

中华绒螯蟹正常附着胚胎与流产胚胎的结构特点

应雪萍*

(温州师范学院生命与环境科学学院, 浙江 温州 325027)

摘要: 用扫描电镜技术观察了中华绒螯蟹正常附着胚胎及流产胚胎的结构特点。结果表明, 受精卵从生殖孔排出 15 min 后, 孵化室中的孵化液体积增大, 使胚胎浸没在孵化液中, 胚胎表面具有粘性; 产卵后 30 min, 卵柄初步形成; 80~140 min 后卵柄完全形成, 胚胎牢固地粘附在携卵绒毛上。正常胚胎的卵柄高度扭曲, 上有很多毛状物, 同时携卵刚毛上有很多粘液; 流产胚胎的卵柄上无毛状物, 但卵柄及胚胎表面有许多寄生物附着。携卵刚毛上的粘液及卵柄上的毛状物可能和胚胎附着有关; 而胚胎表面寄生物的活动, 可能使胚胎外被、卵柄以及卵索的结构发生变化, 增加了胚胎之间的摩擦, 进而胚胎呼吸困难, 以致死亡和流产。

关键词: 中华绒螯蟹; 流产; 扫描电镜; 胚胎附着

中图分类号: Q959.223 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254–5853 (2005) 04–0429–06

Structural Characteristics of Normal and Abnormal Embryos Attachment of *Eriocheir sinensis*

YING Xue-ping*

(School of Biological and Environmental Sciences, Wenzhou Normal College, Wenzhou 325027, China)

Abstract: The structural features of normal and abnormal embryo attachment systems of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* were investigated by scanning electron microscopy. The results showed that the volume of incubation fluid in the brooding chamber increased 15 minutes after egg-laying, immersing the embryos in the incubation fluid and thus the egg envelop became very sticky immediately. The egg stalk was largely formed within 30 minutes and completed within 80 to 140 minutes after egg-laying, so that the egg envelop became strongly adherent to the ovigerous hairs. In normal embryos, the egg stalks were highly twisted and the embryos were attached to the ovigerous hair by the egg stalk or funiculus. Many villiform were found on egg stalks and a lot of mucus was also found on the ovigerous seta. In abnormal egg stalks, villiform were never found, though numerous epibionts were attached to the embryo surface and egg stalk. The mucus of ovigerous hair and the villiform of egg stalks may contribute to egg attachment. Because of the epibionts the structure of egg investment coat egg stalk and funiculus were changed, enhancing the attrition between embryos and making embryo respiration difficult. The death and loss of embryos occur because of the above reasons.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Embryo loss; Scanning electron microscopy; Embryo attachment

大多数十足目甲壳动物(除对虾科外)的雌体产卵后, 其受精卵(胚胎)附着在腹肢的刚毛上, 直到孵化。多数学者认为, 受精卵是依靠特殊的卵柄(egg stalk)或卵索(funiculus)附着于腹肢与腹肢之间, 进而完成胚胎发育过程。卵柄和卵索的形态是否正常, 决定了胚胎的正常发育或流产

(Yonge, 1937; Aiken & Waddy, 1982; Fisher & Clark, 1983; Saigusa, 1994; Saigusa et al, 2002; Harper & Talbot, 1984; Goudeau et al, 1987)。Yang et al (1996)通过对日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)卵柄和卵索形态及作用的初步研究, 指出只有卵柄和卵索正常的胚胎才能正常发育;

* 收稿日期: 2005–02–01; 接受日期: 2005–06–09

基金项目: 温州市科技局基金资助项目(N2000A26); 温州市“551人才”基金项目; 乐清市科技局基金资助项目(02N043)

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: xpying2000@tom.com

作者简介: 应雪萍(1966–), 女, 硕士, 副教授, 从事水生经济动物发育与生殖生物学研究。

Kang et al (2000) 对锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 的卵膜变化与卵子附着研究后认为, 卵膜的变化影响卵子的附着; Xue & Wu (2004) 在研究三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 卵附着机制时, 证实三疣梭子蟹原肢底节和内肢有粘液腺的存在, 并阐明粘液腺在卵子附着过程中能形成卵柄和外层卵膜; Ying et al (2004 a) 也认为中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 粘液腺分泌的粘液与胚胎的附着有关。Ying et al (2004b, c) 对不同生理阶段中华绒螯蟹的肝胰腺及不同发育时期胚胎的脂肪酸及氨基酸比较研究后认为, 必需脂肪酸的组成及含量与胚胎的流产相关。本文通过扫描电镜观察中华绒螯蟹成熟卵、正常附着胚胎、流产胚胎卵柄及卵膜上的细微结构变化, 旨在进一步探索其胚胎流产机理。

1 材料与方法

实验材料取自浙江省温州市清江养殖场。分别于 2002 年 12 月—2003 年 3 月、2003 年 12 月—2004 年 3 月先后两次在清江养殖场进行抱卵和孵化实验, 并购得温州本地成熟亲蟹 10 只及已交配的亲蟹 100 只。带回实验室后, 将其置于装有新鲜海水 (缓慢升温并恒温至 18 °C) 的 5 只玻璃缸中 (55 cm × 50 cm × 40 cm), 24 h 充氧, 饲喂新鲜的缢蛏 (*Sinonovacula constricta*); 每日清除残饵, 更换新鲜海水 (来自养殖场)。一旦发现雌蟹开始产卵, 就跟踪该蟹, 并每隔 5 min 取一次卵。由于实验室与养殖场的养殖环境有差异, 其抱卵蟹的流产 (即大部分胚胎从携卵绒毛上脱落) 率较高。根据正常胚胎发育时间 (Zhao et al, 1993) 以及胚胎脱落的特征 (Yang et al, 1996), 收集不同发育时期的流产胚胎样品。

取成熟蟹卵巢中的卵、刚从生殖孔中排出的受精卵、排出后不同发育时期的胚胎 (Zhao et al, 1993) 抱卵蟹及流产蟹腹肢、流产的胚胎, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 配制的 2.5% 戊二醛及 1% 锇酸进行双固定, 酒精系列脱水, 醋酸异戊酯置换, CO₂ 临界点干燥, 离子溅射仪喷金, Hitachi S-450 及 KYKY-100B 扫描电镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 中华绒螯蟹成熟卵的形态结构

中华绒螯蟹成熟卵是指发育到已可受精的雌性生殖细胞, 系初级卵母细胞。扫描电镜显示: 成熟

卵近球形, 卵表面光滑而有起伏, 分布较多微孔 (图 1), 无受精孔及卵极标志。从破损卵的结构中可以看出, 成熟卵的质膜外有一层较厚的膜, 称为卵膜 (图 2)。受精卵通过输卵管排出体外后, 其表面起伏较大, 颗粒状物质凸起明显, 颗粒直径约 0.2 ~ 1 μm (图 3)。

2.2 中华绒螯蟹胚胎附着过程及形态结构

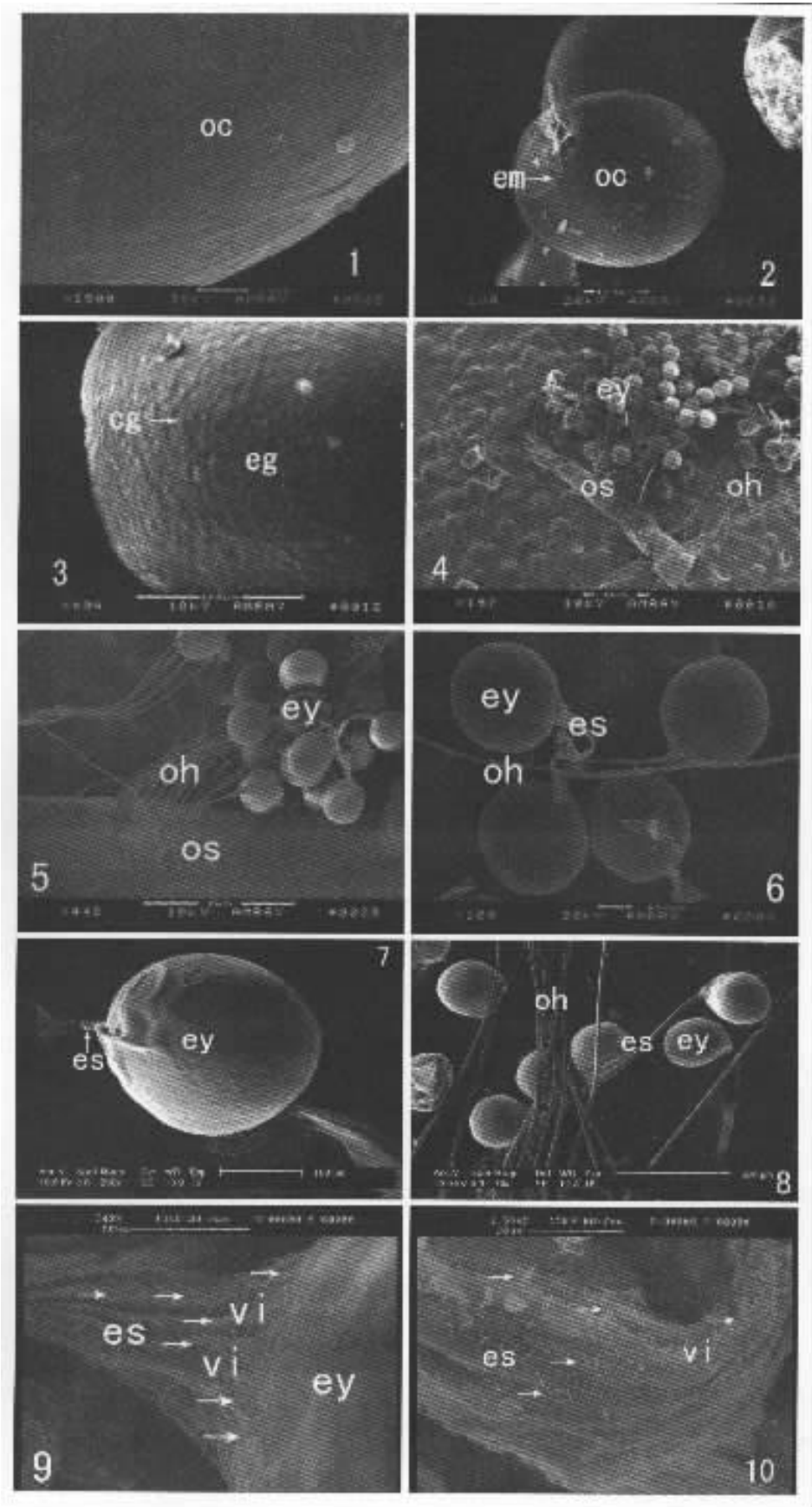
在正常情况下, 中华绒螯蟹的胚胎附着于腹肢的第 2—5 对内肢的携卵刚毛 (ovigerous setae) 上 (图 4)。内肢上还有许多成束的携卵绒毛 (ovigerous hair) (图 4, 5)。受精卵从雌蟹生殖孔产出, 然后进入腹部由抱卵腹肢形成的孵化室中。其孵化室中的受精卵不久就被来自粘液腺的粘液所覆盖, 形成三级卵膜。受重力和受精卵旋转运动的影响, 三级卵膜逐渐拉引成为一条卵柄 (图 6), 卵柄围绕携卵绒毛牢固地附着在腹肢上 (图 4, 5)。

跟踪观察部分雌蟹的排卵过程发现, 排卵 15 min 后, 孵化室中会产生一种透明粘性液体, 将胚胎浸泡其中。携卵刚毛和携卵绒毛不断运动, 粘液逐渐粘附在胚胎表面, 使胚胎表面的粘性逐渐增强。随着胚胎与粘液的进一步接触及携卵刚毛的运动, 产卵 30 min 后, 胚胎已初具“卵柄”形态 (图 7)。产卵 60 min 后, 三级卵膜的粘性降低, 浸没胚胎的孵化液也减少。在产卵后 80 ~ 140 min, “卵柄”形成基本完成, 并牢固地附着在“携卵绒毛”上 (图 8)。

扫描电镜观察正常胚胎, 其刚附着在携卵绒毛上的卵柄呈扁而宽的带状 (图 6); 几周后的卵柄, 特别是靠近卵的部分的形态高度扭转、褶皱 (图 9)。卵柄上有很多的毛状物 (villiiform) 和少量长丝状结构 (图 10)。在携卵绒毛的绒毛囊周围有许多白色的粘性物质 (图 5, 11)。

2.3 流产胚胎的形态结构

观察流产胚胎发现, 有单个胚胎从携卵绒毛中脱落 (图 12), 也有以几个胚胎的卵柄扭结在一起脱落 (图 13)。这些流产的胚胎上有较短的卵柄 (图 12) 或卵索 (图 14)。而着生在腹肢刚毛上的携卵绒毛没有与胚胎一起脱落 (图 15)。流产胚胎表面及卵柄上长有许多寄生物 (图 16, 17), 卵柄上的毛状物已基本消失 (图 17)。与正常胚胎相比, 流产胚胎卵柄扭曲程度较低, 大多数卵柄变得宽而平 (图 12, 13, 18)。



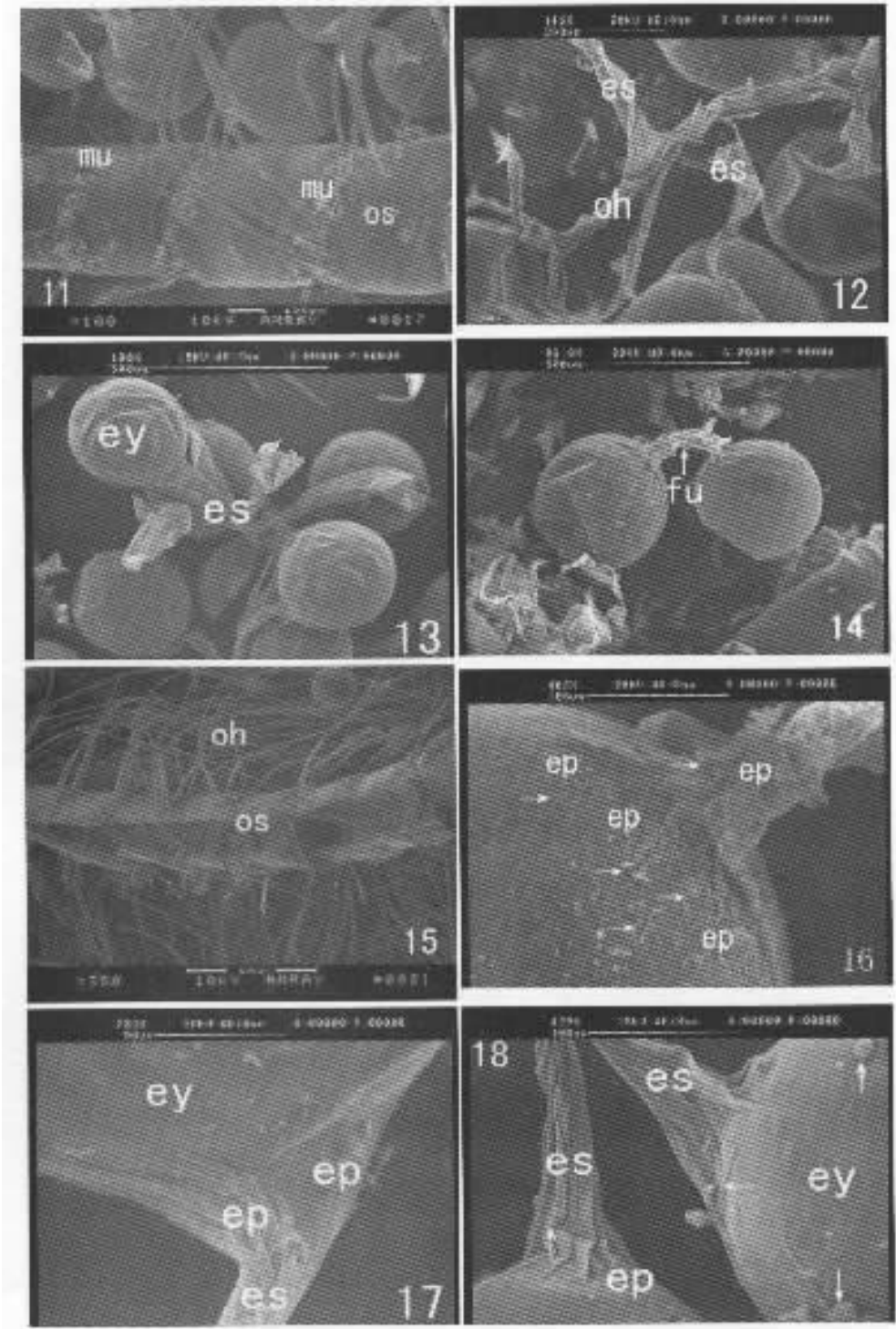


图 1—18 中华绒螯蟹正常附着胚胎与流产胚胎的结构特点

Figs. 1—18 Structural characteristics of normal and abnormal embryos attachment of *Eriocheir sinensis*

cg : 皮层颗粒 (Cortical granule); eg : 卵 (Egg); em : 卵膜 (Egg membrane); ep : 寄生物 (Epibionts); es : 卵柄 (Egg stalk); ey : 胚胎 (Embryo); fu : 卵索 (Funiculus); mu : 粘液 (Mucus); oc : 卵母细胞 (Oocytes); oh : 携卵绒毛 (Ovigerous hair); os : 携卵刚毛 (Ovigerous seta); vi : 毛状物 (Villiform)

- 1. 成熟卵表面结构 (The structure of mature egg surface);
- 2. 卵巢中破损的卵, 示卵膜 (The rupture egg, showing the egg membrane);
- 3. 受精后的卵表面结构, 示皮层颗粒 (The structure of fertilized egg surface, showing cortical granule);
- 4. 抱卵蟹的腹肢, 示大量的胚胎附着在腹肢的刚毛上 (The pleopod in spawning crabs, showing numerous embryos attach to the ovigerous seta);

5. 一束绒毛上附着的卵 (The fertilized eggs attach to the ovigerous hairs);
6. 一根绒毛上附着的卵、卵柄及其附着方式 (The eggs attach to a ovigerous hairs, showing egg stalk and the attachment form);
7. 受精后 30 min 的受精卵, 示刚形成的卵柄 (The egg after 30 min of egg-laying, showing the egg stalk is primary formed);
8. 受精后 2 h, 大部分胚胎已牢固地附着在携卵绒毛上 (The eggs 2 h after egg-laying, most embryo have attached to the ovigerous hairs firmly 2 h after egg-laying);
9. 正常胚胎卵柄上的毛状物 (小箭头所指) 及扭曲的卵柄 (Showing villiform and the twisted egg stalks of normal embryos, some villiform are shown by small arrows);
10. 图 9 放大, 小箭头所示为卵柄上的毛状物 (The magnifying of Fig. 9, some villiform of egg stalk are shown by small arrows);
11. 抱卵蟹第 2 腹肢一小部分, 示刚毛上的粘液 (The ovigerous seta of second pleopod in spawning crabs, showing the mucus);
12. 从携卵绒毛上脱落的胚胎 (The loss embryos);
13. 缠绕在一起脱落的流产胚胎 (The loss embryos which twisted together);
14. 卵索 (Egg funiculus);
15. 流产后的携卵刚毛及其上的携卵绒毛 (The ovigerous hair and ovigerous seta of abortion crab);
16. 流产胚胎及卵柄上的寄生物, 小箭头所示为寄生物 (The structure of loss embryo surface and the epibionts of egg stalk, some epibionts are shown by small arrows);
17. 流产胚胎光滑的卵柄及部分寄生物 (Showing the smooth egg stalk and some epibionts of loss embryo);
18. 流产胚胎疏松的卵柄表面无毛状物, 小箭头所示为寄生物 (The loose egg stalk of loss embryo and its surface without villiform, some epibionts are shown by small arrows)。

3 讨 论

3.1 中华绒螯蟹胚胎附着特点

中华绒螯蟹的成熟卵表面光滑密布微孔, 质膜外具有较厚的卵膜。受精后, 卵表面出现很多颗粒, 可能是由皮层颗粒的运动引起 (Yang et al, 1996; Du et al, 1995)。受精卵排出体外后不久, 雌蟹孵化室中出现由母体腹肢分泌而来的粘性物质, 携卵绒毛不断摆动将粘液涂在胚胎的表面, 使胚胎具有粘性, 在受重力和胚胎旋转的影响进而逐渐拉引成为一条扭转的卵柄。这与 Yang et al (1996) 对日本沼虾的研究结果一致。Saigusa et al (2002) 对红螯相手蟹 (*Sesarma haematocheir*) 的胚胎附着系统进行研究, 也发现了这一现象, 但认为雌蟹孵化室中的液体并不一定是母体腹肢粘液腺分泌的粘液。Du et al (1995) 对中华绒螯蟹成熟卵形态和超微结构的研究发现, 携卵绒毛贯穿于卵膜的外、中及内层之间, 形成卵柄。在滨蟹属 (*Carcinus*) (Cheung, 1966; Goudeau & Lachaise, 1983) 海蛎蛄属 (*Homarus*) 等 (Goudeau et al, 1987; Talbot & Harper, 1984) 的一些种中都发现了这种形成方式。但这只能解释一卵一绒毛现象。本实验发现, 中华绒螯蟹除一卵一绒毛外, 大多数是多个卵附着在同一根携卵绒毛上 (图 6、12), 卵产出后卵膜膨胀, 然后缠绕在携卵绒毛上形成卵柄, 而不是以穿刺的方式形成。

3.2 中华绒螯蟹胚胎流产的原因

中华绒螯蟹的受精卵在产出后往往不能完全附着在携卵绒毛上, Goudeau et al (1987) 和 Yang et al (1996) 分别在研究海蛎蛄属的种类和日本沼虾时

也发现了这种现象。他们认为, 流产的一个重要原因是卵柄的不规则形成, 卵柄薄且短造成。Du et al (1995) 认为中华绒螯蟹的卵膜为初级卵膜, 与腹肢的粘液腺分泌无关; 而 Yang & Zhou (2000) 认为中华绒螯蟹粘液腺的活动和胚胎的附着有相当密切的关系。我们曾用组织学和电镜观察了不同发育阶段的中华绒螯蟹雌体腹肢, 发现腹肢上确实存在粘液腺, 并且粘液腺量的多少和有无粘液腺导管在不同发育阶段都有所不同, 抱卵阶段母体腹肢的粘液腺及分泌量最丰富 (Ying et al, 2004a)。本研究对抱卵蟹腹肢的扫描电镜观察也发现, 携卵刚毛上确有许多粘液, 产卵后孵化室中的粘液在不断增加, 当卵柄初步形成后又减少直至消失。因而, 胚胎流产的可能原因是: 在形成卵柄的过程中粘液腺分泌的粘液量不足, 不能形成正常的卵柄; 腹肢的摆动所形成的拉力过大; 不能承受卵本身的重量。此外, 正常胚胎的卵柄上还具有很多毛状物, 而流产胚胎的卵柄上并无此结构。至于毛状物的结构及来源目前尚不清楚, 可能有利于胚胎的附着, 但有待于进一步研究。

引起中华绒螯蟹胚胎流产的外因较多, 但水温与体表寄生物可能是造成胚胎流产的主要外在因素。Zhao et al (1993) 研究不同水温对中华绒螯蟹胚胎发育的影响时发现, 水温达到 26 °C 时, 胚胎发育不正常, 易出现畸胎; 同时胚胎尚未完成发育, 雌蟹常已死亡。作者在对刚抱卵不久的雌蟹进行实验时发现, 当水温缓慢升到 22 °C 时, 已有部分胚胎流产; 22 °C 恒温 3 ~ 5 d 后, 抱卵蟹腹部的胚胎已基本脱落。水温升高可能会引起粘液腺化学成分、胚胎营养成分改变, 以致胚胎病变, 故易使

胚胎流产 (Ying et al, 2004c)。

中华绒螯蟹正常发育的胚胎, 其卵柄和卵索能使胚胎与胚胎相互撑开, 使每一个胚胎与水环境有一个最大的接触面, 既有利于胚胎呼吸作用的顺利进行, 又减少了胚胎之间的机械磨损。经寄生物感染后的胚胎, 胚胎之间的卵索或卵柄结构已发生变化, 导致胚胎常堆积在一起; 胚胎表面大量的寄生物直接导致胚胎之间的磨损度加大, 使胚胎呼吸困难, 最终导致胚胎脱落, 甚至全部流产。这一点和 Talbot & Zao (1991) 对美洲海螯蛄 (*Homarus americanus*) 流产原因的分析相同。此外, 美洲海

螯蛄在产卵的 20~30 min 内, 如果受到干扰, 将会严重影响粘液腺的分泌活动, 直接导致胚胎流产 (Talbot & Harper, 1984)。因此, 水温、寄生物、人为干扰及养殖环境等均会影响中华绒螯蟹胚胎流产。

致谢: 承蒙浙江大学生命科学学院杨万喜教授的指导与审阅; 扫描电镜样品制备得到浙江大学分析测试中心电镜室洪健主任及黎军英老师等的鼎力支持和帮助, 一并谨致谢意!

参考文献:

- Aiken DE, Waddy SL. 1982. Cement gland development, ovary maturation and reproductive cycles in the American lobster *Homarus americanus* [J]. *J. Crust. Biol.*, **2** (3): 315–327.
- Cheung TS. 1966. The development of egg-membranes and egg attachment in the shore crab, *Carcinus maenas*, and some related decapods [J]. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **46**: 373–400.
- Du NS, Lai W, Nan CR, Jiang HW. 1995. The morphology and ultra-structure of the mature egg of *Eriocheir sinensis* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, **41** (3): 229–234. [堵南山, 赖伟, 南春容, 姜焕伟. 1995. 中华绒螯蟹成熟卵形态和超微结构的研究. 动物学报, **41** (3): 229–234.]
- Fisher WS, Clark WH Jr. 1983. Eggs of *Palaemon macrrodactylus*: I. Attachment to the pleopods and formation of the outer investment coat [J]. *Biol. Bull.*, **164**: 189–200.
- Goudeau M, Lachaise F. 1983. Structure of the egg funiculus and deposition of embryonic envelopes in a crab [J]. *Tissue Cell*, **15** (1): 47–62.
- Goudeau M, Talbot P, Harper R. 1987. Mechanism of egg attachment stalk formation in the lobster, *Homarus* [J]. *Gamete Res.*, **18** (4): 279–289.
- Harper RE, Talbot P. 1984. Analysis of the epibiotic bacteria of lobster (*Homarus*) eggs and their influence on the loss of eggs from the pleopods [J]. *Aquaculture*, **36**: 9–26.
- Kang XJ, Li SJ, Wang GZ, Chen JM. 2000. Studies on the egg membrane variation and egg attachment in *Scylla serrata* [J]. *Journal of Fisheries of China*, **24** (6): 500–503. [康现江, 李少菁, 王桂忠, 陈景民. 2000. 锯缘青蟹卵膜变化与卵子附着研究. 水产学报, **24** (6): 500–503.]
- Saigusa M. 1994. A substance inducing the loss of premature embryos from ovigerous crabs [J]. *Boil. Bull.*, **186** (1): 81–89.
- Saigusa M, Terajima M, Yamamoto M. 2002. Structure, formation, mechanical properties, and disposal of the embryo attachment system of an estuarine crab, *Sesarma haematocheir* [J]. *Biol. Bull.*, **203**: 289–306.
- Talbot P, Harper R. 1984. Abnormal egg stalk morphology is correlated with clutch attrition in laboratory: Maintained lobsters (*Homarus*) [J]. *Biol. Bull.*, **166**: 349–356.
- Talbot P, Zao P. 1991. Secretion at molting by the pleopod tegumental glands of the lobster *Homarus americanus* (Milne Edwards) [J]. *Journal of Crustacean Biology*, **11** (1): 1–9.
- Xue JZ, Wu HX. 2004. The mechanisms and correlated morphological character of the egg attachment of the swimming crab *Portunus trituberculatus* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, **50** (5): 873–879. [薛俊增, 吴惠仙. 2004. 三疣梭子蟹卵附着机制及相关形态学特征. 动物学报, **50** (5): 873–879.]
- Yang WX, Du NS, Lai W. 1996. Studies on the mechanism of egg attachment of *Macrobrachium nipponense*: I. The scanning electron microscopy study on egg attachment [J]. *Journal of Hebei University*, **16** (3): 34–40. [杨万喜, 堵南山, 赖伟. 1996. 日本沼虾卵子附着机制研究——I. 卵膜和卵子附着的扫描电镜观察. 河北大学学报 (自然科学版), **16** (3): 34–40.]
- Yang WX, Zhou H. 2000. Primary study on the histology of exoskeleton of female pleopod in *Eriocheir sinensis* [J]. *Donghai Marine Science*, **18** (3): 30–33. [杨万喜, 周宏. 2000. 中华绒螯蟹雌体附肢外骨骼组织学初步研究. 东海海洋, **18** (3): 30–33.]
- Ying XP, Yang WX, Xu J, Lin FF, Santos A. 2004a. Histological changes and cement gland characters of female pleopod of *Eriocheir sinensis* in different physiological stages [J]. *Zool. Res.*, **25** (3): 256–262. [应雪萍, 杨万喜, 许捷, 林芳芳, Santos A. 2004a. 中华绒螯蟹不同生理阶段腹肢的结构变化及粘液腺的发育特征. 动物学研究, **25** (3): 256–262.]
- Ying XP, Zhang YP, Yang WX. 2004b. A comparative study on the fatty acids composition in *Eriocheir sinensis* during the stages of maturation, spawning and abortion [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, **35** (2): 141–148. [应雪萍, 张永普, 杨万喜. 2004b. 中华绒螯蟹成熟蟹、抱卵蟹、流产蟹肝胰腺脂肪酸组成的比较研究. 海洋与湖泊, **35** (2): 141–148.]
- Ying XP, Luo YY, Zhang YP. 2004c. A comparative study on the composition of amino acid and fatty acid in fertilized eggs and lost eggs of *Eriocheir sinensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, **28** (4): 48–54. [应雪萍, 罗媛媛, 张永普. 2004c. 中华绒螯蟹受精卵、氨基酸及脂肪酸组成的比较研究. 水生生物学报, **28** (4): 48–54.]
- Yonge CM. 1937. The nature and significance of the membranes surrounding the developing eggs of *Homarus vulgaris* and other Decapoda [J]. *Proc. Zool. Soc. Lond.*, **107**: 499–517.
- Zhao YL, Du NS, Lai W. 1993. Effects of different gradient temperature on embryonic development of the Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Zool. Res.*, **14** (1): 49–53. [赵云龙, 堵南山, 赖伟. 1993. 不同水温对中华绒螯蟹胚胎发育的影响. 动物学研究, **14** (1): 49–53.]