

文章编号: 1004-7271(2007)03-0219-05

## 三角帆蚌胚胎在外鳃育儿囊内 形态变化初步研究

王宏<sup>1,2</sup>, 白志毅<sup>1</sup>, 李家乐<sup>1</sup>, 王建军<sup>1</sup>

(1. 上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090;

2. 锦州医学院畜牧兽医学院, 辽宁 锦州 121001)

**摘要:**对三角帆蚌胚胎在其外鳃育儿囊内的形态变化进行了显微观察。结果表明:在水温20℃~23℃时,受精卵发育为膜内钩介幼虫需11d;受精卵吸水后,卵膜膨胀,在整个发育过程中,其大小无显著变化,但膜内胚胎生长明显;整个发育期分为受精卵、卵裂期、原肠期、膜内钩介幼虫期,经过这4个时期,胚胎最大长度增长了82.8%,生长速度在后期快于前期,并且以原肠期和膜内钩介幼虫期增长速度最快。胚胎发育的不同时期与外鳃特征具相关性。

**关键词:**三角帆蚌; 外鳃育儿囊; 胚胎发育

中图分类号: S 966.22 文献标识码: A

## A primary study on the morphological changes of embryo of *Hyriopsis cumingii* in nurturing pouch of outer gill

WANG Hong<sup>1,2</sup>, BAI Zhi-yi<sup>1</sup>, LI Jia-le<sup>1</sup>, WANG Jian-jun<sup>1</sup>

(1. Key laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquaculture Ecosystem Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jinzhou Medical College, Jinzhou 121001, China)

**Abstract:** The morphological changes of embryo of *Hyriopsis cumingii* in its nurturing pouch of outer gill were examined. It was found that, when the water temperature ranged from 20℃ to 23℃, the embryonic development from oosperm to mature glochidia took 11 days. After the oosperm sucked the water, the membrane swelt up and its size varied little, while the embryo bulged distinctly. The embryonic development of *Hyriopsis cumingii* might be divided into four stages: oosperm, cleavage, gastrulae and glochidia. The length of embryo increased 82.8% during the whole embryonic development. The growth rate of late embryo was higher than that of early embryo. The highest growth rate was observed in gastrulae stage and glochidia stage. There were relations between different stages of the embryonic development and the character of the outer gill of the female.

**Key words:** *Hyriopsis cumingii*; nurturing pouch of outer gill; embryonic development

收稿日期: 2006-09-04

基金项目: 农业部农业结构调整重大技术研究专项项目(06-05-05B); 上海市曙光跟踪项目(06GG12); 上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介: 王宏(1970-), 男, 辽宁黑山人, 讲师, 主要从事水产种质资源与养殖生态方面的研究。

通讯作者: 李家乐, E-mail: jlli@shfu.edu.cn

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 属软体动物门, 瓣鳃纲, 真瓣鳃目, 蚌科, 帆蚌属<sup>[1,2]</sup>, 是我国特有种, 为最主要的淡水育珠蚌, 其珍珠质量佳。近年来, 由于珍珠产业的快速发展, 三角帆蚌的苗种需求量逐年增加, 但目前采用的三角帆蚌人工育苗方法受自然条件的限制非常大, 出苗率极不稳定, 这与三角帆蚌繁殖生物学的基础研究薄弱有关, 仅有几位学者曾对三角帆蚌精子的形态及超微结构、怀卵期鳃瓣结构以及钩介幼虫做过一些研究<sup>[3-10]</sup>, 因此亟待加强该方面的基础研究。本实验研究了三角帆蚌胚胎在外鳃育儿囊内的形态变化, 以及胚胎发育不同时期与外鳃特征的相关性, 为改进三角帆蚌育苗方法以及进行多倍体育种和现代生物技术辅助育种提供基础性资料<sup>[11-12]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

三角帆蚌亲蚌取自浙江省诸暨市王家井镇珍珠养殖场, 选用蚌壳质厚重、表面放射纹明显、色泽鲜亮、年轮宽、腹缘有游离角质软边、个体无损伤, 闭壳肌关闭迅速、喷水有力的健康蚌, 用开壳器检查, 其内脏囊鲜艳光滑, 呈玉白色, 软体丰满、斧足肌完整、边缘无缺刻, 鳃瓣完整无伤。

### 1.2 实验方法

于2006年4月三角帆蚌的繁殖期, 在实验水温为20~23℃, 气温为19~25℃的条件下, 将成熟的雌亲蚌取出, 阴干1~2h后, 放入大塑料盆(容积50L, 直径0.5m)中加入水, 使其将成熟的钩介幼虫排空后, 将雌雄亲蚌按3:1的比例放入池塘网袋中, 每天从池塘中取雌亲蚌5个, 用开壳器把壳打开, 用细吸管从蚌外鳃育儿囊中吸取正在发育的胚胎, 光镜下进行活体观察, 用目测微尺测量受精卵及各期胚胎的大小。三角帆蚌的受精卵是椭圆型的, 用目测微尺测量膜内受精卵及卵膜的长轴长和短轴长; 到钩介幼虫形成时, 测量其铰合部长、壳长(平行于铰合部的最大距离)、壳高(垂直于铰合部的最大距离)。每次测量30个, 用波恩氏液固定后显微照相, 同时记录当时的水温。

每期胚胎增长率按下式计算:

$$\text{胚胎增长率} = (\text{期末数值} - \text{期初数值}) / \text{生长天数}。$$

## 2 结果

在20~23℃的水温下, 三角帆蚌胚胎发育时间为11d, 在外鳃育儿囊内的胚胎发育过程分为受精卵、卵裂期、原肠期、膜内钩介幼虫期。胚胎发育各时期的胚胎大小见表1和表2。

### 2.1 受精卵

三角帆蚌受精卵见图版-1, 在雌蚌外鳃的育儿囊中排列成片状, 进行胚胎发育<sup>[9]</sup>。受精卵为椭圆形, 卵膜吸水后与卵细胞之间有很大的围卵周隙, 此期卵径为 $(146.23 \pm 7.81) \mu\text{m} \times (105.33 \pm 5.22) \mu\text{m}$ , 吸水后, 卵膜膨胀, 其卵膜直径为 $(272.23 \pm 6.24) \mu\text{m} \times (223.34 \pm 5.93) \mu\text{m}$ 。在发育过程中, 卵膜直径无显著变化, 受精卵发育至钩介幼虫过程中, 其大小有显著变化。

### 2.2 卵裂期

该期受精卵大小见表1, 受精卵进行不等的完全卵裂, 受精后12h动物极隆起(图版-2), 并开始进行细胞分裂, 形成两个大小完全不等的分裂球, 为2细胞期(图版-3), 其大小为 $(162.23 \pm 6.21) \mu\text{m} \times (148.44 \pm 4.62) \mu\text{m}$ , 随后在3天内发育为4细胞期(图版-4), 8细胞期, 多细胞期(图版-5)。四细胞期是二细胞进行卵裂, 形成三个大小相等的小分裂球和一个较大的分裂球, 四个分裂球围成一圈, 中间形成一个分裂腔。四细胞进一步卵裂, 小分裂球数目增多, 堆积在大分裂球上面, 分裂腔仍旧存在于大小分裂球之间, 分裂球堆积使胚胎呈近椭圆形, 形成8细胞期和多细胞期。继续分裂为桑葚期(图版-6), 再继续分裂, 大分裂球已不明显, 全部分裂球包围在囊胚腔周围, 胚胎发育到囊胚期(图版-7), 为椭球形。此期胚胎长度增长率为 $(172.32 - 162.23) / 3 = 3.36 \mu\text{m}/\text{d}$ , 宽度增长

率为  $(161.12 - 148.44)/3 = 4.23 \mu\text{m}/\text{d}$ 。

表 1 三角帆蚌卵裂期及原肠期胚胎发育

Tab. 1 The embryonic development of *Hyriopsis cumingii* in cleavage and gastrulae stages

发育时期	发育时间	受精卵周隙膜 长轴×短轴( $\mu\text{m}$ )	受精卵或胚胎 (长×宽)( $\mu\text{m}$ )
受精卵	12 h	$(147.23 \pm 8.23) \times (115.09 \pm 6.75)$	$(146.23 \pm 7.81) \times (105.33 \pm 5.22)$
卵裂期	第 1 天	$(272.23 \pm 6.24) \times (223.34 \pm 5.93)$	$(162.23 \pm 6.21) \times (148.44 \pm 4.62)$
	第 2 天	$(271.56 \pm 6.57) \times (221.73 \pm 6.23)$	$(160.21 \pm 5.83) \times (149.21 \pm 6.12)$
	第 3 天	$(271.78 \pm 6.14) \times (222.36 \pm 6.34)$	$(172.32 \pm 6.22) \times (161.12 \pm 5.91)$
原肠期	第 4 天	$(273.26 \pm 5.91) \times (219.43 \pm 6.24)$	$(179.23 \pm 5.74) \times (170.43 \pm 6.32)$
	第 5 天	$(272.54 \pm 6.36) \times (224.12 \pm 6.14)$	$(189.76 \pm 6.32) \times (177.45 \pm 7.10)$

表 2 三角帆蚌膜内钩介幼虫发育

Tab. 2 The development of glochidia in membrane of *Hyriopsis cumingii*

发育时间	受精卵周隙膜 长轴×短轴( $\mu\text{m}$ )	钩介幼虫 铰合部长×壳高×壳长( $\mu\text{m}$ )
第 6 天	$(274.45 \pm 5.62) \times (218.23 \pm 5.81)$	$(102.82 \pm 9.10) \times (220.83 \pm 9.81) \times (178.28 \pm 7.22)$
第 7 天	$(272.23 \pm 6.12) \times (223.45 \pm 6.23)$	$(115.76 \pm 9.28) \times (238.96 \pm 6.72) \times (186.92 \pm 6.84)$
第 8 天	$(270.67 \pm 5.98) \times (222.34 \pm 5.87)$	$(126.89 \pm 8.92) \times (248.76 \pm 5.91) \times (197.56 \pm 6.22)$
第 9 天	$(269.56 \pm 6.82) \times (218.34 \pm 6.23)$	$(139.18 \pm 7.96) \times (257.18 \pm 6.05) \times (207.32 \pm 5.82)$
第 10 天	$(271.37 \pm 6.24) \times (221.43 \pm 6.15)$	$(145.21 \pm 8.13) \times (262.30 \pm 6.21) \times (210.27 \pm 6.09)$
第 11 天	$(273.43 \pm 5.84) \times (220.51 \pm 6.08)$	$(147.28 \pm 7.92) \times (267.28 \pm 6.42) \times (215.38 \pm 5.83)$

### 2.3 原肠期

受精后 4-5 d,继囊胚期后,胚胎进入原肠作用时期,此期大小见表 1,形态变化见图版- 8,9。此时,一端的分裂球逐渐内卷,使此端变得平直出现透明薄膜状物,即原始壳腺,以后分裂球继续内卷,形成凹陷,同时原始壳腺开始分泌形成原壳。胚胎发育到原肠早期。原壳在形成的过程中开始外包胚胎,同时分裂球也在内卷,经过内卷和外包的共同作用,原肠作用完成。此期胚胎长度增长率为  $(189.76 - 179.23)/1 = 10.53 \mu\text{m}/\text{d}$ ,宽度增长率为  $(177.45 - 170.43)/1 = 7.02 \mu\text{m}/\text{d}$ 。

### 2.4 膜内钩介幼虫期

受精后的第 6 d 开始,原壳逐渐包被胚体后,胚胎发育到膜内钩介幼虫期,此期大小见表 2,钩介幼虫形态变化分别见图版- 10~15。钩介幼虫在卵膜内继续发育,先形成铰合部,逐渐向腹缘生长,形成两片近椭圆形透明的原壳。到第 11 天,发育为成熟的膜内钩介幼虫,显微镜下可观察到铰合部平直,两壳呈半椭圆形,并有节奏的开合运动,其透明的壳内有内幼虫足丝、外套膜颗粒、闭壳肌、外幼虫足丝及壳腹缘的棘刺(钩)和刚毛等构造。此期胚胎壳高增长率为  $(267.28 - 220.83)/5 = 9.29 \mu\text{m}/\text{d}$ ,壳长增长率为  $(215.38 - 178.28)/5 = 7.42 \mu\text{m}/\text{d}$ 。

## 3 讨论

### 3.1 三角帆蚌受精过程的探讨

三角帆蚌的受精过程目前存在两种观点:一种认为是雌蚌将成熟的卵排到外鳃育儿囊中,雄蚌排出精子,精子随水流进行雌蚌的外鳃育儿囊中,与卵子结合,完成受精作用;另一种认为是雄蚌将精子排到水中,精子随水流进入雌蚌的外鳃育儿囊中,刺激雌蚌排出卵子,在外鳃育儿囊中受精。

作者在实验过程中发现,将排空钩介幼虫的雌蚌单独放入水体中,发现雌蚌仍然将卵排到其外鳃育儿囊中,支持第一种观点,由此可以确定三角帆蚌的受精过程是雌蚌将成熟的卵排到外鳃育儿囊中,雄蚌排出的精子随水流进入雌蚌的外鳃育儿囊中,与卵结合,完成受精作用的,但其受精机制还需进一步研究。

### 3.2 关于三角帆蚌胚胎发育的分期及特点

刘月英、蔡英亚等<sup>[1,2]</sup>在瓣鳃类胚胎发育期划分中,按其自身发育特点,将淡水瓣鳃类胚胎发育分为受精卵、卵裂期、原肠期、膜内钩介幼虫期。本文实验结果表明,将三角帆蚌胚胎发育分为受精卵、卵裂期、原肠期、膜内钩介幼虫期四个时期是合适的。经过这4个时期,胚胎最大长度增长了82.8%,生长速度在后期快于前期,并且以原肠期和膜内钩介幼虫期增长速度最快。

在四细胞期时,四个分裂球围成一圈,形成分裂腔,分裂腔中充满液体,可能作为胚胎发育的营养。受精卵吸水后,卵膜膨胀,形成围卵黄间隙,在围卵黄间隙内充满液体,杨学芬<sup>[9]</sup>观察到绢丝丽蚌围卵黄间隙内也充有这种液体,这些液体参与胚胎发育过程中的营养作用<sup>[13]</sup>。但目前仍不清楚三角帆蚌胚胎发育过程中的营养需求。张根芳等<sup>[10]</sup>通过对繁殖期三角帆蚌侧鳃瓣的组织结构研究初步探讨了鳃腔育儿机理,只提到了育儿囊为胚胎发育提供水流和氧气,仍未谈到育儿囊对胚胎发育所需营养的提供,了解胚胎发育过程中的营养需求是进行胚胎体外培养的关键。由于人工受精和胚胎体外培养是进行三角帆蚌全人工繁殖和采用现代生物技术手段育种的瓶颈,因此亟待更深入进行该方面的研究<sup>[11,12]</sup>。

### 3.3 胚胎发育各时期与外鳃特征的关系

在实验过程中,每天取样时,观察外鳃的变化,在卵裂期,外鳃的外形质感较硬,腹缘较尖;随着胚胎发育的进行,外鳃逐渐膨胀;到了钩介幼虫成熟期,外鳃变得柔软,饱满且富有弹性。在外形变化同时,颜色也发生相应的变化,在卵裂期,颜色为乳白色;以后逐渐变为浅黄色;当钩介幼虫成熟时,颜色则为桔黄色。与张根芳<sup>[14]</sup>报道的三角帆蚌胚胎发育期与外鳃形状与颜色的变化的结果相符,绢丝丽蚌也具有相似的现象<sup>[9]</sup>。张根芳等观察到在三角帆蚌胚胎发育初期,受精卵被黏液状物质包裹,随着孵化的进行包裹物逐渐消失,这可能与外鳃外形和颜色的变化有一定的关系;吴小平认为,圆顶珠蚌、中国尖脊蚌的育儿囊中有胶质索,受精卵进入鳃水管后按一定方式排列,并与鳃上皮细胞分泌的黏液黏和在一起,黏液硬化后形成“米粒”大小的胶质结构,使得早期外鳃质感较硬<sup>[5]</sup>。外鳃的外形、颜色与胚胎发育时期的这种对应关系已被广泛应用到生产实践中,确定胚胎发育所处的时期,选择怀有成熟的钩介幼虫的雌蚌进行繁殖。

### 3.4 三角帆蚌胚胎发育与温度和饵料的关系

三角帆蚌的繁殖季节在每年的4~6月份,繁殖初期,池塘的水温还较低,不利于水中各种饵料生物生长,饵料生物少,其性腺发育慢,受精后,胚胎发育时间延长,影响三角帆蚌的人工繁殖。

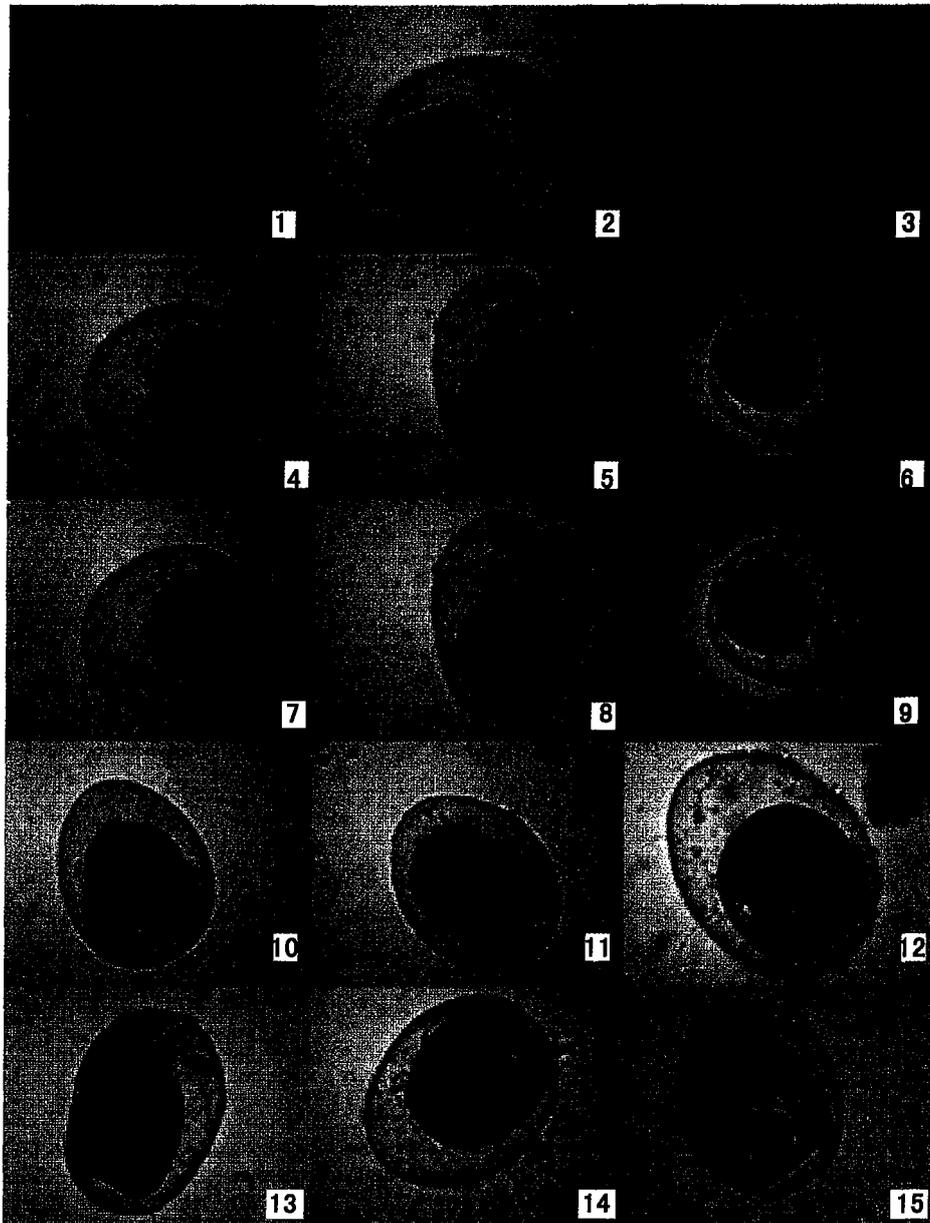
生产中发现,在繁殖初期,水温在18℃~20℃,其外鳃育儿囊内胚胎发育时间在15d以上,在繁殖中后期,水温在21℃~28℃时,其外鳃育儿囊内胚胎发育时间可缩短至10d左右。本次试验水温为20~23℃,胚胎发育时间为11d。杨学芬<sup>[9]</sup>报道绢丝丽蚌在水温25~8℃时,胚胎发育历时51d;王玉凤<sup>[15]</sup>报道刻裂丽蚌在平均水温32℃时,胚胎发育仅需5~6d。温度是影响双壳类软体动物胚胎发育的重要因素,其中胚胎发育生物学零度和有效积温是最重要的两个基本参数<sup>[16]</sup>,因此,有必要进一步研究三角帆蚌的胚胎发育生物学零度和有效积温。

掌握了三角帆蚌胚胎发育的生物学零度和有效积温,就有助于在人工繁殖过程中调节水温,促进性腺成熟,缩短胚胎发育时间,提早进行三角帆蚌的繁殖,有利于当年培育更大规格的育珠蚌进行插珠,提高插珠手术的成功率;并有利于提高孵化率和育苗成活率,以及有助于制定生产计划。

### 参考文献:

- [1] 刘月英,张文珍,王跃先,等. 中国经济动物志—淡水软体动物[M]. 北京:科学出版社,1979:68-132.
- [2] 蔡英亚,张英,魏若飞. 贝类学概论[M]. 上海:上海科学技术出版社,1982.
- [3] 郭延平,谈厅坤. 三角帆蚌精子的发生[J]. 动物学杂志,2002,37(1):2-5.
- [4] 弭志祥,王大威,王国夫,等. 三角帆蚌精子超微结构的观察[J]. 电子显微学报,2002,21(5):578-579.
- [5] 吴小平,梁彦龄,王洪铸. 蚌科钩介幼虫比较形态学研究 I. 四个种幼虫形态[J]. 水生生物学报,1999,23(2):141-145.
- [6] 吴小平,梁彦龄,王洪铸,等. 蚌科钩介幼虫的比较形态学研究 II. 六个种幼虫的形态[J]. 水生生物学报,2000,24(3):252-256.

- [7] 魏青山. 珠蚌科六种钩介幼虫形态的比较研究[J]. 水生生物学报, 1994, 18(4): 303 - 308.
- [8] 舒凤月, 吴小平. 蚌科两种蚌钩介幼虫形态的比较研究[J]. 山东科学, 2005, 18(1): 14 - 17.
- [9] 杨学芬, 龚世园, 张训蒲, 等. 绢丝丽蚌胚胎发育的研究[J]. 水生生物学报, 1999, 23(4): 359 - 362.
- [10] 张根芳, 王旦旦, 方爱萍, 等. 三角帆蚌怀卵期外侧鳃瓣结构研究[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(4): 336 - 341.
- [11] 张根芳, 方爱萍, 李家乐, 等. 淡水蚌类繁殖生物学研究进展[J]. 水产学报, 2005, 29(4): 560 - 564.
- [12] 常亚青, 王子臣, 杨旦光. 贝类多倍体育种研究现状[J]. 水产科学, 2002, 21(1): 31 - 36.
- [13] 楼允东. 组织胚胎学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1980: 223 - 238.
- [14] 张根芳. 河蚌育珠学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 37 - 57.
- [15] 王玉凤, 魏青山. 刻裂丽蚌的繁殖生物学[J]. 华中农业大学学报, 1994, 13(2): 170 - 174.
- [16] 刘德经, 黄德尧, 王家滂, 等. 西施舌胚胎发育生物学零点温度和有效积温的初步研究[J]. 特产研究, 2003, (4): 22 - 24.



图版 Plate

1. 受精卵 × 100; 2. 受精卵(动物极突起) × 100; 3. 卵裂期(二细胞期) × 100; 4. 卵裂期(四细胞期) × 100; 5. 受精卵(多细胞期) × 100; 6. 桑葚期 × 100; 7. 囊胚期 × 100; 8. 原肠期 I × 100; 9. 原肠期 II × 100; 10. 钩介幼虫(第 1 天) × 100; 11. 钩介幼虫(第 2 天) × 100; 12. 钩介幼虫(第 3 天) × 100; 13. 钩介幼虫(第 4 天) × 100; 14. 钩介幼虫(第 5 天) × 100; 15. 钩介幼虫(第 6 天) × 100。