

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19352

中间球海胆卵膜与受精膜去除方法及染色体核型分析

陈小慧, 张伟杰, 李雅娟, 刘雷, 张宝警, 丁君, 常亚青

大连海洋大学, 农业农村部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023

摘要: 去除卵膜及受精膜是成功制备棘皮动物染色体的关键步骤。为找到高效去除海胆卵膜与受精膜的方法, 使用三氮唑(2 g/L)、盐酸海水溶液(pH 4.75)、二硫苏糖醇(3×10^{-3} mol/L)和对氨基苯甲酸(3×10^{-3} mol/L)等4种化学试剂分别对中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)卵子及各时期胚胎进行处理, 比较了不同试剂、处理时间或处理时期的去膜率、去膜后受精率和胚胎畸形率等指标的差异; 利用常规空气干燥法对经去膜处理的囊胚期胚胎制备染色体, 并进行核型分析。结果表明, 三氮唑、盐酸海水溶液、二硫苏糖醇和对氨基苯甲酸等4种试剂对中间球海胆的卵膜和受精膜均有去除效果, 其中2 g/L三氮唑处理未受精卵30 min的去膜率为85.50%, 去膜后受精率为97.25%, 畸形率为1.75%, 去膜效果优于其余处理组。利用经该方法去膜后的早期囊胚进行染色体制备效果较好, 获得了61个分散良好、形态完整的染色体中期分裂相。核型分析表明, 中间球海胆的二倍体染色体数为 $2n=42$, 核型公式为: $2n=20m+20sm+2st$, NF=84, 即有10对中部着丝粒染色体, 10对亚中部着丝粒染色体, 1对亚端部着丝粒染色体, 染色体臂数为NF=84。本研究可为海胆染色体制备及染色体操作育种提供技术参考。

关键词: 中间球海胆; 去膜; 染色体; 核型分析

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)09-1033-09

中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)又称虾夷马粪海胆, 隶属于棘皮动物门(Echinodermata)、游走亚门(Eleutherozoa)、海胆纲(Echinoidea)、正形目(Centrochinoida)、球海胆科(Strongylocentrotidae)、球海胆属, 原产于日本北海道以北以及俄罗斯远东等地沿海^[1], 其生殖腺颜色好, 味道鲜美, 富含高不饱和脂肪酸, 深受市场欢迎。中国自1989年从日本引入该种以来, 对其生物学^[2-3]、疾病与免疫^[4-5]、生态学^[6-7]、人工育苗技术^[8]、增养殖技术^[9-10]和遗传育种技术^[11-13]等多方面开展了广泛研究。中间球海胆是中国唯一开展大规模人工养殖的海胆种类, 近年来, 随着中国国内对海胆的消费需求逐年增加, 中间球海胆的养殖规模不断扩大。然而, 由于缺乏生长快速、抗逆抗病能力强的良种, 中间球海胆的养殖面临成活率低、生产周期长等突出问题。

染色体操作育种作为一种高效的育种技术, 在鱼类^[14-15]、贝类^[16-17]等水产动物的遗传改良中发挥了重要作用。在海胆中, 关于染色体操作育种的报道较少, 仅见高悦勉等^[18]和丁君等^[19]利用经紫外线照射失活的精子与正常卵子授精, 分别获得了光棘球海胆(*S. nudus*)和中间球海胆雌核发育的单倍体胚胎, Anne Böttger等^[20]利用卵子融合的方法获得了绿球海胆(*S. droebachiensis*)的三倍体胚胎。染色体的制备是染色体操作育种的基础。在海胆中, 中间球海胆、红海胆(*Pseudocentrotus depressus*)、光棘球海胆、马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)、海刺猬(*Glyptocidaris crenularis*)、曼氏孔楯海胆(*Astriclypeus manni*)、紫球海胆(*S. purpuratus*)、绿球海胆和拟球海胆(*Paracentrotus lividus*)的染色体数目已有报道^[21-25]。然而由于海胆染色体较小, 目前关于海

收稿日期: 2019-11-20; 修订日期: 2020-02-07.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31672652); 农业农村部农业科研杰出人才及创新团队项目.

作者简介: 陈小慧(1993-), 女, 硕士研究生, 从事海胆遗传育种研究. E-mail: 17752237303@163.com

通信作者: 常亚青, 教授, 从事水产养殖及水产动物遗传育种研究. E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

胆染色体的核型分析研究较少, 仅见 Lipani 等^[25]和常亚青等^[26]分别对拟球海胆和马粪海胆的染色体核型进行了报道, 关于中间球海胆的核型分析则未见报道。在海胆中, 为达到较好的滴片效果, 去除胚胎的受精膜或卵膜是关键步骤之一^[27]。已有的关于海胆染色体制备的研究均以其胚胎为材料, 且制备前均去除了胚胎的受精膜或卵膜。采用反复吹打、过滤等机械方法对去除受精膜有一定效果, 但容易损伤胚胎, 影响染色体标本制备。一些化学试剂如三氮唑^[22]、二硫苏糖醇^[23]、对氨基苯甲酸^[24]和酸性海水^[28]等可通过阻止受精膜硬化或使卵外层的胶状膜和卵黄膜分解等途径, 去除卵膜和受精膜。

本研究采用几种化学试剂对中间球海胆卵子及各胚胎时期进行处理, 试图找到高效去除其卵膜或受精膜的方法, 以提高中间球海胆染色体制备的成功率。此外, 本研究还制备了中间球海胆胚胎的染色体并进行了核型分析, 研究结果可为中间球海胆细胞遗传学研究提供基础资料, 并为其染色体操作等遗传育种研究提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

中间球海胆取自大连海洋大学农业农村部北方海水增养殖重点实验室, 体重 45~50 g, 均为活力较好、健康无损伤且处于精排放、卵排放前期的个体。采用注射 KCl 溶液的方法^[26]获取精卵。

1.2 方法

1.2.1 去除卵膜和受精膜 共设置 4 个试剂处理组: 三氮唑(2 g/L)^[22]、二硫苏糖醇(3×10^{-3} mol/L)^[23]、对氨基苯甲酸(3×10^{-3} mol/L)^[24]和盐酸海水溶液(pH 4.75)处理组。所有工作液均使用经紫外线消毒并经 0.22 μm 滤膜抽滤后的无菌海水配置。

利用 4 种试剂分别对未受精卵进行处理以去除卵膜, 每种试剂处理组内设置 10 min、20 min、30 min 等 3 个处理时间和 0 min 对照组, 每个处理时间内设置 4 个重复。处理完成后进行洗卵和授精, 授精 2 h 后, 从各组随机选取 100 个胚胎,

在光学显微镜下分别对受精卵个数、去膜受精卵个数和畸形胚胎个数进行计数, 并按以下方法计算受精率、去膜率和畸形率:

$$\text{受精率} = \frac{\text{受精卵个数}}{\text{总胚胎数}} \times 100\%$$

$$\text{去膜率} = \frac{\text{去膜受精卵个数}}{\text{总胚胎数}} \times 100\%$$

$$\text{畸形率} = \frac{\text{畸形胚胎个数}}{\text{总胚胎数}} \times 100\%$$

利用 4 种试剂分别对受精后的胚胎进行处理以去除受精膜, 以受精膜顶起为处理起始时间, 在每种试剂处理组内设置受精后 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min、2 细胞期、4 细胞期、8 细胞期、16 细胞期等 10 个处理时期, 每个时期处理时间为 10 min, 每个处理时期内设置 4 个重复。处理完成后移除处理液, 按上述方法计算去膜率和畸形率。

1.2.2 染色体制备 根据去膜实验结果, 选取最佳去膜方法进行去膜。取囊胚期胚胎, 2000 r/min 离心 4 min 收集于 10 mL 离心管内, 加入 0.4 g/L 秋水仙素, 21 °C 水浴处理 55 min。离心弃上清, 加入 0.075 mol/L 的 KCl 溶液低渗 46 min 后, 用预冷的卡诺氏固定液(-20 °C, 甲醇 : 冰醋酸=3 : 1)固定 3 次, 每次 15 min。后置于-20 °C 冰箱中过夜。

用 50% 冰醋酸解离, 吹打 2 min, 加入预冷的卡诺氏固定液, 用冷滴片法滴片。自然干燥后用 10% Giemsa 染液(pH 6.8)染色 45 min^[29]。自来水冲洗, 自然干燥后镜检。

1.2.3 数据分析 使用 SPSS 17.0 软件对去膜率、受精率及畸形率等数据进行 K-S 正态性检验, 对不符合正态分布的数据进行数据转换。利用单因素方差分析方法分别对不同试剂间、不同处理时间或时期的去膜率、受精率及畸形率进行方差分析和方差齐性检验, 并采用 S-N-K 方法进行各水平间的多重比较, 显著性水平设置为 0.05。

1.2.4 染色体组型分析方法 挑选染色体形态清晰的中期分裂相 5 个, 测量、计算其臂比值, 根据臂比值进行着丝点分类、同源染色体配对, 并制成组型图。染色体相对长度计算公式为: 染色体相对长度=(每条染色体长度/单倍体总染色体总长度)×100。染色体类型按 Levan 标准^[30]进行划分。

2 结果与分析

2.1 不同试剂及处理时间处理未受精卵后的去膜率、去膜后受精率和胚胎畸形率

不同试剂和不同处理时间处理未受精卵后的去膜率见图 1。使用三氮唑、盐酸海水溶液和二硫苏糖醇处理未受精卵均可显著提高其受精后的去膜率($P<0.05$)，而使用对氨基苯甲酸则未能显著提高去膜率；3个处理时间组内，4种试剂处理组的去膜率由高到低均依次为三氮唑、二硫苏糖醇、盐酸溶液、对氨基苯甲酸，且4组间均存在显著差异($P<0.05$)。三氮唑处理30 min组的去膜率最高，达到 $(85.50\pm2.52)\%$ ，但3个处理时间组间的去膜率无显著差异。

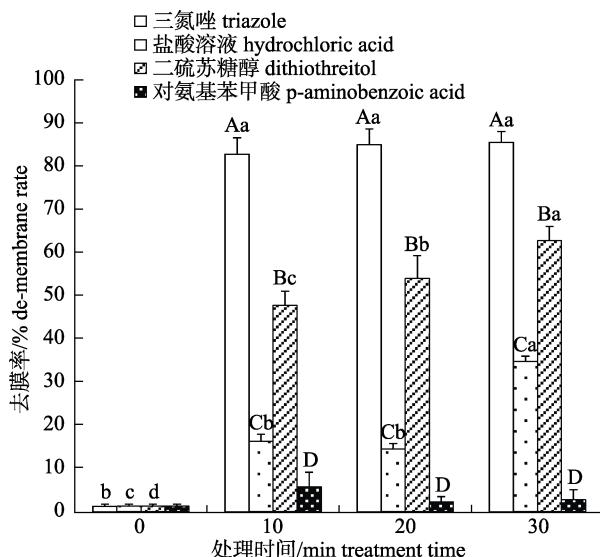


图1 不同试剂及处理时间处理的中间球海胆未受精卵的去膜率

上标不同大写字母表示同一处理时间内，不同试剂间去膜率差异显著($P<0.05$)；上标不同小写字母表示同一试剂处理组不同处理时间去膜率差异显著($P<0.05$)。

Fig. 1 The de-membrane rates of the unfertilized egg of *Strongylocentrotus intermedius* treated with various reagents for different time

Different uppercase letters indicate significant differences in de-membrane rate between reagents within the same treatment time ($P<0.05$)。Different lowercase letters indicate significant differences in de-membrane rate between treatment times with the same reagent ($P<0.05$)。

不同试剂和不同处理时间处理未受精卵后的受精率见图 2。使用三氮唑、盐酸海水溶液和二硫苏糖醇处理未受精卵均显著降低其受精率

($P<0.05$)，而使用对氨基苯甲酸处理则未显著降低受精率；3个处理时间组内，三氮唑、盐酸溶液和二硫苏糖醇3种试剂处理组的受精率由高到低均依次为三氮唑、二硫苏糖醇、盐酸溶液，且3组间均存在显著差异($P<0.05$)。三氮唑处理10 min、20 min和30 min的受精率分别为 $(94.75\pm0.96)\%$ 、 $(97.00\pm0.82)\%$ 和 $(97.25\pm0.96)\%$ ，3组间无显著差异($P>0.05$)。

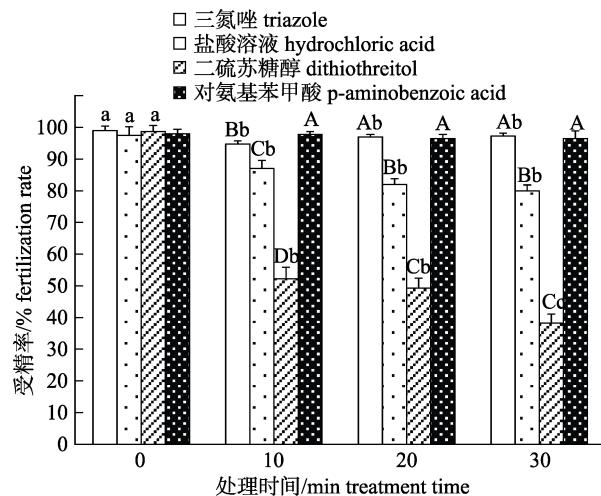


图2 不同试剂及处理时间处理的中间球海胆未受精卵的受精率

上标不同大写字母表示同一处理时间内，不同试剂间受精率差异显著($P<0.05$)；上标不同小写字母表示同一试剂处理组不同处理时间去膜率差异显著($P<0.05$)。

Fig. 2 The fertilization rates of the unfertilized eggs of *Strongylocentrotus intermedius* treated with various reagents for different time

Different uppercase letters indicate significant differences in fertilization rate between reagents within the same treatment time ($P<0.05$)。Different lowercase letters indicate significant differences in fertilization rate between treatment times with the same reagent ($P<0.05$)。

不同试剂和不同处理时间处理未受精卵后的胚胎畸形率见图 3。使用三氮唑、盐酸海水溶液、二硫苏糖醇和对氨基苯甲酸处理未受精卵均使其胚胎畸形率显著升高($P<0.05$)；在10 min、20 min和30 min 3个处理时间组，三氮唑组畸形率分别为 $(2.75\pm0.96)\%$ 、 $(5.50\pm1.92)\%$ 和 $(1.75\pm0.96)\%$ ，均为4种试剂中最低，且均显著低于盐酸溶液和二硫苏糖醇组($P<0.05$)。三氮唑处理20 min组畸形率显著高于对照组($P<0.05$)，处理10 min和30 min组与对照组间无显著差异($P>0.05$)。

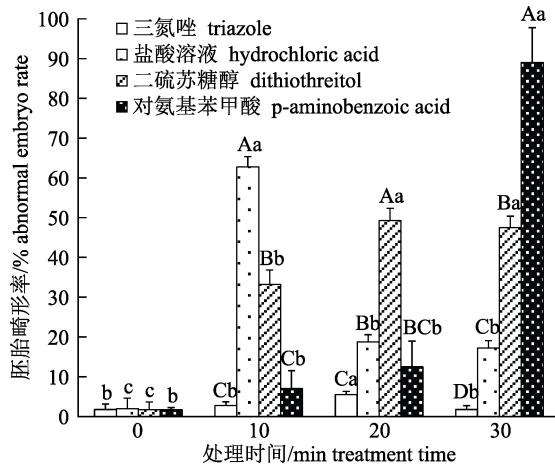


图 3 不同试剂及处理时间处理的中间球海胆未受精卵的胚胎畸形率

上标不同大写字母表示同一处理时间内不同试剂间胚胎畸形率差异显著($P<0.05$)；上标不同小写字母表示同一试剂处理组不同处理时间胚胎畸形率差异显著($P<0.05$)。

Fig. 3 The abnormal embryo rates of the unfertilized eggs of *Strongylocentrotus intermedius* treated with various reagents for different time

Different uppercase letters indicate significant differences in abnormal embryo rate between reagents within the same treatment time ($P<0.05$). Different lowercase letters indicate significant differences in abnormal embryo rate between treatment times with the same reagent ($P<0.05$)。

综合上述结果得出，对于处理未受精卵来说，使用 2 g/L 的三氮唑处理 30 min 的去膜效果最好，去膜率为 85.50%，去膜后受精率为 97.25%，畸形率为 1.75%。

2.2 不同试剂处理各期胚胎后的去膜率和畸形率

4 种试剂处理下，不同发育时期胚胎的去膜率见图 4。除在受精后 60 min 和 16 细胞期外，其余各期使用三氮唑的去膜率均为最高，而在各发育时期，使用盐酸溶液处理胚胎去膜率均为最低。使用三氮唑处理受精后 10 min 后的胚胎去膜率最高，达到(25.75±1.71)%，显著高于其余各发育时期($P<0.05$)。使用盐酸溶液处理 16 细胞期胚胎的去膜率最高，为(6.25±3.50)%，显著高于其余各发育时期($P<0.05$)；使用二硫苏糖醇处理 16 细胞期胚胎的去膜率最高，为(16.25±1.00)%，显著高于其余各发育时期($P<0.05$)；使用对氨基苯甲酸处理受精后 60 min 胚胎去膜率最高，为(14.25±2.50)%，但仅显著高于受精后 10 min 期胚胎、受精后 20 min 期胚胎、4 细胞期胚胎和 16 细胞期胚胎($P<0.05$)。

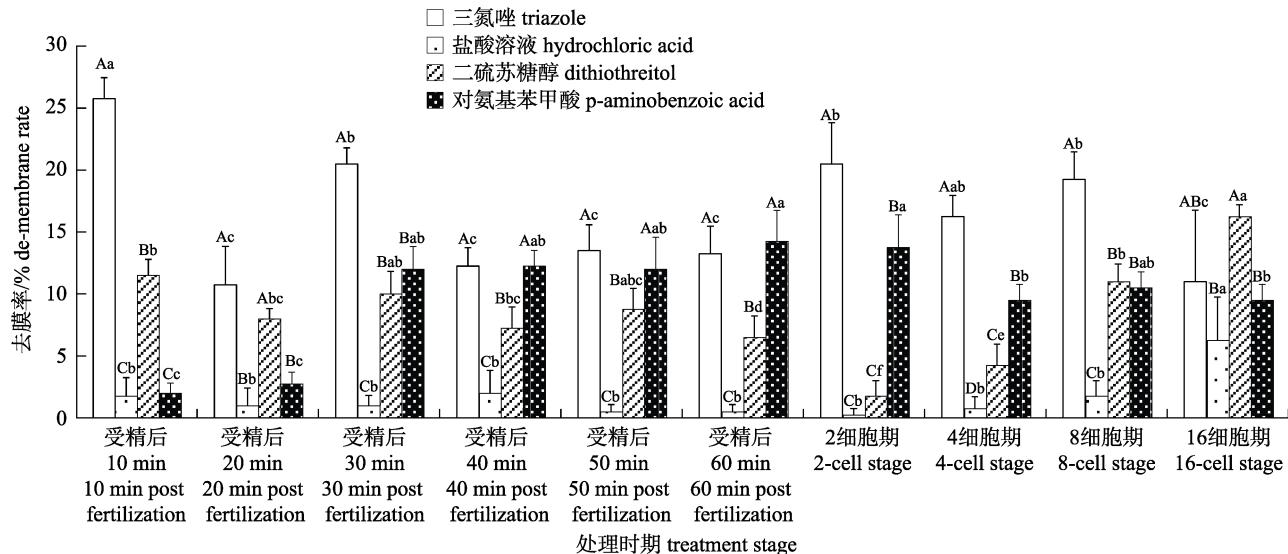


图 4 不同试剂处理的中间球海胆不同发育时期的去膜率

上标不同大写字母表示同一发育时期内，不同试剂间去膜率差异显著($P<0.05$)；

上标不同小写字母表示同一试剂处理组内不同发育时期去膜率差异显著($P<0.05$)。

Fig. 4 The embryo de-membrane rates of *Strongylocentrotus intermedius* at different developmental stages treated with various reagents

Different uppercase letters indicate significant differences in de-membrane rate among different reagents within the same developmental stage ($P<0.05$)。Different lowercase letters indicate significant differences in de-membrane rate among different developmental stages with the same reagent ($P<0.05$)。

4种试剂处理下, 不同发育时期胚胎的畸形率见图5。各胚胎发育期使用三氮唑处理后的畸形率均为最低, 使用对氨基苯甲酸处理从受精后10 min至2细胞期等各期胚胎的畸形率均为最高。使用三氮唑处理16细胞期胚胎畸形率最低, 仅为(2.00±0.82)%, 显著低于受精后20 min期、受精后30 min期和受精后60 min期($P<0.05$); 使用盐酸溶液处理受精后10 min期胚胎的畸形率最

低, 为(20.00±8.17)%, 显著低于受精后40 min、受精后50 min、受精后60 min、2细胞、4细胞和16细胞期胚胎($P<0.05$); 使用二硫苏糖醇处理8细胞期胚胎的畸形率最低, 为(11.50±2.38)%, 显著低于其他各胚胎发育期($P<0.05$); 使用对氨基苯甲酸处理16细胞期胚胎的畸形率最低, 为(1.75±1.26)%, 显著低于除8细胞期外的其余各胚胎发育期($P<0.05$)。

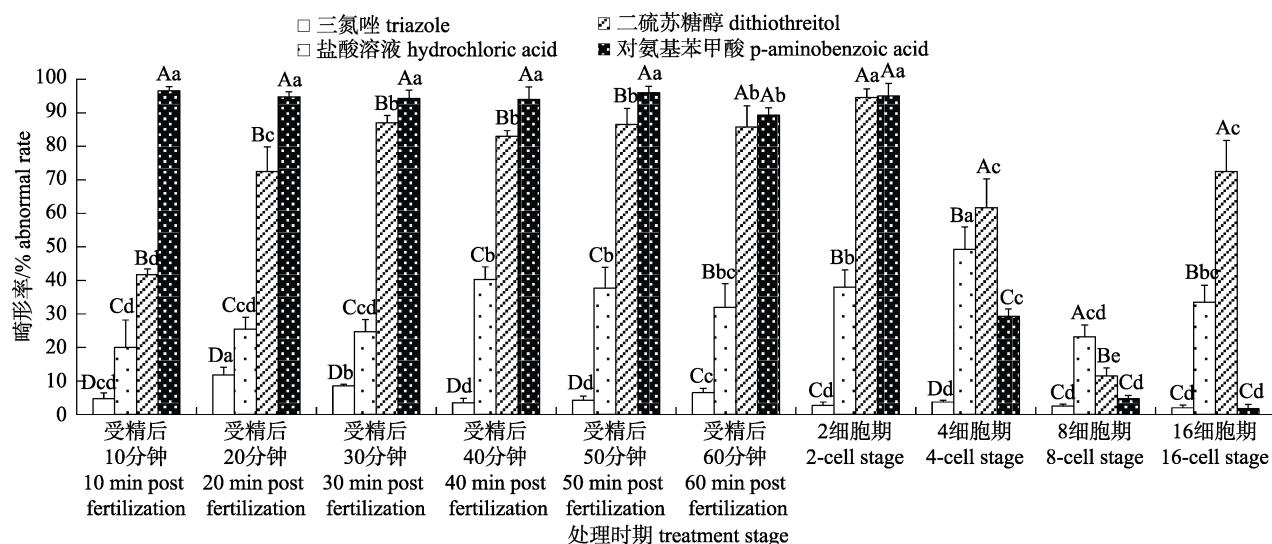


图5 不同试剂处理的中间球海胆不同发育时期胚胎的畸形率

上标不同大写字母表示同一发育时期内不同试剂处理间畸形率差异显著($P<0.05$); 上标不同小写字母表示同一试剂处理组内不同发育时期间畸形率差异显著($P<0.05$)。

Fig. 5 The abnormal embryo rates of *Strongylocentrotus intermedius* at different developmental stages treated with various reagents
Different uppercase letters indicate significant differences in abnormal rate among different reagents
within the same developmental stage ($P<0.05$). Different lowercase letters indicate significant
differences in abnormal rate among different developmental stages with the same reagent ($P<0.05$).

根据上述结果得出, 对于胚胎处理来说, 使用2 g/L的三氮唑处理受精后10 min的胚胎去膜效果最好, 去膜率为25.75%, 去膜后畸形率为4.75%。经与处理未受精卵的结果比较认为, 使用2 g/L的三氮唑处理未受精卵30 min是去除中间球海胆卵膜及受精膜的最佳方法。

2.3 中间球海胆胚胎细胞染色体数目

采用上述最佳去膜方法去除中间球海胆卵膜及受精膜, 选取囊胚期胚胎并进行了染色体制备。选取61个分散良好、形态清晰的染色体中期分裂相计数染色体数目, 其中52个细胞染色体数目为 $2n=42$, 占细胞总数的85%, 由此可以认为中间球海胆染色体数目为 $2n=42$ 。

2.4 中间球海胆染色体核型

由染色体相对长度及臂比值得知, 中间球海胆染色体组成为: 中部着丝粒染色体(m)20条, 亚中部着丝粒染色体(sm)20条, 亚端部着丝粒染色体(st)2条(表1)。

2.5 组型分析

中间球海胆染色体中期分裂相见图6, 核型公式为 $2n=20m+20sm+2st$ 。

3 讨论

3.1 4种试剂对中间球海胆未受精卵及胚胎的去膜效果

在各试剂、处理时间和处理时期实验组中,

表 1 中间球海胆染色体核型数据
Tab. 1 Karyotype data of *Strongylocentrotus intermedius*

序号 no.	相对长度(平均值±标准差) relative length ($\bar{x} \pm SD$)	臂比 arm ratio	类型 type	序号 no.	相对长度(平均值±标准差) relative length ($\bar{x} \pm SD$)	臂比 arm ratio	类型 type
1	6.18±0.87	1.11±0.11	m	12	6.49±1.37	1.76±0.24	sm
2	5.33±0.50	1.21±0.15	m	13	5.82±0.68	2.60±0.95	sm
3	5.05±0.96	1.47±0.36	m	14	5.68±0.52	1.71±0.12	sm
4	4.69±0.54	1.34±0.18	m	15	5.21±0.64	2.98±0.59	sm
5	4.62±0.51	1.06±0.08	m	16	5.13±0.61	1.82±0.51	sm
6	4.21±0.61	1.39±0.12	m	17	4.70±0.37	2.34±0.57	sm
7	3.84±0.17	1.08±0.06	m	18	4.27±0.47	2.48±0.90	sm
8	3.46±0.53	1.52±0.29	m	19	3.57±0.50	2.01±0.48	sm
9	2.87±0.53	1.20±0.17	m	20	2.97±0.57	2.43±0.58	sm
10	2.51±0.50	1.16±0.16	m	21	6.51±1.05	3.54±0.97	st
11	6.92±1.14	2.29±0.62	sm				

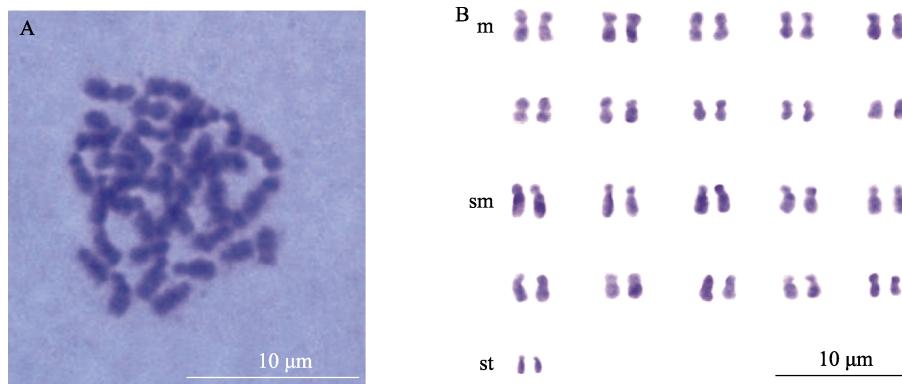


图 6 中间球海胆囊胚期染色体中期分裂相(A)及核型图(B)

Fig. 6 Metaphase of chromosome (A) and karyotype (B) at the blastula stage of *Strongylocentrotus intermedius*

使用三氮唑处理未受精卵 30 min 获得了最高的去膜率(85.5%)、最高的受精率(97.25%)及最低的畸形率(1.75%)，表明该方法是去除中间球海胆卵膜和受精膜的最佳方法。三氮唑处理各期胚胎的去膜效果不及处理未受精卵，这是由于三氮唑的作用原理是抑制受精膜形成时的硬化过程^[27]，各期胚胎在受精时已经形成硬化的受精膜，而三氮唑难以去除硬化的受精膜。而用三氮唑处理受精后的胚胎时，在受精后仍达到 25.50% 的去膜率，这可能是因为受精膜的硬化与时间有关系，也有可能是胚胎个体之间的差异性。二硫苏糖醇处理未受精卵的去膜效果优于处理胚胎各组，且最大去膜率出现在处理未受精卵 30 min，去膜率为 62.75%，这是由于二硫苏糖醇含有巯基还原基，能抑制膜的硬化，使受精卵不形成受精膜^[27]，因

此其对已形成受精膜的胚胎去膜的效果不及未受精卵。本研究中，二硫苏糖醇处理未受精卵后较高的受精率及较低的畸形率与胡庆明等^[23]的研究结果一致。对氨基苯甲酸处理各组去膜效果均较差，仅在受精后 60 min 处理组去膜率达到最大 14.25%。Eno 等^[24]利用对氨基苯甲酸完全去除了紫球海胆的受精膜，与本研究结果相差较大，这可能由于在本研究中，处理未受精卵后洗去处理液再授精，而 Enzo 等采用的方法是在对氨基苯甲酸处理液中授精。盐酸海水溶液有酸性，处理时间越长，去膜率越高，这也验证了实验结果，去膜率在处理未受精卵 30 min 时达到最高，最大值为 34.75%。直接处理受精后的胚胎，其去膜效果不明显，与直接处理受精后的胚胎相比，处理多细胞期时去膜效果较为明显。

3.2 中间球海胆染色体数目及核型

本研究用三氮唑除去受精膜后, 在染色体制备过程中获得了大量的分裂相, 这说明受精膜的去除是中间球海胆染色体制备的关键步骤。本研究确定了中间球海胆的染色体数目为 $2n=42$, Colombera 等^[31]确定了中间球海胆单倍体染色体数目为 21, 与本研究结果一致。Colombera 等提出棘皮动物门的染色体数目相当稳定, 这也与 Saotome 等^[22]的观点一致, 中间球海胆的染色体数目与马粪海胆、光棘球海胆、紫海胆、红海胆、哈氏刻肋海胆染色体数目同为 42 条, 而与海刺猬、曼氏孔楯海胆、紫掘居海胆染色体数目不同, 其中海刺猬染色体数为 44 条, 曼氏孔楯海胆、紫掘居海胆染色体数为 46 条。

本研究确定了中间球海胆的染色体组型为 $2n=20m+20sm+2st$, 与常亚青等^[26]报道的马粪海胆染色体组型相同, 而与 Lipani 等^[25]报道的拟球海胆的组型结果 $2n=32(a+st)+2sm+1st+1m/sm$ 有较大差异。中间球海胆与马粪海胆中, 21 对染色体中有 20 条中部着丝粒染色体(m)和亚中部着丝粒染色体 20 条(sm), 只有 2 条为亚端部着丝粒染色体(st), 属于稳定的染色体组型^[26], 而拟球海胆^[25]有 32 条都是 a+st, 只有 2 条 sm 及 1 条为 m/sm, 属于较不稳定的染色体组型。染色体核型的异同可能与物种间的进化关系密切相关, Lee 等^[33]和周遵春等^[34]均通过基因序列比对和构建系统发生树的方法证明了中间球海胆与马粪海胆遗传距离较小, 而与拟球海胆的遗传距离较大, 这可能是中间球海胆与马粪海胆具有相同染色体数目和核型, 而与拟球海胆差异较大的主要原因。

王祖熊等^[35]认为决定鱼类杂交不亲和性的主要因素是亲本间核型的差异和核质间的矛盾程度, 即杂交的双亲染色体核型越相近, 杂交成功率越高, 反之则越低或不能进行杂交。根据这一观点, 本研究结果可应用于海胆的杂交育种中。已有的研究^[36-37]已表明, 中间球海胆与马粪海胆的远缘杂交可行性较高, 这应该与这两种海胆核型的相似有很大关系。中间球海胆的染色体核型不仅能够对杂交育种、多倍体育种提供技术参考, 还能为

中间球海胆染色体基因定位、细胞遗传学等研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Chang Y Q, Ding J, Song J, et al. Biology and Aquaculture of Sea Cucumber and Sea Urchin[M]. Beijing: China Ocean Press, 2004. [常亚青, 丁君, 宋坚, 等. 海参、海胆生物学研究与养殖[M]. 北京: 海洋出版社, 2004.]
- [2] Zhang W J, Zhao C, Liu P J, et al. First report on tube feet differential pigmentation in the cultivated sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* (Agassiz, 1863) and its relationship with growth performance[J]. Aquaculture Research, 2010, 41(10): e706-e708.
- [3] Li X, Wang B, Liu J, et al. Type and function of coelomocyte in sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(5): 381-385. [李霞, 王斌, 刘静, 等. 虾夷马粪海胆体腔细胞的类型及功能[J]. 中国水产科学, 2003, 10(5): 381-385.]
- [4] Wang Y N, Feng N S, Li Q, et al. Isolation and characterization of bacteria associated with a syndrome disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*, in North China[J]. Aquaculture Research, 2013, 44(5): 691-700.
- [5] Wang Y N, Cheng S X, Chang Y Q, et al. Identification and expression analysis of a TLR11 family gene in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Immunogenetics, 2018, 70(5): 337-346.
- [6] Zhao C, Feng W P, Tian X F, et al. One generation of inbreeding does not affect covering behavior of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 2013, 46(5): 345-350.
- [7] Zhao C, Ji N J, Sun P, et al. Effects of light and covering behavior on PAX6 expression in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. PLoS ONE, 2014, 9(10): e110895.
- [8] Wang Z C, Chang Y Q. Studies on hatching of Japanese sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1997, 4(1): 60-67. [王子臣, 常亚青. 虾夷马粪海胆人工育苗的研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(1): 60-67.]
- [9] Lawrence J M, Chang Y Q, Cao X B, et al. Potential for production of uni by *Strongylocentrotus intermedius* using dry formulated feeds[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2011, 42(2): 253-260.
- [10] Qi S B, Zhang W J, Jing C C, et al. Long-term effects of stocking density on survival, growth performance and marketable production of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Aquaculture International, 2016, 24(5): 1323-1339.
- [11] Chang Y Q, Ding J, Xu Y H, et al. SLAF-based high-density

- genetic map construction and QTL mapping for major economic traits in sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 820.
- [12] Chang Y Q, Tian X F, Zhang W J, et al. Family growth and survival response to two simulated water temperature environments in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(9): 1356.
- [13] Chang Y Q, Zhang W J, Zhao C, et al. Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and gonad traits in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. *Aquaculture Research*, 2012, 43(2): 271-280.
- [14] Liu H J, Hou J L, Liu Y. Gynogenesis in Japanese flounder: A review[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(4): 902-912. [刘海金, 侯吉伦, 刘奕. 牙鲆雌核发育研究进展[J]. 中国水产科学, 2017, 24(4): 902-912.]
- [15] Liu S J. Fish Distant Hybridization[M]. Beijing: Science Press, 2015. [刘少军. 鱼类远缘杂交[M]. 北京: 科学出版社, 2015.]
- [16] Li K J. Tetraploid breeding in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[D]. Qiangdao: Ocean University of China, 2004. [李慷慨. 太平洋牡蛎四倍体育种研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.]
- [17] Li Y J, Li X, Mao L J, et al. The induce on tetraploid of Pacific oyster by artificial gynogenesis[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2006, 37(3): 362-366. [李雅娟, 李霞, 毛连菊, 等. 人工雌核发育诱导太平洋牡蛎四倍体的研究[J]. 东北农业大学学报, 2006, 37(3): 362-366.]
- [18] Gao Y M, Sun X S, Liu X. Effect of ultraviolet on genetic inactivity and fertilization of sea urchin (*Strongylocentrotus nudus* A.) sperm[J]. *Fisheries Science*, 2003, 22(6): 1-4. [高悦勉, 孙祥山, 刘馨. 紫外线照射对光棘球海胆精子遗传失活和授精能力的影响[J]. 水产科学, 2003, 22(6): 1-4.]
- [19] Ding J, Chang Y Q, Cao X B, et al. The embryonic development in gynogenesis monoploid in sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*)[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2004, 19(1): 10-15. [丁君, 常亚青, 曹学彬, 等. 中间球海胆雌核发育单倍体胚胎的初步研究[J]. 大连水产学院学报, 2004, 19(1): 10-15.]
- [20] Anne Böttger S, Eno C C, Walker C W. Methods for generating triploid green sea urchin embryos: An initial step in producing triploid adults for land-based and near-shore aquaculture[J]. *Aquaculture*, 2011, 318(1-2): 199-206.
- [21] Saotome K. Chromosome number of sea urchin andromerogones during early development[J]. *Zoological Science*, 1999, 16(1): 87-92.
- [22] Saotome K, Kamimura R, Kurokura H, et al. Male chromosomes of sea urchin hybrid andromerogones created with cryopreserved sperm[J]. *Zoological Science*, 2002, 19(2): 185-189.
- [23] Hu Q M, Xu W D, Sui X L, et al. Study of chromosome preparation in the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*[J]. *Fisheries Science*, 1993, 12(3): 11-12. [胡庆明, 许伟定, 隋锡林, 等. 大连紫海胆染色体制备的研究[J]. 水产科学, 1993, 12(3): 11-12.]
- [24] Eno C C, Böttger S A, Walker C W. Methods for karyotyping and for localization of developmentally relevant genes on the chromosomes of the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*[J]. *The Biological Bulletin*, 2009, 217(3): 306-312.
- [25] Lipani C, Vitturi R, Sconzo G, et al. Karyotype analysis of the sea urchin *Paracentrotus lividus*, (Echinodermata): Evidence for a heteromorphic chromosome sex mechanism[J]. *Marine Biology*, 1996, 127(1): 67-72.
- [26] Chang Y Q, Cao J, Zhang Y J, et al. The chromosome preparation and karyotype analysis of sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2006, 21(3): 247-250. [常亚青, 曹洁, 张彦娇, 等. 马粪海胆的染色体制备及组型分析[J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(3): 247-250.]
- [27] Zhou Z C, Dong Y, He C B, et al. Advances on chromosome study of echinoderm[J]. *Fisheries Science*, 2005, 24(12): 37-40. [周遵春, 董颖, 赫崇波, 等. 棘皮动物染色体的研究进展[J]. 水产科学, 2005, 24(12): 37-40.]
- [28] Osanai K, Kyozuka K I. Cross fertilization between sea urchin eggs and oyster spermatozoa[J]. *Gamete Research*, 1982, 5(1): 49-60.
- [29] Fan R, Jiang Z Q, Li Y J, et al. Chromosome karyotypic analysis and Ag- NORs of Pacific COD *Gadus macrocephalus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(1): 115-120. [范瑞, 姜志强, 李雅娟, 等. 太平洋鳕染色体核型及银染分析[J]. 水生生物学报, 2014, 38(1): 115-120.]
- [30] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. *Hereditas*, 2009, 52(2): 201-220.
- [31] Colombera D, Tagliaferri F. The male chromosomes of five species of echinoderms together with some technical hints[J]. *Caryologia*, 1986, 39(3-4): 347-352.
- [32] Colombera D, Vitturi R, Zanirato L. Chromosome number of *Cidaris cidaris* (Cidaridae, Echinoidea)[J]. *Acta Zoologica*, 1977, 58(4): 185-186.
- [33] Lee Y H. Molecular phylogenies and divergence times of sea urchin species of Strongylocentrotidae, Echinoidea[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2003, 20(8): 1211-1221.

- [34] Zhou Z C, Bao Z M, Dong Y, et al. Analysis of cDNA encoding major yolk protein (MYP) in sea urchin *Strongylocentrotus nudus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3): 352-359. [周遵春, 包振民, 董颖, 等. 光棘球海胆的主要卵黄蛋白 cDNA 序列分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(3): 352-359.]
- [35] Wang Z X, Zhang J X, Jin G Q. Study on the incompatibility of fish hybridization[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1986, 10(2): 171-179. [王祖熊, 张锦霞, 靳光琴. 鱼类杂交不亲和性的研究[J]. 水生生物学报, 1986, 10(2): 171-179.]
- [36] Zhang W J, Han F J, Chen S, et al. Comparisons of early growth and estimation of combining ability of parents for *Strongylocentrotus intermedius* and *Hemicentrotus pulcherrimus* sea urchin hybrid families[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(5): 1035-1044. [张伟杰, 韩奋杰, 陈顺, 等. 中间球海胆与马粪海胆杂交家系早期生长比较和亲本配合力估计[J]. 中国水产科学, 2017, 24(5): 1035-1044.]
- [37] Chang Y Q, Wang Z C, Song J, et al. Cross breeding between four species of sea urchin, feasibility and early development of F1 offspring[J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(3): 211-216. [常亚青, 王子臣, 宋坚, 等. 四种海胆杂交的可行性及子代的早期发育[J]. 水产学报, 2000, 24(3): 211-216.]

Methods for egg membrane and fertilization membrane removal and karyotype analysis of the sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*)

CHEN Xiaohui, ZHANG Weijie, LI Yajuan, LIU Lei, ZHANG Baojing, DING Jun, CHANG Yaqing

Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: *Strongylocentrotus intermedius* is a commercially important sea urchin species in China and Japan. The chromosomes are difficult to prepare, so the karyotype of *S. intermedius* is unknown. Egg membrane or fertilization membrane removal is a key step in the preparation of the echinoderm chromosome. To identify the optimal method of egg membrane and fertilization membrane removal, four reagents [triazole solution (2 g/L), dithiothreitol solution (3×10^{-3} mol/L), p-aminobenzoic acid solution (3×10^{-3} mol/L), and hydrochloric acid solution (pH 4.75)] were used to treat the eggs and embryos for 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, and 60 min post-fertilization at the 2-cell, 4-cell, 8-cell, and 16-cell stages, respectively. The chromosomes of the blastocyst embryos whose membranes were removed were prepared by conventional air-drying, and the karyotypes were analyzed. The results showed that all four reagents could remove the egg membrane or fertilization membrane. The eggs treated with 2 g/L of triazole for 30 min had an 85.50% membrane removal, 97.25% fertilization rate, and 1.75% deformity rate, indicating that this was the best method. Sixty-one metaphase cells with well-dispersed and well-preserved chromosomes were successfully prepared from the early blastocysts by the optimal membrane removal method. Karyotype analysis showed that the diploid chromosome number of *S. intermedius* was 42, and the karyotype was composed of 10 pairs of metacentric chromosomes, 10 pairs of submetacentric chromosomes, one pair of subtelocentric chromosomes, and 84 chromosome arms. Thus, the karyotypic formula is $2n=42=20m+20sm+2st$ and $NF=84$. The chromosome number is the same as that in previous reports for this species and in other sea urchins, such as *S. nudus* and *Hemicentrotus pulcherrimus*. The karyotype is the same as *H. pulcherrimus* but is different from *Paracentrotus lividus*. In conclusion, this study compared the membrane removal efficiencies of four reagents, and the results showed that treating with 2 g/L triazole solution for 30 min was the optimal method. We also obtained the karyotype of *S. intermedius*. The results provide a technical reference for the preparation of sea urchin chromosomes and chromosome manipulation breeding.

Key words: *Strongylocentrotus intermedius*; membrane removal; chromosome; karyotype analysis

Corresponding author: CHANG Yaqing. E-mail: yqchang@dlou.edu.cn