

体外诱导日本蟳精子顶体反应的形态变化与诱导条件

许星鸿*, 阎斌伦, 徐加涛, 徐国成, 邵营泽, 吴建新, 戴钧

(淮海工学院江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005)

摘要: 用光镜和透射电镜观察了日本蟳精子顶体反应过程的形态变化, 采用正交实验法分析了体外诱导精子顶体反应的最佳诱导条件, 并对比了离子载体 A23187 与卵水的诱导效果以及取自雄蟹贮精囊的精子顶体反应诱导情况。日本蟳精子的顶体反应过程可分为 4 个阶段: 第 I 阶段为头帽隆起; 第 II 阶段为头帽破裂, 顶体囊外翻, 辐射臂收缩; 第 III 阶段为穿孔器前伸, 顶体颗粒聚集于顶体管后段; 第 IV 阶段为穿孔器断裂, 顶体囊外层脱落, 顶体丝形成, 顶体颗粒向外释放, 核体积缩小。取自雌蟹纳精囊的精子, 在 pH 为 8.0、CaCl₂ 浓度为 0.30% 的人工海水中, 用离子载体 A23187 (60 μg/mL) 诱导 50 min, 可以得到最大的精子顶体反应率 (80.41%), 而经卵水诱导得到的顶体反应率为 73.87%。用所得出的最佳诱导条件对取自雄蟹贮精囊的精子进行处理, 可得到 64.37% 的顶体反应率。

关键词: 日本蟳; 精子; 顶体反应; 形态变化; 诱导条件

中图分类号: Q 959.223; S 917

文献标识码: A

顶体反应是发生受精作用的重要环节^[1]。甲壳纲动物精子无鞭毛, 无法以常规运动性指标判断其精子活力, 所以顶体反应诱导率还可作为非鞭毛型精子质量的评价指标^[2]。日本蟳 (*Charybdis japonica*) 隶属于甲壳纲 (Crustacean) 十足目 (Decapoda) 梭子蟹科 (Portunidae), 俗称靠山红、石闸蟹, 广泛分布于我国各海区^[3]。其肉味鲜美、营养丰富, 为经济价值较高的海产蟹类^[4]。目前, 关于日本蟳精子生物学的研究资料很少, 仅王春琳等^[5]采用扫描电镜对日本蟳精子的表面形态进行了观察, 但日本蟳精子顶体反应的研究国内外尚未见报道。本文采用光镜和透射电镜对日本蟳精子顶体反应过程的形态变化进行了详细观察, 分析了顶体反应的最佳诱导条件, 并就离子载体 A23187 与卵水的诱导效果以及取自雄蟹贮精囊的精子顶体反应诱导情况进行探讨, 以期为本蟳人工繁育技术的深入研究提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验用日本蟳于 2009 年 5-7 月购自连云港

海产品市场, 甲长为 5.4~6.7 cm, 甲宽为 6.9~8.1 cm。

1.2 方 法

精子样品制备 每次解剖雌蟹 5 只, 取出纳精囊于研钵中, 加入 20 mL 无钙离子人工海水 (Ca²⁺-FASW 配制)^[6] 研磨 5 min, 用 200 目筛绢网过滤去除组织碎片, 800 r/min 离心 5 min, 获得白色精子沉淀。用 Ca²⁺-FASW 将精子沉淀稀释成密度 10⁷ ind/mL 的精子悬浮液, 4℃ 保存备用。

精子形态观察 分别从下述对照组及实验组取 1 滴精子悬液于干净载玻片上, 涂片法制片, 用 2% 曙红 B 染色液染色 4 min, Nikon E1000 显微镜下观察、摄影。另取不同反应阶段的精子悬液, 用 2.5% 戊二醛预固定 (4℃), 1% 锇酸后固定, 梯度乙醇脱水, Epon812 环氧树脂包埋。LKB-Nova 超薄切片机切片, 醋酸铀和柠檬酸铅双染色, 日本电子 JEM-1200EX 型透射电镜观察、摄影。

精子顶体反应诱导 离子载体 A23187 (Sigma 公司) 先用二甲亚砜溶解, 再用 Ca²⁺-

收稿日期: 2010-08-02 修回日期: 2010-08-23

资助项目: 江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放课题 (Z2007HS006); 江苏省科技厅苏北科技发展计划项目 (BN2010026)

通讯作者: 许星鸿, E-mail: xhxul19@163.com

FASW 稀释成 2 mg/mL 的母液,置 4 °C 备用。

精子顶体反应时间的测定 取 11 个塑料离心管,各加入 480 μL 的 0.20% CaCl_2 溶液(用 Ca^{2+} -FASW 配制)和 20 μL 的精子悬液,再加入 A23187 母液 12.5 μL ,使离心管中 A23187 的浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,分别在 10、20、30、40、50、60、70、80、100、120 min 后加入 75 μL 的 25% 戊二醛固定液以中止反应,其中有 1 管不加 A23187 作为对照组 1。另取 1 个塑料离心管,加入 480 μL Ca^{2+} -FASW 和 20 μL 精子悬液作为对照组 2。

精子顶体反应的最佳诱导条件测定 pH、 Ca^{2+} 及 A23187 是影响精子顶体反应的关键因素^[7-8]。本实验采用此 3 个因子:A 因子,pH 取 6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0 共 5 个梯度;B 因子, Ca^{2+} 取 0.10%、0.15%、0.20%、0.25% 和 0.30% 等 5 个梯度;C 因子,A23187 取 30、40、50、60 和 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 共 5 个梯度。采用 $L_{25}(5^6)$ 的正交表进行实验,反应 50 min 后,用戊二醛固定。每一试样重复计数 3 次,每次随机镜检约 200 个精子,计算平均顶体反应率。

卵水的诱导实验 取成熟期雌蟹,解剖取出卵巢,剪碎后浸泡于预冷的过滤海水中,4 °C 下放置 24 h,取上清液即为卵水,于 -20 °C 冷冻备用。取 0.5 mL 卵水,加入适量精子沉淀,轻微震荡制成精子悬液,室温下处理 50 min 后,戊二醛固定,计算顶体反应率。

雄蟹贮精囊的精子顶体反应诱导实验 取成熟雄蟹贮精囊,利用“精子样品制备”中的方法制成精子悬液。在上述实验所得出的最佳诱导条件下,检测其顶体反应率。

1.3 数据处理

实验数据用“平均值 \pm 标准差”表示。采用 SPSS 16.0 软件进行数据处理,并进行 t 检验或单因子方差分析(One-Way ANOVA),LSD 多重比较和 Duncan 检验。

正交实验数据处理方法 各因素同一水平之和(T 值)的计算:A 因子所对应的 T_1 值是正交表第 1 列数字“1”所对应的实验结果之和, T_2 值是正交表第 1 列数字“2”所对应的实验结果之和,以此类推,可计算出其它 T 值。各因素同一水平的平均值(\bar{X} 值)的计算:A 因子所对应的(\bar{X}_1)值为(T_1 值/正交表第 1 列数字“1”的重复次数),(\bar{X}_2)值为(T_2 值/正交表第 1 列数字“2”的

复次数),以此类推,可计算出其它(\bar{X})值。极差(R 值)能表明因素的主次顺序,即 R 值越大,该因子的水平变化对结果的影响越大,该因子就越重要。A 因子所对应的 R 值 = A 因子所对应的(\bar{X}_1)、(\bar{X}_2)、(\bar{X}_3)、(\bar{X}_4)和(\bar{X}_5)中最大值减去最小值,同理可得出 B、C 因子的 R 值。

2 结果

2.1 日本蟳精子顶体反应过程中的形态变化

未发生顶体反应的日本蟳成熟精子形状不规则,宽约 3 μm ,辐射臂向四周伸出(图版-1)。核膜内陷成核杯,染色质呈细丝状或颗粒状,散布于核区,并延伸至辐射臂中(图版-8)。球形顶体位于核杯腔内,由头帽、顶体管和顶体囊三部分组成。顶体管前段含有纵行排列的细管状结构,构成穿孔器。顶体囊根据电子密度的不同可分为内层和外层,呈同心圆状包裹着顶体管。

日本蟳精子的顶体反应过程可分为 4 个阶段:第 I 阶段:头帽隆起,辐射臂未见明显收缩(图版-2,9)。第 II 阶段:头帽破裂,顶体囊外翻(图版-10)。随着头帽孔的形成,顶体囊连同包裹的顶体管逐渐往外翻出,最终外翻部分长约 2.3 μm ,核呈约 3.4 $\mu\text{m} \times 2.3 \mu\text{m}$ 的扁圆形,精子整体呈哑铃状(图版-3,11)。此阶段辐射臂数量有减少现象,核表面较以前平滑。第 III 阶段:穿孔器前伸(图版-4),前伸长度约 1.1 μm ,使精子总长度达 5.7 μm 左右。顶体颗粒聚集于顶体管后段,围脖状头帽环绕着顶体管与核连接处(图版-12)。第 IV 阶段:穿孔器断裂,顶体囊外层脱落,顶体丝形成(图版-5,6)。顶体丝由顶体囊内层和顶体管后段构成。于顶体丝前端的穿孔器断裂处,可见有囊泡状顶体颗粒向外释放(图版-13,14),核呈扁圆形、体积缩小至 2.3 $\mu\text{m} \times 1.4 \mu\text{m}$ (图版-7)。

2.2 日本蟳精子在不同诱导时间下的顶体反应率

由表 1 可见,在含有 0.20% CaCl_2 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A23187 的条件下,日本蟳精子顶体反应率随着诱导时间的延长而逐渐升高,50 min 时可达 50.15% \pm 0.75%,50 min 后精子顶体反应率增速减慢。对照组 1 中含有 0.20% CaCl_2 但未添加 A23187,精子顶体反应率较低,至 120 min 时仅达 13.81% \pm 1.18%。而用 Ca^{2+} -FASW 配

制的对照组 2 中,有少数精子出现顶体反应的第 I、第 II 阶段,但没有发现完成顶体反应全过程的精子。

2.3 正交实验分析

正交实验结果见表 2,3 个因子中,以 A 因子—pH 的 *R* 值最大,所以 pH 是主要影响因子,其次是 A23187 浓度, CaCl₂ 浓度的影响程度较 A23187 浓度略低。从各 *T* 值可得出较好的组合是 A₃B₅C₄, 即 pH 为 8.0、CaCl₂ 浓度为 0.30%、A23187 浓度为 60 μg/mL。在本实验的 25 个组合中,以第 12 号处理 A₃B₂C₄ 最好:pH 为 8.0、CaCl₂ 浓度为 0.15%、A23187 浓度为 60 μg/mL(表 3)。

按照 A₃B₅C₄ 和 A₃B₂C₄ 两种组合进行精子顶体反应的诱导实验, A₃B₅C₄ 组的顶体反应率为 80.41% ± 1.29%, A₃B₂C₄ 组的顶体反应率为 73.28% ± 2.67%。表明日本蠋精子顶体反应的最佳诱导条件为 pH 8.0、CaCl₂ 浓度 0.30%、A23187 浓度 60 μg/mL。

表 1 日本蠋精子不同诱导时间下的顶体反应率
Tab.1 The acrosome reaction rate of sperm from *C. japonica* after different induction period

处理时间(min) induction period	实验组(%) experimental group	mean ± SD	
		对照组 1(%) control group 1	对照组 2(%) control group 2
10	13.94 ± 0.75 ^a	2.52 ± 0.49 ^a	0
20	15.61 ± 0.63 ^a	5.53 ± 0.46 ^b	0
30	19.49 ± 0.96 ^b	7.21 ± 1.04 ^{bc}	0
40	43.37 ± 1.06 ^c	9.73 ± 0.66 ^c	0
50	50.15 ± 0.75 ^d	11.07 ± 0.45 ^{cd}	0
60	52.93 ± 1.44 ^{de}	12.52 ± 0.35 ^{de}	0
70	56.47 ± 1.06 ^{ef}	12.71 ± 0.89 ^{de}	0
80	59.42 ± 2.43 ^{fg}	13.23 ± 0.35 ^{de}	0
100	62.63 ± 1.19 ^g	13.61 ± 1.3 ^e	0
120	62.86 ± 1.58 ^g	13.81 ± 1.18 ^e	0

注:单因子方差分析,表中上标不同字母表示不同诱导时间的顶体反应率有显著差异($P < 0.05$)。

Notes: One-Way ANOVA. Data marked with different letter mean significant difference under the conditions of different induction period ($P < 0.05$).

表 2 日本蠋精子顶体反应正交实验结果

Tab.2 The results of acrosome reaction in sperm of *C. japonica* by orthogonal experiments

处理号 treatment no.	影响因素 factors of effect			顶体反应率(%) acrosome reaction rate
	A:pH	B:CaCl ₂ (%)	C:A23187(μg/mL)	
1	(1)6.0	(1)0.10	(1)30	33.94 ± 1.29
2	(1)6.0	(2)0.15	(2)40	35.89 ± 1.60
3	(1)6.0	(3)0.20	(3)50	29.17 ± 1.68
4	(1)6.0	(4)0.25	(4)60	27.78 ± 1.95
5	(1)6.0	(5)0.30	(5)70	32.66 ± 0.92
6	(2)7.0	(1)0.10	(2)40	31.76 ± 1.30
7	(2)7.0	(2)0.15	(3)50	22.07 ± 1.53
8	(2)7.0	(3)0.20	(4)60	44.24 ± 1.36
9	(2)7.0	(4)0.25	(5)70	38.68 ± 2.26
10	(2)7.0	(5)0.30	(1)30	46.81 ± 2.66
11	(3)8.0	(1)0.10	(3)50	43.17 ± 2.20
12	(3)8.0	(2)0.15	(4)60	73.65 ± 2.18
13	(3)8.0	(3)0.20	(5)70	48.50 ± 0.67
14	(3)8.0	(4)0.25	(1)30	68.33 ± 1.81
15	(3)8.0	(5)0.30	(2)40	60.03 ± 2.01
16	(4)9.0	(1)0.10	(4)60	46.08 ± 2.20
17	(4)9.0	(2)0.15	(5)70	60.58 ± 2.35
18	(4)9.0	(3)0.20	(1)30	52.21 ± 0.99
19	(4)9.0	(4)0.25	(2)40	57.21 ± 1.89
20	(4)9.0	(5)0.30	(3)50	53.37 ± 2.82
21	(5)10.0	(1)0.10	(5)70	42.03 ± 0.67
22	(5)10.0	(2)0.15	(1)30	33.99 ± 1.38
23	(5)10.0	(3)0.20	(2)40	34.56 ± 2.81
24	(5)10.0	(4)0.25	(3)50	42.79 ± 1.24
25	(5)10.0	(5)0.30	(4)60	50.83 ± 1.44

表3 日本蟳精子顶体反应正交实验分析
Tab.3 Data analysis of acrosome reaction in sperm of *C. japonica* by orthogonal experiments

影响因素 factors of effect	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	(\bar{X}_1)	(\bar{X}_2)	(\bar{X}_3)	(\bar{X}_4)	(\bar{X}_5)	R
A:pH	159.44	183.56	293.68	269.45	204.20	31.89	36.71	58.74	53.89	40.84	26.85
B;CaCl ₂	196.98	226.18	208.68	234.79	243.70	39.40	45.24	41.74	46.96	48.74	9.34
C;A23187	235.28	219.45	190.57	242.58	223.21	47.06	43.89	38.11	48.52	44.64	10.41

2.4 卵水的诱导实验

用卵水处理取自日本蟳雌蟹纳精囊的精子,可得到顶体反应率为 $73.87\% \pm 2.45\%$,与正交实验分析中用最佳诱导条件得到的顶体反应率: $80.41\% \pm 1.29\%$ 进行比较,经 t 检验,差异较显著 ($P < 0.05$)。

2.5 雄蟹贮精囊的精子顶体反应诱导实验

在最佳诱导条件下对取自雄蟹贮精囊的精子进行处理,可得到 $64.37\% \pm 3.36\%$ 的顶体反应率,与取自雌蟹纳精囊的精子顶体反应率: $80.41\% \pm 1.29\%$ 进行比较,经 t 检验,差异极显著 ($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 顶体反应过程中精子形态的变化

蟹类精子顶体反应过程中形态的变化特征既有一致性,也有互异性(表4)。中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)^[9] 和锯缘青蟹 (*Scylla serrata*)^[10] 精子在顶体反应起始时即有辐射臂收缩现象,三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)^[11] 精子辐射臂直至顶体反应最后阶段才开始收缩,而日本蟳精子的辐射臂收缩发生在顶体反应第II阶段,即顶体囊外翻时期。Mcknight等^[12] 认为使

表4 几种蟹精子顶体反应过程中的形态变化比较
Tab.4 Comparison of morphological changes of acrosome reaction in sperm of several crabs species

	中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> ^[9]	锯缘青蟹 <i>S. serrata</i> ^[10]	三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i> ^[11]	日本蟳 <i>C. japonica</i>
头帽隆起、破裂形成头帽孔 swelling of the apical cap and rupturing to form an aperture	+	+	+	+
辐射臂收缩发生阶段 the stage of contracting radial arms	I	I	IV	II
顶体囊外翻 eversion of acrosomal vesicle	+	+	+	+
穿孔器前伸长度(μm) elongation length of perforator	-	2.5	2.5	1.1
穿孔器断裂 rupture of perforator	-	-	-	+
顶体囊脱落 shedding of acrosomal vesicle	+	+	+	仅顶体囊外层脱落 shedding of acrosomal vesicle outer layer
顶体丝组成结构 composition of acrosomal filament	顶体管 acrosomal tubule	顶体管+“十字型”细管 acrosomal tubule and cruciform tube	穿孔器+靠近核的近端段 perforator and proximal piece near nucleus	顶体囊内层+顶体管后段 acrosomal vesicle inner layer and posterior segment of acrosomal tubule
顶体颗粒释放 releasing of acrosomal granules	-	-	-	+
核体积缩小 reduction of nuclear size	+	+	+	+

注:“+”表示精子顶体反应过程中发生了该形态变化;“-”表示文献报道中未发生或未提及该现象。

Notes:“+” indicates the morphological changes have happened during the acrosome reaction;“-” indicates the morphological changes did not happen during the acrosome reaction or it did not be mentioned in the literature.

精子能附着于卵子表面可能是辐射臂的唯一功能,堵南山等^[13]则认为辐射臂的收缩有助于精卵靠拢和头帽在卵膜上定位。从本实验日本蟳精子的辐射臂收缩发生时期来看,其辐射臂除了能增加精卵接触机会以外,辐射臂的收缩还可以升高精子细胞内压,对顶体囊外翻起到推动作用。

日本蟳精子穿孔器前伸约 1.1 μm ,而我们测得的日本蟳成熟卵子卵膜厚度约 2 μm ,所以穿孔器可插入卵膜中,但不能穿透卵膜。穿孔器内部纵行排列的细管状结构对穿孔器前伸运动起到机械支撑作用,其化学成分尚有待测定。穿孔器前伸完成后即断裂,顶体囊外层脱落、顶体丝形成,该现象与三疣梭子蟹^[11]精子的穿孔器构成顶体丝组成部分而不同,属首次报道。在顶体丝前端的穿孔器断裂处,顶体颗粒外排,释放顶体酶、溶解卵膜,打开精子入卵通道。另一方面,精子结构达到进一步简化及核体积缩小都利于精卵的结合。

3.2 日本蟳精子的顶体反应条件

正交实验结果表明 pH 是日本蟳精子顶体反应的主要影响因子,相同的结论也见于对中华绒螯蟹^[9]和锯缘青蟹^[10]精子顶体反应的研究报道。从表 5 可以看出,不同种类蟹类精子顶体反应的最佳诱导条件各不相同,这可能与物种差异以及对栖息环境的适应性有关。对于所检测的诱导精子顶体反应的 3 个影响因子来说:日本蟳和锯缘青蟹的最适 pH 均为偏碱性,而中华绒螯蟹的最适 pH 为偏酸性;CaCl₂ 最适浓度相近;A23187 最适浓度以锯缘青蟹和日本蟳较高,三疣梭子蟹最低;中华绒螯蟹的适宜诱导时间最长,日本蟳和三疣梭子蟹的适宜诱导时间均为 50 min,锯缘青蟹仅 40 min。在各自的最佳诱导条件下,所得到的顶体反应率以三疣梭子蟹最高(92.73%),锯缘青蟹(82.50%)和日本蟳(80.41%)相近,中华绒螯蟹较低(72%)。

表 5 几种蟹精子顶体反应的最佳诱导条件比较

Tab. 5 Comparison of optimal induced conditions of acrosome reaction in sperm of several crabs species

	中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> ^[9]	锯缘青蟹 <i>S. serrata</i> ^[10]	三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i> ^[2]	日本蟳 <i>C. japonica</i>
pH	6.0	9.0	-	8.0
CaCl ₂ (%)	0.20	0.25	-	0.30
A23187 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	40	64	30	60
诱导时间 (min) induction period	70	40	50	50
顶体反应率 (%) acrosome reaction rate	72	82.50	92.73	80.41

注:“-”表示文献报道中未提及。

Notes:“-” indicates it did not be mentioned in the literature.

离子载体 A23187 是精子顶体反应的人工诱导研究中常用的诱导剂,其作用是帮助打开细胞膜的通道、促进 Ca²⁺ 内流^[7],促进 cAMP 产生,激活 cAMP-PKA 系统,最终可使一些蛋白质磷酸化,同时 Ca²⁺ 启动细胞骨架系统,从而引发顶体反应^[14]。本实验发现在缺乏诱导剂的含 Ca²⁺ 人工海水中,精子顶体反应率仅有 13.81%,表明精子顶体反应的发生需要有诱导剂的激发作用。但离子载体 A23187 价格昂贵,而卵水成本低廉,从生产实践的角度来说更加适用。目前对卵水的诱导效果尚无一一致结论:堵南山等^[13]用中华绒螯蟹卵水处理精子,获得高达 93% 的顶体反应率;朱冬发等^[11]采用刚开始排卵的雌蟹卵巢制备卵水,对三疣梭子蟹精子的顶体反应诱导率为 84.83%,甚至高于离子载体 A23187;王艺磊等^[10]用卵水处理锯缘青蟹精子,基本上不发生顶体反应,并认

为原因之一是卵子成熟度不够;而本研究中用成熟期雌蟹卵巢制备的卵水诱导率(73.87%)低于离子载体 A23187(80.41%)。Wang 等^[15]也发现卵水诱导的精子顶体反应不稳定。所以卵水的制备方法、成分组成及诱导机制等仍有待于进一步研究。

用相同的诱导条件处理取自锯缘青蟹雄蟹贮精囊的精子,其顶体反应不能完全完成,且精子在纳精囊中会发生结构上的变化,故推测锯缘青蟹的精子可能在交配后储存于纳精囊的过程中经历了获能的过程^[10]。而多数学者认为无脊椎动物精子是无需获能的^[16],Lin^[17]和张伟权等^[18]分别在斑节对虾(*Penaeus monodon*)和凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)的人工授精实验中,采用从雄虾精荚获得的精子成功地使虾卵受精。本实验前期的工作虽然发现日本蟳雄体贮精囊和雌体纳

精囊中的精子结构上有一定差异(另文发表),但经诱导后前者却可得到 64.37% 的顶体反应率,因此有必要对两类精子的顶体酶活力及受精率做深入研究,将有助于开展日本扇的人工授精工作。

青岛医学院电镜室谭金山老师对本工作给予大力支持和帮助,谨致谢忱。

参考文献:

- [1] 李霞. 水产动物组织胚胎学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006; 217-220.
- [2] 朱冬发, 周帅. 三疣梭子蟹精子活力的评价方法[J]. 水产学报, 2008, 32(5): 765-771.
- [3] 梁象秋, 方纪祖, 杨和荃. 水生生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996; 360.
- [4] 王春琳, 陈建青, 叶晓园, 等. 日本扇的营养成分组成分析[J]. 营养学报, 2005, 27(1): 81-83.
- [5] 王春琳, 蒋霞敏, 陈惠群, 等. 日本扇繁殖生物学的初步研究 II. 雄性繁殖习性及其胚胎发育[J]. 东海海洋, 2000, 18(1): 43-49.
- [6] Leung T J R, Lawrence A L. Observation on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions [J]. Aquaculture, 1987, 65: 363-370.
- [7] Bhavanishankar S, Subramoniam T. Cryopreservation of spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) [J]. J Exp Zool, 1997, 277: 326-336.
- [8] Lindsay L L, Clark J W H. Proloading of nucromolar intracellular Ca^{2+} during capacitation of *Sicyonia ingentis* sperm, and the role of the pH decrease during the acrosome reaction [J]. J Exp Zool, 1992, 262: 219-229.
- [9] 夏爱军, 丁淑燕, 潘建林, 等. 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 精子的形态和顶体反应的研究 [J]. 南京大学学报: 自然科学版, 2007, 43(2): 139-144.
- [10] 王艺磊, 张子平, 谢芳靖, 等. 锯缘青蟹精子顶体反应的研究 [J]. 动物学报, 2001, 47(3): 310-316.
- [11] 朱冬发, 王春琳, 余红卫, 等. 三疣梭子蟹精子顶体反应过程中的形态和结构变化 [J]. 动物学报, 2004, 50(5): 800-807.
- [12] Mcknight C E, Hinsch G W. Sperm maturation and ultrastructure in *Scyllarus chacei* [J]. Tissue and Cell, 1986, 18(2): 257-266.
- [13] 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.
- [14] Lefievre L, Jha K, Delamirande E, et al. Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction [J]. J Androl, 2002, 23(5): 709-716.
- [15] Wang Q Y, Misamore M, Jiang C Q, et al. Egg water induced reaction and biostain assay of sperm from marine shrimp *Penaeus vannamei*: Dietary effects on sperm quality [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1995, 26: 261-271.
- [16] Browder L W. Developmental biology [M]. Philadelphia: Saunders College, 1991: 132-135.
- [17] Lin M N. Spermatophore transplantation and artificial fertilization in grass shrimp [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1986, 52(4): 585-589.
- [18] 张伟权, 于琳汀, 童保福, 等. 南美白对虾全人工授精技术研究 [J]. 海洋与湖沼, 1993, 24(4): 428-432.

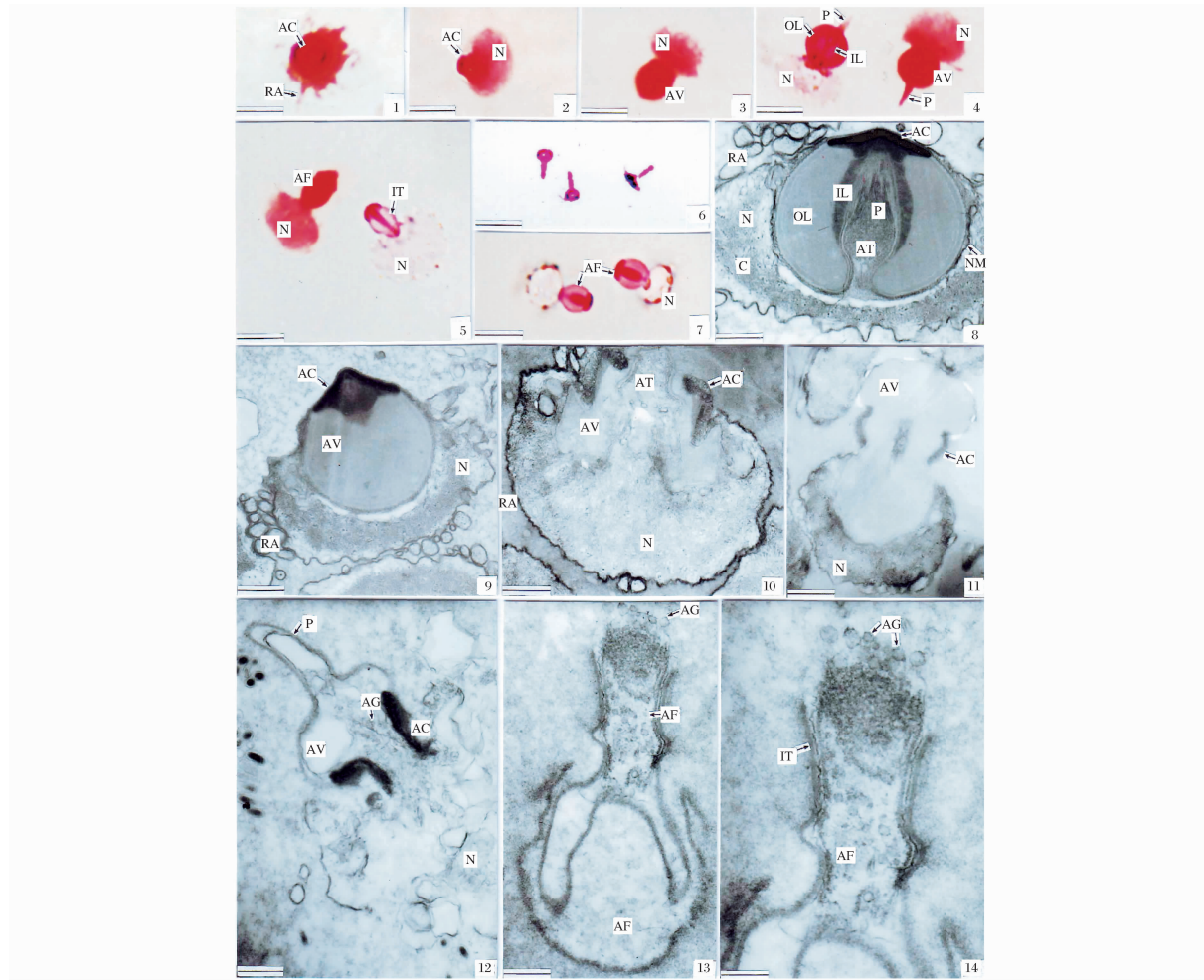
Morphological changes and induced conditions of acrosome reaction *in vitro* induction of sperm from marine crab (*Charybdis japonica*)

XU Xing-hong*, YAN Bin-lun, XU Jia-tao, XU Guo-cheng, SHAO Ying-ze, WU Jian-xin, DAI Jun
(Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: *Charybdis japonica* is an important marine crab widely distributed in China sea area. The main purpose of the study was to provide a theory basic for the research of reproduction biology and promote the progress of artificial breeding technology of *C. japonica*. The morphological changes of sperm during the acrosome reaction in *C. japonica* were studied in detail with light and transmission electron microscope, and the optimal induced conditions of acrosome reaction *in vitro* was obtained by orthogonal experiments. Then the induced effect of ionophore A23187 and egg-water was investigated by contrast experiment, and the acrosome reaction rate of the sperm collected from male seminal receptacle has been analysed induced by treatment with ionophore A23187. The process of acrosome reaction consists of four consecutive stages: (1) swelling of the apical cap, (2) the apical cap ruptures to form an aperture which acrosomal vesical can evert through it and radial arms contract, (3) elongation forward of perforator and aggregation of acrosomal granule in the posterior segment of acrosomal tubule, (4) rupture of perforator and shedding of the acrosomal vesicle outer layer result in formation of the acrosomal filament, then acrosomal granules release out and nuclear size reduce. Most of the acrosome reaction of *C. japonica* sperm were complete in 50 minutes. Three factors with five levels including a series of pH (6.0, 7.0, 8.0, 9.0 and 10.0), a series of different concentrations in Ca^{2+} (0.10%, 0.15%, 0.20%, 0.25% and 0.30%) and A23187 (30, 40, 50, 60 and 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were chosen to assay the optimal induced conditions for the acrosome reaction in sperm of with an orthogonal experiment. The highest rate (80.41%) of the acrosome reaction in sperm collected from female spermatheca can be achieved when sperm exposed to 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A23187, 0.30% CaCl_2 at pH = 8.0 in Ca^{2+} free artificial seawater for 50 minutes, but the acrosome reaction rate of the sperm is 73.87% induced by egg-water. 64.37% of acrosome reaction rate can be achieved by treating the sperm taken from male seminal receptacle with the optimal induced conditions.

Key words: *Charybdis japonica*; sperm; acrosome reaction; morphological changes; induced conditions

Corresponding author: XU Xing-hong. E-mail: xhxu119@163.com



图版 日本螯精子顶体反应的光镜及透射电镜观察

1~7. 光镜下精子顶体反应全过程 $\times 4\ 000$, 标尺 $2.5\ \mu\text{m}$: 1. 未发生顶体反应的精子; 2. 顶体反应第 I 阶段的精子; 3. 顶体反应第 II 阶段的精子; 4. 顶体反应第 III 阶段的精子; 5. 顶体反应第 IV 阶段的精子; 6. 从反应后精子脱落下穿孔器; 7. 核体积缩小的精子; 8~14. 透射电镜下精子顶体反应全过程: 8. 未发生顶体反应的精子纵切 $\times 20\ 000$, 标尺 $0.5\ \mu\text{m}$; 9. 第 I 阶段精子纵切, 头帽隆起 $\times 15\ 000$, 标尺 $0.67\ \mu\text{m}$; 10. 第 II 阶段初期精子纵切, 头帽破裂、形成头帽孔 $\times 20\ 000$, 标尺 $0.5\ \mu\text{m}$; 11. 第 II 阶段后期精子纵切, 顶体囊外翻 $\times 12\ 000$, 标尺 $0.84\ \mu\text{m}$; 12. 第 III 阶段精子纵切, 穿孔器前伸 $\times 20\ 000$, 标尺 $0.5\ \mu\text{m}$; 13. 第 IV 阶段精子纵切, 穿孔器断裂, 顶体囊外层脱落, 顶体丝形成, 顶体颗粒向外释放 $\times 25\ 000$, 标尺 $0.4\ \mu\text{m}$; 14. 顶体颗粒向外释放 $\times 40\ 000$, 标尺 $0.25\ \mu\text{m}$. AC: 头帽; AF: 顶体丝; AG: 顶体颗粒; AT: 顶体管; AV: 顶体囊; C: 染色质; IL: 顶体囊内层; N: 细胞核; NM: 核膜; OL: 顶体囊外层; P: 穿孔器; RA: 辐射臂。

Plate The process of acrosome reaction of the sperm in marine crab *C. japonica* by light and transmission electron microscope

1-7. The process of acrosome reaction (AR) of the sperm in light microscope $\times 4\ 000$, Bar = $2.5\ \mu\text{m}$: 1. Unreacted sperm; 2. Sperm in the 1st stage of the AR; 3. Sperm in the 2nd stage of the AR; 4. Sperm in the 3rd stage of the AR; 5. Sperm in the 4th stage of the AR; 6. Perforator separated from reacted sperms; 7. Sperm with reduced nucleus; 8-14. The process of acrosome reaction (AR) of the sperm in transmission electron microscope: 8. Longitudinal section of unreacted sperm $\times 20\ 000$, Bar = $0.5\ \mu\text{m}$; 9. Sperm in the 1st stage of the AR, showing swelling of the apical cap, $\times 15\ 000$, Bar = $0.67\ \mu\text{m}$; 10. Sperm in the early period of the 2nd stage of the AR, showing the apical cap ruptures to form an aperture $\times 20\ 000$, Bar = $0.5\ \mu\text{m}$; 11. Sperm in the later period of the 2nd stage of the AR, showing eversion of the acrosomal vesicle $\times 12\ 000$, Bar = $0.84\ \mu\text{m}$; 12. Sperm in the 3rd stage of the AR, showing elongation forward of perforator $\times 20\ 000$, Bar = $0.5\ \mu\text{m}$; 13. Sperm in the 4th stage of the AR, rupture of perforator and shedding of the acrosomal vesicle outer layer result in formation of the acrosomal filament, acrosomal granules release out $\times 25\ 000$, Bar = $0.4\ \mu\text{m}$; 14. Acrosomal granules release out $\times 40\ 000$, Bar = $0.25\ \mu\text{m}$; AC: Apical cap; AF: Acrosomal filament; AG: Acrosomal granule; AT: Acrosomal tubule; AV: Acrosomal vesicle; C: Chromatin; IL: Inner layer; N: Nucleus; NM: Nuclear membrane; OL: Outer Layer; P: Perforator; RA: Radial arm.