

doi: 10.7541/2013.115

中华绒螯蟹蜕皮过程中体壁结构和主要成分的变化

田志环^{1,2} 康现江² 焦传珍¹

(1. 韶关学院英东生命科学学院, 韶关 512005; 2. 河北大学生命科学学院, 保定 071002)

摘要: 采用组织化学和原子吸收分析等方法, 研究了中华绒螯蟹蜕皮过程中体壁结构和主要成分的变化。结果显示: 中华绒螯蟹体壁分为上表皮、外表皮、内表皮和膜层, 糖类物质各层均有分布, 胶原纤维分布在除上表皮外的其他各层。在蜕皮前, 糖类、胶原纤维都被重吸收, 体壁上表皮和外表皮在蜕皮前形成, 内表皮和膜层在蜕皮后形成。体壁粗蛋白含量在蜕皮前期(D₁-D₃₋₄期)降低($P < 0.05$), 蜕皮后 A-B 期含量极高($P < 0.05$)。几丁质含量在蜕皮过程中变化不显著($P > 0.05$), 只是在蜕皮前稍有上升。Ca²⁺和 Mg²⁺含量在蜕皮前 D₁期显著低于蜕皮间期和蜕皮前其他时期($P < 0.05$), 而蜕皮后 A-B 期降到最低($P < 0.05$), 蜕下的甲壳中则含有较多的 Ca²⁺和 Mg²⁺ ($P < 0.05$)。Cu²⁺和 Zn²⁺含量除蜕皮后 A-B 期升高外($P < 0.05$), 其余时期变化不明显($P > 0.05$)。这些研究结果表明, 中华绒螯蟹体壁结构和成分变化与蜕皮周期密切相关。

关键词: 中华绒螯蟹; 蜕皮周期; 体壁结构; 生化成分

中图分类号: Q174 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)05-0899-06

蜕皮是甲壳动物生长发育过程中一项复杂而重要的生理现象, 由Y-器官分泌的蜕皮激素和X-器官分泌的蜕皮抑制激素协同作用。在蜕皮过程中, 动物发生一系列形态、行为、结构及生理变化^[1-3]。国外对甲壳动物蜕皮过程中的重要变化已有十几年的研究历史^[4-6], 但是, 国内在这一领域起步较晚。尤其对于中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis* 这一我国重要的经济物种, 其蜕皮过程中重要的生理变化仍是空白。甲壳动物蜕皮首先涉及体壁外骨骼的蜕去及重建, 本文拟探讨中华绒螯蟹蜕皮过程中体壁结构及主要成分的变化, 研究结果不仅可以丰富甲壳动物蜕皮机制内容, 还可以为中华绒螯蟹的养殖提供生物学的理论指导和技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

一年生未成熟幼蟹, 甲壳宽度在 15—40 mm, 平均体重(20±2) g, 2010年7月购于河北白洋淀。中华绒螯蟹购回后暂养在 75 cm×50 cm×45 cm 的玻璃缸内, 24h 充气, 自然光照, 每天换水, 每次换水后

投喂土豆、杂鱼等食物, 动物适应实验室条件一周后进行实验。为得到蜕皮后的样本, 将处于蜕皮前晚期的个体在相同条件下单独饲养。

1.2 实验方法

蜕皮周期的鉴定 按照文献[7, 8]的方法鉴定中华绒螯蟹的蜕皮周期, 将其分为蜕皮间期C期、蜕皮前D₀、D₁和D₃₋₄期、蜕皮后A-B期等5个时期。

组织学及组织化学研究 取不同蜕皮时期的中华绒螯蟹, 剪取鳃区部位甲壳, 剪成 1—2 mm 的小块, Bouin 氏液固定 24h, 10%盐酸-福尔马林脱钙液脱钙 12h, 流水冲洗。系列酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 常规切片, 切片厚度 6—8 μm。马洛赖氏三色法(Mallory)^[9]和过碘酸-shiff(PAS)染色^[10]显示胶原纤维和糖类物质。

生化成分测定 取不同蜕皮时期的中华绒螯蟹, 剪取鳃区部位甲壳, 60 °C 烘干 10h。一部分甲壳用于测定几丁质和粗蛋白含量, 参考陈长昆^[11]的方法, 略有改动: 电子天平准确称重(W_0), 然后于 10% NaOH 溶液中煮沸 1h 除去蛋白质, 95%、50%乙醇蒸

收稿日期: 2012-07-03; 修订日期: 2012-10-02

基金项目: 河北省自然科学基金(C2011201028); 韶关学院香港铭源基金(314-140632)资助

作者简介: 田志环(1971—), 女, 山东夏津人; 博士; 研究方向为甲壳动物生长发育。E-mail: tianzhihuan@126.com

通信作者: 康现江(1965—), 男, 教授, 博士生导师; 研究方向为甲壳动物生殖生物学。E-mail: xjkang218@126.com

馏水依次冲洗 3 次, 60 °C 烘干称重(W_1), 称重后的材料经 3.6% HCl 15min, 得透明状几丁质, 60 °C 烘干称重(W_2)。甲壳中粗蛋白相对含量为 $(W_0-W_1)/W_0 \times 100\%$, 几丁质相对含量为 $W_2/W_0 \times 100\%$ 。另一部分甲壳电子天平准确称重后, 采用火焰原子吸收法测定 Ca、Mg、Cu、Zn 等无机离子含量。

数据处理 利用 SPSS 17.0 软件处理数据, 采用单因素方差分析, 显著性水平 $P < 0.05$, 数值以平均数 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 糖类与胶原纤维在体壁的不同亚层分布

中华绒螯蟹蜕皮间期体壁结构与其他甲壳动物相似^[12], 由外至内依次为: 上表皮层、外表皮层、内表皮层和膜层(图版 I)。上表皮位于最外层, 比较薄, 糖原染色显示深红色, 说明此层含有丰富的糖类物质, Masson 三色法染色显示紫红色, 说明缺少胶原纤维, 而含有蛋白质, 结合糖原染色的深红色, 上表皮应该含有丰富的糖蛋白。外表皮层位于上表皮层内面, 稍厚, 糖原染色为粉色, 而 Masson 三色法染色显示深绿色, 说明此层糖类物质比上表皮层含量减少, 而含有大量胶原纤维。内表皮层是中华绒螯蟹体壁中最厚的一层, 糖原染色和 Masson 三色法染色都较浅, 表明此层糖类物质和胶原纤维含量最少。膜层糖原染色和 Masson 三色法染色的深度都有所加深, 此层糖类物质和胶原纤维的含量有所增加。

2.2 上表皮层和外表皮层在蜕皮前合成

甲壳动物的体壁结构在蜕皮过程中会发生周期性的变化。在蜕皮前早期(D_{0-1}), 可见膜层被染成浅粉、浅蓝色, 甚至不能辨别(图版 II)。与蜕皮间期相比, 染色反应降低, 说明膜层在蜕皮前期降解, 膜层、内表皮层中糖类、胶原纤维被重吸收。在蜕皮前晚期(D_{3-4}), 可见新形成的上表皮和外表皮在旧的外骨骼下形成(图版 III)。这表明中华绒螯蟹在蜕皮前, 旧表皮的膜层、内表皮层降解, 新表皮的上表皮和外表皮合成。

2.3 内表皮层和膜层在蜕皮后合成

刚刚蜕皮的中华绒螯蟹, 表皮只有上表皮和外表皮(图版 IV), 1—2d 之后, 可见被染成浅粉、浅蓝色的内表皮层(图版 V), 3—4d 之后, 膜层形成(图版 I)。

2.4 中华绒螯蟹蜕皮过程中体壁主要成分的变化

中华绒螯蟹蜕皮过程中体壁主要成分变化如表 1 所示。相对于蜕皮间期和蜕皮前 D_0 期, 体壁粗蛋白含量在蜕皮前 D_1 期降低($P < 0.05$), 在蜕皮后 A-B 期含量极高($P < 0.05$), 而蜕壳中含量很低($P < 0.05$)。几丁质含量在蜕皮过程中变化不显著($P > 0.05$)。体壁 Ca^{2+} 含量和 Mg^{2+} 含量变化相似, 在蜕皮前 D_1 期显著低于蜕皮间期和蜕皮前其他时期($P < 0.05$), 而蜕皮后 A-B 期降到最低($P < 0.05$), 蜕下的甲壳中则含有较多的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ($P < 0.05$); 体壁 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 含量除蜕皮后 A-B 期升高外($P < 0.05$), 其余时期变化不明显($P > 0.05$)。

表 1 中华绒螯蟹蜕皮过程中体壁主要成分的变化

Tab. 1 Biochemical constituent changes in integument during the molt cycle of *E. sinensis*

| 蜕皮周期 Molt stage | 粗蛋白 Crude protein (mg/g) | 几丁质 Chitin(mg/g) | Ca (mg/g) | Mg (mg/g) | Cu (μ g/g) | Zn (μ g/g) |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| C | 31.98 \pm 1.20 ^a | 12.65 \pm 1.98 ^{ab} | 254.09 \pm 23.32 ^a | 11.98 \pm 1.10 ^{ad} | 24.36 \pm 7.98 ^a | 24.62 \pm 4.14 ^{ac} |
| D_0 | 32.53 \pm 3.95 ^{ac} | 12.85 \pm 0.64 ^{ab} | 267.05 \pm 6.95 ^a | 11.62 \pm 1.99 ^{ad} | 19.96 \pm 4.60 ^a | 23.85 \pm 9.12 ^{ac} |
| D_1 | 25.30 \pm 4.20 ^b | 13.29 \pm 1.78 ^a | 225.68 \pm 18.36 ^b | 10.73 \pm 2.64 ^b | 21.13 \pm 7.14 ^a | 29.36 \pm 10.80 ^c |
| D_{3-4} | 27.10 \pm 4.71 ^{ad} | 14.84 \pm 2.12 ^a | 271.22 \pm 20.93 ^a | 11.09 \pm 1.70 ^{ab} | 23.93 \pm 7.12 ^a | 21.9 \pm 9.44 ^{ac} |
| A-B | 72.45 \pm 3.94 ^e | 12.94 \pm 1.72 ^{ab} | 85.56 \pm 17.69 ^c | 3.87 \pm 0.26 ^c | 62.05 \pm 14.80 ^b | 85.66 \pm 7.98 ^b |
| 蜕壳 Integument | 16.69 \pm 3.02 ^f | 10.32 \pm 3.41 ^b | 313.9 \pm 19.72 ^d | 13.99 \pm 1.09 ^d | 15.43 \pm 2.82 ^a | 16.65 \pm 1.49 ^a |

注: 表中不同字母表示差异显著($P < 0.05$, $N=3-7$)

Note: Significant differences ($P < 0.05$) are indicated by differing letters ($N=3-7$)

3 讨论

甲壳动物体壁自外而内由上表皮、外表皮、内表皮和膜层组成^[12, 13]。无机物(Ca、Mg、Al、硫酸

盐等)和有机物(糖类、蛋白质、几丁质、胶原纤维等)以 3 : 2 的比例分布在各亚层^[2, 5, 14-17]。体壁中糖类是合成几丁质单体 N-乙酰- β -葡萄糖胺的前体物质, 胶原纤维则可形成体壁的骨骼支架, 增强体壁

的硬度。组织化学染色反应显示: 糖类分布于中华绒螯蟹体壁各层, 在上表皮中则和蛋白质结合在一起以糖蛋白的形式存在。胶原纤维则分布在除上表皮外的其余各层。在中华绒螯蟹蜕皮前早期(D₀₋₁期), 体壁的上皮细胞会分泌含有几丁质酶和蛋白酶的黏液(通常称为蜕皮液), 膜层和内表皮层被蜕皮液溶解, 体壁蛋白、糖类、胶原纤维、Ca、Mg等各种物质被重吸收。蜕皮前晚期(D₃₋₄期), 新表皮的上表皮和外表皮在旧的外骨骼下形成。蜕皮后 A-B 期早期, 表皮只有上表皮和外表皮, 然后逐渐分泌形成内表皮和膜层。这表明在中华绒螯蟹一个蜕皮周期中, 上表皮和外表皮在蜕皮前形成, 内表皮和膜层在蜕皮后形成, 这和甲壳动物其他物种是相似的^[12]。

体壁粗蛋白含量和蜕皮周期密切相关。在蜕皮前期, 随着体壁的膜层和内表皮层的溶解, 体壁蛋白被降解重吸收, 在蜕皮前 D₁ 期降至最低。蜕皮后 A-B 期, 由于要构建新表皮, 体壁蛋白重新合成, 体壁此时尚未钙化和矿化, 无机盐类含量相对较低, 所以此时体壁粗蛋白含量极高, 而蜕壳内粗蛋白含量仅为 16%, 这说明中华绒螯蟹大部分体壁蛋白在蜕皮前被动物重吸收。中华绒螯蟹体壁几丁质含量在蜕皮过程中变化不显著, 稳定在 12%左右, 只是在蜕皮前 D₃₋₄ 期稍有上升, 其原因可能是此时旧表皮的降解速率小于新表皮形成速率, 致使整个体壁几丁质含量更高。蜕壳中几丁质含量仍旧保持在 10%左右, 说明在中华绒螯蟹蜕皮过程中, 大部分几丁质随外骨骼一同蜕下。

甲壳动物蜕皮过程中体壁无机离子的变化可归结为外骨骼蜕皮前的蜕去、重吸收及蜕皮后的重建^[18]。Ca²⁺和 Mg²⁺是外骨骼矿化所必需的, 同时也是参与新陈代谢的重要物质。随着蜕皮的临近, 外骨骼的膜层和内表皮层逐渐降解, Ca²⁺、Mg²⁺离子被释放到血淋巴中, 所以体壁组织 Ca²⁺、Mg²⁺含量显著降低。在蜕皮前 D₃₋₄ 期, 体壁组织已合成新的外表皮和上表皮, Ca²⁺、Mg²⁺含量恢复到间期水平, 按照 Shafer, et al. 和 Coblentz, et al.^[19,20]的观点, 即便此时表皮含有适宜的 Ca²⁺含量, 蜕皮前合成的新的外表皮和上表皮也不会进行矿化。蜕皮后 A-B 期, 由于旧表皮完全蜕去, 新表皮尚未完全矿化, 所以体壁组织 Ca²⁺、Mg²⁺含量较低。Cu²⁺和 Zn²⁺在体壁组织含量较低, 所以在蜕皮间期和蜕皮前无显著变化, 而蜕皮后体壁要完成矿化, Cu²⁺和 Zn²⁺是完成矿化作用

所需酶类的必需成分, 所以蜕皮后 A-B 期 Cu²⁺和 Zn²⁺含量较高^[21]。

中华绒螯蟹蜕下的甲壳中含有较多的 Ca²⁺和 Mg²⁺, 而蜕壳中 Cu²⁺和 Zn²⁺含量与体壁相似, 这是因为蜕皮时体壁中的有机物质大部分被吸收, 导致蜕壳中 Ca²⁺和 Mg²⁺等无机物相对含量较高; 至于 Cu²⁺和 Zn²⁺, 它们在体壁中的含量本来就低, 蜕皮时一部分被动物重吸收, 所以蜕壳中的含量与体壁中含量并无显著差异。

参考文献:

- [1] Pratoomchat B, Sawangwong P, Guedes R, et al. Cuticle ultra-structures changes in the crab *Scylla serrata* over the molt cycle [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2002, 293(4): 414—426
- [2] Gorokhova E. Moults cycle and its chronology in *Mysis mixta* and *Neomysis integer* (Crustacea, Mysidacea): implications for growth assessment [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2002, 278(2): 179—194
- [3] Wang C J, Zhu D F, Qi Y Z, et al. Molt-inhibiting hormone levels and ecdysteroid titer during a molt cycle of *Portunus trituberculatus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(1): 22—28 [汪春建, 朱冬发, 元一舟, 等. 三疣梭子蟹蜕皮周期中 MIH 基因 mRNA 水平与蜕皮激素浓度变化. *水生生物学报*, 2013, 37(1): 22—28]
- [4] Gilbert L I, Rybczynski R, Warren J T. Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway [J]. *Annual Review of Entomology*, 2002, 47: 883—916
- [5] Pratoomchat B, Sawangwong P, Pakkong P, et al. Organic and inorganic compound variations in haemolymph, epidermal tissue and cuticle over the molt cycle in *Scylla serrata* (Decapoda) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2002, 131(2): 243—255
- [6] Nakatsuji T, Sonobe H. Regulation of ecdysteroid secretion from the Y-organ by moltinhibiting hormone in the American crayfish, *Procambarus clarkia* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2004, 135(3): 358—364
- [7] Tian Z H, Kang X J, Mu S M. The molt stages and the hepatopancreas contents of lipids, glycogen and some selected inorganic elements during the molt cycle of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Fisheries Science*, 2012, 78(1): 67—74
- [8] Kang X J, Tian Z H, Wu J L, et al. The molt stages and the hepatopancreas changes in the activities of digestive enzymes during cycle the molt of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(5): 806—812 [康现江, 田志环, 吴江立, 等. 中华绒螯蟹蜕皮周期及蜕皮过程中肝胰腺消化酶活性变化.

- 中国水产科学, 2012, 19(5): 806—812
- [9] Bancroft J D, Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques [M]. 5thed. Harcourt Publisher Limited, London. 2002, 175
- [10] Bancroft J D, Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques [M]. 5thed. Harcourt Publisher Limited, London. 2002, 153
- [11] Chen C K. Methods of Insect Physiology and Biochemistry [M]. Beijing: Agriculture Press. 1993, 11—15 (in Chinese) [陈长昆. 昆虫生理生化实验. 北京: 农业出版社. 1993, 11—15]
- [12] 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 Technology*, 2005, 27(3): 499—509
- [13] Skinner D M. Molting and Regeneration [M]. In: Bliss D E, Mantel L H (Eds.), The biology of Crustacea. New York: Academic Press. 1985, 43—128
- [14] Marlowe R L, Dillaman R M, Roer R D. Lectin binding by crustacean cuticle: the cuticle of *Callinectes sapidus* throughout the molt cycle, and the intermolt cuticle of *Procambarus clarkia* and *Ocypode quadrata* [J]. *Journal of Crustacean Biology*, 1994, 14(2): 231—246
- [15] Wang W, Wang A, Wang D, et al. Calcium, phosphorus and adenylate levels and Na⁺-K⁺-ATPase activities of prawn, *Macrobrachium nipponense* during the moult cycle [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2003, 134(2): 297—305
- [16] Vigh D A, Dendinger J E. Temporal relationships of postmolt deposition of calcium, magnesium, chitin and protein in the cuticle of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology*, 1982, 72(2): 365—369
- [17] Roer R D, Halbrook K E, Shafer T H. Glycosidase activity in the post-ecdysial cuticle of the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 128(4): 683—690
- [18] Nørum U, Bondgaard M, Bjerregaard P. Copper and zinc handling during the moult cycle of male and female shore crabs *Carcinus maenas* [J]. *Marine Biology*, 2003, 142(4): 757—769
- [19] Coblentz F E, Shafer T H, Roer R D. Cuticular proteins from the blue crab alter in vitro calciumcarbonate mineralization [J]. *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 121(3): 349—360
- [20] Shafer T H, Roer R D, Midgetteluther C, et al. Postecdysial cuticle alteration in the blue crab, *Callinectes sapidus*-synchronous changes in glycoproteins and mineral nucleation [J]. *Journal of Experimental Zoology. Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 1995, 271(3): 171—182
- [21] Salaenoi J, Bootpugdeethum J, Mingmuang M, et al. Chitinase, proteinase, glycogen and some trace elements during molting Cycle of Mud Crab (*Scylla serrata* Forskål 1775) [J]. *Kasetsart Journal (Nature Science)*, 2006, 40: 517—528

STRUCTURAL AND CONSTITUENT CHANGES IN INTEGUMENT DURING THE MOLT CYCLE OF CHINESE MITTEN CRAB *ERIOCHEIR SINENSIS*

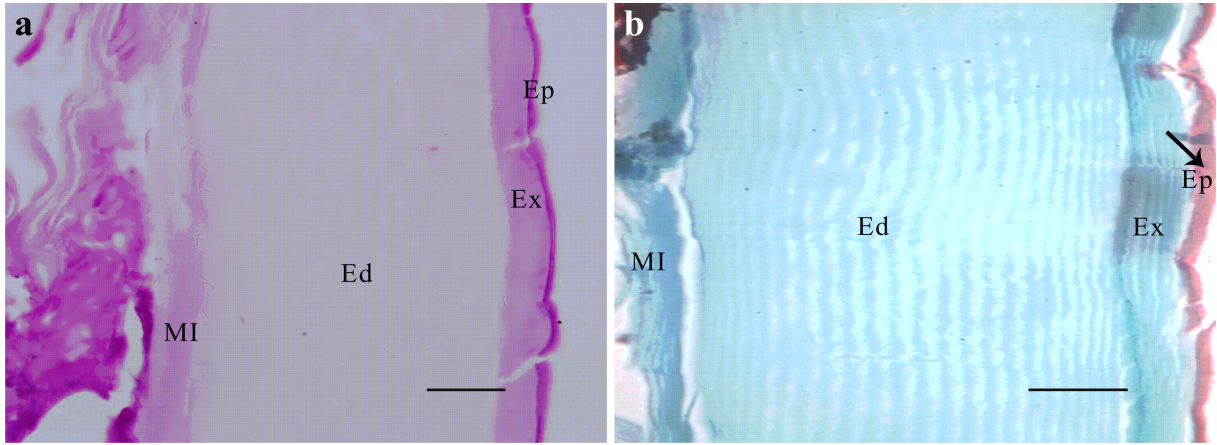
TIAN Zhi-Huan^{1,2}, KANG Xian-Jiang² and JIAO Chuan-Zhen¹

(1. College of Yingdong Life Science, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China;

2. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

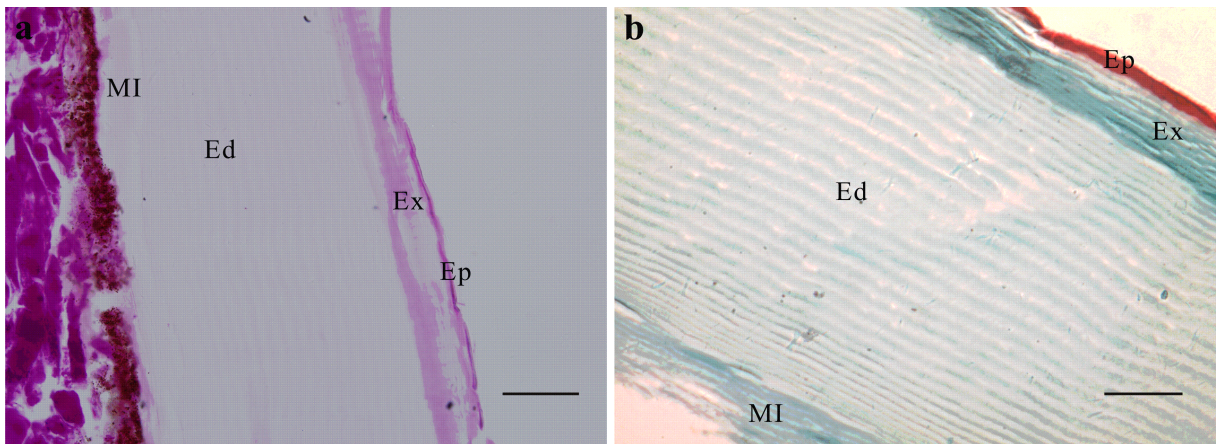
Abstract: The construction and main constituent of the integument of *Eriocheir sinensis* were studied by the methods of histochemistry and atomic absorption methods. The results showed that the integument of *E. sinensis* was composed of four sub-layers from the exterior to the interior: an epicuticle, an exocuticle, an endocuticle, and a membranous layer. The carbohydrates were deposited in all sub-layers and the collagen fibers were deposited in all sub-layers except the epicuticle. Both carbohydrates and collagen fibers were reabsorbed in premolt stages. The epicuticle and exocuticle were synthesized before molt and the endocuticle and membranous layer were synthesized after molt. The contents of integumental crude protein decreased before molt (D₁-D₃₋₄) ($P < 0.05$) and were extremely high in postmolt A-B stage ($P < 0.05$). The integumental chitinous content showed no obvious variation during the molt cycle ($P > 0.05$) except a little increase before molt. The contents of Ca²⁺ and Mg²⁺ in premolt D₁ stage were significantly lower compared with the intermolt stage and other stages in premolt ($P < 0.05$) and were the lowest in the postmolt A-B stage ($P < 0.05$). There were much Ca²⁺ and Mg²⁺ in the exoskeleton that the animal moulted. The content of Cu²⁺ and Zn²⁺ showed no obvious variation except increased in postmolt A-B stage ($P < 0.05$). These results indicated that the structural and constituent changes in integument of *E. sinensis* are coincident with its molt stages.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Molt stage; Construction of integument; Biochemical constituent



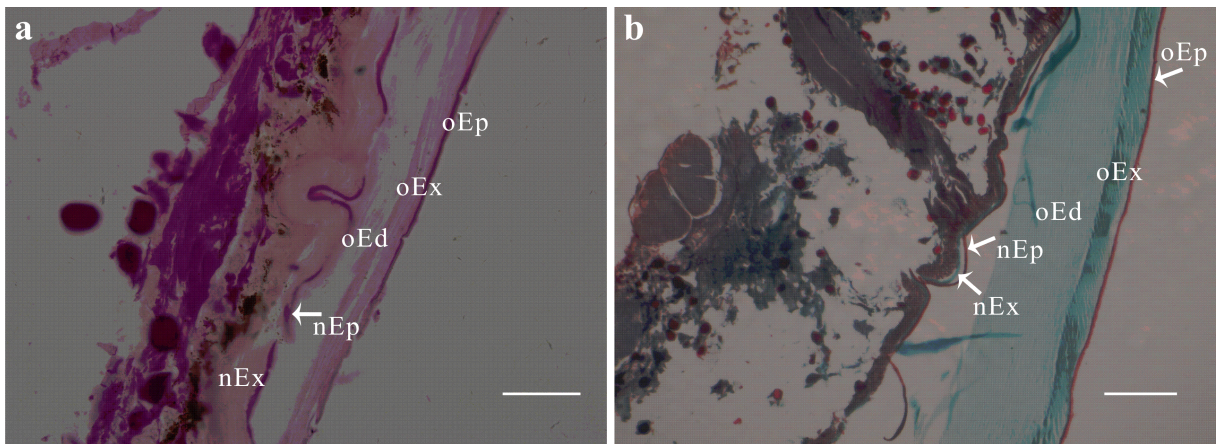
图版 I 中华绒螯蟹蜕皮间期体壁糖类 (a) 和胶原纤维 (b) 染色, Ep-上表皮、Ex-外表皮、Ed-内表皮、MI-膜层(标尺: 50 μm)

Plate I Location of carbohydrate (a) and collagen fibers (b) of the integument of *E. sinensis* in intermolt. Four cuticular sub-layers are shown: epicuticle (Ep), exocuticle (Ex), endocuticle (Ed), and membranous layer (MI). Scale bar: 50 μm



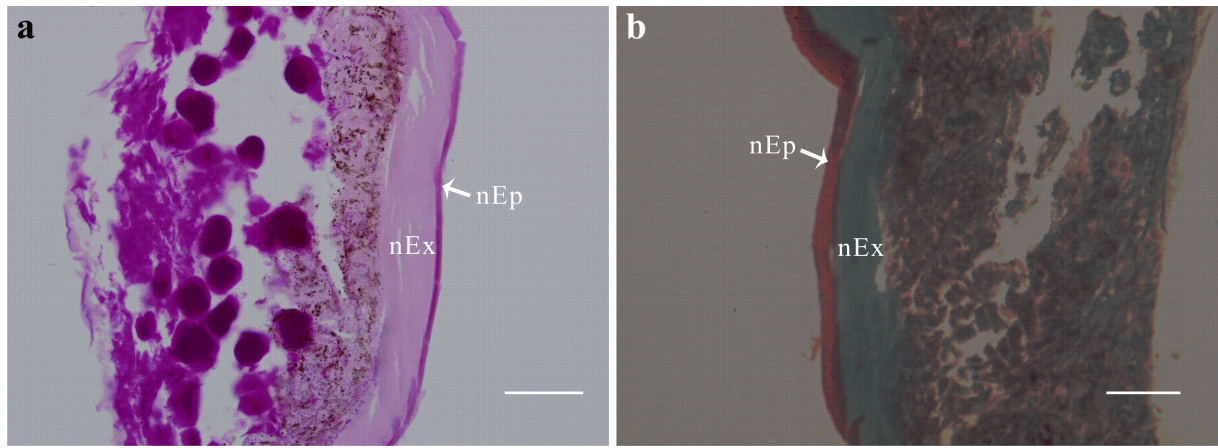
图版 II 中华绒螯蟹蜕皮前早期 D_{0-1} 期体壁糖类 (a) 和胶原纤维 (b) 染色, Ep-上表皮、Ex-外表皮、Ed-内表皮、MI-膜层(标尺: 50 μm)

Plate II Locations of carbohydrate (a) and collagen fibers (b) of the integument of *E. sinensis* in early premolt D_{0-1} stage. Four cuticular sub-layers are shown: epicuticle (Ep), exocuticle (Ex), endocuticle (Ed), and membranous layer (MI). Scale bar: 50 μm



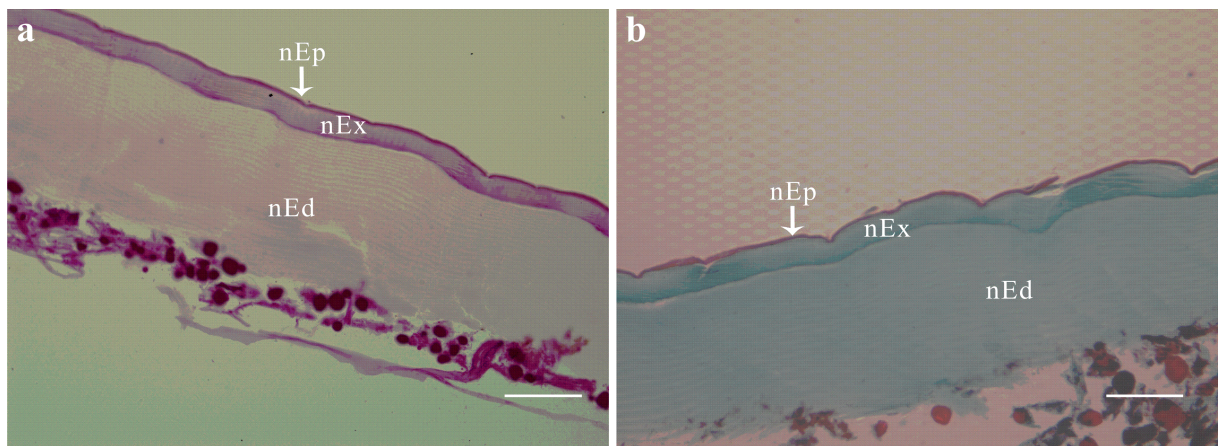
图版 III 中华绒螯蟹蜕皮前晚期 D_{3-4} 期体壁糖类 (a) 和胶原纤维 (b) 染色, oEp-旧上表皮、oEx-旧外表皮、oEd-旧内表皮、nEp-新上表皮, nEx-新外表皮(标尺: 25 μm)

Plate III Locations of carbohydrate (a) and collagen fibers (b) of the integument of *E. sinensis* in later premolt D_{3-4} stage. Five cuticular sub-layers are shown: old epicuticle (oEp), old exocuticle (oEx), old endocuticle (oEd), new epicuticle (nEp), and new exocuticle (nEx). Scale bar: 25 μm



图版 IV 中华绒螯蟹蜕皮后早期体壁糖类 (a) 和胶原纤维 (b) 染色, nEp-新上表皮, nEx-新外表皮(标尺: 25 μm)

Plate IV Locations of carbohydrate (a) and collagen fibers (b) of the integument of *E. sinensis* in early postmolt. Two cuticular sub-layers are shown: new epicuticle (nEp), and new exocuticle (nEx). Scale bar: 25 μm



图版 V 中华绒螯蟹蜕皮后晚期体壁糖类 (a) 和胶原纤维 (b) 染色, nEp-新上表皮, nEx-新外表皮(标尺: 25 μm)

Plate V Locations of carbohydrate (a) and collagen fibers (b) of the integument of in later postmolt, three cuticular sub-layers are shown: new epicuticle (nEp), new exocuticle (nEx), and new endocuticle (nEd). Scale bar: 25 μm