

似刺鳊鮰精子的超显微结构及主要生物学特性*

徐钢春¹, 张呈祥², 顾若波¹, 闻海波¹

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081; 2. 江阴市水产指导站, 江苏 江阴 214075)

摘要: 选取健壮无伤的似刺鳊鮰亲鱼进行人工采精, 应用扫描电镜和透射电镜观察了其精子超微结构, 同时研究了不同温度、盐度对精子活力的影响。结果显示: ① 似刺鳊鮰精子由头部、中片和鞭毛组成。头部近圆形, 主要结构是细胞核, 核前端无顶体, 核中染色质致密均匀, 后端有植入窝; 中片的袖套与细胞核相连, 含有丰富的线粒体和囊泡; 尾部细长, 主要结构是轴丝, 为典型的“9+2”微管结构。② 似刺鳊鮰精子活力较适宜温度为20~28℃, 温度为24℃时精子寿命最长, 为1900s; 较适盐度为5‰~8‰, 盐度7‰时精子寿命最长, 为1350s。

关键词: 似刺鳊鮰; 精子; 微结构; 生物学特性

中图分类号: Q954.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2010)01-0080-05

Spermatozoal Ultrastructure and the Main Biological Characteristics of *Paracanthobrama guichenoti*

XU Gangchun¹, ZHANG Chengxiang², GU Ruobo¹, WEN Haibo¹

(1. Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2. Spread Station of Aquiculture Technology of Jiangyin, Jiangyin 214431, China)

Abstract: The healthy male *Paracanthobrama guichenoti* were employed and the spermatozoa were collected from the body by artificial conduction. The sperm was observed under the scan electron microscope. Meanwhile, effects of temperature, salinity on sperm motility were studied. The results showed that: the sperm of *Paracanthobrama guichenoti* containing 3 parts, a head, a middle-piece and a long tail. The head is subcircle in shape. The main structure of the head is nucleus. There is no acrosome at the anterior end of the nucleus, whereas there is an implantation fossa at the posterior end of the nucleus, within which the chromatin is dense; The sleeve of the middle-piece, which is rich in mitochondria and vesicles, is connected to the posterior end of the nucleus; The tail part is slender, including principal piece and end piece. The main structure is axoneme, which is the structure of a typical “9+2”. The effects of water temperature on spermatozoa motility showed that the optimum water temperature is 24℃ when the spermatozoa have the longest life of span (1900), and the optimum range of water temperature is 20~28℃. When the salinity of water at 5‰~8‰, the spermatozoa have the best motility and the spermatozoa have the longest life span at salinity 7‰, which is 1350s.

Key words: *Paracanthobrama guichenoti*; sperm; ultrastructure; biological characteristic

* 收稿日期: 2009-02-08

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(2007JBFB03); 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室开放课题资助项目(BM2007-08)

作者简介: 徐钢春(1979年生), 男, 助理研究员; 通讯作者: 顾若波; E-mail: gurb@ffrc.cn

似刺鲃 *Paracanthobrama guichenoti* Bleeker, 隶属鲤形目、鲤科、鲃亚科、似刺鲃属^[1], 又叫拟刺鲃^[2], 俗称石鲫, 主要分布在我国长江中、下游干流及附属湖泊的一种中小型经济鱼类, 在太湖、澄湖、昆承湖、同里湖有一定量的分布。其肉质细嫩、味道鲜美、营养丰富, 深受消费者青睐, 是餐桌上的珍品^[3], 随着近年来太湖、昆承湖等湖泊自然生态环境的改变和人为滥捕, 导致水域中似刺鲃群体数量急剧减少, 因此, 此资源的保护和增殖是目前亟待解决的问题。

精子超显微结构的研究有助于揭示生物的受精机理, 精子活力 (快速运动时间和寿命) 则是精子质量评价的重要指标, 精子在最适宜的环境下被激活将提高受精率和保证胚胎的质量。因此, 开展精子超显微结构及环境因子对精子活力影响的研究有着重要的意义。在对似刺鲃的人工繁殖试验中发现雄鱼精子浓度极低导致了受精率的低下, 而有关似刺鲃精子超显微结构和主要生物学特性的研究在国内尚属空白, 本试验对其精子超显微结构进行初步研究, 并探讨了温度、盐度对精子活力的影响, 旨在为似刺鲃的繁殖生物学及大规模人工繁殖提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验用似刺鲃于 2008 年 4 月 15 日采集自苏州澄湖, 选取个体体质量 160 g 左右、健壮无伤、生殖乳突微红且膨大的成熟雄鱼 10 尾。

1.2 采精及采卵

用纱布抹干鱼体生殖孔周围的水分, 然后轻压腹部, 挤出精液, 用中号玻璃吸管吸取刚挤出适量的新鲜精液并快速用 PBS 漂洗、离心 (800 r/min) 重复 3 次后置于盛有 $\varphi = 2.5\%$ 戊二醛的青霉素瓶中保存待测; 大部分置于冰浴的 1.5 mL 离心管中, 立即取样进行活力观察。采精过程中要防止水溅入精液, 避免粪、尿污染。

1.3 扫描电镜制样及观察

制样时, 固定的精液用 pH 7.3, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液清洗 3 次, 放入 $\varphi = 2.5\%$ 戊二醛溶液中先行固定, 约 24 h 后再入 $w = 1\%$ 锇酸溶液中进行固定, 约 2 h。用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液清洗, 梯度乙醇脱水, 醋酸异戊酯置换, 液态 CO_2 临界点干燥, 金溅射喷镀, 日立 S-3000N 型扫描电子显微镜观察并拍照。并按模式图 (图 1) 所示测量其头长 (head length)、头宽 (head width)、中片高

(midpiece height)、鞭毛长度 (flagellum length)。

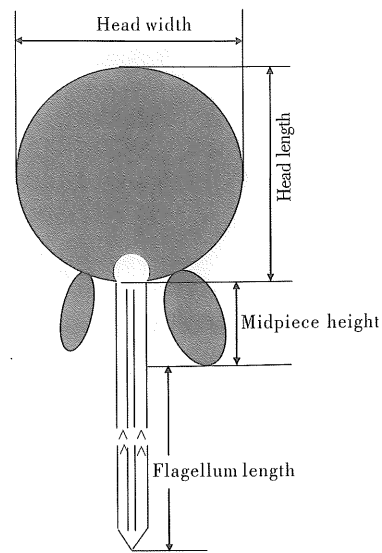


图 1 精子形态测量模式图

Fig. 1 Morphological features measured on sperm of *Paracanthobrama guichenoti*

1.4 透射电镜制样及观察

将用 $\varphi = 2.5\%$ 戊二醛固定 12 h 以上 ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) 的精液依次用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲溶液 (pH 7.4) 清洗 3 次, $w = 1\%$ 锇酸固定 2 h ($4 \text{ }^\circ\text{C}$), $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液清洗 2 次, 丙酮脱水, Epon812 环氧树脂浸透包埋, 常规方法制作超薄切片^[8], 醋酸双氧铀染色 30 min, 柠檬酸铅染色 20 min, 在日立 H-7650 型透射电镜下观察并拍照。

1.5 精子活力观察

在空调控温的小实验室内进行温度实验并用 WT-2000C 型精密生物学显微恒温控制器控制梯度温度, 设置温度梯度为 16、20、24、28、 $32 \text{ }^\circ\text{C}$; 盐度设置为 0、1‰、3‰、5‰、7‰、8‰、10‰。观察各温度和盐度各个梯度条件下似刺鲃精子活力。精子活力观察方法参照文献^[6]并加以改进, 在 Olympus BH-2 型显微镜下用红宝石精子计数板中加入 $50 \mu\text{L}$ 梯度实验用水, 然后用移液器吸取 $10 \mu\text{L}$ 原精液与计数板中的实验用水混合, 同时开始计时, 用针头搅匀后迅速盖上盖玻片在 Olympus BH-2 型显微镜 (10×100 倍) 下观察精子运动情况。活力指标分为: ① 快速运动时间: 精子自激活开始到约 90% 原处颤动前的激烈运动; ② 寿命: 精子自激活开始到约 90% 停止原处颤动。每个处理重复 3 次, 结果取平均值。

1.6 数据处理及分析

所有数据经 SPSS11.5 软件统计分析, 用 Excel2003 软件制图。

2 结果与分析

2.1 似刺鳊鮡精子的微结构观察

似刺鳊鮡精子由头部 (head)、中片 (mid-piece) 和鞭 3 毛 (flagellum) 部分组成 (图 2: 1, 2)。扫描电镜下, 精子头部近圆形, 长 $1.87 \mu\text{m}$ 、宽 $1.83 \mu\text{m}$; 中片较短, 紧连头部长 $0.65 \mu\text{m}$; 鞭毛细长, 长约 $27 \mu\text{m}$ 。精子及其各部分测量比值见表 1。

表 1 似刺鳊鮡精子各部分长度比值

Table 1 The component parts ratio of the spermatozoon of *Paracanthobrama guichenoti*

项目	头部长/全长	头部宽/全长	中片长/全长	鞭毛长/全长
比值	0.061 ± 0.005	0.062 ± 0.008	0.022 ± 0.004	0.915 ± 0.085

2.1.1 头部 似刺鳊鮡精子头部呈圆形, 主要结构是细胞核, 细胞核内染色质高度浓缩且分布较为均匀, 细胞质相对较少 (图 2: 3-5)。精子质膜为单层, 核膜为双层, 两者紧密相附, 包裹着细胞核, 两者紧密相附, 包裹着细胞核, 质膜一般呈波浪状, 核膜也不甚平整。在质膜和核膜间不规则地分布着一些圆形或近似圆形的囊泡状结构 (图 2: 5)。细胞核前方呈细丝状, 但非顶体结构 (图

2: 1, 2), 头部后端凹陷, 称为植入窝 (implantation fossa), 植入窝较浅, 凹入深度约为细胞核的 $1/8$ (图 2: 3)。

2.1.2 中部 中片包括线粒体和袖套 (sleeve) 两部分。其中线粒体位于细胞核下方, 约有 $5 \sim 6$ 个, 排列无规则, 部分线粒体彼此融合 (图 2: 6), 袖套较发达, 两侧不对称, 位于线粒体的下方, 其最深处才达到线粒体下端的 $1/3$ 处。线粒体的双膜层和内嵴均清晰可见, 基质较疏松。袖套中有大量囊泡分布, 囊泡中存在明显可见的电子致密物质。鞭毛和袖套、线粒体之间的空腔为袖套腔 (central space of sleeve) (图 2: 3-5), 袖套腔较狭。

2.1.3 尾部 精子的尾部为一条细长的鞭毛 (图 2: 1, 2), 主要由轴丝和质膜组成 (图 2: 7)。轴丝的起始端位于袖套腔中, 大部分伸出袖套腔外。整个尾部其核心结构为轴丝, 袖套腔中和基体相连的轴丝段可见典型的“9+2”微管结构 (图 2: 8)。轴丝伸出袖套腔之后, 外包以双线形凹凸不平的质膜, 中央为少量的细胞质, 没有观察到其他细胞器和囊泡分布其中 (图 2: 9)。整个尾部除具典型的“9+2”微管结构轴丝外, 无侧鳍等其他明显的结构存在。

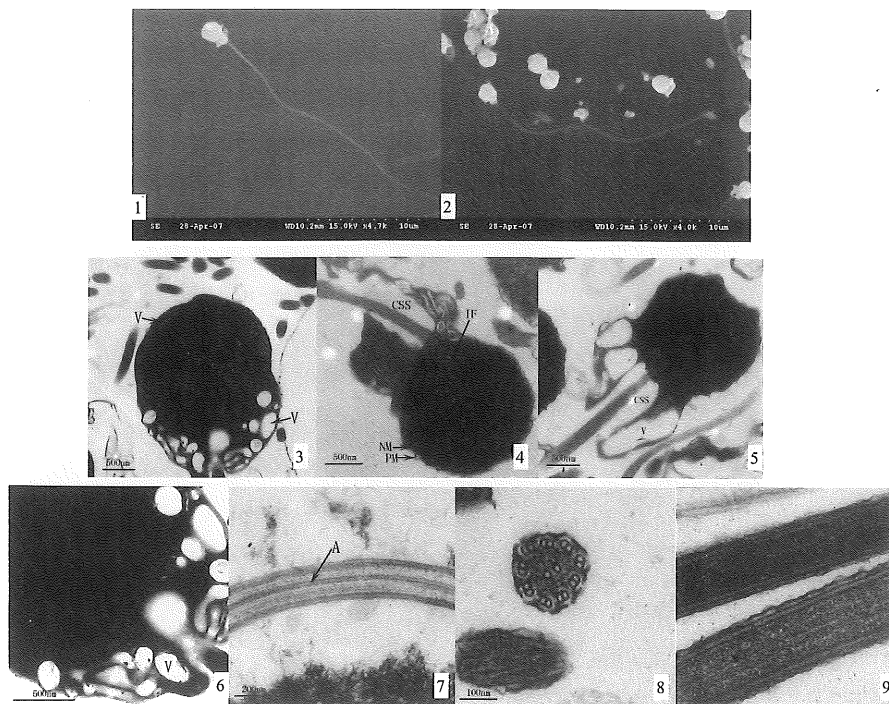


图 2 似刺鳊鮡精子的超显微结构

Fig. 2 Spermatozoon ultrastructure of *Paracanthobrama guichenoti*

1, 2: 精子整体扫描, 示头部、中片、尾部 (鞭毛主段和末段) 形态, 标尺 $10 \mu\text{m}$; 3: 精子头部纵切, 示细胞核、质膜、核膜及植入窝, 标尺 $0.5 \mu\text{m}$; 4: 精子头部纵切, 示袖套腔, 标尺 $1 \mu\text{m}$; 5: 精子头部纵切, 示细胞核及囊泡, 标尺 $1 \mu\text{m}$; 6: 精子头部纵切, 示线粒体, 标尺 $0.5 \mu\text{m}$; 7: 鞭毛纵切, 示轴丝, 标尺 $0.2 \mu\text{m}$; 8: 鞭毛横切, 示“9+2”微管结构, 标尺 $0.1 \mu\text{m}$; 9: 鞭毛纵切, 示质膜结构, 标尺 $0.2 \mu\text{m}$ 。A: 轴丝; CSS: 袖套腔; IF: 植入窝; M: 线粒体; NM: 核膜; PM: 质膜; V: 囊泡

2.2 温度对似刺鳊鮰精子活力的影响

如图 3 所示, 在 7.5‰ 条件下, 16 ~ 32 °C 温度范围内似刺鳊鮰精子都能快速运动。从 16 °C 开始, 精子活力逐渐升高, 到 24 °C 时达到最高值, 此后, 快速运动时间则随温度升高而下降。精子快速运动时间 (S) 与温度 (T) 之间呈二次曲线函数关系: $S = -9.6875T^2 + 447.25T - 4240$, $R^2 = 0.9068$, F 检验表明, 快速运动时间与温度有极显著的复相关关系。精子活力适宜温度为 20 ~ 28 °C。

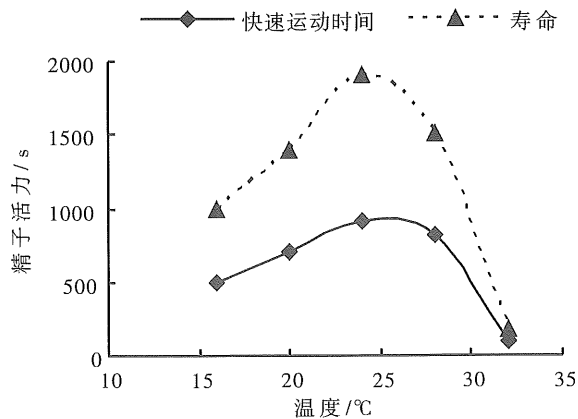


图 3 似刺鳊鮰精子活力与温度的关系

Fig. 3 Relationship between time of sperm motility and temperature of sperm of *Paracanthobrama guichenoti*

2.3 盐度对似刺鳊鮰精子活力的影响

由表 2 可知, 在实验盐度 0 ~ 7‰ 的范围内, 随着盐度的升高, 精子的快速运动时间和寿命也相应延长, 而后随着盐度的升高, 精子的快速运动时间和寿命则减少, 以 5‰ ~ 8‰ 时为最适条件; 在 0 时, 快速运动时间和寿命仅为 80 s 和 160 s, 而在 10‰ 时, 精子的活动受到抑制, 只能短时原地颤动, 不能快速运动。

表 2 似刺鳊鮰精子在不同盐度下的运动时间和寿命

Table 2 The active time and life of sperm of *Paracanthobrama guichenoti* at different salinity (20°C)

盐度/‰	0	1	3	5	7	8	10
快速运动时间/s	80	347	417	477	670	480	0
寿命/s	160	720	803	950	1350	950	40

3 讨论

3.1 似刺鳊鮰与其它硬骨鱼类精子超微结构的异同点

(1) 似刺鳊鮰精子头部为圆形, 主要结构是细胞核, 无顶体, 尾部轴丝为“9+2”微管结构, 这些特征与大多数硬骨鱼类是相同的。

(2) 从已有的资料看来, 鲤形目的大多数种类的精子不具备顶体^[7]。刘筠等^[8]认为, 尼罗罗非鱼的精子具有顶体结构, 但尤永隆等^[9]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, 也观察到有的精子细胞排出囊泡正好位于精子头部, 容易误认为是顶体。似刺鳊鮰乃至多数硬骨鱼类的精子没有顶体, 这可能是因为它们独特的卵孔^[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。

(3) 一般而言, 鲤科鱼类精子的中片不甚明显, 但似刺鳊鮰精子的中片相对明显。似刺鳊鮰精子的袖套两侧不对称, 线粒体呈不规则排列, 这与哲罗鱼的相应结构类似^[11], 而与尼罗罗非鱼精子的相应结构不相同^[8], 尼罗罗非鱼精子的袖套分为 2 部分; 上段袖套较厚, 含有较多线粒体和囊泡, 下段袖套很薄, 仅含有多余的核膜。

(4) 研究表明, 硬骨鱼类精子都具有细长的尾部, 这与其多数于行水中受精的方式相适应。而其鞭毛的结构同样显示出种属差异性, 侧鳍的有无及发达程度, 液泡的存在与否可为硬骨鱼类分类提供超微水平上的形态依据^[12]。似刺鳊鮰的尾部除轴丝之外无侧鳍结构, 与鲤鱼的一致^[13], 而与黄颡鱼^[14]、长吻鮠不同^[15]。鞭毛是精子的运动器官, 侧鳍的有无能否影响精子的游泳速率, 从而影响受精效率, 不同学者有不同的看法: Stoss^[16]认为侧鳍可能改善精子鞭毛的游泳速率, 有利于提高受精率; 而 Afzelius^[17]则认为侧鳍与精子游泳速率的提高无多大关系。那么, 似刺鳊鮰无侧鳍的特点与其受精率低是否存在一定的相关性, 有待于进一步深入研究。

3.2 似刺鳊鮰精子活力与温度、盐度的关系

潘德博等^[18]认为, 温度与广东鲂精子快速运动时间的关系是一个开口向下的二次曲线函数关系, 这与本研究结果一致; 在水温 20 ~ 28 °C 内似

刺鳊鮠精子具有较长的快速运动时间和寿命,在24℃时有最大活力,而似刺鳊鮠产卵期的水温为18~25℃,两者非常吻合。所以,进行似刺鳊鮠人工授精的最佳水温为24℃。而对于精液在各温度下(主要是低温)保存后的活力随时间延长的变化规律则有待于进一步研究。

似刺鳊鮠精子在盐度1‰~8‰的运动较理想,尤以7‰为最佳,其快速运动时间及寿命都最长,分别为670s和1350s。故在似刺鳊鮠人工授精过程中,使用7‰左右的盐水有利于提高受精率。而1‰~5‰内随着盐度升高对精子活力影响并不显著($P>0.05$)。当盐度高于10‰时,似刺鳊鮠精子只在原地颤动。结果表明,似刺鳊鮠精子活动的最适盐度高于其栖息环境盐度,与潘德博等^[18]对广东鲂精子和杨彩根^[19]对黄颡鱼精子的研究结果相似。研究表明^[18],NaCl特别是Na⁺(维持细胞兴奋性和渗透压的主要阳离子)在一定范围内具有提高精子活率和加快精子运动速度的作用。在似刺鳊鮠进行人工授精时可以选择盐度为7‰的氯化钠溶液,以延长精子活力,保持精子的激烈运动状态,提高受精率,降低畸变率;当盐度大于10‰时,似刺鳊鮠精子不活动,故可以将该结果作为精子保存液的参考值。

参考文献:

- [1] 倪勇,朱成德.太湖鱼类志[M].上海:上海科学技术出版社,2005:139-142.
- [2] 杨明生.似刺鳊鮠生物学的初步研究[J].淡水渔业,1996,26(3):17-19.
- [3] 顾若波,徐钢春,华丹,等.似刺鳊鮠肌肉营养成分与品质的评价[J].中国海洋大学学报,2008,38(2):263-267.
- [4] OHTA H, SHINRIKI Y. Changes in osmotic pressure that trigger the initiation of sperm motility in river scalp in *Cottus hangiongensis* [J]. Fish Physiol Biochem, 1998 (18):29-35.
- [5] 安利国,刘家尧,孙虎山,等.细胞生物学实验教程[M].北京:科学出版社,2004:25-30.
- [6] 赵会宏,刘晓春,林浩然,等.斜带石斑鱼精子超微结构及盐度、温度、pH对精子活力及寿命的影响[J].中国水产科学,2003,10(4):286-290.
- [7] 刘筠.中国养殖鱼类繁殖生理学[M].北京:农业出版社,1993:20-98.
- [8] 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.
- [9] 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,1998,4(3):257-263.
- [10] 顾若波,徐钢春,闻海波,等.似刺鳊鮠的胚胎及胚后发育[J].中国水产科学,2008,15(3):414-424.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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):246-257.
- [16] STOSS J. Fish gamete preservation and spermatozoon physiology[C]//HOAR W S, RANDALL D J, RANDALL E M. Fish Physiology (8B). New York: Academic Press,1983:307-308.
- [17] AFZELIUS B A. Fine structure of the garfish spermatozoon [J]. J Ultr Res, 1978, 64: 309-324.
- [18] 潘德博,许淑英,叶星,等.广东鲂精子主要生物学特性的研究[J].中国水产科学,1999,6(4):111-113.
- [19] 杨彩根,宋学宏,王永玲. pH及不同浓度NaCl溶液对黄颡鱼精子活力的影响[J].水利渔业,2003,23(3):10-11.