

黑鹿睾丸及精子的形态学观察

孟祥辉^① 陶勇^{①*} 张志忠^② 易刚^② 王根红^② 周世贤^① 建平^①

(① 安徽农业大学动物科技学院 合肥 230036; ② 合肥野生动物园 合肥 230061)

摘要: 研究了成年雄性黑鹿(*Muntiacus crinifrons*)的睾丸和附睾尾精子形态。Gimsa染色后在显微镜下观察了黑鹿精子的顶体形态,统计了顶体畸形和原生质滴存在情况,并与成年黄淮山羊(*Capra hircus*)的睾丸进行了对比。结果发现,黑鹿睾丸长轴4.25 cm,短轴2.05 cm,明显低于成年黄淮山羊睾丸。黑鹿精子长54.80 μm,顶体呈圆柱形,顶体约覆盖精子头部的2/3,这个比例明显高于黄淮山羊。黑鹿精子畸形率为21.50%,附睾尾部的精子活力为0.20,附睾尾精子原生质滴率为30.17%,顶体异常率为30.50%,与黄淮山羊基本接近。本实验为进一步研究黑鹿的繁殖性能和保护提供了参考。

关键词: 黑鹿; 精子; 顶体; 活力

中图分类号: Q954 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2008)04-122-05

Morphology of Testis and Spermatozoa in *Muntiacus crinifrons*

MENG XiangHui^① TAO Yong^{①*} ZHANG ZhiZhong^② YI Gang^② WANG GenHong^②
ZHOU ShiXian^① DING JiarPing^①

(① College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

② Hefei Wild Animal Park, Hefei 230061, China)

Abstract: Black Muntjac (*Muntiacus crinifrons*) is a critically endangered mammalian species. For the first time, this study investigated the testis and spermatozoa morphology of *M. crinifrons* by using Gimsa staining. The parameters of acrosome abnormality were recorded and compared with those of Huanghuai Goat. The results showed that the long axis of Black Muntjac testicle was 4.25 cm while the short axis was 2.05 cm, obviously lower than the values of Huanghuai Goat testicle. The length of Black Muntjac spermatozoon was 54.80 μm and its acrosome was in a cylinder shape. The acrosome covered approximately 2/3 sperm head, while Huanghuai Goat acrosome covered only 1/2 sperm head. Furthermore, we found that the percentage of teratosperm in epididymal caudae was 21.50% ± 4.23%, and the spermatozoa mobility was 0.20. The percentage of sperm with protoplasmic droplet and abnormal acrosome was 30.17% ± 4.45% and 30.50% ± 3.99%, respectively. These data will be useful for assisted reproduction and protection of this endangered species.

Key words: Black Muntjac (*Muntiacus crinifrons*); Spermatozoa; Acrosome; Activity

黑鹿(*Muntiacus crinifrons*), 俗称红头青鹿、蓬头鹿、乌金鹿, 是我国特有的珍稀濒危动物, 分布范围十分狭小, 全世界仅有我国的皖、浙、赣、闽4省有分布。由于分布区狭小、活动隐蔽、性躁而难以驯养以及栖息环境的破坏和人们的滥捕滥猎, 目前野外数量十分稀少, 总数仅有5 000~ 6 000只, 已处于濒临灭绝的境地^[1]。

为了加强对黑鹿的保护, 世界自然保护联盟(IUCN) 将其列为易危物种(UV), 《濒危物种国

基金项目 安徽省优秀青年科技基金项目(No. 06041081);

* 通讯作者, E-mail: apieceofgrass@163.com;

第一作者介绍 孟祥辉, 男, 硕士研究生; 主要从事动物繁殖生理和胚胎工程研究; E-mail: mxlr521@163.com.

收稿日期: 2008-01-18, 修回日期: 2008-05-04

际贸易公约》(CITES) 将其列入附录 I 中,在我国黑鹿是国家一级保护野生动物。合肥野生动物园自 1978 年开始饲养黑鹿,1989 年繁殖成功。创下了人工饲养黑鹿首次繁殖的纪录。至 2001 年,累计繁殖成活 51 仔^[2]。因黑鹿繁殖能力较低,每胎仅产一仔,且易感染细菌而死亡,因此黑鹿的品种资源保护还有很多工作要做。

精子质量可以从畸形率、精子顶体状态和原生质滴存在情况等方面进行衡量。例如,家畜正常精液中畸形精子一般不应超过 20%。如果精液中含有过多的畸形精子或顶体异常的精子,则受胎率就会降低^[3]。精子的畸形影响其活率和活力,从而最终影响受精能力。精子畸形率和精子活率及活力成明显的负相关^[4]。原生质滴的存在则标志着精子没有成熟,正常精液中应检测不到带有原生质滴的精子。顶体是哺乳动物精子头部前端的帽状结构,处于精子质膜和核之间,由顶体内膜和顶体外膜构成,内含有顶体酶,在受精过程中可以溶解透明带并使精子穿过透明带而进入卵母细胞内完成受精^[5]。因此,精子顶体状态是决定能否受精的关键因素。

此前,已有黑鹿的生存状态、环境、生理指标及体细胞克隆的相关报道^[1,2,6,7],但还未见黑鹿的睾丸和精子形态方面的研究报道。本实验观察测定了成年黑鹿睾丸和精子的形态结构,为黑鹿的扩繁和保种提供参考。

1 材料与方法

1.1 黑鹿精液采集

合肥野生动物园半散养状态下饲养的黑鹿一只,年龄 5 岁,雄性,体重 20 kg。意外死亡 4 h 后采集睾丸,0.9% 生理盐水保存并立即送回实验室,测量睾丸的长轴和短轴的长度,并用 Nikon 数码相机拍照。取附睾尾部的精子观察活力,然后做成精子涂片备用。作为对照,采集健康雄性黄淮山羊(*Capra hircus*)的睾丸(1 岁,体重 25 kg),作同样处理。

1.2 精子染色

根据此前报道的方法,对精子进行 Gimsa 染色^[8]。将精子涂片用甲醛固定 15 ~ 20 min,水洗后用 Gimsa 染色 1.5 ~ 2.0 h,取

出脱色,干燥后在显微镜下观察精子的形态,测量精子长度和顶体覆盖面积,统计 3 张涂片各 3 个视野下的精子畸形率、原生质滴(存在)率和顶体异常率,并拍照(Nikon)。

2 结果

2.1 黑鹿睾丸生理参数

黑鹿和黄淮山羊两侧睾丸均基本对称,与黄淮山羊睾丸相比,黑鹿睾丸呈圆柱形,稍狭长。黑鹿睾丸体积明显较山羊睾丸小(图 1)。

黑鹿及黄淮山羊睾丸检测数据见表 1,黑鹿睾丸长轴平均长 4.25 cm,短轴长 2.05 cm,明显低于成年黄淮山羊睾丸。

2.2 精子染色

Gimsa 染色后统计了黑鹿与黄淮山羊精子的畸形率、原生质滴率和顶体异常率。黑鹿的精子畸形率为 21.50%,原生质滴率为 30.17%,顶体异常率为 30.50%。与黄淮山羊各对应的指标较为接近,只是顶体异常率低于黄淮山羊(表 2)。

黑鹿精子畸形包括头部、中段和尾部的畸形,顶体畸形包括顶体的部分或全部脱落(图 2)。精子中段和尾部会带有原生质滴。

表 1 黑鹿与黄淮山羊睾丸大小对比(cm)

Table 1 Comparison of testis size between Black Muntjac and Huanghuai Goat

动物		长轴	短轴
Species		Long axis	Short axis
黑鹿	左 Left	4.5	2.1
	右 Right	4.0	2.0
	平均值 Average	4.25	2.05
黄淮山羊	左 Left	7.5	4.6
	右 Right	7.4	4.6
	平均值 Average	7.45	4.60

2.3 精子顶体形态比较

测量结果显示黑鹿和山羊精子长度基本相当,头部长轴的大小也基本相当,但黑鹿精子顶体占其头部的比例大于山羊的,其值分别为 2/3 和 1/2(表 3)。

高倍镜下观察到黑鹿精子顶体呈圆柱状,山羊精子顶体呈梨形,并且黑鹿精子比山羊精子着色均匀(图 3)。



图 1 黑麂(a)和黄淮山羊(b)睾丸

Fig.1 Testides of Black Muntjac (a) and Huanghuai Goat (b)

箭头所指为附睾尾, 标尺= 1 cm. The arrows show the epididymal caudae, Bar= 1 cm.

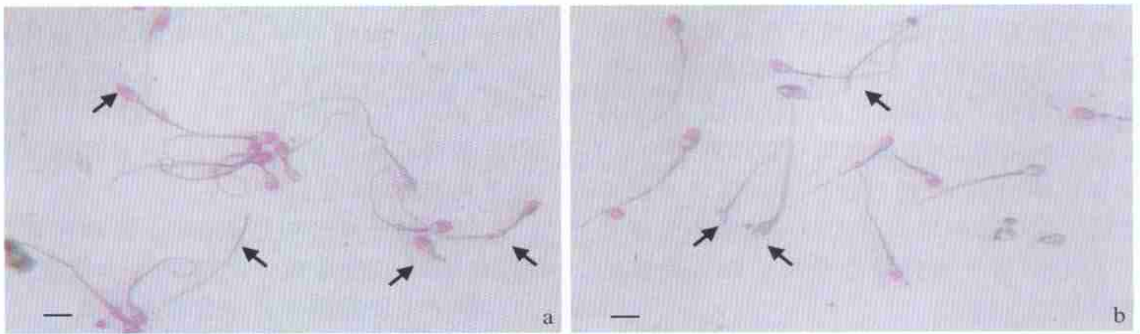


图 2 黑麂精子畸形和精子顶体畸形

Fig.2 Abnormal spermatozoa (a) and acrosome (b) of Black Muntjac

a 中箭头所指为精子畸形; b 中箭头所指为顶体畸形; 标尺= 100 μm.

The arrows show the abnormal spermatozoa (a) and acrosome (b); Bar= 100μm.

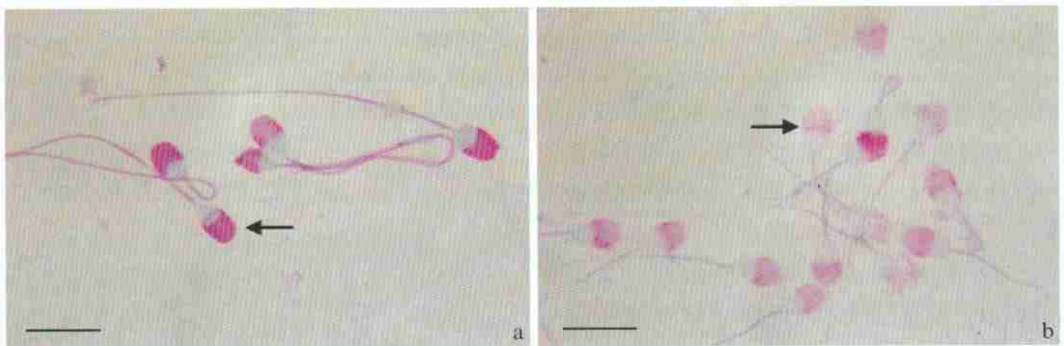


图 3 黑麂(a)和黄淮山羊(b)精子顶体

Fig.3 The acrosome of Black Muntjac (a) and Huanghuai Goat (b) spermatozoa

箭头所指为似帽状的精子顶体, 标尺= 10 μm. The arrows show the sperm cap like acrosome with red staining, Bar= 10 μm.

表 2 黑鹿与黄淮山羊精子畸形参数对比

Table 2 Comparison of abnormal sperm parameters between Black Muntjac and Huanghuai Goat

动物 Species	精子畸形率(%) Abnormality rate	原生质滴率(%) Protoplasmic droplet rate	顶体异常率(%) Abnormal acrosome rate
黑鹿 Black Muntjac	21.50±4.23	30.17±4.45	30.50±3.99
黄淮山羊 Huanghuai Goat	20.50±2.35	28.33±2.66	38.33±2.71

表中所有指标均按照世界卫生组织(WHO)所规定的标准进行测量。

All the indexes were tested followed the specified standard of the World Health Organization.

表 3 黑鹿与黄淮山羊精子长度及顶体占头部的比例

Table 3 Sperm Length and the ration of acrosome to sperm head of Black Muntjac and Huanghuai Goat

动物 Species	精子长度(μm) Sperm length	精子头部长度(μm) Sperm head length	顶体比例(顶体长/头部长) Acrosome / head ratio
黑鹿 Black Muntjac	54.80±0.22	7.03±0.11	2/3
黄淮山羊 Huanghuai Goat	57.00±0.31	7.10±0.16	1/2

3 讨论

睾丸的内分泌功能和产生精子的能力是雄性动物繁殖性能的最重要的基础。本实验研究了国家一级保护动物黑鹿的睾丸和精子的形态结构,并与同属于偶蹄目且成年体型大小相似的黄淮山羊对比。结果发现,黑鹿睾丸及精子形态与黄淮山羊有相似的地方,但也具有一些独有的特征。

精子畸形分为头部畸形、颈部畸形和尾部畸形^[9],正常精液中畸形精子一般不应超过20%,本实验中黑鹿的精子总畸形率为21.5%,稍稍高出正常范围。精子原生质滴的存在说明精子在附睾中尚未成熟或是附睾机能受损,一般附睾尾的精子原生质滴基本会脱去。实验中黑鹿精子的原生质滴率与黄淮山羊接近,约30%,说明很多尚未完全成熟。对精子活力检测结果显示,黑鹿精子的活力明显地低于山羊精子,也可能是因为与黑鹿死亡有关。

精子顶体是由高尔基体复合体形成的,包括顶体内、外膜,顶体基质和顶体酶类。精子顶体的存在与精子的正常受精密切相关^[10-12]。本实验中,在高倍镜下可以观察到黑鹿精子顶体有明显的特征,即顶体覆盖的面积大,约覆盖了精子头部的2/3,明显高于山羊的1/2,这体现

了物种间的差别。另外,还注意到在顶体中有形状和大小不一的淡染区域,不同于顶体空泡,具体结构还有待进一步研究。实验中黑鹿和黄淮山羊的顶体异常率均较高,都达到30%以上,高于此前在山羊射出精子的检测结果19.23%^[13],这可能与精子来源不同有关。附睾尾的精子虽基本成熟,但顶体结构在射精前仍有一个完善过程。

综上所述,本实验首次研究了黑鹿睾丸和精子的形态结构,发现与黄淮山羊相比有相似的地方,但也具有一些独有的特征。这些研究结果有助于进一步研究和利用黑鹿的繁殖机能,从而为保护这种珍稀物种提供依据。

参 考 文 献

- [1] 盛和林. 中国特产动物 黑鹿. 动物学杂志, 1987, 22(2): 45 ~ 48.
- [2] 吴海龙, 江浩, 吴治安等. 合肥野生动物园黑鹿的繁殖资料. 动物学杂志, 2003, 38(2): 40 ~ 44.
- [3] Gadea J. Sperm under the microscope: how to interpret boar sperm morphology when inspecting semen samples in the AI laboratory. *Pig International*, 2002, 32(9): 24 ~ 27.
- [4] 王照青, 崔小凤. 精子活率活力畸形率的比较分析. 实用医技杂志, 1997, 4(4): 270 ~ 271.
- [5] 杨增明, 孙青元, 夏国良. 生殖生物学. 北京: 科学出版社, 2005, 39 ~ 40.
- [6] 方俊顺, 陶勇, 章美玲等. 黑鹿耳成纤维细胞培养及异

- 种重构胚构建. 农业生物技术学报, 2007, 15(2): 228 ~ 232.
- [7] 陶勇, 张志忠, 李慧英等. 黑麝血液生理生化指标的测定. 野生动物, 2007, 28(5): 5 ~ 7.
- [8] Fernández Santos M R, Esteso M C, Soler A J, *et al.* Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, 2006, 41(2): 114 ~ 118.
- [9] 中国农业大学主编. 家畜繁殖学(第三版). 北京: 中国农业出版社, 2000, 83~ 84.
- [10] Olson G E, Winfrey V P, Nagdas S K. Structural modification of the hamster sperm acrosome during posttesticular development in the epididymis. *Microsc Res Tech*, 2003, 61(1): 46 ~ 55.
- [11] Sullivan R, Frenette G, Girouard J, *et al.* Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl*, 2007, 9(4): 483 ~ 491.
- [12] 陈大元. 受精生物学. 北京: 科学技术出版社, 2000, 70 ~ 71.
- [13] Zhang X G, Zhao Y J, Li Z Q. Freezing - thawing damages plasma membrane integrity of goat spermatozoa. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2007, 13(5): 403~ 406.

黑龙江省鸟类新纪录——紫翅椋鸟

笔者于 2007 年 3 月 25 日在黑龙江省大庆龙凤湿地发现 15 只紫翅椋鸟(*Sturnus vulgaris*) 并拍摄照片。后又于 4 月 26 日在扎龙国家级自然保护区进行鸟类资源监测时, 于 18:00 时左右用 10× 50 Eagle Optics 双筒及 20× 60 Kowa 单筒望远镜在望鹤楼(N47° 11′ 42.2″, E124° 14′ 04.7″)北面的灌木丛中的杨树树梢上发现 1 只紫翅椋鸟, 栖息地生境为杨树林, 下层灌木丛为榆叶梅和丁香, 地表面有稀疏草丛。该鸟距观察点 20 m 左右, 停息 25 min 左右, 后又飞到望鹤楼西侧的杨树树梢上, 距观察点 30 m 左右, 停息时间约 10 min。观察发现, 其嘴黄绿色, 头、颈部至前胸铜绿色, 具金属光泽, 背部、后胸紫红色; 背、翼上覆羽、两肋和尾下覆羽先端白色; 跗 赤褐色。与椋鸟科其他鸟类形态最明显的区别为: 紫、绿色椋鸟, 身体密布白色细斑。

2007 年 9 月 22 日在大庆水库发现 100 多只的紫翅椋鸟。于 10 月 2 日 7:00 时左右在八支干引水渠(N47° 13′ 28.4″, E124° 12′ 57.9″) 边上发现 60 多只灰椋鸟(*S. cineraceus*), 在灰椋鸟群中发现 2 只紫翅椋鸟在渠边觅食。距观察点 20 m, 觅食停息时间 30 min 左右。栖息地生境为水渠边淤泥及草丛, 此鸟觅食时与灰椋鸟群稍微有一定的距离, 其他行为没什么区别。

2008 年 3 月 26 日在大庆龙凤湿地再一次观察到 3~ 4 只紫翅椋鸟并拍下照片。4 月 10 号在扎龙保护区也再一次观察到紫翅椋鸟 1 只。

根据赵正阶主编《中国鸟类志》, 紫翅椋鸟在中国已有记录的分布区有新疆、青海、甘肃、西藏等部分地区; 偶见于河北、山西、山东威海、福建、四川及广东沿海(迷鸟)。

郑光美主编《中国鸟类分类与分布名录》中, 此鸟在我国分布于河北、北京、天津、山东、山西、宁夏、甘肃西部、内蒙古西部、青海、新疆、西藏北部和西南部、浙江、福建、广东、香港、台湾等地。

常家传等编著《东北鸟类图鉴》中, 该鸟国内在新疆为夏候鸟, 东北仅 1985 年在辽宁大连市营城子曾采到标本(李庆伟, 1990)。

约翰·马敬能等著《中国鸟类野外手册》中, 该鸟在我国分布于西部的农耕区、城镇周围及荒漠边缘, 并偶见于华中及华南沿海, 在新疆西北部为夏候鸟。

经两年观察未发现繁殖群, 笔者认为此鸟在黑龙江省为旅鸟。

李 枫^① 汪青雄^① 刘福凯^① 高忠燕^② 张亚飞^③

(① 东北林业大学野生动物资源学院 哈尔滨 150040; ② 扎龙国家级自然保护区 齐齐哈尔 161002;

③ 大庆市公安局 大庆 163311)

基金项目 白鹤 GEF 项目资助;

第一作者介绍 李枫, 男, 教授; 研究方向: 动物生态学、湿地保护与管理; E mail: lifeng604@ 163. com。