

长江珍稀鱼类西伯利亚鲟的卵子保存液的初步研究

李学华, 黄显杰, 龙永才, 陈文善*

长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区云南管护局 云南昭通

【摘要】 试验对西伯利亚鲟的卵子进行保存技术研究。将参数具体设置为卵子受精率, 主要研究各种类型、不同用量的保存剂、稀释液、以及根据不同的稀释程度, 对实验鱼类卵子保存的实验效果。研究表明, 西伯利亚鲟的卵子保存液由以下各部分组成培养液 60%~70%、营养液 15%~20%、鱼卵巢液 9%~23% 和抗菌液 1%~2%。其中, 甘氨酸 0.5~0.6g/L、葡萄糖 1.0~2.0g/L、HEPES 0.8~1.2g/L、磷酸二氢钠 0.2~0.4g/L、氯化钾 0.17~0.38g/L、硫酸镁 0.2~0.23g/L、氯化钠 5.0~7.25g/L、氯化钙 0.11~0.13g/L、碳酸氢钠 2.0~2.5g/L, 牛血清白蛋白 0.5~1.0g/L, 青霉素 30~35 万 IU/L, 硫酸链霉素 0.2~0.4g/L。最佳卵子保存量为 1 毫升/200 粒。最佳卵子保存液按体积分数计其包含以下各组分: 培养液 65%、营养液 17.5%、鱼卵巢液 16% 和抗菌液 1.5%。此次研究结果可以为日后保存长江珍稀鲟属鱼类的种质资源奠定了坚实的研究基础。

【关键词】 西伯利亚鲟; 卵子; 保存液

【收稿日期】 2023 年 6 月 20 日

【出刊日期】 2023 年 7 月 15 日

【DOI】 10.12208/j.jlsr.20230010

Preliminary study on egg preservation fluid of Siberian Sturgeon, a rare fish in Yangtze River

Xuehua Li, Xianjie Huang, Yongcai Long, Wenshan Chen*

Yunnan Management and Conservation Bureau of Rare and Endemic Fish National Nature Reserve
in the Upper Reaches of the Yangtze River, Zhaotong, Yunnan

【Abstract】 In this study, the egg preservation techniques of Siberian sturgeon were studied. The parameters were specifically set as egg fertilization rate, and the experimental effects of various types, different amounts of preservatives, diluents, and different dilution degrees on egg preservation of experimental fish were mainly studied. Studies have shown that the egg preservation solution of Siberian sturgeon is composed of the following parts: culture solution 60%~70%, nutrient solution 15%~20%, fish ovarian fluid 9%~23% and antibacterial solution 1%~2%. Among them, Glycine 0.5~0.6g/L, glucose 1.0~2.0g/L, HEPES 0.8~1.2g/L, sodium dihydrogen phosphate 0.2~0.4g/L, potassium chloride 0.17~0.38g/L, magnesium sulfate 0.2~0.23g/L, sodium chloride 5.0~7.25g/L, calcium chloride 0.11~0.13g/L, sodium bicarbonate 2.0~2.5g/L, bovine serum albumin 0.5~1.0g/L, penicillin 300 ~ 350,000 IU/L, streptomycin sulfate 0.2~0.4g/L. The optimal egg storage is 1 ml /200 eggs. The optimal egg preservation solution by volume consists of the following components: culture solution 65%, nutrient solution 17.5%, fish ovarian solution 16%, and antibacterial solution 1.5%. The results of this study can lay a solid foundation for the future conservation of the germplasm resources of rare acipenser in the Yangtze River.

【Keywords】 Siberian sturgeon; Egg; Preservation fluid

鱼类主要为体外受精、体外发育的生殖方式。真骨鱼类的受精繁殖过程是由雄性和雌性个体之间的交配行为引发的。在交配时, 雄性鱼通过外部或内部的精液传递给雌性鱼。此传递方式主要取决于

鱼类物种的生殖特征。在外部受精中, 雄性鱼通过排放精子, 同时雌性鱼排放卵子。这样的行为通常发生在水中, 其中雄性鱼瞄准雌性鱼的产卵位置, 并释放大量的精子。精子通过游动进入水中, 与雌

作者简介: 李学华 (1996-) 男, 硕士, 从事渔业资源保护性研究;

*通讯作者: 陈文善 (1979-) 男, 农艺师, 从事水产技术推广工作。

性鱼释放的卵子结合, 形成受精卵。在受精完成后, 受精卵通常进一步发育成为胚胎。这些胚胎会通过一系列的发育阶段, 最终孵化成为年轻的鱼类个体。在这个过程中, 雌性鱼通常会提供养分和保护, 以确保受精卵和胚胎的正常发育。但在体内因发育会快速过熟, 体外因产卵时卵巢液少, 一般只能有效保存 10-20 分钟。温度、光照、溶氧、pH、渗透压及离子种类等均会影响鱼类卵子保存的效果^[1]。

西伯利亚鲟, 学名 *Acipenser baerii*, 是鲟科鱼类中的一种, 也被称为贝加尔鲟。它是一种大型淡水鱼类, 是世界上最大的淡水鱼之一。西伯利亚鲟分布于西伯利亚和俄罗斯远东地区的河流、湖泊和水库中。它们喜欢清澈、冷水和缓流的环境。西伯利亚鲟的身体呈纺锤形, 有长长的背鳍和臀鳍。它们的鳞片是坚硬的, 通常为灰色或深褐色。成年的西伯利亚鲟可以长达 2 至 3 米, 并且能够重达 200 公斤。开展长江珍稀鱼类的卵子保存技术, 从降低人工繁殖成本和减少种鱼用量角度考虑^[6], 对更好的保护和运用优良种质资源是极具研究意义的。拟建立一套适合类西伯利亚鲟的卵子保存技术的简易方法, 以为长江珍稀鲟属鱼类的种质保存、生产应用等提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所使用的西伯利亚鲟卵子样品由鲟鱼养殖场提供。

1.2 卵子体外保存液的配制

体外保存液配比具体数据如下: 培养液 60%~70%、营养液 15%~20%、鱼卵巢液 9%~23%和抗菌液 1%~2%。其中, 培养液配方: 甘氨酸 0.5~0.6g/L、葡萄糖 1.0~2.0g/L、HEPES 0.8~1.2g/L、磷酸二氢钠 0.2~0.4g/L、氯化钾 0.17~0.38g/L、硫酸镁 0.2~0.23g/L、氯化钠 5.0~7.25g/L、氯化钙 0.11~0.13g/L、碳酸氢钠 2.0~2.5g/L。

营养液包括以下各组分及其体积分数: 牛血清白蛋白 40%和鱼血清 60%。其中牛血清白蛋白配方: 牛血清白蛋白 0.5~1.0g/L。抗菌液养液包括以下各组分及其体积分数: 青霉素 30~35 万 IU/L, 硫酸链霉素 0.2~0.4g/L。

1.3 卵子保存方法

卵子与保存液按一定比例混合, 轻微吸打混匀, 16~20°C下浸泡保存。

2 实验结果

2.1 最佳保存液各组分及其体积分数

依据培养液、营养液、鱼卵巢液和抗菌液的不同配比, 设计了三种不同体积分数的混合实验, 实验组一包含以下各组分及其体积分数: 培养液 60%、营养液 15%、鱼卵巢液 23%和抗菌液 2%, 实验组二包含以下各组分及其体积分数: 培养液 65%、营养液 17.5%、鱼卵巢液 16%和抗菌液 1.5%, 实验组三包含以下各组分及其体积分数: 培养液 70%、营养液 20%、鱼卵巢液 9%和抗菌液 1%。其中, 培养液配方: 甘氨酸 0.55g/L、葡萄糖 1.5g/L、HEPES 1g/L、磷酸二氢钠 0.3g/L、氯化钾 0.28g/L、硫酸镁 0.22g/L、氯化钠 6.0g/L、氯化钙 0.12g/L、碳酸氢钠 2.3g/L。营养液包括以下各组分及其体积分数: 牛血清白蛋白 40%和鱼血清 60%。牛血清白蛋白浓度为牛血清白蛋白 0.75g/L。抗菌液配方: 青霉素 33 万 IU/L, 硫酸链霉素 0.3g/L。

各实验组的西伯利亚鲟卵子的体外保存液用磷酸二氢钠调节 pH 至 8.00, 现用现配, 将收集的排出体外的西伯利亚鲟成熟卵子浸泡在含有卵子体外保存液的玻璃皿中 (1 毫升/200 粒), 16~20°C下浸泡 2 小时后, 吸去保存液进行人工授精操作, 结果如表 1。

2.2 卵子体外保存的应用

最佳体积分数西伯利亚鲟卵子体外保存液的应用, 采用如下步骤: 将培养液 6.5ml、营养液 1.75ml、鱼卵巢液 1.6ml 和抗菌液 0.15ml 混匀后, 用磷酸二氢钠调节 pH 至 8.00, 现用现配, 将收集的排出体外的西伯利亚鲟成熟卵子浸泡在含有卵子体外保存液的玻璃皿中 (1 毫升/200 粒), 16~20°C下浸泡 2 小时后, 吸去保存液进行人工授精操作, 结果如表 2。西伯利亚鲟卵子的体外保存液在 16~20°C下, 保存西伯利亚鲟卵子 2 小时后, 其仍然具有较高的受精率和孵化率。

2.3 最佳保存方法的确定

设定 1 小时、4 小时、6 小时的时间保存, 经保存的温度设定在同一范围内, 依照时间为标准划分为三个实验组, 和一个用于比较的对照组。将体外保存液按照比例现用现配, 以雌鱼为主要的实验对象, 将雌鱼排出的成熟卵子浸泡在不同的体外保存液的玻璃皿中 (1 毫升/200 粒), 在同一温度范围内分别在浸泡 1h、4h 和 6h 后, 随后进行人工授精,

研究结果如表 3。从表 3 中可以看出, 西伯利亚鲟卵子的体外保存液在同一温度范围内, 在保存 6 小时后, 卵子依然有较高的受精率和孵化率, 但和 1h 和 4h 相比, 6 小时的受精结果和孵化情况都远不如 1 到 4h, 所以西伯利亚鲟卵子的保存时间最好是 1 到 4 小时。

2.4 最佳保存量的确定

将西伯利亚鲟卵子的体外保存液按照不同的配比进行配比, 以雌鱼为主要的实验对象, 将西伯利

亚鲟卵子按照 1 毫升/100 粒、1 毫升/200 粒、1 毫升/500 粒浸泡在体外保存液的玻璃皿中, 在相同温度范围内浸泡 2 小时后, 开始人工授精, 研究结果如表 4。从表 4 中可以看出, 西伯利亚鲟卵子的体外保存液在 16~20°C 下, 按照 1 毫升/200 粒, 保存西伯利亚鲟卵子 2 小时后, 西伯利亚鲟卵子受精率和孵化率较高, 随着保存量的增加, 西伯利亚鲟卵子受精率和孵化率有所下降, 建议保存量为 1 毫升/200 粒。

表 1 不同体积分数体外培养液对西伯利亚鲟卵子受精率、孵化率和畸形率的影响

	受精率 (%)	孵化率 (%)	畸形率 (%)
对照组	93.62±1.20	90.76±1.22	0.24±0.96
实验组一	89.64±1.00	88.67±1.16	0.24±0.08
实验组二	92.21±0.53	90.45±1.06	0.28±0.09
实验组三	88.63±1.07	88.43±1.16	0.35±0.09

表 2 不同处理对西伯利亚鲟卵子受精率、孵化率和畸形率的影响

	受精率 (%)	孵化率 (%)	畸形率 (%)
对照组	93.51±1.13	90.85±1.17	0.23±0.13
保存组	90.82±1.21	90.49±1.29	0.32±0.13

表 3 不同保存时间对西伯利亚鲟卵子受精率、孵化率和畸形率的影响

	受精率 (%)	孵化率 (%)	畸形率 (%)
对照组	94.46±1.26	90.92±2.97	0.24±0.27
1h	91.18±1.67	90.28±2.67	0.27±0.10
4h	90.39±1.26	89.52±1.85	0.26±0.11
6h	82.44±1.12	84.76±0.27	0.49±0.10

表 4 不同保存量对西伯利亚鲟卵子受精率、孵化率和畸形率的影响

	受精率 (%)	孵化率 (%)	畸形率 (%)
对照组	94.83±1.07	92.61±1.12	0.16±0.11
1 毫升/100 粒	92.66±1.05	90.54±0.92	0.26±0.09
1 毫升/200 粒	91.54±1.24	90.36±0.97	0.26±0.09
1 毫升/500 粒	80.56±0.96	83.38±1.27	0.46±0.11

3 讨论

不同动物卵子适用的卵子保存液不同, 常见的保存液一般分为化学保存液、生物保存液、化学-生物保存液。化学保存液由有机物和无机物混合而成, 由于化合物的刺激性和复杂性, 其保存效果相比于源环境而言, 保存效果较差。生物保存液原材料源于生物体内或生物分泌物, 其保存效果较好, 但是

造假不菲, 且不符合实际需求。实验中使用的卵子保存液为了实现更好的保存效果, 采用了部分鱼卵巢液, 目的是为了降低使用成本和追求更好的保存效果。通过不同比例的保存液各组分及其体积分数的实验结果显示, 卵子体外保存液的最佳条件是体外保存液按体积分数计其包含以下各组分: 培养液 65%、营养液 17.5%、鱼卵巢液 16%和抗菌液 1.5%。

抗菌环境是保存液中较难实现的, 实验中使用的抗菌液成分为青霉素 33 万 IU/L, 硫酸链霉素 0.3g/L。在水产技术领域, 抗菌物质除了使用青霉素和链霉素外, 还存在有左氧氟沙星、多西环素、土霉素、环丙沙星、洛美沙星等, 但是在实验过程中发现这些物质都会影响到卵子的受精率、孵化率和畸形率, 比如我们在使用左氧氟沙星作为抗菌剂的过程中发现西伯利亚鲟卵子的孵化率和畸形率显著性增加, 是因为左氧氟沙星可以抑制 RNA 的转录和复制, 从而导致受精卵在发育不全, 类似的问题在使用多西环素、土霉素、环丙沙星、洛美沙星中均有发生。

卵子采集之后, 保存液的使用浓度直接决定了保存液的保存效果。最适的使用浓度是影响卵子受精率的重要因素, 在鱼类和哺乳动物精液如果稀释的过多, 就会造成活力下降的问题^[14]。由于鱼类独特的生殖方式, 被保存液稀释后的卵子液会直接影响受精结果。结果表明, 西伯利亚鲟卵子体外保存在 16~20°C 下, 按照 1 毫升/200 粒, 保存成熟卵子 2 小时后, 的卵子受精率和孵化率都是最为恰当的, 不同条件的变化, 卵子受精率和孵化率都达不到前者的效果。

4 结束语

西伯利亚鲟是长江的珍稀鱼类之一, 面临着濒危甚至灭绝的风险。卵子保存液的研究可以帮助保护西伯利亚鲟的遗传资源, 确保其种群的存续和保护。卵子保存液的研究可以深入了解西伯利亚鲟繁殖生物学和生理特性, 在科学上对长江生态系统和鱼类繁殖有更深入的认识。这有助于指导更好的保

护和管理策略, 维护长江的生态平衡。通过研究卵子保存液, 可以开发出更有效的保存和运输方法, 有助于实现鱼类种质资源的长期保存与持续利用。同时, 也为珍稀鱼类的人工繁殖与养殖提供了基础, 减轻了对自然资源的压力。长江是中国重要的渔业资源之一, 鱼类资源养殖业也在不断发展。卵子保存液的研究可以提高鱼类繁殖技术、增加渔业产值, 为当地经济发展和渔民收入增长做出贡献。

参考文献

- [1] 张涛, 颜世伟, 庄平, 等. 保存介质和温度对西伯利亚鲟卵子短期保存的影响[J]. 应用生态学报, 2010(1):5.
- [2] 林星. 西伯利亚鲟稚幼鱼生长特征的初步研究[J]. 莆田学院学报, 2003, 10(3):4.
- [3] 陈宁宁, 章龙珍, 庄平, et al. 西伯利亚鲟消化道形态学和组织学的初步研究[J]. 海洋渔业, 2011, 33(1):20-20.
- [4] YAN Shi-wei. 西伯利亚鲟卵巢发育过程血清脂蛋白脂酶活性与血脂代谢的研究[J]. 海洋渔业, 2010(001):032.
- [5] 马境. 西伯利亚鲟卵黄发生过程中的生理调节机制与中华鲟 EST 文库的生物信息学分析[J]. 华东师范大学, 2011.

版权声明: ©2023 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS