

电刺激日本沼虾精英排放及人工授精的研究*

邱高峰

(上海水产大学, 200090)

摘 要 应用低压交流电刺激日本沼虾精英排放, 进行精英移植, 取得了人工授精的成功。在电压为4~6V范围内, 刺激虾体精英排放的效果最佳, 而对虾体无伤害; 间隔48小时的电刺激, 可再次获得精英, 且精英中精子的形态结构正常。精英移植人工授精实验结果表明, 经精英移植的16只已完成生殖蜕皮的雌虾中, 10只顺利产卵, 受精率高达71%。

关键词 日本沼虾, 电刺激, 精英排放, 精英移植, 人工授精

随着虾类生殖生物学基础研究的深入, Clark 等对体外人工授精的探索取得了一些进展^[9], 但尚未从技术上完全解决具体操作途径, 难以掌握卵子的生理成熟度。目前, 精英人工移植的方法仍为进行虾类人工授精的主要手段, 得到了众多学者的采纳^[8]。自 Sandifer and Lynn^[11]首次运用电刺激法采取罗氏沼虾精英并用于人工授精后, Kooda - Cisco and Talbot^[10]、Sandifer 等^[12]分别在美洲龙螯虾和对虾也取得了同样的成功。

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*), 俗名青虾, 在我国分布广泛, 是我国经济价值最高的淡水虾之一, 作者^①曾对其雄性生殖系统进行了较系统而深入的研究, 在此基础上, 本文应用电刺激法采取精英, 对精英排放所需的适宜电压条件及其对虾体的影响进行了探讨, 并成功地完成了精英移植人工授精, 为进一步开展日本沼虾的杂交育种及雌核发育等遗传育种工作奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验用虾

日本沼虾采自上海淀山湖和购自上海市图们路农贸市场, 暂养于实验室通气良好的水族箱内, 水温控制在22℃左右, 每天投喂充足食物, 用循环过滤装置保持水体清洁。

1.2 电刺激精英排放

1.2.1 电刺激装置 与 Sandifer and Lynn 使用的电刺激装置基本相同, 由变压器、变阻器和

收稿日期: 1996-07-11。

* 华东师范大学生物系动物学专业肖飞同学参加部分实验工作, 张敏同志帮助拍摄洗印照片, 在此一并致谢!

① 邱高峰, 1994. 日本沼虾雄性生殖系统及多倍体诱导的研究. 华东师范大学博士学位论文。

电极组成,交流电压可调范围为0—30V。此外,电刺激实验时,在电流回路中串联一个万用电表,以便随时显示电流值的变化。

1.2.2 电刺激及精英移植人工授精操作 实验前用吸水纸将实验虾头胸部腹面特别是第五步足雄性生殖孔附近擦干,实验时,左手持虾,右手持电极。用左手大拇指、食指夹住虾体头胸部,中指、无名指和小指及掌心握住虾体尾部,使其固定不致伸屈跳跃,右手将两电极端分别置于两侧第五步足基部(图1),以2—20V交流电压进行电刺激实验。电刺激获取的精英用眼科镊移植到已完成生殖蜕皮但未进行交配的雌虾头胸部腹面(第4、5步足基部之间),在移植前,雌虾头胸部腹面特别是第4、5步足基部之间部位也必须用吸水纸擦干,以便精英能牢固地粘连于雌虾腹面。



图1 电刺激精英排放实验

Fig. 1 The test of electrically induced spermatophore expulsion

1.2.3 精英中精子的结构观察 为了研究电刺激对精英中精子结构是否会造成影响,采用透射电镜观察精子超微结构。电镜制样过程如下:以2.5%戊二醛和1%锇酸(两者均用0.2mol/L磷酸缓冲液配制,pH7.2)双重固定电刺激采集的精英,经酒精系列脱水后,以Epon 812树脂包埋,于LKB-8800超薄切片机上切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,JEM-100Ⅺ透射电镜观察、拍照。

1.2.4 受精率的计算 随机选取抱卵虾5只,每只统计50个卵粒,计算受精率。

2 结果

2.1 精英结构观察

电刺激采集的精英呈连续的索状,无色,在未接触水之前,具有较强粘性。其结构由精子群、精英基质、粘液团和精英壁组成。精英基质中含有大量无序纤丝,其中散布着许多絮状泡和精子。精子呈图钉样,它包括杯状的主体部和由该基部发出的棘突两部分。精核中具膜性泡和囊(图2),以上所有这些结构均与作者从前研究日本沼虾精子及输精管内精英的结构相一致^[5~7],说明电刺激对于精子及精英的正常形态结构并无影响。



图2 电刺激采取的精英中精子超微结构

Fig. 2 The ultrastructure of the sperm in electroejaculated spermatophore

F: 纤丝 Filaments FV: 絮状泡 Flocculent vesicle M: 主体部 Main body S: 棘突 Spike

2.2 不同电压刺激精英排放的实验结果

以不同电压刺激日本沼虾精英排放的实验结果见表 1, 当电压低于 4V 时, 精英基本上不排放; 以 4-6V 电压刺激精英排放的效果最佳, 且对虾体无伤害, 电刺激后的实验个体存活率为 100%; 以 10-20V 电压刺激后, 大多数虾体活动变得迟缓或昏迷, 有的不久便死亡。

表 1 不同电压刺激日本沼虾精英排放实验结果

Table 1 The results of electroejaculation tests with different voltage applied to the freshwater prawn (*Macrobrachium nipponense*)

电压 Voltage (V)	实验个体数 Numbers of sample	精英排放 Electroejaculation		精英排出率 Percentage of spermatophore extrusion	个体存活率 Survival rate (%)
		单侧 One side	双侧 Two sides		
2	8	0	0	0	100
3	10	1	0	10	100
4	15	2	11	86.7	100
5	20	0	20	100	100
6	17	0	17	100	100
10	17	0	17	100	71
20	12	0	12	100	50

2.3 不同间隔时间电刺激精英排放与人工授精实验结果

探讨电刺激精英排放后, 虾体需要多长时间恢复, 方可接受第二次电刺激, 获得有正常受精能力的精英, 在生产实践上具有重要意义。研究结果表明, 两次电刺激间隔时间以 48 小时最为适宜(表 2), 精英排出率高达 90%。这样获得的精英在人工植荚后, 雌体的卵子受精率较高, 经精英移植的 16 只已完成生殖蜕皮的雌虾中, 有 10 只产卵后顺利受精, 平均受精率高达 71%。而间隔 6 小时电刺激不但精英获取率低, 而且人工植荚后雌体的卵子受精率也很低, 仅 20%, 说明精英中精子的数量少。

表 2 不同间隔时间电刺激日本沼虾精英排放及人工授精实验结果

Table 2 The results of electroejaculation and artificial insemination tests for the prawn (*M. nipponense*) at different stimulation interval

刺激间隔时间 (小时) Stimulation interval	实验个体数 Numbers of sample	精英排放 Electroejaculation		精英排出率 Percentage of spermatophore extrusion	平均受精率 Mean percentage of fertilization
		单侧 One side	双侧 Two sides		
6	6	2	0	33.3 %	20 %
12	8	2	2	50 %	31 %
24	20	1	13	70 %	63 %
48	20	0	18	90 %	71 %

3 讨论

3.1 电刺激法采获精英

与镊取法相比, 电刺激法不失为一种较安全可靠采取成熟精英的方法, 只要摸索出适宜的电刺激电压范围, 对虾体无伤害, 且可间隔重复多次采精。美洲螯龙虾电刺激采精的适宜电压为 7-8V^[8], Kooda - Cisco and Talbot^[10]则需用 12V 交流电压才可获得美洲螯龙虾成熟

精英,但他们未进行精英移植人工授精实验。日本沼虾电刺激采精的适宜电压为4-6V交流电压,与Sandifer and Lynn^[11]、Sandifer等^[12]在罗氏沼虾和对虾的实验结果相似,本研究电镜观察结果表明,电刺激获得的精英,其中的精子结构正常,人工授精实验的成功进一步证明了精子具有正常的受精活力。

3.2 体外人工授精与精英移植人工授精

虾类人工授精技术包括2种,即体外人工授精和精英移植人工授精。体外人工授精是指人为地将生理成熟的精子和卵子于体外混合在一起而完成受精的过程。Clark等^[7]以褐对虾为材料,将精子制成悬液,滴入正在进行产卵的雌虾周围水体中,首次获得了虾类体外人工授精的成功,但受精率仅达到10%,且重复性较差。张伟权等^[1]以同样方法也获得了南美洲白对虾体外人工受精卵,受精率在2%-22%之间,李泰煌等^[2]、陆仁后等^[3]则先后以“杀蟹取卵”的方法进行了中华绒螯蟹体外人工授精实验,即待母蟹刚开始产卵时,把蟹杀死解剖取出其体内成熟卵,与精子悬液混合进行人工授精。由于目前尚不能人为控制虾、蟹类卵子的生理成熟度,因此以上这些方法均需要静候母体产卵,十分费时费力,在生产实践中应用受到限制。而精英移植人工授精,只要有性成熟个体,于母体产卵前随时都可进行精英人工移植,无需为了掌握受精时机而长时间等候母体产卵,故在生产上具有较强实用性。

3.3 人工授精与遗传育种

人工授精技术完善与否直接关系到遗传育种研究工作的开展,多倍体诱导、杂交育种、雌核发育等遗传育种无不依赖于人工授精这一关键环节,鱼类人工授精的突破极大地推动了鱼类遗传育种研究的发展。长期以来,虾蟹类生殖过程难以人为控制和操作,体外人工授精技术还不成熟,因此精英移植人工授精对于开展遗传育种研究特别是杂交育种具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 张伟权等,1993. 南美洲白对虾全人工授精技术研究. 海洋与湖沼, 24(4):428-432.
- [2] 李泰煌等,1991. 中华绒螯蟹体外人工授精和培养的细胞学观察. 水产科技情报, 18(1):91-94.
- [3] 陆仁后等,1990. 中华绒螯蟹人工授精的突破. 水生生物学报, 14(3):274-275.
- [4] 邱高峰等,1994. 日本沼虾染色体及其核型的研究. 海洋与湖沼, 25(5):493-498.
- [5] 邱高峰等,1995. 日本沼虾雄性生殖系统的研究: I. 雄性生殖系统的结构及发育. 上海水产大学学报, 4(2):107-111.
- [6] 邱高峰等,1996. 日本沼虾雄性生殖系统的研究: II. 精子的形态及超微结构. 动物学报, 42(4):349-354.
- [7] 邱高峰等,1997. 日本沼虾雄性生殖系统的研究: III. 输精管内精英的结构与形成. 动物学报, 43(1):68-73.
- [8] Aiken, D.E. et al., 1984. Electrically induced ejaculation and artificial insemination of the American lobster *Homarus americanus*. J. Crust. Biol., 4:519-527.
- [9] Clark, W. H. et al., 1973. In vitro fertilization with non-motile spermatozoa of the brown shrimp *Penaeus styceus*. Mar. Biol., 22:353-354.
- [10] Kooda-Cisco, M. J. and P. Talbot, 1983. A technique for electrically stimulating extrusion of spermatophores from the lobster, *Homarus americanus*. Aquaculture, 30:221-222.
- [11] Sandifer, P. A. and J. W. Lynn, 1980. Artificial insemination of caridean shrimp. In: W. H. Clark, Jr., and T. S. Adams, eds., Advance in invertebrate reproduction, 271-188. Elsevier North Holland, Inc.

- [12] Sandifer, P. A. et al., 1984. Electrical stimulation of spermatophore expulsion in marine shrimp, *Penaeus* spp. *Aquaculture*, 6:181 - 187.

ELECTRICALLY INDUCED SPERMATOPHORE EXPULSION AND ARTIFICIAL INSEMINATION OF THE FRESHWATER PRAWN (*MACROBRACHIUM NIPPONENSE*)

Qiu Gaofeng

(Shanghai Fisheries University, 200090)

ABSTRACT Electrical stimulation was successfully used to induce spermatophore expulsion in the freshwater prawn (*Macrobrachium nipponense*), and the electroejaculation spermatophores were transferred to the soft-shell female's sperm receptacle area for artificial insemination. A stimulus of 4 - 6 V was sufficient to provoke ejaculation within 1 - 2 seconds without causing harm to the prawns. Electrical stimulation at 48 hours intervals also result in spermatophore expulsion. The sperms in the spermatophore exhibited normal morphology and ultrastructure. Of the 16 soft-shell females prawns artificially inseminated, 10 had spawned. The most percentage of fertilized eggs reached 71%. The success of artificial insemination via transferring spermatophore could be important in genetic breeding of such animal.

KEY WORDS *Macrobrachium nipponense*, Electrical stimulation, Spermatophore expulsion, Spermatophore transplantation, Artificial insemination