淡水石首鱼人工催产与胚胎发育观察

张亮^{1,2,3}, 闻海波^{1,2,3}, 郑冰清^{2,3,4}, 李红霞^{1,2,3}, 宋长友^{1,2,3}, 金武^{1,2,3}, 马学 艳^{1,2,3}, 徐跑^{1,2,3}, 华丹^{1,2,3}, 顾若波^{1,2,3}

- 1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214128;
- 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,农业农村部淡水鱼类遗传育种与养殖生物学重点开放实验室,江苏 无锡 214081;
- 3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,中美淡水贝类种质资源保护及利用国际联合实验室, 江苏 无锡 214128;
- 4. 江阴市申港三鲜养殖有限公司, 江苏 江阴 214431

摘要: 以人工培育的淡水石首鱼(*Aplodinotus grunniens*)亲本为基础,首次通过人工催产突破了人工繁育关键技术, 并系统观察了其胚胎发育时序和特征。研究结果表明,引进的淡水石首鱼野生苗种经过3年的人工培育,雌、雄亲 鱼达到性成熟;结合产前加温与营养强化培育,采用LHRH-A2一次人工催产和干法授精获得一批受精卵。在水温 23~24 ℃条件下,淡水石首鱼的催产效应时间为25~27 h。其成熟卵为淡黄色,卵径为(1.07±0.04) mm;卵受精的同 时吸水膨胀呈圆球形,浮性,半透明,无黏性,有1个同心油球,少数受精卵油球有2~3个,大小不一,膨胀后的卵 径为(1.41±0.03) mm,油球径为(0.66±0.02) mm。淡水石首鱼胚胎发育过程可划分为胚盘形成、卵裂、囊胚、原肠 胚、神经胚、器官形成及孵化7个阶段29个时期;受精卵经25 h 30 min 孵化出膜,初孵仔鱼平均全长(2.88±0.10) mm。 本研究首次报道了淡水石首鱼在人工养殖和催产条件下的胚胎发育特征,将为进一步实现苗种规模化繁育提供基 础资料和重要参考。

关键词:淡水石首鱼;人工繁殖;人工催产;胚胎发育 中图分类号:S917 文献标志码:A 文章编号:1005-8737-(2021)05-0569-10

淡水石首鱼(Aplodinotus grunniens)俗称淡水 黄花鱼、淡水大黄鱼,隶属于鲈形目(Perciformes), 石首科(Sciaenidae),原产于美洲,广泛分布于加 拿大南部至危地马拉的淡水水系中^[1]。世界现存 的约 70属 270种石首鱼类中,仅美洲的淡水石首 鱼和东南亚的小鳞波曼石首鱼(Boesemania microlepis)等极少数种类为淡水种,其余均属海水 鱼类^[2]。石首科鱼类因其肉质细嫩,味道鲜美,经 济价值高,成为世界海洋渔业和海水养殖的重要 对象。目前,国内已成功开展人工养殖的石首科 鱼类主要包括大黄鱼(Larimichthys crocea)、小黄 鱼(Larimichthys polyactis)、褐毛鲿(Megalonibea fusca)、双棘黄姑鱼(Nibea diacanthus)、棘头梅童 鱼(Collichthys lucidus)及眼斑拟石首鱼(Sciaenops ocellatus)等种类,均为海水养殖,尚没有适合在 淡水中养殖的石首科种类^[3]。淡水石首鱼因其具 有生长快、肉质好、无肌间刺、适应力强等优点, 是适合我国大部分地区淡水及咸淡水养殖的优良

收稿日期: 2020-11-07; 修订日期: 2020-01-28.

基金项目: 江苏省农业科技自主创新项目[CX(20)2025]; 中国水产科学研究院长江特色水生动物繁养创新团队项目; 无锡市科技发展资金项目(N20203008); 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心中央基本业务费项目(2020JBFR02, 2020JBFR03)

作者简介: 张亮(1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向为淡水名特优鱼类繁育. E-mail: 181308459@qq.com

通信作者:徐跑,研究员,博士生导师,研究方向为淡水特色水产品绿色生态养殖,E-mail: xup@ffrc.cn;顾若波,研究员, 硕士生导师,研究方向为淡水名特优水产品养殖,E-mail: gurb@ffrc.cn

品种,市场前景广阔。

国外关于淡水石首鱼的研究主要集中在食性 差异分析^[4-5]、种群动态^[6-8]、繁殖特性^[9-11]、雌雄 形态与生长的差异性^[5,12]、出血病毒抗体检测^[13] 等方面;而国内仅见周立斌等^[14]对淡水石首鱼含 肉率及肌肉营养成分的报道,闻海波^[15]对紫黑翼 蚌钩介幼虫寄生淡水石首鱼的变态发育过程、淡 水石首鱼的幼鱼外部形态与内部解剖学特征^[2]及 线粒体基因组特征的研究^[16]。

鱼类的胚胎发育是繁殖生物学重要的研究内 容之一,对鱼类胚胎发育特征与发育时序的了解 有助于育苗生产中受精卵孵化及鱼苗培育环节的 把握,提高孵化率和鱼苗成活率^[17]。目前,关于 淡水石首鱼胚胎及早期发育的研究国内尚无报道, 而国外的相关研究^[9,18-19]又因人工繁育技术一直 未取得突破,而无法系统地开展淡水石首鱼胚胎 发育的研究。本研究以人工培育的淡水石首鱼系 本为基础,首次通过人工催产试验获得受精卵, 并对其胚胎发育时序和形态特征进行详细的记录 和描述,旨在充实淡水石首鱼早期发育的生物学 资料,为淡水石首鱼人工繁育工作提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 亲鱼来源与促熟培育

试验亲鱼为中国水产科学研究院淡水渔业中 心 2016 年从美国引进的一批淡水石首鱼野生鱼 苗,全长 6.0~11.0 cm,经 3 年人工培育达到性成 熟^[2]。雌鱼体重 1.25~1.75 kg,雄鱼体重 1.15~ 1.5 kg。2019 年 4 月,将亲鱼移入室内水泥池,培 育池水温从 18 ℃逐步升高至 23~24 ℃, pH 8.0、 溶解氧保持在 5 mg/L 以上,每天投喂鲜活饵料, 投喂量为体重的 3%~5%,进行产前强化培育。

1.2 人工催产试验

经过 2~3 周强化培育后,选择性腺发育良好 的亲鱼用于开展人工催产试验,其中雌鱼腹部较 膨大,前后腹部大小较匀称柔软,生殖孔扩大而 红润; 雄鱼轻压腹部有乳白色精液流出。选用促 黄体素释放激素(LHRH-A2)(宁波第二激素厂)进 行人工催产试验; 雌鱼注射剂量为 2~4 μg/kg,视 性腺成熟程度适当增减,胸鳍注射,雄鱼注射剂 量减半。注射催产剂后,将雌鱼雄鱼分池放养,亲 鱼池水温均控制在 23~24 ℃; 在催产 12 h 后, 每 1~2 h 捞取 2~3 尾雌鱼, 轻压雌鱼腹部尝试人 工挤卵, 直至发现能顺利挤出透明清亮色的卵 粒, 将所有亲鱼捞出进行人工干法授精, 获得受 精卵。

1.3 胚胎发育观察

取部分淡水石首鱼受精卵,移入玻璃缸中控 温孵化,水温控制在(24±1) ℃。将受精卵置于 Leica DFC 295显微镜下观察胚胎发育,并用LAS V4.8软件进行拍摄与测量。记录胚胎发育时序及 各期典型特征,以 50%个体出现新特征作为划分 发育时期的标准。每一发育阶段的试验材料用 5% 甲醛固定,供核查。

1.4 数据和图像处理

使用 Excel 2019 对实验数据进行统计分析, 结果以平均值±标准差(\overline{x} ±SD)表示。

2 结果与分析

2.1 催产效果

经过 3 年的人工培育和强化培育,淡水石首 鱼雌、雄亲鱼全部达到性成熟,采用 LHRH-A2 一次注射即可实现人工催产,首次实现了淡水石 首鱼的人工繁殖。催产试验结果表明:在水温 23~24 ℃的条件下,在人工催产 25 h 开始有雌鱼 可顺利挤出成熟卵子,至 27 h,成熟的雌鱼比例 逐步增加,人工催产的效应时间为 25~27 h。

2.2 卵

淡水石首鱼的成熟卵呈圆球形,淡黄色,有 一个油球,平均卵径(1.07±0.04) mm。卵受精的同 时吸水膨胀,出现受精膜和围卵腔,约 20 min 膨 胀完毕,膨胀后平均卵径为(1.41±0.03) mm,膨胀 系数约 1.32。受精卵为浮性卵,无色半透明,无黏 性,有一个油球,油球径(0.66±0.02) mm,少数受 精卵油球有 2~3 个,大小不一。在水体静止状态 下,受精卵油球面朝上,正面观,油球、卵黄囊、 卵膜为同心球形(图 I-1)。未受精的卵也能吸水膨 胀,形成假胚盘,但膨胀系数较小且呈浑浊状, 逐渐发白,漂浮在水面上层。

2.3 胚胎发育

在水温 23~24 ℃, 淡水石首鱼胚胎从受精卵 到孵化出仔鱼, 历时约 25 h 30 min。淡水石首鱼

的卵裂类型为盘状卵裂均等分裂型。根据淡水石 首鱼胚胎发育各阶段的特征将其分成胚盘形成、 卵裂、囊胚、原肠胚、神经胚、器官形成及孵化 7个阶段 29个时期(表 1、图 1)。

2.3.1 胚盘形成阶段 淡水大黄鱼的受精卵遇水膨胀,可见卵周隙,随后受精卵的原生质开始在卵球的一极汇聚形成胚盘原基,此极即为动物极,胚盘原基逐步隆起成小丘状胚盘。至受精后

45 min, 胚盘高度约占卵黄径的 1/5 后就不再变化。静水状态下, 胚胎的动物极朝下, 植物极朝上(图 I-2)。

2.3.2 卵裂阶段 2 细胞期: 受精后 1 h 15 min, 胚盘顶部中央形成一道纵裂沟, 并向两侧伸展, 把细胞纵裂为两个大小相同的细胞(图 I-3)。

4 细胞期:受精后 1 h 35 min,完成第 2 次纵 分裂,两个细胞顶部中央出现分裂沟,与原分裂

时间 time after fertilization	发育时期 embryonic development stage	主要特征 main characteristic	图序 figure ordinal
0	受精卵 fertilized egg	球形, 半透明, 浮性无黏性, 有一同心油球,	图 I-1
		漂浮在水层中	
45 min	胚盘形成期 blastoderm stage	原生质向动物极汇聚并逐步隆起, 形成胚盘	图 I-2
1 h 12 min	2 细胞 2-cell stage	第1次分裂, 胚盘顶部中央形成卵裂沟, 经裂成2个对等细胞	图 I-3
1 h 35 min	4 细胞 4-cell stage	第2次分裂,分裂面与第1次垂直,形成4个等大细胞	图 I-4
1 h 50 min	8 细胞 8-cell stage	第3次分裂,分裂面与第1次平行,形成8个细胞	图 I-5
2 h 15 min	16 细胞 16-cell stage	第 4 次分裂, 经裂成 16 个细胞, 排列规则	图 I-6
2 h 40 min	32 细胞 32-cell stage	第 5 次分裂, 形成 32 个细胞, 大小略不相同, 排列不规则	图 I-7
2 h 55 min	64 细胞 64-cell stage	第6次分裂,体积逐渐变小,分裂为64个细胞	图 I-8
4 h	多细胞期 multi-cell stage	经裂与纬裂成多个细胞, 细胞变小并开始重叠	图 I-9
4 h 45 min	桑椹期 morula stage	细胞继续分裂下去且越分越小,细胞团类似桑椹球	图 I-10
5 h 15 min	高囊胚期 high blastula stage	细胞高度分裂,细小且界限模糊,堆积成高帽状	图 I-11
6 h 15 min	低囊胚期 low blastula stage	囊胚边缘变薄, 细胞向植物极外包呈低帽状, 进入低囊胚	图 I-12
6 h 45 min	原肠初期 early gastrula stage	胚盘细胞下包至卵黄约 1/3 处, 形成一个环状细胞层, 即胚环	图 I-13, 14
8 h 15 min	原肠中期 mid gastrula stage	胚盘下包卵黄约 1/2, 一端明显增厚隆起, 形成胚盾	图 I-15, 16
9 h 30 min	原肠后期 late gastrula stage	胚层下包卵黄 3/4, 胚盾变得细长	图 I-17, 18
10 h 15 min	神经胚期 neurula stage	神经管与胚体雏形形成,胚体轮廓清晰	图 I-19, 20
11 h 30 min	眼泡出现期 optica vesicula formation	前脑两侧出现1对眼囊雏形	图 I-21
13 h 15 min	胚孔封闭期 blastopore closing stage	胚层下包, 胚孔将封闭, 胚体后部出现柯氏泡	图 I-22, 23
14 h 45 min	视囊形成期 visual sac formation stage	胚体前脑两侧出现1对视囊	图 I-24
16 h	嗅板形成期 olfactory sac formation stage	胚体最前端,出现1球状嗅板	图 I-25
16 h 45 min	听囊形成期 otocyst stage	胚体后脑, 靠后位置出现 1 对听囊	图 I-26
18 h 15 min	晶体形成期 eye lens forming stage	视囊出现晶体,轮廓清晰	图 I-27
19 h 45 min	尾芽期 tail bud appearance	锥状尾芽出现并逐渐与分离卵黄囊分离, 柯氏泡消失	图 I-28, 29
21 h 15 min	尾鳍褶形成期 tail fin folds formation	胚体绕卵黄延伸至 3/5 周, 在尾芽的边缘表皮外突成皮褶状的膜	图 I-30
22 h 15 min	心跳期 stage of heart beating	心窦开始搏动,心跳逐渐加快,可见透明状营养物质的流动	图 I-31
22 h 45 min	肌肉效应期 muscle response stage	胚体基本全包卵黄, 胚体不断颤动, 尾可伸近头部	图 I-32
23 h 45 min	出膜前期 prophase of incubation	胚体颤动更加剧烈	图 I-33
25 h	出膜期 incubation period	尾部剧烈摆动,撕破卵膜仔鱼破膜而	图 I-34
25 h 30 min	初孵仔鱼 newly hatched larvae	全部孵出, 刚出膜仔鱼头向上, 仰卧姿势悬浮于水中	图 I-35

表 1 淡水石首鱼胚胎发育时序及特征 Tab. 1 Embryonic developmental characteristics of *Aplodinotus grunniens*

注:发育期间水温保持在 23~24 ℃

Note: The water temperature is 23~24 °C during embryonic development.



图 I 淡水石首鱼胚胎发育(×40)

受精卵; 2.胚盘形成期; 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. 桑椹期; 11. 高囊胚期; 12. 低囊胚期; 13. 原肠初期 I; 14. 原肠初期 II; 15. 原肠中期 I, 示胚环(→); 16. 原肠中期 II, 示胚盾(→); 17. 原肠后期 I; 18. 原肠后期 II; 19. 神经胚期 I; 20. 神经胚期 II, 示胚体(→); 21. 眼泡出现期, 示眼泡(→); 22. 胚孔封闭期 I, 示 9 肌节(←); 23. 胚孔封闭期 II, 示 11 肌节(←); 24. 视囊形成期; 25. 嗅囊形成期, 示嗅囊(→); 26. 听囊形成期, 示听囊(→); 27. 晶体形成期, 示晶体(→); 28. 尾芽期 I; 29. 尾芽期 II, 示尾芽分离(←); 30. 尾芽褶形成期; 31. 心跳期; 32.肌肉效应期; 33. 孵出前期; 34. 孵出期; 35. 初孵仔鱼, 示耳石(←).

Fig. I Embryonic development of Aplodinotus grunniens (×40)

Fertilized eggs; 2. Blastoderm stage; 3. 2-cell stage; 4. 4-cell stage; 5. 8-cell stage; 6. 16-cell stage; 7. 32-cell stage; 8. 64-cell stage;
 Multi-cell stage; 10. Morula phase; 11. High blastuta stage; 12. Low blastuta stage; 13. Early gastrula stage I; 14. Early gastrula stage II; 15. Mid-gastrula stage I, show embryotoxon(→); 16. Mid-gastrula stage II, show embryonic shield(→); 17. Late gastrula stage I; 18. Late gastrula stage II; 19. Neurula stage I; 20. Neurula stage II, show idiosome (→); 21. Vesicula optica formation, show vesicula optica(→); 22. Blastopore closing stage I, show 9-myomere(←); 23. Blastopore closing stage II, show 11-myomere(←); 24. Visual sac formation stage; 25. Olfactory sac formation stage, show olfactory sac(→); 26. Otocyst stage, show otocyst(→); 27. Stage of eye lens formed, show lens(→); 28. Fail bud appearance I; 29. Fail bud appearance II, show separate fail bud(←); 30. Tail fin folds formation; 31. Stage of heart beating; 32. Muscle response stage; 33. Prophase of incubation; 34. Hatching stage; 35. Newly hatched larvae, show otolith (←).

沟垂直, 经裂成 4 个等大的细胞(图 I-4)。

8 细胞期: 受精后 1 h 50 min, 完成第 3 次纵 分裂, 在第 1 次分裂面两侧各出现 1 条与之平行 的分裂沟, 并与第 2 分裂面垂直, 形成 8 个大小相 近, 排列整齐细胞, 细胞体积开始变小(图 I-5)。

16 细胞期: 受精后约 2 h 15 min, 完成第 4 次 分裂, 形成 16 个细胞, 轮廓清晰, 形状、大小相 近, 排列不整齐(图 I-6)。

32 细胞期: 受精后 2 h 40 min, 完成第 5 次分裂, 经裂形成 32 个排列不规则的细胞, 细胞体积 变小, 大小略有不同, 细胞间的轮廓比较清晰(图 I-7)。

64 细胞期: 受精后 2 h 55 min, 完成第 6 次分 裂, 形成 64 个细胞, 细胞间的轮廓较模糊, 计数 困难(图 I-8)。

多细胞期:细胞不断分裂,数目呈指数级增长,细胞体积逐渐变小。受精后约4h,多层细胞相互叠加,但细胞界限仍可分辨,此时发育到多细胞期(图 I-9)。

桑椹期: 卵裂进行至受精后 4 h 45 min, 细胞体积更小, 大小不均一, 细胞间的界限模糊, 大小很不均一, 在动物极隆起, 形似桑椹, 细胞进入桑椹期(图 I-10)。

2.3.3 囊胚阶段 高囊胚期: 卵裂继续进行, 细胞分裂得更加细密, 界限完全模糊, 至 5 h 15 min 在胚盘动物极上堆积成一高帽状结构, 即囊胚, 凸起于卵黄之上。胚体发育进入高囊胚期, 囊胚 高约为卵黄囊径的 1/4(图 I-11)。

低囊胚期:高囊胚期后,胚盘四周细胞分裂 明显加快。再经过1h发育,囊胚细胞不断向下包 裹,胚层高度逐渐下降,与卵黄囊交界处坡度变 缓,胚体发育进入低囊胚期(图 I-12)。

2.3.4 原肠胚阶段 原肠初期:受精后 6 h 45 min,胚盘细胞从四面向植物极下包,至卵黄 囊 1/3 处,同时胚盘部分细胞内卷成一个隆起的 细胞环,即胚环,胚胎进入原肠初期(图 I-13、14)。

原肠中期:受精后 8 h 15 min,胚盘细胞下包 至卵黄囊 1/2 处,胚环扩大,并继续内卷,形成胚 盾雏形,胚胎进入原肠中期(图 I-15、16)。

原肠后期:受精后约9h30min,胚盘细胞下

包至卵黄囊 3/4处, 胚盾不断向前延伸, 出现胚体 雏形, 进入原肠后期(图 I-17、18)。

2.3.5 神经胚阶段 神经胚期: 胚层继续下包卵 黄囊 2/3 以上, 植物极由胚层包裹形成胚孔, 孔中 可见卵黄栓。胚体不断延长, 包卵黄囊约 1/2, 胚 体头部和尾部渐渐凸起, 形成神经板, 脑泡出现。 卵黄囊上开始出现点状黑色素, 受精后 10 h 15 min, 胚体雏形形成(图 I-19、图 I-20)。

2.3.6 器官形成阶段 眼泡形成期: 受精后 11 h 30 min 胚体头部两侧依稀可见 1 对椭圆形的眼 泡。此时胚体包裹卵黄囊大于 1/2, 肌节 4~6 对, 卵黄囊和油球上色素细胞数量增多, 分布范围明 显扩大(图 I-21)。

胚孔关闭期:受精后 13 h 15 min,胚体后部 出现小的柯氏泡,头部腹面开始出现心原基,色 素细胞进一步扩张,油球、卵黄囊及胚体皆有分 布,肌节分化明显,肌节 9 对,胚孔关闭(图 I-22、 图 I-23)。

视囊形成期:受精后 14 h 45 min,胚体进一步发育,包裹卵黄囊约 3/5,胚体头部和尾部发育 明显,显著凸起;两视囊分化清晰,占据头部约 2/3,星状色素在油球上密集分布,占油球面积约 3/4(图 I-24)。

嗅板形成期:受精后 16 h, 胚体最前端出现 一球状嗅板, 占脑部约 1/4(图 I-25)。

听囊形成期: 受精后 16 h 45 min, 在胚体后脑靠后位置出现一对椭圆形的听囊, 每个听囊内 有两个原始的耳石(图 I-26)。

晶体出现期:受精后 18 h 15 min,胚体前脑 突出,眼囊居于两侧,可见晶体;色素细胞广泛 分布,油球上尤甚,形状色素相互连接成网状覆 盖在有球表面;尾芽隆起明显,尚未与卵黄分离 (图 I-27)。

尾芽期:受精后 19 h 45 min,胚体前端,嗅板下方,紧贴卵黄囊出现明显的心脏原基;油球上星状色素柯氏泡消失,胚体后端尾芽逐渐与卵黄分离,并开始颤动(图 I-28、图 I-29)。

尾鳍褶形成期: 受精后 21 h 15 min, 随着胚体的延长, 尾部边缘表皮不断向外延展, 形成连续的鳍膜, 尾芽也由棒状逐渐变扁(图 I-30)。

心跳期:受精后 22 h 15 min,心脏位于头部的前下方,呈葫芦状并开始搏动,心率约 140 次/min (图 I-31)。

肌肉效应期:受精后 22 h 45 min, 胚体围绕 卵黄延伸至 3/4 周,尾长占胚体长度的 1/2,各器 官发育更趋完善,胚体做间歇性颤动(图 I-32)。

2.3.7 出膜阶段 出膜前期: 受精后 23 h 45 min, 胚体尾部继续增长,约占胚体长的 2/3,可伸近头部, 鳍褶变宽扭动更加剧烈,转动有力(图 I-33)。

孵化期:受精后 25 h 30 min,仔鱼开始陆续 出膜,出膜前胚体在膜内不停扭动,尾部不断拍 击卵膜,直至将卵膜击破,露出尾部,随后整个 仔鱼破膜而出(图 1-34)。

初孵仔鱼:全长平均为(2.88±0.10) mm,卵黄 囊长径为(1.36±0.05) mm,油球径为(0.64±0.04) mm。 油球位于卵黄囊的后部,背鳍鳍膜突起至脑后方, 与尾鳍鳍膜相连,有原始的胸鳍鳍芽,色素主要 分布在卵黄囊的背侧及头部区域;腹部朝上,悬 浮在水层中间,卵黄囊的后端和尾部贴近水面。 此时仔鱼对外界扰动很敏感,但活动能力很弱, 以螺旋的方式,间歇性地向下游动,当游动停止 时,又会慢慢浮近水面(图 1-35)。

3 讨论

3.1 淡水石首鱼亲鱼性腺成熟度、卵质量对受精和胚胎发育的影响

亲鱼是鱼类人工繁殖的物质基础,性腺发育 是人工繁殖的关键^[20-21]。鱼类性腺的正常发育需 要从外界摄取大量的营养物质。笔者发现,因投 喂不足或者营养不满足其性腺发育需求,亲鱼性 腺成熟系数低,成熟期延缓且怀卵量少。对这类 亲本进行人工催产,亲本往往不产卵或者产卵量 少、受精率低,即使有一部分亦可孵化,但孵出的 仔鱼畸形率也较高。在淡水石首鱼人工催产过程 中,笔者还发现部分雌鱼腹部柔软且轮廓明显, 轻轻按压即有淡黄色的卵子流出,此时卵巢已处 于第 V 期,尝试对该种卵子进行干法受精,并于 孵化桶中孵化。结果表明,这种卵受精率极低,能 受精的卵裂也不正常,胚盘隆起较慢,胚盘虽能 形成,也不突出;分裂也较慢,进行到二细胞期 后, 分裂就无法继续。根据朱洗等^[22]对卵母细胞 的分类,这一时期的卵母细胞属于过分成熟卵, 即排出滤泡的卵,由于未能及时产出体外,而失 去受精能力的卵。处于第二次成熟分裂中期的次 级卵母细胞,能接受精子的时间虽然可长达数小 时,但最适时间为2h左右。在此最适时间之外受 精,胚胎发育多为畸形,甚至根本不能受精。因此 只有根据亲本性腺发育程度把握好人工催产的时 机并灵活调整催产剂的使用剂量,才能适时得到 "成熟卵",提高催产效果。通常,当卵巢发育到第 IV 期末时初级卵母细胞已生长成熟, 摆脱休眠状 态,等待条件进行成熟分裂。此时进行催产,卵巢 和卵的反应最为敏感,催产效果最好。超过该阶 段,卵对催产剂的敏感程度将逐渐下降,卵巢内 卵母细胞开始退化并转入被吸收的阶段。此时催 产,很少能有良好的效果。胚胎发育的畸形率随 着卵母细胞过熟程度的加深而增大; 过熟严重时, 卵不能产出。

3.2 产卵类型

按照卵母细胞由 III 期时相进入 IV 期时相, 决定是否同步将鱼类产卵类型分为一次产卵型和 多次产卵型。淡水石首鱼属于分批产卵型鱼类, 在同一产卵周期内可多次产卵^[3,9]。初级卵母细胞 发育不同步,不同发育期的卵母细胞大小呈连续 性分布是分批产卵鱼的典型模式^[23]。淡水石首鱼 雌性个体卵巢中的卵母细胞按照卵径大小大致分为 三种: 第一种, 卵子卵径最大, 平均卵径(1.07± 0.04) mm, 卵黄充满整个卵母细胞, 分布均匀, 颜 色透亮微黄。此种卵母细胞处于成熟的第 IV 时相, 在当年繁殖季节产出。第二种卵母细胞, 卵径大 小居中, 处于卵黄沉积阶段, 卵子中只有部分卵 黄且分布不均匀。这种卵母细胞处于第 III 时相。 最后一种卵母细胞发育程度最低,处于原生质生 长期, 卵母细胞大小不一, 没有卵黄积累, 颜色 发白,这部分卵母细胞处于卵母细胞成熟第 II 时 相前,需要更长的时间发育成熟才能产出^[9]。分批 产卵是鱼类进化过程中一种独特的繁殖方式,其 积极意义在于,一方面,雌性个体在一个繁殖周 期内可多次产卵,进而可与不同雄性个体交配产 生具有不同基因型后代, 增加了种群的遗传多样

性;另一方面,将后代在不同时期分批产出,可 避免因突发性灾难事件而导致的后代全部死亡, 提高种群的存活率。

3.3 淡水石首鱼与几种石首鱼胚胎发育特征比较

淡水石首鱼的卵与海水石首科鱼类一样,为 浮性卵,半透明、卵膜光滑无黏性、有一同心油 球。本研究淡水石首鱼的成熟卵径平均为(1.07± 0.04) mm,油球径为(0.66±0.02) mm,受精的同时 吸水膨胀,卵径比原来大近 1/3,平均卵径达 (1.41±0.03) mm。由表 2 可知, 淡水石首鱼的受精 卵径及初孵仔鱼全长与小黄鱼^[24]接近, 稍大于大 黄鱼^[25], 明显大于石首科中的鮸(*Miichthys miiuy*)^[26]、黄姑鱼(*Nibea albiflora*)^[27]、双棘黄姑 鱼(*N. diacanthus*)^[28]、棘头梅童鱼^[29]、眼斑拟石首 鱼^[30-31], 而淡水石首鱼的油球径远大于其他几种 石首科鱼类。石首科鱼类在卵径、油球径以及初 孵仔鱼全长的种间差异可以作为区分淡水石首鱼 与石首科其他种属鱼类的依据。

表 2 8 种石首科鱼类受精卵及初孵仔鱼全长比较

Tab. 2	2 Comparison of the zygot	Comparison of the zygote and whole length of newly hatched larvae of eight Sciaenidae fishes			ishes	
种 species	名 name	卵径/mm egg size	油球径/mm oil-ball size	初孵仔鱼全长/mm newly hatched larvae size	参考文献 reference	
小黄鱼	Pseudosciaena polyactis	1.41 ± 0.07	0.46 ± 0.02	3.26±0.11	[24]	
大黄鱼	Pseudosciaene crocea	1.26 ± 0.08	0.44±0.03	2.75±0.15	[25]	
鮸	Miichthys miiuy	0.91-1.01	0.36-0.39	2.42	[26]	
黄姑鱼	Nibea albiflora	$0.83 {\pm} 0.02$	0.24±0.01	1.95 ± 0.06	[27]	
双棘黄姑鱼	Nibea diacanthus	0.81-0.83	0.18-0.21	1.79-1.98	[28]	
棘头梅童鱼	Collichthys lucidus	1.18±0.04	0.46±0.01	2.54±0.06	[29]	

0.26-0.31

0.64-0.72

 $0.85 {\pm} 0.02$

 0.66 ± 0.02

0.89-0.98

1.15-1.70

1.39-1.57

0.93-1.19

1.41±0.03

注:"—"代表此处无数据;"卵径"为吸水膨胀后的大小.

Sciaenops ocellatus

Aplodinotus grunniens

眼斑拟石首鱼

淡水石首鱼

Note: "-" represents no data herein; "egg size" is the size after water absorption and expansion.

鱼类的卵子大小对于其早期发育和存活具有 重要意义。一般而言,在相同温度条件下,同种鱼 卵子的大小对胚胎发育速率的影响不显著,而就 不同种鱼类而言,所产的卵子越大其发育速率可 能越慢^[32]。卵黄囊和油球的大小与卵子的大小呈 正相关,作为初孵仔鱼的内源性营养物质,卵黄、 油球越大,则内源性营养就越充足,意味着仔鱼 在内源性营养阶段及混合营养阶段所处的时间就 越长,这对仔鱼建立初次摄食、提高存活率具有 重要的意义。从表 2 中可看出,初孵仔鱼的大小 与卵径也呈正相关,淡水石首鱼的卵径最大,其 初孵仔鱼全长也最长。在相同的生态条件下,初 孵仔鱼个体越大,生长就越快,躲避天敌的能力 就越强,存活率也就相对更高。徐镇等^[33]认为初 孵仔鱼越大,其开口口裂也越大,开口饵料的选择 范围就更广,这更有利于顺利开展人工育苗工作。

2.10 - 2.30

4.2

3.2

1.66-3.28

2.73-3.10

[30-31]

[18]

[9]

[19]

本研究 this study

鱼类产卵温度是一定的,即每种鱼的卵母细 胞从第Ⅳ时相过渡到第Ⅴ时相,需要在一定温度 条件下才能实现^[34]。在适温范围内,淡水石首鱼 的孵化时间与水温呈负相关,水温越高,孵化时 间越短(表 3)。在自然条件下淡水石首鱼最适产卵 水温为 18~24.5 ℃^[9]。本研究的孵化水温为 23~ 24 ℃,亲鱼在注射催产剂 25~27 h 后可实现人工 授精,结果与 Swedberg 等^[9]、Davis 等^[18]报道吻 合。据 Hernández-Gómez 等^[19]报道,淡水石首鱼 在水温 27~ 30 ℃条件下也能顺利产卵、孵化,这 与 Swedberg 等^[9]报道的适温上限差异较大,可能 是由于前者得出的适温范围不完备,但这也证明 了淡水石首鱼属于广温性物种,适温范围广的特 点。如表 3 所示,在相近水温条件下,淡水石首

	•	8	8	
种 species	名 name	孵化水温/℃ brooding temperature	孵化时间 brooding time	参考文献 reference
小黄鱼	Pseudosciaena polyactis	17.5-18.5	50 h 40 min	[24]
大黄鱼	Pseudosciaene crocea	23.0-24.0	25 h 30 min	[25]
鮸	Miichthys miiuy	21.4-22.0	29 h 30 min	[26]
黄姑鱼	Nibea albiflora	23.2±0.15	23 h	[27]
双棘黄姑鱼	Nibea diacanthus	26.9-27.0	19 h 12 min	[28]
棘头梅童鱼	Collichthys lucidus	25.0±0.5	20 h 20 min	[29]
眼斑拟石首鱼	Sciaenops ocellatus	23.0-24.3	26 h	[30]
淡水石首鱼	Aplodinotus grunniens	21	36 h	[9]
		22	25–30 h	[18]
		23	27 h	[9]
		25	25 h	[9]
		27-30	17 h	[19]
		23-24	25 h 30 min	本研究 this study

	表 3	8 种石首科鱼类孵化时间与水温的关系
Гаb. З	Relationship betwee	n hatching time and water temperature for eight Sciaenidae fishes

鱼、黄姑鱼、大黄鱼的孵化时间也很接近,可见 尽管石首科鱼类受精卵的卵径、油球径存在一定 的种间差异性,但在孵化时间上基本像相同,而 其中起关键性作用的因素就是温度^[35]。

参考文献:

- Nelson J S. Fishes of the World[M]. 4th Ed. New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2006: 372-373.
- [2] Wen H B, Ma X Y, Xu P, et al. External morphology and internal anatomical characters of juveniles of the freshwater drum *Aplodinotus grunniens*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(6): 1161-1171. [闻海波, 马学艳, 徐跑, 等. 淡水石首鱼幼鱼外部形态与内部解剖学特征[J]. 中国 水产科学, 2018, 25(6): 1161-1171.]
- [3] Liu M, Sun G W, Wang Z D. Analysis of the current situation of marine fish culture in China[J]. Current Fisheries, 2019, 44(11): 90-93. [刘敏, 孙广文, 王卓铎. 中国海水鱼 养殖现状分析[J]. 当代水产, 2019, 44(11): 90-93.]
- [4] Daiber F C. The food and feeding relationships of the freshwater drum, *Aplodinotus grunniens* Rafinesque in western Lake Erie[J]. The Ohio Journal of Science, 1952, 52(1): 35-46.
- [5] Jacquemin S J, Pyron M, Allen M, et al. Wabash river freshwater drum *Aplodinotus grunniens* diet: Effects of body size, sex, and river gradient[J]. Journal of Fish and Wildlife Management, 2014, 5(1): 133-140.
- [6] Edsall T A. Biology of the freshwater drum in western Lake Erie[J]. The Ohio Journal of Science, 1967, 67(6): 321-340.
- [7] Bur M T. Food of freshwater drum in western Lake Erie[J]. Journal of Great Lakes Research, 1982, 8(4): 672-675.
- [8] Bur M T. Growth, reproduction, mortality, distribution, and

biomass of freshwater drum in Lake Erie[J]. Journal of Great Lakes Research, 1984, 10(1): 48-58.

- [9] Swedberg D V, Walburg C H. Spawning and early life history of the freshwater drum in Lewis and Clark Lake, Missouri River[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1970, 99(3): 560-570.
- [10] Hernández-Gómez R E, Contreras-Sánchez W M, Perera-García M A. Reproductive biology of the freshwater drum *Aplodinotus grunniens* in Tabasco, Mexico[J]. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios, 2017, 4(11): 317-330.
- [11] Hernández-Gómez R E, Contreras-Sánchez W M, Hernández-Franyutti A A, et al. Reproductive cycle of *Ap-lodinotus grunniens* females (Rafinesque, 1819) in the Usumacinta River, Mexico[J]. Latin American Journal of Aquatic Research, 2019, 47(4): 612-625.
- [12] Rypel A L. Sexual dimorphism in growth of freshwater drum[J]. Southeastern Naturalist, 2007, 6(2): 333-342.
- [13] Wilson-Rothering A, Marcquenski S, Koenigs R, et al. Temporal variation in viral hemorrhagic septicemia virus antibodies in freshwater drum (*Aplodinotus grunniens*) indicates cyclic transmission in Lake Winnebago, Wisconsin[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(9): 2889-2894.
- [14] Zhou L B. Approximate composition of muscles and dressed fish in *Aplodinotus graniens*[J]. Fisheries Science, 2005, 24(4): 18-20. [周立斌. 淡水石首鱼的含肉率和肌肉营养成 分分析[J]. 水产科学, 2005, 24(4): 18-20.]
- [15] Wen H B. Fundamental biology characteristics of pink heelsplitter (*Potamilus alatus*) under artificial breeding condition and its glochidia metamorphosis development[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016. [闻海波. 紫黑翼蚌养殖基础生物学与钩介幼虫变态发育研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.]

- [16] Wen H B, Ma X Y, Xu P, et al. Structure and evolution of the complete mitochondrial genome of the freshwater drum, *Aplodinotus grunniens* (Actinopterygii: Perciformes: Sciaenidae)[J]. Acta Ichthyologica et Piscatoria, 2020, 50(1): 23-35.
- [17] Ma A J, Lu L J, Chen C, et al. Breeding and genetic research of major economic species of *Fugu*[J]. Marine Sciences, 2011, 35(11): 128-133. [马爱军, 陆丽君, 陈超, 等. 东方 鲀属主要经济鱼种繁育养殖、育种和基因研究现状[J]. 海 洋科学, 2011, 35(11): 128-133.]
- [18] Davis C C. A planktonic fish egg from fresh water[J]. Limnology and Oceanography, 1959, 4(3): 352-355.
- [19] Hernández-Gómez R E, Perera-Garcia M A, Valenzuela C I, et al. Embryonic development of *Aplodinotus grunniens* (Perciforme: Sciaenidae) in Tenosique, Tabasco, Mexico[J]. International Journal of Morphology, 2013, 31(2): 633-639.
- [20] Wang J, Liu H F, Liu M Y, et al. Histological and ultrastructural study of oocyte development in the spotted steed, *Hemibarbus maculatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(2): 158-165. [王静, 刘慧芬, 刘梦园, 等. 花餚卵母细胞发育的组织学和超微结构观察[J]. 中国水 产科学, 2020, 27(2): 158-165.]
- [21] Wang J Q, Zhao X W. Fish Culture[M]. Dalian: Dalian University of Technology Press, 2000: 76-100. [王吉桥, 赵兴文. 鱼类增养殖学[M]. 大连: 大连理工大学出版社, 2000: 76-100.]
- [22] Zhu X, Wang Y L, Lin Z C. Relationship between fertilization and embryo development of goldfish, bream, and roach in different maturity degree[J]. Acta Biologiae Experimentalis Sinica, 1960(Z1): 47-58,190-192. [朱洗, 王幽兰, 林志 春. 金鱼、鲤、鳊的不同成熟程度卵球的受精和胚胎发育 的关系[J]. 实验生物学报, 1960(Z1): 47-58,190-192.]
- [23] Xu G C, Bao M M, Du F K, et al. Progress in studies on gonadal development and oviposition types of fish[J]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition), 2017, 14(6): 43-48. [徐钢春, 鲍明明, 杜富宽, 等. 鱼类性腺发 育及产卵类型研究进展[J]. 长江大学学报(自科版), 2017, 14(6): 43-48.]
- [24] Zhan W, Lou B, Chen R Y, et al. Observation of embryonic, larva and juvenile development of small yellow croaker, *Larimichthys polyactis*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2016, 47(5): 1033-1039. [詹炜, 楼宝, 陈睿毅, 等. 小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*)胚胎发育及仔、稚鱼形态特征观察 [J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(5): 1033-1039.]
- [25] Cheng S, Du C, Zhu J Q, et al. The development of embryo, larva, juvenile and young *Pseudosciaena crocea* in daiquyang[J]. Advances in Marine Science, 2014, 32(4): 551-559.
 [程顺, 杜晨, 竺俊全, 等. 岱衢洋大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)胚胎与仔稚幼鱼发育[J]. 海洋科学进展, 2014, 32(4): 551-559.]
- [26] Shan L Z, Xie Q L, Shao X B, et al. Study on embryonic

development and morphological characteristic habitual behavior for larvae, juvenile and young of *Miichthys miiuy*[J]. Marine Sciences, 2010, 34(1): 75-79,96. [单乐州, 谢起浪, 邵鑫斌, 等. 鮸鱼胚胎发育及其仔、稚、幼鱼形态特征和 生活习性的初步研究[J]. 海洋科学, 2010, 34(1): 75-79,96.]

- [27] Geng Z, Xu D D, Shi H L, et al. Study on development and growth of early life stages of *Nibea albiflora* Ricbardson[J]. Advances in Marine Science, 2012, 30(1): 77-86. [耿智, 徐 冬冬, 史会来, 等. 黄姑鱼(*Nibea albiflora* Richardson)早期生长发育研究[J]. 海洋科学进展, 2012, 30(1): 77-86.]
- [28] Zhang Y Z, Hu S L, Xu S, et al. Study on early development of *Nibea diacanthus*[J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2006, 11(1): 13-17. [张雅芝, 胡石柳, 徐沈, 等. 双棘黄姑鱼的早期发育研究[J]. 集美大学学报(自然科学 版), 2006, 11(1): 13-17.]
- [29] Liu J G, Song W, Jiang K J, et al. Observation of embryonic development and larval morphology of *Collichthys lucidus*[J]. Marine Fisheries, 2018, 40(6): 691-702. [刘俊果, 宋炜, 蒋科技, 等. 棘头梅童鱼胚胎发育和仔鱼形态观察[J]. 海洋 渔业, 2018, 40(6): 691-702.]
- [30] Wang B, Fang H, Zhang X L, et al. A preliminary observation on the development of embryonic, larval and juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*)[J]. Journal of Oceanography of Huanghai & Bohai Seas, 1999, 17(1): 51-56. [王波, 房慧, 张樹令, 等. 眼斑拟石首鱼胚胎及仔鱼、稚鱼发育的初步 观察[J]. 黄渤海海洋, 1999, 17(1): 51-56.]
- [31] Zheng T L. Artificial breeding technology of *Sciaenops Ocellatus*[J]. Journal of Aquaculture, 2002, 23(1): 14-16. [郑 天伦. 眼斑拟石首鱼人工育苗技术[J]. 水产养殖, 2002, 23(1): 14-16.]
- [32] Su Y Z, Zheng Z Y, You L, et al. A study on techniques of artificial propagation and breeding of large yellow croaker, *Pseudosciaena Crocea* (Richardson)[J]. Modern Fisheries Information, 1997, 12(5): 21-27. [苏跃中,郑智莺, 游岚,等. 大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* (Richardson)人工繁殖及育苗技术的研究[J]. 现代渔业信息, 1997, 12(5): 21-27.]
- [33] Xu Z, Li M Y, Chen H Q. Study on the embryonic development of *Miichthys miiuy*[J]. Marine Sciences, 2007, 31(2): 93-97. [徐镇, 李明云, 陈惠群. 鮸鱼胚胎发育的研究[J]. 海洋科学, 2007, 31(2): 93-97.]
- [34] Li M Y. Breeding of Economic Animals in Fishery[M]. Beijing: China Ocean Press, 2011: 52-83. [李明云. 水产经济动 物增养殖学[M]. 北京:海洋出版社, 2011: 52-83.]
- [35] Xia L J, Shi Z H, Wang J G, et al. The effect of temperature on embryonic development of *Dentex tumifrons* (Temminck et Schlegel)[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2006, 15(2): 163-168. [夏连军, 施兆鸿, 王建钢, 等. 温度 对黄鲷胚胎发育的影响[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(2): 163-168.]

Artificial spawning and embryonic development of freshwater drum, Aplodinotus grunniens

ZHANG Liang^{1, 2, 3}, WEN Haibo^{1, 2, 3}, ZHENG Bingqing^{2, 3, 4}, LI Hongxia^{1, 2, 3}, SONG Changyou^{1, 2, 3}, JIN Wu^{1, 2, 3}, MA Xueyan^{1, 2, 3}, XU Pao^{1, 2, 3}, HUA Dan^{1, 2, 3}, GU Ruobo^{1, 2, 3}

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214128, China;

- 2. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;
- Sino-US Cooperative Laboratory for Germplasm Conservation and Utilization of Freshwater Mollusks, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214128, China;
- 4. Jiangyin Shengang Sanxian Aquaculture Co., Ltd., Jiangyin 214431, China

Abstract: Sciaenidae species have been an important focus of global marine fisheries and mariculture for a long time owing to its delicate meat, delicious taste, and high corresponding economic value. At present, several species of the family have been successfully cultivated in China, such as Pseudosciaena polyactis, Megalonibea fusca, Nibea diacanthus, Collichthys lucidus, and Sciaenops ocellatus, but none are suitable for freshwater aquaculture in China. Among the 70 genera with 270 existing species of Sciaenidae, only a few are freshwater species, including Boesemania microlepis from Southeast Asia and Aplodinotus grunniens from the Americas. A. grunniens is commonly known as the freshwater drum, topuche, or sheepshead. Freshwater drum have several advantages such as fast growth, good meat quality, no intermuscular spines, and strong adaptability. It is suitable for freshwater and brackish aquaculture in most parts of China and has a broad market prospect. In terms of reproduction biology, embryonic and larval development is one of the key research agendas. Understanding the development characteristics and timings of fish embryos is helpful for improving hatching and survival rates of larvae. At present, there are no data available on embryonic and larval development of freshwater drum for domestic cultivation, and foreign research has not been systematic owing to limitations in artificial breeding technology. This study on artificially reared freshwater drum specimens is the first to obtain fertilized eggs by manual stimulation with oxytocin. Subsequently, the sequence and morphological characteristics of developing embryos of freshwater drum were recorded and described in detail. We believe that our results will enrich the biological data on early development and provide theoretical guidance for the artificial breeding of freshwater drum. The results showed that all studied males of the species were sexually mature, while most females were sexually mature after 3 years of artificial cultivation and can spawn more than once during a spawning season. Artificial reproduction could be realized by means of enhanced cultivation and manual oxytocin stimulation. The spawning duration of freshwater drum was approximately 27 h (23–24 °C). Mature eggs were slightly yellow with an average diameter of 1.07 mm (SD= 0.04). Newly fertilized eggs of freshwater drum were spherical, pelagic, translucent, and non-adhesive with only one concentric drop of oil of 0.66 mm (SD = 0.02). There were 2–3 drops of oil of different sizes among fertilized eggs. The diameter of fertilized egg expanded to 1.41 mm (\pm 0.03). The embryonic development of freshwater drum can be divided into 7 phases and 29 periods, including: disk formation, cleavage, blastocyst, gastrula, neurula, organ formation, and incubation. Eclosion started at 25.5 h post-fertilization when larvae had attained a length of 2.88 mm (SD = 0.10). The morphologic characters recorded in the study were similar to those of Sciaenidae species in general. The diameter of the eggs and the length of the larvae for freshwater drum were larger than those of other Sciaenidae species such as Miichthys miluy, Nibea albiflora, N. diacanthus, C. lucidus, and S. ocellatus and the same as those of *P. polyactis*. The diameter of the drop of oil was obviously larger than that of the other Sciaenidae species mentioned above. This study is the first to report the embryonic development characteristics of freshwater drum under artificial culture and manual oxytocin stimulation and will provide basic data and important references for future implementation of large-scale breeding of the species.

Key words: *Aplodinotus grunniens*; artificial breeding; artificial spawning; embryonic development Corresponding author: XU Pao, E-mail: xup@ffrc.cn; GU Ruobo. E-mail: gurb@ffrc.cn