

隗 阳,水 燕,朱光艳,等. 克氏原螯虾胚胎发育与离体孵化的研究进展及展望[J]. 江苏农业科学,2021,49(15):25-32.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.15.005

克氏原螯虾胚胎发育与离体孵化的研究进展及展望

隗 阳¹,水 燕²,朱光艳²,徐钢春^{1,2}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院,江苏无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室,江苏无锡 214081)

摘要:克氏原螯虾是世界上分布最广、养殖最普遍的淡水螯虾。该虾肉味鲜美、营养丰富,深受国内外市场欢迎,消费量巨大。克氏原螯虾具有广阔的产业化前景,然而苗种供应不足的问题一直制约着克氏原螯虾产业的可持续发展。因此,规模化的人工繁殖是克氏原螯虾产业化的起点和突破口。本文概述了克氏原螯虾胚胎发育的形态结构变化、生化组成及营养代谢、酶活研究、分子和组学研究以及生态因子对克氏原螯虾胚胎发育的影响,并且概述了胚胎离体孵化的相关技术进展,探讨了克氏原螯虾离体孵化的思路和方法以及对未来克氏原螯虾育种的展望。

关键词:克氏原螯虾;胚胎发育;离体孵化;甲壳动物;人工繁殖

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)15-0025-07

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)别称淡水龙虾、小龙虾,隶属于甲壳纲(Crustacea)螯虾科(Cabariidae),现已分布至全国十几个省市,成为归化于我国自然水体的一个种^[1-3]。克氏原螯虾生长迅速,在池塘养殖条件下,幼虾 5~6 个月即可达性成熟^[4]。自 20 世纪 90 年代以来,随着克氏原螯虾消费量的快速增加,其经济利益和营养价值逐渐被人们了解,野生虾被狂捕滥捞,使其资源急剧下降。目前,克氏原螯虾的野生资源已远远不能满足市场的需求,人们对克氏原螯虾消费需求的快速上升加速了其养殖业的发展,其人工养殖与苗种繁育受到人们的广泛重视^[5]。

克氏原螯虾是当今世界范围内最主要的淡水螯虾养殖种类,其产量占有所有螯虾产量的 70%~80%^[6-8]。目前来说,克氏原螯虾的人工繁殖技术已基本成熟,但规模化苗种繁育技术尚未突破,尤其是苗种问题无法得到有效解决。苗种的紧缺制约了克氏原螯虾规模化养殖的发展,克氏原螯虾苗种可控化、规模化生产势在必行^[9-11]。

克氏原螯虾的受精卵及第一期幼体都要附着在母体的腹肢上,故人工孵化时需精心饲养抱卵虾,科学调节水质,这不仅增加了亲虾的管理成本,并且不能保证孵化虾苗的可控性。若能将克氏原螯虾受精卵离体孵化,则可减少抱卵虾的饲养管理成本,实现低成本、可控化、规模化、高效益培育虾苗。因此,掌握克氏原螯虾胚胎发育过程,了解其胚胎发育所需要的条件,分析提高离体孵化率及成活率的措施,针对性地开展克氏原螯虾的离体繁育技术研究变得极为重要。

1 胚胎发育的研究进展

1.1 受精作用和胚胎形态结构

克氏原螯虾受精卵形成之前,精子发生在输精管中,包括精子原体转化为精子的一系列事件。克氏原螯虾精子细胞的组织结构与其他动物群体中典型的鞭毛精子有显著差异。在研究充分的十足目动物中,精子不仅不典型,而且不能运动^[12]。Niksirat 等对螯虾科叉肢螯虾属(*Orconectes*)、原螯虾属(*Procambarus*)和螯虾属(*Astacus*)3 属精子的超微结构进行了观察比较。顶端带的形成、顶体穗的存在或突出是精子成熟的标志。克氏原螯虾精囊由包裹着 3 层精囊壁的精子团组成,精囊中间层的基质呈网状,其中的颗粒释放出内容物。随着受精的开始,精囊壁被雌性腺体的釉状分泌物溶解,胞外包膜、质膜和膜片等被除去,精子从顶体前部释放出成束的丝^[13]。此外,精子从包膜中释放后形成

收稿日期:2020-12-21

基金项目:中国水产科学研究院科技创新团队(长江特色水生动物繁育创新团队);国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(编号:2019YFD0900305)。

作者简介:隗 阳(1996—),男,湖北襄阳人,硕士研究生,研究方向为克氏原螯虾种质资源利用。E-mail:1652687478@qq.com。

通信作者:徐钢春,博士,研究员,研究方向为水产健康养殖技术。

E-mail:xugc@ffrc.cn。

细丝/水滴结构,有助于克氏原螯虾(非运动精子动物的代表)卵子-精子的结合,形成受精卵^[14]。也有研究显示,克氏原螯虾的卵母细胞被第 1 层包膜所包围,其皮层内有 3 种类型的囊泡,受精卵活化过程中,形态发生了广泛的变化。受精时,克氏原螯虾卵子的皮层反应至少持续 24 h。其卵子的受精外壳由第 1 层和第 2 层包膜组成,分别由卵巢和皮层反应构成。此外,还发现克氏原螯虾卵母细胞的附着柄来源于卵母细胞的第 1 层包膜^[15]。

克氏原螯虾的生活史从受精卵开始,紧接着是胚胎发育,达到性成熟后繁衍后代,最后衰老死亡。克氏原螯虾产卵量较少(200~800 粒),单个卵粒较大,卵径达 2.0 mm。其胚胎发育速度较快,受精卵经 6~10 周可孵出幼苗,幼苗吸附于母体 1~2 周,3 周后可独立生活,从孵出到幼虾要经过 11 次蜕壳,幼虾再经过多次蜕壳才能达到性成熟^[16]。其胚胎发育过程的分期并没有一个统一的划分方法。目前,大多数研究中将克氏原螯虾的胚胎发育划分为 9 期,即受精卵期(fertilized eggs)、卵裂期(cleavage stage)、囊胚期(blastula stage)、原肠期(gastrula stage)、前无节幼体期(egg-nauplius stage)、后无节幼体期(egg-metanauplius stage)、复眼色素期(eye pigment stage)、预备孵化期(prehatching stage)和孵化期(hatching stage)^[16-17],也有研究将其划分为 7 期^[18-19]和 12 期^[20-22]。当心跳频率约为 200 次时,幼体很快破壳而出,即为第 1 期幼体。初孵幼体体型与成体基本相同,腹部卷曲,活动能力很弱,依靠卵黄为营养物质,附着在母体腹足上生活。第 1 期幼体须附着在母体上 15 d 左右,期间完成 2 次蜕壳,将卵黄完全消耗殆尽,待环境条件适宜,才完全脱离母体,在水中营自由生活^[17]。

克氏原螯虾胚胎发育过程中,其胚胎颜色产生了一系列变化。最初受精卵为橄榄绿色,随后颜色加深,囊胚期呈灰绿色,原肠期胚胎呈灰褐色,随后的几个发育时期,胚胎颜色依次呈棕褐色、红褐色、暗红色。这种胚胎外部颜色的变化与其胚胎不同发育阶段具有一定的对应性。许多淡水螯虾类的胚胎发育均呈现类似的颜色变化^[23-24]。从卵的颜色变化可以进一步判断其所处的发育时期,有利于指导克氏原螯虾的人工育苗生产。

1.2 胚胎的生化组成及营养代谢

通常甲壳动物受精卵的卵黄中含有丰富的可供胚胎发育所需的蛋白质、脂类和碳水化合物,而

蛋白质是卵黄中含量最高的物质之一,在胚胎发育过程中不仅是构成组织的物质基础,也是维持胚胎发育新陈代谢的重要能源物质。研究表明,甲壳动物抱卵孵化的过程中,主要依靠卵子成熟过程中所积累的卵黄提供结构和能量物质,亲本和胚胎之间不存在营养物质交换^[1-2]。近 10 年来,对甲壳动物胚胎发育营养需求的研究有很多,包含甲壳动物对脂质、脂肪酸、蛋白质、碳水化合物、类胡萝卜素、维生素和矿物质等的营养需求^[25]。

戴颖在克氏原螯虾胚胎发育的研究中指出,可溶性蛋白质含量在胚胎发育过程中总体呈下降趋势,胚胎发育早期快速降低,从受精卵期到原肠期下降了 24%,这可能是因为早期的细胞分裂须要消耗大量卵黄中的蛋白质,以及为胚胎发育提供组织或器官的构建物质,而在随后的发育期中可溶性蛋白质含量下降比较缓慢,表明胚胎已进入胚胎组织或器官的形成阶段^[19]。这与姚俊杰在罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)胚胎发育主要营养物质代谢的研究中发现的可溶性蛋白含量变化类似,可溶性蛋白含量随着胚胎发育的进行逐渐降低^[24]。研究中还发现,总蛋白的含量也呈下降趋势,表明蛋白质是主要的能源物质,卵内营养物质应该进行着异化和同化作用,一部分的蛋白质用于构建组织和器官,另一部分的蛋白质则被分解,为胚胎提供能量^[19]。罗文对红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)胚胎营养代谢的研究和田华梅等对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的研究也得到了类似的结果,即红螯螯虾和中华绒螯蟹胚胎发育过程中,蛋白质含量随着胚胎发育的进行而不断下降。在中华绒螯蟹的整个胚胎发育过程中,在对几种水解酶的活力测定中发现,蛋白质水解酶和胃蛋白酶的比活力远远高于脂肪酶的比活力,因此表明蛋白质不仅是作为中华绒螯蟹胚胎发育的结构物质,而且也是主要能源物质^[26-27]。

董卫军研究发现,克氏原螯虾的胚胎发育与其他甲壳动物相类似,随着胚胎发育的进行,构成组织和器官的细胞增多,水分含量呈上升趋势,发育到孵化期达到最高点,增加了自身的体积,以便突破卵膜,从卵内孵出^[28]。在克氏原螯虾胚胎发育过程中,总糖含量基本呈下降趋势。总糖在克氏原螯虾整个胚胎发育阶段总体含量偏低,这说明它不是克氏原螯虾胚胎发育的主要能源物质。卵裂期、原肠期总糖含量快速下降,可能与糖参与形成各种蛋

白质、脂类复合物有关;无节幼体期糖含量回升可能是为以后甲壳的形成做准备,而随着甲壳的形成消耗,到最后时期糖含量又逐渐下降^[28],这与姚俊杰等的研究结果^[24,29]类似。克氏原螯虾胚胎发育过程中,氨基酸含量的变化呈抛物线状,即从受精卵期、卵裂期到孵化期,氨基酸含量先上升后下降,在必需氨基酸中异亮氨酸的含量很高,非必需氨基酸中谷氨酸的含量最高。但在胚胎发育的代谢组学研究中,氨基酸易转化成其他物质,因此变异系数较大。董卫军的研究表明,克氏原螯虾各期胚胎发育过程中,脂肪酸的组成结构没有显著变化,其中单不饱和脂肪酸(MUFA)含量最高,其次为多不饱和脂肪酸(PUFA),饱和脂肪酸(SFA)含量最低^[28],这与姚俊杰对罗氏沼虾胚胎发育的研究结果有所不同,在罗氏沼虾中,油酸是主要的能源物质^[24]。由此可见,虾类胚胎中主要脂肪酸的组成含量存在种间差异,这可能与不同虾类所经历的胚胎发育时间的长短有关。

营养对十足目甲壳动物性腺成熟、繁殖性能及胚胎发育等具有至关重要的作用,营养不足会导致性腺不成熟,精子和卵子的质量变差,进而影响胚胎发育。Muzaffer 等通过分析输精管和精包囊中的精子数、精子活力、精包囊大小等参数,来确定十足纲甲壳动物精子质量,进而阐述影响十足目甲壳动物精子产生和精子质量的因素,如精巢营养对甲壳动物性腺成熟和精子质量具有不可或缺的作用^[30]。Oraporn 等研究比较了野生斑节对虾(*Penaeus monodon*)与饲料喂养的斑节对虾中花生四烯酸(AA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)的含量以及繁殖性能对比。结果发现,野生斑节对虾的精子囊中 AA 含量高于人工饲料喂养的对虾。天然活饲料的一个显著特点是具有较多的长链脂肪酸,即 n3 和 n6 高不饱和脂肪酸(HUFA),高不饱和脂肪酸参与生殖和神经系统的发展、生物膜的生产、类固醇激素的合成和卵黄形成。在所有的自然生物体中,多毛纲动物(Polychaeta)被认为是最好的天然饵料,多毛纲不仅含有高水平的蛋白质、脂类和 HUFA,而且还具有几种激素活性化合物。但是,生产多毛纲作为饲料来源并不总是可靠的,存在营养价值波动、可能的疾病传播、自然栖息地和动物数量减少、日益上涨的价格等问题。该研究模拟了多毛纲动物的营养特性,特别是其油脂含量的实用膳食,建立了一种促进对虾繁殖成熟的配

方饲料。结果显示,AA(而不是 DHA)对雄虾生殖组织发育成熟具有促进作用。精子囊中 AA 水平显著对虾的精子总数较多。饲料中脂肪酸的不平衡会对繁殖产生负面影响,会造成异常精子比例较高,活精子比例较低。在饲料中寻找最佳 AA 浓度对提高对虾雄性繁殖质量有重要意义^[31]。这与 Binh 等对海洋多毛纲动物提取物对日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)卵巢成熟及组织脂质成分^[32]影响的研究类似。该研究表明,日粮中添加海洋多毛纲动物提取物 n3 高不饱和脂肪酸对日本对虾卵巢成熟至关重要,多毛纲中脂质提取物对日本对虾卵巢成熟最有效,以游离氨基酸和多肽为主的可溶性提取物次之^[32]。Xu 等对膳食油脂来源对中国对虾(*Penaeus chinensis*)育苗繁殖力、卵孵化力及脂肪酸组成的影响进行了研究,结果表明,以猪油饲料喂养的中国对虾繁殖能力差、卵孵化率低。饲喂亚麻籽和玉米油日粮的产卵率有所提高,然而,孵化性没有明显改善。以凤尾鱼油饲料喂养,其繁殖力和卵孵化力均有显著提高。以凤尾鱼油为唯一膳食脂质的对虾中 n3 高不饱和脂肪酸含量最高。结果表明,n3 高不饱和脂肪酸在甲壳动物繁殖过程中可能发挥着不同的和特定的作用,必须包含在繁育饲料中^[33]。

1.3 胚胎发育的酶活性研究

克氏原螯虾以抱卵的方式进行孵化,而抱卵孵化虾蟹的胚胎发育仅依靠自身储存的丰富卵黄作为营养物质,在胚胎发育过程中卵黄物质的分解、运输和利用与酶的种类及活性变化密切相关。戴颖研究发现,克氏原螯虾胚胎中的 4 种消化酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶)从受精卵期开始就有活力,表明母体在卵母细胞形成过程中已将相关的酶或卵源性 mRNA 转运并储存在卵黄中,能为胚胎发育早期卵内物质的水解提供保障^[19]。胚胎发育的基因调控受卵源性 mRNA 和自身合子基因的双重影响,在胚胎发育初期主要依赖卵源性 mRNA 合成各种蛋白质,而合子基因影响甚微。然而,随着胚胎发育的不断深入,卵源性 mRNA 持续消耗,母体提供的相关酶类随之减少,而此时的胚胎尚未形成完整的消化系统,自身不能合成相关酶类,从而导致随后的发育期(卵裂和囊胚期、原肠期)胃蛋白酶活性不断降低。原肠期后随着细胞快速分化和组织、器官的出现,尤其是肝胰腺及消化系统的逐渐形成,胃蛋白酶的比活力出现小高峰,

胰蛋白酶的比活力达到最高值,这与姚俊杰对罗氏沼虾的研究结果^[24]类似,胃蛋白酶活力原肠期最低,随后的胚胎发育时期里胃蛋白酶活力逐渐上升。此外,胃蛋白酶和胰蛋白酶活力在出膜前期的升高,表明胚胎已为幼体的摄食作好准备,这也表明消化酶的产生是受基因控制而不是饵料刺激所致^[19]。

此外,在克氏原螯虾胚胎发育过程中,淀粉酶有活力,且酶活性有显著变化,原肠期最高,其他时期活性都较低且活力相差不大,原肠期后,3 种比活力较高的消化酶(淀粉酶、类胰蛋白酶和胃蛋白酶)活性都有较明显的下降,其原因可能是随胚胎发育卵源性 mRNA 持续消耗,而合子本身合成的 mRNA 较少,尚未完全发挥功用,以及消化系统尚未发育完善,即胚胎自身还不能合成相关酶类,导致随后的胚胎发育阶段酶活性不断下降。综合来看,整个胚胎发育过程可以根据生化物质和酶类活力变化分为 2 个阶段:母型控制阶段和合子型控制阶段^[19]。这与赵艳民对日本沼虾胚胎发育的研究类似^[29]。该研究对日本沼虾胚胎发育过程中 4 种消化酶类胰蛋白酶、胃蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活性进行了测定。其中,类胰蛋白酶和胃蛋白酶在受精卵期就已经表现出比较强的活性,随着胚胎发育至原肠期,2 种消化酶活力达到最高,随着母源 mRNA 逐渐被合子型基因所取代,消化酶活性开始下降,直到后无节幼体期开始,有所升高^[29]。

Mohd 等对罗氏沼虾幼体发育过程中消化酶活性的变化研究显示,罗氏沼虾早期幼虫为专食肉食性,罗氏沼虾幼体发育过程中消化酶的活性似乎与肝脏的发育过程具有一致性^[34]。Genodepa 等对青蟹(*Scylla serrata*)胚胎发育期间和新孵化幼体饥饿后的主要消化酶进行了研究,结果发现,脂质是青蟹胚胎发育早期利用的第 1 个能量储备,这可以从酯酶活性早期显著增加而淀粉酶和蛋白酶活性相对较低且稳定可以看出。随着现成的脂质储备逐渐枯竭,不足以满足胚胎发育末期日益增加的能量需求,蛋白质和某种程度上的碳水化合物被越来越多地利用。这可以通过酯酶活性水平来证明,与蛋白酶和酯酶活性在胚胎发育的最后阶段显著增加相一致^[35]。这些结果强调了脂质储备在青蟹胚胎发育中的重要性,以及适当均衡的营养和管理的重要性,以确保这些储备的积累,以生产高质量的青蟹苗种。

1.4 生态因子对胚胎发育的影响

甲壳动物生境(生态因子)对甲壳动物的生长和胚胎发育具有至关重要的作用。在自然环境下,甲壳动物在特定的季节,水温、光照周期、盐度等生态环境适宜的时候,其性腺才会成熟,会储藏能量交配产卵,集中繁育后代;当环境恶劣时,甲壳动物的性腺可能发育残缺或营养不良,出现交配少、产卵率低、孵化率低等情况。关于生态因子对甲壳动物胚胎发育影响的研究已经有很多。徐加元在物理因子对克氏原螯虾繁殖和生长的研究中指出,健康虾类亲本的性腺发育、繁殖力、受精率、胚胎孵化及其后续自营养阶段幼体的质量和存活率不仅与其所处生态环境中的物理因子息息相关,还与亲本的营养状况关系密切相关,该研究表明,在水温、光周期和饲料组成的 3 个因素中,对雌虾成活率的影响大小顺序为水温 > 饲料组成 > 光周期;对雌虾性腺发育的影响大小顺序为饲料组成 > 水温 > 光周期^[36]。可见水温和光照周期不仅对克氏原螯虾性腺发育有影响,甚至会造成克氏原螯虾死亡。

王庆等通过增加水温来刺激克氏原螯虾性腺发育及交配抱卵,结果显示,经过 38 d 的加温刺激,在 26 ℃ 下陆续观察到抱卵,而 18 ℃ 以下未观察到,但该水温能促进雌虾卵巢发育。雌虾经加温刺激后所抱卵在 18、21、26 ℃ 水温下均能正常孵化出幼虾,而且孵化所需时间随着温度的提升而缩短^[37]。这与李庭古等的研究类似,在一定温度范围内(20 ~ 30 ℃),温度越高,孵化时间越短^[22,38]。Jin 等在通过控制水温优化克氏原螯虾繁殖性能和胚胎发育的研究中同样指出,控制水温是诱导产卵和优化胚胎发育以提高克氏原螯虾产量的有效途径^[39],这对可持续水产养殖具有重要意义。在该研究中,提高克氏原螯虾繁殖性能的最佳温度为 21 ~ 25 ℃,而胚胎发育的最佳温度为 25 ℃,可以缩短胚胎发育时间,避免胚胎异常和死亡,同时还建立了一个依赖于温度的发育模型^[39]。这与 Carmona - Osalde 等的研究类似,温暖的水温能够加速克氏原螯虾产卵和胚胎发育^[40-41]。甲壳动物的生长、脱皮、生殖无不受光照和温度的影响与调控,越是低等动物,受光照和温度的影响越大^[42]。宋光同等研究了光照度对克氏原螯虾繁殖效果的影响,结果表明,利用遮阳网将白天光照度调控在 100 lx 以下时,克氏原螯虾的抱卵率显著高于对照组(2.5 倍)^[43]。这与强晓刚等利用水草等遮蔽物促进克氏原螯虾

繁殖、受精卵孵化具有一致性^[44-45]。张龙岗等研究了光照和饵料对克氏原螯虾亲虾性腺发育的影响,结果显示,光照和饵料对克氏原螯虾雌虾的性腺发育均具有重要影响。在这 2 个试验因子中,饵料对克氏原螯虾性腺发育影响最大,光照的影响次之。在投喂动物性饵料的 2 组中,遮光组的克氏原螯虾性腺系数(4.02%)要明显高于不遮光组(3.58%),而投喂颗粒配合饵料的试验组中没有遮光的池塘,克氏原螯虾性腺成熟系数也是最低的(2.34%)。光照时间太长会降低克氏原螯虾雌虾的性腺成熟系数,说明过长的光照会抑制雌虾的性腺发育^[46]。这一研究结果与罗文等对红螯螯虾的研究结果相类似,该试验结果同样佐证,相同投饵条件下,设置遮阳网有利于克氏原螯虾性腺的发育^[47-48]。

国外也有关于生态因子对甲壳动物影响的研究,Aiken 对温度和光周期对克氏原螯虾卵巢成熟和产卵的影响进行了更进一步的研究,结果表明,中枢神经系统组织中存在一种刺激排卵的物质,一些迹象表明,神经分泌与季节性生殖活动之间存在相关性,只有当温度和光周期在规定的时间内达到适当比例时,才能保证克氏原螯虾卵巢完全成熟并产卵^[49]。这在 Fanjul - moles 等对光周期和光强度变化对克氏原螯虾耗氧量、乳酸浓度和行为的影响研究中也得到证明,光对控制行为和代谢功能的神经和内分泌结构有影响^[50]。Ardavan 等在光周期影响雄性细趾小螯虾(*Pontastacus leptodactylus*)的配子产生、蛋白质和脂质代谢的研究中发现,黑暗会增加雄性细趾小螯虾的配子产量,长光照则会降低配子的产量。此外,恒定的光照会提高肝胰脏的总蛋白含量,光周期影响肝胰脏的氨基酸和脂肪酸谱^[51]。这与 Harlioglu 等在黑暗(无光照条件)对淡水螯虾交配和产卵时间影响的研究中类似,黑暗 24 h 无光照条件下,雌性淡水螯虾产卵率较高,交配和产卵时间要早于其他暴露于光照下的组^[52]。

盐度、pH 值、密度、农药残留等也会对克氏原螯虾的胚胎发育产生影响,pH 值、盐度和碱度之间还有毒性共同作用。李庭古在盐度对克氏原螯虾孵化率的影响研究中发现,克氏原螯虾受精卵孵化过程中对盐度要求较为严格,盐度高低直接影响克氏原螯虾受精卵胚胎的渗透压调节。盐度低于 4 时,克氏原螯虾受精卵孵化率较高且稳定。高于此盐度时,随着盐度升高,孵化率急剧下降,盐度 10 时无幼体孵出。由试验数据可知,克氏原螯虾受精卵孵

化的适宜盐度范围为 0 ~ 4^[22]。Barki 等研究了雌性红爪小龙虾(*Cherax quadricarinatus*)在拥挤的小罐孵化场条件下的密度极限。结果表明,繁殖的红爪雌性小龙虾对大范围密度的拥挤不太敏感。在室内孵化场条件下,孵化密度高于 60 只/m² 是可行的^[53]。Vogt 研究发现,在克氏原螯虾胚胎时期,将卵暴露于甲基睾丸素中,会降低孵化成功率和生长,并引发致畸效应^[54]。

1.5 分子和组学研究

随着传统遗传学、分子生物学及电镜技术等现代研究方法的引入,从分子结构和组学层面对于甲壳动物胚胎发育的研究成为了热点。Jiang 等对克氏原螯虾的转录组分析,从小龙虾睾丸和卵巢文库中共获得 1 134 993 条高质量序列,揭示了参与性腺发育的基因(卵黄蛋白原、周期蛋白 B、周期蛋白依赖性激酶 2、Dmc1 和泛素等)^[55]。这些数据将有助于发展人工调控克氏原螯虾繁殖的新思路。Kang 等研究了来自克氏原螯虾卵巢的转录组信息,共读取了 31 080 133 个基因,组装了 69 261 个基因序列,获得了卵巢的深度覆盖转录组测序数据。对 *PcRDH11* 基因进行敲除,可导致克氏原螯虾卵巢中的卵黄蛋白原(Vg)和卵黄蛋白原受体(VgR)表达水平降低,导致胚胎发育停滞^[56]。Ngernsounngern 等研究了斑节对虾卵巢中促性腺激素释放激素(GnRH)对卵巢成熟的影响,发现促性腺激素释放激素促进了虾的受精和产卵,促性腺激素释放激素可能是高度保守的肽,在诱导虾卵巢成熟的过程中发挥着重要作用^[57]。

2 克氏原螯虾胚胎离体孵化技术的发展

克氏原螯虾胚胎离体孵化是将亲虾与受精卵分离,然后对受精卵给予特定的孵化条件,使之破膜成为幼虾的过程。目前,克氏原螯虾胚胎离体孵化的相关研究并不多。对日本米虾胚胎发育及离体孵化的研究中,将各时期的胚胎分别置于自制的离体孵化装置中,同时在孵化装置的玻璃缸中放入胚胎发育至相应时期的抱卵亲虾,孵化期间盐度为 17.0 ± 1.0 ,温度为 $(25.5 \pm 1.0) ^\circ\text{C}$ 。结果显示,各期离体胚胎均能孵化出幼体,但膜内蚤状幼体期离体胚胎孵化率最高,为 $(80.7 \pm 2.4) \%$,与非离体孵化的对照组 $(79.1 \pm 4.9) \%$ 相比,二者差异不显著。卵裂期离体胚胎孵化率最低,为 $(28.2 \pm 2.6) \%$,与对照组差异显著。其中,温度对离体胚胎孵化时

间、孵化率和离体孵化出幼体的质量具有影响。在 15.0 ~ 32.5 °C 范围内,随着水温升高孵化时间逐渐缩短。但温度高于 29.0 °C 时,孵化出的幼体变态率开始下降^[58]。

波纹龙虾 (*Panulirus homarus*) 胚胎的离体培养及发育观察的研究结果表明,各期胚胎在相同条件下分别进行离体培养,均能孵化出健康幼体。卵裂期、原肠期、中眼色素形成期、复眼色素形成期和心跳期的胚胎平均孵化率依次为 35.0%、38.4%、54.6%、71.0% 和 80.0%^[59]。可见,初始培养胚胎越接近出膜期,其孵化率越高。中华绒螯蟹胚胎离体孵化方面也有研究,将中华绒螯蟹不同发育期的胚胎从腹肢基部剪下后在室温下孵化。结果表明,处于卵裂期、囊胚期和原肠期的胚胎离体孵化率 (42.16% ~ 54.90%) 无显著性差异;从原肠期开始,离体孵化的孵化率随着离体时间的缩短呈升高的趋势,即眼点期 (68.95% ± 5.89%) 和心跳期 (77.47% ± 5.45%) 极显著高于前 3 个时期,对外界环境的适应性也增强。试验证明,剪掉抱卵腹肢进行胚胎离体孵化,不但促进了亲蟹卵巢的快速发育,而且还降低了投喂、调节水质等费用^[60-61]。

随着对各种生态因子如水温、光照、盐度、营养等的深入研究,为摸索克氏原螯虾胚胎发育过程最适宜的外在条件提供了理论基础。而克氏原螯虾胚胎发育过程中形态结构、生理变化的研究,展示了其中物质能量的转移变化。对胚胎发育过程中各种激素的研究,能为控制诱导繁殖产卵和胚胎发生提供理论支撑。对卵巢发育和胚胎发生中分子生物学的研究,揭示了甲壳动物卵巢发育的分子调控机制,同时,将有助于开发人工调节克氏原螯虾繁殖产卵的新技术。这些外在条件和内在机制的研究都将为选择离体培养时期、找到最适的生态因子、提高孵化率和成活率提供理论支撑。

3 趋势与展望

甲壳动物多为体外受精,且有许多种类的受精卵须附着在母体腹部的附肢刚毛上完成孵化过程,这就为观察其形态发育提供了方便。但是,想要突破表面进行深层面的研究往往需要研究技术的突破创新。借助于早期的显微镜技术,初步了解了部分甲壳动物发育过程中的外部形态特征为甲壳动物胚胎发育学的研究奠定了基础。之后,随着石蜡切片技术、电子显微镜技术、生化和分子生物学技

术的发展引入,关于甲壳动物胚胎发育的研究得到深入发展,不再停留于观察表面形态变化的层面。目前,借助于新的研究手段,很多学者在观察精子和卵子的细微结构、观察胚胎发育过程中各个阶段的内在结构变化、生态因子对胚胎发育的影响、揭示甲壳动物胚胎发育过程中相关激素和基因调控机制等方面做了大量深入的工作。

随着克氏原螯虾胚胎发育过程中,结构形态发育、营养物质代谢、相关酶学、激素、基因调控、生境影响等的研究,克氏原螯虾完整的胚胎发育过程包括调控机制等等已经越来越清晰地呈现在我们面前。加上新的研究手段日新月异,预计不久的将来,我们将能够精准控制包括克氏原螯虾在内的甲壳动物的繁殖和胚胎发育,最终实现克氏原螯虾的全人工规模化育苗,使苗种问题不再成为制约克氏原螯虾产业发展的瓶颈。

参考文献:

- [1] 堵南山. 甲壳动物学[M]. 北京:科学出版社,1993.
- [2] David M H. Biology of freshwater crayfish[M]. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2002.
- [3] 沈嘉瑞,刘瑞玉. 我国的虾蟹[M]. 北京:科学出版社,1976.
- [4] 唐鑫生. 克氏原螯虾[J]. 生物学通报, 2001, 35 (9): 19 - 20.
- [5] 夏爱军,唐建清. 克氏原螯虾现状分析与研究思路[J]. 水产养殖, 2006, 27 (6): 9 - 11.
- [6] 慕峰,成永旭,吴旭干. 世界淡水螯虾的分布与产业发展[J]. 上海水产大学学报, 2007, 16 (1): 64 - 72.
- [7] Holdich D M, Lowery R S. Freshwater crayfish, biology, management and exploitation[M]. Oxford: Blackwell Science Ltd, 1988.
- [8] Hunter J V. Overview of international and domestic freshwater crawfish production[J]. Journal of Shellfish Research, 1989, 8: 259 - 265.
- [9] 吴桂亮. 克氏螯虾养殖中存在的问题及应对措施[J]. 江苏农业科学, 2008, 36 (6): 226 - 228.
- [10] 孙志周. 克氏螯虾资源的开发利用[J]. 北京水产, 2003 (5): 37 - 38.
- [11] 徐加涛, 阎斌伦, 徐国成. 克氏原螯虾产业发展背景、现状与展望[J]. 水产科技情报, 2011, 38 (4): 172 - 176, 180.
- [12] Thanumalaya S. Sexual biology and reproduction in Crustaceans[M]. New York: Academic Press, 2017.
- [13] Niksirat H, Kouba A, Psenicka M, et al. Ultrastructure of spermatozoa from three genera of crayfish *Orconectes*, *Procambarus* and *Astacus* (Decapoda: Astacoidea): New findings and comparisons[J]. Zoologischer Anzeiger, 2013, 252 (2): 226 - 233.
- [14] Niksirat H, Kouba A, Kozak P. Post - mating morphological changes in the spermatozoon and spermatophore wall of the crayfish *Astacus leptodactylus*: Insight into a non - motile spermatozoon[J]. Animal Reproduction Science, 2014, 149 (3/4): 325 - 34.

- [15] Niksirat H, Kouba A, Kozak P. Ultrastructure of egg activation and cortical reaction in the noble crayfish *Astacus astacus* [J]. *Micron*, 2015, 68: 115 – 121.
- [16] 刘其根, 李应森, 陈蓝荪. 克氏原螯虾的生物学 [J]. 水产科技情报, 2008, 35(1): 21 – 23.
- [17] 慕 峰, 吴旭干, 成永旭, 等. 克氏原螯虾胚胎发育的形态学变化 [J]. 水产学报, 2007, 31(B09): 6 – 11.
- [18] 张小谷, 王建民, 黄金球, 等. 克氏原螯虾工厂化繁育条件下胚胎发育时间序列 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(1): 192 – 195.
- [19] 戴 颖. 克氏原螯虾繁殖和胚胎发育的研究 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2008.
- [20] 吕建林, 龚世园, 李浪平. 克氏原螯虾胚胎发育的初步研究 [J]. 长江大学学报(自科版) 农学卷, 2006, 3(4): 179 – 182.
- [21] 吕建林. 克氏原螯虾繁殖生物学及胚胎和幼体发育研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [22] 李庭古. 盐度对克氏原螯虾孵化率的影响 [J]. 水产科学, 2009, 28(12): 789 – 791.
- [23] 孟凡丽, 赵云龙, 陈立侨, 等. 红螯螯虾胚胎发育研究 I. 胚胎外部结构的形态发生 [J]. 动物学研究, 2000, 21(6): 468 – 472.
- [24] 姚俊杰. 罗氏沼虾 (*Macrochium rosenbergii*) 胚胎营养与形态发生相关性的研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2006.
- [25] Wouters R, Lavens P, Nieto J, et al. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development [J]. *Aquaculture*, 2001, 202(1/2): 1 – 21.
- [26] 罗 文. 红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 胚胎营养代谢的研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2004.
- [27] 田华梅, 赵云龙, 李晶晶, 等. 中华绒螯蟹胚胎发育过程中主要生化成分的变化 [J]. 动物学杂志, 2002, 37(5): 18 – 21.
- [28] 董卫军. 克氏原螯虾繁殖生物学及胚胎发育过程中主要生化物质变化的研究 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2007.
- [29] 赵艳民. 日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 胚胎发育的研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2005.
- [30] Muzafer M H, Ardavan F, Seyfettin G. Determination of sperm quality in decapod crustaceans [J]. *Aquaculture*, 2018, 490: 185 – 193.
- [31] Oraporn M, Panadda M, Somkiat P. Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock [J]. *Aquaculture Research*, 2005, 36(12): 1216 – 1225.
- [32] Binh T N, Shunsuke K, Kazutaka S, et al. Effects of polychaete extracts on reproductive performance of kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* Bate. Part II. Ovarian maturation and tissue lipid compositions [J]. *Aquaculture*, 2012, 334/335/336/337: 65 – 72.
- [33] Xu X L, Ji W L, Castell J D, et al. Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock [J]. *Aquaculture*, 1994, 119(4): 359 – 370.
- [34] Mohd S K, Jones D A, Vay L L, et al. Ontogenetic change in digestive enzyme activity during larval development of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Aquaculture*, 1994, 123(3/4): 323 – 333.
- [35] Genodepa J G, Zeng C S, Southgate P C. Changes in digestive enzyme activities and nutrient utilization during embryonic development and starvation of newly hatched larvae of the mud crab, *Scylla serrata* [J]. *Aquaculture*, 2018, 493: 137 – 143.
- [36] 徐加元. 影响克氏原螯虾繁殖与生长的物理和营养因子的研究 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2008.
- [37] 王 庆, 杨家新, 匡腾蛟, 等. 冬季温度刺激对克氏原螯虾繁育的影响 [J]. 淡水渔业, 2012, 42(2): 93 – 96.
- [38] 韩晓磊, 李小蕊, 程天成, 等. 温度对克氏原螯虾交配、抱卵、孵化和幼体生长发育的影响 [J]. 湖北农业科学, 2011(10): 143 – 145.
- [39] Jin S Y, Jacquin L, Huang F, et al. Optimizing reproductive performance and embryonic development of red swamp crayfish *Procambarus clarkii* by manipulating water temperature [J]. *Aquaculture*, 2019, 510: 32 – 42.
- [40] Carmona – Osalde C, Rodriguez – Serna M, Olvera – Novoa M, et al. Gonadal development, spawning, growth and survival of the crayfish *Procambarus llamasii* at three different water temperatures [J]. *Aquaculture*, 2004, 232(1/2/3/4): 305 – 316.
- [41] Dube P, Portelance B. Temperature and photoperiod effects on ovarian maturation and egg laying of the crayfish, *Orconectes limosus* [J]. *Aquaculture*, 1992, 102(1/2): 161 – 168.
- [42] 薛俊增, 堵南山, 赖 伟. 甲壳动物胚胎学的研究 [J]. 水产科学, 1998, 17(2): 3 – 5.
- [43] 宋光同, 丁凤琴, 武 松, 等. 光照度、去单侧眼柄、盐度对克氏原螯虾繁殖效果的影响 [J]. 水产科学, 2013, 32(8): 482 – 484.
- [44] 强晓刚. 克氏原螯虾促性腺发育技术的初步研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2008.
- [45] 蒋国耘, 严维辉. 不同遮蔽物对克氏原螯虾受精卵孵化的影响 [J]. 内陆水产, 2007, 32(12): 9 – 10.
- [46] 张龙岗, 钟君伟, 刘羽清, 等. 光照和饵料对克氏原螯虾亲虾性腺发育的影响 [J]. 河北渔业, 2014(7): 6 – 7.
- [47] 罗 文, 赵云龙, 王 群, 等. 光照对红螯螯虾繁殖性能及其受精卵卵质的影响 [J]. 水产学报, 2004, 28(6): 675 – 681.
- [48] 吴志新, 陈孝煊, 刘小玲, 等. 不同光周期对红螯螯虾繁殖及生长的影响 [J]. 淡水渔业, 2000, 30(3): 4 – 5.
- [49] Aiken D E. Ovarian maturation and egg laying in the crayfish? *Orconectes virilis*: influence of temperature and photoperiod [J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1969, 47(5): 931 – 935.
- [50] Fanjul – Moles M L, Bosques – Tistler T, Prieto – Sagredo J. Effect of Variation in Photoperiod and Light Intensity on Oxygen Consumption, Lactate Concentration and Behavior in Crayfish *Procambarus clarkii* and *Procambarus digueti* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 1998, 119(1): 263 – 269.
- [51] Ardavan F, Muzafer M H. Photoperiod affects gamete production, and protein and lipid metabolism in male narrow – clawed Crayfish *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) [J]. *Animal Reproduction Science*, 2019, 211: 106204.
- [52] Harlioglu M M, Duran. The effect of darkness on mating and pleopodal egg production time in a freshwater crayfish, *Astacus*

付丽,刘加珍,陶宝先,等. 盐生植物对盐渍土壤环境的适应机制研究综述[J]. 江苏农业科学,2021,49(15):32-39.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.15.006

盐生植物对盐渍土壤环境的适应机制研究综述

付丽,刘加珍,陶宝先,陈永金,郭雯雯,贾一灿,尚婉滢

(聊城大学环境与规划学院,山东聊城 252059)

摘要:盐生植物是指在盐渍土壤环境中生长的一类天然的植物区系。在对近年来有关盐生植物的研究论文进行广泛分析的基础上,综述盐生植物的定义及其分类,重点从避盐、耐盐 2 个方面总结了盐生植物对盐胁迫的生理适应机制,其中避盐性主要从泌盐、稀盐和拒盐 3 个方面进行介绍,而耐盐性包括渗透调节、内源激素响应、离子的区域化与 pH 值调节、抗氧化防御调节等生理生化过程。盐生植物除了形成对盐胁迫的生理适应,其本身也会通过形态结构的变化达到生态适应。盐生植物通过对盐渍环境的生理和生态适应,实现对环境的改造,从而为人类对盐渍土地的开发与利用提供技术参考和保障。

关键词:盐生植物;盐渍环境;盐渍土;适应机制;避盐;耐盐

中图分类号: S184 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)15-0032-08

土壤盐碱化是一种环境风险,主要由自然或人类活动引起^[1-2]。土壤盐碱化包括盐渍化和碱化 2 个方面,其中土壤盐渍化是指可溶性盐在土壤中的积累,尤指在土壤表层的积累过程。土壤碱化是指土壤胶体被钠离子饱和的过程,通常被称为钠化过

程(sodicization)^[3]。盐渍化威胁着世界上约 $9.55 \times 10^8 \text{ hm}^2$ 的土壤,其中我国盐渍土壤总面积约为 $3.6 \times 10^7 \text{ hm}^2$,约占全国可用土地面积的 4.88%^[4-5]。盐生植物是在盐渍土上生长的一种天然植物,它们的存在会对盐渍土中盐分、养分的分布产生一定影响^[6-11]。同时,盐生植物在长期进化过程中,已经形成了一系列适应盐生环境的特殊生存策略^[12]。在许多盐渍土壤处理措施中,一般认为生物措施是最绿色经济和最有效的改良方法^[13-17],因此耐盐盐生植物通常被用作改良盐渍土壤的优先物种^[8-11]。由此可见,研究盐生植物适应盐碱土的机制对于盐碱地的改良利用、补偿耕地面积的减少、种植耐盐作物、促进农业发展具有重要意义^[18-19]。

收稿日期:2021-01-02

基金项目:国家自然科学基金(编号:40901276,40871239);国家科技支撑计划(编号:2014BAC15B02);聊城大学社科平台项目(编号:32102915,32102916)。

作者简介:付丽(1997—),女,山东泰安人,硕士研究生,主要从事湿地物质循环研究。E-mail:2629074972@qq.com。

通信作者:陈永金,博士,副教授,主要从事生态保护与生态文化研究。E-mail:chenyongjin@lcu.edu.cn。

leptodactylus Eschscholtz[J]. Aquaculture International,2010,18:843-849.

[53] Barki A, Karplus I. Crowding female red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, under small-tanks hatchery conditions: what is the limit? [J]. Aquaculture,2000,181(3):235-240.

[54] Vogt G. Exposure of the eggs to 17 α -methyl testosterone reduced hatching success and growth and elicited teratogenic effects in postembryonic life stages of crayfish[J]. Aquatic Toxicology,2007,85(4):291-296.

[55] Jiang H C, Xing Z J, Lu W, et al. Transcriptome analysis of red swamp crawfish *Procambarus clarkii* reveals genes involved in gonadal development[J]. PLoS One,2014,9(8):105-122.

[56] Kang P F, Mao B, Fan C, et al. Transcriptomic information from the ovaries of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) provides new insights into development of ovaries and embryos[J]. Aquaculture,

2019,505:333-343.

[57] Ngernsounnern A, Weerachatanukul W. The existence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immunoreactivity in the ovary and the effects of GnRHs on the ovarian maturation in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Aquaculture,2008,279(1/2/3/4):197-203.

[58] 曹林泉,秦政,姜玉声,等. 日本米虾胚胎发育及离体孵化[J]. 渔业科学进展,2020,41(1):145-152.

[59] 刘慧玲,李长玲,黄翔鸽,等. 波纹龙虾胚胎的离体培养及发育观察[J]. 广东海洋大学学报,2008,28(4):45-48.

[60] 王吉桥,张涛,佟鹰,等. 不同发育期中华绒螯蟹胚胎离体孵化和幼体培育的研究[J]. 大连水产学院学报,2005,20(3):192-197.

[61] 鲍鹰,刘军,林少军. 中华绒螯蟹受精卵离体培育的初步研究[J]. 海洋科学,1999(1):55-58.