

凡纳滨对虾精子发生的超微结构研究

许尤厚, 刘学东, 张吕平, 胡超群

(中国科学院南海海洋研究所中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广东省应用海洋生物学重点实验室, 广东 广州 510301)

摘要: 对凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 精子发生的过程进行了透射电镜的观察。结果表明, 成熟凡纳滨对虾精巢为指状, 分16叶。凡纳滨对虾精子发生分为精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞和精子5个时期。染色质经历了从以异染色质为主变为高度凝聚状态, 再经解聚为弥散絮状的变化过程。核膜由完整转变为不完整。凡纳滨对虾精子发生过程中仅见线粒体、内质网、核糖体细胞器的参与, 未见有典型的高尔基体结构的出现。顶体由内质网囊泡团和线粒体囊泡共同转变而来。精子的棘突以及亚顶体区需在输精管的中后端形成, 而非在精巢中形成。纳精囊内精子比储精囊内精子的棘突细长。

关键词: 凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei*; 精子发生; 顶体; 超微结构

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2010)04-0089-05

Studies on the ultrastructure of spermatogenesis in shrimp, *Litopenaeus vannamei*

XU You-hou, LIU Xue-dong, ZHANG Lü-ping, HU Chao-qun

(CAS Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, Guangdong Key Laboratory of Applied Marine Biology, South China Sea Institute of Oceanology, CAS, Guangzhou 510301, China)

Abstract: Spermatogenesis in shrimp *Litopenaeus vannamei* was investigated using light and transmission electron microscopy. Results showed that the matured testis of *L. vannamei* was fingers-like, which was comprised of 16 leaves. Spermatogenesis in *L. vannamei* could be divided into five stages: spermatogonium, primary spermatocyte, secondary spermatocyte, spermatid and sperm. During spermatogenesis, chromatins underwent dramatic changes. At the stage of spermatogonium, the heterochromatins were spread in the nucleus and some of them were distributed under the nuclear membrane. At the stage of spermatocyte, chromatins became highly coacervative. At the stage of spermatid and sperm, the chromatins lost condensation and looked like flocculus. Mitochondria, endoplasmic reticulum and ribosome were observed during spermatogenesis. No typical golgi apparatus were observed. The acrosome was derived from endoplasmic reticulum vesicles and mitochondria vesicles. The sperm spike and sub-acrosome were formed in the vas deferens, not in the testis. The sperm spike from the seminal receptacle was longer than that from the terminal ampullae.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; spermatogenesis; acrosome; ultrastructure

动物的精子分为有鞭毛精子 and 无鞭毛精子, 无鞭毛精子又包括多棘型和单棘型两种。研究表明对虾的精子属于单棘型的无鞭毛精子。对虾精子的超微结构的研究仅见于斑节对虾 *Penaeus monodon*^[1]、长毛明对虾 *Fenneropenaeus penicillatus*^[2-4]、中国明对虾 *F. chinensis*^[5-9]、西方滨对虾 *Litopenaeus*

occidentalis^[10]、凡纳滨对虾 *L. vannamei*^[11-12]以及锐脊单肢虾 *Sicyonia ingentis*^[13]。对虾精子发生的研究则更少, 主要有中国明对虾^[9]、斑节对虾^[1]以及锐脊单肢虾^[13], 均属于封闭式纳精囊对虾类, 而开放式纳精囊对虾类的精子发生则未见报道。研究表明不同类型纳精囊对虾的亚顶体区的形成来源不一

收稿日期: 2009-07-25; 修订日期: 2009-09-18。蔡卓平编辑

基金项目: 国家“863”计划子课题(2006AA10A406、2010AA10A401); 广东省海洋渔业科技推广专项(A200899A02、A200901B03); 中国科学院广东省科学院院合作项目(2009B091300088)

作者简介: 许尤厚(1980—), 男, 湖南省邵阳市人, 在读博士, 主要从事对虾发育和病害研究。E-mail: xuyouhou@gmail.com

通信作者: 胡超群。电话: 020-89023218, E-mail: cqhu@scsio.ac.cn

样,而亚顶体区的形态结构被认为是判别对虾精子获能与否的依据之一^[12]。因此精子发生过程的超微结构的变化的研究显得愈来愈重要。凡纳滨对虾属于节肢动物门(Arthropoda),甲壳纲(Crustacea),十足目(Decapoda),游泳亚目(Natantia),对虾科(Penaeidae),滨对虾属(*Litopenaeus*)^[14],为开放式纳精囊对虾类,为世界规模化养殖对虾品种之一,目前为我国产量最高的对虾。本文利用透射电镜详细观察了凡纳滨对虾精子发生的超微结构,一方面可以丰富凡纳滨对虾以及游泳亚目生殖生物学理论内容,另一方面为对虾受精生物学以及品种改良提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

对虾均于2007年1至5月取自广东省湛江东海岛湛江海茂水产有限公司,挑选发育成熟且健康无疾病的雄性亲虾,从体内解剖出完整的雄性生殖系统。自然排出并已经植入雌虾纳精囊内3—4h后的精英于产卵前取出进行固定。

1.2 方法

用于透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)观察的样品置于固定液中固定30min,然后用双面刀片把雄性生殖系统的各个部分分成大小为1mm³的方块。电镜样品取样所用的固定液参照^[15],组成成分为在0.1M的二甲酸钠盐溶液里加入2.0%的多聚甲醛、2.5%的戊二醛和5.0%的葡萄糖,然后经过抽虑置于4℃冰箱避光保存。样品直接送中山大学中山医学院电镜实验室,由工作人员进行样品处理、包埋、切片,最后自己进行电镜观察,拍照。用于体视镜观察的样品直接用Bouin's液固定,固定液按饱和苦味酸水溶液:甲醛:冰醋酸=15:5:1的比例配制,待固定1天以后换成70%的酒精保存,于体视镜下观察,拍照。

2 结果

凡纳滨对虾的精巢为指状,分16叶,输精管的结构与Chow等^[16]的结果一致,明显不同于刀额新对虾*Metapenaeus ensis*的输精管,后者的近端输精管盘绕成一团^[17](图1a)。精子的发生过程分为精原

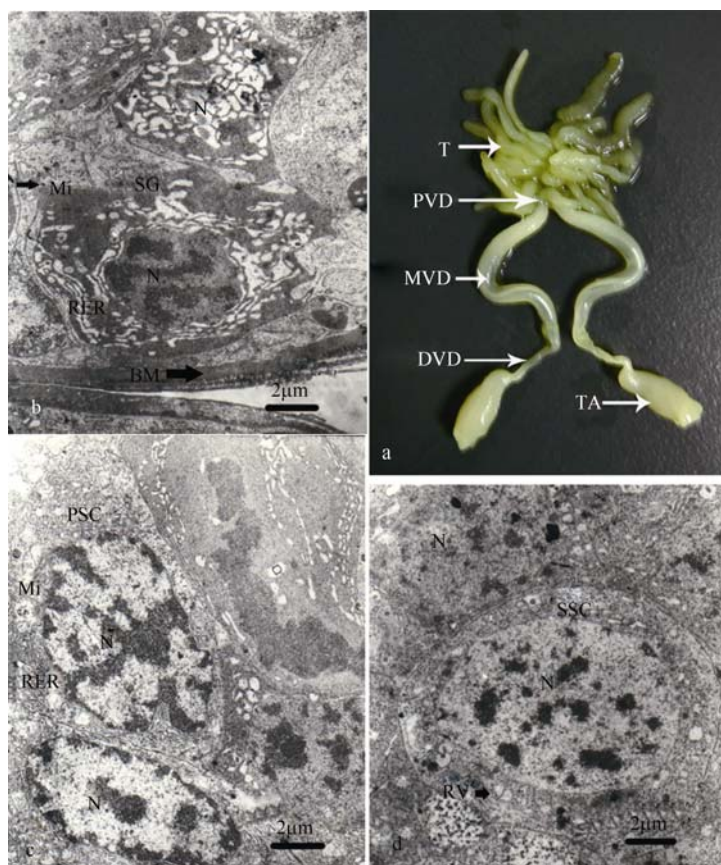


图1 雄性生殖系统以及精巢管的透射电镜切片

a. 雄性生殖系统整体图(1.8×); b. 精原细胞; c. 初级精母细胞; d. 次级精母细胞。BM: 基膜; DVD: 远端输精管; Mi: 线粒体; MVD: 中端输精管; N: 细胞核; PSC: 初级精母细胞; PVD: 近端输精管; RER: 粗面内质网; RV: 内质网囊泡; SG: 精原细胞; SSC: 次级精母细胞; T: 精巢; TA: 壶腹

Fig. 1 Male reproductive system and the TEM section of testis tube

细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞和精子 5 个时期。

2.1 精原细胞

精原细胞大都紧贴精巢管。细胞和细胞核均为多角形。细胞大小为 $11.5\mu\text{m}$, 胞质的大部分区域电子密度较高, 可见内质网囊泡分布其中; 少部分区域电子密度较低, 可见少数几个线粒体分布其中; 胞膜结构清晰。核大小为 $5.8\mu\text{m}$, 细胞核仅占精原细胞的小部分, 核质与胞质有明显界限, 核膜清晰可见, 胞质中的内质网小泡大都和核膜相连。核质电子密度高, 核内染色质较均匀, 部分染色质凝聚成异染色质团, 分散于核内(图 1b)。

2.2 初级精母细胞

初级精母细胞以卵圆形为主, 偶尔可见多角形。细胞大小无明显变化, 为 $13.6\mu\text{m}$ 。胞质电子密度明显降低, 整个胞质都被内质网囊泡所布满, 线粒体数量明显增加且体积增大, 胞质中游离核糖体丰富, 分布均匀。核为卵圆形或多角形, 细胞核大小为 $9.1\mu\text{m}$, 体积明显比精原细胞大, 占据了整个初级精母细胞的绝大部分, 双层核膜结构清晰, 很多膜复合体与之相连, 核异染色质基本都凝聚成团, 彼此相连, 绝大部分靠近核内膜(图 1c)。

2.3 次级精母细胞

次级精母细胞的细胞大小为 $12.8\mu\text{m}$, 核大小为 $9.3\mu\text{m}$ 。其胞质和核均发生了明显的变化。胞质中的内质网逐渐减少并转变为内质网囊泡, 线粒体消失。核异染色质凝聚程度更高, 且脱离核膜区域向核中间靠拢, 双层核膜结构清晰(图 1d)。

2.4 精子细胞

早期精子细胞的胞质中出现和核膜平行的环核内质网, 内质网囊泡的数量减少, 在核一端的胞质中出现一堆比较大的内质网囊泡, 称为顶体囊泡团。核异染色质开始解聚合并重新分散到细胞核, 双层核膜结构仍清晰(图 2a)。到中期核异染色质完全解聚合成絮状染色质, 双层核膜消失, 顶体开始出现, 顶体和细胞核之间由一条明显的电子密度较高的带状区域分开, 细胞质仅剩一点点包围着细胞核并处于顶体的另一端(图 2b)。后期精子细胞的顶体区域越来越大, 开始形成棘突的原基, 同时亚顶体区域的电子密度开始低于顶体区域, 并逐渐从顶体区域中分离出来(图 2c)。

2.5 精子

精子由精子细胞完成一定的形态结构后形成, 主要的形态变化为棘突和亚顶体区的形成。棘突位

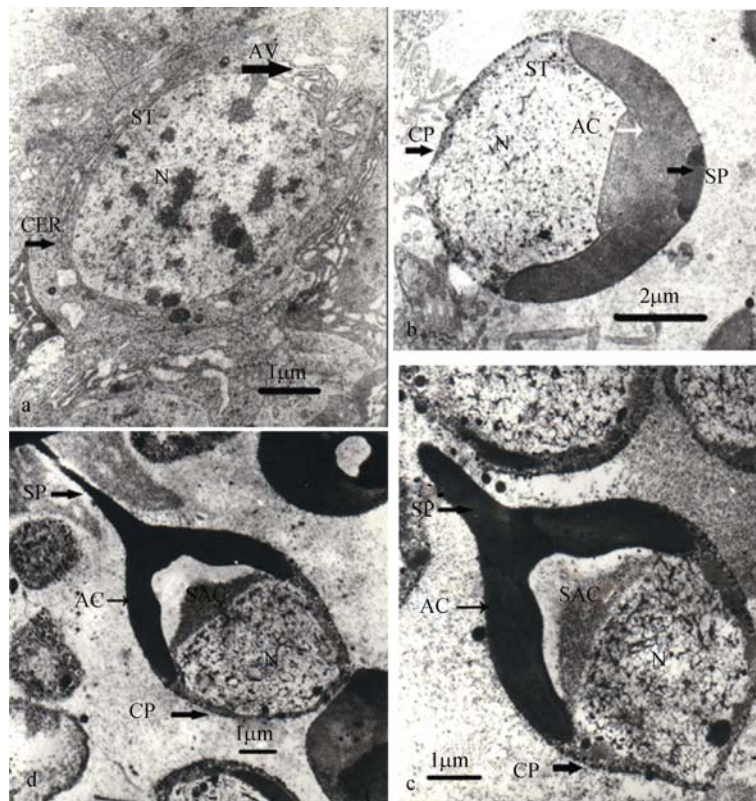


图 2 精巢管(a, b)、输精管(c)及精英(d)透射电镜切片

a. 精子细胞早期切片; b. 精子细胞中期切片; c. 精子细胞后期切片; d. 精子切片。AC: 顶体; AV: 顶体囊泡团; CER: 环核内质网; CP: 环核细胞质带; N: 细胞核; SAC: 亚顶体囊区; SP: 棘突; ST: 精子细胞

Fig. 2 TEM section of testis tube (a,b), vas deferens(c) and spermatophore(d)

于顶体的前端,电子密度和顶体的非常相似,都非常高,明显高于细胞核、细胞质带和亚顶体区,成熟精子的棘突为 $4.8\mu\text{m}$ 。亚顶体区位于顶体和细胞核之间,相互之间存在着明显的界限。亚顶体区由 2 部分构成,一部分为电子密度极低的区域,靠近顶体区域,称为亚顶体腔;另一部分为电子密度较高的区域,被称为亚顶体区颗粒。成熟精子的主体部为圆球状,长径 $5.2\mu\text{m}$,短径 $4.2\mu\text{m}$ (图 2d)。

3 讨论

3.1 精子发生过程中细胞器的变化

已有研究认为高尔基体、高尔基体和线粒体等细胞器联合形成的片层复合体、膜复合物及其囊泡、核物质和内质网小泡中的一种或者几种参与了十足目甲壳动物精子的发生^[18]。十足目甲壳动物精子发生过程中,已有研究发现内质网主要存在 4 种形式:环形片层、泡状内质网、大型丝状网和致密片层。在凡纳滨对虾精子发生的过程中,目前仅发现有线粒体、核糖体和内质网参与精子发生,未能发现有典型的高尔基体的存在。从精原细胞到精子细胞,内质网的活动非常频繁,活动的高峰期为初级精母细胞,内质网几乎布满了整个胞质(图 1c),且线粒体的数量也在这一时期达到最大,这一现象说明初级精母细胞对蛋白质和能量的需求是最大的。研究认为次级精母细胞期经历了减数分裂的变化,初级精母细胞的大量能量和蛋白的聚集可能正是为次级精母细胞做准备。线粒体在精原细胞期就已经出现,当进入精子细胞期时则找不到典型的线粒体结构,仅见许多大囊泡状结构,推测为线粒体解体后的残留结构,对虾精子发生过程中线粒体解体后的去向问题有待于进一步的研究。凡纳滨对虾精子发生的精子细胞期开始出现环核内质网,此时处于内质网囊泡团形成期、细胞核的解聚合期及核膜的消融期,环核内质网的出现与上述 3 个结构的变化之间的关系有待于更进一步的生理生化的研究。

3.2 精子顶体和棘突的形成

有关对虾精子发生过程中顶体形成的来源问题一直存在争议。较早的研究大都集中于十足目的爬行亚目(Reptantia),对于游泳亚目则很少涉及,报道一般认为十足目动物精子顶体的形成缺乏高尔基体的参与,是由内质网和线粒体共同参与形成。洪水根等^[1]和康现江等^[5]分别研究了斑节对虾、中国明对虾的精子发生过程,发现均有高尔基体的出现,并且高尔基体参与了精子顶体的形成。随后对长毛

明对虾^[4]精子发生的研究未能发现高尔基体参与顶体的形成。中国明对虾和长毛明对虾同属于明对虾属,其顶体的来源都各不一样,由此可见对虾精子顶体来源的复杂性和多样性。凡纳滨对虾的精子发生过程中同样未见有典型的高尔基体结构,到开始出现顶体囊泡团的精子细胞期,原本非常丰富的粗面内质网和线粒体都消失不见,粗面内质网成为内质网囊泡和环核内质网,而线粒体则失去其典型结构,仅在胞质中可见一些解体后的线粒体空腔,推测顶体应该为内质网囊泡和线粒体解体后的残余结构共同构成。顶体来源的不同是否与精子后期获能具相关性到目前还不知道。凡纳滨对虾精子棘突在输精管中开始形成,最终于壶腹中完成,在精巢中仅见有棘突原基的出现。Alfaro 等^[12]以亚顶体区颗粒的形态作为判断精子在纳精囊内是否存在获能的标准,其研究结果表明凡纳滨对虾储精囊内精子的亚顶体区颗粒形态与纳精囊内的存在明显变化,从而说明凡纳滨对虾精子在纳精囊内存在一个获能过程。目前有关对虾精子获能的判断标准的研究几乎是一片空白。研究表明精子的棘突在受精过程中具有非常重要的功能,它帮助精子穿透卵子从而保证受精过程的顺利进行^[19]。图 2c 和 2d 的图片分别来自于储精囊内和自然排出并已经植入雌虾纳精囊内 3—4h 后的精英,其棘突的形态存在明显变化,前者的棘突明显短于后者。这一研究结果与 Clark 等^[20]、林勤武等^[21]和 Alfaro 等^[22]对封闭式纳精囊对虾精子棘突的研究结果相似。对虾精子在植入纳精囊后棘突的形态变化与亚顶体区的形态变化是一致的^[12],表明棘突的变化可以作为对虾精子是否成熟的标志之一。

3.3 精子细胞核的形态变化

凡纳滨对虾精子发生的过程中其核发生了明显变化,在精原细胞期观察发现胞质中电子密度较高的物质,且占据细胞质的大部分,细胞核电子密度高是由于存在核酸蛋白,推测早期胞质中的蛋白含量较高。核的变化主要包括两个方面:核染色质的变化和核膜的变化。核染色质经历了聚合和解聚合的过程。从精原细胞到初级精母细胞,染色质主要以异染色质的形态呈团块状分布于核内膜附近及核质中。进入到次级精母细胞,染色质渐渐浓缩,并逐渐脱离核内膜附近,全部向核中心靠拢,到精子细胞期染色质达到最大浓缩程度,随后到精子细胞后期染色质开始解凝聚,并在精子期完全变为弥散状态均匀分布于细胞核中。研究推测精子发生过

程中的形态变化可能与对虾精子属于无鞭毛类型精子有关, 有利于受精过程的进行。核膜的变化主要是在进入精子细胞期核膜的双层膜结构消失, 透射电镜下几乎看不到膜性结构。整个凡纳滨对虾精子发

生过程中未发现核仁, 这一结果和中国明对虾和斑节对虾的不一样。对于对虾精子发生过程中核膜的消失, 目前推测有利于在受精过程中核内物质进入卵子, 而对于其最终的去向到目前为止还未见报道。

参考文献

- [1] 洪水根, 李祺福, 郭永刚, 等. 斑节对虾精子发生的超微结构[J]. 动物学报, 1998, 44(1): 1-4.
- [2] 洪水根, 陈细法, 周时强, 等. 长毛对虾精子发生的研究 I: 精子的形态结构[J]. 动物学报, 1993, 39(3): 239-243.
- [3] 王艺磊, 张子平, 李少菁. 长毛对虾精子形成的超微结构[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(6): 582-587.
- [4] 洪水根, 夏传武, 吴文杰, 等. 长毛对虾精子的发生过程[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(4): 368-373.
- [5] 康现江, 王所安, 堵南山, 等. 中国对虾精子发生及受精细胞学[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 1998, 18(4): 399-401.
- [6] 康现江, 王所安, 堵南山, 等. 中国对虾精子发生过程内质网的变化[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2000, 39(6): 849-854.
- [7] 康现江, 王所安. 中国对虾精子发生后形态结构及其变化[J]. 东海海洋, 2000, 18(3): 40-46.
- [8] 康现江, 王所安, 堵南山, 等. 中国对虾受精过程中精卵核的细胞学变化[J]. 动物学报, 2001, 47(2): 182-189.
- [9] 吴长功, 周岭华, 相建海, 等. 中国对虾输精管结构及精子形成[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(1): 23-30.
- [10] KING J E. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus) [J]. Biol Bull, 1948, 94: 244-262.
- [11] DOUGHERTY W J, DOUGHERTY M M. Electron microscopical and histochemical observations on melanized sperm and spermatophores of Pond-cultured shrimp *Penaeus vannamei* [J]. J Invert Path, 1989, 54: 331-343.
- [12] ALFARO J, ULATE K, VARGAS M. Sperm maturation and capacitation in the open thelycum shrimp *Litopenaeus* (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea) [J]. Aquaculture, 2007, 270: 436-442.
- [13] SHIGEKAWA K, CLARK J R W H. Spermiogenesis in the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. [J] Develop Growth and Differ, 1986, 28(2): 95-112.
- [14] 刘瑞玉. 关于对虾类(属)学名的改变和统一问题[C]. 甲壳动物学论文集: 第四辑. 北京: 科学出版社, 2003: 106-124.
- [15] RO S, TALBOT P, LEUNG-TRUJILLO J, et al. Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*: segments 1-3[J]. J Crustac Biol, 1990, 10: 455-468.
- [16] CHOW S, DOUGHERTY M M, DOUGHERTY W J, et al. Spermatophore formation in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*[J]. J Crustac Biol, 1991, 11(2): 201-216.
- [17] 张子平, 王艺磊. 三种对虾雄性生殖系统解剖学、组织学与组织化学的研究[J]. 厦门水产学院学报, 1996, 18(2): 29-38.
- [18] 康现江, 王所安. 十足目甲壳动物精子发生过程顶体形成和细胞核变化[J]. 动物学杂志, 2000, 35(4): 35-39.
- [19] KANG X J, GE S Q, GUO M S, et al. A transmission electron microscopy investigation: the membrane complex in spermatogenesis of *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Cytotechnology, 2008, 56: 113-121.
- [20] CLARK JR W H, TALBOT P, NEAL R A, et al. In vitro fertilization with non-motile spermatozoa of the brown shrimp *Penaeus aztecus*[J]. Mar Biol, 1973, 22: 353-354.
- [21] 林勤武, 刘瑞玉, 相建海. 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[J]. 海洋与湖沼, 1991, 22(5): 397-401.
- [22] ALFARO J, MUÑOZ N, VARGAS M, et al. Induction of sperm activation in open and closed thelycum penaeoid shrimps[J]. Aquaculture, 2003, 216: 371-381.