

乌梢蛇精巢显微结构的年周期变化

梁刚 周艳妮 王琼霞*

(陕西师范大学生命科学院 西安 710062)

摘要: 用光镜观察了乌梢蛇(*Zaocys dhumnades*)精巢显微结构的年周期变化,并结合精巢重量、精巢体积及精巢系数的年周期变化探讨了其生殖规律。结果表明,乌梢蛇精巢重量、精巢体积、精巢系数、曲细精管直径、生精上皮厚度及组成均具有明显的季节性变化。据此将乌梢蛇精巢的年周期活动划分为6个时期,其精子发生属于非连续型,生殖周期的类型属于交配后型。用精巢系数的年周期变化作为参数来判定精子发生进程是可靠的。

关键词: 乌梢蛇; 精巢; 显微结构; 生殖周期

中图分类号: Q954 文献标识码: A 文章编号: 0250 3263(2008)02- 116 07

Annual Variation in Testicular Microstructure of *Zaocys dhumnades*

LIANG Gang ZHOU Yarr-Ni WANG Qiong Xia*

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

Abstract: Combined with the annual variations in mass, volume and somatic index of testis, the changes in testicular microstructure during the annual reproductive cycle was observed in snake (*Zaocys dhumnades*). The results showed that the seasonal variations in mass, volume, somatic index of testis, seminiferous tubule, and seminiferous epithelium were very evident. The spermatogenetic cycle comprised of six stages with significant features and showed a discontinuous type. Its reproductive type belonged to postcopulative, and its testis somatic index was a reliable parameter for determining the spermatogenesis.

Key words: *Zaocys dhumnades*; Testis; Microstructure; Reproductive cycle

乌梢蛇(*Zaocys dhumnades*)为我国特有的大型无毒蛇类,分布于我国21个省市,主要以蛙类为食,也吃鱼类和小型哺乳动物^[1],对维护生态系统平衡起着十分重要的作用^[2]。乌梢蛇具有较高的药用和食用价值,由于人类过量捕捉及栖息环境的破坏,导致乌梢蛇的野生种群数量急剧减少^[3]。为了有效保护和开发利用这一珍贵的自然资源,我国已经在乌梢蛇人工孵化与饲养^[4],雌性个体大小、窝卵数和卵大小三者之间的关系^[5]等方面开展过一些与生殖有关的研究工作。本文测量、分析、观察了乌梢蛇精巢的重量、体积、精巢系数及其显微结构的年周期变化规律,旨在为乌梢蛇的资源保护、人工饲养与繁殖等工作提供基础资料。

1 材料与方法

研究用乌梢蛇分4次购自陕西省汉阴县,均系性成熟个体,购回后饲养于陕西师范大学生命科学院动物饲养房内。自2004年11月至2005年10月,每月10日选取健康的雄性乌梢蛇2条(2005年2、3月未取材,12月至次年3月为冬眠期),共计20条。首先称量体重

基金项目 陕西省自然科学基金项目(No. 2007C114),陕西师范大学校级重点科研项目;

第一作者介绍 梁刚,男,硕士,副教授;研究方向:动物发育生物学;E-mail: liangg@snu.edu.cn.

* 现在北京市苹果园中学工作。

收稿日期: 2007-07-06, 修回日期: 2007-11-07

(362.47±92.02) g、全长(1.62±0.11) m 及尾长(0.47±0.04) m, 然后剖腹取出左右精巢, 分别称重(精度 0.01 g) 并计算精巢系数(精巢重/体重×100), 再用数显卡尺分别测量左、右精巢的长径 R 和短径 r (精度 0.01 mm), 精巢体积用 $(4/3) \times 3.14 \times (R/2) \times (r/2)^2$ 计算得出^[9]。称量后的精巢立即投入到新配制的改良 Bouin's 液中固定, 24 h 后切取右侧精巢的中段, 常规石蜡切片, 切片厚 6 μm , H.E 染色。用 Motic BA200 光学显微镜观察, 目镜测微尺分别随机测量每月切片中的 50 个曲细精管外径和生精上皮厚度、30~50 个主要生精细胞和间质细胞及其细胞核的直径。Leica DFC320 显微镜数码相机拍照。

2 结 果

2.1 精巢重量的年周期变化 乌梢蛇精巢重量的年周期变化见图 1。从图 1 可以看出, 4~6 月精巢重量较小, 在 0.90~0.99 g 范围内; 7 月精巢重量明显增加, 达到 4.10 g; 8 月减少到 2.85 g; 9 月达到全年的最大值 4.82 g; 其后逐渐减小。从整体上看, 乌梢蛇精巢重量在年周期中出现两个峰值, 一个在 7 月, 另一个在 9 月, 精巢重量的变化过程曲线呈“马鞍型”(双峰值), 具有明显的季节性变化。

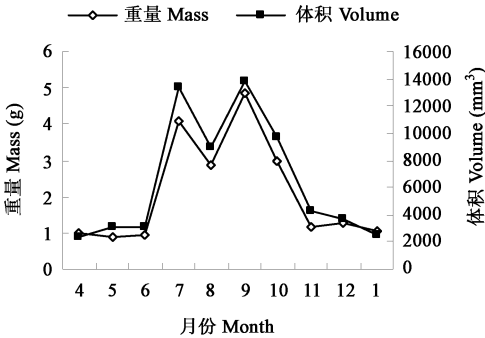


图 1 乌梢蛇精巢重量和精巢体积的年周期变化

Fig. 1 Annual variation in testis mass and testis volume of *Zaocys dhumnades*

2.2 精巢体积的年周期变化 乌梢蛇精巢体积的年周期变化见图 1。如图 1 所示, 4~6 月

精巢体积较小, 在 2 383~3 078 mm^3 之间; 7 月显著增大, 为 13 335 mm^3 ; 8 月为 9 005 mm^3 ; 9 月达全年最大值(13 760 mm^3); 10 月至翌年 1 月, 精巢体积逐月减小。综上所述, 乌梢蛇精巢体积在整个年周期中也出现了两个峰值, 与精巢重量的变化曲线一致。

2.3 精巢系数的年周期变化 乌梢蛇精巢系数的年周期变化见图 2。从图 2 知, 4~6 月精巢系数在 0.27~0.36 之间; 随后迅速增大, 7 月达到全年最大值 1.15; 8~10 月分别为 0.98、0.86 和 0.77; 11 至次年 1 月逐渐减小。从总体上看, 乌梢蛇精巢系数呈现出先增大、后减小的趋势, 峰值出现在 7 月。

图 2 乌梢蛇精巢系数的年周期变化

Fig. 2 Annual variation in testis index of *Zaocys dhumnades*

2.4 精巢显微结构的年周期变化 乌梢蛇精巢实质主要由曲细精管和间质区组成。曲细精管的管壁(生精上皮)主要由支持细胞和不同发育阶段的生精细胞构成; 间质区位于曲细精管之间, 主要由间质细胞构成。在生精活动的活跃期, 生精上皮从基膜到腔面有 10 多层生精细胞, 其中最外 1~3 层是精原细胞, 向内依次为初级精母细胞、次级精母细胞、圆形精子细胞、长形精子细胞和成熟精子。生精上皮与间质区随季节的变迁而发生周期性变化, 不同个体之间差异较小。

4 月, 曲细精管排列疏松, 管径(100±11) μm , 管腔大。生精上皮主要由 1~2 层精原细胞和支持细胞组成。精原细胞多为圆形, 最大约 9 μm ; 细胞质较少, 弱嗜碱性; 细胞核直径 5

μm , 色深。一些紧贴基膜的精原细胞较大, 直径达 $17 \mu\text{m}$; 细胞质丰富, 色极浅; 细胞核大, 直径约 $9 \mu\text{m}$, 色浅, 有些可见核仁, 有些即将分裂为两个核, 这些精原细胞正处于分裂期。支持细胞附着于基膜上, 游离面伸向曲细精管的管腔, 两侧镶嵌着精原细胞, 细胞界限不清。间质区大, 间质细胞多呈卵圆形, 3~5 个成群分布, 直径约 $8 \mu\text{m}$; 细胞质嗜酸性; 细胞核约 $4 \mu\text{m}$, 色深(图版 I: 1)。

5、6 月, 生精细胞有 4~5 层, 厚度为 $(23 \pm 4) \mu\text{m}$, 主要是精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞, 未见正处于分裂期的精原细胞。初级精母细胞大, 约 $16 \mu\text{m}$; 细胞质较少, 弱嗜碱性; 胞核大而圆, 色浅; 数量 5 月比 6 月多。次级精母细胞较小, 约 $10 \mu\text{m}$; 细胞质弱嗜酸性; 细胞核小而圆; 与 5 月相比, 6 月的次级精母细胞数量较多。5 月间质区较大, 间质细胞较多, 大多分布于曲细精管周围; 6 月间质区明显减小, 间质细胞主要集中在相邻几个曲细精管的交接处(图版 I: 2)。

7 月, 曲细精管排列较疏松, 管径为全年最大, 达 $(278 \pm 57) \mu\text{m}$; 生精上皮厚 $(71 \pm 18) \mu\text{m}$, 使得曲细精管的管腔小; 特点是开始出现了精子细胞。生精上皮由 10 多层细胞组成, 主要包括精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞。精子细胞小而圆, 约 $7 \mu\text{m}$, 若干精子细胞聚集成团, 细胞界限比较清晰; 胞质嗜酸性; 胞核小而圆, 约 $5 \mu\text{m}$, 色浅。有些精子细胞正处于变态期, 细胞界限不甚明显; 胞质强嗜酸性; 胞核多呈长卵圆形, 色深。间质区继续减小, 间质细胞数量也进一步减少(图版 I: 3)。

8 月, 生精上皮较厚, 为 $(49 \pm 7) \mu\text{m}$, 主要由精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞和少量精子组成; 管腔中也偶见精子。与 7 月相比, 精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞的数量明显减少, 细胞排列松散。大多数精子细胞处于变态期, 细胞核多呈长杆状, 胞质明显存在(图版 I: 4)。

9 月, 曲细精管排列紧密, 管径 $(232 \pm 24) \mu\text{m}$ 。生精上皮较薄, 为 $(40 \pm 11) \mu\text{m}$, 主要由精

原细胞、精子细胞和精子组成, 有些部位偶见精母细胞。精子细胞仍处于变态期, 其形态特征与 8 月的相似。精子附着于生精上皮的腔面, 大多成簇整齐排列, 头部呈长杆状, 长约 $7 \mu\text{m}$ 。间质区不发达(图版 I: 5)。

10 月, 生精上皮组成和生精细胞形态与 9 月相似, 但细胞层数减少。主要特点是曲细精管内精子较多, 其中大部分精子成簇整齐地排列在生精上皮腔面, 少部分精子在管腔中央杂乱分布(图版 I: 6)。

11 月, 曲细精管排列紧密, 管径 $(145 \pm 15) \mu\text{m}$, 生精上皮主要由 1~2 层精原细胞构成, 厚 $(12 \pm 4) \mu\text{m}$ 。精子细胞和精子脱离生精上皮, 位于曲细精管的管腔内。间质区小, 间质细胞成群分布在相邻几个曲细精管之间(图版 I: 7)。

12 月和翌年 1 月, 曲细精管排列仍然紧密, 生精上皮薄, 主要由 1~3 层精原细胞构成。精原细胞排列松散且杂乱, 有些支持细胞也脱离生精上皮, 管腔中的精子已基本排完。间质区开始增大(图版 I: 8)。

综上所述, 随着精巢发育的年周期变化, 乌梢蛇曲细精管直径(图 3)、生精上皮组成等也呈现出明显的周期性变化。从图 3 可知, 乌梢蛇曲细精管直径的年周期变化趋势为先逐渐增大, 到 7 月达最大值, 随后逐渐减小, 其中在 9 月略有回升。

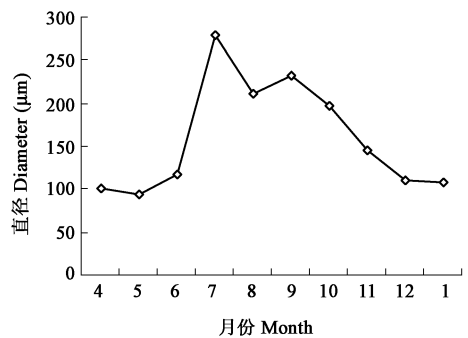


图 3 乌梢蛇曲细精管直径的年周期变化
Fig. 3 Annual variation in seminiferous tubule diameter of *Zaocys dhumnades*

3 讨 论

3.1 精巢年周期活动的分期 依据唐大由等^[7]对银环蛇(*Bungarus multicinctus multicinctus*)生精活动的分期方法,再结合乌梢蛇生精活动中生精细胞的特征,将其精巢的年周期活动划分为6个时期(表1)。

从表1和精巢显微结构等结果可知,4月,乌梢蛇精巢的生精活动处于第I期,为精原细胞的增殖期;5~6月生精活动处于第II期,为精母细胞发生期;7月生精活动处于第III期,开始出现精子细胞,是精母细胞的成熟分裂期;8~10月为第IV期,精子细胞变态形成精子,是精子形成期;11月处于第V期,曲细精管的管腔中残留有精子细胞和精子,精巢的生精活动基本停滞;从12月到翌年1月生精活动处于第VI期,生精活动完全停滞。在此需要说明的是,由于不同个体之间或同一个体不同曲细精管内精子发生不完全同步,所以乌梢蛇生精周期的不同阶段之间可能略有重叠。

表1 乌梢蛇精巢年周期活动的分期

Table 1 The stages of testicular activity of *Zaocys dhumnades* during the whole calendar year

分期 Stage	曲细精管特征 Traits of the seminiferous tubule
I	生精上皮由单层精原细胞和支持细胞构成
II	有精原细胞及精母细胞
III	有精原细胞、精母细胞和一定数量的精子细胞
IV	有精原细胞、精母细胞、大量的精子细胞和精子
V	管腔中有残留的精子细胞和精子
VI	生精上皮由1~3层精原细胞和支持细胞构成

3.2 精巢重量和精巢系数与精子发生进程的关系 从图1可知,乌梢蛇精巢重量和精巢体积的年周期变化曲线均呈“马鞍型”,峰值分别出现在7月和9月。结合对年生殖周期中精巢显微结构的观察结果,乌梢蛇7月精巢重量和精巢体积的峰值是由于曲细精管内生精细胞正处于成熟分裂期、细胞数量较多的缘故;9月的峰值是因为曲细精管管腔中存在大量处于变态期的精子细胞所引起的。Lofts等认为欧洲林蛙(*Rana temporaria*)的精巢重量是精巢功能的

适当指数,精巢重量的季节性变化与精子发生的进程一致^[8]。看来利用精巢重量的年周期变化来判定精子发生进程,不仅适用于无尾两栖类,而且可能也适合于蛇类。此外,已有研究表明,精巢重量可以间接地反映曲细精管的扩张和收缩及精子的形成情况^[9],本文观察到曲细精管直径的年周期变化曲线与精巢重量的变化曲线基本相似,说明乌梢蛇精巢重量的年周期变化也可以间接反映曲细精管的直径变化。尽管本文结果表明,乌梢蛇精巢重量、精巢体积及曲细精管直径的年周期变化规律基本相似,但考虑到在实际操作过程中,精巢体积和曲细精管直径这两个参数的获取较为困难,所以本文认为,将精巢重量的年周期变化作为参数来判定精子发生进程是可行的。

陆宇燕等在研究了雄性虎斑颈槽蛇(*Rhabdophis tigrina lateralis*)后认为,精巢系数随着季节的不同而有所不同,精巢系数的季节性与精子的形成密切相关^[9]。乌梢蛇精巢系数的年周期变化曲线呈现单峰值,与精巢重量年周期变化曲线中的第一个峰值出现时间相吻合,是因为该期正好处于精母细胞的成熟分裂期、细胞数量较多的缘故。尽管8~10月精巢系数没有出现峰值,但该时期的曲线仍然处于较高水平,正好处于精子形成期。8~10月是乌梢蛇冬眠前大量捕食、在体内积累营养、体重逐渐增加的时期,因此,精巢系数未出现第二个峰值而处于缓慢下降的趋势是容易理解的。基于以上分析,本文认为将精巢系数的年周期变化作为参数来判定精子发生进程是可靠的。

3.3 生殖周期的类型 Fitch和Shine指出,在温带地区几乎所有爬行动物的繁殖都呈现出季节性^[10,11]。乌梢蛇精子发生开始于4月,5~10月为精子发生的活跃期,9月为精子形成的高峰期,11月至翌年1月,精子发生逐渐停滞。因此,本文认为乌梢蛇与其他大多数温带地区的爬行动物一样为季节性繁殖,精子发生属于非连续型^[10,11]。

Girons将雄性蛇类的生殖周期分为交配后型、交配前型、混合型和连续型等4种类型。交

配后型是指精子发生于温暖的季节,成熟的精子储存于附睾及输精管内或通过交配储存于输卵管内过冬,交配期一般在春天^[12]。已有的研究表明,食鱼蝮(*Aglkistrodon piscivorus*)^[13]、铜头蝮(*A. contortrix*)^[14]、中国水蛇(*Enhydris chinensis*)^[15]、短尾蝮(*A. brevicaudus*)^[16]、日本鼠蛇(*Elaphe dimacophora*)^[17]、银环蛇^[7]和虎斑颈槽蛇^[9]均属于交配后型。依据精巢系数的年周期变化与精子发生进程的关系,并依据精巢、附睾及输精管年周期变化的组织学特征(附睾及输精管组织结构将另文讨论),乌梢蛇的生精活动开始于4月,9~10月精子在曲细精管中形成后,经过输出小管、附睾管到达输精管,在附睾管和输精管中储存并越冬。基于以上分析,本文认为乌梢蛇的生殖周期类型属于交配后型。

黄美华认为,与鸟类和哺乳类相比,爬行类的生长发育和繁殖等生理过程更依赖于环境^[18]。胡健饶指出,季节性繁殖是生活在温带地区的爬行动物适应环境过程中长期发展进化所形成的一种战略选择,事关动物的生存与繁衍^{*}。生殖周期呈现出季节性,能够使幼体在每年当中具有最大存活潜能的特定时期出生,这对栖息在温带或两极地带的动物具有特别重要的意义^[19]。乌梢蛇的生殖周期呈现出季节性,其生物学意义是保证该物种能够最大限度的繁衍和幼体的生存。

参 考 文 献

- [1] 赵尔宓. 中国蛇类. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2006, 287~ 288.
- [2] 刘军, 钟福生, 周剑涛等. 乌梢蛇的仿生态饲养试验. 中国林副特产, 2005, 74(1): 30~ 32.
- [3] 刘军, 钟福生. 我国养蛇业存在的问题及发展对策. 中国林副特产, 2003, 64(1): 20~ 21.
- [4] 叶红, 唐鑫生, 胡建国等. 乌梢蛇的人工孵化与冬眠前的人工饲养. 四川动物, 2005, 24(2): 216~ 217.
- [5] 计翔, 孙平跃, 许雪峰等. 浙江舟山五种卵生游蛇科动物个体大小、窝卵数和卵大小之间的关系. 动物学报, 2000, 46(2): 138~ 145.
- [6] 陈国柱, 方展强. 饥饿对唐鱼仔鱼摄食和生长的影响. 动物学杂志, 2007, 42(5): 49~ 61.
- [7] 唐大由, 梁玉, 李海. 银环蛇雄性生殖器官季节性变化的研究. 中药材, 1996, 19(7): 329~ 332.
- [8] Lofts B, Wellen J J, Benraad T J. Seasonal changes in endocrine organs of the male common frog, *Rana temporaria*. 3 The gonads and cholesterol cycles. *General and Comparative Endocrinology*, 1972, 18(2): 344~ 363.
- [9] 陆宇燕, 李丕鹏. 虎斑颈槽蛇的生殖生态学探讨. 经济动物学报, 1999, 3(4): 49~ 52.
- [10] Fitch H S. Reproductive cycles in lizards and snakes. *University of Kansas Museum of Natural History Miscellaneous Publication*, 1970, 52: 1~ 247.
- [11] Shine R. The reproductive biology of Australian reptiles: A search for general patterns. In: Grigg G C ed. *Biology of the Australian Frogs and Reptiles*. Sydney: Royal Zoological Society of NSW, 1985, 297~ 303.
- [12] Girons S H. Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climates and female reproductive cycles. *Herpetologica*, 1982, 38(1): 5~ 16.
- [13] Johnson L F, Jacob J S, Torrance P. Annual testicular and androgenic cycles of the cottonmouth (*Aglkistrodon piscivorus*) in Alabama. *Herpetologica*, 1982, 38(1): 16~ 25.
- [14] Schuett G W, Harlow H J, Rose J D. Annual cycle of plasma testosterone in male copperheads *Aglkistrodon contortrix* (Serpentes, Viperidae): relationship to timing of spermatogenesis, mating, and agonistic behavior. *General and Comparative Endocrinology*, 1997, 105(3): 417~ 424.
- [15] 吴美锡, 傅福英. 中国水蛇生殖周期和生殖模式的研究. 动物学报, 1989, 35(1): 82~ 87.
- [16] 林秀玉, 黄美华, 杨友金等. 蝮蛇短尾亚种雄性生殖周期的初步研究. 动物学杂志, 1992, 27(5): 12~ 15.
- [17] Hondo E, Kurohmaru M, Toriba M. Seasonal changes in spermatogenesis and ultrastructure of developing spermatids in the Japanese rat snake, *Elaphe dimacophora*. *Journal of Veterinary and Medicine Sciences*, 1994, 56(5): 836~ 840.
- [18] 黄美华. 爬行动物总论. 见: 黄美华, 金貽郎, 蔡春抹主编. 浙江动物志 两栖类 爬行类. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1990, 95~ 98.
- [19] Karsch F J, Bittman E L, Foster D L. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progress in Hormone Research*, 1984, 40: 185~ 232.

* 胡健饶. 中国石龙子(*Eumeces chinensis*)季节性繁殖生物学研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2004. 6.

图 版 说 明

乌梢蛇精巢横切的显微结构($\times 400$)

1. 4月精巢, 示精原细胞处于生长和分裂期; 2. 5月精巢, 示精母细胞数量较多及成群分布的间质细胞; 3. 7月精巢, 示曲细精管管径大, 生精上皮厚, 开始出现精子细胞; 4. 8月精巢, 示生精细胞排列松散, 管腔中偶见少量精子; 5. 9月精巢, 示生精上皮较薄, 精子成簇附着于曲细精管的内壁; 6. 10月精巢, 示大部分精子成簇整齐地附着在生精上皮腔面, 少部分精子在管腔中央杂乱分布; 7. 11月精巢, 示曲细精管中央存在大量的精子; 8. 1月精巢, 示曲细精管中的精子已基本排空, 有些支持细胞脱离生精上皮。

SPG. 精原细胞; SPC. 精母细胞; SPT. 精子细胞; SPZ. 精子; Sert. 支持细胞; Leyd. 间质细胞。

Explanation of Plate

Testicular microstructure of *Zaocys dhumnades* in different months ($\times 400$)

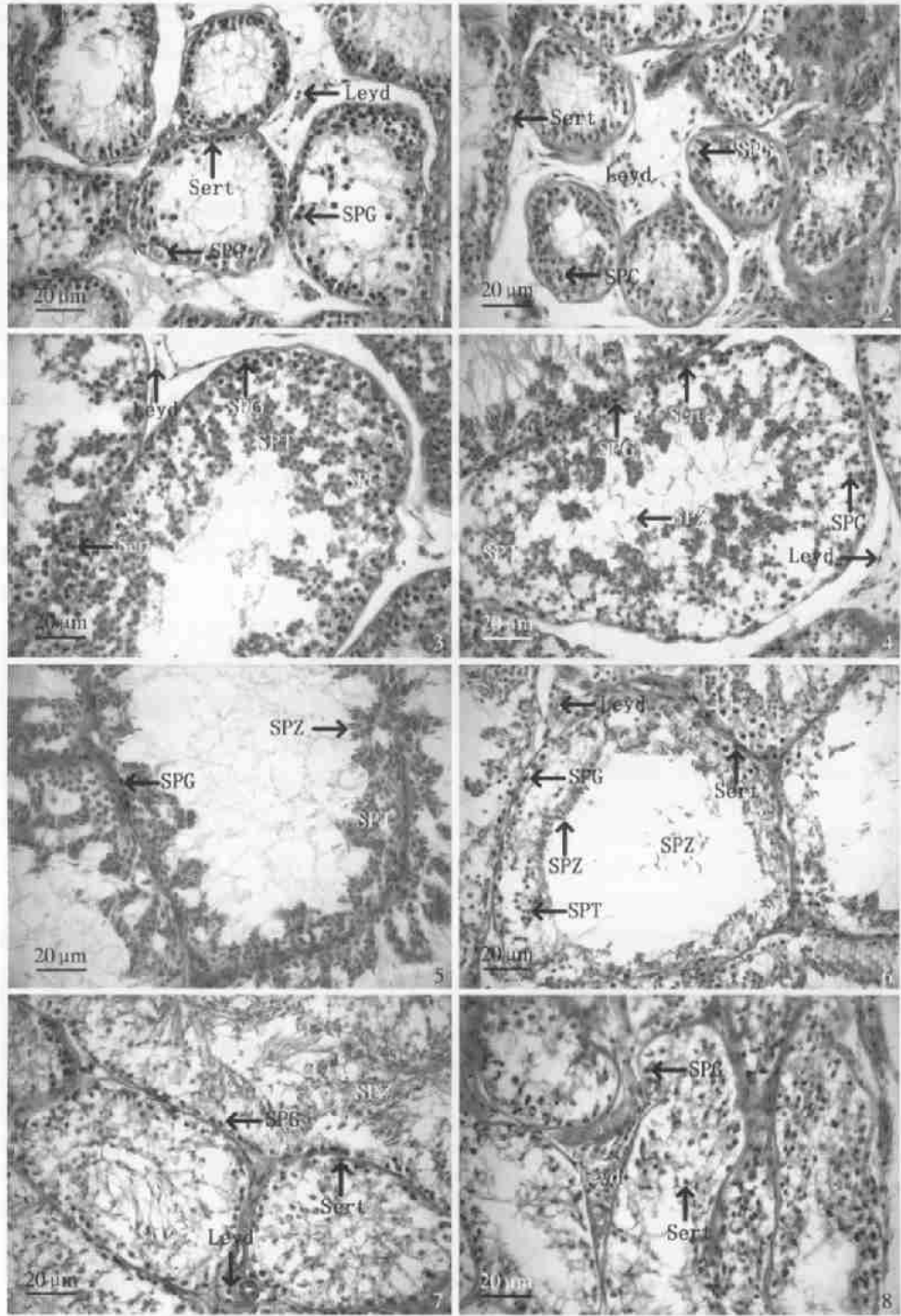
1. Testis in April showing the growing and mitotic spermatogonia; 2. Testis in May showing more spermatogonia and groups of Leydig cells; 3. Testis in July showing increscent tube cavity of seminiferous tubule, thick seminiferous epithelium and the presence of spermatids; 4. Testis in August showing loose spermatogenic cells and occasionally a small amount of sperm in the lumen; 5. Testis in September showing thin seminiferous epithelium and spermatozoa attached to the wall of seminiferous tubule; 6. Testis in October showing most spermatozoa neatly attached to the wall of seminiferous tubule, a small portion of spermatozoa distribute cluttered in the lumen; 7. Testis in November showing numerous spermatozoa in the lumen; 8. Testis in January showing most spermatozoa and some Sertoli cells were released from the wall of seminiferous tubule.

SPG. Spermatogonia; SPC. Spermatocytes; SPT. Spermatids; SPZ. Spermatozoa; Sert. Sertoli cells; Leyd. Leydig cells.

梁 刚等: 乌梢蛇精巢显微结构的年周期变化

图版 I

LIANG Gang *et al.*: Annual Variation in Testicular Microstructure of *Zaocys dhumnades* Plate I



图版说明见文后