

中国对虾卵母细胞发育的初步研究*

李怀梅[†] 张乃禹

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 于 1989 年 10 月—1990 年 9 月分别先后在昌邑县下营镇对虾育苗场和青岛黄岛盐业公司养殖场采集中国对虾,运用光学、电子显微镜及组化方法,研究中国对虾卵母细胞的形态发育及其内部结构分化。结果表明,中国对虾卵母细胞的发育可分为 4 个主要时相:

I. 早期分化时相, II. 滤泡初生期时相, III. 卵黄大量生成时相, IV. 皮质棒生成时相。

关键词 中国对虾 卵母细胞 发育

近年来已有学者利用电子显微镜分别研究了褐对虾 (*Penaeus aztecus*)、白对虾 (*P. setiferus*) (Duronslet et al., 1975)、日本对虾 (*P. japonicus*) (Yano, 1988) 和长毛对虾 (*P. penicillatus*) (洪水根等, 1988) 卵母细胞的发育, 但对中国对虾卵母细胞发育期间内部结构及其变化尚未见报道。本文利用电子显微技术及组织化学方法对这种对虾卵母细胞发育的细微过程进行了初步观察。

1 材料和方法

于 1989 年 10 月—1990 年 5 月在昌邑县下营镇对虾育苗场采集越冬的中国对虾 (*P. chinensis*) 亲虾(体长约 15cm)及 1990 年 8, 9 两月在黄岛盐业公司养殖场采集养殖的成体对虾。取腹部第一节卵巢。用于光镜观察的标本, 以 Bouin's 液或 10% 福尔马林固定, 以 H·E, Masson 和 Mallory 三重染色, 以 Alcian 蓝-PAS(AB-PAS) 及汞-溴酚蓝(Hg-BpB)反应作组织化学染色(芮菊生等, 1980)。用作电镜观察的标本, 以 3% 戊二醛及 1% 锇酸双固定, 铅-铀染色。

从同一发育期的卵母细胞中, 随机取 100 个以目微尺测其长短直径, 取平均值, 即为该期卵母细胞的平均卵径。

2 结果

以光镜和电镜技术对中国对虾不同发育期的卵巢切片进行观察, 在最早期卵巢切片中可以看出, 卵母细胞由卵原细胞发育而成。卵原细胞呈球形(图版 I: 1, Oo); 核(N)很大, 核径略小于胞径, 核内有多个小核仁及线形染色质; 细胞质稀薄, 平均胞径为 6.89—11.69 μm 。卵原细胞经过增殖而进入卵母细胞期。依据胞径大小、核及核仁形态、卵黄粒和皮质棒的出现, 及其与滤泡细胞间的活动关系, 卵母细胞的发育可分为 4 个时相。

I. 早期分化时相 在 11 月份以前的卵巢中主要由该时相的卵母细胞组成。光镜下, 依据核相变化的不同, 此时相又分为两个亚时相: (1)染色质核仁亚时相, 卵母细胞形状不规则; 核大, 中央含有一个大的核仁, 在其周围则为多个大小不等、形状各异的小核

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 2007 号。硕士生论文。

[†] 现在青岛市山东省食品进出口公司, 邮政编码 266001。

刘瑞玉、李嘉泳、高洁、相建海、宋裕昌 5 位先生审阅全文, 均此一并志谢。

收稿日期: 1991 年 10 月 15 日, 接受日期: 1993 年 9 月 15 日。

仁,是为周边核仁(图版 I:2,Nu),它们以丝状染色质彼此相连;胞径平均为 $15.65\mu\text{m}$,核径平均为 $10.76\mu\text{m}$ 。(2)周边核仁亚时相,在此时相早期,中央核仁大,着色深,周边核仁小,在同一切面上其数目大致在 6—10 个之间(图版 I:3);细胞质具较强嗜碱性;胞径平均为 $29.89\mu\text{m}$,核径平均为 $18.71\mu\text{m}$ 。至晚期,卵核较大,中央核仁着色浅;有的中央核仁中颗粒区与纤丝区已明显辨出 (Adiyodi et al., 1983);周边核仁多至 10 个以上,大而呈球形(图版 I:4);细胞质嗜碱性;胞径平均为 $42.98\mu\text{m}$,核径平均为 $22.82\mu\text{m}$ 。

电镜下,可见多数周边核仁均沿核膜内侧分布,由这些核仁又分出一些小核仁(图版 II:9,单箭头所示),后者作为核仁物质通过核膜孔排入细胞质中堆积为电子致密物质(图版 II:9,双箭头所示)。在该堆积处密集着许多线粒体(图版 II:10,M)。整个卵质中富含核糖体。核仁的变化可以被认为是卵母细胞早期发育中的特点(表 1)。

表 1 中国对虾早期卵母细胞的核仁变化

Tab.1 The nucleoli changes of oocyte in early phases in *Penaeus chinensis*

名称	染色质核仁期	周边核仁期
中央核仁	1 个,较大,着色深	着色变浅,内部出现分区
周边核仁	多个,较小,形状不一,以染色质丝相连	较多,较大,呈近球形物质块

II. 滤泡初生期时相 在 12 月至次年 2 月份的卵巢中,滤泡细胞开始大量出现,在切面上呈扁圆形。电镜下,核大,致密,细胞质少,细胞器不丰富;细胞长径 $4.92-6.15\mu\text{m}$,短径 $3.69\mu\text{m}$ 。滤泡细胞可能来自结缔组织,系进入到卵巢内部的唯一的非性细胞。它们逐渐包围整个卵母细胞,形成滤泡(图版 I:5,Oc,FC)。这时卵母细胞多为卵圆形,核内物质密集,核仁分成致密的小的块状物沿核周排列;细胞质弱嗜碱性;胞径增大,平均为 $71.34\mu\text{m}$,核径平均为 $43.13\mu\text{m}$ 。在 AB-PAS 反应中,此时卵母细胞核外周开始出现紫色物质(图版 I:5, MPS),表明细胞质内有中性粘多糖(陈棣等,1986)。

在亚显微观察方面,可见卵核膜外膜有些褶皱,核膜外有电子致密物质——核仁外排物、内质网和大量的线粒体;有的内质网内积累营养物质而成为贮存粒。

III. 卵黄大量生成时相 在 3 月上旬的卵巢中,卵母细胞明显增大,核体积相对变小;细胞质内逐渐充满卵黄颗粒(Y)。卵黄颗粒先在核外周密集分布,愈向周边密度愈小,在 Mallory 染色中,呈紫、桔黄等不同着色;在核内,小核仁沿核周排列(图版 I:6,Nu);细胞质强嗜酸性;胞径平均为 $169.59\mu\text{m}$,核径平均为 $69.95\mu\text{m}$ 。此时卵母细胞对 AB-PAS 呈强阳性反应,胞质中密集分布着紫色颗粒;在 Hg-BpB 染色中,胞质中也密集着深鲜蓝色颗粒,此为卵母细胞内中性粘多糖和蛋白质含量已很高的证明。

电镜下,可见卵黄球系由许多卵黄小球融合而成,在小球周围有许多线粒体(图版 II:11,Y,M)和粗糙型内质网,而且几乎每个较大的卵黄球都有线粒体群包围,看去卵黄的形成与线粒体有直接关系。

滤泡细胞扁平,长径约 $4.92\mu\text{m}$,短径在 $2.95-3.69\mu\text{m}$ 。胞质内线粒体、粗糙型内质网、高尔基体小泡及核糖体小颗粒增多。由滤泡细胞向卵母细胞输送的物质(图版 II:12,

单箭头所示),卵母细胞以胞饮形式吸收之(图版 II:12,双箭头所示)。这时在卵母细胞表面出现一层膜状结构,即卵黄膜(图版 II:12,VM)。

IV. 皮质棒生成时相 在3月下旬的卵巢内,卵母细胞卵黄粒继续积累,卵母细胞周边出现许多皮质棒(图版 I:7,CR)。皮质棒在 AB-PAS 反应中呈紫色,为中性粘多糖(Lynn et al., 1975) (图版 I:8,MPS)。有的皮质棒中已出现充满碎颗粒的囊状物(图版 II:13,CC),此相似块状物亦见于卵母细胞(Oc)与滤泡细胞(FC)两者间隙中(图版 II:14,CC)。此时由于皮质棒的出现和向卵母细胞质膜内挤入,卵核呈各种不规则形状;胞质强嗜酸性;胞径平均为 233.8 μm ,核径平均为 79.18 μm 。

在此时相中,滤泡细胞紧贴卵母细胞外缘,其长径约 7.38 μm ,短径为 1.23—2.46 μm 。胞质内细胞器非常丰富。在此滤泡细胞层不断靠拢卵母细胞的同时,卵母细胞也向滤泡细胞一侧伸出许多微绒毛(图版 II:15,单箭头所示)。随后卵母细胞进一步发育,皮质棒也随之增大,呈近核端细、远核端粗的棒状体;平均长 46.49 μm ,宽(中间宽度)7.06 μm 。此外,由于胞质内卵黄颗粒密集,卵母细胞中央变得不透明,核已看不到;胞质内密集被 Hg-BpB 染成深蓝色的颗粒:说明胞内蛋白质含量很高。最后,滤泡细胞层萎缩得极薄,紧贴卵母细胞外缘,排卵即将发生。中国对虾卵母细胞发育各期的形态特点见表 2。

表 2 中国对虾卵母细胞的发育分期

Tab.2 The development phases of oocyte of *Penaeus chinensis*

形态特点	I		II	III	IV
	染色质核仁期	周边核仁期			
胞径(μm)	15.65	29.89—42.98	71.34	169.59	233.80
核径(μm)	10.76	18.71—22.82	43.13	69.95	79.18
滤泡细胞(μm)		+	长径 4.92—6.15, 短径 3.69	长径 4.92, 短径 2.95—3.69	长径 7.38, 短径 1.23—2.46
卵黄颗粒			+	++	++
PAS 反应			核外周紫色	强阳性反应	紫色颗粒大
皮质棒					+
核仁特点	中央核仁大而明显	周边核仁球形	呈致密块状核周排列	致密小块核周排列	很少见到

+ 表示少量出现; ++ 表示量较多。

3 讨论与结论

3.1 滤泡细胞对卵黄发生的作用 实验中,发现在 11 月份以前,滤泡细胞很少。在 12 月至次年 2 月的卵巢内,滤泡细胞开始大量出现,但其含有的细胞器却很少。在卵黄大量生成时相,滤泡细胞内线粒体、内质网和高尔基体非常丰富,由滤泡细胞不断向卵母细胞输送物质(图版 II:12,单箭头所示),是为卵黄前体;继之,卵母细胞质内充满了卵黄粒。

待皮质棒生成后,卵母细胞内卵黄颗粒更加密集,其蛋白质含量也高,而滤泡细胞则萎缩成一薄层。由此推测,滤泡细胞对卵黄的发生起供给作用。这也和以下几位学者的结论相似。Talbot(1981)曾认为美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*) 的滤泡细胞泌出物可合成绒毛膜。Yano 等(1987)用免疫荧光反应证明日本对虾 (*P. japonicus*) 的滤泡细胞与卵黄发生有一定关系。洪水根等(1988)报道长毛对虾 (*P. penicillatus*) 的滤泡细胞可合成大量的卵黄蛋白输送给卵母细胞作为卵黄粒的原料。

3.2 卵黄粒形成的物质来源 - 通过电镜观察表明,卵黄的起源是二元的。一是卵母细胞的核排出物¹⁾、内质网、线粒体(图版 II:11,M)等,均参与卵黄物质的形成;二是卵母细胞通过胞饮作用吸收滤泡细胞所输送的物质参与卵黄的形成(图版 II: 12)。

3.3 卵母细胞发育与核仁变化密切相关 从表 1、表 2 可以看出,处于不同发育期的卵母细胞其核仁具有明显不同的特点,而且核仁物质还通过核膜孔进入到细胞质中参与胞质中物质的合成¹⁾。核仁形态的变化是判断卵母细胞发育分期的一个主要依据。

参 考 文 献

- 芮菊生等,1980,组织切片技术,人民教育出版社(北京),147。
 陈 隼、邢东方,1986,中国毛虾生殖系统的组织学和组织化学,甲壳动物学论文集,科学出版社(北京),158—164。
 洪水根等,1988,长毛对虾卵子发生的研究,海洋与湖沼,19(4): 301—306。
 Adiyodi, R.G. and Subramoniam, T., 1983, 18. Anthropoda—Crustacea, *In* Reproductive Biology of Invertebrates, Vol. 1. Oogenesis, Oviposition and Oosorption, ed. by Adiyodi, K.G. et al., A Wiley-Interscience Publication (New York et al.), pp. 443—495。
 Duronslet, M.J., et al., 1975, Light and fine structural studies of natural and artificially induced egg growth of penaeid shrimp, *Proc. World Maricult. Soc.*, 6: 105—122。
 Lynn, J.W., Clark, H. Jr., 1975, A Mg⁺⁺ dependent cortical reaction in the eggs of penaeid shrimp, *J. Cell Biol.*, 67: 251。
 Talbot, P., 1981, The ovary of the lobster, *Homarus americanus* II. Structure of the mature follicle and origin of the chorion, *J. Ultra. Res.*, 76(3): 249—262。
 Yano, I. and Chinzei, Y., 1987, Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 86B(2): 213—218。
 Yano, I., 1988, Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*, *Mar. Biol.*, 99: 547—553。

1) 杜宣,1990,中国对虾卵巢发育及超微结构,硕士学位论文。

A PRELIMINARY STUDY ON DEVELOPMENT OF OOCYTE OF *PENAEUS CHINENSIS* (OSBECK)*

Li Huamei[†], Zhang Naiyu

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071*)

ABSTRACT

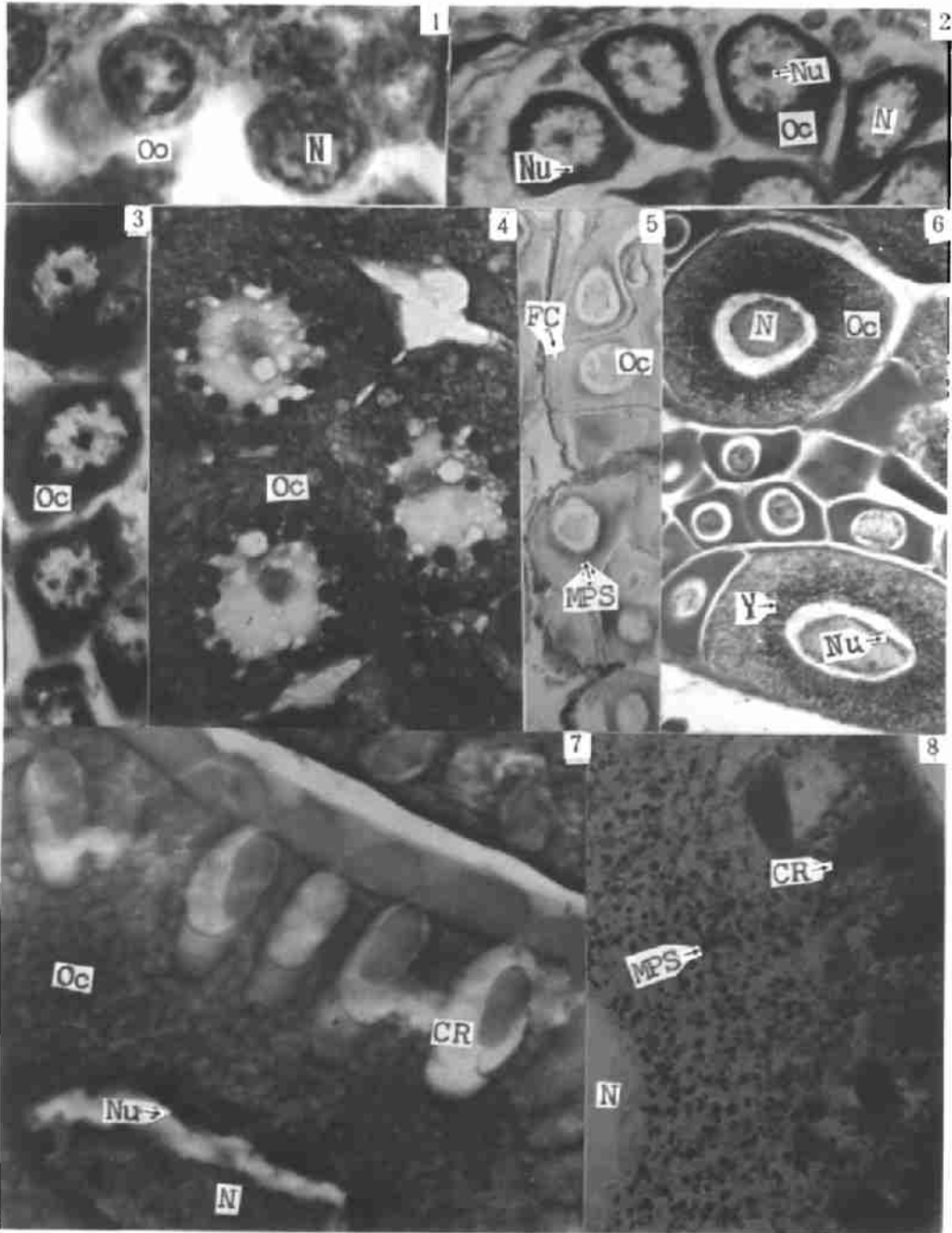
This paper describes the development phases of oocyte of cultured *Penaeus chinensis*. From October 1989 to September 1990, the cultured shrimps were caught in Xiaying Town Shrimp Hatchery, Changyi County and in Huangdao Salt Industry Corporation Shrimp Farm, Qingdao. Light and electron microscope and histochemical methods were used to study oocytes' morphological changes and inner structure differentiations. Based on the size of the cell, the shape of the nuclei and nucleoli, the existence of the yolk granules, the emergence of cortical rods and the relationship between oocyte and follicle cells, the oocyte development was classified into 4 main phases, namely: I. early differentiation phase, II. folliculogenesis phase, III. vitellogenic phase, IV. cortical rods forming phase.

This study shows that: follicle cells probably supply substances needed for yolk formation; there are two resources, one from the oocyte itself and the other from the follicle cells, nucleoli shape change is one feature of during oocyte development, especially during early the differentiation phase of oocyte.

Key words *Penaeus chinensis* Oocyte Development

* Contribution No. 2007 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.

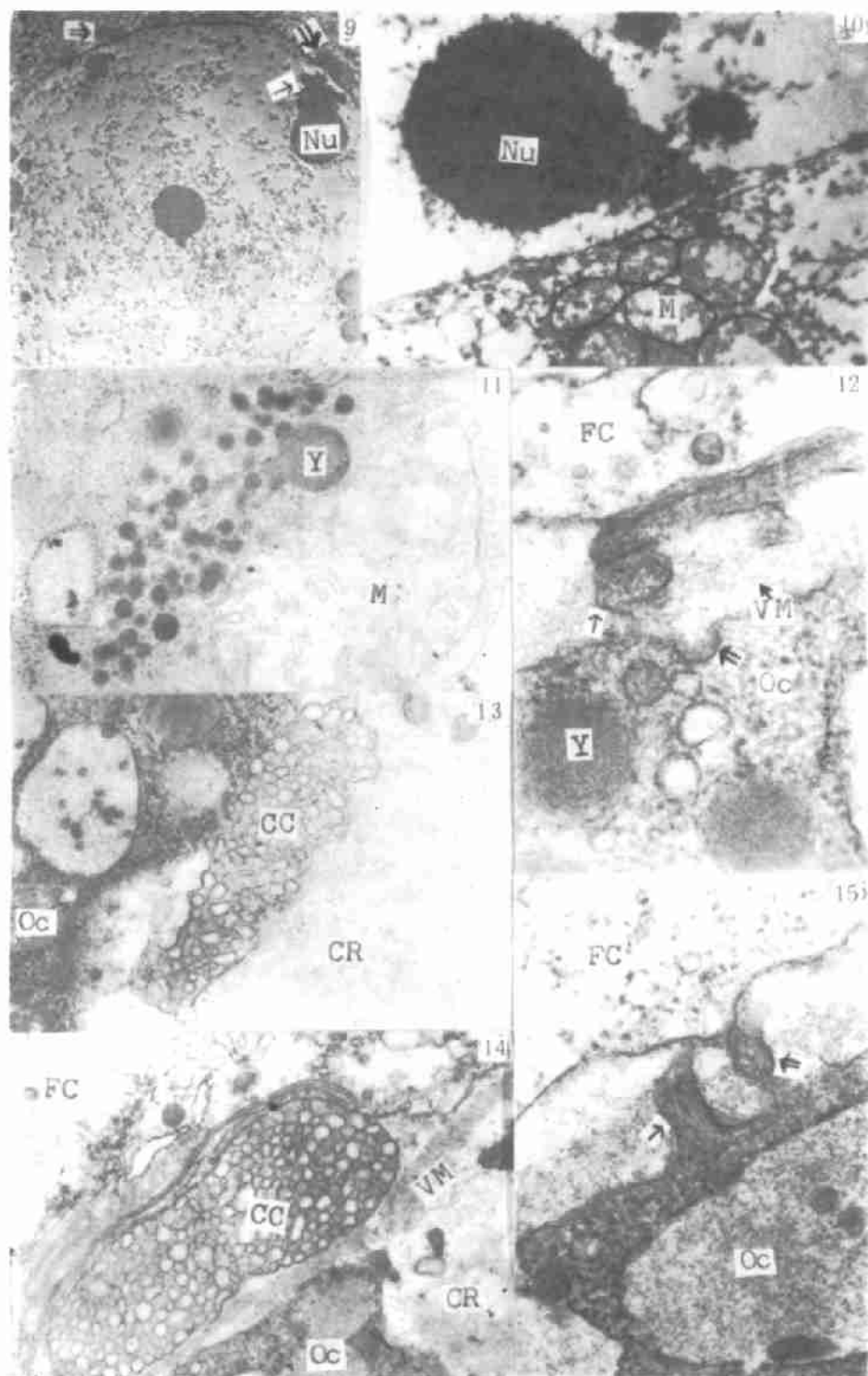
[†] Present address: Shandong Foodstuffs Import & Export Corp, Qingdao, P. O. 266001.



图版 I 中国对虾卵母细胞的光镜照片

Plate I The light microscope photographs of oocyte of *Penaeus chinensis*

1-4. 早期分化时相 (I): 1. 卵原细胞(Oo), 核(N), H·E, ×6400; 2. 染色质核仁(Nu)亚时相, 卵母细胞(Oc), H·E, ×2560; 3. 周边核仁亚时相, 早期卵母细胞, Masson, ×2560; 4. 周边核仁亚时相, 晚期卵母细胞, Mallory, ×2560。 5. 滤泡初生时期时相 (II), 卵母细胞的AB-PAS反应结果, 滤泡细胞(FC), 粘多糖(MPS), ×640。 6. 卵黄(Y)大量生成时相 (III), 卵母细胞, Mallory, ×640。 7. 皮质棒(CR)生成时相 (IV), 卵母细胞, H·E, ×2560; 8. 皮质棒生成时相卵母细胞的AB-PAS的反应结果, ×2560。



图版 II 中国对虾卵母细胞的电镜照片

Plate II The electron micrographs of oocyte of *Penaeus chinensis*

9—10. 早期分化时相(I)卵母细胞的一部分: 9. 周边核仁(Nu)分出的核仁物质(单箭头示), 核外的电子致密物质(双箭头示), $\times 6400$; 10. 核仁物质进入细胞质中, 周围多线粒体(M), $\times 12000$ 。11—12. 卵黄大甍生成时相(III): 11. 线粒体附近大量卵黄小球融合成较大的卵黄球(Y), $\times 20000$; 12. 由滤泡细胞(FC)向卵母细胞(Oc)输送物质(单箭头示), 卵母细胞膜凹陷(双箭头示)及卵黄膜(VM), $\times 46000$ 。13—15. 皮质棒生成时相(IV): 13. 皮质棒(CR)内的碎颗粒囊状物(CC), $\times 10000$; 14. 卵母细胞与滤泡细胞两者间隙中的相似物(CC), $\times 15000$; 15. 卵母细胞向滤泡细胞伸出突起(单箭头示), 来自滤泡细胞的分泌物(双箭头示), $\times 40000$ 。