

文章编号:1000-0615(2009)01-0078-09

红螯螯虾输精管的结构及精荚的形成

丁银娣, 贾林芝, 马强, 赵云龙, 王群

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要:运用组织学、组织化学和蛋白电泳等多种方法,对红螯螯虾输精管结构和精荚形成进行研究,结果发现,红螯螯虾精荚为一个连续的管状结构,由精子群、精荚基质和精荚壁组成;精荚壁完全包裹精子,分初级、次级精荚壁2层;初级精荚壁由致密的纤丝组成,包裹精子和精荚基质;次级精荚壁由大小不等的小泡和疏松的纤丝组成,包裹在初级精荚壁之外。红螯螯虾输精管可分为前、中、后输精管,其上皮细胞均具有合成、分泌精荚形成物质的功能;前输精管卷曲段的高柱状上皮分泌弱嗜酸性丝状分泌物,主要成分为中性粘多糖和蛋白质,形成均匀的初级精荚壁;中输精管的高柱状上皮成丛状向内腔突起,具有分泌泡,其分泌物为嗜酸性、颗粒状物质,主要成分为酸性粘多糖和蛋白质,形成不均匀、黏性极好的次级精荚壁。后输精管结构较简单,肌层较前两者厚,同时管腔更大,其内精荚结构完整。后输精管与射精管相连处有一狭部,内有瓣膜相隔。射精管肌层厚,上皮明显突起,内无精荚。

关键词:红螯螯虾;输精管;精荚

中图分类号:S 917

文献标识码:A

红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)自1992年引进至今已15年,但至今尚未在我国形成大规模的人工养殖产业,其原因主要与其抱卵量少、孵化率低有关。目前,针对该虾生殖生物学的研究主要集中在亲体繁殖习性的观察^[1-4]、胚胎发育^[5]、精巢的发生^[6]及精子代谢^[7]等方面。红螯螯虾为体外受精种类,雌雄交配后精子以精荚的形式黏附与雌体腹侧近雌性生殖孔,精荚的质量很大程度上影响着受精率和孵化率,但有关该虾精荚的研究却较少^[8]。本文从组织学、超微结构以及蛋白质水平,就输精管的形态结构、精荚的形成方式以及蛋白质组成进行了初步的研究,以期为提高精子质量、胚胎的受精率和孵化率提供理论依据,以促进该虾养殖业的发展。

1 材料与方 法

实验材料 于2003年5月取自浙江省淡水水产研究所水产养殖场,成熟个体体长12~14 cm ($n=25$),体重 (104.25 ± 11.21) g ($\text{mean} \pm$

SD),眼眶后头胸甲长(OCL)为 (50.5 ± 3.1) mm,肝体指数(HEP)为 $5.12\% \pm 1.02\%$,性腺指数(GSI)为 $1.01\% \pm 0.25\%$;未成熟个体取OCL=28.1 mm及OCL=31.5 mm两组。活体解剖,迅速取出输精管、射精管和精荚等,根据不同需要分别进行处理。

组织学 Bouin氏液固定,酒精梯度脱水,水杨酸甲酯透明,常规石蜡包埋,连续切片,切片厚度6 μm ;H. E染色,中性树脂封片,日产Olympus BH-2显微镜下观察拍照。

透射电镜 2%戊二醛和4%的多聚甲醛混合固定30 min,戊二醛、锇酸双重固定,Epon812包埋,Reichert-Jung切片超薄片,日立H800型透射电镜观察拍照。

断面扫描电镜 2%戊二醛和1%锇酸双重固定,二甲亚砜防冻处理,冷冻断裂,0.1%的锇酸后固定,酒精系列脱水,醋酸异戊酯置换,HCP-2临界点干燥仪干燥,EIKO IB-3离子溅射仪喷金,JXA-840扫描电镜观察拍照。

收稿日期:2007-12-07 修回日期:2008-04-08

资助项目:国家自然科学基金(30671607)

通讯作者:王群, E-mail: Qwang@bio.ecnu.edu.cn

组织化学 Carnoy 氏液固定,石蜡包埋并切片。糖原测定采用 PAS 法,酸性粘多糖测定采用 A-PAS 法,中性粘多糖测定采用胭脂红法,蛋白质测定采用茚三酮法,脂类测定采用苏丹 IV 丙二醇法。

蛋白质电泳 蛋白含量测定采用考马斯亮兰法(南京建成试剂盒)。蛋白分离采用 SDS-PAGE,4% 分离胶,电压 60 V;10% 分离胶,电压 120 V。上样量为每孔 11 μg ,常规银染^[9]。

2 结果

2.1 输精管的结构

红螯螯虾输精管一对,分别发自每个精巢外侧的近上部,终止于射精管。整个输精管在形态结构上可分成三个部分:与精巢相连的一段,由直行和卷曲小管组成,为直径最小的前输精管,继之是长而卷曲的中输精管,最后为膨大的后输精管。整个管壁由里到外依次为:分泌上皮、基膜、肌肉层和结缔组织层。

前输精管 前输精管前端直接与精巢相连,管径小,平均内径约为 50 μm ,外径约为 100 μm ,分为直行段和卷曲段,其间有丰富的结缔组织分布。直行段管腔外壁缺乏肌层,上皮为矮柱状(图版 I-1),核大呈圆形,核仁单个,胞质中线粒体少而呈圆形,高尔基复合体由多层扁平囊相叠而成,其成熟面分泌的液泡多且膨大(图版 II-1)。卷曲段管径较平直段大,出现环肌,为平滑肌,上皮为高柱状(图版 I-2),核大呈椭圆形,核仁多个,线粒体长棒状(图版 II-2),分布在上皮细胞基部;粗面内质网发达,部分围绕细胞核呈环状排列(图版 II-2,3),部分则平行排列,并与细胞的游离面垂直;胞质中含有大量的游离核糖体、糖原颗粒和少量小泡,小泡内含电子密度较高的糖原颗粒(图版 II-4);细胞内近游离端含大量大小不一的小泡和高电子密度颗粒物质(图版 II-4),这些物质以外排和顶泌的方式向管腔中分泌,其中包括含高电子密度颗粒的糖原小泡,分泌物呈弱嗜酸性(图版 I-1,2);该类细胞的边缘通常具有短的微绒毛(图版 II-4)。管腔内精子团被分泌物包裹,在下行过程中分泌物逐渐致密、变薄,在精子团表面形成第一层结构,即初级精荚壁。

中输精管 管壁结构与前输精管基本相似,盘绕卷曲,卷曲度不及前输精管卷曲段强,但

管径较前输精管粗,内、外径平均约为 475 μm 和 920 μm 。输精管之间的结缔组织较之前输精管少,且环肌层外侧出现纵肌束(图版 I-3,4,5)。上皮为高柱状,成丛状向内突起,平均高 200 μm ,胞质总体嗜碱性,核底位,卵圆形,10 μm \times 6 μm ,核仁 1 至多个(图版 I-3),分布在核内侧边缘;跟前输精管类似,内质网非常发达,同时细胞基部的线粒体数量较之前输精管大大增加,线粒体椭圆形或球形,嵴丰富(图版 II-5);上皮游离端有较多长的微绒毛,微绒毛中含有大小不一的小泡和絮状物,小泡内含高电子密度的嗜酸性颗粒物质以及低电子致密度的网状物质(图版 I-4),这些分泌物同样以外排或顶泌方式排入输精管腔。管腔中,初级精荚呈连续的索状结构卷曲盘绕于中输精管管腔,并完全浸润于中输精管分泌物中,形成了管状精荚,而中输精管分泌物则构成了次级精荚壁(图版 II-6);初、次级精荚壁之间界限明显,次级精荚壁往往含有类似初级精荚壁组分的块状结构(图版 II-6)。

此外,在中输精管后段管腔的一侧,部分上皮向内凹陷,缢裂成 1 大 1 小 2 个管腔,较小的管腔在原管腔之外,类似刀额新对虾分泌管^[10]的结构,其内含有少量絮状分泌物,无精荚(图版 I-5)。

后输精管 后输精管膨大,直行,成熟个体外径可达 5 mm,内径达 4.8 mm,管壁外有少许结缔组织;与中输精管相比,肌肉层明显增厚,平均厚度约为 60 μm ,内侧为环肌,外侧为纵肌;环肌层较薄,具斜纹,可能为斜纹肌;纵肌层约占整个肌层的 5/6,未观察到斜纹,可能与其切面有关。上皮多为矮柱状,高 40 μm ,核多为长圆形,底位,5 μm \times 10 μm (图版 I-6);内质网数量明显减少(图版 II-7),合成能力减弱,仅见上皮顶端有少量分泌活动(图版 II-8),分泌物为嗜酸性颗粒和少量嗜碱性丝状物。管腔内初级精荚壁进一步致密并变薄,次级精荚壁中的胶连度增强,表现为大小高电子密度颗粒排列紧密,颗粒周围形成一折光较强的透明环状带,类似病毒颗粒的外壳(图版 II-9)。

此外,在后输精管与射精管的交界处有一明显的狭处(图版 I-7),内径约 60 μm \times 560 μm ,其中部分基膜膨大向内腔突起,高度可达 150 μm ;横切面呈块状,为两个半圆瓣膜,瓣膜厚度约

66 μm ,瓣膜间为狭缝状管腔,管腔内可见丝状粘液(图版 I-8)。

2.2 射精管

肌层厚,环径可达 200 μm 以上,内层为环肌,外层为纵肌(图版 I-9)。基膜呈条状渐向内腔突起,最高可达 450 μm ,其上附着上皮细胞。射精管中无精荚,仅有少量嗜酸性颗粒状和嗜碱性絮状分泌物(图版 I-9)。

2.3 精荚的结构及理化性质

精荚呈管状,横切面近圆形,其内由精子群(sperm mass)、精荚基质(spermatophore matrix)和精荚壁(spermatophore layer)组成(图版 I-10, 11,图版 II-10,11)。精子由半圆形主体部(包括顶体,acrosome)和由该基部发出的棘突组成(图版 II-11,12),H. E 染色呈嗜碱性;精子间充满精荚基质,精荚基质来自精巢分泌物,由大量无序纤维(filament)交织而成(图版 II-10),H. E 染色呈弱嗜碱性。初级精荚壁(primer spermatophore layer)呈索状包裹精子团,为一层嗜酸性(图版 I-1,2)、由致密纤维浓缩而成的电子密度极高的致

密层,其间分散着少量小泡(vesicle)(图版 II-10);索状初级精荚壁盘绕于次级精荚壁中,次级精荚壁呈嗜酸性(图版 I-6),为电子密度较低的疏松状纤维,其间含有大量大小不一的颗粒状小泡(图版 II-10),小泡外有一透明环状带(图版 II-9);次级精荚壁极厚,充斥整个输精管腔。

输精管内的精荚为乳白色,柔软,具有良好的黏附性,可黏附于多种物体的表面,在空气、纯水、 Na^+ 溶液、 K^+ 溶液、 Mg^{2+} 溶液中都不会溶解,且能在短时间内表面硬化,但在空气中不易久存。组织化学的染色结果显示(表 1),PAS 反应初级精荚壁为阳性,而次级精荚壁呈强阳性;茛三酮反应初级精荚壁呈阳性,而次级精荚壁呈极强阳性;苏丹 IV 丙二醇反应初级精荚壁为弱阳性,而次级精荚壁呈阳性;此外,初级精荚壁胭脂红反应呈弱阳性,而 A-PAS 反应则显示阴性;次级精荚壁胭脂红反应为阴性,A-PAS 反应呈极强阳性。精荚基质仅茛三酮反应为弱阳性,其余均为阴性。精子 PAS、A-PAS 和苏丹 IV 丙二醇反应均为弱阳性,胭脂红反应为阳性,茛三酮反应为极强阳性。

表 1 红螯螯虾输精管各部分组织化学染色结果

Tab. 1 Histochemistry method used in tissues of male reproductive system

项 目 item	基 膜 ground membrane	上皮细胞 epithelial cell	精 荚 spermatophores			
			次级壁 secondary layer	初级壁 primary layer	基质 matrix	精子 sperm
PAS	++	++	+++	++	-	+
A-PAS	-	+	++++	-	-	+
胭脂红 catmine	-	+++	-	+	-	++
茛三酮 ninhydrin	+	++++	++++	++	+	++++
苏丹 IV 丙二醇 sudan IV propylene glycol	++	++	++	+	-	+

注:“-”为阴性,“+”为弱阳性,“++”为阳性,“+++”为强阳性,“++++”为极强阳性

Notes:“-”negative,“+”weak positive,“++”positive,“+++”strong positive,“++++”extremely strong positive

2.4 精荚蛋白质组成

在成熟的红螯螯虾输精管 SDS-PAGE 电泳中(图 1),从前输精管开始 116 ku 蛋白亚基表达量增加,这种蛋白在精荚中也相应出现。从中输精管开始 63.8 和 58 ku 蛋白亚基表达量增加,同样在精荚中也存在相应的蛋白。从中输精管开始出现一个小分子量 40 ku 蛋白亚基,在精荚中也有相应的蛋白条带。

在发育不同时期的红螯螯虾的输精管中其蛋白条带差异明显(图 2)。C1 中为成熟个体的前输精管,较之未成熟个体,116 ku 蛋白量增加;成熟个体的中输精管与未成熟个体比较,116、63.8、

58 和 40 ku 蛋白量增加;另外,整体而言,蛋白条带在成熟个体中输精管的表达量增加。以上蛋白条带都在 C3(精荚)相应位置出现。

3 讨论

十足类甲壳动物具有特殊的精荚结构,通常具有 3 种类型:柄状(异尾类)、管状或索状(长尾类)、球形或椭圆形(短尾类)^[11],而整个精荚主要由精荚壁,精荚基质及精子团组成,其中精荚壁一般 1~3 层,多数为 2~3 层^[12]。不同的物种,其精荚的结构及形成方式具有较大差异。

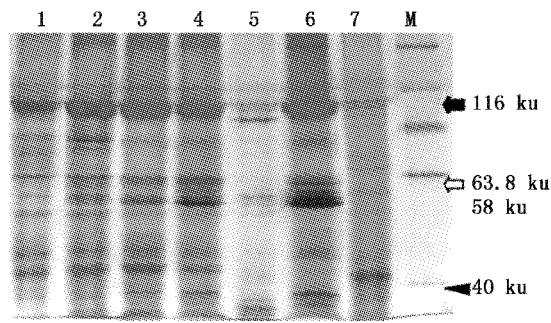


图1 红螯螯虾成体各组织蛋白的凝胶分离 SDS-PAGE

1. 精巢;2. 前输精管;3. 中输精管;4. 后输精管;5. 射精管;
6. 精荚;7. 肝胰腺

Fig. 1 Tissues protein in adult *Cherax quadricarinatus* separating by SDS-PAGE

1. testis; 2. proximal vas deferens; 3. mid-vas deferens;
4. distal vas deferens; 5. ejaculatory duct; 6. spermatophores;
7. hepatopancreas

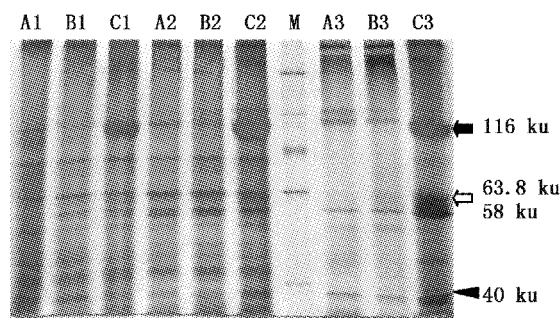


图2 红螯螯虾不同生长时期相应组织的蛋白比较 SDS-PAGE

1. 前输精管;2. 中输精管;3. 内容物(C3中含精荚)

Fig. 2 Tissues protein comparison in different periods of growth *Cherax quadricarinatus* separating by SDS-PAGE

1. proximal vas deferens; 2. mid-vas deferens; 3. content (with spermatophores in sample C3)

A. OCL = 28.1 mm; B. OCL = 31.5 mm; C. OCL = 52.3 mm

3.1 红螯螯虾输精管和精荚的形态结构

红螯螯虾输精管根据其结构和功能可分为前、中、后输精管;这一结果基本与 Lopez Greco 等^[13]的研究相似,但也存在一定差异,主要有两个方面:其一, Lopez Greco 等认为前输精管直径约 0.3 mm 到 0.6 mm,为卷曲的半透明小管,内含初级精荚,而本实验观察发现,前输精管还可细分为直行段和卷曲段,直行段向前直接与精巢相连,后接卷曲段,两者在上皮以及肌层上存在较大

差异(图版 I-1,2),且仅卷曲段管腔内含初级精荚;因此, Lopez Greco 等^[13]的观察不够全面,其所认为的前输精管仅为前输精管卷曲段。其二, Lopez Greco 等认为在中输精管之后均为后输精管,但本实验发现,后输精管进入步足后,管径骤然变细,狭窄处的管腔中又有瓣膜状结构存在(图版 I-7),阻碍精荚向后续管腔延伸;为此,作者认为自瓣膜之后无精荚存在的管状结构应为射精管。

红螯螯虾精荚为一连续的管状结构,沿输精管下行其直径不断增粗且结构不断完善;成熟的精荚位于后输精管内,其精荚壁明显分为 2 层,外层次级精荚壁较厚,为含嗜酸性颗粒的低电子密度的疏松状纤丝层;初级精荚壁较薄,为一均匀、弱嗜酸性、含少量小泡的高电子密度致密层,呈索状卷曲盘绕于次级精荚壁内;精子团直接被初级精荚壁包裹,其内大量精子均匀分布,精子间充斥着来源于精巢的精荚基质。从形态和结构上看,红螯螯虾精荚与龙虾等咸水虾相类似,精荚壁均较厚,但较龙虾类和螯虾类简单,这与其繁殖习性相关^[13]。红螯螯虾的繁殖习性与罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)^[14] 和日本沼虾 (*M. nipponense*)^[15] 等类似,交配后一般在 24 h 内即完成受精,但龙虾类和螯虾类交配后精荚可贮存几年以上,故精荚壁相对更厚且层数多,这将有利于精子的长期保存。因此,精荚壁的形态结构通常与其繁殖习性密切相关。

此外,红螯螯虾排出体外的精荚小段一般长约 6 mm,与射精管的长度基本一致;根据后输精管狭部结构推测,红螯螯虾交配时后输精管纵肌收缩,导致瓣膜间隔增大,然后环肌收缩,将精荚推入射精管,最后通过射精管肌肉的联合作用排出体外并黏附到雌体腹板。因此,精荚小段的形成与输精管肌肉层的联合收缩及其瓣膜共同作用有关。

3.2 红螯螯虾精荚的形成

由精巢产生的精子及其分泌物,自精巢进入输精管后,逐渐被输精管上皮所分泌的物质包裹而形成精荚结构。研究证实,不同部位的输精管上皮分泌物在精荚的形成过程中作用各不相同。在短尾类,前输精管具分泌功能,而后输精管则只有储存的功能^[16];在异尾类和长尾类中后输精管也具有高度的分泌功能^[17-18]。而本研究发现,红

螯螯虾前、中、后输精管的上皮细胞均有合成、分泌形成精荚壁物质的功能,且其作用不尽一致。

前输精管卷曲段的上皮细胞具有旺盛的分泌功能,其分泌方式为外排或顶泌,管腔内的分泌物包裹来自精巢的精子及精子间的基质,形成初级精荚壁;由于该段管腔较细,故初级精荚为连续的细长索状结构;至中输精管前段,管径增大,上皮细胞分泌的低电子密度絮状物质以及分散其间的高电子密度颗粒物进入管腔,包裹来自前输精管的初级精荚,形成次级精荚壁,两者间界限明显;后输精管上皮细胞的分泌活动较前、中输精管弱,只分泌少量丝状物质,沉积于精荚壁外层,但两者间无明显界限,该分泌物是否与精荚壁的黏附和硬化有关,尚有待进一步研究。此外,在整个精荚形成的过程中初级精荚壁不断致密变薄,次级精荚壁亦在后输精管段进一步致密化,这与邱高峰等^[15]的研究相类似,而其间具透明环状带的小泡可能与次级精荚壁的浓缩有关。

输精管上皮分泌物在精子团表面的沉积和浓缩是十足类甲壳动物精荚形成过程中常见的两个环节。长尾类通常为体外受精,其精荚结构复杂,精荚的形成一般包括分泌物的沉积和浓缩过程^[10,15,19];而短尾类通常为体内受精,虽也有上述过程,但其精荚结构相对简单,如中华绒螯蟹输精管上皮分泌物仅形成了精荚间精液物质,而未在精荚表面沉积^[12]。红螯螯虾属长尾类,其输精管各段上皮细胞的分泌物均参与了精荚的形成,这些分泌物通过有序的沉积,最终形成了红螯螯虾的初级和次级精荚壁,而精荚的最终成熟,同样经历了分泌物的逐渐浓缩过程,这与 *Cherax albidus*^[20] 的精荚形成过程相类似。

3.3 输精管分泌物及其生化组成

研究证实,甲壳动物精荚壁主要由中性粘多糖、酸性粘多糖以及蛋白质组成,其主要功能是粘着精子,并起化学和生物的保护作用^[21-22]。本研究证实,红螯螯虾整个输精管中从前至后共出现三种分泌物:弱嗜酸性絮状分泌物,弱嗜酸性颗粒状分泌物和嗜碱性絮状分泌物。弱嗜酸性絮状分泌物是由前输精管高柱状上皮细胞分泌,主要为中性粘多糖和蛋白质,构成初级精荚壁;弱嗜酸性颗粒状分泌物是在中输精管高柱状上皮出现丛状突起之后,由该类上皮细胞分泌形成,分泌泡中可见形态相似、嗜酸性相同的颗粒状分泌物,主要成

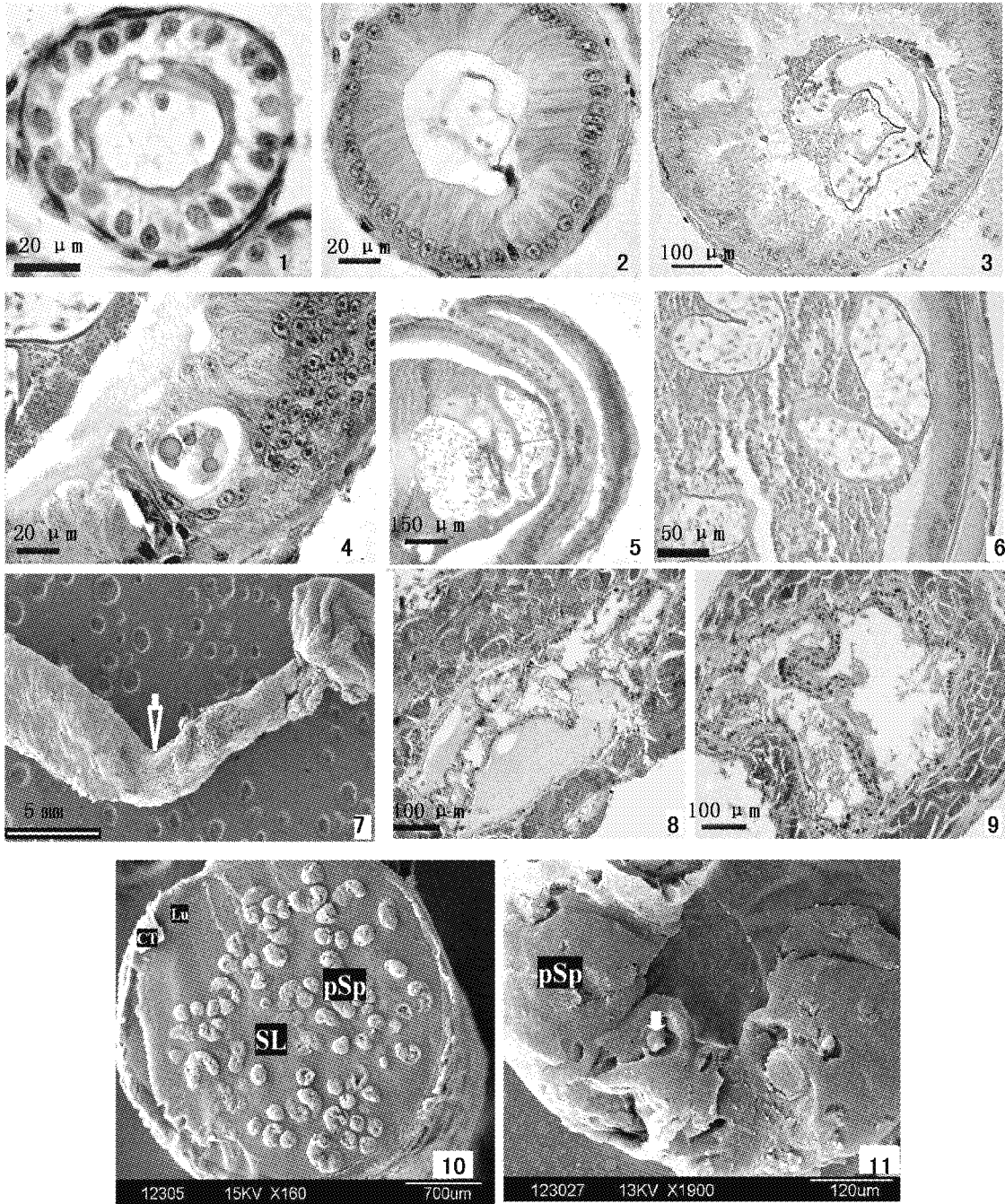
分为酸性粘多糖和蛋白质,构成次级精荚壁;嗜碱性絮状分泌物是在中输精管出现低柱状上皮之后,由低柱状上皮细胞分泌形成,但在高柱状上皮的游离面附近的管腔也充斥着这种分泌物,其主要成分需进一步确定。

对成体输精管和精荚的蛋白凝胶分离后发现,精荚中3个主要的蛋白条带116 ku、63.8 ku、58 ku 依次在前、中输精管的相应位置表达量上升,同时40 ku 蛋白从中输精管开始出现。红螯螯虾幼体的输精管还没有形成精荚的分泌物,相应的这些蛋白的表达量就少。因而推测,这几种蛋白为精荚的主要构成蛋白。其中116 ku 蛋白亚基在精巢、输精管中都表达而射精管和肝胰腺中不表达,推测该蛋白为精浆的主要蛋白;63.8 ku 的蛋白亚基从前输精管开始表达量上升,其可能为弱嗜酸性絮状分泌物的主要成分,即初级精荚壁的主要蛋白;58 ku 在中输精管表达量增加,同时中输精管开始出现一个40 ku 的小分子蛋白,这两者在输精管内容物的电泳条带中也有分布,故此推测,它们为弱嗜酸性颗粒状碱性分泌物的主要成份,即次级精荚壁的主要成分。

参考文献:

- [1] Meade M E, Doeller J E, Kraus D W. Heat and oxygen flux as a function of environmental PO₂ in juvenile Australian crayfish, *Cherax quadricarinatus* [J]. J Exp Zool, 1994, 270 (1): 460-466.
- [2] King C R. Growth and survival of red-claw crayfish hatchlings (*Cherax quadricarinatus* von Martens) in relation to temperature, with comments on the relative suitability of *Cherax quadricarinatus* and *Cherax destructor* for culture in Queensland [J]. Aquaculture, 1994, 122 (15): 75-80.
- [3] Barki A, Levi T, Hulata G. Annual cycle of spawning and molting in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* under laboratory conditions [J]. Aquaculture, 1997, 157 (30): 239-249.
- [4] Karplus I, Zoran M, Milstein A. Culture of the Australian red claw crayfish in Israel III. Survival in earthen ponds under ambient winter temperatures [J]. Aquaculture, 1998, 166 (3-4): 259-267.
- [5] 孟凡丽, 赵云龙, 陈立侨, 等. 红螯螯虾胚胎发育研究 I. 胚胎外部结构的形态发生 [J]. 动物学研究, 2000, 21(6): 468-472.

- [6] 罗宇良, 吴志新, 陈孝煊, 等. 红螯螯虾精巢发育的组织学研究[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(1): 78 - 79.
- [7] 丁银娣, 王群, 李恺, 等. 红螯螯虾雄性生殖系统的生化组成及精子代谢[J]. 中国水产科学, 2005, 12(5): 526 - 528.
- [8] 叶玉珍, 吴清江, 董新红. 澳洲淡水红螯螯虾繁殖特性及精荚显微结构的研究[J]. 水利渔业, 1997, 5: 9 - 11.
- [9] 郭尧君. SDS 电泳技术的实验考虑及最新进展. 生物化学与生物物理进展[J]. 1991, 18(1): 32 - 37.
- [10] 王群, 赵晓勤, 赵云龙. 刀额新对虾输精管的组织学及精荚形成[J]. 中国水产科学, 2002, 9(2): 110 - 113.
- [11] Dudenhausen E E, Tablot P. An ultrastructural comparison of soft and hardened spermatophores from the crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana [J]. Can J Zool, 1983, 61: 182 - 194.
- [12] 王群, 赵云龙, 黄勃, 等. 甲壳动物十足类精荚的研究概况[J]. 海洋科学, 2000, 24(3): 22 - 25.
- [13] Lopez Greco L S, Vazquez F, Rodriguez E M. Morphology of the male reproductive system and spermatophore formation in the freshwater "red claw" crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1898) (Decapoda, Parastacidae) [J]. Acta Zoologica, 2007, 88(3): 223 - 229.
- [14] Dougherty W J, Dougherty M M, Harris S G. Ultrastructure and histological observations on electroejaculated spermatophores of the palamomid shrimp, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Tissue and Cell, 1986, 18(5): 709 - 724.
- [15] 邱高峰, 堵南山, 赖伟. 日本沼虾雄性生殖系统的研究: III. 输精管内精荚的结构和形成[J]. 动物学报, 1997, 43(1): 68 - 73.
- [16] Hirsch G W, Walker M H. The vas deferens of the spider crab, *Libinia emarginata* [J]. J Morph, 1974, 143: 1 - 20.
- [17] Berry P F, Heydorn A F F. A comparison of spermatophoric masses and mechanism of fertilization on South African spiny lobster (*Palinuridae*) [J]. Invest Rep Oceanogr Res Inst S Africa, 1970, 25: 1 - 18.
- [18] Matthews D C. The origin, development and nature of the spermatophore mass of the spiny lobster, *Panulirus penicillatus* (Oliver) [J]. Pac Sci, 1951, 5: 359 - 371.
- [19] 赵连翠, 蔡生力. 对虾精荚和精子的研究进展[J]. 海洋科学, 2005, 29(2): 73 - 77.
- [20] Talbot P, Beach D. Role of the vas deferens in the formation of the spermatophore of the crayfish (*Cherax*) [J]. Canadian Journal of Zoology/Revue Canadienne de Zoologie, 1983, 61(1): 182 - 194.
- [21] Wolfe A F. A histological and histochemical study of the male reproductive system of *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) [J]. J Morph, 1971, 135: 51 - 70.
- [22] Clark W H, Kleve M G, Yudin A I. An acrosome reaction in natantian sperm [J]. J Exp Zool, 1981, 218: 279 - 291.



图版 I

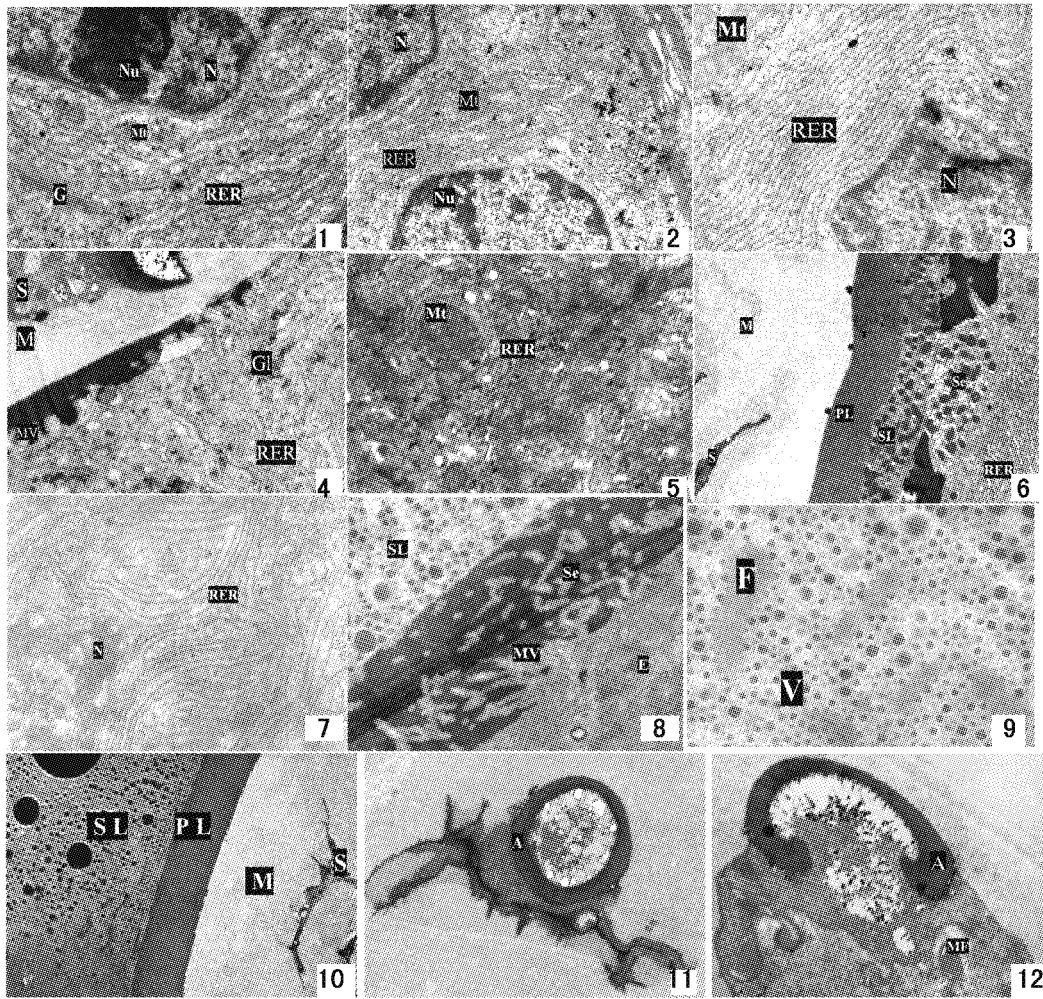
1. 前输精管直行段; 2. 前输精管卷曲段; 3. 中输精管前段; 4, 5. 中输精管后段; 6. 后输精管局部; 7. 后输精管和射精管外部扫描, 箭头示狭部; 8. 射精管狭部; 9. 射精管; 10. 后输精管精荚断面扫描, 示结缔组织、管腔、初级精荚、次级精荚壁; 11. 精荚局部放大, 示初级精荚, 箭头示精子。

A: 顶体; CT: 结缔组织; E: 上皮细胞; F: 纤丝; G: 高尔基体; GL: 糖原; M: 其质; Lu: 腔隙; MF: 髓体结构; Mt: 线粒体; Mv: 微绒毛; N: 细胞核; Nu: 核仁; PSP: 初级精荚; PL: 初级精荚壁; RER: 粗面内质网; S: 精子; Se: 分泌物; SL: 次级精荚壁; V: 小泡

Plate I

1. Straight proximal vas deferens; 2. Curly proximal vas deferens; 3. Anterior segmental mid-vas deferens; 4, 5. posterior segmental mid-vas deferens; 6. Part of distal vas deferens; 7. Stenosing ejaculatory duct; 8. Ejaculatory duct; 9. SEM of distal vas deferens and ejaculatory duct, arrow shows stenosis; 10. SEM of sectional distal vas deferens, shows connective tissue, duct, primer spermatophore and secondary layer of spermatophore; 11. part of spermatophore, shows primer spermatophore. Arrow shoes sperm.

A: acrosome; CT: Connective tissue; E: epithelium; F: filament; G: Golgi body; GL: glycogen; Lu: lacuna; M: matrix; MF: myelin figure; Mt: mitochondria; MV: microvilli; N: nuvclcus; Nu: nucleolus; pSp: primer spermatophore; PL: primer layer of spermatophore; RER: rough endoplasmic reticulum; S: sperm; Se: secretion; SL: secondary layer of spermatophore; V: vesicle



图版 II

1. 前输精管直行段上皮细胞基部,示核、线粒体、粗面内质网、高尔基体等, $\times 22483$; 2,3. 前输精管卷曲段上皮细胞基部,示核、核仁、线粒体、环形粗面内质网等, $\times 8763$; $\times 15967$; 4. 前输精管卷曲段上皮细胞腔面,示微绒毛、分泌物、精子、堆积的糖原颗粒等, $\times 34900$; 5. 中输精管上皮细胞基部,示线粒体和粗面内质网, $\times 13330$; 6. 中输精管上皮细胞腔面,示初、次级精英壁、精子、粗面内质网等, $\times 8531$; 7. 后输精管上皮细胞基部,示核和粗面内质网, $\times 18659$; 8. 后输精管上皮细胞腔面,示次级精英壁、微绒毛、分泌物等, $\times 7321$; 9. 次级精英壁,示纤丝和小泡, $\times 13886$; 10. 精英透射电镜,示精子、精英基质、初级精英壁、次级精英壁, $\times 4345$; 11. 精子非中心轴切面,示顶体, $\times 18560$; 12. 精子中心轴纵切,示顶体、髓样结构, $\times 36000$

Plate II

1. Basal part of straight proximal vas deferens epithelial cells, shows nucleus, mitochondria, rough endoplasmic reticulum and Golgi body, $\times 22483$; 2,3. Basal part of curly proximal vas deferens epithelial cell, shows nucleus, nucleolus, mitochondria and annular rough endoplasmic reticulum, $\times 8763$, $\times 15967$; 4. Free end of curly proximal vas deferens epithelial cell, shows microvilli, secretions, sperm and the accumulated glycogen granules, $\times 34900$; 5. Basal part of mid-vas deferens epithelial cells, shows mitochondria and rough endoplasmic reticulum, $\times 13330$; 6. Free end of mid-vas deferens epithelial cells, shows primer layer of spermatophore, secondary layer of spermatophore, sperm and rough endoplasmic reticulum, $\times 8531$; 7. Basal part of distal vas deferens epithelial cells, shows nucleus and rough endoplasmic reticulum, $\times 18659$; 8. Free end of distal vas deferens epithelial cells, shows secondary layer of spermatophore, microvilli and secretions, $\times 7321$; 9. Secondary layer of spermatophore, shows filament and vesicle, $\times 13886$; 10. TEM photos of spermatophore, shows sperm, matrix, primer layer of spermatophore and secondary layer of spermatophore, $\times 4345$; 11. Non-central axis section of sperm, shows acrosome, $\times 18560$; 12. Central axis section of sperm, shows acrosome and myelin figure, $\times 36000$

The structure of vas deferens and formation of spermatophore in crayfish, *Cherax quadricarinatus*

DING Yin-di, JIA Lin-zhi, MA Qiang, ZHAO Yun-long, WANG Qun
(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: Crayfishes (*Cherax quadricarinatus*) were collected from artificial ponds in Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries. The samples were observed under microscope after being sacrificed and investigated with histological, histochemical, biochemical methods and chromatography. The *C. quadricarinatus* spermatophore comprises a highly convoluted tube and a firm membrane forming a cord-like mass, and this spermatophoric ribbon is embedded in a gelatinous matrix. The structure of *C. quadricarinatus* spermatophore was observed under the electron microscopy, which consists of sperm mass, spermatophore matrix and spermatophore wall. Sperm mass is embedded in a dense fibrillar matrix and with an acellular wall surrounding both of them. In this study, the structure of the spermatophore wall in the vas deferens was also investigated using electron microscopy and biochemical test. The wall of the spermatophore is composed of two concentric layers: a thin primary spermatophore layer which is a fibrillar structure that directly surrounds the sperm mass and spermatophore matrix, and a thick secondary layer which contains heterogeneous vesicles and loose filament surrounds the primary spermatophore layer. The vas deferens of *C. quadricarinatus* consists of an anterior vas deferens, a middle vas deferens, and a posterior vas deferens. The histology of the inner epithelial cells of the vas deferens contributing to the spermatophore mass is described. The inner epithelial cell of the coiling anterior vas deferens secretes the weakly acidophilic filament that forms the equable primary layer of spermatophore. Neutral muopolysaccharides and protein are the main components of the primary layer. There are incrassate epithelial cells of middle vas deferens, which are fasciculate high cellula columnoepithelialis. In the middle of epithelial cells, some secretory vacuoles were observed with acidophily vesicular secretion, which formed the inequable secondary layer. Acidic muopolysaccharides and protein are the main components of the secondary layer. Spermatophores structure are complete in posterior vas deferens which has a simpler structure than the former two but incrassate muscular layer and larger tube. The posterior vas deferens links with ejaculatory duct. Between the posterior vas deferens and the ejaculatory duct, there is a bottleneck with two valves inside. The ejaculatory duct has an incrassate muscular layer and protuberant inner epithelial cells. No spermatophore in the ejaculatory duct is visible.

Key words: *Cherax quadricarinatus*; vas deferens; spermatophore