

斜带石斑鱼雌鱼卵巢发育与血清性类固醇激素的生殖周期变化^{*}

赵会宏¹, 刘晓春¹, 刘付永忠², 王云新², 林浩然¹

(1. 中山大学水生经济动物研究所//广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275;
2. 广东省大亚湾水产试验中心, 广东 惠州 516081)

摘 要: 斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 卵母细胞发育可分为6个时相, 以卵母细胞在卵巢中组成的差异可以把卵巢发育划分为相应6个时期。测定了成熟雌鱼血清中雌二醇和睾酮含量的生殖周期变化, 在生殖季节成熟雌鱼血清中雌二醇和睾酮含量最高。生殖季节成熟雌鱼的平均性腺成熟系数 GSI 显著高于其它月份, 并且血清性类固醇激素水平的季节变化与性腺成熟系数的变化基本一致, 都是在生殖季节达到最高峰。

关键词: 斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides*; 卵巢发育; 雌二醇; 睾酮

中图分类号: Q132; Q579.1 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2003) 06-0056-05

斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 是热带亚热带暖水性鱼类, 属鲈形目 Perciformes、鲈亚目 Percoidae、科 Serranidae, 是我国南方沿海地区特别是广东和福建两地网箱养殖的重要经济鱼类之一。关于石斑鱼的性腺发育已有一些研究, 如: Tan 等^[1]报道了巨石斑鱼 *E. tauvina* 的雌雄同体现象, 廖彦等^[2]研究了青石斑鱼 *E. amoara* 卵巢的周年变化和性转变, 张其永等^[3]研究了赤点石斑鱼 *E. akaara* 雌性性腺的周期发育, Johnson 等^[4]研究了黑缘石斑鱼 *E. morio* 的性腺发育及性类固醇激素的周期变化。但斜带石斑鱼尚无这方面的研究报道。由于目前我国南方沿海地区石斑鱼苗种来源主要依靠天然捕捞和进口, 因而限制了大规模养殖的发展。近年来, 本实验室致力于斜带石斑鱼的人工苗种繁育研究, 并已取得初步进展^[5], 但与苗种大批量生产的目标尚有一定距离。本文研究了斜带石斑鱼卵巢的发育过程以及血清性类固醇激素雌二醇和睾酮的生殖周期变化, 为掌握斜带石斑鱼的生殖生理特点积累基础资料, 亦为提高它的人工繁育技术提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 样本采集及处理

实验材料于1999年10月至2001年10月取自广东省大亚湾水产试验中心(广东省惠阳市澳头镇)及其附近水域的养殖网箱, 按季节进行, 共取样90尾。测量体长(l), 鱼体质量(m)。血样由尾静脉

抽取, 4℃下静置4~6h, 离心(15 000 r/min, 5 min)分离血清, 加1 μL $w = 1\%$ 硫柳汞钠(Thiomersal, Sigma 公司)防腐, 保存于-20℃待测。解剖鱼体, 称量性腺质量(m_g), 计算性腺成

熟系数($GSI = \frac{m_g}{m} \times 100\%$)。取性腺组织用波恩氏液固定, 做常规组织学切片, 切片厚度6~8 μm, 哈利氏苏木精-伊红染色, OLYMPUS BX40 型显微镜观察并拍照, 对卵细胞发育进行分期。将性腺切片置于显微镜下, 任意移动若干视野, 采用性腺切面中平均面积超过50%或居最高比例的卵细胞来确定性腺发育时期。

1.2 性类固醇激素雌二醇、睾酮的测定方法

血清性类固醇激素雌二醇(E_2)、睾酮(T)水平采用放射免疫测定方法(RIA)进行测定。 E_2 、 T 放射免疫测定试剂盒购自中国原子能科学研究院同位素研究所(北京)。 E_2 的测量灵敏度为2 pg/mL。批内变异系数(CV)平均6.5%($n = 10$); 批间变异系数为8.3%($n = 10$); 在血清样品中加入低、中、高已知浓度的 E_2 , 测定回收率为101.5%~114%。 T 的测量灵敏度为30 μg/mL。批内变异系数(CV)小于10%($n = 10$); 批间变异系数小于15%($n = 10$)。回收率为107%~110%。样品测定均采用双管平行。

1.3 数据分析

血清 E_2 , T 的含量以平均值±标准差表示。用

^{*} 收稿日期: 2003-02-17

基金项目: 国家863资源与环境技术领域海洋生物技术主题资助项目(2001AA621010); 国家自然科学基金资助项目(39970586); 广东省科技计划项目(重大专项及重点项目)(A3050201); 广东省重大科技兴海项目(A200000A02)

作者简介: 赵会宏(1975年生), 男, 博士; 通讯联系人: 林浩然, E-mail: ls32@zsu.edu.cn

Spss10.0 统计软件包对不同季节血清 E₂ 和 T 的含量进行统计分析及 Duncan 氏多重比较。当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结 果

2.1 卵细胞时相的划分

第 I 时相: 卵原细胞呈椭圆形颗粒状, 直径约为 $9 \sim 12 \mu\text{m}$, 细胞核所占比例较大, 核径约为 $7.5 \sim 8 \mu\text{m}$ 。核外细胞质含量少, 核膜及核仁均被苏木精染成蓝色 (图 1: 1)。

第 II 时相: 初级卵母细胞由卵原细胞发育而成, 卵母细胞呈多角椭圆形或长椭圆形, 处于小生长期。细胞直径约为 $37 \sim 50 \mu\text{m}$, 核径约为 $16 \sim 35 \mu\text{m}$ 。细胞质含量增长较快, 胞质紫色, 嗜碱性反应强; 细胞核圆形, 核仁 $1 \sim 3$ 个, 分散分布。卵膜外可见单层滤泡细胞膜 (图 1: 2, 3)。

第 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, 细胞直径约为 $153 \sim 260 \mu\text{m}$, 核径约为 $64 \sim 103 \mu\text{m}$ 。细胞质中间出现液泡, 核外周的胞质内出现细小的脂肪滴和卵黄颗粒。核仁多在核膜内缘, $11 \sim 20$ 个。卵膜外开始出现双层滤泡细胞膜 (图 1: 4)。

第 IV 时相: 初级卵母细胞进入卵黄积累的大生长期, 可划分为早、中、晚三个时期。

早期: 卵母细胞椭圆形, 细胞直径约为 $300 \sim 396 \mu\text{m}$, 核径约为 $116 \sim 153 \mu\text{m}$ 。卵黄颗粒逐渐充满胞质。核膜波纹状。核仁紧贴在核膜上, 约 20 个。卵膜厚约 $8 \mu\text{m}$, 出现放射带, 滤泡细胞扁平状 (图 1: 5)。

中期: 细胞呈圆形。细胞直径约为 $432 \sim 521 \mu\text{m}$ 。核径约为 $131 \sim 162 \mu\text{m}$, 卵黄颗粒大量充满, 并有油球出现; 放射带两层, 内层染色较深。卵膜厚约 $10 \mu\text{m}$, 滤泡膜仍为双层滤泡结构 (图 1: 6, 8)。

晚期: 细胞直径约 $542 \sim 650 \mu\text{m}$ 。细胞核周围卵黄颗粒密集, 卵黄颗粒及油球直径增大, 卵核开始向动物极移动。卵膜厚约 $15 \mu\text{m}$, 放射带双层, 两层滤泡细胞膜仍存在 (图 1: 7, 8)。第

V 时相: 初级卵母细胞经成熟分裂向次级卵母细胞过渡。细胞直径约 $650 \sim 700 \mu\text{m}$ 。细胞核极化, 核膜呈溶解消失状, 卵黄颗粒均质化 (图 1: 9)。

第 V 时相: 未能排出的成熟卵母细胞在卵巢内退化吸收。其特征是: 卵质液化, 卵膜及放射带模糊不清, 外围滤泡细胞变后, 卵母细胞逐渐萎缩退化 (图 1: 10)。

2.2 卵巢发育分期的主要组织学特征

根据以上卵细胞 6 个发育时相在卵巢中组成的

差异以及卵巢形态和组织结构特征, 将卵巢发育相应划分为如下 6 个发育时期:

I 期卵巢: 为幼鱼的卵巢。呈透明细丝状。卵巢中以 I 时相卵原细胞为主。在 6 月龄至 1 龄鱼可见 (图 1: 11)。

II 期卵巢: 卵巢呈淡黄色或白色透明状, 肉眼不能区分卵粒。卵巢中以 II 时相卵母细胞为主。GSI 为 $0.009\% \sim 0.13\%$ 。在 1 龄至 2 龄鱼可见 (图 1: 12)。

III 期卵巢: 卵巢呈浅黄色, 前端钝圆, 卵巢表面微血管分布丰富。肉眼可见卵粒。卵巢中以 III 时相卵母细胞为主, 还有部分 I、II 时相的卵母细胞。GSI 为 $0.29\% \sim 0.51\%$ 。在 3 至 4 龄鱼可见 (图 1: 13)。

IV 期卵巢: 卵巢体积迅速增大, 卵巢皱褶增大增厚, 呈黄色。卵巢中卵粒清晰可见。以 IV 时相卵母细胞为主, 也有 I、II、III 时相的卵母细胞。GSI 为 $0.41\% \sim 2.43\%$ 。3、4 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 (图 1: 14)。

V 期卵巢: 此时卵巢体积达到最大, 剖开腹腔, 卵巢质感松软, 内含大量成熟卵粒。卵巢中以 V 时相卵母细胞为主, 还有较多 III、IV 时相和少量 I、II 时相卵母细胞。GSI 为 $1.43\% \sim 5.71\%$ 。4 龄以上的性成熟鱼在产卵季节卵巢发育处于此阶段 (图 1: 15)。

VI 期卵巢: 卵巢壁变厚皱缩, 颜色暗红, 血管大量充血, 卵母细胞排列松散, 空滤泡增多。随卵母细胞退化过程的加剧, II 时相卵母细胞逐渐增多。GSI 为 $0.29\% \sim 1.52\%$ 。生殖季节后期产卵结束后的雌鱼卵巢处于此阶段 (图 1: 16)。

2.3 卵巢发育的周年变化

雌鱼通常在 3~4 龄达性成熟。人工培育条件下可提前至 2.5 龄。性成熟雌鱼在每年 3 月份左右, 伴随水温升高和摄入营养物质的增多, 性腺内卵母细胞迅速发育成熟。4 月中旬至 6 月初产卵活动最旺盛。斜带石斑鱼卵母细胞发育属于不同步型, 在生殖季节雌鱼卵巢内含有各时相卵母细胞 (图 1: 13, 14, 15)。至每年 7~8 月水温超过 $30.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右时, 产卵活动逐渐减弱至完全停顿, 但卵巢内仍有大量处于 III、IV 时相的卵母细胞存在。至 9、10 月份水温在 $26 \sim 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右时, 卵巢会再次发育成熟并且产卵, 但产卵量较少。而后随着水温的降低, 卵母细胞逐渐退化吸收, 进入冬季以后, 性腺发育停止。

2.4 血清中性类固醇激素水平的生殖周期变化

由图 2、3 可知, 3、4 月份生殖季节开始, 水温升高至 $17.5 \sim 22.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右时, 性成熟雌鱼的平均 GSI 处于 $0.17\% \sim 0.24\%$ 之间, 血清雌二醇含量显著上升 ($P < 0.05$), 而睾酮含量略有升高。此时雌鱼

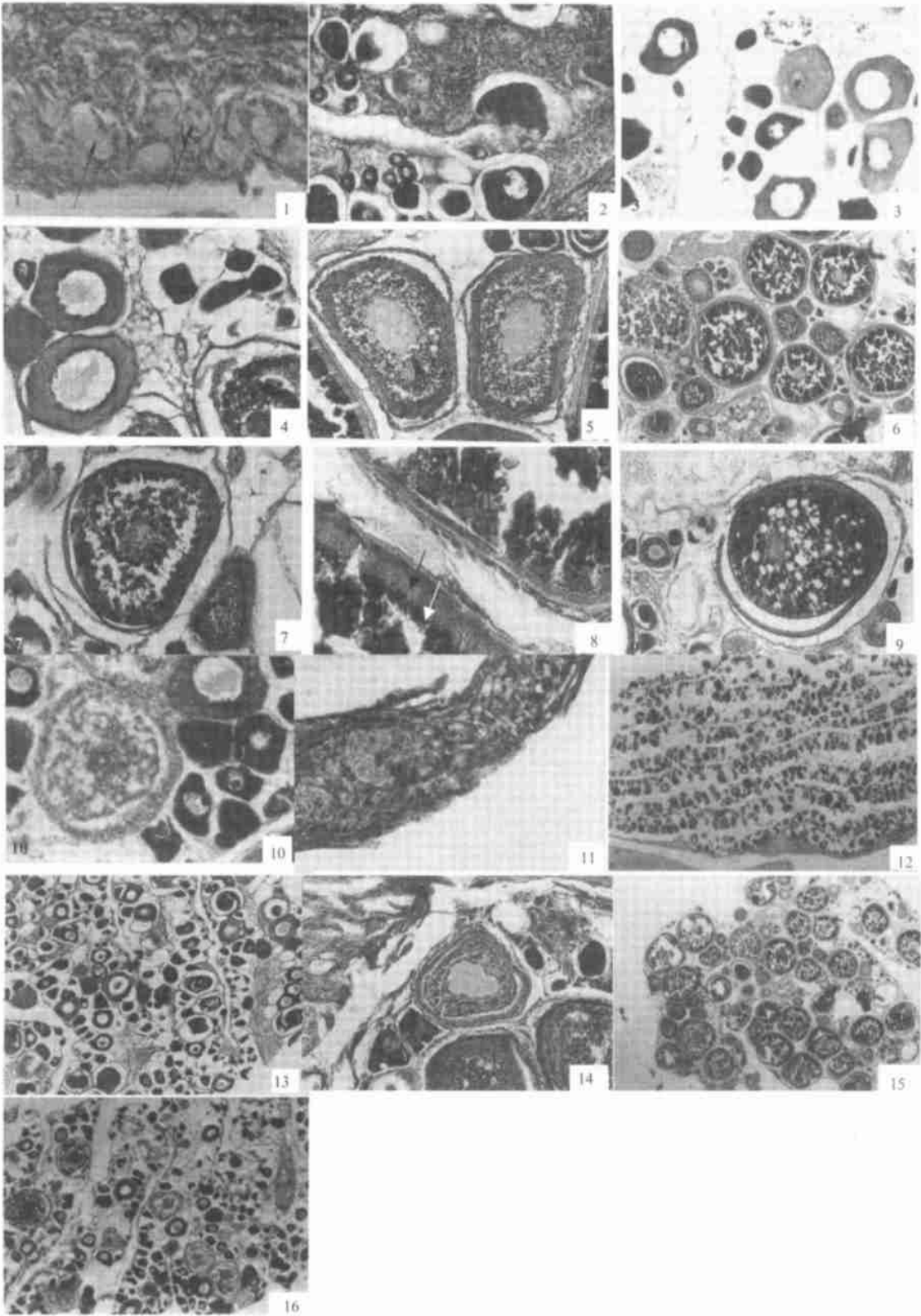


图 1 斜带石斑鱼卵母细胞及卵巢发育分期

Fig 1 The section of oocytes and ovary development of *E. coioides*

1: 6 月龄鱼的性腺切片, 可见成团聚集的卵原细胞 (箭头所示) ($\times 600$); 2: 第II时相卵母细胞 (箭头所示) ($\times 150$); 3: 第II时相卵母细胞 ($\times 120$); 4: 第II时相卵母细胞 ($\times 600$); 5: 第IV时早期卵母细胞, 可见卵黄颗粒、脂肪滴和双层滤泡膜 ($\times 600$); 6: 第IV时相中期卵母细胞 ($\times 150$); 7: 第IV时相晚期卵母细胞 ($\times 300$); 8: 示第IV时相卵母细胞的卵黄颗粒及放射带 (黑白箭头示双层放射带) ($\times 1500$); 9: 示第V时相成熟卵。可见核偏位 ($\times 300$); 10: 示卵母细胞退化吸收 (300); 11: I期卵巢 ($\times 600$); 12: II期卵巢 ($\times 60$); 13: II期卵巢 ($\times 60$); 14: IV期卵巢 ($\times 150$); 15: V期卵巢 ($\times 60$); 16: VI期卵巢 ($\times 60$)

的卵巢发育多处于 III—IV 期(图 1; 13, 14)。进入 5、6 月份水温继续升高至 26.5~27.9℃左右时, 雌鱼的平均 GSI 由 0.53% 剧增至 5.71%, 达到最高值, 血清雌二醇含量也在 5 月迅速升高至峰值(20.4±2.07) pg/mL, 睾酮含量在 6 月升至峰值(30.6±4.4) μg/mL。此时卵巢发育处于 IV—V 期(图 1; 14, 15)。

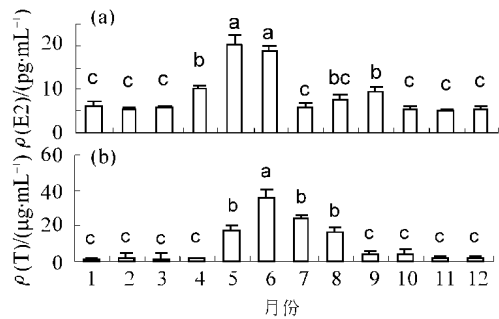


图 2 性成熟雌鱼血清雌二醇和睾酮的周年变化

Fig. 2 Annual change of serum oestradiol-17β and testosterone level in mature female grouper

各值为平均值±标准差, 图中标有相同字母者表示激素水平无显著差异, $P<0.05$, Duncan 氏检验, $n=7$

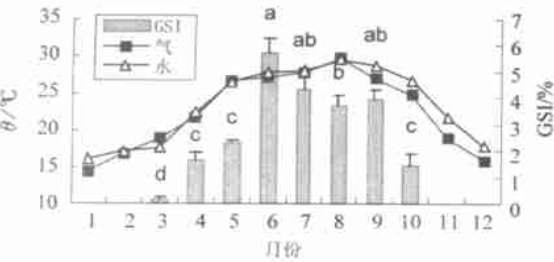


图 3 性成熟雌鱼 GSI 与水温、气温变化的关系

Fig. 3 The relationship between the water temperature, air temperature and GSI of mature female grouper

各值为平均值±标准差, 图中标有相同字母者表示激素水平无显著差异, $P<0.05$, Duncan 氏检验, $n=7$

3 讨论

与多数硬骨鱼类相似, 斜带石斑鱼卵母细胞发育可分为 6 个时相, 卵巢发育亦相应分为 6 个时期。卵母细胞发育属于不同步型, 产卵类型为分批产卵类型。卵母细胞膜具双层放射带, 与赤点石斑鱼类似^[3]。受精卵属浮性卵。

卵巢发育的周期性可由性腺成熟系数的变化表现, 水温是很重要的影响因子。从图 3 可见, 雌性月平均性成熟系数 GSI 在 6 月有一个峰值, 随后逐月降低, 到 9 月份又形成一个峰值。自然条件或人

工培育条件下, 性腺发育状况及营养状况良好的雌鱼, 在 9—10 月水温下降至其适宜的产卵温度范围内时, 性腺可继续发育, 形成第二个产卵高峰。但由于水温持续降低, 这个产卵周期维持的时间很短。这种现象和其它石斑鱼相似^[2,3]。

进入生殖季节斜带石斑鱼体内的雌二醇及睾酮含量增长迅速, 与性腺发育及 GSI 的迅速升高基本一致。血清雌二醇和睾酮含量分别在 5 月和 6 月达到(20.4±2.07) pg/mL 和 (30.6±4.4) μg/mL, 性腺成熟系数 GSI 也在 6 月达到最高值。

雌二醇能够诱导肝脏的肝细胞合成卵黄蛋白原, 因而鱼类血液中的雌二醇水平在卵黄形成过程中升高, 在卵黄生成后下降。斜带石斑鱼的血清雌二醇含量在 4 月份开始升高, 5 月和 6 月达到最高值, 然后降低; 而在 9 月份又出现一个小高峰, 这和卵巢发育的周年变化完全吻合。雌二醇水平类似的生理周期变化亦出现在一些生殖季节较长及卵巢多次发育成熟和产卵的鱼类^[4,6,7]。

参考文献:

[1] TAN S M, TAN K S. Biology of tropical grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.) I A preliminary study on hemaphroditism in *E. tauvina* [J]. Singapore J Prim Ind, 1974, 2(2): 123—133.

[2] 邬彦, 胡杰, 周婉霞, 等. 浙江北部水域青石斑鱼 (*Epinephelus awaara*) 卵巢周年变化及性转变的研究 [J]. 浙江水产学院学报, 1984, 3(1): 11—19.

[3] 张其永, 洪心, 蔡友义, 等. 赤点石斑鱼雌性性腺的周期发育 [J]. 台湾海峡, 1988, 7(2): 195—212.

[4] JOHNSON A K. Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous grouper in the eastern Gulf of Mexico [J]. J Fish Biol, 1998, 52: 502—518.

[5] 刘付永忠, 王云新, 黄国光, 等. 斜带石斑鱼亲鱼强化培育及自然产卵的研究 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(6): 81—85.

[6] SMITH J S, THOMAS P. Changes in hepatic estrogen-receptor concentrations during the annual reproductive and ovarian cycles of a marine teleost, the spotted seatrout *Cynoscion nebulosus* [J]. General and Comparative Endocrinology, 1991, 81, 234—245.

[7] KANEKO T, AIDA K, HANYU I. Changes in ovarian activity and fine structure of pituitary gonadotrophs during spawning cycle of the chichibu-goby [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1986, 52: 1923—1928.

(下转第 63 页)

Studies on the Production of Amicronucleate Lines of
Histriculus similes by *Cis* platin Treatment

LIU Xing yin, CHENG Lin, JIN Li pei

(School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: To search into the somatic function of the micronucleus of the ciliated protozoan *Histriculus similes*, all amicronucleates were generated with treatment of *cis* dichlorodiammineplatinum (II) (*cis* platin), a DNA cross linking agent, which has differential effect on the micro and macronucleus of *Histriculus similes*. For the reason that micronuclei in the G₁ phase are more sensitive to *cis* platin than those in the S phase, all treated normal cells were synchronized G₁ cells, which underwent a growth suppression phase before recovery to divide. Compared to the cell lines reserved micronuclei after treatment with *cis* platin and normal cell lines, about 70% (93/171) of cells in the amicronucleate cell lines possessed abnormal macronuclei in number and/or in shape: there were over two oval macronuclei instead two round ones; the macronuclei often exhibited various irregular appearances, such as rod like, bud like, contorted, and otherwise, which suggested that micronucleus play an essential role in retaining the stability of morpha and quantity of macronucleus in *Histriculus similes*.

Key words: *cis* platin; *Histriculus similes*; macronucleus; micronucleus; somatic function

(上接第 59 页)

Seasonal Cycles of Ovarian Development and
Serum Sex Steroid Levels of Female Grouper *Epinephelus coioides*

ZHAO Hui hong¹, LIU Xiao chun¹, LIUFU Yong zhong², Wang Yun xin², LIN Hao ran¹

(1. Institute of Aquatic Economic Animals and Key Laboratory of Guangdong Province For Aquatic Economic Animals,
Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Guangdong Daya Bay Fishery Development Center, Huizhou, 516081, China)

Abstract: The female gonadal development and levels of sex steroid of the protogynous *Epinephelus coioides* in the Daya bay of Guangdong province were studied. The oocyte development were divided into six phases: ①oogonia, ②oocyte with follicular epithelium consisting of a single layer of follicle cells, ③oocyte with adipose vesicle and yolk, ④ oocyte filled with yolk, ⑤ oocyte with migratory nucleus, ⑥ degeneration of oocyte. Based on the largest transverse section area occupied by different phase of oocytes, the development of gonad could be divided into six stages. The serum levels of oestradiol 17 β (E₂) and testosterone (T) of mature females were measured seasonally by radioimmunoassay. Mean E₂ levels in females were higher in spawning season of May and June then in all other months; Mean T levels were also highest in May and June. The gonadosomatic index (GSI) was higher in spawning season; it was consistent with the change of serum sex steroid levels.

Key words: epinepheinae; ovarain development; oestradiol 17 β ; testosterone