

# 海洋鱼类人工繁殖和苗种培育高新技术的研究进展和前景

林浩然

(中山大学水生经济动物研究所, 广州 510275)

**[摘要]** 发展海洋鱼类的增殖和养殖是海洋鱼类资源的合理开发利用与持续性发展的根本措施和策略。因此, 发展和提高海洋鱼类的增殖养殖技术, 特别是做为增殖基础的人工繁殖和苗种培育新技术, 是海洋生物技术的一个重要研究领域。近年来在诱导海洋鱼类性腺发育成熟和改善卵子质量、排卵与产卵、提早性成熟和性别转换, 调控海洋养殖鱼类在全年都能性腺发育成熟和产卵、改善幼苗培育与提高成活率和生长率以及采用基因工程技术生产各种促进鱼类生殖与生长的激素与神经肽等方面都取得明显进展, 并且显示良好的生产应用前景。

**[关键词]** 海洋鱼类增殖和养殖; 人工繁殖; 苗种培养; 生物工程技术

海洋鱼类资源是海洋生物资源的重要组成部分。由于过度捕获、海区污染、海洋生态条件破坏等因素, 海洋鱼类资源已面临枯竭的危险。大力发展海洋鱼类的增殖和养殖是海洋鱼类资源的合理开发利用与持续性发展的根本措施和策略。因此, 发展和提高海洋鱼类的增殖养殖技术, 特别是做为增殖基础的人工繁殖和苗种培育的高新技术, 成为近年来国内外海洋生物技术的一个重要研究发展领域。

## 1 诱导海洋鱼类性腺发育成熟和改善卵子质量

在细胞和分子水平研究主要海洋养殖鱼类性腺发育和配子最后成熟的激素调控作用机理, 阐明在脑垂体分泌的促性腺激素 (GtH) 作用下, 精巢组织产生的 11-酮基睾酮和卵母细胞滤泡分泌产生的雌二醇分别诱导精子和卵母细胞发育成熟<sup>[1]</sup>。在淡水鱼类, 诱导配子进行最后成熟分裂、胚泡破裂和排精排卵的类固醇激素是  $17\alpha, 20\beta$ -双羟孕酮<sup>[1]</sup>, 而在已研究的海洋鱼类是  $17\alpha, 20\beta-21$ -三羟孕酮<sup>[2]</sup>。在鱼类性腺发育成熟过程中, 除激

素的调控以外, 营养因素如必需氨基酸 (EAA) 和必需脂肪酸 (EFA) 对改善卵子质量和提高生殖能力起重要作用。对一些海洋鱼类的研究表明: 亲鱼饵料中的脂肪酸组成直接影响卵的脂肪酸组成; 在饵料中添加高不饱和脂肪酸 (PUFA), 特别是  $n-3$  不饱和脂肪酸, 能促使处于卵黄生成期的雌鱼合成卵黄蛋白原并掺入到正在发育的卵母细胞中, 有利于加速卵母细胞发育成熟和提高卵子质量, 并且使产卵量以及产出卵的受精率和孵化率明显提高; 亦促进雄鱼的雄激素生成, 使排精期延长, 精液量增加<sup>[3,4]</sup>。

## 2 诱导海洋鱼类排卵和产卵

促性腺激素对鱼类性腺发育成熟和排卵起着主导作用。研究表明刺激海洋鱼类 GtH 合成与释放的神经内分泌因子是促性腺激素释放激素 (GnRH)。因此, 必需筛选与生产能对海洋鱼类有效催产的高活性 GnRH 类似物。对一些海洋鱼类 (如鲈科、鲷科等) 的研究表明, 它们的脑区分泌产生 3 种 GnRH, 即 cGnRH-II, sGnRH 和 sbGnRH, 其中 sbGnRH 大量分布在脑垂体, 是刺

**[收稿日期]** 2000-09-18

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (39970586)

**[作者简介]** 林浩然 (1934-), 男, 海南文昌县人, 中国工程院院士, 中山大学教授, 博士生导师

激 GtH 释放的 GnRH, 但其刺激 GtH 释放的活性却不及分布在脑区其他部位的 cGnRH - II。最近分析比较这 3 种 GnRH 和哺乳类 mGnRH 的类似物对刺激条纹鲈脑垂体 GtH 释放的活性, 结果表明目前普遍推广使用的一种 mGnRH 类似物, 即 (D - Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup> Net) - LHRH (LHRH - A) 的活性最强<sup>[5]</sup>。因此, 目前普遍生产和应用的海洋鱼类催产剂是 LHRH - A。但是, 为了适合许多海洋鱼类分批多次性产卵的生殖生理特点, 必需采用特制的 GnRH 类似物缓释制品, 让它们在鱼体内缓慢而持续的释放, 以刺激 GtH 较长时间的分泌活动。目前研制成功并推广应用的非降解的 (如用乙烯聚合物和 GnRH 类似物制成) 体内埋植小丸和可降解的 (如用胆固醇 - 纤维素和 GnRH 类似物制成) 体内注射微球, 催产效果很好<sup>[6]</sup>。

### 3 诱导海洋鱼类提早性成熟和性别转换

许多海洋养殖鱼类通常为雌性先熟 (如石斑鱼) 或雄性先熟 (如鲷鱼) 的雌雄同体鱼类, 并且需要 3~5 年或更长时间才能达到成熟, 这不利于大规模发展增殖和养殖。通过环境、激素和基因等对鱼类性成熟起始和性别转换的调控机理研究, 特别是脑 - 脑垂体 - 性腺轴在鱼类个体发育过程中分泌的各种激素对生殖活动的调控作用研究, 已经发现和掌握调控鱼类性成熟和性别转换的主要因素, 并且建立有效的激素调控技术。例如, 通过性类固醇激素的正反馈作用能刺激脑 - 脑垂体 - 性腺轴分泌促性腺激素释放激素、促性腺激素以及雌激素与雄激素, 启动性腺发育, 并配合以充足的营养条件和适宜的温度与光周期, 能缩短一些海洋养殖鱼类的性成熟年龄, 提早性腺发育成熟和产卵。利用雌激素 (如雌二醇) 或雄激素 (如甲基睾酮) 能有效地诱导雌雄同体的海洋鱼类提早进行性别转换而获得性成熟的雌鱼或雄鱼。例如给雌性先熟的石斑鱼埋植甲基睾酮 (剂量为 2~4 mg/kg), 约 2 个月后可以诱导提早完成性别转换而成为能排精的性成熟雄鱼<sup>[7]</sup>。给舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 幼鱼投喂 17 $\alpha$ -脱氢甲基睾酮 (剂量为 0.5~5 毫克/公斤饵料) 30~90 d 后能得到 100% 的全雄鱼种<sup>[8]</sup>。给牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 投喂芳化酶抑制剂 fadrozde 或 17 $\alpha$ -甲基睾酮能抑制 P450 芳化酶基因的表达, 使遗传型雌鱼发生性别转换而成为表现型

雄鱼<sup>[9]</sup>。

### 4 调控海洋养殖鱼类在全年都能性腺成熟和产卵

许多海洋鱼类的严格产卵季节性 (如冬末初春、春季或夏季) 往往限制苗种的常年大量供应, 亦不利于增殖和养殖的大规模发展。鱼类繁殖的季节性主要受到环境因素 (如温度、光周期) 的影响, 以及在环境因素影响下的神经内分泌因子的调控。因此, 通过环境因素和激素作用完全可以诱导一些重要的海洋养殖鱼类在一年的各个季节都能达到性腺发育成熟并正常产卵和孵出幼苗。以石首鱼科为例, 温度和光照是调控性腺发育成熟和产卵的最主要环境因素, 试验结果表明将亲鱼长期驯养在产卵季节 (夏季) 的温度 (26℃ 左右) 和光照 (12L:12D) 条件下, 加上适量的激素刺激, 就可以常年诱导它们性腺发育成熟和产卵<sup>[10]</sup>。

### 5 改善幼苗培育, 提高成活率和生长率

海洋鱼类的苗种生长和发育除了需要适合的饵料和营养物质之外, 还受到许多环境的、激素的和细胞的因子调控。因此, 既要了解幼苗的营养需要, 提供适合的开口饵料, 又要掌握各种因素对幼苗生长发育的调控机理, 采取有效的技术方法, 促进幼苗生长发育。鱼苗开始摄取初期, 消化道消化吸收蛋白质和肽类的能力较弱, 主要是吸收游离氨基酸以供身体的生长发育, 因而, 游离氨基酸是影响鱼苗成活的主要营养物质之一; 采用包含游离氨基酸的微型脂类饵料并配合以小型浮游生物, 能较好地满足鱼苗发育初期的需要<sup>[11]</sup>。归纳海洋鱼类幼苗脂类营养与代谢的研究结果, 认为理想的饵料是含有约 10% 的干物质、富于 n-3 高不饱和脂肪酸, 磷脂中的三酰甘油少于 5%, 和海洋鱼类的卵黄、幼鱼本身以及海洋浮游动物的脂类组成基本相似, 并且含有 22:6 n-3 (二十二碳六烯酸: DHA)、20:5 n-3 (二十碳五烯酸: EPA) 和 20:4 n-6 (花生四烯酸: AA) 的适宜含量与比例, 就能满足幼苗对磷脂、肌醇和胆碱的需要<sup>[12]</sup>。近年来采用含有鱼类苗种所必需的磷脂、蛋白质、固醇等的人工微型颗粒饲料取代天然活饵料培育鱼苗已获得初步成效, 但还需进一步研究其实际的营养价值并加以改善<sup>[13]</sup>。甲状腺素、生长激素 (GH) 和胰

岛素样生长因子 (IGF) 是促进鱼类生长的重要因子。甲状腺素和一些能促进 GH 与 IGF 分泌产生的神经内分泌因子, 通过注射、浸泡或投喂的方式已经证明能促进养殖鱼种苗种的成活率、生长率和食物转化率。

## 6 采用基因工程技术生产各种促进鱼类生殖和生长的激素和神经肽

近年来随着基因工程技术的发展, 一些鱼类的 GnRH, GtH, GH, IGF 等 cDNA 已经陆续克隆并且研究它们的基因表达调控。使用细菌或杆状病毒表达系统得到的金头鲷基因重组 GtH 和天然 GtH 具有相似的免疫特性, 只是表达水平还比较低 (产量为 5~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )<sup>[14]</sup>。用真核生物表达系统 (中国仓鼠卵巢细胞表达系统) 能获得条纹鲈的 GtH-I 和 GtH-II, 经蛋白质印迹和 Elisa 检测证明它们和天然的 GtH-I 和 GtH-II 具有相同的免疫特性和生物活性, 能诱导卵巢产生雌二醇和睾酮<sup>[15]</sup>。以大肠杆菌表达的金头鲷基因重组生长激素和天然 GH 具有相似的免疫活性和生物活性<sup>[16,17]</sup>。罗非鱼基因重组的 IGF-II 和 IGF-I 亦已先后产生<sup>[18,19]</sup>。这方面的研究正在进一步开展, 预计不久的将来会陆续获得一些海洋养殖鱼类有生物活性的基因重组 GH, GtH, IGF, GnRH 等。这些基因重组的激素和神经肽既可以直接应用于促进海洋鱼类的繁殖和苗种生产; 而且分离纯化后还可以用于建立它们的特异性放射免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA), 以进一步深入研究它们对促进鱼类生殖和生长的作用机理。

### 参考文献

- [1] Nagaham Y. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish[A]. Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology in Fish [C]. Bergen Norway, 1999. 211~222
- [2] Thomas P, Trant J M. Evidence that 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -21-trihydroxy-4-pregnen-3-one is a maturation-inducing steroid in spotted seatrout[J]. Fish Physiol Biochem, 1989, 7(2): 185~191
- [3] Navas J M, Mananos E, Thrush M, et al. Effect of dietary lipid composition on vitellogenin, 17 $\beta$ -estradiol and gonadotropin plasma levels and spawning performance in captive sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)[J]. Aquaculture, 1998, 165: 65~79.
- [4] Asturiano J E, Sorbera L A, Carrillo M, et al. Evidence of the influence of polyunsaturated fatty acids in vivo and in vitro in the reproduction of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) [A]. Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish[C]. Bergen, Norway, 1999, 194
- [5] Mylonas C, Blaise, O, Gothilf Y, et al. Gonadotropin-releasing activities in striped bass (*Morone saxatilis*) of the three native forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and of novel agonists[A]. Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish[C]. Bergen, Norway, 1999, 451
- [6] Barbaro A, Francescon A, Bozzato G, et al. Induction of spawning in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., by a long-acting GnRH agonist and its effects on egg quantity and daily timing of spawning[J]. Aquaculture. 1997, 154: 349~359
- [7] Tanaka H, Tsuchihashi Y, Kuromiya Y. Induction of sex reversal in the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* [A]. Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish[C]. Bergen, Norway, 1999, 423
- [8] Chatain B, Saillant E, Peruzzi S. Production of mono-sex male populations of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. By use of the synthetic androgen 17 $\alpha$ -methyldehydrotestosterone [J]. Aquaculture, 1999, 178: 225~234
- [9] Kitano Y, Takamune K, Nagahama Y, et al. Aromatase inhibitor and 17 $\alpha$ -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Molecular Reproduction and Development, 2000, 56: 1~5
- [10] Thomas P, Arnold C R. Environmental and hormonal control of reproduction in sciaenid fish[A]. Muir J F, Roberts R J. (eds.) Recent Advances in Aquaculture IV[M]. 1993. 31~42
- [11] Ronnestad L, Thorsen A, Finn R N. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acid[J]. Aquaculture, 1999, 177(2): 201~216
- [12] Sargent J, Mc Evoy L, Estevez A, et al., Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions[J]. Aquaculture, 1999, 179(2): 217~229
- [13] Teshima S, Ishikawa M, Koshio S. Nutritional assessment and feed intake of microparticulate diets in crus-

- taceans and fish[J]. *Aquaculture Research*, 2000, 31: 691~702
- [14] Elizur A, Zmore W, Meiri L, et al. Gonadotropins: from genes to recombinant proteins[A]. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*[C]. Bergen, Norway, 1999. 462~465
- [15] Blaise O, Szkudlinski M, Hassin S, et al. Production of recombinant striped bass (*Morone saxatilis*) gonadotropins in Chinese hamster ovarian (CHO) cell expression system[A]. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish* [C]. Bergen, Norway, 2000, 482
- [16] Martinez-Barbera C, Rodriguez R B. Cloning, expression, and characterization of a recombinant gilthead seabream growth hormone[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1994, 96: 179~188
- [17] Ben-Atia I, Fine M, Tandler A. Preparation of recombinant gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone and its use for stimulation of larvae growth by oral administration[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1999, 113: 155~164
- [18] Chen J Y, Chang C Y, Chen J C, et al. Production of biologically active recombinant tilapia insulin-like growth factor-II polypeptide in *E. coli* cells and characterization of the genomic structure of the coding region[J]. *DNA cell Biol*, 1997, 16: 883~892
- [19] Chen J Y, Chen J C, Chang C Y et al. , Expression of recombinant tilapia insulin-like growth factor-I and stimulation of juvenile tilapia growth by injection of recombinant IGFs polypeptides[J]. *Aquaculture*, 2000, 181: 347~360

## The advances and Prospects of the High Technology of Reproduction And Larval Rearing in Marine Fishes

Lin Haoran

( *Institute of Aquatic Economic Animals, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China* )

**[Abstract]** The development of proliferation and culture of marine fishes is the fundamental measure and strategy for the exploitation and sustainable development of marine fishery resources. Therefore, developing and heightening the techniques of proliferation and culture of marine fishes, particularly the advanced techniques of artificial propagation and larval rearing as the bases of proliferation and culture, represent an important research field of marine biotechnology. Recently, in the aspects of induction of gonadal maturation and egg quality improvement, ovulation and spawning, artificial advanced sexual mature and sex reversal, regulation of continual mature and spawning for year - round, improvement of larval rearing and enhance their survival and growth rates, as well as production of a variety of hormones and neuropeptides for promoting reproduction and growth by gene engineering techniques were achieved major advancements, and displayed fine prospects for the productive application.

**[Key words]** proliferation and culture of marine fish; artificial propagation; larval rearing; biotechnology

\* \* \* \* \*

更 正

《中国工程科学》2001年第3卷第3期第83页左栏倒数第4行“郑皆速院士……”系郑皆连院士之误,特此更正,并向作者谢肖礼等先生及郑皆连院士表示歉意。