

何兴恒,谭 刚. 大渡河重口裂腹鱼胚胎发育初步研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(4):164-168.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.04.030

大渡河重口裂腹鱼胚胎发育初步研究

何兴恒,谭 刚

(四川律贝生物科技有限公司,四川成都 610000)

摘要:2017 年 6—10 月,对大渡河重口裂腹鱼的胚胎发育过程进行了初步研究,结果表明,成熟鱼卵呈卵圆形,受精卵吸水膨胀后,平均卵径约 3.5 mm,淡黄色或橘黄色,弱黏性的沉性卵。其胚胎发育过程经历胚盘、卵裂、囊胚、原肠胚、神经胚、器官形成和出膜 7 个阶段。在水温 16~18 ℃ 的情况下,受精卵经历 134 h 左右孵出仔鱼,出膜仔鱼平均全长 9.8 mm。

关键词:大渡河;重口裂腹鱼;胚胎发育

中图分类号:S961.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)04-0164-04

重口裂腹鱼(*Schizothorax davidi* Sauvage)属于鲤形目、鲤科、裂腹鱼亚科、裂腹鱼属,分布于大渡河中、下游及支流,岷江及支流,沱江、涪江、嘉陵江和渠江上游及任河^[1-2],是长江上游重要的冷水经济鱼类之一。近十几年来,由于人为的过度捕捞和各级水电站的建设等原因,对重口裂腹鱼生态环境造成了很大的影响,导致其野生资源量急剧下降。大渡河黑鱼鱼类增殖站近几年对大渡河的重口裂腹鱼等珍稀濒危鱼类进行了人工驯化、繁育,以期为大渡河流域实施其特有经济鱼类的人工增殖放流提供技术和苗种保障。

目前对重口裂腹鱼的人工繁殖^[2-4]、形态发育^[5-7]等方面已有了少数研究,但关于其人工催产和胚胎发育还未见报道,因此,笔者于 2017 年 6—10 月,对重口裂腹鱼的胚胎发育过程进行了初步研究,以期为重口裂腹鱼的人工繁育和增殖放流提供基础资料。

1 材料与方法

本试验所用重口裂腹鱼野生亲鱼是在大渡河中、下游水域捕获,于大渡河黑鱼鱼类增殖放流站进行驯化和人工繁殖。本研究所用亲鱼雌、雄比例为 3:1。2017 年 5 月开始对其进行冲水强化培育,

9 月开始进行人工催产。雌鱼采用 2 次体腔注射的方法,第 1 次注射为 1/3 剂量,第 2 次注射剩余剂量。雄鱼采用一次性体腔注射的方法,注射剂量为雌鱼总剂量的 1/2。

本研究采用干法受精,获得的鱼卵加入精液后用少量清水激活,静置 20 s 左右,用清水漂洗 3~4 次,将血块和多余的精液去除。将受精卵放入准备好的孵化筛中进行微流水孵化,水温控制在 16~18 ℃。每隔一定时间段,取同一批次的受精卵 10 枚置于显微镜下进行观察、记录。相机记录时间以同批受精卵一半以上出现相同发育时期为准。

2 结果与分析

2.1 受精卵

重口裂腹鱼裂腹鱼卵为沉性卵,呈现多种颜色如淡黄色或橘黄色或淡灰色等,不同个体的卵颜色不一定相同,这可能是因为个体差异、食物和环境等因素导致。受精卵具有弱黏性,随着时间黏性逐渐消失,卵膜吸水膨胀至最大,卵径约为 3.5 mm(图 1-2)。

2.2 胚盘形成阶段

受精后 1 h 5 min,可见原生质呈丝状向动物极集中,并逐渐隆起形成胚盘,呈直立状(图 1-3、表 1)。受精后 1 h 52 min,动物极出现明显的胚盘,隆起高度约占卵黄的 1/3,此时胚体呈侧卧状,此阶段为胚盘期(图 1-4)。

2.3 卵裂阶段

重口裂腹鱼的卵裂发生于胚盘,为盘状卵裂。受精后 2 h 30 min,胚盘隆起中部逐渐下陷形成分

收稿日期:2018-12-16

作者简介:何兴恒(1985—),男,四川南充人,水产工程师,主要从事水产养殖技术研究。E-mail:416186795@qq.com。

通信作者:谭 刚,硕士研究生,水产工程师助理,主要从事鱼类分类、鱼类生态和水产养殖技术研究。E-mail:164683932@qq.com。

裂沟,将胚盘分裂为 2 个大小相似的分裂球,为 2 细胞期(图 1-5)。受精后 3 h 42 min,再次分裂,并与第一次分裂面相垂直,形成 4 个大小相似的细胞,进入 4 细胞期(图 1-6),由于重心降低,胚盘再次转为直立。受精后 4 h 56 min,出现第 3 次分裂,2 条分裂沟与第 1 次分裂沟平行,与第 2 次分裂沟垂直,形成 2 排 4 列 8 个大小相似的分裂球,此为 8 细胞期(图 1-7)。受精后 6 h 25 min,进行第 4 次分裂,与第 2 次分裂沟平行,形成 16 个细胞。均匀排列为 4 排,每排 4 个,大小相似,但单个细胞已明显变小,此为 16 细胞期(图 1-8)。受精后 7 h 30 min,出现第 5 次分裂,单个细胞进一步显小,细胞分裂进入 32 细胞期(图 1-9)。受精后 8 h 35 min,开始出现第 6 次分裂,分裂沟出现的同步性较差,并且开始纬向分裂,细胞团有向上隆起的趋势,其外缘细胞排列由方形过渡为圆形,由于重心变化,胚胎开始逐渐侧卧,进入 64 细胞期(图 1-10)。受精后 11 h 7 min,随着分裂球细胞不断增多,细胞进一步变小,向上堆积隆起,但细胞界限明显,形似桑葚,称为桑葚期,即多细胞期(图 1-11)。胚胎逐渐由直立转为明显侧卧状。

2.4 囊胚阶段

受精后 12 h 4 min,动物极细胞继续分裂。分裂球数急剧增多,使胚体呈侧卧状。随之囊胚腔的出现,胚胎发育进入囊胚初期(图 1-12)。受精后 14 h 30 min,随着分裂球细胞分裂的次数递增,细胞越来越小,再也看不出细胞界限,在动物极分裂球细胞隆起达到最高,约占卵球高度的 1/4,此为囊胚中期,又称高囊胚期(图 1-13)。受精后 16 h 41 min,囊胚细胞向边缘扩展,胚盘逐渐降低,呈小帽状覆盖在卵黄体上,胚体逐渐转为半直立状态,胚胎发育进入囊胚晚期,又称低囊胚期(图 1-14)。

2.5 原肠胚阶段

受精后 26 h 5 min,分裂球细胞由动物极向植物极移动下包,至卵黄高度的 1/3,标志着原肠作用开始,边缘细胞较大且排列平坦,胚胎由侧卧逐渐转为直立,此为原肠早期(图 1-15)。受精后 34 h 49 min,胚层下包至卵黄囊的 1/2 时,在动物极和植物极之间出现胚环。在胚环上,胚层细胞移动集中增厚,形成胚盾。此时胚胎由直立又逐渐转为侧卧状态,为原肠中期(图 1-16)。

受精后 38 h 36 min,胚层继续下包至卵黄囊的 2/3 处,此时,胚层包围了大部分卵黄。随之胚盾伸

长,前端略显膨大,胚胎发育进入原肠晚期(图 1-17)。受精后 41 h 26 min。下包至 3/4,进入大卵黄栓期(图 1-18)。受精后 42 h 57 min,胚层继续下包至卵黄的 5/6 处,仅露出极少卵黄,进入小卵黄栓期(图 1-19)。受精后 45 h 57 min,胚层完全包裹住卵黄,胚孔封闭,称为胚孔封闭期(图 1-20)。

2.6 神经胚阶段

受精后 48 h 34 min,在胚体的中轴线上出现神经索,胚体前端逐渐膨大形成脑泡。整个胚体紧贴于卵黄囊上,胚胎发育进入神经胚期(图 1-21)。

2.7 器官形成阶段

受精后 51 h 44 min,在胚体前端形成眼泡,呈椭圆形结构(图 1-22),几乎同时,胚体中部出现 2~5 对肌节。受精后 55 h 40 min,胚体眼泡内出现凹陷,肌节为 5~7 对,即眼囊出现期(图 1-23)。

受精后 60 h,胚体肌节数增多,肌节增加为 25 对左右时,背部肌节开始出现缓慢微弱的运动,是为肌肉效应期。受精后 64 h 48 min 耳囊原基出现(图 1-24),受精后 71 h 37 min,胚体尾部开始与卵黄囊分离,尾芽伸长(图 1-25)。此时肌节为 25 对左右。受精后 74 h 18 min,胚体头部腹面与卵黄囊前端间出现 1 个小的空隙,即为围心腔,其内形成一斜长的较透明细胞团,是为心脏原基期。随着尾芽的伸长,卵黄囊被分为球状囊和一小部分被牵拉向后延伸成棒状(图 1-26~29)。

受精后 77 h 7 min,胚体扭动频率增加为 18 次/min,主要以胚体中部第 3~7 对肌节产生收缩效应带动胚体尾部一起形成扭动。受精后 80 h 37 min,眼晶体出现(图 1-27)。同时,胚体扭动次数增至 25 次/min 左右,以胚体尾部左右摆动为主,如此反复。由于此时尾部伸长较快,可带动整个胚体及卵黄囊在膜内转动。随后,心脏形成,为较透明管状,并开始搏动。搏动次数 35~50 次/min。受精后 85 h 58 min,两侧耳囊内各出现 1 对耳石(图 1-28)。此时胚体尾部无规律的左右摆动,并带动整个胚体及卵黄囊在卵膜内大幅度转动。在耳囊后下方,形成月牙状的胸鳍原基。受精后 90 h 8 min,胚体吻端形成 1 对嗅囊(图 1-29)。

2.8 出膜阶段

受精后 131 h 52 min,部分仔鱼开始出膜。134 h 后,逾半数仔鱼孵化出膜。139 h 45 min 出膜完成,整个出膜历时 7 h 53 min。出膜前,卵膜在孵化酶的作用下逐渐变软变薄^[6],胚体在膜内运动加

剧,时而旋转,时而翻滚,最终以尾部或头部首先破膜。

初孵仔鱼通体透明,体色素尚未形成。全长 9.8~10.2 mm。卵黄囊前端球状,后端呈棒状,紧贴仔鱼腹部(图 1-30)。多数时间侧卧于容器底部,间歇性作尘焰式向上运动。

表 1 大渡河重口裂腹鱼胚胎发育过程

发育阶段	水温 (℃)	发育期	距受精时间 (h:min)	图序
胚盘形成阶段	16	未受精卵	0:00	图 1-1
	16	受精卵	0:00	图 1-2
	16	胚盘期	1:05	图 1-3、4
卵裂阶段	16	2 细胞期	2:30	图 1-5
	16	4 细胞期	3:42	图 1-6
	16	8 细胞期	4:56	图 1-7
	16	16 细胞期	6:25	图 1-8
	16	32 细胞期	7:30	图 1-9
	16	64 细胞期	8:35	图 1-10
	16	桑葚期	11:07	图 1-11
	16	囊胚早期	12:04	图 1-12
囊胚阶段	16	囊胚中期	14:30	图 1-13
	16	囊胚晚期	16:41	图 1-14
原肠阶段	16	原肠早期	26:05	图 1-15
	16	原肠中期	34:49	图 1-16
	16	原肠晚期	38:36	图 1-17
神经胚阶段	16	大卵黄栓期	41:26	图 1-18
	16	小卵黄栓期	42:57	图 1-19
	16	胚孔封闭期	45:57	图 1-20
	16	神经胚期	48:34	图 1-21
器官形成阶段	17	肌节出现期	51:44	图 1-22
	17	眼囊期	55:40	图 1-23
	17	耳囊期	64:48	图 1-24
	17	尾芽期	71:37	图 1-25
	17	心脏原基期	74:18	图 1-26
	17	眼晶体出现期	80:37	图 1-27
	17	耳石期	85:58	图 1-28
	17	嗅囊期	90:08	图 1-29
出膜阶段	18	出膜期	131:52	图 1-30

3 讨论

3.1 重口裂腹鱼胚胎发育与其他裂腹鱼比较

重口裂腹鱼的胚胎发育过程同其他裂腹鱼属鱼类较为一致,但也有不同之处(表 2)。主要表现:(1)吸水膨胀后的卵径差异,重口裂腹鱼卵径为 3.5 mm,小于四川裂腹鱼(*S. kozlovi*)(3.7 mm)^[8-9]、松潘裸鲤(*Gymnocypris potanini*)(4.0 mm)^[10]、细鳞裂

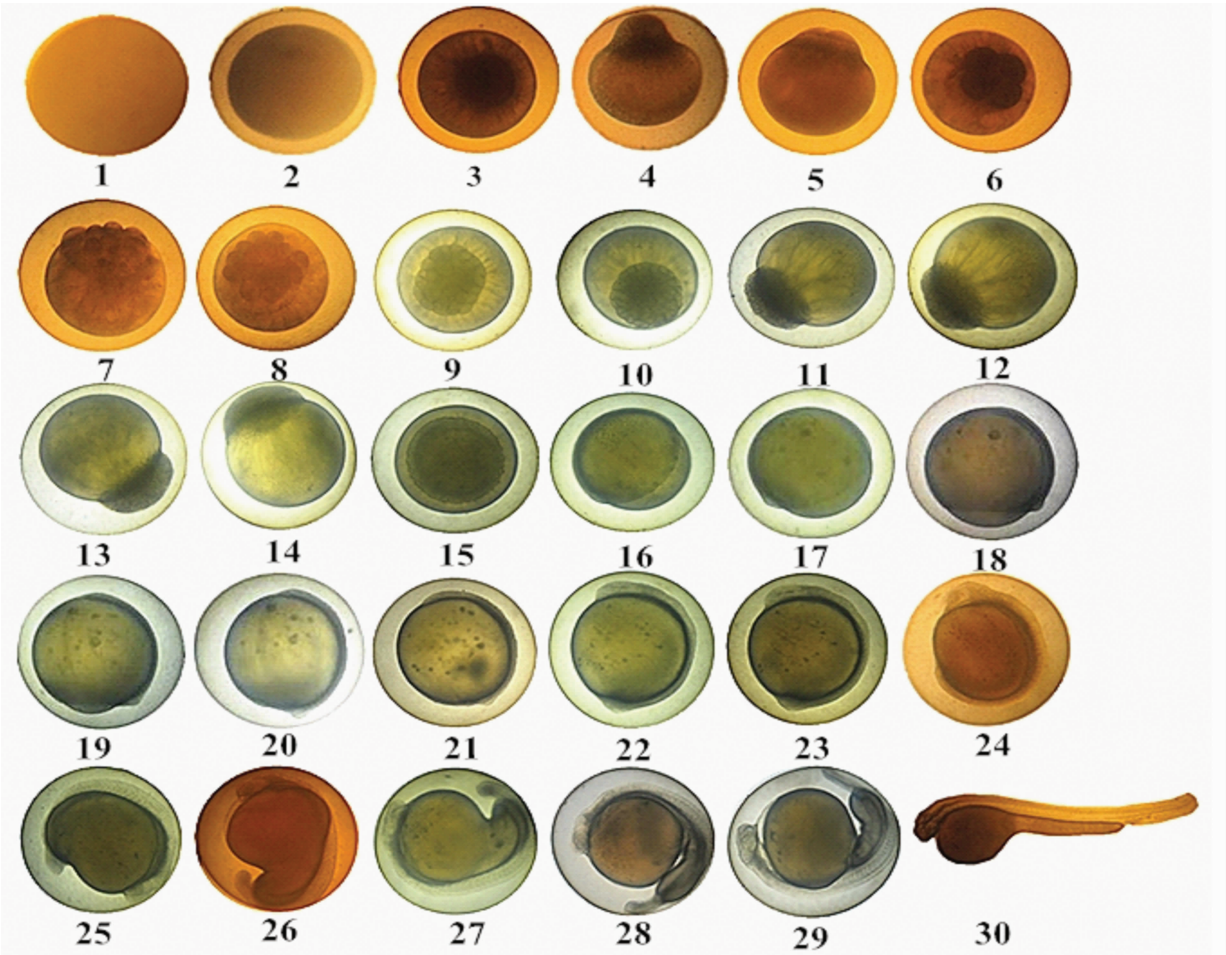
腹鱼(*S. chongi*)(3.8 mm)^[11]、齐口裂腹鱼(*S. prenanti*)(4.2 mm)^[12]、短须裂腹鱼(*S. wangchiachii*)(3.9~4.1 mm)^[13-14]和长丝裂腹鱼(*S. dolichonema*)(4.2 mm)^[15]的卵径;大于小裂腹鱼(*S. parvus*)(3.0 mm)^[16]、伊犁裂腹鱼(*S. pseudaksaiensis*)(2.9~3.1 mm)^[17]、塔里木裂腹鱼(*S. biddulphi*)(2.9 mm)^[18]和光唇裂腹鱼(*S. lissolabiatu*s)(3.2 mm)^[19];(2)耳囊期出现时期不同,重口裂腹鱼的耳囊期出现在尾牙期之前,与短须裂腹鱼、齐口裂腹鱼和塔里木裂腹鱼相同,而四川裂腹鱼、细鳞裂腹鱼、伊犁裂腹鱼、长丝裂腹鱼和小裂腹鱼的耳囊期出现在尾牙期之后;(3)肌肉效应期出现时期不同,重口裂腹鱼的肌肉效应期出现在晶体期之前,与短须裂腹鱼、齐口裂腹鱼、松潘裸鲤、小裂腹鱼和塔里木裂腹鱼相同,而与光唇裂腹鱼、细鳞裂腹鱼和长丝裂腹鱼不同;(4)初孵仔鱼长度不同,重口裂腹鱼的初孵仔鱼长度(9.8 mm),小于齐口裂腹鱼(11.0 mm)和短须裂腹鱼(10.9 mm),大于四川裂腹鱼(7.8~8.5 mm)、小裂腹鱼(7.5 mm)、伊犁裂腹鱼(7.9 mm)、塔里木裂腹鱼(7.3 mm)和光唇裂腹鱼(8.5 mm)。

3.2 水温对重口裂腹鱼胚胎发育的影响

水温是影响鱼类胚胎发育和仔鱼胚后发育的重要因素之一。水温过高会缩短整个发育过程,并且引起畸形苗出现概率增大;水温过低会延长发育过程,并引起胚胎发育过程死亡率增加,还会使仔鱼生长缓慢等情况。本研究用山泉水对重口裂腹鱼受精卵进行孵化,水温在 16~18℃,这与其在自然条件下繁殖水温度 14~19℃较为接近。在水温 16~18℃时,采用微流水的环境,受精卵出膜率能够达到 85%以上,并且畸形苗出现率最低。重口裂腹鱼的胚胎发育温度与齐口裂腹鱼(16.8℃)、细鳞裂腹鱼(17℃)、塔里木裂腹鱼(16~19℃)、光唇裂腹鱼(15~17℃)相接近,但发育经历时间要小于光唇裂腹鱼(174.3 h),高于塔里木裂腹鱼(93 h)和细鳞裂腹鱼(124 h),与齐口裂腹鱼(134 h)相近,这可能由生存环境、分布区域和物种差异等原因引起。

3.3 重口裂腹鱼胚胎发育过程的注意事项

重口裂腹鱼属于冷水性鱼类,胚胎发育过程中,需要及时地清除孵化筛中的死卵和漂浮在卵周围的飞蛾等生物,防止霉变,此外还要保持孵化水流速度、水温、pH 值等。当发育到出膜期的时候,需要将孵化筛转移到小型孵化盆中,并减少进水量。



1—未受精卵；2—受精卵；3、4—胚盘期；5—2 细胞期；6—4 细胞；7—8 细胞；8—16 细胞；9—32 细胞；10—64 细胞；11—多细胞期；12—囊胚早期；13—囊胚中期；14—囊胚晚期；15—原肠初期；16—原肠中期；17—原肠晚期；18—大卵黄栓期；19—小卵黄栓期；20—胚孔封闭期；21—神经胚期；22—肌节出现期；23—眼囊出现期；24—耳囊出现期；25—尾芽期；26—心脏原基期；27—眼晶体出现期；28—耳石期；29—嗅囊期；30—出膜仔鱼

图1 重口裂腹鱼的胚胎发育过程

表 2 重口裂腹鱼与其他裂腹鱼的胚胎发育比较

物种名	胚胎发育经历时间	胚胎发育水温 (℃)	受精卵径 (mm)	初孵仔鱼长度 (mm)
四川裂腹鱼	130 h	11.0 ~ 21.0	3.7	7.8 ~ 8.5
齐口裂腹鱼	134 h	16.8	4.2	11.0
小裂腹鱼	186.5 h	13.4	3.0	7.5
细鳞裂腹鱼	124 h	17.0	3.8	9.0 ~ 11
伊犁裂腹鱼	125 h 30 min	19.0 ~ 21.0	2.9 ~ 3.1	7.9
塔里木裂腹鱼	93 h	16.0 ~ 19.0	2.9	7.3
光唇裂腹鱼	174.3 h	15.0 ~ 17.0	3.2	8.5
短须裂腹鱼	192.5 h	12.7 ~ 14.0	3.9 ~ 4.1	10.9
长丝裂腹鱼	132 h 25 min	15.9	4.2	10.2
重口裂腹鱼	134 h	16.0 ~ 18.0	3.5	9.8

参考文献:

[1] 丁瑞华. 四川鱼类志[M]. 成都:四川科学技术出版社,1994.

[2] 彭 洪, 吴 彬, 陈 斌, 等. 野生重口裂腹鱼[*Schizothorax (Racoma) davidi* (Sauvage)]的性腺发育观察与人工繁殖研究[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(3): 651 - 655.

[3] 宋旭燕, 吉小盼, 杨玖贤. 基于栖息地模拟的重口裂腹鱼繁殖期适宜生态流量分析[J]. 四川环境, 2014, 33(6): 27 - 31.

[4] 王燕群, 陈 禧, 罗 鹏, 等. 攀西地区重口裂腹鱼人工繁殖试验初探[J]. 基层农技推广, 2017, 5(7): 53 - 55.

[5] 严大明, 周翠萍, 李忠利, 等. 实验室饲养的重口裂腹鱼仔鱼的形态发育与生长[J]. 四川农业大学学报, 2007(4): 493 - 497, 525.

祭仲石,厉成新,王中清,等.嗜水气单胞菌灭活疫苗对鲫鱼的免疫效果[J].江苏农业科学,2020,48(4):168-171.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.04.031

嗜水气单胞菌灭活疫苗对鲫鱼的免疫效果

祭仲石,厉成新,王中清,韦艳,张木泓

(上海市海丰水产养殖有限公司,江苏盐城 224151)

摘要:随着食品安全等问题日趋严重,寻找良好而安全的防治细菌性疾病的方法迫在眉睫。本研究利用从患病鲫鱼体内分离的嗜水气单胞菌制备灭活疫苗,用(50±5)g的健康鲫鱼作为试验对象,免疫组腹腔注射制备的疫苗,对照组腹腔注射等量的磷酸缓冲液。二次免疫后1、7、14、21、28d检测血清凝集效价、血清中溶菌酶活性和酸性磷酸酶活性;二次免疫28d后,对免疫组和对照组同时腹腔注射嗜水气单胞菌进行攻毒,观察鲫鱼生长状况,记录死亡率。结果表明,免疫组血清凝集效价在免疫后逐渐升高,在21d达到峰值,明显高于对照组;血清中溶菌酶活性和酸性磷酸酶活性都于免疫后14d达到峰值,明显高于对照组;攻毒结果显示,免疫组死亡率10.0%,对照组死亡率83.7%,相对保护率达到88.5%。说明制备的嗜水气单胞菌灭活疫苗可以诱导鲫鱼产生免疫应答反应,对嗜水气单胞菌的感染具有较好的免疫保护作用。

关键词:嗜水气单胞菌;疫苗;免疫保护;鲫鱼;血清凝集效价;溶菌酶;酸性磷酸酶

中图分类号:S942.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)04-0168-04

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)属于γ-变形菌纲气单胞菌目气单胞菌科气单胞菌属^[1-2]。嗜水气单胞菌是水产养殖中多种疾病的病原菌,广泛存在自然水体与养殖水体中,在池塘水质恶化、养殖对象体质下降时往往诱发疾病,给水产养殖带来重大损失^[3-5]。嗜水气单胞菌是一种重

要的淡水养殖病原菌,可以感染多种水产动物,其中以细菌性败血症最为严重,一般表现为体表和鳍条充血、肛门红肿、腹部肿胀、有腹水等^[6-7]。该病在每年的6—9月高发,暴发迅速,一旦暴发往往造成巨大的损失。目前,治疗嗜水气单胞菌引起的疾病主要还是依靠内服抗生素和外用消毒剂来控制,但是,抗生素和消毒剂的长期不合理使用容易产生耐药菌株^[8-9],同时抗生素和消毒剂在鱼体内残留也导致了食品安全问题。因此,寻找安全有效的方法控制细菌性疾病对水产养殖及食品安全方面具有重要意义。

运用免疫学方法,制备细菌疫苗,是控制细菌

收稿日期:2019-01-09

基金项目:国家大宗淡水鱼产业体系上海综合试验站海丰农场示范片(编号:CARS-46-30-6)。

作者简介:祭仲石(1989—),男,江苏盐城人,硕士,水产工程师,主要从事水产养殖疾病检测与防治工作。E-mail:973691132@qq.com。

[6]严太明,刘小帅,杨淞,等.重口裂腹鱼鳞片发育和覆盖过程[J].动物学杂志,2014,49(3):391-398.

[7]李忠利,陈永祥,胡思玉,等.四川裂腹鱼和重口裂腹鱼形态差异的多元分析[J].动物学杂志,2015,50(4):547-554.

[8]陈永祥,罗泉笙.四川裂腹鱼繁殖生态生物学研究(续) II 胚胎发育的研究[J].毕节师专学报,1994(4):1-7.

[9]陈永祥,罗泉笙.乌江上游四川裂腹鱼的胚胎发育[J].四川动物,1997(4):163-167.

[10]吴青,王强,蔡礼明,等.松潘裸鲤的胚胎发育和胚后仔鱼发育[J].西南农业大学学报,2001,23(3):276-279.

[11]向成权,曾如奎,邓龙君,等.细鳞裂腹鱼人工催产及胚胎发育观察[J].现代农业,2018(8):78.

[12]吴青,王强,蔡礼明,等.齐口裂腹鱼的胚胎发育和仔鱼的早期发育[J].大连水产学院学报,2004,19(3):218-221.

[13]左鹏翔,李光华,冷云,等.短须裂腹鱼胚胎与仔鱼早期发育特性研究[J].水生生态学杂志,2015,36(3):77-82.

[14]刘阳,朱挺兵,吴兴兵,等.短须裂腹鱼胚胎及早期仔鱼发育观察[J].水产科学,2015,34(11):683-689.

[15]刘小帅,王红梅,甘维熊,等.雅砻江长丝裂腹鱼胚胎形态发育及仔鱼生长研究[J].安徽农业科学,2017,45(31):118-121.

[16]冷云,徐伟毅,刘跃天,等.小裂腹鱼胚胎发育的观察[J].水利渔业,2006,26(1):32-33.

[17]蔡林钢,牛建功,张北平,等.伊犁裂腹鱼胚胎及早期仔鱼发育的观察[J].淡水渔业,2011,41(5):74-79.

[18]龚小玲,崔忠凯,吴敏芝,等.塔里木裂腹鱼胚胎和仔鱼的发育与生长[J].上海海洋大学学报,2013,22(6):827-834.

[19]申安华,李光华,赵树海,等.光唇裂腹鱼胚胎发育与仔鱼早期发育的研究[J].水生生态学杂志,2013,34(6):76-80.