

文章编号: 1004-7271(2004)03-0198-05

江黄颡鱼精子的超微结构

刘利平^{1,2}, 王武³, 赵雷蕾⁴, 张克俭³

(1. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室 山东 青岛 266071 2. 中国科学院研究生院 北京 100039;
3. 上海水产大学生命科学与技术学院 上海 200090 4. 启东市海洋与渔业局 江苏 启东 226241)

摘要 利用组织切片技术和电子显微镜研究江黄颡鱼 [*Pelteobagrus vachelli* (Richardson)] 精巢的精细胞结构。未成熟精巢中次级精母细胞的细胞核大,核物质染色浅,次级精母细胞的线粒体向细胞的一侧集中,有囊泡从细胞膜排出,精子细胞的核物质染色深,有明显的外排作用,精子分头部、中段和鞭毛三部分。头部长约 1.8 μm ,有马鞍形的细胞核及不规则的核泡。中段有袖套、核小窝及中心粒复合体,核小窝非常发达,长度约为细胞核长轴的一半,中心粒复合体位于核小窝内。鞭毛长约 15 μm ,其轴丝为典型的“9+2”结构。江黄颡鱼的精子不具顶体。

关键词 江黄颡鱼 精子 超微结构

中图分类号 S917 文献标识码: A

Ultrastructure of spermatozoa in *Pelteobagrus vachelli*

LIU Li-ping^{1,2}, WANG Wu³, ZHAO Lei-lei⁴, ZHANG Ke-jian³

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, CAS, Qingdao 266071, China;
2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;
3. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;
4. Qidong Ocean and Fishery Bureau, Qidong 226241, China)

Abstract: Ultrastructure of spermatozoa of darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*) was investigated using histochemical methods and transmission and scanning electron microscopes. The spermatozoon consists of three parts—head, midpiece and flagellum. The head (about 1.5 μm in length) has a saddle-shaped nucleus with vesicles in it. The midpiece contains sleeve, nuclear fossa and centriolar complex. The centriolar complex is located in the nuclear fossa. The nuclear fossa, which is 1/2 of the head, is well developed. The flagellar tail is about 15 μm in length containing the conventional “9+2” axoneme. The spermatozoa of *P. vachelli* are acrosome less.

Key words: *Pelteobagrus vachelli*; spermatozoa; ultrastructure

在我国淡水鱼类中,鲇形目是仅次于鲤形目的第二大类群,共有 80 多种^[1],大部分种类分布在长江、珠江和淮河流域,其中包括有我国特色的黄颡鱼、长吻鮠、大鳍鱮等名贵的鳃科鱼类,具有重要的经济价值。由于鳃科鱼类主要分布在长江流域,三峡大坝的修建势必对其渔业资源存在潜在的负面影响;

收稿日期 2003-10-22

基金项目 安徽省科技厅 2001 年重点科研项目(0102308)

作者简介 刘利平(1977-),男,湖南宁乡人,博士研究生,专业方向为海洋动物生殖与遗传工程。E-mail:patrick-01@sohu.com

通讯作者 王武(1941-),男,博士生导师,主要从事水产动物增殖方面的研究和教学工作。E-mail:wwang@shfu.edu.cn

而在淮河流域 鳢科鱼类的资源已处于枯竭的状态^[2]。开展鳢科鱼类繁殖生物学的研究更显紧迫性。目前,国内仅张耀光等^[3,4]报道有关鱼类生殖细胞。为此,作者开展了鳢科常见的经济鱼类——江黄颡鱼的人工饲养和繁殖等研究^[2,5]。本文对人工饲养的江黄颡鱼的精子发生和超微结构进行了研究,以期为其繁殖生物学的研究和繁殖的开展提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用的江黄颡鱼取自安徽省淮南市窑河渔场,为人工饲养 2~3 年的成鱼,总计 6000 余尾。于 2000 年 4~6 月捕获,体长 30~50cm,取出精巢,按下述方法进行处理。

1.2 方法

1.2.1 扫描电镜和透射电镜观察

用于透射电镜观察的精巢用锋利的刀片切成约 1mm³ 的小段,迅速用冷的 PBS 缓冲的 2.5% 戊二醛固定,4℃ 冷藏过夜。经磷酸缓冲液漂洗数遍后用 1% 的锇酸再固定,乙醇和丙酮梯度脱水, Epon812 包埋, LKB-1 型超薄切片机切片,切片厚度约 600Å。醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, JEM100CX-II 型透射电镜观察^[6](加速电压 60kV)。

为观察成熟精子的形态,将精子与卵子混合,立即用冷的 PBS 缓冲的 2.5% 戊二醛固定,按标准方法进行样品处理后^[6,7], JEOL JSM-T300 型扫描电子显微镜观察黏附在卵细胞表面的精子形态(加速电压为 15kV)。

1.2.2 组织学观察

用于光镜观察的精巢样品用 Bouin 氏液固定,石蜡包埋,切片厚为 7~8μm,苏木精-伊红染色, Olympus BH-2 型显微镜观察,摄影。

2 结果

2.1 精母细胞向精子转化

精子是雄性生殖细胞的成熟形态,经过精原细胞,初级精母细胞,次级精母细胞,精子细胞逐步演变而成。IV 期精巢中有大量未成熟的精细胞(图版-1)。其中次级精母细胞的细胞核相对较大,核物质染色浅(图版-2),偶见部分次级精母细胞的线粒体向细胞的一侧集中,囊泡从细胞膜通过胞吐作用(exocytosis)排出(图版-3)。而精子细胞的核物质染色深,胞吐作用明显(图版-4)。

2.2 精子形态

扫描电镜下观察,江黄颡鱼的精子头部呈圆形或近圆形,直径约 1.8μm;中段不明显,鞭毛细长,约 15.0μm(图版-5)。

2.3 精子结构

2.3.1 头部

主要结构有细胞核及核泡(nuclear vesicle)。从精子纵切面看,细胞核呈马鞍型,核膜将核物质与核小窝分开,核前端的核膜与质膜紧贴,后端与中段相连(图版-6)。细胞核占精子头部的大部分空间,长径约 1.5μm,短径约 1.2μm。其结构致密,染色较深,偶见少量染色浅的囊泡(图版-7)。江黄颡鱼的精子未见顶体(acrosome)。

2.3.2 中段

主要结构有核小窝(nuclear fossa)、中心粒复合体(centriolar complex)及袖套(sleeve)。

核小窝与中心粒复合体:江黄颡鱼精子的核小窝呈井状,从核的后端中央陷入核中(图版-6),长超过细胞核的一半。其长轴与细胞核的长轴平行。中心粒复合体(图版-6)位于核小窝内,包括近端中心

粒和远端中心粒。近端中心粒位于核小窝的上段,长轴与精子的长轴垂直,远端中心粒位于核小窝的中段,其长轴与近端中心粒的长轴垂直。鞭毛(图版-6)的轴丝由此形成。

袖套:袖套位于中段前端,与细胞核后端相连(图版-6),中央的空隙称为袖套腔。袖套中有线粒体,线粒体是精子能量贮存的场所(图版-8),为精子的运动提供能量。

袖套腔与远端中心粒相连处是鞭毛的起始端。由于鞭毛占据其中,袖套腔仅余一狭窄的空间。

2.3.3 鞭毛

精子的鞭毛细长,长约 $15.0\mu\text{m}$ 。鞭毛的起始端位于核小窝中,核心结构是轴丝,轴丝由9组外周二联微管构成,中央有一微管对(图版-9)。在鞭毛上段,微管的电子致密度高,管腔不清晰;后段是典型的“9+2”结构(图版-9)。

3 讨论

3.1 精子结构

江黄颡鱼的精子由头部、中段和鞭毛三部分组成。头部的主要结构为细胞核,核内含有核泡;具有鞭毛是硬骨鱼类精子的共性^[8],袖套、核小窝、中心粒复合体等则介于头尾之间,称为中段,其中含有丰富的线粒体。这与同一属的黄颡鱼的精子结构特征基本一致^[9]。

鱼类精子的超微结构特征之间存在系统发生的联系^[10,11],同一科鱼类的精子细胞器的分布模式相同^[12]。与鲤科的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、兴国红鲤(*Cyprinus carpio var. singuinensis*)的精子^[13]相比,江黄颡鱼的精子有如下特点:细胞核外形不同,江黄颡鱼的精子的细胞核呈马鞍形,而草鱼和兴国红鲤的细胞核呈圆形或椭圆形;江黄颡鱼的精子核小窝极发达,凹入深度约占核长径的一半,鲤科鱼类的核小窝则不发达;江黄颡鱼精子有明显中段,包含远端中心粒、近端中心粒和袖套等结构,通过醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色后,核膜和袖套膜明显,而鲤科鱼类精子的中段不明显。

十足类甲壳动物的精子则与江黄颡鱼的精子以及草鱼、兴国红鲤的精子有很大不同,缺少中段和鞭毛,但具有棘突,棘突具有顶体的功能^[14]。如长毛对虾的精子不具有鞭毛,属非运动型,核属于非浓缩型,核DNA与细菌等原核细胞的DNA类似,核膜不连续,是较原始的细胞类型^[15]。江黄颡鱼和黄颡鱼^[9]同为鲿科的鱼类,二者的精子结构亦近似。与鲤科鱼类相比,十足类与江黄颡鱼的进化亲缘关系更远,精子的结构就有更大区别。从上述比较看来,分类地位越近的种类,精子结构具有越大的相似性。因此,反过来说,精子的形态结构、生化组成等是否可应用于分类学,为分类地位模糊的物种提供分类依据,值得进一步研究^[10,11]。

3.2 关于顶体

江黄颡鱼的成熟精子未见顶体。一般而言,硬骨鱼类(真骨类)的精子不具有其它绝大多数脊椎动物都具备的顶体^[16-18]。从已有的资料看来,包括鲇形目的长吻鲶^[3]、黄颡鱼^[9]、索氏六须鲶^[19]、鲤形目的多数种类^[20]、鲈形目的大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)^[21]以及鳗鲡^[22]等鱼类的精子不具备顶体。刘筠^[20]、刘筠和张轩杰^[23]认为,尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)的精子具有顶体结构。但尤永隆和林丹军^[24]随后的研究指出,从尼罗罗非鱼精子细胞的核中释放出来的囊泡可能位于精子细胞的核的前方,所谓的尼罗罗非鱼的顶体,只不过是精子形成过程中核内的囊泡释放的位置正好位于精子头部,而被误认为是顶体。在本实验中,也曾见到有的精子细胞正在排出囊泡(图版-4)。此外,到目前为止,尚未发现还有另外的硬骨鱼类的精子同样具有顶体。因此,作者认同硬骨鱼类精子不具有顶体的论断,认为硬骨鱼类的精子存在顶体类型^[20]的观点需要更多的实验支持。江黄颡鱼乃至多数硬骨鱼类的精子没有顶体,这可能是因为它们的卵细胞具有独特的卵孔^[25](图版-10),受精时精子通过卵孔直接进入卵细胞,无须通过顶体水解酶溶解卵膜后入卵受精。

尽管江黄颡鱼的精子不具形态学上的顶体,但其头部是否含有有助于进入卵细胞的水解酶类,目前没有明确的研究支持。

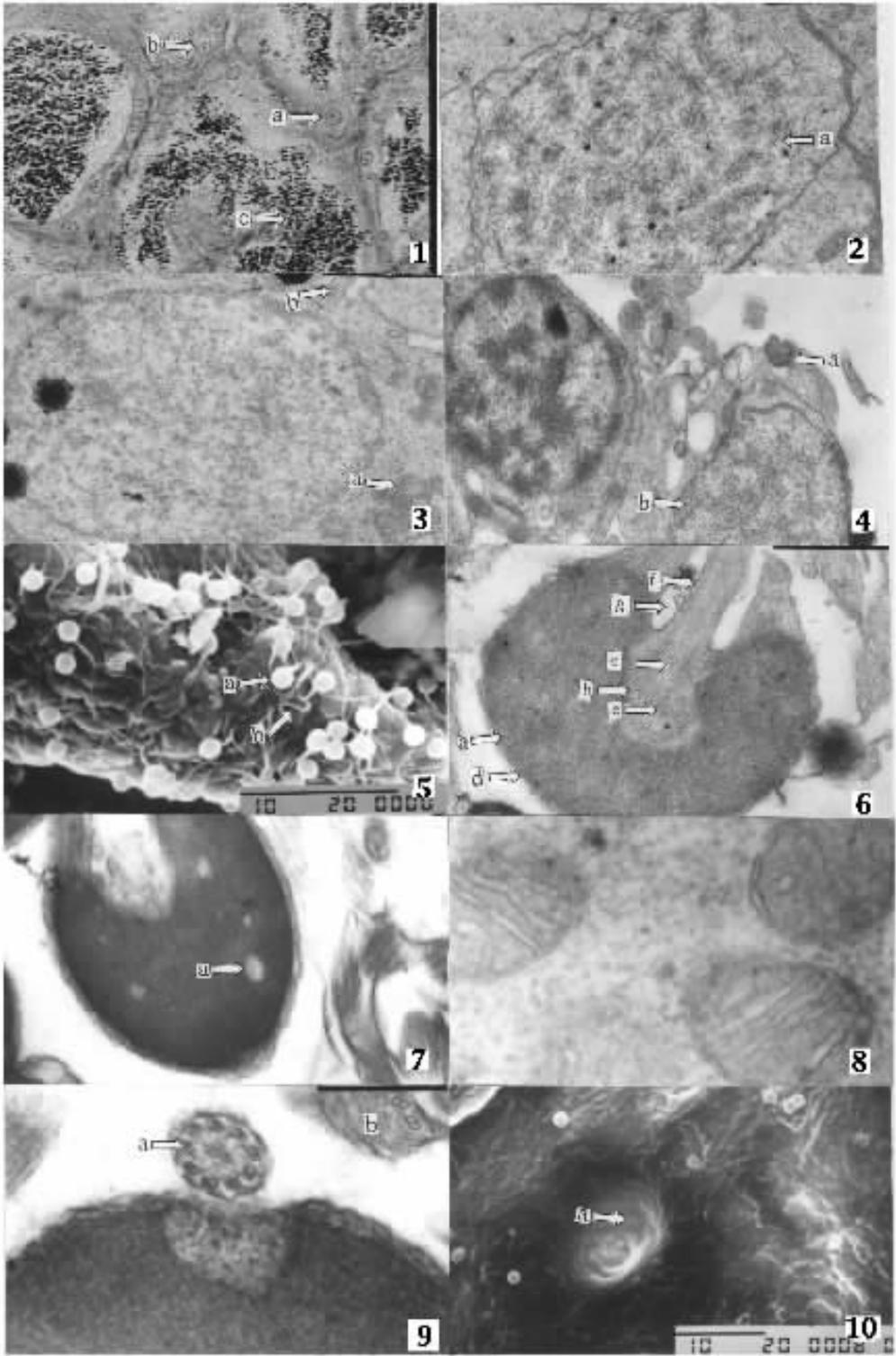
3.3 关于核泡

江黄颡鱼精子细胞核中明显的泡状结构称为核泡(或称囊泡)。随着精子的逐步成熟,核泡的数量不断减少。当精子细胞分化成精子时,体积减小,细胞核内染色质进一步浓缩,与传递遗传信息没有直接关系的物质如 RNA 和非组蛋白等通过外排作用从核中排出。但成熟的江黄颡鱼精子核内仍然存在少量核泡(图版-7)。栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[26]、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[27]、尼罗罗非鱼^[24]以及家鸡,甚至马、大熊猫和人类精子^[28]同样存在核泡。由于受精过程中,精子的不断运动可能对细胞核内的遗传物质造成冲击,因此核泡可能具有缓冲机械压力的作用^[28]。在江黄颡鱼精子的袖套腔中,鞭毛与袖套膜亦存在一定空隙,这对缓解鞭毛运动对细胞核的冲击可能具有同样的功效。

本实验的电镜部分得到上海水产大学电镜室周孝康、张敏老师和复旦大学电镜室赵慧玲老师的指导;取样过程得到安徽省淮南市窑河渔场沈光彩、周家根两位场长的支持,在此一并致谢。

参考文献：

- [1] 王德寿,林浩然,Goos H J Th.大鳍鱠促性腺激素分泌调控的研究[J].动物学报,1998,44(3):322-328.
- [2] 王武,刘利平,张克俭,等.江黄颡鱼人工繁殖的初步研究[J].水产科技情报,2001,28(5):195-201.
- [3] 张耀光,罗泉笙,钟明超.长吻鮠精巢及精子结构的研究[J].水生生物学报,1993,17(3):246-251.
- [4] 张耀光,罗泉笙,钟明超.长吻鮠精巢发育的分期及精子的发生和形成[J].动物学研究,1992,13(3):281-287.
- [5] 刘利平.江黄颡鱼的繁殖生物学[D].上海水产大学硕士论文,2002.
- [6] Poirier G R, Nicholson N. Fine structure of the testicular spermatozoa from the channel catfish *Ictalurus punctatus*[J]. Journal of Ultrastructure Research, 1982, 80:104-110.
- [7] Quagio-Grassiotto I, Olivlira C, Gosztony A E. The ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa in *Diplomystes mesembrinus*[J]. Journal of Fish Biology, 2001, 58:1623-1632.
- [8] Baccetti B. Comparative spermatology[M]. New York: Academic Press, 1970:57-72.
- [9] 尤永隆,林丹军.黄颡鱼(*Pseudobagrus fulvidraco*)精子的超微结构[J].实验生物学报,1996,29(3):235-245.
- [10] Jamieson B G M. Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.
- [11] Mattei X. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes[J]. Canadian Journal of Zoology, 1991, 69:3038-3055.
- [12] Baccetti B, Burrini A G, Callaini G, et al. Fish germinal cells. I: Comparative spermatology of seven cyprinid species[J]. Gamete Research, 1984, 10:373-396.
- [13] 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.
- [14] 邱高峰,堵南山,赖伟.日本沼虾雄性生殖系统的研究:II.精子的形态及超微结构[J].动物学报,1996,42(4):349-354.
- [15] 洪水根,陈细法,周时强,等.长毛对虾精子发生的研究:I.精子的形态结构[J].动物学报,1993,39(3):239-241.
- [16] Abascal F J, Medina A, Megina C, et al. Ultrastructure of *Thunnus thynnus* and *Euthynnus alletteratus* spermatozoa[J]. Journal of Fish Biology, 2002, 60:147-153.
- [17] Quagio-Grassiotto I, Negro J N C, Carvalho E D, et al. Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus*(Teleostei, Characiformes, Erythrinidae)[J]. Journal of Fish Biology, 2001, 59:1494-1502.
- [18] Afzelius B A. Fine structure of the garfish spermatozoon[J]. Journal of Ultrastructure Research, 1978, 64:309-314.
- [19] 尹洪滨,孙中武,刘玉堂,等.索氏六须鲶精子的超微结构[J].水产学报,2000,24(8):302-305.
- [20] 刘筠.中国养殖鱼类繁殖生理学[M].北京:农业出版社,1993:20-98.
- [21] 尤永隆,林丹军.大黄鱼精子的超微结构[J].动物学报,1997,43(2):119-126.
- [22] 谢刚,叶星,苏植蓬,等.鳊鲡精子的主要生物学特性[J].上海水产大学学报,1999,8(1):81-84.
- [23] 刘筠,张轩杰.鱼类精子结构和相应的卵子类型[J].湖南师范大学自然科学学报,1992,15(2):168-174.
- [24] 尤永隆,林丹军.尼罗罗非鱼精子形成中核内囊泡的释放[J].动物学报,1998,44(3):257-263.
- [25] Amanze D, Iyengar A. The micropyle: a sperm guidance system in teleost fertilization[J]. Development, 1990, 109:495-500.
- [26] 任素莲,王如才,王德秀.栉孔扇贝精子超微结构的研究[J].青岛海洋大学学报,1998,28(3):386-391.
- [27] 任素莲,王德秀,绳秀珍,等.太平洋牡蛎精子形成的研究[J].青岛海洋大学学报,2001,31(4):501-505.
- [28] 陈大元.受精生物学—受精机制与生殖工程[M].北京:科学出版社,2000:1-52,105-138.



图版 Plate

1.Ⅳ期精巢中未成熟的精细胞。a,初级精母细胞;b,次级精母细胞;c,精子细胞和精子。×240; 2.次级精母细胞。a,细胞核。×10 000; 3.次级精母细胞向精子细胞转变。a,线粒体向细胞的一端集中;b,囊泡从细胞膜处排出。×14 000; 4.精子细胞的胞吐作用明显,核物质染色加深。a,囊泡从细胞表面排出;b,细胞核。×14 000; 5.精子外形。a,精子头部;b,精子鞭毛。×2 500; 6.精子结构图。a,细胞核;b,核膜;c,核小窝;d,质膜;e,中心粒复合体;f,鞭毛;g,袖套腔。×29 000; 7.成熟的江黄颡鱼精子。a,精子核内的囊泡。×29 000; 8.精子中段的线粒体。×72 000; 9.鞭毛上段的管腔和末段的“9+2”结构。a,鞭毛末段的“9+2”结构;b,鞭毛上段的管腔不清晰。×72 000; 10.卵孔示意图。a,卵孔。