

光裸方格星虫 (*Sipunculus nudus* L.) 生殖细胞及胚胎发育

Development of Genital Cells and Embryo of *Sipunculus nudus* L.

吴 斌

Wu Bin

(广西海洋研究所 北海市长青东路 92号 536000)

(Guangxi Institute of Oceanography, 92 East Changqinglu, Beihai, Guangxi, 536000, China)

摘要 1990年3月至1991年2月, 每月采样1~2次, 每次取30条个体, 在显微镜下观察雌雄生殖细胞的发育和形态特征。计数雌性个体体腔卵细胞。1990年6月~7月取体重 ≥ 13 g的个体, 解剖取肾管中的精卵进行人工授精, 观察胚胎发育进程。取部分担轮幼虫于10 L容器中(水温 $27.5^{\circ}\text{C} \sim 29^{\circ}\text{C}$, 海水比重 $1.017 \sim 1.019$)培养, 观察早期个体发育。结果表明, 光裸方格星虫雄性生殖细胞以细胞团形式存在, 卵细胞以单个游离存在。卵细胞分5个发育期。各期卵细胞相对含量的周年变化表明光裸方格星虫属分批产卵类型, 产卵期为4月~9月。光裸方格星虫的精卵只有经肾管收集后才具受精能力。受精卵约经3 h发育为担轮幼虫, 经24 h左右发育为海球幼虫。担轮幼虫为卵黄营养型, 海球幼虫为浮游生物营养型, 摄取单细胞藻类或有机碎屑为食, 浮游生活2~3周后变态为稚星虫。

关键词 光裸方格星虫 生殖细胞 繁殖期 胚胎发育

中图法分类号 Q 959.197

Abstract *Sipunculus nudus* was sampled one or two times each month from March 1990 to February 1991. Thirty individuals each time were dissected to observe the development of male and female genital cells by microscope. Oocytes of female coelom were counted. The sperm and oocyte in nephridioduct were took out from the samples (weight ≥ 13 g) to observe the embryonic development in June and July 1990. Part of pelagosphere was cultured in 10 L container at water temperature 27.5°C to 29°C , water specific gravity 1.017 to 1.019 to observe the early individual development. The results were as follows. The male genital cells were group and egg cell was single. The egg cells had five stages. *S. nudus* spawned in patches according to the annual fluctuations of relative content of oocytes in different stages. The breeding period is April to September. The genital didn't have fertilization until being collected by nephridioduct. The zygote grew up to trochosphere after 3 h and to pelagosphere after 24 h. The trochosphere relied on yolk sac, while the pelagosphere relied on plankton and became naiaid with intake of microalgae and organic about 2 or 3 weeks.

Key words *Sipunculus nudus*, genital cell, breeding period, embryonic development

光裸方格星虫 (*Sipunculus nudus* L.) 俗称“沙虫”, 为全球分布种, 我国沿海均有分布, 尤以广西沿海资源最为丰富。国外学者对星虫类繁殖生物学研究, 特别是性腺发育和胚胎及早期个体发育的形态学、组织学及生物学研究做了不少工作^[1~5], 相比之下, 国内这方面的工作较少。至于光裸方格星虫, 国外对其繁殖生物学研究也不多, 仅报道了那不勒期种群可于7月产卵^[1], 坦帕湾种群可于6月产卵^[1], 国内郭学武报道了其生殖细胞的发育和生殖周期^[6]。迄今

为止未见有关该种胚胎和早期个体发育的报道

本文进行光裸方格星虫繁殖生物学研究, 以了解其生殖习性, 为恢复资源提供保证, 也为开展其人工繁殖提供参考。

1 材料与方 法

材料来自广西北海市白虎头和高德海区潮间带。

从1990年3月~1991年2月, 每月采样1~2次, 每次取30条个体, 用注射器取体腔液, 在显微镜下观察雌雄生殖细胞的发育和形态特征。卵细胞经 Bouin 氏液固定, 石蜡包埋, 切片, H-E 染色后进行细胞学

观测 取雌性个体体腔卵细胞在显微镜下计数, 算出各项卵细胞相对含量

1990年 6月~ 7月, 取个体体重 ≥ 13 g的光裸方格星虫, 解剖取尿管中的精卵进行人工授精, 观察胚胎的发育进程。

取部分担轮幼虫于 10 L玻璃罐中培养, 培养期间水温 27.5 $^{\circ}$ C~ 29 $^{\circ}$ C, 海水比重 1.017~ 1.019, 投喂金藻、扁藻等饵料, 充气, 以观察其早期个体发育状况。

2 结果

2.1 雄性生殖细胞的形态和发育

光裸方格星虫雄性生殖细胞是以精细胞团的形式存在于体腔中, 全年都有精细胞团存在, 在非繁殖季节, 精细胞团较小, 只有 60 μ m~ 100 μ m, 精细胞结合紧密 在繁殖季节, 精细胞团较大, 有 150 μ m~ 200 μ m, 精细胞结合松散 精细胞从精细胞团上脱落后游离于体腔中分化为成熟的精子, 精子头部 3 μ m~ 5 μ m, 尾长约 30 μ m。体腔中的精子不能游动, 不具受精能力。

2.2 雌性生殖细胞的发育和分期

雌性个体体腔中, 全年均有卵细胞存在, 但在不同季节, 体腔中各期卵细胞的相对数量不同 经过体腔液涂片及卵细胞切片观察, 卵细胞分为无卵黄期、卵黄形成期、胶膜形成期、生长期和成熟期 各期的划分及主要特征见表 1

2.3 卵细胞组成周年变化及繁殖期

周年调查结果分析表明, 光裸方格星虫体腔中全年都有卵细胞存在, 但在不同时期各期卵细胞的相对数量不同 (表 2)。结果表明, 光裸方格星虫 4月下旬开始进入繁殖期, 一直持续至 9月, 而 5月、6月、7月、

Table 1 Stages of oocytes of *S. nudus*

期 Stage	卵径 Oocytes diameter (μ m)	核径 Nucleus diameter (μ m)	核仁数 No. kernel	胶膜厚度 Glue membrane thickness (μ m)	特征 Character
无卵黄期 No yolk stage	20~ 30	12~ 16	1	—	卵细胞外附有滤泡细胞, 涂片及切片染色均未见卵黄物质, 细胞质薄而透明。The oocytes is surrounded by Follicle cells. Not found yolk material by means of smear, section and pigmentation. The cytoplasm is tenuity and transparency.
卵黄形成期 Yolk form stage	30~ 70	15~ 30	1	—	卵黄逐渐形成, 滤泡细胞逐渐消失。Yolk form and Follicle cells disappear gradually.
胶膜形成期 Glue membrane form stage	70~ 120	30~ 50	1	5~ 20	卵膜外逐渐被一层胶膜。Oocytes are surrounded by glue membrane gradually.
生长期 Growth stage	120~ 165	40~ 50	1	20~ 25	卵细胞生长迅速, 卵径明显增大。Oocytes grow rapidly. The diameter bulk obviously.
成熟期 Maturity stage	165~ 175	模糊 Blur	—	20~ 25	细胞核形状不规则, 模糊不清晰。nucleus becomes irregular, its membrane is not lucid.

8月为繁殖盛期。

表 2 体腔中卵细胞组成周年变化

Table 2 Annual changes of coelomic oocytes of *S. nudus*

月份 Month	无卵黄期 No yolk stage (%)	卵黄形成期 Yolk form stage (%)	胶膜形成期 Glue membrane form stage (%)	生长期 Growth stage (%)	成熟期 Maturity stage (%)
3	1.2	26.4	55.0	16.8	0.6
4	0	10.3	50.2	37.4	2.1
5	0	7.3	18.4	27.2	47.1
6	0	7.4	12.0	35.4	45.2
7	9.1	15.8	13.6	25.7	35.8
8	17.6	24.2	15.5	16.4	26.3
9	22.3	28.6	22.1	9.2	16.8
10	66.3	31.0	0	0	2.7
11	51.1	48.9	0	0	0
12	35.3	64.7	0	0	0
1	10.3	80.7	9.0	0	0
2	9.9	66.0	24.1	0	0



图 1 受精卵

Fig. 1 Zygote

2.4 胚胎发育进程

采用人工授精方法研究星虫的胚胎发育进程。受精作用完成后, 胚胎经过 10 min~ 20 min 的潜伏期, 此时受精卵并不像许多海产无脊椎动物的受精卵一样有受精膜举起, 卵的外形无明显变化 尔后, 卵黄质收缩, 卵黄膜明显 (图 1), 经 30 min 左右完成第 1 次卵裂 (图 2), 受精后 40 min~ 45 min 发生第 2 次

卵裂, 仍为纵裂。此后 15 min~ 20 min 出现第 3 次卵裂, 为横裂, 胚胎出现细胞较小的动物极和细胞较大的植物极, 并出现螺旋卵裂现象 (图 3) 胚胎经 3 h 左右即发育为担轮幼虫 (trochosphere), 担轮幼虫呈球形, 直径 $180\mu\text{m} \sim 200\mu\text{m}$, 体表周生纤毛, 并具有顶纤毛束, 眼点对 (图 4), 能作顺时针方向螺旋转动, 游动非常活泼, 具趋光性。在 $29.5^{\circ}\text{C} \sim 30.5^{\circ}\text{C}$ 条件下, 大约经 24 h 发育成为海球幼虫 (Pelagosphere) (图 5)。担轮幼虫为卵黄营养型。星虫胚胎发育进程见表 3

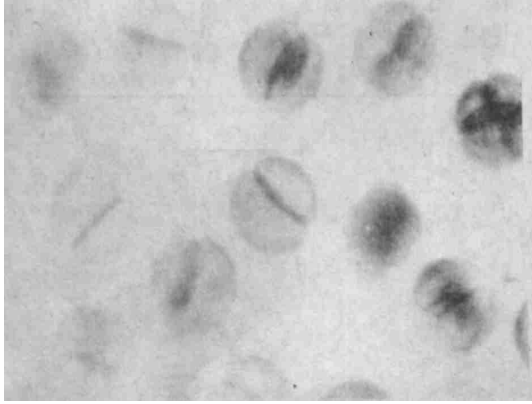


图 2 二细胞及四细胞
Fig. 2 Two cells and four cells

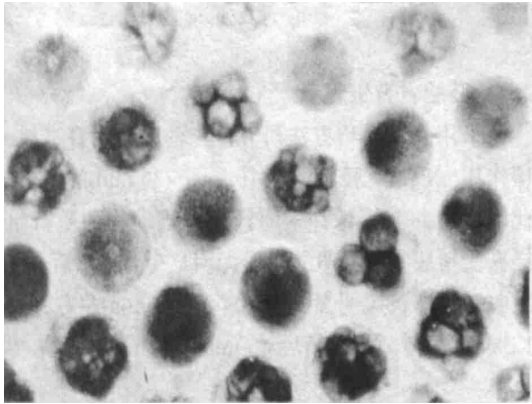


图 3 八细胞
Fig. 3 Eight cells

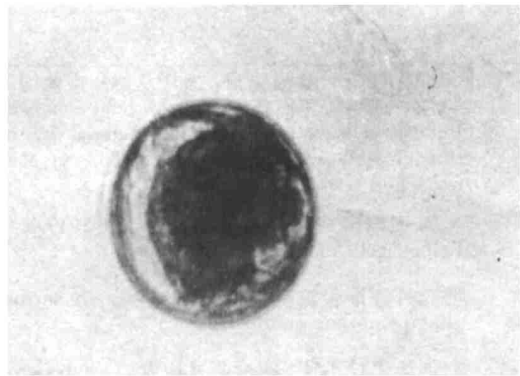


图 4 担轮幼虫
Fig. 4 Trochosphere



图 5 海球幼虫

Fig. 5 Pelagosphere

表 3 光裸方格星虫胚胎发育进程

Table 3 The embryonic development of *S. nudus*

受精后时间 Time after fertilization		发育阶段 Development stage
时 Hours(h)	分 Minutes(min)	
0	00	受精 Fertilization
0	30	二细胞 Two cells
0	46	四细胞 Four cells
0	58	八细胞 Eight cells
2	30	原肠胚 Archenteron
3	20	担轮幼虫 Trochosphere
24	00	海球幼虫 Pelagosphere

2.5 海球幼虫的发育及其生活习性

光裸方格星虫受精卵在水温 $29.5^{\circ}\text{C} \sim 30.5^{\circ}\text{C}$ 下, 约经 24 h 发育变态为海球幼虫。海球幼虫身体由头部、口后纤毛轮和躯干部组成。头部背面有两个红色的眼点, 腹面为腹沟和口。头部与躯干部之间为口后纤毛轮。躯干部透明, 可清晰观察到体腔内肾管和消化道等器官。肛门在躯干部背面中线偏后的位置。

游泳时, 海球幼虫身体伸长, 呈流线型 (图 6), 停止游泳或受到刺激时, 头部和纤毛轮可完全收缩于体腔内, 形似樽状 (图 7) 其身体再伸展时, 担轮纤毛先翻出, 不停摆动, 然后伸出头部, 躯干部伸长。

海球幼虫主要摄食浮游单胞藻和悬浮于水中的有机碎屑。其消化道较发达, 包括腹沟、口、胃、肠、肛门等器官。初期海球幼虫胃很大, 占据体腔的大部分空间, 肠细短, 弯曲简单, 不螺旋, 肛门位于躯干部的后端。随着幼虫的生长, 胃逐渐变小, 肠弯曲复杂, 后期海球幼虫肠螺旋 2~ 3 个, 肛门逐渐前移至躯干部前端。排泄系统具有对肾管。运动系统除口后纤毛轮外, 体肌也较发达, 纵肌能使头部和躯干部收缩或舒张, 后期海球幼虫还出现不太明显的环肌。海球幼虫初期依靠纤毛轮的摆动浮游生活, 后期纤毛轮逐渐退化而呈匍匐运动, 并且出现钻沙习性, 经 5 d~ 7 d 匍匐运动后, 逐渐变态成稚星虫。稚星虫的身体构造和生活习性与成体基本相同 (图 8)。海球幼虫的发育及其生活习性见表 4

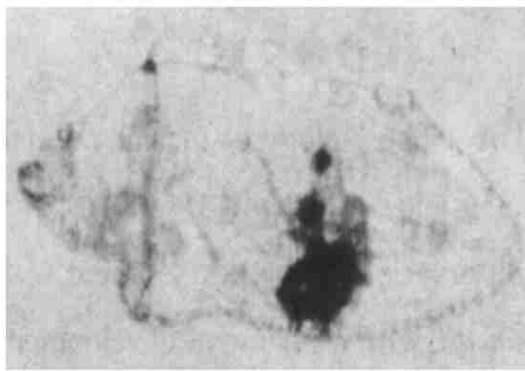


图6 游泳状态的海球幼虫
Fig. 6 Swimming pelagosphere

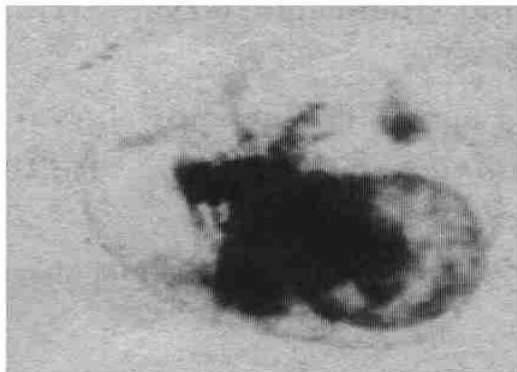


图7 收缩状态的海球幼虫
Fig. 7 Contracting pelagosphere

量 10个刚产出而未受精的卵子,获得星虫成熟卵细胞平均直径为 $120\mu\text{m}$ 郭学武^[6]研究厦门地区星虫的成熟卵,得出卵到了 $155\mu\text{m}$ 即为成熟 这些数值与我们实验观察结果 $170\mu\text{m}$ 左右显然有区别 事实上,星虫是一种变异性较大的种类,地理环境不同,成体大小也有明显差别^[7] 因此,成熟卵存在地理上的大小差异是有可能的。

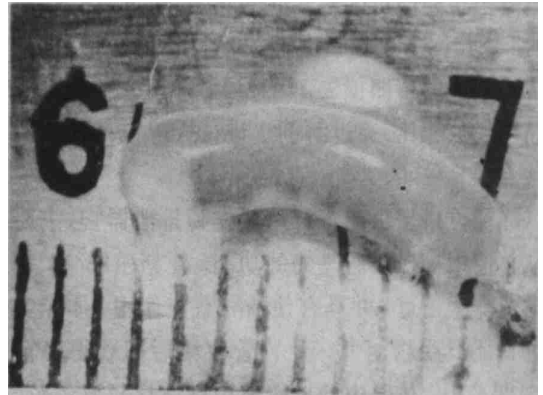


图8 稚星虫
Fig. 8 Naïad

光裸方格星虫的滤泡膜在无卵黄期和卵黄形成期很明显。到了胶膜形成期,滤泡膜即消失,而代之以一层胶膜包围在卵的周围,我们把这种变化作为一个分期的主要特征。有些星虫种类如 *Theniste pyroides* 的滤泡膜变化与光裸方格星虫的相似^[4]。我们认为滤泡膜主要作为一层营养膜而胶质膜则作为一层保护膜

3 讨论

卵径大小是卵细胞成熟度的形态指标。Rice^[2]测

表4 海球幼虫的发育及其生活习性

Table 4 The development of pelagosphere of *S. nudus*

出膜后天数 Days after incubation	体长 Length (μm)	体宽 Width (μm)	担轮 Trahophora	收缩肌 Contract muscle	体肌 Body muscle	肾 Mates	消化器官 Digestive organ	肛位 Anus site	习性 Habit
1	250	150	有, 活跃 Yes, active	1- 2 条 1- 2 ingot	不明显 Not obvious	不明显 Not obvious	胃大, 肠直 Maw big bowel straight	无 No	浮游 Plankton
3	320	170	有, 活跃 Yes, active	2- 3 条 2- 3 ingot	不明显 Not obvious	对 a pairs	胃大, 肠直 Maw big bowel straight	位于体后 in the hind of body	浮游 Plankton
5	450	240	有, 活跃 Yes, active	2- 3 条 2- 3 ingot	不明显 Not obvious	对 a pairs	胃大, 肠直 Maw big bowel straight	位于体后 in the hind of body	浮游 Plankton
9	640	250	有, 活跃 Yes, active	3- 5 条 3- 5 ingot	不明显 Not obvious	对 a pairs	胃大, 肠直 Maw big bowel straight	位于体中 in the middle of body	浮游 Plankton
11	710	310	有, 活跃 Yes, active	3- 5 条 3- 5 ingot	不明显 Not obvious	对 a pairs	胃大, 肠直 Maw big bowel straight	位于体中 in the middle of body	浮游 Plankton
13	820	340	有, 活跃 Yes, active	3- 5 条 3- 5 ingot	不明显 Not obvious	对 a pairs	胃大, 肠直 Maw big bowel straight	位于体中 in the middle of body	浮游 Plankton
15	900	380	有, 不活跃 Yes, not active	4- 6 条 4- 6 ingot	环肌, 模糊 Loop muscle but blur	对 a pairs	胃小, 肠螺旋 Maw small bowel sorew	位于体前 in the front of body	底栖 Benthon

在海产无脊椎动物工作中,通常采用解剖法获得精卵,进行人工授精。在沙蚕的人工育苗中,挑破异沙蚕的体腔壁可获得大量成熟精卵能够成功地进行人工授精。但是,采用解剖法取星虫体腔中的精卵进行人工授精却未能成功,体腔中的精卵不具有受精能力,而解剖取经阴干刺激的亲虫肾管中收集的精卵进行人工授精,受精可以很好地完成。然而,由于星虫肾管收集精卵的情况需长时间观察,解剖取已收集的肾管,操作起来也相当困难,并且解剖操作亦常常会造成不必要的精卵损失。因此,与采用人工阴干法诱导精卵排放相比,通过解剖法进行人工授精没有明显的优点。

光裸方格星虫的肾管一般作为排泄器官,主要担负从体腔中排出代谢废物的功能。在繁殖季节,肾管同时兼作生殖道,并具有使精卵获能作用。体腔内的精卵尚不具受精能力,经肾管收集后即获得受精能力。事实上,体腔中的成熟卵包被一层很厚的胶膜,而肾管中的卵却没有这层胶膜。我们认为,肾管的去胶膜作用与卵子的获能相关联,虽然这种机制尚不明了。另一方面,星虫精卵分别在两性亲体中获能的现象,与哺乳类精子在雌性生殖道获能过程有着明显不

同的生物学意义,显然这种机制对光裸方格星虫雌雄亲体完成体外受精过程是必要的。

参考文献

- 1 Coliu Nicol J A. The biology of marine animals. Londor: Sir Isaac Pitman and Soms Ltd. 1960.
- 2 Rice M E. Observation of the development of six species of *Caribbean sipuncula* with a review of development in the phylum. In: Proc Interu Synip Biol *Sipuncula* and *Echiura*. I. Beograd: Nancno Delo Press, 1975. 141~ 160.
- 3 Rice M E. Reproduction of marine invertebrates. In: Giese A C, Pearse J S. et al. *Sipuncula*. New York: Academic Press, 1975. 2: 67~ 127.
- 4 Rice M E, Murdoch J P. Influence of adults on metamorphosis of oceanic sipunculan larvae. *Amer Zool*, 1978, 18 (3): 644.
- 5 Rice M E. Factors influencing larval metamorphosis in *Golfingia misakiana* (*Sipuncula*). *Bull Mar Sic*, 1986, 39 (2): 362~ 375.
- 6 郭学武, 李复雪. 光裸星虫生殖周期的研究. *热带海洋*, 1993, 12 (2): 69~ 75.
- 7 李凤鲁. 中国沿海方格星虫属(星虫动物门)的研究. *青岛海洋大学学报*, 1990, 20 (1): 93~ 99.

(责任编辑: 蒋汉明 邓大玉)

中国生物芯片的初级形式 cDNA开发成功

据《科技日报》1999年8月6日报道:中国科学院上海细胞生物学研究所胡赓熙博士和他所在的实验室,自1998年底开始研究cDNA阵列的制备和应用技术,并与国内外同行包括陈竺教授领导的国家人类基因组南方中心通力合作,迄今为止,已率先建立了含有8000多个不同人类基因的cDNA阵列,并已经在肝癌研究中发挥了重要作用。

所谓“生物芯片”,可以与计算机芯片的比较来理解,它的本质是进行生物信号的平行分析,利用微点阵技术将成千上万的生物信息密码集中到一小片固相基质上,从而使一些传统的生物学分析手段能够在尽量小的空间范围内,以尽量快的速度完成。正如计算机芯片改变了人们的生活方式一样,生物芯片概念是随着人类基因组的发展而建立起来的,所以目前生物信号平行分析最成功的形式,是以一种尼龙膜为基质的“cDNA阵列”,用于检测生物样品中基因表达谱的改变。

据悉,中国科研人员经过努力攻关,在1999年1月就证明了一组100多个基因表达的变化与人类肝癌发展相关;7月,他们又发现了300多个类似的人类基因。他们的研究计划是在半年内获得25000个基因数,这将是整个人类基因数量的四分之一。

为了使cDNA阵列能够广泛地应用于中国各个相关的科研领域,胡赓熙博士在上海细胞生物学研究所的支持下,将向中国国内各研究所、大学、医院的研究部门提供cDNA阵列的服务,并进行技术培训。胡赓熙博士认为,发展生物芯片的目标不仅是为国家的科学研究提供技术平台,还要把它变成一个能够大量产生经济效益和社会效益的生物高技术产业。鉴于最直接的、能够产生大量经济效益的是医学诊断芯片,他的实验室正在积极筹集资金,希望开发一种能够进行肿瘤早期诊断的生物芯片,让病人能够以一种心理上能适应的方式进行早期肿瘤诊断。而目前最重要的一个目标,是开发出一种廉价的诊断用的生物芯片,能够在数十分钟内完成多种人类肿瘤的普查,从而突破肿瘤诊断中人们的心理障碍,使大规模的肿瘤普查成为现实。