

对虾受精过程生理生化特征的研究进展*

ADVANCES IN THE STUDIES ON PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF FERTILIZATION PROCESS IN SHRIMP

吴长功 相建海

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

* 对虾受精细胞学目前已成为对虾生殖生物学的研究热点。近十几年来科研人员对对虾的受精过程、特点及影响条件,受精的生理生化特性及机理进行了广泛的研究,取得了很大进展。对单肢虾、褐对虾、白对虾、鹰爪虾、中国对虾等虾类受精细胞学的研究表明,对虾的受精过程包括精子的顶体反应、卵子的激活(卵子发生皮层反应形成孵化膜、减数分裂的恢复等)、精卵的结合(包括精子的入卵、雌雄原核的形成

及融合等)。这些过程同其他动物的受精过程有些相似,但也有明显的不同,而且不同的对虾也有各自的特性。目前对锐脊单肢虾已研究得比较深入,而对其他虾类报道则较少。本文综述了对虾受精过程的生理

* 国家自然科学基金资助项目 39670579 号;中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3248 号。
收稿日期:1997-05-21

生化特征及影响因素,并对对虾人工授精的可行性及未来研究的发展进行了分析。

1 精子的顶体反应

精子同卵子结合及进入卵子内部都需要一个获能及顶体反应的过程,这一过程在锐脊单肢虾已研究得比较清楚,而其他虾类未见详细报道。Clark, W. H. (1984), Griffin, F. J. 等(1987, 1990)对锐脊单肢虾精子的研究表明,精子的顶体反应分为胞吐及顶体丝的形成两个特征性过程。在自然产卵的条件下,胞吐及顶体丝的形成都是由卵子表面的物质引起的,但顶体丝的形成比胞吐晚 10~20 min。人工诱导精子顶体反应的实验证明,这两个过程可分别由不同的物质诱导。卵水(取成熟卵子放于一定量的海水中摇匀后静置所得上清液)、几种离子载体: A 23187、缬氨霉素、尼日利亚菌素等都能诱导已胞吐的精子产生顶体丝。另外,同其他一些动物的精子顶体反应中胞内 pH (pH_i) 的升高相反,锐脊单肢虾的精子在发生顶体反应时 pH_i 下降,人为降低海水的 pH 也可诱导已胞吐的精子产生顶体丝。离子载体的作用及 pH 的降低很可能与 K⁺ 外流有关,由于单价阳离子载体利于 K⁺ 外流,引起膜电位的改变,导致 H⁺ 内流,使 pH_i 下降。但这些诱导过程的真正机理并不清楚。这些现象在其他虾类也有待证实。

Lynn, J. W. 等 1992 年的研究表明,一些酶类如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、链霉蛋白酶都可诱导顶体反应,而大豆胰蛋白酶抑制因子则可抑制顶体反应。通过对卵水的生化分析也证明卵水内含有类胰蛋白酶的蛋白酶。胰蛋白酶的诱导实验还证明不论胰蛋白酶的浓度大小,在能引起诱导反应的浓度范围内,其作用时间至少是 30 min,而卵水的作用时间为 20 min,自然产卵时 10~20 min 顶体丝可形成,其原因可能与诱导物的专一性有关,但机理并不清楚。Chen Tzyy-Ing 等^[2]对锐脊单肢虾精子的内含物分析表明,精子内含有类胰蛋白酶溶素(Trypsin-like lysin),它可以降解卵黄膜。SDS-PAGE 分析表明精子内含有 46 kD 和 30 kD 两种蛋白,分别具有类胰蛋白酶和类氨基肽酶的活性,它们的作用可能与精子溶解卵黄膜进入卵内有关。上述过程对锐脊单肢虾已研究得比较清楚,在其他虾类则未有详细的报道。林勤武等(1991)曾对中国对虾精子的超显微结构进行研究,但未见有对中国对虾顶体反应的报道。

2 卵子的激活

有关卵子激活过程中的形态变化在许多种对虾中都有报道,而有关卵子激活的生理生化特性的研究,只在锐脊单肢虾有详细的报道。Clark, W. H. 等(1990, 1991), Pillai, M. C. 等(1987)对锐脊单肢虾的研究表明,卵子产入海水中,无论受精与否,都能被激活而发生皮层反应,形成孵化膜,只是未受精卵孵化膜的形成及减数分裂的完成较晚。未受精卵也不能进行正常的卵裂,但可进行假卵裂,形成大小不等的子细胞,但不能继续分裂下去。Clark, W. H. 等(1981)采用不同离子成分的人工海水诱导褐对虾卵子激活的实验表明,海水中的 Mg²⁺ 对受精和未受精的卵子的激活都是必须的,而未受精的卵子的激活及减数分裂的完成还必须有 Ca²⁺ 的参与。Lindsay, L. L. 等(1992)利用激光扫描共聚焦显微镜对活卵研究表明,在卵子激活过程中,胞外 Mg²⁺ 可引起膜内 Ca²⁺ 的波动,且这一波动不依赖于胞外 Ca²⁺ 的存在。在 Mg²⁺ 诱导的 Ca²⁺ 波发生以后 15 min,卵内还会自发产生第二次 Ca²⁺ 波。在无 Mg²⁺ 人工海水中,使用 Ca²⁺ 的载体 A 23187 也能引起卵内 Ca²⁺ 的波动。在正常海水中卵子是单精受精,而在无 Mg²⁺ 海水中可见多精受精,可能是 Mg²⁺ 诱导的 Ca²⁺ 波动与调节精子入卵有关。而且卵外 Mg²⁺ 可能对调节膜上 Ca²⁺ 通道具有决定作用, Mg²⁺ 激活了 Ca²⁺ 通道使 Ca²⁺ 内流。Clark, W. H. 等(1981)对褐对虾的研究表明,卵子在无 Mg²⁺ 海水中也可由 Ca²⁺ 的载体 A 23187 激活,而不加 Ca²⁺ 的载体时,卵胶则不能排放,卵子不能激活,由此可推想卵子的激活同 Ca²⁺ 增加有关。Lynn 等(1992)对锐脊单肢虾及近缘鹰爪虾在低 Na⁺ 海水中的激活研究表明,低 Na⁺ 环境下,卵胶可以释放,并形成胶膜,但膜的形态不正常,既无内部的絮状带,也无外部的致密层,说明海水中的 Na⁺ 对孵化膜的形成也是至关重要的。虽然上述许多报道都研究了海水中几种离子对卵子激活的影响,但对这些离子的作用机理并不清楚,而且这些作用在对虾中是否具有普遍性也有待于证实。有关卵子孵化膜的生化组成, Lynn 等(1987)在对褐对虾卵子孵化膜的研究中表明,形成孵化膜的卵胶含有 25%~30% 的碳水化合物及 70%~75% 的蛋白质,氨基酸分析发现卵胶内含有较高的磺基丙氨酸。而卵胶的释放过程则可被大豆胰蛋白酶抑制因子抑制,说明卵胶内有类胰蛋白酶的蛋白酶,但其作用及特性还不十分清楚。对于孵化膜的作用一

般认为,一是防止多精受精,二是具有保护受精卵的作用。

3 精卵的结合

在自然产卵情况下,精子的顶体反应及卵子的活化同受精是紧密相关的。Clark, W. H. 等(1991)在对虾产卵时,交配后贮存的精子随卵子一同产出,并在对虾附肢拨动及水流的作用下,精子的棘突同卵子的卵黄膜接触,精子发生顶体反应的第一步——胞吐:棘突解聚、收缩,顶体泡内含物释出,前颗粒流向卵黄膜,此时可见卵黄膜向内凹入。尔后精子迅速穿过卵黄膜,同紧靠卵膜的类蛋白多糖复合物结合。从精子同卵子初次接触到棘突收缩、内含物释出、穿过卵黄膜及第二次结合这一过程非常迅速,在3 s内完成。此后20~40 min内精子在形态上处于相对静止状态。此时会有许多精子结合在一个卵子表面。卵子一接触海水便发生活化,主要是卵胶前体的释放,孵化膜的形成以及减数分裂的恢复,先后排出第一、第二极体。卵胶前体贮存于卵子皮层囊中,皮层囊呈瓶刷状(锐脊单肢虾)或棒状(褐对虾等)。刚排出的卵胶为非均质,最后形成一均质的卵胶层,厚约50 nm。这一过程可被丝氨酸蛋白酶抑制因子阻断。在卵胶释放的同时减数分裂也开始进行,并在孵化膜形成之前排出第一极体。卵胶层形成后约10 min,精子的顶体反应又继续进行,开始形成顶体丝。顶体丝为一前端膨大的丝状体,直径0.5 μm ,长约12 μm ,前端膨大呈一圆盘状。在顶体丝形成以后,卵子皮层中将释放出两种不同类型的皮层小泡。第1种是致密囊泡,是在卵子活化后由高尔基体形成的,第2种是环状囊泡在卵子活化前即已形成。卵子产出后30~35 min时致密囊泡以胞吐的形式形成孵化膜的外膜并随着内含物的外流而从卵子表面举起,多余的精子便被推向卵外。卵子产出后约40 min,环状囊泡发生胞吐,形成内膜,随着孵化膜的形成,第二极体排出,减数分裂完成。光显微镜下可看到第一极体位于膜外,第二极体位于膜内,在孵化膜形成的同时雌雄原核也开始形成并发生融合。但到目前为止雌雄原核的融合过程缺乏详细的报道,至于其机理则更不清楚。上述各过程发生的时间会随温

度的不同而不同,至于在不同虾类受精的异同尚未见系统的比较研究。

4 关于对虾的人工授精

有关对虾人工授精的研究已进行了几十年,但至今未有较成功的办法。Clark 等(1973)以褐对虾为材料,首先对非鞭毛型不运动的精子,进行了人工授精,取得了10%的受精率。同时他认为直接从雄虾精荚中取出的精子不能发生顶体反应,没有受精能力。并认为对虾的精子在受精前必须经历一个获能的过程。Lin 等(1985)在斑节对虾的人工授精研究中,采用自然排出受精卵,然后投入精子的方法,获得约60%的受精率。孔杰等^[1]在对中国对虾精子和卵子受精能力的研究中,采用类似的方法,最高受精率达到77.8%,同时还分析了精子入卵的最佳时机,认为卵子入水20 s,受精率最高,从雌虾纳精囊中取出的精子在入水1 min时受精率最高。对于雄虾精荚中精子的受精能力未作研究。由于对虾产卵是一个复杂的生物学过程,自然条件下精卵的结合同体外人为的简单混合下的受精有着很大不同。且人们目前对对虾产卵及受精过程的本质仍不清楚,所以人工授精的问题至今还是未能解决。在生产上鉴于对虾的夜间产卵、产卵量大、产卵时间长等问题,进行人工授精更是困难。

综上所述,对虾受精细胞学的研究目前只限于个别种类,而且有许多问题仍不能解决,尤其在有重大经济效益的种类,多年来由于过于注重对虾养殖技术、养殖工艺的研究及病害的防治,也使得对虾生物学方面的基础研究相对落后,许多基本问题至今未能解决,从而大大影响了对虾养殖工程的发展。目前从科研到生产都已认识到了基础研究的重要性,从而使对虾生物学,尤其是生殖生物学和发育生物学的研究越来越受到人们的重视。

主要参考文献

- 1 孔 杰等。海洋科学,1995, 2: 3~ 5
- 2 Tzyy-Ing Chen et al. . *Develop. Growth & Differ.* 1994. 36(3): 259~ 73