

几种鲆鲽鱼类精子超微结构及生理特性的比较研究

王 华¹, 牛从从^{1,2}, 邵明瑜¹, 张全启¹, 张志峰¹

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 青岛第 58 中学, 山东 青岛 266100)

摘要:借助透射电镜分别对石鲽(*Kareius bicoloratus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)成熟精子的超微结构进行了比较研究,进一步测定了石鲽和牙鲆精子的基本生理特性,并研究了 17℃ 和 4℃ 保存精子的活力变化。结果显示 3 种鱼类精子均为有鞭毛精子,无顶体,尾部轴丝 9+2 型。不同之处包括:成熟精子的核致密度不同,以石鲽最高,大菱鲆和牙鲆则较低;在大菱鲆和牙鲆精子头部,核前端侧面都有一缺刻状结构,石鲽精子未发现此结构;头部核膜与质膜之间的细胞质含量以大菱鲆的最多;精子中段的线粒体数量不同,大菱鲆较多(10 个左右),石鲽次之(8 个左右),牙鲆最少,仅为 5 个左右;中段植入窝深度不同,以大菱鲆陷入核中最深,其他 2 种比较接近。石鲽和牙鲆精液的 pH 值比较接近,精子密度以牙鲆较高,为 10.18×10^9 个/mL \pm 3.37×10^9 个/mL。牙鲆和石鲽精子活力的保存时间在 17℃ 下分别为 48 h 和 36 h,4℃ 下分别为 7 d 和 8 d。精子活力完全失去之前,随着保存时间的延长,精子的激活率和寿命逐渐下降,而涡动时间则相差不大。

关键词:石鲽(*Kareius bicoloratus*);大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.);牙鲆(*Paralichthys olivaceus*);精子;超微结构;活力

中图分类号:Q959.483

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2008)10-0018-06

精子生理特性的研究是动物繁殖生理学的重要内容,其中对精子结构的研究有助于认识某一动物的进化规律和进行科学的分类及受精机制的探讨等^[1],精子活力不仅是评价精液质量的重要指标,也是进行精液保存、人工授精等其他研究的基础^[2]。

目前国内外已有许多关于硬骨鱼精子超微结构的报道^[3~11],不同的硬骨鱼其精子的超微结构各不相同。但就我国经济鲆鲽类来讲,仅见圆斑星鲽精子和牙鲆精子超微结构及有关生理特性的研究报道^[9,12,13],对其他鲆鲽鱼类至今尚未见相关报道。

石鲽(*Kareius bicoloratus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)皆属鲆形目,冷温性底栖鱼类,鲆鲽鱼类由于具有生长迅速,肉质鲜美、抗病力强等优点,因而是中国北方海水养殖鱼类中的重要养殖对象。

本实验对上述 3 种鲆鲽鱼类的精子超微结构及石鲽和牙鲆精子的生理特性进行了初步研究,以期为今后开展鲆鲽鱼类相关方面的研究提供基础资料。

1 材料与方 法

实验所用材料分别于 2003 年 12 月和 2004 年 12 月采自山东华新海大海洋生物股份有限公司的养殖亲鱼,分别以性成熟的健康无病的 4 尾雄性亲鱼为取材对象。取材时用干净纱布拭净鱼体表水分,从泄殖孔处人工挤压出精液。

电镜制样:直接用干净吸管吸取干燥精液于 3% 戊二醛中固定,1% 锇酸后固定,系列酒精脱水,Epon 812 环氧树脂包埋,超薄切片,H-7000 型透射电镜下观察并拍照。

精液密度和 pH 值的测定:采用血球计数板测定精液的密度。采用 DELTA 320 pH 计测定精液的酸碱度。测定个体数为 3 尾。

精液保存及活力测定:将实验鱼精子分别盛入 EP 管中,加盖密封,置于鱼类生殖温度(17℃ \pm 1℃)和 4℃ 冰箱中保存,定期取出少许精子用过滤海水激活,显微镜下测其活力。实验用过滤海水是由砂滤海水再经脱脂棉过滤所得,温度 17℃ \pm 1℃,盐度 30,pH 值 8。

精子活力的测定:参考区又君等^[14]的方法,并稍加改进。活力指标分为:激活率(入水后,活动精子的数量占全部精子数量的百分比);涡动时间(从精子激活至 90% 精子原处颤前的时间);寿命(总运动时间,即从精子激活至 90% 精子停止颤动的的时间)。每组重复 3 次,结果取平均值。

收稿日期:2006-09-13;修回日期:2008-05-07

基金项目:国家 863 计划资助项目(2003AA603130)

作者简介:王华(1983-),女,山西运城人,硕士研究生,主要从事海洋动物细胞与发育生物学研究,E-mail: wanghua2092911@yahoo.com.cn; 张志峰,通讯作者,电话:0532-82031647,E-mail: zzfpl07@ouc.edu.cn

数据处理:用 SPSS 11.5 软件对数据进行 One-way ANOVA 统计分析,每组重复样以 95% 的可信度进行统计处理,求得平均值和标准误差。不同组间通过两独立样本的 *t* 检验进行比较,当 $P < 0.05$ 时视为差异显著。

2 结果

2.1 石鲮、大菱鲆和牙鲆精子的超微结构比较

3 种鱼类精子的超微结构如图 1 所示。3 种鱼的

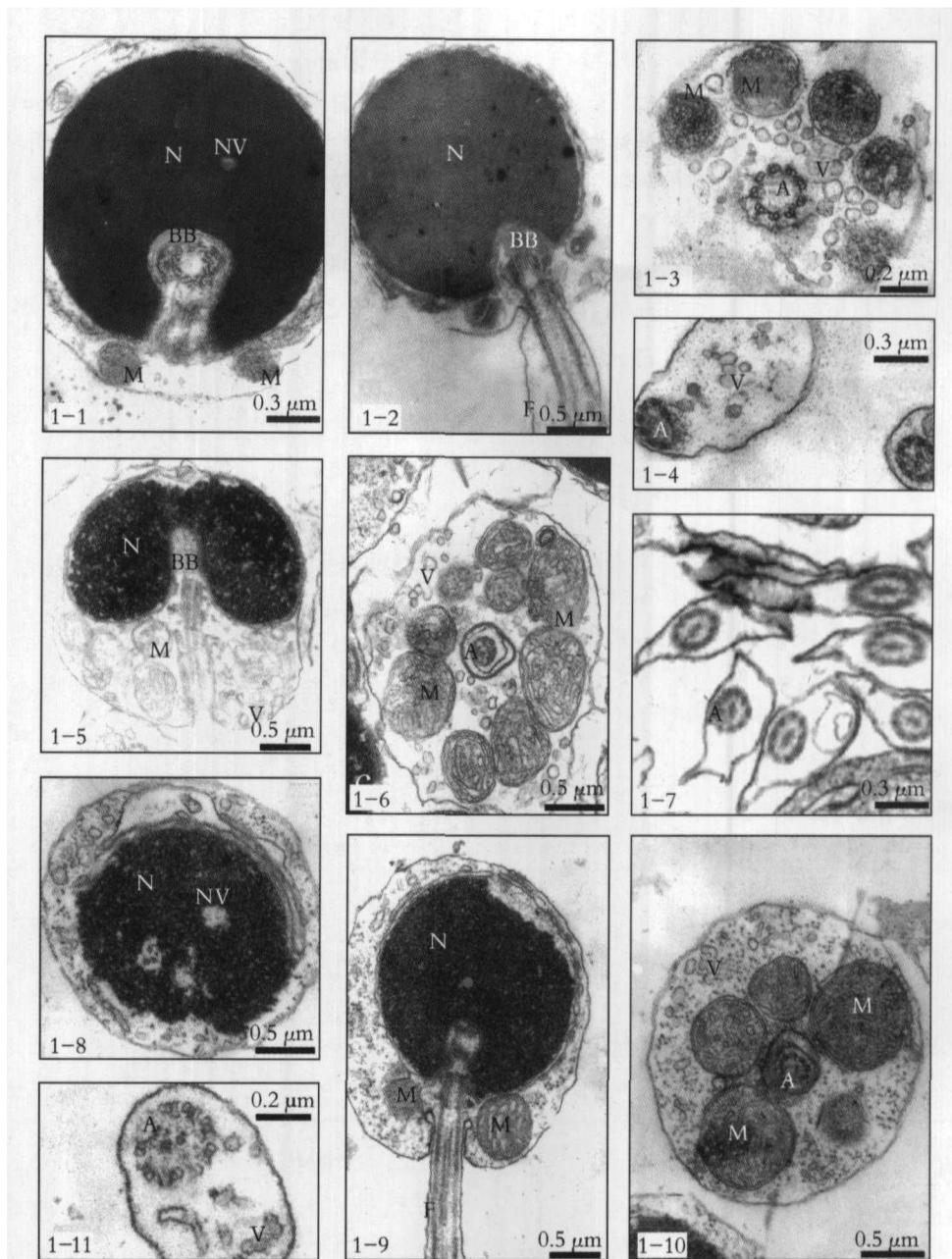


图 1 3 种鱼类精子的超微结构

Fig. 1 Ultrastructure of sperm in three fish species

1-1. 石鲮精子头部纵切;1-2. 石鲮精子纵切;1-3. 石鲮精子中段横切;1-4. 石鲮精子尾部横切;1-5. 大菱鲆精子头部纵切;1-6. 大菱鲆精子中段横切;1-7. 大菱鲆精子尾部横切;1-8. 牙鲆精子头部;1-9. 牙鲆精子头部纵切;1-10. 牙鲆精子中段横切;1-11. 牙鲆精子尾部横切;N. 胞核;A. 轴丝;M. 线粒体;BB. 基体;V. 囊泡;NV. 核泡;F. 鞭毛

1-1. Longitudinal section of sperm head of *Kareius bicoloratus*; 1-2. Longitudinal section of *K. bicoloratus* sperm; 1-3. Transverse section of sperm middle piece of *K. bicoloratus*; 1-4. Transverse section of sperm tail of *K. bicoloratus*; 1-5. Longitudinal section of sperm head of *Scophthalmus maximus* L.; 1-6. Transverse section of sperm middle piece of *S. maximus* L.; 1-7. Transverse section of sperm tail of *S. maximus* L.; 1-8. Sperm head of *Paralichthys olivaceus*; 1-9. Longitudinal section of sperm head of *P. olivaceus*; 1-10. Transverse section of sperm middle piece of *P. olivaceus*; 1-11. Transverse section of sperm tail of *P. olivaceus*; N. Nucleus; A. Axoneme; M. Mitochondria; BB. Basal body; V. Vesicle; NV. Nucleus vesicle; F. Flagellum

精子皆可分为头部、中段和尾部三部分,头部前端无顶体,尾部轴丝 9+2 型。其特点如下。

2.1.1 石鲮

头部主要为一细胞核占据,核呈卵圆形,核质致密均一,其中局部有电子致密颗粒分布。核中分布少量核泡,内有电子致密物质。核膜与质膜之间细胞质含量较少,其中未发现囊泡结构。头部核后端有一植入窝,陷入核中约 1/3 左右(图 1-1,1-2)。

中段占整个精子长度很短,包括中心粒复合体和袖套。近端中心粒位于植入窝前段中,由 9 组 3 联体微管组成,基体位于植入窝中段,后端与轴丝相连。袖套体积占整个中部较小,袖套中含线粒体,约 8 个左右。基体和线粒体之间的胞质中分布有较多的囊泡结构(图 1-3)。

尾部为一细长的鞭毛,鞭毛前端起始于袖套腔中的轴丝,轴丝与质膜之间细胞质含量较多,其中也有较多的囊泡结构(图 1-4)。

2.1.2 大菱鲆

头部核相对较小,核质比较致密,核中分布有核泡。核顶端有一缺刻结构,此结构与核膜之间的区域内含电子致密物质。质膜和核膜紧贴,细胞质含量极少,植入窝陷入核中很深,陷入核中约 2/3 左右,将核分为等大的两叶,呈肾形(图 1-5)。

中段袖套占整个中部较大,其中线粒体 10 个左右,分布于不同的水平上,中心粒复合体深入植入窝中。袖套中细胞质较多,其中也分布有较多的囊泡(图 1-6)。

尾部鞭毛远核端有较多细胞质,但囊泡消失,并且质膜在轴丝外周形成双翼状(图 1-7)。

2.1.3 牙鲆

头部细胞核呈卵圆形,染色质浓缩,核前端侧面有一缺刻状结构,此结构与核膜之间的区域内含中度电子致密物质。细胞核中有核泡,在临近植入窝处有一较大的核泡,内含电子致密物质。质膜与核膜之间的细胞质含量较多,其中含有大量囊泡。核后端的植入窝陷入核中约 1/4 左右(图 1-8,1-9)。

中段袖套占整个中部较大,其中线粒体 5 个左右,袖套中也分布有较多的囊泡(图 1-10)。尾部鞭毛的轴丝与质膜之间也含有细胞质,其中有较多的囊泡(图 1-11)。

2.2 精子基本生理指标

石鲮和牙鲆精子的基本生理特性(精液特征及精子活力)见表 1。

结果显示,两种鱼类精液颜色和 pH 值接近,牙鲆精液密度较高,精子活力(包括涡动时间、寿命和激活率)也较石鲮的强。

表 1 石鲮和牙鲆精子的基本生理特性

Tab. 1 The basic physiological characters of *K. bicoloratus* and *P. olivaceus* sperms used in this study

鱼种	鱼体质量 (kg)	鱼体长 (cm)	精液颜色	精液 pH	精子密度 ($\times 10^9$ 个/mL)	精子活力		
						涡动时间 (min)	寿命 (min)	激活率 (%)
石鲮	0.35 \pm 0.05	23.33 \pm 2.89	乳白色	7.29 \pm 0.15	6.27 \pm 3.50	1.91 \pm 0.02	5.67 \pm 0.20	76.67 \pm 2.20
牙鲆	2.17 \pm 0.29	56.67 \pm 2.89	乳白色	7.38 \pm 0.34	10.18 \pm 3.37	2.96 \pm 0.21	19.04 \pm 0.44	93.33 \pm 0.17

2.3 室温和低温保存精子活力的变化

2.3.1 石鲮精子

结果如图 2 所示,石鲮精子在 17℃ 下可保存 36 h,在 4℃ 下则可保存 8 d,精子仍具有一定活力,继续保存则精子失去活力。比较精子在保存不同的时间里,激活后其涡动时间一直无显著性变化。石鲮精子在 17℃ 和 4℃ 下保存 6 h 后,激活后其寿命均出现显著性下降,精子寿命由最初的 5.67 min \pm 0.20 min 分别降为 3.18 min \pm 0.30 min 和 3.38 min \pm 0.16 min。17℃ 保存 6 h,精子激活率由最初 76.67% \pm 2.20% 显著下降至 58.33% \pm 1.67%,而 4℃ 保存 48 h 精子激活率显著下降至 56% \pm 2.18%。

2.3.2 牙鲆精子

结果如图 3 所示,牙鲆的精子在 17℃ 下可保存 48 h,在 4℃ 下可保存 7 d,精子仍具有活力,继续保存则失去活力。比较精子在保存不同的时间里,在精子失去活力之前,激活后其涡动时间均无显著性变化。精子在 17℃ 和 4℃ 下保存 24 h,激活后其寿命均出现显著性下降,精子寿命由最初的 19.04 min \pm 0.44 min 分别降为 12.06 min \pm 0.59 min 和 10 min \pm 2.11 min。17℃ 下保存 12 h 精子激活率由 93.33% \pm 0.17% 显著下降至 76.67% \pm 2.20%,4℃ 保存 48 h 激活率显著下降至 76.67% \pm 6.51%。

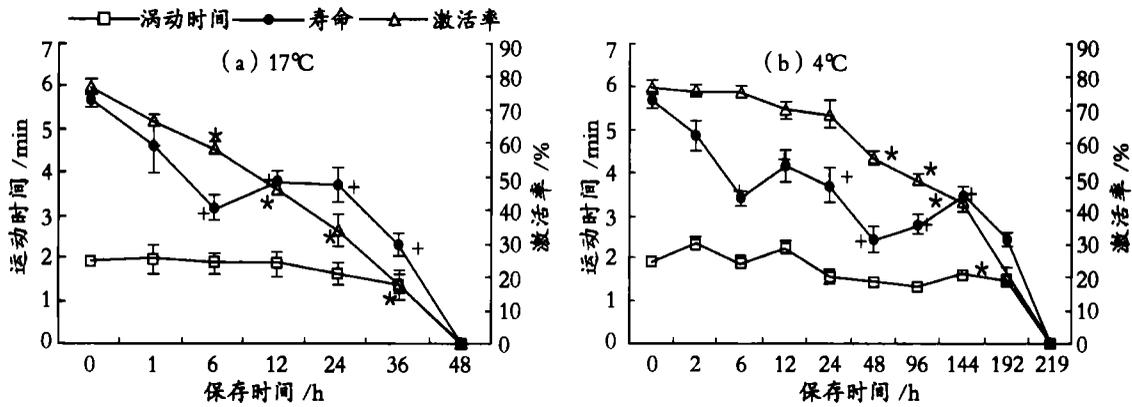


图2 石鲮精子在不同温度下保存不同时间的活力

Fig. 2 Motility of *K. bicoloratus* sperm preserved at different times and different temperatures

设0 h时为对照,与对照相比,“+”寿命有显著差异;“*”激活率有显著差异,涡动时间无显著性差异(图3同)

The group at 0 h is considered as the control, in comparison with the control, “+” means significant difference in lifetime, “*” means significant difference in activation rate; There were no significant differences in time of rapid movement (the same as Fig. 3)

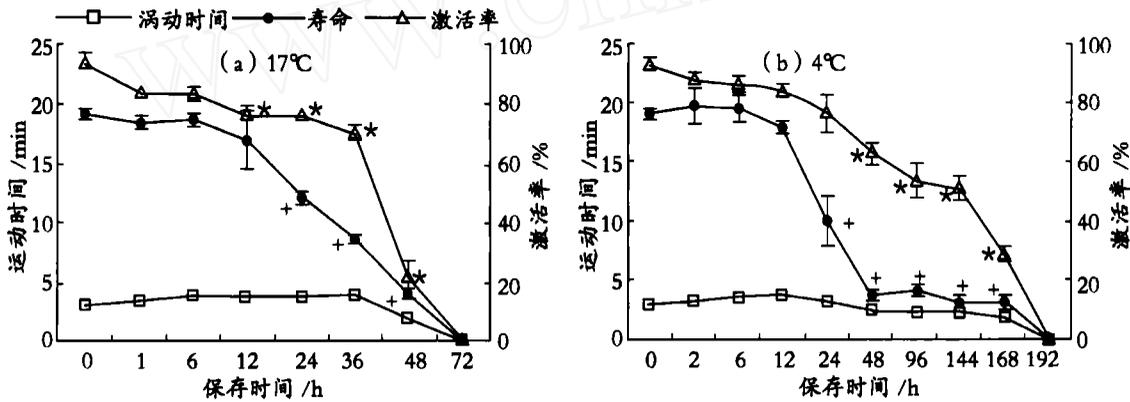


图3 牙鲆精子在不同温度下保存不同时间的活力

Fig. 3 Motility of *P. olivaceus* sperm preserved at different times and different temperatures

3 讨论

3.1 3种鲆鲽鱼类精子超微结构的相同点

3种鱼的精子均有鞭毛,无顶体,这同大多数硬骨鱼类相似^[3~11]。3种鱼的精子头部核中都有核泡,内含电子致密颗粒物质,在其他鱼类及哺乳类动物的精子中也有核泡的存在,一般认为是由染色质部分浓缩而形成的空隙^[6~10]。

3种鱼精子中部袖套中,基体位于植入窝中,其后端与轴丝相连。在鞭毛近核端的轴丝与质膜之间含有较多的细胞质,其中含有囊泡结构,随鞭毛向后端的延长,细胞质含量逐渐减少,尾部轴丝为典型的“9+2”型微管结构。

3.2 3种鲆鲽鱼类精子超微结构的不同点

精子头部细胞核的致密度以石鲮的最高,大菱鲆和牙鲆则较低。有学者在研究了长吻鲈精子后指出,头部质膜和核膜间隙较小,且核质高度凝聚,能增强细胞核结构的稳定性,使遗传信息的多层游离表面减少到最低限度,并使精子免受物理损伤和突

变^[15],本实验3种鱼中,是否石鲮精子较大菱鲆和牙鲆精子更能抵抗外界不利因素的影响,有待进一步的研究。

在大菱鲆和牙鲆精子头部,核前端侧面都有一缺刻状结构,石鲮精子未发现此结构,目前也尚未见这种结构在其他鱼类中的报道,但有学者在圆斑星鲽中发现其精子头部核前区有一不含染色质的电子透明区,并推测可能是顶体的一种遗迹或是精子向外释放核物质的一种途径^[12];还有学者在研究尼罗罗非鱼中指出,存在于核周围的囊泡从核内释放出来后,浓缩的染色质表面就会凹凸不平,外观上表现为细胞核表面有很多凹陷^[21]。在以前对牙鲆精子超微结构的报道中未见此结构^[11],本次作者比较了其中的电子致密物质,发现与核泡中的电子致密物质相似,推测此区域结构的形成与核泡相同,都是核内染色质浓缩的结果。

牙鲆精子头部核膜与质膜之间的细胞质含量较多,且其中含有囊泡。大菱鲆精子的袖套占中部的体积最大,其中所含的细胞质含量和线粒体的数量

也高于其他 2 种鱼类,大菱鲂精子含 10 个左右线粒体,石鲮精子含有 8 个左右,牙鲆精子的线粒体数量仅为 5 个左右。囊泡可能与向精子输送营养和能量有关^[19],线粒体的主要作用则是为精子的运动提供能量,上述结构一定程度上可体现精子的活力高低。

根据已有的报道,硬骨鱼的植入窝是细胞核表面的凹陷,深浅不一,其位置多位于核后端,如黄颡鱼^[11];但也有的是植入窝位于核前端,如鲤鱼^[8];还有的是介于前两者的过渡类型,如大黄鱼^[7],石鲮、牙鲆和大菱鲂精子的植入窝同黄颡鱼一样,均位于核后端,以大菱鲂的植入窝最深。植入窝的位置与形态是否与硬骨鱼类进化有关尚不清楚。

3.3 石鲮和牙鲆精子的生理特性及比较

有学者在研究中发现,一般海产鱼精子寿命比淡水鱼精子寿命要长,其原因除了渗透压调节所需能量较少外,与海水鱼长期形成的对海洋恶劣环境的适应性以及它们在海里受精运动所耗能量较少亦有一定关系^[16]。作者对比了几种淡水鱼的精子活力之后也发现了同样的结果^[16~19]。

石鲮与牙鲆虽然精液的颜色及 pH 值相近,但牙鲆精子密度明显高于石鲮,且精子经海水激活后,牙鲆精子的激活率、涡动时间及寿命也高于石鲮精子,可能这与牙鲆精子中含有较多的能量物质(如细胞质和囊泡等)有关。

保存温度和保存时间对牙鲆和石鲮精子的涡动时间均无较大的影响。牙鲆精子在 17℃ 保存 12 h 和在 4℃ 保存 24 h 仍具活力,且活力均较强,而石鲮精子在 17℃ 和 4℃ 保存 6 h 活力均较强。随着保存时间的延长,精子的寿命和激活率逐渐下降。低温可明显延长精子的保存时间,这与低温能降低精子的能量代谢有关^[18],但本试验低温下(4℃)牙鲆和石鲮精子活力保存的延长时间是有限的,分别为 7 d 和 8 d,继续保存精子便失去活力。同时作者发现,虽然精子激活后石鲮精子活力不如牙鲆精子,但在低温下精子活力的保存时间并不低于牙鲆精子,可能与石鲮精子头部结构(核致密度高,质膜与核膜之间间隙小)有关,亦或与本实验所使用牙鲆体长过大(可能年龄偏大),导致牙鲆精子在结构和储能等方面受到一定的影响。

对石鲮、大菱鲂和牙鲆精子超微结构的研究比较可为受精生物学和鱼类进化研究提供相关理论基础,而对 17℃ 和 4℃ 下保存精子活力的研究在生产上有一定的指导意义。在实际生产中,由于环境或其他因素的影响,雌雄亲鱼有时并不是同时成熟,或

是成熟性比相差很大,或是质量很好的精液有限,这就需要已经取得的授精质量较好的精液保存备用,以便提高受精率,同时也能减缓由于人工挤压重复采精造成精子质量下降和雄性亲本的压力。

参考文献:

- [1] 上官步敏,李少菁. 锯缘青蟹精子超微结构的研究 [J]. 动物学报,1994,40(1): 8-11.
- [2] 邓岳松,林浩然. 鱼类精子活力研究进展 [J]. 生命科学,1999,3(4): 271-378.
- [3] Hara M, Okiyama M. An ultrastructural review of the spermatozoa of Japanese fishes [J]. *Bull Ocean Res Ins, Uni Tokyo*, 1998, 33: 120-131.
- [4] Grier H J. Ultrastructure of the testis in the teleost *Poecilia latipinna* [J]. *J Ultr Res*, 1973, 45: 82-92.
- [5] 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(4): 355-357.
- [6] 尤永隆,林丹军. 鲤鱼精子超微结构的研究 [J]. 动物学研究,1996,17(4): 377-383.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 王宏田,徐永立,张培军. 牙鲆精子的超显微结构 [J]. 海洋科学,1999,6: 5-7.
- [10] 林丹军,尤永隆. 褐菖鲉精细胞晚期的变化及精子结构的研究 [J]. 动物学研究,1998,19(15): 359-366.
- [11] 尤永隆,林丹军. 黄颡鱼(*Pseudobagrus fuloisraco*)精子的超微结构 [J]. 实验生物学报,1996,29(3): 235-245.
- [12] 张永忠,徐永江,刘学舟,等. 圆斑星鲮精子的超微结构及核前区特殊结构 [J]. 动物学报,2004,50(4): 630-637.
- [13] 王宏田,张培军. 环境因子对牙鲆精子运动能力的影响 [J]. 海洋与湖沼,1999,30(3): 233-237.
- [14] 区又君,李加儿,江世贵. 保存和激活对真鲷精子生理特性的影响 [J]. 热带海洋,1998,17(3): 65-74.
- [15] 魏刚,戴大临,陈怀辉,等. 长吻鮠精子超微结构的观察 [J]. 四川动物,1995,14(2): 56-57.
- [16] 杨红波,谢刚,刘伟光,等. 鳊鲂精子生物学特性的初步观察 [J]. 珠江水产,1989,14: 72-76.
- [17] 孙大江,韩世忠,曲秋芝,等. 史氏鲟全人工繁殖研究— I. 精子生物学特性观察 [J]. 水产学杂志,2002,15(2): 32-34.
- [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] 罗相忠,邹桂伟,潘光碧. 大口鲈精子生理特性的研究 [J]. 淡水渔业,2002,32(2): 51-53.

A comparative study on sperm ultrastructure and physiological characteristics in *Kareius bicoloratus*, *Scophthalmus maximus* L. and *Paralichthys olivaceus*

WANG Hua¹, NIU Cong-cong^{1,2}, SHAO Ming-yu¹, ZHANG Quan-qi¹, ZHANG Zhi-feng¹

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Qingdao No. 58 Middle School, Qingdao 266100, China)

Received: Sep. , 13, 2006

Key words: *Kareius bicoloratus*; *Scophthalmus maximus* L.; *Paralichthys olivaceus*; sperm; ultrastructure; motility

Abstract: In the present research, the sperm ultrastructures of *Kareius bicoloratus*, *Scophthalmus maximus* L. and *Paralichthys olivaceus* were observed at TEM level. Furthermore the physiological characteristics of sperm of *K. bicoloratus* and *P. olivaceus* were estimated, and the motility changes of sperm stored at 17°C and 4°C were measured. The results showed that sperm of three kinds of fish were all flagellum type ("9+2" pattern), but no acrosome existed in sperm. The differences among them included; the nucleus density of mature sperm was highest in *K. bicoloratus* and lower in *S. maximus* L. and *P. olivaceus*. An indentation structure appeared in front of the sperm nucleus in *S. maximus* L. and *P. olivaceus*, however that in *K. bicoloratus* was no. The contents of cytoplasm and vesicles were most located between plasma membrane and nuclear membrane in the sperm head of *S. maximus* L. The number of mitochondria was different in middle piece of sperm, about 10 mitochondria were found in *S. maximus*, while about 8 in *K. bicoloratus* and about 5 in *P. olivaceus*. The deepness of implantation fossa was deepest in *S. maximus* L., and those in other two fish were similar. The pH of *K. bicoloratus* semen was closed to that of *P. olivaceus*, and the density of semen was higher in *P. olivaceus*, which reached $10.18 \times 10^9 / \text{mL} \pm 3.37 \times 10^9 / \text{mL}$. At 17°C the longest storing time of sperm motility in *P. olivaceus* and *K. bicoloratus* was 48 h and 36 h respectively, and at 4°C was 7 d and 8 d. With the process of preservation, the activation rate and the lifetime gradually declined, however, the time of rapid movement indicated no significant differences.

(本文编辑:刘珊珊)