

刺参受精及早期胚胎发育过程的细胞学观察

谭杰^{1,2}, 孙慧玲^{2*}, 高菲², 燕敬平², 董迎辉³, 叶乃好², 王清印²

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100)

摘要: 采用 HOECHST 33258 染色荧光显微方法, 对刺参成熟未受精卵以及受精过程中精子入卵、极体排放、雌雄原核的形成与结合、早期卵裂以及多精入卵等细胞学进行了研究。结果显示, 刚产出的刺参成熟未受精卵呈圆形, 核相处于第一次成熟分裂中期; 在水温 22~23 °C、盐度 29 条件下进行受精, 受精后 12 min, 完成第一次成熟分裂, 释放第一极体; 受精后 20 min, 大部分受精卵完成第二次成熟分裂, 放出第二极体。受精后 35 min, 雌、雄原核开始在卵中央发生染色体联合; 受精后 80 min, 部分受精卵完成第一次卵裂, 受精后 100 min, 部分受精卵完成第二次卵裂。刺参在受精过程中存在极少数的多精入卵现象。

关键词: 刺参; 受精; 多精入卵; 细胞学观察

中图分类号: Q 954.4; S 917.4

文献标志码: A

受精及早期胚胎发育过程的观察和研究是水生物发育生物学的重要研究内容。一方面, 对该过程中精卵识别与皮层反应、多精入卵及其抑制机制、雌雄原核的扩散与结合等现象的研究, 加深了人们对受精机制的认识。另一方面, 对精子入卵方式、极体排放和卵裂时间等的研究则加速了转基因、染色体操作等育种技术的完善。荧光显微观察法是受精及早期胚胎发育过程研究的重要手段之一, 具有简洁、清晰、直观等优点, 已被用于泥蚶 (*Tegillarca granosa*)^[1]、可口革囊星虫 (*Phascolosoma esculenta*)^[2]、菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)^[3]、日本珍珠贝 (*Pinctada fucata martensii*)^[4] 等水生生物的研究中。

我国的刺参 (*Apostichopus japonicus*) 规模化育苗技术在 20 世纪 80 年代中期取得突破性进展, 到 90 年代中期, 随着人工育苗及养殖技术研究的不断深入, 许多关键技术不断完善与进步, 使刺参育苗和养殖这一新兴产业获得了强有力的技术支撑^[5]。2009 年全国刺参苗种生产能力超过

500 亿头, 养殖面积超过 15 万 hm^2 , 产量超过 10 万 t ^[6], 是目前我国养殖水产品中单一经济总量最大的养殖品种之一。然而, 与产业的快速发展形成鲜明对比的是, 有关刺参基础生物学的研究还相当薄弱, 刺参育种的研究工作也尚未取得实质性进展。本研究采用荧光显微观察技术, 对刺参受精及早期胚胎发育过程中的一系列细胞学现象进行了系统观察与分析, 以期对刺参受精机制的深入研究和细胞工程育种的开展提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

刺参亲参取自山东寻山水产集团有限公司苗种场亲参促熟车间。荧光染色试剂盒 HOECHST 33258 购自江苏碧云天生物技术研究所。

1.2 方法

挑选性腺发育成熟的雌雄刺参, 阴干 1 h 后流水刺激 15 min, 然后将雌雄亲参置于水桶内。待亲参开始排放精卵后, 迅速将雌雄亲体移出分别放入备用的水桶内, 使其分别排放精卵。待得

收稿日期: 2011-06-25 修回日期: 2011-10-18

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (2010-cb-03)

通讯作者: 孙慧玲, E-mail: sunhl@ysfri.ac.cn

到足够数量的精卵后,进行人工受精。显微镜下观察,精子密度控制在卵周围一个视野面可见3~5个精子时即可。受精卵在水温22~23℃、盐度29条件下孵化。取样方法为受精前取样一次;受精后20min之内每隔3min取样一次,20min至60min内每隔5min取样一次,60min后每隔10min取样一次;每次取卵量不少于500粒。样品用0.1mol/L PBS(pH 7.4)配制的4%多聚甲醛溶液固定,更换两次固定液后,4℃下保存备用。观察时吸取适量样品,用0.1mol/L磷酸缓冲液(pH 7.4)冲洗2~3次,HOECHST 33258荧光染料在黑暗环境下染色5~10min,再用磷酸缓冲液冲洗2次,然后将卵液滴于载玻片上,滴1滴抗淬灭剂,加盖玻片在Nikon 80i荧光显微镜的紫外光(365nm)下观察拍照。

2 结果

2.1 精子入卵与成熟分裂

成熟的刺参未受精卵呈圆球形,直径140~170μm,核相处于第一次减数分裂中期。经HOECHST 33258染色后,卵母细胞卵质为浅蓝色,染色体较小,呈亮蓝色,在纺锤丝的牵引下排列于赤道板中央(图版-1)。

精卵混合后,精子借助于鞭毛的摆动,以头部附着于卵母细胞表面,附着部位随机(图版-2)。受精后6~9min,精子通过顶体反应穿过卵黄膜进入卵内,并迅速去致密完成第一次膨胀,形成圆球形的精核。精核直径4.0~6.0μm(图版-3)。精子入卵后,卵母细胞的成熟分裂重新启动,染色体在纺锤丝的牵引下开始向卵膜移动。在移动的同时,同源染色体逐渐分开。至分裂后期,染色体已被明显分为两组(图版-4,5)。受精后12min,靠近卵膜的一组染色体脱离卵质形成第一极体,第一次成熟分裂完成(图版-6)。第一极体排出后,留在卵质内的另一组染色体很快启动第二次成熟分裂,姐妹染色单体分离(图版-7)。至受精后20min,大部分受精卵排出第二极体,完成第二次成熟分裂(图版-8)。在成熟分裂过程中,精核不断向卵母细胞中央迁移。至第二次成熟分裂结束,精核已迁移至接近中央处,这期间精核的大小未发生显著变化。

2.2 雌雄原核的形成与联合

随着第二次成熟分裂的完成,精核进行了第二次膨胀,体积急剧扩大,形成圆形的雄原核。同

时,卵子染色体也去浓缩扩散,形成形状相似的雌原核(图版-9)。至受精后30min,多数雌雄原核达到最大体积,雄原核的直径15~17μm,而雌原核比雄原核略小,直径13~14μm。雌雄原核形成以后,开始向受精卵中央迁移。到达中央时,雌雄原核的体积均略有缩小,雄原核的直径13~14μm,雌原核的直径10~11μm。至受精后35min,可在部分受精卵中观察到雌雄原核在中央赤道板相遇(图版-10),但仍可看到中间的核膜。随后两者的核膜破裂,染色质浓缩,形成各自的染色体组,在卵子中央合并,雌雄原核通过联合的方式形成合子核(图版-11)。受精后50min,联合核的染色体整齐地排列在纺锤体的赤道板上,形成第1次卵裂的中期分裂相(图版-12)。

2.3 早期卵裂

受精后55min,染色体在纺锤丝的牵引下开始向两极移动(图版-13)。至受精后70min,观察到明显的卵裂沟(图版-14)。受精后80min左右,第一次卵裂完成,形成两个大小相同的卵裂球。大部分刺参受精卵在第一次卵裂时的卵裂沟位于极体处,但也观察到少量受精卵第一次卵裂的卵裂沟并不位于极体处。

第一次卵裂完成后,两个卵裂球中的染色体去致密变为染色质,核膜重建,进入有丝分裂的间期(图版-15)。受精后90min左右,两个卵裂球中的染色质经复制后开始螺旋化,形成清晰的染色体,第二次卵裂开始。第二次卵裂的方向与第一次卵裂的方向垂直(图版-16,17)。受精后100min,部分受精卵的第二次卵裂完成,形成4个大小一样的卵裂球(图版-18)。

2.4 多精入卵

在受精过程中观察到少量的多精入卵现象。一般是两个精子同时进入卵母细胞。进入卵母细胞的精子都能够去致密形成雄原核,并且刺激卵母细胞排出两个极体,正常完成成熟分裂(图版-19)。在发生多精入卵的卵子中,只观察到一个雄原核与雌原核发生联合形成联合核(图版-20)。在对第一次卵裂的观察中,没有发现染色体异常分离的现象。

3 讨论

3.1 受精卵发育速度

本研究条件下,刺参成熟卵子于受精12min后释放第一极体,20min后释放第二极体,55min

后开始第一次卵裂,胚胎发育的速度与以往报道稍有差异。常亚青等^[7]报道刺参精卵混合后约10 min释放出第一极体,约30 min放出第二极体,受精后1 h左右开始第一次卵裂。朱峰^[8]报道刺参卵子受精后15~20 min在动物极放出第一极体,40~45 min放出第二极体,1 h左右出现卵裂沟。和其他研究相比,本研究中刺参受精卵完成成熟分裂所用时间较短,而第一次卵裂开始的时间与其他研究相似。

影响受精卵发育速度的因素包括温度、盐度等^[9-11]。Eudeline等^[12]在太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)极体排放动力学研究过程中发现,较高的温度能加快极体的排放。Desrosiers等^[13]在巨扇贝(*Placopecten magellanicus*)受精及早期发育的研究中,也得到同样的结论,并认为温度通过影响染色体移动速度以及相关酶活性来影响成熟分裂的时间,在一定温度范围内,随着温度的升高,染色体移动速度加快。本研究中,刺参受精卵孵化温度保持在22~23℃,而朱峰^[8]的研究中受精卵孵化水温保持在20~21℃,较高的温度可能是本研究刺参受精卵完成成熟分裂较快的一个原因。盐度也是影响极体排放和卵裂时间的重要因素。Desrosiers等^[13]发现随着盐度从20升到30,巨扇贝完成成熟分裂的时间出现先减少后增加的趋势,并且成熟分裂各个过程受盐度影响不同,并认为盐度通过影响微管蛋白组装成纺锤体的速度影响成熟分裂的时间。本研究中刺参受精卵孵化盐度在29,而朱峰^[8]的研究中盐度为32~33。较低的盐度可能是本研究中刺参卵母细胞完成成熟分裂时间较短的另一个原因。尽管本研究中刺参受精卵较快完成了成熟分裂,然而第一次卵裂开始的时间与其他研究相似。已有的研究表明,生物发育过程中的某些事件只有在达到特定的生理状态才会启动,如两栖动物的中胚胎转换(MBT)只有在胚胎的细胞核与胞质达到某一特定比值时才能发生^[14]。刺参受精卵可能只有在细胞核与胞质达到某个特定的比值才能开始第一次卵裂,因此,本研究中尽管温度和盐度影响了染色体移动速度以及相关酶活性和纺锤体组装速度,但胞质的合成却未受影响,第一次卵裂开始的时间与其他研究相似。

3.2 多精入卵

多精入卵现象是海洋无脊椎动物受精生物学

的一个研究热点。多精入卵将引起胚胎的发育异常和死亡^[15]。为保证单个精核与卵核的融合,在长期的进化过程中,海洋无脊椎动物形成了复杂的对应多精入卵的机制。目前有关海胆阻止多精入卵机制的研究较多,海胆主要通过两个反应阻止多精入卵:(1)快封闭反应:精子进入卵细胞迅速触发膜电位改变,引起膜外精子与卵细胞识别和融合障碍;(2)慢封闭反应:通过皮层反应形成厚而硬的受精膜,防范多余精子入卵^[16]。庞振国^[17]发现,刺参的精子穿入卵子之后,卵子也会发生皮层反应,形成受精膜,这表明刺参也具有海胆的慢封闭反应,以阻止多精入卵的发生。至于刺参是否具备海胆的快封闭反应,尚待进一步研究。

封闭反应并不能完全阻止多精入卵。当精子冲撞卵子的机会多到超过卵子阻止多精入卵的能力时,依然会发生多精入卵的现象^[18]。对海胆的研究表明,当发生多精入卵以后,将同时形成多个雄原核,在这种情况下,受精卵的第一次卵裂将会出现多极分离的现象,这种胚胎将会发育畸形并且死亡^[19]。本研究中也观察到多精入卵现象,进入的精子也能够形成雄原核。然而与上述海胆研究不同的是,本研究中未发现染色体分离异常的现象。栉水母(*Beroe ovata*)存在多精受精现象,在多达10个精子进入卵子时栉水母的受精卵仍然能正常发育^[20]。推测刺参具有和栉水母相同的适应多精入卵的机制,即进入卵子的精子都能形成雄原核,但雌原核只与其中一个雄原核发生联合,多余的雄原核在卵内被逐渐吸收或崩解。

3.3 受精过程中的核相变化

海洋无脊椎动物成熟卵子所处的发育阶段主要有以下三种情况:一是初级卵母细胞阶段,例如海绵、沙蚕、牡蛎等;二是第一次成熟分裂中期,如一些十足目动物以及大多数贝类;三是已完成两次成熟分裂,如海胆等。本研究中,刺参成熟卵子的生发泡已经破裂,处于第一次成熟分裂中期,这与同为棘皮动物的海胆不同,而与海星相同^[21]。竺俊全等^[2]认为,成熟未受精卵处在第一次成熟分裂前期或中期在海洋无脊椎动物中较为普遍。

Longo等^[22]对海星的研究表明,受精过程中核相的变化与卵子受精时所处的时期密切相关。本研究中刺参精子入卵后发生明显膨胀现象,形成精核。第二极体形成时,精核突然膨胀形成雄

原核,雌原核也在同时形成。此后,雌雄原核都经历缓慢膨胀又浓缩的过程。刺参雌、雄原核靠近时核膜不相互融合,两原核都形成各自的染色体组,说明其结合方式为原核联合。刺参受精卵核相的变化过程与卵子处于第一次成熟分裂中期的海星相似。

3.4 卵裂与极体

董迎辉等^[23]对文蛤(*Meretrix meretrix*)和宽壳全海笋(*Barnea dilatata*)^[24]的受精及早期胚胎发育的荧光观察表明,文蛤和宽壳全海笋第一次卵裂卵细胞均自极体处发生纵向内缢。本研究中,大部分刺参受精卵第一次卵裂的卵裂沟位于极体处,但也观察到少量受精卵卵裂沟并不位于极体处。研究认为,小鼠受精卵排出的第二极体的位置是固定的,是动物极的标志,而第一次卵裂的方向与动-植物极轴的角度小于 30° ,所以卵裂沟一般位于极体处^[25-26]。然而,Hiiragi等^[27]对小鼠受精卵发育进行的定时观察表明,小鼠受精卵的第二极体并不是固定的,在半数受精卵中,第二极体在卵裂刚开始前后即向第一次卵裂的卵裂面移动,当第一次卵裂结束时,大部分受精卵的极体位于卵裂沟附近,但也有部分受精卵的极体不向卵裂面移动,极体并不位于卵裂沟处,并发现小鼠第一次卵裂的方向总是与雌雄原核结合时两者的中心连线相垂直,同样的拓扑结构关系也存在于海胆受精卵的卵裂中^[28]。据此,推测刺参的受精卵很有可能像小鼠的一样,部分极体自卵裂开始前后就向卵裂处移动,另有一部分极体并不向卵裂处移动,与卵裂沟相离。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Komaru A, Matsuda H, Yamakawa T, et al. Meiosis and fertilization of the Japanese pearl oyster eggs at different temperature observed with a fluorescence microscope[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1990, 56(3):425-430.
- [5] 常亚青,隋锡林,李俊. 刺参增殖业现状、存在问题与展望[J]. 水产科学,2006,25(4):198-201.
- [6] 农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京:中国农业出版社,2010:40-78.
- [7] 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,2004:67-68.
- [8] 朱峰. 仿刺参 *Aposticho japonicus* 胚胎发育和主要系统的组织学研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2009.
- [9] Lough R G, Gonor J J. Early embryonic stages of *Adula californiensis* (Pelecypoda: Mytilidae) and the effect of temperature and salinity on developmental rate[J]. Marine Biology, 1971, 8(2):118-125.
- [10] Downing S L, Allen S K Jr. Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature [J]. Aquaculture, 1987, 61(1):1-15.
- [11] Santos A E D, Nascimento I A. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828 [J]. Aquaculture, 1985, 47(4):335-352.
- [12] Eudeline B E, Allen S K, Guo X. Delayed meiosis and polar body release in eggs of triploid pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in relation to tetraploid production [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2000, 248(2):151-161.
- [13] Desrosiers R R, Desilets J, Dube F. Early developmental events following fertilization in the giant scallop *Placopecten magellanicus* [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1996, 53(6):1382-1392.
- [14] Matsumoto Y, Kominami T, Ishikawa M. Timers in early development of sea urchin embryos [J]. Development, Growth and Differentiation, 1988, 30(5):543-552.
- [15] Gilbert S F. Developmental biology, 8th edn [M]. Sunderland: Sinauer Associates, 2006:181.
- [16] 樊其昶,白书农. 发育生物学原理[M]. 北京:高等教育出版社,2002:321-323.
- [17] 庞振国. 刺参的性腺发育及受精细胞学研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2006.
- [18] Levitan D R, Terhorst C P, Fogarty N D. The risk of polyspermy in three congeneric sea urchins and its implications for gametic incompatibility and reproductive isolation [J]. Evolution, 2007, 61(8):2007-2014.
- [19] Schuel H. The prevention of polyspermic fertilization

- in sea urchins [J]. *Biological Bulletin*, 1984, 167: 271 – 309.
- [20] Gould M C, Stephano J L. Polyspermy prevention in marine invertebrates [J]. *Microscopy Research and Technique*, 2003, 61(4): 379 – 388.
- [21] Wessel G M, Reich A M, Klatsky P C. Use of sea stars to study basic reproductive processes [J]. *Systems Biology In Reproductive Medicine*, 2010, 56(3): 236 – 245.
- [22] Longo F J, Look S, Mathews L. Pronuclear formation in starfish eggs inseminated at different stages of meiotic maturation; correlation of sperm nuclear transformations and activity of the maternal chromatin [J]. *Developmental Biology*, 1991, 147(1): 62 – 72.
- [23] 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.
- [24] 董迎辉,林志华,柴学良,等. 宽壳全海笋受精及早期卵裂的细胞学研究 [J]. *海洋科学*, 2009, 33(10): 68 – 72.
- [25] Piotrowska K, Zernicka G M. Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo [J]. *Nature*, 2001, 409(6819): 517 – 521.
- [26] Plusa B, Grabarek J B, Piotrowska K, *et al.* Site of the previous meiotic division defines cleavage orientation in the mouse embryo [J]. *Nature Cell Biology*, 2002, 4(10): 811 – 815.
- [27] Hiiragi T, Solter D. First cleavage plane of the mouse egg is not predetermined but defined by the topology of the two apposing pronuclei [J]. *Nature*, 2004, 430(6997): 360 – 364.
- [28] Paweletz N, Mazia D, Finze E M. Fine structural studies of the bipolarization of the mitotic apparatus in the fertilized sea urchin egg. II. Bipolarization before the first mitosis [J]. *European Journal of Cell Biology*, 1987, 44(2): 205 – 213.

Cytological observations on fertilization and early embryonic development in sea cucumber *Apostichopus japonicus*

TAN Jie^{1,2}, SUN Hui-ling^{2*}, GAO Fei², YAN Jing-ping²,
DONG Ying-hui³, YE Nai-hao², WANG Qing-yin²

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

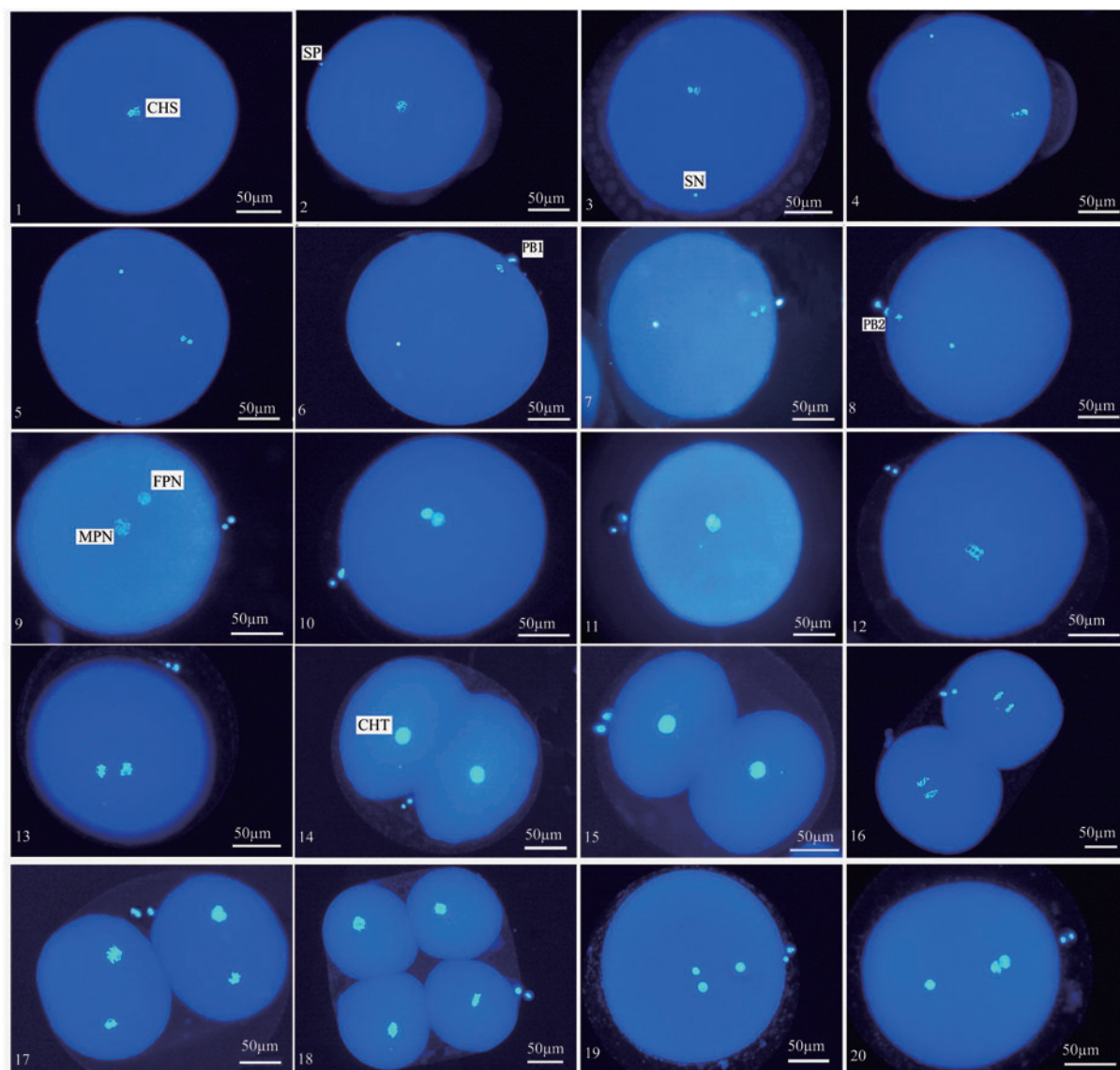
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

Abstract: A series of characteristic cytological events during fertilization and early embryonic development in *Apostichopus japonicus* were studied by the fluorescence microscope with HOECHST 33258 stained. The results indicated that unfertilized mature eggs of *A. japonicus* were globular and remained at the metaphase of meiosis I. At water temperature of 22 – 23 °C and salinity 29, sperms quickly attached to the surface of the egg after mixing of sperms and eggs. At 12 min after insemination, the first meiosis is finished, with release of the first polar body. Most of fertilized eggs released the second polar bodies at 20 min after insemination. About 35 min, the male and the female pronuclei associated with each other after their chromosomes formed respectively in the center of egg. The first and second cleavages finished at 80 min and 100 min respectively in fast developing fertilized eggs. Polyspermy phenomena were observed in the fertilization process in *A. japonicus*.

Key words: *Apostichopus japonicus*; fertilization; polyspermy; cytological observation

Corresponding author: SUN Hui-ling. E-mail: Sunhl@ysfri. ac. cn



图版

1. 成熟未受精卵; 2. 精子附卵; 3. 精子入卵; 4、5. 第一次成熟分裂后期; 6. 排出第一极体; 7. 第二次成熟分裂后期; 8. 排出第二极体; 9. 雌雄原核的形成; 10、11. 雌雄原核的靠近与联合; 12. 第一次卵裂中期; 13、14. 第一次卵裂后期; 15. 两细胞期; 16、17. 第二次卵裂后期; 18. 四细胞期; 19. 双精入卵; 20. 多精入卵时的雌雄原核联合。

CHS. 染色体; SP. 精子; SN. 精核; PB. 极体; FPN. 雌性原核; MPN. 雄性原核; CHT. 染色质; 标尺 = 50 μm 。

Explanation of Plate

1. unfertilized mature egg; 2. sperm attaching to the egg; 3. sperm penetrated in egg; 4,5. anaphase of the first meiosis; 6. release of the first polar body; 7. anaphase of the second meiosis; 8. release of the second polar body; 9. formation of the female and male pronuclei; 10,11. approach and association of the female and male pronuclei; 12. metaphase of the first cleavage; 13,14. anaphase of the first cleavage; 15. 2-cell stage; 16,17. anaphase of the second cleavage; 18. 4-cell stage; 19. two sperms penetrated into the same egg; 20. association of one male pronuclei and female pronuclei in polyspermy.

CHS. chromosome; SP. sperm; SN. sperm nucleus; PB. polar body; FPN. female pronucleus; MPN. male pronucleus; CHT. chromatin; Bar = 50 μm .