡期) 卵母细胞排列于产卵基靠外侧,由于胞质积累而迅速增大,形态不一,以椭圆形为主,卵径87.5~99.4 μm ,核质比0.72~0.81。核椭圆,稍微偏向胞体一边,直径33.9~46.4 μm ,无核仁,核膜清晰,不平整,呈波浪状,此核质被膜染色与胞质染色相一致且比较均一。而“核质被膜”内侧的染色质却不均匀,出现2种状态,靠中间的絮状,染色较其它的为深;另外一种核质浅,丝网状(图版I-9)。此时相卵母细胞包裹有两层的滤泡细胞,滤泡细胞外膜清晰:滤泡细胞层厚1.2~1.4 μm ,外层为平整的单层的扁平滤泡细胞,长梭形;内层为稀疏的滤泡细胞层,圆球形(图版II-4)。

④第4时相(滤泡增厚期) 随着卵母细胞的发育,包裹在卵细胞外围的2层的滤泡细胞迅速增殖、增厚,增厚的滤泡层6.3~8.5 μm ,外层仍然为扁平滤泡细胞,长梭形(长径为7.07~10.58 μm ,短径为2.11~3.04 μm);最内层滤泡细胞排列整齐,椭圆形或球形,长3.45~4.02 μm ,宽2.03~2.74 μm ;细胞核均隐约可见,染色深,嗜碱性(图版II-5)。

此时相卵母细胞最大的特点是增厚的滤泡细胞层与细胞质某些部位之间逐渐出现了明显的空隙,即卵周隙,这是增厚的滤泡细胞向卵母细胞内折的前驱(图版I-10)。形态椭圆形,卵径106.8~119.4 μm ,核质比0.55~0.67,核质接近平衡。核椭圆,偏位明显,核径34.6~45.4 μm ,核膜清晰,核膜内侧波浪状被膜,核内侧的染色质却不均匀,靠中间的絮状,比较集中,染色较其它的为深;核边沿核质浅,丝网状,较分散。胞质致密均匀,弱嗜碱性。

⑤第5时相(滤泡内折期) 卵母细胞迅速增长,体积增大,核质比进一步缩小。“双轨道”内膜破裂、溶解,只剩下外膜,滤泡细胞外层仍然为单层扁平状,内层则内折入卵母细胞,增殖形成球形的颗粒分泌细胞,胞体透亮,核明显,染色深(图版II-6~8)。根据滤泡细胞内折突起的形态结构变化、卵核以及卵黄物质积累情况,将此时相卵母细胞分为早、中、晚3期。

早期 卵母细胞体积增大,近椭圆形,平均卵径132.5~274.8 μm ,核质比0.36~0.44。核

椭圆,偏位明显,核径 $58.2 \sim 85.3 \mu\text{m}$,核膜清晰,核膜内侧波浪状,染色质浓缩明显,不均匀,中间密集,周边疏松丝网状。胞质致密均匀,嗜碱性进一步增强。随着卵母细胞发育,滤泡细胞继续增殖,在其与细胞质存在明显空隙的部位,滤泡细胞向细胞质方向增长、内折,首先伸出指状突起,形成早期内折滤泡细胞的雏形,形状如“八”(图版 I-11),紧跟着滤泡细胞内折进入旺盛期,向细胞质不断伸出指状突起,1~8个指状突起,而且这些“指状突起”的发育处于非同步状态,从雏形到延长,长度 $15.1 \sim 97.2 \mu\text{m}$ 不等(图版 I-16)。位于卵母细胞内部滤泡细胞折褶上的滤泡细胞之间,H. E 染色有被染成桔黄色的卵黄物质存在(图版 I-11~16)。

中期 卵母细胞内部滤泡细胞折褶明显增多,发育更为明显,12个指状突起直至环生于整个卵母细胞,且折褶出现分叉,不同的折褶之间开始连接成网状构造。卵母细胞体积增大特别明显,椭圆形,平均卵径 $469.3 \sim 2584.7 \mu\text{m}$,核更加偏位,扁椭圆形或近球形,并开始有所缩小,核径 $41.3 \sim 157.6 \mu\text{m}$,核膜清晰,核膜内侧波浪状逐渐转变成比较平滑,染色质浓缩明显,较均匀,核质比降低 $0.12 \sim 0.18$ 。卵母细胞内部滤泡细胞折褶发育旺盛,细胞质被这些滤泡细胞瓜分为不同的区域,滤泡细胞之间的卵黄物质增多,整个卵母细胞呈嗜碱性,而卵黄物质则染成桔黄色偏淡(图版 I-17~25)。

晚期 卵母细胞呈椭圆形,平均卵径 $2912.7 \sim 3986.5 \mu\text{m}$,细胞核消失,细胞嗜碱性。卵母细胞内部滤泡细胞折褶已经发育成为相互连接成网状,滤泡细胞间的卵黄物质积累增多(图版 I-26)。随着卵母细胞继续增长,滤泡细胞折褶解体,之前的滤泡细胞界限消失,滤泡细胞群逐渐发育成为亚心形或马蹄形独立构造,长 $145.4 \sim 196.3 \mu\text{m}$,宽 $78.6 \sim 92.5 \mu\text{m}$ 。四周环绕着生有滤泡细胞,滤泡层厚约 $22.8 \mu\text{m}$,中间为染成紫红色的卵黄物质(图版 I-27)。接着,卵母细胞继续发育,这些亚心形或马蹄形滤泡细胞组成单位重新连结成为网状,卵黄物质也随之重新分配其中(图版 I-28)。

成熟期 此期卵母细胞发育成熟,体积达到最大,平均卵径 $4028.7 \sim 4359.0 \mu\text{m}$ 。肉眼观察,卵细胞晶莹透亮,椭圆型,浅草绿色,卵黄物质

丰富,卵膜清晰明显。组织切面中,卵细胞嗜碱性,卵细胞中充满了粗大的卵黄颗粒,并在成熟过程中逐渐相互融合成块状,染色成淡紫色(图版 I-29)。在卵母细胞发生过程中没有观察到初级卵膜结构,而在这一时相卵母细胞中观察到一层条纹状、H. E 染色呈粉紫色的膜状构造(图版 II-10)。

最后,成熟卵逐渐脱离卵巢而跌入到生殖腔中,经过输卵管排出体外,外被一层黑色的卵膜,切片中,这层黑色的卵膜为50~60层的独立膜层构造(图版 II-11)。

退化吸收期 在卵子发生过程中,由于营养不良或者相互挤压等原因,一些正在发育或者是成熟后无法及时排出的卵母细胞都有可能退化而被吸收。与正常发育的卵母细胞相比,退化卵母细胞的特点是:①肉眼观察:整个卵母细胞暗无光泽,凹凸不平;②切片观察:卵母细胞结构溃变,胞质空泡化,卵黄物质液化;③滤泡细胞急剧膨胀,体积增大明显,呈球形,约 $22.85 \mu\text{m} \times 27.34 \mu\text{m}$,核消失,胞膜模糊,滤泡细胞群排列不规则,常聚集成群,染色深而明显(图版 II-9)。

在曼氏无针乌贼卵巢切面上,观察到了3种不同时期的退化吸收期的卵母细胞:①两层滤泡或者是滤泡增厚期的退化卵母细胞(图版 I-30);②第5时相(滤泡内折期)中期的退化卵母细胞(图版 I-31);③成熟期的退化卵母细胞(图版 I-32)。

2.2 卵巢发育的分期

通过对卵巢的目测和组织学观察,根据卵巢的外形和内部卵母细胞的组成异同,将曼氏无针乌贼卵巢发育划分为6个时期。

第 I 期卵巢 性腺分化早期,12日龄乌贼幼体,性腺极小, $108.4 \mu\text{m} \times 89.1 \mu\text{m}$,肉眼不易区别,组织切面上,最早观察到零星散布的少许卵原细胞,此性腺就是卵巢原基,即第 I 期卵巢的早期(图版 III-1)。20日龄的乌贼幼体,外观无法辨别性腺,切面正中,卵巢大小为 $10.5 \mu\text{m} \times 91.7 \mu\text{m}$,卵巢内部初始产卵基正在增殖形成,结缔组织丰富,不同时相的卵原细胞清晰可见,分列于产卵基两侧,分裂旺盛,没有观察到卵母细胞期的卵细胞,此为第 I 期卵巢(图版 III-2)。这个时期的卵巢终生只出现一次,即只有出膜孵化20日龄左右的乌贼幼体的卵巢才属于这一时期,以后绝不

会再出现。

第Ⅱ期卵巢 肉眼还不能辨别出性腺,组织切片显示,卵巢大小为 $135.1 \mu\text{m} \times 146.2 \mu\text{m}$ (31 日龄)至 $161.8 \mu\text{m} \times 186.3 \mu\text{m}$ (42 日龄),处于此时期的卵巢为第Ⅱ期卵巢。光学显微镜下观察,卵巢中的生殖细胞以卵母细胞期的第 1 时相(无滤泡期)和第 2 时相(单层滤泡期)为主,少量卵原细胞(图版Ⅲ-3,4),其中,第 1 时相和第 2 时相卵母细胞占卵巢切面上卵数的 13.5% (31 日龄)至 23.4% (42 日龄),占切片面积的 57.6% (31 日龄)至 88.7% (42 日龄);卵原细胞占总数量的 86.5% (31 日龄)至 76.6% (42 日龄),占总面积的 42.4% (31 日龄)至 11.3% (42 日龄)。同样,这个时期的卵巢终生只出现一次,即只有出膜孵化 30~45 日龄左右的乌贼幼体的卵巢才属于这一时期,以后绝不会再出现。

第Ⅲ期卵巢 进入 50 日龄的曼氏无针乌贼,卵巢快速增长,卵粒隐约突现凹凸不平,肉眼能辨。整个卵巢呈米粒状,乳白色半透明,外被一层薄膜,血管可见。切片观察,卵巢组织结缔组织丰富,卵巢中的生殖细胞以卵母细胞期的第 3 时相(两层滤泡期)和第 4 时相(滤泡增厚期)卵母细胞为主,还伴有少数的卵原细胞、第 1 时相和第 2 时相卵母细胞。其中,第 3 时相和第 4 时相卵母细胞占有绝对优势,分别达到 71.9% 和 90.4% (图版Ⅲ-5)。

第Ⅳ期卵巢 卵巢较第Ⅲ期明显增大,充实,整个卵巢乳白色、囊状、凹凸不平、外被卵巢被膜,肉眼可见逐渐增大的卵粒,乳白略现黄色,卵粒间相互粘连于卵巢上,未见有成熟卵游离于卵巢腔中。切片显示,卵巢中除了第 5 时相(滤泡内折期)的卵母细胞外,还有相当数量的第 1~4 时相卵母细胞。第 5 时相卵母细胞着列于卵巢外侧,其余时相卵母细胞依次着生于内侧。经统计,此期卵巢第 5 时相卵母细胞占卵子数量的 68.7%,占总面积的 85.2% (图版Ⅲ-6)。

第Ⅴ期卵巢 卵巢迅速膨胀,充满整个胴部后端,卵巢被膜由于挤压而拉伸变薄,微血管丰富。卵巢黄色,半透明,卵巢腔中游离卵子显黄色,不透明,遇水即膨胀,次级卵膜迅速突起。卵巢腔和输卵管均中充满成熟期的卵母细胞,轻压卵巢,卵巢被膜破裂;轻挤输卵管,卵子会自流,流出的卵子不具有粘性。此期卵巢从早期卵粒的刚

开始游离直至晚期的受精排卵,历时长。切片中,游离卵为成熟期相卵母细胞,卵巢上卵母细胞以第 5 时相为主,还伴有少许的第 3、4 时相卵母细胞(图版Ⅲ-7)。

第Ⅵ期卵巢 即产后卵巢,成熟游离卵刚排完的卵巢就处于此时期。卵巢浑白,卵巢被膜呈空囊状,缺乏弹性,柔软,粘性强。肉眼可见卵粒细小,量也少。组织学观察,此期卵巢主要为排空后的卵巢基质,结缔组织丰富,卵巢上主要存在退化期的卵母细胞、第 2、3、4 时相的卵母细胞,主要以第 2、3 时相的卵母细胞为主,占卵母细胞面积的 80.8% (图版Ⅲ-8)。

3 讨论

3.1 关于卵子发生的特点

根据曼氏无针乌贼卵细胞生长、发育的形态学特征及规律,将其卵子发生划分为卵原细胞期、卵母细胞期、成熟期和退化吸收期四个阶段。这种划分方法与硬骨鱼类卵子发生的划分相类似^[11]。又根据细胞核、核仁形态和数目、核膜形态、H. E 染色情况、滤泡细胞层包裹以及内折的相互关系,把卵母细胞期划分为 5 个时相。这种划分方法和依据与龚启祥等^[7]、Laptikhovsky^[12]一致。

关于卵核 伴随着卵子的发生,细胞核经历了显著变化:①体积:由小变大,而后逐渐减小并消失;②形态:圆形→椭圆形;③分布:中位→偏位;④核膜:平滑→波浪状→不明显→波浪状→平滑。如上所述,曼氏无针乌贼卵核的趋向变化说明卵子也逐渐发育成熟。这与 Wourms^[13]以核大小、核膜形态等特征作为卵子成熟度判断标准的组织学特征相类似。

双核仁与双质核仁现象 曼氏无针乌贼卵核具有双核仁,一大一小(图版 I-4)。目前,关于卵母细胞发生的双核仁现象,在多种贝类均有报道,主要为软体动物的瓣鳃纲^[14]、腹足纲^[15]种类,还未有关于头足类的报道。此次曼氏无针乌贼卵核双核仁的发现,可以认为贝类双核仁普遍性存在。关于双质核仁现象,杨耀聪等^[16]把双质核仁分为三种情况(端牙型、偏位型和中央型)。切片中观察到的双质核仁(图版 I-3)属于中央型。双质核仁的出现是由于核仁两部分蛋白质组含量不同,反映了在卵母细胞不同发育时期核

仁功能活动状况以及卵母细胞代谢强度。本实验中观察到的双质核仁出现于卵原细胞期的第3时相,而杨耀聪等^[16]认为,双质核仁一般出现于较晚期的卵母细胞期,关于这一点,有待进一步研究。

卵母细胞发育的同步与异步性 卵巢内部各卵母细胞发育程度不均,同时存在同步性与异步性,同步性是指一部分卵母细胞发育程序相同,发育步骤一致;异步性是指一部分卵母细胞先发育,另一部分细胞后发育。这样的卵巢发育的结果是卵巢排卵进卵巢腔是连续不断,产卵是分批进行的,这与张炯^[17]、龚启祥等^[7]观察到曼氏无针乌贼产卵习性是一致的。作者认为曼氏无针乌贼卵母细胞发育的同步与异步性是与其独特的生殖系统结构、生活习性密切相关的。①卵巢:卵巢中间具产卵基,外被卵巢被膜,卵子发生不同时期的卵母细胞依次环布于产卵基周围,越靠近卵巢中心,卵母细胞发育程度越低;②输卵管:游离于卵巢腔的卵母细胞,只有通过输卵管才能够排出体外,而且输卵管宽度为3.4~3.8 mm只相当于一个游离卵母细胞的直径,这就决定了排卵的顺序性;③挤压:曼氏无针乌贼是快速游泳动物,繁殖期间,胴部膨胀,受到内外压力的挤压,导致受力的不均。

退化吸收 卵母细胞的退化属于常见现象,但退化的卵母细胞都是些发育接近成熟的第4、5时相卵母细胞^[18]。本实验中,也有发现退化卵母细胞现象,除了第5时相卵母细胞外还存在早期第2、3时相卵母细胞的退化(图版I-30~32)。此外,解剖中还发现由于没有及时地受精交配,曼氏无针乌贼因肿胀而死导致卵子退化。但曼氏无针乌贼卵母细胞的退化机理还待进一步探讨。引起卵母细胞退化的原因总结如下:①卵子发生过程中相互挤压;②营养不良、饵料缺乏、饥饿造成;③产后卵巢退化直接导致卵母细胞吸收。

关于卵膜 曼氏无针乌贼卵子发生过程中,卵原细胞期核膜清晰而明显(图版I-1~2),第1时相卵母细胞期,出现“双轨道”状薄膜(图版I-5),而后进入生长期,出现滤泡膜层,并增厚内折入卵母细胞中,由滤泡细胞分泌次级卵膜(图版II-10)后,滤泡细胞吸收消化而达到成熟排于卵巢腔中,经过输卵管排出体外再包被有三级

卵膜(胶质膜)(图版II-11)。因此,曼氏无针乌贼的次级卵膜和三级卵膜分别是在卵巢中和卵巢外形成的。次级卵膜的形成与龚启祥等^[7]观察的结果一致,三级卵膜的形成与金乌贼的形成相似^[19]。张炯^[17]描述了曼氏无针乌贼三级卵膜的形成过程,指出成熟卵子排出体外,由输卵管腺和缠卵腺分泌物通过漏斗包被卵子而成三级卵膜,其黑色可能是因为墨囊分泌墨汁染成的结果,有待进一步研究。胶质膜坚韧结实,具有保护、支撑、固着卵子的作用。

3.2 关于卵巢发育分期

关于软体动物卵巢发育的分期,比较混乱,分期标准不一。双壳类的卵巢常划分为增殖期、生长期、成熟期、排放期和休整期^[20];头足类则划分为I~VI期^[7,21]。实验中,作者发现“肉眼不能区分性别”的阶段,实际上包括了两性未分化期、细胞学上的两性分化期以及卵母细胞期的早期时相,暂且不讨论两性未分化期,以往把“肉眼不能区分”的卵巢时期全部划分为第I期是不甚合理的,即把“肉眼不能区分”时期卵巢划分为第I期过于笼统,未能够从显微水平反映曼氏无针乌贼卵巢的早期发育规律。本文把“肉眼不能区分”卵巢依次划分为第I期(图版III-1、2)、第II期(图版III-3),也符合龚启祥等^[7]的时期划分规律,也与Hochleithner等^[22]提出的鱼类I-VI期划分标准相仿。

3.3 关于滤泡细胞

滤泡细胞的来源 关于滤泡的来源,目前存在两种看法:①滤泡细胞来源于卵巢的基质细胞,属于非生殖细胞^[23];②来源于卵原细胞,由早期生殖细胞演化而来^[24]。曼氏无针乌贼滤泡细胞最早出现于性腺发生分化期,由卵巢基质上的生殖上皮细胞分化而来,形态、大小、数量均不同于卵原细胞(图版II-1),而后迅速发育,包裹卵母细胞,因此,曼氏无针乌贼滤泡细胞属于非生殖细胞,来源于卵巢的基质细胞。

滤泡细胞的形态变化 伴随卵子发生,滤泡细胞的形态变化主要有两个方面:①滤泡细胞个体变化:由发生分化期的形态多样化,核不明显;逐渐发育为形态单一,核明显。②滤泡细胞群体变化:发生分化期比较散乱分布,逐渐发育为规则的群体层状构造。这与张耀光等^[23]观察到南方鲎卵巢滤泡细胞个体以及滤泡细胞群体的变化

相类似,但是,关于滤泡细胞核的变化存在差异,张耀光等^[23]认为零散期、单层扁平滤泡细胞期的滤泡细胞核大且明显,而在曼氏无针乌贼的滤泡细胞中,发生分化期的核是不明显的,只有到发育后期才逐渐清晰,其机理还有待进一步探讨。

滤泡细胞的功能 卵子发生过程中,滤泡细胞在运输、分泌提供营养物质方面起着十分重要的作用^[25]。本文观察到卵母细胞中的卵黄颗粒是由滤泡细胞分泌而来(图版 II-6~8),从而证明曼氏无针乌贼滤泡细胞具有分泌提供营养的功能,与方永强等^[25]的研究较一致。另外,龚启祥等^[7]在曼氏无针乌贼卵子发生后期的卵母细胞中,提出卵子的次级卵膜由滤泡细胞分泌形成,本文也发现卵膜的形态结构与其所描述的次级卵膜比较一致,张耀光等^[23]也提出硬骨鱼类卵膜的形成与滤泡细胞的分泌功能有关,所以,认为曼氏无针乌贼滤泡细胞具有分泌形成卵膜的功能。

参考文献:

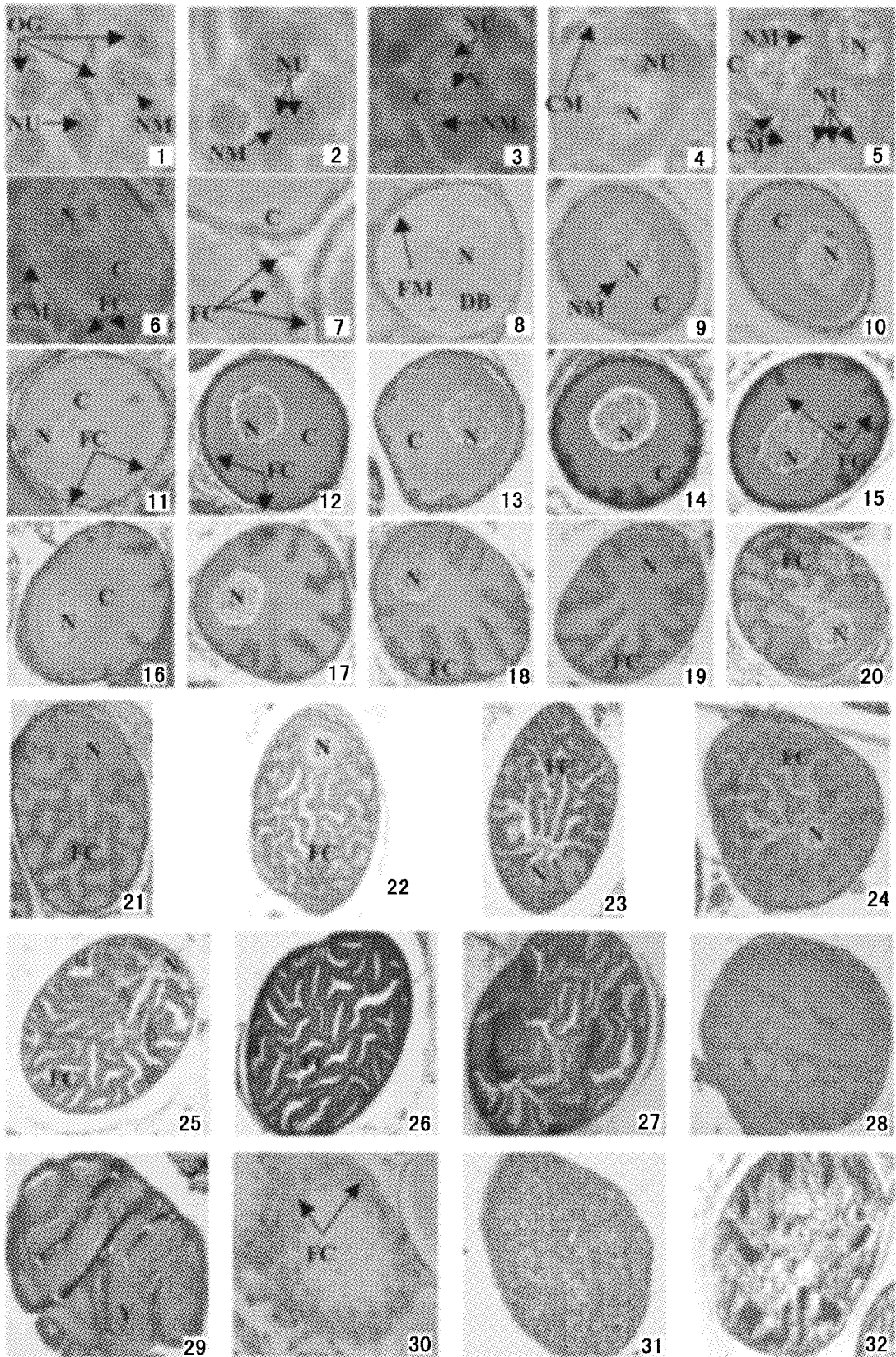
- [1] 乌贼资源增殖研究组(唐逸民执笔). 浙江近海曼氏无针乌贼资源增殖及繁殖保护的研究[J]. 浙江水产学院学报,1986,5(2):99-104.
- [2] 山本孝至. 金乌贼 *Sepia esculenta* 和曼氏无针乌贼 *Sepiella japonica* 内壳形态的研究[J]. 贝类学杂志,1945,14:62-72.
- [3] Ueda K. Studies on the growth, maturation and migration of the shiryake-ika, *Sepiella japonica* Sasaki [J]. Bulletin of the Nansei Regional Fisheries Research Laboratory,1985,19:1-4.
- [4] 郑美丽,肖金华,郑微云,等. 曼氏无针乌贼的趋光特性[J]. 厦门大学学报(自然科学版),1980,19(3):91-99.
- [5] Zheng X D, Yutaka N, Wang R C, et al. Biochemical genetic studies on cuttlefish *Sepiella maindroni* (Cephalopoda: Sepiidae)-active lociscreening of isozyme [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology,2001,19(4):345-349.
- [6] Zheng X D, Wang R C, Xiao S, et al. Genetic diversity in population of *Sepiella maindroni* using 16S rRNA gene sequence analysis [J]. High Technology Letters,2003,9(1):1-5.
- [7] 龚启祥,杜立勤. 浙江近海曼氏无针乌贼卵巢周年变化的研究[J]. 水产学报,1988,12(1):57-62.
- [8] 陈海燕. 乌贼生殖系统标本的制作[J]. 丽水师专学报(自然科学版),1991,12(1):31.
- [9] 张中英. 鱼卵切片技术[J]. 动物学杂志,1980,(2):145.
- [10] 倪海儿,杜立勤. 东海鳐卵巢发育的组织学观察[J]. 水产学报,2001,25(4):317-324.
- [11] 方永强,郑文彪,马广智. 鲶卵膜形成和卵黄发生的超微结构观察[J]. 华南师范大学学报,2002,(2):25-31.
- [12] Laptikhovskiy A I. Oogenesis and gonad development in the cold water Loliginid squid *Loligo gahi* (Cephalopoda: Myopsida) on the Falkland [J]. Shelf J Moll Stud,2001,67:475-482.
- [13] Wourms J P. Oogenesis reproduction of marine invertebrates [M]. Pacific Grove (California): The Boxwood Press,1987,(4):50-179.
- [14] 陈竟春,石安静. 椭圆背角无齿蚌卵子发生的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版),2002,39(3):546-551.
- [15] Bolognari A. Primary nucleolus and amphinucleolus in the oocytes *Patella coerulea* [J]. Experientia,1976,32(8):1008-1010.
- [16] 杨耀聪,李复雪. 尖紫蛤生殖周期的研究[J]. 热带海洋,1994,13(2):61-67.
- [17] 张炯. 曼氏无针乌贼繁殖习性的初步观察[J]. 水产学报,1965,2(2):35-43.
- [18] 龚启祥. 东海群成熟带鱼卵巢变化的细胞学观察[J]. 水产学报,1984,8(8):185-196.
- [19] 李嘉泳. 金乌贼在我国黄渤海的生殖洄游和发育[J]. 山东海洋学院学报,1963,(2):69-108.
- [20] Broow M J. Gonad development and spawning in *Anadara granosa* (Bivalve: Arcidae) [J]. Aquaculture,1983,30(4):211-219.
- [21] 欧瑞木. 中国枪乌贼性腺成熟度分期的初步研究[J]. 海洋科学,1983,(1):44-46.
- [22] Hochleithner M, Gessner J. The sturgeon and paddlefishes of the world; biology and aquaculture [M]. Australia, Aqua Tech Publication,1999:81-82.
- [23] 张耀光,谢小军. 南方鲇卵巢滤泡细胞和卵膜生成的组织学[J]. 动物学研究,1995,16(2):166-172.
- [24] 方永强,林君卓,翁幼竹,等. 池养鳊的卵巢发育和卵子发生过程[J]. 水产学报,2004,28(4):353-359.
- [25] 方永强,Welsch U. 文昌鱼卵巢中滤泡细胞超微结构及功能的研究[J]. 中国科学(B辑),1995,25(10):1079-1085.

图版 I 说明

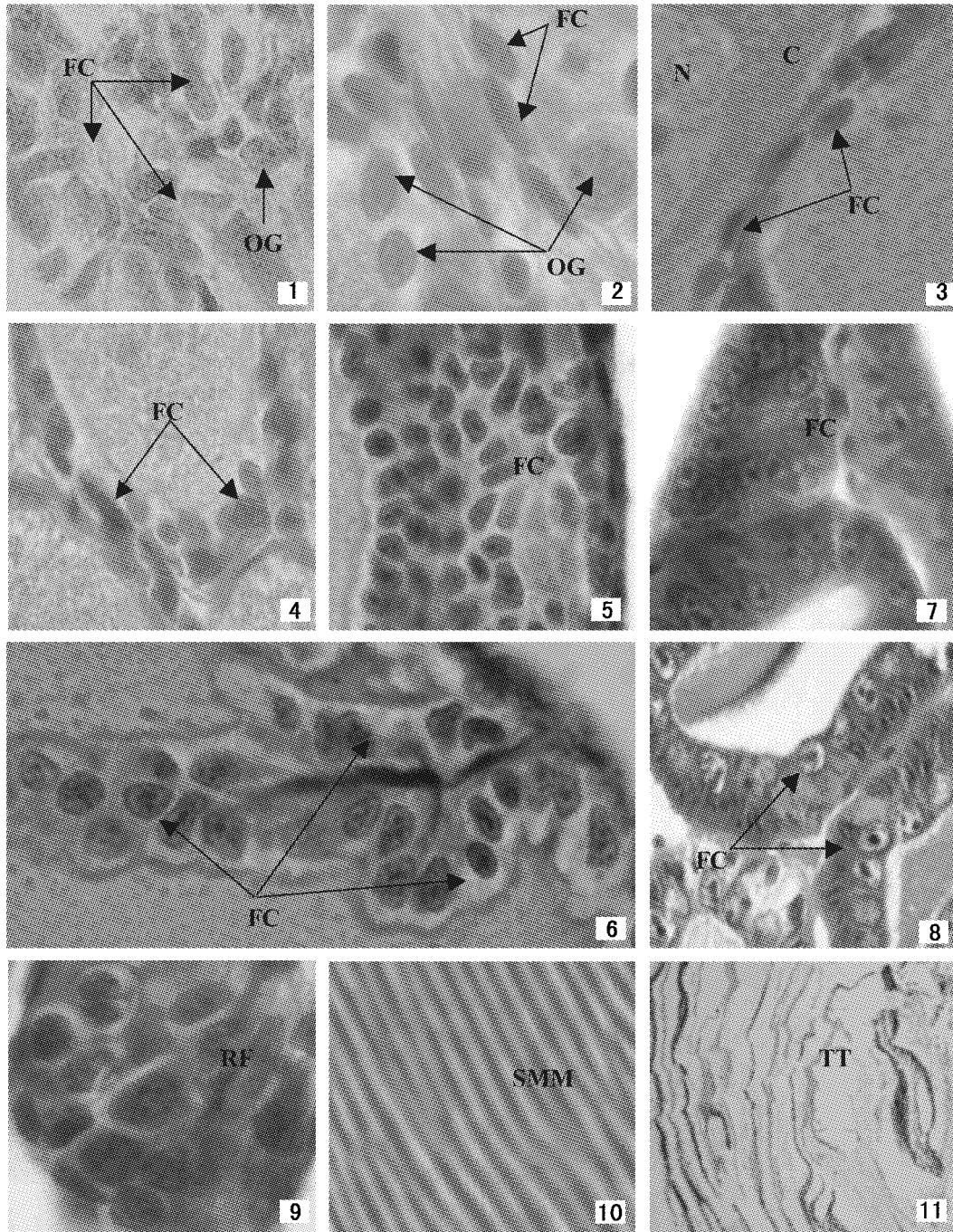
1. 由原始生殖细胞分化而来卵原细胞, H. E, 示卵细胞核、核仁、细胞膜, $\times 1000$;
2. 卵原细胞, H. E, 示卵细胞核、核仁、细胞膜, $\times 1000$;
3. 第 1 时相卵母细胞, H. E, 示卵细胞核、双质核仁、核膜、细胞膜, $\times 1000$;
4. 第 1 时相卵母细胞, H. E, 示卵母细胞核、外周核仁、核膜、细胞膜, $\times 1000$;
5. 第 1 时相卵母细胞, H. E, 示卵母细胞核、核膜、“双轨道”细胞膜, $\times 1000$;
6. 第 2 时相卵母细胞, H. E, 示滤泡细胞向卵母细胞靠拢, $\times 1000$;
7. 第 2 时相卵母细胞, H. E, 示零散的滤泡细胞散布于卵母细胞的“双轨道”膜内, $\times 1000$;
8. 第 2 时相卵母细胞, H. E, 示卵母细胞单层滤泡细胞, $\times 400$;
9. 第 3 时相卵母细胞, H. E, 示卵母细胞两层滤泡细胞, 核膜形态变化, $\times 200$;
10. 第 4 时相卵母细胞, H. E, 示卵母细胞滤泡细胞增厚, 卵周隙, $\times 200$;
11. 第 5 时相早期卵母细胞, H. E, 示内折滤泡细胞的雏形, $\times 200$;
12. 第 5 时相早期卵母细胞, H. E, 示 1 个早期滤泡细胞内折, $\times 200$;
13. 第 5 时相早期卵母细胞, H. E, 示 5 个早期滤泡细胞内折, $\times 200$;
14. 第 5 时相早期卵母细胞, H. E, 示 7 个早期滤泡细胞内折, $\times 200$;
15. 第 5 时相早期卵母细胞, H. E, 示 8 个早期滤泡细胞内折, 内折有所增长, $\times 200$;
16. 第 5 时相早期卵母细胞, H. E, 示滤泡细胞内折开始出现分支, $\times 200$;
17. 第 5 时相中期卵母细胞, H. E, 示滤泡细胞内折增长, 基部增厚, $\times 200$;
18. 第 5 时相中期卵母细胞, H. E, 示滤泡细胞内折基部出现分叉, $\times 200$;
19. 第 5 时相中期卵母细胞, H. E, 示滤泡细胞内折相互之间开始连结, $\times 200$;
20. 第 5 时相中期卵母细胞, H. E, 示滤泡细胞内折连接成网状, $\times 200$;
21. 第 5 时相中期卵母细胞, H. E, 示滤泡细胞内折增多, $\times 100$;
22. 第 5 时相中期卵母细胞, H. E, 示网状内折连接进一步加密, $\times 100$;
23. 第 5 时相中期卵母细胞, H. E, 示核偏位, $\times 100$;
24. 第 5 时相中期卵母细胞, H. E, 示网状内折包围细胞核, $\times 100$;
25. 第 5 时相中期卵母细胞, H. E, 示核偏位, $\times 40$;
26. 第 5 时相晚期卵母细胞, H. E, $\times 40$;
27. 第 5 时相晚期卵母细胞, H. E, 示滤泡细胞, $\times 40$;
28. 第 5 时相晚期卵母细胞, H. E, 示卵黄物质, $\times 40$;
29. 成熟期卵母细胞, H. E, 示卵黄颗粒, $\times 40$;
30. 退化吸收早期卵母细胞, $\times 400$;
31. 退化吸收中期卵母细胞, $\times 200$;
32. 退化吸收晚期卵母细胞, $\times 40$

Explanation of Plate I

1. Oogonium from the primordial germ cells (PGCs), H. E, showing nucleus, nucleolus, cytoplasm, cell membrane, $\times 1000$;
2. Oogonium stages, H. E, showing nucleus, nucleolus, cytoplasm, cell membrane, $\times 1000$;
3. Oocyte of the phase 1, H. E, showing nucleus, amphinucleous, karyotheca, cell membrane, $\times 1000$;
4. Oocyte of the phase 1, H. E, showing nucleus, circumjacent nucleolus, karyotheca, cell membrane, $\times 1000$;
5. Oocyte of the phase 1, H. E, showing nucleus, karyotheca, double tramroad cell membrane, $\times 1000$;
6. Oocyte of the phase 2, H. E, showing follicle cell going to the oocytes, $\times 1000$;
7. Oocyte of the phase 2, H. E, showing some follicle cell going to the double tramroad cell membrane, $\times 1000$;
8. Oocyte of the phase 2, H. E, showing oocytes with one layer of follicle cell, $\times 400$;
9. Oocyte of the phase 3, H. E, showing oocytes with two layers of follicle cell, $\times 200$;
10. Oocyte of the phase 4, H. E, showing oocytes with lots of layers of follicle cell, $\times 200$;
11. Early oocyte of the phase 5, H. E, showing the inflexed rudiment of follicle cell, $\times 200$;
12. Early oocyte of the phase 5, H. E, showing one inflexed of follicle cell, $\times 200$;
13. Early oocyte of the phase 5, H. E, showing five inflexed of follicle cell, $\times 200$;
14. Early oocyte of the phase 5, H. E, showing seven inflexed of follicle cell, $\times 200$;
15. Early oocyte of the phase 5, H. E, showing eight inflexed of follicle cell, the inflexed increasing, $\times 200$;
16. Metaphase oocyte of the phase 5, H. E, showing the embranchment in inflexed of follicle cell, $\times 200$;
17. Metaphase oocyte of the phase 5, H. E, showing increasing with inflexed of follicle cell, and the base incassation, $\times 200$;
18. Metaphase oocyte of the phase 5, H. E, showing the base of inflexed come with cleavage, $\times 200$;
19. Metaphase oocyte of the phase 5, H. E, showing connection between different inflexed, $\times 200$;
20. Metaphase oocyte of the phase 5, H. E, showing reticulate conformation between different inflexed, $\times 200$;
21. Metaphase oocyte of the phase 5, H. E, showing inflexed increasing, $\times 100$;
22. Metaphase oocyte of the phase 5, H. E, showing the inflexed reticulation become osculation, $\times 100$;
23. Metaphase oocyte of the phase 5, H. E, showing the nucleus become deflection, $\times 100$;
24. Metaphase oocyte of the phase 5, H. E, showing the inflexed reticulation encircle the nucleus, $\times 100$;
25. Metaphase oocyte of the phase 5, H. E, showing the nucleus become deflection, $\times 40$;
26. Terminal oocyte of the phase 5, H. E, $\times 40$;
27. Terminal oocyte of the phase 5, H. E, showing the follicle cell, $\times 40$;
28. Terminal oocyte of the phase 5, H. E, showing the yolk, $\times 40$;
29. Autumn oocyte, H. E, showing he yolk, $\times 40$;
30. Early resorbing oocyte, $\times 400$;
31. Metaphase resorbing oocyte, $\times 200$;
32. Terminal resorbing oocyte, $\times 40$



图版 I 曼氏无针乌贼卵子发生
Plate I Oogenesis of *Sepiella maindroni*

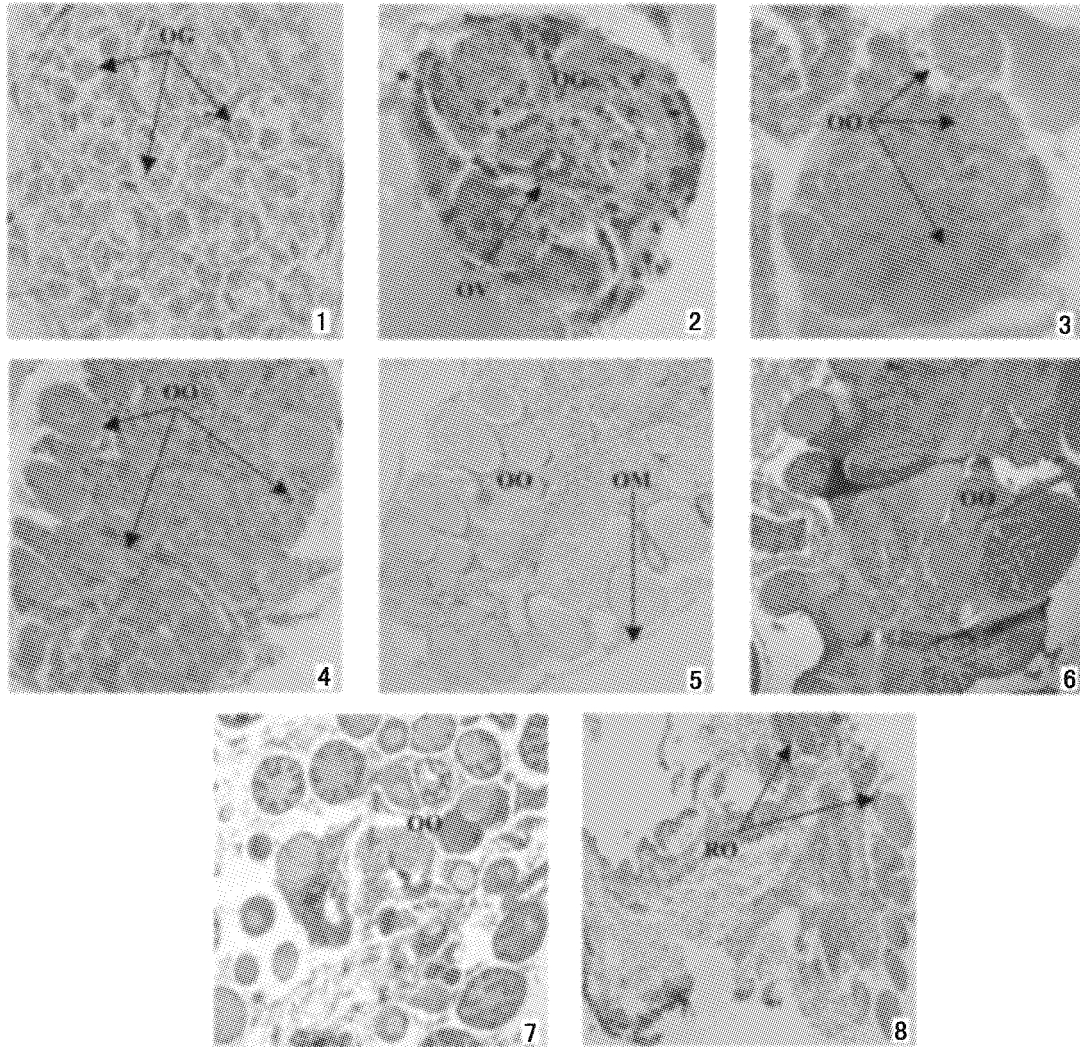


图版 II 曼氏无针乌贼卵巢滤泡细胞形态与卵膜形成

Plate II The configuration of follicle cell and egg envelopes in *Sepiella maindroni*

1. 发生分化期滤泡细胞, $\times 1000$; 2. 形态规则滤泡细胞, $\times 1000$; 3. 单层滤泡细胞, $\times 1000$; 4. 两层滤泡细胞, $\times 1000$; 5. 多层滤泡细胞, $\times 1000$; 6. 内折早期滤泡细胞, $\times 1000$; 7. 内折中期滤泡细胞, $\times 1000$; 8. 内折晚期滤泡细胞, $\times 1000$; 9. 退化吸收期滤泡细胞, $\times 1000$; 10. 次级卵膜, H. E., $\times 400$; 11. 三级卵膜, $\times 40$

1. Follicle cells in the stage of occurrence, $\times 1000$; 2. The inerratic follicle cells in the stage of oocytes, $\times 1000$; 3. A singular layer of follicle cells surrounded oocytes, $\times 1000$; 4. Double layer of follicle cells surrounded oocytes, $\times 1000$; 5. Multiple layer of follicle cells surrounded oocytes, $\times 1000$; 6. The early inflexed layer of follicle cells surrounded oocytes, $\times 1000$; 7. The metaphase inflexed layer of follicle cells surrounded oocytes, $\times 1000$; 8. The terminal inflexed layer of follicle cells surrounded oocytes, $\times 1000$; 9. The resorbing follicle cell, $\times 1000$; 10. Secondary membrane, H. E., $\times 400$; 11. Tertiary membrane, $\times 40$



图版 III 曼氏无针乌贼卵巢发育周期

Plate III The ovarian development cycle of *Sepiella maindroni*

1. I 期卵巢早期, H. E, 示卵原细胞, $\times 400$; 2. I 期卵巢, $\times 400$; 3. II 期卵巢早期, 示不同时期卵母细胞, $\times 200$; 4. II 期卵巢, $\times 200$; 5. III 期卵巢, 示卵巢被膜、不同时期卵母细胞, $\times 40$; 6. IV 期卵巢, $\times 40$; 7. V 期卵巢, $\times 40$; 8. VI 期卵巢, 即退化吸收期卵巢, $\times 40$

AM 双质核仁; C 细胞质; CM 细胞质膜; DB 核周致密物; FC 滤泡细胞; FM 滤泡膜; N 细胞核; NM 核膜; NU 核仁; OG 卵原细胞; OM 卵巢被膜; OO 卵母细胞; OR 卵巢; OV 产卵基; RF 退化吸收滤泡细胞; RO 退化吸收卵母细胞; SMM 次级卵膜; TT 三级卵膜; Y 卵黄

1. The early ovary in the stage I, H. E, showing oogonium, $\times 400$; 2. The ovary in the stage I, $\times 400$; 3. The early ovary in the stage II, H. E, showing oocytes of different period, $\times 200$; 4. The ovary in the stage II, $\times 200$; 5. The ovary in the stage III, showing ovary velum and oocytes of different period, $\times 40$; 6. The ovary in the stage IV, $\times 40$; 7. The ovary in the stage V, $\times 40$; 8. The ovary in the stage VI, namely the degenerative ovary, $\times 40$

AM amphinucleous; C cytoplasm; CM cytoplasm membrane; DB ensenucleus bodies; FC follicle cell; FM follicle membrane; K karyotheca; N nucleus; NM nucleus membrane; NU nucleolus; OG oogonium; OM ovary velum; OO oocytes; OR ovary; OV ovipositor; RF resorbing follicle cell; RO resorbing oocytes; SMM secondary membrane; TT tertiary membrane; Y yolk