

池蝶蚌胚胎发育与繁殖季节性腺的观察

余颖 洪一江* 邱齐骏 王军花 徐毛喜 李云娟

(南昌大学生命科学学院 南昌 330031; 洪门水库开发公司 江西 抚州 334000)

摘要: 以池蝶蚌 (*Hyriopsis schlegeli*) 育儿囊中单细胞胚胎为材料, 通过连续观察、人工体外培养等方法, 对繁殖季节池蝶蚌的生殖腺特性、生殖细胞形态、胚胎发育过程等进行了观察。结果表明, 年满 4 冬龄池蝶蚌卵巢的相对怀卵量为 $(2.25 \pm 1.09) \times 10^3$ 粒/g, 绝对怀卵量为 $1.93 \times 10^4 \sim 1.03 \times 10^5$ 粒; 性腺指数为 $24.09\% \pm 0.33\%$; 在体外用自制培养液培养的胚胎, 部分能正常分裂发育至桑椹期, 其胚胎发育过程经历了 4 个时期, 即卵裂期、囊胚期、原肠期、钩介幼虫期。在 18 ~ 23 的水温下, 胚胎发育历时约 12 d; 胚胎发育的最适水温为 20 ~ 30。此外, 通过池蝶蚌外鳃的特征可初步判断胚胎发育的时期。研究结果可为池蝶蚌人工繁殖、新品种培育及种质资源保护等提供理论依据。

关键词: 池蝶蚌; 胚胎发育; 怀卵量; 生殖细胞

中图分类号: Q132.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2008)03-102-06

Embryonic Development and Breeding-season Gonad in *Hyriopsis schlegeli*

YU Ying HONG Yi-Jiang* QIU Qi-Jun WANG Jun-Hua XU Mao-Xi LI Yun-Juan

(College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031;

Hongmen Reservoir Exploitation Company, Fuzhou 334000, China)

Abstract: The characteristics of gonadal structure, gamete (sperm and egg) morphology and embryonic development of *Hyriopsis schlegeli* were studied by continuous observation and *in vitro* culture. The results showed that the absolute fecundity was $1.93 \times 10^4 - 1.03 \times 10^5$ eggs and the relative fecundity was $(2.25 \pm 1.09) \times 10^3$ eggs/g. The gonad index (GI) was $24.09\% \pm 0.33\%$. The embryo cultured *in vitro* could develop successfully to blastocyst in nutrient solution prepared by ourselves. Embryonic development and process were described. The embryo development of *H. schlegeli* was divided into four stages: cleavage, blastocyst, gastrulae and glochidia. The embryonic development took 12 days when the water temperature ranged between 18 - 23. The optimum temperature range for the embryonic development was 20 - 30. As observed, the glochidia of this species were hooked and there were relations between embryonic development stages and the outer gill characters of the female. Our results will provide valuable data for artificial reproduction, germplasm resource conservation and breeding in freshwater pearl mussel.

Key words: *Hyriopsis schlegeli*; Embryonic development; Fecundity; Germ cell

国内外关于贝类胚胎发育已有很多报道。Madrones-Ladja^[1]分别采用两种不同的方法对比观察了海月科窗贝 (*Placuna placenta*) 产卵、胚胎及幼体发育等过程的异同。李琼珍等^[2]对海产贝大獭蛤 (*Lutraria maxima*) 的胚胎发育进行了研究, 受精卵由人工授精获得, 胚胎发育经历

卵裂期、囊胚期、原肠期、担轮幼虫期及 D 形幼

基金项目 农业部 948 项目 (No. 2004-T9);

* 通讯作者, E-mail: yjhong2008@163.com;

第一作者介绍 余颖, 女, 硕士; 研究方向: 水生动物遗传育种学; E-mail: yu.ying.84@163.com.

收稿日期: 2007-10-15, 修回日期: 2008-03-12

虫期五期。沈永忱等^[3]对比了 3 种不同的诱导产卵方法,对蛤蜊(*Mactra chinensis*)体外胚胎发育过程进行了观察。然而,有关淡水贝(蚌)胚胎发育的研究相对较少。杨学芬等^[4]对绢丝丽蚌(*Lamprotula fibrosa*)、顾敏强等^[5]对河蚬(*Corbicula fluminea*)及王宏等^[6]对三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)胚胎发育进行了观察,描述了胚胎发育过程及特征。

池蝶蚌(*H. schlegeli*)与三角帆蚌为同属不同种,原产于日本滋贺县的琵琶湖,是重要淡水育珠贝。本项目组从日本引进池蝶蚌原种并取得人工繁殖成功后,已相继开展了繁殖和发育生物学等方面的研究^[7],但有关池蝶蚌繁殖特性和胚胎早期发育的研究未见相关报道。为此,本研究尝试在体外培养池蝶蚌胚胎,并对其生殖细胞的形态、胚胎发育特征进行观察,以期为贝类发育生物学和池蝶蚌人工选育等提供有价值的参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料 池蝶蚌取自江西省抚州市国家级池蝶蚌良种场,4⁺冬龄(经历了 4 个冬季)雌、雄蚌各 30 只,雌蚌体重 108.31 ~ 541.45 g,雄蚌体重 115.02 ~ 474.83 g,健壮丰满,外鳃瓣完整无伤、喷水有力、闭壳力强劲等。

1.2 怀卵量及性腺指数的计算 取性成熟的亲蚌,洗净称重,小心剥离出完整的性腺后称重,统计每只蚌的相对怀卵量和绝对怀卵量。性腺指数的计算公式为:性腺指数 = 性腺重/去壳重 × 100%。

1.3 胚胎发育观察

1.3.1 生殖细胞及性腺的观察 剖开亲蚌使生殖系统暴露,分别取雌雄蚌体部分性腺组织于 Bouin's 液中固定,石蜡切片,H.E 染色。另外,滴片观察卵子大小及形态;精液用自配的平衡盐溶液(balanced salt solution, BSS)稀释。所有样品均于 Leica DM5000B 型正置显微镜下观察,仔细调节光源至最佳后拍照。

BSS 平衡盐溶液配方为:每升含 NaCl 0.503 g, KCl 0.051 g, Na₂SO₄ 0.235 g, CaCl₂ 0.350 g,

MgSO₄ · 7H₂O 0.090 g, NaHCO₃ 0.750 g, NaH₂PO₄ 0.014 g, 葡萄糖 0.030 g。

1.3.2 胚胎的体外培养 用解剖针挑破外鳃,检测不同雌蚌育儿囊中胚胎的发育时期,将已受精但并未进行卵裂的胚胎以一定密度小心吸入装有 BSS 的培养皿中进行体外培养,置于 Leica DM5000B 型正置显微镜下继续跟踪其胚胎发育早期的过程。在此期间,每隔 1 h,更换一次新鲜的 BSS,以保证充足的养分并及时去除代谢物。

1.3.3 胚胎发育连续观察 在池蝶蚌的繁殖期,将成熟的雌蚌取出,阴干 1 ~ 2 h 后,人为促使其将成熟的钩介幼虫排空,将雌雄亲蚌按 3 : 1 的比例放入池塘网箱中,每隔 24 h 取蚌数只,用细吸管从蚌外鳃中吸取正在发育的胚胎,在显微镜下进行活体连续观察,直至发育出成熟的钩介幼虫。具体操作方法参考杨学芬等^[4]。

1.4 胚胎发育各时期与外鳃特征的关系 在采样观察胚胎发育过程中,同时观察外鳃的颜色、外形,比较胚胎发育各时期与外鳃特征的关系。

2 结果

2.1 怀卵量及性腺指数 池蝶蚌性腺成熟为 3⁺龄,由于个体大小差异,所采样品的性腺重量为 16.62 ~ 30.92 g,平均重(23.16 ± 7.23)g ($n = 30$);相对怀卵量(2.25 ± 1.09) × 10³粒/g ($n = 30$);绝对怀卵量范围为 1.93 × 10⁴ ~ 1.03 × 10⁵粒;性腺指数为 24.09% ± 0.33% ($n = 30$)。

2.2 生殖细胞及性腺 繁殖季节池蝶蚌的性腺包裹着整个内脏团,呈葡萄状分支,由许多滤泡型腺体组成。成熟卵子近似圆形,淡黄色,沉性卵(图 1a);横切面上,能看到滤泡中成熟的卵细胞。卵径为(199.81 ± 37.89)μm,卵膜薄而光滑,卵黄颗粒分布均匀。精子属鞭毛型,全长约(41.04 ± 4.16)μm;头部呈子弹形,长约(4.68 ± 1.17)μm,宽约(1.60 ± 0.40)μm;鞭毛细长均匀,长(36.11 ± 4.17)μm(图 1b)。实验证明,自配的 BSS 对精子有较好的激活效果,成熟精子在水中游动活跃,并且存活时间较长(图 1)。

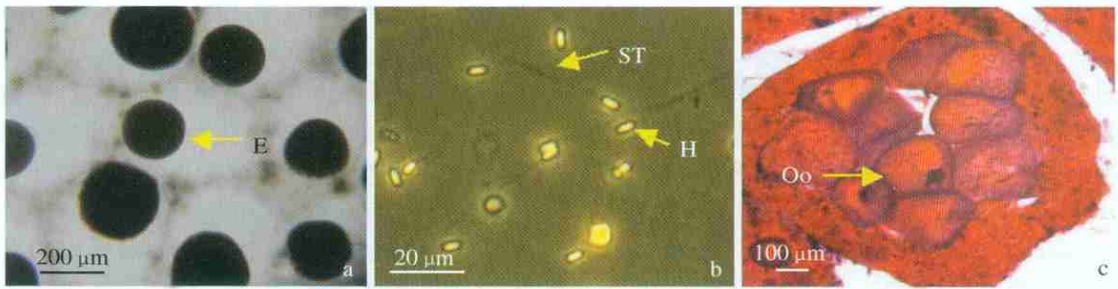


图 1 池蝶蚌生殖细胞

Fig.1 Germ cells of *Hyriopsis schlegeli*

a. 成熟卵细胞; b. 精子; c. 繁殖季节雌性性腺形态。

E. 卵子; H. 精子头部; ST. 精子尾部; Oo. 卵母细胞, 卵核偏向动物极。

a. Eggs; b. Spermatozoa; c. Gonad morphogenesis of in breeding seasons.

E. Egg; H. Sperm head; ST. Sperm tail; Oo. Oocyte and egg nucleus turn to animal pole.

2.3 胚胎早期发育 卵母细胞成熟后通过生殖导管由生殖孔排到内鳃叶腔, 再到达外鳃叶腔, 与随水流进入的精子相遇而受精。池蝶蚌以两外鳃为育儿囊, 胚胎在育儿囊内发育至成熟钩介幼虫。

受精卵呈圆球形, 在雌蚌外鳃的鳃水管中排列成片状。受精卵进行不等完全卵裂, 先是分裂为二个大小不等的分裂球(图版 :1), 随后发育为由一个较大的分裂球和三个大小相当的分裂球组成的四细胞(图版 :2), 4 个分裂球

围成一圈, 中间形成一个分裂腔。四细胞进一步卵裂为八细胞(图版 :3)、多细胞(图版 :4)、桑椹期, 再继续分裂, 大分裂球不再明显, 全部分裂球包围在分裂腔周围, 胚胎发育到囊胚期(图版 :5), 近似椭圆形(表 1)。

受精后 2~3 d, 胚胎发育进入原肠期(图版 :6), 原肠胚的形成是通过内陷和外包方式共同完成。原肠期可以看到胚体的原胚孔, 以后发育形成口, 其相对的一端可以看到以后发育成肛门的另一个原胚孔。

表 1 池蝶蚌的胚胎发育

Table 1 Embryonic development of *Hyriopsis schlegeli*

阶段 Stage	时间 Time	特征 Traits
二细胞期 2-cell stage	2 h 45 min	2 个大小不等的分裂球, 大小为(146.5 ±8.4)μm ×(121.1 ±4.6)μm
四细胞期 4-cell stage	6 h 25 min	纵裂, 形成一个较大的分裂球和 3 个大小相当的分裂球
八细胞期 8-cell stage	10 h 10 min	7 个小分裂球大小相近, 另外还有一个相对较大的分裂球
十六细胞期 16-cell stage	13 h 50 min	由 15 个大小相近的小分裂球和一个相对较大的分裂球组成
三十二细胞期 32-cell stage	17 h 10 min	由 31 个大小相近的小分裂球和一个相对较大分裂球组成
桑椹期 Morula	22 h 30 min	形似桑椹, 众多小分裂球位于一侧, 一个体积稍大的分裂球位于另一侧
囊胚期 Blastocyst	30 h 35 min	形成一个椭圆形的胚胎, 众多分裂球已无明显的大小之分
原肠期 Gastrulation	2~3 d	通过内陷和外包共同完成
钩介幼虫早期 Glochidium	4~5 d	逐渐形成幼虫期所特有的结构
成熟期 Mature glochidium	11~12 d	已破膜, 壳钩和足丝都具有附着能力, 脱离母体, 准备寄生

水温变化幅度为 18~23 。 The water temperature ranged between 18 - 23 .

2.4 钩介幼虫期 当原壳完全包裹胚体后, 胚胎发育到钩介幼虫期(图版 :7)。随着发育的不断进行, 逐渐形成以下几种特有的结构, 双壳

腹缘近中央处形成一对壳钩(图版 :8); 壳内外套膜组织中有幼虫丝, 幼虫丝一端紧贴左壳内表面, 常称内幼虫丝, 幼虫丝螺旋式伸展变

细,向外套腔突出成细长丝状,常称外幼虫丝;脊、翼的外表面不光滑。钩介幼虫发育成熟约需一周的时间,成熟的标志是已脱离卵膜,足丝具有附着力。完成变态发育脱落后的稚蚌近椭圆形,平均每只约为 0.0019 g。

2.5 蚌鳃在成熟季节的变化 蚌鳃的形状及颜色都会随着胚胎发育的进行而发生相应的变化。在卵裂初期雌蚌的鳃是白色,条纹清晰,每个卵细胞都能看清楚。随着胚胎发育的进行,左右两瓣外鳃逐渐膨胀,纹路慢慢变浑浊,颜色变深。到了钩介幼虫成熟期外鳃变得柔软饱满且富有弹性,呈桔红或紫色;而此时期雄蚌外鳃仍很薄,变成灰色,外边缘颜色较深。据此,可通过观察外鳃的特征来粗略确定胚胎发育所处的阶段。

3 讨 论

淡水蚌类成熟卵细胞多呈圆形或椭圆形,卵子由卵膜包裹^[8~11]。本实验观察到池蝶蚌成熟卵子近似圆形,卵膜薄而光滑,卵径大小与其他文献报道过的淡水蚌类的卵子相似^[8~11]。淡水蚌类精子主要由子弹形头部和细长、粗细均一的尾部组成^[8,10,12,13]。池蝶蚌精子也具有子弹形头部及细长均匀鞭毛尾,在形态、结构上都与三角帆蚌、背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)、褶纹冠蚌(*Cristaria plicata*)、绢丝丽蚌等淡水蚌类的精子相似。

一般而言,多数淡水蚌类都在春夏季繁殖,但时间会有所不同。三角帆蚌繁殖季节为 5~7 月,可排卵 10 余次^[6];而褶纹冠蚌每年 3~4 月底、10~12 月共繁殖 2 次,每次可排卵 2~3 次;绢丝丽蚌繁殖期为 10 月至翌年 1 月中旬,属于一次性产卵类型^[14];背角无齿蚌在气候适宜的情况下终年可进行繁殖^[10]。本研究发现,池蝶蚌性成熟要求养殖水体温度不低于 18℃,最适发育水温 20~30℃。池蝶蚌属于季节性繁殖,繁殖季节分别为春季(3 月下旬至 6 月底)和秋季(9 月下旬至 10 月初),繁殖高峰期分别为 4 月中旬至 5 月。性腺指数为 24.09% ± 0.33%,相对软壳蛤(*Mya arenaria*)^[15]、扇贝

(*Nodipecten subnodosus*)^[16]繁殖季节的性腺指数较高;与栉江珧(*Pinna pectinata*)^[17]、绢丝丽蚌^[14]性腺指数值相接近。池蝶蚌受精后约一周钩介幼虫开始成熟。池蝶蚌同一个体生殖腺的同一部位取出的卵,卵径差异很大,即发育程度不同,表明此蚌的生殖细胞发育也是分批分期进行的,一只雌蚌在繁殖季节可排卵 5~6 次。

目前,关于淡水蚌类人工授精及胚胎体外发育方面的报道比较少见,这可能与其胚胎在育儿囊中发育这一特殊方式有关。虽然育儿囊与外界水体在一定程度上是相通的,但是蚌类的鳃属真瓣鳃型,具有很高的封闭性,育儿囊的鳃丝和鳃瓣有大量血管,因此育儿囊与外界环境又有差异。在胚胎发育过程中,育儿囊仅仅是胚胎发育的场所还是能为胚胎的发育提供某些特殊的信号因子和营养物质,至今尚无相关文献报道。本研究用自配的平衡盐溶液成功地将池蝶蚌的胚胎培育到囊胚期,但未获得钩介幼虫。育儿囊作用机理的研究以及如何获得成功获得破膜钩介幼虫有待进一步深入。

淡水贝类胚胎发育一般分为卵裂期、囊胚期、原肠期和钩介幼虫期 4 个时期,且钩介幼虫都要经历一段寄生生活阶段^[18]。池蝶蚌胚胎发育过程与多数淡水贝类相似,但水温变化可造成发育的速度差异。池蝶蚌胚胎在水温 18~23℃左右发育到钩介幼虫阶段大约需 12 d,三角帆蚌在水温 20~23℃左右需用 11 d^[6],两种蚌的胚胎发育时序相似。在胚胎发育过程中,从四细胞期开始分裂球中间形成了一个分裂腔,分裂腔中充满液体,胚胎发育到囊胚期,分裂腔被分裂球包裹在内部。分裂腔与卵膜内的液体为胚胎发育提供了营养,保证胚胎发育的顺利进行。

此外,不同种类的钩介幼虫在形态上存在一定的差异。池蝶蚌钩介幼虫侧面观与吴小平等^[19]所述的三角帆蚌钩介幼虫侧面观相似,近椭圆形。壳钩是特殊结构之一,淡水蚌类钩介幼虫据壳钩的有无被分为无钩型和有钩型两大类。真柱矛蚌(*Lanceoïaria gladiolus*)、剑状矛蚌

(*L. grayana*)、褶纹冠蚌的幼虫均为有钩型,而洞穴丽蚌 (*Lamprotula caveata*)、角月丽蚌 (*L. cornuumlunae*) 的幼虫为无钩型^[19]。三角帆蚌的壳钩观察有不同的结果,吴小平等^[19]应用光镜和扫描电镜对三角帆蚌钩介幼虫的形态结构进行了观察,结果发现三角帆蚌为无钩型;舒凤月^[20]采用相同的方法却观察到三角帆蚌钩介幼虫具有壳钩,推测出现这种差异的原因可能是由于地理分布不同造成。本实验观察结果表明,池蝶蚌的钩介幼虫属于有钩型,这对池蝶蚌幼体寄生和发育具有重要的作用。

参 考 文 献

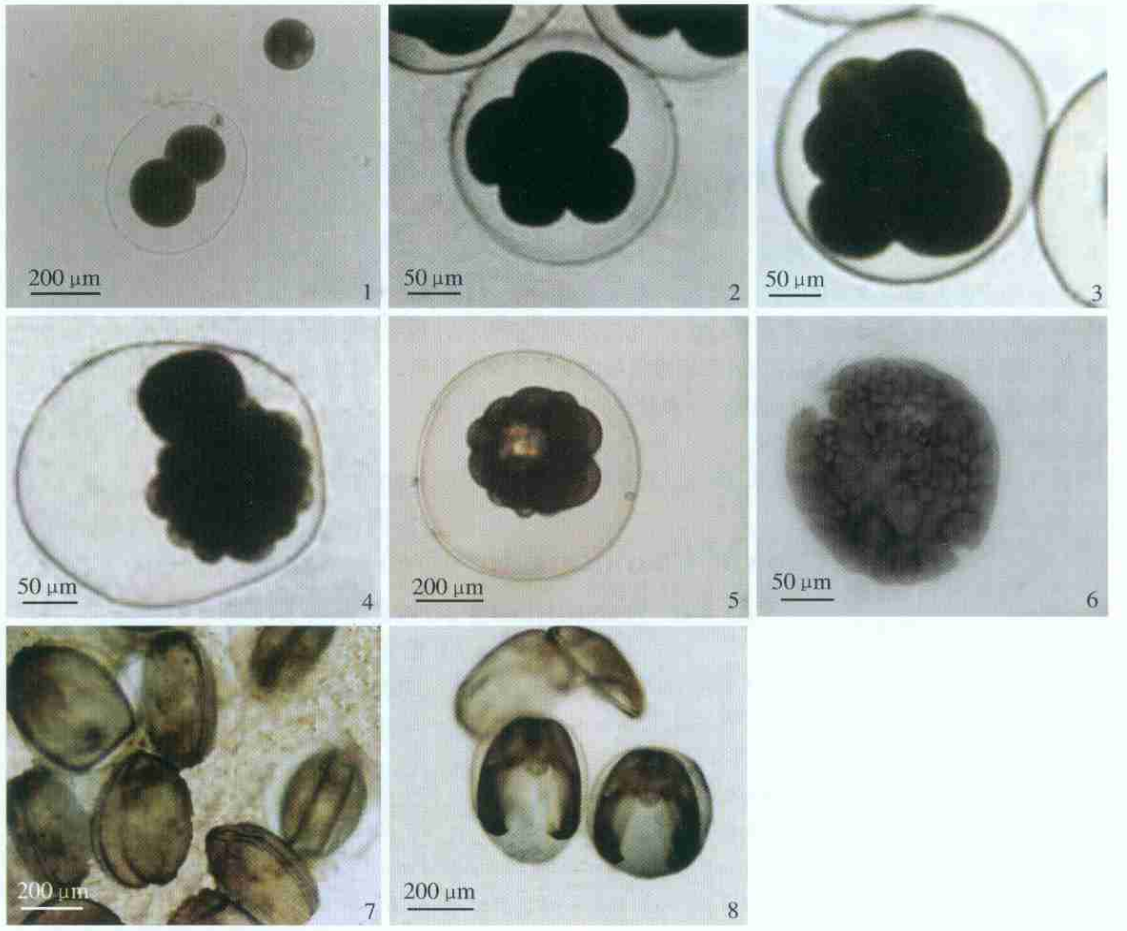
- [1] Madrones-Ladja J A. Notes on the induced spawning, embryonic and larval development of the window-pane shell, *Placuna placenta* (Linnaeus, 1758) in the laboratory. *Aquaculture*, 1997, **157**:137 ~ 146.
- [2] 李琼珍,童万平,苏琼. 大獭蛤的胚胎、幼虫及稚贝的形态发育. *广西科学*, 2003, **10**(4):296 ~ 299.
- [3] 沈永忱,郑宝太,刘吉明等. 中国蛤蜊的诱导产卵和胚胎发育. *山东渔业*, 2005, **22**(3):2 ~ 3.
- [4] 杨学芬,龚世园,张训蒲等. 绢丝丽蚌胚胎发育的研究. *水生生物学报*, 1999, **23**(4):359 ~ 362.
- [5] 顾敏强,王众. 河蚬胚胎发育观察及分期的探讨. *现代渔业信息*, 2001, **16**(10):28 ~ 30.
- [6] 王宏,白志毅,李家乐等. 三角帆蚌胚胎在外鳃育儿囊内形态变化初步研究. *上海水产大学学报*, 2006, **16**(3):219 ~ 223.
- [7] 徐毛喜. 池蝶蚌的引种及繁育技术. *南昌大学学报*, 2000, **24**(专辑):21 ~ 24.
- [8] 龚世园,朱子义,张训蒲等. 绢丝丽蚌的配子发生. *水产学报*, 1998, **22**(1):81 ~ 84.
- [9] 弭忠祥,赵小钊,王秀珍. 三角帆蚌卵子超微结构的研究. *电子显微学报*, 2005, **24**(4):431 ~ 431.
- [10] 石安静. 背角无齿蚌生殖细胞及钩介幼虫的扫描电镜观察. *动物学杂志*, 1995, **30**(1):10 ~ 13.
- [11] 田津方,魏青山. 武汉南湖褶纹冠蚌性腺发育与繁殖周期. *华中农业大学学报*, 1993, **12**(2):190 ~ 196.
- [12] 邓道贵,谈奇坤. 褶纹冠蚌精子的超微结构研究. *水生生物学报*, 2001, **25**(5):481 ~ 485.
- [13] 郭延平,谈奇坤. 三角帆蚌精子的发生. *动物学杂志*, 2002, **37**(1):2 ~ 5.
- [14] 朱子义,龚世园,张训蒲等. 绢丝丽蚌的繁殖习性研究. *华中农业大学学报*, 1997, **16**(4):374 ~ 379.
- [15] Mathieu M, Audet C, Etchian O A, et al. Sexual maturation and related changes in aspartate transcarbamylase activity of gonad tissues in the soft shell clam (*Mya arenaria*). *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2004, **139**(2):287 ~ 297.
- [16] Racotta I S, Ramirez J L, Ibarra A M, et al. Growth and gametogenesis in the lion's paw scallop *Nodipecten* (*Lyropecten*) *subnodosus*. *Aquaculture*, 2003, **217**:335 ~ 349.
- [17] 王梅芳,余祥勇,叶富良. 北部湾及附近海域栉江珧性腺发育研究. *广西科学*, 2000, **7**(2):140 ~ 143.
- [18] 张根芳,方爱萍,李家乐. 淡水蚌类繁殖生物学研究进展. *水产学报*, 2005, **29**(4):560 ~ 564.
- [19] 吴小平,梁彦龄,王洪铸等. 蚌科钩介幼虫的比较形态学研究. 六个种幼虫的形态. *水生生物学报*, 2000, **24**(3):252 ~ 256.
- [20] 舒凤月,吴小平. 蚌科两种蚌钩介幼虫形态的比较观察. *山东科学*, 2005, **18**(1):14 ~ 16.

余 颖等:池蝶蚌胚胎发育与繁殖季节性腺的观察

图版

YU Ying *et al.* : Embryonic Development and Breeding-season Gonad in *Hyriopsis schlegeli*

Plate



1. 二细胞期; 2. 四细胞期; 3. 八细胞期; 4. 三十二细胞; 5. 囊胚期; 6. 原肠期; 7. 钩介幼虫期; 8. 钩壳及足丝。
 1. 2-cell stage; 2. 4-cell stage; 3. 8-cell stage; 4. 32-cell stage; 5. Blastocoel; 6. Blastocyst; 7. Gochidium; 8. Hook and byssu.