

文章编号: 1000-0615(2008)03-0342-11

沙氏下鱚鱼卵的形态学及遗传学鉴别

卞晓东, 张秀梅, 高天翔, 肖永双

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:为了准确鉴别在南黄海海区(33°49'N, 122°10'E)采集的附着在海藻上的鱼卵种类, 利用光学显微镜、扫描电镜和遗传学方法开展了综合鉴别研究。在光学显微镜下: 卵呈微扁圆形, 卵径 1.95~2.38 mm, 粘着沉性; 卵黄间隙较窄, 卵黄囊呈乳白色, 无龟裂; 卵膜平滑, 在其表面有 5~7 根细长角质管状卵膜丝; 多油球数不定(4~145), 油球径 0.05~0.50 mm, 油球在卵黄囊中的位置随不同发育时期而不断发生变化; 胚体处在不同的发育阶段, 其特征符合颌针鱼目鱼卵的特征。在扫描电镜(SEM)下观察: 鱼卵受精孔明显, 位于动物极的卵膜丝之间, 外缘孔径 12.3 μm; 卵膜壁孔不明显, 在卵膜表面有大量颗粒状突起, 密度约为 50 ind·100 μm⁻²。遗传学分析结果显示: 鱼卵与沙氏下鱚鱼 mtDNA Cyt b 基因片段序列之间无差异, 遗传距离为 0, 而与其它颌针鱼目鱼类序列间差异达 18.72%~21.3%, 遗传距离在 21.9%~26.4% 之间。NJ 分子系统树的聚类结果也显示鱼卵与沙氏下鱚鱼序列聚为一支, 它们共享一个单倍型, 而与其它颌针鱼目鱼类序列分为两大支, 其亲缘关系较远。以上分析结果表明该鱼卵为沙氏下鱚鱼卵。

关键词:沙氏下鱚鱼; 鱼卵; 鉴别; 形态学; Cyt b 基因; 序列

中图分类号: S 917; Q 939

文献标识码: A

鱼卵阶段是鱼类生活史中的一个重要环节, 在其中存储着许多生态信息, 因而在环境影响评价、渔业资源解析以及鱼类的增养殖等研究领域扮演着重要的角色^[1]。在海洋营养动力学中, 鱼卵又是主要的生物能转换者, 是海洋食物链中的重要环节^[2]。因此, 对鱼卵进行准确的鉴别是进行渔业资源可持续利用研究与海洋生态系统科学研究的基础工作。

鱼类的分类工作在众多分类学者的共同努力下, 目前已鉴别的成鱼种类逾 27 000 种^[1]。鉴别鱼卵的传统方法主要利用光学显微镜来观察其形态特征。但在鱼类的生活史中, 鱼卵阶段发育时间短, 形态变化复杂, 可用于鉴别的形态特征较少, 只有极少数的鱼卵在发育后期阶段可以被鉴别到种, 许多鱼卵只能鉴别到科或属的水

平^[3]。近三十年来, 已有不少学者利用扫描电镜对鱼卵卵膜进行超显微结构观察^[4-8], 发现不同鱼类卵膜的超显微结构不尽相同, 卵膜的许多形态结构可以作为区分鱼类科或属的性状, 部分鱼卵可在受精孔(区)结构中可找到种的特征^[9-13]。但真正利用扫描电镜来鉴别鱼卵种类的报道很少, 可供参考的资料不足^[14]。近年来, 随着分子生物学技术的不断发展, 人们开始采用 mtDNA 序列分析的方法来解决鱼类和鱼卵种类鉴别的问题^[14-18]。

沙氏下鱚鱼(*Hyporhamphus sajori*, Temminck & Schlegel)隶属于颌针鱼目(Beloniformes)、鱚科(Hemiramphidae)、下鱚鱼属(*Hyporhamphus*), 是一种暖温性中小型鱼类。其常栖息于浅海、河口, 有时入淡水。主要分布在西北太平洋, 从中

收稿日期: 2007-06-22

资助项目: 国家重点基础研究发展计划(“九七三”计划)项目(2005CB422306); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA09Z418); 我国近海海洋综合调查与评价专项(908 专项)项目(908-01-ST02)

作者简介: 卞晓东(1981-), 男, 山东潍坊人, 博士研究生, 主要从事为鱼卵仔稚鱼研究。E-mail: dongdong811206@yahoo.com.cn

通讯作者: 张秀梅, Tel: 0532-82032076, E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn

国的长江口起,到黄海,渤海,日本海,日本太平洋沿岸一直延伸到俄罗斯的库页岛以及符拉迪沃斯托克港湾附近。在黄渤海海域该鱼于5月下旬到6月上旬产卵,为黄渤海鱼卵常见种类^[19]。本研究分别利用光学显微镜、扫描电镜以及遗传学方法对形态学初鉴为沙氏下鱚鱼的鱼卵进行了形态及遗传学特征的分析研究,以期为该种鱼卵的形态学及遗传学鉴别研究积累基础材料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

鱼卵及太平洋颌针鱼(*Strongylura anastomella*)成鱼为2006年5月22日采集于黄海南部海域(33°49'N,122°10'E)。鱼卵取自流刺网起网时带到船甲板的海藻团中,其种类单一、数量大(约5000粒),鱼卵之间通过韧性强的卵膜丝相互粘连,并缠绕在海藻上进行发育,在海藻团中还发现数条已经腐烂无法辨认的鱼类尸体;太平洋颌针鱼成鱼标本1尾,取自流刺网的渔获物。

沙氏下鱚鱼成鱼标本2尾,其为保存于中国海洋大学渔业资源室-30℃冰箱中标本。

1.2 实验方法

将卵块小心地从海藻上剥离,分别用三种不同的固定液对其进行固定,以进行鱼卵光学显微镜观察,鱼卵卵膜扫描电镜观察以及鱼卵的遗传学分析研究。

鱼卵光学显微镜观察的处理及实验方法
将采集的部分鱼卵用5%的甲醛溶液固定,带回实验室后,随机挑选鱼卵约100粒,在光学显微镜(Nikon E600)下进行形态学观测并拍照。

鱼卵卵膜扫描电镜观察的处理及实验方法
将采集的部分鱼卵先用0.1 mol·L⁻¹磷酸盐(PB)缓冲溶液(pH 7.4)冲洗干净,再用5%戊二醛固定液(用pH 7.4,0.1 mol·L⁻¹的PB溶液配置)进行初固定,置4℃避光保存。

扫描电镜观察前,取20粒鱼卵,在解剖镜下将其小心地分开,用PB溶液漂洗3次,1%锇酸后固定1h,酒精梯度脱水,临界点干燥仪干燥,离子溅射仪喷镀,用扫描电子显微镜(KYKY-2800B型)观察鱼卵细胞表面的亚显微形态结构,同时取卵膜破裂的卵观察卵黄囊表面结构。

用UTHSCSA ImageTool软件测量各结构的长度。

鱼卵的遗传学分析方法 将采集的部分鱼卵用95%酒精固定,带回实验室后,挑取不同卵膜丝类型的鱼卵3粒(“4+1型”,“5+1型”,“6+1型”各1粒),采用标准酚/氯仿法^[20]提取鱼卵总DNA,DNA模板置于4℃冰箱备用。

用于扩增Cyt b基因片段序列的1对引物为实验室通用引物L14734-Glu(5'-AACCACCGTT-GTTATTCAACT-3')和H15149-Cyt b(5'-CTCA-GAATGACATTTGTCCTCA-3')^[21]。

PCR反应体积为50 μL,其中10×PCR缓冲液5 μL,dNTPs(各2.5 mol·L⁻¹)4 μL,10 pmol·μL⁻¹的引物各1 μL,1.25 U Taq DNA酶(大连宝生物公司),模板DNA1 μL。

PCR循环参数为:95℃预变性3 min;94℃45 s,52℃45 s,72℃1 min,35个循环;最后72℃延伸10 min。

以上反应均用阴性对照来检查是否有DNA污染。取2 μL PCR产物,用1%琼脂糖凝胶电泳检测基因片段长度,PCR产物用胶回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)回收。用ABI Prism 377型自动测序仪进行双向测序。

将测序、比对好的鱼卵序列输入GenBank中进行BLAST搜索,得到8条颌针鱼目成鱼的同源序列,登录号分别为AY693508、AY693509、AY693514、AY693515、AF243901、AF243902、AF243861、AF231659(表1)。从中国海洋大学渔业资源室-30℃冰箱保存的标本中,取与鱼卵序列相似度最高的AY693509与AY693508序列对应的成鱼—沙氏下鱚鱼2尾,以及与鱼卵采自同一地点的太平洋颌针鱼成鱼1尾的标本肌肉组织,按鱼卵Cyt b基因片段序列扩增测序的方法提取总DNA,并扩增、测序。

将PCR扩增、回收、双向测序后的序列以及从GenBank中下载的序列,一起用DNASar软件包进行拼接、比对。用MEGA 3.1软件绘制基因片段序列的变异位点图;序列之间的遗传距离用Kimura双参数模型进行估算,系统进化分析采用Neighbor-joining(NJ)法,置信度估算采用Kimura双参数模型^[22],重复数为1000。

表 1 基于 Cyt b 基因片段序列比对分析所用序列的材料标号、拉丁名、英文名、中文名、样品来源

Tab. 1 List of the partial sequences of Cyt b gene with sample ID, scientific name, English name, Chinese name and origin of samples

材料标号 sample ID	拉丁名 scientific name	英文名 English name	中文名 Chinese name	样品来源 origin of samples
egg1	*	*	*	江苏吕泗
egg2	*	*	*	江苏吕泗
egg3	*	*	*	江苏吕泗
labH. s1	<i>Hyporhamphus sajori</i>	Japanese halfbeak	沙氏下鱚鱼	资源标本室
labH. s2	<i>Hyporhamphus sajori</i>	Japanese halfbeak	沙氏下鱚鱼	资源标本室
H. s1	<i>Hyporhamphus sajori</i>	Japanese halfbeak	沙氏下鱚鱼	AY693509/GenBank
H. s2	<i>Hyporhamphus sajori</i>	Japanese halfbeak	沙氏下鱚鱼	AY693508/GenBank
labS. a	<i>Strongylura anastomella</i>	Pacific needlefish	太平洋颌针鱼	江苏吕泗
S. a1	<i>Strongylura anastomella</i>	Pacific needlefish	太平洋颌针鱼	AY693514/GenBank
S. a2	<i>Strongylura anastomella</i>	Pacific needlefish	太平洋颌针鱼	AY693515/GenBank
S. l1	<i>Strongylura leiura</i>	Banded needlefish	台湾原尾颌针鱼	AF243902/GenBank
S. l2	<i>Strongylura leiura</i>	Banded needlefish	台湾原尾颌针鱼	AF243901/GenBank
T. a. m1	<i>Tylosurus acus melanotus</i>	Keel-jawed needlefish	叉尾颌针鱼	AF243861/GenBank
T. a. m2	<i>Tylosurus acus melanotus</i>	Keel-jawed needlefish	叉尾颌针鱼	AF231659/GenBank

注: * 表示未知

Notes: * stands for unknown

2 结果

2.1 光学显微镜观察结果

通过对 100 粒鱼卵的光学显微镜观测发现: 鱼卵透明, 呈微扁圆形(图版 I-1), 粘着沉性, 卵径为 1.95~2.38 mm, 平均为 2.18 mm, 以 2.00~2.33 mm 的出现频率最多(图 1); 卵黄囊无龟裂, 呈乳白色, 卵黄囊径为 1.00~2.30 mm, 平均为 1.90 mm, 卵黄较多, 卵黄间隙狭小(图版 I-2); 多油球, 数不定(7~145 个, 平均 28 个), 油径变化大, 为 0.05~0.50 mm, 在卵黄囊后位聚集分布(图版 I-4), 且随着胚胎发育, 其位置也会发生很大的变化(图版 I-1~5); 卵膜较厚并具有较强的韧性, 其上着生有 5~7 根细长的角质管状卵膜丝(图版 I-3), 卵藉此细丝彼此缠绕在一起并缠绕在其它物体或海藻上进行发育; 卵膜丝有明显的起讫点, 多为一端附着 4 根, 另一端附着 1 根的“4+1 型”, 其占观测鱼卵总数的 56%, 此

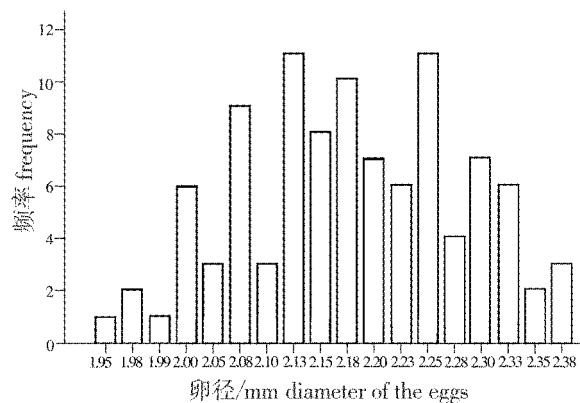


图 1 卵子卵径频数分布图(n=100)

Fig. 1 The frequency of diameter in the eggs(n=100)

外一端附着 5 根, 另一端附着 1 根的“5+1 型”占观测鱼卵总数的 33%, 一端附着 6 根, 另一端附着 1 根的“6+1 型”占观测鱼卵总数的 11%。卵的卵裂和其它硬骨鱼类相同, 均属盘状分裂性, 观察到的胚体处在不同的发育阶段(未发育卵占 11%, 细胞分裂期占 7%, 囊胚期占 24%, 原肠期

占 17%, 胚胎期占 38%, 孵化期占 0%), 当胚盘包卵 3/4 时(占观测鱼卵总数的 15%), 整个胚体即完全成形, 尾鳍和胸鳍等鳍膜均已出现(图版 I-4~6)。

2.2 扫描电镜观察结果

在扫描电镜下卵的受精孔明显, 位于动物极的卵膜丝之间(图版 II-2), 受精孔呈漏斗状(图版 II-3), 由受精孔前庭与精孔管组成, 前庭上口缘直径为 12.3 μm , 下口缘为 7.3 μm , 其底部中央为精孔管; 卵膜上的微孔不明显(图版 II-5~7); 但在卵膜表面有大量较规则的颗粒状突起(图版 II-4), 密度约为 50 ind \cdot 100 μm^{-2} , 直径在 1.95~2.50 μm 之间; 卵膜表面还生有细长管状角质细丝, 在动物极端着生 4~6 根(图版 II-1), 其基部较粗, 有明显的起迄点, 基部断裂面外管径为 34.0 μm , 且卵膜丝管与卵内环境是相通的(图版 II-10); 通过对卵膜破裂卵的卵黄囊表面观察发现, 其存在规整的颗粒状结构(图版 II-8)。

2.3 遗传学鉴别研究结果

用 DNASTAR 软件包将经 PCR 扩增、回收、双向测序后的序列以及从 GenBank 中下载的序列进行拼接、比对后得到分析用 14 条 235 bp 的同源序列(表 1)。

Cyt *b* 基因片段序列比较 从鱼卵与颌针鱼目鱼类 Cyt *b* 基因片段序列碱基变异位点图(图 2)看出: 鱼卵序列之间, 以及鱼卵与沙氏下鱚

鱼序列之间碱基无差异; 鱼卵与太平洋颌针鱼基因片段序列 S. a1、S. a2、labS. a 之间分别出现 48、49、49 个碱基差异, 差异率在 20.42%~20.85% 之间; 鱼卵与台湾原尾颌针鱼(*Strongylura leiura*) 基因序列片段 S. l1、S. l2 之间分别出现 44 个碱基差异, 差异率为 18.72%; 鱼卵与叉尾颌针鱼(*Tylosurus acus melanotus*) 基因序列片段 T. a. m1、T. a. m2 之间分别出现 50、48 个碱基差异, 差异率在 20.43%~21.3% 之间。

Cyt *b* 基因片段序列之间的遗传距离 从采用 Kimura 双参数模型估算的鱼卵与颌针鱼目鱼类基因片段序列间的遗传距离表 2, 可以看出: 鱼卵基因片段序列间以及鱼卵与沙氏下鱚鱼基因片段序列之间没有出现核苷酸替代(Nucleotide substitution), 其遗传距离为 0; 鱼卵与太平洋颌针鱼序列 S. a1、S. a2、labS. a 之间分别出现 48、49、49 个核苷酸替代, 转换数与颠换数比(Ts/Tv)分别为 29/19、30/19、30/19, 它们之间的遗传距离在 24.3%~24.9% 之间; 鱼卵与台湾原尾颌针鱼基因片段序列 S. l1、S. l2 之间分别出现 44 个碱基替代, Ts/Tv 均为 27/17, 它们之间的遗传距离均为 21.9%; 鱼卵与叉尾颌针鱼基因片段序列 T. a. m1、T. a. m2 之间分别出现 50、48 个碱基替代, Ts/Tv 分别为 40/10、38/10, 它们之间的遗传距离分别为 26.4% 和 25.0%。

Cyt *b* 基因片段序列的聚类分析结果 用

	11111	1111111111	1111111111	1111122222	22222222		
	1122233	4555666777	8889900011	1122233344	4556667778	8999900011	12222333
	2594703928	1039258127	0392815703	6925814736	9251473695	8145706925	81457013
egg1	TGTCGGTCGC	TTTCCGCTAT	CTTTCATGCA	TATTTTACCC	TCCTCCAGTC	CTTTACGTAT	CTTGTTCG
egg2
egg3
T. a. m2	AACA. ACTA.	CCA. . A. CGC	TCCA. CCC..	C. CAC. C. T.	.. TC. . G. CT	ACCC. TAC. C	T. AACCTA
T. a. m1	AACA. ACTA.	CCA. . A. CGC	TCCA. CCC..	CGCAC. C. TT	.. TC. . GACT	ACCC. TAC. C	T. A. CCTA
S. l2	AA. AAAC..	CCAATATAG.	.. C. TCCCT.	C. . GC. . A. .	CTT. . T. T. T	.. CCT. A. G.	AAAACA. C
S. l1	AA. AAAC..	CCAATATAG.	.. C. TCCCT.	C. . GC. . A. .	CTT. . T. T. T	.. CCT. A. G.	AAAACA. C
H. s2
H. s1
S. a1	AA. A. CCTA.	CCAA. AAAG.	... A. CCC. T	.. CACCCATT	. TTCTTGA. T	.. CCTTA. .	AAAACC. C
S. a2	AA. A. CCTAT	CCAA. AAAG.	... A. CCC. T	.. CACCCATT	. TTCTTGA. T	.. CCTTA. .	AAAACC. C
labH. s1
labH. s2
labS. a	AA. A. CCTAT	CCAA. AAAG.	... A. CCC. T	.. CACCCATT	. TTCTTGA. T	.. CCTTA. .	AAAACC. C

图 2 鱼卵与颌针鱼目鱼类 Cyt *b* 基因片段序列碱基变异位点图

Fig. 2 Variable sites of partial sequences of Cyt *b* gene in fish eggs and the other species of Beloniformes

左边为材料标号, 详见表 1; 上方数字表示相应碱基的位置, 圆点表示与 egg1 有相同的碱基组成

The IDs of samples are shown on the left, site numbers correspond to Tab. 1; Numbers (vertical) are the variation positions among these sequences. A dot indicates identity in nucleotide to the sequence of egg1

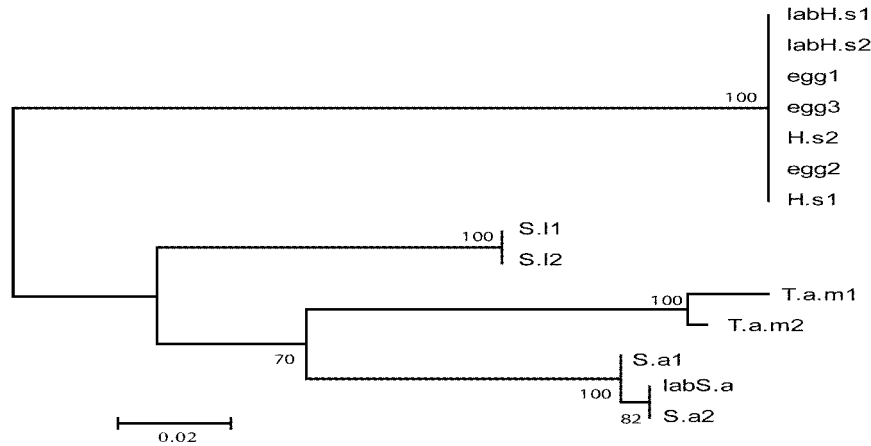


图3 利用 Kimura 双参数法构建的鱼卵与颌针鱼目鱼类 Cyt *b* 基因片段序列 NJ 分子系统发生树(材料标号相关序列见表 1;树上数值为 1000 次重复运算得到的大于 50%的支持率)
Fig.3 Neighbor-joining molecular phylogenetic tree using Kimura 2-parameter based on the sequences of Cyt *b* gene of the eggs and homologous sequences of the species of Beloniformes(The IDs of samples are indicated in the Tab. 1;Numbers above the branches indicate bootstrap values with 1000 which supported by more than 50%. Scale bar represents an interval of genetic distance of $D = 0.02$.)

表 2 鱼卵与颌针鱼目鱼类 Cyt *b* 基因片段序列 Kimura 双参数遗传距离(下三角),和转换数/颠换数(上三角)
Tab. 2 The Kimura 2-parameter genetic distances (below diagonal) and number of transitions/transversions (above diagonal) of Cyt *b* gene between fish eggs and the other species of Beloniformes

材料标号 sample ID	egg1	egg2	egg3	T. a. m2	T. a. m1	S. l2	S. l1	H. s2	H. s1	S. a1	S. a2	labH. s1	labH. s2	labs. a
egg1		0/0	0/0	38/10	40/10	27/17	27/17	0/0	0/0	29/19	30/19	0/0	0/0	30/19
egg2	0.000		0/0	38/10	40/10	27/17	27/17	0/0	0/0	29/19	30/19	0/0	0/0	30/19
egg3	0.000	0.000		38/10	40/10	27/17	27/17	0/0	0/0	29/19	30/19	0/0	0/0	30/19
T. a. m2	0.250	0.250	0.250		4/0	24/13	24/13	38/10	38/10	17/11	18/11	38/10	38/10	18/11
T. a. m1	0.264	0.264	0.264	0.017		27/13	27/13	40/10	40/10	27/11	18/11	40/10	40/10	18/11
S. l2	0.219	0.219	0.219	0.180	0.197		0/0	27/17	27/17	17/8	18/8	27/17	27/17	18/8
S. l1	0.219	0.219	0.219	0.180	0.197	0.000		27/17	27/17	17/8	18/8	27/17	27/17	18/8
H. s2	0.000	0.000	0.000	0.250	0.264	0.219	0.219		0/0	29/19	30/19	0/0	0/0	30/19
H. s1	0.000	0.000	0.000	0.250	0.264	0.219	0.219	0.000		29/19	30/19	0/0	0/0	30/19
S. a1	0.243	0.243	0.243	0.131	0.131	0.116	0.116	0.243	0.243		1/0	29/19	29/19	1/0
S. a2	0.249	0.249	0.249	0.136	0.136	0.121	0.121	0.249	0.249	0.004		30/19	30/19	0/0
labH. s1	0.000	0.000	0.000	0.250	0.264	0.219	0.219	0.000	0.000	0.243	0.249		0/0	30/19
labH. s2	0.000	0.000	0.000	0.250	0.264	0.219	0.219	0.000	0.000	0.243	0.249	0.000		30/19
labs. a	0.249	0.249	0.249	0.136	0.136	0.121	0.121	0.249	0.249	0.004	0.000	0.249	0.249	

Kimura 双参数模型构建鱼卵与颌针鱼目鱼类 Cyt *b* 基因片段序列 NJ 分子系统树(图 3)。树上的数字为 1000 次 Bootstrap^[23] 统计分析后的自引导值,表示对该支的支持百分比。NJ 分子系统树明显聚分为两大支,3 粒鱼卵与实验室保存的 2 条沙氏下鱚鱼标本以及登录号为 AY693509

与 AY693508 的沙氏下鱚鱼序列聚为第一大支,自引导值为 100;鱼卵与颌针鱼科鱼类分聚为两大支。其中颌针鱼科鱼类中太平洋颌针鱼与叉尾颌针鱼聚在一起后又与台湾原尾颌针鱼分别聚为两支,各自的自引导值均在 71 以上。

3 讨论

3.1 通过形态学特征初鉴鱼卵为沙氏下鱚鱼卵

经形态学观察,本实验采集的鱼卵与同期在该调查海域产附着性鱼卵的种类,如颌针鱼目(Beloniformes)颌针鱼科(Belonidae)的扁颌针鱼^[24](*Ablennes anastomella*)、鱚科(Hemirhamphidae)的沙氏下鱚鱼^[19]、飞鱼科(Exocoetidae)的燕鳐鱼^[19, 26](*Cypselurus agoo*),以及鲀形目(Tetraodontiformes)鲀科(Tetraodontidae)鱼类^[26-27]的卵相似。鱼卵卵径大,在1.95~2.38 mm之间,而鲀科鱼类所产卵的卵径较小,一般在0.85~1.1 mm之间。鱼卵具有厚而坚韧的卵膜,大而丰富的卵黄以及细长角质卵膜丝,这在其它硬骨鱼类的卵子中很少见到,符合颌针鱼目鱼类鱼卵的特征。鱼卵卵膜表面动物极端着生4~6根卵膜丝,在相反方向有1根卵膜丝,与扁颌针鱼及沙氏下鱚鱼相似,而燕鳐鱼则具有30~40根。鱼卵多油球、数不定,与沙氏下鱚鱼卵相似而扁颌针鱼卵不含油球。且同一海藻团上采集到的鱼卵处在不同的发育期,并发现数条已经腐烂无法辨认的鱼类尸体,与陈大刚^[19]描述的沙氏下鱚鱼为分批产卵类型,产卵后即死亡的特征相吻合。由此根据鱼卵形态及生态特征初步推断其为沙氏下鱚鱼卵。此外鱼卵卵膜丝具有明显的起讫点,卵膜丝管与卵内环境是相通的,与大银鱼^[28](*Protosalanx hyalocranius*)不同。鱼卵盘状分裂性,当胚盘包卵3/4时,整个胚体大部分组织器官均已形成,比同期产浮性鱼卵的硬骨鱼类如牙鲆^[25]、条鲆^[25]等器官发育早。

综上得出该种鱼卵典型的形态学鉴别特征为:鱼卵透明,粘着沉性,呈微扁圆形;卵膜厚并具有较强的韧性,表面生有5~7根细长的管状胶质卵膜丝(“4+1型”,“5+1型”,“6+1型”);卵径1.95~2.38 mm [(2.18 ± 0.03) mm, n = 100];卵黄丰富,卵黄囊无龟裂,呈乳白色,卵黄囊径1.00~2.30 mm [(1.90 ± 0.03) mm, n = 100]卵黄间隙狭小;多油球数不定,一般7~145个[(28 ± 2) mm, n = 100],多数在15~40个之间,油球径0.05~0.50 mm [(0.15 ± 0.03) mm, n = 100],其在卵黄囊中的位置随胚胎发育不断发生变化等。

3.2 扫描电镜下鱼卵的超微结构特征

鱼卵卵膜的受精孔是鱼类在发育早期建立的生殖隔离机制,防止与不同种杂交,具有种的特异性^[6]。在SEM下观察,鱼卵受精孔明显,为浅凹陷、长孔道类型^[29],与黑鲷^[30](*Sparus macrocephalus*) (深凹陷、短孔道类型)、红鳍东方鲀^[30](*Takifugu rubripes*) (无凹陷、长孔道)、牙鲆^[30](*Paralichthys olivaceus*) (浅凹陷、短孔道)及暗纹东方鲀^[31](*Fugu obscurus*) (无凹陷、长孔道)的受精孔存在一定差异;精孔管外径7.3 μm,比红鳍东方鲀(8.24~8.26 μm)小,比暗纹东方鲀(6.73 μm)、牙鲆(5.18~5.21 μm)、黑鲷(3.90~4.10 μm)大;精孔管内壁与Hosokawa^[10]研究的青鳞(*Oryzias latipes*),张筱兰等^[30]研究的三种海产鱼类黑鲷、牙鲆和红鳍东方鲀及卢敏德等^[31]研究的暗纹东方鲀相似,应属于螺旋形。而黄永松^[32]报道的尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)卵精孔管内壁为阶梯状;Szöllösi和Billar^[33]、Riehl^[11]、Kobayashi和Yamamoto^[5]、Hart和Dovovan^[7]分别报道了几种鲑鱼卵精孔管为肋条状内壁。同时,SEM下观察发现,鱼卵卵膜上的微孔不明显,与许多海产鱼类如:点带石斑鱼^[8](*Epinephelus malabaricus*)、斜带石斑鱼^[8](*Epinephelus coioides*)、鲮鱼^[8](*Mugil cephalus*)、美国红鱼^[8](*Sciaenops ocellatus*)、黑鲷、牙鲆、红鳍东方鲀、暗纹东方鲀等存在明显的差异。大麻哈鱼^[7](*Oncorhynchus keta*)的卵膜突起遍布卵膜孔前庭和壳膜外表面,常有狭窄浓缩脊状物与邻近突起互相连接。而本研究中鱼卵卵膜表面有大量较规则的颗粒状突起,遍布卵膜表面,在前庭区不存在,且各突起之间没有明显的连接,其为该种鱼卵表面的特异性结构,可以作为该种鱼卵种类鉴别的重要依据。

3.3 遗传学分析确定鱼卵为沙氏下鱚鱼卵

鱼类mtDNA由于其结构简单,严格的母系遗传^[34];即便是在最初的发育阶段在鱼卵中也有大量的mtDNA的拷贝数^[18],因此,在鉴别鱼卵种类时首选mtDNA序列作为鉴别的分子标记。而mtDNA上的Cyt b基因既有足够的变异位点用于研究种群水平,又足够保守。一个较小的基因片段可包含从种内到种间乃至到科间的进化遗传信息,在系统进化和分类研究中具有很好的

适用性^[35-36]。在本研究中用 Cyt *b* 基因片段序列来作为鱼卵遗传学鉴别研究的分子标记。通过对 235 bp Cyt *b* 基因片段的同源序列比对分析,结果显示:不同卵膜丝类型的鱼卵之间以及鱼卵与沙氏下鱚鱼基因片段序列之间无变异位点出现,用 Kimura 双参数法计算遗传距离为 0,而与其它颌针鱼目鱼类序列间的差异率在 18.72%~21.3% 之间,遗传距离在 21.9%~26.4% 之间。据其他一些动物的 Cyt *b* 基因序列分析的结果,种内个体间的平均遗传距离一般在 0~4.06% 之间,差异超过 6% 的个体已有明显的亚种或种的分化,10% 以上时就具有种的差异^[37-40]。鱼卵与沙氏下鱚鱼序列之间遗传距离为 0,而与其它颌针鱼目鱼类序列之间的遗传距离远远超出一般种内和亚种间的变异范围。通过 Kimura 双参数模型构建的 NJ 分子系统发生树聚类结果也显示鱼卵与沙氏下鱚鱼序列聚为一支,亲缘关系极近,而与其它颌针鱼目鱼类序列聚为两支,亲缘关系较远。经遗传学综合分析认为鱼卵为沙氏下鱚鱼卵。

我国已知海洋鱼类已超过 3000 种,约占世界海洋鱼类种类的 1/4,但是有资料可查的鱼卵与仔稚鱼种类不超过 300 种。考虑到从自然界中所取得样品的复杂度以及有限的参考资料,仅通过形态学观察(光学显微镜观测、扫描电镜观测)的结果往往不能对鱼卵进行准确的鉴别,而附加以遗传学方法,通过基因序列比对能够大大提高鱼卵鉴别的准确性。近年来随着分子生物学技术的不断进步,DNA 序列数据库也呈几何级数增长,Tautz 等^[41-42]首先提出要用 DNA 序列作为生物分类系统的主要平台(即 DNA Taxonomy)。随后,Hebert 等^[43-44]提出利用线粒体 DNA 的特定区段来做 DNA 条形编码的基础,期待给所有生物种进行编码,以达到物种鉴定分类的目的。目前,尽管国际上对此争论不少,但它操作的简便性和高效性将以我们无法想象的速度加快物种鉴定和进化历史研究的步伐,其已成为生物分类学中引人注目的新方向^[45-46]。随着越来越多的鱼类基因片段序列被测序,我们可以运用 GenBank 中丰富的资源,将 PCR 测序技术直接运用到鱼卵与仔稚鱼的准确鉴别中。

同时我们也注意到虽然遗传学方法和技术

手段日趋成熟,但需要建立庞大的 DNA 数据库来记录各种鱼类的基因片段序列,这需要花费大量的时间和财力。因此尽管目前形态学鉴别方法还存在种种困难,但其还是鉴别鱼卵的基本手段,且在进行遗传学鉴别前,以形态学鉴别的初步结果为前提来选择鱼卵所属的科或属的成鱼来进行比对分析,可提高鉴别的准确性和工作效率。

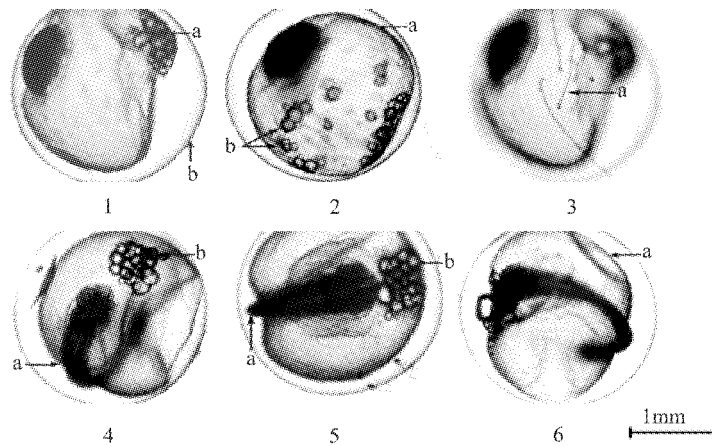
本文电镜图片由中国科学院海洋研究所刘伟老师协助拍摄,台湾中央研究院生物多样性研究中心邵广昭研究员为本研究提供了重要的参考资料,在此谨表谢意!

参考文献:

- [1] Shao K T, Yang J S, Chen K C, *et al.* An identification guide of marine fish eggs from Taiwan [M]. Taiwan: Institute of Zoology, Academia Sinica, 2001: 1-14.
- [2] 万瑞景, 孙 珊. 黄、东海生态系统中鱼卵、仔稚幼鱼种类组成与数量分布[J]. 动物学报, 2006, 52(1): 28-44.
- [3] Matarese A C, Sandknop E M. Identification of fish eggs. // Ahlstrom E H, ed. Ontogeny and systematics of fishes [M]. California: Spec Publ Am Soc Ichthyol Herpetol, 1984: 27-30.
- [4] Szöllösi D, Billard R. The micropyle of trout eggs and its reaction to different incubation media [J]. Journal of Microscopy, 1974, 21: 55-62.
- [5] Kobayashi W, Yamamoto T. Fine structure of micropylar apparatus of the chum salmon egg, with a discussion of the mechanism for blocking polyspermy [J]. J Exp Zool, 1981, 217: 265-275.
- [6] Gary N C, Wallis H, Clark J R. Fine structure of the envelope and micropyles in the eggs of the white sturgeon, *Asiipenser trasmontanus* Richardson [J]. Development Growth and Differentiation, 1982, 24: 341-352.
- [7] Hart N H, Donovan M. Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg of *Brachydanio* [J]. J Exp Zool, 1983, 227: 277-296.
- [8] Chen K C, Shao K T, Yang J S. Using micropylar ultrastructure for species identification and

- phylogenetic inference among four species of Sparidae[J]. *Journal of Fish Biology*, 1999, 55: 288-300.
- [9] Kuchnow K P, Scott J R. Ultrastructure of the chorion and its micropyle apparatus in the mature *Fundulus heteroclitus* (Walbaum) ovum [J]. *Journal of Fish Biology*, 1977, 10: 197-201.
- [10] Hosokawa K. Scanning electron microscopic observations of the micropyle in *Oryzias latipes* [J]. *Jap J Ichthyol*, 1979, 26: 94-99.
- [11] Riehl R. Micropyle of some salmonids and coregonids [J]. *Environ Biol Fish*, 1980, 5: 59-66.
- [12] Riehl R. Surface morphology and micropyle as a tool for identifying fish eggs by scanning electron microscopy[J]. *European Microscopy and Analysis*, 1993, 23: 7-9.
- [13] Riehl R, Kokoscha A. An unique surface pattern and micropylar apparatus in the eggs of *Luciocephalus* sp. (Perciformes, Luciocephalidae)[J]. *Journal of Fish Biology*, 1993, 43: 617-620.
- [14] Shao K T, Chen K C, Wu J H. Identification of marine fish eggs in Taiwan using light microscope, scanning electric microscope and mtDNA sequencing [J]. *Mar Fresh Res*, 2002, 53: 355-365.
- [15] Rocha-Olivares A. Multiplex haplotype-specific PCR; a new approach for species identification of the early life stages of rockfishes of the species-rich genus *Sebastes* Cuvier[J]. *Exp Mar Biol Ecol*, 1998, 231: 279-290.
- [16] Perez J, Alvarez P, Martinez J L, et al. Genetic identification of hake and megrim eggs in formaldehyde-fixed plankton samples[J]. *J Mar Sci*, 2005, 62: 908-914.
- [17] Pegg G G, Sinclair B, Briskey L, et al. mtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef Australia [J]. *Scientia Marina*, 2006, 70(S2): 7-12.
- [18] García-Vázquez E, Álvarez P, Lopes P, et al. PCR-SSCP of the 16S rRNA gene, a simple methodology for species identification of fish eggs and larvae[J]. *Scientia Marina*, 2006, 70(S2): 13-21.
- [19] 陈大刚. 黄渤海渔业生态学[M]. 北京: 海洋出版社, 1991: 224-230.
- [20] Sambrook J, Russell D W. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edition[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 461-471.
- [21] 张俊丽, 高天翔, 韩志强, 等. 3种白鲢线粒体细胞色素 b 和 16S rRNA 基因片段序列分析[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(1): 8-14.
- [22] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform*, 2004, 5: 150-163.
- [23] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. *Evolution*, 1985, 39(4): 783-791.
- [24] 赵传细, 姜言伟. 渤海颚针鱼的习性和早期发育形态的研究[J]. *海洋水产研究*, 1983, 5: 63-71.
- [25] 张孝威, 何桂芬, 沙学绅. 牙鲆和条鳎卵子及仔、稚鱼的形态观察[J]. *海洋与湖沼*, 1965, 7(2): 158-174.
- [26] 万瑞景, 姜言伟. 黄、渤海硬骨鱼类鱼卵与仔稚鱼种类组成及其生物学特征[J]. *上海水产大学学报*, 2000, 9(4): 290-297.
- [27] 张仁斋, 陆惠芬, 赵传细, 等. 中国近海鱼卵与仔鱼[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 188-196.
- [28] 戈志强, 王永玲. 大银鱼卵膜表面的扫描电镜观察[J]. *上海水产大学学报*, 1998, 7(4): 348-350.
- [29] Riehl R, Götting K. Zu struction und vorkommen der mikropyle an eizellen und eiern von konchenfischen[J]. *Arch Hydrobiol*, 1974, 74: 393-402.
- [30] 张筱兰, 郭恩棉, 王昭萍, 等. 3种海产经济鱼类成熟卵膜形态的比较研究[J]. *海洋科学*, 1999, 6: 48-51.
- [31] 卢敏德, 葛志亮, 倪建国, 等. 暗纹东方鲀精、卵超微结构及精子入卵早期电镜观察[J]. *中国水产科学*, 1999, 6(2): 5-8.
- [32] 黄永松. 尼罗罗非鱼成熟卵结构及精子入卵早期的电镜观察[J]. *动物学报*, 1990, 36(3): 227-230.
- [33] Szöllösi D, Billard R. The micropyle of trout eggs and its reaction to different incubation media[J]. *Journal of Microscopy*, 1974, 21: 55-62.
- [34] 肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化[J]. *水生生物学报*, 2000, 24(4): 384-391.
- [35] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, et al.

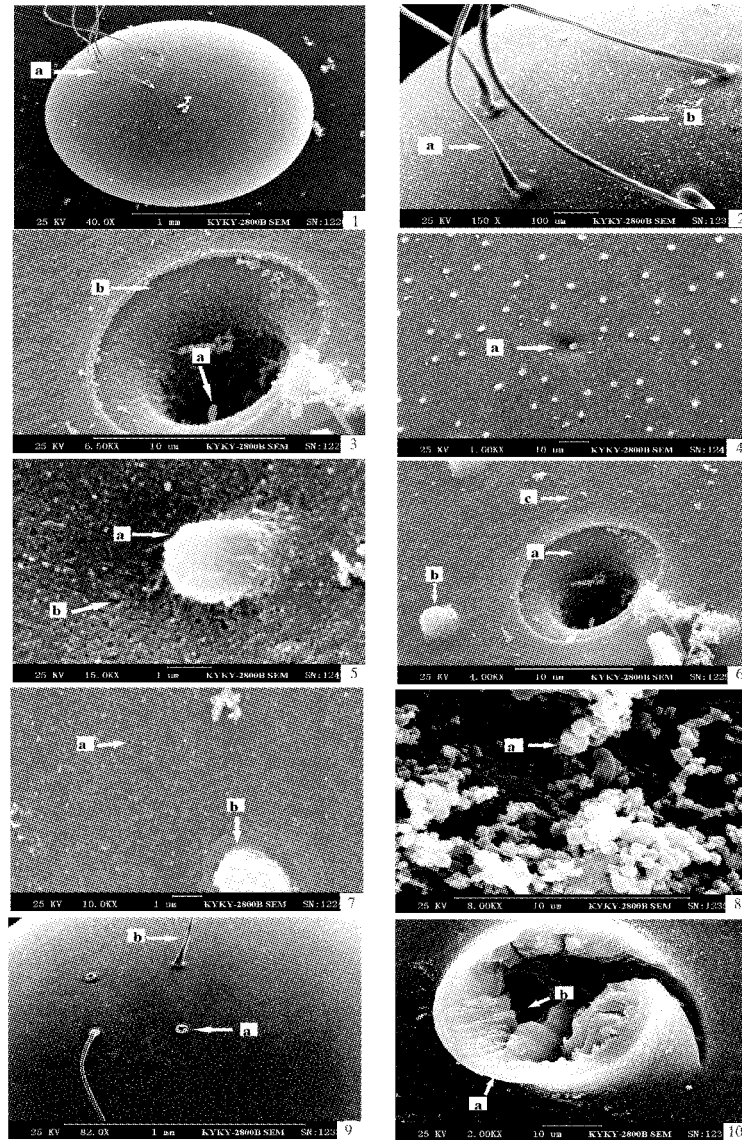
- Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals; Amplification and sequencing with conserved primers[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 6190–6200.
- [36] Irwin D M, Kocher T D, Wilson A C. Evolution of cytochrome b gene of mammals[J]. *J Mol Evol*, 1991, 32: 128–144.
- [37] 王义权, 周开亚, 徐璐珊, 等. 中药材乌梢蛇及其混淆品的 DNA 序列分析鉴别研究[J]. *药学学报*, 1999, 34(1): 67–71.
- [38] 王义权, 许群山, 彭宜宪, 等. 通过 Cyt b 基因同源序列比较评估厦门文昌鱼的分类学地位[J]. *动物学报*, 2004, 50(2): 202–208.
- [39] 杨学干, 王义权, 周开亚, 等. 从细胞色素 b 基因序列探讨我国林蛙属动物的系统发生关系[J]. *动物学研究*, 2001, 22(5): 345–350.
- [40] 曹祥荣, 束峰珏, 张锡然, 等. 毛冠鹿 3 种鹿属动物的线粒体细胞色素 b 的系统进化分析[J]. *动物学报*, 2002, 48(1): 44–49.
- [41] Tautz D, Arctander P, Minelli A, *et al.* DNA points the way ahead in taxonomy[J]. *Nature*, 2002, 418: 479.
- [42] Tautz D, Arctander P, Minelli A, *et al.* A plea for DNA taxonomy[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2003, 2: 70–74.
- [43] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. *Proc R Soc Lond B (Suppl)*, 2003, 270: S96–S99.
- [44] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc R Soc Lond B*, 2003, 270: 313–321.
- [45] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, *et al.* DNA barcoding Australia's fish species[J]. *Phil Trans R Soc B*, 2005, 1716: 1–11.
- [46] Schander C, Willassen E. What can biological barcoding do for marine biology? [J] *Marine Biology Research*, 2005, 1: 79–83.



图版 I Plate I

1~6: 沙氏下鱚鱼的卵(光学显微镜下)×40; 1~3: 囊胚期(1: a 油球, b 卵膜; 2: a 卵黄囊, b, 油球; 3: a 卵膜丝)×40; 4~6: 胚体发育期(4、5: a 胚体, b 油球; 6: a 被吸收的卵黄囊)×40

1–6: The eggs of Japanese halfbeak (under light microscope), Bar=1 mm×40; 1–3: Blastula stage (1: a, the oil globule; b, the egg envelope. 2: a, the yolk, b, the oil globule. 3: a, the egg-filaments), Bar=1 mm×40; 4–6: Developing of the embryo (4, 5: a, the embryo; b, the oil globule. 6: a, the absorbing of the yolk), Bar=1 mm×40



图版 II Plate II

1. 成熟的沙氏下鱈鱼卵:a 卵膜丝,Bar=1 mm×40; 2. 成熟卵膜表面:a 卵膜丝;b 受精孔,Bar=100 μm×150; 3. 成熟卵的受精孔:a 精孔管;b 受精孔前庭,Bar=10 μm×6500; 4. 成熟卵膜表面颗粒状突起:a 颗粒状突起,Bar=10 μm×1000; 5. 成熟卵膜表面颗粒状突起:a 颗粒状突起;b 卵膜表面微孔,Bar=1 μm×15000; 6. 成熟卵受精孔区卵膜表面:a 受精孔, b 颗粒状突起, c 卵膜表面微孔,Bar=10 μm×4000; 7. 成熟卵颗粒状突起区域卵膜表面微孔:a 卵膜表面微孔 b 颗粒状突起,Bar=1 μm×10000; 8. 卵黄囊表面颗粒状结构:a 卵黄囊表面颗粒状结构,Bar=10 μm×8000; 9. 成熟卵管状角质卵膜丝的断痕:a 卵膜丝断痕, b 卵膜丝,Bar=1 mm×82; 10. 成熟卵管状角质卵膜丝的断痕:a 断痕, b 中空的管,Bar=10 μm×2000

1. Mature egg of Japanese halfbeak. a, egg-filaments. Bar=1 mm×40. 2. Surface patterns of mature egg envelope. a, egg-filaments; b, micropyle. Bar=100 μm×150. 3. Micropyle of mature egg of Japanese halfbeak. a, micropylar cannal; b, micropylar vestibule. Bar=10 μm×6500. 4. Grain substances on the envelope. a, grain substances. Bar=10 μm×1000. 5. Grain substances on the envelope. a, grain substances; b, poles on the envelope. Bar=10 μm×15000. 6. Surface patterns of the micropylar region. a, micropole; b, grain substances; c, poles on the envelope. Bar=10 μm×4000. 7. Surface patterns of the region around the grain substances. a, poles on the envelope; b, grain substances. Bar=1 μm×10000. 8. Surface patterns of the yolk membrane. a, grain substances on the surface of the yolk. Bar=10 μm×8000. 9. Rupture mark of the cannular and keratose egg-filaments. a, egg-filaments; b, egg-filaments. Bar=1 mm×82. 10. Rupture mark of the cannular and keratose egg-filaments. a, Rupture mark; b, cannular space. Bar=10 μm×2000.

Morphological and genetic identification of Japanese halfbeak (*Hyporhamphus sajori*) eggs

BIAN Xiao-dong, ZHANG Xiu-mei, GAO Tian-xiang, XIAO Yong-shuang

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: A large number of fertilized eggs with attaching filaments attached to some seaweeds were collected in the southern Yellow Sea (33° 49' N, 122° 10' E). In order to make an accurate identification of the fish eggs, light microscope, scanning electronic microscopy (SEM), and genetic analysis were used. Under light microscope, the egg is an oblated and agglutinated demersal with a narrow perivitelline space; eggs ranged in diameter from 1.95 mm to 2.38 mm with a mean of (2.18 ± 0.03) mm; their membranes are smooth and they have 5 to 7 annular keratose egg-filaments; the oil globules are multiple, ranged in diameter from 0.05 mm to 0.50 mm and in number from 7 to 145 with a mean of 28 ± 2 , the position of them migrates during embryonic development; the yolks are ivory-white with no segments, ranged in diameter from 1.00 mm to 2.30 mm with a mean of (1.90 ± 0.03) mm; the development phases of the embryo are variable. So they were identified as the eggs of one Beloniformes. Under scanning electric microscopy (SEM); the egg's micropyle is apparent, it lies in the middle of the attaching filaments and the outer diameter of it is about $12.3 \mu\text{m}$; the pores on the envelope are inapparent, but there are many grain substances on it, with the density of about $50 \text{ ind} \cdot 100 \mu\text{m}^{-2}$. The result of genetic analysis conveyed that in partial sequences of mtDNA Cyt *b* gene there were no variable sites between the eggs and Japanese halfbeak, and the genetic distance between them was 0, however, many variable sites between the eggs and the other fishes of Beloniformes existed, the variable rate was 18.72% – 21.3%, and the genetic distance between them is 21.9% – 26.4%. The result of Neighbor-joining (NJ) molecular phylogenetic tree also indicated that the eggs and the Japanese halfbeak were assembled at the same embranchment, they shared one haplotype, but the eggs were assembled at different embranchments with the other species of Beloniformes so the fish eggs were alienated from them. Based on the results above, it is suggested that the fish eggs to be Japanese halfbeak.

Key words: *Hyporhamphus sajori*; fish eggs; identification; morphology; Cyt *b* gene; sequence