

大菱鲂亲鱼、配子和仔稚鱼的质量评价

Quality assessment of broodstock, sperm, egg, oosperm and larva of turbot (*Scophthalmus maximus* L.)

马爱军, 雷霖霖, 王新安, 黄智慧, 丁福红

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛 266071)

中图分类号: Q33

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)01-0098-07

自 1992 年大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.)被引入中国以来, 在海水鱼类工厂化养殖领域取得了重大成效^[1]。近年来, 引进的大菱鲂在中国种质退化现象较为严重^[2]。调研表明, 在 2000~2001 年大菱鲂苗种经 10 个月的养成有 30% 可达到上市规格, 现在养成 10 个月能达到上市规格的不到 10%, 整批苗种达到上市规格要在 18 个月以上, 甚至 2 a。为促进中国大菱鲂健康、稳定、可持续发展, 科研人员对其进行了一些列良种选育及繁育优化研究。在此过程中, 依据一定的科学标准选择优良的亲鱼、精子、卵子、受精卵和仔稚鱼是极其重要的。多年来, 尽管国外对大菱鲂亲鱼、精子、卵子、受精卵和仔稚鱼的质量评价方法、尤其对精子和卵子的评价方法从不同的角度进行了探讨, 并根据所采用的指标得出相应的质量评估参数。但目前尚未有统一的标准应用到实际生产。作者分别详细综述了国内外大菱鲂亲鱼、精子、卵子、受精卵和仔稚鱼质量评估方法及其相应的评估参数, 以期为在大菱鲂繁育(选育)过程中选择质量优良的亲鱼、精子、卵子、受精卵和仔稚鱼提供参考依据。

1 亲鱼质量评价

对亲鱼质量评估的研究主要集中于雌鱼, 通常采用的直接指标是雌性亲鱼的繁殖力和产卵量。Jones^[3]估算, 每年大菱鲂雌性亲鱼的排卵量为 3×10^5 个/kg, 繁殖力(卵母细胞数)为 10^6 个/kg。Howell 等^[4]在两个连续繁育季节对 5 尾雌大菱鲂(3~5 kg)的产卵状况进行研究, 发现每年相对繁殖力范围是 285~463 g/kg, 在研究范围内繁殖力和体质量不相

关。根据 Fauvel 等^[5]所报道的“大菱鲂人工繁育技术”中雌性亲鱼繁殖力的演变资料估算, 两组大菱鲂雌鱼在连续 4 a(1988~1991 年)繁殖力平均值的范围分别是 $7.0 \times 10^4 \sim 1.3 \times 10^5$ 和 $5.9 \times 10^4 \sim 1.3 \times 10^5$ 个/kg; 4 组大菱鲂雌鱼在连续 3 a(1989~1991 年)繁殖力平均值的范围分别是 $2.1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^5$ 、 $1.2 \times 10^6 \sim 3.3 \times 10^6$ 、 $6.9 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^5$ 和 $9.5 \times 10^4 \sim 1.7 \times 10^5$ 个/kg; 一组大菱鲂雌鱼在连续 2 a(1990~1991 年)繁殖力平均值的范围是 $1.1 \times 10^5 \sim 2.1 \times 10^5$ 个/kg。Fauvel 等^[6]研究了通过控制过熟来提高亲鱼的繁殖能力。

实验设计为对不同组别雌鱼进行每周检查 2 次和每周检查 5 次两种处理。结果表明, 除了 1 个组具有极低的繁殖力(0.95×10^5 个/kg)外, 其余各组繁殖力基本都相似(2.69×10^5 、 3.10×10^5 、 2.89×10^5 、 2.87×10^5 、 2.64×10^5 个/kg), 两种处理的平均繁殖力分别为 2.89×10^5 、 2.33×10^5 个/kg。进一步研究发现, 每一种处理中, 两种处理之间的平均繁殖力都没有明显的差异($P > 0.05$); 一个繁殖组每尾鱼的产卵数量与另一个繁殖组每尾鱼的繁殖数量不因处理方法的不同而不同($P > 0.05$)。据此推测, 卵子是否过熟, 对利用繁殖力和产卵量评估亲鱼质量基本上没有影响。Fauvel 等^[5]研究表明, 雄性大菱鲂个体质量只有

收稿日期: 2010-04-07; 修回日期: 2010-11-12

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(nycytx-50); 国家支撑计划专题项目(2006BAD01A12012); 农业公益性行业科研专项经费项目(nyhyzx07-046); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(2009-ts-11)

作者简介: 马爱军(1971-), 女, 山东荣成人, 研究员; 主要从事海水鱼类繁育与遗传育种研究, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn; 电话: 0532-85835103

达到 0.6 kg 以上时, 按摩其腹部才能挤出精液。精液百分比含量随个体体质量的增加而提高。Deniel^[7]报道, 雄性大菱鲂的性成熟系数值(gonadosomatic index, 简称 GSI)很低, 最高比率只达到接近 0.6%。与其他鱼类比较, 说明这个比率很低。在大菱鲂精子发生过程中, 精巢发育很慢。有关大菱鲂亲鱼质量评价的研究, 雷霖霖等^[8]认为选择优质亲鱼的形态标准为: (1)体质量 2~6 kg, 雌鱼 3 kg(3~6 龄)以上, 体长 40 cm 以上; 雄鱼 2 kg(2~6 龄)以上, 体长 30~35 cm; (2)体型完整无缺、无畸形、活动力强、集群性好、摄食积极。雌、雄两性亲鱼性成熟标准为雌鱼通过卵巢在腹面突出的程度判断成熟度。0 阶段: 不突出; 1 阶段: 卵巢后小叶轻微突出; 2 阶段: 卵巢后小叶明显突出, 而前小叶轻微突出; 3 阶段: 卵巢前后小叶都明显突出。当雌鱼发育到第 3 个阶段时, 可用手轻挤卵巢, 可见有成熟卵流出。大菱鲂雄鱼性腺不明显, 挤压力度大于雌鱼, 可见有精液流出。

2 精子、卵子及受精卵的质量评价

2.1 精子的质量评价

精子质量评价包括常规的精液检查方法和近年来发展起来的一些新技术检测手段。常规检查方法主要是指精液密度、活力、形态等方面的判断, 能够快速评价精子质量; 新技术检测手段主要是指计算机辅助精子分析(computer assisted sperm analysis, 简称 CASA)^[9]、流式细胞技术分析^[10]、精子染色的显微镜检测^[11]、单细胞凝胶电泳^[12]和低渗肿胀^[13]等方法, 新技术检测方法的建立为快速、多指标、客观、准确地评价鱼类精子质量提供了技术保证。其中, 精液浓度和精子活力是较为常用的两个指标。Suquet 等^[14]认为精子浓度可利用血细胞计数器计数法、精子比容值法、分光光度推定法进行评估; 精子活力可在议定标度上通过运动细胞的百分比、细胞运动的持续期或这两个参数共同评估。Suquet 等^[14]利用精液浓度和精子活力这两个指标对大菱鲂精子质量评估的可行性进行了研究。结果表明, 利用精子比容值法精子浓度不能被精确评估; 利用血细胞计数器计数法可以得到精子浓度的精确值, 但这种计数耗时较长, 对一尾雄鱼精子浓度的评估需要 2 h; 利用分光光度测定法在 420 nm 波长可以精确评估精子的浓度。黏性状态精液的浓度(54.6×10^9 个/mL ± 5.4 个/mL)高于液态精液的浓度(20.0×10^9 个/mL ± 2.4 个/mL),

大菱鲂精液的稀释倍数可以影响精子的活力。在 1:10、1:100、1:1000 3 个稀释梯度下, 以每 30 s 为时间间隔对大菱鲂精子的活力进行评估(运动精子的议定标度: 0 表示 0%, 1 表示 0~25%, 2 表示 25%~50%, 3 表示 50%~75%, 4 表示 75%~100%), 发现增加稀释可导致大菱鲂精子活力降低(运动精子的百分比减少及精子运动的持续期降低)。在自然产卵季节, 对于初次采集的精液, 运用上述方法对其质量进行了评估。结果表明每尾鱼提取精液的均值为 1.6 mL ± 0.2 mL, 浓度为 38.3×10^9 个/mL ± 5.9 个/mL, 精子运动持续期为 6.06 min ± 1.08 min, 精子比容值为 40.4% ± 5.8 %。对大菱鲂精子活力评价时, 运动精子的议定标度也可参照文献^[15]。即:“0”表示无运动精子, “1”表示有 1%~5%的运动精子, “2”表示有 5%~29%的运动精子, “3”表示有 30%~79%的运动精子, “4”表示有 79%~95%的运动精子, “5”表示有 95%~100%的运动精子。Suquet 等^[16]根据已报道的研究成果详述了大菱鲂精子的特征, 并与部分淡水及海水鱼类的精子特征进行了比较。大菱鲂 GSI 值是很低的, 仅为 0.6%~0.8%。每尾鱼每次提取精液的均值为 0.2~2.2 mL, 浓度为 0.7×10^9 ~ 11.0×10^9 个/mL, 每次提取得到的精子总量为 0.2×10^9 ~ 12.0×10^9 个精子, 和大多数淡水鱼相比, 大菱鲂精子运动的持续期较长为 1~17 min。大菱鲂精子的正常形态被认为是一种原始的类型, 借助电子显微镜观察, 发现大菱鲂精子与其他已报道的大多数真骨鱼精子相类似。精子总长度大约为 45 μ m, 精子头部为圆形(最大直径为 1.7 μ m)没有顶体。细胞核的前、后部呈现凹陷, 中间室出现萎缩, 聚集呈环状物的 10 个线粒体经常是可计数的。等离子膜围绕着鞭毛的近端, 形成“纱罩”, 鞭毛呈现典型的“9+2”微管结构。Suquet 等^[17]研究了光周期、挤鱼的频率以及雌鱼的存在对大菱鲂精液产量的影响, 其相关数据可为大菱鲂精子质量评估提供借鉴。研究结果表明改变光周期对精液产量没有影响, 在试验期间每尾鱼总精液产量均值为 4.9 mL ± 0.9 mL, 平均精液浓度为 29.4×10^9 个/mL $\pm 2.8 \times 10^9$ 个/mL。在第二次自然排卵结束, 尽量刺激精液产生或导致释放低量的精液, 结果得到平均精子浓度和平均精子活力分别为 47.6 个/mL $\pm 10.2 \times 10^9$ 个/mL 和 2 min36 s ± 0 min47 s, 挤鱼的频率对精液总量、平均精子活力没有影响, 在自然产卵时期雌鱼的存在可以提高精子的活力。实验结果为从 3 min27 s ± 0 min52 s 提高到 6 min38 s ± 1 min28 s。

Geffen 等^[18]认为在对精子质量的描述方面尽管精子浓度、精子运动、受精率之间的关系并不直观,但这些参数仍然是评估精子质量最常使用的指标。为了界定大菱鲂精子质量, Geffen 等^[18]利用运动精子的百分比、精子运动的保持力、温度对精子运动保持力的影响、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, 简称 ATP)浓度对精子运动保持力的影响等 4 个参数对其进行了研究。结果表明, 来源于不同雄鱼的精子被激活初期, 运动精子的百分比是 34.8%~97.6%, 均值为 76.3%, 精子激活 1 h 后, 均值降低为 48.1%, 同时保持运动的精子是激活初期运动精子的 27%~90%, 均值为 62.6%; 在-27℃ 下冷休克对激活初期精子的运动影响不大, 但激活 30 min 后影响显著($P < 0.05$), 冷冻样品保持运动的精子仅是激活初期运动精子的 8.6%(范围: 0~25%), 而对照组保持运动的精子是激活初期运动精子的 49%(范围: 38%~63%), 冷冻样品和对照组之间差异极其显著($P < 0.001$); 大菱鲂精子的 ATP 浓度变化范围是(0.02~1.35) mg / 10^6 精子(均值: 0.46 mg / 10^6 精子, 相当于 9.2 nmol/ 10^8 精子), 激活后运动精子的百分比以及精子激活后运动的保持力和来自非激活精子的 ATP 数量之间的相关性不显著($P > 0.05$), 根据 ATP 浓度的 3 个水平(1=高 1.0 mg / 10^6 精子, 2=中=(0.9~0.1) mg / 10^6 精子, 3=低 0.1 mg / 10^6 精子)将来自不同雄鱼的精子分级, 可发现一定的变化趋势, 在精子激活后的任何时刻, 高 ATP 水平的运动精子的百分比显著性地减少, 然而, 运动下降的比率可能和 ATP 水平有关, 因为 ATP 越低水平运动减少地越快。鱼类精子被激活后对其进行生化变化的密切调查是非常有意义的一项工作。Suquet 等^[14]指出大菱鲂精子运动的持续期可能仅有 5 min。Barton^[19]报道大菱鲂精子在激活后 3, 15 和 28 min, 受精能力分别为 97%、94%和 22%。尽管以运动精子的百分比和精子运动的持续期为指标对大菱鲂精子质量进行了评估^[18], 然而 Chauvaud 等^[20]认为由于技术粗糙, 这两个参数不可能精确反映精子运动特征。精子运动是评估精子质量最常用的参数, 因为精子必须充分运动才能获得突破卵子的能力。Chauvaud 等^[20]采用暗视野显微观察和频闪照明-显像记录的方法对大菱鲂精子进行观察, 并对更能体现精子游泳行为的良好参数如鞭毛波动频率、游泳速度和精子运动距离进行了测量。结果表明, 大多数新采集的精子在激活初期运动精子的百分比为 100%, 在激活 70~100 s 后运动精子的百分比突然下

降到 15%~30%; 精子激活后的前 40s 鞭毛波动频率保持 50 Hz 常数值, 随后突然下降到 15~30 Hz; 激活后 30~40 s 期间精子运动速度约为 200 $\mu\text{m/s}$, 激活 50 s 后下降到 100 $\mu\text{m/s}$ 的稳定值; 精子激活 1.2 min 后越来越多的精子停止运动; 精子在激活后的 1.2 min 期间精子运动最小距离的平均值约为 12 mm。根据上述大菱鲂精子的运动特征可将精子运动分为 4 个连续阶段: 阶段 1, 持续 40 s, 运动精子的百分比比较高, 鞭毛波动频率接近 50 Hz; 阶段 2, 在精子激活后第 40 秒, 运动精子的百分比突然下降到 30%, 鞭毛波动频率降为 15~30 Hz 直到运动结束; 阶段 3, 鞭毛末梢变的僵硬; 阶段 4, 从激活后 80 s 开始, 越来越多的精子停止运动, 整个鞭毛完全变的僵化。与其他鱼类比较, 大菱鲂精子的运动能力是很高的, 这在一定程度上能够对大菱鲂雄鱼低 GSI 值(0.6%)^[7]、小的精子释放体积(最小值~最大值: 0.2~2.2 mL)、低精子浓度($0.7 \times 10^9 \sim 11.0 \times 10^9$ 个/mL)和低精子产量($0.2 \times 10^9 \sim 12.0 \times 10^9$ 个精子)^[18]起到补偿作用。Dreanno 等^[21]研究了尿液对大菱鲂精子质量的影响。发现精子被尿液人工污染后延迟了精子运动的初始时间。利用 CASA 技术对尿液污染精子的运动速度和对照组精子运动速度进行测定, 发现在 30%被尿液污染的精液中, 精子初始运动 10 s 后, 运动速度从 230 $\mu\text{m/s}$ 显著地减小到 160 $\mu\text{m/s}$ ($P < 0.05$)。在精液中添加 10%的尿液并混合 15 min, 精子初始运动 10 s 后的运动细胞百分比从 83.4%显著地减小到 54.2%。此外, 尿污染对运动参数的影响随尿液与精液的混合时间而显著发生变化。尿污染后精子的受精率也显著降低。

2.2 卵子和受精卵的质量评价

从形态上观察, 大菱鲂卵子呈球状, 卵径为 0.91~1.20 mm, 卵内仅含有一粒油球, 油球径为 0.15~0.22 mm^[7]。雷霖霖等^[23]也对大菱鲂卵子形态进行研究, 发现大菱鲂卵呈圆球形, 无色透明, 中央有油球 1 个, 亦无色透明, 平均卵径为 0.98 mm, 平均油球径为 0.13 mm。Howell 等^[4]报道, 大菱鲂卵径范围是 0.97~1.10 mm, 在每一繁殖季节期间卵径存在下降趋势。评价鱼卵的质量, 传统的方法是计算受精率和孵化率。Sahin^[24]在实验室条件下, 对黑海大菱鲂(*Psetta maxima*)的繁育性能进行研究。发现在水温 15℃ 条件下, 大菱鲂卵的受精率很低, 仅为 27.6%, 孵化率为 74.5%。Fauvel 等^[5]研究发现, 在产卵受精协调一致

的情况下大菱鲂卵的平均成活率为 85%，受精率(受精卵/活卵)大约为 68%。然而，评价成活率存在着主观性。对于大菱鲂而言，卵巢以及卵子的 pH 存在不稳定性，当排卵的时候 pH 变化较大。当产卵时卵巢的 pH 为 8.2 时，卵的成活率为 100%。当 pH 为 7.3 时成活率则为 0。卵巢液具有较强的阻断海水能力，使之形成一个受精的微环境，其中包括 pH 对精子的受精能力和对卵子受精率的影响。卵巢 pH 的不稳定可以作为一种目标参数，成为搜集部分过成熟卵子状态的特征而预告受精成功的可靠因素^[5]。Devauchelle 等^[25]每周按摩 1 次雌鱼腹部采集到卵子的平均受精率为 20%，而 Howell 等^[4]每天按摩 1 次雌鱼腹部采集到卵子的平均受精率为 24%。显然，从总体上看，不同采集频率对卵的受精率影响不大。对于大菱鲂卵子的质量评价，Fores 等^[22]在对卵子质量研究的基础上，结合其他学者的观点制定了大菱鲂卵子质量的鉴定标准(表 1)。对于获得的批量卵子，根据以下指标进行选择孵化：选择在阶段 1 和阶段 2 中，多于 50 mL 的上浮卵^[16]，显示了高或中等程度的上浮，卵径 < 1.1 mm。受精后受精率大于 70%，初次分裂的分裂球较大且对称率大于 50%。Fores 等^[22]认为卵径是决定卵子活力的一个重要指标。当卵径为 0.9~1.1 mm 时，能够产生比较高的受精率；卵径为 1.1~1.2 mm 时，可产生中等或比较低的受精率。这一结果与在其他鱼类中比较大的卵径产生较高比率的受精率和孵化率不同。Fauvel 等^[6]在研究通过控制过熟来提高亲鱼的繁殖能力中发现，大菱鲂卵子的活力与孵化率是正相关的($r=0.63$; $P < 0.001$)，因此认为卵子质量的评估可由卵子的活力率(活的卵子数/总卵子数)来表示。对不同组别雌鱼进行每周检查 2 次和每周检查 5 次两种处理，结果发现，每天挤卵产生的均活力率(72.56%)显著高于每周检查 2 次的均活力率(46.62%)($P < 0.01$)。据此推测大菱鲂卵子过熟是导致卵子低活力并最终导致限制仔鱼产量的主要原因，因此应用卵子活力率评估卵子质量。为防止卵子过熟，采卵应在规范的程序下进行。在对 4 组雌鱼进行每天采卵处理并研究其活力发现，各组活力率均值分别为 59.59%、71.17%、74.42%、83.31%。显然，非过熟卵子活力间差异显著($P < 0.05$)。每周检查 5 次处理组的平均孵化率(34.45%)显著高于每周检查 2 次处理组的平均孵化率(11.47%)，每周检查 2 次 2 组的孵化率为 9.88%、16.78%，而每周检查 5 次

4 组的孵化率分别为 30.02%、31.12%、32.57%、50.46%。Fauvel 等^[6]研究还发现，卵子发展到过熟阶段，活卵子到达仔鱼阶段的比例减少。这与 Howell 等^[4]的研究结果相一致，他们认为当活力率在 40% 左右时，仅有 60% 的活卵子被受精。由于了解了这种相关性，认为可以通过观察受精前卵子的形态特征来预测卵子发育的潜在可能性，因此限定用孵化单位来预测卵子的质量。Omnes 等^[26]认为一个好的实用的卵质量评估标准应该是简单的。他们利用观察卵形态特征和染色检测技术对大菱鲂卵质量评估方法进行研究，中性红(neutral red)(可发育细胞被染成红色，非发育细胞不能被染成红色)和台盼蓝(trypsin blue)(染料不能渗透可发育细胞，死细胞则被染色)两种染料被使用。实验结果发现大菱鲂卵的发育能力率(卵的成活率)约为 70%~85%。作者认为利用中性红和台盼蓝染料可更好地评估大菱鲂可发育卵或死卵的比例。Omnes 等^[26]认为没有任何 100% 可靠的方法去预测仔鱼的饲养潜能。细胞的完整性并非卵质量评估的唯一参数，生化标准和胚胎发育的环境条件也应该被考虑。Kjørsvik 等^[27]从卵子的形态标准、受精率和孵化率 3 个方面对大菱鲂卵子质量进行了研究。结果发现优良的卵子具有以下特征：(1)形态标准：在 8~32 细胞期，标准分裂球百分率为 87%~94%；(2)受精率：以过原肠期计数，卵的受精率为 90%~95%；(3)孵化率：孵化率为 73%~82%。由于卵子的受精率和分裂球的形态决定着卵子、仔鱼、稚鱼的存活能力，因此这 2 个指标可以提前预测仔鱼的质量。由于操作简单，卵子的受精率和分裂球的形态标准通常被应用到海水鱼类卵子质量的快速评价中。对于上述 3 个标准，由于卵裂早期观察的卵质量与其孵化率以及由这些卵孵化出幼体的存活率之间存在显著的正相关^[28]，Kjørsvik 等^[29]建议把卵裂早期卵的对称性(形态标准)作为评价海水鱼卵质量的主要指标。这一形态学评价标准至今仍最具可信性。受精卵的高孵化率和仔鱼的高成活率说明来源于亲鱼的卵的质量是优良的^[23]。Bromage 等^[30]提出 3 个影响卵质量的重要因素是卵表面的菌群、亲鱼营养、卵子的过熟。大菱鲂受精卵呈圆球形，无色透明，属端黄卵，呈盘状分裂，分裂方式与其他硬骨鱼类相似。孵化前不久，胚胎体躯干部色素增多，尤以背鳍前端和尾部的上、下鳍膜出现的两丛棕黄色素丛为其标志，据此可以判断卵质和胚胎发育的优劣^[23]。

Sahin^[24]对黑海大菱鲂受精卵研究发现,受精卵呈球形、悬浮、内含一油球,受精卵卵径为 1.213 mm ±0.063 mm。雷霖霖等^[8]认为优良受精卵的典型特征为透明、浑圆,卵周隙小。受精后的第 1、2 次分裂,清晰对称,说明此批卵受精率和孵化率高。

表 1 大菱鲂卵子质量标准^[22]
Tab. 1 Quality criteria of turbot egg (*Scophthalmus maximus* L.)^[22]

卵子等级	1	2	3	4
上浮	高	中		低
卵径	< 1.1mm		> 1.1mm	
受精率(%)	> 70%		< 70%	
分裂球对称率(%)	> 50%		< 50%	
第一次分裂球大小	大		小	

3 仔稚鱼的质量评价

3.1 仔稚鱼质量评估的发育标准

Sahin^[24]对黑海大菱鲂研究发现,初孵仔鱼全长 2.63~3.33 mm,均值为 3.12 mm±0.140 mm。卵黄囊均值大小 926 μm,油球直径 243 μm。到初次开口摄食,全长均值增长到 3.44 mm±0.262 mm。仔鱼的成活率是对仔鱼进行质量评估的最直接标准。Fauvel 等^[5]对来源于 3 个池塘的亲鱼种群后代的成活率进行了统计。结果发现,3 个池塘连续 3 a(1989~1991 年)的成活率依次分别为 79%、71.5%、81%、87%、69.5%、80%、73.5%、没有估算、72.5%。Sahin^[24]对黑海大菱鲂仔鱼存活率研究发现,孵化后 5 日龄仔鱼的存活率是 64.52%,15 日龄的存活率是 12.47%,25 日龄的存活率是 5.48%,此后,存活率几乎变化不大。在整个仔鱼期,即 0~60 日龄,存活率大约为 5.2%。大菱鲂早期仔稚鱼存活率存在很大差异,Robin^[31]报道 27 日龄仔鱼存活率是 7.5%~8.3%~20.2%(使用 3 种不同的富集材料);Estévez 等^[32]在 45 日龄获得了 30%的平均存活率;Olsen 等^[33]声称对于鲆鲽鱼类到变态和饵料转换后(即 80 日龄)总体存活率范围通常是 0~10%;根据 Witt 等^[34]报道,从孵化到饵料转换,理想的平均存活率范围是 5%~10%。上述 Sahin^[24]研究表明,0~60 日龄,大菱鲂存活率为 5.2%,显然存活率在正常范围内。雷霖霖等^[23]对大菱鲂仔稚幼鱼发育进行了研究。结果表明,胚后仔鱼阶段,体背部色素逐步加深,鱼体逐渐由透明变为不透明,由两侧对称变为不对称。3 日龄仔鱼开口;

1~9 日龄仔鱼,体色呈红色,称之为“红苗”;10~24 日龄,黑色素增多,称之为“黑苗”;25 日龄以上,体披大量花状色素,称之为“花苗”,由此鱼体变宽,右眼开始上升;30 日龄苗,右眼已上移至头顶背部;35~38 日龄苗,右眼已完全转移至左侧,变态完成而具鲆鲽类所特有的形态、生态和生理状态。

3.2 仔稚鱼质量评估的生化标准

对于海水鱼类仔鱼的质量评估,基于生化标准的方法被认为是更有效和更敏感的,因为摄食体制的变化首先反映在细胞和亚细胞水平,然后才体现在整个有机体^[35]。仔鱼的 RNA、DNA 和蛋白质含量是经常被利用的生化标准^[36-41]。Cunha 等^[42]利用两种生物多元统计分析的方法(主成分分析-PCA 和逐步判别分析-SDA),以核苷酸(DNA 和 RNA)和蛋白质含量为指标,评估了大菱鲂仔稚鱼(发育时期小于 12~13 d,苗干质量低于 200 μg)的营养状况。结果表明,来源于 2 种处理的生化资料经多元分析将具有特定结构的试验材料可以分为几个组。通过甄别每一批试验材料中仔鱼的发育期和营养状况,并将这两个标准和生化分析(RNA、DNA 和蛋白质含量)相关联确定了 4 个组,即 G1、G2、G3、G4,分别代表营养状况次理想、最理想、极其缺乏和缺乏 4 种情况。经逐步判别分析(stepwise discriminant analysis,简称 SDA),4 个组的判别函数式分别为 G1: $Y = -20.5 + 183.9X_1 + 0.3X_2 - 2.3X_3$; G2: $Y = -52.8 + 274.6X_1 + 0.3X_2 - 3.2X_3$; G3: $Y = -84.8 + 345.6X_1 - 27.5X_2 - 2.2X_3$; G4: $Y = -30.7 + 224.6X_1 - 8.1X_2 - 2.3X_3$ 。式中, X_1 、 X_2 、 X_3 分别表示 DNA、RNA 和蛋白质的含量。对于营养和发育背景不清晰的仔鱼个体或仔鱼新样本,要判断所归属的组别,只需将仔稚鱼个体或仔稚鱼新样本的 DNA、RNA 和蛋白质含量指标,分别代入上述 4 组的判别公式,计算出 4 个函数值,以函数值最大的判别函数所对应的组作为所属组别。

3.3 仔稚鱼质量评估的细菌环境标准

Gatesoupe^[43]认为对鱼类仔稚鱼的质量评价除了发育标准和生化标准外,还应该考虑细菌环境的影响。他利用 7 批孵化后 1~10 d 大菱鲂仔稚鱼,通过对 10 日龄稚鱼鱼的成活率和平均体质量、8 日龄稚鱼分别在 Petrifilm 干膜和 TCBS 琼脂上的细菌数以及 9 日龄稚鱼分别在弧菌 NP、弧菌 P、无弧菌感染 3 种条件下 48 h 内成活率的统计对大菱鲂仔稚鱼质量的早期评估方法进行研究。结果表明,10 日龄稚鱼的

平均成活率为 66%，其中第 2 批稚鱼的成活率最低，仅为 30%，第 5 批稚鱼的成活率最高，为 95%；10 日龄稚鱼的总体平均体质量为 0.57 mg，其中第 2 批均质量最低为 0.37 mg，第 4 批均质量最高，为 0.70 mg；8 日龄稚鱼在 Petrifilm 干膜上平均细菌数目是 11×10^4 CFU/仔鱼，其中第一批仔鱼的菌数均值最低，为 2×10^4 CFU/仔鱼，第 7 批菌数均值最高，为 2×10^5 CFU/仔鱼；对同批次仔鱼，在 TCBS 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 培养基上弧菌 NP 的数目范围是 $3 \times 10^3 \sim 3 \times 10^4$ CFU/仔鱼，均值为 17×10^3 CFU/仔鱼；9 日龄稚鱼在弧菌 NP、弧菌 P、无弧菌感染(对照组)3 种条件下 48 h 内的平均成活率分别为 82%、46%和 80%，其中在弧菌 P 感染条件下，第二批稚鱼的成活率最低，仅为 0.7%，第 6 批稚鱼的成活率最高，为 85%。稚鱼在弧菌 NP 和无弧菌感染两种条件下的成活率的相关性极高(相关系数 $r=0.93$)，在当前试验条件下弧菌 NP 对大菱鲂仔稚鱼的存活不存在有害作用，而弧菌 P 对仔稚鱼则有显著影响。显然，通过弧菌 NP 感染仔稚鱼进行质量评价意义不大。在仔稚鱼非感染条件下，成活率、平均体质量、细菌数目等常规标准间不相关，只有在细菌感染条件下，上述标准间才存在相关。通过对仔稚鱼进行感染试验，可以揭示仔稚鱼质量所隐藏的内在特征。

参考文献:

[1] 马爱军, 王新安, 雷霖霖, 等. 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)四个不同地理群体数量形态特征比较[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(1): 24-29.

[2] 王新安, 马爱军, 许可, 等. 大菱鲂幼鱼表型形态性状与体重之间的关系[J]. 动物学报, 2008, 54(3): 540-545.

[3] Jones A. Sexual maturity, fecundity and growth of the turbot *Scophthalmus maximus* L[J]. J Mar Biol Ass U K, 1974, 54: 109-125.

[4] Howell R, Scott A P. Ovulation cycles and post-ovulatory degradation of eggs of the turbot (*Scophthalmus maximus* (L.))[J]. Rapports et proces-Verbaux de la Réunion du Conseil Internationale pour l, Exploration de la Mer, 1989, 191: 21-26.

[5] Fauvel C, Omnes M H, Mugnier C, et al. La reproduction du turbot: aspects biologiques et gestion des reproducteurs[J]. La Pisciculture Francaise, 1993, 112: 23-29.

[6] Fauvel C, Omnes M H, Suquet M, et al. Enhancement of the production of turbot, *Scophthalmus maximus*(L.), larvae by controlling overripening in mature females[J]. Aquaculture and Fisheries Management, 1992, 23:

209-216.

[7] Deniel C. Les poissons plats en baie de Douarnenez. Reproduction, croissance et migration des Bothidac, Scophthalmidae, Pleuronectidae et Soleidae[J]. Thèse dr, Univ Bretagne Occidentale, Brest, 1981, 22: 476.

[8] 雷霖霖. 海水鱼类养殖理论与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 524-591.

[9] Kime D E, Van Look K J, Mc Allister B G, et al. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish[J]. Comp Biochem Physiol, 2001, 130C: 425-433.

[10] Baulny B O, Vern Y L, Kerboeuf D, et al. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in freshand cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa[J]. Cryobiology, 1997, 34: 141-149.

[11] Rurangwa E, Volckaert F A M, Huyskens G, et al. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepi nus*)[J]. Theriogenology, 2001, 55: 751-769.

[12] Zilli L, Schiavone R, Zonno V, et al. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation[J]. Cryobiology, 2003, 47:227-235.

[13] Krasznai Z, Marian T, Balkay I, et al. Permeabilization and structural changes in the membrane of common carp (*Cypri nus carpio* L.) sperm induced by hypoosmotic shock[J]. Aquaculture, 1995, 129:134.

[14] Suquet M, Omnes M H, Normant Y, et al. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Aquaculture, 1992, 101: 177-185.

[15] Trippel E A. Estimation of male reproductive success of marine fishes[J]. J Northw Atlantic Sci, 2003, 33: 81-113.

[16] Suquet M, Billard R, Cosson J, et al. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species[J]. Aquat Living Resour, 1994, 7:283-290.

[17] Suquet M, Omnes M H, Normant Y, et al. Influence of photoperiod, frequency of stripping and presence of females on sperm output in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.)[J]. Aquaculture and Fisheries Management, 1992, 23: 217-225.

[18] Geffen A J, Frayer O. Retention of sperm motility in turbot, *Scophthalmus maximus* L.: the effects of time from activation, thermal shock and adenosine triphosphate levels[J]. Aquaculture and Management, 1993, 24: 203-209.

[19] Barton L. Egg-Quality of Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) Kept in Captive Conditions (Unknown Bind-

- ing)[D]. UK: University of Liverpool, 1981, 129.
- [20] Chauvaud L, Cosson J, Suquet M, et al. Sperm motility in turbot, *Scophthalmus maximus*: initiation of movement and changes with time of swimming characteristics[J]. Environmental Biology of Fishes, 1995, 43: 341-349.
- [21] Dreanno C, Suquet M, Desbruyères E, et al. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*)[J]. Aquaculture, 1998, 169: 247-262.
- [22] Fores R, Iglesias J, Olmedo M, et al. Induction of spawning in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) by a sudden change in the photoperiod[J]. Aquacultural Engineering, 1990, 9(5): 357-366.
- [23] 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.
- [24] Sahin T. Larval rearing of the Black Sea turbot, *Scophthalmus maximus*, under laboratory conditions[J]. Turkish Journal of Zoology, 2001, 25: 447-452.
- [25] Devauchelle N, Alexandre J C, Le Corre N, et al. Spawning of turbot *Scophthalmus maximus* in captivity [J]. Aquaculture, 1988, 69: 159-184.
- [26] Omnes M H, Dorange G, Suquet M, et al. Application of staining techniques to improve the viability assessment of turbot (*Psetta maxima*) ova[C]//Norberg B. Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, Bergen, Norway, July 4-9, 1999. Norway: International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, 2000, 6: 435.
- [27] Kjörsvik E, Hoehne-Reitan K, Reitan K I. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. Aquaculture, 2003, 227: 9-20.
- [28] Shields R J, Brown N P, Bromage N R. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability[J]. Aquaculture, 1997, 155: 1-12.
- [29] Kjörsvik E, Mangor-Jensen A, Holmefjord I. Egg quality in fishes[J]. Advances in Marine Biology, 1990, 26: 71-113.
- [30] Bromage N, Bruce M, Basavaraja N, et al. Egg quality determinants in finfish: the role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*[J]. J World Aquacult Soc, 1994, 25(1): 13-21.
- [31] Robin J H. Use of borage oil in rotifer production and Artemia enrichment: effect on growth and survival of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae[J]. Aquaculture, 1998, 161: 323-331.
- [32] Estévez A, McEvoy L A, Bell J G, et al. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in arachidonic and eicosapentaenoic acids[J]. Aquaculture, 1999, 180: 321-343.
- [33] Olsen Y, Evjemo J O, Olsen A. Status of the cultivation technology for production of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) juveniles in Norway/ Europe[J]. Aquaculture, 1999, 176: 3-13.
- [34] Witt U, Quantz G, Kattner G. Recent development in turbot (*Scophthalmus maximus*) hatcheries: design and operation[C]// Efficiency in aquaculture: technology improvements in farming systems, proceedings of the 4th international conference on aquafarming "Aquacultura 88" Italy: Verona, 1988: 14-15.
- [35] Robinson S M C, Ware D M. Ontogenetic development of growth rates in larval Pacific herring, *Clupea harengus pallasi*, measured with RNA-DNA ratios in the Strait of Georgia, British Columbia[J]. Can J Fish Aquat Sci, 1988, 45: 1 422-1 429.
- [36] Canino M F. Effect of temperature and food availability on growth and RNA/DNA ratios of walleye pollock *Theragra chalcogramma* (Pallas) eggs and larvae[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1994, 175: 1-16.
- [37] Takii K, Seoka M, Takaoka O, et al. Chemical composition, RNA and DNA contents, and alkaline phosphatase activity and growth of striped jack larvae through juveniles[J]. Fish Sci, 1994, 60: 73-76.
- [38] Clemmesen C, Sanchez R, Wongtschowski C. A regional comparison of the nutritional condition of SW Atlantic anchovy larvae, *Engraulis anchoita*, based on RNA/DNA contents[J]. Arch Fish Mar Res, 1997, 45: 17-43.
- [39] Gronkjaer P C, Clemmesen C, John M S. Nutritional condition and vertical distribution of the Baltic cod larvae[J]. J Fish Biol, 1997, 51A: 352-369.
- [40] Chi'charo M A, Chi'charo L, Valdez L, et al. Estimation of starvation and diel variation of the RNA/DNA ratios in field-caught *Sardina pilchardus* larvae off the north of Spain[J]. Mar Ecol Prog Ser, 1998, 164: 273-283.
- [41] Bergeron J. Effect of strong winds on the nutritional condition of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) larvae in the Bay of Biscay, Northwest Atlantic, as inferred from an early field application of the DNA/C index[J]. ICES J Mar Sci, 2000, 57: 249-255.
- [42] Cunha I, Saborido-rey F, Planas M. Use of multivariate analysis to assess the nutritional condition of fish larvae from nucleic acids and protein content[J]. The Biological Bulletin, 2003, 204: 339-349.
- [43] Gatesoupe F J. A method for the early assessment of the quality of turbot larvae[J]. Aquaculture International, 1995, 3: 150-154.

(本文编辑: 谭雪静)