

长毛对虾精子形成的超微结构*

王艺磊 张子平[†]

李少菁^{††}

(集美大学水产学院 厦门 361021) [†](香港城市大学生物与化学系)

^{††}(厦门大学海洋学系 厦门 361005)

提要 于 1993—1994 年在厦门海区采集长毛对虾雄性成虾,取其精巢、输精管和精荚,采用 JEM-100CXII 透射电镜观察长毛对虾精子形成过程的超微结构,并根据顶体形成过程中超微结构的变化进行分期。结果表明:长毛对虾精子形成过程可分为早期精子细胞、中期精子细胞、晚期精子细胞及成熟精子四个时期。在早期精子细胞阶段,细胞质中含有丰富的粗面内质网,其周围分布着许多大小不一的囊泡,囊泡融合成前顶体囊,囊内合成前顶体颗粒物质。中期棘突原基形成。后期棘突原基进一步浓缩,并向前突出。成熟精子期整个前顶体囊分化为棘突和内、外顶体层。在精子形成过程中,细胞质先囊泡化后移至细胞的一极,同时不断减少,最后只剩下一些残余的扁平小泡样膜相结构,成一薄层包绕于细胞核外。细胞核也经历了三次形态变化,染色质从去浓缩变成弥散状态到重又浓缩为凝絮状;随着发生过程中精子染色质的变化,核膜也崩解,至成熟精子已无完整核膜存在。这些结果说明,长毛对虾与大多数十足目动物类似,精子的顶体物质系由粗面内质网合成。细胞核内染色质的演化,推测与其核骨架与核蛋白的演化是相对应的,是 DNA 与蛋白质相互作用的结果。

关键词 长毛对虾 精子形成 超微结构

学科分类号 Q24

十足目是甲壳纲中进化程度最高、经济意义最为重要的一个目,但有关其生殖细胞的结构、功能与发育的工作,特别在超微结构水平研究其游泳亚目雄性生殖细胞的发生,仍十分薄弱(Shigekawa 等, 1986; 陈楠生等, 1992; Arsenault, 1984; Koehler, 1979; Medina, 1994b)。长毛对虾是重要的海产经济动物,也是十足目游泳亚目对虾科的代表种。张子平等于 1989 年提出了长毛对虾精子超微结构模型¹⁾,进一步确定了前人对对虾科精子认识上的一些谬误,以后的一些工作(林勤武等, 1991; 张子平等, 1991; 洪水根等, 1993; Medina, 1994a, 1994b)也证实了此模型。正确认识成熟精子的结构与功能,还应当有其发生过程的证据作为支持,关于对虾属精子发生过程中超微结构的工作国内外均未见正式发表。本文

* 福建省自然科学基金资助项目, C95030号;中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室资助项目。

王艺磊,女,出生于1963年7月,副教授,博士生, E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

收稿日期: 1996-12-31, 收修改稿日期: 1998-06-11

1) 张子平 王艺磊, 1989. 对虾精子的研究 I. 成熟精子的形态与超微结构. 中国细胞生物学会第四次全国代表大会学术讨论会论文摘要汇编. 89

报道长毛对虾精子形成过程中超微结构的演化,以期为甲壳动物精子学研究以及对虾养殖提供基础资料。

1 材料与方法

于 1993—1994 年在厦门海区采集长毛对虾 (*Penaeus penicillates*) 雄性成虾。取其精巢、输精管、精荚等,切成小块,以 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定,环氧树脂 618[#] 包埋, LKB-5 超薄切片机切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, JEM-100CXII 透射电镜观察。根据电镜观察结果,并参照 Medina 等 (1992、1994b), Shigekawa 等 (1986) 对其它十足目动物精子发生过程的描述,依其顶体形成过程中超微结构的变化,将长毛对虾精子形成过程分期。

2 结果

长毛对虾精子形成过程可分为四个时期,见图 1。

2.1 早期精子细胞期

刚完成减数分裂的精子细胞核为较规则的椭圆形,长径约 5.5 μm ,短径约 4.0 μm ,核内有许多异染色质分散于整个核质中,核外有连续的核膜包绕。细胞质内有发达的粗面内质网。此期分为三个阶段。

第一阶段:形成前顶体囊的囊泡出现,细胞质内的粗面内质网大多与核膜平行,粗面内质网包围着含有均质内含物的囊泡,大量大小不一的囊泡散布于整个细胞质中。(图版 I: 1)

第二阶段:前顶体囊形成,细胞从此开始极化,核从其先前的中心位置移到细胞的另一端,囊泡融合构成了位于细胞另一端的前顶体囊。前顶体囊与细胞外界由均匀的细胞质膜相分隔,前顶体囊与细胞质之间界限明显,但无膜相结构相分隔。粗面内质网依然发达。囊泡大量存在。(图版 I: 2)。

第三阶段:前顶体颗粒物质合成开始,此阶段前顶体囊内物质合成出由电子密度较高的颗粒状物质构成的小斑块,这些小斑块将在中期发育为棘突原基。(图版 I: 3)

2.2 中期精子细胞期

此期精子细胞与附近细胞脱离接触,在一个单独的小腔中继续发育。细胞核发生了显著的变化,染色质去浓缩而为均匀弥散状,核膜开始崩解,核形变得不规则,细胞质体积开始缩小,发达的粗面内质网退化成众多短小及一些细长折叠的膜相结构(图版 I: 4 箭头所示)。前顶体囊内物质继续分化,棘突原基已经出现(图版 I: 4)。

2.3 晚期精子细胞期

此期精子细胞已与周围细胞完全分离,细胞核外无完整核膜包被,核物质重又浓缩而成为凝絮状结构,细胞质体积进一步缩小仅剩一层薄带包围着细胞核。细胞质中的短小膜相结构变为扁平小泡。前顶体进一步分化,棘突原基本身进一步浓缩(图版 I: 5, 图版 I: 6),并开始向前端突出(图版 I: 7),帽状的前顶体囊进一步覆盖精核。

2.4 成熟精子期

前顶体囊已完成分化形成顶体,由细丝状结构构成的棘突(图版 I: 8)、细颗粒状的外顶体层和粗颗粒状的内顶体层所组成(图版 I: 9, 10)。核膜不连续,核内染色质为凝絮状,细胞质未见明显变化,众多扁平小泡及少量细长膜相结构成一薄层包于核外,位于顶体的

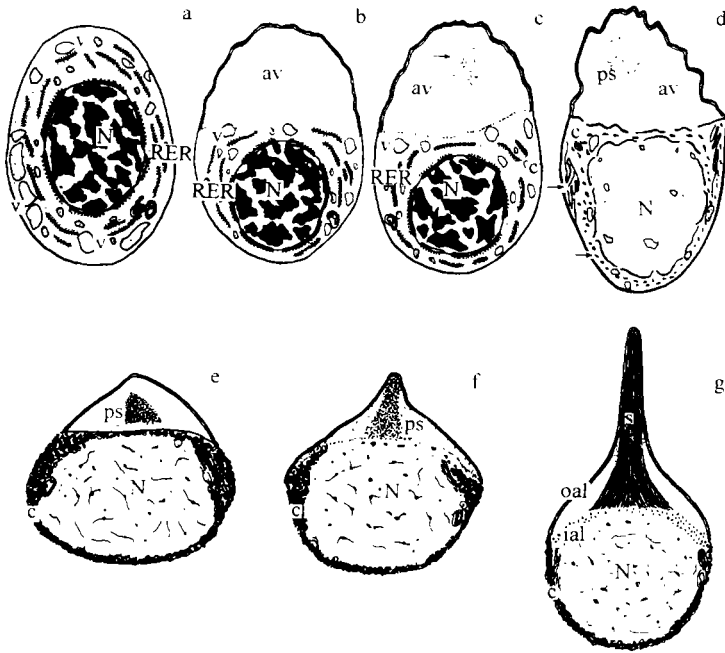


图1 长毛对虾精子形成过程超微结构图

Fig.1 Ultrastructure of spermiogenic process of *Penaeus penicillates*

a—c. 早期精子细胞; d. 中期精子细胞; e, f. 晚期精子细胞; g. 成熟精子(注释详见图版I)

远端区。(图版 I: 10)

3 讨论

3.1 顶体的形成

具有大而复杂的顶体是十足目动物精子的特征之一 (Ake, 1987; Pochon-Mosson, 1983), 而长毛对虾精子的顶体结构相对较为简单, 由棘突和内、外顶体层组成 (张子平等, 1991)。十足目动物精子顶体的形成是一个有争论的问题, 早期光镜水平的工作曾提出高尔基体、线粒体起源等假设, 以后在超微结构水平的工作也提出了核外膜发泡起源的假设 (Shigekawe *et al*, 1986), 近年的工作多提出由内质网起源 (堵南山等, 1988; Ake, 1987; Koehler, 1979; Medina *et al*, 1992; Medina, 1994a, 1994b; Pochon-Masson, 1983; Reger, 1970; Sagi *et al*, 1988)。本文的结果表明, 在早期精子细胞阶段, 细胞质中含有丰富的绕核分布的粗面内质网, 随着发育的进行, 粗面内质网周围出现许许多多大小不一的囊泡, 推测其是由粗面内质网合成的物质聚集在一起形成的结构, 这些囊泡的内含物系由电子密度与前顶体囊相同的物质构成的。这些结果说明, 长毛对虾与其它十足目动物类似, 顶体物质应当是在粗面内质网中合成的, 这些囊泡在细胞质的各个区域均有分布, 推测通过融合等机制形成前顶体囊。

棘突是由丝状物构成的, Koheler (1979) 在小长臂虾的工作中推测其起源于精子细胞质中大量的片层体。Shigekawa 等 (1986) 在锐脊单肢虾, Medina (1994b) 在长额拟对虾提出了起源于前顶体的假设。从本文提供的结果, 长毛对虾的棘突应当是由前顶体囊内的

颗粒物合成并浓缩,形成棘突原基后,向外突出形成的,这与前人研究锐脊单肢虾和长额拟对虾的结果较为一致。

3.2 细胞质的变化

本研究表明,在长毛对虾精子形成过程中,细胞质发生了一系列的变化。首先是在早期阶段,由于粗面内质网旺盛地合成大量大小不一的囊泡,使得细胞质囊泡化。随着囊泡聚集成为前顶体囊,粗面内质网开始减少并退化成膜相结构残余物存在于细胞质中,细胞质也逐渐消失,体积缩小,最后成为含许多扁平小泡的一层薄带,覆盖于精子核外。故此,成熟长毛对虾精子细胞质部分的外表面形态为小泡状凸起与小孔状凹陷。本研究还可表明,长毛对虾精子由早期精细胞至成熟精子的形成过程中细胞质中未见高尔基体,线粒体也呈退化状态,进一步说明了长毛对虾精子顶体并非起源于高尔基体、线粒体。

因此,细胞质在长毛对虾精子形成过程中的演化特点,与长额拟对虾(Medina, 1994b)、锐脊单肢虾(Shigekawa *et al.*, 1986)有相似之处。但必须指出,与锐脊单肢虾从早期精子细胞阶段开始细胞质中就有丰富发达的膜片层体结构(MLB)不同,长毛对虾精子形成过程中,至中期精子细胞才在胞质中出现一些退化的由膜相结构堆积成的残余物,远较锐脊单肢虾的膜片层体样结构简单。

3.3 细胞核的变化

本研究表明,在长毛对虾精子的顶体形成过程中,细胞核也经历了三次形态变化(图1)。早期精子细胞,细胞核的形态与其它动物相似,有异染色质存在;至中期精子细胞,类似于其它十足目动物(Medina *et al.*, 1992; Medina, 1994b; Shigekawa *et al.*, 1986),染色质去浓缩而成弥散状态,此时核膜开始崩解,核形变得不规则;到晚期精子细胞,染色质重又浓缩为凝絮状,随着发生过程中精子染色质的变化,核膜也崩解,至成熟精子已无完整核膜存在(张子平等, 1991)。细胞核内染色质的演化,与其核骨架与核蛋白的演化是相对应的,是DNA与蛋白质相互作用的结果。刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)精子发生过程中碱性蛋白从有到无的变化(王艺磊等, 1996)可从一个侧面说明这一点。疏松且无完整核膜的核可能有利于精子顶体反应的完成及受精的进行。

4 结语

对虾是重要的渔业资源和养殖对象,其精子又是无鞭毛非运动型精子的代表。因此研究其精子的结构与功能不仅有重要的应用前景,而且有进化生物学的重要意义。通过对长毛对虾精子形成过程超微结构的研究可以知道:根据顶体形成过程中超微结构的变化,长毛对虾精子形成可分为早期精子细胞,中期精子细胞,晚期精子细胞及成熟精子四个时期。在顶体形成过程中,细胞质和细胞核也发生显著的变化,最终形成由棘突、内外顶体层所组成的顶体;大而疏松、染色质呈凝絮状的细胞核以及包绕于细胞核外由一些残余的扁平小泡样膜相结构组成的细胞质。研究结果还表明,长毛对虾与大多数十足目动物类似,精子的顶体物质系由粗面内质网合成。细胞核内染色质的演化,推测与其核骨架与核蛋白的演化是相对应的,是DNA与蛋白质相互作用的结果。

致谢 堵南山教授、Medina 博士提供资料,厦门大学电镜室提供实验方便,谨志谢忱。

参 考 文 献

- 王艺磊 张子平 李少菁, 1996. 刀额新对虾精子发生过程中碱性蛋白的变化. 厦门大学学报(自然科学版), 35(6): 947—954
- 陈楠生 李新正 刘恒, 1992. 对虾生物学. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 272—303
- 张子平 王艺磊, 1991. 对虾精子的研究 I. 成熟精子的形态与超微结构. 厦门水产学院学报, 13(2): 1—9
- 林勤武 刘瑞玉 相建海, 1991. 中国对虾精子的形态结构、生理生化功能的研究 I. 精子的超微结构. 海洋与湖沼, 22(5): 397—401
- 洪水根 陈细法 黄加棋等, 1993. 长毛对虾精子发生的研究 I. 精子的形态结构. 动物学报, 40(2): 239—243
- 堵南山 薛鲁征 赖伟, 1988. 中华绒螯蟹精子的研究 II. 精子发生. 海洋与湖沼, 19(1): 71—75
- Ake France, 1987. Spermatogenesis. In Gsease C *et al* ed. Reproduction of Marine Invertebrate. Vol. IX General Aspects: Seeking Unity in Diversity. Calif.: Calif. and Bowxwood Press. 1—47
- Arsenault A L, 1984. Changes in the nuclear envelope associated with spermtid differentiation in the shrimp, *Crangon septemspinosa*. J Ultrastruct Res, 8: 294—308
- Koehler L D, 1979. A unique case of cytodifferentiation: spermiogenesis of the prawn, *Palaemonetes paludosus*. J Ultrastruct Res, 69: 109—120
- Medina A, 1994a. Spermatozoal ultrastructure of *Penaeus kerathurus* and *Penaeus japonicus* (Crustacea, Dendrobranchiata). Zoomorphology, 114: 181—187
- Medina A, 1994b. Spermiogenesis and sperm structure in the shrimp *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Dendrobranchiata): comparative aspects among decapods. Mar Biol, 119: 449—460
- Medina A, Rodriguez A, 1992. Spermiogenesis and sperm structure in the crab *Uca tangeri* (Crustacea, Brachyura), with special reference to the acrosome differentiation. Zoomorphology, 111: 161—165
- Pochon-Masson J, 1983. Arthropoda—Crustacea. In: Adiyodi K G *et al* ed. Reproductive Biology of Invertebrates Vol. II Spermatogenesis and Sperm Function. New York: John Wiley and Sons Inc. 107—449
- Reger J F, 1970. Studies on the fine structure of spermatids and spermatozoa of the crab *Pinnixia* sp. J Morph, 132: 89—100
- Sagi A, Milner Y, 1988. Spermatogenesis and sperm storage in the testes of the behaviorally distinctive male morphotypes of *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae). Biol Bull, 174: 330—336
- Shigekawa K, Clark W H Jr, 1986. Spermiogenesis in the marine shrimp, *Sicyonia ingentis*. Dev Growth Differentiation, 28: 5—12

ULTRASTRUCTURE OF SPERMIOGENESIS IN THE SHRIMP *PENAEUS PENICILLATES*

WANG Yi-lei, ZHANG Zi-ping[†], LI Shao-jing^{††}

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen, 361021)

[†] (Department of Biology and Chemistry, City University of Hong Kong, Kowloon, Hong Kong)

^{††} (Oceanography Department, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract From 1993—1994, mature male shrimp *Penaeus penicillate* were collected from the coastal areas of Xiamen. Testes, vasa deferentia and spermatophores were cut into small fragments and fixed for 2h at 4°C in 2.5% glutaraldehyde, postfixed for 2h at 4°C in 1% osmium tetroxide,

and embedded in 618[#] resin. Thin sections were cut with glass knives, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined on JEM-100CXII transmission electron microscope.

The study shows that the spermiogenesis of *Penaeus penicillates* can be divided into four successive stages, namely early spermatid, mid spermatids, late spermatids and mature spermatozoa.

Early spermatid possesses numerous rough endoplasmic reticulum and small vesicles; some of vesicles coalesce with the large proacrosomal vesicle. The nucleus and the voluminous proacrosomal vesicle occupy both cell poles. Within proacrosomal vesicle, the proacrosomal granulated material develops. The nucleus shows extensive areas of condensed chromatin and is entirely separated from the cytoplasm by the nuclear envelope.

In mid spermatids, the nucleus has become uncondensed and the perinuclear cytoplasm is considerably reduced. The chromatin is finely granular in appearance. The nuclear envelope has ruptured. Proacrosomal granulated material has formed a primordial spike.

In late spermatids, the primordial spike tends to elongate progressively. After reduction in volume, the perinuclear cytoplasm forms a thin band around the nuclear region. The chromatin also undergoes morphologic change to form a flocculent pattern.

In the stage of mature spermatozoa, proacrosomal vesicle further develops into spike, inner acrosomal layer and outer acrosomal layer. The nuclear and cytoplasm have not changed significantly in this stage.

To sum up, during the spermiogenesis in *Penaeus penicillates*, the chromatin undergoes three morphologic changes. The initially continuous nuclear envelope breaks up, allowing for free nucleocytoplasmic exchange. Proacrosomal vesicles are thought to derive from rough endoplasmic reticulum.

Key words *Penaeus penicillates* Spermiogenesis Ultrastructure

Subject classification number Q24

图 版 说 明

图版 I 长毛对虾精子形成过程的超微结构

Plate I Ultrastructure of spermiogenesis in the shrimp *Penaeus penicillates*

1—3. 早期精子细胞: 1. 细胞质内含众多粗面内质网和大量将要形成前顶体囊的囊泡, $\times 10\ 000$; 2. 前顶体囊形成, $\times 10\ 000$; 3. 前顶体颗粒物质开始合成(箭头所示), $\times 7\ 200$ 。4. 中期精子细胞, 棘突原基出现, 短小及一些细长折叠的膜相结构分布在细胞质中(箭头所示), $\times 10\ 000$ 。5—7. 晚期精子细胞: 5. 棘突原基浓缩, $\times 19\ 000$; 6. 棘突原基开始向前突起, 帽状的前顶体囊进一步覆盖精核, $\times 14\ 000$; 7. 棘突原基向前突出, $\times 14\ 000$ 。8—10. 成熟精子: 8. 示棘突横切, 内具细丝状结构, $\times 48\ 000$; 9. 示内外顶体层, $\times 48\ 000$; 10. 示整体观及染色质呈凝絮状, $\times 10\ 000$

av. 前顶体囊; c. 细胞质; ial. 内顶体层; M. 线粒体; N. 细胞核; oal. 外顶体层; ps. 棘突原基; RER. 粗面内质网; s. 棘突; v. 囊泡