

白肛海地瓜精子发生及形态的超微结构

冯维达 金春华* 苏秀榕 竺俊全

宁波大学教育部应用海洋生物技术重点实验室 宁波 315211

摘要:通过透射和扫描电镜观察了白肛海地瓜(*Acaudina leucoprocta*)的精子发生过程及其形态结构,揭示了白肛海地瓜精子发生时期一系列变化,其精子发生分为精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精细胞、成熟精子5个时期。精原细胞体积最大。精母细胞染色质开始凝集。精细胞前顶体颗粒形成。白肛海地瓜成熟精子的超微结构为原生型,由头部、中部、尾部组成,头部圆形,最前端为顶体,核染色质凝集成团块状,中部是线粒体和中心粒复合体融合成1个超大结构,尾部长约60 μm,尾部鞭毛横切面为典型的“9+2”型结构。

关键词:白肛海地瓜;精子发生;形态;超微结构

中图分类号:Q952 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2012)05-66-08

Spermatogenesis and Sperm Morphology of Sea Cucumber *Acaudina leucoprocta*

FENG Wei-Da JIN Chun-Hua* SU Xiu-Rong ZHU Jun-Quan

Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology by the ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China

Abstract: The ultrastructure and development of the sperm of sea cucumber *Acaudina leucoprocta* were observed by using scanning electronic microscopy (SEM) and transmission electronic microscopy (TEM). As expected, spermatogenesis was divided into five periods: spermatogonium, primary spermatocyte, secondary spermatocyte, spermatid and mature spermatozoon. Spermatogonia had the biggest volume. Chromatin condensation and a pair of centriole were found in spermatocyte. The mature spermatozoon belonged to primitive type, consisting of head, middle piece and tail. The head was spherical in shape with apical acrosome, and chromatin was condensation in the nucleus. Mitochondria complex and centrioles were observed in the middle piece, and the flagellum showed a simple “9+2” type.

Key words: *Acaudina leucoprocta*; Spermatogenesis; Morphology; Ultrastructure

白肛海地瓜(*Acaudina leucoprocta*)为芋参目(Molpadida)棘皮动物,俗称香参,也称为白参、海茄子^[1]。在棘皮动物中,对柯氏砂海星(*Luidia clathrata*)^[2]、紫海胆(*Anthocidaris crassispinata*)^[3]、艾氏紫海蛇尾(*Ophiopholis aculeata*)^[4-5]等的精子发生过程及海参纲中的一些种类,如纽细锚参(*Leptosynapta clathi*)^[6]的精子超微结构研究国外已有报道,刺参(*Stichopus japonicus*)^[7]、仿刺参(*Apostichopus japonicus*)^[8]等精子的超微结构国内也有过

研究。

白肛海地瓜在我国海南、广东、福建、浙江沿海均有分布,生活在53~122 m水深的环

基金项目 浙江省重大科技专项项目(No. 2009C03017-4),国家星火计划项目(No. 2010GA701063);

* 通讯作者, E-mail: jinchunhua@nbu.edu.cn;

第一作者介绍 冯维达,男,硕士研究生;研究方向:海洋生物技术; E-mail: fwdfengweida@163.com。

收稿日期:2012-03-22,修回日期:2012-07-05

中。通过使用光学显微镜对每个时期采集白肛海地瓜性腺发育情况的观察,推测其繁殖期为每年的1~4月份。由于白肛海地瓜生活在较深的海底环境中,其精子排放后,必须有一个适应高压低温这一环境特点的结构,如更牢固的顶体,以保证精子存活更长的时间,完成受精。

本文对白肛海地瓜精子发生过程及其超微结构进行了观察。通过研究白肛海地瓜的精子发生过程以及结构等生物学问题,对于深入研究白肛海地瓜繁殖及发育规律提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 实验用白肛海地瓜于2010年1月采自东经26°00'00"~27°00'00",北纬121°00'00"~122°00'00"的东海海区,共50头,取体长20 cm左右且活力强的雄性(光学显微镜判断雌雄)个体,通过解剖获得其生殖腺的生殖管,用2.5%的戊二醇固定,4℃下保存备用。

1.2 方 法

1.2.1 透射电镜样品的制备 将样品置冰块上快速解剖取出精巢组织,切成0.5 mm × 0.5 mm的小块,用2.5%戊二醛4℃固定过夜,0.1 mol/L磷酸缓冲液充分漂洗后,再用1%锇酸后固定2 h,固定后的组织经磷酸缓冲液漂洗后,用梯度酒精和丙酮脱水,Epon812环氧树脂渗透并包埋,RMC超薄切片机切片,醋酸铀和柠檬酸铅双染色,日立H-7650透射电子显微镜观察并拍照。

1.2.2 扫描电镜样品的制备 取白肛海地瓜的精巢组织放入装有2.5%戊二醛固定液的离心管中并用力摇动,精子就分散到固定液中。静置片刻,待大块组织沉淀后,取上层固定液滴到洁净盖玻片上,待固定液将干未干时,用0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗3次,再用1%锇酸后固定1 h,固定后的组织经磷酸缓冲液漂洗后,用梯度酒精脱水,叔丁醇置换,最后加纯叔丁醇冷冻,ES-2030型冷冻干燥仪干燥,E-1010型离子溅射仪喷金镀膜,日立S-3400型扫描电子显微镜观察并拍照。

2 结 果

2.1 精子发生 透射电镜下,白肛海地瓜精子发生的三个阶段,即精原细胞(spermatogonium)(图版I:1,2)、精母细胞(spermatocyte)(图版I:1,3,4)、精细胞(spermatid)(图版I:5),可以清晰地观察分辨。

2.1.1 精原细胞 精原细胞(图版I:1,2)与基膜相连接,核为椭圆形,长轴约为5~6 μm,短轴约为3~4 μm,核质比大约为1/3,染色质凝集程度较低,精原细胞的细胞质包括内质网和少量且随机分布的线粒体,没有发现高尔基体。

2.1.2 精母细胞 精母细胞(图版I:1,3,4)大致包括初级精母细胞和次级精母细胞两个阶段。初级精母细胞(图版I:1,3)位于精原细胞的内侧,为椭圆形,直径5 μm;细胞核较明显;线粒体围绕在核膜的周围。在白肛海地瓜的精母细胞内有高电子密度球形颗粒,为前顶体颗粒(图版I:1),这种颗粒将在发育过程中融合成为前顶体。

次级精母细胞(图版I:4)很少见到,可能是由于次级精母细胞存在的时间很短,很快进入第二次成熟分裂,成为精子细胞的原因。次级精母细胞体积小于初级精母细胞,细胞为圆形,直径2~3 μm;核圆形,染色质进一步凝集,线粒体体积无明显变化。

2.1.3 精细胞 精细胞(图版I:5)体积继续缩小,直径约3 μm,染色质聚集成团块状,线粒体集中于细胞的后部,核前端凹陷,前顶体颗粒尚未融合。

2.2 精子结构 白肛海地瓜精子为有鞭毛的原生型精子。扫描电镜下,白肛海地瓜的精子可分为三段:头部、中部和尾部(图版I:6)。头部呈球状,长轴约1.75 μm,短轴约1.50 μm,顶体完全包被在核窝内;中部一般为2个线粒体,体积明显小于头部,内部有近端中心粒和远端中心粒;尾部长约60 μm(图版I:6)。头部由一层褶皱的质膜包裹,中部和尾部表面光滑。

2.2.1 头部 精子头部(图版II:1,2)主要包

括顶体和细胞核,在顶体和细胞核之间为围顶体物质。

顶体(acrosome)(图版 II:1,2)位于精子的最前端,透射电镜下顶体电子密度基本相同。顶体前端有的突起呈明显的乳头状,而有的精子顶体前端无突起。在精子纵切面的中轴方向上,顶体的长度约占细胞核长度的 1/3。

顶体下方为细胞核(图版 II:1),顶体与核之间的腔,称为围顶体物质(periacrosomal material)(图版 II:1~3)。围顶体物质的电子密度略高于顶体。

细胞核为椭圆形,前后稍扁平,其体积占头部的大部分。核内染色质致密,电子密度均匀,是精子中电子密度最高的部分。核后部圆滑,与精子中部具有明显的间隙,称为核后窝(图版 II:1,3)。

2.2.2 中部 白肛海地瓜精子的中部(图版 II:1,3,4)位于细胞核与尾部之间。中段的主要结构有线粒体和中心体。从白肛海地瓜精子的纵切面一般可以观察到由一个或两个线粒体围绕着的中心粒复合体(图版 II:1,4),中心粒复合体由近端中心粒和远端中心粒(图版 II:1,5)相互垂直排列组成(图版 II:1,3)。

2.2.3 尾部 尾部(图版 II:3,6)为精子的运动器官,起源于位于中部的远端中心粒。白肛海地瓜精子的尾部为远端中心粒延伸而成的鞭毛,横切面近圆形,外周为一薄层质膜,内有轴丝,和双联体微管,是典型的“9+2”结构(图版 II:6)。

3 讨论

3.1 白肛海地瓜精子发生 Walker^[9]利用营养物质和激素创造一个适合海百合类生物生存的微环境来模拟配子形成,通过电镜研究,基本可以了解精巢壁各种结构和组织的功能。因为白肛海地瓜和海百合纲的生物同属于棘皮动物门,所以我们可以从中大致推断白肛海地瓜的精巢壁相关结构的功能:精子发生时,发生层会产生很多的内陷(invaginations),这些褶皱结构可以增大生殖细胞附着的表面积,加快精子

产生的速度;精原细胞就附着在发生层,精母细胞位于精原细胞的内侧,这样的排列类似于大多数生物精子的发生情况;从精原细胞开始,生殖细胞逐渐向腔内迁移,直至精子成熟进入精巢腔内。白肛海地瓜的精原细胞和初级精母细胞在体积上没有明显的变化,但从初级精母细胞到成熟的精子,体积逐级减小。内质网出现在精原细胞时期。

在海百合(*Florometral serratissima*)^[10]精子发生过程中,围脏层上由围脏上皮细胞(perivisceral epithelial cells)、肌肉组织(muscle fibers)及神经细胞(nerve cell)等组成,精子发生层包括生殖细胞(germinal cells)和间隙细胞(interstitial cells)。通过核仁电子密度比较大等特征,可以很容易分别间隙细胞和生殖细胞,间隙细胞存在于精子发生层的内基膜到精巢腔(testicular lumen)之间,在靠近精巢壁的间隙细胞很多被拉成长扁状并含有少量细胞器。但是在白肛海地瓜只隐约可以发现基膜。

3.2 白肛海地瓜与其他棘皮动物的精子形态比较 海参的受精多为体外进行,为原生型精子^[11],结构大致都包括头部、中部和尾部三个部分,但是不同海参之间内部结构却有所不同,差别主要在于顶体区域。

大部分海参精子的形状都呈圆球形,目前发现只有卢氏瓜参(*Cucumaria lubrica*)^[12]的精子形状为圆柱形,裴氏瓜参(*C. pseudocurata*)^[13]的精子形状为片状。

在所报道的文献中,可发现纽细锚参^[14]、尼氏刺参(*Neostchopus grammatus*)^[15]及贾氏光参(*C. japonica*)^[16]等精子顶体前端由一层顶体颗粒膜(acrosomal granule membrane)包裹,在卢氏瓜参^[12]发现精子有顶体颗粒膜的存在,偶见侧边缺失。白肛海地瓜的顶体颗粒膜暂没有观察到缺失现象。

一般认为,可以根据顶体的形状和大小对动物进行分类,顶体与精子和卵细胞结合有关,杨万喜等^[17]研究发现,动物精子的顶体内具有水解酶,如蛋白酶、透明质酸酶、酸性磷酸酶、 β -葡萄糖醛酸酶、 β -葡萄糖胺酶及磷脂酶等。当

精子接触卵子时,精子能发生顶体反应,释放顶体酶,协助精子进入卵内。顶体多数包裹于核前窝内,只有在孔氏瓜参(*C. conicospermium*)^[16]的超微结构报道中,有1/3的顶体位于核窝之外,而这种情况在许多其他棘皮动物精子的超微结构研究中很少见到;顶体区域一般由围顶体物质及顶体组成,它们由一层质膜包裹。在不同的海参种类中,顶体的大小、结构不同,顶体内的物质分布也不同^[16],白肛海地瓜的顶体及围顶体物质密度较为均匀,围顶体物质的电子密度略高于顶体;在细锚参^[14]的精子中,顶体中心的电子密度呈同心圆排列;斯氏海参(*Roweia stephensoni*)^[15]、艾氏赛瓜参(*Thyone aurea*)^[15]、斯氏伪翼手参(*Pseudocnella sykion*)^[15]、黑赤星海参(*Holothuria cinerescens*)^[15]及另一种斯氏海参(*Aslia spyridophora*)^[15]等顶体中心的电子密度大于周围的电子密度,但是没有呈现同心圆排列的状况^[15];尼氏刺参^[15]、柯氏砂海星^[2]的顶体与上述情况正好相反,其中心的电子密度低于周围的电子密度。与大多数海参不同的是,白肛海地瓜顶体的横切图上,可见围顶体物质与顶体的内膜之间有明显的间隔(图版II:1,3),这个内容物有何生理功能以及这些物质的来源,有待于进一步探索。

白肛海地瓜精子的核内物质分布均匀且电子密度高,为球形,偶尔可见囊泡(或核泡)(vesicicle)结构,在对海参纲其他物种的研究中,只有在报道细锚参精子^[14]的图片中能清晰地看见囊泡结构。囊泡的发生及功能尚未明确。相对来说,在很多双壳类动物如栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[18]、青蛤(*Cyclina sinensis*)^[19]、泥蚶(*Tegillarca granosa*)^[20]等的精子中报道过囊泡结构的存在。庞振国等^[7]认为这是一种自然结构,功能有待进一步研究。白肛海地瓜精子无核前窝,存在核后窝,核后窝是近端中心粒嵌入细胞核的位置。Popham^[21]认为核前窝的出现可能与顶体轴棒的出现有关;核后窝的发生与远端中心粒的卫星体的出现有关。刘长琳等^[22]认为根据核后窝是否发达,是否形成核内沟及是否偏离细胞核的中心位置,可将核后窝

分为3类,这3种类型与精子的运动及受精方式有一定的联系。吴莹莹等^[23]则认为核后窝在精子运动中起到关节窝的作用,以降低尾部运动对头部的震动。

线粒体是精子游动所需的能量来源,数目基本比较稳定,白肛海地瓜精子一般都是有2个线粒体,位于精子核的后部,偶见3~5个线粒体,近端中心粒和远端中心粒位于中间,它们互成垂直。在中心粒和线粒体之间,可以看到脂滴(lipid droplet)的存在。白肛海地瓜远端中心粒的长轴方向与尾部一致,是鞭毛的基体(图版II:9)。横切面可以看到其中心粒卫星体,由远端中心粒后端外围向四周发出9条辐射状电子致密带,每条致密带的末端与质膜及线粒体相连,它们的连接形状呈Y型,这与报道中提到的米氏光参(*Cucumaria miniata*)^[11]和艾氏紫海蛇尾^[11]的模式结构基本相同。竺俊全等^[24]研究发现,线粒体的排列方式直接反映物种进化地位的高低,哺乳动物精子的中段长、线粒体数量多;双壳软体动物的精子中段则明显变短,线粒体数量减少;十足类甲壳动物精子则没有中段。所以,通过对白肛海地瓜线粒体中段的观察及研究可以为研究海参生殖进化提供重要依据。

精子的尾部是游动器官。白肛海地瓜精子头部为圆柱形,尾部细长,尾部结构为典型的“9+2”结构,外围由质膜包围,内有2条轴丝。但是裴氏瓜参^[13]精子尾部为“9+3”的结构。

综上所述,生活在较深海水环境中的白肛海地瓜,相比海参纲其他物种,其精子存在特殊结构与适应机制:超级中心粒复合体,有助于精子在高压低温环境中存活,以有充足的时间完成受精;较长的尾部及顶体包含于精核的前端使精子头部小而灵巧,使精子在海底环境中更快速地运动。

参 考 文 献

- [1] 廖玉麟. 中国动物志:棘皮动物门 海参纲. 北京:科学出版社, 1997: 243-247.
- [2] Paula F D, Geertude W H. The ultrastructural

- organization of the mature spermatozoon of *Luidia clathrata* (Say) (Echinodermata: Asteroidea). *Gamete Research*, 1981, 4(6): 547–553.
- [3] Au D W, Reunov A A, Wu R S. Four lines of spermatid development and dimorphic spermatozoa in the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. *Zoomorphology*, 1998, 118(3): 159–168.
- [4] Fontaine A R, Lambert P. The fine structure of the sperm of a holothurian and an ophiuroid. *Journal of Morphology*, 1976, 148(2): 209–226.
- [5] Jamieson B G M. The spermatozoa of the Holothuroidea (Echinodermata): an ultrastructural review with data on two Australian species and phylogenetic discussion. *Zoologica Scripta*, 1985, 14(2): 123–135.
- [6] Atwood D G. Fine structure of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids of the sea cucumbers *Cucumaria lubrica* and *leptosynapta clarki* (Echinodermata: Holothuroidea). *Journal of Zoology*, 1974, 52(11): 1389–1396.
- [7] 庞振国, 孙慧玲, 燕敬平, 等. 刺参精子发生的超微结构研究. *海洋水产研究*, 2006, 27(3): 26–31.
- [8] 姚红伟, 宋冠南, 郭晋, 等. 仿刺参精子形态与超微结构的研究. *大连水产学院学报*, 2009, 24(增刊1): 73–76.
- [9] Walker C W. Ultrastructure of the somatic portion of the gonads in asteroids, with emphasis on flagellated-collar cells and nutrient transport. *Journal of Morphology*, 1979, 162(1): 127–162.
- [10] Bickell L R, Chia F S, Crawford B J. A fine structural study of the testicular wall and spermatogenesis in the Crinoid, *Florometra serratissima* (Echinodermata). *Journal of Morphology*, 1980, 166(1): 109–126.
- [11] Chia F S, Atwood D, Crawford B. Comparative morphology of echinoderm sperm and possible phylogenetic implications. *Integrative and Comparative Biology*, 1975, 15(3): 533–565.
- [12] Atwood D G, Chia F S. Fine structure of an unusual spermatozoon of a brooding sea cucumber, *Cucumaria lubrica*. *Journal of Zoology*, 1973, 52(4): 519–523.
- [13] Atwood D G. Fine structure of an elongated dorso-ventrally compressed echinoderm (Holothuroidea) spermatozoon. *Journal of Morphology*, 1975, 145(2): 189–208.
- [14] Atwood D G. Fine structure of the spermatozoon of the sea cucumber, *Leptosynapta clarki* (Echinodermata: Holothuroidea). *Cell and Tissue Research*, 1974, 149(2): 223–233.
- [15] Hodgson A N, Bernard R T F. Spermatozoon structure of eight species of South African Holothurians (Echinodermata). *Journal of Morphology*, 1992, 211(2): 179–186.
- [16] Tyurin S A, Drozdov A L. Spermatozoon ultrastructure of two holothurian species of the genus *Cucumaria* (Dendrochirotida, Holothuroidea) from the sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology*, 2001, 28(1): 61–64.
- [17] 杨万喜, 赖伟, 堵南山. 日本沼虾行为研究. *动物学杂志*, 1997, 32(3): 51–54.
- [18] 任素莲, 王如才, 王德秀. 栉孔扇贝精子超微结构的研究. *青岛海洋大学学报: 自然科学版*, 1998, 28(3): 387–392.
- [19] 曾志南, 李复雪. 青蛤精细胞分化的超微结构研究. *海洋学报*, 1991, 13(4): 547–551.
- [20] 孙慧玲, 方建光, 王清印, 等. 泥蚶精子的超微结构. *水产学报*, 2000, 24(4): 297–302.
- [21] Popham J D. Comparative spermatozoon morphology and bivalve phylogeny. *Malacological Review*, 1979, 12(1): 1–20.
- [22] 刘长琳, 邹捷, 刘君刚, 等. 金乌贼精子的超微结构. *渔业科学进展*, 2011, 32(3): 1–6.
- [23] 吴莹莹. 半滑舌鳎精子发生及其受精过程. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2008.
- [24] 竺俊全. 毛蚶 *Scapharca subcrenata* 精子发生过程中线粒体的行为研究. *浙江海洋学院学报: 自然科学版*, 2001, 20(1): 23–26.

图版 I 说明

白肛海地瓜的精子发生

1. 雄性生殖腺:示精原细胞、精母细胞、前顶体颗粒; 2. 精原细胞:示核、线粒体; 3. 初级精母细胞:示核、线粒体; 4. 次级精母细胞:示核、近端中心粒、远端中心粒、线粒体; 5. 早期精细胞:示前顶体颗粒、线粒体、脂滴及质膜; 6. 精子扫描电镜:示头部、中部、尾部。

Explanation of Plate I

Spermatogenesis of Sea Cucumber *Acaudina leucoprocta*

1. Male gonad showing spermatogonia, spermatocytes and proacrosomic granule; 2. Spermatogonium showing nucleus and mitochondria; 3. Primary spermatocyte showing nucleus and mitochondria; 4. Secondary spermatocyte showing nucleus, proximal centriole, distal centriole and mitochondria; 5. Early stage spermatid showing proacrosomic granule, mitochondrion, lipid droplet and plasma membrane; 6. Scanning electronic microscopy showing the head, the middle piece and the flagellum of the sperm.

图版 II 说明

白肛海地瓜精子超微结构

1. 精子纵切:示顶体、围顶体物质、核、远端中心粒、近端中心粒、线粒体、尾部; 2. 核仁横切:示顶体、围顶体物质、核、质膜; 3. 精子纵切:示顶体、顶体颗粒膜、核、线粒体、尾; 4. 中段前端横切:示线粒体、质膜; 5. 远端中心粒横切:示远端中心粒、线粒体; 6. 尾部横切。

Explanation of Plate II

Ultrastructure of sperm of Sea Cucumber *Acaudina leucoprocta*

1. Longitudinal section of sperm, showing acrosome, periacrosomal material, nucleus, distal centriole, proximal centriole, mitochondria, and flagellum; 2. Cross section of nucleus, showing acrosome, periacrosomal material, nucleus, and plasma membrane; 3. Longitudinal section of sperm showing acrosome, periacrosomal material, nucleus, distal centriole, proximal centriole, mitochondria, and flagellum; 4. Cross section of middle front, showing mitochondria and plasma membrane; 5. Cross section showing distal centriole, mitochondria; 6. Cross section of flagellum.

AC: 顶体; AGM: 顶体颗粒膜; DC: 远端中心粒; ER: 内质网; F: 尾部; H: 精子头部; L: 脂滴; M: 线粒体; MP: 中部; N: 核; PA: 前顶体颗粒; PAM: 围顶体物质; PC: 近端中心粒; PM: 质膜; PS: 初级精母细胞; SG: 精原细胞; SS: 次级精母细胞; V: 核泡。

AC: Acrosome; AGM: Acrosomal granule member; DC: Distal centriole; ER: endoplasmic reticulum; F: Flagellum; H: Head of sperm; L: Lipid; M: Mitochondrion; MP: Middle piece; N: Nucleus; PA: Proacrosomic granule; PAM: Periacrosomal material; PC: Proximal centriole; PM: Plasma membrane; PS: Primary spermatocyte; SG: Spermatogonium; SS: Secondary spermatocyte; V: Vesicle.

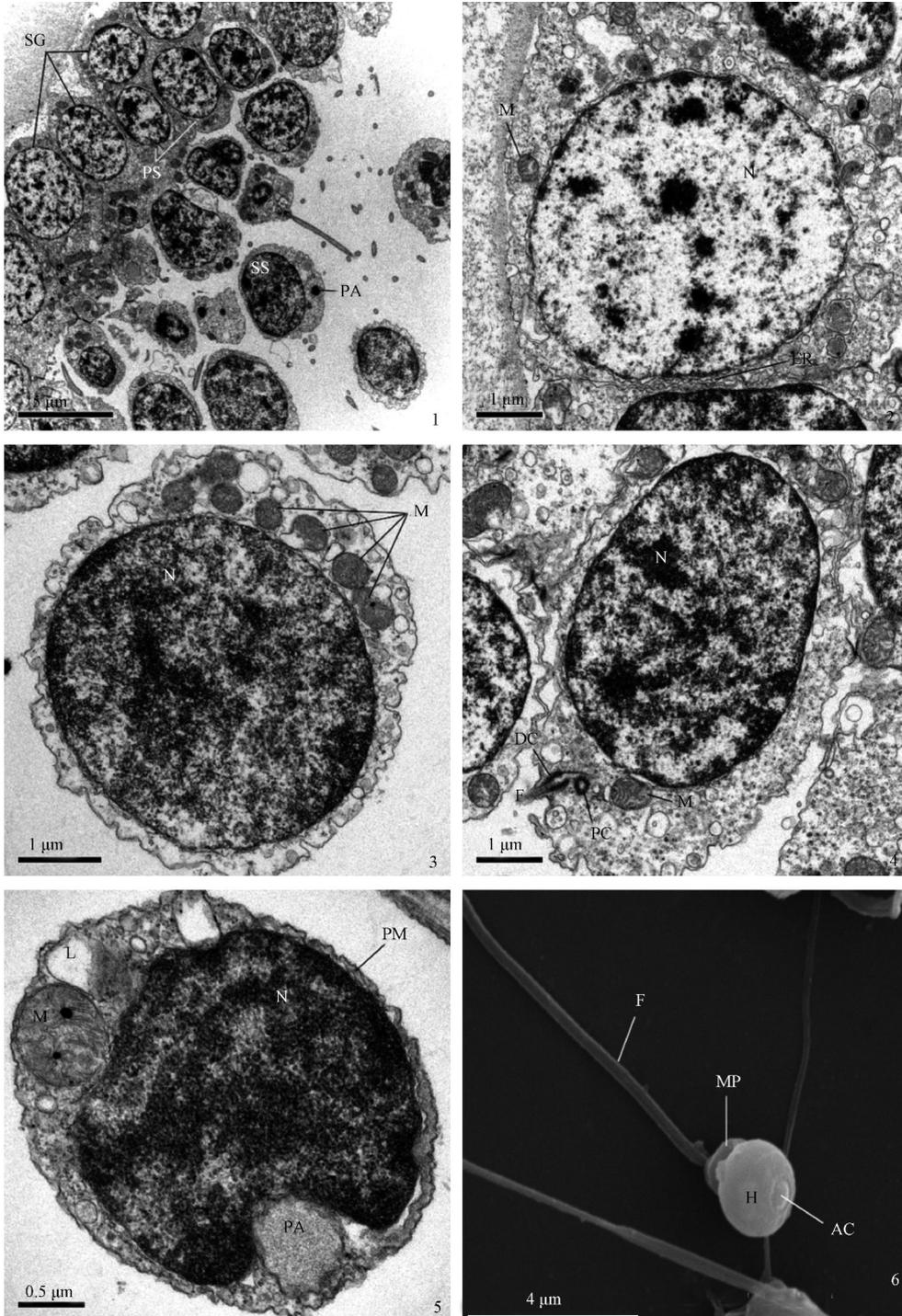
冯维达等:白肛海地瓜精子发生及形态的超微结构

图版 I

FENG Wei-Da *et al.*: Spermatogenesis and Sperm Morphology of Sea Cucumber *Acaudina*

leucoprocta

Plate I



图版说明见文后

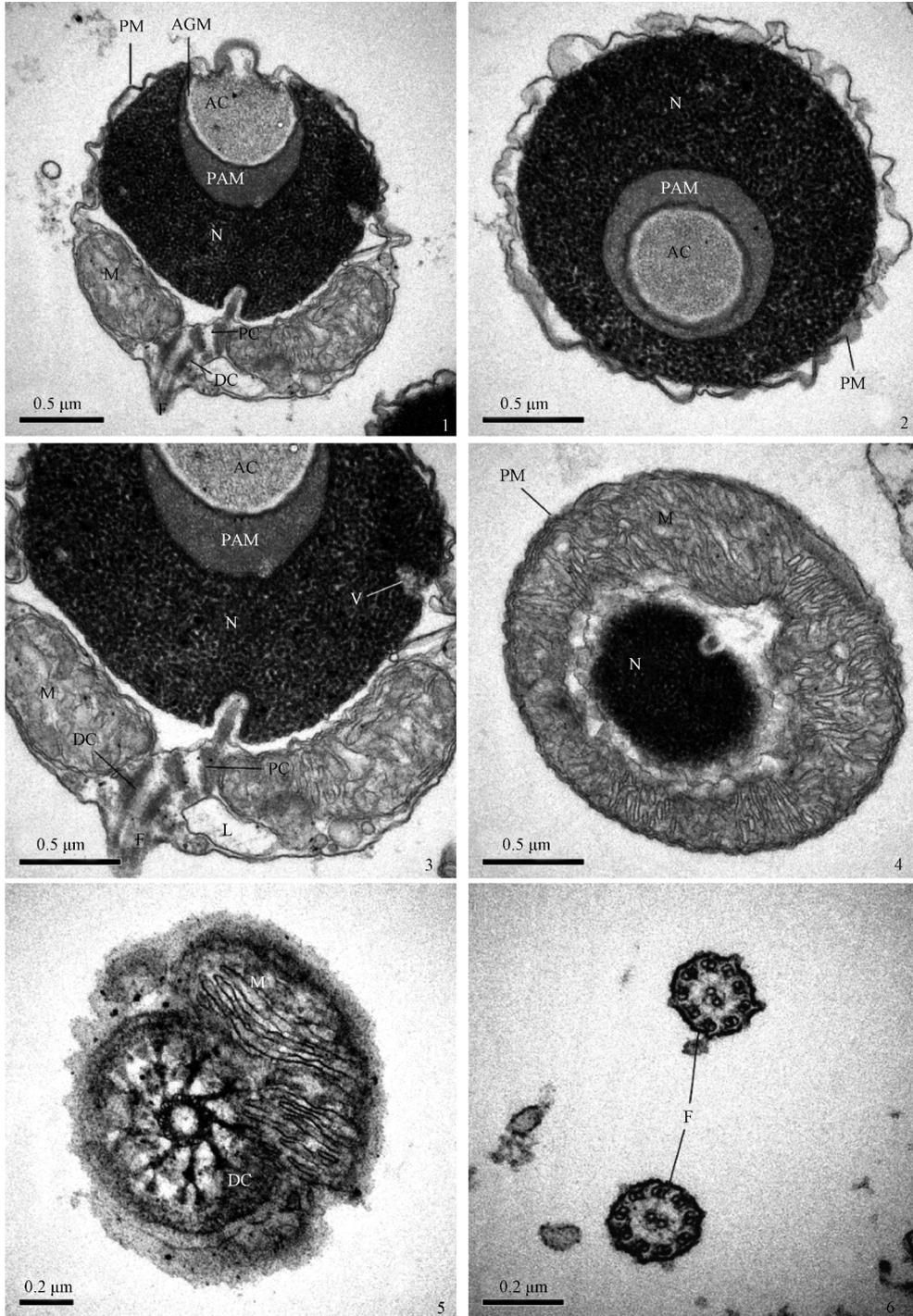
冯维达等:白肛海地瓜精子发生及形态的超微结构

图版 II

FENG Wei-Da *et al.*: Spermatogenesis and Sperm Morphology of Sea Cucumber *Acaudina*

leucoprocta

Plate II



图版说明见文后