

中国海耳鲍胚胎发育特征

黄 勃¹, 邓中日², 王小兵³, 周 智¹

(1. 海南大学 海洋学院, 海南 海口 570228; 2. 湖南城市学院 化学与环境工程系, 湖南 益阳 413000; 3. 海南大学 公共实验中心, 海南 海口 570228)

摘要: 利用显微技术对耳鲍 (*Haliotis asinine* Linnaeus) 的胚胎发育进行了研究, 同时观察到孵化后的担轮幼虫。结果表明, 耳鲍胚胎发育过程与皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 和杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 基本相似, 胚胎发育过程分为受精期、第一极体放出期、第二极体放出期、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。在海水质量密度 1.024, 水温 28 的条件下, 耳鲍完成胚胎发育历时约 5 h 30 min, 比皱纹盘鲍 (海水质量密度 1.022 ~ 1.023, 水温 22.5)、杂色鲍 (海水质量密度 1.022 ~ 1.023, 水温 24 ~ 26) 分别快 1.5 ~ 2.5 h 和 0.5 h。耳鲍成熟卵卵径为 0.18 ~ 0.19 mm, 担轮幼虫具有 1 束顶毛和 2 个纤毛环带。

关键词: 耳鲍 (*Haliotis asinine* Linnaeus); 胚胎发育

中图分类号: Q954.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2007)04-0068-05

耳鲍 (*Haliotis asinine* Linnaeus) 俗称驴耳鲍, 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*), 是一种海产经济贝类, 具有极高的食用价值和药用价值。耳鲍与九孔鲍 (*Haliotis diversicolor aquatilis*)、杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 同属暖水性种, 分布于热带和亚热带海域, 在中国主要分布在南海海域, 是海南重要的鲍鱼经济品种之一。

目前国内外对耳鲍研究的报道不多^[1-7], 中国海耳鲍胚胎发育的研究未见报道。对中国海域耳鲍的胚胎发育进行研究, 不仅可以了解其生殖生物学的相关知识, 而且对它的人工育苗具有重要的指导作用。

1 材料和方法

1.1 成熟卵与精子的收集

胚胎发育所用的成熟卵与精子均来自海南鲍鱼场。耳鲍经诱导产卵、排精后, 立即收集圆形、呈分散状态、下沉底部的卵与活泼的精子用于胚胎发育研究^[8]。

1.2 人工授精

将鲍卵收集到一个塑料容器中, 卵子密度保持

在 30 粒/ mL 左右, 再加入适量的精子密度为 1×10^5 个/ mL 的海水, 同时不断轻轻搅动水体, 以加速精卵结合。受精 10 min 后洗卵, 将上层的清水轻轻换出 60% 左右, 然后注入经紫外线照射过的海水。待卵下沉后, 再次洗卵, 共洗卵 4 次, 洗卵水温稳定在 28 , 海水质量密度稳定在 1.024。

1.3 观察记录

受精前, 在显微镜下观察卵的形状和颜色; 受精后, 每隔 10 min 取一次样, 在显微镜下观察、计数; 胚胎发育进入 16 细胞期后, 每隔 40 min 取样, 显微镜下观察、计数; 桑椹期后每隔 60 min 取样观察胚胎发育情况。在胚胎发育期间, 保持水温和海水质量密度的相对稳定。

1.4 显微照相

在显微观察、计数的同时, 及时取样, 用 10% 的

收稿日期: 2005-11-20; 修回日期: 2006-02-10

基金项目: 国家 863 计划项目 (2004AA603130); 国家自然科学基金项目 (40366001); 教育部科学技术研究重点项目 (03146); 海南省外国专家局项目 (20031211)

作者简介: 黄勃 (1965-), 博士, 教授, 研究方向: 海洋生物, 水产养殖, E-mail: huangbohbl@163.com

福尔马林固定,返校后,OL YMPUS IX71 倒置荧光显微镜观察和照相。

2 结果

耳鲍成熟卵呈圆球形,米黄色,无粘性,分散状分布,卵径约为 0.18 ~ 0.19 mm (图 1-1),属沉性的匀黄卵。

耳鲍胚胎发育过程与皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*)、杂色鲍基本相似,可分为受精期、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,作者还观察到孵化后担轮幼虫的出现(表 1)。

耳鲍卵在海水质量密度 1.024,水温 28 的条件下受精,约 10 min 时,在动物极的顶端出现第一极体,同时也发现有第二极体的受精卵存在,分别约占 70% 和 30% (图 1-2,图 1-3)。

受精后 20 min,进行第一次纵裂,在卵轴的平面上分为 2 个大小基本相等的细胞,为 2 细胞期(图 1-4)。此时镜检计数,2 细胞期约占镜检胚胎总数的 30%;10 min 后,约占 60%;再过 10 min 后,约占 98%。

受精 50 min 后,镜检计数,4 细胞期的胚胎占 25%,这是由于受精卵进行第二次纵裂,分裂面与第一次卵裂面垂直,卵裂后形成了 4 个大小基本相等的分裂球而进入 4 细胞期(图 1-5);10 min 后,4 细胞期胚胎约占 85%;再过 10 min 后,约占 97%。

受精后 80 min,发现有 8 细胞期的胚胎出现,占镜检胚胎总数的 90%。8 细胞期的出现是在 4 细胞期的基础上,进行了第 3 次卵裂,此次分裂为横裂,分裂形式为不等裂,卵裂后形成了两层共 8 个分裂球,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 90 min,出现 16 细胞期的胚胎(图 1-7)。16 细胞期的出现是在 8 细胞期的基础上再次进行一次横裂,横裂后形成 4 层分裂球,其中 3 层较小,只有植物极的 1 层较大。此时,镜检计数,16 细胞期的胚胎约占 95%。

受精后 130 min,出现 32 细胞期的胚胎(图 1-8),镜检计数,约占 75%。

受精后 170 min,进入桑椹期(图 1-9),胚胎发育成桑椹状,胚胎的内部没有出现空腔,组成胚胎的细

胞非常小。此时镜检计数,桑椹期胚胎约占 10%,40 min 后,桑椹期胚胎约占 80%。

受精后 270 min,出现原肠期胚胎(图 1-10),胚胎向两极延伸,原口出现,植物极细胞部分内陷形成原肠腔。由于植物极细胞被动物极小细胞外包,不易看到。此时,镜检计数,原肠期胚胎约占 28%。

受精后 330 min,出现未孵化的担轮幼虫(图 1-11),镜检计数,未孵化的担轮幼虫约占 98%。此时胚胎出现纤毛环带,顶毛隐约可见,幼虫在卵膜内缓慢转动,大约每 10 ~ 20 s 转动 1 次。

受精后 9 h 30 min,出现约 70% 担轮幼虫浮游(图 1-12),发现约 30% 的未孵化担轮幼虫依靠纤毛环和顶毛的剧烈摆动,有规律地向前冲击卵膜,每次撞击间歇 5 ~ 10 s,接近出膜时,纤毛摆动更剧烈,直至破膜而出。破膜后的担轮幼虫大多上浮到孵化容器的中上层。

3 讨论

耳鲍成熟卵卵径约 0.18 ~ 0.19 mm,较皱纹盘鲍(0.22 mm)和杂色鲍(0.2 mm)小,这可能主要与耳鲍卵用 10% 福尔马林固定后引起脱水缩小有关,也可能是种间差异的表现。与皱纹盘鲍和杂色鲍一致,耳鲍胚胎发育过程中出现 1 束顶毛和 2 个纤毛环带,孵化前的担轮幼虫主要依靠顶毛和纤毛环带的剧烈摆动冲击卵膜,最后破膜而出,发育为孵化后的担轮幼虫。

陈木等^[9]将鲍的发育划分为胚胎发育、胚后发育和幼鲍三个阶段。吕军仪等^[10]研究杂色鲍的胚胎发育时,在卵裂阶段增加了受精期、第一极体放出期和第二极体放出期,认为当第一极体和第二极体放出时,鲍卵已受精,可用于指导进行人工洗卵。作者在研究耳鲍胚胎发育过程时,也观察到第一极体和第二极体的放出,此时进行洗卵,可及时洗去海水中过量的精子,避免受精卵继续受到精子的攻击而发生畸形,对耳鲍人工育苗有重要的指导作用。

不同种类鲍的胚胎发育直接受到温度的影响^[9],同一种鲍在不同水温条件下,胚胎发育的速度亦不同,当水温在 18 ~ 34 范围内时,随着水温的升高,胚胎发育的速度加快^[10]。在海水质量密度 1.024,水温 28 的条件下,耳鲍开始卵裂的时间比皱纹盘鲍(海水质量密度 1.022 ~ 1.023,水温 22.5)、杂色鲍(海水质量密度 1.022 ~ 1.023,水温 24 ~ 26)早;耳鲍

完成胚胎发育历时约5 h 30 min,比皱纹盘鲍、杂色鲍分别快1.5~2.5 h和0.5 h;耳鲍发育成孵化后担轮幼虫所需时间与杂色鲍大体相当,比皱纹盘鲍约快0.5 h~2.5 h(表1)。鲍胚胎发育速度的快慢可能与不同的物种和胚胎发育所处条件(水温等)有关。

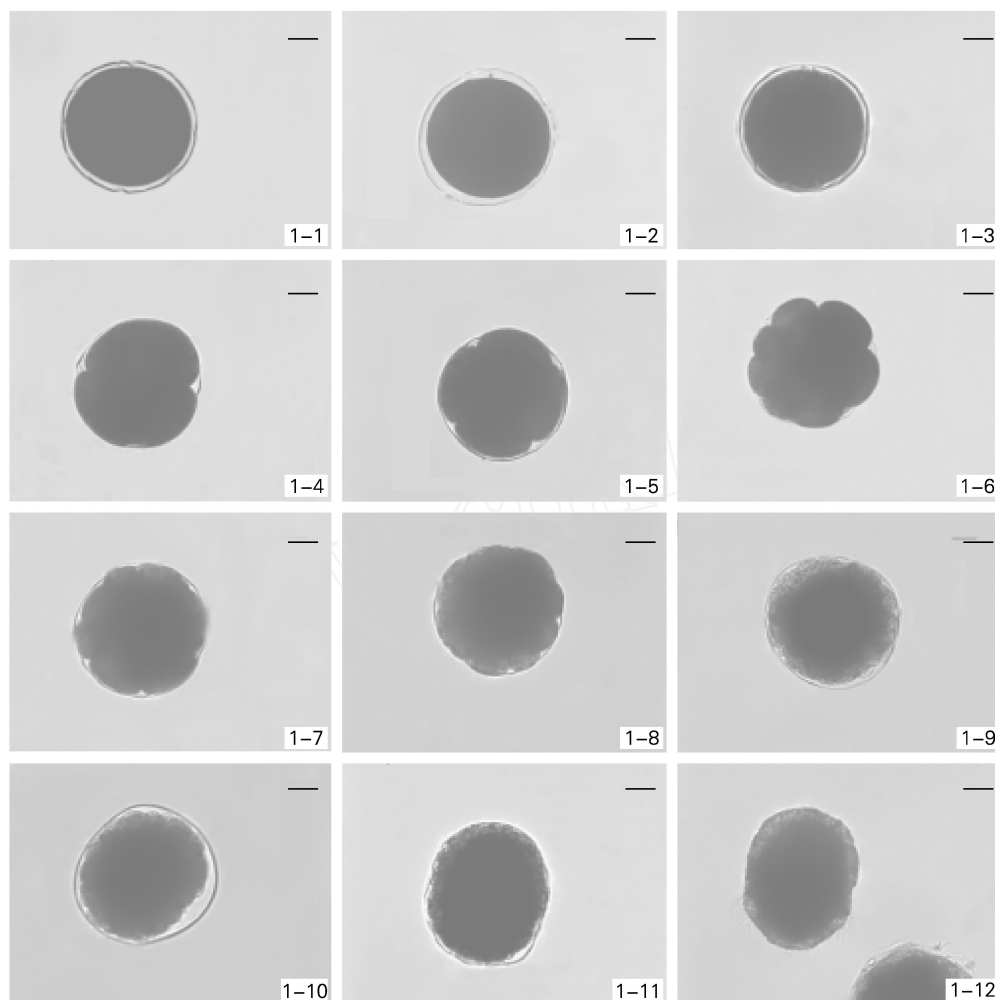


图1 耳鲍的胚胎发育

Fig. 1 Embryonic development of *Haliotis asinine*

1-1. 成熟卵;1-2. 第一极体放出期;1-3. 第二极体放出期;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 first polar body stage;1-3. The second 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 larva stage;1-12. The trochophore larva stage. Scale bar: 30 μm

表 1 耳鲍胚胎发育及其与皱纹盘鲍、杂色鲍的比较

Tab. 1 Embryonic development of *H. asininna* and comparison with *H. discus hannai* and *H. diversicolor*

发育阶段	耳鲍		皱纹盘鲍发育 时间	杂色鲍发育 时间
	发育时间(min)	该发育阶段胚胎所占比例 (%)		
第一极体放出期	10	70	15 min	20 min
第二极体放出期	10	30		
	20	30		
2 细胞期	30	60	40 ~ 50 min	45 min
	40	98		
	50	25		
4 细胞期	60	85	80 min	60 min
	70	97		
8 细胞期	80	90	120 min	80 min
16 细胞期	90	95	160 min	100 min
32 细胞期	130	75		
	170	10		
桑椹期	210	80	195 min	150 min
原肠期	270	28	6 h	4 h 15 min
未孵化的担轮幼虫	330	98	7 ~ 8 h	6 h

参考文献:

- [1] 黄勃,王小兵,刘杰俊.耳鲍人工养殖的可行性研究[J].海洋科学,2002,26(7):40-41.
- [2] Emmanuel C, Capinpin J R. Studies on the reproductive biology of Donkey's ear abalone, *Haliotis asinina* Linne [J]. **HAquaculture**, 1998, **166**(1-2):141-150.
- [3] Tanate K. Induced spawning, seed production, and juvenile growth of the donkey's ear abalone *Haliotis asinina* Linne, 1758 (EN) [J]. **Thai Fisheries Gazette (Thailand)**, 1998, **51**(5):433-439.
- [4] Somjai A. Characterization of trabecular cells in the gonad of *Haliotis asinina* Linnaeus [J]. **Journal of Shellfish Research**, 2001, **1**(20):717-724.
- [5] Teruel M N, Millamena O M, Fermin A C. Reproductive performance of hatchery-bred donkey's ear abalone, *Haliotis asinina* Linne, fed natural and artificial diets [J]. **Aquaculture Research**, 2001, **32**(11):249-254.
- [6] Chanpoo M. Localization of egg-laying hormone in the gonads of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus [J]. **Journal of Shellfish Research**, 2001, **1**(20):725-731.
- [7] Maliao R J. A survey of stock of the donkey's ear abalone, *Haliotis asinina* L. in the sagay Marine Reserve, Philippines:evaluating the effectiveness of marine protected area enforcement [J]. **Fisheries Research**, 2004, **66**(2-3):343-353.
- [8] 王如才,王昭萍,张建中.海水贝类养殖学[M].青岛:青岛海洋大学出版社,1993.135.
- [9] 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.
- [10] 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.

Embryonic development of abalone (*Haliotis asinine* Linnaeus) in the Chinese seas

HUANG Bo¹, DENG Zhong-ri², WANG Xiao-bing³, ZHOU Zhi¹

(1. College of Oceanography, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Department of Chemistry and Environmental Engineering, Hunan City University, Yiyang 413000, China; 3. Public Lab Center, Hainan University, Haikou 570228, China)

Received: Nov. , 20, 2005

Key words: *Haliotis asinina* Linnaeus; embryonic development

Abstract : For promoting and improving mariculture of *Haliotis asinina* Linnaeus, the embryonic development of the abalone was studied using microtechnique, and the trochelminth larva was observed. The results showed that the embryonic development of *H. asinina* resembled those of *Haliotis discus hannai* and *Haliotis diversicolor*, and was divided into 11 periods of comprising fertilization as follows: the first polar body stage, the second polar body stage, 2-cell stage, 4-cell stage, 8-cell stage, 16-cell stage, 32-cell stage, morula stage, gastrula stage and non-hatched trochelminth larva stage. Under seawater specific gravity 1.024 and water temperature 28 °C, the embryonic development of *H. asinina* needed about 5 and half hours, which developed faster about 1.5 to 2.5 hours than *H. discus hannai* (seawater specific gravity 1.022 ~ 1.023 and water temperature 22.5 °C), and half an hour than *H. diversicolor* (seawater specific gravity 1.022 ~ 1.023 and water temperature 24 ~ 26 °C). The diameter of the matured egg was about 0.18 ~ 0.19 mm; the larva had a bundle of vertical seta and two cilia-clitellums.

(本文编辑:张培新)

(上接第 4 页)

An efficient methodology of sperm cryopreservation of large yellow croaker (*Pseudosciaena croce*)

XIAO Zhi-zhong¹, CHEN Xiong-fang², DING Fu-hong^{1,3}, LIU Qing-hua^{1,3}, XU Shi-hong¹, LI Jun¹

(1. Center of Marine Biotechnology Research & Department, Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Chongqing College of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China; 3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Aug. , 8, 2005

Key words: cryopreservation; cryoprotectant; large yellow croaker (*Pseudosciaena croce*); sperm; motility; fertility

Abstract : In the present study, a great deal of yellow croaker (*Pseudosciaena croce*) sperm were efficiently cryopreserved in 2 mL cryovials by using a programmable freezer. The motility and fertility of both fresh and post-thaw sperm were investigated in order to optimize the spermatozoa cryopreservation protocols for red large yellow croaker. Five cryoprotectants with different concentrations, three cooling rates (10, 20 and 30 °C/min) from 0 °C to -180 °C as well as two thawing temperatures (28 °C and 43 °C) were designed and tested in the sperm cryopreservation, and their effects on post-thaw sperm motility were studied. Optimal post-thaw motility (76.6% ± 11.4% ~ 80.0% ± 12.6%) was achieved when using Hanks' supplemented with 10% to 20% glycerol or 10% dimethyl sulfoxide in combination with 20 °C/min cooling rate, and thawing in 43 °C water bath. Furthermore, optimal fertilization rate of sperm frozen with 10% glycerol and hatching rate were obtained, which were similar to those of fresh sperm.

(本文编辑:刘珊珊)