

研究简报

## 南美洲白对虾全人工授精技术研究\*

张伟权 于琳江 童保福 李光友 丁美丽 鲍鹰

何晋伟 王世震<sup>1)</sup> C.R. 阿诺尔特<sup>†</sup> 张仕君<sup>††</sup>

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

(<sup>†</sup>德克萨斯大学海洋研究所, 美国 TX 78373)

(<sup>††</sup>山东省海阳县小滩盐厂 265100)

**提要** 于1988年4月和1991年4月分别从厄瓜多尔和美国引进南美洲白对虾仔虾, 经驯化、养成和室内人工越冬后, 采用单侧眼柄切除手术人工催熟, 以试管授精和人工植荚方法进行该种的繁殖技术试验。结果表明, (1)体长在13—16cm的南美洲白对虾雌虾, 一般在摘眼后的1—2周内开始性腺发育; 产卵量通常为3—10万粒; 产卵后的雌虾卵巢可再次发育, 最高产卵次数高达17次。(2)应用高频电针法取荚的成功率和取荚后雄虾的存活率均为100%; 用上述方法取得的精荚内的精子无需“获能”即可使卵子受精。(3)假裂现象在南美洲白对虾的未受精卵中较为普遍。

**关键词** 南美洲白对虾 全人工授精 假裂 卵巢再次发育

南美洲白对虾(学名为凡纳对虾, *Penaeus vannamei* Boone, 1931) 为当今世界养殖产量最高的3大品种之一, 其自然分布区主要在东太平洋沿岸的暖水水域(从墨西哥至秘鲁北部沿岸), 与中国对虾(*P. chinensis*)相比, 该种虾具有以下优点: (1)繁殖季节长, 可以周年进行苗种生产。(2)营养要求低, 饵料中蛋白质含量在25%—30%时即可满足其正常生长的需要, 而中国对虾一般要求在45%左右。(3)生长快, 适应性强, 可以高密度养殖, 成活率一般在70%以上。(4)离水存活时间长, 因而可望以活虾销售, 产品价值高。(5)肉质鲜美, 加工出肉率达65%以上, 而中国对虾一般不超过60%。鉴于以上优点, 这种虾是世界各地竞相争养的品种。但是, 该种雌性属开放式体外纳精器种类, 其人工繁殖是已知对虾属中难度最大的虾种之一(张伟权, 1990), 这是限制该种向世界各地迅速推广养殖的关键所在。目前, 产虾当地主要还是依靠从海区捕获自然虾苗来从事养殖生产, 或是捕获已交配的亲虾进行半人工育苗(刘文御, 1988)。但由于所捕到的亲虾自然交配率很低, 加上交配的精荚很容易脱落, 因而远远不能满足生产的需要。为了改变世界虾类生产中的这种被动局面, 迅速进行南美洲白对虾人工繁殖的深入研究已经是当

\* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第2189号。中国科学院重大项目, KY85-08-01-01号。

1) 现在山东省海洋药物科学研究所工作。参加工作的还有徐连亭副教授、李茂堂副研究员、刘洪军等同志。承蒙张嘉萌讲师、杨学宋经理以及黄叔平、孙加春、周海鸥、张树荣、肖余生等同志大力协助, 均此一并志谢。

收稿日期: 1992年11月23日; 接受日期: 1993年1月12日。

务之急。

于 1988 年我们首次从美洲引进该虾种仔虾 17 尾以来,经过多年的技术攻关研究,先后突破了种苗的水环境驯化,雌雄对虾性腺人工催熟、性腺发育节律控制,电针法人工安全取荚,精卵质量鉴别以及全人工授精技术等各项关键;先后成功地孵化出了 3 批南美洲白对虾幼体,于 1992 年 8 月完成了实验室条件下该种对虾的幼体培育工作,为开展大规模育苗试验以及今后在我国沿海推广养殖这一优良虾种奠定了理论和实验基础。本文系全人工授精技术的研究简报。

## 1 材料与方法

**1.1 水质条件** 实验用海水经沉淀和活性炭过滤后加 5mg/L EDTA-2Na 及抗生素处理。实验期间海水盐度为  $31 \pm 2$ ,  $DO > 5\text{mg/L}$ ,  $\text{pH} = 8.13 \pm 0.10$ , 氨氮  $< 0.1\text{mg/L}$ , 水温为  $27-30^\circ\text{C}$ 。

**1.2 实验用虾** 亲虾为 1988 年 4 月和 1991 年 4 月分别从厄瓜多尔和美国引进的南美洲白对虾仔虾(体长 0.5—0.7cm),经驯化、养成和室内人工越冬后,分别于 1989 年 7 月和 1992 年 6 月采用镊烫法切除单侧眼柄催熟。此时雌虾体长在 13.2—15.6cm,体重 34.5—56.2g;雄虾体长在 11.4—14.2cm,体重 21.5—41.2g;亲虾的年龄分别为 16 和 17 个月。性腺催熟期间,亲虾饵料以活沙蚕为主。

**1.3 人工取荚** 采用高频脉冲电针法获取雄虾精荚。

**1.4 试管授精** 将精荚置于玻璃研钵中,加注少量 ZYT-92 溶液后充分研磨使精子释出,然后用消毒海水将精液冲洗于 250ml 烧杯中制成精子悬浮液,待雌虾产卵时,将产卵雌虾置于烧杯上方,卵子入水后即可受精。

**1.5 性腺发育节律控制** 按实验需要,采用注射对虾眼柄提取液、调控光照和温度、饵料中添加诱导剂等综合措施,控制雌性对虾性腺的发育速度和产卵时间。

**1.6 人工植荚** 选择当晚将要产卵的性腺充分成熟的雌虾,以干棉球在其纳精器位置上吸湿,用自制的无毒镊子夹取一对精荚,用 Cyanoacrylate 将其胶粘在雌虾第四、五对步足间的纳精器位置上,然后放入容水量为  $0.15\text{m}^3$  的玻璃水族箱内让其产卵、受精。

## 2 结果与讨论

**2.1 电针法取荚效果** 用高频脉冲电针法取荚的结果表明,在一定的电压、电流强度及频率下,对体质健壮的雄虾取荚的成功率和取荚后的雄虾存活率均可达 100%。整个操作过程一般只需 1—2s。因此,该取荚方法与传统的切划法或者挤压法相比,优势十分明显。

**2.2 摘眼对雄虾精荚发育的影响** 体质健壮的雄虾,应用电针法取荚后,新的精荚一般可在 24h 内重新形成,此时在体外可观察到其输精管末端的壶腹(ampoule)内有一对乳白色的新精荚。新形成的精荚经 5—7d 的进一步发育逐渐饱满,成为具有正常功能的成熟精荚。这同 Leung-Trujillo 等(1991)报道的南美洲白对虾精荚再生时间为 2—4d 的结果不太一致,推测为饲养条件不同所致。本实验采用镊烫法摘除雄虾眼柄。结果发现,摘除单侧眼柄的雄虾,其精荚的再生速度、精荚大小和精子数量都明显地高于未摘眼雄虾,但双眼摘除的雄虾的死亡率较高。Leung-Trujillo 等(1985,1991)报道,单侧眼柄摘除可以有效地提高精荚的重量和精子数量,并加速精荚的形成速度。他们的实

验披露,摘除单侧眼柄的雄虾,其精荚内精子的平均数量可达 8 180 万个,而未摘眼和双侧摘眼的分别仅为 3 190 万个和 3 940 万个。他们的研究还发现,摘眼手术并不会引起精子的质量下降。由此可见,摘眼手术能够加速雄虾性腺的发育速度,并增加个体的繁殖能力。

**2.3 卵巢发育** 在水温 27—30℃ 的条件下,以活沙蚕喂养为主,龄期在 16 个月以上的雌虾(体长 13—16cm 范围内),通常在摘除单侧眼柄后的 1—2 周内,卵巢开始发育,3—5d 后成熟并产卵。上述体长范围内的雌虾,每次产卵的数量通常为 3—10 万粒,怀卵量与体形大小呈正相关。这与 Chamberlain 等(1981)的实验结果基本一致。本实验发现,产卵后的雌虾卵巢可再次发育并成熟产卵,最高产卵记录为 17 次,每两次产卵间隔时间最快仅 48h。但是在连续产卵 3—5 次后,通常要伴随一次蜕皮。一般情况下,同一尾雌虾卵巢第一次发育的形态和大小决定了其再次发育的程度(包括卵巢的颜色等),具体表现为其各次的产卵数量基本相近(见表 1)。

表 1 南美洲白对虾摘眼雌虾卵巢重复产卵的数量比较

Tab. 1 Number of eggs per spawn for female *Penaeus vannamei* (eyestalk ablated) during successive spawns

亲虾编号	产卵次序				
	1	2	3	4	5
1	57 000	62 000	64 000	58 000	53 000
2	72 000	72 000	69 000		

**2.4 试管授精与人工植荚的结果比较** 本实验采用试管授精和人工植荚方法,先后培育出了三批南美洲白对虾仔虾,受精率在 2%—22%。有趣的是,同一尾亲虾所产的同一批卵子,采用试管授精和人工植荚的受精率通常比较接近。例如,编号为 No.1 的雌虾(体长 13.5cm)第 1 次产卵的试管授精和人工植荚的受精率均为 2%,而编号 No.2 的雌虾(体长 14.7cm)的第 1 次产卵,采用试管授精和人工植荚的受精率则分别为 21% 和 22%。由此推测,雌虾卵子的质量是影响受精率的关键因子之一。通常情况下,体质健壮的亲虾所产的卵子质量都比较好,而且产卵顺利。而不健康的亲虾则往往出现难产现象(滞产或慢产),有时虽有产卵行为出现但并不一定产卵或仅产出少量卵子。这种情况下产出的卵子往往质量较差。如卵粒大小不均,入水后皮质棒(cortical rod)排放较慢,第 1 极体排出时间较晚,受精膜不高举,卵粒常常向膜的一侧偏贴等等。这种卵子的受精率一般较低或者根本不能受精。即使受精,大多不能正常地完成胚胎发育过程,或者孵出的幼体容易夭折。

本实验条件下试管授精的结果表明,开放式体外纳精器(open thelycum)类型的南美洲白对虾用电针法所取精荚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。这与 Clark 等(1988)所报道的单肢虾(*Sicyonia ingentis*)和国内一些学者(林勤武等,1991)强调的中国对虾的精子必须在雌体纳精囊(seminal receptacle)中进一步成熟即“获能”后才具受精能力的结论是不同的。

**2.5 非受精卵裂——假裂** 假裂现象在对虾未受精卵中的出现尚未见诸正式报道。我们的观察发现,在水温 27℃、盐度为 30 的条件下,南美洲白对虾产卵 2—3h 后,未受精的卵子亦能进行卵裂——假裂。假裂的结果往往出现不均等的 2-细胞、不对称的 4-细胞或不规则的多细胞。有时分裂球在形成过程中出现回缩现象,胞膜界限亦不确定。假裂所形成的不规则实体常偏离轴心,绝无发育成正常胚胎的可能。有趣的是,非受精卵子假裂前的发育相(包括入水后吸水变圆、释放皮质棒、排放极体、卵膜举起以及卵胶囊形成等)与正常的受精卵子在外观上并无明显的差异。见表 2。

表 2 南美洲白对虾受精卵与非受精卵发育的形态学比较<sup>1)</sup>

Tab. 2 Comparison of the developmental patterns of the fertilized and non-fertilized eggs of *P. vannamei*

	皮质棒 释放	排出第 1,2 极体	卵膜 举起	卵胶囊 形成	第 1 次分 裂时间	2-细胞期 形态	4-细胞期 形态	胚胎期
受精卵	✓	✓	✓	✓	入水后 1.5h 左右	分裂球均等	分裂球均等,对称,界限清楚	✓
非受精卵	✓	✓	✓	✓	入水后 2h 以上	分裂球不均等	分裂球不均等,不对称,界限不确定	×

1) 表内✓示出现;×示不出现。

### 3 小结

**3.1** 本实验利用人工驯养的南美洲白对虾亲虾,采用全人工授精技术,成功地培育出 3 批幼苗,受精率在 2%—22% 之间。

**3.2** 水温在 27—30℃、体长在 13—16cm 的南美洲白对虾雌虾,一般在摘眼后的 1—2 周内性腺开始发育,经 3—5d 后成熟并产卵。单尾亲虾一次的产卵量一般在 3—10 万粒。产卵多少与雌虾体形大小呈正相关。

**3.3** 产卵后的雌虾,其卵巢可再次发育。本实验的最高产卵次数高达 17 次。通常卵巢首次发育的大小决定了其以后各次的发育程度。

**3.4** 体质健壮的雄虾,用电针法取荚的成功率和取荚后雄虾的存活率均可达 100%。由此法获得的精荚,其中的精子在生理功能上已完全成熟,而无需在雌虾纳精器内“获能”即可使卵子受精。

**3.5** 假裂现象在南美洲白对虾未受精卵中较为普遍。与受精卵一样,未受精卵子入水后也能正常地释放皮质棒,排出第 1,2 极体,举起卵膜并形成卵胶囊。但不能发育成正常的胚胎。

### 参 考 文 献

张伟权,1990,世界主要养殖品种——南美洲白对虾生物学简介。海洋科学,3: 69—72。

刘文御,1988,南美厄瓜多尔白虾繁殖现况,养鱼世界,12: 26—28。

林勤武、刘瑞玉、相建海,1991,中国对虾精子的形态结构、生理生化功能的研究 I. 精子的超显微结构,海洋与湖沼,22(5): 397—401。

Chamberlain, G. W. and Lawrence, A. L., 1981, Effect of light intensity and male and female eyestalk ablation on reproduction of *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei*, *J. Maric. Soc.*, 12(2): 357—372。

- Clark, Jr. W. H. and Driffin, F. J., 1988, The morphology and physiology of the acrosome reaction in the sperm of decapod, *Sicyonia ingentis*, *Dev. Growth Differ.*, 30(5): 451—462.
- Leung-Trujillo, J. R., and Lawrence, A. L., 1985, The effect of eyestalk ablation on spermatophore and sperm quality in *Penaeus vannamei*, *J. World Maricul. Soc.*, 16: 258—266.
- Leung-Trujillo, J. R., and Lawrence, A. L., 1991, Spermatophore generation times in *P. setiferus*, *P. vannamei* and *P. stylirostris*, *J. World Aquaculture Soc.*, 22(4): 244—251.

## Research Notes

# STUDIES ON THE FULL-ARTIFICIAL FERTILIZATION OF *PENAEUS VANNAMEI*\*

Zhang Weiquan, Yu Linjiang, Tong Baofu, Li Guangyou, Ding Meili,  
Bao Ying, He Jinwei, Wang Shizhen, C. R. Arnold<sup>†</sup>, Zhang Shijun<sup>††</sup>

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071)

(<sup>†</sup>University of Texas, Marine Science Institute, Port Aransas, U. S. A., TX 78373)

(<sup>††</sup>Xiaozan Salt Farm of Haiyang County, Shandong Province 265100)

## ABSTRACT

In this study, conducted from April, 1988 to August, 1992, three groups of *P. vannamei* postlarvae were achieved successfully using full-artificial fertilization technique. The parent shrimps used in tests were introduced from Ecuador and the United States in 1988 and 1992 respectively and grew up in fabric tanks. The fertilization rate of eggs was 2 to 22 percent.

In 27—30°C, health female shrimp of *P. vannamei*, 13—16 cm in body length, began to mature and spawn about 1—2 weeks late after unilateral eyestalk ablation. The number (from 30 000 to 100 000) of eggs per spawning for one female shrimp ranged, closely related to its size. The spawner could mature and spawn again within 3—5 days, with a minimum of 48 h only. It was recorded that a female shrimp matured and spawned up to 17 times in this study. In general, a female shrimp was accompanied by moulting after 3—5 times of successive spawning.

Spermatophore was obtained using electric acupuncture. Both the rate of spermatophore obtaining and the survival of male shrimp were 100%. The sperm obtained directly from ampoules of male shrimp was functionally ripe, i.e. it was capable of fertilizing oocytes without capacitation in thelycum of female shrimp.

The size of the 1st maturation of ovary developing restricts the following size of successive maturation.

It was common for non-fertilized eggs of *P. vannamei* to undergo pseudo-cleavage about 2—3 h late after spawning. Just the same as fertilized eggs, non-fertilized eggs began to exocytose its cortical rod to form the egg jelly soon after spawning into seawater and then release the first and second polar body and elevate the "fertilization membrane".

**Key words** *Penaeus vannamei* Full-Artificial fertilization Pseudo-cleavage Ovary re-development

\* Contribution No. 2189 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.