

不同生长时期虾夷扇贝壳质的超微结构观察及表面 5 种元素组成分析

庞云龙, 丁君, 田莹, 郝振林, 常亚青

(大连海洋大学 农业部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: 以人工吊养的已明确月龄的(5 月龄、7 月龄、9 月龄、12 月龄、18 月龄、30 月龄)虾夷扇贝(*Patinopecten (Mizuhopecten) yessoensis*)为实验材料, 从壳顶沿生长线方向纵切, 用扫描电镜观察了不同生长时期贝壳的壳质结构, 并探讨了虾夷扇贝生长发育过程中壳质结构的一般性变化规律。结果表明, 虾夷扇贝壳质包括均质型(homogeneous)、叶状型(foliated)、交错片状型(crossed lamellar)、棱柱型(prismatic)4 种结构类型。随着生长期的增加, 壳质结构逐渐趋向于复杂, 叶状结构和交错片状结构的比例增加。同时分析比较了同一时期“象牙白”品系和普通红褐色虾夷扇贝的贝壳外表面 5 种化学元素的含量, “象牙白”品系和普通红褐色贝壳所含的 C、O、Na、Mg、Ca 5 种元素质量分数分别为: 24.26%、60.44%、0.63%、0.48%、14.18%和 18.24%、56.48%、0.52%、0.36%、24.41%。

关键词: 虾夷扇贝(*Patinopecten (Mizuhopecten) yessoensis*); 扫描电镜; 壳质结构

中图分类号: Q954 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)08-0028-07

doi: 10.11759/hyxx20141118002

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)属软体动物门(Mollusa)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、翼形亚纲(Pterimorphia)、珍珠贝目(Pterioida)、扇贝科(Pectinidae), 为冷水性种, 自然分布于日本海、俄罗斯远东海域, 自 20 世纪 80 年代初由日本青森县陆奥湾引入中国海域, 目前已成为中国北方沿海地区重要的养殖经济贝类之一^[1]。虾夷扇贝左壳小而平、呈红褐或紫褐色, 右壳稍大而凸、呈白色, 近些年也发现左右壳均呈白色的个体, 并且表现出一定的优势^[2-3]。目前对虾夷扇贝的研究主要集中在生产养殖^[4-5]、群体遗传多样性和种质^[6-7]、蛋白质组学^[8]、营养成分等方面^[2, 9]。关于虾夷扇贝壳超微结构的相关研究极少报道。

双壳类的壳壁从壳质成分上可分为有机质层和无机质层(即碳酸钙层)两部分, 有机质层覆于壳体最表面, 故称表壳层(Periostracum), 表壳层的作用首先是保护壳体的钙质部分。钙质部分结构就是通常所称的壳质结构^[10]。钙质层一般可分为三层: 外壳层(outer layer), 中壳层(middle layer), 和内壳层(inner layer)^[10-11]。双壳类外壳层包括均质结构和叶状结构, 成分为方解石; 中壳层由文石结构组成, 包括片状结构和棱柱结构; 内壳层为片状结构部分叶状结构。本实验所使用壳质结构的专业术语参考陈

金华^[10]和 Carter^[12]。

贝壳的壳质结构研究由光学显微镜的使用而开展^[13]。随着电子显微镜技术的发展, 20 世纪 60 年代后期, 主要应用扫描电子显微镜对壳质结构进行分析研究。目前国内外关于软体动物壳质超微结构的报道较少, 梁艳^[14]研究了腹足纲香螺贝壳在生长过程中不同时期的壳体材料结构及力学性能; 冯伟民^[15-16]对陆栖肺螺类与半咸水螺类的壳质超微结构进行了对比研究, 阐述了腹足类个体发育中壳质结构的变化; Younis^[17]研究了长刺古螺(*Murex trosccheli*)壳质的原子结构和超微结构; West^[18]对淡水腹足类壳质超微结构做了相关研究。Dauphin^[19]对 6 种双壳类和腹足类壳的化学组成以及超微结构做了详细研究; Villagran^[20]利用扫描电镜技术观察到紫贻贝(*Mytilus edulis*)经过风化作用后产生了一种新的壳质结构。为探究不同生长时期虾夷扇贝的壳质结构, 本实验以大连海洋大学农业部北方海水增养殖重点实验室培育的不同生长时期的虾夷扇贝作为实验材料,

收稿日期: 2014-11-18; 修回日期: 2015-02-14

基金项目: 国家“863”计划项目(2012AA10A410)

作者简介: 庞云龙(1988-), 男, 硕士研究生, 从事海洋生物学研究, E-mail: tclpang@163.com; 常亚青, 通信作者, 教授, 博士生导师, E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

使用扫描电镜观察了不同月龄贝壳的超微结构,明确了不同发育阶段虾夷扇贝的壳质结构类型,以期丰富双壳贝类的壳质结构积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验所用虾夷扇贝取自大连海洋大学农业部北方海水增殖重点实验室培育并吊养的已明确月龄的(5月龄、7月龄、9月龄、12月龄、18月龄、30月龄)虾夷扇贝(图1)。其中5月龄样品分为红壳和白壳2种,共计7种,每种随机取5只观测。贝壳表型信息如表1所示。

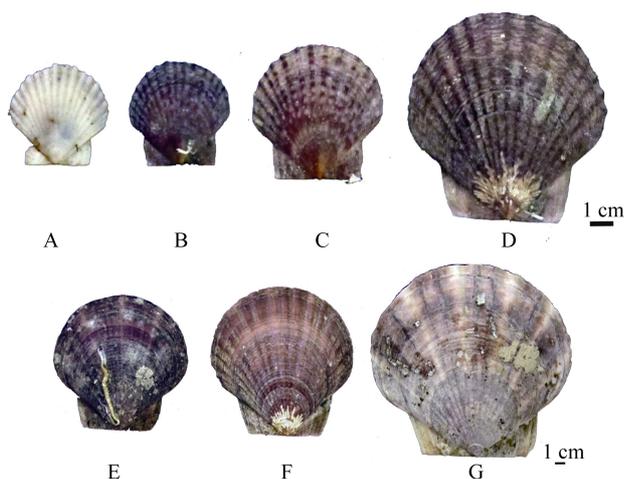


图1 不同时期虾夷扇贝左壳

Fig.1 The left valve of *Patinopecten yessoensis* at different ages

A: 5月龄“象牙白”; B: 5月龄普通红褐色贝; C: 7月龄普通红褐色贝; D: 9月龄普通红褐色贝

E: 12月龄普通红褐色贝; F: 18月龄普通红褐色贝; G: 30月龄普通红褐色贝

表1 不同生长时期虾夷扇贝形态指标测量

Tab.1 The morphological index of *Patinopecten yessoensis* at different ages

编号	生长阶段(月龄)	壳长(mm)	壳高(mm)
5R01	5	21.50	22.37
5W02	5	16.10	17.06
7R01	7	22.67	23.85
9R02	9	36.90	39.06
12R02	12	59.70	60.42
18R01	18	66.19	68.83
30R01	30	104.00	103.08

注: R代表普通虾夷扇贝红褐色贝壳, W代表“象牙白”品系的白色贝壳, 01和02代表个体编号

实验所用仪器: 超声波清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司产品), 多功能台锯(永康市新纪元工贸有限公司产品), 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司产品), 扫描电镜(德国 ZEISS 上海有限公司产品)。

实验在大连海洋大学农业部北方海水增殖重点实验室进行样品处理, 在大连海事大学进行电镜观察。

1.2 方法

本实验的步骤和样品处理方法采用 Carter 方法并略有改进^[21], 具体操作步骤如下:

将样品用毛刷将贝壳表面的泥土和附着物刷洗干净, 对样品进行编号、拍照, 然后沿贝壳壳顶中心点至壳口中点进行切割, 切割后得到贝壳的两个截面, 距壳顶每隔1 cm取样, 大小规格约为1 cm×1 cm。将切割得到的剖面用800目的玻璃进行打磨, 每个剖面打磨至少1 min。把样品放入超声波震荡清洗仪中清洗。每件样品清洗30 s左右。清洗之后, 将样品放入1%的过氧化氢(H₂O₂)溶液中浸泡, 约3 h, 在放入超声波震荡清洗仪中清洗, 30s。清洗后的样品用镊子取出放入恒温干燥箱中烘干, 45℃, 48 h。先在显微镜下观察壳质结构是否清晰, 如果能够清晰展示, 则继续下一步。如不能则重复步骤4~9。将准备好的样品用镊子放置在电镜纽扣上, 喷金, 在扫描电镜下进行观察实验结果, 同时通过扫描电镜的能谱成分分析功能对壳表面元素组成和含量进行测定。

2 结果

2.1 虾夷扇贝壳质结构类型

双壳类的壳质超微结构呈多层分布, 组成这些层的晶体排列方向和矿物成分不尽相同。虾夷扇贝从矿物成分上可分为2种: 文石(aragonite)和方解石(calcite)。从壳质结构上可以分为4种主要类型: 均质型结构(homogeneous)、叶状型结构(foliated)、交错片状结构(crossed lamellar)、棱柱型结构(prismatic), 均质型结构又可分为均质型结构(homogeneous)和颗粒状均质结构(granular homogeneous)。叶状型结构根据首级片体的结构模型可分为交错叶状结构(crossed foliated)、规则叶状结构(regular foliated)和不规则叶状结构(irregular foliated)。交错片状结构分为交错片状结构(crossed lamellar)和复杂交错片状结构(complex crossed lamellar)。虾夷扇贝左壳纵切面扫描电镜图片见图2。

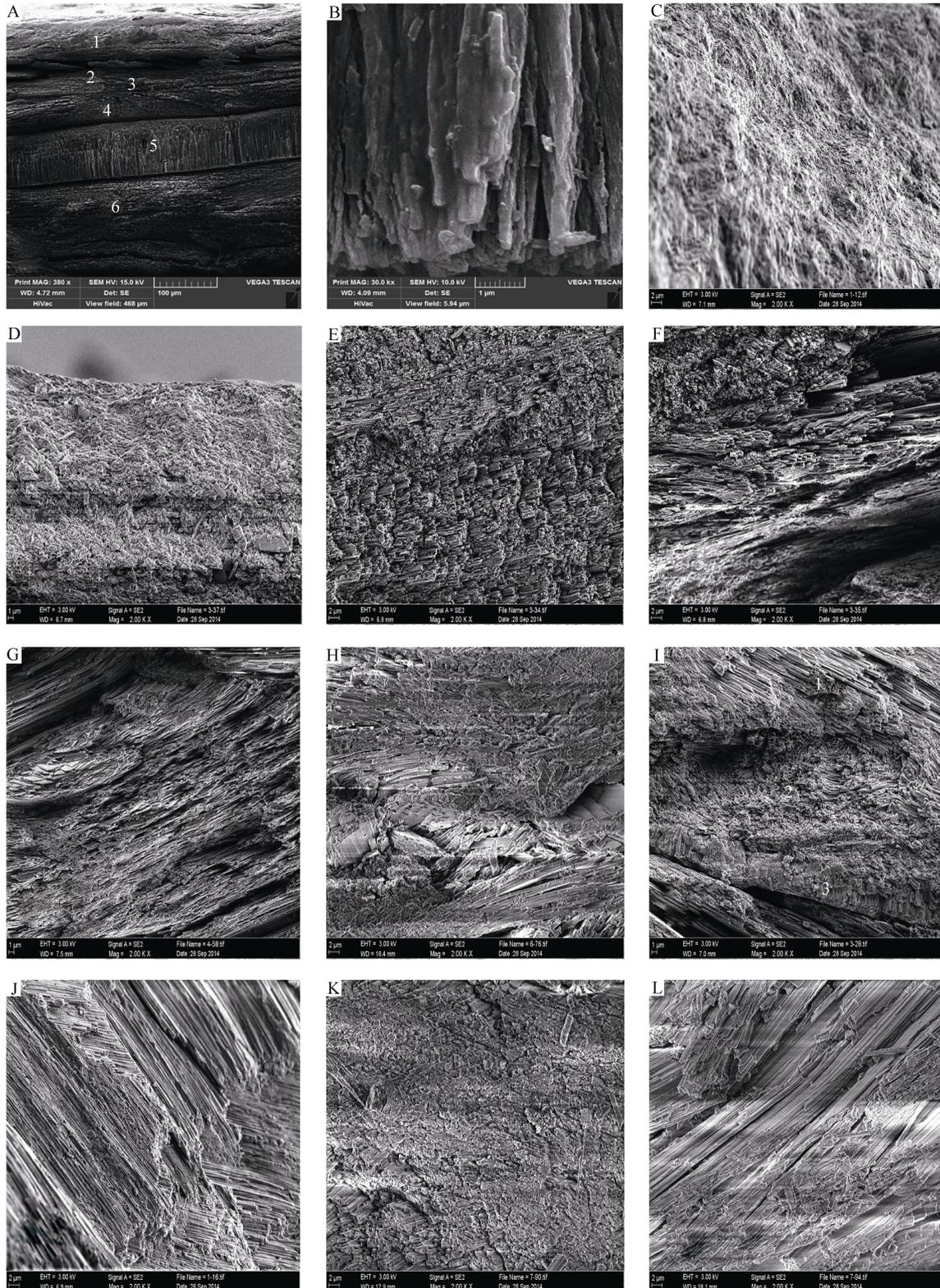


图 2 虾夷扇贝左壳纵切面扫描电镜图片

Fig. 2 SEM photomicrographs showing the vertical section of the left valve of *Patinopecten yessoensis*

A: 1. 均质结构, 2. 交错叶状结构, 3. 外层规则叶状结构, 4. 交错片状结构, 5. 棱柱结构, 6. 内层规则叶状结构; B: 棱柱结构; C: 均质结构; D: 均质结构(上), 颗粒状均质结构(下); E: 交错叶状结构; F: 交错叶状结构(上), 外层的规则叶状结构(下); G: 内层的规则叶状结构; H: 不规则叶状结构(右上、左下), 规则叶状结构(中); I: 1. 交错片状结构, 2. 较规则的板状结构, 3. 棱柱结构; J: 交错片状结构; K: 复杂交错片状结构; L: 交错片状结构

2.1.1 均质型结构(homogeneous)

壳质结构最外层是很薄的方解石结构, 位于叶状结构之上。通过观察不同的样品可以将均质型结构分为上下 2 种亚层, 上层结构为均匀致密亚层, 如图 2C、2D(上)。下层结构为颗粒状亚层, 如图 2D(下), 由不规则的晶体构成, 大小不一。

2.1.2 叶状型结构(foliated)

叶状结构是由 3 个层级的片体构成, 3 级片体 lamellae(third-order lamella)构成次级片体 sheets (second-order lamella), 首级片体(first-order lamella)由次级片体构成。根据首级片体的结构模型又可以将叶状结构分为以下几种类型。

交错叶状结构(crossed foliated) 通常分布在最外层均质结构下面的一层方解石结构, 首级片体的方向一致。交错排列。如图 2E。

规则叶状结构(regular foliated) 具有相同的倾斜角度的片状方解石结构。规则叶状结构在壳的外层, 和壳内层均有分布。壳外层的规则叶状结构与交错叶状结构相接, 图 2F; 壳内层的规则叶状结构位于交错片状结构之下, 如图 2G。

不规则叶状结构(irregular foliated) 分布具有区域性, 在局部分布广泛。首级片体没有固定的方向性, 与前 2 种叶状结构的区别在于它的形状不规则, 树枝状排布, 而且明显小于前 2 种结构, 如图 2H。在分布上这 3 种结构通常是过渡式的排列, 由外向内为交错叶状结构过渡为规则叶状结构, 再到不规则叶状结构, 如图 2F。

叶状结构的分布大致可分为 2 种情况: (1)分布在较外层, 均质结构之下, 贯穿整个贝壳, 规则叶状结构从壳顶延伸至壳腹缘, 交错叶状结构覆在其上面, 从腹缘至背缘逐渐变薄。(2)内层的规则叶状结构分布在片状结构之下, 是贝壳内层的主要结构。内

外两部分只有在壳顶区域才有接触。

2.1.3 交错片状结构(crossed lamellar)

交错片状的首级片体由互相平行的文石晶体聚集而成。在相邻的首级片体中, 次级片体长轴可能在两个相反的方向上交替排列。复杂交错片状结构(complex crossed lamellar)更加复杂, 在三个或者更多的方向上分布排列。这种排列方式可以增加壳的抗击能力。交错结构被棱柱结构分隔为上下两个亚层, 棱柱结构上面的交错片状亚层的首级片体长而且形状规则, 如图 2J, 最显著的特征是分支状的首级片体; 内部交错片状亚层主要是复杂交错片状结构, 与外部亚层相比首级片体较短, 而且形状更加不规则, 如图 2K。

2.1.4 棱柱型结构(prismatic)

棱柱结构是由长条形的棱柱构成, 楔形或 V 字形, 长远大于宽, 成分为文石。如图 2B。棱柱形状简单, 边界笔直或不规则, 直径 1~3 μm。棱柱结构分布在交错片状结构和复杂交错片状结构之间, 厚度从闭壳肌痕处向四周呈放射状逐渐变薄。

2.2 不同时期虾夷扇贝的壳质结构组成

壳顶是贝壳发生的最初点, 也被称作胎壳。本实验以不同生长阶段的虾夷扇贝为实验材料, 距壳顶每隔 1cm 取样进行电镜观察。分析不同阶段的扇贝所具有的壳质结构类型, 结果见表 2。5 月龄的壳质结构组成种类较少, 包括 3 种结构类型, 即均质结构、叶状结构、交错片状结构。7~30 月龄的壳质结构类型组成基本保持稳定, 但也存在差异, 如复杂交错片状结构只在 18 月龄和 30 月龄中出现。

2.3 同一时期不同壳色虾夷扇贝的壳质元素组成

本实验分析了不同壳色虾夷扇贝壳表面的化学

表 2 不同时期虾夷扇贝壳质结构
Tab.2 Shell structure at different ages

结构类型	生长阶段(月龄)					
	5	7	9	12	18	30
均质结构	+	+	+	+	+	+
交错叶状结构	-	+	+	+	+	+
规则叶状结构	+	+	+	+	+	+
不规则叶状结构	-	+	-	+	+	+
交错片状结构	+	+	+	+	+	+
复杂交错叶状结构	-	-	-	-	+	+
棱柱结构	-	+	+	+	+	+

元素组成。对 5 月龄虾夷扇贝“象牙白”品系和普通红褐色虾夷扇贝的贝壳表面 5 种化学元素含量进行了分析。如表 3 和表 4。结果表明:除 Ca 外,“象牙白”品系和普通红褐色贝壳所含的 C、O、Na、Mg 4 种元素比例差异较小,而 Ca 元素的含量在 2 种贝壳中的差异较显著。从表中可以看出 O、C、Ca 3 种元素在贝壳中的含量均较高,其中 O 元素含量的百分比在 2 种贝壳中均显示最高,分别为 60.44%和 56.48%;Mg 元素含量的百分比均显示最低,分别为 0.48%和 0.36%。

表 3 “象牙白”外壳表面元素分析

Tab.3 The shell surface elemental analysis of “Ivory” strains of *Patinopecten yessoensis*

元素	质量分数(%)	原子(%)
C	24.26	32.59
O	60.44	60.94
Na	0.63	0.44
Mg	0.48	0.32
Ca	14.18	5.71

表 4 普通红褐色虾夷扇贝外壳表面元素分析

Tab.4 The shell surface elemental analysis of ordinary individuals

元素	质量分数(%)	原子(%)
C	18.24	26.66
O	56.48	61.99
Na	0.52	0.40
Mg	0.36	0.26
Ca	24.41	10.69

3 讨论

3.1 不同生长时期壳质超微结构类型比较分析

研究不同月龄贝壳壳顶处的超微结构发现,随着月龄的增长,壳质超微结构的主要类型稍有差异,但基本保持稳定。实验观察到 5 月龄壳质结构类型较少,主要由均质结构、规则叶状结构和交错片状结构构成,而均质结构和规则叶状结构所占的比例很少,均质结构仅分布在贝壳的表层下部,规则叶状结构只出现在壳内层的部分区域,贝壳中间很大一部分是交错片状结构。出现这种现象的原因可能是由于交错片状结构具有很强的抗裂碎能力,5 月龄的幼贝壳体尚小,为了增加自身的贝壳抗击能力,从

而有效的防止物理损伤而导致死亡。我们还观察到复杂交错片状结构只出现在 18 月龄和 30 月龄,复杂交错片状结构是交错结构的一种,但它的首级片体交错方式更加复杂,形状更加不规则,因此复杂交错片状结构使得此时的贝壳具有更强的抗击能力和抗磨损能力。冯伟民在观察腹足类壳质超微结构时也提出了相似的观点^[16]。

同时,观察到随着壳体发育,会突然出现增生新的超微结构层的现象,如图 2I,在观察 18 月龄虾夷扇贝样品时,棱柱结构(3)和交错片状结构(1)中间,新生成一层交错片体结构(2),它的首级片体比交错片状结构短,但排列形式却比复杂交错片体规则。相似的研究结果也有见报道,Bandel 在 *Seguenzia* 中的第 2 螺层和第 3 螺层中发现了这种情况^[22]。

此外,通过反复比对发现,随着生长时期的增加,壳质结构逐渐趋向于复杂,叶状结构和交错片状结构的比例增加,如图 2G 和图 2J 所示。片状结构的矿物成分是文石,这是由于随着生长期的增加,碳酸钙不断沉积,壳体增厚,不断形成新的文石,从而使扇贝在生长过程中通过壳质超微结构调整不断获得个体生长所必需的性能。

3.2 壳色差异对壳外表面元素组成和含量的影响

贝壳的主要成分是碳酸钙,占其重量的 90%以上^[23]。本试验选取不同壳色的虾夷扇贝,初步分析了贝壳外表面的元素组成,在分析比较的 5 种元素 C、O、Na、Mg、Ca 中,C、O、Ca 3 种元素的含量占绝对优势。Ca 元素含量在 2 种贝壳中表现出了差异,“象牙白”品系 Ca 元素的质量分数比普通红褐色扇贝少了 10.23%,Ca 元素含量的减少可能会对壳质结构产生影响。研究表明双壳类壳体中元素组成主要受壳体矿物物相类型的制约^[24],通常情况下,文石质壳体内 Mg 元素含量较低,为 100~450 mg/kg,而方解石质壳体内 Mg 元素含量则较高,且范围更广^[25]。因此,研究壳质元素组成有利于进一步阐释壳质结构。

参考文献:

- [1] 常亚青. 贝类增养殖学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 91.
- [2] 丁君, 常亚青, 张婧, 等. 虾夷扇贝象牙白品系与普

- 通品系营养成分分析及评价[J]. 中国农业科技导报, 2011, 13(2): 121-128.
- [3] 赵鹏, 丁君, 常亚青. 两种壳色虾夷扇贝壳体尺性状对活体重影响效果的分析[J]. 大连海洋大学学报, 2011, 26(1): 1-5.
- [4] 李文姬, 谭克非. 日本解决虾夷扇贝大规模死亡的启示[J]. 水产科学, 2009, 28(10): 609-612.
- [5] 张明, 刘项峰, 李华琳, 等. 黄海北部虾夷扇贝吊耳养殖技术研究[J]. 水产科学, 2011, 30(12): 726-730.
- [6] 常亚青, 陈晓霞, 丁君, 等. 虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis* Jay) 5 个群体的遗传多样性[J]. 生态学报, 2007, 27(3): 1145-1152.
- [7] 韩斐斐, 张继彪, 李莉, 等. 虾夷扇贝养殖群体及其子代的遗传多样性分析[J]. 海洋科学, 2012, 36(9): 1-8.
- [8] 沈妍, 刘伟, 湛垚垚, 等. 虾夷扇贝性腺和闭壳肌蛋白质双向电泳分析[J]. 海洋科学, 2014, 38(6): 10-16.
- [9] 张婧, 常亚青, 丁君, 等. 虾夷扇贝不同壳色间的遗传结构及微卫星标记与生长性状相关分析[J]. 中国农学通报, 2011, 27(26): 83-91.
- [10] 陈金华. 双壳类壳质超微结构及其研究现状[J]. 古生物学报, 1985, 24(5): 463-476.
- [11] Isabel Z, Jaime D P, Antonio V. The shell microstructure, mineralogy and isotopic composition of *Amusiopecten baranensis* (Pectinidae, Bivalvia) from the miocene of Spain: a valuable paleoenvironmental tool[J]. Geobios, 1996, 29(6): 707-724.
- [12] Carter J G. Skeletal biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends[M]. Van Nostrand: Reinhold Press, 1990, 117-133.
- [13] Bogild O B. The shell structure of the mollusks[J]. K dansk Vidensk Selsk-Skr, 1930, 2: 232-325.
- [14] 梁艳, 赵杰, 吴承伟. 不同生长期贝壳的结构和力学性能[J]. 复合材料学报, 2011, 28(3): 121-126.
- [15] 冯伟民. 陆栖肺螺类壳质超微结构的研究及其与半咸水螺壳的对比[J]. 古生物学报, 1991, 30(3): 388-395.
- [16] 冯伟民. 腹足类个体发育中壳质结构的变化[J]. 古生物学报, 1994, 33(5): 635-645.
- [17] Younis S. Atomic structure and ultrastructure of the *Murex troscheli* shell[J]. Journal of Structural Biology, 2012, 180: 539-545.
- [18] West K, Andrew C. Shell microstructure of gastropods from lake Tanganyika, Africa: adaptation, convergent evolution, and escalation[J]. Evolution, 1996, 50(2): 672-681.
- [19] Dauphin Y, Denis A. Structure and composition of the aragonitic crossed lamellar layers in six species of Bivalvia and Gastropoda[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 2000, 126: 367-377.
- [20] Villagran X S, Rosa M. P. A new form of needle-fiber calcite produced by physical weathering of shells[J]. Geoderma, 2014, 213: 173-177.
- [21] Carter J G. Skeletal biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends[M]. Van Nostrand. Reinhold Press, 1990, 117-133.
- [22] Bandel K. Übergänge von einfacheren Strukturtypen zur Kreuzlamellenstruktur bei Gastropodenschalen[J]. Biomin Forsch Ber, 1979, 10: 9-38.
- [23] 刘娟花, 胡世伟, 李世杰, 等. 插核手术对马氏珠母贝中矿物元素的影响[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(5): 1012-1014.
- [24] 张爱滨, 刘升发, 范德江, 等. 胶州湾双壳类壳体中的 Ca, Mg, Mn, Sr 元素组成及影响因素[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(5): 829-835.
- [25] Cravo A, Foster P, Bebianno M J. Minor and trace elements in the shell of *Patella aspera* (Lind 1798)[J]. Environment International, 2002, 28: 295-302.

Analysis of shell microstructure and five surface elements of *Patinopecten yessoensis* at different ages

PANG Yun-long, DING Jun, TIAN Ying, HAO Zhen-lin, CHANG Ya-qing

(Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture, Dalian 116023, China)

Received: Nov., 18, 2014

Key words: *Patinopecten yessoensis*; scanning electron microscope (SEM); shell structure

Abstract: In this study, *Patinopecten yessoensis* at different ages (5 months, 7 months, 9 months, 12 months, 18 months, and 30 months old) was investigated. Scanning electron microscope (SEM) was used to observe the longitudinal section of different ages of shells given by cutting shells along the growth lines. The variation laws of shell structure in the process of growth and development were explored. The results showed that the shell microstructure consisted of homogeneous, foliated, crossed lamellar and prismatic. Shell structure gradually tended to be complex and the proportion of foliated and foliated increased with growth. Meanwhile, five kinds of mineral elements taken from the outer surface of shell were investigated. The results showed that the element content percentages of C, O, Na, Mg and Ca from "Ivory" strains of *Patinopecten yessoensis* and ordinary individuals were 24.26%, 60.44%, 0.63%, 0.48% and 14.18%, 18.24%, 56.48%, 0.52%, 0.36% and 24.41%, respectively.

(本文编辑: 梁德海)