

环境温度和盐度对墨吉明对虾(*Fenneropenaeus merguensis*)胚胎发育的影响*

杨世平 王成桂 黄海立 陈兆明 孙成波

(广东海洋大学水产学院 湛江 524088)

提要 以自然成熟的亲虾为材料, 观察并描述了墨吉明对虾(*Fenneropenaeus merguensis*)从受精卵到幼体孵化出膜的胚胎发育过程。结果显示, 在水温 29°C, 盐度 28 的条件下, 墨吉明对虾整个胚胎发育过程需要 11h 左右。水温和盐度对幼体出膜时间和受精卵的孵化率均有显著的影响($P < 0.05$)。孵化水温从 32°C 下降到 23°C 时, 幼体出膜时间由 555min (9.25h) 增加到 1108min (18.46h)。胚胎发育的最适水温为 26—32°C, 在此温度范围内, 墨吉明对虾的幼体出膜时间与水温呈负相关。胚胎发育的最适盐度 25—35, 在此范围内, 墨吉明对虾的幼体出膜时间和孵化率均无显著差异($P > 0.05$), 说明墨吉明对虾的胚胎发育的盐度范围较广。

关键词 墨吉明对虾; 胚胎发育; 温度; 盐度

中图分类号 S966 doi: 10.11693/hyhz20140500137

生物的早期发育阶段是复杂的生命周期中最为敏感的阶段。其中, 盐度和温度是水生生物自然水体分布范围的主要决定因子, 影响着水生生物的生长与繁殖, 尤其是影响水生生物胚胎发育的最重要的非生物因素。因此, 学者们分别研究了盐度或温度对方斑东风螺(*Babylonia areolata*)、尖紫蛤(*Soletellina acuta*)、长毛明对虾(*Fenneropenaeus penicillatus*)等胚胎发育的影响(施流章, 1981; 刘建勇等, 2005; 黄洋等, 2011)。不同温度和盐度对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)受精卵孵化出膜的时间和受精率有显著影响, 并得出的理想孵化水温为 28—30°C, 盐度为 27.93—33.01(彭昌迪等, 2002)。因此, 在进行水生生物苗种的大规模生产时, 必须要关注和了解盐度和温度等物理性质, 以及该物种对这些性质的要求和适应能力。

墨吉明对虾(*Fenneropenaeus merguensis*)属于十足目(Decapoda)、枝鳃亚目(Dendrobranchiata)、对虾科(Penaeidae)、明对虾属(*Fenneropenaeus*), 广泛分布

于我国东南沿海, 以及亚洲和澳洲的热带和亚热带海域中。它具有个体大、生长快、肉质细嫩、滋味鲜美的特点, 我国很早就对其进行了人工养殖。吴琴瑟(1975)就针对墨吉明对虾的产卵、孵化、胚胎发育、幼体培育等进行了研究。吴琴瑟等(1985)还研究了墨吉明对虾育苗期疾病的药物防治技术。彭文国等(1996)研究了 pH 值、盐度、氨氮浓度变动情况下幼体的耗氧量的变化。近年来, 由于凡纳滨对虾进口亲虾的价格节节攀升、而养殖成功率却不断下降, 严重影响对虾养殖效益。广东省湛江对虾种苗协会建议开展墨吉明对虾的人工繁殖和养殖技术研究, 以期能替代部分凡纳滨对虾的养殖, 优化我国的对虾养殖结构。Hoang 等(2002a)研究了墨吉明对虾在池塘养殖条件生长、性腺成熟和产卵。国外学者还对其性腺催熟、产卵条件、病毒感染、小规模人工育苗等开展了相关的研究(Hoang *et al*, 2002b; Naik *et al*, 2002; Wang *et al*, 2002; Zacharia *et al*, 2002, 2004b), 以期能实现墨吉明对虾的规模化养殖。有关温度和盐度对墨吉明对

* 科技部星火计划重点项目, 2010GA800008 号; 广东海洋大学引进人才启动经费, 1312254 号。杨世平, 博士, 高级工程师, E-mail: ysp20010@sina.com

通讯作者: 孙成波, 博士, 教授, E-mail: scb248@126.com

收稿日期: 2013-09-13, 收修改稿日期: 2014-01-25

虾胚胎发育影响也有报道,但其研究的温度、盐度范围较窄。因此,本文对温度和盐度对墨吉明对虾胚胎发育的影响进行研究,为开展墨吉明对虾的人工繁殖、育种等研究提供理论依据,促进其养殖业的健康发展。

1 材料与方法

1.1 亲虾来源与用水

本实验所用墨吉明对虾为湛江海区采捕自然成熟的亲虾,挑选个体大、性腺饱满的雌虾。自然海水经沉淀、砂滤,强氯精消毒、曝气后,再用 5×10^{-6} 的 ETDA 二钠盐消除重金属离子。

1.2 胚胎发育观察

将亲虾放入 1m^3 的黑色产卵桶中让其自然产卵,产卵桶上加盖黑色塑料膜遮挡光线。每 10min 观察桶内产卵情况,一旦发现产卵,立即移走亲虾。在水温为 $27.5\text{—}27.8^\circ\text{C}$ (自然水温)、盐度为 28、微沸腾的充气环境下进行孵化。从发现产卵开始,根据胚胎发育情况随时用吸管吸取受精卵或胚胎在显微镜下观察,记录胚胎不同发育阶段的特征,并对不同发育阶段的胚胎进行拍照,直至幼体出膜。

1.3 温度对胚胎发育的影响

取受精卵置于事先准备好的装有 1L 干净海水的 2L 塑料桶中,置于 23°C 、 26°C 、 29°C 、 32°C 、 35°C 温度下孵化。每个温度设 3 个平行组,每组 100 粒受精卵,盐度均为 28。为了保证受精卵能悬浮在水中,每个实验组均进行充气,充气量为微沸腾状态。分卵的过程在 10min 内完成,以减少受精卵在原有温度条件下胚胎发育的影响。观察统计在不同温度条件下受精卵的孵化率和幼体出膜时间,为保证各平行组胚胎的充分孵化时间,在观察到幼体出膜 2h 后进行孵化率的统计。温度实验控温装置采用白色泡沫箱内装淡水水浴的方式进行,高温组(29°C 、 32°C 、 35°C)采用缸内电子恒温器进行加热,低温组(23°C 、 26°C)采用冰袋降温,所有实验桶均放置温度计,以保证控温的准确性。

1.4 盐度对胚胎发育的影响

受精卵在装有 1L 干净海水的 2L 塑料桶中进行孵化。盐度实验组也设 5 个梯度,依次为 15、20、25、30、35,温度为 $27.0\text{—}27.5^\circ\text{C}$ (小桶内的自然水温)。每个盐度梯度设有 3 个平行组。保证微沸腾的充气量,分卵的过程在 10min 内完成。观察统计在不同温度条件下的孵化率和幼体出膜时间。为保证每个平行组胚

胎的充分孵化时间,在观察到幼体出膜 2h 后进行孵化率的统计。高盐度组(30, 35)采用海水精进行调节,低盐度组(15, 20, 25)采用经消毒、暴气处理的自来水进行调节,盐度采用手持式折光盐度计进行测定。

1.5 主要观测指标及数据处理

孵化时间是指从受精卵开始发育到幼体出膜所经历的时间。孵化率是指受精卵经孵化后出膜的幼体总数与受精卵总数的比率。最适孵化温度(盐度)范围是指孵化率超过 80%,幼虫孵化出膜后活力正常的实验组的温度(盐度)范围。所得数据均用平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,用 Excel 2003 和 SPSS13.0 软件对数据进行拟合回归方程和单因素方差分析(ANOVA)和多重比较进行统计分析,并在 $P < 0.05$ 水平上对结果进行差异显著性检验。

2 实验结果

2.1 墨吉明对虾的胚胎发育过程

受精卵 墨吉明对虾的受精卵,呈椭圆,直径为 $280\text{—}300\mu\text{m}$ 。在产出 10min 后,见突起的卵膜,同时见到第 1 次和第 2 次成熟分裂时排出的第 1 极体、第 2 极体以及多余的精子(图 1a)。

卵裂 受精卵发生正常的完全均等卵裂。第 1、2 次卵裂产生的分裂球,可在同一平面观察到,其均等性特别显著(图 1b, 图 1c)。第 3 次卵裂后产生 8 个基本等大的细胞,因其呈现明显的螺旋卵裂特征,在显微镜能同时观察到 6 个细胞(图 1d)。在以后的第 4、5、6 次卵裂分别产生 16、32 和 64 细胞,从显微镜下可以观察到的胚胎边缘的细胞来看,其卵裂球的大小基本一致(图 1e, 图 1f, 图 1g)。从第 1 次分裂产生 2 细胞时起至第 6 次分裂产生 64 细胞,平均每次分裂的时间为 14.4min。

囊胚期 从第 7 次卵裂开始,卵裂后细胞形成一个完全封闭的囊胚腔,胚胎进入囊胚期,此期胚胎仍为圆形,在显微镜下能观察胚胎边缘由细胞分裂产生的分裂球(图 1h)。

原肠期 胚胎的植物极端稍变扁平,其他细胞开始内陷,原肠腔逐渐形成。在显微镜下不能明显观察到胚胎边缘的分裂球,可明显观察到内陷处的细胞分裂球(图 1i)。

肢芽期 原肠胚继续发育,4h 33min 时,观察到胚胎两侧呈现 3 对肢芽凸起,说明胚胎发育进入肢芽期。在显微镜下观察不到胚胎细胞的界线。在该期可清楚看到胚胎外包裹的膜(图 1j)。肢芽期发育时间

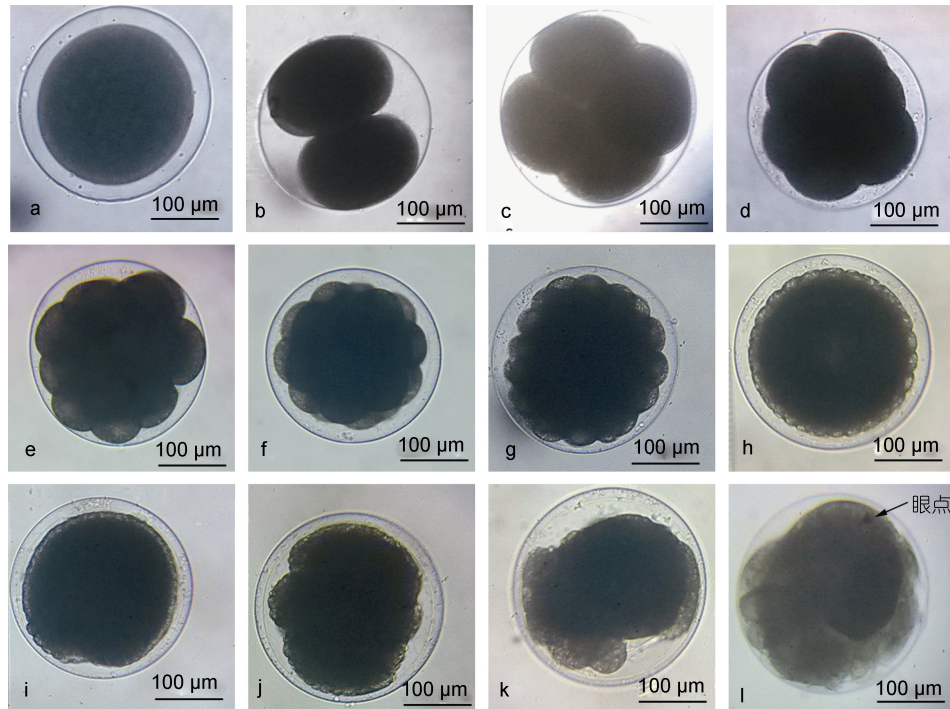


图 1 墨吉明对虾胚胎发育各期的形态

Fig.1 The morphologies of *F. merguensis* embryos in each development stage

a. 受精卵; b. 2 细胞期; c. 4 细胞期; d. 8 细胞期; e. 16 细胞期; f. 32 细胞期; g. 64 细胞期; h. 囊胚期; i. 原肠期; j. 肢芽期; k. 膜内无节幼体期; l. 膜内无节幼体期(眼点)

较长, 从不同角度观察胚胎的形态差异较大。肢芽期的发育时间约 2h 42min。

膜内无节幼体 7h 15min 时, 观察到胚胎的 3 对附肢末端出现刺状刚毛, 标志着胚胎发育进入膜内无节幼体期(图 1k)。随着胚胎的发育, 头部中央出现了 1 个棕色眼点(图 1l)。发育到 10h 59min 时, 观察膜内无节幼体的附肢能抖动。在 11h 50min 时, 幼体破膜而出。膜内幼体发育时间约 4h 35min。

2.2 温度对墨吉明对虾胚胎发育的影响

从表 1 可以看出, 水温对墨吉明对虾的幼体出膜时间和孵化率有显著的影响($P < 0.05$)。水温高于 35°C 的实验组, 胚胎发育至囊胚期后陆续死亡, 少数胚胎

发育到膜内无节幼体期, 但不能出膜。水温在 23—32°C 之间胚胎能发育至膜内无节幼体期, 且幼体能顺利出膜。水温为 32°C 的实验组, 幼体出膜时间最短 555min, 孵化率为 $92.67\% \pm 1.53\%$, 幼体活力也正常。水温为 23°C 的实验组, 幼体出膜时间最长 (1108.00 ± 49.11)min, 比水温为 32°C 的实验组的幼体出膜时间增加了 553min, 且各平行组间幼体出膜时间差较大, 达 96min, 孵化率也仅为 $65.33\% \pm 5.51\%$ 。26°C 组孵化率最高为 $96.67\% \pm 1.15\%$, 但 26°C、29°C 和 32°C 组孵化率比较接近, 各组间差异不显著($P > 0.05$)。从孵化率来看, 墨吉明对虾胚胎发育在最适温度范围为 26—32°C。

表 1 不同水温条件下墨吉明对虾胚胎的发育情况
Tab.1 Embryonic development of *F. merguensis* at different temperatures

水温(°C)	幼体出膜时间(min)	孵化率(%)	备注
35	—	0 ^c	大多数胚胎发育至囊胚期死亡, 少数胚胎发育到膜内无节幼体期
32	555.00 ± 0 ^d	92.67 ± 1.53 ^a	胚胎发育同步, 三个平行组同时观察到幼体出膜, 幼体活力正常
29	641.67 ± 2.89 ^c	94.67 ± 2.31 ^a	胚胎发育较为同步, 平行组间观察到幼体出膜时间最大仅为 5min, 幼体活力正常
26	873.33 ± 5.77 ^b	96.67 ± 1.15 ^a	胚胎发育较为同步, 平行组间观察到幼体出膜时间差最大为 10min, 幼体活力正常
23	1108.00 ± 49.11 ^a	65.33 ± 5.51 ^b	胚胎发育同步性较差, 平行组间观察到幼体出膜时间差最大达 96min, 少数幼体活力较差, 不运动

表中同一列数据上标字母不同表示差异显著($P < 0.05$), “—”表示胚体不能正常发育

在 23—32°C 的范围内, 胚胎能正常发育, 幼体出膜时间与水温之间呈负相关关系, 孵化水温(x)与幼体出膜时间(y)存在着多项式函数 $y = 4.1111x^2 - 289.13x + 5590.4$ ($R^2 = 0.9946$)。在最适水温范围内 26—32°C, 受精卵的孵化率与水温之间呈负相关关系。在实验水温范围内, 孵化水温(x)与孵化率(y)也存在着多项式函数 $y = -1.9683x^2 + 109.67x - 1419.8$ ($R^2 = 0.9188$) (图 2)。

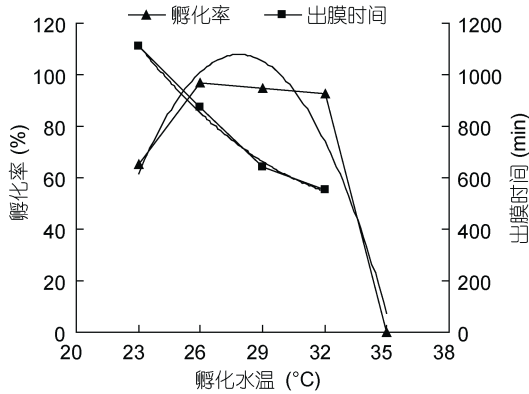


图 2 墨吉明对虾幼体出膜时间、孵化率与水温的关系
Fig.2 Relationship between temperature and the hatching time, hatching ratio of *F. merguensis*

2.3 盐度对胚胎发育的影响

从表 2 可以看出盐度对墨吉明对虾的孵化率有显著的影响($P < 0.05$)。盐度为 15 的实验组少数胚胎发育到囊胚期死亡, 大多数胚胎发育至肢芽期后死亡。盐度在 20—35 之间胚胎均能发育至膜内无节幼体期, 且幼体能顺利出膜。盐度为 20 组的胚胎发育最慢, 幼体出膜时间为 960min, 显著慢于盐度为 25、30 和 35 的实验组($P < 0.05$), 且孵化率也仅为 $57.67\% \pm 7.09\%$, 显著低于盐度为 25、30 和 35 的实验组($P < 0.05$)。在盐度为 25、30 和 35 的实验组, 其幼体出膜时间相当, 同时观察到幼体出膜, 且孵化率均在 90% 以上。表明墨吉明对虾胚胎发育在最适盐度范围为 25—35。统计结果表明, 在盐度为 25、30 和 35 的实验组的幼体出膜时间和孵化率均无显著差异($P > 0.05$), 说明在最适盐度范围内, 盐度对墨吉明对虾的胚胎发育没有显著的影响。

在盐度为 20—35 的范围内, 盐度(x)与幼体出膜时间(y)存在着多项式函数 $y = 0.84x^2 - 51.24x + 1574.6$ ($R^2 = 0.9333$)。在实验盐度范围内, 盐度(x)与孵化率(y)也存在着多项式函数 $y = -0.4438x^2 + 26.537x - 296.59$ ($R^2 = 0.9764$) (图 3)。

表 2 不同盐度条件下墨吉明对虾胚胎的发育情况

Tab.2 Embryonic development of *F. merguensis* at different salinity

盐度	幼体出膜时间(min)	孵化率(%)	备注
35	806 ± 0^a	92.33 ± 3.51^a	胚胎发育同步, 三个平行组同时观察到幼体出膜, 幼体活力正常
30	806 ± 0^a	90.33 ± 5.50^a	胚胎发育同步, 三个平行组同时观察到幼体出膜, 幼体活力正常
25	806 ± 0^a	96.00 ± 2.65^a	胚胎发育同步, 三个平行组同时观察到幼体出膜, 幼体活力正常
20	890 ± 0^a	57.67 ± 7.09^b	胚胎发育同步, 三个平行组同时观察到幼体出膜, 幼体活力正常
15	—	0 ^c	大多数胚胎发育到肢芽期死亡, 少数胚胎发育到囊胚期死亡。

表中同一列数据上标字母不同表示差异显著($P < 0.05$), “—”表示胚体不能正常发育

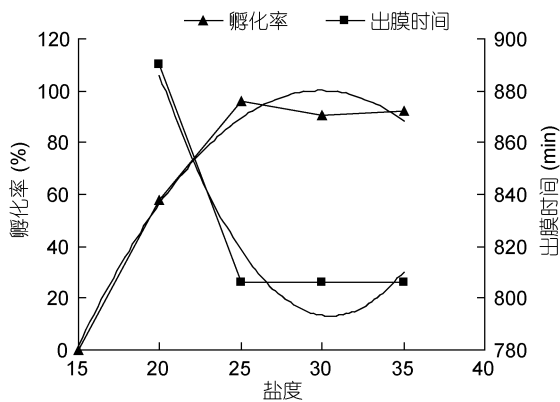


图 3 墨吉明对虾幼体出膜时间、孵化率与盐度的关系
Fig.3 Relationship between salinity and the hatching time, hatching ratio of *F. merguensis*

3 讨论

3.1 温度对墨吉明对虾的胚胎发育

本实验结果表明, 墨吉明对虾胚胎发育最适温度范围为 26—32°C。且在 23—32°C 的范围内, 胚胎能正常发育, 幼体出膜时间与水温之间呈负相关关系。与吴琴瑟(1975)报道结果相似, 该作者认为在适宜的水温范围, 墨吉明对虾受精卵的发育速度随温度升高而加速其胚胎发育适宜水温为 23—32°C。说明水温对墨吉明对虾胚胎发育速度快慢的影响是非常显著的。在对长毛明对虾胚胎发育研究中, 也发现温度对幼体出膜时间有影响, 在一定的水温范围内, 温度越高, 发育越快, 出膜时间越短。在盐度为 28.59,

水温为(28±0.5)°C时的孵化时间为13h 20min, 而水温为(24±0.5)°C的孵化时间为16h 50min(施流章, 1981)。温度对青虾(*Macrobrachium nipponense*)、尖紫蛤、方斑东风螺等的胚胎发育的影响也呈现相似的规律(邹盛希等, 2002; 刘建勇等, 2005; 黄洋等, 2011)。

从实验结果可以看出: 温度既影响墨吉明对虾胚胎发育的速度, 也影响了受精卵的孵化率。水温29.0°C时, 墨吉明对虾的幼体出膜时间为641min, 与凡纳滨对虾(11.8h)相近(彭昌迪等, 2002), 它们都具有热带型对虾的共同点。在26—32°C时, 其孵化率均为90%以上, 而在温度为23°C时, 其孵化率仅为65.33%, 说明作为热带和亚热带品种的墨吉明对虾期胚胎发育的温度要求较高。温度高可缩短孵化时间, 但其孵化率为受到影响, 如果进一步提高了温度, 则会引起胚胎畸形, 产生败育(陈昆慈等, 2008; 黄洋等, 2011)。温度过低时(23°C), 墨吉明对虾的孵化率显著低于最适温度内各组的孵化率($P<0.05$), 说明温度过低, 胚胎发育会产生滞后。

3.2 盐度对墨吉明对虾的胚胎发育

Roberts(1971)报道, 每一个物种都有一个独特的盐度范围适合胚胎发育和孵化。从实验结果来看, 盐度也会影响墨吉明对虾胚胎发育的速度和受精卵的孵化率。盐度为15时, 其胚胎不能正常发育和孵化。在盐度为20时, 幼体的出膜时间为960min, 其孵化率也仅为57.67%, 孵化效果明显差于盐度为25、30和35的实验组。但在盐度为25、30和35的各实验组之间, 其幼体出膜时间和孵化率均没有显著差异($P>0.05$), 说明墨吉明对虾胚胎发育的盐度范围较广。分布和形态结构相似的长毛明对虾胚胎发育时, 同一温度条件下, 各盐度组幼体的出膜时间相差不大(施流章, 1981)。凡纳滨对虾在盐度为25.39—33.01范围内, 最高孵化率为96.4%(盐度为27.93), 但两端孵化率低于墨吉明对虾, 分别为76.7%和82.4%(彭昌迪等, 2002)。说明墨吉明对虾胚胎发育的适宜盐度比凡纳滨对虾宽, 孵化率也较高。本实验的结果显示, 在盐度为25时, 孵化率为96%, 是各盐度组中最高的。而Zacharia等(2004a)在盐度为35, 温度为33°C和29°C时, 取得了墨吉明对虾较高的孵化率(分别为86.5%和86.5%)。与本实验的结果存在一定的差异, 是否与墨吉明对虾亲虾来源不同有关, 还有待进一步研究。水温和盐度对墨吉明对虾胚胎发育速度快慢的都有显著的影响, 但从水温和盐度二者来比较, 影

响发育速度快慢的主要因素还是温度。

致谢 在实验过程中得到冯楚璋、陈旭东和何炳强同学的帮助, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 刘建勇, 卓健辉, 2005. 温度和盐对方斑东风螺胚胎发育的影响. 湛江海洋大学学报, 25(1): 1—4
- 吴琴瑟, 1975. 墨吉对虾人工育苗. 水产与教育, 2: 42—47
- 吴琴瑟, 谢永康, 杨燕忠等, 1985. 药物防治墨吉对虾育苗期疾病提高成活率的试验. 福建水产, (4): 5—10
- 邹盛希, 李永吉, 2002. 温度对青虾胚胎及幼体发育影响的初步观察. 内陆水产, 27(4): 15—15
- 陈昆慈, 朱新平, 杜合军等, 2007. 温度和盐度对宝石鲈胚胎发育的影响. 中国水产科学, 14(6): 1032—1037
- 施流章, 1981. 温、盐度与长毛对虾卵的孵化及无节幼体发育的关系. 水产学报, 5(1): 57—63
- 黄洋, 黄海立, 吕广焯等, 2011. 温度和盐度分别对尖紫蛤胚胎发育的影响. 海洋科学, 35(10): 117—122
- 彭文国, 郑建民, 1996. 墨吉对虾幼体耗氧量的初步研究. 水产科技情报, 23(4): 169—172
- 彭昌迪, 郑建民, 彭国文等, 2002. 南美白对虾的胚胎发育以及温度与盐度对胚胎发育的影响. 上海水产大学学报, 11(4): 310—316
- Hoang T, Lee S Y, Keenan C P *et al*, 2002a. Observations on growth, sexual maturity and spawning performance of pond-reared *Penaeus merguensis*. Aquaculture Research, 33(11): 863—873
- Hoang T, Lee S Y, Keenan C P *et al*, 2002b. Spawning behaviour of *Penaeus (Fenneropenaeus) merguensis* de Man and the effect of light intensity on spawning. Aquaculture Research, 33(5): 351—357
- Naik S D, Belsare S G, Sharangdhar M T *et al*, 2002. Seed production trial of banana prawn (*Fenneropenaeus merguensis*) on small scale in indoor hatchery. Journal of Maharashtra Agricultural Universities (India), 27(3): 296—299
- Roberts M H, 1971. Larval development of *Pagurus longicarpus* Say reared in the laboratory. II. Effects of reduced salinity on larval development. The Biological Bulletin, 140(1): 104—116
- Wang Y T, Liu W, Seah J N *et al*, 2002. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. Diseases of Aquatic Organisms, 52(3): 249—259
- Zacharia S, Kakati V S, 2002. Effect of eyestalk ablation on ovarian maturation in the banana prawn, *Fenneropenaeus merguensis* de man under different environmental conditions. Journal of the Marine Biological Association of India, 45(1): 111—114
- Zacharia S, Kakati V S, 2004a. Optimal salinity and temperature for early developmental stages of *Penaeus merguensis* De man. Aquaculture, 232(1): 373—382

Zacharia S, Kakati V S, 2004b. Ovarian maturation in the banana shrimp, *Fenneropenaeus merguensis* (De Man) by Serotonin

(5-hydroxytryptamine) injection. Indian Journal of Fisheries, 51(1): 11—15

EFFECTS OF ENVIRONMENTAL TEMPERATURE AND SALINITY ON EMBRYONIC DEVELOPMENT OF *FENNEROPENAEUS MERGUIENSIS*

YANG Shi-Ping, WANG Cheng-Gui, HUANG Hai-Li, CHEN Zhao-Ming, SUN Cheng-Bo
(Fisheries College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract Based on natural mature *Fenneropenaeus merguensis*, the whole process of embryonic development from fertilized egg to nauplius was observed and described. The results showed that the duration of embryonic development was about 11h at water temperature 29°C and salinity 28. The hatching time of larvae and hatching ratio of fertilized eggs were influenced significantly by water temperature and salinity. When water temperature fell from 32 to 23, the hatching time increased from 555min (9.25h) to 1108min (18.46h). The optimum water temperature for embryos development was 23—32°C. Hatching time of larvae was inversely related to water temperature in the optimum water temperature range. The optimum salinity for embryos development was 25—35. In the optimum salinity range, no significantly difference in the hatching time and hatching ratio was observed. Therefore, *F. merguensis* embryos could develop in wider range of salinity.

Key words *Fenneropenaeus merguensis*; embryonic development; temperature; salinity