

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17167

日本沼虾蜕皮过程中头胸甲外骨骼超微结构的改变

杜娟^{1,2}, 张俊芳¹, 郑征帆¹, 黄亚龙¹, 苗泽龙¹, 宁黔冀¹

1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007;

2. 新乡医学院 基础医学院, 河南 新乡 453003

摘要: 采用 HE 染色及石蜡切片的扫描电镜观察方法, 描述了日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)蜕皮间期(C 期, intermolt stage)及新旧表皮更替变化剧烈的蜕皮前晚期(D₄ 期, late premolt stage)和蜕皮后期(postmolt stage)A–B 期头胸甲外骨骼的形态结构变化特点。结果显示, 日本沼虾外骨骼分为上表皮、外表皮、内表皮三层, D₄ 期出现新的上表皮和外表皮, B 期出现新内表皮, 外表皮强嗜碱性而内表皮弱嗜酸性。扫描电镜观察发现, C 期头胸甲内、外表皮均为几丁质–蛋白质纤维构成的平行板层结构且板层内有发达的孔道系统(pore canals, pc), 但内外表皮板层间排列紧密程度不同, 外表皮板层切面边缘较整齐, 结构致密, 板层内 pc 大小均一、近似圆形, 内表皮板层切面边缘粗糙, 结构较疏松, 板层内 pc 大小不等、多为梭形。在蜕皮前后, 新外表皮结构变化显著, 与 C 期相比, D₄ 期新外表皮超微结构与旧内表皮结构相似, 而在 A 期, 外表皮超微结构由疏松变为致密, 这可能与蜕皮后表皮的钙化相关。本研究旨在阐明沼虾的蜕皮机制提供基础资料。

关键词: 日本沼虾; 外骨骼; 蜕皮周期; HE 染色; 扫描电镜

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2018)02–0301–07

甲壳动物由分层的表皮构成坚硬的外骨骼, 覆盖在柔软身体的表面, 抵抗同种竞争者和天敌, 但这种保护性“盔甲”也限制了动物生长, 因此必须通过周期性的蜕皮克服这一弊端, 蜕皮成为甲壳动物生长发育过程中极其复杂而重要的生理事件, 其产生机制一直是研究的热点问题。甲壳动物蜕皮周期分为 4 个时期: 间期、蜕皮前期、蜕皮期和蜕皮后期^[1–2]。间期表皮发育完全, 高度钙化; 蜕皮前期, 旧表皮下方形成未钙化新表皮^[3]; 蜕皮时动物脱去旧表皮; 蜕皮后期, 形成内表皮, 同时完成表皮的钙化和硬化^[4]。大量的研究表明, 甲壳动物的蜕皮周期与外骨骼的形成和钙化密切相关^[5]。外骨骼的光镜结构已经研究得较为透彻^[6], 多采用组织化学染色方法^[6–8], 最常用的有 PAS 染色和 Masson 染色等, 能分别显示外骨骼中的糖和纤维成分。利用电子显微镜可进一步观察表

皮内部的微细构架^[9–11], 但已有的报道多以间期表皮为研究对象, 而一个蜕皮周期中外骨骼微细结构的变化还未见报道。

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)是中国重要的淡水养殖经济虾类, 本研究采用石蜡切片的扫描电镜观察方法^[12]研究头胸甲外骨骼超微结构及其在蜕皮过程中的形成和发展, 初步了解蜕皮周期中表皮各层的动态变化, 为阐明沼虾的蜕皮机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

选取健康日本沼虾(河南原阳黄寺浴场提供)幼虾(体长 2.5~3.5 cm), 饲养于水族箱中, 水温(25±1)℃, 每日早晚各投喂 1 次, 1 周后用于实验研究。

收稿日期: 2017-04-28; 修订日期: 2017-07-01.

基金项目: 河南省基础与前沿技术研究项目(142300410021).

作者简介: 杜娟(1980–), 女, 在读博士, 研究方向为动物生理. E-mail: dujuan0313@126.com

通信作者: 宁黔冀, 教授, 博士生导师. E-mail: ningqianji1964@163.com

1.2 蜕皮周期的鉴定

实验过程中蜕皮周期的鉴定依据 Cesar 等^[13]的方法, 将其分为蜕皮间期 C 期(inter molt stage)、蜕皮前早期(D₀期, early premolt stage)、蜕皮前晚期(D₄期, late premolt stage)、蜕皮后(postmolt stage)A~B 期等 5 个时期。在以往实验中发现光镜下 C 期和 D₀期外骨骼在结构上基本无差异^[8], 因此本实验中未取 D₀期材料。

1.3 组织学及组织化学研究

取 C 期、D₄期、A 期及 B 期的幼虾, 将鳃区头胸甲剪成 5~7 mm 的小块, Davidson's fixative (DF)固定液^[14]固定 24 h, 流水冲洗 1 h, 系列酒精脱水, 正丁醇过夜透明, 石蜡包埋, Leica 切片机(德国 Leica, RM2245)上行横切和矢状切, 切片厚 6 μm, 将部分蜡片按常规方法制成组织玻片, HE 染色后显微镜(Nikon, YS2-H)下观察与拍照, 将另一部分蜡片贴于 14 mm×14 mm 盖玻片上烘干, 经 60℃二甲苯脱蜡 3 d, 更换 3 次二甲苯, 将含材料的盖片贴于扫描电镜(日立, TM3030Plus)用的样品台上, 离子溅射仪(中科科仪, SBC-12)镀膜喷金后, 用扫描电镜观察、拍摄及分析比较。

另取 C 期头胸甲, 体式显微镜下用解剖刀轻轻将内面组织刮去, 磷酸缓冲液洗净后, 迅速放入 2.5%戊二醛中固定 12 h 后, 磷酸缓冲液冲洗 3 次, 每次 15 min, 用酒精配制成 30%、50%、70%、80%、90%的叔丁醇溶液梯度脱水, 每次 10~15 min, 样品经此逐级脱水置换后入纯叔丁醇 3 次, 每次 15 min, 最后一次置 4℃冰箱内, 然后将样品置入真空干燥仪(德国 CHRIST, 1-2LD), 在低真空状态下使样品彻底干燥。将干燥后的样品粘于样品台上, 经离子溅射仪喷金后扫描电镜观察、拍摄及分析比较。

2 结果与分析

2.1 不同蜕皮时期日本沼虾头胸甲的显微结构

经 HE 染色显示, C 期头胸甲明显分为 3 层(图 1a), 即上表皮、外表皮和内表皮, 没有膜质层。上表皮最薄, 是表皮的最外层, 占整个外骨骼厚度的 1/12~1/14, HE 染色着色较深, 为亮红色均质状结构; 外表皮较厚, 嗜碱性较强, 呈深紫蓝

色, 其中隐约可见紧密排列、明暗相间的条带, 沿着与体表的平行面从外而内层叠排列; 内表皮厚度与外表皮相当, 呈弱嗜酸性, 为浅粉色, 其间明暗相间的条带排列较疏松; 上皮细胞层是体壁的最内层, 为单层细胞结构, 常由于取材、制片等原因, 导致上皮细胞层与内表皮分离, 此期上皮细胞为立方或矮柱状。在 D₄期(图 1b), 原有旧表皮下方出现新形成的上表皮和外表皮, 染色与旧表皮相同, 上皮细胞排列规则紧密, 细胞明显增高, 为高柱状, 胞质嗜碱性, 核椭圆形, 位于细胞基底部, 着色较浅, 核仁明显。蜕皮后 A 期(图 1c)表皮只有上表皮和外表皮, B 期(图 1d)内表皮出现, A 期、B 期上皮细胞形态与 D₄期相似。

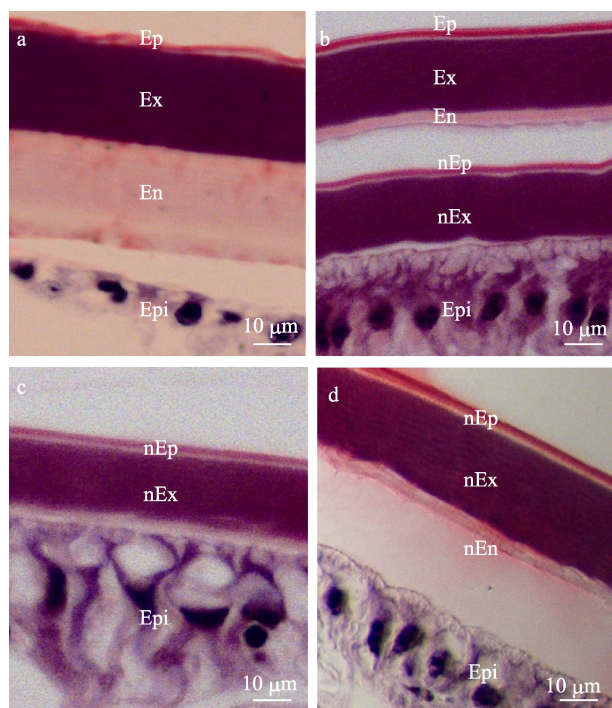


图 1 不同蜕皮时期日本沼虾头胸甲外骨骼的组织学结构

a: C 期; b: D₄期; c: A 期; d: B 期。

En: 内表皮; Ep: 上表皮; Epi: 上皮细胞; Ex: 外表皮;

nEn: 新内表皮; nEp: 新上表皮; nEx: 新外表皮。

Fig.1 Histological structures of carapace cuticle of *Macrobrachium nipponense* in different molting stages

a: C stage; b: D₄ stage; c: A stage; d: B stage.

En: endocuticle; Ep: epicuticle; Epi: epidermis; Ex: exocuticle; nEn: new endocuticle; nEp: new epicuticle; nEx: new exocuticle.

2.2 不同蜕皮时期日本沼虾头胸甲的超微结构

2.2.1 C 期头胸甲超微结构 扫描电镜下 C 期头

胸甲横切面上外骨骼 3 层结构分界清晰(图 2a), 上表皮为一薄层均质蜡状物; 上表皮下方为多层与上表皮平行排列的板层, 根据板层之间排列的紧密程度及板层厚度, 可以区分外表皮与内表皮, 紧邻上表皮、板层排列紧密为外表皮, 外表皮下方, 板层由内向外逐渐增厚、排列较疏松部分为内表皮。图 2b 可见横切面上内表皮中每一板层都可分为上、下两部分, 板层上 3/4 电子密度高于板层下 1/4, 相邻板层之间可见纵行纤维。图 2c 显示每一板层均由与身体长轴平行的几丁质-蛋白质纤维构成, 切面可见纤维断面, 板层上 3/4 纤维

细密, 板层下 1/4 纤维较粗大。

C 期头胸甲矢状切面上(图 3a)可见头胸甲由外至内三层结构分界清晰, 表层均质蜡状物为上表皮, 外表皮与内表皮板层中均存在大量孔道 (pore canals, pc) 结构, 管径最粗者为表皮孔 (cuticular pores, P), 外表皮板层(图 3b)切面边缘较整齐, 结构较致密, 板层内 pc 近似圆形, 大小较均一; 内表皮板层(图 3c)切面边缘粗糙, 可见粗大的几丁质-蛋白质纤维束, 结构较疏松, 板层内 pc 多为头尾走向的梭形, 大小不等。用解剖刀刮去内面上皮细胞层及其他组织, 暴露内表皮,

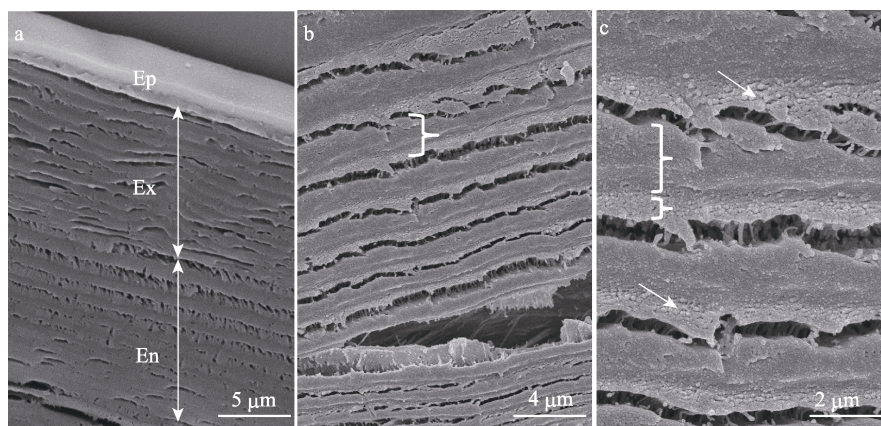


图 2 扫描电镜下 C 期日本沼虾头胸甲外骨骼横切面

a. 外骨骼横切面; b、c 为更高倍数下显示的内表皮。

En: 内表皮; Ep: 上表皮; Ex: 外表皮; 大括号: 内表皮中几丁质-蛋白质纤维板层; 细线箭头: 几丁质-蛋白质纤维断面。

Fig. 2 SEM micrographs of cross-sections of carapace cuticle of *Macrobrachium nipponense* in stage C. a. Cross-section of cuticle; b, c. Higher magnifications of the cross-section showing detail images of endocuticle. En: endocuticle; Ep: epicuticle; Ex: exocuticle. Open braces represent chitin-protein layers. Thin arrows indicate sharp fractures of the fibers.

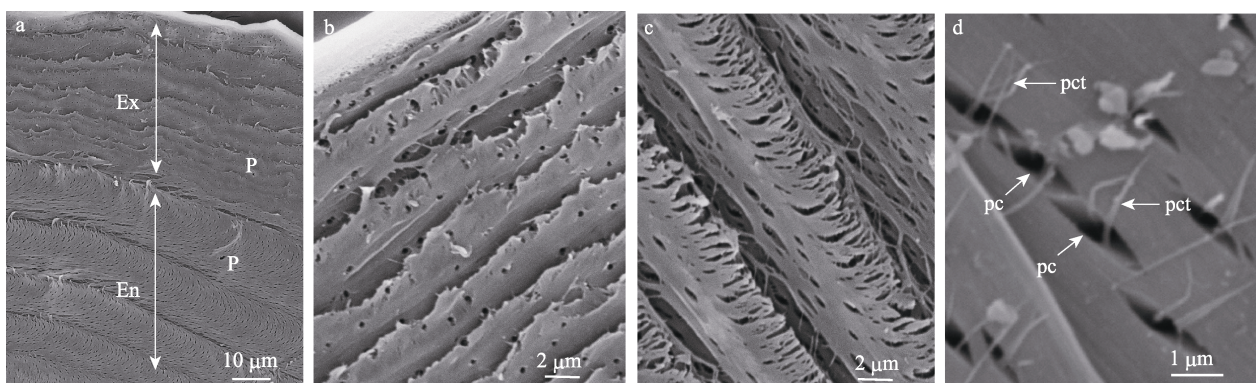


图 3 扫描电镜下 C 期日本沼虾头胸甲外骨骼矢状切面

a: 外骨骼矢状切面; b、c 为更高倍数下显示的外表皮和内表皮; d: 解剖刀刮去上皮细胞后内表皮的扫描电镜像。

En: 内表皮; Ex: 外表皮; P: 表皮孔; pc: 孔道; pct: 孔道小管。

Fig. 3 SEM micrographs of sagittal sections of carapace cuticle of *Macrobrachium nipponense* in stage C. a. Sagittal section of cuticle; b, c. Higher magnifications of the sagittal section showing exocuticle and endocuticle; d: SEM micrograph of endocuticle when epidermis was scraped. En: endocuticle; Ex: exocuticle; P: cuticular pores; pc: pore canals; pct: pore canal tubes.

固定、脱水、干燥、镀膜后在扫描电镜下观察(图 3d), 可见内表皮中存在大量 pc, 形态与切片中内表皮板层相同, 从 pc 中伸出细长的孔道小管(pore canal tubes, pct), 有些有分支, 垂直穿过几丁质-蛋白质纤维板层。

2.2.2 D₄ 期外骨骼超微结构 如图 4a 所示, D₄ 期旧表皮下方出现新的上表皮和外表皮, 新表皮此时未钙化而较柔软, 在制片过程中新旧表皮由于收缩程度不同而发生分离。旧表皮(图 4b)中上表皮、外表皮、内表皮三层分界清晰, 各层超微结构与 C 期相同; 而新外表皮(图 4c)与旧外表皮差异较大, 新外表皮板层结构疏松, 切缘粗糙, pc 大多为梭形, 与旧内表皮相似。

2.2.3 蜕皮后 A、B 期外骨骼超微结构 如图 5a 和图 5b 所示, A 期头胸甲外骨骼只有上表皮和外表皮, 此时外表皮板层结构已经与 D₄ 期新外表皮不同, 表现在板层切缘较为平整且结构致密, pc 近似圆形, 这与 C 期外骨骼中外表皮结构相同。B 期(图 5c 和图 5d)外表皮板层下方出现内表皮板层, 切缘较粗糙, 板层内可见大量头尾走向的梭形 pc, 与 C 期内表皮板层结构相似, 内、外表皮相邻板层间可见垂直穿过 pc 的 pct。

3 讨论

对甲壳动物表皮亚显微结构的研究, 通常采

用冰冻断裂技术, 研究对象包括美洲海螯虾(*Homarus americanus*)^[15]、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)^[16]、蓝蟹(*Callinectes sapidus*)^[17]等体型较大的动物, 取自发育完善的 C 期螯或头胸甲等表皮较厚部位, 所以表皮的横断(显示表皮各层)和水平断裂(显示内部具体结构)容易操作。日本沼虾幼虾个体小、表皮极薄(~40 μm), 无法进行水平断裂, 因此我们首次将石蜡切片的扫描电镜观察方法引入到对日本沼虾头胸甲结构的研究, 结合 HE 染色方法, 选择 C 期以及蜕皮周期中表皮结构变化剧烈的 3 个连续阶段——D₄ 期、A 期以及 B 期, 观察分析蜕皮前后表皮结构的动态发育过程。

HE 染色方法的研究结果显示, 日本沼虾头胸甲自外而内由上表皮、外表皮和内表皮构成, 没有膜质层, 与已有报导相同^[8]。表皮各层表现出不同的嗜色性, 上表皮主要由蜡状物、脂类以及蛋白构成, 不含几丁质纤维^[18-20], 染色中嗜酸性较强, 说明上表皮中碱性蛋白质含量较多。内、外表皮都是由几丁质-蛋白质微纤维网架构成^[21], 染色的差异应该也与各层所含蛋白质的性质及含量有关, 外表皮中酸性蛋白质较多, 表现出强嗜碱性, 而内表皮中酸性蛋白质可能较少或无, 有少量碱性蛋白质, 因此表现出弱嗜酸性(图 1)。内、外表皮中都有钙盐沉积^[6, 22], 酸性大分子被认为

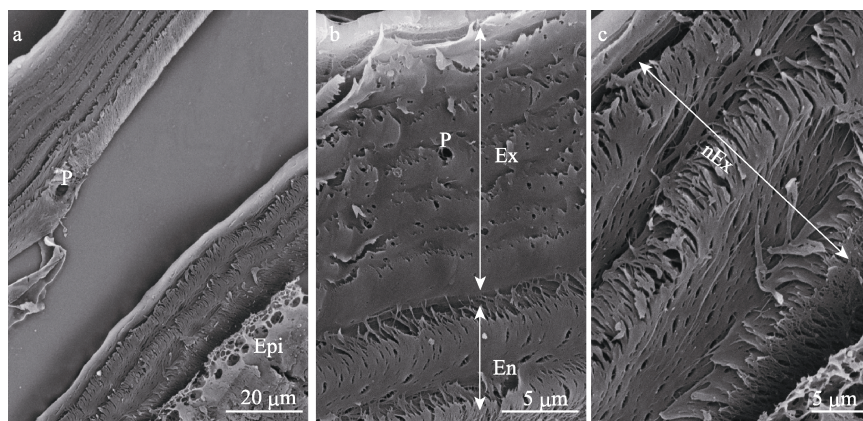


图 4 扫描电镜下 D₄ 期日本沼虾头胸甲外骨骼矢状切面

a: 外骨骼矢状切面; b: 旧表皮; c: 新表皮。

En: 内表皮; Epi: 上皮细胞; Ex: 外表皮; nEx: 新外表皮; P: 表皮孔。

Fig. 4 SEM micrographs of sagittal sections of cuticles in carapace of *Macrobrachium nipponense* in late premolt stage
a. Sagittal section of cuticles; b. Sagittal section of old cuticle; c. Sagittal section of new cuticle.

En: endocuticle; Epi: epidermis; Ex: exocuticle; nEx: new exocuticle; P: cuticular pores.

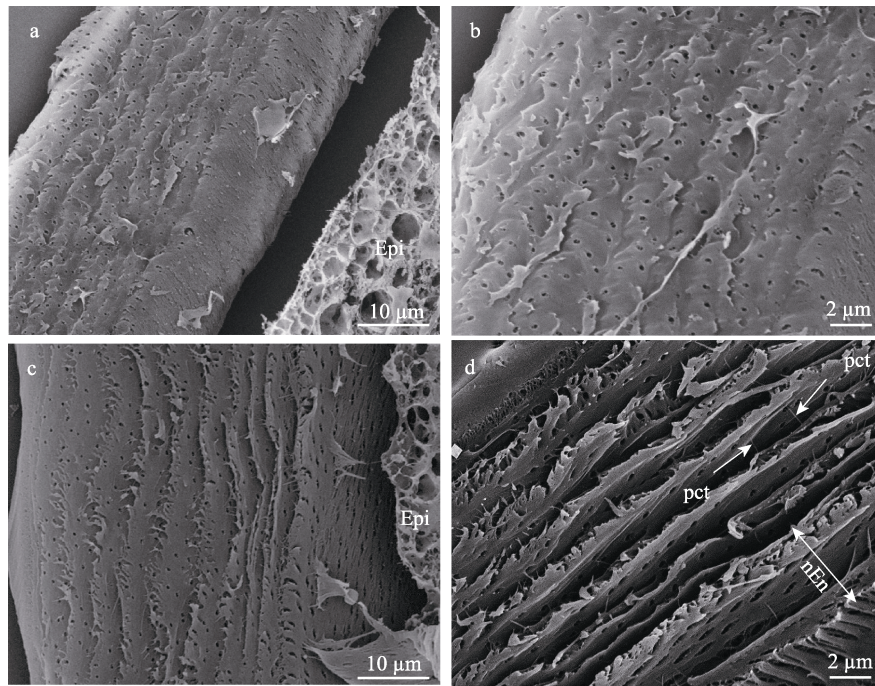


图5 扫描电镜下 A 期和 B 期日本沼虾头胸甲外骨骼矢状切面

a、b: A 期外骨骼矢状切面; c、d: B 期外骨骼矢状切面。

Epi: 上皮细胞; nEn: 新内表皮; pct: 孔道小管。

Fig. 5 SEM micrographs of sagittal sections of cuticles in carapace of *Macrobrachium nipponense* in A and B stages

a, b: sagittal sections of cuticles in A stage; c, d: sagittal sections of cuticles in B stage.

Epi: epidermis; nEn: new endocuticle; pct: pore canal tubes.

在钙盐沉积中发挥重要作用^[23]。上皮细胞的形态呈显著的周期性变化。在新表皮合成 D₄ 期、A 期以及 B 期, 上皮细胞增高呈高柱状, 提示其细胞内活性增强, 各种反应如 DNA 复制、RNA 转录、蛋白质合成以及钙沉积等正在活跃进行; 在表皮再生过程完成的 C 期, 上皮细胞呈矮柱状(图 1)。

处于 C 期的头胸甲外骨骼, 内、外表皮均呈互相平行的板层结构, 外表皮板层排列比较紧密, 而内表皮板层排列较为松散, 此种结构方式不仅兼顾了表皮的硬度, 而且有利于上皮细胞的分泌物通过松散的内层向外层输送, 补充因磨损而造成外骨骼的损失, 这与已报道的甲壳动物外骨骼超微结构相似^[24-26]。但内表皮的结构与相关报导明显不同^[9, 21, 25], 板层由外至内逐渐变薄, 每一板层都由粗细两种几丁质-蛋白质纤维构成, 粗、细纤维各自聚集而互不相混(图 2c), 这种结构是否有利于增强表皮的机械性能尚待进一步研究。大部分十足类动物表皮中都存在 pc, 但形状及数量差异较大。欧洲羔蟹(*Carcinus maenas*)^[27]、

美洲海螯虾(*Homarus americanus*)^[9]、蜘蛛蟹(*Loxorhynchus grandis*)^[28]等动物表皮中 pc 为蜂窝状, 数量极多, 而日本沼虾头胸甲表皮中 pc 不够发达, 数量相对较少(图 3a)。一般认为 pc 来源于表皮下方上皮细胞游离面的微绒毛, 微绒毛延伸穿过内表皮和外表皮, 终止于上表皮内侧, 沿途发出分支, 形成 pct, 推测 pc 及 pct 在营养物质、酶与无机离子的输送以及蜕皮后内、外表皮的矿化中发挥重要作用^[27, 29]。日本沼虾表皮的厚度和硬度均不如美洲海螯虾等动物, 与 pc 不够发达相适应。

本研究发现, 外表皮在形成过程中板层结构出现明显变化。D₄ 期在原有旧表皮下方出现新上表皮和外表皮, 刚形成的新外表皮结构疏松(图 4c), 有利于构建新表皮所需物质由上皮细胞转运至表皮内; 蜕皮后, 板层结构由疏松变为致密(图 5a、图 5b), 可能预示着外表皮的钙化作用趋于完成。据报道, 外表皮的形成和钙化并不同步, 蜕皮后与钙化相关的表皮蛋白开始表达^[30-31], 在此过程中, 钙

盐的沉积以及大量表达的蛋白质使得原本疏松的板层变得较为致密。另外,钙盐在 pc 周围沉积可能引起其形状发生改变,这也解释了外表皮板层中 pc 形状在蜕皮前后的差异(图 4c 和图 5b)。

在 B 期形成的内表皮,无论 pc 形状还是板层结构均与 C 期相似(图 5),说明内表皮结构在形成过程中变化不大,提示内表皮的形成与钙化同步进行。

综上,我们将石蜡切片的扫描电镜观察方法引入到日本沼虾头胸甲表皮超微结构的研究中,首次发现外表皮在形成过程中板层结构的明显变化。当然,该方法仍有待进一步改进,如制作组织切片时某些物质(如脂类)易丢失和易位而形成空腔,可能造成观察结果与实际结构有一定的偏差。

参考文献:

- [1] Calhoun S, Zou E. Epidermal carbonic anhydrase activity and exoskeletal metal content during the molting cycle of the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, 2016, 325(3): 200-208.
- [2] Chang E S. Physiological and biochemical changes during the molt cycle in decapod crustaceans, an overview[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1995, 193(1-2): 1-14.
- [3] Shechter A, Berman A, Singer A, et al. Reciprocal changes in calcification of the gastrolith and cuticle during the molt cycle of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*[J]. Biological Bulletin, 2008, 214(2): 122-134.
- [4] Andersen S O. Insect cuticular sclerotization: a review[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 40(3): 166-178.
- [5] Inoue H, Ohira T, Ozaki N, et al. Cloning and expression of a cDNA encoding a matrix peptide associated with calcification in the exoskeleton of the crayfish[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 136(4): 755-765.
- [6] Promwikorn W, Boonyoung P, Kirirat P. Histological characterization of cuticular depositions throughout the molting cycle of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 2005, 27(3): 499-509.
- [7] Williams C L, Dillaman R M, Elliott E A, et al. Formation of the arthrodial membrane in the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. Journal of Morphology, 2003, 256(3): 260-269.
- [8] Lü Y J, Chen X L, Guo A L, et al. Effect of KK-42 on the carapace structure in *Macrobrachium nipponense* during premolt D₃ stage[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(12): 1964-1969. [吕艳杰, 陈香丽, 郭爱莲, 等. KK-42 对日本沼虾 D₃ 期头胸甲表皮结构的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(12): 1964-1969.]
- [9] Romano P, Fabritius H, Raabe D. The exoskeleton of the lobster *Homarus americanus* as an example of a smart anisotropic biological material[J]. Acta Biomaterialia, 2007, 3(3): 301-309.
- [10] Raabe D, Sachs C, Romano P. The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material[J]. Acta Materialia, 2005, 53(15): 4281-4292.
- [11] Cheng L, Wang L, Karlsson A M. Image analyses of two crustacean exoskeletons and implications of the exoskeletal microstructure on the mechanical behavior[J]. Journal of Materials Research, 2008, 23(11): 2854-2872.
- [12] Li G W, Lu A L, Li J T, et al. The observation of paraffin section for nephros of *Cyprinus carpio linnatus* by means of scanning electron microscopy[C]//Proceedings of the 65th Anniversary of China Zoological Society. Beijing: China Zoological Society, 1999: 113-116, 16. [李庚午, 卢爱玲, 李金亭, 等. 鲤鱼肾脏石蜡切片的扫描电镜观察[C]//中国动物学会成立 65 周年年会论文集. 北京: 中国动物学会, 1999: 113-116, 16.]
- [13] Cesar J R O, Zhao B P, Malecha S, et al. Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle [J]. Aquaculture, 2006, 261(2): 688-694.
- [14] Latendresse J R, Warbritton A R, Jonassen H, et al. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid[J]. Toxicologic Pathology, 2002, 30(4): 524-533.
- [15] Erko M, Hartmann MA, Zlotnikov I, et al. Structural and mechanical properties of the arthropod cuticle: comparison between the fang of the spider *Cupiennius salei* and the carapace of American lobster *Homarus americanus*[J]. Journal of Structure Biology, 2013, 183(2): 172-179.
- [16] Zhou F, Wu Z W, Wang M L, et al. Structure and mechanical properties of pincers of lobster (*Procambarus clarkii*) and crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2010, 3(6): 454-463.
- [17] Cheng L, Wang L Y, Karlsson A M. Image analyses of two crustacean exoskeletons and implications of the exoskeletal microstructure on the mechanical behavior[J]. Journal of Materials Research, 2008, 23(11): 2854-2872.
- [18] Green J P, Neff M R. A survey of the fine structure of the integument of the fiddler crab[J]. Tissue and Cell, 1972, 4(1): 137-171.
- [19] Humphreys C R, Stevenson J R. Changes in epidermal DNA, protein and protein synthesis during the molt cycle of the crayfish *Orconectes sanborni* (Faxon)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1973, 44(4): 1121-1128.

- [20] Nagasawa H. The crustacean cuticle: structure, composition and mineralization[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2012, 4(1): 711-720.
- [21] Chandran R, Williams L, Hung A, et al. SEM characterization of anatomical variation in chitin organization in insect and arthropod cuticles[J]. *Micron*, 2016, 82: 74-85.
- [22] Roabe D, Romano P, Sachs C, et al. Microstructure and crystallographic texture of the chitin-protein network in the biological composite material of the exoskeleton of the lobster *Homarus americanus*[J]. *Materials Science and Engineering: A*, 2006, 421(1-2): 143-153.
- [23] Weiner S, Addadi L. Acidic macromolecules of mineralized tissues: the controllers of crystal formation[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1991, 16(7): 252-256.
- [24] Giraud-Guille M M, Chanzy H, Vuong R. Chitin crystals in arthropod cuticles revealed by diffraction contrast transmission electron microscopy[J]. *Journal of Structural Biology*, 1990, 103(3): 232-240.
- [25] Giraud-Guille M M. Fine structure of the chitin-protein system in the crab cuticle[J]. *Tissue and Cell*, 1984, 16(1): 75-92.
- [26] Giraud-Guille M M. Plywood structures in nature[J]. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 1998, 3(3): 221-227.
- [27] Roer R D. Mechanisms of resorption and deposition of calcium in the carapace of the crab *Carcinus maenas*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 1980, 36(88): 205-218.
- [28] Chen P Y, Lin A Y M, McKittrick J, et al. Structure and mechanical properties of crab exoskeletons[J]. *Acta Biomaterialia*, 2008, 4(3): 587-596.
- [29] Roer R, Abehsera S, Sagi A. Exoskeletons across the Pancrustacea: comparative morphology, physiology, biochemistry and genetics[J]. *Integrative & Comparative Biology*, 2015, 55(5): 771-791.
- [30] Nagasawa H. Structure and function of matrix proteins and peptides in the biomineral formation in crustaceans[J]. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 2011, 52: 315-329.
- [31] Shafer T H, McCartney M A, Faircloth L M. Identifying exoskeleton proteins in the blue crab from an expressed sequence tag (EST) library[J]. *Integrative & Comparative Biology*, 2006, 46(6): 978-990.

Changes in the ultrastructure of the carapace during the molt cycle of *Macrobrachium nipponense*

DU Juan^{1,2}, ZHANG Junfang¹, ZHENG Zhengfan¹, HUANG Yalong¹, MIAO Zelong¹, NING Qianji¹

1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. School of Basic Medical Sciences, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China

Abstract: The carapace exoskeletal structure, and its change during the molt cycle of *Macrobrachium nipponense*, were studied using hematoxylin-eosin staining and the observation of paraffin sections using scanning electron microscopy (SEM). The results showed that the exoskeleton in the intermolt stage (C) is composed of three sub-layers: epicuticle, exocuticle, and an endocuticle, from the outer to the inner layer. The newly formed epicuticle, exocuticle, and endocuticle in the carapace occur in the late premolt D₄ and postmolt B stages. The exocuticle is in a strongly basophilic state but the endocuticle is in a weak eosinophilic state. The observation by SEM revealed that, in stage C, both exocuticle and endocuticle have lamellae comprised of parallel sheets of chitin-protein fibers, with abundant pore canals (pc). The stacking density of the lamellae in the exocuticle is higher than that in the endocuticle. The lamellae edges of the exocuticle are regular and the pore canals within them are approximately circular. On the other hand, there are rough edges and unequal-sized, fusiform pore canals in the endocuticle. There is a significant change in the ultrastructure in the newly formed exocuticle after molt. In stage D₄, the ultrastructure of the exocuticle is loose, and similar to the old endocuticle from stage C; however, the density of the exocuticle increases in stage A, which may be associated with calcification after molting.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; exoskeleton; molt cycle; hematoxylin-eosin staining; scanning electron microscope

Corresponding author: NING Qianji. E-mail: ningqianji1964@163.com