

# 罗氏沼虾精子棘状部的结构、 生化组成和功能

王玉凤 堵南山<sup>1)</sup> 赖伟<sup>1)</sup>

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

1) (华东师范大学生物系, 上海 200062)

**摘要** 作者探讨了罗氏沼虾精子棘状部的组成、生化成分和受精时所起的作用。棘状部主要由具周期性横纹的纤丝组成, 在近尖端横切面的中央有絮状颗粒存在。棘状部 Feulgen 反应呈阴性, 不含核物质, 而 HgBpB 反应呈强阳性, 蛋白质含量很高。另还有少量粘多糖类, 部分部位还含有酸性磷酸酶。从精子入卵过程发现, 精子棘状部不是鞭毛结构, 不能活动。精子是以棘状部破膜才得以进入卵中参与受精的, 因此棘状部似乎具有顶体的功能。

**关键词** 罗氏沼虾, 精子, 棘状部, 结构, 生化组成, 顶体

近年来的研究表明, 十足类精子是无鞭毛、不能活动的<sup>[1-3]</sup>。对淡水虾类精子的研究很少, 且有很多争议。为此, 作者在研究罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)生殖生物学的过程中, 对其精子棘状部的结构、生物化学组分和功能作一特别研究, 并与已有文献进行了比较和讨论, 补充了前人在十足类精子方面的工作。

## 1 材料与方法

**1.1 形态结构和细胞化学观察** 于1995年9—12月在上海市长风市场购得成熟雄性罗氏沼虾, 活体解剖, 迅速取出生殖系统的射精管部分, 切成小块。对形态结构观察的样品用0.2mol/L pH7.2磷酸缓冲液配制的2.5%戊二醛和1%锇酸双重固定, 乙醇和丙酮脱水, Epon 812环氧树脂包埋, LKB-8800超薄切片机切片, 醋酸铀和柠檬酸铅染色, JEM-100CXII透射电镜下观察并拍照。用于细胞化学实验的样品, 用Bouin氏液、Carnoy氏液或中性福尔马林固定, 常规石蜡包埋, 切片厚6—8μm。

以Feulgen反应示DNA, 对照不经60℃1mol/L HCl处理。

以甲基绿——派若宁反应显示RNA, 对照用37℃1mol/L HCl处理3h。

过碘酸——Schiff(PAS)法示中性粘多糖或糖元, 对照以乙酰作用阻断, 再用KOH还原。

汞溴酚蓝(HgBpB)法示蛋白质。

Gomori——PbS法示酸性磷酸酶。

**1.2 功能实验** 1995年3—5月在上海市星火开发区特种水产养殖中心进行。选择交配后数小时但还未产卵的成熟雌体,将粘在胸部腹面的精巢取下,捣碎,与从卵巢中取出的成熟卵子混合,按所设计的时间间隔取样。用2.5%戊二醛和1%锇酸(二者均用0.2 mol/L, pH7.2的磷酸缓冲液配制)双重固定,酒精系列脱水,临界点干燥,真空喷镀后,在Hitachi S-450扫描电镜下观察和拍照。

## 2 结果

### 2.1 棘状部的结构

罗氏沼虾精子呈浅漏斗形,由锥形的基部和细长的棘状部组成。棘状部从锥体的凸面延伸出来,由粗渐细,长约8—12μm(图版I,1),是由具周期性横纹的纤丝构成的,横纹走向与棘长轴垂直,周期性间隔约为35nm(图版I,2)。在棘状部近尖端的横切面中央,有一些絮状颗粒存在(图版I,3)。棘状部未发现有微管等与运动有关的结构。

### 2.2 化学组成

细胞化学显示,罗氏沼虾精子棘状部Feulgen反应呈阴性,不含DNA物质;派若宁染色结果也显阴性,说明不含RNA;而蛋白质含量很高,HgBpB反应呈强阳性;PAS反应略显阳性,经乙酰阻断后为阴性,KOH还原后又恢复阳性,证明其中含少量粘多糖类;部分部位Gomori-Pbs反应呈阳性,有一定量的酸性磷酸酶存在(表1)。

表1 罗氏沼虾精子棘状部细胞化学反应结果

Tab. 1 Results of cytochemical tests on the sperm spike of *Macrobrachium rosenbergii*

所测物质 Materials	DNA	RNA	糖类 Sacchande		蛋白质 Protein	酸性磷酸酶 Acidphosphatase
反应方法 Methods	Feulgen Methylgreen- Pyronine	甲基绿-派若宁 PAS	PAS- acetylation	PAS- acetylation -KOH	HgBpB	Gomori-Pbs
结果 Results	-	-	+	-	+	+++ ++

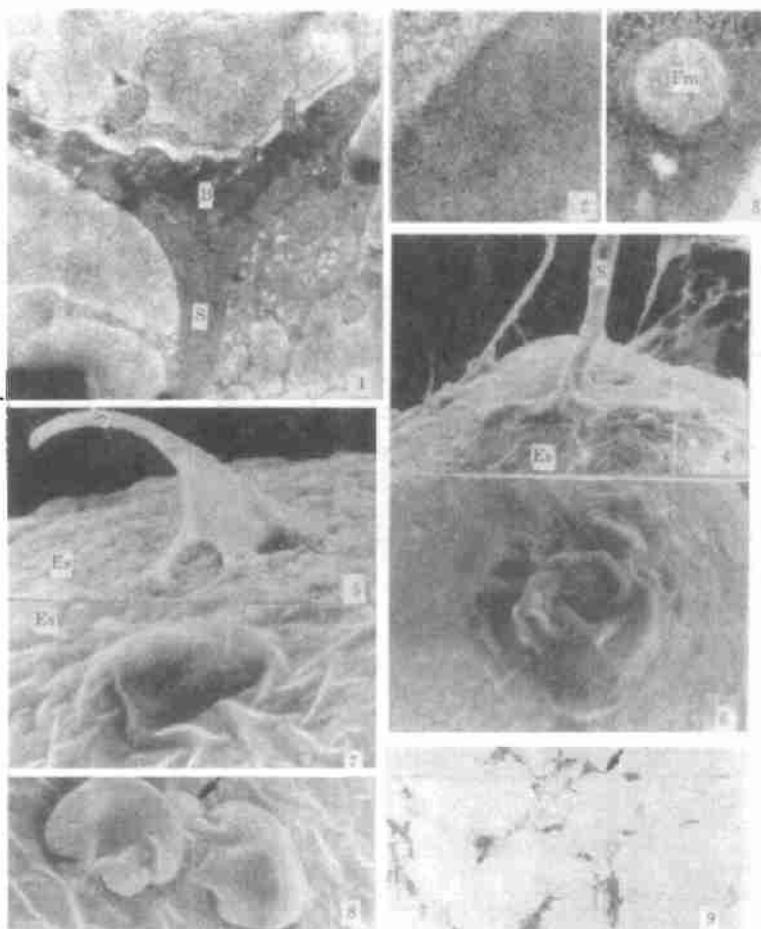
注:+++表示强阳性,++表示较强阳性,+表明弱阳性,-表示阴性。

### 2.3 棘状部在精子入卵过程中的行为

从精巢中释放出的精子在显微镜下观察是不活动的,当与卵子接触后才发生变化。在受精后15s的扫描电镜图片上可以看出,精子以基部侧边附着在卵表面,棘状部几乎以垂直于卵子表面的角度朝向卵外(图版I,4),后来一些精子发生棘状部弯曲(图版I,5),使得棘状部尖端接触卵表面并进入卵中。受精后30s,由于棘状部尖端进一步进入卵内,导致精子基部被迫脱离卵表面并被翻卷到卵表上方,然后随棘状部进入卵中。在受精后45s,仅可见精子基部顶端露在卵表面(图版I,6)。大约到受精后1.5min,精子已完全进入卵中,仅在卵表面留下一精子入卵孔(图版I,7)。

可能由于定位不正或被先行进入的精子所阻挡,有些精子尽管可以发生棘状部弯曲,但却不能进入卵内。图版I,8示两个精子可能由于没有完全分离的缘故,使得基部无法进入由自己的棘状部产生的入卵孔中。但可以看出,棘状部尖端入卵以后还是发生了变化(箭头所示)。

## 图版I



1. 成熟精子。 $\times 11000$ ; 2. 示棘状部的横纹  $\times 35000$ ; 3. 棘状部近尖端横切面, 示中央的絮状物质  $\times 55000$ ; 4. 精子以基部侧边附着在卵表面, 棘状部朝外  $\times 5000$ ; 5. 精子棘状部弯曲  $\times 7500$ ; 6. 精子基部最后入卵  $\times 3500$ ; 7. 精子已完全进入卵中, 卵表面留下一精子入卵孔  $\times 12000$ ; 8. 两个不能入卵的精子, 棘状部尖端已发生变化(箭头所示)  $\times 9800$ ; 9. Gomori-PbS 法示酸性磷酸酶阳性反应部位(箭头所示)  $\times 1500$

1. Mature sperm.  $\times 11000$ ; 2. The cross striated appearance of spike.  $\times 35000$ ; 3. Flocculent materials in the middle of the cross section near the tip of the spike.  $\times 55000$ ; 4. Sperm attaching egg with their spikes toward outwards.  $\times 5000$ ; 5. Spike bending occurs.  $\times 7500$ ; 6. The remnant of a sperm base is observed on the surface of the egg.  $\times 3500$ ; 7. The small micropore is left by a sperm having entered the egg completely.  $\times 12000$ ; 8. Changes have taken place at the tip of the spike (arrow), although the sperm cannot enter the egg.  $\times 9800$ ; 9. The location of the phosphatase positive reaction for the spike is indicated by arrow, staining by Gomori-PbS method.  $\times 1500$ .

B: 基部(Base); Es: 卵表面(Egg surface); Fm: 絮状物质(Flocculent materials); S: 棘状部(Spike)

### 3 讨论

**3.1 罗氏沼虾精子棘状部没有与运动有关的细胞器(如微管),也没见提供运动能量的线粒体,它与典型动物精子的鞭毛是完全不同的,在实验中,也发现精子不能主动运动,因此**

罗氏沼虾精子的棘并非鞭毛结构, 该精子应属于不动的无鞭毛精子 (non-motile, nonflagellate sperm)。这与 Hudinage 等认为对虾精子棘是鞭毛的观点<sup>[4—6]</sup>不同, 而与洪水根、林勤武及 Koehler 等在长毛对虾 (*Penaeus penicillatus*)、中国对虾 (*P. Chinese*) 及长臂虾 (*Palaemonetes paludosus*) 中的研究结果<sup>[7]</sup>相似。

**3.2** 罗氏沼虾精子棘状部富含蛋白质, 而不含核物质, Feulgen 反应为阴性, 这一点和同属于十足目的爬行亚目不同, 爬行亚目精子的棘(在那儿常被称为臂)是核外侧的细长凸起部分, 与核之间没有隔膜, 完全相通, 实际上就是精子核的延伸物, Feulgen 反应呈阳性, 也证明了这一点<sup>[8]</sup>。

**3.3** Koehler 曾观察到在 *Palaemonetes paludosus* 精子核中有许多膜泡状结构, 当精子受到外界刺激时, 这些泡就破裂, 释放出内含物, 因此他认为它们具有顶体的功能<sup>[7]</sup>。而在本实验中发现, 精子最初是以基部侧边附着在卵表面的, 但后来棘状部弯曲直至尖端接触卵表面并进入卵中, 使得基部又被翻卷到卵表上方, 最后随棘状部进入卵中。这个过程表明, 至少从某种程度上来说, 罗氏沼虾精子棘状部具有顶体的功能, 与对虾类 Penaeidea 相似。尽管扫描电镜下没有观察到明显的顶体反应, 但从图版 I, 8 可以看出, 棘状部尖端在进入卵中以后还是发生了变化(箭头所示), 这种变化与锐脊单肢虾 (*Sicyonia ingentis*) 精子顶体反应开始时棘尖端翻卷的形态<sup>[9]</sup>有些相似, 很可能顶体反应是在棘状部尖端入卵的时刻从尖端开始发生的。Gomori-PbS 法实验表明, 罗氏沼虾精子棘状部呈酸性磷酸酶阳性反应(图版 I, 9)。此外, 在棘状部近尖端(直径 0.4μm)的横切面中央, 有一些絮状颗粒(图版 I, 2), 可能代表着磷酸酶所在的部位。从细胞生物学的观点看, 精子顶体是一种特殊的溶酶体, 含特定的酸性水解酶, 在受精时, 可溶解卵膜, 使精子入卵, 所以, 以上证据也支持罗氏沼虾精子棘状部具有顶体的功能的推测。

**3.4** 前人曾将十足目的精子分为爬行亚目的“多棘型”和游泳亚目的“单棘型”<sup>[10, 11]</sup>。作者认为, 二者中所谓的“棘”在结构、生化成分和功能上都是完全不同的。结构和生化组成的区别如前所述。在功能上, 精卵结合时, 爬行亚目的“棘”用以首先接触卵子表面, 随后通过自身的收缩将精子拉向卵子, 当精子前端已接触卵表面时, 这些“棘”就收缩回去了<sup>[12, 13]</sup>。而罗氏沼虾的“棘”, 其功能不在于附着, 而在于破膜使精子入卵, 可能具有顶体的功能。Clark 等人通过实验已经表明, 一些海水虾类精子的棘状部是顶体复合物的一部分<sup>[14]</sup>。实际上, 很多文献表明, 即使在所谓“单棘型”精子之间, 精子棘状部在形态、结构及功能上都有很大差异, 例如 *Penaeus setiferus* 精子的“棘”在中部区域有一奇特的螺环出现<sup>[15]</sup>, 而 *Procaris ascensionis* 精子的“棘”是没有横纹的<sup>[15]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] 培南山等. 中华绒螯蟹精子的研究: 精子的形态及超微结构. 海洋与湖沼, 1987, 18(2): 119—125
- [2] 洪水根等. 长毛对虾精子发生的研究: 精子的形态结构. 动物学报, 1993, 39: 239—242
- [3] 林勤武等. 中国对虾精子的形态结构、生理功能的研究: I. 精子的超微结构. 海洋与湖沼, 1991, 22(5): 397—401
- [4] King J E. A study of the reproduction organ of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). *Biol. Bull.*, 1937, 94: 244—262
- [5] Hudinaga M. Reproduction, development and rearing of *Penaeus japonicus*. *Bate. J. Zool.*, 1942, 10(1): 305—389

- [6] 岡正雄.コウテイエビ *Penaeus orientalis* Kishinoye の研究. 長崎大学水産学部研究報告, 1967, 29: 71—88
- [7] Koehler L D. A unique case of cytodifferentiation: Spermiogenesis of the prawn, *Palaemonetes paludosus*, *J. Ultrastruct. Res.*, 1979, 69:109—120
- [8] Brown G G. Ultrastructural studies of sperm morphology and sperm egg interaction in Decapod Callinectes sapidus. *J. Ultrastruct. Res.*, 1966, 14:425—440
- [9] Clark W H Jr., et al An acrosome reaction in natantian shrimp. *J. Exp. Zool.*, 1981, 218:279—291
- [10] Burkenroad M D. The higher taxonomy and evolution of Decapoda (Crustacea). *Transaction of the San Diego Society of Natural History*, 1981, 19:251—268
- [11] Talbot P et al. The structure of sperm from Panulirus, the spiny lobster with special regard to the acrosome. *J. Ultrastruct. Res.*, 1978, 64:341—351
- [12] Antonio Medina. Structural modifications of sperm from fiddler crab *Uca Tangeri* (Decapoda) during early stages of fertilization. *J. Crustacean Biol.*, 1992, 12(4):610—614
- [13] 堵南山等. 中华绒螯蟹受精的细胞学研究. 中国科学(B辑), 1992, (3): 260—265
- [14] Clark W H Jr., et al. In vitro fertilization with the non-motile spermatozoa of the brown shrimp *provaris aztecus*. *Mar. Biol.*, 1973, 22:353—354
- [15] Felgenhauer B E., et al. Reproductive morphology of the anchialine shrimp *procaris ascensionis* (Decapoda: Procarididae)., *J. Crustacean Biol.*, 1988, 8(3):333—339

## STRUCTURE, BIOCHEMICAL, COMPOSITION AND FUNCTION OF SPERM SPIKE IN *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* (CRUSTACEA, DECAPODA)

Wang Yufeng    Du Nanshan<sup>1)</sup>    and    Lai Wei<sup>1)</sup>

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)<sup>1)</sup>

1) (Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062)<sup>1)</sup>

**Abstract** There are many contradictory reports about the sperm spike of shrimps. The structure, biochemical composition and function of sperm spike in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* were studied in this paper by using cytochemical techniques and electron microscopy. The sperm spike of the shrimp has a cross striated appearance. The flocculent materials in the middle of the cross section near the tip of the spike may represent the phosphatase. The spike is composed primarily of protein as indicated by positive mercury bromphenol blue staining. The negative feulgen reaction means no DNA present here, which is significantly different from that of reptantian. Part of the spike contains acid phosphatase. Unlike the flagellate in the typical sperm, this spike is non-motile. The incorporation of the sperm into egg is through the spike penetrating into firstly and the base following in finally, which suggests that the spike could play a role of acrosome.

**Key words** *Macrobrachium rosenbergii*, Sperm, Spike, Structure, Biochemical composition, Acrosome