



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103798167 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 13

(21) 申请号 201410036013. 4

(22) 申请日 2014. 01. 24

(73) 专利权人 中国科学院南海海洋研究所  
地址 510301 广东省广州市新港西路 164 号

(72) 发明人 张跃环 肖述 张扬 喻子牛

(74) 专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限公司 44001

代理人 刘明星

(51) Int. Cl.

A01K 61/00(2006. 01)

(56) 对比文件

- CN 103120139 A, 2013. 05. 29,
- CN 102077800 A, 2011. 06. 01,
- CN 101731168 A, 2010. 06. 16,
- JP 特开平 11-32619 A, 1999. 02. 09,
- CN 102763617 A, 2012. 11. 07,
- JP 特开 2000-354434 A, 2000. 12. 26,
- 曾志南等. 僧帽牡蛎三倍体和二倍体的生长

比较.《中国水产科学》. 1999, 第 6 卷(第 4 期),  
陈和鹏. 僧帽牡蛎海区半人工菜苗及棚架式  
养殖.《福建水产》. 1992, (第 1 期),  
蔡清海. 牡蛎养殖技术的进展.《福建水产  
>. 2001, (第 3 期),

审查员 冷婷婷

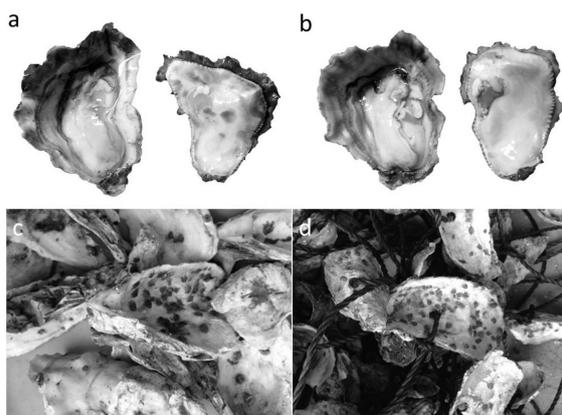
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种僧帽牡蛎的人工繁育方法

(57) 摘要

本发明公开了一种僧帽牡蛎的人工繁育方法。本发明通过采用形态与分子手段相结合鉴别亲本,生态与室内相结合促熟性腺,自然排放与解剖方式相结合获取配子,微充气、不换水、不倒池培育子代等技术环节,成功培育健康僧帽牡蛎苗种,为其苗种生产、土著品种开发及其维护生物多样性奠定了坚实的基础。本发明颠覆了传统贝类苗种繁育时大量换水、经常倒池、多种单胞藻同时投喂的习惯,大大节约了人力、物力、财力,创造了一种成本低廉、简单高效的贝类苗种培育新模式。



1. 一种僧帽牡蛎的人工繁育方法,其特征在于,包括以下步骤:

(a) 亲本采集:在华南沿海采集 2-3 龄野生僧帽牡蛎作为亲本;

(b) 性腺促熟:将僧帽牡蛎采用吊养的方式在虾池中进行生态促熟或室内人工升温促熟;

(c) 受精孵化:当亲本性腺成熟时,采用降温、阴干和流水刺激进行人工催产、受精和孵化,控制孵化密度为 30-60 个 /ml,发育得到 D 形幼虫;或者对于尚未鉴别好的亲本,采取现场解剖,发现右壳边缘有半圈或者一圈栉齿者为僧帽牡蛎,采取解剖配子方式,获取大量成熟配子,之后进行受精、孵化,控制孵化密度为 30-60 个 /ml,发育得到 D 形幼虫;

(d) 子代培育:将发育正常的 D 形幼虫按照 2-3 个 /ml 密度进行幼虫培育,当 30% 幼虫出现眼点、鳃原基、足向外伸时,投放附着基进行人工采苗,然后进入稚贝培育阶段,经过培育,即可获得健康的僧帽牡蛎苗种,在此期间,微充气、不换水、不倒池、幼虫期投喂一种单胞藻和酵母粉,稚贝期间以虾池水作为生物饵料,所述的单胞藻为绿色巴夫藻或云尾藻。

2. 根据权利要求 1 所述的人工繁育方法,其特征在于,所述的在华南沿海采集 2-3 龄野生僧帽牡蛎作为亲本是在华南沿海采集野生牡蛎样品,首先根据壳内缘是否有栉齿及其栉齿分布来确定僧帽牡蛎,剔除掉其它类牡蛎;同时结合分子手段进行物种鉴别,进一步确认是僧帽牡蛎,然后再以确定为僧帽牡蛎的作为亲本。

3. 根据权利要求 1 所述的人工繁育方法,其特征在于,所述的采用降温、阴干和流水刺激进行人工催产具体是放置于 4℃ 海水中 1.5h、阴干 3h、流水刺激 0.5h 进行人工催产。

4. 根据权利要求 1 所述的人工繁育方法,其特征在于,所述的发育正常的 D 形幼虫是采用 320 目筛绢网对步骤 (c) 的 D 形幼虫进行优选,得到发育正常的 D 形幼虫。

## 一种僧帽牡蛎的人工繁育方法

### 技术领域：

[0001] 本发明属于海洋农业中贝类苗种繁育技术领域，具体涉及一种僧帽牡蛎的人工繁育方法。

### 背景技术：

[0002] 僧帽牡蛎 *Saccostrea cuculata* 分布于印度洋、太平洋及我国的华南沿海（福建、广东、广西、海南、香港、澳门），从岩石、沙滩到红树林的潮间带均有分布，是一个亚热带、热带类型的经济种。

[0003] 僧帽牡蛎作为我国华南沿海一个主要野生牡蛎类群，经常与熊本牡蛎 *Crassostrea sikamea*、葡萄牙牡蛎 *C. angulata* 生活在一起，统称为杂蚝。由于野生杂蚝味道鲜美，深受广大消费者青睐，有较大的市场开发前景。其中，葡萄牙牡蛎苗种几乎全部来自人工繁育，年产量在 150 万吨左右，主要集中在福建地区；而熊本牡蛎人工育苗已经取得突破，学者们正在开展该产业的养殖示范推广工作。由于我国牡蛎物种分类比较混乱，一些学者们将葡萄牙牡蛎 *Crassostrea angulata* 俗称为僧帽牡蛎 *S. cucullata*，导致出现了一些伪僧帽牡蛎的相关研究报道（张玺，楼子康．中国牡蛎的研究 [J]．动物学报，1956，8(1)：65-94；陈和鹏，僧帽牡蛎海区半人工采苗及棚架式养殖 [J]．福建水产，1992，(1)：6～9；林加涵、汪德耀．僧帽牡蛎卵母细胞卵黄发生的超微结构研究 [J]．厦门大学学报（自然科学版），1983，22(3)：355—363；曾志南、陈木、林琪、陈朴贤、刘伟斌，僧帽牡蛎三倍体的研究 [J]．海洋通报，1994. 13(6)：34～40；曾志南、林琪、吴建绍、陈朴贤、陈木，僧帽牡蛎三倍体和二倍体的生长比较 [J]．中国水产科学，1999，6(4)：59～61；林琪、曾志南、吴建绍、陈朴贤、陈木，僧帽牡蛎二倍体和三倍体卵母细胞发育的超微结构比较 [J]．台湾海峡，2000，19(3)：350～355；柯才焕、李少菁、李复雪，郑重，僧帽牡蛎幼体附着和变态的诱导 [J]．水产学报，2000，24(3)：229～234。）。然而，最近研究报道中，学者们虽然沿用僧帽牡蛎的中文名称，但是已经将拉丁文修订为 *Crassostra angulata* 或者是 *Crassostra gigas angulata*（许茜、秦骥、柯才焕，僧帽牡蛎 EGFR 基因的克隆及早期发育阶段的表达 [J]．厦门大学学报（自然科学版），2010，49(6)：756～763；韩国栋、杨丙晔、秦骥、柯才焕，僧帽牡蛎 EGFR 基因的原核表达及其在幼体附着变态过程中的表达特性 [J]．厦门大学学报（自然科学版），2012，51(2)：263～267。）。对此，Lam 和 Morton (Katherine Lam, Brian Morton. The oysters of Hong Kong (Bivalvia: Ostreida and Cryphaeidae). The Raffles Bulletin of Zoology 2004, 52(1): 11～28; Katherine Lam, Brian Morton. Morphological and mitochondrial-DNA analysis of the Indo-West Pacific rock oysters (Ostreida: Saccostrea species). Journal of Molluscan Studies 2006, 72: 235～245.)、夏建军（夏建军，华南近海牡蛎种类鉴定、分布和香港巨牡蛎微卫星开发及群体遗传学研究，中国科学院研究所院，博士学位论文，2008）及 Wang et al., (Haiyan Wang, Lumin Qian, Xiao Liu, Guofan Zhang and Ximing Guo, Classification of a Common Cupped Oyster from Southern China. Journal of

Shellfish Research, 29(4):857-866. 2010.) 等对我国僧帽牡蛎进行了重新定义, 先前报道的僧帽牡蛎均为葡萄牙牡蛎, 真正僧帽牡蛎 *S. cucullata* 隶属于小蛎属, 主要特点壳内缘具有栉齿, 从铰合部延伸到闭壳肌区域; 而葡萄牙牡蛎 *C. gigas angulata* 壳内表面光滑无齿, 两类牡蛎是不同属间的两个物种, 不可以将其混淆使用。

[0004] 根据夏建军的研究报道(夏建军, 华南近海牡蛎种类鉴定、分布和香港巨牡蛎微卫星开发及群体遗传学研究, 中国科学院研究所院, 博士学位论文, 2008), 我国的僧帽牡蛎可以划分为 4 种类型, 分别为 *S. cucullata*-B、*S. cucullata*-D、*S. cucullata*-E 和 *S. cucullata*-F。其中, *S. cucullata*-B 和 *S. cucullata*-F 较为常见, 出现频率较高。目前, 该类群资源完全来自于野生采捕, 尚无人工苗种养成。那么, 作为小蛎属的典型代表种能否进行人工繁育, 采用何种技术手段可以成功的繁育出健康苗种成为本发明的创新点。

#### 发明内容:

[0005] 本发明的目的是为了摆脱华南沿海僧帽牡蛎资源完全依赖于野生采捕的窘境, 解决当前没有僧帽牡蛎人工苗种的现状, 而提供一种僧帽牡蛎苗种培育技术, 即一种僧帽牡蛎的人工繁育方法, 该方法具有操作简便、成本低廉、实用性强、易于推广等优点。

[0006] 本发明的僧帽牡蛎的人工繁育方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

[0007] (a) 亲本采集: 在华南沿海采集 2-3 龄野生僧帽牡蛎作为亲本;

[0008] (b) 性腺促熟: 将僧帽牡蛎采用吊养的方式在虾池中进行生态促熟或室内人工升温促熟; 其中, 促熟时间与亲本本身性腺发育度正相关, 如果亲本本身性腺好促熟时间相对较短, 否则会相应延长;

[0009] (c) 受精孵化: 当亲本性腺成熟时, 采用降温、阴干和流水刺激进行人工催产、受精和孵化, 控制孵化密度为 30-60 个 /ml, 发育得到 D 形幼虫; 或者对于尚未鉴别好的亲本, 采取现场解剖, 发现右壳边缘有半圈或者一圈栉齿者为僧帽牡蛎, 采取解剖配子方式, 获取大量成熟配子, 之后进行受精、孵化, 控制孵化密度为 30-60 个 /ml, 发育得到 D 形幼虫;

[0010] (d) 子代培育: 将发育正常的 D 形幼虫按照 2-3 个 /ml 密度进行幼虫培育, 当 30% 幼虫出现眼点、鳃原基、足向外伸时, 投放附着基进行人工采苗, 然后进入稚贝培育阶段, 经过培育, 即可获得健康的僧帽牡蛎苗种, 在此期间, 微充气、不换水、不倒池、幼虫期投喂一种单胞藻和酵母粉, 稚贝期间以虾池水作为生物饵料, 所述的单胞藻为绿色巴夫藻或云尾藻。

[0011] 所述的在华南沿海采集 2-3 龄野生僧帽牡蛎作为亲本, 优选在华南沿海采集野生牡蛎样品, 由于其经常与熊本牡蛎、葡萄牙牡蛎等其他牡蛎种类有生活重叠区域, 首先根据壳内缘是否有栉齿及其栉齿分布来确定僧帽牡蛎, 剔除掉其他类牡蛎; 同时结合分子手段进行物种鉴别, 进一步确认是僧帽牡蛎, 然后再以确定为僧帽牡蛎的作为亲本。通过形态与分子手段相结合可以鉴别亲本。

[0012] 所述的采用降温、阴干和流水刺激进行人工催产优选为放置于 4℃ 海水中 1.5h、阴干 3h、流水刺激 0.5h 进行人工催产。

[0013] 所述的发育正常的 D 形幼虫是采用 320 目筛绢网对步骤 (c) 的 D 形幼虫进行优选, 得到发育正常的 D 形幼虫, 之后再用于后续的幼虫培育。

[0014] 所述的虾池水是指养虾土塘中海水, 由于养虾过程中要投喂大量饵料, 会出现残

料及其虾粪等有机质,使其海水富营养化较高,含有大量多元化的单胞藻类及有机颗粒,营养丰富,是牡蛎稚贝良好的天然饵料。

[0015] 本发明通过采用形态与分子手段相结合鉴别亲本,生态与室内相结合促熟性腺,自然排放与解剖方式相结合获取配子,微充气、不换水、不倒池培育子代等技术环节,成功培育健康僧帽牡蛎苗种,为其苗种生产、土著品种开发及其维护生物多样性奠定了坚实的基础。本发明颠覆了传统贝类苗种繁育时大量换水、经常倒池、多种单胞藻同时投喂的习惯,大大节约了人力、物力、财力,创造了一种成本低廉、简单高效的贝类苗种培育新模式。

#### 附图说明:

[0016] 图 1:僧帽牡蛎亲本及其子代, a、B- 型僧帽牡蛎 ;b、D- 型僧帽牡蛎, c、B- 型僧帽牡蛎子代 ;d、D- 型僧帽牡蛎子代。

#### 具体实施方式:

[0017] 以下实施例是对本发明的进一步说明,而不是对本发明的限制。

#### [0018] 实施例 1

[0019] (a) 亲本采集:于 2013 年 4 月初在深圳东涌潮间带采集 2-3 龄野生僧帽牡蛎样品,解剖发现该类牡蛎右壳边缘有半圈栉齿,右壳表面无棘刺,确认为僧帽牡蛎,同时采用按照 Lam&Morton(Lam, K., Morton. Morphological and mitochondrial-DNA analysis of the indo-west pacific rock oysters(Ostreidae:Saccostrea speices) [J]. Journal of Molluscan Studies, 2006, 72:235-245) 及夏建军(夏建军,华南近海牡蛎种类鉴定、分布和香港巨牡蛎微卫星开发及群体遗传学研究 [D]. 中国科学院南海海洋研究所博士学位论文,广州,2008) 的分类标准利用线粒体测序方法进一步确认为 D- 型僧帽牡蛎。对所采集到的 120 个样品进行活体鉴定,发现有 87 个为僧帽牡蛎,25 个为熊本牡蛎,8 个为葡萄牙牡蛎。以僧帽牡蛎作为亲本。

[0020] (b) 性腺促熟:将鉴别好的僧帽牡蛎亲本装鲍鱼框中,采用吊养的方式在深圳市龙科源海产品有限公司的虾池中进行室内促熟。微充气,以小球藻、云尾藻、扁藻作为生物饵料,投喂量以水中微微泛绿为标准,保证亲本有足够的饵料。每天检查亲本生存状态,将死亡的亲贝移走。经过 23 天促熟,亲本性腺成熟。在此期间,水温由 20.2 逐渐升至 25.6℃,盐度维持在 28-30ppt。

[0021] (c) 受精孵化:共获得 72 个性腺成熟的亲贝,将其放置于 4℃海水中 1.5h、阴干 3h、流动的海水冲刷刺激 0.5h 进行人工催产,将处理好的亲贝放置于盛满 100L 新鲜海水的白桶中大量充气处理,大约经过 1.2h,亲本开始产卵排精,获得了 9600 万受精卵;将受精卵倒入盛满 1.6m<sup>3</sup>新鲜海水的玻璃钢水槽中,受精卵周围有 3-5 个精子即可,孵化密度 60 个/mL。期间,海水温度为 26.4℃,盐度为 30ppt,发育得到 D 形幼虫。

[0022] (d) 子代培育:利用 320 目筛绢网进行 D 形幼虫选育(选取壳高大于 320 目孔径的),获得 9000 万 D 形幼虫,之后按照 2-3 个/mL 密度将幼虫培育在 4 个 10m<sup>3</sup>水泥池中;当 30%左右幼虫出现眼点、鳃原基、足向外伸时适时投放贝壳串作为附着基进行人工采苗;继续培育 7d 之后,90%幼虫都已经附着变态,进入稚贝培育期。在此期间,微充气、不换水、不倒池、幼虫期投喂一种单胞藻云尾藻及酵母粉;稚贝期间以虾池水作为生物饵料,饵料投喂

量根据具体情况而定。从受精开始,一共经过 56d 培育,获得壳高在 3-8mm 的健康僧帽牡蛎苗种 1200 万,单位水体出苗量 30 万 /m<sup>3</sup>。

[0023] 实施例 2

[0024] (a) 亲本采集 :于 2013 年 6 月初在湛江硇洲岛潮间带采集 2-3 龄野生僧帽牡蛎样品,解剖发现该类牡蛎右壳边缘有一圈栉齿,右壳表面有棘刺,初步确认为僧帽牡蛎,同时采用按照 Lam&Morton(2006) 及夏建军(2008) 的分类标准利用线粒体测序方法进一步确认为 B- 型僧帽牡蛎,共采集了 360 个 B- 型僧帽牡蛎个体作为亲本。

[0025] (b) 性腺促熟 :将僧帽牡蛎亲本装扇贝笼中,采用吊养的方式在恒星 863 基地的虾池中进行生态促熟。微充气,以小球藻、云尾藻、扁藻作为生物饵料,投喂量以水中微微泛绿为标准,保证亲本有足够的饵料。每天检查亲本生存状态,将死亡的亲贝移走。经过 9 天促熟,亲本性腺成熟。在此期间,水温由 26.5 逐渐升至 28.2℃,盐度维持在 27-30ppt。

[0026] (c) 受精孵化 :共获得 305 个性腺成熟得亲贝,为了进一步确保亲本准确性,采用现解剖现取样的原则,共解剖了 105 个个体,通过显微镜镜检,发现雌性 82 个,雄性 23 个。从中选出 60 个性腺发育较好的雌性做为母本,利用牙签划取卵子,通过 260 目筛绢网过滤,500 目筛绢网洗卵,获得 5400 万成熟卵子。将其放置于盛满 1.8m<sup>3</sup>新鲜海水的玻璃钢桶中,浸泡 30min 之后,加入活力十足的精子,标准为每个卵子周围有 3-5 个精子即可。孵化密度为 30 个 /mL。期间,海水温度为 28.4℃,盐度为 30ppt,发育得到 D 形幼虫。

[0027] (d) 子代培育 :利用 320 目筛绢网进行 D 形幼虫选育(选取大于 320 目孔径的),获得 4860 万发育正常的 D 形幼虫,之后按照 2-3 个 /ml 密度将幼虫培育在 2 个 12m<sup>3</sup>水泥池中;当 30%左右幼虫出现眼点、鳃原基、足向外伸时适时投放贝壳串作为附着基进行人工采苗;继续培育 6d 之后,90%幼虫都已经附着变态,进入稚贝培育期。在此期间,微充气、不换水、不倒池、幼虫期投喂绿色巴夫藻及酵母粉;稚贝期间以虾池水作为生物饵料,饵料投喂量根据具体情况而定。从受精开始,一共经过 60d 培育,获得壳高在 4-9mm 的健康僧帽牡蛎苗种 768 万,单位水体出苗量 32 万 /m<sup>3</sup>。

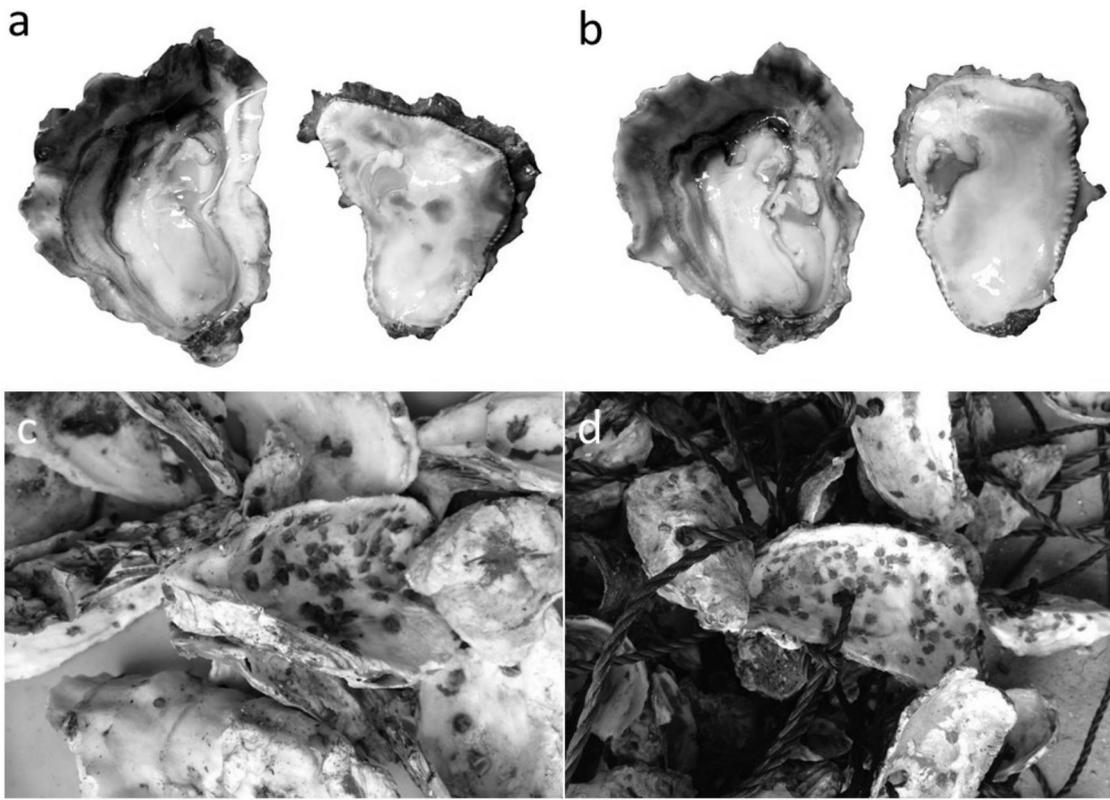


图 1