

人工授精平角涡虫早期胚胎和幼虫的扫描电镜观察

汤启友 王艳杰 王晓安*

鲁东大学生命科学学院 烟台 264025

摘要: 为探明平角涡虫 (*Planocera reticulata*) 胚胎发育规律, 采用人工授精方法, 获得不同发育阶段的无卵外胶膜胚胎, 并运用扫描电镜技术, 观察了受精卵早期胚胎发育和幼虫发育。结果表明, 从第3次卵裂开始表现出螺旋式卵裂的特征。在囊胚时期和原肠时期在动物极顶端有几个卵裂球向内下陷形成一凹陷。浮游幼虫期的幼虫利用体表纤毛营自由游泳生活, 虫体沿腹中线分布1列向外凸出的长细胞。底栖爬行时期虫体体表纤毛逐渐减少, 腹侧形成明显的口和咽。本文讨论了平角涡虫与本目其他涡虫卵裂方式、幼虫发育的异同, 以及出现的动物极凹陷的意义。

关键词: 多肠目; 平角涡虫; 胚胎发育; 人工授精; 扫描电镜

中图分类号: Q954.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2011)04-66-06

Early Embryo and Larva of *Planocera reticulata*: *in Vitro* Fertilization and SEM Observation

TANG Qi-You WANG Yan-Jie WANG Xiao-An*

School of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China

Abstract: In order to study the early development of *Planocera reticulata*, embryos without egg-shell and larva were obtained using *in vitro* fertilization, and examined by scanning electron microscopy (SEM). Typical spiral cleavage was observed since the third cleavage. Several micromeres at proximal end of animal pole tended to form an invagination during blastula and gastrula stages. Planktonic larva swam freely with the cilia, which were emanated from the epidermal plates. At the ventral surface of larva, a rank of long cells was situated on the ventral part of embryo along median line. Demersal larva sank to the bottom and opened the external mouth, while at that time the number of cilia decreased obviously. Our results allow a comparison between *P. reticulata* and other polyclad flatworms in cleavage pattern and larval development. The unexpected finding of a special apical invagination of the blastula and gastrula stage embryos in polyclad *P. reticulata* was discussed.

Key words: Polyclad; *Planocera reticulata*; Embryonic development; *In vitro* fertilization; Scanning electron microscope

涡虫是扁形动物门中一类自由生活的类群, 全世界已知种类超过4 000种^[1]。部分涡虫的螺旋式卵裂 (spiral cleavage) 与系统发育中后来出现的环节动物、软体动物等的卵裂方式关系密切, 因此涡虫是动物系统进化主干上早期的一个分支, 在动物进化和系统发育中具有

重要意义^[2-4]。

由于三肠亚目 (Tricladida)^[5] 涡虫有单独卵

* 通讯作者, E-mail: wangxiaolan@163.com;

第一作者介绍 汤启友, 男, 硕士研究生; 研究方向: 动物学; E-mail: tangqiyu123@126.com。

收稿日期: 2010-11-04, 修回日期: 2011-05-19

黄腺,受精卵与卵黄细胞共同在卵囊(egg capsules)中完成早期发育,观察较为困难^[6-7]。涡虫早期发育观察多以无卵黄腺的大口涡虫目(Macrostomida)^[8]和多肠目(Polycladida)^[4,9-11]涡虫为主,但自然产卵时会形成卵外胶膜(egg-shell),影响了胚胎表面结构的观察,有关涡虫胚胎发育扫描电镜观察的报道还很少^[9]。本文以多肠目平角涡虫(*Planocera reticulata*)为实验材料。采用人工授精方法获得无卵外胶膜的胚胎,结合自然产卵孵化后各时期幼虫,对平角涡虫早期胚胎发育和幼虫发育做了扫描电镜观察。同时与其他多肠目涡虫相关发育进行比较,并探讨了低等无脊椎动物胚胎动物极出现凹陷的意义。

1 材料与方法

平角涡虫成体采自烟台海滨(N 37° 32.192', E 121° 25.751')潮间带,用过滤的天然海水饲养。以熟鸡蛋黄每周饲喂2次,喂食1~2 h后更换新鲜海水。平角涡虫雌性同体异体受精,故待其生殖腺成熟,每次取2只性成熟个体进行实验。用2根解剖针从生殖孔附近刺入并向身体两侧撕开。成熟的卵子和精子从生殖腺中自然流出。用吸管将2个涡虫的精卵收集到盛有少量过滤海水的细胞培养板中混匀。1 h后进行3次洗卵,每次轻轻吸去表层海水然后加满,以清除多余的精子,保持海水的清洁。置14℃恒温培养箱培养,从而获得各时期无卵外胶膜的胚胎。实验中同时采集自然产卵发育的各期胚胎和幼虫作为发育时期的参照。

取各发育时期胚胎,经2.5%戊二醛固定,常规梯度酒精脱水、叔丁醇置换、真空干燥、离子溅射仪(JFC-1600)喷金,日立TM-1000扫描电镜观察,拍照记录结果。

平角涡虫胚胎各卵裂球的描述参考Surface于1907年的命名规则^[10]。A~D:4细胞期的4个卵裂球。1a~1d:8细胞期的4个小卵裂球,分别被命名为1a、1b、1c和1d,合称第1个四集体(quartet),靠近动物极。1A~1D:8细胞期的4个大卵裂球,靠近植物极。1a¹~1d¹和1a²~1d²:“1a”表示来自于第1个

四集体1a的卵裂球,上标1表示靠近动物极,上标2表示远离动物极。1a¹¹:表示1a¹继续分裂形成的子细胞。2a~2d和2A~2D:表示16细胞期来自1A~1D的8个卵裂球,其中2a~2d为第2个四集体。3a~3d和3A~3D:表示32细胞期来自2A~2D的8个卵裂球,其中3a~3d为第3个四集体。4a~4d和4A~4D:表示36细胞期来自3A~3D的8个卵裂球,其中4a~4d为第4个四集体,4A~4D为植物极4个小细胞。

2 结果

2.1 卵裂期 平角涡虫受精卵为圆球形,直径约98.0 μm,表面有直径约2.0~3.0 μm突起(图版 I:A)。平角涡虫卵裂为全裂。第1次卵裂为经线裂,2个卵裂球直径约91.5 μm(图版 I:B)。第2次卵裂亦为经线裂,与第1次卵裂面相垂直,4个卵裂球A~D直径约72.0 μm(图版 I:C)。第3次为纬线裂,卵裂面近动物极且顺时针旋转,形成的动物极4个小卵裂球1a~1d,排列为一个平面,为第1个四集体,卵裂球直径约30.5 μm。植物极4个大卵裂球1A~1D位于下方,排列为一个平面,卵裂球直径约60.5 μm。动物极卵裂球与植物极卵裂球构成的2个平面相平行(图版 I:D)。第4次卵裂方向沿逆时针旋转,其中卵裂球1A~1D分裂出8个卵裂球2a~2d和2A~2D,4个卵裂球2a~2d构成第2个四集体。胚胎呈现为三层,最下层为卵裂球2A~2D,直径约61.5 μm。中间层为卵裂球2a~2d,直径约37.0 μm。卵裂球1a~1d近似均等分裂为8个卵裂球1a¹~1d¹、1a²~1d²,直径约21.0 μm,排列为一个平面且位于最上层(图版 I:E)。第5次卵裂16细胞期到32细胞期沿顺时针方向旋转,卵裂球2A~2D产生大的卵裂球3A~3D和第3个四集体卵裂球3a~3d,卵裂球2a~2d产生2a¹~2d¹、2a²~2d²。32细胞期,卵裂球3A~3D为最大,直径约54.5 μm。卵裂球2a²~2d²其次,直径约24.5 μm。其他卵裂球最小,直径约13.5 μm(图版 I:F)。第6次卵裂,32细胞期

到 36 细胞期,仅卵裂球 3A ~ 3D 分裂,向近动物极方向分裂出第 4 个四集体较大卵裂球 4a ~ 4d,直径约 50.5 μm ,同时形成的 4 个较小卵裂球 4A ~ 4D 位于植物极端部(图版 I:G)。36 细胞期后,卵裂球 1a¹¹ ~ 1d¹¹沿逆时针方向各分裂 1 次,形成较大的卵裂球 1a¹¹² ~ 1d¹¹²和较小的 1a¹¹¹ ~ 1d¹¹¹,其中后者位于动物极的顶端,且有向下凹陷的趋势(图版 I:H)。

2.2 囊胚期和原肠胚形成期 随着胚胎细胞数量的增多、卵裂球体积逐渐变小且分裂的同步性已消失,发育进入囊胚期和原肠期。在卵裂球 1a¹¹¹ ~ 1d¹¹¹形成后,动物极表面向下的凹陷逐步增大加深,最大约 11.0 μm 。卵裂球 4a ~ 4d 以及 4A ~ 4D 不分裂,且 4a ~ 4d 间发生紧密化,使得胚胎逐步由顶窄底宽的帽状变为圆球状。其后,第 1、2、3 个四集体分裂形成的子细胞沿卵裂球 4a ~ 4d 之间的缝隙向下迁移,进入原肠胚形成时期。至此时期,胚胎各卵裂球表面依然清晰可见向外的突起(图版 I:I)。

2.3 幼虫发育 平角涡虫幼虫发育经历浮游幼虫期和底栖爬行时期。刚孵化时,幼虫前端钝圆、后端稍尖,长约 150 μm ,宽 100 ~ 115 μm ,呈梨形,体表密布纤毛。从距头端 1/5 处的腹中线开始至尾端有 1 列直径约 4 ~ 5 μm 向外突出的长细胞。孵化 72 h 幼虫依然处于浮游幼虫期,但腹侧的长细胞逐步消失(图版 I:J,K)。孵化约一周后幼虫开始沉入水底营爬行生活。体表纤毛大量减少,裸露出 100 ~ 120 个直径约 10 μm 的圆形纤毛板(epidermal plate)痕迹,虫体腹侧形成咽并可由口伸出。此时幼虫已接近成体形态(图版 I:L)。

3 讨论

3.1 平角涡虫与其他多肠目类群的早期胚胎发育比较 平角涡虫卵裂为典型的四集体模式的螺旋式卵裂。前两次卵裂为均等卵裂,4 细胞期到 8 细胞期为顺时针方向旋转,8 细胞期到 16 细胞期为逆时针方向旋转,16 细胞期到 32 细胞期又转变为顺时针方向旋转,32 细胞期到 36 细胞期形成第 4 个四集体。这一卵裂方式与胃涡

虫(*Hoploplana inquilina*)^[10]和 *Maritigrella crozieri*^[9]早期卵裂方式相同。但薄背涡虫(*Notoplana humilis*)则不同,在第 5 次卵裂时,第 1 个四集体的 8 个卵裂球不分裂,其他卵裂球正常分裂,产生 24 个卵裂球^[2]。由此反映出有些多肠目涡虫从第 5 次卵裂开始不同步分裂,而有的类群是从第 6 次卵裂开始不同步分裂。此外,平角涡虫胚胎在卵裂期之后第 4 个四集体 4 个大卵裂球会持续较长时间,与在薄背涡虫^[2]、*M. crozieri*^[9]和 *Imogine mcgrathi*^[12]的观察结果不同,后 3 种涡虫第 4 个四集体的 1 个卵裂球会两侧对称分裂 1 次,进而形成 5 个大卵裂球。可见多肠目不同种类涡虫的早期胚胎发育也存在着很大的差异。

多肠目涡虫中胚层形成是很多学者关注的问题^[10,13]。一般认为多肠目涡虫第 4 个四集体中卵裂球 4a ~ 4c 仅作为营养物质,而卵裂球 4d 参与构成主要的中胚层^[10]。胃涡虫卵裂球 4d 在体积上比同一四集体的另外 3 个大,平角涡虫卵裂球 4d 也略大,但不如胃涡虫明显。此外,平角涡虫第 2 个四集体的体积也相对较大,这可能与卵裂球 2b 的功能相关。前人应用显微注射标记物的方法已经证实,胃涡虫卵裂球 2b 将来形成幼虫中胚层环肌^[13]。

3.2 多肠目涡虫幼虫发育比较 多肠目幼虫有直接和间接 2 种主要发育模式^[9]。按发育过程又分为浮游幼虫和底栖爬行幼虫 2 个时期^[2,14]。间接发育类群浮游幼虫密布细长纤毛,在幼虫的头部顶端一般会出现长的顶纤毛束(apical tuft),Müller's 幼虫还出现 8 个纤毛瓣(ciliary band)^[13],而 Götter's 幼虫一般有 4 个纤毛瓣^[14]。间接发育类群由浮游幼虫到底栖爬行幼虫转变过程中,背涡虫属的 *N. australis* 的幼虫先失去顶纤毛束和大多数的游泳纤毛,之后纤毛瓣的数目减少并出现腹后侧的口^[14]。

直接发育类群的薄背涡虫^[2,15]和 *Melloplana ferruginea*^[16]浮游幼虫虽然也具有细长纤毛,但不具有顶纤毛束和纤毛瓣,而是利用细长纤毛营游泳生活。其中,在薄背涡虫^[2]已

经证实,其幼虫发育过程也先后经历 2 个时期:浮游幼虫时期和底栖爬行幼虫时期。这类幼虫由于缺乏纤毛瓣和顶纤毛丛等易于观察的结构,运用普通光镜很难观察其纤毛的形态变化,目前有关发育过程中纤毛的脱落方式所知甚少。本研究运用扫描电镜技术对平角涡虫各期幼虫进行观察,结果发现在由浮游幼虫向底栖爬行幼虫转变的过程中,出现明显的纤毛减少现象。而且,其纤毛脱落后裸露出比较规则的纤毛板痕迹。这说明多肠目涡虫的幼虫发育有一定的相似性,无论是直接发育还是间接发育的种类,浮游幼虫在游泳纤毛脱落之后都将进入底栖爬行生活,已与成体的生活模式接近。

平角涡虫刚孵化幼虫的腹中线上形成一列明显的长细胞,约 72 ~ 120 h 后退化。仅 Lang 在斑盘属的 *Discocelis tigrina* 观察到类似的结果^[11],其功能还不清楚。根据这些细胞顶端膨大、缺少纤毛等形态特征,推测可能是与幼虫孵化时胶膜溶解有关的一类腺细胞。现已有多肠目和扁形动物卵外胶膜形成过程及化学成分的报道^[17-18],但幼虫孵化机制尚不明朗,对此涡虫腹中线长细胞深入研究,可能对了解多肠目和扁形动物孵化机制有一定的意义。

3.3 低等无脊椎动物胚胎动物极凹陷比较

多肠目胃涡虫^[10]和 *M. crozieri*^[9]在产生大量的动物极卵裂球之后,这些卵裂球向植物极端部迁移形成原肠胚。平角涡虫动物极卵裂球在形成后并不立即迁移,而是由位于动物极顶端的卵裂球向下凹陷。虽然 Lang 曾报道在斑盘属涡虫胚胎发育过程中也发现这一凹陷^[11],但多数有关多肠目涡虫胚胎发育的文献中均未提及这一结构。在栉水母门(Ctenophora)的 *Mnemiopsis leidyi*^[19]和纽形动物门(Nemertinea)的一些类群,如 *Pantionemertes californiensis*^[20]、细首纽虫属的 *Cephalothrix rufifrons*^[21]、厚肌纽虫属的 *Carinoma tremaphoros*^[22],也发现有类似的凹陷。其中栉水母形成的凹陷较大,出现在卵裂期的动物极^[19];而纽形动物则形成多个凹陷,出现在囊胚期和原肠胚时期,很多学者认为其中的一对可以形成纽虫神经系统原基

(nervous system rudiments)^[20-21]。平角涡虫形成的这一凹陷要比栉水母类似的凹陷小许多。随着其后原肠期动物极卵裂球的进一步分裂,位于这一凹陷处的卵裂球 1a¹¹¹ ~ 1d¹¹¹ 分裂的子细胞继续向胚胎内部下陷,它们是否参与其神经系统的形成还有待深入研究。

通过本研究,建立了适合于多肠目涡虫的人工授精方法,避免了自然产卵时形成的卵外胶膜,证实了无卵外胶膜胚胎能够在体外实验条件下完成正常发育过程。该方法能够更加精细地观察多肠目涡虫早期发育过程的形态变化,也为活体染色和细胞内标记技术的运用提供了一种更加有效的手段,对于深入开展多肠目涡虫发育的研究具有重要参考价值。

参 考 文 献

- [1] Tyler S, Schilling S, Hooge M, et al. Turbellarian taxonomic database. Version 1.5. [EB/OL]. [2011-03-02]. <http://turbellaria.umaine.edu>. 2006-2010.
- [2] 王晓安,于梅. 多肠目薄背涡虫的胚胎发育. 动物学杂志, 2008, 43(2): 96-100.
- [3] 陈广文,陈晓虹,刘德增. 中国涡虫纲分类学研究进展. 水生生物学报, 2001, 25(4): 406-412.
- [4] 王晓安. 平角涡虫早期胚胎发育的观察. 生物学通报, 1998, 33(2): 39-40.
- [5] 张合彩,陈广文,孙健,等. 三肠亚目(扁形动物门:涡虫纲:序列目)涡虫系统发育研究进展. 河南师范大学学报:自然科学版, 2009, 37(2): 172-176.
- [6] Cardona A, Hartenstein V, Romero R. The embryonic development of the triclad *Schmidtea polychroa*. Development Genes and Evolution, 2005, 215(3): 109-131.
- [7] Benazzi M, Gremigni V. Developmental biology of triclad turbellarians (Planaria) // Harrison F W, Cowden R R. Developmental Biology of Fresh Water Invertebrates. New York: Liss, 1982: 151-211.
- [8] Morris J, Nallur R, Ladurner P, et al. The embryonic development of the flatworm *Macrostomum* sp. Development Genes and Evolution, 2004, 214(5): 220-239.
- [9] Rawlinson K A. Embryonic and post-embryonic development of the polyclad flatworm *Maritigrella crozieri*; implications for the evolution of spiralian life history traits. Frontiers in Zoology, 2010, 7(1): 12.
- [10] Surface F M. The early development of a polyclad,

- Planocera inquilina* Wh. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 1907, 59(3): 514 – 559.
- [11] Lang A. Die polycladen (Seeplanarien) des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeresabschnitte. Eine Monographie. Flora und Fauna des Golfes von Neapel. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann, 1884, 11: 1 – 688.
- [12] Younossi-Hartenstein A, Hartenstein V. The embryonic development of the polyclad flatworm *Imogine mcgrathi*. Development Genes and Evolution, 2000, 210(8/9): 383 – 398.
- [13] Boyer B C, Henry J J, Martindale M Q. The cell lineage of a polyclad turbellarian embryo reveals close similarity to coelomate spiralians. Developmental Biology, 1998, 204(1): 111 – 123.
- [14] Anderson D T. The embryonic and larval development of the turbellarian *Notoplana australis* (Schmarda, 1859) (Polycladida: Leptoplanidae). Australian Journal of Marine and Freshwater Research, 1977, 28(3): 303 – 310.
- [15] Kato K. On the development of some Japanese polyclads. Japanese Journal of Zoology, 1940, 8(4): 537 – 573.
- [16] Bolaños D M, Litvaitis M K. Embryonic muscle development in direct and indirect developing marine flatworms (Platyhelminthes, Polycladida). Evolution and Development, 2009, 11(3): 290 – 301.
- [17] Shinn G L. Formation of egg capsules by flatworms (phylum Platyhelminthes). Transactions of the American Microscopical Society, 1993, 112(1): 18 – 34.
- [18] Ishida S, Teshirogi W. Eggshell formation in polyclads (Turbellaria). Hydrobiologia, 1986, 132(1): 127 – 135.
- [19] Henry J Q, Martindale M Q. Multiple inductive signals are involved in the development of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. Developmental Biology, 2001, 238(1): 40 – 46.
- [20] Smith J E. The early development of the nemertean *Cephalothrix rufifrons*. Quarterly Journal of Microscopical Science, 1935, 77: 335 – 381.
- [21] Hiebert L S, Gavelis G S, von Dassow G, et al. Five invaginations and shedding of the larval epidermis during development of the hoplonemertean *Pantionemertes californiensis* (Nemertea: Hoplonemertea). Journal of Natural History, 2010, 44(37): 2331 – 2347.
- [22] Maslakova S A, Martindale M Q, Norenburg J L. Vestigial prototroch in a basal nemertean, *Carinoma tremaphoros* (Nemertea: Palaeonemertea). Evolution and Development, 2004, 6(4): 219 – 226.

图 版 说 明

A. 受精卵; B. 2 细胞期; C. 4 细胞期; D. 8 细胞期动物极顶面观, 示第 1 个四集体(▲); E. 16 细胞期动物极顶面观, 示第 2 个四集体(▲); F. 32 细胞期动物极顶面观, 示第 3 个四集体(▲); G. 36 细胞期植物极顶面观, 胚胎形成第 4 个四集体卵裂球 4a~4d 和卵裂球 4A~4D, 示植物极卵裂球 4A~4D(↑); H. 36 细胞期之后的顶面观, 示动物极顶端出现较小的卵裂球 1a¹¹¹~1d¹¹¹(↑); I. 原肠期侧面观, 胚胎趋于圆球形, 示动物极顶端的凹陷(↑)以及靠近植物极的第 4 个四集体卵裂球(▲); J. 孵化 24 h 浮游幼虫腹面观, 示腹中线长细胞(↑); K. 孵化 24 h 浮游幼虫背面观, 示密集的纤毛; L. 孵化一周底栖幼虫腹面观, 示密集分布的纤毛板痕迹(▲)以及后端的口和咽(↑)。图 A~I 放大 1 500 倍; 图 J~L 放大 1 200 倍。

Explanation of Plate

A. Zygote; B. 2-cell stage; C. 4-cell stage; D. 8-cell stage. Animal pole view showing the first quartet micromeres (arrowheads); E. 16-cell stage. Animal pole view showing the second quartet micromeres (arrowheads); F. 32-cell stage. Animal pole view showing the third quartet micromeres (arrowheads); G. 36-cell stage. Vegetal pole view showing large fourth quartet micromeres 4a – 4d and mini-macromeres 4A – 4D (arrow); H. Animal pole view after 36-cell stage, showing the micromeres 1a¹¹¹ – 1d¹¹¹ at animal pole (arrow); I. Lateral view of gastrulae, showing an invagination at proximal end of animal pole (arrow), large fourth quartet micromeres near the vegetable pole (arrowheads); embryos change from cap-shaped to globe-like; J. Ventral view of planktonic larva 24 h after hatching, noting the long cells along the ventral median line (arrow); K. Dorsal view of planktonic larva 24 h after hatching, noting the dense cilium (arrow); L. Ventral view of demersal larva for one week after hatching with visible trace of dense epidermal plates (arrowheads), mouth and pharynx at the posterior (arrow). Fig. A – I × 1 500; Fig. J – L × 1 200.

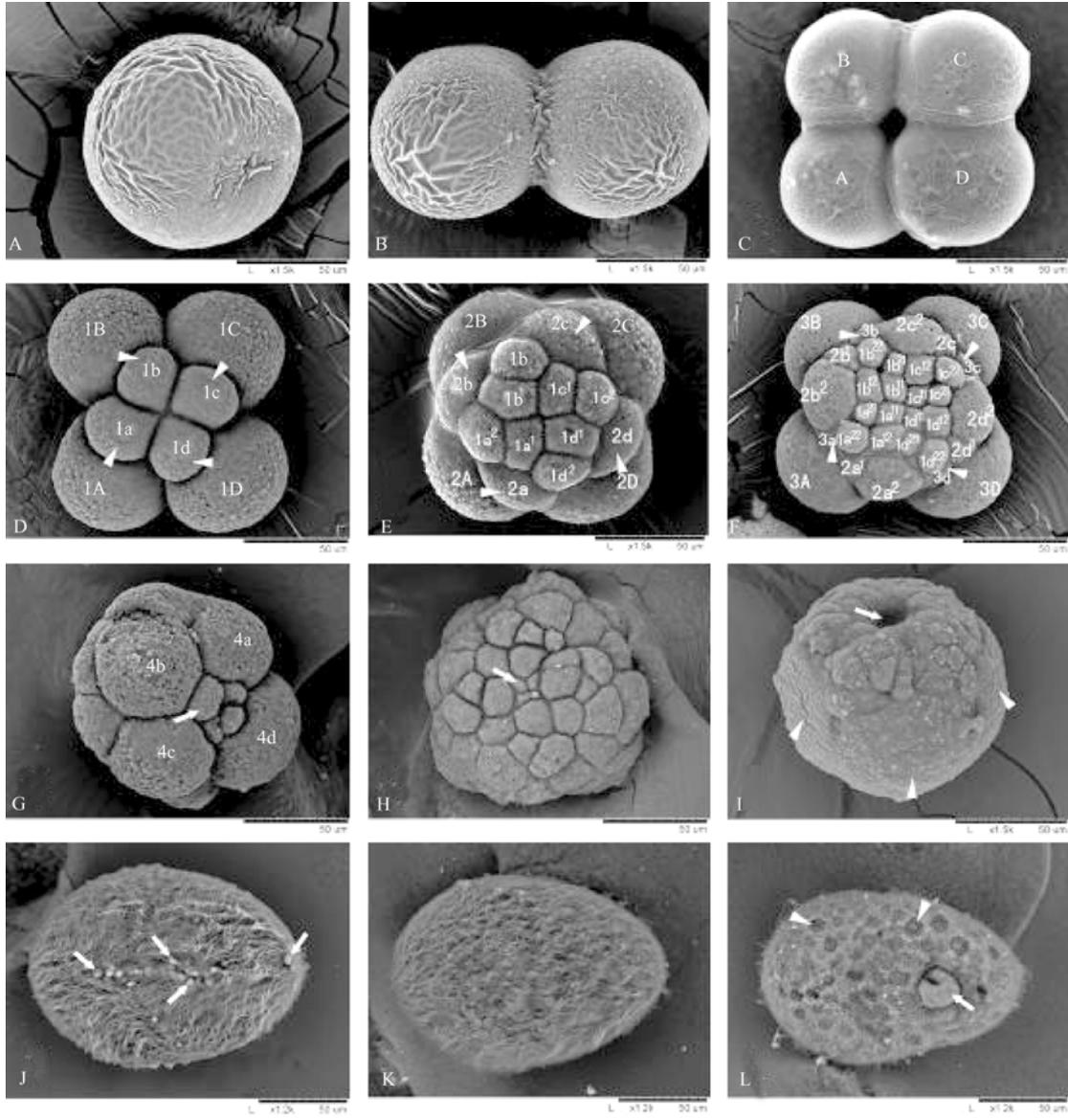
汤启友等:人工授精平角涡虫早期胚胎和幼虫的扫描电镜观察

图版 I

TANG Qi-You *et al.* : Early Embryo and Larva of *Planocera reticulata* :in Vitro

Fertilization and SEM Investigation

Plate I



图版说明见文后