

黑棘鲷胚胎发育过程及特殊结构观察

官曙光¹, 刘洪军¹, 李祥东², 于道德¹

(1. 山东省海水养殖研究所, 山东 青岛 266002; 2. 烟台百佳水产有限公司 山东 烟台 265715)

摘要: 驯化野生黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)作为亲鱼, 自然受精, 通过溢水法收集发育同步的受精卵。受精卵孵化条件为水温(21.0±0.5)°C, 盐度 32~33, pH7.8~8.2, 微充气。在奥林巴斯 SZ61 解剖镜下对黑棘鲷的胚胎发育进行观察, 并使用 CCD 图像传感器拍照, 描述了各发育时期的发育时序和形态特征。黑棘鲷受精卵为圆球形端黄卵, 单油球, 卵膜薄、局部具龟裂结构, 卵子直径 0.84~0.98 mm, n=30, 卵黄均匀透明。其胚胎发育可分为胚盘形成期、卵裂期、桑椹期、囊胚期、原肠期、神经胚期、器官发生期、尾芽期、肌肉效应期。在水温(21.0±0.5)°C, 盐度 32~33 的条件下, 受精卵历时 32 h 完成孵化。在黑棘鲷胚胎发育过程中, 发现部分卵子具两个油球, 卵黄囊膜较脆弱, 心脏附近具有类似于柯氏囊的囊泡存在。另外, 高温(25°C)在大大缩短孵化时间的同时, 增加了胚胎的畸形率和死亡率。

关键词: 黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegelii*); 胚胎发育; 柯氏囊

中图分类号: S917.4; Q959.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2011)09-0068-05

黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegelii*(Bleeker, 1854)), 隶属鲈形目(Perciformes)、鲷科(Sparidae)、棘鲷属(*Acanthopagrus*)^[1], 而中国海水养殖中最常见的鲷科鱼类, 真鲷(*Pagrus major*)属于赤鲷属(*Pagrus*)。黑棘鲷的俗称鲷、黑加吉、乌格鱼、海鲂等。为暖温性底层鱼类, 喜栖息于砂泥底质或多岩礁的浅海, 分布于俄罗斯、中国、朝鲜半岛及日本沿海。黑棘鲷具有生长迅速、食性较杂、适应能力和抗病力强等特点, 且肉质鲜美、营养丰富, 深受人们喜爱。自 20 世纪 80 年代以来, 随着黑棘鲷人工繁殖技术的突破和苗种培育试验的成功, 在中国沿海及咸淡水地区, 黑棘鲷的池塘养殖和网箱养殖取得了迅猛发展, 成为中国重要的海水养殖品种之一^[2]。但是黑棘鲷养成周期长, 抗病力差。为了黑棘鲷养殖业的稳定与持续发展, 由宁波市海洋与渔业研究院开展了真鲷与黑棘鲷的杂交工作^[3]。目前, 黑棘鲷主要是作为增殖放流品种而进行人工培育, 而对其胚胎发育过程及特殊结构观察的研究并不多见。

作者对黑棘鲷的早期发育和特殊结构进行了详细观察, 取得了其早期发育大量的生物学资料, 为进一步开展黑棘鲷的生物学研究以及增养殖提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 亲鱼来源

黑棘鲷亲鱼为山东省龙口市烟台百佳水产有限

公司自养, 数量 30 尾, 雌雄各半。威海周边海域捕捞的 2~3 龄野生黑棘鲷, 通过自制亲鱼饵料进行营养强化和人工生殖调控促性腺发育, 培育成熟, 自然产卵。

1.2 受精卵及孵化条件

每天晚上 16:00~17:00 为亲鱼的产卵高峰期, 停气通过溢水法用网袋收集受精卵, 利用孵化网箱放入恒温水池进行孵化, 受精卵孵化条件为水温(21.0±0.5)°C, 盐度 32~33, pH 7.8~8.2, 微充气; 初孵仔鱼的培育水温为(22.0±0.5)°C, 随仔鱼发育缓慢升高至 23~24°C, 保持此温度进行培育。

1.3 观察方法

孵化期间定期取样, 记录孵化水温。使用 Nikon YS100 型显微镜和奥林巴斯 SZ61 解剖镜观察胚胎发育, 记录发育各时期的形态特征; 使用 CCD 图像传感器和 SONY H-50 相机拍照; 使用 DN-2 显微图像处理软件, 结合目微尺、台微尺测定卵径, 每次观察胚胎 3 组, 每组至少 30 粒左右。发育时间的确定按照受精卵 50% 以上达到该时期界定。

收稿日期: 2009-09-25; 修回日期: 2010-05-25

基金项目: 农业部 948 项目(2011-z39); 山东省农业良种工程项目

作者简介: 官曙光(1963-), 男, 山东青岛人, 硕士, 主要从事鱼类学研究, 电话: 0532-82655167, E-mail: shuguang63@126.com; 于道德, 通信作者, 理学博士, E-mail: wensentte@163.com

2 结果

观察结果显示,黑棘鲷卵属端黄卵,为单油球的悬浮卵,呈圆球形、分离透明。卵膜局部具龟裂结构,卵黄均匀无色。卵径平均为 0.84~0.95 mm。黑棘鲷受精卵行盘状卵裂。在水温(21.0±0.5)℃,盐度 33 的条件下,受精后 40 min 形成胚盘,受精后 1 h 开始第一次卵裂,卵裂期共历时 5 h 30 min。这段时期最显著的特点就是胚盘的形成带动卵黄囊向上同样形成一个尖状突起。受精后 7 h 20 min 胚盘细胞开始下包并内卷,胚胎发育进入原肠胚阶段,此阶段

是胚体发育中变化最剧烈的时期,在出现胚体雏形的时候形成神经板,头部形成眼泡。原口关闭前,柯氏囊出现(Kupffer's vesicle, KV),色素开始形成,体节 6~8 对。原口关闭后,胚胎进入器官形成期,听囊、嗅囊、晶体等依次形成。受精后 22 h 10 min,胚体尾芽形成并开始脱离卵黄囊,受精后 23 h 20 min 胚胎开始出现微弱心跳;随着胚体进一步发育,心跳加快,并伴随着肌体的间歇颤动。在受精后 32 h,心率达到 60 次/min 左右,胚体发育进入到最后的孵化时期,仔鱼主要以头部首先破膜的方式孵化。其具体的发育时序及发育特征见表 1 及图 1。

表 1 黑棘鲷的发育时序及发育特征
Tab. 1 Developmental stages and characteristics of *Sparus macrocephalus* embryo

发育时期	发育时间	胚胎主要发育特征	对应图
受精卵	0	卵径 0.84~0.98 mm, 油球直径 0.18~0.22 mm	—
胚盘形成	40 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	图 1-1,1-2
2 细胞期	1 h	受精卵第一次经裂。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	图 1-3
4 细胞期	1 h 20 min	受精卵第二次经裂。分裂沟与第一次径裂沟相互垂直,胚盘被分割成 4 个相等的分裂球	图 1-4
8 细胞期	1 h 40 min	第三次经裂,胚盘形成 8 个大小相似的细胞球,单细胞层	图 1-5
16 细胞期	2 h	第四次经裂,将胚盘分割成 16 个细胞球,仍为单细胞层	图 1-6,1-7
32 细胞期	2h 30 min	第五次卵裂,为纬裂。最终形成 32 个分裂球,细胞分为两层	—
桑椹期	3 h 30 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“桑椹”	图 1-8
高囊胚期	5 h 30 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	图 1-9
低囊胚期	6 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	图 1-10
原肠早期	7 h 20 min	下包约 20%,顶部可见胚环的出现	图 1-11,1-12
原肠中期	8 h 20 min	下包 25%~50%。胚盘继续向植物极运动,下包约 40%时,预定的胚体原基处细胞开始加厚,在胚环清晰的基础上,胚盾出现	图 1-13
原肠晚期	13 h	下包 50%~85%。下包约 50%,胚体雏形出现,下包约 2/3 时,神经板形成,同时头部眼泡形成	图 1-14
原口关闭前期	14 h 20 min	下包 90%以上,卵黄栓形成,KV 出现,不明显,胚体此时已绕卵黄囊近 1/2,肌节 4 对,黑色素开始出现	图 1-15
听囊期	16 h	原口关闭,听囊显现。柯氏囊清晰可见,肌节 6~12 对,头部及眼泡无色素分布,黑色素分布在躯干、油球及油球卵黄囊膜上。黄色素在躯干腹侧分布,较小	图 1-16,1-17
嗅囊期	20 h	嗅囊出现,色素进一步密集化,油球,躯干部分色素开始具有扩散能力,为雪花状。心脏原基出现。12~16 体节	图 1-18
尾芽期	22 h 10 min	头部色素密集,尾芽形成中,与油球接触,部分开始游离,18~20 体节	图 1-19,1-20
晶体形成	23 h 20 min	嗅囊具色素分布,形成两个色素圈,晶体形成,胚体心脏开始微弱和缓慢的搏动,心率为 10 次/min,20~22 体节	图 1-21
肌肉效应期(心跳期)	28 h	心跳加快,心率为 50~56 次/min,胚体开始间歇地进行扭动和颤动,次数也逐渐增加。体节 22~24 对	图 1-22
孵化前期	30 h	胚体运动加剧,心脏搏动也随之加速,部分仔鱼开始破膜付出。以头部首先孵化出膜。孵化周期约为 3 h	图 1-23
初孵仔鱼	32 h	典型的头部、躯干中部、以及尾部色素带,类似于真鲷的色素模式	图 1-24

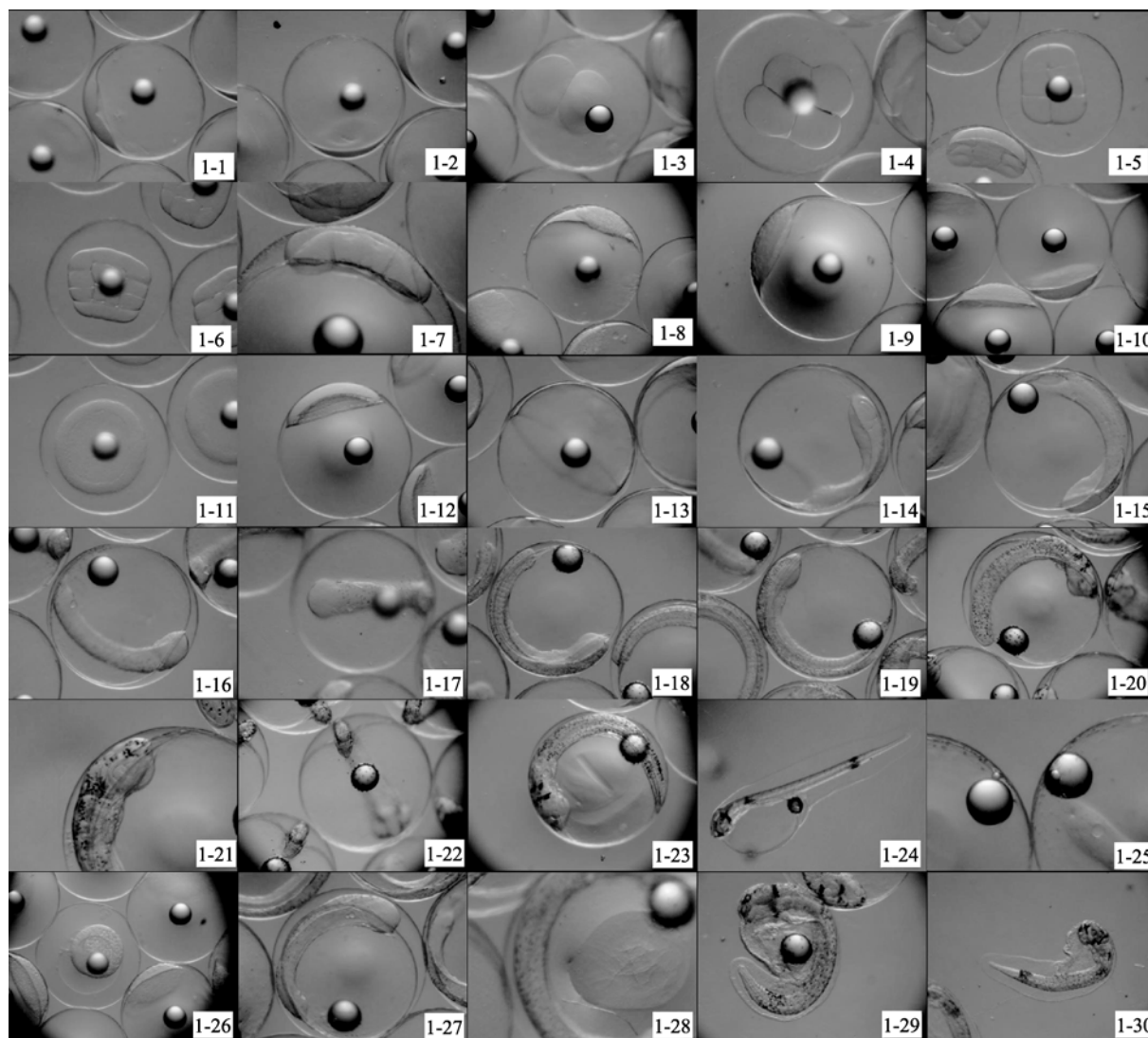


图 1 黑棘鲷的胚胎发育(×32)

Fig.1 Embryonic development of *Acanthopagrus schlegelii*(×32)

1-1. 胚盘形成侧面观; 1-2. 胚盘形成腹面观; 1-3. 2 细胞; 1-4. 4 细胞; 1-5. 8 细胞; 1-6. 16 细胞; 1-7. 16 细胞侧面观; 1-8. 桑椹期; 1-9. 高囊胚; 1-10. 低囊胚; 1-11. 原肠早期腹面观, 示胚环; 1-12. 原肠早期侧面观; 1-13. 原肠中期; 1-14. 原肠晚期, 眼泡形成; 1-15. 胚孔封闭前期, KV 出现; 1-16. 胚孔封闭期, KV 明显; 1-17. 耳石形成, 色素增加; 1-18. KV 消失; 1-19. 尾芽形成中; 1-20. 尾芽形成; 1-21. 晶体形成; 1-22. 肌肉效应期; 1-23. 孵化前期; 1-24. 初孵仔鱼; 1-25. 双油球胚胎; 1-26. 多细胞期, 卵黄囊膜破裂; 1-27. 心脏处的囊泡; 1-28. 卵膜龟裂结构; 1-29. 畸形仔鱼, 缺乏卵黄囊; 1-30. 畸形仔鱼, 缺乏卵黄囊和油球

1-1. blastodisc forming stage, lateral view; 1-2. lastodisc forming stage, abdomen view; 1-3. 2-cell stage; 1-4. 4-cell stage; 1-5. 8-cell stage; 1-6. 16-cell stage; 1-7. 16-cell stage, lateral view; 1-8. morula stage; 1-9. high blastula stage; 1-10. low blastula stage; 1-11. early gastrula stage, abdomen view, showing embryo ring; 1-12. early gastrula stage, lateral view; 1-13. middle gastrula stage; 1-14. late gastrula stage, optic vesicle forming; 1-15. blastopore closing stage, KV forming; 1-16. blastopore closed stage, obvious KV; 1-17. otolith forming stage, melanin increasing; 1-18. KV disappeared; 1-19. tai bud forming stage; 1-20. tai bud formed stage; 1-21. lens forming stage; 1-22. heart beating stage; 1-23. hatching period; 1-24. newly-hatched larva; 1-25. embryo with double oil droplet; 1-26. multiple cell stage with rupture of yolk sac; 1-27. showing the KV-like vesicle around heart; 1-28. chap on egg membrane; 1-29. a deformed larva, devoid yolk sac; 1-30. deformed larva, devoid yolk sac and oil globule

3 讨论

与大部分海洋真骨鱼类类似, 黑棘鲷的受精卵也是端黄卵, 行盘状卵裂。而且前期大部分过程: 包括细胞分裂期、桑椹期、高囊胚、低囊胚以及原口

闭合前, 与其他鱼类尤其是鲷科的真鲷胚胎发育并无差异。在进行海洋鱼卵仔鱼调查的过程中, 此时用于区分不同鱼类卵子的主要特征就依赖于卵径。当胚胎继续发育, 尤其是色素出现后, 开始具有种属的特异性, 黑棘鲷的胚胎发育色素出现在原口关闭

后,最终孵化仔鱼的尾部 6 体节出的色素带成为该种类典型的仔鱼特征。

3.1 卵黄囊膜

鱼类的卵子具有二层膜结构,外一层为卵膜,内层为卵黄囊膜。在对胚胎进行拍照的过程中,利用解剖针拨动受精卵,由于卵膜受到压力变形,松开解剖针后,卵膜恢复弹性,而部分胚胎的卵黄囊膜会出现破裂(图 1-26)。作者在进行其他海水鱼类(真鲷、牙鲆等)的胚胎发育观察过程中,从未发现如此脆弱的卵黄囊膜。这种脆性是否也与黑棘鲷第一次繁殖相关,尚不清楚。

3.2 油球(oil globule, oil droplets)与龟裂结构

海洋鱼类的卵子,根据物理性质有几种分类方法:黏性和非黏性,浮性和沉性等。其中根据油球的有无可以分为 3 种类型:单油球浮性卵(60%)、无油球浮性卵(25%)和多油球浮性卵(15%)^[4]。一般来说,油球的有无与卵子的浮性相关,因为油球的本质为脂肪,比重轻于海水,因此具有油球的卵子一般都是浮性卵^[4-5]。实际上,即使是无油球的卵子也可以在 32%~34%下呈现漂浮状态,例如条斑星鲷^[6],这是因为这种卵子在最后成熟阶段水化过程,吸入大量比重同样轻于海水的水(体积增加 3~6 倍)^[7],而呈现上浮特性,只是不如油球的明显^[8-9]。本实验观察了 3 批自然受精卵,其中只有第一批受精卵具有双油球,占 15%~20%(图 1-25),由于第二个油球很小,因此应该也属于单油球类型。作者在以前进行真鲷胚胎观察的过程中,发现过类似现象,而且其同批次的卵子中含第 2 个油球的比率很高(60%~80%),据中国科学院海洋研究所李军教授介绍是由于产卵的真鲷过于老龄化所致(当年的真鲷为 13 龄,2007 年)。本实验所用亲本为二三龄鱼,不存在老龄化问题,可能是第一次繁殖产卵的缘故。因此笔者推断部分亲本应该属于第一次进入繁殖期,具有卵质量不稳定、出现 2 个油球的可能。另外,具蒋宏雷等^[3]报道的黑棘鲷卵子表面并无龟裂结构,作者也曾观察过真鲷的卵子和胚胎发育过程也无此结构出现。本实验发现的龟裂结构(图 1-23,图 1-28)可能是由于第一次繁殖所致。

3.3 关于柯氏囊

Kupffer^[10]在 1868 年发现真骨鱼类胚胎发育过程中会出现一个囊泡。此后为纪念这个鱼类学家,以其名命名这个器官,即为柯氏囊(Kupffer's vesicle)。

而关于柯氏囊的作用一直是个谜,也成为鱼类胚胎学家最感兴趣的话题。近年来研究证实了柯氏囊启动了鱼类的不对称发育^[11]。不对称发育现象普遍存在于脊椎动物,例如人类身体左侧的胃、心脏和脾脏;右侧的肝脏就是典型的不对称发育器官。

柯氏囊是一个内含单纤毛细胞(monociliated cells)的器官^[12]。这些单纤毛细胞在柯氏囊的背腹部不对称分布,导致内液进行逆时针流动,正是这种流动起始了胚胎发育的不对称性^[11,13]。作者虽然没有对柯氏囊进行深入的研究,但是在进行胚胎观察的过程中,发现有的胚胎在心脏原基的部位也会出现一个或几个类似于柯氏囊的泡状囊泡(图 1-27),由于鱼类的心脏是属于发生上出现的第一个不对称器官,这种囊泡的存在是否也与柯氏囊的作用类似,还需要进一步深入研究和探讨。

3.4 高温的致死和致畸作用

类似于其他真骨鱼类,在一定的温度范围内,胚胎发育过程会随温度升高而加快。同时,在超过一定范围的温度条件下,会导致胚胎发育畸形和死亡^[14-16]。将一部分受精卵于 25℃ 的高温进行孵化,发现至少两个死亡高峰期,囊胚期和原肠晚期(或是原口关闭期),另外就是强烈的致畸作用:高温条件下,鱼类过早达到胚胎发育的有效积温,而细胞分裂的速度以及发生过程还远远滞后于此,因此,很多胚胎在尾芽形成后不久就孵化出膜(图 1-29,1-30)。如上述,由于卵黄囊膜十分脆弱,过早孵化出的仔鱼会缺乏卵黄囊(卵黄囊膜破裂所致)甚至油球(图 1-29,1-30)。据文献报道和本文实验,可以推测黑棘鲷胚胎发育的最佳温度为 18~22℃。

本实验发现黑棘鲷的胚胎发育过程的特殊现象,例如卵黄囊膜的脆性,双油球的存在以及龟裂结构等,与以往的实验结论不同,是否是初次性成熟相关,或者受到其他因素影响,还需要进一步的观察和研究。

参考文献:

- [1] 吴仁协,刘静,樊翼蓉,等.黑棘鲷的命名和分类地位探究[J].海洋科学,2011,5:117-119.
- [2] 朱德芬.黑鲷生物学特性及增养殖概况[J].水产养殖,1996,1:30-32.
- [3] 蒋宏雷,吴雄飞,石刚德,等.真鲷与黑鲷杂交子一代的胚胎发育[J].河北渔业,2007,14(2):40-42.
- [4] 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.
- [5] Riis-vestergaard J. Energy density of marine pelagic fish eggs[J]. Journal of Fish Biology, 2002, 60: 1511-1528.
- [6] 肖志忠, 于道德, 张修峰, 等. 条斑星鲷 (*Verasper moseri*) 早期发育生物学研究—受精卵的形态、生态和卵胚发育特征研究[J]. 海洋科学, 2008, 32(2): 17-21.
- [7] Selman K, Wallace R A, Cerda J. Bafilomycin A1 inhibits proteolytic cleavage and hydration but not yolk crystal disassembly or meiosis during maturation of sea bass oocytes[J]. Journal of Experimental Zoology, 2001, 290: 265-278.
- [8] Craik J C A, Harvey S M. The causes of buoyancy in eggs of marine teleosts[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1987, 67: 169-182.
- [9] Craik J C A, Harvey S M. Biochemical changes occurring during final maturation of eggs of some marine and freshwater teleosts[J]. Journal of Fish Biology, 1984, 24: 599-610.
- [10] Kupffer C. Beobachtungea uber die entwicklung der Knochenfische[J]. Arch Mikrob Anat, 1868, 4: 209-272.
- [11] Essner J J, Amack J D, Nyholm M K, et al. Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut[J]. Development, 2005, 132(6): 1247-1260.
- [12] Essner J J, Vogan K J, Wagner M K, et al. Conserved function for embryonic nodal cilia[J]. Nature, 2002, 418: 37-38.
- [13] Kreiling J A, Prabhat W G. Analysis of kupffer's vesicle in zebrafish embryos using a cave automated virtual environment[J]. Developmental Dynamics, 2007, 236(7): 1963-1969.
- [14] 史海东, 毛国民, 王海岳. 温度和盐度对横带髯鲷胚胎发育的影响[J]. 上海水产大学学报, 2004, 17(3): 230-234.
- [15] 黄永春, 胡石柳, 周泽斌, 等. 鲩状黄姑鱼早期发育特征及对温盐度的适应性[J]. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 2006, 48(1): 101-106.
- [16] 林伟雄, 蔡发盛, 陈伟洲, 等. 温盐度对斜带髯鲷孵化率及仔鱼存活率的影响[J]. 台湾海峡, 1998, 27(3): 305-308.

Observation of embryonic development of *Acanthopagrus schlegelii*

GUAN Shu-guang¹, LIU Hong-jun¹, LI Xiang-dong², YU Dao-de¹

(1. Mariculture Institute of Shandong Province, Qingdao 266002, China; 2. Yantai Baijia Fishery Limited Corporation, Yantai 265715, China)

Received: Sep., 25, 2009

Key words: *Acanthopagrus schlegelii*; embryonic development; Kupffer's vesicle

Abstract: The naturally fertilized eggs of wild broodstock, *Acanthopagrus schlegelii* were collected by the flooding method in order to obtain developmentally synchronized embryos. The fertilized eggs were incubated in filtered sea water under subtle aerated conditions (salinity 32 ~ 33, 21.0 °C ± 0.5 °C, and pH 7.8 ~ 8.2). The ontogenetic embryos were observed by Olympus SZ-61 microscope, the duration of every developmental stage was recorded, and the characteristic images were taken using a charge-coupled device (CCD). The fertilized eggs had globular, single oil globule and thin egg membrane, and the diameters of the eggs were in the range of 0.84 to 0.98 mm ($n=30$). During embryonic development, the main ontogenetic stages include blastodisc forming stage, cleavage stage, morula stage, blastula stage, gastrula stage, neurulation stage, organogenesis stage, tail bud stage, and heart beating stage. The time-table of major embryonic development stages was as follows: blastodisc forming stage at 40 m post fertilization; 4-cell stage at 1 h and 20min pf; morula at 3 h and 30 m pf; low blastula stage at 6 h 40 m pf; early gastrula stage at 7 h 20 min pf; late gastrula at 13 h pf; blastopore closing stage at 14 h 20 min pf; tail bud stage at 22 h 10 min pf; embryo movement at 28 h pf; 50% hatching stage at 32 h pf. High temperature (25°C) shortened the hatching period, but significantly increased embryo mortality rates and deformity rates.

(本文编辑: 梁德海)