

# 克氏原螯虾大颚器对卵巢发育的影响

赵维信 李 胜

(上海水产大学渔业学院, 200090)

**摘 要** 采用埋植和离体方法进行克氏原螯虾的大颚器(MO)对卵巢发育作用的研究。埋植大颚器 7 次能显著提高成熟系数和促进卵径增大。处于不同卵巢发育时期的克氏原螯虾大颚器提取物(MOE)的离体研究发现,卵黄发生期的 MOE 对初级和次级卵黄发生期卵径增大均有极显著的作用,而对卵黄发生前期的卵径增大无作用。处于卵巢发育早期的 MOE 对卵黄发生期卵巢小块总 RNA 含量升高无显著作用;处于卵黄发生前期、卵黄发生期和恢复期卵巢的 MOE 对卵黄发生期的卵巢小块总 RNA 含量升高均有极显著作用。MOE 的作用基本与保幼激素类似物—ZR515 相似。研究结果表明卵黄发生期卵巢对 MOE 较敏感;卵黄发生期的 MOE 的生物效应最强;MO 的功能性物质具有促进卵母细胞发育的作用。

**关键词** 克氏原螯虾, 大颚器, 埋植, 离体培育, 卵巢发育

Lauffer 等[1987]首先证明甲壳动物的大颚器(MO)合成甲基法尼酯(Methyl farnesoate, MF),一种昆虫保幼激素 II 的非环氧化形式(保幼激素 II 的前体)。MF 在十足目甲壳动物的卵黄发生过程中积极合成并大量出现在血淋巴中,而且发现 MF 在两性中均存在,因此认为 MF 具有促性腺激素的作用[Lauffer 等 1992]。本研究为了进一步了解大颚器在甲壳动物生殖中的作用,采用埋植和离体的方法,研究了克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)大颚器对卵巢发育的影响,试图为虾、蟹等甲壳动物繁殖的人工控制提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验动物

克氏原螯虾于 1996 和 1997 年 4~10 月购自本市图们路及定海路菜场。一类为体色暗红的隔年虾,另一类为当年的幼虾,体呈绿色。实验虾逐尾称体重和测量体长(眼柄基部至尾柄末端),活体解剖取出不同发育阶段的卵巢计算成熟系数,并确定卵巢的分期[李胜和赵维信 1999]。按赵维信和李胜[1998]方法解剖取出大颚器。

### 1.2 大颚器埋植实验

选用隔年雌螯虾 20 尾,体长 7.0~8.3cm,体重 22~41 克,分成 2 组,处理组和对照组各 20 尾,分别饲养在两个小水族箱内,每日投喂颗粒饲料、换水,饲养 35 天(4 月 18 日~5 月 23 日)。每隔 5 天在处理组雌螯虾腹部肌肉内植入一对大颚器。用于埋植的大颚器取自卵巢处于恢复期或卵黄发生前期的个体,每尾虾共埋植 7 次,对照组不作任何处理。

### 1.3 离体培育

取出螯虾的卵巢,放入每 100mL 螯虾生理溶液[李永才 1989]含 60mg 青霉素 G 的漂洗液中漂洗,然后把卵巢分成大致相等的 6 个小块,分别准确称重后,置于直径为 2cm 的培养皿中,每个培养皿中加入 1mL 199 培养基,再分别加入 2mL 激素或大颚器提取液,室温(25±0.5)℃下培育 24 小时。然后取出卵巢小块分别用 Kahle 氏液[赵维信等 1996]固定,苏木精-伊红染色,石蜡切片在光镜下测量卵径,选择 10 个切到卵核的卵进行最大卵径测量,如若一个视野中合适的卵少于 10 个,则取石蜡块上相距 1mm 以上的另一个视野中的卵继续测量。

### 1.4 大颚器的粗提取

按 Tsukimura 和 Kamemoto[1991]方法略加修改。取 5 对或 25 对雌螯虾的大颚器进行粗提取,25 对大颚器加入 5mL 丙酮进行匀浆,倾入 10mL 离心管中,再用少量丙酮多次冲洗匀浆器并倾入离心管中,2500 r/min 离心 15 分钟,取出上清液,然后用空气压缩机吹干丙酮提取液至黄色粘稠物质,再加入 10mL 螯虾生理溶液充分溶解。5 对大颚器用同样方法提取后,最后用 2mL 螯虾生理溶液溶解。

### 1.5 RNA 提取和紫外吸收测定

卵巢总 RNA 的提取方法,按戴维斯[1990]方法略加修改。卵巢小块经离体培育后,分别准确称重进行 RNA 提取,采用紫外分光光度计 751 型,在波长 260nm 处读光密度值(OD 值),即 RNA 浓度。

### 1.6 激素配制

17 $\alpha$ -孕酮(17 $\alpha$ -P)10mg,溶解在 10mL 无水乙醇中,再用螯虾生理溶液经倍比稀释成浓度为 15pmol/mL 的工作液。保幼激素类似物-ZR515(JHA-ZR515)40mg/2mL 用螯虾生理溶液先稀释成 1.5mg/mL,再经倍比稀释成浓度为 1.5 $\mu$ g/mL 的工作液。

### 1.7 数据处理

实验所得数据采用 t-检验、方差分析和均数间多重比较,以及协方差和线性回归进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 大颚器埋植对雌螯虾性腺发育的影响

大颚器埋植实验结束后解剖全部实验虾,取出卵巢称重,然后做组织切片观察,结果见表 1。处理组虾死亡 2 尾,对照组死亡 4 尾。处理组虾的成熟系数(GSI)和卵径都显著高于对照组(P<0.05);处理组虾的卵巢发育优于对照组,大部分个体的卵巢已进入卵黄发生期,而对照组的卵巢尚未发育至卵黄发生期。

表 1 大颚器埋植对克氏原螯虾卵巢发育的影响

Tab. 1 Effects of implantation of mandibular organs on ovarian development of *P. clarkii*

	GSI %	卵径(mm)	卵粒颜色	卵巢发育时期
处理组(n=8)	0.246±0.03	0.321±0.051	淡黄、黄、深黄、褐黄	卵黄发生前期(2尾)、卵黄发生期(6尾)
对照组(n=6)	0.202±0.04	0.266±0.064	乳白、淡黄、黄色	发育早期(3尾)、卵黄发生前期(3尾)

## 2.2 大颚器提取物、 $17\alpha$ -P、JHA-ZR515 和 $17\alpha$ -P+JHA-ZR515 对不同发育时期离体卵巢小块卵径的影响

实验采用卵黄发生前期卵巢(GSI 为 0.12%)、初级卵黄发生期卵巢(GSI 为 0.28%)和次级卵黄发生期卵巢(GSI 为 1.85%)各 1 组。每组卵巢再分成 5 个卵巢小块,每个卵巢小块为一份离体培育,加入 1mL 199 培养基,2mL MOE 或 2mL  $17\alpha$ -P,或 2mL JHA-ZR515 或  $17\alpha$ -P+JHA-ZR515 各 1mL;对照组未加任何激素或 MOE,仅为 3mL 培养基,组成 5 个培养系列。试验结果见表 2。对于卵黄发生前期的卵巢,MOE 和两种激素分别作用或联合作用对卵径增大均无作用( $P>0.05$ )。对于初级卵黄发生期卵巢,除  $17\alpha$ -P 的作用不显著( $P>0.05$ )外,其它 3 组与对照组比较均有极显著作用( $P<0.01$ )。对于次级卵黄发生期卵巢, $17\alpha$ -P 有显著性作用( $P<0.05$ ),其余 3 组均为极显著作用( $P<0.01$ )。

表 2 MOE 与两种激素对克氏原螯虾离体卵径的作用

Tab. 2 Effects of mandibular organ extracts and two hormones on oocyte diameters of crayfish *in vitro*

处理方法	卵黄发生前期卵径		初级卵黄发生期卵径		次级卵黄发生期卵径	
	(mm)	n=10	(mm)	n=10	(mm)	n=10
MOE	0.255±0.02		0.420±0.02 <sup>*2</sup>		1.210±0.11 <sup>*2</sup>	
$17\alpha$ -P	0.245±0.02		0.398±0.02		1.189±0.15 <sup>*1</sup>	
JHA-ZR515	0.235±0.02		0.415±0.02 <sup>*2</sup>		1.200±0.10 <sup>*2</sup>	
$17\alpha$ -P+JHA-ZR515	0.259±0.03		0.423±0.02 <sup>*2</sup>		1.275±0.12 <sup>*2</sup>	
对照组	0.242±0.04		0.385±0.01		1.063±0.10	

注: \*1 为与对照组比较差异显著; \*2 为与对照比较差异极显著。

## 2.3 不同卵巢发育时期的 MOE 对卵黄发生期离体卵巢小块总 RNA 含量的影响

分别用卵巢处于发育早期、卵黄发生前期、卵黄发生期、恢复期的雌性螯虾的 MO 各 5 对进行提取。离体培育的卵巢小块均处于初级卵黄发生期,使用 4 尾螯虾的卵巢,成熟系数分别为 0.25%、0.35%、0.34%、0.29%。同时用  $17\alpha$ -P 和 JHA-ZR515 作为参照,卵巢小块总 RNA 含量变化见图 1。与对照组比较,卵巢处于发育早期的 MOE 对卵巢小块总 RNA 含量没有显著性作用( $P>0.05$ ),其余 5 组均有极显著促进作用( $P<0.01$ ),其中以处于卵黄发生期的 MOE 促进作用最强。卵巢处于恢复期的 MOE 与卵黄发生前期的 MOE 之间无显著性差异;卵黄发生期的 MOE、JHA-ZR515 和  $17\alpha$ -P 与恢复期的 MOE 和卵黄发生前期的 MOE 之间有显著性差异( $P<0.05$ );卵黄发生期的 MOE 与 JHA-ZR515 和  $17\alpha$ -P 之间有极显著差异( $P<0.01$ ),前者诱导卵巢小块的总 RNA 含量是后者的 2 倍。

### 3 讨论

本工作作为国内首次进行十足目甲壳动物 MO 功能的研究,采用传统的内分泌腺移植方法,将 MO 整体埋植在同种另一个体的腹部,该试验结果表明 MO 埋植对促进接受体(受埋植个体)成熟系数升高和卵径增大有显著作用,加速了接受体的卵巢发育。在活体研究基础上,又采用离体研究方法,进一步证明大颚器提取物(MOE)对性腺有直接作用,MOE 对离体卵径增大和卵巢总 RNA 含量升高有明显作用。卵黄发生期卵巢(包括初级和次级卵黄发生期)对 MOE 十分敏感,而卵黄发生前期卵巢的反应不明显(表 2),表明不同发育时期的卵巢对 MOE 的反应有差异。另外,卵黄发生期的 MOE 较其它各卵巢发育时期的 MOE 对卵巢总 RNA 含量升高更显著(图 1),这表明卵黄发生期 MOE 的生物活性最高,这与克氏原螯虾的 MO 在卵黄发生期颜色较深,体积较大,MO 细胞直径增大,细胞轮廓明显(超微结构观察为 MO 细胞外缘的基膜增厚)和胞质中光面内质网、线粒体极为丰富等一系列形态学变化相一致[李胜和赵维信 1999、赵维信和李胜 1998]。由此提示,MO 的功能与卵黄发生有关,由于 RNA 与细胞内蛋白质合成密切相关,因此,MOE 促进卵巢总 RNA 增大,就无疑与卵巢滤泡细胞的卵黄蛋白原(vitellogenin)合成有关[Yano 和 Chinzei 1987],而且已知保幼激素能使七星瓢虫脂肪体 mRNA 含量显著提高,并转译成卵黄蛋白原[瞿启慧 1990]。在本实验中,MOE 功能的表现与参考激素 JHA-ZR515 的作用基本相似,表明 MO 功能性分泌物的性质可能是与 JHA-ZR515 相似的类萜激素,这与已发现的 MO 合成和释放保幼激素样化合物[Laufer 等 1987]或 MF 即一种保幼激素前身物[Sagi 等 1991]是相符合的。

本工作中,17 $\alpha$ -P 对卵黄发生前期和初级卵黄发生期卵径增大无作用(表 2),这与 Tsukimura 和 Kamemoto[1991]及赵维信等[1996]的结果不符,这可能是本实验使用的 17 $\alpha$ -P 剂量浓度偏低的缘故;另外,使用相同浓度的 17 $\alpha$ -P,对次级卵黄发生期卵径增大确有作用,这也反映出不同发育时期的卵母细胞对 17 $\alpha$ -P 的敏感性有差异,这表明 17 $\alpha$ -P 在卵母细胞发育中具有一定作用。虽然 Couch 等[1987]在美洲龙螯虾的 MO 中检测到孕酮,但该孕酮是否由 MO 自身合成,还是来自卵巢等组织器官,尚有待更多的工作予以阐明。

李胜现在中国科学院上海昆虫研究所攻读博士学位。

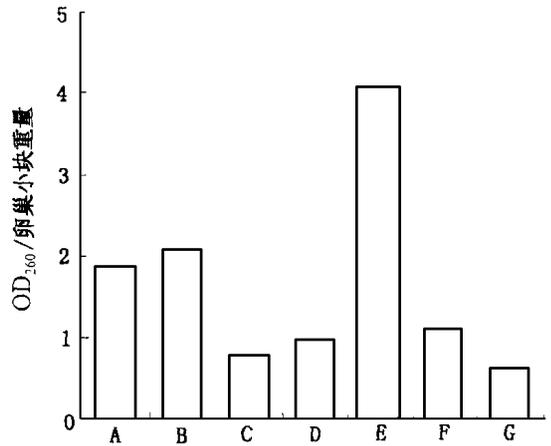


图 1 不同卵巢发育时期大颚器提取物(MOE)对克氏原螯虾离体卵巢小块总 RNA 含量的影响  
Fig. 1 Effects of mandibular organ extract (MOE) at different developing stages of ovary on total RNA of ovarian fragments of *P. clarkii* in vitro

- A. 17 $\alpha$ -P (1.8418 $\pm$ 0.0925); B. JHA-ZR515 (2.0209 $\pm$ 0.1630); C. 发育早期 MOE (0.7506 $\pm$ 0.0548); D. 卵黄发生前期 MOE (0.9394 $\pm$ 0.0528); E. 卵黄发生期 MOE (4.0356 $\pm$ 0.2847); F. 恢复期 MOE (1.0581 $\pm$ 0.1089); G. 对照组 (0.5670 $\pm$ 0.0055)

## 参 考 文 献

- 李永才(主编). 1989. 动物生理及比较生理实验. 北京: 高等教育出版社, 285~293
- 李 胜, 赵维信. 1999. 克氏原螯虾大颚器在卵巢发育周期中的形态结构变化. 上海水产大学学报, 8(1): 12~18
- 赵维信, 贾 江, 安 苗. 1996. 外源激素和眼柄提取物对罗氏沼虾卵母细胞的离体诱导作用. 上海水产大学学报, 5(4): 221~225
- 赵维信, 李 胜. 1998. 克氏原螯虾大颚器的超微结构研究. 水产学报, 22(4): 303~307
- 瞿启慧. 1990. 七星瓢虫卵黄蛋白原基因的表达: 保幼激素类似物对 mRNA 的诱导. 昆虫学报, 33(3): 257~264
- 戴维斯(编著). 1990. 分子生物学实验技术. 北京: 科学出版社. 82~84
- Couch E F, Hagino N, Lee J W. 1987. Changes in the estradiol and progesterone immunoreactivity in tissues of the lobster, *Homarus americanus*, with developing and immature ovaries. *Comp Biochem Physiol, A*, 87: 765~770
- Laufer H, Borst D, Baker F C, et al. 1987. Identification of juvenile hormone-like compound in a crustacean. *Science* 235: 202~205
- Laufer H, Sagi A, Ahl J S B, et al. 1992. Methyl farnesoate appears to be crustacean reproductive hormone. *Invertebra, Reprod Dev*, 22: 17~20
- Sagi A, Homola E, Laufer H. 1991. Methyl farnesoate in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Synthesis by the mandibular organ *in vitro*, and titers in the hemolymph. *Comp Biochem Physiol* 99B: 879~882
- Tsukimura B, Kamemoto F I. 1991. *In vitro* stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquacul*, 92: 59~66
- Yano I, Chirzei Y. 1987. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Comp Biochem Physiol* 86B: 213~218

## EFFECTS OF MANDIBULAR ORGAN ON OVARIAN DEVELOPMENT OF *PROCAMBARUS CLARKII*

ZHAO Wei-Xin, LI Sheng

(Fisheries College, Shanghai Fisheries University, 200090)

**ABSTRACT** The effects of mandibular organ (MO) in ovarian development were studied using implantation method. A pair of MO were implanted into the abdominal muscle of crayfish at an interval of 5 days. MO implantation for 7 times caused increase of gonadosomatic index (GSI) and promoted the enlargement of oocyte diameter. The effects of mandibular organ extracts (MOE) at different developmental stage of ovaries in crayfish were also studied *in vitro*. It was found that MOE at vitellogenesis stage had highly significant effect on enlarging oocyte diameter at primary and secondary vitellogenesis stages, but had no effect on enlarging oocyte diameter at pre-vitellogenesis stage. MOE at early ovarian developing stage had no effect on total RNA enhancement of ovarian fragment at vitellogenesis stage. MOE at pre-vitellogenesis, vitellogenesis and redeveloping stages had highly significant enhancement on total RNA of ovarian fragment at vitellogenesis stage. The effect of MOE is similar to juvenile hormone analogue—ZR515. The results indicate that the ovary during the vitellogenesis is more sensitive to MOE; the biological effect of MOE at vitellogenesis stage is biggest. The function material of MO has promotive effect on oocyte development.

**KEYWORDS** *Procambarus clarkii*, Mandibular organ, Implantation, Culture *in vitro*, Ovarian development