

文章编号 :1000 - 0615(2006)04 - 0433 - 11

大西洋牙鲆冷冻精子 × 褐牙鲆卵杂交胚胎的发育及胚后发育

田永胜¹, 陈松林^{1,2}, 刘本伟¹, 王 波³

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071; 2. 上海水产大学 E-研究院, 上海 200090 3. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘要: 利用大西洋牙鲆冷冻精子与褐牙鲆卵授精, 培育出了生长健康的杂交鱼苗。并对杂交后代的胚胎发育、胚后发育和不同温度下的生长特征进行了研究。利用 OLIMPUS 显微镜连续观察和描述了冷冻精子受精杂交胚胎的发育, 在水温 15~17.1℃, 其受精卵经过卵裂、囊胚、原肠胚、胚孔封闭、肌节胚、尾芽胚、心跳胚、出膜胚等时期的发育, 经历 65 h 57 min 完成胚胎发育进入胚后发育, 发现胚胎撬动 15 min 后心脏开始跳动。利用 OLIMPUS 解剖镜每天观察和记录一次鱼苗的生长形态, 并测定其体全长, 将杂交鱼苗的胚后发育划分为卵黄囊吸收期(出膜后 1~6 d)、变态前期(出膜后 7~25 d)、变态期(出膜后 25~30 d)和变态后生长期(出膜 30d 以后)4 个时期。对 16~17℃、18~19℃、20℃和 22~23℃ 4 个温度环境下胚胎发育的研究结果显示, 杂交胚胎宜于在 16~20℃的水温下发育, 鱼苗在 22~23℃孵化出膜后 2~3 d 大量死亡。对 18~19℃、20℃、22℃和 24℃ 4 个温度下稚鱼的生长研究结果显示, 变态期稚鱼在 22~24℃水温下饲养时变态和生长速度较 18~20℃快。

关键词: 大西洋牙鲆; 褐牙鲆; 冷冻精子; 胚胎发育; 胚后发育

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Embryonic and postembryonic development of hybrid produced with frozen sperms of *Paralichthys dentatus* and eggs of *Paralichthys olivaceus*

TIAN Yong-sheng¹, CHEN Song-lin^{1,2}, LIU Ben-wei¹, WANG Bo³

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China; 3. The First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

Abstract: In order to study hybrid offspring's embryonic development, postembryonic development and growth characteristics under different temperatures, crossing test was carried out using frozen sperms of summer flounder (*Paralichthys dentatus*) and eggs of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). The development of the hybrid embryos was successively observed and described under Olympus microscope. After 65 hours and 57 minutes the embryonic development finished, which contains cleavage stage, blastula stage, gastrula stage, closure stage of blastopore, somites stage, tail bud stage, heart-beating stage, and hatching stage. Then the embryos began postembryonic development. During the embryonic development the heart began to beat at 15 minutes after the embryos moved. Morphological characters and growth of the fries were also observed by Olympus dissecting microscope and recorded once every day. According to these, the postembryonic development was divided into four stages: yolk-sac absorption stage (1-6 days after hatching), premetamorphosis stage (7-25 days after hatching), metamorphosis stage (25-30 days after hatching) and growth stage after metamorphosis. The embryonic development at 16-17℃, 18-19℃, 20℃ and 22-23℃ was

收稿日期: 2005-10-28

资助项目: 国家“十五”863 项目(2003AA603510); 山东省科技发展计划项目(031070121); 上海市教委 E-研究院项目部分资助

作者简介: 田永胜(1964-), 男, 甘肃会宁人, 博士, 副研究员, 从事鱼类生态生理及低温生物学研究。E-mail: tianys@ysfri.ac.cn

通讯作者: 陈松林, E-mail: chensl@yfsri.ac.cn

studied. Result showed that the hybrid embryos developed better at 16–20 °C, and a great deal of the fries hatched at 22–23 °C died 2–3 days after hatching. Growth of the postlarva at 18–19 °C, 20 °C, 22 °C and 24 °C was also studied, result showed that the metamorphosis and the growth rate of metamorphosis stage postlarva were higher at 22–24 °C than that at 18–20 °C.

Key words: *Paralichthys dentatus*; *Paralichthys olivaceus*; frozen sperm; embryonic development; postembryonic development

大西洋牙鲈(*Paralichthys dentatus*)和褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)都属于鲽形目(Pleuronectiformes)鲽亚目(Pleuronectoidei)鲽科(Bothidae)牙鲈属(*Paralichthys*)。牙鲈属鱼类在自然界大多分布在南、北美洲东西两岸,有近20种。大西洋牙鲈又名夏牙鲈,主要分布于北美洲大西洋沿岸,是西北大西洋4种牙鲈中一种较大型鱼类,秋冬产卵,产卵水温为12~19 °C^[1,2]。褐牙鲈分布在中国沿海及朝鲜、日本、俄国远东沿海,是分布在亚洲牙鲈属鱼类中的唯一1种。为改变我国牙鲈养殖种类单一的局面,2002年从美国引进大西洋牙鲈,但是大西洋牙鲈最适生长温度较高,在北方不易越冬,而褐牙鲈最适生长温度较低,夏季养殖水温超过24 °C易造成停食和死亡现象。为解决牙鲈养殖中的这一实际问题,培育出适应温度较广的养殖牙鲈新品种,提高牙鲈的抗病能力,我们利用精子冷冻技术冷冻保存大西洋牙鲈的精液,进行不同分布地区、不同繁殖季节的大西洋牙鲈和褐牙鲈的人工杂交实验,并对这两种地理分布差异较大的牙鲈杂交后代的胚胎发育、胚后发育和生长做了研究。

1 材料与方法

1.1 大西洋牙鲈精子冷冻保存

2002年9月12日从美国大海湾养殖公司引进大西洋牙鲈鱼苗^[2],在青岛市黄岛区水产研究所人工养殖,培育两年雄性达到性成熟,雌性还未成熟。2005年1月用挤压腹部法人工采集成熟的精子50 mL,利用精子冷冻稀释液MPRS配制10% DMSO,按1:1比例稀释平衡精子5 min,分装在1.8 mL冷冻管中,采用“精子三步冷冻法”在-196 °C的液氮中冷冻保存精液^[4]。

1.2 褐牙鲈卵的采集

2005年4月在黄海水产有限公司,利用人工驯养的分布于中国黄、渤海的褐牙鲈雌鱼,挤压腹部法人工采集达到性成熟的卵50 mL,置于15 °C室温下,利用保鲜膜封住烧杯口,等待受精。

1.3 人工授精和受精卵的培养

在37 °C水浴中解冻冷冻精子1.5 mL(精液

与冷冻稀释液混合液),在显微镜下检查精子的质量,解冻后快速运动的精子数量在60%~70%。采用干法授精,直接将解冻后精子加入牙鲈卵中,用玻璃棒轻轻搅拌使精卵混合,加入15 °C海水200 mL激活受精,10 min后再加入500 mL海水稀释受精卵,等受精卵充分上浮后,过滤并用海水冲洗数次。

受精卵直接放入直径为200 cm,深80 cm的圆形水泥池中培育,孵化水温15~17.1 °C,盐度28,直接往水中充入压缩空气,充气量30 L·m⁻³·h⁻¹为宜。杂交受精率为81.63%,孵化率为98%。孵化后鱼苗培养水温逐渐提高到18.5~20.5 °C,孵化后鱼苗的培育参照了大西洋牙鲈^[5]和褐牙鲈^[6]的有关技术。

1.4 胚胎发育和胚后发育观察

利用OLIMPUS显微镜和解剖镜在15~18 °C室温下连续观察杂交胚胎的发育过程,待孵化出膜后每天观察一次幼鱼的发育情况,用OLIMPUS照相机拍摄胚胎发育和胚后发育的全过程,并记录胚胎和幼鱼发育时间和形态变化。

1.5 不同温度下杂交胚胎的发育进程

15~17 °C室温下,在4个15 L水桶培育杂交胚胎,每桶放入5 mL受精卵,利用300 W可调式加热器调控培养桶中水温。事先分别将水温分别调节在16~17 °C、18~19 °C、20 °C、22~23 °C,并用水银温度计测定实际水温。利用显微镜观察胚胎发育过程和形态标志,记录发育时间。

1.6 杂交鱼苗在不同水温下的生长比较

利用60 cm×40 cm的塑料水箱在18~19 °C、20 °C、22 °C和24 °C 4个水温下培养杂交鱼苗,水箱中水温利用300 W可调节加热器控制。每个水箱中放入100尾变态期的鱼苗,平均体长在11.33 mm,平均体宽在6.33 mm,培养24 d,每天投喂卤虫,投喂量为每毫升10~15个,培养至第13天、19天、23天时,每箱中随机采集10~12尾鱼苗测定其体全长和体宽。

1.7 数据处理

实验数据利用SPSS统计软件进行单向方差

分析(one way ANOVA),对不同数据组之间均值利用最小显著极差法(LSR)做差异显著性分析。

2 结果

2.1 冷冻精子杂交牙鲈胚胎发育

表1和图版I分别记录了冷冻精子杂交牙鲈的胚胎发育过程,杂交牙鲈的胚胎在15~17.1℃的培育水温中,从受精卵开始,经过胚盘形成,细胞的几何级数分裂,历时8 h 16 min进入多细胞期(图版I-1~10),9 h 39 min胚胎细胞堆积似桑椹状,12 h 09 min发育成囊胚,囊胚层分化沿卵黄表面下包,在囊胚周围形成似裙褶状胚层(图版I-11~12),14 h 03 min进入原肠早期,21 h 35 min后完成了原肠期发育(图版I-13~15),胚孔开始封闭,形成卵黄栓,卵黄囊一侧隐约可见胚体(图版I-16~17)。22 h 54 min胚孔封闭,完整胚体出现,胚体细小,中部可见神经管(图版I-18);28 h 02 min肌节开始分化,形成6对肌节,随着肌节的增多,视泡扩大,耳囊形成(图版I-19),胚体形态逐渐完整清晰;30 h 20 min肌节数目增至15对,此时胚体近尾部腹面形成一个球形突起-末球(图版I-21~22),31 h 22 min肌节增加到27对,围心腔、耳囊形成,但耳石还不清晰(图版I-23~24),头部形态似菱形;33 h 55 min尾芽形成并向胚体中轴侧面偏转;42 h 53 min尾芽继续伸长,头后两侧伸出两个翼状突起,为胸鳍原基,围心腔和心室出现,但耳石还未形成;46 h 42 min耳石已清晰可见(图版I-25~26),肌节分化至36对。50 h 19 min胚体开始搔动,此时心脏还未跳动;50 h 34 min观察到心脏开始跳动(图版I-27~28),从胚胎搔动到心脏跳动中间相隔15 min。50 h 34 min胚体绕卵黄囊 $9/12$ (胚体的伸长以时钟划分)(图版I-29);57 h 50 min胚体继续伸长,头尾几乎相接,进入出膜前期(图版I-30~31);65 h 57 min开始孵化出膜,胚体以头部先破膜而出(图版I-32),初孵仔鱼体长3 mm(图版I-33),之后进入胚后发育阶段。

2.2 杂交牙鲈胚后发育

杂交牙鲈的胚后发育可依据形态和习性的变化划分为卵黄吸收期、变态前期、变态期、变态后生长期4个时期。

卵黄吸收期 鱼苗出膜后1~6 d,全长在3~6 mm。初孵仔鱼具大的椭圆形卵黄囊,卵黄囊长约占体长的 $1/2$,1个大的油滴位于卵黄囊后部,头部贴于卵黄囊的表面,鳍褶从头后开始绕过尾部,在腹部连于卵黄囊,胸鳍贴于卵黄囊表面。仔鱼倒悬于水中,很少游动。在16~17℃水温中培育4~5 d卵黄囊吸收完毕,体长达到4~5 mm,体宽1.5 mm,在显微镜下可明显看到口张开。肠直管状,前部膨大,向后逐渐变细,在泄殖腔转弯处膨大成漏斗状,泄殖腔与肠管几乎成直角。鳍褶周缘具黑色素点,眼色素黑。由水中倒立变为平游(图版II-1~2)。

变态前期 出膜后7~25 d,身体全长从6 mm生长到12 mm,体宽达4~6 mm。主要特点为冠状鳍的生长、身体加宽、肠变粗和弯曲增多。第10天鱼苗胸鳍发达,背、尾、臀鳍相连成膜状,眼左右正位对称,未偏转,眼色素黑,眼眶突起,口裂明显,肠有1个小的弯曲,肠内充满食物,开始摄食轮虫,10 d后摄食卤虫(图版II-3~4)。16~17 d鱼苗体长达8 mm,体宽达3.5 mm,头后突起,生长出3~4根冠状鳍棘,肠已形成1个环形弯曲(图版II-5)。至22 d长出6根冠状鳍棘,第3、4根最长,最长冠状鳍棘约为体长的 $1/4$ (图版II-6)。

变态期 出膜后25~30 d,体全长从9~12 mm生长至15 mm,体宽从4~6 mm长至8~8.5 mm。鱼苗的主要特征为右眼从右侧偏移至左侧,身体逐渐变的扁平,游泳方式由尾鳍的左右摆动变为上下摆动,生活水层由水面逐渐变为底栖。25 d后鱼苗背、尾、臀鳍完全分化,右眼开始上移,两眼左侧观相重叠 $1/2$,但个体较小鱼苗右眼还未开始偏转,尾鳍明显分开,肠弯曲增大。26 d鱼苗最大体长达12 mm,体宽达6 mm,左右眼相重叠 $1/3$ (图版II-7),冠状鳍棘长达背中部,体色素较褐牙鲈深,冠状鳍棘达8根,第1根短小,第4根冠状鳍棘最长;尾鳍为歪尾型,尾椎骨上翘,尾鳍条20根,背、臀鳍条分明。体全长9 mm的鱼苗冠状鳍只有5根,尾鳍上叶还未分化,背、臀鳍条也未分化,眼仍为两侧对称。27 d全长达14~15 mm,右眼偏转至头顶(图版II-8);28 d全长达16 mm时,右眼完全偏转至头部左侧,冠状鳍消失,开始伏底(图版II-9)。

表1 冷冻精子杂交牙鲈(*P. dentatus* ♂ × *P. olivaceus* ♀)胚胎发育过程
 Tab.1 Development time-table of hybrid embryos by frozen sperms of
P. dentatus(♂) and eggs of *P. olivaceus*(♀)(15~17.1℃)

受精后时间 time after fecundation(h :min)	胚胎发育时期 stage of embryonic development	图版 plate
0 0	受精卵 zygote	I - 1
0 30	胚盘形成 blastodisc formation	I - 2
1 27	2 细胞 2 cell	I - 3
2 02	4 细胞 4 cell	I - 4
3 23	8 细胞 8 cell	I - 5
4 00	16 细胞 16 cell	I - 6
4 33	32 细胞 32 cell	I - 7
5 11	64 细胞 64 cell	I - 8
6 19	128 细胞 128 cell	I - 9
8 16	多细胞 multi-cell	I - 10
9 39	桑椹胚 morula	
12 09	囊胚期 blastula	I - 11 ~ 12
14 03	原肠早期 early gastrula	II - 13
18 06	原肠前期 prophase gastrula	
18 25	原肠中期 middle gastrula	II - 14
21 29	原肠中后期 middle-late gastrula	
21 35	原肠后期 late gastrula	II - 15
22 08	胚孔形成 blastopore formation	II - 16
22 54	胚孔封闭 blastopore closure	II - 17 ~ 18
28 02	6 对肌节 6 somites stage	II - 19
29 49	肌节胚 视泡进一步扩大 somites stage , optic vesicle expands	II - 19 ~ 20
30 20	15 对肌节胚 15 somites stage	II - 21 ~ 22
31 42	27 对肌节胚 27 somites stage	II - 23
31 42	围心腔、耳囊形成 pericardial cavity and ear vesicle forming	II - 24
33 55	尾芽侧向弯曲 tail-bud bend	
42 53	尾芽伸长 tail-bud elongation	III - 25
46 42	耳石清晰 ,36 对肌节 clear statolith , 36 somites	III - 26
50 19	胚体抽搐 心未跳动 embryo twitching , heart without beating	
50 34	心脏开始跳动 胚包卵黄 9/12 heart beating embryo encircle 9/12 of yolk sac	III - 27 ~ 28
56 39	出膜前期 pre-hatching	III - 29
57 50	头尾几乎相接 head and tail-bud almost touching	III - 30 ~ 31
65 57	部分出膜 ,体长 3mm portion of embryos hatched	III - 32

变态后生长期 30 d 鱼苗 ,最大体全长达 15~16 mm ,体宽达 7~8 mm ,冠状鳍变短与背鳍等长 ,但较背鳍条粗 ,各鳍分化完整 ,两眼已完全分布于左侧 ,肠管变成“回”型 ,背鳍条(包括冠状鳍)80 根 ,腹鳍条 5 根 ,胸鳍条 8 根 ,臀鳍条 64 根 ,尾鳍条 18 根 ,尾鳍为圆形 ;椎骨数 41 个 ,背肌节 41 个 ,腹肌节 28 个(从腹腔后计数 ,前部在解剖镜下不清晰) 。 鱼苗伏底 ,生态习性与成鱼相似(图版 II - 10) 。

2.3 不同水温下杂交牙鲈胚胎发育结果

图 1 记录了杂交牙鲈胚胎在不同水温下的发育进程 ,在 16~17℃ 水温下 ,杂交胚胎经过 57 h 17 min 完成胚胎发育 ,孵化出膜。在 18~19℃ 水温下经过 42 h 31 min 孵化出膜 ,在 20℃ 水温

下经过 39 h 59 min 孵化出膜 ,在 22~23℃ 水温下经过 35 h 20 min 孵化出膜。

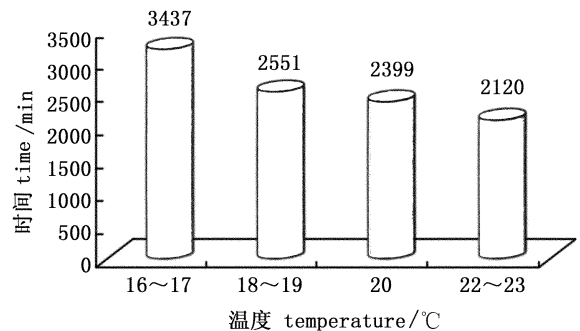


图 1 杂交牙鲈胚胎在不同水温下的发育结果
 Fig.1 Development effect of hybrid embryos at different temperatures

杂交牙鲈胚胎在 16 ~ 23 °C 都能正常发育, 但 22 ~ 23 °C 下孵化的鱼苗出膜后 2 ~ 3 d 却大量死亡。在多细胞前期, 几个温度条件下胚胎发育进程无明显区别, 显微镜下无法区分细胞分裂的速度, 只是在多细胞期时 20 °C 和 22 ~ 23 °C 下的细胞分裂球表现出不规则的分裂形态。发育至原肠期以后随着温度升高, 胚胎发育速度加快, 在 22 ~ 23 °C 时, 胚胎发育至 27 h 04 min 出现心跳; 20 °C 时 31 h 40 min 心跳; 18 ~ 19 °C 时 37 h 09 min 出现心跳; 16 ~ 17 °C 时 39 h 59 min 出现心跳。

2.4 杂交鱼苗在不同水温下的生长结果

实验开始时杂交牙鲈平均体长为 11.42 ± 1.96 mm, 实验 24 d 后, 对实验鱼苗进行了 3 次测定, 结果显示, 20、22 和 24 °C 3 个水温条件下的鱼苗生长明显较 18 ~ 19 °C 生长快(图 2), 很快完成了变态发育, 体全长与 18 ~ 19 °C 下培养鱼苗具有显著性差异 ($P < 0.05$)。22 °C 和 24 °C 下鱼苗生长速度较其它水温下生长更快, 实验结束时 4 个温度组的鱼苗体全长分别为: 18.85 ± 4.55 、 21.74 ± 2.54 、 24.2 ± 3.68 和 22.7 ± 3.65 mm; 平均增长率分别为 0.31、0.43、0.53 和 0.47 mm · d⁻¹。可见, 冷冻精子受精的杂交牙鲈鱼苗较适合于在 22 ~ 24 °C 水温下饲养。

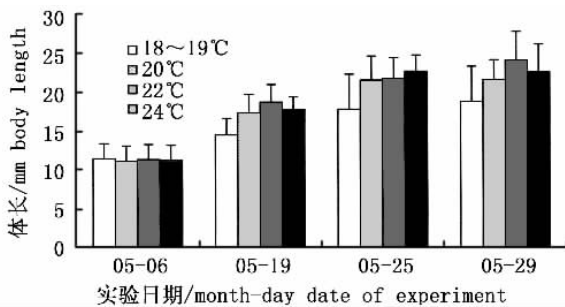


图 2 2005 年 5 月 6 ~ 9 日杂交牙鲈在不同水温下的生长结果 ($n = 10 \sim 12$)

Fig. 2 Growth effect of hybrid fries at different temperatures in 6 ~ 29 May 2005

3 讨论

国内外利用冷冻保存的精液进行杂交育种的报导极少, 仅有石鲮冻精和牙鲈卵的杂交实验, 杂交组受精率为 $28.4\% \pm 4.55\%$ ($n = 3$), 孵化率为 $42.7\% \pm 7.35\%$ ($n = 3$), 胚胎发育正常; 5000 尾杂交鱼苗有 102 尾成功度过变态期。牙

鲈冻精和大菱鲈卵的杂交实验中, 杂交组的受精率只有 2.7%, 部分受精卵虽能孵化出膜, 但仔鱼全为畸形^[7]。本文利用大西洋牙鲈冷冻精子与褐牙鲈卵进行杂交, 50 mL 受精卵孵化出 40 000 尾鱼苗, 受精率为 81.63%, 孵化率高达 98%; 受精后培养 90 d 有 1/3 的鱼苗生长到 7 ~ 8 cm, 未发现有畸形鱼苗。有关鱼类冷冻精子受精后胚胎发育和胚后变态发育的研究, 国内外未有报道。大西洋牙鲈胚胎在水温 16 ~ 21 °C、盐度 34 的海水中经过 48 ~ 60 h 孵化出膜^[8]; 牙鲈受精卵在 14 ~ 16 °C、盐度 29.9 的海水中培育, 历时 93 h 左右完成整个胚胎发育过程, 进入胚后发育阶段^[9]。利用大西洋牙鲈冷冻精子受精的褐牙鲈受精卵, 在 15 ~ 17.1 °C、盐度 28 的海水中培育, 经过 65 h 57 min 完成胚胎发育, 孵化出膜, 并对此温度下胚胎发育过程中胚盘出现时期, 细胞分裂, 原肠发育进程, 胚体出现时间, 视泡、耳囊、耳石、心室的发育和心跳出现的时间, 孵化进程等进行了较详细的观察。杂交胚胎从出现胚体抽动到心跳的时间相当短, 只有 15 min, 杂交胚胎孵化后未发现畸形鱼苗。

在 16 ~ 23 °C 水温下 4 个温度梯度下冷冻精子杂交鱼苗胚胎发育显示, 在不同的温度下胚胎发育时间不同, 随着水温的升高胚胎发育的时间缩短, 在较高温度下心跳出现时间较早, 孵化速度较快, 但是孵化水温在超过 20 °C 时, 分裂球出现不规则现象, 22 ~ 23 °C 水温下胚胎发育和孵化正常, 但是孵化后仔鱼在 2 ~ 3 d 全部死亡, 说明胚胎发育的水温不宜超过 22 °C。18 ~ 24 °C 不同水温下变态发育期稚鱼的生长实验则显示: 22 ~ 24 °C 水温较适合于此时期鱼苗的培养。

变态是比目鱼不同于其它硬骨鱼类的一大特点, 对于变态发育的研究在鱼类生态生理的研究方面具有重要的意义。Bisbal 和 Bengtson^[10]在 21 °C 对大西洋牙鲈幼鱼消化道组织、消化腺及下颌结构的发育进行了研究, 幼鱼在孵化后第 3 天开口, 胃腺和幽门盲囊在孵化后 31 天出现, 完整消化道的形成贯穿整个幼鱼发育阶段; 本实验结果显示, 在 18.5 ~ 20.5 °C 仔鱼生长至第 10 天肠开始弯转并延长。大西洋牙鲈由双侧对称的体形转变为不对称的体形一般从孵化后 35 d 开始^[5], 其变态和伏底与稚鱼体长有密切的关系^[11]。在不同温度下表现出不同的生长和变态

速率,在 22℃ 生长 $0.41 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$, 20 d 伏底; 20℃ 生长 $0.34 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$, 25 d 伏底; 18℃ 生长 $0.25 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$, 30 d 伏底^[12]。本实验结果显示,培养水温在 18.5~20.5℃,孵化后 26 d 杂交牙鲆稚鱼右眼开始上移偏转,30 d 左右大部稚鱼伏底,部分稚鱼由于规格较小,未能完成变态。在 18~19、20、22、24℃ 4 个温度环境下的平均生长率分别为 0.31 、 0.43 、 0.53 和 $0.47 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$,可见大西洋牙鲆冷冻精子与褐牙鲆卵杂交鱼苗的生长率较大西洋牙鲆高。

Keefe 等将大西洋牙鲆鱼苗的变态划分为:变态前期(pre-M)、变态初期(early pro-M)、变态晚初期(late pro-M)、变态高潮早期(ve-MC and e-MC)、变态高潮中期(m-MC)、变态高潮晚期(l-MC)、幼鱼期(J)^[13]。刘立明^[14]在实验室人工控制水温条件下,研究了牙鲆的变态期生长、发育和存活特性,将变态期划分为变态早期、变态中期和变态晚期 3 个亚期,其中又划分为 5 个阶段。牙鲆鱼苗体长达到 15 mm,培育 30~32 d 时基本完成变态发育,变态约经历 5~7 d,之后开始贴壁或着底生活^[15]。本实验中杂交牙鲆鱼苗体长达到 12 mm,体宽达 6 mm 时开始变态,右眼开始上移,体长达到 15~16 mm,体宽达 7~8 mm 时完成变态发育,由开始的水层表面集群游动,到贴附于池壁四周,最后逐渐沉降到池底。本文根据幼鱼形态、食性转换及生态适应性的变化,认为将杂交牙鲆的胚后发育划分为卵黄吸收期、变态前期、变态期和变态后生长期 4 个阶段较为合理。

大西洋牙鲆适应温度范围为 5~31℃,最适生长范围 17~27℃,幼鱼在水温大于 26℃ 生长最快^[5]。在纽约和新泽西洲沿岸,产卵高峰发生在 9 月初至 11 月初,繁殖水温 11.67~18.89℃,水深 16.15~20.12 m。褐牙鲆生存水温为 2~33℃,成鱼生长适温在 8~24℃,最适水温为 16~21℃,中国黄渤海褐牙鲆在 5 月初至 6 月产卵^[6]。大西洋牙鲆对夏季高温环境易于适应,较适合于在我国南方较高水温下养殖,而褐牙鲆对低温易于适应,较适合于在北方养殖,而在夏季水温超过 24℃ 时出现停食、抗病能力下降等不适应症状。两种牙鲆在地理分布上相差很远,在繁殖时间上大西洋牙鲆为秋冬季产卵,而褐牙鲆为春夏季产卵类型,在自然环境中两种牙鲆不可

能产生遗传物质的交换,而精液冷冻保存技术轻易的解决了这一难题。为了改善牙鲆养殖性状,使两种牙鲆的优良性状得到互补,培育出适温性较广的牙鲆养殖新品种,解决生产中遇到的实际问题,我们冷冻保存了大西洋牙鲆的精液,在褐牙鲆繁殖季节,进行了两种牙鲆的杂交育种实验,成功的培育出了 4 万尾杂交鱼苗,实现了不同分布地域、不同繁殖时间鱼类之间的杂交育种。经过以上研究表明:冷冻精子受精鱼苗发育正常,能顺利完成胚胎发育和胚后发育,并对杂交牙鲆鱼苗适宜生长温度进行了研究,结果表明:杂交鱼苗在 22~24℃ 较 18~20℃ 生长快,可见杂交后代对高温的适应能力较强。

参考文献:

- [1] Morse W W. Reproduction of the summer flounder (*Paralichthys dentatus*) [J]. J Fish Biol, 1989, 19: 189-203.
- [2] 王波,张朝晖,张杰东,等. 大西洋牙鲆繁殖生物学及繁育技术研究进展 [J]. 海洋水产研究, 2004, 25(1): 91-96.
- [3] 黄瑞. 牙鲆的人工繁殖及养殖技术 [J]. 福建水产, 1997, 2: 55-59.
- [4] Chen S L, Ji X S, Yu G C, et al. Cryopreservation of spermatozoa from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large scale fertilization [J]. Aquaculture, 2004, 236: 547-556.
- [5] Bengtson D A. Aquaculture of summer flounder *Paralichthys dentatus*: status of knowledge, current research and future research priorities [J]. Aquaculture, 1999, 176: 39-49.
- [6] 谢忠明. 牙鲆石斑鱼养殖技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999. 1-135.
- [7] 季相山,陈松林,赵燕,等. 石鲈、牙鲆精子冷冻保存研究及其在人工杂交中的应用 [J]. 海洋水产研究, 2005, 26(1): 14-16.
- [8] Johns D M, Howell W H. Yolk utilization in summer flounder *Paralichthys dentatus* embryos and larvae reared at two temperatures [J]. Mar Ecol Prog Ser, 1980, 2: 1-8.
- [9] 田永胜,陈松林,严安生,等. 牙鲆的胚胎发育 [J]. 水产学报, 2004, 28(6): 609-615.
- [10] Bisbal G, Bengtson D A. Development of the digestive tract in larval summer flounder [J]. J Fish Biol, 1995, 47: 277-291.
- [11] Schreiber A M, Specker J L. Metamorphosis in the summer flounder *Paralichthys dentatus*: influence of stage-specific thyroidal status on larval development and growth [J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 111, 156-166.
- [12] Burke J S, Seikai T, Tanaka Y, et al. Experimental intensive culture of summer flounder, *Paralichthys dentatus* [J]. Aquaculture, 1999, 176: 135-144.
- [13] Keefe M, Able K W. Patterns of metamorphosis in the summer

flounder (*Paralichthys dentatus* [J]. J Fish Biol, 1993, 42 : 713 - 728.

[14] 刘立明. 不同温度条件下牙鲆变态期生长发育变化的研

究[J]. 海洋科学, 1996, 6: 58 - 63.

[15] 吴光宗, 张英. 牙鲆早期阶段成活率研究[J]. 海洋科学, 1993, 1: 13 - 17.

图版说明 Explanation of Plate

图版 I

1. 受精卵, ×60; 2. 胚盘出现, ×60; 3. 2 细胞, ×60; 4. 4 细胞, ×60; 5. 8 细胞, ×60; 6. 16 细胞, ×60; 7. 32 细胞, ×60; 8. 64 细胞, ×60; 9. 128 细胞, ×60; 10. 多细胞, ×60; 11. 囊胚, ×60; 12. 囊胚后期, ×60; 13. 原肠早期, ×60; 14. 原肠中期, ×60; 15. 原肠后期, ×60; 16. 胚孔期, 胚体头部出现, ×60; 17. 胚孔开始封闭, 胚体逐渐形成, ×60; 18. 完整胚体形成, 肌节未分化, ×60; 19. 肌节胚头部, 示视泡和耳囊, ×300; 20. 肌节出现, ×60; 21. 15 对肌节, ×60; 22. 示胚体尾部末球, ×60; 23. 27 对肌节, 晶体出现, ×60; 24. 耳囊、围心腔形成, ×300; 25. 尾芽胚头部, 耳石、神经管清晰, 头后两侧伸出锥状胸鳍突, ×300; 26. 尾芽偏转伸长, 胚体开始抽搐, ×60; 27. 心跳胚, ×60; 28. 心跳胚头部, 围心腔突起, 耳石呈椭圆形, ×300; 29. 出膜前期胚, 胚体包卵黄囊约 11/12, ×60; 30. 胚体尾尖超过头部, ×60; 31. 出膜前期头部, 吻部未伸长, 两眼突出, ×300; 32. 破膜, ×60; 33. 胚体出膜, ×60

图版 II

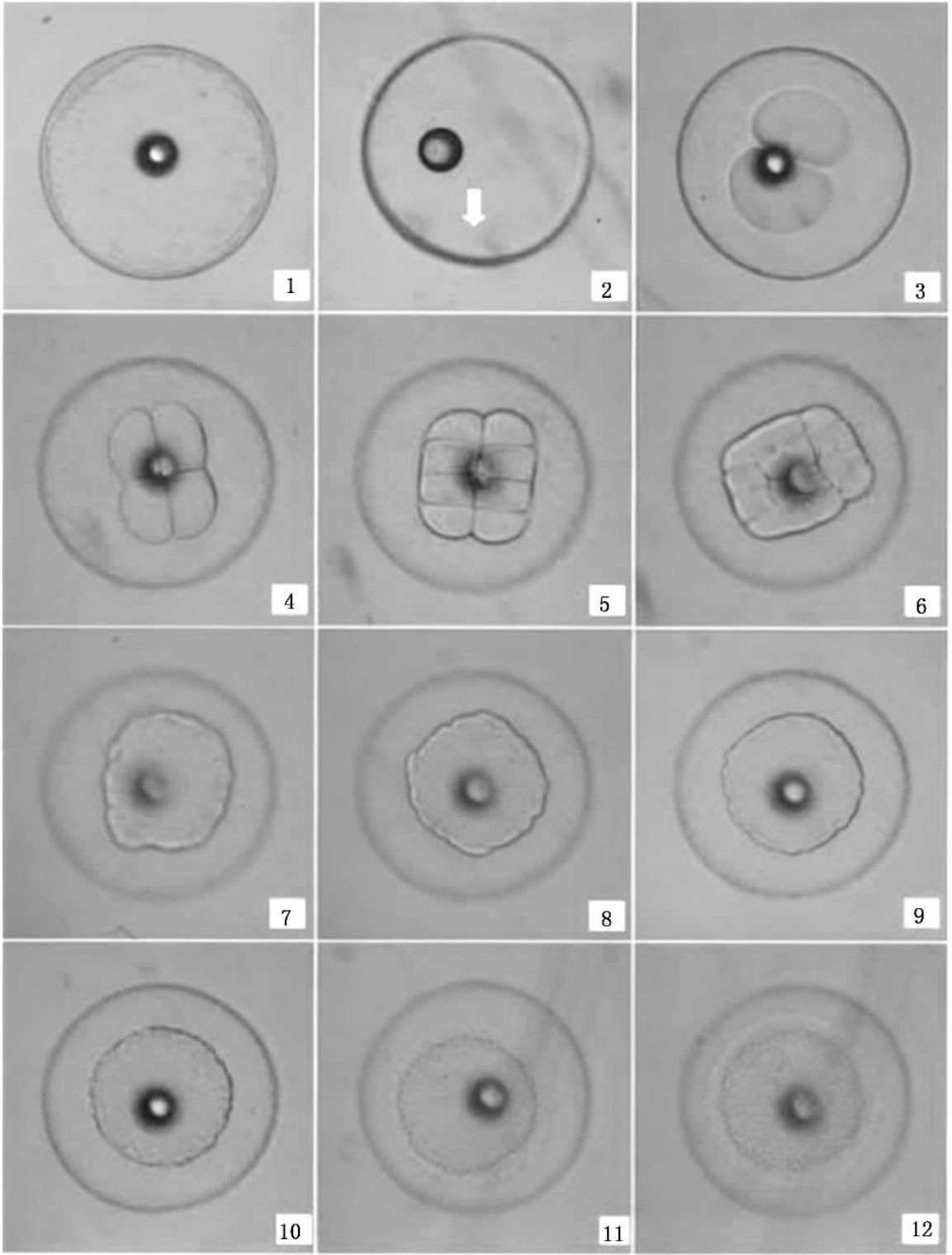
1. 出膜 3 d 鱼苗, ×40; 2. 出膜 6 d 鱼苗, 眼色素加深, 肠为一直管, 肠内可见食物, ×40; 3. 出膜 10 d 鱼苗, 肠明显加粗, 开始弯转, ×40; 4. 肠已有 1 个弯曲, 鳃盖后缘明显, ×40; 5. 16 d 鱼苗, 肠变粗加长, 头后开始生长 3 个冠状鳍棘, ×40; 6. 21 d 鱼苗, 冠状鳍棘生长至 5 根, 第 2 根最长, 鱼体加宽, ×40; 7. 26 天鱼苗, 有 8 根冠状鳍棘, 右侧眼开始上移, 尾鳍分离, ×12; 8. 27 d 鱼苗, 右眼上移至头顶, ×12; 9. 28 d 鱼苗, 右眼移至左侧, 冠状鳍变短, ×12; 10. 30 d 鱼苗, 冠状鳍基本消失, 体色与成鱼相似, 完全伏底, ×12

Plate I

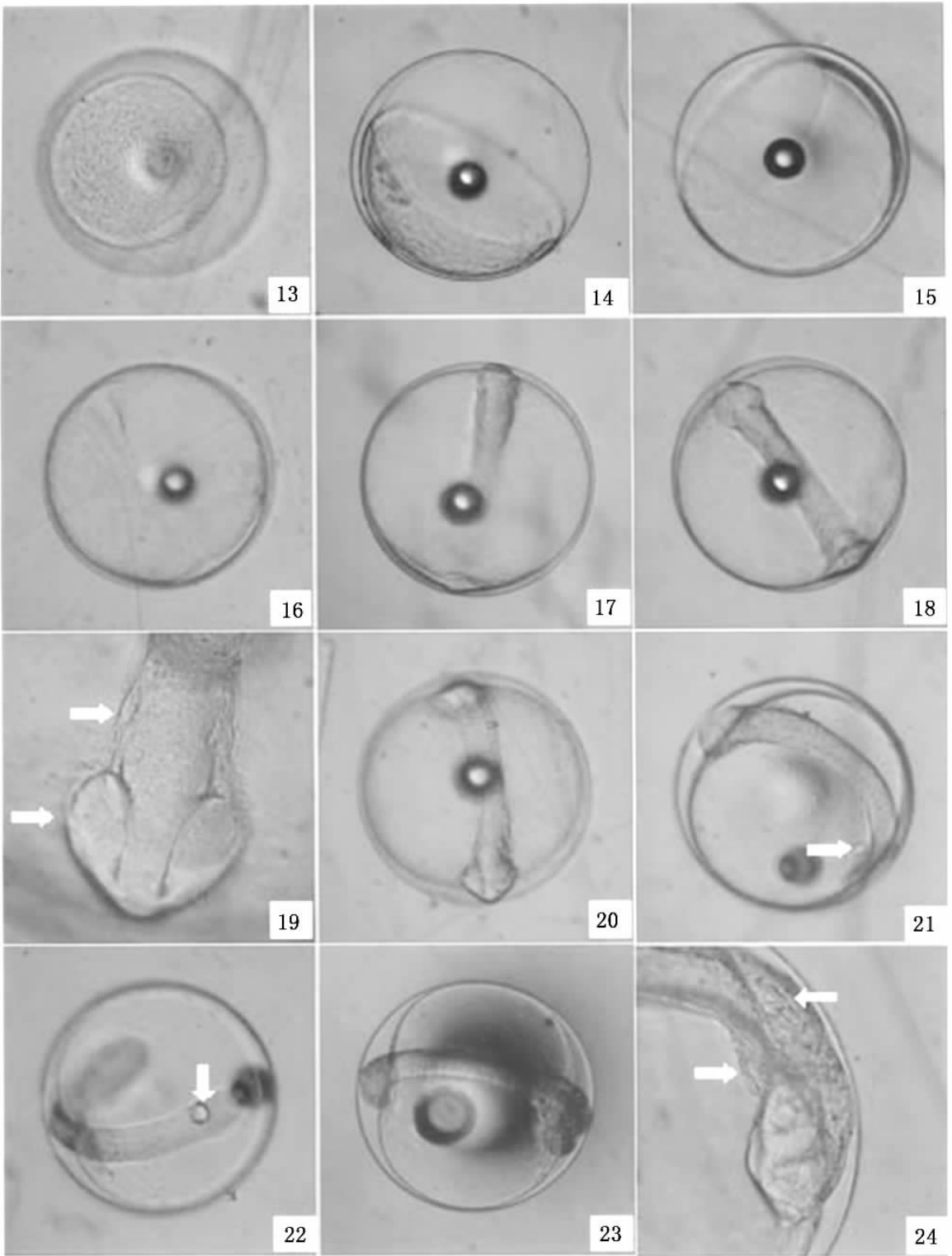
1. zygote, ×60; 2. blastodisc forming, ×60; 3. 2 cell stage, ×60; 4. 4 cell stage, ×60; 5. 8 cell stage, ×60; 6. 16 cell stage, ×60; 7. 32 cell stage, ×60; 8. 64 cell stage, ×60; 9. 128 cell stage, ×60; 10. multi-cell stage, ×60; 11. blastula stage, ×60; 12. late blastula stage, ×60; 13. early gastrula stage, ×60; 14. middle gastrula stage, ×60; 15. late gastrula stage, ×60; 16. blastopore stage, present itself of embryo head, ×60; 17. early blastopore closure, embryo clearly forming, ×60; 18. whole embryo forming, no differentiation of somites, ×60; 19. head of somites stage, showing optic vesicle and ear vesicle, ×300; 20. somites developing, ×60; 21. 15somites stage, ×60; 22. showing terminal knob of embryo, ×60; 23. 27somites stage, crystal presence, ×60; 24. ear vesicle and pericardial cavity forming, ×300; 25. showing clear head, statolith and neural tube of tail-bud stage, growing pectoral fin germ behind two sides of head, ×300; 26. tail-bud deflexion and elongation, embryo twitching, ×60; 27. heart beating stage, ×60; 28. head of heart beating stage, pericardial cavity sticking up, oval statolith in ear, ×300; 29. pre-hatching stage, embryo encircle 11/12 of yolk sac, ×60; 30. tail bud exceeding head, ×60; 31. head of pre-hatching stage, without elongation of mouth, two eye extruding, ×300; 32. embryos out of egg, ×60; 33. embryos hatching, ×60

Plate II

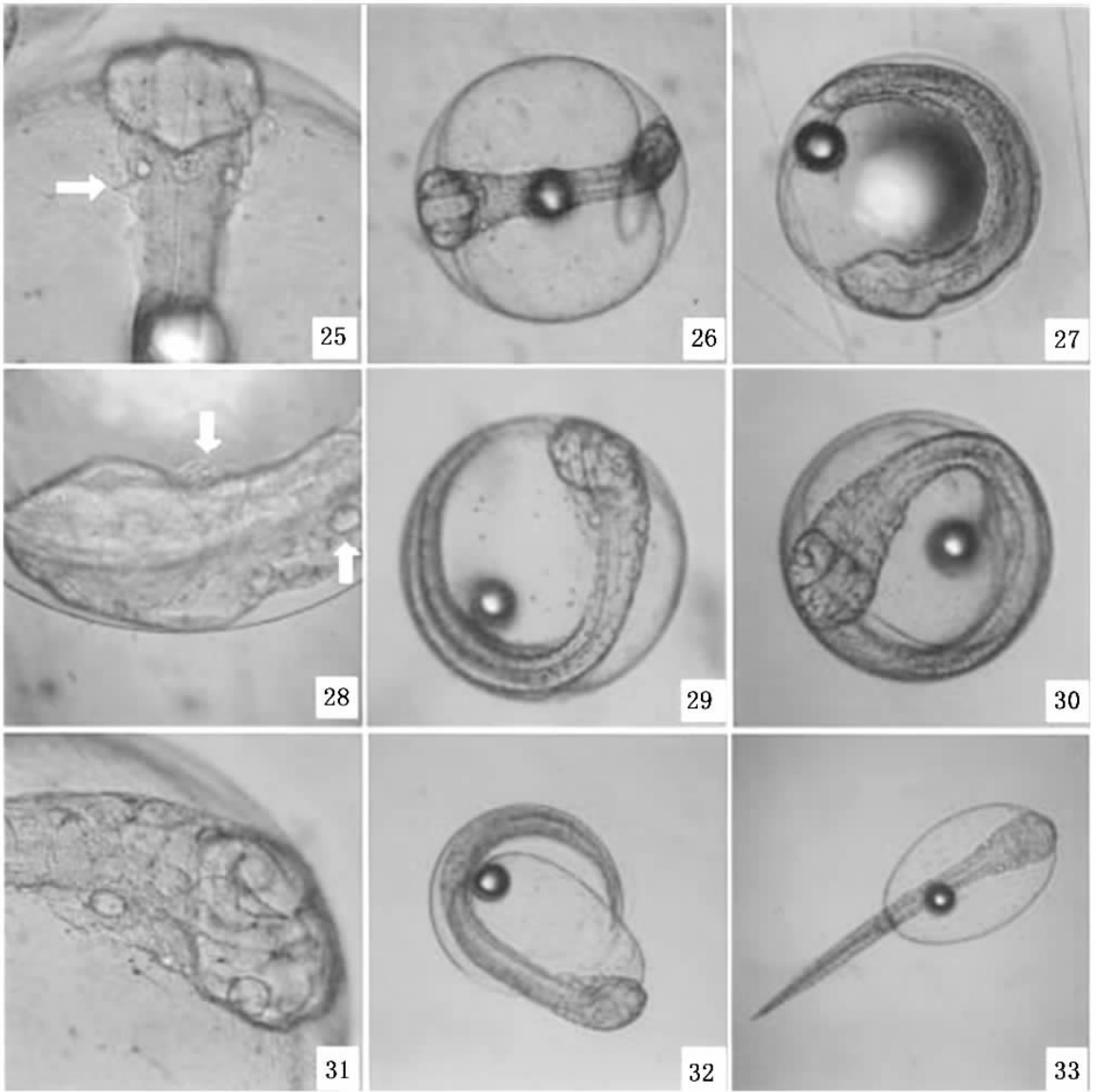
1. 3 d larva after hatching, ×40; 2. 6 d larva after hatching, pigment of eye nigrescence, straight tubelike intestine in which food can be seen, ×40; 3. 10 d fry after hatching, diameter of intestine making bigger and it beginning inflecting, ×40; 4. forming one bend of intestine, back side of operculum beginning evident, ×40; 5. 16 d fry after hatching, intestine making wide and long, three fin spine of the coronal fin growing behind head, ×40; 6. 21 d fry after hatching, five fin spine of coronal fin forming and second fin spine longest, width of fry increasing, ×40; 7. 26 d fry after hatching, eight fin spine of coronal fin growing, right eye migrating to above, tail fin separating, ×12; 8. 27 d fry after hatching, right eye migrating to the peak of head, ×12; 9. 28 d fry after hatching, right eye migrating to the left side of head, coronal fin beginning short, ×12; 10. 30 d fry after hatching, coronal fin almost disappearing, body color similar to adult fish, and getting to bottom of pond, ×12



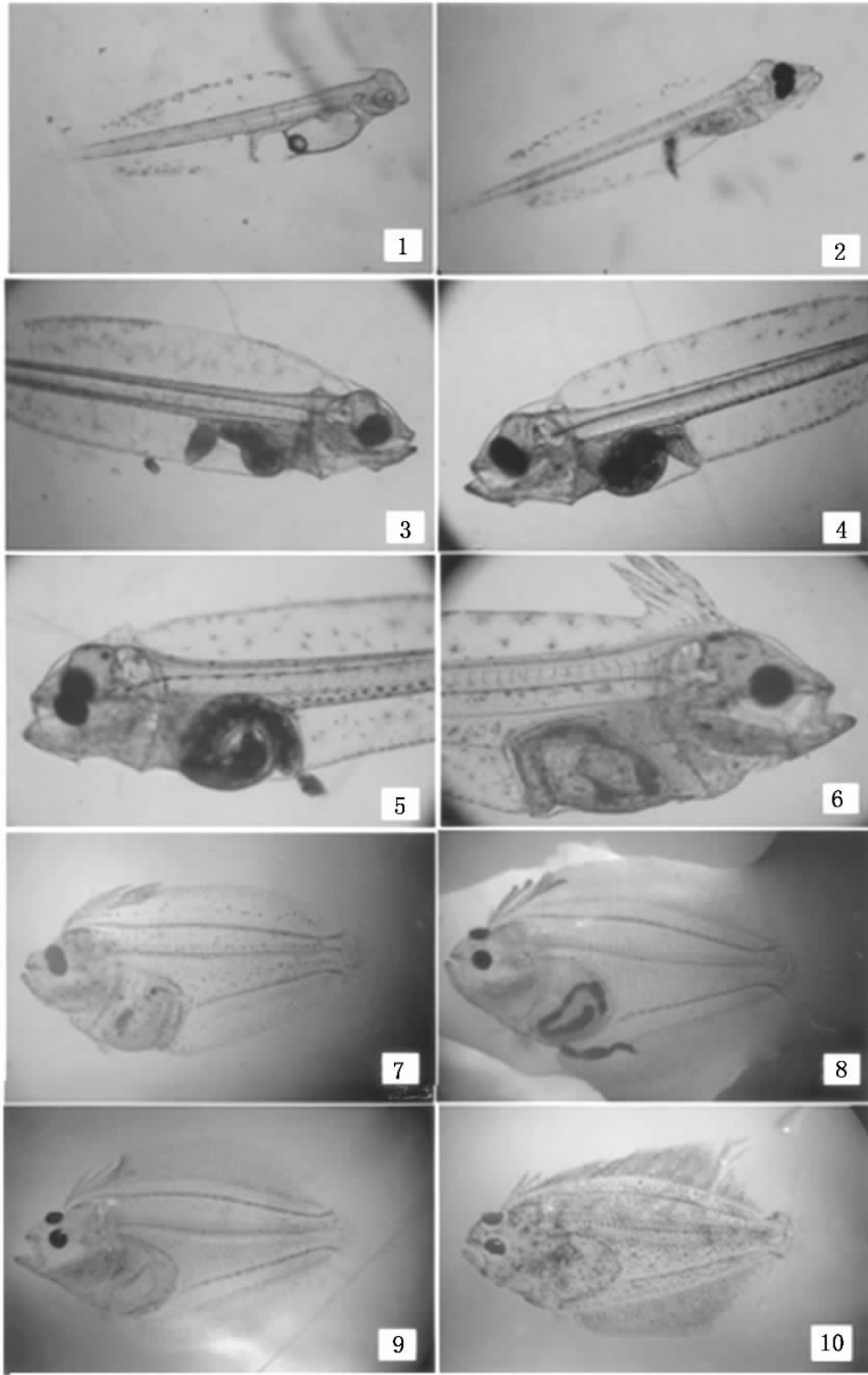
图版 I Plate I



图版 I Plate I



图版 I Plate I



图版 II Plate II