

海水青鳉胚胎发育的观察

王友红¹, 刘洪军², 于道德², 李玉全¹, 官曙光², 刘莹²

(1. 青岛农业大学 海洋科学与工程学院, 山东 青岛 266109; 2. 山东省海洋生物研究院, 山东 青岛 266104)

摘要: 为了解模式生物种海水青鳉(*Oryzias melastigma*)的胚胎发育特征, 作者培育 30 日龄的海水青鳉, 收集自然受精卵, 在水温 26~28℃、盐度 27~28 条件下, 静水孵化。利用奥林巴斯 SZ61 解剖镜对海水青鳉胚胎发育进行了观察研究。结果表明: 海水青鳉受精卵为圆球形端黄卵, 多油球, 沉性, 卵膜上具有绒毛膜和纤维丝。和多数硬骨相似, 胚胎发育的过程大致可以分为 7 个期: 胚盘形成期、细胞分裂期、囊胚期、原肠期、器官形成期、肌肉效应期和孵化期。并发现海水青鳉胚胎发育有其特征: 早期分裂具有不规则现象; 仔鱼以尾部破膜先出的方式孵化; 柯氏囊出现在原口关闭前, 少数个体具有两个柯氏囊。

关键词: 海水青鳉(*Oryzias melastigma*); 胚胎发育; 柯氏囊

中图分类号: S917.4; Q959.471 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)06-0018-08

DOI: 10.11759/hyxx2016062003

海水青鳉(*Oryzias melastigma*)隶属辐鳍亚纲(Actinopterygii)、颌针鱼目(Beloniformes)、怪颌鳉科(Adrianichthyidae)、青鳉属(*Oryzias*), 是一小型的热带鱼种, 具有性别容易区分、世代周期短、产卵率高、易于大规模繁殖、盐度适应范围广等特点, 其为具有代表性的海洋模式生物种, 广泛的应用于生态和毒理方面的研究^[1-4]。

鱼类发育的早期阶段对污染物最为敏感, 因此, 胚胎毒性分析法是广泛应用的毒性检测方法, 也是传统的毒性实验的替代方法^[5-6]。而目前众多学者的生态毒理试验, 以早期发育阶段作为基础, 研究了鱼类胚胎发育、孵化以及特殊器官组织的变化。王赛男等^[3]研究了不同分散剂对海水青鳉早期发育胚胎的畸形率、孵化率以及孵化时间的影响; 穆景利等^[2]研究了几种重金属离子对早期生活阶段的毒性效应, 以胚胎发育畸形、孵化率和心律作为毒性指标; 王晓杰等^[1]则研究了海洋酸化对海水青鳉骨骼发育的影响。因此, 海水青鳉的早期发育是生态毒理研究的基础, 深入了解各个胚胎发育各个特征时期尤为重要。

海水青鳉在系统分类学上类似于日本青鳉(*Oryzias latipes*), 但是其生理结构有很大的不同。现有很多用日本青鳉毒性试验数据来预测海水鱼的毒性试验, 但由于日本青鳉为淡水种, 其渗透压与海水青鳉不同, 因此, 实验结果往往存在很大的误差^[7]。研究海水青鳉的胚胎发育是毒理实验的前提, 目前, 对海水青

鳉的胚胎发育的报道仅见于陈漪等^[8]的海水模式种青鳉的胚胎发育观察。作者通过培养亲鱼, 产卵繁育, 记录了其胚胎发育的整个环节, 发现了一些特殊时期, 通过讨论, 以期更深入地了解海水青鳉的胚胎发育过程, 为海洋模式生物种的进一步研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 亲鱼培养

2016 年 1 月 9 号, 于山东省海洋生物研究院气候室玻璃水缸, 培育 30 日龄海水青鳉。水温 26~28℃, 盐度 27, 14 h 的光照: 10 h 黑暗。早晚 2 次投喂卤虫(*Artemia salina*)无节幼体, 每天吸底换水, 排除粪便残饵, 换水量 1/2, 以此条件培育至产卵期。

1.2 自然产卵和自然受精

2016 年 3 月 5 号, 海水青鳉开始产卵, 产卵时间

收稿日期: 2016-06-20; 修回日期: 2016-10-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101916); 山东省农业良种工程项目(2014-2016); 山东半岛近岸海域生态模拟实验研究项目

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No.31101916; Agricultural Seeds Engineering Projects of Shandong, No.2014-2016; Peninsula Nearshore Ecosystem Simulation Experiment Research Projects of Shandong]

作者简介: 王友红(1989-), 女, 山东五莲人, 在读研究生, 主要从事水产养殖研究, E-mail: 13335033571@163.com; 李玉全, 通信作者, E-mail: jiangfangqian@163.com

约 7:00~11:00, 自然产卵, 自然受精后, 受精卵粒通过长丝状物悬挂在亲鱼的泄殖孔, 约 0.1~6 h 自动脱落, 沉落在玻璃缸底部。

1.3 受精卵收集和孵化条件

为了便于观察了解整个受精卵的发育过程, 10:00 左右观察亲鱼, 发现产卵后, 参照陈漪等^[8]报道的方法收集受精卵: 受精 10 min 后, 用烧杯小心捕捉带卵亲鱼, 放置铺有脱脂棉的培养皿中, 用塑料吸管吸取受精卵粒, 移至 500 mL 烧杯中, 新鲜海水经脱脂棉过滤。水温 26~28℃, 盐度 27, 净水培养观察。

1.4 胚胎发育观察方法

为了详细地观察, 实验设定在孵化前期, 1 h 观察 1 次, 原肠期后, 每天观察 3 次。奥林巴斯 SZ61 解剖镜下观察胚胎发育, 记录发育各个时期的形态特征; 并使用 CCD 图像传感器和 SONYH-50 相机拍照, 使用 DN-2 显微图像处理软件。连续收集 3 d 的受精卵进行观察, 作为重复。每次观察受精卵不少于 20 枚, 发育时间的确定按照受精卵 50% 以上达到该时期界定。

2 结果

2.1 未受精卵

海水青鳞成熟的未受精卵, 直径约为 0.9 mm±0.05 mm, 透明、圆球形、多油球、沉性卵。卵外层包围较厚的卵膜, 围卵周隙 0.05 mm±0.005 mm 在卵膜鱼卵黄囊中间, 未受精前很难分辨。胚孔在动物极, 解剖镜下观察为颜色较深的圆点区域。卵膜上覆盖着大量的短绒毛(非黏性纤维丝), 但是受精卵孵化后期, 短绒毛会吸附水中的杂质, 影响胚胎的孵化。在靠近植物极的一端, 有一簇较长的纤维丝。亲鱼排卵时, 卵通过纤维丝悬挂在亲鱼的泄殖腔, 脱落后, 将卵黏结成团, 与淡水青鳞^[9]的受精卵很相似, 长短纤维丝在整个胚胎发育的过程中都不会消失。

2.2 胚盘形成期(图 1-1、1-2)

在水温 26~28℃ 条件下, 受精 10 min 后, 受精膜与卵周隙逐渐形成。卵子皮层的原生质由卵的四周向动物极集中, 分散油球逐渐向植物极移动并且开始融合。受精后 50 min, 在动物极一端形成一个隆起帽状胚盘。在胚盘形成期的最后, 大多数的小油球已经从动物极移动到了植物极, 并且融合减少。

2.3 卵裂期

2.3.1 2 细胞期(图 1-3)

受精 1 h 20 min, 受精卵第一次卵裂是经裂, 在胚盘顶部的中央出现一纵裂面, 分裂面垂直于胚盘底面, 将胚盘分成大小几乎相等的两个分裂球, 受精卵进入两细胞期。此时油球变大且变少, 并且集中到了植物极。

2.3.2 4 细胞期(图 1-4、1-5)

受精 2 h 后, 出现第二次分裂, 分裂面仍然垂直于胚盘底面, 同时垂直于第一次分裂面, 将两细胞分裂为了 4 个大小相似的分裂球。

2.3.3 8 细胞期(图 1-6、1-7)

受精约 2 h 46 min, 进行了第三次分裂, 与第一次分裂面平行, 形成两条卵裂沟, 将胚盘分裂为两排均匀对称的、8 个大小相似的细胞。并且第二次的分裂面被拉长。

2.3.4 16 细胞期(图 1-8)

受精约 3 h 30 min, 进行了第四次分裂, 与第二次分裂面平行, 形成了两条卵裂沟, 将原来的两排细胞分裂为了 4 排细胞。卵裂球开始不规则, 周围 12 个细胞相对于中间的 4 个细胞体积大。

2.3.5 32 细胞期(图 1-9)

受精约 4 h 15 min, 第五次分裂是将周围的 12 个细胞经裂纬 24 个细胞, 在中心区域内将 4 个细胞平行分裂为 8 个细胞, 形成两个细胞层。

2.4 桑葚胚(图 1-10、1-11)

受精约 6 h 10 min 后, 从第六次分裂开始, 经裂和纬裂交替进行, 分裂面很难清楚的观察, 细胞体积逐渐变小, 层数变多, 堆积于动物极, 形成一个半球形, 似“桑葚”, 成为桑葚胚。

2.5 囊胚期(图 1-12、1-13)

受精 7 h 50 min 后, 堆积在动物极的细胞体继续增高, 在卵周隙中达到最高点, 称为高囊胚。同时在贴近卵黄的中央处形成囊胚腔。受精约 9 h 40 min 后, 细胞体继续分裂, 细胞变小, 界线模糊不清, 隆高的囊胚变低并有下包趋势, 此时为低囊胚。

2.6 原肠期

2.6.1 原肠早期(图 1-14)

受精约 11 h 40 min, 胚盘沿着卵黄囊的表面向下移动, 由于卵黄囊的阻碍, 下包的细胞层移动很慢, 边缘变厚, 卵黄囊弯曲变形。当胚盘细胞下包

1/4 到 1/3 时, 胚胎发育进入原肠早期。

2.6.2 原肠中期(图 1-15)

受精约 13 h 40 min 后, 下包缓慢进行, 胚盘覆盖卵黄囊约 1/2 处, 胚环清晰可见, 并且在胚环特定区域, 胚盾形成, 此时进入原肠中期。

2.6.3 原肠晚期(图 1-16、1-17、1-18)

受精约 24 h 35 min 后, 胚胎发育进入原肠晚期, 此时胚盘下包卵黄囊约 3/4, 胚盾拉长, 形成一个窄的条痕, 清晰可见。

2.7 原口关闭前期

2.7.1 头部形成期(图 1-19、1-20)

受精约 26 h 20 min, 胚盘继续下包卵黄囊约 90%, 在植物极形成胚孔。胚体的一端膨大, 形成以类似“三角形”的结构, 为头部。在胚体的尾部出现一个小液泡(柯氏囊, Kupffer's vesicle, KV)。

2.7.2 眼部形成期(图 1-19、1-21)

受精约 27 h 40 min 后, 在头部的两侧形成椭圆形的结构, 为眼原基, 在胚体的中心线出现脊索。KV 体积有所增大, 原口未关闭, 体节出现 3~4 对。

2.7.3 色素形成(图 1-22、1-23)

受精约 33 h 后, 在卵黄囊的表面以及胚体, 有点状黑色的色素出现, 体节清晰 8~12 对。脑部开始分化, 在眼囊后方, 耳囊原基出现, 原口关闭。KV 体积逐渐变得最大。

2.8 器官形成期

2.8.1 晶体形成期(图 1-24、1-25)

受精约 45 h 后, 眼泡中晶体形成, 耳囊变得清晰, 心脏原基出现, KV 逐渐变小。与此同时, 脑腔开始分化为 3 个部分, 并且清晰可见。

2.8.2 尾牙形成期(图 1-25、1-26)

受精约 47 h 后, 尾芽形成, 并翘离卵黄囊。此时色素点变大密集, KV 体积进一步减小, 头部细胞集中, 变宽。

2.8.3 心脏跳动期(图 1-26、1-27)

受精约 49 h 后, 心脏开始跳动, 微弱, 约 35~40 次/min。晶体清晰, KV 完全消失, 胚体绕卵黄囊约 1/2, 头部后方以及体节两侧的色素点密集。胸鳍原基出现, 卵黄囊黑色素变为星芒状。

2.9 肌肉效应期

2.9.1 尾芽颤动(图 1-28、1-29)

受精后 60 h, 血液循环开始, 血细胞流动速度很慢, 心脏跳动 70 次/min, 耳石出现不十分清晰,

在耳囊下方内侧肝脏原基出现。受精后 71 h, 圆柱状的尾芽变尖形, 并且微弱颤动。胚体绕卵黄囊 3/5, 血液循环清晰, 血液从心脏射出, 经胚体躯干背部主动脉, 在尾芽翘离处流出, 绕卵黄囊一周。另外两条血液在胸鳍原基处, 分别流向左右主静脉, 绕过头部, 与从主动脉流出的血液在头部前方汇合流入心脏。血液无色血细胞流动明显, 由慢变快。耳石清晰, 像两颗较小的砂砾。在耳囊的稍后内侧脊索从头部到尾部开始空泡化。

2.9.2 尾部抽动(图 1-28、1-29)

受精后 77 h, 尾芽完全游离, 不断的扭动。尾部静脉出现, 经过背部主动脉的血液流向尾部, 形成尾部静脉, 在尾部与卵黄囊游离处流出进入卵黄静脉。受精 87 h 后, 在耳囊后方, 胸鳍出现, 不明显。此时眼球色素集中, 开始黑化, 头部逐渐变大, 并且隆起形成脑腔, 胚体绕卵黄囊 2/3, 游离的尾部开始抽动。

2.10 孵化前期

2.10.1 孵化前期(图 1-30)

受精后 102 h, 头部隆起, 在耳囊后方, 左右静脉分流处, 胸鳍形成, 尾鳍膜出现。背部的黑色素密集, 肝脏膨大在躯体的左侧, 胰脏出现在躯体右侧, 胚体绕卵黄囊 3/4。受精 108 h 后, 心房心室开始出现分化, 血液颜色由无色变为黄色, 肝静脉血细胞开始流动。受精 125 h 后, 鳃静脉血细胞开始流动, 腹鳍膜出现。肝脏进一步变大, 肠管清晰, 胚体绕卵黄囊 4/5。

2.10.2 孵化前期(图 1-31、1-32)

受精 148 h, 血液变微红色。耳石逐渐变大, 胚体绕卵黄囊 9/10。仔鱼在卵膜内能自由转动, 对外界刺激比较敏感, 用解剖针刺刺激, 仔鱼会迅速转动躯体, 躲避刺激。眼球进一步黑化, 眼球的后方和躯干背部的黑色斑颜色进一步加深, 并且延伸向尾部。尾鳍膜明显变大, 尾椎上翘。受精 197 h 后, 胚体绕卵黄囊一周, 胆囊黄绿色。受精 231 h 后, 胚体的尾鳍边缘到达眼囊的中部, 胸鳍静脉出现, 尾鳍条出现, 不十分明显。

2.10.3 孵化前期(图 1-33、1-34)

受精 264 h 后, 尾尖超过卵黄囊一周到达眼泡后端。脊索空泡化完成, 胸鳍血液开始循环, 胆囊绿色, 胰脏微红色。尾部鳍条不断伸长, 黑色素丝明显。卵膜变薄, 卵黄囊变小, 血液循环清晰, 胚体在卵内不断的翻转。



1-1. 受精卵激活; 1-2. 胚盘形成; 1-3. 2 细胞期; 1-4. 4 细胞期; 1-5. 不规则 4 细胞期; 1-6. 8 细胞期; 1-7. 不规则 8 细胞期; 1-8. 16 细胞期; 1-9. 32 细胞期; 1-10. 多细胞期; 1-11. 桑葚胚; 1-12. 高囊胚; 1-13. 低囊胚; 1-14. 原肠早期; 1-15. 原肠中期(胚环); 1-16. 原肠晚期; 1-17. 胚盾出现; 1-18. 胚盾拉长; 1-19. 头部形成; 1-20. 柯氏囊出现; 1-21. 2 个柯氏囊; 1-22. 体节出现; 1-23. 柯氏囊变大; 1-24. 晶体出现; 1-25. 心脏原基形成; 1-26. 心脏跳动; 1-27. 血液循环; 1-28. 尾牙游离; 1-29. 眼球黑化; 1-30. 尾鳍膜形成; 1-31. 胆囊绿色; 1-32. 尾鳍条出现; 1-33. 脊索空泡化; 1-34. 脾脏红色; 1-35. 孵化期; 1-36. 尾鳍破膜而出; 1-37. 初孵仔鱼; 1-38. 初孵仔鱼

1-1. Activated eggs; 1-2. Blastodisc forming stage; 1-3. 2 cells stage; 1-4. 4 cells stage; 1-5. Irregular 4 cells stages; 1-6. 8 cells stage; 1-7. Irregular 8 cells stages; 1-8. 16 cells stage; 1-9. 32 cells stage; 1-10. Many cells stage; 1-11. Morula stage; 1-12. High blastula stage. 1-13. Low blastula stage; 1-14. Early gastrula stage; 1-15. Middle gastrula stage, (embryo ring); 1-16. Late gastrula stage; 1-17. Embryonic body forming; 1-18. Embryonic body clearly; 1-19. Head formation; 1-20. Kupffer's vesicles appear; 1-21. 2 Kupffer's vesicles; 1-22. Somite formation; 1-23. Kupffer's vesicles larger; 1-24. Lens formation; 1-25. Heart anlage appearance; 1-26. Heart beating stage; 1-27. Blood circulation; 1-28. Muscle effect stage; 1-29. Pigment of eyes; 1-30. Tail fin appear; 1-31. Gallbladder green; 1-32. Tail fin fold appear; 1-33. Notochord vacuolization is completed; 1-34. spleen reddish; 1-35. hatching stage; 1-36. Tail-first escape from chorion; 1-37, 1-38. 0 day after hatching

2.11 孵化期(图 1-35、1-36、1-37、1-38)

受精 288 h 后, 胚体尾部绕卵黄囊一周后到达耳囊处, 尾部鳍条明显, 鳍条分布黑色素点。心脏分为心房、心室, 位于吻前端, 很明显。受精 312 h 后, 仔鱼开始陆续出膜, 仔鱼出膜的方式主要是通过尾巴摆动破膜而出, 尾巴出膜后, 仔鱼通过猛烈抖动身体摆脱卵膜。刚出膜的仔鱼尾部和头部向下弯曲弯曲, 躯体透明, 孵出后很快仔鱼的游动速度变得很快, 大多数还是停留在某个缸底部或缸体不游动, 胸鳍颤动快速。身体有少量色素斑; 卵黄囊为椭圆形。详细发育时序见表 1。

3 讨论

3.1 海水青鳉卵的特征

海水青鳉卵为圆形, 卵黄囊均匀, 卵子直径(0.9±0.05)mm, 与日本青鳉卵相似, 卵膜表面有短绒毛(不具有黏性)和长纤维丝(具有黏性), 长纤维丝连接受精卵, 悬挂于泄殖腔处, 有多个油球^[9]。油球的成份主要是脂肪, 密度小于水, 和卵的沉浮性有关, 因此具有油球的卵子一般都是浮性卵^[10-11], 但是海水青鳉的卵为多油球沉性卵。胚胎发育前, 油球多且小, 较分散, 与大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)^[12]、棘颊雀鲷(*Premnas biaculeatus*)^[13]相似。油球随机的镶嵌于周细胞质中, 在发育的过程中, 油球逐渐融合, 作者观察发现海水青鳉的油球在低囊胚期到原肠早期, 融合为 1 个, 并且在动物极与胚盘相对。关于受精卵油球融合问题在多多油球的鱼类受精卵中都有提到: 在半滑舌躄(*Cynoglossus semilaevis*)早期胚胎发育^[14]的研究报告中提到, 受精卵进入低囊胚期, 卵黄囊中油球减少并不规则的分布在植物极; 大泷六线鱼胚胎发育^[12]中也提到, 胚胎发育后期, 油球融合为 1~5 个, 使得受精卵透明度增加, 并未提及具体的融合时期。作者认为, 多油球的鱼类受精卵中, 油球的融合时期可以作为发育时期的一个重要特征。

3.2 发育时序和孵化

海水青鳉胚胎发育的过程中, 在细胞分裂期, 卵裂球出现不规则的分裂现象。黄海大头鳉(*Gadus macrocephalus*)^[15]的胚胎发育中也观察到此类现象。作者观察到原口关闭以前胚体形成, 头部出现, 柯氏囊出现, 并逐渐变大, 体节出现, 但是较模糊不清, 之后原口才关闭。在柯氏囊快要消失的同时, 尾芽出

现, 并翘离卵黄囊。这与陈漪等^[8]的观察有很大的不同。海水青鳉受精卵在 26~28℃ 条件下, 孵化时间为 13~14 d。在胚胎发育过程中, 受精卵表面的绒毛, 极易黏附水中的颗粒物质, 影响后期仔鱼孵化。因此, 在孵化的过程保持水质清洁, 最好将海水煮沸、冷却、过滤后使用。作者观察到海水青鳉是以尾部先破膜而出的方式孵化, 而大多数硬骨鱼类都是以头部先破膜而出的方式孵化, 仅有牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)(♀)×圆斑星鲽(*Verasper variegatus*)(♂)杂交子代^[16]和褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)(♀)×犬齿牙鲆(*P. Dentatus*)(♂)杂交一代^[17]等仔鱼以尾部先破膜的方式孵出。以尾部先出的鱼类在淡水鱼中常见, 如: 唐鱼(*Tanichthys albonubes*)^[18]、光泽黄颡鱼(*Pseudobagrus Nitidus*)^[19]、日本青鳉^[9]。作者还发现, 海水青鳉孵化出来的仔鱼有两种运动形态, 和黄海大头鳉早期发育^[13]中描述的运动状态相似。第一种: 仔鱼孵出后在水中几乎无活动能力, 侧卧水底, 约 0.5 至几个小时后, 仔鱼从水底螺旋状游至水的上层。第二种: 仔鱼孵出后, 立刻螺旋游至水的表层。跟大头鳉一样两种仔鱼都能正常的存活。黄海大头鳉是低温(6~8℃)孵化^[15], 孵化周期长可以理解; 海水青鳉高温孵化, 孵化周期最长达到 70 h, 最终孵化出来的仔鱼运动形态不同。作者推测, 海水青鳉之所以有如此长的孵化期, 可能是卵膜外的短绒毛在孵化过程中, 吸附了水中的杂质, 导致了仔鱼破膜孵出的难度。

3.3 柯氏囊

柯氏囊^[20]在胚胎发育的过程中, 一般出现在原口关闭前后, 随着胚胎的发育, 会逐渐消失。条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)的柯氏囊出现在原口关闭期, 尾芽游离立刻消失^[21]。黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)的柯氏囊在原口关闭前期出现^[22]。大菱鲆柯氏囊在原肠晚期出现, 受精后 89 h 消失^[23]。而作者研究的海水青鳉的柯氏囊的同样也是出现在原肠晚期, 在水温 27℃ 约 24 h 出现。此时, 胚体的头部形成, 柯氏囊出现并且随着胚胎发育逐渐增大, 眼囊出现, 体节 3~4 对。之后柯氏囊会逐渐变小, 并且在心脏跳动时消失。并不是所有的硬骨鱼类都会有柯氏囊, 大泷六线鱼^[12]就没有柯氏囊, 大头鳉的胚胎发育中也只有 10% 的个体会出现柯氏囊^[15]。而海水青鳉都有柯氏囊, 大多数胚体有一个柯氏囊, 少数有两个柯氏囊。

表 1 海水青鳉胚胎发育时序以及特征表

Tab. 1 Developmental duration and characteristics of *Oryzias melastigma* embryo

发育时期	发育时间	胚胎主要发育特征	图片
未受精卵	0	约 0.9 mm。	1-1
胚盘形成	50 min	原生质在动物性极隆起形成帽状胚盘, 并带动卵黄囊形成一个尖顶状突起, 过程缓慢。	1-2
2 细胞期	1 h 20 min	受精卵第 1 次分裂。在胚盘顶部的中央出现纵行的分裂沟, 将胚盘分割成 2 个等大的分裂球。	1-3
4 细胞期	2 h	受精卵第 2 次分裂。分裂沟与第 1 次径裂沟相互垂直, 胚盘被分割成 4 个相等的分裂球。	1-4、 1-5
8 细胞期	2 h 46 min	第 3 次分裂, 胚盘形成 8 个大小相似的细胞球, 单细胞层。	1-6、 1-7
16 细胞期	3 h 30 min	第 4 次分裂, 将胚盘分割成 16 个细胞球, 仍为单细胞层, 分裂球大小不规则。	1-8
32 细胞期	4 h 15min	第 5 次分裂之后, 分裂球开始分层, 形成两层细胞。	1-9
桑葚胚	6 h 10 min	胚盘多次经裂和纬裂的交叉进行, 变成多层细胞球的堆积于动物极, 恰似“桑葚”。	1-10 1-11
高囊胚期	7 h 50 min	细胞分裂球在胚盘中央隆起并达到最高点, 同时贴近卵黄的中央处出现囊胚腔。	1-12
低囊胚期	9 h 40 min	囊胚的高度逐步降低, 细胞层相对变薄, 渐渐沿卵黄囊向扁平发展, 为胚盘的下包做准备。	1-13
原肠早期	11 h 40 min	胚层细胞沿着卵黄囊下包约 30%。	1-14
原肠中期	13 h 40 min	胚层细胞下包 50%, 胚环明显, 内卷形成胚盾。	1-15
原肠晚期	24 h 35 min	下包 80%~90%, 胚盘继续向植物极运动, 胚环细胞层的加厚使得胚胎两侧出现类似胚体形状。	1-16、 1-17、 1-18
胚体形成期	26 h 20 min	下包 90%, 具有卵黄栓, KV 出现, 很明显, 有点个体有两个 KV, 胚体形成, 头部不明显个别胚体清晰可见。	1-19、 1-20、 1-21
视囊期	27 h 40 min	视囊开始形成, 胚体中部逐渐变瘦, 脊索形成, 出现, kv 增大, 体节 3~4 对。	1-22、 1-23
色素形成期	33 h	很小的点状黑色素, 逐渐在胚体、卵黄囊表面开始形成, 逐渐变多变大。	1-22、 1-23
晶体形成	45 h	视囊内晶体出现, 脊索两侧的体节, 黑色点增多, 密集, 心脏原基出现。	1-24、 1-25
尾芽期	47 h	尾芽形成并开始游离于卵黄囊。	1-25
心跳期	49 h	心脏开始跳动, 开始不规律缓慢, 逐渐心跳变得迅速, 心跳次数有开始 40 次/min, 变为 80 次/min。	1-26
肌肉效应期	71 h	尾部脱离卵黄囊占胚体的 1/4 到 1/3 的部分, 并且不时抽动, 随着胚胎发育的进行, 尾部的抽动带动整个胚体在卵黄内转动。	1-27、 1-28
孵化前	102 h	眼泡逐渐变大, 并且逐渐黑化。 血液循环后, 尾部静脉、肝静脉、鳃静脉、胸鳍静脉逐渐出现, 颜色逐渐由无色变为黄色再到红色。 头后部的色素斑逐渐增多, 并向躯干部延伸。 胚体逐渐变大, 变粗, 尾部不断的身长, 最后绕卵黄囊一圈。	1-29、 1-30、 1-31、 1-32、 1-33、 1-34
孵化期	312 h	卵膜变薄, 仔鱼在卵内不时转动, 红色流动的血液明显。最后以尾部破膜而出的方式孵出。	1-35、 1-36、 1-37、 1-38

参考文献:

- [1] 王晓杰, 肖潇, 李超, 等. 海洋酸化对海水青鳞胚胎骨骼发育的影响[J]. 海洋学报, 2015, 37(12): 116-122. Wang Xiaojie, Xiao Xiao, Li Chao, et al. Impact of ocean acidification on skeletal development in embryonic marine medaka[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2015, 37(12): 116-122.
- [2] 穆景利, 王莹, 王新红, 等. Cd²⁺、Hg²⁺、Cr⁶⁺和 Pb²⁺对黑点青鳞(*Oryzias melastigma*)早期生活阶段的毒性效应研究[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(4): 252-360. Mu Jingli, Wang Ying, Wang Xinhong, et al. Toxic effects of cadmium, mercury, chromium and lead on the early life stage of marine medaka (*Oryzias melastigma*)[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2011, 6(4): 252-360.
- [3] 王赛男, 刘春艳, 穆景利, 等. 不同分散剂对海水青鳞早期发育毒性影响的比较研究[J]. 海洋环境科学, 2013, 32(6): 801-805. Wang Sainan, Liu Chunyan, MU Jingli, et al. Comparative study on the toxicity of different dispersants to the early development of marine medaka (*Oryzias melastigma*)[J]. Marine Environmental Science, 2013, 32(6): 801-805.
- [4] 张灵. 鱼类毒理蛋白质组学研究进展: 以海洋青鳞鱼和斑马鱼为例[J]. 海洋环境科学, 2015, 34(4): 616-621. Zhang Ling. Research progress on toxicoproteomics in fish: Using marine medaka and zebrafish as models[J]. Marine Environmental Science, 2015, 34(4): 616-621.
- [5] Brannen K C, Panzica-Kelly J M, Danberry T L, et al. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model[J]. Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology, 2010, 89(1): 66-77.
- [6] Embry M R, belanger S E, braunbeck T A, et al. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research[J]. Aquatic Toxicol, 2010, 97(2): 79-87.
- [7] Wheeler J R, Leung K M Y, Morritt D, et al. Freshwater to saltwater toxicity extrapolation using species sensitivity distribution[J]. Environ Toxicol Chem, 2002, 21, 2459-2467.
- [8] 陈漪, 王晓杰, 冉浩宇, 等. 海洋模式种青鳞鱼(*Oryzias melastigma*)的胚胎发育观察[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(1): 72-84. Chen Yi, Wang Xiaojie, Ran Haoyu, et al. Developmental stages of a marine model fish-Medaka *Oryzias melastigma*[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2016, 47(1): 72-84.
- [9] Takashi Iwamatsu. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*[J]. Mechanisms of Development, 2004, 121: 605-618.
- [10] Ahlstrom E H, Moser H G. Characters useful in identification of pelagic marine fish eggs[J]. Reports of California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations, 1980, 21: 121-131.
- [11] Riis Vestergaard. Energy density of marine pelagic fish eggs[J]. Journal of Fish Biology, 2002, 60: 1511-1528.
- [12] 胡发文, 潘雷, 高凤祥, 等. 大龙六线鱼胚胎发育及其与水温的关系[J]. 渔业科学进展, 2012, 33(1): 28-33. Hu Fawen, Pan Lei, Gao Fengxiang, et al. Embryonic development of *Hexagrammos otakii* and its relationship with incubation temperature[J]. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(1): 28-33.
- [13] 王珊珊, 罗海忠, 李伟业, 等. 棘颊雀鲷的胚胎发育形态学研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(8): 102-105. Wang Shanshan, Luo Haizhong, Li Weiye, et al. Study on the morphological characteristics of embryonic development of *Premnas biaculeatus*[J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2015, 43(8): 102-105.
- [14] 张曹进, 张志勇, 张志伟, 等. 半滑舌鳎胚胎发育及稚鱼变态过程观察[J]. 水产养殖, 2011, 32(10): 48-51. Zhang Caojin, Zhang Zhiyong, Zhang Zhiwei, et al. Study on the embryonic and larva metamorphosis development of *Cynoglossus semilaevis*[J]. Journal of Aquaculture, 2011, 32(10): 48-51.
- [15] 于道德, 刘名, 刘洪军, 等. 黄海大头鳕胚胎发育过程[J]. 海洋科学, 2014, 38(3): 80-86. Yu Daode, Liu Ming, Liu Hongjun, et al. The embryonic development of *Gadus macrocephalus* Tilesius[J]. Marine Science, 2014, 38(3): 80-86.
- [16] 孙珺竹, 张全启, 齐洁, 等. 牙鲆(♀)×圆斑星鲽(♂)杂交子代的胚胎及仔鱼发育[J]. 中国水产科学, 2006, 13(5): 732-737. Sun Junzhu, Zhang Quanqi, Qi Jie, et al. Embryonic and larval development in hybrid between *Paralichthys olivaceus* (♀) and *Verasper variegates* (♂)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(5): 732-737.
- [17] 关键, 柳学周, 兰春燕, 等. 褐牙鲆(♀)×犬齿牙鲆(♂)杂交子一代胚胎发育及仔稚鱼形态学观察[J]. 中国水产科学, 2007, 14(4): 644-650. Guan Jian, Liu Xuezhou, Lan Chunyan, et al. Observation of embryonic and larval development of crossbreed F₁ by *Paralichthys olivaceus*(♀)×*Paralichthys dentatus*(♂)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(4): 644-650.
- [18] 陈国柱, 方展强, 马广智, 等. 唐鱼胚胎发育的观察[J]. 中国水产科学, 2004, 11(6): 489-495. Chen Guozhu, Fang Zhanqiang, Ma Guangzhi, et al. Embryonic development of *Tanichthys albonubes*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2004, 11(6): 489-495.

- [19] Wei Gang, Huang Ling, Chen Yong, et al. Observation on the embryonic development of *Pseudobagrus nitidus*[J]. Journal of Southwest China Normal University (Natural Science), 2002, 27: 567-571.
- [20] Kupffer C. Beobachtungea über die entwicklung der knochenfische[J]. Arch Mikrob Anat, 1868, 4: 209-272.
- [21] 肖志忠, 郑炯, 于道德, 等. 条石鲷早期发育的形态特征[J]. 海洋科学, 2008, 32(3): 25-30.
Xiao Zhizhong, Zheng Jiong, Yu Daode, et al. Developmental characters at the early stages of the Japanese parrotfish (*Oplegnathus fasciatus*)[J]. Marine Science, 2008, 32(3): 25-30.
- [22] 官曙光, 刘洪军, 李祥东, 等. 黑棘鲷胚胎发育过程及特殊结构观察[J]. 海洋科学, 2011, 35(9): 68-72.
Guan Shuguang, Liu Hongjun, Li Xiangdong, et al. Observation of embryonic development of *Acanthopagrus schlegelii*[J]. Marine Science, 2011, 35 (9): 68-72.
- [23] 佟雪红, 马道远, 徐世宏, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)胚胎发育的形态学和组织学研究[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(6): 844-849.
Tong Xuehong, Ma Daoyuan, Xu Shihong, et al. Morphological and histological development of the embryo of turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2011, 42(6): 844-849.

Observation of embryonic development of marine medaka *Oryzias melastigma*

WANG You-hong¹, LIU Hong-jun², YU Dao-de², LI Yu-quan¹, GUAN Shu-guang², LIU Ying²

(1. Qingdao Agricultural University, College of Ocean Science and Engineering, Qingdao 266109, China; 2. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104, China)

Received: Jun. 20, 2016

Key words: marine medaka (*Oryzias melastigma*); embryonic development; Kupffer's vesicle

Abstract: This study aims to observe the embryonic development characteristics of marine medaka. As a promising model, *Oryzias melastigma* was cultivated 30 days after hatching as broodstock and naturally fertilized eggs were collected. The fertilized eggs were incubated in filtered sea water at 26–28°C and at 32–33 salinity without ventilation. The ontogenetic embryos of *O. melastigma* were observed using an Olympus SZ-61 microscope. The total development time of every stage was noted and calculated; characteristic images were taken using a digital camera. The results show that the fertilized eggs were globular, multiple oil globules, or demersal. The outermost structure of the egg was covered with a number of short villi and long attaching filaments. The embryonic development includes various stages such as the blastodisc, cleavage, blastula, gastrula, neurula, organogenesis, tail bud, heart beating, and hatching. Significant differences between *O. melastigma* were observed, which are as follows: (1) Irregular blastomeres occurred in early cleavage; (2) The way of hatching was tail-first escaping from the chorion; (3) Two Kupffer's vesicles appeared in some embryos.

(本文编辑: 谭雪静)