

东方扁虾胚胎发育温比率的初步研究

王桂忠 朱冬发 李少菁

(厦门大学海洋学系, 国家教委海洋生态环境开放研究实验室, 厦门 361095)

摘 要 从抱卵雌虾腹部剥离的东方扁虾 (*Thenus orientalis* Lund, 1793) 胚胎在四组恒温水浴 ($22\text{C} \pm 0.2\text{C}$, $25\text{C} \pm 0.2\text{C}$, $28\text{C} \pm 0.2\text{C}$, $31\text{C} \pm 0.2\text{C}$) 下进行的离体培养孵化实验取得成功。通过监测以胚胎眼指数来指示胚胎发育进程, 建立了四组温度下眼指数对时间的直线回归图。在此基础上, 确立了单位时间内眼指数增长值与培养温度之间的线性关系, 用于预报不同温度下胚胎的孵化日期。此外, 还结合亲虾抱卵孵化实验和自然水温下离体孵化实验的结果探讨了东方扁虾胚胎孵育机制及复眼形成期发育所需要的有效积温。

关键词 东方扁虾 胚胎 温比率 离体培养

东方扁虾 (*Thenus orientalis* Lund, 1793) 隶属于甲壳纲十足目爬行亚目龙虾总科蝉虾科扁虾属, 分布于印度、西太平洋海域。在我国东方扁虾分布于浙江舟山以南, 东海、南海^[1,2]。东方扁虾味道鲜美, 其肌肉和成熟的卵巢富有营养, 是蝉虾科中最具经济价值的物种, 但东方扁虾在各分布海域产量均不大。为发展龙虾类人工增殖事业, 我们开展了东方扁虾胚胎孵育和幼体培养的研究, 在研究中我们特别关注了胚胎发育的温度效应及预报幼体孵化日期的方法, 以便为叶状幼体的培养做好充分的准备, 这种准备是育苗工作的重要环节。通过比较我们认为: Perkins (1972) 应用眼指数 (eye index, EI) 测量法监测美洲巨螯虾 (*Homarus americanus*) 胚胎发育速率, 研究水温对胚胎发育影响的方法最为有效和可靠^[8]。该方法已经在涉及美洲巨螯虾的胚胎和幼体发育的研究中得到广泛应用^[11~14], Charmantier 等将其应用于欧洲巨螯虾 (*H. gammarus*) 的研究, 建立了胚胎发育温比率关系式来预报孵化日期^[9]。本文在离体卵胚胎孵化成功的基础上, 应用 Perkins 的眼指数法研究了东方扁虾胚胎发育的温度效应, 建立了不同培养温度下预报孵化日期的方法并就其孵育机制、复眼形成期胚胎发育的生物学零度、有效积温等进行探讨。

1 材料与方 法

1.1 材料及暂养

抱卵亲虾购自福建省东山县铜陵镇渔排和厦门霞溪市场。在室温充气条件下将头胸甲宽 $10.1 \sim 11.9\text{cm}$, 体重 $238.5 \sim 379.5\text{g}$ 亲虾运至实验室, 暂养在底层铺 $3 \sim 4\text{cm}$ 细沙的 1m^2 水泥池中, 池中装有新鲜沙滤海水 ($S: 30 \sim 34$), 水位高 60cm 。暂养期间连续充气并投喂适量

收稿日期: 1997-12-01

活的菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinesis*), 每天虹吸池中粪便及碎屑。

1.2 离体孵育

用剪刀将卵从第一号和第二号亲虾腹肢内肢上剥离下来, 经灭菌海水 ($S: 30\sim 34$) 洗三次后分装于 500mL 培养瓶中, 瓶中装 200mL 灭菌海水 ($S: 30\sim 34$), 每瓶培养卵数为 200 个, 培养瓶盖紧后 (盖上设有气体交换管道) 放于自然水温和恒温水浴箱中 ($22^{\circ}\text{C}\pm 0.2^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C}\pm 0.2^{\circ}\text{C}$, $28^{\circ}\text{C}\pm 0.2^{\circ}\text{C}$, $31^{\circ}\text{C}\pm 0.2^{\circ}\text{C}$, $34^{\circ}\text{C}\pm 0.3^{\circ}\text{C}$, $37^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$), 每一温度组设置 2 个重复分样 (镜检样和对照样), 水浴高度与瓶内孵育水位大致齐平, 大约每 3 天换一次水, 新鲜灭菌海水须先预热至相应温度后再操作。

1.3 抱卵孵育

温度控制在 $31^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 其他条件与营养条件相同; 另外第 4 号和第 5 号亲虾于自然水温下进行抱卵孵育实验。

1.4 EI 测定

每次换水时从镜检样瓶中取 5~10 个卵 (对抱卵虾每次定期剪取 10~20 个卵) 置于载玻片上, 在 Olympus BH-2 显微镜下仔细检查, 并在 $100\times$ 下测量胚胎复眼部分 (以色素为界线, 不包括弱色素的晕部) 的最长径 (L) 与最大短径 (W), 依据 Perkins (1972) 方法^[8] 计算 EI 即 $EI = (L+W) / 2$ 。

2 结 果

2.1 离体孵育

从抱卵亲虾上剥离卵进行离体孵育的实验始于 1996 年 3 月, 经多次实验不断改进, 我们于 1996 年 10 月采用灭菌海水, 适量充气密闭孵育的方法成功地孵化出东方扁虾叶状幼体。经与亲虾抱卵孵化的幼体进行比较发现, 抱卵孵育并非东方扁虾胚胎孵育的必要条件, 离体孵育是完全可行的。本实验就是在离体孵育条件下进行的。

2.2 胚胎培养的适宜温度

34°C 组实验中离体卵 2~3d 后即表现为温度不适, 心跳乏力。约一周后呈解体状 (卵胚褐浊)。 37°C 组实验中离体胚胎 1~2d 后即全呈解体状。其他温度组均孵化出叶状幼体。说明 $22\sim 31^{\circ}\text{C}$ 对东方扁虾胚胎发育是适宜的。在平均温度变幅为 $12\sim 25^{\circ}\text{C}$ 的自然水温 (1997-03-13~1997-05-01), 东方扁虾离体胚胎也是可以耐受的。

2.3 胚胎发育的温比率及理论生物学零度

胚胎发育温比率的实验中测得的最低 EI 值是 $43\mu\text{m}$, 将孵化的胚胎 EI 值为 $182\sim 211\mu\text{m}$ ($X\pm SD = (197\pm 9)\mu\text{m}$), 以后的数据处理和预报分析中我们均定 $200\mu\text{m}$ 为东方扁虾胚胎的孵化 EI 值。对每一组实验, 我们将实验开始时 (即温度逐步上升至所设定的温度值时) 的第一次测得的 EI 值 ($EI\geq 43\mu\text{m}$) 时的时间定为 0 (单位: 日, d), 以后每次换水时测得的 EI 值对应的时间在此基准时间 (d) 上依次累加, 直至孵化日止。对这些 EI 值和其对应的时间 (d) 进行相关分析, 发现各恒温组下 EI 与对应的发育累加时间之间均呈强的线性相关 ($r\geq 0.98$) 其回归线斜率 b ($\mu\text{m}\cdot\text{d}^{-1}$) 分别为 $b_{22}=4.6$; $b_{25}=6.7$; $b_{28}=8.3$; $b_{31}=9.5$ 。依据这四组温度下的回归线斜率在时间为自变量, EI 为因变量的二维关系平面上分别作出由原点 (即

时间为 0d, $EI=0\mu\text{m}$ 时) 发出的四条直线回归线, 使其 EI 均终止于 $200\mu\text{m}$ (图 1)。此即四组恒温下东方扁虾胚胎发育复眼形成期 EI 相对于时间的回归线图, 每温度组 $EI=200\mu\text{m}$ 下相对应的时间即为该温度下东方扁虾胚胎复眼形成期发育所需的天数, 从图 1 可以看出: 22°C 下需 43d, 25°C 下约需 30d, 28°C 下约需 24d, 31°C 下约需 21d。

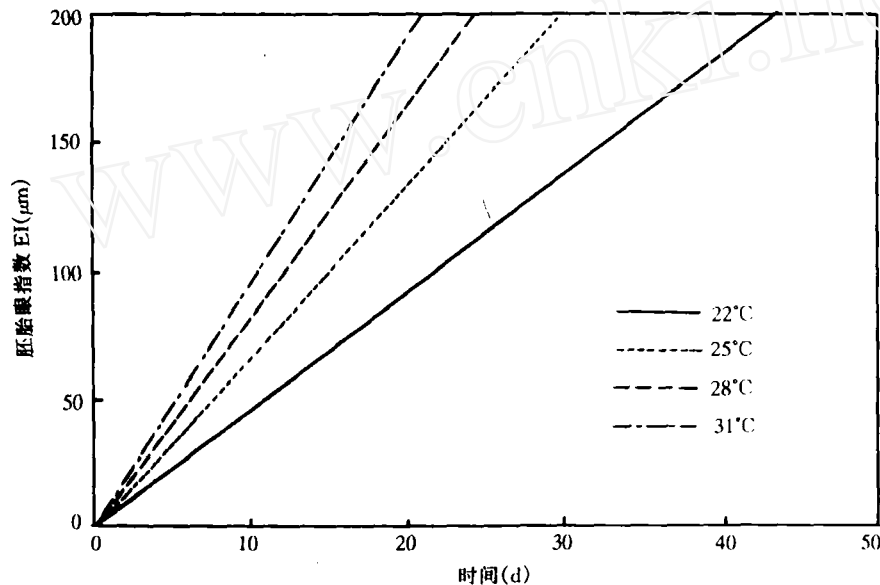


图 1 不同温度下东方扁虾胚胎 EI 值与发育时间的线性相关图

回归线斜率 ($\mu\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$) 的生物学意义是单位时间内增长的 EI 值, 从图 1 可以看出该斜率 b 随孵育温度的升高而增大, 进一步的统计分析表明二者之间的关系也呈强的线性相关 ($r=0.992$)。式 (1) 描述了单位时间内 EI 增长值 (Y) 与温度 (X) 之间的关系:

$$Y=0.54X-7.12 \quad (13.2^\circ\text{C} \leq X \leq 31^\circ\text{C}) \quad (1)$$

其中 X 轴上的截距 $X=13.5^\circ\text{C}$ (此温度下 $Y=0\mu\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$) 为用该方法推导出的东方扁虾胚胎发育的理论生物学零度。本文讨论部分将依据该值计算自然水温下孵育的有效温度及有效积温。

2.4 孵化日期的预报

与 Perkins (1972)^[8]和 Charmantier 等 (1992)^[9]的研究相同, 式 (1) 同样可应用于预测东方扁虾胚胎孵化的日期, 式 (2):

$$N=(200-EI)/(0.54X-7.12) \quad (2)$$

式中 EI ——任一时间抽样检测的胚眼指数; X ——恒定的孵育温度; N ——该温度下从该任意时间点算起至孵化所需的时间。

3 讨 论

a) 我们能在离体条件下孵育出与抱卵孵化完全一致的东方扁虾叶状幼体, 这充分表明抱

卵孵育并非必要条件。在孵育过程中,胚胎并未通过携卵刚毛从母体获取任何营养物质,这与人们在锯缘青蟹、中华绒螯蟹等胚胎孵育研究中的结论是一致的^[2~4,10]。但同时我们又认为东方扁虾不同于青蟹,其携卵刚毛并非只有机械的孵育作用^[2](如增氧,除污),很可能还将母体产生的某种抗生素类微量物质输送到所抱卵块周围。因为一旦亲虾死亡,卵块很快就被细菌、原生动动物等侵蚀致死。当然这一推测有待于进一步证实。

b) 比较实验表明,31℃下抱卵孵育与离体孵育回归线斜率之间无显著差异($b_{抱卵}=9.5$, $b_{离体}=9.4$),说明离体孵育不仅能孵化出正常的叶状幼体,而且其孵育过程的温度效应与抱卵孵育是一致的。离体孵育的研究结论完全适用于抱卵孵育条件下的预测。

c) 上述研究及预测均是在恒温孵育条件进行,那么对变温孵育又如何预报呢?很早就有人提出胚胎发育所必需的总能量基本是一个常数(热常数),即发育期的平均水温(有效温度)与发育所经过的天数或时数的积是一个常数,此即有效积温法则:

$$K=N(T-C) \quad (3)$$

式中 K ——热常数; T ——发育期平均温度; C ——生物学零度; N ——历经时间^[5]。由这一理论我们演推东方扁虾胚胎复眼形成期发育所需的总能量也应基本上为一个常数。我们设定四组恒温下测得的有效积温的平均数(351.2 d·℃)为其热常数,并由此出发来讨论热常数的预报准确性(表1)。

表1 热常数的预报

		初测 EI (μm)	理论积温 (d·℃)	孵化时间 (d)	孵育期平均 温度(℃)	实际积温 (d·℃)	预报误差 d(%)
离体	1号虾	43	275.7	49	18.8	273.6	+0.4 (+0.82)
	2号虾	97.5	180.0	29	20.2	202.4	-3.2 (-11.04)
抱卵	4号虾	56.9	251.3	20	24.4	223	+2.5 (+12.5)
	5号虾	73.1	222.8	18	24.4	198.4	+2.2 (12.22)

由表1可见,热常数(有效积温)的预报准确性不是很好,主要原因可能是尽管温度是影响发育进程的最主要因子,但并非唯一因子,而且变温积温效应和恒温积温效应可能也有所区别。当然,用热常数进行孵化日期的大致预报还是可行的。

d) 1985年韦受庆在中国龙虾的研究中提出在胚胎复眼形成期后有一个“临孵化期”,约占胚胎发育期的五分之一^[6],我们认为这一期确实是存在的,但对于东方扁虾胚胎发育,相对于复眼形成期,孵化期要短得多,所以我们并未单列出来计算其经历时数,但我们关注到孵化期具有一些明显特征,尤其是卵色由于卵黄耗尽而渐变灰紫,晶莹闪亮,另外卵径由于吸水而快速增大,卵胚外膜变脆易裂。发现这些特征的胚胎一般第二天凌晨至上午间就会开始孵化,这一经验使我们的预测得到了证实。

e) 同其他研究者一样,我们也一直关注胚胎孵育过程中胚径、心跳、附肢色斑及卵色的变化与孵化的关系,但不同的是我们认为东方扁虾心跳频率可能确实随发育发展而加快,但其心跳并不连续,常伴随停顿无法通过单位时间的计算心跳数来预报,而胚径的变化也并非线性渐变,所以我们认为在复眼形成期 EI 是最好的监测胚胎发育进程的指标,尤其对于象东方扁虾这样复眼形成期相对较长的经济甲壳动物。其他特征也可以作为附属的参考指标。

参考文献

- 1 浙江动物志编辑委员会. 浙江动物志 (甲壳类). 杭州: 浙江科技出版社, 1991
- 2 韦受庆, 罗远裕. 青蟹胚胎生长的研究. 热带海洋, 1986, 5 (3): 57~62
- 3 曾朝曙, 王桂忠, 李少菁. 锯缘青蟹胚胎发育的观察及温度影响胚胎发育的研究. 福建水产, 1991, 1: 45~50
- 4 陆仁后, 张菁. 中华绒螯蟹人工授精的突破. 水生生物学报, 1990, 14 (3): 274~275
- 5 沈国英, 施并章. 海洋生态学 (修订版). 厦门: 厦门大学出版社, 1995. 28~29
- 6 韦受庆. 中国龙虾 *Panulirus stimpsoni* (Holthuis) 的个体发生. 热带海洋, 1985, 4 (2): 80~88
- 7 Jones C M. Population structure of *Thenus orientalis* and *T. indicus* in northern Australia. Mar. Ecol. Prog. Ser. , 1993, 97 (2): 143~155
- 8 Perkins H C. Developmental rates at various temperatures of embryos of the northern lobster (*Homarus americanus*, Milne-Edwards). Fish. Bull., 1972, 70: 95~99
- 9 Charmantier G and Monnet-Gaillaume R. Temperature-specific rates of embryonic development of the European lobster *Homarus gammarus* (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 1992, 1600: 61~66
- 10 Costlow J D and Boolhout C G. A method for developing brachyura egg in vitro. Limnol. Oceanogr., 1960, 5: 212~215
- 11 Waddy S L and Aiken D E. Broodstock management for year-round production of larvae for culture of the American lobster. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci., 1984, 1272: 1~18
- 12 Schuur A et al. Hatchery methods for the production of juvenile lobsters (*Homarus americanus*). Inst. Mar. Res. Calif., 1996, 48: 1~20
- 13 Helluy S and Beltz B. Embryonic development of the American lobster (*Homarus americanus*) quantitative staging and characterization of an embryonic molt cycle. Biol. Bull., 1991, 180: 355~371
- 14 Cole L L and Lang F. Spontaneous and evoked postsynaptic potentials in an embryonic neuromuscular system of the lobster, *Homarus americanus*. J. Neurobiol., 1980, 11: 459~470

作者简介: 王桂忠, 男, 1951年12月生。主要从事甲壳动物繁殖生物学和海洋浮游生物学及其生化生态研究, 正式发表学术论文30多篇。

**Preliminary Study on the Temperature—specific
Rates of Embryonic Development of the
Flathead Lobster *Thenus orientalis* (Lund.)**

Wang Guizhong , Zhu Dongfa and Li Shaojing

Dept. of Oceanog. , Res. Lab. of SEEC of Mar. Ecol. Environ. , Xiamen Univ. , Xiamen 361005

Abstract The embryos stripped from the pleopods of the berried *Thenus orientalis* (Lund.) are incubated in vitro at four constant temperatures ($22^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$, $28^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ and $31^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$) and the rates of development of the embryos of each group are monitored by measuring embryonic eye index (EI) according to Perkins. We have established the regression lines of EI related to time at four temperatures, and find that the relationship between the increase of EI per unit time and the incubating temperatures is also linear ($Y = 0.54X - 7.12$, $r = 0.992$). The equation can be used to calculate the embryonic developing time from EI=0 to hatching and predict the hatching date of larvae at different temperatures. We have also discussed the developing mechanism and thermal constant of the embryos of *T. orientalis*.

Keywords *Thenus orientalis*; embryo ; temperature ; in-vitro incubation