

中国对虾卵子激活过程的形态学研究

张 岩 王清印 李 健 孙修涛 张立敬
(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 报道了对中国对虾卵子激活反应的形态学研究。中国对虾卵子皮层中有由卵黄膜下陷形成的与卵表垂直的皮层囊, 内有棒状结构称棒状周边体, 其内物质为凝胶前体。对虾卵子的激活并不需要精子的发动, 而是在卵子与海水接触后即开始进行。在卵子激活过程中, 棒状周边体向外放出形成花冠状的凝胶层, 然后从基部开始逐渐消失并向远端扩展, 最后完全消失, 同时卵子进行成熟分裂放出第一、第二极体, 并举起受精膜, 完成激活反应。还对中国对虾卵子激活的作用进行了讨论。

关键词 中国对虾, 卵子, 激活, 形态学

卵子的激活反应(activating reaction)又称卵子的皮层反应(cortical reaction), 在从腔肠动物到哺乳动物的许多动物卵子中都有发生。一般情况下, 行体外受精的海产动物都是由雌、雄亲体将配子产入海水中, 精卵的相遇主要依赖于精卵产出时间的同步性。产出的精子一旦与卵子相遇即进行顶体反应(acrosome reaction), 从而为受精作好准备。随后精子进入卵子, 并使卵子激活而继续发育。卵子激活的生物学意义主要包括几个方面: (1) 激发处于停滞状态的减数分裂继续进行; (2) 在受精卵周围形成受精膜或孵化膜; (3) 激活胚胎发育所需的生物合成体系。

甲壳纲十足目特别是对虾类在繁殖生物学方面与其它海产无脊椎动物有着很大的差别。在对虾类的许多种类中, 卵子的激活并不需要精子的存在, 只要产出的卵子一与海水接触, 便开始激活反应。对对虾卵子激活反应的形态学描述已有一些报道, Hudinaga [1942] 简要描述了日本对虾(*Penaeus japonicus*) 和独角新对虾(*Metapenaeus monoceros*) 卵子的激活反应。Clark 等[1980] 对褐对虾(*P. aztecus*) 和白对虾(*P. setiferus*) 的卵子激活过程进行了详细的形态学描述。对中国对虾(*P. chinensis*) 的卵子激活过程的形态学研究目前尚未见报道, 本文报道了 1996 年春天对中国对虾的卵子激活过程进行观察和研究的结果。

1 材料和方法

1.1 试验材料

所用亲虾购自山东沿海的海捕亲虾, 用帆布桶运至本所麦岛实验基地后即放入水泥池内暂养。当自然水温升至 16℃ 时开始产卵。捞取有产卵迹象的亲虾于 500 L 黑塑料桶中进行观察, 开始产卵后移入 500 mL 大烧杯中让其继续产卵, 按所需间隔时间取样观察固定。

收稿日期: 1998-02-27

1.2 样品的固定

光镜样品固定液采用 Bouin 氏液, 固定 12 小时后移入 70% 酒精中保存。电镜样品用 2% 多聚甲醛—1% 戊二醛高透磷酸盐缓冲液($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.8 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 23.25 g, NaCl 5.0 g, 加蒸馏水溶解成 1000mL) 固定[朱丽霞等 1982]。

1.3 切片及染色

光镜固定样品用酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋、切片, 切片厚度为 $6 \mu\text{m}$ 。切片采用 H. E 染色法[Thomas 和 Donald 1988]。

2 结果

2.1 胶质层的形成和消散

刚产出的中国对虾卵子为不规则球形, 皮层内有深凹的小囊, 称为皮层囊, 内含凝胶前体。在光镜下直接观察时由于卵黄的遮盖作用, 皮层囊并不十分清楚。卵子排入海水中后, 无论有无精子附着, 卵子均开始激活。皮层囊由卵皮层内向外推出, 由凝胶前体构成的棒状的周边体(peripheral bodies) 也同时向外放出并略有膨胀, 同时卵子也由不规则的球形变为规则的球形。凝胶前体与海水作用形成胶质层, 约经 5 分钟皮层囊完全推出, 棒状的周边体全部放出, 胶质层达最大。随着时间的推移, 胶质层逐渐消失。图版 I 为卵子从刚开始激活到胶质层形成、消失并放出第一、第二极体的整个过程的光镜照片。

为了更好地描述中国对虾卵子的激活过程, 可将其分为未激活期、激活早期、冠状期和消散期四个阶段[Clark 等 1980]:

(1) 未激活期: 未激活期的卵子直接取自对虾产卵孔并进行固定(图版 I-1), 图版 II-1 为未激活期卵子横切的光镜照片。此时的卵子细胞质内含有大量的卵黄物质, 皮层内有许多呈棒状的棒状周边体, 位于卵膜下陷形成的小囊内(亦称皮层囊), 与卵子表面呈垂直排列, 其长度约占整个卵半径的三分之一, 整个卵子又由一层卵黄膜与外界隔开。图版 II-6 为经过皮层的卵子横切的光镜照片, 可以看到皮层囊及其内的棒状周边体。

(2) 激活早期: 卵子皮层中的棒状周边体开始放出, 并把卵黄膜举起(图版 I-2~3), 从图中可以清楚的看到被棒状周边体举起的卵黄膜, 随着棒状周边体的不断举起, 卵黄膜逐渐破碎消失。在图版 I-2 中卵黄膜尚清晰可见, 在图版 I-3 中卵黄膜已完全消失, 此时有些卵子仍呈不规则圆形, 随后卵子逐渐变为圆形, 在这一时期棒状周边体仍保持其结构。图版 II-2 为这一时期卵子横切的光镜照片, 图版 II-7 为 Bouin 氏液固定的刚开始激活反应的对虾卵子的光镜照片。

(3) 冠状期: 棒状的周边体完全释出, 形成美丽的花冠状凝胶层(图版 II-4), 棒状的周边体略有膨大, 各棒状周边体间仍有明显的界限, 下陷的卵膜随着棒状周边体的释放升至卵子的表面, 皮层囊随之消失。图版 II-3 为此期卵子横切的光镜照片。

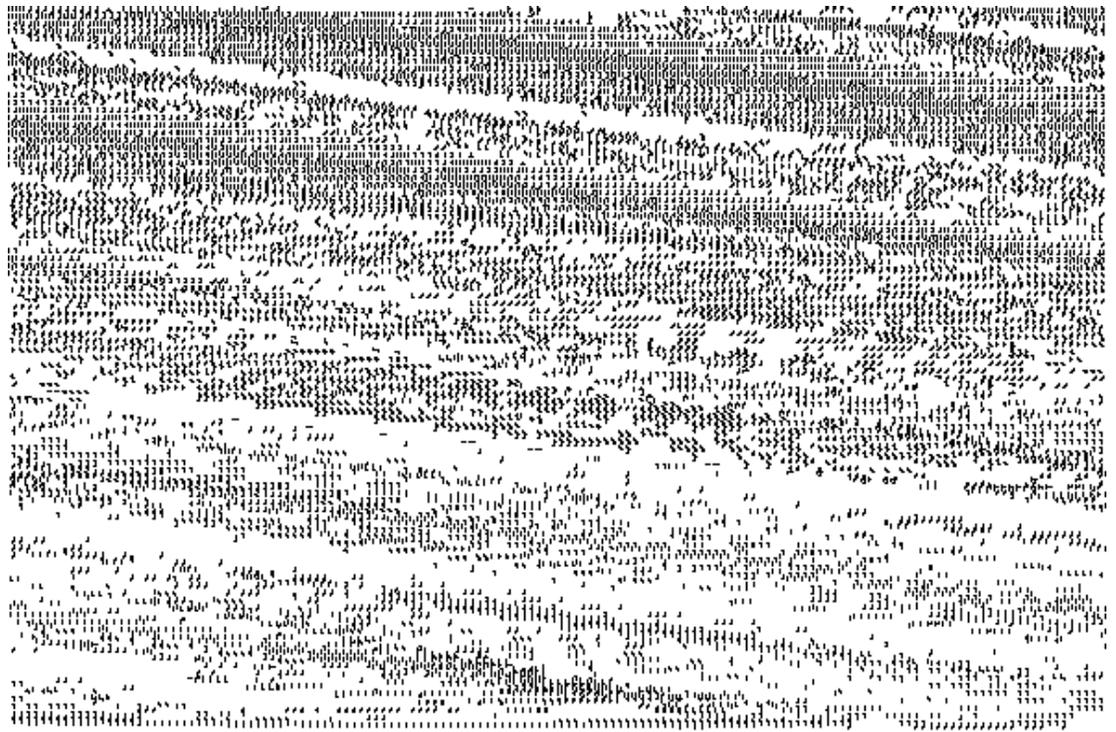
(4) 消散期: 棒状周边体逐渐扩散消失, 但棒状周边体的溶解消失并不是同步进行的, 而是从基部开始向整个棒状周边体扩散, 图版 II-4~5 清楚的显示了这一过程。随着棒状周边体间的界限逐渐消失, 凝胶层逐渐消散, 此时可清晰地看到附着在卵膜上的精子(图版 I-4)。整个过程大约历时 10 分钟。

2.2 卵子的成熟分裂和极体的形成

刚产出的卵子处于第一次成熟分裂间期[蔡难儿等 1997],成熟分裂的进行与胶质层的形成和消散是同时进行的。大约在卵子产出后 4 分钟卵子进入第一次成熟分裂中期,染色体整齐的排列在赤道板上(图版 I 3、I 5),此时卵子处于皮层反应的消散期。在卵子产出后约 9 分钟卵子完成第一次成熟分裂,排出第一极体(图版 I 6),而后举起受精膜。在产出后约 30 分钟卵子开始第二次成熟分裂放出第二极体(图版 I 7),有时也可观察到正在分裂的第一极体(图版 I 2)。

2.3 受精膜的形成

中国对虾卵子受精膜的形成是与成熟分裂同时进行的。光镜切片的观察结果表明,在受精膜的举起过程中卵膜表面呈锯齿状(图版 I 1),透射电镜照片显示卵膜表面有向内凹陷的小泡,卵子皮层中存在与卵周隙中相同的颗粒状物质(图版 I 4),由此可以推断,受精膜的举起与卵子皮层向卵周隙的胞吐作用(exocytosis)有关。



图版 I Plate I

1. 刚产出的卵子; 2~ 3. 激活早期的卵子; 4. 冠状期的卵子; 5. 消散期的卵子, 正在放出第一极体; 6. 已放出第一、二极体
Y: 卵黄 CR: 棒状体 VE: 卵黄膜 S: 精子



图版 II Plate II

1. 刚产出的对虾卵子横切; 2. 激活早期的卵子横切, 棒状体已部分放出; 3. 冠状期卵子横切, 棒状体已完全放出; 4~5. 消散期卵子横切, 棒状体基部已融合, 箭头为尚未融合的棒状体远端; 6. 卵子皮层横切; 7. Bouin 氏液固定的激活早期的卵子; 8. 产出后 9'00" 的卵子横切, 示双精入卵

Y: 卵黄 CR: 棒状体 O: 卵膜 C: 皮层囊 VE: 卵黄膜 S: 精子

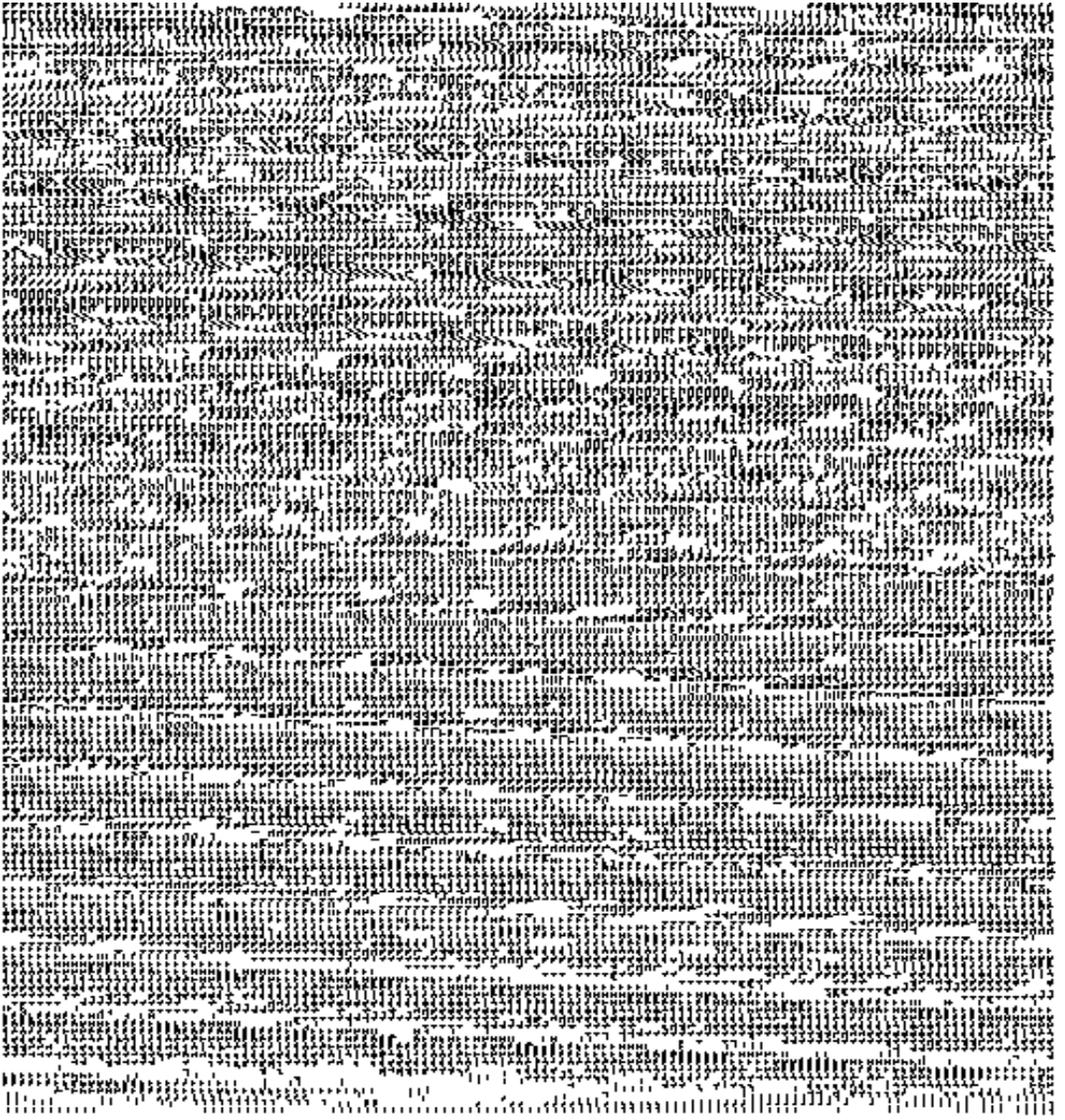
3 讨论

3.1 中国对虾卵子的激活反应

在沙蚕和硬骨鱼类中卵子的激活反应也有与对虾卵子激活相类似的现象发生。沙蚕卵子的皮层内有许多泡状结构, 并在受精过程中形成胶质层, 此胶质层在受精卵早期发育阶段一直保留[Novikoff 1939, Costello 1949, Fallon 和 Austin 1967]。真骨鱼类卵子的皮层反应形成的胶质层并不冲破卵黄膜而很快消失, 而是存在于卵黄膜内[Yamamoto 1939]。

沙蚕和硬骨鱼类卵子的皮层反应均是由于卵子与精子的接触而诱发, 而锐脊单肢虾(*Sicyonia ingentis*) 卵子的激活反应并不需要精子的存在, 发育成熟的卵子只要与海水接触便会引起皮层反应[Clark 和 Lynn 1977]。我们对中国对虾卵子激活的研究结果也证明与海水接触是中国对虾卵子激活的必要条件。

Clark 等[1980]描述了褐对虾(*P. aztecus*) 和白对虾(*P. setiferus*) 卵子的激活反应, 并认为其观察结果是对虾属的特征。Clark 等认为对虾卵子的激活反应较之其它种类有以下特点: (1) 卵子皮层中有参与皮层反应的特殊结构; (2) 卵子的激活是由海水而不是由精子所诱导; (3) 卵子完成激活反应后体积减小。我们对中国对虾卵子激活的观察结果与其基本相符, 只是在各个时期所经历的时间上有所差异, 这进一步证实了 Clark 等的结论。



图版 III Plate III

1. 正在举起受精膜的卵子, 卵膜表面呈锯齿状; 2. 正在分裂的第一极体; 3, 5. 第一次减数分裂中期的卵子横切; 4. 正在举起受精膜的卵子的透射电镜照片, 示卵膜向卵周隙的胞吐作用; 6. 正在放出第一极体; 7. 已放出第二极体

3.2 卵子激活的作用

在许多动物中, 卵子的激活反应是为了把多余的精子推离卵子表面[Epel 1975]。在对虾卵子激活过程中, 棒状周边体的举起也确实会把许多精子推离卵子表面。但是防止多余精子入卵似乎并不是对虾卵子激活的最基本的作用, 这是因为: (1) 对虾卵子的激活并不是由精子激发的, 而是由于与海水的接触; (2) 对虾的精子是不动精子, 其精子在产卵的同时即卵子激活之前就与卵子相接触了[Clark 1974]; (3) 许多学者认为对虾是多精入卵的, 这一点我们已在光镜切片中得到证实(图版 II-8), 在切片中我们最多曾看到过 3 个精子同时入卵的情况。多

精入卵现象存在于许多节肢动物中, 并被认为是受精必不可少的先决条件[Austin 1965, Brown 和 Knouse 1967, Hinsch 1971]。

对虾卵子激活反应的另一种可能的作用就是形成一个具有保护作用的胶质层, 以便保护卵子来抵抗外界不稳定的环境因素[Allen 1958, Schuel 1978], 许多动物卵子周围包围的胶质或其它的围卵层都具有这一作用, 对虾卵子的激活反应是由海水来激发, 这一点也支持这一论点。Hudinaga[1942] 曾报道过在日本对虾(*P. japonicus*) 中凝胶层一直到卵子的第二次卵裂仍包围着卵子, 但在褐对虾和白对虾中, 受精膜形成后卵周就没有发现胶质物质的存在。在中国对虾中, 受精膜开始形成后胶质层就已完全消失, 与 Clark 等在褐对虾中观察到的结果相似。

3.3 受精膜的举起

锐脊单肢虾的受精膜是皮层反应形成的, 皮层反应包括两种皮层小囊的连续的胞吐作用[Pillai 和 Clark 1988], 我们在中国对虾中也发现了类似的结果。对正在举起受精膜的卵子的光镜切片观察发现, 此时的卵膜呈粗糙的锯齿状(图版 III 1), 透射电镜观察的结果也发现卵膜有向卵周隙的胞吐现象, 卵子皮层中存在有与卵周隙中相同的电子致密的颗粒状物质(图版 III 4)。以上结果说明中国对虾的受精膜的形成与卵子皮层小囊的胞吐作用(exocytosis) 有关。

国家攀登计划 B 资助项目, 编号: PDB- 6- 2- 3。

参 考 文 献

- 朱丽霞, 程乃乾, 高信曾. 1982. 生物学中的电子显微镜技术. 北京: 北京大学出版社, 12.
- 蔡难儿, 林 峰, 陈楠等. 1997. 中国对虾受精生物学的研究. 海洋与湖沼, 28(3): 271~ 281.
- Allen R D. 1958. The initiation of development. In: McElriy W D, Glass B, eds. The chemical basis of development. Johns Hopkins University Press, Baltimore. 17~ 61.
- Austin C R. 1965. Fertilization. Prentice-Hall, Inc, New Jersey. 145.
- Brown G G, Knouse J R. 1967. Effects of sperm concentration, sperm aging and other variables on fertilization in the horseshoe crab *Limulus polyphemus* L. Biol Bull. 144: 462.
- Clark W H J. 1974. In vitro fertilization with non- motile spermatozoa of the brown shrimp *Penaeus aztecus*. Mar Biol, 22: 353~ 354.
- Clark W H J, Lynn J W. 1977. A Mg^{++} dependent cortical reaction in the eggs of Penaeid shrimp. J Exp Zool, 200: 177~ 183.
- Clark W H J, Lynn J, Yudin A I, et al. 1980. Morphology of the cortical reaction in the eggs of *Penaeus aztecus*. Biol Bull. 158: 175~ 186.
- Costello D P. 1949. The relations of the plasma membrane and jelly in the egg of *Nereis limbata*. J Gen Physiol, 32: 351~ 366.
- Epel D. 1975. The program of and mechanisms of fertilization in the echinoderm egg. Am Zool, 15: 507~ 522.
- Fallon J F, Austin C R. 1967. Fine structure of gametes of *Nereis limbata* before and after interaction. J Exp Zool, 166: 225~ 242.
- Hinsch G W. 1971. Penetration of the oocyte envelopes by spermatozoa in the spide crab. J Ultrastruc Res, 35: 86~ 97.
- Hudinaga M. 1942. Reproduction, development, and rearing of *Penaeus japonicus* Bate Jpn. J Zool, 10: 305~ 393.
- Novikoff A B. 1939. Changes at the surface of *Nereis limbata* eggs after insemination. J Exp Biol, 16: 403~ 408.
- Pillai M C, Clark W H J. 1987. Oocyte activation in the marine shrimp, *Sicyonia ingentis*. J Exp Zool, 244: 325~ 330.
- Schuel H. 1978. Secretory functions of egg cortical granules in fertilization and development: a critical review. Gamete

Res. 1: 299~ 382.

Thomas A B, Donald V L. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. Lawrence: Allen Press, KS, 6.

Y amamoto T. 1939. Changes of the cortical layer of the eggs of *Oryzias latipes* at the time of fertilization. Proc Imp Acad. 15: 269~ 271.

MORPHOLOGICAL STUDIES OF THE CORTICAL REACTION IN THE EGG OF *PENAEUS CHINENSIS*

ZHANG Yan, WANG Qing-Yin, LI Jian, SUN Xiu-Tao, ZHANG Li-Jing
(Yellow Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Qingdao 266071)

ABSTRACT The morphology of cortical reactions during oocytes activation in shrimp *Penaeus chinensis* is described in this paper. In the peripheral ooplasm there are many cortical specializations—rods, which are perpendicular to the oolemma and located in the cortical crypt formed by the subsided vitelline envelope. The cortical of the *P. chinensis* does not need the existing of the sperm. When an oocyte is spawned into sea water, it starts the cortical reaction. The cortical rods are expelled and form a corona around the egg. This corona remains as the rods swell and begin to dissipate from the end of the rods. With the rods dissipating completely, the corona disappears. The oocytes accomplish the meiosis and release the first and second polar bodies. A hatching membrane also forms and ends the cortical reaction. The functions of the cortical reaction are also discussed.

KEYWORDS *Penaeus chinensis*, Oocytes, Cortical reaction, Morphology