

## 狭鳕早期胚胎发育的形态结构观察

赵静<sup>1</sup>, 卞晓东<sup>2</sup>, 樱井泰宪<sup>3</sup>, 张秀梅<sup>1\*</sup>

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 北海道大学水产学部, 日本 函馆 041-8611)

**摘要:** 利用显微数码摄像系统, 活体观测、拍摄了狭鳕受精卵的早期胚胎发育过程, 详细描述记录不同发育时相胚胎的形态特征、发育时间等。选取6个发育期(未受精、细胞分裂期、囊胚期、原肠胚期、胚体发育期、将孵化前期)的照片, 利用Image J软件测量不同发育期的卵径, 以探讨狭鳕早期胚胎发育过程中卵径的变化。此外, 利用扫描电镜观察了4个胚胎发育期(未受精期、2细胞期、原口关闭期、孵化前期)受精孔及卵膜的形态结构。结果表明, 狭鳕产浮性分离卵子, 卵膜单层、透明光滑, 卵黄均匀, 无油球, 卵径1.45~1.58 mm。在水温(6.3±1.24)℃, 盐度34时受精后约1 h胚胎形成, 24 h后进入囊胚期, 61 h后进入原肠胚期, 134 h后进入器官形成早期, 161 h后心脏开始跳动, 319 h后开始孵化。在整个胚胎发育过程中, 狭鳕卵子的直径呈现逐渐增大的趋势。亚显微观察显示, 狭鳕受精孔为II型, 受精孔前庭平坦, 但受精孔孔道较长。未受精时, 受精孔开放, 卵膜上多皱褶, 卵膜壁孔不明显; 2细胞期时, 受精孔被卵周液分泌物阻塞, 卵膜皱褶减少, 卵膜壁孔明显; 原口关闭期时, 受精孔呈半开放状态, 卵膜褶皱增多, 卵膜壁孔不明显; 即将孵化期时, 受精孔完全塌陷, 卵膜表面十分粗糙, 卵膜壁孔明显。由此可见, 狭鳕卵子卵径、受精孔和卵膜结构的动态变化都与整个胚胎发育过程紧密相关, 其对提高卵子受精率、卵子在海底正常发育和散布, 卵子发育过程中防止多精受精和细菌感染具有重要意义。

**关键词:** 狭鳕; 胚胎发育; 卵径; 受精孔; 卵膜; 壁孔

**中图分类号:** Q 954.4; S 917.4

**文献标志码:** A

海洋硬骨鱼类卵子与仔稚鱼的早期发育机制大致相同, 但不同鱼类在卵子大小、卵黄成分, 卵裂、发育速率、孵化时间、初孵仔鱼形态, 各器官及生理系统功能等方面存在差异, 这些机能受遗传和环境因子共同调控<sup>[1-3]</sup>。近20年来, 日本鱼类学家通过人工孵化观测方法, 描述了锥齿鲷科(Pentapodidae)、蝴蝶鱼科(Chaetodontidae)、鲷科(Serranidae)及隆头鱼科(Labridae)等20余种鱼类的早期发育过程<sup>[4-6]</sup>。我国学者也对鲈形目(Perciformes)中多种鱼类通过人工孵化连续观察的方法开展了其早期发育生物学研究<sup>[7-11]</sup>。

狭鳕(*Theragra chalcogramma*)隶属鲷形目

(Gadiformes)、鳕科(Gadidae)、狭鳕属, 分布于日本海南端到白令海峡北侧的楚科奇海及加拿大等沿海, 是一种重要的冷水性经济鱼类。20世纪80年代末, 白令海狭鳕产量曾达到145万t, 但自20世纪90年代以来, 狭鳕资源量开始下降, 1992年产量仅为1万t。为了恢复该种资源, 各国制定了相应的养护措施。同时, 许多学者对狭鳕的早期发育生物学及补充机制做了研究。Kyung等<sup>[12]</sup>研究了20世纪70年代白令海峡东南岸海域狭鳕鱼卵和仔稚鱼的生态学特征。Kendall等<sup>[13]</sup>于1990年对阿拉斯加湾和雪利科夫海峡的狭鳕产卵场进行调查, 此后Schumacher等<sup>[14]</sup>对其早期

收稿日期:2011-07-27 修回日期:2011-11-11

资助项目:海洋公益性行业科研专项经费项目(200905019)

通讯作者:张秀梅, E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn

补充机制进行进一步研究。Blood 等<sup>[15]</sup>曾研究了阿拉斯加湾狭鳕的早期发育。1986—1989 年间, Masashi 等<sup>[16]</sup>于每年 4 月在北海道北部海域取样,开展了狭鳕仔稚鱼分布情况的追踪调查。1990—1992 年, Hiroki 等<sup>[17]</sup>对日本海狭鳕鱼卵、仔稚鱼的分布趋势进行了研究。Tsutomu 等<sup>[18]</sup>还对狭鳕和北鳕 (*Boreogadus saida*) 的后期仔鱼进行了形态学比较。Hiroya 等<sup>[19]</sup>针对日本根室海峡狭鳕数量急剧下降的现象进行了调查。迄今,未见关于狭鳕早期胚胎发育过程中卵径、卵膜以及受精孔等形态学变化的系统研究。

本研究以狭鳕受精卵为研究对象,通过显微和亚显微观察,建立狭鳕胚体早期发育图谱,比较了在胚胎不同发育阶段受精卵卵径的变化,探讨了卵膜及受精孔在胚胎发育过程中的形态变化及生物学意义。本研究结果可为狭鳕早期胚胎发育及狭鳕属鱼类系统发生研究提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 受精卵制备及孵化条件

狭鳕亲鱼为 2008 年 10 月初在日本北海道渡岛半岛东侧喷火湾海域利用定置网捕获,按雌雄分别暂养于日本青森县胁野泽水产实验场 15 000 L 的 2 个 U 型循环水槽中。2008 年 11 月上旬选取性成熟度合适的雌鱼(♀)与雄鱼(♂)各 3 尾,分别编号,并测量全长(TL, mm),体长(BL, mm),总体质量(BW, g)。采用 1000 L 水袋低温充氧,用卡车运至北海道大学水产学部 5 000 L 圆形实验循环水槽中暂养。利用生殖孔插管取生殖细胞判定成鱼性腺成熟度。雌鱼卵子完全成熟后,采集 1 尾雄鱼的精子与 1 尾雌鱼卵子进行干法授精,静置 5 min 后,用盐度 34、温度 6 °C 的海水过滤并洗涤数次。受精卵迅速转移至 24 个直径 15 cm、深 3 cm 的大型玻璃培养皿中(每个培养皿盛 2 000 粒),并置于温度 6 °C 的孵化箱中孵化。孵化箱中采用人工控光照 11L:13D,孵化海水盐度为 34,每天定时更换相同温度、盐度的海水 2/3,并将死卵挑出。在实验室中受精卵所接触的海水均用孔径 0.22 μm 的微孔滤膜过滤。

本实验中用于产卵排精的亲鱼为♀:TL = 780 mm, BL = 721 mm, BW = 4110 g;♂:TL = 711 mm, BL = 665 mm, BW = 3 510 g,同时取耳石估算亲鱼年龄。

### 1.2 胚胎发育期划分及观察方法

胚胎发育是一个连续渐进的过程。根据 Hall 等<sup>[20]</sup>对大西洋鳕 (*Gadus morhua*) 胚胎发育期和 Kimmel 等<sup>[21]</sup>对斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎发育期的划分及命名方法(依据鱼卵主要形态变化及器官发生),将狭鳕受精卵发育期分为 21 个时期(表 1)。

狭鳕胚胎发育观察方法如下:受精后 24 h 内,每 2 小时观察 1 次;胚体形成前每 4 小时观察 1 次;胚体形成后至孵化开始时每 8 小时观察 1 次。每次从孵化箱取出 10 ~ 15 粒卵子,利用 Nikon SMZ1500 显微拍摄系统拍摄其胚胎发育照片并测定卵径大小,随时记录胚胎发育时间和发育阶段。依据显微镜照片,绘制狭鳕胚胎发育模式图。

表 1 狭鳕受精卵胚胎发育的时相划分  
Tab. 1 Stages of embryonic development of walleye pollock divided in this research

时期 stage	发育期划分 developmental stage
1(0 ~ 2 h)	单细胞期(pre-cell stage)
2(3 ~ 6 h)	2 细胞期(2-cell stage)
3(6 ~ 8 h)	4 细胞期(4-cell stage)
4(8 ~ 10 h)	8 细胞期(8-cell stage)
5(10 ~ 12 h)	16 细胞期(16-cell stage)
6(12 ~ 19 h)	32 细胞期(32-cell stage)
7(19 ~ 24 h)	32 <sup>+</sup> 细胞期(32 <sup>+</sup> cell stage)
8(24 ~ 36 h)	囊胚早期(early blastula period)
9(36 ~ 50 h)	囊胚中期(middle blastula period)
10(50 ~ 61 h)	囊胚晚期(later blastula period)
11(61 ~ 79 h)	原肠早期(early epiboly period)
12(79 ~ 98 h)	原肠包卵黄 1/4(germ ring 1/4 epiboly)
13(98 ~ 116 h)	原肠包卵黄 1/2(germ ring 1/2 epiboly)
14(116 ~ 134 h)	原肠包卵黄 3/4(germ ring 3/4 epiboly)
15(134 ~ 161 h)	原口关闭(early middle)
16(161 ~ 192 h)	胚体包卵 5/8(tail 5/8 around yolk)
17(192 ~ 226 h)	胚体包卵 3/4(tail 3/4 around yolk)
18(226 ~ 259 h)	胚体包卵 7/8(tail 7/8 around yolk)
19(259 ~ 292 h)	胚体包整个卵(full circle around yolk)
20(292 ~ 324 h)	胚体包卵 9/8(tail 9/8 around yolk)
21(324 ~ 355 h)	孵化(hatching)

### 1.3 胚胎发育过程卵径的测量

根据狭鳕胚胎照片,利用 Image J 软件测量卵径大小。本研究选取未受精卵、细胞分裂期、囊胚期、原肠胚期、胚体发育期、孵化前期等 6 个发育期 40 ~ 50 个卵进行测量,每粒受精卵测量 3 次,取平均值绘制柱形图,探讨胚胎发育过程中卵

径的变化。

#### 1.4 受精孔及卵膜结构亚显微结构观察

分别固定未受精卵、2 细胞期、原口关闭期及孵化前期卵子各约 100 粒。各卵子先用 0.1 mL/L 磷酸缓冲(PB)溶液(pH = 7.4)分别冲洗干净,再用 5% 戊二醛固定液(pH = 7.4, 0.1 mL/L 的 PB 溶液)漂洗 3 次,1% 锇酸固定 1 h,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(JEOL-JSM-840 型)观察鱼卵细胞表面的亚显微形态结构。用 Image J 软件测量各结构的长度。

## 2 结果

用于人工授精的雌鱼与雄鱼均为 3 龄以上,性腺发育正常,卵巢饱满呈黄色或橙黄色,精巢呈乳白色。

### 2.1 胚胎发育期的形态描述

狭鳕产浮性分离卵,为多次分批产卵<sup>[22]</sup>。卵膜单层、透明光滑,卵黄均匀,无油球,未受精卵卵径 1.41 ~ 1.54 mm。孵化水温为 6.3 °C,在整个发育过程中卵子均为浮性,从受精开始直至仔鱼即将孵出划分为 21 个时期。各发育期照片从 4 细胞期开始拍摄(图版 I),并根据拍摄的照片绘制狭鳕胚胎发育示意图(图版 II)。

**卵裂前期(0 ~ 3 h) 单细胞(发育期 1):**受精后 1 h,受精卵原生质逐渐向动物极移动,使得动物极端的细胞质开始聚集形成一个圆盘状隆起——胚盘。此时,卵内不同部位的比重出现明显变化。当隆起达到最大限度时卵裂即将开始(图版 II-1)。

**卵裂阶段(3 ~ 24 h) 2 细胞期(发育期 2):**在受精后 3 h 左右,胚盘进行首次水平面内的分裂,将胚盘分成近似相等的两个部分(图版 II-2)。

**4 细胞期(发育期 3):**在受精后 6 h 左右,胚盘进行第二次分裂,此次分裂与第一次在同一水平面内,方向与第一次分裂方向垂直。胚盘被近似的分成 4 部分(图版 I-1;图版 II-3)。

**8 细胞期(发育期 4):**在受精后 8 h 左右,胚盘进行第三次分裂,此次分裂与第一次方向平行,垂直于第二次分裂方向。胚盘被分成 8 个细胞,呈两排排列,中间 4 个细胞明显小于顶点处的细胞(图版 I-2;图版 II-4)。

**16 细胞期(发育期 5):**在受精后 10 h 左右,

胚盘进行第四次分裂,这次分裂垂直于第三次,这也是胚盘卵裂中最后一次仅限于水平面内的卵裂。为了保证每个面有四个细胞,多数细胞呈四方体。这个阶段所有细胞都和卵黄接触<sup>[15]</sup>(图版 I-3;图版 II-5)。

**32 细胞期(发育期 6):**在受精后 12 h 左右,胚胎进入第 5 次分裂。此期中间的 4 个细胞进行纬裂,边缘 12 个细胞进行纵裂,起初只有一层细胞,最终由于不规则的分裂形成一个胚盘中间有两层细胞,而胚盘边缘仅有一层的局部分层的胚盘。该发育阶段内虽然细胞数量明显增加,但胚盘大小变化不大。32 细胞期各细胞的排列不规则,并且接下来的卵裂变得越来越不具规律(图版 I-4;图版 II-6)。

**32<sup>+</sup> 细胞期(发育期 7):**在受精后 19 h 左右,胚胎陆续进入第 6、7 次分裂,分裂在水平及垂直面内同时进行使得胚盘形成一个似附着在卵黄上桑葚状的中空的细胞球,细胞界限不清。在此之前,各细胞之间的卵裂大致同步,直至卵裂进行至 64 ~ 128 细胞时变得不同步,开始向囊胚过渡(图版 I-5;图版 II-7)。

**囊胚阶段(24 ~ 61 h) 囊胚早期(发育期 8):**受精后 24 h,经过 10 ~ 11 次的细胞分裂,细胞体积减小,数量增多。囊胚突出于卵黄之上,形成一个较高的馒头状隆起,即所谓的高囊胚,此时囊胚卵裂球开始转录自己的 mRNA<sup>[20]</sup>(图版 I-6;图版 II-8)。

**囊胚中期(发育期 9):**受精后 36 h,胚盘细胞向植物极下包,馒头状突起逐渐降低(图版 I-7;图版 II-9)。

**囊胚晚期(发育期 10):**受精后 50 h,囊胚细胞向卵黄表面包围,外观囊胚色浓,细胞层次增多,在囊胚下部边缘呈现一个圆状环沟,由囊胚向原肠胚过渡(图版 I-8;图版 II-10)。

**原肠胚阶段(61 ~ 161 h) 原肠早期(发育期 11):**受精后 61 h,在囊胚后期胚盘中间变得平整,卵间隙变大,囊胚层细胞沿卵黄表面植物极继续扩展、下包、并伴随着内卷,囊胚层变薄。囊胚下包受卵黄阻碍后边缘细胞向内卷而上升,因而在囊胚层外周边缘形成环状增厚细胞即胚环,胚环的形成标志着原肠胚发育阶段的开始(图版 I-9;图版 II-11)。

**原肠胚包卵 1/4(发育期 12):**受精后 79 h,胚

环下包卵黄至1/4,随着分裂细胞的卷入、上升和集中,胚盘发育成较薄的舌状胚体基原,胚盾锥形形成(图版I-10;图版II-12)。

原肠胚包卵1/2(发育期13):受精后98 h,胚环包卵黄囊至1/2,胚盾弯曲增厚,伸长胚体显露,胚盾的上部将发育成胚胎的背部,而下部则形成胚胎的腹部。随着细胞的运动,下胚层插入囊胚腔,形成了原肠腔。神经板锥形形成,胚轴明显高于其他胚层,胚环边缘愈加明显(图版I-11;图版II-13)。

原肠胚包卵3/4(发育期14):受精后116 h,胚环包卵黄囊至3/4,头部和尾部分化变得更加明显可辨,但并没有明显的脑室出现,眼泡开始出现。胚盾背中央轴中心区逐渐向前形成神经板(图版I-12;图版II-14),神经板两侧向中部折叠而成神经褶,神经褶前部膨大而形成脑的原基。

原口关闭期(发育期15):受精后134 h,原肠包卵一周,原口关闭,神经褶两侧不断折叠,在中线处合并而成神经索,神经索在卵黄的腹面突起为神经脊,神经沟从胚体中后部开始愈合形成神经管,然后向两端扩展,整个胚体呈扁平状,早期视囊和尾部的原基出现,心脏组织开始膨大,进入器官形成早期,尾部不明显,胚体雏形出现(图版I-13;图版II-15)。

胚体发育阶段(161~292 h) 胚体包卵5/8(发育期16):受精后161 h,随着头部器官的不断分化,出现3个初级脑室(端脑、中脑、后脑);尾芽形成,整个胚体增厚,体节出现,肌节数达15~20,背部色素稀疏,胚体背部紧贴卵膜,肝脏出现,在靠近胚体前端部位,心脏基原更为明显(图版I-14;图版II-16)。

胚体包卵3/4(发育期17):受精后192 h,胚体包卵黄囊3/4,随着脑室的进一步分化,中脑略大于前后脑。头部后脑两侧听囊明显,视晶体形成,尾部尖端变小,开始脱离胚体所在的轴线发育;体节数增多达30~35,色素细胞增多,克氏囊在尾部内侧出现;随着胚体对卵黄囊的进一步吸收和胚体的不断增厚,卵黄囊与卵膜间隙增大(图版I-15;图版II-17)。

胚体包卵7/8(发育期18):受精后226 h,胚体包卵黄囊7/8,体节数进一步增加,胚胎继续增厚,胸鳍基原出现,心脏开始微弱收缩;色素细胞愈加明显并呈星状,主要分布于中脑至尾部,卵黄

囊被持续利用,卵黄周隙增大,孵化腺出现但不明显(图版I-16;图版II-18)。

胚体包整个卵(发育期19):受精后259 h,胚体包整个卵,尾端逐渐变圆,发育到达吻端。体节数目增加,达44~48。克氏囊缩小,心脏更加完善,胸鳍原基明显,肝脏一侧的胰脏开始出现;色素呈两列分布于胚体背部,少量色素分布于腹面中线,孵化腺逐渐明显(图版I-17;图版II-19)。

孵化前期(292~324 h) 胚体包卵1~1/8(发育期19):受精后292 h,胚体尾端包卵至视囊背侧面,心脏开始有规律地跳动。头部色素扩展到视囊背上部分,胰脏清晰可见;胚体中部色素分布于胚体背中线两侧直至腹中线的上方;肛门部位色素向背中线和腹中线聚集;孵化腺清晰可见(图版I-18;图版II-20)。

孵化(324~355 h) 孵化(发育期21):受精后324 h,开始孵化,胚体尾部已经完全脱离卵黄囊,卵膜变薄。孵化是不同步的,孵化腺溶解卵膜,绝大多数胚体头部先孵出,除听囊与下颌外胚体外,初孵仔鱼绝大多数器官已经发育,残余卵黄囊较大,仍为仔鱼提供营养(图版I-19;图版II-21)。

## 2.2 胚胎发育过程中卵径的变化

本研究对狭鳕的未受精卵、细胞分裂期、囊胚期、原肠胚期、胚体发育期和孵化前期,6个发育时期的卵径进行了测量(图1),卵径随胚胎发育呈明显上升的趋势。

## 2.3 胚胎发育过程中受精孔及卵膜的亚显微结构变化

分别对狭鳕未受精卵、2细胞期、原口关闭期和孵化前期卵子的受精孔及卵膜亚显微结构进行扫描电镜观察(表2)。

未受精卵的亚显微结构 狭鳕卵子的亚显微结构观察显示,狭鳕受精孔属于II型,受精孔前庭平坦,但受精孔孔道较长<sup>[23]</sup>。卵膜上有较多皱褶,卵膜壁孔不明显,间隙为 $(1.46 \pm 0.31) \mu\text{m}$ ,卵膜表面壁孔的密度为 $21.16 \sim 30.60$ 个/ $100 \mu\text{m}^2$ ,受精孔孔径为 $(4.33 \pm 0.31) \mu\text{m}$ (图版III)。

2细胞期卵子的亚显微结构 2细胞期卵子卵膜皱褶变缓,卵膜壁孔较未受精卵明显,间隙为 $(2.04 \pm 0.35) \mu\text{m}$ ,比未受精时明显增大,卵膜表面壁孔的密度为 $14.71 \sim 20.30$ 个/ $100 \mu\text{m}^2$ 。卵子受精孔被卵周液分泌物阻塞,受精孔孔径为 $(5.26 \pm 0.29) \mu\text{m}$ ,也较受精前增大(图版IV)。

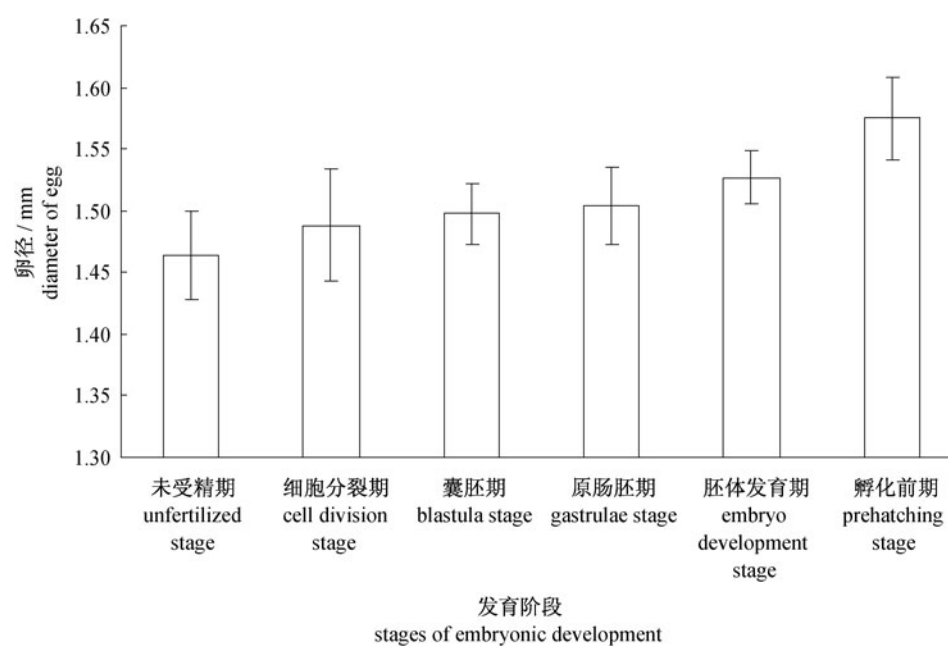


图 1 狭鳕胚胎早期发育的卵径变化

Fig. 1 Egg diameter of the walleye pollock based on embryonic development

表 2 狭鳕受精卵发育过程中受精孔和卵膜亚显微结构的变化

Tab. 2 Development of submicroscopic structure of fertilization hole and egg envelope of walleye pollock

发育阶段 stage	壁孔间隙/ μm interval of the pore canals	壁孔密度/ (个/100 μm <sup>2</sup> ) density of the pore canals	受精孔孔径/ μm diameter of micropyle	卵膜特点 characters of egg envelope
未受精卵 unfertilized egg	1.46 ± 0.31	21.16 ~ 30.60	4.33 ± 0.31	卵膜光滑, 较多褶皱, 壁孔不明显、间隙小
2 细胞期 2-cell stage	2.04 ± 0.35	14.71 ~ 20.30	5.26 ± 0.29	卵膜粗糙, 褶皱减缓, 壁孔较明显、间隙大
原口关闭 blastopore closure	1.70 ± 0.23	23.59 ~ 27.53	4.48 ± 0.15	卵膜更加粗糙, 褶皱增多, 壁孔不明显、间隙小
孵化前 prehatching stage	2.56 ± 0.22	12.38 ~ 15.97	5.73 ± 0.22	卵膜十分粗糙, 褶皱不明显, 壁孔明显、间隙大

原口即将关闭期卵子的亚显微结构 卵子发育到原口关闭期后, 卵膜变得更加粗糙, 表面又重新布满褶皱, 卵膜壁孔不明显, 间隙为 (1.70 ± 0.23) μm, 卵膜表面壁孔的密度为 23.59 ~ 27.53 个/100 μm<sup>2</sup>。卵子受精孔呈现半开放状态, 外周粘附一些分泌物, 受精孔孔径为 (4.48 ± 0.15) μm (图版 V)。

孵化前期卵子的亚显微结构 卵子发育到原口关闭期后, 卵膜表面粗糙, 几乎看不到褶皱, 卵膜壁孔明显, 间隙为 (2.56 ± 0.22) μm, 卵膜表面壁孔的密度为 12.38 ~ 15.97 个/100 μm<sup>2</sup>。受精孔已经完全塌陷, 且达到发育的最大值为 (5.73 ± 0.22) μm (图版 VI)。

### 3 讨论

#### 3.1 狭鳕早期胚胎发育特征在鳕鱼分类研究中的应用

鱼卵的形态特征, 如卵膜的形态, 油球的有无, 卵径的大小, 油球在卵黄囊中的位置及鱼类卵子的发育特征 (如各发育阶段鱼卵胚体的发育程度, 色素出现的时间及位置, 孵化时各器官的分化程度等特征) 被作为鱼类的分类依据之一<sup>[24]</sup>。

目前, 狭鳕属种类的分类一直存在争议。1814 年, 狭鳕正式定种。1956 年, Privalikhin 等<sup>[25]</sup>鉴定了在挪威芬马克郡捕获的 3 尾鳕鱼, 认为其中 2 尾虽隶属狭鳕属, 但与狭鳕不同, 定名为挪威狭鳕 (*T. finnmarchica*)。2008 年, Byrkjedal

等<sup>[26]</sup>发现线粒体 *CO I* 序列并不能有效区分挪威狭鳕和狭鳕,但两种狭鳕却在 42 个非骨骼特征中的 10 个以及 17 个骨骼特征中的 4 个存在差异,除了幽门盲囊的数目外,所有被检测的特征在这两个地点的狭鳕中均存在交叉现象。因此,基于遗传上的高度相似性和形态特征的微小差异,Byrkjedal 等<sup>[26]</sup>认为挪威狭鳕与狭鳕为同种异名。

狭鳕与鳕属的大西洋鳕形态相似,均为浮性卵、无油球、卵膜光滑不具粘性且卵径有重叠(狭鳕 1.41~1.54 mm,大西洋鳕 1.43~1.51 mm)。通过比较狭鳕与大西洋鳕胚胎发育过程发现<sup>[27]</sup>,在各发育阶段两种鱼卵胚体发育程度存在较大的差异。狭鳕胚胎器官分化和视囊的形成发生于原口关闭期;胚体包卵黄囊 5/8 期时出现体节,色素细胞稀疏地分布于胚体上,当胚体包卵 3/4 时,尾芽开始离开卵黄囊并开始离开胚体所在的轴线进行发育。据 Hall 等<sup>[20]</sup>的研究发现,大西洋鳕鱼胚胎器官分化发生在原肠包卵 1/3 时,体节分化则发生在原肠包卵黄囊 1/2 时。此结果进一步证实,狭鳕与大西洋鳕分属不同种类,差异明显。

### 3.2 狭鳕受精卵发育过程中卵径的变化

本研究所用狭鳕亲鱼来自日本北海道喷火湾,卵径为 1.41~1.54 mm,这与 Matarese 等<sup>[28]</sup>报道的东北太平洋狭鳕卵子的卵径(1.35~1.45 mm)存在差异,推测这种差异可能与亲鱼所处的海域环境,如食物、温度、盐度等环境因子,以及亲鱼的年龄、卵子排出的批次等因素相关。

在狭鳕胚胎早期发育过程中,卵径呈明显上升的趋势,由未受精时的(1.46±0.04) mm 上升至孵化前的(1.57±0.03) mm。整个过程中卵径有两次明显的升高,第一次是受精前到受精后,由于受精过程中经皮层反应,皮层颗粒物质排到卵周液中,使得卵膜与卵黄囊分离,同时卵周液渗透压升高,使鱼卵吸水膨胀,整个卵径增大<sup>[29]</sup>。第二次明显升高是孵化前,由于胚体已经发育至孵化前的最大程度,卵子也因此膨胀,卵径进一步增大,达到整个胚胎发育过程的最大值。

### 3.3 狭鳕卵膜在各发育阶段亚显微结构的变化及其生物学意义

卵子卵膜的亚显微结构可被用来进行亲缘关系较远种类的形态分类,但是对于亲缘关系十分相近种类,由于它们的形态相似而变得无法区分;有研究表明,在受精过程中受精孔具有精子识别

功能,并具有种的特异性<sup>[30]</sup>。未受精狭鳕卵子受精孔为 II 型,受精孔前庭平坦,但受精孔孔道较长<sup>[23]</sup>。鳕属的大西洋鳕、黑线鳕(*Melanogrammus aeglefinus*)的未受精卵受精孔前庭不明显仅见精孔管,为 III 型受精孔<sup>[31]</sup>;鳕属的大头鳕(*Gadus macrocephalus*)为前庭明显,精孔管较短的 I 型受精孔<sup>[32]</sup>。狭鳕受精孔径(4.33±0.31) μm 与大头鳕(3.28±0.55) μm 相当,明显小于大西洋鳕与黑线鳕(6 μm)。狭鳕卵膜较平整,无网纹,与黑线鳕与大西洋鳕类似<sup>[33]</sup>,但狭鳕卵膜壁孔较大西洋鳕与黑线鳕不明显,大头鳕卵膜表面具有六角形的网状轮纹,壁孔亦不明显<sup>[34]</sup>,该研究结果进一步证明卵膜在鉴定种类中的有效性。

狭鳕卵子排出体外后,由于发生皮层反应,卵周液渗透压升高,使受精卵吸水膨胀,卵径增大,卵膜则由于卵周液膨压作用而拉伸变平整<sup>[35]</sup>。部分受精卵卵周液能通过精孔管排到卵膜外,其中的一部分卵周液在受精孔区沉淀下来,形成栓状阻塞物,使受精孔关闭,这样一方面可以防止多精受精和再受精,另一方面还可以防止细菌进入。由于受精过程中皮层颗粒物质及外界物质不断沉淀到卵膜上,使受精后的卵膜变得粗糙<sup>[36]</sup>。在受精过程中,狭鳕受精卵动物极端的细胞质开始聚集形成胚盘,使得受精卵所受膨压进一步增大。但随着胚盘细胞分裂的发生,其高度降低,对卵膜产生膨压效能减弱,使得发育早期的 2 细胞期壁孔间距增大。当受精卵发育至原肠胚后期,整个胚盘开始下包卵黄囊,至原口关闭时期对整个卵膜产生膨压效能降至最低,卵膜也由于内部膨压减少再度呈现明显褶皱,精孔管末端栓状阻塞物沉陷在围卵腔内,导致精孔管部分开放<sup>[22]</sup>。当受精卵发育到孵化前期,胚体持续变长变粗,卵周液在内部不断增大的膨压作用下持续外移,整个受精孔也在强大的压力下完全塌陷。

在鱼类早期胚胎发育过程中,鱼卵表面细菌的着生是不可避免的现象。本研究发现,在原口关闭期狭鳕卵子受精孔栓状阻塞物由于围卵腔内部膨压减小而内陷,精孔管也因此部分开放,从而使外界细菌等有机会进入卵子内部,并感染胚体导致其不能孵化。该现象在粘性卵中尤其严重<sup>[33]</sup>。推测这可能是部分受精卵在原肠发育期死亡率较高的原因之一。

狭鳕早期胚胎发育特征,如卵子形态特征、各器官发生时间、受精孔及卵膜亚显微结构变化等是区分其与其它鳕科鱼类的重要依据。本研究结果表明,狭鳕卵子卵径与其它海域同种鱼卵卵径间存在差异,这种差异体现了其生活海域及其亲鱼的生态信息,该结果对于区分不同海域狭鳕种群资源具有重要意义。通过对狭鳕早期胚胎发育生物学特征及其生物学意义的探讨,进一步丰富鱼卵形态分类、单精受精机制和系统发生研究的内涵。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Howell B R, Day O J, Ellis T, *et al.* Early life stages of farmed fish [ M ] // Black K D, Pickering A. (Eds). Biology of farmed fish. Academic Press, Sheffield, England, 1998: 27 - 66.
- [ 2 ] Kjörsvik E, Moksness E, Kjörsvik E, *et al.* Culture of cold-water marine fish [ M ]. Blackwell Publishing, Oxford, 2004: 204 - 278.
- [ 3 ] Falk-Petersen I B. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 19(5): 397 - 412.
- [ 4 ] Suzuki K S, Kobayashi K. Spawning seasons and eggs of *Chaetodon daedalma* (Chaetodontidae) from the coast waters around Hatijo island. Larval morphology [ R ]. Faculty of Marine Science and Technology, Tokai University, Technical Report, 1996, 41 ( 2 ): 185 - 195.
- [ 5 ] Kuroda K, Yamamoto T S. Development and identification of the eggs of the Pacific mackerel (*Scomber iaponicus* Houttuyn) and a similar egg [ J ]. Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, 1982, 107(6): 3 - 52.
- [ 6 ] Leis J, Moyer J. Development of eggs, larvae and pelagic juveniles of three Indo-Pacific ostraeniid fishes (Tetraodoniformes): *Ostracion meleagris*, *Lactoria fornasini* and *L. diaphana* [ J ]. Ichthyology Reserch, 1985, 32(2): 189 - 202.
- [ 7 ] 谢仰杰, 张雅芝, 胡家财, 等. 斜带髯鲷早期发育的形态观察 [ J ]. 中国水产科学, 2004, 11 ( 1 ): 89 - 94.
- [ 8 ] 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, 11(1): 25 - 30.
- [ 9 ] 雷霖霖, 马爱军, 刘新富, 等. 大菱鲆 *Scophthalmus maximus* 胚胎及仔稚幼鱼发育研究 [ J ]. 海洋与湖沼, 2003, 34(1): 9 - 18.
- [ 10 ] 万瑞景, 姜言伟, 庄志猛. 半滑舌鳎早期形态及发育特征 [ J ]. 动物学报, 2004, 50(1): 91 - 102.
- [ 11 ] 陈四清, 高天翔, 王琛, 等. 圆斑星鲽早期发育特征的研究 [ J ]. 中国海洋大学学报, 2006, 36 ( 1 ): 81 - 286.
- [ 12 ] Kyung M J, Sukyung K, Suam K, *et al.* Ecological characteristics of Walleye Pollock eggs and larvae in the southeastern Bering Sea during the late 1970s [ J ]. Journal of Oceanography, 2006, 62 ( 3 ): 859 - 871.
- [ 13 ] Kendall A, Kim S. Buoyancy of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) eggs in relation to water properties and movement in Shelikof Strait, Gulf of Alaska [ J ]. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences, 1989, 108(1): 169 - 180.
- [ 14 ] Schumacher J D, Kendall A W. Some interactions between young walleye pollock and their environment in the western Gulf of Alaska [ J ]. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports, 1991, 32(4): 22 - 40.
- [ 15 ] Blood D M, Matarese A C, Yoklavich M M. Embryonic development of walleye pollock, *Theragra chalcogramma*, from Shelikof Strait, Gulf of Alaska [ J ]. Fisheries Bulletin, 1994, 92(2): 207 - 222.
- [ 16 ] Masashi N, Masayoshi S. Distribution of walleye Pollock, *Teragra chalcogramma*, larvae and juveniles off the northern coast of Hokkaido [ J ]. Scientific Reports of the Hokkaido Fisheries Experimental Station, 1995, 47(8): 33 - 40.
- [ 17 ] Hiroki Y, Takashi M. Recent aspect of the distribution of eggs, larvae and postlarvae of the walleye Pollock *Theragra chalcogramma* (Pallas) for the season of 1990 - 91 to 91 - 92 in Iwanai Bay (Japan Sea), Hokkaido [ J ]. Scientific Reports of the Hokkaido Fisheries Experimental Station, 1993, 42 ( 1 ): 91 - 100.
- [ 18 ] Tsutomu H, Tsuneo N. Postlarval morphology of walleye pollock, *Theragra chalcogramma* (Pallas) and Arctic cod, *Boreogadus saida* (Lepechin) [ J ]. Scientific Reports of the Hokkaido Fisheries Experimental Station, 1993, 42(1): 121 - 133.
- [ 19 ] Hiroya M, Keiji H, Masanori I, *et al.* Recent sharp decrease in walleye Pollock egg abundance in the Nemuro Strait, Hokkaido [ J ]. Scientific Reports of the Hokkaido Fisheries Experimental Station, 1993, 42(1): 113 - 119.
- [ 20 ] Hall E H, Smith P, Johnston I A. Stages of embryonic development in the Atlantic cod *Gadus morhua* [ J ]. Journal of Morphology, 2004, 259 ( 3 ): 81 - 102.

- 255 - 270.
- [21] Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R, *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. *Developmental Dynamics*, 1995, 203 (1): 253 - 278.
- [22] 林景祺. 狭鳕等三种鳕鱼生态和资源[J]. *海洋科学*, 1994, 2: 25 - 29.
- [23] Yamamoto T S, Kobayashi W. Closure of the micropyle during embryonic development of some pelagic fish eggs[J]. *Journal of Fish Biology*, 1992, 40(2): 225 - 241.
- [24] Matarese A C, Sandknop E M. Identification of fish eggs[C] // Moser H G, *et al.* (eds) *Ontogeny and systematic of fishes*. American Society of Ichthyologists and Herpetologists, 1984, Spec Publ No. 1 Lawrence: 27 - 31.
- [25] Privalikhin A M, Norvillo G V. On the finding of a rare species-norwegian Pollock *Theragra finnmarchica* Koefoed, 1956 (Gadidae) in the Barents Sea [J]. *Journal of Ichthyology*, 2010, 50 (2): 143 - 147.
- [26] Byrkjedal I, Rees D J, Christiansen J S, *et al.* The taxonomic status of *Theragra finnmarchica* Koefoed, 1956 (Teleostei: Gadidae): perspectives from morphological and molecular data[J]. *Journal of Fish Biology*, 2008, 73(5): 1183 - 1200.
- [27] Arthur W, Kendall J, Toshikuni N. Early life history of *Theragra chalcogramma* in Shelikof Strait and Funka Bay [J]. *Fish Bulletin*, 1992, 90 (3): 129 - 138.
- [28] Matarese A C, Kendall J, Blood D M, *et al.* Laboratory guide to early life history stages of Northeast Pacific fishes [R]. U. S. Department of Commerce, NOAA Technical Report NMFS, 1989, 80: 652.
- [29] Laurel B J, Hurst T P, Copeman L A, *et al.* The role of temperature on the growth and survival of early and late hatching Pacific cod larvae (*Gadus macrocephalus*) [J]. *Journal of Plankton Research*, 2008, 30(9): 1051 - 1060.
- [30] Kobayashi W, Yamamoto T S. Fine structure of the micropylar apparatus of the chum salmon egg, with a discussion of the mechanism for blocking polyspermy [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1981, 217 (2): 265 - 275.
- [31] Morrison C M. Histology of the Atlantic cod, *Gadus morhua*: Part 3: reproductive tract [J]. *Canadian Special Publication of Fisheries Aquatic Sciences*, 1980, 110(2): 177.
- [32] 卞晓东. 鱼卵、仔稚鱼形态生态学基础研究—兼报黄河口海域鱼类浮游生物调查[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [33] Iwamatsu T, Ishijima S, Nakashima S. Movement of spermatozoa and changes in micropyles during fertilization in Medaka eggs [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1993, 266(1): 57 - 64.
- [34] Oppen-berntsen D O, Helvik J V, Walther B T. The major structural proteins of cod (*Gadus morhua*) eggshells and protein crosslinking during teleost egg hardening [J]. *Developmental Biology*, 1990, 137 (2): 258 - 265.
- [35] Kudo S, Teshima C. Assembly *in vitro* of vitelline envelope components induced by a cortical alveolus sialoglycoprotein of eggs of the fish *Tribolodon hakonensis* [J]. *Zygote*, 1998, 6(3): 193 - 202.
- [36] Morrison C, Bird C, O'Neil D, *et al.* Structure of the egg envelope of the haddock, *Melanogrammus aeglefinus*, and effect of microbial colonization during incubation [J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1999, 77(6): 890 - 901.



## Observation on morphological structure of the early development of *Theragra chalcogramma*

ZHAO Jing<sup>1</sup>, BIAN Xiao-dong<sup>2</sup>, SAKURAI Yasunari<sup>3</sup>, ZHANG Xiu-mei<sup>1\*</sup>

(1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

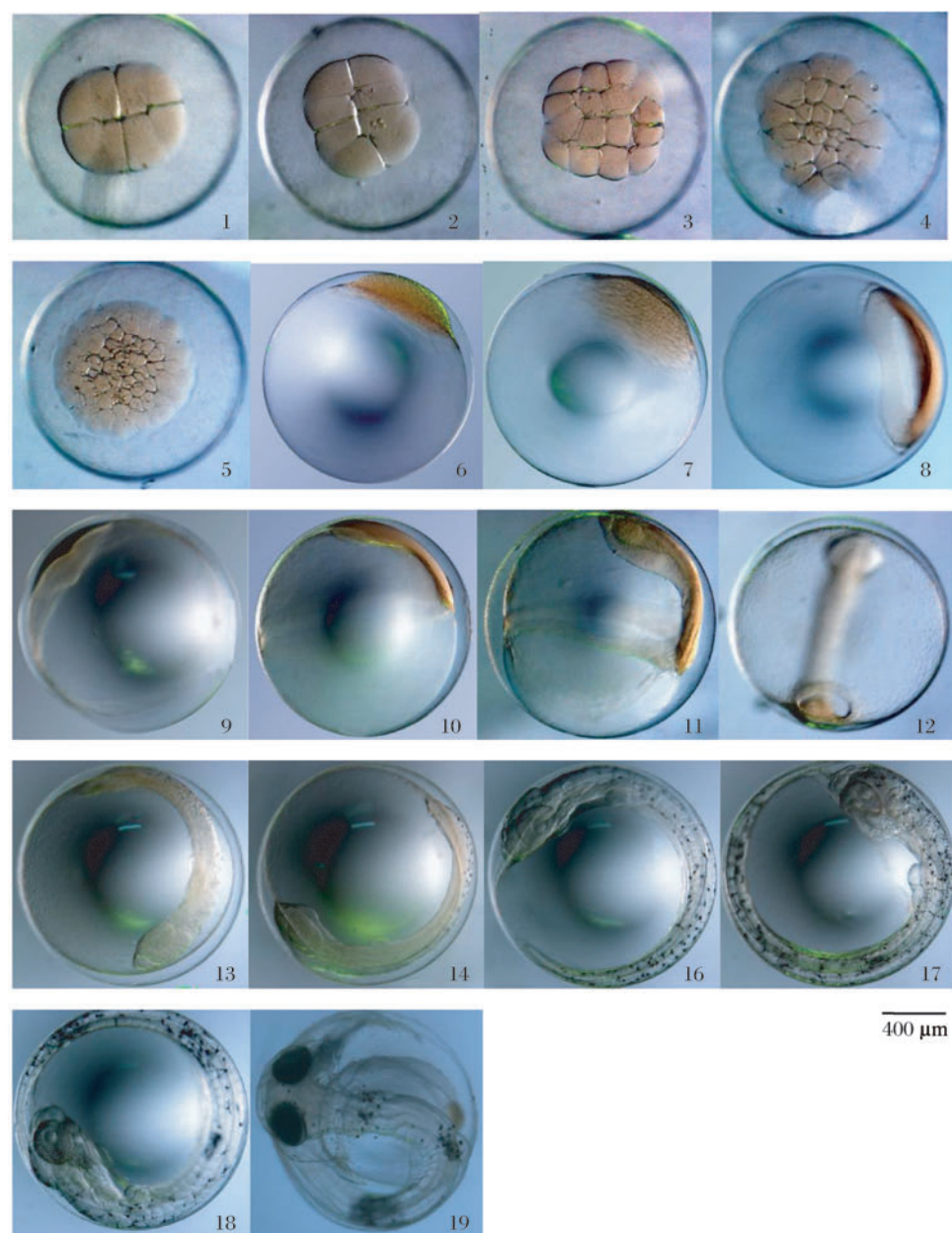
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate Hokkaido 041-8611, Japan)

**Abstract:** The embryonic development pattern of walleye pollock and the morphological characteristics of fertilized eggs were observed and recorded from October to December in 2008. The egg diameters in six stages were measured and the egg envelopes of seven stages were also studied with scanning electron microscopy. The egg of walleye pollock was pelagic, without oil globules. The diameter was 1.45 – 1.58 mm, the incubated temperature was  $(6.3 \pm 1.24) ^\circ\text{C}$  and the salinity was 34 psu. The microscopic observation showed the fertilization tube opened with  $(4.33 \pm 0.31) \mu\text{m}$  pore diameter; the pore canals of the egg envelope were inconspicuous; the interval of micropyle and density of the pore canals of the egg envelope were  $(1.46 \pm 0.31) \mu\text{m}$  and  $21.1 - 30.6/100 \mu\text{m}^2$  respectively. The micropyle with the micropyle canal was completely plugged with material at the 2-cell stage, and the fertilization pore diameter was  $(5.26 \pm 0.29) \mu\text{m}$ . The egg envelope contained less ruffles and the pore canals of the egg envelope became more prominent and the interval of micropyle was  $(2.04 \pm 0.35) \mu\text{m}$ . The density of the pore canals of the egg envelope was  $14.7 - 20.3/100 \mu\text{m}^2$ . After the closing phase of blastopore, the fertilization pore of egg presented the open state; few secretions were adhered to its periphery region. The diameter of the fertilization pore, interval of the pore canals and density of the pore canals of the egg envelope were  $(4.48 \pm 0.15) \mu\text{m}$ ;  $(1.70 \pm 0.23) \mu\text{m}$ ; and  $23.59 - 27.53/100 \mu\text{m}^2$ , respectively. Approaching the incubation period, the egg envelope had a rough surface, on which the pore canals were inconspicuous with a  $(2.56 \pm 0.22) \mu\text{m}$  interval and the density was  $12.38 - 15.97/100 \mu\text{m}^2$ . The diameter of egg, the fertilization pore, as well as the dynamic change of structure of egg envelope, were closely related to the embryonic development of Alaska pollock. The above indexes had great importance in improving the fertility rate of egg, facilitating the normal development and spread of egg on seabed, and preventing both polyspermy and bacterial infection during the egg development process.

**Key words:** *Theragra chalcogramma*; embryonic development; egg diameter; micropyle; egg envelope; pore canals

**Corresponding author:** ZHANG Xiu-mei. E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn

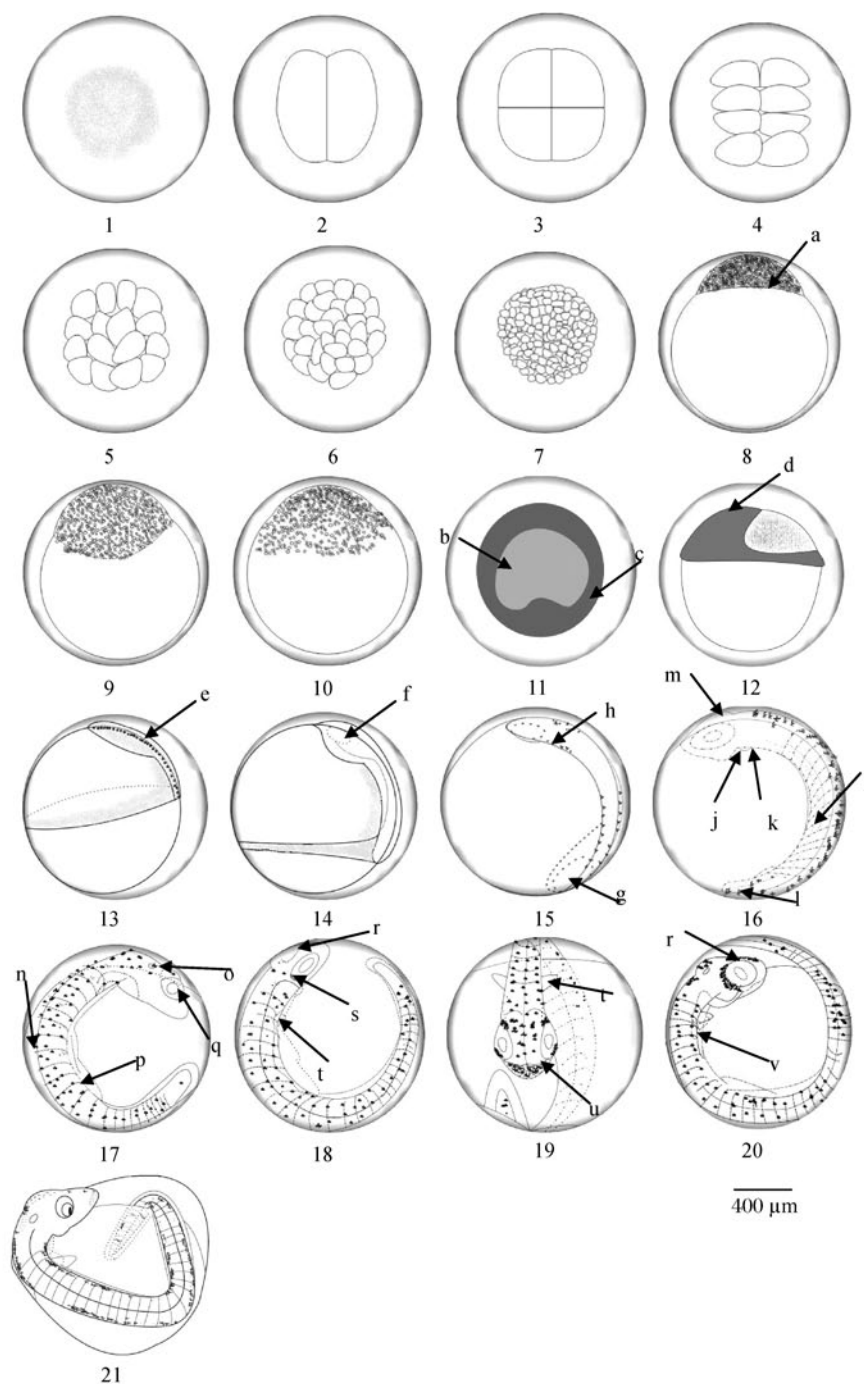


图版 I 狭鳕胚胎发育活体观测(孵化温度 6 °C, 盐度 34)

1. 4 细胞期; 2. 8 细胞期; 3. 16 细胞期; 4. 32 细胞期; 5. 32<sup>+</sup> 细胞期; 6. 囊胚早期; 7. 囊胚中期; 8. 囊胚晚期; 9. 原肠包卵黄 1/4; 10. 原肠包卵黄 1/2; 11. 原肠包卵黄 3/4; 12. 原肠包卵黄 3/4; 13. 原口关闭; 14. 胚体包卵 5/8; 15. 胚体包卵 3/4; 16. 胚体包卵 7/8; 17. 胚体包卵整个卵; 18. 胚体包卵 9/8; 19. 孵化。

**Plate I *In vivo* observations on embryonic development of the walleye pollock (incubated at 6 °C, salinity 34)**

1. 4-cell stage; 2. 8-cell stage; 3. 16-cell stage; 4. 32-cell stage; 5. 32<sup>+</sup>-cell stage; 6. early blastula period; 7. middle blastula period; 8. later blastula period; 9. early epiboly period; 10. germ ring 1/4 epiboly; 11. germ ring 1/2 epiboly; 12. germ ring 3/4 epiboly; 13. early middle; 14. tail 5/8 around yolk; 15. tail 3/4 around yolk; 16. tail 7/8 around yolk; 17. full circle around yolk; 18. tail 9/8 around yolk; 19. hatching.

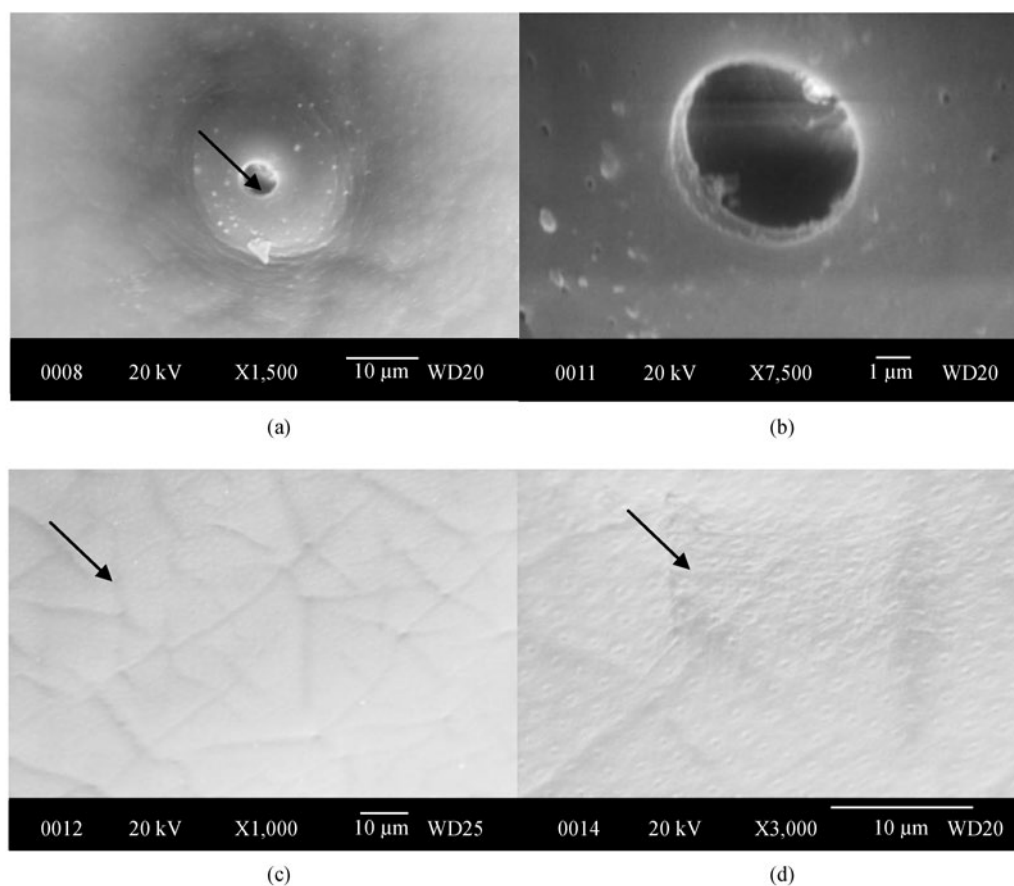


图版 II 狭鳕胚胎发育示意图

a: 胚周层; b: 囊胚层; c: 胚环; d: 胚盾; e: 神经板; f: 眼泡; g: 胚孔; h: 色素细胞; i: 体节; j: 心脏; k: 肝脏; l: 克氏泡; m: 脑室; n: 背鳍; o: 耳室; p: 肠; q: 视晶体; r: 孵化腺; s: 眼周色素; t: 胸鳍; u: 鼻孔; v: 胰脏。

**Plate II *In vivo* observations on embryonic development of the walleye pollock (bar = 200  $\mu\text{m}$ ).**

a: periblat; b: blastocoel; c: germ ring; d: embryonic shield; e: neural keel; f: optic vesicle; g: blastopore; h: pigment; i: myomeres; j: heart; k: liver; l: Kupffer's vesicle; m: encephalocoele; n: dorsal finfold; o: otic capsule; p: gut; q: lens; r: hatching glands; t: pectoral fin bud; s: eye pigment; u: nares; v: pancreas.

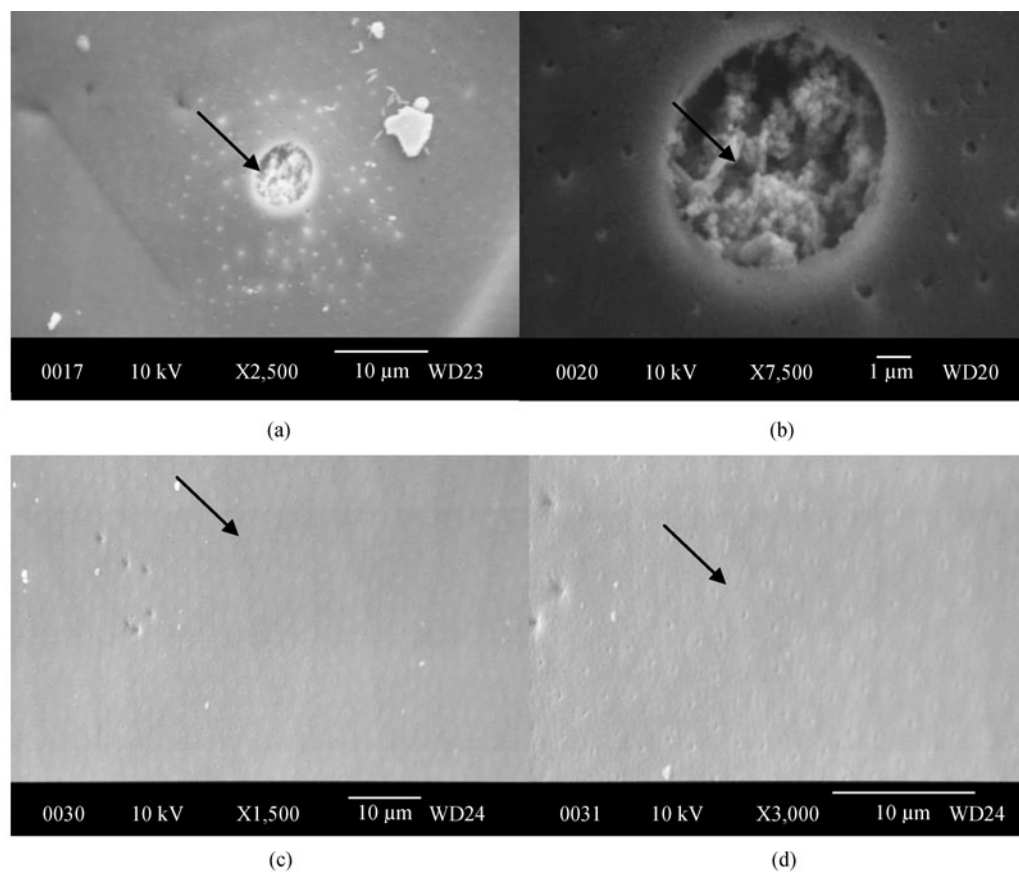


图版III 狭鳕未受精卵受精孔和卵膜结构

(a) 未受精卵受精区,箭头示受精孔; (b) 受精孔前庭平坦,但受精孔孔道较长; (c) 具褶皱未受精成熟卵子卵膜,箭头示褶皱; (d) 高倍镜下壁孔不明显,箭头示壁孔。

**Plate III Structures of walleye pollock egg surface fixed by SEM method**

(a) micropyle region of the unfertilized mature egg, arrow shows the Micropyle; (b) micropylar vestibule is flat, but the micropylar canal is long; (c) the unfertilized egg envelope with fold, arrow shows the pore canals; (d) the pore canals is not clear, arrow shows the pore canal.

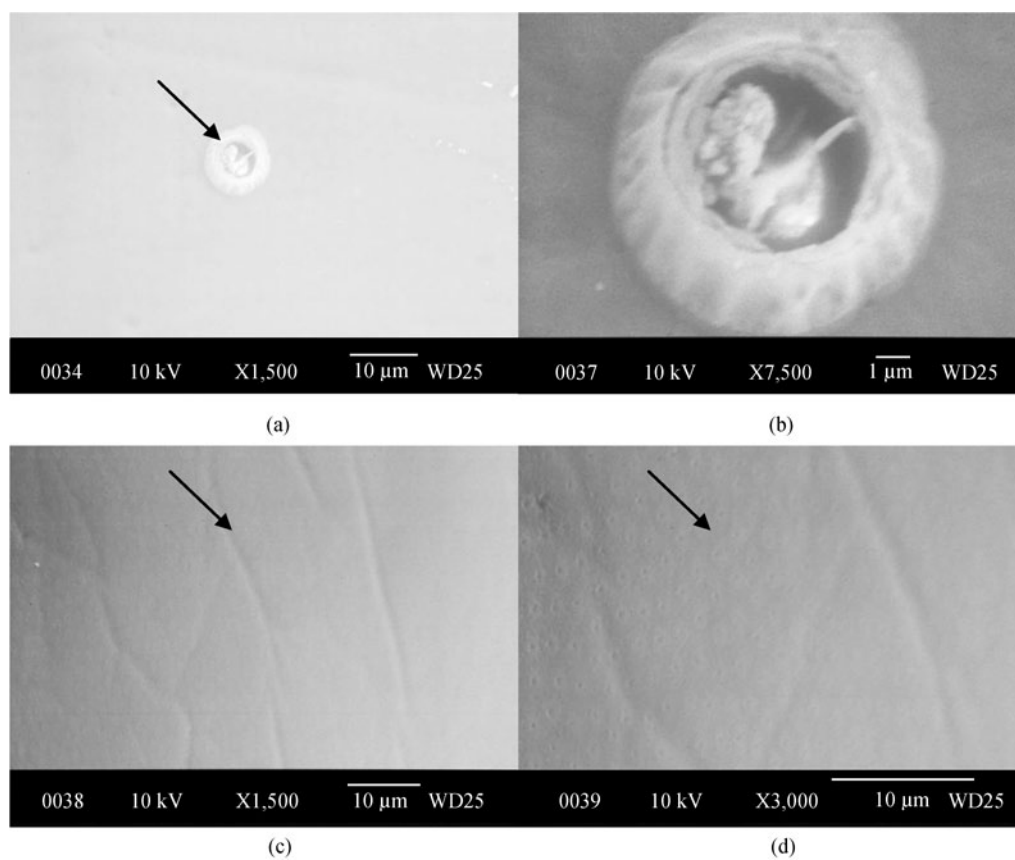


#### 图版IV 2 细胞期狭鳕卵子受精孔和卵膜结构

(a) 2 细胞期卵子受精区,箭头示完全阻塞的受精孔;(b) 完全阻塞的受精孔,箭头示卵周液;(c) 2 细胞期时卵膜稍显粗糙,褶皱减缓,箭头示褶皱;(d) 高倍镜下壁孔明显,箭头示壁孔。

#### Plate IV Structures of walleye pollock egg surface fixed at the 2-cell stage by SEM method

(a) micropyle region of the 2-cell stage, arrow shows the micropyle with the micropyle canal completely plugged with material; (b) the completely piugged micropyle, arrow shows blocked micropylar canal; (c) faint wrinkles envelope surface increase in roughness, arrow shows wrinkle; (d) the pore canals is clear, arrow shows the pore canal.

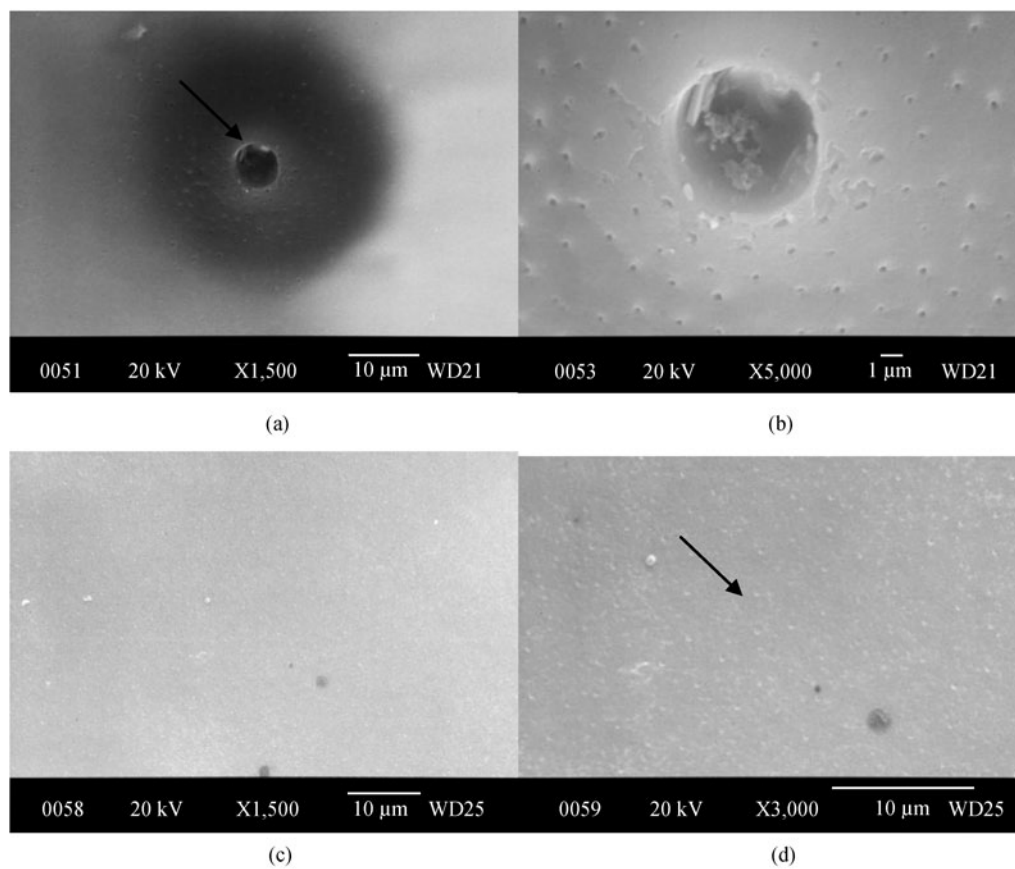


图版 V 原口关闭期狭鳕卵子受精孔和卵膜结构

(a) 原口关闭期受精区,箭头示半阻塞的受精孔; (b) 半关闭的受精孔,箭头示污染物; (c) 原口关闭期卵膜,褶皱加剧,箭头示褶皱; (d) 高倍镜下壁孔不明显,箭头示壁孔。

**Plate V Structures of walleye pollock egg surface fixed at blastopore closure stage by SEM method**

(a) micropyle region of blastopore closure stage, arrow shows the partly blocked micropyle; (b) the micropyle is partly blocked, arrow shows pollutants; (c) the envelope of the blastopore closure stage with fold, arrow shows wrinkle; (d) the pore canals is not clear, arrow shows the pore canals.



图版VI 即将孵化期狭鳕卵子受精孔和卵膜结构

(a) 即将孵化期受精区,箭头示完全塌陷的受精孔; (b) 高倍镜下即将孵化期受精孔; (c) 孵化期时卵膜十分粗糙,褶皱减弱; (d) 高倍镜下壁孔不明显,箭头示壁孔。

**Plate VI Structures of walleye pollock egg surface fixed at prehatching stage by SEM method**

(a) micropyle region of prehatching stage, arrow shows the completely deformed micropyle; (b) the micropyle of prehatching stage; (c) the egg envelope in the prehatching stage is roughness, the wrinkles is faint; (d) the pore canals is not clear, arrow shows the pore canals.