

团头鲂的胚胎发育与观察方法优化

于森^{1,2}, 方健², 薛亭², 陈凯², 李玲玉², 潘启华², 王艺舟², 邓羽², 陈天圣²

(1. 河南师范大学 水产学院; 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 河南 新乡 453007;

2. 华中农业大学 水产学院; 农业部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070)

摘要:通过人工繁殖获得团头鲂受精卵,在体视显微镜下对其胚胎和早期仔鱼发育过程进行了连续观察、拍照与测量.结果显示,团头鲂受精卵呈圆球形,具黏性,卵径 (1.18 ± 0.09) mm;在水温 (21 ± 1) °C条件下,团头鲂胚胎发育从受精到孵化历时39 h 10 min,经历了胚盘形成、卵裂期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期、器官形成期和出膜期7个发育阶段;初孵仔鱼体长 (3.44 ± 0.29) mm,出膜后第4 d仔鱼鳔完全充气,卵黄囊消失;观察时,受精卵至尾鳍出现期胚胎置0.7%生理盐水中,肌肉效应期和后面各时期的胚胎经4%多聚甲醛固定后置3%甲基纤维素中拍照可获得良好效果.该工作为研究团头鲂胚胎早期发育过程提供了实时和动态的图像资料,并为鱼类胚胎发育观察提供了基本技术参考.

关键词:团头鲂;胚胎发育;鲤科;显微观察;甲基纤维素

中图分类号:S917.4

文献标志码:A

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*),又名武昌鱼,属鲤形目(Cypriniformes),鲤科(Cyprinidae),鲃亚科(Cultrinae),鲂属(*Megalobrama*),主要分布在长江中下游大型湖泊中.团头鲂目前已在国内各渔区成功大规模养殖并成为我国第六大淡水养殖鱼类^[1].自1955年被易伯鲁教授^[2]定名和报道以来,有关团头鲂的研究,在基础生物学^[2-7]、遗传育种^[8-9]、营养与饲料^[10-11]、疾病与免疫^[12]、基因克隆与表达^[13-15]、全基因组测序等方面均取得了较大进展,但在基础研究中关于团头鲂胚胎发育的报道迄今仍限于经典的手绘模式图^[6,16],缺少实时和动态的显微图像.为进一步提供团头鲂胚胎和早期仔鱼发育详尽的动态图像等基础资料,本研究进行了团头鲂的人工繁殖、胚胎发育的显微观察和拍照,这些工作可为今后进一步开展团头鲂胚胎的显微操作、鱼苗培育以及其他鱼类胚胎发育观察等提供参考依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料及人工繁殖方法

团头鲂亲鱼由湖北鄂州团头鲂原种场提供,于繁育季节挑选健康雌性和雄性亲鱼各3尾.雌鱼胸腔注射促黄体素释放激素A2(LHRH-A2) $3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,9 h效应期后雌鱼再注射绒毛膜促性腺激素(HCG) $300 \text{IU} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和马来酸地欧酮 $3 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,雄鱼减半注射,分别置养殖桶中暂养.3种催产剂均购自宁波市三生药业有限公司.6~8 h效应期后,分别捞取雌、雄鱼挤出成熟卵子和精子,加入0.7%生理盐水后搅拌使之受精,将刚受精卵置于培养皿中孵化,水温控制在 (21 ± 1) °C.

1.2 胚胎显微观察与拍照方法

由于团头鲂胚胎具黏性,拍照前先用平板轻推使胚胎与皿分离,吸出胚胎用0.7%生理盐水洗去杂质,再

收稿日期:2017-02-11;修回日期:2017-11-20.

基金项目:国家重点基础研究计划(2013CB967700);华中农业大学自主科技创新基金(2013RC014);河南省科技厅科技计划项目(102300410104);河南师范大学青年科学基金(2013qk15);河南省水产养殖省级重点学科资助项目.

作者简介:于森(1981-),女,安徽砀山人,河南师范大学副教授,博士,研究方向为水产动物发育生物学,E-mail:miaoyu@htu.edu.cn.

通信作者:陈天圣,E-mail:tiansheng.chen@mail.hzau.edu.cn.

置生理盐水中拍照;观察肌肉效应期及其后各发育期胚胎时,为避免胚体运动影响观察和获得最佳拍照效果,特设置3种胚胎处理方式以进行比较:a.将胚胎置于3%甲基纤维素(国药沪试,上海)中拍照;b.将胚胎用4%多聚甲醛(Paraformaldehyde, PFA)(谷歌生物,武汉)固定后,剥去卵膜,置生理盐水中拍照;c.将胚胎用4% PFA 固定、除去卵膜后置3%甲基纤维素中拍照.卵径与初孵仔鱼数据测量均在活体进行,其中仔鱼用MS-222(Sigma,美国)麻醉.每次观察胚胎数不少于30颗,当其中60%以上达到某发育阶段时,记为该发育阶段的起始时间^[16].在体视显微镜(LEICA DFC550,德国)下对受精卵发育进行连续观察与拍照,使用Leica Application Suite软件进行长度测量,胚胎发育时程参照文献^[16].

2 结果与分析

2.1 团头鲂胚胎发育过程

团头鲂的成熟卵呈浅绿色,卵质均匀,为沉性卵.受精卵吸水后膨胀,具黏性.在水温(21±1)℃条件下,团头鲂胚胎孵化出膜历时39 h 10 min,经历胚盘期、卵裂期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期、器官形成期阶段,之后破膜而出并进行胚后发育,孵化率为75.39%.胚胎发育各时期的发育特征如下.

受精卵与胚盘阶段:受精卵近圆球形,卵径(1.18±0.09) mm(见图1a),吸水膨胀后达到(1.37±0.10) mm.受精后15~30 min,植物极与动物极分化,原生质向动物极流动,并逐渐隆起形成胚盘,其中胚盘呈白色,卵黄呈淡黄色(图1b).

卵裂阶段:受精后30 min,胚盘发生第1次卵裂,胚盘细胞分裂为两个大小相似的分裂球,进入2细胞期(图1c);随后细胞继续发生分裂,分裂细胞数目按4、8、16、32、64成倍递增,分裂球体积也同时逐渐变小(图1d~g);此后分裂的细胞越来越多,进入多细胞期(图1h).

囊胚期阶段:细胞不断分裂,细胞数量成倍增加,细胞界限越来越模糊,由若干分裂细胞组成的囊胚层在动物极堆积并隆起,在囊胚早期尚未形成囊胚腔;随着细胞继续分裂,囊胚层继续增高,囊胚腔形成,为囊胚中期(图1i);之后囊胚层下降,囊胚细胞开始下包卵黄,进入囊胚晚期.

原肠胚期阶段:囊胚细胞向植物极下包约占整个胚体的1/2时,胚盘下包边缘受卵黄阻碍加厚呈帽沿状,形成胚环,进入原肠早期;随后胚盘继续下包,当下包至约2/3时,胚环一侧细胞集中增厚形成胚盾,胚盾下方的卵黄略向内凹,进入原肠中期(图1j);胚盘继续下包至约3/4时,胚盾延长,胚体雏形显现,进入原肠晚期.

神经胚期阶段:胚盘下包卵黄约占整个胚体的4/5,卵黄栓明显,神经板雏形出现,进入神经胚期阶段(图1k);随着细胞继续分裂发育,胚盘完全包住卵黄,神经板中线下凹,胚孔越来越小直至封闭,进入胚孔闭合期(图1l).

器官形成期阶段:胚体头部神经板向前微隆起,胚体中部开始出现肌节,为体节形成期(图1m);在脑泡两侧形成肾形凸起即眼原基,为眼基出现期;长椭圆形眼囊逐渐形成,为眼囊期(图1n);眼前方腹面出现圆形嗅板,为嗅板期(图1o);胚体后端出现膜状尾芽,眼囊逐渐变圆并开始内陷,为尾芽期;眼囊内陷成眼杯,尾芽继续发育延伸,后脑两侧出现长圆形小泡状听囊,为听囊期(图1p);眼杯进一步扩大,尾部边缘表皮外突形成鳍褶并离开卵黄,为尾鳍出现期(图1q);胚体肌节达22~24对,肌节开始收缩且频率逐渐加快,为肌肉效应期(图1r);眼杯处出现圆形透明晶体,肌节收缩进一步加快,为晶体出现期(图1s);心脏原基形成,呈管状,为心脏出现期;眼前下方有一对鼻窝出现,为鼻窝期;听囊中出现一对耳石,胚胎在卵膜内转动,为耳石期;管状心脏开始搏动,为心跳期(图1t).

出膜阶段:胚胎在卵膜内卷曲,胚体摆动加剧至破卵膜而出,为出膜期(图1u);此时鱼体全身无色素,体长(3.44±0.29) mm,卵黄囊长(2.37±0.08) mm.

胚后发育:眼球内侧出现黄褐色色素,胸鳍明显,为眼球色素出现期(图1v);之后眼球色素逐渐增多,淡红色血液在血管内循环流动,为循环期;泄殖窦后方出现少量色素,口微张开,仔鱼游泳能力增强,为体色素出现期;眼球色素增多呈黑褐色,卵黄囊被吸收仅剩狭长条形,出现囊状鳔,为鳔形成期(图1w);鳔膨大充气,直管状肠管形成,可主动摄食,为肠管形成期(图1x).

团头鲂胚胎发育分期和主要特征见表 1.

表 1 团头鲂胚胎发育过程

发育时期	发育时间	发育期主要特征	图序
受精卵 Fertilized eggs	0h00min	受精卵近圆球形, 卵径(1.18±0.09) mm	图 1a
1 细胞期 Blastodisc	0h30min	卵间隙明显扩大, 受精卵的动物极出现隆起胚盘	图 1b
2 细胞期 2-cell	0h55min	胚盘细胞纵裂, 分为 2 个细胞	图 1c
4 细胞期 4-cell	1h55min	2 个相等细胞分为 4 个细胞	图 1d
8 细胞期 8-cell	2h35min	分为 8 个相等的细胞, 排列成 2 列	图 1e
16 细胞期 16-cell	3h00min	分为 16 个相等的细胞, 排列成 4 列	图 1f
32 细胞期 32-cell	3h35min	分为 32 个相等的细胞, 排列成 4 列	图 1g
多细胞期 Morula	3h55min	胚盘处形成高高隆起的细胞团, 细胞分裂较多	图 1h
囊胚期 Blastula	5h40min	细胞间隔模糊, 囊胚凸起较高	图 1i
原肠胚期 Gastrula	10h00min	囊胚细胞下包卵黄并内卷	图 1j
神经胚期 Neurula	12h30min	胚胎背部形成神经板	图 1k
胚孔闭合期 Closure of blastopore	13h35min	胚盘完全包住卵黄, 胚孔闭合	图 1l
体节形成 Appearance of myomere	15h25min	胚体前段微隆起, 中部出现肌节	图 1m
眼囊期 Optic capsule stage	17h30min	胚体前出现 1 对眼囊	图 1n
嗅板期 Olfactory phase plate	18h35min	眼前方出现圆形嗅板	图 1o
听囊期 Auditory vesicle stage	20h45min	后脑两侧出现听囊	图 1p
尾鳍出现期 Rudiment of tail fin	22h30min	尾部伸长, 末端出现尾鳍褶	图 1q
肌肉效应期 Muscle functioning	23h00min	胚体肌节开始有节律收缩, 频率、幅度都较小	图 1r
晶体出现期 Crystal stage of eyes	24h40min	眼杯口出现圆形晶体, 肌节收缩进一步加快	图 1s
心跳期 Heart beating stage	31h50min	心脏开始搏动并逐渐加快	图 1t
出膜期 Hatching	39h10min	胚体摆动加剧至完全脱膜, 体无色素	图 1u
眼球色素出现期 Eyeball pigment	47h35min	眼球内侧出现黄褐色色素	图 1v
鳔形成期 Air bladder formation	110h15min	囊状鳔形成, 体色素增多, 卵黄囊呈狭长条形	图 1w
肠管形成期 Intestine appearance	132h20min	肠管形成, 鳔室充气, 卵黄囊吸收完毕	图 1x

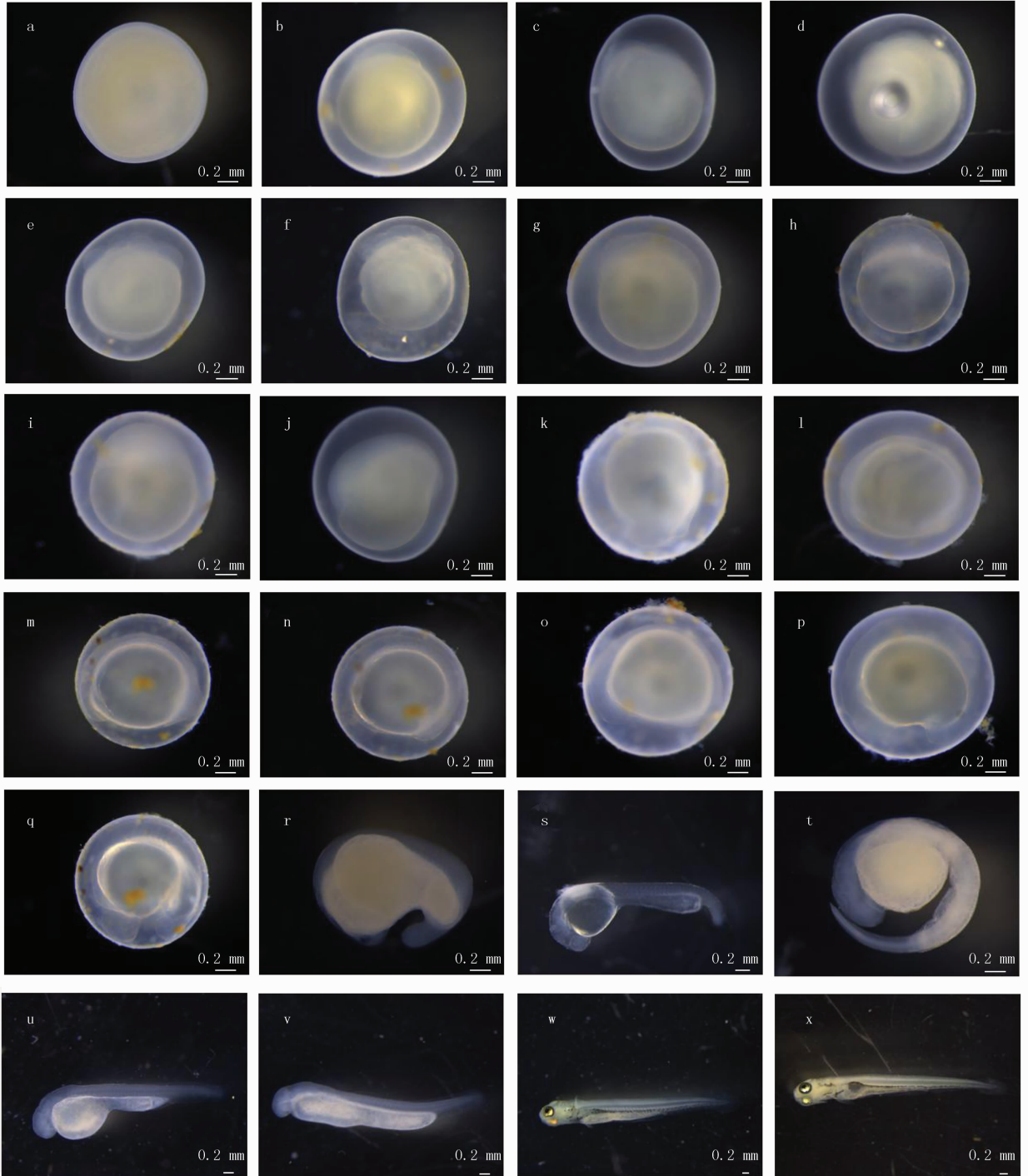
2.2 胚胎不同处理方式与拍照效果比较

在团头鲂胚胎发育肌肉效应期及其后各发育期, 胚胎的处理方式不同, 拍照效果亦不相同. 方式 a 胚胎未经 PFA 固定直接置于甲基纤维素中, 胚体仍会发生肌肉运动影响观察与拍照, 且卵膜会因渗透压出现皱缩(图 2a); 方式 b 胚胎经 4% PFA 固定及去膜后胚体不再运动、完整不易破碎且拍照效果较清晰, 但胚体颜色不自然(图 2b); 方式 c 胚胎拍照效果既完整清晰又呈现正常颜色, 整体效果较好(图 2c), 因此本研究选择方式 c 进行胚胎发育的观察与拍照.

3 讨 论

3.1 团头鲂催产剂的使用

目前我国广泛使用的催产剂主要有 3 种, 即鱼类脑垂体(简称垂体或 PG)、绒毛膜促性腺激素(简称绒毛膜激素或 HCG)、促黄体生成素释放激素类似物(简称类似物或 LRH-A), 此外, 还有一些提高催产效果的辅助剂, 如多巴胺排除剂(RES)、多巴胺拮抗物(DOM)^[17]. 虞鹏程等^[16]已报道对团头鲂可用鲤鱼脑垂体和 HCG 两种催产剂进行催产, 而本文中使用了 LHRH-A2, HCG 和 DOM3 种试剂, 亦取得了较好的催产效果, 表明其均可促进亲鱼排卵. 催产剂的效应时间主要受亲鱼性腺发育程度、水温的高低、催产剂的种类与剂量等的影响, 要根据实际情况及时观察亲鱼反应. 本实验中, 在亲鱼性腺成熟良好, 水温(21±1)℃、催产剂使用如上所述的情况下, 效应时间为 6~8 h.



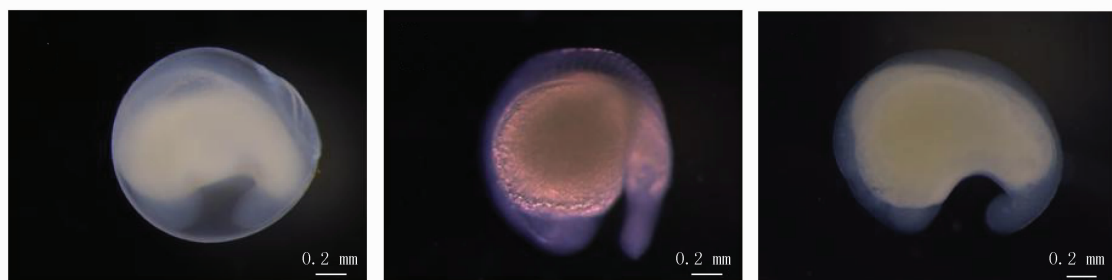
a. 受精卵 ; b. 1细胞期 ; c. 2细胞期 ; d. 4细胞期 ; e. 8细胞期 ; f. 16细胞期 ; g. 32细胞期 ; h. 多细胞期 ; i. 囊胚期 ;
j. 原肠胚期 ; k. 神经胚期 ; l. 胚孔闭合期 ; m. 体节形成期 ; n. 眼囊期 ; o. 嗅板期 ; p. 听囊期 ; q. 尾鳍出现期 ; r. 肌
肉效应期 ; s. 晶体出现期 ; t. 心跳期 ; u. 出膜期 ; v. 眼球色素出现期 ; w. 鳔形成期 ; x. 肠管形成期 .

图1 团头鲂胚胎发育分期

3.2 胚胎与仔鱼的收集与拍照

团头鲂受精卵为黏性卵,这为胚胎收集、观察与拍照工作带来了一定难度,本研究对实验方法进行了改进并取得了较好效果.该方法通过用一边缘较薄平板轻推分离培养皿与粘着卵粒,一次可分离多颗受精卵,

且卵膜不易破损同时膜内胚体保持自然完整状态;用生理盐水清洗可除去胚胎表面黏附的部分杂质,提高胚胎发育观察时的清晰度;后期胚胎经 4% PFA 固定可维持胚体基本形态且不易破碎;置 3% 甲基纤维素中拍照可呈现胚胎的原色并有利于预期定位;值得注意的是,由于胚胎接近透明,在黑色背景下拍照效果较好。



a. 未经 PFA 固定并置于甲基纤维素中;

b. PFA 固定后置于生理盐水中

c. PFA 固定后置于甲基纤维素中

图 2 胚胎不同处理方式及其拍照效果

3.3 胚胎发育与水温的关系

适宜的水温是鱼类胚胎发育和仔鱼培育的重要条件之一.一般水温过低会使孵化周期延长、孵化率降低、仔鱼生长发育缓慢,水温过高则可导致胚胎畸形率上升^[18-19].团头鲂在水温(21±1)℃条件下可正常发育,受精卵孵化时间为 39 h 10 min.同为鲂属的三角鲂在 22~24.5℃条件下,胚胎孵化历时 29 h^[7].本试验的团头鲂胚胎孵化时间较三角鲂长,可能是由于水温较低.但在相同温度下,团头鲂出膜和其他器官的发育速度比同为鲤科的鲢鱼和草鱼快^[6],这可能与物种本身的遗传因素有关.总的来说,这些现象与鲤形目鱼类多数属于温水性鱼类相符^[20-21].

3.4 团头鲂胚胎发育特点

团头鲂受精卵的分裂与许多淡水硬骨鱼类基本相同^[22],属于典型的盘状分裂.从总体上看,团头鲂胚胎发育经历了胚盘形成、卵裂期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期、器官发生期和孵化出膜等阶段,其发育过程符合硬骨鱼类胚胎发育的一般规律^[23].在不同发育阶段历时上我们的结果与虞鹏程等^[16]的报道有些出入,比如肠管形成期其结果历时 143.82 h(水温 20~22℃),比本研究结果推迟约 11 h,很可能是实际温度偏低所致.也注意到团头鲂不同发育阶段孵化历时不一,以器官形成期历时较长,表明完成这一发育阶段需要消耗较多能量,因此在生产中要为团头鲂胚胎和仔鱼发育提供充足的氧气,包括选用优良的水源、调节适宜的水流量及控制适当的放卵密度等,以助于团头鲂胚胎发育过程顺利完成.

综上所述,成功地使用 3 种催产剂诱导了团头鲂产卵,并用改进的胚胎收集和观察方法对团头鲂的胚胎发育及早期仔鱼进行了拍照,为团头鲂的胚胎发育阶段提供了证据,这些数据也能为其他鱼类胚胎的获取和观察提供帮助.

参 考 文 献

- [1] 李麒麟.团头鲂胚胎发育的转录组分析[D].长沙:湖南师范大学,2015.
- [2] 易伯鲁.关于鲂鱼(平胸鲂)种类的新资料[J].水生生物学集刊,1955(2):115-122.
- [3] 曹文宣.梁子湖的团头鲂和三角鲂[J].水生生物学集刊,1960(1):57-82.
- [4] 陆仁后,李燕鹃,许克圣.团头鲂染色体的研究[J].海洋与湖沼,1984(5):487-492.
- [5] 孟庆闻,唐宇平.团头鲂的器官发育[J].水产学报,1986,10(4):395-408.
- [6] 李军,张海明.团头鲂胚胎及仔稚鱼发育观察[J].水产科技情报,1993,20(4):158-163.
- [7] 万成炎,林永泰,黄道明.鲂胚胎的发育[J].湖泊科学,1999,11(1):70-76.
- [8] ZOU Shuming, LI Sifa, CAI Wanqi, et al. Establishment of fertile tetraploid population of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. Aquaculture, 2004, 238: 155-164.
- [9] 罗伟.团头鲂 EST-SSR 的开发及在育种中的应用[D].武汉:华中农业大学,2014.
- [10] LI Xiangfei, LIU Wenbin, JIANG Yangyang, et al. Effects of dietary protein and lipid levels in practical diets on growth performance and

- body composition of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerlings[J]. Aquaculture, 2010, 303: 65-70.
- [11] JIANG Ming, WU Fan, HUANG Feng, et al. Effects of dietary Zn on growth performance, antioxidant responses, and sperm motility of adult blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* [J]. Aquaculture, 2016, 464: 121-128.
- [12] CHEN Qingqing, LIU Wenbin, ZHOU Man, et al. Effects of berberine on the growth and immune performance in response to ammonia stress and high-fat dietary in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2016, 55: 165-172.
- [13] WAN Shiming, YI Shaokui, ZHONG Jia, et al. Dynamic mRNA and miRNA expression analysis in response to intermuscular bone development of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. Sci Rep, 2016. Doi: 10.1038/srep31050.
- [14] JAKOVLCIC I, LIU H, WANG W. Identification, origin and evidence for retained functionality of two I kappa B alpha paralogs in *Megalobrama amblycephala* [J]. Dev Comp Immunol, 2016, 62: 89-96.
- [15] ZHAN Fanbin, LIU Han, LAI Ruifang, et al. Molecular identification and functional characterisation of the interferon regulatory factor 1 in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2016, 54: 456-465.
- [16] 虞鹏程, 张丰旺. 鄱阳湖渔区的团头鲂胚胎发育观察[J]. 中国水产科学, 1998, 5(1): 103-108.
- [17] 张欣, 蒋艾青. 水产养殖概论[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [18] 周玉, 张俊辉, 杨振国, 等. 温度和光照对神仙鱼胚胎发育的影响[J]. 水产科学, 2001(3): 9-10.
- [19] 张廷廷, 陈超, 施兆鸿, 等. 温度对云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)胚胎发育和仔鱼活力的影响[J]. 渔业科学进展, 2016, 37(3): 28-33.
- [20] 王吉桥, 赵兴连. 鱼类增养殖学[M]. 大连: 大连理工大学出版社, 2000.
- [21] 股名称. 鱼类生态学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [22] 徐玲玲, 邵邻相, 谢炜, 等. 七彩神仙鱼胚胎及仔鱼发育研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2012, 40(1): 125-129.
- [23] 张天荫. 动物胚胎学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1996.

Embryonic development of *Megalobrama amblycephala* and optimization on the observation method

Yu Miao^{1,2}, Fang Jian², Xue Ting², Chen Kai²,
Li Lingyu², Pan Qihua², Wang Yizhou², Deng Yu², Chen Tiansheng²

(1. College of Fishery, Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation, Henan Normal University, Xixiang 453007, China; 2. College of Fisheries, Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: This study investigated the development process of embryos and early larval fish from *Megalobrama amblycephala* under stereoscopic microscope. The fertilized eggs were sticky and round with a diameter at (1.18 ± 0.09) mm. The embryonic development underwent seven stages as blastoderm formation, cleavage, blastula, gastrula, neurula, organ formation and hatching stage. Under incubation temperature of (21 ± 1) °C, the embryos take 39 h 10 min to hatch into larvae, which is near (3.44 ± 0.29) mm in length. The swim bladder of the larvae was inflated completely and the yolk sac disappeared in the fourth day. An optimized protocol was obtained to achieve the better observation; Embryos before muscle functioning stage were treated with 0.7% saline, or embryos after muscle functioning stage were fixed in 4% PFA and immersed into methylcellulose. Taken together, the present study provided dynamic images on the embryonic development of *M. amblycephala* and supplied a basic technical skill on observation of fish embryos.

Keywords: blunt-snout bream (*Megalobrama amblycephala*); embryonic development; Cyprinidae; microscope observation; methylcellulose

[责任编辑 王凤产]