

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19267

## 四指马鲅精巢发育及精子发生的组织学和超微结构

蓝军南<sup>1, 2, 3, 4</sup>, 区又君<sup>1</sup>, 温久福<sup>1</sup>, 李俊伟<sup>1</sup>, 牛莹月<sup>1, 2, 3, 4</sup>, 周慧<sup>1</sup>, 李加儿<sup>1</sup>

1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;

2. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 中国科学技术部海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306;

4. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306

**摘要:** 为了解四指马鲅(*Eleutheronema tetradactylum*)精巢的组织结构和精巢发育及精子发生的组织学和超微结构变化, 运用组织切片 HE 染色和透射电镜技术对养殖四指马鲅的精巢发育过程进行观察。结果显示, 四指马鲅精巢位于腹腔背侧, 紧贴中肾和鳔的腹面, 为一对延长的扁平带状器官, 呈灰白色, 两条精巢于后端融合, 呈“Y”字形, 组织学上属典型小叶型精巢; 根据精巢发育及精子发生的组织学特点可将其分为 6 个时期: 3 月龄精巢发育至第 I 期(精原细胞增殖期), 4 月龄发育至第 II 期(精母细胞增长期), 5~7 月龄发育至第 III 期(精母细胞成熟期), 7~9 月龄发育至第 IV 期(精子开始出现期), 最早在 10 月龄发育至第 V 期(精子完全成熟期)达到初次性成熟; 参与生殖排精后的精巢为第 VI 期(精子退化吸收期); 精子发生过程经历初级精原细胞、次级精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精细胞和精子 6 个时相, 其细胞及细胞核直径逐级减小, 核质比发生规律性变化; 电镜下显示精子发生过程中, 细胞核内染色体逐渐浓缩, 电子密度增加, 线粒体数量减少, 体积增大, 内嵴结构逐渐丰富; 精子由头部、中部和尾部组成, 鞭毛轴丝为典型“9+2”结构。本研究阐述了四指马鲅雄鱼精巢的组织结构及初次性成熟精巢发育及精子发生过程的组织学和超微结构变化, 丰富了四指马鲅的繁殖生物学内容, 为掌握四指马鲅的繁殖规律和提高人工繁育技术提供理论参考。

**关键词:** 四指马鲅; 精巢发育; 精子发生; 组织学; 超微结构

中图分类号: S917; Q95

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)06-0637-12

四指马鲅(*Eleutheronema tetradactylum*)隶属于鲻形目(Mugiliformes), 马鲅亚目(Polynemoidae), 马鲅科(Polynemidae), 四指马鲅属, 俗称马友、午筍、鲤后等<sup>[1]</sup>, 是一种广盐性溯河洄游鱼类, 幼鱼常栖息在河口, 成鱼则多生活在沿海水域的浅泥底<sup>[2]</sup>。四指马鲅通常广泛分布于热带和温带海区, 在澳大利亚、印度、东南亚以及中国沿海等均有分布<sup>[3-5]</sup>。四指马鲅生长迅速、肉质鲜美、营养价值高, 在渔业和水产养殖中具有十分重要的商业价值<sup>[6]</sup>。2012—2015 年区又君等<sup>[7]</sup>对四指

马鲅进行规模化全人工繁育取得成功, 并在多个沿海地区推广养殖, 现已成为中国海水鱼类养殖种类之一。目前对四指马鲅的遗传多样性<sup>[8]</sup>、种群结构<sup>[4]</sup>、个体发育<sup>[9-11]</sup>及环境胁迫<sup>[12]</sup>等方面已有较多的研究报道。

繁殖是鱼类生活史中极为重要的环节, 而性腺的完全发育是进行有效繁殖的关键, 因此鱼类的性腺发育一直以来都是学者们感兴趣的研究课题。组织学和电镜观察是研究鱼类性腺发育的最为经典的技术手段之一, 通过观察各类生殖细胞

收稿日期: 2019-10-12; 修订日期: 2019-11-20.

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2018YFD0900200); 广东省“扬帆计划”引进创新创业团队项目(2016YT03H038); 广东省省级科技计划项目(2017B020204002); 广东省现代农业产业技术体系(海水鱼产业)创新项目(2019KJ143).

作者简介: 蓝军南(1994-), 男, 硕士研究生, 从事海水鱼类繁殖发育和基础生物学研究. E-mail: ljn009@126.com

通信作者: 区又君, 研究员, 从事鱼类生物学、发育生物学与水产养殖技术研究. E-mail: ouyoujun@126.com

的形态结构及其分布特点将性腺划分为不同的发育时期<sup>[13-15]</sup>。此外,应用分子生物学技术探讨鱼类性腺发育机制也越来越受到关注,特别是在性别分化和性腺发育的分子调控机制<sup>[16-18]</sup>、性别决定基因的发掘<sup>[19-20]</sup>以及性腺的转录组学分析<sup>[21-22]</sup>等方面取得较大进展。关于四指马鲅繁殖生物学,近年来国外已有一些关于野生种群的繁殖习性以及性腺发育的基础研究<sup>[5, 23]</sup>。但四指马鲅精巢的组织结构、首次性成熟的发育过程和精子发生的组织学和超微结构的相关研究在国内外却鲜见报道。本研究以养殖四指马鲅的精巢为研究对象,运用石蜡组织切片和 HE (haematoxylin-eosin)染色及透射电镜技术对其精巢组织结构、精巢发育及精子发生过程进行观察,拟了解四指马鲅精巢组织结构特点以及首次性成熟精巢发育与精子发生的组织学和超微结构变化,以期丰富四指马鲅的繁殖生物学内容,为加快掌握四指马鲅繁殖规律、提高人工繁育技术提供理论基础,这对于加强四指马鲅种质资源保护和开发利用都具有十分重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验材料为于 2018 年 5 月至 2019 年 7 月采集自广东省珠海市南海水产研究所珠海试验基地人工养殖四指马鲅,养殖盐度 5.0~9.0,温度 24~30 ℃。共采集到雄鱼 175 尾,体重 1.62~384.54 g,体长 4.69~25.58 cm。

### 1.2 实验方法

将采集到的四指马鲅活体进行形态性状及体重测量后立即解剖,观察精巢的解剖结构,记录精巢发育过程中的形态特征及色泽变化。

组织切片标本:将精巢取出,整体或分别剪取前、中、后各一小段将其置于 4% 多聚甲醛通用型组织固定液(BL539A)中固定 24 h 后,转至 70% 酒精中保存。将固定的样品进行 50%~100% 梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,以 3~5 μm 的厚度分别做横切和纵切,苏木精-伊红(HE)染色,中性树脂封片,在 ZEISS 光学显微镜下观察并采集图像分析。

透射电镜标本:活体取各阶段的性腺,将其切成约 3 mm 大小的组织块,迅速投入电镜固定液(Servicebio-G1102)并于 4 ℃ 固定 2 h 后,用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗 3 次,每次 15 min;再用 1% 铁酸·0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)室温(20℃)固定 2 h,0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗 3 次,每次 15 min。组织依次经 50%~100% 梯度酒精和 100% 丙酮脱水、渗透并包埋后,用 Leica-UC7 型超薄切片机作 60~80 nm 超薄切片,经铀铅双染色,在 HT7700 型透射电子显微镜下观察并采集图像分析。

各类型细胞直径大小采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件随机选取各时期的 3 张切片(每张切片随机选取 10 个视野)进行测量,用 Excel 2010 软件统计分析,所有统计值采用平均值±标准差( $\bar{x} \pm SD$ )表示。参考已有的精巢分期方法<sup>[14, 24-25]</sup>,并结合四指马鲅精巢的形态特征及组织学特点对其发育和精子发生进行研究。

## 2 结果与分析

### 2.1 精巢的组织结构特征

四指马鲅精巢位于腹腔背面,紧贴中肾和鳔腹面,为一对延长的扁平带状器官,灰白色(图 1a),两条精巢于后端汇合后由一条输精管通向生殖孔,呈“Y”字形。

精巢横切面呈中间宽两头窄的梭形结构(图 1b);根据结构特点判断其为典型的小叶型精巢。精小叶呈叶片状,由腹侧向背侧辐射,分布极为规则,是小叶型精巢中的辐射型结构(图 1c),纵切面显示精小叶呈卵圆形或不规则形(图 1d)。精巢外膜有两层,外层为腹膜,主要由嗜碱性间皮细胞组成;内层为白膜,主要为结缔组织,呈粉红色,结缔组织向实质部延伸形成小叶间质,把实质分成各个精小叶(图 1e)。

小叶间质主要由间质细胞、成纤维细胞和微血管组成,间质细胞呈椭圆形或梭形,嗜碱性较强,长径( $6.20 \pm 0.58$ ) μm,短径( $2.22 \pm 0.47$ ) μm,成纤维细胞呈纺锤形,嗜碱性较弱,长径( $8.47 \pm 0.99$ ) μm,短径( $3.29 \pm 1.17$ ) μm(图 1f)。电镜下显示,间质细胞的细胞核为卵圆形,细胞质中有大

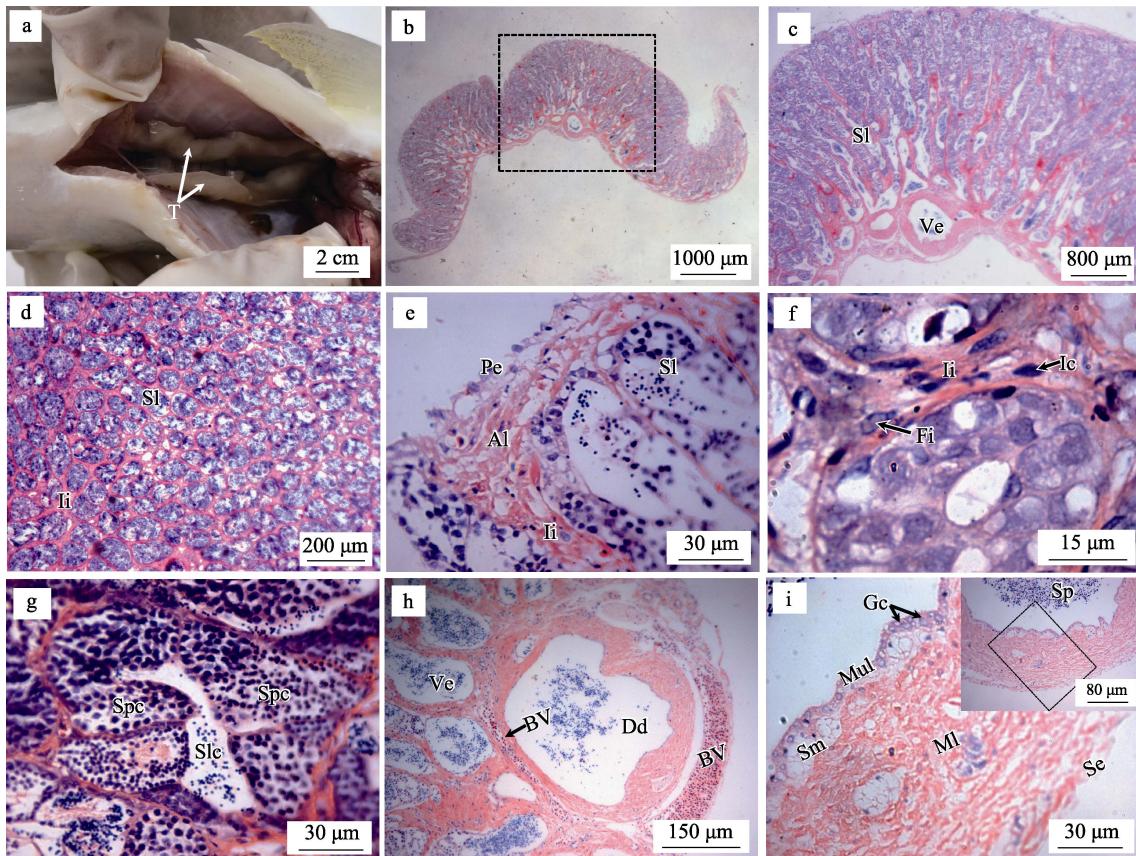


图1 四指马鲅精巢组织结构

a. 示精巢解剖形态; b. 示精巢横切面; c. b图的放大; d. 示精巢纵切面; e. 示精巢外膜和小叶间质, 横切(下同); f. 示小叶间质、成纤维细胞和间质细胞; g. 示精小叶、精小囊和精小叶腔; h. 示输出管和输精管; i. 示输精管。Al: 白膜; BV: 血管; Dd: 输精管; Fi: 成纤维细胞; Gc: 杯状细胞; Ic: 间质细胞; Ii: 小叶间质; Ml: 肌肉层; Mul: 黏膜层; Pe: 腹膜; SL: 精小叶; Slc: 精小叶腔; Spc: 精小囊; Sm: 黏膜下层; Se: 浆膜; T: 精巢; Ve: 输出管。

Fig. 1 The organizational structure of the testis in *Eleutheronema tetradactylum*

a. The anatomical morphology of testis; b.: The transverse section of testis; c. A larger version of b; d. Longitudinal section of testis; e. Spermatic outer membrane and intralobular interstitium; f. Intralobular interstitium, fibroblast and interstitial cell; g. Seminiferous lobules, spermatogenic cysts and seminiferous lobules cavity; h. Vasa efferentia and ductus deferens; i. Ductus deferens. Al: albuginea; Bv: blood vessel; Dd: ductus deferens; Fi: fibroblast; Gc: goblet cell; Ic: interstitial cell; Ii: Intralobular interstitium; Ml: muscle layer; Mul: mucosal layer; Pe: peritoneum; SL: seminiferous lobules; Slc: seminiferous lobules cavity; Spc: spermatogenic cysts; Sm: submucosa; Se: serosa; T: testis; Ve: vasa efferentia.

量小囊泡状的线粒体聚集; 微血管较小, 仅能通过1~2个血细胞; 成纤维细胞的核较大, 卵圆形, 细胞质边缘分布少量较小的线粒体(图3b)。

精小叶由多个精小囊构成, 分布规律, 每一精小囊的生精细胞发育是同步的, 由于各时期生精细胞的染色质浓缩程度不同, 在电镜下观察电子密度差别明显(图3a); 随着细胞的发育成熟, 精小囊向精小叶腔延伸, 精子成熟时精小囊破裂, 将精子释放到小叶腔(图1g), 从小叶腔进入输出管, 输出管为精子输出到输精管前的汇集通道, 常伴随有微血管分布(图1h)。精巢成熟时输精管

充满精子, 由黏膜层、黏膜下层、肌肉层和浆膜层组成, 黏膜上皮有大量的杯状细胞, 呈灰白色(图1i)。

## 2.2 精巢发育及精子发生的组织学和超微结构

根据四指马鲅精巢发育的组织学和细胞学特征, 可将其首次性成熟精巢的发育过程分为6个时期(表1), 即第I期(精原细胞增殖期)、第II期(精母细胞增长期)、第III期(精母细胞成熟期)、第IV期(精子开始出现期)、第V期(精子完全成熟期)、第VI期(精子退化吸收期)。四指马鲅在精子发生过程中, 生殖细胞经历了初级精原细胞、次级精

表 1 四指马鲅精巢发育分期的形态学和组织学特征

Tab. 1 Macroscopic and histological characteristics of testis development in *Eleutheronema tetradactylum*

分期 stage	月龄 age of months	形态特征 macroscopic characteristic	组织学特征 histological characteristic
I	3	细线状, 白色, 紧贴腹腔背侧, 肉眼无法区分雌性	切面可见结缔组织和微血管以及分散的精原细胞(图 2a)
II	4	细带状, 浅灰白色	精小叶无腔隙, 小叶间为结缔组织, 精母细胞形成并增多, 排列规则(图 3b)
III	5~7	扁带状, 灰白色略带浅黄色, 血管发达, 长度约占腹腔的一半	精小叶腔出现, 精母细胞沿小叶边缘多层排列, 有少量精子细胞形成(图 3c)
IV	7~9	厚带状, 乳白色, 表面血管网发达, 长度超过腹腔的一半	精小叶内同时存在不同发育时期的精小囊, 小叶腔出现少量成熟精子(图 3d)
V	10~11	体积最大, 按压时有精液流出	精小叶腔内布满成熟精子且连成片状(图 3e)
VI	-	萎缩松弛呈带状, 表面血管丰富	精小叶腔精子排空, 仅有少量精子残留、退化, 主要以结缔组织为主(图 3f)

原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精细胞和精子 6 个发育阶段, 且细胞及细胞核的直径逐渐减小, 核质比也相应发生明显的规律性变化(图 2)。

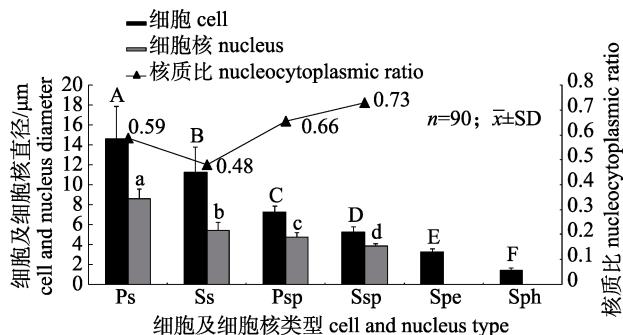


图 2 四指马鲅精子发生过程中生精细胞和细胞核的直径及核质比变化

不同大写字母和小写字母分别表示各细胞和细胞核的直径大小存在显著性差异( $P<0.05$ )。Ps: 初级精原细胞; Ss: 次级精原细胞; Psp: 初级精母细胞; Ssp: 次级精母细胞; Spe: 精子细胞; Sph: 精子头部。

Fig. 2 The diameters of spermatogenic cells and nucleus and the nucleocytoplasmic ratio changes during the process of spermatogenesis in *Eleutheronema tetradactylum*. Different capital letters and lowercase letters indicated that the diameters of cells and nucleus were significantly different ( $P<0.05$ ), respectively. Ps: primary spermatogonia; Ss: secondary spermatogonia; Psp: primary spermatocytes; Ssp: secondary spermatocytes; Spe: spermatids; Sph: sperms head.

**2.2.1 第 I 期(精原细胞增殖期)** 在约 3 月龄的幼鱼中可观察到第 I 期精巢, 该时期精巢细线状, 呈白色, 紧贴于腹腔背侧, 肉眼无法分辨雌雄。组织学观察显示, 内部为多个分散的精原细胞被结缔组织包裹, 形状不规则(图 3a)。此时可观察到两种精原细胞, 周围伴随有数个支持细胞, 支持

细胞形状不规则, 嗜碱性较弱; 电镜下可见支持细胞有较大的细胞核, 中位, 核膜较厚, 两层核膜的间隙较大, 细胞质中有较多椭圆形的囊泡状线粒体分布(图 4c)。

初级精原细胞也叫 A 型精原细胞, 沿生殖上皮分布, 椭圆形或圆形, 个体较大, 胞径( $14.57\pm3.27$ )  $\mu\text{m}$ , 细胞核较大, 核径( $8.56\pm2.06$ )  $\mu\text{m}$ , 核质比约为 0.59, 嗜碱性较强, 可见大核仁, 中位或偏位, 细胞质嗜碱性较弱, 几乎不着色(图 3g)。电镜下显示, 初级精原细胞的细胞核较大, 多为中位, 核内有一电子密度较高的大核仁, 而细胞核与细胞质的电子密度无较大差别; 核膜为两层结构, 其间隙明显, 呈波浪状; 靠近核膜处的细胞质中有若干由颗粒状物质组成的拟染色质小体以及发达的内质网分布, 拟染色质小体电子密度与核仁中的致密体相近, 其周围有较多小型的线粒体富集(图 4d)。

次级精原细胞也叫 B 型精原细胞, 由初级精原细胞分裂而来, 多为圆形, 较初级精原细胞小, 胞径为( $11.28\pm2.47$ )  $\mu\text{m}$ , 细胞核较大, 中位, 核仁不明显, 核径为( $5.41\pm1.00$ )  $\mu\text{m}$ , 核质比约为 0.48, 细胞质嗜碱性较弱, 着色较浅(图 3h)。随着性腺发育, 次级精原细胞增殖, 数量明显增加。电镜下显示, 次级精原细胞的细胞核电子密度与初级精原细胞类似, 核膜附近同样有拟染色质小体分布。细胞质中线粒体增大, 切面呈圆形或椭圆形囊泡状, 内质网较发达(图 3-e)。正处于分裂期间的次级精原细胞其电子密度增大, 细胞核内染色

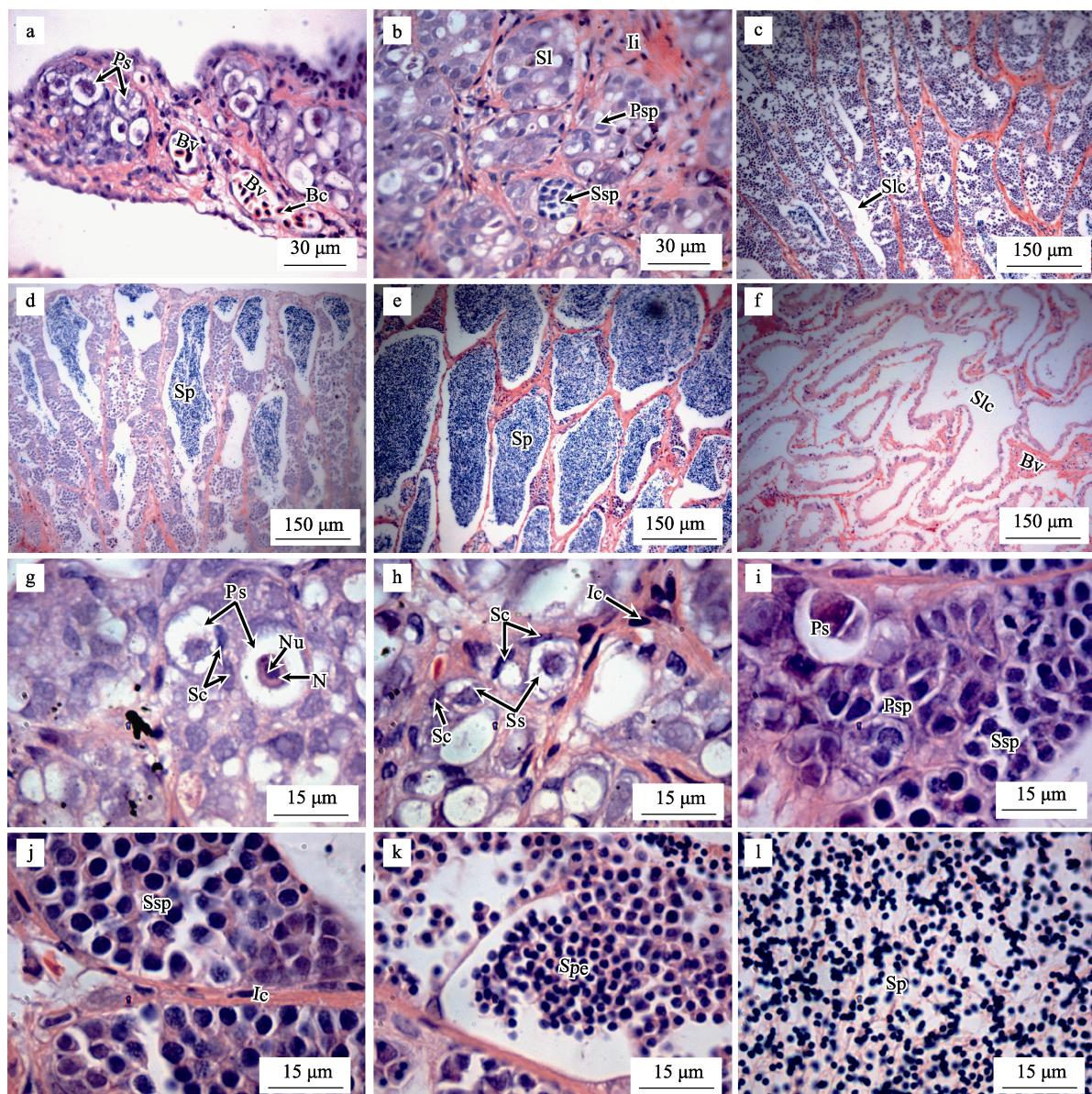


图3 四指马鲅精巢发育和精子发生的组织学变化

a. I期精巢, 纵切; b. II期精巢, 横切; c. III期精巢; d. IV期精巢; e. V期精巢; f. VI期精巢; g. 示初级精原细胞、支持细胞和间质细胞; h. 示次级精原细胞和支持细胞; i. 示初级精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞; j. 示次级精母细胞和支持细胞; k. 示精细胞; l. 示精子。Bc: 血细胞; Bv: 血管; Ic: 间质细胞; li: 小叶间质; N: 细胞核; Nu: 核仁; Ps: 初级精原细胞; Psp: 初级精母细胞; Sc: 支持细胞; Sl: 精小叶; Slc: 精小叶腔; Sp: 精子; Spe: 精细胞; Ss: 次级精原细胞; Ssp: 次级精母细胞。

Fig. 3 The histologic changes of testis development and spermatogenesis in *Eleutheronema tetradactylum*

a. Stage I, longissection; b. Stage II, transection; c. Stage III; d. Stage IV; e. Stage V; f. Stage VI; g. Primary spermatogonia, sertoli cells and interstitial cells; h. Secondary spermatogonia and sertoli cells; i. Primary spermatogonia, primary spermatocytes and secondary spermatocytes; j. Secondary spermatocytes and interstitial cells; k. Spermatids; l. Sperms. Bc: blood cells; Bv: blood vessel; Ic: interstitial cell; li: intralobular interstitium; N: nucleus; Nu: nucleolus; Ps: primary spermatogonia; Psp: primary spermatocytes; Sc: sertoli cell; Sl: seminiferous lobules; Slc: seminiferous lobules cavity; Sp: sperms; Spe: spermatids; Ss: secondary spermatogonia; Ssp: secondary spermatocytes.

质高度浓缩, 细胞质内的线粒体大量增加并在核周围聚集(图4f, 图4g)。

## 2.2.2 第II期(精母细胞增长期)

在4月龄幼鱼

中可观察到精巢发育至第II期, 该时期精巢长度和宽度略有增大, 呈细带状, 浅灰白色。横切面可见结缔组织向内部延伸, 精小叶形成, 呈卵圆形,

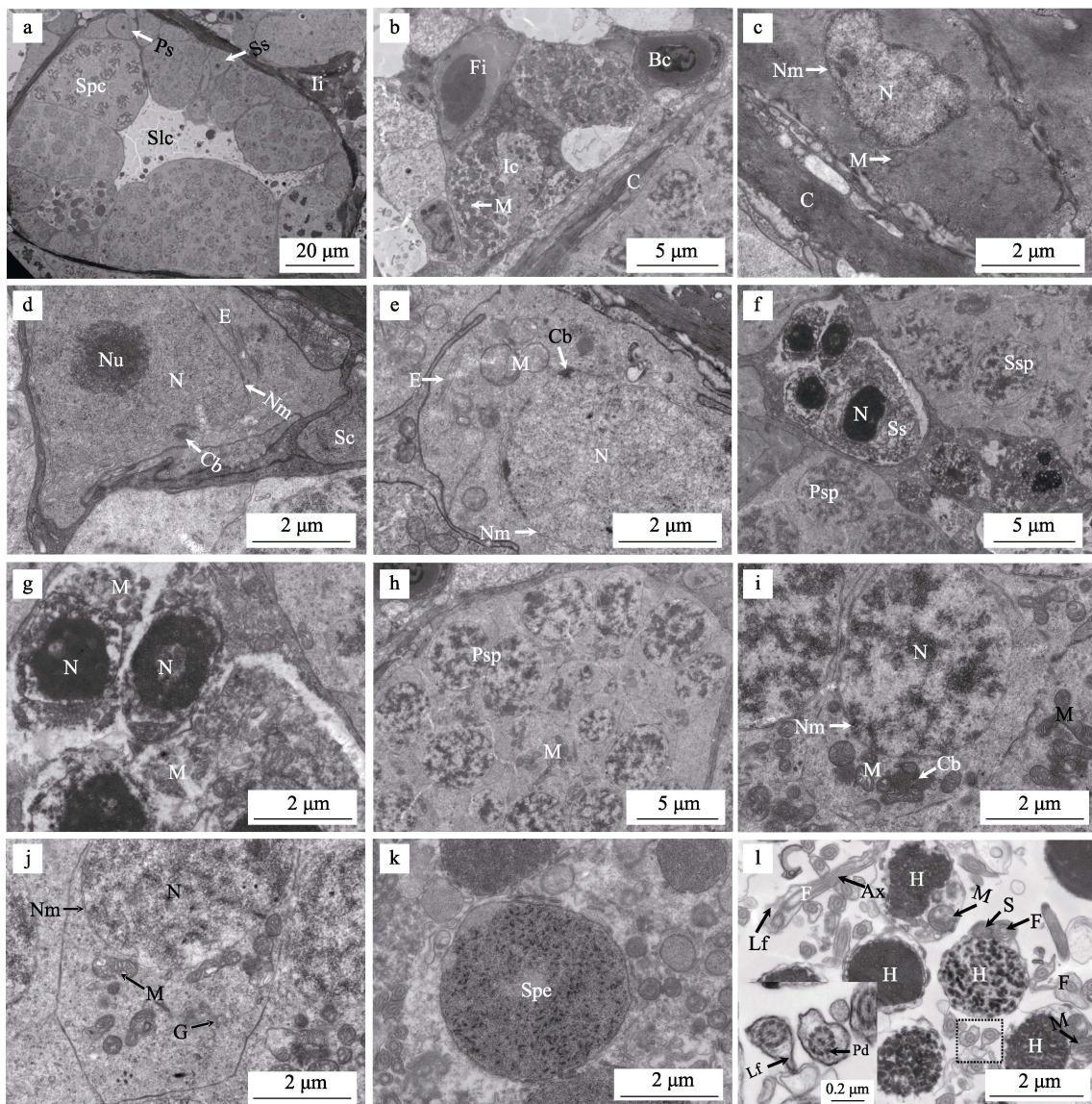


图 4 四指马鲅精子发生的超微结构

a. 精小叶, 示精小囊、初级精原细胞和次级精原细胞; b. 小叶间质, 示间质细胞、成纤维细胞和血细胞; c. 支持细胞, 示细胞核和线粒体; d. 初级精原细胞, 示细胞核、核仁和内质网; e. 次级精原细胞, 示细胞核、线粒体和内质网; f. 示次级精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞; g. f 的放大, 示正在分裂的次级精原细胞, 细胞核染色质浓缩和线粒体增加; h. 精小囊, 示初级精母细胞和线粒体; i. 初级精母细胞, 示细胞核和线粒体; j. 次级精母细胞, 示细胞核和线粒体; k. 精细胞, 示染色质浓缩; l. 精子, 示精子头部、线粒体和鞭毛。Ax: 轴丝; Bc: 血细胞; C: 结缔组织; Cb: 拟染色体; E: 内质网; F: 鞭毛; Fi: 成纤维细胞; G: 高尔基体; H: 头部; Ic: 间质细胞; Ii: 小叶间质; Lf: 侧鳍; M: 线粒体; N: 细胞核; Nm: 核膜; Nu: 核仁; Pd: 外周二联管; Ps: 初级精原细胞; Psp: 初级精母细胞; S: 袖套; Spe: 精子细胞; Ss: 次级精原细胞; Ssp: 次级精母细胞。

Fig. 4 The ultrastructure of spermatogenesis in *Eleutheronema tetradactylum*

a. Seminiferous lobules, showing spermatogenic cysts, primary spermatogonia, secondary spermatogonia; b. Intralobular interstitium, showing interstitial cell, fibroblast and blood cell; c. Sertoli cell, showing nucleus and mitochondria; d. Primary spermatogonia, showing nucleus, nucleolus and endoplasmic reticulum; e. Secondary spermatogonia, showing nucleus, mitochondria and endoplasmic reticulum; f. Secondary spermatogonia, primary spermatocytes and secondary spermatocytes; g. Zoom in on figure f, showing secondary spermatocyte dividing, chromatin concentrating and mitochondria increasing; h. Spermatogenic cysts, showing primary spermatocytes and mitochondria; i. Primary spermatocytes, showing nucleus and mitochondria; j. Secondary spermatocytes, showing nucleus, mitochondria, Golgi apparatus; k. Spermatids; l. Sperms, showing sperms head, flagellum and mitochondria. Ax: axial filament; Bc: blood cell; C: connective tissue; Cb: chromatoid body; E: endoplasmic reticulum; F: flagellum; Fi: fibroblast; G: Golgi apparatus; H: head; Lf: lateral fin; Ic: interstitial cell; Ii: intralobular interstitium; M: mitochondria; N: nucleus; Nm: nuclear membrane; Nu: nucleolus; Pd: peripheral diplomicrotubule; Ps: primary spermatogonia; Psp: primary spermatocytes; S: sleeve; Spe: spermatids; Ss: secondary spermatogonia; Ssp: secondary spermatocytes.

尚无腔隙形成, 精小叶内可见大量初级精母细胞形成, 成群排列, 被支持细胞包围形成精小囊, 极少数精小囊内出现次级精母细胞, 总体来说该时期精巢发育表现出较好的同步性(图 3b, 图 4h)。

初级精母细胞呈卵圆形或多边形, 细胞膜不清晰, 细胞质嗜碱性较弱, 呈浅红色或透明的泡状, 细胞核大且深染(图 3i), 胞径为 $(7.24\pm0.64)\text{ }\mu\text{m}$ , 核径为 $(4.75\pm0.80)\text{ }\mu\text{m}$ , 核质比约为 0.66。电镜下显示, 初级精原细胞的细胞核较大, 多为偏位, 细胞核中染色质较分散且呈现不同的形状, 电子密度较高, 核膜仍为双层结构。细胞核外仍有拟染色质小体分布, 电子密度高且周围附有较大的线粒体。细胞质中线粒体分区聚集(图 4h), 体积变大, 多为长卵形, 内嵴结构增多(图 4i)。

**2.2.3 第 III 期(精母细胞成熟期)** 5~7 月龄大部分幼鱼精巢处于第 III 期, 该期发育时间较长。此时精巢长度约占腹腔的一半, 呈扁带状, 分支部分为灰白色并略带浅黄色, 合并部分为粉红色, 表面微血管较多, 肉眼清晰可见。组织学横切面显示精小叶中部开始形成狭长形的精小叶腔, 小叶间质增厚, 有较多微血管分布, 被染成红色; 精小囊内初级精母细胞逐渐分裂成次级精母细胞, 且可观察到少数次级精母细胞发育成精细胞, 精小囊内的生精细胞为同步发育(图 3c)。

次级精母细胞较初级精母细胞小, 且嗜碱性增强, 多为椭圆形, 呈紫色, 胞径为 $(5.26\pm0.51)\text{ }\mu\text{m}$ , 细胞核内染色质更浓缩, 着色加深, 核径为 $(3.84\pm0.43)\text{ }\mu\text{m}$ , 核质比约为 0.73 (图 3j)。电镜下显示, 次级精母细胞的细胞核较初级精母细胞的小, 电子密度增加, 多为偏位(图 4f)。核膜附近较少发现有拟染色质小体, 而线粒体则多为分布于核膜附近, 个体较大, 内嵴丰富, 成群聚集, 高尔基体形状典型(图 4j)。

**2.2.4 第 IV 期(精子开始出现期)** 7~9 月龄幼鱼的精巢发育至第 IV 期, 该期精巢厚度增加, 呈带状, 乳白色, 表面血管网更发达, 长度超过腹腔的一半。组织学观察发现小叶腔内开始出现少量成熟精子(图 3d)。

此时次级精母细胞分裂形成大量的精细胞, 精细胞嗜碱性增强, 呈深紫色, 圆形, 胞径为

$(3.23\pm0.35)\text{ }\mu\text{m}$ , 明显小于次级精母细胞, 细胞核进一步浓缩, 呈圆形, 较大且核膜模糊, 不能与胞质区别(图 3k)。电镜下显示, 精细胞染色质高度浓缩, 处于变态期精细胞的细胞核和细胞质电子密度无明显差别, 细胞核不易区分, 细胞膜双层结构明显(图 4k)。

**2.2.5 第 V 期(精子完全成熟期)** 最早在 10 月龄幼鱼观察到发育至第 V 期的精巢, 通常出现在繁殖季节。该期精巢体积达到最大, 轻轻挤压腹部可见精液流出。此时大量精细胞已变态发育成精子, 由于大量精小囊破裂, 精子都被释放到精小叶腔中连成一片, 呈深紫色(图 3e); 精子嗜碱性比精细胞强, 着色加深, 被染成蓝紫色, 头部直径约为 $(1.41\pm0.22)\text{ }\mu\text{m}$ , 尾部为弯曲细线状, 被染成红色(图 3l)。

电镜下显示, 精子由头部、中部和尾部组成, 头部前端未见顶体结构, 大部分被细胞核占据, 核膜与质膜紧密相接, 细胞质较少, 胞质中的线粒体数量减少, 多偏于一侧, 但体积较大, 切面为圆形, 内嵴丰富, 细胞核内的染色体高度浓缩, 为颗粒状或团块, 电子密度极高; 精子的尾部(鞭毛)较长, 纵切面可见内部为线状轴丝, 电子致密, 横切面显示内部的轴丝为典型的“9+2”结构, 由 2 对中央微管和 9 组外周二联微管组成, 轴丝外侧有由细胞质膜向两侧扩张形成的侧鳍, 呈不对称分布(图 4l)。

**2.2.6 第 VI 期(精子退化吸收期)** 成熟排精后的精巢被归为第 VI 期, 该期精巢略有萎缩, 呈松弛带状, 表面血管丰富, 为粉红色。组织学观察显示, 精小叶腔中的精子已排空, 仅有少量精子残留, 后期退化而被吸收, 精小叶形态不规则, 小叶间质混乱交错, 变形扭曲, 结缔组织增厚, 血管丰富, 有 1~2 层精原细胞沿小叶间质有规律排列, 将进入下一轮的生长发育(图 3f)。

### 3 讨论

#### 3.1 四指马鲅的精巢结构类型

关于硬骨鱼类精巢的组织结构、精巢发育以及精子发生的研究, 在宏观的外形观察、微观的显微和超微结构<sup>[15, 25-27]</sup>以及细胞发生和分子调控

机制<sup>[21, 28-29]</sup>等方面在国内外已较多的报道。根据组织结构特点和生殖细胞排列方式和发育特点,一般将精巢分为小叶型(lobular type)和小管型(tubular type)两种<sup>[30]</sup>,大多数硬骨鱼类的精巢属于小叶型结构。小叶型精巢分为壶腹型和辐射型,壶腹型精巢的基本单位是壶腹(又叫生精滤泡),这些壶腹不规则地排列在精巢内部,如黑脊倒刺鲃(*Spinibarbus caldwelli*)<sup>[31]</sup>等;辐射型的精小叶呈片状,从精巢腹侧向背侧辐射,分布极规则,如粗唇𬶏(*Leiocassis crassilabris*)<sup>[27]</sup>等。

本研究结果表明,四指马鲅的精巢成对存在,位于腹腔背侧紧贴中肾和鳔的腹膜,后部融合呈“Y”字形;组织学上为典型小叶型精巢,与大多数硬骨鱼类一样;横切面显示精小叶从精巢腹部向背部有规则地辐射排列,是小叶型精巢中的辐射型。精小叶由外膜的结缔组织向实质部延伸形成小叶间质分隔,小叶间质主要由结缔组织、微血管、成纤维细胞、间质细胞等组成;小叶内精小囊排列规则,精小囊由支持细胞包围而成,同一精小囊内的生精细胞发育同步;精小囊内的生精细胞完全成熟后形成精子,精子被释放到小叶腔后通过输出管汇集充满输精管,这与大多数硬骨鱼类一致<sup>[25, 32-33]</sup>。鱼类精巢支持细胞的结构和功能研究一直为研究者所关注<sup>[34]</sup>,支持细胞具有较强的可塑性,除了有结构的功能外,还有吞噬、营养、免疫等功能,在精子发生过程中起到关键作用<sup>[26, 28, 34]</sup>,本研究中四指马鲅精巢的支持细胞在电镜下可见较厚的细胞膜和核膜,线粒体较发达,这可能与它的结构功能相适应。

### 3.2 四指马鲅的精巢发育分期

目前关于精巢发育的分期尚无统一的划分规定,外国学者根据精巢外观及组织学特征,一般将其分为未成熟(immature)、发育(developing)、成熟(maturing)、排放(spawning)和排放后(spent)5个时期<sup>[35]</sup>,而中国学者一般习惯将其划分为6个时期<sup>[14, 24]</sup>。本研究据参考刘筠<sup>[24]</sup>和张耀光等<sup>[14]</sup>的分期方法并结合四指马鲅的形态特征和生殖细胞分布特点,将其精巢发育和精子发生过程分为6个时期,分别为第I期(精原细胞增殖期)、第II期(精母细胞增长期)、第III期(精母细胞成熟期)、

第IV期(精子开始出现期)、第V期(精子完全成熟期)、第VI期(精子退化吸收期)。本研究结果显示,首次性成熟四指马鲅群体的精巢约3月龄时处于第I期,精原细胞增殖;4月龄时精巢发育至第II期,精原细胞分裂形成初级精母细胞并且不断增加,成群的精母细胞被支持细胞包围形成精小囊;最早在5月龄时发现有精巢腔出现,标志着精巢发育进入第III期,直到7月龄时大部分精巢仍处于该时期,持续时间较长;7月龄时个别精小叶腔出现少量精子发育,表明精巢开始进入第IV期,且持续到9月龄仍处于该时期;最早在10月龄精巢发育成熟达到第V期,精小叶腔扩大,精子形成,连成片状,通常发生在当年的繁殖季节。不同的鱼类中,精巢成熟的时间有较大差别,本研究中四指马鲅最早在10月龄开始性成熟,而布氏罗非鱼(*Tilapia buttikoferi*)在6月龄性成熟<sup>[33]</sup>,卡拉白鱼(*Chalcalburnus chalcooides aralensis*)在23月龄性成熟<sup>[36]</sup>,大鳞鲃(*Barbus capito*)在32月龄性成熟<sup>[37]</sup>,长臀𬶏(*Ctenopharyngodon idellus*)则在约36月龄才达到性成熟<sup>[32]</sup>;此外,即使在同一种鱼类中,性腺发育进程易受盐度、温度、pH、光照周期以及种群密度等环境因子的影响<sup>[38]</sup>。

### 3.3 四指马鲅的精子发生

本研究发现,四指马鲅在精子发生过程中,生殖细胞经历了初级精原细胞、次级精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精细胞和精子6个发育阶段。在四指马鲅精子发生早期,可见在生殖上皮边缘存在两种类型的精原细胞,即初级精原细胞和次级精原细胞,也称为A型精原细胞和B型精原细胞,沿生殖上皮分布,椭圆形或圆形。初级精原细胞个体较大,核质比较高,细胞质嗜碱性极弱,几乎不着色。次级精原细胞较初级精原细胞小,核质比较小,这与鲻(*Mugil cephalus*)<sup>[25]</sup>和南方鮈(*Silurus meridionalis*)<sup>[39]</sup>等的研究结果基本一致。早期有相关研究认为A型精原细胞为精原干细胞,通过分裂产生B型精原细胞,通常B型精原细胞要经过7~8次有丝分裂才形成初级精母细胞<sup>[25, 40]</sup>,近年来国外也有相关研究成果与该观点相一致<sup>[41]</sup>。更有趣的是,A型精原细胞(初级精原细胞)的功能及迁移机制越来越受关

注<sup>[42]</sup>。四指马鲅精巢在第Ⅰ期和第Ⅱ期主要表现为精原细胞和精母细胞的增殖,具有较好的同步性;到第Ⅲ期时靠近精小叶腔一侧精小囊会先发育成熟,靠近小叶间质一侧的精小囊则发育较迟缓,表现出非同步的现象;到发育至第Ⅳ期,精小叶腔开始有成熟的精子出现,往后精子慢慢成熟,不断往小叶腔释放;当精巢发育至第Ⅴ期时,精子充满精小叶腔和输出管以及输精管,此时又表现为同步性。该模式被称为同步—非同步—同步的“追赶”现象,与鳗鲡(*Anguilla japonica*)等其他硬骨鱼类相似<sup>[13]</sup>。

电镜结果显示,各级生精细胞的超微结构有着明显的差异。从细胞形状上看,四指马鲅精原细胞多为圆形,而精母细胞则多为椭圆形或多边形,可能是精母细胞普遍排列紧密,细胞相互挤压导致变形而呈现多种形态,这与黑鮨(*Girella leonina*)<sup>[43]</sup>等鱼类的研究结果类似。众多研究结果表明,各时相生精细胞的细胞核电子密度也会发生明显变化<sup>[27, 31, 43-44]</sup>,四指马鲅精原细胞的细胞核电子密度较低,但处在分裂期的精原细胞的核质会高度浓缩,电子密度显著增加;在精子发生的过程中核质逐渐浓缩,从而满足逐渐成熟并向下一阶段转化所必需的物质基础,这符合鱼类核质浓缩变化的一般规律,在黑鮨<sup>[43]</sup>、粗唇鮨<sup>[27]</sup>和孔雀鱼(*Poecilia reticulate*)<sup>[44]</sup>等鱼类中也有类似的研究报道。在四指马鲅精子发生过程中,线粒体等细胞器发生明显的变化,特别在分裂期线粒体大量增加,聚集在细胞核附近,以保证足够的能量供应。总体看来,线粒体的变化由分散到聚集,数量由多变少,体积由小变大,内嵴由简单到复杂,这是与各级细胞结构相适应的。从精原细胞发育至精子,细胞体积逐渐下降,其他细胞器数量同时相应减少,因而所需能量相对减少,线粒体通过增大体积以及增加内嵴面积来提高能量供应效率<sup>[43, 45]</sup>。四指马鲅成熟精子由头部、中部和尾部组成。头部由高电子密度的细胞核所占据,前方不具顶体结构,精子鞭毛细长,内部轴丝为典型“9+2”结构,与大多数硬骨鱼类一致<sup>[27, 43-44]</sup>。鞭毛轴丝外部有由细胞质膜向两侧扩张形成的侧鳍,呈不对称分布,而在黑鮨等鱼类中侧鳍呈对

称分布,说明在不同的鱼类中存在差异<sup>[43]</sup>。郭明申等<sup>[44]</sup>和肖云朴等<sup>[43]</sup>认为侧鳍可增大鞭毛与水之间的接触面,提高精子的游泳速度,从而增大受精机会。但实际上侧鳍的具体生物学功能尚存在较大争议,仍有待进一步验证。

## 参考文献:

- [1] Sun D R, Chen Z. South China Sea Fish Search[M]. Beijing: China Ocean Press, 2013: 380-382. [孙典荣, 陈铮. 南海鱼类检索[M]. 北京: 海洋出版社, 2013: 380-382.]
- [2] Wang G H, Hao R C, Yang G Z, et al. The complete mitochondrial genome sequence of *Eleutheronema tetradactylum* (Mugiliformes: Polynemidae) and phylogenetic studies of Mugiliformes[J]. Mitochondrial DNA Part A, 2016, 27(6): 4457-4458.
- [3] Wang J J, Sun P, Yin F. Low mtDNA Cytb diversity and shallow population structure of *Eleutheronema tetradactylum* in the East China Sea and the South China Sea[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2014, 55(2): 268-274.
- [4] Moore B R, Stapley J, Allsop Q, et al. Stock structure of blue threadfin *Eleutheronema tetradactylum* across northern Australia, as indicated by parasites[J]. Journal of Fish Biology, 2011, 78(3): 923-936.
- [5] Bharadhirajan P, Gopalakrishnan A, Raja K, et al. Prevalence of copepod parasite (*Lernaeenicus polynemi*) infestation on *Eleutheronema tetradactylum* from Pazhayar coastal waters, southeast coast of India[J]. Journal of Coastal Life Medicine, 2013, 1(4): 278-281.
- [6] Abu Hena M K, Idris M H, Wong S K, et al. Growth and survival of Indian salmon *Eleutheronema tetradactylum* (Shaw, 1804) in Brackish Water Pond[J]. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 2011, 6(4): 479-484.
- [7] Ou Y J, Xie M J, Li J E, et al. First maturation and mass seedling propagation of cultured *Eleutheronema tetradactylum* in Guangdong Province[J]. South China Fisheries Science, 2017, 13(4): 97-104. [区又君, 谢木娇, 李加儿, 等. 广东池塘培育四指马鲅亲鱼初次性成熟和苗种规模化繁育技术研究[J]. 南方水产科学, 2017, 13(4): 97-104.]
- [8] Thirumaraiselvi R, Thangaraj M. Genetic diversity analysis of Indian salmon, *Eleutheronema tetradactylum* from South Asian countries based on mitochondrial COI gene sequences[J]. Notulae Scientia Biologicae, 2015, 7(4): 417-422.
- [9] Xie M J, Ou Y J, Wen J F, et al. Observation on embryonic development of *Eleutheronema tetradactylum*[J]. Journal of Applied Oceanography, 2016, 35(3): 405-411. [谢木娇, 区又君, 温久福, 等. 四指马鲅胚胎发育观察[J]. 应用海洋学报, 2016, 35(3): 405-411.]

- [10] Zhou H, Li J E, Ou Y J, et al. Histological observation on the development of retina in fourfinger threadfin (*Eleutheronema tetradactylum*) larvae[J]. Chinese Journal of Zoology, 2017, 52(3): 458-467. [周慧, 李加儿, 区又君, 等. 四指马鲅视网膜早期发育的组织学研究[J]. 动物学杂志, 2017, 52(3): 458-467.]
- [11] Xie M J, Ou Y J, Li J E, et al. Histology observation in digestive tract of *Eleutheronema tetradactylum* at different developmental stages[J]. South China Fisheries Science, 2016, 12(2): 51-58. [谢木娇, 区又君, 李加儿, 等. 不同发育阶段的四指马鲅消化道组织学比较研究[J]. 南方水产科学, 2016, 12(2): 51-58.]
- [12] Liu Q Q, Wen J F, Ou Y J, et al. Effects of acute handling stress on liver tissue and oxidative stress of juvenile *Eleutheronema tetradactylum*[J]. South China Fisheries Science, 2017, 13(5): 103-109. [刘奇奇, 温久福, 区又君, 等. 急性操作胁迫对四指马鲅幼鱼肝脏组织结构和氧化应激的影响[J]. 南方水产科学, 2017, 13(5): 103-109.]
- [13] Lin D, Lin H R. Studies on the breeding biology of the eel(*Anguilla japonica* Temminck & Schlegel) 3. Histological and cytological studies on the gonadal development of eel[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1984, 8(2): 157-170. [林鼎, 林浩然. 鳗鲡繁殖生物学研究Ⅲ. 鳗鲡性腺发育组织学和细胞学研究[J]. 水生生物学集刊, 1984, 8(2): 157-170.]
- [14] Zhang Y G, Luo Q S, Zhong M C. Studies on the developmental stages of testis, spermatogenesis and spermatoleosis in *Leiocassis longirostris*[J]. Zoological Research, 1992, 13(3): 281-287, 305-306. [张耀光, 罗泉笙, 钟明超. 长吻𬶏精巢发育的分期及精子的发生和形成[J]. 动物学研究, 1992, 13(3): 281-287, 305-306.]
- [15] de Melo Dias G C, Cassel M, de Jesus L W O, et al. Spermatogonia, germline cells, and testicular organization in the characiform *Prochilodus lineatus* studied using histological, stereological, and morphometric approaches[J]. Anatomical Record, 2017, 300(3): 589-599.
- [16] Kaneko H, Ijiri S, Kobayashi T, et al. Gonadal soma-derived factor (gsdf), a TGF-beta superfamily gene, induces testis differentiation in the teleost fish *Oreochromis niloticus*[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2015, 415: 87-99.
- [17] Fan Z F, Zou Y X, Jiao S, et al. Significant association of cyp19a promoter methylation with environmental factors and gonadal differentiation in olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2017, 208: 70-79.
- [18] Hsu C W, Pan Y J, Wang Y W, et al. Changes in the morphology and gene expression of developing zebrafish gonads[J]. General and Comparative Endocrinology, 2018, 265: 154-159.
- [19] Liu J, Zhang W, Du X, et al. Molecular characterization and functional analysis of the GATA4 in tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B, 2016, 193(2): 1-8.
- [20] Wang H Z, Wang B, Liu J X, et al. Piwil1 gene is regulated by hypothalamic-pituitary-gonadal axis in turbot (*Scophthalmus maximus*): A different effect in ovaries and testes[J]. Gene, 2018, 658: 86-95.
- [21] Wang W J, Han Z F, Li W B, et al. The identification and analysis of long noncoding RNA in testes and ovaries of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(5): 852-860. [王伟佳, 韩兆方, 李完波, 等. 大黄鱼雌雄性腺长链非编码RNA的挖掘与差异分析[J]. 中国水产科学, 2019, 26(5): 852-860.]
- [22] Zhang W, Liu Y Z, Yu H Y, et al. Transcriptome analysis of the gonads of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2016, 42(6): 1581-1594.
- [23] Shihab I, Gopalakrishnan A, Vineesh N, et al. Histological profiling of gonads depicting protandrous hermaphroditism in *Eleutheronema tetradactylum*[J]. Journal of Fish Biology, 2017, 90(6): 2402-2411.
- [24] Liu Y. Reproductive Physiology of Main Cultivated Fish in China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1993: 22-30. [刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1993: 22-30.]
- [25] Lin J Z, Weng Y Z, Fang Y Q, et al. A histological study on spermatogenesis of grey mullets, *Mugil cephalus*[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2001, 20(1): 57-60, 136. [林君卓, 翁幼竹, 方永强, 等. 鲻鱼精子发生的组织学研究[J]. 台湾海峡, 2001, 20(1): 57-60, 136.]
- [26] de Siqueira-Silva D H, da Silva Rodrigues M, Nóbrega R H. Testis structure, spermatogonial niche and Sertoli cell efficiency in Neotropical fish[J]. General and Comparative Endocrinology, 2019, 273: 218-226.
- [27] Chen Y Q, Wei G, Li Z H, et al. Study on the microstructures of testis and spermatogenesis of *Leiocassis crassilabris*[J]. Freshwater Fisheries, 2008, 38(1): 6-10. [陈永强, 魏刚, 李振华, 等. 粗唇𬶏精巢显微结构和精子发生的研究[J]. 淡水渔业, 2008, 38(1): 6-10.]
- [28] Costa F G, Adolfi M C, Gomes C C, et al. Testes of *Astyanax altiparanae*: The Sertoli cell functions in a semicystic spermatogenesis[J]. Micron, 2014, 61(6): 20-27.
- [29] Wu G C, Jeng S R, Pan Y T, et al. The germline-specific expression of Foxl3a and its paralogous Foxl3b are associated with male gonadal differentiation in the Japanese eel, *Anguilla japonica*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2018, 265: 154-159.

- ocrinology, 2019, 277: 56-65.
- [30] Billard R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species[J]. *Reproduction Nutrition Dévelopement*, 1986, 26(4): 877-920.
- [31] Lin D J, You Y L, Su M. Studies on testicular histology and spermatogenesis of teleost, *Spinibarbus caldwelli* (Nichols)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, 27(6): 563-571. [林丹军, 尤永隆, 苏敏. 黑脊倒刺鲃精巢结构和精子发生的研究[J]. 水生生物学报, 2003, 27(6): 563-571.]
- [32] Chen J T, Xie S L, Wang C, et al. Development and histological observation of gonad in helmet catfish *Cranoglanis bouderius*[J]. *Fisheries Science*, 2015, 34(1): 48-52. [陈金涛, 谢少林, 王超, 等. 长臀𬶏性腺发育及其组织结构观察[J]. 水产科学, 2015, 34(1): 48-52.]
- [33] Liu Y, Zhao T T, Hu Y C, et al. Histological studies on gonadal development of *Tilapia buttikoferi*[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2019, 41(2): 340-346. [刘奕, 赵婷婷, 胡隐昌, 等. 布氏罗非鱼性腺发育的组织学研究[J]. 江西农业大学学报, 2019, 41(2): 340-346.]
- [34] França L R, Hess R A, Dufour J M, et al. The Sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity[J]. *Andrology*, 2016, 4(2): 189-212.
- [35] Akayli T, Karakulak F S, Oray I K, et al. Testes development and maturity classification of albacore (*Thunnus alalunga* (Bonaterre, 1788)) from the Eastern Mediterranean Sea[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2013, 29(4): 901-905.
- [36] Jiang A L, Liu J D, Ding C L, et al. Histological observation of the gonad development in *Chalcalburnus chalcoides aralensis*[J]. *Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science)*, 2016, 33(2): 144-150. [姜爱兰, 刘俊得, 丁辰龙, 等. 卡拉白鱼性腺发育组织学观察[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2016, 33(2): 144-150.]
- [37] Jiang A L, Wang X H, Lin Y H, et al. Histological observation of the gonad development in *Barbus capito*[J]. *Journal of Tianjin Agricultural University*, 2016, 23(4): 9-13. [姜爱兰, 王信海, 薛玉华, 等. 大鳞鲃性腺发育组织学观察[J]. 天津农学院学报, 2016, 23(4): 9-13.]
- [38] Baroiller J F, D'Cotta H. Environment and sex determination in farmed fish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2001, 130(4): 399-409.
- [39] Zhang Y G, Xie X J. Reproductive biology of *Silurus meridionalis* Chen: The development and annual change in the gonads[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, 20(1): 8-16. [张耀光, 谢小军. 南方鮈的繁殖生物学研究: 性腺发育及周年变化[J]. 水生生物学报, 1996, 20(1): 8-16.]
- [40] Selman K, Wallace R A. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*[J]. *American Zoologist*, 1986, 26(1): 173-192.
- [41] Schulz R W, de França L R, Lareyre J J, et al. Spermatogenesis in fish[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3): 390-411.
- [42] Nóbrega R H, Greebe C D, van de Kant H, et al. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish[J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(9): e12808.
- [43] Xiao Y P, Xu S L, Sun M, et al. Ultrastructural changes in *Girella leonina* during spermatogenesis[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2011, 30(1): 107-112. [肖云朴, 徐善良, 孙敏, 等. 黑鮨精子发生过程中的超微结构变化[J]. 热带海洋学报, 2011, 30(1): 107-112.]
- [44] Guo M S, Liu L, Mu S M, et al. Study on microstructure and ultrastructure of spermatogenesis of *Poecilia reticulate*[J]. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 2006, 26(6): 653-658. [郭明申, 刘龙, 穆淑梅, 等. 孔雀鱼精子发生的显微与超微结构[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2006, 26(6): 653-658.]
- [45] Medina A, Megina C, Abascal F J, et al. The sperm ultrastructure of *Merluccius merluccius* (Teleostei, Gadiformes): Phylogenetic considerations[J]. *Acta Zoologica*, 2003, 84(2): 131-137.

## Histology and ultrastructure of developing testes and spermatogenesis in the fourfinger threadfin, *Eleutheronema tetradactylum* (Show, 1804)

LAN Junnan<sup>1, 2, 3, 4</sup>, OU Youjun<sup>1</sup>, WEN Jiufu<sup>1</sup>, LI Junwei<sup>1</sup>, NIU Yingyue<sup>1, 2, 3, 4</sup>, ZHOU Hui<sup>1</sup>, LI Jia'er<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
4. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** Reproduction is one of the most important processes in the life history of fish. However, there is little information about the reproductive biology of the fourfinger threadfin, *Eleutheronema tetradactylum* (Show, 1804). In this paper, paraffin tissue sections were used to observe the developmental process of testes via haematoxylin-eosin (HE) staining and transmission electron microscopy (TEM) in order to understand the organizational structure of the testes as well as the histological and ultrastructural changes associated with spermatogenesis during primary sexual maturity in cultured fourfinger threadfin individuals. The results show that the testes are a pair of extended flat zonal organs that are gray in color and fuse at the posterior end into a Y-shape. The organs are located on the dorsal side of the abdominal cavity, attached to the ventral surface of the mesonephros and swim bladder. The developmental process of the testes was divided into six stages defined by histological characteristics. The testes develop to stage I (spermatogonia proliferates), followed by stage II (spermatocyte growth), stage III (spermatocytes mature), and stage IV (sperms begin to appear) at about three months of age, four months of age, five to seven months of age, and seven to nine months of age, respectively. At a minimum of 10 months of age, the testes develop to stage V (complete maturation of sperm) and reach the first stage of sexual maturity. The post-reproductive testes in stage VI (degradation and absorption) were observable after the breeding season. Spermatogenesis went through six phases, namely primary spermatogonia, secondary spermatogonia, primary spermatocyte, secondary spermatocyte, spermatocyte, and sperm in succession. The diameter of cells and nuclei decreased step by step, and the ratio of nucleus to cytoplasm changed regularly. During spermatogenesis, chromosomes in the nucleus were gradually condensed, electron density was increased, and mitochondria were enlarged and aggregated with inner cristae structure gradually enriching. Sperm was composed of a head, middle, and tail. The axial filament of the flagella followed a typical “9+2” structure. This study elaborated on the organizational structural characteristics of the testes and the histological and ultrastructural changes during testes development and the spermatogenesis process of first sexual maturity stage of cultured fourfinger threadfin. This information enriches our collective knowledge on the species’ reproductive biology and provides a theoretical reference for understanding reproduction laws and improving artificial breeding technologies.

**Key words:** *Eleutheronema tetradactylum*; testes development; spermatogenesis; histological; ultrastructure

**Corresponding author:** OU Youjun. E-mail: ouyoujun@126.com