

栉江珧精子超微结构的电镜观察

顾向飞^{1,2}, 边平江³, 周小龙², 林志华², 董迎辉²

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 浙江万里学院 浙江省水产种质资源有效利用技术研究重点实验室, 浙江 宁波 315100; 3. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 温州 325005)

摘要: 为了给栉江珧(*Atrina pectinata*)受精机理提供细胞学依据, 利用透射电镜对栉江珧精子的超微结构进行了详细观察。结果显示, 栉江珧成熟精子为典型的原生型, 包括头部、中段与尾部三部分。头部为卵圆形, 由顶体和细胞核组成。顶体纵切面为倒“V”字形, 顶体腔内电子密度不均匀, 近顶体外膜有一电子密度较高的弧状带, 其余部分电子密度较低。核内有高度浓缩的染色质, 其中有不规则的电子密度较低的核泡存在。无核后窝, 有核前窝和植入窝。中段由 2 个相互垂直的中心粒及周围 5 个呈辐射状排列的线粒体组成。线粒体近卵圆形, 由内外膜组成。尾部鞭毛由轴丝和质膜组成。结果表明栉江珧精子超微结构与典型的双壳贝类精子结构类似, 在一定程度上反映了栉江珧的生殖进化及受精机理。

关键词: 栉江珧(*Atrina pectinata*); 精子; 超微结构; 透射电镜

中图分类号: Q954.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)08-0067-05

栉江珧(*Atrina pectinata*), 又名江珧蛤、牛角江珧蛤、牛角蚶等, 隶属于软体动物门(Mollusca)瓣鳃纲(Lamellibranchia)贻贝目(Mytiloida)江珧科(Pinnidae)江珧属(*Atrina*)^[1]。栉江珧广泛分布于温、热带泥砂质的近海区域, 属于广温、广盐性的海产经济贝类, 主要分布于我国的福建、广东等沿海省份, 在北方的山东、辽宁等海区也有分布^[2]。栉江珧具有较高的食用价值, 是一种极具发展潜力的海水养殖种类。

近年来, 关于栉江珧人工繁育和繁殖生物学方面的研究已见诸报道, 如开展了亲贝人工促熟、稚贝附着基的选择^[3-4]以及雌核发育单倍体诱导^[5]等人工繁育研究, 进行了生殖细胞发生的研究^[6-7]、受精过程的细胞学观察^[8]、精子超低温冷冻保存以及精子线粒体荧光活性检查^[9-10]等繁殖生物学研究。但是, 尚未见到关于栉江珧精子超微结构的研究报道。本研究利用透射电镜技术对栉江珧精子的超微结构进行了观察, 旨在为物种鉴定、生殖进化及受精机理研究提供细胞学依据。

1 材料方法

1.1 实验材料

栉江珧于 2012 年 4 月取自广东湛江东海岛自然海区, 贝龄 2~3 a, 壳长 20~25 cm, 于宁波甬盛水产

种业有限公司暂养。暂养期间混合喂养微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)、亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)、牟氏角毛藻(*Chaetoceros miielleri*), 以促进性腺发育。

1.2 精巢取样及透射电镜观察

栉江珧暂养 2 周后, 随机抽取雄性个体, 活体解剖取精巢, 切成小块, 用 4℃ 2.5%戊二醛和 1%锇酸双固定, 4℃冷藏保存。固定样品经 0.1 mol/dm³磷酸缓冲液漂洗, 30%~90%梯度乙醇脱水, 90%丙酮置换, 无水丙酮脱水, Epon 812 环氧树脂包埋, 在日立 H-7650 透射电镜下对精巢样品切片进行观察并拍照。

2 栉江珧精子超微结构电镜观察结果

栉江珧精子形态为近圆形, 属于鞭毛型。成熟的精子由头部、中段和尾部 3 部分构成。头部长度约 3 μm, 包括顶体(acrosome)和细胞核(nucleus) (图 1a)。中段则由中心粒复合体(centriolar complex)和线粒体(mitochondria)构成。尾部为鞭毛型。

收稿日期: 2013-06-05; 修回日期: 2013-06-23

基金项目: 国家现代贝类产业技术体系项目(CARS-48); 宁波市科技创新团队项目(2011B82017); 宁波市科技局农业择优委托项目(2010C10011)

作者简介: 顾向飞(1989-), 男, 河北枣强人, 硕士研究生, 研究方向: 贝类养殖生物学, E-mail: guxiangfei000@163.com; 董迎辉, 通信作者, E-mail: dongyinghui118@126.com

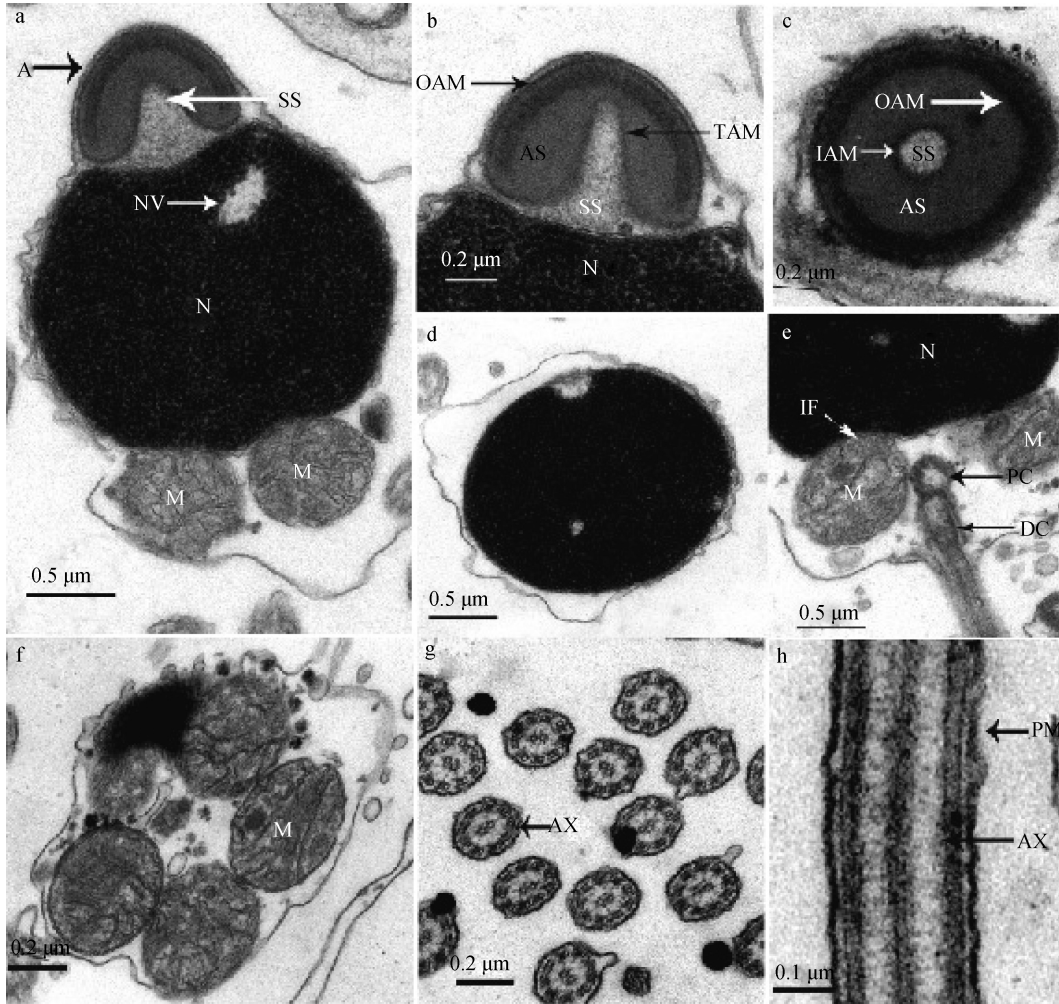


图 1 栉江珧精子的超微结构

Fig. 1 Ultrastructure of spermatozoon in *Atrina pectinata*

a: 头部和中段纵切面; b: 顶体纵切面; c: 顶体过亚顶体腔的横切面; d: 细胞核横切面; e: 中段纵切面; f: 线粒体横切面; g: 鞭毛横切面; h: 鞭毛纵切面; A: 顶体; ANF:核前窝; AS: 顶体腔; AX: 轴丝; DC: 远端中心粒; IAM: 顶体内膜; IF: 植入窝; M:线粒体; N: 细胞核; NV:核泡;OAM: 顶体外膜; PC: 近端中心粒; PM: 质膜; SS: 亚顶体腔
 a: longitudinal section of head and mid-piece; b: longitudinal section of acrosome; c: transverse section of acrosome through subacrosomal space; d: transverse section of nucleus; e: longitudinal section of mid-piece; f: transverse section of mitochondria; g: transverse section of flagellum; h: longitudinal section of flagellum; A: acrosome; ANF: anterior nuclear fossa; AS: acrosomal space; AX: axoneme; DC: distal centriole; IAM: inner acrosomal membrane; IF: implantation fossa; M: mitochondria; N: nucleus; NV: nuclear vacuole; OAM: outer acrosomal membrane; PC: proximal centriole; PM: plasma membrane; SS: subacrosomal space

2.1 顶体

顶体位于精子头部最前端, 在透射电镜下可观察到顶体明显突出。顶体纵切面呈倒“V”形, 在精子纵切面中轴方向上, 顶体长度约 0.7 μm, 占精子头部长度的 1/5。顶体物质外包被一层膜, 根据其位置可分为顶体内膜(inner acrosomal membrane)和顶体外膜(outer acrosomal membrane), 二者围成顶体腔(acrosomal space)(图 1b), 腔内顶体物质分布不均匀, 靠近顶体外膜的为电子密度较大的弧状带。顶体外膜与质膜之间存在一薄层胞质, 顶体内膜与细胞核

形成亚顶体腔(subacrosomal space)(图 1b、图 1c), 腔内亚顶体物质电子密度均匀且较低。

2.2 细胞核

顶体后部紧接着细胞核, 细胞核呈近球形, 直径约 2.0 μm, 长度约 1.7 μm, 占精子头部体积的大部分(图 1d)。细胞核是一个电子致密区域, 内含有高度浓缩的染色质, 同时可观察到不规则染色较浅的核泡(nuclear vacuole)存在(图 1a)。细胞核前端略凹陷, 形成核前窝; 无核后窝; 在后端与线粒体相邻处, 细胞核向内凹陷形成植入窝(implantation fossa)(图 1e、图 1f), 线

粒体嵌于植入窝内。

2.3 中段

中段位于头部和鞭毛之间,由中央的中心粒复合体和呈辐射状排列的线粒体构成。中心粒复合体由近端中心粒(proximal centriole)和远端中心粒(distal centriole)构成(图 1e),两个中心粒均为圆柱状,由 9 组微管组成。远端中心粒是鞭毛的基体,在末端发出鞭毛,其长轴与精子的长轴方向一致,近端中心粒则与远端中心粒互相垂直。中段横切面可以观察到 5 个线粒体(图 1f)。线粒体嵌入细胞核的植入窝,为近椭圆形或球形,长轴约 0.3 μm ,短轴约 0.2 μm 。线粒体电子密度均匀且较低,由内外两层膜组成,内膜向腔内折叠形成线粒体嵴。

2.4 尾部

精子的尾部为鞭毛型,横切面呈圆形,直径约 0.25 μm ,内部为轴丝(axoneme),外部包被的质膜(plasma membrane)呈波浪状(图 1g、图 1h)。轴丝由远端中心粒末端发出,起始端无中央微管,为外周的 9 组二联微管结构,起始端之后为典型的“9+2”型结构。

3 讨论

顶体是位于细胞核与质膜之间的囊状细胞器,是一种特化的溶酶体,含有多种水解酶类,如透明质酸酶、酸性磷酸酶、蛋白水解酶等,能够溶解卵细胞的外被及滤泡细胞,产生孔道,使精子进入卵细胞^[11]。顶体酶作为受精过程中的关键酶,在精子穿透卵膜时起溶解卵膜的作用,对于营体外受精的贝类是十分重要的,因而顶体酶活性高低可直接影响受精^[12]。而对于褶冠冠蚌(*Cristaria plicata*)^[13]、三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)^[14]等受精过程发生在雌贝外鳃腔内的淡水蚌类而言,受精环境相对稳定的,并且卵的胶质卵膜较薄,精子无需发达的顶体就可入卵,因此这些贝类精子顶体通常体积较小,结构简单^[15]。顶体腔内电子密度反映腔内的物质组成,帘文蛤(*Meretrix lyrata*)^[15]、西施舌(*Coelomactra antiquata*)^[16]、沟纹巴非蛤(*Paphia exarata*)^[17]等基部靠近核的位置电子密度较高;而栉江珧与文蛤(*Meretrix meretrix*)^[18]、彩虹明樱蛤(*Moerella iridescens*)^[19]、翡翠贻贝(*Perna viridis*)^[20]、合浦珠母贝(*Pinctada martensi*)^[21]等类似,靠近顶体外膜内侧的位置电子密度较高,推测腔内电子密度反映腔内顶体酶的分

布。栉江珧精子顶体结构为明显的倒“V”字形,且顶体约占整个头部的 1/3,顶体腔及亚顶体腔内含有电子密度不同的酶,这与其生存的海水环境及体外受精机制是相适应的。

贝类精子结构在不同种属间存在差异,对于贝类系统分类具有重要意义^[22]。多数双壳贝类精子的细胞核为卵圆形,如沟纹巴非蛤^[23]、墨西哥湾扇贝(*Argopecten irradians concentricus*)^[24];少数贝类精子的细胞核为圆柱形,如栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[25]、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)^[26]等;还有一些贝类精子的细胞核近圆锥形,如菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)^[27]、斧文蛤(*Meretrix lamarkii*)^[28]等;但也存在特殊形态的细胞核,如彩虹明樱蛤的细胞核为螺旋状^[19]。栉江珧精子的细胞核为近球形,生物细胞的结构形状与功能是相统一的,精子细胞核的形状在一定程度上适应其在水中的运动以及穿透卵膜的能力,从而提高受精的成功率。

核前窝是顶体丝突起的重要结构基础,而核后窝是精子尾部鞭毛形成的结构基础;核前窝的存在使得精子可以容纳更多的亚顶体腔物质,增加受精成功率^[29]。精子细胞核的核前窝的有无在科内较为接近但存在差异,如蚶科的毛蚶(*Scapharca subcrenata*)^[29]、泥蚶(*Tegillarca granosa*)^[30]及魁蚶(*Scapharca broughtonii*)^[31]的精子细胞核形状接近,均为有核后窝而无核前窝,但同科的青蚶(*Barbatia virescens*)^[23]的细胞核则具有核前窝及核后窝。核前窝、核后窝的有无并不能作为判别物种间亲缘关系的依据,仍需引入其他可度量指标^[15]。栉江珧精子具有核前窝,使得其精子具有较大的亚顶体腔,以容纳一些亚顶体腔物质,虽不具有核后窝,但具有完整的中心粒复合体,具有完整的尾部结构,有助于其在海水中游动及穿透卵膜完成受精。

线粒体切面通常呈卵圆形,是由内外两层彼此平行的单位膜套叠而形成的封闭的囊状结构,内膜向内折叠形成嵴,嵴上分布有大量的呼吸链酶系及 ATP 酶复合体,可为精子运动和入卵过程提供能量^[11]。同种双壳贝类精子线粒体数目通常一致,不同种类精子线粒体数目会有细微不同。通过比较双壳贝类精子超微结构,发现绝大多数精子线粒体数目为 4~5 个,偶见 6 个^[18];而本研究通过观察精子中段横截面,发现栉江珧具有 5 个线粒体,没有发现 4 个或者 6 个的情况,故可以推断栉江珧精子线粒体数目较为稳定。根据细胞代谢的需要,线粒体在细

胞质中可以进行运动、融合或者分裂增殖^[11]。根据精子发生过程的研究可知,线粒体的数目及位置在精细胞的早期就基本确定,但在精子发生过程中存在着小个体线粒体融合成为个体较大线粒体的现象,据此双壳贝类中成熟精子线粒体数目不一致是因为线粒体融合出现偏差。

参考文献:

- [1] 王祯瑞. 中国动物志[M]. 北京:科学出版社, 1997: 214-239.
- [2] 陈桢. 栉江珧 (*Atrina pectinata*), 魁蚶 (*Scapharca broughtonii*)不同群体的遗传多样性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- [3] 王一农, 张义君. 中国海产底栖经济贝类的苗种生产[J]. 水产学报, 1995(2): 166-171.
- [4] 于瑞海, 王昭萍, 李琪, 等. 栉江珧工厂化育苗技术[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版)2007, 37(5): 704-708.
- [5] 杨青, 李琪, 于瑞海, 等. 人工诱导栉江珧雌核发育的初步研究[J]. 中国水产科学, 2006, 13(2): 310-314.
- [6] 邱盛尧, 杨建敏, 张锡佳, 等. 栉江珧的繁殖生物学[J]. 水产学报, 2000, 24(1): 28-31.
- [7] 王梅芳, 余祥勇, 王如才. 栉江珧生殖细胞的发生[J]. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2000, 30(3): 441-446.
- [8] 余祥勇, 王梅芳. 栉江珧受精过程的细胞学研究[J]. 湛江海洋大学学报, 1998, 18(4): 12-16.
- [9] 郑娇. 栉江珧精子的超低温冷冻保存及精子质量检测方法的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012.
- [10] 郑娇, 王梅芳, 余祥勇. 贝类精子质量检测与评价方法的研究: 栉江珧精子线粒体活性的荧光检测[J]. 广东海洋大学学报, 2011, 31(6): 86-90.
- [11] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝, 等. 细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 194-195.
- [12] Howes L, Jones R. Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization[J]. Journal of Reproductive Immunology, 2002, 53(1-2): 181-192.
- [13] 邓道贵, 谈奇坤. 褶纹冠蚌精子的超微结构研究[J]. 水生生物学报, 2001, 25(5): 481-485.
- [14] 郭延平, 谈奇坤, 陈士超. 三角帆蚌精子的形态及超微结构[J]. 动物学杂志, 2002, 37(2): 10-13.
- [15] 周小龙, 董迎辉, 边平江, 等. 帘文蛤精子超微结构及与其他双壳贝类的比较[J]. 台湾海峡, 2012, 31(4): 495-500.
- [16] 饶小珍, 陈寅山, 陈文列, 等. 西施舌精子发生过程的超微结构观察[J]. 水产学报, 2002, 26(2): 97-103.
- [17] 赵志江, 李复雪. 波纹巴非蛤(*Paphia undulata*)精子发生的超微结构[J]. 台湾海峡, 1992, 11(3): 238-243.
- [18] 董迎辉, 林志华, 柴雪良, 等. 文蛤 (*Meretrix meretrix*) 精子的超微结构及精子入卵过程的电镜观察[J]. 海洋与湖沼, 2010, 5: 726-732.
- [19] 余红卫. 彩虹明樱蛤精子的超微结构[J]. 台湾海峡, 2011, 30(3): 375-378.
- [20] 柯佳颖, 饶小珍, 陈寅山. 翡翠贻贝精子的超微结构[J]. 动物学杂志, 2005, 40(2): 66-70.
- [21] 沈亦平, 张锡元. 合浦珠母贝精子发生过程的超微结构观察[J]. 武汉大学学报: 自然科学版, 1993, 6: 123-129.
- [22] Hodgson A N, Bernard R T F. Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis of three species of Mytilidae(Mollusca, Bivalvia)[J]. Gamete Research, 1986, 15(2): 123-135.
- [23] 陈寅山, 饶小珍, 柯佳颖, 等. 沟纹巴非蛤精子发生过程的超微结构观察[J]. 海洋科学, 2006, 30(8): 28-33.
- [24] 袁秀堂, 周一兵, 杨大佐. 墨西哥湾扇贝精子的超微结构[J]. 动物学杂志, 2003, 38(4): 16-19.
- [25] 任素莲, 王如才, 王德秀. 栉孔扇贝精子超微结构的研究[J]. 青岛海洋大学学报: 自然科学版, 1998, 28(3): 387-392.
- [26] 韩厚伟, 高悦勉, 刘春凤, 等. 虾夷扇贝精子的超微结构[J]. 动物学杂志, 2008, 43(1): 75-81.
- [27] 代培芳, 饶小珍, 陈寅山. 菲律宾蛤仔的精子发生和精子超微结构[J]. 动物学杂志, 2004, 39(2): 26-32.
- [28] 董迎辉, 林志华, 姚韩韩. 斧文蛤精子超微结构与受精过程的细胞学变化[J]. 水产学报, 2011, 35(3): 356-364.
- [29] 竺俊全, 杨万喜. 毛蚶与青蚶精子超微结构及其所反映的蚶科进化关系[J]. 动物学研究, 2004, 25(1): 57-62.
- [30] 孙慧玲, 方建光, 王清印, 等. 泥蚶精子的超微结构[J]. 水产学报, 2000, 24(4): 297-301.
- [31] 姚红伟, 孙金阳, 郭晋, 等. 魁蚶精子的超微结构[J]. 渔业科学进展, 2010, 31(2): 67-71.

Observation on ultrastructure of spermatozoon in *Atrina pectinata* with electron microscope

GU Xiang-fei^{1,2}, BIAN Ping-jiang³, ZHOU Xiao-long², LIN Zhi-hua², DONG Ying-hui²,
(1. College of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China; 3. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China)

Received: Jun.,5,2013

Key words: *Atrina pectinata*; spermatozoon; ultrastructure; transmission electron microscopy

Abstract: To provide the cytology basis for the mechanism of *Atrina pectinata* fertilization, the ultrastructure of spermatozoon in *A. pectinata* was observed under transmission electron microscopy (TEM). The results showed that the mature spermatozoon of *A. pectinata* was typical primitive type, composed of 3 parts including head, middle piece and tail. The head is egg-shaped, and it is composed of acrosome and nucleus. The acrosome is upside-down V-shaped. The distribution of acrosomal materials is uneven. There is an arc near the outer acrosomal membrane with much higher electron density than that of other areas. The nucleus is mainly made up of highly enriched chromatin, but lower electron density irregular structure is also found. Implantation fossa and anterior nuclear fossa can be observed. However, posterior nuclear fossa is absent. The centriolar complex which is comprised of 2 orthogonal centrioles and 5 surrounding oval mitochondria constitute the middle piece of spermatozoon. Mitochondrion, formed by 2 membranes, is almost spherical in shape. Flagellum in tail is constituted by wavy plasma membrane and axoneme. These results showed that the ultrastructure of spermatozoon in *A. pectinata* is structurally similar to the typical bivalve spermtozoon, and illustrate the fertilization mechanism of *A. pectinata* to some extent.

(本文编辑: 刘珊珊)