

赤点石斑鱼精子发生和形成的超微结构研究*

舒 琥^{1,2}, 刘晓春¹, 张 勇¹, 林浩然¹

(1. 中山大学水生经济动物研究所//广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 广州大学生物与化学工程学院生物系, 广东 广州 510405)

摘 要: 用透射电镜研究了赤点石斑鱼 *Epinephelus akaara* 精子发生和精子形成过程。结果表明, 赤点石斑鱼精子发生经历了初级精原细胞、次级精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞阶段。精子细胞再经过精子形成过程成为精子。在初级精原细胞、次级精原细胞阶段, 细胞核释放出拟染色体。拟染色体分布于精原细胞和前期 I 的初级精母细胞的细胞质中。初级精母细胞减数分裂早期同源染色体配对明显可见, 并形成联会复合体。精子细胞之间存在细胞联系(桥粒)。赤点石斑鱼成熟精子的特点是细胞核圆形, 核内染色质致密, 没有核泡(核空隙)。精子尾部细长, 横切面为典型的“9+2”轴丝结构。

关键词: 赤点石斑鱼; 精子发生; 精子形成; 超微结构

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 04-0103-04

赤点石斑鱼 *Epinephelus akaara* 为名贵海水经济鱼类。从 20 世纪 70 年代开始, 国内外不少学者都致力于石斑鱼的人工繁殖研究, 虽然有学者在研究激素对赤点石斑鱼性腺发育成熟和性转化的报道中涉及到精子发生^[1], 但均是从组织学角度进行, 难以揭示精巢内各级生精细胞在精子发生过程中所发生的细微结构及其功能的变化, 因此, 我们对赤点石斑鱼精巢的结构和精子发生进行超微结构研究, 为赤点石斑鱼人工繁殖提供理论依据。

1 材料和方法

试验用鱼购于广东大亚湾水产试验中心附近海域网箱, 然后饲养在该中心的网箱中。海水盐度 32~33, 水温 20~30℃, 自然光照。2002 年 3 月—2003 年 12 月, 共选用性成熟雄鱼 8 尾, 平均体质量 480.6g (328~654 g), 平均体长 26.5 cm (25.5~32.5 cm), 年龄 3~5 龄, 在生殖季节和非生殖季节取样, 鱼经麻醉后测量称量, 快速解剖取出精巢, 用海水鱼生理盐水洗净, 将精巢组织切成 1 mm³ 的组织块, 置于 $\varphi = 2.5\%$ 戊二醛中固定, 4℃保存备用。组织块经 $w = 1\%$ 锇酸后固定, 梯度乙醇脱水, E812 树脂包埋。切片。切片经醋酸铀和柠檬酸铅染色后, 置日立 H-600 型透射电镜观察及拍照。

2 结 果

赤点石斑鱼的精巢属于小叶型。精小叶中包含许多精小囊, 精小囊中包含数量不等的同级生精细胞。初级精原细胞单个分布, 周围由支持细胞 (Sertoli cell) 围绕。和一般硬骨鱼相似, 赤点石斑鱼精子发生和形成需经过初级精原细胞、次级精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞和精子形成等一系列过程。

2.1 初级精原细胞

又称 A 型、I 型或早期精原细胞。初级精原细胞是生精细胞中体积最大的细胞, 圆形或椭圆形。细胞核位于细胞的中央, 呈弱碱性, 电子密度低, 核仁明显, 由电子致密颗粒聚集而成。细胞质内有线粒体, 滑面内质网和拟染色体 (chromatoid body), 拟染色体也是由电子致密颗粒聚集而成, 结构与核仁相似, 常分布在细胞核表面的凹陷中或与线粒体在一起 (图 1: 1)。

2.2 次级精原细胞

又称为 B 型、II 型或晚期精原细胞。是由初级精原细胞经有丝分裂发育而成。次级精原细胞体积比初级精原细胞小, 细胞圆形或椭圆形。细胞核为卵圆形, 核中核仁明显, 居中或偏于一侧, 核表面的凹陷减少。胞质见到成堆的线粒体, 集中分布

* 收稿日期: 2005-02-01

基金项目: 国家海洋 863 项目 (2001AA621010); 国家自然科学基金项目 (39970586); 广东省科技计划项目 (A3050201, 2003C20308); 教育部科学技术研究重点资助项目 (02150)

作者简介: 舒琥 (1965 年生), 男, 副教授, 博士; 通讯联系人: 林浩然; E-mail: shuhu001@126.com

在一定的区域,线粒体拉长呈条形。拟染色体的分布与初级精原细胞的相似(图1:2,3)。

2.3 初级精母细胞

次级精原细胞停止分裂,发育成为初级精母细胞。初级精母细胞体积增大,比次级精原细胞大,比初级精原细胞小。细胞核圆形或椭圆形,核表面较平滑,无凹陷。细胞质减少,细胞核所占的比例增大,初级精母细胞在发育过程中经历了第一次成熟分裂前期(前期Ⅰ)、中期(中期Ⅰ)、后期(后期Ⅰ)和末期(末期Ⅰ)的变化,最终完成第一次成熟分裂。

第一次成熟分裂的早期,在偶线期,细胞核中的同源染色体开始配对,配对的同源染色体呈现出联会复合体(synaptonemal complex)的雏形(图1:4),到分裂中期,也即粗线期,细胞核中联会复合体完全形成(图1:5),此时细胞质中仍可见到拟染色体。到双线期,细胞核中的联会复合体解体,表现为中央成分消失,同源染色体不再整齐配对,但仍能看到同源染色体配对的痕迹。染色质聚集成团块状,较粗线期致密,细胞质中可见到拟染色体(图1:6)。到分裂末期,细胞发生不完全胞质分裂,胞质之间出现合胞体,胞质内线粒体较多,高尔基体典型(图1:3,6)。

进入第一次成熟分裂的中期Ⅰ,染色质集中在细胞中部,核膜已基本消失。细胞质中可见到高尔基体和线粒体,没有拟染色体(图1:7)。

后期Ⅰ的染色质一分为二,成为2部分,分别向相反的方向移动,染色质聚集成致密状态,细胞质中没有拟染色体(图1:8)。

末期Ⅰ的细胞拉长成哑铃状,染色质拉向两极,染色质聚集成致密状态,胞质中没有拟染色体(图1:9)。

2.4 次级精母细胞

由初级精母细胞减数分裂形成。体积小于初级精母细胞。细胞核内的染色质呈深染的团块状,胞质内可见高尔基体、线粒体和一些小泡结构(图1:10)。

2.5 精子细胞

次级精母细胞形成不久完成第2次成熟分裂形成精子细胞。精子细胞体积更小。染色质由次级精母细胞期的团块状变为细小的颗粒状,均匀分布全核。线粒体、内质网数量少,细胞之间有细胞连接(桥粒)相连(图1:11)。

精子形成:精子细胞通过变态过程形成精子(图1:11~14)。根据细胞核和细胞质所发生的变化,可将精子形成分为3个时期,即早期、中期和

晚期。

早期:该期大多数形态变化出现在精子细胞分化时,这时赤点石斑鱼精子细胞染色质高度浓缩,往核的一侧聚集,该侧将成为精子头部的背侧,在未来精子头部的腹侧,电子致密度较低(图1:12),大部分细胞质和细胞器集中于核的一端,位于核的下方,参与构成精子的中段。

中期:近端中心粒向核的方向移动,细胞核出现凹陷,远端中心粒向外延伸长出鞭毛,线粒体围绕鞭毛前段排列(图1:13)。

晚期:鞭毛继续延长形成精子的尾部,最后完全变态为成熟精子(图1:14)。

变态的成熟精子由头部、中段和尾部组成。头部圆形或椭圆形,细胞核圆形,细胞质包裹在核外周,核无顶体。中段由细胞质、线粒体和轴丝前段构成。尾部鞭毛细长,横切面为典型的“9+2”的轴丝结构(图1:15)。

2.6 赤点石斑鱼精巢中的非生殖细胞

电镜下,赤点石斑鱼精巢内有两种非生殖细胞:支持细胞和间质细胞(Leydig细胞)。

支持细胞(图1:16,17):形态不规则长条形,核为长梭形,靠近核膜的染色质较密集。胞质内有大量光滑内质网,线粒体和脂滴。说明赤点石斑鱼精巢支持细胞可能与类固醇激素生成有关。支持细胞围绕生殖细胞构成精小囊。同一精小囊内的生殖细胞发育基本同步。

间质细胞(图1:16,17):间质细胞分布在精小叶之间,核呈强嗜碱性,体积较大,呈多角形。在精巢发育成熟过程中,细胞质内有许多管嵴状线粒体和较多光滑内质网。表明间质细胞可能是精巢中类固醇激素生成的主要部位。

3 讨论

关于硬骨鱼类精子发生的超微结构研究,在国内外已有报道^[2-7],但有关赤点石斑鱼的精子发生及其超微结构的资料尚未见到。本文研究证实,在赤点石斑鱼精小囊中有两种类型的精原细胞,初级精原细胞和次级精原细胞,该结果与尤永隆等在大黄鱼、褐菖鲉等观察的结果一致^[3,5],认为初级精原细胞是一种干细胞,它只能进行有丝分裂,不发生进一步分化。而次级精原细胞是由初级精原细胞经过分裂后形成的,次级精原细胞经过多次分裂,分化为初级精母细胞,最终形成精子。

在相关的报道中,关于鱼类初级精母细胞在第一次成熟分裂前期Ⅰ各阶段,及中期Ⅰ、后期Ⅰ和末期Ⅰ的形态学变化很少见到,只有尤永隆等^[5]在

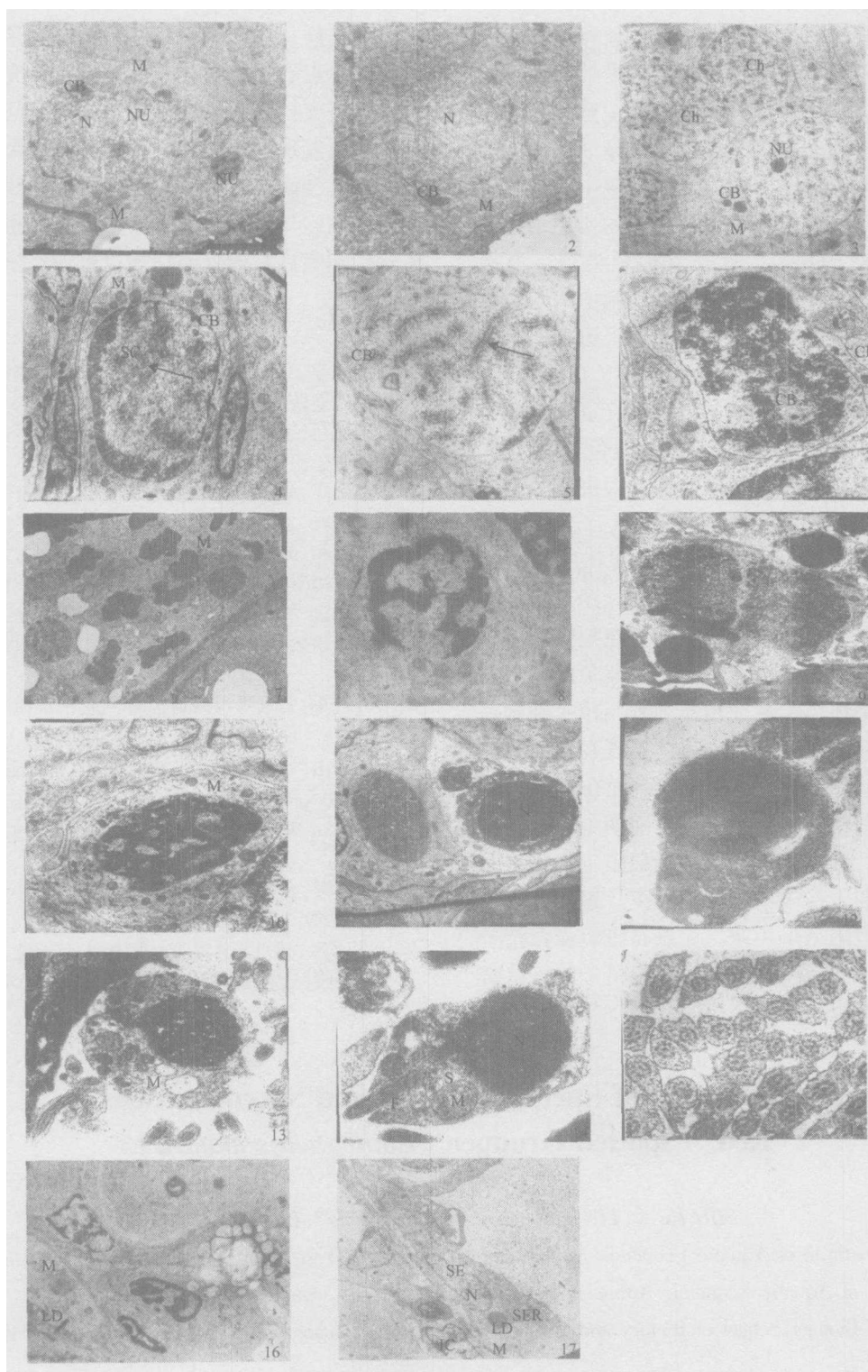


图1 赤点石斑鱼精子发生和形成的超微结构研究

Fig.1 Ultrastructure of spermatogenesis and spermiogenesis in red - spotted grouper (*E. akaara*)

1: 初级精原细胞, 示线粒体, 核凹陷中拟染色体等 ($\times 6000$); 2: 次级精原细胞, 示长条形线粒体, 拟染色体 ($\times 8000$); 3: 初级精母细胞, 示拟染色体 ($\times 8000$); 4: 偶线期初级精母细胞, 示细胞核中联会复合体雏形 (箭头) ($\times 8000$); 5: 粗线期初级精母细胞, 示配对的同源染色体和联会复合体 ($\times 8000$); 6: 双线期初级精母细胞, 示细胞核中联会复合体正在解体 ($\times 8000$); 7: 中期 I 初级精母细胞, 示染色质集中在赤道板上 ($\times 4000$); 8: 后期 I 初级精母细胞, 染色质拉向两极 ($\times 10000$); 9: 末期 I 初级精母细胞, 染色质拉向两极 ($\times 8000$); 10: 次级精母细胞 ($\times 8000$); 11: 早期精子, 核内染色质浓缩 ($\times 15000$); 12: 精子细胞, 示细胞连接 (桥粒) (箭头) ($\times 15000$); 13-14: 精子纵切 ($\times 15000$); 15: 精子尾部横切, 示“9+2”轴丝结构 ($\times 30000$); 16: 间质细胞, 示脂滴和线粒体 ($\times 5000$); 17: 支持细胞, 示细胞质中的脂滴, 滑面内质网和管状线粒体 ($\times 6000$)

CB: 拟染色体 GC: 高尔基体 F: 鞭毛 LD: 脂滴 M: 线粒体 N: 细胞核 NU: 核仁 SC: 联会复合体 Se: 支持细胞 IC: 间质细胞

卵胎生硬骨鱼褐菖鲉上作过描述,而象赤点石斑鱼这种雌雄同体雌性先熟的鱼类则尚未见报道。本文观察了赤点石斑鱼初级精母细胞前期Ⅰ至末期Ⅰ的形态学特征,发现赤点石斑鱼初级精母细胞各期的形态变化十分明显,在前期Ⅰ,细胞核中的染色质的变化很有规律,并出现联会复合体的典型结构和同源染色体配对的现象,这在其他鱼类很少有报道。赤点石斑鱼前期Ⅰ的初级精母细胞中的联会复合体的变化同尤永隆等有关褐菖鲉的报道相似,同样也经历了出现、形成和分解的过程。在偶线期,可见到某些同源染色体配对,出现联会复合体的雏形(图1:4)。进入粗线期,同源染色体配对完毕。呈现出联会复合体的典型结构:中央成分呈一细线状,同源染色体分居其两侧,呈茸毛状外形(图1:5)。在双线期,联会复合体解体。其中央成分逐渐消失,染色体配对已不明显(图1:6)。

关于硬骨鱼类精子发生过程中存在拟染色体的研究,国内外报道较少。在金鱼和大黄鱼的精子发生过程中,拟染色体出现在精原细胞至精子细胞这段时期^[3,8,9]。在褐菖鲉,拟染色体出现在精原细胞至前期Ⅰ初级精母细胞这段时期^[5]。而在赤点石斑鱼拟染色体出现在初级精原细胞至前期Ⅰ初级精母细胞这段时期。其中初级精原细胞最多,次级精原细胞次之,前期Ⅰ初级精母细胞较少。这与尤永隆等在褐菖鲉报道的结果相似。赤点石斑鱼成熟精子的结构也有自身的特点,表现在成熟精子的核致密度高,未见到类似核泡的结构。此外,与大多数硬

骨鱼类一样,赤点石斑鱼的精子没有顶体。

对赤点石斑鱼精巢超微结构的研究发现,在生精囊内有支持细胞,在精小叶之间有间质细胞,通过观察还发现这两种细胞都具有产生类固醇细胞的特征:具脂滴,发达的滑面内质网和线粒体。表明这两种细胞与类固醇激素产生有关,也为赤点石斑鱼支持细胞具有内分泌功能提供形态学证据。

参考文献:

- [1] 方永强,林秋明,齐襄,等. 17 α -甲基睾酮对赤点石斑鱼性逆转的影响[J]. 水产学报, 1992, 16(2): 171-174.
- [2] 张旭晨,王所安. 细鳞鱼精巢超微结构和精子发生[J]. 动物学报, 1992, 38(4): 355-358.
- [3] 尤永隆,林丹军,陈莲云. 大黄鱼的精子发生[J]. 动物学研究, 2001, 22(6): 461-466.
- [4] 洪万树,翁幼竹,林君卓,等. 鲷鱼精子发生和形成的超微结构研究[J]. 海洋学报, 2001, 23(5): 116-120.
- [5] 尤永隆,林丹军,钟秀容. 卵胎生硬骨鱼褐菖鲉精子发生的超微结构研究[J]. 热带海洋学报, 2002, 21(1): 70-75.
- [6] 林丹军,尤永隆,苏敏. 黑脊倒刺精巢结构和精子发生的研究[J]. 水生生物学报, 2003, 27(6): 563-571.
- [7] Estay R, Neira R, Diaz N F, et al. Gametogenesis and sex steroid profiles in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*, Walbaum) [J]. J. Exp. Zool., 1998, 280: 429-438.
- [8] 管汀鹭. 金鱼精子发生中的拟染色质小体[J]. 动物学报, 1989, 35(2): 124-129.
- [9] 尤永隆,林丹军. 黑脊倒刺鲃生精细胞拟染色体的形成过程[J]. 实验生物学报, 2003, 36(1): 67-75.

Ultrastructure of Spermatogenesis and Spermiogenesis in Red-spotted Grouper (*Epinephelus akaara*)

SHU Hu^{1,2}, LIU Xiao-chun¹, ZHANG Yong¹, LIN Hao-ran¹

(1. Institute of Aquatic Economic Animal and Key Lab of GD for Improved Variety Reproduction of Aquatic Economic Animals, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Department of Biology, School of Biology and Chemistry Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510405, China)

Abstract: The ultrastructure of spermatogenesis and spermiogenesis in red spotted grouper (*Epinephelus akaara*) is investigated by means of transmission electron microscope. The results show that the spermatogenic process included following stages primary spermatogonia, secondary spermatogonia, primary spermatocytes, secondary spermatocytes, spermatids and formation of sperm. At the stages of primary and secondary spermatogonia, nuclei released chromatoid bodies, which spread through the cytoplasm of spermatogonia and primary spermatocytes of prophase I. The homologous chromosomes started pairing and forming synaptonemal complex in the primary spermatocytes. There exist cell junctions (desmosome) between the two spermatids. Matured spermatozoon is composed of head, midpiece and tail. The head has a round-like nucleus with a nucleolus. There is not any acrosome in front of nucleus. The tail is long and there is a pair of lateral fins along the two sides of flagellum. The flagellum shows typical axoneme organization of "9+2".

Key words: *Epinephelus akaara*; spermatogenesis; spermiogenesis; ultrastructure