

文章编号: 1004 - 7271(2008)05 - 0547 - 06

青蛤精子结构及环境因子对精子活力的影响

竺俊全^{1,2}, 丁理法³, 沈和定², 许式见¹, 叶 霆¹

(1. 宁波大学教育部应用海洋生物技术重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 200090;

3. 温岭市水产技术推广站, 浙江 温岭 317500)

摘 要:用显微及亚显微技术研究了青蛤精子的形态结构;通过设定盐度、pH 及温度梯度条件,研究了其对青蛤精子活力的影响。精子头部呈稍弯曲的辣椒形,由圆锥状顶体与柱状细胞核构成。顶体长约 0.8 μm 、内部物质分布均匀,顶体下腔内颗粒状物质均布;核长约 2.3 μm 、核宽约 0.7 μm ~ 0.9 μm ,核质电子密度高而均匀,具核后窝。尾部包括中段和末段,中段由 5 个线粒体围绕近、远端中心粒构成;末段细长鞭状,由轴丝及包裹轴丝的质膜组成,轴丝为“9 + 2”结构。青蛤精子与同属帘蛤科的菲律宾蛤仔、波纹巴非蛤及沟纹巴非蛤精子在顶体的形态与尺寸、核形态与大小、中段线粒体数目上存在差异。青蛤精子激活与运动的最适盐度为 20 ~ 25,最适 pH 为 8.0 ~ 9.0,最适温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ ~ 30 $^{\circ}\text{C}$ 。青蛤精子对盐度及 pH 的适应性较强,反映了该物种对潮间带栖息环境变化的适应性。

关键词:青蛤;精子;形态结构;活力;盐度;pH;温度

中图分类号: S 917 **文章标识码:** A

Spermatozoa morphology and effects of environmental factors on spermatozoa motility in *Cyclina sinensis*

ZHU Jun-quan^{1,2}, DING Li-fa³, SHEN He-ding², XU Shi-jian¹, YE Ting¹

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology by the Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China;

3. Extending station of fishery technique, Wenling 317500, China)

Abstract: The morphology of spermatozoa of *Cyclina sinensis* were investigated by light microscopy as well as electron microscopy. The effects of environmental factors on the sperm motility were also investigated by setting different gradients of salinity, pH and temperature. The sperm of *Cyclina sinensis* is pepper-shaped, with a slight curve on the head which consists of a conical acrosome and a columnar nucleus. The acrosome is about 0.8 μm in length, with equally distributed materials in it. The subacrosomal space contains granular material. The nucleus is about 2.3 μm in length, and 0.7 - 0.9 μm in width, with high electronic density and equally distributed material in it. The nucleus also contains a post nuclear fossa. The tail is comprised of a mid-piece and an end piece. The mid-piece has five mitochondria which surround the proximal and distal centrioles. The whip-like end piece consists of an axoneme which is a typical “9 + 2” structure, and plasma membrane

收稿日期: 2007-11-14

基金项目: 宁波市青年科学基金(02J20102 - 18)

作者简介: 竺俊全(1964 -), 男, 浙江嵊州人, 教授, 主要从事水产动物繁育生物学方面的研究。Tel: 0574 - 87608162, E - mail: zhujunquan@nbu.edu.cn

which is around the axoneme. There are many differences in the morphology and the size of acrosome and nucleus, as well as the number of mitochondria in mid-piece among *Cyclina sinensis*, *Ruditapes philippinarum*, *Paphia undulata*, and *Paphia exarata*, which are all in the Family Veneridae. The optimal salinity for spermatozoa activation and motility is 20 – 25, the optimal pH is 8.0 – 9.0, and the optimal temperature is 25°C – 30°C. The *Cyclina sinensis* spermatozoa has broad adaptation to environmental salinity and pH value, this reflects that this species adapts to the intertidal zone environmental changes.

Key words: *Cyclina sinensis*; spermatozoa; morphology; motility; salinity; pH; temperature

水生动物精子的形态结构与其运动方式及受精过程密切相关,是受精生物学研究的重要内容之一;精子形态结构的种间差异可作为鉴别种的依据^[1-2]。精子活力不仅与自身质量有关,而且与盐度、pH及水温等环境因子相关^[3-4];适宜的水环境因子是精子激活及完成受精作用的必要条件。

青蛤(*Cyclina sinensis*)属帘蛤目(Veneroida)、帘蛤科(Veneridae)、青蛤属(*Cyclina*),是我国重要滩涂经济贝类之一,育苗与养殖已产业化,遗传育种、良种培育研究正在进行之中。有关该种的生殖生物学,已见卵母细胞发育和卵黄发生、精细胞分化及繁殖周期等的研究报告^[5-7]。尽管曾志南和李复雪对青蛤精子结构作了简单描述^[6],但显示的精子形态不典型,且未分析精子结构特点;青蛤精子的活力尚未见研究报告。本文研究了青蛤成熟精子的典型形态结构和盐度、pH及温度对精子活力的影响,比较了青蛤和其它帘蛤科物种精子结构的异同,探讨了青蛤精子顶体、核及中段结构特点,分析了青蛤精子的环境适应性。为青蛤受精机理的研究及其苗种繁育中人工催产与人工授精的适宜环境条件选择、培育优质苗种提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

性成熟青蛤于7月-8月的繁殖季节采自温岭沿海的养殖池塘,样品贝采得后立即带回宁波大学实验室暂养。

1.2 实验方法

挑选活力强、成熟度高的雄贝用于采精。先洗净贝壳表面并擦干,然后解剖、采精。

1.2.1 精子显微结构观察

用吸管吸取少量精液,用盐度23的过滤海水稀释50~100倍后涂片,在Nikon显微镜下观察精子的形态特征,并摄影。

1.2.2 精子超微结构观察

将采得的精液用0.1 mol/L、pH 7.4的磷酸缓冲液配制的2.5%戊二醛(4℃)固定2h,用1%锇酸后固定2h,乙醇梯度浓度脱水,Spurr氏低粘度包埋剂渗透、包埋,LKB-II型超薄切片机切片,日立JEM-1200EX型电镜观察精子的超微结构特征,并拍照。

1.2.3 环境因子设定及精子活力观察

(1)设定盐度梯度为5、10、15、20、25、30、35、40、45,系由过滤海水(盐度23,pH8.2)加海水晶或蒸馏水调配而成;(2)设定pH梯度为6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0,系用1 mol/L盐酸或氢氧化钠溶液调节过滤海水配制而成;(3)设定温度梯度为10、15、20、25、30、35、40,即将过滤海水储存于滴瓶中与玻片等实验器具(放入塑料袋中,扎紧)一起放在低温恒温槽或恒温水浴锅中调节到设定的温度,立即进行精子的激活实验,观察瞬时激活率;(4)精子活力观察方法参照文献[8],精子激活率以显微镜下同一视野中的活动精子百分比表示,运动时间指精子自激活开始到约90%运动精子转入缓慢运动(原处颤动)为止的时间,精子的寿命指精子自激活开始到约90%运动精子停止运动为止的时间。每个梯度实验重复3次,取平均值。

2 结果

2.1 精子的形态结构

显微观察青蛤精子属典型的鞭毛型,头部呈稍弯曲的辣椒形(图版-1,2)。透射电镜观察精子头部由顶体(Acrosome)与核(Nucleus)构成,尾部可明显地区分为短的中段(Mid-piece)和细长的末段(End piece)。精子从头至尾各部分均被包裹在质膜内(图版-3,4)。

2.1.1 顶体

精子顶体位于核的前端,从纵切面及横切面观判断,为圆锥状,长约 $0.8\ \mu\text{m}$ 。顶体长与顶体基部宽之比接近1:1。整个顶体由质膜包被,或称之为顶体泡(Acrosomal vesicle)。顶体的顶端较薄,向后端渐增厚;顶体内部物质分布均匀、电子密度较高;顶体和核之间为顶体下腔(Subacrosomal space),呈圆锥形,由近核端向远核端渐缩小,内有颗粒状物质均布(图版-4~7)。

2.1.2 核

精子核纵切面观呈稍弯曲的柱状,核质高度浓缩、电子密度高而均匀;核长约 $2.3\ \mu\text{m}$ 、核宽约 $0.7\ \mu\text{m}\sim 0.9\ \mu\text{m}$,从前向后略增宽;核前端微凸,核后端中央稍内陷成核后窝(Posterior nuclear pocket),近端中心粒位于核后窝处。核膜外被质膜(图版-4~6,8,9)。

2.1.3 中段

精子中段纵切面观可见2个线粒体,横切面观可见5个线粒体环绕于中心粒的周围,相邻线粒体间连接紧密;线粒体切面观呈圆形或卵圆形,内部嵴较发达、基质电子密度高;近端中心粒(Proximal centriole)长轴与精子的纵轴垂直,远端中心粒(Distal centriole)长轴与精子的纵轴平行,远端中心粒末端向后延伸出轴丝(图版-8~10)。

2.1.4 末段

精子末段为细长的鞭毛,从纵切及横切面观可见由轴丝及外包轴丝的质膜组成,轴丝为典型的“9+2”结构(图版-11,12)。

2.2 环境因子对精子活力的影响

2.2.1 盐度对精子活力的影响

由图1可见,在水温 $28\pm 1\ ^\circ\text{C}$ 条件下,盐度5及45时未能激活精子,盐度10~40范围内均有不同比例精子被激活。在盐度20~25范围内,精子激活率不小于90%,其中盐度25时,精子激活率最高、运动时间与寿命最长,分别达到95%、5 h和7.4 h。

2.2.2 pH对精子活力的影响

由图2可见,在水温 $28\pm 1\ ^\circ\text{C}$ 条件下,pH 6.0~10.0范围内均有不同比例的精子被激活。在pH 8.0~9.0范围内,精子激活率不小于90%,其中pH 8.5时,精子激活率最高、运动时间与寿命最长,分别达到了97%、5.3 h和7 h。

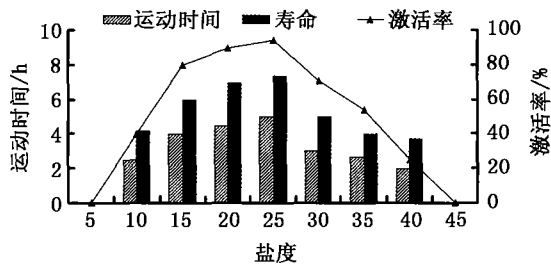


图1 盐度对青蛤精子活力的影响

Fig.1 Effect of salinity on motility of spermatozoa from *C. sinensis*

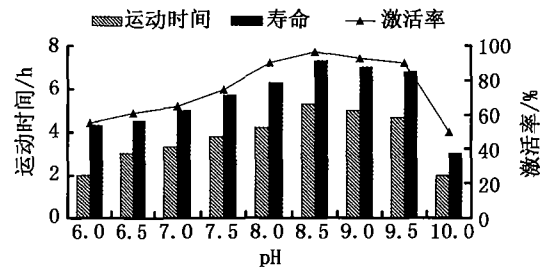


图2 pH对青蛤精子活力的影响

Fig.2 Effect of pH on motility of spermatozoa from *C. sinensis*

2.2.3 温度对精子激活率的影响

由图3可见,在盐度23条件下,水温10℃~40℃范围内均有不同比例的精子被激活。水温25℃~30℃范围内,精子激活率不小于90%,其中水温30℃时,精子激活率最高。

3 讨论

3.1 精子顶体的形态特征是种间区分的依据

曾志南和李复雪报道青蛤精子的顶体呈帽状,外区电子密度较内区大,顶体下腔中央有一高电子密度的球状颗粒^[6]。本研究表明,青蛤精子顶体呈圆锥形,内部物质分布均匀,顶体下腔中颗粒状物质均布、无高电子密度的球状颗粒存在。我们认为,曾志南和李复雪描述的精子顶体尚未发育成熟。

青蛤精子的顶体与同属帘蛤科的非律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)^[9]、波纹巴非蛤(*Paphia undulata*)^[10]及沟纹巴非蛤(*Paphia exarata*)^[11]精子的顶体形态及尺寸上存在差异。蛤仔属非律宾蛤仔精子顶体细长柱形,长度不小于3 μm,电子密度低而均匀。巴非蛤属波纹巴非蛤精子顶体呈圆锥形,长约0.58 μm;而沟纹巴非蛤精子圆锥形顶体长约0.9 μm,基部宽约0.6 μm,内含物分布不均匀。本研究的青蛤精子圆锥形顶体长约0.8 μm,基部宽与长基本相同。可见,精子顶体的形态与尺寸可作为帘蛤科属、种间区分的依据。

3.2 精子核形态的特异性

一般,双壳类精子核染色质高度浓缩、致密而均布,以确保最小的体积与特定的形状,同时使精子在结构上十分灵巧,以满足快速运动及完成受精作用的需要。双壳贝类种间精子核的形态结构差异主要体现在核的形态与大小、横径与纵径的比例,以及核前窝与核后窝结构的有无等等^[1]。在帘蛤科动物中,非律宾蛤仔的精子核近锥形,向一端有一定的弯曲度,长3 μm~4 μm,最窄处0.2 μm,最宽处1 μm,核质电子密度高而均匀,有核泡,具核前窝与核后窝^[9];波纹巴非蛤精子核呈桶状,长1.74 μm~1.84 μm,从前端向后端渐增宽,最宽处0.89 μm~1.29 μm,核物质高度凝集,核后端具凹窝^[10]。沟纹巴非蛤精子核呈卵圆形,大小约1.7 μm×1.0 μm,核物质高度凝聚,有不规则核泡,具浅的核后窝^[11]。本研究的青蛤精子核呈稍弯曲的柱状,核质电子密度高而均匀,无核泡,核长约2.3 μm,核宽0.7 μm~0.9 μm,从前向后略增宽,无核前窝,具浅的核后窝。可见,帘蛤科精子核的形态与大小具有种的特异性。

关于青蛤精子核弯曲的生理功能,我们认为与入卵时精子头部着卵方向有关。太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[12]、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[13]等双壳贝的精子头部轴对称,只要顶体斜对着卵膜,哪一面着卵是随机的。青蛤精子头部可能是弯曲面着卵,从而使顶体斜对着卵膜,有利于精子通过顶体反应顺利入卵,这一点有待受精细胞学研究证实。

3.3 精子中段线粒体的形态与数目

双壳类精子中段线粒体呈卵圆形或球形,数目4或5个,围绕在近端与远端中心粒的周围^[14]。例如:在蚶科,泥蚶精子中段线粒体5个^[15],毛蚶精子中段线粒体常见5个、偶见4个,青蚶精子中段线粒体常见5个、偶见6个^[2]。在帘蛤科,非律宾蛤仔^[9]和波纹巴非蛤^[10]精子中段线粒体4个,沟纹巴非蛤^[11]精子中段线粒体常见4个、偶见5个,青蛤精子中段线粒体5个。可见,同一科内种间精子线粒体数目有相同,也有变异。

线粒体是游动型精子的动力源。青蛤精子线粒体嵴发达、内部基质丰富,为精子在海水中长时间运动提供能源。

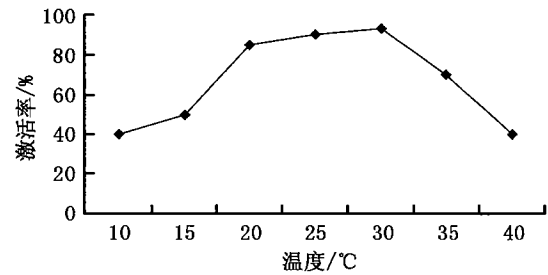


图3 温度对青蛤精子激活率的影响
Fig. 3 Effect of temperature on activation of spermatozoa from *C. sinensis*

3.4 精子对环境的适应性

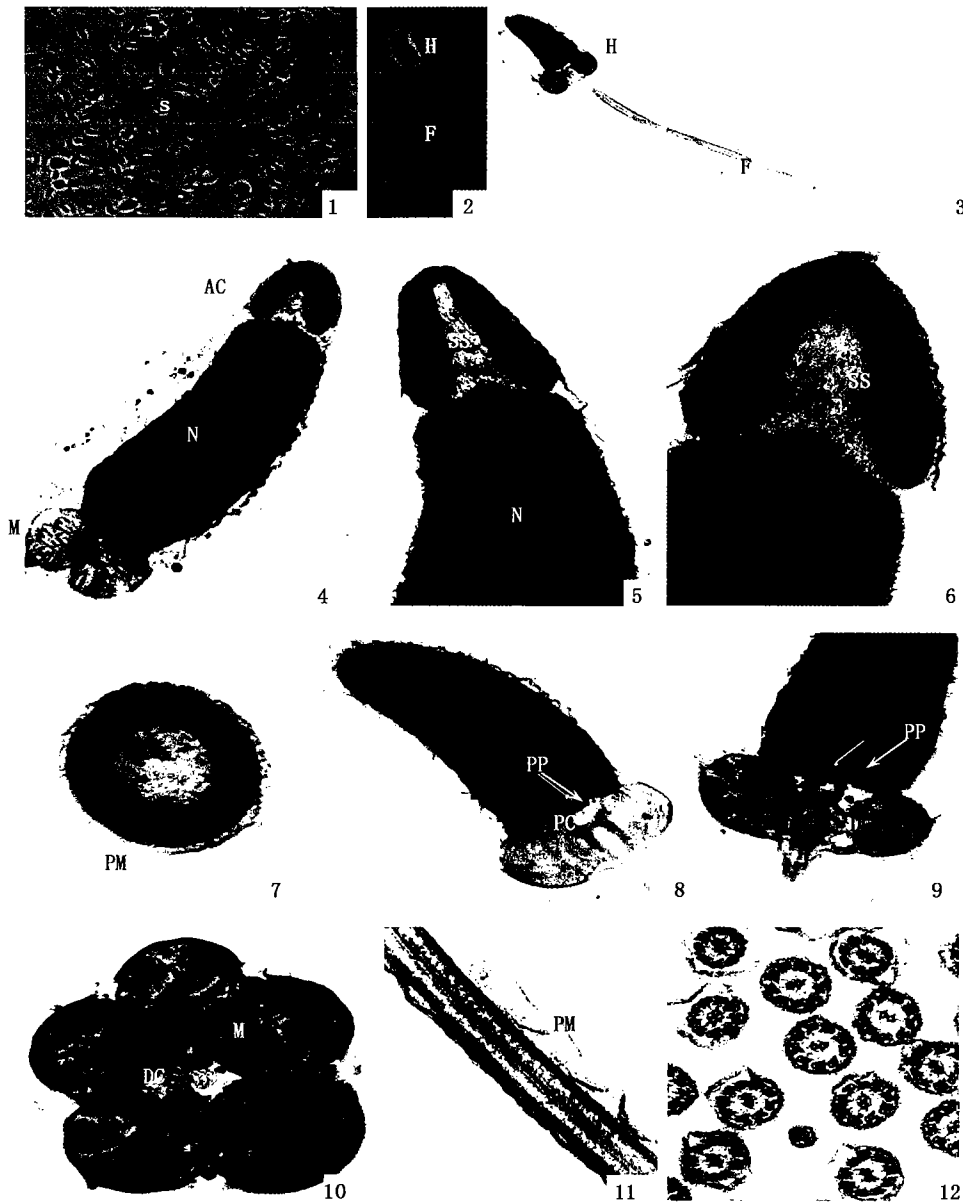
青蛤精子在盐度 15 ~ 30 范围内能被较好地激活,与同样是潮间带滩涂生活的泥蚶的精子耐盐性相似^[8]。潮间带滩涂海水环境多变、盐度变化大,青蛤与泥蚶等已经适应了这种多变的环境,其精子也表现出广盐性特点,且耐低盐能力较强。外海生活的合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)^[16]及珠母贝(*Pinctada margaritifera*)^[17]精子激活的适宜盐度范围为 25 ~ 35,与其栖息的环境相对稳定、且盐度较高相关。

青蛤精子在 pH 7.5 ~ 9.5 范围内能被较好地激活,具较强的 pH 适应能力,并表现出碱性环境下精子活力较好,这与泥蚶精子对 pH 的适应性相似^[8],是对潮间带栖息环境 pH 变化较大的适应。青蛤精子激活的最适水温为 25 ~ 30 °C,与其繁殖适温 25 ~ 28 °C 相一致^[18]。

青蛤精子运动时间最长达 5.3 h,寿命最长达 7.4 h,比泥蚶^[8]、合浦珠母贝^[16]及珠母贝^[17]精子的运动时间及寿命明显长。

参考文献:

- [1] 竺俊全,杨万喜. 双壳类软体动物精子发生及其在系统演化研究中的应用前景[J]. 海洋湖沼通报,2002,(4):25 - 31.
- [2] 竺俊全,杨万喜. 毛蚶与青蚶精子超微结构及其所反映的蚶科进化关系[J]. 动物学研究,2004,25(1):57 - 62.
- [3] 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.
- [4] 苏天凤,艾红. 鱼类精子活力及其超低温保存研究综述[J]. 上海水产大学学报,2004,13(4):345 - 347.
- [5] 曾志南,李复雪. 青蛤卵母细胞发育过程和卵黄发生的超微结构研究[J]. 海洋学报,1991,13(5):679 - 683.
- [6] 曾志南,李复雪. 青蛤精细胞分化的超微结构研究[J]. 海洋学报,1991,13(4):547 - 551.
- [7] 曾志南,李复雪. 青蛤的繁殖周期[J]. 热带海洋学报,1991,10(1):86 - 94.
- [8] 竺俊全,丁理法,焦海峰,等. 环境因子变化对泥蚶精子活力的影响[J]. 海洋科学,2006,30(2):65 - 68.
- [9] 代培芳,饶小珍,陈寅. 菲律宾蛤仔的精子发生与精子超微结构[J]. 动物学杂志,2004,29(2):26 - 32.
- [10] 赵志江,李复雪. 波纹巴非蛤 *Paphia undulata* 精子发生的超微结构[J]. 台湾海峡,1992,11(3):238 - 243.
- [11] 陈寅山,饶小珍,柯佳颖,等. 沟纹巴非蛤精子发生过程的超微结构观察[J]. 海洋科学,2006,30(8):28 - 33.
- [12] 姜明,汝少国,陶迺蓉,等. 入卵过程中太平洋牡蛎精子超微结构变化[J]. 青岛海洋大学学报,2003,33(4):551 - 556.
- [13] 赵峰,杨爱国,刘志鸿,等. 诱导栉孔扇贝雌核发育时精子入卵的扫描电镜观察[J]. 中国水产科学,2004,11(4):281 - 285.
- [14] Franzen A. Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalvia species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa[J]. Gamete Res,1983,7:199 - 214.
- [15] 竺俊全,杨万喜,石钢德. 泥蚶精子的超微结构[J]. 浙江大学学报(理学版),2002,29(3):324 - 328.
- [16] 喻达辉,陈亮春,苏天凤,等. 合浦珠母贝精子的实验生物学初步研究[J]. 热带海洋,1998,17(3):83 - 87.
- [17] 蔡云川,林黑着,吴开畅,等. 解剖采集的珠母贝精子的激活条件[J]. 中国水产科学,2001,8(4):9 - 12.
- [18] 王兴强,曹梅,阎斌伦,等. 青蛤的生物学及其繁殖[J]. 水产科学,2006,25(6):312 - 316.



图版 青蛤精子结构及环境因子对精子活力的影响

Plate Spermatozoa morphology and effects of environmental factors on spermatozoa motility in *Cyclina sinensis*

1. 青蛤精子,示头部,×400; 2. 青蛤精子,示头部及尾部鞭毛,×2000; 3. 青蛤精子,示头部及尾部鞭毛,×7200; 4. 青蛤精子纵切,示顶体、核、中段线粒体,×19000; 5. 青蛤精子头部纵切,示顶体、顶体下腔、核,×29000; 6. 青蛤精子头部纵切,示顶体、顶体下腔,×29000; 7. 青蛤精子顶体横切,示顶体下腔及质膜,×29000; 8. 青蛤精子头部纵切,示核后窝、近端中心粒,×19000; 9. 青蛤精子头部纵切,示核后窝、远端中心粒,×19000; 10. 青蛤精子中段横切,示5个线粒体围绕远端中心粒,×29000; 11. 青蛤精子尾部鞭毛纵切,示中央微管,×36000; 12. 青蛤精子尾部鞭毛横切,示“9+2”微管结构,×36000。

AC - 顶体; DC - 远端中心粒; F - 鞭毛; H - 头部; M - 线粒体; N - 核; PM - 质膜; PP - 核后窝; PC - 近端中心粒; S - 精子; SS - 顶体下腔。