

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.18040

西藏黑斑原鲢胚胎发育观察

潘瑛子¹, 李宝海¹, 格桑加措², 刘海平¹, 周建设¹

1. 西藏自治区农牧科学院水产科学研究所, 西藏 拉萨 850032;

2. 西藏自治区拉萨市墨竹工卡县林业局, 西藏 拉萨 850200

摘要: 黑斑原鲢(*Glyptosternum maculatum*)是中国唯一的原鲢属鱼类, 仅分布在中国境内的西藏雅鲁藏布江水系。由于过度捕捞、水利工程影响、外来鱼类入侵等原因, 其野生种群数量持续下降, 分布范围逐年缩小, 目前处于极危状态。本研究中黑斑原鲢亲鱼捕自西藏日喀则市谢通门县、拉孜县、昂仁县、萨嘎县 4 个地区的雅鲁藏布江江段, 采样地海拔分布范围介于 3900~4500 m。2015 年 5 月中旬至 6 月中旬, 人工催产雌鱼 79 尾, 自然排卵 7 尾, 解剖雄鱼 15 尾进行授精, 得到了黑斑原鲢受精卵约 42208 粒。受精卵为圆形的沉性卵, 略显淡黄色, 黏性较强。将受精卵平铺放在特制筛网上, 置于微流水的平列槽内进行孵化。观察从受精卵至仔鱼孵化出膜的胚胎发育过程, 统计有效积温。结果显示: 黑斑原鲢胚胎发育时序符合硬骨鱼类胚胎发育的一般规律, 分为 8 个阶段, 即受精卵、胚盘形成、卵裂、囊胚、原肠、神经胚、早期器官形成及孵出阶段。胚孔封闭前就形成了肌节和眼囊, 进入早期器官形成阶段后依次出现了耳囊、心脏原基、消化道、耳石、眼睛体、胸鳍原基等, 心脏搏动后红细胞也有出现。整个胚胎发育期间的平均温度约为 13.8℃, 有效积温为 2963.2~3132.4 h·℃, 孵化率约为 70%。本研究还发现黑斑原鲢胚胎具有双层卵膜的特殊结构, 该结构在成熟卵吸水膨胀后形成, 进入神经胚期完全消失, 分析推测这种结构可能与对环境的适应有关, 外层卵膜在卵的传播和孵化过程中可以起到黏附固定和缓冲保护的作用。本研究旨在深入了解黑斑原鲢胚胎发育的特点及规律, 为黑斑原鲢资源恢复及科学保护提供理论参考。

关键词: 黑斑原鲢; 胚胎发育; 形态特征; 时序性; 双层卵膜; 雅鲁藏布江; 西藏

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)06-1205-11

黑斑原鲢(*Glyptosternum maculatum*)属鲇形目(Siluriformes)、鲢科(Sisoridae)、原鲢属(*Glyptosternum*), 是原鲢属目前已知的 3 种鱼类中唯一分布在中国雅鲁藏布江水系的物种^[1], 在中国鲢科鱼类系统发育研究中占有重要的地位。历史上, 黑斑原鲢曾广布在雅鲁藏布江中上游干流及支流拉萨河、尼洋河等流域^[1-2], 近些年来, 由于经济利益驱使下的过度捕捞、水利工程影响、外来鱼类入侵等原因, 野生黑斑原鲢的种群数量持续下降, 分布范围逐年缩小^[1], 拉萨、林芝、山南等地已很难捕获到, 只有在雅鲁藏布江海拔 3900~4500 m 的日喀则江段尚存有一定数量。研

究显示其种群资源处于“生长型”及“补充型”过度捕捞阶段^[1], 环境保护部和中国科学院 2015 年公布的《中国生物多样性红色名录——脊椎动物卷》^[3]中, 黑斑原鲢被列入了极危(CR)鱼类名录, 也是目前国内已知的 77 种鲢科鱼类中被唯一评定为极危等级的物种。

2004 年至今, 国内几所科研先后开展了黑斑原鲢的人工繁殖与苗种培育研究工作, 2015 年, 西藏自治区农牧科学院水产团队成功实现了黑斑原鲢的人工催产及繁殖, 并研发建立了黑斑原鲢开口饵料供应模式, 在仔鱼开口驯食人工饵料的研究方面获得了阶段性的成果^[4]。关于黑斑原鲢

收稿日期: 2017-10-10; 修订日期: 2018-05-30.

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项(201403012); 西藏自治区财政专项(藏财指(专)字[2014]69 号).

作者简介: 潘瑛子(1984-), 女, 助理研究员, 研究方向为鱼病学. E-mail: pyingzi_tibet@163.com

通信作者: 李宝海, 研究员, 博士后合作导师, 研究方向为鱼病学. E-mail: lbh0891@163.com

的年龄与生长、食物与消化生理、繁殖生物学、特殊器官副肝、细胞遗传学和生化遗传学、遗传多样性等已有较为系统的研究报道^[1]。

鱼类的胚胎发育在卵膜内进行, 胚胎没有任何主动避敌的能力和行爲特性^[5-6]。鱼类胚胎发育的研究可为鱼类遗传育种、鱼类学等研究提供参考。本研究观察了黑斑原鲃胚胎发育的时序性及形态特征, 统计了胚胎发育的有效积温, 发现了胚胎发育过程中存在着双层卵膜的特殊结构。中国已知鲃科鱼类共有 12 属^[7], 可分为两个自然类群, 即包括鲃属(*Bagarius*)、黑鲃属(*Gagata*)、纹胸鲃属(*Glyptothorax*)、褶鲃属(*Pseudecheneis*)的非褶鲃鱼类和包括原鲃属等 8 个属在内的褶鲃鱼类^[8]。褶鲃鱼类演化的总趋势是向着栖居在急流底层石头缝隙间的方向发展, 因此形态特征也发生了一系列的适应性变化, 例如没有胸吸着器, 但拥有宽大且腹面带横纹皮褶的胸鳍、腹鳍, 可以有效附着, 稳定身体, 抵御水流冲击, 以适应生存环境^[8]。由此推测, 黑斑原鲃受精卵双层卵膜的发生可能也是对环境的适应。本研究旨在了解黑斑原鲃胚胎发育的特点及规律, 为黑斑原鲃苗种培育提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 亲鱼来源

黑斑原鲃亲鱼捕自西藏日喀则市谢通门县、

拉孜县、昂仁县、萨嘎县 4 个地区的雅鲁藏布江江段, 采样地海拔分布范围介于 3900~4500 m, 采样点分布见图 1。

1.2 亲鱼催产及授精

2015 年 5 月中旬至 6 月中旬, 挑选体重介于 64.70~250.10 g, 为(110.64±37.20) g、腹部膨大, 以手触摸可明显感觉到卵粒的雌性个体, 适当力度挤压其腹部, 观察卵粒游离情况。卵粒尚未完全分离的雌性个体用促黄体素释放激素 A₂ 和鲤鱼脑垂体人工催产、授精。成功催产雌鱼 79 尾, 自然排卵 7 尾, 产卵总数约为 57440 粒。雄性黑斑原鲃的精巢构造特殊, 呈拥有众多细小分支的树杈状, 用挤压方式较难挤出精液, 故挑选健康强壮的性成熟雄性进行解剖。共解剖雄鱼 15 尾取其精巢研磨, 用 1 mL 生理盐水冲洗、经纱布过滤后干导法授精。雄性亲鱼体重范围为 145.20~502.60 g, 体重为(304.82±100.28) g。

1.3 胚胎孵化及观察

在微流水的平列槽内放入特制的筛网, 筛网四侧边框为木头, 可漂浮于水面上, 中间为孔径 2.0 mm×2.0 mm 的纱网, 将受精卵平铺在纱网上进行孵化。

胚胎观察在西藏自治区农牧科学院水产养殖基地(拉萨, 海拔约 3600 m)内进行。受精卵和卵裂阶段, 每隔 30 min 对同一批受精卵进行连续取样、观察、拍照及记录; 卵裂结束后, 每隔 1 h 采

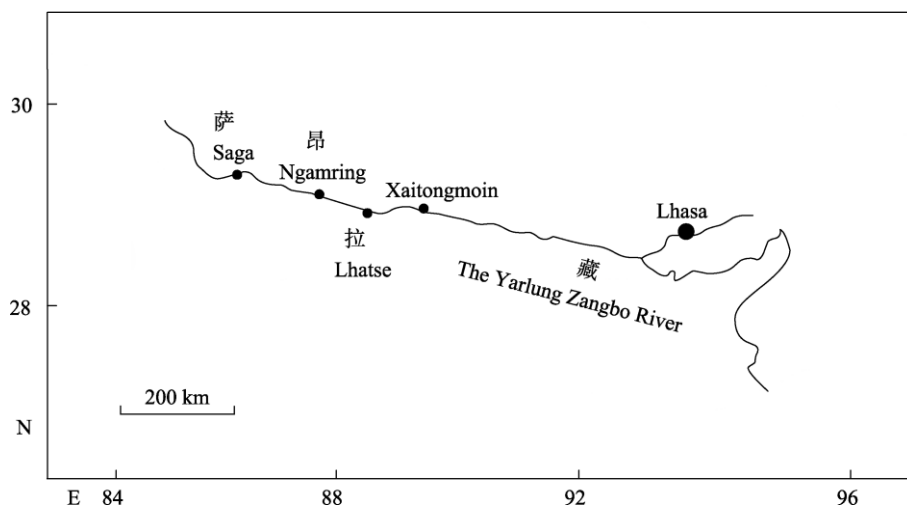


图 1 雅鲁藏布江采样点示意图

Fig.1 Sampling locations in the Yarlung Zangbo River

样 1 次。每次取 10 枚受精卵, 胚胎发育的时序及进入各时期的时间点以镜检 50%以上胚胎出现相应特征为准, 各发育时期的划分参考硬骨鱼类的胚胎发育分期方法^[9]。当有不足 50%的卵出现某时期特征后, 进行连续观察, 直至一半以上出现相应特征。

用凤凰 XTL165 系列变倍体式显微镜、普通台式电脑和 PHMIAS2008 CS Ver2.2 软件采集图片。

1.4 温度记录及积温计算

用杭州凌硕检测仪器有限公司型号为 LS-T111 的温度记录仪采集温度信息, 记录频率为 30 min 1 次。

胚胎发育各阶段有效积温按下式计算: $K = NT$ (K , 有效积温, $h \cdot ^\circ C$; N , 某一发育阶段所经历的时间, h ; T , 该发育阶段的平均水温, $^\circ C$), 即胚胎发育各阶段的有效积温等于本阶段的平均温度

与该阶段持续时间的乘积^[6]。黑斑原鲑胚胎发育所需的有效积温等于各阶段的有效积温之和。

2 结果与分析

2.1 受精率及孵化率

共获得受精卵 42208 粒, 受精率约为 73.5%, 孵出仔鱼约 29546 尾, 孵化率约为 70.0%。

2.2 胚胎发育的时序及形态特征

孵化水源为曝气后的地下水, 微流水环境, 水体溶氧量 6.0~7.2 mg/L, 水温 13.1~15.0 $^\circ C$ 。受精卵经过 216~228 h 完成整个胚胎发育, 进入胚后发育。其时序与众多硬骨鱼相同^[6, 9-17], 分为 8 个阶段, 即受精卵、胚盘形成、卵裂、囊胚、原肠、神经胚、器官分化及孵出阶段。根据发育形态特征的变化, 每个阶段又划分为 28 个时期, 详见表 1 及图 2。

表 1 西藏黑斑原鲑胚胎发育时序及主要特征(水温 13.1~15.0 $^\circ C$)
Tab. 1 Embryonic development of *Glyptosternum maculatum* in Tibet (water temperature 13.1–15.0 $^\circ C$)

序号 No.	发育时期 development stage	距受精时间 (h:min) time after fertilization	主要特征 major characteristics	图 2 Fig. 2
1	受精卵 fertilized egg	0:0	圆形的沉性卵, 几乎为淡黄色, 偶见金黄色卵质分布均匀。受精卵吸水膨胀后形成双层卵膜, 外层卵膜黏性较强。	1-1, 1-2
2	胚盘期 blastodisc phase	3:20	原生质开始向动物极集中, 逐渐隆起如帽状, 胚盘形成。	2-1, 2-2
3	2 细胞期 2-cell phase	5:20	分裂形成两个大小相等的细胞, 细胞间界限明显。	3
4	4 细胞期 4-cell phase	6:20	分裂形成 2×2 排布、大小相等的 4 个细胞。	4
5	8 细胞期 8-cell phase	7:45	分裂形成 2×4 排布、大小相近、形状相似的 8 个细胞, 两侧 4 个细胞稍小。	5
6	16 细胞期 16-cell phase	9:25	分裂形成 4×4 排布、大小相近、形状相似的 16 个细胞。	6
7	32 细胞期 32-cell phase	10:25	分裂形成 4×8 排布、大小相近、形状相似的 32 个细胞。	7
8	64 细胞期 64-cell phase	11:30	分裂的细胞大小不一且开始重叠并逐渐形成两层分布。	8
9	多细胞期 multicellular phase	13:00	分裂的细胞大小、形态出现明显差异, 越来越小且越来越多, 重叠形成多细胞胚体。	9
10	囊胚早期 early blastula phase	18:00	分裂的细胞数目不断增多, 细胞界限逐渐模糊, 细胞重叠隆起如帽状, 高举在卵黄上, 且与卵黄界限明显。	10
11	囊胚中期 mid blastula phase	24:20	胚盘细胞的高度逐渐下降, 沿卵膜向下扩展并慢慢变薄, 其与卵黄间的界限依旧明显。	11
12	囊胚晚期 late blastula phase	29:20	胚盘细胞沿卵黄下包的面积逐渐变大, 细胞层越来越薄, 像平铺在卵黄上, 胚胎整体近似圆形。	12
13	原肠早期 early gastrula phase	48:20	胚盘细胞继续沿卵黄向下扩展, 下包达卵黄约 1/3 处, 细胞层厚度均一, 边缘内卷不明显。	13
14	原肠中期 mid gastrula phase	58:20	胚盘细胞下包达卵黄约 1/2 处, 细胞层下缘周边细胞集中增厚并内卷, 形成胚环。细胞层后端由于胚盘细胞的集中和内卷, 逐渐出现呈三角状并加厚隆起的胚盾。	14-1, 14-2

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab. 1 continued)

序号 No.	发育时期 development stage	距受精时间 /(h:min) time after fertilization	主要特征 major characteristics	图 2 Fig. 2
15	原肠晚期 late gastrula phase	68:30	胚盘细胞下包达卵黄 2/3~3/4。胚盾向动物极发展，胚环向下收缩，仅有少部分卵黄未被包入，形如倒放的梨形，胚盾逐渐变厚变大。	15-1, 15-2
16	神经胚期 neurula phase	71:25	胚盘细胞继续下包，卵黄栓逐渐变小，神经外胚层增厚形成神经板。	16-1, 16-2
17	肌节出现期 appearance of myomere phase	80:20	胚体背部中央位置出现 2~4 对肌节，头部开始膨大，出现脑泡原基。	17
18	眼囊出现期 appearance of optic vesicle phase	84:30	在胚体前端两侧逐渐形成对称的囊状窝，形如小梭。	18
19	胚孔封闭期 closure of blastopore phase	88:20	胚盘细胞下包完成，胚孔关闭。胚体长度超过卵周 1/2。	19-1, 19-2
20	尾芽出现 appearance of tail bud phase	103:30	胚体后端突出呈圆弧状，并逐渐游离于卵黄，尾芽形成。部分胚胎后端卵黄部分略微向内收缩。	20
21	耳囊出现期 appearance of otic capsule phase	106:30	胚体继续伸长，在胚体前端约 1/4 处，两侧对称出现椭圆形囊状窝。	21
22	肌肉效应期 Muscular effect phase	119:25	胚体背部抽动带动尾部小幅扭动，频率较低。胚体继续延长，肌节增多。	22
23	心脏原基出现期 appearance of heart rudiment phase	127:20	由于卵黄吸收，在胚体前端与卵黄之间出现了透明的围心腔，围心腔逐渐扩大，内部出现管状突起，心脏原基出现。	23
24	心搏期 heart pulsation phase	134:20	心脏开始轻微、缓慢但有节律地跳动，随着发育时间的增加，心脏收缩力度逐渐增大，跳动频率逐渐加快。此时，在 0.9%的 NaCl 溶液中把卵膜剥开，观察胚胎可以发现消化道直通游离部分胚体的中部，抵达部位略微凹陷。	24-1, 24-2
25	耳石出现期 appearance of otolith phase	146:00	每侧耳囊中隐约可见两个黑点，耳石出现。	25
26	眼晶体出现期 appearance of eye lens phase	150:50	眼囊中出现圆形、透明的晶状体。胚体不停扭动、翻转。剥卵膜进行观察，可见胚体尾部透明鳍褶面积增大，血红细胞出现。	26-1, 26-2
27	胸鳍原基出现期 appearance of pectoral fin rudiment phase	174:30	在耳囊后下方对称出现一对月牙形突起，胸鳍原基出现。	27
28	出膜期 hatching phase	215:30	胚体尾部率先破膜而出，经过特制的孵化专用筛网后头部脱离卵膜，仔鱼侧躺于平列槽底。此时期持续约 12 h，绝大部分胚体都完成了脱膜。	28

2.2.1 受精卵阶段 黑斑原鲢成熟卵呈圆形，卵径介于 3.10~3.60 mm，略显淡黄色，偶见金黄色，沉性卵，卵质均匀分布。成熟卵遇水后迅速吸水膨胀，卵周隙扩大，在包裹卵质的卵黄膜外面形成第二层卵膜(图 3)。受精卵吸水膨胀后卵径介于 4.80~5.60 mm，其中，内层卵膜厚 0.10~0.17 mm，外层卵膜厚 0.80~1.10 mm。内层卵膜比较薄，而外层卵膜比较厚，呈透明胶质状，富有弹性和较强黏性，极易吸附水体中的细小颗粒。观察发现，

不管成熟卵受精与否，遇水后均形成外层卵膜[图 2-(1-1,1-2)]。

2.2.2 胚盘形成阶段 细胞质逐渐向动物极集聚，隆起形成胚胎发育的中心——胚盘，胚盘呈圆形，颜色较深[图 2-(2-1, 2-2)]。

2.2.3 卵裂阶段 胚盘开始分裂，细胞数目从 2 细胞逐渐翻倍增多，直至无法清晰计数；随着卵裂次数的增加，分裂出的细胞体积逐渐变小，细胞间界限较为明显，细胞层增厚隆起[图 2-(3, 4, 5,

6, 7, 8, 9)]。

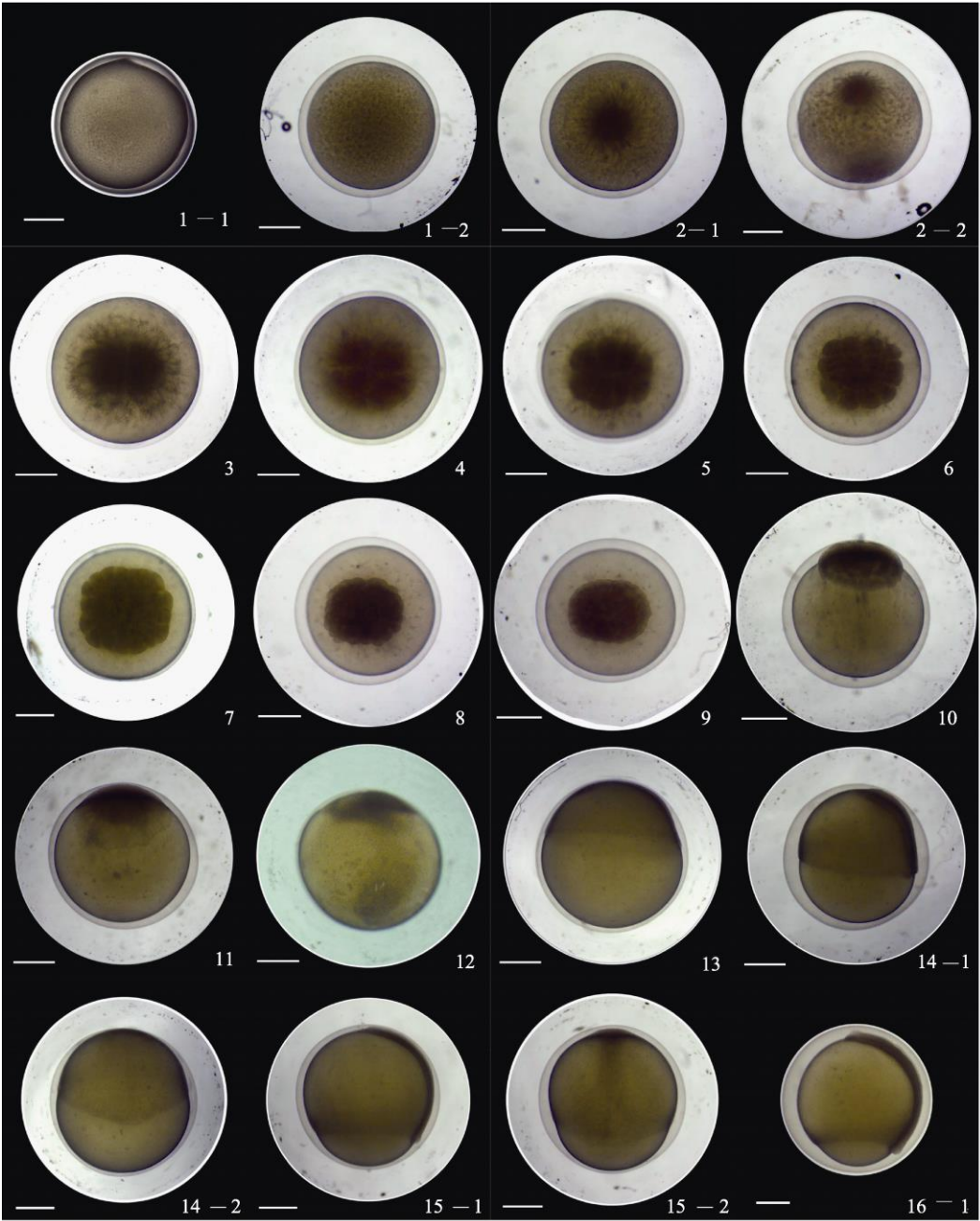
2.2.4 囊胚阶段 细胞不断分裂, 细胞间界限变得模糊, 细胞层隆起达最高时, 标志着胚胎发育进入囊胚早期。随后, 胚盘细胞沿卵黄朝植物极方向逐渐下包, 细胞层覆盖卵黄的面积逐渐增大, 细胞层逐渐变薄[图 2-(10, 11, 12)]。

2.2.5 原肠阶段 当胚盘细胞下包至胚体约 1/3 处时, 胚胎发育进入了原肠阶段。胚盘下周边缘的胚盘细胞逐渐集中增厚, 内卷形成胚环, 后端

形成三角状加厚隆起的胚盾。胚层继续下包达卵黄 2/3~3/4, 形成倒梨形的“卵黄栓”, 胚盾前端略微膨大。在原肠晚期即将进入神经胚前, 可见外层卵膜开始消融[图 2-(13, 14-1, 14-2, 15-1, 15-2)]。

2.2.6 神经胚阶段 进入神经胚发育阶段后, 外层卵膜完全消失, 胚盘细胞继续向下延伸, 未被细胞层包裹的部分越来越小, 肌节和眼囊先后出现, 且越来越明显[图 2-(16-1, 16-2)]。

2.2.7 早期器官形成阶段 胚孔封闭后胚胎进入



(待续 to be continued)

(续图 2 Fig. 2 continued)

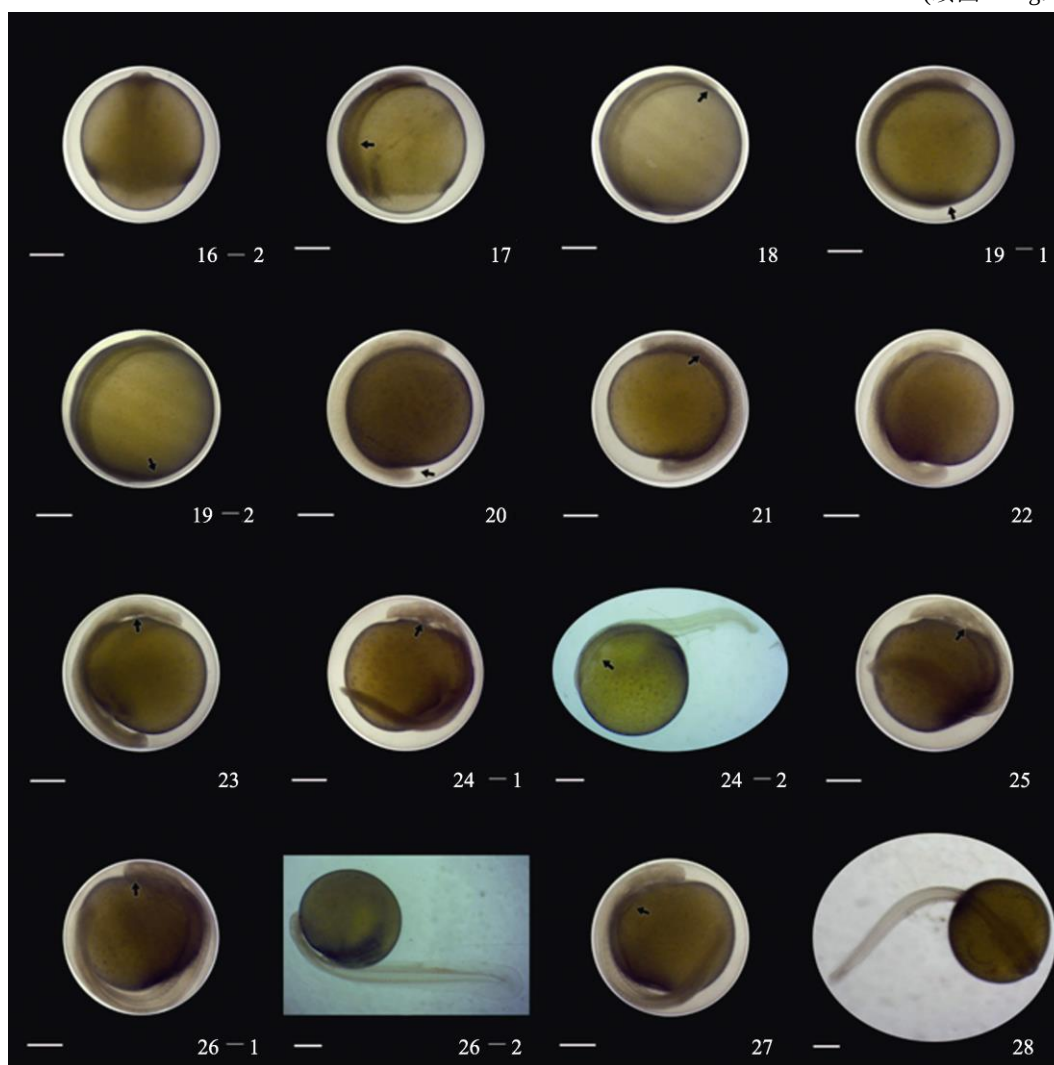


图 2 西藏黑斑原鲃胚胎发育时序及主要形态特征

1-1: 受精卵; 1-2: 受精卵吸水膨胀; 2-1: 胚盘隆起; 2-2: 胚盘隆起; 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: 多细胞期; 10: 囊胚早期; 11: 囊胚中期; 12: 囊胚晚期; 13: 原肠早期; 14-1: 原肠中期, 侧面观; 14-2: 原肠中期, 背面观; 15-1: 原肠晚期, 侧面观; 15-2: 原肠晚期, 背面观; 16-1: 神经胚期, 侧面观, 外层卵膜消失不见; 16-2: 神经胚期, 背面观; 17: 肌节出现期, 箭头示肌节; 18: 眼囊出现期, 箭头示眼囊; 19-1: 胚孔封闭期, 侧面观, 箭头示封闭处; 19-2: 胚孔封闭期, 背面观, 箭头示封闭处; 20: 尾芽出现期, 箭头示尾芽; 21: 耳囊出现期, 箭头示耳囊; 22: 肌肉效应期; 23: 心脏原基出现期, 箭头示心脏原基; 24-1, 24-2: 心搏期; 25: 耳石出现期, 箭头示耳石; 26-1: 眼晶体出现期, 箭头示眼睛体; 26-2: 血红细胞出现; 27: 胸鳍原基出现期, 箭头示胸鳍原基; 28: 出膜期。比例尺: 1 mm。

Fig. 2 Embryonic development of *Glyptosternum maculatum* in Tibet

1-1: fertilized egg; 1-2: fertilized egg absorbs water and expands; 2-1: blastodisc phase; 2-2: blastodisc uplift; 3: 2-cell phase; 4: 4-cell phase; 5: 8-cell phase; 6: 16-cell phase; 7: 32-cell phase; 8: 64-cell phase; 9: multicellular phase; 10: early blastula phase; 11: mid blastula phase; 12: late blastula phase; 13: early gastrula phase; 14-1: mid gastrula phase, lateral view; 14-2: mid gastrula phase, dorsal view; 15-1: late gastrula phase, lateral view; 15-2: late gastrula phase, dorsal view; 16-1: neurula phase, lateral view, outer egg membrane had disappeared; 16-2: neurula phase, dorsal view; 17: appearance of myomere phase, arrowhead shows the myomere; 18: appearance of optic vesicle phase, arrowhead shows the optic vesic; 19-1: closure of blastopore phase, lateral view; 19-2: closure of blastopore phase, dorsal view; 20: appearance of tail bud phase, arrowhead shows the tail bud; 21: appearance of optic capsule phase, arrowhead shows the optic capsule; 22: muscular effect phase; 23: appearance of heart rudiment phase, arrowhead shows the heart rudiment; 24-1, 24-2: heart pulsation phase; 25: appearance of otolith phase, arrowhead shows the otolith; 26-1: appearance of eye lens phase, arrowhead shows the eye lens; 26-2: appearance of red blood cells; 27: appearance of pectoral fin rudiment phase, arrowhead shows the fin rudiment; 28: hatching phase. Scale bar: 1 mm.

早期器官形成阶段,耳囊、心脏原基、消化道、耳石和眼晶体等先后出现。尾芽开始游离,不断延伸;心脏开始跳动,出现红细胞,胚体活动从肌肉轻微颤动变为扭动、翻转,且频率逐渐加快[图 2-(17, 18, 19-1, 19-2, 20, 21, 22, 23, 14-1, 24-2, 25, 26-1, 26-2, 27)]。

2.2.8 出膜阶段 随着胚体的继续发育,在 216 h 进入出膜阶段。在胚体的不断运动及孵化酶的共同作用下,胚体的尾部最先破膜而出,尾部不停摆动,胚体落入平列槽底,在经过筛网时绝大部分胚体完全脱出卵膜。刚出膜的仔鱼通体淡黄色,侧躺于平列槽底部,尾部不停摆动,卵黄囊较大、近圆形。整个出膜阶段持续 12 h 左右,绝大部分胚体完成脱膜(图 2-28)。

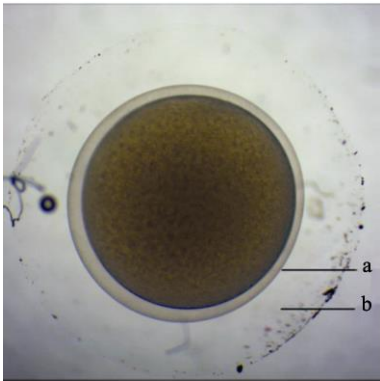


图 3 西藏黑斑原鲢受精卵的双层卵膜
a: 内层卵膜; b: 外层卵膜。
Fig. 3 Two-layer egg membranes of fertilized egg in *Glyptosternum maculatum* in Tibet
a: inner egg membrane; b: outer egg membrane.

2.3 胚胎发育的有效积温

整个胚胎发育期间 平均水温约为 13.8℃,有效积温为 2963.2~3132.4 h·℃(表 2)。

3 讨论

3.1 黑斑原鲢胚胎期的双层卵膜

本研究中,多批胚胎观察发现,不管受精与否,黑斑原鲢卵遇水后立即膨胀,在包裹细胞质的卵膜外部,形成胶质状、有黏性的厚膜。而这一现象在共同生活于雅鲁藏布江流域的 6 种裂腹鱼卵粒中并未发现。这一结果与谢从新等^[1]的黑斑原鲢胚胎发育观察存在较大差异,他们在整个

表 2 黑斑原鲢的胚胎发育各阶段的有效积温
Tab. 2 Effective accumulative temperature of *Glyptosternum maculatum* at different stages of embryonic development

发育期 development stage	所经历时 间/(h:min)	平均温度 /℃ average temperature	有效积温 /(h·℃) effective accumulative temperature
受精卵 fertilized egg	3:20	13.5	45.0
胚盘形成阶段 blastoderm formation stage	2:00	13.5	27.0
卵裂阶段 cleavage stage	12:40	13.5	171.0
囊胚阶段 blastula stage	30:20	13.6	412.5
原肠阶段 gastrula stage	23:05	13.6	313.9
神经胚阶段 neurula stage	16:30	13.7	226.1
早期器官形成阶段 early organogenesis stage	127:10	13.9	1767.7
出膜期 hatching stage	12:00	14.1	169.2
总计 total	227: 30	13.8	2963.2~3132.4

胚胎发育过程中只观察到了单层卵膜。本研究还发现,外层卵膜在原肠晚期开始消融,结构变得松散、弹性变差,进入神经胚时完全消失,仅剩内层较薄的卵膜包裹胚胎。这与王志坚等^[10]的研究结果较为相似。他们在同属于鲃科鱼类的福建纹胸鲃(*Glyptothorax fukiensis*)胚胎中也发现了双层卵膜,但外层卵膜在胚体可自如翻转后黏性和弹性才逐渐降低,出膜前完全消失。

鲃鱼类是向着栖居在急流底层石头缝隙间的方向演化,形态特征也随之发生了一系列适应性变化^[8]。外层卵膜的出现可能也是对环境的一种适应对策。黑斑原鲢一般将卵产于河道近岸处石堆的缝隙中,河道底质以砾石为主,伴有卵石和沙子^[1]。人工孵化时,可观察到外层卵膜的黏性会黏附水体中的杂质,如细小的颗粒物及毛发状纤维等。据此推测,在自然环境中,外层卵膜既可使卵黏附于沙砾上或石缝间,又可黏附周围环境中的细小颗粒,以此来增加卵粒的重量,以免被水流冲走,还可避免受精卵间的互相黏连,保证胚胎发育对溶解氧的需求。黑斑原鲢产卵场通常避开了湍急的主流,乱石堆的阻隔使这一区域水流流速变缓、流态复杂紊乱,常常形成回旋水流^[1]。人工孵化时轻轻搅动水体,受精卵便会移动。推

测, 自然环境下回旋水流带动受精卵分布到产卵场各处, 遇到阻挡物时滞留下来, 外层卵膜在这一过程中可能发挥重要作用: 一是黏附固定, 以保证受精卵散落后能有效滞留, 在比较狭窄的区域内完成整个生命周期, 以适应特定环境, 保证种的繁衍^[7-8]; 二是缓冲保护, 黑斑原鲌的绝对繁殖力较低^[1, 11], 胚胎期成活率对其种群繁衍有重要意义。外层卵膜较厚、弹性极好, 可降低水流冲击的影响、避免撞击等外界损伤, 保证胚体的正常发育, 以提高孵化率。

关于鲌科鱼类胚胎发育的研究资料非常有限, 鲌科鱼类中哪几个属或种的胚胎具有双层卵膜, 黑斑原鲌胚胎的双层卵膜为什么没有等到出膜前才消失, 而在进入神经胚时就消失了, 还有待于进一步的观察研究与探讨。

3.2 黑斑原鲌胚胎发育特点

目前关于鲌科鱼类胚胎发育的报道, 除黑斑原鲌^[1]外, 仅见纹胸鲌属的福建纹胸鲌^[10]以及鲴属的巨鲴(*Bagarius yarrelli*)^[12]。

黑斑原鲌胚胎发育时序与一般硬骨鱼类^[13-19]胚胎发育相同, 但具有自身特点: (1) 成熟卵不管受精与否, 吸水后均膨胀形成双层卵膜; (2) 胚孔未封闭前, 胚体就出现了肌节和眼囊, 而福建纹

胸鲌和巨鲴都是在胚孔封闭后形成肌节与眼囊; (3) 出膜前胸鳍原基就已出现, 与福建纹胸鲌相同; (4) 胚体心脏开始轻微跳动后, 在 0.9% 的 NaCl 溶液中剥去胚胎外膜并保存胚体, 发现胚体依旧存活, 并按时序发育。说明胚体内部渗透压与 0.9% NaCl 溶液的渗透压基本相等, 胚体内部已经形成与外部环境等渗的体液环境; (5) 破膜时胚体尾部先出, 而福建纹胸鲌尾部和头部均破膜而出; (6) 胚胎发育不同步, 以出膜时间为例, 同一批胚胎发育至 189 h 就观察到出膜仔鱼, 216 h 左右大批出膜, 而较晚的胚胎在 240 h 后才破膜; (7) 黑斑原鲌为高原冷水性鱼类, 胚胎发育时间较福建纹胸鲌和巨鲴长, 胚孔封闭前肌节约 12 对, 并出现了眼囊, 且胚体较早就形成了消化道, 出膜前胸鳍原基也出现了。一般来说, 器官发育的迟早和完备程度与鱼类胚胎期的长短有关。胚胎期长的种类出膜前拥有更完善的器官结构^[9](表 3)。

本研究与谢从新等^[1]对黑斑原鲌胚胎器官形成阶段的器官发育顺序及完整度不尽相同。本研究发现, 眼囊出现在胚孔封闭前, 四者的发育顺序为眼囊、胚孔封闭、尾芽、耳囊, 与他们胚孔封闭后才依次出现了耳囊、眼囊和尾芽顺序不同。本研究还观察到, 黑斑原鲌出膜前胚胎就已出现

表 3 黑斑原鲌与其他鲌科鱼类胚胎发育特点的比较
Tab. 3 Comparison of embryonic developmental characters among *Glyptothorax maculatum* and other fishes of Sisoridae

项目 item	黑斑原鲌 <i>Glyptosternum maculatum</i>	福建纹胸鲌 <i>Glyptothorax fukiensis</i>	巨鲴 <i>Bagarius yarrelli</i>
属 genes	原鲌属 <i>Glyptosternum</i>	纹胸鲌属 <i>Glyptothorax</i>	鲴属 <i>Bagarius</i>
卵色 egg color	淡黄色居多 light yellow	浅绿色 light green	无记录 no record
卵径/mm egg diameter	3.10~3.60	1.30~1.80	1.20
吸水膨胀后卵径/mm egg diameter after water-swelling	4.80~5.60	3.36	3.50
是否形成双层卵膜 whether to form two-layer egg membrane	是 yes	是 yes	无记录 no record
肌节出现时间 myomere formation time	胚孔封闭前 before closure of ephase	胚孔封闭后 post closure of ephase	胚孔封闭后 post closure of ephase
眼囊出现时间 optic vesicle formation time	胚孔封闭前 before closure of ephase	胚孔封闭后 post closure of ephase	胚孔封闭后 post closure of ephase
胸鳍原基出现时间 pectoral fin rudiment formation time	出膜前 before hatching	出膜前 before hatching	无记录 no record
从受精卵到出膜结束的时/h:min time from fertilized egg to the end of hatching	227: 30	116: 50	24: 00
孵化水温/℃ water temperature	13.5~14.1	15.6~18.5	27

了胸鳍原基, 完善了胚胎发育时序特征。

3.3 孵化水温

胚胎发育时间的长短与物种特性密切相关, 也受环境因子的影响, 而温度是最主要的影响因子^[1]。温度影响胚胎发育的速率及成活率^[21-24]。在适宜的温度范围内, 胚胎发育速率随水温升高而加快, 低于或超过适宜温度则胚体发育停滞、仔鱼畸形, 时间过长还会造成胚胎死亡, 降低孵化率^[20-24]。温度还影响着胚体的活动强度以及胚胎孵化酶的分泌, 影响仔鱼出膜^[6]。

雅鲁藏布江常年水温在 1~16℃ 范围内, 每年 5~6 月水温为 11~15℃^[1], 为黑斑原鲃的繁殖季节。为保证胚胎的正常发育, 提高孵化率, 人工孵化条件下将水温控制在 13~15℃。胚胎发育前期对温度变化较为敏感^[24], 水温控制在 13.5℃ 左右, 卵裂期结束后逐渐提高温度, 出膜前温度提高到 15℃, 整体孵化效果较好, 孵化率达到了约 70.0%。但 13~15℃ 是不是孵化的最适温度, 能不能最有效提高发育速率及孵化率, 以及黑斑原鲃胚胎发育的临界温度, 还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Xie C X, Ma B S, Qin J H. Studies on biodiversity and conservation technology of *Glyptosternum maculatum* in Yarlung Zangbo River[M]. Beijing: Science Press, 2016. [谢从新, 马宝珊, 覃剑晖. 雅鲁藏布江黑斑原鲃的生物多样性及养护技术研究[M]. 北京: 科学出版社, 2016.]
- [2] Bureau of water production in Tibet autonomous region. Fishes and Fish Resources In Xizang, In China [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995: 134-136. [西藏自治区水产局. 西藏鱼类及其资源[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 134-136.]
- [3] Redlist of China's biodiversity-volume of vertebrate[R]. Chinese Academy of Sciences, Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China, 2015(5.20). http://www.mep.gov.cn/gkml/eg/hbb/bgg/201505/t20150525_302233.htm. [中国生物多样性红色名录-脊椎动物卷[R]. 中华人民共和国环境保护部、中国科学院, 2015(5.20). http://www.mep.gov.cn/gkml/hbb/bgg/201505/t20150525_302233.htm.]
- [4] Zhou J S, Li B H, Pan Y Z, et al. Studies on technique of artificial propagation for *Glyptosternum maculatum* in Tibet[J]. China Fisheries, 2015, 10: 81-83. [周建设, 李宝海, 潘瑛子, 等. 黑斑原鲃的人工繁殖技术研究[J]. 中国水产, 2015, 10: 81-83.]
- [5] Yin M C. Advances and studies on early life history of fish[J]. Journal of fisheries of China, 1991, 15(4): 348-358. [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.]
- [6] Xu J. Early development of four Schizothoracinae fishes in the Yarlung Zangbo River, Tibet[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011: 4-9. [许静. 雅鲁藏布江四种特有鱼类早期发育的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011: 4-9.]
- [7] Chu X L, Zheng B S, Dai D Y. Fauna Sinica-osteichthyes-Siluriformes[M]. Beijing: Science Press, 1999: 163-172. [褚新洛, 郑葆珊, 戴定远. 中国动物志·硬骨鱼纲·鲇形目[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 163-172.]
- [8] Chu X L. Systematics and evolutionary pedigree of the Glyptosternoid fishes (Family Sisoridae)[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 1979, 4(1): 72-82. [褚新洛. 鲇鲃鱼类的系统分类及演化谱系, 包括一新属和一新亚种的描述[J]. 动物分类学报, 1979, 4(1): 72-82.]
- [9] Li X. Histology and Embryology of Aquatic Animals[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 324-350. [李霞. 水产动物组织胚胎学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 324-350.]
- [10] Wang Z J, Zhang Y G, Li J L, et al. Embryonic development of *Glyptothorax fukiensis*[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2000, 9(3): 194-199. [王志坚, 张耀光, 李军林, 等. 福建纹胸鲃的胚胎发育[J]. 上海水产大学学报, 2000, 9(3): 194-199.]
- [11] Ding C Z, Chen Y F, He D K, et al. Reproductive biology of *Glyptosternum maculatum* in Yarlung Zangbo River in Tibet, China[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(4): 762-768. [丁城志, 陈毅峰, 何德奎, 等. 雅鲁藏布江黑斑原鲃繁殖生物学研究[J]. 水生生物学报, 2010, 34(4): 762-768.]
- [12] Xue C J, Zhang Z X, Ma J Y, et al. Preliminary studies on artificial propagation and embryonic development of *Bagarius yarrelli*[J]. Journal of Hydroecology, 2012, 33(5): 54-56. [薛晨江, 张正雄, 马建颜, 等. 巨鲈人工繁殖初报与胚胎发育观察[J]. 水生态学杂志, 2012, 33(5): 54-56.]
- [13] Hua Z L, Chen J, Shi Y L, et al. Artificial propagation and embryonic development of *Acrossocheilus yunnanensis* [J]. Fisheries Science & Technology Information, 2017, 44(2): 69-72. [华泽祥, 陈俊, 石永伦, 等. 云南光唇鱼的人工繁殖和胚胎发育观察[J]. 水产科技情报, 2017, 44(2): 69-72.]
- [14] Yan Y L, Shi Y H, Deng P P, et al. Artificial propagation and embryonic development of *Acrossocheilus yunnanensis*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2016, 31(1): 24-29. [严银龙, 施永海, 邓平平, 等. 舌鰕虎鱼的人工繁殖及其胚

- 胎发育[J]. 大连海洋学报, 2016, 31(1): 24-29.]
- [15] Yang H C, Yang X G, Wu J M, et al. Early development of *Hucho bleekeri* Kimura[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(4): 759-770. [杨焕超, 杨晓鸽, 吴金明, 等. 川陕哲罗鲑个体的早期发育观察[J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 759-770.]
- [16] Gan W X, Wang H M, Deng L J, et al. The morphological development of embryos and yolk-sac larvae of Yalong river wangchiachii's schizothoracin(*Schizothorax wangchiachii*)[J]. Chinese Journal of Zoology, 2016, 51(2): 253-260. [甘维熊, 王红梅, 邓龙君, 等. 雅砻江短须裂腹鱼胚胎和卵黄囊仔鱼的形态发育[J]. 动物学杂志, 2016, 51(2): 253-260.]
- [17] Shen Y C, Huang M Z, Su Q S. A preliminary observation on the embryonic development of *Pangasius sutchi*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2008, 28(4): 41-44. [申玉春, 黄木珍, 苏秋生. 苏氏圆腹鱼芒胚胎发育的初步观察[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(4): 41-44.]
- [18] Qiao D L, Fu L X. Studies on the development of embryo and yolk-sac stage larval channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. Journal of Hydroecology, 2009, 2(1): 58-62. [乔德亮, 付立霞. 斑点叉尾鲴胚胎及卵黄囊仔鱼发育研究[J]. 水生生态学杂志, 2009, 2(1): 58-62.]
- [19] Kang S K, Qin Q, Wang M H. Observation on the embryonic and yolk-sac stage larval development of *Ictalurus punctatus*[J]. Journal of Aquaculture, 2011, 32(1): 1-4. [康晟凯, 秦钦, 王明华. 斑点叉尾鲴胚胎及卵黄囊仔鱼发育的观察[J]. 水产养殖, 2011, 32(1): 1-4.]
- [20] Bermudes M, Ritar A J. Effects of temperature on the embryonic development of the striped trumpeter *Latris lineate* (Bloch and Schneider, 1801)[J]. Aquaculture, 1999, 176: 245-255.
- [21] Ingo S W, Gastón A L. Effects of temperature on the embryonic development and hatchling size of *Betaeus emarginatus* (Decapoda: Caridea: Alpheidae) [J]. Journal of natural history, 2003, 37(18): 2165-2178.
- [22] Klimogianni A, Koumoundouros G, Kaspiris P, et al. Effects of temperature on the egg and yolk-sac larval development of common pandora, *Pagellus erythrinus*[J]. Marine Biology, 2004, 145: 1015-1022.
- [23] Zhang T T, Chen C, Shi Z H, et al. Effects of temperature on the embryonic development and yolk-sac larval development of *Epinephelus moara*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(3): 28-32. [张廷廷, 陈超, 施兆鸿, 等. 温度对云纹石斑鱼胚胎发育和仔鱼活力的影响[J]. 渔业科学进展, 2016, 37(3): 28-32.]
- [24] Mu L L, Xu C H, Xu A Y, et al. Effects of temperature on the embryonic development of *Oxyeleotris marmorata* and its morphology observation on post-embryonic development[J]. Guangdong Agricultural Science, 2015, 42(14): 94-99. [木亮亮, 徐慈浩, 许爱娉, 等. 温度对云斑尖塘鳢胚胎发育的影响及其胚后发育的形态学观察[J]. 广东农业科学, 2015, 42(14): 94-99.]

Embryonic development of *Glyptosternum maculatum* in Tibet

PAN Yingzi¹, LI Baohai¹, KELSANG Gyatso², LIU haiping¹, ZHOU Jianshe¹

1. Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Institute of Fishery Sciences, Lhasa 850032, China;

2. Maizhokunggar County Forestry Bureau, Lhasa 850200, China

Abstract: *Glyptosternum maculatum* is the only species of *Glyptosternum* in China and is uniquely endemic to the Yarlung Tsangpo River system. With the rapid dwindling of its populations and gradually shrinking distributions due to overfishing and the impact of water conservancy projects and foreign fish invasion in recent years, it is considered a critically endangered (CR) species by the Red List of Chinese vertebrates (2015). It is the only one of the 77 known Chinese sisorid species to be ranked on this list. In this study, the broodstock were captured in the four Yarlung Zangbo River sections of Shigatse, Tibet, including Xaitongmoin, Lhatse, Ngamring, and Saga. The altitude distribution range of the four sampling sites is approximately 3900–4500 m. From mid-May 2015 to mid-June 2015, 79 females were artificially induced to spawn, another 7 females naturally produced eggs and about 57440 eggs were spawned. At the same time, 15 males were dissected and their testes were broken for use in artificial insemination. Approximately 42208 fertilized eggs of *G. maculatum* were obtained. The fertilized round, demersal eggs were slightly yellowish with strong viscosity. The fertilized eggs were laid flat on a special sieve net and hatched in a small trough of a running water. In Lahsa, Tibet, the entire embryonic development process from fertilized egg to hatching was observed and the effective accumulated temperature of the embryonic development was calculated. In the fertilized egg and cleavage stage, the same batch of fertilized eggs were sampled, observed, photographed and recorded every 30 min. After the cleavage stage, samples were taken every 1 h. At each time point, 10 fertilized eggs were taken and the stages of embryonic development and the period for entry into each were examined by microscopy. More than 50% of the embryos appeared to have corresponding characteristics. It was found that the timing sequence for embryonic development of *G. maculatum* was consistent with the general rule of teleosts, divided into eight stages—fertilized egg, blastoderm formation, cleavage, blastula, gastrula, neurula, organogenesis and hatching stages—and further subdivided into 28 phases according to the morphological characteristics of each stage. Myomere and optic vesicles were formed before the blastopore and its closure, optic capsules, heart rudiment, digestive tract, otoliths, eye lens, pectoral fin rudiments formed successively in the organogenesis stage. The red blood cells were found after the heart started beating. Meanwhile, the observation records revealed an average temperature of about 13.8 °C, and the effective accumulated temperature 2963.2–3132.4 h·°C, with a hatching rate of approximately 70%. However, unlike the eggs of the six common fish in the Yarlung Zangbo River, the fertilized eggs had a two-layer membrane that formed immediately at the point of water absorption and disappeared completely at the neurula stage. The two-layer egg membrane as a special structure may be responsible for environmental adaptability. The outer membrane may play a role in the adhesion, fixation and buffer protection in the process of egg transmission and incubation. This study may contribute to understanding the characteristics and laws of *G. maculatum*, embryonic development and provide a theoretical reference for artificial breeding and scientific protection of the species.

Key words: *Glyptosternum maculatum*; embryonic development; morphological characteristics; two-layer egg membrane; Yarlung Tsangpo River

Corresponding author: LI Baohai. E-mail: lbh0891@163.com