

不同盐度下拟目乌贼(*Sepia lycidas*)胚胎发育过程研究*

陈道海^{1,2} 郭永平² 文菁^{1,2} 梁汉清²

(1. 湛江师范学院环北部湾海洋药用动物资源保护与利用研究所 湛江 524048;

2. 湛江师范学院生命科学与技术学院 湛江 524048)

提要 分别配置盐度为 13、18、23、28、33、38 和 43 的海水, (23 ± 0.5) °C 温度条件下孵化拟目乌贼(*Sepia lycidas*)卵, 并对拟目乌贼胚胎发育情况进行观察与分析。结果表明, 拟目乌贼胚胎在盐度为 28 时发育最佳, 孵化历期为 28—30 天, 胚胎发育经过受精卵、卵裂期、囊胚期、原肠胚期、胚芽原基形成期、胚体形成期、漏斗形成期、眼点形成期、红眼期、心跳出现期、内壳发生期、色素形成期、墨囊形成期、黑眼期、内壳形成期和幼体出膜期等 16 个典型时期。盐度为 13、18、38 和 43 时, 发育停滞, 说明海水盐度是拟目乌贼胚胎发育过程中一个很重要的影响因素。

关键词 拟目乌贼; 盐度; 胚胎发育

中图分类号 S917.9

拟目乌贼 (*Sepia lycidas*) 属于软体动物门 (Mollusca)、头足纲 (Cephalopoda)、乌贼目、乌贼科、乌贼属, 别名眼墨、花鸡姆、墨公, 分布于我国浙江舟山群岛以南近海、日本群岛南部、马来群岛和印度东海岸等。拟目乌贼体型较大, 最大体重可达 5kg, 为我国南方海域大型经济头足类 (董正之, 1988, 1991)。具有较高的营养价值, 而且富有药用价值 (周庆峰等, 2009)。

由于过度捕捞, 乌贼的产量逐年下降。为了满足市场需求, 国内已有学者对曼氏无针乌贼和金乌贼胚胎发育及人工养殖技术、增殖放流等方面进行了研究, 并取得了较高的经济效益 (李嘉泳, 1963; 刘振勇等, 2009; 常抗美等, 2009; 陈四清等, 2010; 张建设等, 2011; 雷舒涵等, 2011)。国内外也已对虎斑乌贼生物学特性和胚胎发育等方面进行了研究 (Nabhitabhata, 1995; Nabhitabhata *et al.*, 1999; Minton *et al.*, 2001; Minton, 2004; 陈道海等, 2012); 也有人对枪乌贼的胚胎发育和人工育苗进行研究 (梁志华, 1980; 欧瑞木,

1981), 雷舒涵等 (2011) 分析了盐度对金乌贼和曼氏无针乌贼胚胎发育的影响。研究表明, 金乌贼和曼氏无针乌贼胚胎发育受盐度影响大; 相对于温度, 盐度对乌贼受精卵孵化率的影响更为显著, 生活在高盐度海区的成体乌贼会选择较低盐度的海区产卵 (刘振勇等, 2009)。但是, 有关盐度对拟目乌贼胚胎发育影响等生物学方面的研究未见报道。本文研究不同盐度对拟目乌贼胚胎孵化率的影响, 观察拟目乌贼胚胎发育的过程, 对开展拟目乌贼人工养殖和增殖放流、恢复乌贼资源和可持续利用具有重要意义。

1 材料与方法

实验用拟目乌贼受精卵于 2010 年 3 月采自广东省湛江市遂溪县某乌贼养殖基地。取 1400 粒受精卵, 分别放入 7 个规格为 60 × 35 × 30cm 的泡沫箱孵化, 盐度分别为 13、18、23、28、33、38 和 43, 孵化水温为 (23 ± 0.5) °C, pH 值 7.5。日换水量 100%, 连续充气。

用游标卡尺测量受精卵的长、短径, 用体视显微

* 国家星火计划项目, 2012GA780020 号; 广西科技合作与交流计划项目, 桂科合 1346011-25 号; 广东省教育部产学研合作专项, 2011B090400274 号; 广东省海洋渔业技术推广专项, A200899E01 号; 湛江市科技攻关项目, 2011D02-44 号。陈道海, 教授, E-mail: dhchen11@21cn.com

收稿日期: 2012-08-25, 收修改稿日期: 2013-06-12

镜(SZX7, 奥林巴斯)观察拟目乌贼胚胎前需剥离卵膜。拍下的图片以 TIF 格式保存, 图片用 Photoshop 软件处理。

2 结果

2.1 卵的形态与结构

刚产出的受精卵长径约 2.445cm, 短径约 1.316cm, 略呈柠檬状, 末端较尖, 另一端柄分叉, 卵膜为奶油色且有细沙覆盖; 拟目乌贼卵膜属次级卵膜且有 6 层, 卵膜的层数随着卵发育进程而减少; 各层卵膜厚度由外到内依次变薄, 最内层卵膜和卵黄膜间有黏液, 两者紧密结合; 胚胎发育后期, 黏液减少, 卵黄与卵膜相对游离, 较容易剥离。刚受精的卵, 卵黄位于卵中央, 随着发育卵黄被挤向一端, 卵也由刚开始的柠檬状变成椭圆形。不完全卵裂, 卵在胚盘一端进行盘状卵裂, 进而发育至各种时期, 最终形成幼体孵出。

2.2 胚胎发育过程

拟目乌贼的胚胎发育从受精卵经过卵裂期、囊胚期、原肠胚期、胚芽原基形成期、胚体形成期和幼体出膜期等 16 个时期。其各时期的特征详见图 1。

2.2.1 卵裂期 受精后约 2h 进入 2 细胞期, 在体视显微镜下明显看到分裂线(图 1-1); 约 4h 形成 4 细胞期, 两条分裂线互相垂直(图 1-2), 形成 4 个相同的细胞; 多细胞期中央细胞小, 边缘细胞大, 边缘分裂沟呈辐射状(图 1-3)。

2.2.2 囊胚期 卵裂继续进行, 细胞数目不断增加, 层次也逐渐增多形成胚层(图 1-4); 正面看囊胚像覆盖在卵黄表面的圆盘, 中央为明区, 边缘为暗区, 称之为胎盘(图 1-5); 随着分裂的继续, 囊胚层边缘细胞开始向植物极下包。

2.2.3 原肠胚期 发育约 4 天, 囊胚层边缘细胞向下外包至卵黄的 1/3 左右, 部分边缘细胞变小, 并内移形成一个环状的胚环, 胚胎发育进入原肠胚早期(图 1-6)。原肠胚早期外胚层细胞继续分裂, 第 6 天, 外胚层细胞向植物极外包至卵黄 1/2, 胚环更明显, 胎盘变大变厚, 明区和暗区同时增大, 在卵黄上可见椭圆形的盾, 称之为胚盾, 是未来的胚区(图 1-7), 胚胎进入原肠胚中期; 第 8 天, 发育至原肠胚晚期, 胚层下包卵黄 2/3, 胚盾明显延长, 边缘细胞排列整齐; 第 9 天, 外胚层下包 3/4, 胚盘处有不规则的隆起, 形成深浅不一的沟, 但外围形成五边形, 明区出现胚体(图 1-8)。

2.2.4 胚芽原基形成期 第 10 天, 外胚层下包卵黄 5/6, 胚环明显缩小, 外胚层细胞将卵黄整个包裹在里面, 形成了卵黄囊, 胚胎在卵黄膜内, 胚芽原基出现, 第 11 天, 胚盘处不规则的隆起, 形成樱桃心形。此时, 腕原基已基本形成, 眼原基尚未形成; 透过解剖镜底光, 可见胚胎的颜色稍暗, 而卵黄部分的颜色偏亮, 容易区分(图 1-9)。第 12 天, 胚盘处出现壳囊、视环、腕基, 呈白色肉芽, 具有一定的形状(图 1-10)。

2.2.5 胚体形成期 第 13 天, 胚体明显隆起, 出现胴体部; 视柄突出, 其端部凹陷, 形成雏形的眼, 但眼柄不明显(图 1-11)。

2.2.6 漏斗形成期 第 14—15 天, 口原基、漏斗原基出现, 左右漏斗褶形成并隆起; 眼柄特别突出, 整个胚体略呈十字形(图 1-13); 触腕长度比其它各腕长, 呈卷曲状态不能收缩; 开始显露外套缘(图 1-12)。

2.2.7 眼点形成期 第 16 天, 第 1 对腕出现, 外套膜已经形成, 胴体尾部偏圆, 眼基缩小; 眼睛出现, 胚体躯干和头部的明显变大, 尾端偏尖, 可见鳃和第 5 对腕, 透过卵黄可见触腕, 鳍缘突显, 胴体开始形成, 胚体长度与卵黄囊直径比为 1 : 2(图 1-14, 15, 16)。

2.2.8 红眼期 眼柄缩短, 眼的晶体轮廓出现, 眼由无色变为浅红色、红色, 虹膜呈一显著的红色圆圈, 外有一层透明膜。

2.2.9 心跳出现期 第 17 天, 乌贼幼体外部结构基本形成, 出现心跳, 眼睛颜色进一步加深, 成为红褐色。

2.2.10 内壳发生期 第 17—18 天, 漏斗具开口, 内壳开始生长。

2.2.11 色素形成期 第 19—21 天, 外套膜出现色素细胞, 躯干背部色素出现, 鳍明显变大; 第 20 天, 头部缩短, 头足也有色素细胞生成(图 1-17)。

2.2.12 墨囊形成期 第 22 天, 漏斗已与成体近似, 少数有墨汁形成(图 1-18)。

2.2.13 黑眼期 第 24 天, 卵黄囊缩小, 眼睛由红褐色转变成黑褐色(图 1-19)。期间, 胴体的体色由乳白色转变成灰褐色, 出现黑色斑点, 鳍和尾端连在一起(图 1-20)。第 26 天, 卵黄囊继续缩小, 表皮上的斑点也越加明显。

2.2.14 内壳形成期 第 28 天, 鳍变大且在尾端分开, 胚体长度和卵黄囊直径比接近 2 : 1, 虹彩细胞生

成, 胚体色素加深, 斑点更明显, 头部稍比躯干小, 内壳在胴体背部明显隆起, 拟目乌贼幼体在卵膜内

的活动加剧。

2.2.15 幼体出膜期

第 30 天, 卵黄囊继续缩小,

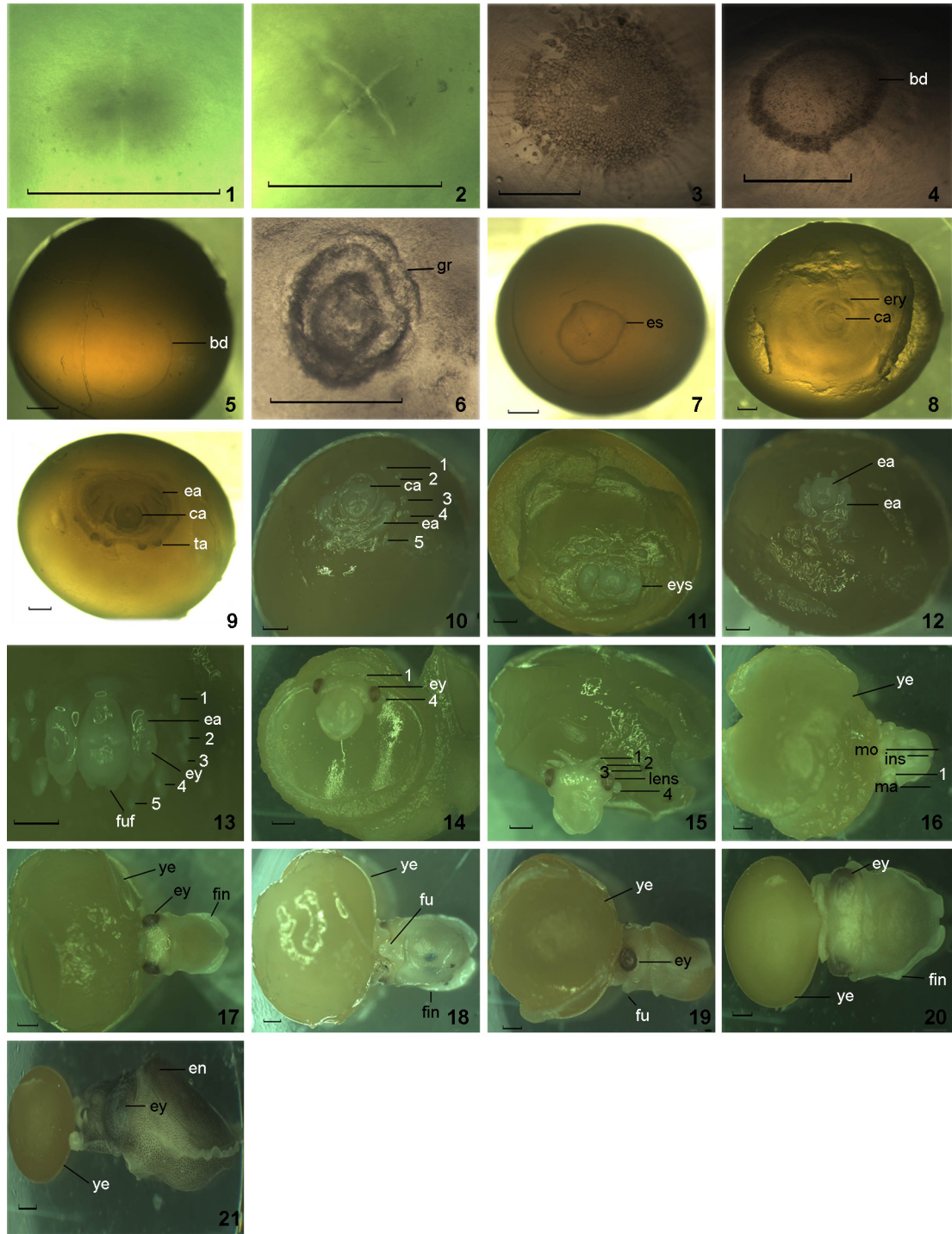


图 1 拟目乌贼的胚胎发育过程

Fig.1 Embryonic development process of cuttlefish *S. lycidas*

1. 2 细胞期; 2. 4 细胞期; 3. 多细胞期; 4. 囊胚早期; 5. 囊胚晚期; 6. 原肠胚早期; 7. 原肠胚中期; 8. 原肠胚晚期; 9. 胚芽原基形成期(壳囊、视环、腕基出现, 眼柄突出, 漏斗褶形成, 口原基、漏斗原基出现); 10—13. 胚体形成期; 14—20. 胚体发育过程(外套膜形成, 眼睛形成, 漏斗成形, 内骨骼形成等); 21. 幼体出膜期。bd. 囊胚, gr: 胚环, es. 胚盾, ea. 眼原基, ta. 腕原基, ca. 胴体, eys. 眼柄, ey. 眼睛, fuf. 漏斗褶, lens. 眼睛晶体, mo. 口, ins. 墨囊, en. 内骨骼, id. 胚体, ma. 外套膜, me. 外套缘, fu. 漏斗, fin. 肉鳍, ye. 卵黄。比例尺均为 1mm

胚体长度与卵黄囊直径之比为 3 : 1, 卵膜变薄变软, 即将孵化的幼体连同卵黄囊将破膜而出(图 1-21)。

2.3 盐度对孵化的影响

盐度对拟目乌贼卵的孵化影响非常明显, 实验表明, 海水盐度为 13、18、38 和 43 时, 发育停滞, 在海水盐度为 23、33 时, 胚体发育缓慢; 盐度 28 是胚胎发育较适宜盐度。详见表 1、表 2。

由表 1 可知, 海水盐度在 13、18、38 和 43 时, 拟目乌贼的胚胎发育几乎停滞在囊胚期, 少数胚胎发育至胚芽形成。根据表 2 的结果, 海水盐度 33 时, 其胚胎发育的速度极慢, 大多数停滞于原肠胚晚期; 海水盐度 23 时, 其胚胎发育速度比较慢, 胚体生长期

延长; 相对 23、33 盐度而言, 海水盐度 28 时, 其胚胎发育情况良好。

3 讨论

3.1 卵和胚胎发育特点

孵化前的卵子长径约 2.445cm, 短径约 1.316cm, 但经过 4 天的发育, 卵裂已经完成并进入原肠早期, 卵紧缩至长径约 1.760cm、短径约 0.742cm; 随后受精卵又慢慢吸水恢复到原状, 胚体生长期后期, 卵又吸水膨胀, 呈透明状; 金乌贼受精卵在发育过程中也出现紧缩的现象(常抗美等, 2009), 受精卵缩小的原因还需进一步研究。

表 1 不同盐度拟目乌贼胚胎发育情况(1)

Tab. 1 Embryonic development process of cuttlefish *S. lycidas* at different salinities water environment (1)

发育天数(d)	不同盐度组发育程度			
	13	18	38	43
5	无	胚环缩小	胚环缩小	胚环缩小
10	胚膜时期	胚环缩小	胚环缩小	胚环缩小
11	胚环缩小	胚体原基开始突出	胚环缩小	
13	无	无	胚体原基开始突出	胚环缩小
15	无	胚环缩小	胚环缩小	胚环缩小
19	无	胚环缩小	胚环缩小	无
21	无	胚环缩小	无	胚膜时期
25	胚环缩小	胚环缩小	胚环缩小	胚环缩小
27	胚环缩小	胚体原基出现	无	无
30	发育停滞	发育停滞	发育停滞	发育停滞

注: “无”表示没有观察到结果或结果不明显

表 2 不同盐度拟目乌贼胚胎发育情况(2)

Tab. 2 Embryonic development process of cuttlefish *S. lycidas* at different salinities water environment (2)

发育天数(d)	不同盐度组发育程度		
	33	23	28
5	无	胚膜时期	胚环缩小
10	胚环缩小	胚环缩小	无
11	无	无	胚环缩小
13	胚环缩小	胚体原基突出	胚环缩小
15	无	胚体成形, 可见视柄突出	胚体形成, 外部器官芽突出, 视柄开始突出
19	无	胚环缩小	视柄突出, 眼睛出现, 第 1 对腕形成
21	胚体原基形成	眼睛形成, 123 对腕形成	眼睛形成, 外套膜开始形成, 123 对腕形成, 鳍清晰可见, 漏斗出现
25	胚体原基开始突出	眼睛清晰可见, 漏斗形成, 触腕形成	眼睛完全突出, 嗅觉陷出现, 触腕吸盘形成, 透过腹部可见黑色墨囊
27	胚体原基突出	眼睛完全可见	胚体色素加深, 与鳍明显区分, 卵黄囊缩小明显
30	胚体视柄突出	卵黄囊缩小, 胚体体色较深, 可见浅色斑点	卵黄囊继续缩小, 墨汁形成
28—38	孵出 19 只	孵出 27 只	孵出 114 只

注: “无”表示没有观察到结果或结果不明显

3.2 盐度影响胚胎发育的原因

拟目乌贼受精卵在低盐或高盐海水组的孵化率均较低,这可能是因为卵膜难以调节细胞与周围介质之间的物质平衡而导致受精卵损伤或代谢失调所致。这种现象在军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) (孙朋华等, 2006; 徐力文等, 2007) 和暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*) (李佳佳, 2008)¹⁾ 等鱼类的研究中也得到了证实。然而, 关于头足类受精卵渗透压调节机制仍需进一步深入。

3.3 乌贼胚胎发育时期的划分

乌贼的胚胎发育是一个复杂而连续的过程, 并且持续时间较长。为了便于科学准确地描述这一过程, 人们将整个过程划分为若干个阶段(或时期), 由于各个研究人员划分依据不同, 乌贼胚胎发育的时期也有不同划分方法, 彼此差异很大。例如, 陈四清等 (2010) 将金乌贼胚胎发育过程划分为 5 个时期, 刘振勇等 (2009) 把曼氏无针乌贼胚胎发育分为 7 个时期, 而常抗美等 (2009) 把曼氏无针乌贼胚胎发育分为 8 个时期。蒋霞敏等 (2013) 将拟目乌贼胚胎发育划分为 11 个时期, Boletzky (2003) 将虎斑乌贼胚胎发育过程划分为 30 个时期, 作者为了便于与 Boletzky (2003) 的研究结果进行比较, 也曾按 30 个时期对虎斑乌贼的胚胎进行表述 (陈道海等, 2012)。如果分期过少, 每个时期的特征不明显, 不利于客观准确描述胚胎变化过程, 也不便于很好地比较乌贼种间胚胎发育各个时期的特性, 分期过多、过于细致, 则不便于育苗过程中技术交流, 例如, 将乌贼胚胎发育分为 30 个时期, 在生产实践中较难把握各时期的典型特征。作者认为, 将胚胎发育过程中典型且容易观察的特征变化作为分期的依据比较适宜。作者根据细胞分裂特征、胚芽原基、胚体、漏斗、眼及其颜色变化、心脏、内壳、墨囊、色素等结构的出现和变化作为分期的指标, 将乌贼胚胎发育分为 16 个时期, 有利于指导实际生产。

3.4 拟目乌贼孵化条件与其它乌贼比较

见表 3。根据实验结果, 拟目乌贼胚胎发育最适宜盐度是 28, 适盐范围是 23—33; 而金乌贼和曼氏无针乌贼的最适宜盐度都是 30, 适盐范围分别是 24—35 和 17—35 (雷舒涵等, 2011); 相对而言, 拟目乌贼卵在水温 23℃ 孵化时间约 1 个月。拟目乌贼孵化的最佳水温、溶氧、pH 等生存条件, 还有待进一步研究。

表 3 几种乌贼胚胎发育进程上的比较

Tab. 3 Comparison of embryonic development among different cuttlefish

种类	温度(℃)	盐度(‰)	孵化天数(d)
金乌贼	22—24	30	20—21
曼氏无针乌贼	23—26	30	18—21
拟目乌贼	20—23	28	28—30
虎斑乌贼	20—23	28	20—24

参 考 文 献

- 刘振勇, 苏跃中, 谢友伦等, 2009. 曼氏无针乌贼胚胎发育的初步观察. 渔业科学进展, 30(5): 15—19
- 孙朋华, 陈浩如, 工肇鼎, 2006. 盐度对军曹鱼胚胎和仔鱼发育的影响. 生态科学, 25(1): 48—51
- 李嘉泳, 1963. 金乌贼 (*Sepia esculenta* Hoyle) 在黄渤海的结群生殖和洄游. 山东海洋学院学报, 5(2): 69—108
- 张建设, 夏灵敏, 迟长凤, 2011. 人工养殖曼氏无针乌贼 (*Sepiella maindroni*) 繁殖生物学特性研究. 海洋与湖沼, 42(1): 55—59
- 陈四清, 刘长琳, 庄志猛等, 2010. 金乌贼胚胎发育的研究. 渔业科学进展, 31(5): 1—7
- 陈道海, 王雁, 梁汉青等, 2012. 虎斑乌贼 (*Sepia pharaonis*) 胚胎发育及孵化历期观察. 海洋与湖沼, 42(2): 394—400
- 欧瑞木, 1981. 中国枪乌贼胚胎发育和稚仔的初步观察. 海洋湖沼通报, 3: 51—59
- 周庆峰, 李明月, 那广水等, 2009. 海洋生物多糖抗肿瘤作用机制的研究进展. 中国药理学通报, 25(8): 995—997
- 徐力文, 刘广锋, 王瑞旋等, 2007. 急性盐度胁迫对军曹鱼稚鱼渗透压调节的影响. 应用生态学报, 18(7): 1596—1600
- 常抗美, 吴常文, 吕振明等, 2009. 曼氏无针乌贼胚胎发育与人工育苗技术的研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 28(3): 257—263
- 梁志华, 1980. 台湾枪乌贼人工育苗的初步观察. 海洋渔业, 1: 12—13
- 董正之, 1988. 中国动物志 软体动物门 头足纲. 北京: 科学出版社, 23—26
- 董正之, 1991. 世界大洋经济头足类生物学. 济南: 山东科学技术出版社, 197—207
- 蒋霞敏, 唐锋, 罗江等, 2013. 拟目乌贼的胚胎发育. 水产学报, 37(5): 711—718
- 雷舒涵, 吴常文, 高天翔等, 2011. 金乌贼和曼氏无针乌贼胚胎发育及其盐度耐受能力的比较研究. 中国水产科学, 18(2): 350—359
- Boletzky S V, 2003. Biology of Early Life Stages in Cephalopod Molluscs. In: Advances in Marine Biology. Academic Press,

1) 李佳佳, 2008. 暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*) 早期发育阶段渗透压调节能力的研究. 南京: 南京师范大学硕士学位论文, 1—68

- 44: 143—203
- Minton J W, 2004. The pattern of growth in the early life cycle of individual *Sepia pharaonis*. *Marine and Freshwater Research*, 55: 415—422
- Minton J W, Walsh L S, Lee P G *et al*, 2001. First multi-generation culture of the tropical cuttlefish *Sepia pharaonis* Ehrenberg, 1831. *Aquaculture International*, 9: 375—392
- Nabhitabhata J, 1995. Mass culture of cephalopods in Thailand. *World Aquaculture*, 26: 25—29
- Nabhitabhata J, Nilaphat P, 1999. Life cycle of cultured pharaoh cuttlefish *Sepia pharaonis* Ehrenberg, 1831. *Phuket Marine Biological Center Special Publication*, 19(1): 25—40

SALINITY IMPACT ON EMBRYONIC DEVELOPMENT OF CUTTLEFISH *SEPIA LYCIDAS*

CHEN Dao-Hai^{1,2}, GUO Yong-Ping², WEN Jing^{1,2}, LIANG Han-Qing²

(1. Zhanjiang Normal University, Round Beibu Gulf Institute for the Protection and Utilization of Marine Animals in Medicine, Zhanjiang, 524048; 2. Zhanjiang Normal University, College of Life Science and Technology, Zhanjiang, 524048)

Abstract To understand the salinity impact on embryonic development of cuttlefish *Sepia lycidas*, we carried out an experiment at water temperature (23 ± 0.5)°C in pH 7.41 in salinities of 13, 18, 23, 28, 33, 38 and 43. The results show that the most suitable salinity was 28, and the peak time of hatching was 28—30d. The embryonic development was divided into 16 stages: cleavage stage, blastula stage, gastrulae stage, organ development stage, embryo growth stage, and so on. The embryonic development failed at salinity 13, 18, 38 and 43. Therefore, the salinity is an important environmental factor for *S. lycidas* early development.

Key words *Sepia lycidas*; salinity; embryonic development