

文章编号: 1674-7054(2016)02-0159-05

羊鲍胚胎发育的显微观察

丁敬敬¹ 胡亚强¹ 黄勃¹ 周智¹ 王小兵² 王林桂¹

(1. 海南大学 海洋学院, 海口 570228; 2. 海南大学 公共实验中心, 海口 570228)

摘要: 为掌握羊鲍个体发育的生命活动规律, 在显微镜下对羊鲍(*Haliotis ovina*)的整个胚胎发育过程进行了形态学的观察。观察结果为羊鲍成熟卵呈球形、米黄色, 平均卵径为(0.19 ± 0.02) mm。在海水盐度 32, 水温 28 °C 的条件下, 羊鲍完成胚胎发育历时约 390 min, 所需总积温为 156 ~ 182 °C · h⁻¹。通过对羊鲍胚胎发育形态与特征观察, 将其胚胎发育过程分为受精卵阶段、卵裂阶段、原肠胚阶段、担轮幼虫阶段等 4 个阶段, 共 11 个发育时期。其发育时间比适宜条件下皱纹盘鲍快约 1 h, 比杂色鲍、耳鲍慢。

关键词: 羊鲍; 胚胎发育; 显微观察

中图分类号: S 945.4 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2016.02.003

羊鲍(*Haliotis ovina*)是一种海产经济贝类,隶属于软体动物门(Mollusca)腹足纲(Gastropoda)前鳃亚纲(Prosobranchia)原始腹足目(Archaeogastropoda)鲍科(Haliotidae)鲍属(*Haliotis*)。其壳体呈卵圆形,生活于低潮线附近的岩礁石缝间,具有极高的食用价值和药用价值。羊鲍、九孔鲍(*Haliotis diversicolor aquatilis*)、杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)、耳鲍(*Haliotis asinina*)均为暖水性贝类,分布于全球热带和亚热带海域,在我国主要分布于南海海域,多以野生为主,是海南省重要的鲍鱼经济品种之一^[1]。近年来因过度捕捞和气候变化,野生羊鲍数量正不断下降,加之育种技术发展滞后,羊鲍数量供不应求,价格不断攀升,因此开展羊鲍的人工养殖和繁殖生物学研究已迫在眉睫。目前国内外学者就羊鲍开展了基因遗传多样性^[2-6]、精巢显微结构等方面的研究^[7],但关于中国海域羊鲍胚胎发育的研究未见报道。研究中国海域羊鲍的早期生活史,掌握其个体发育中的生命活动规律,以为羊鲍的自然保护与人工育苗产业化提供参考。

1 材料与方 法

1.1 亲鲍受精卵的采集 筛选个体体长 > 6 cm 的野生成体鲍(采自海南三亚半山半岛海区,坐标: E109°48', N18°21')经人工驯养约 40 d,致羊鲍性成熟后,筛选出 24 只性腺发育良好的作为亲鲍,雌雄比例为 5:1。用经紫外线照射过的海水注满玻璃缸,将雌鲍和雄鲍分开放置,每缸放 1 个亲鲍,雄鲍放入时间晚于雌鲍 30 min。待亲鲍产卵、排精后,立即收集卵子和带精子的海水,镜检后用于胚胎发育研究^[8]。

1.2 人工授精 用规格为 30 cm × 20 cm × 15 cm 的可充氧方形玻璃缸作为受精卵孵化容器。在容器中加入卵子,密度控制约为 30 粒 · mL⁻¹。精子用过滤海水稀释,密度控制约为 1 × 10⁵ 个 · mL⁻¹,加入孵化容器中,期间不断轻轻搅动水体。受精 10 min 后洗卵。待卵下沉后,将容器上部 3/4 左右不含有卵的海

收稿日期: 2015-12-08

基金项目: 国家高技术研究发展计划高值海珍品良种培育(863 计划)项目(2012AA10A412-8); 中医药行业科研专项: 海南省代表性区域中药资源保护利用(201207002-03); 国家海洋公益项目琼枝麒麟菜产胶红藻生态系统恢复技术集成与示范(201105008-7); 教育部海南大学中西部计划学科重点领域建设项目: 典型海湾热带海洋生物资源开发利用和保护(ZXBJH-XK006)

作者简介: 丁敬敬(1990-),女,海南大学海洋学院 2013 级硕士研究生。E-mail: 18208983885@163.com

通信作者: 黄勃(1965-),男,教授。研究方向: 海洋生物学。E-mail: huangboh1@163.com

水倒出,再加入等量的经紫外线照射过的海水。30 min 后再进行1次,如此反复操作4次。洗卵水温稳定在28℃,盐度控制在30~32^[9]。

1.3 胚胎发育观察 受精前,在显微镜下观察卵的形状和颜色,受精后,每隔10 min 取样,胚胎发育进入16细胞期后,每隔40 min 取样,桑椹期后每隔60 min 取样观察胚胎发育情况。每次观察取20粒受精卵,用固定液(10%福尔马林)固定保存^[10]。将固定样品置于OLYMPUS IX71 荧光倒置显微镜上观察,拍照并记录胚胎发育过程。在胚胎发育期间,保持水温和盐度的相对稳定。

1.4 卵径的测量及胚胎发育总积温的计算方法 显微镜下用测微尺测量受精卵卵径等数据(最小刻度为0.01 mm)。胚胎发育总积温的计算:胚胎发育总积温=胚胎发育全过程的时间(h)×水温(℃)^[11]。

2 结果与分析

受精卵在水温为28℃,盐度为32的条件下孵化,经过6.5 h 完成胚胎发育阶段,整个发育过程在卵膜中进行。根据羊鲍胚胎发育的形态变化,可分为受精卵阶段、卵裂阶段、原肠胚阶段、担轮幼虫阶段等4个阶段。这4个阶段根据形态特征变化又可分为11个时期,分别为受精期、第1极体放出期、第2极体放出期、2细胞期、4细胞期、8细胞期、16细胞期、32细胞期、桑椹期、原肠期和未孵化的担轮幼虫期。笔者不仅观察了11个时期还观察了孵化后的担轮幼虫,观察到的各个时期发育主要特征和所需时间见表1。

表1 羊鲍的胚胎发育全过程

Tab. 1 Embryonic development of *Haliotis ovina*

胚胎发育时期 Developmental stage	受精后时间/min Time after fertilization	胚胎发育特征 Developmental characteristics	图版 Plate
受精卵 Zygote	0	米黄色,沉水性,分散分布	1-1
第1极体放出期 1st polar body stage	10	动物极较植物极颜色较深	1-2
第2极体放出期 2st polar body stage	20	受精卵吸水膨胀,卵径增大,卵周隙明显	1-3
2细胞期 2-cell stage	35	纵裂,细胞大小基本相等	1-4
4细胞期 4-cell stage	65	纵裂,细胞大小基本相等	1-5
8细胞期 8-cell stage	95	横裂,不等裂,2层共8个分裂球	1-6
16细胞期 16-cell stage	120	横裂,4层分裂球	1-7
32细胞期 32-cell stage	180	分裂面开始无序,整个胚盘渐呈圆形	1-8
多细胞期 Multi-cell stage	220	分裂更密,分层现象明显,形成细胞团	-
桑椹期 Morula stage	260	细胞间缢裂面明显,细胞团似桑葚球状	1-9
原肠期 Gastrula stage	315	胚胎向两极延伸,出现原口,但不易看到	1-10
未孵化的担轮幼虫期 Non-hatched trochelminth larval stage	390	纤毛短而细,顶毛隐约可见,缓慢转动	1-11
孵化后担轮幼虫期 Hatched trochelminth larval stage	495	纤毛和顶毛剧烈摆动,间歇性撞击卵膜,破膜而出	1-12

2.1 受精卵阶段 成熟的羊鲍卵呈球形,米黄色,卵径为(0.19±0.02) mm,沉水性卵,在水体中分散分布。其最外层为富有弹性的卵膜,无粘性,卵膜与卵黄膜之间的卵周隙较明显(图1-1)。精、卵混合后5~10 min 精子完成入卵。刚受精的卵,动物极集中多数细胞质,所以动物极颜色比植物极深。在盐度31~32,水温28~29℃的条件下,受精后约10 min 排出第1极体(图1-2),15~20 min 排出第2极体(图1-3)。此时,受精卵吸水膨胀,卵径增大为(0.20±0.015) mm,形成较大的卵周隙。

2.2 卵裂阶段 受精后30 min,受精卵发生第1次卵裂,为纵裂。首先动物极出现裂缝,逐渐加深形成分裂沟,将受精卵一分为二,形成2个基本相等的分裂球,此时细胞进入2细胞期(图1-4)。受精后65 min,第2

次分裂开始,仍为纵裂。但第 2 次卵裂的分裂面与第 2 次垂直,并逐渐加深加大,将受精卵分裂成 4 个大小基本相等的分裂球(图 1-5)。受精后 95 min,开始第 3 次卵裂,此次分裂为横裂,分裂形式为不等裂,把受精卵分裂成 8 个大小不等的分裂球,共 2 层,其中动物极一端的 4 个分裂球较小,植物极一端的 4 个分裂球较大(图 1-6)。受精后 120 min,进行第 4 次卵裂,仍为横裂,横裂后形成 4 层分裂球,较大的一层位于植物极,其他较小的 3 层位于动物极(图 1-7)。受精 180 min 后,分裂面开始无序,分裂球小而生多,此时为多细胞期。受精后 260 min,细胞间缢裂面明显,细胞团似桑葚球状,内无空腔,进入桑葚胚期(图 1-9)。

2.3 原肠阶段 受精后 315 min,胚胎进入原肠胚期,且动物极分裂球小,植物极分裂球较大。分裂过程中,动物极分裂球不断变小,细胞间分界线不明显;植物极分裂球也减小,但仍较动物极大,此时胚体开始向两极不断延伸,外胚层小细胞外包植物极的大细胞,并在此位置出现隆起、形成原口,由于是小分裂球外包产生,故不易观察到(图 1-10)。

2.4 担轮幼虫阶段 受精后约 390 min,出现纤毛环,此时受精卵由圆球形变为卵长径为 (0.20 ± 0.02) mm、短径为 (0.16 ± 0.05) mm 的扁球形。最初长出的纤毛短而细,它的摆动使胚体在膜内缓慢旋转,随后幼体顶端出现顶毛(图 1-11),幼体在卵膜中每隔 20 s 转动 1 次。随着时间推移,孵化前幼体在卵膜内依靠纤毛环带和顶毛的不断摆动,间歇性撞击卵膜。接近出膜时,纤毛摆动更剧烈。胚体在卵子受精后的 495 min 脱膜孵化,成为孵化后的担轮幼体,幼体具有趋光性。羊鲍整个胚胎发育过程的有效积温为 $156.0 \sim 182.0$ 。

3 讨 论

3.1 羊鲍受精卵直径的特点 受精卵直径的大小直接影响羊鲍胚胎发育的速度,一般受精卵直径越大,胚胎发育速度越慢^[11-13]。本实验同时对比了耳鲍(*Haliotis asinina* Linnaeus)^[9]、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)^[10]、杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)^[12]的受精卵直径、发育温度、胚胎发育时间及有效积温。与其他鲍鱼相比,羊鲍的各项指标值适中(表 2)。在最适发育条件下,羊鲍胚胎发育速度和其他 3 种鲍鱼一样,都受到卵径的影响,卵径大小与胚胎发育时间呈正相关关系。但不同鲍鱼孵化时间一般相差 1~2 h,这相对于整个发育周期而言,差别较小,这一结论跟海洋珊瑚礁鱼类^[11]的卵径(种间差距超过 0.1 mm)和发育时间(种间差距达到 25 h)有显著差异的结论不一致,这可能跟鲍鱼卵径差异较小,胚胎发育时间短有关。

表 2 4 种鲍鱼受精卵的直径、胚胎发育过程的温度与发育所需时间

Tab. 2 Fertilized egg diameter, temperature and time needed for embryonic development in 4 *Haliotis* species

种类 Species	受精卵直径/mm Diameter of fertilized egg	最适发育温度/°C Development temperature	胚胎发育所需时间 Time for embryonic development	有效积温/(°C·h ⁻¹) Effective acc umulated temperature
羊鲍 <i>Haliotis ovina</i>	0.19 ± 0.02	24.0 ~ 28.0	6 h 30 min	156.0 ~ 182.0
耳鲍 <i>Haliotis asinina</i> Linnaeus	0.18 ± 0.02	28.0 ~ 29.0	5 h 30 min	154.0 ~ 159.5
皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus hannai</i>	0.22	22.0 ~ 23.0	7 h 30 min	165.0 ~ 172.5
杂色鲍 <i>Haliotis diversicolor</i>	0.16 ± 0.03	24.0 ~ 28.0	6 h 0 min	144.0 ~ 168.0

3.2 胚胎发育的主要影响因素 温度和盐度是羊鲍胚胎发育的直接影响因素^[14-15],本课题组就水温和盐度对羊鲍胚胎发育的影响进行了后期研究。发现在适宜水温范围内,受精卵发育速度能够随着温度的升高而加快。当水温过低时,胚胎发育出现停滞现象;当水温过高时,胚胎发育能够进行,但浮游幼体多出现畸形,且随着时间的延长,在水中不断呈螺旋状运动,最后衰竭而亡。在适宜盐度时,羊鲍胚胎发育正常,且孵化率高,畸形率低。而盐度过高或过低时,胚胎发育无法正常进行,孵化率明显降低,畸形率以及死亡率升高。这与同属于狭盐性种类的九孔鲍相似^[16],而与广盐性的文蛤差别较大^[17]。另外盐度可能对受精卵在水体中的分布产生影响^[18],盐度过低时,受精卵沉集在水体底部,无法得到足够的氧气,容易在 2 细胞期死亡。而盐度过高时,受精卵漂浮在水体表层,与水体接触不充分,无法进行正常物质交

换,导致分裂异常。结合以上温度、盐度对羊鲍生长发育影响的最适条件研究,为指导羊鲍育种提供重要理论依据。

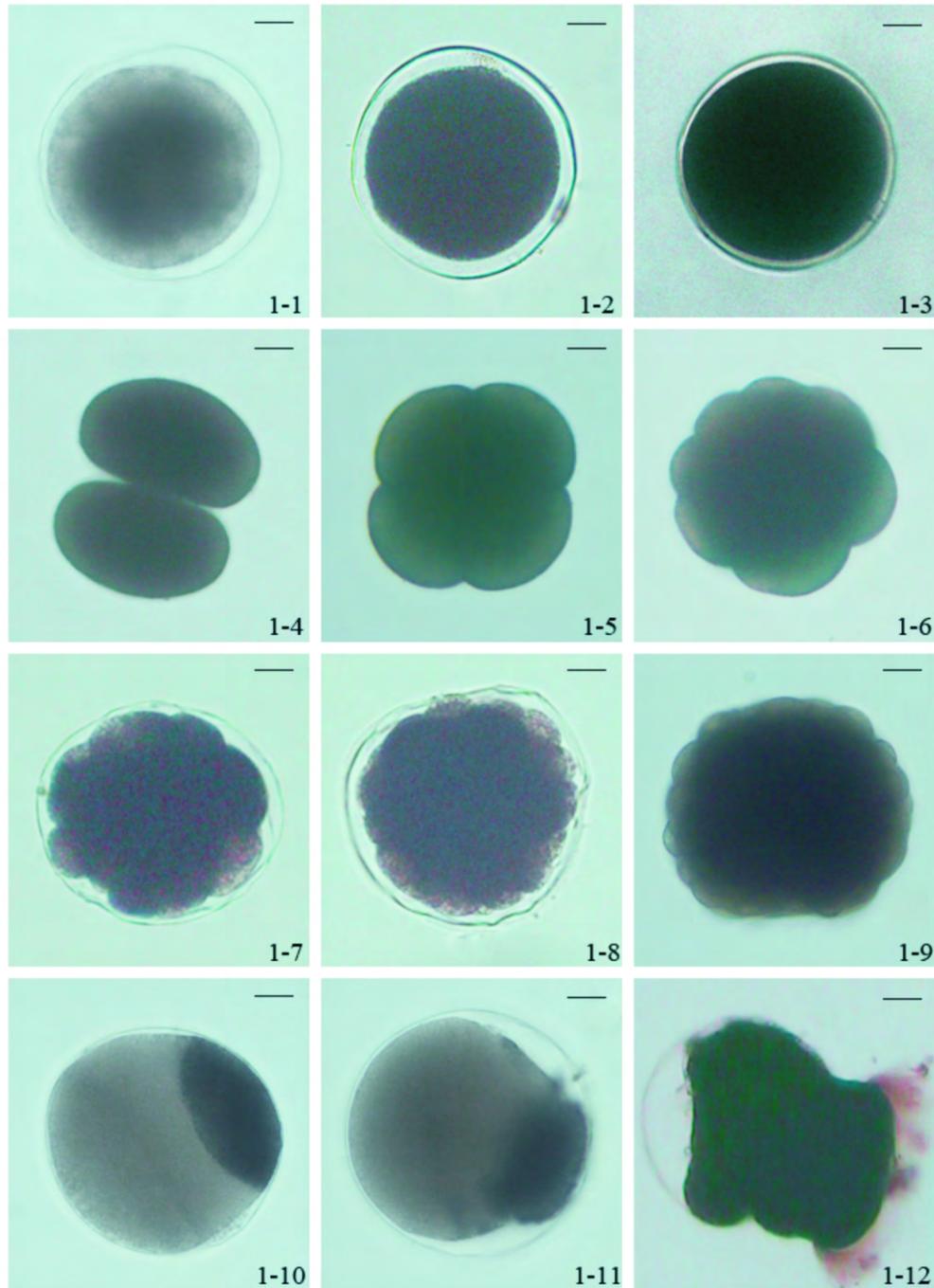


图1 羊鲍的胚胎发育

Fig. 1 Embryonic development of *Haliotis ovina*

1-1. 成熟卵; 1-2. 第1极体放出期; 1-3. 第2极体放出期; 1-4. 2细胞期; 1-5. 4细胞期; 1-6. 8细胞期; 1-7. 16细胞期; 1-8. 32细胞期; 1-9. 桑椹期; 1-10. 原肠期; 1-11. 未孵化担轮幼虫期; 1-12. 孵化后担轮幼虫期。标尺: 30 μm

1-1: The matured egg; 1-2: The 1-polar body stage; 1-3: The 2-polar body stage; 1-4: The 2-cell stage; 1-5: The 4-cell stage; 1-6: The 8-cell stage; 1-7: The 16-cell stage; 1-8: The 32-cell stage; 1-9: The morula stage; 1-10: The gastrula stage; 1-11: The non-hatched trochophore larval stage; 1-12: The trochophore larval stage. Scale bar: 30 μm

参考文献:

- [1] 聂宗庆,王素平. 鲍养殖实用技术[M]. 北京: 中国农业出版社 2000: 57 - 62.
- [2] 杨文杰,黄勃,王仁恩,等. 海南不同地理群体羊鲍 18S rDNA 的克隆与序列分析[J]. 安徽农业科学 2012 40(20): 10370 - 10373.
- [3] 张桂玲,黎中宝,谢德华. 羊鲍野生群体遗传多样性与分化的研究[J]. 海洋科学 2011 35(3): 12 - 16.
- [4] Li Z B. The genetic diversity and differentiation of *H. ovina* populations by allozyme analysis[C]. 13th International Congress on Genes, Gene Families and Isozymes-ICGGFI. Bologna: Medimond, 2006: 201 - 207.
- [5] Li Z B. The genetic diversity and differentiation of *Haliotis ovina* by AFLP [C]. 2009 International Conference on Environmental Science and Information Application Technology. Hong Kong: Engineering Technology Press 2009: 39 - 42.
- [6] Klinbunga S, Amparyup P, Leelatanawit R, et al. Species identification of the tropical abalone (*Haliotis asinina*, *Haliotis ovina*, and *Haliotis varia*) in Thailand using RAPD and SCAR markers[J]. Journal of biochemistry and molecular biology 2004, 37(2): 213 - 222.
- [7] 罗安,黄勃. 羊鲍精巢显微结构的研究[J]. 安徽农业科学 2012 40(31): 15279 - 15280.
- [8] 王如才,王昭萍,张建中. 海水贝类养殖学[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社 2008: 135.
- [9] 黄勃,邓中日,王小兵,等. 中国海耳鲍胚胎发育特征[J]. 海洋科学 2007 31(4): 68 - 72.
- [10] 陈木,卢豪魁,陈世杰. 皱纹盘鲍人工育苗的初步研究[J]. 动物学报 1977 23(1): 35 - 46.
- [11] 陈猛猛,骆剑,陈国华,等. 波纹唇鱼(*Cheilinus undulatus*)的胚胎发育及初孵仔鱼的形态观察[J]. 渔业科学进展, 2015 36(5): 38 - 44.
- [12] 吕军仪,陈志胜,吴金英,等. 杂色鲍的胚胎发育[J]. 动物学报 2001 47(3): 317 - 323.
- [13] Jarayabhand P, Kojima H, Menasveta P. Embryonic and larval developments, and early growth of hatchery - produced abalone (*Haliotis ovina* Gmelin, 1971) seed[J]. Thai Journal of Aquatic Science (Thailand) 1995 29(3): 342 - 346.
- [14] Lu J, Lin Q, Sun Y, et al. Effect of temperature on the early development of *Haliotis diversicolor* Reeve [J]. Journal of Shellfish Research 2004, 23(4): 963 - 966.
- [15] 阎希柱,王桂忠,李少菁. 盐度对九孔鲍能量收支影响[J]. 生态学杂志 2009 28(8): 1520 - 1524.
- [16] 林伟,杨治国. 盐度对九孔鲍胚胎发育及幼体附着率的影响[J]. 现代渔业信息 2009 24(11): 21 - 27.
- [17] 栗志民,刘志刚,姚茹. 温度和盐度对皱肋文蛤幼体存活与生长的影响[J]. 生态学报 2010 30(13): 3406 - 3413.
- [18] Petereit C, Hinrichsen H H, Voss R, et al. The influence of different salinity conditions on egg buoyancy and development and yolk sac larval survival and morphometric traits of Baltic Sea sprat (*Sprattus sprattus balticus* Schneider) [J]. Scientia Marina 2009 73(S1): 59 - 72.

Microscopic Observation of Embryonic Development of Abalone

DING Jingjing¹, HU Yaqiang¹, HUANG Bo¹, ZHOU Zhi¹, WANG Xiaobing², WANG Lingui¹

(1. College of Oceanography, Hainan University, Haikou, Hainan 570228;

2. Public Lab Center, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: The embryonic developmental process of *Haliotis ovina* in the seas of China were observed microscopically to understand the life activity of *H. ovina* in ontogenesis. Observations showed that *H. ovina* mature eggs were spherical and beige, with an average egg diameter being (0.19 ± 0.02) mm. In the sea water under the salinity of 32 ‰ and water temperature of 28 °C, it took 390 min for *H. ovina* to hatch from fertilization, with an average cumulative temperature of 156 - 182 °C · h⁻¹. Morphological and characteristic observations showed the embryonic development process could be divided into 4 stages, fertilized egg stage, cell division stage, gastrula stage and trochelmith larval stage, and 11 development periods. *H. ovina* developed embryonically about 1 hour faster than *Haliotis discus hannai* developing under suitable conditions but slower than *H. diversicolor* and *H. asinine*.

Keywords: *Haliotis ovina*; embryonic development; microscopic observation