

我国海域耳鲍 (*Haliotis asinina*) 精子发生的超微结构研究*

黄 勃 邓中日 王小兵

(海南大学海洋学院 海口 570228)

(海南大学海洋学院 海口 570228 湖南城市学院化学与环境工程系 益阳 413000)

(海南大学实验中心 海口 570228)

提要 应用透射电子显微镜技术研究了我国海域耳鲍精子发生的全过程。结果表明,耳鲍精原细胞呈近椭圆形,染色质分布较均匀,线粒体较少;初级精母细胞较大,染色质凝聚成小块状,线粒体增多;次级精母细胞较初级精母细胞小,线粒体较多,部分线粒体发生融合,呈扁囊状。分化早期精细胞染色质凝聚成团块状,多数贴附于核膜内面,胞质中出现前顶体颗粒。分化中期精细胞染色质继续凝聚成较大的团块,线粒体在核的|端融合,形成数量少、体积大的线粒体,前顶体颗粒形成圆形外膜明显的前顶体。分化后期精核由近圆形变成长桶状,核内染色质凝聚并均质化,前顶体泡化发育成顶体,鞭毛形成,精细胞分化成精子。成熟精子为鞭毛型精子,由头部、中段和尾部(鞭毛)3部分组成。

关键词 耳鲍,精子发生,超微结构

中图分类号 Q954.43

精子发生是发育生物学研究的重要内容之一,对软体动物尤其是重要经济种类软体动物精子发生的研究,不仅可以深化对发育生物学的认识,丰富发育生物学的内容,也可为增养殖的开展提供一些理论基础,对人工繁殖具有重要指导作用。目前,国内外对腹足类软体动物精子发生的超微结构研究较多(柯才焕等,1992;郑曙明等,2000;应雪萍等,2002;严云志等,2004;Garreau de Loubresse, 1971; Buckland-Nicks *et al.*, 1976; Franzen, 1979; Ekebbangar *et al.*, 1981; Parivar, 1981),对鲍科动物精子发生的研究仅见于日本鲍(Shioya, 1984),耳鲍精子发生的研究未见报道。

耳鲍(*Haliotis asinina*)隶属于软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、前鳃亚纲(Prosobranchia)、原始腹足目(Archaeogastropoda)、鲍科(Haliotidae),是一种经济价值和营养价值高的贝类,与九孔鲍和杂色鲍相比,耳鲍具有生长速度快,死亡率低的优点,是很好的全人工繁殖

推广品种。对耳鲍精子发生的超微结构进行研究,不仅可以了解耳鲍生殖生物学的相关知识,而且对耳鲍人工繁殖具有重要的指导作用。

1 材料与方法

实验用耳鲍样采自海南岛海域,活体解剖,快速取出精巢,切成小块,用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定,梯度酒精脱水, Epon812 渗透包埋, LKB-Nova 超薄切片机切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, Joe+1010 型透射电镜下观察、拍照。

2 结果

2.1 精原细胞

精原细胞(spermatogonium)紧靠精巢生殖小管基膜,细胞呈近椭圆形,大小为 $6.0\mu\text{m} \times 3.9\mu\text{m}$,胞质中线粒体少,高尔基体不发达;细胞核较大,大小为 $4.1\mu\text{m} \times 3.4\mu\text{m}$,核质较分散,核中异染色质少且分布较均匀,核膜清晰(图 1a)。

* 国家“863”资源环境技术领域项目资助, 2004AA603130号;国家自然科学基金项目资助, 40366001号;教育部科学技术研究重点项目资助, 03146号;海南省外国专家局资助项目, 20031211号。黄 勃, 博士, 教授, E-mail huangboh@163.com

收稿日期: 2005-03-08 收修改稿日期: 2005-10-18

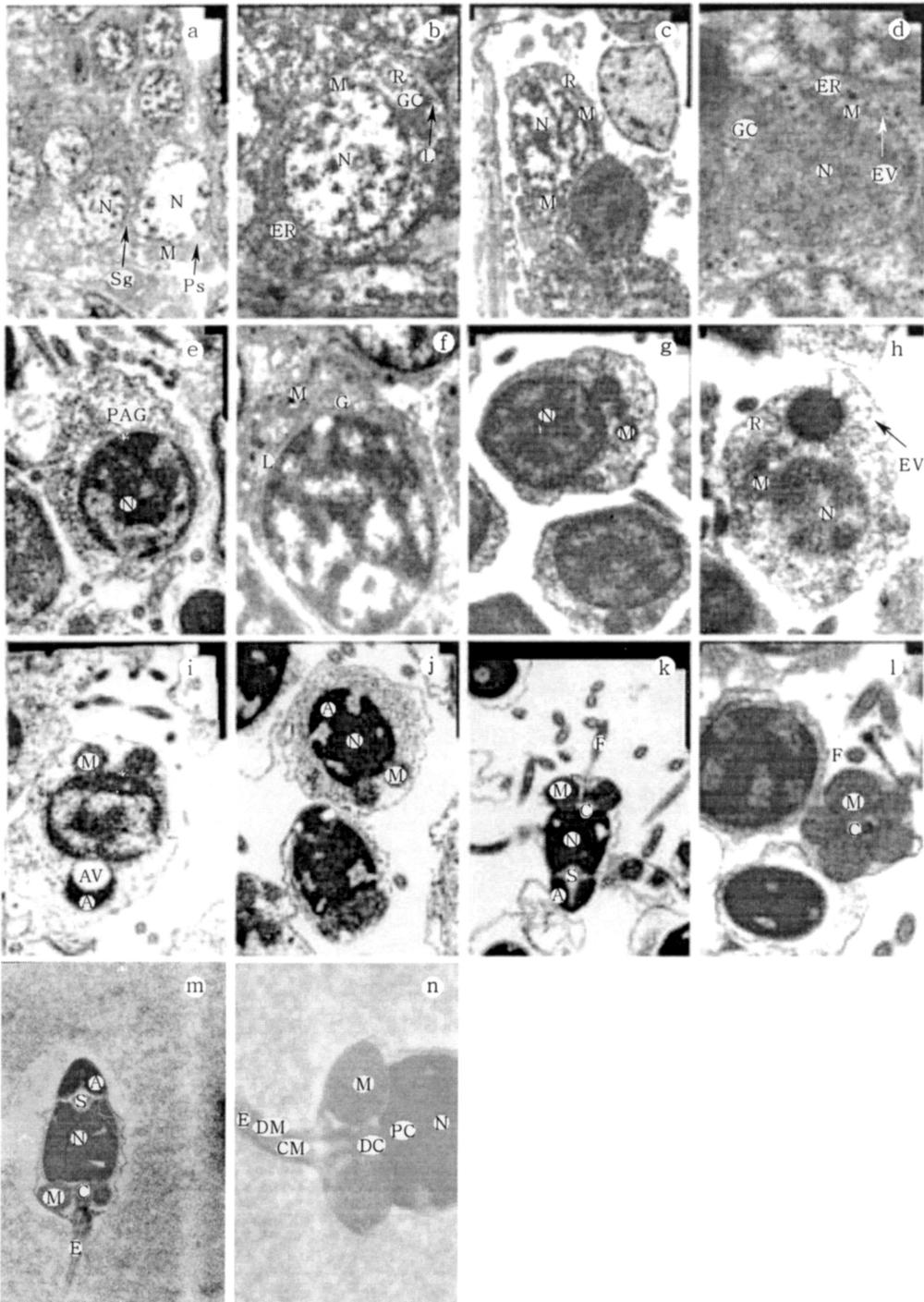


图 1 耳鲍精子发生的超微结构

Fig 1 Ultrastructural study on spermatogenesis of abalone *H. asinine*

a 精原细胞和初级精母细胞, $\times 4000$; b 初级精母细胞, $\times 8000$; c 次级精母细胞, $\times 6000$; d 精细胞, $\times 12000$; e 分化早期的精细胞 (箭头示核周腔), $\times 15000$; f 分化早期的精细胞, $\times 15000$; g 分化中期的精细胞, $\times 15000$; h 分化中期的精细胞, $\times 20000$; i 分化后期的精细胞, $\times 15000$; j 分化后期的精细胞, $\times 20000$; k 分化后期的精细胞 (箭头示染色质缺失), $\times 15000$; l 分化后期的线粒体和鞭毛, $\times 40000$; m. 成熟精子 (箭头示染色质缺失), $\times 15000$; n 成熟精子, $\times 30000$. 图中字母分别表示: 精原细胞 (Sg), 初级精母细胞 (PS), 细胞核 (N), 线粒体 (M), 高尔基复合体 (GC), 内质网 (ER), 核糖体 (R), 溶酶体 (L), 内质网小泡 (EV), 前顶体颗粒 (PAG), 中心粒 (C), 前顶体 (PA), 顶体 (A), 顶体泡 (AV), 顶体下腔 (S), 鞭毛 (F), 尾部 (E), 近端中心粒 (PC), 远端中心粒 (DC), 质膜 (PM), 双联体微管 (DM) 和中心微管 (CM)

2.2 初级精母细胞

初级精母细胞 (primary spermatocyte) 的细胞胞体稍有增大, 细胞呈近椭圆形, 大小为 $7.0\mu\text{m} \times 4.9\mu\text{m}$ 。细胞核大小约为 $5.6\mu\text{m} \times 4.0\mu\text{m}$, 偏向细胞一极, 核内染色质多数凝聚成小团块状散布于其中, 核膜清晰 (图 1b)。胞质中游离核糖体丰富; 线粒体数目增多, 分布在细胞的一侧, 并逐渐向细胞核后方聚积 (图 1a b); 胞质出现高尔基体、内质网和溶酶体, 溶酶体的直径约为 $0.35\mu\text{m}$, 内容物较均一 (图 1b)。

2.3 次级精母细胞

初级精母细胞进行第一次成熟分裂后产生染色体减半的次级精母细胞 (second spermatocyte)。次级精母细胞比初级精母细胞小, 细胞大小约为 $6.0\mu\text{m} \times 3.6\mu\text{m}$, 核大小约为 $4.3\mu\text{m} \times 3.0\mu\text{m}$ 。胞质内线粒体数量多, 部分线粒体发生融合而呈扁囊状, 部分线粒体仍呈初始的椭囊状 (图 1c)。

2.4 精细胞及其分化

精细胞 (spermatid) 是由次级精母细胞经减数分裂 II 产生的, 近圆形, 大小约为 $3.9\mu\text{m} \times 3.4\mu\text{m}$ 。核圆形或卵圆形, 相对精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞而言最小, 约为 $3.0\mu\text{m} \times 2.5\mu\text{m}$, 染色质丝状, 较均匀地弥散分布。细胞中线粒体少, 呈短棒状, 内质网小泡增多, 游离核糖体颗粒增加 (图 1d)。精细胞逐渐分化成熟形成精子, 其过程较复杂, 可划分成三个阶段。

分化早期: 精细胞形状变得不规则。细胞核为圆形, 部分核膜囊泡化, 扩张成明显的核周腔, 核内染色质由较均匀弥散状分布逐渐聚合成致密的团块状, 相互连接, 多数染色质贴附于细胞核膜内面, 其余分布于核的中央, 核内有许多空泡状的电子密度疏松的区域。内质网小泡形状变得不规则, 胞质内有内质网小泡产生的致密圆形颗粒, 即为前顶体颗粒 (图 1e)。中心粒出现, 逐渐移向核后端; 线粒体分布于细胞核一端; 溶酶体较丰富 (图 1f)。

分化中期: 细胞形状变得不规则。细胞核呈近圆形, 核周腔不明显, 核内染色质继续凝聚成较大的团块, 电子密度疏松的区域向核中央汇集, 其内出现了颗粒状、纤维状物质。线粒体移至核的一端, 开始融合, 随着精细胞的分化, 线粒体进一步融合, 形成数量少、体积大的线粒体集合体 (图 1g, h)。前顶体颗粒聚集形成形状较为

规则、圆形、外膜明显、内充满均匀的高电子密度物质前顶体。胞质中高尔基囊泡位于前顶体附近, 内质网小泡丰富 (图 1g, h)。

分化后期: 细胞形状不规则, 胞质明显减少; 细胞核仍为近圆形, 与线粒体集合体相对的一端的核向内微凹; 前顶体移至核的微凹处, 与核结合, 并逐渐空泡化, 近细胞核的一端形成空泡, 远细胞核的一端仍充满均匀的高电子密度物质 (图 1i)。随着精细胞的进一步分化, 细胞核由近圆形变成长桶状, 靠近前顶体基部的核进一步内凹陷形成核内凹陷, 中间略为突出, 后端粗大并在后缘形成核后窝。核内染色质完全凝聚, 趋向于均质化, 核内疏松区域不断减少和变小, 最后呈空泡状位于核内或核边缘, 成为染色体缺失部位 (图 1j), 核周腔消失; 前顶体进一步分化, 呈马蹄形扣在核端 (图 1j), 并向内凹陷, 逐渐形成圆锥形的顶体, 此凹陷称为顶体凹陷; 核与顶体之间的腔隙, 称为顶体下腔, 顶体内充满低电子密度物质 (图 1k); 5个线粒体包围中心粒; 鞭毛已形成, 由被原生质膜包被的轴丝微管组成, 轴丝为典型的“9+2”结构 (图 1l); 精细胞中多余的细胞质被抛弃, 此时精细胞已分化为精子 (图 1k)。

精细胞经过三个阶段的分化, 最终发育成精子, 其中顶体、顶体腔和核构成精子的头部, 线粒体和其包围的中心粒组成精子的中段, 鞭毛组成精子的尾部。精细胞分化的三个阶段是连续的过程: 分化早期, 核周腔明显, 核内染色质聚合成团块, 线粒体极化, 前顶体颗粒和中心粒出现; 分化中期, 核周腔不明显, 核内染色质进一步凝聚, 线粒体融合, 前顶体颗粒形成前顶体, 中心粒被线粒体包围, 轴丝伸展; 分化后期, 细胞核由近圆形变成长桶状, 核周腔消失, 核内染色质凝聚并均质化, 前顶体泡化并发育成顶体, 鞭毛形成, 精细胞分化成精子。

2.5 成熟精子

耳鲍精子为鞭毛型精子, 可分为头部、中段和尾部 (鞭毛) 三部分 (图 1m, n)。精子头部由顶体、顶体下腔和细胞核组成, 顶体呈圆锥形, 顶端较钝, 外包被一连续的顶体膜, 顶体的电子密度比较均匀; 顶体下腔中含有中等电子密度物质; 细胞核圆棒状, 核内电子密度比较均匀。精子中段较短, 主要由 5个线粒体包围一对中心粒构成。尾部是由一根鞭毛组成, 从前到后逐渐变细, 鞭毛是由原生质膜包被的轴丝组成, 轴丝为

典型的“9+2”微管结构(图 1n)。

3 讨论

耳鲍精子发生过程中,细胞经历了一系列的变化,主要包括顶体的形成、细胞核和线粒体的变化和鞭毛的形成。

3.1 关于精细胞分化过程的分期

关于精细胞分化过程的分期,不同学者根据所观察的结果有各自不同的分期方法,有主要根据顶体的演变特点将精细胞分化过程分为早、中、后三期(Azevedo 1981),也有根据顶体的演化、核及染色质的变化、线粒体的变化等特点综合考虑将精细胞分化过程分为5期(Jaramillo *et al.* 1986),还有在5期的基础上根据观察结果将精细胞分化过程分为6期(柯才焕等,1992;严云志等,2004)。作者主要根据精子顶体演化的特点,根据观察结果将耳鲍精细胞分化过程分为前、中、后三期,其主要依据分别是前顶体颗粒的出现(前期)、前顶体的形成(中期)、顶体的形成(后期)。

3.2 顶体的形成

大多数腹足类软体动物精子具有顶体(柯才焕等,1992;郑曙明等,2000;应雪萍等,2002;Garcereau de Loubresse 1971; Buckland-Nicks *et al.* 1976; Eckelbarger *et al.* 1981),也有些腹足类软体动物精子没有顶体的形成(严云志等,2004; Franzen 1979; Parivar 1981),耳鲍精子具有顶体。腹足类精子的顶体多来源于高尔基体,精细胞早期,由高尔基体分泌一个体积较大的前顶体囊泡和一些体积较小的泡状体共同组成顶体复合体。也有些腹足类精子的顶体不是来自于高尔基体,而形成于细胞质中的大量前顶体颗粒。在耳鲍精子发生过程各时期中,高尔基体发现较少,在精细胞期也未观察到前顶体囊泡和大量泡状体的产生,但在细胞质中观察到前顶体颗粒物质的产生,因此,作者认为耳鲍精子顶体的形成不是来自高尔基体,而可能形成于胞质中的前顶体颗粒,这与日本鲍精子顶体的形成相同(Shiroya 1984)。

耳鲍精子发生过程中,在精原细胞、初级精母细胞和次级精母中没有观察到前顶体颗粒,但在次级精母中观察到了大量的高尔基体,在精子细胞分化早期观察了前顶体颗粒,由此可以推断,耳鲍精子前顶体颗粒可能产生于次级精母和精子细胞分化早期。

3.3 核的变化

耳鲍精子发生过程中发生了染色质的浓缩和核的形态变化,两者是同时进行的。精细胞在分化过程中,核由近圆形变成与细胞长轴一致的长桶状,并出现明显的核内凹陷;染色质浓缩,细胞核成为电子密度较大的匀质物质,使核体积缩小,便于精子运动,有利于精子快速穿过卵膜,提高耳鲍的受精率。

3.4 线粒体的变化

线粒体的形态、大小、数量与分布,在不同的细胞内变动很大,同一细胞在不同生理状态下也不一样(翟中等,2000)。在耳鲍精子发生过程中,线粒体经历了由少到多,由小到大的积累过程。精原细胞线粒体数目少,分布较分散;精母细胞线粒体数量明显增多,趋向于分布在细胞一端;精细胞线粒体数目减少,相互融合,体积增大。线粒体在细胞生命活动中提供能量,精母细胞期线粒体增加,与细胞的进一步分化有关,从这一时期开始,细胞生命活动越来越旺盛,需要线粒体提供更多的能量。精细胞分化成精子、线粒体体积增大和嵴数目增多表明精子在成熟过程中逐步积累了能量,以便为受精做准备。耳鲍精细胞分化完成时,形成5个囊泡状的、体积大小不一的线粒体包绕在中心粒的周围,形成精子的中段。

参 考 文 献

- 严云志,谈奇坤,陈士超等,2004. 中国圆田螺典型精子及其发生的超微结构研究. 水生生物学报, 28(1): 45—51
- 应雪萍,姜乃澄,杨万喜,2002. 泥螺精子发生的超微结构研究. 动物学研究, 23(5): 400—404
- 郑曙明,吴青,2000. 大瓶螺精子发生的超微结构研究. 西南师范大学学报(自然科学版), 25(6): 700—703
- 柯才焕,李复雪,1992. 台湾东风螺精子发生和精子形态的超微结构研究. 动物学报, 38(3): 233—238
- 翟中和,王喜忠,丁明孝,2000. 细胞生物学. 北京: 高等教育出版社, 208
- Azevedo C, 1981. The fine structure of the spermatozoon of *Patella lusitanica* (Gastropoda Prosobranchia) with special reference to astrosome formation. J Submicrosc Cytol, 13(1): 47—56
- Buckland-Nicks J Chia F-S, 1976. Sperm atogenesis of a marine snail *Littorina sikana*. Cell Tissue Res, 170: 455—475
- Eckelbarger K J Eyster L S, 1981. An ultrastructural study of sperm atogenesis in the nudibranch mollusc *Spirilla*

- neapolitana*. JM ophol 170 283—299
- Franzen A, 1979. A fine structural study on spermatogenesis in the Entoprota. J Submicrosc Cytol 11: 73—84
- Gareau de Loubresse N, 1971. Spermatogenesis d'un gastropode prosobranch *Nerita senegalensis*: evolution du canal intronuclear. JM icrose Biol Cell 13: 57—66
- Jaramilb R, Garrido O, Jorquera B, 1986. Ultrastructural analysis of spermiogenesis and sperm morphology in *Chonus giganteus* (Lesson 1829) (Prosobranchia Muriceidae). Veliger 29(2): 217—225
- Parivar K, 1981. Spermatogenesis and sperm dimorphism in land slug *Arianta* L. Z. M ikrosk Anat Forsch Leipzig 95(1): 81—92
- Shiroya Y Ect, 1984. Ultrastructural changes of the “Truncated cone” during the acrosome reaction in Japanese abalone spermatozoa. Develop Growth and Differ 26(1): 25—32

ULTRASTRUCTURAL STUDY ON SPERMATOGENESIS OF ABALONE *HALIOTIS ASININE* LINNAEUS IN THE CHINA SEA

HUANG Bo, DENG Zhong-Ri, WANG Xiao-Bing

(Ocean College, Hainan University, Haikou, 570228)

(Ocean College, Hainan University, Haikou, 570228; Department of Chemistry and Environmental

Engineering, Hunan City University, Yiyang, 413000)

(Experimental Centre, Hainan University, Haikou, 570228)

Abstract For promoting and improving mariculture of *Haliotis asinine* Linnaeus, an economically important abalone that grows fast in high yield, spermatogenesis of the abalone collected in the South China Sea near Hainan was studied using transmission electron microscopy (TEM). The results showed that the spermatogonium was oval with few mitochondria. The chromatin was relatively dispersed. The primary spermatocyte was larger than the spermatogonium; its chromatin became denser and lied at one side of the nucleus; the number of mitochondria increased. The secondary spermatocyte was usually smaller than the primary spermatocyte; many mitochondria merged into flat capsules. The differentiation of spermatid was complicated and could be divided into 3 stages in terms of acrosome evolution. In the early stage, chromatin agglutinated into lumps and most of them were attached to the internal surface of nuclear membrane; the proacrosomic granule appeared in the cytoplasm; the centriole moved to the posterior extremity of nucleus and mitochondrion located at one side of the nucleus. In the middle stage, the chromatin continued to agglutinate into bigger lumps; the mitochondria fused at one side of nucleus and formed a few big mitochondria complexes whose pro-acrosomic granule developed into a pre-acrosome that was round and surrounded by plasmalemma in homogeneously high electron density. In the late stage, the nucleus changed in shape from round to long ellipse with condensed and homogenized chromatin; the pre-acrosome approached to the nucleus, alveolated, and developed into acrosome. 5 cystiform mitochondria surrounded the centriole; flagellum formed, and at last the spermatid altered into spermatozoon. A mature spermatozoon was typical hauch-sperm, including a head, middle sector and tail (flagellum). The axoneme of flagellum featured in 9+2 microtubular pattern.

Key words *Haliotis asinine*, Spermatogenesis, Ultrastructure