

黑鲧精子发生过程中的超微结构变化

肖云朴¹, 徐善良², 孙敏³, 吕慧明³

(1. 平阳县海洋与渔业局, 浙江 平阳 325400; 2. 海洋生物工程浙江省重点实验室, 浙江 宁波 315211; 3. 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 利用透射电镜对黑鲧 *Girella leonina* 精子发生过程中的各个阶段细胞以及精子的超微结构变化进行了观察。结果表明: 1) 黑鲧的精子发生过程主要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、精子细胞和精子 6 个阶段。由精子细胞形成成熟精子还需经过前、中、后期的一系列变态过程。2) 各阶段生精细胞以初级精原细胞体积最大, 大小约为 $10.00\mu\text{m} \times 6.40\mu\text{m}$, 核大小约为 $8.80\mu\text{m} \times 5.80\mu\text{m}$, 而精子细胞体积最小, 大小约为 $3.20\mu\text{m} \times 2.60\mu\text{m}$, 核约为 $2.80\mu\text{m} \times 2.50\mu\text{m}$; 随着生精细胞不断分裂和成熟, 细胞的体积逐渐减小, 核的位置、核仁、线粒体等发生相应的变化, 核内染色质趋于浓缩, 电子密度增加, 染色程度也逐步加深。3) 线粒体是各期细胞内的最主要细胞器之一, 在精子发生过程中, 它的数量逐渐减少, 至成熟精子形成时, 核内仅存 4 个线粒体, 但体积却不断增加, 内嵴变得长而明显。4) 与大多数硬骨鱼类精子特点相似, 黑鲧的成熟精子不具顶体, 核后窝深, 精子的鞭毛细长, 两旁具侧鳍。尾部为典型的“9+2”型结构。

关键词: 黑鲧 *Girella leonina*; 精子发生; 超微结构; 线粒体

中图分类号: Q959.212 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2011)01-0107-06

Ultrastructural changes in *Girella leonina* during spermatogenesis

XIAO Yun-pu¹, XU Shan-liang², SUN Min³, LÜ Hui-ming³

(1. Ocean and Fisheries Bureau of Pingyang County, Pingyang 325400, China; 2. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang, Ningbo 315211, China; 3. College of Life Sciences, Ningbo University, Ministry of Education, Ningbo 315211, China)

Abstract: The ultrastructural changes of the germ cells and sperm during spermatogenesis of *Girella leonina* were observed by transmission electronic microscope. The results are as follows. (1) The spermatogenesis of *Girella leonina* included six stages: primary spermatogonium, secondary spermatogonium, primary spermatocyte, secondary spermatocyte, spermatid, and sperm. These stages can be divided into three periods (before, during, and after) when the spermatid differentiated into sperm. (2) A primary spermatogonium was the largest of various stages of germ cells, and its cell was about $10.00\mu\text{m} \times 6.40\mu\text{m}$ and the nuclear counted $8.80\mu\text{m} \times 5.80\mu\text{m}$. The spermatid was the smallest, and its cell was about $3.20\mu\text{m} \times 2.60\mu\text{m}$ and the nuclear counted $2.80\mu\text{m} \times 2.50\mu\text{m}$. With spermatogenic cells continued to divide and mature, their size gradually reduced, the nuclear chromatin tended to concentrate, electron density increased, extent of staining deepened, and nuclear position, nucleolus, mitochondria also correspondingly changed. (3) Mitochondria were the main organelles in the germ cell, which gradually reduced the number in the process of spermatogenesis. At last, there were only four mitochondria in the mature sperm. On the contrary, the volume of mitochondria had kept increasing, and its cristae became clearer and longer. (4) As most kinds of teleostean, each sperm of *Girella leonine* consisted of a head without an acrosome, a midpiece, and a long tail that contains the lateral fins and a conventional “9 + 2” axoneme pattern.

Key words: *Girella leonina*; spermatogenesis; ultrastructural; mitochondria

收稿日期: 2009-01-16; 修订日期: 2010-05-14。刘学东编辑

基金项目: 浙江省农业重点科研项目(2007C22044)

作者简介: 肖云朴(1975—), 男, 浙江省平阳县人, 工程师, 从事水产养殖研究。E-mail: xiaoyunpu@21cn.com

通信作者: 徐善良。Tel: 13705749890, E-mail: xushanliang@nbu.edu.cn

黑鲷 *Girella leonina* 隶属鲈形目鲈亚目鲷科鲷属, 主要分布于西太平洋区的日本至中国东海南部海域以及中国台湾岛附近海域, 栖息于近岸岩礁区的浅水层。黑鲷食性杂, 在冬季以藻类为主食, 其余季节以中小型无脊椎动物等为食。过去其渔获量主要来自岛礁附近的渔钓^[1], 目前已在我国台湾、福建、广东及浙江南部沿海开展人工养殖, 黑鲷是一种很有发展潜力的养殖种类。迄今为止, 国内外关于黑鲷的研究甚少, 国内仅见姚善成^[2]对鲷种群和地理变异研究、陈舜等^[3]对其网箱养殖试验研究以及孙敏等^[4]对其消化酶活力和血液指标^[5]研究, 国外研究则主要集中在鲷属的形态比较及分类方面^[6-7], 有关黑鲷的精子发生未见有相关研究报道。鱼类精子的发生规律和结构特点是鱼类繁育生物学研究的重要内容之一。本文采用透射电镜技术, 研究了黑鲷的精子发生和成熟过程, 以期为黑鲷人工繁殖的开展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

黑鲷雄鱼于 2008 年 3 月—2008 年 4 月取自福建省福鼎市八尺门海水养殖网箱, 精巢接近成熟或已成熟。共取实验鱼 16 尾, 个体长为 21.77—25.09 cm, 个体重为 414.33—482.83 g。

1.2 方法

在冰块上活体解剖, 迅速取出完整精巢, 切取约 1 mm³ 的精巢组织块, 用 0.1 mol·L⁻¹、pH 7.4 的磷酸缓冲液配制的 2.5% 戊二醛(4)固定, 用 1% 锇酸后固定 1—2 h, 乙醇梯度脱水, Epon 812 环氧树脂渗透并包埋, POWER TOM XL 超薄切片机切片, 醋酸铀及柠檬酸铅双重染色, H-7650 型透射电镜观察并拍照。

1.3 核质比计算

核质比=(平均核长轴×平均核短轴)/(平均细胞长轴×平均细胞短轴)^[8]。

2 结果

2.1 精巢基本结构

黑鲷雄鱼精巢 1 对, 左右大小相等, 位于鳔室腹面, 紧贴于体腔壁。精巢可分为被膜和实质两部分。被膜又可分为内膜和外膜; 实质则主要由许多形状和大小不同的精小叶构成, 且小叶内分布着多个由各个时期的生精细胞集聚而成的精小囊。黑鲷的精子发生过程即在各个精小囊内进行, 该过程主

要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、精子细胞以及精子 6 个阶段。

2.2 生精细胞成熟过程

2.2.1 初级精原细胞

黑鲷的初级精原细胞在各期生精细胞中体积最大, 大小约为 10.00 μm×6.40 μm, 核大, 约为 8.80 μm×5.80 μm(图 1a), 核质比 0.798。初级精原细胞形态较为规则, 大多呈近圆形, 少数呈椭圆形。细胞内电子密度低, 染色浅且分布均匀, 但在核膜内缘附近分布着少量呈颗粒状的异染色质。核内具一明显偏心核仁, 染色较深(图 1a)。在细胞质多的一侧分散分布着数量较多的线粒体, 线粒体呈棒形或者圆形, 胞质中少见内质网和高尔基体(图 1b)。在精原细胞间可见支持细胞(图 1c)。

2.2.2 次级精原细胞

次级精原细胞由初级精原细胞经有丝分裂后形成, 胞体大小约为 9.00 μm×6.20 μm, 核大小约为 6.40 μm×5.60 μm, 核质比为 0.642。其形状呈椭圆形或者圆形, 有些细胞表面具多处凹陷。细胞核呈近圆形或椭圆形, 核膜清晰且表面平整(图 1d、图 1e)。与初级精原细胞相比, 次级精原细胞核质比减小, 且核偏位明显, 同时细胞染色程度加深。核内部分染色质凝聚, 核内电子密度高于初级精原细胞, 核仁明显偏心。在核外细胞质多的一侧有许多内质网, 线粒体分散分布于核膜附近, 多呈棒形且内嵴不明显, 与初级精原细胞相似。

2.2.3 初级精母细胞

初级精母细胞由次级精原细胞分裂并长大后形成(图 1f), 其体积小于次级精原细胞, 大小约为 7.50 μm×3.20 μm, 核明显缩小, 大小约为 3.80 μm×2.60 μm, 核质比为 0.412。刚形成的初级精母细胞分布于精小囊的内缘, 形状较规则, 细胞核多数呈椭圆形, 核内仍具有明显偏心核仁(图 1g)。随初级精母细胞发育, 初级精母细胞逐渐向精小囊中央靠近, 因此, 成熟的初级精母细胞主要分布于精小囊中央(图 1h)。与此同时, 初级精母细胞的形状也有变化, 呈圆形、椭圆形或多角形等(图 1h、图 1i)。核内核仁逐渐消失且染色质浓缩, 造成核内电子密度升高, 染色加深。根据核内染色质的形态变化, 可将其划分为细线期、偶线期、粗线期、和双线期。

在细线期, 细胞核呈椭圆形或圆形, 具一明显核仁, 位于核的偏心位置。核内染色质逐渐浓缩, 呈细颗粒状或条带状, 主要分布于核中央和核膜内

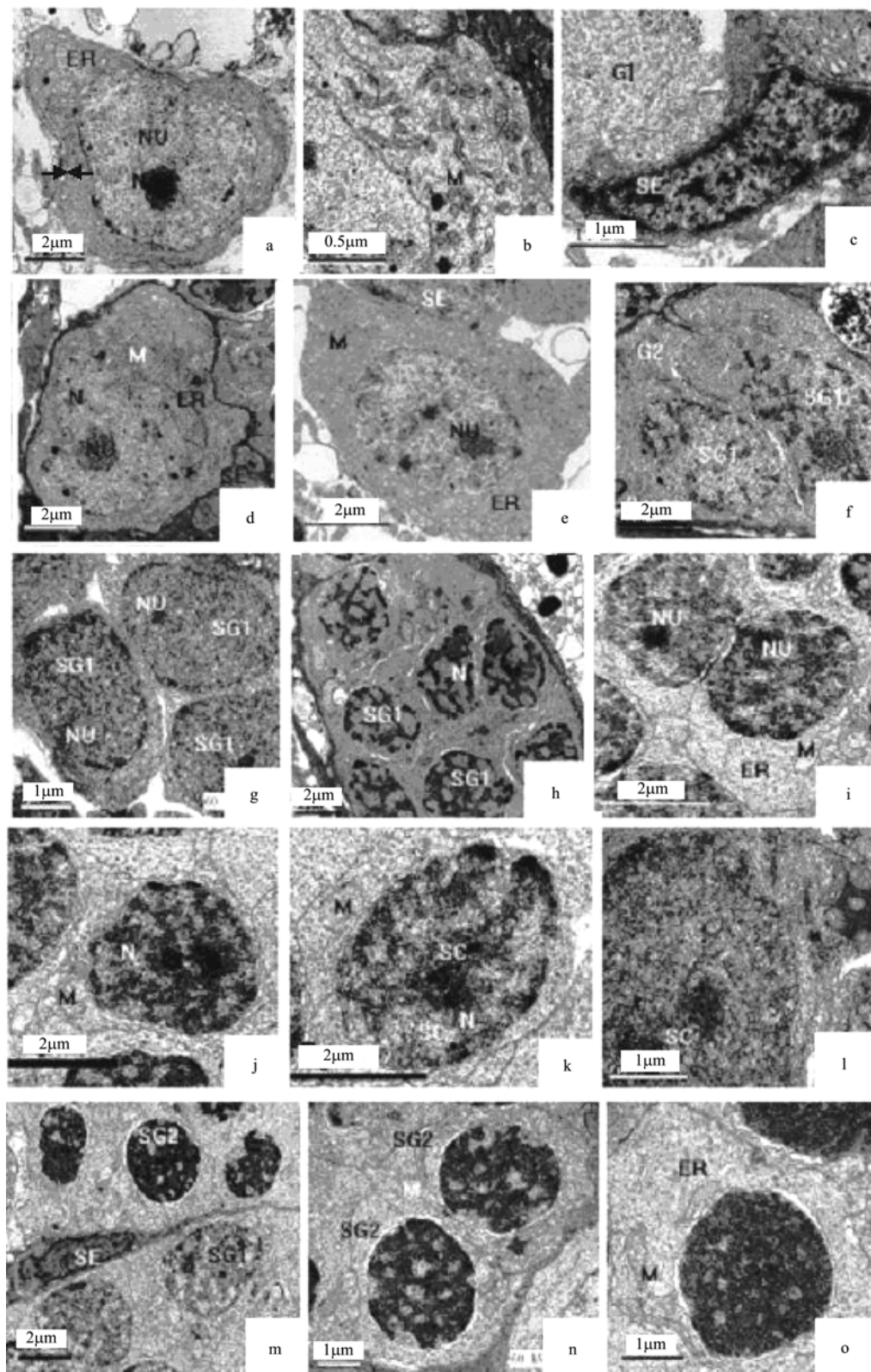


图 1 黑鲷早期生精细胞的超微结构观察

a. 初级精原细胞, 示核、核仁、内质网; b. 初级精原细胞, 示细胞质内线粒体; c. 示精原细胞周边的支持细胞; d. 圆形次级精原细胞, 示核、核仁、内质网及周边支持细胞; e. 椭圆形次级精原细胞, 示核、核仁、内质网及周边支持细胞; f. 示正在分裂的次级精原细胞; g. 初级精母细胞, 示偏位核仁; h. 精小囊, 示精小囊内的初级精母细胞; i. 细线期初级精母细胞, 示核、偏位核仁、内质网及线粒体; j. 偶线期初级精母细胞, 示核、及线粒体, 箭头示核内染色质块; k. 粗线期初级精母细胞, 示核、联会复合体雏形及线粒体; l. 双线期初级精母细胞, 示联会复合体分开; m. 精小囊, 示初级精母细胞、次级精母细胞及支持细胞; n. 示双核期初级精母细胞; o. 次级精母细胞, 示线粒体及内质网
G1: 初级精原细胞; G2: 次级精原细胞; ER: 内质网; M: 线粒体; N: 核; NU: 核仁; SC: 联会复合体; SE: 支持细胞; SG1: 初级精母细胞; SG2: 次级精母细胞

Fig. 1 Ultrastructural observation in *Girella leonina* during early spermatogenic cell

缘。胞质内细胞器少, 3—4 个线粒体集中分布于细胞质较多的一侧。线粒体较精原细胞时大且内嵴明显(图 1i)。

在偶线期, 细胞核内核仁开始消失, 核内同源染色体联会配对, 此时在核中心位置可见染色较深的两染色质块, 附近的染色质浓缩, 比细线期更粗, 部分染色质已浓缩成团块状(图 1j)。

在粗线期, 细胞核中心出现联会复合体, 其大小与核仁相当且在中间有细线状结构。此时, 染色质主要分布于核膜边缘以及联会复合体附近, 呈团状(图 1k)。

在双线期, 细胞核中联会复合体消失, 联会染色体逐渐分开, 核内两染色体仍呈绒毛状, 核外胞质中细胞器分布密集, 线粒体内嵴多而明显, 高尔基体多分布于近核膜处(图 1l)。

2.2.4 次级精母细胞

初级精母细胞成熟后, 经过第一次成熟分裂形成两个次级精母细胞(图 1n)。次级精母细胞体积比初级精母细胞小, 大小约为 $4.50\mu\text{m}\times 3.50\mu\text{m}$, 核大小约为 $3.30\mu\text{m}\times 2.70\mu\text{m}$ 。不具核仁, 核内染色体明显浓缩, 呈团状分布, 染色程度深于初级精母细胞(图 1m)。细胞核形状规则, 多数呈圆形。细胞质中部分线粒体相互融合, 因而体积较大, 内容物丰富, 内嵴更加明显(图 1o)。

2.2.5 精子细胞

次级精母细胞经过第二次成熟分裂形成精子细胞(图 2a)。精子细胞不再分裂, 在各期生精细胞中精子细胞体积最小, 约为 $3.2\mu\text{m}\times 2.6\mu\text{m}$, 核大小约为 $2.80\mu\text{m}\times 2.5\mu\text{m}$ (图 2b), 核质比最大, 为 0.841。精子细胞经过一系列变态后, 形成具鞭毛的成熟精子。精子细胞大多呈圆形或椭圆形, 细胞质中出现大小不一的囊泡(图 2c)。刚形成的精子细胞核内染色质分布均匀, 随后由于核内染色质浓缩, 核内出现低电子密度区域, 无染色质分布(图 2d)。

2.3 精子形成过程

2.3.1 精子形成早期

在精子形成早期, 细胞核圆形、偏位, 核内染色质呈细颗粒状分布。在核膜处开始出现核周隙(图 2c), 随后周隙增大, 核内染色质浓缩(图 2e), 核内出现许多核空泡, 在细胞质中则存在大量大小不等的囊泡, 核内多余的染色质通过高尔基体形成的囊泡排入其中(图 2f、图 2g)。细胞质内各种细胞器分布较集中(图 2d), 中心粒十分明显, 近端中心粒较远端中心粒更靠近核膜。近中心粒一侧的细胞膜向

内凹陷, 并逐渐形成核后窝, 线粒体则逐渐转移并集中于此处(图 2h, 图 2i)。

2.3.2 精子形成中期

精子细胞核内的染色质继续浓缩, 呈粗大颗粒状, 核内出现低电子密度区域(图 2j、图 2k), 核由圆形变为马蹄形(图 2j)。核周隙缩小, 使核质界线不清晰, 核后窝凹陷加深(图 2k), 核后窝附近还可见高尔基体、几个粗大线粒体以及由位于后端的远端中心粒形成的鞭毛(图 2j)。

2.3.3 精子形成晚期

精子核内染色体进一步浓缩, 核内的低电子密度区域消失, 精子头部的染色质致密但呈均匀分布(图 2m)。细胞质仅少量存在于精子核后窝, 原先呈无序排列的线粒体移至核后窝后, 围绕于精子鞭毛基部, 共同构成了精子的袖套, 其他细胞器不明显或者消失。至此, 成熟精子形成(图 2o)。

2.3.4 成熟精子结构

黑鲷的成熟精子分为头部、中部和尾部 3 个部分。头部纵切面呈马蹄形, 核直径为 $1.0\text{—}1.5\mu\text{m}$, 核前方无顶体。头部电子密度高, 染色深, 核质分布均匀且致密, 偶尔可见核空泡分布。核后窝深, 约占精子头部长度的 $1/2$ (图 2m、图 2n)。精子中部主要由袖套和中心粒复合体构成, 袖套由基体发出的轴丝和线粒体套组成(图 2m), 轴丝横切面为典型的“9+2”双联管结构(图 2l), 轴丝外围有向两侧扩展而成的侧鳍。精子尾部细长, 在电镜切片中未观察到末端(图 2o)。

3 讨论与结果

3.1 生精细胞形态及核质的变化

在黑鲷的精子发生过程中, 精细胞形态也发生着改变, 由精原细胞时的圆形或椭圆形变为精母细胞时的不规则多边形或多角形等, 而至精子细胞时, 则多为近圆形, 这种形态变化与黑鲷 *Sparus macrocephalus*、平鲷 *Rhabdolosargus sarba* 等鱼类的研究结果^[9]相似。由于精母细胞的核质比小于精原细胞和精子细胞, 其胞质相对比例较高, 胞质的流动性使精母细胞更易发生变形, 而呈现多种形态。

众多研究表明^[9-11], 生精细胞的核形态不同于胞质, 核形稳定, 除精子变态期, 精细胞的细胞核形状均呈圆形或者椭圆形。因而, 核的变化主要是核质等的改变。黑鲷的生精细胞在分裂、成熟过程中核质趋于浓缩、染色程度趋于加深, 初级精母细胞后期核仁消失, 这符合一般鱼类的核质浓缩及变

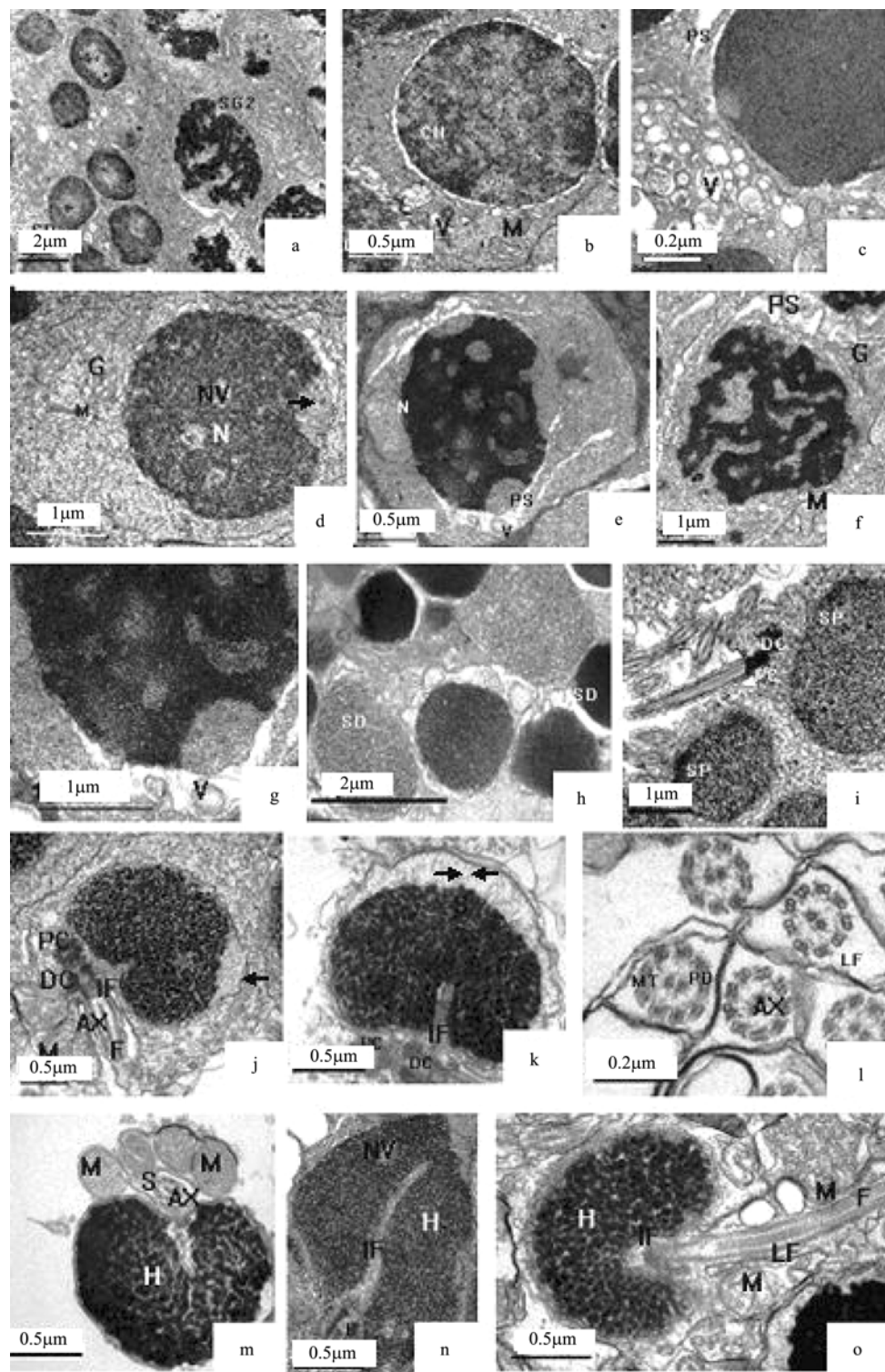


图2 黑鲷精子形成过程的超微结构变化

a. 示精小囊周边的次级精母及精子细胞; b. 精子细胞, 示均匀核质、囊泡及线粒体; c. 精子细胞放大, 示囊泡和核间隙; d. 精子细胞, 示圆形核、核空泡、高尔基体及线粒体; 箭头示低电子密度区域; e. 精子细胞, 示核质浓缩、核间隙以及囊泡; f. 精子细胞, 示核质进一步浓缩及扩大的核间隙; g. 图 2e 局部放大, 示核间隙中的囊泡; h. 精子细胞, 示细胞内核浓缩, 染色加深; i. 精子, 示近端中心粒、远端中心粒以及鞭毛; j. 精子, 示线粒体、中心粒及轴丝; 箭头所指示核前方低电子密度区; k. 精子, 示核后窝、中心粒; 箭头所指示核前方低电子密度区; l. 成熟精子鞭毛横切, 示鞭毛内轴丝和侧鳍; m. 成熟精子, 示袖套由 4 个粗大线粒体围绕鞭毛构成; n. 精子, 示核后窝以及核空泡; o. 成熟精子, 示鞭毛、侧鳍及线粒体;

Ax: 轴丝; DC: 远端中心粒; ER: 内质网; F: 鞭毛; G: 高尔基体; G1: 初级精原细胞; G2: 次级精原细胞; H: 精子头部; IF: 核后窝; LF: 侧鳍; M: 线粒体; MP: 中段; MT: 微管; N: 核; NU: 核仁; NV: 核空泡; PC: 近端中心粒; PD: 外周二联管; PS: 核膜间隙; PP: 核后窝; S: 袖套; SC: 联会复合体; SD: 精子细胞; SE: 支持细胞; SG1: 初级精母细胞; SG2: 次级精母细胞; SP: 精子; V: 囊泡

Fig. 2 Ultrastructural changes in *Girella leonina* during spermatogenesis

化过程。黑鲷的核质经历了条带状、团状、细颗粒状、粗颗粒状再浓缩成为高电子密度的均匀物质的过程,核质的分化改变是生精细胞逐渐成熟并向下一发育期转化所必需的物质基础。关于核质形状在核质浓缩过程中的这种改变,在粗唇鲷 *Leiocassis crassilabrus* Günther^[12]、黄颡鱼 *Pseudobagrus fulvidraco*^[13]、孔雀鱼 *Poecilia reticulata*^[14]等鱼类中均有报导。

3.2 精子发生与线粒体变化

线粒体作为细胞生命活动的供能者,是精细胞内重要的细胞器,在精子发生过程中起着极其重要的作用。随着黑鲷精细胞的发育,胞质中的线粒体经历了体积由小变大、数量由多变少、分布由分散到集中、膜内嵴由简到繁的过程,最后线粒体只存在于核后窝处,数量减少为4个。线粒体数量的变化反映了精细胞对能量的需求状况,从精原细胞发育至成熟精子,精细胞的体积急剧减小,胞质含量下降,其他细胞器数量也同时减少^[15],使所需能量减少,少量的线粒体即能保证能量供应。但是,至精子形成的中后期,高尔基体及内质网等共同作用不断将细胞内多余物质排出,使细胞对能量的需求加大。但体积的缩小限制了线粒体数量的增加,因此,只有通过增加线粒体体积、增加内嵴、提高供能效率的方式得以解决。故线粒体越发达其内嵴越长而明显。黑鲷的线粒体内嵴增加最早出现于初

级精母细胞早期,与黑鲷^[16]、大黄鱼 *Pseudosciaena crocea*^[9]、孔雀鱼^[14]、褐菖鲉 *Sebastiscus marmoratus*^[11]等鱼类基本相同,这也从精子发生过程反映了硬骨鱼类的系统进化关系。

3.3 成熟精子形成过程及其结构特点

黑鲷的成熟精子形成过程分为早、中、晚3期,与黑鲷^[16]、孔雀鱼^[14]和半滑舌鲷 *Cynoglossus semilaevis* Günther^[17]等鱼类相似。在核内染色质浓缩的同时,出现了核周隙和核内低电子密度区域,核周隙主要作用是转移核内排出的囊泡;低电子密度区的核质极少,染色浅,该区域的出现可能与核染色质浓缩早于核体积的缩减有关。在观察黑鲷精子变态过程时,也发现了这一事实,核中的低电子密度区域直到晚期才逐渐消失,而精子头部的核质浓缩较早,在中期时即已基本完成。

黑鲷的成熟精子可分为头部、中部以及后部3部分。黑鲷的精子头部前方也不具顶体,与大多数硬骨鱼类一样^[9-15],精子核后窝处鞭毛具有4个粗大线粒体,供应精子所需的能量。核后窝凹入深,约占精子头部的1/2。有研究表明,不同硬骨鱼的精子核凹陷有所区别,较高等的鱼类其凹陷也较深^[15],由此也说明黑鲷为较高等的鱼类。其精子鞭毛细长,两旁具侧鳍,两侧鳍大小均等,这在一定程度上增强了精子的游动能力。

参考文献

- [1] 沈世杰. 台湾鱼类志[M]. 台湾: 国立台湾大学动物系, 1993, 12: 1-960.
- [2] 姚善成, 李凤歧. 日本产鲷鱼 *Girella punctata* 种群和地理变异研究[J]. 海洋通报, 1998, 7(2): 87-75.
- [3] 陈舜, 肖云朴. 南麂列岛海域黑鲷网箱养殖试验初报[J]. 水产科技情报, 2008, 35(1): 1-8.
- [4] 孙敏, 徐善良, 肖云朴, 等. 黑鲷(*Girella leonina*)淀粉酶与蛋白酶的活力研究[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2009(3): 338-342.
- [5] 孙敏, 徐善良, 唐道军. 黑鲷血液的生理生化指标研究[J]. 台湾海峡, 2009, 28(4): 482-487.
- [6] NAOKI Y, TETSUJI N. Revision of the genus *Girella* (Girellidae) from East Asia [J]. Ichthyol Res, 1999, 47(2): 119-135.
- [7] NAOKI Y, TETSUJI N. Evolutionary trend in feeding habits of *Girella*[J]. Ichthyol Res, 2003, 50: 358-366.
- [8] 周凯, 房文红, 乔振国. 锯缘青蟹血细胞的形态及分类[J]. 中国水产科学, 2006, 13(2): 211-216.
- [9] 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.
- [10] 石戈, 刘雪珠, 王健鑫, 等. 3种鲈形目鱼类精子发生早期的超微结构研究[J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(2): 163-167.
- [11] 林丹军, 尤永隆. 褐菖鲉精细胞晚期的变化及精子结构研究[J]. 动物学研究, 1998, 19(5): 359-366.
- [12] 陈永强, 魏刚, 李振华, 等. 粗唇鲷精巢显微结构和精子发生的研究[J]. 淡水渔业, 2008, 38(1): 6-10.
- [13] 刘文彬, 张轩杰. 黄颡鱼精巢发育和周年变化及精子的发生与形成[J]. 湖南师范大学: 自然科学学报, 2004, 27(1): 66-70.
- [14] 郭明申, 刘龙, 穆淑梅, 等. 孔雀鱼精子发生的显微与超微结构[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2006, 26(6): 653-658.
- [15] MEDINA A, MEGINA C, ABASCAL F, et al. The sperm ultrastructure of *Merluccius merluccius* (Teleostei Gadiformes): phylogenetic considerations[J]. Acta Zoologica, 2003, 84: 131-137.
- [16] 刘雪珠, 石戈, 王日昕. 黑鲷精子发生过程中的超微结构变化[J]. 海洋科学, 2005, 29(10): 48-53.
- [17] 康现江, 梁春光, 郭明申, 等. 半滑舌鲷精子发生和精子形成的超微结构[J]. 动物学报, 2008, 54(2): 356-365.