

学校编码: 10384

密级_____

学号: 22320121151341

廈門大學

硕士学位论文

赤点石斑鱼和青石斑鱼性分化过程中
性腺发育的研究

Gonad development during sexual differentiation in

Epinephelus akaara and *E. awoara*

王盈颖

指导教师姓名: 刘敏 教授

专业名称: 海洋生物学

论文提交日期: 2015年5月

论文答辩时间: 2015年5月

2015年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(刘敏)课题(组)的研究成果,获得(刘敏)课题(组)经费或实验室的资助,在(刘敏)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 王盈颖

2015年5月27日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：王盈颖

2015年5月27日

目 录

摘要.....	I
Abstract	III
第一章 绪论	1
1.1 鱼类的性别方式类型	1
1.2 硬骨鱼类的性腺发育	3
1.2.1 原始生殖细胞及其迁移	3
1.2.2 卵巢的结构及卵子发生	4
1.2.3 精巢的结构及精子发生	8
1.2.4 性分化与性腺发育	10
1.2.5 性转变与性腺发育	11
1.3 石斑鱼概述及其性别方式	12
1.3.1 石斑鱼简介	12
1.3.2 石斑鱼的性别方式	13
1.4 赤点石斑鱼和青石斑鱼概述及其性别方式的研究	15
1.4.1 赤点石斑鱼	15
1.4.2 青石斑鱼	17
1.5 本研究的目的地及意义	19
第二章 研究材料及方法	20
2.1 研究材料	20
2.1.1 样品的采集	20
2.1.2 主要仪器	20
2.1.3 主要试剂	21
2.2 研究方法	21
2.2.1 数量性状测量	21

2.2.2 性腺固定	21
2.2.3 脱水和包埋	21
2.2.4 切片	22
2.2.5 染色	22
2.2.6 显微镜观察和性腺分期	23
第三章 研究结果	25
3.1 生物学特征	25
3.1.1 全长-体重关系	25
3.1.2 全长随年龄的变化关系	26
3.2 性分化过程中的性腺发育阶段特征	28
3.2.1 未分化型性腺	28
3.2.2 卵巢型性腺	33
3.2.3 双性型性腺	36
3.2.4 卵巢和精巢	41
3.3 性腺发育的月变化	45
第四章 讨论	50
4.1 生长特性	50
4.2 早期性腺发育	51
4.3 性别方式	54
4.4 初次性成熟及繁殖季节	54
第五章 总结与展望	57
5.1 总结	57
5.2 创新点	58
5.3 不足与展望	58
参考文献	59
致 谢	69

Content

Abstract in Chinese	I
Abstract in English.....	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Sex patterns of fishes	1
1.2 Gonad development in teleosts.....	3
1.2.1 Primordial germ cell and its migration.....	3
1.2.2 Ovarian structure and oogenesis.....	4
1.2.3 Testicular structure and spermatogenesis	8
1.2.4 Gonad development during sex differentiation.....	10
1.2.5 Gonad development during sex change.....	10
1.3 Introduction to groupers and their sexual patterns	12
1.3.1 Introduction of groupers	12
1.3.2 Sexual patterns in groupers	13
1.4 Introduction to <i>Epinephelus akaara</i> and <i>E. awoara</i> and their sexual patterns	15
1.4.1 <i>E. akaara</i>	15
1.4.2 <i>E. awoara</i>	17
1.5 Objectives and significance of this study	19
Chapter 2 Materials and Methods.....	20
2.1 Materials	20
2.1.1 Sample collection	20
2.1.2 Main apparatus	20
2.1.3 Main reagents	21
2.2 Methods	21
2.2.1 Biological parameter measurements	21
2.2.2 Fixation of gonad.....	21
2.2.3 Dehydration and embedment.....	21

2.2.4 Section	22
2.2.5 Staining.....	22
2.2.6 Microscopic examination and gonad developmental stages	23
Chapter 3 Results	25
3.1 Biological parameters	25
3.1.1 Relationships between total length and body weight	25
3.1.2 Size variation within age groups	26
3.2 Gonad developmental stages during sexual differentiaton.....	28
3.2.1 Undifferentiated-phase gonad	28
3.2.2 Ovarian-phase gonad.....	33
3.2.3 Bisexual-phase gonad.....	36
3.2.4 Ovary and testis	41
3.3 Monthly variation of gonad development	45
Chapter 4 Discussion	50
4.1 Growth characteristics	50
4.2 Early gonad development	51
4.3 Sex pattern	54
4.4 First sexual maturation and reproductive season.....	54
Chapter 5 Conclusion and Perspective	57
5.1 Conclusion.....	57
5.2 Innovation.....	58
5.3 Perspective.....	58
References	59
Acknowledgements.....	69

摘要

赤点石斑鱼和青石斑鱼已分别被确认为双向性转变和雌性先熟的雌雄同体型种类,但是第一次性成熟前的性分化和性腺发育特征还未有深入的研究。本研究利用传统组织学切片方法,跟踪赤点石斑鱼从孵化后6周到95周和青石斑鱼从孵化后6周到85周的性腺发育过程,深入了解石斑鱼性分化过程中性腺发育特征,探讨石斑鱼性别方式的多样性。孵化后约6周的仔鱼捕获自福建漳浦附近海域,并移入当地的养殖场利用天然海水进行室外养成,直至达到商品规格(一般2年以上)。实验样品采集从2013年2月至2014年5月,每2~17周(主要5~6周)一次,每种每次随机取20尾。赤点石斑鱼性分化过程中性腺发育结果如下:(1)成对的性腺原基在孵化后6周被观察到,位于体腔背部、鳔腹面的两侧。(2)孵化后16周在性腺原基内观察到性原细胞。(3)初级卵母细胞在孵化后27周出现,同时伴随着卵巢腔的形成。(4)孵化后27周的性腺呈双性型,即包含卵巢腔、初级卵母细胞和少量精小囊。(5)孵化后34周由双性型性腺开始性分化。雌性分化表现在从初级卵母细胞向皮质泡卵母细胞的发育,并含有少量精小囊。雄性分化表现为精小囊的大量增殖,并含有初级卵母细胞。(6)孵化后41周雌性和雄性均初次性成熟。雌性的卵巢含有卵黄卵母细胞和分散的精小囊,最小全长为143 mm;雄性的精巢含有大量不同阶段的精小囊、精子排入输精窦中以及一定数量的初级卵母细胞,最小全长为137 mm。青石斑鱼性分化过程中性腺发育结果如下:(1)成对的性腺原基在孵化后6周被观察到,同样位于体腔背部、鳔腹面的两侧。(2)孵化后8周在性腺原基内观察到性原细胞。(3)初级卵母细胞出现在孵化后18周,卵巢腔则在孵化后23周形成。(4)孵化后29周的性腺呈双性型(见上)。(5)孵化后41周由双性型性腺开始性分化。雌性分化和雄性分化的性腺特征与赤点石斑鱼相同(见上)。(6)雌性初次性成熟最早在孵化后47周,最小全长为149 mm;孵化后58周观察到即将成熟的雄性,精巢含有大量的精子小囊,但未见精子排入输精窦,最小全长为

188 mm。研究表明，赤点石斑鱼和青石斑鱼的性腺发育不同阶段的出现时间存在差异。无论是赤点石斑鱼还是青石斑鱼，均发现有直接由幼鱼通过性分化发育为雄性的途径。结合过去的研究成果，进一步确定了赤点石斑鱼属于双雄型的双向性转变雌雄同体，而青石斑鱼属于双雄型的雌性先熟雌雄同体。

关键词：石斑鱼；雌雄同体；性分化；性腺发育；组织学

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Bi-directional sex change and protogynous hermaphroditism are confirmed for the Hong Kong grouper *Epinephelus akaara* and the yellow grouper *E. awoara*, respectively; however, sexual differentiation and gonad development prior to first sexual maturation are still unclear for both species. In this study, based on histology, gonad development of *E. akaara* was examined from post larval phase with the estimated age of 6 weeks after hatching (wah) until 95 wah and *E. awoara* was from 6 wah until 85 wah. Post larvae were collected by nets from Zhanpu waters, Fujian, and subsequently reared locally in outdoor tanks under seawater supply till marketable sizes (usually after two years). Approximate 20 specimens of each species were randomly collected every 2~17 weeks (mainly 5~6 weeks) between February 2013 and May 2014. The results of *E. akaara* showed that: (1) the paired gonadal primordia (GP) were observed at 6 wah lied in the dorsal part of the body cavity and the ventral part of the swimbladder; (2) gonidia were first observed in GP at 16 wah; (3) primary-growth stage oocytes (O1) were observed at 27 wah, consistent with the completion of ovarian lumen (OL); (4) the bisexual phase gonad with an OL, O1 and scattered spermatogenic cysts (SC) was observed at 27 wah; (5) sexual differentiation started subsequently from the bisexual phase at 34 wah, with the appearance of cortical-alveolus stage oocytes (O2) for developing females and the proliferation of SC for developing males; (6) the minimum age for first sexual maturation was at 41 wah for both female and male, with 143 mm total length (TL) and 137 mm TL for minimum size, respectively. Ovaries of mature females contained the vitellogenic stage oocytes (O3), or later stage oocytes, and scattered SC; testes of mature males had sperm in sperm sinuses within the gonadal wall and the remained O1. The results

of *E. awoara* showed that: (1) the paired GP were observed at 6 wah, lied the same position as *E. akaara*; (2) gonad were first observed in GP at 8 wah; (3) the appearance of O1 was recorded at 18 wah, and the OL completed at 23 wah; (4) the bisexual phase gonad, same as that in *E. akaara*, was observed at 29 wah; (5) sexual differentiation started subsequently from the bisexual phase at 41 wah, and the gonad characteristics were the same in *E. akaara*; (6) the minimum age and size for first sexual maturation of female were at 47 wah and 149 mm TL, respectively; a nearly-mature male was found at 58 wah and 188 mm TL with the proliferation of spermatid cysts but without sperm in sperm sinuses. This study demonstrated the variation of time on gonad development of groupers and provided the evidence of primary male developmental pathway in both *E. akaara* and *E. awoara*. Based on the previous and current studies, it is confirmed that *E. akaara* is a bi-directional sex changer with two developmental pathways of males, and *E. awoara* is a diandric protogynous hermaphrodite.

Key words: Epinephelidae; hermaphroditism; sexual differentiation; gonad development; histology

第一章 绪论

1.1 鱼类的性别方式类型

鱼类是脊椎动物中种类最多的一个类群, 约27,977种, 其中淡水鱼类11,952种、海水鱼类15,800种、洄游性鱼类225种, 广泛分布在全球的各种水域(Nelson, 2006)。鱼类不仅表现出不同的形态构造和生活方式, 而且在性别多样性和复杂性方面也尤为突出(Atz, 1964; Smith, 1975; Sadovy and Shapiro, 1987; Delvin and Nagahama, 2002; Sadovy de Mitcheson and Liu, 2008)。鱼类的性别方式可分为两种, 即雌雄异体型(Gonochorism)和雌雄同体型(Hermaphroditism) (图1.1)。雌雄异体型的个体在其整个生活史中仅含有卵巢或精巢, 性别表达分别为功能性雌鱼(Functional female)或功能性雄鱼(Functional male)。功能性雌鱼产生卵子, 而功能性雄鱼产生精子。卵子和精子在体内或体外受精。大多数鱼类属于雌雄异体型。雌雄同体型的个体在其整个生活史中既具有卵巢, 可产生卵子, 又具有精巢, 可产生精子。Atz (1964)首次系统地描述了鱼类雌雄同体的性别方式, 阐述了其多样性、广泛性和复杂性。近50年, 有关鱼类雌雄同体的研究主要集中在适应机制(Ghiselin, 1969; Warner, 1988)、外在社会调控机制(Fricke and Fricke, 1970; Hattori, 1991; Quintio et al., 1997; Liu and Sadovy, 2004a; Nakamura et al., 2005)、内在基因调控机制(Delvin and Nagahama, 2002)、性转变过程中卵巢和精巢的结构变化(Sadovy and Shapiro, 1987)等方面。目前已确定7目27科的鱼类具有雌雄同体型, 涵盖了辐鳍鱼纲(Actinopterygii)低等和高等的种类(Sadovy de Mitcheson and Liu, 2008)。

鱼类雌雄同体又分为两大类, 即同时成熟雌雄同体(Simultaneous hermaphroditism)和相继成熟雌雄同体(Sequential hermaphroditism) (图1.1)。若个体在一个短暂的繁殖季节内, 性腺既产生卵子又产生精子, 此类鱼为同时成熟雌雄同体; 若个体在一个繁殖季节内仅产生卵子或产生精子, 然后通过性转变(Sex

change), 在下一个繁殖季节又产生精子或产生卵子, 此类鱼为相继成熟雌雄同体。相继成熟雌雄同体又分为三种形式, 分别为雌性先熟(Protogyny)、雄性先熟(Protandry)和双向性转变(Bi-directional sex change) (图1.1&1.2)。雌性先熟的鱼类是指功能性雌鱼可以通过性转变成为功能性雄鱼(图1.2)。而雄性先熟的鱼类恰恰相反, 是指功能性雄鱼可以通过性转变成为功能性雌鱼(图1.2)。双向性转变是指功能性雌鱼可以通过性转变成为功能性雄鱼, 而功能性雄鱼也可以通过性转变成为功能性雌鱼, 这是最近二十年在实验室环境下发现的新形式(图1.2)。目前双向性转变在鲈形目(Perciformes)的石斑鱼科(Epinephelidae)、拟雀鲷科(Pseudochromidae)、刺盖鱼科(Pomacanthidae)、鲷科(Cirrhitidae)、隆头鱼科(Labridae)和鰕虎鱼科(Gobiidae)有报道, 确定的种类原先均认为是雌性先熟的雌雄同体(Kobayashi and Suzuki, 1994; Munday et al., 1998; Nakashima et al., 2000; Cole and Hoese, 2001; Sakai et al., 2003; Liu and Sadovy, 2004a; Lorenzi, 2006; Sadovy de Mitcheson and Liu, 2008; Kuwamura et al., 2015)。

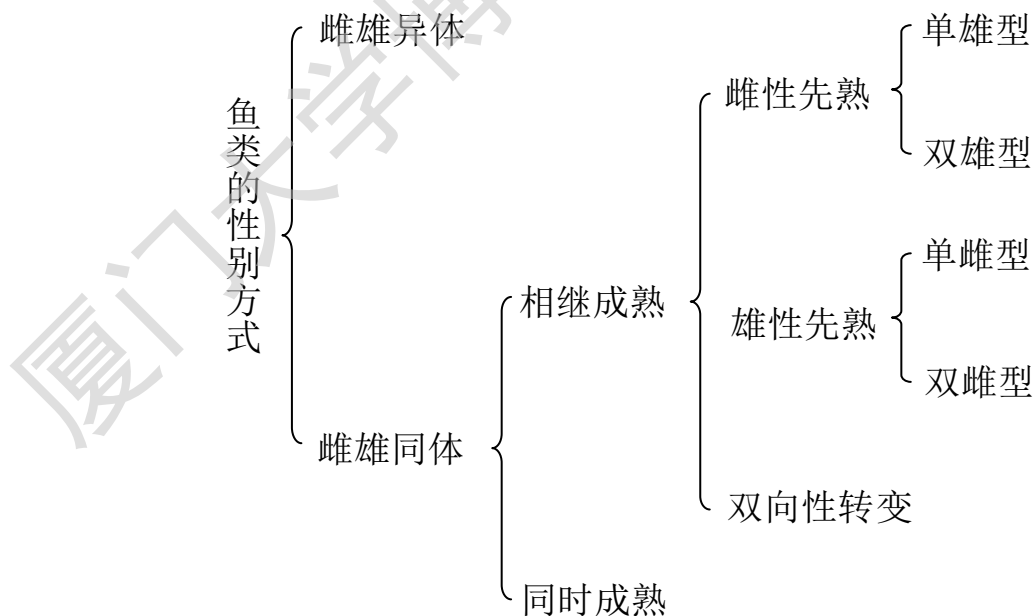


图1.1 鱼类的性别方式

Figure 1.1 Sexual patterns in fishes

雌性先熟鱼类，根据雄鱼的发育途径，又可分为两类：单雄型(Monandry)和双雄型(Diandry) (Reinboth, 1962) (图1.1)。单雄型的雄性个体均来自于功能性雌鱼的性转变，而双雄型的雄性个体不仅来自于功能性雌鱼的性转变，也来自于幼鱼直接通过性分化(Sex differentiation)发育为功能性雄鱼。同样，雄性先熟鱼类，也可分为两类：单雌型(Monogyny)和双雌型(Digynty) (Reinboth, 1962) (图1.1)。单雌型的雌性个体均来自于功能性雄鱼的性转变，而双雌型的雌性个体不仅来自于功能性雄鱼的性转变，也来自于幼鱼直接通过性分化发育为功能性雌鱼。

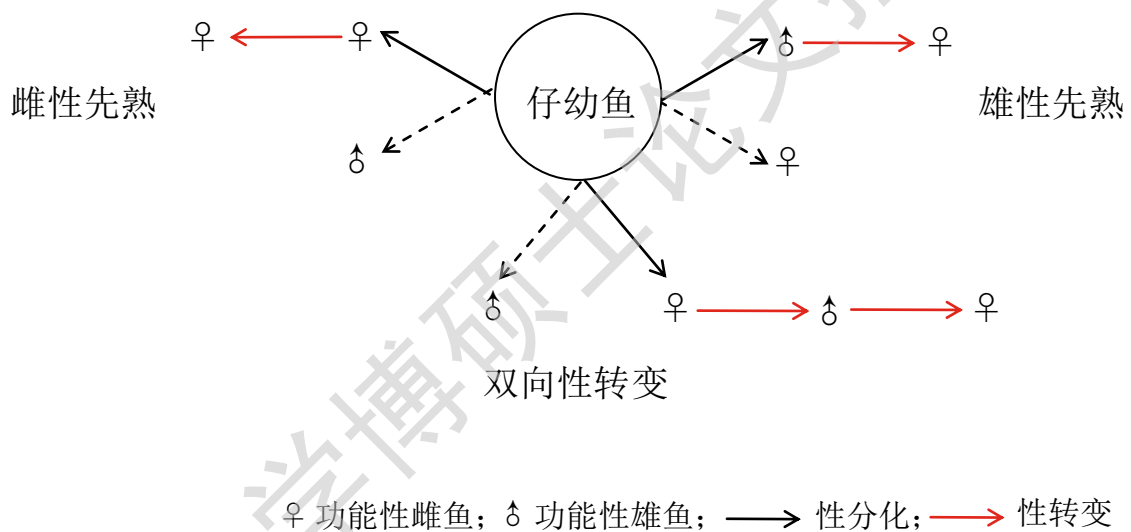


图1.2 鱼类同时成熟雌雄同体的发育路径

Figure 1.2 Pathways of simultaneous hermaphroditism in fishes

1.2 硬骨鱼类的性腺发育

1.2.1 原始生殖细胞及其迁移

鱼类的性腺原基(Gonadal primordium)或生殖脊(Genital ridge)是在胚胎阶段由中胚层(Mesoderm)的体细胞(Somatic cell)发育而成，位于背肠系膜两侧的腹腔

壁膜上(Nieuwkoop and Sutasurya, 1979; Timmermans, 1995; Braat et al., 1999; Slanchev et al., 2005)。

鱼类胚胎发育过程中,最早出现的、迁移至性腺原基或生殖脊前的生殖细胞称为原始生殖细胞(Primordial germ cell),是在胚胎发育的早期阶段从一般体细胞分化出来的,但其起源随种类不同而不同,且存在较大争议。在光镜下,鱼类原始生殖细胞的共同特征为:体积大,圆形、梨形或卵圆形,细胞界限明显,细胞质弱嗜酸性,细胞核大,核仁1~2个(André and Rouiller, 1957; Eddy, 1975; Nieuwkoop and Sutasurya, 1979; 宋卉和王树迎, 2004)。

原肠形成后,原始生殖细胞便从发生部位通过肠系膜或体节迁移至性腺原基或生殖脊;不过,在某些鱼类,原始生殖细胞还出现在其它器官中,如肝脏,从而说明其可能会借助于血液循环进行迁移(Romanov and Altuf'ev, 1992)。另外,由于原始生殖细胞周围被一群组织细胞包围,因此有研究者认为其迁移是与这些组织细胞的推动有关;但也有观点认为原始生殖细胞表面具伪足,是以主动迁移方式进入性腺原基的(Johnston, 1951; Hamaguchi, 1992)。

1.2.2 卵巢的结构及卵子发生

在卵巢(Ovary),原始生殖细胞迁移进入性腺原基后,开始有丝分裂(Mitosis),形成卵原细胞(Oogonia)。在大多数硬骨鱼类中,卵巢的发育首先表现在体细胞和卵原细胞的增殖以及进入减数分裂(Meiosis)的初级卵母细胞的出现,然后卵巢腔(Ovarian lumen或Ovarian cavity)才开始形成;不过,也有部分鱼类,如一些鲑科(Salmonidae)鱼类,是没有卵巢腔的(Kendall, 1921)。从外部形态上看,大多数硬骨鱼类的卵巢成对,分为左右两叶,长条状,由卵巢系膜悬系于体腔背侧,末端开口于共同的输卵管(Ovarian duct)。卵巢壁由结缔组织、平滑肌纤维和微血管等构成。同时,从卵巢壁向卵巢腔内伸出许多成束的由结缔组织和生殖上皮(Germinal epithelium)组成的片状或板层状结构,生殖细胞在上面进行发育,称为产卵板(Ovarian lamellae)。

卵子发生(Oogenesis)是指从卵原细胞增殖进入减数分裂,成为卵母细胞(Oocyte),并最终发育成为卵子(Egg)的整个过程(Grier et al., 2009)。关于卵子发生的分期,国际上至今仍无统一的标准。

20世纪50~60年代, Yamamoto等学者对卵母细胞发育的分期做了较多的研究,主要以细胞核、核仁数目和大小、细胞质内含物的演变状态为依据(Yamamoto, 1956; Yamamoto and Yamazaki, 1961; Yamamoto and Yoshioka, 1964)。例如,在研究暗拟鲈(*Pseudopleuronectes obscurus*)的卵母细胞发育时,将其分为11期,分别为染色质-核仁时期(Chromatin-nucleolar stage)、核仁外周早期(Early peri-nucleolus stage)、核仁外周晚期(Late peri-nucleolus stage)、卵黄囊泡时期(Yolk vesicle stage)、初级卵黄时期(Primary yolk stage)、次级卵黄时期(Secondary yolk stage)、三级卵黄时期(Tertiary yolk stage)、细胞核迁移时期(Migratory nucleus stage)、成熟前期(Pre-maturation stage)、成熟时期(Maturation stage)和成熟卵时期(Ripe egg stage) (Yamamoto, 1956) (表1.1)。在对金鱼(*Carassius auratus*)和青鳉(*Oryzias latipes*)的研究中,将卵母细胞的发育分期做了细微调整,分别划分为10个时期和8个时期(Yamamoto and Yamazaki, 1961; Yamamoto and Yoshioka, 1964)。

20世纪70年代, Harder对鱼类性腺及其发育进行了系统的分析和总结,指出 Srivastava和Rathi在研究印度囊鳃鲈(*Heteropneustes fossilis*)卵母细胞发育时提出的7个时期更为合理,即染色质-核仁时期、核仁外周时期(Perinucleolar stage)、卵黄囊泡时期、卵黄球时期(Yolk globule stage)、卵黄颗粒时期(Yolk granule stage)、成熟时期和成熟卵时期(Srivastava and Rathi, 1970; Harder, 1975) (表1.1)。

20世纪80~90年代,国外多位学者对硬骨鱼类卵母细胞的发育均做了总结(Wallace and Selman, 1981; De Vlaming, 1983; Guraya, 1986; Wallace et al., 1987; West, 1990)。不过,也同70年代大多数文章一样,其术语都是来自 Yamamoto (1956)的研究结果。其中, Wallace和Selman (1981)提出卵母细胞发育分为4个时期,即初级生长(Primary growth)、卵黄泡或皮质泡形成(Yolk vesicle or cortical alveoli formation)、卵黄发生(True vitellogenesis)和成熟(Maturation) (Wallace and Selman,

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.