

北方山溪鲵精子发生不同阶段的显微与超微结构

王宏元 张育辉*

(陕西师范大学生命科学院 西安 710062)

摘要:用光镜和电镜观察了北方山溪鲵 (*Batrachuperus tibetanus*) 精子发生过程中各种类型生精细胞的显微与超微结构变化。结果显示, 北方山溪鲵在 4~8 月时处于精子发生期, 精子形成在 7~8 月。成熟精子的结构具有小鲵科精子的一些共同特征, 如顶体前端呈三叶草状, 尾部由轴纤维、波动膜、轴丝及轴丝旁纤维构成, 轴纤维粗大呈圆柱形, 尾部无线粒体等。比较分析认为, 在两栖类的系统发育中, 轴纤维、波动膜和轴丝旁纤维的消失为近裔性状。

关键词: 北方山溪鲵; 精子发生; 显微结构; 超微结构

中图分类号: Q954 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2007)05-136-05

Spermatogenesis in Stream Salamander *Batrachuperus tibetanus*: Light Microscopy and Electronic Microscopy Studies

WANG Hong-Yuan ZHANG Yu-Hui*

(College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: Microstructure and ultrastructure of different stage spermatogenic cells in Stream Salamander *Batrachuperus tibetanus* were observed. The results show that spermatogenesis occurs during April through August and spermiogenesis occurs from July to August. The structure of spermatozoa possesses the common features of the Hynobiidae spermatozoa. The transverse section of the acrosomal vesicle is trifoliate. The tail of the spermatozoa is composed of the juxta-axonemal fibre, axoneme, axial fibre and undulating membrane. It can be concluded that the loss of axial fibre and undulating membrane is the evolution features in the amphibian phylogeny.

Key words: *Batrachuperus tibetanus*; Spermatogenesis; Microstructure; Ultrastructure

北方山溪鲵 (*Batrachuperus tibetanus*) 属有尾目 (Urodela) 小鲵科 (Hynobiidae), 生活在较高海拔的山区溪流中。北方山溪鲵有重要的药用价值, 是我国珍稀的经济两栖动物。徐剑等对其繁殖生态和分类地位进行了报道^[1,2]。王宏元等对北方山溪鲵精巢结构的季节变化进行了形态学研究^[3,4], 但有关其生精细胞的发育未见报道。本研究通过光镜和电镜观察了北方山溪鲵精巢中不同发育阶段生精细胞的显微和超微结构, 旨在为北方山溪鲵繁殖生物学及保护生物学积累资料, 并为有尾目系统分类研究提供精子形态学方面的证据。

1 材料与方法

1.1 材料 采用北方山溪鲵雄性成体共 18 尾, 体重 18~34 g。于 2004 年 3~8 月采自西安市周至县板房子河的高山溪流中, 每月采集 3 例, 采集地位于东经 107°58'15", 北纬 33°47'03",

基金项目 陕西省自然科学基金项目 (No. 2001SM26), 陕西师范大学校青年基金项目;

* 通讯作者, E-mail: yu-huizhang@163.com;

第一作者介绍 王宏元, 男, 讲师; 研究方向: 动物生殖与发育; E-mail: hongyuanwang@snnu.edu.cn;

收稿日期: 2007-01-30, 修回日期: 2007-07-03

海拔 1 600 ~ 2 000 m。

1.2 光镜样品的制备 对北方山溪鲵乙醚麻醉后进行解剖,取出精巢,置 Bouins 液固定。常规方法制备石蜡切片,切片厚度为 5 ~ 8 μm , H.E 染色。用 Leica 2 型光学显微镜观察,并用 Leica Qwin V 3 图像系统摄像。

1.3 电镜样品制备 将取出的精巢迅速切成 1 mm^3 的小块,置于体积分数 3% 的戊二醛磷酸缓冲液中固定 3 h,再置于体积分数 1% 的锇酸溶液中后固定 30 min,常规脱水, Epon 812 包埋。超薄切片机切片,切片厚度为 50 nm。将切片用醋酸双氧铀-枸橼酸铅双染后,在日立 H-600 型电子透射显微镜下观察、摄像。

2 结 果

在北方山溪鲵的生精小叶内,支持细胞包绕生精细胞构成生精小囊(spermatogenic cyst)。生精小囊是生精小叶内的基本结构单位。

2.1 精原细胞 在 3 ~ 5 月的精巢中,一个生精小囊内有 6 或 7 个精原细胞,被一个支持细胞所包围(图版 I:1)。精原细胞直径约 15 ~ 16 μm ;细胞核不规则,直径 10 ~ 12 μm 。电镜观察显示,精原细胞的胞核内异染色质较多,呈团块状,散在分布于核内(图版 II:1)。精原细胞的胞质较少,含少量的脂滴,成堆的线粒体位于细胞核一侧(图版 II:2)。同一生精小囊内的精原细胞之间通过桥粒连接(图版 II:3)。

2.2 精母细胞 6 月,精巢中的精原细胞分化为初级精母细胞。光镜下可见一个生精小囊内包被 20 ~ 30 个初级精母细胞(图版 I:2)。初级精母细胞直径约 18 μm ,细胞核直径为 14 ~ 15 μm 。当初级精母细胞进入第一次成熟分裂期时,在同一生精小囊内,生精细胞所处的分裂时相相同。在不同的生精小囊中,精母细胞所处的分裂时相则不同,其胞核形态多样,分别处于细线期、偶线期、粗线期和终变期等(图版 I:3)。次级精母细胞的体积较初级精母细胞小,细胞直径约 13 μm (图版 I:4)。

2.3 精子细胞 7 月,在精巢中,早期精子细胞的胞核呈球形,有少量胞质。光镜下可见一

个生精小囊内有 80 ~ 100 个精子细胞(图版 I:5)。细胞直径约 10 ~ 11 μm ,胞核 7 ~ 8 μm 。电镜观察显示,精子细胞的细胞核内异染色质较多,紧贴在核膜下,胞质内有成群的线粒体(图版 II:4)。细胞核内的染色质由颗粒状逐渐浓缩。在细胞核的一端出现顶体,其附近有发达的高尔基复合体(图版 II:5)。随着精子形成的开始,精子细胞圆形胞核延伸变长,变为长锥形,近而成细线形(图版 I:6,7)。末期的精子细胞核变成细长的圆杆状,其中染色质的电子密度很高(图版 II:6)。

2.4 精子 8 月,在精巢生精小叶内,有大量成簇排列的成熟精子。精子外形细长,可分为头部和尾部(图版 I:8)。头部呈长杆状,长约 65 μm ;尾部呈细丝状,长约 125 μm 。杆状的头部着色较深,平行排列成簇;尾部着色较浅,排列较散乱。电镜观察显示,其头部呈三叶草状的结构,其周围有丢弃的胞质(图版 II:7)。尾部由轴纤维、波动膜、轴丝和轴丝旁纤维(juxta-axonemal fibre) 4 部分构成。轴纤维与精子的长轴平行,比较粗大,电子密度较高。轴丝与颈部的远端中心粒后端相连,其中微管排列为典型的“9 + 2”结构。在轴丝的一侧,与其平行排列的一条致密纤维,为轴丝旁纤维。在轴丝和轴纤维之间,有膜样结构的波动膜(图版 II:8,9)。

3 讨 论

本观察结果显示,北方山溪鲵精子的结构具有小鲵科精子的一些共同特征,如顶体前端呈三叶草状,尾部由轴纤维、波动膜、轴丝和轴丝旁纤维构成,轴纤维粗大呈圆柱形,尾部无线粒体等。而在蝶螈科、钝口螈科和无肺螈科等科物种的精子尾部中,轴纤维较细,中段呈马蹄形,主段为三叶草形,线粒体位于精子尾部^[5,6]。郑中华等发现在龙洞山溪鲵(*B. longdongensis*)精子头部的胞质小团内有线粒体,认为这些线粒体可以为精子活动提供能量^[7]。在北方山溪鲵精子头部周围也可见胞质小团,但在胞质小团中没有观察到线粒体。推测这些胞质小团可能是精子在成熟过程中丢弃的,并不是为精子

提供能量的。因为山溪鲵精子在精巢中需要贮藏 5~6 个月,在此期间所观察到的精子不是严格意义上的成熟精子^[1]。小鲵科和隐鳃鲵科物种为体外受精,而蝾螈科、无肺鲵科、钝口鲵科等其余各科物种为体内受精。郑中华等据此认为在有尾类体外受精的物种中,线粒体位于精子的头部,而体内受精物种的线粒体则位于精子的尾部^[7]。然而,中华大蟾蜍 (*Bufo bufo gargarizans*)、刀齿泽蟾 (*Odontophrynus cultripes*) 等无尾两栖类动物均为体外受精,精子中线粒体均位于尾部^[8,9]。因此,线粒体所在的部位是否与动物的受精类型相关,仍需探讨。

北方山溪鲵精子的尾部有两条附属纤维 (accessory fiber), 一条为轴丝旁纤维,靠近轴丝,与轴丝并列;另一条为轴纤维,在轴丝的另一侧,远离轴丝。轴纤维与轴丝之间以波动膜相连。刀齿泽蟾成熟精子的尾部也由轴丝、轴纤维和波动膜三部分组成,称之为 AMR 复合体^[8]。山溪鲵精子尾部的轴丝旁纤维与轴纤维在位置上分列于轴丝两侧,发达的轴纤维一直延伸到精子尾部的末端,轴丝旁纤维则不很发达,与轴丝的第八组二联微管相临近。中华大蟾蜍、刀齿泽蟾的轴丝旁纤维和轴纤维均位于轴丝的一侧,轴丝旁纤维与轴丝的第三组微管毗邻^[8,9]。所以,从精子尾部结构上比较,山溪鲵与蟾蜍等无尾目物种的精子存在较明显的差异。中国雨蛙 (*Hyla chinensis*) 精子尾部具有轴丝和轴丝旁纤维^[10]。蛙科精子的尾部则只有轴丝,没有轴纤维,也不具有波动膜^[11]。依据

结构分析两栖类精子的系统发育,轴纤维、波动膜,以及轴丝旁纤维的消失为近裔性状。

参 考 文 献

- [1] 徐剑. 西藏山溪鲵生殖腺的季节变化. 动物学杂志, 1995, 30(3): 47~49.
- [2] 徐剑. 我国小鲵科几个属分类问题的探讨. 中山大学学报(自然科学版), 2002, 41(1): 79~81.
- [3] 王宏元, 张育辉. 北方山溪鲵精巢显微结构的年周期变化. 动物学研究, 2004, 25(6): 484~490.
- [4] 王宏元, 王小平, 张育辉等. 北方山溪鲵精巢生精小叶与间质区在繁殖周期中的显微结构变化. 动物学杂志, 2005, 40(3): 72~76.
- [5] Selmi M G, Brizzi R, Bigliardi E. Sperm morphology of salamandrids (Amphibia, Urodela): implications for phylogeny and fertilization biology. *Tissue Cell*, 1997, 29(6): 651~664.
- [6] Kuramoto M, Tanaka S. Sperm morphology of *Ehinotriton andersoni* (Caudata: Salamandridae). *Amphibia Reptilia*, 1997, 18(3): 308~313.
- [7] 郑中华, 江建平, 谢锋. 龙洞山溪鲵精子的超微结构. 动物学报, 2005, 51(4): 703~709.
- [8] Bao S N, Dalton G C, Oliverira S F. Spermiogenesis in *Odontophrynus cultripes* (Amphibia Anura Leptodactylidae): ultrastructural and cytochemical studies of proteins using E-PTA. *J Morphol*, 1991, 45: 307~314.
- [9] 莫慧英. 黑斑蛙和中华大蟾蜍精子的超微结构研究. 动物学研究, 1985, 6(4): 381~390.
- [10] 林丹军, 尤永隆, 钟秀容. 中国雨蛙精子结构及其在系统发育上的意义. 动物学研究, 1999, 20(3): 161~167.
- [11] Lee M S Y, Jamieson B G M. The ultrastructure of the spermatozoa of three species of myobatrachid frogs (Anura, Amphibia) with phylogenetic considerations. *Acta Zool*, 1992, 73: 213~222.

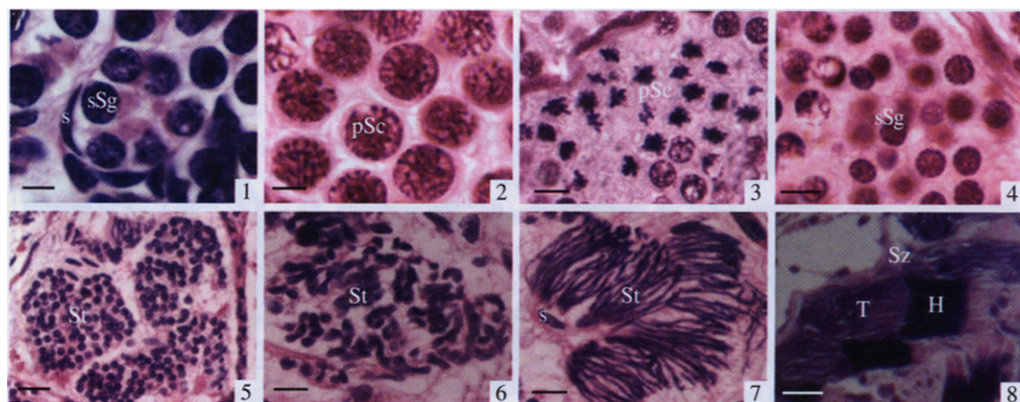
王宏元等:北方山溪鲵精子发生不同阶段的显微与超微结构

图版 I

WANG Hong-Yuan *et al.*: Spermatogenesis in Stream Salamander *Batrachuperus tibetanus*:

Light Microscopy and Electronic Microscopy Studies

Plate I



1. 精原细胞 (bar = 10 μm , $\times 400$); 2. 初级精母细胞处于双线期 (bar = 10 μm , $\times 400$); 3. 初级精母细胞, 箭头示精母细胞处于分裂中期 (bar = 20 μm , $\times 200$); 4. 次级精母细胞 (bar = 10 μm , $\times 400$); 5. 圆形的精子细胞 (bar = 40 μm , $\times 100$); 6. 锥形的精子细胞 (bar = 40 μm , $\times 100$); 7. 线性的精子细胞 (bar = 40 μm , $\times 100$); 8. 精子 (bar = 40 μm , $\times 100$)。

1. Spermatogonia (bar = 10 μm , $\times 400$); 2. Primary spermatocyte at diplotene stage (bar = 10 μm , $\times 400$); 3. Primary spermatocyte at metaphase stage (bar = 20 μm , $\times 200$); 4. Secondary spermatocyte (bar = 10 μm , $\times 400$); 5. Round spermatid (bar = 40 μm , $\times 100$); 6. Cone-shaped spermatid (bar = 40 μm , $\times 100$); 7. Linear spermatid (bar = 40 μm , $\times 100$); 8. Spermatozoa (bar = 40 μm , $\times 100$).

s: 支持细胞 Sertoli cell; St: 精子细胞 Spermatid; pSc: 初级精母细胞 Primary spermatocyte; sSg: 次级精母细胞 Secondary spermatocyte; Sz: 精子 Spermatozoa; H: 头部 Head; T: 尾部 Tail.

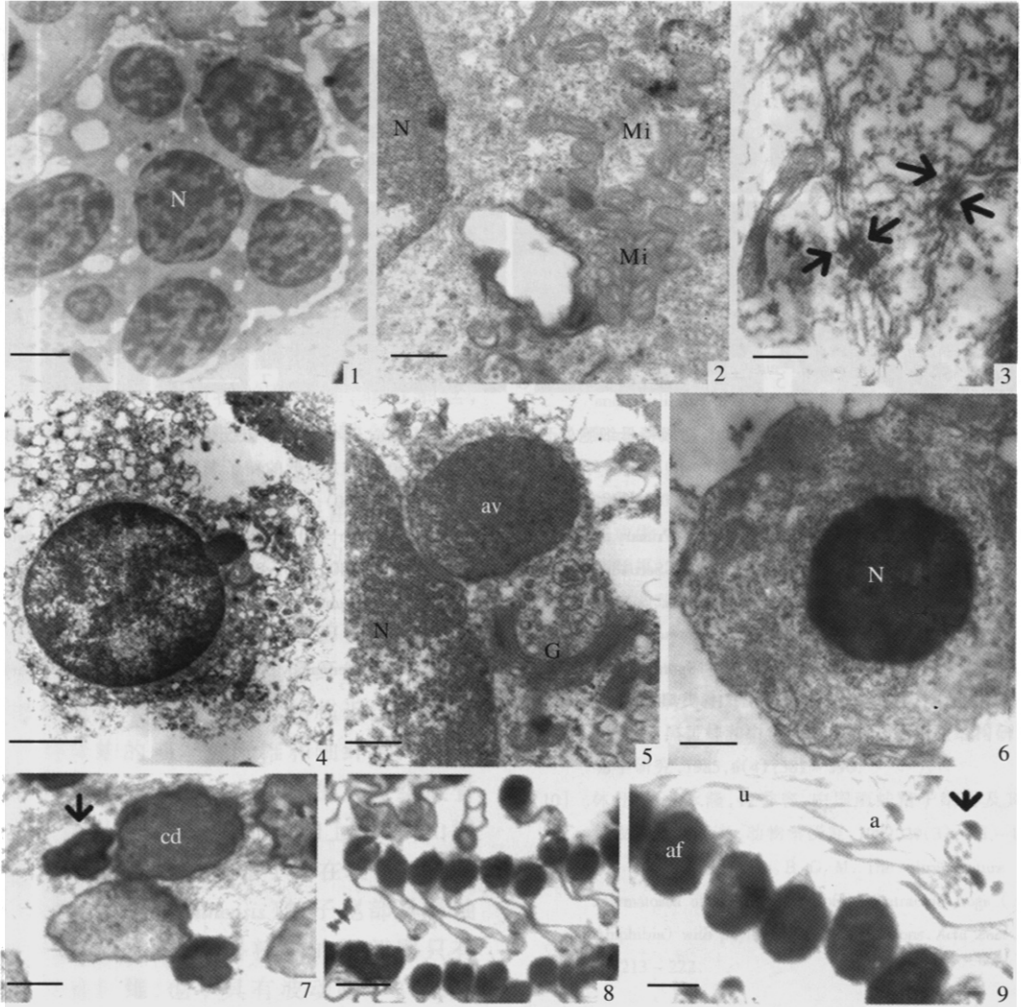
王宏元等:北方山溪鲵精子发生不同阶段的显微与超微结构

图版 II

WANG Hong-Yuan *et al.*: Spermatogenesis in Stream Salamander *Batrachuperus tibetanus*:

Light Microscopy and Electronic Microscopy Studies

Plate II



1. 一个生精小囊内有多个精原细胞 (bar = 5 μm , $\times 1\,500$); 2. 精原细胞胞质内的线粒体 (bar = 500 nm, $\times 15\,000$); 3. 精原细胞与精原细胞之间的桥粒连接, 箭头示桥粒连接 (bar = 250 nm, $\times 30\,000$); 4. 精子细胞 (bar = 2 μm , $\times 4\,000$); 5. 精子细胞内的顶体和高尔基复合体 (bar = 500 nm, $\times 15\,000$); 6. 精子细胞内的染色质浓缩, 电子密度增高 (bar = 300 nm, $\times 25\,000$); 7. 精子头部的横断, 箭头示三叶草结构 (bar = 600 nm, $\times 12\,000$); 8. 精子的尾部横切 (bar = 750 nm, $\times 10\,000$); 9. 图 8 的放大, 可见轴纤维、轴丝和轴丝旁纤维 (箭头) (bar = 300 nm, $\times 25\,000$)。

1. Several spermatogonia in a spermatogenic cyst (bar = 5 μm , $\times 1\,500$); 2. A cluster of mitochondria in the cytoplasm of the spermatogonia (bar = 500 nm, $\times 15\,000$); 3. Desmosome lies between the spermatogonia (bar = 250 nm, $\times 30\,000$); 4. Spermatid (bar = 2 μm , $\times 4\,000$); 5. Golgi complex and acrosome vesicle in the cytoplasm of spermatid (bar = 500 nm, $\times 15\,000$); 6. Chromatin is condensed in spermatid nuclei (bar = 300 nm, $\times 25\,000$); 7. Cross section of sperm head, arrow shows the trifoliate structure (bar = 600 nm, $\times 12\,000$); 8. Cross section of sperm tail (bar = 750 nm, $\times 10\,000$); 9. Magnification of Fig. 8, axial fibre, axoneme and juxta-axonemal fibre (arrow) can be recognised (bar = 300 nm, $\times 25\,000$).

a: 轴丝 Axoneme; af: 轴纤维 Axial fibre; av: 顶体泡 Acrosome vesicle; cd: 胞质小团 Cytoplasmic droplet; u: 波动膜 Undulating membrane; G: 高尔基体 Golgi complex; Mi: 线粒体 Mitochondria; N: 细胞核 Nucleus.