

凡纳滨对虾人工授精的初步研究

赖秋明, 王海石, 符孔忠

(海南大学 海洋学院, 海南 海口 570228)

摘要:以未交配的成熟雌性亲虾和脱落精英为实验材料, 采用不同精英破裂处理、不同基础液释出精子、不同保存时间的脱落精英和不同授精密度进行凡纳滨对虾的人工授精实验。实验结果表明, 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 脱落精英的精子在生理功能上是成熟的, 可以使卵子受精, 受精卵发育正常并孵出无节幼体。网搓法进行精英破裂处理对精子损伤较少, 人工授精的效果比研磨法好; 用生理盐水作为基础液释出精子进行人工授精的效果比海水略好; 精英冷冻保存时间越长, 其人工授精的效果越差; 凡纳滨对虾的精子不具鞭毛, 没有运动能力, 人工授精的卵子受精率很大程度上取决于精子在水中的密度, 增加精子密度可获得较高的无节幼体产量。

关键词: 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*); 精英; 人工授精; 精子密度

中图分类号: Q968.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2005)10-0019-04

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 属对虾科、对虾属、白对虾亚属, 俗称南美白对虾, 联合国粮农组织定名为 White leg shrimp (白脚虾)^[1], 是当今世界养殖产量最高的三大对虾品种之一。凡纳滨对虾的头胸部较小, 出肉率高 (53.03% ~ 53.81%), 蛋白质含量和必需氨基酸指数等营养指标均高于其它对虾^[2]。凡纳滨对虾个体大, 生长快, 对环境的适应能力强, 适合开展高密度养殖, 驯化后可在盐度为 2 以上的水中饲养^[3], 具有较好的养殖潜力。凡纳滨对虾自 1988 年初次引进我国, 现已成为我国沿海及内陆地区对虾养殖的主要品种。

1994 年我国已突破了凡纳滨对虾的全人工繁殖技术, 经过多年的摸索, 工厂化育苗技术日趋成熟, 苗种的批量化生产有力推动了我国凡纳滨对虾养殖业的发展。凡纳滨对虾具有开放式纳精囊, 其交配行为通常发生在性腺成熟雌虾产卵前的 4~12h, 交配行为是在雌虾硬壳状态下完成, 交配后的精英依靠自身的粘性贴在雌虾第 4~5 对步足之间的纳精囊位置, 交配后的雌性亲虾排卵时, 精英内的精子同时释放, 精卵在水中完成受精作用^[4,5]。在凡纳滨对虾人工繁殖生产中, 由于精英易脱落, 成熟雌虾的自然交配率通常在 50%~60%, 但是没有交配的成熟雌性亲虾当晚照常产卵, 这就意味有 40%~50% 的亲虾资源是浪费的, 严重影响了孵化场的无节幼体产量和效益。在中南美洲, 有的对虾繁殖场采取精英人工移植技术弥补亲虾自然交配率低的问题, 但因凡纳滨对虾是开放式的纳精囊, 精英粘附在雌虾纳精囊

位置上极易脱落, 操作技术难度较大且效果不佳。本研究利用亲虾交配池自然脱落的精英和没有交配的成熟雌性亲虾进行人工授精试验, 探索提高无节幼体产量、降低生产成本的途径和方法。

1 材料与 方法

1.1 精英与成熟雌性亲虾

实验用的凡纳滨对虾精英和成熟雌虾采自海南康达实业有限公司的对虾繁殖基地, 精英为交配池自然脱落的精英, 成熟雌性亲虾的体质量为 45~50 g。

1.2 精英的收集保存

每天 20:00~23:00, 从亲虾交配池底部收集自然脱落的精英, 用清洁海水或生理盐水冲洗干净, 放置在洁净的玻璃器皿中, 加入适量的生理盐水, 放入 -5℃ 的恒温冰箱中保存, 使用前在 30℃ 的环境下复苏。

1.3 精英的破裂处理

网搓洗法: 将精英放入 200 目的筛网布袋中, 放入盛有清洁海水或生理盐水的桶内用手搓洗, 让精子释出, 取样于血球计数板中, 在显微镜下计数并推算

收稿日期: 2004-10-26; 修回日期: 2005-06-20

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2002AA603032)

作者简介: 赖秋明 (1956-), 男, 广东清远人, 硕士研究生, 副教授, 主要从事虾、蟹人工繁殖及养殖技术的研究与教学工作, 电话 0898-66279184, E-mail: lqming815@163.com

精子密度。

研磨法:将精英放入玻璃研钵中,一边轻轻研磨一边注入少量的生理盐水,让精子释出,取样于血球计数板中,在显微镜下计数并推算精子密度。

1.4 人工授精

于当晚 23:00 挑选 20 尾没有交配的性腺成熟的雌性亲虾放入一个面积 8 m^2 , 注入海水深度 120 cm, 容积 9.6 m^3 的产卵池, 池内微弱充气增氧, 水温调控在 $28\sim 30\text{ }^\circ\text{C}$ 。当发现个别亲虾游至水面产卵时, 即将预先准备好的精子释出液泼入产卵池进行人工授精。亲虾产卵通常集中在凌晨 1:00~2:00, 在此时间段内将精子释出液分 3 次泼入产卵池, 翌日早上 6:00~7:00, 通过人为搅动孵化池水体, 让卵子均匀分布于水体中, 然后从孵化池取水样计算卵的密度和卵的数量; 下午 15:00 用 200 目筛绢网进行排水收集无节幼体, 并计算无节幼体的数量。

1.5 人工授精实验

实验一:将当晚收集的精英, 分别采用生理盐水网搓洗法、海水网搓洗法、生理盐水研磨法和海水研磨法 4 种不同精子释出方法进行人工授精的对比试验。每一种处理选用未交配的成熟雌性亲虾 20 尾, 卵的数量 $3.04\times 10^6\sim 3.60\times 10^6$ 粒; 分别用 4 种不同的方法将 40 个精英的精子释出后, 根据精子密度求算精子释出液的用量, 使各产卵池水中精子密度达到 100 个/mL, 该实验设置 4 个重复。

实验二:将凡纳滨对虾的精英放入盛有少量生理盐水的烧杯中, 放置在 $-5\text{ }^\circ\text{C}$ 的冰箱内冷冻保存 24h 和 48h, 然后分别用当晚收集的精英、冷冻保存 24h 的精英和冷冻保存 48h 的精英, 采用生理盐水网搓洗法释出精子进行人工授精的对比试验。每一种处理选用未交配的成熟雌性亲虾 20 尾, 卵的数量 $3.10\times 10^6\sim 3.45\times 10^6$ 粒; 取 3 种不同保存时间的精英各 20 个, 采用生理盐水网搓洗法释出精子, 根据精子密度求算精子释出液的用量, 使各产卵池水中精子密度达到 100 个/mL, 该实验设置 3 个重复。

实验三:将当晚收集的精英, 采用网搓法进行精英破裂处理, 以生理盐水作为基础液释出精子, 分别以不同的精子密度进行人工受精的对比试验。每一种处理选用未交配的成熟雌性亲虾 20 尾, 卵的数量 $3.16\times 10^6\sim 3.52\times 10^6$ 粒, 分别取精英 20, 40 和 60 个用生理盐水网搓洗法释出精子, 根据精子密度求算精子释出液的用量, 使各产卵池水中精子密度分别达到 50, 100 和 150 个/mL, 该实验设置 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 精英破裂处理方法对人工授精效果的影响

本实验利用在凡纳滨对虾亲虾交配池收集的自然脱落精英, 以 4 种不同的精英破裂处理方法释出精子进行人工授精的对比试验。图 1 显示的实验结果表明, 每一个试验池均可孵化无节幼体, 说明凡纳滨对虾自然脱落精英的精子在生理功能上是成熟的, 即精子无需“获能”就可以使卵子受精, 受精卵发育正常并孵出无节幼体^[6]。从人工授精的生产效果看, 其中以生理盐水网搓洗法释出精子的人工授精效果最好。虽然各池的产卵量接近, 水中精子密度相同, 但以生理盐水网搓洗法释出精子的授精效果远高于其它 3 个处理组, 孵出无节幼体的平均产量为 6.575×10^5 尾, 卵子的孵化率为 19.6%; 其次为海水网搓洗法, 卵的孵化率为 16.6%; 生理盐水研磨法和海水研磨法的授精效果较差, 卵的孵化率分别为 16.0% 和 14.6%。我们认为, 其原因可能是网搓洗精英时, 释出的精子能及时透过网目, 搓洗过程中对精子损伤较小; 研磨法要让精子充分释出, 要求研磨程度较高, 时间长, 因而对精子的损伤作用较大。

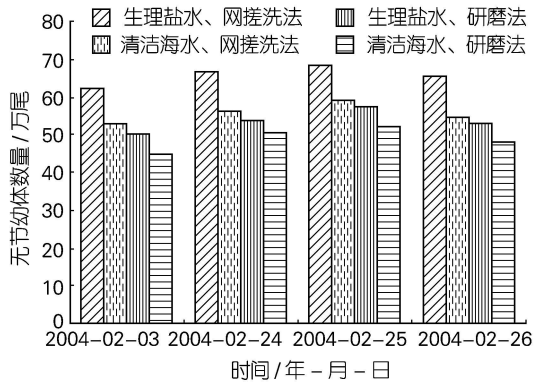


图 1 不同精英破裂处理方法的人工授精效果

Fig. 1 Artificial insemination efficiency of different spermatophore squeezing methods

与此同时, 用生理盐水作为基础液释出精子的人工授精效果比清洁海水释出精子的效果要好, 原因可能是生理盐水的渗透压与凡纳滨对虾体液的渗透压比较接近, 起到缓冲介质和保护精子的作用, 比海水更利于延长精子的寿命, 从而提高卵子的受精率和孵化率。

2.2 精子密度与无节幼体产量的关系

我们采用 50, 100 和 150 个/mL 3 种精子密度进行人工授精试验, 结果见图 2。实验结果显示, 在体积相同、布卵数量接近的产卵池中, 精子密度越大, 孵出无节幼体的产量越高, 无节幼体产量与精子密度呈正相关。凡纳滨对虾的繁殖为体外受精, 体外发育, 自然交配的成熟雌虾, 卵子排出时, 经过精英的豆状

部,精子就以刺突附于卵子表面,数量一般为 10~20 个,精子通过顶体反应时与卵子表面结合,进入卵子完成受精作用^[6,7]。由于每个精英所含的精子数量大致相近,大约在 3 000 万个左右^[8],雌性亲虾的产卵量通常只有 $7 \times 10^4 \sim 30 \times 10^4$ 粒,所以自然受精的受精率通常高达 90%。但人工受精的情况有所不同,凡纳滨对虾的精子不具鞭毛,小尾巴缺乏运动能力而不能主动接近卵子,精卵相遇的机会大大减少,卵的受精率远远低于自然受精的受精率。因此,增加水中的精子密度,可在精子有效受精期内增加精子与卵子相遇受精的机会,从而提高卵的受精率和无节幼体的产量。

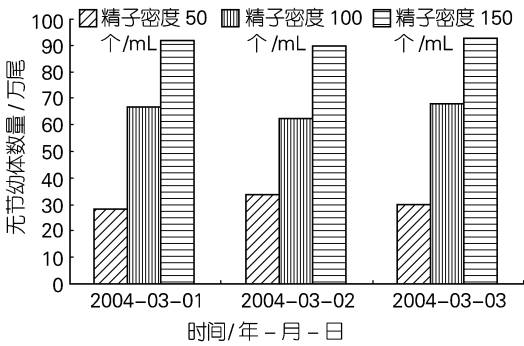


图 2 不同精子密度的人工受精效果

Fig. 2 Artificial insemination efficiency with different densities of spermatozoa

2.3 精英冷冻保存时间与人工受精效果的关系

本实验分别用当晚收集、保存 24 h 和保存 48 h 的自然脱落精英进行人工受精的对比试验。图 3 的实验结果表明,凡纳滨对虾的精英经冷冻保存 24、48 h

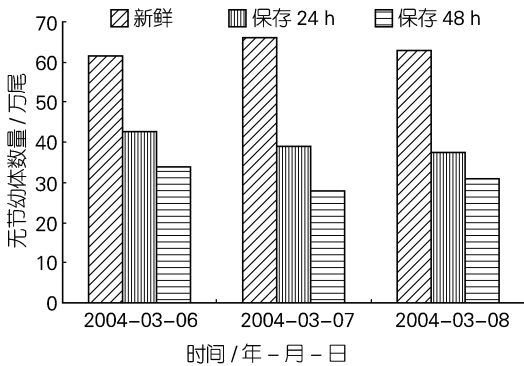


图 3 不同保存时间精英的人工受精效果

Fig. 3 Artificial insemination efficiency with different preserved times of spermatophores

后,再在室温条件下解冻复苏,其精子仍有受精能力,精英冷冻保存时间越长,其人工受精的效果越差。分析其原因可能是冷冻保存过程中,因实验条件限制,没有考虑冷冻速率、复苏方法等因素,导致部分精子不能正常复苏。另外,可能是因为精英冷冻保存的温度不够低,导致精子随着保存时间的延长其存活率下降。如果贮存温度、冷冻速率、稀释液的化学成分、卫生条件和复苏方法等关键因子控制适当,精子冷冻保存同样可以保持较高的受精率。中国科学院海洋研究所曾经做过中国对虾精子超低温保存的研究,他们用天然海水作为基础液释出精子,并往其中加抗冻剂,将精子放于液氮中超低温 (-196°C) 保存 94~138 d,在室温下解冻后做人工受精试验,最高受精率达 59%^[7]。

3 小结

用网搓法和研磨法破裂处理精英释出的精子用于人工受精均可孵化无节幼体。表明凡纳滨对虾脱落精英的精子在生理功能上是成熟的,即精子无需“获能”就可以使卵子受精,受精卵发育正常并孵出无节幼体。网搓法进行精英破裂处理对精子损伤较小,人工受精的效果比研磨法明显要好。

生理盐水的渗透压与凡纳滨对虾体液的渗透压比较接近,起到缓冲介质和保护精子的作用,用生理盐水作为基础液释出精子的人工受精效果比清洁海水释出精子的效果略好。

精英冷冻保存时间越长,其人工受精的效果越差。若能改进精英冷冻前和解冻的处理技术,进一步降低精英的保存温度,可望获得更好的人工受精效果。

凡纳滨对虾的繁殖为体外受精,体外发育。因为凡纳滨对虾的精子不具鞭毛,不能依靠自身的运动去主动接近卵子,人工受精时,卵子的受精率很大程度上取决于精子在水中的密度,受精率远比自然受精的低。因此,增加精英用量或减少产卵池的海水体积,可有效提高产卵池中精子密度,增加精卵结合的机会,进而提高人工受精的效果。本实验我们多次进行精子密度的观察计数,一个成熟饱满的精英通常可以释出 $2.4 \times 10^7 \sim 2.6 \times 10^7$ 个精子,产卵池精子密度要达到 150 个/mL,每立方水体使用精英 6~7 个。根据本次实验的结果,我们认为,要获得较理想的人工受精效果,每立方米的产卵池水体所使用精英的数量不应少于 6 个,究竟以多大的精子密度可获得最佳的人工受精效果,尚有待今后进一步的研究。

- 参考文献:
- [1] 王吉桥. 南美白对虾生物学研究与养殖[M]. 北京: 海洋出版社, 2003. 146- 148.
- [2] 陈晓汉, 陈琴, 谢达祥. 南美白对虾含肉率及肌肉营养价值的评定[J]. 水产科技情报, 2001, 4: 165- 168.
- [3] 赖秋明. 海水养虾新技术[M]. 海口: 海南出版社, 2003. 18- 28.
- [4] 勇江波. 诱导南美白对虾交配行为的观察[J]. 齐鲁渔业, 2001, 5: 9- 11.
- [5] 张伟权, 于琳江, 童保福, 等. 南美白对虾全人工授精技术研究[J]. 海洋与湖沼, 1993, 4: 428- 432.
- [6] 蔡生力, 戴习林, 臧维玲, 等. 南美白对虾的性腺发育, 交配, 产卵和受精[J]. 中国水产科学, 2002, 4: 335- 339.
- [7] 柯亚夫, 蔡难儿. 中国对虾精子超低温保存的研究[J]. 海洋与湖沼, 1996, 2: 187- 192.
- [8] 王广军. 南美白对虾的生物学特性及繁殖技术[J]. 水产科技情报, 2000, 3: 128- 129.

Artificial insemination of *Litopenaeus vannamei*

LAI Qiu-ming, WANG Hai-shi, FU Kong-zhong

(Ocean College of Hainan University, Haikou 570228, China)

Received: Oct., 26, 2004

Key words: *Litopenaeus vannamei*; spermatophores; artificial insemination; spermatozoa density

Abstract: In hatchery seed production of *Litopenaeus vannamei*, due to the drop-off of the spermatophores in mating process, the impregnating rate of matured females is usually low, ranging from 50% to 60%, resulting in the waste of resource and increase of production cost. In the present study, matured virgin females were artificially inseminated with the spermatozoa from dropped spermatophores obtained using different spermatophore squeezing methods, treated using different medium solutions, preserved for different durations of time, and inseminated at different densities. The results showed that the spermatozoa from the dropped spermatophores were physiologically matured and able to fertilize eggs and produce normal nauplii. Squeezing spermatophores using screen net had less damage to spermatozoa and better artificial insemination efficiency than using grinders. Physiological saline as dilution medium produced better artificial insemination efficiency than seawater, while longer preservation period for spermatophores caused lower artificial insemination efficiency. Due to zero flagellum and movability of *Litopenaeus vannamei* spermatozoa, the fertilization rates to a great extent depended upon the spermatozoa density in water, increasing fertilization rate and nauplii production with increasing density of spermatozoa.

(本文编辑: 刘珊珊)