

DOI: 10.12264/JFSC2024-0027

## 横带髭鲷精子超微结构及其生理特征

林慧<sup>1</sup>, 史会来<sup>2</sup>, 张涛<sup>2</sup>, 平洪领<sup>2</sup>, 邹京华<sup>1</sup>, 杨淑越<sup>1</sup>

1. 浙江海洋大学海洋与渔业研究所, 浙江 舟山 316021;

2. 浙江省海洋水产研究所, 浙江省海水增养殖重点实验室, 浙江 舟山 316021

**摘要:** 为探究横带髭鲷(*Hapalogenys mucronatus*)精子形态和生理特性, 以提高人工繁殖的受精率, 利用扫描电子显微镜和透射电子显微镜观察其精子结构, 并设置不同梯度的盐度、pH 和温度, 探讨横带髭鲷精子快速运动时间、寿命与环境因子的关系。结果表明: 横带髭鲷精子由头部、中部和鞭毛 3 段组成, 精子头部呈近球形或椭球形, 头部直径为  $(1.56 \pm 0.05) \mu\text{m}$ , 细胞核中染色质高度浓缩, 核膜紧贴于质膜, 无顶体; 中段主要由袖套腔与中心粒复合体构成; 鞭毛细长有侧鳍, 为典型“9+2”微管结构。横带髭鲷精子的适宜盐度范围为 22~28, 盐度为 26 时精子寿命达到最大值 425 s; 适宜 pH 范围为 7~10, 在 pH 为 7 时, 精子活力最强, 精子寿命达到最大值 430 s; 适宜温度范围 18~26 °C, 在水温为 22 °C 时精子寿命最长, 为 427 s。综上所述, 建议横带髭鲷卵子和精子受精时的最佳水环境盐度为 24~26、pH 为 7~8、温度为 20~22 °C。

**关键词:** 横带髭鲷; 精子; 超微结构; 环境因子; 精子活力

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)03-0257-09

横带髭鲷(*Hapalogenys mucronatus*)俗称十六枚, 隶属于鲈形目(Perciforms)、石鲈科(Pomadasytidae)、髭鲷属(*Hapalogenys*)。横带髭鲷是近海中下层鱼类, 栖息于多岩石的区域, 是典型的恋礁性鱼类, 在我国沿海均有分布<sup>[1]</sup>。横带髭鲷肉质鲜美, 营养价值较高, 是重要的经济性鱼类, 该鱼的野生资源有限, 市场需求旺盛<sup>[2]</sup>。其具有广盐和耐低温的特性, 特别适宜于在浙江沿海地区进行增养殖。

目前, 虽已突破小规模人工繁育技术, 但在其繁育过程中存在一个瓶颈问题即受精率极低, 无法获得批量优质受精卵, 严重制约了规模化繁育进程。已有研究表明, 精子的超微结构可作为评价精子质量的指标之一<sup>[3]</sup>, 精子活力亦是精子质量检测的重要指标, 与鱼类的受精能力密切相关<sup>[4]</sup>。体外受精鱼类的精子在精巢和精浆中是

不活动的, 只在排出到水环境中被稀释后才能被激活进行运动<sup>[5]</sup>。所以精子的活力既取决于自身质量, 同时也受到水环境中各种因子(盐度、pH、温度及渗透压等)的调节和影响<sup>[6]</sup>。Dzyuba 等<sup>[7]</sup>研究发现鱼类精子储存的能量是有限的, 环境温度与精子活力持续时间呈反比关系, 温度升高引起速度加快导致运动时间的缩短, 反之, 将导致运动时间延长。Van Deurs 等<sup>[8]</sup>研究发现, 精子活动时间和总活动时间与温度的关系均为二次函数关系。邓岳松等<sup>[9]</sup>阐述了外界因子对精子活力影响的机制, 是通过影响 cAMP-ATP-Mg<sup>2+</sup> 系统来影响鞭毛的活动而实现的。目前, 尚未见关于横带髭鲷精子生理特性方面的相关研究。本研究对横带髭鲷精子超微结构进行观察分析, 探讨环境因子对其精子活力的影响, 旨在了解横带髭鲷精

收稿日期: 2024-1-11; 修订日期: 2024-03-08.

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LTGN24C190010); 浙江省重点研发计划项目(2023C02050); 浙江“三农九方”科技协作计划项目(2022SNJF073); 舟山市科技计划项目(2022C31056); 浙江省科技厅院所专项(HYS-CZ-202317).

作者简介: 林慧(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向为海水鱼类发育生物学. E-mail: linhui5499@163.com

通信作者: 平洪领, 工程师, 研究方向为海水鱼类繁育与发育生物学. E-mail: pinghongling@126.com

子结构特征,以期为人工繁育及提高受精率提供理论基础和新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验亲鱼

实验用鱼来自浙江省海洋水产研究所西轩试验基地,选择体重为 320~500 g 的健康发育成熟的驯养野生雄鱼 10 尾。

### 1.2 精子的采集与观察

**1.2.1 精子的采集** 用吸水纸将鱼体生殖孔及周围的水分擦干,沿腹部向生殖孔轻轻挤压,待流出乳白色的精液时,用洁净的吸管吸取精液至 5 mL 离心管中,确保采集的精液无尿液、粪便等污物。

**1.2.2 扫描电镜样本制备** 用吸管吸取适量的精液于 2 mL 的离心管中,加入 2.5% 戊二醛溶液,将其放入 4 °C 的冰箱中固定 2 h,用不同浓度乙醇进行逐级脱水,用临界点干燥仪进行常规临界干燥、镀膜,使用赛可(SEC)SNE-3200M 扫描电子显微镜进行观察并拍照。

**1.2.3 透射电镜样本制备** 用吸管吸取适量的精液于 2 mL 的离心管中,加入等量的 2.5% 戊二醛溶液,过滤,3500 r/min 下离心 5 min,去除上清液,再加入适量的 2.5% 戊二醛溶液,4 °C 固定 2 h。用 PBS 缓冲液漂洗 3 次,每次 15 min,加入四氧化锇固定液,固定 2 h,再次用 PBS 缓冲液漂洗 3 次,每次 15 分钟,用不同梯度的酒精和丙酮进行脱水,再将样品包埋,放入聚合箱中固化 12 h,用超薄切片机切片,醋酸铀和柠檬酸铅染色,使用日立 120 kV 透射电镜 HT7800 进行观察并拍照。

**1.2.4 精子活力的观察** 将天然海水进行过滤,通过加热蒸发及蒸馏水稀释的方式调节盐度,设置盐度梯度为 20、22、24、26、28,其中盐度 24 为天然海水。利用盐度为 24 的天然过滤海水配制氢氧化钠溶液与盐酸溶液,设置 pH 梯度为 6、7、8、9、10、11。使用恒温箱控制海水温度,设置温度梯度为 16 °C、18 °C、20 °C、22 °C、24 °C、26 °C、28 °C、30 °C。

横带髭鲷精子通过不同盐度、pH、温度的海水进行激活后,会经过激烈运动、原地颤动以及原地静止 3 个阶段。以横带髭鲷精子快速运动时

间及精子寿命为判断精子活力的指标,对比在不同环境因子的影响下精子活力的变化。精子活力观察方法如下:使用针管吸取少量精液于载玻片上,加入天然过滤海水进行稀释与激活,用显微镜观察精子运动情况,同时计时。其中精子快速运动时间为精子从开始激活到约 90% 的精子原处颤动所经过的时间;精子寿命为精子从激活开始到约 90% 的精子停止颤动所经过的时间。

### 1.3 数据分析

每组实验重复 3 次,结果用平均值±标准差 ( $\bar{x} \pm SD$ ) 表示,使用 IBM SPSS statistics 23 进行数据分析,利用单因素方差分析对各组数据进行差异显著性比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 横带髭鲷精子的超微结构

**2.1.1 扫描电镜下精子的形态** 扫描电镜观察结果显示,横带髭鲷精子由头部、中段和尾部 3 部分组成。横带髭鲷精子为典型的鞭毛型精子。精子头部呈近球形或椭球形,精子头部直径为  $(1.56 \pm 0.05)$   $\mu\text{m}$ 。尾部鞭毛细长,直径为  $(0.19 \pm 0.02)$   $\mu\text{m}$ (图 1a、1b、1c)。

**2.1.2 透射电镜下精子内部结构** 透射电镜观察结果显示,横带髭鲷精子由头部、中段和尾部 3 部分组成,无顶体结构(图 1d)。

横带髭鲷精子头部主要由致密的细胞核、细胞膜等结构组成,细胞膜将细胞质包裹于细胞核外周(图 1d、1e)。细胞膜表面为波浪形凹凸褶皱。细胞核与细胞膜之间存在由极少量细胞质构成的透明空腔,未见明显的线粒体等细胞器。细胞核中染色质紧密,几乎不存在分散空隙(核空隙)。

横带髭鲷精子的中段主要由袖套腔与中心粒复合体构成。细胞核底端有向内凹陷部分,为植入窝,内含中心粒复合体(远端中心粒与近端中心粒)。远端中心粒连接着近端中心粒与精子尾部的起始段。近端中心粒长轴与远端中心粒所形成的基体长轴相互垂直,通过水平截面可见近端中心粒外围的 9 条二联体微管(图 1f、1g)。袖套与细胞核底部相连,植入窝与轴丝基部相嵌合形成袖套腔。袖套腔周围环绕有数个线粒体及囊泡。切

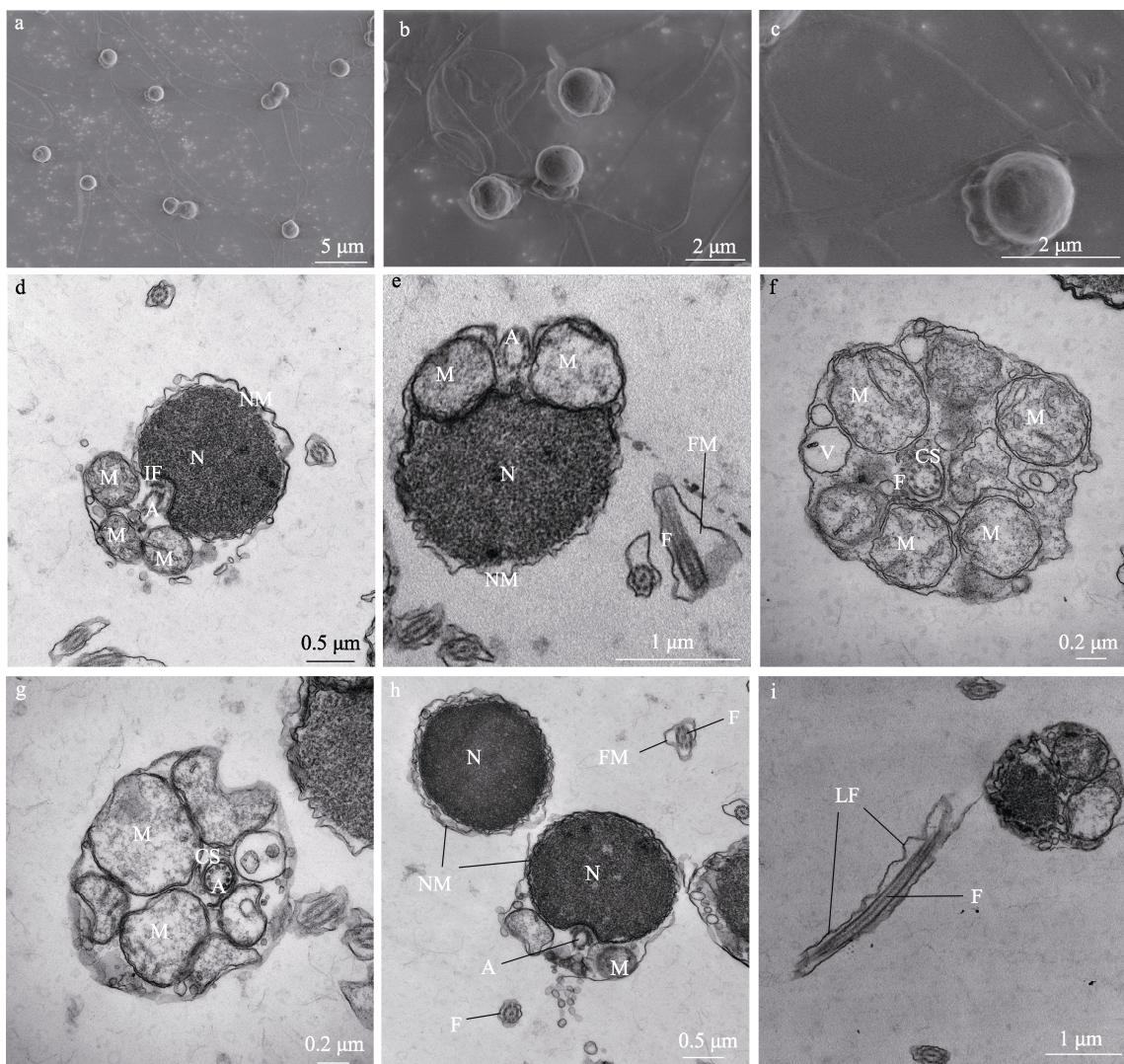


图 1 横带髭鲷精子超微结构

a、b、c.扫描电镜下精子外部形态; d、e.透射电镜下精子头部横切, 示中心粒复合体、线粒体、细胞核、细胞膜; f、g.透射电镜下精子尾部横切, 示轴丝的“9+2”结构、线粒体、囊泡; h.透射电镜下精子结构, 示细胞膜、细胞核、鞭毛; i.透射电镜下精子鞭毛。M:线粒体; V:囊泡; F:鞭毛; FM:鞭毛膜; CS:袖套腔; IF:植入窝; N:细胞核; NM:核膜; A:轴丝; LF:侧鳍。

Fig. 1 Ultrastructure of sperm of *Hapalogenys mucronatus*

a,b,c. External morphology of sperm under scanning electron microscope; d,e. Under the transmission electron microscope, the sperm head was cut transversely, showing the centriolar complex, mitochondria, nucleus and cell membrane; f,g. The tail of sperm was cut transversely under transmission electron microscope, showing the “9 + 2” structure, mitochondria and vesicles of axoneme; h. The sperm structure under transmission electron microscope showed cell membrane, nucleus and flagella; i. Sperm flagella under transmission electron microscope. M: mitochondria; V: vesicles; F: flagella; FM: flagellar membrane; CS: central space of the sleeve; IF: implantation fossa; N: nucleus; NM: nuclear membrane; A: axoneme; LF: lateral fin of the flagellum.

面清晰可见线粒体双层膜结构与内部嵴状结构(图 1f、1g)。

横带髭鲷精子尾部为一条细长的鞭毛。在鞭毛外面有由细胞质向两侧快扩形成的不连续波纹状侧鳍, 随精子尾部延伸至末端(图 1i)。精子尾部起始于袖套腔内远端中心粒, 然后由袖套腔中逐渐向外延伸。精子尾部主要由轴丝与质膜构成,

轴丝具有典型的“9+2”微管结构(图 1d、1e、1h)。

## 2.2 横带髭鲷精子活力

**2.2.1 不同盐度对精子活力的影响** 横带髭鲷精子快速运动时间、寿命与盐度的关系如图 2 所示。在自然过滤海水的水温 22.8 °C 条件下, 横带髭鲷精子快速运动时间、寿命先随盐度的升高而增长, 随后又缩短。精子快速运动时间在盐度 20~24

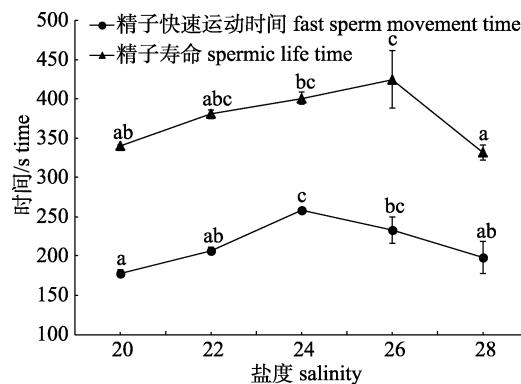


图 2 横带髭鲷精子快速运动时间、寿命与盐度的关系  
不同字母表示差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

Fig. 2 The relationship between rapid sperm movement time, life span and salinity of *Hapalogynus mucronatus*  
Different letters indicates statistically significant differences ( $P<0.05$ ).

范围逐渐增长，在盐度为 24 精子的快速运动时间达到最大值 258 s。之后随着盐度增加，精子的快速运动时间逐渐缩短；精子寿命在盐度 20~26 范围逐渐增长，在盐度为 26 时精子寿命达到最大值 425 s。之后随着盐度的增加，精子寿命逐渐缩短。

**2.2.2 不同 pH 对精子活力的影响** 横带髭鲷精子快速运动时间、寿命与 pH 的关系如图 3 所示。在自然过滤海水的水温 22.8 °C 条件下，横带髭鲷精子快速运动时间、寿命先随 pH 升高而快速增长，随后又逐渐缩短。横带髭鲷精子对强酸强碱环境极敏感，在 pH 高于 10 或 pH 低于 6 的环境中活力极差，在极短的时间内失活。精子活力

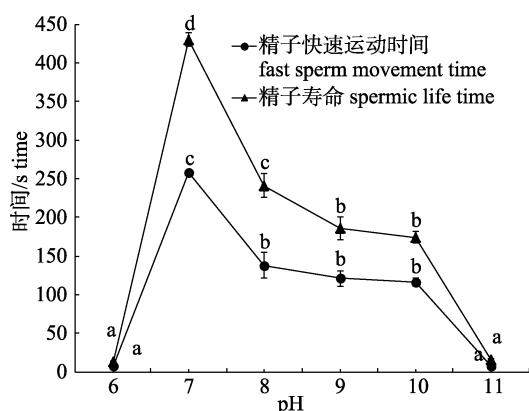


图 3 横带髭鲷精子快速运动时间、寿命与 pH 的关系  
不同字母表示差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

Fig. 3 The relationship between rapid sperm movement time, life span and pH of *Hapalogynus mucronatus*  
Different letters indicates statistically significant differences ( $P<0.05$ ).

在 pH 6~11 范围，随 pH 增大呈现先加强，后减弱的趋势。在 pH 为 7 时，精子活力最强，精子快速运动时间与精子寿命均达到最大值，分别为 258 s, 430 s。

**2.2.3 不同温度对精子活力的影响** 横带髭鲷精子快速运动时间、寿命与温度的关系如图 4 所示。通过不同温度的自然海水对精子激活时，发现横带髭鲷精子在海水温度 16~30 °C 范围均有一定的活力。在海水温度 16~30 °C 范围，随温度升高，精子活力呈现先增强后减弱的趋势。在海水温度在 22~24 °C 范围内，精子快速运动时间基本稳定 227 s。海水温度超出 24 °C 后，精子活力开始显著下降。在水温 20 °C 时，精子快速运动时间最长为 253 s；在水温 22 °C 时，精子寿命最长为 425 s。

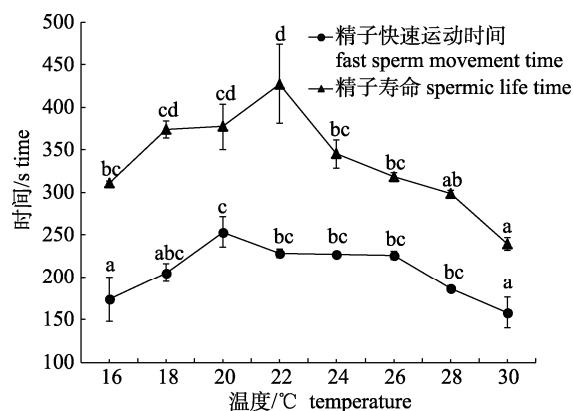


图 4 横带髭鲷精子快速运动时间、寿命与温度的关系  
不同字母表示差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

Fig. 4 The relationship between rapid sperm movement time, life span and temperature in *Hapalogynus mucronatus*  
Different letters indicates statistically significant differences ( $P<0.05$ ).

### 3 讨论

#### 3.1 横带髭鲷精子的形态结构

横带髭鲷精子头部呈椭圆形，与大多数硬骨鱼类的精子头部形状类似。其头部具有电子密度极大的细胞核，头部几乎完全被细胞核所占据，细胞核中染色质高度浓缩，不存在核间隙，这与银鲳(*Pampus argenteus*)<sup>[10]</sup>精子呈团块状的细胞核所不同。横带髭鲷精子头部细胞核呈马蹄形，这与鮈(*Silurus asotus*)<sup>[11]</sup>、裸盖鱼(*Anoplopoma fimbria*)<sup>[12]</sup>等鱼的精子头部类似，与香鱼

(*Plecoglossus altivelis*)<sup>[13]</sup>倒 U 形细胞核和大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)<sup>[14]</sup>浅 U 形细胞核有所不同。横带髭鲷精子头部细胞核与细胞膜之间无其他结构, 而斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)<sup>[15]</sup>、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)<sup>[16]</sup>精子头部细胞核与细胞膜之间间隙较大。目前有关于细胞核的形状、细胞核与细胞膜之间间隙的有无及大小是否对精子受精有影响尚有待进一步的探索。

刘筠等<sup>[17]</sup>研究发现, 一般硬骨鱼类中精子不具有顶体结构, 如黑鲷(*Sparus macrocephalus*)<sup>[18]</sup>、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[19]</sup>、大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)<sup>[20]</sup>等, 少部分鱼类精子具有顶体结构, 如鲟属(*Acipenser*)中大部分鱼类精子都具有顶体结构, 且顶体前端存在有受精丝<sup>[21]</sup>。本研究观察发现横带髭鲷精子并无顶体结构, 刘利平等<sup>[22]</sup>认为大多数硬骨鱼类的精子没有顶体结构可能是其卵细胞具有独特的卵孔, 精子直接从卵孔进入卵细胞, 从而进行精卵细胞结合, 并不需要通过顶体的水解酶溶解卵膜再进入卵细胞受精。由于缺乏横带髭鲷卵子超微结构及受精过程的观察, 此结论是否适用值得进一步的研究。

横带髭鲷精子的中段主要是由袖套腔与中心粒复合体构成, 在透射电镜下其中心粒复合体由近端中心粒与远端中心粒所构成, 和大部分硬骨鱼类精子排列方式一样, 都呈“T”字形垂直排列, 如平鲷(*Rhabdosargus sarda*)<sup>[23]</sup>、哲罗鱼(*Hucho taimen*)<sup>[24]</sup>、鮟<sup>[11]</sup>。但也有例外, 如大麻哈鱼<sup>[14]</sup>精子的近端中心粒与基体相互平行, 呈“一”字形排列; 乌苏里拟鲿(*Pseudobagrus ussuriensis*)<sup>[25]</sup>精子的近端中心粒与基体之间约为 130°。可见在不同种类的鱼精子中, 中心粒复合体的排列方式也有所不同。刘雪珠等<sup>[26]</sup>和杨万喜等<sup>[27]</sup>均认为精子中段中心粒复合体的有无及其排列方式可以用来对硬骨鱼进行分类。

横带髭鲷精子尾部与大黄鱼(*Larimichthys crocea*)<sup>[28]</sup>、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)<sup>[29]</sup>结构类似, 有一条较长的鞭毛, 主要由轴丝构成, 为典型的“9+2”结构。在轴丝两侧发现有侧鳍存在, 与胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)<sup>[30]</sup>、中华鲟(*Acipenser sinensis*)<sup>[31]</sup>、长吻𬶏(*Leiocassis longirostris*)<sup>[32]</sup>等鱼类相同。也有部分鱼类的精子鞭毛没有侧鳍, 如玫瑰无须鲃(*Puntius conchonius*)<sup>[33]</sup>、斜带石斑鱼<sup>[15]</sup>、鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[34]</sup>等。目前关于侧鳍有无与精子受精率之间的关系存在着争议<sup>[11, 19]</sup>。横带髭鲷两侧侧鳍呈现不规则的形状, 可以在精子进入水中为了保持平衡而进行快速运动, 从而有利于提高受精率。

### 3.2 环境因子对横带髭鲷精子活力的影响及适应性分析

不同海水鱼类精子的最适环境通常与鱼类所生存的栖息地环境相适应<sup>[35]</sup>。通过与开展实验附近海域相同月份海水水文特征进行对比<sup>[36]</sup>, 横带髭鲷精子激活时的最适条件与其栖息地环境基本吻合。当鱼类精子在海水中稀释时, 就会被激活进行有效的运动, 其激活的充分性根据鱼类种类而变化<sup>[37]</sup>, 而不同激活介质的 pH 和盐度对精子的激活有直接影响<sup>[38]</sup>。因此外界因素如 pH、盐度和温度被认为在精子生理中起着关键作用。

盐度主要通过渗透压与离子浓度的变化改变精子中 ATP 酶的活力, 进而对精子活力产生影响<sup>[39]</sup>。研究表明赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)精子的适宜盐度范围在 15~35 之间, 与大亚湾海区亲鱼产卵期所对应的海水盐度 28~34.8 相符合<sup>[40]</sup>。圆斑星鲽(*Verasper variegatus*)精子活力的适宜盐度范围为 25~30, 与其繁殖栖息地的盐度相符合<sup>[41]</sup>。横带髭鲷精子的适盐范围广, 在盐度为 20~28 的条件下都能够进行激活。这也与其栖息地环境盐度范围相适应<sup>[42]</sup>, 说明精子激活的最适盐度与其繁殖期环境盐度密切相关。

根据研究分析, 绝大多数鱼类精浆偏碱性, 精子在中性或偏碱性的介质中活力及受精率均较高<sup>[43]</sup>。如细鳞斜颌鲷(*Xenocypris microlepis*)<sup>[44]</sup>精子在 pH 为 6.9 时激活率、运动时间及寿命均达到最高; 大黄鱼<sup>[45]</sup>精子在 pH 为 7.5~8.0 时, 精子的活动时间及寿命较长。本研究中, 横带髭鲷精子在 pH 为 7 时活力最好, 精子运动时间及精子寿命均达最长, 且 pH 在 6~11 范围均能够被激活, 且都具有一定的活力。这说明横带髭鲷精子对于酸性环境也具有一定的耐受性, 且对于 pH 的适应范围较广。由此可见, 横带髭鲷精子适宜的 pH

与其他硬骨鱼类有一定的差异。不同的鱼类精子的激活与运动的 pH 适应范围不同, 最适 pH 也有所差异, 这可能与不同鱼类的生理特性或者其生长繁殖环境相关。

精子的运动速率和运动期的持续时间, 受所在水温的影响。游泳介质的温度升高超过最佳温度会增加细胞新陈代谢, 导致速度增加, 能量资源迅速耗尽, 促进运动的早期停止<sup>[46]</sup>。横带髭鲷在温度为 20~22 °C 时, 精子活力最好, 高于或低于这个温度范围, 精子活力逐渐下降, 这与上述理论基本一致。韩英等<sup>[47]</sup>认为 ATP 酶的大量活化激活了精子运动, 温度能够通过影响 ATP 酶的活性, 进而影响精子的激活与运动。Lahnsteiner 等<sup>[48]</sup>认为能量供应和鞭毛运动酶的最佳温度与精子运动密切相关, 激活温度过低或过高都会对精子的活力产生影响。亲鱼在人工养殖过程中受到营养限制及养殖环境等因素的影响, 导致其相关性激素分泌异常, 从而影响其精子质量。因此, 开展横带髭鲷人工繁育时, 为提高成熟卵子的受精率, 使精子活力达到最佳, 受精时精子处于适宜条件下被激活, 精子活性增强, 可有效提高受精率。

## 参考文献:

- [1] Ping H L, Zhang T, Shi H L, et al. Morphometric characteristics of the embryonic and postembryonic development of belted beard grunts, *Hapalogrenys mucronatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28(3): 276-287. [平洪领, 张涛, 史会来, 等. 横带髭鲷早期生长发育特征[J]. 中国水产科学, 2021, 28(3): 276-287.]
- [2] Zhang T, Ping H L, Shi H L, et al. Analysis and evaluation of nutritional components in the muscle of different sizes of *Hapalogrenys mucronatus* of Zhoushan[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2020, 39(6): 502-508. [张涛, 平洪领, 史会来, 等. 舟山海域不同规格横带髭鲷营养成分分析及品质评价[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2020, 39(6): 502-508.]
- [3] Alavi S M H, Cosson J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: A review[J]. Cell Biology International, 2005, 29(2): 101-110.
- [4] Cosson J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa[J]. Aquaculture International, 2004, 12(1): 69-85.
- [5] França T S, Motta N C, Egger R C, et al. Impact of activation solutions on fresh and frozen-thawed sperm motility and fertilization success for two species of migratory freshwater fishes[J]. Theriogenology, 2020, 149: 6-15.
- [6] Billard R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species[J]. Reproduction Nutrition Développement, 1986, 26(4): 877-920.
- [7] Dzyuba B, Legendre M, Baroiller J F, et al. Sperm motility of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Effects of temperature on the swimming characteristics[J]. Animal Reproduction Science, 2019, 202: 65-72.
- [8] van Deurs B, Lastein U. Ultrastructure of the spermatozoa of the teleost *Pantodon buchholzi* Peters, with particular reference to the midpiece[J]. Journal of Ultrastructure Research, 1973, 42(5): 517-533.
- [9] Deng Y S, Lin H R. Advance in fishes sperm motility[J]. Life Science Research, 1999, 3(4): 271-278. [邓岳松, 林浩然. 鱼类精子活力研究进展[J]. 生命科学研究, 1999, 3(4): 271-278.]
- [10] Zhao F, Zhuang P, Zhang L Z, et al. Ultrastructure of the spermatozoon in *Pampus argenteus*[J]. Marine Fisheries, 2010, 32(4): 383-387. [赵峰, 庄平, 章龙珍, 等. 银鲳精子的超微结构[J]. 海洋渔业, 2010, 32(4): 383-387.]
- [11] Qiao Z G, Liu S Y, Shen F F. Ultrastructure of spermatozoon and effects of pH and temperature on spermatozoon motility in oriental sheatfish *Silurus asotus*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2016, 31(6): 602-606. [乔志刚, 刘淑琰, 沈方方. 鮰精子超微结构及 pH、温度对其精子活力的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2016, 31(6): 602-606.]
- [12] Sun J X, Chen S Y, Wang M L, et al. Ultrastructure of spermatozoon of *Anoplopoma fimbria*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2020, 40(6): 130-134. [孙静娴, 陈仕友, 王茂林, 等. 裸盖鱼精子超微结构[J]. 广东海洋大学学报, 2020, 40(6): 130-134.]
- [13] Zheng X B, Zhang Q K, Yue Y, et al. Scanning and transmission electron microscopic observation of spermatozoon in *Plecoglossus altivelis*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2018, 49(4): 866-872. [郑学斌, 张清科, 乐韵, 等. 香鱼(*Plecoglossus altivelis*)精子的超微结构及其与鲤形目及鲑形目其他鱼类精子结构的比较研究[J]. 海洋与湖沼, 2018, 49(4): 866-872.]
- [14] Yin H B, Sun Z W, Pan W Z, et al. Study on sperm ultrastructure of *Oncorhynchus keta*[C]// China Association of Agricultural Science Societies. Proceedings of the Agricultural Branch of the 2005 National Academic Annual Meeting of the Chinese Agricultural Society. Beijing: Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005: 26-28. [尹洪滨, 孙中武, 潘伟志, 等. 大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)精子

- 超微结构的研究[C]//中国农学会. 2005年全国学术年会农业分会场论文专集. 北京: 中国农学通报期刊社, 2005: 26-28.]
- [15] Zhao H H, Liu X C, Lin H R, et al. Ultrastructure of spermatozoa and effects of salinity, temperature and pH on spermatozoa motility in *Epinipheles cooides*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(4): 286-292. [赵会宏, 刘晓春, 林浩然, 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[J]. 中国水产科学, 2003, 10(4): 286-292.]
- [16] Zhang T, Liu L, Zhang J M, et al. Ultrastructure of spermatozoa and fertilized eggs of *Anguilla japonica* and observation on the fertilization process[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(4): 769-778. [张涛, 柳凌, 张洁明, 等. 日本鳗鲡精卵的超微结构以及受精过程观察[J]. 水生生物学报, 2010, 34(4): 769-778.]
- [17] Liu Y, Zhang X J. Types of sperm structure and corresponding types of ovum structure[J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 1992, 15(2): 168-174. [刘筠, 张轩杰. 鱼类精子结构和相应的卵子类型[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 1992, 15(2): 168-174.]
- [18] Liu X Z, Shi G, Wang R X. Ultrastructural changes in *Sparus macrocephalus* cells during spermatogenesis[J]. Marine Sciences, 2005, 29(10): 48-53. [刘雪珠, 石戈, 王日昕. 黑鲷精子发生过程中的超微结构变化[J]. 海洋科学, 2005, 29(10): 48-53.]
- [19] Gu W, Zhang Y Q, Hu G, et al. Scanning and transmission electron microscopic observation of spermatozoon in rainbow trout[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2014, 27(5): 24-27. [谷伟, 张永泉, 户国, 等. 虹鳟精子的扫描和透射电镜观察[J]. 水产学杂志, 2014, 27(5): 24-27.]
- [20] Li L, Hu F W, Wang X, et al. Ultrastructural observation on sperm of *Hexagrammos otakii*[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2016, 43(6): 287-290, 297. [李莉, 胡发文, 王雪, 等. 大泷六线鱼精子的超微结构观察[J]. 水产科技情报, 2016, 43(6): 287-290, 297.]
- [21] Zhang L Z, Zhuang P, Zhang T, et al. On the sperm-cell ultrastructure of Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii* [J]. Marine Fisheries, 2008, 30(3): 195-201. [章龙珍, 庄平, 张涛等. 史氏鲟精子超微结构[J]. 海洋渔业, 2008, 30(3): 195-201.]
- [22] Liu L P, Wang W, Zhao L L, et al. Ultrastructure of spermatozoa in *Pelteobagrus vachelli*[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2004, 13(3): 198-202. [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.]
- [23] Liu X Z, Yang W X. The fine structure of the spermatozoon of teleost *Rhabdosargus sarda* (Forskai)[J]. Donghai Marine Science, 2004, 22(1): 43-48. [刘雪珠, 杨万喜. 平鲷精子的超显微结构[J]. 东海海洋, 2004, 22(1): 43-48.]
- [24] Yin H B, Yin J S, Sun Z W, et al. Ultrastructure of the spermatozoon of *Hucho taimen*[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(1): 27-31. [尹洪滨, 尹家胜, 孙中武, 等. 哲罗鱼精子的超微结构[J]. 水产学报, 2008, 32(1): 27-31.]
- [25] Yin H B, Sun Z W, Yu B. Ultrastructure of spermatozoa of *Pseudobagrus ussuriensis*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2009, 29(6): 28-31. [尹洪滨, 孙中武, 于波. 乌苏里拟鲿(*Pseudobagrus ussuriensis*)精子的超微结构[J]. 广东海洋大学学报, 2009, 29(6): 28-31.]
- [26] Liu X Z, Yang W X. Recent progresses of study on spermatozoon structure of teleost and its application in reproductive evolution studies[J]. Donghai Marine Science, 2002, 20(3): 32-37. [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.]
- [27] Yang W X, Ying X P, Zhu J Q, et al. Spermatogenesis of teleost and its prospective application in the study of phylogenetic development[J]. Donghai Marine Science, 2000, 18(3): 53-58. [杨万喜, 应雪萍, 竺俊全, 等. 硬骨鱼类精子发生及其在系统演化研究中的应用前景[J]. 东海海洋, 2000, 18(3): 53-58.]
- [28] Hu M, Miao L, Li M Y, et al. Observation and comparison on the ultrastructure of the spermatozoon of *Nibea albiflora* and *Pseudosciaena crocea*[J]. Journal of Biology, 2014, 31(2): 1-4. [胡谋, 苗亮, 李明云, 等. 黄姑鱼(*Nibea albiflora*)与大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)精子超微结构的观察与比较[J]. 生物学杂志, 2014, 31(2): 1-4.]
- [29] Yu H T, Zhang X M, Chen C, et al. Changes in ultrastructures of *Takifugu rubripes* spermatozoa before and after cryopreservation[J]. Marine Sciences, 2007, 31(2): 17-19, 26. [于海涛, 张秀梅, 陈超, 等. 红鳍东方鲀精子超低温保存前后的超微结构观察[J]. 海洋科学, 2007, 31(2): 17-19, 26.]
- [30] Li F, Wan Q, Zhuang Y L, et al. Structure of *Myxocyprinus asiaticus* (Bleeker) spermatozoon[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2009, 36(2): 260-266. [李飞, 万全, 庄永龙, 等. 腮脂鱼精子结构研究[J]. 安徽农业大学学报, 2009, 36(2): 260-266.]
- [31] Li P. Studies on structure characteristics of spermatozoa of *Acipenser sinensis* and its sperm cryopreservation[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007. [厉萍. 中华鲟精子结构特征及其精液超低温冷冻保存技术研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.]
- [32] Wei G, Dai D L, Chen H H, et al. Ultrastructure of sperm of *Leiocassis longirostris*[J]. Sichuan Journal of Zoology, 1995,

- 14(2): 56-57. [魏刚, 戴大临, 陈怀辉, 等. 长吻鮈精子超微结构的观察[J]. 四川动物, 1995, 14(2): 56-57.]
- [33] Hu J H, Zhang Y Z, Fu C L, et al. Ultrastructure of rosy barb *Puntius conchonius* spermatozoon[J]. Acta Zoologica Sinica, 2005, 51(5): 892-897. [胡家会, 张永忠, 付崇罗, 等. 玫瑰无须鮈精子的超微结构[J]. 动物学报, 2005, 51(5): 892-897.]
- [34] You Y L, Lin D J. A study on the fine structure of the spermatozoon of teleost *Cyprinus carpio* (Linnaeus)[J]. Zoological Research, 1996, 17(4): 377-383. [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.]
- [35] Jiang S G, Li J E, Ou Y J, et al. Relationships between conditions for activating spermatozoa of four sparidae fishes and the fishes' ecological habits[J]. Acta Ecologica Sinica, 2000, 20(3): 468-473. [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.]
- [36] Zheng H, Zheng H, Tong Y Z, et al. Hydrological characteristics analysis in summer over the Taohua Island area area, Zhoushan[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2015, 34(5): 424-428. [郑衡, 郑红, 童元正, 等. 夏季舟山桃花岛海域水文特征分析[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2015, 34(5): 424-428.]
- [37] Dadras H, Dzyuba B, Cosson J, et al. Effect of water temperature on the physiology of fish spermatozoon function: A brief review[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(3): 729-740.
- [38] Magnotti C, Figueroa E, Farias J G, et al. Sperm characteristics of wild and captive lebranch mullet *Mugil liza* (Valenciennes, 1836), subjected to sperm activation in different pH and salinity conditions[J]. Animal Reproduction Science, 2018, 192: 164-170.
- [39] Morisawa S, Morisawa M. Induction of potential for sperm motility by bicarbonate and pH in Rainbow trout and Chum salmon[J]. The Journal of Experimental Biology, 1988, 136(1): 13-22.
- [40] Zhu Y T, Zhang M Q, Wu Y X, et al. Ultrastructure of spermatozoa and effects of environmental factors on spermatozoa motility of grouper *Epinephelus akaara*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2022, 53(6): 1523-1530. [朱雅婷, 张明清, 吴好萃, 等. 赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)精子超微结构及环境因子对精子活力的影响[J]. 海洋与湖沼, 2022, 53(6): 1523-1530.]
- [41] Xu Y J, Wang Y Y, Chen X Z, et al. Influence of environmental factors on sperm activity of *Verasper variegatus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(4): 21-26. [徐永江, 王妍妍, 陈学周, 等. 环境因子对圆斑星鲽精子活力的影响[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(4): 21-26.]
- [42] Fan L M, Liu P X, Gu Y Z, et al. Hydrological characteristics in the Zhoushan sea area in summer[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2020, 59(S1): 1-11. [范黎明, 刘鹏霞, 顾艳镇, 等. 夏季舟山海域水文特征分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2020, 59(S1): 1-11.]
- [43] Kowalski R K, Cejko B I. Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors[J]. Theriogenology, 2019, 135: 94-108.
- [44] Xu W T, Dai H P, Cheng S, et al. Observation the sperm motility of *Plagionathops microlepis*[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2013, 32(4): 309-314. [徐万土, 戴海平, 程顺, 等. 细鳞斜颌鲷精子活力观察[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2013, 32(4): 309-314.]
- [45] Zhu D F, Cheng Y X, Wang C L, et al. Effects of environmental factors on the vitality of sperm in large yellow croaker *Pseudosiaena crocea*[J]. Fisheries Science, 2005, 24(12): 4-6. [朱冬发, 成永旭, 王春琳, 等. 环境因子对大黄鱼精子活力的影响[J]. 水产科学, 2005, 24(12): 4-6.]
- [46] Dadras H, Dzyuba B, Cosson J, et al. Effect of water temperature on the physiology of fish spermatozoon function: A brief review[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(3): 729-740.
- [47] Han Y, Zhang L L, Xu G F, et al. Observation the sperm motility of Amur Grayling[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2008, 21(1): 9-14. [韩英, 张澜澜, 徐革峰, 等. 黑龙江茴鱼(*Thymallus arcticus grubei* Dybowsky)精子活力的观察[J]. 水产学杂志, 2008, 21(1): 9-14.]
- [48] Lahnsteiner F, Mansour N. The effect of temperature on sperm motility and enzymatic activity in brown trout *Salmo trutta*, burbot *Lota lota* and grayling *Thymallus thymallus*[J]. Journal of Fish Biology, 2012, 81(1): 197-209.

## Ultrastructure and physiological characteristics of sperm in *Hapalogenys mucronatus*

LIN Hui<sup>1</sup>, SHI Huilai<sup>2</sup>, ZHANG Tao<sup>2</sup>, PING Hongling<sup>2</sup>, ZOU Jinghua<sup>1</sup>, YANG Shuyue<sup>1</sup>

1. Zhejiang Ocean University, Zhejiang Marine Fisheries Research Institute, Zhoushan 316021, China;

2. Zhejiang Province Key Laboratory of Mariculture and Enhancement, Zhejiang Marine Fisheries Research Institute, Zhoushan 316021, China

**Abstract:** To explore the sperm morphology and physiological characteristics of *Hapalogenys mucronatus* and enhance the fertilization rate of artificial reproduction, sperm structure was observed using scanning electron microscopy and transmission electron microscopy under varying gradients of salinity, pH, and temperature. Our aim was to investigate the relationship between the rapid movement time, life span, and environmental factors of *H. mucronatus* sperm. The results showed that the sperm of *H. mucronatus* consisted of three parts: the head, middle part, and flagella. The head of the sperm was nearly spherical or ellipsoidal, with a diameter of  $(1.56 \pm 0.05)$   $\mu\text{m}$ . Chromatin in the nucleus was highly concentrated, and the nuclear membrane was close to the plasma membrane without the acrosome. The middle part was mainly composed of a sleeve cavity and a centriole complex. The flagellum is slender and has lateral fins, which is a typical “9+2” microtubule structure. The suitable salinity range for *Hapalogenys mucronatus* sperm was 22–28, and the sperm lifespan reached a maximum value of 425 s when the salinity was 26. The optimum pH range was 7–10. Sperm motility was the strongest at pH 7, and sperm lifespan reached a maximum of 430 s. The suitable temperature range is 18–26 °C, and the longest sperm life is 427 s when the water temperature is 22 °C. It is suggested that the optimum water environment conditions for the fertilization of eggs and sperm of *H. mucronatus* are salinity 24–26, temperature 20–22 °C, and pH 7–8.

**Key words:** *Hapalogenys mucronatus*; sperm; ultrastructure; environmental factors; sperm viability

**Corresponding author:** PING Hongling. E-mail: pinghongling@126.com