

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00557

秦岭细鳞鲑早期发育观察

施德亮^{1,2}, 危起伟^{1,2,3}, 孙庆亮^{1,2}, 李罗新^{2,3}, 杜浩^{1,2,3}

1. 华中农业大学 水产学院 湖北 武汉 430070;

2. 农业部淡水生物多样性保护重点实验室, 中国水产科学研究院 长江水产研究所 湖北 武汉 430223;

3. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081

摘要: 研究所用性成熟秦岭细鳞鲑(*Brachymystax lenok tsinlingensis*)亲鱼为野生捕获。对其进行人工繁殖, 并观察其胚胎和仔鱼发育。结果表明: 在水温 9.31 ~ 12.80℃, 受精卵历经 408 h 出膜, 所需积温为 193.35℃·d, 初孵仔鱼体长为(9.64±1.03) mm。整个胚胎发育过程可划分为 6 个阶段(受精卵、卵裂阶段、囊胚阶段、原肠胚阶段、神经胚阶段、器官形成阶段)、26 个时期。刚出膜的仔鱼体色透明, 肌节明显, 无游泳能力, 出膜第 5 天体表出现大量黑色素, 12 d 后卵黄囊开始消失, 46 d 的仔鱼各鳍条与幼鱼相似, 出现幼鲑斑。通过探讨水温、溶氧和水质等对秦岭细鳞鲑早期发育的影响, 建议秦岭细鳞鲑人工繁殖的水温不宜超过 14℃, 最适宜水温应控制在 6 ~ 10℃; 孵化水体 DO 应在 6.00 ~ 8.55 mg/L, 如果低于这个水平将会导致发育迟缓、坏死或是出膜幼苗畸形。本研究旨在为秦岭细鳞鲑的人工繁殖和鱼种培育提供科学指导。

关键词: 秦岭细鳞鲑; 胚胎发育; 积温; 仔稚鱼

中图分类号: S96; Q959

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)04-0557-11

秦岭细鳞鲑(*Brachymystax lenok tsinlingensis*)隶属于鲑形目(Salmoniformes)、鲑科(Salmonidae)、鲑亚科(Salmoninae), 俗称梅花鱼、五色鱼, 是典型的陆封型冷水性鱼类, 是第四纪冰川时期自北方南移的残留种, 地域分布范围狭窄, 为中国特有种, 是世界上分布最南的鲑科鱼类。20 世纪 60 年代李思忠^[1]将陕西太白山细鳞鲑定为一新亚种。目前秦岭细鳞鲑仅分布在中国黄河的渭水系南、北部各支流上游和长江的汉水北侧支流渭子河、子午河上游, 栖息的河流海拔为 900 ~ 1 300 m, 水流湍急、水质清澈、水底多为大型砾石^[2]。秦岭细鳞鲑一般 3 ~ 5 龄达到性成熟, 并于每年春、夏季(3–6 月)溯河洄游至上游的各支流小溪中觅食并完成繁殖, 秋末又由上游顺水向下游较大较深的河流迁移, 或是河流两岸的深潭、石缝中

越冬^[3]。由于栖息地环境恶化、人类偷捕现象严重, 导致秦岭细鳞鲑野生资源日益减少, 1988 年被中国政府列为国家二级重点保护动物^[4]。鉴于秦岭细鳞鲑的濒危现状, 陕西省政府在 1997 年先后在太白县和陇县建立秦岭细鳞鲑自然保护区, 但是有关秦岭细鳞鲑的基础研究仍较为薄弱, 2010 年长江水产研究所、陕西省水产研究所和陕西省陇县秦岭细鳞鲑国家级自然保护区三方合作首次取得其人工繁殖和幼鱼培育的成功^[5], 为秦岭细鳞鲑相关生物学和保护技术研究奠定了基础。本研究通过对秦岭细鳞鲑胚胎、仔鱼和稚鱼阶段发育的观察, 了解秦岭细鳞鲑胚胎发育的规律, 探讨相关孵化条件对其发育的影响, 以期为秦岭细鳞鲑的人工繁殖和鱼种培育提供科学指导。

收稿日期: 2011-09-25; 修订日期: 2011-12-23.

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203086); 中央科研院所基本业务费项目(2011JBFA22).

作者简介: 施德亮(1987–), 男, 硕士研究生, 专业方向为濒危鱼类保护. E-mail: shideliang008@163.com

通信作者: 危起伟, 博士, 研究员, 从事濒危鱼类保护研究. E-mail: weiqw@yfi.ac.cn

1 材料与方法

1.1 材料来源

2011 年 4 月 5–16 日于陕西省陇县千河支流咸宜河(秦岭细鳞鲑保护区内)采用电捕方式(电压 8~10 V)捕获数对秦岭细鳞鲑性成熟亲鱼, 采用氧气打包方式运回陕西省陇县秦岭细鳞鲑国家级保护区咸宜关保护站基地(N34°52.939', E106°38.921')暂养 1 周左右, 待亲鱼稳定后采用人工催产获得受精卵。

1.2 实验方法

将受精卵静置至少 20 min, 然后再缓慢地转入孵化池的孵化筐内, 整个期间孵化过程采用 Tidbit V2 T 型水温自动记录仪(美国 Onset HOBOT 公司生产, 精度为 0.001℃)记录水温, ProODO 溶氧仪(YSI 公司生产, 精度为 0.01 mg/L)记录孵化水体溶解氧(每天 4 次)。

1.2.1 样品采集与观察 每次采集样品 8~10 粒受精卵, 自受精起 0~12 h 内每隔 0.5 h 取样 1 次, 12~48 h 内每隔 1 h, 48~84 h 内每隔 2 h, 84~168 h 内每隔 6 h, 168~240 h 内每隔 12 h, 240 h 后到出膜期间每隔 24 h 各采样一次。由于秦岭细鳞鲑的卵为沉性卵, 无黏性, 卵膜厚, 卵径大, 受精卵发育时间较长, 直接观察比较困难, 因此样品用体积分数为 5% 的甲醛溶液保存固定后剥膜观察。破膜后的仔稚鱼体质量用分析天平(型号 JD200-4; 精度为 0.000 1 g)称重, 全长、体长用游标卡尺(精度为 0.02 mm)测量, 每次测量 5 尾, 受精卵在 LEICA-Mz75(德国)解剖镜下剥膜重复观察记录并用 LEICA DFC 300FX 图像采集软件成像。

1.2.2 孵化和养殖条件 孵化和养殖水源为山涧水和井水的混合水, 其中山涧水的引水管道埋于地表下 50 cm 左右, 长度 3 km。孵化期间最低水温为 9.31℃, 最高水温为 12.80℃, 平均水温为 11.3℃, DO 范围为 7.99~8.55 mg/L; 受精卵处于黑暗条件下; 每天检查受精卵情况, 并及时把死亡卵用吸管吸出, 防止长水霉卵把坏卵与好卵连片导致局部受精卵缺氧死亡。仔鱼开口饵料为丰年虫(*Artemia salina*), 稚鱼长到 20 mm 左右开始

混合投喂剥碎的水蚯蚓(恩诺沙星浸泡灭菌)和鱼苗专用微粒子配合料 No.2(山东升索渔用饲料研究中心, 主要成分: 粗蛋白质 ≥ 50%, 粗脂肪 ≥ 8%, 粗纤维 ≤ 3%, 粗灰分 ≤ 16.5%), 每天投喂 3 次(6:00、12:00 和 18:00), 用聚维酮碘和食盐对养殖水体进行定期消毒。

1.3 发育积温算法

胚胎发育特征的确定是以该批样品的 50% 以上的样本出现发育特征为标准, 其中, 各阶段积温(℃·d)的计算方法如下:

$$\text{各阶段积温 } K(\text{℃} \cdot \text{d}) = N \times T$$

式中: N 为各个阶段所需时间(d), T 为该阶段的平均水温(℃)。

1.4 数据处理与统计分析

采用 Microsoft Excel 2003 对所采集的实验数据进行整理和统计分析, 结果用平均值±标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示, 使用 LEICA DFC 300FX 图像采集软件和 Photoshop CS3 处理图像。

2 结果与分析

2.1 秦岭细鳞鲑胚胎发育时序

秦岭细鳞鲑受精卵在 9.31~12.80℃, (11.03±0.03)℃ 的水温条件下, 整个胚胎发育过程历经 408 h, 分为 6 个阶段 26 个时期(表 1): 受精卵阶段(2.5 h), 卵裂阶段(12.5 h), 囊胚阶段(34 h), 原肠胚阶段(70 h), 神经胚阶段(24 h), 器官形成至破膜阶段(264 h)。

2.1.1 受精卵 秦岭细鳞鲑的卵为端黄卵, 成熟卵为圆球形, 黄色(图版 -1), 密度大于水, 含大量的卵黄, 未吸水时卵径为(3.81±0.06) mm, 用生理盐水洗 30 s 后卵径达到最大(4.25±0.05) mm, 整个胚胎发育过程中卵径变化不明显。卵在吸水之后能清楚的看到卵黄与卵膜之间出现间隙, 直至出膜一直保持这个状态。受精 1 h 后, 动物极的原生质开始聚集并逐渐隆起形成盘状胚盘即胚盘隆期起或是 1 细胞期(图版 -2), 自此开始卵裂。

2.1.2 卵裂阶段 秦岭细鳞鲑为盘状卵裂, 受精后 3.5 h 胚盘中部出现 1 条明显的分裂沟并逐渐加深, 将胚盘分为 2 个近似相等大小的分裂球, 第 1

表 1 秦岭细鳞鲑胚胎发育时序表
Tab.1 Duration of embryogenesis in *Brachymystax lenok tsinlingensis*

图版 plate	发育时期 development stage	起始时间/h start time	持续时间/h duration of each stage	水温/℃ water temperature	积温/(℃·d) accumulated temperature
I-1	受精卵 fertilized egg	0	1	12.30	
I-2	1 细胞期 1-cell stage	1	2.5	12.26	0.51
I-3	2 细胞期 2-cell stage	3.5	1	12.17	1.79
I-4	4 细胞期 4-cell satage	4.5	1	12.16	2.29
I-5	8 细胞期 8-cell stage	5.5	2	12.09	2.80
I-6	16 细胞期 16-cell stage	7.5	3	11.81	3.79
I-7	32 细胞期 32-cell stage	10.5	1.5	11.91	5.29
I-8	64 细胞期 64-cell stage	12	3	12.17	6.05
I-9	多细胞期 multi-cellular stage	15	1	12.15	7.57
I-10	囊胚早期 early-blastula stage	16	6	11.44	8.08
I-11	囊胚中期 mid-blastula stage	22	21	12.05	11.04
I-12	囊胚晚期 late-blastula stage	43	7	10.67	21.38
I-13	原肠早期 early-gastrula stage	50	34	9.99	24.55
I-14	原肠中期 mid-gastrula stage	84	12	10.29	40.87
I-15	原肠晚期 late-gastrula stage	96	24	10.83	46.48
I-16	神经胚期 neurula plate stage	120	6	10.78	57.84
I-17	眼基出现期 eye anlage stage	126	6	10.90	60.53
I-18	胚孔关闭期 blastopore closed stage	132	12	10.45	63.08
I-19	脑部分化期 brain differentiation stage	144	18	11.12	68.71
I-20	胸鳍原基出现期 pectoral fin anlage stage	162	18	10.71	77.05
I-21	尾芽出现期 tail bud formed stage	180	24	11.59	85.67
I-22	胸鳍雏形出现期 rudiment of pectoral fin stage	204	60	11.34	97.06
I-23	眼晶体出现期 eye lens formed stage	264	24	11.65	125.72
I-24	尾鳍出现期 caudal fin appearance stage	288	24	10.90	136.88
I-25	眼色素出现期 eye pigment stage	312	96	10.54	147.84
I-26	孵化期 hatching	408		11.41	193.35

次卵裂(经裂)标志着进入 2 细胞时期(图版 -3); 在 4.5 h 后出现与第 1 条分裂沟相垂直的分裂沟, 将胚盘分成 4 个等大的细胞, 此时进入 4 细胞期(图版 -4); 5.5 h 后开始第 3 次卵裂, 分裂沟与第 1 次平行, 垂直与第 2 次, 将胚盘分为 8 个相似的细胞, 进入 8 细胞期(图版 -5); 离受精 7.5 h 时, 胚胎发育进入 16 细胞期(图版 -6), 形成具有 4 排 16 个细胞的胚盘, 分裂球仍在一个平面上; 受精 10.5 h 后, 分裂球进一步分裂, 进入 32 细胞期(图版 -7); 受精 12 h 后形成具有 64 个细胞的胚盘, 此时的细胞形状变小, 进入 64 细胞期(图版 -8); 随细胞的不断分裂, 胚盘上隆起, 细胞个数越来越多, 分裂球也越来越小, 而且大小不等,

但界限还清楚, 最后形成一个细胞团, 此时进入多细胞期(图版 -9)。

2.1.3 囊胚阶段 受精后 16 h, 细胞继续分裂, 细胞变得更小, 细胞界限不清楚, 有很多分裂球组成的囊胚层高举在卵黄囊上, 胚盘的细胞堆积如帽, 达到最高点, 胚盘边缘与卵黄囊交界清晰, 这个时期为囊胚早期(图版 -10); 经过 6 h, 囊胚层逐渐变矮、变平, 分裂球已看不到界限, 此期为囊胚中期(图版 -11); 受精后 43 h, 囊胚层继续下陷, 变成扁状, 囊胚层细胞向卵黄囊下包, 约占整个胚胎的 1/3, 此时进入囊胚晚期(图版 -12)。

2.1.4 原肠胚阶段 受精后 50 h, 囊胚层细胞继

续由四面向植物极下包,因受卵黄的阻碍,胚盘周缘形成一增厚的环带,即是胚环(germ ring),此时进入原肠早期(图版 -13);再过 34 h,胚环继续往植物极下包,并在胚环的一定部位(未来胚胎的后端),由于囊胚层细胞的集中和迁移而出现呈三角形的加厚结构,即为胚盾(embryonic shield),胚胎进入原肠中期(图版 -14);受精后 96 h,胚环下包到 3/4,胚盾继续延伸,未被胚环包裹的卵黄之后形成“卵黄栓”,胚环则逐渐封闭形成胚孔,胚盾前部形成了稍稍膨大的脑泡原基,此时胚胎发育进入晚期原肠(图版 -15)。

2.1.5 神经胚阶段 受精后 120 h,胚环逐渐变小并在胚体末端形成一个较大的圆形的胚孔(图版 -16),此时胚体成形,胚体前端比中末端较大,是之后脑部形成的地方;受精 132 h 后,胚孔关闭,胚体前端呈柱状,神经板头端凸起,头部雏形出现,此期为胚孔关闭期(图版 -18)。

2.1.6 器官形成到破膜阶段 受精后 126 h,胚体最前端的两侧呈一对肾形向左右略微突出,即为眼的原基(图版 -17);再过 18 h 后,胚体前端开始分化为清晰的脑部的前、中、后三部分,进入脑部分化期(图版 -19);受精后 162 h,在胚体脑后左右下方均出现两个小锥形盾状原点,即为胸鳍原基(图版 -20),再经过 42 h,胸鳍原基发育成能清晰可见的胸鳍雏形(图版 -22);受精后 180 h,胚体后端继续向后弯曲延伸,进入尾芽出现期(图版 -21);尾芽经过 108 h 的发育,脱离了卵黄形成透明的鳍褶,进入尾鳍出现期(图版 -24),此时已经能看到胚体的心脏跳动[(69±2.1)次/min, $n=5$]和清晰的血管;受精后 264 h,眼原基已经发育到眼晶体阶段(图版 -23);受精后 312 h,眼囊中能清晰的看到黑色素,眼囊颜色逐步加深,此时为眼色素出现期(图版 -25),这个时期胚体摆动比较明显,卵膜逐渐变薄,为之后的破膜做好充分准备;受精后 408 h,第一批鱼苗破膜而出(图版 -26),经仔细观察发现,破膜的方式主要有 2 种,一是头部破膜而出,二是尾部破膜而出,经统计头部破膜而出高达 95%,只是

少部分是尾部破膜而出。刚出膜的仔鱼体色透明,肌节清楚,没有体色素,心率为(81.5±1.05)次/min ($n=5$)。出膜的仔鱼基本是先进行短时间的无方向的上下窜动后以静卧的方式躺在底部,此时卵黄囊还比较大,呈椭圆形。在出膜过程中发现有个别头部出膜到一半就死亡,或是出现弯曲状或是其他形状的畸形个体。

2.2 秦岭细鳞鲑仔、稚鱼发育

由于鲑科鱼类对于仔稚鱼的分期尚无明确定义,因此本研究中将出膜至开始上浮阶段定为仔鱼期,将上浮阶段开始到幼鲑斑形成完毕定义为稚鱼期。秦岭细鳞鲑受精卵在 9.31~12.80 °C [(11.03±0.03)°C] 的水温条件下历经 408 h 出膜,刚出膜的仔鱼(图版 -A)体长(9.64±1.03) mm, 体质量(0.0229±0.002) g, 肛突明显,肌节清楚,卵黄囊血管分布密集,血色素明显,口已开启,胸鳍已经展开,尾鳍出现,背鳍雏形出现,脂鳍还未出现;第 3 天的仔鱼(图版 -B)体质量(0.0274±0.002) g, 体长(11.21±1.11) mm, 背鳍出现,臀鳍、腹鳍出现雏形,体表出现了少量的黑色素点(图版 -C);第 5 天的仔鱼(图版 -D)腹鳍和臀鳍界限分开明显,体表出现大量的黑色素点(图版 -E),第 7 天的仔鱼(图版 -F)体质量(0.0295±0.002) g, 体长(14.21±1.59) mm, 卵黄囊变小,背鳍、腹鳍和臀鳍基本成形,脂鳍雏形出现,部分仔鱼已上浮;出膜第 12 天的仔鱼(图版 -G)卵黄囊开始消失,开始由内源性转向外源性营养,以摄食外来饵料为主,直至卵黄囊全部消失,同时体表的黑色素逐步加深,各鳍条出现;第 46 天鱼体出现幼鲑斑(图版 -H), 体形已经达到幼鱼阶段。

2.3 秦岭细鳞鲑胚胎发育时间

秦岭细鳞鲑受精卵在 9.31~12.80 °C 条件下历经 408 h 孵出,总共所需要的积温为 193.35 °C·d, 其中器官形成期到出膜期历时最长(122.74 °C·d), 占总时间的 63.48%; 其次依次为原肠期阶段(30.26 °C·d), 占 15.65%; 囊胚阶段(16.13 °C·d), 占 8.34%; 神经胚阶段(10.84 °C·d), 占 5.61%; 卵裂期阶段为(6.28 °C·d), 占 3.25%; 受精卵阶段最短

(1.28℃·d),仅占 0.66%。

3 讨论

3.1 秦岭细鳞鲑繁殖习性 & 胚胎发育特征

秦岭细鳞鲑是陆封型洄游鱼类,属典型的冷水性鱼类,需要在较低的水温环境下进行繁殖,每年春、夏季(3–6 月)自主河道下游游至含有沙砾底质的上游主河道或是支流进行繁殖,9–11 月自上游洄游到主河道的下游(含深潭或石缝)进行越冬^[6]。秦岭细鳞鲑受精卵在 9.31~12.80℃条件下历经 408 h 出膜,所需的总积温为 193.35℃·d,这比尖吻哲罗鲑(♀)(*Hucho taimen*)与细鳞鱼(♂)(*Brachymystax lenok*)杂交种^[7]、哲罗鱼^[8]、高白鲑(*Coregonus peleol*)^[9]、西藏亚东鲑(*Salmo truttafario* L.)^[10]和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[11]等鲑科鱼类的孵化总积温要小,与尖吻细鳞鲑^[12]相近(表 2),可能是秦岭细鳞鲑孵化水温比较高,因此所需总热量就相对偏低,这体现了不同种的卵发育所需的总热量是不一样的。秦岭细鳞鲑卵裂方式和胚胎发育时序与绝大多数硬骨鱼类相似,大体分为卵裂–胚体形成–器官形成–出膜这 4 个阶段^[13]。本研究参照鲑形目鱼类中虹鳟、西藏亚东鲑、哲罗鱼和尖吻细鳞鲑的划分将秦岭细鳞鲑的胚胎发育分为 6 个阶段和 26 个时期,除此之外也有该物种本身的特殊性: 秦岭细鳞鲑在春季繁殖,胚胎发育不同步,致使出膜时间不一致。本研究中出膜时间跨度为 5~7 d,且秦岭细鳞鲑具有种间相残的现象,因此应及时将不同规格的仔稚

鱼分池培育。 秦岭细鳞鲑卵为沉性的端黄卵,卵直径为 3.81~4.25 mm,较大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)^[14] (8~9.5 mm)和大西洋鲑^[15](*Salmon salar* L.)(5.5~6.0 mm)的小,且卵黄量大,胚盘较小,卵膜比较厚,需要剥膜观察,发育时间较长。 秦岭细鳞鲑卵黄囊含有大量的油球(中性脂肪),是一种营养物质。油球一般只存在于海产硬骨鱼类卵,如大西洋鲑^[15],而在少数的淡水鱼类如哲罗鱼、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)、虹鳟、太湖短吻银鱼(*Neosalanx tangkahkeii taihuensis* Chert)、西藏亚东鲑等卵黄囊表面均有油球分布。 与同属鲑科的虹鳟、西藏亚东鲑、哲罗鱼等物种类似,秦岭细鳞鲑在胚孔关闭之前已经形成眼原基,这与银鲑(*Squalidus argentatus*)^[16]、宽口光唇鱼(*Acrossocheilus monticola*)^[17]、胡子鲇(*Clarias fuscus* Lacepede)^[18]、裂腹鱼(*Sehizothorax*)^[19]、泰山赤鳞鱼(*Scqphecthes macrolepis*)^[20]等的眼原基都形成于胚孔关闭后不同。 秦岭细鳞鲑很多器官在胚胎发育中已经形成,胸鳍、尾鳍原基在脑部分化之前已经出现,背鳍、脂鳍等其他鳍均在胚后形成,眼色素也是在胚胎发育过程中完成,这与尖吻细鳞鲑^[12]、哲罗鱼^[8]和大西洋鲑^[15,21–22]类似。

秦岭细鳞鲑胚胎发育过程中胚环的形成是发生在原肠期阶段,而哲罗鱼(♀)与细鳞鱼(♂)杂交种^[7]、哲罗鱼^[8]和尖吻细鳞鲑^[12]的胚环是在囊胚晚期形成的,两者不一致。本研究与楼允东的组织胚胎学^[23]、尤永隆的发育生物学^[21–22]和大马哈鱼^[14]符合。作者对哲罗鱼(♀)与细鳞鱼(♂)杂交种^[7]、

表 2 秦岭细鳞鲑与其他鲑科鱼类的比较
Tab.2 Comparson between *Brachymystax lenok tsinlingensis* and other salmons

种类 species	平均温度/℃ water temperature	孵化时间/h duration from fertilization to hatching	总积温/(℃·d) accumulated temperature	出膜仔鱼体长/mm body length at hatching
秦岭细鳞鲑 <i>B.lenole tsinlingensis</i>	11.03	408	193.35	9.64
哲罗鱼 <i>H.taimen</i> ^[8]	7.5	839	262.19	18.45
尖吻细鳞鲑 <i>B.lenole</i> ^[12]	7.7	597	191.53	10.67
高白鲑 <i>C.peleol</i> ^[9]	5.6	1392	325	7.25
西藏亚东鲑 <i>S.truttafario</i> ^[10]	4.3	2196	393.5	13.09
虹鳟 <i>O.mykiss</i> ^[11]	6.3	1248	328.12	16.51
哲罗鱼(♀)与细鳞鱼(♂)杂交种 hybrid of <i>H.taimen</i> (♀)× <i>B.lenok</i> (♂) ^[7]	7.55	769	241.95	18.1

哲罗鱼^[8]和尖吻细鳞鲑^[12]中胚环出现的划分方法持有不同的观点。

3.2 影响胚胎发育和仔稚鱼生长的因素

3.2.1 胚胎发育影响因素 受精卵的第一次卵裂标志着胚胎发育的开始,在整个发育过程中,卵的发育速率和出膜率受外界因子影响较大,主要因子有水温、溶氧、光照、水质以及敌害生物等^[13]。

鱼类的胚胎发育都需要一个适合的水温范围,如红大麻哈鱼的低温和高温温度忍受范围分别在 40~42.5°F 和 55~57.5°F^[24],如果超过或是低于这个范围,胚胎发育将停滞、异常或死亡。在合适的水温范围内,卵的发育时间与温度呈正相关,虹鳟在 3℃ 条件下孵化历时 100 d 以上,而在 17℃ 时不到 17 d 即可出膜^[25]。秦岭细鳞鲑在平均水温 11.03℃ 条件历经 408 h 出膜,时间远远低于平均温度较低的哲罗鱼^[8](7.5℃/839 h)、西藏亚东鲑^[10](4.3℃/2 196 h)、尖吻细鳞鲑^[12](7.7℃/597 h)。日本大头鳕(*Gadus macrocephalus* Tilesius)受精卵的发育速率、孵化率、初孵仔鱼存活率和形态特征在一定温度范围内受水温变化影响显著,发育速率与孵化速率呈正相关^[26]。本研究由于条件限制水温较自然产卵场的水温要高,这也可能是导致受精卵出膜时间短,出膜过程中出现死亡或是畸形苗的原因之一。2010 年在 10.35℃ 的平均温度下从孵化到出膜所需积温为 197℃·d,经推算得出在自然河道 6~11℃ 的水温变化下需要经过 29~35 d 孵化出膜^[27],这反应了水体温度与孵化速率、出膜时间的关系,因此可以推断人工繁殖的最高水温不要超过 14℃,最适宜水温应控制在 6~10℃。

鱼卵发育对 DO 水平的要求随种类、卵的类型及其特点而不同,鱼卵所需氧气是通过扩散得到的,受精卵在不同阶段对 DO 水平的要求也不一样,如鲱(*Clupea harengus* L.)、中华鲟(*Acipenser sinensis*)的卵在发育初期要求较低,而后逐渐递增,在孵化前期即胚体开始扭动至出膜时期达到最高峰^[28-29],DO 水平在大西洋鲑的胚胎发育后期的肌肉发育中具有重要作用^[30],秦岭细鳞鲑的孵化水体 DO 需求在 6.00~8.55 mg/L。如果低于这个水平将会导致发育迟缓、坏死或是出膜幼苗

畸形,在正常水平范围内孵化出正常胚胎与溶氧的水平呈正比。通常在一定范围内,耗氧量的多少与水温的高低成正比,中华鲟胚胎耗氧量的需求量实验验证了这个观点^[29]。因此适合的水体 DO 水平是保证秦岭细鳞鲑胚胎正常发育的前提之一。

孵化水体的水质也是保证胚胎正常发育的一个重要条件。本研究中孵化水体采用的是山涧引水和井水混合水体,雨天的山涧水体(持续大雨)通常比较浑浊,这样可能会导致水体中各种病原菌或是其他能感染受精卵的微生物数量增加,细菌长在卵膜外部会使卵膜牢固下降,出现坏死区,增加耗氧量,从而严重影响了胚胎的正常发育。在鱼卵孵化过程中,一旦胚胎发育停止或是死亡,可能极易感染水霉病^[31]。在具体生产中作者采用了定时用食盐泼洒进行最大可能预防水霉病的发生。

3.2.2 仔稚鱼生长影响因素 秦岭细鳞鲑刚出膜的仔鱼体长(9.64±1.03) mm,体质量(0.022 9±0.002 0) g。此时的仔鱼营养完全依靠卵黄提供,属于内源性营养阶段,该阶段最大影响因子是温度和水质等,需要有稳定的温度和良好的水质。当达到临界期(内源性营养转外源性营养)时,是由饵料保障和仔鱼器官发育的共同作用的一个危险期^[32],鱼类的初次摄食时间主要与种类、卵黄囊消失时间、消化器官的发育、水体水温和开口饵料的选择等有关^[33],鱼类仔鱼的开口摄食率通常很低,在 10%~50%^[34-35],这也是野外环境下,稚鱼和幼鱼的死亡率远远低于仔鱼的原因^[36]。仔鱼初次摄食成功的最主要决定因子有饵料的大小、质量和密度,其次初次摄食的仔鱼都需要伴以视觉、摄食、消化、运动等器官功能的形成。秦岭细鳞鲑初孵仔鱼就已经开口,到第 3 天口咽腔已经逐步发育,出膜到第 12 天阶段称为卵黄囊期仔鱼(yolk-sac larvae),以卵黄囊作为营养源。12 d 卵黄囊逐步消失,开始进食,这与尖吻细鳞鲑的主动摄食时间相近^[12]。

鱼类仔鱼度过危险期成功进入外源性营养,在良好的水体环境中,温度、密度和饵料的选择则是影响仔稚鱼生长的主要因素。高白鲑仔稚鱼

摄食强度随温度变化很大,在适合温度范围内仔稚鱼的摄食强度都随着水温的变高而增强^[37]。大西洋鲑在水温 8℃ 以上出膜到初次摄食的时间与褐鲑(*Salmo trutta*)、红点鲑(*Salvelinus malma*)的时间一致,但水温降到 8℃ 以下大西洋鲑比褐鲑、红点鲑需要等多的时间达到初次摄食阶段,该结果与这 3 种鱼的最适合水温范围以及地理分布相一致^[38]。目前关于秦岭细鳞鲑摄食强度与温度的关系还没有报道,有待更进一步的研究,以为苗种驯化提供基础资料。饵料种类及大小的选择关系到仔稚鱼食物喜好性选择,楼宝等对赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)稚幼鱼采用不同的生物饵料投喂得出鲢足类的投喂效果最佳,存活率最高^[39]。据饲养观察,秦岭细鳞鲑开口饵料丰年虫效果较好,仔鱼摄食活动强烈,等仔稚鱼长到 20 mm 左右,开始投喂剁碎的水蚯蚓,摄食强度也很好,若换成了饲料,则摄食强度变差,这可能是因为野生秦岭细鳞鲑偏好在水中晃动的活饵料,因此在人工驯化的时候先需要活饵料和饲料的混合再逐步用饲料替代活饵料,以达到人工驯化的目的。

3.3 胚胎发育过程中注意的问题

2010 年春季在长江水产研究所、陕西省水产研究所和陕西陇县秦岭细鳞鲑国家级自然保护区三方合作首次取得了人工繁殖和幼鱼培育的成功,但仍需要注意以下问题:

(1) 根据 2010 年、2011 年两年的经验,建议孵化水温控制在 6~10℃,本次孵化水温偏高,出膜时间较短,导致受精卵出膜过程中死亡或是出现畸形仔鱼(主要是身体弯曲)。

(2) 溶氧要控制在 6 mg/L 以上,确保在胚胎发育过程中因缺氧而坏死从而导致水霉病发生,最后形成坏死区域,水体的流速要适中,水流小了会导致受精卵表面氧气交换量不足导致缺氧,水流过大会导致对受精卵的冲击力较大影响正常的胚胎发育,特别是在敏感阶段(囊胚期到原肠期到神经胚阶段)。

(3) 要做到日常的定时消毒工作,及时用自制符合大小的吸管吸出死卵,防止死卵感染水霉,连成坏死区,吸卵时动作要非常轻,避免碰到好

卵影响发育,整个孵化过程中受精卵要避免光照。

(4) 由于秦岭细鳞鲑出膜时间不一致,先出膜的仔鱼生长时间长,个体较后出膜的仔鱼大,会出现大吃小和相互残杀的现象,因此需要及时将规格差别大的仔稚鱼分开驯养,提高种苗的存活率。

致谢: 本研究得到了陕西省陇县秦岭细鳞鲑国家级自然保护区全体人员的大力支持,长江水产研究所太湖试验场王义辉先生在捕获亲本和受精卵采样中提供了大力帮助,长江水产研究所柳凌、张洁明老师在提供解剖镜等方便给与了大力支撑,西南大学博士研究生梁志强在图片处理给与了帮助,在此谨表谢意!

参考文献:

- [1] 李思忠. 陕西太白山细鳞鲑的一新亚种[J]. 动物分类学报, 1966, 3(1): 92-94.
- [2] 陕西省动物研究所. 秦岭鱼类志[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 14-15.
- [3] 侯峰. 甘肃秦岭细鳞鲑保护生物学研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2009: 1-63.
- [4] 乐佩琦, 陈宜瑜. 中国濒危动物红皮书(鱼类)[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [5] 靳建波, 危起伟, 孙庆亮, 等. 茜素络合物浸泡标记秦岭细鳞鲑发眼卵及仔鱼耳石[J]. 淡水渔业, 2011, 41(2): 10-17.
- [6] 任剑和梁刚. 干河流域秦岭细鳞鲑资源调查报告[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2004, 32(S2): 165-168.
- [7] 徐革锋, 杜佳, 张永泉, 等. 哲罗鱼(♀)与细鳞鱼(♂)杂交种胚胎及仔稚鱼发育[J]. 中国水产科学, 2010, 17(4): 630-638.
- [8] 张永泉, 尹家胜, 贾钟贺, 等. 哲罗鱼胚胎和仔鱼发育的研究[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(6): 425-430.
- [9] 张北平, 蔡林钢, 吐尔逊, 等. 高白鲑受精卵人工孵化及胚胎发育观测[J]. 水产学杂志, 2001, 14(2): 24-27.
- [10] 豪富华, 陈毅峰, 蔡斌. 西藏亚东鲑的胚胎发育[J]. 水产学报, 2006(3): 289-296.
- [11] 黄金善, 范兆廷, 贾钟贺, 等. 沉性大卵径鱼卵的观察方法与虹鳟的胚胎发育[J]. 经济动物学报, 2005, 9(4): 235-238.
- [12] 杜佳, 徐革锋, 韩英, 等. 尖吻细鳞鲑胚胎及仔、稚、幼鱼发育的研究[J]. 大连海洋大学学报, 2010(5): 379-385.

- [13] 殷名称. 鱼类生态学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 134-272.
- [14] Mahon E F, Hoar W S. The early development of the chum salmon *Oncorhynchus keta* (Walbaum) [J]. J Morphol, 1956, 98(1): 1-47.
- [15] Battle H I. The embryology of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Can J Res, 1944, 22(5): 105-125.
- [16] 李修峰, 黄道明, 谢文星, 等. 汉江中游银鮡的胚胎发育[J]. 大连水产学院学报, 2005, 20(3): 181-185.
- [17] 严太明, 何学福, 贺吉胜. 宽口光唇鱼胚胎发育的研究[J]. 水生生物学报, 1999, 23(6): 636-640.
- [18] 刘文生, 李勇, 肖建光. 胡子鲇胚胎发育的观察[J]. 华南农业大学学报, 2004, 25(4): 89-92.
- [19] 陈永详, 罗泉笙. 乌江上游四川裂腹鱼的胚胎发育[J]. 四川动物, 1999, 16(4): 163-167.
- [20] 陈红菊, 姜运良. 泰山赤鳞鱼胚胎发育的研究[J]. 水生生物学报, 2008, 32(6): 926-933.
- [21] 龙永隆, 林丹军, 张彦定. 发育生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2011(1): 96-98.
- [22] Blalinsky B I. An Introduction to Emryology: 4th ed[M]. Philadelphia: WB Saunders Company, 1975: 175-178.
- [23] 楼允东. 组织胚胎学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996, (2): 314-319.
- [24] Combs B D. Effect of temperature on the development of salmon eggs [J]. The Progressive Fish-Culturist, 1965, 27(3): 134-137.
- [25] Blaxter J H S. Pattern and variety in development[J]. Fish Physiol, 1988, 11A: 1-58.
- [26] 卞晓东. 鱼卵, 仔稚鱼形态生态学基础研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010: 1-239.
- [27] 靳建波. 秦岭细鳞鲑仔稚鱼耳石微结构及荧光标记研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011: 1-55.
- [28] Braum E. Ecological aspects of the survival of fish eggs, embryos and larvae [J]. Gerking D (ed), 1978: 177-252.
- [29] 唐国盘. 中华鲟胚胎发育和早期生活史阶段耗氧率的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005: 1-80.
- [30] Matschak T W, Stickland N C, Mason P S, et al. Oxygen availability and temperature affect embryonic muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. Differentiation, 1997, 61(4): 229-235.
- [31] 肖克宇, 陈昌福. 水产微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [32] 殷名称. 鱼类早期生活史研究与其进展[J]. 水产学报, 1991, 15(4): 348-358.
- [33] 殷名称. 北海鲱卵黄囊期仔鱼的摄食能力和生长[J]. 海洋与湖沼, 1991, 22(6): 554-560.
- [34] Dou S, Masuda R, Tanaka M, et al. Effects of temperature and delayed initial feeding on the survival and growth of Japanese flounder larvae[J]. J Fish Biol, 2005, 66(2): 362-377.
- [35] Rana K. Influence of egg size on the growth, onset of feeding, point-of-no-return, and survival of unfed *Oreochromis mossambicus* fry[J]. Aquaculture, 1985, 46(2): 119-131.
- [36] 黄洪贵, 胡振禧, 黄种持, 等. 饥饿对中华倒刺鲃仔鱼摄食、存活与生长发育的影响[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(2): 231-235.
- [37] 董崇智, 牟振波, 赵彩霞, 等. 高白鲑仔鱼、稚鱼在不同温度条件下的摄食强度试验[J]. 水利渔业, 1991: 13-16.
- [38] Jensen A J, Johnsen B O, Saksgård L. Temperature requirements in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Brown trout (*Salmo trutta*), and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from hatching to initial feeding compared with geographic distribution[J]. Can J Fish Aquat Sci, 1989, 46(5): 786-789.
- [39] 楼宝, 史海东, 柴学军, 等. 不同生物饵料对赤点石斑鱼稚幼鱼生长和存活率的影响[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(3): 270-273.

Early ontogenesis of *Brachymystax lenok tsinlingensis*

SHI Deliang^{1,2}, WEI Qiwei^{1,2,3}, SUN Qingliang^{1,2}, LI Luoxin^{2,3}, DU Hao^{1,2,3}

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

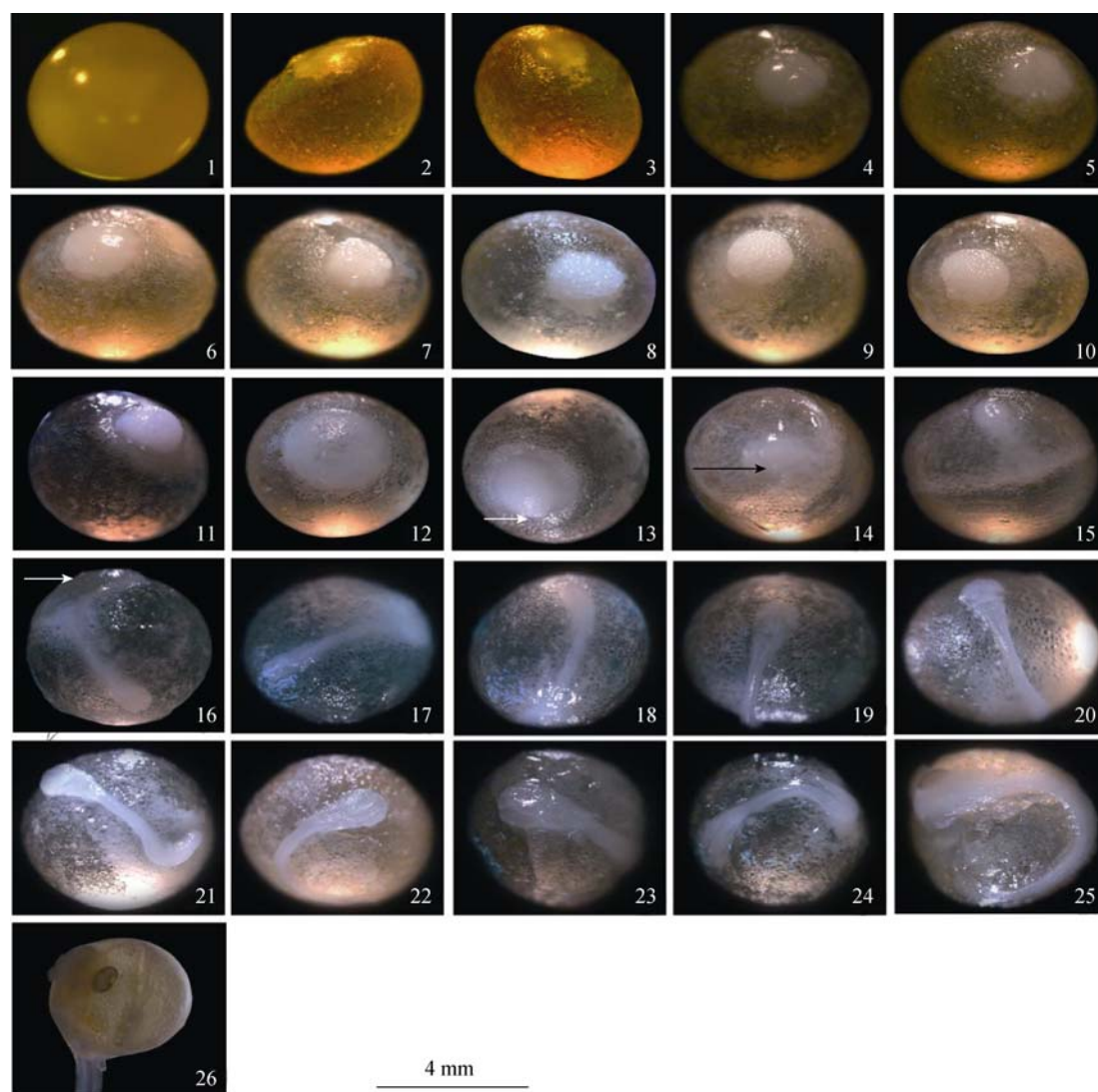
2. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture of China, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

3. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: Sexually mature *Brachymystax lenok tsinlingensis* were caught from the wild and, after artificial fertilization, embryonic and larval development were investigated. Larvae of mean body length (9.64 ± 1.03) mm hatched 408 h after fertilization. The total accumulated temperature of embryonic development was $193.35^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$ at a water temperature of $9.31\text{--}12.80^{\circ}\text{C}$. We defined six broad stages of embryogenesis (zygote, cleavage stage, blastula stage, gastrula stage, neurula stage, and organ formation stage), which included 26 minor periods. The hatching larvae had a transparent body with clearly visible sarcomeres, but with limited swimming capability. Five days after hatching, a patch of melanin appeared on the body surface. The yolk sac began to disappear 12 days after hatching and parr markings started to appear after 46 days, at which stage the fins of the larvae resembled those of young fish. The morphological characteristics of the embryos and larvae are described and the factors affecting ontogenesis of the early life stages of *Brachymystax lenok tsinlingensis*, including water temperature, dissolved oxygen and water quality, are discussed.

Key words: *Brachymystax lenok tsinlingensis*; embryonic development; accumulated temperature; larvae; juveniles

Corresponding author: WEI Qiwei. E-mail: weiqw@yfi.ac.cn



图版 I 秦岭细鳞鲑胚胎发育时序图

1: 受精卵; 2: 1 细胞期; 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: 分裂后期; 10: 囊胚早期; 11: 囊胚中期; 12: 囊胚晚期; 13: 原肠早期(箭头: 胚环); 14: 原肠中期(箭头: 胚盾); 15: 原肠晚期; 16: 神经胚期(箭头: 胚孔); 17: 眼基出现期; 18: 胚孔关闭期; 19: 脑部分化期; 20: 胸鳍原基出现期; 21: 尾芽出现期; 22: 胸鳍雏形出现期; 23: 眼晶体出现期; 24: 尾鳍出现期; 25: 眼色素出现期; 26: 孵化期。

Plate Development stage of *Brachymystax lenok tsinlingensis* embryo

1: zygote; 2: 1-cell stag; 3: 2-cell stage; 4: 4-cell stage; 5: 8-cell stage; 6: 16-cell stage; 7: 32-cell stage; 8: 64-cell stage; 9: Multicellular stage; 10: Early-blastula stage; 11: Mid-blastula stage; 12: Late-blastula stage; 13: Early-gastrula stage (arrowhead: germ ring); 14: Mid-gastrula stage (arrowhead: embryonic shield); 15: Late-gastrula stage; 16: Neurula plate stage (arrowhead: Blastopore); 17: Eye anlage stage; 18: Blastopore closed stage; 19: Brain differentiation stage; 20: Pectoral fin anlage stage; 21: Tail bud formed stage; 22: Rudiment of pectoral fin stage; 23: Eye lens formed stage; 24: Caudal fin appearance; 25: Eye pigment stage; 26: Hatching.

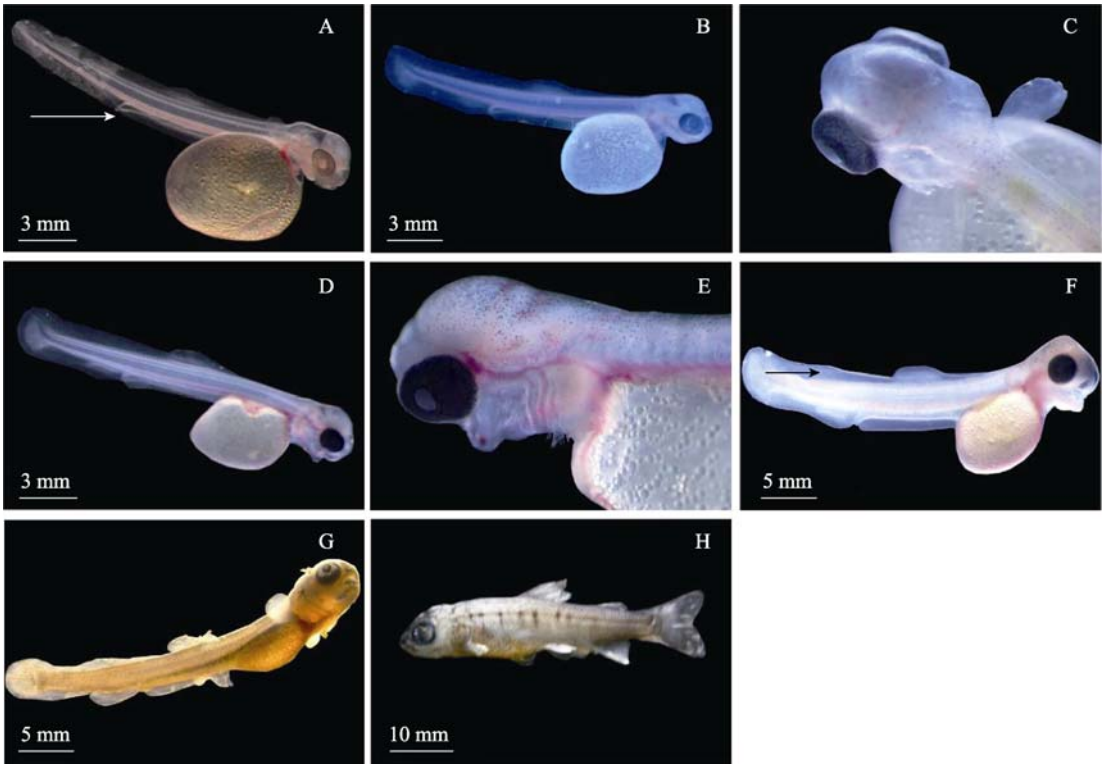


图 II 秦岭细鳞鲑的仔稚鱼发育图

A: 出膜仔鱼(箭头: 肛突); B: 出膜 3 d 的仔鱼; C: 出膜 3 d 的仔鱼(放大: 体表黑色素); D: 出膜 5 d 的仔鱼; E: 出膜 5 d 的仔鱼(放大: 体表黑色素); F: 出膜 7 d 的仔鱼(箭头: 脂鳍雏形); G: 出膜 12 d 的仔鱼; H: 出膜 46 d 的仔鱼.

Plate Development of *Brachymystax lenok tsinlingensis* larvae and juveniles

A: hatching larvae (arrowhead: anal tubercle); B: 3 d larvae after hatching; C: 3 d larvae after hatching (enlarged: melanin); D: 5 d larvae after hatching; E: 5 d larvae after hatching (enlarged: melanin); F: 7 d larvae after hatching (arrowhead: Rudiment of adipose fin); G: 12 d larvae after hatching; H: 46 d larvae after hatching.