

四川华鲃胚胎发育观察

李青芝¹, 李 华¹, 陈彦伶¹, 张宏伟², 杨焕超¹, 黄 晋³, 邓旭艳⁴, 杜 军¹

(1.四川省农业科学院水产研究所, 四川 成都 611731;
2.武汉中科瑞华生态科技股份有限公司, 湖北 武汉 430000;
3.中国水电建设集团圣达水电有限公司, 四川 乐山 614000;
4.中电建水电开发集团有限公司, 四川 成都 610000)

摘要:四川华鲃(*Sinibrama taeniatus*)是长江上游特有的小型鱼类, 由于近年来受河道采砂、水利工程建设、环境污染和滥捕等多种因素影响, 其资源量持续下降, 通过探究其胚胎发育规律, 能为其后续人工繁育提供参考。从 2014 年 5 月起, 在大渡河下游流域收集四川华鲃亲鱼进行池塘人工驯化培育。2016 年 8 月, 筛选出雌鱼 90 尾, 体重(60.40±7.83) g, 全长(16.28±0.62) cm; 雄鱼 30 尾, 体重(31.93±3.77) g, 全长(13.90±0.64) cm, 进行人工催产和人工干法授精, 在溶氧充足的微流水中孵化胚胎, 水温范围控制在 22.3~23.0℃, 用体视显微镜对不同发育阶段的胚胎细胞进行连续观察和记录。结果表明, 四川华鲃在池塘驯养条件下性腺发育成熟, 可开展人工繁殖, 受精卵呈圆球形, 浅黄色, 具弱粘性, 吸水后卵径为(2.11±0.04) mm, 卵周间隙为(0.72±0.01) mm; 在水温(22.0±0.7)℃的条件下, 受精卵发育经过 42 h 21 min 孵化, 总积温 931.7℃·h, 发育过程可分为受精卵胚盘、卵裂、囊胚、原肠胚、神经胚、器官形成以及孵化出膜 7 个阶段; 初孵仔鱼全长(2.91±0.05) mm, 肌节数为 24 对, 具心跳和血液循环, 仔鱼静卧水底, 极少活动, 偶尔窜游。四川华鲃胚胎发育与亲源关系最近的鲴属鱼类表现出高度一致性, 该研究可为四川华鲃规模化人工繁育及其他长江上游特有鱼类的资源增殖保护和开发利用提供理论参考。

关键词:四川华鲃; 胚胎发育; 人工授精

中图分类号:Q132.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2019)06-0106-05

四川华鲃(*Sinibrama taeniatus*)隶属鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、鲃亚科(Cultrinae)、华鲃属(*Sinibrama*), 其身体纵向有明显黑线, 又称墨线鱼; 是我国长江上游特有的小型鱼类, 主要分布在长江上游干、流水域, 包括岷江、大渡河及青衣江, 生活在水体的中上层(丁瑞华, 1994)。四川华鲃普遍体长 71~100 mm, 体重 6~20 g, 岷江眉山江段中 2~3 龄的个体占 96.07% (其中以 2 龄个体为主), 且眉山段四川华鲃种群已经出现了小型化趋势(解崇友等, 2016)。四川华鲃的繁殖时间主要集中在 4~5 月, 最小性成熟雌性个体体长 70 mm, 体重 7.1 g; 最小性成熟雄性个体体长为

65 mm, 体重为 4.5 g。近年来, 随着长江上游干支流生态环境遭到破坏以及受河道采砂、水利工程建设、环境污染和滥捕等多种因素影响, 四川华鲃资源量持续下降。

目前, 针对四川华鲃的相关研究较少, 且未见人工繁殖等相关报告。有鉴于此, 项目组筛选四川华鲃性成熟个体开展人工繁殖, 并系统观察其胚胎发育的过程, 依据其形态结构特征制定了分期标准, 旨在为后续人工繁育孵化提供参考, 为其他长江上游特有鱼类的资源增殖保护和开发利用提供理论参考; 同时, 四川华鲃胚胎发育的资料在比较胚胎学上也具有一定的科研价值。

1 材料和方法

1.1 亲鱼来源

从 2014 年 5 月起, 在大渡河下游流域收集四川华鲃亲鱼, 在四川省农业科学院水产研究所成都基地(亲鱼池面积约 1 200 m²)进行人工驯化和培育, 绝大多数为 4⁺ 龄。繁殖用雌性亲鱼卵巢外部轮廓明显, 有流动感, 腹部膨大、饱满, 生殖孔突出微红,

收稿日期: 2017-10-27
基金项目: 四川省大渡河安谷水电站鱼类保护专题研究项目(AG2012/S-46-C); 四川省淡水鱼创新团队-大水面增殖与生态养殖技术研发集成与应用岗位。
作者简介: 李青芝, 1987 年生, 女, 助理研究员, 主要从事动物遗传育种及淡水养殖技术研究。E-mail: qingzhi649@163.com
通信作者: 杜军, 1964 年生, 男, 研究员, 主要从事淡水养殖技术及水生生态学研究。E-mail: dujun9100@126.com

雄性亲鱼轻挤腹部可排出精液,直观发现入水即散。雌鱼体重均在 60 g 以上,全长(16.28±0.62) cm;雄鱼的体重均在 32 g 左右,全长(13.90±0.64) cm。

1.2 授精与孵化

2016 年 8 月下旬,网捕并筛选可顺产的四川华鲃亲鱼共 120 尾,其中 90 尾雌性,30 尾雄性,按照 3∶1 的比例放入室内催产池暂养 2 h,催产前在水中加入一定比例的 MS-222(30 g/1 000 L)对亲鱼进行麻醉;人工繁殖均采用干法授精,将 1~2 尾雌鱼卵挤到圆形瓷碗后,随即挤入 3~5 尾雄鱼的精液 5~10 滴;同时用鹅毛不断搅拌瓷碗中的卵粒 20 s,加入生理盐水 5 mL 继续搅拌 20 s,随后加入清水,使其受精,轻晃瓷碗洗涤受精卵数秒,重复洗涤一次,最后用羽毛将受精卵均匀铺放在 60 目筛绢制作的木质长方形孵化槽上,放置于长×宽×深为 2.0 m×1.0 m×0.5 m 的孵化池中,并打开进水阀和充气泵,保持孵化水体呈微流水状态,水温变化范围控制在 22.3~23.0℃。

1.3 观察和取样

将受精卵放置在孵化槽中,在孵化池中充氧孵化,每次在相同孵化槽中取受精卵 40 粒进行观察,同时测量水温和溶氧。四川华鲃胚胎发育在体视显微镜(ZEISS,Discovery V8)下进行连续观察,用配套成像软件(ZEN 2012)拍摄,以样本中 50%受精卵发育到某个时期的时间作为该时期的发育时间,各时期表述以距受精后累计时间为主。

2 结果与分析

四川华鲃的胚胎发育过程与“四大家鱼”等淡水硬骨鱼类相似,从受精到出膜划分为受精卵胚盘、卵裂、囊胚、原肠胚、神经胚、器官形成、孵化出膜共计 7 个阶段。划分方法参考其他硬骨鱼类(张天荫,1996)。整个发育过程划分为 19 个时期(表 1)。四川华鲃受精卵在平均水温(22.0±0.7)℃时,经过 42 h 21 min 孵化出膜,总积温 931.7℃·h。

2.1 受精卵胚盘形成阶段

四川华鲃受精卵外形近似圆球形,呈浅黄色,卵质透明,受精卵遇水后吸水膨胀,吸水后卵径平均达(2.11±0.04) mm,卵周间隙为(0.72±0.01) mm。卵膜较薄,半透明,受精卵具有弱粘性,沉于水底。随着发育的继续,卵膜透明度降低。受精数分钟后,原生质向动物极汇聚,在动物极开始形成胚盘,胚盘随卵膜的膨胀逐步隆起。

表 1 四川华鲃胚胎发育时序

Tab.1 Time sequence of *Sinibrama taeniatus* embryonic development

序号	发育时期	阶段	距受	平均	有效	图版
		时间/ h : min	精时间/ h : min	水温/ ℃	积温/ ℃·h	
1	受精卵					
2	卵裂前期					
3	多细胞期		4 : 05	22.3		I - 1
4	囊胚早期	1 : 31	5 : 36	22.3	33.82	I - 2
5	囊胚中期	1 : 35	7 : 11	22.7	35.94	I - 3
6	囊胚晚期	1 : 05	8 : 16	22.7	24.59	I - 4
7	原肠早期	0 : 25	8 : 41	22.7	9.46	I - 5
8	原肠中期	1 : 38	10 : 19	22.6	36.91	I - 6
9	原肠晚期	0 : 59	11 : 18	22.6	22.22	I - 7
10	神经胚期	0 : 36	11 : 54	22.6	13.56	I - 8
11	胚孔封闭期	1 : 05	12 : 59	22.6	24.48	I - 9
12	肌节出现期	2 : 40	15 : 39	23.0	61.33	I - 10
13	眼基期	1 : 28	17 : 07	23.0	33.73	
14	眼囊期	2 : 01	19 : 08	22.7	45.78	I - 11
15	脊索形成期	0 : 50	19 : 58	22.7	18.92	I - 12
16	尾芽期	2 : 44	22 : 42	22.3	60.95	I - 13
17	尾鳍出现期	1 : 12	23 : 54	22.7	27.24	I - 14
18	晶体形成期	0 : 38	24 : 32	22.7	14.38	
19	肌肉效应期	0 : 45	25 : 17	22.6	16.95	I - 15
20	心脏原基期	3 : 24	28 : 41	23.0	78.20	I - 16
21	耳石出现期	5 : 57	34 : 38	23.0	136.85	I - 17
22	心脏搏动期	4 : 57	39 : 35	22.6	111.87	I - 18
23	出膜期	2 : 46	42 : 21	22.6	62.53	I - 19

2.2 卵裂阶段

受精后在动物极形成的胚盘逐渐增高,卵裂局限在动物极形成的胚盘,第 1 次卵裂为经裂,将胚盘分成 2 个大小相等的卵裂球;接着发生的 4 次卵裂亦均为经裂,每次形成的卵裂沟均与上一次卵裂沟垂直。随着卵裂的进行,卵裂成的细胞呈 2 的次方增长,卵裂球逐渐变小,细胞界限越来越模糊,细胞数逐渐增加不可数,胚盘逐渐增高隆起成团,状如桑葚,进入多细胞期(图版 I - 1),此时距受精时间为 4 h 5 min。

2.3 囊胚阶段

胚胎发育到 5 h 36 min,卵裂球越分越小,胚盘明显隆高,细胞界限难以辨认,形成高囊胚,囊胚腔出现,进入囊胚早期(图版 I - 2);其后再经过 1 h 35 min 发育进入囊胚中期(图版 I - 3);细胞更为细密,胚盘高度开始下降。受精后 8 h 16 min,胚盘继续下降,进入囊胚晚期(图版 I - 4);整个胚胎呈正圆型,胚盘下包约占全卵的 1/3。

2.4 原肠胚阶段

囊胚层细胞继续下包,8 h 41 min 囊胚层细胞往植物极继续下包达卵黄的 1/2,进入原肠早期,胚环出现(图版 I - 5);10 h 19 min,囊胚层下包卵黄

达 2/3, 胚盾出现, 进入原肠中期(图版 I - 6); 再经过 59 min 之后, 囊胚层继续下包达 4/5 时, 进入原肠晚期(图版 I - 7); 整个胚胎背唇明显, 卵黄囊呈倒梨形, 出现胚体雏形, 此时距受精时间总共 11 h 18 min。胚层细胞的下包和内卷从囊胚晚期到原肠早期, 再到原肠中期时都较慢, 原肠中期后下包速度加快。

2.5 神经胚形成阶段

发育至 11 h 54 min, 囊胚层细胞下包至卵黄囊的底部, 约占胚体的 7/8, 植物极部分卵黄囊露出胚环以外, 形成卵黄栓, 到达神经胚期(图版 I - 8); 胚孔继续收缩并逐渐合拢, 神经胚期后再经过 1 h 5 min 后胚孔封闭, 可见卵黄囊腔, 胚体呈椭圆形, 进入胚孔封闭期(图版 I - 9); 受精卵发育经过 15 h 39 min, 胚体椭圆形更明显, 胚体环抱卵黄, 中部开始出现 3~5 对肌节(图版 I - 10); 胚体的头和尾可初步分辨, 头部侧面观呈长蚕豆状, 顶面观可见中央凹陷。

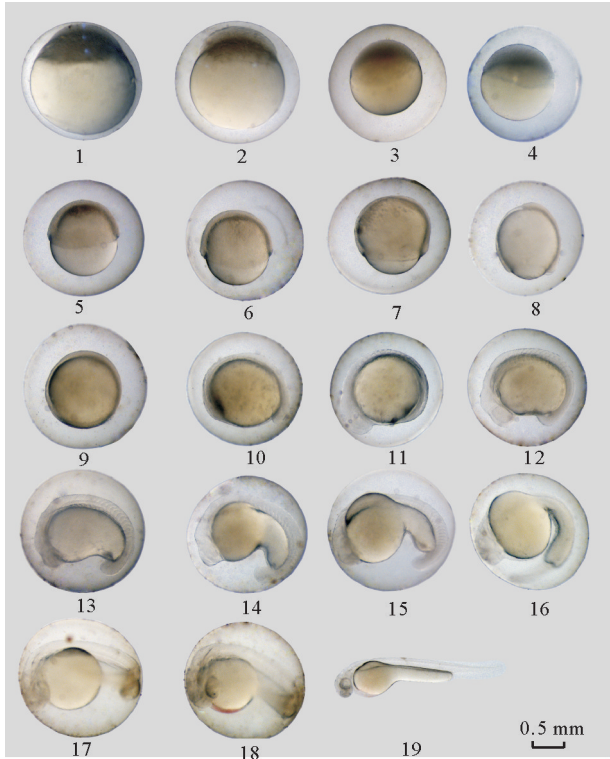
2.6 器官形成阶段

距受精 17 h 7 min 进入眼基期, 肌节有 8 对。眼基期后 2 h 1 min, 眼囊扩大成长椭圆形, 隆起于头部前侧, 肌节约 12 对(图版 I - 11); 19 h 58 min 进入脊索形成期, 肌节约 15 对, 卵黄一侧开始略微内陷(图版 I - 12); 22 h 42 min 进入尾芽期, 尾部逐渐与卵黄囊分离, 脑区扩大, 肌节约 18 对, 胚胎成蚕豆瓣形(图版 I - 13); 再经过 1 h 12 min 后, 尾鳍原基形成, 胚体拉长, 胚体出现间歇性颤动, 肌节约 20 对(图版 I - 14); 24 h 32 min, 眼晶体出现, 尾泡逐渐消失, 尾部增长, 耳囊出现, 在 25 h 17 min 进入肌肉效应期, 胚体颤动较剧烈, 尾鳍出现鳍褶, 接近头部的肌节最先蠕动(图版 I - 15); 28 h 41 min, 心脏原基出现, 肌节约 22 对, 卵黄囊前 1/2 呈球状, 后 1/2 呈棒状(图版 I - 16); 34 h 38 min 耳石出现, 胚胎不时扭动, 肌节约 24 对(图版 I - 17); 距受精 39 h 35 min 心脏开始微弱搏动, 心脏位于头部下方、卵黄囊前下方, 血液循环出现, 可见血细胞按一定的循环路线缓慢移动(图版 I - 18)。

2.7 孵化出膜阶段

器官形成阶段的后期, 血液呈淡粉红色, 血液循环路线清晰。出膜前卵膜开始软化, 胚体在卵膜内不断颤动、转动。42 h 21 min 出膜, 初孵仔鱼全长 (2.91±0.05) mm, 卵黄囊呈浅黄色, 肌节约 24 对, 眼眶浅黑色。头部未伸直, 与体部垂直; 心脏位于卵黄囊正前端, 卵黄囊前部椭圆形, 后部为长条形, 并

向后逐渐变细(图版 I - 19)。仔鱼静卧水底, 极少活动, 偶尔窜游。



(1)多细胞期;(2)囊胚早期;(3)囊胚中期;(4)囊胚晚期;(5)原肠早期;(6)原肠中期;(7)原肠晚期;(8)神经胚期;(9)胚孔封闭期;(10)肌节出现期;(11)眼囊期;(12)脊索形成期;(13)尾芽期;(14)尾鳍出现期;(15)肌肉效应期;(16)心脏原基期;(17)耳石出现期;(18)心脏搏动期;(19)出膜期

图版 I 四川华鲃的胚胎发育期

(1) Multicellular; (2) Early blastula; (3) Mid blastula; (4) Late blastula; (5) Early gastrula; (6) Mid gastrula; (7) Late gastrula; (8) Neurula; (9) Closure of blastopore; (10) Appearance of myomere; (11) Optic vesicle; (12) Appearance of notochord; (13) Tail bud; (14) Appearance of caudal fin; (15) Muscular contraction; (16) Heart rudiment; (17) Appearance of otoliths; (18) Heart pulsation; (19) Hatching

Plate I Pictures showing the embryonic development of *S. taeniatus*

3 讨论

3.1 四川华鲃与鲤科鱼类的胚胎发育差异

四川华鲃受精卵呈圆形, 浅黄色, 沉性, 产出后即有弱粘性, 与鲤科其它鱼类表现出一定的共性和差异性(表 2)。受精卵遇水出现胶膜, 半透明, 吸水膨胀后卵周隙稍有增大, 与同产粘性卵的鲤、鲫以及同亚科的多种鱼类相似, 而与鲤科产漂流性卵的铜鱼和圆口铜鱼等受精卵随水漂流而发育, 具大的卵周隙, 卵膜透明无粘性相区别, 表现出卵子特性和产卵类型的统一(庾云, 2006)。四川华鲃的卵在鲤科鱼类中属于小型卵, 卵径大于鲃亚科鲃属中卵径最

大的厚颌鲂(王剑伟等,2005)、近红鲃属的黑尾近红鲃(殷海成,2009),小于鲃属的兴凯湖翘嘴鲃(刘丹阳等,2012)以及鲤亚科的岩原鲤(庾云,2006)和瓯江彩鲤(姚俊杰等,2012)。四川华鲃的卵膜具有粘

性,卵的比重大于水,产出后能附着在水草等物体上,其生活的长江流域长落差大、水流湍急,可见四川华鲃的产卵方式、卵的性质与外界环境条件存在密切的关系。

表 2 四川华鲃与鲃亚科鱼类胚胎发育比较

Tab.2 Comparison of embryonic development between *S. taeniatus* and Culterinae fishes

属	种	平均卵径/mm	孵化温度/℃	孵化时间/h : min	有效积温/℃ · h	仔鱼体长/mm
鲃	三角鲂	1.30	25.0~27.0	26 : 30	689.0	4.20~4.50
	鲂	1.30	22.0~24.5	29 : 00	674.3	4.30
	厚颌鲂	1.64	22.5~23.8	42 : 50	991.6	4.80
	团头鲂	1.37	20.0~22.0	39 : 10	822.5	3.44
近红鲃	黑尾近红鲃	1.20	24.5	50 : 00	1225.0	4.10
鲃	兴凯湖翘嘴鲃	4.75	26.8	22 : 30	603.0	3.98
华鲃	四川华鲃	2.11	22.0	42 : 21	931.7	2.91

3.2 四川华鲃胚胎发育的影响因素

四川华鲃受精卵的分裂与许多淡水硬骨鱼类基本相同(徐玲玲等,2012);与亲源关系最近的鲂属鱼类表现出高度一致性(顾钱洪等,2017),如盘状分裂,以下包、内卷的方式进行原肠运动、发育阶段分为典型的 7 个时期等;但由于种间差异性,四川华鲃的胚胎发育也有自身的特点,各发育期出现时序和其余种类有差异,胚孔封闭期在整个进行中出现的相对时间较鲂(万成炎等,1999)、团头鲂(于森等,2018)、三角鲂(林永泰等,1989)更早,晶体形成在肌肉效应期之前。卵黄体变形程度较鲢大(薛凌展,2015),先后经历了圆形、蚕豆瓣形、倒梨形、肾形、锤形、棒形等。本试验中,胚胎发育到出膜期后,出现出膜率较低的情况,由于试验用的繁殖亲鱼均为初产,催产时性腺成熟度不够,卵子质量和精子质量不佳,由此说明亲鱼的性腺成熟度、繁殖次数等都是人工繁育的关键因素。

有研究指出,鱼的卵径越大,则胚胎发育的速度越慢(Bobe & Labbe,2010);与其他种属相比,三角鲂(卵径1.30 mm,孵化积温 689.0℃ · h)、鲂(卵径1.30 mm,674.3℃ · h)、团头鲂(卵径1.37 mm,822.5℃ · h)的卵径均小于四川华鲃(卵径2.11 mm,931.7℃ · h),同时孵化出膜所需积温也都小于四川华鲃,这与前人的研究相一致,但厚颌鲂(卵径1.64 mm,991.6℃ · h)、黑尾近红鲃(卵径1.20 mm,1 225.0℃ · h)所需孵化积温却高于四川华鲃。由此可见,在水温相似的情况下,鱼卵的大小并不一定与胚胎发育速度直接相关,可能还受种类、溶氧、水质等多种因素影响。

参考文献

丁瑞华,1994.四川鱼类志[M].成都:四川科学技术出版社: 199 - 200.

顾钱洪,方冬冬,程清清,等,2017.中国鲃亚科鱼类遗传多样性研究进展[J]. 河南师范大学学报,45(4):79 - 86.

解崇友,倪露芸,吴迪,等,2016.岷江眉山段四川华鲃年龄与生长[J]. 四川动物,35(1):78 - 83.

林永泰,万成炎,黄道明,等,1989.三角鲂人工繁殖和胚胎发育[J]. 水利渔业,(2):28 - 31.

刘丹阳,司力娜,张晓光,等,2012.兴凯湖翘嘴鲃胚胎和仔鱼发育的研究[J]. 东北农业大学学报,43(3):110 - 116.

庾云,2006.岩原鲤胚胎、胚后发育与早期器官分化的研究[D]. 重庆:西南大学:23 - 24.

万成炎,林永泰,黄道明,1999.鲂胚胎的发育[J]. 湖泊科学, 11(1):70 - 74.

王剑伟,谭德清,李文静,2005.厚颌鲂人工繁殖初报及胚胎发育观察[J]. 水生生物学报,29(2):130 - 136.

徐玲玲,邵邻相,谢炜,等,2012.七彩神仙鱼胚胎及仔鱼发育研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版),40(1):125 - 129.

薛凌展,许震,樊海平,等,2015.长丰鲢胚胎发育的初步观察[J]. 福建水产,37(6):441 - 446.

姚俊杰,何登菊,赵云龙,等,2012.瓯江彩鲤胚胎发育研究[J]. 山地农业生物学报,31(2):140 - 144.

殷海成,吕海英,2009.黑尾近红鲃胚胎发育研究[J]. 河南农业科学,(6):127 - 130.

于森,方健,薛亭,等,2018.团头鲂的胚胎发育与观察方法优化[J]. 河南师范大学学报,46(1):89 - 94.

张天荫,1996.动物胚胎学[M].济南:山东科学技术出版社: 143 - 158.

Bobe J, Labbe C, 2010. Egg and sperm quality in fish[J]. General and Comparative Endocrinology, 165(3):535 - 548.

Embryonic Development of *Sinibrama taeniatus*

LI Qing-zhi¹, LI Hua¹, CHEN Yan-lin¹, ZHANG Hong-wei², YANG Huan-chao¹,
HUANG Jin³, DENG Xu-yan⁴, DU Jun¹

(1.The Fishery Institute of the Sichuan Academy of Agricultural Sciences,
Chengdu 611731,P.R.China;

2.Wuhan Sinoeco Ecological Science & Technology CO., LTD, Wuhan 430000,P.R.China;

3.The China Sinohydro Corpora on Shengda Sinohydro CO., LTD, Leshan 614000,P.R.China;

4.Power China Hydropower Development Group CO., LTD, Chengdu 610000,P.R.China)

Abstract: *Sinibrama taeniatus* is a small fish endemic to the upper reaches of the Yangtze River. In recent years, wild populations of *S. taeniatus* have declined sharply as a result of cascaded hydropower stations, sand excavation, over fishing and environment pollution. In this study, the embryonic development of *S. taeniatus* under controlled laboratory conditions was described and illustrated. Parental stock was collected in the lower reaches of Dadu River in May 2014 and pond reared. In late August 2016, 90 females [(16.28 ± 0.62) cm, (60.40 ± 7.83) g] and 30 males [(13.90 ± 0.64) cm, (31.93 ± 3.77) g] were treated with oxytocin to induce spawning. Zygotes were obtained by dry fertilization and incubated under slowly running water at $22.3 - 23.0^{\circ}\text{C}$ and adequate dissolved oxygen. A stereoscopic microscope was used to observe and record embryonic development from fertilization to larval release from the membrane. Results showed that the gonads of *S. taeniatus* matured during pond domestication and artificial reproduction could be carried out. The fertilized eggs were ovate and yellow, demersal and weakly glutinous, with an average diameter of (2.11 ± 0.04) mm and average perivitelline space of (0.72 ± 0.01) mm after swelling. The entire embryonic development period was 42 h 21 min at $(22.0 \pm 0.7)^{\circ}\text{C}$ and the maximum cumulative temperature was $931.7^{\circ}\text{C} \cdot \text{h}$. The embryonic development process consisted of seven stages: fertilized egg, cleavage, blastula, gastrula, neurula, organ development and the release of newly hatched larvae from the membrane. The newly hatched larva were (2.91 ± 0.05) mm, had 24 sarcomeres and blood circulation and heart pulsation began. The eyes of the larvae were pale black and the head was perpendicular to the body. The larvae reposed at the bottom of the water and displayed weak activity. The embryonic development of *S. taeniatus* was highly similar to that of its closest *Megalobrama* relatives. This study provides basic information for large-scale artificial breeding of *S. taeniatus* as well as resource protection and utilization of species endemic to the Yangtze River.

Key words: *Sinibrama taeniatus*; embryonic development; artificial fertilization