

中国对虾输精管结构及精子形成^{*}

吴长功 周岭华 相建海 刘瑞玉

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 采用激光扫描共聚焦显微镜及电子显微镜技术,对中国对虾输精管结构及精子的形成过程进行研究。结果表明,中国对虾的输精管可分为近端、中间、远端输精管及壶腹 4 部分,输精管壁各部分的基本结构相似,但分泌细胞的结构有较大的差别。输精管自中间膨大部开始,管腔逐渐被一隔膜分为大小不等的两部分,较大的腔内充满了很多精子,输精管较小的腔内充满胶体状物质。中国对虾精子细胞在精巢内产生,在两条输精管内逐渐发育,经过细胞质的分化并与精子外部进行物质的交换,形成顶体、亚顶体及棘突。核的变化则经历了染色质的解凝和核膜的消失,最后形成成熟的精子。

关键词 中国对虾,输精管,精子形成,激光扫描共聚焦显微镜

中图分类号 Q954.43

有关对虾雄性生殖系统的结构、精子发生及形态结构的研究,国内外已有许多报道(Hudinaga, 1942; King, 1948; Kleve *et al*, 1980; Malek *et al*, 1974a, b; Champion, 1987; Ro *et al*, 1990; Chow *et al*, 1991; Bauer *et al*, 1991, 1993; Shigekawa *et al*, 1986; Medina, 1994)。就中国对虾而言,日本冈正雄(1967)曾对中国对虾生殖系统的形态结构进行了初步研究;陈休等(1986)对中国对虾雄性生殖系统的组织学及发育进行研究;林勤武等(1991)报道了中国对虾精子的形态及超微结构;柯亚夫等(1996)对中国对虾精子的超低温保存进行研究。而有关中国对虾精子的形成过程及输精管的超微结构及在精子和精荚形成中的作用,至今未见有报道。本文使用激光扫描共聚焦显微镜及电子显微镜对中国对虾精子的形成及输精管的结构进行了报道,并初步分析了输精管结构与功能的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性中国对虾为中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室虾贝组人工养殖的成虾。

1.2 电镜样品制备

解剖取当年成熟尚未交配的雄虾精巢及输精管,用解剖刀小心切成 2mm³ 左右的小块,输精管按近端细部、中间膨大部、远端细部及壶腹四个部位分别取样,以 pH=7.2 的

^{*} 国家自然科学基金资助项目,39900016 号。吴长功,男,出生于 1968 年 11 月,博士,助理研究员,E-mail:xbyc@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:1999-07-16,收修改稿日期:2000-09-07

磷酸缓冲液配制的 2.5% 的戊二醛固定 1h 以上,然后用 1% 锇酸固定 1h,常规方法制片, HITACHI-H500 透射电镜观察,照相。

1.3 荧光染色及共聚焦显微镜观察

解剖取出成熟雄虾输精管、精英,用 10% 的福尔马林固定 1h 后,以蒸馏水冲洗 3 次,用 MICROM 冷冻剂包埋, -28℃ 冷冻后,用 MICROM-HM505E 冷冻切片机进行切片,厚度为 10—20 μ m,贴片到载玻片上,稍凉干,以 5 μ g/ml 的 Fluorescein isothiocyanate (FITC) 及 5 μ g/ml 的 Propidium iodide (PI) 进行荧光双染色,室温下染 20min。488nm Kr/Ar 离子激光激发,发射波长 522nm 及 585nm 对切片进行激光扫描,得到完整图像。

2 结果

2.1 输精管的结构

中国对虾的输精管为左右两条的弯曲折叠的复合型管腔,输精管近精巢的一段较细,中间一段膨大,远端近壶腹处又变细。壶腹为输精管末端的膨大,呈椭圆型,内有精英,精英内充满精子和胶体状物质。每条输精管内自中间膨大输精管的前端开始形成大小两个腔,较大的腔内充满了处于相同发育期的精子,较小的腔内充满均匀分布的胶状物质。

输精管整个管壁结构由外向里依次为结缔组织、肌肉层、基膜、及分泌上皮紧密相连的 4 个部分。在近端输精管、中间卷曲输精管及远端输精管每一部分的结构都有其特异性,主要的差异在于管壁组成结构及分泌细胞形态结构的不同。

近端输精管管壁较厚,由管壁向管腔内伸出两隔膜,隔膜的一端游离(图版 I:1)分泌细胞为单层柱状细胞,核近长形,细胞质内有丰富的膜系统(图 1:1),能向管腔内释放两种形式的囊泡及一种电子密度较大的颗粒,一种囊泡内含物电子密度较小,以分泌的方式释放到管腔内;另一种囊泡是从细胞的微绒毛前端断裂形成,管壁内可见大大小小的囊泡存在;致密颗粒与管腔内精子细胞正在形成的顶体前颗粒相似(图 1:2)。胞质中含有丰富的粗面内质网及高尔基体,线粒体相对较少,且线粒体嵴不发达(图 1:3)。

中间输精管,管径明显增大,结缔组织及环肌层比较发达,分泌细胞的功能也增强,隔膜也比较发达(图版 I:2、3)。在中间输精管,管腔逐渐被隔膜分成大小两部分,此处的管壁变薄(图版 I:5)。分泌细胞的内质网和线粒体都十分发达,内质网常常折叠盘绕着线粒体(图 1:4)。管腔内有丰富的分泌物,分泌物有颗粒状、絮状、细丝状等,每一种形状分泌物都相对集中的有规律的聚集在一起,正在形成的精子被各种分泌物所包围(图 1:5)。

远端输精管,含胶体物的腔逐渐变大,含精子的腔相对较小(图版 I:4)。此处的分泌细胞最发达,细胞为高柱状,细胞核长形,形状不规则,分泌细胞内质网特别发达,线粒体很多,分泌细胞的微绒毛非常多(图 1:6),其分泌的方式是分泌细胞的分泌物先向微绒毛集中,然后以胞吐(exocytosis)的形式释放到管腔内,分泌物可能是以大大小小的囊泡的形式存在,最后在管腔内均质化形成规则的胶体物和围绕精子的基质(图 1:5、7)。

2.2 早期精子的形成

中国对虾的精子在精巢内即形成精子细胞,并开始了顶体的形成。在精巢的睾丸小管内有大量处于相同发育期的精子细胞(图 2:1)。精子细胞在精巢小管内已开始分化,细胞核位于精子细胞的一端,而另一端顶体颗粒已经形成,有核的一端细胞质较少,质膜

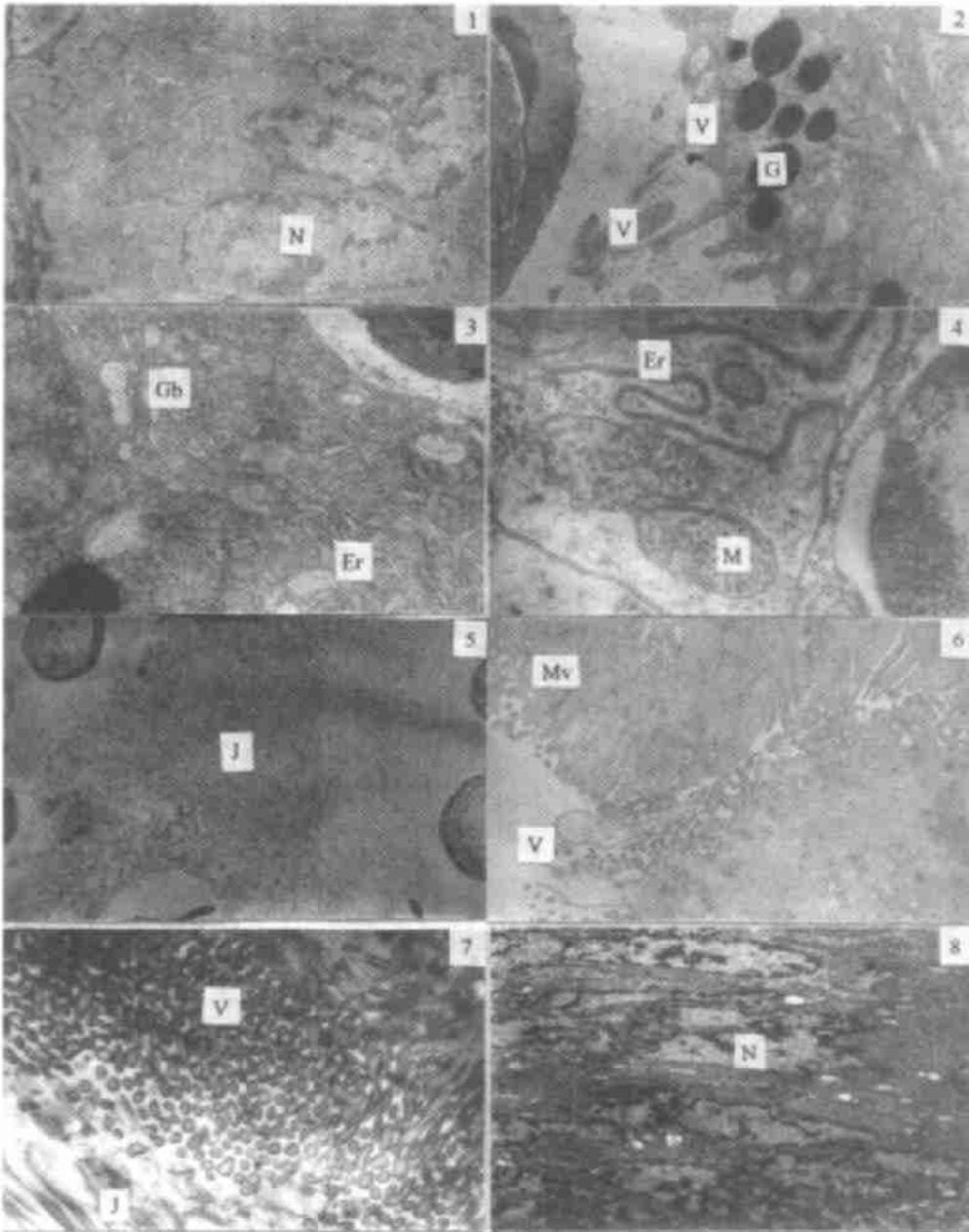


图 1 中国对虾输精管的超微结构

Fig. 1 Ultrastructure of vas deferens in *Penaeus chinensis*

1. 近端输精管壁的柱状上皮细胞,细胞核(N)呈长型,×4800;2. 输精管内壁的微绒毛(V)及腔内的颗粒物(G),×9000;3. 输精管壁分泌细胞内丰富的膜系统、高尔基体(Gb)、内质网(Er)、线粒体(M),×12000;4. 中间输精管分泌细胞内丰富的线粒体(M)和内质网(Er),×18000;5. 管腔规则排列的基质(J),正在形成的精子处于基质中,×3600;6. 远端输精管具有大量微绒毛(Mv)的分泌细胞向管腔内释放两种囊泡的物质(V),×6000;7. 精荚内释放出的大量囊泡(V),内部的囊泡已破裂,形成胶体物(J),×15000;8. 精荚壁紧密排列的柱状上皮细胞,内有丰富的膜系统,×3000

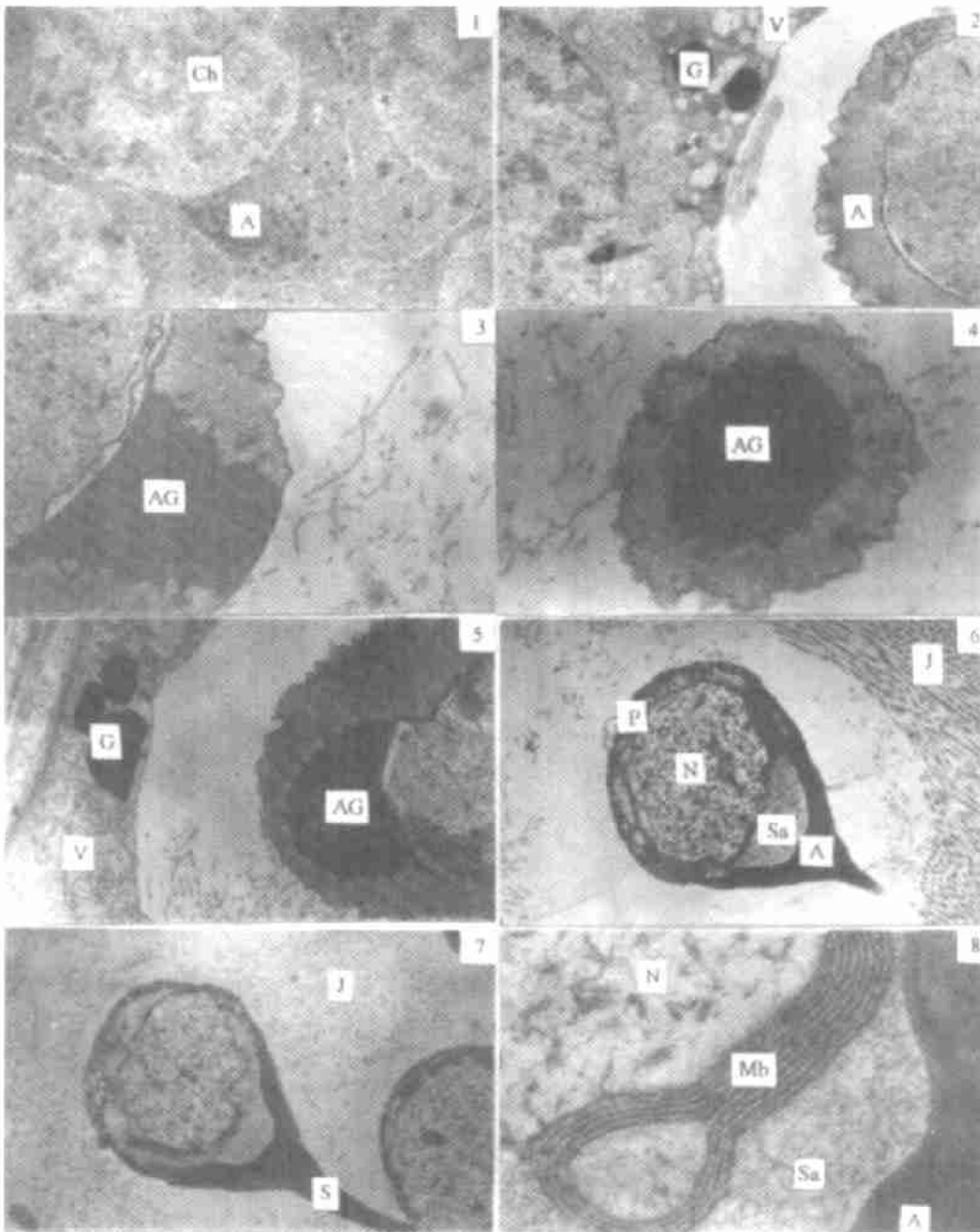


图 2 中国对虾精子的形成过程的超微结构

Fig. 2 Ultrastructure of spermiogenesis in *Penaeus chinensis*

1. 刚开始分化的精子细胞, 染色质(Ch)呈团块状, 细胞质的一端已有致密颗粒(A)聚集, $\times 4800$; 2. 早期精子细胞前顶膜成锯齿状, 核膜完整, 顶体(A)开始形成, 输精管管壁内有丰富的囊泡(V)及致密颗粒(G), $\times 10000$; 3. 顶体前颗粒(AG)进一步聚集, 前颗粒与管壁内的分泌颗粒相似, 此处管壁内有丰富的膜系统, 内膜较平滑, $\times 18000$; 4. 前顶体区的横切面, 顶体颗粒正在形成(AG), $\times 24000$; 5. 正在形成的精子, 顶体颗粒(AG)与管壁内的致密颗粒(G)相似, $\times 24000$; 6. 亚顶体及棘突已形成, 亚顶体(Sa)后端与核膜中间形成膜层体(Mb), 核后细胞质带内形成许多囊泡(P), $\times 7000$; 7. 几近成熟的精子, 棘突(S)已经形成, $\times 7000$; 8. 亚顶体(Sa)与核(N)之间的膜层体(Mb), 由双层膜折叠形成, $\times 42000$

平滑,而顶体颗粒所在的前端,细胞质膜呈锯齿状,小管内的基质从凹陷的质膜处进入精子细胞内(图 2:2)。从前端锯齿状胞膜的透射电镜切片看,精子细胞以胞饮的形式从基质中吸收处于非凝聚状态的物质进入细胞以后则逐渐凝集成电子密度较高的颗粒,最后形成一个大的顶体颗粒,而细胞质内有些物质也通过胞膜排出胞外(图 2:3、4)。在精巢壁细胞质内也有许多类似顶体颗粒的颗粒物(图 1:2;图 2:5)。

2.3 顶体形成

精子细胞在精巢内即开始顶体颗粒的积累,因此顶体在精巢内即开始形成。伴随顶体的形成,细胞质也向有顶体的一端聚集,使细胞的极性也更加明显,后部主要为细胞核,外包有极薄的细胞质带,内有许多膜泡及膜层体。前部顶体区细胞质也开始分化,顶体区中部积累起顶体颗粒,颗粒周围为电子密度较低的物质,通过细胞前端充满皱褶的胞膜,精子细胞与周围的基质进行物质交换(图 2:2、3、5)。

2.4 棘突及亚顶体形成

在中输精管内精子细胞进一步分化,顶体区向前端伸展,形成棘突,从超微结构看,棘突为顶体向前延伸形成,故它应属于顶体的一部分。顶体区后端与核接触的部位形成一个电子密度较低的亚顶体区,亚顶体区与顶体区之间有明显的界限。形成亚顶体区的物质由顶体颗粒周围胞质内的某些物质及核的分泌物共同形成(图 2:6、7)。整个亚顶体区呈凹槽状向后包着细胞核。亚顶体区与细胞核之间有不连续膜隔开,并有许多双层膜折叠形成膜层体。亚顶体区除有膜层体以外,为均质的物质(图 1:6、7、8)。

2.5 精英的形成

中国对虾的精英在输精管末端的壶腹内形成。但从输精管的结构来看,输精管内较小的腔内胶体物质的合成非常活跃,即使在壶腹内,精子团与胶体物质也是分别贮存的(图版 I:6)。壶腹壁由长柱状细胞紧密排列构成,内有丰富的膜系统(图 1:8)。精英壁合成的分泌物通过富含微绒毛的内壁分泌到精英腔内,最后形成均质的胶体状物质(图 1:7)。

3 讨论

中国对虾的输精管具有对虾类输精管的典型特征。输精管腔被一隔膜分成大小两个腔,在较大的腔内,精子进一步发育形成成熟的精子,并逐渐聚集形成精子团,较小的腔内聚集胶体物质,胶体物最终形成精英的瓣状体。

精子在精巢内产生,并在输精管内进一步发育为精子。成熟的精子被输送到壶腹内,聚集成团,外包胶体物质,形成精英。输精管的结构同精子和精英的形成密切相关。近年来许多学者对对虾输精管的结构和精子的形成进行了研究。Ro 等(1990)研究了白对虾(*Penaeus setiferus*)精子即精英的形成与输精管结构的关系。输精管在输送由精巢产生的精子到端壶腹的过程中,首先分泌一种能促使精子成熟的物质。这些物质以胞吐的形式由输精管壁向管腔内释放膜泡。膜泡内含物除促使精子的成熟以外,还能调节精子在输精管内的方向。

精子功能上的成熟还应包括精英的形成及在纳精囊内的贮存。精英的形成及精英的形态是同纳精囊的形态结构相适应的。开放式纳精囊对虾的精英结构比较复杂,精英容易移动,交配和产卵的时间间隔比较短。封闭式纳精囊种类的精英结构简单,只有一个主

体部和翼或瓣状体,其交配与产卵的时间间隔较长(Primavera, 1985)。取自雌虾精英的精子与取自雌虾纳精囊的精子在结构上也有差别(林勤武等,1991)。

不同种类的对虾精子的形成过程及形态结构的变化是不同的,并在一定程度上反应了对虾进化程度的不同(Shigekawa *et al*, 1986; Medina, 1994)。输精管的结构也与精子的形成相适应,表现出一定的差异。单肢虾输精管与其它种类有明显的不同,其输精管腔并不分成大小两个腔,精子从精巢释放出来进入近输精管并与表皮细胞的分泌物混合。近输精管由两类细胞组成,一种是具有分泌功能的细胞,向管腔内分泌电子透明囊泡及致密颗粒;另一种细胞的微绒毛状边缘,能有效地吸收分泌到管腔内的多余液体物质。在近输精管内的精子尚未完全分化,棘突未形成。到达中输精管以后,精子开始高度特化,棘突及亚顶体开始形成,精子体积变小,许多精子聚集成团,基质减少。而到远端输精管浓缩的精子团又分散开,似乎又有分泌物加入(Shigekawa *et al*, 1986)。中国对虾精子形成的研究也表明,精子在形成的过程中始终处于电子密度较低的基质中,输精管壁也有许多微绒毛,并向管腔内释放大小不等的膜泡,这与单肢虾是相似的。

关于精子的形成过程,常按其形态的变化而人为分成不同的期,在对虾类精子形成的研究中,对锐脊单肢虾(*Sicyonia ingentis*)及长额拟对虾(*Parapenaeus longirostris*)精子的形成研究得比较详细。Shigekawa 等(1986)将锐脊单肢虾精子的形成分成七期:囊泡状胞质期、粗面内质网增生期、前颗粒形成期、顶体泡形成期、絮状染色质期、膜泡形成期以及亚顶体发育期。这些描述详细表达了精子形成的过程及特征。Medina(1994)将长额拟对虾的精子形成过程简单地分为精子细胞发育的早期、中期、晚期及成熟的精子。精子细胞在精巢内产生,在输精管内进一步分化、成熟,最后在壶腹内形成完整的精英。其过程还包括核内染色质的解凝、核膜的消失、细胞质的浓缩,顶体泡的分化包括顶体、亚顶体区及棘突的形成。

本研究表明,中国对虾精子的形成与已报道的一些对虾精子的形成具有相似的过程,且在这个过程中输精管始终分泌一些膜泡或胶体物质对精子及精英的形成产生作用,最后将成熟的精子及分泌的胶体输送到壶腹内以形成精英。壶腹的电镜切片观察表明,壶腹本身的合成代谢也很活跃。有关精子在精英内的贮存及精英的结构特征对于维持精子的活性的作用,以及精子在纳精囊内较长时间的贮存过程中其活性如何维持及是否有获能的过程等问题,均有待进一步研究。

参 考 文 献

- 陈 侠,崔维喜,1986. 中国对虾雄性生殖系统的结构及发育. 动物学报,32(3):255—259
- 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. 精子的超显微结构. 海洋与湖沼,22(5):398—401
- 柯亚夫,蔡难儿,1996. 中国对虾精子超低温保存的研究. 海洋与湖沼,27(2):187—193
- 冈 正雄,1967. 卵巢の构造と排卵机构について. 长崎大学水产研究报告,23:43—56
- Bauer R T, Cash C E, 1991. Spermatophore structure and anatomy of the ejaculatory duct in *Penaeus setiferus*, *P. duorarum*. *P. aztecus* (Crustacea: Decapoda): Homologies and functional significance. *Tran Am Microsc Soc*, 110:144—162
- Bauer R T, Lin J M, 1993. Spermatophores and plug substance of the marine shrimp *Trachypenaeus similis* (Crustacea:

- Decapoda: Penaeidae): formation in the male reproductive tract and disposition in the inseminated female. Biol Bull, 185:174—185
- Champion H F B, 1987. The functional anatomy of the male reproductive system in *Penaeus indicus*. South African J Zool, 22:297—307
- Chow S, Sandifer P A, Dougherty M M *et al*, 1991. Spermatophore formation in penaeid shrimps. J Crustacean Biol, 11: 201—216
- Hudinaga M, 1942. Reproduction, development and rearing of *Penaeus japonicus* Bate. Jap J Zool, 10(1):305—389
- King J E, 1948. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). Biol Bull, 94:244—262
- Kleve H G, Yudin A L, Clark W H Jr, 1980. Fine structure of the unistellate sperm of the shrimp *Sicyonia ingentis* (Nantantia). Tissue and Cell, 121:29—45
- Malek S R A, Bawab F M, 1974a. The formation of the spermatophore in *Penaeus trisulcatus* (Forsk., 1775)(Decapoda, Penaeidae), I. The initial formation of a sperm mass. Crustaceana, 26:273—285
- Malek S R A, Bawab F M, 1974b. The formation of the spermatophore in *Penaeus trisulcatus* (Forsk., 1775)(Decapoda, Penaeidae), II. The deposition of the main layers of the body and of the wing. Crustaceana, 27:73—83
- Medina A, 1994. Spermiogenesis and sperm structure in the shrimp *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Dendrobranchiata): comparative aspects among decapods. Mar Biol, 119:449—460
- Primavera J H, 1985. A Review of Maturation and Reproduction in Closed Thelycum Penaeid. In: “The Proceedings of the 1st International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps”. Manila: South East Asian Fisheries Development Center, 47—64
- Ro S, Talbot P, Leung - Trujillo J *et al*, 1990. Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*. Segment 1—3. J Crustacean Biol, 10(3):455—468
- Shigekawa K, Clark W H Jr, 1986. Spermiogenesis in the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. Dev Growth Differ, 28(2): 95—112

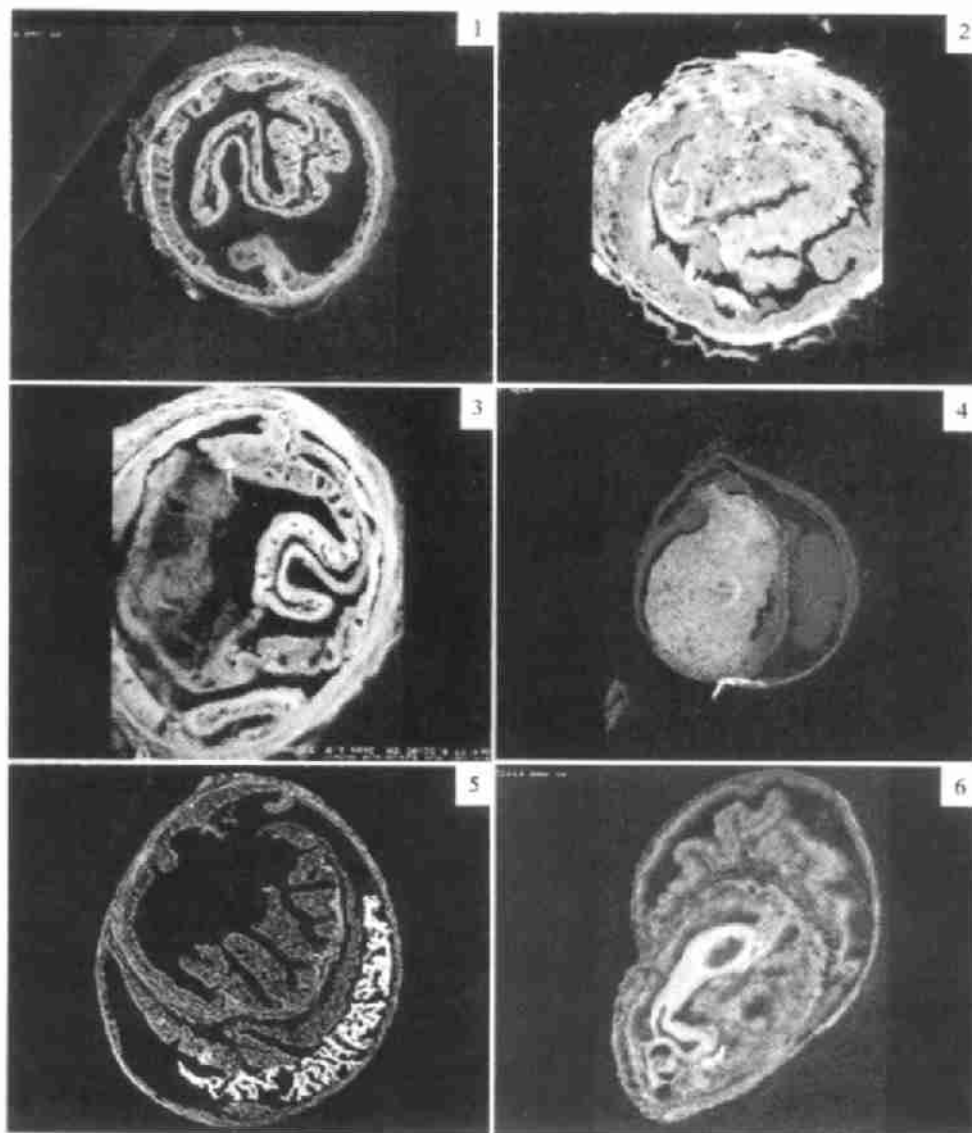
STRUCTURE OF VAS DEFERENS AND SPERMIOGENESIS IN *PENAEUS CHINENSIS*

WU Chang-Gong, ZHOU Ling-Hua, XIANG Jian-Hai, LIU Rui-Yu

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

Abstract Laser scanning confocal microscopy and electronic microscopy were used in studying the structure of vas deferens and spermiogenesis. The vas deferens can be divided morphologically into four parts including proximal, mid, distal vas deferens and ampullae. The basic structure of the wall is similar in different parts of vas deferens. However, the structure of the secretory cells in different parts varies. The lumen is divided by a septum into two lumina from mid vas deferens, with the larger lumen contains sperm mass and the smaller one containing jelly materials. Sperm cells of *Penaeus chinensis* develop in testis and mature in vas deferens. Acrosome, subacrosome and spike are formed through cell differentiation and material exchange. Chromatin is homogenous and nuclear membrane disappears to form matured sperm.

Key words *Penaeus chinensis*, Vas deferens, Spermiogenesis, Laser scanning confocal microscopy



图版 I 中国对虾输精管横切面的共聚焦扫描图象($\times 25$)

Plate I Confocal images of cross section of vas deferens in *Penaeus chinensis* ($\times 25$)

1. 近端输精管横切面图象；2. 中间膨大的输精管前部横切图象；3. 中间膨大的输精管中部横切图象；4. 远端输精管横切图象的结构。示较大的胶体腔和较小的精子腔；5. 中间膨大的输精管后部横切图象；6. 精英的横切面图象