

人工条件下日本鳗鲡胚胎及早期仔鱼发育的生物学特征

柳凌*, 张洁明, 郭峰, 张涛

(中国水产科学研究院长江水产研究所,
农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点实验室,湖北荆州 434000)

摘要: 在多年对日本鳗鲡人工育苗技术研究的基础上,通过采用对胚胎和早期仔鱼的活体观察、计算机图文分析以及组织切片等方法,系统研究了鳗鲡胚胎及孵化后19 d前仔鱼的生物学特性。研究表明,在水温(23 ± 0.5) °C条件下,日本鳗鲡从受精卵到仔鱼出膜需约38 h 30 min,总积温为885.50 °C·h。其特征与一般硬骨鱼类胚胎发育基本相同,鳗鲡胚胎发育可分为14期,为典型的盘状卵裂,原肠作用通过细胞的下包和内卷完成。但日本鳗鲡早期仔鱼与一般硬骨鱼类的仔鱼存在较大差异,表现为无色透明的血细胞和S形心管;开放型的口腔,发达且不能闭合的上下颌和3对颌齿;孵化后3~9 d在身体两侧出现由神经细胞和支持细胞构成发达的感觉丘,其数目为6~9对不等;以及形态不断变化的尾垂体等生物学特性。分析认为这些生物学特性决定了日本鳗鲡仔鱼的孵化环境可能相对较稳定,以及仔鱼摄食方式可能为触碰后咬食的方式。

关键词: 日本鳗鲡; 胚胎; 仔鱼; 发育

中图分类号: S 917.4

文献标识码: A

日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)是一种在淡水里生长、降海洄游产卵的鱼类。在中国每年10月中旬到11月底从它们栖息的江河、湖泊中成群洄游入海,完成性腺发育、产卵繁殖、仔鱼生长等生活史阶段^[1]。日本鳗鲡一旦进入海洋,有关它在自然状态下的性腺发育特征、产卵繁殖行为,以及胚胎和仔鱼的发育生物学特性等,国内外均未见相关报道。同时,由于日本鳗鲡人工育苗是一道世界性难题,在人工条件下,仔鱼在第一次变态发育前就全部死亡,目前我国尚未获得在人工条件下发育变态的柳叶鳗^[2]。对其死亡原因的研究,由于在自然条件下日本鳗鲡的发育变态过程是个谜,缺少相应的参照系,国内外一直未见相关报道。这也成为了日本鳗鲡人工育苗最大的难题之一。

随着对日本鳗鲡人工育苗技术研究的不断深入,对在人工养殖条件下日本鳗鲡的胚胎及早期仔鱼发育也有了一些初步的认识和研究^[3-6]。但

由于研究的目的不同,所有的报道均缺少对日本鳗鲡胚胎,特别是早期仔鱼发育特征的系统研究。王义强等^[3]的报道重点研究了产卵和孵化条件。而谢骏等^[4]则从池塘养殖的鳗鲡人工繁殖角度探讨了鳗鲡仔鱼的发育。日本的Tanaka等^[5-6]虽然在2001年成功获得了在人工条件下发育变态的柳叶鳗,但重点描述了开口饵料与仔鱼发育的关系。众所周知,鱼类胚胎发育和胚后发育过程的系统观察和数据积累,对提高人工繁殖的孵化率及苗种质量以及以后的育种研究都具有重要的指导意义^[7-9]。本实验经过15年对日本鳗鲡人工育苗技术的连续研究,通过不断提高催产率、受精率、孵化率等一系列技术,并不断改善孵化方式和孵化条件,有效地提高了各阶段日本鳗鲡仔鱼的存活率。在此基础上,开展了对胚胎及早期仔鱼发育生物学的系统研究,旨在为日本鳗鲡人工育苗技术研究积累资料,为进一步突破仔鱼存

收稿日期:2010-06-28 修回日期:2010-09-21

资助项目:国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD03B08-04)

通讯作者:柳凌, Tel:0716-8120187, E-mail:Liul@yfi.ac.cn

活的关键技术提供指导。

1 材料与方

1.1 亲鳗及催熟、催产

实验用亲鳗取自每年 11 月中旬珠江口的下海野生鳗。选择体质健壮、无病无伤的鳗鲡作为实验用鱼。全部亲鳗运回长江水产研究所养殖实验室后,先在盐度为 15~20 的海水中暂养 1 周,然后分组养殖于盐度为 30 的人工海水的玻璃钢水槽中,每缸亲鳗数为 30 尾左右,其中雌鳗 8~9 尾,雄鳗 20~22 尾。10 d 后,开始采用外源激素诱导性腺发育。催熟、催产方法参照柳凌等^[10]的方法进行。

1.2 胚胎及早期仔鱼孵化

受精卵可通过人工授精和自然产卵获得。人工授精的受精卵主要用于早期胚胎发育观察,自然产卵的受精卵主要用于后期胚胎和仔鱼发育观察。当受精卵质量较差时,采用 Unuma 等^[11]的方法区分卵子,获得较高质量的受精卵。受精卵被置于 10 L 玻璃水槽中孵化,每个水槽 500~800 粒受精卵。水槽被放置在一个避光的孵化房中。海水为过滤的天然海水。水温控制在(23±0.5)℃,盐度为 28。每天定时换 2 次海水,换水量为总量的 1/2~2/3。

1.3 取样、观察和测量

全部发育过程均用(0.5~2.5)×10 倍的解剖镜(Leica MZ 75,德国)观察、与电脑连接的冷 CCD(Leica DFC 300FX)照相、高清晰度彩色细胞图文分析系统(HCIAS-2000)(武汉千屏影像技术有限公司)进行生物学参数测量。所观察样本中以有 50% 表现出相应发育期特征为准,胚胎发育观察的样本数为 50~100,胚后发育观察的

样本数为 30。受精卵在静水中的下沉速率通过自制的带有标尺的有机玻璃圆桶观察测量,圆桶直径为 20 cm,高 2 m。分别测量 30 粒受精卵的下沉速率。随机称取 5 g 受精卵,进行计数,重复 3 次后获得受精卵的平均重量。仔鱼用 Bouin 氏液固定 24 h 后,保存于 70% 乙醇中。石蜡包埋,切片厚度 6 μm。苏木精-伊红(H.E)染色。所得参数用 SPSS 进行平均数计算,结果以算术平均数±标准差表示。

2 结果

2.1 受精卵特征

日本鳗鲡受精卵为圆形,无色透明。每粒卵平均重为(5.1~5.2) mg,平均卵径为(0.94±0.15) mm。受精卵在静水中为沉性,平均下沉速率为(0.38±0.06) m/min。若遇外力或轻微水流,受精卵则悬浮于水中。遇海水 5 s 后开始吸水膨胀,25 min 后吸水膨胀完成。吸水膨胀后的卵周隙为(0.13±0.04) mm。日本鳗鲡卵子在产出后具油球,油球集中在卵的中央靠植物极一侧,油球数目不可数。随着受精卵的发育,到原肠中晚期后油球逐渐合并,最后形成一个大的油球。

2.2 胚胎发育时序及形态特征

日本鳗鲡胚胎发育分期、发育时间、积温及各发育时期的主要特征见表 1。依据外部形态特征可将胚胎发育过程分为 14 期。在水温(23±0.5)℃范围内,受精 1 h 40 min 完成第 1 次卵裂,卵裂形式为盘状卵裂。受精后 18 h 30 min 开始形成器官,受精后约 38 h 30 min 仔鱼开始出膜。从受精到仔鱼孵化出膜总积温为 885.50℃·h。

表 1 日本鳗鲡的胚胎发育时序
Tab. 1 The embryonic development of Japanese eel

发育时期 stage	发育时间(h:min) development time	积温(℃·h) sum of temperature	主要特征 main characteristics	图版 plate
受精卵 fertilized egg	0:00	0	圆形、透明、具油球、卵周隙小、半浮性 sphericity, transparent, having oil globule, narrow perivitelline space, semi-pelagic eggs	
胚盘期 blastodisc formation stage	0:35	13.42	原生质在动物极集中,形成隆起的胚盘 protoplasm converged at the animal pole, forming a embossed blastodisc	I-1
卵裂期 cleavage stage				
2 细胞期 2-cell stage	1:40	38.33	胚盘第 1 次分裂 the first cleavage of the blastodisc	I-2

· 续表 1 ·

发育时期 stage	发育时间(h:min) development time	积温(°C·h) sum of temperature	主要特征 main characteristics	图版 plate
4 细胞期 4-cell stage	1:55	44.08	第 2 次分裂, 分裂面与第 1 次垂直 the second cleavage and the cleavage face was perpendicular to the first	I -3
8 细胞期 8-cell stage	2:05	47.92	第 3 次分裂, 分裂面与第 1 次平行 the third cleavage and the cleavage face was parallel to the first	I -4
16 细胞期 16-cell stage	2:15	51.75	第 4 次分裂, 分裂面与第 1 次垂直 the fourth cleavage and the cleavage face was perpendicular to the first	I -5
32 细胞期 32-cell stage	2:30	57.50	第 5 次分裂, 分裂面在第 4 次的水平切面上 the fifth cleavage and the cleavage face was on the horizontal section of the fourth	I -6
多细胞期 multi-cell stage	2:55	67.08	细胞堆积, 分裂不规则 cells accumulation and the irregular cleavage	I -7
桑椹胚期 morula stage	5:20	122.67	细胞变小, 但界限清楚, 似桑椹球 cell volume shrunk but the boundary is clear, like the shape of mulberry	I -8
囊胚期 blastula stage	6:20	145.67	细胞细密, 界限不清, 胚体隆起 cells became dense and the boundary was indistinct, the embryo raised	I -9
原肠期 gastrula stage				
原肠早期 early gastrula stage	8:40	199.33	可见胚环和胚盾 embryonic ring and embryonic shield were observed	I -10
原肠中期 mid gastrula stage	11:20	260.67	胚层下包 1/2, 胚层顶部形成一透明半月形空腔 the embryonic layer folded one half downward and the top of the embryonic layer formed a transparent half-moon cavity	I -11
原肠晚期 late gastrula stage	15:00	345.00	胚层下包 3/4 以上, 胚盾变细长, 空腔隐约可见 the embryonic layer folded more than three fourth downward, the embryonic shield became slender and the cavity was dimly visible	I -12
器官分化期 organ differentiation stage				
胚体形成期 embryo body stage	17:30	402.50	胚体轮廓变清晰 the embryo profile became clear	I -13
视囊出现期 optic sac stage	18:30	425.50	胚体头部出现 1 对视囊 one pair optic vesicle appeared on the head of the embryo	I -14
体节出现期 somite appearance stage	20:45	477.25	胚体中部出现 5~8 对肌节 five to eight pairs muscle nodes appeared on the middle of the embryo	I -15
脑泡形成期 brain-vesicle formation	24:20	559.67	两视囊间出现板状脑泡, 未分室 flattened brain vesicle appeared between the two optic vesicles, without divided compartments	I -16
心脏跳动期 heart-beating stage	27:30	632.50	心脏开始跳动 heart began to beat	I -17
肌肉效应期 stage of muscular effect	30:30	701.50	胚体出现肌肉效应, 缓慢, 不定期 muscular effect appeared, slowly and occasionally	I -18
出膜前期 pre-hatching stage	36:30	839.50	卵膜变形, 卵膜孔出现 egg membrane deformed and egg membrane hole appeared	I -19
初孵仔鱼 newly hatched-larvae	38:30	885.50		I -20

注: 水温(23 ± 0.5) °C。

Notes: Water temperature is (23 ± 0.5) °C.

胚盘形成期 受精后约 15 min,卵外周及分散在卵黄间隙的原生质开始向动物极集中,形成胚盘。此时动物极顶端颜色变浅,呈浅乳白色。受精后 35 min,胚盘隆起最高,胚盘完全形成,胚盘隆起的高度约为 0.7 mm(图版 I-1)。

卵裂期 受精后 1 h 40 min,胚盘第一次分裂完成,分裂沟由上而下,但未达到胚盘底面就停止,形成两个大小相等,形状相似的细胞,2 细胞期出现(图版 I-2)。受精后 1 h 55 min,进行第 2 次卵裂,分裂面与第 1 次分裂面垂直,也未达胚盘底面就停止,形成大小相等的 4 个细胞,胚胎进入 4 细胞期(图版 I-3)。2 h 5 min 后,开始第 3 次卵裂,两个卵裂面与第 1 次卵裂面平行,出现 8 细胞期,细胞大小相似,排成两行,每行 4 个(图版 I-4)。受精后 2 h 15 min,经第 4 次卵裂,两个卵裂面与第 2 次卵裂面平行,形成 16 细胞期,细胞均匀排列成 4 行,每行 4 个,但单个细胞已明显变小(图版 I-5)。2 h 30 min 后,细胞第 5 次分裂,属纬裂,形成 32 个细胞,细胞纬裂明显并分上下两层,胚盘由 16 细胞期的方形逐渐变为圆形,中间细胞小,周围细胞大(图版 I-6)。32 细胞以后,分裂球细胞数量越来越多,体积变得越来越小,胚盘增高,立于卵黄上面,此为多细胞期。此期细胞排列紧凑,排列明显不规则,但细胞界限清楚(图版 I-7)。

日本鳗鲡的卵裂仅限于胚盘部分,卵黄不分裂,分裂沟不到达植物极卵黄部分,属典型的盘状卵裂。从受精后到第 1 次卵裂所需时间较长,为 1 h 40 min,所需积温为 $38.33\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}$ 。但第 1 次卵裂后,每次卵裂的间隔时间都相对较短,一般 10~15 min 发生 1 次卵裂。到多细胞期结束时,胚胎发育所需的总积温约为 $122.67\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}$ 。

桑椹胚期 日本鳗鲡胚胎从卵裂期结束到进入囊胚期,其间要经历一个较长的时期,间隔时间约 3 h 30 min。此时为桑椹期。桑椹期的胚胎细胞与多细胞期和囊胚期的细胞无明显区分,但随着细胞分裂次数的增加,细胞变得越来越小,而细胞间的界限却仍然十分清楚,胚胎细胞相互堆积,形成一桑椹球状结构(图版 I-8)。

囊胚期 胚胎细胞继续分裂、细胞界限开始模糊不清。到 6 h 20 min 后,卵的动物极侧面观呈椭圆形,进而形状变化似一帽状。此时在解剖镜下还可观察到一较“平坦”的区域即卵黄多

核体,称高囊胚。囊胚细胞继续分裂,向四周扩展,囊胚层变低,有人称之为低囊胚(图版 I-9),之后胚胎细胞开始向卵黄表面扩展,进入原肠期。

原肠期 受精后 8 h 40 min,随着分裂球细胞不断向下延伸,由于外包进展缓慢,胚环出现。此时胚胎发育为原肠早期(图版 I-10)。到 11 h 20 min 时,胚盘下包至卵黄纵轴约 1/2 处,胚轴后端背唇处细胞卷入内部,沿内侧向上伸展成加厚部分,即为胚盾。此时胚盾较小,胚孔最大。油球开始合并、变大、可数,一般为 14~25 个不等。胚胎开始进入原肠中期(图版 I-11)。此后,胚盘细胞继续下包至卵黄直径 2/3 处,胚盾基部加宽,前端加长。受精后约 15 h,胚盘细胞下包到卵黄直径的 3/4 处,胚盾隆起加长伸展,前端略膨大为脑泡原基,背唇、侧唇、腹唇明显,形成了较小的胚孔。油球在卵黄中间靠近胚胎一侧完全合并成一大而圆的油球。此时发育为原肠晚期(图版 I-12)。

器官分化期 胚胎发育至 17 h 30 min,胚盾表面的外胚层分化成神经板和表皮层。在表皮层下神经板向中央集中形成实心细胞索,以后细胞索中央裂缝形成管状,即神经管。这一时期为胚体形成期(图版 I-13)。18 h 30 min 后,胚盘继续下包至卵黄囊的底部。胚体前端开始膨大,两侧出现长椭圆形的视囊。视囊中间出现凹陷,形成一模糊的圆块,即嗅板。胚体后部腹面出现尾芽,尾芽呈圆锥状的尾泡。此时为视囊出现期(图版 I-14)。随着胚胎的发育,卵黄栓越来越小,胚孔逐渐合拢。至 20 h 45 min 最后封闭。在胚胎中部出现 5~8 对体节。神经管头端开始隆起,胚体前端约 1/4 处,两侧出现“泡状”听囊。视囊中看见圆形晶体。此时为体节出现期(图版 I-15)。24 h 20 min 时,脑原基已清晰可见,在两视囊间出现板状脑泡,但未分室。胚胎的头和尾部已很明显,尾芽延长,尾鳍出现,胚体已经明显形成。此时为脑泡形成期(图版 I-16)。受精后 27 h 30 min,体节发育到 24~32 对。此时,在脊索前部,视囊后方腹面形成了围胸腔。围胸腔内形成一“S”形管状心脏,心脏开始有节律性的搏动,搏动频率为每分钟 80~90 次。但日本鳗鲡的胚体及以后的仔鱼血细胞为无色透明,因此无法观察到血液在循环系统中的流动。此时为心脏跳动期(图版 I-17)。受精后 30 h 30 min,围胸腔扩大,嗅窝出现。胚体尾部发育延长超过头部约

1/4。此时,胚胎在卵膜内摆动收缩,但摆动的频率相对较低,且无规律,一般为每10分钟1~2次。此时为肌肉效应期(图版I-18)。

出膜前期及初孵仔鱼 受精后36 h 30 min,胚胎在油球浮力的作用下,头部向上,后部卷曲,将卵顶成一椭圆形。卵膜在胚胎的顶撑、胰蛋白酶的溶解作用、以及胚胎的扭动共同作用下,在椭圆形的长轴端形成一个孔。与许多鱼类不同的是日本鳗鲡仔鱼是头部先出的膜。此为出膜前期(图版I-19)。刚出膜的仔鱼全长为(3.32 ± 0.02) mm,无色素,透明,具泄殖腔,体节43~44节,心跳每分钟90~100次。卵黄囊在鱼体下方呈前粗后细的锥形,油球位于卵黄囊最前端。此时仔鱼鳍发育不完全,一般平躺在水底,只能间歇性地做螺旋垂直游动(图版I-20)。

2.3 早期仔鱼发育时序及生物学特性

本文中的日本鳗鲡早期仔鱼是指出膜后1~19 d间的仔鱼。根据Tanaka等^[5-6]的报道,日本鳗鲡的仔鱼在出膜后第25天左右发生第1次变态,形成柳叶鳗。因此,本文中的19 d仔鱼应该是

前期柳叶鳗(pre-leptocephali)。而图1反映了这一时期仔鱼体长体宽比的变化情况,从图1可发现,仔鱼在出膜后第15天后体长体宽比开始增加,也证明了此时的仔鱼已开始向柳叶鳗变化。此外,由于日本鳗鲡仔鱼发育在形态特征上的特殊性,与其它鱼类有较大差异,目前很难以形态特征来划分仔鱼发育的时序。因此,本文采用了按仔鱼发育时间顺序来描述其相应的形态特征。

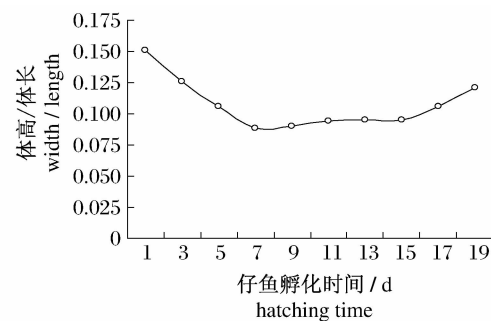


图1 日本鳗鲡仔鱼孵化期间体高体长比的变化
Fig. 1 The changes of proportion between body width and length in Japanese eel larvae during hatching time

表2 日本鳗鲡仔鱼发育的主要生物学参数

Tab. 2 The main biological parameters of larvae development in Japanese eel

孵化时间(d) hatching time	肛门前长(mm) length before genital pore	肛门后长(mm) length after genital pore	体长(mm) body length	体高(mm) body width	油球周长(mm) perimeter of oil ball	心跳速率(次/min) heart beating rate
1	3.51 ± 0.02 ^a	0.65 ± 0.01 ^a	4.17 ± 0.02 ^a	0.63 ± 0.01 ^a	1.38 ± 0.05 ^a	100 ~ 120
3	3.69 ± 0.01 ^a	1.23 ± 0.01 ^b	4.92 ± 0.02 ^b	0.62 ± 0.01 ^a	1.23 ± 0.07 ^a	105 ~ 130
5	3.87 ± 0.03 ^{ab}	1.80 ± 0.01 ^c	5.66 ± 0.03 ^c	0.60 ± 0.0 ^a	1.08 ± 0.04 ^b	125 ~ 180
7	4.27 ± 0.03 ^b	1.99 ± 0.02 ^{cd}	6.25 ± 0.02 ^d	0.55 ± 0.0 ^b	0.62 ± 0.05 ^c	160 ~ 185
9	4.53 ± 0.02 ^b	2.04 ± 0.01 ^d	6.57 ± 0.04 ^{de}	0.59 ± 0.0 ^b	0.47 ± 0.03 ^{cd}	160 ~ 185
11	4.79 ± 0.04 ^{bc}	2.09 ± 0.02 ^d	6.89 ± 0.04 ^e	0.65 ± 0.0 ^a	0.31 ± 0.02 ^d	160 ~ 185
13	4.86 ± 0.03 ^c	2.17 ± 0.02 ^{de}	7.03 ± 0.04 ^e	0.67 ± 0.01 ^a	-	160 ~ 185
15	4.92 ± 0.05 ^{cd}	2.25 ± 0.03 ^e	7.16 ± 0.03 ^{ef}	0.68 ± 0.02 ^c	-	160 ~ 185
17	5.06 ± 0.07 ^{cd}	2.19 ± 0.03 ^{de}	7.26 ± 0.06 ^{ef}	0.77 ± 0.01 ^{cd}	-	150 ~ 170
19	5.19 ± 0.09 ^d	2.15 ± 0.05 ^{de}	7.35 ± 0.11 ^f	0.89 ± 0.04 ^d	-	140 ~ 160

注:表中同一列内,右上角标有不同英文字母的数据,相邻字母间的比较(如:a与b;b与c的比较)具有显著差异($P < 0.05$),间隔字母间的比较(如:a与c的比较)具有极显著差异($P < 0.01$)。

Notes: The continuously different letters in the same row show significant difference ($P < 0.05$), and the uncontinuously different letters show highly significant difference ($P < 0.01$).

出膜后1~3 d仔鱼 出膜后1~3 d的仔鱼身体由初孵仔鱼的略微弯曲发育成笔直形态,无色透明。仔鱼在油球浮力的作用下,头上尾下垂直悬浮于水中,一般静止不动,偶尔向上或斜上方蹿动,每次蹿动距离为5~30 cm。此时仔鱼的卵黄呈棒状,平行位于脊椎下方,前粗后细。油球位于身体前部,呈前细后圆的鸡蛋形。眼和心

脏均位于仔鱼的最前端。脑未分化,口腔未形成。出膜第1天,在仔鱼尾部尖端出现黑色尾垂体,尾垂体呈絮状(图版III-3)。出膜第3天,在仔鱼身体两侧由头至尾各形成一排感觉丘,每排感觉丘数目为6~9个不等(图版II-1)。此阶段的仔鱼体长变化较大,而体宽变化无显著性差异($P \geq 0.05$)。根据表2可发现,仔鱼体长的变化主要发

生在肛门后段,1 d 与 3 d 比较有显著性差异($P < 0.05$)。因此,在图 1 中,仔鱼的体长体宽比呈下降趋势。此阶段仔鱼的心跳速率在逐渐加快,由平均每分钟 100 次增长到每分钟 130 次。

出膜后 5~7 d 仔鱼 5 d 的仔鱼还能悬浮于水中。但随着油球逐渐变小,仔鱼开始下沉。到 7 d 时,仔鱼基本上平躺于水底,偶尔向上做蛇形游动。此阶段仔鱼变化最大的是头部。口腔开始形成,位于头部下方,并逐渐向前位移,分上颌和下颌,但均不能活动,上、下颌各具 3 对较大的颌齿。口咽腔形成,并与咽部连通(图版 III-1)。5 d 时脑泡非常发达,但只有前脑和后脑之分。身体两侧的感觉丘非常发达(图版 III-2),组织切片发现,感觉丘上层为一层有规律排列的神经细胞,神经细胞上端为纤毛,下端为神经纤维。神经纤维穿过无规律排列的支持细胞层,与体内的神经系统连接(图版 III-6)。7 d 时开始分前、中、后脑。5 d 时晶体增大,但眼睛色素未形成。7 d 时眼睛色素完全形成。5 d 时听囊内形成 2~3 个耳石,且听囊开始逐渐增大(图版 III-1,2)。围胸腔从 5 d 开始后移至口后,增大,内包一管状心脏。心跳速率在 7 d 时达到最快,每分钟 160~185 次。这一时期仔鱼的卵黄消耗较快,到 7 d 时,只在仔鱼腹面有一很细的卵黄线。仔鱼的尾垂体在这一时期也发生了变化,由原来的絮状变成发达的枝杈状(图版 III-5)。仔鱼的胸鳍原基也在这一时期出现(图版 II-2,3)。这一时期的仔鱼体长在继续增长,虽然肛门前和肛门后的长度,5 d 与 7 d 间并无显著差异($P \geq 0.05$),但总体长则显著增加($P < 0.05$)。同时,体宽则显著变小($P < 0.05$)。因此,在图 1 中的体长体宽比则继续呈下降趋势。

出膜后 9~11 d 仔鱼 此阶段的仔鱼在行为上发生了很大变化,仔鱼头下尾上垂直立于水底,尾部不停摆动,胸鳍不断扇动。此时,如果底质为玻璃等硬底时,仔鱼竖立 30~60 min 后会倒伏。但如果底质为 100 μm 以上厚度软底时,仔鱼的上颌和大牙可以插入到软底中,仔鱼则不会倒伏。仔鱼的口腔已全部形成,上颌为角质化的喙,尖而锋利。颌齿 3 对。下颌呈 V 字形。口腔不能闭合,下颌向身体后方做无规律的开启运动。下颌每开启 1 次,咽部食道向后做 1 次蠕动。此时仔鱼肠道全部贯通。9 d 前的仔鱼咽部食道为

单层细胞构成,内壁光滑(图版 III-7)。9 d 后的仔鱼咽部食道内壁沿身体纵向形成皱褶,在横切面上可看见向内的突起。同时在肠道背侧方可见 1 对原始生殖脊,生殖脊为单层细胞构成的管状结构。肝脏原基也在此时形成,为多层细胞堆积而成的囊状结构(图版 III-8)。感觉丘消失。听囊发达,在眼后形成 1 对透明的圆形空泡。心脏虽然仍是管状结构,但开始分化出心室和静脉窦(图版 II-4)。仔鱼的体长、体宽虽略有增加,但体长体宽比与 7 d 仔鱼比无显著差异($P \geq 0.05$)(图 1)。

出膜后 13~15 d 仔鱼 此阶段的仔鱼无论在形态,还是在行为上与 9~11 d 的仔鱼相比,均无明显差异。所不同的只是口腔的上颌和颌齿更加尖而锋利,听囊更加发达。在头部与泄殖孔的中间出现了肾脏原基。尾垂体开始退化,由最发达时的树枝状逐渐退化成神经细胞状(图版 II-5)。此时的仔鱼体长、体宽比仍无显著变化($P \geq 0.05$)(图 1)。

出膜后 17~19 d 仔鱼 此阶段的仔鱼形态开始出现一些变化。首先是口腔位置开始前移,上、下颌骨变细,但颌齿仍然 3 对。听囊逐渐消失。腮弓由之前的 3 对变为 5 对。鳔开始充气。尾垂体进一步退化成分散的黑色斑点。最重要的特征是脊椎骨上、下两侧横纹肌出现。仔鱼的体长、体宽比与之前的仔鱼比出现显著变化($P < 0.05$)(图 1),整个仔鱼的身体明显加宽(图版 II-6)。此时应该是进入到日本鳗鲡仔鱼发育的一个重要阶段,即柳叶鳗前期(pre-leptocephalus)。

3 讨论

3.1 日本鳗鲡胚胎发育生物学特性

日本鳗鲡的胚胎发育,无论是胚胎发育所需的积温、胚胎发育的分期以及胚胎发育过程中的生物学特征与大多数硬骨鱼类的胚胎发育基本相同。其表现为典型的盘状卵裂;原肠作用通过细胞的下包和内卷完成;具胚环和胚盾;以及脊索由中胚层内卷形成等^[12]。但日本鳗鲡胚胎发育也有其特殊性,如:心脏形成初期为 S 形心管,心跳速率较慢,一般为每分钟 80~90 次;血细胞无色透明;胚胎在卵膜内摆动频率相对较低,且无规律,一般每 10 分钟 1~2 次等。

3.2 日本鳗鲡早期仔鱼发育时期的划分

关于鱼类早期生活史阶段的划分,不同的学

者持有不同的观点。多数学者认为,仔鱼阶段的划分应从孵出期开始一直延续到形态变异完成^[12-13]。从这个意义上说,日本鳗鲡的仔鱼发育阶段相当漫长。根据 Tanaka 等^[6]的报道,日本鳗鲡仔鱼的发育时间需 250 d 左右,期间要经历柳叶鳗前期、柳叶鳗期 (leptocephalus)、玻璃鳗期 (glass eel) 3 个发育期和 2 次变态过程。

本实验主要观察了柳叶鳗前期的发育生物学特性,认为柳叶鳗前期又可分为早期仔鱼和晚期仔鱼。早期仔鱼主要是 1~7 d 的仔鱼,此时的仔鱼没有摄食能力,器官发育不完全,摄食和消化能力尚处于适应和强化的阶段,外源性营养的获得和利用没有保证,以卵黄囊的存在为其典型特征,故也称卵黄囊仔鱼 (yolk sac larva)。此阶段仔鱼的存活率主要依据两方面的因素,一是诱导性腺发育的方式所决定的精卵质量,二是孵化期间的环境条件。目前,通过多年的研究已较好的解决了上述两方面的因素,使该阶段仔鱼的存活率由原来的万分之几^[1-2]提高到现在的 70% 以上。卵黄吸尽期之后的仔鱼进入晚期仔鱼 (late stage larva)。并认为该阶段的仔鱼应该是第 1 次变态前的准备期。此时的仔鱼卵黄已基本吸收完,消化道已贯通,各种器官逐步发育完全。当采用适当的开口饵料和投喂方式,到出膜后 25 d 左右即可发育变态成柳叶鳗。Tanaka 等^[5]就是通过冷冻干燥的鲨鱼卵粉,辅以其它成分做成的饵料,并采用适当的喂养方式成功获得了发育变态的柳叶鳗。

3.3 日本鳗鲡早期仔鱼特殊器官及功能分析

感觉丘 日本鳗鲡仔鱼的感觉丘 (neuromast) 最早是王义强等^[3]报道的,但他们并没有对它的结构和功能做进一步的描述。柳凌等人通过组织切片的方式观察了日本鳗鲡感觉丘的结构,发现它与一般板鳃类和硬骨鱼类的感觉丘结构基本相同,即都是由神经细胞和支持细胞构成的丘状突起 (图版 III-6)。所不同的是日本鳗鲡仔鱼的感觉丘发生的时间和部位与其它鱼类存在较大差异。如:白鲟 (*Psephurus gladius*) 和七鳃鲨 (*Heptranchias perlo*) 的感觉丘是终身存在,白鲟的感觉丘是一簇簇地分布在长吻的背腹面,上下颌,鳃盖上以及头的其他部分,好似花朵一般。七鳃鲨的感觉丘在喷水孔和胸鳍前之间按节成行排列^[13-14]。而日本鳗鲡仔鱼的感觉丘在第 3 天时

出现,到第 9 天左右又消失了,且在仔鱼身体两侧由头至尾各形成一排,每排数目为 6~9 个不等。一般来讲,感觉丘的作用是感觉水流和水压。而日本鳗鲡仔鱼在这一发育阶段出现发达的感觉丘,柳凌等人认为可能与仔鱼需要稳定的孵化环境有关。此阶段的仔鱼是悬浮在水中的,并具有一定的游泳能力,它可以通过感觉丘来感知周围水流和水压的变化,通过游泳使自己处在最佳的孵化环境。但日本鳗鲡仔鱼感觉丘是否还具有其它功能,为什么在 9 d 后又退化了,这些问题还有待进一步的研究。

尾垂体 尾垂体 (urohypophysis) 为鱼类尾部的一个神经内分泌结构。其形态及功能都同哺乳动物的神经垂体相似。许多真骨鱼都有这种结构,只是形态和大小不一^[16]。尾垂体的生理功能尚不十分清楚,但有资料表明,从真骨鱼的尾垂体内分离出一些具有生物学活性的物质,这些物质属于多肽或蛋白质,分别叫做血管紧张素 I、II、III、IV。血管紧张素 II 能使鲑膀胱的平滑肌收缩,并使鳗鲡的血压升高,尿量增加。当这些鱼类处于不同的渗透压环境中时,可引起尾垂体组织学上的变化;切除尾垂体后,鱼类对淡水和海水的适应能力都降低,这说明尾垂体与渗透压调节有关^[15-16]。日本鳗鲡仔鱼的尾垂体形态有一个变化的过程,从第 1 天出现时的絮状,到第 5 天时发达的枝杈状,再到第 15 天后逐渐退化成神经细胞状。本实验分析认为,仔鱼的尾垂体仍然可能与仔鱼的渗透压调节有关,但为什么其形态会发生变化,这种变化是否会导致分泌的活性物质也发生相应的变化,均有待进一步的研究。

3.4 日本鳗鲡早期仔鱼口腔结构与摄食行为关系分析

一般鱼类的仔鱼摄食方式有如下两种类型: S 型攻击和触碰后咬食。S 型攻击是鲱 (*Clupea pallasii*)、真鲷 (*Chrysophrys major*) 和牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 等一般海水鱼类早期仔鱼普遍采用的捕食浮游动物方式^[17-18],特点是利用上下颌的闭合和鳃盖的开启,使口腔内形成负压,仔鱼在摄食前身体弯成“S”型,然后迅速挺直身体前冲,并开口捕食。日本鳗鲡早期仔鱼虽然偶尔能见到这种典型的摄食行为,但对投喂的轮虫摄食成功率极低^[19]。原因是日本鳗鲡仔鱼的上下颌不能闭合,无法与鳃盖配合使口腔形成负

压。所以作者认为日本鳗鲡仔鱼的摄食方式可能是触碰后咬食的摄食方式。Tanaka 等^[5]利用以鲨鱼卵冷冻干燥粉末为主要成份并含有磷虾或其它鲜鱼虾抽提液的糊状饲料,正是迎合了日本鳗鲡仔鱼口腔的特殊结构和摄食方式。根据 Tanaka 等^[5]的描述,日本鳗鲡早期仔鱼和柳叶状仔鱼均以鳗形方式不停游动,触碰到糊状饲料团后立即离开或停住,用吻部反复触碰糊状饲料团后开口至最大,使口裂几乎呈直角压在糊状饲料团上,最后猛然甩头而咬住撕下一满口饲料,咀嚼后吞咽并再次开始以鳗形方式继续巡游。虽然这种糊状饲料不是日本鳗鲡仔鱼的天然食物,但其食物特征非常适于日本鳗鲡早期仔鱼和柳叶状仔鱼摄食,仔鳗异常发达且朝前伸的颌齿在咬住撕下大口糊状饲料中似乎很有作用。上述结果表明日本鳗鲡仔鱼的天然饵料可能是活动性较弱、生长面积较大、且质地松软海洋动物或它们的排泄物。

参考文献:

- [1] 黄大明,陈世群. 鳗鲡的生活史和人工育苗技术探讨[J]. 生物工程进展,1997,17(2):3-12.
- [2] 谢刚. 鳗鲡苗种人工繁育的研究概况及其展望[J]. 大连水产学院学报,2001,16(1):42-48.
- [3] 王义强,赵长春,施正峰,等. 河鳗人工繁殖的初步研究[J]. 水产学报,1980,4(2):147-158.
- [4] 谢骏,余德光,王广军,等. 人工诱导池塘养殖鳗鲡成熟产卵以及胚胎和仔鱼发育[J]. 水产学报,2005,29(5):688-694.
- [5] Tanaka H, Kagawa H, Ohta H. Production of leptocephali of Japanese eel (*Anguilla japonica*) in captivity[J]. Aquaculture,2001,201:51-60.
- [6] Tanaka H, Kagawa H, Ohta H, et al. The first production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture[J]. Fish Physiol Biochem,2003,28:493-497.
- [7] 罗建仁,邬国民,陈焜慈. 斑点胡子鲶的胚胎和仔鱼发育观察[J]. 动物学杂志,1994,29(4):16-20.
- [8] 柳爱莲,曹更生. 斑马鱼早期胚胎发育形态学观察[J]. 河南大学学报:自然科学版,2004,34(2):50-53.
- [9] 方家仲,褚茂兵,肖勤. 大黄鱼早期发育的形态学研究[J]. 海洋科学,2003,27(6):1-6.
- [10] 柳凌,郭峰,张洁明,等. 日本鳗鲡排卵的人工诱导[J]. 中国水产科学,2005,12(1):49-55.
- [11] Unuma T, Kondo S, Tanaka H, et al. Relationship between egg specific gravity and egg quality in the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. Aquaculture, 2005,246:493-500.
- [12] 楼允东. 组织胚胎学[M]. 2版. 北京:中国农业出版社,1994:312-319.
- [13] 姚承昌. 白鲟消化道形态学和组织学的初步观察[J]. 水生生物学报,1989,13(1):65-75.
- [14] Cedrola P V, Caille G M, Chiamonte G E, et al. Demographic structure of broadnose seven-gill shark, *Notorynchus cepedianus*, caught by anglers in southern Patagonia, Argentina [J]. Marine Biodiversity Records,2009,2:15-23.
- [15] Schoonen W G E J, Granneman J C M, Lambert J G D. Steroids and steroid glucuronides in the ovarian fluid of the African catfish, *Clarias gariepinus*, between ovulation and oviposition [J]. Fish Physiology and Biochemistry,1989,3:66-73.
- [16] 陈恒,刘书朋,谷平. 鱼类尾部神经分泌系统研究进展[J]. 上海大学学报:自然科学版,2000,20(3):18-27.
- [17] Fukuhara O. Morphological and functional development of Japanese flounder in early life stage [J]. Bull Jap Soc Sci Fish,1986,52:81-91.
- [18] Blaxter J H S. Development of sensor gansand behavior of teleost larvae with special reference to feeding and predator avoidance [J]. Trans Am Fish Soc,1986,115:98-114.
- [19] Tanaka H, Kagawa H, Ohta H. The first report of eel larvae ingesting rotifers [J]. Fish Sci, 1995, 61:171-172.

Biological characteristics of embryo and larval development in Japanese eel under artificial incubation

LIU Ling^{*}, ZHANG Jie-ming, GUO Feng, ZHANG Tao

(Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources and Biotechnology, Ministry of Agriculture,
Yangtze River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China)

Abstract: The purpose of this study is to accumulate the research data about artificial reproduction of Japanese eel and provide guidance on breaking through the key technology of successful larva survival. On the foundation of the studying on artificial reproduction in Japanese eel for many years, this experiment systematically studied the biological characteristics of embryo and the larva before 19 days incubation used by the methods of observing living body, computer-aided analysis, as well as tissue slice. The results indicated that the time needed 38 h 30 min from fertilized egg to the larva just leaving egg, and the total accumulated temperature was 885.50 °C · h for this time. The development characteristic of embryo, similar to those of most other teleosts, is a classical meroblastic. The gastrulation is completed by cells wrapped downward and curled inward through yolk. The embryo development of Japanese eel can be divided into 14 stages. However, the development characteristic of larva was different from those of most other teleosts, such as transparent blood cell and S-transformer tubular heart, open oral cavity, 3 pairs of genasauria that are developed and cannot close, about 6–9 pairs of neuromast which are located at both sides of body from the 3-day to 9-day of leaving egg, as well as the urohypophysis whose morphology continually changed during the development stages. Analyses for these results indicated that the environment of incubation for the larva of Japanese eel in nature may be very stable, and ingestion feed of larva may depend on the method of bite-after-touch.

Key words: Japanese eel (*Anguilla japonica*); embryo; larva; development

Corresponding author: LIU Ling. Tel: 0716–8120187, E-mail: Liul@yfi.ac.cn

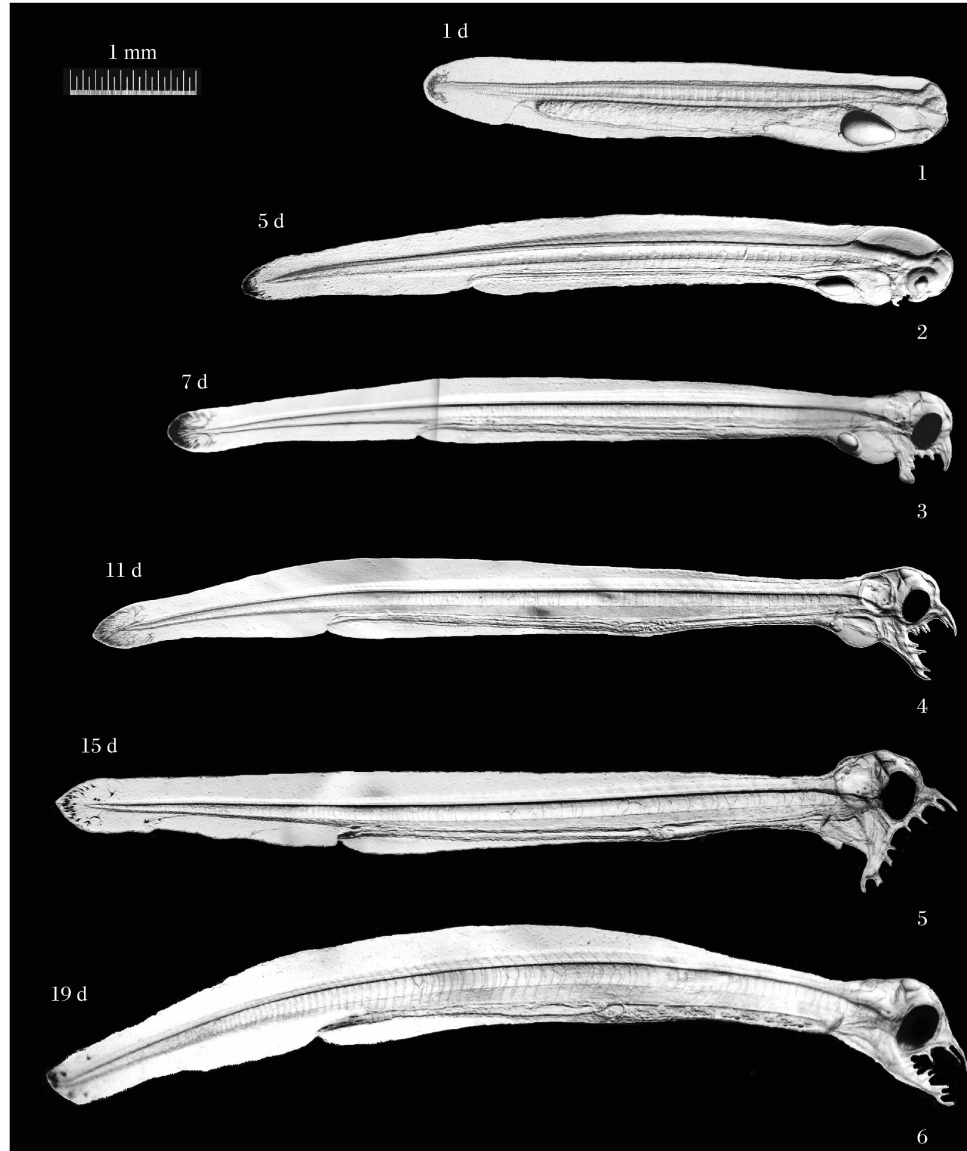


图版 I

1. 受精卵; 2. 2细胞期; 3. 4细胞期; 4. 8细胞期; 5. 16细胞期; 6. 32细胞期; 7. 多细胞期; 8. 桑葚期; 9. 囊胚期; 10. 原肠早期; 11. 原肠中期; 12. 原肠末期; 13. 胚体形成期; 14. 视囊形成期; 15. 肌节出现期; 16. 脑泡形成期; 17. 心脏跳动期; 18. 肌肉效应期; 19. 出膜前期; 20. 初孵仔鱼。所有照片均为显微镜下放大25倍。

Plate I

1: Fertilized egg; 2: 2-cell stage; 3: 4-cell stage; 4: 8-cell stage; 5: 16-cell stage; 6: 32-cell stage; 7: Multi-cell stage; 8: Morula; 9: Blastula; 10: Early Gastrula; 11: Middle Gastrula; 12: Late Gastrula; 13: Embryo body stage; 14: Optic capsule stage; 15: Muscle burl stage; 16: Brain vesicle stage; 17: Heart-beating stage; 18: Muscle contraction; 19: Pre-hatching stage; 20: Newly hatched larvae. All of the photos are magnified by 25 times under a microscope.

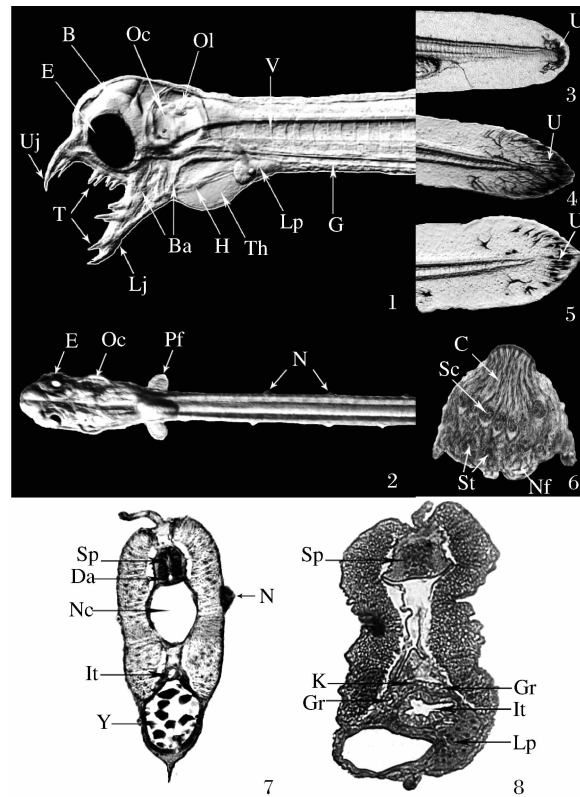


图版 II

1. 1 d 仔鱼; 2. 5 d 仔鱼; 3. 7 d 仔鱼; 4. 11 d 仔鱼; 5. 15 d 仔鱼; 6. 19 d 仔鱼(柳叶鳎前期)。

Plate II

1. 1 d Larva after hatching (LAH); 2. 5 d LAH; 3. 7 d LAH; 4. 11 d LAH; 5. 15 d LAH; 6. 19 d LAH (Pre-leptocephali).



图版 III

1. 仔鱼前部侧面观; 2. 仔鱼前部腹面观; 3. 发育早期的尾垂体; 4. 发育中期的尾垂体; 5. 发育晚期的尾垂体; 6. 感觉丘剖面; 7. 发育早期的仔鱼躯干横切面; 8. 发育晚期的仔鱼躯干横切面。

Uj: 上颌; T: 牙齿; Lj: 下颌; Ba: 腮弓; H: 心脏; Th: 围胸腔; Lp: 肝脏原基; G: 食道; V: 脊椎; Ol: 耳石; Oc: 听囊; B: 大脑; E: 眼睛; Pf: 胸鳍; N: 感觉丘; C: 纤毛; Sc: 感觉细胞; St: 支持细胞; Nf: 神经纤维; Sp: 脊髓; Da: 背主动脉; Nc: 脊索; It: 肠道; Y: 卵黄; K: 肾脏; Gr: 生殖脊。

Plate III

1. Lateral view in the front of larvae; 2. Ventral view in the front of larvae; 3. Urohypophysis in the early stage of development; 4. Urohypophysis in the middle stage of development; 5. Urohypophysis in the late stage of development; 6. Profile of neuromast; 7. Cross-section of larvae body in the early stage of development; 8. Cross-section of larvae body in the late stage of development.

Uj: Upper jaw; T: Teeth; Lj: Lower jaw; Ba: Branchial arch; H: Heart; Th: Thorax; Lp: Liver primordium; G: Gullet; V: Vertebra; Ol: Otolith; Oc: Otocyst; B: Brain; E: Eye; Pf: Pectoral fin; N: Neuromast; C: Cilia; Sc: Sensory cells; St: Sertoli's cells; Nf: Nerve fibers; Sp: Spinal cord; Da: Dorsal aorta; Nc: Notochord; It: Intestinal tract; Y: Yolk; K: Kidney; Gr: Gonadal ridge.