

武汉地区克氏原螯虾繁殖期的研究

戴颖 巩雪洁 李兵 王玉凤* 黄卫国

(华中师范大学生命科学学院 武汉 430079; 湖北省洪湖市发展计划局 洪湖 433200)

摘要: 为探究武汉地区克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 繁殖期的问题,采用石蜡切片的方法,对武汉地区自然群体中克氏原螯虾雌雄成体的生殖腺进行了周年观察研究。结果表明,武汉地区成年克氏原螯虾的卵母细胞发育不同步,在4~5月以及9~10月的卵巢中都有大量成熟期的卵子,同时也含有少量卵黄发生前期或初期的卵母细胞。6~7月和11月都可见产后恢复期的卵巢,内含少量未产出的正在退化的过熟卵和一些卵黄发生前期或初期的卵母细胞。精巢发育的年周期变化没有卵巢变化的那么明显,但也可以看到,在4~6月和9~10月,含精子细胞和精子的精小管的比例大大增加,而在其他时期,含精原细胞和精母细胞的精小管比例较多。这些结果提示,武汉地区克氏原螯虾一年有两个繁殖高峰期,一个在4~5月,另一个在9~10月。

关键词: 克氏原螯虾; 卵子发生; 精子发生; 繁殖高峰期

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2008)02-21-07

Reproductive Period of *Procambarus clarkii* in Wuhan Area

DAI Ying GONG Xue-Jie LI Bing WANG Yu-Feng* HUANG Wei-Guo

(College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079;

Department of Developmental Program of Honghu City, Hubei Province, Honghu 433200, China)

Abstract: The reproductive period of *Procambarus clarkii* in Wuhan area was investigated to provide basic data for developing artificial reproduction technique. The asynchronism of oogenesis was observed in the sections of ovaries. The mature eggs appeared in the sections of the ovaries sampled in two periods. One period was from April to May, and the other one was from September to October. The large eggs contained abundant yolk granules. From June to July and in November, more previtellogenic and initial vitellogenic oocytes were observed in the ovaries, although there were a few eggs in degeneration, indicating that these periods might oogenesis recovery periods after spawning. In crayfish testis, the proportion of the testicular tubules containing spermatids and sperm increased dramatically in two periods, April to June and September to October, although spermatocytes were also observed during these two periods. Furthermore, the vas deferens containing spermatozoa were frequently observed in these two periods. The ratio of the testicular tubules containing the spermatogonia and spermatocytes was higher in other periods. These results suggest that *P. clarkii* have two periods of reproductive peak in Wuhan area, from April to May and from September to October.

Key words: *Procambarus clarkii*; Oogenesis; Spermatogenesis; Period of reproductive peak

克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*), 属节肢动物门甲壳纲十足目, 又名克氏螯虾、红色沼泽螯虾, 俗称淡水龙虾, 但它实际上属于螯蛄科螯虾亚科原螯虾属^[1], 与海水龙虾不同。近年, 由于人们对克氏原螯虾的开发利用缺乏长远的认

基金项目 湖北省重点攻关计划项目 (No. 2005AA205B01);

*通讯作者, E-mail: yfengw@mail.ccnu.edu.cn;

第一作者介绍 戴颖, 女, 硕士研究生; 研究方向: 水生经济动物增殖学; E-mail: sophia.dy@163.com.

收稿日期: 2007-08-20, 修回日期: 2008-01-05

识,克氏原螯虾被狂捕滥捞,导致其自然资源量锐减。目前克氏原螯虾基本上处于自然繁殖、人工捕捞的状况,其人工养殖目前还没有成熟的经验、模式与技术。

国内外对克氏原螯虾的生物学^[2,3]、生殖生理学^[4]、精子形成和精子形态^[5,6]、幼体发育阶段的形态描述^[7]以及受精卵发育的温度因子^[8]等方面已有研究报道。关于克氏原螯虾的产卵时间的说法各有不同,有资料显示,5~6月为亲虾交配、产卵高峰期^[9],另有文章表明,6~7月为亲虾交配、产卵高峰^[10],还有的作者认为,7~8月是克氏原螯虾繁殖高峰期^[11]。本研究组在研究了水温对克氏原螯虾幼虾发育和存活的影响^[12]的基础上,为了探讨武汉地区克氏原螯虾的繁殖季节和年繁殖周期,又对克氏原螯虾精巢和卵巢发育的形态与组织学特征进行了详细的周年观察,以期为克氏原螯虾的人工繁殖技术及合理开发利用提供基础资料。

1 材料与方法

本文所用克氏原螯虾购于武汉市白沙洲农副产品市场,一部分用于解剖取样,另一部分饲

养在实验室中,冬季市场无法购得的时候,样品就取自实验室中自然水温饲养的群体。于2005年4月至2006年12月,4~10月每月采样2~3次,其他月份每月采样一次。每次随机取12 cm以上健壮的雌、雄个体各5只左右,将头胸甲从背面剪开,迅速取出卵巢或精巢,切成约0.5 cm³大小,然后用Bouin氏液固定,经脱水、透明、石蜡包埋、切片(厚度为6~8 μm),用苏木精-伊红染色,中性树胶封片。组织切片在Leica DM 4000B显微镜下观察、照相。

2 结果

2.1 卵巢发育分期 克氏原螯虾卵巢发育过程中,外形、大小与颜色等可直接观察到,其内部的变化主要表现为卵母细胞的大小和卵黄积累程度的不同。卵巢发育分期则以在卵巢切面中面积居最高比例的卵母细胞的时相来确定。根据卵子大小以及苏木精-伊红染色程度,参考李信等^[13]的描述,本次实验中克氏原螯虾的卵巢发育期可分为:卵黄发生前期、卵黄发生初期、卵黄发生中期、成熟期、产后恢复期5个阶段(表1)。

表1 克氏原螯虾的卵巢发育分期

Table 1 Developing stages of ovary in *Procambarus clarkii*

卵巢发育时期 Developing stages of ovary	特征 Features
卵黄发生前期 Previtellogenic stage	卵巢内多为半透明的细小卵粒,卵细胞质未被伊红染成红色,而被苏木精染成蓝色。卵径 < 200 μm
卵黄发生初期 Initial vitellogenic stage	卵巢呈淡黄色,卵细胞质开始出现被伊红染成红色的物质,呈蓝紫色。卵母细胞边缘开始出现滤泡细胞。卵径 200~400 μm
卵黄发生中期 Midvitellogenic stage	卵巢黄褐色,卵细胞质含被伊红染成明显红色的细小物质,卵母细胞边缘滤泡细胞发达。卵径 400~1 200 μm
成熟期 Mature stage	卵巢深褐色,切片中可见,卵细胞质含粗大的红色卵黄颗粒,卵母细胞边缘滤泡细胞退化,滤泡细胞层与卵母细胞分离,卵母细胞即将排出。卵径 > 1 200 μm
产后恢复期 Resuming stage postoviposition	产卵后卵巢内残存有淡红至黄褐色的卵粒,结缔组织增生,有半透明的细小颗粒和淡黄色的卵黄发生初期或刚刚进入中期的卵母细胞

2.2 卵巢发育的周年变化 1~2月,克氏原螯虾卵巢向两侧扩大,颜色由浅黄色向黄褐色过渡。卵巢中的大部分卵母细胞刚刚进入卵黄发生中期,该时期卵母细胞呈近圆形,多数卵细胞长径约为500 μm。在细胞质中出现被伊红

染成红色的细小卵黄物质。卵母细胞核近中央,呈圆形(图版 :1)。卵母细胞外围绕着一圈小的滤泡细胞,滤泡细胞的细胞核被苏木精染成深蓝色。切片显示左右两叶卵巢同步发育。另外,卵巢中可见少数较小的卵母细胞,细

胞质被苏木精和伊红染成蓝紫色,处于卵黄发生初期(图版 :1)。

3~4月中上旬,卵巢发育很快,处于卵黄发生中期,体积增大,向后延伸,颜色逐渐变为褐色。卵母细胞体积显著增大,多数卵细胞直径为700 μm以上。由于卵黄物质的不断积累,胞质被伊红染成红色。核也随之增大,核仁明显。在卵母细胞周围围绕一圈小的滤泡细胞,有些个体的卵母细胞内卵黄颗粒开始集结。

4月下旬至5月,卵巢极度膨大,覆盖了胰腺,前叶向两侧延伸,充满了整个头胸部,前叶和后叶比例失调,呈蘑菇型,颜色为深褐色,处于成熟期。一些个体的卵巢被刺破时,卵子会自动散开,说明卵子已经脱离滤泡细胞,游离于卵巢,达到产卵的程度。此时卵巢中的卵母细胞大多呈椭圆形,细胞体积很大,卵径一般在1200 μm以上,胞质中充满粗大的卵黄颗粒,呈深红色。细胞核也增大(图版 :2)。此时的卵巢切片中也可以见到少数卵黄发生初期的小的卵母细胞。另外,该时期一些个体已经产卵,卵巢里只有产卵后剩下的正在退化的过熟卵子和小的卵黄发生前期的卵母细胞。

6月,产卵后的卵巢,体积缩小,包膜趋松,在卵巢切片中可观察到少量未产出的卵子,这些卵子正在退化。结缔组织增生,切片中还可观察到体积很小的卵黄发生前的卵母细胞和一些卵黄发生初期的卵母细胞(图版 :3)。在卵巢边缘和中央都可见到处于分裂期的卵原细胞(图版 :3),表明卵原细胞在增殖过程中。

7月,卵巢处于产后恢复期。切片有时仍然可以看到少数正在退化的卵子(图版 :4),多为卵黄发生初期和卵黄发生中期的卵母细胞,这些细胞可继续发育,将再次成熟产卵。从这里可以明显看出,克氏原螯虾卵母细胞的发育是不同步的(图版 :4)。

8月,卵巢切片中,卵黄发生中期的卵母细胞占多数,另外还有一些小的卵黄发生前期的卵母细胞。至9月,卵母细胞进一步成熟,切片中可见,大多数卵母细胞体积很大,胞质中充满了粗大的卵黄颗粒,与5月的卵巢切片类似

(图版 :5)。10月的卵巢切片中,可观察到巨大的卵子,胞质中含丰富的粗大卵黄颗粒,卵子和滤泡细胞层明显分离,达到排卵的发育程度(图版 :6)。同时切片中可见到一些卵黄发生前期的小的卵母细胞(图版 :6)和少数卵黄发生初期的卵母细胞,说明又一轮卵子发生开始启动。另外,该时期一些个体已经产卵,卵巢里只有卵子排出后剩下的小的卵黄发生前的卵母细胞。

11月,产卵后的卵巢,体积缩小,结缔组织增生,卵巢中多为卵黄发生初期的卵母细胞,还有少数卵黄发生前的卵母细胞,与6月份的卵巢切片类似(图版 :7)。12月,这些卵母细胞逐渐进入卵黄发生中期(图版 :8),这些细胞将在冬季缓慢发育,至次年春季,发育速度加快,4~5月产卵。

2.3 精巢发育的周年变化 克氏原螯虾精巢由许多生精小管构成,位于不同位置的生精小管中的生精细胞发育时期不一致,同一生精小管中的生精细胞发育时期大致相同。克氏原螯虾精巢或精子发育的周年变化没有卵子发育的周年变化那么明显。

1~3月,克氏原螯虾精巢中已有不同发育阶段的生精细胞,虽然精子发生早期的细胞(精原细胞和精母细胞)比例相对较大。精巢背面两侧(离输精管较远处)许多生精小管里的生精细胞处于发育早期,多为精原细胞(spermatogonium, SG)阶段,细胞核相对较大,苏木精染色深(图版 :1)。从精巢背部到接近输精管处,精子逐渐成熟。部分精小管内分布着初级精母细胞(primary spermatocyte, PS),初级精母细胞相对较大,核浓缩,染色深(图版 :2)。有时还可以看到初级精母细胞正在进行减数分裂,形成次级精母细胞(secondary spermatocyte, SS)。次级精母细胞比初级精母细胞小,再经过一次减数分裂,形成更小的精子细胞(spermatid, ST)。在这些发育过程中精细胞体积逐渐缩小。但此时输精管中很少见到成熟的精子。

4~6月,该时期克氏原螯虾精巢中,含精子发生后期精细胞(精子细胞期和精子期)的生

精小管比例大大增加,在这些精小管中,嗜碱性增强,伊红染色相对较深,周边有较大的支持细胞(sustentacular cell)(图版 :3)。精小管中的精子细胞核体积减小,有的处于精子形成期(从精母细胞发育至精子的时期)(spermiogenesis),有的已经形成了精子(sperm,S)。有的精小管中的精子已经进入输精管,因此该时期的输精管中一般都充满了精子(图版 :3)。在高倍镜下可以看到,精子的核染色质解聚为弥散状态,核质由絮状染色质构成。由核延伸出数个核臂(nucleus arm,NA)环绕在核周围。切面上最多见到5个核臂,有时见到4个或更少。在顶面观的图片上,可以看到精子中央有一顶体结构(图版 :4)。此外,这个时期有的切片中还可以看到精子排出后较空的精小管。

7~8月,排精后,又开始了新一轮精子发生过程。这个时期,含精子发生早期(特别是精母细胞期)细胞的精小管的比例又大大增加,但也可见到其他精小管中处于精子形成期不同变态发育阶段的精细胞(图版 :5)。

9~10月,此时期精巢的切片与4~6月时的切片类似,含精子发生后期精细胞的生精小管的比例大大增加(图版 :6),在输精管中一般都充满了精子。而且此期有的切片中也可以看到精子排出后较空的精小管。

11~12月,此时期精巢的切片与1~3月的比较类似,多数生精小管中的细胞处于精子发生早期的精原细胞和精母细胞期,但也可以看到一些精小管中的细胞处于精子形成期。

3 讨论

关于克氏原螯虾的年繁殖次数有许多文献介绍,但其中的说法很不一致。有人认为克氏原螯虾一年只有一个繁殖期,即每年的5~6月为亲虾交配、产卵高峰期^[9],有的文章则表明,6~7月为亲虾交配、产卵高峰^[10]。我们对武汉地区克氏原螯虾生殖细胞发育的周年变化进行了切片观察,发现无论是卵巢还是精巢,都有生殖细胞发育不同步的现象。在同一时期同一个卵巢中,可以发现处于不同发育时期的卵母细

胞。比如,在7月份的同一个卵巢中,可以同时观察到卵黄发生前期和卵黄发生中期的卵母细胞。根据这个现象,可以明确判断,克氏原螯虾不是同步产卵的。此外,在4~5月和9~10月,都可以看到成熟的卵子,说明武汉地区性成熟的克氏原螯虾有两个繁殖高峰期,一个在4~5月,另一个在9~10月,这与在两个时期中观察到大量雌雄虾交配和雌虾抱卵的现象一致。在克氏原螯虾卵子发生早期,细胞质也会被苏木精染成蓝色,可能由于部分核物质进入细胞质,并且细胞质中还含有大量由DNA转录成的核糖核酸(RNA)的缘故。殷海成等^[14]对克氏原螯虾生殖系统组织化学研究表明,在卵原细胞和初级卵母细胞的细胞质中RNA反应都呈强阳性,说明RNA含量丰富。而在罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)中则明显观察到,在卵黄发生前期卵母细胞的细胞质中含部分DNA和大量RNA^[15]。随着卵发生的进行,细胞质中卵黄蛋白等蛋白质逐渐积累,卵细胞质中的蓝色逐渐被伊红染成的红色所代替。

同一时期同一精巢中,也可以观察到处于不同发育时期的雄性生殖细胞,因此克氏原螯虾的精子发生也是不同步的。在不同季节,含不同发育时期雄性生殖细胞的精小管的比例不同。在繁殖季节,含精子细胞和精子的精小管所占比例明显增多,精巢中一直存在着成熟精子,这为雄虾在繁殖季节多次交配提供了物质基础。

克氏原螯虾卵巢发育具有周期性,且一年可以排两次卵,这与处于同一地域的日本沼虾(*M. nipponense*)类似,自然条件下,日本沼虾主要繁殖期为春夏季和秋季^[16]。克氏原螯虾与红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)不同,一般水温18℃以上为红螯螯虾生长繁殖温度,因此自然条件下我国中东部地区5~10月为其繁育时期^[17]。Oluoch曾报道,在美国南部的路易斯安那州,克氏原螯虾主要在8~11月产卵,繁殖高峰在10月,而在位于热带地区的肯尼亚的Naivasha湖则可常年产卵^[3]。可见克氏原螯虾的繁殖与温度的关系非常密切。在本实验室的

实验中也观察到,只要保证合适的水温和充足的营养,即使在冬天(1月份)也有较多的克氏原螯虾产卵(另文发表)。在武汉地区,可能由于气温变化比较剧烈,夏天过热,冬天过冷,所以在盛夏和严冬都没有克氏原螯虾大量繁殖的现象。

以上组织学研究结果说明,武汉地区的克氏原螯虾繁殖高峰期有两个,春末夏初和秋季,这与魏青山的观察结果一致^[2]。在自然条件下,只要是性成熟的克氏原螯虾,一年之中一般可以有两个产卵高峰期,一个在4月下旬到5月,另一个在9~10月。

参 考 文 献

- [1] 堵南山编著. 甲壳动物学(下册). 北京:科学出版社, 1993, 820~823.
- [2] 魏青山. 武汉地区克氏原螯虾的生物学研究. 华中农学院学报, 1985, 4(1): 16~24.
- [3] Olwoch A O. Breeding biology of the Louisiana red swamp crayfish *Procambarus clarkii* Girard in Lake Naivasha, Kenya. *Hydrobiologia*, 1990, 208: 85~92.
- [4] Rodriguez E M, Lopez Greco L S, Medesani D A, et al. Effect of methyl farnesoate, alone and in combination with other hormones, on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during vitellogenesis. *General and Comparative Endocrinology*, 2002, 125: 34~40.
- [5] Moses M J. Spermiogenesis in the crayfish (*Procambarus clarkii*). I. Structural characterization of the mature sperm. *J Biophysic and Biochem Cytol*, 1961, 9: 222~228.
- [6] Moses M J. Spermiogenesis in the crayfish (*Procambarus clarkii*). . Description of stages. *J Biophysic and Biochem Cytol*, 1961, 10: 301~333.
- [7] 郭晓鸣, 朱松泉. 克氏原螯虾幼体发育的初步研究. 动物学报, 1997, 43(4): 372~381.
- [8] 吕佳, 宋胜磊, 唐建清等. 克氏原螯虾受精卵发育的温度因子数学模型分析. 南京大学学报, 2004, 40(2): 226~231.
- [9] 江河, 汪留全. 克氏螯虾的生物学特性. 安徽农业, 2002, (8): 29~30.
- [10] 张湘昭, 张弘. 克氏螯虾的养殖技术. 渔业致富指南, 2000, 24: 29~30.
- [11] 许星鸿. 克氏原螯虾的生物学特性及人工养殖技术. 中国水产, 2001, 11: 38~39.
- [12] 李铭, 董卫军, 邢迎春等. 温度对克氏原螯虾幼虾发育和存活的影响. 水利渔业, 2006, 26(2): 36~37.
- [13] 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. 上海水产大学学报, 1999, 8(1): 12~18.
- [14] 殷海成, 张训蒲. 克氏原螯虾生殖系统组织化学研究. 河南农业科学, 2006, (8): 144~146.
- [15] 王玉凤, 堵南山, 赖伟. 罗氏沼虾卵子发生的细胞化学研究. 华东师范大学学报, 1997, (4): 91~94.
- [16] 何绪刚, 龚世园, 张训蒲等. 武湖日本沼虾繁殖生物学研究. 应用生态学报, 2003, 14(9): 1538~1542.
- [17] 初世伟, 王林波, 姜绍贤. 红螯螯虾自然温度下人工繁育技术. 齐鲁渔业, 2003, 20(5): 7~8.

图版 说明

1. 1月卵巢切片; 2. 5月卵巢切片; 3. 6月卵巢切片; 4. 7月卵巢切片; 5. 9月卵巢切片; 6. 10月卵巢切片, 白色箭头指向PVC; 7. 11月卵巢切片; 8. 12月卵巢切片。标尺=100 μm (×50)

DE:退化的卵母细胞; IVC:卵黄发生初期的卵母细胞; Oo:分裂期的卵原细胞; PVC:卵黄发生前期的卵母细胞; VC:卵黄发生中期的卵母细胞。

Explanation of Plate

1. The section of ovary in January; 2. The section of ovary in May; 3. The section of ovary in June; 4. The section of ovary in July; 5. The section of ovary in September; 6. The section of ovary in October, PVC were indicated by white arrows; 7. The section of ovary in November; 8. The section of ovary in December. Bar = 100 μm (×50)

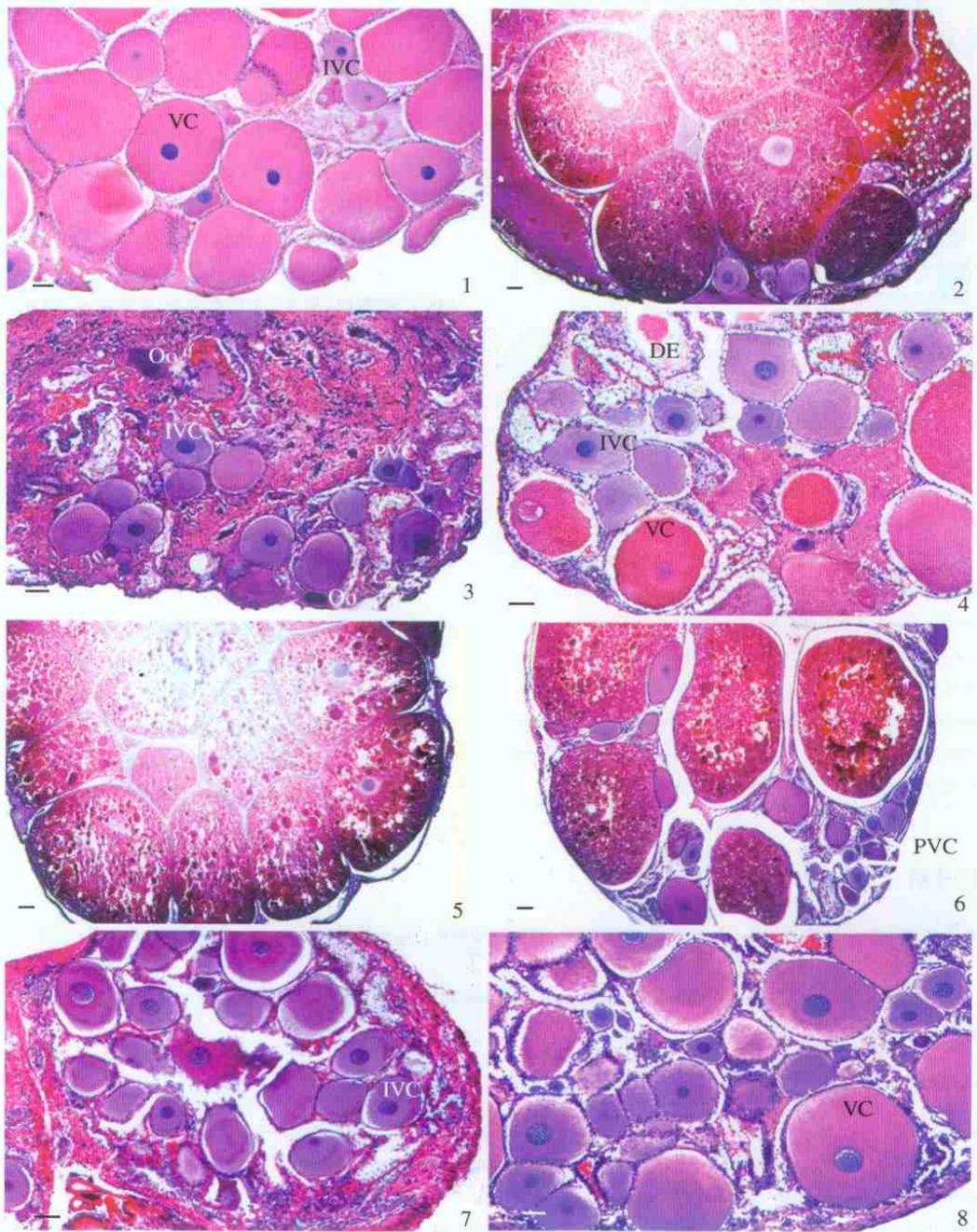
DE:Degenerating egg; IVC:Initial vitellogenic oocyte; Oo: Oogonia in mitosis; PVC:Previtellogenic oocyte; VC:Midvitellogenic oocyte.

戴颖等:武汉地区克氏原螯虾繁殖期的研究

图版

DAI Ying *et al.*: Reproductive Period of *Procambarus clarkii* in Wuhan Area

Plate



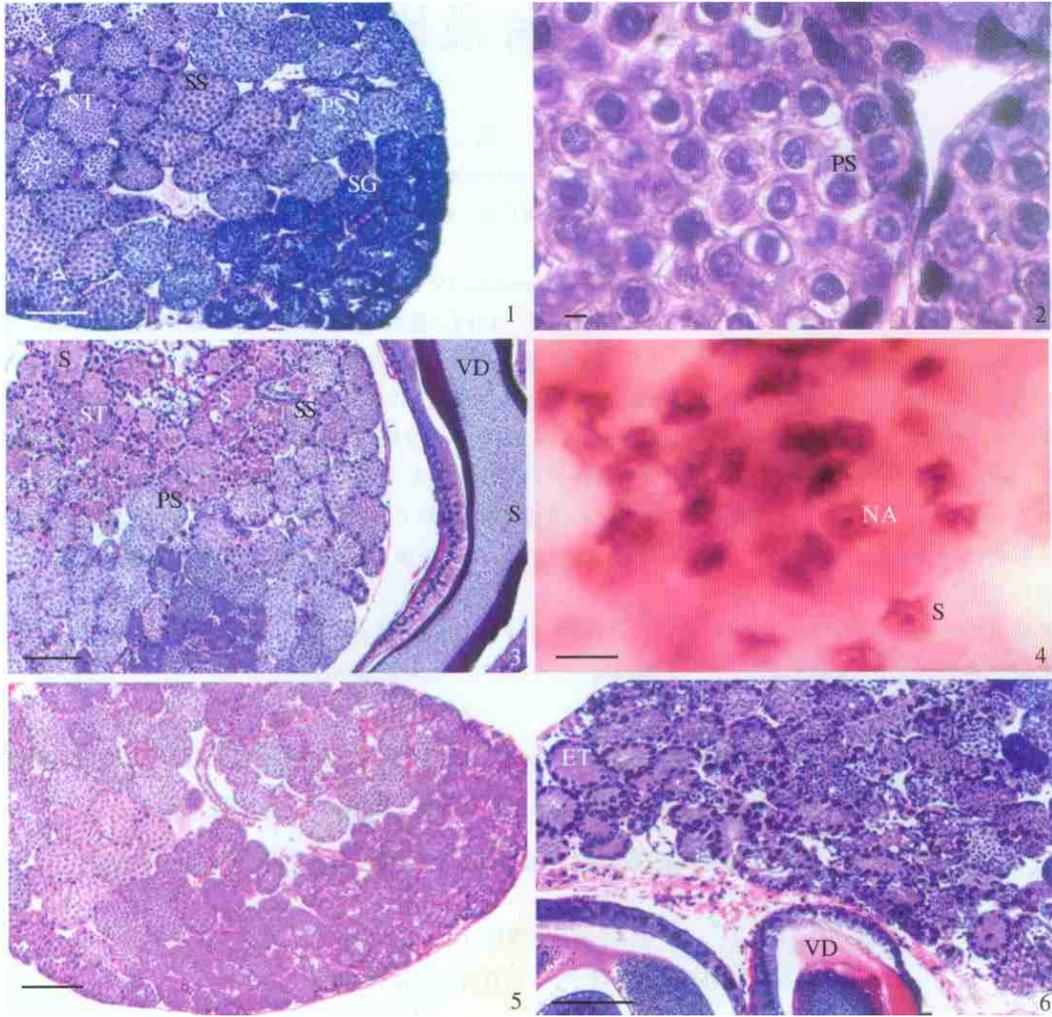
图版说明见文后

戴 颖等 :武汉地区克氏原螯虾繁殖期的研究

图版

DAI Ying *et al.* :Reproductive Period of *Procambarus clarkii* in Wuhan Area

Plate



1. 3月精巢切片,标尺=200 μm (×50); 2. 精母细胞,标尺=10 μm (×400); 3. 5月精巢切片,标尺=200 μm (×50); 4. 精子图片,标尺=10 μm (×1 000); 5. 7月精巢切片,标尺=200 μm (×50); 6. 10月精巢切片,标尺=200 μm (×50)。

ET:排空的精小管; NA:核臂; PS:初级精母细胞; S:精子; SG:精原细胞; SS:次级精母细胞; ST:精子细胞; VD:输精管。

1. The section of testis in March ,Bar = 200 μm (×50) ; 2. Spermatocyte ,Bar = 10 μm (×400) ; 3. The section of testis in May , Bar = 200 μm (×50) ; 4. Sperm ,Bar = 10 μm (×1 000) ; 5. The section of testis in July ,Bar = 200 μm (×50) ; 6. The section of testis in October Bar = 200 μm (×50) .

ET: Empty testicular tubule after the sperm extrusion; NA: Nuclear arm; PS: Primary spermatocyte; S: Sperm; SG: Spermatogonium; SS: Secondary spermatocyte; ST: Spermatid; VD: Vas deferens.