

DOI: 10.12264/JFSC2024-0037

稀有白甲鱼人工繁殖与胚胎发育

韩淋梅^{1,2}, 刘明求¹, 李传武¹, 向兴³, 李建成⁴, 肖亚梅², 邹利^{1,2}, 田璐¹,
谢仲桂^{1,2}, 梁志强^{1,2}

1. 湖南省水产科学研究所, 湖南 长沙 410153;
2. 湖南师范大学生命科学学院, 省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室, 湖南 长沙 410081;
3. 怀化市洪江区畜牧水产事务中心, 湖南 怀化 418000;
4. 怀化天鲢自然保护有限公司, 湖南 怀化 418000

摘要: 为实现稀有白甲鱼 (*Onychostoma rara*) 的人工繁殖, 丰富稀有白甲鱼胚胎发育的生物学资料, 2016—2019 年从怀化市沅江水系捕捞野生稀有白甲鱼 12 批次, 放入网箱中进行驯化养殖, 获得性腺发育成熟的稀有白甲鱼亲本, 2019 年人工繁殖获得成功, 繁育苗种 8500 尾; 2023 年, 子一代苗种性腺发育成熟, 获得全人工繁殖成功, 繁殖苗种 20.2 万尾。雌鱼适宜催产药物组合和剂量为: LHRH-A₂ 12 μg/kg+HCG 700 IU/kg+PG 1.5 mg/kg, 分两次注射, 雄鱼剂量减半。采用干法受精, 显微镜下观察并记录受精卵的时序及发育特征。稀有白甲鱼受精卵颜色为黄色, 沉性卵, 具有微黏性, 受精 30 min 后黏性消失, 卵径为(2.21±0.06) mm, 吸水膨胀后卵径为(2.88±0.07) mm。水温为 19.5~25.5 °C 时, 稀有白甲鱼胚胎孵化时长约为 45.5 h, 孵化累积积温为 1024.39 h·°C。初孵鱼苗呈淡黄色, 全身无其他色素, 孵化后第 2 天, 眼球黑色素沉着, 心脏及腹部红色血管清晰可见。当孵化温度降低, 胚胎出膜的时间延长, 出膜前期眼球色素明显, 心脏及腹部可见红色血液流动, 表现出更完善的发育状态。本研究首次实现了稀有白甲鱼的人工繁殖, 并对其胚胎发育的时序及发育特征进行了较为系统的观察, 为稀有白甲鱼野生种群恢复及规模化产业开发提供了苗种, 也为我国土著鱼类繁育提供了重要参考资料。

关键词: 稀有白甲鱼; 人工繁殖; 胚胎发育

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)06-0662-12

稀有白甲鱼 (*Onychostoma rara*) 隶属鲤科 (Cyprinidae), 鲃亚科 (Barbinae), 白甲鱼属 (*Onychostoma*)。稀有白甲鱼主要以藻类为食, 辅食节肢动物、原生动物等, 其肉质鲜美, 营养丰富, 深受消费者喜爱, 是优质的淡水经济鱼类^[1-2]。历史上稀有白甲鱼主要分布于沅江水系和西江水系^[3], 由于过度捕捞及水环境破坏等原因, 野生稀有白甲鱼数量锐减, 目前仅在湖南怀化沅江、贵州锦屏清水江及西江等局部水域偶有发现, 已

被《中国物种红色目录》列为濒危鱼类^[4]。稀有白甲鱼具有重要的物种保护价值和经济价值。

目前, 有关稀有白甲鱼的报道主要集中在形态分类^[3,5-6]、地理分布^[3,6]、繁殖习性^[1]、染色体核型^[7]、外周血细胞特征^[8]、肌肉营养成分^[2]、血液生化指标^[9-10]、不同群体间形态度量学性状的差异性^[11]、遗传多样性^[12-13]、线粒体全基因组序列^[14]等方面。白甲鱼属的小口白甲鱼 (*Onychostoma lini*)、白甲鱼 (*Onychostoma sima*)、粗须白

收稿日期: 2024-02-28; **修订日期:** 2024-04-10.

基金项目: 省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室开放课题项目(2021KF003); 湖南省农业农村厅直属单位省级专项项目(2024); 农业农村部中央预算内投资计划项目(湘发改投资〔2023〕449号).

作者简介: 韩淋梅(1994-), 女, 博士, 工程师, 从事鱼类遗传与育种研究. E-mail: 1041309648@qq.com.

通信作者: 梁志强, 研究员, 主要从事鱼类遗传育种研究, E-mail: liangzhiqiang@163.com; 谢仲桂, 高级农艺师, 从事鱼类种质资源研究与利用, E-mail: 23692569@qq.com

甲鱼(*Onychostoma barbata*)以及多鳞白甲鱼(*Onychostoma macrolepis*)的人工繁殖与养殖技术^[15-21]以及胚胎发育观察^[22-26]也已有一些研究。而稀有白甲鱼的人工繁殖以及胚胎发育观察均未见报道。本研究于2016—2019年从怀化市沅江水系捕获野生稀有白甲鱼,人工驯化养殖获得成熟亲本,开展人工繁殖与全人工繁殖,并对其胚胎发育的时序及发育特征进行了较为系统的研究,为稀有白甲鱼野生种群恢复及规模化产业开发提供了苗种基础,也可给我国土著鱼类繁育提供重要参考资料。

1 材料和方法

1.1 亲鱼来源与养殖

在怀化天鲢自然保护有限公司洪江基地(简称洪江基地)开展研究实验,于2016—2019年从怀化市沅江水系捕捞野生稀有白甲鱼12批次,放入洪江基地网箱中进行驯化养殖,网箱材料为聚乙烯,网箱规格3.0 m×3.0 m×1.5 m,网目3 cm,网底为80目筛绢布(便于喂饲料);投喂通威青鱼专用饲料,饲料蛋白质含量30%;洪江基地水质较好,透明度为60~150 cm,溶解氧7.5~9.0 mg/L, pH 7.0~8.5,水流速度0.08~0.20 m/s。

1.2 人工繁殖与催产

在进行人工催产前,选择腹部柔软饱满且生殖孔红肿的雌性为母本;选择吻端和侧吻端有明显白色颗粒状珠星、轻轻按压腹部有乳白色精液流出的雄性为父本。挑选雌雄亲本各100尾,于两个网箱中分开暂养,用于后续的人工催产实验。利用ONSET HOBO MX2203(美国)温度记录仪记录亲鱼养殖场洪江基地2022年8月至2023年7月的周年水温变化,每天6:00、12:00、18:00、24:00分别记录1次水温。

2019至2023年,每年繁殖季节开展稀有白甲鱼的人工催产工作,选用促黄体素释放激素A₂(LHRH-A₂)、绒毛膜促性腺激素(HCG)和鲤鱼脑垂体(PG)作为催产药物进行混合注射,胸鳍基部注射,雌鱼分两次进行注射,第一针注射用量:LHRH-A₂ 2 μg/kg;第二针注射用量:LHRH-A₂ 10 μg/kg+HCG 700 IU/kg+PG 1.5

mg/kg,两次注射间隔时间为12 h, (24±0.5) °C水温下效应期约为11 h,雄鱼只注射一针,注射剂量为雌鱼第二针剂量的一半。至2023年,2019年繁殖的子一代稀有白甲鱼性成熟,并开展稀有白甲鱼后备亲本的人工催产工作,方法同上。

1.3 受精与孵化

雌鱼注射催产药物后,密切观察雌鱼产卵情况,选取产卵状况良好的雌鱼用湿毛巾包裹其头背部,裸露其生殖孔并擦干尾臀部的水分,由前往后轻轻挤压腹部,将卵粒挤入干燥的玻璃器皿中后,按同样的方法将雄鱼精液挤入卵粒中,采用干法受精,用羽毛轻轻搅拌使卵粒和精液充分混匀,1~2 min后孵化水激活,并且置于洪江基地40目的孵化框中进行孵化。孵化水为洪江基地的沅江江水,孵化框大小为1 m×1 m×1 m,水深为0.5 m,孵化过程中充氧泵24 h工作,保持水体溶解氧在6.5 mg/L以上。孵化过程中,发现死卵后立即挑除,防止污染健康的受精卵。

1.4 胚胎观察

取2023年6月10日早上人工受精的稀有白甲鱼受精卵150颗,将受精卵置于体式显微镜下进行连续观察。通过笔记本电脑将ImageView软件与显微镜连接进行连续拍照,用C1型显微镜测微尺(DIV=10 μm,总长度为1 mm)测量卵径的大小,最后用Adobe Photoshop CC (64 Bit)软件将胚胎发育图片进行编排。利用ONSET HOBO MX2203(美国)温度记录仪每0.5 h记录一次孵化水的温度,胚胎发育所需累计积温计算:胚胎发育各时期所需的积温=平均水温(°C)×胚胎发育至此阶段所用时间(h)。各发育期的划分参照文献^[22,27-29]方法,按照50%以上个体达到该时期特征的时间来划分。

1.5 数据统计与作图

统计子一代体重与体长数据:随机选取子一代已性成熟的雌雄个体30组进行体重、体长的数据测量。怀卵量统计:取3尾雌性稀有白甲鱼子一代进行解剖,并称量其体重、去内脏后的体重以及卵巢重量。在卵巢前、中、后3个部位称取1 g重的卵粒,乙醇固定,分散卵粒,统计卵粒数。绝对怀卵量=(卵巢前、中、后卵粒数总和/3 g)×

卵巢重; 相对怀卵量=绝对怀卵量/去内脏后的体重。

统计胚胎的受精率以及孵化率: 正常胚胎受精后能发育至原肠期, 而死胎或者未受精的胚胎则止步原肠期, 呈不透明的白色。取受精胚胎 500 粒于显微镜下观察, 稀有白甲鱼受精卵发育至原肠期约 12 h, 在受精后 12 h、21 h 以及 52 h 时统计白卵数和正常出膜的仔鱼数。

受精率=[(总卵数-12 h 白卵数)/总卵数]×100%

总孵化率=[正常出膜仔鱼数/(出膜卵数+21 h 白卵数+52 h 白卵数)]×100%

使用 Excel 2019、GraphPad Prism 对实验数据进行统计分析以及图形化展示, 结果以平均值±标准差($\bar{x}\pm SD$)表示。

2 结果与分析

2.1 亲本养殖情况及年度繁殖苗种数量

2019 年首次成功进行稀有白甲鱼人工繁殖, 并获苗种 8500 尾。人工繁殖的子一代经人工培育, 雄性和雌性个体 3~4 年后几乎全部性成熟, 2023 年实现稀有白甲鱼全人工繁殖成功。至 2023 年 12 月止, 洪江基地现有已性成熟的原种亲本约 100 组、后备亲本 2000 组。稀有白甲鱼后备亲本体重范围为 205~430 g/尾, 平均体重为 287 g/尾, 体

长范围为 19.9~26.0 cm/尾, 平均体长为 22.8 cm/尾(表 1)。2019 年繁殖成功的稀有白甲鱼子一代中, 第二年发现少量雄性性成熟个体, 第三年发现少量雌性性成熟个体, 至 2023 年 90%以上的稀有白甲鱼子一代个体性成熟, 其个体绝对怀卵量为 4208~4610 粒/尾, 平均绝对怀卵量为(4379±170)粒/尾, 个体相对怀卵量为 15.37~19.13 粒/g, 平均个体相对怀卵量为(17.00±1.58)粒/g(表 1)。2022 年 7 月至 2023 年 8 月, 洪江基地的水温周年变化见图 1a。结合 2019 至 2023 年稀有白甲鱼的繁殖经验, 在水温为 23~28 ℃时, 雌鱼的催产效果比较好, 效应时间约 11 h, 多数人工催产的雌性个体可产 2000 至 3000 卵粒。2023 年人工繁殖主要集中在 6 月至 7 月初, 6 月 10 日人工繁殖稀有白甲鱼胚胎的受精率为 89%, 孵化率为 72%; 2019 年繁殖苗种 0.85 万尾数, 2021 年繁殖苗种 1.06 万尾, 2023 年繁殖苗种 20.2 万尾, 洪江基地现有规格苗种 12 万尾(表 1)。

2.2 稀有白甲鱼胚胎发育

稀有白甲鱼受精卵为黄色, 沉性卵, 微黏性, 受精 30 min 后黏性消失, 当孵化温度为 19.5~25.5 ℃时, 从受精到孵化大约需要 45.5 h。稀有白甲鱼从受精到孵化过程中不同时期的发育特征以及至相应阶段的累积积温如表 2 所示。

表 1 稀有白甲鱼人工催产及繁殖效果
Tab. 1 Results of artificial reproduction of cultured *Onychostoma rara*

项目 item	平均值 mean	范围 range
体重/g body weight	287	205~430
体长/cm body length	22.8	19.9~26.0
绝对怀卵量/(粒/尾) absolute brood amount	4379	4208~4610
相对怀卵量/(粒/g) relative brood amount	17.00	15.37~19.13
效应时间/h effective time	11	—
受精率/% fertilized rate	89%	—
孵化率/% hatching rate	72%	—
2023 年原种亲本数/组 the number of wild parents in 2023	100	—
2023 年后备亲本/组 the number of cultured parents in 2023	2000	—
2019 年苗种繁殖量/尾 quantity of hatching-out larvae in 2019	0.85×10 ⁴	—
2021 年苗种繁殖量/尾 quantity of hatching-out larvae in 2021	1.06×10 ⁴	—
2023 年苗种繁殖量/尾 quantity of hatching-out larvae in 2023	2.02×10 ⁵	—
2023 年开口摄食仔鱼数/尾 number of initial-feeding larvae in 2023	1.20×10 ⁵	—

注: — 代表此处无数据。
Note: — represents no data herein.

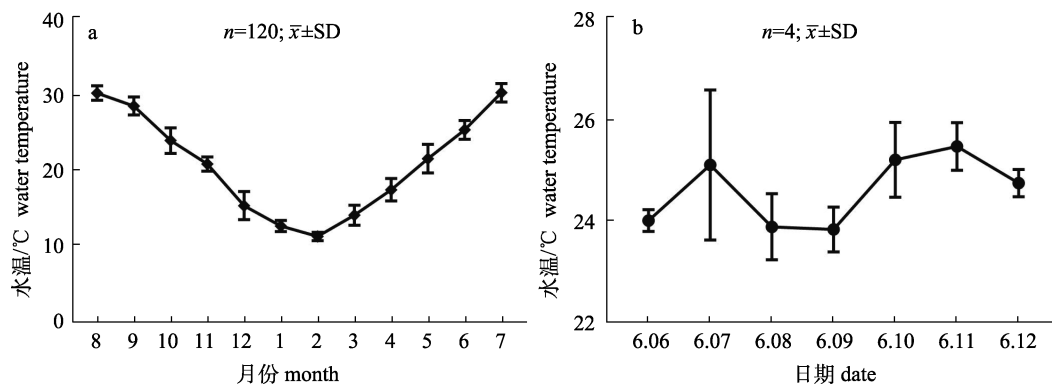


图1 洪江基地水温节律图

a. 2022年8月至2023年7月洪江基地水温周年节律图; b. 2023年6月6日至6月12日洪江基地孵化水水温变化图.

Fig. 1 Water temperature profile at Hongjiang farm

a. Cultivation water temperature at Hongjiang farm from August 2022 to July 2023; b. Hatching water temperature at Hongjiang farm from June 6 to June 12, 2023.

2.2.1 卵裂前期 受精卵未吸水膨胀前卵径为 (2.21 ± 0.06) mm, 30 min后吸水膨胀到最大, 膨胀后卵径为 (2.88 ± 0.07) mm (图 2-1)。卵黄膜内的原生质呈辐射状不断向动物极聚拢, 受精 50 min 后可观察到胚盘雏形, 随后, 胚盘不断隆起, 受精 1 h 16 min 达到最高, 此时为胚盘形成期(图 2-2)。

2.2.2 卵裂期 受精 1 h 40 min 后, 胚盘表面上方出现分裂沟, 此时细胞一分为二, 两个细胞大小相等, 为 2 细胞期(图 2-3)。受精后 2 h 2 min, 出现第二次分裂, 此时分裂方向与第一次的垂直, 将细胞分成 4 个相同大小的细胞(图 2-4)。受精后 2 h 25 min, 出现第 3 次分裂, 出现两列平行的分裂沟, 分裂沟方向与第一次的分裂沟平行, 将细胞分成等大的 8 个细胞(图 2-5)。受精后 2 h 47 min, 出现第 4 次分裂, 分裂出上下两行细胞, 每行 4 个细胞, 总共 16 个细胞, 此时细胞大小基本相等, 为 16 细胞期(图 2-6)。受精后 3 h 10 min, 出现第 5 次分裂, 分裂成 4 行 8 列 32 个大小不一的细胞, 此后细胞分裂不再统一, 为 32 细胞期(图 2-7)。受精后 3 h 30 min, 进行第 6 次分裂, 分裂成 64 细胞, 为 64 细胞期(图 2-8)。受精后 4 h 15 min, 细胞不断分裂, 不成行成列分布, 而是聚集成团, 随着分裂次数的增加, 细胞越来越小, 细胞之间排列越来越紧密, 进入多细胞期(图 2-9)。

2.2.3 囊胚期 动物极的细胞不断分裂增多, 受精后 5 h 30 min, 囊胚隆起于卵黄之上, 如一顶帽

子一般, 进入囊胚早期(图 2-10), 此时在囊胚表面, 细胞与细胞之间仍可见清晰的界限, 植物极开始出现凹陷的波动性运动。受精后 7 h, 囊胚层细胞开始向卵黄囊一端进行下包运动, 囊胚逐渐降低, 进入囊胚中期(图 2-11)。囊胚层细胞继续向植物极进行下包运动, 受精后 9 h 35 min, 囊胚层细胞几乎与卵黄囊持平, 进入囊胚晚期(图 2-12)。

2.2.4 原肠期 植物极仍不断进行凹陷的波动性运动, 囊胚层细胞继续下包, 囊胚与卵黄囊的界限逐渐模糊不清, 直至消失。受精后 11 h 30 min, 动物极细胞下包至卵黄囊的 1/3 处, 进入原肠早期(图 2-13), 可看见明显的胚环结构。受精后 15 h, 胚层下包至卵黄囊 1/2 处, 进入原肠中期(图 2-14)。受精后 16 h 30 min, 胚层下包至卵黄囊 3/4 处, 胚盾清晰可见, 进入原肠晚期(图 2-15)。

2.2.5 神经胚期 受精后 18 h 30 min, 胚层继续下包, 胚孔未完全闭合, 仅留卵黄栓外漏, 胚盾背面神经板开始形成, 进入神经胚时期(图 2-16)。受精后 21 h, 胚层完全包围卵黄, 胚孔封闭, 神经板背面神经褶不断向上内卷形成神经管, 进入胚孔封闭期(图 2-17)。

2.2.6 器官形成期 受精后 26 h 50 min, 神经板头端不断膨胀, 形成脑泡, 可见胚体雏形, 但胚体较透明, 隐约可见脑泡两侧椭圆形眼泡, 且不容易观察到肌节数目, 预估此时肌节数为 5, 进入肌节出现期(图 2-18)。受精后 27 h 50 min, 眼泡

表 2 稀有白甲鱼胚胎发育情况
Tab. 2 Embryonic development of *Onychostoma rara*

发育时期 embryonic development stage	主要特征 main characteristic	发育时间 time after fertilization	积温(h·℃) accumulated temperature	图序 figure ordinal
受精卵 fertilized egg	受精卵呈黄色, 近似球形, 微黏性, 卵黄物质丰富, 吸水后膨胀	30 min	10.34	图 2-1
胚盘形成期 blastoderm stage	细胞质向动物极移动, 颜色加深, 逐渐隆起形成胚盘, 直至最高	1 h 16 min	26.16	图 2-2
2 细胞期 2-cell stage	胚盘上方细胞分裂成两个相同大小的细胞	1 h 40 min	34.37	图 2-3
4 细胞期 4-cell stage	第二次分裂与上一次垂直, 分裂成 4 个等大的细胞	2 h 02 min	41.90	图 2-4
8 细胞期 8-cell stage	第三次分裂, 上下两行细胞, 每行 4 个细胞	2 h 25 min	49.75	图 2-5
16 细胞期 16-cell stage	第四次分裂, 4 行 4 列 16 个细胞	2 h 47 min	57.26	图 2-6
32 细胞期 32-cell stage	第五次分裂, 4 行 8 列 32 个细胞	3 h 10 min	65.41	图 2-7
64 细胞期 64-cell stage	第六次分裂, 8 行 8 列 64 个细胞	3 h 30 min	72.85	图 2-8
多细胞期 muti-cell stage	细胞持续分裂, 聚集成团, 细胞之间界限逐渐模糊	4 h 15 min	90.05	图 2-9
囊胚早期 early blastula	细胞数目增多, 囊胚隆起于卵黄之上	5 h 30 min	120.41	图 2-10
囊胚中期 middle blastula	囊胚层高度下降, 囊胚层细胞向卵黄下包	7 h	154.55	图 2-11
囊胚晚期 late blastula	囊胚层细胞下包至卵黄的 1/4 处	9 h 35 min	208.00	图 2-12
原肠早期 early gastrula stage	胚层下包至 1/3 处, 胚环出现	11 h 30 min	250.10	图 2-13
原肠中期 mid gastrula stage	胚层下包至 1/2 处	15 h	323.61	图 2-14
原肠晚期 late gastrula stage	胚层下包至 3/4 处, 出现胚盾	16 h 30 min	354.48	图 2-15
神经胚期 neurula stage	胚层下包, 仅留卵黄栓外露, 神经板形成	18 h 30 min	395.34	图 2-16
胚孔封闭 blastopore closing stage	胚层继续下包, 完全包围卵黄	21 h	445.90	图 2-17
肌节出现期 appearance of myomere	神经板头端不断隆起形成脑泡, 可见胚体、眼泡雏形, 肌节约 5 对	26 h 50 min	585.78	图 2-18
眼囊出现期 eye sac formation	脑泡继续膨大, 脑泡两侧的眼泡内陷, 形成眼囊	27 h 50 min	589.89	图 2-19
尾芽出现期 tail bud appearance	嗅囊、听囊出现, 尾芽游离于卵黄之上, 肌节约 15 对	29 h 30 min	631.21	图 2-20
晶体出现期 eye lens forming stage	眼囊中出现圆形的晶体	31 h	669.05	图 2-21
肌肉效应期 muscle response stage	尾部肌肉出现有节律的收缩	33 h	719.87	图 2-22
心跳期 stage of heart beating	晶体越来越明显, 尾芽伸长, 心脏开始搏动	38 h 50 min	863.52	图 2-23
出膜前期 prophase of incubation	胚体频繁扭动, 尾部不断撞击卵膜, 胚体呈淡黄色, 无明显色素	42 h 20 min	947.78	图 2-24
出膜前期 prophase of incubation	6 月 6 日批次的受精卵, 眼球色素明显, 心脏和腹部可看见红色血液流动	54 h 50 min	—	图 2-25
刚出膜幼苗 newly hatched larvae	44 h 20 min 开始脱膜, 幼苗整体呈淡黄色, 全长约 7.2 mm	45 h 30 min	1024.39	图 2-26
出膜第一天 the first day after hatching	卵黄囊由球状逐渐变成棒状, 心脏处可见红色血液	69 h 50 min	—	图 2-27
出膜第二天 the second day after hatching	眼球色素逐渐加深, 心脏和腹部可见红色血液流动	74 h 40 min	—	图 2-28
出膜第三天 the third day after hatching	眼球黑色素明显, 全身血管清晰可见, 肌节约 35 对	106 h	—	图 2-29

注: 胚胎发育期间水温为 19.5–25.5 ℃; —代表此处无数据。

Note: The water temperature is 19.5–25.5 ℃ during embryonic development; — represents no data herein.

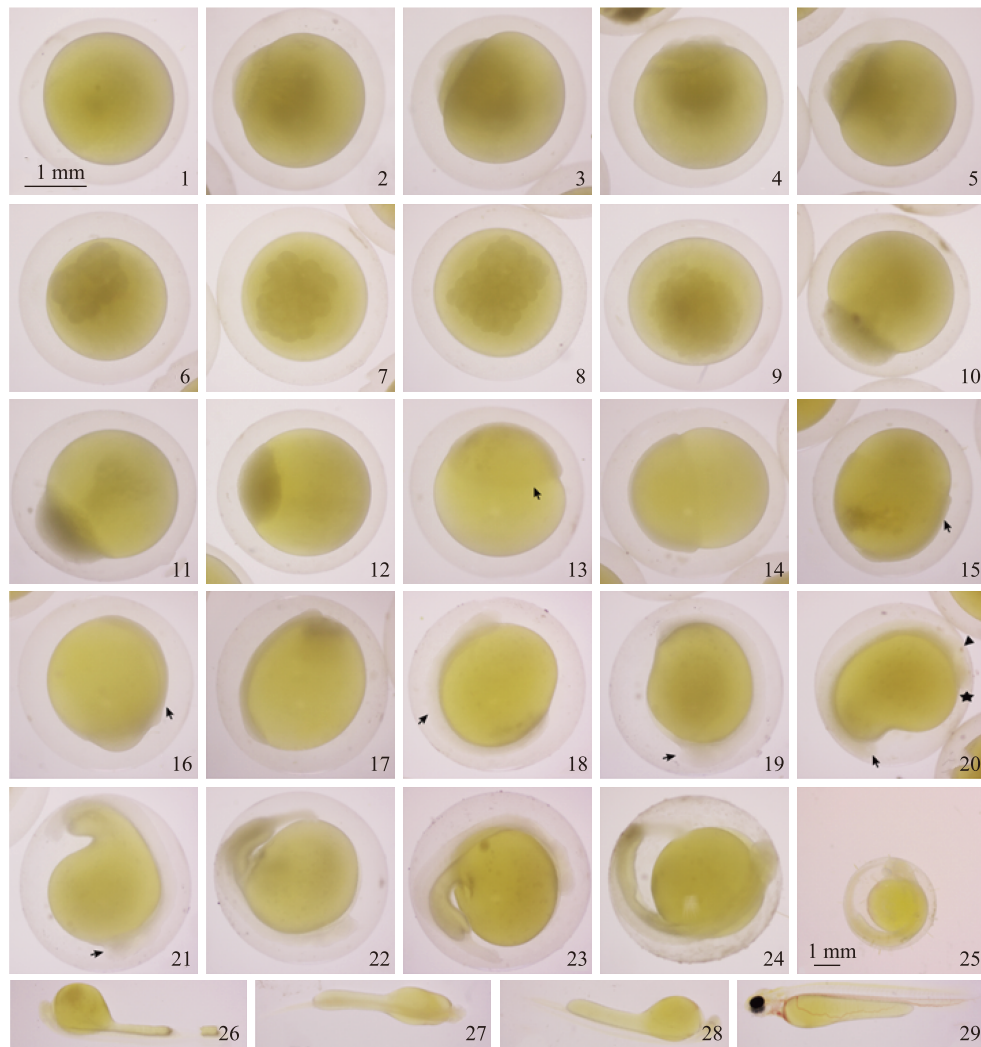


图2 稀有白甲鱼胚胎发育情况

1. 受精卵(10日 11:13); 2. 胚盘形成期(10日 11:56); 3. 2细胞期(10日 12:18); 4. 4细胞期(10日 12:39); 5. 8细胞期(10日 13:04); 6. 16细胞期(10日 13:27); 7. 32细胞期(10日 13:58); 8. 64细胞期(10日 14:17); 9. 多细胞期(10日 14:49); 10. 囊胚早期(10日 16:05); 11. 囊胚中期(10日 17:36); 12. 囊胚晚期(10日 20:19); 13. 原肠早期(10日 22:12), 胚环(➡); 14. 原肠中期(11日 01:19); 15. 原肠晚期(11日 03:19), 胚盾(➡); 16. 神经胚期(11日 05:26), 神经板(➡); 17. 胚孔封闭期(11日 07:03); 18. 肌节出现期(11日 13:33), 胚体(➡); 19. 眼囊出现期(11日 14:40), 眼囊(➡); 20. 尾芽出现期(11日 16:28), 游离尾芽(➡), 嗅囊(★), 听囊(▲); 21. 晶体出现期(11日 17:35), 晶体(➡); 22. 肌肉效应期(11日 19:45); 23. 心跳期(12日 01:37); 24. 出膜前期(12日 05:10); 25. 出膜前期(6月6日批次受精卵, 08日 17:50); 26. 刚出膜幼苗(12日 08:16); 27. 出膜后第一天(13日 08:30); 28. 出膜后第二天(13日 13:20); 29. 出膜后第三天(14日 20:40). 胚胎发育观察在2023年6月进行. 图2-1至图2-24的比例尺同图2-1; 图2-25至图2-29的比例尺同图2-25.

Fig. 2 Embryonic development of *Onychostoma rara*

1. Fertilized egg (11:13, 10th); 2. Blastoderm stage (11:56, 10th); 3. 2-cell stage (12:18, 10th); 4. 4-cell stage (12:39, 10th); 5. 8-cell stage (13:04, 10th); 6. 16-cell stage (13:27, 10th); 7. 32-cell stage (13:58, 10th); 8. 64-cell stage (14:17, 10th); 9. Multi-cell stage (14:49, 10th); 10. Early blastula (16:05, 10th); 11. Middle blastula (17:36, 10th); 12. Late blastula (20:19, 10th); 13. Early gastrula stage (22:12, 10th), embryotoxon (➡); 14. Mid gastrula stage (01:19, 11th); 15. Late gastrula stage (03:19, 11th), embryonic shield (➡); 16. Neurula stage (05:26, 11th), neural plate (➡); 17. Blastopore closing stage (07:03, 11th); 18. Appearance of myomere (13:33, 11th), idiosome (➡); 19. Eye sac formation (14:40, 11th), eye sac (➡); 20. Tail bud appearance (16:28, 11th), separate tail bud (➡), olfactory sac (★), otocyst (▲); 21. Eye lens forming stage (17:35, 11th), eye lens (➡); 22. Muscle response stage (19:45, 11th); 23. Stage of heart beating (01:37, 12th); 24. Prophase of incubation (05:10, 12th); 25. Prophase of incubation (The fertilized egg on June 6th, 17:50, 8th); 26. Newly hatched larvae (08:16, 12th); 27. the first day after hatching (08:30, 13th); 28. the second day after hatching (13:20, 13th); 29. the third day after hatching (20:40, 14th). Embryo development observation was conducted in June 2023. The scales of Fig. 2-1 to Fig. 2-24 are the same as that of Fig. 2-1. The scales of Fig. 2-25 to Fig. 2-29 are the same as that of Fig. 2-25.

中心内陷,出现眼囊结构,进入眼囊出现期(图 2-19)。受精后 29 h 30 min,嗅囊、听囊出现,尾牙游离于卵黄之上,肌节约 15 对,进入尾芽出现期(图 2-20)。受精后 31 h,胚体尾端卵黄囊开始凹陷,晶体出现,进入晶体出现期(图 2-21)。受精后 33 h,胚体尾部开始有节律地收缩,每分钟约 15 次,进入肌肉效应期(图 2-22),随后尾部摆动频率增加,从带动尾部运动到整个胚体不停地在卵膜内上下翻转。受精后 38 h 50 min,晶体越来越明显,尾牙伸长,心脏开始搏动,未见血液循环,进入心跳期(图 2-23)。

2.2.7 孵化期 受精后 42 h 20 min,胚体频繁扭动,尾部不断撞击卵膜,进入孵化前期(图 2-24),此时胚胎的眼球色素不明显,未见红色的血流信号。受精后 45 h 30 min,胚胎尾部不断撞击卵膜,随后整个胚体脱膜而出,此时刚脱膜的幼苗,卵黄囊大且圆,全身无色素,体长约 6.67 mm (图 2-26)。受精后 69 h 50 min,孵化后的第一天,幼苗整体呈黄色,眼球色素不明显,卵黄囊逐渐变小,由圆形向棒状形态转变,心脏跳动约 80 次/min,心脏处出现红色血流信号(图 2-27)。受精后 74 h 40 min,孵化后的第二天,幼苗眼球的色素明显加深,腹部出现明显的血流信号(图 2-28)。受精后 106 h,孵化后的第 3 天,幼苗眼球的色素明显加深,卵黄囊变成长棒状,颈部一侧三排鳃弓平行排列,鳃丝上布满毛细血管,全身血管也清晰可见,心脏跳动约 120 次/min,肌节数约 35 对,口可以进行开合运动(图 2-29)。

洪江基地孵化水水温监测显示 2023 年 6 月 6 日至 12 日孵化水水温呈波动性升高(图 1b)。2023 年 6 月 6 日早上 11 点受精的稀有白甲鱼胚胎(洪江基地孵化)在受精后 54 h 50 min 才进入孵化前期,这批次胚胎在孵化前期表现出的发育特征为眼球色素明显,心脏和腹部有红色血流信号(图 2-25),相比于 6 月 10 日批次受精的胚胎,其胚胎在孵化前期时的发育程度更加完善。

3 讨论

3.1 稀有白甲鱼的人工养殖与繁殖习性

野生稀有白甲鱼的生存环境对水质条件要求

较高,特别是溶氧量、pH 值、氨氮含量等环境因子。目前捕获的野生稀有白甲鱼以江河网箱驯养为主,但江河网箱难以实现规模化养殖,池塘驯养和水泥池流水驯养又容易暴发病虫害。2023 年稀有白甲鱼的年苗种繁殖量已达 20.2 万尾,目前计划以圈养桶的养殖模式来扩大稀有白甲鱼的养殖规模。

饲料也是影响驯养稀有白甲鱼成功率的关键,通过比较草鱼、青鱼、鲟鱼等多种蛋白质含量不同的饲料进行驯养和苗种培育,发现通威青鱼专用饲料(蛋白质含量 30%)养殖效果相对较好。白甲鱼属的多种鱼类在繁殖季节之前会提前进行亲鱼培育,比如多鳞白甲鱼的亲鱼培育采用鲟鱼专用配合饲料搭喂水蚯蚓喂养^[30]或是以配合饲料缓沉料(粗蛋白质水平 42%)搭配黄粉虫喂养^[18],白甲鱼的亲鱼培育采用蛋白含量在 42%以上的人工配合饲料并辅以水蚯蚓的方式喂养^[16],表明饲料喂养对亲鱼的性腺成熟起关键作用。本研究中稀有白甲鱼子一代雄性与雌性个体初次性成熟年龄分别为 2 龄、3 龄,但数量较少难以开展人工繁殖工作,4 龄个体中 90%以上能达性成熟,与野生稀有白甲鱼性成熟时间相比几乎缩短了一年^[1]。这显示在繁殖季节提前进行亲鱼培育,改善亲鱼的饲料配方,可以缩短稀有白甲鱼性成熟所需的年限,在实现规模化养殖后,可节约养殖成本提高经济收益。

3.2 稀有白甲鱼的胚胎发育

本研究发现不同批次的胚胎发育在孵化时间以及孵化前期的特征形态上有很大的差别。这很有可能和孵化的温度^[31]以及胚胎自身分泌的孵化酶^[32]有关,而环境温度也会影响孵化酶的分泌量以及活性从而改变胚胎孵化的快慢^[33]。洪江基地 6 月初的水温波动性逐渐上升(图 1b),6 月 6 日批次的鱼卵受精后 54 h 50 min 发育到孵化前期,眼球色素明显,心脏以及腹部有明显的血流信号;而 6 月 10 日批次的鱼卵受精后 42 h 20 min 发育至孵化前期,45 h 30 min 脱膜,孵化后第二天才具有类似的形态特征(表 2)。表明一定范围内温度增加,孵化酶的活性增强,稀有白甲鱼胚胎孵化的时间缩短,但温度升高也会导致胚胎的眼睛、

心脏以及血管等器官发育延迟,但不影响其正常的胚后发育。鱼类孵化主要靠胚体运动以及孵化酶的裂解作用^[34-36],孵化酶的浓度和活性过高,导致胚胎发生提早脱膜的现象^[37],会对人工繁殖生产造成重大损失。在开展稀有白甲鱼人工繁殖工作前,须留意当地气温变化,避免造成不必要的损失。

3.3 稀有白甲鱼与同属其他鱼类的胚胎发育比较

稀有白甲鱼的卵粒特征与同属鱼类较为相似,

卵粒黄色,沉性卵,具有微黏性,吸水膨胀后黏性消失(表 3),这与其分布于水流较湍急、底质多砾石的江段环境相适应。稀有白甲鱼及其同属鱼类的受精卵吸水膨胀后黏性消失,随水流向下分散到岩石的空隙之中,避免被捕食,提高孵化率。受精卵这种很强的分散性的特征使稀有白甲鱼保持了种族的延续性。稀有白甲鱼胚胎孵化时间以及孵化所需积温与白甲鱼和泰山赤鳞鱼(*Scaphesthes macrolepis*)相差不大,但粗须白甲鱼、多

表 3 稀有白甲鱼与其他鱼类胚胎发育特点比较
Tab. 3 Comparison of embryonic development characteristics between *Onychostoma rara* and other fishes

种名 species	稀有白甲鱼 <i>Onychostoma rara</i>	白甲鱼 ^[22] <i>Onychostoma simus</i>	粗须白甲鱼 ^[23] <i>Onychostoma barbata</i>	多鳞白甲鱼 ^[24] <i>Varicorhinus macrolepis</i>	清江河多鳞白甲鱼 ^[25] <i>Onychostoma macrolepis</i>	泰山赤鳞鱼 ^[26] <i>Scaphesthes macrolepi</i>
卵色 colour of egg	黄色	淡黄色	浅灰色	金黄色或白色	金黄色	黄色或淡黄色
卵粒性状 egg trait	微黏、沉性	微黏、沉性, 30 min 后失去 黏性	微黏、沉性	黏性、沉性	遇水强黏性, 20 min 后黏性减弱	受精后黏性, 20-30 min 后黏性 消失
卵径/mm egg diameter	2.21±0.06	2.0-2.3	1.99±0.04	2.46±0.12	1.90±0.02	1.65-1.82
吸水后卵径/mm egg diameter after abs- orbing water	2.88±0.07	2.8-2.9	2.81±0.07	2.87±0.36	2.60±0.03	2.38-2.45
水温/℃ water temperature	19.6-25.5	23-25	16.5-21.7	17.2±0.5	19±1	22.5-24.5
胚胎孵化时间/(h, min) time from fertilization to hatching	45 h 30 min	48 h	101.43 h	147 h 30 min	80 h	46 h 50 min
胚胎孵化所需 积温/(h·℃) accumulated tempera- ture from fertilization to hatching	1024.39	1146.62	—	2 537.82	1 551.98	—
出膜仔鱼发育时期 development stage of newly hatched larvae	全身无色素, 心跳,出膜 后第二天具 红色血液循 环	全身无色素, 心跳,血液略 带黄色,有血 液循环	鱼体透明,色素 少,心跳,血液 红色且循环明显	全身透明,心 跳,出膜后第二 天具红色血液 循环	鱼体透明,心跳,血 液循环	全身透明,心跳, 孵化一段时间后 红色血管清晰, 晚出膜的胚胎发 育更完善
出膜时仔鱼全长/mm newly hatched larvae size	6.67±0.53	5.5-6.6	—	8. 86±0. 52	6.00-7.00	6-6.5
出膜时仔鱼肌节数 number of myomere of newly hatched larvae	35	48	—	—	—	46-48
出膜时仔鱼心跳 次数/min heartbeat of newly hatched larvae	120	122	—	114-128	85-90	180

注: — 代表此处无数据。
Note: — represents no data herein.

鳞白甲鱼以及清江河白多鳞白甲鱼的胚胎孵化时间以及孵化所需积温明显大于稀有白甲鱼(表 3)。受地理分布以及自身繁殖习性的影响,在一定温度范围内,胚胎孵化时间与温度呈负相关。李岑等^[38]认为温度对鱼类胚胎发育的作用机制并不完全基于量的积累,其他环境因子及遗传因素也调控胚胎的代谢和发育。因此,稀有白甲鱼胚胎孵化所需累积积温与同属鱼类相比具有一定的差异。鱼类的卵径越大代表其内源性营养越充足,越有利于应对繁殖季节的低温环境。当饵料生物短缺时,卵黄囊内的营养物质也能保证初孵仔鱼有充足的时间由内源性营养向外源性营养转化。稀有白甲鱼的卵径为 (2.21 ± 0.06) mm,与淡水石首鱼(*Aplodinotus grunniens*)(1.07 ± 0.04) mm^[39]以及草海鲫鱼(*Carassius auratus*)(1.50 mm)^[40]相比,稀有白甲鱼及其同属鱼类属于大卵径的鱼类(表 3),为其转食预留了充足的时间,有利于提高仔鱼的存活率。稀有白甲鱼初孵仔鱼的肌节数为 35,明显少于白甲鱼和泰山赤鳞鱼(表 3)。Hempel 等^[41]发现在一定条件下,初孵仔鱼的肌节数与孵化的温度呈负相关。不同种之间初孵仔鱼的肌节数具有一定的差异,同种不同个体之间肌节的数量也受环境因素的影响。稀有白甲鱼出膜时幼苗淡黄色全身无其他色素,到出膜后第二天,血液为红色,心脏以及腹部的血管逐渐清晰可见,这与白甲鱼和多鳞白甲鱼较为相似;孵化温度降低,胚胎孵化时间延长,稀有白甲鱼膜内的胚胎会发育更为完善,这与泰山赤鳞鱼晚出膜的胚胎发育情况较为相似(表 3)。综上所述,胚胎的发育不仅具有种的差异性,也受环境因素的影响,造成器官发育程度和阶段以及胚胎出膜的时间有所不同。

致谢: 感谢怀化天鲢自然保护有限公司的张在权与怀化市畜牧水产事务中心余长生、补子龙等人在野生稀有白甲鱼的捕捞、稀有白甲鱼日常养殖等事务上提供的帮助。

参考文献:

- [1] Wang X H. Studies on the biological characteristics and the evaluation of genetic resource of *Onychostoma rara*[D]. Guiyang: Guizhou University, 2006. [王晓辉. 稀有白甲鱼

- 的生物学特性及种质资源评估[D]. 贵阳: 贵州大学, 2006.]
- [2] Dai Y G, Wang X H. Dressed ratio and nutritive composition of *Onychostoma rara*[J]. Fisheries Science, 2007, 26(1): 7-11. [代应贵, 王晓辉. 稀有白甲鱼含肉率及肌肉营养成分分析[J]. 水产科学, 2007, 26(1): 7-11.]
- [3] Shan X H, Lin R D, Le P Q, et al. *Onychostoma*[M]//Le P Q. Zoology of China·Osteichthyes·Cyprinidae (volume 3). Beijing: Science Press, 2000: 126-147. [单向红, 林人端, 乐佩琦, 等. 白甲鱼属[M]//乐佩琦. 中国动物志·硬骨鱼纲·鲤形目(下卷). 北京: 科学出版社, 2000: 126-147.]
- [4] Wang S, Xie Y. Red list species of China (volume 1): Red list[M]. Beijing: Higher Education Press, 2004: 160. [汪松, 解焱. 中国物种红色名录(第一卷): 红色名录[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 160.]
- [5] Hunan Fisheries Science Institute. Hunan Fish[M]. Changsha: Hunan People's Publishing House, 1977. [湖南省水产科学研究所. 湖南鱼类志[M]. 长沙: 湖南人民出版社, 1977.]
- [6] Zheng C Y. Zhujiang Fish[M]. Beijing: Science Press, 1989. [郑慈英. 珠江鱼类志[M]. 北京: 科学出版社, 1989.]
- [7] Ran G X, Dai Y G, Luo H X. Chromosome karyotype analysis in endangered species *Onychostoma rara*[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2014(8): 242-243, 248. [冉光鑫, 代应贵, 罗昊翔. 濒危鱼类稀有白甲鱼染色体核型分析[J]. 现代农业科技, 2014(8): 242-243, 248.]
- [8] Dai Y G, Yue X T, Yin B Y. Characteristics of peripheral hemocytes in endangered fish *Onychostoma rara*[J]. Chinese Journal of Zoology, 2014, 49(6): 875-885. [代应贵, 岳晓炯, 尹邦一. 濒危鱼类稀有白甲鱼外周血细胞特征[J]. 动物学杂志, 2014, 49(6): 875-885.]
- [9] Yue X T, Dai Y G, Yin B Y. Determination of biochemical blood index of *Onychostoma rara* from the Yuanjiang River[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(19): 160-162. [岳晓炯, 代应贵, 尹邦一. 沅江水系稀有白甲鱼血液生化指标的测定[J]. 广东农业科学, 2012, 39(19): 160-162.]
- [10] Yue X T. Effect of stored time on the biochemical indices of serum in *Onychostoma rara*[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2014, 33(3): 46-49. [岳晓炯. 存放时间对稀有白甲鱼血清样品生化指标测定结果的影响[J]. 山地农业生物学报, 2014, 33(3): 46-49.]
- [11] Dai Y G, Yue X T, Yin B Y. Morphometrics differences between the populations of endangered species *Onychostoma rara* from Yuanjiang River and Xijiang River systems, Southwest China[J]. Chinese Journal of Ecology, 2013, 32(3): 641-647. [代应贵, 岳晓炯, 尹邦一. 濒危鱼类稀有白甲鱼沅江种群与西江种群形态度量学性状的差异性[J]. 生态学杂志, 2013, 32(3): 641-647.]

- [12] Peng S. Polymorphism of D-loop sequence from mtDNA of *Onychostoma rara*[D]. Guiyang: Guizhou University, 2008. [彭珊. 稀有白甲鱼 mtDNA D-loop 序列多态性研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2008.]
- [13] Ran G X, Dai Y G, Yue X T. Structure and genetic diversity of mtDNA D-loop in the population of *Onychostoma rara* from the Xijiang River[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(2): 176-182. [冉光鑫, 代应贵, 岳晓炯. 稀有白甲鱼西江种群 mtDNA D 环区的结构及遗传多样性[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(2): 176-182.]
- [14] Zeng C F, Li X L, Li C W, et al. Mitochondrial DNA sequence of *Onychostoma rara*[J]. Mitochondrial DNA, 2015, 26(5): 744-746.
- [15] Shen Z X, Fan J D, Xu Q Z, et al. Study on artificial breeding technique of *Onychostoma lini* (Wu) on the Fanjingshan Mountain[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(20): 5096-5098. [沈正雄, 樊均德, 许勤智, 等. 梵净山小口白甲鱼人工养殖技术研究[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(20): 5096-5098.]
- [16] Liu C, Long M X. Summary of artificial breeding experience of *Onychostoma sima*[J]. Sichuan Agricultural Science and Technology, 2018(11): 50-51. [刘超, 龙命雄. 白甲鱼人工繁殖经验总结[J]. 四川农业科技, 2018(11): 50-51.]
- [17] Chen F X, Zhang X B, Zhou Q C, et al. Artificial breeding experiment of *Onychostoma barbata*[J]. Agricultural Technology Service, 2020, 37(9): 50-51. [陈飞雄, 张显波, 周其椿, 等. 粗须白甲鱼人工繁殖试验[J]. 农技服务, 2020, 37(9): 50-51.]
- [18] Jing C B, Ma L, Xu G W. Artificial breeding and cultivation technique of *Onychostoma macrolepis*[J]. Scientific Fish Farming, 2023(6): 49-50. [金灿彪, 马力, 徐国文. 多鳞白甲鱼的人工繁殖与养殖技术[J]. 科学养鱼, 2023(6): 49-50.]
- [19] Chen Z F, Li G, Xi Y, et al. Study on artificial breeding technique of *Onychostoma macrolepis*[J]. Scientific Fish Farming, 2023(3): 18-19. [陈志方, 李刚, 邵禹, 等. 多鳞白甲鱼人工繁育技术研究[J]. 科学养鱼, 2023(3): 18-19.]
- [20] Gou N N, Wang K F. A review: Research on biology and artificial breeding techniques in largescale shoveljaw fish *Onychostoma macrolepis*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2021, 34(1): 88-93. [苟妮娜, 王开锋. 多鳞白甲鱼生物学与繁育技术研究进展[J]. 水产学杂志, 2021, 34(1): 88-93.]
- [21] Dong W Z, Wang T, Ma L, et al. Artificial reproduction of *Varicorhinus macrolepis* in Qin-Ba Mountains[J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2016, 35(3): 27-30, 35. [董武子, 王涛, 马力, 等. 秦巴山区多鳞白甲鱼人工繁殖试验[J]. 畜牧兽医杂志, 2016, 35(3): 27-30, 35.]
- [22] Li Y, Zhang Y G, Xie B W, et al. Observations on the embryonic and larval development of *Varicorhinus (Onychostoma) simus*[J]. Journal of Southwest China Normal University (Natural Science), 2006, 31(5): 142-147. [李勇, 张耀光, 谢碧文, 等. 白甲鱼胚胎和胚后发育的初步观察[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2006, 31(5): 142-147.]
- [23] Liang Z Q, Li Q J, Song X C, et al. Observation on the embryonic development of *Onychostoma barbata*[J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition), 2022, 43(2): 1-5. [梁正其, 李沁瑾, 宋兴超, 等. 粗须白甲鱼的胚胎发育观察[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2022, 43(2): 1-5.]
- [24] Liu D, Yan H G, Dong Z L, et al. Observation of the early development characteristics of *Varicorhinus macrolepis*[J]. Freshwater Fisheries, 2022, 52(4): 92-98. [刘德, 闫井果, 董智玲, 等. 多鳞白甲鱼早期发育特征观察[J]. 淡水渔业, 2022, 52(4): 92-98.]
- [25] Li S, Li H, Zhang M J, et al. Observation on the embryonic development of *Onychostoma macrolepis* in Qingjiang River[J]. Agricultural Science and Engineering in China, 2021, 33(2): 36-40. [李松, 李宏, 张明建, 等. 清江河多鳞白甲鱼胚胎发育观察[J]. 中国农业文摘-农业工程, 2021, 33(2): 36-40.]
- [26] Chen H J, Jiang Y L, Song J Y, et al. Study on the embryonic development of *Scaphesthes macrolepis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(6): 926-933. [陈红菊, 姜运良, 宋憬愚, 等. 泰山赤鳞鱼胚胎发育的研究[J]. 水生生物学报, 2008, 32(6): 926-933.]
- [27] Yang M. Study on embryo development and early antioxidant ability of *Schizothorax grahami*[D]. Guiyang: Guizhou University, 2020. [杨梅. 昆明裂腹鱼胚胎发育及早期抗氧化能力研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.]
- [28] Kuang J H, Chen G, Ma Q, et al. Embryonic development and morphological characteristics of larvae and juveniles of cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(11): 1814-1824. [邝杰华, 陈刚, 马骞, 等. 军曹鱼的胚胎发育及仔稚鱼形态观察[J]. 水产学报, 2021, 45(11): 1814-1824.]
- [29] Zhao C H. Preliminary observation on embryonic development of *Rhinogobius giurinus*[J]. South China Agriculture, 2023, 17(1): 6-12. [赵长华. 子陵吻虾虎鱼胚胎发育初步观察[J]. 南方农业, 2023, 17(1): 6-12.]
- [30] Zhang J. Experiment on artificial breeding and larval rearing techniques of *Onychostoma macrolepis*[J]. Jiangxi Feed, 2019(2): 19-21. [张君. 多鳞白甲鱼人工繁殖及苗种培育技术的试验[J]. 江西饲料, 2019(2): 19-21.]

- [31] Mendonça R C, Ikebata S P, Araújo-Silva S L, et al. Thermal influence on the embryonic development and hatching rate of the flameback pygmy angelfish *Centropyge aurantonotus* eggs[J]. *Zygote*, 2020, 28(1): 80-82.
- [32] Yamagami K. Studies on the hatching enzyme (choriolydin) and its substrate, egg envelope, constructed of the precursors (choriogenins) in *Oryzias latipes*: A sequel to the information in 1991/1992[J]. *Zoological Science*, 1996, 13(3): 331-340.
- [33] Liang Y J. Study on the development of hatching gland and the biochemical characteristics of hatching enzyme of *Misgurnus anguillicandatus*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2003. [梁宇君. 泥鳅孵化腺发育及孵化酶生化特性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2003.]
- [34] Lou Y D. Hatching enzyme of fishes[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1965(3): 97-101, 123. [楼允东. 鱼类的孵化酶[J]. 动物学杂志, 1965(3): 97-101, 123.]
- [35] Hou L. Study on secretion of hatching enzyme and dissolution of egg envelope in fishes[J]. *Hunan Fisheries*, 1984(3): 42-43. [候陵. 鱼类孵化酶的分泌与卵膜溶解的研究[J]. 湖南水产, 1984(3): 42-43.]
- [36] Fan T J, Shi Z P. Advances and prospect in fish hatching enzyme research[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2002(1): 48-56. [樊廷俊, 史振平. 鱼类孵化酶的研究进展及其应用前景[J]. 海洋湖沼通报, 2002(1): 48-56.]
- [37] Zhang Q, Zhao H X, Wu X D, et al. Discussion on the hatching enzyme of fishes and the premature digestion of egg envelope by artificial hatching[J]. *Current Fisheries*, 2005, 30(5): 19-20. [张奇, 赵红雪, 吴旭东, 等. 鱼类孵化酶及鱼类人工孵化提前脱膜问题探讨[J]. 内陆水产, 2005, 30(5): 19-20.]
- [38] Li C, Jiang Z Q, Liu Q K, et al. Embryonic development and temperature effects in fighting fish *Betta splendens*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2011, 26(5): 402-406. [李岑, 姜志强, 刘庆坤, 等. 泰国斗鱼的胚胎发育及温度对胚胎发育的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2011, 26(5): 402-406.]
- [39] Zhang L, Wen H B, Zheng B Q, et al. Artificial spawning and embryonic development of freshwater drum, *Aplodinotus grunniens*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(5): 569-578. [张亮, 闻海波, 郑冰清, 等. 淡水石首鱼人工催产与胚胎发育观察[J]. 中国水产科学, 2021, 28(5): 569-578.]
- [40] Wang J N, Tai D M, Zhou Q C, et al. Preliminary study on embryo and juvenile development of *Carassius auratus*[J]. *Northern Chinese Fisheries*, 2023, 42(1): 9-13. [王金娜, 邵定敏, 周其椿, 等. 草鱼鲫鱼胚胎和幼鱼发育的初步研究[J]. 黑龙江水产, 2023, 42(1): 9-13.]
- [41] Hempel G, Blaxter J H S. The experimental modification of meristic characters in herring (*Clupea harengus* L.)[J]. *ICES Journal of Marine Science*, 1961, 26(3): 336-346.

Artificial reproduction and embryonic development of *Onychostoma rara*

HAN Linmei^{1,2}, LIU Mingqiu¹, LI Chuanwu¹, XIANG Xing³, LI Jiancheng⁴, XIAO Yamei², ZOU Li^{1,2},
TIAN Lu¹, XIE Zhonggui^{1,2}, LIANG Zhiqiang^{1,2}

1. Hunan Fisheries Science Institute, Changsha 410153, China;

2. State Key Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China;

3. Animal Husbandry and Aquatic Products Bureau of Huaihua City, Huaihua 418000, China;

4. Huaihua Tianling Nature Protection Company, Huaihua 418000, China

Abstract: *Onychostoma rara* is a fish species distributed only in the Yuan River system in the middle Yangtze River and the Xijiang River system in the Pearl River basin of China. It is locally popular due to its tender meat, delicious taste, and high nutritional value. However, stressors including overfishing and environmental damage have led to a sharp decline in the number of *O. rara* and it is currently listed as an endangered fish species in the "Red List of Species in China." The artificial breeding and release of endangered fish can aid in protecting them from extinction. To achieve this, wild *O. rara* were captured from the Yuan River system in Huaihua from

2016–2019. In 2019, numerous artificially reared *O. rara* reached sexual maturity, and the F1 generation was obtained by artificial cultivation and manual stimulation with oxytocin. Our findings indicate that male F1 individuals attain sexual maturity for the first time at the age of 2 years, whereas female F1 individuals achieve sexual maturity at 3 years. By the age of 4 years, 90% of the F1 population has reached sexual maturity. In 2023, we successfully achieved the controlled reproduction of cultured *O. rara*. Until Dec 2023, there were 100 wild parents, 2000 cultured parents, and 2.02×10^5 newly hatched larvae. One hundred male and one hundred female parents were sequestered in two separate net cage for the subsequent artificial oxytocin experiment.” Artificial oxytocin was injected with a mixture of luteinizing hormone releasing hormone A_2 , chorionic gonadotropin, and carp pituitary gland extract. Each female received two injections, while each male received one that was half the dose of the female's second dose. After the response period was reached, which was approximately 11 h after the second injection, the fertilization was performed using the artificial dry method. The sequence and morphological characteristics of the developing fertilized eggs were observed using a microscope and described in detail. The newly spawned eggs of *O. rara* were yellow, sinkable, and weakly adhesive, with an average diameter of (2.21 ± 0.06) mm. After absorbing water and approximately 30 min after fertilization, the average diameter of the fertilized eggs expanded to (2.88 ± 0.07) mm and became non-adhesive. When the water temperature was 19.5–25.5 °C, the time from fertilization to hatching was 45.5 h, and the accumulated temperature from fertilization to hatching was 1024.39 h·°C. The newly hatched larvae showed a light-yellow color, with no other pigments visible throughout the larva body. On the second day, melanosis in the eyes and red blood vessels in the heart and abdomen were clearly visible. When the water temperature was decreased, the time of the embryo hatching from the membrane was extended, and the embryonic development of the prophase stage of incubation was more complete; furthermore, the eye pigments were clearly visible, and red blood flow could be seen in the heart and abdomen. The morphological characteristics of the prophase stage of incubation were basically consistent with those of the larvae on the second day, with higher water temperatures. This suggests that temperature is crucial for the hatching and development of *O. rara* embryos.

In general, the egg traits of the *O. rara* are basically the same as those of other fish in the genus *Onychostoma*, which may be related to their typical habitats such as rivers with strong currents and gravelly bottoms. In such environments, fertilized eggs can be dispersed with water flowing downward into the spaces between rocks to avoid predation and improve survival rates. However, due to the difference between species and environmental factors, the degree and stage of organ development and the time from fertilization to hatching are different. Using artificial breeding and artificial oxytocin technology, this study realized the artificial reproduction of *O. rara* for the first time and carried out a preliminary study on the development of *O. rara* embryos and larvae, providing basic data and an important reference for the future implementation of large-scale breeding of this species.

Key words: *Onychostoma rara*; artificial reproduction; embryonic development

Corresponding author: LIANG Zhiqiang. E-mail: liangzhiqiang@163.com; XIE Zhonggui. E-mail: 23692569@qq.com