

# 杂交鲢( 乌苏里拟鲢 ♀ × 瓦氏黄颡鱼 ♂ ) 胚胎发育的研究

秦 钦<sup>1,2</sup> 梁丹妮<sup>2</sup> 王明华<sup>1</sup> 陈校辉<sup>1</sup> 刘文斌<sup>2</sup> 蔡永祥<sup>1</sup>

( 1. 江苏省淡水水产研究所 江苏 南京 210017)

( 2. 南京农业大学动物科技学院 江苏 南京 210095)

【摘要】 采用 LRH - A2 + HCG + DOM 混合催产剂对乌苏里拟鲢及瓦氏黄颡鱼进行催产. 采取半干法受精的方式进行乌苏里拟鲢、瓦氏黄颡鱼自交及乌苏里拟鲢( ♀ ) × 瓦氏黄颡鱼( ♂ ) 组合的人工授精. 孵化水温为 24℃ ~ 27℃. 在解剖镜下进行胚胎发育观察. 描述胚胎发育时序和形态特征. 结果获得了 23 个时期的胚胎发育照片; 乌苏里拟鲢、瓦氏黄颡鱼自交受精卵分别经过 50 h 9 min、46 h 50 min 孵化出膜; 杂交鲢受精后 28 min 胚盘形成, 受精后 1 h 进入卵裂期, 4 h 23 min 进入囊胚期, 11 h 3 min 进入原肠胚阶段, 受精后 16 h 56 min 胚孔封闭, 当受精 38 h 53 min 后心脏开始出现搏动, 受精后 49 h 37 min 仔鱼开始孵出. 杂交鲢 F1 的胚胎发育时间介于两亲本之间, 杂交苗全长偏向母本乌苏里拟鲢.

【关键词】 乌苏里拟鲢, 瓦氏黄颡鱼, 杂交 F1, 胚胎发育

【中图分类号】 S961.5 【文献标识码】 A 【文章编号】 1001-4616(2012) 03-0081-06

## Studies on Embryonic Development of Crossbreed F1 by *Pseudobagrus Ussuriensis* ( ♀ ) × *Pelteobagrus Vachelli*( ♂ )

Qin Qin<sup>1,2</sup> ,Liang Danni<sup>2</sup> ,Wang Minghua<sup>1</sup> ,Chen Xiaohui<sup>1</sup> ,Liu Wenbin<sup>2</sup> ,Cai Yongxiang<sup>1</sup>

( 1. Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province ,Nanjing 210017 ,China)

( 2. College of Animal Science and Technology ,Nanjing Agricultural University ,Nanjing 210095 ,China)

**Abstract:** The mixture of LRH - A2 + HCG + DOM was injected into *Pseudobagrus ussuriensis* and *Pelteobagrus vachelli* , before their embryonic development was observed by Nikon 80 ioptical microscope. The results showed that: at 24℃ ~ 27℃ of water temperature , 23 fetation photographs were taken to describe the whole process. The hatching time of *Pseudobagrus ussuriensis* and *Pelteobagrus vachelli* were 50 h 9 min and 46 h 50 min respectively. The blastodisc of cross-breed F1 formed at 28 min after fertilization , cleavage began at 1 h and blastula stage appeared at 4 h 23 min , gastrula stage at 11 h 3 min. Blastopore closed at 16 h 56 min and heart began beating rhythmically at 38 h 53 min. Some embryos began to break the membrane and came out at 49 h 37 min after fertilization. The total embryonic development time of crossbreed F1 was between that of *Pseudobagrus ussuriensis* and *Pelteobagrus vachelli*. The total length of crossbreed F1 was more similar to that of the female parent.

**Key words:** *Pseudobagrus ussuriensis* , *Pelteobagrus vachelli* , crossbreed F1 , embryonic development

乌苏里拟鲢(*Pseudobagrus ussuriensis*) 地方名为牛尾巴, 为鲶形目( Siluriformes) , 鲶科( Bagridae) 拟鲶属(*Pseudobagrus*) 鱼类. 主要分布于我国黑龙江水系. 鲶科大部分均为小型鱼类, 唯独乌苏里拟鲢体型大、最大可达 1 m. 该鱼肉质细嫩、味道鲜美、无肌间刺, 具有很高的经济价值. 由于生态环境的改变和人类活动的影响, 其自然产量明显下降, 已成为稀有种类, 种群面临枯竭. 有关学者在乌苏里拟鲢人工繁育方面开展了相关研究<sup>[1-3]</sup>, 目前在全人工条件下可培育亲鱼达到性成熟, 并实现了人工繁殖. 但乌苏里拟鲢在人工养殖条件下,

收稿日期: 2012-02-22.

基金项目: 江苏省水产三项更新工程项目( K2007 - 8) 、江苏省科技支撑计划项目( BE2009335) .

通讯联系人: 秦 钦, 助理研究员, 研究方向: 水产动物遗传育种及生态养殖. E-mail: qinqinapple1980@163.com

生长速度较慢,且性成熟较晚,一般需要3~4龄,制约了规模化养殖的进程。瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)又名江鲿、江黄颡鱼等,在我国分布较广,以长江干、支流和通江湖泊中出产最多。与乌苏里拟鲿同隶属于鲿科,肉质及口味方面具有乌苏里拟鲿类似的优点,历来深受长江中、上游人民喜爱。其为黄颡鱼属(*Pelteobagrus*)鱼类,与乌苏里拟鲿相比,其生长速度较快,性成熟较早,一般为2~3龄,但体型较小。目前瓦氏黄颡规模化繁育及成鱼养殖技术已较成熟,但商品鱼规格小,产量不高,不能满足市场需求。

远缘杂交(Distant hybridization)是指杂交亲本之间的亲缘关系超过种内关系的杂交,往往能获得具有杂种优势的群体,杂种的生活力、生长速度、品质或抗病能力等比亲本有显著的提高<sup>[4]</sup>。研究表明鲿科鱼类之间杂交障碍较小,杂交F<sub>1</sub>代表现出一定的杂种优势<sup>[5-8]</sup>,但各杂交配组皆未能应用于繁养殖生产。在鲿科鱼类胚胎发育观察方面,乌苏里拟鲿自交胚胎观察的研究尚未见报道,乌苏里拟鲿(♀)×瓦氏黄颡(♂)杂交组合胚胎观察的研究亦属空白。本研究采用生理与生态学理论,解决了乌苏里拟鲿(♀)和瓦氏黄颡(♂)性腺发育不同步的技术关键,利用2009~2010年引进的乌苏里拟鲿及瓦氏黄颡亲本,于2010年进行3批人工催产试验获得成功,分别对乌苏里拟鲿自交、瓦氏黄颡自交及两者杂交F<sub>1</sub>受精卵胚胎发育过程进行了详细观察和记录,拟为实现两者优良经济性状的组合开发利用,获得超亲优质杂交品系,提供胚胎学基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 亲鱼

2009~2010年从江苏淮安水产技术推广站及武进水产养殖场,合计引进乌苏里拟鲿后备亲本167尾、瓦氏黄颡后备亲本256尾,经驯化养殖及产前强化培育达到性成熟,于2010年繁殖期人工催产亲鱼。雌雄鉴别: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,肛门之后有一明显的锥状尿殖乳突,即使用力挤压泄殖孔前部也挤不出精液。催产用乌苏里拟鲿雌鱼体重89 g~217 g,雄鱼体重94 g~306 g;催产用瓦氏黄颡雌鱼体重120 g~210 g,雄鱼体重290 g~400 g。雌雄比为2:1。

#### 1.1.2 试验设施

亲鱼培育池塘1口,面积667 m<sup>2</sup>,水深1.5 m左右,配备1.5 kW的叶轮式增氧机1台;室内亲鱼暂养池及孵化池(1.5 m×1.2 m×0.4 m)20个,水深0.5 m,每池配备散气石2个。使用Nikon SMZ1500解剖镜对受精卵的发育过程进行连续观察并照相。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 亲鱼培育

参照乌苏里拟鲿及瓦氏黄颡在自然江河水域中的生态习性和食性特点,采用小鱼、小虾鲜活饵料及精养鱼人工配合饲料结合投喂的方法,对亲鱼进行池塘驯化饲养和产前强化培育,适时开增氧机,定期用生石灰对水泼洒、进行消毒。

#### 1.2.2 人工催产及授精

采用促黄体素释放激素类似物2号(LRH-A2)、绒毛膜促性腺激素(HCG)、马来酸地欧酮(DOM)混合催产剂,根据2种亲本对催产药物的敏感性和个体大小,剂量有所差异,使亲本同时达到排卵、排精效应期。选取性腺发育成熟度好的9尾雌鱼、3尾雄鱼,先将雄鱼解剖,整体取出精巢,将其剪碎、研磨和稀释。将成熟卵挤到干燥的盛卵盆内,采取半干法受精的方式进行人工授精。授精后小部分卵(100~300粒)用吸管吸取于盛有蒸馏水的培养皿中,用作胚胎发育观察。

#### 1.2.3 孵化与胚胎发育观察

布于培养皿中的受精卵采用静水孵化,孵化水温控制在24℃~27℃,于解剖镜下记录胚胎发育所需时间及其特征,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<sup>[9]</sup>。记录时间以所观察样本中有50%表现出相应发育期特征为准。

## 2 结果与分析

在水温24℃~27℃条件下,乌苏里拟鲿、瓦氏黄颡自交受精卵分别经过50 h 9 min、46 h 50 min孵化出

膜,胚胎发育过程见表3.杂交鳢(乌苏里拟鳢♀×瓦氏黄颡鱼♂)卵裂方式与其他大部分硬骨鱼类一样,属于盘状卵裂.受精后经过1 h进入2细胞期,4 h 23 min进入囊胚期,11 h 3 min进入原肠胚阶段,15 h 52 min进入神经胚期,17 h 55 min进入体节出现期,49 h 37 min孵化出膜.胚胎发育过程见表1,胚胎发育期见图1.

表1 胚胎发育观察一览表  
Table 1 Stages of embryogenesis

发育期	组合 I	组合 II	组合 III		主要形态特征
	受精后 时间	受精后 时间	受精后 时间	图版	
受精卵	0	0	0	1	圆球形,粘性,卵质均匀分布.
1 细胞期	27′	30′	28′	2	原生质集中在卵球动物极一端,胚盘隆起.
2 细胞期	1:28′	57′	1:00′	3	胚盘经裂为两个大小相等的细胞.
4 细胞期	1:50′	1:48′	1:18′	4	分裂球再次经裂,形成4个大小相等的分裂球.
8 细胞期	2:04′	2:16′	1:51′	5	有2个经裂面,形成8个分裂球.
16 细胞期	2:09′	2:20′	2:22′	6	2个经裂面,形成16个分裂球.
32 细胞期	2:34′	2:27′	2:44′	7	4个经裂面,32个分裂球排成4行.
多细胞期	2:58′	2:30′	2:50′	8	各分裂球分裂的速度不一致,大小不整齐.分裂球越分越小,形成多细胞的胚体.
囊胚早期	5:03′	3:12′	4:23′	9	分裂球很小,界线不清,形成的囊胚层高举在卵黄上.
囊胚晚期	7:23′	7:06′	7:00′	10	囊胚表面细胞向卵黄部分下包,约占胚胎的1/3.
原肠早期	9:14′	9:07′	11:03′	11	胚盘下包1/2,胚环出现,背唇呈新月状.
原肠中期	11:36′	13:02′	13:37′	12	胚盘下包2/3,胚盾出现.
原肠晚期	14:39′	14:32′	14:53′	13	胚盘下包3/4.
神经胚期	15:32′	15:46′	15:52′	14	胚盘下包4/5,神经板形成,胚体转为侧卧.
胚孔封闭期	16:50′	17:03′	16:56′	15	胚孔关闭,神经板中线略下凹,脊索呈柱状.
体节出现期	17:25′	17:23′	17:55′	16	胚体出现两对体节,神经板头端隆起.
眼基出现期	19:46′	18:03′	18:55′	17	在前脑两侧,出现一对肾形的突起,即眼的原基.体节4~5对.
耳囊期	25:16′	23:30′	23:39′	18	泡状耳囊出现,眼囊内陷成眼杯,体节15~16对.
肌肉效应期	27:00′	24:36′	27:55′	19	胚体开始微弱的肌肉收缩,第四脑室出现.
耳石期	32:35′	32:06′	32:36′	20	脑可区分为五部分,耳石在耳囊中出现,胚体左右作有节奏的摆动.
心跳期	38:53′	35:22′	38:28′	21	管状心脏开始微弱搏动,继而加强.
出膜前期	41:34′	38:41′	40:53′	22	胚体在卵膜内转动,泄殖腔出现.
出膜期	50:09′	46:50′	49:37′	23	无色胚体破膜而出.中脑与后脑膨大,心脏为长管状.

注:组合 I 为乌苏里拟鳢自交;组合 II 为瓦氏黄颡自交;组合 III 为乌苏里拟鳢♀×瓦氏黄颡♂杂交.

## 2.1 受精卵和卵裂期

成熟乌苏里拟鳢及瓦氏黄颡卵子均为淡橙黄色、圆球形、粘性,卵质均匀分布.乌苏里拟鳢卵径平均2 mm(图1-1),瓦氏黄颡卵径平均1.7 mm.受精后27 min~30 min,卵细胞的原生质向动物极集中形成小丘状的胚盘结构(图1-2),为卵裂和胚胎的进一步发育奠定了基础;隆起的胚盘从中间凹陷,出现一个暗沟并不断加深,将胚盘分成大小相等的两部分,进入2细胞期(图1-3);继而开始第二次分裂,卵裂面方向与第一次卵裂面垂直,发育进入4细胞期(图1-4);第三次卵裂有2个经裂面,与第一次经裂面平行,形成8个大小基本相等的分裂球(图1-5).此后,细胞分裂速度逐渐不一致,大小不等,但总体上卵裂依次经16细胞期、32细胞期和多细胞期,细胞越分越小,形成多细胞胚体(图1-6~8).

## 2.2 囊胚和原肠期

组合 I、II、III 的 F1 受精卵分别经过5 h 3 min、3 h 12 min 和4 h 23 min 的分裂,分裂球数目增加、体积变小,细胞间界线不清楚,形成的囊胚层高举在卵黄上,发育进入囊胚早期(图1-9);此后,胚胎细胞不断分裂,隆起的囊胚层逐渐向四周扩张而变矮,当囊胚表面细胞向卵黄部分下包,约占胚胎的1/3时,发育进入囊胚晚期(图1-10).囊胚层的细胞沿着卵黄的表面向四周扩展,由于卵黄的阻碍,胚盘外包到1/2时,大量细胞聚集在囊胚层外周的边缘,形成环状隆起,即胚环,发育进入原肠早期(图1-11);在胚环一定区域(即胚孔背唇处),不断地有胚胎细胞向内卷入,胚盘下包2/3时,卷入的细胞集中形成胚盾,进入原肠中期(图1-12),胚盾是未来胚体的原基,其长轴相当于未来胚胎的主轴;随着外包运动的进行,胚盘下包3/4时,进入原肠晚期(图1-13).组合 III 约50%左右的卵被精液所激动,在囊胚晚期到原肠中晚期阶段,出现大量停滞发育卵、逐渐死亡,受精率偏低.

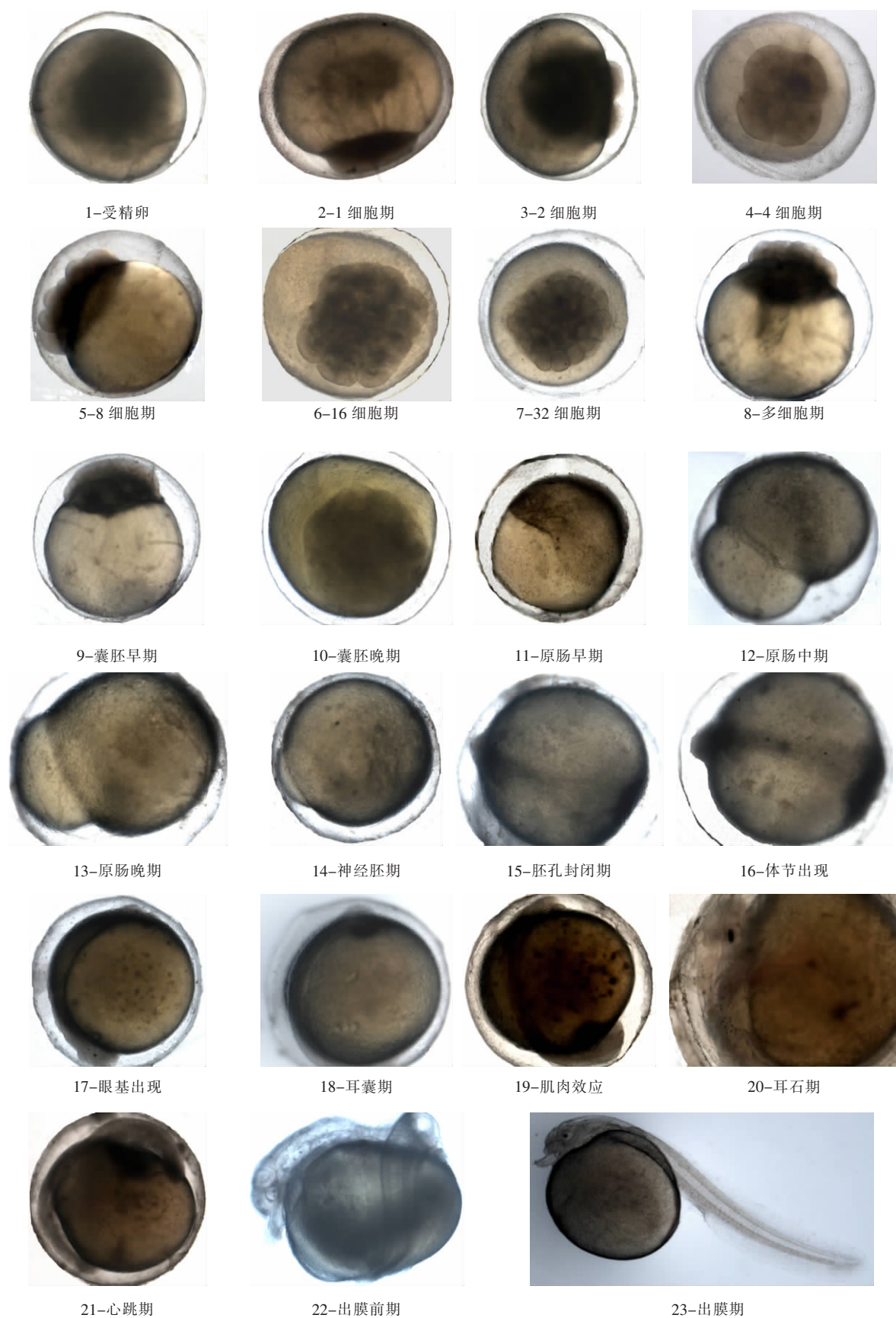


图 1 胚胎发育期

Fig. 1 Stages of embryogenesis

### 2.3 神经胚和胚孔封闭期

组合 I、II、III 的 F1 受精卵分别经过 15 h 32 min、15 h 46 min 和 15 h 52 min,胚盘下包 4/5 时,胚胎背部表面中线的细胞增厚、形成神经板,胚体转为侧卧,发育进入神经胚期(图 1-14),囊胚层的一部分细胞不断向内卷入,其余的细胞继续向下移动、包盖卵黄,并且绕过植物极、向背唇所在地汇集,使胚环的直径变得越来越小,最后形成一圆形的孔,即胚孔。通过胚孔可以看到微微凸出的卵黄,即卵黄栓。外包继续进行,胚环在背唇附近汇集,最后胚孔关闭,完全将卵黄栓封闭住,神经板中线略下凹,脊索呈柱状,进入胚孔封闭期(图 1-15)。

### 2.4 体节出现至出膜前期

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。组合 I、II、III 的 F1 受精卵分别经过 17 h 25 min、17 h 23 min 和 17 h 55 min,胚体出现 2 对体节、神经板头端隆起,进入体节出现期(图 1-16)。继而前脑两侧出现 1 对清晰的肾形突起,即眼的原基,胚体中部显露 4~5 对体节,进入眼基出现期(图 1-17)。此后胚体逐步伸长,卵黄囊开始内陷并逐渐明显,至泡状耳囊出现在后脑两侧,眼囊内陷成眼杯,体节 15~16 对,进入耳囊期(图 1-18)。组合 I、II、III 的 F1 受精卵分别经过 27 h 0 min、24 h 36 min 和 27 h 55 min,胚体开始出现微弱的肌肉收缩,第四脑室出现,晶体清楚,进入肌肉效应期(图 1-19)。胚体继续伸展,体内明显可见脊索,脑可区分为 5 部分,耳石在耳囊中出现,胚体左右作有节奏地摆动,包心腔十分清晰,心脏未见搏动,进入耳石期(图 1-20)。继而观察到管状心脏开始微弱搏动,并逐渐加强,进入心跳期(图 1-21)。胚胎在膜内较剧烈摆动,胚胎缓慢转动,而后胚体运动幅度进一步加强,在卵膜内转动,心脏微红,可以看到胚胎背部血液回流心脏、泄殖腔出现,进入出膜前期(图 1-22)。3 组合中组合 II 的 F1 受精卵经 38 h 41 min 最早进入出膜前期。

### 2.5 出膜期

组合 I、II、III 的 F1 受精卵分别经过 50 h 9 min、46 h 50 min 和 49 h 37 min,开始进入出膜期(图 1-23)。外膜逐渐溶解,膜表面出现很多孔隙、并不断加大,卵膜逐渐变薄。胚体由扭动变成颤动,头部和尾部同时用力,胚体尾部率先破膜而出,尾部继续摆动,直到胚体全部从卵膜中脱出,完成整个胚胎发育过程,也有少量胚体头部率先出膜。刚孵出的仔鱼躯干部侧扁,中脑与后脑膨大,体色透明、略带浅灰黄,有一较大的卵黄囊,肛凹明显,尾索较直,鳍褶宽大、薄膜状,心脏为长管状,有居维氏管从心脏出来,在脊椎下方有动静脉形成,两侧须原基突出,口裂未张开。瓦氏黄颡仔鱼全长 4.9 mm~5.4 mm,肌节 40~41 对;乌苏里拟鳢及杂交苗全长 5.1 mm~5.6 mm,肌节 40~42 对。总体来看杂交初孵苗全长偏向母本乌苏里拟鳢。

## 3 讨论

### 3.1 杂交 F1 与亲本的孵化时间及初孵仔鱼的特征

在其他鱼类的杂交育种研究中发现,杂交胚体的孵化时间介于父母本之间,并偏向于各自母本胚胎发育时间<sup>[10-11]</sup>。夏仕玲将此现象解释为“偏母遗传”现象,即杂种的胚胎发育速度受到细胞质因子的调控<sup>[10]</sup>。本次研究中,在温度 24℃~27℃ 下,乌苏里拟鳢胚胎从受精到孵化所需要的时间为 50 h 9 min,瓦氏黄颡胚胎发育时间为 46 h 50 min。乌苏里拟鳢(♀)×瓦氏黄颡(♂)杂交 F1 胚胎发育时间约为 49 h 37 min,介于两亲本之间、较接近母本。但由于乌苏里拟鳢及瓦氏黄颡胚胎发育时间较接近,有待开展不同温度水平及多平行的胚胎发育观察,以确定乌苏里拟鳢(♀)×瓦氏黄颡(♂)杂交 F1 胚胎发育是否存在“偏母遗传”。与瓦氏黄颡相比,乌苏里拟鳢的卵径大、卵黄营养较为丰富,乌苏里拟鳢初孵苗全长总体上大于瓦氏黄颡全长,杂交苗全长偏向母本乌苏里拟鳢。可见,在初孵仔鱼的体征方面杂交鳢仔鱼存在一定“偏母遗传”特征,有待开展胚后发育研究,在可数及可量性状上积累更丰富的资料。

### 3.2 鳢科杂交鱼研究现状及应用前景

杂交育种是一种较易实现的短期育种方案,一般可以在 1~2 代上看到结果。该技术在品种的改良和生产实践中发挥了巨大的作用。鳢科鱼类杂交育种研究工作虽然起步较晚,但许多水产专家也做了探索性的研究,并且取得了一定的成绩。魏刚<sup>[5]</sup>选用瓦氏黄颡鱼(♀)和长吻鮠(♂)为材料进行杂交试验,并将受精卵培育到幼鱼阶段。王卫民、严安生等<sup>[6]</sup>选用黄颡鱼(♀)×江黄颡鱼(♂)的杂交组合,证明两者之间不存在杂交障碍或杂交障碍较小。王峰、王武<sup>[7]</sup>选用黄颡鱼、江黄颡鱼和粗唇鮠 3 种亲鱼,进行正反交组合试

验,其中江黄颡鱼(♀)×粗唇鲃(♂)及黄颡鱼(♀)×江黄颡鱼(♂)的杂交组合取得了较高的受精率与出苗率.赵文学、杨星等<sup>[8]</sup>采用RAPD技术对黄颡鱼(♀)×江黄颡鱼(♂)杂交的F<sub>1</sub>代群体进行了杂种遗传分析,认为F<sub>1</sub>代的基因图谱预示着杂种优势的可能.本研究提出的乌苏里拟鲿(♀)×瓦氏黄颡(♂)繁育组合,F<sub>1</sub>苗种在生长、抗病上已表现出明显的优势,继续开展可育性以及杂交核质基础等方面的基础研究,并改善繁育技术,可能成为具有开发应用潜力的杂交新品系.

#### [参考文献]

- [1] 潘伟志,王鹏,赵春刚,等.乌苏里拟鲿人工繁育技术及开发利用——乌苏里拟鲿繁殖生物学及人工催产初步研究[J].水产学杂志,2001,14(2):1-3.
- [2] 潘伟志,陈军,王鹏,等.乌苏里拟鲿人工繁育技术研究[J].水产学杂志,2006,19(1):31-35.
- [3] 陈军,潘伟志,赵春刚,等.乌苏里拟苗种培育技术[J].黑龙江水产,2006(3):13-17.
- [4] 楼允东.鱼类育种学[M].北京:中国农业出版社,1999.
- [5] 魏刚.瓦氏黄颡鱼与长吻鲿杂交的初步研究[J].淡水渔业,1987,6:14-17.
- [6] 王卫民,严安生,张志国,等.黄颡鱼与瓦氏黄颡鱼的杂交研究[J].淡水渔业,2002,32(3):3-5.
- [7] 王峰,王武.江黄颡鱼、黄颡鱼、粗唇鲿杂交繁育初报[J].水产科技情报,2004,31(1):10-11.
- [8] 赵文学,杨星,彭智,等.黄颡鱼属物种的RAPD分子鉴定及杂种遗传分析[J].水生生物学报,2006,30(1):101-106.
- [9] 上海水产学院.组织胚胎学[M].北京:中国农业出版社,1981.
- [10] 夏仕玲.鱼类卵细胞质对胚胎发育速度的调控[J].珠江水产,1992,18(1):65-68.
- [11] 宓国强,练青平,王雨辰,等.杂交鳊胚胎发育观察[J].江西水产科技,1994,3:21-24.

[责任编辑:黄 敏]