

陈学文,陈再忠. 中华青鳉胚胎低温保存研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):192-195.

中华青鳉胚胎低温保存研究

陈学文, 陈再忠

(上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要:初步研究了中华青鳉胚胎在低温条件下的保存状况,结果表明,在发眼期使用添加泥炭土的 0.5 mg/L 聚维酮碘保护液 4 ℃ 保存胚胎 15 d 后 28 ℃ 孵化,正常仔鱼率能达到 82.2%,是 3 个时期 4 种保存方式中最高的;发眼期胚胎在保存时使用添加泥炭土的 1.0 mg/L 孔雀石绿保护液,正常仔鱼率也较高,能达到 77.8%;在脊索空泡化完成期,孔雀石绿保护液浓度 4.0 mg/L 时,正常仔鱼率最低,只有 33.3%,还有一定的畸形率;其余时期的保存效果介于上述三者之间。结果表明,可以通过低温保存的方式延长青鳉胚胎的存活时间。

关键词:青鳉;胚胎;低温保存

中图分类号: S965.199.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0192-04

青鳉属青鳉目(Cyprinodontiformes)青鳉科(Oryzias),是一种小型淡水鱼,口上位,体长 20~40 mm,身体近似透明,喜欢在上层水面群体游动,易于饲养,分布广泛^[1],是被国际标准组织推荐的研究鱼类胚胎发育、遗传变异、生理特性和水生毒理学的经典模式鱼类^[2]。国外很早就将养殖青鳉作为水族箱内观赏鱼来观赏和养殖^[3],经过多年的培育出现了若干人工品种,根据颜色分有透明、白、银、橙、红、黄、金、黑、花等,体型也出现了几种不同的类型,受到了人们的广泛喜爱。青鳉卵径大,卵膜透明,发育时间长,胚胎在器官发育完全后才会出膜,是很好的科普教学材料。

我国对青鳉也有研究,1989 年我国学者对东部青鳉和日本当地青鳉做比较研究,将青鳉分为中华青鳉和日本青鳉 2 个亚种,定义我国青鳉为中华青鳉(*Oryzias latipes sinensis*)^[4-5]。我国原生青鳉分布广泛,北至黑龙江、南至海南岛、西至宁夏银川都有分布,主要生活在稻田小溪里,生物量很大^[6-7]。1924 年为了消灭蚊子,我国从菲律宾引入了食蚊鱼^[8]。食蚊鱼经过早期的适应和发展,不仅完全适应了我国的环境,而且迅速繁衍生息,将同等生态位的青鳉步步逼退^[9],稻田里青鳉的身影越来越少,原来的“土著”青鳉也只有未被食蚊鱼入侵的少量地区生存。

近些年来,随着人们对环境的日益关注和青鳉作为观赏鱼走进家庭水族箱,青鳉的生态意义和观赏价值得到了大家的认可。但在青鳉繁育工作中,却遇到了繁殖量大而鱼苗养成量小的问题。分析主要原因,一是青鳉胚胎发育时间长,28 ℃ 水温 7 d 才出膜,发育过程中易受水霉影响,很多胚胎因发霉而死亡;二是仔鱼在繁殖季连续孵出,相互之间竞争激烈,很多刚孵出的仔鱼处于劣势,因为没有合适的生存环境而被淘汰。

低温生物学是探索低温(0~5 ℃)条件下生命现象的特征和规律的学科^[10]。胚胎在低温时生命活动率低,但温度升高到适宜温度后,还能健康生长,低温并没有造成不良的影响,从而可以实现短期保存。鱼类胚胎低温保存在国内外都有研究,国外研究过虹鳉^[11]、美国鲟鱼^[12]胚胎的低温保存技术,国内对大银鱼^[13]、池沼公鱼^[14]做过胚胎的低温保存研究。本试验采用 2 种常用药孔雀石绿和聚维酮碘,还有一种常用在观赏鱼卵保存运输的泥炭土,对青鳉胚胎低温保存做了初步研究,拟解决青鳉在繁殖扩大规模上遇到的问题,帮助集约化养殖青鳉。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为中华青鳉胚胎。中华青鳉采自江苏淮安,每 200 尾养殖在 100 L 水体的水族箱内,水族箱内放置生化过滤棉加气,每天 09:00、14:00、18:00 共喂食 3 次,前 2 次喂食体重 3% 的商品细微颗粒浮性饲料,第 3 次喂食体重 5% 的新鲜卤虫。光-暗周期 14 h-10 h。每天 10:00 吸污换水 1 次。

青鳉 06:00 左右开始排卵受精,可以持续到 10:00。雌鱼排卵,雄鱼随后追随授精,受精卵会成串地挂在雌鱼臀鳍上,随着雌鱼运动卵块可能被挂在滤棉上,或者 2 h 后自由脱落。本试验采取人工采卵,待卵受精后,用小网兜将雌鱼捞离水面,用手或胶头吸管将卵块与鱼体分离,然后将雌鱼放回水中,卵块收集在一处。用体式显微镜观察胚胎的发育状况,试验之前将卵块放于培养皿中水浴锅恒温 28 ℃ 培养。

试验所用 3 个时期的胚胎分别为:发眼期胚胎(简称发眼期)、16 肌节期胚胎(简称 16 期)、脊索空泡化完成期胚胎(简称脊索期)。

1.2 仪器

OLYMPUS SZ61 体式显微镜,双列六孔恒温水浴锅(型号 HWS-26),西门子冰箱(型号 KK21V70)。

1.3 样本的处理

每份样本中包括同一发育时期的胚胎 15 粒,保护液 0.50 mL,对于要添加泥炭土的样本则加入煮沸干燥后的泥炭土 20 mg,一起放入 60 mm×40 mm 的自封袋中密封,在 4 ℃

收稿日期:2013-03-27

基金项目:上海市重点学科建设项目(编号:Y1101)。

作者简介:陈学文(1987—),男,甘肃兰州人,硕士研究生,研究方向为水产动物增殖学。E-mail:ch_xuewen@126.com。

通信作者:陈再忠,副教授,硕士生导师,主要从事水产动物繁殖生物学和观赏鱼养殖方面的研究。E-mail:chenzz@shou.edu.cn。

冰箱中冷藏,15 d 后取出在 28 ℃ 水浴锅中孵化。每个试验重复 3 次。结果从 3 个方面考察,依次为胚胎存活率、胚胎孵化率、仔鱼正常率,其计算公式如下:

胚胎存活率 = (保存 15 d 后的胚胎存活数/样本中的总胚胎数) × 100% ;

胚胎孵化率 = (孵化出苗数/保存 15 d 后的胚胎存活数) × 100% ;

仔鱼正常率 = (孵化的正常仔鱼苗数/样本中的总胚胎数) × 100% 。

1.4 数据处理

所有数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析,利用 Excel 制作图表进行分析。

2 结果

2.1 胚胎在低温保存 15 d 时只使用聚维酮碘保护液

由图 1 可知,3 个发育时期中,发眼期和 16 期保存效果较好,与脊索期差异显著,这 2 个时期在 0.5、1.0 mg/L 水平上保存效果最好。发眼期在 0.5 mg/L 水平保存效果显著,存活率为 84.4% ;16 期在 0.5、1.0 mg/L 水平上保存效果显著高于对照和 2.0 mg/L 水平,存活率都为 82.2% ,但是与同浓度的发眼期没有显著差异;脊索期 4 个水平无显著差异。在 2.0 mg/L 水平发眼期保存效果显著高于 16 期和脊索期。发眼期、16 期、脊索期的平均胚胎存活率为 75.0%、71.1%、62.5% 。

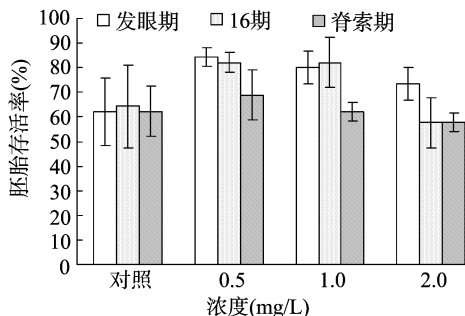


图1 以“2.1”方式保存后的胚胎存活率

由图 2 可知,发眼期胚胎在 0.5 mg/L 水平与对照、2.0 mg/L 水平组差异显著,孵化率为 84.2% ;16 期在 0.5、1.0 mg/L 水平上与对照差异显著,孵化率为 75.7%、78.4% ;脊索期在 0.5 mg/L 水平与对照差异显著,孵化率为 90.3% 。发眼期、16 期、脊索期的平均孵化率为 73.7%、73.0%、79.1% 。

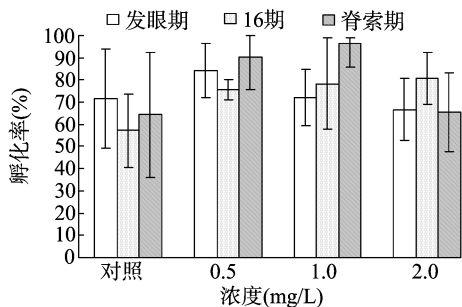


图2 以“2.1”方式保存后28 ℃ 恒温的胚胎孵化率

由图 3 可知,发眼期中 0.5 mg/L 水平与对照及 2.0 mg/L 水平差异显著,正常率为 71.11% ;16 期中 0.5、1.0 mg/L 水

平与对照及 2.0 mg/L 差异显著,正常率分别为 62.2%、60.0% ;脊索期中 0.5、1.0 mg/L 水平与 2.0 mg/L 差异显著,正常率分别为 62.2%、57.8% 。在 0.5、1.0 mg/L 水平上 3 个时期的仔鱼正常率无显著差异。发眼期、16 期、脊索期的平均仔鱼正常率分别为 54.0%、48.2%、48.3% 。

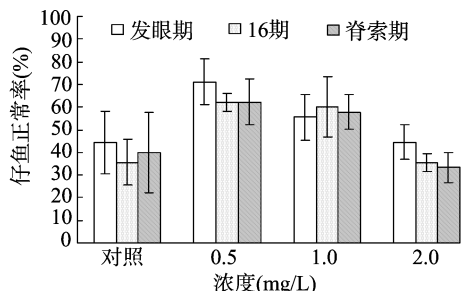


图3 以“2.1”方式保存胚胎后的仔鱼正常率

2.2 胚胎在低温保存 15 d 时使用了添加泥炭土的聚维酮碘保护液

由图 4 可知,3 个发育时期中,发眼期、16 期保存效果较好,与脊索期差异显著。在 0.5 mg/L 水平上发眼期、16 期与脊索期差异显著,存活率分别为 88.9%、86.7% 。发眼期、16 期、脊索期的平均胚胎存活率为 86.0%、84.3%、74.5% 。

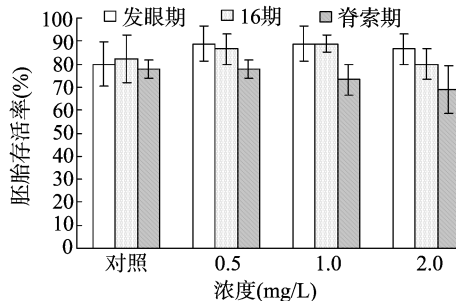


图4 以“2.2”方式保存后的胚胎存活率

由图 5 可知,3 个时期中,发眼期的胚胎孵化率最高。发眼期中 3 个水平处理 0.5、1.0、2.0 mg/L 与对照差异显著,孵化率分别为 92.5%、87.5%、76.9% ;16 期中 0.5、1.0 mg/L 水平和对照差异显著,孵化率分别为 89.7%、80.0% 。在 0.5 mg/L 水平上,发眼期、16 期保存效果最好,与脊索期差异显著,孵化率分别为 92.5%、89.7% 。发眼期、16 期、脊索期胚胎的平均孵化率为 79.5%、74.0%、79.1% 。

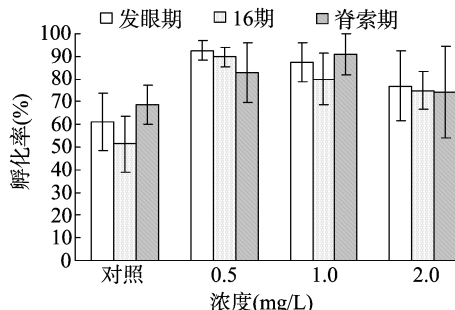


图5 以“2.2”方式保存后28 ℃ 恒温的胚胎孵化率

由图 6 可知,3 个处理中发眼期仔鱼正常率显著高于脊索期。发眼期中 0.5、1.0 mg/L 水平与对照及 2.0 mg/L 水平差异显著,正常率分别为 82.2%、77.8% ;16 期中 0.5、

1.0 mg/L 水平与对照及 2.0 mg/L 水平差异显著,正常率为 77.8%、68.9%;脊索期中 0.5、1.0 mg/L 水平与 2.0 mg/L 差异显著,正常率都为 64.4%。在 0.5 mg/L 水平,发眼期、16 期与脊索期差异显著,仔鱼正常率为 82.2%、77.8%。发眼期、16 期、脊索期的平均仔鱼正常率为 67.1%、59.8%、56.8%。

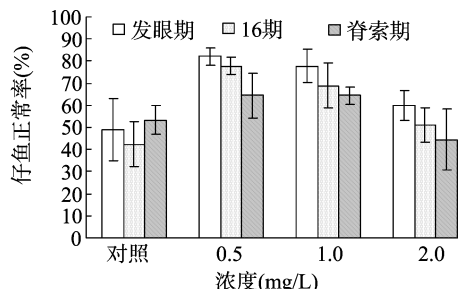


图6 以“2.2”方式保存胚胎后的仔鱼正常率

2.3 胚胎在低温保存 15 d 时只使用了孔雀石绿保护液

由图 7 可知,3 个时期的胚胎存活率无显著差异。发眼期中 3 个水平之间无显著差异。16 期中 1.0 mg/L 与对照及 2.0 mg/L 差异显著,存活率为 86.7%;脊索期在 1.0 mg/L 与对照差异显著,存活率为 82.2%。发眼期、16 期、脊索期的平均存活率为 74.5%、68.3%、72.7%。

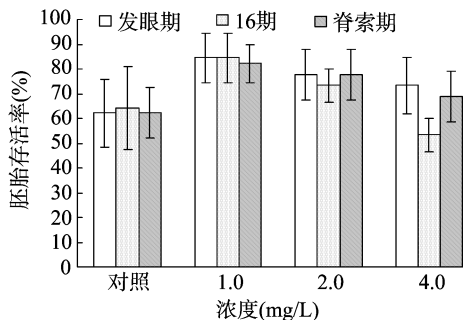


图7 以“2.3”方式保存后的胚胎存活率

由图 8 可知,16 期中 2.0 mg/L 水平孵化率最高,为 87.9%。发眼期、16 期、脊索期的平均孵化率为 73.3%、73.8%、66.2%。

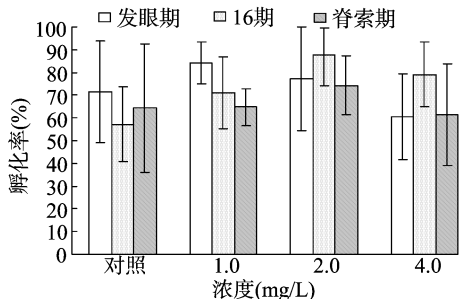


图8 以“2.3”方式保存后28℃恒温的胚胎孵化率

由图 9 可知,发眼期中 1.0 mg/L 与对照及 4.0 mg/L 水平差异显著,正常率为 71.1%;16 期中 1.0 mg/L 水平与对照及 4.0 mg/L 差异显著,正常率为 60.0%。发眼期、16 期、脊索期的平均仔鱼正常率为 51.6%、45.5%、45.0%。

2.4 胚胎在低温保存 15 d 时使用了添加泥炭土的孔雀石绿保护液

由图10可知,3个时期的胚胎存活率无显著差异,发眼期、

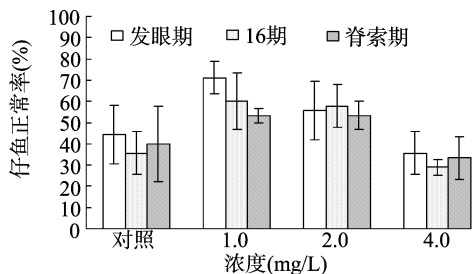


图9 以“2.3”方式保存胚胎后的仔鱼正常率

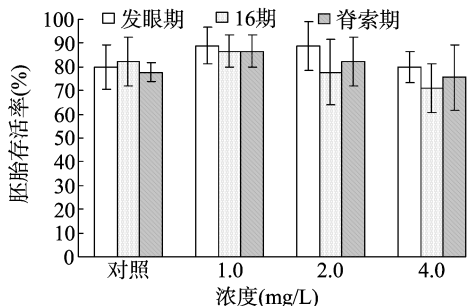


图10 以“2.4”方式保存后的胚胎存活率

16 期、脊索期的平均胚胎存活率为 84.3%、79.0%、80.5%。

由图 11 可知,发眼期、16 期与脊索期胚胎孵化率差异显著。发眼期中 1.0、2.0 mg/L 与对照及 4.0 mg/L 水平差异显著,孵化率为 87.5%、82.5%;16 期中 3 个处理组与对照差异显著,孵化率分别为 82.1%、94.3%、84.4%。脊索期中 1.0、2.0 mg/L 与 4.0 mg/L 处理水平差异显著,孵化率分别为 71.8%、78.4%。在 4.0 mg/L 水平时,发眼期、16 期与脊索期有显著差异。发眼期、16 期、脊索期的平均胚胎孵化率为 74.5%、78.1%、69.3%。

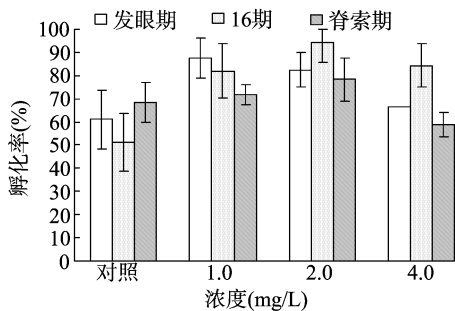


图11 以“2.4”方式保存后28℃恒温的胚胎孵化率

由图 12 可知,3 个时期的仔鱼正常率无显著差异。发眼期中 1.0、2.0 mg/L 水平与对照及 4.0 mg/L 差异显著,正常率分别为 77.8%、71.1%;16 期中 1.0、2.0 mg/L 水平与对照及 4.0 mg/L 差异显著,正常率分别为 71.1%、68.9%。脊索期中对照、1.0、2.0 mg/L 处理与 4.0 mg/L 处理差异显著,正常率分别为 53.3%、62.2%、60.0%。发眼期、16 期、脊索期的平均仔鱼正常率为 61.2%、57.7%、52.7%。

3 讨论与结论

本试验中,中华青鳉胚胎经过 15 d 的低温保存,平均存活率为 76.2%,之后又顺利孵化成仔鱼,可见低温保存青鳉胚胎是可行的。国内外已有大量关于水温对鱼类胚胎发育的影响的研究资料,主要集中在胚胎发育的有效温度、最适温

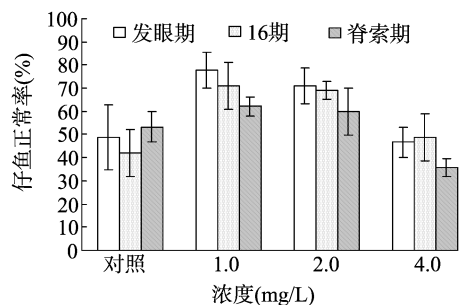


图12 以“2.4”方式保存胚胎后的仔鱼正常率

度、临界温度以及积温等^[15-17]方面,关于低温对于鱼类胚胎的影响方面研究不多。国内做过大银鱼^[13]、池沼公鱼^[14]的胚胎低温保存和短途运输技术研究,但这2种鱼的胚胎能够在低温下保存和发育。青鳉的最低产卵温度范围为21~28℃^[4],远高于低温范围(0~4℃),在这种情况下关于低温保存胚胎的研究还没有报道过。

本试验中,低温保存时青鳉胚胎经常受到水霉菌的污染,这是胚胎死亡的主要原因。水霉菌适应温度范围广,分布范围也大^[18],一旦发生将难以控制,往往给水产养殖业带来巨大的经济损失^[19]。如何控制水霉是低温保存鱼类胚胎首要解决的问题,常用方法有添加食盐^[20]、孔雀石绿^[21]、高锰酸钾、甲醛^[22]等,近些年也有关于中草药^[23]和微生态制剂^[24]用于防治水霉病的研究。本试验在采用了孔雀石绿、聚维酮碘2种药品的基础上,添加了泥炭土来防治水霉病。泥炭土是分解不充分的植物残体积累而形成的土壤,经常用于鳊科鱼其他种属的运输保存,效果很好^[25]。本试验观察到泥炭土阻碍了水霉菌丝的扩散,有效抑制了水霉。

本试验选取了3个不同发育时期发眼期、16肌节期、脊索空泡化完成期的胚胎进行低温保存,结果发现,发眼期胚胎的存活率、孵化率和仔鱼正常率都较高,比其他2个时期保存效果好。在超低温冷冻保存鱼类胚胎的研究中,发现不同发育时期的胚胎对抗冻剂的抗性不同^[26],在对青鳉胚胎的超低温保存中发现保护剂的毒性在发眼期最弱^[27]。

本试验对青鳉胚胎低温保护液设置了不同的浓度,结果表明高浓度的保护液(聚维酮碘2.0 mg/L、孔雀石绿4.0 mg/L)对青鳉胚胎有伤害作用,这种作用不仅表现在低温保存后的存活、孵化,还表现在仔鱼正常率低、畸形率较高。

综上所述,本试验对3种时期的青鳉胚胎用2种药品、4种方式低温4℃保存,随后进行28℃恒温孵化,对低温保存后的存活率、28℃时的孵化率和最后出苗的仔鱼正常率做了考察,结果表明,在低温保存时低浓度的保护液能起到较好的保存效果,最后仔鱼正常率能达到60%以上;而添加泥炭土的保护组存活率、孵化率和仔鱼正常率效果更好。仔鱼正常率最高的是添加泥炭土的0.5 mg/L聚维酮碘保护组,最后的仔鱼正常率达到了82.2%。

参考文献:

- [1] Uwa H. Karyotype evolution and geographical distribution in the ricefish genus *Oryzias* [J]. *Indopacific Fish Biology*, 1986; 867-876.
- [2] Huang Y, Biddinger G R, Gloss S P. Bioaccumulation of 14C-hexachlorobenzene in eggs and fry of Japanese medaka *Oryzias latipes* [J].

- Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1986, 36: 437-443.
- [3] Yamamoto T. Medaka - Biology and strains [M]. Tokyo: Keigaku Publishing Company, 1962; 30-32.
- [4] 黄玉瑶. 青鳉的生物学特性与饲养管理技术[J]. 动物学杂志, 1988, 23(6): 28-31.
- [5] Chen Y R, Hiroshi U, Chu X L. Taxonomy and distribution of the genus *Oryzias* in Yunnan, China [J]. *Acta Zootaxonomica*, 1989, 14(2): 239-246.
- [6] 张党民. 黑龙江省鱼类志[M]. 哈尔滨: 黑龙江省科学技术出版社, 1995: 207-209.
- [7] 赵红雪. 宁夏鳉形目鱼类1新纪录种——青鳉[J]. 淡水渔业, 2006, 36(5): 10.
- [8] 李家乐. 中国外来水生动物植物[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2007: 58.
- [9] Kitching R L, Wiley J, Brisbane S. The ecology of exotic animals and plants [M]. Milton: John Wiley and Sons, 1986: 7-25.
- [10] 陈松林. 鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 34-37.
- [11] Lahnsteiner F, Mansour N, Weismann T. The cryopreservation of spermatozoa of the burbot, *Lota lota* (Gadidae, Teleostei) [J]. *Cryobiology*, 2002, 45(3): 195-203.
- [12] 任维美. 美国鲟鱼卵的消毒和脱粘方法[J]. 水产科技情报, 2003, 30(3): 133.
- [13] 秦伟. 大银鱼受精卵采集、低温无水保存和运输的初步研究[J]. 水利渔业, 1994(5): 24-26.
- [14] 解玉浩, 李勃, 冯辉. 池沼公鱼受精卵低温无水保存和运输的初步研究[J]. 水利渔业, 1989(1): 17-19.
- [15] 张耀光, 何学福, 蒲德永. 长吻鮠胚胎和胚后发育与温度的关系[J]. 水产学报, 1991, 15(2): 172-176.
- [16] 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, 20(3): 9-10.
- [17] 袁伦强, 谢小军, 曹振东, 等. 温度对瓦氏黄颡鱼胚胎发育的影响[J]. 动物学报, 2005, 51(4): 753-757.
- [18] Steciow M M, Paul A, Bala K. *Saprolegnia bulbosa* sp. nov. isolated from an Argentine stream; taxonomy and comparison with related species [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 268(2): 225-230.
- [19] Tampieri M P, Galuppi R, Carelle M S, et al. Effect of selected essential oils and pure compounds on *Saprolegnia parasitica* [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2003, 41(8): 584-591.
- [20] Kitanchareon N, Ono A, Yamamoto A. The fungistatic effect of NaCl on rainbow trout egg saprolegniasis [J]. *Fish Pathology*, 1997, 32(3): 159-162.
- [21] Srivastava S, Sinha R, Roy D. Toxicological effects of malachite green [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 66(3): 319-329.
- [22] 高鹏, 杨先乐, 张书俊. 几种常用水产消毒剂对水霉的体外作用效果[J]. 水产科技情报, 2007, 34(6): 247-250.
- [23] 张为民. 中草药在鳊病防治中的应用[J]. 广东饲料, 1995, 4(5): 37-39.
- [24] 宋学宏, 陈葵, 王永玲, 等. EM及重氢硫酸盐对黄颡鱼卵孵化中水霉的抑制作用[J]. 淡水渔业, 2007, 37(1): 9-12.
- [25] 吴瑞板. 卵生鳞鱼的饲养与赏析[M]. 台北: 台湾鱼杂志社, 2011: 154.
- [26] Cabrita E, Chereguini O, Luna M, et al. Effect of different treatments on the chorion permeability to DMSO of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Aquaculture*, 2003, 221(1/2/3/4): 593-604.
- [27] 秦洁. 青鳉胚胎发育培养及冷冻保存研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2010.