

文章编号: 1000-0615(2019)04-0867-08

DOI: 10.11964/jfc.20180711357

拟穴青蟹受精膜形成过程中环形颗粒的发生与胞吐

陈锦民^{1,2}, 李少菁^{2*}, 王桂忠², 叶海辉², 王艺磊¹

(1. 集美大学水产学院, 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 为了揭示拟穴青蟹受精膜形成机制, 采用透射电子显微镜研究了其受精膜形成过程中环形颗粒的形成与胞吐。结果显示, 拟穴青蟹精子入卵后, 发生皮层反应而形成受精膜。皮层反应包括致密颗粒首先胞吐以及环形颗粒的相继多轮胞吐。每轮环形颗粒的胞吐参与到受精膜的平缓期、增厚期和举起期3个阶段。环形颗粒的形成主要发生在受精膜的增厚期, 受精卵的皮层和靠近皮层的内质中都在形成大量的环形颗粒, 并且迅速移至皮层质膜附近发生爆发性胞吐, 参与到受精膜的快速形成中。环形颗粒的形成与2种卵黄颗粒以及脂滴密切相关, 在皮层中发现了线粒体参与其中, 推测在拟穴青蟹受精卵的皮层和内质中可能存在环形颗粒合成的两套不同机制。研究表明, 卵黄颗粒、脂滴及环形颗粒在拟穴青蟹受精膜形成过程中发挥重要作用。

关键词: 拟穴青蟹; 受精膜; 环形颗粒; 胞吐

中图分类号: Q 954.4; S 968.25⁺¹

文献标志码: A

受精膜(fertilization membrane, FM)是精子与卵子接触引发卵子发生皮层反应而形成的, 对防止多精受精和保护卵子有着重要的生物学意义。学者们在十足目(Decapoda)甲壳动物众多种类中展开了相关的研究^[1], 主要集中在对其形成的形态结构的描述, 只在少数物种中较深入探讨了形成受精膜的皮层颗粒的来源和发生^[2-3], 但受精膜形成机制的许多问题尚不清楚。

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)俗称青蟹, 是重要的海洋经济蟹类。康现江等^[4]曾对其皮层反应与受精膜形成进行了报道, 本实验在原有的基础上对拟穴青蟹受精膜形成开展了更为深入的研究, 包括环形颗粒(ring-shaped granule, RG)的发生和胞吐, 卵黄、脂滴和细胞器的变化, 以及它们对环形颗粒与受精膜形成的作用, 以期更深入地探讨拟穴青蟹受精膜形成的机制, 丰富十足目甲壳动物受精生物学内容, 并为拟穴青蟹科学化人工育苗及品种改良提供基础资料。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

2002年3—7月和2003年3—7月, 从厦门厦港农贸市场购买雌性拟穴青蟹, 头胸甲长8.0~10.0 cm, 头胸甲宽10.0~12.0 cm, 体质量300~380 g。剪去雌蟹一侧眼柄诱导产卵, 暂养于水泥培育池(2.0 m×1.5 m×1.5 m)中, 水位1 m, 池底铺有2~4 cm厚的细砂。充气泵用节电开关控制充气, 水温25.5~29.0 °C, 盐度25.5~26.5, 每日投喂整只鲜活的菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinensis*)。

1.2 实验方法

待亲蟹产卵时, 从排卵孔附近取受精卵放入预先准备好的烧杯中, 间隔30~60 s取样观察和固定处理。取数个受精卵置于载玻片上, 用联于Olympus-II显微镜的数码图象采集器DN-CAM进行活体观察并拍照。取数个受精卵用2.5%

收稿日期: 2018-07-10 修回日期: 2018-10-18

资助项目: 国家“八六三”高新技术研究发展计划(2002AA603013); 福建省教育厅科技计划项目(JAT160256); 集美大学学科建设基金(C517064)

通信作者: 李少菁, E-mail: zoopecol@xmu.edu.cn

戊二醛和1%锇酸双重固定,酒精系列脱水,环氧树脂618包埋,切片于柠檬酸铀—醋酸铅双重染色, JEM-100CX透射电镜观察拍照。

2 结果

精子入卵后,皮层反应从精子入卵处开始,并迅速波及整个卵子。首先是卵子皮质中的致密颗粒胞吐出质膜,释放其内含物,融合形成一薄层的膜性结构,即早期受精膜(FM1)。接着RG大量胞吐,使得FM迅速加厚,由0.05 μm 增至0.15 μm 。RG由爆发性的胞吐渐渐趋于缓和,质膜指状突起也变得渐少(图版 I -1)。接着进入下一轮RG的胞吐。以下是在同一粒受精卵上观察到的第二轮RG的胞吐全过程,直到FM的举起。RG的胞吐参与FM形成的3个阶段:受精膜的平缓期、增厚期和举起期(表1)。

2.1 受精膜的平缓期

上一轮的RG刚胞吐完毕,FM迅速增厚至0.15 μm 左右,FM与新质膜紧挨,它们间的卵周隙内仍有少量残留的指状突起。皮质中卵黄分解的絮状物质很稀疏,出现很多电子密度低的空白区域,有少量正在溶解的脂滴和环形颗粒前体,有的空白处充满溶解了的脂肪液,大量的线粒体密集聚集在一处(图版 I -1)。此阶段皮质内很少见到RG,只有少量的环形颗粒前体正在形成:絮状物质凝聚成团,周边出现一层薄膜状物质,并由断续逐渐连结一起,将团状絮状包围在内(图版 I -2)。

2.2 受精膜的增厚期

随后新形成的RG移到卵周围,开始了新一轮的胞吐(图版 I -3~4)。RG直接胞吐出质膜,其外膜与卵质膜愈合,由于这种胞吐作用形成许多指状突起,指状突起断裂也进入卵周隙,还发现空白区域内的脂肪液也排入卵周隙,参与FM的形成(图版 I -4)。RG的外膜和其内含颗粒,以及指状突起都是双层膜结构(图版 I -3)。RG和指状突起的内含物的前体都是絮状物质,它们进入卵周隙后双层膜溶解,絮状物质排放;絮状物质含有黏多糖的成分,会引起渗透压的骤然上升和水分的渗入,导致卵周隙逐渐膨胀,宽度变为0.40 μm 左右(图版 I -3~4)。

内质中的两种卵黄颗粒以及脂滴常伴随着

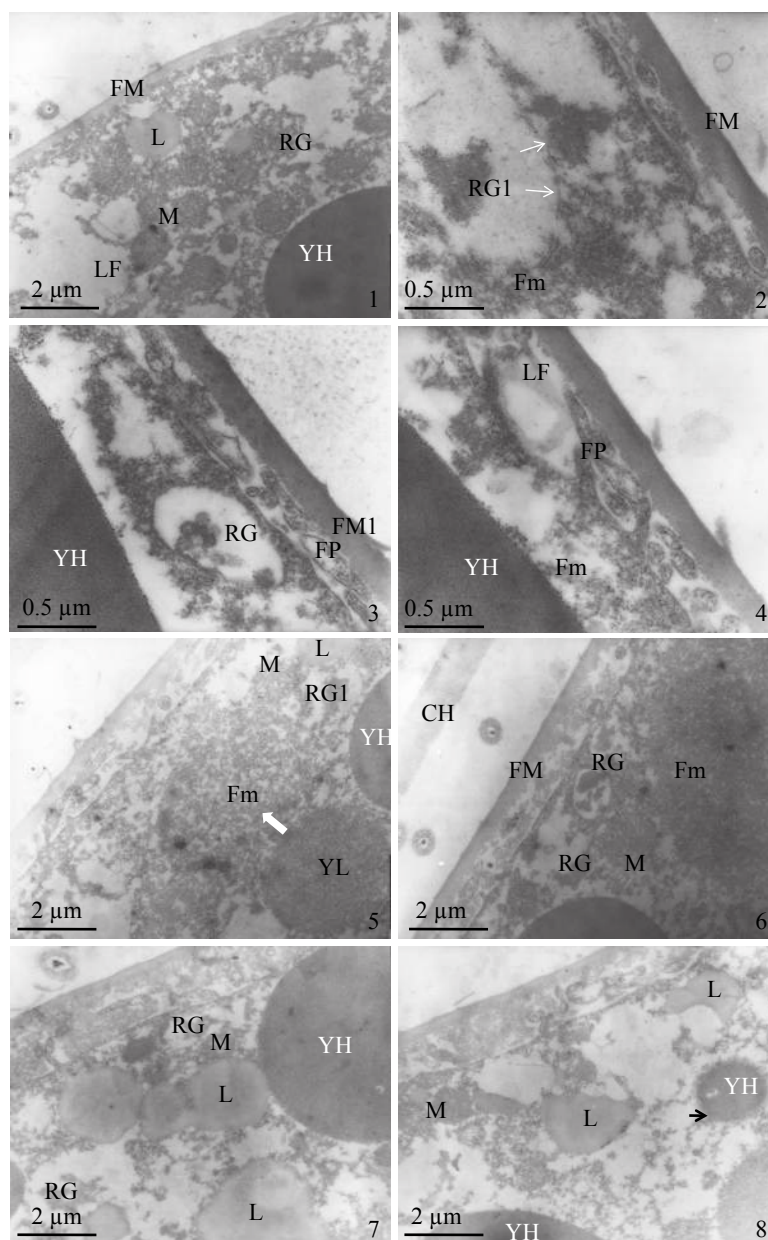
线粒体迁移到皮层(图版 I -5~8),低电子密度卵黄颗粒逐渐变得疏松膨胀,最后整团散开充满细胞质中(图版 I -5~6);高电子密度卵黄颗粒只是通过颗粒四周脱落形成卵黄絮状物质而逐渐变小(图版 I -7~8);脂滴分解成小脂滴而快速溶解,并黏附许多絮状物质于四围;卵黄和脂滴的溶解物质参与合成RG,并有常见线粒体分布其中(图版 I -7~8)。

此时,靠近皮层的内质中正在形成大量的RG。RG的形成主要有两种方式:有的区域中卵黄和其分解的絮状物质密集,只有少量在溶解的脂滴,絮状物质会聚集成电子密度高的小颗粒,小颗粒之间愈合形成较大的颗粒,由于这种聚集致使颗粒旁边出现电子密度低的空白区域,并会有一圈薄膜将聚集的颗粒包围而形成环形颗粒前体,然后逐步扩大成为RG(图版 II -1~2);有的区域脂滴集中分布,正在溶解产生凹陷和膜结构,将高电子密度卵黄颗粒分解的大量絮状物质包裹,形成环形颗粒前体,并逐渐生成RG(图版 II -3~4)。靠近皮层的内质中没有发现线粒体参与RG的形成。

大量新形成的RG从内质移到皮质,胞吐更加剧烈,排入卵周隙内的RG和指状突起更多,卵周隙膨胀成0.6~0.7 μm 。皮质中的絮状物质大大减少而变稀疏,但大量的脂滴移到皮层并溶解成小脂滴,呈各种形状,溶解的脂肪液充斥空白区域,脂滴有助于絮状物质的凝聚,并与线粒体一同参与新质膜的形成和修复;高电子密度颗粒被溶解的体积越来越小,有的直径只剩下2~3 μm (图版 I -7~8)。FM形成末期,靠近皮层的内质中,高电子密度卵黄颗粒和脂滴继续在溶解,低电子密度卵黄颗粒已很少见到,絮状物质稀疏(图版 II -5~6)。

2.3 受精膜的举起期

RG的胞吐又逐渐趋于缓和,指状突起也变少;卵周隙中RG的内含物和指状突起电子密度变低并黏附于上一轮胞吐形成的FM,使得其厚度增厚(由0.15 μm 增至0.25 μm)并开始举起,卵周隙中的物质变少,FM与新质膜间的空白隙越来越宽(图版 II -7)。新一轮胞吐形成的FM与早期受精膜间,有的部位因未完全愈合而出现明显的空白痕迹。随后卵周隙内的内含物都基本溶解,并与原先的FM愈合,FM完全举起,卵周隙也增



图版 I 拟穴青蟹受精膜形成过程中环形颗粒的胞吐

1. 受精膜平缓期, 示大量线粒体集群分布, $\times 15\ 000$; 2. 受精膜平缓期, 示环形颗粒前体、絮状物质和形成中的薄膜(\uparrow), $\times 40\ 000$; 3. 受精膜增厚初期, 示环形颗粒和指状突起, $\times 40\ 000$; 4. 受精膜增厚初期, 示胞吐出溶解的脂滴, 指状突起在形成, $\times 40\ 000$; 5. 受精膜增厚期, 示脂滴、线粒体和环形颗粒, 正在溶解的YL(\uparrow), $\times 15\ 000$; 6. 受精膜增厚期, 示环形颗粒的形成和胞吐, 线粒体以及大量卵黄絮状物质, $\times 17\ 000$; 7. 受精膜增厚期, 示正在溶解的脂滴、大YH、线粒体以及形成中的环形颗粒, $\times 15\ 000$; 8. 受精膜增厚期, 示正在溶解的脂滴和小YH(\uparrow)及线粒体, $\times 15\ 000$ 。CH. 壳膜; FP. 指状突起, PS. 卵周隙, RG1. 环形颗粒前体, LF. 脂肪液, M. 线粒体, YH. 高电子密度卵黄颗粒, YL. 低电子密度卵黄颗粒, L. 脂肪滴, Fm. 絮状物质, FM1. 早期受精膜; 下同

Plate I Exocytosis of the ring-shaped granules during fertilization membrane formation in *S. paramamosain*

1. at the placid phase of FM, shows many mitochondria assemble densely, $\times 15\ 000$; 2. at the placid phase of FM, shows RG1, flocculent material, arrow indicates thin membrane is forming(\uparrow), $\times 40\ 000$; 3. at the beginning of thickening phase of FM, shows RG and finger protuberance, $\times 40\ 000$; 4. at the beginning of thickening phase of FM, shows exocytosis of dissolving lipid drops and forming of finger protuberance, $\times 40\ 000$; 5. at the thickening phase of FM, shows lipid drops, mitochondria, and RG, arrow indicates YL is dissolving(\uparrow), $\times 15\ 000$; 6. at the thickening phase of FM, shows forming and exocytosis of RG, mitochondria, and massive yolk flocculent material, $\times 17\ 000$; 7. at the thickening phase of FM, shows the dissolving lipid drops, mitochondria, and the forming RG, $\times 15\ 000$; 8. at the thickening phase of FM, shows the dissolving lipid drops and YH(\uparrow), and mitochondria, $\times 15\ 000$. CH. chorion, FP. finger protuberance, PS. perivitelline space, RG1. pre-ring-shaped granule, LF. lipid fluid, M. mitochondria, YH. high yolk granule, YL. low yolk granule, L. lipid drop, Fm. flocculent material, FM1. early-formed fertilization membrane; the same below

表1 拟穴青蟹环形颗粒的胞吐过程

Tab. 1 The exocytosis process of ring-shaped granules in *S. paramamosain*

阶段 stage	主要特征 main traits	环形颗粒 RG	线粒体 mitochondria	皮质 cortex	受精膜厚度/ μm width of FM
平缓期 the placid phase	FM1与PM紧挨, PM平滑, RG未胞吐	皮层内有少量在合成	大量密集皮层一处	少量YH、L在溶解, 无YL, Fm稀疏	0.15
增厚期 the thickening phase	RG大量胞吐, 卵周隙充满RG胞吐物和FP, 并逐渐变宽	皮层内快速合成并胞吐, 内质中大量合成并移至皮层	分散到皮层的各处, 新线粒体在生成, 参与RG的形成	大量YL、YH、L在迅速溶解, Fm稠密	0.15~0.2
举起期 the swelling phase	RG停止胞吐, 卵周隙内胞吐物黏附FM1, FM增厚并浓缩和举起	皮层内见, 内质中有少量在合成	密集在新PM旁, 参与PM的形成和修复	YL基本溶解, 仍有大量的YH、L在溶解, Fm稀疏而均匀	0.2~0.3 0.3~0.14

注: PM. 质膜

Notes: PM. plasm membrane

厚至2.0~3.6 μm , FM与壳膜间的距离变小, 越来越靠近。新质膜已形成, 表面平滑, 偶见几个指状突起。最终皮质中的絮状物质稀疏且分布均匀, 卵黄颗粒也分布其间, 很少见到线粒体(图版 II -8)。

3 讨论

3.1 RG的发生

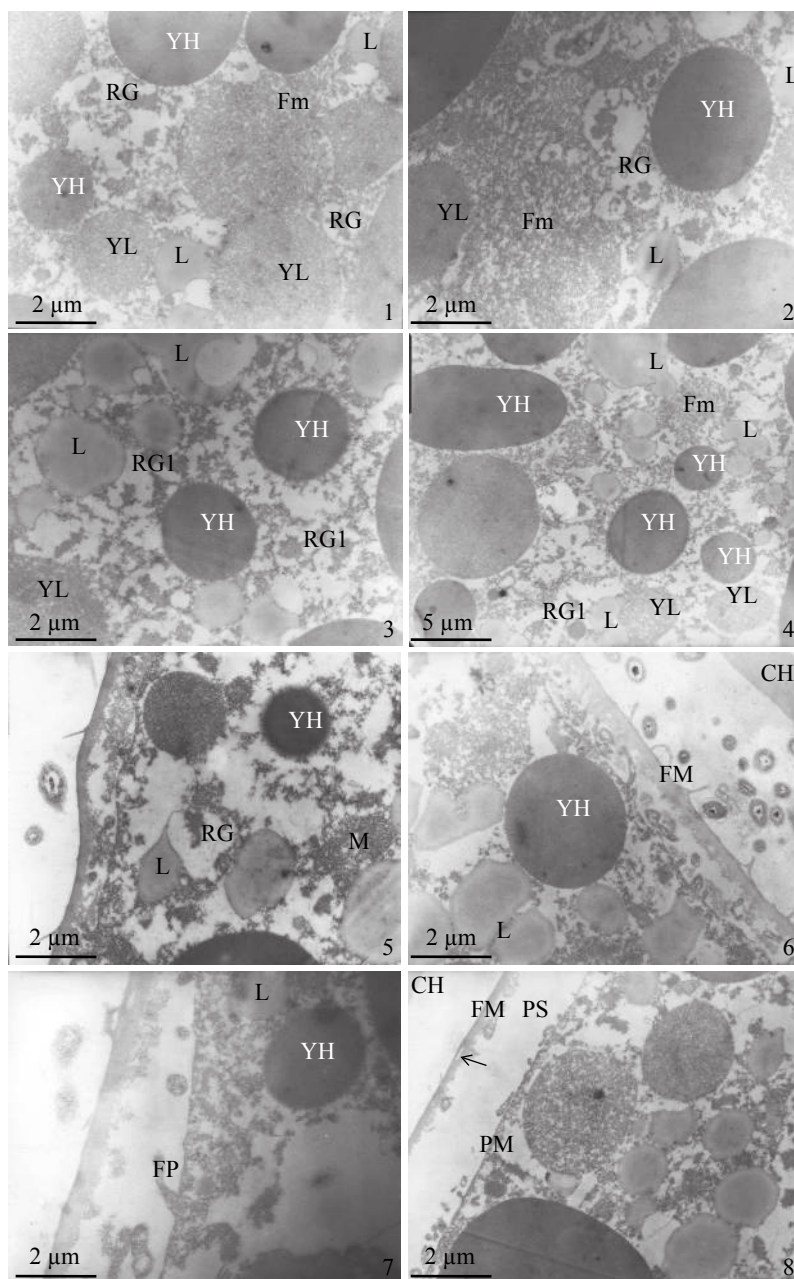
有关皮层颗粒的发生, 在海胆、鱼类、两栖类和哺乳类中, 通常被认为是高尔基体和内质网共同参与而形成的^[5]。然而, 甲壳动物中皮层颗粒的形成机制不尽相同, 目前相关报道主要集中在RG的发生, 而且仅在普通滨蟹(*Carcinus maenas*)^[3]和锐脊单肢虾(*Sicyonia ingentis*)^[6]有过报道。拟穴青蟹成熟卵子的皮质和内质中就存在RG, 推测是在卵子发生过程中就已开始形成, 远远在FM形成之前^[4]; 这与中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[7]和普通滨蟹^[3]相似, 而在锐脊单肢虾, RG是在排卵后的30 min内出现, 是由含有环形结构的潴泡物质(cisternal elements)愈合而成^[2]。在拟穴青蟹中, RG在FM的整个形成过程中还一直在不断形成, 而且其形成机制与其他甲壳动物很不一样。在普通滨蟹, RG是在成熟卵子和受精卵的早期形成, 来源于内质网, 没有高尔基体的参与^[3]。而在拟穴青蟹中既无内质网也无高尔基体的参与, RG的形成与卵黄颗粒和脂滴以及线粒体密切相关。在FM的形成过程中, 受精卵中间的内质中, 卵黄颗粒和脂滴也在溶解并合成少量环形颗粒前体, 但合成RG的主要区域靠近皮层的内质, 并随着皮层反应的剧烈进行, 合成的RG大量地迁移到皮质中参与胞吐; 同时也有大量的卵黄颗粒和脂滴迁移到皮层, 合成RG立即参与胞吐。卵黄颗粒和脂滴以及线

粒体同时参与合成RG的过程非常复杂, 大量的卵黄颗粒和脂滴迅速溶解, 尤其是低电子密度卵黄颗粒整团溶解成絮状物质而扩散, 脂滴溶解成小脂滴和脂肪液分散在絮状物质间, 有助于絮状物质凝聚成电子密度高的小颗粒, 小颗粒又愈合合成大的颗粒, 最后外面包裹一薄膜而成RG。高电子密度卵黄颗粒的周围也在不断地溶解分散, 可能可以调节絮状物质的密度和稠度, 共同参与RG的合成。低电子密度卵黄颗粒溶解的絮状物质占RG内含物的主要部分, 而且它们是最先被消耗完的; RG的膜结构成分是否主要是来自于脂滴和高电子密度卵黄颗粒有待进一步证实。本研究还发现, 在受精卵内质合成RG的过程中未发现线粒体的存在, 而在皮层中经常发现一些线粒体分布其中, 可能起到提供能量、加速RG合成的作用。RG的合成在拟穴青蟹受精卵的皮层和内质是否存在两套不同的机制还有待进一步验证。

有关皮层颗粒的生化成分及合成位点及其调控机理都是有待深入研究的问题。在哺乳动物卵子皮层颗粒中, 已知含有糖基化物质、蛋白酶、糖苷酶和卵过氧化物酶等物质^[8]。而在十足目甲壳动物, 这方面的研究较少。堵南山^[7]报道蟹卵的皮层颗粒是一种内膜结构, 内含水合蛋白质、酶类及黏多糖等, 在受精中起重要作用。Pillai等^[6]用凝集素标记研究了2种皮层颗粒的发生和成分, 以及它们各自在FM形成和举起中起的作用。今后需要在十足目动物中广泛开展这方面的研究, 才能更好地揭示十足目动物皮层颗粒发生的调控机制以及FM的形成机制。

3.2 RG的胞吐与受精膜的形成

受精时, 皮层颗粒膜与质膜融合, 导致皮层颗粒发生胞吐作用而排出, 最终形成FM。胞



图版 II 拟穴青蟹受精膜形成过程中环形颗粒的发生

1. 受精膜增厚期, 示靠近皮层内质大量YL在分解, 参与环形颗粒的形成, $\times 8\ 000$; 2. 受精膜增厚期, 示靠近皮层内质的脂滴和大量卵黄絮状物质, 参与环形颗粒的形成, $\times 10\ 000$; 3. 受精膜增厚期, 示靠近皮层内质正在溶解的卵黄粒和大量脂滴, 参与环形颗粒前体的形成, $\times 10\ 000$; 4. 受精膜增厚期, 示靠近皮层内质大脂滴正分解成小脂滴, 卵黄絮状物质稀疏, 参与环形颗粒前体的形成, $\times 6\ 000$; 5. 受精膜增厚晚期, 示在溶解的YH和脂滴, 以及环形颗粒的形成, $\times 12\ 000$; 6. 受精膜增厚晚期, 示YH, 以及大量脂滴, $\times 15\ 000$; 7. 受精膜举起初期, 示卵周隙内含物稀少, YH和脂滴快速分解, $\times 15\ 000$; 8. 受精膜举起期, 示受精膜愈合处留有间隙(\uparrow), $\times 8\ 000$. PS. 卵周隙

Plate II Development of the ring-shaped granules during fertilization membrane formation in *S. paramamosain*

1. at the thickening phase of FM, shows the dissolving of massive YL, attending to form RG in the endoplasm near cortex, $\times 8\ 000$; 2. at the thickening phase of FM, shows lipid drops and massive flocculent material, attending to form RG in the endoplasm near cortex, $\times 10\ 000$; 3. at the thickening phase of FM, shows the dissolving of yolk and massive lipid drops, attending to form RG1 in the endoplasm near cortex, $\times 10\ 000$; 4. at the thickening phase of FM, shows sparse flocculent material, and large lipid drops resolving into little ones, attending to form RG1 in the endoplasm near cortex, $\times 6\ 000$; 5. at the end of thickening phase of FM, shows the dissolving of YH and lipid drops, attending to form RG, $\times 12\ 000$; 6. at the end of thickening phase of FM, shows YH and massive lipid drops, $\times 15\ 000$; 7. at the beginning of swelling phase of FM, shows a few inclusions in the perivitelline space, YH and lipid drops both resolving quickly, $\times 15\ 000$; 8. at the swelling phase of FM, shows space in coalescence of FM(\uparrow), $\times 8\ 000$. PS. perivitelline space

吐可以分为持续性胞吐和间断性胞吐2种形式。拟穴青蟹皮层颗粒的胞吐形式属于后者,受化学或电刺激的调节,通常与刺激引起的 Ca^{2+} 内流有关。拟穴青蟹的成熟卵子皮层有2种皮层颗粒,即致密颗粒和RG。皮层反应时,此2种颗粒相继胞吐而形成FM,与普通滨蟹相似^[9]。具有2种皮层颗粒的动物比较常见,而在美洲龙虾(*Homarus americanus*)和欧洲龙虾(*H. gammarus*)成熟卵子皮层中存在4种皮层颗粒,它们相继胞吐形成FM^[10]。拟穴青蟹致密颗粒的胞吐首先形成FM最外一薄层,之后RG多轮“爆发性”胞吐形成一厚层,两层融合成FM。RG胞吐过程常伴随有质膜的指状突起、皮层内的脂肪滴和卵黄絮状物质排入卵周隙,与皮层颗粒内含物融合。因此,2种皮层颗粒以及卵质膜和皮层基质都参与了FM的形成。

本研究发现,在拟穴青蟹FM的形成过程中, RG有明显的2次胞吐,每次胞吐都使FM迅速增厚将近0.1 μm 。其他甲壳动物的报道中,一般认为是RG一次性连续胞吐,只有在普通滨蟹中有提到RG的第一次胞吐形成FM的致密外层,后面RG的胞吐持续7 h以上^[11],推测RG的胞吐在普通滨蟹中也不止1次。此外,拟穴青蟹RG的胞吐过程中发现大量的线粒体局部集中在即将发生胞吐的皮质中,当RG胞吐从此位置开始并迅速波及全卵时,线粒体也随即分散到皮层反应部位。在胞吐越剧烈的地方和时段,线粒体出现的越多越集中。线粒体通过氧化磷酸化合成ATP,为细胞的生命活动提供能量。因此,拟穴青蟹RG的胞吐是一个与线粒体规律分布密切相关的耗能过程。在长毛对虾(*Penaeus penicillatus*)和蜃(*Limulus polyphemus*)胞吐的受精卵皮质中也发现众多的线粒体密集的现象^[12-13]。以往研究证明哺乳动物皮层颗粒的胞吐机制与 Ca^{2+} 有关, Ca^{2+} 的升高诱发皮层反应的发生^[14-15]。线粒体不单可以作为能量的储存器^[16-17],也是一种可发送和传递信号的细胞器,起到调控细胞质中浓度的作用^[18-19],对调节细胞钙稳态起重要作用^[20]。拟穴青蟹RG胞吐过程中,线粒体与 Ca^{2+} 的升高有无必然联系、RG多轮胞吐的诱发机制如何,都有待进一步研究。

3.3 卵黄颗粒和脂滴与受精膜的形成

卵黄和脂肪是卵母细胞的主要营养物质,它们在受精和胚胎发育中担负重要作用。但是

很多研究主要针对卵母细胞中卵黄颗粒和脂滴的形成,有关它们在FM形成过程中的变化和作用,在十足目甲壳动物中却很少有报道。本研究在拟穴青蟹中发现,卵黄颗粒和脂滴在FM的整个形成过程中起着非常重要的作用。

首先,卵黄和脂肪以各种不同的方式参与FM的形成,卵黄颗粒和脂滴不断溶解并形成RG, RG通过胞吐将内含物排入卵周隙;同时,在胞吐过程中以指状突起的方式将皮质中的脂肪液和絮状物质的混合物包裹其中,然后脱落掉入卵周隙,并与RG的内含物一起溶解愈合,使FM迅速增厚。这可能是它们参与FM形成的最重要的途径。还有少部分是在胞吐时直接将脂肪液和絮状物质排出而参与FM的形成。因此,卵黄颗粒和脂滴是拟穴青蟹FM最主要的最终来源物质。

其次,卵黄和脂肪对FM的举起和硬化起作用。甲壳动物的卵黄颗粒和脂滴含有各种脂类和多糖及蛋白质等成分。皮层反应而倾泄到卵周隙的内含物中含有黏多糖,它可以引起蟹卵渗透压的骤然上升,并从外界吸收水分导致FM的举起;同时内含物中过氧化物酶的作用使得FM逐渐硬化,这与中华绒螯蟹相似^[7]。

此外,卵黄和脂肪在FM的整个形成过程中为其生理活动和代谢提供营养,可能包括了线粒体的分裂和生长所需的营养物质。

参考文献:

- [1] 王艺磊,李少菁,张子平.十足目受精生物学研究概述[J].动物学杂志,1998,33(5):45-51.
Wang Y L, Li S J, Zhang Z P. Survey of fertilization in decapoda[J]. Chinese Journal of Zoology, 1998, 33(5): 45-51(in Chinese).
- [2] Pillai M C, Clark W H Jr. Hatching envelope formation in shrimp (*Sicyonia ingentis*) ova: origin and sequential exocytosis of cortical vesicles[J]. Tissue and Cell, 1988, 20(6): 941-952.
- [3] Goudeau M. Fertilization in a crab. III. Cytodifferentiation of vesicles enclosing ring-shaped elements involved in the cortical reaction[J]. Gamete Research, 1984, 9(4): 409-424.
- [4] 康现江,李少菁,王桂忠,等.锯缘青蟹皮层反应与受精膜形成研究[J].海洋科学,2001,25(1):40-43.
Kang X J, Li S J, Wang G Z, et al. Studies on the cortical reaction and fertilization membrane formation in

- Scylla serrate*[J]. Marine Sciences, 2001, 25(1): 40-43(in Chinese).
- [5] 丁汉波, 全允栩, 黄浙. 发育生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987.
- Ding H B, Tong Y Y, Huang Z. Developmental Biology[M]. Beijing: Higher Education Press, 1987(in Chinese).
- [6] Pillai M C, Clark W H Jr. Development of cortical vesicles in *Sicyonia ingentis* ova: their heterogeneity and role in elaboration of the hatching envelope[J]. Molecular Reproduction & Development, 1990, 26(1): 78-89.
- [7] 堵南山. 中华绒螯蟹的受精[J]. 水产科技情报, 1998, 25(1): 9-13.
- Du N S. Fertilization of the mitten crab[J]. Aquatic Science and Technology Information, 1998, 25(1): 9-13(in Chinese).
- [8] 陈大元. 受精生物学-受精机制与生殖工程[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- Chen D Y. Fertilization Biology: Fertilization Mechanism and Reproductive Engineering[M]. Beijing: Science Press, 2000(in Chinese).
- [9] Goudeau M, Lachaise F. 'Endogenous yolk' as the precursor of a possible fertilization envelope in a crab (*Carcinus maenas*)[J]. Tissue and Cell, 1980, 12(3): 503-512.
- [10] Talbot P, Goudeau M. A complex cortical reaction leads to formation of the fertilization envelope in the lobster, *Homarus*[J]. Gamete Research, 1988, 19(1): 1-18.
- [11] Goudeau M, Becker J. Fertilization in a crab. II. Cytological aspects of the cortical reaction and fertilization envelope elaboration[J]. Tissue and Cell, 1982, 14(2): 273-282.
- [12] 王艺磊, 张子平, 常林, 等. 长毛对虾卵子皮层反应的研究[J]. 动物学报, 2001, 47(1): 112-115.
- Wang Y L, Zhang Z P, Chang L, et al. Morphology of the cortical reaction in the eggs of *Penaeus penicillatus*[J]. Acta Zoologica Sinica, 2001, 47(1): 112-115(in Chinese).
- [13] Bannon G A, Brown G G. Vesicle involvement in the egg cortical reaction of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* L[J]. Developmental Biology, 1980, 76(2): 418-427.
- [14] Ducibella T. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes[J]. Human Reproduction Update, 1996, 2(1): 29-42.
- [15] Muller W A. Developmental Biology[M]. Beijing: Higher Education Press, 1998.
- [16] 韩贻仁. 分子细胞生物学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 2001.
- Han Y R. Molecular Cytobiology[M]. The 2nd Edition. Beijing: Science Press, 2001(in Chinese).
- [17] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- Zhai Z H, Wang X Z, Ding M X. Cell Biology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000(in Chinese).
- [18] Gunter T E, Gunter K K, Sheu S S. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance[J]. American Journal of Physiology Cell Physiology, 1994, 267(2): C313-C319.
- [19] Ichas F, Jouaville L S, Mazat J P. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals[J]. Cell, 1997, 89(7): 1145-1153.
- [20] Hansford R G, Zorov D. Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 1998, 184(1-2): 359-369.

Development and exocytosis of the ring-shaped granules during fertilization membrane formation in *Scylla paramamosain*

CHEN Jinmin^{1,2}, LI Shaojing^{2*}, WANG Guizhong², YE Haihui², WANG Yilei¹

(1. Key Laboratory of Science and Technology for
Aquaculture and Food Safety, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;
2. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The development and exocytosis of the ring-shaped granules (RG) during the process of fertilization membrane (FM) formation in *Scylla paramamosain* were investigated by transmission electron microscope. The results are as follows: FM, the second envelope between oocyte and chorin, formed during a complex cortical reaction initiated after fertilization. The cortical reaction includes the successive exocytosis of two morphologically different granules. Firstly the dense granules underwent exocytosis and formed a thin membrane. After that, RG underwent several rounds of massive and rapid exocytosis, and the material from RG fused and formed a thick membrane. Every round of exocytosis of RG participated in three stages as the placid, the thickening and the swelling of FM. The development of RG happened both in the cortex and the nearby endoplasm mainly at the thickening phase of FM. Numerous RG formed and shifted to the edge of plasma membrane to participate in FM formation by explosive exocytosis. Our study showed that the development of RG was closely connected with two kinds of yolk granules and lipid drops, and mitochondria only appeared at cortex. So we inferred that there may be two kinds of RG forming mechanics in cortex and endoplasm in *S. paramamosain*. Finally, FM was composed of the two layers, and the newly formed plasma membrane became an inlaying membrane (the third envelope). The importance of yolk and lipid drops and RG in participating in FM formation was discussed at the end of this paper.

Key words: *Scylla paramamosain*; fertilization membrane; ring-shaped granules; exocytosis

Corresponding author: LI Shaojing. E-mail: zoopecol@xmu.edu.cn

Funding projects: National High Technology Research and Development Program of China(2002AA603013); Science and Technology Projects of Fujian Provincial Education Department(JAT160256) ; Discipline Construction Fund of Jimei University(C517064)