

熊本牡蛎室内人工育苗技术研究*

于 洋, 李 伟, 王许波, 张景晓, 李 琪*

(中国海洋大学水产学院, 青岛, 266003)

摘 要:本文以熊本牡蛎为材料, 在高温季节, 通过强化亲贝营养和 26℃ 以上高温促熟培育, 使熊本牡蛎亲贝快速成熟, 利用阴干流水刺激方法诱导产卵, 并进行了不同盐度下受精卵孵化实验; 通过合理控制幼虫密度、投喂新鲜无污染的单胞藻、及时分级筛选等系列技术措施, 克服了熊本牡蛎育苗成功率低的技术难题; 开展了栉孔扇贝壳、长牡蛎壳和栉江珧壳三种附着基的采苗试验, 结果显示牡蛎壳是理想的附着基, 可使稚贝的附着变态率达到 60% 以上, 促进稚贝的生长和成活, 提高稚贝产量, 壳长 2 mm 以上的稚贝单位水体出苗量超过 10×10^4 粒/ m^3 。

关键词:熊本牡蛎; 人工育苗; 高温; 采苗; 附着; 变态

中图分类号: S968 文献标志码: A 文章编号: 1003-6482(2016)05-104-05

DOI: 10.13984/j.cnki.cn37-1141.2016.05.015

引 言

熊本牡蛎(*Crassostrea sikamea*), 属牡蛎科(*Ostridae*)巨牡蛎属(*Crassostrea*), 主要分布在日本有明海海域。目前美国养殖的熊本牡蛎群体是 20 世纪 50 年代由日本引种到美国东海岸^[1-4]。熊本牡蛎相对于长牡蛎, 个体偏小, 肉质细腻, 口味鲜美, 其软体部相对较大, 在美国颇受消费者的青睐。另外, 夏季是长牡蛎、近江牡蛎等养殖牡蛎繁殖的季节, 这一时期的牡蛎肥满度低, 口感差, 难以满足夏季吃牡蛎的消费需求。但熊本牡蛎的产卵期较其他牡蛎晚, 这一时期的熊本牡蛎肉质依旧细腻可口, 较好地填补了夏季吃牡蛎市场的空白^[5-6]。

目前有关熊本牡蛎的研究, 国内外均集中在其分类地位研究和自然资源调查等方面, 而生长繁殖方面的研究还鲜见报道。仅美国 Robinson 在 1992 年前后对熊本牡蛎引种、性腺发育周期、亲贝最佳升温促熟时间、幼虫适宜的生长温度、人工繁育进行了研究, 并研究了饵料对亲贝性腺发育的影响^[6]。2015 年 7~9 月, 我们在莱州市进行熊本牡蛎人工育苗技术研究, 突破了育苗技术中一些技术难题, 取得了熊本牡蛎室内人工育苗的成功, 为我国熊本牡蛎的引种及养殖打下坚实的基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料:

1.1.1 熊本牡蛎亲贝: 亲贝系从美国俄勒冈东海岸引进的 2~3 龄贝, 大小在 5~6 cm, 共 80 个。

1.1.2 育苗设施: 育苗车间 100 m^3 , 有 4 个培育池, 每池大小为 25 m^3 , 附着基种类主要有栉孔扇贝壳、长牡蛎壳及栉江珧壳。

1.2 熊本牡蛎人工育苗技术措施和方法

1.2.1 亲贝促熟培育

熊本牡蛎繁殖盛期在美国沿海一般在 8—9 月份的高温期, 海水水温在 28℃ 以上, 因此, 熊本牡蛎亲贝需 6 月份从美国引进后, 经过 30 多天促熟培育, 在 7 月底水温 28℃ 以上才能成熟。

1.2.1.1 亲贝蓄养期间管理技术措施

水温: 亲贝 6 月入池后在自然水温 25—28℃ 条件下培育至成熟待产。

饵料: 饵料种类以小新月菱形藻、扁藻及金藻为主, 螺旋藻代用饵料为辅, 每天投喂 6 次, 日投喂量由

* 第一作者简介: 于 洋(1992-), 男, 硕士研究生. E-mail: 576821112@qq.com

* 通讯作者: 李琪, 男, 教授, 从事贝类育种研究, qili66@ouc.edu.cn

收稿日期: 2016-06-02

10×10^4 cell/d, 逐渐增至 30×10^4 cell/d。

换水: 每天换水 2 次, 每次换水量为培育水体的 1/3, 每 3 天移池 1 次。

1.2.2 诱导精卵排放及洗卵

1.2.2.1 诱导产卵

熊本牡蛎产卵、排精主要采用阴干、流水刺激的方法诱导。具体方法为: 把成熟的亲贝, 先经 5~6h 的阴干, 再放入培育池中流水刺激 1h, 经 1~2h 的适应期后, 亲贝排放精、卵, 亲贝排放率为 90% 以上。

1.2.2.2 受精及洗卵

受精: 熊本牡蛎排放精、卵时, 一般雄性先排精, 排精时呈白色烟雾状; 雌性排放较雄性晚 0.5~1h, 呈颗粒状。在充气或搅动条件下, 卵子在海水中受精。

洗卵: 排放过程中, 如精子过多, 则需进行洗卵。洗卵方法: 受精后静置 30~40min, 待受精卵下沉后, 将中上层含有精液的海水用 300 目滤鼓虹吸排出, 去除多余的精液和杂质, 然后再加入新鲜的海水; 受精卵经上述方法洗卵 2 次, 分池后孵化。

为确定最佳孵化效果, 在 28℃ 水温下, 比较了 20、25、30 等不同盐度下的受精率和孵化率研究实验。

1.2.3 幼虫培育

1.2.3.1 幼虫培育环境条件: 水温在 28~32℃, 盐度 25~30。

1.2.3.2 幼虫培育密度: 前期应控制在 6~8 粒/ml, 250 μ m 后为 3~4 粒/ml。

1.2.3.3 充气: 连续微量充气。

1.2.3.4 换水: 幼虫刚入池时, 保持水深 100cm, 第 1 天逐渐加水至满池, 以后改为换水。换水方法为: 用浮动网箱换水, 所用筛绢规格视幼虫大小而定。每天换水 2 次, 每次更换 1/4~1/3 倍水体。

1.2.3.5 换池: 每 4~5 天换池 1 次。换池可更好改善幼虫的水环境, 淘汰死亡和不健康的幼虫, 除去幼虫的粪便和粘液。

1.2.3.6 投饵: 熊本牡蛎幼虫发育到 D 形幼虫时, 就开始摄食。在幼虫培育前期, 投喂湛江叉鞭金藻; 在幼虫培育后期主要投喂金藻和青岛大扁藻为主, 小球藻为辅。在培育幼虫前期, 日投饵量应控制在 $0.5 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ cell/mL; 在培育后期, 适当添加扁藻, 一般投饵量为 $4 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$ cell/mL。投饵量应根据从池中取出幼虫在显微镜下检查胃肠饱满度后再确定。

1.2.3.7 幼虫检查

(1) 每天抽检幼虫的生长和发育情况, 其中隔 3 天取样详细测量大小, 至投附着基时。

(2) 每天早晚各检查一次胃肠饱满程度, 定期测量池水的水温、盐度、溶解氧、酸碱度、氨氮, 并做好记录, 发现问题及时处理。

1.2.4 附着基的投放及采苗

当幼虫达到 340 μ m 以上时, 60% 以上幼虫出现眼点, 即开始准备投放附着基, 进行采苗。

1.2.4.1 附着基种类选择及处理

主要选择牡蛎壳、栉孔扇贝壳、魁蚶壳及栉江珧附着基穿成串, 魁蚶壳每串 20 片, 栉江珧每串 10 片, 牡蛎壳每串 80 片, 栉孔扇贝壳每串 100 片。附着基经稀盐酸浸泡、洗刷干净即可以投放。

1.2.4.2 采苗密度: 采苗时眼点幼虫密度为 2~3 个/ml。

1.2.4.3 附着基投放量: 栉孔扇贝壳按 3 000 个/m³ 投放, 牡蛎壳按 2 000 个/m³ 投放。

1.2.4.4 采苗后的管理: 投附着基后, 除加大换水量外, 其它培育管理措施与后期幼虫管理相同。幼虫全附着后到出池前, 其管理技术措施如下:

培育水温: 因在 7~9 月份随自然海水温度而变, 一般 25~32℃。

盐度: 在 7~9 月因雨水较多, 一般在 25~32。

换水: 采用大换水培育, 每天换 1 倍水体的量, 分 2 次。

投饵: 附着变态后, 饵料主要以扁藻和小球藻为主, 金藻为辅; 投饵量为 $15 \times 10^4 \sim 20 \times 10^4$ cell/ml 日, 分 6~8 次投喂。

施药: 因熊本牡蛎变态时水温高, 微生物易繁殖, 因此, 在投放附着基后连施 3~4 天的抗菌素抑菌, 用药浓度为 2×10^{-6} 。

2 结果

2.1 亲贝的促熟培育情况

亲贝经过 35 天的室内促熟培育逐渐成熟,当观察到有个别雄贝有小量流产时,说明亲贝已经接近成熟,再稳定培育 5—7 天就可以准备产卵。亲贝促熟情况(见表 1)。

表 1 2015 年亲贝入池时间及培养情况表

Table 1 Cultivation situation of parent shellfish in 2015

亲贝入池时间	亲贝数量(个)	蓄养水体(m ³)	亲贝蓄养时间(天)	亲贝成活率(%)
2015 年 6 月 18	80	20	70	90

2.2 熊本牡蛎孵化和选优

2.2.1 不同盐度下受精、孵化效果比较

在 30℃ 水温下,不同盐度 20、25、30 的受精、孵化情况(见表 2)。

表 2 不同盐度下熊本牡蛎受精率、孵化率比较

Table 2 Result of cleavage rate, hatchery rate of hypotonic treatment

盐度	20	25	30
受精率(%)	90	95	90
孵化率(%)	90	95	85

从表 2 可看出,在盐度 20~25 条件下,受精率都在 90% 以上,其中盐度 25 时受精卵最高,为 95%;在孵化率方面,盐度为 20 和 25 之间差异不显著($P>0.5$),25 和 30 差异显著($P<0.01$)。

2.2.2 熊本牡蛎生产性孵化及选优情况

在水温 28℃、盐度 30 的海水中,熊本牡蛎生产性产卵、受精、孵化情况(见表 3)。

表 3 2015 年熊本牡蛎产卵、受精、孵化情况表

Table 3 The situation of spawning fertilization and incubation of *Crassostrea sikamea* in 2015

项目 年份	亲贝数量(个)	亲贝大小(cm)	产卵总量(亿粒)	受精率(%)	D 幼孵化率(%)	选幼量(亿粒)
2015.7.28	70	5.5	6.0	95.0	90	5.0

当幼虫发育到 D 形幼虫时,立即选优。选优采用 300 目筛网虹吸法,收集 D 形幼虫,置于培育池中进行培育。

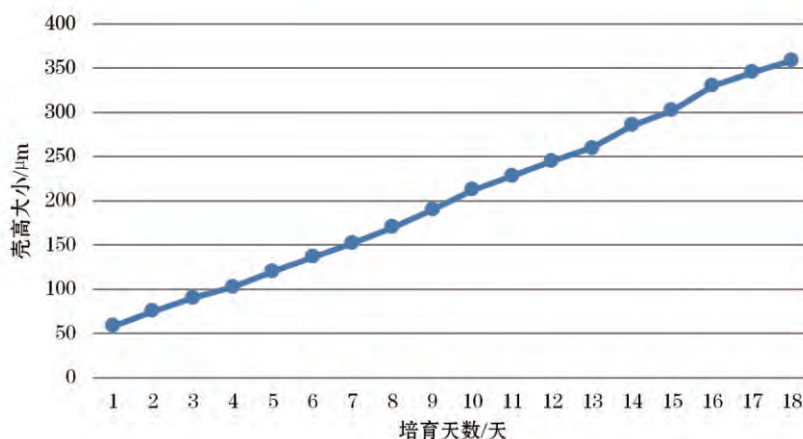


图 1 熊本牡蛎幼虫生长发育情况

Fig. 1 Growth and development situation of *Crassostrea sikamea*

2.3 幼虫生长情况

2015 年熊本牡蛎幼虫生长情况(见图 1),共测量 18 次,而成活率是以开始的密度和投附着基时密度对比计算的,2015 年为 80%。整个育苗期间水质变化情况(见表 4)。

表 3 幼虫培育期间的水质变化情况表

Table 3 The change of water quality during larval breeding

测量指标	水温/℃	盐度	溶解氧(mg/L)	pH	氨氮(ug/L)
测量结果	26~33	25~32	4~5	8.0~8.2	30~70

2.4 采苗情况:

经过幼虫 20 天的培育,当眼点幼虫出现比率达到 60%以上时,开始投放贝壳附着基,并进行了牡蛎壳、栉孔扇贝壳和栉江珧壳做为附着基的实验,其结果见表 4。

表 4 2015 年眼点幼虫附着变态情况表

Table 4 Adhering metamorphosis of eyebot larvae from 2015

测量项目 年份	牡蛎壳附着基		栉孔扇贝附着基		栉江珧壳附着基	
	附着变态率(%)	每壳附苗数(粒)	附着变态率%	每壳附苗数(粒)	附着变态率(%)	每壳附苗数(粒)
2015	62	68	40	36	25	26

综合研究表明:附着基的采苗效果排序为:牡蛎壳>栉孔扇贝壳>栉江珧壳。2015 年共获得 500 μ m 以上大小的牡蛎稚贝 1.5 亿粒,熊本牡蛎室内人工育苗生产获得成功。

3 分析与讨论

3.1 熊本牡蛎亲贝促熟培育的探讨

熊本牡蛎是一种适合低盐、高温海域养殖的牡蛎,在 20℃ 以下温度条件下,熊本牡蛎的性腺发育较慢,在 26℃ 以上,性腺发育较快,精子活力强。熊本牡蛎不能按长牡蛎温度较低(22℃ 以下)的育苗方式进行,同时,在高温、低盐的条件下,更有利于熊本牡蛎的性腺发育。因此,熊本牡蛎室内育苗时,性腺发育的条件是温度必须达到 26℃ 以上,本实验与 Robinson 对熊本牡蛎亲贝升温促熟的最适培育温度为 26℃ 的研究结果一致^[6,8-10]。

3.2 不同盐度条件下对受精、孵化情况的影响

在熊本牡蛎卵子受精及孵化过程中发现,低盐度环境下精子活力强,受精率高于高盐的受精率,本实验也得到验证。在孵化率方面,也是低盐高于高盐的孵化率;在盐度 25‰ 以下受精率和孵化率都较高;这与长牡蛎人工育苗相比,正好相反。盐度对受精卵的发育影响差异显著,与 Robinson 在盐度方面的研究结果一致^[6,8,10-11]。

3.3 熊本牡蛎幼虫发育及成活的探讨

在 26~28℃ 条件下,熊本牡蛎受精卵在 17h 后即可发育到 D 形幼虫阶段,比长牡蛎发育到 D 形幼虫所需的时间(22~23h)短。熊本牡蛎幼虫在发育到 16 天时,壳高达到 320~330 μ m,有个别幼虫出现眼点幼虫;发育到第 20 天,壳高达到 360~370 μ m,绝大部分幼虫出现眼点,并附着变态。与长牡蛎相比,熊本牡蛎幼虫在附着变态的时间和大小方面都有所差异。长牡蛎幼虫在 23~24℃ 条件下培育 15 天,壳高达到 290 μ m,个别幼虫出现眼点,在 18 天时,绝大部分长牡蛎幼虫出现眼点,壳高达到 350 μ m 左右,开始附着变态。

在幼虫培育过程中,由于精卵的质量比较好,受精率和孵化率较高,接近 90%。与 Robinson 实验过程中的受精率和孵化率(平均 95%)相近。根据我们的培育经验,影响培育期间熊本牡蛎幼虫成活的主要因素是饵料的质量和水质,因为熊本牡蛎适宜于高温条件培养,此时饵料培养较为困难,水质容易败坏。这与 Robinson 的分析,幼虫成活率低与盐度和亲贝采集海区的差异是造成熊本牡蛎幼虫死亡率高的不同原因^[6-7,11]。

3.4 不同附着基附着效果比较

目前牡蛎的采苗主要以扇贝壳为主,牡蛎壳和栉江珧壳等贝类贝壳为辅。从附苗效果上看,牡蛎壳附着变态率最高,出苗量最多,栉孔扇贝壳次之,栉江珧最差;但由于牡蛎壳重,不易掰碎,对大规模育苗而言,工作量很大;而栉江珧壳虽大但因壳面光滑、易碎,不适合做牡蛎附苗的附着基。因此,熊本牡蛎育苗过程中附着基选择还应以栉孔扇贝壳为主,这与周茂德的研究结果相一致^[12]。

参考文献

- [1] Camara MD, Davis JP, Sekino M, Hedgecock D, Li G, Langdon CJ, Evans S. The Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* is neither rare nor threatened by hybridization in the northern Ariake Sea, Japan. *J Shellsh Res*, 2008, 27: 313-322.
- [2] Jae-Sang Hong, Masashi Sekino, Shinichi Sato. Molecular species diagnosis conrmed the occurrence of Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* in Korean waters. *Fish Sci*, 2012, 78: 259-267.
- [3] Masashi Sekino. In search of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* (Amemiya, 1928) based on Molecular markers: is the natural resource at stake? *Fish Sci*, 2009, 75: 819-831.
- [4] Wang H, Guo X. Identification of *Crassostrea ariakensis* and related oysters by multiplex species-specific PCR. *J Shellsh Res*, 2008, 27: 481-487.
- [5] Ahmed M. Cytogenetics of oysters. *Cytologia*, 1973, 38: 337-346.
- [6] Robinson A. Gonadal cycle of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for brood-stock oysters and larval culture. *Aquaculture*, 1992, 106: 89-97.
- [7] 许飞, 李莉, 等. 中国常见牡蛎各物种初孵化面盘幼虫大小的比较[D]. 中国动物学会, 2009.
- [8] 于瑞海, 王昭萍, 等. 太平洋牡蛎人工育苗稳产高产技术的探讨[J]. 烟台: 齐鲁渔业, 2001, 18(5): 27-29.
- [9] 李华琳, 李文姬, 等. 太平洋牡蛎室内育苗技术, 水产科学, 2005, 24(8): 41-42.
- [10] 吕豪, 李大成, 等. 太平洋牡蛎控温条件下的性腺发育、条件指数与积温的关系[J]. 北京: 中国水产科学, 1998(1): 18-24.
- [11] 隋锡林, 王志松, 等. 影响太平洋牡蛎人工苗种培育的主要因子[J]. 大连: 大连水产学院学报, 1997, 12(4): 13-18.
- [12] 周茂德. 太平洋牡蛎室内人工育苗附着习性的研究[J]. 动物学杂志, 1987, 22(6): 9-11.

The study of *Crassostrea sikamea* Indoor Artificial Seedling Technique

Yu Yang, Li Wei, Wang Xubo, Zhang Jingxiao, Li Qi*

(Aquaculture College, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract: Used Kumamoto oysters as materials, promoting the maturity of parents by enhancing nutrition and culturing in situations with higher temperature. Stimulated the female to spawn by drying them in the shade and putting them under flowing water. And the hatching rates of the fertilized eggs under different salinity conditions were studied. The results indicate that there are several methods to improve the low seedling successful rate of Kumamoto oysters: controlling the larvae density reasonably (6~8 个/ml in the early stage while 3~4/ml in the late stage), feeding unicellular algae which is fresh and pollution-free, changing water and inflating air scientifically and classifying and filtrating them in time. The adhering effectiveness of three adhering substances, chlamys farreri shell, oyster shell and Comb Pen Shell, were studied. The results indicate that oyster shell has the best effect. It can improve the Adhesion rate to over 60%, which improve the survive and growth of the juvenile oysters. Meanwhile, the output of juvenile oysters with size over 2mm is over 10 10⁴/m³.

Key word: *Crassostrea sikamea* ; Artificial breeding; High temperature; Picking seedling; Adhere to; Abnormal condition