



单环刺螠的繁殖生物学

许星鸿^{1,2,3*}, 孟 霄¹, 甘宏涛¹, 刘统昊¹, 丁子媛¹,
姚海洋¹, 徐国成¹, 丁 姗¹, 傅子玥¹, 陈 伟¹

- (1. 江苏海洋大学, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005;
2. 江苏海洋大学, 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室, 江苏 连云港 222005;
3. 江苏海洋大学, 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏 连云港 222005)

摘要: 运用实验生态学和组织学方法研究了单环刺螠的性比、性腺指数、繁殖力、胚胎与胚后发育等繁殖生物学特征, 并采用正交实验法分析了单环刺螠受精率和孵化率的最佳环境条件, 为单环刺螠的人工增养殖提供科学依据。结果显示, 单环刺螠雌、雄比例为 1:1.17, 雄性略多于雌性。成熟卵径为 $(145.16 \pm 1.70) \mu\text{m} \times (141.27 \pm 1.94) \mu\text{m}$, 处于第 1 次成熟分裂前期。绝对繁殖力为 $111\ 800 \sim 720\ 488 (449\ 684 \pm 265\ 905)$ 粒, 相对繁殖力为 $2\ 214 \sim 12\ 702 (6\ 849 \pm 4\ 854)$ 粒, 怀卵量与体质量呈显著正相关。生物学最小型体长约 7 cm, 体质量为 11.21 g。精子密度为 $(5.88 \pm 0.52) \times 10^9$ 个/mL, 雄性个体平均精子数为 $(2.41 \pm 0.73) \times 10^{10}$ 个/只。雌性性腺指数在繁殖季节 4—5 月份呈现 2 个峰值, 表明单环刺螠为分批产卵类型。在盐度 25、水温 15 °C 的条件下, 胚胎发育经 20~24 h 孵化。组织学研究表明, 单环刺螠为间黄卵, 进行不等全裂, 且有螺旋卵裂的特征, 形成偏极囊胚, 原肠作用方式为外包和内陷。胚后发育经担轮幼虫(孵化后 1~10 d)、体节幼虫(11~20 d)、蠕虫状幼虫(21~30 d)发育为幼螠。正交实验结果表明, 单环刺螠受精率的最佳环境条件为温度 25 °C、盐度 35、pH 8~9; 孵化率的最佳环境条件为温度 15 °C、盐度 25、pH 8~9。

关键词: 单环刺螠; 繁殖生物学; 环境条件

中图分类号: Q 959.9; S 917.4

文献标志码: A

单环刺螠 (*Urechis unicinctus*) 俗称海肠, 属螠虫动物门 (Echiuroinea)、刺螠科 (Urechidae), 主要分布于俄罗斯、日本、韩国和中国黄渤海沿岸。其肉味鲜美、营养丰富, 体内存在多种生物活性肽, 具有免疫调节、抗肿瘤等功能, 并且对海水中硫化物有较强的耐受与解毒能力, 对调节水质、缓解海洋污染起到积极作用, 因此具有较大的开发和利用价值^[1-3]。随着单环刺螠天然资源量的日趋减少, 其繁殖生物学及人工增养殖技术的研究日益受到重视。有关单环

刺螠精巢发育周期及精子发生^[4]、生殖腺的发生及卵巢发育周期^[5]、精子结构、受精过程^[6]以及和环境因子的关系^[7]等方面已有报道, 但目前尚缺乏性比、繁殖力以及环境对繁育的影响等基础数据。本研究运用实验生态学和组织学方法对单环刺螠的性比、性腺指数、繁殖力、胚胎与胚后发育等繁殖生物学特征进行了分析, 并采用正交实验法筛选出适宜单环刺螠受精率和孵化率的温度、盐度及 pH 3 个主要环境因子的最佳条件, 以期单环刺螠的生殖生理及人工

收稿日期: 2019-06-24 修回日期: 2019-09-01

资助项目: 江苏省科技厅苏北科技专项 (LYG-SZ201814); 江苏省优势学科建设工程资助项目 (CXKT2020); 连云港市科技局现代农业项目 (CN1411); 连云港 521 高层次人才培养工程项目 (KK18027); 江苏省研究生和大学生科研与实践创新计划项目 (SJCX18-0928)

通信作者: 许星鸿, E-mail: xhxu119@163.com

繁育技术的深入研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用单环刺螈于2017年4—5月采集自山东省莱州湾,每周采集1次,每次采集样品50只以上,记录雌雄比例,测量其收缩状态的体长和从水中取出时的体质量。所采集样品体长5.5~21.3 cm,体质量12.7~60.1 g。

1.2 实验方法

样品处理 每次从样品中随机取出雌、雄个体各10只,性别判断通过观察肾管颜色,黄色为雌性,白色为雄性。用电子天平称其体质量、肾管重,计算性腺指数(gonadosomatic index, GSI):

$$\text{GSI}(\%) = \frac{\text{肾管重 (g)}}{\text{体质量 (g)}} \times 100\%$$

随机取成熟雌、雄性个体各9只,分别剪取肾管前、中、后段,每段各制作1张生殖细胞水封片,用Nikon E1000显微镜测量卵径,每张水封片测量50个卵子,用血球计数板计数精子个数,进而计算精子密度和繁殖力($n=9$):

$$\text{绝对繁殖力} = 1 \text{ g 卵子数量} \times \text{成熟期肾管质量}$$

$$\text{相对繁殖力} = \frac{\text{绝对怀卵量}}{\text{成熟期雌体质量}}$$

取成熟生殖细胞进行人工授精,受精卵洗卵3次后转入70 cm×50 cm×40 cm水族缸中进行培养,观察胚胎与胚后发育过程。培养期间自然水温15~25℃,培养密度(20±5)只/mL,盐度25±1,pH 8.0±0.1,自然光照,连续充气,孵化48 h后日投喂2次单胞藻[球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)和小新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)]。至孵化后15 d,投放经60目筛绢过滤、消毒漂洗后的细沙作为附着基,厚度约5 cm。每天取样显微镜观察、拍照。

分别取成熟卵和卵裂期、囊胚期、原肠期等各期胚胎,用Bouin氏液固定,石蜡包埋,切片厚6~7 μm,苏木精—伊红(H.E)染色,显微镜观察、拍照。

环境因子对精子受精率和孵化率影响的正交实验设计 本实验采用温度、盐度及pH 3个主要境因子。温度取10℃、15℃、20℃、25℃和30℃ 5个梯度;盐度取15、20、25、30和35共5个梯度;pH取6、7、8、9和10共5个梯度,采用 $L_{25}(5^6)$ 的正交表进行实验。取25个500 mL

烧杯,按照正交表分别设置25组水环境,每个烧杯加水量均为300 mL。取1只成熟雌性个体的肾管,剪开肾管上皮释放出卵子,分别取300粒卵于25个烧杯中,再按精卵比为10:1比例加入1只雄性个体的精子,连续充气,于精卵混合后4 h到达卵裂晚期,此时受精卵可见多个分裂球,用300目筛绢网过滤出胚胎,显微镜观察并计算受精率。重复上述实验步骤,于精卵混合后24 h,用300目筛绢网滤出已孵化幼虫和未孵化胚胎,显微镜观察,计算孵化率。实验重复3次,计算平均值。受精率和孵化率公式:

$$\text{受精率}(\%) = \frac{\text{受精卵数}}{\text{取样卵总数}} \times 100\%$$

$$\text{孵化率}(\%) = \frac{\text{孵化个数}}{\text{取样卵总数}} \times 100\%$$

1.3 数据处理

实验数据用“平均值±标准差”表示。采用SPSS 18.0软件进行数据处理,并进行 t 检验或单因子方差分析(One-way ANOVA),LSD多重比较和Duncan氏检验。显著水平设为 $P<0.05$ 。

各因素同一水平之和(T 值)的计算。温度所对应的 T_1 值是正交表括号中数字“1”所对应的实验结果之和, T_2 值是正交表括号中数字“2”所对应的实验结果之和,以此类推,可计算出其他 T 值。

各因素同一水平的平均值(\bar{X} 值)的计算。温度所对应的 \bar{X}_1 值为(T_1 值/正交表括号中数字“1”的重复次数), \bar{X}_2 值为(T_2 值/正交表括号中数字“2”的重复次数),以此类推,可计算出其他 \bar{X} 值。

极差(R 值)能表明因素的主次顺序,即 R 值越大,该因子的水平变化对结果的影响越大,该因子就越重要。温度因子所对应的 R 值即温度因子所对应的 \bar{X}_1 、 \bar{X}_2 、 \bar{X}_3 、 \bar{X}_4 和 \bar{X}_5 中最大值减去最小值,同理可得出盐度和pH因子的 R 值。

2 结果

2.1 性比、卵径和繁殖力

对采集的446只单环刺螈样本进行雌雄性的统计分析,除去性别难以分辨的32只,单环刺螈的雌雄比为1:1.17,与1:1不存在显著性差异($P>0.05$)。

成熟卵径为(145.16±1.70) μm×(141.27±1.94) μm。绝对繁殖力为111 800~720 488(449 684±265 905)粒,相对繁殖力为2 214~12 702(6 849±4 854)

粒, 怀卵量与体质量呈显著正相关 ($R=0.683$, $P<0.05$)。在所测的 191 只成熟雌性个体中, 生物学最小型体长约 7 cm, 体质量为 11.21 g。精子密度为 $(5.88\pm 0.52)\times 10^9$ 个/mL, 雄性个体平均精子数为 $(2.41\pm 0.73)\times 10^{10}$ 个/只。

2.2 性腺指数

从单环刺螈性腺指数 (GSI) 变化趋势来看, 进入 4 月中旬后性腺指数迅速升高, 表明随着水温的逐渐升高发育加快。GSI 至 4 月下旬达到峰值后显著下降, 表明其该时间段出现集中排放。随后 GSI 有所回升, 至 5 月中旬出现第 2 个峰值后又明显降低, 表明在一个繁殖期内, 单环刺螈有 2 次集中排放精卵的现象 (图 1)。

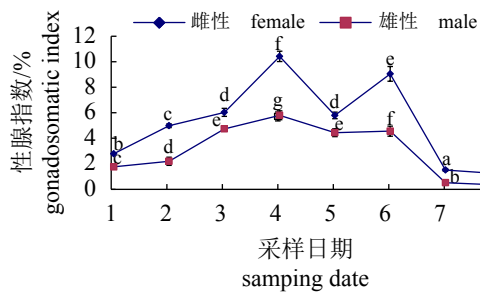


图 1 单环刺螈性腺指数变化

图中不同小写字母表示同一性别不同时间取材组间差异显著 ($P<0.05$)

Fig. 1 Changes of gonadosomatic index (GSI) of *U. uncinatus*

1. 04-10, 2. 04-16, 3. 04-23, 4. 04-26, 5. 08-03, 6. 05-10, 7. 05-14, 8. 05-21; the different letters indicated significant difference among the groups of the same sex at the different sampling times ($P<0.05$)

2.3 胚胎与胚后发育

单环刺螈成熟卵处于第 1 次成熟分裂前期, 胞质内卵黄颗粒明显, 生发泡完整 (图版 I-1)。在盐度 25、水温 15°C 的条件下, 精卵混合后约 0.5 h 受精膜举起, 形成围卵周隙, 此时卵径 (含卵膜) 约 $164.04\ \mu\text{m}\times 159.13\ \mu\text{m}$ (图版 I-2)。单环刺螈胚胎发育过程可分为卵裂期、囊胚期、原肠期和膜内担轮幼虫期等阶段。

受精后约 1 h 排出第一极体 (图版 I-3), 1.5 h 排出第二极体, 第一极体分裂成第三、四极体, 形成共 3 个极体 (图版 I-4), 2 h 发育至 2 细胞期, 有些分裂球大小相近, 有些则大小差异较明显 (图版 I-5), 以后每 0.5~1 h 分裂 1 次, 分裂球数量逐渐增多 (图版 I-6, 7)。分裂球有明显大小之

分, 且其排列有螺旋卵裂的特征。受精后 5~6 h 发育至囊胚期 (图版 I-8), 7~8 h 进入原肠期, 可见内陷 (图版 I-9) 和外包 (图版 I-10), 原肠后期胚胎表面长出纤毛 (图版 I-11)。受精后约 18 h 形成膜内担轮幼虫, 形状如大小悬殊的 2 个半球相接, 逐渐在卵膜内转动, 此时胚体大小约 $145.78\ \mu\text{m}\times 115.83\ \mu\text{m}$ (图版 I-12)。

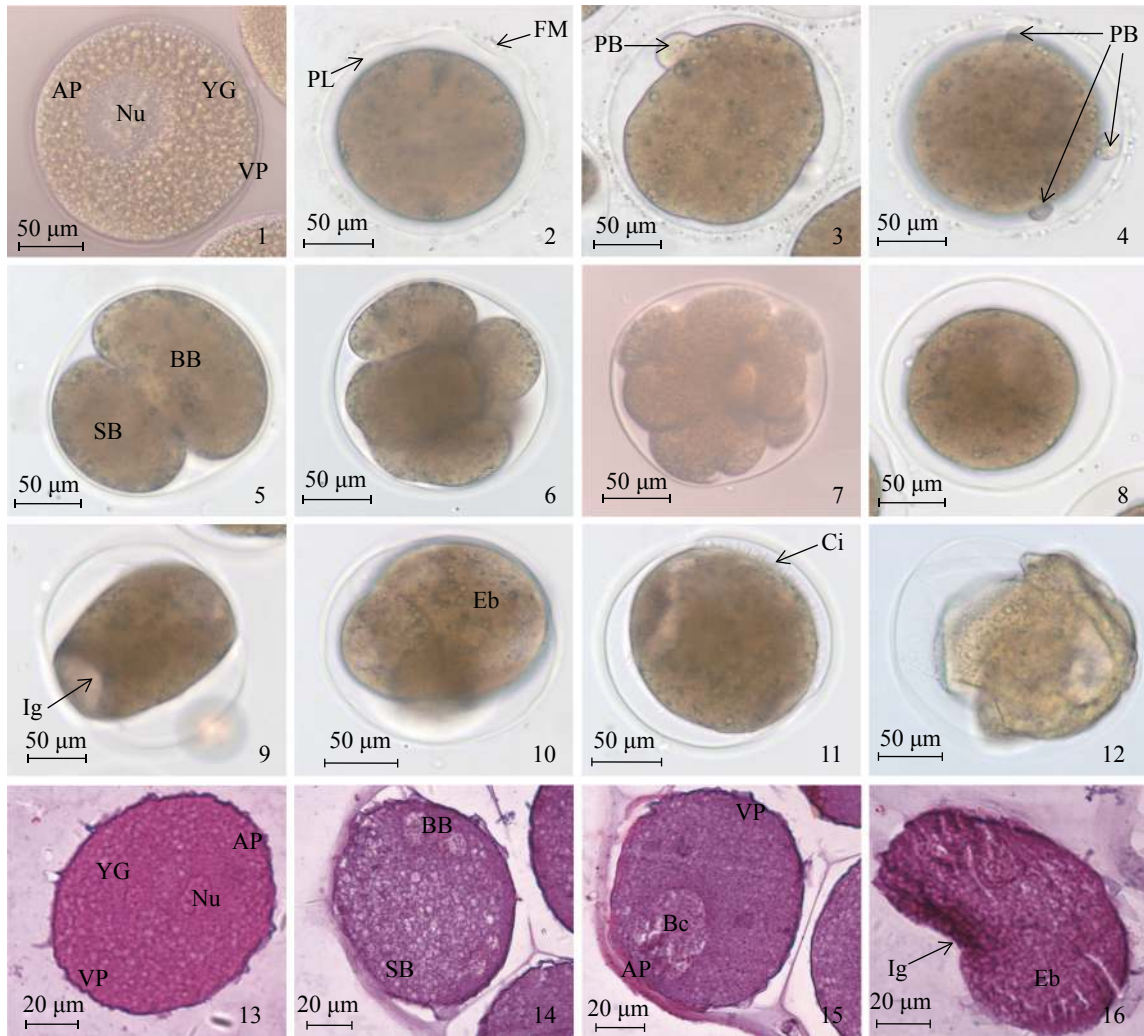
组织学研究结果表明, 单环刺螈为间黄卵, 卵黄颗粒分布不均匀, 植物性半球卵黄颗粒较多且粗大 (图版 I-13)。进行不等全裂, 动物性半球分裂球小, 而植物性半球的分裂球含卵黄多、体积较大 (图版 I-14)。形成偏极囊胚, 囊胚腔偏于动物极 (图版 I-15)。原肠作用方式为植物极分裂球向囊胚腔内陷, 同时动物性半球的分裂球往植物极方向外包 (图版 I-16)。

胚后发育经担轮幼虫 (孵化后 1~10 d)、体节幼虫 (11~20 d)、蠕虫状幼虫 (21~30 d) 发育为幼螈。受精后约 20~24 h 孵化为早期担轮幼虫, 大小约 $150.15\ \mu\text{m}\times 127.36\ \mu\text{m}$, 体呈梨形, 可分为上、下 2 个半球, 中间具 1 条纤毛环, 上半球较大、为体前端, 可摄食并带动着下半球浮游于水中 (图版 II-1)。孵化约 6 d 后发育为后期担轮幼虫, 大小约 $267.23\ \mu\text{m}\times 211.85\ \mu\text{m}$, 仍呈梨形, 摄食量增大 (图版 II-2)。孵化约 10 d 后, 下半球变长并出现分节, 发育为体节幼虫, 大小约 $388.34\ \mu\text{m}\times 268.25\ \mu\text{m}$, 体前端仍呈半球状, 依靠纤毛环浮游 (图版 II-3)。孵化约 20 d 后, 体前端变小, 体形呈长桶状, 发育为蠕虫状幼虫, 消化管变粗并出现弯折, 后端出现 1 对肛门囊, 纤毛环逐渐消失, 由浮游转为底栖, 体长约 $519.11\ \mu\text{m}$, 体宽约 $247.98\ \mu\text{m}$ (图版 II-4, 5)。孵化约 30 d 后发育为幼螈, 体前端呈管状的吻伸缩频繁, 消化道增长, 分段明显, 前端体腔内出现肾管, 具潜泥沙习性, 体长约 $1\ 145.10\ \mu\text{m}$, 体宽约 $275.12\ \mu\text{m}$ (图版 II-6)。

2.4 环境因子对精子受精率和孵化率的影响

从正交实验结果 (表 1) 可见, 在本实验的 25 个组合中, 受精率以第 20 号处理 (25°C 、盐度 35、pH 8) 最高, 可达 $(99.02\%\pm 0.81\%)$; 孵化率以第 8 号处理 (15°C 、盐度 25、pH 9) 最高, 为 $(93.73\%\pm 2.06\%)$, 和由 T 值计算所得结果不同 (表 2)。

正交实验数据 T 值分析结果显示, 单环刺



图版 I 单环刺螭胚胎发育活体及切片光镜观察

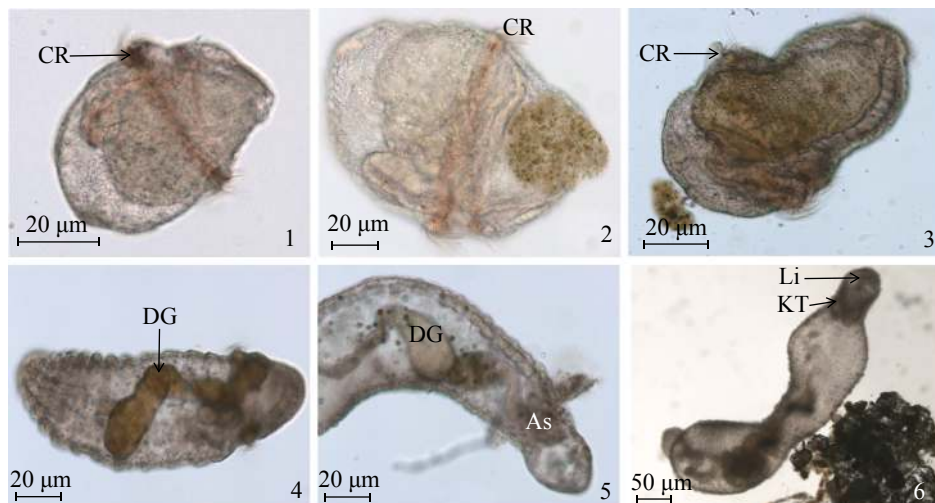
1. 成熟卵, 2. 受精卵, 示受精膜举起及围卵黄周隙形成(↑), 3. 排出第一极体, 4. 排出第二极体, 示3个极体(↑), 5. 2细胞期, 6. 4细胞期, 7. 16细胞期, 8. 囊胚期, 9. 原肠早期, 示植物极内陷(↑), 10. 原肠中期, 示动物性半球外包, 11. 原肠晚期, 示纤毛(↑), 12. 膜内担轮幼虫, 13. 成熟卵纵切(H.E染色), 14. 卵裂期纵切(H.E染色), 15. 囊胚期(H.E染色), 16. 原肠期纵切(H.E染色), 示植物极内陷(↑); AP. 动物极, BB. 大分裂球, Bc. 囊胚腔, Ci. 纤毛, Eb. 外包, FM. 受精膜, Ig. 内陷, Nu. 细胞核, PB. 极体, PL. 围卵黄周隙, SB. 小分裂球, VP. 植物极, YG. 卵黄颗粒

Plate I Viviperception and histological observation of the embryo development of *U. uncinatus* by light microscope

1. mature oocyte, 2. fertilized egg, showing the fertilization membrane lift and the perivitelline lacunae formation (↑), 3. first polar body, 4. second polar body, showing three polar bodies (↑), 5. 2-cell period, 6. 4-cell period, 7. 16-cell period, 8. blastula stage, 9. early gastrula stage, showing the vegetal pole invagination (↑), 10. middle gastrula stage, showing the animal pole epiboly (↑), 11. later gastrula stage showing the cilium (↑), 12. intramembrane trochophore, 13. longitudinal section of mature oocyte (H.E), 14. longitudinal section of cleavage stage (H.E), 15. blastula stage (H.E), 16. longitudinal section of gastrula stage (H.E), showing the vegetal pole invagination (↑); AP. animal pole, BB. big blastomere, Bc. blastular cavity, Ci. cilium, Eb. epiboly, FM. fertilization, Ig. invagination, Nu. nuclues, PB. polar body, PL. perivitelline lacunae, SB. small blastomere, VP. vegetal pole, YG. yolk granule

螭受精率最高的环境条件为温度 25 °C、盐度 35、pH 9, 孵化率最高的环境条件为温度 15 °C、盐度 25、pH 9(表 2)。影响受精率的 3 个因子中, 以盐度的 *R* 值最大, 所以盐度是受精率的主要影响因子, 温度和 pH 的影响程度相对较小。而孵化率的 *R* 值从高到低依次为温度>盐度>pH, 表明对孵化率的影响程度最大的环境因子为温度。

正交实验的验证实验结果显示, 温度 25 °C、盐度 35、pH 9 环境条件下, 单环刺螭的受精率为 (99.18%±0.97%), 温度 25 °C、盐度 35、pH 8 的条件下单环刺螭受精率为 (98.85%±0.78%), 二者差异不显著 ($P>0.05$)。表明单环刺螭受精率的最佳环境因子组合: 温度 25 °C、盐度 35、pH 8~9。



图版 II 单环刺螠幼体发育光镜观察

1. 担轮幼虫前期, 示纤毛环(↑), 2. 担轮幼虫后期, 3. 体节幼虫, 示纤毛环(↑), 4. 蠕虫状幼虫早期, 示消化道(↑), 5. 蠕虫状幼虫后期, 6. 幼螠, 示吻(↑); As. 肛门囊, CR. 纤毛环, DG. 消化道, KT. 肾管, Li. 吻

Plate II Light microscopic observation of the pedomorphosis of *U. unicinctus*

1. protochophora, showing ciliary ring (↑), 2. late stage of the trochophore, 3. sectorial larva, showing ciliary ring (↑), 4. early stage of the wormlike larva, showing digestive tract (↑), 5. late stage of the wormlike larva, 6. juveniles, showing lips (↑); As. anal sac, CR. ciliary ring, DG. digestive tract, KT. kidney tube, Li. lips

孵化率的验证测定实验结果显示, 温度 15 °C、盐度 25、pH 8 环境条件下, 单环刺螠的孵化率为 (94.79%±1.93%), 温度 15 °C、盐度 25、pH 9 的环境条件下单环刺螠孵化率为 (93.54%±1.54%), 二者无显著性差异 ($P>0.05$)。表明单环刺螠孵化率的最佳环境因子组合: 温度 15 °C、盐度 25、pH 8~9。

3 讨论

3.1 单环刺螠繁殖特征

单环刺螠一年之中有春、秋 2 个繁殖盛期, 与美洲刺螠 (*U. caupo*)^[8]、疣吻沙蚕 (*Tylorrhynchus heterochaetus*)^[9]、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)^[10] 等一致。根据定期采样观察发现, 春季繁殖期个体怀卵量较大, 结合实际生产需要, 所以本实验重点研究春季繁殖期。随着春季水温的回升, 单环刺螠性腺指数逐渐升高, 并分别于 4 月下旬和 5 月中旬有 2 次急剧下降的现象, 表明单环刺螠为分批产卵类型, 且有集中排放精卵的行为。

繁殖力反映了该物种个体及种群的繁殖潜能, 与物种的产卵模式、栖息环境、营养状况等密切相关^[11-12]。单环刺螠的繁育方式为体外受精、体外发育, 精子和卵子排放于水中完成受精及胚胎发育过程, 受环境影响较大, 常因环境

因子的剧烈变化导致死亡或者被其他动物吞食, 因此较大的产卵量才能保障该物种的延续。单环刺螠绝对繁殖力约 45 万粒, 高于多齿围沙蚕 (*Perinereis nuntia*) 的 (1.4~1.8) 万粒^[13] 和方格星虫 (*Sipunculus nudus*) 的 (4~5) 万粒^[14]。据李诺等^[15]报道, 单环刺螠个体怀卵量可达 (300~500) 万粒, 显著高于本实验结果, 可能与其取材以及计算误差有关。Collins 等^[16]发现福氏枪乌贼 (*Loligo forbesi*) 成熟期个体越大、繁殖力越高。本研究结果显示, 单环刺螠怀卵量与体质量呈显著正相关, 因此在人工繁育选择亲本时应考虑个体大小。

Arp 等^[17]调查发现, 分布于美国加州的美洲刺螠雌雄比例为 1 : 1.22, 与单环刺螠雌雄比例 (1 : 1.17) 相近, 二者均呈现群体中雄性个体多于雌性的现象。该现象亦见于其他一些海洋动物, 如疣吻沙蚕的雌雄比例为 1 : 1.5^[9], 日本刺沙蚕 (*Neanthes japonica*) 的雌雄比例为 1 : 2^[18]。据陈健^[19]报道, 单齿螺 (*Monodonta labio*) 雄体比例随壳高增长呈逐渐增加, 至壳高 25 mm 以上的个体雌雄比为 1 : 2。这可能是由于海洋水体巨大, 体外受精的物种需要大量的精子才能保证精卵相遇的机会。本实验检测出单环刺螠精子密度为 $(5.88 \pm 0.52) \times 10^9$ 个/mL, 与牛从从等^[6]的研究结果 $(4.2 \pm 0.2) \times 10^9$ 个/mL 相近。李诺等^[15]报道单环刺螠的生物学最小型体长约 7 cm、体质

表 1 单环刺螠受精率和孵化率正交实验结果

Tab. 1 Results of fertility and hatching rate of *U. unicinctus* by orthogonal experiments

(n=3)

处理号 treatment no.	影响因子 influence factors			受精率/% fertility	孵化率/% hatching rate
	温度/°C temperature	盐度 salinity	pH		
1	(1) 10	15	6	3.13±0.15	0
2	(1) 10	20	7	18.01±0.89	0
3	(1) 10	25	8	17.72±0.72	0
4	(1) 10	30	9	96.61±2.15	0
5	(1) 10	35	10	92.15±1.98	0
6	(2) 15	15	7	19.53±0.23	0
7	(2) 15	20	8	96.42±2.24	90.55±1.63
8	(2) 15	25	9	95.37±2.08	93.73±2.06
9	(2) 15	30	10	90.31±2.31	45.36±1.59
10	(2) 15	35	6	93.16±1.46	28.91±0.85
11	(3) 20	15	8	15.71±0.25	0
12	(3) 20	20	9	89.48±1.55	15.32±0.74
13	(3) 20	25	10	98.43±1.49	89.32±1.37
14	(3) 20	30	6	95.22±1.65	9.59±0.48
15	(3) 20	35	7	98.76±1.21	56.77±1.53
16	(4) 25	15	9	45.23±1.38	6.39±0.32
17	(4) 25	20	10	89.74±2.01	0
18	(4) 25	25	6	74.51±1.89	0
19	(4) 25	30	7	98.63±1.22	87.73±2.05
20	(4) 25	35	8	99.02±0.81	57.86±1.68
21	(5) 30	15	10	47.13±1.16	0
22	(5) 30	20	6	3.32±0.20	0
23	(5) 30	25	7	96.61±2.06	0
24	(5) 30	30	8	97.54±1.75	0
25	(5) 30	35	9	98.92±1.05	0

注：表中带括号的数字代表影响因子的不同水平

Notes: Numbers in brackets indicate different levels of influence factors

量约 20 g, 本研究结果与之相比, 体长一致, 体质量 (11.21 g) 较低。由于单环刺螠呼吸需要机体不停地伸缩变化, 故体长不易测量, 以体质量作为计量指标较为准确。

单环刺螠近亲物种如方格星虫^[14]、可口革囊星虫 (*Phascolosoma esculenta*)^[20] 以及泥蚶 (*Tegillarca granosa*)^[21]、菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)^[22] 等双壳类和中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)^[23]、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)^[24] 等

甲壳类的成熟卵处于第一次成熟分裂中期, 此时卵细胞内生发泡核膜解体、形成纺锤体。这类动物的卵母细胞在繁殖季节常会停滞于第一次成熟分裂前期, 经自然海区的温度、盐度的剧烈变化 (如大潮) 或人工诱导方式才进一步到达分裂中期, 获得受精能力^[25]。单环刺螠成熟卵处于第一次成熟分裂前期, 其细胞学特征为核膜完整、生发泡明显, 与双齿围沙蚕 (*Preinereis aibuhitensis*)^[26]、岩虫 (*Marphysa sanguinea*)^[27] 和四

表 2 单环刺螭受精率和孵化率正交实验分析

Tab. 2 Data analysis of fertility and hatching rate of *U. uncinatus* by orthogonal experiments

检测指标 detection indicator	影响因子 influence factors	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	\bar{X}_1	\bar{X}_2	\bar{X}_3	\bar{X}_4	\bar{X}_5	R
受精率 fertility	温度	227.62	394.79	397.60	407.13	343.52	45.52	78.96	79.52	81.43	68.70	35.91
	盐度	130.73	296.97	382.64	478.31	481.62	26.15	59.39	75.93	95.66	96.32	70.17
	pH	269.34	331.54	326.41	425.61	417.76	53.87	66.31	65.28	85.12	83.55	31.25
孵化率 hatching rate	温度	0	258.55	171	151.98	0	0	51.71	34.20	30.40	0	51.71
	盐度	6.39	105.87	183.05	142.68	143.54	1.28	21.17	36.61	28.54	28.71	35.33
	pH	38.50	144.5	148.41	115.44	134.68	7.70	28.90	29.68	23.09	26.94	21.98

角蛤蜊 (*Macra veneriformis*)^[28] 等一致, 所以在繁殖季节无须经过人工诱导, 通过解剖法即可获得成熟卵用于育苗。

3.2 单环刺螭的胚胎与胚后发育

动物卵子的特征直接影响到其胚胎发育过程。单环刺螭卵子类型为间黄卵, 卵黄含量比较多、分布不均匀, 因此进行不等全裂, 动物性半球分裂球含卵黄少、体积小, 而植物性半球的分裂球含卵黄多、体积较大, 致使囊胚腔偏于动物极, 形成偏极囊胚。单环刺螭的不等全裂与可口革囊星虫卵裂规律^[20]一致, 其卵裂过程中出现螺旋卵裂的特征与疣吻沙蚕^[29]以及大部分贝类^[30]相同, 这可能与其分类地位相近有关。囊胚腔较大的种类如波纹巴非蛤 (*Paphia undulata*)^[31]的原肠作用方式为内陷, 形成实心囊胚的种类如疣吻沙蚕^[29]没有囊胚腔, 则采取外包的原肠作用方式, 单环刺螭囊胚腔较小, 内陷空间有限, 所以加以外包同时进行以完成内、外胚层的分区。李诺等^[15]将单环刺螭胚胎发育分为卵裂、囊胚和原肠胚 3 个阶段, 本研究发现单环刺螭胚胎发育后期, 胚体形成 2 个大小不等的半球相连接, 并且逐渐在卵膜内转动, 特征明显, 故增加了膜内担轮幼虫这个分期, 有利于在育苗生产中观察判断。

在盐度 25、水温 15 °C 的条件下, 单环刺螭胚胎发育约需 20~24 h, 时间较短, 孵化时机体结构简单, 所以胚后发育历经复杂的变态才能发育为幼体。康庆浩等^[32]将单环刺螭幼虫发育过程分为担轮幼虫期、2 体节期、7 体节期和 13 体节期等时期; 陈宗涛等^[33]将担轮幼虫分为早、中、晚 3 个时期, 再加上体节幼虫期; 本研究结合幼虫形态特征及生活习性将胚后发育过程分

为担轮幼虫 (孵化后 1~10 d)、体节幼虫 (11~20 d) 和蠕虫状幼虫 (21~30 d), 与李诺等^[15]分期方法一致。本实验中, 单环刺螭在自然水温 (15~25 °C) 条件下, 孵化后约经 30 d 发育至体长约 1 mm 的幼螭, 再 1 个月培育至体长约 1 cm 投放至池塘中养殖。2 个月的育苗生产周期较长、成本高, 如何缩短幼体培育期、提高生产效率是亟待解决的问题。

单环刺螭为滤食性, 对食物成分无选择性, 只要水体中悬浮颗粒大小合适即可摄食。育苗中多以球等鞭金藻、小新月菱形藻等单胞藻作为饵料, 较为单一, 因此, 对饵料配比进行优化、研制人工配合饵料是提高幼体生长速度的一条途径。本实验中, 以细沙作为底质时幼虫附着顺利, 而养殖池塘中多为泥沙混合底质或泥底质, 单环刺螭幼虫对于底质的要求和适应能力有待于进一步研究。

3.3 环境因子对单环刺螭繁殖的影响

单环刺螭在自然海区中的繁殖期为 4—5 月和 9—10 月^[5], 此期间水温 15~25 °C, 因此, 在人工强化培育亲体时不宜超过 15 °C。从 GSI 变化规律来看单环刺螭有集中排放的现象, 一般发生在大潮期或降雨后, 海区理化因子变化剧烈对亲体排放是天然的刺激诱导。在育苗生产中, 除了可用解剖法获得单环刺螭受精卵外, 也可用降温处理的方法人工诱导亲体排放精卵^[34]。

王力勇等^[35]采用单因子实验方法分析了环境因子对单环刺螭孵化率的影响规律, 得出较为适宜的环境条件为温度 15~21 °C、盐度 27.2、pH 8.02。本研究的正交实验结果显示, 孵化率的最佳环境条件为温度 15 °C、盐度 25、pH 8~9, 与前者研究结果相近。牛从从等^[6]报道单环刺螭

精子适宜的盐度为 20~30(最佳盐度为 25), 适宜的 pH 为 7~9(最佳 pH 为 8)。本实验所得出的单环刺螠受精率的最佳环境条件为温度 25 °C、盐度 35、pH 8~9, 可见较高的温度和盐度有利于受精作用的完成, 但从自然海水的盐度以及精子活力、孵化率等综合分析, 以盐度 25、pH 8 为单环刺螠适宜的繁殖环境。温度越高, 精子新陈代谢越快、寿命越短, 而且本实验结果显示, 盐度是影响受精率的主要因子, 无需以升温的方式提高受精率。在胚后发育期, 适温范围内, 随着培育温度的升高, 发育时间会缩短^[36]。因此, 进一步研究单环刺螠的生物学零度和各发育阶段的有效积温, 有助于在育苗生产中通过温度调节的方式调控生产周期。

参考文献 (References):

- [1] 杨桂文, 安利国, 孙忠军. 单环刺螠营养成分分析[J]. *海洋科学*, 1999(6): 13-14.
Yang G W, An L G, Sun Z J. Analysis of nutrient composition in *Urechis unicinctus*[J]. *Marine Sciences*, 1999(6): 13-14(in Chinese).
- [2] 赵欢, 韩宝芹, 刘万顺, 等. 单环刺螠多肽抗肿瘤及对小鼠免疫功能的调节作用[J]. *中国天然药物*, 2008, 6(4): 302-306.
Zhao H, Han B Q, Liu W S, et al. Antitumor effect and immunomodulation of polypeptides from *Urechis unicinctus* in Mice[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2008, 6(4): 302-306(in Chinese).
- [3] Ma Y B, Zhang Z F, Shao M Y, et al. Sulfide: quinone oxidoreductase from echiuran worm *Urechis unicinctus*[J]. *Marine Biotechnology*, 2011, 13(1): 93-107.
- [4] 王航宁, 邵明瑜, 张志峰. 单环刺螠精巢年周期发育及精子发生[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(5): 1189-1195.
Wang H N, Shao M Y, Zhang Z F. Annual development of testis and spermatogenesis in *Urechis unicinctus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(5): 1189-1195(in Chinese).
- [5] 李昀, 王航宁, 邵明瑜, 等. 单环刺螠生殖腺的发生及雌体的生殖周期[J]. *中国海洋大学学报*, 2012, 42(6): 81-84.
Li Y, Wang H N, Shao M Y, et al. Gonadal ontogenesis and annual development of ovary and oogenesis in *Urechis unicinctus*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2012, 42(6): 81-84(in Chinese).
- [6] 董英萍, 张志峰, 邵明瑜. 单环刺螠受精过程的细胞学观察[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(4): 760-765.
Dong Y P, Zhang Z F, Shao M Y. Cytological observation of fertilization in *Urechis unicinctus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(4): 760-765(in Chinese).
- [7] 牛从从, 张志峰, 邵明瑜. 单环刺螠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.
Niu C C, Zhang Z F, Shao M Y. Biological characteristics of *Urechis unicinctus* sperm and the effects of environmental factors on sperm vitality[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(5): 556-561(in Chinese).
- [8] Suer A L. Growth and spawning of *Urechis caupo* (Echiura) in Bodega Harbor, California[J]. *Marine Biology*, 1984, 78(3): 275-284.
- [9] 陈兴汉. 疣吻沙蚕繁殖生物学探讨[J]. *海洋与渔业*, 2014(8): 64-66.
Chen X H. Discussion on the Breeding Biology of the silkworm[J]. *Ocean and Fishery*, 2014(8): 64-66(in Chinese).
- [10] 王如才. 海水贝类养殖学 [M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1993.
Wang R C. Seawater shellfish culture[M]. Qingdao: Qingdao Ocean University Press, 1993(in Chinese).
- [11] Sykes A V, Domingues P M, Andrade J P. Effects of using live grass shrimp (*Palaemonetes varians*) as the only source of food for the culture of cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758)[J]. *Aquaculture International*, 2006, 14(6): 551-568.
- [12] Laptikhovskiy V V, Nigmatullin C M. Egg size, fecundity, and spawning in females of the genus *Illex* (Cephalopoda: Ommastrephidae)[J]. *ICES Journal of Marine Science*, 1993, 50(4): 393-403.
- [13] 杜荣斌, 刘红梅, 郑家声, 等. 人工养殖条件下多齿围沙蚕亲体培育和繁殖生物学的初步研究[J]. *海洋科学*, 2009, 33(11): 37-43.
Du R B, Liu H M, Zheng J S, et al. The preliminary study on parent stock culture and reproductive biology of *Perinereis nuntia* savigny under artificial culture condition[J]. *Marine Sciences*, 2009, 33(11): 37-43(in Chinese).
- [14] 兰国宝, 阎冰. 方格星虫繁殖生物学研究[J]. *水产学报*, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 2002, 26(6): 503-509.
- Lan G B, Yan B. The reproductive biology of peanut worm, *Sipunculus nudus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2002, 26(6): 503-509(in Chinese).
- [15] 李诺, 宋淑莲, 唐永政. 单环刺螠[J]. 生物学通报, 1998, 33(8): 12-14.
- Li N, Song S L, Tang Y Z. *Urechis unicinctus*[J]. Bulletin of Biology, 1998, 33(8): 12-14(in Chinese).
- [16] Collins M A, Burnell G M, Rodhouse P G. Reproductive strategies of male and female *Loligo forbesi* (Cephalopoda: Loliginidae)[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1995, 75(3): 621-634.
- [17] Arp A J, Hansen B M, Julian D. Burrow environment and coelomic fluid characteristics of the echiuran worm *Urechis caupo* from populations at three sites in northern California[J]. Marine Biology, 1992, 113(4): 613-623.
- [18] 张志南, 孙文林, 于子山, 等. 日本刺沙蚕大规模移植的生态学研究[J]. 海洋与湖沼, 1993, 24(5): 520-526.
- Zhang Z N, Sun W L, Yu Z S, et al. Large scale transplant of the *Neanthes japonica* (Izuka) population[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1993, 24(5): 520-526(in Chinese).
- [19] 陈健. 舟山沿海单齿螺和锈凹螺生物学特性研究 [D]. 舟山: 浙江海洋学院, 2013.
- Chen J. Studies on biological characteristics of *Monodonta labio* and *Omphalius rusticus* in coastal area of Zhoushan[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2013(in Chinese).
- [20] 竺俊全, 王武, 应雪萍, 等. 可口革囊星虫受精过程及早期卵裂的细胞学变化[J]. 动物学报, 2008, 54(2): 290-298.
- Zhu J Q, Wang W, Ying X P, et al. Cytological changes of fertilization and early cleavage in *Phascolosoma esculenta*[J]. Acta Zoologica Sinica, 2008, 54(2): 290-298(in Chinese).
- [21] 孙慧玲, 方建光, 王清印, 等. 泥蚶受精过程的细胞学荧光显微观察[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 104-107.
- Sun H L, Fang J G, Wang Q Y, et al. Cytological observation on fertilization of *Tegillarca granosa* with fluorescent microscope[J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(2): 104-107(in Chinese).
- [22] 毕克, 包振民, 黄晓婷, 等. 菲律宾蛤仔受精及早期胚胎发育过程的细胞学观察[J]. 水产学报, 2004, 28(6): 623-627.
- Bi K, Bao Z M, Huang X T, et al. Cytological observations on fertilization and early embryonic development in *Ruditapes philippinarum*[J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(6): 623-627(in Chinese).
- [23] 康现江, 王所安, 堵南山, 等. 中国对虾受精过程中精卵核的细胞学变化[J]. 动物学报, 2001, 47(2): 182-186.
- Kang X J, Wang S A, Du N S, et al. Cytological Changes of sperm and egg nuclei during fertilization in *Penaeus chinensis*[J]. Acta Zoologica Sinica, 2001, 47(2): 182-186(in Chinese).
- [24] 朱冬发, 王春琳, 余红卫, 等. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)卵子发生、激活与早期卵裂的细胞学观察[J]. 海洋与湖沼, 2005, 36(5): 423-429.
- Zhu D F, Wang C L, Yu H W, et al. Oogenesis, oocyte activation and early cleavage of *Portunus trituberculatus* (miers)[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2005, 36(5): 423-429(in Chinese).
- [25] Stricker S A, Smythe T L. 5-HT causes an increase in cAMP that stimulates, rather than inhibits, oocyte maturation in marine nemertean worms[J]. Development, 2001, 128(8): 1415-1427.
- [26] 范广钻, 郑佩玉, 钟惠英, 等. 双齿围沙蚕 *Preinereis aibuhitensis* Grube 雌性生殖腺发育的组织学研究[J]. 浙江水产学院学报, 1983, 2(2): 105-113, 4.
- Fan G Z, Zheng P Y, Zhong H Y, et al. A Histological study on the development of the female gonad of *Preinereis aibuhitensis* Grube[J]. Journal of Zhejiang College of Fisheries, 1983, 2(2): 105-113, 4(in Chinese).
- [27] 于海志, 朱丽岩, 郑家声. 岩虫的性腺发育和生殖周期[J]. 中国水产科学, 2005, 12(6): 669-672.
- Yu H Z, Zhu L Y, Zheng J S. Development of sex gonad and reproduction cycle of *Marphysa sanguinea*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(6): 669-672(in Chinese).
- [28] 柯巧珍, 李琪, 闫红伟, 等. 山东北部沿海四角蛤蜊性腺发育年周期研究[J]. 中国海洋大学学报, 2012, 42(11): 28-34.
- Ke Q Z, Li Q, Yan H W, et al. Annual observation on the reproduction of Surf clam (*Macrta veneriformis*) inhabiting the north coast of Shandong peninsula[J]. Periodical of Ocean University of China, 2012, 42(11): 28-34(in Chinese).

- [29] 段薛辉, 刘文生, 许爱娣, 等. 疣吻沙蚕胚胎发育观察及盐度对其孵化的影响[J]. *南方水产科学*, 2017, 13(4): 115-121.
Duan X H, Liu W S, Xu A Y, *et al.* Observation on embryonic development of *Tylorrhynchus heterochaeta* and effect of salinity on their hatching[J]. *South China Fisheries Science*, 2017, 13(4): 115-121(in Chinese).
- [30] Aranda-Burgos J A, Da Costa F, Nóvoa S, *et al.* Embryonic and larval development of *Ruditapes decussatus* (Bivalvia: Veneridae): a study of the shell differentiation process[J]. *Journal of Molluscan Studies*, 2014, 80(1): 8-16.
- [31] 徐小伟, 张鹏飞, 黄妙琴, 等. 波纹巴非蛤早期发育的扫描电镜观察[J]. *福建水产*, 2015, 37(4): 263-269.
Xu X W, Zhang P F, Huang M Q, *et al.* The morphology observation of the embryo and larva of *Paphia undulata* by scanning electron microscope[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2015, 37(4): 263-269(in Chinese).
- [32] 康庆浩, 郑家声, 金在敏. 单环刺螠(*Urechis unicinctus*)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.
Kang Q H, Zheng J S, Jin Z M. Studies on the seed production of *Urechis unicinctus* I. Influence of water temperature on embryonic development and larval rearing[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2002, 32(2): 273-278(in Chinese).
- [33] 陈宗涛, 张志峰, 牛从从, 等. 单环刺螠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.
Chen Z T, Zhang Z F, Niu C C, *et al.* Isozymic and biochemical study on development of pre-metamorphic larva in *Urechis uniconctus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(3): 233-238(in Chinese).
- [34] 许星鸿, 霍伟, 孟霄, 等. 单环刺螠人工育苗及养殖技术[J]. *科学养鱼*, 2016(2): 44-45.
Xu X H, Huo W, Meng X, *et al.* Artificial Seedling of *Urechis uniconctus*[J]. *Scientific Fish Farming*, 2016(2): 44-45(in Chinese).
- [35] 王力勇, 胡丽萍, 姜黎明, 等. 单环刺螠的人工苗种生产研究 I. 环境因子对单环刺螠受精与孵化的影响[J]. *中国渔业质量与标准*, 2017, 7(4): 37-44.
Wang L Y, Hu L P, Jiang L M, *et al.* Artificial seed production of *Urechis uniconctus* I. Influence of environmental factors on fertilization and hatching *Urechis uniconctus*[J]. *China Fishery Quality and Standards*, 2017, 7(4): 37-44(in Chinese).
- [36] 吴杨平, 陈爱华, 姚国兴, 等. 大竹蛏胚胎发生及稚贝发育基本特征[J]. *动物学杂志*, 2012, 47(4): 74-81.
Wu Y P, Chen A H, Yao G X, *et al.* Basic characteristics of embryogenesis and juvenile development of *Solen grandis*[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2012, 47(4): 74-81(in Chinese).

Reproductive biology of *Urechis unicinctus*

XU Xinghong^{1,2,3*}, MENG Xiao¹, GAN Hongtao¹, LIU Tonghao¹, DING Ziyuan¹,
YAO Haiyang¹, XU Guocheng¹, DING Shan¹, FU Ziyue¹, CHEN Wei¹

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;
2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;
3. Co-innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

Abstract: The reproductive biology of *Urechis unicinctus* was studied by the method of experimental ecology and histology, including the sex ratio, gonadosomatic index (GSI), fecundity, embryonic and postembryonic development. The optimal environmental conditions for fertility and hatching rate of *U. unicinctus* were also assessed by orthogonal experiments in order to provide reliable protocols for the artificial culture of *U. unicinctus*. The sexual ratio between the female and male was 1 : 1.17 and the males were slightly more than females. The mature oocyte remained at the prophase of the first maturation division with the diameter of $(145.16 \pm 1.70) \mu\text{m} \times (141.27 \pm 1.94) \mu\text{m}$. The absolute fecundity ranging from 111 800 to 720 488 $(449\ 684 \pm 265\ 905)$ ind., and the relative fecundity ranging from 2 214 to 12 702 $(6\ 849 \pm 4\ 854)$ ind., positive correlation between fecundity and weight was recorded. The biological minimum was about 7 cm of length and 11.21 g of weight. The sperm density was $(5.88 \pm 0.52) \times 10^9$ ind./mL, and the average number of sperm produced by each male was $(2.41 \pm 0.73) \times 10^{10}$ ind.. Two peaks of female GSI were observed in the breeding season from April to May, which suggested the type of spawning of *U. unicinctus* was in batches. The trochophore was hatched after 20-24 h of embryo development under the conditions of salinity 25 and temperature 15 °C. According to the histological observation, the oocyte of *U. unicinctus* was a type of mesopodium that developed into hemipolar blastocyst by unequal cleavage and spiral cleavage, and then the gastrulation was formed via outsourcing and invagination of cell migration. The postembryonic development after hatching included three stages: trochophore (1-10 d), somatic larva (11-20 d) and worm larva (21-30 d). The results of orthogonal experiments showed that the highest fertility and hatching rate was obtained under the conditions of temperature of 25 °C, the salinity of 35, and pH 8-9, and temperature of 15 °C, the salinity of 25, and pH 8-9, respectively.

Key words: *Urechis unicinctus*; reproductive biology; environmental condition

Corresponding author: XU Xinghong. E-mail: xhxu119@163.com

Funding projects: Science and Technology Special Project Northern Jiangsu Province of S & T Department (LYG-SZ201814); Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (CXKT2020); Lianyungang City Science and Technology Development Project (CN1411); Lianyungang 521 High-level Talent Training Project (KK18027); Jiangsu Province Training Courses of Practice Innovation for Postgraduates and College students (SJCX18-0928)