

养殖施氏鲟的人工繁殖

孙大江¹, 曲秋芝¹, 马国军¹, 王炳谦¹, 吴文化¹, 邱岭泉¹, 王 斌², 夏永涛²

(1. 冷水性鱼类增殖重点开放实验室 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;
2. 中国水产科学研究院 鲟鱼繁育技术工程中心, 北京 100039)

摘要:对6尾雌性养殖施氏鲟(*Acipenser schrenckii* Brandt)进行人工催产,其中4尾雌鲟顺利排卵;采用输卵管切割手术取卵,获成熟卵7.7 kg,共计 42.77×10^4 粒;以“半干法”授精,获受精卵 28.82×10^4 粒,受精率67.37%;孵出鱼苗 12.69×10^4 尾,孵化率43.63%。本研究对人工催情方法和活体取卵方法与手术技巧进行分析,结果发现,人工养殖亲鱼催产效应时间长于野生鱼(已报道);不同时间取出鱼卵的授精效果差异较大,即成熟卵均能受精,但受精率随产卵时间的延长而逐渐降低;经产雄鱼与初产雄鱼间精子活力差异显著,经产雄鱼精子平均快速泳动时间及精子寿命均长于初产雄鱼精子。

关键词:施氏鲟;人工繁殖

中图分类号:S965.215.2

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2003)06-0485-06

施氏鲟(*Acipenser schrenckii* Brandt)是黑龙江的重要经济鱼类^[1],是我国主要的鲟类养殖对象,其产量占国内鲟鱼养殖总产量的一半以上。但养殖施氏鲟的种苗一直依赖捕捞野生亲鱼,经人工繁殖获得,所以受黑龙江自然捕捞量波动影响很大。近年来,黑龙江鲟鱼捕捞量逐年下降,捕捞天然亲鱼采卵已经远远不能满足国内养殖市场的需要。为此,本实验室开展了养殖施氏鲟的人工繁殖研究。国内对野生施氏鲟的人工繁殖研究较多^[2-5],但是,对养殖鲟鱼的繁殖生物学及人工繁殖研究很少,仅见曲秋芝等^[6]首次用养殖施氏鲟繁育出健康鱼苗的报道和章龙珍等^[7]对养殖施氏鲟性腺发育观察的报道。国外学者对人工养殖的高首鲟(*Acipenser transmontanus*)、西伯利亚鲟(*Acipenser baeri*)、杂交鲟[*Huso huso*(♀) × *Acipenser ruthenus*(♂)]等的繁殖生物学及性别控制研究较多^[8-10],实现了这些鲟鱼的全人工繁殖,并探索了杂交鲟全雌培育问题^[11-12]。本实

验通过对施氏鲟全人工繁殖过程中的亲鱼催产效应、手术取卵方法和精、卵质量及成熟同步性等进行研究,旨在为规模化生产种苗提供可操作的技术方法与科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 亲鱼 雌、雄亲鱼均为8龄施氏鲟,1995年孵化,用配合饲料驯养。产卵前2周,用取卵器采卵鉴定卵子成熟度,从亲鱼群体中选出卵子达到Ⅳ期的雌性亲鱼6尾,全长142~157 cm,编号分别为♀1、♀2、♀3、♀4、♀5、♀6;选出个体大、成熟较好的雄鱼20尾,全长139~155 cm,其中8尾用于人工繁殖试验,12尾用于精子活力比较。雌、雄分池蓄养。

1.1.2 催产药物 宁波市激素制品厂生产的注射用促黄体素释放激素A₂(LHRH-A₂)。

1.2 试验方法

1.2.1 催情 2003年4月18日,分别对雌、雄亲鱼进行催产。雌亲鱼注射LHRH-A₂总剂量为40~50 μg/kg,分3次注射,每次间隔10~12 h;雌鱼第2次注射的同时给雄鱼一次性注射,剂量为雌鱼总剂量的10%~15%;雄鱼在注射后8~10 h可挤

收稿日期:2003-06-27; 修订日期:2003-08-27.

基金项目:科技部“十五”科技攻关计划(2001BA505B0506).

作者简介:孙大江(1955-),男,研究员,从事冷水性鱼类及鲟鱼人工繁育养殖技术研究.

通讯作者:曲秋芝, Tel:0451-84861424, E-mail: quqiuizhi@163.com

出精液,取得精液并镜检合格(精子快速运动时间不低于30 s)后,贮存于3~4℃冰箱内备用;雌鱼最后一次注射后,每隔2~3 h检查1次排卵情况。

1.2.2 采卵 雌鱼排卵后,先将输卵管中的卵挤出,然后经生殖孔用手术刀切开输卵管交叉部(见图1-A、B),挤压腹部,使成熟卵不经输卵管直接从生殖孔排出体外,尽量挤出腹腔中的游离卵后,将

鱼放回水中,间隔1 h,重复挤卵数次,直至挤出绝大部分卵。取卵结束后,生殖孔周围做局部消毒处理,将亲鱼放入恢复池中。

1.2.3 授精、孵化 用镜检合格的精液,以半干法授精5 min^[3,6],然后用20%滑石粉脱粘40~50 min,将受精卵放在孵化器上孵化。

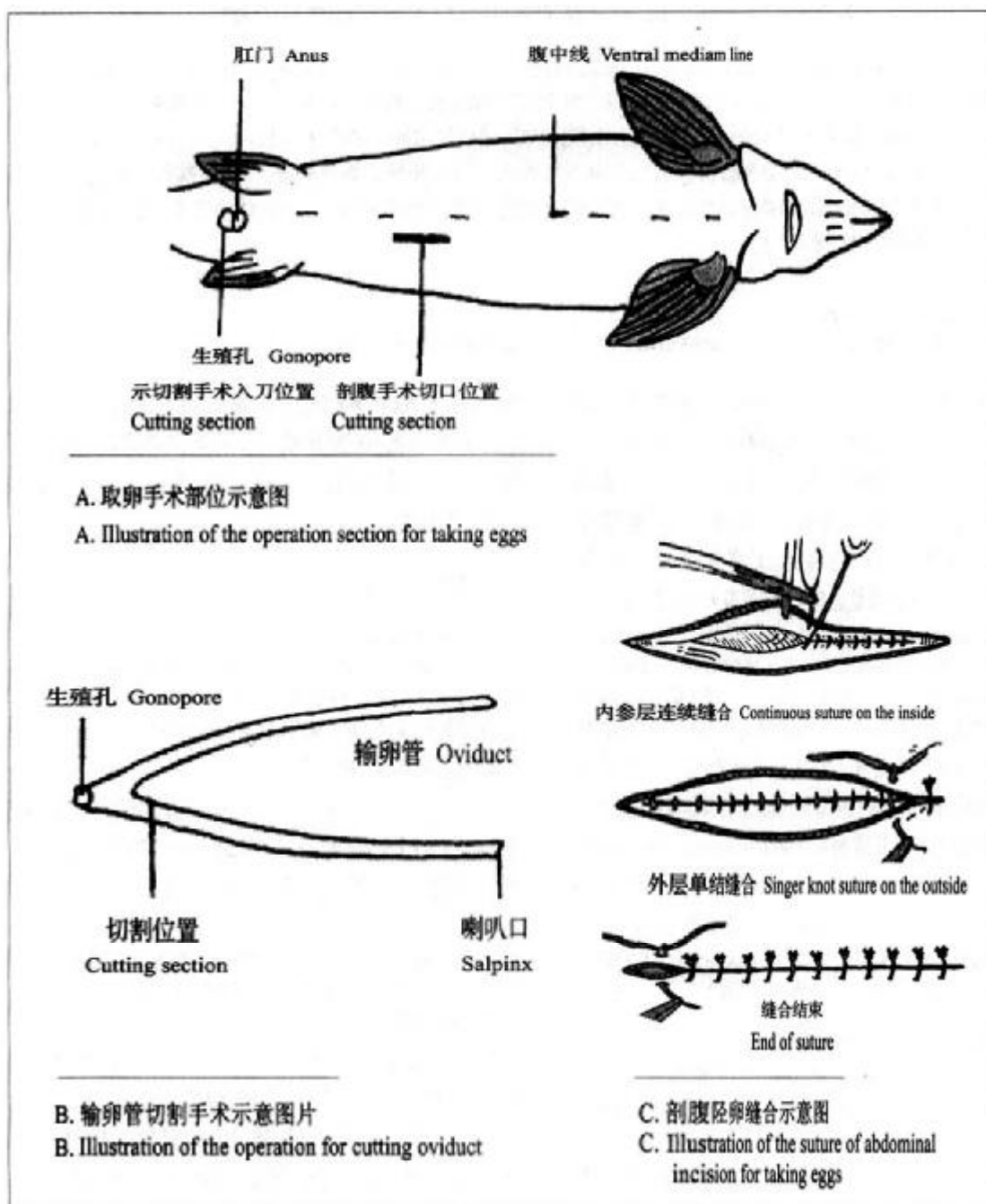


图1 施氏鲟取卵手术示意图

Fig. 1 Illustration of operation for taking eggs in *Acipenser schenckii*

1.2.4 不同时间挤出鱼卵的质量比较 对每尾雌鱼不同时间顺序所挤出的鱼卵,在相同条件下分别孵化,至神经胚期检查受精率,比较不同批次鱼卵的受精率。

1.2.5 精子活力比较 12尾同龄雄鱼,其中6尾为上年度经过催产并取过精液的雄鱼(简称经产鱼),另6尾为第1次催产的雄鱼(简称初产鱼),催产后10、16、18、22 h,分别取精液,在100倍显微镜下观察测定精子的快速泳动时间和寿命,比较经产鱼和初产鱼的精子活力。精子快速运动时间为加水激活开始至精子快速运动停止所持续的时间;精子寿命为从加水激活开始至约50%精子失去活力所经历的时间。活力测定由同一研究人员完成。

2 结果

2.1 催产、手术取卵、授精及孵化

受试的6尾雌鱼,在经3次催产注射后,其中4尾出现排卵反应,催产效应时间33~40 h;采用切割输卵管方法分批取卵,每尾亲鱼取卵3~5次,取卵率5.9%~17.4%;另外2尾亲鱼(♀5、♀6)在第3次注射后仍无排卵反应,增加第4次注射后出现排卵,最初挤卵即发现卵子退化,中止取卵;取卵亲鱼入水后立即游走,没有翻卧池底现象,取卵6 d后检查手术创口,无发炎、溃烂现象。本次试验共获得成熟卵7.7 kg, 42.77万粒;受精卵28.82万粒,受精率67.37%;孵出鱼苗 12.69×10^4 尾,孵化率43.63%(详见表1)。

表1 雌鱼催产及孵化结果
Table 1 Results of induced breeding and hatchery

项目 Item	个体编号 Individual No.						合计 Total
	♀1	♀2	♀3	♀4	♀5	♀6	
体重/kg Body weight	12.5	19.5	16.0	21.0	13.0	17.0	99.0
催产温度/℃ Temperature	11.0~15.4	11.0~15.4	12.2~14.8	12.2~14.8	12.2~14.8	12.2~14.8	
注射次数 Injecting times	3	3	3	3	4	4	
取卵次数 Taking eggs times	4	5	3	4	1	2	
催产效应时间/h Effective time*	33	39	37	40	43	44	
取卵数量/($10^4 \cdot \text{kg}^{-1}$) Taking amount of eggs	7.63/1.53	9.32/1.63	17.27/2.78	5.88/1.24	0.67/0.12	2.00/0.40	42.77/7.7
取卵率/% Taking eggs rate**	12.2	8.50	17.37	5.90	0.88	2.35	
受精率/% Fertilized rate	88.22	12.97	90.10	84.10	—	19.50	
孵化率/% Hatching rate	62.2	24.99	28.68	74.16	—	18.39	
孵出鱼苗总数/($\times 10^4$) Number of hatchery fry	4.18	0.30	4.47	3.67	—	0.07	12.69
鱼苗畸形率/% Disabled rate	2.24	5.87	2.14	2.41	—	8.37	

* 催产效应时间指:第1次注射至第1次取卵所经历的时间。

** 取卵率:(取卵量/体重) $\times 100\%$ 。

* Duration from the first injection to the egg collection.

** (eggs weight/body weight) $\times 100\%$ 。

2.2 分批取卵的比例与授精

每尾亲鱼每次可取卵的数量不同(见图2),♀1取卵4次,第3次取卵最多(占总取卵量66.9%);♀2取卵5次,每次的取卵量都不大(11.0%~25.2%);♀3取卵只有3次,前2次已经挤出大部分(92%),其中第2次挤出的卵最多(51.4%);♀4取卵4次,第1次最多(44.5%),随后每次递减。

不同时间采出鱼卵的受精率不同(图3)。♀3

和♀4两尾鱼最初取出的卵受精率最高(均为93.0%),以后取出的卵受精率依次降低,明显表现出受精率随取卵时间的推移而逐渐降低的趋势;♀1第2次取卵的受精率最高(90.6%),第3次与第2次比较接近(89.5%),最后一次降低较多(83.0%)。

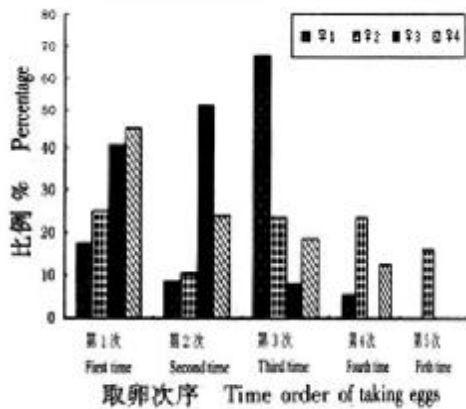


图2 各次取卵比例示意图

Fig. 2 Taking eggs rate of different batch

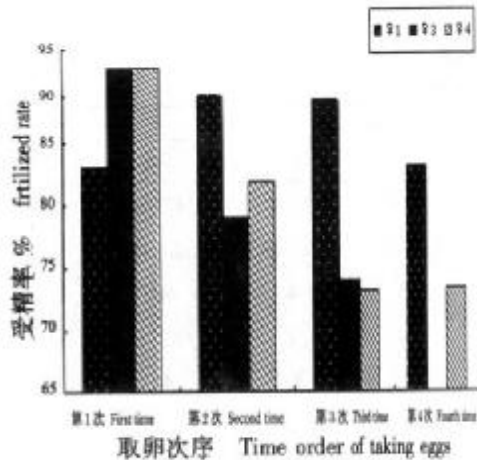


图3 受精率与取卵时间关系示意图

Fig. 3 Fertilized rate of different batch

2.3 精子活力比较结果

催产后 10 h 所取的经产雄鱼精子平均快速运动时间为 (108.1 ± 13.8) s, 初产鱼为 (55.0 ± 11.9) s, 二者差异极显著 ($P < 0.01$); 经产鱼的精子寿命为 (192.2 ± 44.5) s, 初产鱼为 (83.5 ± 17.7) s, 二者同样存在着显著差异 ($P < 0.01$); 随取精液时间的推迟, 不论经产还是初产雄鱼的精子活力均呈下降趋势, 但在 10 h 和 16 h 所取精液的精子活力相近, 22 h 以后精子活力开始明显降低 (见图 4)。

3 讨论

3.1 关于催产效应

采用人工合成的 LHRH-A₂ 催产, 受试的 6 尾雌鱼均在催产后 33 ~ 44 h 出现排卵反应, 与前次催

产试验^[6]结果 (34 h) 相同。而在相同的水温条件下, 野生雌鱼的催产效应时间多为 24 ~ 30 h^[3-4], 雄鱼催产也存在类似差别。笔者认为, 此现象可能与产前亲鱼所处的环境及性腺的生理成熟程度有关。野生施氏鲟产卵前要从黑龙江下游的越冬场, 经几百公里洄游至中上游产卵场^[1], 洄游期间不摄食, 这个过程对卵子由生长成熟向生理成熟转变具有重要意义。因此, 在产卵通道上捕获的亲鱼胃内完全没有食物, 不经催产雄鱼即可挤出少量精液, 雌雄鉴别比较容易。而人工养殖亲鱼的生活环境相对稳定, 没有生殖洄游过程, 除温度变化外, 缺少其他繁殖信号, 在繁殖季节亲鱼仍摄食, 不经催产, 雄鱼始终挤不出精液, 雌、雄鉴别亦十分困难^[6]。从 2 年的繁殖试验均可看出, 虽然催产可得到鱼卵, 但其成熟程度差别较大, 受精、孵化效果也不如野生鱼。因此, 改进亲鱼的产前培育, 包括饲料营养、模拟生态环境或其他人为手段促使亲鱼达到生理成熟, 是今后需重点研究的课题。

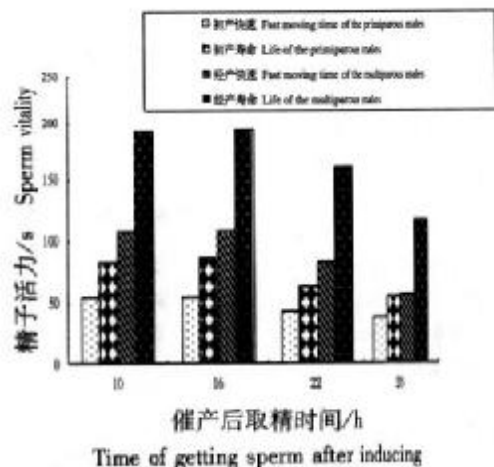


图4 经产雄鱼和初产雄鱼精子活力比较示意图

Fig. 4 Comparison of sperm vitality between primiparous and multiparous males

3.2 取卵时间与受精率

采用输卵管切割手术取卵, 需要分几批将卵挤出并分别授精, 每批间隔时间需 1 h 左右。鱼类成熟卵的有效受精时间虽存在着种间差异, 但都有一定的范围, 超出这个范围的受精效果都会受到很大影响^[3]。施氏鲟属一次性排卵类型^[1,13], 其成熟卵受精的有效延续时间尚无研究报道。本试验中的 4 尾产卵鱼, 从第 1 次到第 4 次取卵的 3 h 之内, 成熟

卵均能受精,但受精率基本上是随着取卵时间的延长而逐渐降低。♀3和♀4第1次取出卵的受精率均为93%,第3次取的卵则分别降为74%和73%,受精率下降了近20%;♀2第5次挤出的卵受精率为零;♀1第1次挤出卵的受精率低于后2次,从取卵量较少(16%)看,可能与取卵时间偏早或卵中血液、腹腔液比例过大有关。可以看出,取卵的时机和取卵所用时间对受精率都有一定影响。尹家胜等^[3]对野生亲鱼产卵的统计认为,施氏鲟从排卵开始到全部卵游离,约需1 h,成熟卵游离后立即授精,其效果是最理想的。本试验中其他雌鱼只取卵3~4次,用时2~3 h,都有不同的受精效果;而♀2亲鱼取卵5次,最后一次用时超过4 h,卵的受精率为零。4 h可否作为施氏鲟的有效受精时限,有待进一步研究,但有一点是清楚的,即准确掌握取卵时机,尽快取出成熟卵,对受精的实际效果至关重要。

3.3 取卵手术方法比较

鲟鱼的取卵与其他养殖鱼有较大区别,由于施氏鲟的输卵管较长,输卵管的喇叭口开于腹腔中部,用常规的挤压方法无法获得大部分成熟卵,因此,对野生施氏鲟进行人工繁殖时一直采用“杀鱼取卵”方法。对于人工养殖的鲟鱼,即要取卵又要保证亲鱼存活,则只有采取适当的手术方法。本研究2年试验所采用的手术方法不同,前次采用“剖腹取卵手术^[2,6]”,本次采用“输卵管切割手术”,2种方法均可成功取出大部分成熟卵,并有效地保证亲鱼存活。而2种方法在操作和实际效果上有所不同:剖腹取卵是在腹中后部开口,取卵后缝合(见图1-A、C),成熟卵可在较短时间内(30 min左右)得到授精,但手术操作比较复杂,用时较长;输卵管切割手术不需缝合,每次挤卵用时只有数分钟,操作相对简便,但需每隔1 h左右重复挤卵数次,整个过程拖延时间较长(3~4 h),对受精率有一定影响。因此,应根据亲鱼的实际情况选择手术方法,个体较大或成熟度好的亲鱼可采用剖腹手术方法;个体小或成熟度不易掌握的亲鱼,则应选择输卵管切割手术方法取卵。

3.4 关于精子活力

精子活力是指精子群体的运动状况,包括精子的激活与抑制、运动精子占精子总数的比例(激活比例)、精子运动激烈程度及运动时间等。精子活力是评价精液质量的重要指标,是精液保存、人工授精等其他研究的基础。对精子活力的评价,目前尚

无统一标准,一般通过检查精子激活比例、精子运动时间和精子运动激烈程度等指标来确定^[13]。本研究采用精子激活后的快速运动时间、寿命来比较受试鱼的精子质量。

受试的雄鱼为同龄、饲养在同一池内的鱼,差别在于经产雄鱼是上年度经人工催情挤过精液的,初产雄鱼是上年未经注射和挤精液的。测定结果表明:二者精子活力相差较大,经产雄鱼的精液明显优于初产雄鱼。本研究证明,施氏鲟雄鱼的精巢每年成熟,同龄鱼的精子活力差别较大的原因,可能与性腺再次发育的基础有关。野生亲鱼进入产卵场前,有足够的催熟刺激,已经有少量精液排出,一旦时机到来即可大量排出,新的性腺随即开始再次发育,准备参加再次繁殖。这是生物与自然长期适应的结果。催产过的养殖雄鱼同样把成熟的精子排出,性腺的再发育也是在一个全新的基础之上,这一点与野生亲鱼相似。而养殖雄鱼不经催产不会排精,精巢再发育之前,原来已经成熟的精子有一个退化的过程,这可能是影响其精子质量的主要原因。了解养殖雄鱼的这种差别,对养殖鲟鱼的人工繁殖具有特殊意义。雄性鲟鱼较雌鱼早成熟几年^[7,14],在养殖雌鱼首次成熟的前一年,有计划地催产下一年度需要使用的雄鱼,届时可获得活力好的精子,保证人工繁殖效果。试验结果还表明,不论经产雄鱼还是初产雄鱼的精子活力,均随采出时间的推移而变化,在10 h和16 h所取精液的精子活力基本相同,22 h以后精子活力开始明显降低。因此,人工繁殖时可采取雄鱼较雌鱼晚催情的方法,以保证雌雄亲鱼成熟的同步,获得最好的受精效果。

参考文献:

- [1] 任慕莲. 黑龙江鱼类[M]. 哈尔滨:黑龙江人民出版社, 1981. 5-10.
- [2] 曲秋芝,孙大江,赵明华,等. 施氏鲟剖腹取卵手术技术的研究[J]. 中国水产科学, 1995, 2(4): 94-96.
- [3] 尹家胜,潘伟志,孙大江. 低温环境下施氏鲟的人工繁殖研究[J]. 生态学报, 2001, 21(10): 1741-1744.
- [4] 潘伟志. 施氏鲟人工催产技术及低温早繁对策[J]. 水产学杂志, 1999, 12(2): 52-55.
- [5] 何珍,许平,周效广. 鲟鱼人工繁殖获取精液新方法试验[J]. 黑龙江水产, 2002, 4: 29-30.
- [6] 曲秋芝,孙大江,马国军,等. 施氏鲟全人工养殖研究初报[J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 277-279.
- [7] 章龙珍,庄平,张涛,等. 人工养殖施氏鲟性腺发育观察[J]. 中国水产科学, 2002, 9(4): 323-327.

- [8] Doroshov S I, Moberg G P, Van Eenennaam J P. Observation on the reproductive cycle of cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus* [J]. *Envir Biol Fish*, 1997, 48:265–278.
- [9] Moberg G P, Watson J C, Doroshov S, et al. Physiological evidence for two sturgeon gonadotropins *Acipenser transmontanus* [J]. *Aqu*, 1995, 135:27–39.
- [10] Williot P, Brun R, Rouault T, et al. Management of female spawners of the Siberian sturgeon *Acipenser baeri*: first results [A]. *Acipenser* [C]. Bordeaux: CEMAGREF Publ, 1991. 365–380.
- [11] Naotaka Omoto, Mamoru Maebayashi, Eri Misuhashi, et al. Histological observation of gonadal sex differentiation in the F₂ hybrid sturgeon, the bester [J]. *Fish Sci*, 2001, 67: 1104–1110.
- [12] Naotaka Omoto, Mamoru Maebayashi, Eri Misuhashi, et al. Effect of estradiol-17 β and 17 α -methyltestosterone on gonadal sex differentiation in the F₂ hybrid sturgeon, the bester [J]. *Fish Sci*, 2002, 68:1047–1054.
- [13] 邓岳松, 林浩然. 鱼类精子活力研究进展 [J]. *生命科学研究*, 1999, 3(4):271–278.
- [14] 张觉民. 黑龙江鱼类志 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1995. 24–36.

Artificial reproduction of cultured *Acipenser schenckii*

SUN Da-jiang¹, QU Qiu-zhi¹, MA Guo-jun¹, WANG Bing-qian¹,
WU Wen-hua¹, QIU Ling-quan¹, WANG Bin², XIA Yong-tao²

(1. Key Opening Laboratory of the Cold-water Fishes' Proliferation and Culture, Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 2. Technological and Engineering Center of Sturgeon's Reproduction, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Six female *Acipenser schenckii*, of which the eggs maturation was at stage IV and total length was 142–157 cm, were injected by external hormone LHRH-A₂ to induce them to spawn. Meanwhile, 20 adult male *A. schenckii* were injected with external hormone LHRH-A₂. Four of the six females reproduced 427.7 thousand eggs by surgery (cutting oviduct), and the total eggs weighted 7.7 kg. Artificial fertilization was conducted by half-drying method and the fertilization rate was 67.3%, and 126.9 thousand larvae were hatched, hatching rate 43.63%. During the experiment, the six females had spawning reaction at 33rd–44th hour after the injection with LHRH-A₂, which implicated that the effect time of external hormone treatment on cultured fish was longer than that on wild fish (reported previously). By different ways of getting eggs (by stomach cutting (reported previously), oviduct cutting and squeezing), the fertilization rate was much different that by squeezing, most mature eggs could not be collected; by the first two methods, most of the mature eggs could be collected, but the former was more complex in operation and the conducting time was lasted which would led to the decrease of fertilizing rate. For the adult males, the spermatozoa vitality was different between the first time and second time of spawning that the second-time-spawned eggs had longer time of motility than the first-time-spawned eggs.

Key words: *Acipenser schenckii*; artificial reproduction

Corresponding author: Qu Qiu-zhi.