沟纹巴非蛤精子发生过程的超微结构观察

陈寅山,饶小珍,柯佳颖,许友勤

(福建师范大学 生物工程学院,福建 福州 350007)

摘要:利用透射电镜观察沟纹巴非蛤(Paphia ex arata Philippi)精子的发生和精子的超微结构,揭示了从精原细胞逐渐发育成精子过程中超微结构的变化。其过程主要包括核逐步拉长、染色质浓缩、顶体形成、线粒体逐渐融合、胞质减少以及中心粒演变为轴丝等。精细胞的分化可分为五个时期。成熟精子属原生型,由头部、中段和尾部三部分组成。头部顶体呈圆锥状,其中的顶体物质分布不均匀,基部密度较其他区域高;亚顶体腔呈倒 V 字型,内含均匀的低密度物质。细胞核卵圆形。中段由 4~5 个椭圆形线粒体和 2 个相互垂直的中心粒组成。尾部为典型的"9+2"型结构。

关键词:沟纹巴非蛤(*Paphia ex arata* Philippi);精子;精子发生;超微结构 中图分类号:0954.43 文献标识码:A 文章编号:1000-3096(2006)08-0028-06

近几十年来,软体动物尤其是双壳类中很多种 类具有较高的经济价值及增养殖前景而越来越受到 研究人员的重视,特别是有关生殖生物学的研究更 为活跃。精子发生是生殖生物学的重要问题之一,精 子形态结构的差异不仅是分类的依据,也是分析不 同动物类群之间亲缘关系的重要依据。有关双壳类 软体动物精子超微结构及精子发生国内外已有大量 报道,如大珠母贝(Pinctada maxima)^[1]、青蛤(Cyclina sinensis)^[2]、缢蛏(Sinonov acul a constricta)^[3]和 中国淡水 蛏(Novaculina chinensis)^[4] 等。沟纹巴非 蛤(Paphia exarata Philippi)广泛分布于中国浙江南 部及广东近海,个体大,肉味鲜美,越来越受到群众的 喜爱[5]。但迄今为止,国内外尚未见到有关沟纹巴非 蛤精子发生超微结构研究的报道。作者研究了其精 子发生的超微结构特点及演变规律,以期加深对沟 纹巴非蛤发育生物学的认识,并为沟纹巴非蛤的人 工繁殖提供科学依据。

1 材料与方法

试验材料于 2003 年 10月 购自福州市程埔市场, 壳长约为 40 mm。将性腺成熟的活体沟纹巴非蛤迅 速解剖,取出大小约为 2 mm³的精巢组织,用 3% 戊 二醛 1.5% 多聚甲醛液于 4℃固定 2 d,充分漂洗后, 再用 1% 锇酸 1.5% 亚铁氰化钾液固定 1.5 h。漂洗; 铀块染, 乙醇 丙酮梯度脱水, 环氧树脂 618 包埋。 LKBV 型超薄切片机切片, 切片用醋酸铀柠檬酸铅双 重染色, 日立Hur 12 A 透射电镜观察与摄影。

2 实验结果

沟纹巴非 蛤的精巢由许多滤泡型腺体组成,滤泡 的腔壁由基膜及位于其内的生殖上皮和支持细胞构 成。生殖上皮向腔 中央排列成一群不同发育阶段的 生殖细胞:精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、 精细胞和精子(图 1-1)。

2.1 精原细胞

这类细胞数目较少,着生于精巢滤泡的基底膜 上。精原细胞是生精细胞中最大的,形状不规则,切 面大小约为 9.8 μ m × 6.4 μ m。细胞核大,形状与胞 体一致,大小约为 5.6 μ m × 4.8 μ m,可见一电子密度 高、直径约 1.4 μ m 的核仁。核膜清晰,核周腔明显。 异染色质呈现小块状分布在细胞核中。细胞质较少,

收稿日期: 2004 09 28; 修回日期: 2005 01-30

作者简介:陈寅山(1951),男,福建南安人,副教授,研究方向:动物学,电话:059183465196,E-mail:biocys@163.com



图 1 沟纹巴非蛤精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞的结构

Fig. 1 The ultrastructure of spermatogonium, primary spermatocyte and secondary spermatocyte of Pap hia exarata Philippi
1-1. 滤泡腔中的各级生殖细胞×4 090; ト2. 精原细胞×6 750; ト3. 早期初级精母细胞,示核仁×3 820; ト4. 初级精母细胞×4 500;
1-5. 双核期次级精母细胞×5 560; ト6. 次级精母细胞,示胞内鞭毛×9000; 1-7. 次级精母细胞,示高尔基体和前顶体囊×10 830
Ps: 初级精母细胞; Ss: 次级精母细胞; S: 精子, Sp. 精细胞; N: 细胞核; Nu: 核仁; M: 线粒体 RER: 粗面内质网; PV: 前顶体囊; F: 鞭毛; Go: 高尔基体
1-1. various spermatogenic cell in a follode×4 090; ト2. spermatogonium×6 750; ト3. primary spermatocyte at early stage, showing the nucleolus×3 820; 1-4. primary spermatocyte at early stage×4 500; ト5. secondary spermatocyte, showing the flagella inside×9 000; ト7. secondary spermatocyte, showing the Golgibodies and proacrosomal vesicle×10 830. Ps: primary spermatocyte; Ss: secondary spermatocyte; S: sperm; Sp: spermatid; N: nucleus; Nu: nur deolus; M: mitochondria; RER: rough endoplasmic reticula; PV: proacrosomal vesicle; F: flagellum; Go: golgi bodies

电子密度较低,含有丰富的椭圆形线粒体,散布于细胞两侧,基质电子密度低,看起来似空泡。内质网较小,呈囊泡状,还存在少量颗粒状游离的核糖体,但未见高尔基体等细胞器(图 ŀ 2)。

2.2 初级精母细胞

初级精母细胞由精原细胞转化而来,已完全脱 离基膜。细胞近椭圆形,大小约为7.9^µm×4.5^µm。 细胞核卵圆形,长约5.8^µm,短约3.8^µm。早期的 初级精母细胞仍有1~2个核仁(图 I-3)。核内异染 色质块增大,稀疏分布。胞质电子密度增高。椭圆形 线粒体分布在细胞一侧,基质的电子密度增高,嵴增 多增长。可见小囊泡状的内质网(图 I-4)。

2.3 次级精母细胞

初级精母细胞经第一次成熟分裂产生次级精母 细胞。这时期常见核分裂为二,而胞质未分开的现 象,形成双核细胞(图 F5),细胞椭圆形,长径约5.0 µm,短径约4.1 µm。细胞核椭圆形,大小约为4.5 µm×2.5 µm。细颗粒状异染色质凝聚成更大的团 块,且有些团块互相融合在一起。线粒体数量略为减 少,但体积增大,多集中在细胞的一侧,嵴的数量更多 更长。中心体已出现,并发出胞内鞭毛(图 F6)。高 尔基体发育较好,它由一系列致密平行的扁平囊组 成,呈新月状,两端膨大成泡状,其周围及附近分泌有 嗜锇的高尔基液泡。这些致密电子颗粒称为前顶体 颗粒,已经相互融合形成前顶体囊(图 F7)。

2.4 精细胞

精细胞是次级精母细胞经第二次成熟分裂产生 的,前者体积明显比后者小。根据其发育过程中染色 质凝集状况、前顶体囊及线粒体形态位置的变化,可 分为6个时期。

2.4.1 精细胞 I 期

细胞椭圆形,大小约3.4 µm×1.8µm。细胞核 较大,核形与胞体一致,大小约为2.9µm×1.6µm。 颗粒状异染色质变粗且均质化。线粒体逐渐融合,数 目减少,体积显著增大。长约0.5µm,宽约0.34µm 的椭圆形前顶体囊继续发育,内含电子密度较高的 颗粒状物质。前顶体囊与线粒体共同分布于细胞的 一端(图2-1)。

2.4.2 精细胞Ⅱ期

细胞呈圆形或椭圆形,大小约为 3.0 μ m × 2.8 μ m。核呈椭圆形,长径约为 2.0 μ m,短径约为 1.5 μ m,位于细胞中央。核内颗粒状染色质不断浓缩,局 部区域仍聚集成团块状。细胞质含量较多,内含少量 内质网。线粒体不断融合,内部基质的电子密度增 大,嵴的数量、长度都增加,并逐渐移向核后端。中心 体发出胞内鞭毛,也往核后端移动。前顶体囊继续发 育,并逐渐向预定的细胞核前端迁移,呈椭圆形,长约 0.6 μ m,宽约 0.45 μ m(图 2·2)。前顶体囊、细胞核、 线粒体三者将位于一直线上,核前窝与植入窝明显 (图 2·3)。

2.4.3 精细胞III期

细胞体积减小,呈椭圆形,长约2.7μm,宽约1.8 μm。细胞核大小约为1.7μm×1.4μm。异染色质 颗粒明显增大且密度增高。前顶体囊临核面中央向 内凹变扁,形成亚顶体腔,内含低电子密度物质。前 顶体囊的内含物分布不均匀,基部四周为高密度顶体 物质,而其他区域的电子密度则较低,此时前顶体形 成(图 2-4)。

2.4.4 精细胞IV期

细胞明显延长, 形态与精子相似, 大小约为 3.0 μm×1.6μm。细胞核亦延长呈椭圆形, 长约 1.8 μm, 宽约 1.3μm。粗颗粒状染色质完全连为一体, 且较为均匀, 电子密度增加, 但有一些核泡。仍有较 多的细胞质, 其中含有少量的粗面内质网。线粒体与 前顶体继续发育(图 2-5)。

2.4.5 精细胞V期

细胞质大量减少,细胞体积显著减小,形态与精 子基本一致,长约3.0 µm,宽约为1.4 µm。核进一 步延伸,大小约1.6 µm×1.2 µm。核内颗粒状染色 质进一步浓缩,成为高电子密度的均质物,仍存在少 量核泡。前顶体及亚顶体腔向前延伸,形成顶体。细 胞质已大部分成为残留体而被排弃,仅留一薄层细胞 质围绕着精细胞(图26)。



图 2 沟纹巴非蛤精细胞和精子的结构

Fig. 2 The ultrastructures of spermatid and sperm of Paphia exarata Philippi

- 2-1. 精细胞I期×11000; 2-2. 精细胞II期×8570; 2-3. 精细胞II期,示前顶体囊和线粒体×8180; 2-4. 精细胞III期×5710;
 2-5. 精细胞IV期×11470; 2-6. 精细胞V期×12140; 2-7. 顶体纵切×20000; 2-8. 成熟精子纵切×7500; 2-9. 精子中段横切×13240;NP:核前窝; IF: 植入窝; PA: 前顶体; ↑: 顶体物质; *: 亚顶体腔; 合: 核胞; A: 顶体; ↑: 顶体外膜; →: 顶体内膜; PM: 质膜; DC: 远端中心粒; 其余符号说明同图1
- 2-1. spermatid I × 11 000; 2·2. spermatid II × 8 570; 2·3. spermatid II, showing the proacrosomal vesicle and mitochondria× 8 180; 2·4. spermatid II × 5 710; 2·5. spermatid IV× 11 470; 2·6. spermatid V×12140; 2·7. the longitudinal section of acrosomel× 20 000; 2·8. the longitudinal section of mature sperm× 7 500; 2·9. the cross section of middle piece× 13 240 NP: nuclear pocket; IF: Implantation fossa; PA: proacrosome; †: acrosomal material; *: subacrosome space; ↑Vesicle; A: acrosome; † external membrane; --internal membrane; PM: plasma membrane; DC: dist al centriole

2.5 成熟精子

沟纹巴非蛤成熟精子呈长辣椒状,为原生型,长约 45^µm,由头部、中段和尾部三部分构成。

头部长约 3.0 μm, 由顶体和细胞核组成。顶体 位于头部最前端,呈现圆锥状,长约 0.9 μm,最宽处 约 0.6 μm。顶体内含物分布不均匀,高密度顶体物 质集中分布于基部四周,顶体中其它空间为一些电 子密度较低的均匀物质所充满。顶体外包有一连续 的单层膜,按其位置的不同可分为顶体外膜和顶体 内膜,顶体外膜以一薄层胞质与质膜相隔;而顶体内 膜靠近亚顶体腔。亚顶体腔呈尖锥状,几乎伸达顶体 的前端,位于顶体基部中央,内含的亚顶体物质电子 密度较低(图 2-7)。细胞核卵圆形,大小约 1.7 μm× 1.0 μm。颗粒状染色质高度凝聚致密,可见一些不 规则透明的核泡。细胞核与亚顶体腔相对处稍许凹 陷,形成核前窝;与线粒体相邻处由于球状线粒体的 嵌入,细胞核亦内陷形成植入窝。与质膜间有少量的 细胞质(图 2-8)。

中段较短,长约1.0 µm,最宽处约为1.5 µm。 由线粒体围绕中心粒复合体形成主要结构。中段横 切面上可见4或5个卵圆形线粒体围绕在中心粒周 围(图29)。线粒体电子密度较低,直径约为0.5 µm,由内外两层膜组成,内膜向腔内折叠形成极明显 的褶皱嵴突。中心粒复合体由相互垂直的近端中心 粒和远端中心粒组成,两者皆为中空的短圆筒状结 构。

尾部细长,约40^{µm},由轴丝和质膜组成,轴丝由 远端中心粒发出,为典型的'9+2"型结构,由中央的 两个单根微管和周围的9个成对微管组成。

3 讨论

双壳类软体动物精子发生的基本过程一致,经 历了从精原细胞[→]初级精母细胞[→]次级精母细胞[→] 精细胞[→]最后变态为成熟精子的过程。各个阶段形 态结构的变化,因种类的不同而存在差异,在精原细 胞阶段一般没有差别,但在精母细胞及精细胞阶段 则可明显地体现出不同。精细胞尚不具有雄性配子 的功能,需要经过一系列的变态分化过程从而形成 成熟的精子,才具备受精的能力。双壳类软体动物精 细胞在分化形成精子的过程中主要经过以下阶段:1) 精子细胞器的形成(包括头部顶体,中段线粒体与中 心粒,末段鞭毛);2)核的形态变化(包括核体积缩小, 染色质浓缩)。分化成熟的精子其形态结构必须与动 物的生殖方式及卵的形态结构相适应。根据受精方 式的不同,软体动物的精子可分为两大类:原生型 (Primitive type) 精子和修饰型(Modified type) 精子。 其中,原生型精子是动物界中最普遍的,进行体外受 精的精子一般都是原生型^[6]。沟纹巴非蛤精子具典 型的原生型结构。由头部、中段和尾部三部分组成。

不同种间同属原生型的精子在形态结构上存在 较大差异,这种差异主要表现在头部的外形构造上。 精子头部的形态主要由顶体的形态和核的形态决定。 例如合浦珠母贝精子顶体呈现奶嘴形,核䜣圆形?1; 贻贝精子的顶体呈长圆锥形,核卵圆形^[8];中国淡水 蛏精子顶体呈"⊥"形,核呈近圆形^[4]。某些种类精 子的亚顶体腔还出现了板层小体[1] 或轴棒[8] 等复杂 的结构。沟纹巴非蛤精子顶体呈圆锥状,核近椭圆 形,亚顶体腔中只有一些电子密度较低的亚顶体物 质。双壳类软体动物的顶体属简单顶体,大多顶体内 含物的电子密度均匀,例如,栉孔扇贝(Chlamys farreri)^[9];也有前中后端、内外区电子密度有差别的, 如大珠母贝^[1]、青蛤^[2]和西施舌(Coelomactra antiquata)^[10]。沟纹巴非蛤精子顶体结构的特殊之处 在干其顶体物质分布不均匀,分布干顶体基部四周的 顶体物质电子密度高,而其它区域则密度较低。亚顶 体腔中的亚顶体物质电子密度较低。这与赵志江研 究的波纹巴非蛤精子的顶体结构不同印。据他的观 察,波纹巴非蛤顶体外区电子密度比内区大,亚顶体 物质分布干顶体与核之间,电子密度较高。存在这种 差别可能与巴非蛤的系统演化及种属差异有关。

作者发现沟纹巴非蛤由生精细胞发育分化成精 细胞的过程中,高尔基体分泌的前顶体颗粒量增多, 并逐渐融合,体积明显增大形成前顶体囊。在精细胞 变态成精子过程中,前顶体囊内凹呈倒"U"字形,覆 盖在核一端。顶体物质逐渐沉积于囊腔基部四周,电 子密度增大,这时顶体也基本形成。由此可见,顶体 的形成及其内容物的合成和浓缩,是同高尔基体关系 密切的。这进一步证实了汪德耀等^[12]关于动物雄性 生殖细胞顶体由液泡演变成的观点。此外,沟纹巴非 蛤精子的亚顶体腔中没有轴状结构,而轴状结构在顶 体反应中起着重要的作用,作者推测内含的亚顶体物 质可能起到与轴状结构相似的功能。

在精子形成过程中,精细胞核形态变化和染色质 浓聚是有种属差异的,Walker^[13]把各种动物精细胞 核染色质浓聚后的形态归为三类:颗粒状、纤维状和 片状(晶体状)。本研究中观察的沟纹巴非蛤精细胞 核染色质浓度过程,不同于上述各种类型,而与波纹 巴非蛤、西施舌类似,即由稀疏小团块[→]细颗粒状小 团块[→]粗颗粒状小团块[→]粗颗状均匀分布[→]高密度 的致密均质物。不管染色质最终变为团块状、颗粒状 还是均质物,其游离的表面积都减少,这种缩小可以 增强结构的稳定性,利于受精功能的完成。随着染色 质密度不断递增的浓缩过程的进行,核的形态由扁 圆变似圆后延长成椭圆,同时体积逐渐缩小,这一过 程与青蛤类似^[2]。核形态的改变与核内染色质变化 密切相关,核内染色质的高度浓缩和核体积的减小 可能有利于精子迅速穿过卵膜与卵受精。

线粒体是精子运动的能量供应中心。Frazen¹⁴ 认为双壳类软体动物精子中段的线粒体形态和数目 比较稳定。从精原细胞发育到次级精母细胞,线粒体 数量增多, 嵴逐渐发达, 基质电子密度也增高, 集中在 高尔基区的线粒体逐渐散布干胞质间。随着精子形 成过程的进行,线粒体相互融合,数目减少,体积增 大, 嵴也愈发达, 并逐渐移向核后端, 最终形成 4个或 5个球状的线粒体,紧密连接成一线粒体环,参与构 成精子的中部。本研究在沟纹巴非蛤中观察到成熟 的精子一般具有4个大的线粒体. 偶尔也有 5个线粒 体的情况。这种同一贝类精子线粒体数量不完全相 等的报道在合浦珠母贝^[7]、栉孔扇贝^[9]中也有报道。 从精子发生的过程中可以观察到线粒体在精子的发 生发育过程中普遍存在着体积由小变大,数量由多 变少的发育过程,因此同种成熟精子内线粒体的量 不完全一致是有可能的。

参考文献:

- [1] 杜晓东.大珠母贝精子发生超微结构变化的研究[J].
 武汉大学学报(自然科学版),1996,42(2):219-224.
- [2] 曾志南,李复雪.青蛤精细胞分化的超微结构研究[J]. 海洋学报,1991,13(4):547551.

- [3] 刘正琮,上官步敏,许振祖. 缢蛏精子发生超微结构的 研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1990, **29**(1): 81-84.
- [4] 饶小珍,陈寅山,陈文列,等.中国淡水蛏精子发生的超 微结构研究[J].动物学杂志,2000, **5**(5):2-5.
- [5] 庄启谦.中国动物志软体动物门双壳纲帘蛤科[M].北 京:科学出版社,2001.190192.
- [6] Franzen A. Comparative morphological investigations into the spermiogenesis among Mollusca[J]. Zool Bidr Uppsala, 1955, 30: 399 456.
- [7] 沈亦平,张锡元. 合浦珠母贝精子发生过程的超微结构 观察[J]. 武汉大学学报(自然科学版),1993,6:123-129.
- [8] 李太武,苏秀榕,李春茂,等.贻贝雄性生殖系统的组织 学和超微结构[J].动物学研究,1999,20(3):168-171.
- [9] 任素莲, 王如才, 王德秀. 栉孔扇贝精子超微结构的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1998, **28**(3): 387-392.
- [10] 饶小珍,陈寅山,陈文列,等.西施舌精子发生过程的 超微结构观察[J].水产学报,2002, **26**(2):97-103.
- [11] 赵志江,李复雪.波纹巴非蛤精子发生的超微结构[J].台湾海峡,1992,11(3):238243.
- [12] 汪德耀.动物细胞液泡系[J].厦门大学科学进展, 1957, 1:6468.
- [13] Walker M H. Comparative Spermatology [M]. New York: A cademic Press, 1970. 383-391.
- [14] Franzen A. Ultrastural studies of spermatozoa in three bivalvia species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitiver spermatozoa[J].
 Gamete Res, 1983, 7: 199 214.

(下转第70页)

(上接第33页)

Observation on the ultrastructure of spermatogenesis of *Paphia* exarata Philippi

CHEN Yin shan, RAO Xiao zhen, KE Jia ying, Xu You qin (Bioengineering College, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Received: Sep. , 28, 2004

Key words: Pap hia exarata Philippi; spermatozoon; spermatogenesis; ultrastructure

Abstract: The ultrastructures of spermatogenesis and spermatozoon of *Pap hia exarata* Philippi were observed with transmission electronic microscope. The result shows the ultrastructural changes from spermatogor nium to spermatozoon. During the spermatid differentiation, the main changes include as follows: gradual e longation of nucleus, condensation of chromatin, acrosome formation, development and fusion of mitochondria, cytoplasmic slougling and flagella formation. The spermatid differentiation can be divided into five stages. M ar ture sperms are of typical primitive type, consisting of three regions: head, middle piece and tail. The acrosome is conical. The distribution of acrosomal materials is uneven, the density of acrosome's base is higher than that of other area. The subacrosome space with materials of low density is V-shaped in upside down. The nur cleus is egg shaped. Four or five ellipsoidal mitochondria and two centrioles make up the middle piece. The flar gellum is a typical "9+ 2" microtubular structure.

(本文编辑:张培新)