

文章编号: 1000-0615(2000)06-0500-05

## 锯缘青蟹卵膜变化与卵子附着研究

康现江, 李少菁, 王桂忠, 陈锦民

(厦门大学海洋学系, 福建 厦门 361005)

**摘要:**利用光镜和电镜观察了锯缘青蟹成熟卵及其受精后卵膜变化和卵子附着特征。锯缘青蟹成熟卵子卵膜有三层即外层、内层和质膜。卵子产出后, 无论受精与否, 外层和内层卵黄膜形成壳膜, 与卵子附着有关。刚产出的卵子卵膜具有溶胶性和延展性, 卵子与刚毛表面之间或卵子与卵子之间接触便粘在一起, 由于刚毛摆动和卵子的重力作用, 形成卵柄或卵索。卵子受精后, 发生皮层反应形成受精膜。由壳膜和受精膜构成的孵化膜为初级卵膜, 保护胚胎发育, 直至幼体破膜而出。

**关键词:** 锯缘青蟹; 成熟卵子; 卵膜变化; 卵子附着

**中图分类号:** S917; Q132 **文献标识码:** A

### Studies on the egg membrane variation and egg attachment in *Scylla serrata*

KANG Xian-jiang; LI Shao-jing; WANG Gui-zhong, CHEN Jin-min

(Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** The egg membrane variation of the matured and fertilized eggs and attachment of the egg in *Scylla serrata* were studied with light-microscope and electron-microscope in this paper. The matured egg has three layers egg membrane, they are outer layer, inner layer of the vitelline membrane, and egg plasma membrane. No matter the egg fertilized or not, the outer and inner layers could form chorion after the egg spawned, and the chorion had glue and extension. When the egg contacted with the setae of the plaopods or other eggs, they attached each other, and formed egg stalk or funiculus by the setae swaying and its gravity action. Eventually the eggs attached to the parent till larvae hatched. After the egg fertilized, it underwent cortical reaction and formed fertilization membrane. The hatching membrane which was composed of chorion and fertilization membrane was the primary egg membrane, and protected the embryo development from harm material till the larva hatched.

**Key words:** *Scylla serrata*; matured egg; egg membrane variation; egg attachment

在十足目甲壳动物中, 除对虾科的受精卵直接散落水中外, 其余种类的雌体则都由腹肢抱卵, 受精卵固着在腹肢的刚毛上, 直到孵化<sup>[1]</sup>。所以, 抱卵孵化在十足目甲壳动物非常普遍, 对于该类动物, 受精卵的成功附着对于胚胎正常发育非常重要, 国内外该方面研究尚少<sup>[2-5]</sup>。锯缘青蟹是重要的养殖种类, 有关卵膜的特征尚未见研究。成熟卵排出后卵膜变化不仅是发育生物学、受精生物学重要基础理论内容, 而且对认识卵子的附着和胚胎发育至关重要。作者在研究锯缘青蟹受精过程中, 观察了锯缘青蟹卵

收稿日期: 2000-01-17

资助项目: 福建省重中之重资助项目(海洋生物优良种质和生物活性物质的应用基础研究)和福建省自然科学基金项目(C9810006)

作者简介: 康现江(1964-), 男, 河北鸡泽人, 博士, 副教授, 主要从事甲壳动物生殖、发育及其调控的研究。E-mail: Zoopecol@jingxi-an.xmu.edu.cn

膜变化、卵柄和卵索的形成及其孵化膜特征,为进一步了解锯缘青蟹卵子附着机制,以及进行科学化人工育苗和品种改良提供基础资料。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

1999年4~6月于福建省云霄县源利苗种场,选取性腺发育较好的青蟹,放于80L水体的瓷缸中,水体约60L,充气泵充气。盐度约29。每日喂新鲜的菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinensis*),进行培育。

1999年8月中旬至10月中旬从厦门市厦港农贸市场购买锯缘青蟹的青蟹,体长8.0~9.0cm,体宽10.0~11.0cm;体重300~350g。暂养于水族箱(规格为70cm×50cm×40cm),水位35cm,水温为24.5~27.5℃,盐度为25.5~26,充气泵用节电开关控制充气,喂新鲜的菲律宾蛤仔,定期换水。水族箱底部铺有1~2cm细砂。将青蟹一侧眼柄剪去进行诱导其产卵。

### 1.2 取样处理

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,隔一定时间,取样固定处理;待亲蟹产卵时,从卵巢取游离成熟卵,并进行人工受精,分别取成熟卵和受精卵固定处理;取幼体孵化出后的外壳进行扫描电镜观察。于Bouin's液固定,酒精系列脱水,石蜡切片,厚6~8μm,H.E.染色,Olympus-II显微镜观察拍照。

于2.5%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。

于2.5%戊二醛和1%锇酸双重固定,酒精系列脱水,入丙酮、醋酸异戊酯,HCP-II临界点干燥仪干燥,S-520扫描电镜观察拍照。

## 2 结果

### 2.1 诱导亲蟹的产卵

从市场购买的青蟹放于亲蟹池(在源利苗种厂)或水族箱进行(在实验室)暂养5~7d,然后将青蟹放于瓷缸或水族箱中,切除眼柄(在实验室)或不切除眼柄(在源利苗种厂)进行诱导产卵,期间保持安静的环境、较暗的光线、较弱的充气和充足的饵料。切除眼柄可促进青蟹发育和卵子成熟,并且与青蟹的发育程度有关。亲蟹在接近产卵时不再进食,临产卵时,两螯和步足将身体支起,腹脐打开并轻微开合,精卵一同排出。由于腹脐的开合和腹肢刚毛的摆动,将精卵混匀,使得卵子能够均匀受精和附着。

### 2.2 青蟹成熟卵的特征

锯缘青蟹成熟卵表面有小凹凸。透射电镜观察表明,成熟卵有三层卵膜即外面两层卵黄膜和卵细胞质膜,外层卵黄膜较薄,厚约0.2μm,电子密度较高;内层卵黄膜较厚,厚约1.03μm,电子密度较低。两层卵黄膜与卵质膜之间为卵周隙,厚度约0.26μm,内有一些絮状物,此时卵细胞质膜虽然一些小凹凸和微绒毛,但基本平滑(图版-1)。成熟卵子内部可分为皮层和内质,成熟卵子皮层厚度较薄,皮层中有一种皮层颗粒(致密颗粒, dense granule),皮层中卵黄颗粒较少,还具有内质网囊泡和线粒体等(图版-1)。内质较厚,富含卵黄颗粒和脂滴(图版-2),另外皮质中还有卵子成熟过程中形成的另一种皮层颗粒(环形颗粒, ring shape granule)(图版-3),以及内质网和线粒体等。

### 2.3 青蟹成熟卵和受精卵的卵膜变化

刚排出的卵子形状不规则,入海水后逐渐变为球形(图版-4)。亲蟹排出的卵子,或从卵巢得到的

成熟卵子入海水后,两层卵黄膜形态结构发生了较为明显的变化。透射电镜观察表明,成熟卵子两层卵黄膜虽然电子密度不同,但都较为致密,入海水后,发生去致密,结构变得疏松,表现出很强的可塑性和延展性。由于渗透压的变化,卵黄膜举起形成壳膜(chorion),从组织切片观察可知,卵黄膜在不同处出现皱褶(图版-5)。卵子受精后,发生皮层反应,致密颗粒首先胞吐形成一薄层膜,电子密度较高;接着环形颗粒胞吐形成较厚一层膜,电子密度较低,二者构成受精膜,厚约 $0.6\mu\text{m}$ 。

## 2.4 卵子附着

卵子排出后,由于卵黄膜结构特性的变化即很强的可塑性和延展性,为卵子的附着提供了前提条件;由于腹肢上的刚毛摆动,使得卵子与刚毛的接触机会大大增加。卵黄膜或其上的皱褶一旦与刚毛接触,便粘附其上,刚毛的摆动加上卵子本身的重力作用,使得卵子摆动、旋转,粘附在刚毛上的卵黄膜便扭转、延展,形成卵柄(图版-6、7);若卵子与卵子之间接触,卵黄膜或皱褶之间则粘在一起,由于卵子的相对移动或旋转则形成卵索(图版-8)。亲蟹排出的卵子大部分散落在刚毛丛中,部分会散落底部的砂质面上,随后这些受精卵被收集到腹部。这样,约200万个受精卵均匀地附着于亲蟹腹肢刚毛上,这时亲蟹的腹扇打开,腹扇打开的程度与亲蟹大小及抱卵量有关。多数卵子附着在一根刚毛上,但发现有些卵子附着于多根刚毛上,也有为数不多卵子被刚毛刺入其内部。

## 2.5 孵化膜

锯缘青蟹在排卵的同时,也将储存在纳精囊中的精子排出。精子通过顶体反应和卵子的作用入卵并将卵子激活,卵子发生皮层反应,形成受精膜(图版-9、10)。皮层反应结束后,受精卵最外层为壳膜,其内为受精膜,质膜变为镶嵌膜(图版-11)。孵化膜则由壳膜和受精膜构成,厚约 $0.8\mu\text{m}$ ,为初级卵膜,整个胚胎发育是在孵化膜保护下进行的(图版-12),待胚胎发育至蚤状幼体时,破膜而出。

# 3 讨论

## 3.1 卵膜变化及卵子附着

在十足目甲壳动物中,抱卵孵化较为普遍,受精卵固着在腹肢的刚毛上,直到孵化。锯缘青蟹为抱卵发育类型,刚产出的卵子具两层卵黄膜,这两层卵黄膜在卵子产出后发生变化。卵黄膜的形态结构变化是与其特性相对应的,即是与卵子附着特性相对应。从光镜和电镜观察的结果可知,其电子密度降低,去致密,此时,其粘附性和延展性非常强,该方面的特性与普通滨蟹(*Carcinus meanus*)<sup>[4]</sup>和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)类似<sup>[1,2]</sup>。卵黄膜的这种特性如何形成,只是卵黄膜本身的变化,还是与皮层颗粒胞吐或卵子分泌的物质有关?以及由何种成分参与?有待进一步研究。锯缘青蟹成熟卵子具有两层卵黄膜,与普通滨蟹类似<sup>[4]</sup>,而与中华绒螯蟹成熟卵子具有三层卵黄膜不同<sup>[2]</sup>。从光镜和电镜观察可知,锯缘青蟹的卵柄(egg stalk)或卵索(funiculus)是由两层卵黄膜形成的,与普通滨蟹和中华绒螯蟹类似,而与日本沼虾由腹肢粘液腺(cement gland)分泌的粘液形成的不同<sup>[3]</sup>。

研究认为锯缘青蟹凡是受精的卵子,都有两层卵膜,内层为卵黄膜;外层为卵巢液(分泌物)的胶质粘液形成的次级卵膜<sup>[6]</sup>。作者观察到的结果与之不同,作者从卵巢中得到的游离成熟卵子和自然排出的卵子,无论其受精与否,都可以形成壳膜,电镜观察表明成熟卵子的具有两层卵黄膜,卵子受精后,发生皮层反应形成受精膜。研究发现锯缘青蟹卵巢发育过程中,在卵黄发生旺盛期,随着卵黄不断积累,卵子外面出现卵黄膜,是卵子在其成熟过程中分泌形成的<sup>[7]</sup>,所以锯缘青蟹的卵膜属于初级卵膜,与在普通滨蟹和中华绒螯蟹中观察到的一致。

在中华绒螯蟹粘着受精卵的刚毛不在外面,而贯穿卵外膜,在粘着处逐渐被拉引形成卵柄<sup>[1]</sup>。光镜和电镜观察发现锯缘青蟹受精卵卵柄形成方式除具有上述特征外,另一种附着方式与壳膜的特性有关,即壳膜的强粘性及膜上的皱褶突起,壳膜或皱褶突起一旦和刚毛接触,便粘附其上,由于刚毛的摆动和

卵子本身的重力作用,粘着的卵黄膜进一步伸长、扭曲,形成卵柄,若卵子与卵子接触便形成卵索,受精卵或未受精卵(数量很少)借助卵柄或卵索牢固地附着,亲蟹利用腹部携带并保护胚胎发育。

### 3.2 卵膜的功能

在许多动物中,成熟卵子外有一层或多层被膜,它们对卵的受精和胚胎发育具有十分重要的作用,这些膜性结构在海胆类和两栖类动物包括卵黄膜和凝胶膜,凝胶膜在海胆的成熟卵子已经具备,而在两栖类凝胶膜是由输卵管分泌形成的<sup>[8]</sup>。在十足目对虾科和单肢虾科中的一些种类,成熟卵子外有卵黄膜和皮质棒(cortical rod)或凝胶前身物质(jelly precursor)形成凝胶膜。凝胶膜的形成是成熟卵子入海水后,由皮质棒举起或凝胶前身物质膨胀、溶解、融合形成的<sup>[9,10]</sup>。

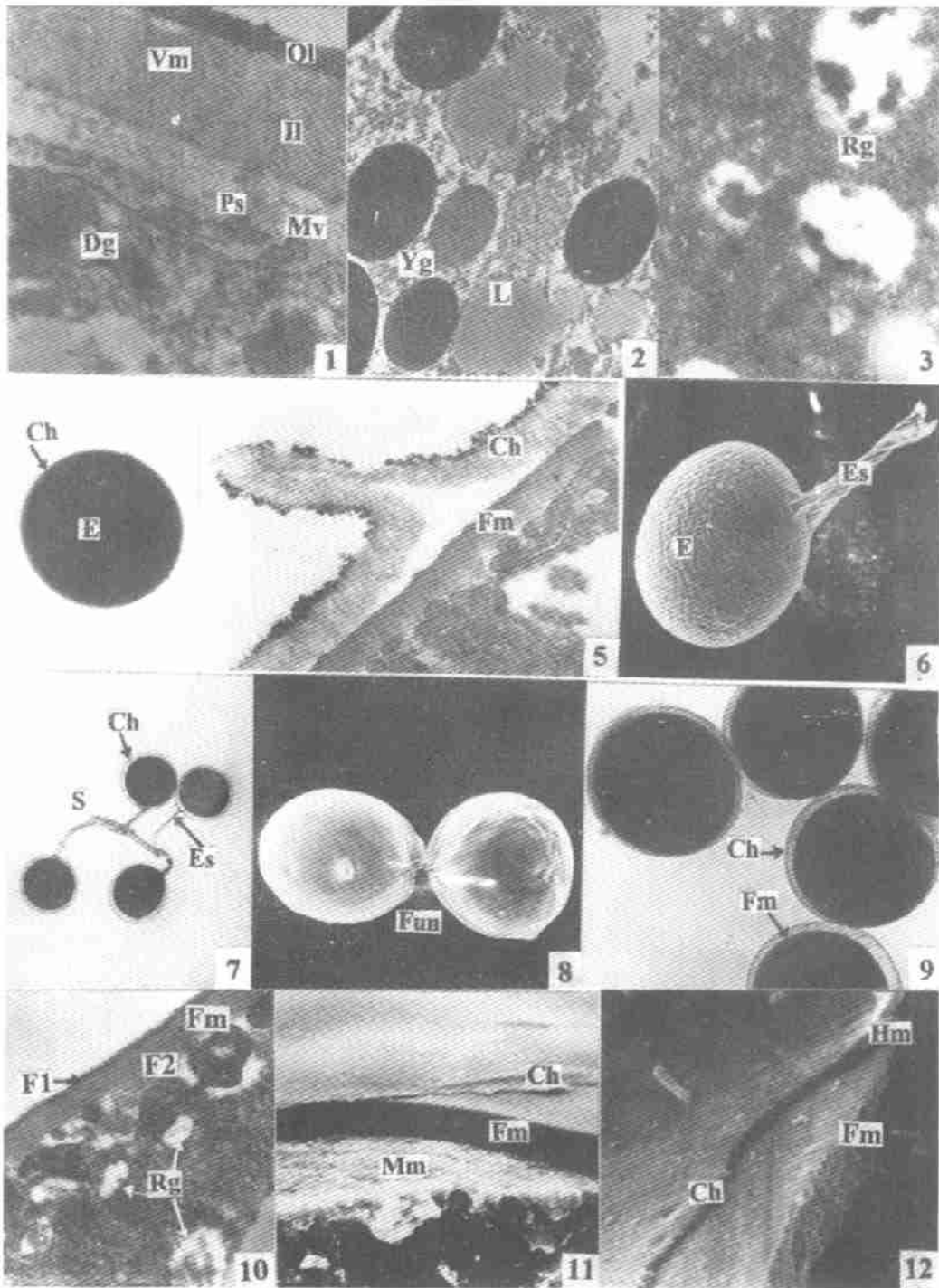
对棘皮动物如海胆的凝胶膜化学组成和其作用进行了细致的研究<sup>[8,11]</sup>。研究认为海胆的凝胶膜具有诱导顶体反应的作用<sup>[11]</sup>;在褐对虾(*Penaeus aztecus*)发现凝胶膜化学组成与其它种类如海胆的不同<sup>[10]</sup>,但认为具有同样的功能,一方面有保护作用,另一方面有诱导顶体反应作用。作者通过人工受精过程和卵水诱导顶体反应研究结果,初步认为锯缘青蟹卵黄膜变化后可诱导精子的顶体反应,具体卵黄膜中何种成分参与,尚有待进一步研究。

在中华绒螯蟹,滨蟹属一些种类和锐脊单肢虾(*Sicynia ingensis*),其孵化膜为初级卵膜,即孵化膜是由卵子分泌形成的<sup>[2,4,12]</sup>,而在长臂虾科的日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)的孵化膜除有初级卵膜外,还有粘液腺分泌的次级卵膜参与形成<sup>[3]</sup>。堵南山等<sup>[2]</sup>认为具有初级卵膜的种类卵子可离体孵化;日本沼虾受精卵离体后也可孵化<sup>[13]</sup>,孵化膜的形成来源不同可能与不同种属以及抱卵和离体孵化繁殖习性有关,孵化膜为胚胎提供了良好的发育环境,一方面保护胚胎免受外界物质侵扰,另一方面又是胚胎与外界进行物质交换的筛选膜。锯缘青蟹抱卵量相当大,李少菁等在80年代后期实验室实验的游离卵约有15%~40%的孵化率,所以卵子能否附着是孵化率高低的指标;此外发现锯缘青蟹幼体孵化出后卵柄仍系于刚毛上,然而在锯缘青蟹和中华绒螯蟹存在“流产”现象,即若抱卵蟹的环境条件变化较大,胚胎发生脱落,这些现象究竟是卵膜特性变化,还是亲蟹内分泌影响?尚有待研究,该方面深入研究可以为十足目抱卵孵化种类的受精卵规模化离体孵化提供依据,为其品种改良提供基础。

取材得到学生叶海辉和郭东晖帮助,电镜样品制作得到电镜室薛茹,倪子绵和陈平老师的帮助,在此一并致谢。

### 参考文献:

- [1] 堵南山. 甲壳动物学(下册)[M]. 北京:科学出版社,1993.
- [2] 堵南山,赖伟,姜焕伟. 中华绒螯蟹成熟卵形态和超微结构的研究[J]. 动物学报,1995,41(3):229-234.
- [3] 杨万喜,堵南山,赖伟. 日本沼虾卵子附着机制研究 I. 卵膜及卵子附着的扫描电镜观察[J]. 河北大学学报(自然科学版),1996,(4):34-40.
- [4] Cheung T S. The development of egg membrane and egg attachment in the shore crab, *Carcinus maenas*, and some related to decapoda[J]. J Mar Biol Ass U K, 1966, 46:373-400.
- [5] Lloyd A J, Yonge C M. Correlation between egg-carrying setae and gement glands crustacea[J]. Nature, 1940, 146:334.
- [6] 冯兴钱,方家仲. 青蟹养殖技术[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,1997.
- [7] 颜素芬,上官步敏,李少菁. 锯缘青蟹卵子发生的超微结构研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版),1994, 33(2): 231-234.
- [8] 丁汉波,仝允桐,黄浙,等. 发育生物学[M]. 北京:高等教育出版社出版,1987.
- [9] Clark W H, Lynn J W, Yudin A I. Morphology of the cortical reaction in the eggs of *Penaeus aztecus*[J]. Biol Bull, 1980, 158:175-186.
- [10] Lynn J W, Clark W H. Physiological and biochemical investigations of the egg jelly release in *Penaeus aztecus*[J]. Biol Bull, 1987, 173:451-460.
- [11] SeGall G K, Lennarz W J. Chemical characterization of the component of the jelly coat from sea urchin eggs responsible for induction of the acrosome reaction[J]. Dev Biol, 1979, 1:33-48.
- [12] Pillai M C, Clark W H. Hatching envelope formation in shrimp (*Sicynia ingensis*) a: origin and sequential exocytosis of cortical vesicle[J]. Tissue & Cell, 1988, 20(6):941-952.
- [13] 康现江,孙天才,王所安. 日本沼虾受精卵离体培养及其胚胎发育的初步研究[J]. 河北大学学报(自然科学版),1996,16(4): 41-45.



1. 示成熟卵子卵黄膜, 卵周隙, 质膜, 致密颗粒等,  $\times 20\,000$ ; 2. 示卵黄颗粒和脂滴,  $\times 80\,000$ ; 3. 示卵黄颗粒和环形颗粒,  $\times 27\,000$ ; 4. 示排出后的卵子和壳膜,  $\times 63$ ; 5. 示壳膜皱褶和受精膜,  $\times 27\,000$ ; 6-7. 示卵子和卵柄,  $\times 200$ ,  $\times 76$ ; 8. 示卵子之间卵索,  $\times 150$ ; 9. 示壳膜和受精膜形成,  $\times 150$ ; 10. 示皮层反应形成受精膜,  $\times 27\,000$ ; 11. 示壳膜, 受精膜和新质膜(镶嵌膜),  $\times 5\,000$ ; 12. 示孵化膜,  $\times 10\,000$ .

Ch: 壳膜, Dg: 致密颗粒, E: 卵, Es: 卵柄, Fm(Fm1, Fm2): 受精膜, Fm: 卵索, Hm: 孵化膜, Il: 内层, L: 脂肪滴, Mm: 镶嵌膜, Mv: 微绒毛, Ol: 外层, Ps: 卵周隙, Rg: 环形颗粒, S: 刚毛, Vm: 卵黄膜, Yg: 卵黄颗粒.