

单环刺螯虫精子生物学特性和环境因子的关系

牛从从, 张志峰, 邵明瑜

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要:解剖成熟的单环刺螯虫(*Urechis unicinctus*)成体, 直接从肾管中取出新鲜精子进行实验。结果显示, 单环刺螯虫精子为鞭毛型, 头部最前端为顶体, 呈奶嘴状; 细胞核近似杯状, 核内有核泡。中段由一个大环状线粒体组成。尾部轴丝为典型的“9+2”型结构。精液的pH值为 6.5 ± 0.2 ; 精子密度为 $(4.2 \pm 0.2) \times 10^7/\text{mL}$; 新鲜精子经过滤海水(10 cm厚的脱脂棉过滤)的激活率为 $86.4\% \pm 6.3\%$, 游动时间为 $(17.0 \pm 6.9) \text{ min}$, 寿命为 $(24.4 \pm 7.8) \text{ min}$ 。室温(20 ± 1)℃下, 精子保存12 h活力无显著变化, 但至24 h活力明显下降; 低温(4℃)可明显延长精子活力的保存时间, 可保存21 d; 盐度和酸碱度对精子的激活率、游动时间和寿命都有较大的影响, 精子适宜的盐度为20~30, 最佳盐度为25; 适宜的酸碱度为7~9, 最佳为8。因此, 低温可以较长时间的保存单环刺螯虫的精子, 在盐度稍低或偏碱性的海水中精子活力较高。

关键词:单环刺螯虫; 精子; 生物学特性; 超微结构

中图分类号:Q959.195 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)05-0556-06

精子的生物学特性主要包括精子的结构和活力特征, 是动物繁殖生理学的重要研究内容之一。对精子结构的研究有助于人们认识动物的进化规律, 了解受精机制, 并进行科学分类^[1]。精子的活力不仅是评价精液质量的重要指标, 也是进行精液保存、人工授精等其他研究的基础^[2]。大部分水生动物精子排出入水后进行体外受精, 水环境中的盐度和pH对精子活动影响较大, 进而影响到体外受精的效果和受精卵的质量, 因此研究环境因子与精子活力的关系, 将有助于水生动物人工繁殖技术的发展和精子生物学的深入研究^[3]。

单环刺螯虫(*Urechis unicinctus*)俗称海肠子, 是分布于中国及远东沿岸底质中的刺螯科动物。虽然在中国北方有一定的分布, 但因其资源量有限, 所以一般都是在自然海区中捕获。近几年, 单环刺螯虫已成为中国北方水产市场颇受欢迎并极具开发前景的海鲜食品, 因此对其增殖的研究愈显重要。本课题组曾对单环刺螯虫消化道以及组织学与细胞学^[4]、变态前幼虫发育的同工酶^[5]进行了研究。本实验则对单环刺螯虫精子生物学特性和环境因子对其活力的影响进行研究, 旨在为该物种精液的保存、人工授精及人工苗种生产提供有益的研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用单环刺螯虫购自青岛海产品市场, 挑选个体健康性腺饱满的雄性个体, 体长9~14 cm, 体重22.7~38.5 g。通过解剖虫体, 由肾管中直接获取成熟精子。

1.2 方法

1.2.1 电镀制样 取成熟精子, 用2.5%的戊二醛和1%的锇酸双固定; Epon-812包埋; LKB超薄切片机上切片; 铀、铅双染色; 日立H-7000型透射电镜观察、拍照。

1.2.2 精子密度和精液pH值的测定 采用血球计数板测定精子的密度。采用DELTA 320 pH计测定精液的pH。测定个体数为6个。

1.2.3 环境因子对精子活力的影响

(1)取新鲜精子置于EP管中, 加盖密封, 分别置于室温(20 ± 1)℃和低温(4℃冰箱)中保存, 定期(室温下0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、36 h, 低温下0 d、5/12 d、17/12 d、3 d、5 d、7 d、10 d、15 d、21 d、24 d)取出少许精子用过滤海水激活, 测其活力。实验用过滤海水是由砂滤海水再经10 cm厚的脱脂棉

收稿日期: 2004-11-22; 修订日期: 2005-01-28。

基金项目: 国家自然科学基金面上基金(30271039); NSFC-KOSEF国际合作项目资助。

作者简介: 牛从从(1979-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋动物发育生物学研究。E-mail: new2000congcong@hotmail.com

通讯作者: 张志峰。Tel: 0532-2031647。E-mail: zxf107@ouc.edu.cn

过滤所得,温度 $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$,盐度 30, pH 8。

(2)取新鲜精子,一部分用不同盐度(15、20、25、30、35、40、45)的过滤海水(pH 为 8)激活,一部分用不同 pH(5、6、7、8、9、10)的过滤海水(盐度为 30)激活,测其活力。水温 $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

(3)精子活力的测定参考区又君等^[6]的方法,并稍加改进。活力指标分为:激活率(入水后,活动精子的数量占全部精子数量的百分比),涡动时间(从精子激活至 90%精子原处颤动前的时间),寿命(总运动时间,即从精子激活至 90%精子停止颤动的时间)。每组重复 3 次,结果取平均值。

1.2.4 精液的浓度和温度对精子受精率的影响

将精液与过滤海水按以下的体积比混合:1:10 000、1:1 000、1:100、1:10、1:1,分别设为 A、B、C、D、E 组,并设对照组 F(新鲜精液)。除 F 组外,其他各组分别保存于室温 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 和低温 (4°C) 冰箱中,每隔一段时间取出少许精液与新鲜的卵子受精(精卵体积比为 1:1 000),20 min 后,于 Nikon Y100 显微镜下观察记录 100 个卵子的受精率。每组重复 3 次,结果取平均值。

1.3 数据处理

用 SPSS 11.5 软件对数据进行 One-way ANOVA 统计分析,每组重复样以 95%的可信度进行统计处理,求得平均值和标准误差。不同组间通过两独立样本的 *t* 检验进行比较,当 $P < 0.05$ 时视为差异显著。

2 结果与分析

2.1 单环刺螭虫精子的生物学特性

2.1.1 精子的超微结构 单环刺螭虫精子属鞭毛型精子,全长约 $50\ \mu\text{m}$,分为头部、中段和尾部 3 部分。电镜下观察,头部由顶体和细胞核构成(图版 I-1)。顶体呈奶嘴状,由顶体囊和亚顶体腔构成。顶体囊内含物可分为两部分,一部分电子致密度高,位于顶体囊基部及边缘区域;另一部分电子致密度较低,位于顶体前端突出区域。亚顶体腔不甚发达,内含低电子密度物质。细胞核呈杯状,电子密度高,偶见核泡和缺刻,核膜呈完整连续的波浪状。中段由两个互相垂直的中心粒外包线粒体构成。线粒体的数目为 1 个,环状(图版 I-2),其与质膜间有较大的胞质区,其内有少量糖原颗粒分布。尾部由典型的“9+2”型轴丝构成(图版 I-3)。

2.1.2 精液 pH 值、精子密度和活力 肾管是单环

刺螭虫精液的贮存场所,共有 4 根,其长度为 4~10 cm。生殖季节,肾管中充满乳白色精液,每管可达 2~4 mL/ind,密度为 $(4.2 \pm 0.2) \times 10^9/\text{mL}$, pH (6.5 ± 0.2) 。新鲜的精子遇水后即激活,激活率为 $86.4\% \pm 6.3\%$,涡动时间为 $(17.0 \pm 6.9)\ \text{min}$,寿命为 $(24.4 \pm 7.8)\ \text{min}$ 。

2.2 环境因子对单环刺螭虫精子活力的影响

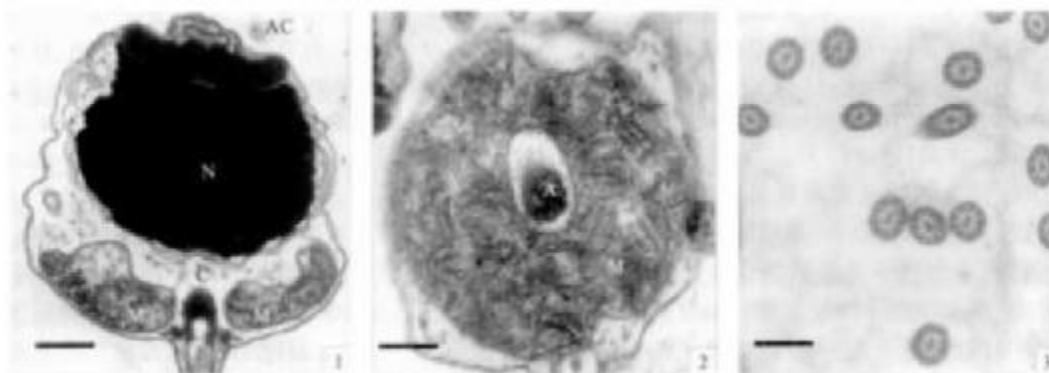
2.2.1 温度和保存时间对精子活力的影响 温度对精子激活率的影响较大,低温比室温更能延长精子的寿命。室温下保存 24 h,精子激活率显著下降至 36.7%,但在低温下保存 15 d 精子激活率仍可高达 55%。同一温度下,随着保存时间的延长,精子激活率逐渐下降,室温保存 36 h 精子失去活力,低温下保存 21 d 仍有 16%的精子可以被激活(图 1)。

2.2.2 盐度对精子活力的影响 盐度对单环刺螭虫精子的激活率、涡动时间和寿命均有影响。盐度在 20~30 范围内,精子激活率均在 81.7%以上,其中盐度为 25 时精子运动时间和寿命与正常海水比较有显著性延长,涡动时间和寿命分别为 27.5 min 和 37.7 min。当盐度为 15 或大于等于 35 时,精子活力明显降低,其中盐度为 40 时,虽然有 20.0%的精子被激活,但仅为颤动或缓慢运动而无剧烈运动,存活时间也仅有 1.7 min;当盐度为 45 时,没有精子被激活(图 2)。

2.2.3 酸碱度对精子活力的影响 酸碱度对单环刺螭虫精子的激活率、涡动时间和总运动时间均有影响。在 pH 7~9 的激活海水中,精子各项活力指标无显著性差异,激活率均在 86.7%以上。pH 6 时,精子激活率和涡动时间分别显著下降至 58.3%、8.7 min; pH 10 时,虽然精子运动时间有显著性缩短,但激活率仍可达 80.0%(图 2、图 3)。

2.2.4 精液的浓度和温度对精子受精率的影响

精子在不同的稀释浓度和温度下保存时,其受精率呈现不同程度的差异。室温下 3 h 内,精子的受精率在精液各浓度组中无显著性差异;且在 24 h 内, D 组同 F 组的保存效果也无显著性差异,受精率均在 90.2%以上;但是随着精液稀释度的提高以及保存时间的延长,受精率明显下降(图 4-a)。低温下保存亦有类似的变化趋势,但是受精率保持较高水平的持续时间较室温下长,即 10 h 内,各浓度组的受精率无显著性差异;且在 10 d 以内, D 组的受精率与 F 组及各观察时间相比均无显著性差异,受精率均达到 97.5%以上(图 4-b)。



bar = 0.05 μm

图版 I 单环刺螯虫精子的超微结构

1:成熟精子,示核、顶体、线粒体和中心体; 2:精子中段横切,示单个环状线粒体包围轴丝; 3:精子尾部横切,示典型的“9+2”型轴丝。

A—轴丝; AC—顶体; C—中心体; M—线粒体; N—核

Plate I Ultrastructure of *Urechis uniconctus* sperm

1: Mature sperm, showing the nucleus, mitochondria and centrosome; 2: The cross section of sperm, showing that single ring-shaped mitochondria encircles; 3: The cross section of the sperm tail, showing the typical axoneme of “9+2”.

A—Axoneme; AC—Acrosome; C—Centrosome; M—Mitochondria; N—Nucleus

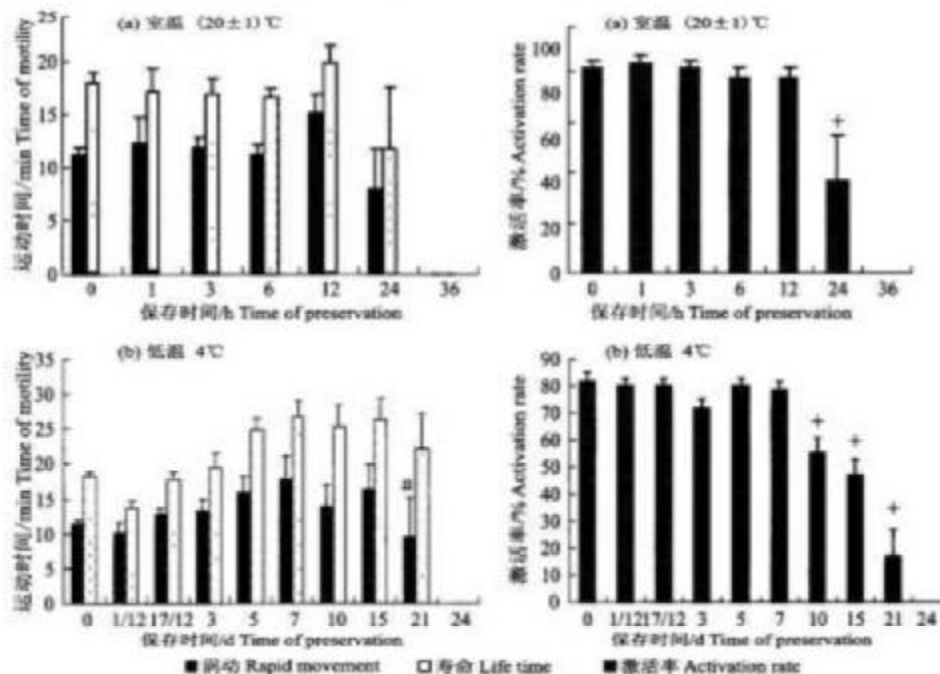


图1 单环刺螯虫精子在不同温度保存不同时间的活力

注:设0h时为对照,与对照相比,“#”运动时间有显著差异;“*”寿命有显著差异;“+”激活率有显著差异

Fig.1 Vitality change of *Urechis uniconctus* sperm preserve at different time and different time and different temperature

Note: The group at 0 h is considered the control. In comparison with the control, “#” means significant difference in rapid movement time; “*” lifetime; “+” activation rate.

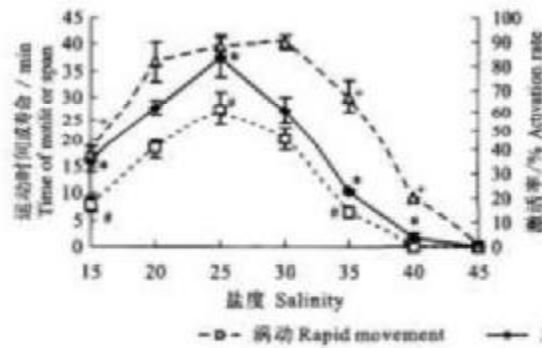


图2 盐度对精子活力的影响

注:水温 $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$, pH 8; 设盐度为 30 时为对照, 与对照相比, “#” 表示快速运动时间有显著差异, “*” 表示寿命有显著差异, “+” 表示激活率有显著差异。

Fig.2 Effects of salinity on sperm vitality

Note: Water temperature $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$, pH 8. The group of salinity 30 is considered the control. In comparison with the control, “#” means significant difference in rapid movement time; “*” lifetime; “+” activation rate.

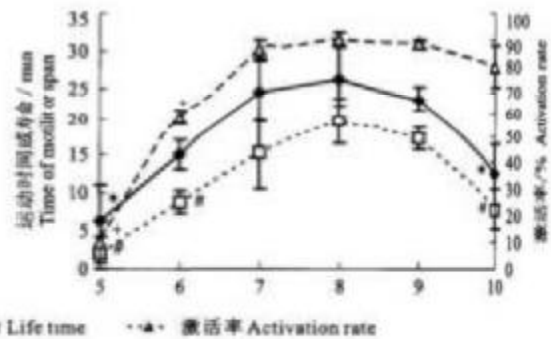


图3 酸碱度对精子活力的影响

注:水温 $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$, 盐度 30; 设 pH 值为 8 时为对照, 与对照相比, “#” 表示快速运动时间有显著差异, “*” 表示寿命有显著差异, “+” 表示激活率有显著差异。

Fig.3 Effects of pH on sperm vitality

Note: Water temperature $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$, salinity 30. The group of pH 8 is considered the control. In comparison with the control, “#” means significant difference in rapid movement time; “*” lifetime; “+” activation rate.

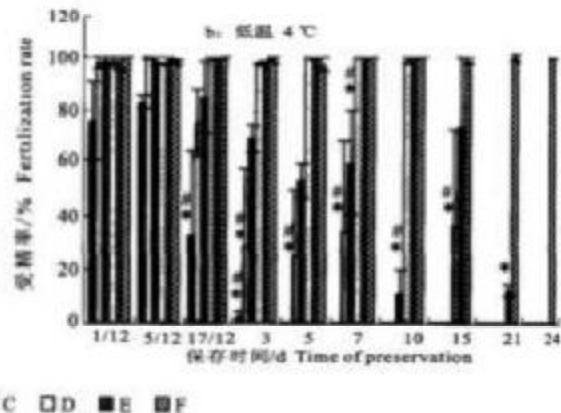
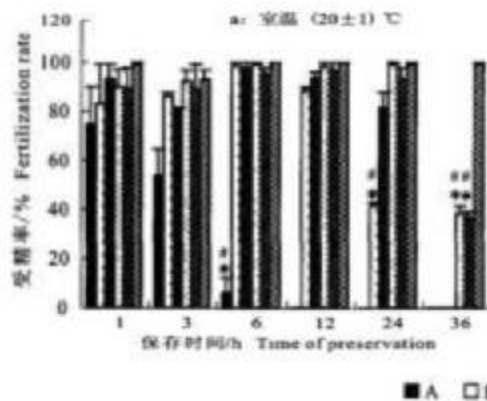


图4 单环刺螈精子稀释液在不同温度下保存不同时间的受精率

注:A-F组表示精液与过滤海水(盐度 30)体积比分别为 1:10 000, 1:1 000, 1:100, 1:10 和 1:0(对照), “#” 表示某时间各组与对照组 F 相比受精率有显著差异, “*” 表示某浓度组各时间与 1 h(a), 1/12 h(b)时相比受精率有显著差异。

Fig.4 Fertilization rates of sperm diluents preserved at different time and different temperature

Note: The volum ratios of sperm to sea water (salinity 30) in groups A-F are 1:10 000, 1:1 000, 1:100, 1:10 and 1:0 (control). “#” means significant difference in fertilization rates at sometime between each group and the control F; “*” means significant difference in fertilization rates of certain group between 1 h (a) and 1/12 h (b) and other time.

3 讨论

动物精子的形态结构、运动方式与受精过程是受精生物学的一个重要内容^[5], 同时精子的形态结构可作为动物分类的依据之一, 有助于研究物种的

分类系统和演化过程^[6-7]。单环刺螈精子以奶嘴状的顶体、小而致密的核、单一环状的大线粒体以及“9+2”型鞭毛等构成其基本形态特征。典型原始型精子特征为无鞭毛, 核非浓缩型, 核膜不连续^[8]。单环刺螈的精子则显示了进化类型的特征。但是

在进化分类中,线粒体数目的多寡又能反映物种在生殖进化中的地位。在单环刺螯虫的精子中仅有一个线粒体,而贝类、鱼类及哺乳类等较高等动物的精子中线粒体的数量均为多个^[9]。因此,对单环刺螯虫精子形态特征的研究将为螯虫类不同种的分类和进化研究提供一定的依据。

除了精子本身的成熟度和结构特征之外,精子的活力是决定精子受精能力的主要因素,也是反映精子质量的重要指标之一^[4]。单环刺螯虫为体外受精,因此精子的活力在一定程度上受到水域中盐度和酸碱度等因子的影响。本实验结果显示,单环刺螯虫精子在盐度稍低且偏碱性的海水中活力较高,这与已报道的单环刺螯虫成体的生活环境^[10]是一致的。

降低温度是抑制精子能量代谢的有效途径之一。有鞭毛的精子依靠尾部运动,能量主要来自中段线粒体^[9],因为线粒体中存在催化和合成能量ATP的各种酶系统^[11]。在低温下,单环刺螯虫精子中的线粒体能量代谢受到抑制,因而精液在低温下比在室温下的保存时间大大地延长,但是精子的代谢活动并未完全停止,因此保存时间是有限的,低温下能保存20 d之久。

此外,本实验发现,精子稀释液的保存,在有效的保存时间里(室温24 h,低温10 d),与海水以体积比1:10稀释的精液保存效果并不差于纯精液,在常温中保存,受精率甚至优于纯精液。已有研究证实,在一些精液保存实验中,精液中加入一定的稀释液可延长精子的保存时间^[12-14],因为保存稀释液中的某些离子,如Na⁺等起着调节内外渗透压的作用,可使精子的保存时间得以延长^[14]。因此,在单环刺螯虫精液的简易保存中,可以考虑适当稀释精液(体积比1:10)。但稀释保存可延长精子寿命的生物学机理尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 上官步敏,李少青. 锯缘青蟹精子超微结构的研究[J]. 动物学报, 1994, 40(1): 8-11.
- [2] 邓岳松,林浩然. 鱼类精子活力研究进展[J]. 生命科学研究, 1999, 3(4): 271-278.
- [3] 江世贵,苏天凤,喻达辉,等. 中华乌塘鳢精子的生物学特性及超低温保存[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 120-122.
- [4] 邵明瑜,张志峰,康庆浩,等. 单环刺螯虫消化组织学和细胞学[J]. 中国水产科学, 2003, 11(4): 265-270.
- [5] 陈宗涛,张志峰,牛从从,等. 单环刺螯虫变态前幼虫发育的同工酶及酶学研究[J]. 中国水产科学, 2005, 12(3): 233-238.
- [6] 区义君,李加儿,江世贵. 保存和激活对真鲷精子生理特性的影响[J]. 热带海洋, 1998, 17(3): 65-74.
- [7] Fruhauf A. Comparative morphological investigation into the spermatogenesis among Mollusca [J]. Zool Bdr Uppsala, 1955, 30: 399-406.
- [8] Daniels E W, Longwell A C, McNeill J M, et al. Ultrastructure of the spermatozoa from the American oyster, *Crassostrea virginica* [J]. Trans Am Micro Soc, 1971, 90: 275-282.
- [9] Eckelbarger K J, Young C M. Spermatogenesis and modified sperm morphology in the "acropora" *Methanourca dendrobranchiata* (Polychaeta: Ophuridae) from a methane seep environment in the Gulf of Mexico: implications for fertilization biology [J]. Biol Bull, 2002, 203: 134-143.
- [10] 洪永根,陈细波,周时强,等. 长毛对虾精子发生的研究: 精子的形态结构[J]. 动物学报, 1993, 39(3): 239-243.
- [11] 竺俊全,杨万喜,石钢德. 泥鳅精子的超微结构[J]. 浙江大学学报, 2002, 29(3): 324-328.
- [12] 李 诺,宋家莲,唐永政,等. 单环刺螯虫精液生物学研究[J]. 齐鲁渔业, 1998, 15(1): 11-14.
- [13] 王晓冬,余耀南,徐智生,等. 活力不足精子的线粒体变化—形态学和计量学研究[J]. 中华物理医学杂志, 1995, 17(4): 231-233.
- [14] 柳 凌,危起伟,鲁大德,等. 中华鲟精子低温保存的相关因子[J]. 水产学报, 1999, 23(Suppl.): 86-89.
- [15] 邓岳松. 鱼类精液的简易冷藏保存[J]. 渔业现代化, 1999(2): 7-8.
- [16] 赵 强,赵清良,殷 宁. 暗纹东方鲀精液冷藏对精子活力、受精率和孵化率的影响[J]. 南京农业大学学报, 1999, 22(4): 57-60.

Biological characteristics of *Urechis uniconctus* sperm and the effects of environmental factors on sperm vitality

NIU Cong-cong, ZHANG Zhi-feng, SHAO Ming-yu

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: *Urechis uniconctus* is a kind of popular seafood in aquatic product market of north China. However its natural resource is limited. Now the research in the aquaculture of *Urechis uniconctus* has become more and more necessary. In this work, biological characteristics and relationships between vitality of *U. uniconctus* sperm and environmental factors were studied in laboratory. The results can provide useful research information for sperm preservation, artificial fertilization and seed production of *U. uniconctus*. Healthy male adults from the market were selected. Mature sperm were collected from the storage organ by dissecting the fresh samples. Part of the sperm was fixed by 2.5% glutaraldehyde and 1% osmium tetrochloride, embedded by Epon-812, stained by uranyl acetate and lead citrate, then observed by Hitachi H-7000 transmission electronic microscope (TEM). By TEM the results show that, the sperm of *U. uniconctus* belongs to flagellum type. The acrosome at the top of the head part is nipple-shaped. The nucleus is cupulate, with nuclear vacuoles in it. The middle part consists of a large and round mitochondrion. The axoneme of tail part shows typical "9 + 2" model. The shape and structure of animal sperm is interrelated with its mode of movement and process of fertilization, and is also one of the bases for animal taxonomy. So this study on the ultrastructure of *U. uniconctus* sperm may provide some information for the classification and evolution of Echiurans species. The density of sperm in *U. uniconctus*, which was measured by haemocytometer, is $(4.2 \pm 0.2) \times 10^9/\text{mL}$, and pH measured by DELTA 320 pH meter, is 6.5 ± 0.2 . The sperm was activated by filtered seawater at salinity 30, pH 8 and temperature $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$. Generally, the vitality of sperm includes activation rates, time of movement and lifetime. After the fresh sperm was activated, the activation rate was $86.4\% \pm 6.3\%$, the time of movement was (17 ± 6.9) min, and the lifetime was (24.4 ± 7.8) min. In the experiment, some fresh sperm was put into Eppendorf tubes, and the tubes were preserved at room-temperatures $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ and 4°C respectively, then the sperm was taken out to measure the vitality termly. Some fresh sperm was activated by filtered seawater at different salinities (15, 20, 25, 30, 35, 40, 45) with pH 8 to determine the vitality; some other fresh sperm was activated by filtered seawater at different pH (5, 6, 7, 8, 9, 10) with salinity 30. There was no significant variety of vitality after the sperm was preserved for 12 h at room temperature, but the vitality obviously declined on 24th hour. The storage time of sperm vitality can be clearly prolonged at low temperature (4°C), and reach 21 d. The salinity or pH of seawater obviously affects the activation rate, rapid movement time and lifetime of the sperm. For sperm activation, the optimum salinity is 20–30, and the best is 25. The optimum pH is 7–9, and the best is 8. The results indicate that in the seawater of low salinity or high pH, *U. uniconctus* sperm shows better vitality. The vitality of sperm is the primary factor to affect the ability of fertilization, as well as one of important aspects to reflect the sperm quality. At low temperature, the vitality of sperm can keep longer because low temperature can reduce sperm metabolism. Sperm with flagellum depend on tail part to move, and the energy for movement mainly comes from mitochondria where exist all kinds of enzyme systems that can catalyse and synthesize energy. At low temperature, the metabolism of mitochondria reduces, however the function of metabolism does not completely ceased. Therefore the time of preservation at low temperature is limited. This study will be helpful to the development of artificial reproduction technology and biology research in *U. uniconctus*.

Key words: *Urechis uniconctus*; sperm; biological characteristics; ultrastructure

Corresponding author: ZHANG Zhi-feng. E-mail: zzfp107@ouc.edu.cn