

文章编号: 1004-7271(2009)01-0028-07

中华绒螯蟹初次排卵后卵巢发育的组织学初步研究

徐佳念, 蔡生力, 肖美南, 刘红

(上海海洋大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 201306)

摘要: 中华绒螯蟹初次排卵后, 卵巢中的卵母细胞基本处于初级卵母细胞的大生长期, 整个卵巢的性腺指数仍然高达 10% 左右。此后, 随着时间的推移, 卵巢的发育呈现两种趋势: 一种卵巢继续处于成熟状态而进一步发育, 7 d 左右卵巢中的卵母细胞几乎全都到达大生长期的中后期, 即即将完全成熟前的卵母细胞, 此时的性腺指数相比前期有所下降; 而另一类卵巢到第 7 天时可以观察到卵母细胞的萎缩退化现象。继续发育的卵巢性腺指数缓慢上升, 到第 15 天时卵巢发育再次呈现退化与继续发育两种趋势。

关键词: 中华绒螯蟹; 初次排卵后; 卵巢发育; 组织学

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

Preliminary histological studies on the post spawn development of ovary in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*

XU Jianian, CAI Shengli, XIAO Meinan, LIU Hong

(The Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquaculture Ecology Certified by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: From the day when the female Chinese mitten crabs *Eriocheir sinensis* spawned, the crabs were cultured in lab and sampled for histological observation of the ovary every two days. Actually, before the spawning, the postspawn development of the ovary in the crabs has begun. During the period from the ovulation until the spawning, most of the oocytes of the Chinese mitten crab have developed to the oocyte I major growth stage. The mean gonadosomatic index (GSI) was about 10%. After the spawning, the ovaries in some crabs were keeping developing, in the other crabs, the ovaries degenerated. On the 7th day post spawn, the regression was significant not only from the ovarian appearance but also from the histological observation in some crabs. In the other crabs, almost all the oocytes reached the metaphase or the postphase of the oocyte I major growth stage that meant the oocytes were near mature. The GSI decreased. From the 8th day to the 15th day, the GSI increased slowly and the oocyte developed further. On the 15th day, the mature ovaries and the degenerated ovaries were observed again.

Key words: *Eriocheir sinensis*; post spawn; ovarian development; histology

收稿日期: 2008-06-10

基金项目: 上海市教育委员会重点学科建设项目 (海洋生物学 50701)

作者简介: 徐佳念 (1983-), 女, 江西九江人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物的繁殖与发育生物学。Email: jrxu@hmail.com

通讯作者: 刘红, Email: hliu@shou.edu.cn

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

中华绒螯蟹 (*Erpcheir sinensis*), 俗称河蟹, 因其肉质鲜美, 一直深受我国人民的喜爱, 从上世纪八十年代以来一直是我国主要的淡水蟹类养殖品种, 具有极高的经济价值。对于中华绒螯蟹的研究, 一直以来多局限于养殖技术层面, 对其生物学相关基础的研究相对较少, 雌蟹初次排卵后卵巢的连续性组织学变化未见相关报道, 对雌蟹繁殖生物学方面的研究也不是太多。在上世纪 80 年代初, 人们仅根据外观特征对卵巢发育进行分期。到 1987 年才初次对中华绒螯蟹的雌性生殖系统进行了组织学观察 (薛鲁征等^[1]), 将卵巢发育时相分成五期。1997 年, 顾志敏等^[2] 补充了第一次成熟分裂中期相这一重要标志, 并提及孵后雌蟹卵巢能够重新发生。但对于中华绒螯蟹初次排卵后卵巢的发育未有进一步的描述, 本文希望通过中华绒螯蟹雌体初次排卵后的卵巢结构变化进行连续的观察, 确定中华绒螯蟹初次排卵后的卵巢有无实际利用价值, 同时补充了中华绒螯蟹雌性生殖系统的整个发育过程, 是对中华绒螯蟹繁殖生物学的进一步完善。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验选用初次排卵当日的中华绒螯蟹雌性亲蟹, 实验材料于 2007 年 4 月上旬取自江苏吕泗育苗基地, 亲蟹的平均壳宽为 (6.2 ± 0.3) cm, 平均重量为 (103 ± 11.4) g, 培养于 $60 \text{ cm} \times 80 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$ 的暂养箱中, 暂养箱底部铺有 10 cm 左右的细砂层, 水深 15 ~ 20 cm。每日早晚投喂鲜活的缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 各一次。实验期间每天去残饵, 换水一次, 换水量为 50% 左右, 水温控制在 (18 ± 2) °C 左右, 与亲蟹排卵前水温相似, pH (7.0 ± 0.2) 。

1.2 研究方法

从亲蟹排卵的当天开始, 连续培养 15 d, 每 2 天取 2 ~ 4 只亲蟹测量体重、壳宽, 然后解剖, 迅速取出卵巢和肝胰腺, 分别称重, 计算性腺指数 (性腺指数 = 卵巢重量 / 体重 $\times 100\%$), 肝胰腺指数 (肝胰腺指数 = 肝胰腺重量 / 体重 $\times 100\%$)。取部分卵巢组织固定在 Bouin 液中, 常规石蜡包埋, 切片, 切片厚度 $7 \mu\text{m}$; HE 染色; Olympus B-41 型显微镜观察拍照。

2 结果

2.1 初次排卵后卵巢的形态学观察

在初次排卵后的 15 d 内, 两种状态的卵巢从雌蟹外观上无明显差异, 解剖后肉眼可以直接观察到中华绒螯蟹的卵巢存在两种形态: 一种成熟饱满, 一种萎缩退化。前一种卵巢呈深咖啡色 (图版 I-1, 2), 分左右两叶, 体积大, 几乎充满整个体腔, 仔细观察可以进一步发现有较多游离状态卵粒, 成熟数系数在 7% ~ 10% 之间 (初次排卵后 0 ~ 13 d)。退化状态的卵巢, 可以在排卵后第 7 天开始观察到, 呈咖啡色 (图版 I-3, 4), 而排卵后第 15 天, 退化的卵巢呈肉色 (图版 I-5, 6), 形态仍为左右两叶, 中间由横桥连接; 萎缩退化的卵巢, 其性腺指数小于 1%。在中华绒螯蟹初次排卵后卵巢发育的观察过程中, 肝胰腺指数的变化与卵巢的发育时间及发育状态之间没有明显的依赖关系, 尤其是卵巢退化与否在肝胰腺指数上都没有相应的反映, 因此在肝胰腺指数的计算中就不再考虑卵巢退化这一影响因素。初次排卵后卵巢性腺指数及肝胰腺指数随时间的变化见图 1。从图 1 可以看出, 中华绒螯蟹初次排卵后的 5 d 之内, 卵巢的性腺指数仍然处于较高水平, 到第七天开始观察到有卵巢的萎缩退化现象, 未退化的卵巢其性腺指数也明显下降, 从第 7 天到第 15 天, 性

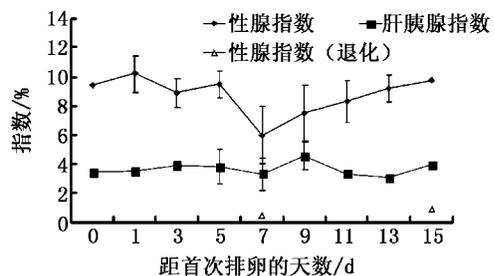


图 1 卵巢性腺指数及肝胰腺指数随时间的变化情况
Fig 1 The changes of gonadosomatic index (GSI) and hepatopancreatic index (HSI) after spawn in *Erpcheir sinensis*

腺指数呈上升趋势, 15 d时较多卵巢出现明显萎缩退化。退化卵巢其性腺指数均小于 1%。整个过程中肝胰腺指数变化不明显, 只是在第 15天的退化卵巢中肝胰腺指数反而高于其它时期。

2.2 初次排卵后卵巢的组织学观察

2.2.1 卵母细胞的分期

参考顾志敏等^[2]所描述的中华绒螯蟹卵子发生及成熟过程, 在本实验的切片观察中, 我们以细胞直径为主要指标, 可以观察到三个时期的卵母细胞: 初级卵母细胞小生长期细胞, 初级卵母细胞大生长期的细胞以及成熟的卵母细胞。初级卵母细胞大生长期的细胞又可以分为前期、中期、后期。

处于初级卵母细胞小生长期的卵母细胞 (S), 胞体呈卵圆形, 胞径为 $25 \sim 50 \mu\text{m}$ (39.4 ± 12.8) μm , 细胞强嗜碱性, 核大, 几乎占胞质的一半; 基本无卵黄的积累; 卵母细胞周围散布滤泡细胞, 滤泡细胞呈圆形。

处于初级卵母细胞大生长期前期的卵母细胞 (I₁), 胞体呈不规则形, 胞径 $54 \sim 122 \mu\text{m}$ (83.3 ± 18.9) μm , 细胞嗜碱性, 核大而居中, 胞核透明, 核径在 $30 \mu\text{m}$ 左右; 未见明显的卵黄积累; 滤泡细胞呈椭圆形散布在卵母细胞周围。

处于初级卵母细胞大生长期中期的卵母细胞 (I₂), 核仍居中, 核膜出现皱缩, 核径 $30 \mu\text{m}$; 胞体则继续增大达 $225 \sim 295 \mu\text{m}$ (274.0 ± 17.8) μm , 胞质由嗜碱性向嗜酸性转变, 卵黄颗粒明显, 充满整个胞体, 直径能达到 $16 \mu\text{m}$; 细胞边缘的卵黄颗粒多于细胞核附近, 细胞内卵黄积累不均匀, 有油滴出现; 由于卵黄颗粒的挤压核膜边缘变得皱曲; 滤泡细胞拉长呈梭型, 单个排列, 完全包裹住卵母细胞。

处于初级卵母细胞大生长期后期的卵母细胞 (I₃), 胞径 $300 \sim 375 \mu\text{m}$ (327.0 ± 19.5) μm ; 细胞核不再位于细胞中央, 核膜曲折模糊 (图版 2-4), 不易区分; 卵黄颗粒分布均匀, 直径 $18 \sim 20 \mu\text{m}$; 有油滴; 滤泡细胞继续拉长, 单个层状包围在细胞周围。

处于成熟期的卵母细胞 (M), 胞体略大于生长后期的卵母细胞, 胞径能达到 $380 \sim 436 \mu\text{m}$ (396.2 ± 20.5) μm ; 卵黄颗粒发达, 直径能达到 $30 \mu\text{m}$; 分布均匀, 有油滴。

除此之外, 本实验还观察到了退化阶段的卵母细胞, 胞径在 $55 \sim 310 \mu\text{m}$ (128.1 ± 30.9) μm 。与其相应发育时期的卵母细胞相比, 其形态相似但略小, 细胞膜出现了明显的褶皱, 周围伴有丰富的滤泡细胞。大生长期中后期或成熟期的卵母细胞退化后, 细胞内仍存在卵黄颗粒。

表 1 初次排卵后卵母细胞分期及特征

Tab 1 Characteristics of oocytes at different developmental stages after spawn in *E. sinensis*

卵母细胞所处发育期	卵母细胞大小 (μm)	卵母细胞形态特征
初级卵母细胞小生长期	25 ~ 50	强嗜碱性, 胞核透明, 基本无卵黄的积累, 周围有圆形滤泡细胞
初级卵母细胞大生长期前期	54 ~ 122	细胞嗜碱性, 核径在 $30 \mu\text{m}$ 左右, 胞核透明, 未见卵黄积累, 滤泡细胞以颗粒形式不均匀的分布在细胞边缘
初级卵母细胞大生长期中期	225 ~ 295	嗜酸性, 核膜变得皱曲, 卵黄颗粒明显, 直径能达到 $16 \mu\text{m}$; 充满整个胞体, 但颗粒分布不均匀, 有油滴出现, 滤泡细胞拉长呈梭型, 单个层状排列
初级卵母细胞大生长期后期	300 ~ 375	胞体继续增大, 核偏离中心位置, 核膜褶皱模糊, 卵黄颗粒分布均匀, 有油滴, 滤泡继续细胞拉长, 单个层状排列
成熟期	380 ~ 436	胞体体积最大, 卵黄颗粒发达, 直径能达到 $30 \mu\text{m}$
退化时期	55 ~ 310	细胞膜明显褶皱, 细胞外滤泡细胞丰富; 大生长期中后期或成熟细胞的卵母细胞退化后, 细胞内仍有卵黄颗粒

2.2.2 排卵后卵巢随时间的变化

中华绒螯蟹初次排卵当天 (排卵后第 0天) 的卵巢 (图版 II-1), 处于大生长期后期的卵母细胞达到 95%以上, 在细胞中占主导地位, 卵母细胞呈强嗜酸性; 组织外缘能观察到处于成熟期的卵母细胞, 约占细胞总数的 4%左右 (图版 II-2); 同时也观察到少量处于初级卵母细胞大生长期前期的卵母细胞 (约占 1%)。

排卵后第 1 天至第 5 天的卵巢内处于大生长后期的细胞仍占主导地位, 占到细胞总数的 90% 左右; 大生长期前期的细胞有逐渐增多的趋势 (约占 5%) (图版 II -3); 同时也观察到了处于大生长中期的卵母细胞 (约占 5% 左右)。

排卵后第 7 天, 中华绒螯蟹卵巢的发育出现两种不同的分化: 一种是继续前面 1 至 5 天的发育趋势继续发育, 另一种则出现了卵巢退化。继续发育的卵巢主要由处于大生长后期的细胞组成, 发育状况与排卵后 5 天的卵巢发育类似; 退化的卵巢中有少量残存尚未被吸收完毕的退化卵子, 以及一批处于大生长期前期的卵母细胞及大量的滤泡细胞 (图版 II -5), 只是这些处于大生长前期的卵母细胞, 其细胞膜褶皱, 排列较分散 (图版 II -6)。

排卵后第 9 至 13 天, 卵巢内的卵母细胞主要处于大生长中期和后期。中期的卵母细胞数量由原先所占的 5% 左右增加到 20% 到 30% (图版 II -7); 而后期的卵母细胞相对较少, 占到总数量的 70% 左右。

排卵后第 15 天, 卵巢再次出现了两种分化, 未退化的卵巢中处于大生长中后期的细胞仍占主导地位; 退化的卵巢则由处于小生长期、大生长期前期的卵母细胞, 以及大量的滤泡细胞共同组成 (图版 II -8)。没有观察到处于退化阶段的大生长中后期的细胞, 退化程度较第 7 天更为明显。

表 2 初次排卵后卵巢随时间变化特征

Tab 2 Changes of the ovary after spawn in *E. sinensis*

距初次排卵时间 (d)	卵巢外部形态特征	卵巢内部形态特征
0	充满甲壳, 呈咖啡色	少量 L ₁ 期细胞, L ₃ 期细胞占主导地位, 有成熟的卵母细胞, 卵黄颗粒直径最大能达到 30 μm
1—5	饱满, 咖啡色	L ₁ 期细胞增多, L ₃ 期占主导, 卵黄颗粒直径在 16 ± 2 μm, 颗粒充满整个细胞, 核膜变得褶皱
7	未退化: 咖啡色, 饱满; 退化: 深肉色, 线状	未退化的卵巢: L ₃ 期卵母细胞占主导地位 退化卵巢: 由少量残存尚未被吸收完毕的退化卵子及一批处于 L ₁ 的卵母细胞共同组成, 滤泡细胞丰富
9—13	较饱满; 咖啡色	偶见处于 L ₁ 期的细胞, L ₂ 期的卵母细胞逐渐增多, L ₂ 及 L ₃ 期的细胞一起占到主导地位,
15	未退化: 咖啡色 退化: 乳白色线状	未退化的卵巢: L ₂ 及 L ₃ 期占主导地位 退化的卵巢: 可以观察到 L ₁ 及 S 期卵母细胞, 滤泡细胞极为发达

注: S—小生长期的卵母细胞; L₁—大生长期前期; L₂—大生长期中期; L₃—大生长期后期的卵母细胞; M—成熟的卵母细胞

3 讨论

3.1 初次排卵前后卵巢发育的比较

本实验还与同期未抱卵的中华绒螯蟹进行了比较, 发现中华绒螯蟹的卵巢在排卵前及排卵后不久, 两者形态相似, 同为深咖啡色, 几乎充满头胸甲, 但排卵后的卵巢外形有些松散; 从组织学观察发现, 中华绒螯蟹排卵后的卵巢中尽管同样存在着很多处于大生长后期的卵母细胞, 但与抱卵前的卵巢相比, 则显得排列较为松散, 细胞形状更为不规则^[3]。抱卵前的中华绒螯蟹卵巢中的第 2、3 批的卵子分布较为集中, 有明显的分布区域, 而排卵后的中华绒螯蟹的卵巢中的第 3 批卵子只是零星的分布在 L₃ 期的细胞之间, 没有明显的分布区域。滤泡细胞在卵巢排卵前后没有明显的变化, 只是在初次排卵后的卵巢发育中, 随着卵巢退化的加剧, 滤泡细胞的数量也呈现出明显增多的趋势。到了退化后期, 卵巢中存在着大量的滤泡细胞。这有可能是中华绒螯蟹储存能量的一种方式, 通过滤泡细胞将原先蕴涵于卵母细胞里的能量转换到滤泡细胞之中, 供卵巢的重新发育使用或者是转换成其他形式的能量^[4]。

表 3 排卵前后卵巢特征的比较

Tab 3 Comparisons of ovaries between pre-ovulation and post-spawn

	排卵前	排卵后
外形	深咖啡色, 充满胸腔甲, 排列紧密	深咖啡色, 充满胸腔甲, 排列较松散
卵母细胞发育阶段	大生长中后期及成熟期, 细胞排列紧密	大生长中后期, 细胞排列较为松散
分区情况	不同发育阶段的卵母细胞有明显分布区域和中心	发育早期的卵母细胞零星夹杂于大生长中后期的卵母细胞中间
滤泡细胞	细胞层状排列于细胞周围	退化的卵巢中, 滤泡细胞明显增多

在退化的细胞中, 也观察到了处于大生长期的初级卵母细胞核仁突出核膜的现象 (图版 2-5), Beam 等^[5]曾观察到核仁迁移到细胞质的现象, 薛鲁征等^[1]在实验中也多次观察到核仁突出核膜的现象, 有这种现象存在, 就说明存在卵黄积累, 因为卵黄的积累需要大量 RNA 及核糖体的参与。由此可以进一步推论: 在我们的实验中, 在中华绒螯蟹初次排卵后卵巢的发育过程中, 存在卵黄的积累现象, 即使卵巢处于退化状态, 这一现象仍然不能排除。

另外在观察中还发现, 中华绒螯蟹的卵巢模式发育及卵母细胞形态与三疣梭子蟹极为相似, 而后者在卵巢发育状态与卵母细胞发育阶段的区分上主要依据卵黄发生及卵黄颗粒的形态^[6], 将卵母细胞分为卵原细胞、卵黄合成前的卵母细胞、内源性卵黄合成期的卵母细胞、外源性卵黄合成期的卵母细胞、近成熟的卵母细胞及成熟期卵母细胞, 这种分类方式更为直观简洁, 也许未来可以作为中华绒螯蟹的参考。

3.2 中华绒螯蟹初次排卵后卵巢的发育

从我们的观察中发现, 中华绒螯蟹在初次排卵之后, 整个卵巢仍然处于发育相当成熟的阶段, 性腺指数可以高达 10% 左右。不仅排卵当天性腺指数极高 (9.5%), 而且还存在成熟的卵母细胞。在观察期间, 中华绒螯蟹初次排卵后卵巢的发育基本有两种趋势: 一是继续发育至二次排卵, 二是萎缩退化。退化现象分别在第七天和第十五天出现。

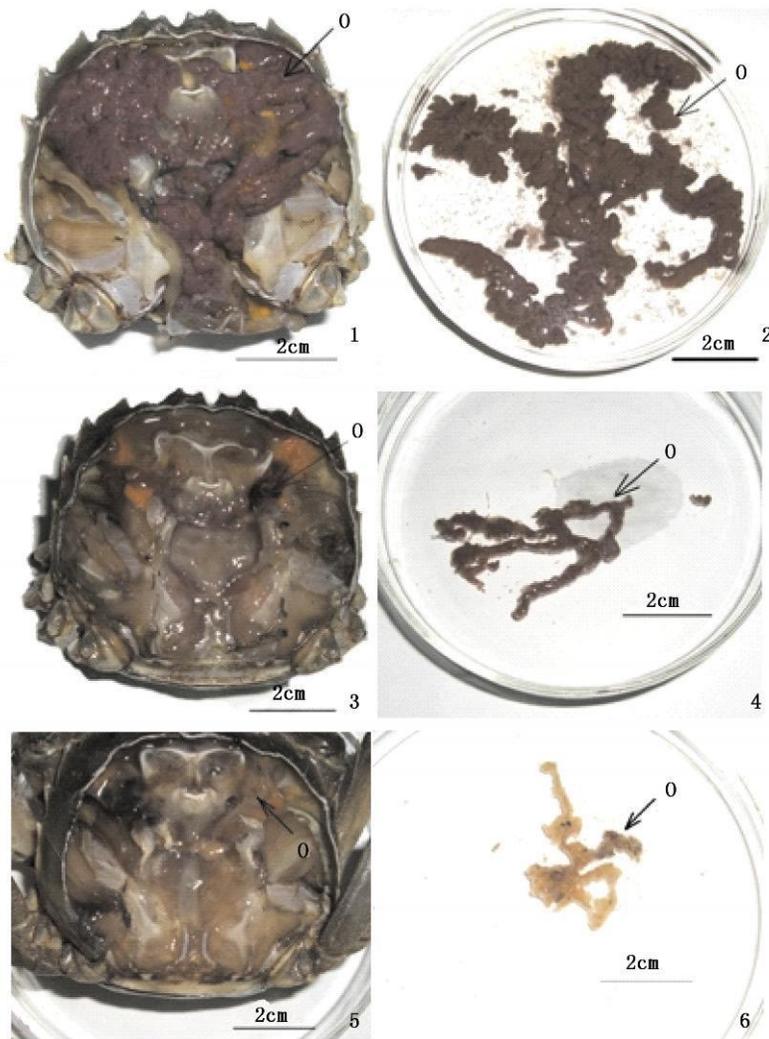
继续发育的卵巢, 卵母细胞中绝大多数是在大生长后期, 处于大生长中期的卵母细胞在排卵后前期变化不大, 但随着时间的推移有逐渐增多的趋势; 处于大生长前期的卵母细胞, 在排卵后前期有逐渐增多的趋势, 但第 7 天后仅能偶尔见到此类细胞; 处于小生长期的卵母细胞在各时期都能零星看到, 数量极少, 但在退化的卵巢中分布相对较多。一般认为中华绒螯蟹的卵巢中存在着三批不同发育程度的卵子^[1], 初次抱卵时将首先发育成熟的卵子排出卵巢, 卵巢内剩余两批卵母细胞, 在整个抱卵过程中, 第二批卵母细胞继续发育, 到初次排卵时, 第二批卵母细胞均已到达大生长期, 且绝大多数已到达大生长期后期, 因此此时的性腺指数仍然较高, 只是这些卵母细胞相互之间略有差异, 在排卵后处于大生长期和中期的卵母细胞继续发育至后期。在中华绒螯蟹初次排卵后的卵巢发育过程中所见的零星分布的小生长期卵母细胞, 则为第三批卵子。滤泡细胞在初次排卵后的卵巢发育过程中的前期以单层形式包围在卵母细胞周围, 随着卵巢的再次发育, 滤泡细胞在细胞间隙中增多, 在退化的卵巢中, 滤泡细胞数量急剧增多, 占主导地位。

在中华绒螯蟹卵巢发育过程中, 初次排卵之后, 如果雌蟹身体营养状况良好, 则卵巢可以继续发育直至二次抱卵, 这在我们的实验过程中确实观察到这种二次抱卵的现象。如果雌蟹营养状况不好, 则已经在排卵时到达大生长期的卵母细胞会萎缩退化, 到第七天时可以在组织学实验中观察到退化的卵母细胞; 如果雌蟹本身营养尚可, 但排卵后摄食不佳, 则原本排卵后继续发育的卵巢也会转而萎缩退化, 在实验到第十五天时, 多数雌蟹的卵巢都观察到退化现象的原因即在于此。据此推断, 大约七天的时间可以使排卵时到达大生长期的第二批卵母细胞基本发育到后期, 由于此时的卵巢发育以内源性营养为主, 若营养不良的雌蟹其卵巢则会退化; 七天以后, 体内储存的营养基本耗尽, 若没有良好的摄食提供后续, 则原本发育良好的卵巢也会退化, 到第十五天时即可在切片中观察到这一现象。

由于中华绒螯蟹繁殖时需要洄游到海水环境之中, 因此有观点认为中华绒螯蟹的卵子成熟必须借助海水及交配活动的刺激^[2], 而在中华绒螯蟹初次排卵后的卵巢发育过程中, 这两项刺激因子是否还是必需则需要进一步的探讨与实验验证。

参考文献:

- [1] 薛鲁征, 堵南山, 赖 伟. 中华绒螯蟹雌性生殖系统的组织学研究[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 1987, 3(2): 88—97
- [2] 顾志敏, 何林岗. 中华绒螯蟹卵巢发育周期的组织学细胞学观察[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(2): 138—145.
- [3] 上官步敏, 刘正琮, 李少菁. 锯缘青蟹卵巢发育的组织学观察[J]. 水产学报, 1991, 15(2): 96—103
- [4] 杨筱珍, 吴旭干, 成永旭, 等. 中华绒螯蟹卵黄发生期卵母细胞和卵泡细胞超微结构观察[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 171—177.
- [5] Beans SH W, Kessel R G. Electron microscope studies on developing rayfish oocytes with special refer to the origin of yolk[J]. J Cell Biol 1963, 18, 621—649
- [6] 吴旭干, 姚桂桂, 杨筱珍, 等. 东海三疣梭子蟹第一次卵巢发育规律的研究[J]. 海洋学报, 2007, 27(4): 120—127.

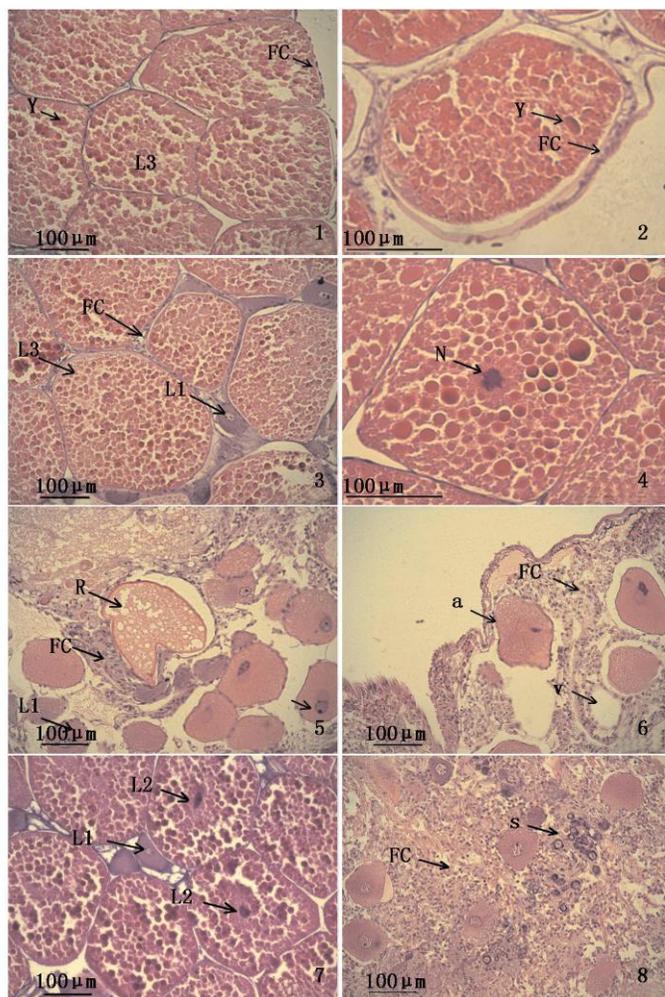


图版 I 初次排卵后卵巢的形态学变化

Plate I The morphologic changes of the ovary after spawn in *E. sinensis*

1, 2 排卵后第 1 天的卵巢 (未退化); 3, 4 排卵后第 7 天的退化卵巢 (咖啡色);

5, 6 排卵后第 15 天的退化卵巢 (肉色) (O—卵巢)



图版 II 初次排卵后卵巢的组织学变化

Plate II The histological changes of the ovary after spawn in *E. sinensis*

1, 2 排卵当天的卵巢; 3, 4 排卵后第 1~5 天内的卵巢, 核膜褶皱; 5, 6 排卵后第 7 天退化的卵巢;

(箭头: 核仁突出核膜) 7 排卵后 9~13 天内的卵巢; 8 排卵后 15 天退化的卵巢。

(FC—滤泡细胞; N—细胞核; R—退化的卵母细胞; V—空泡; Y—卵黄颗粒;

L₁—大生长期前期的卵母细胞; L₂—大生长期中期的卵母细胞; L₃—大生长期后期的卵母细胞;

M—成熟的卵母细胞; S—小生长期的卵母细胞; a—细胞膜褶皱。)