

暗纹东方鲀的人工繁殖*

陈亚芬 陈源高 刘正文

(中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京 210008)

提 要 1995-1997年,以暗纹东方鲀进行人工繁殖,经LHRH-A₂催熟处理,雌鱼的性腺可以发育到IV期末,性腺发育达到IV期中以后的雌鱼注射激素能引起正常的排卵反应.试验用的催产药物为LHRH-A₂、HCG和PG.在水温16-21℃的条件下,效应时间为6-86h,平均催产率为87.5%,平均受精率为61.8%,平均孵化率为51.7%.在水温20℃时,胚胎发育历时154h孵出.

关键词 暗纹东方鲀 人工繁殖 催产 孵化

分类号 Q959.4

暗纹东方鲀(*Takingfugu obscurus* (Abe))是我国名贵的经济鱼类之一.俗称河豚,分类上隶属于鲀形目(Tetrodontiforms)、鲀科(Tetraodontidae)、东方鲀属(*Fugu*).在我国的黄海、渤海、东海均有分布,每年清明前后成群溯河至淡水江河中产卵,幼鱼在江河或通江的湖泊中肥育,翌年春季返回海中.暗纹东方鲀肉味鲜美,民间素有“拼死吃河豚”之说,与鲥鱼、刀鱼并称长江三鲜,历来是我国长江中下游的重要渔业资源.历史上春季溯河洄游的河豚产量较高,但近十年来,由于长江水环境的恶化、沿江河湖闸坝的阻隔以及自然资源的过度捕捞,暗纹东方鲀的资源遭到了极大的破坏,目前,长江河豚已形成不了产量,价格连年攀升,1996、1997、1998年市场售价高达1000、1400、2800元·kg⁻¹.为保护和增殖这一重要渔业资源,满足人们对河豚鱼消费需求,对暗纹东方鲀进行人工繁殖的研究已成为当务之急.

河豚鱼具有较大的食用价值和综合利用价值,特别是由其内脏提取的河豚毒素是医疗上的高级镇痛剂,每克售价高达 $5 \times 10^4 - 7 \times 10^4$ 美元.日本自60年代就开展了纯海水性的东方鲀属鱼类红鳍东方鲀(*Takingfugu rubripese* Temminck et Schlegel)^[1,2]的人工繁殖育苗及养殖试验,我国黄海水产研究所也曾对红鳍东方鲀、假睛东方鲀(*Takingfugu pseudomuschu* Chu)、豹纹东方鲀(*Takingfugu pardalis* Temminck et Schlegel)^[3-5]等进行过人工繁殖的初步研究.而对具溯河生殖洄游习性的暗纹东方鲀的人工繁殖的研究则未见报道.笔者在1995-1997年对暗纹东方鲀的人工繁殖进行了系统研究,采用激素催产获得受精卵,并孵化出鱼苗,取得了暗纹东方鲀人工繁殖的成功.

1 材料与方法

1.1 亲本来源

试验用亲鱼为3月下旬至4月中旬的溯河亲鱼,从农贸市场收购,收购的亲鱼主要捕自常熟至镇江江段.收购的亲鱼要求体格健壮、无病无伤,游泳活泼,各鳍色泽透明且自然舒展,安

* 中国科学院“九五”重点项目资助.

收稿日期:1998-12-09;收到修改稿日期:1999-01-01.陈亚芬,女,1971年生,助理研究员.

静时自然伏底而不倾斜或吊在水中. 亲鱼规格雌鱼在 0.6kg、雄鱼在 0.4kg 以上, 雌雄比例 1:1 至 1:2.

1.2 亲鱼的暂养与促熟

亲鱼暂养池为 10-20m² 的水泥池, 放鱼前强氯精彻底消毒, 注水水深 0.8-1.0 m, 水温控制在 18-22℃, 保持 24 h 不间断充气, 每天换水 1/3, 保持水质清新. 专人昼夜观察亲鱼的活动情况, 适时检查亲鱼的性成熟程度, 对发育较差的亲鱼, 小剂量注射 LHRH-A₂ 2-5μg·kg⁻¹, 促进性腺成熟.

1.3 催产亲鱼的选择

雌鱼要求腹部膨大, 卵巢轮廓明显, 前后腹部大小均匀一致, 生殖孔松弛而红润, 背部及腹部小刺突出较硬, 手感粗糙刺手, 采卵检查, 卵外形正规, 圆形, 卵粒晶莹饱满, 卵色鹅黄, 卵核偏位; 雄鱼要求轻压腹部有少量精液流出, 遇水即散.

1.4 催产剂种类和数量

催产药物为促黄体素释放激素类似物 LHRH-A₂、绒毛膜促性腺激素 HCG 和鲤鱼脑垂体 PG. 体腔注射, 单独注射或混合注射, 次数 1-2 次, 二次注射的间隔时间 12h, 第一次注射总剂量的 1/3, 第二次注射其余的 2/3. 单独注射剂量 LHRH-A₂ 为 120μg·kg⁻¹, HCG 为 2500IU·kg⁻¹; 混合注射以 LHRH-A₂ 和 PG 混合注射效果为好, 注射剂量 LHRH-A₂ 90μg·kg⁻¹ + PG 6mg·kg⁻¹, 雄鱼剂量减半.

1.5 授精与孵化

人工授精采用干法授精, 受精卵放入锥形筛绢网流水孵化, 孵化水温 18-22℃, 保持充气和微流水, 使受精卵均匀散布于筛绢网中. 孵化过程中, 及时清除死卵并定期泼洒孔雀石绿防止卵霉. 胚胎发育到原肠中期, 计算其受精率; 仔鱼出膜后, 统计出苗数, 计算孵化率.

1.6 胚胎发育

借助连续变倍双目解剖镜和 OLYPUS 双目显微镜连续观察胚胎发育过程, 每次取样 50 粒, 对活体进行测量和绘图, 并描述记录不同时期形态特征和发育时间. 并用 5% 的福尔马林固定不同发育时期的受精卵, 以备复查.

2 结果

2.1 人工催熟

对采卵检查成熟较差的亲鱼注射小剂量的 LHRH-A₂ 进行催熟, 试验结果见表 1.

表 1 暗纹东方鲀的人工催熟

Tab. 1 The result of promoting maturation of *Takingfugu obscurus*

批次	尾数	体重 /kg	注射日期	注射剂量 /μg·kg ⁻¹	注射前卵子 发育情况	注射后卵子 发育情况
I	3♀	2.2	1995-04-07	3	卵不透明, 粘连, 黄色, 卵径较小, 入水	卵薄而透明, 单个卵
II	1♀	0.7	1995-04-14	2	没有粘性, 用透明液	呈淡黄色, 卵径变大,
III	4♀	2.9	1996-04-02	5	不能透明, 卵粒发白	入水后具弱粘性, 镜
IV	3♀	2.4	1996-04-10	3		检可见卵核偏位
V	2♀	1.3	1997-04-12	3		

从表 1 可见, LHRH-A₂ 对发育较差的雌鱼有明显的催熟作用, 经 LHRH-A₂ 注射后, 亲鱼腹围增大, 卵子发生明显的变化, 卵变得薄而透明, 入水后具弱粘性, 镜检可见卵核偏位. 经激素催产后, 除 2 条未产卵外, 其它亲鱼全部产卵(表 2).

表 2 暗纹东方鲀的人工催产情况

Tab.2 The data of spawning induced artificially of *Takingfugu obscurus*

批次	试验日期	亲鱼配组		♀体重 /kg	平均水温 /℃	第一次注射			第二次注射			效应 时间	产卵 尾数
		♀	♂			LRH-A	HCG	PG	LRH-A	HCG	PG		
						$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\text{IU}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\text{IU}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$		
I	1995-04-04	4	6	3.85	17.8	60	/	/	120	/	/	49	3
II	1995-04-10	2	3	1.55	17.5	/	800	/	/	1600	/	43	2
III	1995-04-10	2	3	1.50	17.7	180	/	/	/	/	/	84	2
IV	1995-04-16	3*	5	2.10	18.2	/	2500	/	/	/	/	86	2
V	1995-04-20	3(1*)	4	1.95	19.0	50	/	2	100	/	4	6	3
VI	1996-04-25	3*	5	2.00	19.2	100	/	6	/	/	/	41	2
VII	1996-04-18	4*	5	3.25	19.3	50	/	2	100	/	4	24	4
VIII	1997-04-20	3(2*)	5	2.70	21.3	50	/	2	100	/	4	19	3
IX	1995-04-07	3		2.00	17.8	/	/	/	/	/	/	/	/

* 表示经催熟处理的亲鱼.

2.2 人工催产

1995-1997 年共催产了 8 批共 60 尾鱼, 其中雌鱼 24 尾, 雄鱼 36 尾, 产卵 21 尾, 平均产卵率为 87.5%, 其中单种激素催产的产卵率为 81.8%, 混合激素催产的产卵率为 92.3%, 一次注射的催产率为 60.0%, 二次注射的催产率为 92.3%, 未注射激素的组催产率为 0. 效应时间为 6-86 h.

2.3 受精、孵化效果

三年共获卵粒 340×10^4 粒, 平均受精率 61.8%, 平均孵化率 51.7%, 共孵出鱼苗 107.6×10^4 尾(表 3). 孵化率与受精率呈明显正相关, 受精率高, 孵化率亦高; 反之, 受精率低, 孵化率也低.

表 3 暗纹东方鲀的受精、孵化效果

Tab.3 The result of fertilizing and hatching of *Takingfugu obscurus*

批 次	获卵数/粒	产卵率/%	受精率/%	孵化率/%	出苗数/万尾
I	46	75	71.2	52.4	17.2
II	21	100	30.0	11.4	0.7
III	20	100	56.8	43.5	4.9
IV	20	66.7	10.0	2.3	0.5
V	28	100	91.6	93.6	24.0
VI	20	66.7	70.0	63.7	8.9
VII	42	100	84.4	75.6	26.8
VIII	43	100	80.4	71.2	24.6
IX	0	-	-	-	-

2.4 胚胎发育

暗纹东方鲀胚胎发育自受精到孵化共历时 154h, 按《组织胚胎》^[6]学将其胚胎发育划分为 6 个阶段: 受精卵、卵裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期、从尾芽期形成孵化期, 各期胚胎发育的形态特征见表 4.

表 4 暗纹东方鲀的胚胎发育($T_{\text{平均水温}} = 20^{\circ}\text{C}$)

Tab. 4 The embryonic development of *Takingfugu obscurus*

发育阶段	经历时间/h	形态特征
受精卵	0 - 2	成熟卵圆球形, 沉性, 淡黄色, 薄而透明, 卵径 1.118 - 1.274, 油球 300 个左右, 受精卵吸水后膨胀, 卵周隙扩大明显, 入水后具粘性, 受精 2 小时左右, 原生质向动物极移动, 形成胚盘
卵裂期	1.8 - 16	胚盘分裂, 逐渐形成 2 细胞、4 细胞、8 细胞, 随着细胞分裂的不断进行, 分裂球细胞的数目越来越多, 体积越来越小, 但细胞界限仍清晰可见
囊胚期	16 - 25	细胞继续分裂, 细胞界限变得越来越模糊, 在胚盘处形成隆起的囊胚, 并随着细胞分裂, 囊胚开始向植物极下包
原肠期	25 - 34	胚层开始明显的下包作用, 经原肠早期、中期、晚期, 胚质延长, 逐渐出现胚体雏形
神经胚期	34 - 50	胚层下包达 5/6, 胚环直径缩小, 形成胚孔, 植物极卵黄大部分包围, 末端外露形成卵黄栓, 胚盾的背中线凹陷形成神经沟, 随着发育的进行, 胚孔封闭, 胚体前端形成膨大的原脑泡, 并在胚体头部形成一对肾形的眼泡原基, 脑泡分化成前、中、后三部分
从尾芽期形成到孵化期	50 - 154	胚体后端延长, 形成尾芽, 嗅囊、耳囊、视杯形成, 体节增加, 受精后 74 小时左右, 肌肉开始间歇抽动, 并逐渐形成心脏原基, 继而形成心脏, 出现血液循环, 胚体绕卵黄一周, 胸鳍原基出现后, 卵开始孵化出膜

3 讨论与小结

3.1 亲鱼的激素促熟

暗纹东方鲀是一种溯河洄游的鱼类, 在淡水江河中产卵, 海水中肥育, 其繁殖生理生态条件较为特殊. 因其内脏有毒, 国家明文规定禁食此鱼, 所以相关研究相对较少. 至今对其繁殖生态、性腺成熟机理、人工繁殖尚不清楚. 一般认为, 溯河鱼类只有在溯河过程中才能产生高能量水平, 使性腺完全发育成熟, 产生成熟的卵子. 因此, 流水是刺激溯河洄游性鱼类性腺成熟的重要因素之一^[7]. 从试验中还观察到, 即使采集性腺发育至 IV 期的暗纹东方鲀亲鱼, 暂养后直接进行催产, 部分亲鱼也不能完成产卵过程, 有的即使产卵, 卵子质量很差, 受精率极低. 亲鱼从江中采捕上来后, 缺少了水流刺激, 即使进行冲水刺激, 也达不到大江中的水生态条件, 性腺发育受阻. 另外, 暗纹东方鲀亲鱼的溯河洄游从 2 月下旬一直延续到 4 月中旬, 持续时间较长, 加之目前资源稀少, 洄游亲鱼往往形成不了群体, 很难获得同一批、性腺发育较为一致的雌雄洄游亲本, 收集的亲鱼性腺的发育从 III 期末到 IV 期中都有, 这给亲鱼的催产造成了很大的难度, 有必要对那些发育较差的亲鱼采取促熟措施, 促进进一步发育, 达到与发育较好的亲鱼同步催产的目的. 对于性腺发育处于 III 期末、IV 期早暗纹东方鲀的亲鱼(表 1), 注射 LHRH-A₂, 具有良好的促熟作用, 卵子发生明显的变化, 性腺发育基本能达到 IV 期中, 可以达到催产的目的.

3.2 亲鱼的诱导排卵

暗纹东方鲀的人工繁殖尚未见报道. 纯海水性的河豚如红鳍东方鲀、假睛东方鲀等一般在海上采捕成熟亲鱼直接进行人工授精以获得受精卵, 而利用激素诱导亲鱼排卵以获得卵子则报道较少^[1-3,8,9]. 笔者分别利用 LHRH-A₂、HCG 以及它们与 PG 的混合物诱导亲鱼产卵, 均具有较好的敏感性, 特别是 LHRH-A₂、PG 对暗纹东方鲀具有良好的催产作用, 这可能是与两种激素本身的特性有关, LHRH-A₂ 是一种长效激素, 它可长时间诱导脑垂体再合成与释放 GtH (促性腺激素), 诱导性腺成熟, 提高了催产效果^[7]. 暗纹东方鲀的人工催产的激素的剂量较一般养殖鱼类要大, 这可能与鱼类被捕捞后, 生态环境的极大反差以及鱼体受伤所引起的生理变化有关. 对野生鱼类, 捕捞和圈养诱导血浆中可的松含量增加和睾酮及 17 β -雌二醇含量的下降, 导致卵黄卵母细胞迅速退化且不能恢复^[10,11]. 在亲鱼的捕捞、运输、催熟催产操作过程中, 都可能造成这种伤害, 影响亲鱼性腺的发育和排卵. 因此, 在亲鱼的收集与暂养过程中, 除尽量收集无伤的个体、运输尽量防止震动外, 亲鱼暂养时间不能太长也是亲鱼催产成功的重要因素.

3.3 效应时间

效应时间是指亲鱼末次注射催产剂到开始发情产卵所需的时间. 由于效应时间的长短受催产剂的种类、水温、注射次数、亲鱼性腺成熟度、年龄以及水质条件等诸多因素的影响, 效应时间往往有些差别, 但一般在 10h 之内^[7]. 但这种差别在暗纹东方鲀显得特别大, 延续时间长, 其一次注射催产的效应时间为 41-86h, 二次注射催产的效应时间为 6-49h, 这对预测亲鱼的产卵时间极为不利. 同时, 暗纹东方鲀不象四大家鱼及其它鱼类, 有明显的发情行为, 如相互追逐等, 暗纹东方鲀几乎不表现发情行为, 因此把握亲鱼的效应时间就显得至关重要. 根据笔者实践, 在一针注射 36h 后, 或二次注射后, 应派人员昼夜观察, 密切注视亲鱼游动及体色变化, 等以亲鱼游动迟缓、体色变深时, 则应及时捞取检查. 当轻压腹部有淡黄色卵粒流出, 卵粒晶莹饱满、弹性好、入水具粘性, 则应及时人工采卵授精.

3.4 受精和孵化

由表 3 可见, 各批亲鱼的受精率有较大的差异, 这主要是由于雌鱼卵的质量决定的. 上已述及, 野生亲鱼由于捕捞、运输等原因, 极易引起性腺发育受阻或退化, 导致卵母细胞质量下降. 身体体质和成熟度较好的亲鱼, 只要采卵及时, 受精率一般相当高. 若卵子质量较差或过熟, 纵使能暂时受精, 但胚胎发育至原肠期后, 受精卵也会夭折. 此外, 在人工授精时, 挤卵与挤精应保护同步, 羽毛搅拌时轻柔而均匀, 控制人工授精时间在 2-3min 内完成, 能适当提高受精率.

暗纹东方鲀的孵化率主要与受精率相关, 受精率高, 受精卵质量较好, 孵化率也高. 此外, 暗纹东方鲀的孵化期较长, 孵化过程中受多种因素的影响, 主要包括水温、溶氧、水质、水照、敌害生物等, 它们都会影响到孵化率的高低. 一般来说, 孵化用水 DO 要求不低于 4mg·L⁻¹, 水质溶氧不足, 会引起胚胎发育迟缓、畸形、停滞甚至窒息死亡. 在孵化过程中, 还要及早预防水霉, 早期, 用孔雀石绿药浴, 及时挑除坏卵, 以防水霉蔓延, 影响孵化率.

参 考 文 献

- 1 立石 健. トテフゲの苗種生産および養殖の現状と問題点. 養殖, 1980;3-4
- 2 長野泰山. 虎斑河豚生産の基礎試験. 香川県水産試験場試験報告, 1979. 28-36
- 3 赵传钢等. 中国近海鱼卵和仔鱼. 上海: 上海科学技术出版社, 1985
- 4 孙灵毅. 红鳍东方鲀的人工繁殖和生长环境试验. 齐鲁渔业, 1992, (1):34-35
- 5 雷霖霖. 假睛东方鲀工厂化育苗研究. 现代渔业信息, 1992, 7(12):12-17
- 6 上海水产学院主编. 组织胚胎学. 北京: 农业出版社, 1995
- 7 张扬宗等. 中国池塘养殖学. 北京: 科学出版社, 1992
- 8 周海欧主编. 90年代最新海水养殖技术. 青岛: 青岛出版社, 1990
- 9 贾长春等. 弓斑东方鲀人工繁殖初步研究. 水产科技情报, 1979, (7):7-8
- 10 Clearwater SJ, N W Pankhurst. Effect of capture and confinement stress on Plasma cortisol, 17 β -estradiol and Testosterone, and Vitellogenic cocytes in the red gurnard *Chelidonichthys kumu* (F. Triglidæ). In: Proceedings of the XI International Congress of Comparative Endocrinology, Toronto. Canada, 1993
- 11 Dedual M, N Pankhurst. Effects of capture and recovery on Plasma cortisol, lactate and gonadal steroid levels in a natural population of rainbow trout, *Oncorhynchus makiss*. In: Proceedings of the XI International Congress of Comparative Endocrinology, Toronto. Canada, 1993

Artificial Reproduction on *Takingfugu obscurus*

CHEN Yafen CHEN Yuangao LIU Zhenwen

(Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008)

Abstract

Parents fish of *Takingfugu obscurus* were collected for artificial reproduction in the lower reaches of the Yangtze River from 1995 to 1997. The sexual gland of female puffer can develop to the end of IV period through treating with LHRH-A. The female puffers which the sexual glands have developed to the middle of IV period could be induced spawning through injecting hormone. The hormone for inducing spawn of the experiments is LRH-A, HCG and PG. At the temperature of 16-21°C, the time of effect is 6-86 hours, the average rate of spawning is 84.0%, the average rate of fertilizing is 61.8%, the average rate of hatching is 51.7%. At the water temperature of 20°C, the time of embryonic development is 154 hours.

Key Words *Takingfugu obscurus*, reproduction, induce spawn, hatch, embryonic development