

切除眼柄对加速克氏原螯虾卵巢发育进程的组织学研究

水燕^① 汤雪君^① 徐增洪^① 周鑫^{①②*}

① 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室 无锡 214081;

② 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081

摘要: 应用组织切片和透射电镜技术研究眼柄切除对加速克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 卵巢发育进程的影响。实验分成 4 组, 选取眼柄切除 15 d 和 30 d 两个时间点进行。切除眼柄 30 d 后, 雌虾体长增长显著, 从 (11.50 ± 2.30) cm 增长至 (18.20 ± 3.40) cm ($P < 0.05$), 性腺指数 (GSI) 从 4.56% ± 2.81% 增长至 8.05% ± 2.51% ($P < 0.05$), 体重和螯肢长也有所增长 ($P > 0.05$)。电镜观察发现卵母细胞从发育 II 期迅速度过 III 期进入到 VI 期阶段, 卵母细胞体积变大, 变圆; 液泡压缩变小; 卵黄颗粒加速积累, 逐渐占满整个胞内空间; 滤泡细胞胞质从黏稠变稀薄。这些结果表明, 切除眼柄在短期内显著加快卵母细胞内卵黄颗粒的积累, 并且加快个体生长。

关键词: 克氏原螯虾; 眼柄切除; 组织学; 卵巢发育

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2016) 03-449-06

Histological Study on the Ovary Development Induced by Eyestalk Ablation in Red Swamp Crayfish *Procambarus clarkii*

SHUI Yan^① TANG Xue-Jun^① XU Zeng-Hong^① ZHOU Xin^{①②*}

① Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081; ② Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China

Abstract: In this study, histological methods were used to study the organizational structure of female ovary development induced by eyestalk ablation in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). A total of 60 female crayfishes in phase II were selected and the experiment was divided into four groups at two time points (group 1: control for 15 days; group 2: control for 30 days; group 3: treatment for 15 days; group 4: treatment for 30 days). The data were analyzed using SPSS 19.0 statistical software. Our results showed that the individual body-length increased from 11.50 ± 2.30 cm to 18.20 ± 3.40 cm ($P < 0.05$, Table 1), gonadosomatic index (GSI) growth increased from 4.56% ± 2.81% to 8.05% ± 2.51% ($P < 0.05$), and body-weight and chelicerae-long index also increased ($P > 0.05$) 30 days after eyestalk ablation. Electron

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 2015JBFM16), 江苏省水产三项工程项目 (No. 201312);

* 通讯作者, E-mail: zhoux@ffrc.cn;

第一作者介绍 水燕, 女, 博士, 研究方向: 甲壳动物遗传与发育生物学; E-mail: shuiy@ffrc.cn.

收稿日期: 2015-05-04, 修回日期: 2015-09-24 DOI: 10.13859/j.cjz.201603012

microscopy showed that oocytes quickly developed from phase II to stage III and VI stage (Table 2). Oocytes became larger, more rounded. Intracellular vacuoles became compressed smaller, yolk granules accumulation was gradually accelerated, finally filling the entire intracellular space, while cytoplasm in follicular cells became thinner (Fig. 1). These results indicate that eyestalk ablation significantly accelerates the yolk granules accumulation in oocytes, and speeds up the individual growth.

Key words: Red swamp crayfish *Procambarus clarkii*; Eyestalk ablation; Histology; Ovary development

甲壳动物的眼柄中存在着 X 器官-窦腺 (X-organ sinus gland, XO-SG) 复合体, 该复合体是甲壳动物的神经内分泌调控中心, 能分泌与生长、蜕皮及性腺发育相关的多种激素。其中性腺抑制激素对甲壳动物的性腺发育起主要调节作用, 能够抑制雌性卵巢卵黄原合成并促进性腺激素类的表达 (Edomi et al. 2002)。国外有学者通过摘取甲壳动物的眼柄实验, 证明了去除甲壳动物的眼柄后, 能够不同程度上加速甲壳动物的蜕皮与生长, 促进甲壳动物性腺的发育 (Uawisetwathana et al. 2011)。国内多位学者分别通过对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) (崔青曼等 2004, 张宽等 2006)、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) (吴超等 2009)、克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) (殷海成 2007) 等的实验研究, 均得出相同的结论, 即不同方式处理眼柄均能促进其研究对象的性腺发育。这些研究均表明, 切除甲壳动物眼柄, 破坏眼柄中 X 器官-窦腺复合体的功能, 可以起到加速卵巢内卵黄积累、促进卵巢成熟的作用。但是总的来说, 目前关于眼柄切除对于甲壳动物性腺发育影响的机理研究并不多。

克氏原螯虾属甲壳纲 (Crustacea) 十足目 (Decapoda) 螯虾科 (Cambaridae), 是十分具有代表性的甲壳动物。本研究借鉴国外最新研究成果, 观察实验室暂养条件下克氏原螯虾单侧眼柄切除前后卵巢发育的一系列变化情况, 并利用石蜡组织切片和透射电镜技术对卵巢发育阶段进行形态和组织学观察, 从而评估眼柄切除对于加速卵巢发育进程的影响程度, 为阐明眼柄切除对甲壳动物生长和发育的影响提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

克氏原螯虾雌性幼虾于 2013 年 3 月初取自江苏大丰宝龙集团养殖公司试验基地。选取雌性、体质健壮、活动力强、附肢完整的幼虾共 60 尾, 体长 8.90~12.30 cm, 体重 13.50~27.60 g。实验室条件下暂养于室内水箱中 (规格: 70 cm × 50 cm × 40 cm), 箱内有水草等隐蔽物, 各组全天供氧。实验期间水温保持在 27~29℃, 每周换水 2/3。每天饲喂 2 次 (8:00 时和 16:00 时), 日投饲率 (日投饵料量/养殖对象体重 × 100%) 为 2%~3%。

1.2 方法

1.2.1 发育分期的判定 为明确 3 月初池塘养殖克氏原螯虾幼虾卵巢发育的基本情况, 本研究事先选取同样养殖环境下 120 尾雌虾随机解剖检测, 再对照赵维信等 (1999) 以及王顺昌 (2003) 对克氏原螯虾卵巢发育划分标准进行发育分期的判定。

1.2.2 单侧眼柄切除 实验分为对照组 (1 组和 2 组) 和实验组 (3 组和 4 组), 实验虾在实验室暂养 7 d, 待活动和摄食都表现正常后, 随机分成 4 个组, 每组 15 尾, 统计体长和体重指标。随后处理组采用镊烫法切除虾右侧眼柄, 采用医用中号镊子, 经酒精灯烧至发红状态, 对准雌虾右侧眼柄烫伤摘除, 处理时间为 30 s。对照组只配备与处理组相同的实验环境, 不做其他任何处理。于眼柄切除 15 d 后, 实验 3 组和对照 1 组终止喂养, 全部样本统计体长、体重、螯肢及卵巢分期和重量指标及性腺指数 (gonadosomatic index, $GSI = \text{卵巢重}/\text{体重} \times$

100%); 于切除 30 d 后, 实验 4 组和对照 2 组终止喂养, 统计同上。

1.2.3 组织切片 从每个实验组随机选取 5 个卵巢组织样本, 用 10% 的福尔马林溶液固定, 再用 Bouin 液浸泡 48 h, 经酒精常规脱水、二甲苯透明、石蜡浸置和包埋后, 连续进行切片、常规 H.E 染色、中性树胶封片, FEI 透射电子显微镜 (TEM) 观察、拍照。

1.2.4 数据处理 应用 SPSS 19.0 统计软件的单因素方差分析进行生物学统计。结果用平均值 \pm 标准差表示。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 切除眼柄前后克氏原螯虾形态与卵巢分期变化

对同样养殖环境下 120 尾雌虾随机解剖检测, 池塘中雌虾卵巢绝大多数处于发育 II 期, 颜色呈黄色或浅黄色, 极个别处于发育 III 期, 据此判定本研究所选取的 60 尾雌虾卵巢在单

侧眼柄切除前处于发育 II 期。

本实验对比研究了眼柄分别切除 15 d 和 30 d 克氏原螯虾形态特征的变化。切除眼柄 30 d 后, 雌虾体长 (从眼柄基部到尾尖的距离) 从 (11.50 ± 2.30) cm 增长至 (18.20 ± 3.40) cm, 卵巢重从 (0.80 ± 1.00) g 增长至 (1.80 ± 1.20) g, 增长显著 ($P < 0.05$); 而螯肢长 (从螯肢连接处到螯尖的距离) 和体重也有所增加, 但是差异不显著 ($P > 0.05$) (表 1)。单侧眼柄切除 15 d 和 30 d, 克氏原螯虾雌虾卵巢发育时期加快显著 (表 2)。切除 15 d 后, 有 3 尾雌虾卵巢从 II 期发育至 III 期, 而对照组只有 1 尾, 并且 GSI 指数从 $2.31\% \pm 1.63\%$ 增长至 $2.76\% \pm 1.10\%$ ($P < 0.05$); 切除 30 d 后, 有 7 尾雌虾卵巢从 II 期发育至 III 期, 2 尾发育至 IV 期, 对照组 4 尾发育至 III 期, 切除组的 GSI 指数增长至 $8.05\% \pm 2.51\%$ ($P < 0.05$) (死亡 2 尾)。以上结果表明, 切除眼柄可以促进雌虾卵巢快速发育成熟, 加快个体生长。

2.2 切除眼柄前后卵巢组织结构比较

表 1 眼柄切除对克氏原螯虾形态特征及卵巢的影响

Table 1 Effects of eyestalk ablation on morphological characteristics and ovary weight of red swamp crayfish

组别 Group	时间 (d) Time	体长 (cm) Body length	螯肢长 (cm) Chelicerae length	体重 (g) Body weight	卵巢重 (g) Ovarian weight
	0	8.40 ± 1.70	4.50 ± 0.80	13.20 ± 3.50	0.30 ± 0.10
对照组 1 组 Group 1	15	9.20 ± 2.10	4.80 ± 0.90	15.50 ± 4.40	0.50 ± 0.60
实验组 3 组 Group 3	15	10.30 ± 3.10	5.00 ± 1.10	18.20 ± 4.60	0.60 ± 0.80
对照组 2 组 Group 2	30	11.50 ± 2.30	5.20 ± 0.90	17.20 ± 3.70	0.80 ± 1.00
实验组 4 组 Group 4	30	18.20 ± 3.40	5.60 ± 1.20	21.20 ± 6.50	1.80 ± 1.20
<i>P</i> 值 <i>P</i> value		< 0.05	> 0.05	> 0.05	< 0.05

表 2 眼柄切除对克氏原螯虾卵巢发育的影响

Table 2 Effect of eyestalk ablation on ovary development of red swamp crayfish

组别 Group	时间 (d) Time	卵巢分期 (尾) Stage of ovary (ind)			性腺指数 Gonadosomatic index (GSI) (%)
		II	III	IV	
	0	15	0	0	2.31 ± 1.63
对照组 1 组 Group 1	15	14	1	0	2.64 ± 1.96
实验组 3 组 Group 3	15	12	3	0	2.76 ± 1.10
对照组 2 组 Group 2	30	11	4	0	4.56 ± 2.81
实验组 4 组 Group 4	30	4	7	2	8.05 ± 2.51

每组随机选取 5 个卵巢样本进行切片, 对不同组别的卵母细胞进行电镜显微观察。分组开始前 (0 d) 的卵巢呈浅黄色线状, 卵粒排列紧密, 卵膜薄且透明, 主要以初级卵母细胞为主。卵母细胞椭圆形, 长径 300 ~ 500 μm , 短径 200 ~ 300 μm , 细胞核椭圆形, 核仁数量几个到十几个, 出现卵黄颗粒, 规格一致, 体积很小。滤泡细胞处于卵母细胞最外层的管状夹层中, 胞质黏稠, 排列稀疏, 核仁数量多 (图 1a)。

对照组 (未切除眼柄) 常规养殖 30 d 后, 卵巢呈深黄色细棒状, 占据胸腔的 1/2, 卵粒排列紧密, 卵膜开始变薄, 卵巢腔变得狭小。卵母细胞近圆形, 长径 500 ~ 700 μm , 短径 300 ~ 450 μm , 周边出现液泡, 并且逐渐增多, 进一

步沉积卵黄, 核近圆形, 核仁沿细胞核四周分布, 数量 10 个以下。滤泡细胞呈细条状, 1 个卵母细胞周围通常有几十个滤泡细胞 (图 1b)。

实验组眼柄切除 30 d 后, 卵巢呈褐色棒状, 比较饱满, 占据胸腔的 3/4, 卵膜变得极薄。卵母细胞呈圆形且饱满, 长径 600 ~ 1 500 μm , 短径 450 ~ 1 000 μm , 胞质内已充满大量卵粒, 容易流出, 核生发泡破裂, 细胞核消失。滤泡细胞为空细胞, 同时体积变小, 逐渐与卵母细胞分离 (图 1c ~ f)。

3 讨论

甲壳动物卵巢发育受到神经系统和内分泌系统等方面的调控, 其中神经系统 (视神经节、脑和胸神经节) 对卵巢发育具有重要的调节作

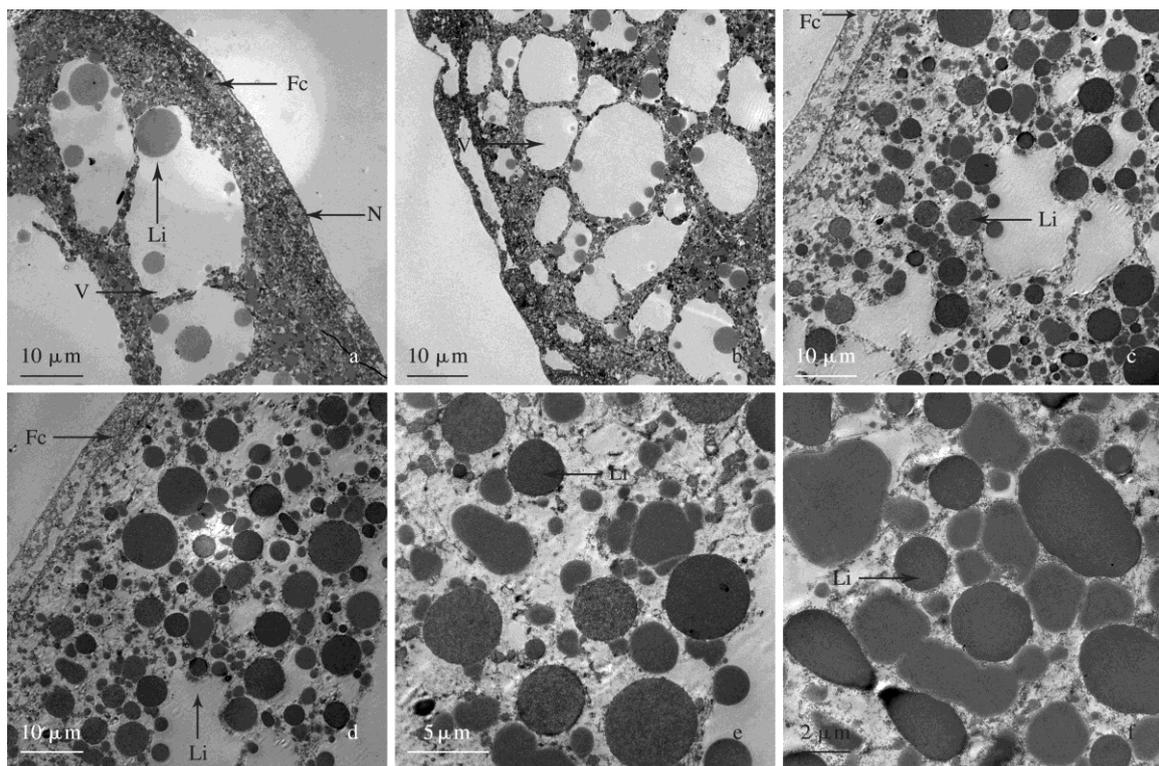


图 1 眼柄切除对于加速克氏原螯虾卵巢发育进程的组织结构比较

Fig. 1 Histological comparison on acceleration of the crayfish ovarian development induced by eyestalk ablation

a. 眼柄切除前卵细胞; b. 未切除眼柄 30 天卵细胞; c ~ f. 眼柄切除 30 d 后实验组卵细胞。

a. Oocyte before eyestalk ablation; b. 30 days without resection of eyestalk ablation; c - f. 30 days after eyestalk ablation.

Fc. 滤泡细胞; N. 细胞核; Li. 脂滴; V. 液泡。Fc. Follicular cell; N. Nucleus; Li. Lipid droplet; V. Vacuole.

用 (Sroyraya et al. 2010)。视神经节 X 器官-窦腺复合体主要分泌性腺抑制激素 (gonad-inhibiting hormone, GIH) 和蜕皮抑制激素 (molt-inhibiting hormone, MIH), 前者靶器官为肝胰腺、卵巢、大颚器及雄性的促雄腺等, 抑制雌性的卵黄发生及性腺刺激因子的生成, 对肝胰腺合成卵黄蛋白及大颚器合成甲基法尼酯 (methyl farnesoate, MF) 也具有抑制作用, 后者也发挥类似的抑制生长、蜕皮的作用。反之, 切除眼柄或者削弱眼柄视神经节中 X 器官-窦腺复合体的机能, 可以阻断性腺抑制激素 (GIH) 和蜕皮抑制激素 (MIH) 对个体生长和发育的抑制作用 (Chaves 2000)。目前国内外许多学者通过实验都证实了甲壳动物去除眼柄后, 能够促进其性腺的发育。

克氏原螯虾作为新兴水产养殖资源, 虽然养殖规模逐年扩大, 但是仍供不应求, 制约因素是虾苗的供给缺口较大。因此, 加快克氏原螯虾生长成熟、促进卵巢发育并排卵具有重要意义。本实验的目的是从形态学及组织学的角度, 对养殖克氏原螯虾经眼柄切除后产生的影响进行研究。实验结果表明, 切除发育早期幼虾单侧眼柄, 可对个体包括体长、螯肢长、体重、卵巢重等方面指标都有不同程度的促进。特别是体长和卵巢重这两个指标, 切除眼柄 30 d 较之 15 d 增加尤其显著, 说明个体体长和卵巢的发育受视神经节的负面调控作用影响相对较大, 也有可能是众多效应的早期表现之一。总之, 削弱视神经节的抑制作用, 对于促进生长、加速发育的效应是显而易见的。但是眼柄手术可能增加个体死亡率 (30 d 死亡 2 尾), 这在技术上需要进一步改进。

从切除眼柄 15 d 以及之后的 15 d, 卵母细胞从发育 II 期阶段度过 III 期阶段进入到 VI 期阶段, 电镜观察卵母细胞最明显的变化有以下几个方面: 卵母细胞体积变大, 变圆; 液泡压缩变小; 卵黄颗粒加速积累, 逐渐占满整个胞内空间; 滤泡细胞胞质从黏稠变稀薄。对照组幼虾在同样 30 d 的正常生长过程中, 其卵巢的发

育程度远远落后于切除眼柄组。我们的实验发现, 与正常养殖情况相比, 切除眼柄之后的克氏原螯虾卵母细胞发育阶段并未减少, 但是发育进程明显加快。对此, 我们认为克氏原螯虾卵黄颗粒的积累主要由两方面提供, 一方面由卵母细胞自身合成, 液泡内可能含有合成卵黄物质所需要的小分子脂类和糖类物质, 并且大量液泡的存在也起到支撑作用, 为接下来大量合成和储存卵黄颗粒提供足够的空间和弹性, 保证每颗卵粒饱满充盈, 到后期阶段, 液泡逐渐被压缩, 空间由卵黄颗粒占据, 可节约胞内空间; 另一方面由外层的滤泡细胞提供, 进入卵黄发生期 (III 期) 后, 滤泡细胞大量出现, 并且与卵母细胞紧密相连, 这两者之间存在广泛而且频繁的跨膜运输, 滤泡细胞不断把大量营养物质运输到卵母细胞内, 直接或间接 (组装加工) 形成卵黄颗粒。到后期时, 卵母细胞的营养物质积累已接近饱和, 同时滤泡细胞传输营养物质的使命已近完成, 此时胞质稀薄, 滤泡细胞变成空细胞, 互相联合形成一层滤泡膜, 最后逐渐与卵母细胞分离。卵黄颗粒的积累在以上两方面的作用下加速完成, 使卵母细胞不断发育, 最终卵巢进入成熟期排卵。王玉凤等 (1997) 在进行罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 卵子发生的研究和杜玉昕等 (2014) 在日本沼虾 (*M. nipponensis*) 卵巢发育研究过程中也都发现了类似的现象, 并提出了相似的观点, 说明卵黄颗粒的两方面积累在甲壳动物中可能存在一定的普遍性。

本研究表明眼柄切除作用对于克氏原螯虾卵黄颗粒的积累有显著加速作用, 但是眼柄切除作用分别对于卵母细胞自身的加速合成和滤泡细胞的快速运输这两点的影响还不是很明确, 有待进一步实验分析和验证。

参 考 文 献

- Chaves A R. 2000. Effect of x-organ sinus gland extract on [³⁵S] methionine incorporation to the ovary of the red swamp crawfish *Procambarus clarkii*. Comparative Biochemistry and Physiology

- Part A: Molecular & Integrative Physiology, 126(3): 407–413.
- Edomi P, Azzoni E, Mettullo R, et al. 2002. Gonad-inhibiting hormone of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*): cDNA cloning, expression, recombinant protein production, and immunolocalization. *Gene*, 284(1/2): 93–102.
- Sroyraya M, Chotwiwatthanakun C, Stewart M J, et al. 2010. Bilateral eyestalk ablation of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*, produces hypertrophy of the androgenic gland and an increase of cells producing insulin-like androgenic gland hormone. *Tissue and Cell*, 42(5): 293–300.
- Uawisetwathana U, Leelatanawit R, Klanchui A, et al. 2011. Insights into eyestalk ablation mechanism to induce ovarian maturation in the black tiger shrimp. *PLoS One*, 6(9): e24427.
- 崔青曼, 袁春营, 吴婷婷. 2004. 眼柄切除及注射黄体酮对中华绒螯蟹幼蟹卵巢发育的影响. *海洋水产研究*, 25(6): 30–34.
- 杜玉昕, 邱高峰. 2014. 日本沼虾卵巢发育的组织学与组织化学观察. *广东农业科学*, 41(13): 119–123.
- 王顺昌. 2003. 克氏螯虾的生物学和生态养殖模式. *淡水渔业*, 33(4): 59–61.
- 王玉凤, 堵南山, 赖伟. 1997. 罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 卵子发生的细胞化学研究. *华东师范大学学报: 自然科学版*, (4): 91–94.
- 吴超, 林琼武, 张黎黎, 等. 2009. 饥饿和切除眼柄对日本囊对虾亲虾性腺发育及血淋巴生化成分含量的影响. *厦门大学学报: 自然科学版*, 48(5): 751–755.
- 殷成海. 2007. 眼柄切除对克氏原螯虾蜕皮·生长·性腺发育的影响. *安徽农业科学*, 35(16): 4818–4819, 4821.
- 张宽, 王贤淼. 2006. 眼柄切除对中华绒螯蟹肝胰腺和生殖腺蛋白质含量及其种类的影响. *山西农业大学学报: 自然科学版*, 26(2): 128–131.
- 赵维信, 白桦, 马晓萍. 1999. 克氏原螯虾卵黄发生过程中卵巢和大颚器孕酮含量的变化. *上海水产大学学报*, 8(3): 232–236.