

王 茜,王小刚,李 鹏,等. 4 种虾虎鱼类精子超微结构的研究与比较[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):320-322.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.100

## 4 种虾虎鱼类精子超微结构的研究与比较

王 茜<sup>1</sup>,王小刚<sup>2</sup>,李 鹏<sup>3</sup>,王小军<sup>3</sup>,胡亚丽<sup>3</sup>,尹绍武<sup>3</sup>

(1. 海南大学海洋学院/海南大学热带生物资源教育部重点实验室,海南海口 570228;2. 海南省农业干部学校,海南海口 571100;

3. 南京师范大学生命科学院/江苏省生物多样性与生物技术重点实验室,江苏南京 210023)

**摘要:**采用扫描电镜和透射电镜分别对云斑尖塘鳢、线纹尖塘鳢、河川沙塘鳢、鸭绿沙塘鳢精子的超微结构进行了比较研究。研究结果显示:在扫描电镜下云斑尖塘鳢、线纹尖塘鳢、河川沙塘鳢、鸭绿沙塘鳢精子均由头部和尾部(即鞭毛)组成。2 种尖塘鳢鱼类精子头部均为圆球形,而 2 种沙塘鳢精子头部则为前端略方的长椭圆形;在透射电镜下这 4 种虾虎鱼的精子均由头部、中段(即颈部)和尾部(即鞭毛)3 部分组成。头部细胞核前端无顶体,细胞核后端的植入窝均较浅,中段不明显,包括中心粒复合体和袖套。云斑尖塘鳢和线纹尖塘鳢的袖套中含有 6~8 个呈环形单层排列的线粒体,河川沙塘鳢和鸭绿沙塘鳢的袖套中含有 2~3 个线粒体。这 4 种虾虎鱼类精子尾部的鞭毛细长,轴丝均为典型的“9+2”型结构,轴丝外侧具有较发达的侧鳍。

**关键词:**虾虎鱼;精子;超微结构;电子显微镜

**中图分类号:** S961.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0320-03

云斑尖塘鳢(*Oxyeleotris marmoratus*, 俗称泰国笋壳鱼)和线纹尖塘鳢(*Oxyeleotris lineolatus*, 俗称澳洲笋壳鱼),均隶属于鲈形目(Perciformes)虾虎鱼亚目(Gobioidae)塘鳢科(Eleotridae)尖塘鳢属(*Oxyeleotris*),分布于东南亚的江河、湖泊及水库中,是塘鳢科乃至虾虎鱼亚目中体型大且生长快的淡水经济鱼类。河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)和鸭绿沙塘鳢(*Odontobutis yaluensis*),均隶属于鲈形目(Perciformes)虾虎鱼亚目(Gobioidae)沙塘鳢科(Odontobutidae)沙塘鳢属(*Odontobutis*)。河川沙塘鳢是一种小型经济鱼类,主要分布于我国长江中下游及沿江各支流、钱塘江水系、闽江水系。而鸭绿沙塘鳢是中小型溪流经济鱼类,主要分布于鸭绿江中下游、辽河东部山区支流太子河、大洋河和辽东半岛碧流河<sup>[1]</sup>。因这 4 种虾虎鱼均具有肉质细嫩鲜美、营养价值高、无肌间刺等诸多优点,深受广大消费者喜爱。到目前为止,仅见胡亚丽等对云斑尖塘鳢精子的超微结构<sup>[2]</sup>的报道。本研究采用扫描和透射电镜对这 4 种鱼类精子的超微结构进行观察比较,为进一步研究虾虎鱼类受精生物学、生殖生理特性等提供基础依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

(1)云斑尖塘鳢雄鱼:2011 年 4 月 15 日购自海南断山渔业有限公司三亚笋壳鱼繁育基地,空运至南京。水温 24~27℃暂养 10~15 d 后,选择体质健壮的雄鱼进行人工催产,

剂量为每 1 000 g 体质量注射 LHRH-A<sub>2</sub>(促黄体生成激素释放激素)8~15 μg<sup>[2]</sup>,或者每 1 000 g 体质量注射 HCG(人绒毛膜促性腺激素)350~400 IU。(2)线纹尖塘鳢雄鱼:2013 年 4 月 2 日购自海南断山渔业有限公司三亚笋壳鱼繁育基地,空运至南京。水温 24~27℃暂养 7~10 d 后,选择体质健壮的雄鱼进行人工催产,剂量为每尾注射 PG(脑垂体)1 mg+HCG 350~400 IU。(3)河川塘鳢雄鱼:2012 年 3 月 15 日购自江苏省宝应县射阳湖镇平江村宋泾河流域。水温 22~25℃暂养 7~10 d 后进行人工催产,剂量为每 1 000 g 体质量注射 LHRH-A<sub>2</sub> 5~8 μg+HCG 200~300 IU。(4)鸭绿沙塘鳢雄鱼:2012 年 4 月 12 日购自辽宁省抚顺市新宾县太子河流域,在江苏省溧阳市金泉特种水产繁育场暂养 20 d 左右,于 5 月 2 日运回实验室。水温 20~23℃暂养 5~7 d 后进行人工催产,剂量为每 1 000 g 体质量注射 LHRH-A<sub>2</sub> 2~4 μg+HCG 250~350 IU。

达到效应时间后,用干燥的毛巾将雄鱼生殖孔处的水分擦净,轻压鱼体腹部挤出精液,弃去最初挤出的精液,随后用干净的胶头滴管吸取乳白色精液备用。

#### 1.2 方法

1.2.1 扫描电镜样品制备 扫描电镜样品制备,参照胡亚丽等的制备方法<sup>[2]</sup>。

1.2.2 透射电镜样品制备 先将精液放在预冷的 2.5%戊二醛中前固定,将精子悬液以 1 000~2 000 r/min 离心 1~2 min,弃去上清液,PBS 缓冲液漂洗 5 min,重复 3 次。然后沉淀包埋于 2%琼脂中,包埋块再放置于 2.5%戊二醛中 4℃过夜,PBS 缓冲液漂洗 10 min,重复 3 次。次日再进行后固定,即转入 1%锇酸后在 4℃固定 2 h。PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 10 min,丙酮梯度系列脱水,每级脱水 15 min。采用 Epon-812 环氧树脂渗透包埋,在 35、45、60℃聚合炉中固化,每级 24 h。用 ULTRACUT E 半薄切片机制片,厚度 2 μm,甲苯胺蓝染色,光镜定位,再用 LEICA ULTRACUT R 超薄切片机制

收稿日期:2014-12-16

基金项目:国家星火计划(编号:2013GA690166);江苏省科技支撑计划(编号:BE2013441);江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目(编号:2012-NY-032);海南大学科研基金(编号:kyqd1525)。

作者简介:王 茜(1982—),女,博士,助理研究员,主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail:wangqian170@163.com。

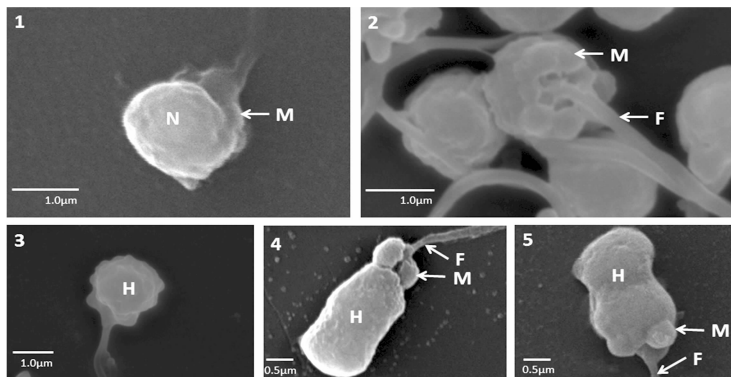
通信作者:尹绍,博士,教授,主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail:yinshaowu@163.com。

片,厚度约 80 nm,经醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色后,用日立 H-7650 型透射电子显微镜进行观察和显微摄影。

## 2 结果与分析

### 2.1 扫描电子显微镜观察

2.1.1 云斑尖塘鳢 精子由头部和尾部(鞭毛)2 部分构成。头部呈圆球形,外表面凹凸不平呈波浪状,其后紧接着由 6~7 个线粒体在轴丝周围围成的 1 圈;尾部自头部后端的正中向后延伸,纤细且长(图 1-1)。头部直径为 1.98~2.12  $\mu\text{m}$ ,尾部鞭毛长 23.22~32.92  $\mu\text{m}$ <sup>[2]</sup>。



1—云斑尖塘鳢精子; 2—线纹尖塘鳢精子; 3—河川沙塘鳢精子; 4—鸭绿沙塘鳢精子; 5—鸭绿沙塘鳢精子; F—鞭毛; H—头部; M—线粒体; N—细胞核

图1 4种虾虎鱼类精子扫描电镜观察

2.1.2 线纹尖塘鳢 精子由头部和尾部构成。头部近似圆球形,表面不平且波纹稍深,明显可见头部后紧接着由 7~8 个线粒体在轴丝周围围成的 1 圈;细长的尾部鞭毛自头部后端的正中向后延伸(图 1-2、图 1-3)。头部直径为 1.68~2.08  $\mu\text{m}$ ,尾部鞭毛长 16.01~25.32  $\mu\text{m}$ 。

2.1.3 河川沙塘鳢 精子由头部和尾部构成。头部呈前端略方的长椭圆形,头部外表面凹凸不平呈不规则的浅网格状,其后紧接着由 2~3 个线粒体围成的 1 圈;鞭毛自头部后端的正中向后延伸(图 1-4)。头部长径为 2.64~3.58  $\mu\text{m}$ ,短径为 1.13~1.50  $\mu\text{m}$ ,尾部鞭毛长 27.45~36.42  $\mu\text{m}$ 。

2.1.4 鸭绿沙塘鳢 精子由头部和尾部构成。头部呈前端略方的长椭圆形,中间略凹,头部外表面纹路较浅,其后紧接着 2~3 个线粒体分布在鞭毛周围;鞭毛从头部后端的正中向后伸出(图 1-5)。头部长径为 2.83~3.24  $\mu\text{m}$ ,短径为 1.38~1.60  $\mu\text{m}$ ,尾部鞭毛长 19.57~27.98  $\mu\text{m}$ 。

### 2.2 透射电子显微镜观察

2.2.1 云斑尖塘鳢 精子由头部、中段(颈部)和尾部(鞭毛)3 部分组成。(1)头部细胞核纵切面呈扁卵圆形,细胞核的后端正中有很浅的植入窝。核膜与质膜间存在着较小的间隙,细胞质膜表面呈凹凸不平状。核内的染色质呈颗粒状或短棒状。染色质中可见到数量很少的空隙(即核泡)。(2)中段(颈部)较短且不太明显,其主要结构是中心粒复合体(即近端中心粒和远端中心粒)及袖套。近端中心粒长轴与远端中心粒垂直,呈“T”字形。袖套中含有线粒体 6~7 个,呈单层环状排列。线粒体内可见清晰的线粒体嵴。在袖套的纵切面可见 2~4 个圆形线粒体(图 2-1),而横切面可见 6~7 个线粒体(图 2-2)。(3)尾部(鞭毛)细长,从头部后端很浅的植入窝伸出。鞭毛的轴丝具有典型的“9+2”型结构(图 2-3),外周是 9 组二联微管,中央是 1 组微管对。在鞭毛的横切面上可见轴丝两侧具有发达的侧鳍,侧鳍的基部有囊泡<sup>[2]</sup>。

2.2.2 线纹尖塘鳢 精子由头部、中段和尾部组成。(1)头部纵切面呈卵圆形,后端正中有较浅的植入窝。细胞质膜表面不平整,核膜与质膜间的间隙较小,其间分布有细胞质、囊泡、溶酶体等。核内染色质致密,呈颗粒或短棒状。(2)中段较短且不明显,主要包括中心粒复合体和袖套。袖套紧接于细胞核的后端,呈短圆筒状,两边对称,袖套中含有线粒体 7~8 个,呈单层环状排列,线粒体内的线粒体嵴清晰可见。

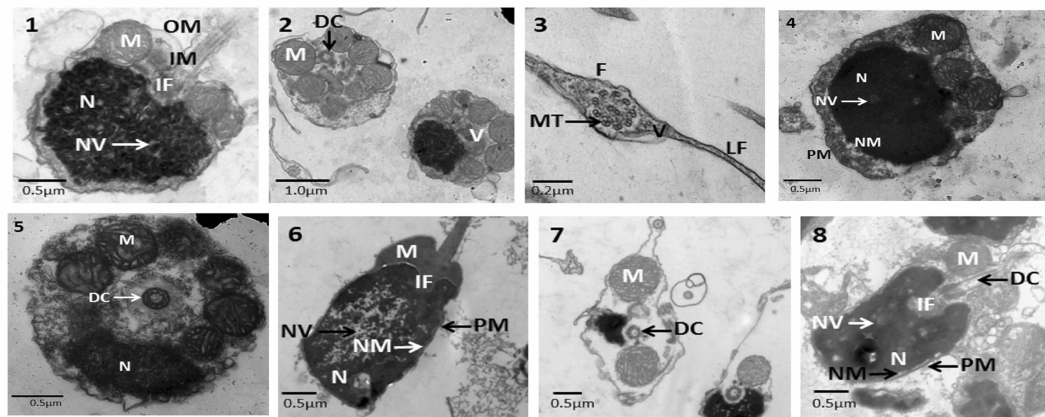
袖套的纵切面可见 3~4 个圆形线粒体(图 2-4),而横切面可见 7~8 个线粒体(图 2-5)。(3)尾部细长,从植入窝中伸出,鞭毛的轴丝具有典型的“9+2”型结构,其横切面可见轴丝两侧发达的侧鳍。

2.2.3 河川沙塘鳢 精子由头部、中段和尾部组成。(1)头部细胞核纵切面呈前端略方的长椭圆形,头部后端正中部位有 1 个较浅的植入窝,凹陷约为头部的 1/6(图 2-6)。核膜与质膜间有小间隙,核内的染色质致密呈颗粒状,染色质中可见到数量较少的空隙。(2)中段较短且不太明显,主要包含中心粒复合体和袖套。袖套中含有线粒体 2~3 个,环状排列在轴丝周围,线粒体内可见清晰的线粒体嵴。在精子的纵切面可见 2 个圆形线粒体(图 2-6),在袖套的横切面可见 2 个线粒体(图 2-7)。(3)尾部细长,从头部后端较浅的植入窝伸出。鞭毛的轴丝具有典型的“9+2”型结构,在鞭毛的横切面上可见轴丝两侧具有发达的侧鳍。

2.2.4 鸭绿沙塘鳢 精子由头部、中段和尾部构成。(1)头部纵切面呈长椭圆形,前端一侧略方。头部后端正中部位有 1 个较浅的植入窝,凹陷为头部的 1/5~1/4。核膜与质膜间有小间隙,核内的染色质致密,呈颗粒状,染色质中可见到少量的空隙。(2)中段较短且不明显,包括中心粒复合体和袖套。袖套中含有线粒体 2~3 个,环状排列呈 1 圈,线粒体内可见清晰的线粒体嵴。在精子的纵切面可见 2 个圆形线粒体(图 2-8)。(3)尾部细长,从头部后端伸出。鞭毛的轴丝由远端中心粒向外延伸,具有典型的“9+2”型结构,轴丝两侧具有侧鳍。

## 3 讨论

通过对云斑尖塘鳢、线纹尖塘鳢、河川沙塘鳢、鸭绿沙塘



1—云斑尖塘鳢精子纵切面; 2—云斑尖塘鳢精子横切面; 3—云斑尖塘鳢精子鞭毛横切面; 4—线纹尖塘鳢精子纵切面; 5—线纹尖塘鳢精子横切面; 6—河川沙塘鳢精子纵切面; 7—河川沙塘鳢精子横切面; 8—鸭绿沙塘鳢精子纵切面; DC—远端中心粒; F—鞭毛; IF—植入窝; IM—袖套内膜; LF—侧鳍; M—线粒体; MT—微管; N—细胞核; NM—核膜; NV—核泡; OM—袖套外膜; PM—细胞质膜; V—囊泡

图2 4种虾虎鱼类精子透射电镜观察

鳢精子的超微结构进行比较,发现它们有以下相同点和不同之处。相同的是,在扫描电镜下观察,精子均由头部和尾部(鞭毛)构成。在透射电镜下观察,精子均由头部、中段和尾部构成,中段较短且不太明显;精子头部的前端均没有顶体结构;尾部轴丝均具有典型的“9+2”型结构;精子鞭毛的轴丝两侧均具有发达的侧鳍。不同的是,在扫描电镜下云斑尖塘鳢和线纹尖塘鳢精子头部均呈圆球形,而河川沙塘鳢和鸭绿沙塘鳢精子头部呈前端略方的长椭圆形;云斑尖塘鳢和线纹尖塘鳢头部细胞核中染色质致密,只见到数量很少的空隙(即核泡),鸭绿沙塘鳢染色质中见到的核泡稍多些,而河川沙塘鳢中见到的核泡则相对较多;在透射电镜下,云斑尖塘鳢和线纹尖塘鳢的袖套中含有线粒体数量较多(为6~8个),呈单层环状排列,而河川沙塘鳢及鸭绿沙塘鳢袖套中仅含有线粒体2~3个,排列在轴丝的周围;云斑尖塘鳢和线纹尖塘鳢的植入窝最浅,河川沙塘鳢的植入窝较浅,凹陷约为头部的1/6,鸭绿沙塘鳢的植入窝相对较深,凹陷为头部的1/5~1/4;从精子的鞭毛长度来看,河川沙塘鳢最长(27.45~36.42 μm)、云斑尖塘鳢次之(23.22~32.92 μm),鸭绿沙塘鳢再次之(19.57~27.98 μm),线纹尖塘鳢最短(16.01~25.32 μm),但均比同为塘鳢科的中华乌塘鳢精子的鞭毛(15.5~17.5 μm)<sup>[3]</sup>要长。比较这4种虾虎鱼类精子的超微结构发现,同属中2种虾虎鱼类的精子超微结构相似,而不同属的虾虎鱼类间精子超微结构存在较大差异,这与同属的鱼类亲缘关系较近相一致。

在云斑尖塘鳢、线纹尖塘鳢、河川沙塘鳢、鸭绿沙塘鳢精子的超微结构中可以看到,与大多数硬骨鱼类一样,精子头部前端均无顶体结构<sup>[4]</sup>。在透射电镜下4种虾虎鱼类精子头部呈扁卵圆形或椭圆形,这与大多数体外受精硬骨鱼类的精子头部相近,如草鱼和兴国红鲤<sup>[5]</sup>,而与江黄颡鱼<sup>[6]</sup>不同,其精子头部呈马鞍形。对黄颡鱼<sup>[7]</sup>和长吻鲇<sup>[8]</sup>的研究发现,它们均具有非常发达的植入窝,黄颡鱼的植入窝呈井状,长吻鲇的植入窝极深,凹入深度约为精子头部长径的5/6,而4种虾虎鱼类精子头部的植入窝均较浅。在长吻鲇<sup>[8]</sup>和褐菖鲢<sup>[9]</sup>中,其袖套中分别含有16个或30~40个线粒体,且呈多层排列,而4种虾虎鱼类精子的袖套线粒体数量较少,且呈单层排列。4种虾虎鱼精子的鞭毛轴丝均具有典型的“9+2”型双联管结

构,而长薄鳅等<sup>[10]</sup>的尾部则为“9+3”式微管结构。与黄颡鱼<sup>[7]</sup>、长吻鲇<sup>[8]</sup>、褐菖鲢<sup>[9]</sup>等相同,这4种虾虎鱼类精子的尾部轴丝两侧都有比较发达的侧鳍,而有些鱼类的精子则无侧鳍,如鲤鱼<sup>[11]</sup>、刀鲚<sup>[12]</sup>等。鞭毛是精子的运动器官,Stoss<sup>[13]</sup>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<sup>[14]</sup>则认为侧鳍与精子游泳速率的提高无多大关系,侧鳍的有无是否影响精子的游泳速率,从而影响受精效率,不同学者存在不同的看法。

#### 参考文献:

- [1] 伍汉霖,钟俊生. 中国动物志:硬骨鱼纲·鲈形目·虾虎鱼亚目[M]. 北京:科学出版社,2008.
- [2] 胡亚丽,刘洋,朱晓平,等. 云斑尖塘鳢精子的超微结构[J]. 淡水渔业,2012,42(6):73-77.
- [3] 何振邦,洪万树,陈仕玺,等. 中华乌塘鳢精子入卵过程的扫描电镜观察[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2009,48(1):128-133.
- [4] 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.
- [5] 林光华,林琼,胡成钰,等. 草鱼、兴国红鲤和草胡子鲇精子超微结构的比较研究[J]. 南昌大学学报:理科版,1998,22(3):90-94.
- [6] 刘利平,王武,赵雷蕾,等. 江黄颡鱼精子的超微结构[J]. 上海水产大学学报,2004,13(3):198-202.
- [7] 龙永隆,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.
- [8] 张耀光,罗泉笙,钟明超. 长吻鲇精巢及精子结构的研究[J]. 水生生物学报,1993,17(3):246-251,293-294.
- [9] 林丹军,尤永隆. 褐菖鲢精细胞晚期的变化及精子结构研究[J]. 动物学研究,1998,19(5):24-30.
- [10] 王志坚,殷江霞,张耀光. 长薄鳅的精巢发育和精子发生[J]. 淡水渔业,2009,39(1):3-9.
- [11] 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.
- [12] 王冰,万全,李飞,等. 刀鲚精子超微结构研究[J]. 水生生态杂志,2010,3(3):57-63.
- [13] Stoss J. Fish gamete preservation and spermatozoon physiology [M]//Hoar W S, Randall D J, Randall E M. Fish physiology. 8th ed. New York: Academic Press, 1983:307-308.
- [14] Afzelius B A. Fine structure of the garfish spermatozoon [J]. Journal of Ultrastructure Research, 1978,64:309-324.