

人工诱导日本鳗鲡性腺发育组织学研究

张洁明, 柳凌, 郭峰, 张涛

(农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室, 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000)

摘要:从人工诱导日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)性腺成熟的角度, 采用对亲鳗群体外形和解剖观察, 以及性腺组织切片的方法, 对日本鳗鲡从下海鳗到性腺发育成熟的全过程进行了组织学和细胞学研究。结果表明, 人工诱导的日本鳗鲡精巢发育仍可分为5个时相, 即精原细胞前增殖期(I); 精原细胞后增殖期(II), 精母细胞生长期(III), 精子出现期(IV)和精子成熟期(V)。除日本鳗鲡下海鳗的精巢有73.3%的个体处在第I时相外, 其整个精巢的发育过程和细胞学特征与以前的研究无太大差异。在下海鳗群体中未观察到第I时相的卵巢。因此, 人工诱导日本鳗鲡的卵巢发育只有卵母细胞单层滤泡期(II); 脂肪泡出现期(III); 卵黄充满期(IV)和卵母细胞最后成熟期(V)。本研究除对人工诱导下日本鳗鲡性腺发育各时相的组织学和细胞学特征进行了观察外, 还探讨了人工诱导日本鳗鲡性腺发育的时间、下海鳗群体的组成、以及脂肪泡的形成和变化过程等问题, 为以后的日本鳗鲡人工育苗技术提供了参考依据。[中国水产科学, 2007, 14(4): 593-601]

关键词:日本鳗鲡; 人工诱导; 性腺发育

中图分类号:S96

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2007)04-0593-09

日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)是一种在淡水里生长, 降海洄游产卵的鱼类。在中国每年10月中旬到11月底从它们栖息的江河、湖泊中成群洄游入海, 完成性腺发育和产卵繁殖。

随着对日本鳗鲡人工育苗技术的研究不断深入, 对人工诱导日本鳗鲡性腺发育也有了一些初步的认识和研究^[1-3]。日本学者山本喜一郎等^[4]发表了有关人工诱导日本鳗鲡精、卵细胞发育的研究报道^[4]。中国的林鼎先生也对在人工条件下的日本鳗鲡性腺发育的组织学和细胞学进行了系统深入的研究^[5-6]。但所有这些研究毕竟已过去近30年了。30年来, 气候条件、水文条件、鱼类资源组成、甚至地理环境等都可能发生了较大变化, 这些变化有可能导致下海鳗群体的性腺发育发生相应的变化, 这些变化有可能进一步影响日本鳗鲡人工诱导性腺发育的结果。同时, 国内外的学者对人工诱导日本鳗鲡性腺发育也开展了许多研究, 这些研究使人工诱导日本鳗鲡性腺发育的技术获得了不断的发展和完善^[7-9]。这些技术的应用也可能影响到日本鳗鲡性腺的组织学特征发生相应的变化。特别是

日本报道了日本鳗鲡人工育苗技术的成功^[10-11], 促使中国必须加快对日本鳗鲡人工育苗技术的研究。因此, 有必要重新开展对日本鳗鲡性腺发育的组织学研究, 以便为进一步开展日本鳗鲡人工育苗技术的其他相关研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 亲鳗及催熟

实验用亲鱼均取自1996~2006年间每年11月中旬珠江口(广东江门市大傲县附近)的下海野生鳗。选择体质健壮, 无疾病的鳗鲡作为实验用鱼。全部亲鳗运回长江水产研究所养殖实验室后, 先在盐度为15~20的人工海水中暂养10 d, 然后分组养殖于装有1 m³盐度为30的人工海水的玻璃钢水槽中, 每缸亲鳗数为30尾左右, 其中雌鳗8~9尾, 雄鳗20~22尾。10 d后, 开始采用外源激素诱导性腺发育。每500 g雌鳗体质量每次注射0.5 mg 鲤鱼垂体(Carp pituitary, CP) + 50 IU 人绒毛膜促性腺激素(Human chorionic gonadotropin, HCG), 雄鳗剂量减半。每隔12 d注射1次, 直到性腺发育成熟^[2]。

收稿日期:2006-10-09; 修订日期:2007-02-12.

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2004BA526B0117); 中国水产科学研究院基金项目(2003-3-4).

作者简介:张洁明(1962-), 男, 助理研究员, 主要从事鱼类繁殖生物学研究. Tel:0716-8126851; E-mail: zhangjm@yfi.ac.cn

通讯作者:柳凌. E-mail: Liul@yfi.ac.cn

1.2 组织学样本的采集及处理

性腺样本取自1996~2006年间,从下海鳗到人工诱导性腺发育成熟的亲鳗群体。不定期、随机从各催熟组中抽取样本。对抽取的样本进行编号后,测量亲鳗的体长、体质量、胸围等生物学数据;解剖测量性腺的长度、宽度及质量等有关生物学数据。

性腺组织块用Bouin氏液固定24 h后,保存于70%乙醇中。石蜡包埋,切片厚度6 μm 。Ehrlich 苏木精-伊红(HE)染色。对全部切片进行组织学观察。

1.3 性腺组织学观察、测量及数据统计

采用光学显微镜(Leica DM 2500)对性腺组织切片进行观察,照相。采用高清晰度彩色细胞图文分析系统(HCIAS-2000)(武汉千屏影像技术有限公司)进行细胞学参数测量。所得参数用SPSS进行处理,结果以算术平均值 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm \text{SD}$)表示。

2 结果与分析

2.1 人工诱导日本鳗鲡精巢发育及组织学特征

日本鳗鲡精巢位于肠道背部、肾脏两侧,长短左右不对称。长的一侧可达到生殖孔后3~5 cm处,短的一侧在生殖孔处与另一侧汇合。一般情况下,其精巢由许多精巢叶片组成,叶片呈团扇形,排成一排。叶片通过底部的输精管与输精导管相连。两条输精导管在生殖孔前汇合成短的输精总管。不同发育时期的精巢,其特征有一定差异。

日本鳗鲡需要外源激素的诱导,其精巢才能逐渐发育成熟^[3]。在本实验中,日本鳗鲡精巢需70~110 d才能发育成熟,集中成熟的高峰期为80~100 d。由于日本鳗鲡精巢发育个体间差异较大,作者将精巢发育的过程分为以下4个时期,以便描述。但细胞生物学时相划分则按照林鼎等^[5]的描述分期。

2.1.1 精巢发育适应期 这一时期主要见于刚捕到的下海雄鳗和第2次注射激素前的雄鳗。此时的雄鳗,除少数500 g以上的个体外,主要群体的平均体质量为147~161 g,成熟系数为1.29%~2.01%(表1)。由于从淡水进入海水的原因,雄鳗的体质量有一个明显的下降过程,以适应海水的高渗作用。外源激素注射后,性腺发育不明显。但体色,特别是胸鳍边缘颜色明显加深。

解剖后发现,该群体主要分为两类。一类性腺薄而透明,呈肉红色。精小叶半圆形,很薄。小叶间

的距离较宽。组织切片观察发现,精小叶由结缔组织分隔成许多不规则的小室,小室内有聚集成团的精原细胞。精原细胞大小不一,染色较深。小室中央形成较大的中空结构。该结构为初期生精囊,组织学分期为第Ⅰ时相(图版Ⅰ-1)。样本统计显示,具有该类型精巢的雄鳗在下海鳗样本中占73.3%,在第2次注射前的样本中占25%。另一类精小叶则较前一类增大,增厚,颜色呈淡红色,小叶间距离变窄。组织切片观察发现,精原细胞数目增多,核染色较深,中空缩小,结缔组织中有明显的血管分布。组织学分期为第Ⅱ期(图版Ⅰ-2)。具有该类型精巢的雄鳗在下海鳗样本中占26.7%,在第2次注射前的样本中占75%。

2.1.2 精巢发育启动期 该时期主要见于第2次注射后到第6次注射前的雄鳗群体。该群体的体质量已停止下降,并有逐渐回升的趋势。群体的平均体质量为150~152 g,成熟系数为2.44%~5.38%(表1)。除体色、胸鳍边缘和尾部边缘颜色进一步加深外,外形无明显变化。

组织切片观察发现,在第2次注射后到第4次注射前的雄鳗群体中,有37.5%的个体精巢还处在第Ⅱ期,第4次注射后到第6次注射前的雄鳗群体中,有4.2%的个体精巢处在第Ⅱ期(表1)。在第2次注射后到第4次注射前的雄鳗群体中,有62.5%,以及第4次注射后到第6次注射前的雄鳗群体中,有87.4%的个体精巢发育到了第Ⅲ期。此时,精小叶增大增厚成圆形,整个精巢呈乳白色,输精导管和输精总管发育完整。组织学特征为:生精囊间有丰富的结缔组织,其中有丰富的微血管网分布;精原细胞分化成初级精母细胞,同时,还可见少量的次级精母细胞;细胞嗜碱性很强,被苏木精染成深蓝色;细胞核仍然很明显,生精囊中空也存在,但明显缩小(图版Ⅰ-3、Ⅰ-4)。少数发育较快的个体,在注射第4针后到注射第6针前的雄鳗样本中,有8.4%的个体精巢已经进入了第Ⅳ期(表1)。

2.1.3 精巢生长期 该时期主要是第6针后到第8针前的雄鳗群体。该时期雄鳗胸围开始增加,部分雄鳗身体颜色由黑转灰,除胸鳍基部保留少部分白色外,其他全部变黑。群体平均体质量为(147 $\pm$ 13.1)g,成熟系数为7.68%(表1)。用手挤压腹部,部分雄鳗生殖孔有少量精液流出。

表 1 日本鳗鲡不同催熟时期精巢组织学特征

Tab.1 The histological characters in different development stages of testis of *A. japonica*

采样 时间 Time of sampling	样本 数 /尾 Number of samples	平均体 质量 /g Average body weight	平均精巢 质量 /g Average testis weight	成熟 系数 /% GSI	精巢发育分期百分比 /%				
					Percent of different development stages of testis				
					第Ⅰ时相 I stage	第Ⅱ时相 II stage	第Ⅲ时相 III stage	第Ⅳ时相 IV stage	第Ⅴ时相 V stage
下海鳗 Magratory eel	30	161±13.8	2.07±0.74	1.29±0.36	73.3	26.7	—	—	—
第 2 针前 Before 2nd inject	16	147±11.9	2.96±0.83	2.01±0.61	25.0	75.0	—	—	—
第 4 针前 Before 4th inject	16	152±11.5	3.71±1.08	2.44±0.79	—	37.5	62.5	—	—
第 6 针前 Before 6th inject	24	150±12.2	7.91±2.06	5.38±1.48	—	4.2	87.4	8.4	—
第 8 针前 Before 8th inject	19	147±13.1	12.13±4.77	7.68±1.95	—	—	26.3	63.2	10.5
催产前 Before in duced	22	158±18.8	21.22±5.74	13.43±3.88	—	—	—	—	100

解剖雄鳗发现,该群体有部分雄鳗精巢仍处在第Ⅲ期,占群体比例的 26.3%。大多数雄鳗的精巢发育明显,精小叶增多、增大和增厚。精巢呈乳白色。组织切片观察发现,精巢中的结缔组织明显减少,精子和次级精母细胞并存,精子到了生精囊外,次级精母细胞在生精囊内,表现出了日本鳗鲡精子发育的非同步性特征,两者极易区别。生精囊壁变得很薄,中空消失(图版 I-5),为第Ⅳ期精巢。此类雄鳗占该时期群体比例的 63.2%。另外有 11.1%的雄鳗精巢发育较快,已达到了第Ⅴ期。

2.1.4 精巢成熟期 该时期的雄鳗精巢发育为人工繁殖的最后时期,一般第 8 针后均能达到这一时期。此时雄鳗身体变灰,胸鳍完全变黑,胸围扩大,体质量增加。少数发育好的个体,精巢轮廓隐约可见。当提起雄鳗头部时,精液可从生殖孔中自然流出。群体的平均体质量为 (158±18.8)g,平均成熟系数达到 13.43% (表 1)。

组织切片发现,生精囊瘪小,次级精母细胞很少。大量精子从生精囊中流出,形成窝旋流动状。高倍相差显微镜下,可看见精子头尾分明(图版 I-6)。

2.2 人工诱导日本鳗鲡卵巢发育组织学特征
日本鳗鲡卵巢位于肠道背部、肾脏两侧,左右不对称。长的一侧可达到生殖孔后 5~8 cm 处,短的一侧在生殖孔处与另一侧汇合。表面无被膜包裹,无卵巢腔,属裸状卵巢。卵巢基底部由结缔组织和

平滑肌与腹腔上皮相连系。日本鳗鲡的卵巢由许多叶片状结构组成,叶片的上半部呈半圆形,呈覆瓦状整齐排列成一行。叶片上部可以相互分开,基部则彼此由结缔组织及平滑肌连接在一起。卵细胞在叶片上生长发育直至成熟,当卵细胞外围的滤泡膜破裂后,成熟卵落入体腔,后由生殖孔排出体外。日本鳗鲡在产卵前,生殖孔会扩开,最大时直径可达 1 cm 以上。

日本鳗鲡需要外源激素的诱导,其卵巢才能逐渐发育成熟^[1-3]。本实验中,日本鳗鲡卵巢需 110~160 d 才能发育成熟,集中成熟的高峰期为 120~140 d。与精巢发育相同,卵巢发育的过程也分为了以下 4 个时期描述。但细胞生物学时相划分则按照林鼎等^[5]的描述分期。

2.2.1 卵巢发育适应期 这一时期的群体主要见于由刚捕到的下海鳗和第 3 次注射激素前的雌鳗组成。群体的平均体质量为 521~578 g,成熟系数为 1.94%~2.70% (表 2)。注射外源激素后,性腺发育不明显。但体色,特别是胸鳍和尾部边缘颜色会明显加深,变黑。

解剖发现,在下海鳗群体中,有占群体比例 13.3% 的个体处于卵巢发育的第Ⅱ期。其卵巢呈一细线,肉红色,覆瓦状的叶片结构尚未出现。组织切片观察发现,这类卵巢主要是由初级卵母细胞组成,平均细胞直径为 78.3 μm,平均核径 45.6 μm (表 3)。细胞核大,核内有 1~2 个大的核仁和几个较小

的核仁,平均核仁数为3~8。在高倍显微镜下,大核仁中可见灯刷状染色体。细胞质中具有强嗜碱性颗粒状结构。细胞膜外有一层长梭形的滤泡细胞包围(图版Ⅱ-1)。

下海鳗中86.7%的个体和注射第3针前的全部个体处于卵巢发育的第Ⅲ期,其卵巢呈扁平带状,有较多的微血管分布,白色或淡红色。平均卵巢宽(1.4 ± 0.3) cm,平均成熟系数为2.7%(表2),覆瓦

状的叶片结构出现。组织切片观察发现,覆瓦状的叶片结构由单层或双层卵母细胞组成(图版Ⅱ-2)。细胞平均直径为132.1 μ m,平均核径为58.1 μ m(表3)。此时的卵母细胞中出现了1层或多层脂肪泡层,脂肪泡大而疏松。细胞核大,圆形,核内有许多小的核仁,位于核膜内侧边缘,一般在30个以上。核内偶尔还可见一个或一较大的空泡。卵膜外出现双层滤泡膜(图版Ⅱ-3)。

表2 日本鳗鲡不同催熟时期卵巢组织学特征

Tab.2 Histological characters at different development stages of ovary of *A. japonica*

取样时间 Sampling time	样本数/尾 Number of samples	平均体质量/g Average body weight	平均卵巢质量/g Average ovary weight	平均卵巢长/cm Average ovary length	平均卵巢宽/cm Average ovary width	成熟系数/% GSI
下海鳗 Magratory eel	30	578 $\pm$ 24.8	10.07 $\pm$ 2.36	27.3 $\pm$ 5.41	1.1 $\pm$ 0.24	1.94
第3针前 Before 3rd inject	18	521 $\pm$ 28.5	16.46 $\pm$ 2.10	28.6 $\pm$ 5.33	1.4 $\pm$ 0.30	2.70
第5针前 Before 5th inject	21	579 $\pm$ 23.9	26.45 $\pm$ 2.22	28.5 $\pm$ 5.17	1.7 $\pm$ 0.23	4.76
第8针前 Before 8th inject	14	556 $\pm$ 27.1	38.42 $\pm$ 8.96	27.9 $\pm$ 5.60	2.0 $\pm$ 0.17	7.02
第10针前 Before 10th inject	19	547 $\pm$ 21.3	59.32 $\pm$ 10.05	29.9 $\pm$ 5.11	2.7 $\pm$ 1.06	10.85
第12针前 Before 12th inject	18	535 $\pm$ 20.8	106.48 $\pm$ 27.62	30.1 $\pm$ 5.31	4.3 $\pm$ 1.39	19.90
催产前 Before in duced	22	495 $\pm$ 19.4	247.15 $\pm$ 48.14	29.8 $\pm$ 5.25	7.8 $\pm$ 1.94	49.93

表3 日本鳗鲡不同发育时期细胞学特征

Tab.3 Cytological characters at different development stages of ovary of *A. japonica*

取样时间 Sampling time	平均卵径/ μ m Dia.of oocyte	平均核径/ μ m Dia.of nucleus	平均核仁数/个 No.of nucleolus	脂肪泡层厚度/ μ m Thickness of fat vesicle	卵巢发育分期百分比/% Percent of different development stages of ovary			
					第Ⅱ时相 Ⅱ stage	第Ⅲ时相 Ⅲ stage	第Ⅳ时相 Ⅳ stage	第Ⅴ时相 Ⅴ stage
下海鳗 Magratory eel	78.3	45.6	3~8		13.3	86.7		
第3针前 Before 3rd inject	132.1	58.1	>30	35.6		100		
第5针前 Before 5th inject	201.6	77.2	>20	42.8		90.5	9.5	
第8针前 Before 8th inject	280.5	97.4	16~24	69.2		64.3	35.7	
第10针前 Before 10th inject	405.9	112.5	7~13	96.4		15.9	84.1	
第12针前 Before 12th inject	586.8	119.3		84.5			88.9	11.1
催产前 Before induced	749.3	126.1						100

2.2.2 卵巢发育启动期 该时期主要见于指第3次注射后到第8次注射前的雌鳗群体。该群体的体质量已停止下降,并有逐渐回升的趋势。群体的平均体质量为556~579 g,卵巢宽度为1.7~2.0 cm,成熟系数为4.76%~7.02%(表2)。与此前的卵巢相比,在形态特征上无明显变化,但卵巢开始加宽增厚。雌鳗除体色、胸鳍边缘和尾部边缘颜色进一步加深外,外形无明显变化。

组织切片观察发现,在第3次注射后到第5次注射前的雌鳗群体中,有90.5%的个体卵巢还处在第Ⅲ期,注射第5针后到注射第8针前的雌鳗群体中,也有64.3%的个体卵巢处在第Ⅲ期(表3)。因此,这一时期的雌鳗主要以第Ⅲ期卵巢为主。但在注射第3针后到注射第5针前的雌鳗群体和注射第5针后到注射第8针前的雌鳗群体中,分别有9.5%和37.5%的雌鳗卵巢达到了第Ⅳ期初。此时的卵径为201.6~280.5 μm ,核径为77.2~97.4 μm ,核仁数可数,一般在16~24以上。最明显的特征是脂肪泡层厚度增加,一般为42.8~69.2 μm (表3)。脂肪泡由内向外逐渐变小,且排列紧密。核周围外缘会出现一些较大的嗜碱性较强的颗粒。卵黄颗粒由外向内逐渐充满细胞质(图版Ⅱ-4、5、6)。

2.2.3 卵巢生长期 该时期主要见于第8次注射后到第12次注射前的雌鳗群体。该群体雌鳗胸围开始增加,身体颜色从侧线处被明显区分开来,身体背部呈黑灰色,腹部呈白色。胸鳍除基部保留少部分白色外,其他全部变黑。群体平均体质量为535~547 g,成熟系数为10.85%~19.9%(表2)。

解剖发现,此阶段卵巢发育明显,卵巢宽度为2.7~4.3 cm。部分发育较快的雌鳗已可见透明的卵粒镶嵌在乳白色的卵巢中。第8次注射后到第10次注射前的群体中除有少数个体卵巢仍处在第Ⅲ期外,其他个体均已进入第Ⅳ期。但与启动期的卵巢有所不同,此时的卵母细胞直径明显增大,为405.9~586.8 μm 。第10次注射前的个体还有少数卵母细胞核内侧边缘具7~13个核仁,第10次注射后核仁已全部消失。核有开始边移的迹象。虽然脂肪泡层厚度比此前的卵母细胞有所增加,平均达到了96.4 μm ,但之后又开始减少,到第12次注射前只有84.5 μm 。而且,脂肪泡进一步松散,大小不均,分布也不均匀。卵膜出现明显的放射纹,滤泡膜仍是双层结构(图版Ⅱ-7、8)。此时的卵巢应为第Ⅳ时相中、晚期。

2.2.4 卵巢成熟期 这一时期的卵巢在日本鳗鲡卵巢整个发育过程中所占的时间很短。往往在第12次注射后3~5天内,雌鳗就完成了卵母细胞的最后成熟过程。如果对第12次注射剂量和方法进行适当调整,可相对延长此段时间。但从核开始向边上移动到胚泡破裂完成,整个过程约46~60 h,柳凌等^[3]对此过程进行过详细描述。

此时期雌鳗外形变化很大,最明显的是胸围迅速扩大,一般在2~3 d内可从10 cm达到14~16 cm以上。卵巢轮廓十分明显,完全成熟时,卵巢轮廓可达生殖孔后。生殖孔发红,外突,并开始扩张。解剖后发现,卵巢中透明卵粒明显增多,卵巢液也增多。平均卵巢宽达到7.8 cm,平均卵巢质量达247.15 g,几乎占整个鱼体质量的一半以上(表2)。

组织切片观察,卵母细胞平均直径为749.3 μm ,平均核直径为126.1 μm 。核膜薄,无核仁,核质均匀致密,圆形或卵圆形。核周围为致密的卵黄颗粒,脂肪泡分散,不规则,且大小不一(图版Ⅱ-9)。

产后卵巢几乎无卵细胞,为皱褶的结缔组织组成。期间充满了卵巢液(图版Ⅱ-10)。说明日本鳗鲡属一次性成熟、一次性排卵的鱼类。

3 讨论

虽然人工诱导日本鳗鲡性腺发育的整个过程、以及组织学观察与以前其他学者的研究基本一致^[4-5,7],但作者仍发现一些值得进一步探讨和研究的问题。

3.1 人工诱导日本鳗鲡性腺发育时间

目前的研究表明,日本鳗鲡在人工养殖条件下,必须通过外源激素长期诱导,才能使性腺逐步发育成熟^[7,12]。日本鳗鲡人工诱导性腺发育的研究最初是由Fontaine等^[17]开始,其后经历了许多学者的不断改进和发展,使日本鳗鲡人工诱导性腺发育的药物、剂量、方法等都发生了很大变化^[13-16]。这些改进最终导致了人工诱导日本鳗鲡性腺发育的时间发生了变化。Fontaine最初用了90天使卵巢发育成熟^[17]; Yamamoto^[18]用了63~105 d;王义强等^[7]用了105 d; Lin等^[14]用了110 d左右; Tanaka等^[16]用了110~120 d;而本研究则用了120~140 d,最长达160 d。整个卵巢发育时间成逐渐延长的趋势。同样的药物、剂量和方法精巢的发育时间比卵巢短,但随着卵巢发育时间的延长,精巢发育的时间也在相应延长。究竟人工诱导日本鳗鲡的性腺发育时间

长更有利于幼苗的发育,还是短更有利,目前尚无定论。但依据报道发现,从回到河口的仔鳗耳石推算日本鳗鲡在自然界的产卵高峰期应该在每年的6月中下旬^[19]。也就是说,按日本鳗鲡每年12月中旬下海开始性腺发育计算,在自然界,日本鳗鲡在海洋中的性腺发育时间应该在180 d以上。由此看来,目前人工诱导日本鳗鲡性腺发育的时间远远没有达到其在自然界性腺发育所需的时间。这是否就是日本鳗鲡幼苗不能存活的原因之一,尚待进一步研究。

3.2 早期精巢发育群体组成

日本鳗鲡属降海洄游性鱼类。有报道认为,在下海鳗的群体中,雄鳗群体先到达河口,在那里等待雌鳗群体,然后一起游向海洋^[20]。也有报道认为,雄鳗群体一直就生活在河口,直到成熟年龄^[12-13]。林鼎等^[5]认为,下海雄鳗群体的精巢处在精原细胞后增殖期和精母细胞生长期,即第Ⅱ和第Ⅲ时相。而本研究则发现,在下海雄鳗群体中有73.3%的个体,其精巢还处在第Ⅰ时相。

出现这种差异的原因,可能有两种。一是林鼎所采的下海雄鳗样本是真正的下海鳗群体,而本研究所收的下海雄鳗中有部分是生活在河口,但没有到成熟年龄的雄鳗。从采样的地理位置上来看,林鼎是在广东中山的斗门一带,而作者是在其上游80~100 km的江门大傲一带。从人工诱导性腺发育的结果来看,作者对10年来日本鳗鲡人工诱导性腺发育的数据进行统计后分析,雌鳗的催熟率达到了95%以上,但雄鳗的催熟率还不到60%。说明本研究所收的雄鳗中有部分未到达性成熟年龄。如果这个分析是正确的,这也支持了雄鳗群体是一直生活在河口的报道。

另一种可能是,20多年来,气候环境、水质环境、资源环境、甚至地理环境都可能发生了变化,这些变化有可能导致日本鳗鲡的种群结构和生活方式发生变化。造成这种差异的原因有待更深入的研究。

3.3 脂肪泡的形成、变化过程

关于日本鳗鲡卵巢发育的整体情况,本研究结果与林鼎的描述基本一致。但也存在着一些差异,尤其是脂肪泡的形成和变化过程。按照林鼎的描述,日本鳗鲡的脂肪泡出现在卵巢发育的第Ⅲ时相,此时卵母细胞直径为166.2~184.3 μm,而且是单层脂肪泡^[5]。但研究结果发现,当脂肪泡出现时,卵母细胞的平均直径为78.3~132.1 μm,远远小于林鼎的描述,且脂肪泡是2~3层。更主要的是,林

鼎认为在卵母细胞成熟后期,脂肪泡集中成2~3个大的油球。而作者则发现,虽然在卵母细胞成熟后期,脂肪泡有集中的趋势,但并未集中,只是变成大小不一、厚度不一、不规则的脂肪泡。而且当卵子产出后,其油球也是不可数的,要直到原肠中晚期,油球才逐渐集中成一个大油球。这不仅与林鼎的描述存在很大差异,而且与王义强等^[7]、Tagawa等^[11]、多部田修等^[12]的研究结果也存在差异。作者认为,这可能与雌鳗卵巢催熟的时间有很大关系。造成这种差异的原因有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 谢刚. 鳗鲡苗种人工繁育的研究概况及其展望[J]. 水产学院学报, 2001, 16 (1): 42-48.
- [2] 柳凌, 郭峰, 张洁明, 等. 外源激素及环境因子对日本鳗鲡卵巢发育的影响[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12 (1): 6-11.
- [3] 柳凌, 郭峰, 张洁明, 等. 日本鳗鲡排卵的人工诱导[J]. 中国水产科学, 2005, 12 (1): 49-55.
- [4] 山本喜一郎, 大森正明, 山内皓平. 日本 *ウナギ (Anguilla japonica)* の卵形成について[J]. 日本水産學會志, 1974, 40 (1): 9-15.
- [5] 林鼎, 林浩然. 鳗鲡繁殖生物学研究Ⅲ. 鳗鲡性腺发育组织学和细胞学研究[J]. 水生生物学集刊, 1984, 8 (2): 157-164.
- [6] 林鼎, 林浩然, 黄奕华, 等. 鳗鲡繁殖生物学研究I. 下海鳗鲡雌雄性状差异和鉴别[J]. 水生生物学集刊, 1977, 6 (2): 177-188.
- [7] 王义强, 赵长春, 施正峰, 等. 河鳗人工繁殖的初步研究[J]. 水产学报, 1980, 4 (2): 147-158.
- [8] Lin H R, Xie G, Zhang L H, et al. Artificial induction of gonadal maturation and ovulation in the Japanese eel [J]. Bull Fr Peche Piscic, 1998, 349: 163-176.
- [9] Scott A P, Sheldrick E L, Flint A P F. Measurement of 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one in plasma of trout (*Salmo gairdneri* Richardson): Seasonal changes and response to salmon pituitary extract. [J]. J Comp Endocrinol, 1982, 46: 444-451.
- [10] Kagawa H, Tanaka H, Ohta H, et al. Recent progress of research on larvae production of Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. Su-isnashoku, 2001, 49: 127-132.
- [11] Tanaka H, Kagawa H, Ohta H. Production of leptocephali of Japanese eel (*Anguilla japonica*) in captivity [J]. Aquaculture, 2001, 201: 51-60.
- [12] 多部田修. ウナギの初期生活史と種苗生産の展望 [M] // 雌の成熟促進技術. 东京: 恒星社厚生閣, 1996: 95-107.
- [13] 黄大明, 陈世群. 鳗鲡的生活史和人工育苗技术探讨[J]. 生物工程进展, 1997, 17 (2): 3-12.
- [14] Lin H R, Xie G, Zhang L H, et al. Artificial induction of gonadal maturation and ovulation in the Japanese eel [J]. Bull Fr Peche Piscic, 1998, 349: 163-176.
- [15] Yamauchi K. Studies of gonadal steroids involved in final gonadal

- maturation in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, a review [J]. Int Revue Gesamten Hydrobiol, 1990, 75: 859–860.
- [16] Tanaka H, Ohta H, Kagawa H. Development of techniques for artificial induction of maturation and rearing larvae of Japanese eel [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 2000, 66: 623–626.
- [17] Fontaine M, Bertrand E, Lopez E et al. Sur la maturation des organes genitaux de l'Anguille femelle (*Anguilla anguilla* L.) et l'emission spontanee des oeufs en aquarium [J]. C R Acad Sci Pari, 1964, 259: 2 907–2 910.
- [18] Yamamoto K, Yamauchi K. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium [J]. Nature, 1974, 251, 220–222.
- [19] Tsukamoto K. Otolith daily increments in the Japanese eel [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1989, 55 (6): 1 017–1 021.
- [20] 朱洗. 鱼类的生殖及子代的发育、生长与变态 [M]. 北京: 农业出版社, 2000: 75–78.

Histological study on artificial induction of gonadal development in Japanese eel *Anguilla japonica*

ZHANG Jie-ming, LIU Ling, GUO Feng, ZHANG Tao

(Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources and Biotechnology, Yangtse River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jinzhou 434000 China)

Abstract: The experiment focused on the course of gonadal development under the condition of artificially inducing gonadal maturation in Japanese eel (*Anguilla japonica*). The methods used in this experiment included morphologic investigation of breedstock, anatomical observation of gonad characteristics, histological section of development stages of the gonad under artificial inducement condition, statistic analysis on the histological and cytological parameters, as well as description about characteristics of gonad at different development stages.

The results indicated that the testis development of Japanese eel could be divided into 5 stages under the condition of artificial inducement: early multiplication of spermtogonia (stage I); late multiplication of spermtogonia (stage II); growth and maturation of spermatocyte (stage III); initial appearance of spermatozoa (stage IV) and complete maturation of spermatozoa (stage V). Except 73.3% males in the population of wild bloodstock whose testis belonging to first stage, there were not too much difference on the course of development and histological character of testis between this experiment and the studies before. Under artificial inducing condition, the testis development was divided into four phases by the author according to its histological and cytological characters, which were testis adapting phase (from wild bloodstock to the time before the second injection); testis pre-development phase (from second injection to the time before sixth injection); testis growth phase (from sixth injection to the time before eighth injection) and testis maturation phase (from eighth injection to spermiation).

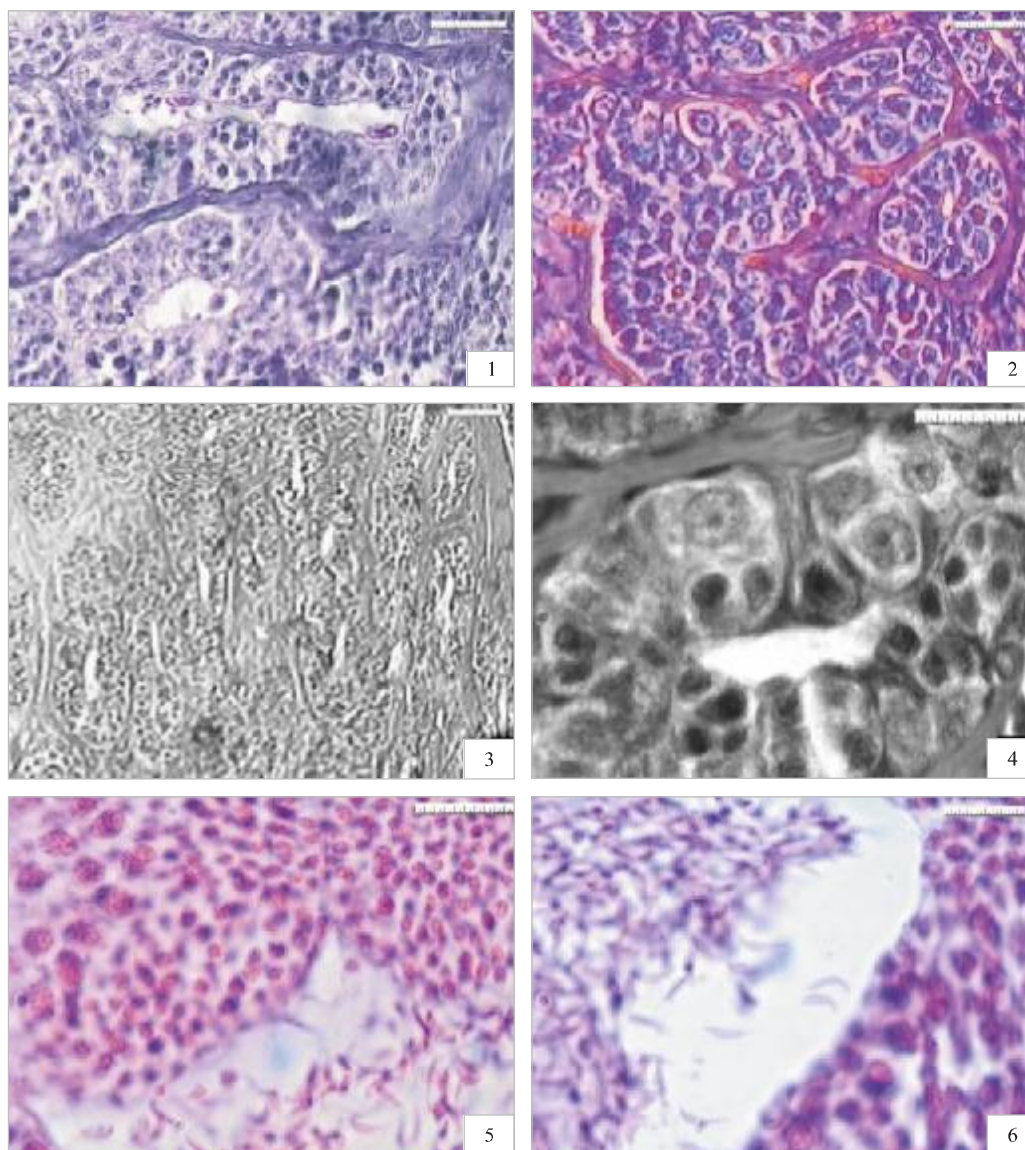
Comparing with composition of male wild bloodstock, there was no ovary of first stage in the female wild bloodstock. Therefore, development of ovary started at the second stage under the condition of artificial inducement, which included oocyte with follicular epithelium stage; oocyte with adipose vesicle stage; oocyte filled with yolk and oocyte with migratory nucleus four stages. However, the ovary development was divided into four phases also by the author according to its histological and cytological changes, which were ovary adapting phase (from wild bloodstock to the third injection before); ovary pre-development phase (from third injection to the time before eighth injection); ovary growth phase (from eighth injection to the time before twelfth injection) and ovary maturation phase (from twelfth injection to spawn). Their histological and cytological characters were detailedly described, and the problems of the time needed by gonadal maturation under the condition of artificial inducement, the composition of wild bloodstock and the growth of adipose vesicle also were discussed for further study. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (4): 593–601]

Key words: *Anguilla japonica*; artificial induction; gonadal development

Corresponding author: LIU Ling. E-mail: Liul@yfi.ac.cn

张洁明等:人工诱导日本鳗鲡性腺发育组织学研究

ZHANG Jie-ming et al: Histological study on artificial induction of gonadal development in Japanese eel *Anguilla japonica*



图版 I

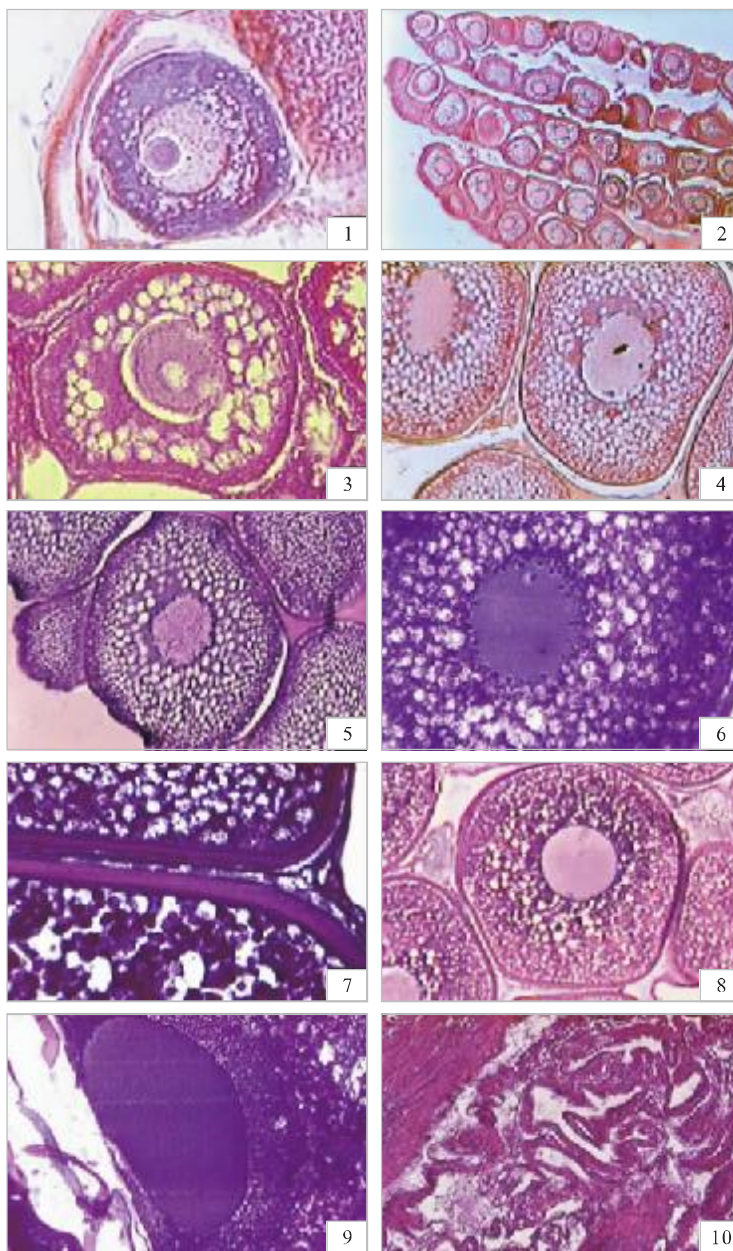
1: 精原细胞增殖前期, $\times 200$; 2: 精原细胞增殖后期, $\times 200$; 3: 精母细胞生长期, $\times 100$, 显示发达的结缔组织; 4: 精母细胞生长期, $\times 1000$; 5: 精子出现期, $\times 400$; 6: 精子成熟期 $\times 400$.

Plate I

1: Early multiplication of spermtogonia $\times 200$; 2: Late multiplication of spermtogonia $\times 200$; 3: Growth and maturation of spermatocyte, showing developed connective tissue, $\times 100$; 4: Growth and maturation of spermatocyte, $\times 1000$; 5: Initial appearance of spermatozoa, $\times 400$; 6: Complete maturation of spermatozoa $\times 400$.

张洁明等:人工诱导日本鳗鲡性腺发育组织学研究

ZHANG Jie-ming et al: Histological study on artificial induction of gonadal development in Japanese eel *Anguilla japonica*



图版 II

1: 卵母细胞单层滤泡期, $\times 200$; 2: 脂肪泡出现期卵巢, 示卵巢小叶, $\times 50$; 3: 脂肪泡出现期, $\times 200$; 4: 卵黄充满期, 示细胞质中嗜碱性颗粒, $\times 200$; 5: 卵黄充满期, $\times 100$; 6: 卵黄充满期, 示核仁, $\times 400$; 7: 卵母细胞最后成熟期, 示放射状膜结构, $\times 400$; 8: 卵母细胞最后成熟期, 示核开始极化, $\times 50$; 9: 示核极化完成, $\times 100$; 10: 产后卵巢, $\times 100$.

Plate II

1: Oocyte with follicular epithelium stage, $\times 200$; 2: Showing the foliole structure of ovary, $\times 50$; 3: Oocyte with adipose vesicle stage, $\times 200$; 4: Oocyte filled with yolk, showing the granule for basic dyes, $\times 200$; 5: Oocyte filled with yolk, $\times 100$; 6: Oocyte filled with yolk, showing many small nucleolus, $\times 400$; 7: Oocyte with migratory nucleus, showing actinomorphic structure of membrane, $\times 400$; 8: Showing the nucleolus beginning to migrate, $\times 50$; 9: Showing the completion of migratory nucleus, $\times 100$; 10: Ovary after spawning, $\times 100$.