

徐宇,许志强,孟祥龙,等. 克氏原螯虾雌雄分养状态下的性腺发育观察[J]. 江苏农业科学,2019,47(15):192-194.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.15.045

克氏原螯虾雌雄分养状态下的性腺发育观察

徐宇,许志强,孟祥龙,陈友明,李佳佳,严维辉,唐建清

(江苏省淡水水产研究所,江苏南京 210017)

摘要:克氏原螯虾具有多雄多雌交配行为,这一特性给克氏原螯虾家系选育工作带来了许多不便。为了获取克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)雌雄分开养殖下的性腺发育状况,本研究从苗种阶段开始对克氏原螯虾进行雌雄分开养殖,在江苏地区克氏原螯虾主要繁殖季节(9—12月),对雌雄分开养殖状态下克氏原螯虾的性腺发育情况进行了观察。9月所采集的雌性克氏原螯虾多处于性腺发育V期(占20/30),卵巢呈深褐色,卵粒饱满均匀;11月所采集的克氏原螯虾样品的卵巢多数已退化(占22/30),卵巢中仅残存少量未成熟卵粒(或空腔),处于性腺发育VI期。组织切片观察结果显示,克氏原螯虾卵母细胞直径为2 000 μm 左右,细胞质中可见大量的卵黄颗粒;精巢呈长囊形,生精小囊多呈囊球状,生精小囊与收集管相连接,收集管中可见部分精子。研究结果提示,雌雄分开养殖对克氏原螯虾的性腺发育没有产生明显的不利影响,本研究为后续开展克氏原螯虾家系选育相关研究积累了数据。

关键词:克氏原螯虾;性腺发育;雌雄分养;肝胰腺指数

中图分类号: S966.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)15-0192-02

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)俗称小龙虾,是一种杂食性淡水虾类,原产于墨西哥北部和美国南部^[1]。近年来,由于国内市场对克氏原螯虾的需求量不断增加,天然克氏原螯虾群体过度捕捞严重,野生资源量急剧下降。在资源量持续降低的同时,天然群体的种质退化问题也开始逐渐显现,主要表现为捕捞个体规格降低、肉质品质差、出肉率低等。此外,由于多数养殖户普遍采取捕大留小的方式来进行苗种繁育和成虾养殖,累代的逆向选择使养殖群体中的优异基因逐渐消失,养殖群体种质退化问题已非常严重^[2]。

深入研究重要经济性状相关的遗传规律,针对相关经济性状对养殖群体进行遗传改良是当前克氏原螯虾产业发展的迫切需求。在采用家系选育方法对克氏原螯虾养殖群体进行遗传改良的工作中,需要对雌雄个体进行单对交配繁殖。之前的研究表明,克氏原螯虾交配季节广泛,繁殖期较长,一年中大部分时间均有交配现象。此外,克氏原螯虾还具有多雄多雌交配行为(即一雌多雄或一雄多雌),而且雌虾在交配以后并不会马上产卵孵化,在繁殖季节所采集到的雌虾可能早已交配(且可能是多雄交配)^[3]。因此,在繁殖季节所采集到的个体通常已不能用于克氏原螯虾育种过程中的家系构建工作,这一特性给克氏原螯虾家系选育工作带来了许多不便。为了解决这一问题,在克氏原螯虾家系选育过程中,需要从苗

种培育阶段开始就对其进行雌雄分开养殖。

为了研究雌雄分开养殖是否会对克氏原螯虾的性腺发育进程产生不利影响,本研究从苗种阶段开始对其进行雌雄分开养殖,通过外部形态和组织切片相结合的方法,在克氏原螯虾主要繁殖季节对其性腺发育情况进行观察,期望为后续开展克氏原螯虾遗传育种研究积累相关数据。

1 材料与方 法

1.1 养殖苗种来源

于2017年5月4日从江苏省淡水水产研究所江浦基地引进克氏原螯虾苗种进行雌雄分开养殖,雌虾体质量为(4.21 \pm 0.82) g,全长(5.95 \pm 0.37) cm,雄虾体质量为(5.15 \pm 1.12) g,全长(6.37 \pm 0.40) cm。

1.2 养殖条件

雌雄分开养殖试验在江苏省淡水水产研究所扬中基地进行,水泥池规格为2.2 m \times 2.2 m,养殖水深0.3 m。雌雄苗种分开后分别随机投放于3个水泥池中进行养殖,每池雌、雄虾放养量均为60尾。水泥池中设置泥瓦、塑料管等遮蔽物,养殖过程中保持微流水状态,适时开启增氧设备。水泥池中栽种伊乐藻,保证水草覆盖率 > 70%。每日早晚根据摄食情况投喂克氏原螯虾专用配合饲料。

1.3 性腺发育情况观察

于2017年9月22日和11月28日(江苏地区克氏原螯虾主要繁殖季节月)分别从养殖池中随机采集雌虾和雄虾进行生长性状测定,解剖并观察性腺发育状态,参考李胜等的方法^[4-5]对克氏原螯虾的卵巢发育情况进行分期。从克氏原螯虾雌雄个体的卵巢组织和精巢组织中取样,观察卵巢颜色、卵粒大小等形态特征,用4%多聚甲醛对卵巢和精巢组织分别进行保存固定。经过乙醇脱水,二甲苯透明处理后进行石蜡包埋并切片(厚度为3~5 μm),苏木精、伊红(HE)染色后中性树脂胶封片,显微镜下观察并拍照。

收稿日期:2018-05-09

基金项目:江苏省克氏原螯虾产业技术体系项目;克氏原螯虾新品种(系)创制研究项目(编号:PZCZ201746);国家虾蟹产业技术体系克氏原螯虾育种技术岗位(编号:CARS-48);江苏省“六大人才高峰”项目(编号:NY-029);江苏省“333高层次人才培养工程”项目。

作者简介:徐宇(1986—),女,江苏高邮人,硕士,助理研究员,主要从事水产动物种质资源保护与利用。E-mail:jsgxyuy@126.com。
通信作者:许志强,博士,研究员,主要从事克氏原螯虾遗传育种及健康养殖相关研究。E-mail:zhiqiangx@163.com。

2 结果与分析

2.1 克氏原螯虾雌雄分开养殖生长情况

雌雄分开养殖至江苏克氏原螯虾的主要繁殖季节以后(9月以后),分别对雌雄个体的生长情况以及性腺发育情况进行测定,结果见表1。2017年9月16日样品测定结果显示,

雌性克氏原螯虾的卵巢多数呈现深褐色,卵粒饱满均匀,所采集的30尾雌性个体的卵巢有20尾处于性腺发育V期。2017年11月28日样品测定结果显示,8尾为深褐色,仍处于性腺发育V期,其余22尾的卵巢退化,卵巢中仅残存少量未成熟卵粒或为空腔,处于性腺发育VI期。

表1 克氏原螯虾雌雄分开养殖生长情况

指标	9月16日		11月28日	
	雌(n=30)	雄(n=30)	雌(n=30)	雄(n=30)
体质量(g)	28.72 ± 5.19	35.20 ± 4.82	30.82 ± 3.96	36.77 ± 3.38
头胸甲长(cm)	3.92 ± 0.31	4.25 ± 0.19	4.87 ± 0.19	4.90 ± 0.22
第一腹节宽(cm)	2.05 ± 0.09	1.81 ± 0.13	2.19 ± 0.29	1.88 ± 0.20
性腺(卵巢/精巢)颜色及发育成熟程度	卵巢呈深褐色,卵粒饱满均匀,10/30处于性腺发育IV期;20/30处于性腺发育V期	乳白色	8/30为深褐色,处于性腺发育V期;22/30残存少量未成熟卵粒或为空腔,处于性腺发育VI期	乳白色
性腺指数(性腺质量/体质量)	0.032 ± 0.023	—	—	—
肝胰腺指数(肝胰腺质量/体质量)	0.053 ± 0.012	—	0.066 ± 0.013	—

肝胰腺是甲壳动物营养物质消化与能量储存等的重要器官,同时也是甲壳动物性腺发育过程中的主要营养来源^[6]。结果表明,克氏原螯虾的肝胰腺指数由9月的0.053 ± 0.012上升至11月的0.066 ± 0.013,可能是由于性腺退化以后,肝胰腺中的营养成分已不需要提供给性腺发育,营养成分的积累增加而使肝胰腺指数出现了上升。

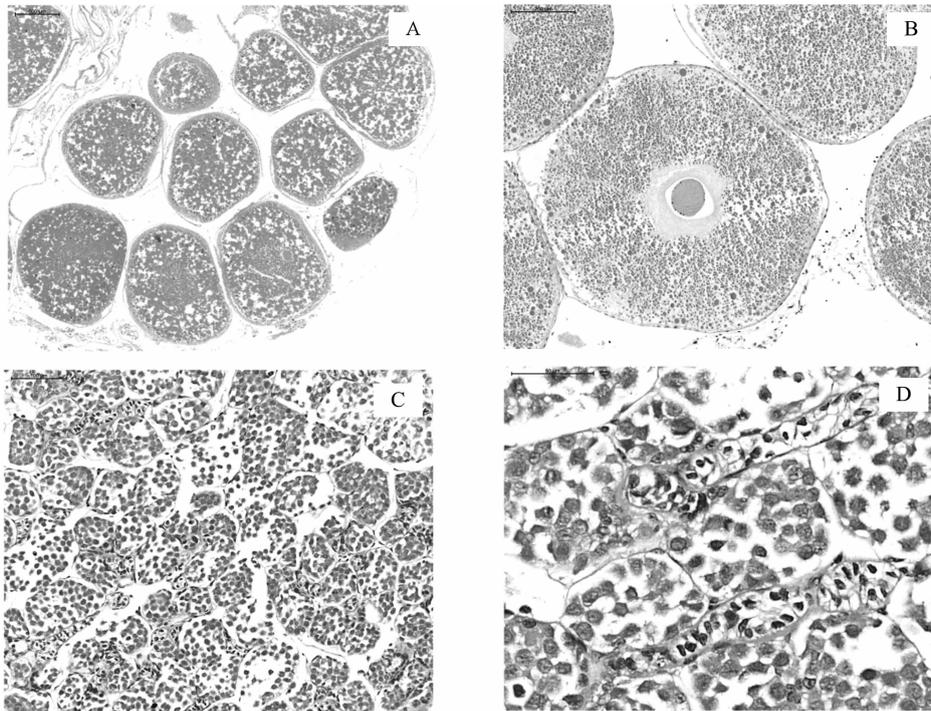
2.2 克氏原螯虾雌雄分开养殖后的性腺发育情况

对雌雄分开养殖的克氏原螯虾的性腺组织分别进行了组织切片观察,克氏原螯虾卵母细胞的细胞质中有大量的卵黄

颗粒,细胞直径2 000 μm左右(图1-A),细胞核偏位,切片不容易观察到(图1-B)。克氏原螯虾的精巢呈长囊形,生精小囊多呈囊球状,切片中生精小囊由于相互紧密挤压而形状略不规则(图1-C),生精小囊与收集管相连接,收集管中可见部分精子(图1-D)。

3 结论

克氏原螯虾具有多雄多雌交配行为,在通过家系选育手段对克氏原螯虾进行遗传改良的过程中,须要对其进行雌雄



A—卵巢组织,其中的卵母细胞中可见大量的卵黄蛋白原颗粒(比例尺=500 μm); B—卵母细胞,其中可见大量的卵黄蛋白原颗粒以及细胞核(比例尺=200 μm); C—精巢组织中的大量生精小囊以及其中的精母细胞(比例尺=100 μm); D—生精小囊以及与之相连的收集管(比例尺=50 μm)

图1 雌雄分开养殖克氏原螯虾性腺组织结构

魏冬梅,段魏魏,陈真,等. 新疆五家渠地区鱼类水霉病病原菌 18S rDNA 序列系统分类分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(15):194-199.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.15.046

新疆五家渠地区鱼类水霉病病原菌 18S rDNA 序列系统分类分析

魏冬梅,段魏魏,陈真,王咏星

(新疆大学生命科学与技术学院,新疆乌鲁木齐 830046)

摘要:在对新疆五家渠地区 15 株鱼类水霉病病原菌 18S rDNA 克隆测序的基础上,探讨相比传统分类方法,运用 18S rDNA 序列进行分子鉴定对水霉菌分类的可行性。结果显示,用 MEGA 5.0 软件构建邻接(NJ)树和最大似然(ML)树进行分类,15 株病原菌中 LF04、LF01、JX03、JX01 为寄生水霉,HL04、JY07、HZ、JY10、LY04、JY15、HL01 为镰刀菌,JX02 为腐霉,JY06 未鉴定出结果,与形态学分类结果差异巨大。

关键词:水霉病;系统发育树;分类;18S rDNA

中图分类号: S941.43⁺¹ **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)15-0194-06

水霉病(saprolegniasis)又称肤霉病、白毛病,是威胁淡水鱼类养殖的世界性病害,在很多淡水鱼的成鱼、鱼苗、鱼卵中都会发病。水霉病的病原目前已发现有几十种,主要是真菌门鞭毛菌亚门藻状菌纲水霉目水霉科的水霉属和绵霉属以及霜霉目腐霉科的腐霉属和疫霉属^[1-3],宿主一般在受伤之后易感染水霉病^[4]。水霉病病原菌通常具有一些真菌特征,但其作为非真菌的类真菌生物,对于其分类地位尚存争议^[5]。目前,随着分子生物学的快速发展,许多分子生物学手段已用于水霉的分类学研究^[6-10]。内转录间隔区(ITS)区域与 18S rDNA 因其高度保守且种间甚至种内高度变异被广泛应用于真菌种间分析和种的鉴定。新疆独特的气候特点使鱼类在经历严冬后的初春易患水霉病,鱼类水霉病的病情较我国其他地区更为严峻,而目前未见相关研究,因此对新疆地区鱼类水霉病病原菌的分离鉴定十分必要。

收稿日期:2018-04-10

基金项目:国家自然科学基金(编号:31560047)。

作者简介:魏冬梅(1990—),女,甘肃定西人,硕士研究生,主要从事鱼类水霉病病原菌多样性研究。E-mail:3169089561@qq.com。

通信作者:王咏星,硕士,副教授,主要从事水生生物研究。E-mail:wuying65@126.com。

分开养殖。为了研究雌雄分开养殖是否会影响克氏原螯虾的性腺发育进程,本研究从苗种阶段开始对克氏原螯虾进行雌雄分开养殖,在其主要繁殖季节分别采集雌雄样本,通过外部形态和组织切片相结合的方法对雌雄分开养殖的克氏原螯虾性腺发育情况进行了观察,研究结果显示,雌雄分开养殖对克氏原螯虾的性腺发育不会产生明显的不利影响,本研究为后续开展克氏原螯虾家系培育研究积累了相关数据。

参考文献:

[1] Huner J V. *Procambarus* in north America and elsewhere [M]// Freshwater crayfish: biology, management and exploitation. London:

对于初学者而言,构建邻接(NJ)树和最大似然(ML)树,一般采用 MEGA 软件^[11]。MEGA 是 Nei 开发并设计的图形化软件,使用方便快捷。本研究以新疆五家渠地区分离纯化所得 15 株水霉病病原菌 18S rDNA 区域为分子标记,进行分子生物学鉴定,并与形态学的鉴定结果作对比,以期弥补国内水霉分类研究的不足,并为鱼类水霉病的病原鉴定及后期药物防治的研究提供数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菌种:由笔者所在实验室早期分离纯化(于 2010—2017 年自新疆五家渠市水产养殖基地采样,带回实验室分离纯化菌种并进行形态、18S rDNA 测序分析等相关试验)获得并进行形态学初步鉴定。其中,HL01、HL02 和 HL04 分离自新疆五家渠患病河鲈鱼病灶处,HZ、HZ02 分离自新疆五家渠患病虹鳟鱼病灶处,JX01、JX02、JX03 分离自新疆五家渠患病江雪鱼病灶处,JY06、JY07、JY10、JY15 分离自新疆五家渠患病鲫鱼病灶处,LF01、LF04 分离自新疆五家渠患病罗非鱼病灶处,LY04 分离自新疆五家渠患病鲢鱼病灶处。

1.2 方法

1.2.1 菌株的活化 从长满水霉菌丝的平板上切取直径为

Croom Helm,1988.

[2] 李庆红,姚田玉. 克氏螯虾原池繁育方式亟待改进[J]. 科学种养,2009(3):40.

[3] 李飞,李喜莲,贾永义,等. 克氏原螯虾家系建立及幼虾生长比较的初步研究[J]. 安徽农业大学学报,2014,41(1):38-43.

[4] 李胜,赵维信. 克氏原螯虾大颚器在卵巢发育周期中的组织结构变化[J]. 上海水产大学学报,1999,8(1):12-18.

[5] 夏爱军,庞璐,严维辉,等. 雌性克氏原螯虾性腺发育及相关系数的周年动态研究[J]. 淡水渔业,2008,38(4):12-15.

[6] 成永旭,赖伟,堵南山. 十足类甲壳动物卵巢发育过程中脂肪的积累与肝胰腺脂肪的变化[J]. 动物学杂志,1997,32(2):57-60.