



克氏原螯虾胚胎离体孵化与抱卵孵化的效果评估

覃丽蓉^{1,2}, 李为^{1,3,4*}, 荣宽^{1,2}, 张堂林^{1,3,4}, 刘家寿^{1,3,4}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072;

2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 湖北省稻田综合养殖工程技术研究中心, 湖北 武汉 430072;

4. 国家淡水渔业工程技术研究中心(武汉), 湖北 武汉 430072)

摘要: 为了评估克氏原螯虾胚胎离体孵化的可行性, 探究其人工集约化孵化技术, 比较研究了克氏原螯虾胚胎在离体孵化模式与抱卵孵化模式下的死亡率、孵化率、胚胎发育情况。结果显示, 胚胎在不同孵化时间段(实验 2~4、5~7、8~10 和 11~13 d)的死亡率差异显著, 出膜前期(实验 11~13 d)的胚胎死亡率显著高于实验 2~4 与 8~10 d 的胚胎死亡率, 但 2 种孵化处理方式下的总死亡率无显著差异。在同个监测时间点, 2 种孵化模式的胚胎发育阶段相近, 且均无胚胎畸形现象, 但离体孵化胚胎易被菌丝附着, 死亡的离体胚胎均被菌丝侵染。2 种孵化模式下开始出现初孵仔虾的时间一致, 全部胚胎均孵化结束后, 离体孵化模式的胚胎孵化率显著低于抱卵孵化模式, 但离体孵化模式也得到较高的孵化率(76.91%±4.62%)。研究表明, 克氏原螯虾胚胎离体孵化模式具有较好的可行性。胚胎离体孵化的主要问题是卵菌感染引起的胚胎死亡, 为降低离体胚胎的死亡率, 可进行梯度抗菌。本研究可为克氏原螯虾苗种集约化繁育提供理论依据与技术支撑。

关键词: 克氏原螯虾; 离体孵化; 抱卵孵化; 胚胎发育

中图分类号: Q 132.4; S 966.12

文献标志码: A

克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 属十足目 (Decapoda) 螯虾科 (Cambaridae)^[1], 俗称小龙虾。克氏原螯虾原产于美国中南部与墨西哥东北部, 自 20 世纪 30 年代从日本传入我国, 至 70 年代, 克氏原螯虾生活在我国的自然水域, 分布范围依靠自然生态, 缓慢扩展, 但始终没有超出江苏、安徽、山东三省^[2]。由于其生长迅速、营养价值与商业价值高, 从 20 世纪 80 年代至 21 世纪 20 年代, 克氏原螯虾人工养殖发展迅速, 养殖分布范围迅速扩大到全国 20 多个省、自治区、直辖市, 已成为我国水产业产量最高的甲壳类水产动物^[3]。

2021 年克氏原螯虾养殖总面积达到 1.7 万 km², 年产量为 263.4 万 t, 养殖业产值约为 823.4 亿元^[4]。然而, 克氏原螯虾种业的基础研究与技术研发严重滞后于产业发展, 苗种繁育技术水平低, 优良苗种供给能力严重不足, 一直是困扰克氏原螯虾产业可持续发展的瓶颈。

克氏原螯虾苗种集约化繁育是解决以上问题的有效手段, 而克氏原螯虾苗种集约化繁育技术涉及优质亲本选择、亲本安全运输、亲本培育、交配产卵、抱卵孵化、苗种培育等多个技术环节, 其中克氏原螯虾受精卵的孵化是苗种集约化繁育

收稿日期: 2022-05-18 修回日期: 2022-09-24

资助项目: 国家重点研发计划 (2020YFD0900303, 2019YFD0900304); 湖北省技术创新专项重大项目 (2018ABA102); 中国科学院青年创新促进会人才项目 (2019331)

第一作者: 覃丽蓉(照片), 从事虾类养殖生态与技术研究, E-mail: qinlirong@ihb.ac.cn

通信作者: 李为, 从事水产增养殖学研究, E-mail: liwei@ihb.ac.cn



的关键环节。克氏原螯虾的受精卵通常是在抱卵亲虾的腹肢上完成胚胎发育(抱卵孵化), 由于克氏原螯虾营底栖生活, 因此单位面积水体的亲虾容纳量与出苗量均不高, 难以实现苗种的集约化生产。先前有学者尝试对克氏原螯虾进行离体孵化, 但实验结果不理想, 离体受精卵的孵化率远低于抱卵孵化, 作者认为这可能与离体孵化过程中环境不理想有关^[5]。目前, 已有较多甲壳类水产动物离体孵化取得成功, Lee 等^[6]证实了中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)人工授精及离体孵化的可行性。鲍鹰等^[7]发现中华绒螯蟹离体胚胎在短期保存后仍可孵化, 且孵化率高于 80%。曹林泉等^[8]发现日本米虾(*Caridina japonica*)膜内蚤状幼体期离体胚胎的孵化率与抱卵孵化的胚胎孵化率差异不显著。因此假设克氏原螯虾胚胎离体孵化具有可行性。

为了验证以上假设, 在较为理想的实验条件下, 比较研究了克氏原螯虾胚胎在离体与抱卵孵化条件下的发育及死亡情况, 评估了 2 种孵化方式的孵化效果, 并探寻离体孵化率较低的原因及解决方法, 为克氏原螯虾苗种集约化繁育提供理论依据与技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用克氏原螯虾抱卵虾由中国科学院水生生物研究所大冶稻渔综合种养实验基地提供。抱卵虾运回实验室后, 在圆形塑料桶中暂养适应 1 周开始正式实验: 选择健康且大小相近的个体, 虾体腹部卵粒均为黑褐色, 处于原肠胚期。所选抱卵虾初始体长为 (92.24 ± 1.97) mm, 体重为 (37.07 ± 3.36) g。实验过程中操作人员严格遵守实验动物伦理规范。

1.2 实验方法

实验设计为离体孵化与抱卵孵化 2 种处理方式。每种处理方式均设有 8 个重复, 分别在 8 个离体孵化装置(图 1-a)与 8 个抱卵孵化装置(图 1-b)中进行。离体孵化装置为直径 8.5 cm、高度 20 cm 的圆筒形孵化器, 孵化器顶部接入水弯头、充气管与具筛网的出水口。抱卵孵化装置为直径 15 cm、高度 50 cm 的具孔圆筒形聚乙烯管, 聚乙烯管壁具有直径 2 mm 的孔洞, 孔洞之间间隔 5 cm, 聚乙烯管底部用 40 目聚乙烯网布封隔,

保证孵化出的幼苗不逃逸至装置外。为了保证孵化过程中水质条件的一致性, 16 个孵化装置均安置于同一个水族箱(L:W:H=102 cm:34 cm:50 cm)中(图 2), 水深控制在 40 cm; 离体孵化装置内的水通过装置自身形成的微水流与水族箱内的水保持持续交换, 水流流动方向如图 1-a 中实线箭头所示。

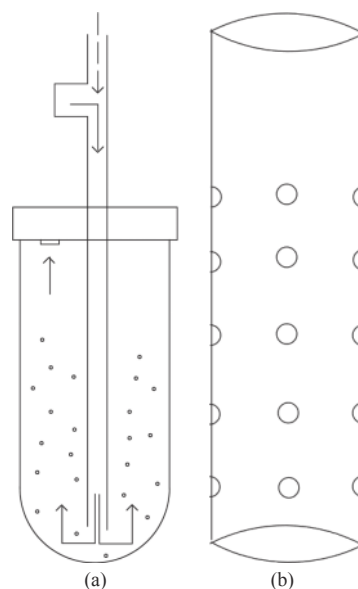


图 1 克氏原螯虾离体孵化装置(a)与抱卵孵化装置示意图(b)

Fig. 1 Schematic diagram of *in vitro* incubation device (a) and maternal incubation device (b) of *P. clarkii*

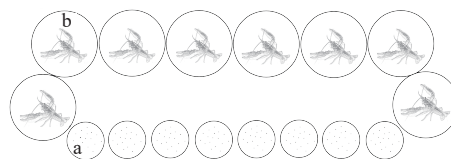


图 2 水族箱中离体孵化装置与抱卵孵化装置分布示意图

同一个水族箱内放入 8 个离体孵化装置(a)与 8 个抱卵孵化装置(b)。离体孵化装置(小圆圈)内放入受试抱卵虾的半数卵粒(圆点示卵粒), 抱卵孵化装置(大圆圈)内放入 1 尾抱卵虾。

Fig. 2 Schematic diagram of the distribution of *in vitro* incubation device and maternal incubation device in aquarium

Eight vitro incubation devices (a) and eight maternal incubation devices (b) were set in the same aquarium. Half of the tested ovigerous *P. clarkii*'s eggs (the dots show the eggs) were placed *in vitro* incubation device (the little circles), and one ovigerous *P. clarkii* was placed in the maternal incubation device (the large circles).

为了避免因个体差异影响实验结果, 同一尾抱卵虾的卵均分为二, 分别作为 2 个处理组的一个重复单元。同一尾受试抱卵虾一侧游泳足上保

留下来的卵粒数量通过另一侧剥离下来的卵粒数进行估算^[9]。具体操作: 选择健康且个体大小相近的抱卵虾 8 尾, 用消毒后的剪刀将每一尾抱卵虾的一侧游泳足取下, 用消毒后的镊子将离体游泳足上的全部卵粒轻轻地剥离至消毒后的大号玻璃皿中, 并清除剥离过程中受损的卵粒, 然后向玻璃皿中加入 2 mL/L 的甲醛(国药集团化学试剂有限公司), 浸泡 15 min 对卵粒进行消毒^[10]。消毒清洗后记录卵粒的数量, 然后将卵粒转移至离体孵化器中, 而还抱有一半卵粒的抱卵虾放入聚乙烯管中。

实验期间抱卵孵化处理组每天上午 11:00 投喂一次商业饲料(广东海大饲料有限公司), 每天总投喂量为体重的 5%。两处理组的其他实验条件保持一致, 每 3 天换 1/2 体积的养殖水, 实验用水为经充足曝气的自来水。使用普通白炽光作为光源, 光周期为 12L:12D (12L 为 6:00—18:00), 光照强度为 500 lx。实验期间, 每天上午 10:00 通过便携式多参数水质分析仪(YSI pro plus)测定水族箱内的水温(WT)、电导率(SPC)、溶解氧(DO)。实验初期及末期采用 APHA^[11] 的标准方法测定水族箱内的总氮(TN)、总磷(TP)、氨氮(NH₄⁺-N)、硝酸盐(NO₃⁻-N)、亚硝酸盐(NO₂⁻-N)、化学需氧量(COD_{Mn})指标。实验期间水质各参数: WT (25.49±0.07) °C、DO (6.37±0.17) mg/L、SPC (0.34±0.00) ms/cm、TN (1.38±0.07) mg/L、TP (0.07±0.00) mg/L、NH₄⁺-N (0.53±0.04) mg/L、NO₃⁻-N (1.69±0.03) mg/L、NO₂⁻-N (0.00±0.00) mg/L、COD_{Mn} (6.21±2.38) mg/L, 实验期间水质条件良好, 各参数均满足克氏原螯虾养殖的水质要求。

1.3 样本采集及胚胎发育情况评估

离体孵化模式 在实验第 4、7、10、13 天使用 2 mL/L 的甲醛浸泡 15 min 对离体卵粒进行消毒, 并记录胚胎死亡率。第 7 天观察胚胎发育情况。使用配备数码相机的显微镜(Leica, DFC295)对胚胎发育情况进行观察, 每次每个重复检查 5 只卵, 每个样品检查 3 次, 胚胎发育情况包括发育的分期及胚胎畸形率。胚胎发育分期参照 Dai 等^[12]与慕峰等^[13]的方法, 分为 I 受精卵、II 卵裂与囊胚期、III 原肠期、IV 无节幼体期、V 复眼色素形成期、VI 出膜前期, 共 6 期。

抱卵孵化模式 在实验第 4、7、10、13 天记录抱卵虾及胚胎的死亡率, 第 7 天观察胚胎发育情况。胚胎发育的情况使用配备数码相机的

显微镜(Leica, DFC295)进行观察, 每次每个重复检查 5 只卵, 每个样品检查 3 次, 胚胎发育情况包括发育的分期及胚胎畸形率。胚胎发育分期判别标准同上。

2 种孵化模式处理组出现初孵仔虾时, 记录最早胚胎发育时间及此时的实验单元占比。所有卵粒均孵化完成后, 记录 2 种处理组的孵化率。参数计算:

$$\text{抱卵虾死亡率 (\%)} = N_{f0}/N_{i0} \times 100\%$$

$$\text{胚胎死亡率 (\%)} = N_{fe}/N_{ie} \times 100\%$$

$$\text{胚胎畸形率 (\%)} = N_{em}/N_e \times 100\%$$

$$\text{出现初孵仔虾的实验单元占比 (\%)} = N_{lu}/N_u \times 100\%$$

$$\text{孵化率 (\%)} = N_{fl}/N_{ie} \times 100\%$$

式中, N_{f0} 为最终抱卵虾死亡数, N_{i0} 为初始抱卵虾数, N_{fe} 为胚胎死亡数, N_{ie} 为初始胚胎数, N_{em} 为畸形胚胎数, N_e 为抽样胚胎数, N_{lu} 为出现初孵仔虾的实验单元数, N_u 为实验单元总数, N_{fl} 为最终初孵仔虾数。

1.4 数据分析

各指标结果以平均值±标准误(mean±SE)表示。死亡率数据采用 Scheirer-Ray-Hare 检验(采用 Nemenyi 多重比较)进行分析, 胚胎发育进程采用相似性分析(Anosim), 孵化率数据采用独立样本 t 检验进行处理, $P < 0.05$ 视为差异显著。数据统计及图形绘制均采用 R 3.6.0 软件进行。

2 结果

2.1 胚胎死亡率

实验期间抱卵虾无死亡情况。双因素非参数分析显示离体孵化处理组与抱卵孵化处理组的胚胎死亡率无显著差异($H=3.736, P=0.053$), 但监测时间对胚胎死亡率有显著影响($H=14.273, P=0.003$), 二者间无明显交互作用($H=6.866, P=0.076$) (图 3)。4 个监测时间的胚胎死亡率与胚胎累积死亡率的多重比较结果均显示, 两种孵化模式在实验 4 d 的胚胎死亡情况与实验 7 和 10 d 时无显著差异($P > 0.05$)。但出膜前期, 两种孵化模式胚胎死亡情况明显增多, 11~13 d 的胚胎死亡率显著高于实验 2~4 及 8~10 d 的胚胎死亡率($P < 0.05$)。离体孵化胚胎在实验 7、10 和 13 d 均被发现有较高的死亡率, 其中实验 5~7 d 的胚胎死亡率达 13.46%, 而抱卵孵化的胚胎在 11~13 d 的死亡率最高, 达

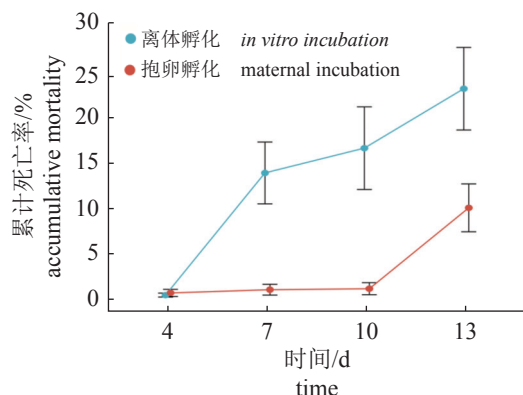


图3 克氏原螯虾胚胎在离体孵化与抱卵孵化模式下的死亡率比较

Fig. 3 Comparison of mortality of embryos of *P. clarkii* under *in vitro* incubation and maternal incubation conditions

到 8.90% (图 3)。

2.2 胚胎发育形态

采用原肠期的胚胎开始实验, 原肠期胚胎 (图版-1) 具有半圆形内胚层沟, 陷入的内胚层细胞不断吸收卵黄形成透明区域 (胚胎动物极)。然后透明区域扩大, 出现明显的附肢原基, 这是无节幼体期胚胎 (图版-2)。观察到离体孵化处理组中部分无节幼体期胚胎表面出现白色菌丝, 菌丝柔软且结构疏松, 此时的胚胎还保持正常的形态 (图版-3)。菌丝成功附着卵膜表面, 可向内外方向生长, 卵粒因缺氧等原因受损后, 内菌丝侵染卵粒, 胚胎的正常发育被破坏, 形态明显发生变化 (图版-4)。随胚胎发育的进行, 胚胎出现明显的头胸部与暗红色色素斑点, 复眼开始发育, 出现“眉形”黑色色素的沉积, 发育为复眼色素形成期胚胎 (图版-5)。部分离体孵化的复眼色素形成期胚胎的卵膜表面附着明显可见的菌丝, 菌丝生长量大, 将活卵完全包围 (图版-6)。死亡的复眼色素形成期离体胚胎的卵膜破裂, 卵内营养物质释放, 胚胎的伤口及胚胎内部充满菌丝 (图版-7)。幼体从破裂的膜中出来, 已经可以看到克氏原螯虾的基本形状 (图版-8)。但刚出膜的幼体无法自由活动, 也不具备坚硬的甲壳, 出膜前后的胚胎容易被菌丝侵染。幼体内部组织发炎、坏死, 体表内外均着生大量菌丝 (图版-9)。显微观察死亡卵粒的横切面, 可发现卵粒的内容物被侵入卵内的菌丝缠绕、吸收 (图版-10), 卵膜外着生大量菌丝, 菌丝游离端具有棍棒状的孢子囊 (图版-11), 孢子

从孢子囊中释放到水体中 (图版-12), 尤其是菌丝附近存在大量孢子。

2.3 胚胎发育进程

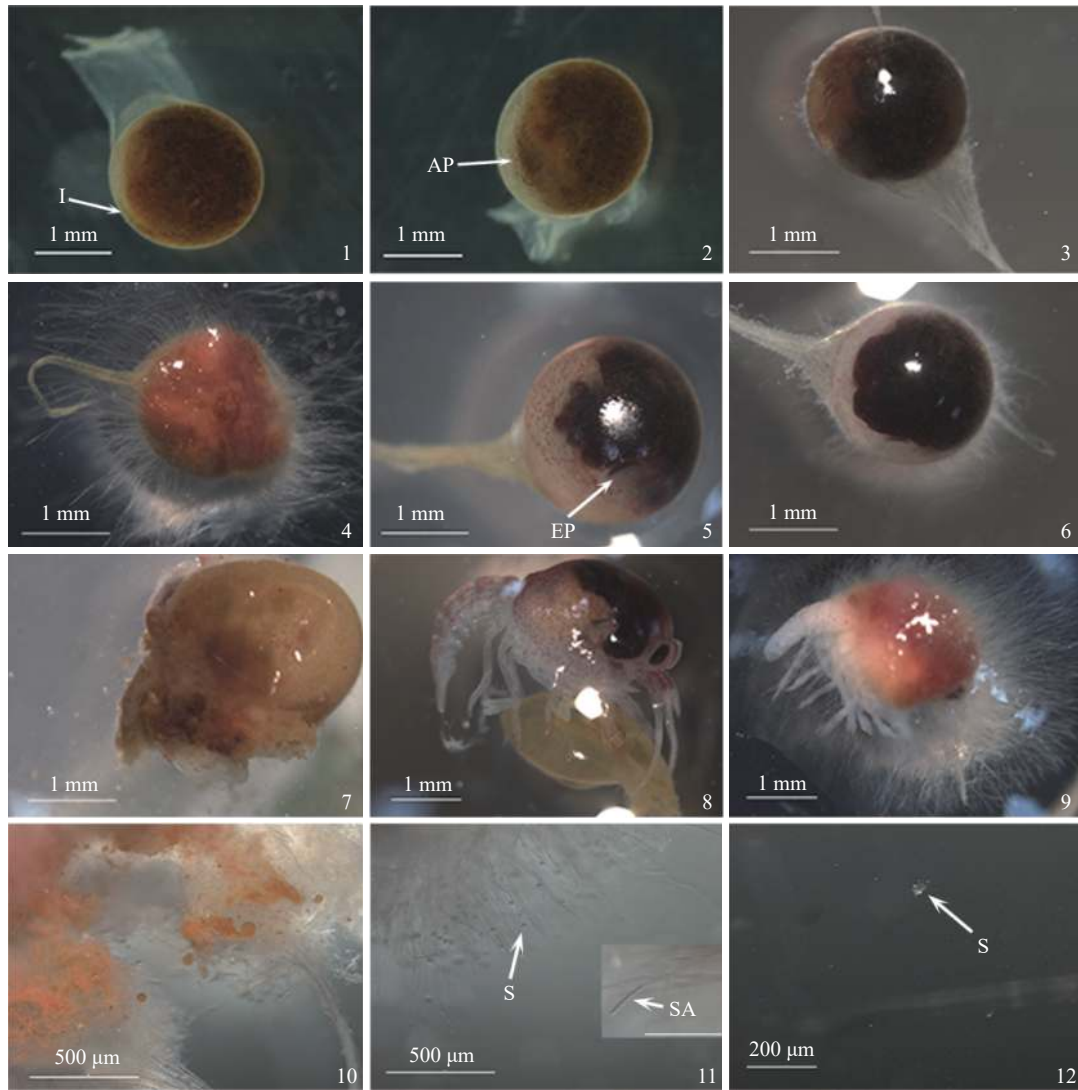
两种孵化模式均没有出现胚胎畸形的现象。采用非度量多维尺度 (NMDS) 分析不同孵化模式下克氏原螯虾在同一个监测时间点的胚胎发育情况, 发现实验期间离体孵化处理组与抱卵孵化处理组的胚胎发育阶段相近 (图 4)。组间差异分析也显示, 两种孵化模式的胚胎发育情况基本一致, 发育进度无显著差异 (Anosim 相似性分析: $P=0.871$)。

2.4 胚胎孵化率

在实验第 11 天时离体孵化处理组与抱卵孵化处理组中均发现了初孵仔虾, 其中离体孵化处理组出现初孵仔虾的实验单元占比为 62.5%, 抱卵孵化处理组出现初孵仔虾的实验单元占比为 75%。离体孵化处理组出现初孵仔虾的实验单元中, 胚胎的平均孵化率为 $67.45\% \pm 7.85\%$, 由于抱卵孵化处理组的卵粒密集附着于游泳足上, 为避免机械操作损伤导致的卵死亡率, 实验 11 d 时未记录抱卵虾的孵化率。实验 13 d 后, 两个处理组的胚胎全部孵化, 离体孵化模式的孵化率为 $76.91\% \pm 4.62\%$, 抱卵孵化模式的孵化率为 $90.02\% \pm 2.64\%$, 离体孵化模式的胚胎孵化率显著低于抱卵孵化模式 ($t=-2.464, P=0.047$) (图 5)。

3 讨论

克氏原螯虾具有抱卵孵化的习性, 其卵粒附着在腹肢刚毛上进行胚胎发育。胚胎进行离体孵化便失去了母体的育雏护理, 会严重影响胚胎的成活与孵化。顾功超等^[14]研究中华绒螯蟹离体孵化时, 发现离体受精卵孵化率低至 0.24%。朱玉芳等^[5]在培养皿中对克氏原螯虾受精卵进行离体孵化研究, 实验过程中通过定期摇动以补充水体溶解氧, 但受精卵的离体孵化的孵化率仍显著低于抱卵孵化。Shui 等^[15]根据克氏原螯虾胚胎发育阶段进行分组, 选取同一发育时期的胚胎分别进行离体孵化与抱卵孵化的比较, 但自原肠胚期开始孵化的胚胎孵化率低于 40%。本研究得到了相似的结果, 离体孵化模式的胚胎孵化率显著低于抱卵孵化模式的胚胎孵化率。这与抱卵孵化模式中母体-子代联系产生的优势有关, 母体-子代的联系主要表现在母体的行为 (保护、清洁和供氧)。



图版 克氏原螯虾胚胎在不同发育时期的正常情况与感染卵菌情况下的形态比较

1.胚胎处于原肠胚期；2-4.胚胎处于无节幼体期：2.正常状态的胚胎；3.初步感染卵菌的胚胎；4.感染卵菌后死亡的胚胎；5-7.胚胎处于复眼色素形成期，5.正常状态的胚胎，6.初步感染卵菌的胚胎，7.感染卵菌后死亡的胚胎；8-9.刚出膜的初孵仔虾，8.正常状态的初孵仔虾，9.感染卵菌的初孵仔虾；10.被菌丝感染的卵粒内部；11.菌丝，菌丝游离端有孢子囊，菌丝周围水体中存在孢子；12.孢子。I.动物极，AP.附肢原基，EP.复眼色素沉积，S.孢子，SA.孢子囊。

Plate Morphological comparison of embryos of *P. clarkii* under normal and oomycete infection at different developmental stages

1. embryo in the gastrula stage; 2-4. embryos in the nauplius stage, 2. embryo in normal state, 3. embryo initially infected with oomycete, 4. embryo died after infection with oomycete; 5-7. embryos in the eye pigment forming stage, 5. embryo in normal state, 6. embryo initially infected with oomycete, 7. embryo died after infection with oomycete; 8-9. first instar larvae, 8. first instar larvae in normal state, 9. first instar larvae infected with oomycete; 10. the interior of egg infested by mycelium; 11. shows mycelium with sporangium at the dissociate end of the mycelium and spores in the water around mycelium; 12. a spore. I. animal pole, AP. appendage primordium, EP. eye pigmentation, S. spore, SA. sporangium.

母体较宽的腹部是一种天然庇护所，当面临外界刺激时，母体腹部卷曲，保护卵粒免受机械损伤^[16]。同时，母体经常活动步足清理损伤及死亡的卵粒，摆动游泳足为卵粒提供波动的水流、充足的氧气。母体-子代的联系也可能表现在物质交流方面。孵化期间，抱卵虾的过氧化氢酶、血蓝

蛋白等血浆蛋白组谱与剥离卵粒的雌虾的血浆蛋白组谱存在显著差异，但尚不清楚差异表达的蛋白质如何有助于育幼，是否帮助早期胚胎抗感染^[15]。与以往的研究相比^[5, 15]，本研究获得了较好的离体胚胎孵化率，达到 76.91%。消毒剂、胚胎离体操作、孵化环境对离体胚胎的成功孵化有重要影

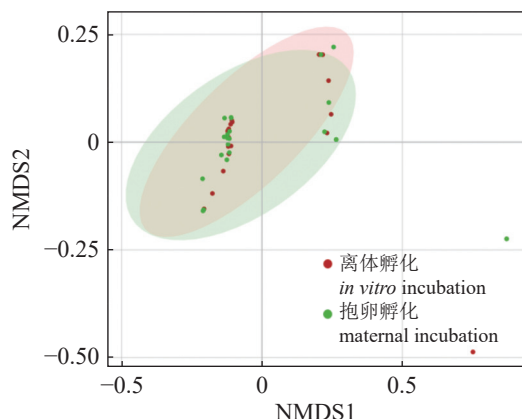


图4 离体孵化与抱卵孵化模式下克氏原螯虾胚胎发育阶段的非度量多维尺度分析

Fig. 4 Non-metric multidimensional scaling analysis (NMDS) of embryo developmental stages under *in vitro* incubation and maternal incubation conditions

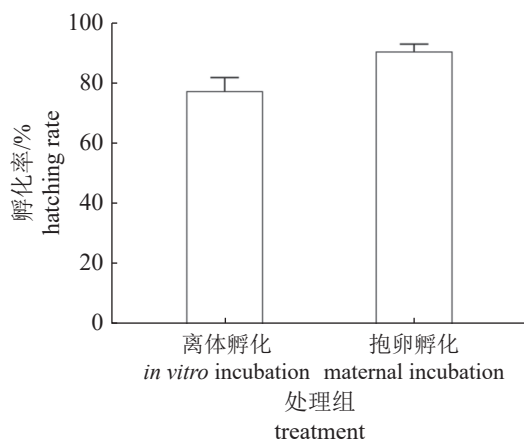


图5 克氏原螯虾胚胎在离体孵化与抱卵孵化模式下的孵化率比较

Fig. 5 Comparison of hatching rate of embryos of *P. clarkii* under *in vitro* incubation and maternal incubation conditions

响^[10, 17]。本研究在实验初期, 使用消毒后的镊子将卵粒从母体一侧游泳足上轻轻地剥离, 这降低了胚胎脱离母体时导致的机械损伤, 保证了胚胎的正常发育。此外, 本实验中采用 2 mL/L 的甲醛溶液定期对离体的胚胎进行杀菌消毒, 有效抑制了胚胎离体初期的卵菌感染。

实验 5~7 d 时, 离体孵化的胚胎开始出现卵菌感染现象。经定期的甲醛处理, 实验 7 d 后离体孵化处理组的卵损失得到有效缓解。然而在大量幼虾出膜的 11~13 d, 胚胎死亡率急剧上升, 此期的抱卵孵化处理组的胚胎死亡率甚至高于离体孵化处理组。这一现象表明卵粒在胚胎发育的最

后阶段处于高死亡率的关键时期, Melendre 等^[10]在宽大太平洋螯虾 (*Pacifastacus leniusculus*) 中也发现了同样的现象。实验 11~13 d 的死亡个体包括出膜前期、复眼色素期的胚胎及初孵仔虾。死亡个体大多与菌丝相连, 其中死亡的离体胚胎均被菌丝侵染。实验认为胚胎发育最后阶段的高死亡率可能与胚胎出膜困难有关, 胚胎长时间挣扎才出膜甚至仍未出膜时胚胎易死亡^[18]。离体孵化末期的高死亡率也可能与抗菌性的减弱有关。实验初期甲醛溶液的抗菌性强, 但卵菌的适应性随培育时间而增强, 实验采用的甲醛浓度无法抑制后期感染。而且消毒后的卵粒具有的微生物异质性降低, 卵粒易受潜在致病微生物的机会性侵染, 因此孵化末期的卵粒抵抗异质能力较弱^[19]。

卵菌感染是伴随胚胎离体孵化的主要问题。克氏原螯虾病害中最常见的是细菌性疾病^[20], 而卵菌感染仅次于细菌感染。引起小龙虾感染的卵菌主要是水霉目 (*Saprolegniales*)^[21], 这种寄生类卵菌可以穿透宿主组织^[22], 并产生可移动的繁殖孢子^[23]。孢子可在水体及空气中传播^[24], 动孢子多次尝试寻找合适的宿主, 靠近卵粒后可黏附在卵膜表面, 萌发出菌丝体, 菌丝缠绕卵粒, 这种菌丝的长期覆盖会导致卵粒缺氧死亡。受感染的卵粒还会成为卵粒集群的核心区域, 这与 Kouba 等^[25]在北欧的一种淡水螯虾 (*Astacus astacus*) 的人工孵化中出现的现象一致。过度生长的菌丝如同母体游泳足上的羽状刚毛, 能够黏附卵粒, 继而促进了卵菌的感染过程。聚集的感染卵粒使水体中的孢子浓度升高, 一个感染者每周可以释放 2 700 个孢子^[26], 游动孢子对营养物质有趋向性^[27], 一旦卵膜被破坏, 菌丝及孢子可利用卵内营养进行繁殖。而且克氏原螯虾胚胎发育的适宜水温为 25 °C^[17], 与水霉目卵菌的无性繁殖适宜水温相似^[28], 在水温 24 °C 时, 受精卵水霉病暴发的潜伏期仅为 2.4 d^[29]。防治卵菌而采用的抗菌药物均具有毒害作用, 有可能妨碍细胞的正常分裂、分化, 导致胚胎畸形、死亡^[30]。本研究中克氏原螯虾离体孵化的胚胎在同一时期的发育阶段与抱卵孵化的胚胎相似, 而且实验期间未出现胚胎畸形现象, 因此本实验采用的甲醛溶液没有影响离体卵的胚胎发育。胚胎能够阻止甲醛溶液渗透的可能原因是原肠期后的卵粒已基本完成分化且卵膜透性弱, 甲醛成功渗入并对其损伤的可能性小^[15, 30]。离体孵化处理组的最早胚胎发育时间与抱卵孵化

处理组一致, 当时抱卵孵化处理组出现初孵仔虾的实验单元占比高于离体孵化处理组。胚胎全部孵化后, 发现抱卵孵化的孵化率显著高于离体孵化的孵化率, 这些结果与已有报道相似^[5, 15]。孵化率较低的关键问题在于实验后期的胚胎死亡, 可以考虑在实验后期加大抗菌药物(如甲醛)剂量, 尤其是出膜前期的胚胎需采用较高浓度的抗菌剂。

克氏原螯虾主要营底栖生活, 水体中上层利用空间有限, 在有限的养殖空间内个体间存在较大的生境与食物竞争^[31-32]。因此在水泥池等集约化繁殖条件下克氏原螯虾亲虾的放养密度不高, 单位水体出苗量有限。如果亲虾放养密度过大, 则会导致其在繁育期间死亡率明显升高。抱卵亲虾死亡后会中断胚胎的氧气与水流供给, 同时会引起水体环境恶化, 氨氮含量快速升高, 从而导致胚胎停止发育直至死亡^[14]。为解决克氏原螯虾苗种的集约化繁育问题, 实验在不断优化抱卵孵化技术的同时, 也在不断探索离体孵化模式的可行性。克氏原螯虾具有较强的伤口愈合与修复能力^[33], 剪去游泳足不会导致其死亡。而且, 在螯虾胚胎发育期已发现甲壳素、抗脂多糖因子等免疫因子的表达, 抗菌肽可能被胚胎分泌并与卵壳组成重要防御分子^[34], 胚胎具备进行离体孵化的前提条件。本研究结果证实离体孵化方法对克氏原螯虾胚胎的发育进程及胚胎正常形态没有影响, 且能取得较高的孵化率, 推测克氏原螯虾胚胎离体孵化具有较好的可行性。但为了提高离体胚胎的成活率与孵化率, 后续研究需要进一步优化孵化条件, 特别是探索合适的甲醛浓度对离体胚胎进行梯度消毒。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 薛俊增, 堵南山. 甲壳动物学 [M]. 上海: 上海教育出版社, 2009: 8-10.
Xue J Z, Du N S. Crustacea [M]. Shanghai: Shanghai Education Press, 2009: 8-10 (in Chinese).
- [2] 舒新亚. 克氏原螯虾产业发展及存在的问题[J]. 中国水产, 2010(8): 22-25.
Shu X Y. Problems and industrial development of *Procambarus clarkii* [J]. *China Fisheries*, 2010(8): 22-25 (in Chinese).
- [3] Luo S, Li X Q, Onchari M M, et al. High feeding level alters physiological status but does not improve feed conversion efficiency and growth performance of juvenile red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) [J]. *Aquaculture*, 2021, 537: 736507.
- [4] 于秀娟, 郝向举, 党子乔, 等. 中国小龙虾产业发展报告(2022) [J]. 中国水产, 2022(6): 47-54.
Yu X J, Hao X J, Dang Z Q, et al. Chinese crayfish industry development report (2022) [J]. *China Fisheries*, 2022(6): 47-54 (in Chinese).
- [5] 朱玉芳, 崔勇华, 戈志强, 等. 克氏原螯虾抱卵与非抱卵孵化比较研究[J]. 水利渔业, 2002, 22(4): 16-17.
Zhu Y F, Cui Y H, Ge Z Q, et al. Comparative studies on two hatching methods for *Cambarus clarkii* [J]. *Reservoir Fisheries*, 2002, 22(4): 16-17 (in Chinese).
- [6] Lee T H, Yamazaki F. Cytological observations on fertilization in the Chinese fresh-water crab, *Eriocheir sinensis*, by artificial insemination (*in vitro*) and incubation [J]. *Aquaculture*, 1989, 76(3-4): 347-360.
- [7] 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.
Bao Y, Liu J, Lin S J. Study on the breeding of *in vitro* embryo of mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Marine Sciences*, 1999(1): 55-58 (in Chinese).
- [8] 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.
Cao L Q, Qin Z, Jiang Y S, et al. Embryonic development of *Caridina japonica* and *in vitro* incubation of its fertilized eggs [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 145-152 (in Chinese).
- [9] Leonard B V, Lennard W A, Kildea D G. A method for testing the effectiveness of artificial incubation of eggs vs. maternal brooding in the freshwater crayfish *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae) [J]. *Aquaculture*, 2001, 195(3-4): 299-309.
- [10] Melendre P M, Celada J D, Carral J M, et al. Effectiveness of antifungal treatments during artificial incubation of the signal crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana. Astacidae) [J]. *Aquaculture*, 2006, 257(1-4): 257-265.
- [11] APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater [M]. 17th ed. Washington: American Public Health Association, 1989.
- [12] Dai Y, Wang T T, Wang Y F, et al. Activities of digestive enzymes during embryonic development in the crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda) [J]. *Aquaculture Research*, 2009, 40(12): 1394-1399.
- [13] 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(S1): 6-11.
Mu F, Wu X G, Cheng Y X, et al. External morphological character during the embryonic development of *Procambarus clarkii* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(S1): 6-11 (in Chinese).

- [14] 顾功超, 黄旭雄, 谭正启. 中华绒螯蟹离体卵的人工孵化及其利用[J]. 渔业机械仪器, 1995(5): 11-14.
Gu G C, Huang X X, Tan Z Q. Artificial hatching of isolated eggs of *Eriocheir sinensis* and its application[J]. Fishery Modernization, 1995(5): 11-14 (in Chinese).
- [15] Shui Y, Kui Y, Zhu G Y, *et al.* Egg incubation and plasma proteome alterations in response to brood care in maternal crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 542: 736888.
- [16] 赵云龙, 孟凡丽, 陈立桥, 等. 红螯螯虾繁殖习性的研究[J]. 动物学杂志, 2000, 35(5): 5-9.
Zhao Y L, Meng F L, Chen L Q, *et al.* Observations on the reproductive behaviour of *Cherax quadricarinatus*[J]. Chinese Journal of Zoology, 2000, 35(5): 5-9 (in Chinese).
- [17] 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.
- [18] 张繁荣, 张凤银. 高锰酸钾、福尔马林防治大银鱼卵水霉病试验[J]. 水产科学, 1999, 16(6): 14-16.
Zhang F R, Zhang F Y. Study on preventing saprolegniasis of salangidae eggs by KMnO₄ and formalin[J]. Fisheries Science, 1999, 16(6): 14-16 (in Chinese).
- [19] Olafsen J A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture[J]. *Aquaculture*, 2001, 200(1-2): 223-247.
- [20] 蒋国民, 李金龙, 刘丽, 等. 克氏原螯虾细菌性病原分离鉴定及血清免疫因子变化[J]. 水产学报, 2023, 47(4): 049414.
Jiang G M, Li J L, Liu L, *et al.* Isolation and identification of bacterial pathogens from *Procambarus clarkii* and study on variations in serum immune factors[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2023, 47(4): 049414 (in Chinese).
- [21] Vey A. Studies on the pathology of crayfish under rearing conditions[J]. *Freshwater Crayfish*, 1977, 3: 311-319.
- [22] Söderhäll K, Svensson E, Unestam T. Chitinase and protease activities in germinating zoospore cysts of a parasitic fungus, *Aphanomyces astaci*, Oomycetes[J]. *Mycopathologia*, 1978, 64(1): 9-11.
- [23] Cerenius L, Söderhäll K. Repeated zoospore emergence from isolated spore cysts of *Aphanomyces astaci*[J]. *Experimental Mycology*, 1984, 8(4): 370-377.
- [24] Sakaguchi S O, Ogawa G, Kasai H, *et al.* Molecular identification of water molds (oomycetes) associated with chum salmon eggs from hatcheries in Japan and possible sources of their infection[J]. *Aquaculture International*, 2019, 27(6): 1739-1749.
- [25] Kouba A, Niksirat H, Kuklina I, *et al.* Ultraviolet light and semi-recirculating systems in artificial incubation of noble crayfish (*Astacus astacus*) eggs: opportunities and limitations[J]. *Aquaculture Research*, 2012, 44(1): 67-74.
- [26] Strand D A, Jussila J, Viljamaa-Dirks S, *et al.* Monitoring the spore dynamics of *Aphanomyces astaci* in the ambient water of latent carrier crayfish[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 160(1-2): 99-107.
- [27] Smith S, Armstrong R A, Springate J, *et al.* Infection and colonization of trout eggs by Saprolegniaceae[J]. *Transactions of the British Mycological Society*, 1985, 85(4): 719-723.
- [28] 陈本亮, 张其中. 水霉及水霉病防治的研究进展[J]. 水产科学, 2011, 30(7): 429-434.
Chen B L, Zhang Q Z. Progress on research of *Saprolegnia* and saprolegniasis treatment in fish[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(7): 429-434 (in Chinese).
- [29] 欧仁建. 黄颡鱼卵致病性绵霉的分离鉴定与感染机制的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
Ou R J. Identification and pathogenesis mechanism of a pathogenic *Achlya klebsiana* strain from the eggs of *Pelteobagrus fulvidraco*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013 (in Chinese).
- [30] 廖永岩, 赵丽梅. 五种抗真菌药物对远海梭子蟹离体卵孵化的影响[J]. 海洋通报, 2001, 20(3): 40-44.
Liao Y Y, Zhao L M. Effects of five kinds of anti-fungus on the embryonic development and hatching *in vitro* of the crab *Portunus pelagicus*[J]. *Marine Science Bulletin*, 2001, 20(3): 40-44 (in Chinese).
- [31] Mazlum Y, Eversole A G. Growth and survival of *Procambarus acutus acutus* (Girard, 1852) and *P. clarkii* (Girard, 1852) in competitive settings[J]. *Aquaculture Research*, 2005, 36(6): 537-545.
- [32] 田捷, 陈友朋, 祝安琪, 等. 空间大小及饲养模式对克氏原螯虾幼虾生长的影响[J]. 水产科学, 2018, 37(6): 825-829.
Tian J, Chen Y P, Zhu A Q, *et al.* Effects of space and rearing mode on growth performance of juvenile red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. *Fisheries Science*, 2018, 37(6): 825-829 (in Chinese).
- [33] Vafopoulou X. Mechanisms of wound repair in crayfish[J]. *ISJ-Invertebrate Survival Journal*, 2009, 6(2): 125-137.
- [34] Zhang Y J, Söderhäll I, Söderhäll K, *et al.* Expression of immune-related genes in one phase of embryonic development of freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(4): 649-653.

Effects evaluation of *in vitro* incubation and maternal incubation of *Procambarus clarkii* embryos

QIN Lirong^{1,2}, LI Wei^{1,3,4*}, RONG Kuan^{1,2}, ZHANG Tanglin^{1,3,4}, LIU Jiashou^{1,3,4}

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Hubei Provincial Research Center for Integrated Rice Field Aquaculture Engineering, Wuhan 430072, China;

4. National Freshwater Fisheries Engineering Technology Research Center (Wuhan), Wuhan 430072, China)

Abstract: The aquaculture of *Procambarus clarkii* has developed rapidly nationwide in recent years. According to statistics, the production of *P. clarkii* in 2021 reached 2 633 600 tons, become the most highly-produced freshwater crustaceans in China. However, limited knowledge about intensive breeding of *P. clarkii* seedlings has hindered its sustainable development. Artificial incubation may be an effective way to realize intensive breeding of *P. clarkii* seedlings. The mortality, hatching rate and embryo development of *P. clarkii* embryos were compared between *in vitro* incubation mode and maternal incubation mode to evaluate the feasibility of *in vitro* incubation of *P. clarkii* embryos and explore its artificial intensive incubation techniques. The results showed that the mortality of embryos at different incubation periods (2-4 days, 5-7 days, 8-10 days, 11-13 days of the experiment) were significantly different. Embryos mortality in the prepared hatching stage (11-13 days of the experiment) was significantly higher than that in 2-4 days and 8-10 days, but there were no significant differences in total embryos mortality between the two incubation treatments. At the same measurement time, the developmental stages of embryos of two incubation treatments were similar and there were no embryo morphological abnormalities. However, embryos hatched under *in vitro* incubation were susceptible to mycelial attachment, and the dead embryos of *in vitro* incubation were all infected by the mycelium. Two incubation treatments appeared the first instar larvae at the same time. The hatching rate of embryos of *in vitro* incubation was significantly lower than that of maternal incubation. But a higher hatching rate (76.91%±4.62%) of embryos under *in vitro* incubation was obtained. The study indicated that the feasibility of *P. clarkii* embryos under *in vitro* incubation was good. The main problem of embryos under *in vitro* incubation was the embryonic death due to the oomycete infection. In order to reduce the mortality of embryos under *in vitro* incubation, gradient anti-oomycete could be carried out.

Key words: *Procambarus clarkii*; *in vitro* incubation; maternal incubation; embryonic development

Corresponding author: LI Wei. E-mail: liwei@ihb.ac.cn

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2020YFD0900303, 2019YFD0900304); Technical Innovation Special Major Project of Hubei Province (2018ABA102); Talent Project of Youth Innovation Promotion Association of Chinese Academy of Sciences (2019331)