

西伯利亚鲟性腺早期发生、分化、发育的组织学观察

田美平^{1,2}, 庄平^{1,2}, 张涛¹, 颜世伟^{1,3}, 章龙珍¹, 刘婷^{1,3}

(1. 中国水产科学研究院 东海水产研究所 农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室, 上海 200090; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 3. 大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 利用组织学方法研究人工繁育、养殖的西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*) 仔、幼、成鱼性腺发育过程中原始生殖细胞 (Primordial germ cells, PGC) 的迁移, 生殖褶的生成, 性腺雌雄分化和发育过程。结果表明, 西伯利亚鲟于3 dph (Days post-hatch) 时, PGC以单细胞的形式存在于仔鱼卵黄囊上方两中肾管之间, 10 dph时其迁移到背侧的腹膜上皮上, 13 dph时其沿腹膜上皮朝肾管区下方迁移, 22 dph时生殖褶形成, 31 dph时原始性腺形成, 40 ~ 60 dph时原始性腺发育形成裂腔, PGCs沿腔壁排列, 裂腔经过进一步发育并从背离腹膜上皮的底端慢慢愈合合成实体, 90 dph时原始性腺中出现生殖上皮和性细胞, 150 dph时脂肪细胞和血管增多, 210 dph时性腺出现2种不同的表面结构, 性腺开始分化。本研究利用组织学方法借鉴鱼类性腺分期标准, 将西伯利亚鲟性腺分化划分为0期和I ~ VI期, 并描述了各期精巢、卵巢的结构变化以及细胞形态学特征。[中国水产科学, 2010, 17(3): 496-506]

关键词: 西伯利亚鲟; 原始生殖细胞; 性腺发育; 性腺分化; 组织学

中图分类号: Q959 · 46*1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)03-0496-11

鱼类的性腺主要由来自体腔膜的体细胞和胚胎发育时期的原始生殖细胞 (Primordial germ cells, PGC) 通过分裂、迁移、分化形成^[1]。性腺雌雄分化的时间、分化的类型以及完成分化的标志在不同种鱼类及同种鱼不同性别之间有差异。系统研究鱼类的性腺发生、分化有助于了解鱼类性腺分化规律, 确定鱼类的性腺分化方式和开始分化时间, 对人工调控鱼类种群的性别, 提高鱼类的繁殖性能、种质特性以及开发和利用优质的品种资源具有重要意义^[2]。鲟的生长发育过程相对比较缓慢复杂, 一般需要几年甚至二十几年才能达到性成熟, 性腺开始分化时间差异很大, 从6月龄到2龄不等, 这取决于物种以及生长环境^[3]。

西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*) 属鲟科 (Acipenseridae), 鲟属 (*Acipenser*), 主要分布在俄罗斯西部的鄂毕河至

东部的科雷马河之间的西伯利亚各河流之中, 中国新疆的额尔齐斯河也有少量的分布。中国自1996年首次引进西伯利亚鲟。由于具有食谱广、易驯养、苗种培育成活率高、生长快、卵的营养价值高等优点, 现在西伯利亚鲟的养殖量仅次于施氏鲟 (*Acipenser schrenckii*), 居中国鲟养殖产量的第2位^[4-5]。鉴于雌鲟较雄鲟生长快, 又是鱼籽酱的生产者, 因此在鲟养殖中, 有必要在性成熟前及早进行性别鉴定及分池培育, 提前淘汰部分雄鲟, 提高养殖群体中雌性个体比例, 这在生产实践中具有重要意义^[6-7]。目前在水产养殖中人工性别调控主要依靠外源性激素诱导和染色体工程操纵^[8], 通过在性别分化时期施用外源性激素可成功诱导性别逆转。由于性腺生理学上的分化要早于形态学上的分化^[9], 因此确定开始施用

收稿日期: 2009-09-03; 修订日期: 2009-11-09.

基金项目: 国家863计划项目 (2008AA10Z227); 农业科技成果转化资金项目 (2008GB23260408); 浙江省重大科技专项 (2007C12026); 上海市教育委员会E-研究院建设项目 (E03009); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (2007M01)。

作者简介: 田美平 (1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事鱼类生理生态学研究. E-mail: tianmeiping@163.com

通讯作者: 庄平, 研究员. E-mail: pzhuang@online.sh.cn

激素的时间是进行激素诱导的难点。利用外源激素诱导鲟性别分化已有报道,但是不同的开始和持续时间,得到的诱导率差异很大^[3],而关于国内引进的西伯利亚鲟的性腺发育状况鲜见报道。本研究以人工繁殖的西伯利亚鲟为研究材料,对其性腺的发生和分化过程进行研究,确定性腺分化时间和各时期的形态特征,旨在为对其进行人工繁育和性别调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

西伯利亚鲟受精卵为2008年杭州千岛湖鲟龙科技开发有限公司全人工繁殖所得。受精卵运至中国水产科学研究院东海水产研究所,在实验室内进行孵化,孵化期间水温为 $(18\pm 0.4)^{\circ}\text{C}$ 。仔鱼出膜当天为0 dph(Days post-hatch, dph),孵化后第1个月内每3天取样1次;第2个月内每8天取样1次;孵化后第3到7个月每15天取样1次;每次样本量为10尾。成鱼采自浙江省新昌县来益生态农业发展有限公司鲟养殖基地,通过活体取样获取性腺。

1.2 仔、幼鱼室内饲养条件

选取在同一时期出膜的仔鱼用于实验。实验期间仔、幼鱼的培养条件为:水温 $(18\pm 1)^{\circ}\text{C}$,溶解氧 $> 6.0\text{ mg/L}$, pH为 7.5 ± 0.1 ;开口饵料为水蚯蚓,27 dph(Days post-hatch)后投喂配合饲料。

1.3 实验方法

成熟的卵使用生理盐水煮沸后,37%甲醛固定24 h,用刀片直接沿动物极正中向植物极纵切为两半,成熟精子直接在显微镜下观察、拍照。

各期仔、稚、幼鱼样本以及成鱼性腺组织于Bouin's 液中固定24 h,其中全长小于80 mm的仔鱼直接固定,全长介于80~110 mm的稚鱼剪去头尾后固定,全长大于110 mm的幼鱼则采用活体解剖,取出性腺固定,成鱼性腺样本分块后固定。梯度酒精脱水、二甲苯透明、常规石蜡包埋,轮式切片机连续切片,切片厚度 $5\text{ }\mu\text{m}$, HE染色, Olympus BX51显微镜下观察拍照。性腺发育分期参照Hochleithner

等^[10]的分期标准,并根据切片中平均面积超过50%或居最高比例的生殖细胞来判断。

2 结果与分析

2.1 性腺的发生

连续切片观察发现,孵化后3 d仔鱼全长 $(10.58\pm 0.25)\text{ mm}$,在卵黄囊上方的两中肾管之间出现原始生殖细胞,其体积明显大于周围的体细胞,呈梨形,核大,着色浅,周围被1层体细胞包被着(图版 I-1、2)。

孵化后10 d,仔鱼开口,全长 $(17.24\pm 0.74)\text{ mm}$,PGC迁移到背侧的腹膜上皮中(图版 I-3、4)。

孵化后13 d,仔鱼全长 $(19.15\pm 0.40)\text{ mm}$,PGC沿腹膜上皮迁移到中肾管下方肠壁上方,在此其经过有丝分裂,数量增加至多个(图版 I-5、6)。

孵化后16 d,仔鱼全长 $(20.47\pm 0.47)\text{ mm}$,PGC沿腹膜上皮迁移到最终位置中肾管侧腹部(图版 I-7)。

孵化后22 d,仔鱼全长 $(23.17\pm 0.72)\text{ mm}$,位于两侧中肾管区下方的腹膜上皮向腹腔突出,形成1对生殖嵴(Genital ridge),由多层体细胞构成,PGC正在迁移到生殖嵴,位于生殖嵴外围(图版 I-8)。

孵化后31 d,仔鱼全长 $(35\pm 1.24)\text{ mm}$,PGC已迁入生殖嵴,与生殖嵴共同构成原始性腺,切面呈圆形,PGC通过有丝分裂数量增多,被增殖的单层扁平上皮细胞包被于原始性腺中部(图版 I-9)。

孵化后40~60 d,幼鱼全长 $(51.21\sim 69.67)\text{ mm}$,在贴近肾管区出现输尿管和输精(卵)管,观察到性腺横切面存在裂腔(图版 I-10),在分化发育过程中从背离腹膜上皮的底端慢慢愈合(图版 I-11),最终形成实心的性腺(图版 I-12),PGC沿腔壁排列。

孵化后3个月,幼鱼全长 $(102\pm 5.8)\text{ mm}$,原始性腺切面呈圆盘状,在切面的背面出现1层生殖上皮细胞,腹侧出现脂肪细胞,靠近柄部出现血管,内部PGC增多增大,核仁染色清晰(图版 I-13)。

孵化后5个月,幼鱼全长 $(180\pm 6.9)\text{ mm}$,原始性腺继续增大,切面呈叶片状,游离末端脂肪组织变大,血管丰富(图版 I-14)。

在6月龄的幼鱼中,肉眼仍不易观察到性腺,在显微镜下,也辨认不出精巢与卵巢。从出膜后22 d的性腺原基形成开始,一直到6月龄为止,性腺均处于未分化状态,在性腺分期上划分为0期。

2.2 性腺Ⅰ期

孵化后7个月,幼鱼全长(220 ± 8.2) mm,性腺成对位于体背部,从外观上看呈透明的带状,靠近腹鳍游离端的脂肪组织呈青灰色,肉眼辨认不出卵巢与精巢。在组织切片中可以观察到2种不同形态的性腺:一种性腺切面的生殖上皮细胞呈柱状,由2~3层伸长的细胞组成,在切面的边缘有明显的凹陷,切面一侧有大量血管分布,生殖细胞成群聚集在生殖上皮下,能观察到被滤泡包被的卵原细胞,核较大,嗜碱性,被苏木精染成紫红色,在视野中能清楚地看到细胞进行有丝分裂(图版Ⅱ-1、2);另外一种性腺切面生殖上皮由单层细胞组成,边缘呈光滑型,能观察到少量的精原细胞,细胞核呈异染色质,精原细胞被精囊包被(图版Ⅱ-3、4)。

2.3 性腺Ⅱ期

性腺外观呈白色或淡黄色,此阶段经历的时间较长。Ⅱ期卵巢呈淡黄色被脂肪覆盖,在切片中观察初级卵母细胞在数量上和面积上占优势。此期卵母细胞体积较卵原细胞大,直径约 $100 \sim 500 \mu\text{m}$,细胞质增多,核也相应增大,细胞质嗜碱性染色,细胞核明显,核内核质不易被染色,核膜内壁有1圈核仁分布。Ⅱ期后期卵母细胞的核仁数显著增加,大小不等,排列在核膜内缘(图版Ⅱ-5)。

在精巢的组织切面中观察到蜂窝状的精小叶形成,此期精巢的精小叶中内含初级精原细胞及次级精原细胞,且初级精原细胞体积明显大于次级精原细胞。精原细胞单个位于精小叶壁边缘,圆形或椭圆形,不易着色,核较大,胞质核质着色浅,周围有数个体积较小的支持细胞包围;次级精原细胞由初级精原细胞分裂而成,细胞呈圆形,三五成群位于精小叶内部的小精囊中,体积比初级精原细胞小,细胞核嗜碱性较细胞质强,被苏木精染成紫红色(图版Ⅱ-6)。

2.4 性腺Ⅲ期

卵巢中卵粒呈灰色,切片上可观察到卵细胞近似椭圆形,外包滤泡细胞,核仁变小数目增多,并且密集排列在核膜内侧,被苏木精染成紫红色。细胞质内含有较多的卵黄颗粒,分布于细胞质的大部分区域。在滤泡细胞膜和核膜之间出现一环状的脂肪滴,脂肪滴经HE染色不着色,此期细胞核在中央没有发生极化(图版Ⅱ-7)。

精巢浅灰色,包裹的脂肪较多,切片上可观察到精小叶中大量的初级精母细胞、次级精母细胞和少量精子细胞,初级精母细胞体积较大,次级精母细胞体积次之,精子细胞较少,没有观察到成熟的精子。不同精小叶中的生精细胞发育不同步,同一精小囊中生精细胞发育基本同步(图版Ⅱ-8)。

2.5 性腺Ⅳ期

Ⅳ期卵巢中卵呈深褐色,椭圆形,脂肪极少,体积增大,细胞长轴直径 $1\,500 \sim 2\,500 \mu\text{m}$,核径与胞径比值减小。根据细胞核偏移情况将该期卵母细胞分为早、中、晚3个发育阶段。当卵细胞发育到中期阶段时,细胞核开始极化,脂肪滴和卵黄小体向细胞一侧集中形成细胞的植物极,对应的一侧为动物极。细胞核核膜开始溶解并慢慢消失,核切面形状变得不规则,核开始朝动物极迁移但尚未抵达动物极,细胞外层的透明放射层很清晰(图版Ⅱ-9),此时期的卵通常可用来加工成鱼籽酱。

发育到Ⅳ期的精巢较大,呈粉红色,精巢中脂肪含量较少,通过切片观察到精小叶切面变大,在精小囊中有少量游离精子成簇出现,精子呈细长的棒状,嗜碱性强,被染成深紫色,精小叶内绝大多数是精子细胞,另有少量的次级精母细胞。此时的精子细胞排列紧密,发育基本同步,精子细胞的着色要比初级精母细胞和次级精母细胞深,嗜碱性更强(图版Ⅱ-10)。

2.6 性腺Ⅴ期

发育到Ⅴ期的卵巢,卵已充满腹腔,呈黑褐色,卵开始从滤泡膜内释出,在动物极用肉眼可观察到灰白色的圆斑,即极斑,在动植物极相交处色素沉

积,形成明显的深色圆环,即极环。卵核膜消失,极化核切面形状不规则,接近动物极。卵黄至卵膜外侧有黑色颗粒层、绒毛膜层和残存的部分滤泡膜。此期的卵多用于人工催产繁殖(图版Ⅱ-11)。

发育到Ⅴ期的精巢完全呈乳白色,脂肪含量极少,轻压鱼腹部,成熟的乳白色精液可成股流出。通过组织切片观察到此期精小叶中一些相邻精小囊壁互相融合,精小囊界限不明显,部分精小囊囊壁已经破裂,小叶腔随之扩大,腔中充满成熟精子。除有少量的初级精母细胞、次级精母细胞和精子细胞外,游离成簇的精子占绝大多数,精子的嗜碱性极强,被苏木精染成深蓝色(图版Ⅱ-12、13)。

2.7 性腺Ⅵ期

Ⅵ期卵巢的卵已经产出,未产出的卵会退化凋亡被鱼体吸收,卵巢中剩下少量Ⅱ期卵母细胞。Ⅵ期精囊内有残余的精子,体积缩小,恢复到Ⅱ期精巢性状。

3 讨论

3.1 原始生殖细胞的起源和迁移方式

动物胚胎发育时期最早出现的生殖细胞称为原始生殖细胞。关于鱼类原始生殖细胞的起源,观点不一,主要存在2种观点:一种观点认为PGC起源于中胚层,如陈玉红等^[11]对1 dph(Days post-hatch)泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)的研究表明,PGC以单个细胞的形式存在于肾管下消化管上的脏壁中胚层中;另一种认为PGC起源于内胚层,如宋卉等^[12]对螭霖鱼(*Varicorhinus macroleois*)的研究表明,在原肠早期观察到PGC位于靠近卵黄囊的内胚层,认为其PGC起源于内胚层。有研究报道红眼鱼属的*Scardinius* sp.的PGC来源于卵黄囊内的卵黄多核体的表胚层,青鳉(*Oryzias latipes*)PGC发生于中胚层与表胚层之间;大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)PGC最早位于胚孔被唇处,中、内胚层之下表胚层之上^[13-14]。本研究显示3 dph的西伯利亚鲟卵黄囊上方的中肾管附近出现迁移过程中的原始生殖细胞,随发育进程朝肾管区下方迁移,推断西伯利亚鲟PGC起源于内胚层。

早期性腺发生分化过程中,PGC从发生部位迁移到生殖褶的方式有多种形式^[14]:一类是PGC沿着肝壁中胚层肠系膜迁移到背面的生殖褶,如泥鳅^[11]等属于此种方式;另一类是PGC沿着体壁中胚层通过体节迁移到生殖褶,如青鳉^[13]等属于此种方式;还有一类借助于血液循环系统迁移到生殖褶部位,如在欧鳊属(*Abramis*)和马鲛属(*Scomberomorus*)的胚胎中找到高度异位的PGC,在真骨鱼类肝中和细鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus gorbuscha*)胚胎小管中观察到PGC,均证实PGC是随血液循环而移动的^[15]。

本研究发现,西伯利亚鲟的原始生殖细胞沿着肾管与肠系膜间的体腔上皮迁移到肾管腹部,在迁移过程中细胞进行有丝分裂,属于第一种迁移方式,研究结果与纳氏鲟(*A. naccari*)非常相似^[3]。

3.2 性腺分化的方式

硬骨鱼的性腺分化主要有2种类型:一种类型是雌雄异体型,首先形成的原始性腺是一个中性的或者没有分化的原始性腺,然后不同个体分别向雄性或雌性分化,斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)和石蝶鱼(*Kareius bicoloratus*)^[16]等都属于这种方式;另一种类型是所有的个体先发育成类似卵巢的性腺,然后一半数目的个体向雄性分化而另一半数目的个体向雌性分化,在具有这种分化方式的鱼类性腺中存在雄性、雌性和间性性腺,如黄鳊(*Monopterus albus*)^[17]和石斑鱼属(*Epinephelus*)^[18]。

本研究结果显示,西伯利亚鲟在性腺分化早期形成的是一个中性的没有分化的原始性腺,到210 dph时向雌、雄性分化,属于第一种分化类型。本研究还观察到在40 dph时,原始性腺会形成间隙,性腺两侧有大量原始生殖细胞;在50 dph时从背离腹膜上皮的底端开始愈合;60 dph时慢慢愈合形成实心的中性原始性腺。这种分化方式在鲟类性腺发育中还未见详细报道,初步推断西伯利亚鲟早期性腺发育是从中间向两端分化发育,但其具体形成机理有待进一步研究。

3.3 性腺分化开始的标志以及时间

鲟解剖学上开始出现雌雄分化的时间在

不同种之间差异很大, Grandi等^[3]报道纳氏鲟(*A. naccarii*)于6月龄性腺开始雌雄分化, 俄罗斯鲟(*A. gueldenstaedtii*)^[19]在3月龄、杂交鲟(*Huso huso* × *A. ruthenus*)^[2]在6月龄、小体鲟(*A. ruthenus*)^[20]在8月龄、短吻鲟(*A. brevirostrum*)^[21]在7月龄、中华鲟(*A. sinensis*)^[22]在9月龄性腺开始雌雄分化。本研究表明, 西伯利亚鲟性腺分化开始的时间为7月龄, 与其他鲟属鱼类差别不大。在鲟类性腺分化早期, 从细胞形态上不易区分精原细胞和卵原细胞, 但从原始性腺的横切面进行观察, 二者存在着不同形态。Flynn等^[21]的研究表明, 在鲟属鱼类中, 原始性腺发育到一定时期存在2种不同形态: 一类是性腺横切面边缘生殖上皮呈光滑状态, 生殖上皮由单层细胞组成, 这类性腺趋向于分化为雄性性腺; 另一类性腺横切面边缘生殖上皮具有凹陷的皱褶, 生殖上皮由多层细胞组成, 这类性腺趋向于分化为雌性性腺。陈细华等^[22]报道在中华鲟早期性腺发育过程中, 原始性腺横切面形态为半圆形的, 将分化成精巢; 而原始性腺形态为长条形或波浪形皱褶的将分化成卵巢。在其他鱼类中, 有的以性腺开始分化时原始性腺的大小作为雌雄分化方向的解剖学标志, 如Uguz等^[23]报道黑头软口鲦(*Pimephales promelas*) 在受精后第10天到第13天的仔鱼中, 较大的原始性腺趋向于向卵巢分化, 较小的原始性腺趋向于向精巢分化。亦有报道以卵巢腔开始形成作为卵巢分化的标志, 如王文君等^[16]报道石鲈鱼和陈玉红等^[11]报道泥鳅性腺分化过程中以形成卵巢腔作为卵巢开始分化的标志。

西伯利亚鲟在7月龄时, 出现性腺解剖学上的分化, 出现2种形态结构不同的性腺: 一种性腺切面的生殖上皮细胞呈柱状, 并且由2~3层伸长的细胞组成, 在切面的边缘有明显的凹陷, 生殖细胞成群聚集在生殖上皮, 能观察到胞径较大被滤泡包被的卵原细胞; 另外一种性腺切面生殖上皮由单层细胞组成, 边缘光滑, 能观察到胞径较小的被精囊包被的精原细胞, 这与Grandi等^[3]报道的结果较为相似, 表明可以原始性腺横切面形态做为判定性别分化方向的标志, 这在西伯利亚鲟早期性别判定上有着重要的意义。

3.4 鲟鱼性腺发育分期

鲟的性腺分期方法并不完全一致。Bruch等^[24]将湖鲟(*A. fulvescens*) 卵巢发育分为7个阶段, 精巢发育分为4个阶段; Conte等^[25]把高首鲟(*A. transmontanus*) 的精巢和卵巢发育各分为4个时期; Van Eenennaam等^[26]把大西洋鲟(*A. oxyrinchus*) 的卵巢发育分为7期, 精巢发育分为6期; 国内早期四川省长江资源调查组基于肉眼直观观察将中华鲟性腺发育划分为0期和I~VI期; 李璐^[6]将施氏鲟(*A. schrenckii*) 发育性腺基于组织学和形态解剖学划分为0期和I~VI期。目前鲟类性腺时期划分多以Hochleithner等^[10]归纳制定的0期和I~VI期为标准。本研究采用组织学和解剖学相结合的方法, 同时借鉴以往学者对鲟类性腺的分期标准, 将西伯利亚鲟性腺发育划分为0期和I~VI期。西伯利亚鲟性腺发育时期划分将为西伯利亚鲟人工繁殖及鱼籽酱加工起到很好的指导作用。

参考文献:

- [1] Van Eenennaam J P, Doroshov S I. Effects of age and body size on gonadal development of Atlantic sturgeon [J]. *Fish Biol*, 1998, 53: 624-637.
- [2] 章龙珍, 庄平, 张涛, 等. 人工养殖施氏鲟性腺发育的观察[J]. *中国水产科学*, 2002, 9(4): 321-327.
- [3] Grandi G, Giovannini S, Chicca M. Gonadogenesis in early developmental stages of *Acipenser naccarii* and influence of estrogen immersion on feminization [J]. *Appl Ichthyol*, 2007, 23: 3-8.
- [4] 曲秋芝, 高艳丽. 西伯利亚鲟的人工繁殖[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(4): 492-495.
- [5] 谢忠明, 孙大江, 王树京, 等. 鲟鱼养殖技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 258-263.
- [6] 李璐. 施氏鲟早期性腺发育研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2006.
- [7] 刘鹏, 庄平, 章龙珍, 等. 人工养殖西伯利亚鲟精子超低温冷冻保存研究[J]. *海洋渔业*, 2007, 29(2): 120-127.
- [8] Yamazaki F. Sex control and manipulation in fish [J]. *Aquaculture*, 1983, 33: 329-354.
- [9] Nakamura M, Kobayashi T, Chang X T, et al. Gonadal sex differentiation in teleost fish [J]. *J Exp Zool*, 1998, 281: 362-372.
- [10] Hochleithner M, Gessner J. The sturgeons and paddlefishes of

- the world: Biology and aquaculture [M]. Australia: Aqua Tech Publications, 1999: 81–82.
- [11] 陈玉红, 林丹军, 尤永隆, 等. 泥鳅的性腺分化及温度对性腺分化的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14(1): 74–82.
- [12] 宋卉, 王树迎, 彭克美. 泰山鱘鱼原始生殖细胞的发生及性腺分化规律的研究[J]. 动物医学进展, 2005, 26(12): 62–67.
- [13] Hamaguchi S A. Light-and electron-microscopic study on the migration of priordial germ cells in teleost, *Oryzias latipes* [J]. Cell Tissue Res, 1982, 227: 139–151.
- [14] 宋卉, 王树迎. 鱼类原始生殖细胞的研究进展[J]. 吉林畜牧兽医, 2004, 4: 16–18.
- [15] Stolk A. Extra-reginal oocytes in teleosts [J]. Nature, 1958, 182: 1241.
- [16] 王文君, 王开顺, 邵明瑜, 等. 石蝶仔、幼鱼性腺发育组织学观察[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 841–848.
- [17] Xiao Y M, Liu Y. Study on the histology in sex changing from intersex to male of *Monopterus albus* [J]. 水产学报, 1995, 19: 297–304.
- [18] 刑晨光, 金珊, 袁思平. 石斑鱼性逆转研究现状[J]. 水产科学, 2006, 25(4): 214–216.
- [19] Akhundov M M, Fedorov KY. Early gametogenesis and gonadogenesis in sturgeons. 1. On criteria for comparative assessment of juvenile gonadal development in the example of the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii* [J]. J Ichthyol, 1991, 31: 101–114.
- [20] Wrobel H H, Hees I, Schimmel M, et al. The genus *Acipenser* as a model system for vertebrate urogenital development: nephrostomial tubules and their significance for the origin of the gonad [J]. Anat Embryol, 2002, 205: 67–80.
- [21] Flynn S R, Benfey T J. Sex differentiation and aspects of gametogenesis in shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* Lesueur [J]. J Fish Biol, 2007, 70: 1027–1044.
- [22] 陈细华, 危起伟, 杨德国, 等. 养殖中华鲟性腺发生与分化的组织学研究[J]. 水产学报, 2004, 28(6): 633–639.
- [23] Uguz C. Histological evaluation of gonadal differentiation in fathead minnows (*Pimephales promelas*) [J]. Tissue Cell, 2008, 40: 299–306.
- [24] Bruch R M, Dick T A. A practical field guide for the identification of stages of lake sturgeon gonad development, with notes on lake sturgeon reproductive biology and management implications [M]. USA: sturgeon for tomorrow press, 2001.
- [25] Conte F S, Doroshov S L, Lutes P B, et al. Hatchery manual for the white sturgeon, *A. transmontanus* with application to other north American Acipenseridae [M]. Oakland. California: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, 1988: 85.
- [26] Van Eenennaam J P, Doroshov S I. Effect of age and body size on gonadal development of Atlantic sturgeon [J]. Fish Biol, 1998, 53: 624–637.

Histological observation on early development and differentiation of gonad in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*

TIAN Meiping^{1,2}, ZHUANG Ping^{1,2}, ZAHNG Tao¹, YAN Shiwei^{1,3}, ZHANG Longzhen¹, LIU Ting^{1,3}

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. College of Life Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

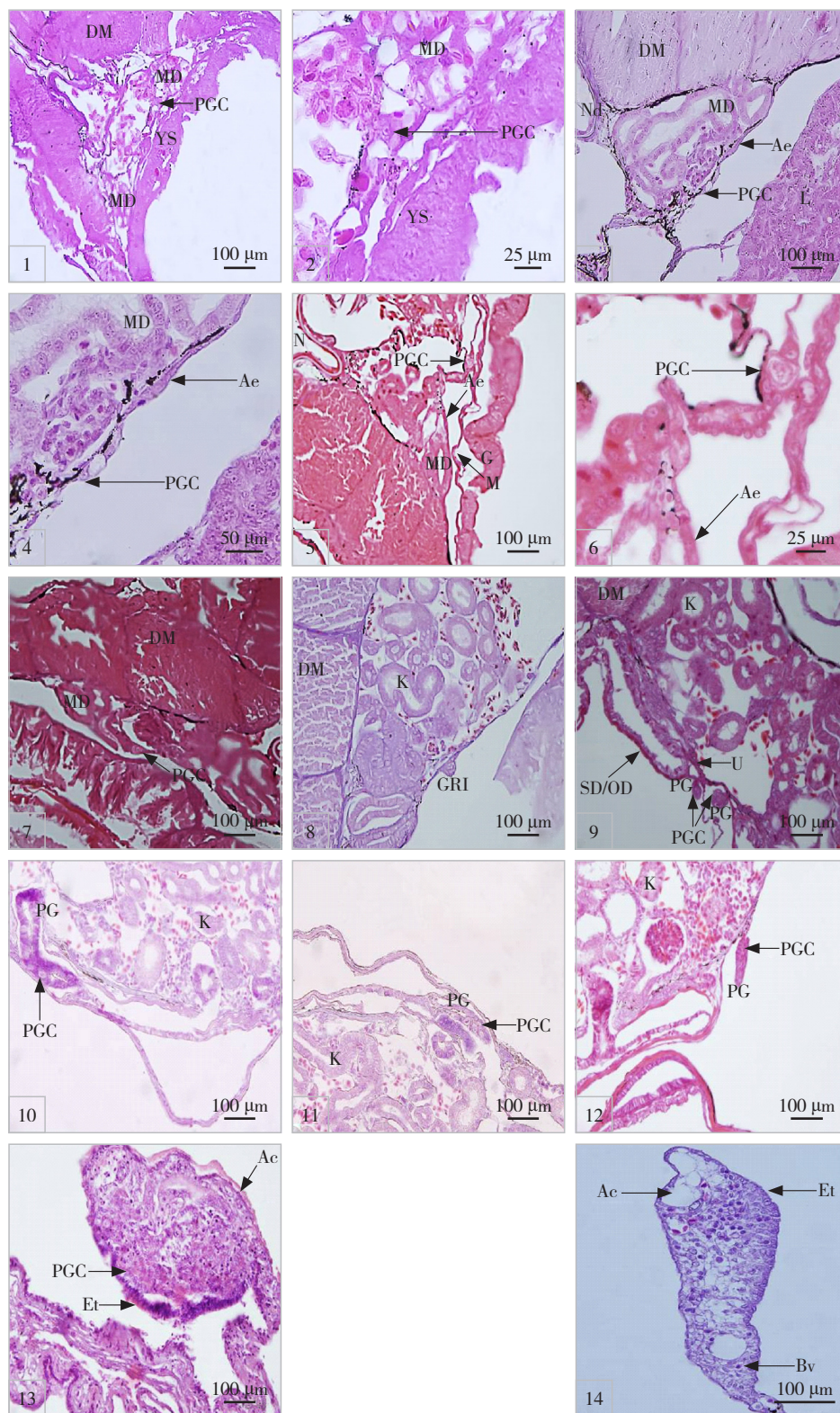
Abstract: Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) is an important cultured fish species in China recently due to its commercial value in caviar producing. Therefore, sex control and production of female populations are very important to commercial sturgeon aquaculture. Generally, artificial sex reversal is achieved through exogenous hormone treatment or chromosome manipulation in aquaculture. In many teleost fish, it is possible to induce sex reversal through the administration of exogenous sex steroids during the period of gonadal differentiation. However, it is difficult to determine the appropriate time to initiate the treatment, because physiological differentiation of the gonad precedes morphological differentiation. In this study, origin, migration of primordial germ cells (PGCs) and gonadal differentiation were investigated with histological method in cultured Siberian sturgeon fries and juveniles. Fertilized eggs were incubated under temperature of $(18 \pm 0.4) ^\circ\text{C}$. Fish of different developmental stages were sampled periodically after hatching. All fish samples or gonads were fixed with Bouin's fluid. Slices were made and observed under microscope. The results indicated that PGC was first observed below nephridium area, posterior to the yolk sac at 3 day post-hatch (dph), and was visible along dorsal epithelium of body cavity at 10 dph, and migrated along peritoneal epithelium in the region between mesentery and kidney at 13 dph. Genital ridges appeared at 22 dph, and PGCs immigrated into the genital ridges and formed primordial gonads at 31 dph. A split cavity appeared in primordial gonads at 40–60 dph. Germ cell and germinal epithelium appeared at 90 dph. Blood vessels and lipocytes were observed in primordial gonads at 150 dph, and two types of gonads were distinguishable at 210 dph. Through histological observation, bisexual gonad could be divided into 0 and I–VI stages according to the development of sperm and ovum. The structural changes and cytomorphology characteristics of every stage gonad were described. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(3): 496–506]

Key words: *Acipenser baerii*; primordial germ cell; gonadal development; gonadal differentiation; histology

Corresponding author: ZHUANG Ping. E-mail: pzhuang@online.sh.cn

田美平等：西伯利亚鲟性腺早期发生、分化、发育的组织学观察

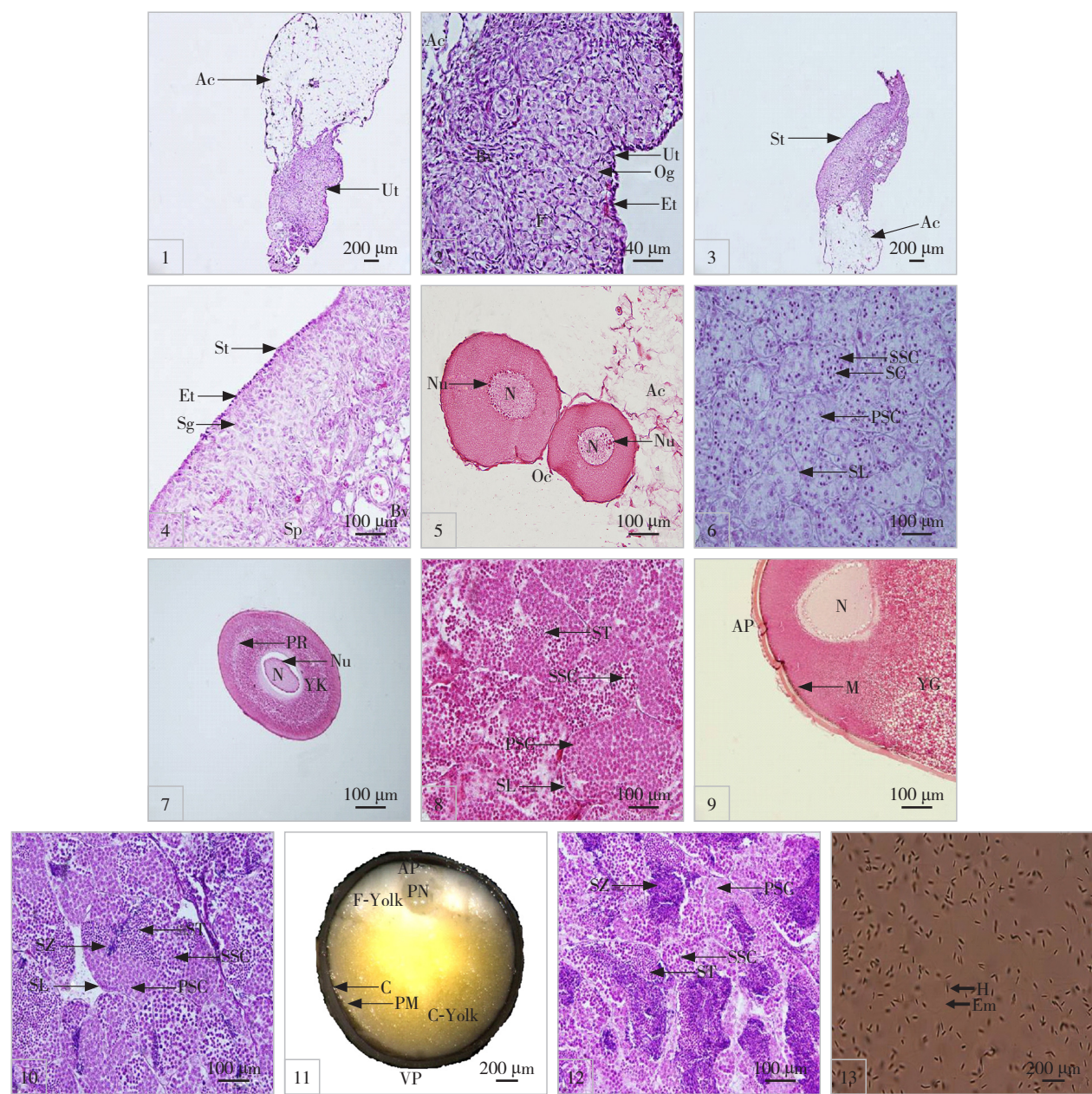
TIAN Meiping et al: Histological observation on early development and differentiation of gonad in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*



图版 I Plate I

田美平等：西伯利亚鲟性腺早期发生、分化、发育的组织学观察

TIAN Meiping et al: Histological observation on early development and differentiation of gonad in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*



图版 II Plate II

田美平等：西伯利亚鲟性腺早期发生、分化、发育的组织学观察

TIAN Meiping et al: Histological observation on early development and differentiation of gonad in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*

图版 I 说明

1. 孵化3 d后仔鱼的横切, PGC出现在卵黄囊上方的两侧中肾管之间, 箭头示PGC; 2. 孵化3 d后仔鱼的横切, PGC所在区域局部放大; 3. 孵化10 d后仔鱼的横切, PGC迁移到腹膜上皮上; 4. 孵化10 d后仔鱼的横切, PGC所在区域局部放大; 5. 孵化13 d后仔鱼的横切, PGC沿腹膜上皮朝肾管下方迁移, 原始生殖细胞核清晰; 6. 孵化13 d后仔鱼的横切, 对迁移过程中的PGC所在区域局部放大; 7. 孵化16 d后仔鱼的横切, PGC沿腹膜上皮迁移到肾管下方; 8. 孵化22 d后仔鱼的横切, 生殖嵴形成; 9. 孵化31 d后幼鱼的横切, PGC迁入生殖褶, 共同构成原始性腺; 10. 孵化40 d后幼鱼的横切, 性腺两端部出现裂腔; 11. 孵化50 d后幼鱼的横切, 性腺切面中裂腔从一端开始愈合; 12. 孵化60 d后幼鱼性腺的横切; 原始性腺发育, 两端部空隙愈合, 形成实心的性腺; 13. 孵化90 d后幼鱼的性腺横切, 原始性腺发育, 一侧出现脂肪细胞, 另侧出现生殖上皮细胞; 14. 孵化135 d后幼鱼的性腺横切, 原始性腺发育, 出现血管, 脂肪组织增大。

Ac: 脂肪细胞; Ae: 腹腔上皮; Bv: 血管; DM: 背部肌肉; Et: 生殖上皮; G: 中肠; GRI: 生殖褶; K: 肾; L: 肝; M: 肠系膜; MD: 中肾管; N: 细胞核; Nu: 核仁; PG: 原始性腺; PGC: 原始生殖细胞; SD/OD: 输精/卵管; U: 输尿管; YS: 卵黄囊。

Explanation of Plate I

1. Cross-section in a 3 days post-hatch (dph) fry; PGC were found near the mesonephric duct posterior to the yolk sac. 2. Detail of fig.1, showing PGC. 3. Cross-section in a 10 days post-hatch (dph) fry; PGCs migrate to dorsal peritoneal epithelium. 4. Detail of fig.3, showing migrating PGC. 5. Cross-section in a 13 days post-hatch (dph) fry; PGC migrate along dorsal peritoneal epithelium to the region below the mesonephric duct. 6. Detail of fig.5, showing migrating PGC. 7. Cross-section in a 16 days post-hatch (dph) fry; PGC reach final position ventral to kidney. 8. Cross-section in a 22 days post-hatch (dph) fry; genital ridges occurred. 9. Cross-section in a 31 days post-hatch (dph) juvenile; PGC had migrated into the genital ridges and formed primordial gonad. 10. Cross-section in a 40 days post-hatch (dph) juvenile; split cavity appeared on both poles of the gonad. 11. Cross-section in a 50 days post-hatch (dph) juvenile; split cavity of one pole cicatrized. 12. Cross-section in a 60 days post-hatch (dph) juvenile; split cavity were cicatrized completely. 13. Cross-section in a 90 days post-hatch (dph) juvenile; at dorsum of the primordial gonad appeared adipocytes and germinal epithelium appeared at the ventral side. 14. Cross-section in a 135 days post-hatch (dph) juvenile; capillaries appeared in the primordial gonad and fat tissue largened.

Ac: lipocyte; Ae: peritoneal epithelium; Bv: blood vessels; DM: dorsal muscle; Et: germinal epithelium; G: gut; GRI: germinal ridge; K: kidney; L: liver; M: mesentery; MD: mesonephric duct; N: nucleoli; Nu: nucleolus; PG: primordial gonad; PGC: primordial germ cell; SD/OD: spermaduct/oviduct; U: ureter; yolk; YS: yolk sac.

田美平等：西伯利亚鲟性腺早期发生、分化、发育的组织学观察

TIAN Meiping et al: Histological observation on early development and differentiation of gonad in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*

图版 II 说明

1. 孵化210 d后幼鱼的性腺横切,性腺开始分化,游离段覆盖脂肪,边缘有皱褶,示 I 期卵巢; 2. 孵化210 d后幼鱼性腺横切,性腺开始分化,边缘有皱褶,内部血管丰富,卵原细胞被滤泡包围,示 I 期卵巢; 3. 孵化210 d后幼鱼的性腺横切,性腺开始分化,游离段覆盖脂肪,边缘光滑,示 I 期精巢; 4. 孵化210 d后幼鱼性腺横切,性腺开始分化,边缘光滑,内部血管丰富,精原细胞在精囊中,示 I 期精巢; 5. II 期卵巢,卵径增大,核仁分散排列在细胞核内膜上; 6. II 期精巢,精小叶中出现蜂窝状精小叶,精小叶中含有初级精原细胞和次级精原细胞; 7. III 期卵巢,卵径增大,胞质内出现卵黄颗粒和环状的脂肪滴层; 8. III 期精巢,精小叶中精原细胞通过减数分裂形成初级精母细胞、次级精母细胞; 9. IV 期卵巢,卵黄颗粒和脂肪滴向细胞一侧集中,卵形成动物极和植物极; 10. IV 期精巢,精小叶中出现精细胞和少量成簇状的精子细胞; 11. V 期卵巢,成熟的卵子,动物极出现白色环状极斑,核偏移到动物极上缘; 12. V 期精巢,精小囊中出现大量成熟的精子细胞; 13. 光镜下观察排出体外的成熟精子.

Ac: 脂肪细胞; AP: 动物极; Bv: 血管; C: 绒毛膜; C-Yolk: 白色卵黄; Et: 生殖上皮; F: 滤泡; Fm: 精子鞭毛; G: 中肠; H: 精子头部; M: 肠系膜; MD: 中肾管; N: 细胞核; Nd: 脊索; Nu: 核仁; Og: 卵原细胞; Oc: 卵母细胞; PG: 原始性腺; PGC: 原始生殖细胞; PM: 环状黑色颗粒层; PN: 极化核; PR: 环状脂肪滴层; PSC: 初级精母细胞; PSG: 初级精原细胞; SD/OD: 输精/卵管; Sg: 精原细胞; SL: 精小叶; Sp: 精囊; SSC: 次级精母细胞; SSG: 次级精原细胞; ST: 精子细胞; St: 光滑边缘; SZ: 精子; U: 输尿管; Ut: 皱褶边缘; VP: 植物极; YG: 卵黄颗粒; YK: 卵黄; YS: 卵黄囊.

Explanation of Plate II

1. Cross-section in a 210 days post-hatch (dph) juvenile; uneven type gonad, gonad notches on lateral side surface and adipose tissue in distal part (putative ovary). 2. Cross-section in a 210 days post-hatch (dph) juvenile; detail of Fig.15, showing gonad portion composed of connective tissue with small blood vessel, oogonium surrounded by follicle. 3. Cross-section in a 210 days post-hatch (dph) juvenile; smooth type gonad, smooth type of germinal portion and prominent adipose tissue in distal part (putative testis). 4. Cross-section in a 210 days post-hatch (dph) juvenile; detail of Fig.17, showing gonad portion composed of connective tissue with small blood vessel, spermatogonium surrounded by spermatophore. 5. Transverse section showing stage II ovarian. 6. Transverse section showing stage II testis. 7. Transverse section showing stage III ovarian. 8. Transverse section showing stage III Testis. 9. Transverse section showing stage IV ovarian. 10. Transverse section showing stage IV testis. 11. Transverse section showing stage IV ovarian. 12. Transverse section showing stage IV testis. 13. Mature spermatozoa.

Ac: lipocyte; AP: animal pole; Bv: blood vessels; C: chorion; C-Yolk: whitish-colored yolk; Et: germinal epithelium; F: follicle; Fm: flagellum; G: gut; H: head of sperm; M: mesentery; MD: mesonephric duct; N: nucleoli; Nd: notochord; Nu: nucleolus; Oc: oocyte; Og: oogonium; PG: primordial gonad; PGC: primordial germ cell; PM: peripheral ring of melanin; PN: polarized nucleus; PR: peripheral ring of lipid droplets; PSC: primary spermatocyte; PSG: primary spermatogonia; SD/OD: spermaduct/oviduct; Sg: spermatogonia; SL: seminiferous lobulus; St: smooth type; Sp: spermatophore; U: ureter; Ut: uneven type; VP: vegetal pole; YG: yolk; YK: yolk grain; yolk; YS: yolk sac.