

鄱阳湖日本沼虾幼体发育及其同工酶研究

洪一江, 张立明, 胡成钰

(南昌大学 生物科学工程系, 江西 南昌 330047)

摘要:对鄱阳湖日本沼虾(*Macrobrachium nipponensis*)幼体发育的5个阶段即 Z_0 、 Z_1 、 Z_3 、 $Z_5 \sim Z_6$ 及 $Z_9 \sim Z_{11}$ 期进行观察,分析乳酸脱氢酶(LDH)、酯酶(EST)、苹果酸脱氢酶(MDH)同工酶谱带变化。结果表明,各期间幼体形态均有明显变化,幼体蜕皮次数随发育快慢不同,发育快的需9次蜕皮完成变态发育过程,慢的则需14次;LDH酶谱在5个发育阶段各有5条带,仅酶活性有强弱变化;EST酶谱不仅条带数从2条增加到9条,酶活性也有明显变化,EST₁和EST₃在5个阶段都出现,且酶活性逐渐升高;MDH酶谱共出现6条带,MDH₁和MDH₄分布延伸时间跨度大,酶活性高,可看作主带。因此日本沼虾变态发育过程中同工酶谱带随变态发育而变化,反映了不同组织器官细胞组成和不同组织中不同同工酶的活性和出现顺序,可作为鉴别种属特异性和发育阶段特异性的一项生化指标。

关键词:日本沼虾;幼体发育;同工酶;鄱阳湖

中图分类号:Q959.223

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2002)03-0203-04

有关日本沼虾(*Macrobrachium nipponensis*)幼体发育的研究很多。鸭脚七郎^[1]、李文杰等^[1]、张建森^[2]、戈敏生^[3]、Kwon等^[4]研究了其幼体发育。同工酶应用于甲壳动物的研究也很多,王桂忠等^[5]对锯缘青蟹不同发育期的食性及食性转变情况与4种同工酶的变化进行了对比研究。结果发现,锯缘青蟹的酯酶在不同发育阶段保持稳定,而其他3种与糖代谢有关的酶则随不同发育阶段有明显变化;Thebault等^[6]对锯缘长臂虾个体发育阶段的乳酸脱氢酶活性进行了分析,发现孵化前LDH₁和LDH₂都已出现,但含量很低,孵化后含量都上升,LDH₁尤其明显。Lester^[7]对对虾幼体发育阶段的同工酶做过研究,结果均表明同工酶可揭示种的特异性及不同发育阶段的特异性。鄱阳湖水域日本沼虾已被

证实具有相对固定的栖息性^[8],但对其幼体发育及其同工酶变化研究未见报道,开展对鄱阳湖区日本沼虾幼体发育阶段形态及其同工酶变化的研究,分析其内在的基因调控机制和生理变化的机理,对日本沼虾的遗传育种研究和良种选育具有重要意义。

1 材料和方法

日本沼虾取自鄱阳湖,选取体长4~6 cm,已出现眼点的活泼健壮的抱卵虾放入挂于水族箱内的小网箱中。第2天即有大量幼体孵化,把小网箱连同亲虾移走,水族箱中只剩幼体。取材时间分为孵化后9~23 h,蜕皮次数为 Z_0 期;孵化后4 d为 Z_1 期;孵化后10 d为 Z_3 期;孵化后20 d为 $Z_5 \sim Z_6$ 期;孵化后30 d为 $Z_9 \sim Z_{11}$ 期共5个阶段。孵化后第1天不投食,幼虾靠自身携带的卵黄发育,从第2天开始,投入少量熟鸡蛋黄粉末,水族箱每2 d换1次水,换水量均为总水量的1/4,充氧,保持良好的水质及生长环境。幼体发育阶段形态观察参考戈敏生^[3]的方法。将10 mg幼虾于0.3 mL 20%蔗糖溶液中冰浴匀浆,在4℃冰箱中抽提1~2 h,4 000 r/min离心20 min,取上清液在-20℃冰箱中保存。电泳前与0.025%溴酚兰、50%甘油以4:1体积混

收稿日期:2001-07-19。

基金项目:江西省科委重点项目(045号);江西省农业厅项目。

作者简介:洪一江(1963-),男,教授,中国科学院水生生物研究所博士研究生,从事细胞及发育遗传学研究。

1) 李文杰,王菊女,蒋全文,等.淡水育虾生物学及池塘养殖研究[A].长江水产研究所、江苏省水产科学研究所调查报告[R].1963,31(1):1-30.

合。电泳参照吴鹤龄^[9]的方法。

2 结果

2.1 幼体发育阶段的形态变化

Z₀期:水温(22±2)℃,体长(2.0±0.15)mm,体重(2.4±0.2)mg,有1双复眼,无柄,与头胸甲直接连接,尾节呈三角形与第6腹不分节,额角和腹甲上没有刺和齿。Z₁期:体长(2.4±0.2)mm,体重(4.5±0.3)mg,眼有柄,可活动,第1对触角柄分2节,第1、2步足内肢分4节,尾节与第6腹仍未分开,头胸甲上颊刺和眼后刺各1对。Z₃期:体长(3.0±0.2)mm,体重(10.6±0.3)mg,已具第1、2、3、5步足,内肢均分节,第4步足已出芽,尾节为狭梯形,额角背缘出现2齿。Z₅~Z₆期:体长(4.0±0.2)mm,体重(40±1.0)mg,第4步足分节,腹肢呈双肢型,尾节后缘收窄。Z₉~Z₁₁期:水温(25±2)℃,幼体完成了变态发育,处于幼虾阶段。蜕皮次数随发育快慢不等,发育快的9次蜕皮完成变态发育,慢的则需14次。体长5.7~10.0mm,体重300~330mg,头胸甲背缘有9~10齿,有触角刺和肝刺。第1、2、3、4步足仅剩内肢,外肢退化,第1、2、3、4、5腹足着生羽状毛。此时,幼虾泳姿与成虾相似。

2.2 幼体发育阶段同工酶变化

2.2.1 乳酸脱氢酶(LDH) LDH出现5条带(图1A,表1),迁移率分别为: $R_{H1}=0.32$, $R_{H2}=0.29$, $R_{H3}=0.25$, $R_{H4}=0.21$, $R_{H5}=0.15$,从负极向正极依次为LDH₅、LDH₄、LDH₃、LDH₂、LDH₁,各阶段都有这5条带,仅酶活性有强弱变化。孵化后第1天5种同工酶的活性基本相近,第4天从LDH₅到LDH₁,酶活性逐渐降低,第10天活性恢复到与第1阶段相近的水平;第20天LDH₅活性稍有降低;第30天LDH₅活性大幅升高,而LDH₄到LDH₁这4条带活性逐步下降。

2.2.2 酯酶(EST) EST呈现9条带(图1B,表1),迁移率分别为 $R_{H1}=0.47$, $R_{H2}=0.49$, $R_{H3}=0.55$, $R_{H4}=0.58$, $R_{H5}=0.66$, $R_{H6}=0.72$, $R_{H7}=0.80$, $R_{H8}=0.86$, $R_{H9}=0.89$ 。第1天仅有EST₁、EST₃带,而第4、10、20天出现了EST₁、EST₃、EST₄酶带且活性逐渐升高,第30天则有9条酶带。

2.2.3 苹果酸脱氢酶(MDH) MDH有6条带(图1C,表1),迁移率分别为: $R_{H1}=0.21$, $R_{H2}=0.36$,

$R_{H3}=0.45$, $R_{H4}=0.50$, $R_{H5}=0.52$, $R_{H6}=0.54$,其中MDH₄在5个阶段都出现,MDH₃和MDH₁在2、3、4、5阶段出现,MDH₂只在第2阶段出现,MDH₅在2、3、5阶段出现,MDH₆在2、3阶段出现。

表1 日本沼虾各发育阶段的LDH、EST、MDH同工酶活性
Table 1 Activity of LDH, EST and MDH during larval development of *Macrobrachium nipponensis*

带 Band	Z ₀	Z ₁	Z ₃	Z ₅ ~Z ₆	Z ₉ ~Z ₁₁
LDH ₅	++	++	++	+	+++
LDH ₄	++	++	++	++	++
LDH ₃	++	+	++	++	++
LDH ₂	++	+	++	++	+
LDH ₁	++	+	++	++	+
EST ₁	+	+	++	++	++
EST ₂	-	-	-	-	+
EST ₃	+	+	++	++	+++
EST ₄	-	+	++	++	+++
EST ₅	-	-	-	-	+
EST ₆	-	-	-	-	+
EST ₇	-	-	-	-	+
EST ₈	-	-	-	-	+
EST ₉	-	-	-	-	+
MDH ₁	-	+++	+++	++	++
MDH ₂	-	+	-	-	-
MDH ₃	-	+	+	+	+
MDH ₄	+++	++	++	+	++
MDH ₅	-	+	++	-	+
MDH ₆	-	+	+	-	-

3 讨论

3.1 鄱阳湖日本沼虾发育阶段形态分析

鄱阳湖日本沼虾幼体发育快慢不一,快者9次蜕皮完成变态,慢的需14次,这与Broad^[10]、戈敏生^[3]等的报道类似。在26~28℃,幼体发育快的仅15~16d可完成变态,第20天体长可达1cm,第40天可达2.5cm。研究中选取Z₀、Z₁、Z₃、Z₅~Z₆及完成变态的幼虾,是因为这5个阶段有较明显的形态学改变,时间也易掌握,如Z₀期幼体眼无柄不能活动,Z₁期眼有柄可以活动,Z₃期出现了第3、5步足,Z₅~Z₆期尾节收窄状,完成变态的幼虾,背缘齿达9~10个,游泳姿态与成虾相同。

采用Bertalanffy公式可得鄱阳湖日本沼虾幼体的生长公式和体重增长公式(见图2):

$$L_t = 43[1 - e^{-0.0154(t-0.001)}]; W_t = 4.9[1 - e^{-0.0154(t-0.001)}]^3 \quad (\text{其中: } L_t \text{—第 } t \text{ 天体长, mm; } t \text{—生长天数; } W_t \text{—第 } t \text{ 天体重, g})。$$

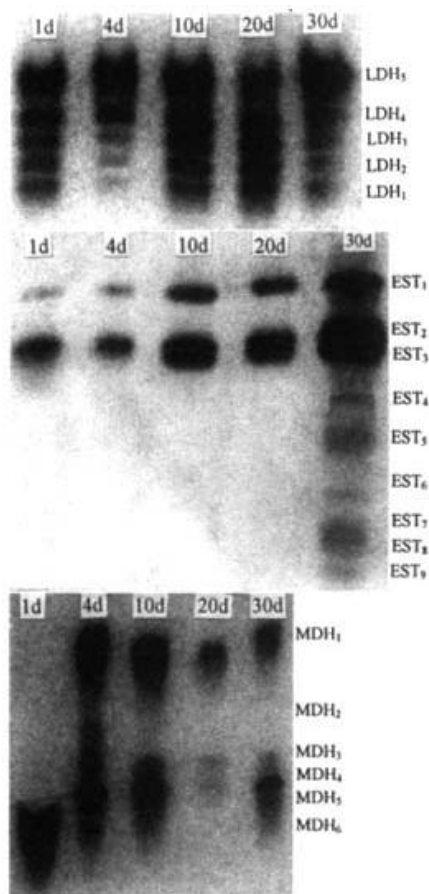


图1 鄱阳湖日本沼虾不同发育阶段 LDH(A), EST(B), MDH(C) 同工酶电泳图谱

Fig.1 Pattern of electropherograms of LDH (A), EST(B), MDH(C) during larval development of *Macrobrachium nipponensis*

3.2 乳酸脱氢酶 LDH 同工酶分析

Thebault^[6]发现, 孵化前锯额长臂虾幼体体内存在 LDH₁ 和 LDH₂, 但含量较低, 孵化后 2 者含量升高, LDH₁ 尤其明显, 与本实验 LDH₁、LDH₂ 在 1 期有较高含量相符。其原因可能是孵化前幼体处于低氧环境中, LDH₁、LDH₂ 的表达处于较低水平, 孵化后, 高氧环境刺激了 LDH-B 亚基合成, 从而使 LDH₁、LDH₂ 含量升高。由于日本沼虾为开放式循环系统, 氧气利用率较低, 对缺氧环境的耐受力较差, 因而关系到其生存能力。而 LDH₅ 正适合于低氧饱和度产生能量, 其含量始终很高, 表明这 2 者有相当重要的关联。此外, 研究中 LDH₃、LDH₄ 在 5

个阶段活性高且稳定, 是否存在组织特异性有待深入研究。

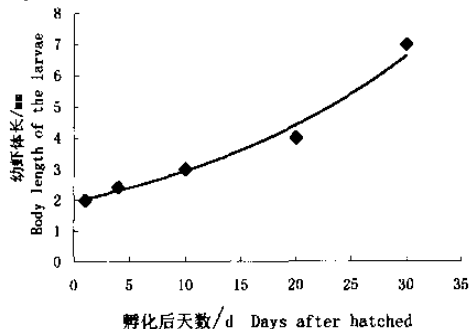


图2 日本沼虾幼体 5 个不同发育阶段生长曲线图

Fig.2 Growth curve during larval development of *Macrobrachium nipponensis*

3.3 酯酶 EST 同工酶分析

李纯厚^[11]曾用酯酶鉴定斑节对虾幼体的种类, 将其分为无节幼体、蚤状幼体、糠虾幼体、子虾 P₄₋₇ 期, 子虾 P₉₋₁₁ 期, 随个体发育, 谱带逐渐复杂。同样, 从日本沼虾 EST 酶谱可看出, 随着幼体的发育, 酯酶的条带也逐渐复杂, 表明对生活环境逐渐适应, 体内各组织器官分化发育需要开启越来越多的基因, 支持幼体变态发育。王桂忠^[5]对锯缘青蟹不同发育阶段 EST 同工酶进行了分析, 在早(5.0 g)、中(50.0 g)、晚(500.0 g)3 个阶段肝胰脏 EST 酶带始终保持 4 条带的稳定谱型, 肌肉有 3 条带, 也在 3 个发育阶段保持稳定, 但有 2 条是肝胰脏中没有的, 表现组织特异性, 但没有表现出发育阶段的特异性。而日本沼虾则不同, 不仅条带数从 2 条到 9 条逐渐增多, 酶活性也有明显变化, 如 EST₁ 和 EST₃ 在 5 个阶段都出现, 而酶活性却逐渐升高, EST₄ 在后 4 个阶段出现, 也呈逐渐升高趋势。这种发育阶段的特异性及酶活性增强与发育及营养相关。如幼体发育从第 1~2 期, 幼虾正好吸收完储存的卵黄, 开始主动取食, EST 谱带在此期间从 2 条增为 3 条。从第 6(7)期幼体发育到幼虾的时期, 其食性转为杂食性, 以浮游生物及动植物残粒为主, 条带数则从 3 条增加到 9 条。这与 Suikin^[12]报道相似, 显然由于取食方式的改变, 需要机体合成新的 EST 同工酶用于新的养分, 并且随机体的变态发育, 新的器官组织增生分化, 也需要开启新的 EST 同工酶来完成。

3.4 苹果酸脱氢酶 MDH 同工酶分析

MDH 共出现了 6 条带, 其中 MDH₄ 在 5 期都

出现,且酶活性相对较高,表明其在维持正常新陈代谢中必不可少。MDH₁、MDH₃从第2期开始出现,MDH₂只在第2期出现。MDH₁和MDH₄分布延伸时间跨度大,酶活性高,可看作主带,其他4条带酶含量则较低,或只在发育的某些特定阶段出现。从日本沼虾的MDH图谱看,第1期只有1条S-MDH条带,第2期形成了3条M-MDH、3条S-MDH谱带,共6条。由于S-MDH和M-MDH是产生能量必不可少的关键环节,而且从第1期到第2期正处在由消耗贮存的卵黄为主转为摄取外界营养的时期,这时幼体不能仅靠自身存储的物质发育了,必须增大活动范围。随着肌肉的生长,蜕皮的需要,线粒体等产能细胞器的增多,开启了多种MDH基因,以满足幼体发育对能量的需要。

日本沼虾变态发育过程中同工酶的复杂变化既反映了不同组织器官细胞组成变化,又反映了不同组织中不同同工酶的活性和出现顺序变化,可作为一种有种属特异性和发育阶段特异性的生化指标。

参考文献:

- [1] 鸭脚七郎.淡水产“テソカエヒ”科及期[J].动物学杂志(日) 1914,26(306):183-187.
- [2] 张建森,李文杰,蒋全文,等.关于青虾繁殖和发育的初步研究[J].动物学杂志,1965,7(4):181-185.
- [3] 弋敏生.淡水青虾幼体发育的初步研究[J].水生生物集刊,1980,7(2):213-223.
- [4] Kwon C S, Uno Y. The larval development of *Macrobrachium nipponensis* reared in the laboratory[J]. Bull Soc Franco-Japonaise Oceanogr, 1963,7(4):278-294.
- [5] 王桂忠,李少菁.锯缘青蟹个体发育过程中同工酶谱的比较研究[J].海洋学报,1991,13(3):412-416.
- [6] Thebault, Marie-Therese, Annis Bernicard. Variations in the LDH activity during the development of the shrimp *Palaemon serratus* [J]. Comp Biochem Physiol B Comp Biochem, 1978,61(3):379-384.
- [7] Lester L J, Cook H P. Ontogenic changes in isozyme patterns of *Penaeus* species [J]. Comp Biochem Physiol, 1987,86(B):253-258.
- [8] 洪一江,官少飞,胡成钰,等.鄱阳湖不同水域青虾生长对比试验[J].水利渔业,2000,20(6):27-29.
- [9] 吴鹤龄.遗传学实验方法和技术[M].北京:高等教育出版社,1983.
- [10] Broad A C. Larval development of *Palaemonetes Pngio* Hofthuis [J]. Biol Bull, 1957,112(2):144-161.
- [11] 李纯厚.同工酶电泳鉴定对虾幼体种类的研究[J].中山大学学报(自然科学版),1998,37(6):79-83.
- [12] Sulkin S D. Depth regulation of crab larvae in the absence of light [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1973,13:73-82.

Larval development and isozymes analysis in shrimp *Macrobrachium nipponensis* in Poyang Lake

HONG Yi-jiang, ZHANG Li-ming, HU Cheng-yu

(Department of Biological Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The female parent *Macrobrachium nipponensis* were collected from Poyang Lake, body length 4-6 cm. The hatched larvae from the parents were observed at 5 different developing stages, which were Z₀, Z₁, Z₃, Z₅-Z₆ and larval stage. For the developing-fast larvae, 9 times of molt are needed to complete the metamorphic process, but for the slow, 14 times are needed. For the larvae at the 5 stages, each has 5 bands on LDH electropherograms with identical rate of mobility, but the activities fluctuate among them. At stage 1, two EST electropherogram bands present, and at stages 2, 3 and 4, three bands present; at stage 5, nine bands present, all accompanied with obvious changes of enzyme activities. The MDH electropherograms have 6 bands, among which MDH₁ and MDH₂ are the main bands for their high enzyme activities and wide prolonged time distribution. The complex changes of isozyme electropherograms in *M. nipponensis* at different developing stages reveal the different isozyme activities and presenting sequence in different organ cells and these changes can be used as the biochemical indexes to identify the specificity of certain species and certain development stage.

Key words: *Macrobrachium nipponensis*; larval development; isozyme; Poyang Lake