

doi: 10.7541/2017.48

褶纹冠蚌钩介幼虫非寄生变态发育观察及早期稚蚌的生长

马学艳^{1,2,3} 徐云涛^{1,3} 闻海波^{1,2,3} 金武^{1,2,3} 徐跑^{1,2,3} 华丹³
顾若波^{1,2,3}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水鱼类遗传育种与养殖生物学重点开放实验室, 无锡 214081; 3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 中美淡水贝类种质资源保护及利用国际联合实验室, 无锡 214081)

摘要: 为揭示褶纹冠蚌钩介幼虫变态发育特征及过程, 采用体外培养方法实现了褶纹冠蚌钩介幼虫的非寄生变态发育。运用光学显微镜和扫描电子显微镜对变态发育过程中幼虫外部形态、内部器官发育进行了系列观察, 对非寄生变态发育的稚蚌后期生长发育进行跟踪研究, 并分析了底泥和光照两种环境因子对稚蚌存活及生长的影响。结果显示: 在整个培养过程中, 钩介幼虫的外部形态及大小未出现显著性变化, 而斧足、鳃丝、外套膜及内脏团等组织器官逐步形成; 在培养第3天, 幼虫可见斧足雏形, 鳃丝、外套膜纤毛尚未发现; 在培养第6天, 斧足成形, 可见斧足侧沟, 外套膜纤毛稀疏, 鳃丝出现; 培养第9天, 斧足纤毛、外套膜纤毛增多, 鳃丝密集。稚蚌投喂30d后, 鳃丝基本成形。养殖试验结果表明: 底泥对稚蚌存活和生长具有显著影响($P < 0.01$), 而光照无显著性影响($P > 0.05$)。该结果为蚌科钩介幼虫变态发育生物学研究积累了基础资料, 也通过对稚蚌生长的评估证实了体外培养是蚌类人工繁育及保护的有效技术途径。

关键词: 褶纹冠蚌; 钩介幼虫; 稚蚌; 非寄生变态; 发育

中图分类号: Q954.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2017)02-0391-08

褶纹冠蚌隶属软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、真瓣鳃目(Eulamellibranchia)、蚌科(Unionidae)、冠蚌属(*Cristaria*), 广泛分布于我国各地, 是我国重要的淡水优质育珠蚌品种, 具有较高的经济价值, 由于特殊的滤水特性, 褶纹冠蚌在池塘水体净化、水产生态健康养殖也有着广泛的应用^[1,2]。在自然界, 绝大多数蚌类的生活史有一个寄生的过程^[3,4], 它们需要寄生在鱼体上才能完成从钩介幼虫到稚蚌的变态过程, 寄主鱼在蚌类的生活史中扮演着重要的角色。随着水环境污染的日趋严重, 不同鱼类种群出现不同程度的下降, 合适寄主鱼的存在和种群大小对蚌科物种, 特别是对蚌科濒危种的繁衍生息具有决定性影响^[5]。

体外培养是指在无寄主鱼的情况下完成钩介幼虫非寄生变态发育成为稚蚌的过程, 钩介幼虫

体外培养逐渐成为贝类种质资源恢复较为先进的手段之一。近年来, 已对42个物种培养成功且获得较高的变态率^[6]。在国内, 仅见闻海波等^[5]首次对三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)钩介幼虫进行体外培养试验, 已取得了一定的进展。在体外培养条件下, 便于对钩介幼虫发育过程进行系统观察。我国水生生物资源丰富, 已报到的蚌科物种约60多种, 目前, 实验研究多集中于对蚌科钩介幼虫寄生过程中外部形态特征的观察^[3,7-9], 而关于非寄生变态发育的基础研究未见报道。

本实验利用光学显微镜和扫描电镜比较观察了钩介幼虫非寄生变态及稚蚌形态变化特征, 比较了钩介幼虫、稚蚌壳、外套膜、鳃丝及斧足等生长发育, 并测试了底泥和光照对非寄生变态稚蚌成活及生长影响。以期揭示褶纹冠蚌变态发育特征

收稿日期: 2016-01-13; 修订日期: 2016-07-25

基金项目: 江苏省水产三新工程(Y2014-38); 中央基本科研业务费项目(2015JBFM02)资助 [Supported by Project to Promote New Species, New Technology and New Modes in Fishery Science in Jiangsu Province (Y2014-38); National Nonprofit Institute Research Grant of Freshwater Fisheries Research Center (2015JBFM02)]

作者简介: 马学艳(1989—), 女, 山东济南人; 研究实习生; 研究方向为淡水贝类种质资源保护及利用。E-mail: 247255164@qq.com

通信作者: 闻海波, E-mail: wenhb@ffrc.cn; 顾若波, E-mail: gurb@ffrc.cn

及过程,有助于从更高层面上掌握蚌科幼虫变态发育的基础理论。

1 材料与方法

1.1 实验材料

褶纹冠蚌亲本采集及成熟钩介幼虫获得

实验用褶纹冠蚌采自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉养殖基地,均为4龄成熟母蚌;从10月中旬开始,检查雌蚌外鳃丝是否有成熟钩介幼虫,钩介幼虫的成熟判断标准可根据闻海波等^[5]采用的方法。

将有成熟钩介幼虫的雌蚌外壳洗净,使用开壳器于雌蚌后端轻轻打开,用5 mL注射器吸入灭菌纯水,穿刺雌蚌外鳃,将纯水注入,成熟的钩介幼虫随水流出于事先准备好的灭菌烧杯中;向烧杯中加入无菌纯水200 mL,洗去残留的组织、黏液以及钩介幼虫的碎壳,重复3—4次;然后,向烧杯中加入配置的抗生素混合液100 mL,清洗钩介幼虫,重复3—4次。钩介幼虫清洗完成后,应尽快移入培养基中,避免因放置过久对其活性产生影响。

血清准备 选取体格健壮、外表无伤鲤鱼作为血清采集实验鱼,规格为(147±25) g,采血前,实验鱼用200 mg/L的喹那啶麻醉,采用尾静脉采血方法^[10],注射器用肝素钠润洗;血液采集后3000 r/min离心10min,取上清液;用0.22 μm无菌过滤器过滤,−80℃冰箱保存备用。

1.2 钩介幼虫的体外培养方法

培养配方及钩介幼虫变态标准 参照Uthaiwan等^[11]标准,培养液体积为3.5 mL,其中选用鲤鱼的血清作为幼虫体外培养配方的重要营养源,L-15培养液为基础培养液,每个培养皿(60 mm×15 mm)幼虫数量为(300±10)只,每3天换液一次,设置5个重复。培养皿置于生化培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂SPX-100B-Z),温度控制在(24±0.5)℃,其中L-15基础培养液购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 钩介幼虫变态及稚蚌生长发育观察

光学显微观察 分别取培养前钩介幼虫、培养3d、6d、9d时钩介幼虫及投喂15d、30d稚蚌,在CX41型光学显微镜(Olympus)下观察并用Scope-Tek软件拍照。然后用0.02 mol/L的磷酸缓冲液(pH=7.2)清洗3次,用2.5%的戊二醛浸泡24h固定。

电镜样品制备及观察 电镜样品制备步骤为:(1)脱水:分别用50%、70%、90%的乙醇梯度脱水各15min,用100%乙醇脱水3次,每次30min;(2)置

换:叔丁醇置换3次,每次30min,叔丁醇熔点为25.69℃;(3)干燥:ES-2030型冷冻干燥仪(Hitachi)冷冻干燥,约5h;(4)喷金:E-1010/E离子溅射仪(Hitachi)喷金,厚度10 nm;用S-3000N型扫描电镜(Hitachi)观察并拍照。

1.4 底泥和光照对稚蚌早期生长影响

钩介幼虫在体外培养10d后,向培养皿中逐渐加入曝气自来水,唤醒稚蚌。取成功变态稚蚌,分为加底泥光照组(A)、不加底泥光照组(B)、加底泥无光照组(C)、无底泥无光照组(D)、取样组(E)5组,每组设置3个重复,每个重复30只。光照组为室内自然光照(约1000 lx),无光照组置于同一室内并用黑纱遮挡,取样组加底泥自然光照,分别放在塑料箱子(32 cm×21 cm×10 cm)中培育,养殖水体为5 L。用充分曝气自来水养殖,水温控制在(24±1)℃,气泵增氧。每天添加少量底泥,其中底泥为未施肥的花园土,加入水后过200目筛网,微波炉高温处理10min,冷却后使用。投喂浓缩藻类^[12],使水体藻密度保持在 2×10^6 个/mL,每天换水1/2,换水时用200目筛网过滤,确保稚蚌不丢失。培育15d、30d后在取样组(E)取30只拍照固定;养殖30d后,取A、B、C、D组稚蚌,在光学显微镜(Olympus CX41)下拍照、测量幼蚌壳长(0.01 mm),并统计成活率。

1.5 统计方法

采用SPSS 20统计软件分析实验数据。采用One-way ANOVA单因素方差分析法。在Excel 2007绘制相关图表。图片用Photoshop 7.0处理。

2 结果

2.1 成熟钩介幼虫形态特征

光学显微镜下,排放的成熟钩介幼虫做周期性开闭合运动(图版 I -1);钩介幼虫受刺激后双壳闭合,呈半透明状(图版 I -2);对钩介幼虫扫描电镜观察,钩介幼虫壳表面存在一些凹陷(图版 I -4);外套膜较平滑(M)(图版 I -5);外套膜边缘没有纤毛(Mc),存在一些突起(P)(图版 I -6);为有钩型(H),且钩上有大棘刺(图版 I -7);绞合线中央有凹陷(图版 I -8)。

2.2 体外培养阶段钩介幼虫形态及器官发育

对培养阶段钩介幼虫扫描电镜观察,在培养第9天时壳表面凹陷与未培养钩介幼虫无差异(图版 II -1),且培养期间钩介幼虫外壳没有生长(Se)(图版 II -2);外套膜覆盖壳内部(图版 II -3),表面褶皱比未培养的钩介幼虫外套膜褶皱明显增多(图版 II -4);培养第3天时未出现外套膜纤毛(图版 II -5),6d较稀

疏(图版 II-6), 9d时外套膜纤毛明显增多(图版 II-7); 培养3d时斧足(F)和内脏团(Vm)尚未成形(图版 II-8), 6d时可观察到斧足及斧足沟, 且斧足纤毛出现(图版 II-9), 9d时斧足纤毛密集(图版 II-10); 在培养第6天时可见鳃丝(图版 II-11), 9d时鳃丝密集, 但未连接(图版 II-12); 不添加鱼血清培养的钩介幼虫斧足较短, 发育不完全, 不能爬动(图版 II-13); 添加血清组钩介幼虫具有发达的斧足, 能伸缩进行自由爬行(图版 II-14)。

2.3 稚蚌的生长发育

对养殖15d、30d的稚蚌扫描电镜观察, 稚蚌壳表越靠近原始壳的地方越平滑(图版 III-2)靠近边缘的地方凹凸不平(图版 III-4), 壳表面比钩介幼虫凹陷明显; 稚蚌长出新壳是由原来壳内长出, 且壳钩仍存在(图版 III-5); 稚蚌新壳可见生长线(图版 III-6); 稚蚌外套膜褶皱状(图版 III-7); 外套膜边缘纤毛密集(Mc), 新壳边缘不整齐(图版 III-8); 斧足纤毛密集(图版 III-10); 稚蚌鳃丝和丝间隔纵形排列, 在鳃丝表面分布3种不同类型纤毛, 包括前纤毛(Fc)、前侧纤毛(Lfc)、侧纤毛(Lc)(图版 III-12)。前纤毛主要密集分布于鳃丝表面的中央部位; 前侧纤毛主要分布在鳃丝表面, 成排位于前纤毛区的两侧, 前侧纤毛较前纤毛粗大; 侧纤毛基部着生于鳃丝的两侧底部, 两鳃丝间隔的表面边缘处, 直径较前纤毛更细。

2.4 底泥和光照对稚蚌存活与生长的影响

褶纹冠蚌稚蚌在4种条件下成活率及壳长如表1所示。添加底泥且正常光照条件下成活率为(93.33±0.27)%, 成活稚蚌平均壳长为(1.06±0.13) mm, 添加底泥无光照组成活率为(92.22±0.58)%, 成活稚蚌平均壳长为(1.03±0.17) mm, 不添加底泥组在第15天时的存活率为(76.67±6.37)%, 30d时成活率为0。单因素方差分析表明: A、C组稚蚌存活及生长无显著性差异($P>0.05$), A、C组与B、D组存活呈极显著差异($P<0.01$)。

表1 投喂30d后稚蚌成活率及大小

Tab. 1 Survival rate and shell length of 30-days-juvenile mussel (N=5; X±SD)

组别Group	成活率 Survival rate (%)	稚蚌壳长 The shell length of juvenile (mm)
A	93.33±0.27 ^a	1.06±0.13 ^c
B	0 ^b	
C	92.22±0.58 ^a	1.03±0.17 ^c
D	0 ^b	

注: 同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Note: Bars labeled with different letters are indicate significantly different ($P<0.05$)

3 讨论

3.1 褶纹冠蚌钩介幼虫的外部形态

由于蚌科钩介幼虫需要寄生到寄主鱼上进行变态发育, 因此在发育过程中取样比较困难, 其变态发育过程的相关研究相对较少。对背瘤丽蚌^[8]、三角帆蚌^[9, 14]、背角无齿蚌^[13]、刻裂丽蚌^[15]的研究表明: 幼虫附着于宿主鱼鳃后, 壳长、壳高和铰合部增加不显著; 本实验发现刚变态成功稚蚌的外部形态未发生显著变化, 与上述研究相符。

目前对褶纹冠蚌钩介幼虫的报道主要集中于对外部形态的研究, 魏青山等^[16]报道的褶纹冠蚌幼虫大棘刺排列不规则。吴小平等^[3]报道的褶纹冠蚌幼虫壳上有2列大棘刺, 壳表面有小孔; 舒月凤等^[14]研究的褶纹冠蚌幼虫3列大棘刺, 壳表面没有小孔, 而是凹窝; 本实验利用扫描电镜观察了褶纹冠蚌钩介幼虫壳表及稚蚌壳表, 褶纹冠蚌钩介幼虫壳表具凹窝且大棘刺排列不规则, 这种不同的原因可能是地理位置不同引起的种群间的差异。

3.2 钩介幼虫及变态稚蚌的内部器官发育与其功能的关系

在整个培养过程中, 钩介幼虫的外部形态及大小未出现显著性变化, 而斧足、鳃丝、外套膜及内脏团等组织器官逐步形成。实验结果显示: 培养期间, 钩介幼虫外套膜褶皱显著增多; 培育第3至第6天, 可观察到斧足、鳃丝、外套膜纤毛; 9d时斧足纤毛、外套膜纤毛增多, 鳃丝密集; 养殖15d时, 鳃丝未成形, 30d时, 前纤毛、前侧纤毛、侧纤毛明显可见。斧足是稚蚌摄取食物的主要器官^[17, 18]。成蚌是靠鳃滤食, 稚蚌的摄食方式与成蚌不同, 稚蚌的鳃处于发育的初始阶段, 滤食功能不够完善, 会通过外套膜纤毛摆动使水流流动, 食物进入鳃部进行简单滤食, 斧足上纤毛密集, 可以刮食底部食物, 满足稚蚌生长需要。养殖30d后, 鳃丝结构与成蚌相似^[19], 鳃的形成可能是稚蚌从“足板”摄食(Pedal-feeders)转向鳃丝滤食(Filter-feeding)的重要标志。

3.3 非寄生变态发育稚蚌的生长发育

Uthaiwan等^[11]用4种鱼血清和马血清对*Hyriopsis myersiana*钩介幼虫进行体外培养实验, 用鲤鱼血清培养的钩介幼虫成活率及变态率显著高于用其他4种血清, 并证实只有鲤鱼血清培养的稚蚌可以存活2个月以上, 而尼罗罗非鱼(*Oreochromis nilo-ticus*)和杂交鲶鱼(*Clarias macrocephalus*×*C. garieunus*)血清培养钩介幼虫只存活1个月, 马血清培养的钩介幼虫只存活2—3个星期, 条纹鲶鱼(*Pangasius pangasius*)血清培养的稚蚌只存活了1个星期。

Reece^[20]比较了鱼体寄生和利用马血清体外培养两种方法获得*Lampsilis fasciola*稚蚌的变态率、后期生长及存活差异,结果显示:添加马血清体外培养幼虫变态率为92%,显著高于鱼体寄生的69%,但鱼体寄生变态稚蚌生长比体外培养快,1周后鱼体寄生稚蚌的成活率为82%,而体外培养仅为45%。从已开展的42种钩介幼虫的体外培养配方可以看出,不同蚌科钩介幼虫变态发育对营养的需求不尽相同^[6]。理论上,无论是体外培养还是鱼体寄生方式,只有当满足了钩介幼虫的营养需求才能正常变态发育。因此,通过稚蚌的后期生长发育评估将有利于筛选出更加科学的钩介幼虫体外培养方法及配方。本实验结果表明:鲤鱼血清培养获得稚蚌在培养30d成活率高达92%以上,这表明该体外培养配方是能满足褶纹冠蚌的变发育的营养需求。

合适的底质对稚蚌存活及生长具有重要作用^[21—25]。Gatenby等^[25,26]研究表明:*Villosa iris*稚蚌在底泥中生长明显快于无底质条件。华丹等^[12]比较了在底泥(于河中采集,过200 μm筛网并高温灭菌)、细沙、石灰石及无底质条件下*V. iris*稚蚌的存活及生长,结果表明:底泥组的稚蚌成活率显著高于其他三组,而无底泥条件下全部死亡。本实验结果与已有研究一致,光照对稚蚌生长无显著影响,而底泥对稚蚌的成活与生长具有显著影响,且笔者在驯养过程中观察发现:刚变态发育的稚蚌爬动较少,随着稚蚌生长爬动变多,后期减少,这可能是由于刚完成变态发育的稚蚌鳃丝等摄食器官未发育完全,不能像成蚌滤食水中藻类,主要靠斧足摄食底泥中有机质、细菌等满足生长需要。随着生长活动能力增强,随着鳃丝及其他器官逐渐发育完全,滤食能力增强,后期爬动减少。同时,在自然条件下,蚌类主要营底栖生活。在人工养殖条件下,添加底泥可以给稚蚌提供更加稳定的庇护场所,同时抑制有害微生物如纤毛虫等的影响。

已有的研究表明:蚌类的饵料一般包括微型藻类、细菌以及底泥等^[27],藻类是被认为是稚蚌的最重要食物^[25,27]。Gatenby等^[25]用 3.0×10^5 — 5.0×10^5 /mL浓度的藻类对*V. iris*进行投喂,45d后获得成活率为66.5%。华丹等^[12]测试了 3.5×10^4 、 8.75×10^4 、 1.75×10^5 个/mL藻类浓度对稚蚌成活率及生长的影响,结果表明在3种藻类浓度下稚蚌成活率及生长无显著性差异,且稚蚌30d后成活率为40%。实验投喂浓度为 2×10^6 个/mL,成活率达92%以上,显著高于上述实验结果。引起稚蚌成活率不同的原因可能是稚蚌养殖方式不同,也可能是投喂藻类浓度过低,已有实验研究表明:投喂浓度过低,会使稚

蚌不断消耗能量摄食而不能获得足够营养而死亡^[28],是否是因为藻类浓度问题还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Xu H J, Ling Q F, Yang C G, *et al.* Preliminary studies on the elimination effect of algae by three species of freshwater bivalve [J]. *Journal of Hydroecology*, 2010, **3**(1): 72—75 [徐海军, 凌去非, 杨财根, 等. 3种淡水贝类对藻类消除作用的初步研究. 水生生态学杂志, 2010, **3**(1): 72—75]
- [2] Li Y, Wu D, Wen G C, *et al.* Effects of cadmium on the antioxidant factors of *Cristaria plicata* [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, **31**(11): 2108—2113 [李琰, 吴丹, 文春根, 等. 镉对褶纹冠蚌抗氧化因子的影响. 农业环境科学学报, 2012, **31**(11): 2108—2113]
- [3] Wu X P, Liang Y L, Wang H T, *et al.* A comparative study on glochidial morphology of unionidae (bivalvia) (II. *Lanceolaria*, *Lamprotula*, *Hyriopsis* and *Cristaria*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(3): 252—256 [吴小平, 梁彦龄, 王洪铸, 等. 蚌科钩介幼虫形态研究 (II. 六种蚌的幼虫). 水生生物学报, 2000, **24**(3): 252—256]
- [4] Araujo R, Ramos M A. Description of the glochidium of *Margaritifera auricularia* (Bivalvia, Unionoidea) [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1998, **253**(1375): 1553—1559
- [5] Wen H B, Gu R B, Hua D, *et al.* Culture of glochidia of *Hyriopsis cumingii* in artificial media and morphological variation of transformed juvenile [J]. *Journal of Wuhan University*, 2011, **51**(1): 57—62 [闻海波, 顾若波, 华丹, 等. 三角帆蚌钩介幼虫体外培养及变态稚贝的形态变化. 武汉大学学报, 2011, **51**(1): 57—62]
- [6] Lima P, Lima M L, Uthaiwan K, *et al.* A review on the in vitro culture of freshwater mussel (Unionoidea) [J]. *Hydrobiologia*, 2012, **691**(1): 21—33
- [7] Xu L, Wu X P, Ling G, *et al.* Reproductive traits and glochidium morphology of *Lamprotula leai* [J]. *Journal of Nanchang University*, 2013, **37**(3): 262—266 [徐亮, 吴小平, 凌高, 等. 背瘤丽蚌繁殖特征及钩介幼虫形态. 南昌大学学报, 2013, **37**(3): 262—266]
- [8] Zhang G F, Xu S J, Fang A P. Parasitic metamorphosis development and effective accumulated temperature of glochidia of *Lamprotula leai* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2010, **40**(3): 18—22 [张根芳, 许式见, 方爱萍. 背瘤丽蚌钩介幼虫寄生变态发育和有效积温的研究. 淡水渔业, 2010, **40**(3): 18—22]
- [9] Wang H, Li J L, Wang G L, *et al.* Preliminary studies on

- morphological change of the glochidia of *Hyriopsis cumingii* in stage of parasiting [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2007, **16**(4): 394—398 [王宏, 李家乐, 汪桂玲, 等. 三角帆蚌钩介幼虫寄宿阶段形态变化的初步研究. 上海水产大学学报, 2007, **16**(4): 394—398]
- [10] Liu B, Wang M Y, Xie J, *et al.* Effects of acute cold stress on serum biochemical and immune parameters and liver HSP70 gene expression in GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, **31**(17): 4866—4873 [刘波, 王美垚, 谢俊, 等. 低温应激对吉富罗非鱼血清生化指标及肝脏HSP70基因表达的影响. 水生生物学报, 2011, **31**(17): 4866—4873]
- [11] Uthaiwan K, Noparatnaraporn N, Machado J. Culture of glochidia of the freshwater pearl mussel *Hyriopsis myersiana* (Lea, 1856) in artificial media [J]. *Aquaculture*, 2001, (1—2): 61—69
- [12] Hua D, Neves R J, Jiao Y. Effects of algal density, water flow and substrate type on culturing juveniles of the rainbow mussel (*Villosa iris*) (Bivalvia: Unionidae) in a laboratory recirculating system [J]. *Aquaculture*, 2013, **195**(1—2): 367—373
- [13] Liu S L, Li J L, Zhang G F, *et al.* Morphological development and growth characteristics of the juvenile of *Anodonta woodiana* [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2009, **18**(3): 269—274 [刘士力, 李家乐, 张根芳, 等. 背角无齿蚌稚蚌形态发育与生长特性. 上海海洋大学学报, 2009, **18**(3): 269—274]
- [14] Shu Y F, Wu X P. A comparative observation on glochidial morphology of two unionid species (unionidae) [J]. *Shandong Science*, 2005, **18**(1): 14—17 [舒月凤, 吴小平. 蚌科两种蚌钩介幼虫形态的比较观察. 山东科学, 2005, **18**(1): 14—17]
- [15] Wang Y F, Wei Q S, Peng Y. Fish Host Requirements of *Lamprotula scripta* Hude (Mollusca: Unionidae) [J]. *Journal of Central China Normal University*. 2001, **35**(1): 72—76 [王玉凤, 魏青山, 彭宇. 刻裂丽蚌钩介幼虫对寄生鱼的选择. 华中师范大学学报(自然科学版), 2001, **35**(1): 72—76]
- [16] Wei Q S, Fu C H, Wang Y F, *et al.* Comparative study on morphology of the glochidia of six mussel species (Mollusca: Unionidae) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1994, **18**(4): 303—309 [魏青山, 傅彩红, 王玉凤, 等. 珠蚌科六种蚌的钩介幼虫形态比较研究. 水生生物学报, 1994, **18**(4): 303—309]
- [17] Watters G T. A brief look at freshwater mussel (Unionacea) biology [A]. In: Farris J L, Van Hassel J H (Eds.), *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*. Florida: CRC Press, Boca Raton, Florida, and SETAC Press, Pensacola. 2007, 51—64
- [18] Yeager M M, Cherry D S, Neves R J. Feeding and burrowing behaviors of juvenile rainbow mussels, *Villosa iris* (Bivalvia: Unionidae) [J]. *Journal of the North American Benthological Society*, 1994, (2): 217—222
- [19] Wen H B, Xu H H, Cao Z M, *et al.* Effects of propagation on filtration rate and variation of gill microstructure in wrinkle comb pearl mussel *Cristaria plicata* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2011, **46**(4): 84—91 [闻海波, 许洪洪, 曹哲明, 等. 孕育对褶纹冠蚌滤食率的影响及鳃微结构变化. 动物学杂志, 2011, **46**(4): 84—91]
- [20] Reece F T. Studies on the in vitro propagation of freshwater mussels with implications for improving juvenile health [D]. North Carolina State University. 2014
- [21] Zimmerman L L. Propagation of juvenile freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae) and assessment of habitat suitability for restoration of mussels in the Clinch River, Virginia [D]. Virginia Polytechnic Institute and State University. 2003
- [22] Henley W F, Zimmerman L L, Neves R J, *et al.* Design and evaluation of recirculating water systems for maintenance and propagation of freshwater mussels [J]. *North American Journal of Aquaculture*, 2001, (63): 144—155
- [23] Hua D. Biology, captive propagation, and feasibility of pearl culture in the pink heelsplitter (*Potamilus alatus*) (Say, 1817) (Bivalvia: Unionidae) [D]. Fisheries and Wildlife Science. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA. USA. 2005
- [24] Mummert A K. Evaluating the feasibility of rearing juvenile freshwater mussels in a flow-through pond system at white sulphur springs national fish hatchery [D]. Virginia Polytechnic Institute and State University. 2001
- [25] Gatenby C M, Neves R J, Parker B C. Influence of sediment and algal food on cultured juvenile freshwater mussels [J]. *North American Journal of Aquaculture*, 1996, **15**(4): 597—609
- [26] Gatenby C M, Parker B C, Neves R J. Growth and survival of juvenile rainbow mussels, *Villosa iris* (Lea, 1829) (Bivalvia: Unionidae), reared on algal diets and sediment [J]. *The American Malacological Bulletin*, 1997, **14**(1): 57—66
- [27] Christian A D, Smith B N, Berg D J, *et al.* Trophic position and potential food sources of 2 species of unionid bivalves (Mollusca: Unionidae) in 2 small Ohio streams [J]. *Journal of the North American Benthological Society*, 2004, **23**(1): 101—113
- [28] Widdows J. Physiological ecology of mussel larvae [J]. *Aquaculture*, 1991, **94**(91): 147—163

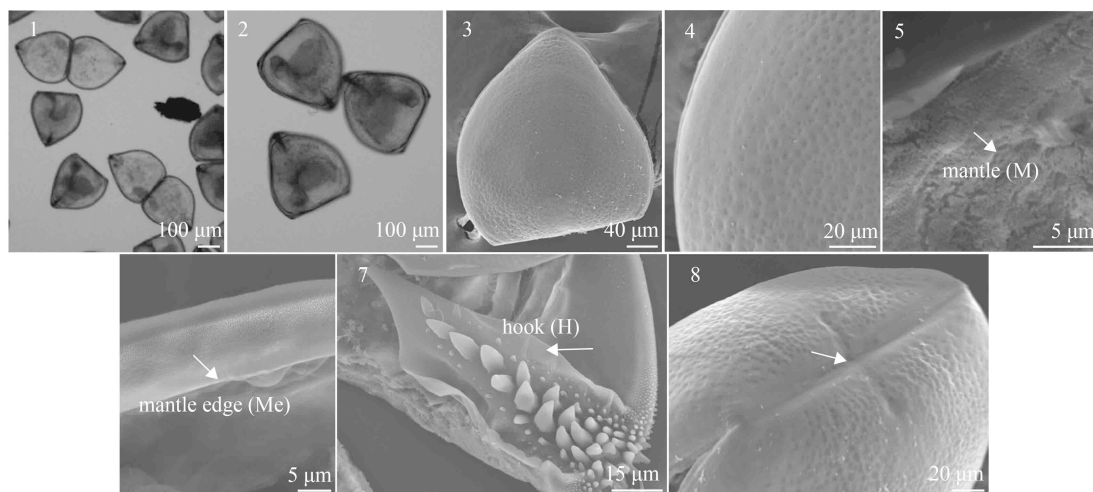
STUDIES ON THE NON-PARASITIC METAMORPHOSIS OF *CRISTARIA PLICATA* GLOCHIDIA AND THE DEVELOPMENT OF EARLY JUVENILES

MA Xue-Yan^{1,2,3}, XU Yun-Tao^{1,3}, WEN Hai-Bo^{1,2,3}, JIN Wu^{1,2,3}, XU Pao^{1,2,3}, HUA Dan³ and GU Ruo-Bo^{1,2,3}

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China; 2. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 3. Sino-US Cooperative Laboratory for Germplasm Conservation and Utilization of Freshwater Mollusks, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: In nature, the glochidia of *Cristaria plicata* must successfully parasitize a suitable host fish to metamorphose into juveniles. The current study investigated non-parasitic metamorphosis of the glochidia mainly focusing on the development of glochidia in external morphology and internal organs using microscope and scanning electron microscope, and analyzed the effects of sediment and light on the survival and growth rate of newly metamorphosed juveniles. The results showed that the glochidia remained similar in external morphology and size during the transformation process, while the feet, gill filaments, mantles, visceral mass and other inner organs were gradually formed. On the 3rd day of the in vitro culture, the rudiment of foot was firstly observed; on the 6th day, the feet had generally took shape with cilia showing on the surface of foot and the edge of mantle, and gill filaments began to show; on the 9th day, the cilia on feet and mantles increased and gill filaments became more dense; and after 30 days of tank culture, the morphology of juvenile mussel gills was clearly evident and was similar with adult mussels, and three typical different cilia were observed on the surface of branchial filament. The results demonstrated that the sediment has significant effects on the survival and growth of juveniles ($P < 0.01$), whereas the nature light has no effect ($P > 0.05$). These results provide basic insight for researches on the non-parasitic metamorphosis of glochidia of Unionidae species, and confirm that in vitro culture is an effective method for the artificial breeding and conservation of freshwater mussels.

Key words: *Cristaria plicata*; Glochidia; Juveniles; Non parasitic metamorphosis; Development

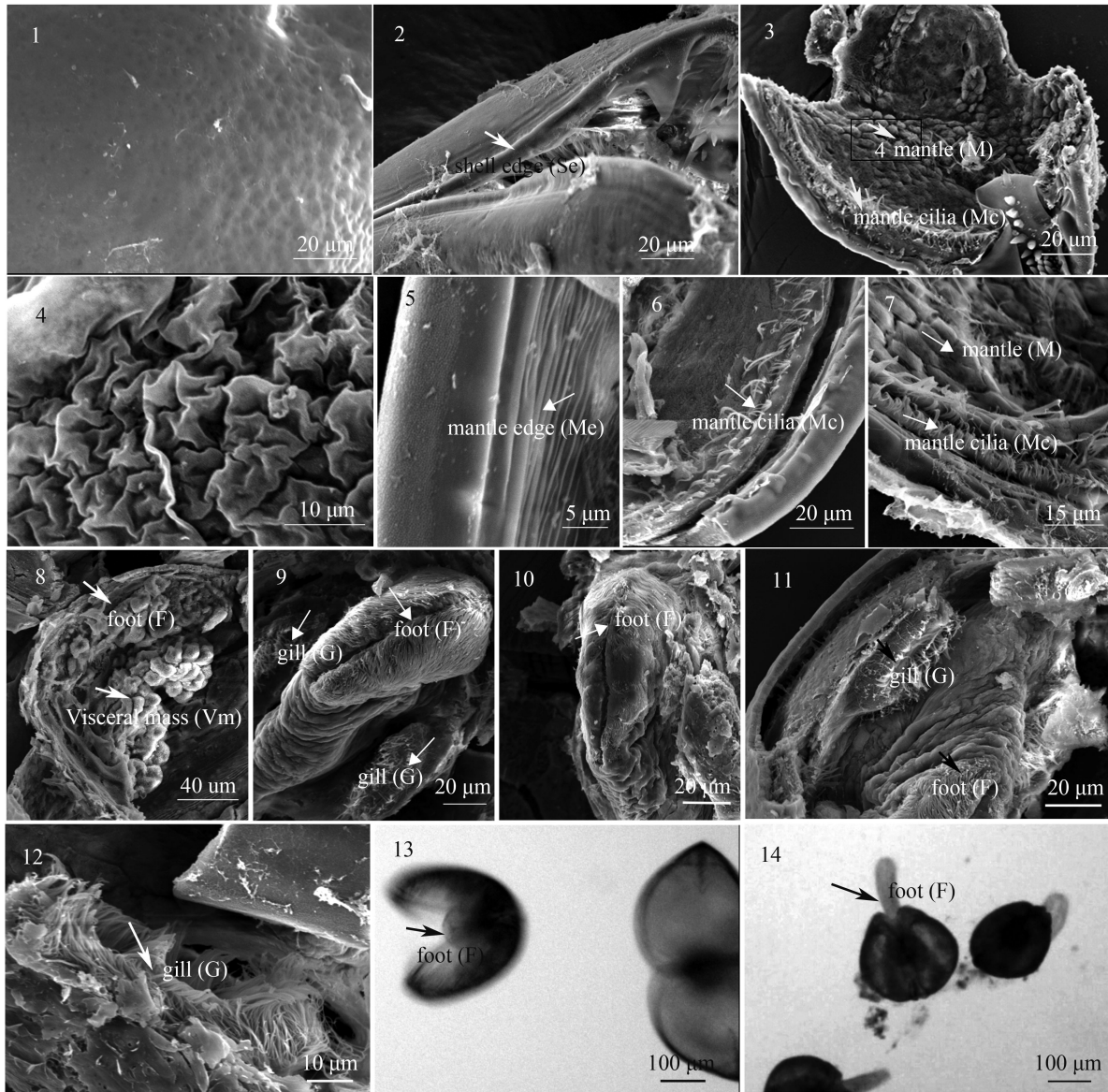


图版 I 钩介幼虫形态

Plate I Glochidium morphology

1. 成熟钩介幼虫; 2. 褶纹冠蚌钩介幼虫受刺激闭合后形态; 3. 钩介幼虫整体形态; 4. 钩介幼虫壳表; 5. 钩介幼虫外套膜表面; 6. 钩介幼虫壳边缘; 7. 钩介幼虫壳钩; 8. 钩介幼虫绞合线

1. Glochidium of *C. plicata*; 2. Valves closed glochidium of *C. plicata*; 3. Magnified glochidium; 4. Glochidium shells; 5. Glochidium mantle surface; 6. Glochidium shells edge; 7. Glochidium hook; 8. Glochidium hinge line

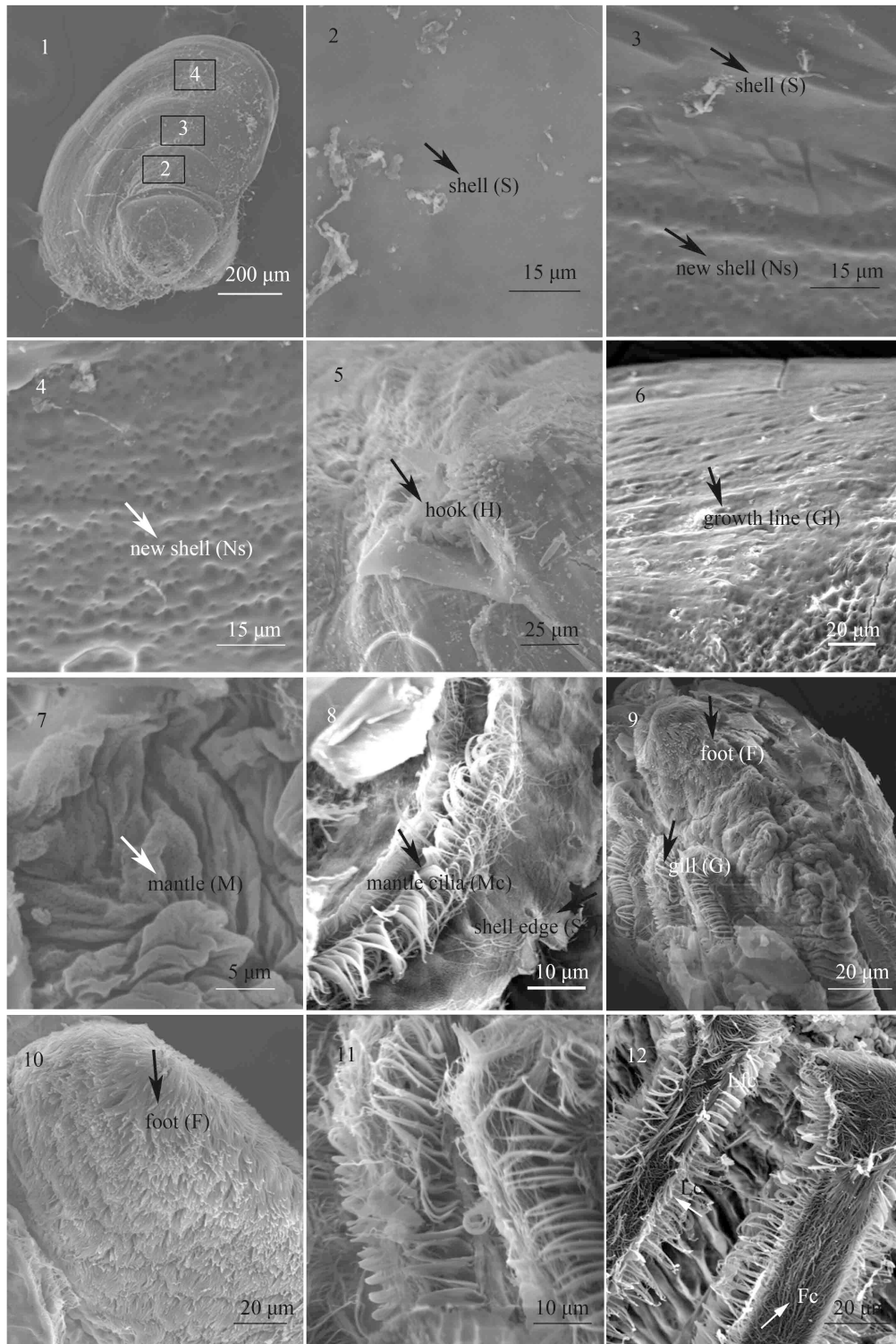


图版 II 培养阶段钩介幼虫形态及器官发育

Plate II Glochidium morphology during the transformation process

1. 培养9d钩介幼虫壳; 2. 培养9d钩介幼虫壳缘; 3. 培养9d钩介幼虫外套膜(a); 4. 培养9d钩介幼虫外套膜(b); 5. 培养3d外套膜边缘; 6. 培养6d外套膜边缘; 7. 培养9d钩介幼虫外套膜边缘; 8. 培养3d钩介幼虫斧足及内脏团; 9. 培养6d钩介幼虫斧足; 10. 培养9d钩介幼虫斧足; 11. 培养6d钩介幼虫鳃丝; 12. 培养9d钩介幼虫鳃丝; 13. 未变态成功的稚蚌; 14. 变态成功的稚蚌

1. Shell surface of 9d glochidium; 2. Shell edge of 9d glochidium; 3. Mantle of 9d glochidium (a); 4. Mantle of 9d glochidium (b); 5. Mantle edge of 3d glochidium; 6. Mantle edge of 6d glochidium; 7. Mantle edge of 9d glochidium; 8. Foot and visceral mass of 3d glochidium; 9. Foot of 6d glochidium; 10. Foot of 9d glochidium; 11. Gills of 6d glochidium; 12. Gills of 9d glochidium; 13. Unsuccessfully metamorphosed juvenile mussels of *C. plicata*; 14. Newly metamorphosed juvenile mussels of *C. plicata*



图版III 稚蚌形态及器官发育

Plate III Juvenile morphology

1. 30d稚蚌形态; 2. 30d稚蚌壳; 3. 30d稚蚌壳-新老生长壳; 4. 30d稚蚌壳-新生长壳; 5. 30d稚蚌壳钩; 6. 30d稚蚌生长线; 7. 30d稚蚌外套膜; 8. 30d稚蚌壳边缘; 9. 15d稚蚌斧足; 10. 30d稚蚌斧足; 11. 15d稚蚌鳃丝; 12. 30d稚蚌鳃丝

1. Juvenile mussel of *C. plicata* (30d); 2. Shell surface of 30d juvenile; 3. Old and new grown shell surface of 30d juvenile; 4. New grown shell surface of 30d juvenile; 5. Hook of 30d juvenile; 6. Growth line of 30d juvenile; 7. Mantle of 30d juvenile; 8. Shell edge of 30d juvenile; 9. Foot of 15d juvenile; 10. Foot of 15d juvenile; 11. Gills of 15d juvenile; 12. Gills of 30d juvenile