

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17428

养殖金乌贼卵子发生和卵巢发育的组织学观察

尹亚南^{1,2,3}, 刘长琳², 胡鹏², 张金勇^{2,3,4}, 柳淑芳^{2,3}, 庄志猛², 薛同明⁵

1. 上海海洋大学 水产与生命学院 上海 201306;
2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266200;
4. 南京农业大学 无锡渔业学院 江苏 无锡 214081;
5. 青岛金沙滩水产开发有限公司 山东 青岛 266000

摘要: 为了深入了解金乌贼(*Sepia esculenta* Hoyle)的生殖生理特性, 本研究采用解剖学方法及组织切片技术, 观察和描述了金乌贼卵巢形态和卵子各个时相结构特征及其变化规律。研究表明, 金乌贼卵子发生过程的主要特征表现为, 卵子成熟之前滤泡细胞一直存在且伴随着其结构变化, 滤泡细胞解体与卵黄物质出现同步发生, 卵黄物质从无到有再到大量积累直至充满整个卵母细胞, 细胞核则随着滤泡细胞内折逐渐发生偏移直至最后消失。研究还发现金乌贼卵巢内卵子发生不同步且形态差异显著, 未成熟的卵子粘连在卵巢基质上, 依次环布于卵巢基质周围, 越靠近中心, 卵母细胞发育程度越低; 成熟后的卵子游离在卵巢腔中, 经过输卵管排出体外。根据卵巢内卵子的大小和形态、滤泡细胞形态及卵黄形成情况, 将金乌贼卵子发生分为增殖期(卵原细胞期)、小生长期(无滤泡期, 单层滤泡期, 双层滤泡期)、大生长期(滤泡内折期, 卵黄形成早期, 卵黄形成晚期)、成熟期、退化吸收期共 5 个时期 9 个时相。卵巢发育分期则是以卵子时相为基础, 根据卵巢的外观形态、性腺系数以及切面上优势卵子的时相, 把卵巢分为 I~VI 共 6 个时期。金乌贼卵巢发育和卵子发生的动态观察与描述, 对丰富头足类繁殖生物学理论及提升人工繁殖技术都具有重要意义。

关键词: 金乌贼; 卵子发生时相; 卵巢发育分期; 组织学特征; 解剖学特征

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)03-0503-09

金乌贼(*Sepia esculenta* Hoyle)属于软体动物门(Mollusca)、头足纲(Cephalopoda)、鞘亚纲(Coleoidea)、乌贼目(Sepiida)、乌贼科(Sepiidae), 俗称乌鱼、墨鱼, 为中国近海常见暖温性大型经济头足类^[1]。金乌贼具有生命周期短、食性广、生长迅速、食用和药用价值高等优点, 是中国海洋渔业重要捕捞对象, 但近些年来由于过度捕捞、产卵场破坏和环境污染等原因, 金乌贼资源量明显衰退^[2]。为保护和修复金乌贼种质资源, 研究人员在金乌贼繁殖生物学和人工繁育技术方面相继开展了繁殖行为与交配^[3]、亲体驯养^[4]、人工

孵化与培育^[5]和胚胎发育^[6]等研究, 并成功实现了金乌贼的全人工育苗^[7]。

卵子发生是动物繁殖的基础, 卵子发育的情况直接影响到受精卵的发育^[8], 系统地研究卵子发生及卵巢发育, 对丰富繁殖生物学理论及提升人工繁殖技术都具有重要意义。国外自 20 世纪 90 年代先后对尖盘艾尔斗蛸(*Eladone cirrhosa*)^[9]、福氏枪乌贼(*Loligo forbesi*)^[10]、巴塔哥尼亚乌贼(*Loligo gahi*)^[11]、狼乌贼(*Lycoteuthis lorigera*)^[12]等几种头足类的卵巢发育进行了系统研究; 国内相关研究起步较晚, 对曼氏无针乌贼(*Sepiella*

收稿日期: 2017-12-01; 修订日期: 2018-01-12.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672645); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(20603022016001); 山东省泰山学者建设工程专项.

作者简介: 尹亚南(1992-), 女, 硕士研究生, 从事海洋生物学研究. E-mail: Yinyin1992@163.com

通信作者: 柳淑芳, 研究员, 从事海洋生物学研究. E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

maindroni)^[13]、长蛸(*Octopus variabilis*)^[14]和拟目乌贼(*Sepia lycidas*)^[15]的卵巢发育已进行了详细的分期研究。关于金乌贼的性腺发育,郝振林^[16]曾观察了金乌贼的性腺发育和卵子发生,但并未研究金乌贼的卵巢周期发育。本研究通过跟踪观察金乌贼卵巢周期发育和卵子发生过程,利用解剖学和组织学方法,详细描述了金乌贼各阶段卵巢的形态特征、发育规律和各个时相卵子的结构特征及其动态变化过程,并对卵巢发育和卵子发生过程进行了分期,旨在深入了解雌性金乌贼的生殖生理特性,为其人工繁育和资源增殖提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

金乌贼野生幼体于 2015 年 9 月捕捞自山东青岛沿海,经过 1 年人工培育性成熟并自然交配,于 2016 年 8 月获得受精卵。受精卵在水温 19~20℃,盐度 29~30 条件下孵化 30 d 后,获得初孵幼体。从 2016 年 9 月~2017 年 7 月跟踪观察性腺发育,幼体和成体培育水温为 20~23℃,盐度 29~30,0~30 日龄投喂活体糠虾,30 日龄后投喂活体小虾和小鱼,每天投喂 2 次,每次投饵至饱食。投喂前取样,0~60 日龄,每 10 天取样 1 次,样品共 6 批次;60 日龄后,每 30 天取样 1 次,样品共 8 批次,每次随机取样 10 尾。分离雌性个体的卵巢组织,浸入 Davidesons 固定液中,固定 24 h 后保存于 70%酒精备用。对于无法分离性腺的幼体,采取整尾固定。

1.2 实验方法

1.2.1 金乌贼样品处理 记录金乌贼日龄(age in days),游标卡尺测量胴背长(doral mantle length, DML),电子天平称量体重(W)。

沿金乌贼腹面胴部中线剪开,分离雌性生殖系统,观察并记录卵巢发育的形状、颜色以及发育程度,电子天平称量卵巢重(W_o),用显微镜测量卵细胞的直径及其细胞核直径。

1.2.2 组织切片制作与观察 使用乙醇对固定好的卵巢组织进行梯度脱水,再用二甲苯使卵巢组织透明,最后进行石蜡包埋。利用切片机对包埋

好的样品进行连续切片,切片厚度为 4~7 μm ,苏木精-伊红(HE)染色,并用中性树胶封片。

I~III 期卵巢发育过程和卵子发生过程用 OLYMPUS DP72 光学显微镜观察并拍照,IV~VI 期卵巢发育过程用 LEICA S8P0 解剖镜观察并拍照。

1.2.3 数据处理 根据金乌贼体重(W)和卵巢重(W_o)计算性腺指数(GI),公式如下:

$$GI(\%) = W_o/W \times 100$$

2 结果与分析

2.1 卵子发生过程及其形态和结构特征

根据卵子的大小和形态、滤泡细胞形态及卵黄的形成情况,将金乌贼的卵子发生分为增殖期(卵原细胞期)、小生长期(无滤泡期,单层滤泡期,双层滤泡期)、大生长期(滤泡内折期,卵黄形成早期,卵黄形成晚期)、成熟期和退化吸收期,共 5 个时期 9 个时相(表 1)。

(1)增殖期 卵原细胞形状不规则或近圆形,长径 $\leq 24.18 \mu\text{m}$;细胞质较少,细胞核大而明显,核膜清晰,呈圆形,直径 $\leq 16.24 \mu\text{m}$,核仁染色较深(图 1a)。滤泡细胞呈散乱状态分布在卵原细胞的周围,染色呈深蓝。

(2)小生长期 随着卵巢的发育,卵原细胞进入第一次减数分裂初期,发育成为卵母细胞,此时细胞质不断积累,细胞核增大,卵母细胞体积随之增大;同时,滤泡细胞开始增殖并包裹卵母细胞。根据滤泡细胞的分布又将此阶段分为无滤泡期、单层滤泡期和双层滤泡期 3 个时相。

无滤泡期 卵母细胞呈圆形或椭圆形,长径 34.65~72.59 μm 。细胞质嗜弱酸性,细胞核呈圆形,直径 22.56~46.44 μm ,核膜清晰明显,核质分布均匀。滤泡细胞呈聚集状态分布在卵母细胞周围(图 1b),呈扁平状或长梭形,长为 3.77~5.56 μm ,细胞核较大,呈嗜碱性。

单层滤泡期 卵母细胞体积增大,呈圆形或椭圆形,长径 73.78~103.08 μm 。细胞核呈圆形,直径 36.49~62.21 μm 。随着卵母细胞的不断增大,滤泡细胞数目增多,扁平状滤泡细胞长为 5.56~8.13 μm ,并附于细胞膜上,包裹整个卵母细胞,形成了单层滤泡细胞层(图 1c)。

表 1 金乌贼卵子发生过程中的形态和结构特征

Tab. 1 Characteristics of morphology and structure of oogenesis in *Sepia esculenta* Hoyle

卵子时相 oogenesis phase	卵子发生分期 stage of oogenesis	卵子长径/ μm length-diameter of egg	卵子特征 characteristics of oogenesis
卵原细胞期 oogonia phase	增殖期 proliferative stage	≤ 24.18	卵原细胞形状不规则或近圆形, 滤泡细胞呈散乱状态分布在卵原细胞的周围
无滤泡期 free follicular cell phase	小生长期 small growing stage	34.65–72.59	卵原细胞进入第一次减数分裂初期发育成为卵母细胞, 滤泡细胞呈聚集状态分布在卵母细胞周围
单层滤泡期 single follicular cell phase		73.78–106.16	滤泡细胞包裹整个卵母细胞, 形成了单层滤泡细胞层
双层滤泡期 double follicular cell phase		140.09–208.18	滤泡细胞继续增多, 增加一层滤泡细胞形成双层滤泡细胞层
滤泡内折期 follicle penetration phase	大生长期 large growing stage	174.57–335.08	滤泡细胞开始嵌入卵母细胞, 并彼此连接在一起, 形成网状结构; 卵母细胞的细胞核开始偏移
卵黄形成早期 pre-vitellogenesis phase		713.85–1328.75	滤泡细胞内折区逐渐积累颗粒状卵黄物质, 滤泡细胞开始解体; 卵母细胞的胞细胞核完成偏移
卵黄形成晚期 late-vitellogenesis phase		2659.62–4083.78	大部分滤泡细胞解体, 内部充满了块状的卵黄物质; 卵母细胞的细胞核消失
成熟期 mature phase	成熟期 mature stage	4979.92–6870.67	滤泡细胞已经完全解体, 卵母细胞内部充满了大量的卵黄物质
退化吸收期 resorbing oocyte phase	退化吸收期 resorbing stage	—	滤泡细胞并未解体, 而是数量增多, 体积增大, 排列不规则, 聚集成群

注: “—”表示未获得数据。
Note: “—”showing data were not obtained.

双层滤泡期 卵母细胞呈椭圆形, 长径 140.09~208.18 μm 。细胞核呈椭圆形, 长径 46.44~66.67 μm , 核膜明显但不平整, 核质分布不均匀, 核仁不明显。滤泡细胞继续向卵母细胞靠拢, 形成双层滤泡细胞层(图 1-4), 内层滤泡细胞呈圆形或椭圆形, 长径为 3.74~6.66 μm , 外层滤泡细胞则呈扁平状, 长径为 4.71~7.56 μm , 排列较稀疏(图 1d)。

(3)大生长期 此时的卵母细胞进入快速生长阶段, 细胞体积增大, 内层滤泡细胞层折入卵母细胞内部, 并逐渐占据整个卵母细胞, 卵黄物质开始积累。根据滤泡内折所导致的卵母细胞结构变化和卵黄物质的积累情况, 将此阶段分为滤泡内折期、卵黄形成早期和卵黄形成晚期 3 个时相。

滤泡内折期 卵母细胞呈椭圆形, 长径 174.57~335.08 μm 。细胞核开始向一侧偏移, 直径 70.01~98.61 μm 。内层滤泡细胞增殖旺盛, 向卵母细胞内折, 形成 7~12 个指状突起(图 1e), 突起长度 12.25~36.58 μm , 部分突起形成分支, 并彼此连接在一起, 形成网状结构(图 1e)。

卵黄形成早期 卵母细胞体积迅速增大, 呈

长椭圆形, 长径 713.85~1328.75 μm 。细胞核完成偏移, 体积有所减小, 直径 66.41~82.49 μm 。滤泡细胞占据整个卵母细胞, 形成复杂的网状结构, 将细胞质分成了不同的内折区, 内折区逐渐积累颗粒状卵黄物质, 嗜酸性增强(图 1f); 但是随着卵母细胞的生长, 网状结构内的部分滤泡细胞开始解体。

卵黄形成晚期 卵母细胞长径 2659.62~4083.78 μm 。细胞核消失, 网状结构内的大部分滤泡细胞已经解体, 内折区充满了块状的卵黄物质, HE 染色呈粉红色(图 1g)。

(4)成熟期 成熟的卵子游离在卵巢腔内, 呈半透明状卵圆形, 淡黄色(图 3b), 细胞长径达到最大值 4979.92~6870.67 μm 。组织切片显示, 滤泡细胞已经完全解体, 网状结构消失, 卵母细胞内部充满了大量的卵黄物质(图 1h)。

(5)退化吸收期 卵巢上无法正常发育成熟的卵母细胞将会退化并被吸收。肉眼观察发现, 退化的卵母细胞表面没有光泽, 形状不规则; 组织切片显示, 卵母细胞内的滤泡细胞并没有解体,

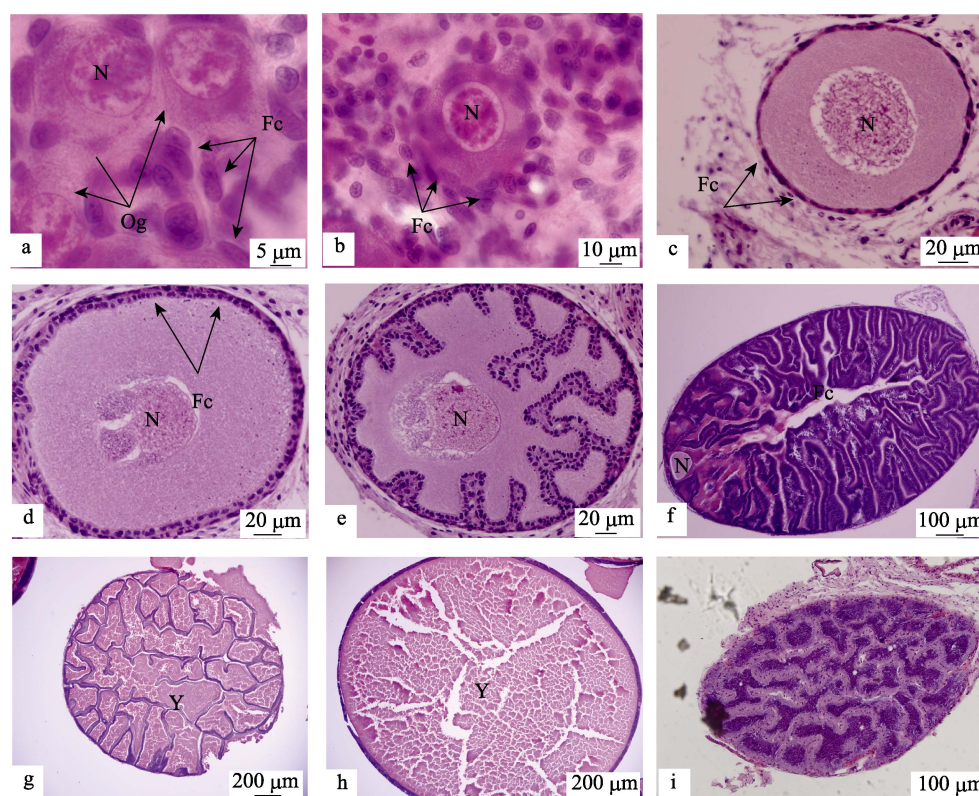


图 1 金乌贼卵子发生过程的组织切片观察

- a. 卵原细胞期, 示散乱状态的滤泡细胞和卵原细胞核; b. 无滤泡期, 示聚集状态的滤泡细胞和卵母细胞细胞核;
c. 单层滤泡期, 示单层滤泡细胞和卵母细胞细胞核; d. 双层滤泡期, 示双层滤泡细胞和卵母细胞细胞核;
e. 滤泡内折期, 示内折的滤泡细胞和卵母细胞细胞核; f. 卵黄形成早期, 示滤泡细胞和卵母细胞细胞核;
g. 卵黄形成晚期, 示卵黄物质; h. 成熟期, 示卵黄物质; i. 退化吸收期. Og: 卵原细胞; Fc: 滤泡细胞; N: 细胞核; Y: 卵黄.

Fig. 1 Histological sections of oogenesis in *Sepia esculenta* Hoyle

- a. Oogonia phase, showing disorganized follicular cell and nucleus of oogonia; b. Free follicular cell phase, showing aggregated follicular cell and nucleus of oocyte; c. Single follicular cell phase, showing single follicular cell and nucleus of oocyte; d. Double follicular cell phase, showing double follicular cell and nucleus of oocyte; e. Follicle penetration phase, showing follicular cell and nucleus of oocyte; f. Pre-vitellogenesis phase, showing follicular cell and nucleus of oocyte; g. Late-vitellogenesis phase, showing yolk; h. Mature phase, showing yolk; i. Resorbing oocyte phase. Og: oogonia; Fc: follicular cell; N: nucleus; Y: yolk.

而是数量增多、体积增大, 滤泡细胞排列不规则, 聚集成群(图 1i)。

2.2 金乌贼卵巢的发育过程及其形态和结构特征

关于卵巢的发育分期, 本研究根据卵巢外观形态、性腺指数以及卵子时相, 将金乌贼卵巢发育划分为 I~VI 共 6 个时期(表 2):

I 期卵巢 金乌贼日龄 30~50 d, 体重 48.83~86.91 g, 胴背长 69.51~82.23 mm。卵巢位于胴部最后端, 由于无法将卵巢完整分离, 故性腺指数无法确定。肉眼尚不能观察到卵子形态。组织切片观察, 卵巢有较多的结缔组织, 切面上的卵子主要以卵原细胞期为主(图 2a)。由于日龄 10~20 d 的金乌贼, 从解剖学和组织学上均无法辨别雌雄,

所以未列入卵巢分期中。

II 期卵巢 金乌贼日龄 50~90 d, 体重 81.4~181.02 g, 胴背长 88.8~105.67 mm, 卵巢位于胴部的后端, 乳白色, 性腺指数 0.077%~0.11%。肉眼可见卵粒, 卵子大小相近, 聚集在一起, 不易分离。组织切片观察, 卵巢内的卵子主要以小生长期卵母细胞为主, 其中单层滤泡期占切面卵子总数的 75.25%, 无滤泡期卵子总数的 21.67%, 双层滤泡期所占比例较少(图 2b)。

III 期卵巢 金乌贼日龄 90~150 d, 体重 231.4~275.85 g, 胴背长 124.51~132.3 mm, 其卵巢呈白色, 性腺系数 0.12~0.22%。肉眼可见不同大小的卵粒, 有的为白色略带黄, 卵子依附于卵巢之上,

表 2 金乌贼卵巢发育过程及其形态和结构特征

Tab. 2 Characteristics of morphology and structure of ovarian development in *Sepia esculenta* Hoyle

卵巢分期 stage of ovary	日龄/d age	胴背长/mm doral mantle length	体重/g weight	卵巢重/g ovary weight	性腺指数/% gonadal index	卵巢特征 characteristic of ovary
I	30–50	69.51–82.23	48.83–86.91	–	–	以卵原细胞期为主
II	50–90	88.8–105.67	81.4–181.02	0.09–0.14	0.077–0.11	以单层滤泡期和无滤泡期卵母细胞为主
III	90–150	124.51–132.3	231.4–275.85	0.17–0.35	0.12–0.22	以滤泡内折期卵母细胞为主
IV	150–210	131.63–179.01	373.71–520.67	1.78–10.63	0.32–2.22	以卵黄形成早期和卵黄形成晚期卵母细胞为主
V	210–270	160.85–200.61	549.94–770.31	16.01–40.23	3.51–7.27	以成熟期卵母细胞为主
VI	300	159.69–197.78	393.51–520.67	20.23–28.78	5.14–5.56	以退化吸收期卵母细胞为主

注: “–”表示未获得数据.
Note: “–”shows no data.

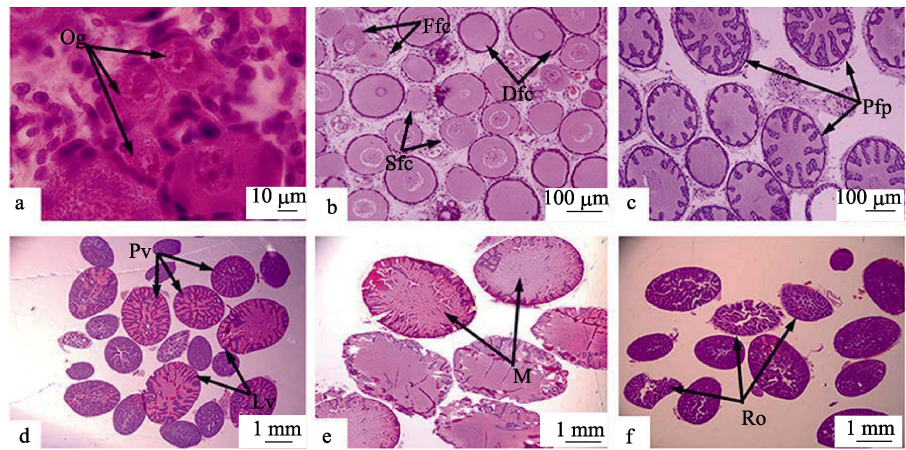


图 2 金乌贼卵巢发育各阶段组织切片观察

a. I 期卵巢, 以卵原细胞期主; b. II 期卵巢, 以无滤泡期和单层滤泡期卵母细胞为主; c. III 期卵巢, 以滤泡内折期卵母细胞为主; d. IV 期卵巢, 以卵黄形成早期和卵黄形成晚期卵母细胞为主; e. V 期卵巢, 以成熟期卵母细胞为主; f. VI 期卵巢, 以退化吸收期卵母细胞为主. Og: 卵原细胞; Ffc: 无滤泡期; Sfc: 单层滤泡期; Dfc: 双层滤泡期; Pfp: 滤泡内折期; Pv: 卵黄形成早期; Lv: 卵黄形成晚期; M: 成熟期; Ro: 退化吸收期.

Fig. 2 Histological sections of ovarian development in *Sepia esculenta* Hoyle

a. Stage I, mainly on oogonia phase; b. Stage II, mainly on oocytes at free follicular cell phase and single follicular cell phase; c. Stage III, mainly on oocytes at phase of follicle penetration; d. Stage IV, mainly on oocytes at pre-vitellogenesis; e. Stage V, mainly on oocytes at late-vitellogenesis phase; f. Stage VI, mainly on oocytes at resorbing oocytes phase. Og: Oogonia; Ffc: Free follicular cell phase; Sfc: Single follicular cell phase; Dfc: Double follicular cel phase; Pfp: Phase of follicle penetration; Pv: Pre-vitellogenesis phase; Lv: Late-vitellogenesis phase; M: Mature phase; Ro: Resorbing oocyte phase.

未观察到游离状态的卵子。组织切片观察显示, 卵巢内的卵母细胞主要以滤泡内折期的为主, 占切面卵子总数的 80.65%(图 2c), 除了滤泡内折期的卵母细胞外, 还有少许小生长期的卵细胞, 卵原细胞的数量更少。

IV 期卵巢 金乌贼日龄 150~210 d, 体重 373.71~520.67 g, 胴背长 131.63~179.01 mm, 其卵巢呈淡黄色, 性腺系数 0.32%~2.22%。肉眼可见体积逐渐增大的卵子, 呈淡黄色, 易于分离, 卵膜上清晰可见的花纹。卵子粘连于卵巢之上,

但生殖腔内游离的成熟卵子并未多见。组织切片显示, 卵巢中主要以卵黄形成早期和卵黄形成晚期卵子为主, 约占 70.68%(图 2d), 其余时相的卵子依次生于卵巢内侧。

V 期卵巢 金乌贼日龄 210~270 d, 体重 549.94~770.31 g, 胴背长 160.85~200.61 mm。卵巢迅速膨胀, 充满胴部后端的体腔(图 3a), 此时卵巢的重量和体积已经达到最大值, 重量 27.82~35.25g, 卵巢整体呈现淡黄绿色, 性腺指数 3.51%~7.27%。卵巢外被基膜, 淡黄色透明状成熟卵子游离在卵

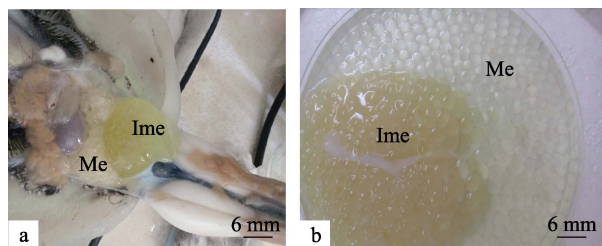


图 3 金乌贼的成熟卵巢

a. 成熟卵巢解剖图, 示成熟卵子和未成熟卵子; b. 成熟卵巢, 示成熟卵子和未成熟卵子. Me: 成熟卵子; Ime: 未成熟卵子.

Fig. 3 Mature ovary of *Sepia esculenta* Hoyle

a. Anatomy of mature ovary, showing mature egg and immature egg; b. Mature ovary, showing mature egg and immature egg. Me: mature egg; Ime: immature egg.

巢腔中(图 3a、3b), 输卵管中也充满了成熟卵粒。组织切片观察显示, 卵巢中主要以成熟期卵子为主, 卵子内部充满了卵黄物质(图 2e), 制作切片时容易破碎。

VI 期卵巢 金乌贼日龄 300 d 后, 体重基本维持 393.51~520.67 g, 胴背长与第 V 期没有显著差异, 基本维持在 159.69~197.78 mm, 体腔后端的卵巢干瘪, 性腺指数 5.14%~5.56%。在这一时期金乌贼已经结束了产卵活动, 产卵消耗了过多的能量, 加上金乌贼产卵之后不再摄食, 所以体重下降。卵巢壁松弛, 韧性较弱。解剖观察, 仍然存在一些未成熟的卵子依附于卵巢基质上; 成熟的卵子大部分已经被排出, 只剩下少数的卵子游离在生殖腔内。组织切片观察显示, 卵巢主要以退化吸收期的卵子为主, 卵子形状不规则(图 2f)。

3 讨论

3.1 金乌贼卵子发生的特点

1939 年苏联学者最早提出将硬骨鱼类卵子发生划分为: 卵原细胞期、单层滤泡细胞期、卵黄泡期、卵黄充满期、成熟期、退化期共 6 个时期^[17], 这一分期标准为中国学者们相继沿用, 但对于不同的物种, 学者们对分期标准进行了调整。在头足类中, Bottke^[18]对锥异尾枪乌贼(*Alloteuthis subulata* Lam)的卵子进行了显微结构和超显微结构分析, 研究表明, 根据滤泡细胞结构变化和卵黄形成情况, 将其卵子发生分为了 3 个阶段: (1)stage I, 无滤泡上层细胞; (2)stage II, 滤泡上层

细胞内折; (3)stage III, 卵膜的出现。Boyle 等^[9]基于卵黄形成的过程将尖盘阿尔斗蛸的卵子分为卵黄形成前期、卵黄形成早期和卵黄形成晚期 3 个阶段。郝振林^[16]根据细胞大小、胞核形态及卵母细胞与滤泡细胞的关系将金乌贼卵子发生分为 8 个时相: 卵原细胞期, 次级卵原细胞期, 滤泡细胞增殖期, 卵黄积累早期, 卵黄积累晚期, 卵黄形成早期, 卵黄形成晚期, 成熟产卵期。本研究发现, 金乌贼卵子发生的特点是, 在卵子成熟前滤泡细胞一直存在并且伴随着相应的结构变化, 细胞核随着滤泡细胞的内折逐渐发生偏移最后消失, 卵黄物质从无到有再到大量积累。因此, 通过参考硬骨鱼类卵子的划分方法^[19-21], 同时结合 Bottke^[18]、Boyle^[9]和郝振林^[16]的分类标准, 本研究对滤泡结构的变化过程进行了更为细化的描述, 根据金乌贼生殖细胞的大小, 滤泡细胞结构的变化以及卵黄积累的情况, 我们将金乌贼卵子发生分为 5 个时期 9 个时相: 增殖期, 小生长期(无滤泡期, 单层滤泡期, 双层滤泡期), 大生长期(滤泡内折期, 卵黄形成早期, 卵黄形成晚期), 成熟期, 退化吸收期。

3.2 金乌贼卵巢发育的特点

目前, 有关鱼类卵巢发育分期研究得较为透彻, 虽然有的专家采用不同分期方法, 但是卵巢周期的组织学变化规律基本一致^[22]。关于头足类卵巢的发育周期, 不同的物种分期标准不统一。Boyle 等^[9]根据卵黄形成过程将尖盘阿尔斗蛸的卵巢分为卵黄形成前期、卵黄形成早期、卵黄形成晚期、成熟卵巢 4 个时期。Di 等^[23]根据卵巢形态学的变化, 将真蛸卵巢发育划分为卵黄形成前期、卵黄形成早期、卵黄形成晚期、成熟卵巢共 4 个时期。焦海峰等^[24]根据滤泡细胞形成褶皱的数目和比例对卵巢发育划分为卵黄合成前期、卵黄合成早期、卵黄合成盛期和卵黄合成后期共 4 个时期。蒋霞敏等^[13]对曼氏无针乌贼的卵巢进行了组织学观察, 根据卵巢的外部形态和各个时相卵子占卵巢切面的比例, 将曼氏无针乌贼卵巢发育划分为 6 个时期。本研究发现, 金乌贼卵巢发育的特点是卵巢内卵子发生不同步, 形态差异显著, 未成熟的卵子粘连在卵巢基质上, 依次环布于卵

巢基质周围,越靠近中心,卵母细胞发育程度越低;成熟后的卵子游离在卵巢腔中,经过输卵管排出体外。本研究参考鱼类卵巢发育分期标准,结合蛸类和乌贼类的卵巢发育划分依据,以卵子时相为基础,根据卵巢的外部状态及其切面各个时相卵子所占比例,将金乌贼的卵巢分为I~VI共6个阶段,比较系统地描述了金乌贼各个阶段卵巢发育特点。

3.3 滤泡细胞结构与功能

细胞的结构与功能具有统一性。虽然有研究报道,在卵母细胞发育过程中,随着卵母细胞的不断增大,滤泡细胞的结构也随之变化^[25],但关于卵巢中滤泡细胞的功能目前尚无定论。方永强等^[26]对文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)卵巢中滤泡细胞超显微结构分析结果认为,滤泡细胞的作用是分泌和运输营养物质。蒋霞敏等^[13]对曼氏无针乌贼卵巢中的滤泡细胞进行了组织学观察,认为卵黄颗粒物质由滤泡细胞分泌,滤泡细胞具有提供营养的作用。牟振波等^[27]利用光镜和透射电镜对细鳞鱼(*Brachymystax lenok*)卵巢中的滤泡细胞进行了研究,结果表明,在卵黄积累旺盛的过程中滤泡细胞具有转运和储存的作用。本研究对金乌贼卵子发生过程中滤泡细胞的结构变化进行连续观察发现,在金乌贼卵子发生早期,滤泡细胞围绕在卵母细胞外层;随着卵母细胞的不断增大,单层滤泡细胞变为双层滤泡细胞,进而内层滤泡细胞发生内折形成网状结构;当卵母细胞内折区出现卵黄物质时滤泡细胞开始解体;当卵母细胞处于成熟期时相,网状内折区消失并完全充满卵黄物质,而滤泡细胞则已完全解体。进一步观察发现退化吸收期的卵母细胞,其滤泡细胞并未发生解体,也没有观察到卵黄物质的存在。综上所述,本研究得出的结论是金乌贼卵母细胞中卵黄物质的形成与滤泡细胞解体几乎同时发生,由此推测在卵子成熟过程中滤泡细胞的作用是运输营养物质,同时参与卵黄物质的分泌及合成。

4 结论

金乌贼的卵子发生经历了增殖期、小生长期、大生长期、成熟期和退化吸收期,其滤泡细胞的

变化、卵黄物质的形成及细胞核的偏移等与硬骨鱼类卵子发生存在一定的共性。

通过解剖学和组织学观察,发现金乌贼同一发育时期的卵巢内卵子发生具有不同步性。卵子不同步发育的结果是成熟卵子先落到卵巢腔内,其他卵子接连成熟之后相继落到卵巢腔,进行繁殖后代。这种卵巢发育类型与金乌贼一年性成熟,一次生殖的生殖类型密切相关。对于卵子发生,本研究结合卵细胞的形态大小、滤泡细胞结构变化及卵黄形成情况进行分析;对于卵巢发育,将卵巢的外部形态、卵巢切面上各个时相卵子所占比例及性腺指数相结合分析,这种根据形态学、组织学和生物学数据为基础进行分期的方法比较全面,为头足类繁殖生物学的研究提供参考。通过对金乌贼卵巢发育和卵子发生动态过程的研究,有助于进一步了解其生殖生理特性,可以丰富头足类发育生物学理论知识,对金乌贼的人工繁育和资源增殖提供指导。

参考文献:

- [1] Dong Z Z. The World Ocean Economy Cephalopod Biology[M]. Jinan: Shandong Science and Technology Press, 1991: 197-207. [董正之. 世界大洋经济头足类生物学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1991: 197-207.]
- [2] Hao Z L, Zhang X M, Zhang P D. Biological characteristics and multiplication techniques of *Sepia esculenta*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2007, 26(4): 601-606. [郝振林, 张秀梅, 张沛东. 金乌贼的生物学特性及增殖技术[J]. 生态学杂志, 2007, 26(4): 601-606.]
- [3] Wang L, Zhang X M, Ding P W, et al. Reproductive behavior and mating strategy of *Sepia esculenta*[J]. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(6): 1871-1880. [王亮, 张秀梅, 丁鹏伟, 等. 金乌贼繁殖行为与交配策略[J]. 生态学报, 2017, 37(6): 1871-1880.]
- [4] Liu C L, Zhuang Z M, Chen S Q, et al. Study on the brood-stock domestication and propagation characteristics of *Sepia esculenta* Hoyle[J]. Fishery Modernization, 2009, 36(2): 34-37. [刘长琳, 庄志猛, 陈四清, 等. 金乌贼亲体驯养与繁殖特性研究[J]. 渔业现代化, 2009, 36(2): 34-37.]
- [5] Zhou W W, Zheng X D. Research on egg-laying pattern and artificial incubation of *Sepia esculenta* Hoyle in chamber[J]. Fishery Modernization, 2006(3): 36-37. [周维武, 郑小东. 金乌贼产卵规律及室内人工孵化培育方法探索与研究[J]. 渔业现代化, 2006(3): 36-37.]

- [6] Chen S Q, Liu C L, Zhuang Z M, et al. Observations on the embryonic development of *Sepia esculenta* Hoyle[J]. Progress in Fishery Sciences, 2010, 31(5): 1-7. [陈四清, 刘长琳, 庄志猛, 等. 金乌贼胚胎发育的研究[J]. 渔业科学进展, 2010, 31(5): 1-7.]
- [7] The first success of the artificial seedling rearing of *Sepia esculenta* Hoyle in our country[J]. Fishery Information and Strategy, 2010, 25(4): 37. [金乌贼全人工育苗在中国首获成功[J]. 渔业信息与战略, 2010, 25(4): 37.]
- [8] Hei N N, Liu H L, Bao H J, et al. Histomorphological characteristics of oogenesis and vitellogenesis in *Pelodiscus sinensis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(3): 656-662. [黑乃楠, 刘海丽, 包慧君, 等. 中华鳖卵子发生与卵黄形成特征[J]. 水生生物学报, 2010, 34(3): 656-662.]
- [9] Boyle P R, Chevis D. Egg development in the octopus *Eledone cirrhosa*[J]. Journal of Zoology, 1992, 227(4): 623-638.
- [10] Pierce G J, Boyle P R, Hastie L C, et al. The life history of *Loligo forbesi* (Cephalopoda: Loliginidae) in Scottish waters[J]. Fisheries Research, 1994, 21: 17-41.
- [11] Laptikhovsky V V, Arkhipkin A I. Oogenesis and gonad development in the cold water loliginid squid *Loligo gahi* (Cephalopoda: Myopsida) on the Falkland shelf[J]. Journal of Molluscan Studies, 2001, 67(4): 475-482.
- [12] Hoving H J T, Laptikhovsky V V. Fecundity, oogenesis, and ovulation pattern of southern African *Lycoteuthis lorigera* (Steenstrup, 1875)[J]. Hydrobiologia, 2014, 725(1): 23-32.
- [13] Jiang X M, Fu F Y, Li Z, et al. Study on the oogenesis and ovarian development of *Sepiella maindroni*[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(5): 607-617. [蒋霞敏, 符方尧, 李正, 等. 曼氏无针乌贼的卵子发生及卵巢发育[J]. 水产学报, 2007, 31(5): 607-617.]
- [14] Li L G. Studies on histology of reproductive system and cell biology on spermatogenesis and oogenesis of *Octopus variabilis*[D]. Ningbo: Ningbo University, 2010: 23-28. [李来国. 长蛸生殖系统组织学和精卵发生的细胞学研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2010: 23-28.]
- [15] Luo J, Jiang X M, Liu M H, et al. Oogenesis and ovarian development in *Sepia lycidas*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(6): 1107-1116. [罗江, 蒋霞敏, 柳敏海, 等. 拟目乌贼卵子发生与卵巢发育[J]. 水生生物学报, 2014, 38(6): 1107-1116.]
- [16] Hao Z L. Studies on reproductive development and fluorescent marking technology of cuttlefish *Sepia esculenta* (Cephalopoda: Sepiidae)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010: 43-61. [郝振林. 金乌贼繁殖、发育及荧光标记技术的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010: 43-61.]
- [17] Zhang X F, Zhang Y G, Wang Z J. Review of ovarian development and genesis of osteichthyes[J]. Journal of Hainan Normal University (Natural Science), 2006, 19(1): 70-74. [张贤芳, 张耀光, 王志坚. 硬骨鱼类的卵巢发育和卵子发生研究综述[J]. 海南师范学院学报(自然科学版), 2006, 19(1): 70-74.]
- [18] Bottke W. The fine structure of the ovarian follicle of *Allotheuthis subulata* Lam (Mollusca, Cephalopoda)[J]. Cell and Tissue Research, 1974, 150(4): 463-479.
- [19] Gong Q X, Cao K J, Zeng Z. A histological study on the development of ovary of Ayu[J]. Journal of Fisheries of China, 1982, 6(3): 221-234. [龚启祥, 曹克驹, 曾贇. 香鱼卵巢发育的组织学研究[J]. 水产学报, 1982, 6(3): 221-234.]
- [20] Gong Q X, Chen G J, Jia G S, et al. A histological study on the oogenesis of *Pseudosciaena crocea*[J]. Chinese Journal of Zoology, 1986(6): 5-9. [龚启祥, 陈桂娟, 郑国生, 等. 大黄鱼卵母细胞发生的研究[J]. 动物学杂志, 1986(6): 5-9.]
- [21] Wang Z J, Luo H, Zhang Y G. Histological studies of the oogenesis of *Gambusia affinis*[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2008, 25(3): 8-12. [王志坚, 罗虹, 张耀光. 食蚊鱼卵子发生的组织学观察[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2008, 25(3): 8-12.]
- [22] Lou Y D. Histology and Embryology[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1994: 131-137. [楼允东. 组织胚胎学[M]. 第2版. 北京: 中国农业出版社, 1994: 131-137.]
- [23] Di Cosmo A, Di Cristo C, Paolucci M. Sex steroid hormone fluctuations and morphological changes of the reproductive system of the female of *Octopus vulgaris* throughout the annual cycle[J]. Journal of Experimental Zoology, 2001, 289(1): 33-47.
- [24] Jiao H F, Peng X M, You Z J, et al. Histological study of reproductive system of the female *Octopus tankahkeei*[J]. Chinese Journal of Zoology, 2011, 46(6): 88-95. [焦海峰, 彭小明, 尤仲杰, 等. 嘉庚蛸雌性生殖系统组织学观察[J]. 动物学杂志, 2011, 46(6): 88-95.]
- [25] Zhang Y G, Yang G Z, Jin L. Studies on the developmental ultrastructure of follicle cell of ovary and egg envelope in *Silurus meridionalis* Chen[J]. Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition), 2004, 29(6): 1009-1015. [张耀光, 杨桂枝, 金丽. 南方鲇卵巢滤泡细胞和卵膜生成的超微结构研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2004, 29(6): 1009-1015.]
- [26] Fang Y Q, Welsch U. Microstructure and function of ovarian follicular cells in *Branchiostoma belcheri*[J]. Science in China (Series B), 1995, 25(10): 1079-1122. [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): 1079-1122.]
- [27] Mou Z B, Xu G F, Yang S Y. Development and function of ovarian follicular cells in *Brachymystax lenok*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(1): 167-171. [牟振波, 徐革锋, 杨双英. 细鳞鱼卵巢滤泡细胞的发育及功能[J]. 中国水产科学, 2008, 15(1): 167-171.]

Histology of oogenesis and ovarian development in cultured *Sepia esculenta*

YIN Yanan^{1,2,3}, LIU Changlin², HU Peng², ZHANG Jinyong^{2,3,4}, LIU Shufang^{2,3}, ZHUANG Zhimeng², XUE Tongming⁵

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266200, China;
4. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;
5. Qingdao Jinshatan Aquatic Product Development Co., Ltd., Qingdao 266000, China

Abstract: The golden cuttlefish (*Sepia esculenta* Hoyle) is one of the most important commercial species in China and Japan. In order to protect and restore cuttlefish resources, researchers have paid a lot of attention to the reproductive biology and artificial breeding techniques of cuttlefish. In the present study, both anatomic methods and tissue section techniques were used to describe the histological and morphological characteristics of oogenesis and ovary development in cuttlefish, in order to elucidate the reproductive physiology of golden cuttlefish. During the oogenesis of *S. esculenta*, follicular cells were always observed and underwent structural changes before oocyte maturation. The disintegration of follicular cells and the occurrence of yolk substances occurred synchronously. Egg yolk substances accumulated gradually until the oocytes were full and the follicular cells had disintegrated completely, and the nuclei gradually disappeared along with the follicular cells. Eggs were not synchronized and exhibited significantly variable morphology. Immature oocytes adhered to the ovarian matrix and circulated around the matrix of the ovary so that oocytes closer to the center were less developed than those further away. After maturation, the oocytes were free in the ovarian cavity and were discharged through the oviduct. According to the morphology of oocytes and follicular cells and vitellogenesis, the asynchronous oogenesis of *S. esculenta* could be categorized into five stages, with nine phases: proliferative stage (oogonia phase), small growth stage (free follicular cell phase, single follicular cell phase, and double follicular cell phase), large growth stage (follicle penetration phase, pre-vitellogenic phase, and late-vitellogenic phase), maturation stage, and resorbing stage. Meanwhile, the ovarian development cycle could be categorized into six stages (I–VI), according to ovary appearance and gonad index (GI) and dominant phase of oocytes. Understanding the development and oogenesis of *S. esculenta* is of great significance to the theory of cephalopod reproductive biology and improving artificial propagation technology.

Key words: *Sepia esculenta* Hoyle; oogenesis; ovarian development; histological characteristic; anatomy characteristic

Corresponding author: LIU Shufang. E-mail: liusf@ysfri.ac.cn