

厚颌鲂人工繁殖初报及胚胎发育观察

王剑伟 谭德清 李文静

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要:从长江支流泸州龙溪河收集野生厚颌鲂, 直接或经驯养后进行人工繁殖, 并对胚胎发育过程进行了描述, 旨在为厚颌鲂资源的增殖与开发提供参考。3次未催产的人工授精实验1次成功, 受精率12.0%; 16次催产试验共注射了32尾雌鱼, 平均催产率62.5%; 12次有效催产的平均受精率62.1%, 孵化率44.7%。每千克鱼注射3mgPG + 3 μ gLRH-A₂, 可以获得较好的催产效果。胚胎发育过程可分为18个时期, 温度对发育进程具有显著的影响。

关键词:厚颌鲂; 人工繁殖; 胚胎发育

中图分类号: S965.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2005)02-0130-07

厚颌鲂(*Megalobrama pellegrini*) 隶属鲤科、亚科、鲂属, 俗称乌鳊, 仅分布于长江上游干流及支流中。由于厚颌鲂资源量小, 其相对狭窄的分布区将部分受到三峡工程的影响, 资源的保护与增殖问题, 值得人们重点关注。此外, 厚颌鲂曾是长江上游名贵鱼类之一, 具有优良的养殖性状, 是一种有待于开发的经济鱼类。

关于厚颌鲂的文献较少, 除刘焕章等对其种群遗传结构进行了初步研究外^[1], 其他文献多限于分类性状描述、分布等记述^[2-4]。长江三峡工程生态与环境监测系统特有鱼类实验站从2001年起对厚颌鲂的生活环境、生物学特点、繁殖生态学、驯养与人工繁殖等进行了较系统的调查研究, 并初步报道了它的含肉率、肌肉生化成分和能值^[5]。现将人工繁殖与胚胎发育观察方面的工作进行总结, 旨在为厚颌鲂资源的增殖与开发提供参考。

1 材料和方法

1.1 亲鱼 2001—2002年收集于四川省泸州市龙溪河, 根据亲鱼性腺发育的情况, 或者立即进行人工授精, 或者暂养后进行催产, 或者跨年度驯养后进行人工催产。人工催产所选择的雌性亲鱼腹部膨大、饱满, 雄性亲鱼体表粗糙并能挤出精液。雌鱼体重50—1600g, 平均422g, 多数雌鱼350—450g; 雄鱼体重150—600g, 平均319g。

1.2 催产、授精与孵化 参考家鱼人工繁殖的技术^[6], 先后试用了多种剂型、剂量(表1)。鱼类催产灵1号为广州中南生物技术有限公司生产, 促黄体释放激素A₂(促排卵素2号, LRH-A₂)由上海丽珠东风生物技术有限公司生产, 绒毛膜促性腺素(HCG)由宁波市激素制品厂生产, 鲤脑垂体(PG)为市售干品。亲鱼注射后放入0.75—1.5m³的小池中, 悬挂棕片或筛绢做巢, 给予池中约30L/min的流水。采用干法或半干法人工授精, 受精卵粘附在用40目筛绢制作的粘卵板上, 置于直径1.5或2.0m、水深约0.5m的便携鱼池(商品名: 鱼盘)中充气孵化。

1.3 观察和取样 人工授精时取部分卵于培养皿中以观察其发育, 并与在鱼盘中孵化的卵进行比较。胚胎发育的连续观察在体视显微镜下进行, 用300万像素数码相机从目镜口拍摄照片, 用5%的中性福尔马林溶液固定部分样本备查。为了便于观察, 用胰蛋白酶对部分受精卵进行了去膜处理。以样本中50%胚胎发育到某个时期的时间作为该时期的发育时间。

2 结果

2.1 人工繁殖

2.1.1 未催产的人工授精 共进行了3批未催产的人工授精实验。2001年4月25日8:45, 用3雌2雄进行人工授精, 结果未获得受精卵。2002年4月

收稿日期: 2003-12-24; 修订日期: 2004-11-10

基金项目: 国务院三峡工程建设委员会办公室生态环境项目经费资助(合同号: SX2004-017)

作者简介: 王剑伟(1967—), 男, 重庆市人; 博士, 副研究员; 主要从事鱼类生态学与鱼类实验动物研究

致谢: 参加部分工作的还有严大明、但胜国、王明清、马 等同志, 乔 博士协助图版制作, 特此致谢

表 1 厚颌鲂催产情况 (2001—2003 年)
Tab. 1 Result of induced spawning of *M. pellegrini*

日期 ^①	水温 ^② (℃)	亲鱼数 ^③	剂量 ^④	效应时间 ^⑤ (h)	产卵数 ^⑥	催产率 ^⑦ (%)	受精率 ^⑧ (%)	孵化率 ^⑨ (%)	备注 ^⑩
2001.04.27	19.8	1♀1♂	1000 单位催产灵	—	0	0	0	0	亲鱼未经驯养, 1 针
2001.05.01	24.0	2♀2♂	5mgPG	18	50000	50	0	0	亲鱼驯养 1 年以上, 1 针
2001.05.09	22.0	3♀4♂	5mgPG + 5μgLRH-A ₂ + 1700IU HCG	10	50000	33.3	0	0	雌鱼未经驯养, 2 针, 针距 10h
2002.04.15	24.0	1♀1♂	4mgPG	12	未统计	100	未统计	未统计	亲鱼驯养 1 年以上, 1 针, 自产, 获得卵苗
2002.05.04	21.0	2♀4♂	3mgPG + 2.5μgLRH-A ₂ + 1250IU HCG	—	0	0	0	0	亲鱼未经驯养, 2 针, 针距 8h
2002.05.04	21.7	4♀5♂	11mgPG + 6μgLRH-A ₂ + 2500IU HCG	—	0	0	0	0	亲鱼未经驯养, 3 针, 针距 12h, 24h
2002.05.06	22.0	1♀2♂	3mgPG + 2.6μgLRH-A ₂ + 1500IU HCG	11.5	2800	100	0	0	亲鱼驯养近 1 个月, 2 针, 针距 8h, 半产
2002.05.20	20.0	1♀1♂	3.7mgPG + 5μgLRH-A ₂	12.5	60000	100	95.0	17.5	亲鱼驯养 1 个月左右, 2 针, 针距 11h
2002.05.25	20.5	2♀2♂	3.7mgPG + 5μgLRH-A ₂	—	0	0	0	0	亲鱼未经驯养, 2 针, 针距 10h
2003.05.15	24.0	1♀1♂	3mgPG + 3μgLRH-A ₂	8	6500	100	86.2	19.6	亲鱼驯养 1 年以上, 2 针, 针距 10h
2003.05.15	24.0	1♀1♂	3mgPG + 5μgLRH-A ₂	8		100			
2003.06.02	21.4	1♀1♂	3mgPG + 3μgLRH-A ₂	10	43500	100	91.2	94.8	亲鱼驯养 1 年以上, 2 针, 针距 8h
2003.06.12	21.0	1♀1♂	3mgPG + 3μgLRH-A ₂	10.5	4000	100	70.0	71.4	亲鱼驯养 1 年以上, 2 针, 针距 8h, 半产
2003.06.17	21.1	1♀1♂	3mgPG + 3μgLRH-A ₂	12	35000	100	72.00	87.3	亲鱼驯养 1 年以上, 2 针, 针距 8h
2003.06.30	24.8	8♀3♂	3mgPG + 3μgLRH-A ₂	8	103500	87.5	90.0	82.0	亲鱼驯养 1 年以上, 2 针, 针距 8h
2003.07.14	27.1	2♀3♂	3mgPG + 3μgLRH-A ₂	6.5	13000	50	92.6	99.0	亲鱼驯养 1 年以上, 2 针, 针距 10h

注: 2003 年 5 月 15 日两种剂量催产, 数据合并统计。Note: Data from two batches of induced spawning under different dose on May 15 2003 were treated together
①Date; ②Water temperature; ③Number of parent fish; ④Dose per kg fish; ⑤Latency (h); ⑥Number of eggs collected; ⑦Spawning rate; percentage of spawned female; ⑧Fertilization rate; ⑨Hatching rate; ⑩Note

8 日在龙溪河边收到 4 月 7 日晚产卵时被捕获的厚颌鲂亲鱼, 用 5 尾雌鱼及多尾雄鱼进行干法人工授精, 结果均未获得受精卵。2002 年 5 月 14 日, 收购到 5 月 13 日晚集群产卵时被捕获的厚颌鲂, 其中 5 尾雌鱼已流卵, 11:00 进行干法人工授精, 共挤出约 33000 粒卵, 受精率仅 12.0%。由于厚颌鲂往往在前半夜集群产卵, 到次日上午获得亲鱼并进行人工授精时已相距 12h 左右, 卵子过熟可能是造成人工授精不能成功或低受精率的主要原因。

2.1.2 人工催产 2001—2003 年共进行了 16 次催产试验, 平均催产率 62.5%。16 次试验中 12 次催产促使雌鱼排卵, 9 次试验获得了受精卵(表 1)。12 次有效催产的平均受精率为 62.1%, 孵化率 44.7%, 共获得受精卵 30.0 万粒, 孵出鱼苗 16.8 万尾。

从表 1 可以清楚地看出, 2003 年 7 次催产中 6 次采用了相同的剂量, 且效果是比较稳定的: 催产率 $89.6\% \pm 20.0\%$, 受精率 $83.6\% \pm 10.0\%$, 孵化率 $79.7\% \pm 29.1\%$ 。据此可总结出厚颌鲂人工繁殖的方法: 即采用 2 针注射法催产, 针距 8—10h; 催产剂量为每公斤鱼注射 3mgPG+3 μ gLRH-A₂, 其中第一针注射 1/6, 第二针注射 5/6, 雌雄剂量相同: 在水温 21℃时效应时间为 10—12h, 水温 24—25℃时 8h 左右, 水温 27℃时仅 6.5h。

2.2 胚胎发育

2.2.1 卵 厚颌鲂的卵球形, 淡黄色。卵粒遇水后吸水膨胀, 20—30min 后卵膜径达到最大。测量了 3 批受精卵, 卵膜径 1.53—1.80mm, 平均 1.64mm \pm 0.06mm; 卵黄囊径 1.17—1.45mm, 平均 1.31mm \pm 0.07mm。厚颌鲂卵膜较厚, 半透明, 膜具有较强的粘性, 属于粘性卵。

2.2.2 胚胎发育过程 厚颌鲂的胚胎发育过程与四大家鱼、鲂等淡水硬骨鱼类相似^[7-8]。需要说明的是, 厚颌鲂的肌肉效应出现时间较早, 在尾鳍出现期即可观察到, 到晶体形成期时已非常明显, 故未将肌肉效应期单独列为一个时期(表 2)。

2.2.3 温度对胚胎发育的影响 2001—2003 年观察发现, 在 19.5—28.8℃的范围内厚颌鲂胚胎均可正常发育, 但不同温度条件从受精至孵出的时间有明显的差异。在水温 19.5—21.0℃时, 胚胎发育过程持续 68h50min; 水温 21.0—21.9℃时需要 55h10min; 水温 22.5—23.8℃时需要 42h50min; 而水温 26.0—28.8℃时仅需 31h40min。表 2 同时列出了两组不同温度下的胚胎发育时序, 由此可以看出温

度对胚胎发育进程的影响不是“均匀”的, 即温度对各发育期的影响程度是不同的。初步分析表明, 低温对神经胚期、尾泡期、尾鳍出现期及孵出期等的延迟作用较大。

3 讨论

3.1 关于厚颌鲂的人工繁殖

由于厚颌鲂天然捕捞量很小、亲鱼被捕后不易驯养成活, 因此其人工繁殖有一定难度。作者通过 3 年的实验, 突破了厚颌鲂的人工繁殖, 并从实践中总结出了进行厚颌鲂人工繁殖时需要注意的问题。

厚颌鲂被捕捞后不像团头鲂那样经常冲跳、挣扎, 其应激反应主要表现为呼吸急促, 有时出现抽搐, 进而直接导致死亡, 因此在亲鱼的运输、驯养及催产操作时要格外小心。此外, 在本实验中, 未经驯养的亲鱼, 均未取得催产成功(表 1)。因此, 刚从河流中收到的亲鱼, 由于亲鱼因捕捞有伤或者较强的应激反应, 人工繁殖的效果不理想, 最好经过一段时间的驯养后再进行催产。

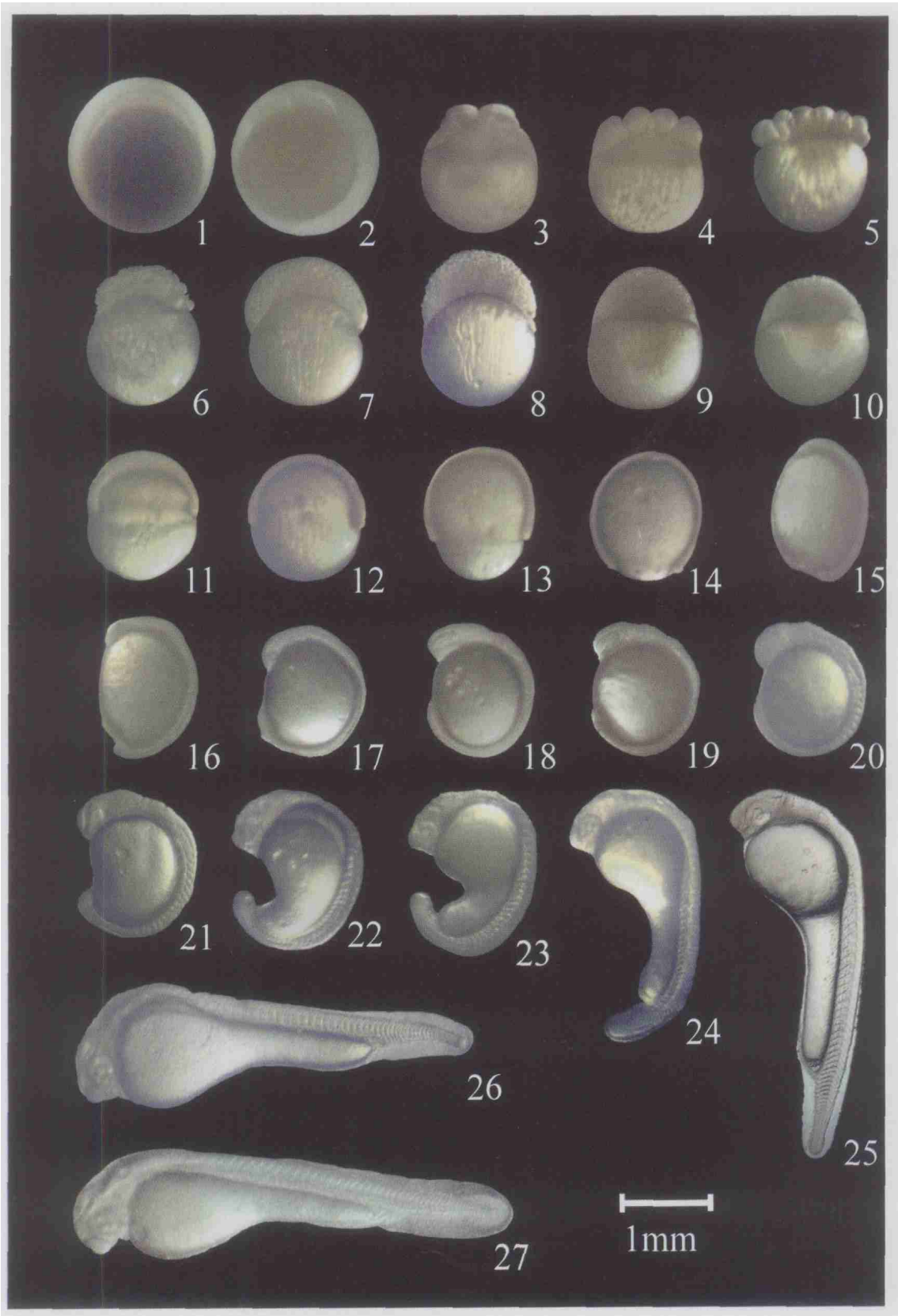
由于时间和亲本数量的限制, 本文未系统地进行催产剂组成及剂量筛选的实验, 但从表 1 中可以看出, 注射一种催产剂、两种混合催产剂、三种混合催产剂, 都可能促使雌鱼排卵, 其中, 每公斤亲鱼注射 3mgPG+3 μ gLRH-A₂ 是经过多次重复实验证明的、能获得较好催产效果的剂量。由于催产剂量可能因为水温、亲鱼性腺发育的程度等而略有变化^[6], 作者建议厚颌鲂催产以上述剂量为基础, 根据具体情况略有增减。

厚颌鲂鳞片较大、比较容易脱落, 如果操作不当, 在捕捞、运输、人工繁殖操作时都可能使亲鱼受伤。在采精、卵时最好用柔软的湿布包裹, 用手指轻压挤精或卵, 手指不能在鱼体上滑动。此外, 应尽量缩短亲鱼在小池、水泥池中的暂养时间; 产后亲鱼, 最好立即用抗菌素处理后放入较大的塘中。

3.2 关于厚颌鲂的产卵条件

2003 年 4 月初, 作者将性腺发育良好的亲鱼转入 150m² 的流水池中饲养, 池水日交换量为池容的 4 倍以上, 而且流量和短期的水位因降雨等发生过明显的变化。但直到 6 月底清池时, 亲鱼自产的情况一直没有出现, 而邻近池中的鲤、鲫、团头鲂都出现了自产的情况。因此, 厚颌鲂产卵的环境条件要求可能较高。野外调查发现, 厚颌鲂自然产卵多发生在 4—5 月, 多见于小型电站排水口。在自然条件下, 厚颌鲂产卵前水温有所升高, 河水也明显上涨;

表 2 厚颌鲂的胚胎发育					
Tab. 2 Embryonic development of <i>M. pellegrini</i> (Temp. 1: 21.0—21.9℃, Temp. 2: 22.5—23.8℃)					
发育时期 Stage		发育时间 Developing time (h: min)		发育期简要特点 Brief characteristics of each stage	图版号 Figure ordinal
		Temp. 1	Temp. 2		
1. 胚盘期	One-cell	0: 45	0: 40	原生质向动物极流动, 形成胚盘, 其高度接近卵黄囊直径的 1/3	1
2. 卵裂					
2 细胞	2-cell	1: 00	0: 57	胚盘经裂为大小相等的 2 个细胞	2
4 细胞	4-cell	1: 10	1: 07	第二次分裂沟与第一次垂直, 4 个分裂球大小相等	3
8 细胞	8-cell	1: 35	1: 20	分裂球排成 2×4	4
16 细胞	16-cell	2: 00	1: 30	分裂球排成 4×4	5
32 细胞	32-cell	2: 20	1: 44	分裂球排成 4×8, 分裂球团最大宽度接近卵黄囊径	6
64 细胞	64-cell	2: 40	2: 00	分裂球大小不均一, 排列也不甚整齐	
128 细胞	128-cell	3: 00	2: 20	第一次水平分裂	
桑椹期	Morula stage	3: 50	2: 50	分裂球越来越小, 细胞团隆起呈桑椹状	7
3. 囊胚	Blastula				
囊胚早期	Early blastula	4: 20	3: 15	分裂球界限模糊, 细胞团隆起较高, 囊胚腔出现	8
囊胚中期	Mid blastula	5: 55	4: 10	囊胚层变薄, 高度降低, 卵黄囊原生质网不明显	9
囊胚晚期	Late blastula	6: 55	5: 18	囊胚表面细胞下包, 胚胎呈正圆球形	10
4. 原肠	Gastrula				
原肠早期	Early gastrula	8: 05	6: 40	胚层下包近 1/2, 胚环出现	11
原肠中期	Mid gastrula	9: 55	7: 50	胚层下包 2/3, 胚盾出现	12
原肠晚期	Late gastrula	10: 55	8: 40	下包约 3/4, 背唇明显, 卵黄囊呈倒梨形	13
5. 神经胚期	Neurula	12: 15	9: 28	神经板雏形出现, 头端隆起明显, 卵黄栓外露	14
6. 胚孔封闭期	Closure of blastopore	13: 43	10: 55	胚层下包结束, 胚孔封闭	15
7. 肌节出现期	Appearance of myomere	16: 45	13: 10	胚体环抱卵黄, 胚体中央出现 1—3 对肌节	16
8. 眼基期	Optic rudiment	18: 05	13: 50	眼原基出现, 肌节 4 对	17
9. 眼囊期	Optic vesicle	18: 45	14: 45	眼囊扩大成长椭圆形, 肌节约 7—8 对	18
10. 尾芽期	Tail bud	20: 15	16: 35	尾端略突出, 脑区扩大, 肌节 9—11 对	19
11. 听囊期	Otic capsule	21: 10	17: 20	听囊雏形出现, 嗅板明显, 肌节 15—17 对	20
12. 尾泡期	Tail vesicle	23: 32	18: 25	尾部变得宽大, 尾泡出现, 肌节 18—20 对	21
13. 尾鳍出现期	Appearance of caudal fin	26: 07	19: 28	尾鳍原基形成, 胚体拉长, 胚体出现间歇性颤动, 每分钟 15—20 次	22
14. 晶体形成期	Formation of eye lens	27: 25	20: 30	眼晶体已经形成, 尾部进一步增长, 肌节 25 对左右, 肌肉效应明显	23
15. 心脏原基期	Heart rudiment	29: 00	22: 50	心脏原基出现, 肌节 30 对, 卵黄囊前 1/2 呈球状, 后 1/2 呈棒状	24
16. 耳石出现期	Appearance of otoliths	30: 02	23: 40	出现 1 对耳石, 卵膜内胚胎环抱卵黄囊超过一周, 胚胎不时扭动	25
17. 心脏搏动期	Heart pulsation	34: 55	28: 15	位于头部腹下方、卵黄囊前下方的心脏开始搏动, 每分钟 75—80 次, 肌节 42—43 对	26
18. 孵出期	Hatching	55: 10	42: 50	胚胎在膜内不停颤动、转动, 直至出膜。初孵仔鱼全长 4.8mm, 肛后长占全长的 32%, 身体呈浅黄色, 眼下有一黑点。头部未伸直, 与体部垂直。心脏位于卵黄囊正前端, 心率每分钟 106 次左右。卵黄囊前部椭圆形, 后部为棒状, 并向后逐渐变细。仔鱼静卧水底, 极少活动。	27



图版 I

厚颌鲂的胚胎发育(图版说明见正文表 2)

Embryonic development of *M. pellegrini*. See Table 2 in context for details

在厚颌鲂产卵的地方—小型电站排水口, 水位上涨了 0.5m 左右, 流速一般达 1.5—2m/s。与鲂的情况相似, 厚颌鲂在水显著流动的地方产卵。

在人工繁殖实验过程中, 共观察到 5 次厚颌鲂催产后自产的情况: 1 次卵全部自产, 4 次产出部分卵时即进行人工授精。除 1 次在用棕片制作的巢上发现部分卵粒外, 厚颌鲂将卵产到了池壁或者池底, 即对悬挂于水面下的基质没有选择性。在泸州龙溪河厚颌鲂的产卵场, 其底质主要是块石和岩石, 虽然消落带有少量草, 但产卵的次日未发现草上粘附鱼卵。由此看来, 厚颌鲂产卵可能需要在石滩上进行, 其卵粒可能随水流散布并粘附于水中石块上。

参考文献:

- [1] Liu H Z, Wang Y P. Studies on genetic structure and null allele in a natural population of *Megalobrama pellegrini*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1997, **21**(2): 194—196[刘焕章、汪亚平. 厚颌鲂种群遗传结构及哑基因问题. 水生生物学报, 1997, **21**(2): 194—196]
- [2] Luo Y L. A revision of fishes of the cyprinid genus *Megalobrama*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1990, **14**(2): 160—165[罗云林. 鲂

属鱼类的分类整理. 水生生物学报, 1990, **14**(2): 160—165]

- [3] Ting R H. The fishes of Sichuan, China[M]. Chengdu, Sichuan Publishing House of Science and Technology, 1994. [丁瑞华. 四川鱼类志. 成都: 四川科学技术出版社, 1994]
- [4] Chen Y Y, Fauna Sinica: Osteichthyes Cypriniformes II [M]. Beijing, Science Press, 1998[陈宜瑜. 中国动物志: 硬骨鱼纲鲤形目(中卷). 北京: 科学出版社, 1998]
- [5] Tan D Q, Wang J W, Dan S G, *et al.*, The ratio of muscle to body and analysis of the biochemical composition of muscle in *Megalobrama pellegrini*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(1): 17—22 [谭德清、王剑伟、但胜国, 等. 厚颌鲂含肉率及生化成分的分析. 水生生物学报, 2004, **28**(1): 17—22]
- [6] Liu J K, He B W. Cultivation of the Chinese Freshwater fishes. (3rd edition) [M]. Beijing: Science Press, 1992[刘建康、何碧梧. 中国淡水鱼类养殖学(第三版). 北京: 科学出版社, 1992]
- [7] Yi B L, Yu Z T, Liang Z S. Gezhouba water control project and four famous fishes in Yangtze River[M]. Wuhan, Hubei Science and Technology Press, 1988[易伯鲁、余志堂、梁秩. 葛洲坝水利枢纽与长江四大家鱼. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1988]
- [8] Wan C Y, Lin Y T, and Huang D M. Embryonic development of *Megalobrama sholkavii*[J]. *Journal of Lake Sciences*, 1999, **11**(1): 70—74[万成炎、林永泰、黄道明. 鲂胚胎的发育. 湖泊科学, 1999, **11**(1): 70—74]

PRELIMINARY STUDIES ON ARTIFICIAL PROPAGATION AND EMBRYONIC DEVELOPMENT OF *MEGALOBrama PELLEGRINI*

WANG Jia-Wei, TAN De-Qing and LI Wen-Jing

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: *Megalobrama pellegrini*, a cyprinid fish belonging to Cltrinae, lives mainly in the upper reaches of the Yangtze River. This bream is a rare commercial fish in Sichuan Province because of the low abundance in natural environment. Due to the loss of habitat after the completion of the Three Gorges project, it was predicted that the population sizes might decrease. Taking suitable countermeasures including artificial breeding and stocking become very urgent for conservation and resource recovery of this endemic species. Habitat, biology, reproductive ecology, artificial breeding and stocking of *M. pellegrini* were studied since 2001. The present paper reports the results of artificial propagation and observation on embryonic development.

The parent fish were collected in the Longxi River, one of the first-order tributary of the Yangtze River at Luzhou, Sichuan Province. The fertilization rate was only 12.0% when artificial fertilizations were done as soon as the parent fish were collected. A total number of 32 females and 33 males were injected with LRH-A, HCG, pituitary gland (PG), or a mixture of these three reagents, to induce spawning. All males released sperm and 20 injected females spawned. The average fertilization rate was 62.1%, while the average hatching rate was 44.7% in the 12 successful induced reproduction. According to the spawning, fertilization, and hatching rates, a mixture of 3 mg of pituitary and 3 μ g of LRH-A₂ per kg fish was suggested to be the appropriate dosage. The latency between the second injection and initial egg release varied from 6.5 to 12 hours when water temperature ranged from 21.0 to 27.0°C.

The eggs were adhesive, spherical, with a diameter of 1.53—1.80mm, and the diameter of the yolk was about 1.17—1.45mm. Embryonic development could be divided in 18 stages, and the characteristics of each stage were described and illustrated in this paper. Ontogenesis process was influenced remarkably by water temperature. The incubation duration lasted about 68h50min, 55h10min, 42h50min and 31h40min under a water temperature of 19.5—21.0°C, 21.0—21.9°C, 22.5—23.8°C and 26.0—28.8°C, respectively.

Key words: *Megalobrama pellegrini*; Artificial propagation; Embryonic development