

中华绒螯蟹卵黄发生的超微结构研究

邱高峰

(上海水产大学渔业学院, 200090)

陶铜静

(华东师范大学生物学系, 上海 200062)

提 要 对中华绒螯蟹卵母细胞卵黄发生全过程进行了电镜观察,结果表明:卵黄发生前期的卵母细胞为小生长期初级卵母细胞,细胞质嗜碱性,无卵黄颗粒,与卵原细胞相比,内质网等细胞组分数量明显增多;卵黄发生期的卵母细胞为大生长期初级卵母细胞,细胞质中出现脂滴和大量卵黄颗粒,高尔基复合体、内质网、核糖体和溶酶体等细胞器均参与卵黄合成,细胞核呈生发泡状,细胞表面形成微绒毛,卵周隙中出现致密颗粒物质,但未被卵母细胞吸收;卵黄发生后期的卵母细胞体积增至最大,细胞器数量减少,滤泡层变薄,但卵周隙间的物质传递活动旺盛,卵母细胞以胞饮方式吸收滤泡细胞提供的营养。

关键词 中华绒螯蟹,卵母细胞,卵黄发生,超微结构

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹和大闸蟹等,历来是人们喜爱的名特优水产珍品,其人工繁殖的成功,摆脱了天然蟹苗资源供应不足的困境,结束了我国有史以来蟹苗只捞不育的历史,从而有力地推动了养蟹业的迅猛发展。但是在目前的蟹苗培育过程中,存在着一些急需解决的问题,其中如何提高苗种的成活率是当前最主要的问题之一。过去一些学者着重研究了外部环境因子(如温度、盐度和水质等)对中华绒螯蟹胚胎发育、幼体发育以及成活率的影响[许步劭等,1987、1992;周仲利,1989;赵云龙等,1993],而对其卵子本身内在因素的探讨却较为不足。众所周知,苗种的成活率不仅与环境因子有关,而且还取决于卵子本身质量的优劣,在某种意义上,可能后者比前者起着更为重要的作用。

卵黄物质的合成与积累是卵子发生过程中的一个重要环节,它直接关系到卵子成熟度和质量优劣,是子一代成活率的决定因素之一。早在60年代,Beams等[1962]应用电镜技术证实了螯虾(*Cambarus virilis*)卵黄发生与昆虫不同,可以依靠卵母细胞自身合成卵黄物质。但至今为止,已被研究过的十足类种类为数不多[Beams等,1963;Byard,1976;Kessel,1968]。国内仅见长毛对虾(*Penaeus penicillatus*)卵子发生过程的报道[洪水根等,1988;洪水根,1992],薛鲁征等[1987]在光镜水平上研究了中华绒螯蟹雌性生殖系统的组织学。本文应用电镜技术对中华绒螯蟹卵黄发生的全过程进行了较详细的观察研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中华绒螯蟹购自上海市十六铺水产农贸集市,依雌体卵巢发育周期[薛鲁征等,1987]适时取材。

1.2 样品制备

迅速解剖取出卵巢,切成小块,电镜样品用 Bouin 氏液固定,各级浓度酒精上行脱水,水杨酸甲酯透明,常规石蜡包埋,切片厚 $4-6\mu\text{m}$,Delafield 氏苏木精、伊红对比染色,Olympus 显微镜下观察;透射电镜样品用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定(两者固定液均用 0.1mol/L ,pH 7.2磷酸缓冲液配制),Epon812包埋,瑞典 LKB-2088超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,JEM-100CXII 透射电镜观察。

2 结果

2.1 卵黄发生前期

这一时期卵母细胞生长速率慢,细胞体积变化不大,为小生长期初级卵母细胞。细胞大多呈多边形,表面光滑,外被一层滤泡细胞(图版 I-1),细胞质嗜碱性强,能被碱性染料苏木精所染,但尚未出现卵黄颗粒。与卵原细胞(图版 I-3)相比,细胞器数量明显增多,内质网扁平囊状,平行排列,表面附着核糖体,囊腔逐渐膨大,开始向囊泡状演变(图版 I-4),线粒体多为球状,高尔基体数量相对较少,细胞核为椭圆形,核仁致密,1-2个,起初位于核中央(图版 I-1),后来移至核周边,近核膜处(图版 I-4),核内染色质呈絮状或颗粒状,沿核膜内侧分布。

2.2 卵黄发生期

与卵黄发生前期卵母细胞相比,此期细胞生长迅猛,体积聚增,为大生长期初级卵母细胞。细胞卵圆形(图版 I-2),表面形成微绒毛,卵周隙小,含有少量电子密度高的致密颗粒物质(图版 II-11),滤泡层厚,滤泡细胞内的膜系统不发达,内质网和高尔基复合体等胞器少,核大,为长椭圆形(图版 I-11)。此期卵母细胞最大的特点是其细胞质中出现了脂滴和大量卵黄颗粒(图版 I-2,6;图版 II-7,9),胞内卵黄物质合成活动旺盛,各细胞组分发生了一系列深刻变化,但尚未开始吸收卵周隙中的营养。具体描述如下:

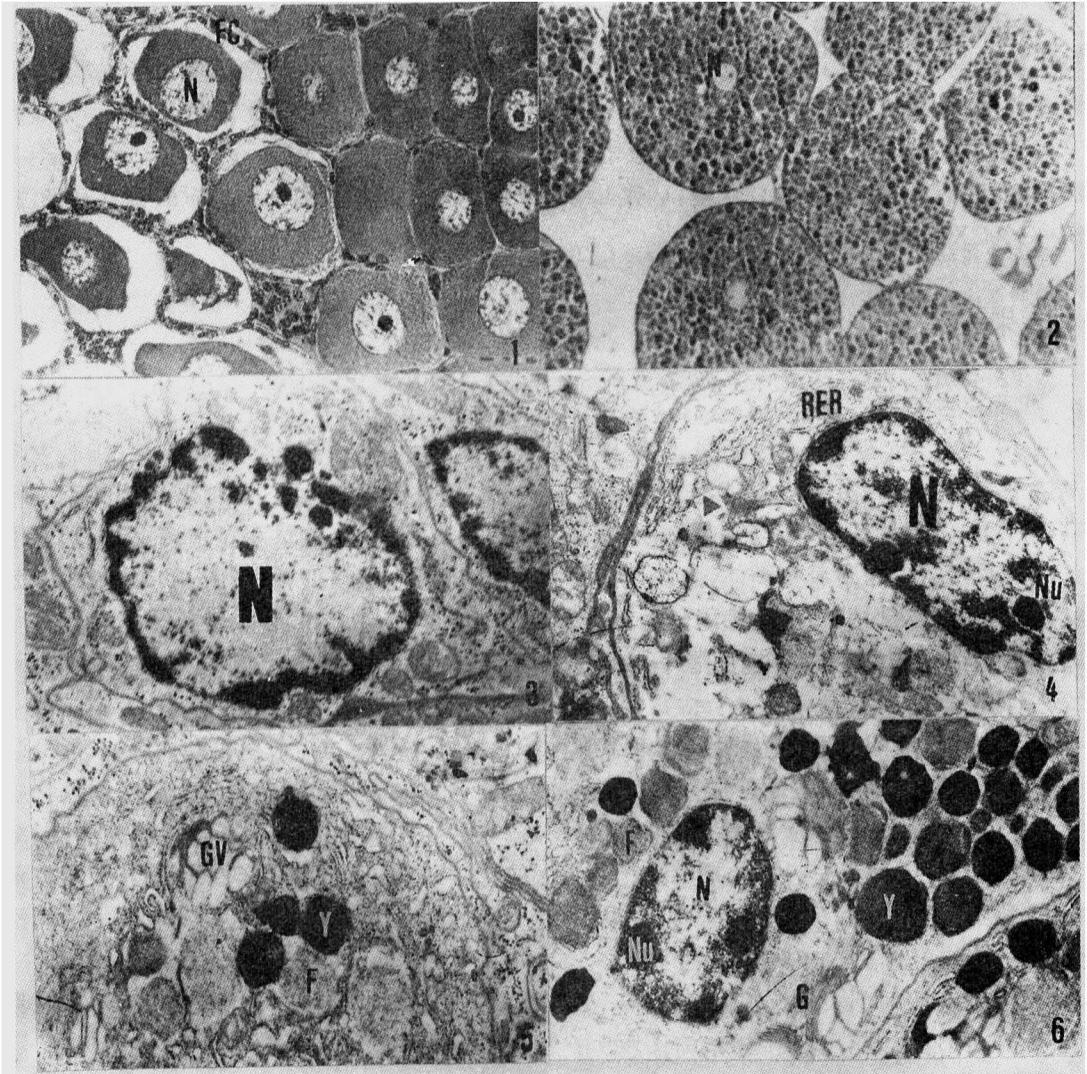
(1)细胞核。膨大形成生发泡,核膜由二层单位膜组成,核仁泡状化,由致密变得疏松,数量为1-3个,沿核周边排列(图版 I-6;图版 II-7),核内物质均一透明,并有穿过核膜现象,说明核质之间物质交换频繁。

(2)高尔基复合体。由扁平囊相互重叠而成,囊的两端略弯曲,凹面为形成面,囊腔中充满电子密度高的物质。高尔基复合体是卵黄物质合成活动开始最早的细胞器,主要分布在细胞核周围,其形成面不断向外产生许多潴泡,潴泡内含有絮状卵黄前体物质,其电子密度逐渐加深,最终演变为卵黄体(均见图版 I-5,6)。

(3)内质网。经历了由扁平囊状向囊泡状转变的过程,在未能转变为囊泡状之前其合成活动并不旺盛,在扁平或管状的囊腔中未见有蛋白质类等电子密度高的物质存在(图版 I-4),内质网演变为形状不一的内质网囊泡后,数量急剧增加,遍及整个细胞质(图版 II-7,9)晶体

样卵黄蛋白质(电子密度高)从囊泡四周向中央沉集逐渐形成卵黄颗粒(图版Ⅱ-7,9,11),这些卵黄颗粒之间相互融合形成更大的卵黄体(图版Ⅱ-9)。

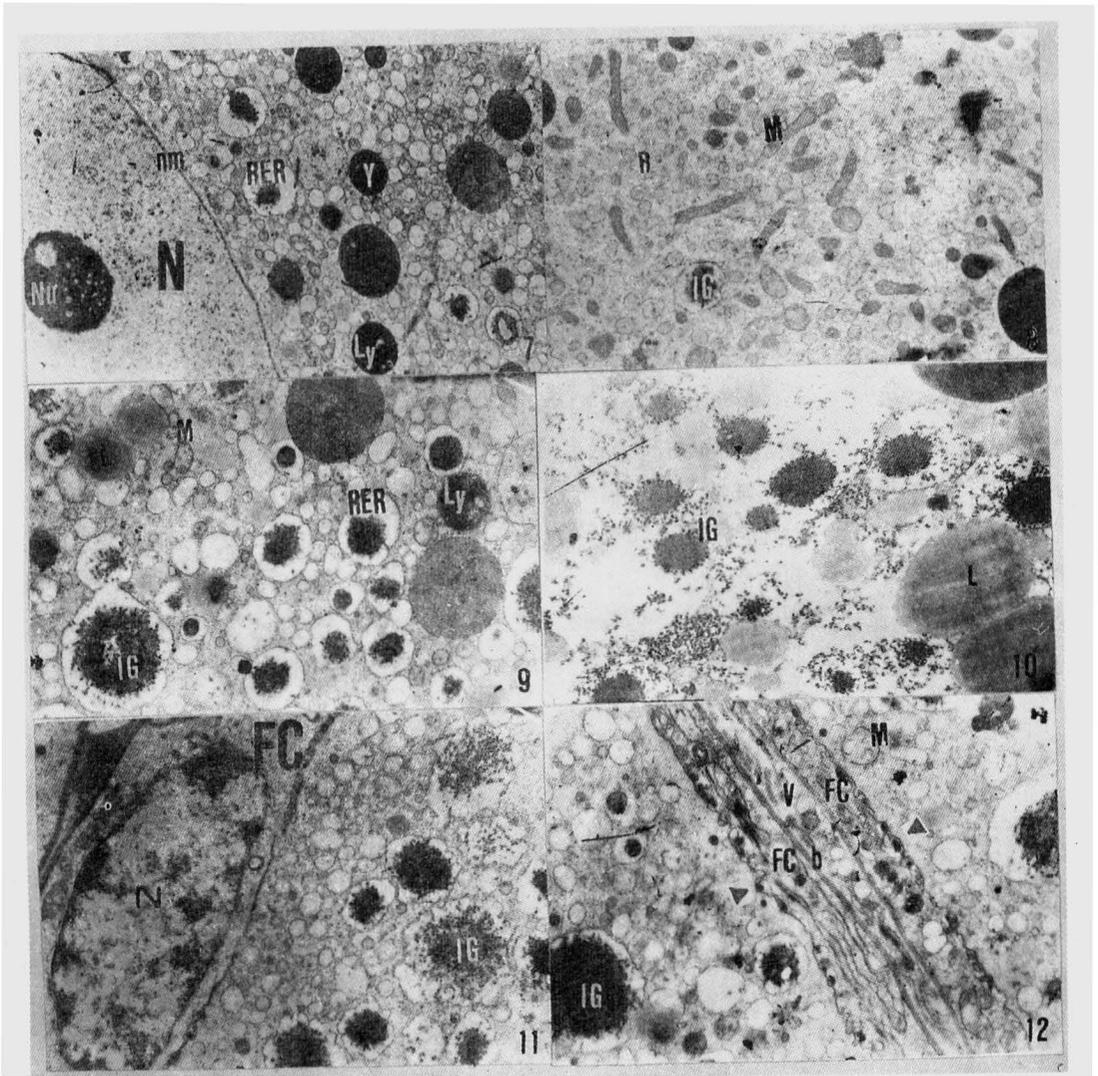
(4)核糖体。除了粗面内质网上附有核糖体外,细胞质中也富含游离核糖体(图版Ⅱ-8),由它们合成的卵黄蛋白颗粒的形状与内质网囊泡中合成卵黄蛋白颗粒的形状相类似;均为晶体状,起初这些蛋白颗粒在细胞质中呈游离状态,随后相互聚集形成卵黄颗粒(图版Ⅱ-10)。



图版 I Plate I

1. 卵黄发生前期卵母细胞(光镜照片, $\times 400$); 2. 卵黄发生期卵母细胞, 出现许多卵黄颗粒(光镜照片, $\times 400$);
3. 卵原细胞($\times 8000$); 4. 卵黄发生前期卵母细胞, 箭头示扁平囊状内质网向囊泡状内质网演变($\times 6700$); 5, 6. 卵黄发生期卵母细胞, 示高尔基体潴泡内含絮状物质及卵黄粒形成($\times 8000, \times 10000$)。

F: 絮状物质; G: 高尔基复合体; GV: 潴泡; N: 细胞核; Nu: 核仁; Y: 卵黄颗粒; RER: 粗面内质网; FC: 滤泡层。



图版 I Plate I

7, 8, 9. 卵黄发生期卵母细胞, 示内质网囊泡与溶酶体内卵黄粒形成过程($\times 4000, \times 6700, \times 6700$); 10. 卵黄发生期卵母细胞, 示游离核糖体合成的晶状物质相互聚集形成卵黄颗粒($\times 6700$); 11. 卵黄发生期卵母细胞与滤泡细胞($\times 6700$); 12. 卵黄发生后期卵母细胞与滤泡层($\times 8000$), 箭头示卵周隙中致密颗粒与微胞饮。

FC: 滤泡细胞; IG: 卵黄蛋白颗粒; L: 脂滴; M: 线粒体; LY: 溶酶体; R: 核糖体; RER: 内质网囊泡; Y: 卵黄颗粒; N: 细胞核; nm: 核膜; Nu: 核仁; b: 基膜; V: 血管。

(5) 溶酶体。球状, 由单层膜包被, 在其内可见被吞噬的其它细胞组分, 呈髓样结构 (图版 I - 7, 9), 故易于与高尔基体潴泡和内质网囊泡相互鉴别。这种髓样结构的电子密度随成熟度逐渐加深, 最终亦可转变为卵黄颗粒。

(6) 线粒体。球状或棒状, 常伴随于内质网囊泡附近或集群于质膜下 (图版 I - 8), 其数量的多, 基质电子密度加深, 可能是蛋白质化的结果。

2.3 卵黄发生后期

卵母细胞体积更大,细胞内合成活动减弱,细胞器数量减少,滤泡层变得很薄,滤泡细胞外侧的基部为一层厚的基膜,基膜外出现血管和血窦,与卵黄发生期相比,卵周隙大,其中充满了致密颗粒物质,卵母细胞表成为微绒毛数量增多,卵周隙间的物质传递活动异常活跃,卵母细胞以微胞饮方式吸收滤泡细胞提供的营养(均见图版 I-12),参与卵黄形成。

3 讨论与结语

3.1 卵黄发生过程

中华绒螯蟹卵母细胞中卵黄发生全过程经历了卵黄发生前期、卵黄发生期和卵黄发生后三个阶段。卵黄发生前期的卵母细胞为小生长期的卵母细胞,细胞表面光滑,细胞质中尚未产生卵黄颗粒,但细胞质嗜碱性强,说明合成卵黄前体物质的 RNA 大量存在[薛鲁征等,1987],同时细胞质中的细胞器数量也明显增加,从而为卵黄的合成在物质上和结构上均做了充分的准备;卵黄发生期的卵母细胞为大生长期卵母细胞,高尔基复合体和内质网等细胞器的合成活动旺盛,胞质中出现了脂滴和卵黄颗粒,使卵母细胞体积骤增,尽管此期卵母细胞表面已形成微绒毛,但未开始吸收外源的营养物质,卵黄物质主要依靠卵母细胞本身合成,直至卵黄发生后期,卵母细胞才以微胞饮作用的方式从卵周隙中吸收由滤泡细胞提供的营养物质。有的学者把卵母细胞依靠自身合成卵黄的过程称为初级卵黄发生,而把由胞饮作用形成卵黄的过程称为次级卵黄发生[陈 侠,1990]。

3.2 卵黄物质的来源

六十年代以来,关于甲壳类卵黄物质的来源问题存在两种不同观点,一种观点认为卵黄物质的发生是内源的,即卵黄物质主要依靠卵母细胞本身内部的内质网等细胞器合成[Ganion等,1972;Kessel,1968;Lui等,1974];另一种则认为甲壳类卵黄物质的发生与陆生昆虫相似,是外源性的,即主要依靠微胞饮作用吸收外来的卵黄物质或卵黄前体物质[Hinsch等,1969]。目前绝大多数人认为甲壳类卵黄发生是双源性的,即外源性发生和内源性发生两者兼有[Eurenus,1973;Komm等,1987],本研究结果进一步验证了这一观点。但是外源性的卵黄物质或卵黄前体物质是在什么器官合成的呢?Kerr[1968]认为是血淋巴中的血细胞。Zerbib[1973]以免疫化学的方法从一种端足类(*Orchestia gammarellus*)的血淋巴中鉴定出一种雌性特异蛋白,随后用辣根过氧化物酶法示踪证实这种雌性特异蛋白能被卵母细胞吸收[Zerbib,1977]。在十足类中,Wolin等[1973]和Byard[1976]分别从尖头蟹(*Libinia emarginata*)和美洲龙虾(*Homarus americanus*)的血淋巴中也分离出雌性特异蛋白,但以上这些工作并不能证明雌性特异蛋白就是由血细胞合成的,因为血淋巴可能仅仅起着运送这种特异蛋白的作用,Croisille等[1980],认为外源卵黄的合成场所在皮下脂肪组织,而Fyffe等[1974]认为是在肝胰腺,他们各自都有免疫学方面的证据,可能是不同种类的动物中存在种的特异性。中华绒螯蟹的卵巢发育与肝胰腺的重量有密切关系,在性成熟前(黄蟹阶段),肝胰腺的重量是卵巢重量的二十多倍,而随着卵巢的发育成熟,到绿蟹阶段,卵巢的重量反而比肝胰腺超出好几倍,这是否意味着肝胰腺合成的卵黄物质运送到卵巢的结果?本研究尚不能确定,需作免疫化学等方面的工作进一步确定。

3.3 细胞器在卵黄物质合成过程中的作用

中华绒螯蟹卵母细胞内的卵黄发生过程中,内质网、高尔基复合体、游离核糖体和溶酶体等细胞器均参与了卵黄形成。过去一般认为高尔基复合体并不直接合成卵黄物质[Beams等,1963],而仅仅起着浓缩包装的作用[Komm等,1987],洪水根[1992]则发现高尔基液泡是长毛对虾(*Penaeus penicillatus*)卵黄物质合成的主要细胞组分,本文进一步证实了高尔基复合体可以直接参与卵黄发生,而且其合成卵黄物质的活动开始最早,后期数量却很少。在高尔基复合体合成活动开始时,内质网仍为管状或扁平囊状,管腔或囊腔中未见有合成的物质存在(图版 I-5),只有在内质网由囊状变为囊泡后,合成活动才开始(图版 II-7,9),可见高尔基复合体液泡内的絮状物质决非由管状或囊状内质网提供的,而是自身形成的。线粒体作为一种供能细胞器,常伴随内质网囊泡周围出现,供给卵黄物质合成所需能量,同时线粒体基质电子密度加深,可能是蛋白质化的结果。

本文第二作者现在上海四药股份有限公司工作。电镜制样过程中得到华东师范大学电镜中心徐俊美、季玲妹等同志协助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 许步劭等,1987.河蟹养殖技术,66—69.金盾出版社(京)。
- [2] ——,1992.中华绒螯蟹土池育苗几个技术问题的讨论,Ⅰ 钙离子对河蟹幼体培育成活率的影响.甲壳动物学论文集(第三辑),100—103,青岛海洋大学出版社。
- [3] 陈 隼,1990.甲壳动物卵发生过程的物质合成和贮存.甲壳动物学论文集(第二辑),73—78.科学出版社(京)。
- [4] 周仲利,1989.不同温度条件下河蟹胚胎发育观察.淡水渔业,(3):8—10。
- [5] 赵云龙等,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。
- [6] 洪水根,1992.长毛对虾卵子发生的研究,Ⅱ 卵黄发生过程.海洋与湖沼,23(3):280—284。
- [7] 洪水根等,1988.长毛对虾卵子发生的研究,Ⅰ 卵子发生过程.海洋与湖沼,19(4):301—306。
- [8] 薛鲁征等,1987.中华绒螯蟹雌性生殖系统的组织学研究.华东师范大学学报(自然科学版),(3):88—97。
- [9] Beams, H. W. *et al.*, 1962. Intracisternal granules of the endoplasmic reticulum in the crayfish oocytes. *J. Cell Biol.*, 13:158—162.
- [10] ——,1963. Electron microscope studies on developing crayfish oocytes with special reference to the origin of yolk. *Ibid.*, 18:621—644.
- [11] Byard, E. H., 1976. The female specific protein and reproduction in the lobster, *Homarus americanus*. Ph. D. Thesis. University of Western Ontario, London Ontario, 107pp.
- [12] Croisille, Y. *et al.*, 1980. Recherche du lieu de synthese de la vitellogenine chez le crustace amphipode *Orchestia gammarella* (Pallas). Demonstration a l'aide l'anticorps spécifiques, de la presence de vitellogenine dans le tissu adipeux sous-epidermique des femelles en vitellogenese secondaire. *C. R. Acad. Sci.* (Paris), 290:1487—1490.
- [13] Eurenus, L., 1973. An electron microscopy study on the developing oocytes of the crab *Cancer pagurus* L. with special reference to yolk formation (Crustacea). *Z. Morphol. Tiere.*, 75:243—254.
- [14] Fyffe, W. E. *et al.*, 1974. Characterization and quantification of a crustacean lipovitellin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 47B:851—867.
- [15] Ganion, C. R. *et al.*, 1972. Intracellular synthesis, transport, and packaging of proteinaceous yolk in oocytes of *Orconectes immunis*. *J. Cell Biol.*, 52:420—437.
- [16] Hinsch, G. W. *et al.*, 1969. Ultrastructural observations of observations of vitellogenesis in the spider crab, *Libinia emarginata* L. *Ibid.*, 40:336—342.
- [17] Kerr, M. S., 1968. Protein synthesis by hemocytes of *Callinectes sapidus*: A study of in vitro incorporation of ^{14}C -leucine. *Ibid.*, 39:72—73 (Abstract)

- [18] Kessel, R. G., 1968. Mechanisms of protein yolk synthesis and deposition in crustacean oocytes. *Z. Zellforsch. mikrosk., Anat.*, **89**:17-38.
- [19] Komm, B. S. *et al.*, 1987. Oogenesis in the terrestrial hermit crab, *Coenobita clypeatus* (Decapoda, Anomura): II. Vitellogenesis. *J. Morph.*, **192**:269-277.
- [20] Lui, C. W. *et al.*, 1974. Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary. *J. Exp. Zool.*, **188**:289-296.
- [21] Wollin, E. M. *et al.*, 1973. Uptake of the yolk protein lipovitellin by developing crustacean oocytes. *Dev. Biol.*, **35**:160-170.
- [22] Zerbib, C., 1973. Contribution a l'etude ultrastructurale de l'ovocyte chez la Crustace Amphipode *Orchestia gammarella* Pallas. *C. R. Acad. Sci. (Paris) Ser. D. Nat. Sci.*, **277**:1209-1212.
- [23] ———, 1977. Endocytose ovocytaire chez le Crustace Amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas). Demonstration par la peroxydase. *Ibid.*, **284**:757-760.

ULTRASTRUCTURAL STUDIES ON THE VITELLOGENESIS IN THE CHINESE MITTEN-HANDED CRAB, *ERIOCHEIR SINENSIS* (CRUSTACEA, DECAPODA)

Qiu Gao-feng

(Fisheries College, SFU, 200090)

Tao Tong-jing

(Department of Biology, East China Normal University, Shanghai, 200062)

ABSTRACT The vitellogenesis of the oocytes from the Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis*, was examined by light and electron microscope. The results show that previtellogenic oocytes belong to primary oocytes in a slow development. Each oocyte is surrounded by a layer of follicle cells. The surface of the oolemma show no specializations and is smooth. The ooplasm, containing no yolk granules, possesses the basophilic property. The numbers of the organelles such as endoplasmic reticulum are much greater than in the oogonium. One to two condensed nucleolus are present in the nucleus. The vitellogenic oocytes grow fast and their volume increase significantly. Lipid vesicles and numerous yolk granules appear throughout the ooplasm. The endoplasmic reticulum, Golgi complex, ribosomes and lysosomes are involved in the formation of yolk granules. The nucleus become germinal vesicle in which one to three descondensed nucleolus are seen. The surface of oocytes form a few microvilli that project into perivitelline space in which electron-dense material are present, but not absorbed by the oocytes. The postvitellogenic oocytes contain a fewer numbers of the organelles. The intra-oocytic synthesis are modified. The layer of follicle cells become very thin. The perivitelline space fills with electron-dense material that are ingested by the oocytes by pinocytosis.

KEYWORDS *Eriocheir sinensis*, Chinese mitten-handed crab, oocyte, vitellogenesis, ultrastructure