

条斑星鲽精子超微结构研究

徐永江^{1,2} 柳学周^{1,2*} 刘新富^{1,2} 赵明^{1,3} 倪娜^{1,3}

⁽¹⁾农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

⁽²⁾青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

⁽³⁾中国海洋大学水产学院, 青岛 266003)

摘要 分别以扫描电镜和透射电镜方法研究了条斑星鲽精子的超微结构。条斑星鲽精子全长 $45.57 \pm 3.23 \mu\text{m}$, 主要包括三部分: 头部、中段和鞭毛。头部呈圆形, 主要结构为近圆形的细胞核; 中段不发达, 主要包括线粒体和中心粒复合体两部分, 具有多个未分化的圆形小线粒体; 鞭毛细长, 结构为典型的“9+2”型双联微管结构, 无侧鳍。这些特征表明, 条斑星鲽的精子属于简单的原始类型。条斑星鲽精子不具顶体, 但具有开口于核前端稍偏处呈不规则状的核前部凹陷及核内核泡结构, 核前凹陷与染色质区无界膜分隔, 部分精子在凹陷前端存在由核膜构成的凸起。凹陷区的前部及其开口处常有多个小的具单层界膜的囊泡, 这些结构可能是顶体的遗迹, 但也不排除其是向外释放核内物质的一种途径的可能性。

关键词 条斑星鲽 精子 超微结构 核前凹陷

中图分类号 Q959 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)05-0008-07

Study on spermatozoon ultrastructure of barfin flounder *Verasper moseri*

XU Yong-jiang^{1,2} LIU Xue-zhou^{1,2*} LIU Xin-fu^{1,2} ZHAO Ming^{1,3} NI Na^{1,3}

⁽¹⁾Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea

Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

⁽²⁾Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea

Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

⁽³⁾Fishery College, Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT The ultrastructure of barfin flounder *Verasper moseri* spermatozoon was studied with scanning microscopy and trans-mission electron microscopy. Total length of the sperm is $45.57 \pm 3.23 \mu\text{m}$ ($n=11$), and the sperm includes three parts: head, mid-piece and flagellum. The spherical head mainly consists of the nearly circular cell nucleus. The mid-piece is composed of mitochondria and center grain complex, with some round undifferentiated small mitochondria. The typical ‘9+2’ pattern of the flagellum has quite simple structure, which means that the spermatozoon of barfin flounder can be classified as a primitive type, which is found in

国家 863 计划项目(2006AA10A414)、农业部公益性行业专项(nyhyzx07-046)、农业科技成果转化资金项目(2008GB23260382)、鲆鲽类现代产业技术体系(nycytx-50)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目共同资助

* 通讯作者。E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期:2009-10-28;接受日期:2009-12-02

作者简介:徐永江(1981-),男,博士,助理研究员,主要从事鱼类繁殖生物学及增养殖技术研究。E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

most of the advanced fish taxa. But the anterior vesicles and pit of the nucleus of this spermatozoon have seldom reported from other species. There is no acrosome in the sperm. At anterolateral to the nucleus, there is a chromatin-free, electron-lucent area, which was named the anterior pit of the nucleus. Within and in front of the pit, an irregular-shaped structure and some different sized vesicles that are encapsulated in a layer of membrane were found. With regard to acrosome and acrosome vestige present in some other euteleosts, we presume that the vesicles may represent acrosome vestiges though they may also function to release nuclear material, while the irregular-shaped structure in front of the nucleus may be caused by improper sample preparation.

KEY WORDS *Verasper moseri* Ultrastructure Spermatozoon
Anterior pit of the nucleus

硬骨鱼类种类繁多,在过去的40多年中,国内外已进行精子超微结构研究的鱼类达300多种(Abascalet al. 2002; Lahnsteiner et al. 1998; Mattei 1991; Medina et al. 2000; Quagio-Grassiotto et al. 2001)。硬骨鱼类精子类型一般为鞭毛型,由头部、中段和尾部三部分组成。精子细胞核、中心粒复合体、袖套和鞭毛等的结构和形态都各有特异之处,对其超显微结构的研究是受精生物学研究的重要内容之一。硬骨鱼类精子超微结构形态差异的研究,在生殖系统发生学和进化生物学研究中具有广阔的前景(Jamieson 1991)。另外,精子顶体鞭毛的结构,精子核膜的区域化程度,精子质膜的结构特点,中片中有无近、远端中心粒,中心粒排列方式如何以及精子表面大分子物质的分布部位等方面均可以作为种之间赖以相互区别的依据(杨万喜等2000)。

条斑星鲽 *Verasper moseri* 为一种底栖大型鲆鲽鱼,隶属鲆形目 Pleuronectiformes, 鲆科 Pleuronectidae, 星鲽属 *Verasper*, 主要分布在日本鄂霍次克海、日本西北海域、朝鲜半岛以东和西南海区及中国的黄、渤海区,因其肉质细嫩、营养丰富、生长快的特点,成为近年来我国鲆鲽鱼类养殖的新兴鱼种。2004年,从日本引入我国。2007年,条斑星鲽人工繁育获得重大突破,苗种规模化生产成功。目前,国内条斑星鲽尚不能在人工条件下自然产卵,受精卵的获得还主要依赖于人工受精。研究过程中,笔者发现其精子时常存在活动率低、寿命短、黏稠度高等问题。因此,本文研究其精子形态的超微结构,以期认识精子的形态特征、结构,为开展其雄性生殖生理特性、受精生物学和雌核发育技术研究提供技术依据。目前,国内外尚未见条斑星鲽精子超微结构的报道。

1 材料和方法

1.1 实验鱼和精液采集

实验于2009年3月条斑星鲽繁殖季节进行。使用青岛忠海水产有限公司培育的条斑星鲽雄性亲鱼6尾(3龄以上)。实验鱼全长27.5~38.6 cm,体重868.4~1450.6 g,培育水温8~11℃,盐度25~32,日换水率600%~800%,光照强度280~350 lx,溶氧大于6mg/L。日投喂鲜杂鱼两次,投喂量为鱼体重的1%~2%。

对性腺成熟的亲鱼采用人工挤压的方式采取精液。具体方法:先将实验鱼以200 mg/L的MS222麻醉,然后将鱼置于垫有干净湿毛巾的木板或泡沫板上,湿毛巾将鱼头部遮盖。挤取精液前先用滤纸或医用脱脂棉轻轻擦拭生殖孔及其周围区域,防止体表黏液和尿液污染。用手按照由后向前的顺序向生殖孔方向用力,轻轻挤压鱼的生殖腺部位,将精液挤出。挤出精液后先弃去粪便等污物,待流出的精液呈较纯的乳白色后,用经过消毒的干燥玻璃吸管将精液吸出并置于干净的1.5 ml Eppendorf管中,加入2.5%的戊二醛(pH 7.4 磷酸缓冲液配制)固定保存。

取5 μ l新鲜精液,用50 μ l人工海水(表1)稀释、激活后,在显微镜(Nikon-TS100)下观察运动精子的百分

率,并计量精子在室温(15℃)下的存活时间。将精液以人工海水稀释2 000倍后,用血球计数板(Erma,日本)计算精子浓度。精子运动率在75%以上、没有被污染的精液样本混合后用于本研究。

表1 人工海水配方

Table 1 Formula of artificial seawater used in the study

试剂 Reagent		浓度 Concentration (g/L)	试剂 Reagent		浓度 Concentration (g/L)
氯化钠	NaCl	24.72	氯化镁	MgCl ₂ · 6H ₂ O	4.66
氯化钾	KCl	0.67	硫酸镁	MgSO ₄ · 7H ₂ O	6.29
氯化钙	CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.36	碳酸氢钠	NaHCO ₃	0.18
pH			8.2		

1.2 形态观察

1.2.1 扫描电镜样品制备

将精液置于预冷的(4℃)2.5%戊二醛固定液中固定8 h。PBS缓冲液(pH 7.2)漂洗3次,每次10 min。以30%、50%、75%、95%乙醇顺序脱水各1次,每次10 min。然后用无水乙醇重复脱水两次,每次20 min左右。最后将50%、70%、90%、100%乙酸异戊酯逐级取代乙醇,每级置换5~10 min。将样品放入Eiko公司DX-1型I临界点干燥器内,加干冰作介质进行干燥。干燥后的样品放入Eiko公司IB-3离子镀膜仪中喷金镀膜。JSM-840型(JEOL,日本)扫描电镜观察。

1.2.2 透射电镜样品制备

将1.2.1所述固定的精液以2 000 r/min离心5 min,PBS缓冲液漂洗10 min,重复3次。以1%锇酸在4℃后固定2 h。PBS缓冲液冲洗3次,每次10 min。乙醇系列梯度(30%、50%、70%、90%、100%)分别脱水10 min,其中100%乙醇脱水两次。Epon 812环氧树脂包埋,37、45、65℃温箱固化,每级温度梯度固化24 h。Ultracut超薄切片机半薄切片,甲苯胺蓝染色,半薄定位。醋酸双氧铀硝酸铅染色。JEM-1200EX透射电镜(JEOL,日本)观察。

2 结果

2.1 精子特性

条斑星鲈精子密度为 $(4.38 \pm 0.57) \times 10^{10}$ 个/cm³(n=8)。室温15℃时,精子运动率为 $(82.16 \pm 7.23)\%$ (n=8),经人工海水激活后可以存活 (10.5 ± 1.42) min(n=11)。

2.2 精子形态与结构

2.2.1 扫描电镜观察

条斑星鲈精子全长为 $45.57 \pm 3.23 \mu\text{m}$ (n=11),主要包括三部分:头部、中段和鞭毛(图版I-A)。头部呈球形,长 $1.47 \pm 0.08 \mu\text{m}$ (n=11),无顶体,头顶前端正中稍偏处有不规则状的凹陷(图版I-B)。中段长度仅约0.32~0.45 μm,与核的基底部紧连,短于头部长。中段周围有圆形的线粒体围绕,呈1~2层排列(图片未展示),数量约10~17个。鞭毛细长,由中段后方基体伸出,长度为 $43.48 \pm 2.13 \mu\text{m}$ (n=11)。除尾端部外,鞭毛直径约0.13~0.16 μm。扫描电镜观察发现,头部外观形状不规则或头部表面凹凸不平的精子约占30%~40%,部分精子头顶有较深的凹陷(图版I-C)。

2.2.2 透射电镜观察

2.2.2.1 头部

精子头部主要结构为细胞核,核周围充满细胞质(图版I-E、图版I-H)。细胞核占精子头部的大部分空

间,细胞核呈近圆形,长径为 $1.9\mu\text{m}$,短径为 $0.96\mu\text{m}$,染色质为电子致密的、浓缩的絮状,核内部可见有数目不等(1~3个)电子密度较低的区域(图版 I-G、图版 I-H),称之为核泡。核泡面积大小不等,个别核泡内可见有内容物的囊泡。核膜为双层膜结构,与细胞质膜间空隙大(图版 I-E)。在纵向切面上发现,约30%的精子有位于核正前方稍偏的深入核内部的电子密度低的凹陷结构,凹陷无膜与核隔开(图版 I-F),凹陷前部核膜凸起形成类三角状结构(图版 I-F、图版 I-G),周围有数目、大小不等,形状不规则的小囊泡,囊泡有的无内含物,有的含电子致密物质(图版 I-F、图版 I-H)。

2.2.2.2 中段

精子中段较短,主要包括中心粒复合体和线粒体两部分。在纵切面上,可观察到1~2个圆形线粒体围绕在鞭毛的近核端,紧贴于细胞核下方(图版 I-E)。在横切面上,可见约5~7个,围成环状,线粒体周围有胞质和胞质膜围绕(图版 I-D)。未见袖套结构。中心粒复合体由近端中心粒和基体(远端中心粒)构成(图版 I-D),位于较浅的核隐窝(Nuclear fossa)内,近端中心粒位于核隐陷近核内部。近端中心粒和基体的排列呈“T”型,近端中心粒长轴与精子长轴垂直、基体长轴与精子长轴平行。基体由9组3联微管组成,腔内中心无双联微管(图版 I-D),中心粒复合体与线粒体间形成类似胞质通道的结构。

2.2.2.3 尾部

精子尾部主要是鞭毛,由基体末端伸出,细长,结构极简单,具有“9+2”型的轴丝等特征(图版 I-I),中央有双联微管(图版 I-J、J')。在鞭毛上段,微管的电子致密度高,管腔清晰(图版 I-K)。在横切面上,发现鞭毛质膜有膨胀的现象(图版 I-J),胞质有数目不等的靠近膜内壁的囊泡、胞质(图版 I-J),未发现侧鳍。尾部末端,鞭毛逐渐变细。

3 讨论

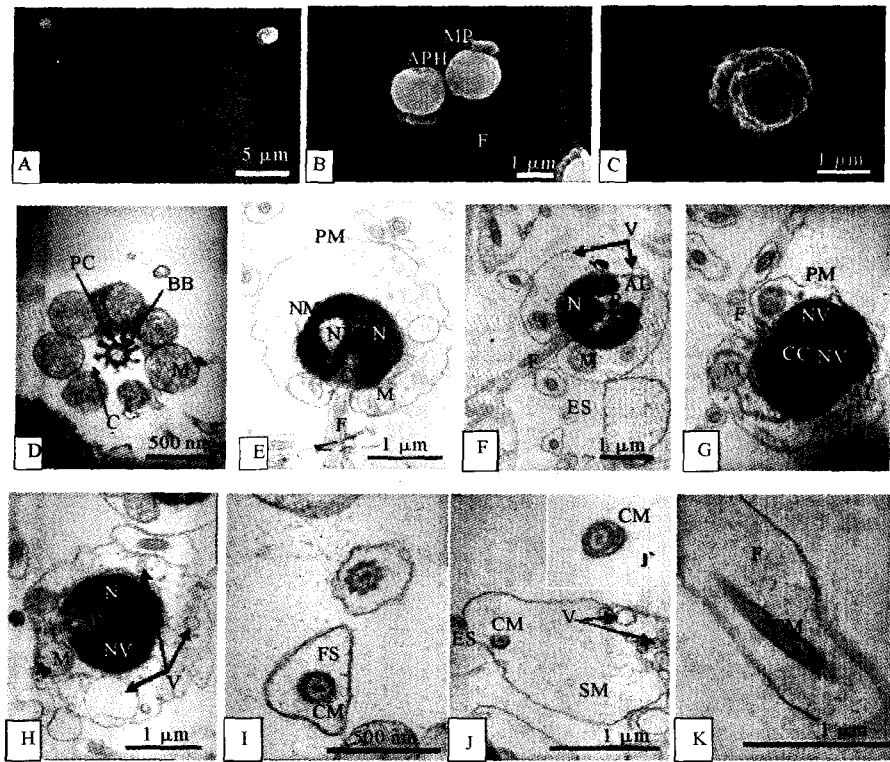
硬骨鱼类种类繁多,约有24 000多种(Kunz 2004),其精子结构各有不同,决定了其生殖特点不尽相同。根据受精方式的不同,分为体内受精类型和体外受精类型,前者精子结构较为复杂(Grier 1981; Gardiner 1978),后者结构较简单(Billard 1986; 尤永隆等 1998; 洪万树等 1991),条斑星鲽属于后者。

Stein(1981)根据已有300余种硬骨鱼类精子超微结构将精子分为3种类型:一是精子头部为长形,二是头部为圆形或者近圆形,三是头部为扁圆形。而Mattei(1970)根据精子发生类型将成熟精子分为两种类型:一是具核隐窝,中心粒位于核隐窝内;另一种是中心粒位于核隐窝外部或者嵌入核内部。条斑星鲽精子头部为圆形,同时属于Mattei分类的第2种类型。

3.1 头部和核前凹陷、囊泡

在超过500种的比目鱼类中,学者们已进行了其中10种的精子超微结构研究,分别是三眼大鼻鲷 *Pegusa triophthalma* (Mattei 1970)、印度淡水比目鱼 *Synaptura* sp. (Mattei 1991)、塞内加尔鲷 *Solea senegalensis* (Mattei 1991; Medina 2000)、*Citharus macrolepidous* (Mattei 1991)、黑大口鲆 *Chascanopsetta lugubris* (Mattei 1991)、大菱鲆 *Scophthalmus maximus* (Suquet et al. 1993)、牙鲆 *Paralichthys olivaceus* (Hara et al. 1998)、川鲆 *Platichthys flesus* (Jones et al. 1988)、圆斑星鲽 *Verasper variegates* (张永忠等 2004)和本研究的条斑星鲽。

条斑星鲽精子超微结构与这些已研究过的鱼类精子结构类似,但也存在不同之处。先前研究结果显示,板鳃类 *Elasmobranchii* 和肺鱼类 *Dipnoi* 的精子核的前方有顶体(Afzelius 1978),而硬骨鱼类的精子一般没有顶体(Craik 1986)。条斑星鲽精子无顶体,但其头部顶端的凹陷很少在其他鱼类中报道,但这一特征在其同属鱼类圆斑星鲽中却存在,表明其在亲缘关系方面比较接近。大菱鲆(Suquet et al. 1993)和牙鲆(Hara et al. 1998)精子的扫描电镜和透射电镜结果显示其头部顶端有1个凹陷,但是王宏田等(1999)和Zhang等(2003)对牙鲆的精子研究时却未发现头部顶端的凹陷结构。因此,笔者认为,从扫描电镜观察结果来看,这种凹陷出现的原因是否是在固定或者是电镜制备过程中的不当处理造成的顶部囊泡消失而留下的,尚有待于进一步研究。



A. 精子整体外观,左上角为尾部不可见但头部圆润的精子;B. 精子头部,圆形,示头顶凹陷(APH)和中段(MP);C. 头部外形不规则且带深凹陷的精子;D. 精子中段横切面,胞膜脱落,示基体(BB)的9组三联微管结构和近端中心粒(PC)及其间的胞质通道(C);E. 核内存在低电子致密区的精子头部(矢状切面),示核膜(NM)、质膜(PM)、核泡(NV)等;F. 具有深入核内部的凹陷(P)结构的精子头部(纵切),可见核膜凸起(NS)及胞质囊泡(V);G. 正常的成熟精子头部(纵切面),示核中两个较小的核泡(NV);H. 精子头部纵切面,核中核泡(NV)和胞质中较多的囊泡(V);I. 精子鞭毛横切面,示质膜的膨胀(FS);J. 精子鞭毛横切面,鞭毛质膜较为膨胀,示膜内较多的囊泡(V),右上角为轴丝的放大;K. 精子鞭毛纵切面,可见轴丝微管结构(CM)

说明: A: 轴丝;NS: 核膜凸起;APH: 头顶凹陷;BB: 基体;C: 胞质通道;CC: 中心粒复合体;CM: 连体微管;EP: 尾部末端;ES: 尾部端横切面;F: 鞭毛;FS: 鞭毛横切面;H: 头部;M: 线粒体;MP: 中段;N: 细胞核;NM: 核膜;NV: 核泡;P: 核前凹陷;PC: 近端中心粒;PM: 胞质膜;SM: 鞭毛膜膨胀;V: 囊泡

Plate: A. Scanning electron micrograph showing the total length of a sperm; B. Scanning electron micrograph showing the head, midpiece and anterior pit of the head; C. Scanning electron micrograph of sperm with the abnormal appearance of head; D. Transmission electron micrograph showing mitochondria around the proximal part of the flagellum, outside the flagellum there is centriole complex composed by basal body and proximal centriole and a cytoplasmic canal between them; 9+2 type of axoneme is in the middle, cytoplasm membrane lost; E. Transmission electron micrograph showing a nucleus vesicle, and plasm membrane and nucleus membrane; F. Transmission electron micrograph showing a pit deepens into the middle of the nucleus, two vesicles anterior to the nucleus, just outside the opening of anterior pit of the nucleus; the nucleolus membrane bulged to form a triangular shaped structure just at the very anterior part of nucleolus; G. Transmission electron micrograph showing centrioles in the basal nuclear fossa and two nucleolus vesicles; H. Transmission electron micrograph showing nucleolus vesicles in the nucleolus and some vesicles in the cytoplasm; I. Transmission electron micrograph showing slight swelling of the tail; J. Transmission electron micrograph showing some small vesicles along the flagellar plasma membrane in the highly swollen part of tail; K. Transmission electron micrograph showing the axoneme in the longitudinal sections of the flagellum

Note: A: Axoneme;NS: Nuclear membrane bulge;APH: Anterior pit of the head;BB: Basal body;C: Candal;CC: Centriolar complex;CM: Connected microtubule;EP: End piece;ES: Transverse section of the end piece;F: Flagellum;FS: Transverse section of the flagellum;H: Head of spermatozoon;M: Mitochondrion;MP: Midpiece;N: Nucleolus;NM: Nucleolus Membrane;NV: Nucleolus vesicle;P: Anterior pit of the nucleus;PC: Proximal centriole;PM: Cytoplasm membrane;SM: Swollen membrane of the flagellum;V: Vesicle

图版 I 条斑星鲽精子超微结构

Plate I The ultrastructure of spermatozoon of barfin flounder

条斑星鲽精子结构同圆斑星鲽类似(张永忠等 2004),在核前部稍偏处有一个狭窄的、稍偏的、深入核内的凹陷,但同时也发现部分精子存在与大菱鲆(Suquet *et al.* 1993)类似的较浅而宽、且位于核正前方的凹陷(图版 I-G、图版 I-H)。本研究中还发现,在核前凹陷的前端存在由核膜隆起形成的三角状结构(图版 I-F、图版 I-G),这在其他硬骨鱼类中从未报道,包括其同属鱼类圆斑星鲽,根据其他硬骨鱼类的精子结构特征,笔者认为该结构可能是操作过程中人为造成的核膜突起。研究发现,条斑星鲽精子核前凹陷和类顶体样结构附近存在数目不等的囊泡结构,该现象在其他硬骨鱼类中也时有报道(王宏田等 1999; 张旭晨等 1992; 赵会宏等 2003)。尤永隆等(1998)在研究尼罗罗非鱼 *Tilapia nilotica* 精子超微结构时认为,成熟精子的核周围存在着一些细小的囊泡而并非是顶体,这些囊泡是在成熟过程中从核内释放出来,染色质浓缩后表面就显得凹凸不平,外观上表现为精子的细胞核表面有许多凹陷。尽管顶体在现存最早的新鳍鱼类,如雀鳝鱼 *Alligator Gar* 及弓鳍鱼 *Amia calva* 中已经完全消失,但考虑甚至在某些纯真骨鱼,如鲑形目 *Salmoniformes* 中的鳟鱼 *Lepidogalaxias salamandroides* Mees 精子上,顶体仍然存在,而在其他一些纯真骨鱼精子或精子细胞中也存在顶体或顶体遗迹等事实,张永忠等(2004)推测在圆斑星鲽精子中的核前凹陷和囊泡结构可能也是顶体的一种遗迹,但也不排除其是向外释放核内物质的一种途径的可能性。与圆斑星鲽相比,本研究中条斑星鲽的精子头部结构具有的类顶体样结构表明,其在进化上可能属于较为原始的类型。

在条斑星鲽精子中,核中发现存在一些电子密度较低的区域,称之为“核泡”,这在其他一些硬骨鱼类中常有发现(林丹军等 1998),这些“核泡”结构可能是核质部分高度凝聚的结果(Poirier *et al.* 1980),也可能是浓缩的染色质中的空隙,原因是周围无膜存在(尤永隆等 1998)。根据本实验观察结果,笔者也同意这种结构是染色质空隙的说法。

本研究发现,约 30%~40%的精子头部呈现不规则的圆形,头的表面有较多褶皱或者部分有较深的凹陷,鞭毛上带有较多凸起状结构,这些特征是否与平时观察到的条斑星鲽精子质量不高有关尚有待进一步研究确定。

3.2 中心粒复合体

条斑星鲽中心粒复合体由近端中心粒和基体(远端中心粒)两部分构成,近端中心粒与基体的排列与牙鲆、大菱鲆和圆斑星鲽的类似,也与一般硬骨鱼类一样(Deurs *et al.* 1973),相互垂直呈“T”型排列,即近端中心粒长轴与精子长轴垂直、基体长轴与精子长轴平行。硬骨鱼类中心粒的垂直排列结构被认为是一种原始的特征,并可作为鲽科 *Pleuronectidae*、棘鲆科 *Citharidae*、鲆科 *Bothidae* 鱼类与鲷科 *Soleoidae* 鱼类的分类特征之一,鲷科鱼类的精子中心粒的排列结构为同轴平行,这在半滑舌鲷 *Cynoglossus semilaevis* Güther 精子研究中再次验证(吴莹莹等 2007),硬骨鱼类中心粒复合体的组成及组成方式在种间的差异可能为系统进化提供基本的形态学依据。

3.3 鞭毛

条斑星鲽精子鞭毛表面起伏不平,具有较多隆起状的结构,不同部位横截面的形状也不相同。条斑星鲽精子鞭毛两侧不存在侧鳍结构,这与圆斑星鲽相同,但在其他比目鱼如大菱鲆(Suquet *et al.* 1993)、塞内加尔鲷(Medina 2000)和牙鲆(Hara *et al.* 1998)中发现有侧鳍存在。鞭毛侧鳍的有无能否影响精子的游泳速率,从而影响受精效率,不同学者有不同的看法:Stoss(1983)认为侧鳍可能改善精子鞭毛的游泳速率,有利于提高受精率,而 Afzelius(1978)则认为侧鳍与精子游泳速率的提高无多大关系。但是,在鞭毛轴丝外侧存在较多囊泡,这些囊泡有的有内容物、有的无内容物。这种囊泡在黄颡鱼 *Pelteobagrus vachelli* (Richardson) (尤永隆等 1996)、长吻鲈 *Leiocassis longirostris* (张耀光等 1993)和鲤鱼 *Cyprinus carpio* Linnaeus (尤永隆等 1996)等精子的近鞭毛基部也存在,其中长吻鲈囊泡内有颗粒状电子致密物质,张耀光等(1993)推测这一囊泡可能是一种储能结构,为精子变态和变态后的精子提供营养物质和能量,至于其来源及生理功能目前尚无定论。

参 考 文 献

- 尤永隆, 林丹军. 1996. 鲤鱼精子超微结构的研究. 动物学报, 17(4): 377~383
- 尤永隆, 林丹军. 1996. 黄颡鱼 *Pseudobagrus fulvisraco* 精子的超微结构. 实验生物学报, 29(3): 235~245
- 尤永隆, 林丹军. 1998. 尼罗罗非鱼精子形成中核内囊泡的释放. 动物学报, 44(3): 257~263
- 王宏田, 徐永立, 张培军. 1999. 牙鲆精子的超显微结构. 海洋科学, 6: 5~7
- 吴莹莹, 柳学周, 王清印, 徐永江, 包振民. 2007. 半滑舌鳎精子的超微结构. 海洋学报, 29(6): 167~171
- 张永忠, 徐永江, 柳学周. 2004. 圆斑星鲽精子的超微结构及核前区特殊结构. 动物学报, 50(4): 630~637
- 张旭晨, 王所安. 1992. 细鳞鱼精巢结构和精子发生. 动物学报, 38(4): 355~358
- 张耀光, 罗泉笙, 钟明超. 1993. 长吻鲢精巢及精子结构的研究. 水生生物学报, 17(3): 246~257
- 杨万喜, 应雪萍, 竺俊全. 2000. 硬骨鱼类精子发生及其在系统演化研究中的应用前景. 东海海洋, 18(3): 53~58
- 林丹军, 尤永隆. 1998. 褐菖鱼由精细胞晚期的变化及精子结构的研究. 动物学研究, 19(15): 359~366
- 洪万树, 张其永, 倪子锦. 1991. 西埔湾黄鳍鲷精子发生和形成. 水产学报, 15(4): 302~307
- 赵会宏, 刘晓春, 林浩然, 刘付永忠, 王云新. 2003. 斜带石斑鱼精子超微结构及盐度、温度、pH对精子活力及寿命的影响. 中国水产科学, 10(4): 286~293
- Abascal, F. J., Medina, A., Megina, C. et al. 2000. Ultrastructure of *Thunnus thynnus* and *Euthynnus alletteratus* spermatozoa. J. Fish Biol. 60: 147~153
- Afzelius, B. A. 1978. Fine structure of the garfish spermatozoon. J. Ultr. Res. 64: 309~324
- Billard, R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. Reprod. Nutr. Develop. 26(4): 877~892
- Craik, J. C. A. 1986. Levels of calcium and iron in the ovaries and eggs of cod *Gadus morhua* L., and plaice *Pleuronectes platessa* L. Comp. Biochem. Physiol. 38(A): 515~517
- Deurs, B. V., and Lastein, U. 1973. Ultrastructure of spermatozoa of the teleost *Pantodon buchholzi* Peters, with particular reference to the mid-piece. J. Ultrastruct. Res. 42: 517~533
- Gardiner, D. M. 1978. Fine structure of the spermatozoon of the viviparous teleost, *Cymatogaster aggregata*. J. Fish Biol. 13: 435~438
- Grier, H. J. 1981. Cellular organization of the testes and spermatogenesis in fishes. Am. Zool. 21: 345~357
- Hara, M., and Okiyama, M. 1998. An ultrastructural review of the spermatozoa of Japanese fishes. Bull Ocean Res Ins, Uni Tokyo, 33: 120~131
- Jamieson, B. G. M. 1991. Fish Evolution and Systematics; Evidence from Spermatozoa. Cambridge: Cambridge University Press
- Jones, P. R., and Butler, R. D. 1988. Spermatozoon ultrastructure of *Platichthys flesus*. J. Ultrastruct. Mol. Strut. Res. 98: 71~82
- Kunz, Y. W. 2004. Developmental biology of Teleost fishes. Netherlands: Springer Press, 636
- Lahnsteiner, F., and Patzner, R. A. 1998. Sperm motility of the marine teleosts *Boops boops*, *Diplodus sargus*, *Mullus barbatus* and *Trachurus mediterraneus*. J. Fish Biol. 52: 726~742
- Mattei, X. 1991. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. Can. J. Zool. 69: 3 038~3 055
- Mattei, X. 1970. Spermiogen se compar e des poissons. In: Baccetti Bed. Comparative Spermatology. New York; Academi Press, 57~70
- Medina, A., Megina, C., Abascal, F. J. et al. 2000. The spermatozoon morphology of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) (Teleostei, Pleuronectiformes). J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 32: 645~650
- Poirier, G. R., and Nicholson, N. 1980. Fine structure of the testicular spermatozoa from the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. J. Ultrastruct. Res. 80: 104~110
- Quagio-Grassiotto, I., Oliveira, C., and Gosztanyi, A. E. 2001. The ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa in *Diplomystes mesembrius*. J. Fish Biol. 58: 1 623~1 632
- Stein, A. 1981. Light and electron microscopic studies on the spermatozoa of several fresh water teleost fish (Teleostei). J. Appl. Zool. 68: 183~198 (In German)
- Stoss, J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoon physiology. Hoar, W. S., Randall, D. J. E. M. Fish Physiol. New York: Academic Press, 307~308
- Suquet, M., Dorange, G., Omnes, M. H. et al. 1993. Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot *Scophthalmus maximus*. J. Fish Biol. 42: 509~516
- Zhang, Y. Z., Zhang, S. C., Liu, X. Z. et al. 2003. Cryopreservation of flounder *Paralichthys olivaceus* sperm with a practical methology. Theriogenol. 60: 989~996