

日本蟳精子结构及环境因子对精子存活率的影响

许星鸿¹, 阎斌伦¹, 徐加涛¹, 徐国成¹, 浦寅芳¹, 吴建新¹

(1. 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: 以光镜和电镜观察了日本蟳精子的形态结构, 对雄体贮精囊和雌体纳精囊中的精子结构进行了比较, 并研究了 pH, 盐度对日本蟳精子存活率的影响规律, 结果表明: 日本蟳精子为非鞭毛型, 主要由顶体、核杯、膜复合体和辐射臂等组成, 其中顶体呈球形或近球形, 可分成头帽、顶体管和顶体囊三部分。核杯包裹整个顶体外围, 染色质呈细丝状或颗粒状。辐射臂向精子四周发出, 内含核质, 没有运动能力。雄体贮精囊中的精子包裹在椭圆形精荚中, 而雌体纳精囊中的精子呈弥散状, 精子顶体管中有囊泡状结构、中心体位置前移、胞质透明区扩大, 而且有些精子已崩解。精巢表面 pH 为 6.5 ± 0.2 , 精液 pH 为 7.0 ± 0.2 , 精子密度平均为 $(3.47 \times 10^9 \pm 0.42 \times 10^9)$ 个/cm³。精子的适宜 pH 为 7~9, 最适 pH 为 8; 适宜盐度为 20~30, 最适盐度为 25。

关键词: 日本蟳; 精子; 形态结构; 存活率; pH; 盐度

中图分类号: Q959.223

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2010)05-0093-07

1 引言

日本蟳 (*Charybdis japonica*) 隶属于甲壳纲 (Crustacean) 梭子蟹科 (Portunidae), 俗称靠山红、赤甲红等, 广泛分布于我国各海区^[1]。其肉味鲜美、营养丰富, 并具有清热、滋补、消肿等功效, 为经济价值较高的大型海产蟹类^[2-3]。由于近年来的滥采滥捕加上环境污染, 致使日本蟳天然资源量日趋衰竭, 亟待发展日本蟳的人工增养殖。目前关于日本蟳繁殖生物学的资料较少, 仅见王春琳等^[4-5]对浙江象山港日本蟳的繁殖习性、胚胎发育进行了初步研究, 并且采用扫描电镜对日本蟳的精子表面形态进行了观察。本实验对日本蟳精子的显微和超微结构进行了详细研究, 并分析了环境因子对日本蟳精子存活率的影响规律, 旨在为日本蟳的人工繁育技术及生殖生理的深入研究提供理论基础。

2 材料与方法

2.1 材料

雄性日本蟳于 2007 年 5 月下旬购自连云港海产品市场, 共 30 个, 甲长为 4.5~6.9 cm, 甲宽为 6.3~8.8 cm。

2.2 方法

2.2.1 显微结构观察

活体解剖取出精巢, 用 Bouin 液固定, 石蜡包埋, 切片厚 6~7 μm , 苏木精-伊红染色, Nikon E1000 显微镜观察、摄影。

取精巢于研钵中, 加入少量无钙离子人工海水 (Ca²⁺-FASW)^[6] 研磨 5 min, 用 200 目筛绢网过滤以去除组织碎片制成精子悬液。取 1 滴精子悬液于干净载玻片上, 用涂片法制片, 用 2% 曙红 B 染色液染色 4 min, 显微镜下观察并摄影。

2.2.2 超微结构观察

分别从雄体贮精囊和雌体纳精囊中获取精荚,

收稿日期: 2010-01-12; 修订日期: 2010-05-14。

基金项目: 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)。

作者简介: 许星鸿 (1970—), 女, 江苏省泰兴市人, 副教授, 硕士, 主要从事海洋动物发育生物学研究。E-mail: xhxu119@163.com

用 2.5%戊二醛预固定(4℃),1%锇酸后固定,梯度乙醇脱水,用 Epon812 环氧树脂包埋。用 LKB-Nova 超薄切片机切片,用醋酸铀和柠檬酸铅双染色,用日本电子 JEM-1200EX 型透射电镜观察、摄影。

取精荚和上述精子悬液,用 2.5%戊二醛和 1%锇酸双固定,用梯度乙醇脱水,低温真空干燥后喷金,用日本电子 JSM-6390LA 型扫描电镜观察、摄影。

2.2.3 精液 pH 值和精子密度的测定

采用上海理达仪器厂 PHS-3CW 型 pH 计测定精巢表面及精液的 pH 值。取稀释后的精子悬液用血球计数板测定精子的密度。测定个体数为 6 个。

2.2.4 环境因子对精子存活率的影响

采用 2.2.1 节的方法制备精子悬液,1 000 r/min 离心 5 min,取得白色精子沉淀,4℃保存备用。

(1)以上述无钙离子人工海水作为基础培养液,用 0.1 mol/dm³ 的 NaOH 和 HCl 溶液调节 pH 至 5,6,7,8,9,10,11 共 7 个 pH 梯度,依次为实验 1~7 组。取精子沉淀,测初始存活率后置于各实验组中,用枪头吹打散开,15℃保存(日本螭繁殖盛期水温变化范围在 15.0~26.5℃,另文发表,本实验取下限低温值),并分别于 1,4,24,48,72 h 时测定精子存活率。

(2)用 NaCl 和蒸馏水配制 15,20,25,30,35,40,45 共 7 个盐度梯度,依次为实验 1~7 组,各组 pH 均调节至 8.0。取精子沉淀于各实验组中,用枪头吹打散开,15℃保存,并分别于 1,4,24,48,72 h 时测定精子存活率。

(3)测定精子存活率采用曙红 B 染色法,每次随机计数 200 个精子,分 4 个随机计数点,每个点约计 50 个精子,统计样品的精子存活率。各实验均重复 3 次,实验数据用“平均数加或减标准差”表示。采用 SPSS16.0 软件进行数据处理,并进行单因子方差分析(one-way ANOVA),LSD 多重比较和 Duncan 检验,显著性水平设计为 $P=0.05$, $P>0.05$ 表示差异不显著, $P\leq 0.05$ 表示差异显著。

3 结果与分析

3.1 日本螭精子的显微结构

精巢切片观察,生精小管中充满成熟的精子(见图 1-1)。精子为非鞭毛型,形状多样,呈扇形、圆球形或不规则形,直径约 2.5 μm。精子边缘呈

嗜碱性,染成蓝紫色,在精子一端凸起处有一嗜碱性颗粒,精子内部被染成红色的嗜酸性区域多呈 U 形。

涂片观察,活精子无运动能力,不着色透明或者部分轻微着色(见图 1-2):从精子正面看在其中心有一红色细环状,为精子的头帽,头帽外围的圆形阴影区为沟环;从精子侧面看仅在一端凸起的头帽处染成粉红色,而死精子全部染成红色,头帽、沟环以及向四周伸出的辐射臂清晰可见(见图 1-3)。发生顶体反应的活精子仅在顶体翻出囊基部呈红色,死精子顶体翻出囊呈红色或全部着色(见图 1-4)。

3.2 日本螭精子的超微结构

扫描电镜显示日本螭精荚呈椭球形,大小不一,直径约 20~50 μm(见图 1-5)。精荚壁较薄,经制片处理后出现褶皱,并紧贴着内部排列紧密的精子,表面可见颗粒状精液。单个精子呈球状,直径 2.5~3.3 μm(见图 1-6)。头帽略微突出,圆形沟环直径约 1 μm。沟环后精子表面伸出 10~20 条辐射臂,长约 3 μm。

透射电镜观察,日本螭精荚壁由外周精荚基质浓缩而成,与内部精荚基质无明显界限(见图 1-7)。精荚内精子排列不规则,在一个切面上可同时看到精子被纵切、横切及斜切的形态。在精子纵切面可见核膜内陷成圆形核杯,染色质呈细丝状或颗粒状,散布于核区,并延伸至辐射臂中(见图 1-8)。核杯腔最宽处约 2 μm,内含球形或近球形顶体。顶体由头帽、顶体管和顶体囊三部分组成。头帽电子密度最高,呈圆锥状突起覆盖在顶体管和顶体囊的前端。顶体管呈子弹形,前端略尖,其前段含有多个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、中间层和外层,呈同心圆状包裹着顶体管(见图 1-9),其中以内层和外层电子密度较高,中间层电子密度略低,但最厚,外层最薄。少量细胞质夹在核杯和顶体之间,在核杯前端可看到线粒体及小囊泡结构,为膜复合体(见图 1-8,10)。中心体分布在顶体管的下方,呈圆柱状,与顶体管垂直,两个中心粒相距约 0.6 μm(见图 1-9,11)。部分精子中可观察到胞质透明区(见图 1-10)。

纳精囊中的精子呈弥散状,有些精子已崩解(见图 1-12)。与雄体精子相比,取自纳精囊的精子在结构上出现一定的变化:顶体管中的纵行细管状结构变成囊泡状;中心体位置前移;胞质透明区扩大(见图 1-13)。

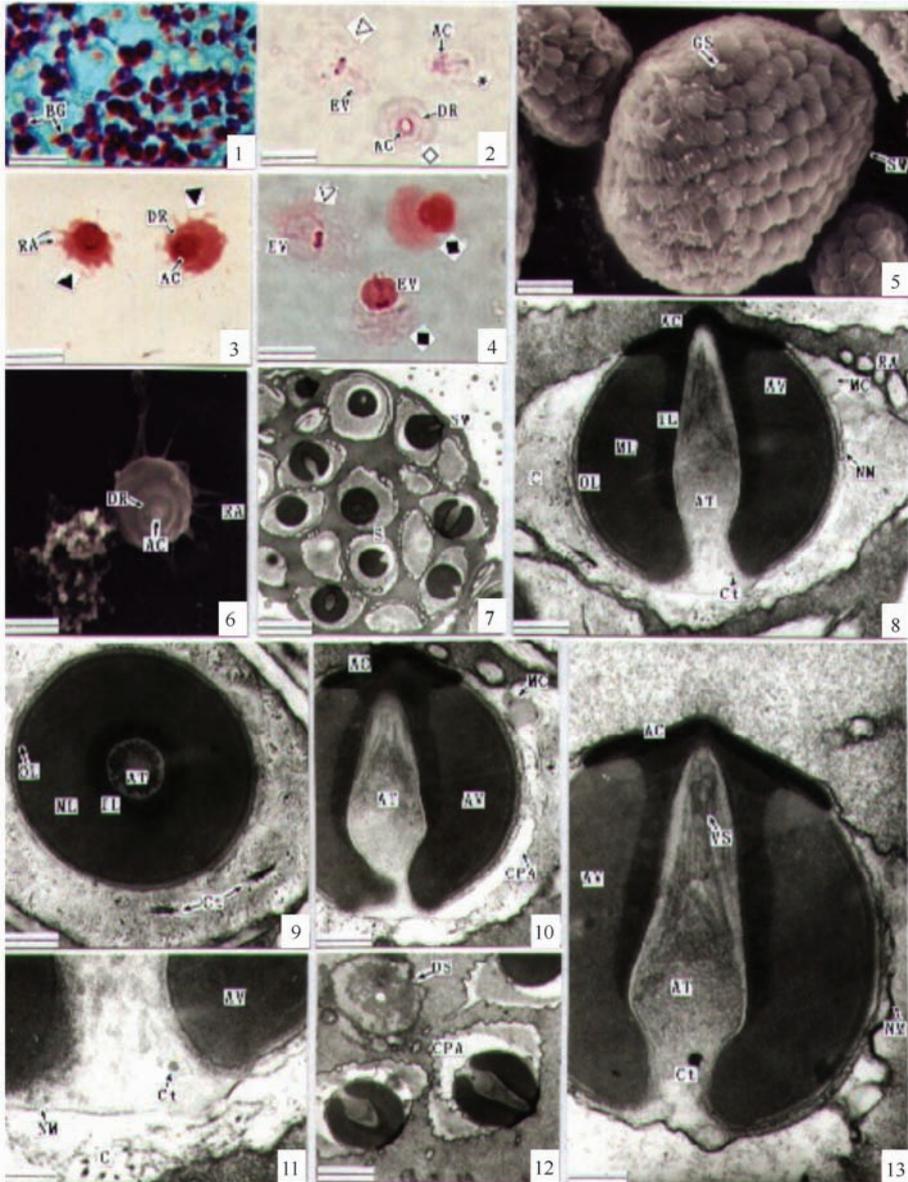


图1 日本蜚精子的光镜及电镜观察

1. 精巢横切(H. E. 染色),表示精子内嗜碱性颗粒(↑)×1 000,标尺10 μm;2-4. 精子涂片(曙红B染色),表示活精子正面(◇)、活精子侧面(*)、死精子(▲)、发生顶体反应的活精子(△)和死精子(◆)×2 000,标尺5 μm;5. 精荚扫描电镜照片,表示颗粒状精液(↑)×1 700,标尺5.88 μm;6. 精子扫描电镜照片×5 100,标尺1.96 μm;7. 精荚透射电镜照片×3 000,标尺3.33 μm;8. 贮精囊内精子纵切×18 000,标尺0.56 μm;9. 贮精囊内精子横切×18 000,标尺0.56 μm;10. 贮精囊内精子纵切,表示膜复合体(↑)×18 000,标尺0.56 μm;11. 贮精囊内精子纵切,表示中心体(↑)×45 000,标尺0.22 μm;12. 纳精囊内精子切片,表示崩解精子(↑)×6 000,标尺1.67 μm;13. 纳精囊内精子纵切,表示顶体管中囊泡状结构(↑)×30 000,标尺0.33 μm。AC. 头帽,AT,顶体管,AV. 顶体囊,BG. 嗜碱性颗粒,C. 染色质,Ct. 中心体,CPA. 胞质透明区,DR. 沟环,DS. 崩解精子,EV. 顶体翻出囊,GS. 颗粒状精液,IL. 内层,MC. 膜复合体,ML. 中间层,N. 细胞核,NM. 核膜,OL. 外层,RA. 辐射臂,S. 精子,SW. 精荚壁,VS. 囊泡状结构

3.3 日本蜚精液 pH 值和精子密度

日本蜚精巢表面 pH 为 6.5 ± 0.2 , 精巢内精液 pH 为 7.0 ± 0.2 。精子密度平均为 $3.47 \times 10^9 \pm 0.42 \times 10^9$ 个/mL。

3.4 环境因子对日本蜚精子存活率的影响

3.4.1 pH 对精子存活率的影响

从表 1 可以看出,日本蜚精子对碱性环境的耐受力要高于酸性环境。保存 1 h 后 pH8 组精子存

活率下降不明显,在 pH7,9,10 时实验组精子存活率有一定下降,但组间差异不显著。在 pH5,6,11 时实验组精子存活率下降迅速,保存至 24 h 时精子存活率仅为 15.76%,19.83% 和 24.74%,保存至

72 h 时均死亡。pH8 组保存 24 h 时的精子存活率可达 73.58%,显著高于其他各组。保存至 72 h 时 pH7~10 组都仍有一定的精子存活,以 pH8 和 9 两组较多,精子存活率分别为 16.37% 和 12.98%。

表 1 pH 对日本螳精子存活率的影响(均值加或减标准差)

时间/h	5	6	7	8	9	10	11
0	92.51±0.73 ^A	92.51±0.73 ^A	92.51±0.73 ^A				
1	42.42±2.53 ^B	54.85±1.32 ^B	72.57±2.33 ^B	87.41±1.79 ^{AB}	80.93±1.04 ^{BB}	76.24±2.20 ^{BCB}	61.26±3.58 ^{DB}
4	32.15±2.48 ^{DC}	37.58±1.08 ^{DC}	66.64±2.88 ^{BB}	78.82±3.49 ^{AB}	68.17±3.95 ^{BC}	66.88±2.74 ^{BC}	47.65±2.20 ^{CC}
24	15.76±1.82 ^{DD}	19.83±1.40 ^{ED}	43.27±1.75 ^{DC}	73.58±1.71 ^{AB}	61.12±3.04 ^{BD}	50.55±3.20 ^{CD}	24.74±1.99 ^{ED}
48	6.83±0.62 ^{DE}	11.91±2.06 ^{ED}	24.92±3.66 ^{BD}	43.16±2.55 ^{AC}	27.87±1.58 ^{BE}	23.45±1.02 ^{BE}	16.68±1.11 ^{CE}
72	0 ^{CF}	0 ^{CF}	10.94±1.35 ^{BE}	16.37±2.43 ^{AD}	12.98±2.75 ^{ABF}	9.35±1.99 ^{BFOCF}	

注:采用单因子方差分析,表中上标小写字母表示同一时间不同 pH 有显著差异($P<0.05$),大写不同字母表示同一 pH 不同时间有显著差异($P<0.05$)。

3.4.2 盐度对精子存活率的影响

从表 2 可见,在精子保存 1 h 后盐度为 20,25,30 的实验组日本螳精子存活率较高,其中以盐度 25 组的精子存活率下降最慢,保存 24 h 后精子存活率可达 85.46%。盐度 15 和 35 两组精子存活率下降略快,保存至 24 h 时的精子存活率分别为 51.83%

和 41.94%。盐度为 40 和 45 的实验组精子存活率下降迅速,并分别于保存 72 和 48 h 后全部死亡。保存至 72 h 时以盐度 25 组精子存活率 26.45% 为最高,盐度 20 和 30 组次之,精子存活率分别为 19.93% 和 16.27%,而盐度 15 和 35 两组仅有少量精子存活。

表 2 盐度对日本螳精子存活率的影响(均值加或减标准差)

时间/h	15	20	25	30	35	40	45
0	92.51±0.73 ^A						
1	77.58±1.92 ^B	88.23±1.61 ^{AB}	91.55±0.88 ^{AB}	85.49±1.85 ^{BB}	68.37±1.54 ^{DB}	42.55±2.89 ^{EB}	28.47±2.69 ^{FB}
4	68.42±1.73 ^C	82.73±2.59 ^{BB}	88.92±1.37 ^{AB}	78.67±1.41 ^{BC}	57.18±3.44 ^{DC}	29.55±2.12 ^{CC}	15.13±1.06 ^{IC}
24	51.83±2.18 ^{DD}	76.17±3.40 ^{BC}	85.46±2.62 ^{AB}	68.75±2.96 ^{CD}	41.94±2.12 ^{ED}	17.92±1.35 ^{FD}	6.55±1.99 ^{GD}
48	28.34±1.36 ^{DE}	49.61±1.88 ^{BD}	55.28±2.14 ^{AC}	42.35±0.94 ^{CE}	20.76±1.04 ^{EE}	4.47±0.67 ^{FE}	0 ^{GE}
72	8.73±1.07 ^{CF}	19.93±2.70 ^{BE}	26.45±1.94 ^{AD}	16.27±0.87 ^{BF}	5.62±0.73 ^{CF}	0 ^{DF}	0 ^{DE}

注:采用单因子方差分析,表中上标小写字母表示同一时间不同盐度有显著差异($P<0.05$),大写不同字母表示同一盐度不同时间有显著差异($P<0.05$)。

4 讨论

4.1 日本螳精荚的形态结构

软甲类与桡足类的精子被输精管末端的分泌物包被而形成精荚^[7]。精荚形态各异,在十足目爬行亚目中主要有三种类型:柄状(异尾类)、管状(长尾类)、球形或椭球形(短尾类)^[8]。日本螳精荚呈椭球形,与中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[9]相似,但直

径明显小于后者的 120~170 μm 。十足目大部分种类的精荚具有 1~3 层精荚壁,它们起到保护、抵御酸碱及抗菌等多重作用^[10-11]。日本螳精荚壁和内部精荚基质无明显差异,结构简单,保护作用较弱,可能与其在交配过程中的精荚和外界环境接触时间较短有关。

4.2 日本螳精子的类型与结构特征

日本螳精子为非鞭毛型,同其他甲壳动物^[7]。王

春琳等^[5]曾报道日本螯精子大小为 $(15\sim 30)\mu\text{m}\times(12\sim 26)\mu\text{m}$,而本实验采用光镜及电镜等多种方法观察到的日本螯精子直径均在 $2.5\sim 3.3\mu\text{m}$ 之间,与前者相差较大,但与堵南山等^[12]对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)精子的观察结果 $3.0\mu\text{m}$ 相近,略小于中华绒螯蟹($4.5\mu\text{m}$)和长江华溪蟹(*Sinopotamon yangtsekiense*)($5.7\mu\text{m}$)^[12-13]。日本螯精子的结构组成与其他短尾类相似,但也有一定的差异。日本螯精子核杯较深、顶体管中形成穿孔器的特点和同科的三疣梭子蟹相同,但前者顶体囊外层没有片层结构,辐射臂数量略多。

顶体囊内含顶体素或卵膜溶素,为数种蛋白酶的混合物^[12],可在精卵相遇时释放出溶解卵膜,打开精子入卵通道。日本螯精子顶体酶的具体成分、穿孔器的作用方式以及顶体反应条件有待于进一步研究。

在日本螯精子中可观察到胞质透明区,在以往的爬行亚目精子研究中未见报道。在秀丽白虾(*Exopalaemon modestus*)^[14]和日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)^[15]等游泳亚目精子核质中发现大量空泡,空泡有何作用尚不明确。

短尾类的非鞭毛型精子无运动能力,向四周发出的辐射臂可增加其与卵子相遇的机会。以往报道^[12]将辐射臂中的丝状物质称为微丝,笔者认为不太恰当。微丝为肌动蛋白单体组装成的细胞质骨架^[16],而辐射臂为细胞核向外延伸的突起外包一层细胞膜构成,内部的丝状物质应为染色质丝而非微丝。该结构有利于受精作用的完成。

爬行亚目精子的结构特征可以反映出各类群的生殖进化趋势^[12,17]。长尾类^[18]精子顶体结构简单,突露在核上,顶体囊仅具锥形顶体管。该类精子体积较大,如 *Homarus americanus*^[19]的精子全长达 $19.3\mu\text{m}$,其中顶体长 $14.0\mu\text{m}$ 。异尾类的精子具备了短而简单的初级顶体管,长度也明显缩短^[17]。*Diogenes custos*的精子在异尾类中是最长的,全长为 $10.0\mu\text{m}$,其中顶体长 $8.5\mu\text{m}$ 。短尾类精子顶体缩小呈球形内陷于核杯腔中,并出现了发达的顶体管和穿孔器^[12,20]。迄今发现的短尾类精子直径均小于 $5.7\mu\text{m}$ 。本实验中观察到的日本螯精子的结构特征与之相符。由此可见,爬行亚目精子结构的演化方向是:精子体积逐渐缩小,顶体结构由简单到复杂,顶体可视为爬行亚目的生殖进化特征。

4.3 雄体贮精囊和雌体纳精囊中的精子比较

日本螯雄体贮精囊中的精子贮存在精荚中,而雌体纳精囊中的精子分散成游离状态,可能是利于和卵子的结合。锯缘青蟹(*Scylla serrata*)纳精囊中的精子也呈分散状态^[21]。精荚在纳精囊中的裂解机制尚不清楚,有必要对日本螯纳精囊的结构及其内环境进行深入的研究,这将有助于开展精子的体外保存和人工授精工作。

林勤武等^[22]曾报道中国对虾雄体贮精囊与雌体纳精囊中的精子比较,有一定差异:前者较粗短、核膜完整、环状片层不发达等。本实验发现,与雄体精子相比,取自日本螯纳精囊的精子在结构上也出现一定的变化:顶体管中的纵行细管状结构变成囊泡状,中心体位置前移,胞质透明区扩大。笔者认为,这些变化是精子为发生顶体反应而作的准备:顶体管中出现的囊泡利于胞吐作用的进行,中心体位置前移与顶体管将要前伸有关,而胞质透明区扩大是由于精子变态期胞质的退化。在本实验中发现,取自日本螯雄体贮精囊的精子同样可大量发生顶体反应,所以对两类精子受精能力的差异程度还需进一步研究。

4.4 日本螯精子的活力

对于甲壳动物的非鞭毛型精子活力判断,无法采用常规的运动性指标,常以精子存活率来说明其活力状况。管卫兵等^[23]发现台盼蓝染色法适用于锯缘青蟹精子的活力评价,朱冬发等^[24]则认为在三疣梭子蟹精子活力判断中采用曙红 B 效果较好。本文在预实验中对台盼蓝和曙红 B 两种染料对日本螯精子的染色效果,认为台盼蓝染色后的精子蓝色深浅程度较难判断,而曙红 B 染色清晰,更适用于评价日本螯精子的活力。

在昆虫精子活力评价研究中,成功地采用了一些新方法^[25-26],如应用络合异硫氰酸荧光素的豌豆凝集素(FITC-PSA)进行精子顶体荧光标记对精子顶体反应的评价、对精子染色质结构进行分析、对精子死活的荧光直接进行评价、对精子顶体酶的活力进行测定等。这些方法是否适用于日本螯等甲壳动物精子的活力评价需要进一步研究。

日本螯栖息于低潮线附近,本实验测得的日本螯精子在盐度稍低且偏碱性的环境中存活率较高,与其成体的生活环境相符合。日本螯精巢表面 pH 为 6.5、精液 pH 为 7.0,均低于其最适 pH,类似的情况见于 Gattij 等^[27]对虹鳟鱼精子的研究

报道中“精子内环境 pH 值要比外环境下降 1 个 pH 单位”。关于“偏碱性的环境可以增强精子的活力”的特性也发现于海水鱼类^[28]和海洋环节动物^[29]。

中国海洋大学海洋生命学院姜明老师和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] 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.
- [2] 王春琳,陈建青,叶晓园,等.日本鳎的营养成分组成分析[J].营养学报,2005,27(1):81—83.
- [3] 刘洪军.海水经济蟹类养殖技术[M].北京:中国农业出版社,2002:246.
- [4] 王春琳,薛良义,刘凤燕,等.日本鳎繁殖生物学的初步研究:Ⅰ.雌性繁殖习性[J].浙江水产学报,1996,15(4):261—266.
- [5] 王春琳,蒋霞敏,陈惠群,等.日本鳎繁殖生物学的初步研究:Ⅱ.雄性繁殖习性及胚胎发育[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] 李霞.水产动物组织胚胎学[M].北京:中国农业出版社,2006:276.
- [8] DUDENHAUSEN E E, TALLBOT P. An ultrastructural comparison of soft and hardened spermatophores from the crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana[J]. Can J Zool, 1983, 61: 182—194.
- [9] 王群,赵云龙,赖伟,等.中华绒螯蟹精荚形成的超微结构研究[J].华东师范大学学报,2000,46(3):98—103.
- [10] BENINGER P G. Functional anatomy of the male reproductive system and the female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. fabricius) (Decapoda: Mjidae) and a hypothesis for fertilization[J]. J Crust Biol, 1988, 8(3): 322—332.
- [11] HINSCH G W. Ultrastructure of the sperm and spermatophores of the golden crab *Geraryon fenneri* and a closely related species, the red crab *G. quinqueeders*, from the eastern Gulf of Mexico[J]. Journal of Crustacean Biology, 1988, 8: 340—345.
- [12] 堵南山,赖伟,陈立侨,等.蟹类精子超微结构的比较研究[J].动物学研究,1999,20(5):372—378.
- [13] 王兰.长江华溪蟹精子的超微结构[J].动物学报,2000,46(2):227—229.
- [14] 姜叶琴,杨万喜.秀丽白虾精子结构及生殖进化特征[J].东海海洋,2002,20(2):45—50.
- [15] 杨万喜,周宏.日本沼虾生殖细胞核的形态变化及其在真虾部 Caridea 生殖进化中的地位[J].应用生态学报,2000,11(5):763—766.
- [16] 翟中和,王喜忠,丁明孝.细胞生物学[M].北京:高等教育出版社,2007:267.
- [17] TUDGE C C. Comparative ultrastructure of hermit crab spermatozoa (Decapoda, Anomura, Paguroidea) [J]. J Crust Biol, 1992, 12(3): 387—409.
- [18] BEACH D, TALBOT P. Ultrastructural comparison of sperm from the crayfishes *Cherax tenuimanus* and *Cherax albidus* [J]. J Crust Biol, 1987, 7(2): 205—218.
- [19] TALBOT P, CHANMANON P. Ultrastructure of sperm from the lobster, *Homarus americanus* [J]. J Ultrastruct Res, 1980, 70: 275—286.
- [20] 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.
- [21] 成永旭,李少菁,王桂忠.锯缘青蟹排卵后纳精囊及其内部精子的超微结构[J].上海水产大学学报,2000,9(1):69—71.
- [22] 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.
- [23] 管卫兵,王桂忠,李少菁,等.锯缘青蟹精子低温冷藏及精子活力的染色法评价[J].台湾海峡,2002,21(4):457—463.
- [24] 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.
- [25] HUNTER F M, BIRKHEAD T R. Sperm viability and sperm competition in insects[J]. Current Biology, 2002, 12: 121—123.
- [26] BERNASCONI G, HELLRIEGEL B, HEYLAND A, et al. Sperm survival in the female reproductive tract in the fly *Scathophaga stercoraria* (L) [J]. J Insect Physiol, 2002, 48: 197—203.
- [27] GATTI L, BILLARD R, Christen R. Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout spermatozoa: role in initiation of sperm motility [J]. Cell Physiol, 1990, 143: 546—554.
- [28] ANDRZEJ C. Factors affecting motility characteristics and fertilizing ability of sea Lamprey spermatozoa [J]. Transactions of American fisheries society, 2002, 131: 193—202.
- [29] 牛从从,张志峰,邵明瑜.单环刺螈精子生物学特性和环境因子的关系[J].中国水产科学,2005,12(5):556—561.

Spermatozoa morphology and influence of environmental factors on viability rates in crab *Charybdis japonica*

XU Xing-hong¹, YAN Bin-lun¹, XU Jia-tao¹, XU Guo-cheng¹, PU Yin-fang¹, WU Jian-xin¹

(1. Key Laboratory of Jiangsu Province for Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: The morphology and structure of sperm from the crab *Charybdis japonica* were observed in detail with a light and electron microscope, and the ultrastructural comparison of the spermatozoa collected from male seminal receptacle and female spermatheca has been summarized. Meanwhile the physiological density and pH of sperm were measured. The influence of pH and salinity on the sperm viability rates were also studied. The mature sperm of *Charybdis japonica* has not any flagella, and is consists of an acrosome, nuclear cup, membrane complex and 10~20 radial arms. The spherical acrosome is comprised of apical cap, acrosomal vesicle and acrosomal tubule. The acrosome is surrounded with nuclear cup which contains filamentous or grainular chromatin. The radial arms which extend from sperm surface were filled with karyoplasm and have no capable of movement. The sperm in male seminal receptacle forms many spheroidal spermatophore, but the sperm in female spermatheca is dispersed. Several ultrastructural differences exist in two sources sperm; the sperm from female spermatheca has vesicle-like structure in acrosomal tubule, the centrosome moves forward and cytoplasmic pellucid area becomes larger than the sperm from male seminal receptacle. The pH value of testis surface in *Charybdis japonica* is 6.5 ± 0.2 , while the pH value of semen is 7.0 ± 0.2 . The density of sperm is $3.47 \times 10^9 \pm 0.42 \times 10^9 / \text{mL}^{-1}$. For sperm viability, the optimum pH is 7~9, and the best is 8, the optimum salinity is 20~30, and the best is 25.

Key words: *Charybdis japonica*; spermatozoa; morphology; viability rates; pH; salinity