

文章编号 : 1004 - 7271(2003)02 - 0106 - 07

中华绒螯蟹性腺发育的形态学、 组织学和组织化学变化

吴萍^{1,2}, 楼允东², 邱高峰²

(1. 苏州大学农业科技学院, 江苏 苏州 215006; 2. 上海水产大学渔业学院, 上海 200090)

摘要:以组织学、组织化学方法研究了中华绒螯蟹后期的性别分化过程。结果表明,中华绒螯蟹雌雄个体在此过程中形态学变化差异显著。雌蟹最宽腹节由第一节逐渐向第五节转变,雄蟹则始终为第三节。雄蟹最长腹节长与背甲长的比率随背甲的增大而减小,而雌蟹则相反,其形态上的差异可作为区分幼蟹性别的直观依据。卵巢从发生到成熟,其颜色由透明、白色、浅咖啡色、豆沙色至深豆沙色转变,精巢的发生则早于卵巢,当卵巢仅为原始生殖细胞团时,精巢已初步具有完整的形态,并且精子出现的时间早于成熟期初级卵母细胞。组织化学研究表明,在精子发生和成熟期卵母细胞形成过程中,都存在多糖类物质积累的过程,同时卵母细胞还进行蛋白质的积累,并且蛋白质的积累早于多糖类物质的积累。

关键词:中华绒螯蟹;性腺发育;形态学;组织学;组织化学

中图分类号 S917 文献标识码: A

Morphological, histological and histochemical variation of sexual gland development in *Eriocheir sinensis*

WU Ping^{1,2}, LOU Yun-dong², QIU Gao-feng²

(1. Agricultural Science and Technology College, Soochow University, Suzhou 215006, China;

2. Fisheries College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The latter part of the sex differentiation of *Eriocheir sinensis* was studied by histological and histochemical methods. The results showed that there were significant differences between male and female during the process. The maximum abdominal segment transformed from I to V in different stages of growth in female, while in male, the maximum abdominal segment was III throughout its life. The ratio of the length of the longest abdominal segment to the length of the back of carapace decreased in pace with increasing of the latter in male, and the female was contrary to this. It was easy to distinguish the immature male and female on the basis of morphological differences. In the process of occurrence to maturity of ovaries, the colors were from transparency to white, light coffee, brown and dark brown. The occurrence of testes was earlier than ovaries. The testes had been in a complete shape when the ovaries were a crowd of primary germ cells. And the time when the sperms occurred was earlier than the time when the oocytes of maturation formed. Histochemical studies showed that there was an accumulation of polysaccharose during the process of forming sperms and oocytes of maturation. It was also a process of accumulating protein in forming oocytes of maturation. And the time when the protein began accumulating was earlier than that of

收稿日期 2003-02-27

作者简介:吴萍(1972-),女,江苏苏州人,讲师,硕士,主要从事水产动物遗传育种教学与研究,上海水产大学1997届毕业生。E-mail: suzhou_wuping@163.com

the polysaccharose.

Key words : *Eriocheir sinensis* ; sexual gland development ; morphology , histology ; histochemistry

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 肉质鲜美 , 具有很高的食用及药用价值 , 雌蟹较之雄蟹 , 更受消费者青睐 , 实现中华绒螯蟹的雌性化养殖 , 将具有重要的经济价值和理论意义。通过促雄腺移植的方法获得雄性化的雌体 , 并产生全雌性后代的研究已屡见报道 , 雌体移植造雄腺后的雄性化程度与其手术前性别的分化完全与否密切相关^[1-2]。但迄今为止 , 有关中华绒螯蟹性别分化方面的研究开展较少。本文从形态学、组织学和组织化学方面研究了其后期的性别分化过程。

1 材料和方法

1.1 材料

试验用中华绒螯蟹于 1996 年 5 月 - 1997 年 4 月分批取自上海水产大学南汇养殖场和图们路农贸市场 , 背甲宽(背甲第四侧齿之间的宽度) δ ~ 55mm , 背甲长(额缘与后缘之间的长度) 4.7 ~ 50mm。

1.2 方法

1.2.1 形态观察和测量

共取雌蟹 66 尾 , 雄蟹 48 尾 , 观察幼蟹至成蟹腹部形态的变化 , 并对背甲宽、背甲长、腹部宽(腹部第一腹节宽)、腹部长^[3-4]、最长腹节长、腹甲上方三角形的宽和高(腹甲的 1、2、3 节愈合形成三角形, 宽和高即为三角形的底和高)等进行测量 , 观察腹部最宽的腹节(最宽腹节)的变化并测量其大小 , 所得数据用 Excel 97 软件统计处理并作图。

1.2.2 组织学

解剖活体取出各发育时期雄蟹的精巢和雌蟹的卵巢 , 用 Bouin 氏液固定 , 常规石蜡切片 , 切片厚约 6 ~ 7 μ m , Delafield 氏苏木精-伊红染色 , Olympus BH - 2 型显微镜观察、摄影。

1.2.3 组织化学

解剖活体取出各发育时期河蟹的性腺 , 用 Carnoy 氏液固定 , 常规石蜡切片。用 Fleugen 反应显示核酸 , 茚三酮-Schiff 反应显示蛋白质 , PAS 反应显示多糖 , Olympus BH - 2 型显微镜摄影。

2 结果

2.1 中华绒螯蟹发育过程中雌雄外部形态变化

当背甲宽 5.0mm、长 4.7mm 时 , 雌雄河蟹在外观上几乎没有差别 , 腹部都呈三角形。随着生长 , 雄蟹腹部仍保持原来的三角形 , 雌蟹腹部逐渐变圆 , 并覆盖住头胸部的整个腹面。

雄蟹在发育过程中腹部形态没有明显变化 , 第三腹节始终最宽(表 1)。当背甲宽大于 27mm 时 , 最宽腹节宽与腹部宽开始出现分离 , 后者与背甲宽的比率基本不变 , 而前者与背甲宽的比率则慢慢增大 , 由此表明 , 第一腹节生长变慢(图 1)。

雌蟹腹部形态则变化明显 , 当背甲宽小于 18mm 时 , 腹部形态和雄蟹相似 , 第一腹节和第三腹节等宽 , 且其和背甲宽的比率与雄蟹的对应值相近。随着生长 , 雌蟹腹部生长速度加快(图 2) , 最宽腹节不断变化 , 从第一腹节逐渐向第五腹节转变(表 1)。

表 1 发育过程中不同性别河蟹最宽腹节变化情况

Tab.1 The change of the maximum abdominal segment of male and female in the development process

	雌蟹背甲宽 (mm)				雄蟹背甲宽 (mm)		
	< 18	18 ~ 20	20 ~ 43	43 ~ 45	< 27	> 27	> 45
最宽腹节	1 3	3 4	4	4 5	1 3	3	3
最宽腹节宽/背甲宽 (%)	44.6 \pm 2.5	48.9 \pm 1.0	58.6 \pm 9.2	78.2 \pm 1.6	45.6 \pm 1.5	45.5 \pm 1.1	46.1 \pm 0.7

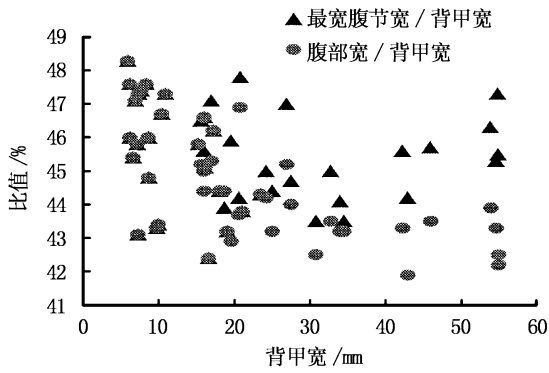


图1 雄蟹生长过程中腹部形态变化

Fig.1 The morphological change of abdomen of male during the growth process

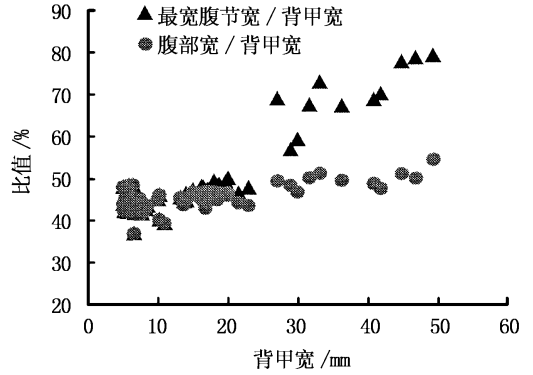


图2 雌蟹生长过程中腹部形态变化

Fig.2 The morphological change of abdomen of female during the growth process

此外,雌、雄河蟹形态测量参数表明(表2),上方三角形高/宽、最长腹节长/背甲长的值,在雄蟹和雌蟹之间差异极为显著($P < 0.01$);腹部宽/背甲宽、腹部长/背甲长的值,在雄蟹和雌蟹之间无显著差异($P > 0.05$).

表2 雌、雄河蟹形态测量参数比较

Tab.2 The comparison of morphologic parameters between male and female

性别	上方三角形高/宽(%)	最长腹节长/背甲长(%)	腹部宽/背甲宽(%)	腹部长/背甲长(%)
雌性	49.2±3.7	19.4±1.2	45.4±2.9	63.3±4.2
雄性	54.3±5.6	17.5±1.5	44.8±1.8	62.5±2.2

在雌雄河蟹的生长过程中,最长的腹节均是第六腹节,但其生长情况在两者不尽一致。雄蟹最长腹节长与背甲长的比率随背甲的增大而减小,而雌蟹则相反,且最长腹节长与背甲长的比值大于雄蟹,说明同样大小的个体,雌蟹第六腹节长于雄蟹(图3A)。

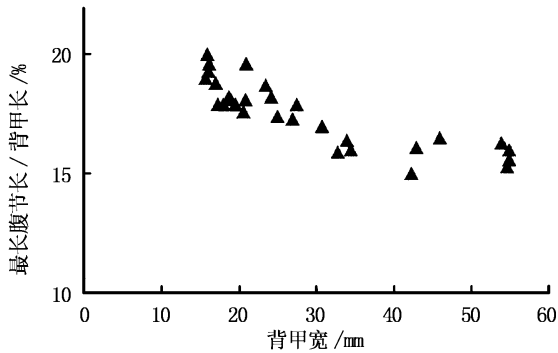


图3 雄蟹生长过程中最长腹节的变化

Fig.3 The change of the longest abdominal segment of male during the growth process

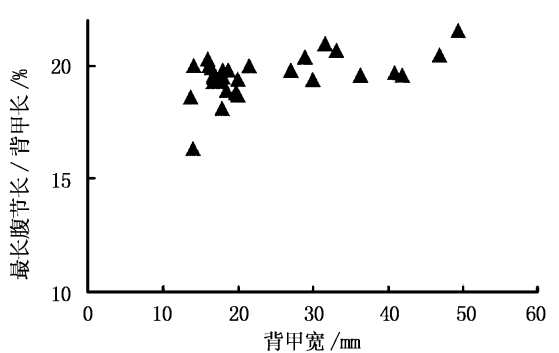


图4 雌蟹生长过程中最长腹节的变化

Fig.4 The change of the longest abdominal segment of female during the growth process

2.2 中华绒螯蟹发育过程中性腺组织学变化

2.2.1 卵巢发育的组织学变化

蟹苗生长至翌年3月下旬,背甲宽40mm、长37.2mm、体重26g的中华绒螯蟹雌体,其卵巢形态肉眼可辨。早期的卵巢很小,位于心脏和内肠道的背面,呈透明状,约3mm大小,左右各一,主要由疏松结缔组织和内生生殖上皮构成。原始生殖细胞团紧贴于内生生殖上皮的侧面,原始生殖细胞呈圆形,核大而明显,胞质呈弱嗜碱性(图版I-1)。

至6月下旬,卵巢外观呈白色。卵巢内仍有大量疏松结缔组织和内生殖上皮,内生殖上皮将卵原细胞分隔成一个个发育区(图版 I-2)。各发育区内主要以小生长期的初级卵母细胞和卵原细胞为主。

卵巢发育到一定阶段,约7月上旬,各发育区之间逐渐汇合,基本具有卵巢的整体形态(图版 I-3)。卵巢内仍然以卵原细胞和小生长期的初级卵母细胞为主,已有大量滤泡细胞。至9月份,卵巢呈H形,白色,卵巢内已开始有大生长期1的初级卵母细胞形成,其周围已有单层滤泡细胞包围(图版 I-4)。

10月份,卵巢体积已较大,呈浅咖啡色,其中已有大生长期2的初级卵母细胞形成,滤泡细胞成极薄的扁平细胞层,紧贴在初级卵母细胞的周围(图版 I-5)。此外,卵巢中尚有各级卵细胞并存。

11月份的卵巢已呈豆沙色,几乎充满整个体腔,卵巢内主要以成熟前期的初级卵母细胞为主(图版 I-6)。至12月份时,卵子已基本成熟,卵巢呈深豆沙色,充满整个体腔,卵粒明显,已从滤泡腔中游离出来,核消失。

2.2.2 精巢发育的组织学变化

精巢的发生早于卵巢,3月下旬,精巢已初步具有完整的形态。在精巢发育早期,各生精小管之间有很多结缔组织相隔,结缔组织内有许多血窦,此时生精小管内精原细胞占绝对优势(图版 I-7)。

雄蟹生长至6月份,精巢内已开始有初级精母细胞和次级精母细胞形成(图版 I-8)。7月份,精巢内已经有精细胞形成,各个生精小管中,精细胞发育并不同步。一般自10月份至翌年3月,精巢内精细胞处于分化后期,组织切片观察发现,生精小管内有许多未成熟的精子镶嵌在营养细胞质突形成的网格上(图版 I-9)。在发育较早的河蟹,精巢内精子成熟后已从生精小管内释放,使生精小管内留下很多空腔(图版 I-10)。

2.3 中华绒螯蟹发育过程中性腺的组织化学变化

2.3.1 雌性生殖细胞的组织化学变化

卵巢发育过程中各级卵细胞过碘酸-Schiff反应显示糖类(PAS反应)和茚三酮-Schiff反应显示蛋白质的结果如表3所示。

表3 各级卵细胞细胞质PAS和茚三酮-Schiff反应结果

Tab.3 The results of two histochemical reactions of the oocytes in every period

各级卵细胞	PAS反应	茚三酮-Schiff反应
卵原细胞	-	+
小生长期初级卵母细胞	-	+
大生长期1初级卵母细胞	+	+
大生长期2初级卵母细胞	+	++
成熟前期初级卵母细胞	++	+++

注:+++强阳性; ++阳性; +弱阳性; -阴性。

2.3.2 雄性生殖细胞的组织化学变化

各级精细胞Feulgen反应核均为阳性,且当发育至精细胞时,核开始呈强阳性,这与它们随着发育体积不断缩小,核内染色质高度浓缩有关(表4)。

表4 各级精细胞的三种组织化学反应结果

Tab.4 The results of three histochemical reactions of the spermatid in every period

组织化学反应	精原细胞	初级精母细胞	次级精母细胞	精细胞		精子	
				核	顶体囊	核杯	顶体囊
PAS	-	-	-	-	++	-	+++
Feulgen	+	++	++	+++	-	+++	-
茚三酮-Schiff	+	+	+	+	+	+	+

注:同表3。

3 讨论

3.1 形态学变化是区分河蟹性别最为直观的依据

许步劭^[5]等认为,河蟹从第一期幼蟹雌雄性别便已开始分化,雌蟹有4对腹肢,雄蟹具2对交接器。此时从外形上较难看出两者有何区别。本文研究表明,同一性别的河蟹腹部上方三角形高与宽之比,在其生长过程中基本保持恒定。雌蟹腹部上方三角形的宽约为高的两倍,而在雄蟹,其比率远小于2。据此,在雌蟹腹部尚未发生明显变化时,在不损伤蟹体的情况下可快速地判断河蟹性别。

雄蟹在生长过程中腹部形态基本保持不变,而雌蟹则变化明显,这和日本绒螯蟹(*Eriocheir japonicus*)变化趋势基本一致^[4],但最宽腹节数具体转变的个体大小并不完全一样。日本绒螯蟹背甲宽为20mm以下时,最宽腹节为第一腹节,20~30mm时为第三腹节,30~50mm时为第四腹节,50mm以上时为第五腹节。可能因为两者毕竟不属同一种,形态上有其特定的差异。

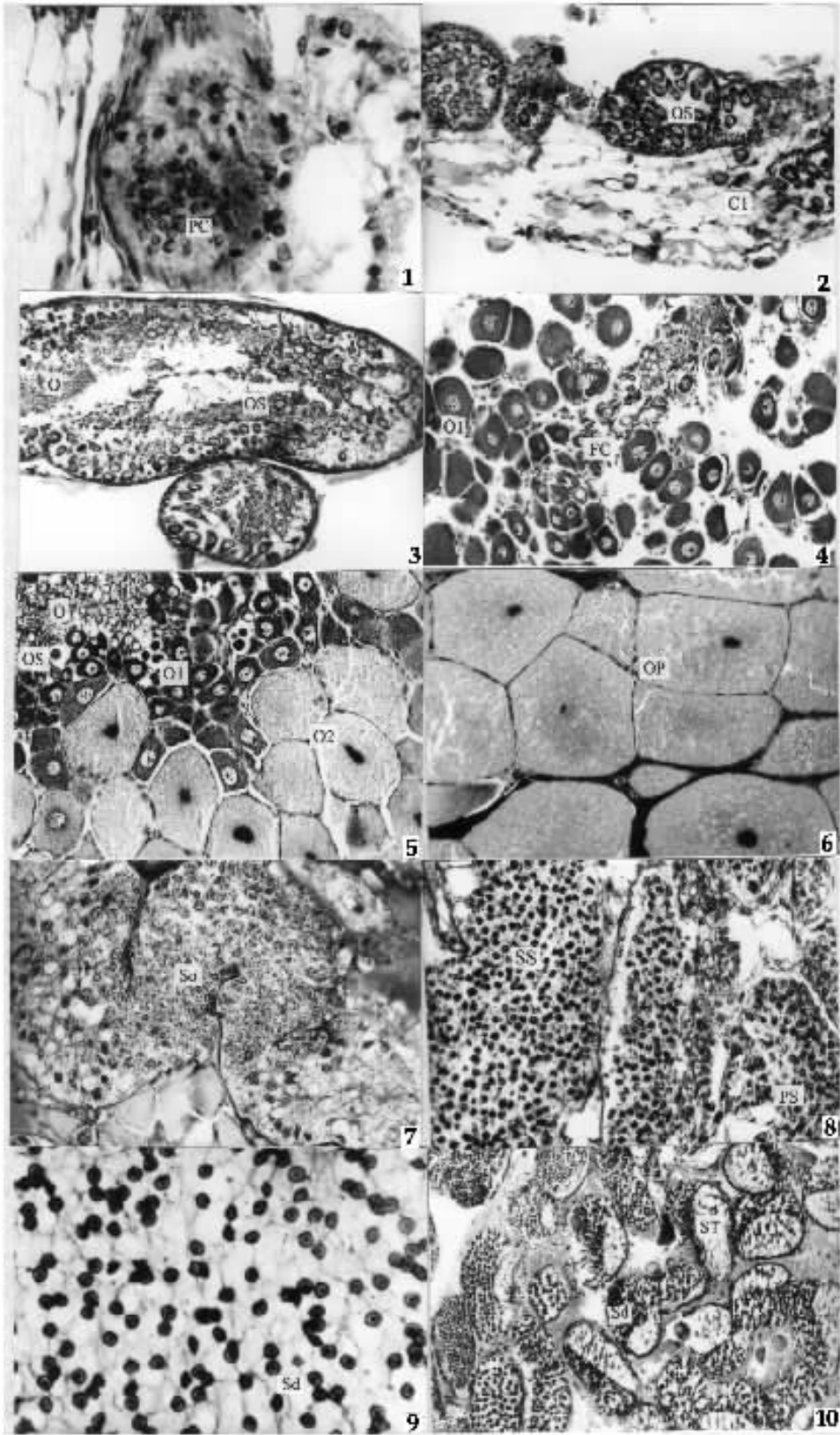
3.2 中华绒螯蟹性腺的发育

当背甲宽约40mm,体重26g时,卵巢内有原始生殖细胞团形成,但不能确定此时就是卵巢刚发生的最早阶段。吴嘉敏和姜新耀^[6]发现体重为13.33g的雌扣蟹就有卵巢形成,并有大量的卵原细胞;王丹等^[7]则发现河蟹的性腺分化时间更早,个体在0.2~1.2g的雌蟹就具单独的细胞团,以后发育成左右卵巢,而薛鲁征等^[8]的研究表明,河蟹生长至翌年4~6月份,卵巢处于第一期。我们的试验结果和后者接近,而与前者相差甚远,原因可能在于前两者都是以研究河蟹性早熟现象为出发点,而我们更侧重于性腺的发育过程。

精巢的发生早于卵巢,河蟹幼体生长至第二年的3月下旬,卵巢雏形刚形成时,精巢已初步具有完整的形态,生精小管已形成,并已有精原细胞。但精巢发育过程中变化的连续性不如卵巢容易分辨,因此较难分期^[8,9]。另外,精巢中精子出现的时间早于成熟期初级卵母细胞,一般在10月份,生精小管中就有精子形成,而成熟期初级卵母细胞则要到12月份才能形成。因此,如考虑促雄腺移植时雄蟹应取月龄更小者。

对性腺组织化学研究表明,卵母细胞中蛋白质的积累早于糖类物质的积累。当卵细胞发育至小生长期初级卵母细胞时,就开始了卵黄物质中蛋白质的积累,茚三酮-Schiff反应胞质呈淡粉红色(图版II-1);而多糖物质积累则始于大生长期1的初级卵母细胞,PAS反应显示,细胞质中与核呈同心圆排列的一圈细胞质呈淡红色,为弱阳性,其他部分的细胞质仍为阴性(图版II-2)。大生长期2的初级卵母细胞,卵黄物质积累加速,其所含蛋白质和多糖也增多(图版II-1,2)。至成熟时,卵黄中含有大量的蛋白质和多糖,成熟前期的初级卵母细胞,卵黄颗粒对于PAS和茚三酮-Schiff都显示较强阳性反应,分别呈紫红色和深粉红色(图版II-3,4)。此外,在整个卵巢发育过程中,核仁PAS反应始终是阴性,茚三酮-Schiff反应则为阳性,说明卵母细胞核仁内具蛋白质而缺乏多糖类物质。一般认为,甲壳类的卵黄发生包括卵黄蛋白原的产生和卵母细胞卵黄有机物或无机物的积累^[6],本研究证实了这一点,并且,对于不同的有机物,其积累速度是不同的。

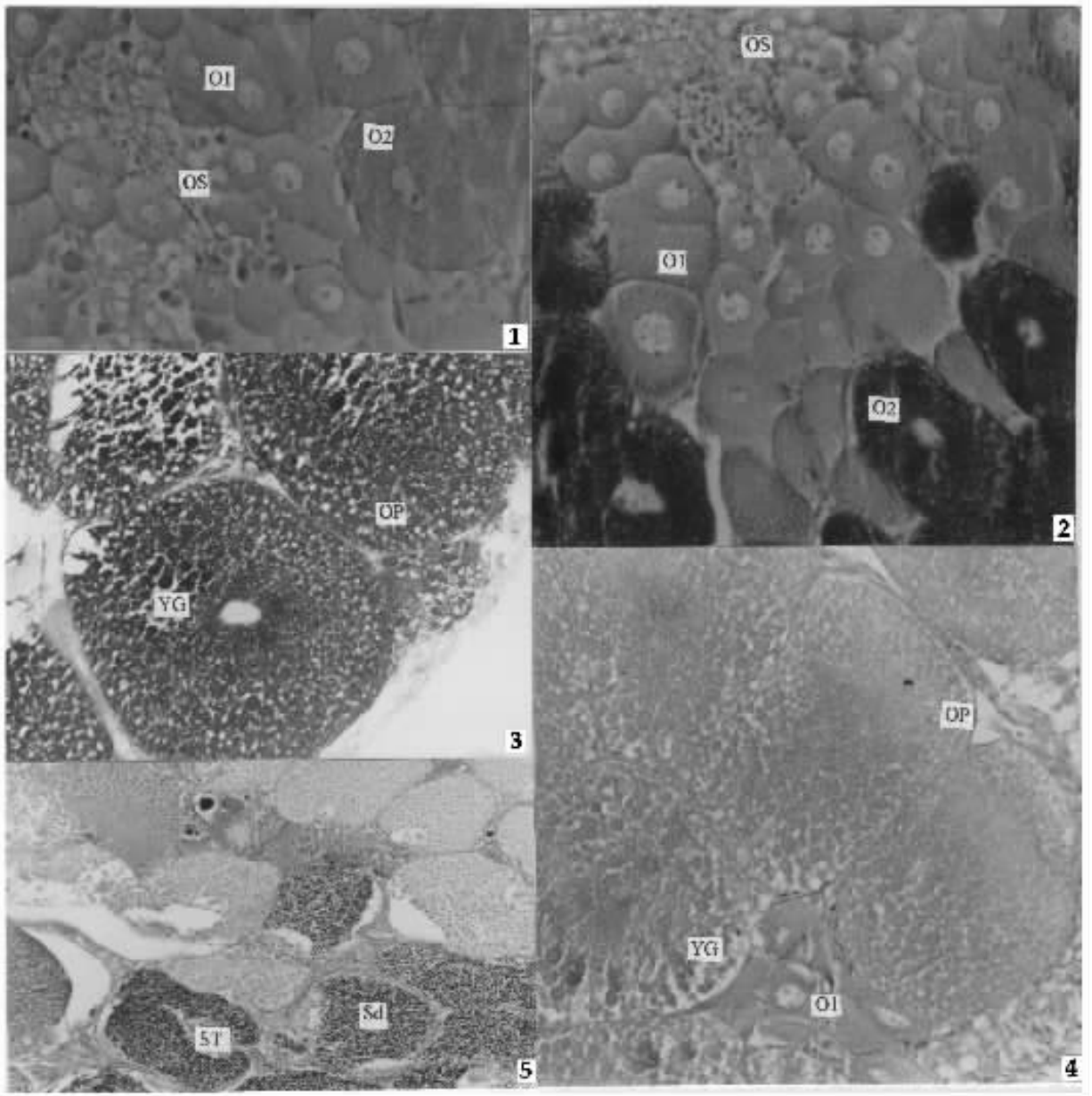
与卵细胞相似,在精子的形成过程中,也有一个多糖物质积累的过程,精细胞形成顶体囊时,PAS反应开始为阳性,至未成熟精子,PAS反应显示紫红色,为强阳性(图版II-5)。这种多糖类物质可能是精子运动所需能量的来源,也有人认为是与受精时溶解卵膜有关的多糖酶类^[10]。在精子发生的整个过程中,茚三酮-Schiff反应始终为弱阳性,说明各级精细胞中蛋白质含量很少,且变化不大。这和游泳亚目的虾类有所差异,罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)在精子发生过程中,蛋白质反应的阳性由强到弱,在精子发生前期无糖类出现,直到精子成熟时才在基部前端检测出少量糖类^[11]。



图版 I Plate I

1. 发育早期的卵巢, ×120; 2. 6月份卵巢, 示各发育区, ×60; 3. 7月份卵巢, ×60; 4. 9月份卵巢, ×60; 5. 10月份卵巢, ×60; 6. 11月份卵巢, ×60; 7. 3月份精巢, ×120; 8. 6月份精巢, ×120; 9. 2秋龄河蟹精巢, ×300; 10. 2秋龄河蟹精巢, 示精子已释放, ×60。

CT-结缔组织; FC-滤泡细胞; O-卵原细胞; O1-大生长期1初级卵母细胞; O2-大生长期2初级卵母细胞; OP-成熟前期初级卵母细胞; OS-小生长期初级卵母细胞; PC-原始生殖细胞; PS-初级精母细胞; Sd-精细胞; So-精原细胞; SS-次级精母细胞; ST-生精小管。



图版 II Plate II

1.发育初期卵巢的茛菪酮-Schiff 反应结果, $\times 100$; 2.发育初期卵巢的 PAS 反应结果, $\times 100$; 3.成熟前期初级卵母细胞 PAS 反应结果, $\times 200$; 4.成熟前期初级卵母细胞茛菪酮-Schiff 反应结果, $\times 200$; 5.精巢 PAS 反应结果, $\times 100$ 。

O1-大生长期 1 初级卵母细胞; O2-大生长期 2 初级卵母细胞; OP-成熟前期初级卵母细胞; OS-小生长期初期卵母细胞; Sd-精细胞; ST-生精小管; YG-卵黄颗粒。

参考文献:

- [1] Malecha S R, Nevin P A, Phyllis H, et al. Sex-ratios and sex-determination in progeny from crosses of surgically sex-reversed freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Aquac, 1992, 105: 201-218.
- [2] Katakura Y. Progeny from the mating of the normal female and the masculinized female of *Armadillidium vulgare*, an isopod crustacean [J]. Anno Zool Japon, 1961, 34(4): 197-199.
- [3] 李晨虹, 王成辉, 李思发. 中华绒螯蟹性早熟的早期判别 [J]. 水产科技情报, 1998, 25(2): 73-76.
- [4] 徐兴川. 日本绒螯蟹雌蟹生长和成熟过程中外骨骼形态的变化 [J]. 水产科技情报, 1995, 22(2): 28-32.
- [5] 许步劭, 何林岗. 河蟹养殖技术 [M]. 北京: 金盾出版社, 1987. 13-21.
- [6] 吴嘉敏, 姜新耀. 中华绒螯蟹血淋巴和肝胰腺的总蛋白含量与性早熟的关系 [J]. 水产学报, 2000, 24(4): 306-311.
- [7] 王丹, 夏大明, 于伟君. 扣蟹性腺发育初探 [J]. 中国水产科学, 1998, 3(3): 112-114.
- [8] 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): 88-97.
- [9] 堵南山, 薛鲁征, 赖伟. 中华绒螯蟹雄性生殖系统的组织学研究 [J]. 动物学报, 1988, 34(4): 329-333.
- [10] 堵南山, 赖伟, 薛鲁征. 中华绒螯蟹精子的研究 I. 精子的形态及超微结构 [J]. 海洋与湖沼, 1987, 18(2): 119-124.
- [11] 王玉凤, 堵南山, 赖伟. 罗氏沼虾雄性生殖系统的组织学研究 [J]. 中国水产科学, 1997, 20(3): 13-15.