

文章编号: 1000-0615(2000)05-0403-05

# 锯缘青蟹精子入卵过程的扫描电镜观察

康现江, 李少菁, 王桂忠

(厦门大学海洋学系, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 利用扫描电镜详细观察了锯缘青蟹精子入卵的过程。精子以其核突起附着在卵膜上, 并迅速发生顶体反应。顶体反应时, 顶体囊外翻, 顶体管前伸, 精子核辐射臂收缩, 并拖至顶体囊的后部。顶体管迅速穿过卵黄膜, 携带核物质一同进入卵子。锯缘青蟹为多精着卵, 数精入卵。本文同时探讨了精子顶体反应机制以及受精过程卵子的作用。

**关键词:** 锯缘青蟹; 受精; 扫描电镜

中国分类号: S917 文献标识码: A

## Observation on the process of sperm penetration into egg of *Scylla serrata* with a scanning electron microscope

KANG Xian-jiang, LI Shao-jing, WANG Gui-zhong

(Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** The process of sperm penetration into egg of *Scylla serrata* was examined with a scanning electron microscope (SEM) in this paper. The sperm contacts with vitelline membrane by its radial arms of the nucleus, and undergoes acrosome reaction immediately. During the process of acrosome reaction, the reversion of acrosomal vesicle, the forward-extending of the acrosomal tubule and the contraction of the radial arms were observed. The nuclear cup separates itself from the acrosome and is pull at the back of the acrosomal vesicle reversed. While the acrosome tubule passes through the egg membranes, the nucleus was carried into the egg. Because *S. serrata* has no micropyle, in the process of fertilization, a great number of sperms attach themselves to the egg and then several of them penetrate into the egg. The mechanism of the acrosome reaction and the action of the egg during the fertilization were discussed in this paper.

**Key words:** *Scylla serrata*; insemination; scanning electron microscope

锯缘青蟹(*Scylla serrata*), 俗称青蟹, 是一种经济价值很高的重要养殖蟹类。国内外学者在它的人工养殖、实验生态(主要是幼体)、生物学和生理生化等方面做了不少研究工作。国内学者对其精子超微结构<sup>[1]</sup>、精子发生<sup>[2]</sup>、卵子发生<sup>[3]</sup>、卵黄的发生<sup>[4]</sup>等进行过研究。在锯缘青蟹受精方面未见正式报道, 只有王艺磊等用离子载体对其精子进行了顶体反应诱导研究<sup>[2]</sup>。本文是在研究锯缘青蟹受精生物学过程中, 利用扫描电镜对精子入卵过程进行了较为详细的观察, 旨在丰富其受精生物学理论内容和对其人工育苗提供基础依据。

收稿日期: 2000-01-17

资助项目: 福建省重中之重“海洋生物优良种质和生物活性物质的应用基础研究”项目资助

作者简介: 康现江(1964-), 男, 河北省鸡泽县人, 博士, 副教授, 主要从事甲壳动物生殖、发育及其调控研究。E-mail: Zoopecol@

# 1 材料与amp;方法

## 1.1 诱导产卵

1999年8月中旬—10月中旬从厦港农贸市场购买体长8.0~9.0 cm, 体宽10.0~11.0 cm, 体重约300~350 g的青蟹膏蟹。暂养于水族箱(70 cm×50 cm×40 cm)中, 水深35 cm, 水温24.5~27.5℃, 盐度25.5~26, 充气泵用节电开关控制充气, 喂新鲜菲律宾蛤子(*Ruditapes philippinensis*), 定期换水。水族箱底部铺有1~2 cm细砂。将膏蟹一侧眼柄剪去进行诱导其产卵。

## 1.2 人工授精

青蟹产卵时, 迅速从卵巢获得游离成熟卵; 取出纳精囊, 放入过滤的海水中, 用剪刀将其剪碎, 并用滴管轻轻挤压、吹匀, 制成精子悬液; 卵子取出后迅速放入精子悬液中, 并用滴管将卵子轻轻吹动混匀, 进行人工授精。

## 1.3 电镜样品制作

隔一定时间取受精卵进行2.5%戊二醛和1%锇酸双重固定, 酒精系列脱水, 入丙酮、醋酸异戊酯, HCP-II 临界点干燥仪干燥, 镀金后, 于S-520扫描电镜观察拍照。

# 2 结果

## 2.1 锯缘青蟹的成熟精子和卵子

锯缘青蟹成熟卵子刚排出时形状不规则, 入海水后逐渐变为球形或椭球形。表面有一些小褶皱, 无受精孔, 但有小微孔(图版-1)。球形的精子无鞭毛, 由顶体和精子核构成, 精子核大部分包裹在顶体外面, 在其基部具有多个核辐射臂(图版-2), 精子随机地附着在卵上。精子着卵后, 很快发生顶体反应入卵, 同时卵子表面在精子入卵处也发生相应的变化。

## 2.2 精子着卵与入卵

锯缘青蟹为多精着卵(图版-3)、数精入卵(图版-4)。精子着卵是随机的, 着卵的方式多种多样, 只有以头帽正对卵子的(与卵黄膜垂直的)精子, 以最短的距离进入卵内。为了叙述方便, 将精子变化分为以下几个阶段描述:

(1)精子附着: 锯缘青蟹产卵的同时, 也将储存于纳精囊中的精子排出, 精子为体内或体外着卵, 体外受精, 精子随机地附着在卵上, 精子主要借助核辐射臂, 以及卵膜的作用即卵膜的粘性较为牢固地结合在卵膜上。

(2)顶体囊外翻: 精子附在卵上, 首先头帽向前突出, 破裂, 顶体囊前伸(图版-5), 在此过程中, 核辐射臂收缩, 又因精子的特殊结构即头帽、片层结构和片层结构基部有加厚带等, 顶体囊便快速外翻, 外翻的顺序为内层、外层和片层结构。外翻的顶体囊自内向外依次为片层结构、外层和内层。核杯和其辐射臂收缩, 并从顶体脱离, 拖至外翻的顶体囊后面, 头帽在收缩的核杯和翻出囊之间形成一个环形的领状结构(图版-6)。

(3)顶体管前伸: 顶体囊外翻的同时, 顶体管向前快速伸出。由于片层结构下端附着在中央管基部的加厚环上, 顶体管的前伸进一步带动片层结构下端的外翻, 此时的精子结构为中央管伸向前端, 接着是中央管与片层结构之间的加厚环, 下面是外翻的顶体囊, 头帽形成一“领状结构”位于顶体囊下面, 所以片层结构两端仍分别固着在头帽和加厚环上, 核物质拖在最后面(图版-6)。

(4)精子入卵: 顶体囊外翻后方, 顶体囊膜和质膜溶解, 外层也溶解脱落, 仅有少许附在片层结构

的外面,此时头帽形成的环形领状结构更加明显(图版一7)。顶体管前伸具有较强的冲击力,由于卵膜溶解和顶体管的冲击力,精子在入卵处打出一孔即入卵孔(图版一8)。精子的顶体管连带核物质先后入卵(图版一9~12)。核杯收缩、脱落,核物质在入卵时皱缩成一团,核杯的口端向外翻,并向后面包裹,所以核杯口入卵比较晚,并在入卵孔处形成环状(图版一4)。精子入卵后,片层结构开始收缩,并从前端开始溶解脱落,最后只剩下中央管和核物质。精子入卵后,入精孔进行愈合、复原,逐渐变为平整(图版一11,12)。

(5)着卵未受精的精子命运:有些精子由于着卵时间较晚或着卵位置不正即不是头帽正对着卵子,不能及时入卵完成受精作用。这些精子有的也可发生顶体反应,但被卵拖入其内吸收(图版一13,14);或精子在卵膜上发生退化,包括中央管前端和核物质脱落,顶体囊收缩,最后被卵膜溶解、吸收。

## 3 讨论

### 3.1 精子的着卵与入卵

在十足目甲壳动物中,精子的着卵、入卵方式多种多样。游泳亚目长臂虾科如罗氏沼虾精子以其主体部核质突起先着卵,然后棘部弯曲再着卵,再将卵膜溶解入卵<sup>[5,6]</sup>;在动额虾科正型动额虾(*Rhynchocinetes typus*)则以其棘突的顶端与卵接触入卵<sup>[7]</sup>;对虾科种类的精子则以其棘部着卵,棘部是精子顶体组成部分,棘部将卵黄膜溶解,形成顶体丝后入卵如中国对虾<sup>[8]</sup>,锐脊单肢虾<sup>[9]</sup>等。锯缘青蟹雌性个体在排卵的同时,将保存在纳精囊中的精子排出,精子以其核辐射臂随机地附着在卵上,精卵的识别与精子核辐射臂的结合蛋白和卵黄膜表面的受体有关。精子通过顶体反应和卵子的作用入卵,顶体反应过程具有爬行亚目的典型特征,顶体囊有个外翻和顶体管前伸的过程<sup>[10-12]</sup>,且即与中华绒螯蟹较为相似,头帽在早期伸出是形成囊状突起,然后破裂形成头帽孔释出内层成分;精子在第一极体排出前入卵,精子的入卵时间与在中华绒螯蟹和锐脊单肢虾观察到的结果一致<sup>[13,14]</sup>。

锯缘青蟹在自然授精和人工授精实验中都存在多精着卵,数精入卵现象。在人工授精的条件下,由于精子的密度较大,多精着卵现象更为普遍,但精子着卵与变化和正常的相同。由于精子的顶体反应十分迅速,过去较多学者借助离子载体和卵水诱导,观察精子的顶体反应<sup>[9,12,15,16]</sup>,借此研究分析精子的入卵过程,但在诱导和人工授精的基础上观察分析并不多见<sup>[10]</sup>。本实验在人工授精的基础上,利用扫描电镜观察了锯缘青蟹精子入卵过程、精子在卵膜上的变化和卵子变化的一些特征,无疑为锯缘青蟹受精生物学深入研究提供了基础依据。

### 3.2 顶体反应机制

在精卵结合过程中,离子通道的活动则是直接参与精子顶体反应的启动,在人和哺乳动物精子顶体反应过程中,跨膜离子交换涉及 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{Na}^+$ 、和 $\text{H}^+$ 等<sup>[17]</sup>,利用人工膜蛋白重组及膜片钳技术研究了海胆精子膜离子通道<sup>[18]</sup>。在十足目动物中,锐脊单肢虾的精子需要一个获能过程,类似与哺乳动物而与海胆的不同,获能的精子 $\text{Ca}^{2+}$ 水平较高,而未获能的精子 $\text{Ca}^{2+}$ 水平较低,在顶体反应前10~15min pH明显降低<sup>[14]</sup>。利用离子载体A23187可诱导精子的顶体反应<sup>[9,12]</sup>。以上说明精子的顶体反应与 $\text{Ca}^{2+}$ 密切相关,除此之外,可能还涉及其它离子的参与,是一个连锁反应,该方面尚有待研究。锯缘青蟹雌雄交配后,精子保存于纳精囊约半年的时间,上官步敏等<sup>[1]</sup>发现精子保存于纳精囊过程中,其形态结构发生变化,在雌性个体产卵时精子方与卵子授精,是其繁殖习性特征,还是其精子有个获能过程,若有获能过程,涉及的关键因子为何?该方面也有待深入研究。

### 3.3 卵子的作用

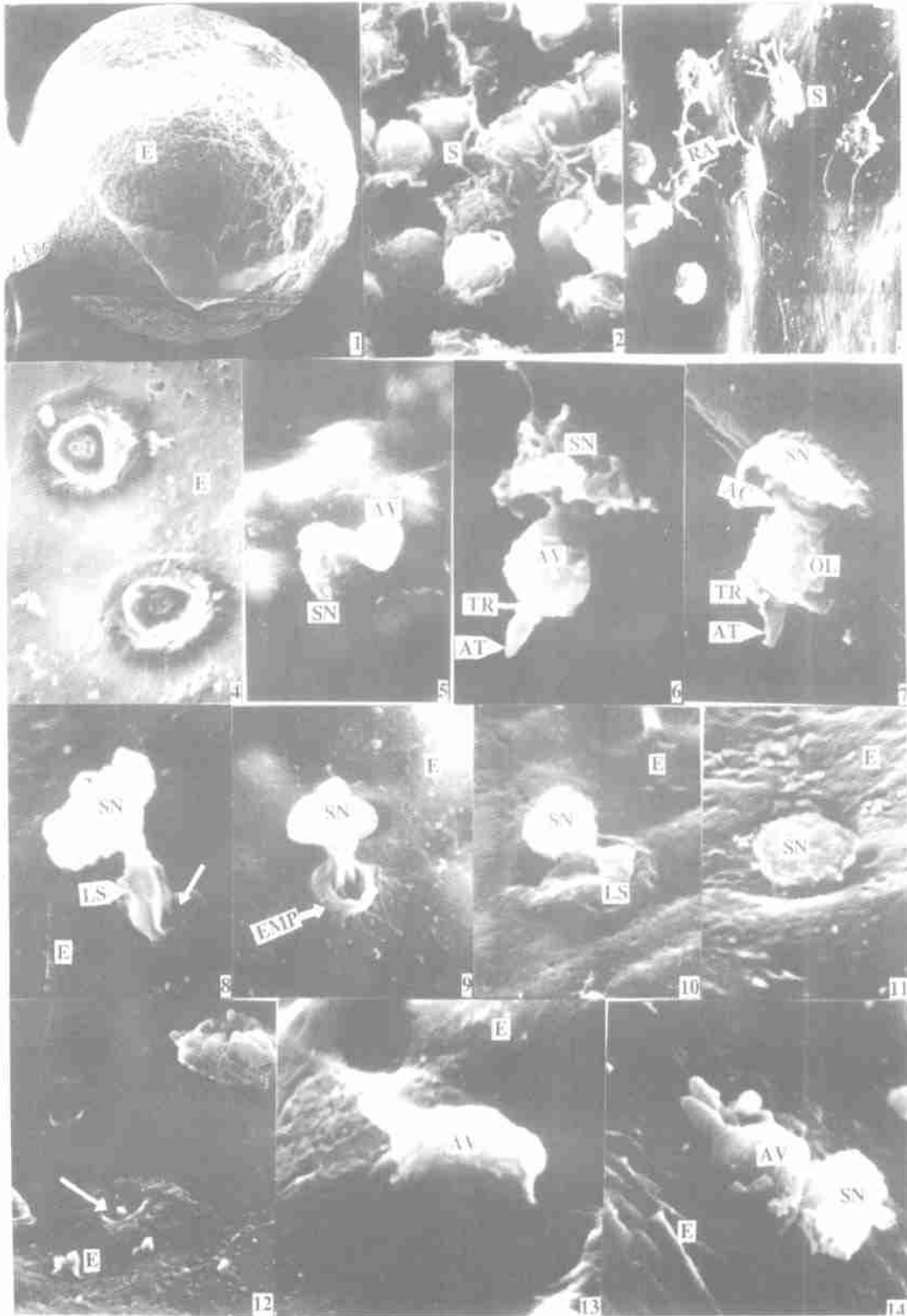
在精子入卵的过程中,卵表面的入精孔周围也发生形态变化。在精子入卵的初始,在入精孔周

围卵膜凸起形成“围孔领”，随着时间的推移，围孔领逐渐消失，最后凹进去。该方面在中华绒螯蟹<sup>[19]</sup>和罗氏沼虾也有类似现象<sup>[6]</sup>，说明精子入卵的过程中，卵子的积极作用，不仅诱导精子的顶体反应，而且卵子也在积极主动协助精子入卵。另外，有些精子着卵的方位不正，也可发生顶体管前伸，精子也可陷入卵子，更说明卵子受精过程中的主动性。

亲蟹喂养得到郭东晖同学的帮助，扫描电镜样品制作得到薛茹老师的帮助，在此一并致谢。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 上官步敏, 李少菁. 锯缘青蟹精子超微结构的研究[ J ]. 动物学报, 1994, 40(1): 7—11.
- [ 2 ] 王艺磊, 张子平, 李少菁. 锯缘青蟹精子发生过程中超微结构变化的研究[ J ]. 动物学报, 1997, 43(3): 249—254.
- [ 3 ] 颜素芬, 上官步敏, 李少菁. 锯缘青蟹卵子发生的超微结构[ J ]. 厦门大学学报, 1994, 33(2): 231—236.
- [ 4 ] 颜素芬, 李少菁, 上官步敏. 锯缘青蟹卵母细胞的卵黄发生[ J ]. 厦门大学学报, 1995, 34(3): 430—436.
- [ 5 ] Lynn J W, Clark W H Jr. A morphological examination of sperm-egg interaction in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [ J ]. Biol Bull. 1983, 164: 446—458.
- [ 6 ] Wang Y F, Du N SH, Lai W. Cytological study on the mechanism of fertilization in *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea, Decapoda) [ J ]. Acta Zool Sinica, 1998, 44(2): 195—202.
- [ 7 ] Barros C, Dupre E, Viveros L. Sperm-egg interaction in the shrimp. *Rhyndocinates typus* [ J ]. Gamete Res, 1986, 14: 171—180.
- [ 8 ] 蔡难儿, 林峰, 陈木楠, 等. 中国对虾受精生物学的研究[ J ]. 海洋与湖沼, 1997, 28(3): 272—279.
- [ 9 ] Clark W H Jr, Griffin F J. The morphology and physiology of acrosome reaction in the sperm of the decapod, *Sicyonia ingentis* [ J ]. Develop Growth & Differ, 1988, 30(5): 451—462.
- [ 10 ] 堵南山, 赖伟, 薛鲁征. 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 精子顶体反应的研究[ J ]. 动物学报, 1987, 33(1): 8—13.
- [ 11 ] Brown G G. Ultrastructural studies of sperm morphology and sperm-egg interaction in the decapod *Callinectes sapidus* [ J ]. J Ultrastruct Res, 1966, 14: 425—440.
- [ 12 ] Talbot P, Summers R G, Hylander B L, et al. The role of calcium in the acrosome reaction: An analysis using ionophore A23187 [ J ]. J Exp Zool, 1976, 198: 383—392.
- [ 13 ] Lee T H, Yamazaki F. Cytological observations on fertilization in the Chinese fresh-water crab, *Eriocheir sinensis* by artificial insemination (*in vitro*) and incubation [ J ]. Aquac, 1989, 76: 347—360.
- [ 14 ] Lindsay L L, Clark W H Jr. Preloading of micromolar intracellular  $Ca^{2+}$  during capacitation of *sicyonia ingentis* sperm, and the Role of the  $pH_i$  decrease during the acrosome reaction [ J ]. J Exp Zool, 1992, 262: 219—229.
- [ 15 ] Gesteira T C V, Halcrow K. Influence of some external factors on the acrosome reaction in the spermatozoa of *Homarus americanus* Milne-Edwards, 1837 [ J ]. J Crust Biol, 1988, 8(3): 317—321.
- [ 16 ] Medina A, Rodriguez A. Structural changes in sperm from the Fiddler crab, *Uca tangeri* (Crustacea, Brachyura), during the acrosome reaction [ J ]. Mol Reprod Dev, 1992, 33: 195—201.
- [ 17 ] 马学海, 施玉梁. 哺乳动物及人精子膜离子通道的研究进展 [ J ]. 生理科学进展, 1998, 29(2): 109—114.
- [ 18 ] Darszon A, Guerrero A, Lievano A, et al. Ionic channels in sea urchin sperm physiology [ J ]. New Physiol Sci, 1988, 3: 181—185.
- [ 19 ] Du N SH, Lai W, An Y, et al. Studies on the cytology of fertilization in Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* (Crustacea, Decapoda) [ J ]. Sci China, 1993, (36)2: 288—294.



1. 示排出后的卵子, ×400; 2. 球形精子, ×7 000; 3. 附着在卵上的精子, ×5 000; 4. 示入卵的精子, ×10 000; 5. 示顶体囊正在外翻, ×700; 6. 示精子的顶体囊外翻和顶体管前伸, ×12 000; 7. 精子的顶体囊外翻后, 内层和外层脱落, ×12 000; 8. 示精子特征和卵膜上的“小洞”(箭头示), ×15 000; 9-11. 示精子入卵过程, ×10 000, ×10 000, ×15 000; 12. 示精子入卵后, 卵膜上的突起变平滑, 箭头示入卵孔, ×12 000; 13-14. 示头帽未正对卵膜的精子, 即使发生顶体反应也不能及时入卵, 最后被卵子吸收, ×15 000, ×15 000.

E. 卵子; S. 精子; RA. 辐射臂; SN. 精子核; AV. 顶体囊; AT. 顶体管; TR. 加厚环; AC. 头帽; LS. 片层结构; OL. 外层; EMP. 卵膜突起.