

斜带石斑鱼精子超微结构及盐度、温度、pH对精子活力及寿命的影响

赵会宏^{1,2}, 刘晓春¹, 林浩然¹, 刘付永忠^{1,3}, 王云新³

(1. 中山大学水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东广州 510275;

2. 华南农业大学动物科学学院, 水产系, 广东广州 510642;

3. 广东省大亚湾水产试验中心, 广东惠州 516081)

摘要:选取健康雄性斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)亲鱼进行人工采精,以日立H-600型透射电镜观察精子超微结构,同时设定盐度梯度、温度梯度和pH梯度,观察其对精子活力的影响。超微观察显示,精子头部呈圆形或卵圆形,核膜与质膜间的空间较大;近端中心粒的长轴与尾部约成120°的夹角;基体位于鞭毛顶端,长轴与精子头部细胞核长轴平行;袖套位于核后端,呈筒状,两侧不对称,分布着数量、大小不等的线粒体和囊泡。尾部细长,长26.0~31.5 μm,其主要结构是轴丝,轴丝为典型的“9+2”微管结构。活力实验显示,精子活力的最适盐度为27~35,盐度33时精子寿命最长,为27 min;最适pH为6.5~8.7,pH 8.4时精子运动时间最长,为20 min;最适温度为25~31℃,29℃时精子寿命最长,为37 min。

关键词:斜带石斑鱼;精子;超微结构;精子活力;盐度;温度;pH

中图分类号:Q959.483;Q248;Q256 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2003)04-0286-07

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)是热带亚热带暖水性鱼类,属鲈形目(Perciformes)、鲈亚目(Percoidei)、鲷科(Serranidae),是我国南方沿海地区,特别是广东和福建两地网箱养殖的重要经济鱼类之一。至今,其成熟精子的超微结构尚未见报道。斜带石斑鱼是雌雄同体、雌性先熟的鱼类,高龄时才转变为雄鱼,在人工繁殖过程中常常会碰到雄鱼不足的问题,因而有必要对其精子生物学进行研究。精子活力不仅是评价精液质量的重要指标,也是精液保存、人工授精等其他相关研究的基础。许多研究表明,精子活动的抑制与激活和盐度、pH、温度、

渗透压、离子、激素及季节变化等因素有关,这是鱼类精子生理特性与环境相适应的结果^[1-2]。而斜带石斑鱼尚无这方面的研究报道。本实验对其精子超微结构进行研究,并探讨盐度、温度、pH等环境因子对其精子活力的影响,旨在为其繁殖生物学及大规模人工繁殖提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 亲鱼来源

雄性斜带石斑鱼由广东省大亚湾水产试验中心提供。在繁殖季节中期,选取健康雄性亲鱼10尾(体重8.2~13.2 kg,体长64~78 cm),在5月初产卵季节开始一段时间后进行实验。

1.2 采精及精子固定方法

用干毛巾擦干鱼体生殖孔周围的水分,然后轻压腹部,挤出精液,用干净的滴管吸取精液置于冰浴的1.5 mL离心管中,立即取样进行活力观察。采精过程中要防止海水溅入精液,避免粪、尿污染。取精液加入等量2.5%的戊二醛(pH 7.4),双层纱布过

收稿日期:2002-10-06; 修订日期:2003-02-17.

基金项目:国家“八六三”资源与环境技术领域海洋生物技术主题资助项目(2001AA621010);国家自然科学基金资助项目(39970586);广东省科技重大专项及重点项目(A3050201);广东省重大科技兴海项目(A200000A02);教育部科学技术重点研究项目(02150).

作者简介:赵会宏(1975-),男,博士研究生,从事鱼类生理学与内分泌研究. E-mail:zhzsu@163.net

通讯作者:林浩然. E-mail:ls32@zsu.edu.cn

滤,制成精子悬液,3 000 r/min离心5 min,弃上清,再加适量2.5%的戊二醛于4℃固定。样品经pH 7.4的磷酸缓冲液冲洗,再用1%的饿酸后固定,各级乙醇脱水,Epon812树脂包埋,切片经醋酸铀和柠檬酸铅染色后,日立H-600型透射电镜观察。

1.3 精子活力观察

用0.1 mol/L的氢氧化钠和盐酸溶液调节过滤海水的pH,设置pH梯度为6.5、7.0、7.5、8.1、8.5、9.0、9.5。用蒸馏水和海水晶(广东徐闻盐场产品)调节过滤海水的盐度,设置盐度梯度为10、15、20、25、30、33、40,其中盐度33为天然海水。将小烧杯中的过滤海水置于不同温度的恒温箱中,设置温度梯度为19、23、27、31、34℃。观察设置的pH、盐度和温度各个梯度对斜带石斑鱼精子活力的影响。

精子活力观察方法参照文献[3]并加以改进。在1块载玻片上的3个位置滴加等量的相同处理的海水作为1个平行组,然后用干净的注射器针头蘸取等量精液与载玻片上的海水混合,同时开始计时,显微镜下观察精子运动情况。温度梯度的做法是将滴加海水和精液的载玻片放在不同温度的恒温箱中,每隔30~60 s取出置于显微镜下观察完毕后迅速放回原处。活力指标分为:①快速运动时间:精子自激活开始到约90%原处颤动前的激烈运动;②寿命:精子自激活开始到约90%停止原处颤动。每个处理重复3次,结果取平均值。

2 结果

2.1 精子的超微结构

2.1.1 精子整体外形 斜带石斑鱼的精子属鞭毛类型。精子全长28.6~33.5 μm。在光镜及电镜下均无明显的颈部结构(图版I-1、2),因此可将精子结构分为头部和尾部2部分叙述。头部在不同切面上呈圆形或卵圆形,尾部细长。

2.1.2 头部 头部在切面上呈圆形或卵圆形。(图版I-1、3、8)。长径1.6~2.7 μm。外周由质膜包围,电镜下质膜显双线形结构。头部的主要结构是细胞核,细胞质相对较少。核膜双层,核膜与质膜的表面并不平整,呈波浪状。精子质膜与核膜中间有较大空隙存在,两者之间有较多细胞质、线粒体和少量囊泡(图版I-7、9)。细胞核染色质密集,其中可见形态和位置不定的个别小间隙存在(图版I-3、8)。细胞核前端无顶体,细胞核后端有一较浅的凹痕,称为植入窝(图版I-6)。中心粒复合体

(centriolar complex)位于植入窝内。中心粒复合体包括近端中心粒和基体2部分(图版I-3、4)。并由基体与轴丝相连发出“9+2”微管结构(图版I-7),即9组外周二联微管及中央微管对。近端中心粒的长轴与尾部约成120°的夹角,排成“)”形(图版I-4)。基体位于鞭毛的顶端,其起始段的横切面亦可见清晰的“9+2”微管结构(图版I-7)。袖套位于核后端,呈筒状,围绕轴丝形成的空腔称为袖套腔;袖套两侧并不对称,分布着数量、大小不等的线粒体和囊泡(图版I-4、5、6)。线粒体排列也不对称,袖套的纵、横切面均可见到2~3个线粒体。线粒体在切面上呈圆形,外围1层外膜,内膜与外膜之间有间隙存在,由内膜形成的嵴较粗,嵴间隙较狭,基质疏松(图版I-5、7)。

2.1.3 尾部 尾部细长,26.2~31.5 μm。起始部分位于袖套腔中(图版I-4、5),大部分伸出袖套腔外。尾部的核心结构为轴丝。整个尾部的结构基本一致,无主段、末段之分。袖套腔中和基体相连的轴丝起始段可见明显的“9+2”微管结构(图版I-7)。轴丝伸出袖套腔之后,外包以双线形凹凸不平的质膜,中央为细胞质及囊泡,囊泡数量极少(图版I-10)。尾部末端除轴丝外,无其他明显的结构存在(图版I-11)。

2.2 精子活力的观察

2.2.1 盐度对精子活力的影响 由图1可见,盐度10时精子不能够激活,盐度从10升高到25时,精子活力缓慢上升,从盐度25开始精子活力迅速升高,当激活溶液的盐度为33时精子活力最强。此时精子的快速运动时间和寿命分别为20 min和27 min。盐度在25以下和40以上时精子活力明显降低。盐度10时精子不能激活,可认为是斜带石斑鱼精子激活的最低限度,精子活力的最适盐度范围为27~35。

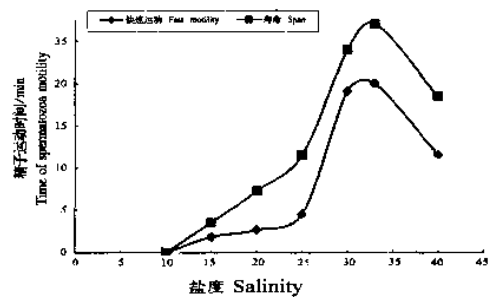


图1 盐度对斜带石斑鱼精子活力的影响

Fig. 1 Effects of salinity on sperm motility of *E. coioides*

2.2.2 pH对精子活力的影响 由图2可见,pH从6.5变化到8.7,精子的快速运动时间和寿命均较长。pH大于8.7时精子活力明显下降,由图2看出,pH 8.4时精子的快速运动时间及寿命最长,分别达到了13 min和20 min。

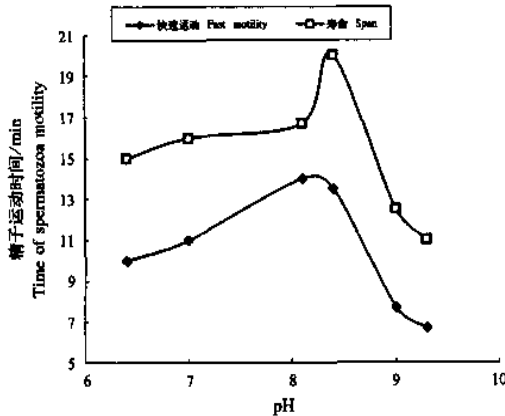


图2 pH对斜带石斑鱼精子活力的影响

Fig.2 Effects of pH on sperm motility of *E. coioides*

2.2.3 温度对精子活力的影响 由图3可见,从23℃开始,精子活力逐渐升高,到29℃时达到最高值。此时精子的快速运动时间和寿命分别为27 min和37 min。精子快速运动时间在23℃~29℃变化不大,在29℃达到最高值后下降较快。精子活力在25~31℃范围内较好。

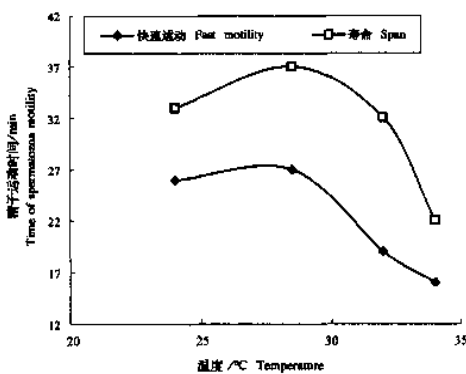


图3 温度对斜带石斑鱼精子活力的影响

Fig.3 Effects of temperature on sperm motility of *E. coioides*

3 讨论

3.1 关于细胞核的超微结构

斜带石斑鱼精子头部浓缩的细胞核中可见空隙(图版I-3,8),其他一些鱼类精子头部的细胞核中

亦有类似结构^[4-7],称为核泡(nuclear vacuole)。Poirier等^[8]认为这是由于核质部分高度凝聚的结果。尤永隆等^[6]认为这种结构并非核泡,而是浓缩的染色质中的空隙,原因是周围无膜存在。根据本实验观察,也同意这种结构是空隙的说法。另外,斜带石斑鱼精子的核膜和质膜之间有较大空间存在(图版I-1,7,9),两者之间有细胞质和少量囊泡,不象鲤^[6]、草鱼、兴国红鲤^[9]那样核膜和质膜之间紧贴,也不象金鱼精子核膜和质膜之间存在着许多液泡^[10],这和其他鱼类精子结构有明显的区别。林光华等^[9]观察革胡子鲶精子头部核后端也有较为丰富的细胞质。硬骨鱼精子头部核膜与质膜间空间的大小及细胞质的多少有何生理意义尚待研究。

3.2 关于近端中心粒

斜带石斑鱼精子的植入窝不在核正中,而是偏向一侧,中心粒复合体也偏向核的一侧,不在细胞核的主轴上,近端中心粒和基体不呈常见的“T”字形排列,而是呈“)”形排列(图版I-4)。通常硬骨鱼精子的植入窝多位于核后端,但也有位于核的一侧的^[6,8]。鲤^[6]精子的植入窝位于细胞核的一侧,与斜带石斑鱼精子类似。但它的近端中心粒和基体垂直,呈“T”字形排列。斜带石斑鱼精子的近端中心粒和基体排列形式,与鲫^[11]、红鳍东方鲀^[12]类似,而与鲈形目的大黄鱼^[5]不同,它的中心粒复合体的走向与细胞核长轴平行。

3.3 关于尾部结构

鱼类精子尾部的主要结构为轴丝,它由基体末端向袖套外延伸而成。斜带石斑鱼精子尾部轴丝的结构为典型的“9+2”结构(图版I-7,12),和草鱼、兴国红鲤、革胡子鲶^[9]、鲤^[6]、长吻鮠^[7]等大多数鱼类相同。但与大黄鱼^[5]、红鳍东方鲀^[12]不同的是,斜带石斑鱼轴丝起始段的“9+2”结构也很清晰明显(图版I-7),而上述2种鱼的轴丝起始段无中央微管对结构。此外,斜带石斑鱼精子尾部的轴丝外周囊泡数量极少,轴丝之外无其他明显结构,也不存在有些硬骨鱼如红鳍东方鲀精子尾部的侧鳍(lateral fin)、大黄鱼精子尾部的篮状结构(basket-like structure)。

3.4 关于精子活力

从鱼类精子的适盐性与环境盐度的关系来看,鱼类精子激活所需的最低盐度与其所需的最低栖息盐度相关,二者呈现相似的变化规律。而精子活动所需的最适盐度则与该种类的繁殖盐度密切相

关^[13]。斜带石斑鱼精子所需的最适盐度范围在 27 ~ 35, 这与产卵期间的海水盐度 (28 ~ 34.8) 相吻合。

研究表明,大多数鱼类精浆 pH 偏碱性,鱼类精子在中性或偏碱性的溶液中活力及受精率均较高。酸性溶液会降低或抑制精子活力和受精率^[14]。美洲大绵鲷 (*Macrozoarces americanus*) 的精子活力在 pH 6.5 ~ 9.0 时最好^[15]。虹鳟的精子活力和受精率在 pH 9 时最高^[16]。大比目鱼 (*Hippoglossus hippoglossus*) 和海鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 的精子分别在 pH 7.5 ~ 8.5^[17] 和 pH 9^[18] 时表现出最高的活力。Koya 等^[19] 报道雀杜父鱼 (*Alicichthys alcicornis*) 在 pH 7.5 时表现出较高的精子活力,而这正是它卵液的 pH。从本实验结果来看,斜带石斑鱼对 pH 的适应性较强,其精子活力在 pH 6.5 ~ 8.7 均较强,pH 8.4 时有最好的活力值,这与产卵期间水域的 pH 7.0 ~ 9.0 相吻合。

温度对精子活力的影响较为复杂。有学者认为,温度与精子快速运动时间的关系是一个开口向下的二次曲线函数关系^[3,20];而另外一些学者认为,高温可促进精子运动,低温抑制精子运动,但低温条件下精子消耗的 ATP 减少,抑制精子的代谢,减少其能量消耗,因此低温下精子的运动时间延长^[21]。本实验结果表明,斜带石斑鱼精子的活力先是逐步升高,到达其临界温度时又会下降。精子活力的最适温度是 25 ~ 31 °C,29 °C 时精子活力最强,这与产卵期的水温 (20.5 ~ 29.6 °C) 符合。温度对斜带石斑鱼精子活力的影响较大,在最适温度范围内精子活力较高,此范围之外精子活力迅速降低。

参考文献:

- [1] Morisawam, Morisawa S. Acquisition and initiation of sperm motility [A]. Control of sperm motility: Biological and clinical aspects [C]. Boca Raton: CRC Press, 1990. 137 - 151.
- [2] Billard R, J Cosson, Crim L W. Motility of fresh and aged halibut sperm [J]. Aquat Living Resour, 1993, 6:67 - 75.
- [3] 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.
- [4] 张旭晨,王所安. 细磷鱼精巢结构和精子发生 [J]. 动物学报, 1992, 38(4):355 - 358.
- [5] 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.
- [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] 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.
- [8] Poirier G R, Nicholson N. Fine structure of the testicular spermatozoa from the channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. J Ultrastruct Res, 1982, 80:104 - 110.
- [9] 林光华,林琼,胡成珏,等. 草鱼、兴国红鲤和革胡子鲶精子超微结构的比较研究 [J]. 南昌大学学报 (理科版), 1998, 22(3):284 - 287.
- [10] 管汀鹭,黄丹青,黄国屏. 金鱼精巢的细胞构造与精子的发生和形成 [J]. 水生生物学报, 1990, 14(3):233 - 237.
- [11] Ven Deurs B, Lastein U. Ultrastructure of the spermatozoa of the teleost *Pantodon buchholzi* Peters with particubr reference to the midpiece [J]. J Ultrastruct Res, 1973, 42:517 - 533.
- [12] 张筱兰,姜明,姚斐,等. 红鳍东方鲀精子形态的研究 [J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(2):255 - 259.
- [13] 江世贵,李加儿,区又君,等. 四种鲷科鱼类的精子激活条件与其生态习性的关系 [J]. 生态学报, 2000, 20(3):468 - 473.
- [14] 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 - 278.
- [15] Wang Z, Crim L W. Seasonal changes in the biochemistry of seminal plasma and sperm motility in the ocean pout, *Macrozoarces americanus* [J]. Fish Physiol Biochem, 1997, 16(1):77 - 83.
- [16] Billard R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species [J]. Reprod Nutr Develop, 1986, 26:877 - 920.
- [17] Billard R, Cosson J, Perchee. G, et al. Biology of sperm and artificial reproduction in carp [J]. Aqu, 1995, 129:95 - 112.
- [18] Stoss J. Fish Gamete preservation and spermatozoon physiology [A]. Fish Physiology [C]. Vol. IX B, New York: Academic Press, 1983. 305 - 350.
- [19] Koya Y, Munehara H, Takano K, et al. Effects of extracellular environments on the motility of spermatozoa in several marine sculpins with internal gametic association [J]. Comp Biochem Physiol, 1993, 106A:25 - 29.
- [20] 谢刚,叶星,苏植蓬,等. 鳊鲮精子的主要生物学特性 [J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(1):81 - 84.
- [21] Billard R, Cosson M P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish [J]. J Exp Biol, 1992, 261:122 - 131.

Ultrastructure of spermatozoa and effects of salinity, temperature and pH on spermatozoa motility in *Epiniphelus coioides*

ZHAO Hui-hong^{1,2}, LIU Xiao-chun¹, LIN Hao-ran¹, LIUFU Yong-zhong^{1,3}, Wang Yun-xin³

(1. Institute of Aquatic Economic Animals and Key Laboratory of Guangdong Province for Aquatic Economic Animals, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China; 2. Department of Fisheries, School of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3. Guangdong Daya Bay Fishery Development Center, Huizhou 516081, China)

Abstract: The healthy male *Epiniphelus coioides* were employed (body weight 8.2–13.2 kg, body length 64–78 cm), and the spermatozoa were collected from the fish body by artificial conduction. Under the transmission electron microscope, the observation shows that the spermatozoon consists of two parts: the head and the tail. A large nucleus shaped round or ellipse with condensed chromatin is located in the head. The space between the membrane of the nucleus and cytoplasm is relatively large. The proximal centriole has a 120 degree angle with the major axis of the spermatozoon, whereas the basal body is parallel to the major axis of the nucleus. The two wings of the column-like sleeve is asymmetry. The central structure of the tail is axoneme with a typical structure of the 9+2 model. When the salinity of sea water at 27–35, the spermatozoa have the best motility and the spermatozoa have the longest life span at salinity 33, which is 27 min. When pH at 6.5–8.7, the spermatozoa have the best motility, and at pH 8.4, the spermatozoa have the longest life span, which is 20 min. The effects of water temperature on spermatozoa motility showed that the optimum sea water temperature is 29 °C when the spermatozoa have the longest life of span (20 min), and the optimum range of water temperature is 25–31 °C.

Key words: *Epiniphelus coioides*; spermatozoa; ultrastructure; spermatozoa motility; temperature; salinity; pH
Corresponding author: LIN Hao-ran. E-mail: ls32@zsu.edu.cn

欢迎订阅 2004 年《水产学报》

《水产学报》是中国水产学会主办的水产科学技术的学术性刊物,创刊于1964年。主要刊载渔业资源、水产养殖和增殖、水产捕捞、水产品保鲜与综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器以及水产基础研究的论文、简报和综述,并酌登学术动态和重要书刊的评介等。

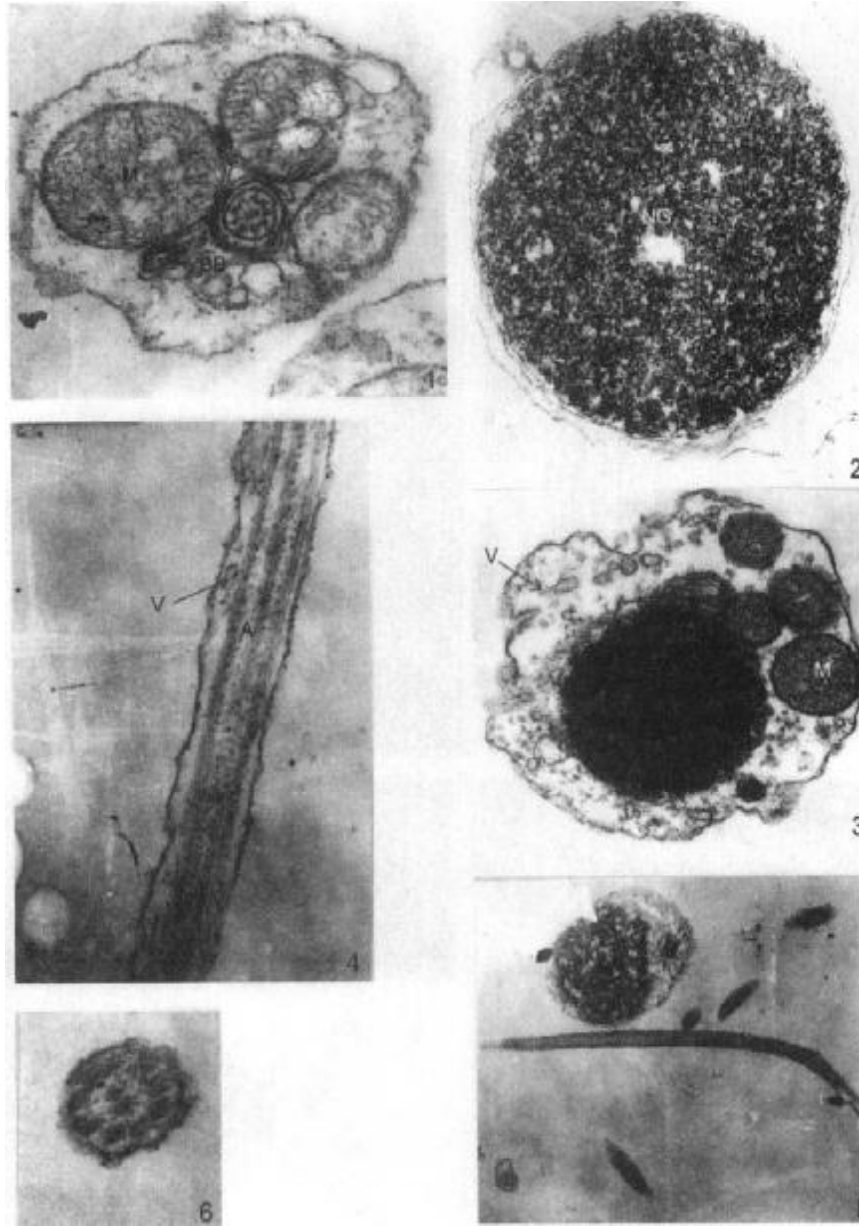
本刊为双月刊,大16开。国内外公开发行。每期单价15元,全年订价90元(含邮费)。国内统一刊号:CN31-1283/S;国际标准刊号:ISSN 1000-0615。国外发行代号:Q-387,国内邮发代号:4-297。读者可在当邮局订阅,也可直接汇款至编辑部订阅。编辑部还有《水产学报》(1964-2001年)全文检索光盘,定价200元(含邮费)。欢迎订阅。

编辑部地址:上海市军工路334号,上海水产大学48信箱,邮政编码:200090。

联系电话:021-65710232,传真:021-65680965。

E-mail: jfc@shfu.edu.cn 或 scxuebao@online.sh.cn。

赵会宏等：斜带石斑鱼精子超微结构及盐度、温度、pH 对精子活力及寿命的影响
 ZHAO Hui-hong et al: Ultrastructure of spermatozoa and effects of salinity, temperature and pH on spermatozoa motility
 in *Epiniphelus coioides*

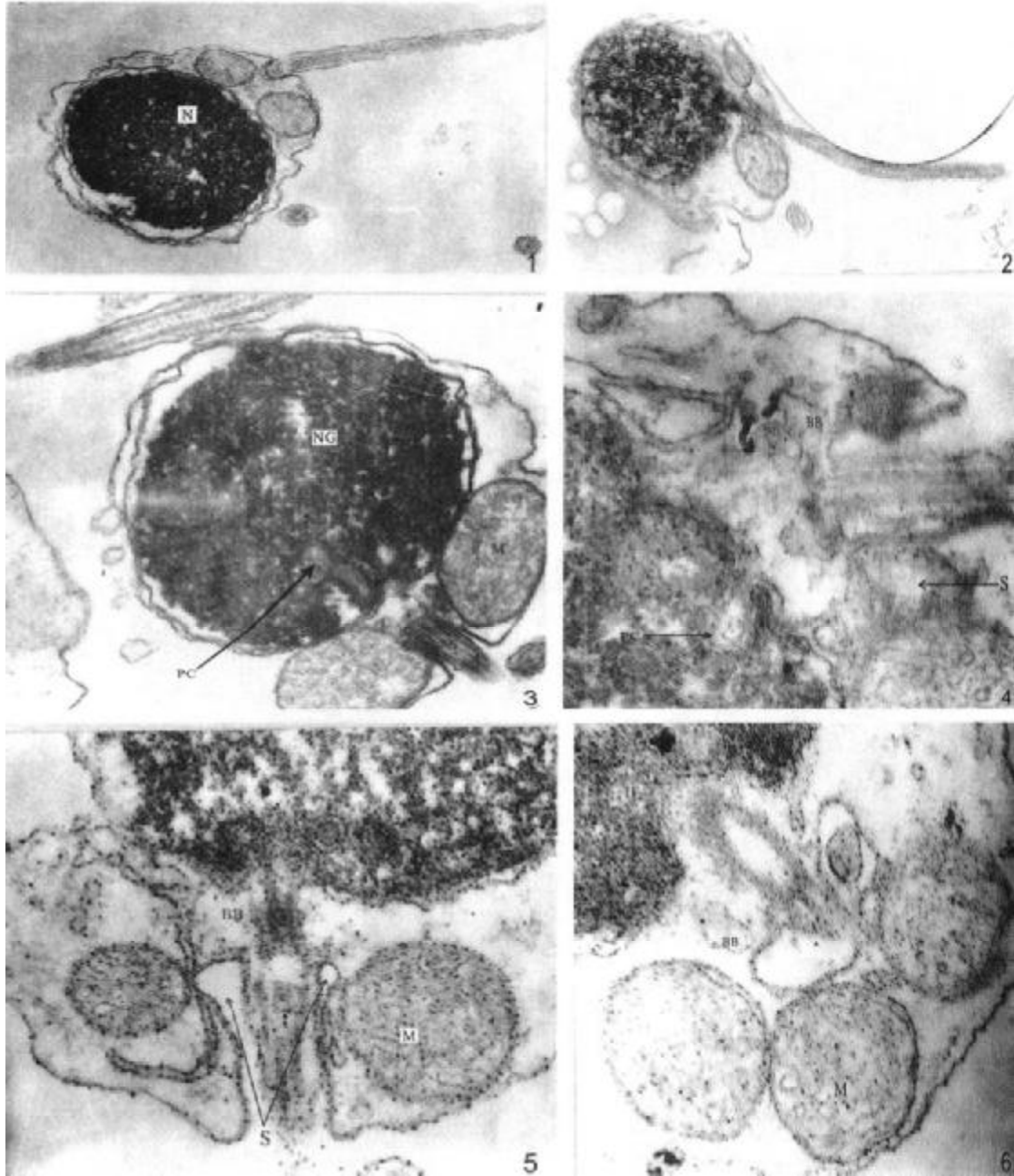


图版 I

Plate I

1. 斜带石斑鱼精子纵切, $\times 9\ 000$ 。2. 斜带石斑鱼精子纵切, $\times 9\ 000$ 。3. 精子头部纵切, 示近端中心粒等 (PC), $\times 15\ 000$ 。
 4. 精子头部纵切, 示近端中心粒及基体的位置, $\times 37\ 500$ 。5. 精子头部纵切, 示袖套结构, $\times 26\ 250$ 。6. 精子头部纵切,
 示基体的位置, $\times 30\ 000$ 。
 A-轴丝; BB-基体; IF-植入窝; M-线粒体; N-细胞核; NG-细胞核中的空隙; PC-近端中心粒; S-袖套腔; V-囊泡
 1. Longitudinal section of the sperm, $\times 9\ 000$.
 2. Longitudinal section of the sperm, $\times 9\ 000$.
 3. Longitudinal section of the head of the sperm, showing the proximal centriole (PC, longitudinal section) $\times 15\ 000$.
 4. Longitudinal section of the head of the sperm, showing the location of the proximal centriole and basal body, $\times 37\ 500$.
 5. Longitudinal section of the head of the sperm, showing the structure of the sleeve, $\times 26\ 250$.
 6. Longitudinal section of the head of the sperm, showing the location of the basal body, $\times 30\ 000$.
 A-Axoneme; BB-Basal body; IF-Implantation fossa; M-Mitochondrion; N-Nucleus;
 NG-Gap within the nucleus; PC-Proximal centriole; S-Central space of the sleeve; V-Vesicle

赵会宏等：斜带石斑鱼精子超微结构及盐度、温度、pH 对精子活力及寿命的影响
 ZHAO Hui-hong et al: Ultrastructure of spermatozoa and effects of salinity, temperature and pH on spermatozoa motility
 in *Epiniphelus coioides*



图版 II

Plate II

1. 精子头部横切, 示基体部分的“9+2”微管结构, × 18 750。
 2. 精子头部横切, 示精子头部的空隙, × 15 000。
 3. 精子头部纵切, 示核周围的细胞质、囊泡、线粒体等结构, × 12 750。
 4. 精子尾部纵切, × 30 000。
 5. 精子尾部纵切, × 7 500。
 6. 精子尾部横切, 示“9+2”微管结构, × 45 000。
- A-轴丝; BB-基体; IF-植入窝; M-线粒体; N-细胞核; NG-细胞核中的空隙; PC-近端中心粒; S-袖套腔; V-囊泡
 1, Cross section of the head of the sperm, × 18 750.
 2, The nucleus of the sperm, showing the gap (NG) within the nucleus, × 15 000.
 3, Longitudinal section of the head of the sperm, showing cytoplasm, vesicles and mitochondrion, × 12 750.
 4, Longitudinal section of the tail, × 30 000.
 5, Longitudinal section of the tail, × 7 500.
 6, Cross section of the tail, × 45 000.
 A-Axoneme; BB-Basal body; IF-Implantation fossa; M-Mitochondrion; N-Nucleus;
 NG-Gap within the nucleus; PC-Proximal centriole; S-Central space of the sleeve; V-Vesicle