

急性碳酸盐碱度胁迫对日本沼虾组织结构和渗透压调节基因表达的影响

徐 康^{1,2}, 薛 程^{1,2}, 吕志敏^{1,2}, 陈璐茜^{1,2}, 王永利³, 孙盛明^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 宁夏泰嘉渔业有限公司, 宁夏 石嘴山 753000)

摘 要: 为了探究碳酸盐碱度胁迫对日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)组织结构和渗透压调节基因表达的影响,以日本沼虾幼虾[(3.12 ± 0.42)g]为研究对象,首先进行碳酸盐碱度急性胁迫实验,得出96 h半致死浓度(LC₅₀),在此基础上设置对照组(1.5 mmol/L)、碳酸盐碱度处理组(10 mmol/L),进行为期96 h的碳酸盐碱度急性胁迫实验。结果显示,日本沼虾幼虾碳酸盐碱度96 h LC₅₀值为16.89 mmol/L,安全浓度为6.47 mmol/L。相比于淡水对照组,随着高碳酸盐碱度胁迫时间的延长,实验组的幼虾鳃上皮细胞与柱状细胞排列紊乱,出现鳃丝开始肿大现象;在肝胰腺组织中,实验组的幼虾肝胰腺中B细胞内部运转泡体积增高,部分肝小管间的边界模糊;在肠道组织中,实验组的幼虾肠道黏膜高度与肌肉厚度明显降低,肠道微绒毛状结构脱落程度随碳酸盐碱度胁迫程度的升高而加剧。在急性碱度胁迫96 h的实验中发现,日本沼虾的鳃组织中渗透压调节基因(*CA3*和*NaK-ATP*)表达量均显著高于对照组($P < 0.01$),而日本沼虾肝胰腺组织中的渗透压调节基因(*CA3*和*NaK-ATP*)表达量在碳酸盐碱度胁迫初期均显著高于对照组($P < 0.01$),但是在碱度胁迫96 h时,其表达量与对照组差异不显著。研究表明,与对照组相比,高碳酸盐碱度急性胁迫会导致日本沼虾幼虾鳃、肝胰腺和肠道组织产生不同程度的损伤,其渗透压调节相关基因表达模式呈先升高后降低趋势,本研究可为碳酸盐型盐碱水养殖日本沼虾生产实践提供参考资料。

关键词: 日本沼虾; 碱度胁迫; 基因表达; 组织结构

中图分类号: S 917

文献标志码: A

随着我国淡水资源的日益匮乏,对长期闲置的盐碱水域开发利用势在必行。内陆盐碱水是一种矿化度为1~50 g/L的非海洋咸水资源^[1],我国存在较大面积盐碱水域资源,由于此类水体中的pH和碳酸盐碱度较高,离子成分较为复杂,使其既无法供人类和牲畜饮用,也不能直接应用于农业生产,对其开发程度低。建立盐碱水渔业模式是扩展水产养殖空间的主要方向之一。碳酸盐碱度作为影响水生动物的主要应激源之一^[2],当水体碱度剧烈升高时,体内酸碱平衡遭到破坏导致其碱中毒,从而使得大多数水生动物难以在盐碱水域内正常生长和繁殖^[3-4]。然而,少部分鱼

类对高盐碱的环境具有独特的耐受能力,例如青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)和瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)等^[5-6],耐盐碱鱼类通过提高渗透压调节与酸碱平衡等基因表达量从而适应高盐碱极端环境^[7-9]。甲壳动物对水体环境碱度变化的适应,主要涉及调节血浆中离子如Na⁺、K⁺、Ca²⁺和Cl⁻的渗透率和浓度的生理过程。鳃组织上皮细胞和触角腺膜中的离子转运蛋白是甲壳动物响应碱度驯化过程中渗透调节的主要位点,包括Na⁺/K⁺-ATP酶(NaK-ATP)和碳酸酐酶(CA)^[10-11]。例如,青鳉(*Oryzias latipes*)暴露于高碳酸盐碱度导致短暂性碱中毒,鳃和肾脏CA2-

收稿日期: 2024-10-28 修回日期: 2025-04-11

基金项目: 国家重点研发项目战略性科技创新合作专项(2023YFE0205100); 宁夏回族自治区重点研发计划(2022BBF03034); 上海市教委东方学者特聘教授项目(TP2022078); 上海市科技创新行动计划(23XD1421600)

作者简介: 徐 康(1997—),男,硕士研究生,研究方向为甲壳动物生理学。E-mail: xukang18012096582 @163.com

通信作者: 孙盛明, E-mail: sunshengming621416@163.com

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

like 基因表达的短暂增加^[12], 拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 中鳃组织是 CA 表达最高的组织, 在盐碱胁迫下鳃组织中的 CA 基因表达量显著升高^[13]。因此, 探究水产动物应答碱度胁迫过程中渗透压调节相关基因表达模式, 对于筛选鉴定耐碱关键基因具有重要意义。

迄今, 关于碱度胁迫对水生动物生长繁殖、生理生化与组织结构的影响已有相继报道, 例如, 房文红等^[14]与王桂春等^[15]发现中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 与罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 幼虾在高碱度环境时的存活率明显降低; YAO 等^[4]发现青鳉在碱度超过 15.7 mmol/L 的环境中, 其胚胎会发生畸形或孵化停滞; 张秀红等^[16]与 LI 等^[17]发现脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 与鳊 (*Siniperca chuatsi*) 在 8 mmol/L 慢性碳酸盐碱度胁迫下抑制其生长性能, 同时对鳃组织均造成损伤; 吴俊伟等^[18]发现在高碳酸盐碱度环境下会引起尼罗罗非鱼血氨水平升高、氨代谢相关基因表达变化; 么宗利等^[19]从转录水平初步筛选了高碳酸盐碱度胁迫下凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 鳃组织的显著差异表达基因, ZHANG 等^[20]发现急性碳酸盐碱度胁迫诱导凡纳滨对虾鳃组织发生细胞凋亡现象。

日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 又名青虾, 是我国淡水养殖产量较高的经济虾类之一。日本沼虾对高碱度有较强的耐受性, 可以在低于 8 mmol/L 的高碱度盐碱水中进行养殖, 尽管高碱度对其的毒性研究早有报道^[21-22], 但是关于碱度胁迫对日本沼虾不同组织结构的影响还未见详细报道。本研究首先通过实验确定了碳酸盐碱度胁迫下日本沼虾 96 h 半致死浓度, 依据本实验确定的半致死浓度设置胁迫浓度, 明确在碳酸盐碱度胁迫下日本沼虾渗透压调节基因表达模式, 同时观察鳃、肝胰腺和肠道组织结构的变化, 从分子和组织水平, 深入分析日本沼虾应答碱度胁迫生理响应过程, 为日本沼虾在碳酸盐碱型盐碱水规模化养殖提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用虾为日本沼虾, 来自宁夏泰嘉渔业有限公司, 选择体格健壮、规格统一、附肢完整的

300 尾幼虾, 个体质量为 (3.12 ± 0.42) g、体长为 (3.44 ± 0.45) cm。实验开始前在宁夏泰嘉渔业有限公司实验基地 20 个养殖缸 ($100 \text{ cm} \times 60 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$) 中暂养 15 d, 暂养期间每日定时定量投喂商业配合饲料 (蛋白质含量 $\approx 40\%$) 3 次 (7: 30, 11: 30, 18: 30), 持续充氧, 每日换水 1/3, 同时在养殖系统内放置隐蔽物, 以降低日本沼虾自残概率。实验用水为过滤曝气自来水并配有增氧设备, 暂养期间保持水体溶解氧为 (6.3 ± 0.2) mg/L, 温度为 (27 ± 1) °C, pH 7.6~7.8, 碳酸盐碱度为 1.5 mmol/L, 氨氮浓度 < 0.3 mg/L, 亚硝酸盐浓度 < 0.02 mg/L。

1.2 急性胁迫试验

虾类养殖池塘碳酸盐碱度的均值在 1.94~3.32 mmol/L, 西北内陆型盐碱水域的碱度为 1.7~20.0 mmol/L^[23]。本研究用水为过滤曝气自来水, 并添加适量的 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 以调节碳酸盐碱度, 并使用 0.1 mol/L 的 HCl 和 0.1 mol/L 的 NaOH 进行微调, 经过 24 h 稳定后用于实验。本研究设置 6 个碳酸盐碱度梯度 1.5、5、10、15、20 和 30 mmol/L, 采用酸碱滴定法监测实验水体碳酸盐碱度, 通过配置相应体积碱度的更换水体来保持碳酸盐碱度浓度稳定, 各实验组中的碳酸盐碱度实测值为 (1.52 ± 0.04) 、 (5.06 ± 0.05) 、 (10.35 ± 0.12) 、 (15.66 ± 0.17) 、 (20.88 ± 0.24) 和 (31.12 ± 0.32) mmol/L。每个碳酸盐碱度梯度设置 3 个重复, 每个重复在养殖缸中放置 10 尾虾, 实验期间不投喂配合饲料。实验过程中定时观察幼虾的活动情况, 幼虾以沉底后仅剩游泳足微摆的个体被视为昏迷, 对刺激无明显反应的个体则被视为死亡^[24], 分别在 12、24、48 和 96 h 记录各组死亡个体数, 死亡后的个体及时捞出。按照寇氏法计算^[25]半致死浓度 (LC_{50}), 计算公式:

$$\text{LC}_{50} = \lg^{-1} \left[X_m - i \left(\sum p - 0.5 \right) \right] \quad (1)$$

式中: LC_{50} 为半致死浓度; X_m 为最大剂量的对数值; i 为相邻两组对数剂量的差值; p 为各组日本沼虾的死亡率; 安全浓度的计算依据日本沼虾 48 h 半致死浓度乘以 0.3, 得到的乘积再除以 24 h 与 48 h 半致死浓度之和的平方。

根据半致死浓度结果, 设置了淡水对照组 (1.5 mmol/L) 和高碳酸盐碱度胁迫组 (10 mmol/L), 每组 3 个重复, 每个重复养殖缸放养 20 尾虾。

一天内采用酸碱滴定对实验水体碳酸盐碱度进行多次测定,每天换水并通过添加适量的 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 来保持碳酸盐碱度稳定,实验周期为96 h,实验期间每天按照体质量3%~5%投喂商业配合饲料(蛋白质含量 $\approx 40\%$)3次(7:30, 11:30, 18:30),投喂1 h后捞出剩余饵料称重。若对照组中出现死亡现象,可根据公式(2)计算各组校正后的死亡百分数。

$$p=(p'-c)/(1-c) \tag{2}$$

式中: p 为校正后的死亡百分数; p' 为实验组观察所得死亡百分数; c 为对照组的死亡百分数。

1.3 样品采集

对照组样品采集后,在胁迫24、48和96 h后采集样品,在每个采样时间点从胁迫组中每个养殖缸随机选取2尾虾,在无菌解剖盘上分离幼虾鳃、肝胰腺和肠道组织,置于2 mL离心管中。鳃、肠道与肝胰腺组织用4%多聚甲醛溶液固定后用于光镜检测,肠道组织用2.5%的戊二醛溶液固定后用于电镜检测,此外,在不同胁迫时间点从对照组和胁迫组中每个养殖缸分别随机选取3尾虾,在无菌解剖盘上分离其鳃和肝胰腺组织,置于2 mL冻存管中,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存用于基因表达检测。

1.4 组织切片制作

首先从4%多聚甲醛固定后的样本中取出鳃、肝胰腺和肠道组织,经过乙醇梯度脱水处理,使用二甲苯进行透明化处理,将样本包埋于石蜡中,通过轮转式切片机连续切割获得约5 μm 厚度的样品切片。采用苏木精-伊红染色技术对切片进行染色处理,进行中性树胶封片,利用OlympusBX-50型荧光显微镜进行观察和拍照。电镜组织切片制作,分别在活体日本沼虾中取得1 mm^2 的肠道组织样本,在10 min内将其置入2.5%戊二醛中进行 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定处理,PBS缓冲液进行3次冲洗,每次持续10 min。1%锇酸 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后的固定处理2 h后,再次使用PBS缓冲液进行3次冲洗,每次10 min。乙醇系列梯度脱水处理后进行Epon812环氧树脂包埋,分别在37、45和 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中固化,每级温度24 h,半薄切片的定位。利用UltracutE超薄切片机对组织样本进行切片处理,并使用醋酸双氧铀和硝酸铅进行染色处理。运用JEM-1200EX透射电镜进行上机测试^[26]。

1.5 荧光定量PCR分析

使用Trizol法提取日本沼虾幼虾鳃和肝胰腺组织中的总RNA,分别采用1%琼脂糖凝胶电泳和分光光度法来检测提取的RNA的质量和纯度,选择质量较好的RNA使用Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis Kit逆转录试剂盒进行反转录^[27]。采用荧光定量PCR(qPCR)检测在碱度胁迫不同时间下 CA3 和 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 基因转录水平。使用Hieff UNICON® qPCR SYBR Green Master Mix试剂盒,配置反应体系,并在QuantStudio™ 3 Real-Time PCR Instrument执行实时定量PCR反应, $\beta\text{-actin}$ 基因作为内参。对照组和碱度处理组幼虾鳃与肝胰腺组织的cDNA样品均进行qPCR分析,并设置3个重复。实验所得qPCR数据用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析^[28],数据用平均值 \pm 标准误差表示($n=3$)。使用Graphpad prism软件进行数据可视化。本实验使用的引物序列如表1所示,从本课题组获得的日本沼虾基因组数据中获得 CA3 和 $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATPase}$ 基因序列片段来设计引物,基因序列引物由生工生物工程股份有限公司合成。

表1 实验所用的引物及其序列
Tab. 1 Primers and their sequences used in this study

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
Carbonic anhydrase 3	F: ACGCAACGTGCACAGATTTC
	R: CCATCATCGTTTCTTCCGCTTC
$\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATPase}$	F: CAGCCCAAGACGACATTCCCATC
	R: GTCACCGCAAGCCAATTCAACAC
$\beta\text{-actin}$	F: TATGCACTTCCTCATGCCAT
	R: AGGAGCGCGCAGTGGTCAT

1.6 数据分析

实验数据使用SPSS Statistics 22.0软件分析,采用Student t 检验比较两组间差异显著性,以 $P<0.01$ 为极显著水平,用**表示,并进行半致死浓度的回归方程计算及单因素方差分析(One-Way ANOVA)。

2 结果

2.1 急性碳酸盐碱度胁迫对日本沼虾幼虾存活的影响

碳酸盐碱度对日本沼虾幼虾的半致死浓度的结果见表2,在对照组和碳酸盐碱度为5 mmol/

L 的实验组中,日本沼虾幼虾能够正常存活。在碱度高于 5 mmol/L 的实验组中,日本沼虾幼虾表现出对环境应激反应,呼吸频率加快,在养殖箱中快速游动,短时间内开始出现死亡现象。48 h 内日本沼虾幼虾的死亡率便达到 50% 及以上,且随着暴露时间越长,死亡速度越快。通过碱度对日本沼虾幼虾毒性的分析可知,日本沼虾幼虾在 24、48 和 96 h 的 LC_{50} 碱度分别为 52.89、39.24 和 16.89 mmol/L,计算得出日本沼虾幼虾对碳酸盐碱度的安全浓度为 6.47 mmol/L。

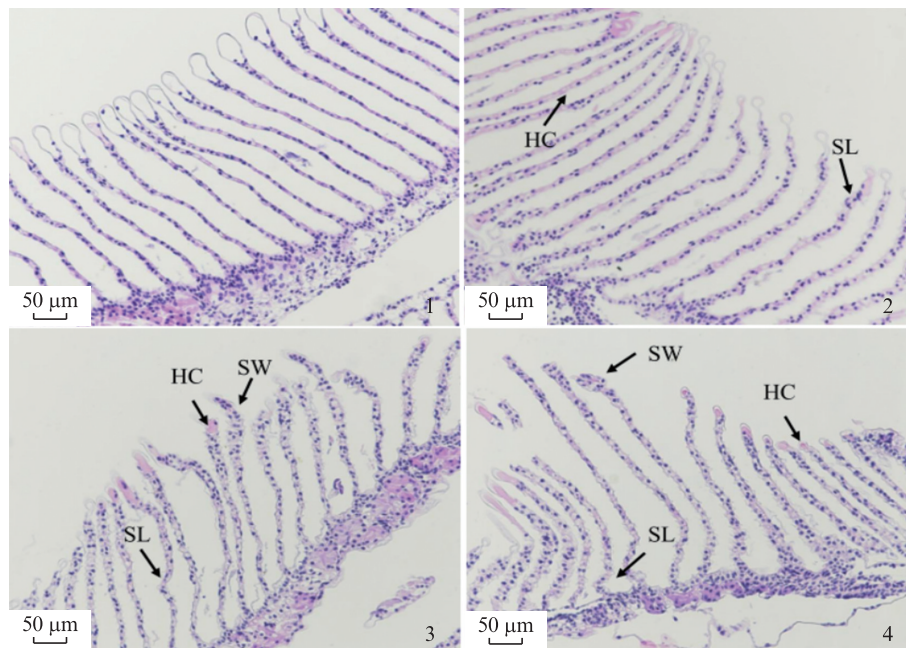
2.2 急性碳酸盐碱度胁迫对日本沼虾幼虾鳃和肝胰腺组织结构的影响

如图版 I -1 所示,对照组的日本沼虾幼虾鳃组织结构完整,呼吸上皮细胞及支柱细胞排列整齐有序,细胞结构以及次级层片形态均呈现正常状态;而在碳酸盐碱度胁迫 24 h 后,鳃丝出现轻度肿大的现象(图版 I -2);碳酸盐碱度胁迫至 48 h 后,上皮细胞与支柱细胞排列紊乱,次级层片开始出现破裂的现象(图版 I -3);当碳酸盐碱度胁迫至 96 h 时,上皮细胞和支柱细胞排列紊

乱,鳃丝肿大,出现血细胞肿胀现象(图版 I -4)。如图版 II -1 所示,对照组中,肝胰腺细胞的结构保持正常且分布均匀,肝小管的基膜完整无缺,管腔呈现星状;碳酸盐碱度胁迫 24 h 后,B 细胞内部运转泡体积增大,开始出现空泡化(图版 II -2);碳酸盐碱度胁迫 48 h 后,空泡化现象持续加重且排列混乱,R 细胞明显减少,由于转运泡体积的增大而导致肝小管的形态结构发生变化(图版 II -3);碳酸盐碱度胁迫 96 h 后,部分肝胰腺小管间的边界模糊,肝小管管腔结构严重变形(图版 II -4)。

表 2 日本沼虾碳酸盐碱度急性毒性试验
Tab. 2 Preliminary test of carbonate alkalinities stress for juvenile *M. nipponense*

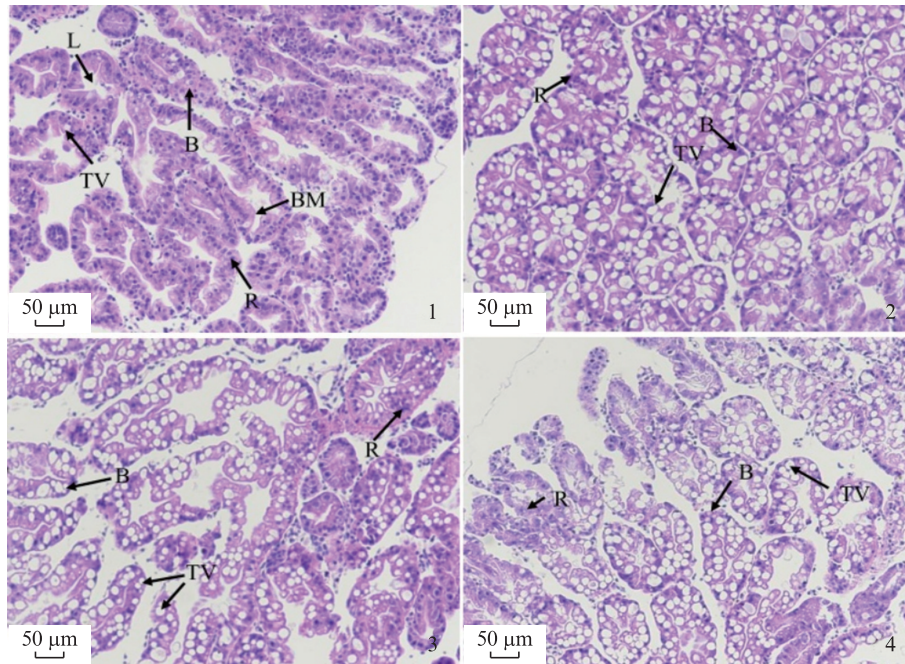
碱度 Alkalinity/ (mmol/L)	24 h 死亡 率/%	48 h 死亡 率/%	96 h 死亡 率/%
对照组 Control	6.67	10.00	16.67
5	3.33	13.33	20.00
10	10.00	20.00	33.33
15	20.00	26.67	40.00
20	23.33	33.33	73.33
30	30.00	46.67	96.67



1. 淡水对照组;2. 碱度胁迫 24 h 组;3. 碱度胁迫 48 h 组;4. 碱度胁迫 96 h 组。SL. 层状上皮轻微弯曲;SW. 肿胀;HC. 血细胞。
1. Control freshwater group; 2. Alkalinity stress for 24 h; 3. Alkalinity stress for 48 h; 4. Alkalinity stress for 96 h. SL. Slightly curved layered epithelium; SW. Swelling; HC. Haemocytes.

图版 I 急性碳酸盐碱度胁迫对日本沼虾幼虾鳃组织结构的影响

Plate I Effect of acute carbonate alkalinity stress on the gill histology of juvenile *M. nipponense*



1. 淡水对照组;2. 碱度胁迫 24 h 组;3. 碱度胁迫 48 h 组;4. 碱度胁迫 96 h 组. B. 分泌细胞;R. 储存细胞;TV. 转运泡。

1. Control freshwater group; 2. Alkalinity stress for 24 h; 3. Alkalinity stress for 48 h; 4. Alkalinity stress for 96 h. B. Secretory cells; R. Storage cells; TV. Transfer bubble.

图版 II 急性碳酸盐碱度胁迫对日本沼虾幼虾肝胰腺组织结构的影响

Plate II Effect of acute carbonate alkalinity stress on hepatopancreas histology of juvenile *M. nipponense*

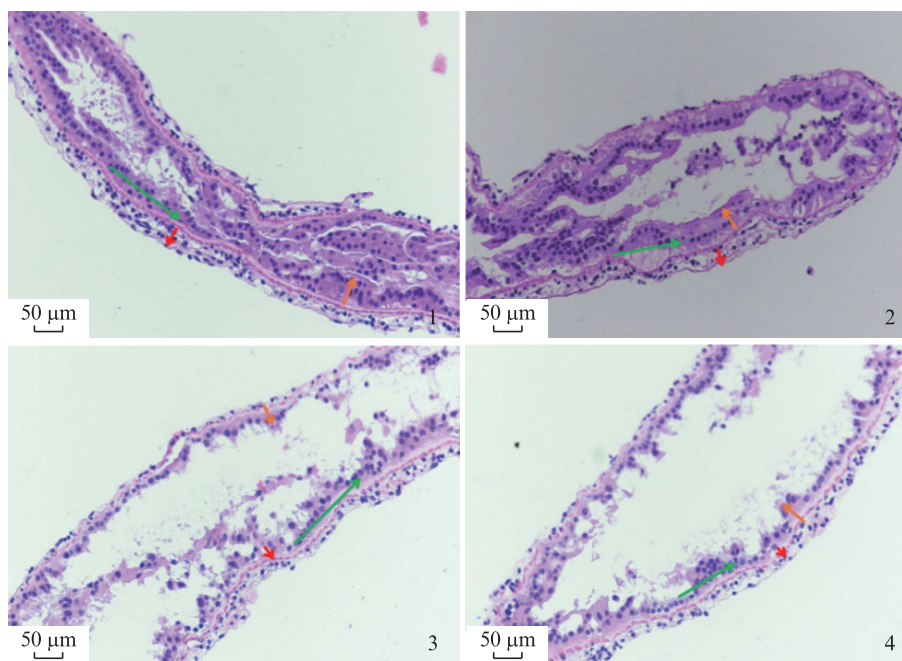
2.3 急性碳酸盐碱度胁迫对日本沼虾幼虾肠道组织结构的影响

如图版 III-1 所示,对照淡水组日本沼虾幼虾肠道皱襞密集细长,与对照组相比,碳酸盐碱度胁迫 24 h 后的幼虾肠道肌肉层厚度、皱襞高度和皱襞宽度变化不明显(III-2),但是当碳酸盐碱度胁迫 48 h 时,其肌肉层厚度呈现变薄的趋势(III-3),在碳酸盐碱度胁迫 96 h 时,幼虾肠道皱襞高度和肌肉层厚度明显降低,并且皱襞宽度也相应减少(III-4),急性高碳酸盐碱度胁迫下也会导致肠道组织损伤。如图版 IV-1 所示,对照淡水组日本沼虾肠道绒毛整齐排列且致密;与对照组相比,高碳酸盐胁迫 24 h 的幼虾肠道微绒毛长度并无明显变化,但是其肠道微绒毛致密性明显较

少(IV-2);而酸盐碱度胁迫 48 h 时,其肠道绒毛数量减少(IV-3);而酸盐碱度胁迫 96 h 时,其肠道绒毛脱落而导致数量明显减少(IV-4)。

2.4 急性碳酸盐碱度胁迫对日本沼虾幼虾渗透压调节相关基因表达的影响

如图 1 所示,日本沼虾鳃组织中碳酸酐酶基因(*CA3*)和 Na^+K^+ -ATP 酶基因(*NaK-ATP*)在碱度胁迫过程中表达量显著高于对照组($P<0.01$)。如图 2 所示,相对于鳃组织,日本沼虾肝胰腺组织中 *CA3* 和 *NaK-ATP* 基因在碱度胁迫中先升高后降低,碱度胁迫 24 h 后,其在肝胰腺组织中表达量均显著高于对照组($P<0.01$),但在碱度胁迫 96 h 时,其肝胰脏组织中 *CA3* 和 *NaK-ATP* 基因表达量与对照组差异不显著。

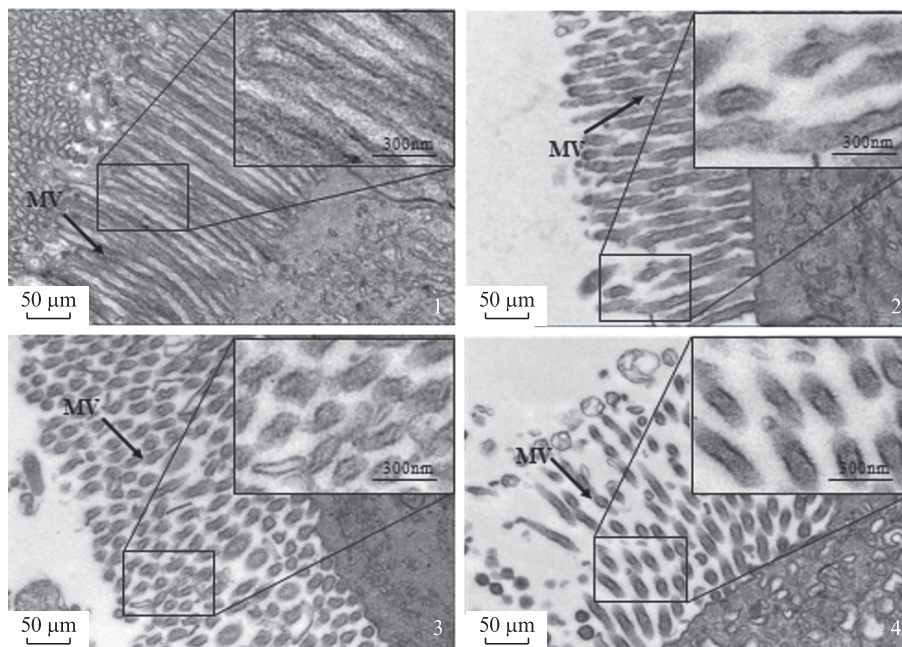


1. 淡水对照组; 2. 碱度胁迫 24 h 组; 3. 碱度胁迫 48 h 组; 4. 碱度胁迫 96 h 组。肠道显微照片中箭头表达为: 红色-肌肉层厚度, 橙色-皱襞高度, 绿色-皱襞宽度。

1. Control freshwater group; 2. Alkalinity stress for 24 h; 3. Alkalinity stress for 48 h; 4. Alkalinity stress for 96 h. The arrows in the micrograph of the intestine are expressed as: red-muscular thickness, orange-fold height, and green-fold width.

图版 III 碳酸盐碱度胁迫对日本沼虾幼虾肠道显微结构的影响

Plate III Effect of carbonate alkalinity stress on intestine microstructure of juvenile *M. nipponense*



1. 淡水对照组; 2. 碱度胁迫 24 h 组; 3. 碱度胁迫 48 h 组; 4. 碱度胁迫 96 h 组; 肠道显微照片中箭头表达为微绒毛长度。

1. Control freshwater group; 2. Alkalinity stress for 24 h; 3. Alkalinity stress for 48 h; 4. Alkalinity stress for 96 h. The arrows in the intestine are expressed as microvilli length.

图版 IV 急性碳酸盐碱度胁迫对日本沼虾幼虾肠道微绒毛形态的影响

Plate IV Effect of acute carbonate alkalinity stress on intestinal microvilli morphology of juvenile *M. nipponense*

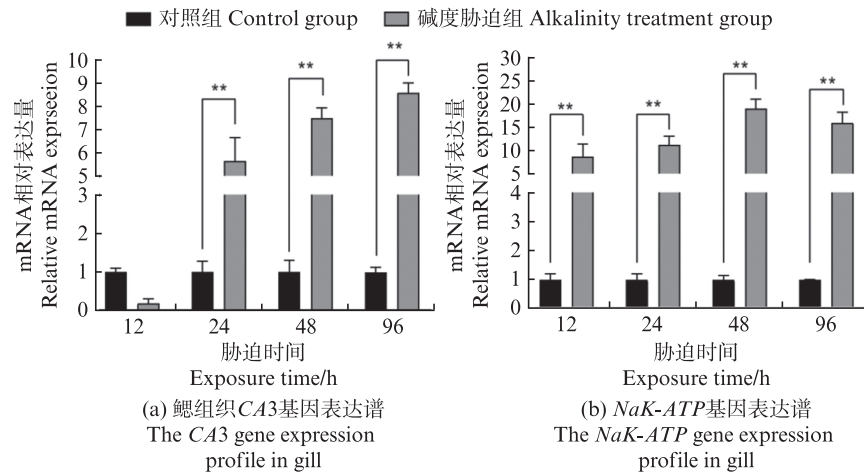


图1 急性碳酸盐碱度胁迫对日本沼虾幼虾鳃组织中渗透压调节基因表达的影响

Fig. 1 Effect of acute carbonate alkalinity stress on expression of osmoregulatory gene in gill of juvenile *M. nipponense*

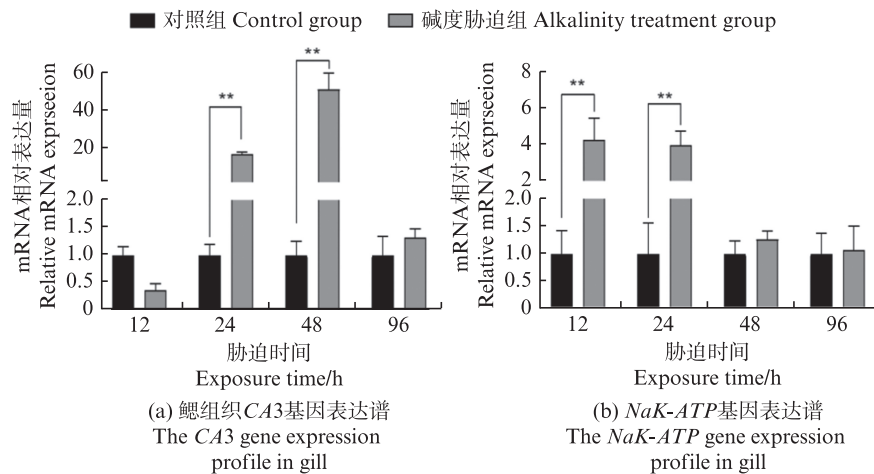


图2 急性碳酸盐碱度胁迫对日本沼虾肝胰腺组织中渗透压调节基因表达的影响

Fig. 2 Effect of acute carbonate alkalinity stress on expression of osmoregulatory gene in hepatopancreas of juvenile *M. nipponense*

3 讨论

3.1 日本沼虾碳酸盐碱度急性胁迫半致死浓度

半致死浓度和安全浓度是衡量盐碱水体对水生动物毒害影响的指标,可为养殖管理提供指导。本实验条件下,碳酸盐碱度对日本沼虾胁迫96 h的 LC_{50} 为16.89 mmol/L,安全浓度为6.47 mmol/L,这与任帅帅等^[17]对日本沼虾碳酸盐碱耐受力实验的研究结果相似(96 h LC_{50} 为14.42 mmol/L,安全浓度为4.71 mmol/L)。在甲壳动物对碱度耐受力的研究中,柳飞等^[29]发现脊尾白虾碳酸盐碱度胁迫72 h, LC_{50} 为8.26 mmol/L,脊尾白虾在碳酸盐碱度为3.5 mmol/L时其生长和繁殖最适宜,但当碱度高于5 mmol/L时,繁

殖能力大大减弱。杨雨虹等^[30]研究了中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)对氯化钠盐度和碳酸氢钠碱度交互作用下的耐受力,结果表明,其96 h $NaHCO_3$ 碱度 LC_{50} 为69.74 mmol/L,安全浓度为18.25 mmol/L。杨富亿等^[31]对凡纳滨对虾在东北碳酸盐型盐碱水域的急性毒性试验表明,在pH 8.11~8.72时,其96 h的 LC_{50} 为10.49 mmol/L,安全浓度为2.77 mmol/L。通过上述结果比较可知,日本沼虾对碳酸盐碱度具有一定的适应能力,能够作为耐盐碱驯化水产养殖品种。

3.2 急性碱度胁迫对日本沼虾鳃和肝胰腺组织显微结构的影响

甲壳动物主要利用鳃组织进行离子调节和呼吸作用,不同的环境因子胁迫或存在较大的应

激源时能够对鳃组织结构造成器质性损伤,进而影响水生动物的呼吸及渗透压调节功能^[32]。碱度胁迫会导致虾类鳃丝结构损伤,同时破坏其离子交换和渗透压调节功能。譬如,张秀红等^[33]研究发现在 10 mmol/L 的碳酸盐碱度胁迫脊尾白虾 12 h 时,其呈现鳃丝肿大与排列不规则、血细胞肿胀现象;高珊等^[34]研究发现碱度胁迫下淡水种瓦氏雅罗鱼的鳃组织由于细胞融合,结构不完整造成生理功能丧失,与本研究发现高碳酸盐碱度胁迫会造成日本沼虾鳃组织结构损伤结果相吻合。肝胰腺组织是虾蟹类重要的消化器官,也是代谢吸收的主要场所。肝胰腺主要由 B 细胞、E 细胞、细胞和 F 细胞构成^[35]。环境胁迫能够对虾蟹类肝胰腺中泡状细胞(B 细胞)和吸收细胞(R 细胞)数量产生明显影响,例如,顾楠等^[36]研究发现氨氮胁迫诱导凡纳滨对虾肝胰腺组织中 B 细胞体积增大和管腔的形态结构严重变形;韩晓琳等^[37]研究表明,三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)在经历 72 h 的低盐胁迫后,R 细胞数量减少,B 细胞内的转运泡数量和体积均有所增加,且肝细胞内的空泡数量增多。本研究中,在 10 mmol/L 的碱度胁迫条件下,日本沼虾肝胰腺中的 B 细胞数量及其转运泡体积增加等现象,这与碱度胁迫下凡纳滨对虾肝胰腺组织结构变化结果相一致^[38],其原因可能是日本沼虾在高碱度胁迫下,机体用以渗透调节的能量增加,导致 B 细胞内部转运泡增多,转运泡体积增大。而当机体不能够适应高碱度胁迫时,导致出现细胞损伤和物质合成失衡的现象。

3.3 急性碱度胁迫对日本沼虾肠道组织结构的影响

虾的开放式的循环系统中肠道组织直接与血淋巴接触,对体内酸碱变化的波动敏感^[39-40]。在本研究中发现,随着碱度胁迫时间的增加,日本沼虾肠道皱襞高度明显降低,这与在鲮鱼(*Phoxinus lagowski*)研究结果相似^[41]。彭丰等^[42]和陶易凡等^[43]研究发现,碱度胁迫下松浦镜鲤(*Mirror carp*)和红罗非鱼(*Oreochromis spp*)的肠绒毛缩短、肠上皮损伤,且随着碱度的升高肠绒毛长度进一步缩短,肠道中消化相关酶活性降低。进一步在透射电镜中也发现类似情况,随着碱度胁迫时间的增加,日本沼虾肠道微绒毛逐渐向椭圆化转变,同时出现掉落的现象,这与微塑

料胁迫下南美白对虾肠道微绒毛出现掉落结果类似^[44],LI 等^[17]和 SHANG 等^[45]相继报道碱度胁迫导致鳊(*Siniperca chuatsi*)和鲇(*Clarias gariepinus*)肠道组织损伤从而抑制其生长性能,提示虾蟹肠道组织也是响应高碱度胁迫的敏感组织。

3.4 急性碱度胁迫对日本沼虾渗透压调节基因表达的影响

Na^+K^+ -ATP 酶(*NaK-ATP*)是一种重要的离子转运蛋白,而碳酸酐酶(CA)是一种在生物体内调节渗透压平衡和离子浓度的重要蛋白^[46]。CA 通过催化 H_2CO_3 和 HCO_3^- 通过脱水反应逐级转变成 CO_2 , 然后被排出体外来维持机体内环境的离子平衡。许多研究已经表明,当虾蟹类受到盐碱胁迫时机体内 *NaK-ATP* 和 *CA* 基因的相对表达量显著增加^[47-48],这与本研究结果相类似,可能是由于虾蟹类在接触高盐碱水环境后,首先通过鳃中 *NaK-ATP* 和 *CA* 介导的离子转运来应对渗透压失衡。王燕等^[49]研究表明,碱度胁迫下,尼罗罗非鱼通过增加离子细胞(*CA II*、*CA IV*)数量,参与维持体内离子平衡和渗透压调节,同时辅助离子转运的细胞数目随着碱度增加而增多,推测鳃组织作为甲壳生物主要的呼吸和离子转换的重要器官,在整个胁迫过程中需要调节机体的内环境稳态和渗透压平衡。而日本沼虾肝胰腺在胁迫前期 *NaK-ATP* 和 *CA3* 基因处于高水平表达,随着碱度胁迫时间的增加肝胰腺组织中 *NaK-ATP* 和 *CA3* 基因表达水平降低并与对照组相似,这与高碳酸盐碱度胁迫下日本沼虾肝胰腺组织结构损伤较为严重的结果相吻合。渗透压调节是水生生物在进化上适应碱度变化的重要策略,不同离子通过特定的离子传输通道传输^[50],但虾蟹类细胞中可通过哪些离子转运蛋白来调节体内酸碱平衡与渗透压值得深入研究。

4 小结

综上所述,在本实验条件下,日本沼虾碳酸盐碱度安全浓度为 6.47 mmol/L,急性高碳酸盐碱度(10 mmol/L)胁迫会导致日本沼虾鳃、肝胰腺和肠道组织不同程度损伤。尽管日本沼虾对碳酸盐碱度胁迫表现出较好耐受性,但在高碳酸盐碱度(>10 mmol/L)盐碱水养殖日本沼虾,必须进行人工处理改良盐碱水才能进行规模化养殖。

本实验研究结果可为日本沼虾在内陆型盐碱水域养殖提供理论参考。

作者声明本文无利益冲突。

参考文献:

- [1] 何志辉, 赵文. 三北地区内陆盐水生物资源及其渔业利用[J]. 大连水产学院学报, 2002, 17(3): 157-166.
HE Z H, ZHAO W. Biological resource in inland saline waters in North China [J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2002, 17(3): 157-166.
- [2] 李明爽. 发展盐碱水养殖 向盐碱水土要食物[J]. 中国水产, 2023(11): 35-36.
LI M S. The development of saline-alkali aquaculture requires food from saline-alkali soil and water [J]. China Fisheries, 2023(11): 35-36.
- [3] 雷衍之, 董双林, 沈成钢. 碳酸盐碱度对鱼类毒性作用的研究[J]. 水产学报, 1985, 9(2): 171-183.
LEI Y Z, DONG S L, SHEN C G. Study on the toxicity of carbonate-alkaline to fishes [J]. Journal of Fisheries of China, 1985, 9(2): 171-183.
- [4] YAO Z L, LAI Q F, ZHOU K, et al. Developmental biology of medaka fish (*Oryzias latipes*) exposed to alkalinity stress [J]. Journal of Applied Ichthyology, 2010, 26(3): 397-402.
- [5] 刘济源, 么宗利, 来琦芳, 等. 盐碱胁迫对青海湖裸鲤耗氧率、血浆渗透浓度和离子浓度的影响[J]. 生态学杂志, 2012, 31(3): 664-669.
LIU J Y, YAO Z L, LAI Q F, et al. Effects of saline-alkali stress on the oxygen consumption and plasma osmolality and ion concentrations of *Gymnocypris przewalskii* [J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(3): 664-669.
- [6] 常玉梅, 何强, 孙言春, 等. 碳酸盐碱度胁迫下瓦氏雅罗鱼血浆游离氨基酸水平的变化[J]. 中国水产科学, 2016, 23(1): 117-124.
CHANG Y M, HE Q, SUN Y C, et al. Changes in plasma free amino acid levels in *Leuciscus waleckii* exposed to different environmental alkalinity levels [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(1): 117-124.
- [7] XU J, LI Q, XU L M, et al. Gene expression changes leading extreme alkaline tolerance in Amur ide (*Leuciscus waleckii*) inhabiting soda lake [J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 682.
- [8] CHANG Y M, TANG R, DOU X J, et al. Transcriptome and expression profiling analysis of *Leuciscus waleckii*: an exploration of the alkali-adapted mechanisms of a freshwater teleost [J]. Molecular Biosystems, 2024, 10(3): 491-504.
- [9] ZHOU Z X, YANG J Y, LV H Z, et al. The adaptive evolution of *Leuciscus waleckii* in Lake Dali Nur and convergent evolution of Cypriniformes fishes inhabiting extremely alkaline environments [J]. Genome Biology and Evolution, 2023, 15(5): evad082.
- [10] LIN C H, HU H J, HWANG P P, et al. Cortisol regulates sodium homeostasis by stimulating the transcription of sodium-chloride transporter (NCC) in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2016, 422: 93-102.
- [11] GILMOUR K M, PERRY S F. Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish [J]. Journal of Experimental Biology, 2009, 212(11): 1647-1661.
- [12] YAO Z L, LAI Q F, HAO Z R, et al. Carbonic anhydrase 2-like and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha$ gene expression in medaka (*Oryzias latipes*) under carbonate alkalinity stress [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2015, 41(6): 1491-1500.
- [13] WANG X P, FANG W, LIU L, et al. Molecular characterization and DNA methylation analysis of carbonic anhydrase (Sp-CA) in the mud crab *Scylla paramamosain*: Its potential osmoregulation role under carbonate alkalinity stress [J]. Aquaculture Reports, 2023, 30: 101591.
- [14] 房文红, 王慧, 来琦芳. 碳酸盐碱度、pH对中国对虾幼虾的致毒效应[J]. 中国水产科学, 2001, 7(4): 78-81.
FANG W H, WANG H, LAI Q F. Toxicity of carbonate-alkalinity and pH to larval *Penaeus chinensis* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2001, 7(4): 78-81.
- [15] 王桂春, 张兆琪, 董双林, 等. 氯化钠和碱度对罗氏沼虾仔虾的毒性研究[J]. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2001, 31(4): 523-528.
WANG G C, ZHANG Z Q, DONG S L, et al. Studies of toxicity of NaCl and alkalinity to post-larval *M. rosenbergii* [J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2001, 31(4): 523-528.
- [16] 张秀红, 李吉涛, 王佳佳, 等. 长期碳酸盐碱度胁迫对脊尾白虾生长及卵巢发育的影响[J]. 水产学报, 2024, 48(4): 049611.
ZHANG X H, LI J T, WANG J J, et al. Effects of long-term saline-alkaline stress on growth and ovary development of *Exopalaemon carinicauda* [J]. Journal of Fisheries of China, 2024, 48(4): 049611.
- [17] LI Y, GAO P C, ZHOU K, et al. Effects of saline and alkaline stresses on the survival, growth, and physiological responses in juvenile mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [J]. Aquaculture, 2024, 591: 741143.
- [18] 吴俊伟, 赵金良, 赵岩, 等. 高碳酸盐碱胁迫对尼罗罗非鱼氨代谢基因表达变化的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(6): 1290-1299.

- WU J W, ZHAO J L, ZHAO Y, et al. Change in ammonia metabolism gene expression of *Oreochromis niloticus* under the stress of high carbonate alkalinity[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(6): 1290-1299.
- [19] 么宗利, 应成琦, 周凯, 等. 碳酸盐碱度胁迫下凡纳滨对虾基因的差异表达[J]. 中国水产科学, 2012, 19(1): 1-12.
- YAO Z L, YING C Q, ZHOU K, et al. Gene expression profiles of *Litopenaeus vannamei* in response to carbonate alkalinity stress [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(1): 1-12.
- [20] ZHANG R Q, SHI X, GUO J T, et al. Acute stress response in gill of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to high alkalinity[J]. Aquaculture, 2024, 586: 740766.
- [21] 任帅帅, 孙博, 罗亮, 等. 青虾 *Macrobrachium nipponense* 对碱度及低温的耐受力[J]. 水产学杂志, 2020, 33(2): 24-28.
- REN S S, SUN B, LUO L, et al. Tolerance of freshwater shrimp (*Macrobrachium nipponense*) to alkalinity and low temperature in northeast China[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2020, 33(2): 24-28.
- [22] 杨富亿, 李秀军, 杨欣乔. 日本沼虾幼虾对碱度和pH的适应性[J]. 动物学杂志, 2005, 40(6): 74-79.
- YANG F Y, LI X J, YANG X Q. Adaptability of *Macrobrachium nipponense* juvenile to water alkalinity and pH[J]. Chinese Journal of Zoology, 2005, 40(6): 74-79.
- [23] 石玉龙. 重盐碱地养殖池塘水质特征及变化规律的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2009.
- SHI Y L. Studies on water quality characteristics and change regulations of culture ponds with heavy saline-alkaline soil[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2009.
- [24] 熊昭娣, 戴习林, 谢剑, 等. 硫丹对罗氏沼虾状幼体及仔虾的急性毒性作用[J]. 广东农业科学, 2013, 40(11): 111-114.
- XIONG Z D, DAI X L, XIE J, et al. Acute toxicity of endosulfan to zoea and postlarve of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2013, 40(11): 111-114.
- [25] 王心如. 毒理学实验方法与技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 34-37.
- WANG X R. Toxicological test methods and techniques [M]. Beijing: The People's Health Press, 2012: 34-37.
- [26] SUN S M, BIAN C, ZHOU N, et al. Dietary *Astragalus polysaccharides* improve the growth and innate immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Insights from the brain-gut axis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 243: 125158.
- [27] 赵倩倩, 孙西超, 郑诚, 等. 日本沼虾 *Bax* 基因克隆及其在低氧胁迫过程中的作用[J]. 水产学报, 2024, 48(8): 089606.
- ZHAO Q Q, SUN X C, ZHENG C, et al. Cloning of *Bax* gene in *Macrobrachium nipponense* and its role in hypoxia stress[J]. Journal of Fisheries of China, 2024, 48(8): 089606.
- [28] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(2): 402-408.
- [29] 柳飞, 李健, 李吉涛, 等. 碳酸盐碱度对脊尾白虾生存、生长、繁殖及免疫酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(5): 1137-1147.
- LIU F, LI J, LI J T, et al. Effects of carbonate alkalinity stress on the survival, growth, reproduction, and immune enzyme activities of *Exopalaemon carinicauda* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(5): 1137-1147.
- [30] 杨雨虹, 李明帅, 罗亮, 等. 盐碱胁迫对中华绒螯蟹毒性作用研究[J]. 东北农业大学学报, 2022, 53(2): 36-41.
- YANG Y H, LI M S, LUO L, et al. Study on toxicity of salinity and alkalinity on *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2022, 53(2): 36-41.
- [31] 杨富亿, 李秀军, 杨欣乔, 等. 凡纳滨对虾对东北碳酸盐型盐碱水域的适应能力[J]. 海洋科学, 2008, 32(1): 41-44.
- YANG F Y, LI X J, YANG X Q, et al. Adaptability of *Litopenaeus vannamei* to carbonate saline-alkaline waters in northeast China[J]. Marine Sciences, 2008, 32(1): 41-44.
- [32] GE Q Q, WANG J J, LI J T, et al. Effect of high alkalinity on shrimp gills: histopathological alternations and cell specific responses [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 256: 114902.
- [33] 张秀红. 长期盐碱胁迫对脊尾白虾生长性能和卵巢发育的影响研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2023.
- ZHANG X H. Study on the Effects of long-term saline alkaline stress on the growth performance and ovarian development of *Exopalaemon carinicauda* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023.
- [34] 高珊, 常玉梅, 赵雪飞, 等. 不同 NaHCO_3 碱度对瓦氏雅罗鱼鳃组织结构的影响[J]. 水生生物学报, 2020, 44(4): 736-743.
- GAO S, CHANG Y M, ZHAO X F, et al. The effect of different bicarbonate alkalinity on the gill structure of amur ide (*Leuciscus waleckii*) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(4): 736-743.
- [35] NEGRO C L. Histopathological effects of endosulfan to hepatopancreas, gills and ovary of the freshwater crab

- Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda: Trichodactylidae) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 113: 87-94.
- [36] 顾楠. 氨氮胁迫对凡纳滨对虾生长、生理指标、鳃和肝胰腺显微结构和相关基因表达的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
- GU N. Effects of ammonia nitrogen stress on growth, physiological and biochemical properties, gill and hepatopancreas gene expression and microstructure of *Penaeus vannamei* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [37] 韩晓琳, 高保全, 王好锋, 等. 低盐胁迫对三疣梭子蟹鳃和肝胰腺显微结构及家系存活的影响[J]. *渔业科学进展*, 2014, 35(1): 104-110.
- HAN X L, GAO B Q, WANG H F, et al. Effects of low salinity stress on microstructure of gill and hepatopancreas and family survival rate of *Portunus trituberculatus* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(1): 104-110.
- [38] ZHANG R Q, SHI X, GUO J T, et al. Acute stress response in hepatopancreas of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to high alkalinity [J]. *Aquaculture Reports*, 2024, 35: 101981.
- [39] YU Q R, XIE J, HUANG M X, et al. Growth and health responses to a long-term pH stress in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 16: 100280.
- [40] SUN S K, GONG C P, DENG C Y, et al. Effects of salinity stress on the growth performance, health status, and intestinal microbiota of juvenile *Micropterus salmoides* [J]. *Aquaculture*, 2023, 576: 739888.
- [41] ZHOU H S, YAO T T, ZHANG T X, et al. Effects of chronic saline-alkaline stress on gill, liver and intestinal histology, biochemical, and immune indexes in Amur minnow (*Phoxinus lagowskii*) [J]. *Aquaculture*, 2024, 579: 740153.
- [42] 程龙, 彭丰, 李晋南, 等. 不同碱度和 α -酮戊二酸水平对松浦镜鲤肠道形态及消化酶活性的影响[J]. *水产学杂志*, 2020, 33(1): 19-24.
- CHENG L, PENG F, LI J N, et al. Effect of different carbonate alkalinity and dietary α -ketoglutarate levels on intestinal morphology and activity of digestive enzymes of *Mirror Carp* [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2020, 33(1): 19-24.
- [43] 陶易凡, 曹巍, 华吉祥, 等. 基于肠转录组学探究 NaHCO_3 碱度胁迫下红罗非鱼应激响应与耐受机制[J]. *中国水产科学*, 2024, 31(8): 897-909.
- TAO Y F, CAO W, HUA J X, et al. Transcriptomic analysis of stress response and tolerance mechanisms in the intestine of red tilapia (*Oreochromis spp.*) during NaHCO_3 exposure [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2024, 31(8): 897-909.
- [44] LI Y M, YE Y C, YUAN H J, et al. Exposure to polystyrene nanoplastics induces apoptosis, autophagy, histopathological damage, and intestinal microbiota dysbiosis of the Pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 919: 170924.
- [45] SHANG X C, GENG L W, WEI H J, et al. Selenium-enriched *Lactobacillus plantarum* alleviate of high alkalinity-induced microbiota-gut-blood systems affect by improving the gut microbiota [J]. *Aquaculture*, 2024, 593: 741294.
- [46] CUENCA A L R, SOUZA M M, FREIRE C A. Osmoregulatory power influences tissue ionic composition after salinity acclimation in aquatic decapods [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2021, 259: 111001.
- [47] 已经删除 HUANG Y H, LIU Z Q, LI Y M, et al. Cloning and characterisation of Na^+/K^+ -ATPase and carbonic anhydrase from oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129: 809-817.
- [48] GE Q Q, LI J, WANG J J, et al. Characterization, functional analysis, and expression levels of three carbonic anhydrases in response to pH and saline - alkaline stresses in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2019, 24(3): 503-515.
- [49] 王燕, 赵金良, 吴俊伟, 等. 碱度胁迫对尼罗罗非鱼鳃离子细胞形态以及鳃、肾和肠中 HCO_3^- 转运因子的影响 [J]. *动物学杂志*, 2016, 51(6): 1027-1037.
- WANG Y, ZHAO J L, WU J W, et al. Effects of alkalinity on morphology of gill ionocytes and HCO_3^- transporters in gill, kidney and intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2016, 51(6): 1027-1037.
- [50] XU J, LI J T, JIANG Y L, et al. Genomic basis of adaptive evolution: the survival of Amur ide (*Leuciscus waleckii*) in an extremely alkaline environment [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34(1): 145-159.

Effects of acute carbonate alkalinity on tissue structure and osmoregulatory gene expression of the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*)

XU Kang^{1,2}, XUE Cheng^{1,2}, LYU Zhimin^{1,2}, CHEN Luqian^{1,2}, WANG Yongli³, SUN Shengming^{1,2}

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Ningxia Taijia Fishery Co., Ltd., Shizuishan 753000, Ningxia, China)

Abstract: To investigate the effects of carbonate alkalinity stress on the tissue structure and osmoregulatory gene expression of the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*), juvenile *M. nipponense* (3.12 ± 0.42) g were subjected to an acute carbonate alkalinity stress experiment to determine the 96-hour lethal concentration (LC_{50}). Based on this, the control group (1.5 mmol/L) and the carbonate alkalinity treatment group (10 mmol/L) were set up with triplicate to carry out the acute stress test of carbonate alkalinity for 96 h. The results showed that the 96-hour LC_{50} value for juvenile *M. nipponense* under carbonate alkalinity stress was 16.89 mmol/L, with a safe concentration at 6.47 mmol/L. In contrast to the control group, with the extension time of carbonate alkalinity stress, the gill epithelial cells and columnar cells in the experimental group were arranged disorderly, and the secondary lamellae began to swell. In hepatopancreas of *M. nipponense* under carbonate alkalinity stress, the volume of B cell internal running vesicles increased, and the boundary between some hepatopancreas tubules was blurred. Compared to control group, the height of intestinal mucosa and muscle thickness of juvenile prawn obviously decreased in intestine of *M. nipponense* under carbonate alkalinity stress, and structural integrity of intestinal microvilli in juvenile prawns was deteriorated with the increasing time of carbonate alkalinity stress. It was found that the gene expression of *carbonic anhydrase 3* (*CA3*) and *Na⁺-K⁺ exchanging ATPase* (*NaK-ATP*) in the gill tissues of prawn in carbonate alkalinity treatment group were significantly higher ($P < 0.01$) than that of the control group within 96 h. The gene expressions of *CA3* and *NaK-ATP* in the hepatopancreas of prawn in carbonate alkalinity treatment group were significantly higher ($P < 0.01$) than those in the control group within 24 h, but there was no significant difference between the control group and carbonate alkalinity stress group along with coercion time extension. The present study shows that high carbonate alkalinity stress can affects the gill, hepatopancreas and intestinal histology of juvenile prawns, and the osmotic pressure regulating gene expression pattern shows a trend of first increasing and then decreasing. This study can provide reference data for large-scale culture of *M. nipponense* juveniles in salt-alkali water.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; alkalinity stress; gene expression; tissue structure