

温度和盐度对宝石鲈胚胎发育的影响

陈昆慈, 朱新平, 杜合军, 谢刚, 刘毅辉, 郑光明, 陈永乐

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380)

摘要: 宝石鲈 (*Scortum barcoo*) 是原产于澳大利亚的一种杂食性、中型经济淡水鱼类, 对饵料要求不高, 生长速度较快, 肌肉的 Ω -3 不饱和脂肪酸含量很高, 具有较高的食用价值。2001 年首次被引进中国, 2004 年人工繁殖获得成功。为了让人们充分了解该物种的繁殖生物学特性, 同时为宝石鲈的开发利用提供基本数据, 本研究对宝石鲈的胚胎发育时序及不同水温和盐度对胚胎发育的影响做了较为详细的观察与研究。采用人工催产、授精获得受精卵, 在水温 $(27.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 孵化, 观察胚胎发育情况。成熟卵圆形、透明、漂浮性, 卵径 $0.87 \sim 0.92 \text{ mm}$, 吸水后卵膜膨胀直径为 2.10 mm 左右; 胚胎明显特征是有直径为 0.50 mm 左右的大油球。出膜仔鱼全长 2.00 mm 左右, 出膜 4 d 后卵黄完全吸收, 并开始摄食, 此时仔鱼全长 $3.5 \sim 3.7 \text{ mm}$ 。胚胎发育的最低和最高临界水温分别是 21°C 和 31°C , 最适水温范围是 $24 \sim 27^\circ\text{C}$, 胚胎发育所需时间与水温成负相关关系。胚胎发育的最适盐度范围为 $0 \sim 8$, 盐度 8 时, 各个发育时期的胚胎和仔鱼的存活率最高, 12 为临界盐度。因此在生产实践中要掌握好温度和盐度, 以获得最佳的种苗生产效果。[中国水产科学, 2007, 14(6): 1 032–1 037]

关键词: 宝石鲈; 胚胎发育; 温度; 盐度

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2007)06–1032–06

宝石鲈 (*Scortum barcoo*) 学名高体革鲈, 属鲈形目 (*Perciformes*)、鲈科 (*Actinoperygii*), 原产于澳大利亚格拉斯顿巴库河 (Gladston's Barcoo) 上游至昆士兰东海岸一带的流域^[1–4], 是一种中型的经济淡水鱼类, 其肉美味鲜, 营养丰富, 无肌间刺。据澳大利亚联邦科学与工业研究组织 (CSIRO, 1998) 的研究报道, 与 200 多种海产品相比, 宝石鲈体内的 Ω -3 脂肪酸含量最高, 超过鸡肉和牛肉含量的 100 倍, 具有较高的食用价值。宝石鲈还是一种杂食品种, 对饵料要求不高, 生长速度较快^[5]。由于宝石鲈养殖的易操作性及产品的优良特性, 其被认为具有较大的市场前景。我研究室于 2001 年 4 月首次从澳大利亚引进 500 尾 $5 \sim 6 \text{ cm}$ 的宝石鲈苗种, 经几年驯养与培育, 于 2004 年和 2005 年进行了宝石鲈人工繁殖实验, 均获得了成功。在国内, 由于宝石鲈的数量尚少, 有关该物种的研究报道较少, 尚未发现宝石鲈胚胎发育方面的资料。水温和盐度是鱼类在自然水体分布范围的主要决定因子, 影响着鱼类的生长和繁殖, 尤其对胚胎发育影响更甚, 直接

影响到仔鱼的孵化率。为了探索宝石鲈的最佳孵化条件, 本研究探讨了温度和盐度对胚胎发育的影响, 并对宝石鲈胚胎发育时序做了较详细的观察与研究, 以期充分了解该物种的繁殖生物学特性, 同时为宝石鲈的开发利用提供基本数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验鱼为 2001 年从澳大利亚引进的鱼苗, 在广州经珠江水产研究所驯养、培育 3~4 年, 已经性成熟的宝石鲈。

1.2 胚胎发育观察

通过注射外源激素诱导宝石鲈产卵, 采用人工授精获得受精卵置于白瓷盘内, 在温度 $(27.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、盐度为 0 的水中孵化; 取卵置于培养皿中在解剖镜 (Opton) 下连续观察胚胎发育情况, 并用 Nikon-450 数码相机拍照。

1.3 温度对胚胎发育的影响

取一定数量的受精卵置于若干培养皿中, 分别

收稿日期: 2007–05–10; 修订日期: 2007–07–09.

基金项目: 珠江水产研究所所长基金 (2001-G1).

作者简介: 陈昆慈 (1963–), 男, 副研究员, 主要从事遗传育种研究. Tel: 020–81616509; E-mail: chenkcunzi@yahoo.com.cn

置于 21、24、27、31 ℃ 温度下孵化。每个温度设 4 个平行组, 每组 100 粒受精卵, 实验重复 2 次。观察统计在不同温度条件下的孵化率和出膜时间。

1.4 盐度对胚胎发育的影响

设置盐度为 4、8、12、16 的 4 种 NaCl 溶液及盐度为 0 的对照组, 每个浓度设 3 个平行组, 实验重复 2 次。各取 100 粒处于多细胞期的受精卵置于盛有 5 种上述同体积溶液中, 定期观察发育结果。

2 结果与分析

2.1 胚胎发育

宝石鲈成熟卵透明, 具油球, 漂浮性。直径为 0.87~0.92 mm, 吸水后为 2.10 mm 左右。在盐度为 0, 水温 (27.0±0.5) ℃ 条件下受精卵经 18 h 32 min 孵化出鱼苗。整个胚胎发育要经过卵裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期、肌节出现期、器官形成期、心跳期、出膜前期和出膜期。胚胎发育时序见表 1。

卵裂期: 受精后 5 min 卵膜吸水膨胀, 直径为 2.10 mm 左右; 卵黄中具 1 个大油球, 直径为 0.50 mm 左右, 小油球 0~3 个, 大小不等 (图版 I-1)。卵受精后 30 min 胚盘形成 (图版 I-2); 第 1 次卵裂发生在受精后 45 min, 形成两个大小相等的分裂细胞 (图版 I-3); 第二次分裂在受精后 1 h 0 min, 形成 4 细胞 (图版 I-4); 受精后 1 h 15 min 开始第 3 次分裂, 在胚盘上形成 2 列细胞, 每列 4 个, 即 8 细胞期 (图版 I-5); 受精后 1 h 31 min, 为 16 细胞期 (图版 I-6); 受精后 1 h 48 min 形成 32 细胞 (图版 I-7); 受精后 2 h 06 min, 细胞继续分裂形成 64 细胞 (图版 I-8)。此后细胞不断分裂, 细胞大小不等, 形成多层排列的小细胞团, 为多细胞期 (图版 I-9)。

囊胚期: 受精后 3 h 13 min, 胚盘呈高帽状, 进入高囊胚期 (图版 I-10); 随后细胞不断下移, 囊胚层覆盖在卵黄上, 受精后 4 h 12 min 进入低囊胚期 (图版 I-11)。

原肠期: 囊胚细胞向植物极移动, 胚盘周缘的囊胚层细胞向内卷入形成环形隆起的胚环, 受精后 5 h 15 min, 胚盘下包达 1/3, 胚胎发育进入原肠早期 (图版 I-12); 胚盘继续下包, 受精后 5 h 53 min, 胚盘下包达 1/2, 进入原肠中期 (图版 I-13), 胚盾、胚环出现, 胚体随着胚层下包逐渐伸长, 原口明显。胚环继续向植物极推进, 原口逐渐缩小形成圆孔, 即胚孔, 进入原肠后期 (图版 I-14), 此时为受精后 6 h

32 min, 胚孔中可见卵黄栓。胚体形状逐渐明显, 头中后部隆起增大, 形成脑泡。

神经胚期: 胚层细胞外包作用的同时, 囊胚层细胞由前向后集中并向外突出形成胚盾, 胚孔关闭。受精后 8 h 0 min, 胚盾不断向前发展形成神经板, 胚体完全形成, 像弓形附着于卵黄上 (图版 I-15), 头部开始分化。

肌节出现期: 胚体后部的中胚层不断分化, 形成体节, 最初为 4~5 节, 当受精后 8 h 45 min 时, 肌节分化到 8~10 节, 胚体尾部膨大形成突状, 油球向胚体尾部偏移, 卵黄呈倒梨形 (图版 I-16)。肌节分化逐渐前移, 至 18 对肌节时, 眼原基出现, 胚体包卵黄囊超过 1/2, 进入尾芽期 (图版 I-17), 此时为受精后 10 h 39 min。

器官形成期: 胚体肌节继续分化增多, 前部的肌节清晰可见, 受精后 11 h 50 min, 头部结构复杂化, 晶体、耳囊出现, 心脏出现微弱搏动, 尾芽离开卵黄囊 (图版 I-18)。

心跳期: 受精后 13 h 15 min, 围心腔清晰可见, 心脏跳动加强, 并可见血液随心脏跳动而流动 (图版 I-19); 脑部进一步分化, 尾鳍褶出现。

出膜前期: 胚体尾部继续伸长, 受精后 17 h 2 min, 胸鳍原基出现, 耳石清晰可见, 心跳有节律性, 可见血红细胞在管内流动; 背鳍褶和腹鳍褶出现, 胚体尾巴左右扭动, 带动整个胚体转动 (图版 I-20)。

出膜期: 胚体在卵膜内不停转动, 受精后 18 h 32 min, 胚体尾部冲破卵膜, 接着整个胚胎破膜而出 (图版 I-21)。刚出膜的仔鱼全长 2.00 mm 左右, 卵黄由梨形变为鹅卵形, 油球体积稍缩小, 由圆形变为椭圆形; 头部大部分离开卵黄, 顶端上突, 与脊椎连接处形成一凹陷, 头部轮廓形成, 眼囊宽大, 晶体明显, 在仔鱼头背部至腹部油球处有一透明鳍褶膜, 胸鳍原基出现。

2.2 胚后发育

鱼苗孵化出膜后, 进入胚后发育阶段。

第 1 天仔鱼: 头部进一步发育并离开卵黄, 口腔尚未形成, 眼径、围心腔增大, 血液循环清晰可见; 泄殖腔出现, 全长 2.40 mm 左右 (图版 I-22)。仔鱼静卧池底, 有时头向下悬浮水中, 游动不规则。

第 2 天仔鱼: 全长 2.90~3.00 mm (图版 I-23), 头部和尾部有少量黑色素, 眼变黑, 口已张开, 上颌稍长于下颌, 眼后清楚可见鳃盖骨。卵黄囊明

显变小,油球前移,肠道开始分化,泄殖腔清晰可见,头与脊椎连接的凹处出现 2 个白色颗粒,作者认为其为进一步发育的小脑,仔鱼平游,并趋光、集群。

第 3 天仔鱼:全长 3.2~3.5 mm(图版 I - 24),体上黑色色素增多,卵黄囊缩小,油球变小并移至中部,胸鳍芽出现,脑后部头骨完成发育。

第 4 天仔鱼:全长 3.5~3.7 mm(图版 I - 25),口裂增大,下颚明显长于上颚,鳃盖骨完成发育;身体表面出现黑色素斑,卵黄全部吸收,泄殖孔开口,肠管蠕动明显并可见黑色内存物,仔鱼游动活跃并开始摄食。

表 1 宝石鲈胚胎发育时序
Tab.1 Embryonic development time-table of *Scortum barcoo*

发育时间/(h: min) Development time	胚胎发育时期 Stage of embryonic development	图版 Plate
00:05	受精卵 Zygote	I - 1
00:30	胚盘形成 Blastodisc formation	I - 2
00:45	2 细胞期 2 cells	I - 3
01:00	4 细胞期 4 cells	I - 4
01:15	8 细胞期 8 cells	I - 5
01:31	16 细胞期 16 cells	I - 6
01:48	32 细胞期 32 cells	I - 7
02:06	64 细胞期 64 cells	I - 8
02:22	多细胞期 Multi-cells	I - 9
03:13	高囊胚期 High blastula	I - 10
04:12	低囊胚期 Low blastula	I - 11
05:15	原肠早期 Early gastrula	I - 12
05:53	原肠中期 Middle gastrula	I - 13
06:32	原肠后期 Late gastrula	I - 14
08:00	神经胚期 Neurula stage	I - 15
08:45	肌节出现期 Somites appear stage	I - 16
10:39	尾芽期 Tail-bud stage	I - 17
11:50	器官形成期 Body segment formation stage	I - 18
13:15	心跳期 Heart-beating stage	I - 19
17:02	出膜前期 Pre-hatching stage	I - 20
18:32	出膜期 Hatching stage	I - 21
32:00	第 1 天仔鱼 1 d larva after hatching	I - 22
54:00	第 2 天仔鱼 2 d larva after hatching	I - 23
78:00	第 3 天仔鱼 3 d larva after hatching	I - 24
98:00	第 4 天仔鱼 4 d larva after hatching	I - 25

2.3 温度对胚胎发育的影响

在不同水温条件下宝石鲈胚胎发育时间及孵化率见表 2。从表 2 可以看出,水温对宝石鲈胚胎发育的时间和孵化率影响较大。随着水温的升高,胚胎发育时间逐渐缩短,孵化率则先随着水温的升高而升高,后又随着水温的升高而降低。受精卵孵化需要一定的积温,积温以度·时表示,即水温×孵化时间(小时)。在水温 (21.0±0.5)℃时,没有仔鱼孵

出;在水温 (24.0±0.5)℃时,所需的“度·时”值为 596,孵化率为 73%;在水温 (27.0±0.5)℃时,所需的“度·时”值为 499,孵化率为 82%;在水温 (31.0±0.5)℃时,所需的“度·时”值为 517,孵化率为 17%。这结果说明水温在 21℃或 31℃时,对胚胎发育不利,也即胚胎发育的最低和最高临界水温分别是 21℃和 31℃,而合适的水温范围应是 24~27℃,胚胎发育所需时间与水温成负相关关系。

表 2 温度对宝石鲈胚胎发育时间和孵化率的影响

Tab.2 Effect of temperature on embryonic development and hatching rate of *Scortum barcoo*

孵化水温 /℃ Water temperature	受精卵数 Egg numbers	发育至原肠期时间 Time of developing to gastrula stage	原肠期受精卵数 Eggs in gastrula stage	受精率 /% Fecundation rate	出膜时间 Time of hatching	出膜鱼数 Fry numbers	孵化率 /% Hatching rate
21.0±0.5	800	11 h 52 min	492	61.5		0	0
24.0±0.5	800	8 h 13 min	656	82.0	24 h 50 min	240	73.0
27.0±0.5	800	5 h 53 min	660	82.5	18 h 2 min	272	82.0
31.0±0.5	800	4 h 35 min	232	29.0	16 h 40 min	54	17.1

2.4 盐度对胚胎发育的影响

在不同盐度下宝石鲈胚胎发育的结果见表 3。从表 3 可以看出,盐度对宝石鲈胚胎发育的影响较大。随着盐度的升高,胚胎的存活率先是升高,然后下降。在盐度 8 时,各个发育时期的存活率最高,盐度 4 时次之;盐度 16 时没有仔鱼孵出。这结果说明

较低盐度时,胚胎及仔鱼的成活率较高,而且高于对照;较高盐度时,当达到 12 以上时,对胚胎的发育不利,胚胎及仔鱼的成活率较低,甚至没有胚胎存活。说明胚胎发育的最适盐度范围为 0~8,12 可能为胚胎发育的临界盐度。

表 3 盐度对宝石鲈胚胎和仔鱼存活率的影响

Tab.3 Effect of salinity on embryonic and larval survival rate of *Scortum barcoo*

%

发育时期 Development stage	对照组 Control	盐度 Salinity			
		4	8	12	16
原肠期 Gastrula stage	92	92	93	92	70
神经胚期 Neurula stage	90	91	92	91	50
出膜期 Hatching stage	79	79	83	80	0
出膜 12 h 仔鱼 12 h larva after hatching	72	75	80	62	0
出膜 24 h 仔鱼 24 h larva after hatching	70	73	79	48	0
出膜 30 h 仔鱼 30 h larva after hatching	70	72	78	21	0
出膜 72 h 仔鱼 72 h larva after hatching	70	72	78	0	0

3 讨论

宝石鲈成熟卵透明,具油球,漂浮性。直径为 0.87~0.92 mm,吸水后为 2.10 mm 左右,与银鲈 (*Bidyanus bidyanus*) 卵相近^[6]。宝石鲈卵内大油球直径为 0.50 mm 左右,超过其卵径的 1/2,这在淡水鱼中是很少见的,相比海水鱼类如高体魮 (*Serida dumerili*)^[7]、牙鲆 (*Paralichthy divaceus*)^[8] 等也大出许多。油球在宝石鲈的胚胎发育过程中可能起着较重要的作用,一方面让胚胎漂浮获取足够的氧以维持胚胎发育;另一方面可能参与胚胎发育和胚后发育的营养供给。在胚胎发育的观察中发现,油球先是位于腹腔的后部,随着卵黄的吸收,逐渐向前移动,直至最前端。在这阶段,油球可能起到协调仔鱼平衡的作用。

宝石鲈的胚胎发育过程与其他硬骨鱼类基本相同^[9],卵裂为盘状分裂,细胞呈几何级增长。但在

发育过程中有其自身的特点,如眼泡出现在尾芽期之后,脑部的发育也相对较迟,在器官形成期才可观察到已分化的前、中、后脑。在胚胎发育速度方面,与其他鲈形目的鱼类相比,银鲈胚胎在 23~25℃ 时孵化出膜需要 32 h^[6],大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 在 17.4~20.4℃ 时需要 68 h 5 min 完成胚胎发育^[10],赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 在 25℃ 时胚胎发育则只要 24 h 10 min^[11]。而宝石鲈胚胎在水温 (24±0.5)℃ 时,需要 24 h 50 min 完成胚胎发育。这说明每个物种胚胎发育过程既有共性的地方也有各自的特点。

温度作为一个主要的生态因子影响着宝石鲈的胚胎发育。在几个不同温度条件下宝石鲈胚胎发育时间、孵化率的结果(表 2)表明,宝石鲈胚胎在 (27±0.5)℃ 时孵化率最高,其次是 (24±0.5)℃ 时,水温在 21℃ 时胚胎不能完成发育,在 31℃ 时胚胎在原肠期以后大部份陆续停止发育,只有少部分发育

至出膜,但出膜的仔鱼畸形较多。宝石鲈胚胎发育的最低和最高临界水温可能分别是 21 ℃ 和 31 ℃,与其他淡水鱼相似^[12,13]。

盐度对宝石鲈胚胎发育亦有一定的影响,在适当的盐度范围内,胚胎及仔鱼的成活率会提高,在盐度 8 时,胚胎及仔鱼的存活率最高。当盐度超出一定范围,则对胚胎发育不利,造成胚胎及仔鱼的死亡。这可能是低盐度可以抑制霉菌的产生,保护了胚胎及仔鱼,使其存活率高于对照组。本研究发现宝石鲈胚胎发育的最适盐度范围为 0~8,12 为其临界盐度,适应范围比一般的淡水鱼^[12-13]要宽。这预示着,在生产实践中,使用具有一定盐度的孵化用水,掌握好水温,可以获得最佳的种苗生产效果。

参考文献:

- [1] Paxton J R, Hoese D F, Allen G R, et al. Petromyzontidae to carangidae [M] // Zoological catalogue of Aust. Vol. 7. Canberra: Australia Government Publishing Service. 1989: 665.
- [2] Grant E M. Grant's guide to fishes [M]. E. M. Grant Pty Limited, Brisbane. 2002.
- [3] Hollaway M, Hamlyn A. Freshwater fishing in Queensland: a guide to stocked waters [M] // Brisbane: Department of Primary Industries. 2001.
- [4] Merrick J R, Schmida G E. Australian freshwater fishes: biology and management [M]. South Australia: Griffin Press Limited. 1984.
- [5] Wingfield M. Preliminary result of Jade Perch feed trial. Http://www.ausfish.com/JadeResearch.htm.
- [6] 李恒颂, 郭国民, 范阳, 等. 银鲈胚胎和仔鱼的发育 [J]. 中国水产科学, 2000, 7 (2): 5-9.
- [7] 陈昌生, 黄佳鸣, 何华武, 等. 高体, 胚胎及仔稚鱼的形态观察 [J]. 中国水产科学, 2004, 28 (6): 609-615.
- [9] 张天萌. 动物胚胎学 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1996: 151-155.
- [10] 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.
- [11] 刘付永忠, 王云新, 黄国光, 等. 自然产卵赤点石斑鱼胚胎及仔鱼形态发育研究 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2001, 40 (1): 81-84.
- [12] 谢刚, 陈昆慈, 李丛伟, 等. 倒刺, 胚胎发育与水温 and 盐度的关系 [J]. 大连水产学院学报, 2003, 18 (2): 95-98.
- [13] 叶星, 潘德博. 水温和盐度对广东鲂胚胎发育的影响 [J]. 水产学报, 1998, 22 (4): 322-327.

Effects of temperature and salinity on the embryonic development of jade perch *Scortum barcoo*

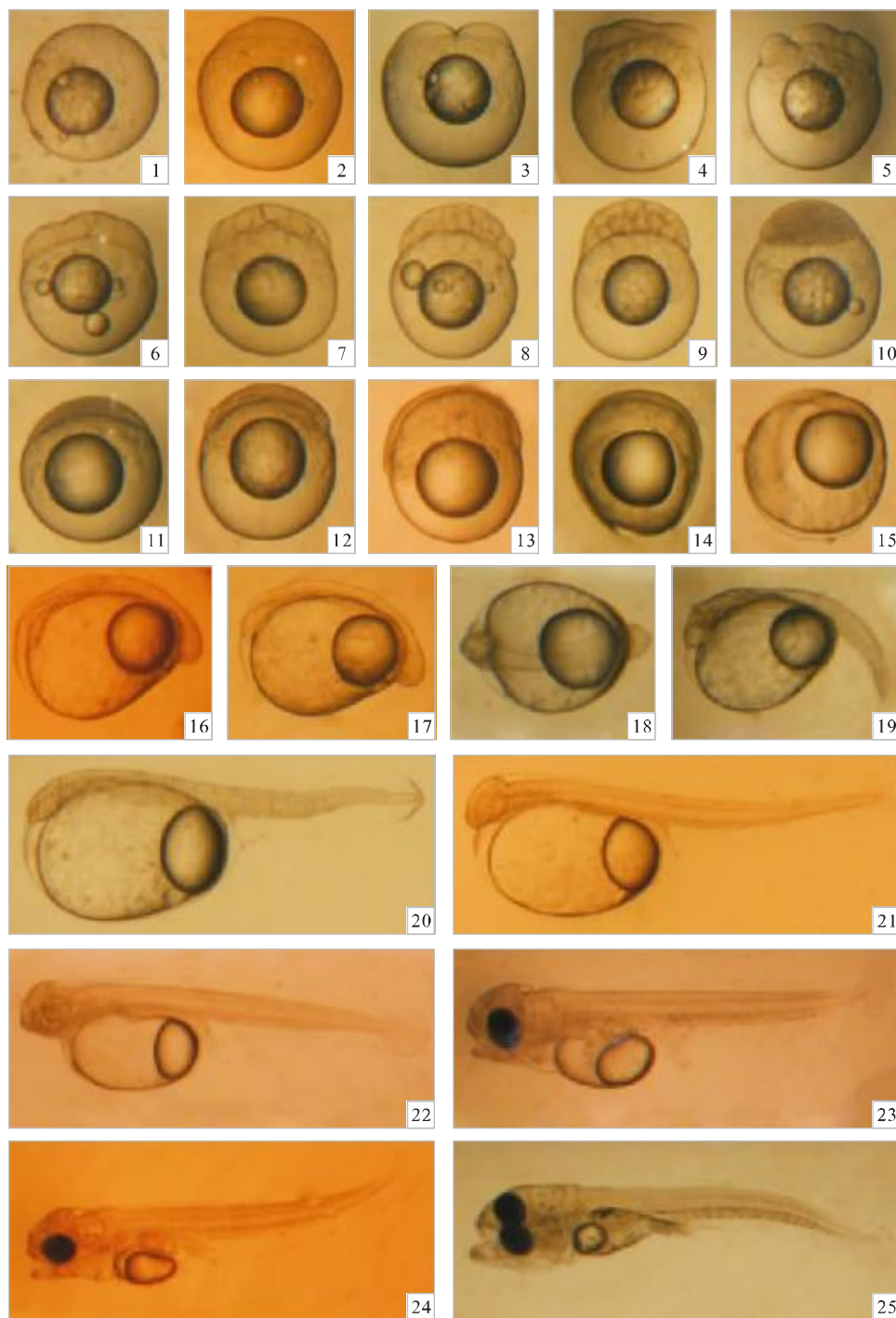
CHEN Kun-ci, ZHU Xin-ping, DU He-jun, XIE Gang, LIU Yi-hui, ZHENG Guang-ming, CHEN Yong-le
(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510380, China)

Abstract: In order to investigate the propagation characters of jade perch (*Scortum barcoo*) and provide basic data for its aquaculture, studies on embryonic development process and the effects of temperature and salinity on embryonic development of jade perch were carried out in this study. The fertilized eggs obtained by induced spawning and artificial insemination were incubated at $(27 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ and the characters of embryonic development were recorded. The fertilization eggs are transparent and floating. It is round in shape and has a diameter of 0.87-0.92 mm. The diameter of eggs will increase to about 2.10 mm when the eggs absorb water. One main character of jade perch embryo is that there is a big fat ball in its yolk vesicle with diameter of 0.50 mm. The embryo takes 18 h 32 min to hatch to fry and the fry is 2 mm in length and it will be 3.5-3.7 mm when its egg yolk is absorbed completely after four days and it begins to feed at that time. The lowest and highest critical temperatures of embryonic development were 21 ℃ and 31 ℃ respectively and the range of optimal temperature was from 24 ℃ to 27 ℃. The relationship between the time for embryonic development and water temperature was negative. The optimal salinity range of embryonic development was 0-8. In salinity of 8, the survival rate of embryo and larva were the highest in different development stages. The critical salinity of embryonic development was 12. The results suggest that the water temperature and salinity should be controlled well in practice in order to achieve optimal effects in seed production. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (6): 1 032-1 037]

Key words: *Scortum barcoo*; embryonic development; temperature; salinity

陈昆慈等: 温度和盐度对宝石鲈胚胎发育的影响

CHEN Kun-ci et al: Effects of temperature and salinity on the embryonic development of jade perch *Scortum barcoo*



图版 I Plate I

1. 受精卵; 2. 胚盘形成; 3. 2 细胞期; 4. 4 细胞期; 5. 8 细胞期; 6. 16 细胞期; 7. 32 细胞期; 8. 64 细胞期; 9. 多细胞期; 10. 高囊胚期; 11. 低囊胚期; 12. 原肠早期; 13. 原肠中期; 14. 原肠后期; 15. 神经胚期; 16. 肌节出现期; 17. 尾芽期; 18. 器官形成期; 19. 心跳期; 20. 出膜前期; 21. 出膜期; 22. 第 1 天仔鱼; 23. 第 2 天仔鱼; 24. 第 3 天仔鱼; 25. 第 4 天仔鱼.

1. zygote; 2. blastodisc formation; 3. 2 cell stage; 4. 4 cell stage; 5. 8 cell stage; 6. 16 cell stage; 7. 32 cell stage; 8. 64 cell stage; 9. multi-cell stage; 10. high blastula stage; 11. low blastula stage; 12. early gastrula stage; 13. middle gastrula stage; 14. late gastrula stage; 15. nerve embryos stage; 16. somites appear stage; 17. tail-bud stage; 18. body segment formation stage; 19. heart beating stage; 20. pre-hatching stage; 21. hatching stage; 22. 1 d larva after hatching; 23. 2 d larva after hatching; 24. 3 d larva after hatching; 25. 4 d larva after hatching.