

海水养殖技术资料汇编

第二十一辑

对虾育苗技术与操作规范 及育苗期间病害防治

中国科学院海洋研究所科技情报研究室

一九九三年十二月·青岛

对虾育苗技术与操作规范 及育苗期间病害防治

中国科学院海洋研究所科技情报研究室

一九九三年十二月·青岛

目 录

研究与探讨

- 南美洲白对虾全人工授精技术研究……………张伟权等 (5)
- 孔雀绿对中国对虾的卵和幼体的毒性试验……………樊海平等 (9)
- 洗卵对对虾受精卵孵化率影响的初探……………李天保等 (27)
- 诱导池养斑节对虾的性腺发育与产卵……………林汝榕等 (57)
- 斑节对虾亲虾卵巢催熟若干问题的探讨……………陈明耀等 (65)
- 斑节对虾卵巢发育条件的研究……………钟振如等 (70)
- 应用干容量法(体积法)计量出池对虾苗的研究……………袁为民等 (33)
- 试论斑节对虾人工育苗中的几个问题……………胡佐楚 (78)

育苗技术与规范

- 中国对虾育苗中几项新的技术措施……………潘鲁青 (1)
- 中国对虾工厂化育苗技术规范……………农业部水产司 (105)
- 碱性品绿对中国对虾幼体的毒性试验及在育苗生产中的应用……………刘洪军等 (13)
- 利用人工越冬亲虾大规模育苗的技术……………王振合, 刘桂友 (30)
- 适应南方多品种对虾育苗的育苗场……………林伟雄 (24)

育苗环境与水质管理

- 草虾种虾蓄养之改良型密闭式海水循环系统……………钟国南 (37)
- 高密度对虾育苗水质环境……………宋吉德, 刘昌杰 (42)
- 几种消毒剂对日本对虾受精卵及无节幼体的毒性……………桃山和夫 (53)
- 残饵及代谢物对斑节对虾育苗的影响……………Oseni M. Millamena (76)
- 在育苗系统中放养密度和老化的沉积物对斑节对虾的影响……………Way-Ming Ray等 (80)

育苗期疾病与防治

- 弧菌对斑节对虾虾苗致病性的研究……………王景明等 (23)
- 中国对虾蚤状幼体的细小病毒(Parvovirus)类疾病初检……………范葵红 (23)
- 用“鱼虾安”防治对虾育苗期疾病的试验……………王克行等 (45)
- 高锰酸钾防治对虾幼体聚缩虫病的研究……………王印庚, 韩阿寿 (46)

对虾幼体霉菌病的防治.....宋吉德 (64)

中国对虾镰刀菌病的治疗试验.....战文斌 (99)

对虾育苗生态防病研究.....何筱洁等 (95)

对虾育苗期间细菌性疾病的防治.....樊海平, 张继彤 (101)

对虾、蟹虾和龙虾育苗水体中的细菌学特征.....M.A. Igarashi等 (102)

营养与饵料

中国对虾人工育苗中直接投喂去壳卤虫卵的饵料效果.....蔡含筠等 (19)

虾池肥水培养饵料生物进行对虾育苗试验.....刘昌杰等 (85)

育苗用生物饵料的培养.....濑户明 (88)

饵料室的设计.....王延艺 (87)

几种单胞藻对于对虾蚤状幼体变态的影响.....刘洪军, 徐启家 (91)

“全国人工养殖对虾疾病综合防治及
环境管理学术研讨会论文摘要”选录

关于加强虾病及其控制的建议..... (114)

对虾人工育苗蚤状期或糠虾期大批死亡原因的研究.....乔聚海 (105)

对虾的种质与病害防治.....相建海 (107)

山东省对虾暴发病病原体的研究.....王金星 (119)

简 要 报 道

草虾育苗期链壶霉菌的防治(113) 全国性虾病爆发的主要原因(121) 湛江市水产局采用生态系原理防治虾病(122) 嘉兴市今年罗氏沼虾育苗9455万尾(122)

中国对虾育苗中几项新的技术措施

潘鲁青

(青岛海洋大学)

摘 要

本文针对目前中国对虾苗种生产中幼体病害日益严重的问题,提出了采用卵子消毒和生态防病作为预防疾病的重要手段,并介绍了几种消毒剂用于对虾幼体不同时期的安全浓度,为对虾育苗生产中防治病害提供了几项新的技术措施。

关键词: 对虾育苗 卵子消毒 生态防病 消毒剂

随着海域污染的日益加重,对虾疾病的危害日趋严重,对虾育苗的技术难度也相应加大,同时在对虾育苗过程中,还存在着盲目施药防治疾病的问题,以致往往不能取得较理想的育苗效果,甚至影响养成工作的进行。笔者依据近几年在对虾育苗中的实践经验,对目前对虾苗种生产技术工艺提出几项新的技术措施。

一、卵子消毒

在中国对虾的苗种生产过程中,危害对虾

幼体的病原体种类繁多,从病毒、细菌和真菌以及附着性生物等都有以中国对虾的卵和幼体为宿主的寄生种类,其主要传染源就是亲虾和卵子本身。病原体侵入卵和幼体,并且在育苗池中迅速蔓延,引起疾病的暴发,造成严重的危害。为了消除这一隐患,对卵子进行消毒处理是非常必要的。

卵子消毒的过程是:将收集的卵子→洗卵→用药液浸泡→用干净的海水冲洗,其主要目的是消除病原的来源,切断其传播途径,以减少对虾育苗期疾病的发生。下面介绍几种药物对卵子消毒和对卵子表面细菌杀灭的试验^[1]。

表 1 福尔马林消毒卵子对孵化率的影响

浓度($\times 10^{-6}$) 孵化率(%) 时 间(分钟)	0.0	100.0	200.0	300.0	400.0	500.0
1.0	48	45	52	46	39	31*
3.0	48	42	40	36	29*	23*

注:本试验浓度按粉剂的重量和药液的体积计算, χ^2 检验公式^[2]为 $\chi^2 = \frac{(P_1(1-P_2) - P_2(1-P_1))^2 \cdot N}{(P_1 + P_2)(2 - P_1 - P_2)}$ 其中 P_1, P_2 为对照和试验组的孵化率, N 为放卵总数(本实验 $N=200$)。表中孵化率为两个重复的平均数,其右上角带*号者,表示

χ^2 检验显著。以上说明,同下列表格。

表 2 路哥氏碘液消毒卵子对孵化率的影响

孵化率(%) 时 间(分钟)	浓 度($\times 10^{-6}$)	0.0	100.0	200.0	300.0	400.0	500.0
1.0		53	46	47	42	31*	33*
3.0		53	41	44	43	26*	10*

表 3 孔雀石绿消毒卵子对孵化率的影响

孵化率(%) 时 间(分钟)	浓 度($\times 10^{-6}$)	0.0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0
1.0		41	44	42	35	34	25*
3.0		41	37	37	38	27*	20*

表 4 漂粉精消毒卵子对孵化率的影响

孵化率(%) 时 间(分钟)	浓 度($\times 10^{-6}$)	0.0	1.0	3.0	5.0	7.0	10.0
1.0		43	40	42	44	34	21*
3.0		43	43	41	38	29*	20*

注: 漂粉精(含有效氯67%)为青岛红旗化工厂生产,

表 5 药物消毒卵子1分钟其表面细菌数量的测定

菌落数(个) 培养基名称	药物浓度($\times 10^{-6}$)	福尔马林	路哥氏碘液	孔雀石绿	漂粉精	空 白
		300.0	300.0	1.0	5.0	0.0
2216E		51	42	58	48	220
TCBS		2	4	6	3	131

注: 表中菌落数为2个重复的平均数, 测定方法为药物消毒30粒卵子后, 用10ml无菌海水反复冲洗, 取0.1ml冲洗液接种培养。

试验结果表明, 药物浓度和消毒时间对卵子孵化率都有影响, 但是各种药物在一定浓度范围内对卵子孵化率无显著影响, 同时, 在实验药物浓度下, 对卵子表面的病原生物都有杀伤作用, 而且在以后的连续培养中幼体发育正常, 因此, 对卵子消毒处理是有效的、可行的。

另据陈秀南报道^[3], 斑节对虾 MBV 病毒

病的主要传染源是亲虾, 利用福尔马林和碘伏(一种有机碘)对卵子和无节幼体进行消毒处理可以有效地抑制 MBV 病毒病的发生。日本学者桃山和夫也报道^[4]了几种消毒剂对日本对虾受精卵和无节幼体的毒性以及对危害日本对虾的 BMN 病毒的不活化试验。由此可以看出, 卵子消毒是对虾育苗过程中防治对虾幼体病害的有效手段。另外, 我们还可以根据各种

表 6 卵子消毒对孵化率和幼体成活率的影响

组 别	池 号 (每池60m ³)	卵 子 总 数 (万粒)	无节幼体总数 (万尾)	出 苗 总 数 (万尾)	孵 化 率 (%)	幼体成活率 (%)
对 照	7,8,9	8800	3200	1595	36.36	49.84
试 验 组	10,11,12	7700	2670	1787	34.68	66.93

注：试验组的卵子经 5×10^{-6} 漂粉精消毒 3 分钟。

疾病的危害情况，有针对性地选择某种药物对卵子进行消毒处理，以达到预防疾病的目的。笔者在文登市水产养殖公司对虾育苗场曾做过如下试验，见表 6，有力地说明了这一点。

二、生态防病

所谓生态防病就是利用生物生态学的原理，来控制养殖的水环境，抑制各种病原体的繁殖和传播，有效地防止养殖动物各种病害的发生。

病原体、虾体和环境是产生虾病的三要素，三者相互影响的结果是虾病产生与否的基础。生物生态学观点认为，种间关系是极其复杂的，共同处在同一特定环境中的生物，彼此间的关系有几种类型。一是存在着种间竞争，即两个生态上较接近的种类具有共同的食物，生存空间或水环境等所产生的竞争关系，也就是生物的拮抗作用；其二是宿生和寄生的关

系；另外，还存在共栖关系，捕食和被捕食关系等。根据这一原理，在对虾育苗生产中，为了抑制病原体的繁殖和传播，控制养殖水环境，提高对虾幼体的健康程度，我们可以在水环境中引入某种生物，对幼体有益或无害，与病原生物存在着种间竞争，从而形成平衡的人工生态系统，使对虾苗种生产顺利进行。下面主要从两个方面来说明这个问题。

1. 近年来国内外进行对虾育苗，在育苗池内接种并繁殖单细胞藻类已成为对虾育苗的常规。它既可以作为对虾幼体的饵料，又能利用水环境中有机氮等代谢废物，并能释放出氧，起到净化水质的作用，同时在平衡的微生态环境条件下，通过生物的拮抗作用，抑制了有致病作用微生物的繁殖，有利于对虾幼体抗病力的发挥。因此，利用单细胞藻类可以人为地制造与自然条件相类似的生态环境，起到生态防病的作用。笔者在莱州市对虾育苗场曾做过如下试验。

表 7 单细胞藻类对水质和出苗量的影响

池 号 (每池50m ³)	N ₂ 期接种藻类密度 (万个/ml)	Z ₂ 期中藻类密度 (万个/ml)	Z ₂ 期中氮氮值 (μg/l)	pH	单位水体出苗量 (万尾/m ³)
10	0	0	189	8.261	12
17	0	0	165	8.291	10.4
14	2	6	65	8.359	20.4
16	2	23	2	8.460	28.6

注：试验所用单细胞藻类为纤角毛藻(*Chaetoceros gracilis*)。

2. 光合细菌在对虾育苗上的应用, 已受到人们的普遍重视。它含有丰富的蛋白质和各种维生素, 且不含对动物有毒的成分, 可作为对虾幼体的优质饵料。同时, 在养殖水环境中, 保持一定密度的光合细菌, 可通过生物之间的拮抗作用, 抑制真菌的生长和细菌的繁殖, 起到生态防病的作用。另外, 光合细菌还可去除水中的有机物, 降低水中有害物质的浓度, 净化水质, 为育苗生产创造理想的环境。

三、几种消毒剂在对虾育苗中的应用

目前, 为防止对虾育苗期间日益增多的疾

病, 育苗单位普遍存在着滥施药物的问题, 尤其是盲目加大了抗菌素及各种抗菌药品的用量, 幼体往往长时间处于药液之中, 使幼体产生耐药性, 严重影响了对虾自身的免疫性。同时, 还影响了幼体外壳的发育, 并损伤了内脏器官, 从而造成施药难以控制病害的状况, 并对养成期间用药治疗虾病带来了很大困难。

针对上述情况, 在对虾育苗生产中, 为了有效地控制养殖水环境, 抑制对虾幼体各种疾病的发生, 可以定期的使用消毒剂类药物, 它不仅可杀死细菌, 对病毒、真菌也有较强的杀伤力, 而且还具有作用时间短、失效快的特点, 因此, 可以大大地减少对幼体的损害, 起到防治病害的作用。下面介绍几种消毒剂在对

表 8 几种消毒剂用于对虾幼体不同发育时期的安全浓度

安全浓度 ($\times 10^{-6}$)	幼体期别	幼体		
		蚤状幼体	糠虾幼体	仔 虾
漂 粉 精		0.4	0.6	≤ 0.8
优 氯 净		0.3	0.4	0.5
高 锰 酸 钾		0.5	0.6	0.7
鱼 虾 安		≤ 0.2	≤ 0.4	≤ 1.0

注: 漂粉精为青岛红旗化工厂生产, 含有效氯67%, 主要成分为次氯酸钙。优氯净为山东省滕州市第一有机化工厂生产含有效氯63%, 主要成分为二氯异氰尿酸钠。鱼虾安为山西省临猗县兽药厂生产。上述药物可选择一种, 每天施用。

虾育苗中使用的安全浓度。

使用消毒剂要结合养殖水环境和对虾幼体的具体情况, 并与其它抗菌素相配合。它避免了长期使用抗菌素所产生的耐药性等不良影响, 其防治病害的效果要比单纯依靠抗菌素好得多, 同时, 消毒剂是一类广谱高效, 价格低廉的消毒杀菌药物, 在上述安全浓度下对单细胞藻无杀伤作用, 可与接种单细胞藻的生态防病措施相结合。因此, 消毒剂的应用是对虾育苗生产中一项新的技术手段, 具有较广阔的应用前景, 应引起人们足够的重视。

参 考 文 献

- (1) 孟庆显, 俞开康, 漂粉精防治对虾疾病试验效果. 中国水产学会, 1992年海水养殖病害防治技术资料汇编, 91~94.
- (2) 刘长安, 生物统计学, 青岛海洋大学水产学院内部教材.
- (3) Chen, S. N, et al. Infection Route and Eradication of *Penaeus monodon* Baculovirus (MBV) in Larval Giant Tiger Prawns, *Penaeus monodon*. Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, 1992, 177~184.
- (4) 桃山和夫, 郭文译, 几种消毒剂对日本对虾受精卵及无节幼体的毒性, 1992, 海水养殖 1.2 期合刊, 85~89. 水 产 科 学

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¹⁾ C.R. 阿诺尔特[†] 张仕君^{††}

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

([†]德克萨斯大学海洋研究所, 美国 TX 78373)

(^{††}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。承蒙张嘉荫讲师、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 ± 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 $0.5-0.7\text{cm}$), 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 $13.2-15.6\text{cm}$, 体重 $34.5-56.2\text{g}$; 雄虾体长在 $11.4-14.2\text{cm}$, 体重 $21.5-41.2\text{g}$; 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 Cyaneacrylate 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 0.15m^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¹⁾

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%。由此法获得的精英,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。

海 洋 与 湖 沼

参 考 文 献

第 24 卷 第 4 期

1993 年 7 月

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。

孔雀绿对中国对虾的卵和幼体的毒性试验

樊海平 孟庆显 俞开康

(青岛海洋大学)

摘 要

本文试验了孔雀绿, 对中国对虾的卵和各期幼体的毒性。0.5×10⁻⁶对卵消毒5.0分钟, 以及1.0×10⁻⁶对卵消毒1.0分钟不影响卵孵化。

幼 体 发 育 期	24hLC ₅₀	SC*
无 节 幼 体	65.8×10 ⁻⁹	12.0×10 ⁻⁹
蚤 状 幼 体	113.0×10 ⁻⁹	29.0×10 ⁻⁹
糠 虾 幼 体	100.0×10 ⁻⁹	6.4×10 ⁻⁹
仔 虾	180.0×10 ⁻⁹	16.0×10 ⁻⁹

24小时更换原浓度溶液和未更换溶液组相比较, 安全浓度和48小时LC₅₀均减小。

关键词: 孔雀绿, 中国对虾, 卵, 幼体, 毒性

在中国对虾(*Penaeus chinensis*)苗种生产过程中, 常发生海壶菌和链壶菌入侵中国对虾的卵和幼体, 并且在育苗池中迅速繁殖, 导致生产失败。目前, 国内主要用孔雀绿来预防和治疗, 其用量一直沿用国外文献提出的浓度范围6×10⁻⁹—1.0×10⁻⁸[2][7], 其不同浓度对中国对虾的卵和幼体的毒性, 还缺少定量依据。本文通过试验, 对这一问题进行研究。

材 料 和 方 法

本试验于92年4月至5月, 在潍坊市尖子镇对虾育苗场进行。所用生物材料, 均取自该场越冬亲虾产的卵和培育的幼体, 孔雀绿为上海标本模具厂生产。试验期间的水温与生产上一致, 以适应对虾幼体各发育期的需要。卵孵化为15℃—18℃; 无节幼体为20℃—22℃; 蚤状幼体为22℃—24℃; 糠虾幼体为24℃—25℃; 仔虾为25℃—26℃。pH为8.1, 盐度为30‰。在500ml烧杯中装海水400ml, 调节试验条件后, 选取优质卵和健康、活泼、趋光性强的幼体, 其数量每杯分别为: 卵50粒、无节幼体50尾、蚤状幼体40尾、糠虾幼体30尾、仔虾20尾。每浓度组设2个重复。整个试验分为A、B两组, 试验进行至24小时, A组更换溶液而B组不更换。将盛有卵和幼体的烧杯固定于育苗池中的木框内, 不充气静止培育。幼体适应

SC* 安全浓度 Safe Concentration

1992年9月18日收到初稿, 1992年10月3日收到修改稿。

8 小时后, 用 100.0×10^{-6} 孔雀绿母液, 加到各烧杯中配成所需的不同浓度, 并开始计时。蚤状幼体、糠虾幼体和仔虾每 8 小时投喂适量的蛋黄, 并及时吸取残饵。幼体试验进行 48 小时, 每 24 小时计数死亡幼体。卵未经适应便加入母液。另外, 卵用不同浓度消毒 5.0 分钟以及用 1.0×10^{-6} 消毒不同时间后, 经清洁海水冲洗放入烧杯中孵化。48 小时后计数孵出幼体和死卵。用对数值线性内插法求半致死浓度 LC_{50} ; 安全浓度 $SC = 48hLC_{50}/(24hLC_{50}/48hLC_{50})^2(1)$ 。

结 果

表 1 不同浓度孔雀绿对卵孵化的影响
Table 1 Effects of various concentrations of malachite green on the hatching of eggs

浓度($\times 10^{-9}$)										
组 别	孵化率(%)	0.0	5.0	10.0	20.0	50.0	70.0	150.0	300.0	600.0
		92	87	85	80	77	77	52	22	9
A		87	85	82	79	77	72	51	15	5

说明: 表中孵化率为 2 个重复的平均数
用对数值线性内插法求得 50% 卵孵化的浓度为: A 组 = 157.0×10^{-9} , B 组 = 152.9×10^{-9}

表 2 不同浓度孔雀绿消毒 5min 对卵孵化的影响
Table 2 Effects of 5 min disinfection by various concentrations of malachite green on the hatching of eggs

浓度($\times 10^{-6}$)							
组 别	孵出数(尾)	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
		36	33	20	19	16	9
1							
2		35	35	23	13	9	8

说明: 1、2 组为两个重复。表 3 同。
50% 卵孵化浓度 = 0.9×10^{-6}
用 χ^2 检验 0.0 和 0.5×10^{-6} 浓度组间差异得 $\chi^2 = 0.212$, $n = 1$, $\chi_{0.05}^2 = 3.841$, $\chi^2 < \chi_{0.05}^2$ 所以两组间差异不显著;
检验 0.0 和 1.0×10^{-6} 浓度组间差异得 $\chi^2 = 15.993$, $\chi^2 > \chi_{0.05}^2$, 所以两组间差异显著。

表 3 1.0×10^{-6} 孔雀绿消毒不同时间对卵孵化的影响
Table 3 Effects of disinfection for various durations by 1.0×10^{-6} malachite green on the hatching of eggs

时间(min)						
组 别	孵出数(尾)	0.0	1.0	5.0	10.0	20.0
		32	29	16	3	1
1						
2		22	30	15	0	1

50% 卵孵出的消毒时间 = 2.30 min
用 χ^2 检验 0.0 和 1.0 分钟组间差异得 $\chi^2 = 0.528$, $n = 1$, $\chi_{0.05}^2 = 3.841$, $\chi^2 < \chi_{0.05}^2$ 所以两组间差异不显著; 检验 0.0 和 5.0 分钟组间差异得 $\chi^2 = 21.835$, $\chi_{0.05}^2 = 3.841$, $\chi^2 > \chi_{0.05}^2$ 所以两组间差异显著。

表 4 不同浓度孔雀绿对无节幼体的毒性
Table 4 Toxicity of various concentrations of malachite green to the nauplius larvae

死亡率(%) / 浓度(×10 ⁻⁹)		0.0	5.0	10.0	20.0	30.0	40.0	50.0	60.0	70.0	80.0	90.0	100.0	110.0
24h		10	12	19	25	34	44	43	47	52	52	58	76	88
48h	A	14	24	20	30	34	44	44	54	72	90	96	98	100
	B	14	24	24	33	46	56	57	58	82	96	96	100	100

说明：表中死亡率为两个重复组的平均数以下表相同。

24hLC₅₀ = 65.8 × 10⁻⁹
48hA: LC₅₀ = 55.8 × 10⁻⁹, SC = 12.0 × 10⁻⁹
48hB: LC₅₀ = 33.7 × 10⁻⁹, SC = 2.6 × 10⁻⁹

表 5 不同浓度孔雀绿对蚤状幼体的毒性
Table 5 Toxicity of various concentrations of malachite green to the zoea larvae

死亡率(%) / 浓度(×10 ⁻⁹)		0.0	20.0	40.0	60.0	80.0	90.0	100.0	120.0	140.0
24h		10.0	12.5	28.8	30.3	31.3	41.9	42.5	53.8	61.3
48h	A	10.0	24.4	30.8	32.5	33.8	41.9	44.4	58.8	64.4
	B	12.5	24.8	32.7	47.5	53.8	72.5	87.5	92	92

24hLC₅₀ = 113.0 × 10⁻⁹
48hA: LC₅₀ = 107.4 × 10⁻⁹, SC = 29.0 × 10⁻⁹
48hB: LC₅₀ = 67.2 × 10⁻⁹, SC = 7.1 × 10⁻⁹

表 6 不同浓度孔雀绿对糠虾幼体的毒性
Table 6 Toxicity of the concentrations of malachite green to the mysis larvae

死亡率(%) / 浓度(×10 ⁻⁹)		0.0	20.0	40.0	80.0	100.0	140.0	160.0	180.0	200.0
24h		10	10	40	40	50	53	100	100	100
48h	A	17	17	47	63	73	97	100	100	100
	B	17	23	49	83	93	97	100	100	100

24hLC₅₀ = 100.0 × 10⁻⁹
48hA: LC₅₀ = 45.9 × 10⁻⁹, SC = 6.4 × 10⁻⁹
48hB: LC₅₀ = 40.8 × 10⁻⁹, SC = 5.0 × 10⁻⁹

表 7 不同浓度孔雀绿对仔虾的毒性
Table 7 Toxicity of various concentrations of malachite green to the post-larva

浓度($\times 10^{-9}$)		0.0	40.0	80.0	120.0	160.0	180.0	200.0	240.0	280.0
组 别	死亡率(%)									
	24h	5	25	35	40	45	50	52	60	65
48h	A	10	35	40	50	65	65	70	70	75
	B	10	35	40	50	70	70	75	75	95

24hLC₅₀ = 180.0×10^{-9}

48hLC₅₀ = 120.0×10^{-9}

SC = 16.0×10^{-9}

讨 论

从实验结果看出,为了预防真菌病,用孔雀绿短时间对卵消毒,浓度不宜超过 0.5×10^{-6} ,消毒时间以5.0分钟为好。卵和各期幼体比较,卵对孔雀绿的抗性较强,而各期幼体抗性较弱。因此,建议用孔雀绿对卵消毒以预防真菌病。

孔雀绿,以前主要用于对鱼卵水霉菌的预防,以及对鱼类体表寄生虫的治疗[4][8]。对虾养殖业发展起来以后,又应用于对虾卵和幼体真菌病的防治。现在生产上应用的浓度与我们根据试验结果计算的安全浓度相近(糠虾幼体除外)。由于孔雀绿在不同水质中降解速度不同,在生产上可以根据毒性试验结果使用适合于当地水质的浓度,不需要规定统一的标准。

对虾幼体在各个发育阶段对孔雀绿抵抗力不同,这可能与各发育阶段的生理特性有关。卵、蚤状幼体、仔虾抗性较强,而糠虾幼体抗性弱些,无节幼体最弱。中国对虾蚤状幼体24hLC₅₀与斑节对虾24hLC₅₀ = 112.8×10^{-9} 一致,而糠虾幼体和仔虾24hLC₅₀比斑节对虾同期幼体的24hLC₅₀小得多[8]。这亦说明了不同品种、不同发育期对孔雀绿具有不同的抗性。另外,孔雀绿比亚甲基蓝对各期幼体的24hLC₅₀均要小得多[3],说明其毒性要比亚甲基蓝大得多。生产中在全池泼洒以前要充分稀释,以免形成对幼体产生毒害的局部高浓度。

当前,孔雀绿在美国已禁止应用于渔业,而且在设法除去水中已有的孔雀绿来保护环境[6]。因为它具有致癌性,对卵和幼体使用,会不会在虾体内积累,在虾体内怎样转化,这些问题均要做进一步的研究,同时,我们亦应寻求新的药物来替代它。

海 洋 湖 沼 通 报
1 期 1993年

(上接第29页)

拿出此网箱。100目网箱中始终放一根口径1吋的胶管,不断缓慢注入与孵化池等温的洁净海水,洗卵的污水从水槽溢出。我们认为这种洗卵方法,在现阶段的苗种生产中是可行的。如果操作人员能加强责任心,仔细操作,受精卵的损伤程度还能进一步降低。

海水养殖 1992 年第 1 2 期

参考文献

碱性品绿对中国对虾幼体的毒性试验 及在育苗生产中的应用

刘洪军、徐启家、曲和令、王志刚

(山东省海水养殖研究所)

在对虾育苗生产中除弧菌病外,聚缩虫病和颤藻附生病(包括一些丝状细菌病)亦是生产中的常见病,这两种病虽然不像弧菌病对生产造成的危害那样大,但严重时也极大的影响幼体成活率,给育苗生产造成一定损失,近几年来引起了生产单位和科研单位的重视。我们受碱性品绿治疗养成中聚缩虫病的启发,在今年的育苗生产中,对碱性品绿对中国对虾幼体的毒性和治疗育苗生产中的聚缩虫病,颤藻附生病(包括丝状细菌病,以下同)的效果,进行了试验。

一、试验材料和方法

1、碱性品绿对中国对虾的幼体的毒性试验

用沙滤海水和碱性品绿配制所需浓度的药液 500ml 放入 500ml 烧杯中,每杯放入本所育苗基地培育的健康幼体 10 尾,定时检查,每 24 小时和 48 小时统计数一次。试验期间不充气,不投饵,不换水。水温:蚤状幼体维持在 $24\pm0.5^{\circ}\text{C}$,糠虾幼体和仔虾幼体维持在 $25\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 。

2、碱性品绿对治疗聚缩虫病及颤藻附生病试验

(1)碱性品绿杀死聚缩虫及颤藻的小实验

2# 池水中卤虫壳及污物上附着聚缩虫和颤藻很多,聚缩虫多呈球状附着,颤藻有的呈球状附着,有的自身缠结成球状或分散于水中。取 2# 池原水与碱性品绿配制所需浓度的药液 500ml 放入 500ml 烧杯中,定时检查水中及污物上的聚缩虫及颤藻的存活情况,试验期间不充气,不换水,水温维持在 $25\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 。

(2)碱性品绿治疗颤藻附生病的小试验

5# 池中 M_3-P_2 幼体感染颤藻,严重者附肢被缠结在一起,感染率 100%。用 5 号池水和碱性品绿配制所需浓度的药液 500ml 放入 500ml 烧杯中,每杯放入 M_3-P_2 幼体 30 尾。不充气、不投饵、不换水、定时检查。水温维持在 $25\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 。

(3)碱性品绿治疗聚缩虫病和颤藻附生病的生产性试验。

对检查有聚缩虫或颤藻附着的一些仔虾池子,分几个浓度梯度用药。12 小时换水时,补施换水药量,24 小时换水时施全量。充气,投饵,水温维持在 $25\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 。

以上各试验海水盐度为 29.59—29.79‰,PH 为 8.12—8.40,其他各指标符合《育苗操作规程》要求。

二、试验结果

(一)毒性试验结果

1、对 P_5-7 幼体的毒性试验结果见表 1