

马粪海胆人工育苗的初步研究

廖承义

(海洋生物学系)

马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)是一种经济海产动物,它的生殖腺营养极为丰富,我国明代就有利用海胆生殖腺制酱的记载。由于马粪海胆的生殖腺色泽橙红,因此是加工高级“云丹”的优质原料。此外,海胆的提取物“波乃利宁”(Bonellinin)具有抑制癌细胞生长的作用,因此可以作为研究抗癌药物的材料。据报道,苏联有关学者最近对海胆生殖腺作了测定和分析,认为海胆生殖腺所含的二十烷酸($C_{19}H_{39}COOH$)可达总脂肪酸的30%以上^[1](二十烷酸是生物合成前列腺制剂的前体之一,是一种有效的预防心血管病的药物)。因此,海胆生殖腺是提取二十烷酸的理想原料。

鉴于海胆上述的应用价值,如何开发利用海胆资源已成为当前亟待解决的问题。

有关海胆发育生物学方面的研究已有多年的历史^{[2][3][4][5]},但对海胆幼虫后期的发育,即幼虫的变态直至发育成幼海胆的研究较少,尤其是作为一种新的水产资源进行增殖的研究尚待深入探讨。

据报道,日本佐贺县栽培渔业中心自1976年开始对红海胆,马粪海胆等进行了苗种生产的研究,并获得一定数量的幼海胆^[6]。在我国有关马粪海胆人工育苗方面的研究工作尚无报道。

本文总结了几年来马粪海胆室内人工育苗的实验,可为今后开展工厂化人工育苗提供一定依据。

一、材料和方法

马粪海胆在青岛近海沿岸的繁殖季节为2—4月。试验时取暂养的个体,自口极围口膜处注射0.5M的氯化钾,并立即置于过滤的新鲜海水中。约经0.5—5分钟,成熟的生殖细胞即从反口极生殖板上的生殖孔处排出。雌性个体排出的卵子呈橙红色,雄性个体排出的精子呈乳白色。当生殖细胞刚排出时,立即将雌雄个体分开,分别置于不同的培养缸中,让其继续排放。当雌性个体排卵结束后,即将海胆取出,并吸取一定量精液进行人工授精。其方法为:取一滴干精加入10毫升过滤海水进行稀释待用,然后在大约100毫升的含卵海水中加入一滴稀释的精液进行人工授精。加入精子后0.5—2分钟,在显微镜下检查即可见受精膜举起,受精率一般在90%左右。

受精后5—10分钟,应洗卵1—2次,以除去多余的精子。

受精卵在玻璃缸内进行培养,水温为14—17℃,约经22小时囊胚破膜孵化,浮于的表层。当胚胎发育至棱柱幼虫 (Prism larva) 时,将上浮的幼虫移至另一培养缸培养。

幼虫的培养密度,早期平均为1.5—2个/毫升。八腕长腕幼虫后大约为0.3—0个/毫升。

幼虫时期的饵料,用不同的单胞藻每天投喂2次。饵料的密度保持在3,000—5,000个细胞/毫升。

幼虫培养期间,每天换水1/3—1/4,充气2—3次,每次约半小时。

待幼虫发育至八腕长腕幼虫的后期,前庭复合体 (vestibular complex) 明显出现,初生管足已突出于前庭腔壁,并能自由伸缩,这表明幼虫即将变态形成幼海胆。此时应将幼虫移到附有底栖硅藻和底部铺有0.5—1公分大小砂砾的培养缸中,以促使幼虫的变态。

幼虫变态为幼海胆后,置于有过滤循环系统的水族箱内继续培养。幼海胆的饵料在早期为底栖硅藻。当壳径为1毫米左右,可以投喂石莼 (ulva) 或马尾藻 (sargassum) 等多细胞藻类。

二、结 果

(一) 性腺的发育与成熟

根据1984年12月—1985年5月从潮间带、低潮区所采集的标本,通过解剖观察和生物学测量表明,自12月下旬雄性个体已开始成熟,当精巢取出后,在破口处即有大量精液流出,在显微镜下观察稀释的精液,精子活泼。但此时雌性个体的卵巢尚不成熟。生殖腺的指数(生殖腺重量占全体重量的百分比),雌性个体为12.3—25%,雄性个体为11—24%(见表1)。1月份雌性生殖腺指数的最高值可达28.5%,雄性可达23.7%。2月初,卵子开始成熟,人工授精率可达90%以上,此时雌性腺的指数最高值为28.8%,雄性腺为23.6%。3月份雌性生殖腺指数的最高值为25.9%,雄性生殖腺为30.7%。至五月初,有的雌或雄性腺仍饱满,但因成熟过度 性腺呈糊状,难以完整地取出进行称量。据观察统计,五月初壳径在5公分以上的个体,性腺已基本排空萎缩,而壳径在3公分以下的个体,性腺仍很饱满,直至5月中旬,性腺才排空萎缩。从上述结果表明,马粪海胆性腺发育的特点是:①雄性先熟。②个体大者早成熟,个体较小者晚成熟。③实验过程中发现,壳径只有2.5公分的个体,生殖腺不仅能成熟,还能正常的受精发育。从而可以认为马粪海胆的性成熟年龄约为一年。

(二) 饵料对幼虫发育的影响

从受精卵发育到早期四腕长腕幼虫,即开始摄食。为了研究浮游幼虫阶段的食性,选用了七种不同的单胞藻进行饵料试验。这些藻类是:湛江叉鞭金藻 (*Dicrateria Zhanjiangensis*), 角毛藻 (*Chaetoceros muelleri*), 三角褐指藻 (*Phaeodactylum tri-cornutum*), 扁藻 (*Platymonas*, Spp.), 小球藻 (*Chlorella* sp.), 盐藻 (*Dunaliella* spp.) 和新月菱形藻 (*Nitzschia closterium*)。

表1 马粪海胆的性腺发育

日期	壳径 (公分)	全重 (克)	生殖腺重 (克)	生殖腺指 数(%)	性别	编号
1984年 12月24日	5.2	45.2	11.6	25.0	♀	20
	4.0	24.2	3.0	12.3	♀	22
	3.8	17.3	4.2	24.0	♂	26
	5.2	50.0	6.6	11.0	♂	6
1985年 1月8日	5.0	45.5	13.0	28.5	♀	43
	3.8	20.7	2.6	12.5	♀	54
	4.4	36.2	8.6	23.7	♂	46
	3.1	13.7	1.2	8.0	♂	62
2月8日	4.2	27.0	7.8	28.8	♀	78
	2.0	7.5	0.6	8.0	♀	93
	4.0	22.0	5.2	23.8	♂	34
	2.5	5.4	0.55	10.1	♂	94
3月7日	4.1	23.5	6.1	25.9	♀	119
	5.4	53.0	8.7	16.4	♀	97
	4.3	27.0	8.3	30.7	♂	109
	5.2	47.5	5.8	12.2	♂	98
4月5日	5.3	47.0	11.0	23.4	♀	124
	6.2	78.0	16.0	21.0	♂	127
	4.3	27.0	6.0	22.2	♀	125
	3.8	17.5	5.2	29.7	♀	126
5月6日	3.8	19.3	性腺呈 糊状无 法完整 取出称 重		♀	128
	3.4	13.0			♂	130
	3.1	9.5			♀	134
	2.8	7.4			♂	137

试验结果,用不同单胞藻培养幼虫,以投喂角毛藻的幼虫发育速度最快,并能顺利完成变态形成幼海胆。而有的只能停留在四腕长腕幼虫阶段。有的虽然能发育成八腕长腕幼虫,但发育速度缓慢,能变态成幼海胆的比例很低。从表2可以看出,在14—17℃温度下,2—4天时,其生长发育速度没有明显的差异,第6天后逐渐表现差异。此时,幼虫的平均体长,投喂小球藻的为529 μ ,扁藻组为422 μ ,三角褐指藻组为471 μ ,角毛藻组为522 μ 。当培养到第8天时,投喂三角褐指藻和扁藻组的幼虫几乎停止生长,出现萎缩现象,并且发现畸形幼虫,而此时投喂角毛藻的幼虫平均体长已达682 μ 。第9天,角毛藻组的幼虫已开始发育成八腕长腕幼虫,而其它各实验组的幼虫仍处于四腕长腕幼虫阶段。幼虫培养至12天,又鞭金藻组的幼虫有部分已发育成早期八腕幼虫,幼虫体长平均为650 μ ,盐藻组的幼虫其后背腕仅呈芽状突起,幼虫平均体长为650 μ 。而角

毛藻组的八腕长腕幼虫已出现肩片(epaulettes)和前庭复合体(Vestibular complex),幼虫的平均体长已达731 μ 。培养至14天,角毛藻组的幼虫前庭复合体在外观上已很明显,初生管足已突出于前庭腔中(图版Ⅲ—2),而其它各实验组的幼虫仍停留在原来的发育阶段。有的幼虫除体长萎缩外,胃部也有明显的萎缩现象,有部分幼虫开始沉底并相继死亡。

(三) 幼虫的生长发育

在水温为14—17℃的条件下,受精卵约经2小时即分裂为两个细胞,15小时左右形成囊胚,22小时囊胚从卵膜中孵出,26小时左右开始进行原肠作用,40小时左右发育成棱柱幼虫(prism larva)(图版I—1),约66小时为四腕长腕幼虫(图版I—2)。受精后约10天即可发育成八腕长腕幼虫(图版I,3—6)。11天左右出现前肩片(包括背肩片和腹肩片)及后肩片(图版Ⅲ—1)。肩片发生后,幼虫的左侧前庭复合体(海胆基)逐

表2

饵料对幼虫生长发育的影响

饵料种类	二 天		四 天		六 天		八 天		十二天	
	体长 (μ)	腕长 (μ)	体长 (μ)	腕长 (μ)	体长 (μ)	腕长 (μ)	体长 (μ)	腕长 (μ)	体长 (μ)	腕长 (μ)
湛江叉鞭金藻	390	146	438	195	546	260	585	325	650	341
角 毛 藻	406	195	471	211	552	243	682	373	731	477
三角褐指藻	391	132	434	178	471	242	438	165	406	163
扁 藻	422	162	438	178	422	195	406	160	408	159
小 球 藻	390	162	471	166	529	276	585	292	520	275
新月菱形藻	401	130	455	178	536	260	585	260	568	325
盐 藻	406	160	438	178	533	260	531	325	650	406

表3 马粪海胆的胚胎发育

水温 $14^{\circ}-17^{\circ}\text{C}$

发育时间	发育阶段
受精后 2小时	2细胞期
3:30	4细胞期
4:30	8细胞期
5:0	16细胞期
15:0	囊胚期
22:0	囊胚自卵膜中孵出
26:0	原肠胚期
43:0	棱柱幼虫
60:0	四腕长腕幼虫
第10天	八腕长腕幼虫
28天	变态成幼海胆

渐明显,至14天前庭复合体中的5个呈锯齿状的茎明显突出,24天就开始生出,管足冲破前庭壁,26天左右管足伸出幼虫体壁(图版II-2),28天幼虫变态形成幼海胆(图版II-6),此时幼胆的壳径约在325 μ 左右。从表3中可以看出,整个发育过程中棱柱幼虫期所经历的时间最短,约只有一天左右,四腕长腕幼虫所经历的时间约天左右,而八腕长腕幼虫所经历的时间则最长,约需要十八天左右才能变态形成幼海胆。在这段时期内,幼虫的体长基本上没有明显的变化,约650—780 μ ,最长的可达812 μ 左右。在这段时间幼虫的发育主要表现在左侧的前庭复合体经过系列复杂的变化,形成幼海胆的各种器官结构,这就是Ralph T.等所描述的海胆原基在幼虫内部育的阶段^[3]。由于幼海胆仅仅是在幼虫的左侧形成,因此刚变态结束时,幼海胆的壳径只有原虫长度的 $\frac{1}{2}$ 左右。

在幼虫的发育过程中,腕的生长可以作为幼虫发育是否正常的标志之一。据测量,马粪海胆腕的长度(以最初发生的口后腕为准)与幼虫的宽度(以幼虫腕基部的左为准)之间有一定的相关性,即随着幼虫腕的增大加长,身体的宽度也在相应增加。图1中表明,腕长与体宽二者的数值是比较相近的。

(四) 幼虫的变态

马粪海胆的胚胎在发育至八腕长腕幼虫后,在接近幼虫腕基部的部分纤毛带成水方向(以幼虫的主轴为准),并突出于身体的表面形成了两条半环形的纤毛带,称为前

片(其中位于后背腕与前侧腕之间的称为背肩片,位于两个口后腕之间的称为腹肩片)。不久在幼虫的后端以同样方式形成两条半环形的纤毛带称为后肩片,其排列方向是在幼虫的左右两侧(图版Ⅲ—1)。前后肩片随着幼虫的发育明显地突出于体表,它是该阶段幼虫的主要运动器官。由于肩片的产生,幼虫的游动方式可以从原来的水平方向(以幼虫的前后端为准)改为垂直方向的上下游动。肩片出现后不久,幼虫身体的左侧面逐渐变得平坦,前庭复合体(海胆基)明显可见。这时从外形看,幼虫的腕粗壮。由于前庭复合体的日益增大,挤压了原来的幼虫胃,最后前庭复合体可超过幼虫胃的体积(图版Ⅲ—2)。

前庭复合体的出现是幼虫即将开始变态的主要标志。在变态过程中,幼虫的棘由体表生出,并逐渐增多。同时,前庭复合体中的初级管足冲破前庭腔壁伸出体壁(图版Ⅱ—2)。幼虫借管足顶端的吸盘吸附于底质上,并以管足作为行动器官。从此,幼虫由原来的浮游生活转变成底栖匍匐生活。这时幼虫的腕仍存在。不久,随着幼虫的变态,原来的腕便渐渐消失。腕的消失,首先是腕表皮组织自顶端逐渐向基部收缩,而腕内的骨针仍旧被保留,因此在标本中经常可以看到裸露在外的骨针(图版Ⅱ—4),直至变态结束形成幼海胆后,骨针才完全脱落。据观察,自八腕长腕幼虫伸出初级管足到变态形成幼海胆,整个过程需要2—4天。刚变态的幼海胆,其外形为不规则的星形(图版Ⅱ—5),以后逐渐变成球形。

合适的底质是幼虫变态的重要条件。在幼虫的变态过程中,培养容器的底部具有一定数量的底栖硅藻和铺有一定大小的砂砾的情况下,幼虫才能顺利完成变态形成幼海胆。当底质只有底栖硅藻而没有砂砾时,幼虫能伸出管足,但迟迟不能变态。例如4月下旬有一部分幼虫已开始沉落,并伸出管足吸附于有底栖硅藻的缸底上,但因缸底没有铺砂砾,幼虫不能变态,并发生大量死亡。后来放置了砂砾,2—3天后,存活的幼虫变态成幼海胆。这表明底质条件是幼虫变态的要素。

合适的底质是幼虫变态的重要条件。在幼虫的变态过程中,培养容器的底部具有一定数量的底栖硅藻和铺有一定大小的砂砾的情况下,幼虫才能顺利完成变态形成幼海胆。

当底质只有底栖硅藻而没有砂砾时,幼虫能伸出管足,但迟迟不能变态。例如4月下旬有一部分幼虫已开始沉落,并伸出管足吸附于有底栖硅藻的缸底上,但因缸底没有铺砂砾,幼虫不能变态,并发生大量死亡。后来放置了砂砾,2—3天后,存活的幼虫变态成幼海胆。这表明底质条件是幼虫变态的要素。

(五) 幼海胆

刚变态形成的幼海胆,壳径在243—325 μ 之间,经过10天的培养,壳径可达487 μ 左右。当幼海胆生长到壳径为1毫米左右时,反口面围肛部周围的五块生殖板和眼板清晰可见,与生殖板相对应的间步带区,色泽较深,外形呈五辐射状,并与步带区的界限十分明显(图版Ⅳ—1)。

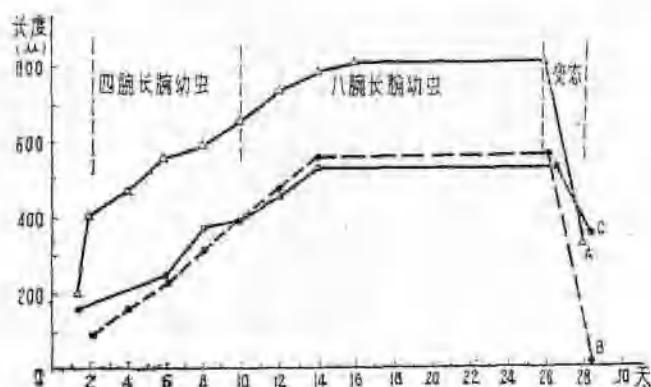


图1 马粪海胆幼虫的生长

A—体长 B—腕长 C—体宽。

幼海胆的棘在发生过程中可分成两种。一种是较短的棘,其顶端分叉(一般为四叉形)称为幼体棘(juvenile type);另一种是较长的,顶端不分叉呈针状的棘,称为成体棘(definite spine)(图版Ⅱ—6)。当幼海胆生长到3—4毫米时,幼体棘逐渐脱落。

值得注意的是,在实验室内相同条件下培养,幼海胆在个体之间有很大的差异。例如,自受精卵开始,培养54天以后,最大的幼海胆可达3毫米,最小的只有0.5毫米(图版Ⅳ—3)。

三、讨 论

(一) 青岛近海沿岸的马粪海胆,12月雄性性腺已经成熟,而雌性性腺要于翌年2月才开始成熟,一直可延续到五月初。人工育苗最适时间,以2月底—4月初为宜。

(二) 马粪海胆的人工育苗和其它经济海产动物的人工育苗一样,首先要解决幼虫的饵料问题。没有合适的饵料,幼虫就不能正常的生长和发育。本实验选择了7种单胞藻做饵料实验,以角毛藻为饵料培养的幼虫,生长和发育最快,并能顺利完成变态形成幼海胆。这和Guillard and Ryther的实验结果相似。他们用14种单胞藻为饵料,培养阿巴海胆(*Arbacia punctulata*)等的幼虫,结果只有三种具有鞭毛的单胞藻是比较理想的饵料^[3]。另外,与日本学者伊东义信以角刺藻(*Chaetoceros gracilis*)为饵料,培养红海胆,马粪海胆和紫海胆的幼虫的结果相一致^[6]。

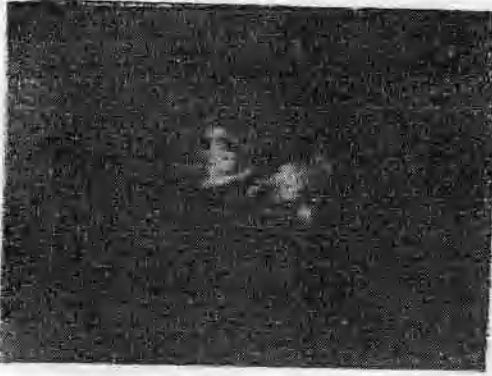
(三) 海胆幼虫经变态形成幼海胆,除了形态上发生变化外,其生活方式也发生了改变,即从营浮游生活转变成营底栖生活,随着生活方式的改变,饵料也相应地发生变化,即要求底质表面有大量的附着藻类。其次需要有利于沉落和变态的底质。以上条件若不能满足,幼虫就不能顺利完成变态形成幼海胆,因而造成幼虫的大量死亡。这与Ralph T. Hinegardner^[3]的意见一致。

(四) 幼虫沉落于底质后,首先伸出管足,这一过程大约需要0.5—1小时。从幼虫伸出管足至完全变态成幼海胆需2—3天,这和伊东义信的实验结果基本一致^[6]。因此在人工育苗过程中,附着器材的投放时间应在幼虫管足伸出体壁前。

(五) 在实验过程中观察到,在相同的条件下,幼虫的生长和发育及幼海胆的生长,在个体间有明显的差异,这可能是由于遗传基础的差异所引起的。因此,在完成人工育苗的基础上,开展遗传育种工作的研究是十分重要的。

参 考 文 献

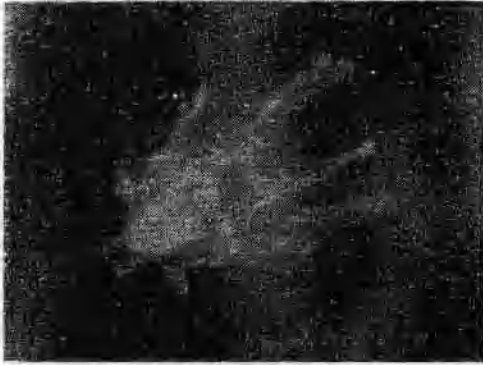
- [1] Морской еж-источник эйкозапентаеновой кислоты-природа, 1983, No 3, 112.
- [2] 张凤瀛, 吴宝铃, 廖玉麟, 1957, 中国的海胆, 生物学通报(7)18—24.
- [3] Gross, Paul, et al., The Sea Urchin: Developmental Biology, MSS Information Corporation, 1972.
- [4] Horstadius, S., Experimental Embryology of Echinoderms, Oxford University Press, 1973.
- [5] 于家建译, 1982, 发育生物学中的形态模式和实验, 人民教育出版社, 78—85.
- [6] 伊东义信, 1982, ウニの种苗生产とその増养殖, 《养殖》, 3:44—49.



1. 棱柱幼虫



2. 四腕长腕幼虫



3. 八腕长腕幼虫



4. 八腕长腕幼虫

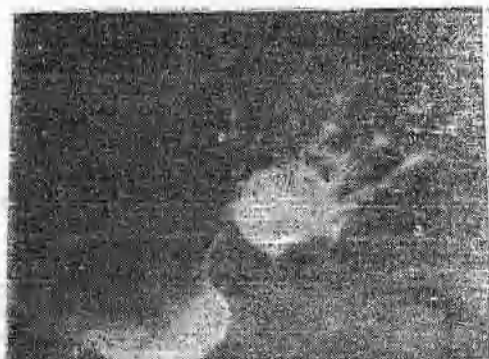


5. 八腕长腕幼虫

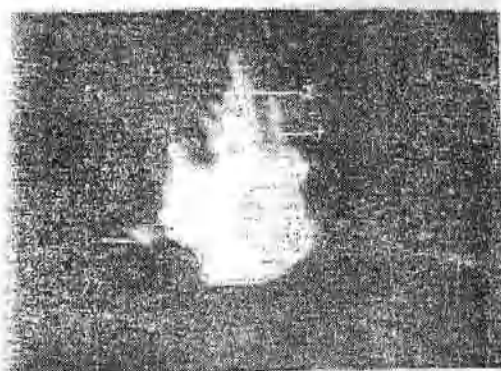


6. 八腕长腕幼虫

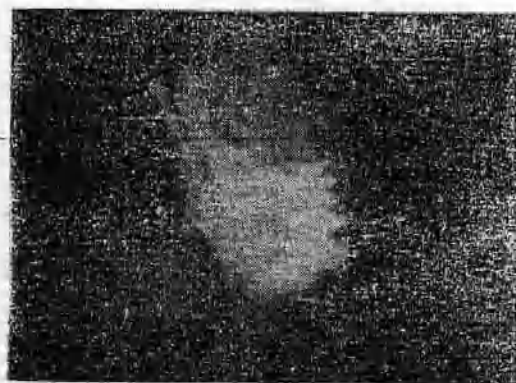
图版I 马粪海胆幼虫的发育过程



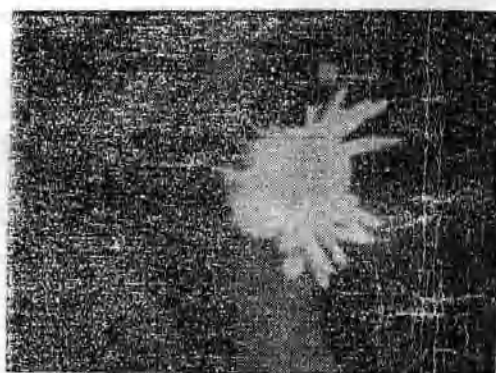
1. 附着于基质上的幼虫



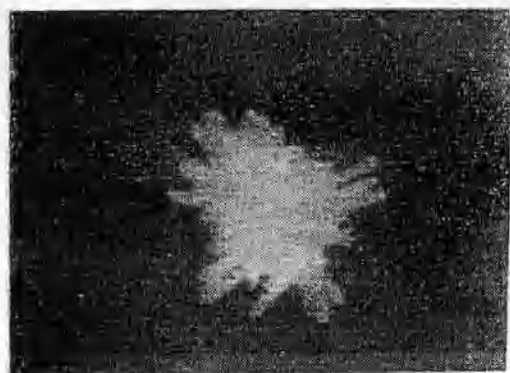
2. 幼虫伸出管足



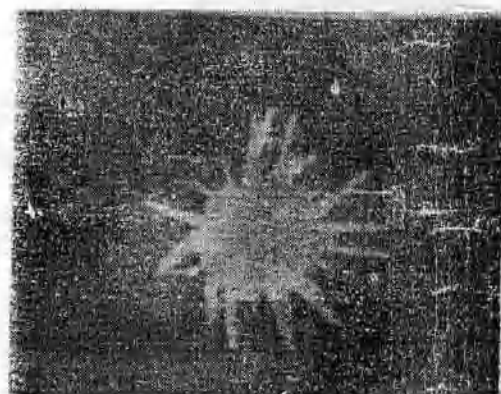
3. 幼虫长出棘



4. 即将变态结束的幼虫



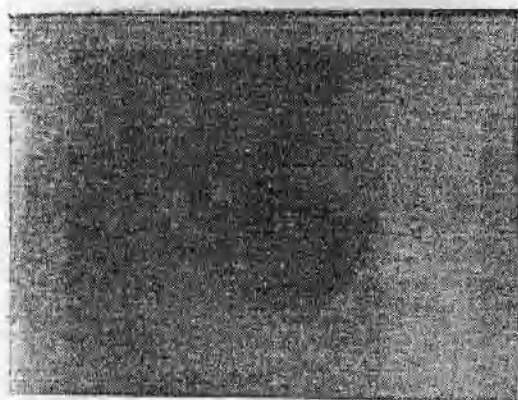
5. 刚形成的幼海胆



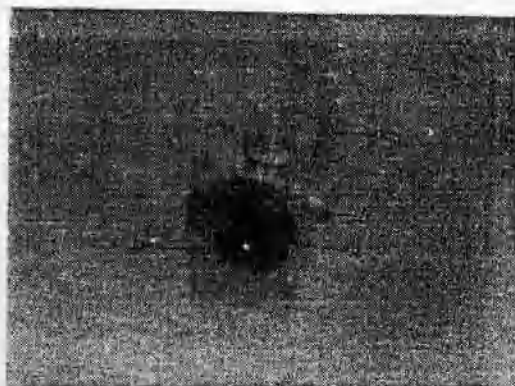
6. 幼海胆

图版II 马粪海胆幼虫的变态过程

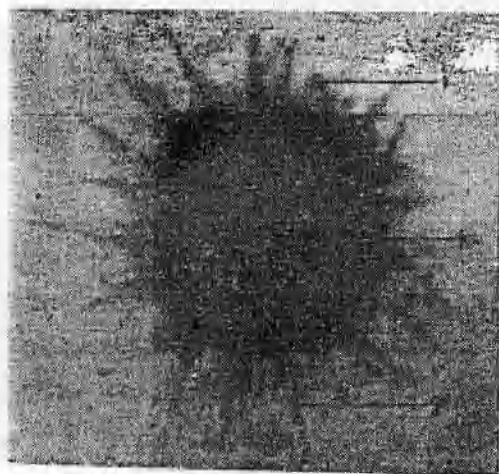
a—幼虫腕 b—管足 c—成体棘 d—幼虫棘 e—后肩片 f—骨针



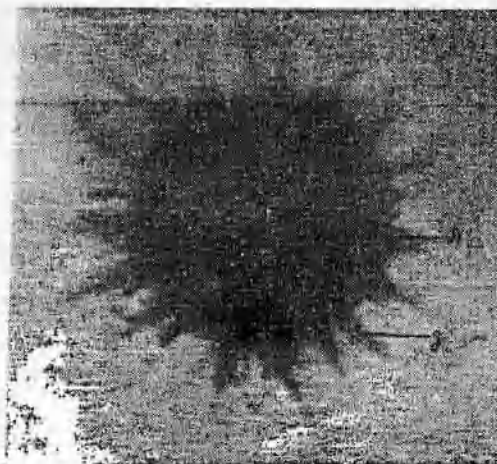
1. 八腕长腕幼虫的前、后肩片



2. 八腕长腕幼虫的前庭复合体



3. 幼海胆的口面观



4. 幼海胆的反口面观

图版Ⅱ

a—腕 b—前肩片 c—后肩片 d—前庭复合体 e—幼虫胃 f—齿
g—成体棘 h—生殖板 i—管足