

文章编号:1000-0615(2014)04-0525-07

DOI:10.3724/SP.J.1231.2014.48831

双须骨舌鱼性腺发育的组织学观察

汪学杰¹, 田媛^{1,2}, 刘奕¹, 牟希东¹, 刘超¹, 胡隐昌¹, 罗建仁^{1*}

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 通过组织学研究方法, 分别对双须骨舌鱼Ⅱ~V期的卵巢及Ⅱ~VI期精巢的形态结构、特征及生殖细胞变化进行描述。结果显示, Ⅱ时相卵母细胞的细胞核较大, 约为细胞体积的一半; Ⅲ时相卵母细胞出现卵黄斑及卵黄颗粒; Ⅳ时相卵母细胞中卵黄迅速积累且细胞膜出现褶皱; Ⅴ时相卵母细胞膜表面的褶皱消失。雄性双须骨舌鱼精巢发育的Ⅱ期, 只含有初级精母细胞。Ⅲ期精巢分布有初级和次级精母细胞, 精小管形成且小管中充满精细胞; Ⅳ期精巢主要含有初级和次级精母细胞以及精原细胞, 精小管中出现空腔; Ⅴ期精巢中包含次级精母细胞、精原细胞和精子细胞, 精小管中的空腔增大; Ⅵ期精巢则显示出高度血管化和结缔组织增多等特点。本研究将为双须骨舌鱼人工繁殖提供参考。

关键词: 双须骨舌鱼; 性腺发育; 卵巢; 精巢

中图分类号: Q 954.6; S 965.3

文献标志码:A

双须骨舌鱼(*Osteoglossum bicirrhosum*), 俗名银龙鱼(silver arowana), 隶属于骨舌鱼科(Osteoglossidae), 骨舌鱼属(*Osteoglossum*), 是现存的7种骨舌鱼科鱼类之一, 进化地位较低等, 起源较古老, 素有“活化石”之称^[1], 原产于南美洲圭亚那和亚马逊河流域^[2], 通常栖息于亚马逊河的缓流区, 是一种重要的食用鱼类。在亚洲, 双须骨舌鱼则是作为观赏鱼饲养, 是影响最大的热带观赏鱼之一, 深受观赏鱼爱好者的喜爱, 具有极高的经济价值^[3]。我国双须骨舌鱼的繁殖技术不成熟, 需要依赖进口以满足市场需求, 每年进口量达数百万尾, 从而限制了我国双须骨舌鱼产业的发展。因此, 研究双须骨舌鱼繁殖生物学的特性, 对保护、利用其资源有着十分重要的意义。

双须骨舌鱼雌、雄个体第二性征不明显, 即使在繁殖期雌雄个体仍难以分辨^[4], 这就对人工繁殖造成了很大的困扰, 只能采用效率不高的半自然方法。为了能够突破其繁殖技术, 首先要解决双须骨舌鱼的性腺发育特征研究, 但是目前相关繁殖生物学研究资料很少, 性腺发育的组织学研

究尚属空白, 这也是导致双须骨舌鱼繁殖技术不成熟的一个主要原因。本实验利用解剖及石蜡切片技术观察双须骨舌鱼性腺发育的形态及组织学结构特征, 旨在了解双须骨舌鱼性腺发育及成熟规律并确定繁殖期, 为实现人工繁殖及规模化养殖提供指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用双须骨舌鱼购自广东观洋农贸发展有限公司, 暂养于玻璃水族箱中, 水温28~30℃, pH 6.0~7.0。经解剖后确定性别, 共取4月龄雌、雄幼鱼各4尾; 8月龄各5尾; 2龄个体各7尾; 3龄以上雌、雄个体各10尾。

1.2 组织学研究

实验鱼解剖后将性腺完整取出后称重, 计算性腺成熟系数。将性腺切割成约0.5 cm³左右的组织块固定于Bouin氏液中, 4月龄幼鱼则将头部和尾部切除后固定整个腹部。组织在Bouin氏液中固定24 h后转移至70%乙醇中保存。在脱

收稿日期:2013-07-30 修回日期:2014-02-20

资助项目:国家科技基础条件平台项目;广东省科技计划(2011B060400023, 2012A020602014)

通信作者:罗建仁, E-mail: olfishlo@163.com

水机中完成脱水、透明、浸蜡后于石蜡包埋机中包埋。使用 Elex 切片机进行组织切片,厚度为 5 μm 。经 H. E 染色后于 Olympus 显微镜下观察并拍照。

1.3 统计分析

参考已报道的分期方法进行性腺的分期及卵母细胞的时相划分^[5-6]。根据公式:性腺成熟系数 = 性腺质量/鱼体质量 × 100% 计算性腺成熟系数。用 Motic 2.0 软件测量卵细胞与细胞核直径。

2 结果

2.1 卵巢和精巢的基本形态

双须骨舌鱼为单侧性腺,位于鱼体腔左侧,卵巢和精巢均在肠道上方紧贴鳔生长。未成熟的卵巢为条带状或扁带状,成熟的卵巢为囊状。未成熟的精巢为条带状,周围有脂肪块包裹,不易分离,精巢后端呈圆柱形。卵巢和精巢后端具有短的生殖道,末端为生殖孔通向体外。双须骨舌鱼成熟卵细胞体积较大,卵径为 10.0 ~ 20.0 mm,绝对怀卵量为 200 粒。

2.2 卵母细胞发育分期的组织学特征

I 时相卵母细胞:卵细胞为卵原细胞,是原始生殖细胞经有丝分裂增殖形成,由质膜、卵质和卵核构成,特点为细胞核较大,细胞界限不明显。

II 时相卵母细胞:细胞处于初级卵母细胞早期,由卵原细胞发育而成,细胞呈圆形或椭圆形,处于小生长期。卵质积累增多,细胞明显增大,细胞直径为 51.6 ~ 81.3 μm ,核径为 18.5 ~ 27.6 μm 。细胞质含量多,胞质紫红色,嗜碱性强;细胞核圆形,核仁较多,呈分散分布。卵细胞质膜外围的滤泡细胞数量增多(图版 I -1)。

III 时相:初级卵母细胞体积显著增大,细胞呈圆形,处于由小生长期转入大生长期的过渡阶段,卵质内不同物质的合成、积累使得卵径增长明显,细胞直径可达 127.6 ~ 313.7 μm ,核径为 40.9 ~ 87.6 μm 。细胞质中间出现卵黄颗粒以及较大的卵黄斑。细胞核偏向细胞的一端,核仁仍呈分散分布。滤泡细胞形成明显的滤泡膜(图版 I -2)。

IV 时相:初级卵母细胞进入了卵黄积累的大生长期,此时期最大的特点就是卵黄颗粒从卵黄斑处逐渐增多(图版 I -3),直至充满整个卵

细胞(图版 I -4)。细胞核被卵黄挤到细胞边缘,核仁分布在核膜周围,细胞直径为 683.3 ~ 1496.3 μm ,核径为 89.9 ~ 144.1 μm 。细胞膜向内褶皱,出现放射带(图版 I -5)。

V 时相:处于成熟期的卵细胞,初级卵母细胞经成熟分裂向次级卵母细胞过渡。卵细胞直径约 10.0 ~ 20.0 mm。由于卵细胞过大,在组织切片时,很难观察到完整的细胞切片,但是对卵膜的观察可发现卵膜上的褶皱消失(图版 I -6)。

本研究未发现第 VI 时相卵母细胞。

2.3 卵巢形态及发育分期

根据上述卵细胞的发育时相在卵巢中组成差异以及卵巢形态和组织结构特征,将卵巢发育划分为 6 个时期。

Ⅰ期卵巢:4 月龄个体卵巢处于此时期(图版 I -1),大多数卵母细胞为Ⅱ时相卵母细胞,也有少量Ⅰ时相卵母细胞。

Ⅲ期卵巢:卵巢呈粉红色,条带状,表面微血管分布丰富。卵巢中只有Ⅲ时相和Ⅱ时相卵母细胞。在 8 月龄至 2 龄鱼可见。性腺成熟系数为 0.08%。

Ⅳ期卵巢:卵巢体积迅速增大,末端逐渐膨大呈囊状,可清楚地看到卵粒,卵粒的颜色由淡黄色逐渐变为桔黄色,同时可见卵粒直径有所增大。卵巢表面血管明显增大且血管变粗。以Ⅳ时相卵母细胞为主,也有Ⅲ时相的卵母细胞,但无其他时相细胞。3 龄及以上的性成熟鱼在进入产卵季节前卵巢可发育至此阶段。性腺成熟系数为 0.23%。

Ⅴ期卵巢:此时卵巢体积达到最大,剖开腹腔,卵巢在体腔后部占据约二分之一空间。卵巢中以Ⅴ时相卵母细胞为主,未见其他时相卵母细胞。卵粒为有光泽的橘黄色,卵黄含量高。3 龄以上的性成熟鱼在产卵季节卵巢发育处于此阶段。性腺成熟系数为 8.12%。

由于所取样品的局限,未发现Ⅰ期及Ⅵ期的卵巢。

2.4 精巢形态及发育的组织学观察

根据精巢的外观和内部切片观察结果,发现所取样品精巢发育处在Ⅱ期至Ⅵ期,其中 4 月龄雄性个体性腺已发育至Ⅱ期,8 月龄至 2 龄个体精巢处于Ⅲ期,在 3 龄以上个体中可见Ⅳ期、Ⅴ期和Ⅵ期精巢。

II期精巢:精巢几乎无法用肉眼观察,经组织切片结果显示,精巢中精小管尚未形成,有初级精母细胞存在,直径为 $3.10\sim5.13\mu\text{m}$ (图版II-1)。

III期精巢:III期精巢形状为细条状,呈白色,血管不发达,后端被脂肪包围,难以分离。组织学结果发现,III期精巢的精小管已开始发育,初级精母细胞分裂增多,精细胞充满精小管(图版II-2)。

IV期精巢:精巢变粗,由于有血管分布,颜色变为暗红色。切片观察,精小管中出现空腔。生殖细胞主要是由精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞组成。成熟系数为0.11%(图版II-3)。

V期精巢:精巢已很发达,但体积很小,末端膨大呈圆柱状,颜色为粉红色。切片观察发现精小管的空腔变大,出现精子细胞和精子。成熟系数为0.62%(图版II-4)。

VI期精巢:此时期为退化的精巢,外部形态特征与III期精巢相类似,精巢的膨大部分消失,颜色恢复暗红色。切片观察可知精小管高度血管化,结缔组织增多,精小管腔变小(图版II-5)。

3 讨论

3.1 双须骨舌鱼性腺特征

双须骨舌鱼所产卵粒较大但繁殖力极低^[7],绝对怀卵量仅为200粒左右。但其具有护幼行为,即雄性将受精卵含在口中孵化3星期左右,直至幼鱼能够独立游动^[8]。因此在同一繁殖季节,雄鱼仅对一尾雌性所产的卵进行受精,相应的所需精子细胞数量就少,本研究亦发现双须骨舌鱼的精巢即使在成熟时期性腺指数也不及1%。同时,研究发现与其他硬骨鱼类相比,双须骨舌鱼成熟卵体积大,卵黄含量高,这可能是由于初孵仔鱼在父本口中停留期较长且不能独立摄食,需要卵黄提供较多的营养物质所致。一般具有含卵行为的鱼类所产卵都具有数量较少、体积较大的特点,但成活率较高。

本研究观察到,双须骨舌鱼不同于绝大多数硬骨鱼类,仅具有左侧性腺,这与Nyonje^[9]于2006年的研究结果一致。已发现单侧性腺鱼类还包括骨舌鱼科(Osteoglossidae)的星点珍珠龙鱼(*Scleropages leichardtii*)^[10]、非洲黑龙鱼(*Heterotis niloticus*)^[11]、巨骨舌鱼(*Arapaima gigas*)^[12]、饰妆铠甲弓背鱼(*Chitala ornata*)和象鼻鱼科(Mormyrids)的贝比背眼长颌鱼

(*Hyperopisus bebe*)、卡氏长颌鱼(*Mormyrus kannume*)^[13~14]以及浅色河马长颌鱼(*Hippopotamyrus pictus*)^[15]。Britz^[16]认为具有双侧卵巢的种类具备原始特征,而单侧卵巢的物种则是具有派生特征。双须骨舌鱼单侧性腺出现原因可能是由于对特定生境的适应而逐渐形成,其具体原因及形成机制还需进一步研究。

3.2 双须骨舌鱼卵巢发育

在IV时相卵母细胞中,观察到卵膜出现褶皱,而在成熟的卵细胞中,这种褶皱消失,这在其他鱼类中是不常见的。出现褶皱的原因可能是为卵母细胞的迅速增大提供条件,由于卵母细胞在第IV时相的发育过程中直径要增加10 mm左右,因此细胞膜的褶皱可以避免卵黄的迅速增加而导致卵膜生长与之差异较大的情况发生,是双须骨舌鱼在长期的进化过程中的一种适应机制。在3龄以上个体中发现IV和V期卵巢,但在8月龄至2龄个体中却未发现IV期卵巢,说明IV时相的卵母细胞发育要经过约1年时间,这与Scott等^[17]观察到的美丽硬仆骨舌鱼(*Scleropages formosus*)卵细胞发育结果一致。

根据卵母细胞的发育情况,大多数硬骨鱼类的卵巢发育模式可分为同步发育、分组同步发育和非同步发育3种类型^[18~19];在每一时相的卵巢中,相应时相的卵母细胞占绝大多数,因此推断双须骨舌鱼的卵巢为分批同步发育型卵巢,拥有这种类型卵巢的鱼类,生殖季节通常较短。

本实验所选取的最小的样本为4月龄个体,但是在组织切片中并没有发现I期卵巢,这说明双须骨舌鱼I期卵巢应该在4月龄之前。因此在后续实验中,还需对双须骨舌鱼早期性腺进行研究。

3.3 精巢及精细胞的发育

在本研究所选择的4个取样时间内,雄性的精巢与雌性的卵巢所处时期基本一致,推测精巢的发育与卵巢基本同步,这还需对4月龄之前的幼鱼进行详细的观察后才能得出结论。Scott等^[17]在对骨舌鱼科另一种类美丽硬仆骨舌鱼精巢的观察中发现,排精后的精巢会出现高度血管化和结缔组织增多现象。本实验所观察的样本中,虽然未发现繁殖行为的发生,但3龄以上部分个体精巢外部形态虽类似III期精巢,内部却呈高度血管化并有结缔组织增多现象,说明其为未排

精而退化的精巢,即VI期精巢。

参考文献:

- [1] Moreau M A, Coomes O T. Potential threat of the international aquarium fish trade to silver arowana *Osteoglossum bicirrhosum* in the Peruvian Amazon [J]. *Oryx*, 2006, 40(2) :152 – 160.
- [2] Saint-Paul U, Zuanon J, Villacorta Correa M A, et al. Fish communities in central white-and blackwater floodplains [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2000, 57(3) :235 – 250.
- [3] Zhuang S W, Lü D Y. Ecological habits and culture of the Silver arowana *Osteoglossum bicirrohomus* [J]. *Reservoir Fisheries*, 2008, 28(1) :49 – 50. [庄树文, 吕冬云. 银龙鱼的生态习性及养成技术. 水利渔业, 2008, 28(1) :49 – 50.]
- [4] Dawes J, Lim L L, Cheong L. *The Dragon Fish* [M]. England: Kingdom Books, 1999.
- [5] Lou Y D. *Histology and Embryology* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996: 131 – 137. [楼允东. 组织胚胎学. 北京: 中国农业出版社, 1996: 131 – 137.]
- [6] Liu Y. *Fish breeding biology* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1993: 23 – 32. [刘筠. 鱼类繁殖生物学. 北京: 中国农业出版社, 1993: 23 – 32.]
- [7] Goulding M. *The fishes and the forest explorations in Amazonian natural history* [M]. Berkeley: University of California Press, 1980.
- [8] Duponchelle F, Arce A R, Waty A, et al. Contrasted hydrological systems of the Peruvian Amazon induce differences in growth patterns of the silver arowana, *Osteoglossum bicirrhosum* [J]. *Aquatic Living Resources*, 2012, 25(1) :55 – 66.
- [9] Nyonje B M. Experimental studies on cyclical reproduction of tropical African freshwater fishes [D]. Dissertation: Humboldt University of Berlin, 2006.
- [10] Merrick J R, Green L C. Pond culture of the spotted Barramundi, *Scleropages leichardti* (Pisces: Osteoglossidae) [J]. *Aquaculture*, 1982, 29 (1 – 2) : 171 – 176.
- [11] Moreau J. Premières observations écologiques sur la reproduction d' *Heterotis niloticus* (Osteoglossidae) [J]. *Annals Hydrobiology*, 1974, 5(1) :1 – 13.
- [12] Godinho H P, Santos J E, Formagio P S, et al. Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) [J]. *Acta Zoologica*, 2005, 86(4) :289 – 294.
- [13] Nawar G. Observations on breeding of six members of the Nile Mormyridae [J]. *The Annals and Magazine of Natural History*, 1959, 13 (2) : 493 – 504.
- [14] Scott D B C. The reproductive cycle of *Mormyrus kannume* Forsk. (Osteoglossomorpha, Mormyriformes) in Lake Victoria Uganda [J]. *Journal of Fish Biology*, 1974, 6(4) :447 – 454.
- [15] Blake B F. Aspects of the reproduction biology of *Hippopotamyrus pictus* from Lake Kainji, with notes on four other mormyrid species [J]. *Journal of Fish Biology*, 1977, 11(5) :437 – 445.
- [16] Britz R. Egg structure and larval development of *Pantodon buchholzi* (Teleostei: Osteoglossomorpha), with a review of data on reproduction and early life history in other Osteoglossomorphs [J]. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 2004, 15 (3) :209 – 224.
- [17] Scott D B C, Fulle J D. The reproductive biology of *Scleropages formosus* (Muller & Schlegel) (Osteoglossomorpha, Osteoglossidae) in Malaya, and the morphology of its pituitary gland [J]. *Journal of Fish Biology*, 1976, 8(1) :45 – 53.
- [18] Wallace A R, Selman K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts [J]. *American Zoologist*, 1981, 21(2) :325 – 343.
- [19] Murua H, Saborido-Rey F. Female reproductive strategies of marine fish species of the North Atlantic [J]. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 2003, 33(1) :23 – 31.

Histological study on the gonadal development of *Osteoglossum bicirrhosum*

WANG Xuejie¹, TIAN Yuan^{1,2}, LIU Yi¹, MU Xidong¹, LIU Chao¹, HU Yinchang¹, LUO Jianren^{1*}

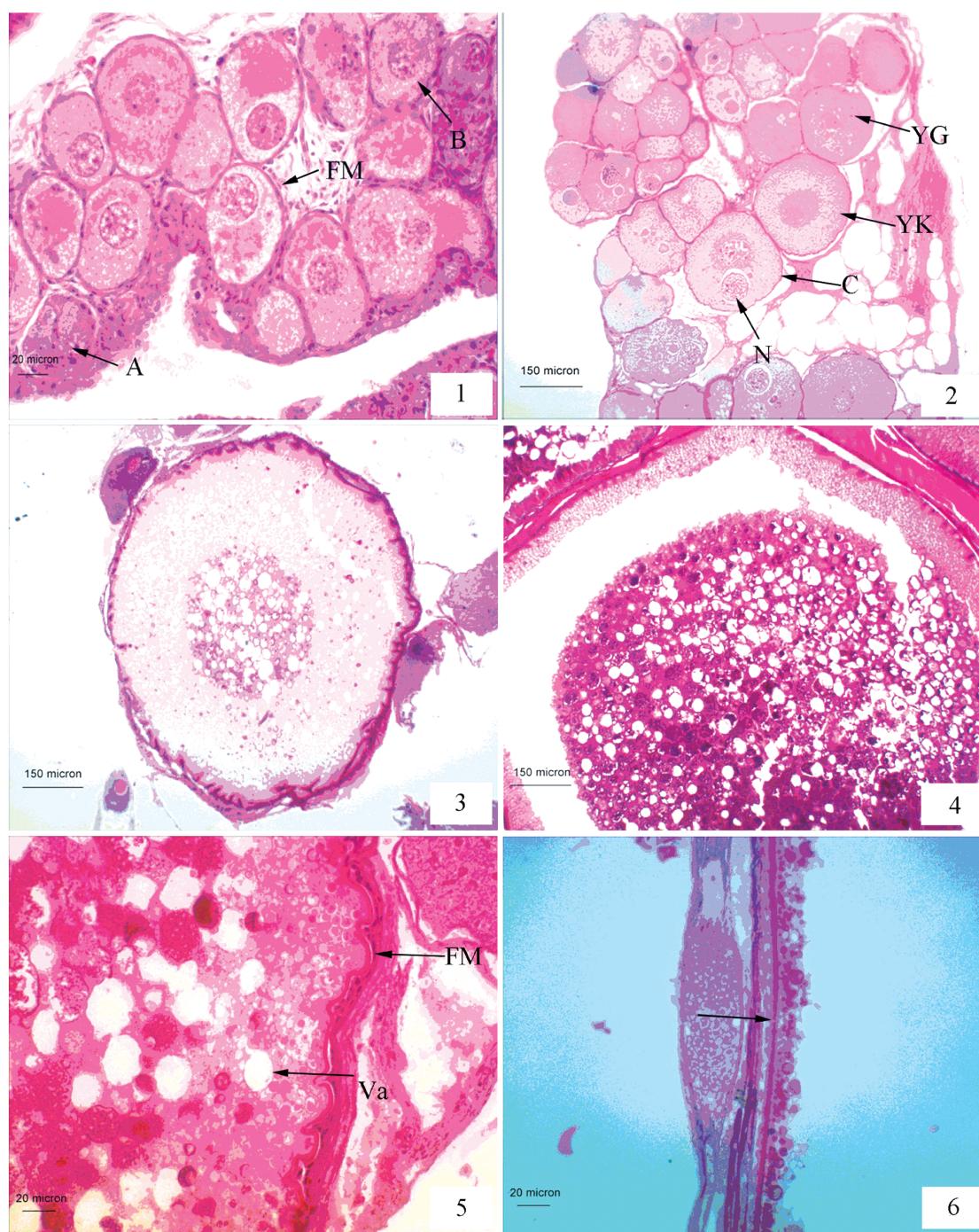
(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The histology of gonadal development of *Osteoglossum bicirrhosum* which is a popular ornamental fish was studied by paraffin section technique and H. E staining method. The morphological characteristics and structures of ovary at stage II – V and testis at stage II – VI were described. Moreover, the development of oocyte and spermatid were also described. The results showed that four months old ovaries were in stage II, while the oocytes were in phase II, and the nucleus occupied the half part of the cell. Eight months to two years old ovaries were in stage III, most of the oocytes were in phase III and egg macular and yolk granules could be observed; two to three years old ovaries were in stage IV, with the oocytes in phase IV which had yolk substance accumulated quickly and oolemma drape appeared. The ovary in stage V was three years or more than three years old, and the oocytes in phase V were full of yolk granules with the drape of oolemma disappeared. The primary spermatocyte in testis could be seen at the stage II. Eight months to two years old testes were in stage III, while the secondary spermatocyte appeared and the seminiferous tubules took shapes, and spermatids are full of the seminiferous tubules, primary spermatocyte, secondary spermatocyte and spermatids were seen at the stage IV, while the seminiferous tubules of void appeared. The testis in stage V was three years old and more than three years old, the spermatozoa appeared and the void of seminiferous tubules became large. The testis highly vascularized and with connective tissue increased was also observed which was in stage VI. This study will provide the basic data for the artificial reproduction of *O. bicirrhosum*.

Key words: *Osteoglossum bicirrhosum*; gonadal development; ovary; testis

Corresponding author: LUO Jianren. E-mail: olfishlo@163.com



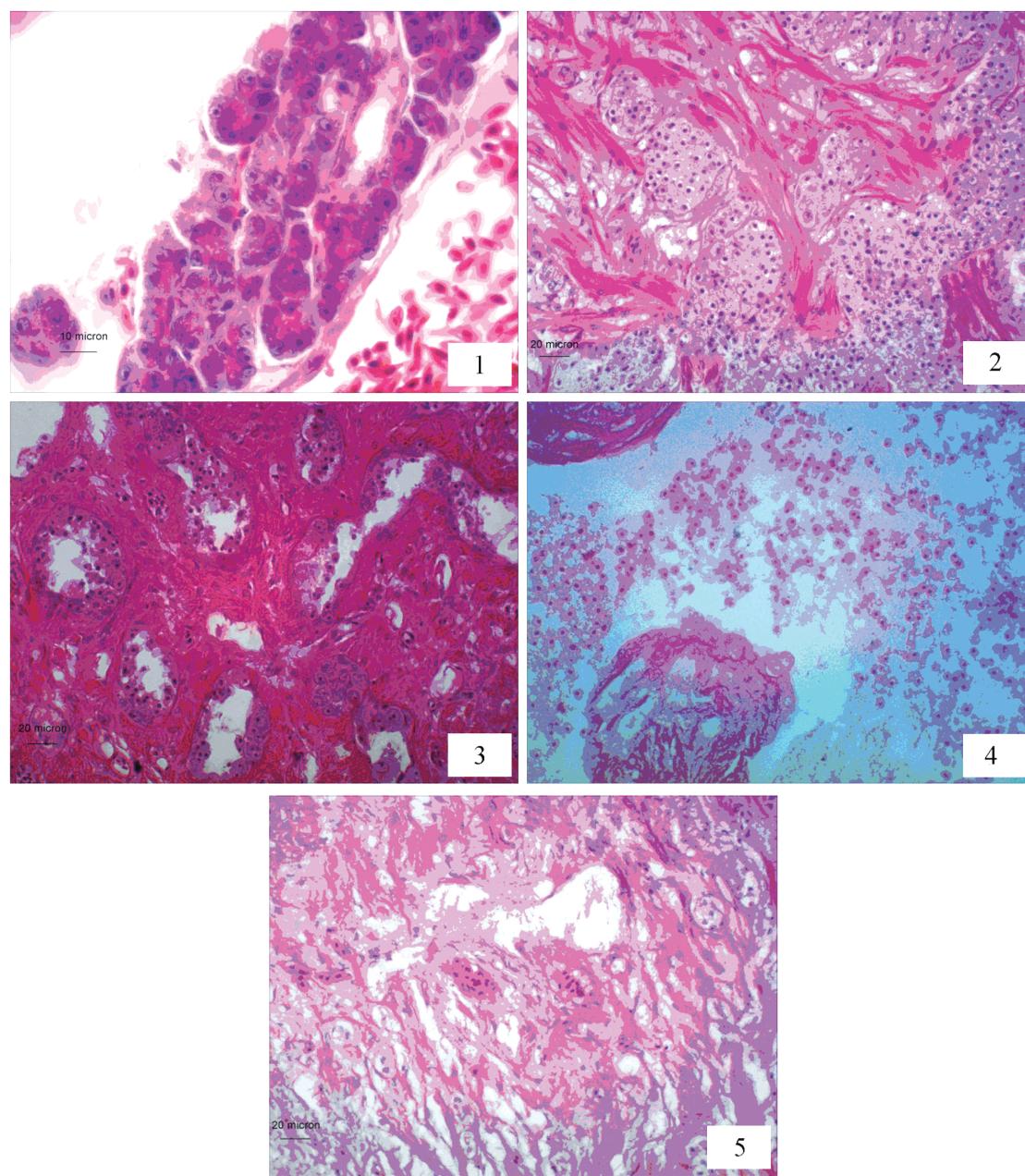
图版 I 双须骨舌鱼不同时期卵巢与卵母细胞发育形态特征

1. 双须骨舌鱼第Ⅱ期卵巢,A:第Ⅰ时相卵母细胞,B:第Ⅱ时相卵母细胞;2. 第Ⅲ期卵巢,C:第Ⅲ时相卵母细胞;3. 第Ⅳ时相早期卵母细胞;4. 第Ⅳ时相晚期卵母细胞;5. 第Ⅴ时相卵母细胞;6. 第Ⅴ时相卵母细胞卵膜,箭头示卵膜褶皱消失
FM:滤泡膜; N:细胞核; YG:卵黄颗粒; YK:卵黄; Va:液泡

Plate I Characteristics of ovary and oocyte cells at different stages in *O. bicirrhosum*

1. ovary in the stage Ⅱ ,A;The oocyte in the phase Ⅰ ,B;The oocyte in the phase Ⅱ ; 2. ovary in the stage Ⅲ ,C;the oocyte in the phase Ⅲ ; 3. oocyte in the early phase Ⅳ ; 4. oocyte in the late phase Ⅳ ; 5. oocyte in the phase Ⅳ ; 6. oolemma oocyte in the phase Ⅴ ,arrow showing the drape of oolemma disappeared

FM:follicular membrane; N:nucleus; YG:yolk grain; YK:yolk; Va:vaculole



图版II 双须骨舌鱼不同时期精巢的形态特征

1. 双须骨舌鱼Ⅱ期精巢；2. Ⅲ期精巢；3. Ⅳ期精巢；4. V期精巢；5. VI期精巢

Plate II Characteristics of testis at different stages in *O. bicirrhosum*

1. Testis in the stage Ⅱ ; 2. Testis in the stage Ⅲ ; 3. Testis in the stage Ⅳ ; 4. Testis in the stage V ; 5. Testis in the stage VI