

三疣梭子蟹雄性生殖系统的组织学研究

李太武
(生物系)

张 峰
(大连水产学院)

苏秀榕
(食品生化所)

摘要 从组织学、组织化学两个方面研究了三疣梭子蟹的雄性生殖系统,其精巢是由无数的生殖小管盘绕成的,小管壁由位于基膜上的大部分生精上皮和少量管壁上皮构成,生精上皮不断向管腔中增殖,产生了不同的生殖带,生殖小管间充满着结缔组织,内有血管和神经等分布,前、中、后输精管壁组织结构相似,均由位于基膜上的单层柱状上皮和其外侧的环形横纹肌构成,上皮细胞具分泌功能,射精管壁亦由单层柱状上皮及内纵、外环两层横纹肌组成,精巢的发育有季节性的变化。

关键词 三疣梭子蟹, 雄性生殖系统, 组织学, 组织化学

中图分类号 Q954.6

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是我国著名的大型经济蟹类,北起辽东半岛南至广东沿海各地均有出产,黄、渤海和东海的产量均较大,它壳薄肉嫩,味美适口,但自然资源日渐贫乏,人工增殖将是大势所趋,迫切需要生殖等系统的结构及发育规律的资料,而到目前为止,尚未见这方面的系统报道,本文为满足养殖、渔业以及教学等方面的需要,特研究了该蟹的生殖系统的组织学和组织化学。

1 材料和方法

研究中所用材料是 1989 年 9 月至 1990 年 8 月从浙江舟山市定海区农贸市场采购的,每月下旬取材一次,所用样品的头胸甲长平均为 70mm 左右,所取材料均来自鲜活的个体。

将研究的雄性生殖系统解剖取出,分别置入卡诺氏液(无水乙醇:氯仿:冰乙酸=4.5:4.5:1)和波恩氏液中固定,系列浓度乙醇脱水、冬青油透明,石蜡包埋,切片厚 5~7 μ m, H. E. 染色, Olympus BH-2 显微镜观察并拍照。

用于组织化学研究的材料是经过卡诺氏液固定的,切片厚 5~7 μ m,共用以下 6 种方法进行了染色:

- (1) 用 Feulgen 法染 DNA,对照片为不经过 60℃ 1NHCl 水解。
- (2) 用汞-溴酚蓝(HgBpB)法染蛋白质。
- (3) 过甲酸-阿利辛蓝(Alcian Blue)法染胱氨酸。
- (4) 二甲氨基苯甲醛(DMAB)-亚硝酸盐法染色氨酸。
- (5) Alcian Blue 法染酸性粘液物质。
- (6) PAS 法染多糖,中性粘多糖、粘蛋白及糖蛋白、糖脂、不饱和脂肪酸及磷脂等,对

照片分别用 α -淀粉酶和唾液消化后再染色,另外,也用了不经过高碘酸处理的对照。

2 结果与讨论

2.1 结果

三疣梭子蟹的雄性生殖系统主要由精巢(testis)、输精管(vas deferrens)、射精管(ejaculatory duct)、副性腺(accessory gland)、阴茎(penis)和雄性附肢(male appendage)构成。

2.1.1 组织学(Histology)

2.1.1.1 精巢

精巢共一对,左右各一,在靠近幽门胃后方处愈合并从此发出输精管。光镜下,精巢外壁和其内的无数生殖小管(seminiferous tubule)盘绕而成。外壁为薄层结缔组织,并有层平滑肌存在,生殖小管间充填着结缔组织,内含血管,肌肉束等构造。血管粗细不一,壁多由单层立方上皮构成,细胞表面复盖着一层厚约 $4.6\mu\text{m}$ 的粘蛋白膜。从横切面看,生殖小管由位于基膜上的生精上皮(germinative epithelium)和管壁上皮构成。生精上皮主要精原细胞组成,而管壁上皮为单层柱状细胞。在发育高峰期,生精上皮不断向管腔内增殖产生了发育至不同阶段的生殖带(germinal zone)。此时,精原细胞大大减少,呈索状或新状位于小管的一角,在有的横切小管腔中,已经失去了精原细胞的踪迹。

精原细胞(spermatogonium)圆形或卵圆形,直径约 $11.5\mu\text{m}$,核近圆形,直径 $8\sim 9\mu\text{m}$,染色质稀疏,分散附着在核膜之内侧,核仁一个,十分明显(图1)。初级精母细胞(primary spermatocyte)略小于精原细胞,圆形,直径约 $9.2\mu\text{m}$,核圆形,直径约 $6.5\mu\text{m}$,染色质凝聚成团块状散布在核质中,核仁一个,较明显(图1)。在6、7、9月等的精巢中,可发现许多初级精母细胞减数分裂中期I分裂相(染色体集中在赤道板上)和减数分裂末期I分裂相(染色体呈半月形或短棍状)。次级精母细胞(secondary spermatocyte)与初级精母细胞相似,圆形,直径约 $7\sim 9\mu\text{m}$,核圆形,直径 $4.6\sim 5.5\mu\text{m}$,染色质凝聚在核膜之内,不见核仁,核质嗜碱性强(图2)。精细胞(spermatid)最小,可大致分为I、II两个阶段。精细胞I圆形,直径约 $4.5\mu\text{m}$,核半月形,直径约 $2.8\mu\text{m}$ (图2)。未成熟精子(immature sperm)圆形,直径约 $3.5\mu\text{m}$,位于营养细胞的网格中,营养细胞包围着未成熟精子,扁平状,核为短棍状,染色深。PAS染色证明,精细胞I弱阳性,说明已开始产生顶体颗粒(顶体内的部分物质是PAS阳性反应)。精细胞II阳性,顶体囊泡已产生。未成熟精子较强阳性,可见一明显的红点,说明顶体帽已产生。精子(sperm)成熟后即离开营养细胞网进入生殖小管腔中,并被运到输精管。

2.1.1.2 精巢的发育周期

精巢的发育有明显的季节性变化,1~3月,精巢体积逐渐变小,半透明,生殖小管中各个阶段的生殖细胞均存在,成熟精子不多,主要发育阶段是初级精母细胞以及初级精母细胞减数分裂后,末期I。4月,精巢体积最小,生殖小管中发育阶段停滞在精原细胞。5月,精巢体积较小,几乎透明。生殖小管中以初级精母细胞为主,精原细胞群呈新月状位于小管的一侧。可见到有少量初级精母细胞正进行到减数分裂中期I。6~7月,精巢体积逐渐增大,呈乳白色。生殖小管中主要为初级精母细胞,但有许多进行到减数分裂中期I,少

量达到末期 I (图 1)。从 8 月开始,发育逐渐加速,精巢体积继续增大,乳白色,生殖小管中出现了次级精母细胞,大量的精细胞和精子(图 2)。10 月份(16 日取的材料),精巢达到最大体积,混浊乳白色。大多数生殖小管内都充满了精细胞、未成熟精子和成熟精子。只有少数小管内一侧有少量精原细胞和一些初级精母细胞。此时,生殖小管的壁细胞由柱状变为立方甚至扁平。本月为精巢的发育高峰期。观察同时取的雌蟹受精囊,发现里边充有大量精子,而 9 月份的受精囊内精子较少,说明该蟹的交配时间(在浙江舟山沿海)为 9 月下旬至 10 月份。11 月,大多生殖小管腔内都含有初级精母细胞和初级精母细胞减数分裂末期 I,精原细胞呈索状存在。部分小管腔内充满精细胞,还有少量精子出现。12 月,大部分生殖小管中均是初级精母细胞和少量精原细胞,有些初级精母细胞在进行减数分裂。

2.1.1.3 输精管和射精管

前输精管(anterior vas deferens) 输精管中前输精管最细,管径为 $174\sim 322\mu\text{m}$,它紧接精巢,精巢中的无数输精细管汇合到前输精管,管壁由位于基膜上的单层柱状上皮及其外侧的薄层横纹肌和少量结缔组织构成。上皮具分泌功能,细胞的形状变化颇大,当腔内无内容物和内容物少时,呈高柱状;反之,呈矮柱状甚至立方形。细胞高为 $13\sim 55\mu\text{m}$,紧密排列,宽度难测。核椭圆形,长约 $11\mu\text{m}$,宽约 $5.5\mu\text{m}$,核仁 1 至多个,较明显。环形横纹肌层厚约 $1\mu\text{m}$ 。前输精管反复缠绕在一起,管间由结缔组织相连,结缔组织中有血管等分布(图 3,4)。

精子在精巢中成熟后,即转运到前输精管。在那里,它们浸在精液中,并由于管壁上皮分泌出的粘蛋白类(或糖蛋白)物质的分割,及管壁上皮细胞的向腔内延长和可能因肌肉层的波动状收缩,把精子群分成大小不同的团块,开始时的团块大多为三角形(图 3,4)。接着又由上皮分泌的含蛋白物质包围着这些精子团,这就是初级精荚壁的形成及精荚的产生。初级精荚壁厚约 $23\sim 32\mu\text{m}$,PAS 阳性,被 HgBpB 染成蓝绿色(图 4)。精荚(spermatophore)之间分布有絮状和颗粒状精液。

中输精管(middle vas deferens) 中输精管最粗,管径为 $765\sim 1413\mu\text{m}$,外观呈米黄色。管壁组织结构与前输精管相似,亦为单层柱状上皮及其外的环形横纹肌和结缔组织构成。上皮细胞也具有分泌功能,高约 $37\sim 64\mu\text{m}$,宽约 $10\mu\text{m}$ 。核椭圆形,长约 $11\mu\text{m}$,宽约 $5.5\mu\text{m}$ 。核仁一个,明显。肌层厚约 $4\sim 12\mu\text{m}$ 。中输精管也是盘绕在一起的,管间由结缔组织填充,内含血管等构造。

中输精管腔内充满精荚。精荚大小不一,均为圆球状,小的直径约 $51\mu\text{m}$,大者直径约 $211\mu\text{m}$ (图 5)。此时,已由次级精荚壁代替了初级精荚壁,看上去次级精荚壁更致密,也比较薄,厚度仅约 $4\mu\text{m}$ (图 5)。次级精荚壁 PAS 阴性反应,汞溴酚蓝弱阳性,过甲酸-Alcian Blue 弱阳性,说明是由含胱氨酸的蛋白质等合成的(不含多糖类),精荚之间有颗粒状的精液。

后输精管(posterior vas deferens) 本种蟹没有贮精囊的结构,也就是从中输精管开始至射精管这一段没有膨大,而是呈逐渐变细的管状,管径为 $783\sim 810\mu\text{m}$ 。后输精管盘绕程度相对较低,管间也有结缔组织,内含血管等。管壁的构造与前、中输精管的相似。单层柱状上皮细胞高约 $24\sim 46\mu\text{m}$,宽约 $2.8\sim 8\mu\text{m}$ 。核椭圆形,长约 $7.3\mu\text{m}$,宽约 $4.6\mu\text{m}$ 。核仁一个,明显。环形横纹肌厚约 $2\sim 6.5\mu\text{m}$ 。后输精管上皮同样具有分泌功能,而且同一横切面

上的细胞分泌的物质染色不同,形状也不同。有的细胞分泌细小的红色颗粒(图7);有的分泌含紫色颗粒的小泡,并以液泡状出现在管腔中(图6);有的细胞分泌染成红色的片状物(图8)。前者为PAS阳性,而后两者为PAS强阳性。在9、10月份的后输精管腔中,发现有少量精荚存在。而在以后的几个月中,未发现有精荚出现。而且,无论是9月、10月还是5月等的中输精管腔内都充满精荚,说明该种蟹贮存精荚的地方是中输精管而不是后输精管,同时也证明了9、10月份为其交配的季节。

射精管 位于后输精管之后,为细而直的小管,管径越来越细,约为 $288\sim 481\mu\text{m}$,具副性腺处管粗,无副性腺处管细。管的颜色由混浊乳白色至半透明。后输精管与射精管的界限从外形上不太好区分,但从组织结构上可见,出现副性腺处即为射精管的开始处。射精管穿过第五步足基部的肌肉群,直达阴茎。管壁由上皮层、肌层和外膜组成。上皮细胞有从单层柱状——矮柱状——单层立方的变化。因此,细胞高度区间为 $5\sim 36\mu\text{m}$,细胞排列紧密,界限不太清楚。高柱状细胞具分泌功能。管腔内有分泌物存在,核卵圆,长约 $5.5\mu\text{m}$ 、宽约 $2.8\mu\text{m}$ 。核仁一个,明显(图9)。肌层分为内纵、外环两层横纹肌,厚度分别为 $3.6\sim 14\mu\text{m}$ 、 $3.1\sim 13.2\mu\text{m}$ 。外膜较厚,由结缔组织构成,厚约 $92\sim 125\mu\text{m}$ 。

副性腺位于射精管的外膜中,为与射精管平行的短管状结构,开口于射精管中,其腺体管壁构造与射精管相似,上皮细胞的形状几乎相同,但最主要的区别是副性腺的肌层由内环、外纵两层横纹肌构成。管腔内有分泌物(图10)。

2.1.2 组织化学(histochemistry)

雄性生殖系统的组织化学结果见附表,Feulgen 阳性反应主要发生在各种组织细胞的核内,而且以初级精母细胞、次级精母细胞、精细胞和精子(未成熟与成熟)的核为强阳性反应,说明富含DNA。

精细胞、未成熟精子和成熟精子为PAS强阳性,说明富含糖类物质。而经 α -淀粉酶和唾液消化后,PAS仍为阳性,说明该糖类是粘多糖或糖蛋白而不是糖原。初级精荚壁为PAS阳性,HgBpB阳性,说明可能是由糖蛋白构成的。前、中、后输精管中的精液均为PAS阳性,HgBpB阳性,证明均为糖蛋白等。

所有组织细胞及其分泌物均为HgBpB阳性,而其中结缔组织和肌层均为强阳性,各种上皮细胞为较强阳性。精原细胞至精子,其阳性反应随细胞质的减少而渐弱,说明蛋白质主要存在细胞质中,核中含量较少。

除初级精荚壁和射精管分泌物不能确定外,其余均为过甲酸—Alcian 蓝阳性反应,说明含有少量胱氨酸。色氨酸存在于整个系统的各种组织结构中。

2.2 讨论

(1) 三疣梭子蟹的精巢构造同部分十足类及端足类的相似(Meusy, 1963; Joshi 和 Khanna, 1982; 堵南山等, 1988),也是由无数的生殖小管(相当于脊椎动物的生精小管)缠绕在一起构成的。其生精过程是分阶段进行的,即在一条小管的不同区段,生殖细胞发育的程度不同,呈波浪式进行。有的已经出现了成熟精子,有的却仍停留在精原细胞或精母细胞阶段,这就是为什么我们可以在一张片子上的不同管腔内看到不同的生殖带。但是,在发育高峰期,小管的各段均动员起来,迅速发育产生大量的精子,所以在9、10月份的精巢中,可见到大多数管腔内均发育至精细胞和精子阶段。从这种结构来看,三疣梭子蟹在

附表: 三疣梭子蟹雄性生殖系统组织化学测定结果

所测物质	方 法	精 巢						精细管		输 精 管						射精管		各部位
		精原细胞	精母细胞	精细胞	精子	助细胞	精细管 上 皮	前		中		后		上皮	分泌物			
								上皮	初级精荚壁	上皮	次级精荚壁	上皮	分泌物					
DNA	Feulgen	+	++	+++	+++	+	++	-	++	-	-	++	++	-	-	++	++	
	不经 60℃ 1N Hcl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
多 糖	PAS	-	-	+	+++	+	+	++	+	+	-	+	+	++	++	++	+	
	α-淀粉酶对照	-	-	+	+++	+	+	++	+	+	-	+	+	0	0	+	+	
	唾液消化对照	-	-	+	+++	+	+	++	+	+	-	+	+	0	0	+	+	
	不经过碘酸氧化	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
蛋白质	Alcian 蓝	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	
	HgBpB	+++	+++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	
	过甲酸-Alcian 蓝	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
色氨酸	二甲氨基苯甲醛 DMAB-亚硝酸盐	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	

注: ++ 强阳性, + 较强阳性, 0 未作试验
初级精母细胞和次级精母细胞结果基本一致, 归于一栏中。

舟山沿海每年可能只在一个较短的时间内交配,即9月下旬和10月份,此时精巢中已产生出大批精子,为交配做好了准备,交配之后,精巢的发育有一个短的停滞时间,然后又重复上述的发育周期。

(2)本种蟹的输精管根据形态可分为三部分:前输精管最细,中输精管最粗,后输精管介于前二者之间,本种蟹没有贮精囊这一结构,从中输精管末端一直到射精管这一段,没发现有膨大成囊的结构存在。

该蟹的精英是在前输精管中产生的,精英形成后,即从前输精管进入中输精管,在一年四季中均可在中输精管中找到精英(Hinsch, 1969),光镜和电镜均证明,中输精管腔内只有一种精液,这一点有别于Ryan(1967)的结果。

后输精管中同时有三种精液存在,这一点与 *Libinia emarginata* (Hinsch, 1974)的不同,但与 *portunus* (Ryan, 1967), *Callinectes* (Cronia, 1947) 和 *Carinus* (Spaulding, 1942) 等几属中的相似。

(3)本种蟹的射精管壁细胞有相当一部分为柱状上皮,核位于基部,细胞顶端有液泡存在,证明它们有分泌功能,且腔内也确有少量液体存在,说明射精管对精液的生成也有一定的贡献,这与 Ryan(1967)的报道有区别。

(4)副性腺为与射精管平行的细管,位于后者的外膜中,二者的管壁上皮相同,主要区别在于肌层,射精管的肌层为内纵、外环;而副性腺与之相反,内层为环肌,外层为纵肌,当然,这种情况在副性腺与射精管相通处发生变化,此时二者的外层肌呈斜向过渡,副性腺腔内含物呈强嗜酸性,其性质尚待进一步探讨,在有些切面中,尚可见到后输精管腔内的三种精液出现在射精管中,与射精管自身分泌的精液混合在一起。

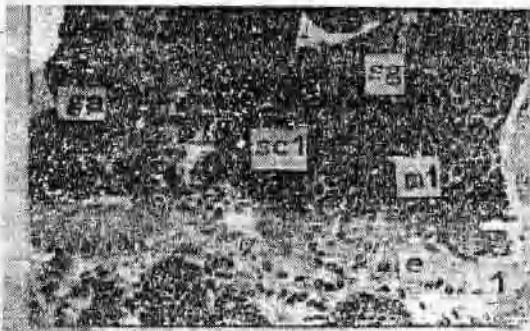


图1 7月精巢,示精原细胞、初级精母细胞、初级精母细胞减数分裂中期I和小管上皮,130×

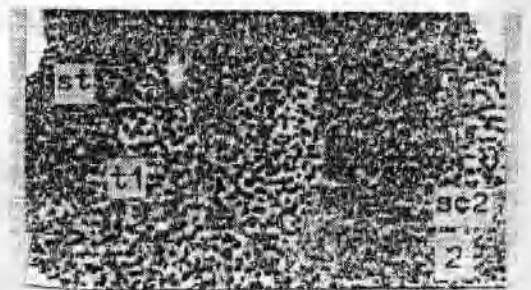


图2 9月精巢,示次级精母细胞、初级精母细胞减数分裂末期I、精细胞,160×

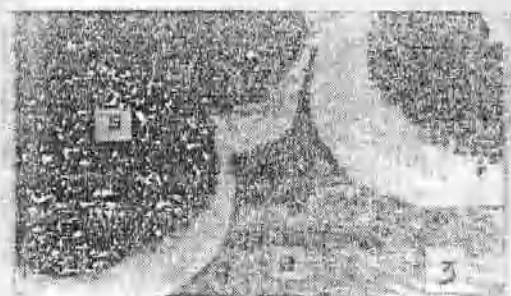


图3 前输精管横切,示管壁上皮细胞延伸和它分泌的物质一起把精子群分割成团块,180 $\times$

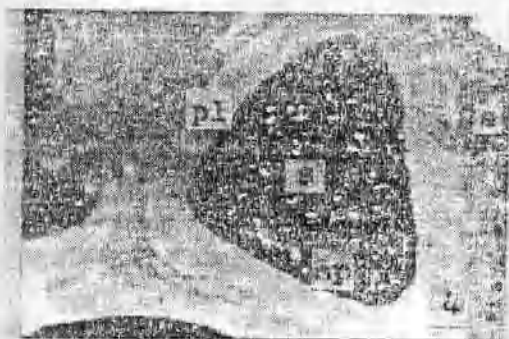


图4 前输精管横切,示管腔内的精英,140 $\times$



图5 中输精管横切,示次级精英壁和精英之间的颗粒状精液,200 $\times$



图6 后输精管横切,示柱状上皮分泌包在液泡中的紫色颗粒,260 $\times$



图7 后输精管横切,示上皮细胞分泌细小的红色颗粒,200 $\times$



图8 后输精管横切,示上皮细胞分泌鲜红色片状物,260 $\times$

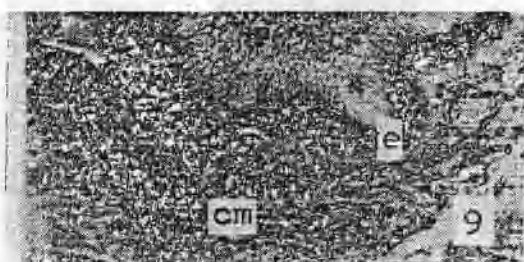


图9 射精管横切,示柱状上皮和内纵、外环肌层,200×



图10 副性腺横切,示柱状上皮和内纵、外环肌层,200×

e: 上皮; ga: 生发区; s: 精子; sc1: 初级精母细胞; sc2: 次级精母细胞; sg: 精原细胞; st: 精细胞; ml: 减数分裂中期 I; t1: 减数分裂末期 I; sp: 精荚; pl: 初级精荚壁; rim: 红色片状分泌物; pg: 紫色颗粒; rg: 红色颗粒; cm: 环肌; lm: 纵肌; ag: 副性腺; ed: 射精管; sl: 次级精荚壁; (箭头): 示含紫色颗粒的小泡。

参 考 文 献

- 1 陈休, 邢东方. 见: 甲壳动物学论文集(第一集). 北京: 科学出版社, 1986. 158~164
- 2 陈休, 崔维喜. 动物学报, 1986, 32(3): 255~259
- 3 宋鹏东. 生物学通报, 1982(5): 18~21
- 4 堵南山. 华东师范大学学报, 1957(1): 60~73
- 5 堵南山, 赖伟, 薛鲁征. 动物学报, 1987a, 33(1): 8~13
- 6 堵南山, 赖伟, 薛鲁征. 海洋与湖泊, 1987b, 18(2): 119~125
- 7 堵南山, 薛鲁征, 赖伟. 海洋与湖泊, 1988, 19(1): 71~75
- 8 堵南山, 薛鲁征, 赖伟. 动物学报, 1988, 34(4): 329~336
- 9 陈啸梅等. 组织化学手册. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 47~82
- 10 卡林 C F A 著; 孔庆雷译. 组织病理学与组织化学技术手册. 北京: 科学出版社, 1982
- 11 Lillie R D. Histopathologic technic and practical Histochemistry. 4th ed, New York: McGraw-Hill Book Company, 1976. 165~216, 611~678
- 12 Schram F R. Crustacea. New York: Oxford University Press, 1986. 286~312
- 13 Hinsch G W, Walker M H. J Morph 1974(143): 1~20
- 14 DeLong M D, Payne J F. Crustaceana, 1987, 53(2): 195~199
- 15 Hinsch G W. J Crust Biol, 1988, 8(2): 254~261
- 16 Talbot P, Beach D. J Crust Biol, 1989, 9(1): 9~24

HISTOLOGY, HISTOCHEMISTRY OF THE MALE REPRODUCTIVE SYSTEM IN BLUE CRAB *PORTUNUS TRITUBERCULATUS* (DECAPODA, PORTUNIDAE)

Li Taiwu

(Department of Biology, Liaoning Normal University)

Zhang Feng

(Department of Aquaculture, Dalian Fishery College)

Su Xiurong

(Institute of Food Biochemistry, Liaoning Normal University)