

# 中华绒螯蟹精子的研究\*

## I. 精子的形态及超微结构

堵南山 赖伟 薛鲁征\*\*

(华东师范大学, 上海)

**提要** 中华绒螯蟹的精子属无鞭毛精子。扫描电镜观察表明,这类精子呈不规则扁球形,前端有一光滑的圆面,圆面四周是凹陷的沟环,沟环后的精子表面凹凸不平,并伸出约20条辐射臂。透射电镜揭示了这类精子是由球形的顶体、杯状的核杯及辐射臂所组成,其中顶体形态较为复杂,包含多种亚显微结构。细胞化学反应证明了核杯为 Feulgen 阳性,顶体为 PAS 阳性。

十足类甲壳动物的精子形态独特,不具鞭毛<sup>[1]</sup>。1878年, Grobben 首次描述了这类无鞭毛精子,自此以后一直引起有关学者的注意<sup>[9]</sup>。早期主要借助光镜和经典的组织学、细胞学方法观察研究<sup>[10]</sup>,因此只能作粗略的描述,有些结果甚至不正确。1940年, McCroan 应用 Feulgen 反应技术,以绿螯虾 (*Cambarus viridis*) 为材料,首次对这类精子的细胞核部位进行定位<sup>[10]</sup>。近年来,由于电镜的应用<sup>[3,6-9,11-16]</sup>,增加了人们对这类精子的了解,但有待于继续深入探讨。国内迄今未见有关这方面的专门报道。

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 俗称河蟹,我们用电镜及细胞化学等方法,对其精子的形态、顶体反应及发生过程进行了较为详细的研究,修正和补充了前人在十足类精子方面的工作。本文仅就精子形态及超微结构的观察结果作出分析。

## 一、材料与方法

所用河蟹于1984年3—4月取自浙江省淡水水产研究所平湖蟹苗繁殖场。从交配不久的雌蟹受精囊中取出精子,或从雄蟹射精管中取出精荚,用玻璃匀浆器裂解其外膜,使之释出精子。

电镜观察的材料,以2.5%戊二醛和1%锇酸双固定(二者匀用0.1mol/L, pH 7.2磷酸缓冲液配制)。扫描电镜(SEM)观察材料在 Hitachi HCP-2 临界点干燥仪上作临界点干燥,并用 Eiko IB-3 离子溅射仪喷金,以 Hitachi S-450 扫描电镜观察。透射电镜(TEM)所用精子,以 Epon 812 或环氧树脂 618 包埋,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, JEM-100CX II 透射电镜观察。

细胞化学研究的材料,以2.5%戊二醛或 Carnoy's 液固定, Feulgen 反应以显示胞

\* 本研究得到我系电镜室曹汉民等协助,并承浙江省淡水水产研究所何林岗提供河蟹材料,谨致谢忱。

\*\* 现在中国科学院上海昆虫研究所。

收稿日期: 1985年8月8日。

核, PAS 反应以显示多糖。Olympus BH-2 显微镜观察。

## 二、观察结果

中华绒螯蟹的精子像其它十足类甲壳动物一样,为无鞭毛精子,呈不规则扁球形(图版 I:1),前端为光滑圆面,圆面四周有一凹陷的沟环(ditch ring),沟环中常见 2—3 个以上的乳头状小突起,其位置不规则,有的精子甚至无此突起。沟环后的精子表面凹凸不平,并伸出约 20 条辐射臂。精子直径约  $4.5\mu\text{m}$ 。

相差显微镜作活体观察表明,这类精子在生理盐水和天然海水中均不游动,只作布朗运动;辐射臂挺直,不划拨,也不伸缩。

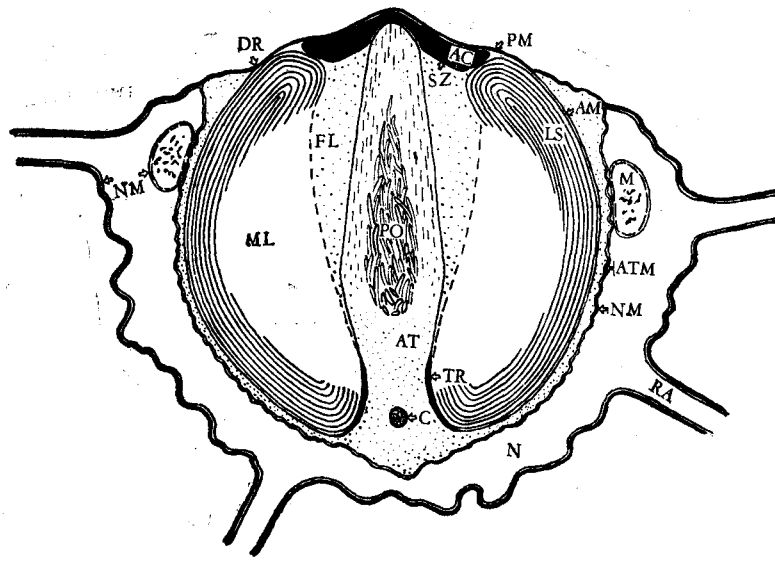


图1 中华绒螯蟹精子超微结构模式图

AC. 头帽; AM. 顶体膜; AT. 顶体管; ATM. 顶体管膜; C. 中心粒; DR. 沟环; FL. 顶体囊丝状层; LS. 顶体囊片层结构; M. 线粒体; ML. 顶体囊中间层; N. 核杯; NM. 核膜; PM. 质膜; PO. 穿孔器; RA. 辐射臂; SZ. 亚帽带; TR. 加厚环。

透射电镜揭示出这类精子由顶体(acrosome)、核杯(nuclear cup)和辐射臂(radial arm)三部分构成(图1,图版 I:2),其中顶体形态较为复杂,包含多种亚显微结构。整个精子外被一层细胞质膜(图版 I:2,3),质膜为中等电子密度。

### 顶体

主要分为顶体管(acrosomal tubule)、头帽(apical cap)和顶体囊(acrosomal vesicle)等部分,位于精子中央,基本为一球形结构,前端略扁平,形成精子前端的圆面,其中央有一圆锥状突起,乃是头帽的中央前突所在部位;顶体的前三分之一处,由顶体管外周延伸的游离端向包在外的细胞核突出(图版 I:2,3),形成一圈突环(convex ring),并与核杯口缘相互靠连。顶体呈 Feulgen 阴性, PAS 阳性,因此在化学组成上至少部分地和常规鞭毛精子的顶体相一致<sup>[2,5]</sup>。

顶体管包括位于顶体中央的中央管 (central canal) 和由该管底部向顶体表层 (除前端外) 包裹而电子密度较低的延伸部分 (图版 I:3)。中央管呈纺锤形, 中段略粗, 前后段较细, 前端钝尖, 一直伸至头帽下, 后端则伸展到顶体后端。中央管前段由沿长轴排列的极细丝状物组成 (图版 I:4), 而后段则由不定向排列的均匀丝状物组成 (图版 I:5), 中段内部含有一些高电子密度、直径约 10—15nm 的粗丝, 这些粗丝基本顺纵轴排列, 在中央管中央形成圆锥体, 其顶尖向前 (图版 I:3), 为穿孔器 (percutor organ)<sup>[1]</sup>。中央管基部近核处有一直径为 0.3 $\mu$ m 的球形颗粒 (图版 I:2, 3, 5), 其周缘密度比中心大, 为中心粒。中央管的基部向四周扩展, 呈薄层状, 沿顶体表层向上包裹, 直至沟环, 这就是顶体管的外周延伸部分, 其游离端增厚, 并与质膜相联系。游离端外侧面与核杯口内侧面有局部融合的迹象, 在这一部位, 核杯内面的核膜消失 (图版 I:2)。外周延伸部分的物质组成和中央管后段相似, 但局部却表现为膜片层结构 (图版 I:5)。顶体管被有一层极薄而较难分辨的顶体管膜 (acrosomal tubule membrane)。

中央管前方, 有一电子密度极高而呈圆盘状的特化结构, 称为头帽 (图版 I:3, 4), 头帽的中央向前突起呈圆锥状, 突起的后壁则内凹, 正可容纳中央管前端的伸入部分。

顶体内还有一层电子密度极低的顶体膜 (acrosomal membrane), 这层膜由头帽前 (图版 I:3, 4) 开始, 一直向后, 到达中央管的基部, 形成加厚环 (thickened ring) (图版 I:5)。顶体膜在头帽前端处与质膜相靠贴, 从沟环起与顶体管膜邻接。

由头帽和顶体膜所围成的部分称顶体囊 (图版 I:3), 中央管即居于囊的中央。顶体囊为精子 PAS 阳性的主要部位, 内含卵膜溶素 (egg membrane lysins) 等物质, 囊内组分并不均一。头帽后方环绕中央管前端为中等电子密度的亚帽带 (subcap zone)。亚帽带后又可分为同心环绕中央管的三个部分: 紧靠中央管的最内部分电子密度略低于亚帽带, 前端厚度与亚帽带相同, 向后逐渐变薄, 终止于加厚环, 其组分呈细丝状, 与 Yasuzumi (1960) 对日本绒螯蟹 (*E. japonicus*) 的观察一致, 称为丝状层 (fibrous layer)<sup>[4]</sup>; 中间为均匀而电子密度低的中间层 (middle layer); 最外部分由平行排列的片层结构 (lamellar structure) 组成 (图版 I:2, 3), 其横切面为同心的圆环 (图版 I:6)。片层结构内共有 8 层片层, 每层厚约 15nm; 从头帽边缘一直达到中央管基部, 前后端向内弯曲而略延伸, 呈侧向“U”形。片层为中等电子密度, 最内的片层似乎与中间层物质相融合; 各片层之间有电子密度低而厚约 15nm 的层间物质。

### 核杯

精子的胞核呈大的杯状, 故称核杯。除沟环之前部分外, 核杯包裹在顶体的外周 (图版 I:2)。细胞化学显示, 核杯呈 Feulgen 阳性, PAS 阴性。核杯的内侧核膜与顶体管外周延伸的顶体管膜相靠贴; 外侧核膜则皱折不平, 与质膜相紧贴, 并在发生辐射臂处随辐射臂外突 (图版 I:7)。核杯内染色质呈细网状均匀分布, 这与 Langreth 对北方黄道蟹 (*Cancer borealis*) 的观察一致<sup>[8]</sup>。近核杯口缘处常有电子密度较低的囊状物, 可能是核膜包裹的线粒体 (图版 I:2, 6), 囊内有时出现电子密度高的晶粒, 无嵴存在, 也没有得到任何其它线粒体功能的证据。

### 辐射臂

由成熟精子的核杯外侧发出的细长放射状突起, 称为辐射臂 (图版 I:1, 7)。每条辐

射臂长约  $3\mu\text{m}$ , 从基部到末端直径几乎相等, 约  $0.2\mu\text{m}$ 。仅近基部一段呈 Feulgen 阳性, 十分微弱。辐射臂与核杯之间完全相通, 无隔膜, 核物质伸入辐射臂内; 此外, 臂内还含有大量丝状物质, 顺轴向排列; 辐射臂外周被有延伸的核膜及质膜。

### 三、讨 论

1. 中华绒螯蟹的精子 and 前人报道的其它短尾类甲壳动物基本相同<sup>[3,6-9,12,13,15]</sup>, 为无鞭毛精子, 形态奇特, 不会游动。本研究较清晰地探索了中华绒螯蟹精子的形态结构, 尤其是扫描电镜观察, 直观地提供了立体形像, 在这类精子研究中尚属首次。我们在精子前端的沟环内观察到有不定数量的乳头状小突起, 这也曾在 Hinsch 研究的长脚蟹属 (*Stenorhynchus*) 精子纵切面上出现过<sup>[7]</sup>, 其详细结构及功能则尚待进一步研究。

2. 中华绒螯蟹和日本绒螯蟹同归于绒螯蟹属, 亲缘关系很近。Yasuzumi (1960) 曾对日本绒螯蟹的精子绘制三维结构模式图<sup>[9]</sup>, 但本研究所得结果与之相较, 存在一定的差异。Yasuzumi 未曾发现头帽; 他的图中, 中央管没有达到顶体后端, 亦无外周延伸部分, 致使片层结构在顶体后端连接而呈杯状; 他认为, 核杯与顶体之间有一个大液泡 (vacuole)。这些差异, 我们以为可能主要是由于 Yasuzumi 所用的电镜照片所示非正中切面而引起的, 他所描述的致密带 (dense band) 可能相当于头帽, 致密膜 (dense membrane) 大概就是顶体管的外周延伸。虽然本文图版 1:2 中也显示液泡状空间, 但我们认为这并非精子本身的结构, 而是材料处理时收缩引起的, 顶体和核杯是紧密邻接的。Brown (1966) 曾对美味优游蟹 (*Callinectes sapidus*) 精子的纵切面画过模式图<sup>[3]</sup>, 他比 Yasuzumi 的描述更接近于我们的观察, 但未曾提到片层结构, 而代之以大微管层 (large "microtubular" layer), 也未对顶体管外周延伸的游离端作出描绘。Langreth (1969), Reger (1970) 和 Hinsch (1971, 1973) 都曾对几种短尾类甲壳动物精子作过详细的研究<sup>[6,7,9,13]</sup>, 但均未发现片层结构。Langreth 只将顶体囊内的物质分为内区 (inner region) 和外区 (outer region); Reger 和 Hinsch 则将顶体管的外周延伸当作片层区 (lamellar region)。后两人认为, 在精子形成过程中, 高尔基体、线粒体等具膜胞器在这个部位融合成明显无序的膜片层结构。但本研究的结果表明, 中华绒螯蟹精子的顶体管外周延伸仅局部显示出膜片层状结构 (图版 1:5)。Langreth 曾提到, 内侧核膜在中央管基部处破裂, 核物质似乎能自由进入中央管内; Reger 和 Hinsch 也观察到核膜在核杯内侧与顶体之间有断续的消失现象, 但本研究中观察到核膜的消失仅出现在核杯口缘与顶体管外周延伸的游离端之间 (图版 1:2)。根据观察结果, 我们对中华绒螯蟹精子纵切面绘制了模式图 (图 1)。

3. 在过去的报道中, 日本绒螯蟹<sup>[15]</sup>、日本拟螯虾 (*Cambaroides japonicus*)<sup>[16]</sup>、克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*)<sup>[11]</sup>、大西洋寄居蟹 (*Eupagurus berhardus*)<sup>[13]</sup> 等的精子均无中心粒, 但在普通海螯蛄 (*Homarus vulgaris*)<sup>[12]</sup>、北方黄道蟹<sup>[8]</sup>、挪威海螯虾 (*Nephrops norvegicus*)<sup>[4]</sup>、镶边拟蠢蟹 (*Libinia emarginata*)<sup>[6]</sup>、巴豆蟹 (*Pinnixia* sp.)<sup>[13]</sup> 和尖额蟹类 (*Oxyrhyncha*)<sup>[7]</sup> 等精子中, 却存在中心粒。Hinsch 曾在颗粒隐足蟹 (*Heterocrypta granulata*) 精子中得到典型的中心粒结构, 但不是由三联体而是由双联体组成的<sup>[7]</sup>。在以上提到的种类中, 除巴豆蟹和尖额蟹类外, 其余种类的精子中均无线粒体。本研究表明, 中心粒、线粒体这两种胞器均存在, 中心粒的形态及位置与 Reger<sup>[13]</sup> 及 Hinsch<sup>[6,7]</sup> 的报道较一致;

线粒体则被曲折的内侧核膜包在近核杯口处,但无线粒体的功能结构,可能与这类精子不运动有关。

4. 辐射臂在过去文献中曾被给予多种名称,如伪足 (pseudopodia)、辐条 (ray)、核臂 (nuclear arm)、刺突 (spike)、丝状体 (filament)、核突 (nuclear process) 等,本文采用近年来较常用的名称——辐射臂。对辐射臂的起源过去有过争议,近来的研究较一致地认为是核起源<sup>[3,6,7,13,14,19]</sup>。本研究肯定了辐射臂由核杯外突形成,仅近基部一段呈 Feulgen 阳性,这与 Brown 及 Moses 的观察相一致<sup>[3,11]</sup>,末段可能由于 DNA 含量极微而显不出 Feulgen 阳性;臂内的丝状物质是否属微管微丝类尚不清楚,可能与受精时收缩有关<sup>1)</sup>,有待于进一步验证。辐射臂数目过去报道最少 3 条<sup>[2,7,8]</sup>,最多 8 条<sup>[3]</sup>,日本绒螯蟹中未报道。中华绒螯蟹精子辐射臂的精确数目虽还难以肯定,但约有 20 条,显然多于已被研究过的其它短尾类。可以初步设想,精子辐射臂的数目或许可作为研究十足类动物系统分类及发生的证据之一。辐射臂在活体状态下是挺直的,电镜观察中的扭曲是材料处理过程中人为原因所致。

5. 细胞化学研究结果和前人的工作基本一致<sup>[3,12]</sup>,核物质位于核杯中,顶体囊内含有 PAS 阳性物质,可能是与受精时溶解卵膜有关的一些多糖蛋白酶类。

### 参 考 文 献

- [1] Adiyodi, K. G. & R. G. Adiyodi, 1983. Reproductive biology of invertebrates, Vol. II, spermatogenesis and sperm function. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore. pp. 407—449.
- [2] Bowen, R. H., 1925. Further notes on the acrosome of the animal sperm, the homologies of nonflagellate sperms. *Anat. Rec.* 31: 201—232.
- [3] Brown, G. G., 1966. Ultrastructural studies of sperm morphology and sperm-egg interaction in Decapod *Callinectes sapidus*. *J. Ultrastruct. Res.* 14: 425—440.
- [4] Chevallier, P. & P. L. Maillet, 1965. Structure fine et constitution Cytochimique du Spermatozoïde de la Langoustine *Nephrops norvegicus* L. (Crustacé Décapode). *J. Microscop.* 4: 679—700.
- [5] Clermont, Y. & C. P. Leblond, 1955. Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the "Periodic Acid-Schiff" technique. *Am. J. Anat.* 96: 229—250.
- [6] Hinsch, G. W., 1969. Microtubules in sperm of the spider crab, *Libinia emerginata* L., *J. Ultrastruct. Res.* 29: 525—534.
- [7] Hinsch, G. W., 1973. Sperm structure of Oxyrhyncha. *Can. J. Zool.* 51: 421—429.
- [8] Langreth, S. G., 1965. Ultrastructural observations on the sperm of the crab *Cancer borealis*. *J. Cell Biol.* 27: 56A.
- [9] Langreth, S. G., 1969. Spermiogenesis in Cancer crabs. *J. Cell Biol.* 43: 575—603.
- [10] McCroan, J. E., 1940. Spermatogenesis of the crayfish, *Cambarus viridis*, with special reference to the Golgi material and mitochondria. *Cytologia* 11: 136—155.
- [11] Moses, M. J., 1961. Spermiogenesis in the crayfish (*Procambarus clarkii*), I. Structural, characterization of the mature sperm. *J. Biophys. Biochem. Cytol., Suppl.* 9: 222—228.
- [12] Pochon-Masson, J., 1965. L'Ultrastructure des épines du spermatozoïde Chez les Décapoda (Macroures, Anomoures, Brachyours). *C. R. Acad. Sci. Paris.* 260: 3762—3764.
- [13] Reger, J. F., 1970. Studies on the fine structure of spermatids and spermatozoa of the crab, *Pinnixia* sp., *J. Morphol.* 132: 89—100.
- [14] Talbot, P. & P. Chanmanon, 1980. The structure of sperm from the lobster, *Homarus americanus*. *J. Ultrastruct. Res.* 70: 275—286.
- [15] Yasuzumi, G., 1960. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. VII. Spermatid differentiation in the crab, *Eriocheir japonicus*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7: 73—87.

1) 堵南山、赖伟、薛鲁征, 1986. 中华绒螯蟹精子顶体反应的研究。(待发表)

- [16] Yasuzumi, G., G. I. Kaye, G. D. Pappas, H. Yamamoto & I. Tsubo, 1961. Nuclear and cytoplasmic differentiation in developing sperm of crayfish, *Cambaroides japonicus*. *Z. Zellforsch.* 53: 141—158.

## STUDIES ON THE SPERM OF CHINESE MITTEN-HANDED CRAB, *ERIOCHEIR SINENSIS* (CRUSTACEA, DECAPODA) I. THE MORPHOLOGY AND ULTRAS TRUCTURE OF MATURE SPERM

Du Nanshan, Lai Wei and Xue Luzhen

(East China Normal University, Shanghai)

### ABSTRACT

The sperm of the Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) was studied with Scanning Electron Microscope (SEM), Transmission Electron Microscope (TEM) and cytochemical methods. The sperm of the crab belongs to a flagellate sperm. SEM observation shows that the sperm has a spherical body, the anterior part of which appears smooth, and the other part is uneven, from which radiate a number of radial arms. Between the two parts there is a ditch ring, in which some papillae can be found. TEM reveals that the sperm is composed of acrosome, nuclear cup and radial arms.

Acrosome is a complicated globular structure and shows PAS positive, the centre of which is a cylindrical acrosomal tubule, the front of which is an apical cap. Around the acrosomal tubule is the acrosomal vesicle, which can be divided into a fibrous layer, a middle layer and some lamellar structures. The centriole is located near the base of the acrosomal tubule.

Except the area of the apical cap, the acrosome is surrounded by nuclear cup, which shows Feulgen positive. Some mitochondrias can be seen distinctively surrounded by the nuclear envelope near the edge of the nuclear cup.

There are about twenty radial arms formed by nuclear processes.

## 图 版 说 明

1. 中华绒螯蟹 (*E. sinensis*) 成熟精子外形

左侧为斜侧面观,  $\times 9,200$ ; 右侧为前面观,  $\times 7,600$ 。细箭头示沟环, 粗箭头示乳头状小突起 (SEM)。

## 2. 精子整体纵切

粗箭头示顶体管外周延伸游离端, 此处核膜消失,  $\times 14,000$ 。

## 3. 精子局部纵切

粗箭头示顶体管外周延伸游离端,  $\times 20,000$ 。

4. 精子前部纵切,  $\times 48,000$ 。

## 5. 精子后部稍斜纵切

粗箭头示膜片层状结构,  $\times 30,000$ 。

6. 精子中部局部横切,  $\times 27,000$ 。7. 精子辐射臂纵切,  $\times 50,000$ 。

AC 为头帽; AM 为顶体膜; AT 为顶体管; ATM 为顶体管膜; C 为中心粒; DR 为沟环; FL 为顶体囊丝状层; LS 为顶体囊片层结构; M 为线粒体; ML 为顶体囊中间层; N 为核杯; NM 为核膜; PM 为质膜; PO 为穿孔器, RA 为辐射臂; SZ 为亚帽带; TR 为加厚环。

