

文章编号:1000 - 0615(2004)06 - 0609 - 07

牙鲆的胚胎发育

田永胜¹, 陈松林¹, 严安生², 季相山¹

(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实验室, 山东 青岛 266071;

2. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘要:在牙鲆胚胎玻璃化冷冻中,为了准确选择胚胎的冷冻时期,掌握胚胎发育进程,同时为牙鲆苗种培育提供一定的依据,对海水工厂化养殖牙鲆的胚胎发育进行了研究。牙鲆受精卵培养在 14~16 ‰、盐度 29.9 的海水中,利用 Olympus 显微镜对牙鲆胚胎发育过程连续观察,对各个胚胎时期的发育时间进行了记录,并对每一时期的特征用 Olympus 照像机进行了拍摄。实验记录了从受精卵到出膜后 5d 的 29 个具体发育时期的特征和发育时间,拍摄了 30 张具有代表性的胚胎和鱼苗图片,将牙鲆胚胎发育划分为卵裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期、肌节期、尾芽期、心跳期、胚体转动期、出膜前期、出膜期 10 个连续的典型时期。在此培养条件下牙鲆胚胎历时 93h 完成整个胚胎发育,孵化出膜,再经 96h 的胚后发育卵黄囊完全吸收,之后进入变态期,向成鱼转化。

关键词:牙鲆;胚胎发育

中图分类号:Q132.4;S917

文献标识码:A

Study on the embryonic development of *Paralichthys olivaceus*

TIAN Yong-Sheng^{1,2}, CHEN Song-Lin¹, YAN An-Sheng², JI Xiang-Shan¹

(1. Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Fishery College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), which naturally inhabits the seas of China, Korea, Russia and Japan, has become one of the most important cultivated species. In order to do cryopreservation research of the Japanese flounder embryos, it is important to define definitely embryo developmental stage. In addition, study of Japanese flounder embryo development will provide support for the fry breeding. In the present study, embryonic development of Japanese flounder cultured in hatchery was studied. Japanese flounder embryos were incubated in sea water (salinity: 29.9) at 14 - 16 ‰ and the course of embryonic development was observed consecutively under Olympus microscope. The total development time of every development stage was noted and calculated and the characteristic images were taken using Olympus camera. The characteristics and time of 29 embryonic development stages were noted from the fertilization to the hatching after 5 d. 30 photographs, representing the characters of all the development stages and fry, were taken. The time-table of major embryonic development stages of Japanese flounder was as follows: blastodisc forming stage at 0.5 h post fertilization (pf); four cell stage at 2.5 h pf; morula at 10.5 h pf; low blastula stage at 17 h pf; early gastrula stage at 20 h 10 m pf; late gastrula at 28.5 h pf; blastopore closing stage at 29 h 44 m pf; nurula stage at 30 h 40 m pf; 4 - 5

收稿日期:2003-09-23

基金项目:国家“十五”863项目(2001AA621100)

作者简介:田永胜(1964-),男,甘肃会宁人,高级工程师,博士研究生,专业方向为鱼类低温生物学。

通讯作者:陈松林(1960-),男,湖北武汉人,研究员,主要从事鱼类生物技术研究。Tel:0532-5844606, E-mail:chensl@ysfri.ac.cn

somite stage at 35 h 20 m pf; 15 - 20 somite stage at 40 h 10 m pf; tail bud stage at 49 h 10 m pf; heart beating stage at 67 h 12 m pf; embryo movement at 75 h 10 m pf; pre-hatching stage at 90 h 9 m pf; hatching stage at 93 h pf. Yolk sac was completely absorbed 190 h after fertilization and then entered metamorphosis stage.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; embryonic development

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 俗称比目鱼, 是冷水性、底栖鱼类, 是我国黄渤海主要的经济鱼类, 具有生长快、繁殖力强、洄游性小、回归性强、易驯化等特点, 因此也是主要的工厂化养殖鱼类, 其肉质细嫩、味美、且含有丰富的维生素 B₁、B₂、D^[1], 具有极高的营养价值, 深受消费者青睐。

牙鲆在自然界主要分布在南、北美洲东西两岸, 有近 20 种。在亚洲只有 1 种, 分布在中国沿海及朝鲜、日本、俄国远东沿海^[1]。对于牙鲆繁殖的研究始于 20 世纪 60 年代, 至 20 世纪 90 年代, 在人工养殖方面, 山东等地取得了较高的经济效益。但对牙鲆胚胎发育的研究未有全面资料报道。

在牙鲆胚胎玻璃化冷冻保存研究中, 为了准确判断胚胎的发育时期, 研究不同时期胚胎对玻璃化液的适应能力, 可以为牙鲆种质保存提供可靠的依据; 另一方面也为牙鲆苗种的培育提供依据, 本文对牙鲆胚胎发育进行了较详细的研究。

1 材料与方 法

取黄海水产研究所黄海实验基地人工养殖牙鲆, 在工厂化养殖条件下自然产卵受精, 受精卵在 14~16 室温、盐度 29.9 的过滤海水中培养, 每天换水 1/2, 清除死卵。取卵置于培养皿中, 加几滴海水, 在 Olympus 显微镜下连续观察胚胎发育情况, 用 Olympus 照像机拍摄胚胎发育特征图片。

2 结 果

牙鲆受精卵在 14~16 盐度 29.9 的海水中培育, 要经过卵裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期、肌节期、尾芽期、心跳期、胚体转动期、出膜前期、出膜期 10 个连续的时期, 历时 93h 左右 (1395 度·时) 完成整个胚胎发育过程, 进入胚后发育阶段。

2.1 卵裂期 (图版 1~9)

牙鲆受精卵直径约为 $0.8 \pm 0.01\text{mm}$ ($n = 10$), 卵黄中有 1 个大的油球。卵受精后 30min 胚盘形成, 并开始分裂, 早期胚胎细胞为等分裂, 细胞呈

几何级数增长, 经过 2 细胞、4 细胞、8 细胞、16 细胞、32 细胞、64 细胞、128 细胞……, 约经 10h40min 进入多细胞期, 细胞数量继续增加, 呈桑椹状。

2.2 囊胚期 (图版 10, 11)

胚胎细胞继续分裂、膨胀, 经 17h, 在卵动物极侧面观呈椭球形, 进而形状变化似一帽状, 称高囊胚; 胚中间形成一椎状空腔——囊胚腔, 至此囊胚形成, 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, 之后胚胎细胞开始延卵黄表面扩展, 进入原肠期。

2.3 原肠期 (图版 12~15)

囊胚周围开始下包, 形成裙边, 裙边内卷, 内外胚层分化, 进入原肠早期, 此时经历 20h 10min。胚盘继续下包至卵黄 1/2 左右, 约 25h 41min 进入原肠中期, 此时胚环、胚盾出现, 胚环围绕在胚层下包边缘, 略鼓起, 在胚环的一侧形成盾状突起, 紧贴在囊胚层表面, 称为胚盾; 随着胚层的下包, 胚体逐渐收缩伸长。经 28h 30min 至原肠后期, 植物极由胚层包裹形成圆孔——胚孔, 孔中可见卵黄栓。此时胚体形状已比较明显, 附着于囊胚层的一侧, 头部两侧膨大, 似龟头, 形成脑泡; 胚尾还未完全收缩成型, 呈扩散状, 似从胚孔中伸出。

2.4 神经胚期 (图版 16)

囊胚层收缩, 胚孔关闭, 胚尾半圆形, 胚体完全形成, 似弓型侧附于卵黄囊一侧, 头部收缩成前、中、后脑, 视泡突出, 胚体中部神经管清晰可见, 此时经历 30h 40min。

2.5 肌节胚期 (图版 17, 18)

神经胚形成以后, 很快进入肌节分化期, 肌节首先在胚体后部分化, 最初可见 4~5 对肌节, 对称分布于胚体两侧, 此时胚胎发育经历 35h 20min。之后肌节数量逐渐增加, 胚体前部肌节也逐渐清晰。至 15 对肌节左右, 胚体尾部形成一球状结构——末球。历时 40h 10min, 发育至 20 对肌节, 尾部尖端出现, 胚体包卵黄囊约 1/2, 进入尾芽期。

表 1 牙鲆胚胎发育时序

Tab. 1 Time-table of *Paralichthys olivaceus* embryonic development

发育时间(h:min) development time	胚胎发育时期 stage of embryonic development	图版 plate
00:00	受精卵 zygote	[1]
00:30	胚盘形成 blastodisc forming	[2]
01:50	2 细胞 two cells	[3]
02:30	4 细胞 four cells	[4]
03:30	8 细胞 eight cells	[5]
04:40	16 细胞 sixteen cells	[6]
05:20	32 细胞 thirty two cells	[7]
10:40	多细胞 multi-cells、桑椹胚 morula	[8,9]
17:00	高囊胚 high blastula、低囊胚 low blastula	[10,11]
20:10	原肠早期 early gastrula	[12]
25:41	原肠中期 middle gastrula	[13]
28:30	原肠后期 late gastrula	[14]
29:44	胚孔封闭期 closure stage of blastopore	[15]
30:40	神经胚期 neurula stage	[16]
35:20	4 - 5 对肌节期 4-5somites stage	[17]
40:10	15 - 20 对肌节期 15-20somites stage	[18]
42:00	尾芽开始形成 tail-bud forming	[19]
49:10	尾芽期 tail-bud stage	[20]
67:12	心跳期 heart-beating stage	[21]
75:10	胚体转动 embryo movement	[22,23]
90:09	出膜前期 pre-hatching stage	[24]
93:00	出膜期 hatching stage	[25]
94:00	出膜后 1d 1d after hatching	[26]
118:00	出膜后 2d 2d after hatching	[27]
142:00	出膜后 3d 3d after hatching	[28]
166:00	出膜后 4d 4d after hatching	[29]
190:00	出膜后 5d 5d after hatching	[30]

2.6 尾芽期(图版 19,20)

胚体肌节数量不断分化,尾部伸长、偏转,并与体轴成一锐角,尾芽明显。胚体头部结构复杂化,晶体轮廓出现,耳囊形成,脑室也开始分化。此时胚胎发育 49h 10min。

2.7 心跳期(图版 21)

尾芽继续伸长,胚胎发育 67h 12min 左右,胚体包卵黄囊 2/3 左右,第 4 脑室开始分化,耳石出现,围心腔清晰,位于胚体头腹面右侧,与体轴呈斜角;尾鳍褶出现。胚体有间歇性的开始摆动,紧接着可见心脏开始跳动,进入心跳期。

2.8 胚体转动期(图版 22,23)

胚胎发育 75h 10min,尾部继续伸长,尾鳍褶形成,在尾端和尾柄两侧成透明膜。心室呈管状,心跳节率性强,耳石清晰可见。当胚体包卵黄 4/5 左右,胚体尾部扭动,带动胚体转动。

2.9 出膜前期和出膜期(图版 24,25)

胚胎发育 90h 9min,胚体长度几可包卵黄一

周,尾鳍褶发达,胸鳍形成,紧贴于卵黄囊,头部吻端突出,胚体转动有力。发育 93h 开始出膜,胚胎以头部或尾部先出膜。

2.10 胚后发育(图版 26~30)

出膜后 1d 鱼苗,发育 94h,体长约 2mm,卵黄囊后长度稍长于卵黄囊前长度,卵黄囊呈鸡蛋型,前大后小,油球位于卵黄后部,头部稍突出于卵黄囊前部。鳍褶从头后背绕尾直到卵黄囊后部,胸鳍贴于卵黄背面,体中部腹面可见泄殖腔。鱼苗倒挂于水中。镜下可见血液循环。

出膜后 2d 鱼苗,发育 118h,体长 3mm 左右,卵黄囊长度约为体长的 1/3,体色素明显增多。

出膜后 3d 鱼苗,发育 142h,体长约 3.5mm,卵黄囊明显变小,呈椭圆形,卵黄囊约为体长的 1/4~1/5,眼色素变黑,身体表面黑色素斑增多,鳍褶边缘也有色素斑形成,肠管的泄殖腔清晰可见。鱼苗仍不能平游。

出膜后 4d 鱼苗,发育 166h,体长约为 3.5~

4mm,卵黄囊约为体长的 $1/5 \sim 1/6$ 。

出膜后5d鱼苗,发育190h,体长约3.5~4mm,卵黄囊全部吸收,胸鳍游离,鳍褶还未分化,鱼苗可在水中平游,口和泄殖孔开口。

3 讨论

牙鲆胚胎在14~16 经过93h的发育后孵化出膜,进入胚后发育。胚后发育是一个复杂的过程,要经过“变态期”,才能进入成鱼生长期。在15~17 水温,盐度33~33.5的海水中,仔鱼开口摄食25~27d,体长在8.7~10.5mm时开始变态,鱼苗由水表层转向40~50cm水深。仔鱼生长28~31d,体长13~14.5mm,鱼右眼偏移向左侧。鱼苗体长15mm,培育30~32d,完成变态,鱼体扁平,变为非对称体型,生态习性转为底栖^[2]。

花鲈(*Lateolabrax japonicus*)胚胎在12.2~14.0,盐度为22的海水中,历时85h 57min 孵化出膜^[3],加州鲈(*Micropterus salmoides*)胚胎在17.4~20.4 经68h 5min 孵化出膜^[4]。

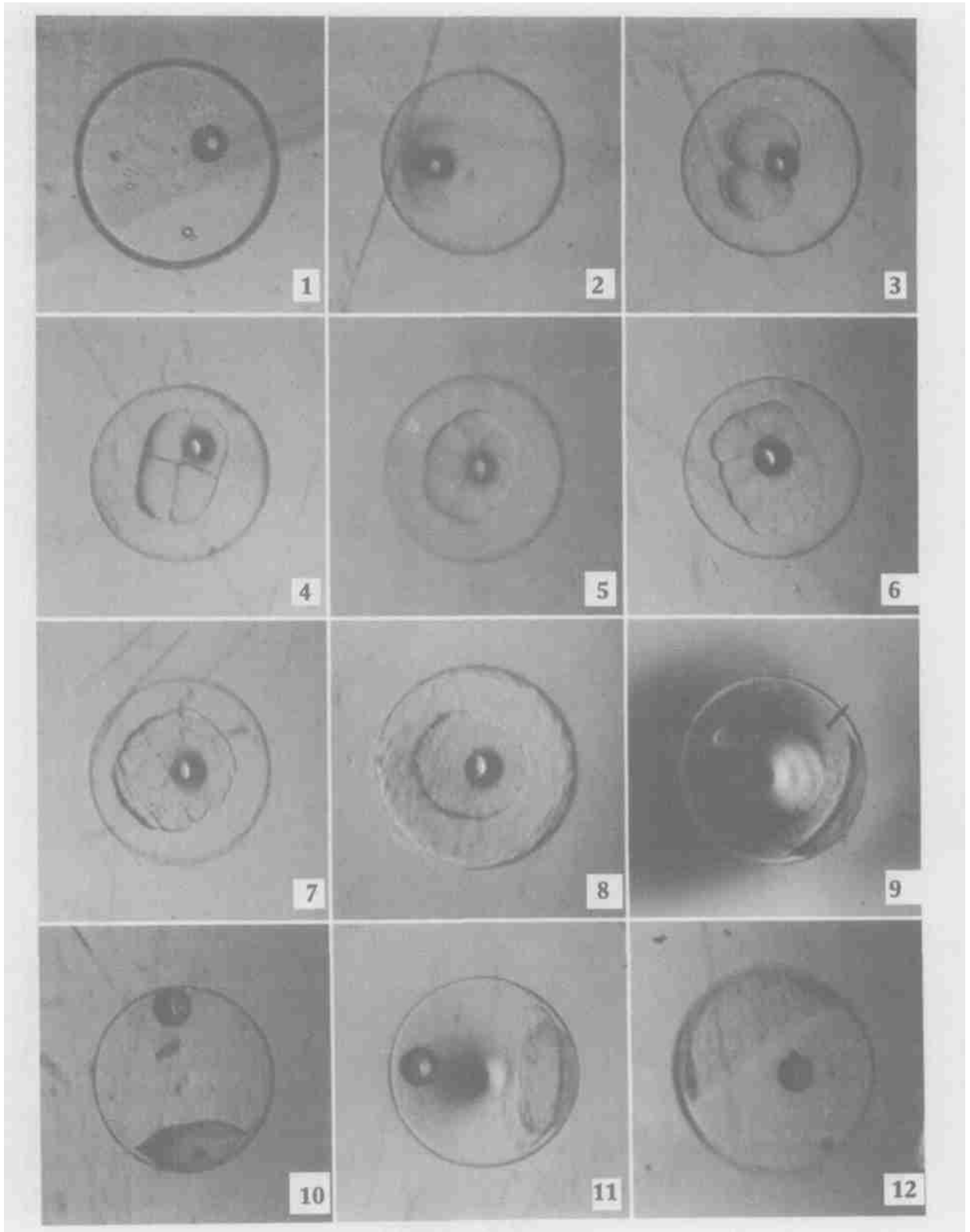
大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)胚胎在13,经过116h完成孵化^[5]。大斑金吉鲈(*Zingel streber*)胚胎在14.3 的水中经过23d发育出膜^[6]。不同鱼类胚胎发育特征不同,大菱鲆胚胎在发育过程中,心跳出现较早,在尾芽伸长不久就开始心跳,而牙鲆胚胎在尾芽伸长至约体长的一半时才开始心跳。大菱鲆胚胎在原肠后期会出现大量死亡,牙鲆胚胎的生命力较强,保持水温稳定和水质良好不会轻易死亡。在胚体转动期大菱鲆胚胎的转动较缓和,而牙鲆胚胎显得较活泼,这一点与成年鱼的性格相似,大菱鲆性温和,而牙鲆性暴躁。

在许多鱼类胚胎发育文献中都描述了“肌效应期”这一胚胎发育时期,瓣结鱼(*Tor brevifilis brevifilis*)在受精后37h 17min 肌肉效应开始,肌肉收缩微弱而无节奏,为缓慢的颤动式收缩,每分钟6~7次,受精后60h 20min 心脏跳动明显^[7],之间

经历23h 3min。神仙鱼(*Pterophyllum scalare*)胚胎在受精后33h 10min 胚体做间断性扭动,进入肌肉效应期,35h 10min 心脏产生节律跳动,之间经历2h^[8]。牙鲆胚胎发育67h左右,胚体包卵黄囊2/3左右,胚体出现短暂的搐动后,很快出现心跳,所谓的“肌肉效应期”不明显。

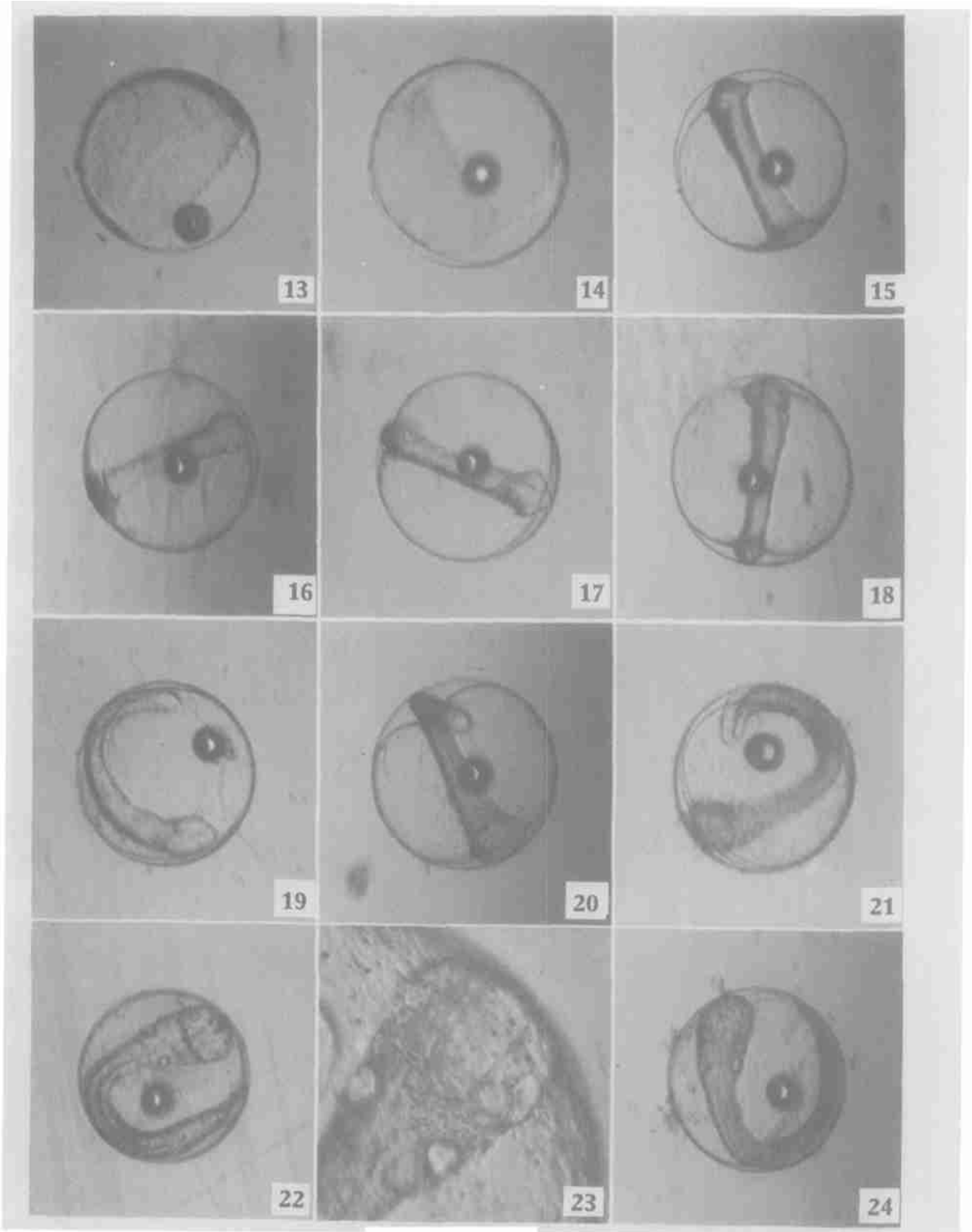
参考文献:

- [1] Xie Z M. The breeding techniques of *Pareichthys olivaceus* and *Epinephelus* [M]. China Agriculture Press, 1999. [谢忠明. 牙鲆石斑鱼养殖技术[M]. 中国农业出版社, 1999.]
- [2] Wu G Z, Zhang Y. The study on the surviving rate of early Japanese flounder larvae [J]. Marine Sciences, 1993, (1): 13-17. [吴光宗, 张英. 牙鲆早期阶段存活率研究[J]. 海洋科学, 1993, (1): 13-17.]
- [3] Hu X C, Cao S J, Zhou Z L, et al. Studies of embryonic development of *Lateolabrax japonicus* [J]. Journal of Chongqing Teachers College (Natural Science Edition), 1997, 14(2): 51-56. [胡先成, 曹双俊, 周忠良, 等. 花鲈胚胎发育的研究[J]. 重庆师范学院学报(自然科学版), 1997, 14(2): 51-56.]
- [4] Liu W S, Lin Z K, Peng R M. A study on the embryonic and larval development of *Micropterus salmoides* [J]. J South China Agr Univ, 1995, 16(2): 5-11. [刘文生, 林焯坤, 彭锐民. 加州鲈胚胎及仔稚幼鱼的发育研究[J]. 华南农业大学学报, 1995, 16(2): 5-11.]
- [5] Lei J L, Ma A J, Liu X F, et al. Study on the development of embryo, larval and juvenile of turbot *Scophthalmus maximus* L [J]. Oceanol et Limnol Sin, 2003, 34(1): 9-18. [雷霖霖, 马爱军, 刘新富, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.) 胚胎及仔稚幼鱼发育研究[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(1): 9-18.]
- [6] Kovac V. Early development of *Zingel streber* [J]. J Fish Biol, 2000, 57: 1381-1403.
- [7] Xie E Y, Yang Q F, He X F. The embryos and larval development of *Tor brevifilis brevifilis* [J]. J Fish China, 2002, 26(2): 115-121. [谢恩义, 阳清发, 何学福. 瓣结鱼的胚胎及幼鱼发育[J]. 水产学报, 2002, 26(2): 115-121.]
- [8] Zhou Y, Yang Z G, Zhang J H. Preliminary observation on the development of embryo and larvae of *Pterophyllum scalare* [J]. J Shanghai Fish Univ, 2001, 10(4): 370-373. [周玉, 杨振国, 张俊辉. 神仙鱼胚胎和仔鱼发育的初步观察[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(4): 370-373.]



图版 Plate

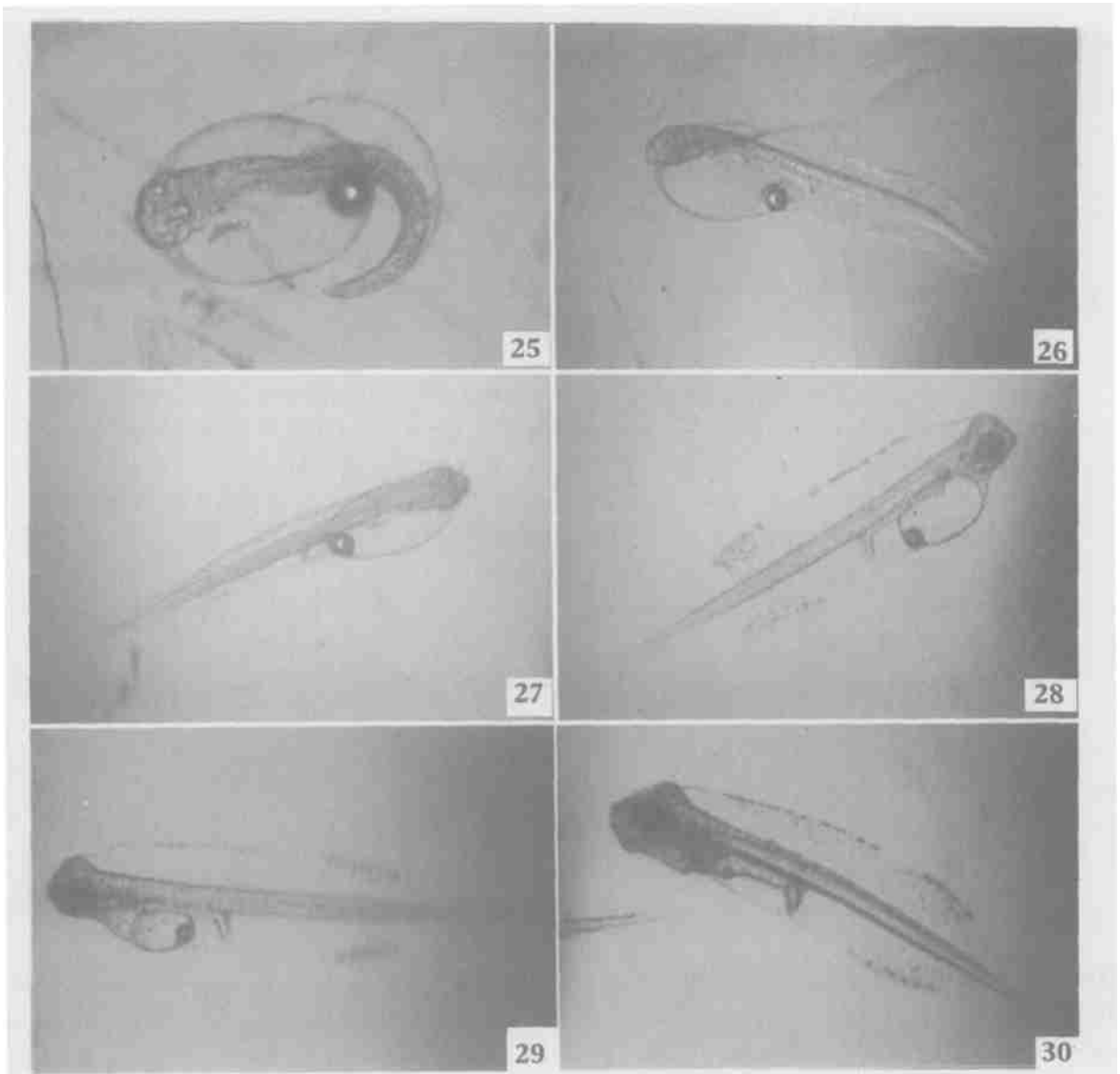
1. 受精卵, ×60; 2. 胚盘形成, ×60; 3. 2细胞期, ×60; 4. 4细胞期, ×60; 5. 8细胞期, ×60; 6. 16细胞期, ×60; 7. 32细胞期, ×60; 8. 多细胞期, ×60; 9. 桑椹胚期, ×60; 10. 高囊胚, ×60; 11. 低囊胚, ×60; 12. 原肠早期, ×60
1. zygote, ×60; 2. blastodisc forming, ×60; 3. 2 cell stage, ×60; 4. 4 cell stage, ×60; 5. 8 cell stage, ×60; 6. 16 cell stage, ×60; 7. 32 cell stage, ×60; 8. multi-cell stage, ×60; 9. morula stage, ×60; 10. high blastula stage, ×60; 11. low blastula stage, ×60; 12. early gastrula stage, ×60



图版 Plate

13. 原肠中期, $\times 60$; 14. 原肠后期, $\times 60$; 15. 胚孔封闭期, $\times 60$; 16. 神经胚, $\times 60$; 17. 4~5对肌节期, $\times 60$; 18. 15~20对肌节期, $\times 60$; 19. 尾芽出现, $\times 60$; 20. 尾芽期, $\times 60$; 21. 心跳期, $\times 60$; 22. 胚体转动期, $\times 60$; 23. 胚体转动期头部,可见心脏及耳囊内耳石, $\times 300$; 24. 出膜前期, $\times 60$

13. middle gastrula stage, $\times 60$; 14. late gastrula stage, $\times 60$; 15. closure stage of blastopore, $\times 60$; 16. nerve embryos stage, $\times 60$; 17. 4 - 5 somites stage, $\times 60$; 18. 15 - 20 somites stage, $\times 60$; 19. tail-bud forming, $\times 60$; 20. tail-bud stage, $\times 60$; 21. heart beating stage, $\times 60$; 22. embryo movement stage, $\times 60$; 23. head of embryos movement stage, seen the heart and stone in the ear, $\times 60$; 24. pre-hatching stage, $\times 60$



图版 Plate

25. 胚胎头部出膜, $\times 60$; 26. 出膜后 1d 鱼苗, $\times 40$; 27. 出膜后 2d 鱼苗, $\times 40$; 28. 出膜后 3d 鱼苗, $\times 40$; 29. 出膜后 4d 鱼苗, $\times 40$; 30. 出膜后 5d 鱼苗 $\times 40$

25. hatching of embryos head, $\times 60$; 26. 1d larva after hatching, $\times 40$; 27. 2d larva after hatching, $\times 40$; 28. 3d larva after hatching, $\times 40$; 29. 4d larva after hatching, $\times 40$; 30. 5d larva after hatching, $\times 40$