

文章编号: 1674 - 5566(2013)01 - 0042 - 05

青海湖裸鲤精子形态和超微结构的研究

梁 健¹, 李长忠¹, 史建全², 祁洪芳²

(1. 青海大学 生物科学系, 青海 西宁 810016; 2. 青海湖裸鲤救护中心, 青海 西宁 810016)

摘 要: 应用扫描电镜和透射电镜技术, 观察了青海湖裸鲤精子的外部形态和超微结构。结果显示, 青海湖裸鲤精子由头部、中段和尾部 3 部分组成。精子头部呈椭圆形, 主要结构是细胞核, 细胞质极少; 核前端无顶体, 后端偏向一侧有植入窝, 植入窝约凹入细胞核的 1/3; 核中染色质致密。精子中段由中心粒复合体和袖套组成。中心粒复合体位于植入窝内, 包括近端中心粒和基体, 近端中心粒和基体之间成钝角关系; 袖套与细胞核后端相连, 袖套中含有线粒体。精子尾部细长, 主要结构是轴丝, 为典型的“9 + 2”型结构, 轴丝外两侧为细胞质膜形成的对称性侧鳍。

研究亮点: 青海湖裸鲤是青海湖水域特有的鱼种, 在青海湖“鱼鸟共生”生态系统中发挥着至关重要的作用。本文发现裸鲤精子头部的主要结构是细胞核, 核后端偏向一侧有较深的植入窝, 位于植入窝内的中心粒复合体和袖套构成了精子中段, 尾部鞭毛轴丝是“9 + 2”型微管结构, 轴丝外侧有两个对称性的侧鳍。

关键词: 青海湖裸鲤; 精子; 形态结构; 超微结构

中图分类号: Q 954; S 917

文献标志码: A

青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii*) 又名湟鱼, 属脊椎动物亚门 (Vertebrate), 硬骨鱼纲 (Osteichthyes), 辐鳍亚纲 (Actinopterygii), 鲤形目 (Cypriniformes), 鲤科 (Cyprinidae), 裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae), 是青海湖水域长期地理隔离所演化而来的冷水性咸淡水特有鱼种, 是适应高原寒冷环境的裂腹鱼类和国家二级保护珍贵鱼类^[1]。青海湖裸鲤是青海湖水系中独有的大型经济鱼类, 在青海湖“鱼鸟共生”生态系统中发挥着至关重要的作用, 处于整个生态系统的核心地位^[1]。同时, 裸鲤体质粗壮肥满, 肉味鲜嫩丰腴, 营养丰富, 含粗脂量为 7.1%, 含粗蛋白量高达 18.3%, 风味独特, 具有很高的经济价值^[2]。

青海湖地处高寒, 水温常年偏低, 湖中饵料贫乏, 青海湖裸鲤生长非常缓慢, 达到 500 g 重的个体需要 10 年以上^[3], 且性成熟晚, 繁殖力低^[4]。为维护青海湖生态系统的平衡, 保持青海湖裸鲤的种群延续, 开展青海湖裸鲤生殖生物学的研究势在必行。已有学者从青海湖裸鲤性腺

发育的组织学^[5]、人工繁育^[6]、遗传多样性^[7]、繁殖力^[4]等方面开展了科学研究。

鱼类精子的结构对其受精生物学过程有重要影响, 研究鱼类精子的超微结构对于获得高质量的精子、提高人工繁殖的受精率意义重大。近年来, 对硬骨鱼类精子超微结构的研究很多, 以鲤科鱼类为例, 有鲤^[8]、草鱼^[9]、兴国红鲤^[9]、玫瑰无须鲃^[10]、胭脂鱼^[11]、似刺鲃^[12]等, 但有关青海湖裸鲤精子结构的研究未见报道。本实验利用电镜技术, 观察了青海湖裸鲤精子形态和超微结构, 旨在完善青海湖裸鲤的生殖生物学资料, 并为提高人工繁殖受精率提供基础数据和资料。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

青海湖裸鲤由青海湖裸鲤救护中心惠赠。

1.2 精子采集

选择生殖周期为 V 期^[5]的雄鱼个体 (雄性个

收稿日期: 2012-05-31 修回日期: 2012-06-29

基金项目: 青海大学 2010 年中青年科研基金项目 (2010 - QN - 01)

作者简介: 梁 健 (1983 -), 男, 助教, 硕士, 研究方向为动物生物化学和分子生物学。E-mail: liangjianws@126.com

体体长 200.0 ~ 230.0 mm, 体质量 65.0 ~ 70.0 g, 年龄 4 ~ 5 龄)。实验鱼要求活跃健壮、体表鲜亮完好。将所选雄鱼体表水分擦干, 用手轻压鱼腹部使精液流出滴入干燥冰浴玻璃瓶中, 实验用精液为乳白、粘稠, 无血、尿、粘液等污染。采精时注意避免高温和阳光直射。经显微镜观察, 取精子活力大于 90% 的精液 3 mL 用 3 倍体积的 2.5% 戊二醛固定, 4 °C 保存。

1.3 电镜样品制备

样品制备参照章龙珍等^[13]的方法。

扫描电镜样品制备: 将固定的精液经磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗, 1% 锇酸固定, 乙醇梯度脱水, 乙酸异戊酯过渡, 干燥, 喷金, JEM-800 扫描电镜下观察、拍照。

透射电镜样品制备: 将固定的精液经离心, 剥离沉淀, PBS 冲洗, 2% 锇酸固定, 乙醇梯度脱水后, Epon812 包埋, LKB-nova 超薄切片片机切片, 醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, 在 JEM-1200EX 透射电镜下观察、拍照。

2 结果

2.1 青海湖裸鲤精子形态

青海湖裸鲤精子分头部、中段和尾部 3 部分 (图版 - 1, 2)。头部近似卵形, 表面光滑, 中段较短, 尾部细长。

2.2 青海湖裸鲤精子超微结构

2.2.1 头部

精子头部呈椭圆形, 长径为 (2.58 ± 0.64) μm , 短径为 (1.4 ± 0.3) μm , 有背腹之分, 头部几乎全由细胞核占据, 细胞质极少。细胞核中染色质致密, 被核膜和质膜紧密包围, 核膜与质膜结合紧密。细胞核的前端无顶体, 后端有植入窝, 植入窝偏向头部一侧, 植入窝凹入深度约为头部的 1/3 (图版 - 3)。

2.2.2 中段

精子中段较短, 长度约为 (1.83 ± 0.23) μm , 由中心粒复合体和袖套构成。中心粒复合体位于植入窝中, 袖套接于核的后端。中心粒复合体偏于核的一侧, 包括近端中心粒和基体两部分, 近端中心粒与基体成钝角关系, 夹角约为 100 ~ 120 度 (图版 - 3, 4)。袖套呈筒状, 连于核的腹侧后端, 袖套两侧较对称。袖套内有线粒体, 纵切面上可见 3 个线粒体 (图版 - 5)。袖套由两层膜

包裹, 即袖套内膜和袖套外膜, 袖套内膜位于袖套的内侧, 内膜包裹着的中央空腔称为袖套腔, 袖套外膜位于袖套的外侧 (图版 - 5, 6)。基体是轴丝生长的根基, 轴丝的起始端位于袖套腔中, 轴丝外侧有 4 个囊管包围, 囊管纵列, 配列不对称, 囊腔中无定形结构存在, 囊管围绕在轴丝外围的 2/3 区域 (图版 - 6)。

2.2.3 尾部

精子的尾部主要是鞭毛。鞭毛细长, 鞭毛的核心结构是轴丝, 轴丝由基体生长出来, 贯穿于整个鞭毛 (图版 - 2, 11, 12)。轴丝横切面为典型的“9 + 2”结构, 外周为 9 组二联微管, 中央为一组微管对 (图版 - 7)。轴丝伸出袖套腔之后, 外包以细胞质膜形成的对称性侧鳍, 侧鳍厚度约为 0.12 μm (图版 - 2, 10), 观察时发现侧鳍有时仅出现在鞭毛一侧, 有时又两侧均无 (图版 - 11, 12)。轴丝外侧囊管由近核端的 4 个逐渐变成 2 个, 最后仅见 1 个, 直至消失 (图版 - 6, 8, 9)。

3 讨论

3.1 精子形态

青海湖裸鲤作为青海湖中唯一的大型经济鱼类, 属体外受精鱼类, 研究发现其精子结构较为简单。与大多数硬骨鱼类的精子结构类似^[14], 青海湖裸鲤精子亦由头部、中段和尾部组成, 但其中段和尾部的分界明显。

3.2 精子头部

青海湖裸鲤精子头部绝大部分为细胞核, 核膜与质膜紧密相接, 这一结构与鲤^[8]、兴国红鲤、草鱼^[9]的精子结构非常相似。精子头部顶端无顶体, 大多数硬骨鱼类的精子都无顶体, 如鲤^[8]、玫瑰无须鲃^[10]、江黄颡鱼^[15]等, 但也有如肺鱼类^[14]、鲟鱼类^[16]、鲑^[17]等硬骨鱼类的精子有顶体。硬骨鱼类的无顶体主要是为了适应在流水中的体外受精进化而来, 是硬骨鱼类进化上逐渐退化丢失的结构^[10], 因此有顶体的鱼类属于较为原始的类群。有顶体的精子在精卵结合时会发生顶体效应、后通过受精孔入卵, 而无顶体的精子则直接通过鱼卵上的卵膜孔进入卵。因此, 青海湖裸鲤精子应是通过卵膜孔直接进入卵的。另外, 青海湖裸鲤精子头部鲜见网络状的间隙^[8, 18]和核泡结构^[19], 有学者认为核空泡可能与精子活力相关^[20], 这需要进一步研究。

3.3 精子中段

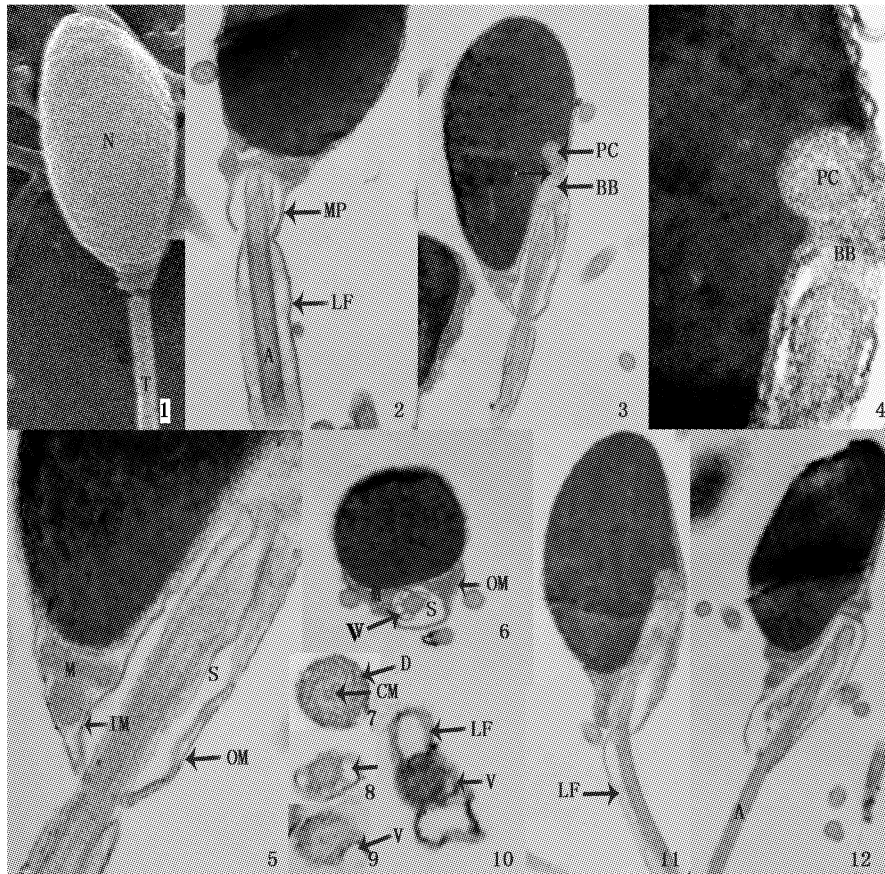
硬骨鱼类精子都有中心粒复合体结构存在,其组成和排列关系不尽相同。青海湖裸鲤精子的中心粒复合体与鲤^[8]相同,由近端中心粒和基体组成。另有部分鱼类中心粒复合体由近端中心粒、中心粒间体和基体构成,如黄颡鱼^[21]、七带石斑鱼^[22],或由两个基体构成,如斑点叉尾鲷^[23]。青海湖裸鲤精子近端中心粒和基体两者呈钝角关系而非垂直关系,这与七带石斑鱼^[22]、大鳞副泥鳅^[24]等相似,比较少见。硬骨鱼袖套结构中的线粒体是为精子的生命活动提供能量的,青海湖裸鲤精子中段一侧线粒体仅见3个,亦无复合线粒体存在,这可能是裸鲤精子活力较差的一个重要原因。

3.4 精子尾部

青海湖裸鲤精子尾部的主要结构为轴丝,轴丝主要由9组外周二联微管和一对中心微管共同构成典型的“9 + 2”结构,这与大部分硬骨鱼类相同^[14]。与其他硬骨鱼类不同的是青海湖裸鲤精子尾部有侧鳍,尤要指出的是,与青海湖裸鲤亲缘关系相近的鲤鱼精子尾部也不存在侧鳍结构^[8]。研究表明,侧鳍会影响到游泳速率,从而影响到受精率,但这一结论还存在争议^[25]。另外,在观察的过程中我们还发现,青海湖裸鲤有的两侧侧鳍都存在,有的只有一侧侧鳍存在,还有两侧侧鳍都不存在的情况。据此推测,侧鳍与鞭毛的结合可能并不紧密,部分侧鳍在样品制作的过程中脱落。青海湖裸鲤精子轴丝外侧有囊管结构存在,此结构在草鱼、兴国红鲤中亦有报道,推测这种扁囊结构其功能在于支撑尾部,其不对称分布与尾部的运动有关^[9]。

参考文献:

- [1] 朱松泉,武云飞. 青海湖地区鱼类区系和青海湖裸鲤的生物学[M]. 北京:科学出版社,1975.
- [2] 陈大庆,熊飞,史建全,等. 青海湖裸鲤研究与保护[M]. 北京:科学出版社,2011.
- [3] 史建全,陈大庆,杨建新,等. 青海湖裸鲤资源评析[J]. 淡水渔业,2000,30(11):38-40.
- [4] 史建全,杨建新,祁洪芳,等. 青海湖裸鲤繁殖生物学的研究[J]. 青海科技,2000,7(2):12-15.
- [5] 唐洪玉,陈大庆,史建全,等. 青海湖裸鲤性腺发育的组织学研究[J]. 水生生物学报,2006,30(2):40-46.
- [6] 闫保国,闫立君,卢建一. 青海湖裸鲤人工繁育试验报告[J]. 河北渔业,2006(7):43-45.
- [7] 张春霖,张大庆,史建全,等. 青海湖裸鲤繁殖群体遗传多样性的RAPD分析[J]. 水产学报,2005,29(3):22-27.
- [8] 尤永隆,林丹军. 鲤鱼精子超微结构的研究[J]. 动物学报,1996,17(4):377-383.
- [9] 林光华,林琼,胡成钰,等. 草鱼、兴国红鲤和革胡子鲶精子超微结构的比较研究[J]. 南昌大学学报:理科版,1998,22(3):283-287.
- [10] 胡家会,张永忠,付崇罗,等. 玫瑰无须鲃精子的超微结构[J]. 动物学报,2005,51(5):892-897.
- [11] 李飞,万全,庄永龙,等. 胭脂鱼精子结构研究[J]. 安徽农业大学学报,2009,36(2):260-266.
- [12] 徐钢春,张呈祥,顾若波,等. 似刺鲃精子的超显微结构及主要生物学特性[J]. 中山大学学报:自然科学版,2010,49(1):80-84.
- [13] 章龙珍,闫文罡,庄平,等. 褐牙鲈精子超微结构观察[J]. 海洋渔业,2010,32(1):35-41.
- [14] 刘雪珠,杨万喜. 硬骨鱼类精子超微结构及其研究前景[J]. 东海海洋,2002,20(3):32-37.
- [15] 刘利平,王武,赵雷蕾,等. 江黄颡鱼精子的超微结构[J]. 上海水产大学学报,2004,13(3):198-201.
- [16] MARTIN N D, WAYNE S K, ROSEMARY A W. Sperm-cell ultrastructure of North American sturgeons. III. The lake sturgeon (*Acipenser fulvescens* Rafinesque, 1817) [J]. Canadian Journal of Zoology, 2000, 78: 438-447.
- [17] SACHIKO M. Fine Structure of Spermatozoa of the Hagfish *Eptatretus burger* (Agnatha) [J]. The Biological Bulletin, 1995, 189: 6-12.
- [18] 尹洪滨,尹家胜,孙中武,等. 哲罗鱼精子的超微结构[J]. 水产学报,2008,32(1):27-31.
- [19] 张永泉,尹家胜,刘奕,等. 白斑红点鲑精子形态和超微结构的研究[J]. 上海海洋大学学报,2011,20(6):820-825.
- [20] 王冰,万全,李飞,等. 刀精子超微结构研究[J]. 水生态学杂志,2010,3(3):57-63.
- [21] 尤永隆,林丹军. 黄颡鱼精子的超微结构[J]. 实验生物学报,1996,29(3):235-239.
- [22] 廖光勇,区又君,李加儿,等. 七带石斑鱼精子的超微结构[J]. 上海海洋大学学报,2011,20(1):73-75.
- [23] POIRIER G R, NICHOLSON N. Fine structure of the testicular spermatozoa from the channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Journal of Ultrastructure Research, 1982, 80(1):104-110.
- [24] 李飞,万全,黄鲜明. 大鳞副泥鳅精子结构研究[J]. 生物学杂志,2011,28(4):26-30.
- [25] STOSS J. Fish gamete preservation and spermatozoon physiology [C]//HOAR W S, RANDALL D J, RANDALL E M. 8th ed. Fish physiology. New York: Academic Press, 1983: 307-308.



图版 青海湖裸鲤精子形态和超微结构

Plate Morphosis and ultrastructure of the spermatozoon of *Gymnocypris przewalskii*

1. 精子外部形态,示头部、中段和尾部,×15 000; 2. 精子纵切,示头部、中段和尾部,×15 000; 3. 精子纵切,示细胞核、近端中心粒、基体、植入窝 ×8 000; 4. 精子头部和中段纵切,示近端中心粒、基体,×60 000; 5. 精子头部和中段纵切,示线粒体、袖套内膜、袖套外膜、袖套腔,×40 000; 6. 精子头部和中段横切,示线粒体、囊管、袖套外膜、袖套腔,×8 000; 7. 精子远核端尾部横切,示“9 + 2”结构的轴丝,×40 000; 8. 精子尾部横切,示 2 个囊管、轴丝,×15 000; 9. 精子尾部横切,示 1 个囊管、轴丝,×25 000; 10. 精子尾部横切,示囊管和发达的侧鳍,×8 000; 11. 精子纵切,示一侧侧鳍脱落,×5 000; 12. 精子纵切,示两侧侧鳍脱落,×8 000。

A. 轴丝; BB. 基体; CM. 轴丝中心微管; D. 轴丝外周二联微管; IF. 植入窝; IM. 袖套内膜; LF. 侧鳍; M. 线粒体; MP. 中段; N. 细胞核; OM. 袖套外膜; PC. 近端中心粒; S. 袖套腔; T. 尾部; V. 囊管。

Morphosis and ultrastructure of the spermatozoon of *Gymnocypris przewalskii*

LIANG Jian¹, LI Chang-zhong¹, SHI Jian-quan², QI Hong-fang²

(1. Department of Biology Science, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China; 2. The Rescues Center of Qinghai-lake Naked Carp, Xining 810016, Qinghai, China)

Abstract: The morphous and ultrastructural tissues of *Gymnocypris przewalskii* spermatozoon were observed by scanning and transmission electron microscopes. The spermatozoon consisted of the head, middle piece and the tail. The head of the spermatozoon was oval shape without acrosome, of which the main structure was nucleus, and only little cytoplasm existed. At the caudal-lateral end of the head, implantation fossa trapped into the internal to the 1/3. The chromatin in nucleus was dense. The middle piece included centriolar complex and sleeve. The centriolar complex was inside the implantation fossa, which comprised proximal centriole (PC) and basal body (BB). The angle between PC and BB was obtuse. The sleeve, which contained several mitochondria, was connected to the posterior end of the nucleus. The tail of the spermatozoon was slim and long. The main composition of the tail was axoneme, whose structure was the typical model of "9 + 2". The tail had lateral fins, which was arranged symmetrically.

Key words: *Gymnocypris przewalskii*; spermatozoon; morphosis; ultrastructure