

杂色鲍精巢显微和超微结构的研究

石敏, 李海云, 温山鸿, 李娜

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:通过光镜、扫描与透射电镜技术对杂色鲍精巢的显微及超微结构进行研究。结果表明:精巢由精滤泡组成,滤泡中央为结缔组织小梁。精原细胞分布于小梁边缘;初级精母细胞、次级精母细胞和精子细胞离小梁较远,散乱分布。精子头部呈短子弹头状。苏木精伊红染色,精子顶体强嗜酸性,为红色,核嗜碱性,为蓝色,尾部难着色,高倍镜下为丝状。精子表面不光滑。头部可见顶体和致密的核及其共同形成的顶体下腔,核中有染色质缺失的空泡结构,核后是4~5个线粒体围绕中心粒形成的略为膨大的颈部。鞭毛轴丝为典型的“9+2”结构。

关键词:杂色鲍; 精巢; 显微结构; 超微结构

中图分类号: S944.45; Q246; Q247

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2007)04-0082-05

Studies on Microstructure and Ultrastructure of Testes of *Haliotis diversicolor*

SHI Min, LI Hai-yun, WEN Shan-hong, LI Na

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Microstructure and ultrastructure of testes of *Haliotis diversicolor* was studied by light microscope, scanning electron microscope and transmission electron microscope. The results showed that under light microscope the testes were composed of follicles, the central of follicles were connective tissue trabeculae. Spermatogonia distributed around trabeculae; Primary spermatocytes, secondary spermatocytes and spermatids were distributed relatively far away from trabeculae, all of which were not distinguishable from their position under light microscope; The head of spermatozoa was short bullet-like with the acrosome highly acidophilic, which was stained red by hematoxylin-eosin (HE), while the nucleus was basophilic and stained blue by HE. The tail was hardly to be dyed and appeared filiform. The surfaces of spermatozoa were more or less not smooth under scanning electron microscope. Under transmission electron microscope, the acrosome and compact nucleus could be seen, both of which formed subacrosomal space. There were vacuous chromoplasm places in the nucleus. Behind the nucleus the neck was a bit expanded, which composed of four to five mitochondria around a pair of centrioles. The axoneme of the tail was typical “9 + 2” structure.

Key words: *Haliotis diversicolor*; testes; microstructure; ultrastructure

杂色鲍 *Haliotis diversicolor*, 隶属腹足纲 Gastropoda、鲍科 Haliotidae、鲍属 *Haliotis*, 是我国南方沿海暖水重要经济贝类之一。有关鲍性腺方面的研

收稿日期: 2006-12-08

作者简介: 石敏(1981—), 女, 硕士研究生; 通讯作者: 李海云(1966—), 女, 教授, 博士, E-mail: hyl@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金(032248); 华南农业大学大型仪器使用基金

研究工作,国内外都有一些报道.如国内对皱纹盘鲍 *H. discus hannai* 的精巢结构、精子形态及多倍体性腺发育等进行了报道^[1-4]. 国外近年主要对皱纹盘鲍生殖腺的形成与分化成熟^[5],以及环境污染物——海洋渔业防脏底油漆内的化学物质对巨型鲍 *Haliotis madaka*、罗氏鲍 *Haliotis roei* 等繁殖周期的扰乱,导致卵巢出现精子的兼性性腺特征等进行报道^[6-7]. 对杂色鲍生殖腺的研究主要是比较了九孔鲍 *Haliotis diversicolor supertexta*、皱纹盘鲍及盘鲍 *H. discus discus* 精子的超微结构^[8]. 对杂色鲍精巢显微及超微结构的研究,可在分类学、繁殖生物学方面提供一定的形态学依据.

1 材料与方法

杂色鲍于2006年6月购自广州黄沙水产市场,择雄性鲍,壳长5.9~6.6 cm,壳宽4.0~4.5 cm.

石蜡切片样品的制备:取精巢,用 $\varphi = 10\%$ 中性福尔马林固定,石蜡包埋,A0820切片机制片,切片厚 $5\ \mu\text{m}$,Harris苏木素-伊红染色,光镜观察并拍照.

扫描电镜样品的制备:取精巢,在 $0.1\ \text{mol/L}$ 磷酸缓冲液中快速漂洗3次,然后迅速放入 $4\ ^\circ\text{C}$ 的 $\varphi = 2.5\%$ 戊二醛前固定4 h以上,再经 $4\ ^\circ\text{C}$ 的 $0.1\ \text{g/L}$ 锇酸后固定1 h, $\varphi = 2.5\%$ 戊二醛和 $0.1\ \text{g/L}$ 锇酸都用 $\text{pH}7.4$ 的 $0.2\ \text{mol/L}$ 磷酸缓冲液配制,双固定后经 $0.1\ \text{mol/L}$ 磷酸缓冲液漂洗3次,梯度酒精脱水,HCP-2临界点干燥,IB-5离子溅射仪喷镀,FEI-XL30环境扫描电子显微镜下观察拍照.

透射电镜样品的制备:取精巢,双固定方法与扫描样品制备相同,后经 $0.1\ \text{mol/L}$ 磷酸缓冲液漂洗6次,梯度酒精脱水,Epon812环氧树脂包埋,Leica UCT超薄切片机制片,厚度 $90\ \text{nm}$,经醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,FEI-Tecanai 12分析型透射电子显微镜观察并拍照.

2 结果

2.1 精巢的形态与组织结构

杂色鲍精巢覆盖着近壳面的消化腺和内脏团,一般为淡黄或乳白色,随成熟程度而有变化.精巢外膜由浆膜、平滑肌及结缔组织构成.精巢实质呈现为

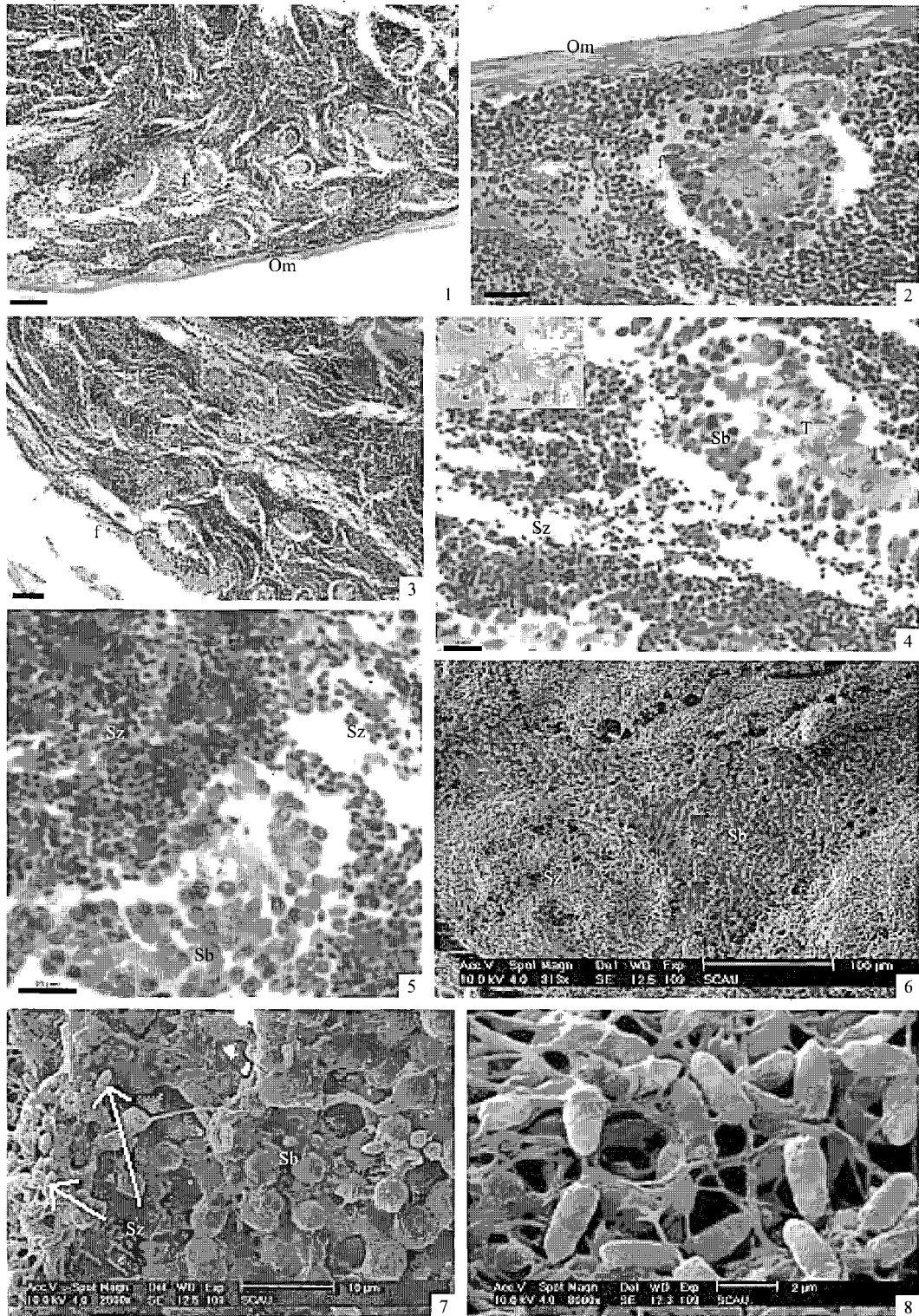
一个个不规则的滤泡状,结缔组织伸向精巢实质成为滤泡中央的小梁(图 I-1). 随精巢的成熟度增加,结缔组织减少,滤泡发达(图 I-2,3),部分排放或排放完精子的精巢,结缔组织小梁明显(图 I-3). 精原细胞分布于小梁边缘,初级精母细胞、次级精母细胞和精子细胞离小梁较远,散乱分布,光镜下不能区分,结缔组织小梁中可见形状不规则的营养细胞(或称支持细胞),苏木精-伊红染色,精子顶体强嗜酸性,为红色,核嗜碱性,为蓝色,尾部难着色(图 I-4 左上角插图,图 I-5).

2.2 精巢的超微结构

扫描电镜下,结缔组织小梁间腔内布满精子,间腔外围分布各种球状大小不等的成精细胞(图 I-6,7). 成熟的精子可分为头和尾两部分. 头部呈短子弹头状,直径约为 $0.5\sim 1.0\ \mu\text{m}$,其后端为略膨大的颈部,精子尾部细长线状(图 I-8).

透射电镜下,精原细胞靠近小梁周围、初级精母细胞、次级精母细胞排列不规则、精子细胞向小梁间腔排列,精巢结缔组织小梁处偶尔可观察到巨大的支持细胞(或称为营养细胞)(图 II-1). 通常一个滤泡断面只有少数发育期的成精细胞. 精子细胞向精子的形变过程包括:精子细胞核浓缩变形,最终成为短棒状,高尔基体与粗面内质网不断变形,成为帽状顶体覆盖在细胞核的顶端(图 II-2 右上插图). 与此同时线粒体移位至中心粒周围,形成略为膨大的颈部,鞭毛由中心粒发出,最后形成精子(图 II-3).

成熟精子头部长约 $4.0\sim 4.5\ \mu\text{m}$,外部细胞膜不规则波状起伏(图 II-4,5). 顶体呈圆锥状,顶端电子密度较高,基部电子密度较低且均匀(图 II-5). 顶体后端与细胞核前部的凹陷共同形成了圆塔式的顶体下腔. 头部正中剖面可见顶体下腔可及顶体最前端(图 II-4 右上插图). 短棒状的细胞核长约 $1.0\sim 1.5\ \mu\text{m}$,宽约 $0.5\sim 1.0\ \mu\text{m}$,核内染色质电子密度高,但在很多切面中,发现染色质缺失的电子透明区(图 II-5). 颈膨大是由4~5个线粒体和中央的中心粒构成. 线粒体围绕中心粒如花朵开放,线粒体内嵴十分明显(图 II-4 左上插图). 由中心粒发出的鞭毛轴丝为典型的“9+2”排列的微管结构(图 II-5 右上插图).

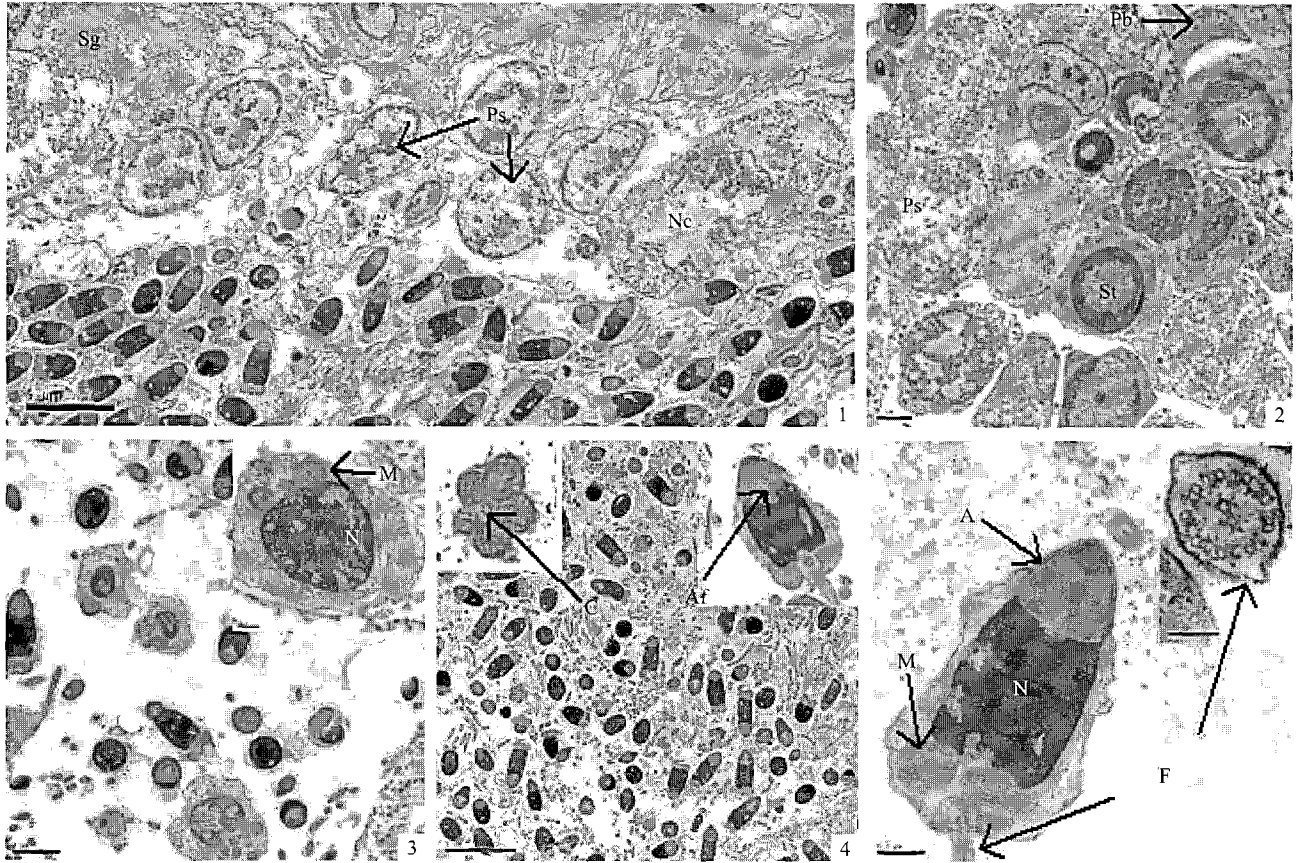


f: 滤泡; Om: 外膜; Sb: 成精细胞; Sz: 精子; T: 结缔组织小梁
 1: 精巢切片 (标尺 = 50 μm); 2: 精巢切片放大示一个滤泡及精巢外膜 (标尺 = 10 μm); 3: 部分精子排放后的精巢 (标尺 = 50 μm); 4: 各级成精细胞及精子 (标尺 = 10 μm); 5: 结缔组织小梁周围示精子发生 (标尺 = 10 μm); 6: 扫描电镜下成精细胞及精子 (标尺 = 100 μm); 7: 图6局部放大 (标尺 = 10 μm); 8: 扫描电镜下的精子 (标尺 = 2 μm)

f: follicle; Om: outer-membrane; Sb: spermoblast; Sz: spermatozoa. T: connective tissue trabeculae
 1: section of the testes (bar = 50 μm); 2: magnification of testes section to show a follicle and outer-membrane of testes (bar = 10 μm); 3: testes after partially spermiation (bar = 50 μm); 4: a follicle undergoes spermatogenesis and spermatozoa (bar = 10 μm); 5: spermatogenesis around a connective tissue trabeculae (bar = 10 μm); 6: spermoblast and spermatozoa under SEM (bar = 100 μm); 7: magnification of part of fig 6 (bar = 20 μm); 8: spermatozoa under SEM (bar = 2 μm)

图 I 精巢光镜及扫描电镜图

Fig. I Testes pictures of light microscope and scanning electron microscope



A: 顶体; Af: 顶体凹陷; C: 中心粒; F: 鞭毛; M: 线粒体; N: 核; Nc: 营养细胞; Pb: 顶体前体; Ps: 初级精母细胞; Sg: 精原细胞; St: 精子细胞
 1: 结缔组织小梁周围示精子发生 (标尺 = 5 μm); 2: 精子细胞形变初期 (标尺 = 2 μm); 3: 精子细胞形变晚期及已形成的精子 (标尺 = 2 μm);
 4: 精子不同部位的纵、横、斜切面 (标尺 = 5 μm); 5: 精子放大 (标尺 = 0.5 μm)

A : acrosome; Af: acrosomal fossa; C: centriole; F: flagellum; M: mitochondrion; N: nucleus; Nc: nutrition cell; Pb: proacrosomal body; Ps: primary spermatocyte; Sg: spermatogonium; St: spermatid

1: a part place shows spermatogenesis around a connective tissue trabecula (bar = 5 μm); 2: initial stage of spermatid deformation (bar = 2 μm); 3: advanced stage of spermatid deformation and formed spermatozoa (bar = 2 μm); 4: cross, longitudinal, and oblique sections of different regions of the spermatozoa (bar = 5 μm); 5: magnification of the head of a spermatozoon (bar = 0.5 μm)

图 II 精巢透射电镜图

Fig. II Testes pictures of transmission electron microscope

3 讨论

3.1 杂色鲍精巢结构的特点

杂色鲍的精巢实质由被膜结缔组织内伸成为小梁,各级成精细胞围绕着结缔组织小梁共同构成一个个并不规则的滤泡. 精原细胞以基膜连接在小梁上,不同发育阶段的成精细胞逐渐远离滤泡中央小梁,精子则位于滤泡边缘. 这样的结构与其他脊椎动物及大多数无脊椎动物形成生精小管(生精小叶、生精壶腹)的精巢结构不一样,与双壳类软体动物的精巢结构刚好相反,双壳类软体动物的雄性滤泡紧靠滤泡壁的是精原细胞,不同发育阶段的成精细胞逐渐向滤泡腔推进,填充滤泡腔隙. 到发育晚期,滤泡腔内充满成熟精子,精子头部朝向滤泡壁,尾部向滤泡腔^[9]. 杂色鲍精巢的结构与皱纹盘鲍精巢结构相

近,但其成精细胞没有明显的不同成熟度的生殖带,而是略为混杂;杂色鲍的精巢中有支持细胞(营养细胞)存在,而皱纹盘鲍精巢未见类似细胞^[3]. 国外学者在对羊鲍 *Haliotis ovina* 精巢的精子发生研究中,将成精细胞分为 13 期:精原细胞、5 期初级精母细胞、次级精母细胞、5 期精子细胞及精子,但却没有足够清晰的图片作为依据^[10]. 在本研究中,只能确定染色质较多的精原细胞、有同源染色体配对的初级精母细胞,体积最小的精子细胞及其形变过程. 至于减数分裂过程的详细分期在形态上不易区分,若借助原位杂交方法显示染色体状况,可能会对此有所帮助.

3.2 鲍精子结构的系统学意义

软体动物的精子,头部顶体的存在与否、来源和形态结构的差异,顶体内部轴棒等特殊结构的存

与否,精核的形态结构差异,核前凹和核后凹的存在与否及其深浅,精子中段线粒体的数目及排列方式、线粒体鞘的存在与否,尾部结构的复杂程度等都可作为属、种的分类依据^[11-15]。

杂色鲍精子顶体呈圆锥状而皱纹盘鲍和盘鲍则为圆柱状。杂色鲍和皱纹盘鲍顶体内容物由2种电子密度不同的部分组成,而盘鲍则密度较为均一。从顶体下腔正中剖面的相对凹陷深度来看,杂色鲍大于皱纹盘鲍和盘鲍;杂色鲍顶体后的细胞核呈短棒状,长宽比例明显小于2,而九孔鲍、皱纹盘鲍、盘鲍精子核的长宽比均大于2^[8];杂色鲍精子颈部的膨大由4~5个圆形或椭圆形线粒体和一对中心粒构成,九孔鲍、皱纹盘鲍颈部则有5~6个线粒体,盘鲍颈部有5个线粒体,尾部鞭毛轴丝都为“9+2”排列的微管结构。鲍是同属动物,它们精子的结构有一些共同点,但各种鲍精子在微形态结构上仍存在一些差异。

致谢:本研究工作得到华南农业大学伦璇、杨秉耀、李玉谷、黄志君等老师的热情指导,叶远兰、叶万树等同学的大力帮助,在此致以诚挚感谢!

参考文献:

- [1] 包振民,胡景杰,姜明,等. 皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)精子的超微结构[J]. 青岛海洋大学学报, 1998,28(2):283-287.
- [2] 阎松,李霞,张国范. 二倍体和三倍体皱纹盘鲍精子发生过程的超微结构[J]. 水产学报,2005,29(3):289-295.
- [3] 崔龙波,周雪莹,陆瑶华. 皱纹盘鲍精巢及精子结构的研究[J]. 烟台大学学报:自然科学与工程版,2000,13(2):103-107.
- [4] 李霞,阎松,张国范,等. 三倍体皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)性腺发育的生物学研究[J]. 海洋与湖沼, 2004,35(1):84-88.
- [5] MASAHIKO A, KAORU H. Gonad formation, sex differentiation gonad maturation processes in artificially produced juveniles of the abalone, *Haliotis discus hannai*[J]. Aquaculture,2004,239:397-411.
- [6] SARA S, MARTHE M G. Intersex in Roe's abalone (*Haliotis roei*) in Western Australia[J]. Marine Pollution Bulletin,2004,49:1122-1126.
- [7] TOSHIHIRO H, MITSUHIRO K, NAOYUKI T. Continuing observation of disturbed reproductive cycle and ovarian spermatogenesis in the giant abalone, *Haliotis madaka* from an organotin-contaminated site of Japan[J]. Marine Pollution Bulletin,2005,51:817-822.
- [8] 柯才煊,周时强,田越,等. 三种鲍精子超微结构的比较[J]. 海洋学报,2003,25(3):138-142.
- [9] 李霞. 水产动物组织胚胎学[M]. 北京:中国农业出版社,2006:83-104.
- [10] SINGHAKAEW S, SEEHABUTR V, KRUAETRACHUE M. Ultrastructure of male germ cells in the testes of abalone, *Haliotis ovina* Gmelin [J]. Molluscan Research, 2003,23(2):109-121.
- [11] 应雪萍,姜乃澄,杨万喜. 泥螺精子发生的超微结构研究[J]. 动物研究,2002,23(5):400-404.
- [12] 焦海峰,尤仲杰,竺俊全. 软体动物精子的超微结构及其分类学意义[J]. 宁波大学学报:理工版,2004,17(4):414-417.
- [13] 竺俊全,杨万喜,焦海峰. 疣荔枝螺精子的超微结构[J]. 水产学报,2005,29(5):643-648.
- [14] 竺俊全,杨万喜. 角蝶螺精子的超微结构[J]. 浙江大学学报:理学版,2005,32(6):685-690.
- [15] 侯林,高岩,邹向阳,等. 香螺精子发生及精子超微结构[J]. 动物学报,2006,52(4):746-754.

【责任编辑 柴 焰】