

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00760

单环刺螠受精过程的细胞学观察

董英萍, 张志峰, 邵明瑜

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: 利用组织学和荧光显微镜对单环刺螠 (*Urechis unicinctus*) 受精过程中精子入卵以及核相变化进行了观察。结果表明: 单环刺螠成熟卵呈卵圆形, 核相处于生发泡尚未破裂的第 1 次成熟分裂前期。在 $(21\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 时, 精卵混合后约 5 min, 精子由卵偏向植物极一侧入卵, 受精膜开始举起, 继而精核发生第 1 次膨胀。直至受精后约 25 min, 受精膜完全举起; 受精后 10~50 min, 卵核相继完成二次成熟分裂, 分别形成第一极体和第二极体; 受精后 50~70 min, 精核卵核分别膨胀, 形成雄原核和雌原核, 进而相向迁移, 最后在卵的中央联合形成合子核。受精后 70~90 min, 受精卵完成第 1 次卵裂, 形成 2 个大小相等的卵裂球。单环刺螠受精全过程历时约 70 min, 略长于多数海洋无脊椎动物的受精持续时间。本研究旨在为今后单环刺螠人工育苗和新品种的培育提供基础资料。

关键词: 单环刺螠; 受精过程; 细胞学观察

中图分类号: Q917.4; Q24

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)04-760-06

受精生物学的研究可以揭示生物的发生发育规律, 并且为生物的孤雌生殖、多倍体研究以及改良和培育新品种奠定理论基础。受精生物学的研究机制主要涉及受精前受精卵的核相、精子入卵的位置和时间、受精过程中精核卵核的形态变化和位置迁移、合子核的形成方式及第 1 次有丝分裂的全部过程。一直以来, 很多学者在这方面进行了大量研究。例如, 双壳类软体动物栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)^[1]、文蛤 (*Meretrix meretrix*)^[2], 星虫动物门的可口革囊星虫 (*Phascolosoma esculenta*)^[3]、方格星虫 (*Sipunculus nudus*)^[4], 甲壳动物中国对虾 (*Penaeus chinensis*)^[5]、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)^[6], 以及多种鱼类等, 取得了一定的进展。

单环刺螠 (*Urechis unicinctus*) 属于螠虫动物门 (Echiuroidea)、螠纲 (Echiurida)、无管螠目 (Xenopneusta)、刺螠科 (Urechidae)、刺螠属 (*Urechis*), 俗称“海肠子”, 是无管螠目在中国沿海分布的

唯一种类, 是一类亟待开发的海洋动物资源, 具有很高的经济食用价值, 且对沿海环境的净化具有重要的生态意义。目前对单环刺螠的研究主要涉及繁育^[7]、器官发生^[8-9]、营养^[10-11]、硫化物代谢^[12-13]以及潜在的药用活性肽分析^[14-15]等领域。本研究从组织学角度观察了单环刺螠的受精过程, 旨在丰富螠虫动物门的受精生物学基础资料, 且对单环刺螠的细胞工程育种提供必要的基础数据。

1.1 实验动物

成熟的单环刺螠于 2009 年 9–10 月购买于青岛市台东海鲜市场, 体质量 20~30 g, 体长 14~16 cm, 产地为山东烟台莱州海区。

1.2 方法

挑选体表健康无伤痕、肾管饱满的单环刺螠个体, 人工解剖法由肾管获取成熟的精子和卵子, 使用过滤海水洗卵 3 次, 按照精卵数量为 10 : 1 的比例进行人工授精, 受精时水温为 $(21\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。

精子悬液的制备: 取 2 滴雄性单环刺螠肾管

收稿日期: 2010-07-27; 修订日期: 2010-10-18.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目资助(40776074).

作者简介: 董英萍(1985-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 海洋动物生殖与发育生物学. E-mail: apingqd@163.com

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

内的精液,滴加到 100 mL 过滤海水中,混匀,即得精子悬液。

精子计数:取 1 mL 精子悬液,用 4%多聚甲醛固定,滴加到 25 格 $\times$ 16 格的血球计数板上,显微镜下计数 4 个角上的中格和中央中格(5 个中格共 80 个小格)的精子总数,根据公式:精子数/mL=80 小格内的精子个数/80 $\times$ 400 $\times$ 10 000 $\times$ 稀释倍数,即可得出每毫升悬液中的精子数。

用 Bouin's 液定期固定受精卵(受精后 10 min 内,每 1 min 取样 1 次;之后每隔 5 min 取样 1 次,直至受精后 40 min;最后改为每隔 10 min 取样 1 次,直到受精后 100 min)和未受精卵;每个时间点取样量约为 10^5 枚卵子,从中随机取 100 枚卵子进行石蜡切片和荧光染色。琼脂石蜡双包埋,美国 AO 轮式切片机上连续切片,厚度为 5 μ m。HE 染色, Nikon 80i 显微镜观察、拍照。

取上述各期样本,用 2%戊二醛和 2.5%多聚甲醛(0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液配制, pH 7.4)固定 2 h 后更换固定液 1 次, 4 $^{\circ}$ C 保存;固定后的样本经上述磷酸缓冲液漂洗 2 次,于 Hoechst33258 染液(贮存液: Hoechst33258 粉末 1 mg,溶于 20 mL 蒸馏水中,过滤, 4 $^{\circ}$ C 避光保存,用时蒸馏水稀释成 0.1 μ g/mL 的浓度)中黑暗染色 5 min,磷酸缓冲液洗 2 次后,将样品置于载玻片上,甘油封片液(20 mmol/L 柠檬酸, 50 mmol/L 磷酸氢二钠, 50%甘油)封片, Nikon 80i 显微镜下,使用波长为 365 nm 的激发光观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 卵母细胞成熟时的核相及精子入卵

单环刺螠成熟卵呈卵圆形,核相处于第 1 次成熟分裂前期,卵内含有 1 个较大的生发泡和一个核仁(图版 -1)。精卵混合后,单环刺螠精子借助于鞭毛的摆动迅速地游动到卵子的周围,并黏附到卵膜上(图版 -1)。受精后 5 min,精子入卵,并位于质膜边缘(图版 -2),受精膜开始举起(图版 -3);精核染色体去致密,发生第 1 次膨胀(图版 -2)。观察发现,单环刺螠精子由卵偏向植物

极一侧入卵,精子入卵启动卵子的成熟分裂。直到受精后 25 min,受精膜完全举起(图版 -9)。

2.2 极体的排放

受精 15 min 后,卵子生发泡的核膜相继经历断裂、局部溶解,直至核膜、核仁消失(图版 -4~6),与此同时,染色质凝缩形成染色体,纺锤体形成;受精后 20 min,染色体整齐地排列在赤道板上(图版 -7);受精后 25 min,进入第 1 次成熟分裂后期,染色体在纺锤丝的牵引下分别向两极移动(图版 -8,图版 -3~4);受精后 30 min,染色体移至两极,靠近质膜的一组染色体,逐渐向质膜外拱、突出于卵周隙中(图版 -10~11,图版 -5),直到受精后 40 min,第一极体完全排出(图版 -12,图 2-6)。受精后约 50 min,第二极体排出,与第一极体并排位于卵周隙中(图版 -13,图版 -7~8)。

2.3 雌雄原核的形成与结合

卵子成熟分裂完成之后,卵质中的单倍体染色体组开始去致密(图版 -14),受精后约 50 min,单倍体染色体组逐渐膨大形成雌原核,并且位置发生迁移,由质膜边缘向卵中央移动(图版 -15,16)。与此同时,精核体积开始膨大,并向卵中央迁移(图版 -7,8)。受精后 60 min,雌雄原核于卵中央相互靠拢(图版 -16)、贴近(图版 -17,图版 -9),两性原核于接触处局部溶解(图版 -18),分别形成染色体(图版 -19),并迁至中央赤道处,联合形成合子核(图版 -20,图版 -10),受精卵形成。

2.4 第 1 次卵裂

受精后 70 min,受精卵进入第 1 次有丝分裂的中期,染色体整齐地排列在赤道板上(图版 -21),之后染色体在纺锤丝的牵引下分别向两极移动(图版 -22,图版 -11),并于受精后约 90 min,两组染色体移至纺锤体的两极(图版 -23),最后在极体排出处缢裂形成 2 个大小相等的子细胞(图版 -24,图版 -12)。

3 讨论

单环刺螠从精子入卵到受精膜完全举起历时约 20 min, 与其他已报道的物种比较, 该物种受精膜举起需时较长, 如中国对虾^[5]的受精膜则在受精后 10 min 左右举起。从组织学切片观察来看, 单环刺螠精子入卵的位置偏向于植物极, 这同泥蚶、文蛤等是相似的, 入卵位点多远离于极体释放处。

3.1 卵子的成熟时间

卵子的成熟程度决定其受精能力, 不成熟的卵子即使能够受精, 胚胎发育也很难正常进行。各类动物在生殖季节所排出的卵子成熟阶段很不一致, 大致可分为 4 种情况: 第一, 受精发生在生发泡破裂之前, 即发生于初级卵母细胞时期, 精子进入后才完成 2 次成熟分裂; 第二, 受精发生在第 1 次成熟分裂中期; 第三, 受精发生在第 2 次成熟分裂中期; 第四, 受精发生在已经完成 2 次成熟分裂之后^[16]。从已报道的结果来看, 多数海洋无脊椎动物卵子在初级卵母细胞时期便已成熟。本实验中, 我们观察到单环刺螠卵子在生发泡破裂之前的初级卵母细胞时期便已成熟, 这一特点与其近亲环节动物沙蚕^[16]和某些双壳动物, 例如, 太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[17]等是一致的, 但与其另一近亲星虫动物门的可口革囊星虫^[3]、方格星虫^[4]以及其他双壳贝类长江牡蛎 (*Crassostrea glgo*)^[18]、栉孔扇贝^[1]、合浦珠母贝 (*Pinctada martensii*)^[19]、文蛤^[2]等的卵子成熟时间不一致, 后者受精时成熟卵子处于第 1 次成熟分裂中期。由此可见, 动物卵子成熟时间存在物种的特异性, 未体现明显的进化连续性。

3.2 雌雄原核的结合方式

不同物种雌雄原核结合的方式不同, 一般有 2 种: 原核融合和原核联合。诸多学者对此进行了探索研究, 像近江牡蛎 (*Crassostrea rivularis*)^[20]、菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)^[21]、泥蚶 (*Tegillarca granosa*)^[22]等软体动物, 以及中国对虾^[5]中华绒螯蟹^[6]等节肢动物, 雌雄原核的结合方式是联合。在受精过程中, 它们的雌雄原核移

动到卵子中央, 核膜不融合, 而以指状形式相嵌, 以后两原核染色体各自形成, 原核核膜消失, 染色体组移动到一起, 混杂组成第 1 次有丝分裂的赤道板。而栉孔扇贝^[1]及可口革囊星虫^[3]等, 则是以原核融合的方式形成合子核。它们的 2 个原核紧贴在一起时, 核膜相互融合, 染色质混合。融合过程开始于核的一侧, 先是两者的外膜融合, 随后是内膜融合, 从而形成合子核, 随之进入第一次有丝分裂过程。

本实验中, 对两性原核结合方式的连续切片和荧光染色观察结果得出, 单环刺螠两原核染色体各自形成, 染色体组移动到一起形成合子核的染色体组。由此证明, 单环刺螠是以原核联合的方式形成合子核。

3.3 组织学方法和荧光显微观察方法的比较

本实验主要采用了荧光显微观察和石蜡切片 2 种手段观察了单环刺螠的受精过程, 二者各有优缺点。前者的优点是可以简洁、直观、清晰地展示受精过程中卵子细胞核和精子细胞核的位置和迁移过程, 并将染色体的变化过程表现的十分明显, 但对细胞的微细结构, 如微管、纺锤体等的变化不能精确显示。组织学方法可很好地弥补上述不足, 通过连续切片, 它可精确地显示在受精过程中卵母细胞核相的变化、两性原核的形成等。2 种方法互相补充, 从而清晰直观地展示了单环刺螠受精的整个过程。

参考文献:

- [1] 任素莲, 王德秀, 绳秀珍, 等. 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 受精过程的细胞学观察 [J]. 海洋湖沼通报, 2000, (1): 24-29.
- [2] 董迎辉, 林志华, 柴雪良, 等. 文蛤受精及早期胚胎发育过程的细胞学观察 [J]. 动物学报, 2007, 53 (4): 700-709.
- [3] 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.
- [4] 兰国宝, 阎冰. 方格星虫繁殖生物学研究 [J]. 水产学报, 2002, 26 (6): 503-509.
- [5] 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): 182-189.
- [6] Lee T H, Yamazaki F. Cytological observations on fertilization in the Chinese freshwater crab, *Eriocheir sinensis*, by

- artificial insemination (in vitro) and incubation [J]. *Aquaculture*, 1989, 76: 347–360.
- [7] 李诺, 宋淑莲, 唐永政. 单环刺螠生活史研究 [J]. *齐鲁渔业*, 1995, 12 (6): 24–27.
- [8] Lehrke J, Bartolomaeus T. Comparative morphology of spermatozoa in Echiura [J]. *Zoologischer Anzeiger*, 2009, 248 (1): 35–45.
- [9] 陈宗涛, 张志峰, 康庆浩, 等. 单环刺螠消化道的发生和分化 [J]. *中国水产科学*, 2006, 13 (5): 700–704.
- [10] 孟祥欣, 郭承华, 董新伟, 等. 单环刺螠(*Urechis unicinctus*)废弃内脏营养成分分析 [J]. *烟台大学学报*, 2008, 21 (3): 232–234.
- [11] 李诺, 宋淑莲, 唐永政. 单环刺螠体壁氨基酸组分与含量的分析 [J]. *齐鲁渔业*, 2000, 17 (5): 26–28.
- [12] Wang S F, Zhang Z F, He C, et al. The effect of toxic sulfide exposure on oxygen consumption and oxidation products in *Urechis unicinctus* (Echiura: Urechidae) [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2010, 9 (2): 157–161.
- [13] Ma Y B, Zhang Z F, Shao M Y, et al. Sulfide: quinone oxidoreductase from echiuran worm *Urechis unicinctus* [J]. *Mar Biotechnol*, 2010, DOI: 10.1007/s10126-010-9273-3.
- [14] Jo H Y, Jung W K, Kim S K. Purification and characterization of a novel anticoagulant peptide from marine echiuroid worm, *Urechis unicinctus* [J]. *Process Biochem*, 2008, 43 (2): 179–184.
- [15] Sung W S, Park S H, Lee D G. Antimicrobial effect and membrane-active mechanism of Urechistachykinins, neuropeptides derived from *Urechis unicinctus* [J]. *FEBS Letters*, 2008, 582 (16): 2463–2466.
- [16] 陈大元. 受精生物学—受精机制与生殖工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2000, 22–46.
- [17] 任素莲, 王德秀, 王如才, 等. 太平洋牡蛎受精过程中的精核扩散与成熟分裂 [J]. *海洋湖沼通报*, 1991, (1): 34–39.
- [18] Longo F J, Mathews L, Hedgecock D. Morphogenesis of maternal and paternal genomes in fertilized oyster eggs (*Crassostrea glglo*): effects of cytochalasin B at different periods during meiotic maturation [J]. *Biol Bull*, 1993, 185: 197–214.
- [19] 沈亦平, 刘汀, 姜海波, 等. 近江牡蛎受精细胞学研究 [J]. *武汉大学学报: 自然科学版*, 1995, 41 (4): 482–486.
- [20] 任素莲, 王德秀, 王如才, 等. 太平洋牡蛎受精过程中的精核扩散与成熟分裂 [J]. *海洋湖沼通报*, 1991, 1: 34–39.
- [21] 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.
- [22] 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.

Cytological observation of fertilization in *Urechis unicinctus*

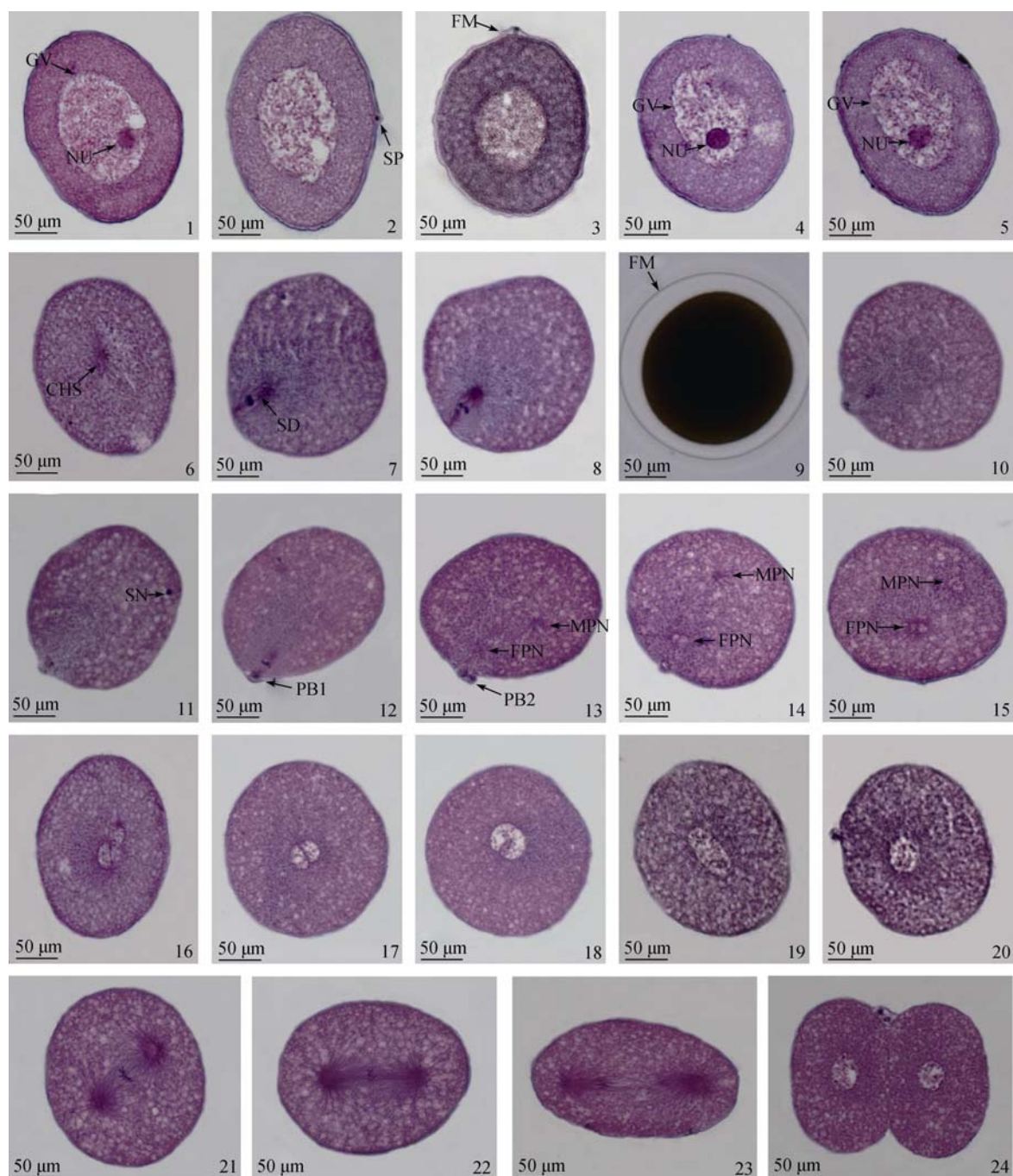
DONG Yingping, ZHANG Zhifeng, SHAO Mingyu

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

Abstract: We documented the penetration of sperm into the oocyte and the changes in nuclear behavior in *Urechis unicinctus* using paraffin sections and fluorescent microscopy. The mature oocyte was egg-shaped, had an unbroken germinal vesicle, and remained in the prophase of the first maturation division. Sperm rapidly attached to the surface of the oocyte within 5 min of insemination, water temperature (21 ± 1) °C. The sperm penetrated into the oocyte at a location close to vegetal pole triggering development of the fertilization membrane. The sperm nuclei then expanded and the fertilization membrane was completed within 25 min. The first and second maturation divisions were completed 10 and 50 min after insemination, and were accompanied by the exclusion of the first and the second polar bodies, respectively. The nuclei of the sperm and egg expanded 50–70 min later, respectively, and developed into the pronuclei. These then migrated to the center of the egg, forming an associated nucleus. The first cleavage was completed after 70–90 min, resulting in two daughter cells. The fertilization process lasted ~70 min, which is slightly longer than in most marine invertebrates. Our observations provide basic information for artificial breeding and the cultivation of new varieties of *U. unicinctus*.

Key words: *Urechis unicinctus*; fertilization process; cytology

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

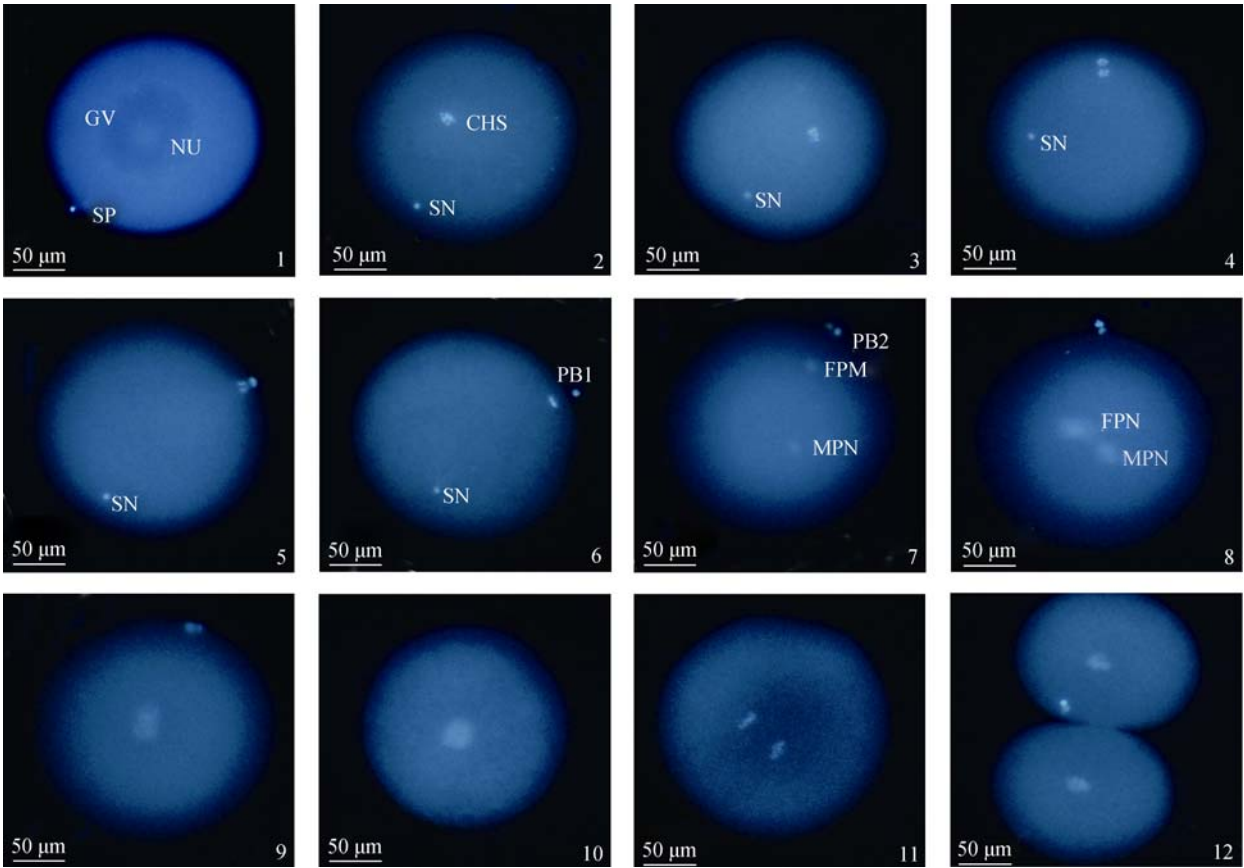


图版 I 单环刺螠受精过程的显微观察 (HE)

1. 成熟卵; 2. 精子入卵; 3. 受精膜开始举起; 4-6: 生发泡逐渐消失; 7-8: 第 1 次成熟分裂中期; 9: 受精膜完全举起; 10: 第 1 次成熟分裂后期; 11-12: 第一极体排出; 13: 第二极体排出; 13-20: 雌雄原核形成及合子核的形成; 21-23: 第 1 次卵裂。
CHS: 染色体; FM: 受精膜; FPN: 雌原核; GV: 生发泡; MPN: 雄原核; NU: 核仁; PB1: 第一极体; PB2: 第二极体; SD: 纺锤体; SN: 精核; SP: 精子。

Plate Micro-observation on fertilization in *Urechis unicinctus* (HE)

1. Mature oocyte; 2. Sperm penetrates into the egg; 3. Fertilization membrane starts to lift; 4-6. Germinal vesicle gradually disappears; 7-8. Metaphase of the first maturation division; 9. Fertilization membrane lifts completely; 10. Anaphase of the first maturation division; 11-12. Releasing the first polar body; 13. Releasing the second polar body; 13-20. Forming female and male pronucleus and association nucleus; 21-23. First cleavage division.
CHS: Chromosome; FM: Fertilization membrane; FPN: Female pronucleus; GV: Germinal vesicle; MPN: Male pronucleus; NU: Nucleolus; PB1: The first polar body; PB2: The second polar body; SD: Spindle; SN: Sperm nucleus; SP: Sperm.



图版 II 单环刺螠受精过程荧光显微观察

1. 成熟卵; 2. 精子入卵; 3-6. 第 1 次成熟分裂; 6: 第一极体排出; 7: 第二极体排出; 8-10: 雌雄原核形成及合子核的形成;
11-12: 第 1 次卵裂。
CHS: 染色体; FM: 受精膜; FPN: 雌原核; GV: 生发泡; MPN: 雄原核; NU: 核仁; PB1: 第一极体; PB2: 第二极体; SN: 精核;
SP: 精子。

Plate Observation on fertilization of *U. unicinctus* with fluorescent microscope

1. Mature oocyte; 2. Sperm penetrates into the egg; 3-6. The first maturation division; 6. Releasing the first polar body; 7. Releasing the second polar body; 8. Forming female and male pronucleus and association nucleus; 11-12. First cleavage division.
CHS: Chromosome; FM: Fertilization membrane; FPN: Female pronucleus; GV: Germinal vesicle; MPN: Male pronucleus; NU: Nucleolus; PB1: The first polar body; PB2: The second polar body; SN: Sperm nucleus; SP: Sperm.