

## 超低温冷冻对西伯利亚鲟精子形态结构损伤的观察

章龙珍<sup>1</sup>, 刘鹏<sup>1,2</sup>, 庄平<sup>1,2</sup>, 王斌<sup>3</sup>, 闫文罡<sup>1,2</sup>

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所农业部海洋与河口渔业重点开放实验室, 上海 200090;

2. 上海海洋大学上海高校水产养殖 E-研究院, 上海 200090;

3. 浙江省杭州千岛湖鲟龙科技开发有限公司, 浙江 杭州 311700)

**摘要:** 为改进西伯利亚鲟精子超低温冷冻保存技术, 探讨精子损伤机制, 应用扫描和透射电子显微镜, 观察了西伯利亚鲟鲜精与冷冻后精子的形态结构。结果显示, 经过冷冻保存后精子的形态发生了很大变化。精子顶体长、精子头中部宽、头中部宽与前部宽比值及中段宽与鲜精相比显著增加( $P < 0.05$ ); 中段长度、后外侧延伸物长度比鲜精显著变短( $P < 0.05$ )。精子经过冷冻后有 30.5% 的精子在形态、结构上受到不同程度损伤, 受损精子显微结构表现为顶体后外侧延伸物与核糅合, 顶体内容物丢失; 核膜囊泡化、核膜断裂, 核内出现空泡; 线粒体内嵴弥散, 线粒体脱落; 鞭毛外膜松弛与鞭毛脱离等。部分受损精子出现顶体丢失, 中段脱落, 鞭毛自中段基部断裂的现象。精子损伤主要集中在膜系统, 中心粒等微管系统基本完好。

**关键词:** 西伯利亚鲟; 精子超微结构; 冷冻损伤

**中图分类号:** Q 954.43; S 917

**文献标识码:** A

精子超低温冷冻保存技术已经在哺乳动物, 鱼类, 昆虫等物种中有了系统的研究<sup>[1-9]</sup>, 低温对哺乳动物, 鱼类等精子造成的形态结构以及遗传上的损伤研究较少, 只对牛、羊、欧洲鲑、鲤鱼等个别种做了初步研究<sup>[1-10]</sup>。鲟鱼作为一种古老的物种, 其精子结构、精浆生化成份都不同于一般的硬骨鱼类<sup>[11-12]</sup>。有关鲟鱼类精子的低温保存已涉及俄罗斯鲟 (*Acipenser gueldenstaedti*)、欧鳊 (*Huso huso*)、闪光鲟 (*Acipenser stellatus*)、小体鲟 (*Acipenser ruthenus*)、裸腹鲟 (*Acipenser nudiventris*)、达氏鳊 (*Huso dauricus*)、西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*)、中华鲟等 10 多个种<sup>[13-18]</sup>, 但有关鲟鱼精子低温损伤的研究还未见有报道。西伯利亚鲟属鲟形目、鲟科, 鲟属, 分为半洄游性种群 (*A. b. baerii*)、河居性种群 (*A. b. baicalensis*) 和湖河性种群 (*A. b. baicalensis*) 三

个亚种。我国主要的养殖对象为半洄游亚种, 并已成为主要鲟鱼养殖品种。本文利用扫描和透射电子显微镜, 对西伯利亚鲟鲜精与冷冻后精子的形态、结构变化进行了比较研究, 从而掌握低温冷冻对精子的损伤情况, 探讨冷冻对精子的损伤机制, 以期对精子超低温保存技术改进提供理论依据和技术支持。

### 1 材料与方法

#### 1.1 精子来源

实验所用亲鱼为人工养殖 7 龄西伯利亚鲟, 雄鱼体长 ( $103.8 \pm 6.5$ ) cm, 体质量 ( $4.87 \pm 1.22$ ) kg ( $n = 10$ )。人工催产后取精。共采集 6 尾鱼精子, 每尾取精液 20 mL。取活力  $> 90\%$  的优质鲜精 5 mL 用等量 2.5% 的戊二醛固定, 4 °C 保存, 以备进行电镜观察。

收稿日期: 2007-08-11

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2004AA603110); 浙江省科技计划 (2007C12026, 2004BA526B0114); 国家科技基础条件平台 (2004DKA30470-004); 上海高校水产养殖 E-研究院建设项目 (E03009); 农业部海洋与河口渔业重点开放实验室开放课题 (开重-03-01); 上海市科委基础重大专项 (06dj14003)

作者简介: 章龙珍 (1954-), 女, 湖北谷城人, 研究员, 主要从事水生动物生殖生物学和生理学研究。Tel: 021-55530954, E-mail: longzhen2885@hotmail.com

## 1.2 冻精制备

选取活力>90%的优质鲜精 5 mL,按精液1:1 (V/V) 与预冷(4 °C) 的稀释液(20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl + 25 mmol·L<sup>-1</sup> Glu + 0.25 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, pH8) 混合;装入离心管,不设平衡时间,利用二步降温法投入液氮冷冻保存,4 °C 水浴解冻<sup>[19]</sup>。冻精用等量的 2.5% 戊二醛固定,4 °C 保存,以备进行电镜观察。

## 1.3 电镜观察

**扫描电镜样品制备** 将固定的精液用 PBS 清洗三次后,用 1% 戊二醛固定 1.5 h, PBS 清洗 1 次,梯度酒精脱水,醋酸异戊酯过渡,自然干燥,喷金,JEOL-6380LV 扫描电镜观察。

**透射电镜样品的制备** 将固定的精液经 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,弃去上清液,再加等量的 2.5% 戊二醛。30 min 后将沉淀从离心管中剥

离出来,置 2.5% 戊二醛中,保存在 4 °C 下备用。样品经 PBS 液漂洗 3 次后,用 2% 戊二醛固定,各级酒精梯度脱水, Epon812 树脂包埋, ULTRACUTE 超薄切片机切片,厚度为 70~80 nm。样本经醋酸铀和柠檬酸铅染色,置 HITACHI H-600 型透射电镜观察并拍照。

## 1.4 测量及数据处理

扫描电镜下分别选取 100 个鲜精及冻后受损精子,测量其顶体长度,宽度,头长,中段长等 9 组数据。精子各个部位的测量按 Dilauro 对精子各部的划分和测量点利用显微图像分析软件 (Image-Pro Plus 5.1, Media Cybernetics, USA) 进行测量<sup>[11]</sup> (图 1)。另加测头中部宽度 (图 1)。

在扫描电镜下随机选取 200 个冻后精子样本,统计受损精子数。

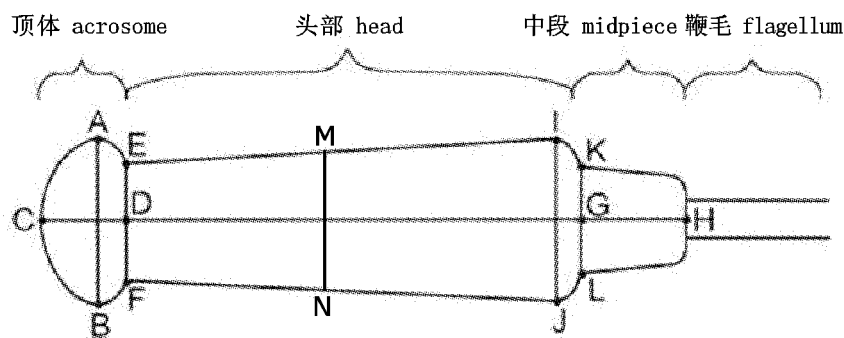


图 1 鲟鱼精子各部分分区图

CD: 顶体长度; AB: 顶体宽度; DG: 头长; EF: 头前部宽; IJ: 头后部宽; MN: 头中部宽; CG: 头全长; GH: 中段长度; KL: 中段宽度; CH: 全长

Fig. 1 Diagram of a typical sturgeon sperm cell, with structural dimensions

CD: acrosome length; AB: acrosome width; DG: head length; EF: anterior head width; IJ: posterior head length; MN: Middle head width; CG: total head length; GH: midpiece length; KL: midpiece width; CH: total length

用方差分析 (ANOVA) 检验组间差异是否显著。  $P < 0.05$  差异显著,  $P > 0.05$  差异不显著。数据表示为: 平均值  $\pm$  标准差。

## 2 结果

### 2.1 数据测量

西伯利亚鲟精子经过冷冻保存后精子活力为  $(51.8 \pm 5.8)\%$ <sup>[19]</sup>, 通过扫描及透射电镜观察其形态发生了很大变化。测量得出: 冷冻后精子顶体长、精子头中部宽度与前部宽度比值、中段宽显著增加 ( $P < 0.05$ ); 中段长度缩短、顶体后外侧延

伸物变短, 冷冻后精子与鲜精有显著差异 ( $P < 0.05$ ); 其他指标没有显著的变化 ( $P > 0.05$ ) (表 1, 图版-1~6)。

### 2.2 形态结构损伤

通过对冻后精子统计, 有 30.5% 的精子有不同程度的损伤 ( $n = 200$ )。其损伤情况和损伤部位如下:

**顶体** 鲜精具有明显的顶体及后外侧延伸物 (图版-1, 9); 顶体中含有亚顶体、顶体泡和顶体腔, 顶体腔中有少量颗粒状物质 (图版-11)。冷冻受损精子表现出顶体不明显或顶体与核发生糅合 (图

表 1 西伯利亚鲟鲜精与冻后精子形态比较

Tab. 1 Dimensions of fresh and frozen-thawed semen under scanning electron microscopy

测量项目( $\mu\text{m}$ ) dimension	鲜精 fresh semen ( $n=100$ )	冻后 thawed semen ( $n=100$ )
顶体长度 acrosome length	$0.64 \pm 0.089^a$	$0.89 \pm 0.235^b$
顶体宽度 acrosome width	$0.86 \pm 0.099^a$	$0.96 \pm 0.100^a$
头前部宽度 anterior head width	$0.78 \pm 0.125^a$	$0.86 \pm 0.156^a$
头后部宽度 posterior head width	$1.11 \pm 0.120^a$	$1.10 \pm 0.123^a$
头中部宽度 middle head width	$0.98 \pm 0.109^a$	$1.44 \pm 0.257^b$
头中部宽度/头前部宽度 middle head width/anterior head width	$1.51 \pm 0.069^a$	$1.87 \pm 0.318^b$
头长 head length	$5.24 \pm 0.391^a$	$5.734 \pm 0.493^a$
中段长度 midpiece length	$1.83 \pm 0.261^a$	$1.16 \pm 0.664^b$
中段宽度 midpiece width	$0.72 \pm 0.103^a$	$0.90 \pm 0.174^b$
PLP(顶体后外侧延伸物)长度 PLP length	$0.32 \pm 0.043^a$	$0.276 \pm 0.024^b$

注: 同行不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Notes: The different letters in the same row mean significant difference( $P < 0.05$ )

版-2,3,4),后外侧延伸物消失或变短(图版-3,5),顶体膜受损(图版-5),顶体腔增大,颗粒物质丢失(图版-12),有的精子甚至顶体脱落(图版-10);顶体泡、亚顶体、核之间的排列松弛(图版-12)。少量精子顶体前部延伸成棒状物,长约 $0.73 \mu\text{m}$ (图版-7)。

**核** 鲜精细胞核电子致密度大,核表面质膜光滑、排列紧密,核内内切沟结构明显(图版-9)。受损精子细胞核表面皱褶,不光滑,质膜破损,呈泡状化(图版-2,3),细胞核电子致密度减小(图版-10),核中间出现核空泡,膜断裂和脱离(图版-16);核膜与质膜之间空隙加大(图版-12),核内切沟管状结构模糊(图版-12)。

**中段** 鲜精具有明显的中段,其直径小于核径(图版-1,14);线粒体呈二到三层排列,靠近核部分呈圆形和椭圆形,线粒体内有明显的长条形和连续弯曲形髓样嵴结构,电子密度大(图版-13);中心粒由三联微管组成的轮状结构(图版-14)。受损精子表现出中段膨大(图版-2);中段膜破损,线粒体外露(图版-3),线粒体内部电子密度下降,线粒体嵴膜受损,髓样结构弥散(图版-15);有的中段不明显(图版-4)、脱落(图版-6);中心粒结构未发生明显变化(图版-15,16)。

**鞭毛** 鲜精鞭毛有连续的鳍褶结构(图版-17)。冻后损伤的鞭毛鳍褶与鞭毛脱离,鞭毛与中

段脱离,少数鞭毛在中段断开(图版-6,8)。

### 3 讨论

精子冷冻保存后,损伤主要表现为形态结构和生化上的变化,其中包括细胞体积变化,细胞膜质氧化,细胞膜选择性渗透机制破坏等<sup>[1]</sup>,这些通常会造成细胞功能紊乱。质膜和顶体膜是精子中最敏感的部分,由观察结果看冷冻损伤主要集中在精子的膜系统,这与其他硬骨鱼类及哺乳动物中的结果相似<sup>[1,4-5]</sup>。受损膜系统主要包括顶体膜,核膜,质膜,内切沟膜,线粒体膜,线粒体嵴膜,鞭毛外膜。细胞膜不仅是细胞结构上的边界,而且可以保持细胞处于一个相对稳定的内环境,同时在细胞与环境之间进行物质、能量的交换,以及在信息传递过程中起着决定性的作用<sup>[20]</sup>。膜受到了损伤,精子便无法接受外界刺激信息,因此即使精子还可以进行基本的物质能量代谢,也不能被激活。

#### 3.1 冻精膜结构的损伤对活力的影响

降温过程中精子膜系统受到损伤主要包括两方面:第一是结构损伤,膜的结构主要是由脂类和一些膜蛋白组成。精子在降温过程中会在精细胞内形成冰晶,而且低温使膜发生相变,膜脂晶格化,韧性降低,这会造成膜形态上的损伤。膜受到损伤膜蛋白容易从膜上脱落,给细胞造成不可逆

的损伤<sup>[21]</sup>。本实验未进行冷冻前的平衡处理,精子中的水分没有充分的脱出,在降温过程中易形成冰晶,造成精子的损伤,冻精的成活率(51.8±5.8)%偏低。冷冻前最佳平衡时间的确定是提高冻精活力的关键因素之一。第二是生化损伤,由于在冷冻过程中细胞外首先结冰,造成了细胞内水分向外流失,细胞脱水体积缩小,细胞内离子浓度增加,细胞内的大分子物质互相挤压,pH及酶活性都会发生变化<sup>[5-7]</sup>。而且同时还会伴随着细胞表面电荷变化,大分子间共价键破坏,从而导致膜不稳定,大分子复合体解体<sup>[5-7,21]</sup>。这两种损伤从外观上表现为顶体膜,核膜,质膜,线粒体膜,鞭毛外膜等膜结构囊泡化,表面破损、断裂,内容物逸失,线粒体嵴弥失,顶体破坏,这与红鳍东方鲀精子经超低温保存后,精子的被膜膨胀、破裂、脱落,线粒体内脊变形、结构模糊,鞭毛断裂,轴丝断裂相似<sup>[22]</sup>。在冷冻保存的精子中有30.5%的精子表现出不同程度的损伤,这也就是冷冻精子活力下降的主要原因。

### 3.2 复温及抗冻剂对精子活力的影响

复温过程中也会对精子造成损伤,其原因也是多方面的。如冷冻后膜的渗透率变化,可能造成渗透率过大或过小,甚至完全没有渗透功能。有的细胞渗透率未变,但却在复温过程中产生细胞溶解<sup>[21]</sup>。在复温过程中还会造成部分膜发生翻转,这都会影响膜的正常功能<sup>[8]</sup>。复温过程中升温速率也会影响到精子的成活。

添加抗冻剂可有效的减少精子的损伤。单一的抗冻剂各有优缺点,He等<sup>[9]</sup>对条纹狼鲈的研究中发现提高DMSO(二甲亚砜)浓度可更好的保护质膜,但线粒体会受到伤害,在DMSO中加入氨基酸能保护冻后线粒体功能,但氨基酸对膜完整性的保护却没有作用。所以不同抗冻剂可按一定比例混合,取长补短得到最优的保存效果。本实验利用的是18%甲醇作为抗冻剂,甲醇虽然对西伯利亚鲟精子的冷冻保存比其他四种抗冻剂能提高冻精的活力<sup>[19]</sup>,但对线粒体及核膜没有较好的保护作用,冻后出现了线粒体及核膜结构的破坏。笔者认为选择适合抗冻剂种类搭配及抗冻剂浓度可以有效的减少精子的损伤,提高冻后精子的活力。结合冷冻保存后膜系统及线粒体结构和功能变化,筛选出合理的抗冻剂是提高冷冻保存精子的成活率的一条有效途径。

### 3.3 西伯利亚鲟精子损伤分析

西伯利亚鲟冻后精子的顶体除顶体膜损伤外还出现一个特别现象,顶体前端延伸成一个棒状结构,不明显的受损精子表现为精子顶体长度增大。此现象在冻前样本中没有出现,初步认为是顶体内容物外排造成的。因为在正常精子中精子顶体的帽状结构的角在60°左右(图版-1),而在有棒状结构的精子中角在45°左右(图版-7)。在哺乳动物中也出现类似的现象,有些学者认为是精子过早发生获能和顶体反应,精子难以穿过卵膜完成受精<sup>[23-25]</sup>。有关鲟鱼精子顶体反应过程,以及精子在入卵时的结构变化还不很清楚,此现象的原因还有待以后深入研究。

精子细胞核在冷冻前是由均一的电子致密物质组成,呈前端细后端粗的棒状,在冷冻后部分核内出现了空泡结构,并且在扫描电镜下可以看到受损精子核中段明显增粗。受损精子核内的空泡不同于在某些硬骨鱼类中的核泡,硬骨鱼中核泡是将与传递遗传信息没有直接关系的物质如RNA和非组蛋白等通过外排作用从核中排出形成的,它随着精子成熟不断减少。西伯利亚鲟中出现的这种囊泡是冷冻后形成的,是否也存在核泡那样的外排作用还不确定。精子核中段的异常增粗可能是由于膜泡状化、膜通透性变化甚至膜破裂后外源物质入核造成的。

冷冻基本上不会对微管系统的结构造成明显的损伤<sup>[1]</sup>。但是鞭毛和中段的结合部位却有部分精子发生断裂损伤。鞭毛与中段结合处是两种不同的细胞骨架结构过渡所在,也是结构上脆弱的地方。同样的现象也出现在顶体和核的结合部以及核与中段的结合部。这些部位之间只有脆弱的膜结构,缺少骨架结构连接,所以在实际冷冻过程中这些部位容易受到损伤,造成不同程度的脱节、断裂现象。

### 参考文献:

- [1] Sandra P, Martin B. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation[J]. *Micron*, 2006, 37: 597-612.
- [2] Baulny B O D, Labbe C, Maisse G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants [J]. *Cryobiology*, 1999, 39:

- [3] Tadei A R, Barbato F, Abelli L, *et al.* Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti) [J]. *Cryobiology*, 2001, 42: 244 - 255.
- [4] 陈田飞, 吴大洋. 单细胞凝胶电泳检测家蚕冷冻精子的DNA损伤[J]. *蚕业科学*, 2005, 31(3): 366 - 369.
- [5] 赵维信, 姜仁良, 刘修英, 等. 几种鲤科鱼类精子和胚胎冷冻损伤的扫描电镜研究[J]. *淡水渔业*, 1992, 5: 3 - 5.
- [6] 张轩杰, 张良平, 沈晓勤. 鱼类冷冻精子结构变异的电子显微镜研究[J]. *湖南师范大学(自然科学版)*, 1991, 14(2): 160 - 164.
- [7] Pegg D E. The history and principles of cryopreservation [J]. *Semin Reprod Med*, 2002, 20 (1): 5 - 13.
- [8] Leeuw D, Chen F E, Colenbrander H C, *et al.* Coldinduced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes [J]. *Cryobiology*, 1990, 27: 171 - 183.
- [9] He S Y, Woods L C. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm [J]. *Cryobiology*, 2004, 48: 254 - 262.
- [10] Gillan L, Maxwell W M C. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract [J]. *J Reprod Fertil Suppl*, 1999, 54: 271 - 283.
- [11] Martin N D, Wayne S K, Rosemary A W, *et al.* Sperm-cell ultrastructure of North American sturgeons. I. The Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) [J]. *Can J Zool*, 1998, 76: 1822 - 1836.
- [12] 张涛, 庄平, 章龙珍, 等. 人工养殖施氏鲟和小体鲟精浆微量元素分析[J]. *中国水产科学*, 2003, 10(4): 350 - 351.
- [13] Dzuba B B, Kopeika A E F, Cherepanov V V, *et al.* Sturgeons sperm quality after 6 years of cryopreservation [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 1999, 15(4 - 5): 312.
- [14] Ciereszko A, Toth G P, Christ S A, *et al.* Effect of cryopreservation and theophylline on motility characteristics of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) spermatozoa [J]. *Theriogenology*, 1996, 45(3): 665 - 672.
- [15] Wayman W R. From gamete collection to database development; development of a model cryopreserved germplasm repository for aquatic species with emphasis on sturgeon [D]. Louisiana State University, 2003.
- [16] Tsvetkova L I, Cosson J, Linhart O, *et al.* Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser baeri* and *A. ruthenus* [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 1996, 12(1): 107 - 112.
- [17] Drokin S I, Kopeika E F. Motility of and phospholipid content in cryopreserved spermatozoa of three sturgeon species [J]. *The Sturgeon Quarterly*, 1996, 4(1): 8 - 10.
- [18] 柳凌, 危起伟, 鲁大椿, 等. 中华鲟精子低温保存的相关因子[J]. *水产学报*, 1999, 23(suppl.): 86 - 89.
- [19] 刘鹏, 庄平, 章龙珍, 等. 人工养殖西伯利亚鲟精子超低温冷冻保存研究[J]. *海洋渔业*, 2007, 29(2): 97 - 104.
- [20] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. *细胞生物学* [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [21] 李广武, 郑从义, 唐兵. *低温生物学* [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998.
- [22] 王海涛. 红鳍东方鲟精子超低温保存前后的超微结构观察[J]. *海洋科学*, 2007, 31(2): 17 - 19, 26.
- [23] 陈松林. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望[J]. *水产学报*, 2002, 26(2): 161 - 168.
- [24] Thundathil J, Meyer R, Palasz A T, *et al.* Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production [J]. *Theriogenology*, 2000, 54: 921 - 934.
- [25] Thundathil J, Palasz A T, Barth A D, *et al.* Plasma membrane and acrosomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrosome defect [J]. *Theriogenology*, 2002, 58: 87 - 102.

---

## Observation on cryodamage of spermatozoa of Siberian sturgeon (*Acipenser b. baerii*)

ZHANG Long-zhen<sup>1</sup>, LIU Peng<sup>1,2</sup>, ZHUANG Ping<sup>1,2</sup>, WANG Bin<sup>3</sup>, YAN Wen-gang<sup>1,2</sup>

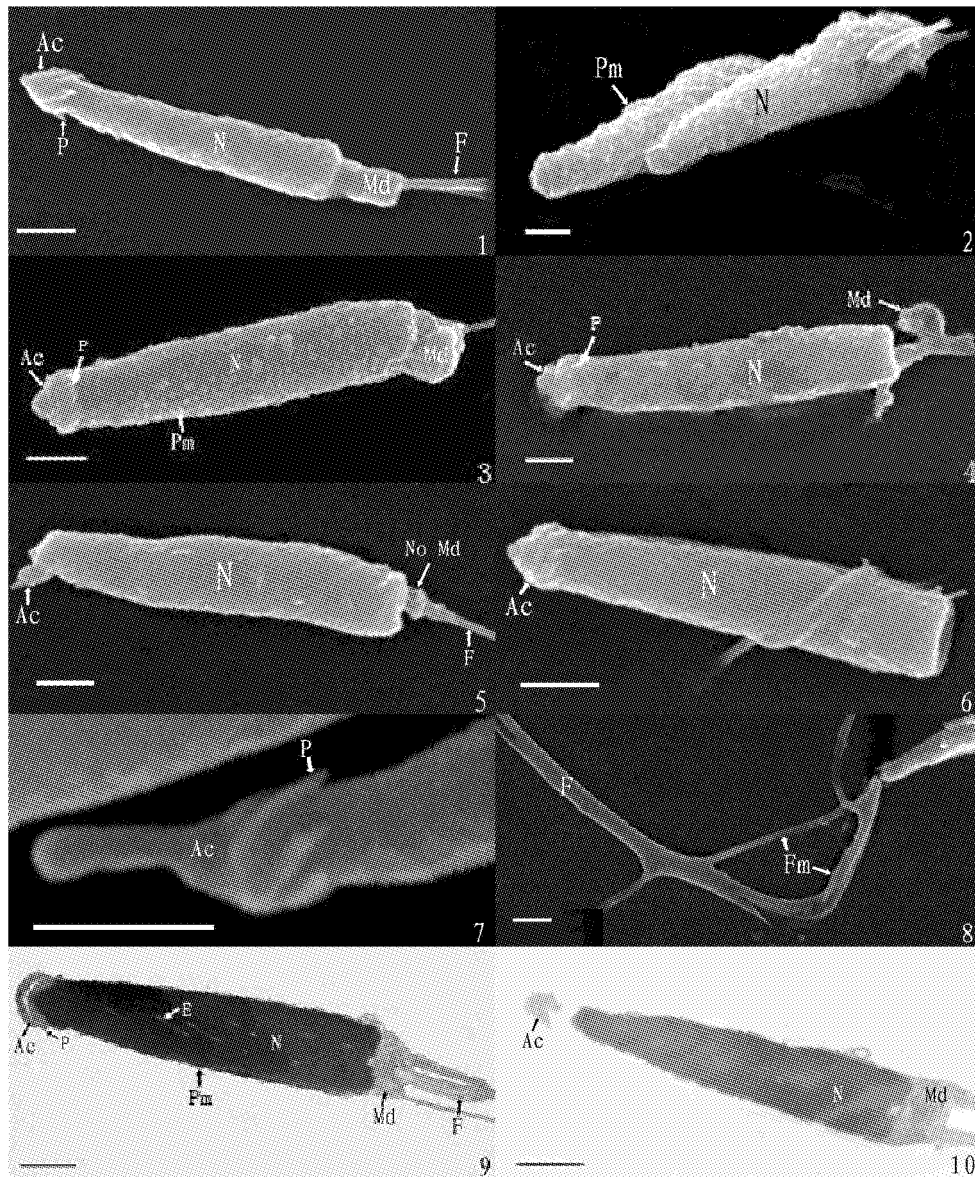
(1. Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

2. E-Institute of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China;

3. Hangzhou Qiandaohu Xunlong Technology Development Co., Ltd, Hangzhou 311700, China)

**Abstract:** The variations of morphology and ultrastructure between fresh Siberian sturgeon sperm and frozen-thawed sperm were observed by transmission and scanning electron microscopy in this paper. The results showed that the sperm morphology and ultrastructure changed greatly after being frozen-thawed. The length of acrosome, the ratio of middle head width to anterior head width and the width of midpiece increased significantly ( $P < 0.05$ ). The length of midpiece and posterolateral projections became short. There was significant difference between fresh and thawed sperm ( $P < 0.05$ ). About 30.5% of the sperms were damaged after being frozen-thawed. The ultrastructure exhibition of freezing injury focused on: the posterolateral projections mixed with nuclear and the content of acrosome lost; the arrangement between acrosomal vesicle, subacrosome and nucleus became slack; the plasma membrane of sperm swelled, folded and disrupted; the membrane of endonuclear canals unclear; the membrane of mitochondria was cracked, dispersed and even mitochondria lost; the membrane of flagellum became slack and released from flagellum. Some of the damaged sperms lost the acrosome, midpiece and flagellum. The flagellum regularly disrupted from the posterior part of midpiece. Most damaged parts focused on the membrane-system of sperm, microtubular-system was still well. Freezing and thawing procedure were the key of cryopreservation. Study of Siberian sturgeon sperm ultrastructure would direct us to choose the proper cryopreservant, extender and right method, including freezing and thawing procedure, to conserve the sperm.

**Key words:** *Acipenser b. baerii*; sperm ultrastructure; damage of cryopreservation



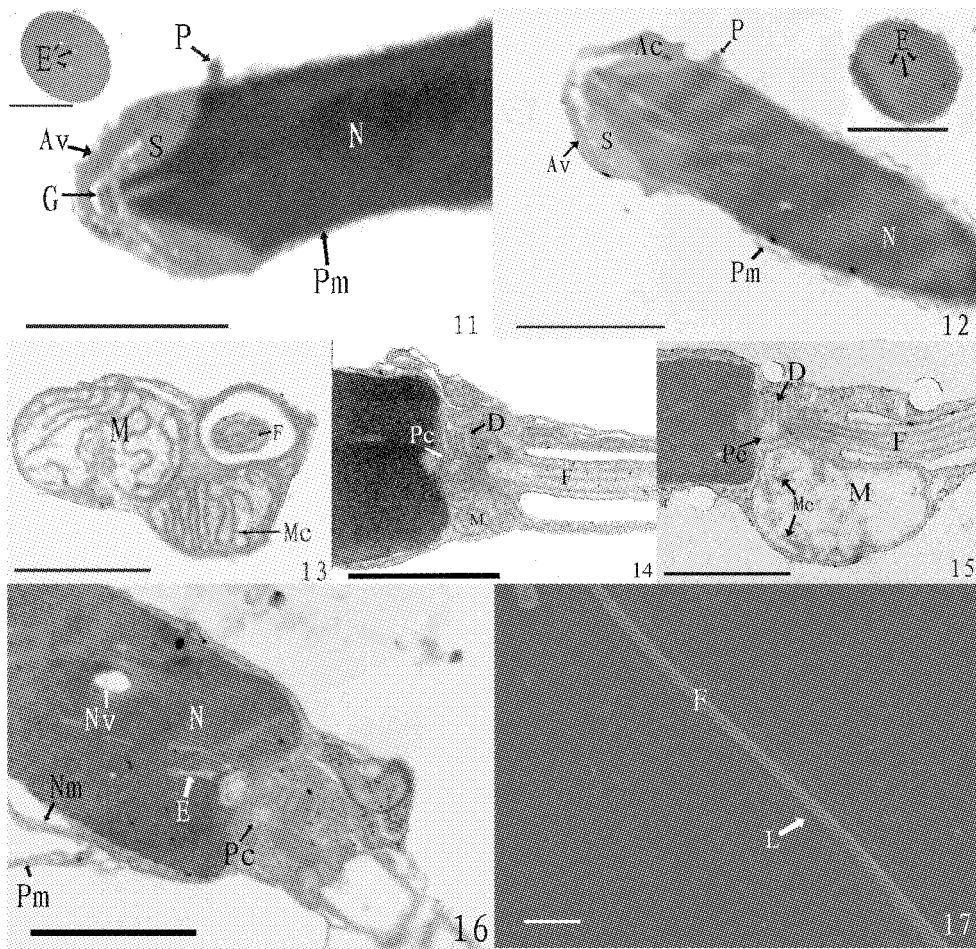
图版 Plate

1. 正常西伯利亚鲟精子扫描电镜图片 比例尺 = 1 μm; 2~8. 冻后受损精子扫描电镜图片 比例尺 = 1 μm; 1. 示精子正常顶体, 核, 中段, 鞭毛形态; 2~6. 示顶体后外侧延伸物与核融合, 顶体丢失; 2~4. 示核膜皱褶、泡状化; 3~5. 示线粒体肿胀、丢失; 6. 示中段、鞭毛脱落; 7. 示顶体前端棒状突起; 8. 示鞭毛外膜破裂; 9. 透射电镜图片, 精子纵切示正常精子形态 比例尺 = 1 μm; 10. 透射电镜图片, 冻后受损精子纵切示顶体脱落 比例尺 = 1 μm

Ac: 顶体; E: 内切沟; F: 鞭毛; Fm: 鞭毛外膜; Md: 中段; N: 细胞核; P: 后外侧延伸物; Pm: 细胞质膜

1. Scanning electron micrograph of normal Siberian sturgeon sperm-cell. Scale bar = 1 μm; 2 - 8. Scanning electron micrograph of unthawn damaged sperm-cell, Scale bar = 1 μm; 1. Showing the morphology of normal sperm-cell; 2 - 6. Showing the posterolateral projections mixed with nuclear and lost the acrosome; 2 - 4. Showing the plasma membrane swelled and folded; 3 - 5. Showing mitochondrion swelled, lost; 6. Showing midpiece, flagellum break off; 7. Showing anterior protuberance; 8. Showing flagellum membrane disrupted; 9. Transmission electron micrograph, longitudinal section of sperm-cell, showing the normal morphology, Scale bar = 1 μm; 10. Transmission electron micrograph, longitudinal section of unthawn damaged sperm-cell, showing acrosome lost, Scale bar = 1 μm

Ac: Acrosome; E: endonuclear canals; F: flagellum; Fm: flagellum membrane; Md: midpiece; N: nucleus; P: posterolateral projections; Pm: cytoplasmic membrane



### 图版 Plate

11, 13, 14. 正常精子透射电镜图片 比例尺 =  $1\ \mu\text{m}$ ; 12, 15, 16. 冻后受损精子透射电镜图片 比例尺 =  $1\ \mu\text{m}$ ; 11. 精子头部纵切与核横切, 示顶体内颗粒物质、质膜、内切沟; 12. 精子头部纵切与核横切, 示顶体内颗粒物质丢失, 质膜皱褶, 内切沟模糊; 13. 精子中段横切, 示线粒体内嵴结构; 14. 精子中段纵切, 示精子中心粒结构; 15. 精子中段纵切, 示线粒体内嵴结构弥散; 16. 精子核纵切, 示核膜质膜断裂分离, 核泡出现; 17. 精子鞭毛扫描, 示正常鞭毛结构

Ac: 顶体; Av: 顶体泡; D: 远端中心粒; E: 内切沟; F: 鞭毛; G: 顶体颗粒物质; L: 鳍褶; Mc: 线粒体嵴; M: 线粒体; N: 细胞核; Nm: 核膜; Nv: 核泡; P: 后外侧延伸物; Pc: 近端中心粒; Pm: 细胞质膜; S: 亚顶体

11, 13, 14. Transmission electron micrograph of normal Siberian sturgeon sperm-cell, Scale bar =  $1\ \mu\text{m}$ ; 12, 15, 16. Transmission electron micrograph of unthawed damaged sperm-cell, Scale bar =  $1\ \mu\text{m}$ ; 11. Longitudinal section of head region and cross section of nuclear areas, showing the granular material, cytoplasmic membrane, endonuclear canals; 12. Longitudinal section of head region and cross section of nuclear areas, showing the granular material lost, cytoplasmic membrane folded, endonuclear canals unclear; 13. Cross section of midpiece, showing the structure of cristae of mitochondria; 14. Longitudinal section of midpiece, showing the structure of centriole; 15. Longitudinal section of midpiece, showing the damage of cristae of mitochondria; 16. Longitudinal section of nuclear areas, showing nuclear membrane and cytoplasmic membrane were disrupted, appearance of nuclear vacuole; 17. Scanning electron micrograph of normal Siberian sturgeon flagellum

Ac: Acrosome; Av: acrosomal vesicle; D: distal centriole; E: endonuclear canals; F: flagellum; G: granular material of acrosome; L: lateral extensions of flagellum; Mc: cristae; M: mitochondrion; N: nucleus; Nm: nuclear membrane; Nv: nuclear vesicle; P: posterolateral projections; Pc: proximal centriole; Pm: cytoplasmic membrane; S: subacrosome