

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01189

单环刺螠精巢年周期发育及精子发生

王航宁, 邵明瑜, 张志峰

海洋生物遗传育种教育部重点实验室, 中国海洋大学, 山东 青岛 266003

摘要: 采用组织学方法观察了单环刺螠(*Urechis unicinctus*)精巢的形态结构及其年周期发育, 并利用超微技术观察了精子的发生过程。结果表明, 单环刺螠的精巢呈条带状, 位于虫体尾部, 两端通过肌束分别与呼吸肠管壁外侧和体壁内侧相连。精巢由生精细胞团与结缔组织组成, 结缔组织位于精巢中央, 精原细胞团分布于结缔组织外周, 精母细胞团散布于结缔组织内, 各级精母细胞脱离精巢落入体腔液中, 历经精母细胞、精细胞, 最后形成精子脱离细胞团进入肾管。根据精巢的组织学特征, 将单环刺螠的精巢年周期发育划分为增殖期、生长期、成熟期、排放期和休止期 5 个时期。光镜和电镜下观察了精巢和体腔液中精子发生各时期的结构变化, 包括细胞核形态的变化、顶体发生以及尾部的形成。本研究揭示了单环刺螠的精巢发育特点、精子发生历的场所和分化特征。

关键词: 单环刺螠; 精巢; 年周期发育; 精子发生

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)05-1189-07

生殖腺是动物体配子形成的部位, 由生殖细胞与体细胞共同形成。生殖腺的研究是繁殖生物学的一个重要内容, 了解生殖腺的发生规律可以为人工繁育、生殖调控以及种质改良等提供理论基础。

单环刺螠(*Urechis unicinctus* Von. Drasche)属螠虫动物门(Echiurida)、刺螠科(Urchidae), 主要分布在中国、日本、韩国和俄罗斯等沿海潮间带下区及潮下带浅水区, 是一种常见的底栖动物^[1]。目前国内外对单环刺螠生殖与发育生物学的相关研究多集中在生殖习性^[2]、胚胎和幼体发育^[2-3]、生殖细胞发育^[4-7]等方面, 且已知其生殖细胞的部分发育过程是在体腔液中进行的^[1]。然而对于该物种生殖细胞来源及其性腺的形态结构和发育特点, 目前知之甚少, 这在一定程度上限制了人们对该物种的系统了解。由此, 本研究采用组织学和电镜技术对单环刺螠的精巢结构、年周期发育以及精子的发生过程进行了观察, 旨在完善单环

刺螠繁殖生物学的内容, 为单环刺螠人工繁育提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用单环刺螠成体于 2009 年 3 月至 2010 年 3 月购自青岛市南山市场, 每月采样 1 次, 共 70 只。体长 10~20 cm、体质量 100~300 g。通过解剖单环刺螠虫体, 观察肾管饱满程度及体腔液中生殖细胞发育情况, 初步确认其所处的生殖阶段。

1.2 方法

组织学观察: 剪取单环刺螠雄性个体尾部虫体, Bouin 氏液固定 24 h, 酒精梯度脱水, 石蜡包埋, 切片厚 5~7 μm , HE 染色, Nikon E80i 显微镜下观察并拍照。同时对所测得的细胞进行测量, 测量时选取 5 个视野, 每个发育阶段的细胞观察数量为 20 个。

收稿日期: 2010-05-07; 修订日期: 2010-07-09.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (40776074).

作者简介: 王航宁(1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋动物生殖生物学研究. E-mail: runningbit@yahoo.com.cn

通信作者: 张志峰, 教授. E-mail: zzfp107@ouc.edu.cn

电镜观察：用注射针管直接穿透体壁，抽取体腔液离心获得各期生殖细胞；解剖虫体，由肾管中获取成熟精子。各期样品采用 2.5%的戊二醛和 1%的锇酸固定；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。

2 结果与分析

2.1 精巢的位置及结构

单环刺螠的精巢呈条带状，位于虫体尾部，两端通过肌束分别与呼吸肠管壁外侧和体壁内侧相连(图版 -1、2)。精巢主要由生精细胞团与结缔组织组成，每个生精细胞团由处于相同发育时期的生精细胞组成，精巢的生精细胞包括精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞。精原细胞团分布于精巢结缔组织外周(图版 -3)，精母细胞团则散布于结缔组织内部，被结缔组织包绕(图版 -4)。精巢中部的结缔组织较疏松，胶原纤维丰富，偶尔可见排列稀疏的肌纤维分布，并在精巢两端形成发达肌束(图版 -1、2)。

2.2 精巢年周期发育

根据精巢的结构组成及体腔液中生精细胞的发育状况，将单环刺螠精巢的年周期发育划分为 5 个时期，即增殖期、生长期、成熟期、排放期和休止期。

2.2.1 增殖期 发生在 6 月末至 7 月，和 11 月至次年 1 月，精巢长度为 200~600 μm ，其中仅见精原细胞，它们成团分布于精巢外缘(图版 -3)。精原细胞团的数量和体积随精巢发育逐渐增加，每个细胞团内的精原细胞数量也明显增多，从最大切面观察细胞团，其中的精原细胞数量从 9 个增至 15 个。此时体腔液中精母细胞团数量很少，解剖单环刺螠成体，肉眼可见位于头部的肾管萎缩，无精子。

2.2.2 生长期 发生在 7 月末至 8 月下旬，和次年 2 月至 4 月初，精巢长度为 800~900 μm ，精巢内可见精原细胞团和精母细胞团(图版 -4)。7 月末至 8 月中旬和次年 2~3 月，初级精母细胞团开始出现在精巢中部的精原细胞团内侧结缔组织中，

数量较少。8 月中旬至 8 月下旬和次年 3 月下旬至 4 月初，初级精母细胞团的数量迅速增多，并出现次级精母细胞团，二者充满了精巢中部，为主要的生精细胞；精原细胞团数量减少，与精母细胞团数量比例约为 1 : 10。在精巢边缘部分无精原细胞团的部位，可见结缔组织膜破裂，精母细胞落入体腔中，继续发育。体腔液中生精细胞团最初以精母细胞团为主，发育至 8 月中旬和 4 月初，精母细胞团数量急剧增加，并出现了精细胞团，其中以前者占多数，为精细胞团的 3 倍(图版 -5)。此阶段多数精细胞团细胞尚无鞭毛，个体较小，平均直径(3.5±0.5) μm ($n=20$)，核圆形，染色质高度浓缩。肾管中开始出现少量精子。

2.2.3 成熟期 发生在 8 月末至 9 月中旬，和次年 4 月至 5 月初。精巢长度为 900 μm 左右，精巢结构组成与生长期末期相似，精原细胞团数量很少，结缔组织内充满了精母细胞团，但以次级精母细胞居多(图版 -6)。体腔液中可见大量生精细胞团，包括精母细胞团和精细胞团，后者数量为前者的 2~3 倍(图版 -7)。此期精细胞多具有鞭毛，长达 48.8 μm 。还可见游离精子。此时肾管逐渐饱满，充满了大量成熟精子，此时单环刺螠尚未进入繁殖期。

2.2.4 排放期 发生在 9 月下旬至 10 月中旬，和次年 5 月中旬至 6 月中旬。精巢长度为 600 μm 左右，精巢中的生精细胞主要为精原细胞，精母细胞团急剧减少，以次级精母细胞团为主(图版 -8)。体腔液中各类生精细胞团和游离精子的数量都逐渐减少。此时单环刺螠处于成熟繁殖期，肾管排放成熟精子后，迅速萎缩。

2.2.5 休止期 发生在 10 月下旬至 11 月初，和次年 6 月中旬至 6 月下旬，精巢萎缩至 100~200 μm ，生精细胞团由单一的精原细胞构成，且数量较少，只有 5~10 个细胞团(图版 -9)。体腔液中很难发现生精细胞，肾管完全萎缩。

2.3 精子发生的显微和超微结构观察

2.3.1 精原细胞 单环刺螠精原细胞均于精巢中发育和分化。在精巢中该细胞体积最大，呈卵圆形，平均直径(10.3±0.5) μm ($n=20$)；核也呈卵圆形，

平均直径 8.5 μm , 核质比大, 约为 0.825。核内异染色质沿核膜分布, 并呈小团块状(图版 -3)。

2.3.2 精母细胞 光镜下, 精巢中的初级精母细胞近圆形, 平均直径(7.5 \pm 0.5) μm ($n=20$); 核卵圆形, 平均直径(5.3 \pm 0.4) μm ($n=20$), 核质比略小于精原细胞, 约为 0.7。核内团块状异染色质散布于核质中或核膜内侧。次级精母细胞呈圆形或卵圆形, 核近圆形, 平均直径为(4.8 \pm 0.5) μm ($n=20$), 团块状异染色质凝缩程度高于初级精母细胞(图版 -4)。处于不同发育时期的精母细胞将陆续脱离精巢进入体腔液中继续发育。

电镜下, 初级精母细胞边缘不规则, 细胞间多以点状连接, 并有细胞间桥。胞质电子密度较高, 可见粗面内质网和大量游离核糖体; 线粒体较多, 多呈椭圆形, 嵴发达, 基质电子密度高, 均匀分布于胞质中(图版 -1)。次级精母细胞中线粒体数量明显减少, 但粗面内质网和核糖体略有增多, 在胞质内偶见中心体, 同时可见一些高尔基小泡(图版 -2、3)。

2.3.3 精细胞及其分化 精细胞的发育和分化均在体腔液中完成。电镜下观察, 精细胞核的形状逐渐由圆形转变为杯状, 体积变小, 平均直径为(1.6 \pm 0.2) μm , 核膜呈波纹状包围在核物质外, 核内染色质高度浓缩, 但可见个别呈透明状的核泡(图版 II-4~9)。在精细胞核分化的同时, 胞质中的细胞器也发生变化。其中最早变化的是线粒体, 在核物质开始浓缩时即开始融合, 并逐渐向核的预定后方迁移, 形成一个大的环状线粒体(图版 -4)。伴随线粒体的融合, 胞质内可见发达的高尔基小泡出现在核的一端(图版 -5), 也逐渐愈合, 其中前顶体内含物不断增加, 首先合成电子致密内含物, 而后出现电子密度低的物质(图版 -6、7), 愈合的高尔基泡沿细胞长轴方向向前突起, 最终形成奶嘴状顶体(图版 -8)。中心体一分为二, 迁移到核后方, 形成近端和远端中心粒, 并被环状线粒体包围, 由此发出的“9+2”型轴丝和部分胞质构成尾部, 精细胞完成分化脱离精细胞团, 进入肾管形成成熟精子(图版 -9)。

3 讨论

3.1 精巢结构和精子发生方式

从进化上看, 动物生殖腺由无特定形态、生殖细胞发生无固定位置的类型, 逐渐进化为具有一定形态和固定位置的器官, 且生殖细胞仅在生殖腺中发生, 一般有辅助细胞参与。本研究采用组织学方法首次发现单环刺螈具有特定形态和位置固定的精巢, 其呈条带状, 两端通过肌束固着于体壁和呼吸肠外壁上。然而精巢无排出管, 精母细胞团通过结缔组织膜破裂而落人体腔中继续发育, 所以不具有完整的生殖器官, 精子的发生在精巢和体腔液中共同进行。精母细胞从精巢进入体腔液中, 发育成成熟精子, 可见其发生过程大部分在体腔液中完成, 周围无辅助细胞, 推测其在发生过程中通过渗透方式直接从体腔液中获取营养。据此笔者认为单环刺螈的精巢及精子发生方式属于由低等向高等进化的过渡类型。

在低等无脊椎动物中, 星虫动物的精子发生方式与单环刺螈相似, 都需要在精巢和体腔液中发育^[8], 但二者精巢的结构存在差异。首先, 星虫的精巢位于体前部, 其一端与身体前部收吻肌基部相连, 为近端, 另一端在体腔中游离, 为远端^[9], 区别于单环刺螈精巢体后部定位, 两端分别与体壁和呼吸肠相连的方式。其次, 生精细胞种类和分布规律不同, 虽然二者精巢中处于相同发育时期的生精细胞都聚集成团, 但星虫的生精细胞团由包被精巢的腹膜内陷分隔为指状小叶, 从近端向远端发育, 精原细胞发育至精细胞后掉落到体腔中^[9]; 而单环刺螈则由外周向中央发育, 精原细胞团分布于精巢中央结缔组织的外周, 并陷入其中发育为精母细胞团, 最终脱离精巢落人体腔中, 尚不确定精巢的结缔组织细胞对生精细胞的发育是否有辅助作用。从精子发生的过程看, 单环刺螈的精巢比星虫更低等。与螈虫动物的另一个近亲—环节动物比较, 多毛纲沙蚕科中部分物种的精子发生方式与单环刺螈也有相似之处, 即均在精巢和体腔液中共同发育, 但前者的精巢无固定形态, 且只有精原细胞分布^[10], 比单环刺螈

的精巢更为低等。上述 3 类动物生殖细胞的产生分化过程基本相同,但生殖腺的类型存在着较大的差异。这些差异据推测应该是进化过程中生殖系统由低级向高级进化过程中形成的。

单环刺螠生殖腺体积较小,成熟期精巢长度仅约 900 μm ,难于观察,因此多年来仅是推测刺螠动物生殖腺可能由某处体腔膜和精原细胞组成^[2]。本研究通过组织学方法首次确定了单环刺螠精巢的位置、形态和结构,即单环刺螠精巢位于虫体尾部呼吸肠处,为条带状组织,由结缔组织和精原、精母等生精细胞团组成。这一研究结果,为单环刺螠生殖生物学、生物进化地位研究提供了新的基础资料。根据精巢大小、结构组成及体腔液中生精细胞的发育状况,将单环刺螠精巢的年周期发育分为 5 个时期:增殖期、生长期、成熟期、排放期和休止期。精巢的成熟期与生殖周期并不完全同步,精巢成熟期比繁殖期稍早。因此,对单环刺螠生殖腺年发育周期和繁殖周期规律的进一步研究,尤其是对影响生殖腺和生殖细胞发育因素的研究,可为苗种繁育、良种培育及增养殖提供理论指导,是今后单环刺螠繁殖生物学研究的重点。

3.2 精子发生的超微结构变化

本研究对精巢和体腔液中各期生精细胞的显微和超微结构变化进行了观察。在精子发生过程中,细胞核体积逐渐减小,核内染色质浓缩,致密度增高,最后整个细胞核被电子致密的均质染色质所充满,呈杯状。有观点认为,精子核的形态由两个方面的因素决定:一是精子形成过程中染色质的凝聚方式,其最终的浓缩程度与精子的活性有关;二是核外的微管对核施以一定的压力,起到定型作用^[11]。在本研究的观察中未见到胞质中大量微管产生,因此认为单环刺螠精子核形状的变化是通过核物质浓缩实现的,且浓缩程度较高。另外在本次观察中,笔者也发现成熟精子的核内有一些核泡,核边缘偶有缺刻,但具体功能尚不清楚。

高尔基复合体形成顶体的过程中,可见次级精母细胞的许多高尔基小泡分散于细胞质中,至

精细胞时期可见发达的高尔基泡集合于细胞核的顶端,随着小泡的愈合以及顶体内含物的产生,最后形成一个奶嘴状顶体,有人认为顶体的形态由构造决定,也可能与精卵相遇时顶体反应的情形相关^[12]。在单环刺螠精子的顶体中,可见两种致密度不同的内含物,至于它们在受精时的表现,笔者将另文报道。

单环刺螠的精子属于鞭毛型,该型精子的形态变异主要表现在尾部中段,其次是头部。而中段的变化主要是长度以及线粒体的形态和数量。多数无脊椎动物精子的中段由 4~5 个或更多的线粒体围成环状^[13-14],哺乳类线粒体则融合形成两条鞘鞭^[10]。单环刺螠精子中段的线粒体只有 1 个,呈圆环状,这是比较少见的一种形式。但在早期精子细胞阶段,胞质内线粒体体积较小,数目较多,散布于细胞质中,随着精子形成过程的进行,线粒体间相互融合,数目减少,体积增大,最后融合成 1 个大的环状线粒体,说明线粒体融合程度高。并且该环状线粒体的基质密度很高,嵴高度发达,这一结构与其精子的高活力也是相适应的。

参考文献:

- [1] 李凤鲁,王玮,周红.我国黄渤海螠虫动物(螠虫动物门)的研究[J].青岛海洋大学学报,1994,24(2):203-210.
- [2] 李诺,宋淑莲,唐永政,等.山东沿海单环刺螠虫繁殖生物学的研究[J].动物学报,1997,43(4):433-435.
- [3] 康庆浩,郑家生,金在敏.单环刺螠的人工苗种生产研究 I 水温对胚胎发育及幼体培育的影响[J].青岛海洋大学学报,2002,32(2):273-278.
- [4] Ohkawa Y M, Ishida J. Electron microscopical studies on the egg of the gephyrean *Urechis unicinctus* [J]. Bull Mar Biol Sta Asamush, 1973, 11: 191-192.
- [5] Sawada N, Noda Y. An electron microscope study on the *Urechis* egg [J]. Mem Ehim Univ Sect II Ser B, 1969, 4: 551-561.
- [6] Meredith G S. Oocyte differentiation in *Urechis caupo* (Echiura): A Fine structural study[J]. J Morphol, 1975, 147: 475-506.
- [7] 牛从从,张志峰,邵明瑜.单环刺螠虫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.
- [8] 郑燕玲,冯丹青,郭丰,等.星虫动物繁殖生物学研究进

- 展 [J]. 海洋科学, 2006, 30 (1): 84–87.
- [9] 竺俊全, 王武, 许式见, 等. 可口革囊星虫的精子发生及精子结构 [J]. 动物学报, 2007, 53 (4): 733–741.
- [10] Luecht J, Pfannenstiel H D. Spermatogenesis in *Platynereis massiliensis* (Polychaeta: Nereidae) [J]. Helgolander Mar Res, 1989, 43 (1): 19–28.
- [11] 张红卫. 发育生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [12] 陈大元. 受精生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [13] Rao X, Chen Y, Chen W, et al. Ultrastructural studies on spermatogenesis of *Novaculinn chinensis* [J]. Chin J Zool, 2000, 35 (5): 2–5.
- [14] Zizzari Z V, Lupetti P, Mencarelli C, et al. Sperm ultrastructure and spermiogenesis of Coniopterygidae (Neuroptera, Insecta) [J]. Arthrop Struct Dev, 2008, 37: 410–417.

Annual development of testis and spermatogenesis in *Urechis unicinctus*

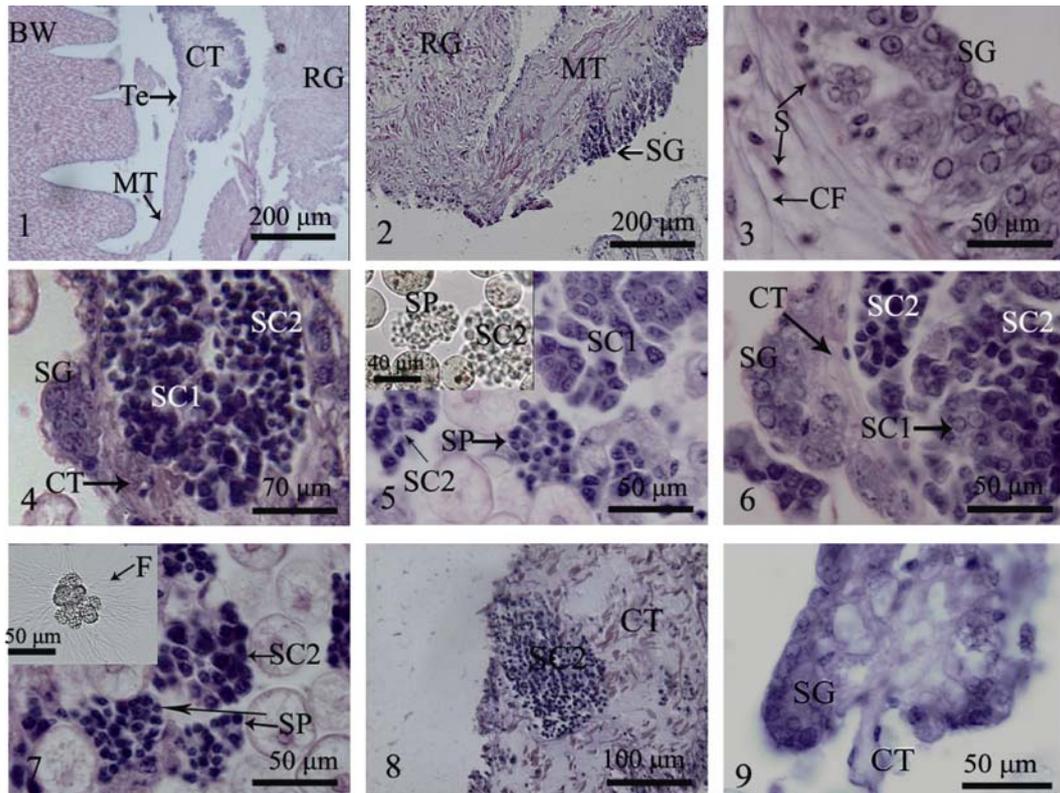
WANG Hangning, SHAO Mingyu, ZHANG Zhifeng

Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding of Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: We documented the histological structure and annual development of the testis and the process of spermatogenesis in *Urechis unicinctus* using light microscopy and transmission electron microscopy. The testis was localized at the end of the body and formed a band. Each end of the testis was connected to the body wall and respiratory gut wall by muscle tissue. The testis was composed of interior connective tissue and spermatogenic cells, including spermatogonia clusters at the periphery of the connective tissue and interior spermatocytes surrounded by connective tissue. Spermatocytes that were clustered at different stages were transported into the coelomic fluid and developed into sperm, which left the cell clusters and entered the nephridia. Based on the histological characteristics of the testis, we divided the annual development into 5 stages: proliferative, growing, mature, release, and resting stages. In addition, we observed spermatogenesis in the testis and coelom using both optical and electron microscopy and documented ultrastructural changes in the nucleolus, acrosome, and sperm tail.

Key words: *Urechis unicinctus*; testis; annual development; spermatogenesis

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



图版 I 单环刺螠精巢年周期发育的组织学观察

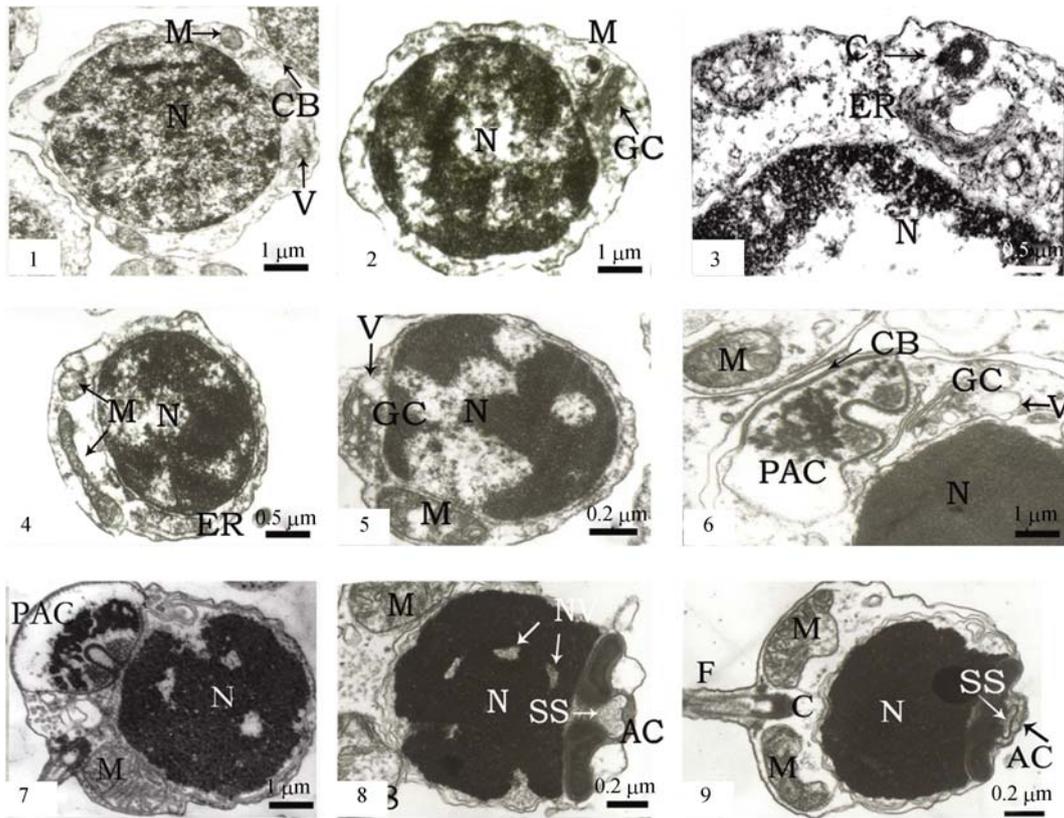
1: 精巢, 示与体壁相连; 2: 精巢, 示与呼吸肠相连; 3: 增殖期精巢; 4: 生长期精巢; 5: 生长期体腔液, 插图为光镜观察体腔提取液; 6: 成熟期精巢; 7: 成熟期体腔液, 插图为光镜观察体腔提取液; 8: 排放期精巢; 9: 休止期精巢。

BW: 体壁; CF: 胶原纤维; CT: 结缔组织; F: 鞭毛; MT: 肌肉组织; RG: 呼吸肠; S: 体细胞; SC1: 初级精母细胞; SC2: 次级精母细胞; SG: 精原细胞; SP: 精细胞; Te: 精巢。

Plate I Histological observation of *Urechis uncinatus* testis during annual development

1: testis, connected with body wall; 2: testis, connected with respiratory gut; 3: testis at proliferative stage; 4: testis at growing stage; 5: coelom fluid at growing stage, insert is coelom extract by optical microscope; 6: testis at mature stage; 7: coelom fluid at mature stage, insert is coelom extract by optical microscope; 8: testis at release stage; 9: testis at resting stage.

BW: body wall; CF: collagenous fiber; CT: connective tissue; F: flagellum; MT: muscle tissue; RG: respiratory gut; S: somatic cell; SC1: primary spermatocytes; SC2: secondary spermatocytes; SG: spermatogonia; SP: spermatid; Te: testis.



图版 单环刺螠体腔液中精子发生的超微结构观察

1: 初级精母细胞; 2-3: 次级精母细胞; 4-8: 精细胞; 9: 精子。

AC: 顶体; C: 中心体; CB: 细胞间桥; ER: 内质网; F: 鞭毛; GC: 高尔基体; M: 线粒体; N: 核; NV: 核泡; PAC: 前顶体; 顶体下腔; V: 囊泡。

Plate Ultrastructural observation of spermatogenesis in *Urechis unicinctus* coelom fluid

1: primary spermatocyte; 2-3: secondary spermatocyte; 4-8: spermatid; 9: sperm cell.

AC: acrosome; C: centrosome; CB: intercellular bridge; ER: endoplasmic reticulum; F: flagellum; GC: Golgi complex; M: mitochondria; N: nucleus; NV: nucleus vesicle; PAC: pre-acrosome; SS: subacrosomal space; V: vesicle.