



## 二倍体泥鳅与大鳞副泥鳅及杂交 $F_1$ 精子结构与活力

李 猛, 虞炯莹, 王卫民\*

(华中农业大学水产学院, 农业动物遗传育种与繁育教育部重点实验室,  
农业农村部淡水生物繁育重点实验室, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 二倍体泥鳅与大鳞副泥鳅杂交能够顺利获得杂交后代, 其正反交核型都为 ( $2n=49$ ), 但杂交后代精巢表现出明显的发育迟缓现象, 杂交泥鳅自交与回交实验表明, 其雄性不可育。为了解二倍体泥鳅和大鳞副泥鳅杂交  $F_1$  雄性不育的原因, 实验通过计算机辅助精子活力分析系统 (CASA)、光学显微镜、扫描电镜、透射电镜、流式细胞技术分别对二倍体泥鳅 (DD)、大鳞副泥鳅 (PP)、其正反杂交  $F_1$  (DP) 和 (PD) 4 种泥鳅精子的形态结构与活力进行了分析。结果显示, 激活 30 s 时, DD 和 PP 的精子运动率分别为  $76.50\% \pm 0.70\%$  和  $75.17\% \pm 8.60\%$ , 极显著高于 DP ( $3.65\% \pm 1.75\%$ ) 和 PD ( $2.68\% \pm 0.63\%$ ), 且杂交泥鳅的孢子的平均运动速度 (VAP)、平均曲线速度 (VCL)、平均直线运动速度 (VSL) 等运动参数也极显著低于 DD 和 PP, 说明杂交泥鳅孢子的活力极其低下。应用流式细胞技术对 4 种泥鳅精巢内细胞进行倍性鉴定, 发现 DD 和 PP 精巢内大多为 1N 精子, 而 DP 和 PD 精巢内除了正常单倍体精子外, 还有大量的 2N 和 4N 以及少量的 8N 细胞。通过扫描电镜和透射电镜发现, DD 与 PP 精巢内精子细胞致密、结构完整、大小均匀, 其全长分别为  $(33.71 \pm 2.12)$  和  $(34.28 \pm 1.83) \mu\text{m}$ 。而 DP 和 PD 精巢内的精子其头长显著高于 DD 和 PP 的精子, 其尾长、中片长和全长皆显著低于 DD 和 PP 的精子。研究表明, 杂交泥鳅的精子与正常精子相比, 在精子形态和内部 DNA 含量方面表现出明显多态性。这可能是造成杂交泥鳅雄性不育的原因。杂交泥鳅中出现了大量的异常精子, 如多尾精子、双核精子以及大头精子, 根据测量, 其头部大小也表现出明显的多态性, 根据头部体积大小测量估算其倍性, 其中有正常的精子即单倍体精子, 同时有二倍体精子、四倍体精子、八倍体精子甚至更高倍性的精子。这些杂交泥鳅的异常精子为其精子活力低下以及雄性不育提供了重要证据。

**关键词:** 二倍体泥鳅; 大鳞副泥鳅; 远缘杂交; 计算机辅助精子活力分析系统; 流式细胞仪; 扫描电镜; 透射电镜

中图分类号: Q 321+.3; S 965.1

文献标志码: A

泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 和大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 分别属于鳅科 (Cobitidae) 花鳅亚科 (Cobitinae) 中的泥鳅属 (*Misgurnus*) 和副泥鳅属 (*Paramisgurnus*)<sup>[1]</sup>。天然水域

中, 我国的泥鳅主要分为二倍体 ( $2n=50$ ) 和四倍体 ( $4n=100$ ) 两种类型<sup>[2-6]</sup>, 大鳞副泥鳅只有二倍体一种倍性, 染色体数目为 ( $2n=48$ )<sup>[2]</sup>。二倍体泥鳅 (DD) 与大鳞副泥鳅 (PP) 杂交能够顺利获得杂交后

收稿日期: 2020-10-02 修回日期: 2021-03-24

资助项目: 国家自然科学基金 (31372180)

第一作者: 李猛 (照片), 从事水产动物遗传与育种研究, E-mail: 1491064802@qq.com

通信作者: 王卫民, 从事水产动物遗传与育种研究, E-mail: wangwm@mail.hzau.edu.cn



代, 其正反交核型都为  $(2n=49)^{[7]}$ , 但杂交后代精巢与卵巢表现出明显的发育迟缓现象<sup>[7-9]</sup>, DP ( $D♀ \times P♂$ ) 自交与回交实验表明, DP 雄性不可育<sup>[9]</sup>。为了初步探究 2 种泥鳅杂交后代雄性不育的原因, 实验通过光学显微镜、扫描电镜、透射电镜、流式细胞技术以及计算机辅助精子分析系统 (CASA) 对 DD、PP、DP [ $DD(♀) \times PP(♂)$ ]、PD [ $PP(♀) \times DD(♂)$ ] 4 种泥鳅的精子形态结构与活力进行了系统分析, 旨在为泥鳅与大鳞副泥鳅杂交育种提供相关数据基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验鱼为 3 龄二倍体泥鳅 DD(♂), 二倍体大鳞副泥鳅 PP(♂), 以及二倍体杂交泥鳅 DP(♂) 和 PD(♂) 均来自华中农业大学水产基地。实验中需要用到的精子稀释液来自陈兵<sup>[10]</sup>的配方 (NaCl: 7.5 g/L、KCl: 0.3 g/L、 $\text{NaHCO}_3$ : 0.4 g/L、葡萄糖: 3 g/L)。

### 1.2 精子 DNA 相对含量测定

利用流式细胞仪对 DD、PP、DP、PD 这 4 种泥鳅的精子进行 DNA 含量测定, 各组选取性腺成熟良好的雄性泥鳅 5 尾, 充分麻醉后, 擦干鱼体, 用事先消毒的解剖剪从肛门处向上剪开, 取出背部两侧的精巢, 放入精子保存液中, 充分剪碎到精子流出, 过滤残渣后保存备用。每个检测样品中滴加 800  $\mu\text{L}$  DAPI 染液, 以二倍体泥鳅血液作为参照, 调节倍性分析仪电压值 ( $UV=460$ ), 随后上机检测。

### 1.3 光学显微镜标本制备

DD、PP、DP 和 PD 每组选取 3 尾, 按上述方法获得精巢后混合, 在 2.5% 的戊二醛中剪碎固定, 过滤残渣, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存过夜后备用。各组用胶头滴管吸取 1 滴精子悬液, 均匀涂抹在载玻片上, 室温干燥后, 伊红染色液染色 5 min, 吉姆萨染色液复染 2 min, 镜检、拍照。

### 1.4 扫描电镜标本制备

按“精子 DNA 相对含量测定”中的方法取精巢在 2.5% 的戊二醛溶液中固定, 观察精巢超微结构, 按“光学显微镜标本制备”中的方法取精子悬液, 固定后观察精子超微结构, 在干净的培养皿中平铺一层滤纸, 其上放置若干大小适中破碎的

盖玻片 (平铺、不重叠) 将煮沸的 5% 琼脂液缓缓倒入 (没过盖玻片即可), 放入 37  $^{\circ}\text{C}$  烘箱中烘干。剪下盖玻片放入新的培养皿中, 用吸管吸取精子样品 (PBS 漂洗后) 滴加到盖玻片上。5 min 后, 精巢样品与精子滴片样品经乙醇系列脱水 (30%、50%、70%、80%、90%、100% 各 10 min), 离子镀膜等步骤后, 扫描电镜 (日本 NTC JSM-6390LV) 下观察、拍照。

### 1.5 透射电镜标本制备

按“扫描电镜标本制备”中的方法取固定后的精巢电镜标本, 按常规步骤进行预包埋、切块后, 用 1% 锇酸固定, 梯度酒精脱水, 然后环氧树脂 812 (Epon 812) 渗透包埋, 超薄切片, 经铀铅双重染色后, 透射电镜 (日本 HITACHI H-7650) 下观察、拍照。

### 1.6 CASA 系统检测精子活力

按照“精子 DNA 相对含量测定”中的方法取精子悬液保存备用, 在显微镜下观察精液浓度, 用精子保存液稀释到合适的浓度, 打开计算机辅助精液分析的软件 (computer-aided semen analysis, CASA), 取 1  $\mu\text{L}$  精液置于载玻片上, 加 1  $\mu\text{L}$  超纯水激活后立刻盖上盖玻片计时。设置曝光时间为 20 ms, 连续曝光 25 次, 精子的运动状态按照平均运动速度 (VAP) 进行分级,  $VAP < 4 \mu\text{m/s}$  为不运动精子,  $VAP > 50 \mu\text{m/s}$  为快速运动精子。每个样品重复测量 3 次, 所得数值均为精子激活 30 s 的平均值  $\pm$  SD。

MOT 表示运动精子率, PRO 表示快速运动精子率, STA 表示不运动精子率。

VCL (average curvilinear velocity, 即平均曲线速度), 是精子头沿其实际行走曲线的运动速度,  $\mu\text{m/s}$ 。

VSL [average straight-line (rectilinear) velocity, 即平均直线运动速度], 是精子头从开始检测时的位置至最后所处位置之间的直线运动的平均速度,  $\mu\text{m/s}$ 。

VAP (average path velocity, 即平均路径速度), 是精子头沿其空间平均轨迹的运动速度,  $\mu\text{m/s}$ 。这种速度是由计算机 CASA 仪器中的算法将精子运动的实际轨迹平均后计算得出。

ALH (amplitude of lateral head displacement, 即头部侧向运动平均振幅), 是精子头部实际运动轨迹对平均路径的侧摆幅度,  $\mu\text{m}$ 。

BCF (beat-cross frequency, 即鞭打频率), 是

精子头部跨越其平均路径的频率, Hz。

## 1.7 数据分析

采用 SPSS 18.0 统计软件进行实验数据的统计学分析, 采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 对各组数据的组间平均值±标准差进行差异分析,  $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 计算机辅助分析精子活力

在医学和动物研究中, VAP、VCL 和 VSL

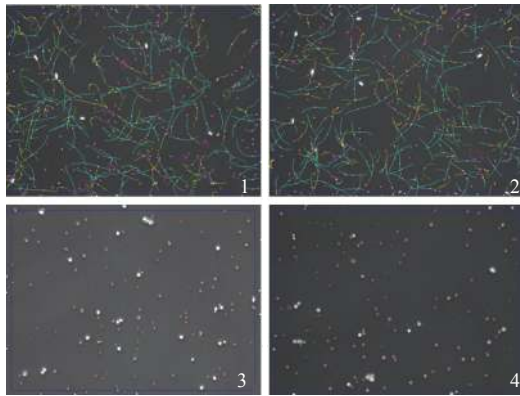
等参数与男性不育能力具有显著相关性<sup>[11-12]</sup>, 本实验中, 二倍体泥鳅和大鳞副泥鳅精子的精子运动率分别为  $76.50\% \pm 0.70\%$  和  $75.17\% \pm 8.60\%$ , 其中快速运动精子率为  $37.50\% \pm 1.60\%$  和  $41.20\% \pm 6.53\%$ , 极显著高于正反杂交泥鳅精子 ( $P<0.01$ ) (表 1)。DD 和 PP 的精子运动轨迹图显示大量的快速运动精子 (图版-1, 2), 而大部分 DP 与 PD 的精子静止不动 (图版-3, 4)。此外, 杂交泥鳅精子的 VAP、VCL 和 VSL 等参数均极显著低于二倍体泥鳅和大鳞副泥鳅 ( $P<0.01$ ), 这些参数表明杂交泥鳅精子的活力极其低下。

表 1 4 种不同泥鳅精子运动参数检测

Tab. 1 Sperm motility parameters detection of four different loach species

精子类型 sperm type	运动 精子率/% MOT	快速运动 精子率/% PRO	不运动 精子率/% STA	平均路 径速度/ ( $\mu\text{m/s}$ ) VAP	平均曲线 速度/ ( $\mu\text{m/s}$ ) VCL	平均直线 速度/ ( $\mu\text{m/s}$ ) VSL	头部侧向运动 平均振幅/ $\mu\text{m}$ ALH	头部鞭打 频率/Hz BCF
DD	$76.50 \pm 0.70^a$	$37.50 \pm 1.60^a$	$23.50 \pm 0.70^a$	$68.41 \pm 3.81^a$	$75.10 \pm 4.58^a$	$60.29 \pm 2.02^a$	$3.53 \pm 0.38^A$	$21.44 \pm 2.45^A$
PP	$75.17 \pm 8.60^a$	$41.20 \pm 6.53^a$	$24.83 \pm 8.60^a$	$70.17 \pm 11.58^a$	$75.28 \pm 11.37^a$	$61.88 \pm 13.00^a$	$3.21 \pm 0.22^A$	$18.52 \pm 2.17^A$
DP	$3.65 \pm 1.75^b$	$0.00 \pm 0.00^b$	$96.35 \pm 1.75^b$	$24.69 \pm 5.11^b$	$27.68 \pm 5.55^b$	$22.25 \pm 3.90^b$	$0.88 \pm 0.27^B$	$28.33 \pm 6.86^{AB}$
PD	$3.70 \pm 1.40^b$	$0.20 \pm 0.20^b$	$96.30 \pm 1.40^b$	$25.02 \pm 2.32^b$	$29.01 \pm 0.02^b$	$23.26 \pm 3.30^b$	$0.99 \pm 0.01^B$	$40.51 \pm 13.43^B$

注: 同一列不同上标小写字母表示具有极显著差异 ( $P<0.01$ ), 不同上标大写字母表示具有显著差异 ( $P<0.05$ )。DD. 二倍体泥鳅, PP. 大鳞副泥鳅, DP. 二倍体泥鳅(♀)×大鳞副泥鳅(♂), PD. 大鳞副泥鳅(♀)×二倍体泥鳅(♂), 下同  
Notes: lowercase letters with different superscripts in the same column indicate very significant differences ( $P<0.01$ ), and uppercase letters with different superscripts indicate significant differences ( $P<0.05$ ), DD. *M. anguillicaudatus*, PP. *P. dabryanus*, DP. DD(♀)×PP(♂), PD. PP(♀)×DD(♂), the same below



图版 I 精子运动轨迹图

Plate I Sperm motion diagram

1. DD, 2. PP, 3. DP, 4. PD

### 2.2 精子 DNA 相对含量分析

利用流式细胞仪对 4 种泥鳅精子进行倍性检测发现, DD 和 PP 精子中有大量的 1N 细胞, 还有少量的 2N 细胞 (图 1-a~b)。杂交泥鳅精子细胞群中, 2N 和 4N 的峰值很高, 表明在杂交泥鳅精巢中有大量的二倍体和四倍体细胞, 此外, 还有少量的 1N 和 8N 的细胞 (图 1-c~d)。

### 2.3 二倍体泥鳅与大鳞副泥鳅及其杂交后代精子形态结构

二倍体泥鳅精子和大鳞副泥鳅精子形态结构 通过光学显微镜和扫描电镜观察并测量发现, DD 和 PP 精巢中精子致密 (图 II-1~2), 二倍体泥鳅和大鳞副泥鳅的精子外部形态相似, 主要由头部、中片和鞭毛组成 (图版 III-1~2; 图版 IV-1~3)。其头长分别为 ( $1.79 \pm 0.05$ ) 和 ( $1.79 \pm 0.07$ )  $\mu\text{m}$ , 其中片长分别为 ( $1.45 \pm 0.24$ ) 和 ( $1.36 \pm 0.20$ )  $\mu\text{m}$ , 其尾部鞭毛长分别为 ( $30.51 \pm 2.61$ ) 和 ( $31.11 \pm 1.86$ )  $\mu\text{m}$ , 其全长分别为 ( $33.71 \pm 2.12$ ) 和 ( $34.28 \pm 1.83$ )  $\mu\text{m}$ 。2 种泥鳅精子各项指标相互比较, 均无显著差异 ( $P>0.05$ ) (表 2)。

2 种泥鳅精子头部多呈圆形, 前部不具顶体, 细胞质很少 (图版 V-1~2), 细胞质外的细胞膜表面不平整, 呈波浪状 (图版 IV-1~3)。细胞核被细胞质包围, 呈圆形, 核后端有一浅的植入窝, 植入核内约核的 1/4 长度。中片紧紧贴在核后, 由中心粒复合体和袖套两部分组成, 袖套两边不对称, 一侧较宽阔, 内含大量的线粒体和囊泡, 一侧狭窄, 其中只有少量的线粒体和囊泡,

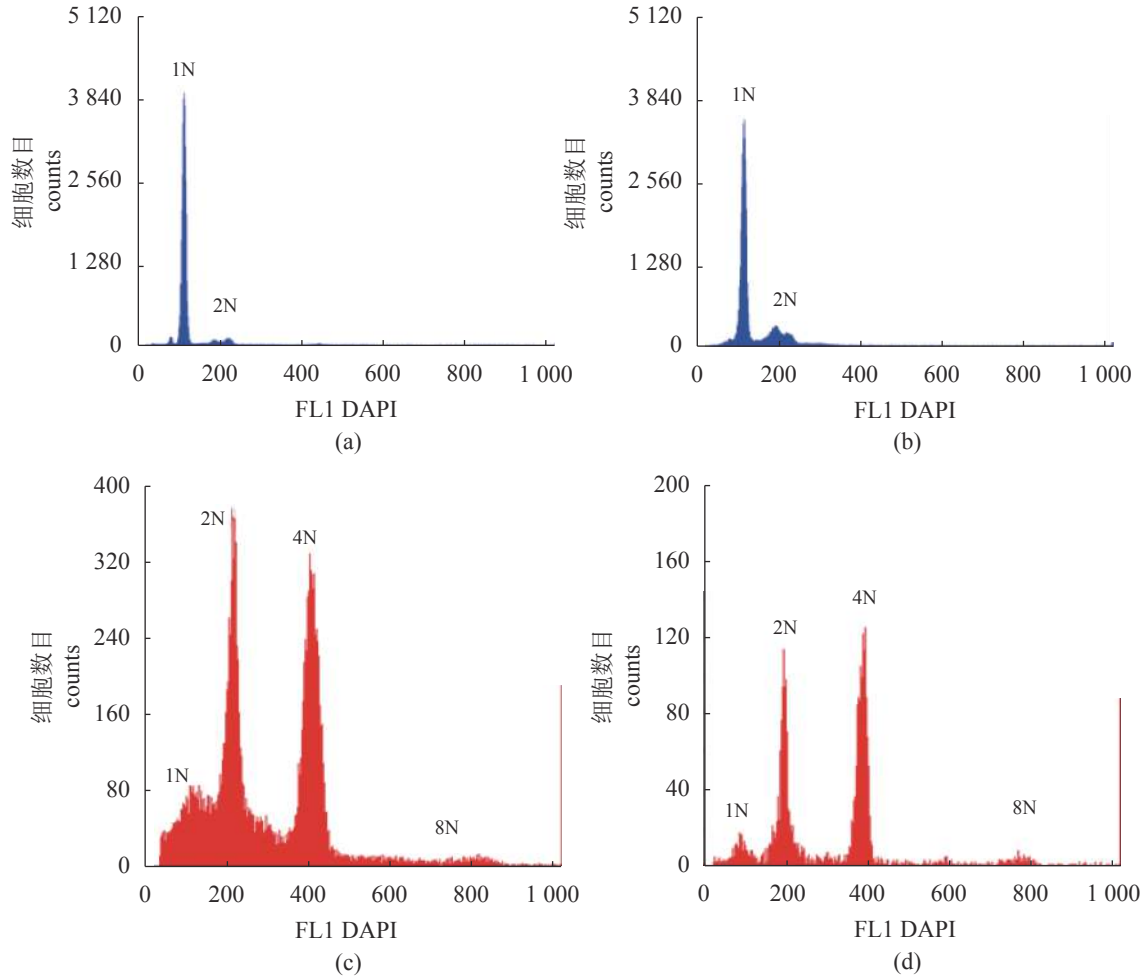
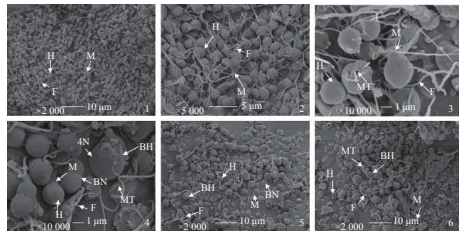


图 1 精子 DNA 相对含量

(a) DD 精巢, (b) PP 精巢, (c) DP 精巢, (d) PD 精巢

Fig. 1 Relative contents of sperm DNA

(a) DD testis, (b) PP testis, (c) DP testis, (d) PD testis

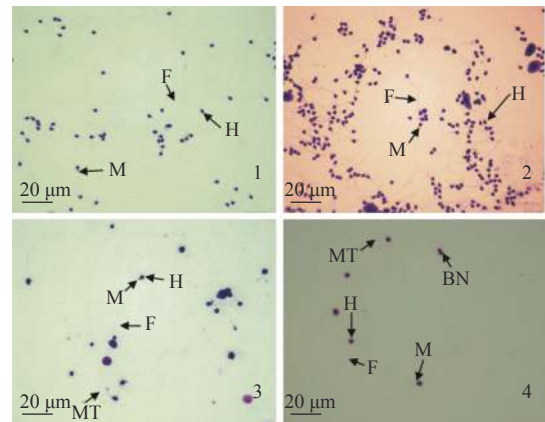


图版 II 精巢组织扫描电镜图

1. DD 精巢, 2. PP 精巢, 3~4. DP 精巢, 5~6. PD 精巢。H. 精子头部, M. 精子中段, F. 精子尾部, MT. 多尾精子, BN. 双核精子, BH. 大头精子。下同

Plate II Testis tissue scanning electron microscopy (SEM)

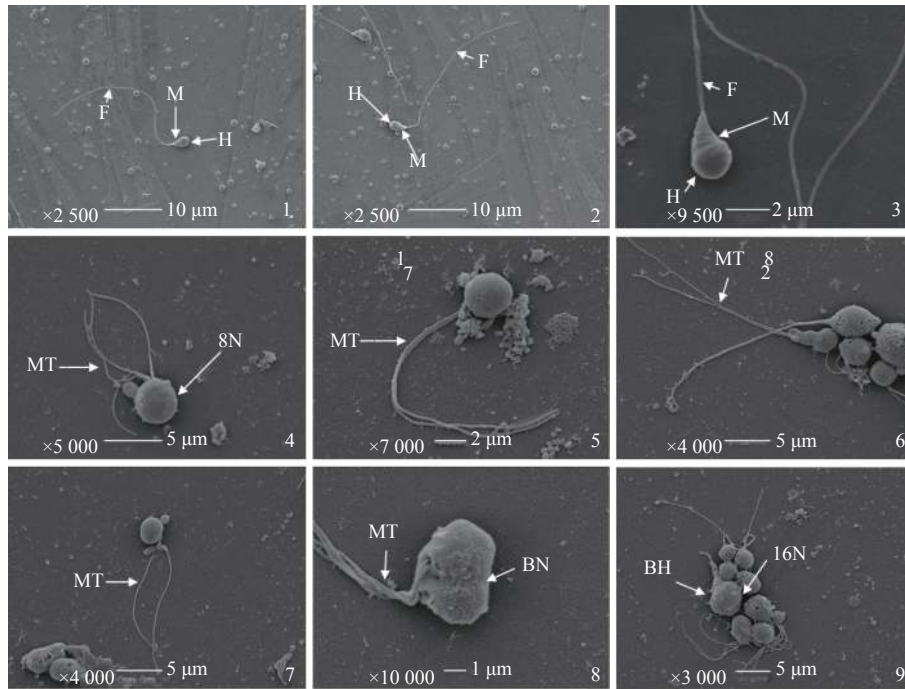
1. DD testis, 2. PP testis, 3-4. DP testis, 5-6. PD testis. H. sperm head, M. sperm midsection, F. sperm tail, MT. multitailed sperm, BN. binuclear sperm, BH. big head sperm. The same below



图版 III 精子光学显微镜图

Plate III Sperm optical micrographs

1. DD, 2. PP, 3. DP, 4. PD



图版 IV 精子涂片扫描电镜

Plate IV Sperm smear scanning electron microscopy (SEM)

表 2 4 种不同泥鳅精子各部分长度

Tab. 2 Length of spermatozoon parts of four different loach species

精子类型 sperm type	头长/ $\mu\text{m}$ head length	中片长/ $\mu\text{m}$ middle length	尾长/ $\mu\text{m}$ tail length	全长/ $\mu\text{m}$ total length
DD	1.79±0.05 <sup>a</sup>	1.45±0.24 <sup>a</sup>	30.51±2.61 <sup>a</sup>	33.71±2.12 <sup>a</sup>
PP	1.79±0.07 <sup>a</sup>	1.36±0.20 <sup>a</sup>	31.11±1.86 <sup>a</sup>	34.28±1.83 <sup>a</sup>
DP	2.72±0.67 <sup>b</sup>	0.65±0.66 <sup>b</sup>	19.26±8.67 <sup>b</sup>	24.78±7.55 <sup>b</sup>
PD	2.68±0.63 <sup>b</sup>	0.72±0.51 <sup>b</sup>	20.80±7.08 <sup>b</sup>	25.03±8.70 <sup>b</sup>

注: 同一列不同上标小写字母表示具有显著差异( $P < 0.05$ ), 下同

Notes: different superscript with lowercase letters in the same column indicates significant difference ( $P < 0.05$ ), the same below

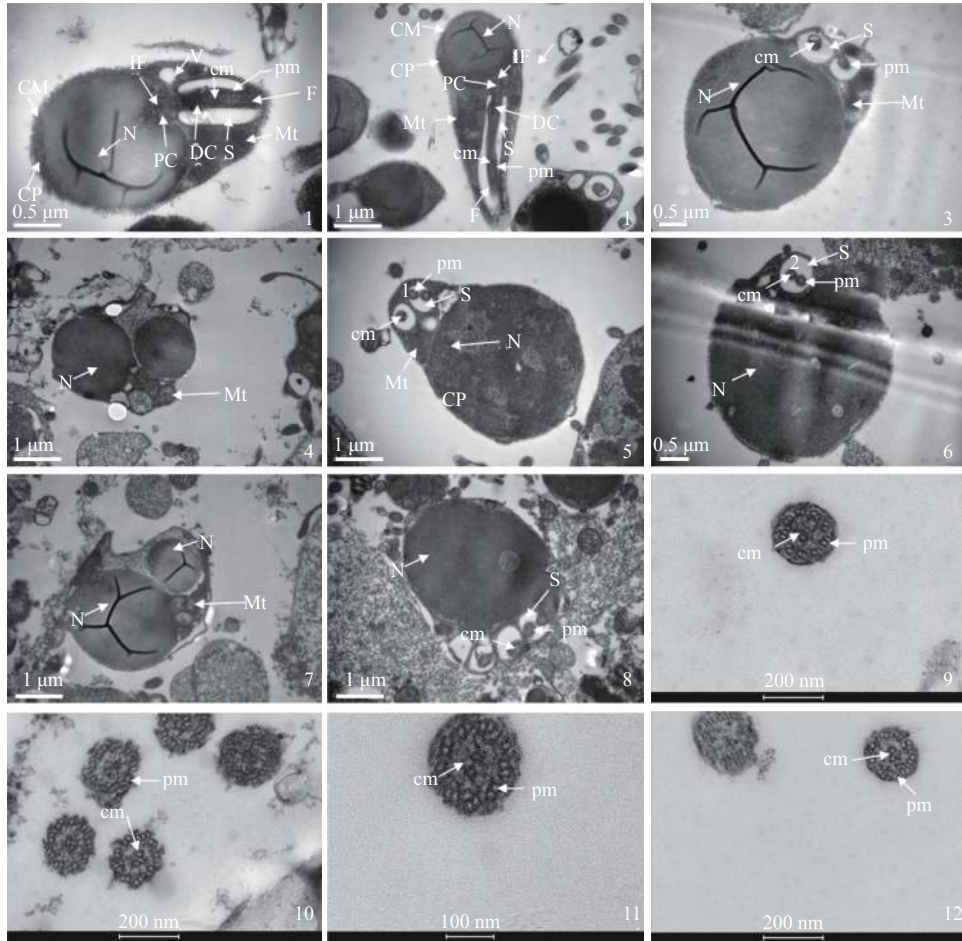
中间的空腔为袖套腔, 鞭毛从袖套腔中伸出中片。线粒体全部位于袖套腔中, 线粒体嵴清晰可见。二倍体泥鳅和大鳞副泥鳅精子鞭毛细长, 从植入窝开始, 从袖套腔一直往后延伸(图版 V-1~2), 由纵切图可见, 精子轴丝结构为经典的“9+2”结构, 未见侧鳍(图版 V-9~10)。

**杂交泥鳅精子形态结构** 通过对杂交泥鳅头长、中片长和尾长的测量, 计算其平均值和标准差, 结果头长分别为 DP (2.72±0.67)  $\mu\text{m}$  和 PD (2.68±0.63)  $\mu\text{m}$ , 中片长分别为 DP (0.65±0.66)  $\mu\text{m}$  和 PD (0.72±0.51)  $\mu\text{m}$ , 尾长分别为 DP (19.26±8.67)  $\mu\text{m}$  和 PD (20.80±7.08)  $\mu\text{m}$ , 全长分别为 DP (24.78±7.55)  $\mu\text{m}$  和 PD (25.03±8.70)  $\mu\text{m}$  (表 3), 对各组数据进行分析, 发现正反杂交泥鳅精子之间的形态学数据没有显著差异 ( $P > 0.05$ ), 但其中头

长显著高于二倍体泥鳅和大鳞副泥鳅的精子 ( $P < 0.05$ ), 其尾长、中片长和全长皆显著低于二倍体泥鳅和大鳞副泥鳅 ( $P < 0.05$ )。

杂交泥鳅正常精子含量很少, 正常精子头部大小分别为 DP (1.79±0.01)  $\mu\text{m}$  和 PD (1.78±0.06)  $\mu\text{m}$ 。尾部鞭毛均为经典的“9+2”结构(图版 V-11~12)。杂交泥鳅内部结构与二倍体泥鳅和大鳞副泥鳅相比, 表现出明显的中片短小, 其内部线粒体含量较少, 且大部分线粒体都被挤压在靠近头部的位 置(图版 V-8~7)。但其无论正交还是反交 F<sub>1</sub>, 均出现大量的异常精子, 其中主要包括“多尾精子”、“双核精子”以及“大头精子”。

多尾精子表现在大部分精子具有 2 个尾部(图版 IV-3, 7)、3 个尾部(图版 V-5) 或 4 个尾部(图版 IV-4, 8), 有少数精子十几尾部连成一束



图版 V 精子透射电镜图

1. DD 精子, 2. PP 精子, 3. DP 双尾精子, 4. DP 双核精子, 5. DP 三尾精子, 6. PD 双尾精子, 7. PD 双核精子, 8. PD 双尾精子, 9. DD 精子鞭毛, 10. PP 精子鞭毛, 11. DP 精子鞭毛, 12. PD 精子鞭毛。N.核, V.囊泡, CP.细胞质, CM.质膜, Mt.线粒体, S.袖套腔, IF.植入窝, DC.远端中心粒, PC.近端中心粒, F.鞭毛, cm.中央微管, pm.边缘轴丝

### Plate V Sperm transmission electron microscopy (TEM)

1. DD sperm, 2. PP sperm, 3. DP double-tailed sperm, 4. DP binuclear sperm, 5. DP tritailed sperm, 6. PD double-tailed sperm, 7. PD binuclear sperm, 8. PD double-tailed sperm, 9. DD. Sperm flagella, 10. PP spermatic flagellum, 11. DP sperm flagella, 12. PD sperm flagellum. N. nucleus, V. vesicles, CP. cytoplasm, CM. plasma membrane, Mt. mitochondria, S. sleeve cavity, IF. implant fossa, DC. distal centrioles, PC. proximal centrioles, F. flagella, Cm. central microtubule, PM. edge axial filament

(图版 II-6), 多尾精子的鞭毛常两两成对, 从头部的同一段发生(图版 IV-8)。鞭毛被膜包裹, 有的延伸于同一袖套腔中(图版 V-5~6), 大部分彼此独立(图版 V-3, 8)。

双核精子是指一个质膜内包含 2 个细胞核, 核与核之间有细胞质隔开, 有的精子双核大小相同(图版 III-4); 有的精子双核大小不同, 2 个核被统一的质膜包裹(图版 V-4, 7)。

光学显微镜和扫描电镜发现, 雄性杂交泥鳅可以产生大小差异有明显差别的精子(图版 II-3~6), 根据 Liu 等<sup>[13]</sup>用  $V=4/3\pi R^3$  来计算精子头部细胞核体积, 再根据测得的二倍体泥鳅和大鳞副泥

鳅的精子大小, 推测精子头部大小为 1.69~1.91  $\mu\text{m}$  的为正常的单倍体精子, 2.14~2.40  $\mu\text{m}$  的为二倍体精子, 2.69~3.02  $\mu\text{m}$  的为四倍体精子(图版 II-4), 3.4~3.80  $\mu\text{m}$  的为八倍体精子(图版 IV-4)。通过在各范围内测得的精子头径平均值计算出精子体积, 分别约为正常精子头部体积的 2 倍、4 倍和 8 倍, 通过对这些精子分类, 不同大小的精子的中片长、尾长以及全长在统计学上无显著差异 ( $P>0.05$ )。此外, 还有一些更大和更小的精子, 部分大精子体积为正常精子的 16 倍(图版 IV-9), 测量到的正反交泥鳅最小的精子头部直径为 1.09  $\mu\text{m}$ , 最大的为 5.83  $\mu\text{m}$ 。

表 3 杂交泥鳅不同类型精子各部分长度

Tab. 3 Length of spermatozoon parts of hybrid loach

精子类型 sperm type	头长/ $\mu\text{m}$ head length	中片长/ $\mu\text{m}$ middle length	尾长/ $\mu\text{m}$ tail length	全长/ $\mu\text{m}$ total length	比例 proportion
DP1N	1.78±0.06	0.58±0.60 <sup>a</sup>	17.29±9.96 <sup>a</sup>	19.78±11.00 <sup>a</sup>	0.04
DP2N	2.28±0.08	0.60±0.64 <sup>a</sup>	18.82±10.08 <sup>a</sup>	21.66±9.25 <sup>a</sup>	0.27
DP4N	2.86±0.09	0.73±0.82 <sup>a</sup>	21.08±8.64 <sup>a</sup>	25.01±8.73 <sup>a</sup>	0.30
DP8N	3.54±0.10	0.93±0.80 <sup>a</sup>	17.27±7.98 <sup>a</sup>	20.80±9.17 <sup>a</sup>	0.10
DP16N	4.41±0.13	1.18±1.50 <sup>a</sup>	14.04±5.39 <sup>a</sup>	18.84±4.68 <sup>a</sup>	0.03
PD1N	1.79±0.01	1.11±0.72 <sup>a</sup>	24.24±8.99 <sup>a</sup>	26.78±9.98 <sup>a</sup>	0.05
PD2N	2.27±0.06	0.58±0.64 <sup>a</sup>	20.94±6.92 <sup>a</sup>	24.40±9.07 <sup>a</sup>	0.32
PD4N	2.87±0.07	0.75±0.74 <sup>a</sup>	22.13±6.26 <sup>a</sup>	26.05±5.87 <sup>a</sup>	0.33
PD8N	3.53±0.07	0.87±0.76 <sup>a</sup>	18.15±6.82 <sup>a</sup>	18.70±5.48 <sup>a</sup>	0.10
PD16N	4.45±0.15	1.14±1.07 <sup>a</sup>	19.16±9.10 <sup>a</sup>	23.83±9.85 <sup>a</sup>	0.03

### 3 讨论

#### 3.1 计算机辅助分析精子活力

计算机辅助精子活力分析系统 (CASA) 是在包含显微摄影、显微图像分析和荧光显微技术等多项技术和设备的基础上发展起来的, 最初应用在男性生殖学中, 随着技术的完善和发展, 近年来逐渐运用到水产动物精子的活力检测中<sup>[14-17]</sup>。精子活力评价指标因精子活力测量方法而异, Rurangwa 等<sup>[18]</sup>使用 CASA 系统检测非洲鲇 (*Clarias gariepinus*) 时发现, VCL、VSL、VAP 这 3 个运动参数与其他参数相比, 与受精率有更强的相关性, 本研究中发现, 杂交泥鳅的精子活力 3 个指标均极显著低于 DD 和 PP, 表明了 DP 与 PD 精子活力极差, 这也直接解释了 DP 与 PD 这 2 种杂交泥鳅不育的原因。

#### 3.2 精子细胞 DNA 含量的估算

利用核酸特异性结合荧光染料 (DAPI) 对鱼类细胞进行染色, 流式细胞仪检测其荧光信号强度, 可以非常直观地鉴定细胞倍性。本实验中, 对 DD 和 PP 精巢剪碎后的悬液上机检测, 发现其大部分皆为 1N 精子, 其中有少量的 2N 细胞, 这可能是精巢中的次级精母细胞或精巢的组织细胞。对 DP 和 PD 杂交泥鳅的精巢悬液上机检测发现, 杂交泥鳅中大量存在 2N 和 4N 细胞, 1N 精子数量较少, 此外还有极少数的 8N 细胞。Huang 等<sup>[9]</sup>在诱导多倍体泥鳅过程中, 对 DP 杂交泥鳅的性腺进行倍性检测, 同样存在大量 2N 细胞与 4N 细胞, 认为 4N 为初级精母细胞, 2N 为次级精母细

胞。Devillard 等<sup>[19]</sup>通过对大头精子的研究发现, 通常体积较大的精子与染色体数目直接相关。鱼类精子大多成圆形, 且头部的主要物质是细胞核, Liu 等<sup>[13]</sup>建立了利用精子头部体积来估算精子倍性的方法, 可以直接通过形态学测量估计其倍性。本实验通过对杂交泥鳅精子细胞扫描电镜形态学观察发现, 有大量具有尾部鞭毛的精子其头部体积为正常单倍体精子头部的 2 倍和 4 倍, DP 中 2 倍体积精子和 4 倍体积精子占总精子数目的 32% 和 33%, PD 中 2 倍体积精子和 4 倍体积精子占总精子数目的 27% 和 30%。因此, 可认为杂交泥鳅精巢细胞多倍体现象除了正常的精子发生过程外, 还存在多倍体精子发生的现象。

#### 3.3 异常精子产生机制

杂交泥鳅除了正常精子外, 还产生了大量的多尾精子、双核精子和大头精子, 鱼类中的双尾精子早有报道<sup>[20]</sup>。在哺乳动物中也发现有双尾精子甚至更多尾的精子<sup>[21-22]</sup>。本实验中双尾精子的起因, 可能是细胞质的不等分裂, 使一个精子获得了额外的中心粒, 也可能是近端中心粒也参与形成轴丝, 这种不正常的双尾精子在人类中被发现是不可育的<sup>[23]</sup>。刘祖洞<sup>[24]</sup>认为, 相互易位可以导致减数分裂中出现异常的染色体联合, 这种易位染色体可能是微核形成的一个原因, 而这类核继续发育, 就可能形成双头畸形的精子。关于大头精子的形成, 可能有 3 个原因: 一是精子细胞在减数分裂中融合。2 个子细胞在第一次减数分裂后融合但第二次减数分裂正常进行, 姐妹染色

单体分离,产生二倍体的配子,或者精子细胞在第二次减数分裂后融合,从而产生各种不同大小的精子。二是核内复制,即染色体在减数分裂前就进行核内复制分裂,第一次减数分裂时,没有核膜的解体和纺锤体的出现,整个过程都在核内进行,分裂的结果是一个细胞,染色体数目没有减半,维持原来的数目,而第二次减数分裂时姐妹染色单体正常分离,分裂的结果产生二倍体配子。如果早期精原细胞分别进行1、2和3次核内复制,再进行正常的减数分裂过程,则会分别产生二倍体(双核精子)、四倍体和八倍体的精子<sup>[25]</sup>。三是由于远缘杂交品系,不存在同源染色体的配对,所有的染色体都集中在赤道板上,第二次减数分裂不进行,从而可以产生多倍体精子<sup>[26]</sup>。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] 陈景星. 中国花鳅亚科鱼类系统分类的研究 [M]//中国鱼类学会. 鱼类学论文集 (第一集). 北京: 科学出版社, 1981: 21-32.
- Chen J X. Studies on the systematic classification of fishes of the *Hyacinidae* in China[M]// Chinese Ichthyological Society. Ichthyology Papers, 1981: 21-32 (in Chinese).
- [2] 李康, 李渝成, 周瞰. 两种泥鳅染色体组型的比较研究[J]. 动物学研究, 1983, 4(1): 75-81.
- Li K, Li Y C, Zhou D. A comparative study of the karyotypes in two species of mud loaches[J]. Zoological Research, 1983, 4(1): 75-81 (in Chinese).
- [3] 余先觉, 周瞰, 李渝成, 等. 中国淡水鱼类染色体 [M]. 北京: 科学出版社, 1989: 18-29.
- Yu X J, Zhou D, Li Y C *et al.* Chromosomes of freshwater fishes from China[M]. 1989: 18-29 (in Chinese).
- [4] 马纲. 中国淡水鱼类染色体形态及数目变异的研究进展[J]. 甘肃科学学报, 1996, 8(3): 77-80.
- Ma G. The research progress in chromosome pattern and numerical variation of freshwater fish in China[J]. Journal of Gansu Sciences, 1996, 8(3): 77-80 (in Chinese).
- [5] 印杰, 赵振山, 陈小奇, 等. 二倍体和四倍体泥鳅染色体组型比较[J]. 水生生物学报, 2005, 29(4): 469-472.
- Yin J, Zhao Z S, Chen X Q, *et al.* Karyotype comparison of diploid and tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus* Tus[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(4): 469-472 (in Chinese).
- [6] 周小云, 李祥云, 方礼豹, 等. 基于形态特征的泥鳅染色体倍性分析[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(5): 644-647.
- Zhou X Y, Li M Y, Fang L B, *et al.* Evaluation of polidy of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) based on morphological characters[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2008, 27(5): 644-647 (in Chinese).
- [7] 方礼豹. 泥鳅和大鳞副泥鳅杂交育种初步研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- Fang L B. Preliminary studies of cross breeding between loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) and Large scale loach (*Paramisgurnus dabryanus*)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011 (in Chinese).
- [8] 马来艳. 泥鳅与大鳞副泥鳅自交和杂交子代形态、性腺发育及相关基因表达的比较研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- Ma L Y. Comparative study on morphology, gonadal development and related genes of *Misgurnus anguillicaudatus*, *Paramisgurnus dabryanus* and their hybrid progenies[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [9] Huang S Q, Cao X J, Wang W M, *et al.* Fertility and ploidy of gametes of allodiploid and allotriploid loaches produced by diploid *Misgurnus anguillicaudatus* females and *Paramisgurnus dabryanus* males[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2018, 44(1): 13-20.
- [10] 陈兵. 大鳞副泥鳅精液超低温保存[J]. 武汉大学学报 (自然科学版), 1991(4): 127-130.
- Chen B. The ultra-low temperature preservation of loach (*Paramisgurnus dabryanus*, sanvage) sperm[J]. *Journal of Wuhan University (Natural Science Edition)*, 1991(4): 127-130 (in Chinese).
- [11] 马远方, 王玉兰, 白慧玲, 等. 精子膜功能完整性与精液各参数关系的研究[J]. 中华男科学, 2002, 8(2): 103-105.
- Ma Y F, Wang Y L, Bai H L, *et al.* Study on the relationship between the functional integrity of sperm membrane and seminal parameters related to CASA[J]. *National Journal of Andrology*, 2002, 8(2): 103-105 (in Chinese).
- [12] 王沐沂, Essam E, Overstreet J W, 等. 用计算机辅助精子分析系统测定TCDD对大鼠精子运动能力的影响[J]. 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries



- 中国公共卫生, 1999, 15(5): 374-376.
- Wang S Y, Essam E, Overstreet J W, *et al.* Influence of TCDD on rat sperm motility evaluated by CASA system[J]. *China Public Health*, 1999, 15(5): 374-376 (in Chinese).
- [13] Liu S J, Liu Y, Zhou G J, *et al.* The formation of tetraploid stocks of red crucian carp×common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization[J]. *Aquaculture*, 2001, 192(2-4): 171-186.
- [14] Gallego V, Asturiano J F. Sperm motility in fish: technical applications and perspectives through CASA-Mot systems[J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2018, 30(6): 820-832.
- [15] Kása E, Bernáth G, Kollár T, *et al.* Development of sperm vitrification protocols for freshwater fish (Eurasian perch, *Perca fluviatilis*) and marine fish (European eel, *Anguilla anguilla*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2017, 245: 102-107.
- [16] 黄晓荣, 冯广朋, 刘鉴毅, 等. 计算机辅助分析冷冻前后褐牙鲈精子运动特征 [J]. *海洋渔业*, 2019, 41(1): 73-81.
- Huang X Y, Feng G P, Liu J Y, *et al.* Motility characteristics of fresh and frozen sperm of *Paralichthys olivaceus* using computer-assisted sperm analysis[J]. *Marine Fisheries*, 41(1): 73-81 (in Chinese).
- [17] Nynca J, Judycka S, Liszewska E, *et al.* Effect of double freezing fish semen on sperm motility and fertility[J]. *Aquaculture*, 2021, 530: 735782.
- [18] Rurangwa E, Volckaert F A M, Huyskens G, *et al.* Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*)[J]. *Theriogenology*, 2001, 55(3): 751-769.
- [19] Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pelletier R, *et al.* Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases[J]. *Human Reproduction*, 2002, 17(5): 1292-1298.
- [20] Jaspers E J, Avault Jr J W, Roussel J D. Spermatozoal morphology and ultrastructure of channel catfish, *Ictalurus punctatus*[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1976, 105(3): 475-480.
- [21] 于峰, 姚宝玉, 王慧, 等. 小鼠畸形精子分型[J]. *上海实验动物科学*, 1997, 17(4): 232-233.
- Yu F, Yao B Y, Wang Y, *et al.* Basic types of aberrant spermatozoa in mice[J]. *Shanghai Laboratory Animal Science*, 1997, 17(4): 232-233 (in Chinese).
- [22] Nistal M, Paniagua R, Herruzo A. Multi-tailed spermatozoa in a case with asthenospermia and teratospermia[J]. *Virchows Archiv B*, 1978, 26(1): 111-118.
- [23] 曹伏君. 鲫(♀)鲤(♂)杂交F<sub>1</sub>代精巢超微结构的研究[J]. *动物学报*, 2000, 46(4): 366-371.
- Cao F J. Ultrastructure of testis of F<sub>1</sub> hybrids between *Carassius auratus* (♀) and *Cyprinus carpio*(♂)[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2000, 46(4): 366-371 (in Chinese).
- [24] 刘祖洞. 遗传学-(下册)[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1991.
- Liu Z D. Genetics[M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 1991 (in Chinese).
- [25] 李建中, 刘少军, 张轩杰, 等. 鲫鲤杂种F<sub>2</sub>精子多态性的研究[J]. *实验生物学报*, 2004, 37(4): 276-282.
- Li J Z, Liu S J, Zhang X J, *et al.* Studies on the polymorphic of sperm of F<sub>2</sub> hybrids of red crucian carp×common carp[J]. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, 2004, 37(4): 276-282 (in Chinese).
- [26] Chrothers A D, Beatty R A. The recognition and incidence of haploid and polyploid spermatozoa in man, rabbit and mouse[J]. *Reproduction*, 1975, 44(3): 487-500.

## Structure and vitality of sperm of diploid *M. anguillicaudatus*, *P. dabryanus* and their hybrid F<sub>1</sub>

LI Meng, YU Jiongying, WANG Weimin\*

(College of Fishery, Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics,  
Breeding and Reproduction of Ministry of Education, Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding,  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** The number of chromosomes of *Misgurnus anguillicaudatus* (Cobitidae; Cobitinae; *Misgurnus*) is (2n=50) and that of *Paramisgurnus dabryanus* (Cobitidae; Cobitinae; *Paramisgurnus*) is (2n=48). Hybridization between *M. anguillicaudatus* (DD) and *P. dabryanus* (PP) can successfully obtain hybrid progeny (DP, PD) with karyotypes (2n=49), but the testes and ovaries of the hybrid progeny showed obvious developmental retardation. Self-crossing and backcrossing experiments of DP (DD♀×PP♂) showed that male DP were infertile. The sperm morphology and vitality of the loach *M. anguillicaudatus* (DD), large scale loach *P. dabryanus* (PP), hybrid F<sub>1</sub> generation (DP) and (PD) were analyzed through computer assisted sperm analysis system (CASA), optical microscope, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and flow cytometry technology in order to explore the reason of male sterility in F<sub>1</sub> generation of hybrid between *M. anguillicaudatus* and *P. dabryanus*. The results showed that the sperm motility rates of DD and PP were 76.50%±0.70% and 75.17%±8.60% respectively at 30 s of activation, which were significantly higher than DP (3.65%±1.75%) and PD (2.68%±0.63%) ( $P<0.01$ ), and the related motion parameters such as VAP, VCL, VSL of hybrid loach are significantly lower than DD and PP ( $P<0.01$ ), which reveals that the sperm of the hybrid loach are particularly inactive. Ploidy identification was carried out on the sperms of four species of loach in the sperms of DD and PP by flow cytometers. It was found that the sperms of DD and PP were mostly 1N cells, while there were a large number of 2N and 4N and a small number of 8N cells in the sperms of DP and PD except for the normal haploid sperm. The spermatozoa in DD and PP testes were dense, intact and uniform in length (33.71±2.12) and (34.28±1.83) μm, respectively, by SEM and TEM. The head length of sperm in the testis of DP and PD was significantly longer than that of DD and PP ( $P<0.05$ ), while the tail length, midlength and full length of sperm in the testis of DP and PD were significantly shorter than those of DD and PP ( $P<0.05$ ). DP and PD in the testis displayed a large number of abnormal sperm, such as multitailed sperm, binuclear sperm and big-head sperm. Head size showed obvious polymorphism, according to the head size measurements to estimate its ploidy, including normal sperm haploid sperm, at the same time have diploid and tetraploid sperms, or even higher haploid sperm. The abnormal sperm of these hybrid loach provided important evidence for its low sperm motility and male sterility.

**Key words:** diploid *Misgurnus anguillicaudatus*; *Paramisgurnus dabryanus*; distant hybridization; CASA; flow cytometry; scanning electron microscope (SEM); transmission electron microscopy (TEM)

**Corresponding author:** WANG Weimin. E-mail: wangwm@mail.hzau.edu.cn

**Funding project:** National Natural Science Foundation of China (31372180)