

厚壳贻贝早期幼虫低温保存的影响研究

李一峰^{1,2}, 杨金龙^{1,2*}, 王冲^{1,2}, 沈和定¹

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 上海海洋大学海洋科学研究院, 上海 201306)

摘要: 探讨低温(4℃)条件下的厚壳贻贝早期幼虫保存可能性,同时调查了不同培育密度对低温保存的影响。在正常条件下,继续培育低温保存后的幼虫,并调查其存活率和生长的变化。结果表明,在低温保存后,早期幼虫存活率较高,超过95%;厚壳贻贝早期幼虫的壳长和壳高出现显著性的增长。不同培育组间,培育密度对厚壳贻贝早期幼虫的存活和生长影响不同,表明密度是幼虫低温保存的一个重要因素。在正常培育条件下,低温保存后的幼虫,3周后其存活率明显低于对照组,但仍超过50%,且其生长速度明显高于对照组。因此,低温培育是保存厚壳贻贝早期幼虫的有效方法,可用于今后贝类幼虫生物学实验和人工育苗技术的改善研究。

关键词: 厚壳贻贝; 低温保存; 幼虫密度; 存活率

中图分类号: S 968.3

文献标志码: A

厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)是我国重要的海水养殖贝类,分布于黄海、渤海和东海沿岸^[1],其中以浙江沿海资源量最大,舟山嵊泗县是厚壳贻贝的主要产区^[2-3]。长期以来,厚壳贻贝养殖所需苗种供应一直依赖于海区半人工采集。近年来,人为过度采伐导致厚壳贻贝自然资源逐渐减少,自然海区附苗数量和质量明显下降,厚壳贻贝养殖产业受到影响^[2]。目前,厚壳贻贝规模化人工繁殖技术一直没有得到很好的解决,育苗数量不稳定,导致苗种供不应求。

与许多其他海洋无脊椎动物一样,厚壳贻贝在变成附着成体之前,有一个浮游幼虫阶段。幼虫的浮游生活短则几分钟,长则达数月。大多数海洋无脊椎动物的幼虫只有在外界环境因子的影响下才能完成附着和变态^[4-6]。因此,理解和控制海洋无脊椎动物幼虫的附着变态行为对于水产养殖苗种生产技术的改善和海洋防污技术的发展具有极其重要的理论意义和实践意义^[5]。稳定且充足的幼虫供应是这一研究的必要前提。

本研究对厚壳贻贝早期幼虫低温的保存可能

性进行了研究,并调查了不同培育密度对低温保存生长和存活的影响,以及继续培育低温保存后的幼虫,其存活和生长的变化。旨在通过本研究延长其繁殖季节,保持长时间内有稳定、大量苗种供应,确保人工繁殖的顺利进行;持续性开展贝类幼虫生物学的研究,理解该种幼虫发育过程中的附着变态机制。

1 材料与方法

1.1 人工授精

人工授精用的成体厚壳贻贝,采自浙江省嵊泗县枸杞岛的附近海域。依照 Yang 等^[7]所述方法进行人工授精和幼虫的培育。

1.2 对照组幼虫培育

对照组厚壳贻贝早期 D 形幼虫(受精后 2 天)的培育参照 Yang 等^[7]所述方法进行。实验室内,幼虫的起始密度为 5 ind/mL,实验器皿为 2 L 玻璃烧杯。培育期间,投喂等鞭金藻,饵料密度为 5×10^4 /mL,每天投喂 1 次。培育温度为 (18 ± 1) °C。在整个培育期间,无光照,每隔 1 天换水 1

收稿日期:2011-09-25 修回日期:2011-11-01

资助项目:国家自然科学基金项目(31101885);上海市晨光计划(09CG54);上海市科技启明星(10QA1403200);上海市教委创新项目(10YZ123);上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金(ssc09002);上海海洋大学博士启动基金

通讯作者:杨金龙, E-mail: jlyang@shou.edu.cn

次。实验所用海水均经过 1.2 μm 滤膜过滤,盐度为 30。

培育期间,显微镜下观察幼虫的存活率。首先,充分搅匀烧杯中的幼虫,使其密度均匀,从中取 10 mL,显微镜下计数。样品中的幼虫,游动或者其面盘上的纤毛在不停地摆动,表明为活体。如触碰多次,仍无任何行为反应,则表明该幼虫已经死亡。存活率为 3 次取样幼虫存活的平均值。

幼虫的贝壳生长则通过壳长和壳高来表示。在培育期间,每周随机选取 40 ~ 50 个幼虫,测量幼虫的壳长和壳高。

1.3 低温保存实验

在实验中,厚壳贻贝早期 D 形幼虫被保存在冰箱中 1 个月。温度为 $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ 幼虫的起始密度分别为 5、10 和 20 ind/mL。幼虫培育的器皿为 2 L 玻璃烧杯。培育期间,投喂等鞭金藻,饵料密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,每 2 天投喂 1 次。实验所用海水均经过 1.2 μm 滤膜过滤,盐度为 30。在整个培育期间,无光照,每 4 天换水 1 次。换水时间限制在 15 min 以内,换完水后立即将幼虫重新放回冰箱中。低温保存实验,共重复 3 次。

低温保存期间,每 4 天测 1 次幼虫的成活率,每周测 1 次幼虫的壳长和壳高的生长。

1.4 低温保存后幼虫的继续培育实验

厚壳贻贝 D 形幼虫经不同低温保存培育后,被转移至培养箱中继续进行培育。培育方法与对照组幼虫的培育一样。实验器皿为 2 L 玻璃烧杯。培育期间,投喂等鞭金藻,饵料密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,在培育期间,每周随机选取 40 ~ 50 个幼虫,测量幼虫的壳长和壳高。

1.5 数据处理

在统计分析之前,所有数据的正态性分布被检验。基于数据满足正态性分布的前提下,且方差相同,则通过单因素方差方法 (One-Way ANOVA) 进行分析。若无法满足正态性分布和方差齐性时,则通过 Kruskal-Wallis Test 进行评估分析。所有的统计计算均采用 JMP 统计软件进行分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 低温保存期间幼虫的存活与生长

组 1 中,幼虫密度为 5 ind/mL 时,保存期间幼虫的成活率差异显著 (Kruskal-Wallis test: $P < 0.05$),28 d 时的存活率为 $(96\% \pm 1\%)$ (图 1-a);

幼虫密度为 10 ind/mL 时,幼虫的成活率差异显著 (Kruskal-Wallis test: $P < 0.05$),28 d 时的存活率为 $(98\% \pm 1\%)$ (图 1-a);同样,幼虫密度为 20 个/mL 时,其成活率存在着显著性差异 (Kruskal-Wallis test: $P < 0.05$) (图 1-a)。在另一方面,组 1 中,28 d 培育后,不同密度下的幼虫成活率却无显著性差异 (ANOVA: $P > 0.05$)。组 2 中 (图 1-b),尽管培育密度不同,但其培育过程中成活率均无显著性差异 ($P > 0.05$);28 d 后,各不同密度组之间也无显著性差异 (Kruskal-Wallis test: $P > 0.05$),其存活率均超过 95%。组 3 中 (图 1-c),除 5 个/mL 密度组,培育过程中存在显著性差异外 (Kruskal-Wallis test: $P > 0.05$),其余两个密度组均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

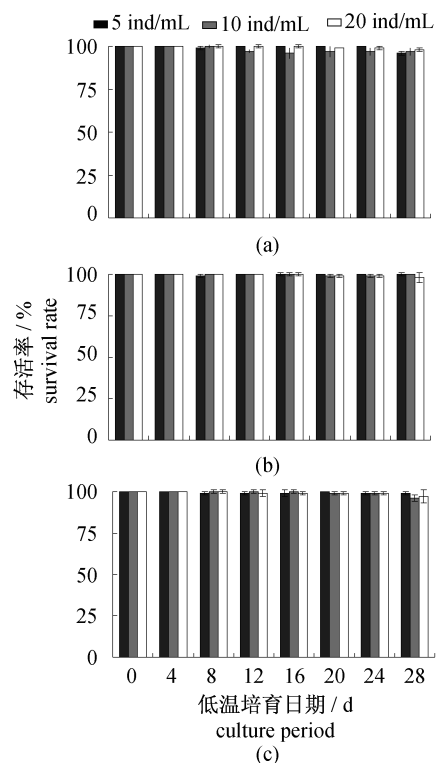


图 1 不同密度条件下幼虫的成活率

a、b、c 分别为不同批次的早期幼虫。

Fig. 1 Survival rate of larvae with different density

a. Batch 1, b. Batch 2; c. Batch 3.

低温培育时期,各密度组幼虫壳长和壳高的生长分别如表 1 和表 2 所示。表 1 的统计分析结果表明:28 d 后,组 1 中的 5 ind/mL 和 10 ind/mL 两个密度组间无显著性差异 (ANOVA: $P > 0.05$),与 20 ind/mL 密度组的壳长存在着显著性差异 ($P < 0.05$);组 2 中仅 5 ind/mL 与 20 ind/

mL 密度组间壳长存在着显著性差异 ($P > 0.05$); 组 3 分析结果显示, 3 个密度组间壳长生长无显著性差异 ($P > 0.05$)。表 2 的分析结果表明: 组 1 各密度组间存在显著差异 (Kruskal-Wallis test: $P < 0.05$); 组 2 中, 5 ind/mL 与 10 ind/mL 和 20 ind/mL 密度组壳高均存在着显著性差异 ($P < 0.05$); 组 3 分析结果显示, 3 个密度组间壳高生长无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 1 低温保存期间不同密度下幼虫壳长的生长
Tab. 1 Growth in shell length of larvae in culture at 4 °C

幼虫密度/ (ind/mL)	不同培育时期的壳长生长/ μm				
	7 d	14 d	21 d	28 d	
1 组 batch 1	5	94 ± 5	100 ± 5	99 ± 4	100 ± 4
	10	99 ± 4	99 ± 4	100 ± 5	101 ± 5
	20	94 ± 6	93 ± 6	95 ± 6	97 ± 6
2 组 batch 2	5	99 ± 15	102 ± 7	100 ± 4	101 ± 4
	10	99 ± 6	99 ± 5	100 ± 5	101 ± 5
	20	97 ± 7	93 ± 6	97 ± 7	98 ± 6
3 组 batch 3	5	97 ± 6	94 ± 7	98 ± 5	100 ± 5
	10	97 ± 6	99 ± 4	99 ± 5	99 ± 4
	20	96 ± 6	93 ± 6	97 ± 5	98 ± 5

表 2 低温保存期间不同密度下幼虫壳高的生长
Tab. 2 Growth in shell height of larvae in culture at 4 °C

幼虫密度/ (ind/mL)	不同培育时期的壳高生长/ μm				
	7 d	14 d	21 d	28 d	
1 组 batch 1	5	65 ± 6	72 ± 4	74 ± 3	74 ± 3
	10	69 ± 5	69 ± 5	70 ± 5	71 ± 4
	20	69 ± 4	69 ± 5	70 ± 4	71 ± 5
2 组 batch 2	5	70 ± 6	71 ± 6	72 ± 5	73 ± 5
	10	71 ± 6	69 ± 5	70 ± 4	71 ± 5
	20	68 ± 7	69 ± 4	70 ± 4	70 ± 5
3 组 batch 3	5	67 ± 5	64 ± 6	67 ± 5	69 ± 5
	10	66 ± 5	69 ± 5	70 ± 5	70 ± 5
	20	65 ± 4	69 ± 5	68 ± 5	69 ± 5

2.2 正常培育与低温保存后幼虫的存活与生长

对照组与低温保存后幼虫的生长和存活率如图 2 所示。3 周培育后, 对照组和低温组的幼虫的壳长分别达到 (165 ± 15) 和 (181 ± 21) μm , 存在着显著性差异 (Kruskal-Wallis test: $P < 0.05$)。同样, 在 18 °C 培育条件下, 两组间幼虫的壳高生长也存在显著性差异, 低温保存后的幼虫的壳高生长明显高于对照组 (Kruskal-Wallis test: $P <$

0.05)。对照组中, 幼虫经 3 周培育后, 幼虫的存活率逐渐下降, 在第 3 周降至最低为 (75% ± 3%)。同样, 低温培育组中的幼虫存活率也逐渐下降, 在 3 周后其存活率明显低于对照组 (ANOVA: $P < 0.05$), 为 (56% ± 10%)。

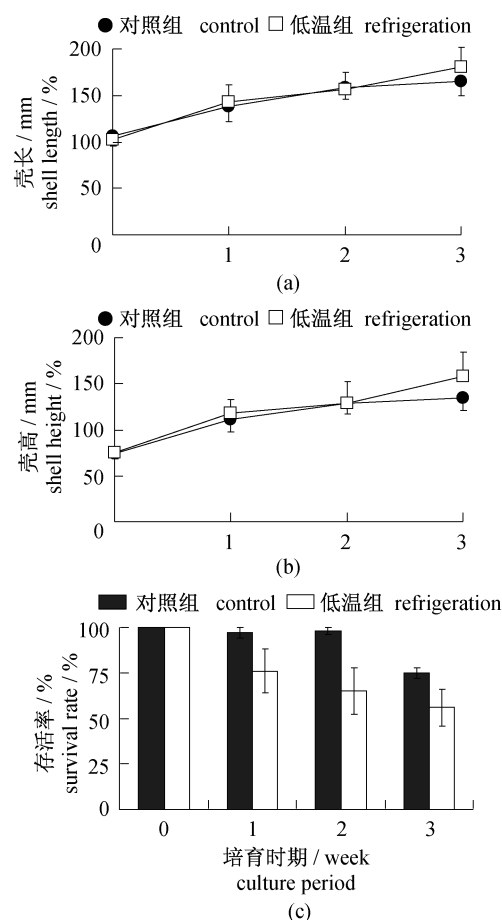


图 2 对照组与低温保存后幼虫的生长及成活率
Fig. 2 Shell growth and survival rate of larvae in control and refrigerated groups

3 讨论

低温生物学技术已在海洋生物的配子、胚胎的保存方面获得了广泛的应用^[8]。在海产贝类中, 大多研究主要集中在贝类的配子和胚胎的低温保存技术研究, 如硬壳蛤 (*Mercenaria mercenaria*)^[9]、太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[10-12]、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)^[13]、虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*)^[14]、九孔鲍 (*Haliotis diversicolor supertexte*)^[15]、马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*)^[16-17] 等。本研究探讨了室内低温保存厚壳贻贝早期幼虫的可能性, 并成功

实现了该种幼虫的低温培育。同时,密度对厚壳贻贝幼虫的低温培育过程中的一个重要因素。

低温保存后,不同贝类幼虫的存活率明显不同。薛钦昭^[18]在栉孔扇贝幼虫的低温保存中,发现担轮幼虫无法实现低温保存,而面盘幼虫的存活率达到65%。王鹏飞等^[17]对马氏珠母贝的担轮幼虫和D形幼虫的低温保存的进行了研究,发现担轮幼虫的存活率非常低(<5%),D形幼虫的存活率相对较高,达到54%。目前的研究发现,1个月的低温培育后,厚壳贻贝D形幼虫的存活率仍然很高;且在不同培育密度下,幼虫的存活率均超过95%。

以往的研究表明在5℃低温保存1个月后,紫贻贝(*Mytilus edulis*)D形幼虫没有出现明显的生长^[19]。Satuito等^[20]对地中海贻贝(*M. galloprovincialis*)幼虫的低温保存进行了研究,其结果表明1个月的低温培育后,幼虫没有出现显著性生长。然而,目前的研究发现低温培育1个月后,厚壳贻贝幼虫的壳长和壳高出现显著性的增长。上述结果表明厚壳贻贝低温培育期间,尽管幼虫生长速度缓慢,但仍有生长,因而,饵料投喂是必要的。低温培育后,不同贻贝种类的幼虫的生长存在一定的差异,可能是由于投饵量、饵料种类等因素有关,这需要开展进一步的研究来证实。

本研究首次调查了不同密度对厚壳贻贝幼虫低温培育效果的影响。存活率的研究结果显示:组1和组2中密度对幼虫的存活率均无显著性差异;然而,在组3中,5 ind/mL密度组与其他两个密度组间存在显著性差异。目前的研究表明密度可能对幼虫的低温培育产生一定程度的影响。此外,幼虫的生长实验结果显示,尽管个别组中不同密度条件下,幼虫的壳长和壳高没有显著性的差异,但其他组中仍存在显著性差异,表明密度对幼虫培育确实存在一定程度的影响。因而,在低温培育过程中,幼虫的密度是重要的因素之一。同时,也应考虑其他因素,例如饵料、容器、充氧等对低温培育的影响。

通过对比研究发现,低温保存后厚壳贻贝D形幼虫的生长明显高于对照组的幼虫,表明低温保存对后期幼虫的生长速度不会产生不利的影响。3周培育后,两组间D形幼虫的存活率均出现明显下降,低温培育组的存活率下降尤为显著,

但其存活率仍高于50%。表明低温保存方法可作为该种延长其繁殖季节的有效方法之一。同时,利用该种幼虫进行后续筛选附着诱导物和防污活性物质研究以及解析海洋贝类幼虫的附着变态机制具有重要的意义。

低温培育可作为今后贝类幼虫保存的有效方法,幼虫密度是低温保存的重要因素之一,本研究的成果对于今后该种人工苗种繁育技术的进一步发展以及阐明幼虫附着变态机制具有重要理论和实践意义。

参考文献:

- [1] 常亚青. 贝类增殖学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [2] 常抗美, 吴剑锋. 厚壳贻贝人工繁殖技术的研究[J]. 南方水产, 2007, 3(3): 26-30.
- [3] 刘慧慧, 薛超波, 常抗美, 等. 厚壳贻贝 M7 lysin 分子的克隆与表达[J]. 水产学报, 2011, 35(9): 1337-1342.
- [2] Pawlik J R. Chemical ecology of the settlement benthic marine invertebrates[J]. Oceanography and Marine Biology: An Annual Review, 1992, 30: 273-335.
- [5] Mccliniock J B, Baker J B. Marine chemical ecology [M]. Boca Raton: CRC Press, 2001: 431-461.
- [6] Yang J L, Satuito C G, Bao W Y, et al. Induction of metamorphosis of pediveliger larvae of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 using neuroactive compounds, KCl, NH₄ Cl and organic solvents[J]. Biofouling, 2008, 24(6): 461-470.
- [7] Yang J L, Li Y F, Satuito C G, et al. Larval metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 in response to Neurotransmitter Blockers and Tetraethylammonium [J]. Biofouling, 2011, 27(2): 193-199.
- [8] 张岩, 陈四清, 于东祥, 等. 海洋贝类配子及胚胎的低温冷冻保存[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(6): 73-78.
- [9] Chao N H, Lin T T, Chen Y J, et al. Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam[J]. Aquaculture, 1997, 155(1-4): 31-44.
- [10] Bourgrier S, Rabenomanna L. Cryopreservation of spermatozoa of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Aquaculture, 1986, 58(3-4): 277-280.
- [11] 李赞, 王品红, 贺桂珍, 等. 太平洋牡蛎精液的超低温保存[J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(2):

- 207-211.
- [12] Renard P. Cooling and freezing tolerances in embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*; methanol and sucrose effects [J]. *Aquaculture*, 1991, 92: 43-57.
- [13] 李纯,李军,薛钦昭. 栉孔扇贝精子的超低温保存研究[J]. *海洋水产研究*, 2000, 21(1): 57-62.
- [14] 杨爱国,王清印,孔杰,等. 扇贝精液超低温冷冻保存技术的研究[J]. *海洋与湖沼*, 1999, 30(6): 624-628.
- [15] 蔡明夷,柯才焕,王桂忠,等. 九孔鲍精子短期保存技术研究[J]. *海洋科学*, 2008, 32(1): 1-5.
- [16] 王梅芳,余祥勇,刘永,等. 马氏珠母贝精子的超低温保存[J]. *水产学报*, 2006, 30(2): 170-174.
- [17] 王鹏飞,王梅芳,余祥勇. 马氏珠母贝胚胎和早期幼虫冷冻的研究[J]. *广东海洋大学学报*, 2008, 28(1): 25-28.
- [18] 薛钦昭. 栉孔扇贝胚胎超低温液氮保存[J]. *海洋科学*, 1994, 4: 44-47.
- [19] Bayne B L. Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.) [J]. *Ophelia*, 1965, 2: 1-47.
- [20] Satuito C G, Bao W Y, Yang J L, et al. Survival, growth, settlement and metamorphosis of refrigerated larvae of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck and their use in settlement and antifouling bioassays [J]. *Biofouling*, 2005, 21(3/4): 217-225.

Study on refrigeration of the early larvae of the mussel *Mytilus coruscus*

LI Yi-feng^{1,2}, YANG Jin-long^{1,2*}, WANG Chong^{1,2}, SHEN He-ding¹

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Institute of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The possibility of refrigeration (4 °C) of early larvae of the mussel *Mytilus coruscus* was examined in the present study. The effect of larval density on the refrigeration of *M. coruscus* was also investigated in three different culture batches. After refrigeration, larvae were transferred to 18 °C, and survival rates and shell growth of larvae were investigated. The present results showed that the average survival rates of early larvae were higher than 95%, and both shell length and shell height showed a significant increase during the 1-month refrigeration period. Larval densities of different culture batches had a different effect on larval survival and shell growth during refrigeration, indicating that larval density may be an important factor for larval refrigeration. After larvae were transferred and cultured at 18 °C for three weeks, survival rates of refrigerated larvae decreased to 56%, which was lower than that in control larvae (75%). In contrast, the shell growth rate of refrigerated larvae was higher than that of control larvae. Thus, refrigeration can be used as an effective method of storing larvae of *M. coruscus* for use in field of mollusk larval biology and improvement of seed production techniques in aquaculture industry.

Key words: *Mytilus coruscus*; refrigeration; larval density; survival rate

Corresponding author: YANG Jin-long. E-mail: jlyang@shou.edu.cn