

圆口铜鱼人工繁殖及胚胎发育研究

董纯, 陈小娟, 万成炎, 曹恒源, 唐会元

(水利部中国科学院水工程生态研究所, 水利部水工程生态效应与生态修复重点实验室, 武汉 430079)

摘要: 鉴于金沙江梯级电站开发运行后鱼类栖息地减少、洄游通道受阻、自然繁殖受到影响、早期资源量显著下降、种群生存面临危机的现状, 为了保护鱼类种质资源, 通过人工增殖放流是补充其资源量的主要补救措施。利用船体网箱原位活水驯养的圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)亲鱼, 开展亲鱼驯养、人工催产和胚胎发育研究。结果表明, 圆口铜鱼亲鱼在船体网箱活水驯养条件下, 性腺发育成熟, 可用于人工催产。2017 年 6 月 17-30 日, 采用二次注射法人工催产 3 批次, 共产卵约 12 万粒, 在水温 20.5~21.9℃条件下, 针距 8~10 h, 效应时间 18~19 h, 平均受精率 69.3%, 出苗约 5 万尾。圆口铜鱼卵径 1.9~2.2 mm, 卵膜径 6.4~7.2 mm, 胚胎发育过程分为受精卵、卵裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期、器官形成期和出膜期 7 个阶段, 在水温 20.5~22.5℃, 溶氧 7 mg/L 以上条件下, 历时 48~62 h 出膜。研究结果为圆口铜鱼人工繁殖技术提供了参考, 为其规模化人工增殖放流提供了保障。

关键词: 圆口铜鱼; 原位驯养; 人工繁殖; 胚胎发育

中图分类号: Q132 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2019)03-0115-05

圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)属于鲤形目(Cypriniformes)、鮡亚科(Gotioninae)、铜鱼属(*Coreius*), 是长江上游特有经济鱼类(刘乐和等, 1990; 丁瑞华, 1994)。作为河道洄游性鱼类, 其繁殖过程高度依赖于金沙江中下游的特殊生境。随着金沙江梯级电站的开发运行, 圆口铜鱼栖息地减少, 洄游通道受阻, 繁殖受到影响, 早期资源量显著下降, 种群生存面临危机。通过人工增殖放流补充其资源量是保护圆口铜鱼的主要补救措施。近年来, 多家研究机构开展了圆口铜鱼人工繁殖技术研究, 由于其对小瓜虫极其敏感, 驯养成活率低、性腺发育成熟不完全、卵子和精子质量差, 导致出苗较少。

本研究采用船体网箱原位活水驯养圆口铜鱼, 培育用水为长江水, 水温为天然水温, 温差小, 培育船体有孔, 保证与江水交换顺畅, 水交换量较大, 降低了疾病发生率, 培育环境更符合圆口铜鱼的自然生长发育环境。在该驯养模式下, 开展圆口铜鱼繁殖技术和胚胎发育研究, 旨在为圆口铜鱼人工繁殖技术提供参考, 为其规模化人工增殖放流提供了保障, 对圆口铜鱼的种质资源保护具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料鱼

本次试验材料圆口铜鱼来源于长江泸州江段, 采用船体网箱原位活水驯养 6 年左右。驯养期间, 在早晨天亮之前和傍晚天黑之后, 按亲鱼体重的 1%~2% 少量多次投喂配合饲料(粗蛋白 36%、粗脂肪 3%)。驯养亲鱼 104 尾, 尾均重 597.26 g, 全长 370 mm。

1.2 亲鱼挑选

人工催产前, 亲鱼禁食 48 h。先根据亲鱼外部形态特征挑选催产亲鱼, 再依据卵粒和精液的特征判断亲鱼成熟度。雌亲鱼体表粗糙, 腹部膨大, 柔软有弹性, 特别是靠近生殖孔附近较松软, 生殖孔红肿突出, 使用挖卵器伸入生殖孔, 然后向左或向右偏转插入卵巢, 轻轻转动挖卵器, 挖出少许卵粒。如果卵粒饱满, 呈青灰色, 在水中易散开, 说明卵粒成熟, 达到 IV 期, 可作催产亲鱼; 如果卵粒不饱满, 在水中不易散开, 说明卵粒成熟度不够, 不能用以催产。

雄亲鱼胸鳍追星明显, 手感粗糙, 生殖孔微红, 腹部向上, 用手指沿腹部两侧从胸部向生殖孔轻轻挤压, 有乳白色精液流出且在水中快速散开, 则为成熟亲鱼, 可用以催产; 如果挤压只有少量精液流出, 在水中不易扩散, 则说明亲鱼成熟度不足, 不能用以催产; 如果挤压完全没有精液流出, 说明亲鱼还未成熟。

收稿日期: 2018-06-08
基金项目: 圆口铜鱼人工繁殖技术研究(2)(JGJ/024203); 金沙江中游圆口铜鱼人工驯养繁殖技术研究(JS2010/D5)。
作者简介: 董纯, 1986 年生, 女, 助理研究员, 主要从事水生态调查和保护研究。E-mail: dongc1314@163.com
通信作者: 唐会元。E-mail: tanghy@mail.ihe.ac.cn

1.3 人工催产

挑选体重大和性腺发育成熟度高的亲鱼,采用生理盐水配制催产剂,现配现用。催产剂包括促黄体素释放激素类似物(LRH-A₂或LRH-A₃)、鲤脑垂体(PG)和绒毛膜促性腺激素(HCG)。

催产采用二次注射法,催产剂剂量符合下列要求:第一针LRH-A 2~6 μg/kg,雄鱼不注射,第二针PG 4~6 mg + LRH-A 8~14 μg + HCG 800~1 000 IU/kg,根据成熟度,雄鱼采用1/4~1/2雌鱼剂量。注射部位为胸鳍基部无鳞凹陷处,注射时将鱼体浸泡在水中,只露出头部和胸鳍部位,并用毛巾遮住亲鱼眼睛。注射针头与鱼体呈45°,深入胸鳍基部0.5~1.0 cm。

1.4 人工授精

为方便催产操作,首先将待产亲鱼置于浓度为100 g/m³的MS-222中麻醉,待亲鱼呼吸减慢,鱼体侧翻,握于手中无明显挣扎状时,即可采用半干法人工授精。先将雄鱼体表水分擦干,将精液挤入盛有生理盐水的盆中,随即挤入鱼卵,边挤边轻轻摇动授精盆,期间加入适量浓度为5%的葡萄糖和孵化用水继续摇匀,使卵和精子充分接触,之后静置2 min,完成受精过程。

1.5 人工孵化

将受精卵倒入孵化器孵化,受精卵密度为1.1×10⁵粒/m³水体。定时检查孵化器,调节水流并保持充氧,以受精卵轻轻上浮、不堆积缺氧为原则,避免阳光照射。孵化期间,水温维持在20~23℃,溶氧大于7 mg/L;统计受精率,显微观察整个胚胎发育过程。

受精率指鱼卵发育至原肠中期的受精卵数占总卵数的百分比。随机取300粒鱼卵,进行镜检计数。受精率计算公式如下:受精率=正常发育卵数/(正常发育卵数+不正常发育卵数)×100%

2 结果

2.1 催产情况

2017年6月17-30日,从驯养亲鱼中挑选24尾雌鱼和36尾雄鱼,采用二次注射法催产3批次,具体人工繁殖情况见表1。共产卵约12万粒,针距8~10 h,效应时间18~19 h,出膜时间48~62 h,相对繁殖力为12.05~13.61粒/g,平均受精率69.3%,出苗5万余尾,培育1 cm鱼苗约4.5万尾,培育3 cm鱼苗约3.5万尾。整个催产期间,水温20.5~21.9℃。

表1 圆口铜鱼人工繁殖情况

Tab.1 Information of the artificial propagation of *Coreius guichenoti*

日期	亲鱼尾数 (♀/♂)	催产剂 剂量	针距/ h	效应 时间/h	产卵量/ 粒	催产率/ %	出膜 时间/h	受精率/ %	出苗数/ 尾	催产水温/ ℃
2017-06-17	4/8	LRH-A ₃ 16 μg+PG 6 mg+ HCG 1000 IU/kg	10	19	40000	100	62	85	30000	20.5~21.6
2017-06-27	10/16	LRH-A ₃ 16 μg+PG 6 mg+ HCG 1000 IU/kg	9	18	50000	70	52	50.5	20000	20.8~21.7
2017-06-30	10/12	LRH-A ₂ 10.5 μg+PG 4 mg+ HCG 1000 IU/kg	8	18	30000	100	48	72.5	5000	21.1~21.9

2.2 胚胎发育

圆口铜鱼产漂流性卵,成熟卵粒饱满,呈圆球形,青灰色,卵径1.9~2.2 mm,吸水膨胀后卵径为6.4~7.2 mm。孵化期间,水温20.5~22.5℃,溶氧7 mg/L以上,出膜时间48~62 h。圆口铜鱼胚胎发育过程分为受精卵、卵裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期、器官形成期和出膜期7个阶段,胚胎发育时序和过程见图1和图2。

3 讨论

3.1 船体网箱原位活水亲鱼驯养的特点

近年来,我国很多机构纷纷研究圆口铜鱼人工繁殖技术,通过增殖放流保护该物种而拥有成熟亲

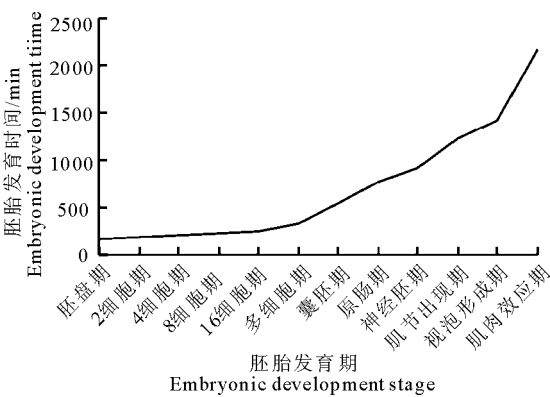
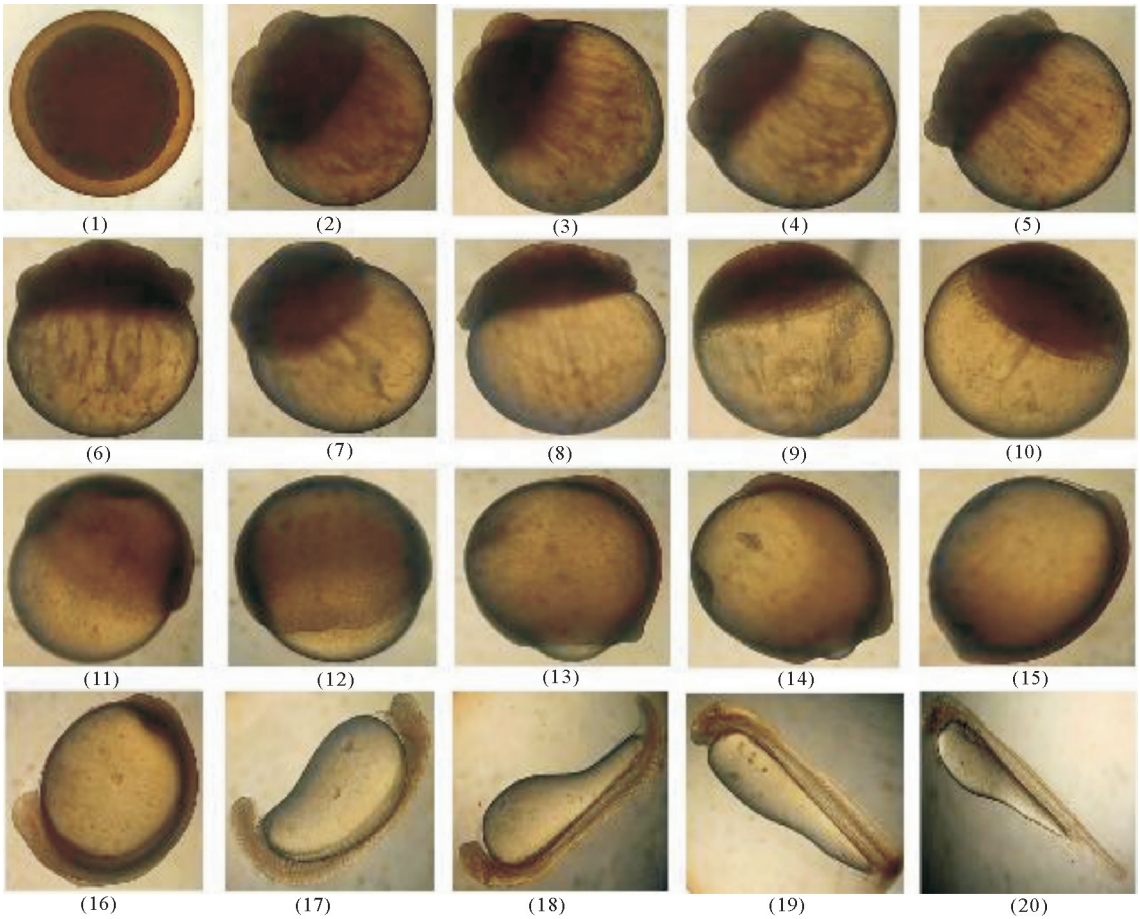


图1 圆口铜鱼胚胎发育时序

Fig.1 Embryonic development of *Coreius guichenoti* over time



(1)受精卵;(2)2 细胞期;(3)4 细胞期;(4)8 细胞期;(5)16 细胞期;(6)多细胞期;(7)囊胚早期;(8)囊胚中期;(9)囊胚晚期;(10)原肠早期;(11)原肠中期;(12)原肠晚期;(13)神经胚期;(14)胚孔封闭期;(15)肌节出现期;(16)尾芽期;(17)肌肉效应期;(18)心脏搏动期;(19)孵出期;(20)初孵仔鱼

图 2 圆口铜鱼胚胎发育过程

(1) fertilized egg; (2) 2-cell; (3) 4-cell; (4) 8-cell; (5) 16-cell; (6) morula; (7) early blastocyst; (8) middle blastocyst; (9) late blastocyst; (10) early gastrula; (11) middle gastrula; (12) late gastrula; (13) neurula; (14) blastopore closed; (15) appearance of myomere; (16) end teeth; (17) muscle effector phase; (18) heart-beating; (19) hatching; (20) larval

Fig.2 Digital images of *Coreius guichenoti* embryonic stages

鱼,是成功催产获得大规模鱼苗的前提条件。针对圆口铜鱼亲鱼驯养,前期采用过室内循环水驯养,但死亡率高,大部分亲鱼性腺发育至 II 期或 III 期,催产获得的卵子和精子质量低下、出苗少,且体质弱、易死亡。本研究采用船体网箱原位活水驯养圆口铜鱼,水深 2.2 m,流速 0.78 m/s,并且网箱四周和底部之间均有 1.5 cm 缝隙,亲鱼性腺可发育至 IV 期,卵子和精子高质量,出苗多。研究表明,通过船体网箱原位活水驯养是获取圆口铜鱼成熟亲鱼的有效方式,具有长江自然水环境,圆口铜鱼栖息于船箱底部,受外界环境干扰少,水体流动性强,水体交换量大,粪便和病菌等不易聚积,感染小瓜虫等疾病几率小,圆口铜鱼驯养成活率高,通过营养强化性腺可发育至成熟,亲鱼可用于人工催产繁殖。这与刘红萍和周波(2018)得出的结果一致。

3.2 催产剂和催产时间对人工催产效果的影响

人工催产前,通常采用注射外源激素诱导促进雌鱼排卵,但催产剂种类和剂量因鱼而异,适量的催产剂可促进卵母细胞同步成熟,过量则会导致过熟而难产(刘筠, 1993; 刘丽丽, 2010)。近年来,水生生态所圆口铜鱼人工催产使用的催产剂主要包括 LRH-A₂、LRH-A₃、PG 和 HCG。2015 年,催产亲鱼性腺处于 III 期,注射 LRH-A₂ 32 μg + PG 7 mg + HCG 1 200 IU / kg,受精率仅 10%;本研究催产亲鱼性腺处于 IV 期,第一批(6 月 17 日)催产效果最好,注射 LRH-A₃ 16 μg + PG 6 mg + HCG 1 000 IU/kg,受精率达 85%。可见,亲鱼性腺成熟度是保障人工催产效果的重要因素。另外,本研究第三批(6 月 30 日)受精卵发育至尾芽期时,大部分受精卵的卵膜皱缩破裂,导致出苗很少。对比两

次催产情况,第一批次挤出的精液呈浓稠的乳白色,而第三批次亲鱼性腺过熟,精液明显稀释很多,这可能与没有把握好最佳催产时间和效应时间有关,导致卵和精子过熟、质量下降,因此胚胎发育后期出现卵膜皱缩,提前破裂现象,具体原因有待进一步研究。由此可见,催产剂、催产时间和亲鱼性腺成熟度是成功实现圆口铜鱼人工催产的关键。

3.3 不同鱼类的卵膜径与其繁殖策略的关系

漂流性鱼卵的卵膜径一般为 3.0~7.0 mm,因种属不同,其卵膜径存在显著差异。如银鲈(*Squalidus argentatus*)、蛇鲈(*Saurogobio dabryi*)的卵膜径为 3.0~4.0 mm,属于小型鱼卵;翘嘴鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)、赤眼鲮(*Spualio barbatus curriculum*)和花斑副沙鳅(*Parabotia fasciata Dabry*)的卵膜径为 4.0~5.0 mm,属于中型鱼卵;草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、铜鱼(*Coreius heterodon*)和圆筒吻鲈(*Rhinogobio cylindricus*)的卵膜径为 5.0~6.5 mm,属于大型鱼卵(周春生等,1980)。漂流性卵从卵产出到仔鱼具备溯游能力,一般需要 30~40 h,按河流平均流速推算,流程在 400 km 左右。圆口铜鱼的卵径为 1.9~2.2 mm,卵膜径为 6.4~7.2 mm,为大型鱼卵,大卵含有较多的卵黄,延长从内源性营养向外源性营养阶段的转变,避免仔鱼因摄食不足而死亡,从而提高仔鱼成活率(Leblanc et al, 2016)。另外,较大的卵周隙,一方面可在漂流期间有效抗击外界环境的冲击,为胚胎发育提供安全的内部环境;另一方面扩大了卵体积,使其密度减小,实现漂流发育,鱼卵吸水后的一系列生理变化是其繁殖策略的重要体现(Lake, 1967; 管敏等, 2015)。

3.4 卵径大小和孵化水温对鱼类胚胎发育的影响

在水温 20.5~22.5℃、溶氧 7 mg/L 以上孵化条件下,圆口铜鱼受精卵出膜时间为 48~62 h。有研究表明,鱼卵的大小会影响鱼类胚胎发育速度,鱼卵越大,其胚胎发育速度越慢(Bobe & Labbe, 2010; Leblanc et al, 2016)。胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)卵径为 1.8~2.1 mm,水温 17.6~19.4℃时,胚胎发育历时约 148 h(万远等, 2013);云南盘鮈(*Discogobio yunnanensis*)卵径为 2.05~2.20 mm,水温 17~19℃时,胚胎发育历时 168 h 30 min(赵健蓉等, 2017);而圆口铜鱼卵径为 1.9~2.2 mm,水温 20.5~22.5℃时,胚胎发育历时 48~62 h。这种差异说明胚胎发育时长不仅与鱼卵大小有关,孵化水温也是影响鱼类胚胎发育的主要

因素(谢仰杰等, 2001)。

圆口铜鱼的胚胎发育速度在一定程度上取决于温度。本研究发现,圆口铜鱼受精卵孵化水温为 20.5~21.6℃时,经 62 h 出膜;孵化水温为 21.1~21.9℃时,经 48 h 即可出(表 1)。这与长鳍吻鲈(*Rhinogobio ventralis*)的胚胎发育类似,孵化水温为 16.4~17.2℃,经 72 h 出膜,孵化水温为 17.6~18.3℃,经 56 h 出膜(管敏等, 2015)。由此可见,在一定温度范围内,水温升高可以促进鱼类的胚胎发育,水温降低则会延缓发育。

参考文献

- 丁瑞华, 1994. 四川鱼类志[M]. 成都: 四川科技出版社.
- 管敏, 肖衍, 胡美宏, 等, 2015. 长鳍吻鲈胚胎发育和仔鱼发育[J]. 渔业科学进展, 36(4): 57-64.
- 刘红萍, 周波, 2018. 圆口铜鱼的生物学研究现状、问题与对策[J]. 养殖世界, 31(1): 37-38.
- 刘筠, 1993. 中国养殖鱼类繁殖生理学[M]. 北京: 农业出版社.
- 刘乐和, 吴国犀, 王志玲, 1990. 葛洲坝水利枢纽兴建后长江干流铜鱼和圆口铜鱼繁殖生态[J]. 水生生物学报, 14(3): 205-215.
- 刘丽丽, 2010. 半刺厚唇鱼的性腺发育及人工繁殖研究[D]. 福州: 福建师范大学.
- 万远, 占阳, 欧阳珊, 等, 2013. 胭脂鱼胚胎及仔鱼早期发育观察[J]. 南昌大学学报(理科版), 37(1): 78-82.
- 谢仰杰, 翁朝红, 管延华, 等, 2001. 温度对花尾胡椒鲋胚胎发育的影响[J]. 集美大学学报(自然科学版), 6(2): 138-143.
- 赵健蓉, 解崇友, 蔡瑞钰, 等, 2017. 云南盘鮈人工繁殖及胚胎发育初步观察[J]. 南方水产科学, 13(5): 124-128.
- 周春生, 梁秩桑, 黄鹤年, 1980. 兴修水利枢纽后汉江产漂流性卵鱼类的繁殖生态[J]. 水生生物学报, 7(2): 175-188.
- Bobe J, Labbe C, 2010. Egg and sperm quality in fish[J]. General and Comparative Endocrinology, 165(3): 535-548.
- Lake J S, 1967. Rearing experiments with five species of Australian freshwater fishes II. Morphogenesis and ontogeny[J]. Marine & Freshwater Research, 18(2): 155-176.
- Leblanc C A, Kristjansson B K, Skulason S, 2016. The importance of egg size and egg energy density for early size patterns and performance of Arctic charr *Salvelinus alpinus*[J]. Aquaculture Research, 47(4): 1100-1111.

(责任编辑 万月华)

Artificial Propagation and Embryonic Development of *Coreius guichenoti*

DONG Chun, CHEN Xiao-juan, WAN Cheng-yan, CAO Heng-yuan, TANG Hui-yuan

(Key Laboratory of Ecological Impacts of Hydraulic-Projects and Restoration of Aquatic Ecosystem of Ministry of Water Resources, Institute of Hydroecology, Ministry of Water Resources and Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430079, P.R.China)

Abstract: *Coreius guichenoti* is an economic fish species endemic to the upper Yangtze River. Cascaded hydropower development on the Jinsha River has severely altered the habitat and migration routes of *C. guichenoti*, resulting in a sharp decline of early life stage populations and threatening wild populations. It is thus necessary to conserve *C. guichenoti* germplasm resources and artificial propagation and release is the primary means available. In this study, we describe and illustrate the propagation technology and embryonic development of *C. guichenoti*. Parental fish, collected from the Luzhou section of Yangtze River, were reared in-situ in a cage. Then, from June 17 – 30 of 2017, 24 females and 36 males were selected for artificial spawning and propagation. The gonads matured during in-situ domestication and spawning was induced three times. Fish were injected twice, at an interval of 8 – 10 h, and the response time was 18 –19 h, at a water temperature of 20.5 –21.9℃. A total of 120 000 eggs were obtained, with the relative fecundity of 12.05 – 13.61 eggs/g. Artificial fertilization was carried out by the semi-dry method and the average fertilization rate was 69.3%, resulting in a total of 50 000 fries. The eggs were pelagic, ovate and steel grey, with an average diameter of 1.9 – 2.2 mm and swelled to 6.4 –7.2 mm. Zygotes were incubated at 20.5 –22.5℃ and DO>7 mg/L. Embryonic development required 48 – 62 h and occurred in seven stages: fertilized egg, cleavage, blastula, gastrula, neurula, organ development, and release of newly hatched larvae from the membrane. This study provides a technical reference for large-scale artificial propagation of *C. guichenoti*.

Key words: *Coreius guichenoti*; in situ domestication; artificial propagation; embryonic development