

文章编号: 1004 - 7271(2008)06 - 0684 - 05

海南长臀鲩人工繁殖与胚胎发育的研究

杨家坚

(广西水产研究所, 广西南宁 530021)

摘要: 使用 LHRH - A₂ + DOM + PG 混合催产剂对从海南引进经池塘驯化养殖 5 冬龄的海南长臀鲩进行催产, 并用日产 80i 光学显微镜观察胚胎发育过程。取得平均催产率 88.9%, 平均受精率 82.3%, 平均孵化率 68.7% 的效果。成熟的卵子为圆球形、淡黄色、粘性卵。在水温 24.8 ~ 27.0 °C 条件下, 其受精卵经细胞期、囊胚期、原肠期、体节出现期、器官出现期和出膜前期等多个发育时期孵化出膜, 所需时间为 82 h 15 min。拍摄了胚胎发育照片 25 幅。

关键词: 海南长臀鲩; 人工繁殖; 胚胎发育

中图分类号: S 965.1 文献标识码: A

Studies on artificial propagation and embryonic development of *Cranoglanis boudierius multiradiatus*

YANG Jia-jian

(Guangxi Institute of Fisheries, Nanning 530021, China)

Abstract: In this study, *Cranoglanis boudierius multiradiatus* was introduced from Hainan and domesticated about five years in pond. The mixture of LHRH - A₂ + DOM + PG was injected into *Cranoglanis boudierius multiradiatus* before their embryonic development was observed by Nikon 80i optical microscope. These results were concluded. The average of spawning rate (induction rate) was 88.9%, and the average fertilization rate and hatchability (hatching rates) were 82.3% and 68.7%, respectively. Their mature eggs were spheroidal, light, yellow and sticky. The cycle of embryonic development included six stages (cell stage, blastula stage, gastrula stage, somite genesis stage, organ stage and hatching stage) through eighty two hours and fifteen minutes at 24.8 - 27.0 °C of water temperature. In the experiment, twenty-five fetation photographs were taken to describe the whole process.

Key words: *Cranoglanis boudierius multiradiatus*; artificial propagation; embryonic development

海南长臀鲩 *Cranoglanis boudierius multiradiatus* (KOLLER) 隶属于鲇形目 Siluriformes、长臀鲩科 Cranoglanididae、长臀鲩属 *Cranoglanis* Peters^[1], 主要分布于海南省南渡江及昌化江水系。味道鲜美, 深受广大群众的喜爱。近年来, 虽然开展了海南长臀鲩天然鱼种人工养殖试验, 但对其胚胎发育的研究, 目前国内尚未见有关报道。本研究利用 2003 年 5 月从海南引进的 8 ~ 10 cm 鱼种, 经 5 年池塘驯化养殖, 于 2007 年 5 月 12 日和 5 月 30 日进行两批人工催产试验获得成功, 并进行了胚胎发育观察, 现将结

收稿日期: 2008-08-27

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科转 0632002 - 3); 广西科学技术厅种苗攻关项目(桂科计字[2006]32 号)

作者简介: 杨家坚(1954 -), 女, 广西防城港市人, 高级工程师, 研究室主任, 主要从事鱼类选育及鱼、贝类养殖技术方面的研究。

果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 亲鱼

2003年5月16日从海南省引进1000尾鱼种,平均体长9.1 cm,平均体重5.5 g,经5年的池塘驯化培育达到性成熟后作为人工催产亲鱼。亲鱼鉴别:在繁殖期雌雄鱼最明显的区别是泄殖孔的形态特征。成熟雌鱼泄殖孔呈浅红色、稍大,有明显的下凹,腹部卵巢轮廓明显,手感松软膨大,轻压泄殖孔前部可挤出卵子。雄鱼泄殖孔浅灰色、细长,没有明显的下凹,即使用力挤压泄殖孔前部也挤不出精液。催产用雌鱼体重1400~2050 g,雄鱼1350 g~2750 g,雌雄比为1:1。

1.1.2 试验设施

亲鱼培育池塘1个,面积为1336 m²,池深2.5 m,各配备1.5 kW的叶轮式增氧机1台;环道产卵池2个,椭圆形,面积80 m²,池深2 m;温棚式育苗池面积150 m²,鱼苗孵化培育池20个,单池面积4 m²,池深0.8 m,每池配备散气石2个。

1.2 方法

1.2.1 亲鱼培育

参照海南长臀鲩在自然江河水域中的生态习性和食性特点,研制人工配合饲料,采取早晚投饵,投喂量占鱼总重3%~5%的方法对海南长臀鲩鱼种进行池塘驯化^[2]饲养,培育至5冬龄性腺发育成熟。

1.2.2 人工催产

采用促黄体素释放激素(LHRH-A₂)、鲤鱼脑垂体(PG)^[3]、马来酸地欧铜(DOM)^[4]混合催产剂^[5-6],经对比确定最佳剂量后使用。

1.2.3 孵化

环道池流水孵化方式,即将粘附鱼卵的筛绢布孵化片,在环道池循环流水条件下孵化。为记录胚胎发育所需时间及其特征,使用日产80i光学显微镜,从精、卵结合开始至鱼苗孵化出膜,连续追踪观察拍摄胚胎发育照片,研究其胚胎发育的变化规律。

2 结果与分析

2.1 人工催产

2007年5月12日、5月30日先后使用经对比确定剂量的LHRH-A₂(10 μg)、PG(3 mg)、DOM(2 μg)混合催产剂对18组5冬龄亲鱼进行催产,结果如表1所示。

表1 人工催产一览表
Tab.1 The result of artificial inducing

催产时间	水温(℃)	效应时间(h)	亲鱼(组)	产卵鱼(组)	催产率(%)	产卵量(粒)	受精卵(粒)	受精率(%)	孵出鱼苗(尾)	孵化率(%)
05-12	24.8~25.3	12~16	6	5	83.3	35 000	26 300	75.1	19 230	73.1
05-30	25.1~27.0	8~12	12	11	91.7	68 000	58 516	86.1	39 017	66.7
平均					88.9			82.3		68.7

表1数据表明,海南长臀鲩在水温24.8~27.0℃条件下,平均催产率为88.9%,受精率82.3%,孵化率68.7%。

2.2 胚胎发育观察

在水温24.8~27.0℃条件下,采用日产80i光学显微镜观察了从精、卵结合开始的胚胎发育过程,

见表 2 和图版^[7-8]。

表 2 胚胎发育观察一览表
Tab. 2 Stages of embryogenesis

发育期	受精后时间	主要形态特征	图版
受精卵	0	圆球形,粘性,卵径 1.06 ~ 1.35mm,卵质均匀分布。	1
1 细胞期	1:30'	原生质集中在卵球动物极一端,胚盘隆起。	2
2 细胞期	2:15'	胚盘经裂为两个大小相等的细胞。	3
4 细胞期	3:05'	分裂球再次经裂,形成 4 个大小相等的分裂球。	4
8 细胞期	3:50'	有两个经裂面,形成 8 个分裂球。	5
16 细胞期	4:35'	两个经裂面,形成 16 个分裂球。	6
32 细胞期	5:20'	四个经裂面,32 个分裂球排成 4 行。	7
64 细胞期	6:05'	各分裂球分裂的速度不一致,大小不整齐。	8
多细胞期	6:50'	分裂球越分越小,形成多细胞的胚体。	9
囊胚早期	10:05'	分裂球很小,界线不清,形成的囊胚层高举在卵黄上。	10
囊胚晚期	16:05'	囊胚表面细胞向卵黄部分下包,约占胚胎的 1/3。	11
原肠早期	32:15'	胚盘下包 1/2,胚环出现,背唇呈新月状。	12
神经胚期	46:15'	胚盘下包 4/5,神经板形成,胚体转为侧卧。	14
胚孔封闭期	52:55'	胚孔关闭,神经板中线略下凹,脊索呈柱状。	15
体节出现期	54:30'	胚体出现两对体节,神经板头端隆起。	16
眼囊期	56:10'	椭圆形眼囊出现,体节 7~8 对。	17
嗅板期	58:45'	眼前方暗色,嗅板出现,体节 9 对。	18
耳囊期	60:15'	泡状耳囊出现,眼囊内陷成眼杯,体节 15~16 对。	19
晶体出现期	62:05'	眼杯口出现圆形晶体,椭圆形鳃板隆起,体节 24~25 对。	20
肌肉效应期	63:05'	胚体开始微弱的肌肉收缩,第四脑室出现。	21
耳石期	66:35'	耳石在耳囊中出现,胚体左右摆动,体节 30~31 对。	22
心跳期	68:25'	管状心脏开始微弱搏动,继而加强。	23
出膜前期	74:35'	胚体在卵膜内转动,泄殖腔出现,体节 33~35 对。	24
出膜期	82:15'	无色素胚体破膜而出。中脑与后脑膨大,心脏为长管状,鳃板三块,体节 37~38 对。	25

2.3 结果与分析

2.3.1 受精卵和卵裂期

受精卵为圆球形,卵径 1.06 ~ 1.35 mm,具有两层卵膜,即初级卵膜和次级卵膜。卵内含有大量颗粒状卵黄,为细胞发育提供能量和营养物质;次级卵膜具粘性,起保护粘着作用,避免鱼卵受机械损伤或落入水体底部因缺氧死亡(图版-1)。

卵裂为盘状卵裂,受精后胚盘渐渐隆起,为细胞的连续分裂做物质准备。受精卵分裂从 1 细胞期到 2 细胞期、4 细胞期、8 细胞期依序递进。第一次、第二次卵裂为经裂,第二次卵裂与第一次卵裂面相垂直。第三次卵裂有两个经裂面,与第二次经裂面相垂直。与第一次经裂面平行,形成 8 个大小基本相等的分裂球。此后,细胞分裂速度不一致,大小不等,但总体上卵裂经 16 细胞期、32 细胞期、64 细胞期和多细胞期,细胞越分越小,堆积在卵黄上端,呈桑椹状。整个细胞分裂期经过时间为 10 h 05 min(图版-2~9)。

2.3.2 囊胚和原肠期

卵裂进行到后期,由于分裂球数目越来越多,可见隆起于卵黄上层的囊胚层,囊胚的形成作为原肠作用的进行作好了形态上和生理上的准备,它们向不同区间作规律的分布运动,为器官原基形成准备了条件。

囊胚层的外包标志着原肠期的开始。由于大量向植物极分裂的细胞受到卵黄的阻力,使得胚盘在卵黄上形成了一个加厚的胚环。在胚盘上,由于细胞的卷入而出现一个外观增厚的胚盾,胚盾是胚体的始基。随着这一时期细胞的不断内陷、集中、迁移,原肠期的上、中、下胚层形成,原肠期进行的质量对胚胎发育起决定性作用。

囊胚期和原肠期两个发育阶段经过时间长达36 h 10 min,(图版-10~13)。

2.3.3 神经胚和胚孔封闭期

原肠后期继续进行,胚孔完全被卵黄栓封住,胚胎前部表皮中线细胞增厚,形成并分化出神经板(神经胚期)。胚孔封闭期的特征是胚孔关闭,神经板中线下凹,脊索呈柱状。神经胚期和胚孔封闭期是原肠晚期的继续。又是胚层深层次分化向胚孔封闭期渐进的开始。因此,这一发育期往往由于胚胎本身质量问题或受外界理化因子的影响而产生畸形。

神经胚期和胚孔封闭期这两个发育期经过时间为8 h 15 min(图版-14~15)。

2.3.4 体节出现至出膜前期

受精后54 h 30 min,胚体出现两对体节,神经板头端隆起;56 h 10 min 椭圆形眼囊出现,体节7~8对;58 h 45 min 眼前方暗色嗅板出现,体节9对;60 h 15 min 泡状耳囊出现,眼囊内陷成眼杯,体节15~16对;62 h 05 min 眼杯口出现圆形晶体,椭圆形鳃板隆起,体节24~25对;63 h 05 min 胚体开始微弱的肌肉收缩;66 h 35 min 耳石在耳囊中出现,胚体左右摆动,体节30~31对;68 h 25 min 管状心脏开始微弱搏动并逐渐加强,可见无色透明的血液在胚体内流动,循环系统形成;74 h 35 min 胚体在卵膜内转动,泄殖腔出现,胚胎卵黄囊后部可见盘曲的消化道,体节33~35对(图版-16~24)。这一阶段胚体发育的特征是形成感觉器官、体节、消化道和循环系统。

2.3.5 出膜期

受精82 h 15 min 胚胎破卵膜而出,中脑和后脑膨大,全身无色素,心脏为长管状,鳃板3块,头仍弯向腹面,体节37~38对(图版-25)。

3 讨论

采用LHRH-A₂+DOM+PG混合催产剂对5龄海南长臀鲉进行人工催产,虽然取得平均催产率88.9%,平均受精率82.3%的较好效果,并成功地拍摄了25幅胚胎发育照片。但平均孵化率只有68.7%,偏低。这可能与雄鱼要解剖取出精巢剪碎激活后授精,成熟度难以控制同步或受外界水质环境影响有关。此外,由于雄鱼性腺发育成熟及排精机制复杂,即使采用人工药物催产,也没能解决雄鱼重复使用问题,此乃为今后攻关技术之一。

海南长臀鲉的胚胎发育,根据本研究的实验观察,与同为鲈形目的斑鲮(*mystus guttatus* (Lacepede))相比较,其卵子直径只有1.06~1.35 mm,约为斑鲮卵径3.2~4.5 mm的三分之一。由于卵子小、卵内储备供给前期的细胞发育及后期的胚体发育的卵黄和营养物质先天存在不足。最终导致海南长臀鲉(24.8~27.0℃)胚胎发育时间^[9]长达82 h 15 min,比斑鲮(26.0~26.5℃)的50 h 12 min多了32 h 03 min。特别是在胚体发育至囊胚期和原肠期阶段,由于卵内营养物质供给不足,胚胎发育经过时间长达36 h 10 min,由此对后续的神神经胚期和胚孔封闭期影响更大,依次渐进,最终导致胚体正常发育被打破平衡,产生畸形或停止发育,造成孵化率偏低,人工繁殖难度大,有待研究解明。

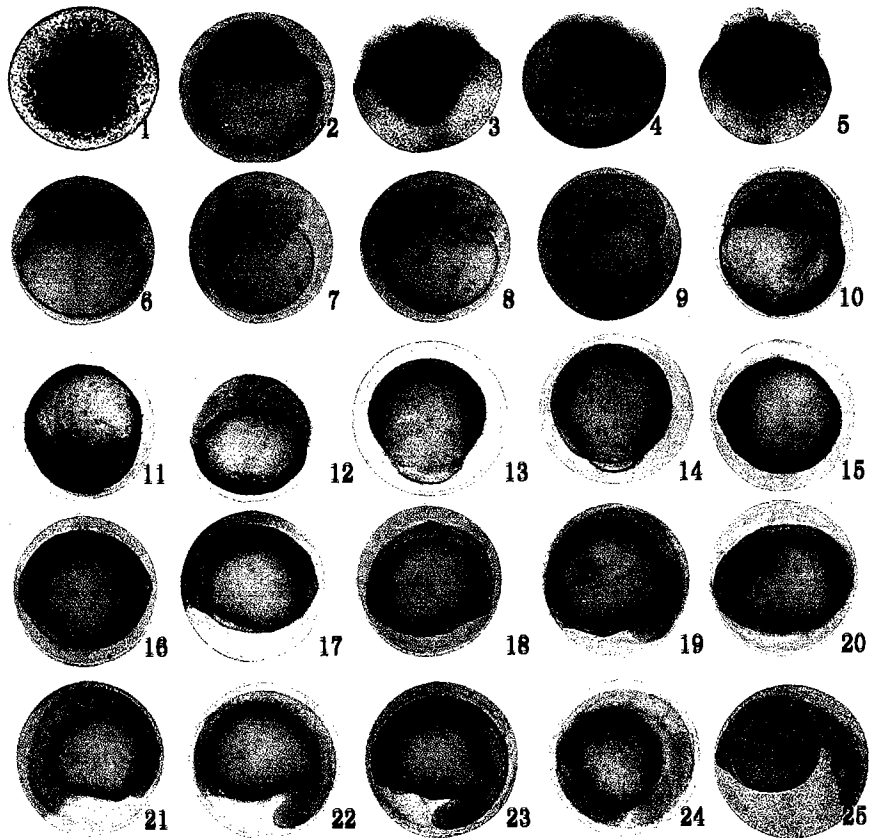
在孵化过程中,正值水霉大量滋生季节。过多的水霉粘附在卵上可危及胚胎发育,甚至出现大批死卵。本研究采用400 ppm食盐水全池泼洒,27 h(约达原肠期)后换水的方法,可有效控制水霉的滋生。同时,要及时清除坏卵、霉卵及其它脏物,避免相互粘连影响好卵的发育。

梁军能、卢智发参加了研究试验,在此一并致谢!

参考文献:

- [1] 中国水产科学研究院珠江水产研究所,华南师范大学等.广东淡水鱼类志[M].广州:广东科技出版社,1990:296-297.
- [2] 楼允东.鱼类育种学(修订版)[M]北京:中国农业出版社,2001:300-328.
- [3] 王洪、邓去端编著.埃及塘角鱼养殖技术[M],南宁:广西人民出版社,1984:16-25.
- [4] 王德寿,林浩然,蒲德永,等.注射促黄体素释放激素类似物和地欧酮诱导,大鳍鲮和长吻鲮排卵的研究[J]动物学研究,1998,19(3):191-196.

- [5] 梁毅,淡水沙鱼生物学特征及人工繁殖[J]. 重庆水产,2007;24-25.
 [6] 度忠臣,李胜章等,南方大口鲶人工繁殖及苗种培育技术研究[J]. 河南水产,2007;9-10.
 [7] 上海水产学院主编,组织胚胎学(第一版)[M]. 北京:中国农业出版社,1981;201-336.
 [8] 杨家坚,梁军能,卢兆发. 三角鲤人工繁殖研究[J]. 上海水产大学学报,2007,16(6)555-559.
 [9] 周平主编. 斑鲢人工繁殖技术研究[C]//华夏英才文集中国国际广播出版社,2003.



图版 海南长臀鲩胚胎发育

Plate Embryogenesis of *Cranoglanis boudierius multiradiatus*

1. 受精卵; 2. 1 细胞期; 3. 2 细胞期; 4. 4 细胞期; 5. 8 细胞期; 6. 16 细胞期; 7. 32 细胞期; 8. 64 细胞期; 9. 多细胞期; 10. 囊胚早期; 11. 囊胚晚期; 12. 原肠早期; 13. 原肠晚期; 14. 神经胚期; 15. 胚孔封闭期; 16. 体节出现期; 17. 眼囊期; 18. 嗅板期; 19. 耳囊期; 20. 晶体出现期; 21. 肌肉效应期; 22. 耳石期; 23. 心跳期; 24. 出膜前期; 25. 出膜期。