

# 砗蚝(*Hippopus hippopus*)的人工繁育\*

张跃环 肖 述 李 军 马海涛 张 扬 向志明 喻子牛

(中国科学院南海海洋研究所 热带海洋生物资源与生态重点实验室 广东省应用海洋生物学重点实验室 广州 510301)

**摘要** 于 2016 年 4—9 月开展了砗蚝(*Hippopus hippopus*)人工繁育技术研究。采用五羟色胺进行催产、促使配子排放;精卵分别收集,进行异体间受精以避免自交;受精卵经过 30h 孵化,选出 600 万 D 形幼虫进行培育。砗蚝的早期生活史与砗磲(*Tridacna* spp.)相似,经历前期面盘幼虫、中期面盘幼虫、后期面盘幼虫、足面盘幼虫、单水管稚贝、双水管稚贝、外套膜触手稚贝、幼贝等阶段。与砗磲不同的是,砗蚝怀卵量较少,但卵径较大,D 型幼虫也较大,幼虫趋光性更强,壳长 2.0mm 以后外套膜不伸出壳缘外,幼贝贝壳形态也不同于砗磲。同砗磲幼虫一样,砗蚝幼虫需要构建虫黄藻系统之后,才能出现鳃、次生壳等,从而完成变态成为稚贝。砗蚝幼虫变态率较低,仅为 1.4%。中间育成期间,丝状藻和锥形螺是稚贝培育的主要敌害,需及时清理才能确保稚幼贝正常生长发育。经过 120d 的精心饲养,培养出平均壳长 6.3mm 幼贝 500 余个。本研究为进一步开展砗蚝人工繁育、中间育成、增殖放流、资源修复及移植保育提供了参考。

**关键词** 砗蚝;人工繁育;幼虫培育;附着变态;虫黄藻;中间育成

**中图分类号** S961.6 **doi:** 10.11693/hyhz20170300069

砗蚝 (*Hippopus hippopus*) 隶属 砗 磲 科 (*Tridacnidae*) 砗 蚝 属 (*Hippopus*), 分布于印度洋东部和太平洋西部及我国南海海域, 主要栖息在珊瑚礁砂质底中, 是珊瑚礁生态系统的主要关键框架生物之一(董杨等, 2015)。从全球范围内来看, 砗蚝有两种, 一种是砗蚝, 另一种叫作瓷口砗蚝(*H. porcellanus*)。在我国分布最多的是砗蚝, 瓷口砗蚝只有零星分布(周勤等, 2014)。砗蚝虽与砗磲(*Tridacna*)同为砗磲科, 但二者外观上仍有一些差别: 首先二者贝壳形态明显不同(杨文等, 2013), 其次砗蚝外套膜不翻出壳缘, 而砗磲外套膜可以翻出壳缘; 另外砗蚝外套膜颜色比较单一, 而砗磲外套膜颜色多种多样, 五彩缤纷。

迄今为止, 砗蚝的人工繁育报道较少。关岛大学海洋实验室描述了砗蚝幼虫及稚贝的早期生活史 (Jameson, 1976); 菲律宾席丽曼大学海洋生物研究室报道了砗蚝产卵、幼虫培育及早期生长情况(Alcala *et al.*, 1986) 和瓷口砗蚝配子排放及幼虫培育状况

(Alcazar *et al.*, 1987); 以上报道均获得了少量壳长为 600—800 $\mu$ m 的稚贝, 但尚未见培育至幼贝的相关报道。本研究在突破了砗磲人工繁育技术的基础上(张跃环等, 2016), 在我国首次成功进行了砗蚝人工繁育, 为进一步开展南海砗蚝资源修复及珊瑚礁生态系统多样性保护提供了技术保障。

## 1 材料与方 法

### 1.1 亲本促熟

2016 年 4 月上旬在南海采集活力强、健康无损, 壳长 36—40cm, 鲜重为平均 5kg/indi. 的亲本 12 个, 共重约 60kg。按照 15kg/m<sup>3</sup> 的密度放置于中国科学院南海海洋研究所海南热带海洋生物实验站的 2 个 2m<sup>3</sup> 玻璃钢水槽中。采用“微充气+微流水”形式进行人工促熟, 流量为每缸 12m<sup>3</sup>/d, 经过 2 周促熟, 砗蚝性腺发育成熟。促熟期间, 海水均经两次砂滤, 海水水温 27.5—29.3 $^{\circ}$ C, 盐度 32—33, 采用半遮光的方式

\* 中国科学院战略先导 A 专项, XDA13020200 号; 中国科学院 STS 项目, KFJ-EW-ST5-123 号; 中国科学院重点部署项目, KGZD-EW-609 号; 国家贝类现代产业技术体系建设项目, CARS-47 号。张跃环, 博士, 副研究员, Email: yhzhang@scsio.ac.cn

通讯作者: 喻子牛, 研究员, 博士生导师, Email: carlzyu@scsio.ac.cn

收稿日期: 2017-03-24, 收修改稿日期: 2017-05-18

控制光照强度。

### 1.2 受精产卵

选取 5 个性成熟的砗蚝, 注射浓度为 0.8mg/mL 的五羟色胺催产剂至外套膜中, 之后置于盛有 20L 新鲜海水的塑料桶中, 几分钟后亲本开始排放精子, 再过几分钟, 开始排放卵子, 单独收集每个个体的精、卵, 用 20L 塑料桶收集精子, 50L 塑料桶收集卵子。一共获得 5 桶精子和 5 桶卵子。显微镜镜检发现, 其中 2 个个体的卵子很圆, 为黑色, 发育整齐, 故选用这 2 个个体的卵子作为母本; 检查精子发现 5 个个体精子均较好。采用异体间配对原则, 利用另外 3 个个体精子与这组卵子受精(平均分为 3 份), 精卵比例(体积比)为 1:60 左右。受精后, 每隔 3—5min 轻轻搅动受精卵一次; 受精 1h 以后, 将受精卵液倒入玻璃钢池中微充气孵化, 其密度为 15indi./mL。

### 1.3 幼虫培养

受精卵经过 30h 孵化发育至 D 形幼虫, 利用对角线 70 $\mu$ m 筛绢网选优, 共获得 600 万个 D 形幼虫。将幼虫放置于 3 个 1m<sup>3</sup> 盛有清新海水的玻璃钢桶中采用微充气法进行培育, 密度控制在 2indi./mL 以内; 至受精后第 6 天, 幼虫密度调整为 0.5indi./mL。幼虫培育期间, 每天换水一次, 换水量控制在 60%, 饵料为金藻, 投喂量在 0.5 $\times 10^4$ —1.0 $\times 10^4$ cell/mL·d。在此期间, 水温为 28.0—29.6 $^{\circ}$ C, 盐度为 32—33, pH 在 8.2—8.3 之间, 半遮光控制光照。

幼虫经 6d 发育至足面盘幼虫后, 将其放置于 4 $\times 10^5$ —5 $\times 10^5$ cell/mL 的虫黄藻溶液中浸泡 2h, 幼虫密度控制在 30—40indi./mL。采用“微充气+不换水”方式处理, 7—10d 幼虫完成变态。在此期间, 水温为 28—30 $^{\circ}$ C, 盐度为 32—33, pH 为 8.2—8.3, 半遮光控制光照。

### 1.4 中间育成

当幼虫完成变态后, 建立了完整的虫黄藻系统。经过 1 个月的培育, 稚贝壳长达 400—500 $\mu$ m, 形成双水管, 运动方式仍为爬行; 经过 2 个月左右培育, 壳长达 1—2mm, 成为幼贝, 与成体砗蚝外观上非常相似, 可站立起来, 利用足丝附着在容器底壁或者附着基上, 完全依赖虫黄藻营养。在此期间, 采用“微充气+微流水”方式饲养, 定期清理培育容器上附着生物及各种藻类等, 半遮光控制光照, 切忌光线过强。

### 1.5 测定指标

受精率为卵裂受精卵数量与全部卵子数量之比;

孵化率为 D 形幼虫数量与发生卵裂卵子数量之比; 幼虫存活率为足面盘幼虫数量与 D 形幼虫数量的比值; 变态率为完成变态稚贝数量与足面盘幼虫数量比值; 稚贝存活率为稚贝数量与刚刚完成变态稚贝数量比值; 幼贝存活率为幼贝数量与刚形成幼贝时数量比值。

卵径、幼虫和稚贝壳长、壳高在显微镜下用目微尺测量; 幼贝壳长、壳高用电子游标卡尺测量(精确值 0.01mm); 每个阶段测量 90 个子代样品。

## 2 结果

### 2.1 配子排放

注射五羟色胺催产剂后, 砗蚝在 5—7min 后开始排放精子, 持续时间为 6—8min; 间隔 9—10min 后开始排放卵子, 持续时间为 27—33min(表 1)。为了避免自体受精, 精卵严格分开收集。

表 1 注射催产剂后砗蚝亲本排放配子情况  
Tab. 1 Duration of gamete release after serotonin injection for horse's hoof clam, *Hippopus hippopus*

序号	注射后配子 开始排放时间 (min)	精子持续 排放时长 (min)	精卵排放 时间间隔 (min)	卵子排放 持续时间 (min)
1	6	6	9	30
2	5	6	10	27
3	7	7	10	32
4	5	7	9	28
5	7	8	10	33

### 2.2 受精孵化

砗蚝卵径为 120.08 $\pm$ 0.30 $\mu$ m。按照 1:60 的精卵比例进行异体间配对受精, 受精率(72.4 $\pm$ 1.2)%。受精卵经过第一极体、第二极体、2 细胞、4 细胞、8 细胞、多细胞、囊胚期、原肠期、担轮幼虫发育至 D 形幼虫(表 2, 图 1), 孵化率为 93.4% $\pm$ 4.5%(表 3)。在砗蚝受精卵中, 发现了明显的三级卵膜。

### 2.3 幼虫发育

经过 30h 胚胎发育, 获得了 D 形幼虫, 壳长 $\times$ 壳高为(170.13 $\pm$ 0.95) $\times$ (140.25 $\pm$ 0.72) $\mu$ m, 采用 260 目筛绢网进行幼虫选育, 放置于 1000L 玻璃钢桶中, 采用微充气方式进行幼虫培育, 幼虫密度为 2indi./mL。经过 7d 的幼虫培育, 发育至足面盘幼虫, 幼虫足外伸, 匍匐运动, 壳长 $\times$ 壳高为(200.05 $\pm$ 1.05) $\times$ (170.49 $\pm$ 0.57) $\mu$ m(表 2, 图 1)。在整个浮游期, 幼虫壳长一直大于壳高, 幼虫累计存活率为 10.6% $\pm$ 1.9%(表 3)。

## 2.4 附着变态

浓缩足面盘幼虫, 利用虫黄藻悬液浸泡 2h, 促进足面盘幼虫摄食虫黄藻, 经过反复比较, 发现每次浸泡幼虫摄食比例在 20%—30%。多次浸泡可以提高虫黄藻植入幼虫体内的比率, 促进幼虫变态。经过 7—14d 培育, 足面盘幼虫生活方式由浮游转为底栖, 完成变态, 出现鳃、次生壳, 建立了虫黄藻系统。但是, 变态率较低, 变态率仅为 1.4%±0.2%(表 3)。

## 2.5 稚贝培育

采用“微充气+微流水”的方式进行稚贝培养, 不投喂任何单胞藻, 保持水质清新。受精后第 25 天, 发育至单水管稚贝阶段, 壳长×壳高=(331.75±18.66)×(270.69±13.52) $\mu\text{m}$ ; 受精后第 30 天, 发育至双水管稚

贝阶段, 壳长×壳高=(450.19±32.47)×(361.42±24.16) $\mu\text{m}$ ; 受精后第 45 天, 发育至多触手稚贝阶段, 壳长×壳高=(920.46±75.22)×(901.55±62.58) $\mu\text{m}$ , 即将进入幼贝阶段(表 2, 图 1)。在此期间, 稚贝存活率为 14.8%±2.7%(表 3)。

## 2.6 幼贝培养

受精后第 50 天, 当稚贝壳长 $\geq 1.20\text{mm}$ , 进入幼贝阶段。与稚贝相比, 贝壳加厚, 变得不透明, 外套膜外伸, 可以站立起来, 进行光合作用为机体提供营养。受精后第 120 天, 壳长×壳高=(6.32±0.60)×(3.95±0.45)mm, 出现了贝壳形态转换, 有放射嵴, 贝壳形态扭曲同成体砗蚝比较相似(表 2, 图 1)。在此期间, 幼贝存活率为 37.5%±5.4%(表 3)。

表 2 砗蚝早期生活史各阶段的发育时间及其规格  
Tab. 2 Early development stages and larval sizes of horse's hoof clam *Hippopus hippopus*

发育阶段	受精后时间	壳长×壳高( $\mu\text{m}$ )(平均数±标准差)
受精卵	8min	—
第一极体	18min	—
第二极体	30min	—
二细胞	56min	—
四细胞	1h 15min	—
八细胞	1h 36min	—
多细胞	2h 13min	—
囊胚期	3h 52min	—
原肠期	8h 45min	—
担轮幼虫	16h 17min	—
D 形幼虫	30h	(170.13±0.95)×(140.25±0.72)
前期面盘幼虫	3d	(180.72±1.27)×(150.48±1.09)
中期面盘幼虫	4—5d	(185.56±2.05)×(155.31±1.54)—(190.28±2.51)×(160.77±1.86)
后期面盘幼虫	6d	(195.43±1.88)×(165.12±1.63)
足面盘幼虫	7d	(200.05±1.05)×(170.49±0.57)
刚完成变态稚贝	15d	(230.19±5.78)×(215.85±4.33)
单水管稚贝	25d	(331.75±18.66)×(270.69±13.52)
双水管稚贝	30d	(450.19±32.47)×(361.42±24.16)
外套膜多触手稚贝	45d	(920.46±75.22)×(901.55±62.58)
幼贝	60d	(1450.71±105.96)×(1390.97±93.65)
幼贝	90d	(3660.05±217.35)×(2620.29±179.44)
幼贝	120d	(6320.21±597.88)×(3950.78±450.77)

注: 实验条件为温度 28—30°C, 盐度 32—33, pH 为 8.2—8.3。

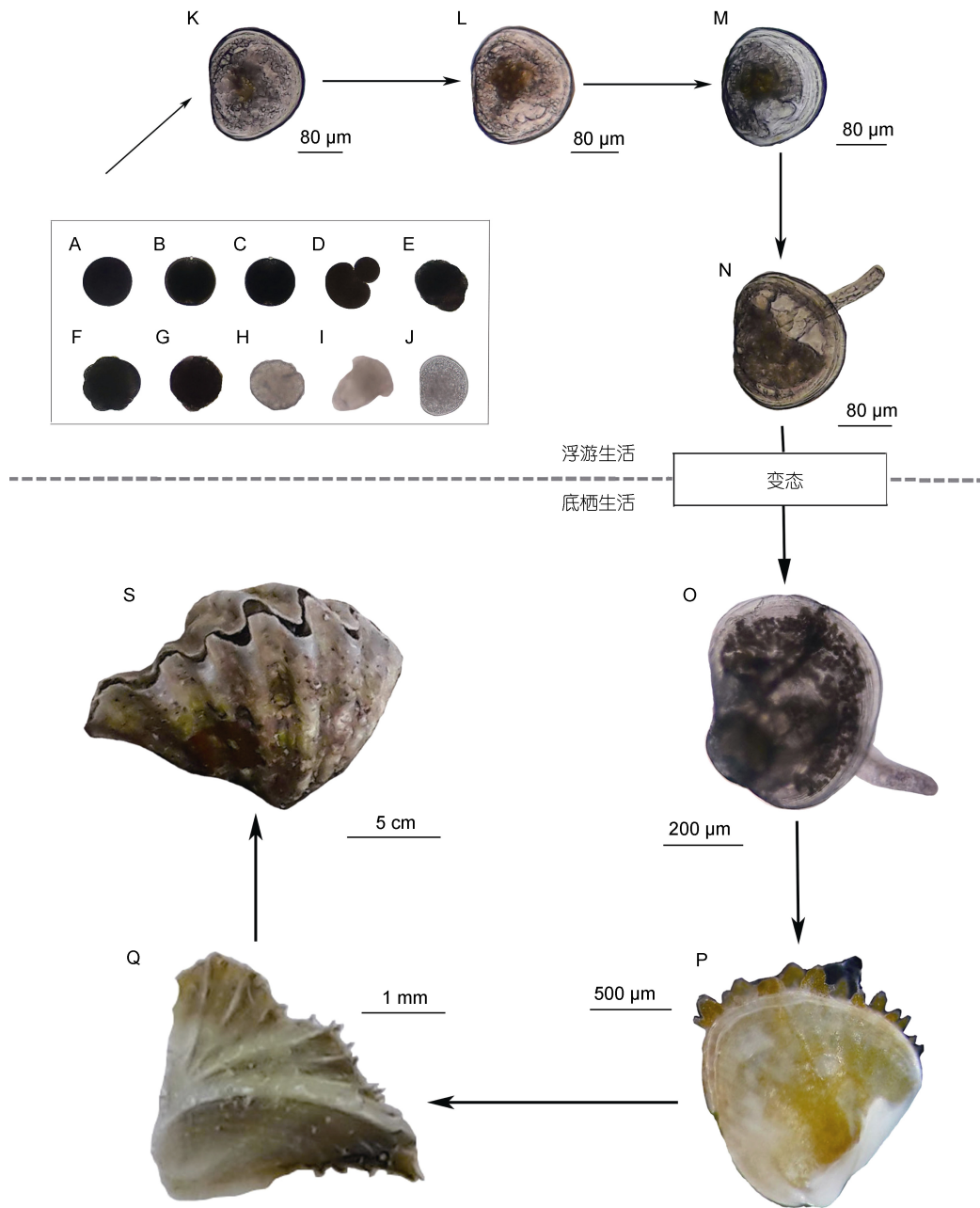


图 1 砗蚝早期生活史

Fig. 1 Early life history of the horse's hoof clam *Hippopus hippopus*

注: A. 卵子; B. 第一极体; C. 第二极体; D. 2 细胞期; E. 4 细胞期; F. 8 细胞期; G. 囊胚期; H. 原肠胚; I. 担轮幼虫; J. D 形幼虫; K. 前期面盘幼虫; L. 中期面盘幼虫; M. 后期面盘幼虫; N. 足面盘幼虫; O. 双水管稚贝; P. 幼贝(壳长 1.5mm); Q. 幼贝(壳长 6.3mm); S. 成体(壳长 36cm)。

表 3 受精率、受精卵孵化率和幼虫变态不同日龄存活率

Tab. 3 Fertilized rate, hatching rate, metamorphosis and survivals at different stages for horse's hoof clam *Hippopus hippopus*

序号	受精率 (%)	孵化率 (%)	变态率 (%)	存活率 (%)		
				7 日龄	60 日龄	120 日龄
1	73.0	96.7	1.2	11.0	15.3	37.6
2	73.2	96.0	1.7	12.3	17.2	42.8
3	71.0	88.5	1.3	8.4	11.9	32.1
均值±偏差值	72.4±1.2	93.4±4.5	1.4±0.2	10.6±1.9	14.8±2.7	37.5±5.4

### 3 讨论

#### 3.1 繁殖特点

砗蚝与砗磲同为砗磲科,二者存在较多相似之处,但也存在部分差异。相似之处在于:(1)卵子中包含三级卵膜,三级卵膜多是腹足类所特有的,具有提供营养以及保护受精卵功能;(2)早期发育均经历了胚胎发育、幼虫、虫黄藻系统构建、稚贝、幼贝等阶段(张跃环等,2016)。不同点在于:(1)怀卵量不同(同样大小的砗蚝怀卵量仅为砗磲的一半左右);(2)卵径大小不同(砗蚝卵径为120 $\mu\text{m}$ ,而砗磲的卵径为95—100 $\mu\text{m}$ ),差异显著;(3)幼虫浮游趋光性不同(砗蚝幼虫具有较强的趋光性,经常聚集在水面上,形成白色面粉状小块,需要较强的充气或者水流将其驱散开来,而砗磲幼虫不具有这么强的趋光性);(4)对基质要求不同(砗蚝幼虫在珊瑚砂底质中容易完成变态,而砗磲幼虫在珊瑚石底质中具有较好的变态率);(5)稚幼贝外套膜伸展程度不同(在稚幼贝早期阶段,二者均有外套膜触手可以伸出壳外缘,当砗蚝幼贝壳长2mm后外套膜无法翻出壳外缘,而砗磲幼贝外套膜一直可以翻出壳外缘)(Jameson, 1976)。

#### 3.2 附着变态

大多数海洋无脊椎动物均存在浮游幼虫阶段,能否变态成功被看作是海洋软体动物生命周期中的里程碑,也是从浮游生活到底栖生活的一个桥梁(Yan et al, 2006)。目前为止,仅有两篇关于砗蚝幼虫发育的报道,其变态水平均极其低下,不足1%。本研究中,砗蚝幼虫的变态率仅为1.4%,这可能与砗蚝变态过程中需要构建虫黄藻系统有关。此前,学者们在开展大砗磲(*T. gigas*)、无鳞砗磲(*T. derasa*)、鳞砗磲(*T. squamosa*)、长砗磲(*T. maxima*)、诺瓦砗磲(*T. nova*)、番红砗磲(*T. crocea*)的人工繁育时,都发现幼虫变态率均1%,说明砗磲幼虫变态水平偏低,这是限制砗磲苗种规模化繁育的最大瓶颈。砗蚝、砗磲幼虫变态均需要建立虫黄藻系统,没有虫黄藻系统幼虫一定无法变态(Fitt et al, 1984)。在这个过程中,大部分幼虫由于虫黄藻系统构建失败被直接淘汰,死亡之后招来诸多原生动物的清理尸肉,这些原生动物的清理完死亡个体后,又会侵蚀健康的处于变态中或者刚刚完成变态的个体,从而造成变态水平极其低下。因此,在苗种繁育中,提高砗蚝幼虫变态率至关重要。

#### 3.3 中间育成

中间育成包括稚贝培养和幼贝培养,是生产贝

类大规格苗种的必要手段(张国范等,2010)。在砗蚝中间育成的过程中,发现两种敌害是其能否成功的关键所在。

一是丝状藻。在流水培养过程中,经常会出现大量丝状藻粘在砗蚝稚贝或者幼贝壳面上,之后将整个个体包围,导致无法开壳进行光合作用,因为营养匮乏或者窒息死亡(Fatherree, 2006)。目前发现两种主要的丝状藻,一种为绿色,毒害作用不强,稚、幼贝死亡率不高,一般在30%以下;还有一种为黑色,毒害作用很强,一旦暴发,稚幼贝死亡率在90%以上,甚至全军覆没。为了有效防止丝状藻对稚、幼贝的危害,在其繁育过程中一定要以防为主,从源头上消灭丝状藻的孢子来源,这样就可以有效防止丝状藻滋生。

二是一种小型锥形螺(*Turbonilla* sp.)。这种锥形螺会从稚、幼贝足丝孔部位吮吸软体部组织,从而引起个体死亡(Fatherree, 2006)。锥形螺是小塔螺科(*Pyramidellidae*)下的一个属,这类螺通常个体较小,最大在10mm左右,具吻,多营体外寄生生活,通过口针刺进寄主软体组织中,然后吸食寄主体液及软体组织,大多寄生在多毛类、棘皮类、贝类或者甲壳类等无脊椎动物体外。由于锥形螺与砗蚝繁殖期比较一致,在自然界中,砗蚝稚、幼贝经常与锥形螺生活在一起,故对砗蚝存活造成一定程度的危害(陈志云等,2011)。在中间育成过程中,如果出现这种小规格锥形螺,一定要及时清理,否则会造成稚幼贝不断死亡,直到全部死光。为了防止这种小规格钉螺造成伤害,需要勤观察,发现后及时清理即可。

### 4 结论

本文通过亲贝促熟、催产孵化、幼虫培育、稚贝培养及中间育成等技术环节,在我国首次培育出砗蚝幼贝,同时比较了砗蚝与砗磲的表型差异,填补了国内相关研究空白,为南海砗蚝资源恢复及珊瑚礁生态系统修复奠定了良好的基础。

致谢 感谢中国科学院海南热带海洋生物实验站对本文的大力帮助。

#### 参 考 文 献

- 杨文,蔡英亚,邝雪梅,2013. 中国南海经济贝类原色图谱. 北京:中国农业出版社,194—196
- 陈志云,张素萍,2011. 小塔螺科系统分类学研究现状与展望. 海洋科学,35(10):123—127
- 张国范,闫喜武,2010. 蛤仔养殖学. 北京:科学出版社,64—70
- 张跃环,肖述,李军等,2016. 鳞砗磲的人工繁育和早期

- 发生. 水产学报, 40(11): 1713—1723
- 周 勤, 王玉芬, 姜秀凤, 2014. 砗磲研究现状及在我国南海开展养殖的前景. 热带海洋学报, 33(2): 87—93
- 董 杨, 李向民, 2015. 砗磲资源保护、开发及其产业化发展前景. 水产科学, 34(3): 195—200
- Alcala A C, Solis E P, Alcazar S N, 1986. Spawning, larval rearing and early growth in *Hippopus hippopus* (Linn.) (Bivalvia: Tridacnidae). Silliman Journal, 33: 45—53
- Alcazar S N, Solis E P, Alcala A C, 1987. Serotonin-induced spawning and larval rearing of the China clam, *Hippopus porcellanus* Rosewater (Bivalvia: Tridacnidae). Aquaculture, 66(3—4): 359—368
- Fatherree J, 2006. Giant clams in the sea and the aquarium. Liquid Medium. Florida: Tampa Press, 197—198
- Fitt W K, Fisher C R, Trench R K, 1984. Larval biology of tridacnid clams. Aquaculture, 39(1—4): 181—195
- Jameson S C, 1976. Early life history of the giant clams *Tridacna crocea* Lamarck, *Tridacna maxima* (Röding), and *Hippopus hippopus* (Linnaeus). Pacific Science, 30(3): 219—233
- Yan X W, Zhang G F, Yang F, 2006. Effects of diet, stocking density, and environmental factors on growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum* larvae. Aquaculture, 253(1—4): 350—358

## ARTIFICIAL BREEDING OF HORSE'S HOOF CLAM *HIPPOPUS HIPPOPUS* IN SOUTH CHINA SEA

ZHANG Yue-Huan, XIAO Shu, LI Jun, MA Hai-Tao, ZHANG Yang, XIANG Zhi-Ming, YU Zi-Niu  
(Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Marine Biology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

**Abstract** Artificial breeding of horse's hoof clam *Hippopus hippopus* was conducted at the Tropical Marine Biological Research Station in Hainan in April—September, 2016. The results show that serotonin can effectively promote gamete release. Six million D-shaped larvae were obtained after 30-h incubation by cross-fertilization to avoid self-fertilization. The horse progeny underwent early veliger, middle veliger, late veliger and pedi-veliger larvae, single-siphon and double-siphon spat, mantle tentacles spat, and youth during the early history life stage, which is same to that of fluted giant clams excepted that the fecundity of horse's hoof clam is less than that of fluted giant clam, while egg size and D larvae are larger than those of fluted giant clam. Light phototaxis of horse's hoof clam larvae was stronger than that of fluted giant clam, and shell shape is different from each other. Larvae can complete metamorphosis forming spat after establishing the zooxanthellae tubular system, growing out gill, second shell, etc. Metamorphosis of larvae was only 1.4% during the settling stage. Filamentous algae and *Oncomelania* are offspring of cultivating key predators during the grow-out stage. Hence, the predators should be cleaned out regularly to ensure normal growth and development for progeny. Some 500 youth progeny in shell length of 6.3 mm were obtained after 120-day rearing. This study on the artificial breeding for horse's hoof clam may provide theoretical basis and reliable techniques for conducting giant clam aquaculture and transplantation work.

**Key words** *Hippopus hippopus*; artificial breeding; larval rearing; metamorphosis; zooxanthellae; grow-out stage