

文章编号: 1674 - 5566(2014)04 - 0492 - 06

## 青蛤活体性别鉴定技术研究

孙祥山<sup>1</sup>, 赵炳然<sup>1</sup>, 黄经献<sup>1</sup>, 张传涛<sup>1</sup>, 曹金凤<sup>1</sup>, 宁晨洁<sup>1</sup>, 方建光<sup>2</sup>, 燕敬平<sup>2</sup>

(1. 中国水产科学研究院东营增殖实验站, 山东 潍坊 261312; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 创造了一种用扩口器扩大青蛤两壳开口观察性腺颜色鉴定性别的新方法, 同时改进了一种适用于青蛤性别鉴定的组织观察法。用两种方法对活体青蛤进行了性别鉴定并检验了准确性; 然后在相同的条件下培养和催产鉴定性别的青蛤与对照组青蛤, 检验了性别鉴定对存活和性腺发育的影响。结果表明, 两种方法都能准确鉴定青蛤性别, 成功率达到 100%; 存活率为 (94.33% ± 1.53%) 和 (93.33% ± 1.53%), 与对照组 (95.00% ± 2.00%) 差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 产卵率为 (87.33% ± 3.06%) 和 (84.67% ± 1.15%), 与对照组 (85.33% ± 3.06%) 差异也不显著 ( $P > 0.05$ ), 即性别鉴定对存活和性腺发育未产生明显不良影响; 扩口观察法的存活率和产卵率均高于组织观察法, 但未达到显著性水平 ( $P > 0.05$ )。扩口观察法与组织观察法比较有明显的优点: (1) 操作步骤少, 鉴定效率高, 所用时间只有后者的 1/3, 利于开展大群体的性别鉴定和群体间杂交; (2) 鉴定可在性腺发育的中期开展, 利于实验方案的制定; (3) 无伤害; (4) 可对性腺整体发育状况进行活体观察。

**研究亮点:** 创造了一种简单、高效、准确、无伤害鉴定活体青蛤性别的新方法, 不影响存活和性腺正常发育, 为青蛤家系建立和群体杂交创造了基础条件。此法也适用于其他雌雄异体且性腺颜色不同的双壳贝类, 还可用于对性腺等内脏器官发育状况的活体观察。

**关键词:** 青蛤; 性别鉴定; 扩口观察法; 组织观察法; 成功率; 存活率; 产卵率

**中图分类号:** S 968.3

**文献标志码:** A

青蛤 (*Cyclina sinensis*) 在我国南北沿海均有分布, 是一种重要的滩涂经济贝类。近年来, 由于种质退化, 人工育苗难度增大, 养殖病害多发, 致使产量降低, 品质下降, 效益下滑。因此, 开展青蛤育种研究, 实现养殖良种化, 具有重要的现实意义。

杂交育种是雌雄异体贝类常用的育种方法, 而对亲本进行性别鉴定是其基础性工作。贝类性别与外部形态无关, 青蛤亦不例外, 董志国等<sup>[1]</sup>研究表明青蛤性别与生态学无相关性, 不能从外部形态鉴定性别。雌雄异体的双壳贝类中, 无水管的种类一般开口较大, 部分种类可通过自然开口观察到性腺, 容易通过性腺颜色鉴定性别, 如栉孔扇贝 [*Chlamys farreri* (Jones & Presion)]<sup>[2]</sup>、虾夷扇贝 (*Pecten yessoensis* Jay)<sup>[3]</sup>

等; 而魁蚶 (*A. inflata* Reeve)<sup>[4]</sup>、毛蚶 (*A. subcrenata* Lischke)<sup>[5]</sup> 等蚶类, 虽然没有水管, 开口偶尔也很大, 但其性腺包被很厚的肌肉层, 只有从靠近壳顶处性腺的颜色才能分辨雌雄, 通过自然开口很难观察到, 性别鉴定也就很难。有水管的种类, 其外套膜自水管往后是愈合的, 往前部分虽然分离, 但两壳开口仅容水管和足伸出, 外套膜闭合在一起, 根本无法观察到性腺, 如文蛤 (*Meretrix meretrix* Linne)<sup>[6]</sup>、青蛤<sup>[7]</sup>、西施舌 (*M. Antigrata* Deshayes)<sup>[8]</sup>、菲律宾蛤仔 [*Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve)]<sup>[3]</sup>、杂色蛤仔 [*Ruditapes variegata* (Sowerby)]<sup>[9]</sup> 等。目前家系的建立主要采取群体催产, 将正在产卵排精的个体取出配对的方式, 如青蛤家系<sup>[10]</sup>的建立、菲律宾蛤仔家系<sup>[11]</sup>的建立及个体间的杂交<sup>[12]</sup>等, 而

收稿日期: 2014-01-22

修回日期: 2014-02-16

基金项目: 中国水产科学研究院院级基本科研业务费资助项目 (2012A0407)

作者简介: 孙祥山 (1976—), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向为水产动物养殖与育种。E-mail: wfxys12345@163.com

群体杂交无法开展。简单实用的活体性别鉴定方法是当前贝类育种研究的薄弱环节,目前国内仅见闫喜武等<sup>[13]</sup>发明的一种在贝壳钻孔抽取性腺组织鉴定性别的方法,适用于完全成熟的个体并立即催产,此法造成的损伤点较多,不利于后期存活,亲本一般一次性利用;另外刘晓等<sup>[14]</sup>发明了一种针对栉孔扇贝制备判性家系的方法用于选育研究,但仅适用于特定家系。本文以青蛤为研究对象,充分利用其雌雄个体性腺颜色区别鲜明的特点,创造了一种使用扩口器扩大两壳开口观察性腺颜色鉴定性别的新方法,达到了简单、高效、准确且无伤害鉴定活体青蛤性别的目的,该法也同样适用于其他雌雄异体且性腺颜色不同的双壳贝类,对开展家系建立和群体杂交育种具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 性别鉴定实验材料

青蛤采自渤海莱州湾滩涂,壳长 3~4 cm,性腺发育到中后期,经 7 d 暂养稳定不再大量死亡后用于实验;实验材料包括自行设计的双壳贝类扩口器(已申报专利)、生物显微镜、2 mL 医用注射器、100 mL 烧杯、载玻片、酒精灯、打火机、钢锯、95% 酒精、凉开水、塑料盆、1 mm 厚铁片、海水、记号笔等。

#### 1.1.2 鉴定性别青蛤的培养与催产实验材料

实验材料包括鉴定性别的青蛤、透水塑料筐、50 L 塑料水箱、20 m<sup>2</sup> 水泥育苗池、充气设备、单胞藻饵料(金藻、角毛藻和扁藻等)、爽水灵(一种复合有益菌制剂)、海水、暗室及其它辅助材料。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 青蛤活体性别鉴定与成功率

(1)扩口器扩口观察法。即用扩口器(图版 I-1)将自然伸展的青蛤两壳间小开口扩大至肉眼能清楚观察到性腺,通过性腺颜色来鉴定性别的方法,以下简称“扩口观察法”。主要操作步骤是,提前一天将青蛤放入盛有海水的塑料盆中,第二天青蛤水管伸出两壳,两壳张开形成 1~1.5 mm 的开口(图版 I-2),此时用 1 mm 厚的薄金属片插入开口中间偏前位置(图版 I-3),然后将扩口器尖嘴插入开口中间位置,转动旋

纽,使尖嘴张开将开口扩大至 4~5 mm,在光线较强的地方用肉眼观察性腺颜色,粉红色为雌性,白色或乳白色为雄性(图版 I-4),用记号笔在壳上标记雌雄并编号(图版 I-5)。此法的主要风险是可能对闭壳肌和外套膜造成拉伤,因此扩口速度不能太快,开口不能过大。

(2)抽取性腺组织观察法。指在青蛤贝壳特定部位锯开一个小口,注射器针头从此口伸入壳内,刺入性腺并抽取少量性腺组织,通过雌雄性腺组织的不同性状来鉴定性别的方法,以下简称“组织观察法”。主要操作步骤是,将钢锯在酒精灯火焰上灼烧消毒(图版 II-1),用其在青蛤贝壳边缘锯出一个宽、深均为 1 mm 的小口(图版 II-2,3),仅容注射器针头穿入,开口位置选在前部壳缘距壳顶约 1/3 处(图版 II-4),此处避开了前闭壳肌,也避免了从后部伸入时必然对后部相连的外套膜以及鳃的损伤,并使针头易于达到卵巢靠近足部处;将注射器抽取凉开水冲洗 2~3 次(图版 II-5),清除前一次残留的组织;将针头蘸取 95% 酒精后在酒精灯火焰上灼烧消毒(图版 II-6,7);消毒后的针头从开口处伸入壳内,刺入性腺,抽取少量性腺组织(图版 II-8),抽取点选在性腺靠近足部中间位置,此处无其它内脏组织,可减轻伤害(图版 II-9);将抽取的性腺组织滴到载玻片上(图版 II-10),用显微镜或肉眼观察,雄性可见正在发育或成熟的精子(图版 II-11),雌性可见发育中大小不等的卵泡(图版 II-12),标记雌雄和编号。此法是闫喜武等<sup>[13]</sup>鉴定方法针对青蛤的改进,主要是改变了开口位置,减少了损伤点,避免了对内脏团伤害的风险,利于鉴定后的存活和多次利用。

(3)性别鉴定成功率的计算。用两种方法对青蛤性别进行鉴定并标记,各取 60 粒破壳观察,通过性腺颜色判定性别,如与标记性别相同,表明鉴定成功,计算成功率。

#### 1.2.2 鉴定性别青蛤的培养与存活率

2012 年 6 月 10 日,取两种方法鉴定性别的 2 个鉴定组和未鉴定性别的对照组各 300 粒进行实验。每组设 3 个重复,每个重复 100 粒,各放于 1 个透水塑料筐中,置于同一水泥池中培养,保证培养条件的一致性,塑料筐底部两端用垫砖起脱离池底以利清除粪便。培育池水深 50 cm,每日换水 20~50 cm,视摄食情况合理投喂单胞藻(金

藻、角毛藻和扁藻混合投喂),每日换水后施入爽水灵 100 mL 调节水质。每日将死亡个体检出并记录,催产前计算存活率。

### 1.2.3 鉴定性别青蛤的性腺发育与产卵率

性别鉴定对性腺发育的影响主要通过人工催产,以产卵率作为对比指标。为了排除青蛤繁殖群体效应对实验结果的影响,需保证一定的催产数量,因此实验选在 3 个 50 L 塑料水箱中进行,2 个鉴定组和对照组各放 1 个水箱,每个水箱底部用障碍物分成 3 个区域,以将 3 个重复隔离,即 3 个重复相互分离却又处于同一水体中。催产采取阴干 8 h,流水 0.5 h,在暗室全遮光强充气的方式催产。对产后的三组各取 50 粒破壳观察,以排卵排精为标准计算产卵率。

### 1.2.4 数据处理

两种方法鉴定性别成功率以所得数据直接对比;鉴定组的存活率和产卵率与对照组的比较,用 Excel 2010 软件中的  $t$ -检验法进行差异显著性检验, $P < 0.05$  表示显著差异, $P > 0.05$  表示差异不显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 性别鉴定成功率

两种方法鉴定青蛤的成功率见表 1。结果表明两种方法均能准确鉴定青蛤性别,成功率 100%。

表 1 两种方法鉴定性别成功率

Tab.1 Success rates of sex identification with two methods

鉴定方法	鉴定数/粒	准确数/粒	成功率/%
扩口观察法雌	28	28	100
扩口观察法雄	32	32	100
组织观察法雌	31	31	100
组织观察法雄	29	29	100

### 2.2 性别鉴定对青蛤存活率和产卵率的影响

2012 年 7 月 15 日催产,催产前计算存活率,催产后破壳检查产卵率,结果采用“平均值  $\pm$  标准差”表示,见表 2。结果表明,存活率为对照组  $>$  扩口观察法  $>$  组织观察法,产卵率为扩口观察法  $>$  对照组  $>$  组织观察法,但数值相差很小,经检验鉴定组与对照组差异不显著( $P > 0.05$ )。扩口观察法的存活率和产卵率均高于组织观察法,但未达显著性水平( $P > 0.05$ )。可见两种性别鉴

定方法对青蛤存活和性腺发育均无明显不良影响,扩口观察法略强于组织观察法。

### 2.3 两种方法的鉴定效率

两种方法在鉴定效率上区别较大,扩口观察法虽然需要提前一天准备亲贝,使其自然开口以方便插入铁片,但两人配合时,一人插铁片,一人扩口观察,平均鉴定 1 粒青蛤只需 30 s 左右。组织观察法操作环节多,特别是注射器需要重复使用,清洗消毒时间较长,抽取时也需要细心操作才能一次成功,发育未完全成熟时性腺不够饱满,有时几次才能取到,因此效率较低,而且容易多次刺伤组织,两人配合时平均鉴定 1 粒青蛤需要 2 min 以上,此法在性腺发育的晚期效率可能会高一些。

表 2 鉴定性别青蛤的存活率和产卵率

Tab.2 Survival rates and spawning rates of *Cyclina sinensis* (Gmelin) which identified sex with two methods

鉴定方法	存活率	产卵率
扩口观察法	94.33 $\pm$ 1.53	87.33 $\pm$ 3.06
组织观察法	93.33 $\pm$ 1.53	84.67 $\pm$ 1.15
对照组	95.00 $\pm$ 2.00	85.33 $\pm$ 3.06

注:  $n = 3$ ;  $\bar{x} \pm SD$ 。

## 3 讨论

### 3.1 两种鉴定方法的优劣

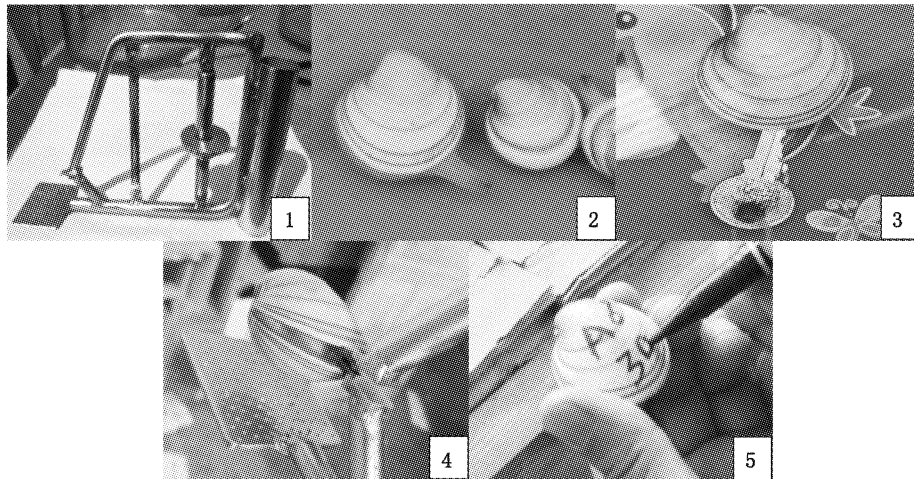
扩口观察法和组织观察法都是有效的青蛤性别活体鉴定方法,可以做到准确无误,对存活和性腺发育无明显不良影响。两者比较又以扩口观察法优势比较明显,扩口观察法的优点:(1)操作简单,效率高,利于进行大数量鉴定,在大群体杂交选育中优势明显;(2)在 6 月初性腺发育的中期,雌雄性腺颜色就有明显区别,此时即可鉴定性别,利于提前安排实验工作;(3)对青蛤无损伤;(4)可对性腺发育状况进行活体观察,剔除发育不良个体。缺点是不适用于雌雄性腺颜色相同的贝类。组织观察法的优点:(1)不受青蛤生活状态的影响,随时可以取出来操作;(2)可用于雌雄性腺颜色相同贝类的性别鉴定。缺点:(1)操作环节较多,效率低;(2)针头刺入性腺组织使其受伤(特别是一次不成功而多次穿刺抽取);(3)不能对性腺进行整体观察;(4)在 6 月下旬性腺发育的晚期才容易抽取和鉴定,不利于提前安排实验工作。

### 3.2 扩口观察法在贝类性别鉴定中的应用前景

大部分双壳贝类在发育成熟时雌雄性腺有比较明显的颜色区别,一般雌性性腺颜色较深,雄性性腺颜色较浅<sup>[2-9]</sup>,也有雌性颜色较浅,雄性颜色较深的种类,如西施舌<sup>[15]</sup>,但都容易用肉眼分辨。对于其中有水管或无水管而开口不大的种类,性别鉴定主要难在如何在活体状态下观察到性腺,扩口观察法很好地解决了这一难题,因此该法也适用于这些贝类,为其良种选育研究中的家系建立,特别是群体间杂交创造了有利条件。

#### 参考文献:

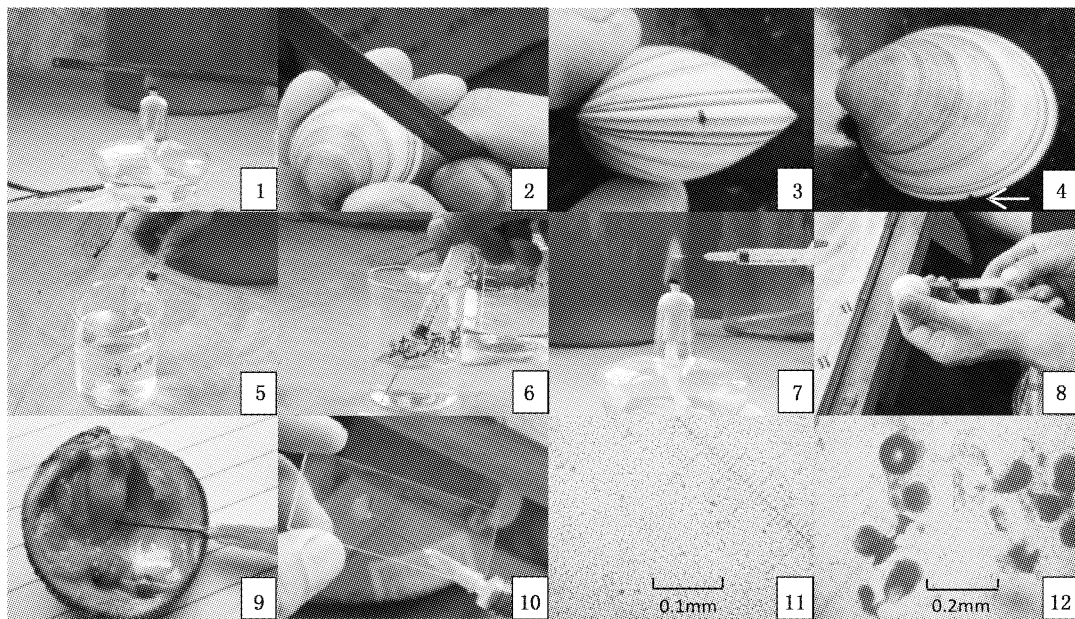
- [1] 董志国,李晓英,程汉良,等. 生殖季节青蛤性别与形态相关性分析[J]. 海洋科学,2011,35(8):32-36.
- [2] 张玺,齐钟彦,李济民. 栉孔扇贝的繁殖与生长[J]. 动物学报,1956,12(8):235-250.
- [3] 王如才,王昭萍,张建中. 海水贝类养殖学[M]. 山东:青岛海洋大学出版社,1993,177.
- [4] 郑永允,张晓燕,栗红,等. 魁蚶亲贝控温促熟试验[J]. 齐鲁渔业,1994,11(5):7-9.
- [5] 陈建华,阎斌伦,高焕. 毛蚶生物学特性及其研究进展[J]. 河北渔业,2006(9):25-26,49.
- [6] 于志华. 文蛤养殖技术讲座 第一讲 文蛤生物学特性及增养殖概况[J]. 水产养殖,1997(1):30-32.
- [7] 王兴强,曹梅,阎斌伦,等. 青蛤的生物学及其繁殖[J]. 水产科学,2006,25(6):312-316.
- [8] 杨瑞琼,潘桂平,张玲,等. 西施舌生物学的初步研究[J]. 厦门水产学院学报,1990,12(1):7-15.
- [9] 石斌,王铁杆,周亚文,等. 杂色蛤工厂化人工育苗技术[J]. 齐鲁渔业,2005,22(9):26-27.
- [10] 杨凤,张跃环,赵越,等. 青蛤家系的建立及早期生长发育比较[J]. 水产科学,2008,27(8):390-396.
- [11] 霍忠明,闫喜武,张跃环,等. 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)大连群体家系建立及生长比较[J]. 海洋与湖沼,2010,41(3):334-340.
- [12] 张跃环,闫喜武,姚托,等. 菲律宾蛤仔2个壳色品系群体杂交的研究[J]. 南方水产,2008,4(3):27-32.
- [13] 闫喜武,杨凤,张国范,等. 贝类亲本性别鉴定的方法:中国,200810013314. X[P]. 2009-03-04.
- [14] 刘晓,张国范. 一种栉孔扇贝的判性系及制备方法和应用:中国,200410020959. 8[P]. 2006-01-18.
- [15] 刘德经,谢开恩. 西施舌的繁殖生物学[J]. 动物学杂志,2003,38(4):10-15.



图版 I 扩口观察法操作步骤

## Plate I The operational procedure of expanding observation method

1. 扩口器; 2. 自然伸展的青蛤; 3. 两壳开口插入铁片的青蛤; 4. 撑大开口的青蛤, 性腺白色, 雄性; 5. 标记性别与编号。



图版 II 组织观察法操作步骤

## Plate II The operational procedure of tissue observation method

1. 钢锯灼烧消毒; 2. 在贝壳边缘开口; 3. 示开口大小; 4. 示开口位置, 箭头所指处; 5. 用凉开水冲洗注射器; 6. 注射器针头蘸酒精; 7. 注射器灼烧消毒; 8. 抽取性腺组织; 9. 示抽取部位; 10. 将抽取的性腺组织滴到载玻片上; 11. 显微放大的精巢组织(精子); 12. 显微放大的卵巢组织(卵泡)。

## Research on identifying sex of live *Cyclina sinensis*

SUN Xiang-shan<sup>1</sup>, ZHAO Bing-ran<sup>1</sup>, HUANG Jing-xian<sup>1</sup>, ZHANG Chuan-tao<sup>1</sup>, CAO Jin-feng<sup>1</sup>, NING Chen-jie<sup>1</sup>, FANG Jian-guang<sup>2</sup>, YAN Jing-ping<sup>2</sup>

(1. *Xiaying Enhancement and Experiment Station Chinese Academy of Fishery Sciences, Weifang 261312, Shandong, China;*

2. *Yellow Sea Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China*)

**Abstract:** This study created a new sex identifying method of live *Cyclina sinensis* by observing the gonad color with an expanding kit expanding two shell openings. At the same time, a tissue observation method was improved that is suitable for sex identification of live *Cyclina sinensis*. The sex of live *Cyclina sinensis* was identified with two methods and the accuracy was checked, then cultured them and made artificial inducing spawning. To check the impact on survival and gonadal development, control group was established under the same conditions. Results showed that two methods can accurately identify the sex of live *Cyclina sinensis*, the success rate was 100%. The survival rates were  $(94.33 \pm 1.53) \%$  and  $(93.33 \pm 1.53) \%$ , respectively. And the spawning rates were  $(87.33 \pm 3.06) \%$  and  $(84.67 \pm 1.15) \%$ , respectively. The survival and spawning rates of control group were  $(95.00 \pm 2.00) \%$  and  $(85.33 \pm 3.06) \%$ . There have no significant difference with the control group in survival and spawning rates ( $P > 0.05$ ). It meant sex identification had no significant adverse effect on survival and gonadal development. The survival rate and spawning rate of expanding observation method were all higher than those of tissue observation method, but have no significant difference ( $P > 0.05$ ). The expanding observation method superior than the tissue observation method as following, (1) few operation steps, high identification efficiency, time spent only about 1/3 of the latter, conducive to sex identification of large group and hybridization between groups; (2) sex identification can be carried out in mid gonadal development, conducive to making experimental scheme; (3) no injury; (4) the integral gonadal development condition can be observed *in vivo*.

**Key words:** *Cyclina sinensis*; sex identification; expanding observation method; tissue observation method; success rate; survival rate; spawning rate