

# 中国对虾交尾雌虾蜕皮及人工再交尾研究

罗 坤, 张庆文, 张天时, 孔 杰

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 为更好地利用交尾雌虾, 采用温差刺激、药物刺激对养殖交尾雌虾和海捕交尾雌虾进行蜕皮实验, 使交尾雌虾的精英随蜕皮而脱落, 然后对蜕皮对虾再次进行精英移植, 来建立特定杂交组合的中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)家系。实验结果表明, 养殖交尾雌虾蜕皮实验中, 在只有温差刺激的情况下, 对虾蜕皮率为 30%, 且对虾成活率为 100%, 说明温差刺激在保持对虾较高存活率的情况下, 可以促使中国对虾蜕皮; 在温差刺激的基础上进行药物刺激, 不同茶籽饼质量浓度梯度下对虾的蜕皮率存在显著差异, 且随着药物浓度的增加, 对虾蜕皮率也随之增加, 3 个茶籽饼质量浓度(30, 60, 90 g/m<sup>3</sup>)下的对虾蜕皮率分别为 40%, 60%, 70%, 茶籽饼质量浓度为 0 的对虾蜕皮率与 60, 90 g/m<sup>3</sup> 质量浓度下的对虾蜕皮率存在显著差异( $P < 0.05$ ); 从对虾的死亡情况看, 当药物质量浓度达到 90 g/m<sup>3</sup> 时, 对虾出现死亡, 经  $\chi^2$  检验表明, 90 g/m<sup>3</sup> 质量浓度与 0~60 g/m<sup>3</sup> 质量浓度下的对虾死亡率存在显著差异( $P < 0.05$ )。在海捕交尾雌虾蜕皮实验中, 对虾蜕皮率不高, 只有在药物质量浓度为 30, 90 g/m<sup>3</sup> 条件下才有对虾蜕皮, 蜕皮率仅为 20%, 10%; 每个药物浓度下均有对虾死亡, 死亡率随着茶籽饼质量浓度升高而升高, 不同药物浓度下的对虾死亡率存在显著差异。对蜕皮后雌虾进行精英移植, 共获得 18 个中国对虾家系, 平均受精率和平均孵化率分别为 51.2%, 88.6%。本研究通过对交尾雌虾进行蜕皮后再交尾, 获得了不同杂交组合的中国对虾家系, 为进一步的中国对虾家系选育工作打下了基础。

**关键词:** 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*); 蜕皮; 精英移植

中图分类号: S917; S961.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)07-0012-04

在中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)大规模家系选育过程中, 首先需要建立基础群体, 然后通过基础群体中不同群体的亲虾间进行定向交尾, 建立大规模的全同胞和半同胞家系, 使优良性状的基因进行富集, 通过这样连续不断的选育, 最终选育出新的优良品种。基础群体所涵盖的遗传变异程度直接影响育种项目的遗传进展, 最终决定项目的可持续性。因此, 基础群体的遗传背景应该尽可能广泛, 涵盖的遗传变异尽可能丰富。作者在黄海水产研究所水产遗传育种中心收集了中国对虾 8 个不同群体来构建基础群体, 但有的群体中未交尾雌虾数目有限, 难以与其他群体进行足够的巢式交配搭配。为保证这些群体建立所需的家系数目, 作者通过对这些群体的交尾雌虾进行蜕皮实验, 并对蜕皮后的雌虾进行群体间的精英移植, 以期建立更多的不同交配组合的中国对虾家系。

在中国对虾蜕皮方面的研究中, 多是关于中国对虾幼体生长蜕皮的报道<sup>[1~5]</sup>, 对于中国对虾的蜕皮机理, 目前还没有明确的认识, 对甲壳类蜕皮激素的研究, 也有不少报道<sup>[6~9]</sup>, 对虾体内的蜕皮激素能

促使对虾蜕皮, 而对于成虾, 也有蜕皮现象发生, 但其蜕皮机制还不明确, 蔡生力等<sup>[10]</sup>对切除眼柄的凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)成虾蜕皮和性腺发育进行过报道。本实验通过对收集的养殖交尾雌虾和海捕交尾雌虾进行温差刺激和药物刺激, 研究了促使中国对虾成虾蜕皮的条件, 探讨了利用交尾雌虾进行蜕皮后再交尾的可行性, 最终建立了 18 个中国对虾杂交家系, 为中国对虾的家系构建方法提供了另一种思路。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

实验采用的中国对虾包括养殖交尾雌虾和海捕交尾雌虾, 平均体长分别为 15.1, 17.5 cm, 挑选健康

收稿日期: 2009-08-28; 修回日期: 2010-01-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA10A406); 公益性行业(农业)科研专项(200803012)

作者简介: 罗坤(1980-), 男, 山东诸城人, 助理研究员, 硕士, 从事水产动物遗传育种学研究, 电话: 0532-85823291-807, E-mail: jak-mail@163.com; 孔杰, 通信作者, E-mail: kongjie@sina.com

雌虾进行实验。养殖交尾雌虾为从对虾养殖池中捕获的交尾雌虾,海捕交尾雌虾包括乳山野生交尾雌虾和韩国野生交尾雌虾。

## 1.2 方法

实验在黄海水产研究所水产遗传育种中心进行,所用海水为沙滤水,盐度 25~29, pH 8.2~8.6。实验用中国对虾在 12 ℃ 水温下驯养 7 d, 每天投喂沙蚕 2 次, 每天的换水量为 1/3, 使对虾适应育种中心条件。实验缸体积为 2.8 m<sup>3</sup> (2 m × 1 m × 1.4 m), 每缸放 5 尾虾, 3 月 16 日开始实验。

### 1.2.1 温差刺激

室内自然水温为 12 ℃。用电加热棒加热海水, 使水温从 12 ℃ 升到 20 ℃ (每天升 2 ℃), 水温升至 20 ℃ 时稳定 3 d, 然后停止加热, 使水温自然下降到 12 ℃, 再稳定 3 d, 如此重复刺激, 直至实验结束。

温差刺激法用于每个实验缸。

### 1.2.2 药物刺激

在温差刺激的基础上, 利用茶籽饼可促使对虾蜕皮的特性, 称取不同质量的茶籽饼, 收集茶籽饼中的药物成分, 然后泼洒到实验缸中进行药物刺激。具体步骤如下: 将不同质量的茶籽饼放入 2 L 容器中, 加入淡水浸泡 24 h, 然后取上层清液, 并分别均匀泼洒到实验缸中; 均匀泼洒后 24 h 内不换水, 以后每天换水 1 次, 换水量为 1/3; 为保证茶籽饼的药物浓度, 每次换水后泼洒一定量茶籽饼上清液 1 次, 使实验缸中茶籽饼质量浓度保持不变。

采用 3 个梯度的茶籽饼质量浓度, 分别为 30, 60, 90 g/m<sup>3</sup>。3 个质量浓度梯度分别设计 2 个重复; 对照组 1 个, 只进行温差刺激, 不泼洒茶籽饼上清液, 亦设置 2 个重复。养殖交尾雌虾和海捕交尾雌虾分别单独进行蜕皮实验。

### 1.2.3 日常管理

以沙蚕为主要饵料, 每天分两次投喂, 早晚各 1 次; 每天换水 1 次, 换水量为 1/3; 采取连续充气的方法以保证充足的溶解氧。

对虾蜕皮后, 移至 14 ℃ 水温下继续培育, 每天投喂沙蚕 2 次, 促其性腺再发育。

### 1.2.4 人工再交尾及受精率、孵化率统计

将蜕皮后性腺再次发育起来的雌虾采用精英移植法进行人工再交尾, 并统计每尾雌虾卵的受精率和孵化率, 所用雄虾来自其他群体的中国对虾。精英移植步骤为: 用酒精棉球擦拭雄虾体表, 然后用手

挤压雄虾第五对步足基部的精英壶腹部, 挤出精英, 小心地剥去精英囊, 剪去瓣状体, 用镊子夹住瓣状体基部, 将整个精英放入撑开的蜕皮后雌虾纳精囊中。

亲虾产卵后, 随机收集 200 粒卵在显微镜下观察, 统计受精率, 以出现受精膜和能进行正常细胞分裂为正常受精指标。受精率计算公式为:  $R_F = (N_F/N_C) \cdot 100\%$ , 式中,  $R_F$  为受精率,  $N_F$  为受精卵数,  $N_C$  为观察的卵子数总数。

产卵后将亲虾捞出, 将水温缓慢升至 16~18 ℃, 进行幼体孵化, 并计算变成无节幼体时的孵化率。孵化率计算公式为:  $R_H = (N_N/N_F) \cdot 100\%$ , 式中,  $R_H$  为孵化率,  $N_N$  为无节幼体数量,  $N_F$  为受精卵数量。

### 1.2.5 数据处理

应用 SPSS 分析软件对所得结果及数据进行  $\chi^2$  检验, 并在  $P < 0.05$  水平上对结果进行差异显著性检验。

## 2 结果

### 2.1 养殖交尾雌虾蜕皮情况

实验设计的温差刺激下各个茶籽饼质量浓度对中国对虾养殖交尾雌虾的蜕皮影响见表 1。

由表 1 可见, 温差刺激和药物刺激均对对虾蜕皮有影响。在未添加药物只在温差刺激的条件下, 对虾蜕皮率为 30%, 且对虾成活率为 100%, 说明温差刺激可以促使中国对虾蜕皮。在温差刺激基础上进行的药物刺激实验中, 3 个茶籽饼质量浓度条件下对虾均出现蜕皮, 且随着药物质量浓度的增加, 对虾蜕皮率也随之增加, 茶籽饼质量浓度为 30 g/m<sup>3</sup> 时, 蜕皮率最低, 为 40%, 当质量浓度达到 90 g/m<sup>3</sup> 时, 蜕皮率最高, 为 70%; 且各个药物质量浓度梯度下的对虾蜕皮率存在差异, 其中, 茶籽饼质量浓度为 0 的对虾蜕皮率与 60, 90 g/m<sup>3</sup> 质量浓度下的对虾蜕皮率存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 30 g/m<sup>3</sup> 质量浓度下的蜕皮率与 90 g/m<sup>3</sup> 质量浓度下的蜕皮率存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

由表 1 还可见茶籽饼质量浓度在 0~60 g/m<sup>3</sup> 范围内, 对虾无死亡, 当质量浓度达到 90 g/m<sup>3</sup> 时, 对虾开始出现死亡, 该质量浓度下对虾的死亡率为 30%。经  $\chi^2$  检验表明, 90 g/m<sup>3</sup> 质量浓度与 0~60 g/m<sup>3</sup> 质量浓度下的对虾死亡率存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

在各实验组中, 出现蜕皮对虾的时间间隔越来越长, 如药物质量浓度为 90 g/m<sup>3</sup> 的 7 号实验组,

第一尾蜕皮对虾出现在实验开始后第 5 天, 第二尾出现在实验开始后第 8 天, 第三尾出现在实验开始后第 14 天, 实验开始后第 27 天出现第四尾蜕皮对虾。

表 1 温差刺激下不同茶籽饼质量浓度梯度对养殖交尾雌虾的蜕皮影响

Tab. 1 Influences of different concentrations of teacake and temperature stimulation on molting of cultured *Fenneropenaeus chinensis*

| 茶籽饼质量浓度 (g/m <sup>3</sup> ) | 温度 (°C) | 池号 | 放虾数 (尾) | 死亡虾数 (尾) | 蜕皮虾数 (尾) | 蜕皮时间 (年-月-日)                                   | 存活率 (%) | 蜕皮率 (%)          |
|-----------------------------|---------|----|---------|----------|----------|--|---------|------------------|
| 0                           | 12~20   | 1  | 5       | 0        | 1        | 2008-03-20                                     | 100     | 30 <sup>e</sup>  |
|                             | 12~20   | 2  | 5       | 0        | 2        | 2008-03-20, 2008-03-22                         | 100     |                  |
| 30                          | 1~20    | 3  | 5       | 0        | 2        | 2008-03-20, 2008-03-23                         | 100     | 40 <sup>bc</sup> |
|                             | 12~20   | 4  | 5       | 0        | 2        | 2008-03-21, 2008-03-22                         | 100     |                  |
| 60                          | 12~20   | 5  | 5       | 0        | 3        | 2008-03-20, 2008-03-23, 2008-03-28             | 100     | 60 <sup>ab</sup> |
|                             | 12~20   | 6  | 5       | 0        | 3        | 2008-03-21, 2008-03-24, 2008-03-30             | 100     |                  |
| 90                          | 12~20   | 7  | 5       | 1        | 4        | 2008-03-21, 2008-03-24, 2008-03-30, 2008-04-11 | 80      | 70 <sup>a</sup>  |
|                             | 12~20   | 8  | 5       | 2        | 3        | 2008-03-21, 2008-03-24, 2008-03-30             | 60      |                  |

注: 上标字母相同者表示组间差异不显著( $P>0.05$ ), 不同者表示差异显著( $P<0.05$ )

## 2.2 海捕交尾雌虾蜕皮情况

各个茶籽饼质量浓度下海捕交尾雌虾的蜕皮情况见表 2。

由表 2 可见, 只有在药物质量浓度为 30, 90 g/m<sup>3</sup> 条件下才有对虾蜕皮, 蜕皮率仅为 20%, 10%, 其他质量浓度下, 均未发现蜕皮虾。

在对虾死亡率方面, 3 个药物浓度梯度及对照

组均有对虾死亡, 且随着药物质量浓度的增加, 对虾死亡率也随之增加, 茶籽饼质量浓度为 0 时, 对虾死亡率最低, 为 10%, 当质量浓度达到 90 g/m<sup>3</sup> 时, 对虾死亡率高达 70%。不同药物质量浓度梯度条件下的死亡率存在差异, 对照组的死亡率与 60, 90 g/m<sup>3</sup> 质量浓度下的死亡率存在显著差异 ( $P<0.05$ )。

表 2 不同茶籽饼质量浓度梯度下中国对虾海捕交尾雌虾的蜕皮情况

Tab. 2 Molting of wild shrimps in different concentrations of teacake

| 茶籽饼质量浓度 (g/m <sup>3</sup> ) | 温度 (°C) | 池号 | 放虾数 (尾) | 死亡虾数 (尾) | 蜕皮虾数 (尾) | 蜕皮时间 (年-月-日) | 死亡率 (%)          | 蜕皮率 (%) |
|-----------------------------|---------|----|---------|----------|----------|--------------|------------------|---------|
| 0                           | 12~20   | a  | 5       | 0        | 0        |              | 10 <sup>b</sup>  | 0       |
|                             | 12~20   | b  | 5       | 1        | 0        |              |                  |         |
| 30                          | 12~20   | c  | 5       | 2        | 1        | 2008-03-23   | 30 <sup>ab</sup> | 20      |
|                             | 12~20   | d  | 5       | 1        | 1        | 2008-03-24   |                  |         |
| 60                          | 12~20   | e  | 5       | 2        | 0        |              | 50 <sup>a</sup>  | 0       |
|                             | 12~20   | f  | 5       | 3        | 0        |              |                  |         |
| 90                          | 12~20   | g  | 5       | 3        | 1        | 2008-03-20   | 60 <sup>a</sup>  | 10      |
|                             | 12~20   | h  | 5       | 3        | 0        |              |                  |         |

注: 上标字母相同者表示组间差异不显著( $P>0.05$ ), 不同者表示差异显著( $P<0.05$ )

## 2.3 人工再交尾结果

将蜕皮后性腺重新发育起来的对虾进行精英移植, 构建不同杂交组合的中国对虾家系。共移植蜕皮后雌虾 22 尾, 其中有 18 尾雌虾的卵正常受精, 平均

受精率为 51.2%, 平均孵化率为 88.6%。

## 3 讨论

中国对虾的蜕皮现象不只是虾体的外部变化, 而是一个复杂的生理现象, 它受其内分泌控制外,

还受盐度、水温、饵料等环境因子的影响。穆迎春等<sup>[1]</sup>研究了盐度波动幅度对中国对虾稚虾蜕皮和生长的影响,结果表明,不同盐度波动幅度对稚虾的蜕皮周期有显著影响。黄国强等<sup>[2]</sup>研究表明,饵料种类对中国对虾的蜕皮次数有显著影响。在本研究中,采用温差刺激对交尾亲虾进行蜕皮实验,并获得了蜕皮对虾,说明 12~20 的温差刺激对中国对虾产卵期交尾雌虾的蜕皮有促进作用。在温差刺激的基础上,本研究对交尾雌虾采用不同浓度的茶籽饼进一步进行药物刺激,随着药物浓度的增加,养殖对虾蜕皮率也随之增加,  $x^2$  检验结果表明,药物浓度为 0 时的蜕皮率与 60, 90 g/m<sup>3</sup> 质量浓度下的蜕皮率存在显著差异;从对虾的死亡情况看,药物质量浓度为 90 g/m<sup>3</sup> 时,对虾出现死亡,且死亡率与其他质量浓度下的死亡率存在显著差异。综合蜕皮率和死亡率这两个方面,对于养殖交尾雌虾,作者认为将茶籽饼质量浓度控制在 60 g/m<sup>3</sup> 左右,可以取得较好的蜕皮效果及存活效果。在蜕皮时间间隔方面,对虾出现蜕皮的时间间隔越来越长,分析原因,这可能由于药物刺激开始时,对虾对药物刺激反应强烈,加快了蜕皮,一段时间后,虾体对药物有了一定的适应性,对药物刺激反应减弱,蜕皮的时间也就相应的延长了。在本研究中,由于亲虾数量有限,致使本实验中每组实验的对虾数量偏少,在以后的实验中,计划通过增加对虾数量及利用不同药物来进一步探讨对对虾蜕皮效果的影响。

在海捕交尾雌虾蜕皮实验中,对虾的蜕皮率不高,只有在茶籽饼质量浓度为 30, 90 g/m<sup>3</sup> 条件下才有对虾蜕皮,蜕皮率仅为 20% 和 10%。但对虾的死亡率随着茶籽饼质量浓度的升高而升高。对于对虾的死亡,作者分析认为,这主要还是由于海捕对虾未经过驯化,对养殖环境适应性较差,加上突然的药物刺激引起对虾的不适应进而导致死亡。

通过对蜕皮雌虾进行人工再交尾,从精英移植

后获得的 18 个家系的受精率和孵化率来看,采用蜕皮后人工再交尾技术是可行的,可以成功建立中国对虾家系。本研究的结果可以为在未交尾雌虾不足情况下,进一步构建不同群体间杂交的中国对虾家系提供指导思路,即首先通过温差刺激和药物刺激方法进行交尾雌虾的蜕皮,然后利用其他群体的雄虾精英移植到蜕皮后失掉精英的蜕皮雌虾纳精囊中,从而获得不同群体间杂交的中国对虾家系,为中国对虾基础群体的家系建立打下基础。

#### 参考文献:

- [1] 穆迎春,王芳,董双林,等.不同盐度波动幅度对中国明对虾稚虾蜕皮和生长的影响[J].海洋学报,2005,27(2):122-126.
- [2] 黄国强,董双林,王芳,等.饵料种类和摄食水平对中国对虾蜕皮的影响[J].中国海洋大学学报,2004,34(6):942-948.
- [3] 康现江,王所安,秦树臻.外源类固醇激素对中国对虾幼体蜕皮和生长影响的初步研究[J].河北大学学报,1995,15(3):44-47.
- [4] 王芳,董双林,董少帅,等.光照周期对中国对虾稚虾蜕皮和生长的影响[J].中国水产科学,2004,11(4):354-359.
- [5] 朱小明,李少菁.甲壳动物幼体蜕皮的调控[J].水产学报,2001,25(4):379-384.
- [6] 房凯.蜕皮激素及其对蟹虾养殖的影响[J].生物学通报,1994,29(5):22-23.
- [7] 许可,唐明,沈璐辉,等.昆虫蜕皮行为的生理生化和分子生物学研究进展[J].昆虫学报,2001,44(2):244-250.
- [8] 罗日祥,王玉英.甲壳类的蜕皮激素[J].海洋科学,1984,8:59-61.
- [9] 罗日祥,王玉英. $\beta$ -蜕皮激素和水龙骨素 B 的混合物对促进对虾蜕皮生长的作用[J].海洋学报,1990,12(3):355-358.
- [10] 蔡生力,臧维玲,戴习林.河口区凡纳对虾亲虾培育及其生长和蜕皮[J].水产学报,2002,26(1):47-53.

(下转第 33 页)