

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

应雪萍^{1,*}, 杨万喜², 许捷¹, 林芳芳¹, Antonina dos SANTOS³

(1. 温州师范学院 生命与环境科学学院, 浙江 温州 325027; 2. 浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310012;

3. Instituto de Investigacao das Pescas e do Mar, 1400 Lisboa, Portugal)

摘要: 用显微及亚显微方法研究了中华绒螯蟹雌体不同生理阶段(幼蟹、未成熟蟹、成熟蟹、抱卵蟹和流产蟹)腹肢的体壁结构变化和粘液腺发育特征。体壁的上皮细胞层常与粘液腺相连,粘液腺分泌物经导管穿过各层角质膜排出。不同生理状况下中华绒螯蟹的腹肢体壁各角质膜层结构的比例及致密度有明显的差异,粘液腺细胞及导管的数量不同,粘液腺与上皮细胞的连接程度也不同。粘液腺是否正常分泌、刚毛囊的开闭均与中华绒螯蟹的胚胎附着有关。比较研究发现,太湖抱卵蟹腹肢体腔内腺体比温州本地抱卵蟹腹肢内腺体发达,分泌的粘液也特别多。分析认为中华绒螯蟹腹肢组织结构、粘液腺的发育和分泌状况与胚胎流产有密切的关系。

关键词: 中华绒螯蟹; 腹肢体壁; 生理状态; 组织学; 流产蟹

中图分类号: Q959.223 文献标识码: A 文章编号: 0254-5853(2004)03-0256-07

Histological Changes and Cement Gland Characters of Female Pleopod of *Eriocheir sinensis* in Different Physiological Stages

YING Xue-ping¹, YANG Wan-xi², XU Jie¹, LIN Fang-fang¹, Antonina dos SANTOS³

(1. School of Biological and Environmental Science, Wenzhou Normal College, Wenzhou 325027 China;

2. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China;

3. Instituto de Investigacao das Pescas e do Mar, 1400 Lisboa, Portugal)

Abstract: The tegument and exoskeleton structure and the cement glands activities of female pleopod in different physiological stages of *Eriocheir sinensis* were investigated by histological method. The results show that the pleopod tegument consists of epicuticle, exocuticle, endocuticle and epithelial cells. The epithelial cells often connect firmly to cement gland. Cement gland tubules come across the exoskeleton. In different physiological stages (youth, maturation, spawning, and abortion), the pleopods of Taihu spawning crab and Wenzhou local crab have some significant differences, which mainly shows in the ratio and the array of epicuticle, exocuticle, endocuticle and epithelial cells, the amount and the distribution of the setae pockets, the substance in the setae pockets and the cement glands secretion aperture. Also, the cement glands activities and the open gates of the setae pockets are related to the egg attachment. The histological structure of pleopod between Taihu spawning crab and Wenzhou spawning crab is different, which the cement glands and mucus of Taihu spawning crab are much higher than those of Wenzhou spawning crab. The analysis shows that the abortion of *Eriocheir sinensis* closely relate to the histological structure of pleopod, and the development and activity of cement gland.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Tegument of pleopod; Physiological stage; Histology; Abortion crab

收稿日期: 2003-12-22; 接受日期: 2004-02-25

基金项目: 中国-葡萄牙政府间国际合作项目(2001-2003)(A18); 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)

* E-mail: xpying2000@163.net

甲壳动物体壁自内而外分为基膜、上皮细胞层和角质层 3 层。大多数十足目甲壳动物的雌体都由腹肢抱卵，受精卵（胚胎）依靠卵索（funiculus）或者卵柄（egg stalk）附着在腹肢的刚毛上，直至孵化（Du, 1993; Cheung, 1966; Dall, 1965; Fisher & Clark, 1983; Goudeau & Lachaise, 1983）。甲壳动物的外骨骼与粘液腺的发育有着明显的相关性，外骨骼发育异常，可直接影响粘液的分泌，从而影响受精卵的附着以及后续的胚胎发育（Yang et al, 1996）。但迄今为止，学者们对卵索或卵柄的生理来源一直争论不休。目前主要有两种观点：一是认为卵膜与卵柄的形成和粘液腺毫无关系，卵柄与卵索是由成熟卵母细胞的两层卵黄膜拓展形成，通过雌蟹腹肢有力的反复拍击，使两层卵黄膜的结构发生变化，并进行拓展，卵黄膜内的物质将携卵刚毛包裹起来，使胚胎附着在携卵刚毛上。粘液腺的作用仅为受精卵提供合适的外部环境（Cheung, 1966; Goudeau & Lachaise, 1980, 1983; Goudeau et al, 1987; Talbot & Zao, 1991; Saigusa et al, 2002）。另一观点认为，一些甲壳动物腹肢的粘液腺分泌物能部分或全部形成卵柄（Aiken & Waddy, 1982; Fisher & Clark, 1983; Saigusa, 1994, 1995; Johnson & Talbot, 1987; Yang et al, 1996）。国内关于虾蟹流产机理的研究起步较晚，仅 Yang (2001)、Yang & Zhou (2000) 和 Yang et al (1996) 初步观察和研究了日本沼虾（*Macrobrachium nipponense*）卵子附着及中华绒螯蟹（*Eriocheir sinensis*）雌体腹肢的外骨骼结构；Chen & Wang (1992) 曾报道了中国对虾（*Penaeus chinensis*）的皮肤以及外骨骼结构。

中华绒螯蟹是我国仅有的淡水养殖蟹类，在育苗生产中，经常出现流产现象。Yang & Zhou (2000) 发现中华绒螯蟹雌体腹肢外骨骼存在大量粘液腺分泌管，产卵时，粘液腺分泌粘液，并通过刚毛的活动涂布到胚胎表面，形成所有抱卵蟹特有的外被。为进一步弄清中华绒螯蟹流产的生理机制，阐明粘液腺在卵子附着过程中的作用，作者对不同生理阶段的中华绒螯蟹雌体腹肢的体壁结构、粘液腺的分布与卵子附着的关系做了系统研究，旨在揭示粘液腺的分泌与流产间的关系。

1 材料与方 法

1.1 动 物

实验所用中华绒螯蟹取自浙江省温州乐清清江养殖场和温州乐清南塘养殖场。于 2001 年 6 月至 2003 年 5 月先后从乐清清江养殖场购得不同生理阶段的温州本地蟹各 10 只；并于 2002 年 1 月从清江养殖场购买 50 只已交配的雌蟹，带回实验室。置于装有新鲜海水（缓慢升温并恒温至 18℃）的玻璃缸中（55 cm × 50 cm × 40 cm），饲喂新鲜的缢蛏，24 h 充氧养殖 6 d 后，雌蟹腹部均已抱卵，然后改变养殖环境促使亲蟹流产，取流产蟹。太湖抱卵蟹（亲蟹来自江苏）于 2002 年 1 月购自温州乐清南塘养殖场。

1.2 方 法

1.2.1 显微观察样品的处理 取太湖抱卵蟹、温州本地流产蟹及温州本地不同生理阶段雌蟹的腹肢，剪成 1~2 mm 的小段，Bouin 氏液固定，常规石蜡切片，H.E 染色，Olympus 显微镜下观察与拍照。

1.2.2 扫描电镜样品的处理 取抱卵蟹附有胚胎的内肢，并切成小段，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 扫描电镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 体壁结构

经 H.E 染色，观察到中华绒螯蟹雌体腹肢体壁自内而外分为 2 层，即上皮细胞层和角质层。在腹肢的不同部位，上皮细胞层分别与粘液腺、结缔组织以及肌肉层相连（图 1—2）。角质层即外骨骼，它自外向内又分为 3 层：上角质（上表皮）、外角质（外表皮）和内角质（内表皮）。内角质又可分为外层和内层 2 个亚层（图 2）。有大量管状结构贯穿外骨骼，是粘液腺向外分泌的通道，有类似瓣膜状结构（图 3）。低倍镜下，在腹肢内腔可见肌肉束与粘液腺及其分泌物相伴而生（图 1），高倍镜下，外骨骼与粘液腺结构明显，粘液腺所分泌的泡状粘液占有腹肢内腔的大部分空间，使其他结构难以完全体现。

2.1.1 上角质 较薄的一层，H.E 染色着色较深，为紫红色匀质结构。由于固定、切片等原因，上角质常与外角质剥离，造成外角质暴露（图 1, 4）。上角质凹陷处为刚毛囊，有刚毛着生其内，囊内含有大量基质（图 5）。

2.1.2 外角膜 最厚的一层,含有甲壳质,染色较浅,为淡红色,有分泌导管贯穿其间(图3)。腹肢横切面图显示,外角膜有分层现象,在腹肢的不同侧面厚薄不一(图2)。

2.1.3 内角膜 厚度与上角膜相似,此层在不同生理阶段的雌蟹腹肢中差异较大,经H.E染色后内角膜分为深浅不同的2层,外层排列比较紧密,染色比外角膜深,为红色,这一点与外角膜有明显差异(图2—3);内层排列疏松,与上皮细胞层的生理特性相适应。

2.1.4 上皮细胞层 上皮细胞层为体壁的最内层,细胞排列紧密,中华绒螯蟹雌体腹肢的粘液腺与上皮细胞层紧密相连(图6)。

2.2 不同生理阶段雌体腹肢的组织学结构

2.2.1 幼蟹 腹肢外骨骼各层结构较薄,腹肢横切面的长轴端具上角膜下陷而成的刚毛囊,未见分泌管道。腺细胞数量极少(图4)。

2.2.2 未成熟蟹 腹肢外骨骼各层明显增厚,结构完整致密,刚毛囊数量较少。上皮细胞层内具一薄层粘液腺细胞,分泌管道已形成,但数量少(图2)。

2.2.3 成熟蟹 腹肢外骨骼的上角膜与未成熟蟹区别不大,但外角膜与内角膜的结构比未成熟蟹疏松(图6),分泌管道有所增加,且分泌管继续向外侧延伸(图7)。腺体分泌活动增强,外骨骼内可见大量的分泌细胞及分泌物。成熟蟹同一腹肢内肢(携卵肢)管腔中的粘液腺细胞数及分泌的粘液比外肢(非携卵肢)管腔中多(图6,7)。

2.2.4 抱卵蟹 腹肢外骨骼的内角膜排列更松散,出现更多的刚毛囊和分泌管道,管内充满腺体所分泌的粘液。管腔内的腺细胞仍然很多,但腔内的粘液有所减少(图8)。扫描电镜显示,抱卵蟹的内肢表面具大量白色的粘液和刚毛囊,且具大量的携卵刚毛(图13),胚胎以卵柄附着在携卵刚毛上(图14)。

2.2.5 太湖抱卵蟹 太湖抱卵蟹腹肢外骨骼横切面最明显的特点是结构排列松散,粘液腺细胞及分泌的粘液特别多,但同一腹肢的内肢管腔中粘液的量更多(图9)。粘液腺分泌管道大多数直接开口于体外(图10)。

2.2.6 流产蟹 流产蟹腹肢外骨骼结构完整,且排列较紧密。腔内腺体分泌活动仍未减弱,腺细胞及分泌的粘液已和外骨骼的上皮细胞层分离,出现间隔(图11—12),但管腔内的肌肉与腹肢体壁的

上皮细胞层结合仍然较紧密(图1)。

中华绒螯蟹不同生理阶段雌体腹肢体壁的结构组成基本相同,但随着个体的生长发育,各角膜层有逐渐增厚的趋势,且排列的紧密程度、粘液腺细胞数目的多少等也有所不同(表1)。

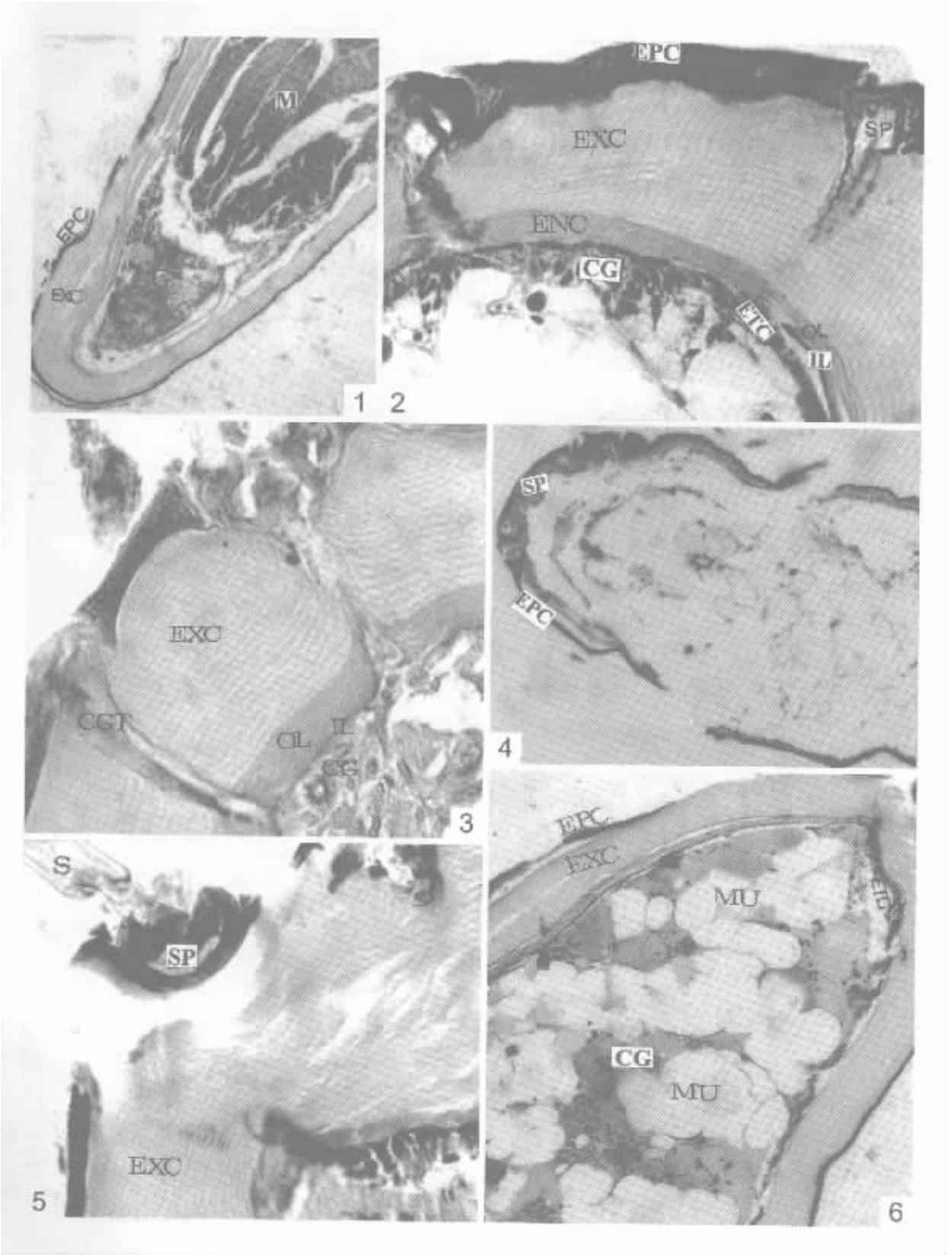
3 讨论

中华绒螯蟹雌体腹肢体壁由角膜层(上角膜、外角膜、内角膜)和上皮细胞层组成。上皮细胞层内有粘液腺分布,粘液腺分泌物经分泌管涂布在上角膜层上,这与Yang & Zhou(2000)的研究结果一致。但中华绒螯蟹雌体腹肢体壁的结构、粘液腺导管多少、粘液腺数目及分泌量的多少等在不同生理阶段及同一腹肢的携卵肢与非携卵肢上均有差异,这些结构的变化最终与受精卵(胚胎)的附着有关。

3.1 幼蟹、未成熟蟹、成熟蟹及抱卵蟹腹肢形态结构的变化

中华绒螯蟹幼蟹腹肢外骨骼薄,有刚毛囊下陷于外角膜上,其性腺已开始发育,粘液腺的活动亦开始渐趋活跃,但未见粘液的分泌,也未见形成粘液腺分泌导管。当个体的发育逐渐成熟,腹肢外骨骼明显加厚,刚毛囊和分泌管道的数量逐渐增多,外骨骼内的腺体分泌活动增强。成熟蟹的生殖腺发育完全,并进入生殖旺季,其雌体腹肢外骨骼内的腺细胞以及分泌的粘液大量增多。随着中华绒螯蟹个体的发育与成熟,粘液腺的生理活动也发生变化,其数量与分泌的粘液在不断地增加,并且通过分泌导管输送到腹肢表面,为受精卵(胚胎)附着奠定基础。当雌体进入抱卵阶段,其外骨骼上出现大量分泌管道和刚毛囊,腺体内的分泌细胞清晰可见,粘液腺分泌的粘液能顺利通过分泌管到达腹肢的携卵刚毛;扫描电镜也发现内肢刚毛囊及携卵刚毛上都分布有白色分泌物,产卵时通过刚毛的频繁活动覆盖于胚胎表面,形成卵柄以及卵索,使受精卵(胚胎)附着于刚毛上。这与日本沼虾(Yang et al, 1996)、巨指长臂虾 *Palaemon macrodactylus* (Fisher & Clark, 1983)、美国龙虾 *Homarus americanus* (Aiken & Waddy, 1982) 以及红螯相手蟹 *Sesarma haematocheir* (Saigusa, 1994) 处于抱卵时期粘液腺的分泌活动一致。

3.2 温州本地抱卵蟹、太湖抱卵蟹、流产蟹腹肢的形态结构与功能



CG: 粘液腺 (Cement gland); CGT: 粘液腺导管 (Duct of cement gland); ENC: 内角膜 (内角质层) (Endocuticle); EPC: 上角膜 (上角质层) (Epicuticle); ETC: 上皮细胞层 (Epithelial cell layer); EXC: 外角膜 (外角质层) (Exocuticle); IL: 内角质层内层 (Inner endocuticle); M: 肌肉 (Muscle); MU: 粘液 (Mucus); OL: 内角质层外层 (Outer endocuticle); S: 刚毛 (Seta); SP: 刚毛囊 (Seta pore)

1. 流产蟹第二腹肢原肢横切面 (Transverse of the second protopodit of abortion crab) $\times 4$
2. 未成熟蟹第二腹肢内肢, 示体壁 (The second endopodit of unmaturing crab, showing the structure of exoskeleton) $\times 40$
3. 成熟蟹第二腹肢内肢, 示体壁及分泌导管 (The second endopodit of mature crab, showing the structure of exoskeleton and secretory duct) $\times 40$
4. 幼蟹第二腹肢内肢 (The second endopodit of larval crab) $\times 10$
5. 成熟蟹第二腹肢内肢, 示刚毛 (The second endopodit of mature crab, showing the seta) $\times 40$
6. 成熟蟹第二腹肢内肢, 示腺体 (The second endopodit of mature crab, showing the cement gland) $\times 10$
7. 成熟蟹第二腹肢外肢 (The second exopodit of mature crab) $\times 10$
8. 抱卵蟹第二腹肢内肢 (The second endopodit of spawning crab) $\times 40$
9. 太湖抱卵蟹第二腹肢内肢, 示腺体 (The second endopodit of Taihu spawning crab, showing the cement gland) $\times 4$
10. 太湖抱卵蟹第二腹肢内肢, 示分泌管 (The second endopodit of Taihu spawning crab, showing the secretory duct) $\times 10$
11. 流产蟹第二腹肢内肢 (The second endopodit of abortion crab) $\times 10$
12. 流产蟹第二腹肢原肢 (The second protopodit of abortion crab) $\times 10$

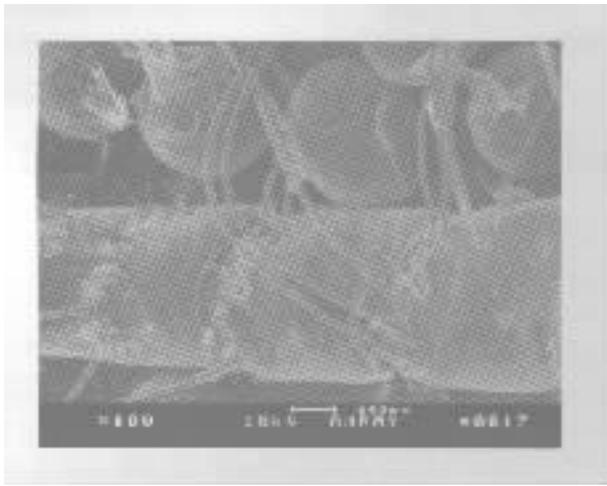


图 13 中华绒螯蟹抱卵蟹第二腹肢内肢扫描图

Fig.13 The ovigerous seta of second pleopod in spawning crabs of *Eriocheir sinensis*

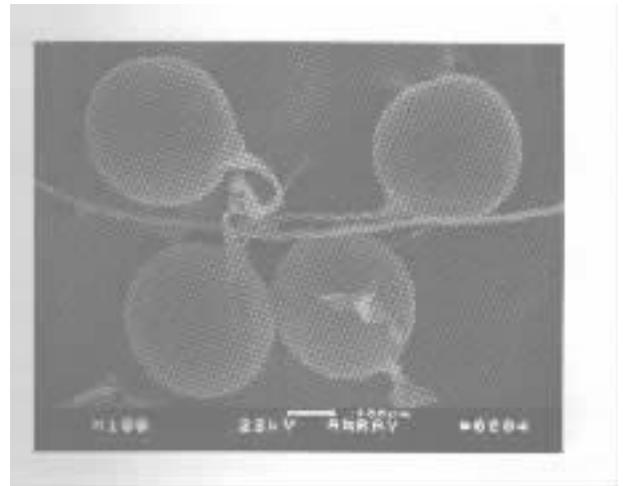


图 14 示中华绒螯蟹抱卵蟹的胚胎以卵柄附着在产卵刚毛上

Fig.14 Egg attachments of the seta by funiculus in spawning crabs of *Eriocheir sinensis*

表 1 中华绒螯蟹不同生理阶段雌体腹肢体壁结构比较

Table 1 A comparison of female pleopod of *Eriocheir sinensis* in different physiological stages

	幼蟹 Larval crab	未成熟蟹 Unmature crab	成熟蟹 Mature crab	抱卵蟹 Spawning crab	太湖抱卵蟹 Taihu spawning crab	流产蟹 Abortion crab
外骨骼 Exoskeleton	薄, 具刚毛囊, 无分泌管	厚, 且结构完整, 刚毛囊少, 分泌管已形成	外角膜及内角膜结构较松散, 分泌管增多	内角膜分层更松散, 分泌管和刚毛囊更多	内、外角膜结构分层特别松散, 刚毛囊及分泌管特别多	结构完整且紧密, 具分泌管
上皮细胞层 Epithelial cell layer	极薄	明显可见	明显可见	较难区分	难以区分	较难区分
附属腺体 Gland	数量极少, 紧贴上皮细胞	腺细胞紧贴上皮细胞排成一薄层	腺细胞与分泌的粘液明显增多	腺细胞多, 但粘液有所减少	腺细胞及粘液特别多	腺细胞及粘液多, 但与外骨骼分离

温州本地抱卵蟹和太湖抱卵蟹的腹肢横切面结构差异较大, 温州本地抱卵蟹外骨骼的上角膜、外

角膜及内角膜排列紧密, 太湖抱卵蟹外骨骼的各层结构排列不紧密, 分层现象明显。太湖抱卵蟹外骨

骼内的粘液腺比温州本地抱卵蟹的粘液腺发达,分泌管道也比温州本地抱卵蟹多,从组织结构上分析有利于粘液腺所分泌的粘液顺利通过外骨骼到达腹肢表面,及时为受精卵(胚胎)附着在携卵刚毛上提供所需的物质,故太湖蟹的育苗率高于温州本地蟹。其生理学原因,尚需作进一步研究。

流产蟹腹肢结构中粘液腺也很发达,分泌的粘液仍然很多,但粘液腺与上皮细胞层分离,出现一层很大的间隔,这种结构阻断了粘液腺分泌的粘液输送到导管。分泌物只能积聚在外骨骼包围的体腔中,不能到达外骨骼表面的携卵刚毛上,从而不能顺利地形成卵索和卵柄,造成胚胎大量流产。这进一步说明中华绒螯蟹腹肢粘液腺的正常分泌与否、能否顺利到达腹肢的携卵刚毛等与胚胎的附着有关。这一结论支持了 Aiken & Waddy (1982)、Fisher & Clark (1983)、Yang et al (1996) 的观点。但导致流产个体粘液腺与上皮细胞层分离的生理原因

有待于进一步研究。

3.3 抱卵雌蟹腹肢粘液腺与受精卵的关系

作者对不同生理阶段的中华绒螯蟹腹肢组织学比较研究发现,不同生理阶段的雌体腹肢外骨骼排列的疏松程度、粘液腺分泌粘液量的多少、导管的数目以及能否正常运送到腹肢的携卵刚毛上等均不相同。故认为中华绒螯蟹雌体腹肢存在粘液腺并且该类腺体通过导管开口于腹肢外表面,粘液腺的活动与胚胎的附着有相当密切的关系。这与 Aiken & Waddy (1982)、Fisher & Clark (1983)、Saigusa (1994)、Yang et al (1996) 等认为十足目甲壳动物腹肢粘液腺分泌物能部分或全部形成卵柄的观点相一致。但十足目不同甲壳动物其胚胎附着系统是否存在一定的差异,或是由于不同的作者所用的方法与视觉有别,以致观察的结果有所差异。这些问题有待于进一步的系统研究。

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. Crustac. Biol.*, **2**: 315-327.
- Chen KZ, Wang SH. 1992. The histology of epidermis and exoskeleton of *Penaeus chinensis* [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, **22**(3): 35-42. [陈宽智, 王淑红. 1992. 中国对虾 *Penaeus chinensis* (O'Sbeck) 皮肤与外骨骼的组织. 青岛海洋大学学报, **22**(3): 35-42.]
- 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.
- Dall W. 1965. Studies on the physiology of a shrimp, *Metapenaeus* sp. (Crustacea, Decapod, Penaeidea): Composition and structure of the integument [J]. *Aust. Mat. Freshw. Res.*, **16**: 13-22.
- Du NS. 1993. Crustaceans [M]. Beijing: Science Press. [堵南山. 1993. 甲壳动物学. 北京: 科学出版社.]
- Fisher WS, Clark WH Jr. 1983. Eggs of *Palaemon macrodactylus*: I. Attachment of the pleopods and formation of the outer investment coat [J]. *Biol. Bull.*, **164**: 189-200.
- Goudeau M, Lachaise F. 1980. Fine structure and secretion of the capsule enclosing the embryo in a crab (*Carcinus maenas*) [J]. *Tissue Cell*, **12**: 287-308.
- 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): 279-89.
- Johnson B, Talbot P. 1987. Ultrastructural analysis of the pleopod tegumental glands in male and female lobsters, *Homarus americanus* [J]. *Journal of Crustacean Biology*, **7**(2): 288-301.
- Saigusa M. 1994. A substance inducing the loss of premature embryos from ovigerous crabs [J]. *Boil. Bull.*, **186**(1): 81-89.
- Saigusa M. 1995. Bioassay and preliminary characterization of ovigerous-hair stripping substance (OHSS) in hatch water of crab larvae [J]. *Biol. Bull.*, **189**: 175-184.
- 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, 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.
- Yang WX. 2001. The effects of epibionts on egg attachment of *Macrobrachium nipponense* [J]. *Fisheries Science*, **20**(1): 5-7. [杨万喜. 2001. 日本沼虾体表寄生物对卵子附着的影响. 水产科学, **20**(1): 5-7.]
- 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.]
- 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 (Natural Science)*, **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.]