

文章编号 : 1004 - 7271(2006)03 - 0297 - 06

盐度对石磺胚胎发育的影响

沈和定¹, 陈汉春², 陈贤龙², 冉 福¹, 施志仪¹, 熊柳平¹, 王 飞¹

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090 ;

2. 浙江省慈溪市水产技术推广中心, 浙江 慈溪 315300)

摘 要 28 ℃水温下, 实验室内比较观察了盐度为 0、3、6、9、15、20、30、40 八组水体中石磺(*Onchidium* sp.)受精卵的胚胎发育状况, 并对囊胚期的胚胎进行了低盐度(0、3、6、9)培育试验。结果表明: 石磺受精卵在不同盐度水体中的胚胎发育状况有很大的差异, 盐度 0 组中的胚胎畸形率高达 $97\% \pm 2\%$, 盐度 3 组中的胚胎畸形率达 $75\% \pm 2\%$, 盐度 30 组中停止发育的胚胎(即单卵黄球胚胎)比例为 $60\% \pm 4\%$, 盐度 40 组中停止发育胚胎的比例达 $98\% \pm 2\%$, 盐度 6、9、15、20 组的胚胎能正常发育, 孵化率均在 90% 以上; 石磺卵群孵化的适宜盐度范围为 6~20。囊胚期的胚胎适应低盐度的能力稍强, 盐度 0 组中的囊胚期胚胎分裂球解体, 不能正常发育; 盐度 3、6、9 组中的囊胚期胚胎能正常发育。盐度为 23.4 和 27.4 的自然海水环境中, 石磺胚胎也能正常发育和孵化。

关键词 石磺; 盐度; 胚胎发育; 囊胚期; 畸形率

中图分类号 S 917; Q 959.215 文献标识码: A

Influence of water salinity on embryonic development of sea slug *Onchidium* sp.

SHEN He-ding¹, CHEN Han-chun², CHEN Xian-long², RAN Fu¹, SHI Zhi-yi¹, XIONG Liu-ping¹, WANG Fei¹

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China ;

2. Spreading Center of Technology in Aquatic Science of Cixi City in Zhejiang Province, Zhejiang 315300, China)

Abstract Under laboratory conditions with water temperature at 28 ℃, the embryonic development of sea slug *Onchidium* sp. was studied from zygote at eight salinity gradients (0, 3, 6, 9, 15, 20, 30, 40 respectively) and from blastula at four salinity gradients (0, 3, 6, 9), respectively. The results showed that the development of the zygotes was significantly different with various salinities. The higher hatching rate occurred at the salinities of 6, 9, 15 and 20 with a hatching rate over 90%, while higher deformity rates were observed at the salinities of 0 and 3 with the deformity rates of 97% and 75%, respectively. Besides, it was observed that 60% and 98% of the embryos stopped developing at salinities 30 and 40. It was concluded that the optimum salinities for embryonic development of sea slug were 6 - 20, although it is showed that the sea-slug zygotes could normally develop at natural sea water salinities such as 23.4 and 27.4. Results also showed that the embryo at blastula stage could even develop under lower salinity such as 3, but it would stop developing or even collapse at salinity 0.

收稿日期 2005-10-28

基金项目: 上海水产大学水产养殖重点学科建设项目(03SC11), 宁波市海洋与渔业局 2005 年项目, 上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介: 沈和定(1964 -)男, 浙江奉化人, 博士研究生。从事贝类学、贝类增殖学和贝类净化技术研究。Tel: 021 - 65710362,

E-mail: hdshen@shfu.edu.cn

通讯作者: 施志仪, Tel: 021-65710284, E-mail: zyshi@shfu.edu.cn

Key words : *Onchidium* sp. ; salinity ; embryonic development ; blastula stage ; deformity rate

石磺 (*Onchidium* sp.) 为腹足纲、肺螺亚纲贝类, 又称土鸡、土海参、涂龟、乌纱鳖、海癞子, 曾名蛤蟆石磺和瘤背石磺, 为江、浙、沪沿海滩涂芦苇丛和大米草滩常见的经济贝类, 具夜行性活动的特点, 以肺呼吸, 多生活在滩涂的高潮带。国外, 有关石磺属贝类的分类^[1, 2]、生态^[3, 4]、对环境的适应性^[5-8]、繁殖生物学^[9, 10]和幼体形态结构^[11]等研究较多。国内, 沈和定等^[12]对石磺的生物学特性及增养殖前景进行了分析, 并研究了饲料对石磺的暂养效果及消化率^[13]; 邱立言^[14], 黄金田等^[15]观察了石磺的形态和生态习性, 进行过温箱养殖试验^[16]。石磺胚胎发育过程以及水温对胚胎发育的影响已有报道^[17], 有关海水盐度对双壳类^[18]、螺类^[19, 20]胚胎发育的影响也有较多报道, 而盐度对石磺胚胎发育的影响至今未见研究。本文通过实验室试验, 比较了 8 个盐度梯度下石磺受精卵的胚胎发育状况, 并进行了囊胚期胚胎对低盐度水体的适应性试验, 同时进行了自然海水中卵群孵化试验, 探索石磺卵群规模化孵化的适宜盐度范围和对自然海水的适应能力, 为石磺人工繁育技术研究提供资料和参考。

1 材料与方法

1.1 室内试验材料

2004 年 6 月 5 日和 2005 年 5 月 28 日分别采集上海崇明和浙江慈溪沿岸滩涂的石磺, 在上海水产大学海洋生物实验室, 采用铺设底泥、搭置浸泡过的瓦片、种植大米草等模拟自然环境的方法, 人工投饵养殖。期间每日观察石磺的交配产卵状况、卵群形态和结构, 石磺交配后约 10 ~ 15 d 以互相连接的卵囊形式产出, 旋转盘曲形成宽约 0.5 mm 的卵带附于瓦片的阴面, 卵带镜检有 2 ~ 3 列卵囊。多在傍晚产卵, 为黏性卵, 刚产出的卵群呈乳白色、柔软、丝状。发现正在产卵的石磺个体后, 用镊子获取刚从雌性生殖孔产出的受精卵作为试验材料。另外, 取用正常发育至囊胚期的卵群进行囊胚期胚胎低盐度耐受试验。

1.2 试验方法

1.2.1 试验条件及其控制

实验室所用海水由比重为 1.090 的浓缩海水与自来水调配而成, 海水盐度分别为 0, 3, 6, 9, 15, 20, 30, 40; 每组设 3 个重复。盐度 0 组水体的 pH 值为 7.1 ± 0.2 , 其他各盐度组的 pH 值为 8.1 ± 0.3 , DO > 4.0 mg/L, 面北背阳的实验室内自然光照。试验期间用电热棒水浴控温在 28.0 °C, 每天添加蒸馏水至水体刻度线, 以保持盐度稳定。孵化培育期间一般不需换水, 如遇水质不良时部分换水。至试验第 12 天左右有面盘幼虫自然孵化出膜时, 更换新鲜海水后即能在 20 min 内大量出膜, 统计孵化率和畸形率。每次试验均采用同一卵群, 保证胚胎质量统一和发育的同步性。

海区自然海水卵群规模化孵化试验时测定海水比重和水温, 查海水比重和盐度换算表即得海水的盐度值。

1.2.2 胚胎生物学数据测量

在带有目微尺的显微镜下, 测量石磺胚胎生物学数据, 各组每次测定的样本数 30 个以上。受精卵生物学数据主要有长径、短径、卵膜厚度和卵黄径。

1.2.3 各盐度组受精卵胚胎发育观察

用镊子取出刚从雌孔排出的卵群片段作为胚胎试验的材料, 为消除卵群表面原有水体的影响, 卵群片段分别经所用梯度水体漂洗后立即放入装有各盐度梯度水体 800 mL 的烧杯中, 间隙充气孵化。每个试验容器中放入的卵群片段长 5.0 cm (受精卵总数约 3 500 个), 均分成 3 ~ 5 段, 以利跟踪观察。采用 Olympus BH-2 显微镜观察, 高级数码成像系统拍摄盐度对胚胎发育的影响状况。囊胚期前的胚胎每 2 h 观察 1 次, 囊胚期后每天观察 3 次, 膜内面盘幼虫期后每天观察 2 次; 每日进行 1 次胚胎或幼虫的生物学数据测量。

胚胎发育适宜盐度范围是指胚胎孵化率不低于 90% 的盐度范围。发育成畸形的胚胎数占总胚胎数的百分比即为胚胎畸形率。

1.2.4 低盐度对囊胚期胚胎发育的影响

为研究已发育胚胎的耐低盐能力,用囊胚期的胚胎进行了盐度 0、3、6、9 四个组的低盐度影响试验,以测定夏季暴雨及河口淡水对胚胎发育的影响,试验方法和观察要求等同上。

1.2.5 卵群自然海水培育试验

2004 年和 2005 年分别在上海水产大学海洋生物实验室、江苏启东金海岸水产研究所育苗场和江苏省南通富洋贝类繁育中心进行石磺卵群规模化培育试验,培育期间进行微量不间断充气,所用海水盐度分别为 10.0、23.4 和 27.4,其中后二者为自然海水;用盐度 10 的人工配置海水模拟河口半咸水进行批量培育试验。

2 结果

2.1 石磺受精卵生物学数据

石磺行体内受精,产出体外时为单细胞受精卵,其胚胎发育过程分别经过卵裂期、囊胚期、原肠期、膜内担轮幼虫期、膜内面盘幼虫期,28℃ 水温下经过 12 d 左右孵化出膜成为自由生活的面盘幼虫,幼虫籍 2 个纤毛盘营浮游生活。不同规格的石磺个体所产卵群的受精卵生物学数据有明显的差异,受精卵平均长径在 234.4~304.5 μm ,平均短径在 178.6~221.7 μm ,平均卵黄径在 67.4~81.8 μm ,卵膜平均厚度为 20.5~29.9 μm (表 1)。

表 1 不同产卵群体石磺受精卵生物学数据

Tab.1 Zygote biological parameters of *Onchidium* sp. in different groups

组别	长径	短径	卵黄径	卵膜厚度
1	269.4±29.6	221.7±19.0	67.4±5.4	29.9±1.3
2	304.5±35.9	206.7±16.3	81.8±3.4	20.9±2.9
3	234.4±20.0	178.6±10.0	81.4±2.2	20.5±1.9

2.2 盐度试验中胚胎发育的异常现象

盐度 0 组、3 组中的卵群入水 3 h 后卵黄球即开始出现分解变形,随着时间的延长,出现线圈形、长条形、外突形、分裂形和膨胀形等 5 种明显的畸变形态(图版-1~8);偶有分裂发育的 1 d 后分裂球之间的界限不清,常呈融合状,发育停止在多细胞期至囊胚期之间。盐度 30、40 的高盐组中的胚胎,约 4 h 后卵黄球开始收缩变小。盐度愈高或愈低,卵黄球收缩或膨胀的时间越是提前。盐度 0 组的受精卵卵黄球极度膨胀,盐度 30、40 组受精卵的卵黄球与正常盐度下的比较有明显的收缩现象(图版-9~11)。

2.3 盐度对石磺胚胎发育效果的影响

孵化 1 d 后,盐度 0 组中的受精卵其畸形发育的百分率为 97.0%±2.0%,出现线圈形、长条形、外突形、分裂形和膨胀形等 5 种形状,还有 3.0%±2.0% 的胚胎几乎不发育,其卵黄球有明显膨大的现象(图版-10)。盐度 3 组的胚胎畸形率达 70.0%±2.0%,25.0%±2.0% 的胚胎能正常发育,约有 5.0% 的胚胎停止发育,卵黄球不进行分裂。盐度 6 组和 9 组的受精卵发育正常,只有极少数畸形的胚胎;盐度 15 组和 20 组的胚胎发育良好,同步率高达 95.0% 以上。盐度 30 组中大部分胚胎停止发育,仍处于单卵黄球的胚胎比例高于 60.0%±4.0%,且有比较明显的卵黄球收缩现象,余下的胚胎能正常发育。盐度 40 组中的受精卵形态几乎没有变化,卵黄球收缩明显,不分裂停止发育的胚胎比例达 98.0%±2.0%(图版-11)。可以得出,石磺胚胎发育适宜的盐度范围为 6~20。另外,发现有盐度越高卵径和胚胎分裂球越小的趋向。4 d 后膜内面盘幼虫的壳已基本形成,之后其贝壳大小无明显变化,而其内部器官不断

发育完善。12 d 后各盐度试验组石磺卵群的平均孵化率与第一天后的正常发育率相接近,盐度对石磺胚胎孵化率的影响具体如图 1。以石磺生活的河口环境水体盐度 10 为中心,可以发现水体盐度过低对胚胎的负面影响要大于水体盐度过高对它的影响。

2.4 低盐度对囊胚期胚胎发育的影响

囊胚期胚胎在盐度 0 组中,随着时间的推移,胚胎发育逐步趋向畸形,分裂球分离解体现象逐渐明显(图版-12~14),扩散严重,畸形率逐步增高。盐度 3 组的大部分胚胎也越发趋于畸形发育,但仍有少部分胚胎能正常发育,其发育速度与 6 组、9 组相比要慢些,盐度 6 组和 9 组的胚胎发育速度和发育状况均正常。

2.5 自然海水对石磺卵群的培育效果

2 年来用盐度 10 的半咸水,进行 12 批次卵群批量培育试验的孵化率都在 90% 以上,孵化效果好。石磺工厂化人工育苗试验时,分别用盐度 23.4 和盐度 27.4 的自然海水进行自然水温(30 ± 3) $^{\circ}\text{C}$ 下的卵群规模化培育,获得了较好的孵化效果,孵化率均高于 90%;即石磺卵群能分别在盐度为 23.4 和 27.4 的自然海水中正常孵化。

3 讨论

3.1 盐度与石磺胚胎发育的关系

Calabrese^[18]认为只有在某一因子接近极限范围时,复合影响才显示出明显的关联,而当其处在安全范围时,则不存在明显的相互关系,将其他因子控制在自然条件下,即适宜的安全浓度范围内,所得各因子的试验结果可以认为是具有普遍意义的。

海洋生物受精卵的发育过程受盐度影响很大,盐度过高或过低都能极大地影响其发育。本试验中盐度突变试验结果表明,盐度为 9、15、20 时,胚胎的畸形率最低,发育快,同步率也最高,因此盐度 9~20 是石磺受精卵发育的最适宜盐度范围。

从囊胚期胚胎的低盐度影响试验可以看出,盐度 0 环境中,随着时间推移,胚胎发育逐渐趋向畸形化,畸形率逐步升高。盐度 3 组的囊胚期胚胎绝大部分也趋向于畸形发育,虽有少部分胚胎能正常发育,但其发育速度与盐度 6、9 组相比要缓慢些,盐度 6 和 9 组的胚胎发育速度和发育状况均属正常。

鱼卵的渗透调节作用是由卵黄周围的薄层原生质外层进行的^[21],渗透调节机能只倾向于在低渗环境中不再吸水,而没有防止受精卵在高渗环境条件下失去水分的能力,受精卵的渗透压调节能力有限,导致卵黄球失水收缩变小,停止分裂、发育。胚胎发育的广盐性与卵群孵化环境的不稳定和剧变有关,并与历史延续进化适应相一致,同时也与卵群膜的保护有密切关系。海水水质条件变化远不如潮间带环境变化剧烈,因此卵群对环境变化的适应能力较强,并且卵群的适应性与有效保护或自身渗透压调节能力有关^[20]。

3.2 盐度渐变和突变对石磺卵群盐度适应性影响

盐度渐变过程是一个缓慢而长期的小幅变化过程,处于这种环境中的胚胎容易适应环境因子的变化,从而扩大对盐度等环境因子的耐受范围。盐度渐变往往都有 12 h 的作用时间,胚胎发育在这一动态的渐变中获得了盐度的适应能力^[19];但由于胚胎发育的进行,作用时间后的胚胎发育阶段往往已有进展,不同阶段胚胎对盐度的适应能力已发生了变化,因此往往不能真实反映刚产卵群对盐度的实际适应能力。虽然盐度渐变对贝类胚胎发育的影响及其试验结果仍有待于进一步探讨,但是动态渐变过

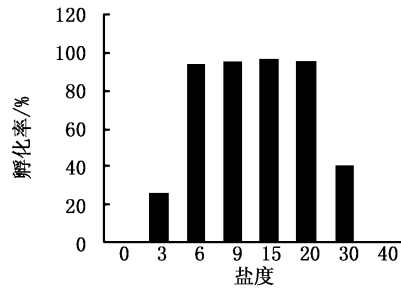


图 1 水体盐度与卵群孵化率之间的关系

Fig. 1 Relationship between salinity and hatching rates of egg-mass

程中胚胎获得了对盐度的适应能力, 从而能获得比突变实验较宽的适盐范围^[19]。这可能也是石磺胚胎能在盐度 27.4 的自然海水中正常培育、孵化的主要原因。

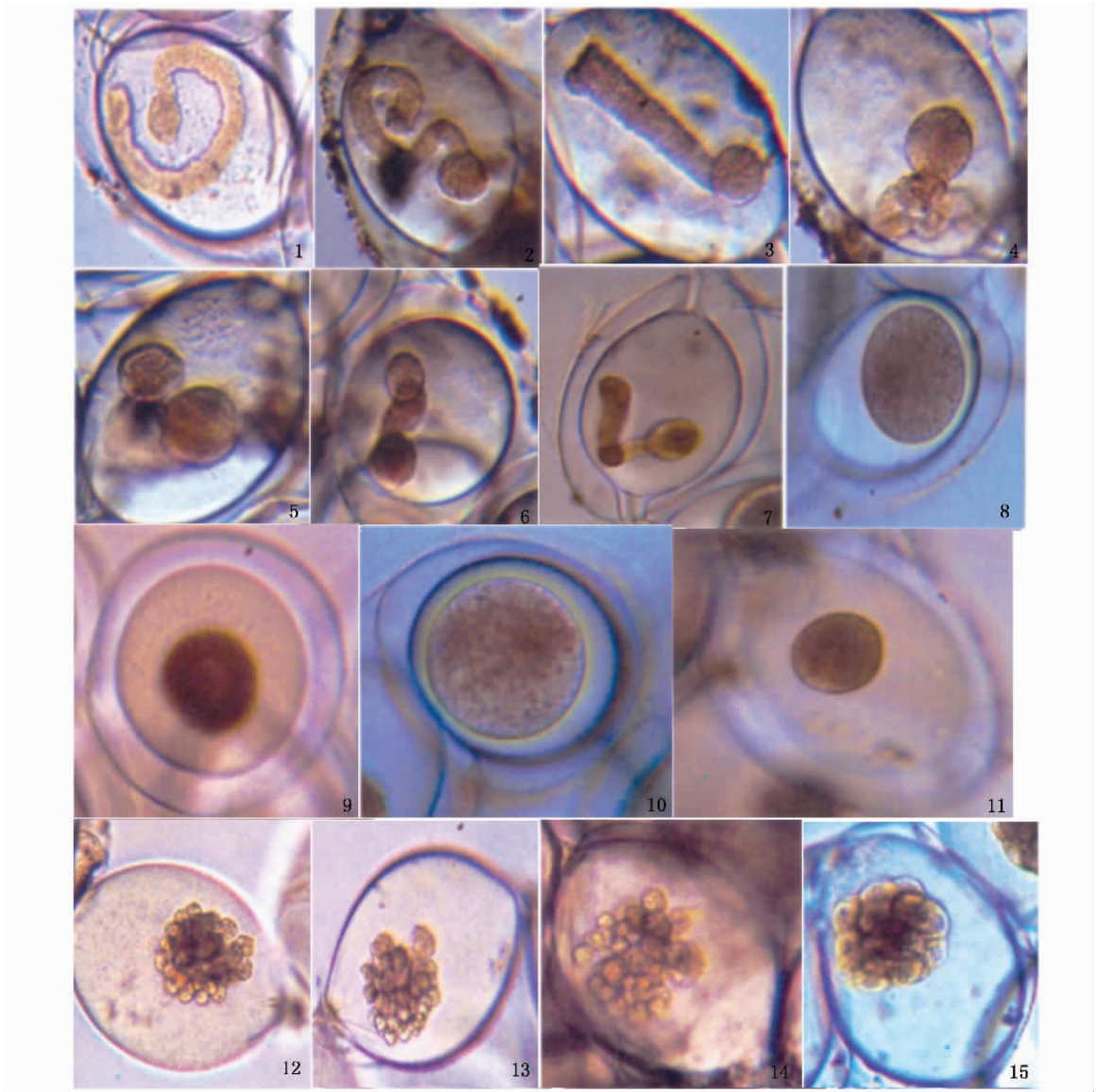
3.3 试验结果对石磺人工繁育和资源保护工作的指导作用

石磺胚胎对较高盐度海水的适应性以及生活史中具有浮游幼虫期等特点间接反映石磺起源于海洋, 可以推知江浙沪地区的石磺是从海洋向陆地过渡的贝类, 是生命从海洋向陆地进军的最好典型之一。盐度低于 0.5 的地区没有石磺分布^[12]的特点又反映出其对海洋的依赖性。根据盐度对石磺胚胎发育的影响, 选择海水盐度适宜的人工繁殖场地, 以保证育苗用海水的盐度要求, 提高石磺卵群的孵化率。研究石磺胚胎发育的盐度要求能为开展石磺工厂化繁育、仿生态土池培育和资源增殖保护工作提供基础资料和有益参考。

本研究得到了江苏启东金海岸水产研究所朱善央高工和江苏省南通富洋贝类繁育中心张国军经理及徐锦昌书记的大力支持和热情帮助, 在此致以衷心感谢!

参考文献:

- [1] Britton K M. The Onchidiacea (Gastropoda, Pulmonata) of Hong Kong with a worldwide review of the genera [J]. *Journal of Molluscan Studies*, 1984, 50(3): 179 - 191.
- [2] Hyman I T. A comparison of two onchidiid species (Mollusca, Pulmonata) [J]. *Molluscan Research Abstract*, 1999, 20(1): 61 - 72.
- [3] Deshpande U D, Nagabhushanam R, Hanumante M M. Reproductive ecology of the marine Pulmonate, *Onchidium verruculatum* [J]. *Hydrobiologia*, 1980, 111(1-2): 83 - 85.
- [4] Ip Y K, Chew S F, Lee C Y, et al. Effects of anoxia on the activities of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase, and the production of lactate and succinate in the intertidal pulmonate *Onchidium tumidum* [J]. *Marine Biology*, 1993, 116(1): 103 - 107.
- [5] Kenny R, Smith A. Emergence behaviour of *Onchidium damelii* Semper 1882 (Gastropoda, Onchidiidae) [J]. *J Malac Soc Aust*, 1988, 9: 19 - 20.
- [6] McFarlane I D. In the Intertidal homing gastropod *Onchidium verruculatum* (Cuv.) the outward and homeward trails have a different information content [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1981, 51(2-3): 207 - 218.
- [7] McFarlane I D. Trail-following and trail-searching behaviour in homing of the intertidal gastropod mollusc, *Onchidium verruculatum* [J]. *Mar Behav Physiol*, 1980, 7(1): 95 - 108.
- [8] Lim C B, Low W P, Chew S F, et al. Survival of the intertidal pulmonate *Onchidium tumidum* during short-term and long-term anoxic stress [J]. *Marine Biology*, 1996, 125(4): 707 - 713.
- [9] Smith A, Kenny R. Reproduction and development of *Onchidium damelii* Semper, 1882 [J]. *J Malac Soc Aust*, 1987, 8: 37 - 39.
- [10] Nanaware S G, Gonjari G R. Studies on the reproductive physiology of molluscs: 6. Histochemical observations on the mucosubstances of spermatheca of marine slug *Onchidium verruculatum* (Cuv.) [J]. *Comparative Physiology and Ecology*, 1989, 14(3): 149 - 154.
- [11] Ruthensteiner B, Schaefer K. The cephalic sensory organ in veliger larvae of pulmonates (Gastropoda: Mollusca) [J]. *Journal of Morphology*, 2002, 251(1): 93 - 102.
- [12] 沈和定, 李家乐, 张缓溶. 石磺的生物学特性及其增殖前景分析 [J]. *中国水产*, 2004, 1: 36 - 39.
- [13] 沈和定, 陈汉春, 陈贤龙, 等. 几种饲料对石磺的暂养效果及其消化率的初步研究 [J]. *上海水产大学学报*, 2004, 13(4): 293 - 297.
- [14] 邱立言. 苏沪沿海瘤背石磺的形态和习性 [J]. *动物学杂志*, 1991, 26(3): 33 - 36.
- [15] 黄金田, 沈伯平, 王资生. 瘤背石磺的生态习性观察 [J]. *海洋渔业*, 2004, 26(2): 103 - 109.
- [16] 黄金田, 张余霞. 瘤背石磺室内温箱养殖试验 [J]. *海洋科学*, 2004, 28(10): 14 - 16.
- [17] 沈和定, 陈贤龙, 陈汉春, 等. 水温对石磺胚胎发育的影响 [J]. *水产学报*, 2005, 29(6): 776 - 782.
- [18] Calabrese A. Individual and combined effects of salinity and temperature on embryos and larvae of the coot clam, *Mulinia lateralis* [J]. *Biological Bulletin*, 1969, 137(3): 417 - 428.
- [19] 郑怀平, 朱建新, 柯才焕, 等. 温盐度对波部东风螺胚胎发育的影响 [J]. *台湾海峡*, 2000, 19(1): 1 - 5.
- [20] 王一农, 尤仲杰, 陈舜, 等. 海水比重对微黄镰玉螺胚胎发育浮游幼虫生存与生长影响 [J]. *浙江水产学院学报*, 1995, 14(4): 231 - 237.
- [21] 邬国民, 陈慈, 罗建仁, 等. 盐度对胡子鲶、革胡子鲶及其杂交子一代胚胎发育的影响 [J]. *中国水产科学*, 1998, 5(3): 43 - 46.



图版 盐度对石磺胚胎发育的影响

Plate Influence of salinity on embryonic development of *Onchidium* sp.

1-8. 盐度 0 组受精卵畸形发育。1-2. 线圈形；3. 长条形；4. 外形；5-7. 分裂形；8. 膨胀形；9. 正常盐度(6, 9, 15, 20)下的受精卵；10. 盐度 0 组受精卵(膨胀形)；11. 盐度 30, 40 组胚胎卵黄球收缩变小；12-14. 囊胚期胚胎盐度 0 组中的分裂球分离解体现象；15. 正常的囊胚期胚胎