

中华绒螯蟹卵巢发育周期的 组织学细胞学观察^{*}

顾志敏 何林岗

(浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001)

提要 于1989—1990年, 用组织切片技术, 结合外观特征, 在光镜水平对浙北地区的中华绒螯蟹卵巢发育周期进行组织学、细胞学观察, 并对从卵原细胞增殖到卵母细胞生长、卵子成熟及卵巢退化、重新发生等进行系统观察研究。研究表明, 中华绒螯蟹可以观察到第一次成熟分裂中期相为成熟卵的标志, 并以此标志将卵子发生分成四期、卵巢发育分成VII期。结果还表明, 中华绒螯蟹雌蟹的成熟时间因所处的地理纬度不同而有所差异, 浙北地区雌蟹促产怀卵的最佳时间是3月份并延至4月上旬; 卵子必须借助海水及交配活动刺激才能达到成熟; 因故无法产卵或一直生活在淡水中的成熟雌蟹其整个卵巢即退化, 退化卵巢亦能重新发生, 新生卵子的形态、发育时序与首次等待青春期蜕壳的蟹一致; 孵后母蟹不仅能继续蜕壳生长, 其卵巢也能重新发生, 新生卵子的形态、发育时序如前一致; 但在卵巢结构上彼此又有明显的区别。

关键词 中华绒螯蟹 卵子发生 卵巢发育周期 组织学与细胞学

开展对中华绒螯蟹雌性卵巢发育的组织学、细胞学研究, 其结果不仅可直接指导育苗生产, 也可充实有关中华绒螯蟹生殖生理的内容。80年代初, 人们仅根据外观特征对卵巢发育进行分期。薛鲁征等(1987)曾对中华绒螯蟹雌性生殖系统的组织学进行了观察, 并将卵巢发育时相分成V期, 但文中对成熟卵的确定, 疏漏了第一次成熟分裂中期相这一重要标志; 对卵巢发育整个周期的观察也欠完整。为此, 笔者对中华绒螯蟹的卵子发生、卵巢发育, 尤其是卵巢的成熟、退化及重新发生等进行系统观察, 以期对中华绒螯蟹人工繁殖技术及生殖生理的深入研究提供科学依据。

1 材料与方 法

于1989年8月—1990年6月, 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)采自浙北地区, 系等待或业已青春期蜕壳的雌蟹。促产用海水, 取自杭州湾, 盐度约为12。促产水泥池, 1m²。雌蟹卵巢, 用Bataillon液固定, 常规石蜡包埋, 切片厚度在6—8μm, 亮

^{*} 农业部重点科研项目, 8604-4号。顾志敏, 男, 出生于1963年4月, 助理研究员。

本文实验承蒙中国科学院上海细胞研究所王幽兰先生指导; 成文后又得到华东师范大学堵南山、陈立侨二教授的审阅, 均此一并志谢。

收稿日期: 1995年4月25日, 接受日期: 1996年9月15日。

绿—蕃红对比染色。为弄清浙北地区中华绒螯蟹卵巢成熟、退化的时间,从1989年12月至1990年5月,每月将10只饲养在淡水中的蟹放入室内水泥池海水促产,同时进行卵巢的解剖、固定、切片,促产水温保持在 7°C 以上。于1987年10月4—6日,分别选择河北秦皇岛、安徽洪泽湖、浙江的湖州及温州的中华绒螯蟹,同时对其雌蟹卵巢进行解剖、观察,以探讨不同纬度地区卵巢发育情况。

2 结果

2.1 卵子的发生分期及成熟过程

2.1.1 卵子的发生分期 中华绒螯蟹的卵子在卵巢中主要经历了卵原细胞的增殖,初级卵母细胞的分化、生长、成熟四个过程,大致可分为四期。

2.1.1.1 卵原细胞期 卵原细胞经有丝分裂达到大量增殖(图版 I: 1, 箭头所示),并向初级卵母细胞转化。胞体呈圆形,胞径 $7-8\mu\text{m}$;核(N)圆且大,占据细胞的大部分,约 $6-7\mu\text{m}$;核仁约20个,细小,分散在核膜的边缘,核仁直径约 $0.7\mu\text{m}$;滤泡细胞(FC)呈单个游离状态。此期特点是卵原细胞的增殖。

2.1.1.2 初级卵母细胞小生长期 胞体渐呈卵圆形,胞径 $15-50\mu\text{m}$;核显著增大形成胚泡,内含网状染色质;核仁数减少至 $6-7$ 个,但大小不均,个别大的核仁直径达 $3\mu\text{m}$ 左右,增长迅速;滤泡细胞形成链状,但尚未分割包绕每个卵细胞(图版 I: 2)。此期的特点是初级卵母细胞的分化。

2.1.1.3 初级卵母细胞大生长期 此期初级卵母细胞的生长,又可分为前、中、后三期。

前期 卵母细胞开始进入指数生长期;胞体呈多边形,胞径 $70-100\mu\text{m}$;胞核仍呈透明,胞内染色质呈丝状;核径达 $30\mu\text{m}$ 左右;核仁数继续减少至 $3-4$ 个,核仁增大至 $7.3\mu\text{m}$;滤泡细胞开始分割包绕每个卵子;卵黄颗粒(Y)开始从边缘积累(图版 I: 3)。

中期 胞体继续增大达 $300-380\mu\text{m}$,胞质由嗜碱性向嗜酸性转变;核失去生发泡特征,核径 $20-29\mu\text{m}$;核仁停止增长,核仁数减至 $1-3$ 个;滤泡细胞变得单薄;卵黄颗粒继续增粗,达 $14\mu\text{m}$ 左右并涉及核位,致使核膜变得皱曲而不规则(图版 I: 4)。

后期 胞体达最大体积,胞径 $380\mu\text{m}$ 左右;核开始偏位,核膜模糊但仍可见 $1-2$ 个核仁;卵黄颗粒达 $16\mu\text{m}$ 左右,充满整个卵子(图版 I: 5)。

2.1.1.4 成熟期 卵子核仁消失,在卵细胞的边缘极易找到不同侧面的第一次成熟分裂中期相(图版 I: 6, 7, 箭头所示),其纺锤体长轴平行于卵膜且与之明显靠近,两组子染色体将相互分离,所有染色体均呈点状。此期的特点是卵子的成熟。

2.1.2 卵子的成熟过程 在1990年3月1日—1990年3月25日,随机选取刚交配完毕尚未排卵的雌蟹及同期放入海水促产尚未交配的雌蟹,即刻解剖固定卵巢,具体观察数据见表1。可知,两者在卵径、成熟系数及颜色上均无显著差别(经 T 检验,成熟系数 $P>0.3$)。组织切片表明,已交配蟹的卵子已达成熟,而未交配雌蟹的卵子依然可见明显核仁,尚处大生长后期,这在所解剖的5组中均无例外。这表明,交配活动是促使中华绒螯蟹卵子成熟的一个必要条件。

表 1 交配与未交配中华绒螯蟹雌蟹解剖观察结果

Tab.1 Dissection results for mating and unmating female crab (*E. sinensis*)

组 别	体宽 × 体长 (cm, 平均)	卵 径 ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	成熟系数 (% \pm SD)	外观结果	卵巢分期
已交配	4.9 × 4.4	350 ± 25	10.5 ± 0.25	纳精囊膨大有精液	V
未交配	5.2 × 4.2	350 ± 25	10.16 ± 0.17	纳精囊未膨大无精液	IV

2.2 卵巢的发育分期与重新发生

2.2.1 卵巢的发育分期 中华绒螯蟹的卵巢中, 存在着三批不同发育程度的卵子, 同一批卵细胞的成熟度基本一致。但从发育时序及各批卵子所占的数量百分比看, 第一批卵细胞都占绝对的主导地位。因此, 我们主要依据第一批卵细胞的发育状态将中华绒螯蟹的卵巢发育分为 VII 期。

I 期 主要由处于卵原细胞期的卵子(OG)组成。卵巢呈透明乳白色, 处痕迹状态很难称重; 尚能看到卵原细胞的有丝分裂增殖(图版 I: 1, 箭头所示), 后期形成卵母细胞增殖中心。此期的主要特点是, 卵原细胞的增殖、分化及卵黄发生的准备。

II 期 主要由处于初级卵母细胞小生长期(S)的卵子组成。卵巢呈乳白或淡黄色; 成熟系数约 0.2%; 卵原细胞停止增殖, 次级滤泡形成(图版 I: 2)。此期的特点是, 细胞开始指数增长, 雌蟹正处于青春期蜕壳高峰。

III 期 主要由处于初级卵母细胞大生长期前期(L1)及中期(L2)的卵子组成。卵巢呈棕色或咖啡色, 成熟系数由 0.5% 跃居 8% 左右; 卵黄颗粒积累迅速, 但核膜及核仁尚清晰(图版 I: 3, 4)。此期的发育特点是, 卵子卵黄积累及体积呈指数增长。

IV 期 主要由处于初级卵母细胞大生长期后期(L3)的卵子组成。卵巢棕褐色或咖啡色; 卵子达最大体积, 成熟系数达 9% 以上; 核膜模糊但核仁依然可见(图版 I: 5)。此期的特点是, 卵黄发生和生长基本结束, 雌蟹等待交配怀卵。

V 期 主要由处于成熟期的卵子(M)组成。卵巢中的卵子呈半透明并脱离卵周膜呈游离状。卵粒清晰可辨; 成熟系数及卵径停止增长; 核仁消失并明显可见第一次成熟分裂中期相(图版 I: 6, 7, 箭头所示)。此期的特点是, 核进入第一次成熟分裂中期, 已达成熟即可排卵受精, 为刚经交配的蟹, 历时短暂。

VI 期 主要由退化卵子(R)组成。卵巢萎缩呈粘稠腐烂状, 着色困难; 出现许多空泡(V), 滤泡细胞开始吸收卵内营养(图版 I: 8)。此期的特点是, 成熟后无法产出的卵巢因过熟而退化, 局部开始吸收。

VII 期 卵巢内主要由少量残存的尚未被吸收完毕的退化卵子、已被吸收完毕的空泡(V)及另一批处于大生长期前期的新生卵母细胞(L1)等三部分组成; 卵巢内滤泡细胞重新发达起来, 卵巢壁明显增厚(图版 I: 9, 10)。此期的特点是, 整个卵巢过熟退化, 或已孵母蟹残存卵的吸收及卵子的重新发生。

2.2.2 卵巢的退化及重新发生 发育成熟的雌蟹卵巢, 若因某种原因无法产出或在淡水中饲养时间过久时, 就会因过熟而退化。与成熟卵相比, 退化卵巢卵子形态的最大特

点是, 卵细胞变得凹凸不平, 卵周膜粗糙发生皱褶、局部断裂(图版 I: 6, 箭头所示)。最终, 这些退化卵无法产出而在体内被旺盛的滤泡细胞吞噬吸收, 有时易导致蟹的死亡。

整个卵巢已退化的亲蟹, 到了8月中旬, 退化卵已基本被吸收干净。此时, 滤泡细胞发达, 能看到个别尚未被吸收完毕的退化卵及另一批正处于大生长期前期的卵。新生卵子的发育时序、形态与当年等待青春期蜕壳蟹的一致; 所不同之处是, 前者在卵巢中存在着许多空泡, 卵子分散, 未形成发育中心(图版 I: 9)。

另外, 3月份促产孵化后一直饲养在海水池中的孵后母蟹, 在8月中旬开始继续蜕壳, 蜕壳前后其形态、大小均发生显著的变化。到了9月中旬, 孵后母蟹已经历了第二次蜕壳, 此时, 体内卵巢呈乳白色卵子直径在 $100-125\mu\text{m}$; 组织切片观察表明, 此时的卵巢虽尚存在着个别残留的尚未被吸收完毕的过熟卵, 但在新生的卵子中, 处于大生长期初期的卵占居着主导地位。卵巢内, 滤泡细胞发达, 新生卵基本形成各自的发育区, 明显区别于过熟退化的卵巢。新生卵的发育时序、形态亦与当年首次经历青春期蜕壳蟹的一致(图版 I: 10)。

2.3 卵巢成熟退化的时间

浙北地区中华绒螯蟹在12月下旬卵巢已发育到IV期, 此后的几个月内, 卵子的卵径变化不大, 但卵巢成熟系统依然有增加的趋势(表2), 至下一年的2月14日才出现雌、雄蟹的交配反应, 2月21日首次出现怀卵蟹, 但整个2月份促产率仅20%。促产高峰是3月份, 达100%; 延至4月上旬, 促产率仍可达90%。成熟的雌蟹卵巢, 在3月底4月初, 出现个别退化卵, 之后, 随着自然界水温的回升, 卵巢内退化卵增多, 至4月中旬, 大部分卵子已退化, 到5月上旬整个卵巢全部退化, 这在所解剖的10只个体中无一例外。组织切片的观察结果也与之相应。

表2 不同时间中华绒螯蟹解剖促产结果

Tab.2 Dissection and inducing results of the crab (*E. sinensis*) in different period

时 间 (月·日)	卵 径 ($\mu\text{m}\pm\text{SD}$)	成熟系数 ($\%\pm\text{SD}$)	卵 巢 发 育	促 产 率 (%)	只 数
12.20	350 ± 25	9.57 ± 0.32	IV	0	10
01.05	350 ± 25	9.28 ± 0.25	IV	0	10
02.05	350 ± 25	10.90 ± 0.10	IV	20	10
03.02	350 ± 25	11.44 ± 0.15	IV	100	10
04.04	375 ± 25	11.00 ± 0.22	少量退化卵	90	10
04.18	400 ± 25	11.00 ± 0.22	大部分退化卵	0	10
05.10	350 ± 25	10.00 ± 0.31	全 部 退 化	0	10

3 讨论与结论

3.1 中华绒螯蟹卵子发生及卵巢发育的合理分期

70年代初, 对中华绒螯蟹卵巢发育分期仅根据外部特征, 无法正确分期。薛鲁征等

(1987)根据外观特征结合组织学观察将中华绒螯蟹卵巢发育分成五期,但文中以组织结构观察来确定卵子的成熟标志,疏漏了第一次成熟分裂中期相这一重要时序,也未曾涉及卵巢的退化和重新发生,致使发育分期欠完整。笔者通过对中华绒螯蟹卵巢内、外特征的对比,以组织学、细胞学观察为主,在掌握和认识了从卵原细胞增殖到卵子成熟及卵巢的退化和重新发生等规律的基础上,将卵子发生分成四期、卵巢发育时相分成 VII 期,笔者认为这将更为完整和系统地反映出中华绒螯蟹卵子发生、卵巢发育的特点。

3.2 中华绒螯蟹卵巢发育可以观察到第一次成熟分裂中期相并以此作成熟卵标志

就中华绒螯蟹来说,在外观上,长足体积的卵子与成熟卵是不易区分的;从细胞学的角度,所谓“卵子的成熟”即指卵子已进入第一次成熟分裂中期,等待受精。在中国对虾(*P. chinensis*)、日本对虾(*P. japonicus*)、长毛对虾(*P. penillatus*) (洪水根等, 1988) 卵子成熟的一个显著标志是在老一代的卵母细胞边缘出现周边体(Periphalbody)并由圆形变成短棒状作辐射状排列,但在中华绒螯蟹上无这一特殊结构。上官步敏等(1991),对锯缘青蟹(*Scylla serrata*)的研究则是以“核明显皱缩、核膜及核仁模糊不清”作为成熟的标志,但由于中华绒螯蟹属多黄卵,卵黄颗粒非常发达,常使核及核仁难以辨清;加之,在自然界卵子从生长结束到成熟尚需 2 个月左右的时间且需交配活动的刺激。为此,我们调整了染色对比度,从而清楚地显示出长足体积卵的核及核仁;并以观察到第一次成熟分裂相作为成熟的标志,这就能更为正确地反映中华绒螯蟹卵子成熟规律。

3.3 中华绒螯蟹的卵子必须借助海水及交配活动的共同刺激才能达到成熟

交配导致卵巢迅速发育和卵黄合成在许多虾蟹均有报道(Bawab et al., 1988),在锯缘青蟹中,通常认为未交配的雌蟹不能促使性腺成熟(徐君卓, 1984)。就中华绒螯蟹而言,笔者的试验证明,雌蟹在淡水中卵巢发育只能到 IV 期,即便有个别个体在淡水中交配,其卵巢发育也不能继续,必须借助海水及交配活动的共同刺激,才能从 III 期发育到 IV 期,这尚属首次报道。显然,蟹的交配活动及海水作为一种生物、物理刺激因子,启动了体内有关调控系统,使之作用于卵母细胞,促进卵子进入第一次成熟分裂中期,等待受精。犹如鱼类必须借助激素或水流刺激才能促使卵子成熟一样,其机理是一致的。

3.4 中华绒螯蟹雌蟹成熟时间因所处的地理纬度不同而有所差异

薛鲁征等(1988)认为,上海地区的中华绒螯蟹雌蟹,在 12 月底达到成熟,其实,文中所指的卵是长足体积的卵;赵乃刚等(1988)根据促产结果确认安徽滁县地区中华绒螯蟹雌蟹交配、怀卵的高峰是 2 月份。笔者曾在 1987 年 10 月,从自然界随机取样解剖了不同纬度地区的中华绒螯蟹雌蟹,结果表明,蟹的卵巢发育有随纬度愈高卵巢成熟愈早的倾向,浙北地区雌蟹的发育程度要比洪泽湖地区推迟一个月左右(表 3)。由此可知,浙北地区(31°N)与安徽滁县地区(32.5°N)雌蟹卵巢成熟的差异正是由于地理纬度不同所致。

3.5 中华绒螯蟹的孵后母蟹仍能蜕壳生长其卵巢亦能重新发生

以往普遍看法是中华绒螯蟹的生命周期为 2 年,青春期蜕壳是其生命的最后一次蜕壳(赵乃刚等, 1988)。笔者不仅观察到了孵后母蟹的再次蜕壳,而且也观察到重新发生

的卵子, 其形态、发育时序与等待青春期蜕壳蟹一致。这进一步证实和支持了“中华绒螯蟹不仅在未成熟阶段蜕壳, 就是成熟以后也仍能继续生长与蜕壳”(堵南山, 1988)这一看法。另外, 整个卵巢过熟退化后重新发生现象或许在锯缘青蟹上也存在着, 上官步敏等(1991), 在对这种蟹卵巢发育周期组织学观察中, 曾报道: “较大个体中, 卵巢中卵子的胞质严重空化, 很少有嗜色颗粒, 还可见到大量增殖的滤泡细胞和卵原细胞”, 并认为这是“卵巢发育早期的退化”现象, 笔者所观察到的中华绒螯蟹退化卵巢的重新发生的结果与之极为相似。但究竟是否属同一时序, 尚有进一步探索的必要。

表 3 不同地区中华绒螯蟹卵巢发育观察结果

Tab.3 The ovarian development observation of the crab (*E. sinensis*) in different areas

地 区 (月 · 日)	纬 度 (N)	卵 径 ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	成 熟 系 数 (% \pm SD)	卵 巢 发 育
河北. 秦皇岛(10.06)	40°	350 \pm 25	12.4 \pm 0.56	IV
安徽. 洪泽湖(10.05)	33°	200 \pm 25	3.43 \pm 0.27	III _后
浙江. 湖 州(10.06)	31°	100 \pm 25	0.65 \pm 0.15	III _前
浙江. 温 州(10.04)	28°	50 \pm 10	0.25 \pm 0.05	II

参 考 文 献

- 上官步敏等, 1991, 水产学报, 15(2): 96—101。
 赵乃刚等, 1988, 河蟹的人工繁殖与增养殖, 安徽科学技术出版社(合肥), 70—142。
 薛鲁征等, 1987, 华东师范大学学报(自然科学版), 3: 88—97。
 Bawab, F. M. and El-Sherief, S. S., 1988, *Crustaceana*, 54(2): 139—148。

HISTOLOGICAL AND CYTOLOGICAL OBSERVATION ON THE DEVELOPMENT CYCLE OF CRAB (*ERIOCHEIR SINENSIS*) OVARY

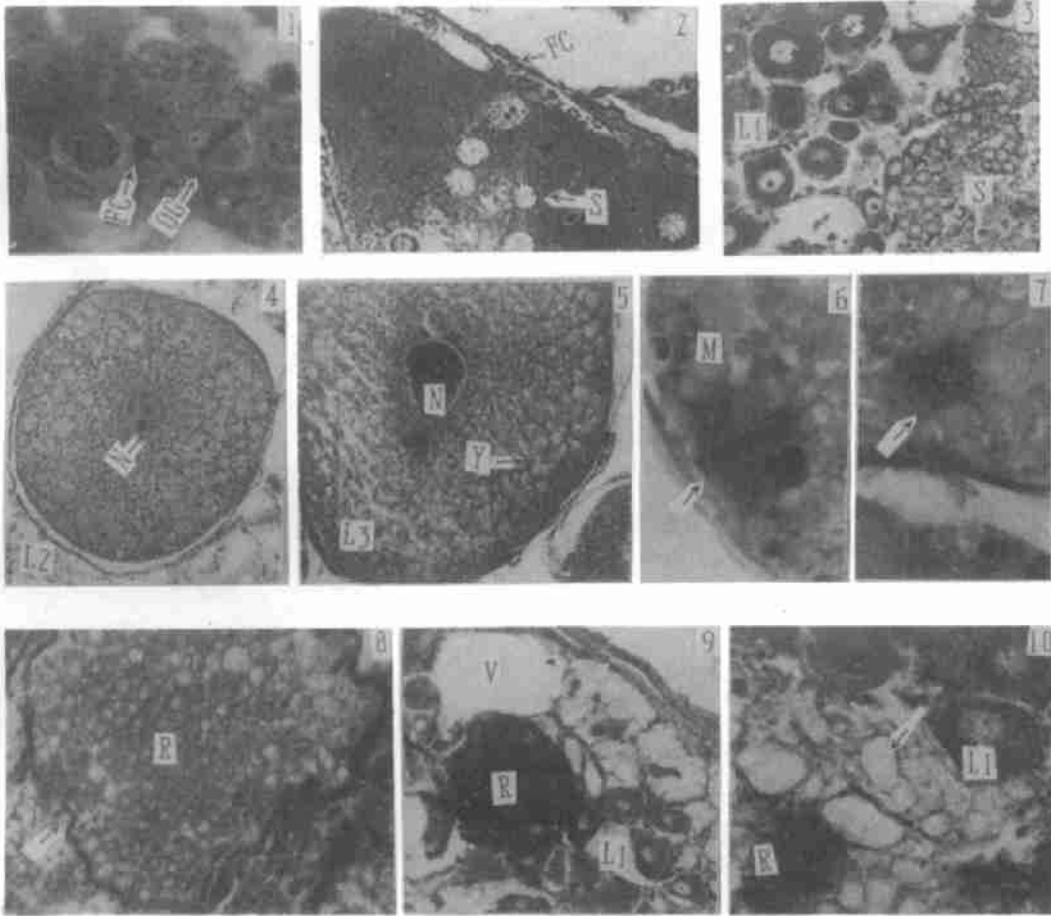
Gu Zhimin, He Lingang

(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001)

Abstract Based on comparison of internal and external features of ovary development, and its histological and cytological observation with tissue section technique, the ovary development cycle in pubertal female crabs (*Eriocheir sinensis*) collected in north Zhejiang Province from Aug. 1989 to Jun. 1990, was investigated, from multiplication of oogonium to growth of oocyte, physiological maturation of ovum, degeneration and regeneration of ovary etc. Groups of

ten crabs hatched in a pool (with salinity 12, above 7 °C, seawater from Huzhou Gulf) were used for the experiment. The crab ovum was multi-yolked but the metaphase of the first division could be observed and regarded as the marker of ovum maturation. The crab oogenesis can be divided into four stages, oogonium stage, oocyte I minor growth stage, oocyte I major growth stage (further divided into antephase, metaphase and postphase) and ovum maturation stage. The ovary development cycle can be divided into seven stages according to the oogenesis and degeneration and regeneration of the ovary. Stage I ovary mainly consists of multiplying and differentiating oogonium. Stage II ovary mainly consists of oocyte I in minor growth and stage III consists of oocyte in major growth ante-phase and metaphase with yolk accumulation. Oocyte I in major growth postphase is observed in stage IV ovary with yolk growth and genesis ended. Stage V ovary is characterized by matured ovum with first division metaphase nucleus; the crab can spawn then. Stage VI ovary consists of degenerated ovum; absorption begins. Stage VII ovary consists of some unabsorbed degenerated ovum and vesicles, formed from degenerated ovum absorbed by follic cells, and neogenesis oocyte in major growth ante-phase. The ovary maturation season was studied with female crabs collected from Hebei (40 ° N), Anhui (33 ° N), northern Zhejiang (31 ° N) and southern Zhejiang (28 ° N). The ovum maturation season varied in different latitude. The crabs in northern Zhejiang Province matured from March to April, and in May almost every crab degenerated in the ovary. The ovum could reach maturation only with the help of seawater and mating activities. When the female stayed in freshwater, the ovary would degenerate and the degenerated ovum will be adsorbed by the follic cells. Neogenesis ovum, which is identical in morphology and development with the pubertal female crabs, can be observed at the same time. Molting and ovary regeneration could be observed in the spawned crabs but there are differences between the tissue structures of the pubertal crabs, the crabs with ovary-adsorption and the spawned crabs.

Key words *Eriocheir sinensis* Ovum generation Ovarian development cycle
Histological and cytological characteristics



图版 I 中华绒螯蟹卵子发生及卵巢发育的组织学细胞学特征

Plate I Histological and Cytological Characteristics of oogenesis and ovary development in the crab *E. sinensis*

1. I期卵巢, 箭头所示卵原细胞有丝分裂中期相, $\times 500$. 2. II期卵巢, 小生长期的卵母细胞, $\times 200$. 3. III期卵巢, 第一批卵处于大生长期前期; 第二批卵尚处小生长期, $\times 200$. 4. 晚III期卵巢, 卵细胞处大生长期中期, $\times 200$. 5. IV期卵巢, 核膜已变得不规则, $\times 200$. 6. V期卵巢, 成熟卵细胞局部, 箭头示第一次成熟分裂中期相, 横切, $\times 660$. 7. V期卵巢, 成熟卵细胞局部, 箭头示第一次成熟分裂中期相, 纵切, $\times 660$. 8. VI期卵巢, 退化的卵细胞, 箭头示断裂的卵周膜, $\times 200$. 9. VII期卵巢, 退化卵, 空泡, 及另一批重新发生的卵, $\times 66$. 10. VII期卵巢, 孵后母蟹的卵巢结构, 残存退化卵, 处大生长期前期新生卵, 发达的滤泡细胞(箭头所示), $\times 100$.
 FC. 滤泡细胞; L1. 大生长期前期的卵母细胞, 重新发生卵; 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. 成熟卵细胞; N. 卵母细胞核; OG. 卵原细胞; R. 退化卵母细胞; S. 小生长期的卵母细胞; V. 空泡; Y. 卵黄颗粒.