

第四部分

育苗场的运作：亲贝促熟, 产卵和受精

4.1 亲贝促熟	55
4.1.1 概述	55
4.1.2 促熟方法	57
4.1.2.1 培育池系统和水处理	57
4.1.2.2 种贝的喂养	60
4.1.2.3 饵料投喂量的计算	61
4.1.2.4 流水系统的水量调节	62
4.1.2.5 促熟的两个阶段	62
4.1.3 热带地区双壳类的促熟	63
4.2 产卵和受精	63
4.2.1 概述	63
4.2.2 剥离获取配子	65
4.2.3 平牡蛎的特殊情况	66
4.2.4 卵生双壳类产卵的诱导	68
4.2.4.1 升降温刺激过程	69
4.2.4.2 雌雄异体双壳类的产卵过程	70
4.2.4.3 雌雄同体双壳类的产卵过程	71
4.2.5 受精过程	71
4.3 参考文献	73

4.1 亲贝促熟

4.1.1 概述

亲贝促熟是双壳类养殖中进行苗种生产必不可少的环节(图32)。通过亲贝促熟, 育苗场可以延长产卵季节, 摆脱自然条件对性成熟的限制。地处边缘气候带的育苗场, 能够较早地生产苗种, 常常比自然界中配子发生和成熟早数月。

如果地处较冷气候带的育苗场, 能够生产早苗, 就能保证种苗在越冬前有较长的生长期。个体较大, 对低温的抵抗力较强。育苗场对亲贝的促熟, 有时用来处理引进的外来养殖品种, 因为新品种原有的生活环境与引进地区不同, 同样规格的苗在新环境下的适应性不如在原产地。

很多双壳类在它们生活史中的第一年表现为雄性先熟。随着年龄的增长, 性别开始改变, 雌性的比率会逐渐增加。雌雄同体动物中性腺发育也存在着雄性先熟的现象。在



图32: 典型的亲贝促熟系统。

普遍养殖的双壳类中,有这种性变现象的种类有蛤类中的*Tapes*、*Mercenaria*、*Mya*和*Spisula*,牡蛎中的*Crassostrea*和贻贝类中的*Mytilus* sp. 和*Perna* sp.。

双壳类中有些种类从性功能角度看,它们是真正的雌雄同体。它们既有成熟的雌性性腺,又有雄性性腺(图33)。配子的产出是依次进行,通常是先产精子,后产卵子,随后又转为排放精子的循环过程。这些雌雄同体的种类包括产于北欧的*Pecten maximus*,产于巴西和加勒比海的*Pecten (Euvola) ziczac*,海湾扇贝属中的三个种:*Argopecten irradians*、*Argopecten gibbus*、*Argopecten purpuratus*,以及栉孔扇贝属中的一些种类。雌雄异体常出现在其它个体较大的扇贝中,如:大西洋深水扇贝(*Placopecten magellanicus*)和虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)。

*Tiostrea*属的牡蛎和*Ostrea*属的平牡蛎呈现性别交替出现的现象。它们在每次生殖循环的末期转变性别。在食物充足和长期温暖的水域中,一个欧洲牡蛎在一个产卵季节中可性逆转2-3次。

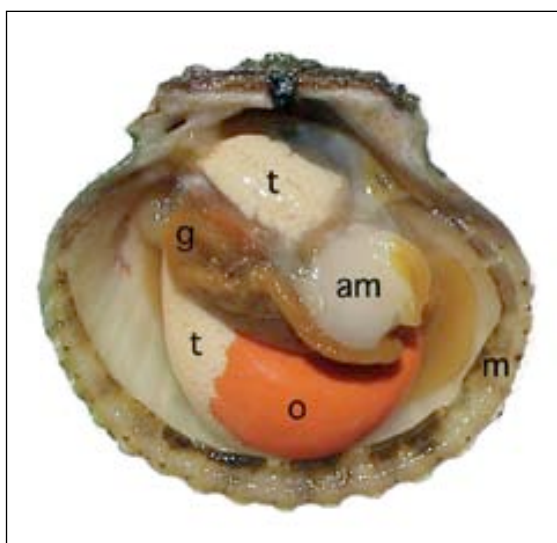


图33: 性腺发育完全成熟的杂色海湾扇贝的解剖图。
am-闭壳肌;g-鳃(为显示性腺而被掀起);m-外套膜;o-卵巢;t-精巢

温带地区的双壳类在一年中一般有两个产卵期,一个是春末,一个是秋天浮游植物量最高时。热带种类的产卵期相对不固定。在一年中的大部分时间都可以产生配子,但

菲律宾蛤仔 (*Tapes philippinarum*) 亲体的暂养促熟个例



图34: 养殖蛤类中的常见种。

注释:在欧洲的一些育苗场里, 蛤仔属(*Tapes*)与另外两个属(*Venerupis* 和 *Ruditapes*)是同义的。因此, 菲律宾蛤仔的学名常常称为 *Tapes philippinarum* 或 *Venerupis philippinarum* 或 *Ruditapes philippinarum* (还有使用 *Tapes semidecussatus* 或 *semidecussata*)。在其他常见的养殖种类中也存有同样的学名混乱的情况。(菲律宾蛤仔的学名应该是 *Ruditapes philippinarum* ——译者注; 见《黄渤海的软体动物》, p. 219. 齐钟彦等著)

像其它的双壳类一样, 菲律宾蛤仔(图34)卵的产量与成体的大小有关。活体重在10-20克之间的成熟雌性蛤平均产生500万-800万粒卵, 这取决于它们的状态和种贝暂养、促熟的时间。

2-3龄的蛤仔群体, 性别比接近1:1。例如, 1987年, 在英国Conwy水产研究所试验蛤仔配子发育的研究中, 所培育的138只蛤仔有54只产卵, 55只产出精子, 其余的29只蛤大体上是在性腺发育的早期, 没能释放出配子, 很可能是性腺没有完全成熟的个体。

在天然海洋环境中, 双壳类的性腺发育大多是在水温10°C以上时开始的。配子在五月末到六月发育, 七八月份成熟, 并保持成熟状态。当受到高温(>20°C), 或者受到一系列的温度变化刺激后时, 配子就释放出来。在北欧的一些水域, 水温很少会高到足以刺激排放精卵的程度, 成熟的配子被保留到初冬, 而后又被再吸收回去。

育苗场通过提高温度和提供合适、足量的饵料来加速蛤仔的成熟。育苗场在冬天和早春得到成熟个体是完全可能的, 而此时海洋中的蛤还没开始性腺发育, 通过一段时间的促熟, 育苗场便可得到幼虫。在一年中的大部分时间, 都可以得到处于产卵状态下的蛤仔。为了在秋天得到产卵状态的蛤仔, 可以在秋初提高水温和供应高质量饵料使幼小的个体成熟。

产卵群体比例只占群体总数的一小部分。这一习性给热带的育苗场带来了难题。当培养的成体中会有相当数量的个体刚排放尽配子;或是处在配子发育的早期, 暂养在育苗场里的这类种贝对时间、空间和饵料资源都是一种浪费。目前已经有方法可以使亲本达到生殖发育同步的水平(见4.1.3)。

4.1.2 促熟方法

4.1.2.1 培育池系统和水处理

所有双壳类亲本促熟的基本方法雷同。育苗场通常要在当地海域采捕一定量的成体, 选择后供生产所用。蓄养种贝的条件要尽可能的满足性腺发育的需要, 如高水

流量和低密度的生长环境。所选择的种贝通常是育苗场以前所培育的优良品种的后代, 具有优良的生长速度、以及在壳形和体色都具有特色的个体。

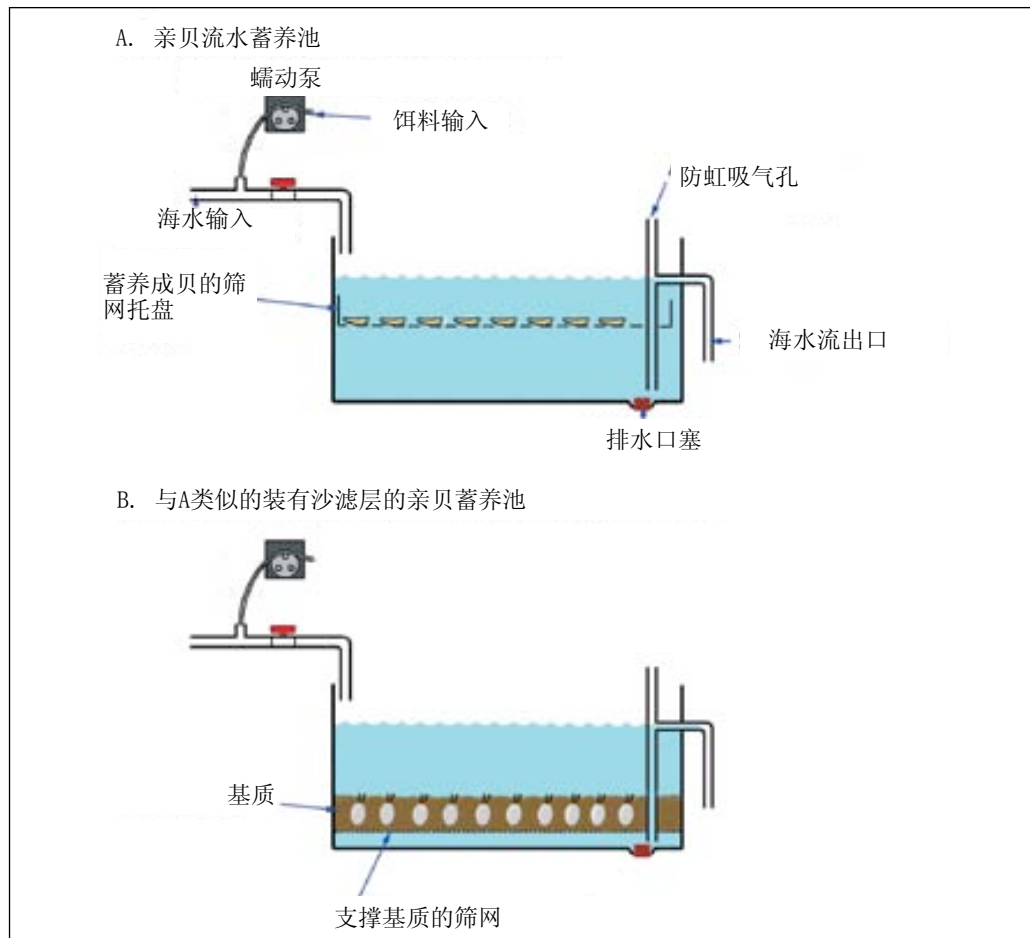


图35: (A) 显示种贝蓄养在网箱中, 网箱上具有大孔可以让代谢废物排出; (B) 显示水池结构与A型池相似, 但有细砂砾过滤层。A型系统适合大多数不需要砂土层的种类。蛤和某些扇贝更适合在B型池中生活。

从海中捕捞的成贝, 其外壳要经过彻底的洗刷, 除去附着在其表面的底栖动物(污损生物)、有机物和沉淀物, 随后放置在与示意图35(也可见图32)相似的培育池中。在自然界中, 蛤和扇贝的某些种(如*Pecten ziczac*)喜欢将自己掩埋在砂土层里生活。在如图所示的这类培育池中, 蛤或扇贝可以潜在在10厘米深的粗砂或贝壳碎片的网箱中, 或是在底部的沙砾过滤层(图35B)中。而暂养那些不需要砂土层的双壳类如牡蛎, 贻贝和某些种扇贝时, 网箱需要抬起, 离开促熟池底(图35A和36)。

海水通常无须过滤。未过滤海水中的多样性食物在促熟过程中是有益的。这样做有可能使亲本在蓄养时随进水夹带的寄生虫或潜在的致病微生物感染, 但用不过滤海水的益处往往超过它的风险。在很多情况下, 蓄养池多数采用流水系统, 在此系统中不一定要包含为防止藻类饵料流失的循环水单元。

如果将亲本蓄养在水循环系统中也是可以的, 总生物量(即池中所有动物的总重量, 也包括贝壳)不超过2-3克/升为宜。同时需要每周彻底换两次水, 以预防细菌和代谢物的积累。

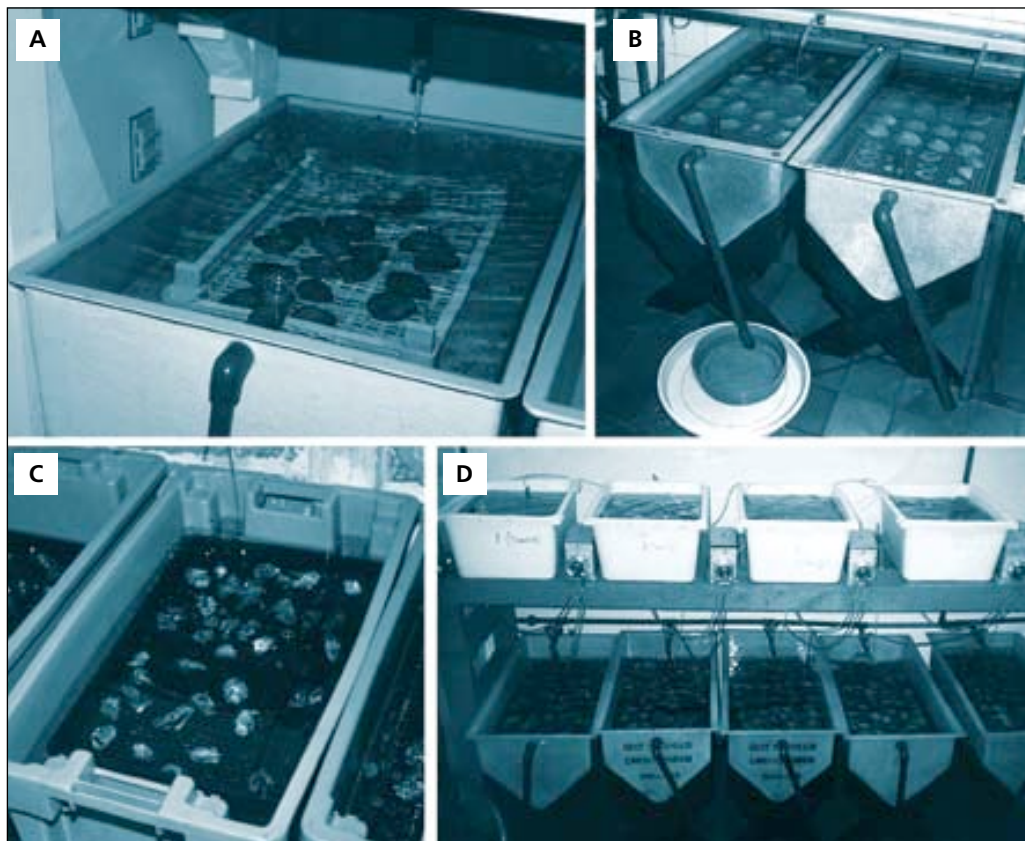


图36: (A)-(D)用于亲本促熟的各种类型流水蓄养池。(B)流水池的网箱中有一滤网,用来截留成体释放出的易被水流带走的幼虫。(C)是一套实验性系统,每一个亲贝蓄养池均由位于池旁的蠕动泵提供不同的饵料。

盐度和温度应该适合所蓄养的贝类的需要。大部分的双壳类,其性腺发育和配子成熟适宜的盐度应高于25PSU,温度应该在16-24°C之间。然而,每一个物种对于这两个参数都有最适合的指标。例如菲律宾蛤仔和太平洋牡蛎最适水温为22-24°C。太平洋牡蛎能适应较宽的盐度范围(15-34PSU),而菲律宾蛤仔则适宜较高的盐度,介于25和34PSU之间,最适盐度是30PSU。美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*),适于非常低的盐度。而那些远离海岸的深水种类则需要较低的温度和正常的海水盐度。

蓄养池中流经每个个体的水流速度应该高于25毫升/分,一个120-150升的培育池中种贝的总生物量不能超过5千克(图37)。在这种小培育池中,当种贝数量过多时,水是不能被循环再利用的。如果作为种贝用的双壳类是从外界种贝培养区域引进的,培育池中排出的水需要经过处理,以预防病原体 and 寄生虫传递到当地环境中。排出的水需要用>100毫克/升的氯气或是相同效果的消毒/杀菌剂(如臭氧)处理24小时以上(最好是48小时),才能排入海中。

育苗场通常有一个独立的亲本暂养室,或是将暂养池安放在场内安静地区,以免受到频繁打扰。很多种类的双壳类当受到光照和震动刺激时,会关闭它们的贝壳。受到的干扰越少,它们的摄食量也就越多。

中小型育苗场通常有5-20个蓄养池以满足不同种类贝类促熟培育的需要,并且可以有序地蓄养不同种类的亲本,以保证可连续地生产和提供幼虫。大的育苗场有较多这样



图37:蓄养池体积120升, 放养55只牡蛎, 平均活体重为80克。在此密度的蓄养池中, 添加饵料的海水的最小流速应达到1375毫升/分。

的小培育池或是少量较大规格的蓄养池。如果一年中要有较长时间稳定地生产计划中选定的某一种类的稚贝, 就需要不断地蓄养新挑选来的种贝, 促熟培育一二个星期后, 使其达到性成熟。通过这种方法, 每周都可以得到可供产卵的成体。

4.1.2.2 种贝的喂养

人工培养的海洋微藻是亲贝促熟期间所用的主要饵料。此外, 室外培育池和池塘中自然生长的浮游植物也可以用作亲贝饵料, 也可以从市场上购买到浓缩的藻膏。

可进行集约化高浓度培养的微藻有四片藻(包括*T. chuii*, *T. tetrabele* 和*T. suecica*等多个种)(旧译名为扁藻, 译者注), 球光等鞭金藻(*Isochrysis galbana*, 和T-Iso无性繁殖系), 卢氏巴夫藻(*Pavlova lutherii*), 牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*) (以前被命名为*C. gracilis*), *Thalassiosira pseudonana*和魏氏海链藻(*T. weissfloggi*)和骨条藻(*Skeletonema costatum*)等, 还有其它一些种类。将这些微藻按适当比例混合使用, 比单个种类更有效。值得注意的是, 不要投喂相对不易消化的种, 如小球藻(*Chlorella* sp.), 或是那些已经弄清楚缺少不饱和脂肪酸的种类, 如杜氏藻中的一种(*Dunaliella tertiolecta*)。

研究结果显示, 饵料投喂不充足时, 成体产生配子的量会减少。如欧洲牡蛎成体培养在过滤过的水中, 并只投喂*Dunaliella tertiolecta*时, 其产量明显减少。众所周知, *Dunaliella*是缺少两种在营养上至关重要的高不饱和脂肪酸——C20和C22。在这一实验中, 60个成体分组养在培育池中, 提供没有过滤或经过2微米微孔过滤器过滤过的海水。(这一实验的培育池系统正如图36C所示)。每天按牡蛎干肉重3%的比例, 分别提供*Dunaliella*, *Dunaliella*与*Tetraselmis suecica*混合或*Dunaliella*与T-Iso混合的三个组合的饵料。对照组培养在过滤和未过滤的流动海水中, 不额外添加人工养殖的微藻饵料。

这一试验持续十周, 从开始促熟到第一批幼虫的孵化, 记录了每一组的数据和每天幼虫的孵化量。表8所示的结果表明, 单一投喂*Dunaliella*的试验组, 配子产生的时间延迟, 与另外两个组相比, 其幼虫的总产量也明显减少。有趣的是, 养殖在未过滤且没有额外提供养殖藻类的海水中的牡蛎成体所产生的幼虫, 比其它任一处理组产生幼虫的数量都要多。这更进一步证实了前面所提到的观点, 在未过滤海水中促熟有利于性腺发育和性腺质量。

表8: 不同饵料对欧洲平牡蛎配子产生的影响*。

海水处理与否	饲料	天数	幼虫总数 ($\times 10^6$)	每一枚母贝 产出的幼虫数
过滤	不投喂	35	1.16	19 367
过滤	Dt	49	0.65	10 280
过滤	Dt + Ts	31	3.00	49 950
过滤	Dt + T-Iso	32	4.70	78 250
未过滤	不投喂	33	8.12	135 317

*说明: Dt-*Dunaliella tertiolecta*, Ts-*Tetraselmis suecica*, T-Iso- *Isochrysis galbana* (T-Iso无性繁殖系)。天数—指从开始促熟到幼虫第一次产出幼虫所经历的天数。幼虫总数是每组成体70天内产出的幼虫数量, 每一枚母贝产出的幼虫数是这组母贝70天内产生幼虫的数量除去成体的个体数。(引自Millican和Helm, 1994)。

上述实验时间包括春天浮游植物大量繁殖的季节, 此时在未过滤海水中, 叶绿素含量平均为1.68毫克/米³, 而在过滤海水中只有0.35毫克/米³。微粒状脂类在未过滤海水中的平均值为62毫微克/升, 而其它组为9.7毫微克/升。

对于饵料的集约化和粗放养殖方法, 在本手册的第三部分已经介绍过。计算所需饵料量的步骤将会在下文的4.1.2.3中加以讲解。然而, 饵料量的计算并不适用于种类复杂、丰富地区的浮游植物的计算, 其总量和全部营养值会天天变化。在这种情况下, 就需要一种总量的估计值, 这一估计值由单位体积中微粒物质的无灰干重决定, 或用有机碳分析得到。此外, 有经验的操作人员都能凭肉眼观察稀释后藻液的颜色来判断需要供给亲贝饵料的数量。

人们可以方便地使用具有不同营养价值的藻膏, 供应商还提供了该产品的单位体积中的细胞数量。这类商品还在包装上标有主要营养成分的具体数量资料。只要按照供应商的说明去操作即可。打开包装后, 这些非活性产品可以保存相当长的时间。流水暂养系统中使用这种藻膏最好, 使用中要注意培育池的卫生情况。

在促熟暂养期间, 提供适量、高营养价值的、不同种类的食物对卵的质量有显著的效果。

4.1.2.3 饵料投喂量的计算

促熟期间所需饵料量是按肉体干重计算。在促熟初期, 每天投喂饵料(微藻)的干重通常为亲贝肉体干重平均值的2%或4%。投喂量超过6%对于促熟是不利的。更确切地说, 双壳类的投喂量大和促熟期间的高温会促使亲贝生长, 而不是在性腺的发育上。

测定促熟的双壳类亲本的肉体干重的方法很简单。随机取10-12个样本, 开壳后取出软体部, 放在60-80°C温度下的烘箱内烘48-72小时, 待恒重时记下该数据, 这便是计算食物投喂量的肉体干重。可用下面等式计算每个成体按干重的3%的日需饵料量。

$$\text{每天每个成体所需食物量} = 3 \times \text{平均肉体部干重(克)} / 100$$

因此,一个肉体干重0.75克的成体,按3%投饵量计算等于0.0225克(藻的干重)。本手册第三部分表1所给出的不同种藻类的干重数据,可计算出实际投喂量。100万四片藻细胞的干重(有机体重)约为0.2毫克。

假如给亲本提供的藻类是四片藻,如果按1.5%的日饵料量计算,亲本肉体的总干重量为50克(在下面公式中变为毫克),则:

$$\begin{aligned} \text{日食物量} &= [(1.5 \times (50 \times 1000)) / 100] / 0.2 \\ &= 37.5 \text{亿细胞} \end{aligned}$$

假如,某日收获的四片藻密度是150万个细胞/毫升,则对于饲喂亲本1.5%食物量所需体积为 $3750 / 1.5 = 2500$ 毫升,或2.5升。计算食物中其它组成种类含量的方法是相似的。如果用牟氏角毛藻替代四片藻,或是混入部分四片藻;牟氏角毛藻的收获密度为700万细胞/毫升,则1.5%的食物投喂量所需的体积为3.57升。100万个牟氏角毛藻细胞的干重约为0.03毫克。

4.1.2.4 流水系统的水量调节

在定量计算中,暂养成体的培养池的外形和系统也要估计在内。这一估计值并不需要非常准确,在封闭系统中,未被吃掉的藻类细胞并没有丢失,而是沉淀或浮在表面。然而,在图32,36和37所示类型的流水系统和培育池中,投喂的饵料的一部分将不可避免会随水流排出。因此,采用开放系统,水体在100-150升的蓄养池中,水交换速度以慢为好。

从经验得出,每交换一个全量水的时间大于90分钟时可以减少藻类饵料的损失,由于给种贝充足的时间,它们可以吃掉60-80%投喂的饵料。例如,体积为150升的促熟池,内有50只牡蛎或扇贝,活体重为75-100克,所需的水流速度为1.25升/分,也就是每个成体分摊到25毫升/分。按此水流速度,培育池的每一体积交换速度是120分。如果培育的是个体较小的双壳类(如菲律宾蛤子),可以根据活体总生物量的比例,相应地增加每一池中成贝的数量。

饵料最好是用计量泵添加到海水内,并随着水流连续输送到培育池,这样会使饵料分布得更均匀。有些育苗场,饵料日投喂量分成几次投入。每次投饵后,海水供应暂停一小时左右。需要提醒的是必须按时重新打开水流系统,否则会产生代谢废弃物的污染。

如果没有办法确定流水培育池中流入和流出时损失饵料的比例,可以把饵料供应量提高到4%以防饵料量不足。如果技术人员能使用电子微颗粒计数器和筛选器(如图2所示的Coulter计数器),可以运用这些硬性数据调节食物量。

4.1.2.5 早期促熟的两个阶段

促熟过程可以分成两阶段。在温带冷水地区的繁殖季节早期,当野生成体还没开始配子发育时,最好加大饵料的投喂量,促熟水温控制在比外界环境温度高,但又比最适促熟温度低的中间温度上。目的是为了成体体内营养储存水平,以供配子发生时的

消耗。这一点对雌性比雄性更为重要，因为卵子的发生和成熟比精子需要更多的能量。这样保持4-6周后：以每天1-2°C的速度逐渐升高水温，最终达到最适温度，同时稍微减少食物的投喂量（从4-6%减少到2-3%）。

在促熟的第一阶段，也可叫做预促熟阶段，以藻膏，或者以本手册在3.4.6节所述的粗养方式培养的藻类，或是以集约化方式培养的藻类做饵料均可。这一阶段亲本所得到的食物结构和食物量都非常重要，它会影响到早期卵母细胞组成成份中主要的脂类结构（磷脂）。如果食物中缺乏高不饱和脂肪酸，包括二十碳五烯酸（EPA, 20:5n-3）和二十二碳六烯酸（DHA, 20:6n-3），将会使卵细胞膜中缺少该成份。因此，食物组成中应该富含一种或几种不饱和脂肪酸含量高的硅藻，如牟氏角毛藻或海链藻，以及鞭毛藻类中的某些种类，如卢氏巴夫藻或球等鞭金藻。

在随后的第二阶段，也叫做温和水温促熟阶段，亲本摄取的中性脂类-三酰基甘油会积累在正处于成熟阶段的卵中。这些脂类在胚胎和幼虫发育时期，用作能量来源。脂类中的脂肪酸的组成主要取决于成体摄取的食物，而母体本身对此所起的作用不大。

4.1.3 热带地区双壳类的促熟

在本章的前面提到，很多热带种类双壳类，在一年中大部分时间都会间歇性产卵。这就给热带和亚热带地区育苗场得到大批量生产用幼虫带来了一定的困难。

如果一年当中海水温度和得到食物量没有太大变化，双壳类就不会像温水性和冷水性的种类那样有静止期。静止期在一个种群中是生殖发育同步性的启动器。但热带育苗场可以设置一个较低温度的时期，即把种贝存放在水温降低至比周围环境低5-10°C，且食物又较丰富的条件下培育4-6周。在此之后，再把种贝促熟的温度逐渐升高至周围环境温度相当的水平，此时将会有较大比率成体的配子同步成熟。这与4.1.2.5中所述方法较为相似。

在古巴，这一技术已经被运用在红树林牡蛎（*C.rbizophorae*）上。在巴西的部分地区，相似的方法也成功地应用在太平洋牡蛎的促熟上。但后者的情况稍有不同。太平洋牡蛎在巴西是一个外来的引入种。在巴西南部地区生长得相当好，但是它们不能发育到可以产生配子的程度。

4.2 产卵和受精

4.2.1 概述

与养殖双壳类的促熟，以及与卵子、幼虫生产相关的资料汇总于表9。

在冬末和春初时节，许多温水性及冷水性的双壳类需要经历4-8周的促熟期才能产卵（图38）。随着自然繁殖季节的临近，促熟的时期会越来越短。准确时间的选择取决于所促熟的双壳类种类、促熟的初始条件、配子在促熟开始时的时期，以及与育苗场有关的因素，但最重要的是温度、饵料种类和饵料量。育苗场的技术人员常倾向于使用在海里正处于配子发生期的成体进行促熟，而不是采捕性腺尚未分化的成体。在自然产卵季节，从海洋中捕捞到的成体，其卵的质量取决于成体的营养储备（尤其是脂类）的多少。这些成体只需在促熟温度下培养7-12天，供给充足的饵料量就可使其配子成熟。

当食物充足时,许多温带海岸和河口水域的双壳类,在冬末、春初时节进行促熟,从开始促熟到随时均可排卵的积温需要350-650度日。育苗场的技术人员需要知道所促熟的种类在海洋中开始性腺发育的温度。像太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*),欧洲平牡蛎(*Ostrea edulis*),大西洋大扇贝(*Pecten maximus*),和菲律宾蛤仔(*Tapes philippinarum*)这些普遍养殖的种类,其配子发育的生物学零度(b0)通常介于8-12°C之间。知道了生殖发育的生物学零度和促熟期间水的温度,就可以计算出促熟所需的天数。

表9: 普遍养殖的双壳类的亲本促熟和卵(或幼虫)产量的汇总资料。性别类型的符号说明在表的底部。在繁殖季节早期被拿到育苗场的促熟时间(时间是用天数计算,它的变化很大程度上取决于成体的配子发生所处的时期)。产卵量只是一个指标,它依产卵成体的大小,所处状态及其他因素的变化而变化。早期D-幼虫(孵化后2-3天的幼虫)的平均壳长也被列出加以比较。

组/种名	性别类型	促熟天数 (天)	温度 (°C)	产卵量 (百万)	D形幼虫大小 (微米)
牡蛎:					
<i>C. gigas</i>	O-D	28 - 42	20 - 24	50+	70 - 75
<i>C. virginica</i>	O-D	28 - 42	20 - 22	50+	60 - 65
<i>C. rhizophorae</i>	O-D	21 - 35	20 - 22	7 - 12	55 - 60
<i>O. edulis</i>	L-A	28 - 56	18 - 22	1 - 3	170 - 190
<i>T. lutaria</i>	L-A	28 - 56	18 - 20	0.02 - 0.05	450 - 490
蛤:					
<i>T. philippinarum</i>	O-D	28 - 42	20 - 22	5 - 12	90 - 100
<i>M. mercenaria</i>	O-D	28 - 42	20 - 22	10 - 20	90 - 100
扇贝:					
<i>P. yessoensis</i>	O-D	14 - 21	7 - 8	20 - 80	100 - 115
<i>P. magellanicus</i>	O-D	28 - 42	12 - 15	20 - 80	80 - 90
<i>P. maximus</i>	O-M	35 - 56	10 - 15	20 - 80	90 - 100
<i>P. ziczac</i>	O-M	14 - 28	20 - 22	7 - 15	90 - 100
<i>A. gibbus</i>	O-M	14 - 28	20 - 22	4 - 7	90 - 100
<i>A. irradians</i>	O-M	21 - 35	20 - 22	4 - 7	90 - 100
贻贝:					
<i>M. edulis</i>	O-D	28 - 35	12 - 16	5 - 12	90 - 100

性别类型: O-卵生型(配子排入水中)L-幼生型(受精卵在成体孵化成幼虫后排入水中)D-雌雄异体类型, M-雌雄同体类型(也称两性的,同一个体表现两种性别特征)A-性特征交替出现类型(同一个体每次产出配子后发生性逆转)。



图38:正在产卵的雌性菲律宾蛤仔(图片由Brian Edwards提供)。

譬如，主要的生殖促熟温度为 20°C ，且性腺发育的生物学零度(b_0)是 10°C ，则每天的有效积温为 $20-10=10$ 。因此，一个30天的促熟期会增加300度日，如果是相同时间但温度变为 22°C ，其有效积温则为360度日。这可能是种贝在晚春能促熟产卵所需要的最短时间。显然，带回育苗场用以促熟的种贝的配子形成已经开始时，使其达到可以产卵程度的积温就要少些。冷水性扇贝，如*Pecten maximus* 大西洋深水扇贝*Placopecten magellanicus*，从开始促熟到产卵所需积温处于相同范围内。但冷水性双壳类促熟的最高温度不应超过 $15-16^{\circ}\text{C}$ ，有时甚至会低到 $10-12^{\circ}\text{C}$ ，所以促熟期所持续的时间会比较长(有时超过8周)。冷水双壳类促熟时往往需要从周围环境的温度开始每周升高 1 或 2°C ，种贝才能适应这一温度。这当然也增长了整个促熟时间。

产卵是育苗的主要环节，通过刺激已经促熟的双壳类，使其释放出它们的成熟配子。在这种情况下，蛤和扇贝的某些种类，通过“剥离”不会得到有发育能力的胚胎(请参阅下一节有关“剥离”的解释)。卵需要通过输卵管排出才能成功地受精。

4.2.2 剥离获取配子

完全成熟的配子能够从太平洋牡蛎，*Crassostrea virginica*，*Crassostrea rhizophorae*及其它相似的卵生型牡蛎中剥离出来。在这些种类促熟的适当时期，这一方法是一种普遍并且方便的获得卵子的方式。

当需要幼虫时，这一过程会牺牲一定数量的成熟成体(图39)。去掉较平的那瓣外壳，露出软体组织。性腺覆盖在消化腺上，一直延伸到壳顶和铰合部，当其非常成熟时还会延伸到闭壳肌。可以用解剖刀反复切割性腺再用过滤海水在盛有半杯海水的烧杯或桶中冲洗配子，或是用干净的移液管插入饱满性腺上皮细胞下，尽量轻地吸取配子。在养殖温度下，将移液管中的配子转移到装有海水的烧杯或桶中。应先从已经打开的牡蛎中取出少量样品。在40-100倍显微镜视野下观察、判定性别和配子的形态。精子应该是有游动能力的，刚取出的卵子通常呈梨形，应该在20分钟内完成与海水的接触。等待剥离期间，上壳应当盖在牡蛎上，以防干燥。

假定配子是完全成熟的，从打开的牡蛎中移出配子(此时性别是已知的)应先移出雌性配子。太平洋牡蛎的生殖力是非常旺盛的。70-90g重的雌性个体可以有8 000万-1.2亿的卵，不是所有的卵都需要剥离。

在剥离期间应注意不要刺破消化腺。以免胃肠组织、细菌及微生物对配子的污染。每个雌性个体的卵可以独立收集在干净的2-5升的玻璃烧杯中，也可以集中收集在10-20升的塑料桶中，其中装入75%的海水，海水需要过滤和紫外线消毒，且保持一定温度(通常为 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$)。



图39:用吸管将太平洋牡蛎的配子剥离并转移到装有过滤海水的烧杯中。

完成卵的剥离后, 雄性配子也用相似的方法处理。一种普遍的做法是取每个雄性个体少量精子, 在相同温度下, 集中于一个装有部分过滤且紫外消毒海水的1升玻璃烧杯中, 确保精子的最终密度不太大。以视线能够穿过盛有精子的烧杯, 看到近处物体为准。此时配子可以用来授精。

4.2.3 平牡蛎的特殊情况

在介绍蛤、扇贝和贻贝的产卵情况以前, 首先谈谈牡蛎中 *Ostrea* 和 *Tiostrea* 的特殊情况。这两个属的牡蛎不同于其它普遍养殖的双壳类, 不需要刺激便可以产卵。在促熟过程中, 它们会依自身情况而产卵并且在外套腔内孵化幼虫, 产卵的时期由种类和温度条件决定。这一类型的牡蛎包括, 平牡蛎(图40), *Tiostrea lutaria* 和 *Tiostrea chilensis* 它们被认为是直接幼生型牡蛎。后两个种类的牡蛎经过20天的孵化期才将幼虫排入周围水域中, 此时幼虫的壳长已经达到450 - 490微米, 几乎做好了附着变态的准备。相反地, 欧洲平牡蛎在常规促熟温度下, 经过6 - 8天的孵化期便将幼虫孵出, 此时幼虫的壳长只有170 - 190微米, 还需要10 - 12天的培育才能达到成熟并做好附着变态准备。新西兰和智利的平牡蛎 *Tiostrea lutaria* 和 *Tiostrea chilensis* 卵的直径是350微米, 而欧洲平牡蛎卵只有150微米。

以上这些种类不能产生大量的卵。而且, 亲本生产幼虫需要较长的时期。成熟雄性将精子释放到周围水域中是相当少见的, 据推断他们是定期向周围水域中释放少量精子。邻近的处于雌性阶段的牡蛎(这些种类的牡蛎交替表现出性特征)将精子像食物颗粒一样顺着吸入的水流进入外套腔的进水室后, 才像卵生种类那样把卵子排入外套腔。然而, 卵并不排入周围水域。相反地, 卵穿过腮丝进入外套腔, 在这里它们受精并



图40: 处在性腺发育期的平牡蛎内部结构 (am) 闭壳肌; (g) 包被在消化腺外的性腺; (gl) 鳃; (h) 铰合部; (ic) 外套腔的进水室; 在排卵时, 卵穿过鳃进入到外套腔的进水室, 受精卵在此发育一周以上, 直到形成带壳幼虫。

发育相当长的时间(图41), 才能具有运动能力, 当离开母体的时候已经变态成为壳形完整的面盘幼虫(图42)。

在养殖这些种类上, 具有经验的育苗场技术员, 能通过少数离开母体外套腔, 并附着在上部壳瓣与外套腔进出水室相邻近的卵, 鉴别出处于产卵期和孵育期的母贝。孵化期的牡蛎不愿活动, 在相当长的一段时期内保持最小限度的壳的开合。

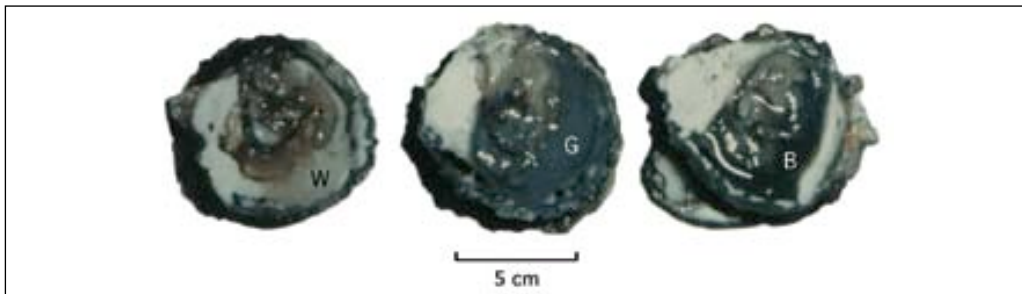


图41: 欧洲平牡蛎幼虫孵育期各阶段的变化 (W)“白苗”期, 卵进入外套腔进水室之后的一个短暂阶段; (G)“灰苗”期, 担轮幼虫之后的时期, 此时壳瓣已经发育完全但幼虫的有些器官还没有发育完全(产卵后的3-5天); (B)“黑苗”期, 此时的幼虫基本上发育完全, 离开母体在即。“白苗”、“灰苗”和“黑苗”是欧洲的一种传统叫法。

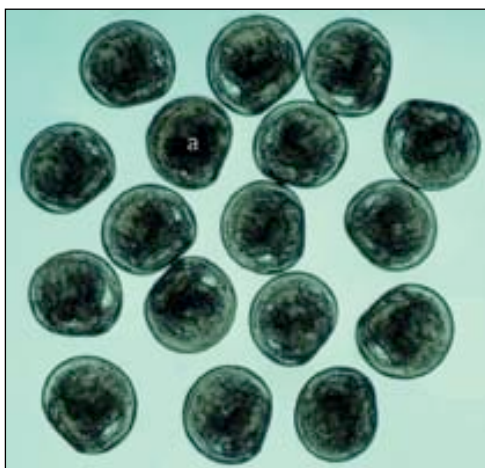


图42: 刚离开母体的平牡蛎面盘幼虫(壳长约175微米), 除了a幼虫外, 所有的幼虫发育正常。

当幼生型牡蛎的幼虫离开母体排入水中后, 表现出有两种类型: 欧洲平牡蛎幼体像“浮筏”那样, 迅速浮游到水面; 而 *Tiostrea* 属的牡蛎立即寻找适合的物体表面, 开始附着变态。对于后一种情况, 合适的附着基要在幼虫离开母体前安置到孵化池中。附着基可以是贝壳、塑料片或塑料网片(见下一部分附着的处理)。

当欧洲平牡蛎临近预期的排放期时, 需要每隔2-3小时检查一次孵化池, 看是否有排放幼虫的征兆。用烧杯或用90微米网目的筛网将游动的幼虫从水面上转移到盛有水的桶中。或者是让幼虫流入到置于水槽内的90微米网目网箱中(图43)。最好是当母

体排出幼虫后立刻收集, 以免幼虫被成体排入水中的代谢物污染, 或是被成体活跃的滤水作用从水中过滤出来。



图43: 对欧洲平牡蛎亲本进行促熟和培育的实验装置; 放在浅盘内的绿色筛网是为收集幼虫用的。

收集起来的幼虫,需要进行计数(见下文),并按合适密度分配到培育池中。体重在70-90克的雌性阶段的平牡蛎(牡蛎大小见图41)能产出100万-250万的幼虫。与此相反,雌性阶段的*Tiostrea*属的牡蛎,产出较大的卵,每只母贝只能产出2-5万个幼虫。

在自然繁殖季节,不管是通过人工促熟、还是在养殖场培养的种贝、或是捕捞的野生种贝,只要鉴别出它们正处于孵育期,通过图44所示的步骤都可以获得幼虫。这种方法也可以用来获得内脏功能尚未发育完全的幼虫,其目的是预防夏季潜在的致病菌的暴发。因为养殖的幼虫在亲本的外套腔内时就已经开始进食,因此,它们可能会处在由其亲本和邻近的母贝排出的、积聚在水体中的大量的细菌和微生物之中。

无论幼虫是自然地由亲本产出,还是在产前剥离出来的,都应该遵照本手册稍后部分有关幼虫养殖中所述的标准方法进行。最好的结果是排出发育成全壳且能动的D形幼虫期。如果在早期发育阶段便被取出,直到幼虫有功能的食物系统发育完全后,此时才具备摄食的能力,通过透明的壳可以看见较暗的S形结构,见图42。移出后的2或3天幼虫才能达到这一阶段。在此时期之前,柔软的身体组织呈现出灰色的密集的颗粒状,幼虫只能作微弱地运动(见图41-“灰苗”幼虫)。



图44: (A)将欧洲平牡蛎的幼虫从正在孵化的成体中分离出来。(B)移去上壳,孵育期的幼虫用过滤海水冲洗到90微米的筛网里,存入桶中(C)。(D)大多数幼虫快速游到水面,像“浮筏”那样聚集在一起。此时可以取样计数和测定大小。照片拍摄于加拿大新斯科舍省的Harwen牡蛎养殖场(由John和Krista Harding提供)。

4.2.4 卵生双壳类产卵的诱导

与上文所述的幼生型牡蛎相比,卵生型牡蛎是另一种普遍养殖的经济种类。卵生种类将卵和精子排入周围水域,在水中受精。

有很多种方法可以运用来刺激诱导产卵;较成功的方法是给予较微弱的刺激,让其自行产卵。接下来要介绍的技术是升降温刺激,它被广泛运用于卵生型种类。一般地

说, 如果亲本对合理的、较长时间的升降温刺激没有反应, 表明它们所携带的配子没有成熟。

复合胺等化学催化剂很少用来诱导产卵, 因为用这种方法得到的卵与升降温刺激相比成活率要低得多。

4.2.4.1 升降温刺激过程

从促熟池取出的成熟亲本需要清洗表面, 除去附着在贝壳上的污物和附着生物, 随后用过滤海水彻底冲洗。清洗之后, 将其放置在产卵槽或产卵池中。理想的产卵池应当浅些, 大小约150 x 50 x 15厘米的玻璃钢容器, 水深约10厘米(图45)。它的大小应当便于两个或多个有经验技术人员在一起操作, 检查亲本的产卵状况(这一点对采集雌雄同体贝类的配子至关重要——后面将会予以解释)。

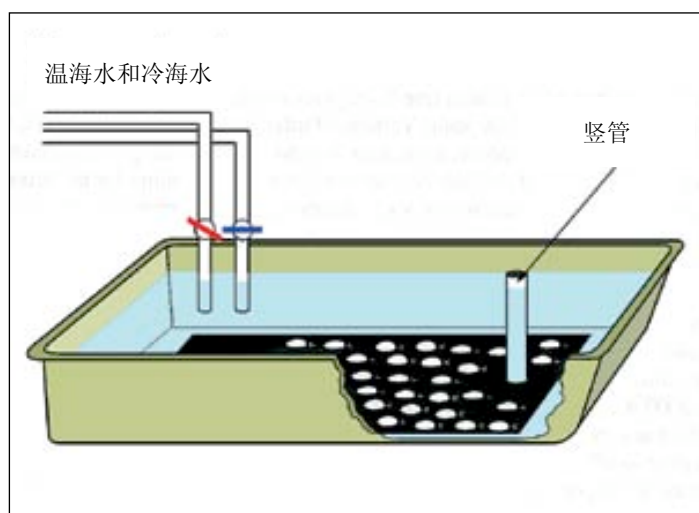


图45: 诱导卵生型双壳类产卵广泛使用的产卵槽示意图(Utting和Spencer, 1991)。

这种水槽有一支用来排水的竖管和两支供应不同温度过滤海水的水管系统, 一个提供12-15°C海水, 另一个提供25-28°C海水(例如: 牡蛎属中的种类和菲律宾蛤仔)。较低的温度应用于冷水种类。关键是高低温度之间的温差, 通常情况下应该保持在10°C上下。

水槽的底部涂成没有光泽的黑色, 或是覆盖一层黑色的塑料薄片, 以提供一个黑色背景。释放出来配子在黑色背景的衬托下形成鲜明的反差, 便于观察(图45)。

水槽中注入约10厘米深的冷水, 加入少量的微藻, 以刺激成体张开壳瓣, 开始滤食活动。30-40分钟后, 排出冷水注入高温水, 并且再次用少量微藻刺激。相同时间后, 再换成冷水, 重复这一过程。

诱导产卵所需冷热水循环的次数, 由配子的成熟情况和成体产卵准备情况决定。在夏季, 不到1小时就能诱导亲本开始产卵。如果是在夏初, 第一个亲本开始产卵大约需要经过3-4小时的循环刺激。如果成体在2-3小时的诱导丝毫没有反应, 则需要把成体放回到促熟池再经一周的促熟处理。亲本开始产卵有时发生在循环处理的冷水阶段, 也可能发生在热水处理阶段, 一般情况下, 发生在热水处理阶段的产卵较多见。通常情况下是雄性个体先排精, 但这不是一定之规。

可以用剥离的卵或精子作为附加的刺激因素。蛤类的性腺位于足的底部。扇贝是一个单独的器官,把外套膜和鳃组织稍稍抬起就可以看到。用移液管小心地刺入性腺,吸出一定量的配子用少量过滤海水混合后加入到产卵盘的海水里。若是刺激诱导蛤产卵,可以用移液管将稀释后的配子向其吸水管靠近,使得配子随着成体的吸水运动吸入外套腔。入水管是离铰合部远端的水管,水管的孔口也较大。当蛤开始产卵时,配子是由图38所示的出水管释放的。一般在第二次热水循环处理阶段便能引起成熟的蛤产卵,而其它完全成熟的卵生型双壳类则需要1-2小时。

4.2.4.2 雌雄异体双壳类的产卵过程

在雌雄异体种类中(表9所提及的),首先是雄性排精。一旦见到雄性排精个体即将其从产卵槽中取出,使其离开水。待收集到足够量的卵后再让雌性排精。这是因为精子比卵子容易失去活性,如果使用产出1小时后的精子授精,受精率会下降。

当雌性个体开始产卵时,必需把它从产卵槽中取出并单独放置在产卵盘或烧杯中,注入水温在24-26°C的过滤海水(图46)。产卵盘或烧杯要放在保温水中,以维持其温度。诱导雄性排精也可以运用相同的方法。雌性产生的卵呈现颗粒状或成簇的排出,雄性通过出水管连续排出的精子则呈一条乳白色线状流体。雄性个体开始释放精子后30-60分钟,雌性才开始产卵。

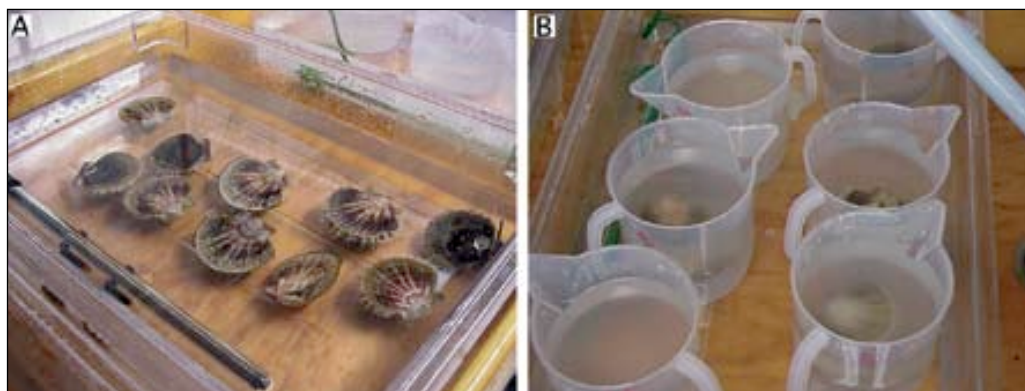


图46: (A) 在产卵盘中对*Pecten ziczac*成体进行冷热处理。注:水族箱中使用的加热器是用来维持产卵槽的水温。一个相似的盛有水的盘子用冰块冷却以提供冷刺激。(B) 扇贝分别浸没在3升的塑料烧杯中产卵,并放置在恒温水浴中。

每一个体完成产卵的时间是不同的,但很少超过40-60分钟,一般雌性所需要的时间较短些。然而,当雌性个体产生大量卵之后必须将其转移到另一容器中。当水中卵的密度过高时会抑制其过滤活动,而不能产生更多的卵。另外,排出的卵可能会被当成食物过滤掉。

呈团块状产出的卵会慢慢地沉在产卵盘或烧杯的底部。当个体完成产卵后,仔细地把盘中的卵块用90微米的尼龙网筛(卵可通过这一规格网目)过滤一下,把聚成簇的卵分离开,再将分散的卵保持在20-40微米的网筛中。将其轻轻地冲入干净的玻璃杯或塑料容器中,容器内事先盛有所需温度的过滤海水。成簇的卵通常难以受精。分散好的卵在水体中的悬浮时间比成簇的卵块长,受精率也高。

刚排出的卵呈梨形,与海水接触后就立刻变为球形。分别收集不同个体产出的卵,并可用显微镜在100倍视野下观察,评定其质量。在海水中悬浮时间少于15-20分钟的卵

应当丢弃。卵生型双壳类雌性的生殖发育并不是完全同步的，不同雌性个体产卵的时间在成熟期上也会稍有差异。当卵的分离和检查完成后，把高质量的卵集中到较大体积的容量中。

不同雄性个体产生的精子也同样地集中到一起。至少用6只雌性个体产生的卵与相同数量雄性个体产生的精子相互受精生产幼虫，可以保证后代基因的多样性，多样性程度是由父母本的杂交程度决定。一边轻轻搅拌卵液，一边将集中后的精子悬浮液混入其中，一般按每升卵悬液中加入1-2毫升的精液为宜。

4.2.4.3 雌雄同体双壳类的产卵过程

雌雄同体种类(包括很多种的扇贝)的产卵过程较为复杂。同一个体的卵和精子有时会同步成熟。我们需要尽量减少卵被同一个体产生的精子受精(自体受精)的机会。但是同一个体的精卵同步成熟的情况是不多见。通常是先产精子，后产卵子。当产完卵后，个体又回复到产出精子的状态。

使交叉受精机会最大化的方法有两种。在水体较深的培育池中，大量成体产出大量的配子。在流水系统中，精子被流水不断地冲淡，某一特定个体产出的精子在总精子量中只占很小的比例。当个体转为雌性生殖时，保留在培育池中高密度的卵与稀释后的精子结合。精卵结合的随机性表明，自体受精的个体的几率极低，而与其它个体产出的精子结合的几率是很高的。这一方法也用于雌雄异体种类的大规模生产，对于雌雄异体种类来说，自体受精并不是问题——在智利它被广泛地应用于紫色海湾扇贝的大规模生产，在亚洲它还应用于双壳类的池塘养殖。

另一种方法是，对受精过程实行密切的控制。当成体开始排放配子时，立即将其转移到盛有过滤海水的小容器中(图47)保持适宜的温度。容器上贴上标签，注明时间和特定成体整个生殖过程的相关数据。成体产生的配子使水浑浊后，将其移入到事先用过滤水彻底冲洗干净的容器里。容器标签上注明转移的时间和相同成体有关的数据。仔细并持续地观察每个烧杯中成体释放精子的情况，以便及时发现卵的释放，因为这一变化是非常突然的。当成体转变为产卵时，将其冲洗一下转移到另一个容器中，并附有相同成体的相关数据和转移时间。当产生卵的量足够多时，就要在其回复到精子生产状态前从烧杯中移出。这样，不同个体产出的卵和精子分别累积起来，根据每一个体相关的资料和配子释放的时间将其区分开。

在育苗场，从海里捕捞性腺成熟的亲本也可以用相同的方法直接诱导其产卵。

4.2.5 受精过程

受精前，卵悬液应当用合适网目的筛网(90微米或稍大些的网目)轻轻过滤，滤网低于水桶或其它容器的水面。这一步骤是为了除去成体产生精子前排出的排泄物的污染，以降低养殖过程中细菌和其它微生物增生对苗种培育带来的危害。

雌雄同体和雌雄异体种类受精方法在本质上是相同的。唯一不同的是，雌雄同体的双壳类必须保证精子和卵的交叉受精，避免用某一个体产出的精子与其自身产出的卵受精。因此，不同个体产出的每一批卵需要分开保存，并且用3-4只雄性个体新近产出的精子分别受精，其受精比例为每升卵悬液加入2毫升精子。加入精子后，可以静置60-90分钟。如若必要，可以将不同亲本产出的卵子混合到一起。

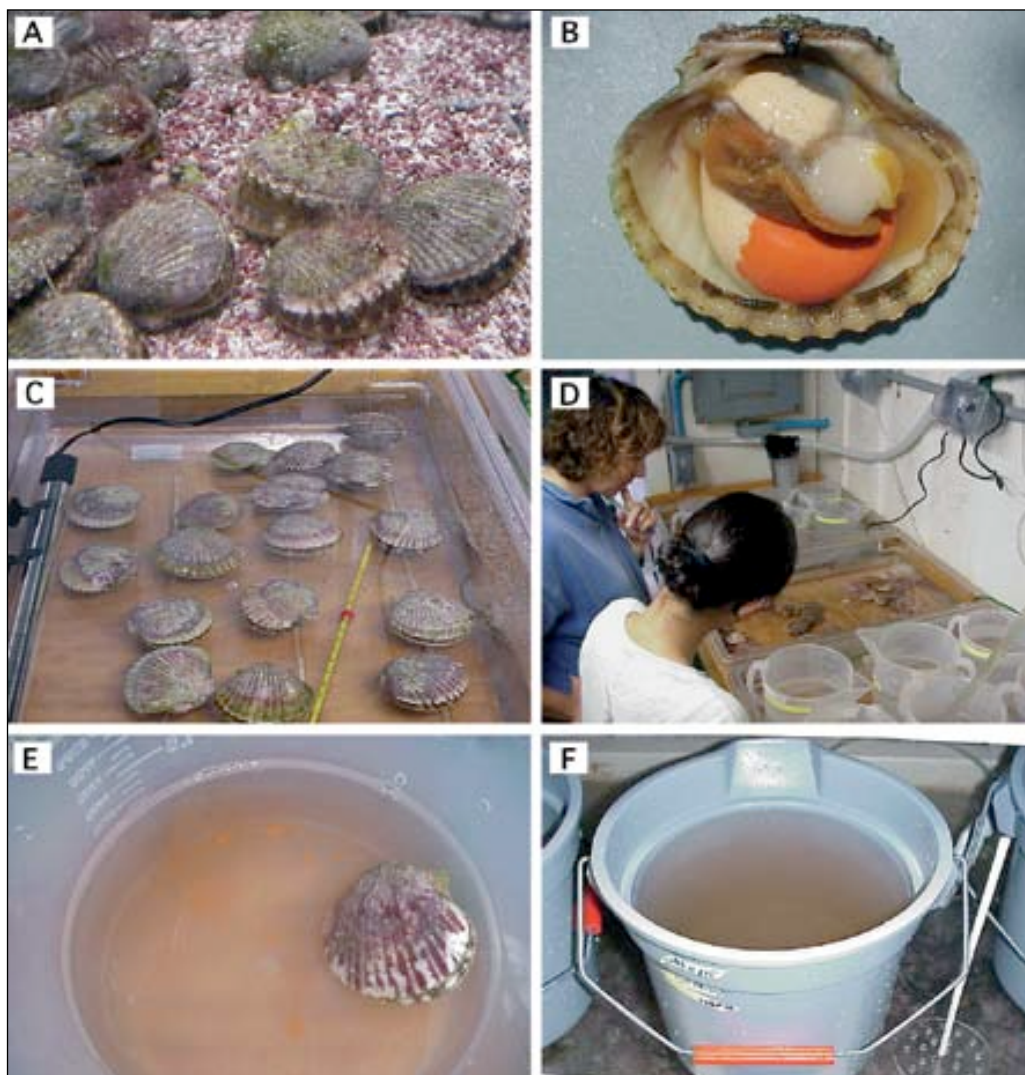


图47: 按照片次序说明在百慕大群岛生物学研究站的雌雄同体杂色海湾扇贝产卵过程:

- A- 冬末和春初时节, 亲本在20 - 22° C水温条件下培育2 - 4周。保持一定的水流量, 每天投喂食物。
- B- 性腺完全成熟的扇贝外观; 桔黄色的卵巢和白色的精巢相互贴近并各自占据性腺的一端。闭壳肌位于中间偏右处, 掀起棕色的鳃和外套膜等组织后便露出了性腺。
- C- 在约75 x 45 x 5厘米水深的透明塑料盘中, 一次有20只扇贝在产卵。让经过1微米网筛过滤过的海水漫过扇贝。一部分是用冰块冷却至12° C的, 另一部分是用150瓦水族加热器加热至25 - 27° C的海水。扇贝如文中所述, 用这两种温度循环促熟。
- D- 工作人员认真观察, 以区分在热水盘中的扇贝是否开始产卵。产卵的个体用过滤海水冲洗过, 再单独地移入装有0.5 - 1升海水、且贴好标签的塑料烧杯中, 一同放置在产卵温度的热水浴中。
- E- 精子释放后, 扇贝会突然转为释放桔黄色的卵。当扇贝转为产卵时, 必须马上将其移出, 冲洗后放入装有过滤海水的干净烧杯中。如果产卵的速度快、量也大, 此时将其它扇贝的精子加入其中。
- F- 镜检后, 质量好的卵集中到10升的桶中。用带孔的塑料棒轻轻搅拌, 使受精卵保持悬浮状态。用肉眼判断, 并掌握卵子数量在500万 - 1000万范围内。

在此阶段, 不同种类的受精卵在适宜温度下开始分裂。最初几乎平均地分裂为两个细胞, 之后不平均地分裂为四个细胞, 可以观察到一个大的细胞上冠有三个非常小的细胞。细胞分裂前受精成功的标志是卵释放的第一极体, 它为一个小而透明, 如同一帽状的结构突显在受精卵上(图48和49)。估计受精卵正常发育的比例可以用20-40倍的物镜观察。如果卵子完全成熟, 受精率一般都会超过90%。

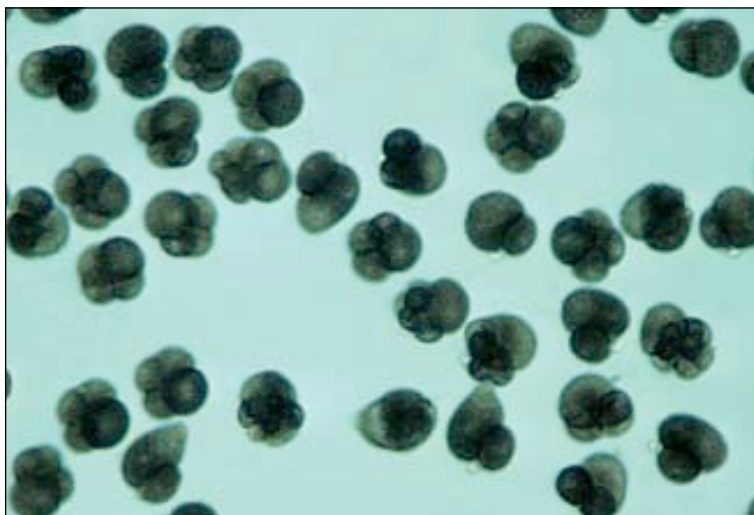


图48: 受精50分钟后太平洋牡蛎的卵(大部分卵处于2细胞和4细胞期,发育正常)。

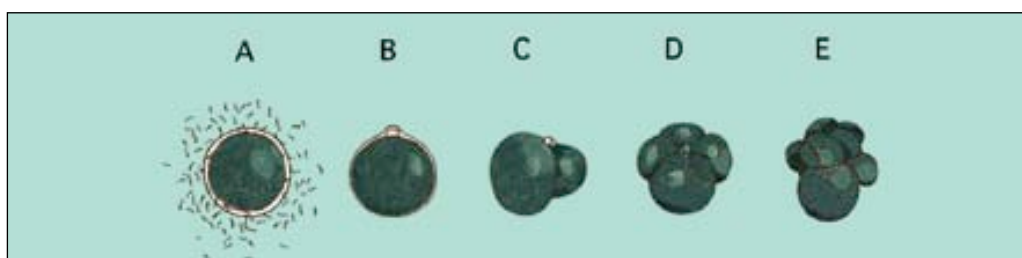


图49: 受精卵的早期胚胎发育;A - 精子在变圆的了的卵子周围游动;B - 受精后排出第一极体;C - 2细胞期,同时显示第二极体;D - 4细胞期;E - 8细胞期;大多数卵生双壳类的卵径在60-80微米之间,其变化因种而异。受精后各发育阶段所需的时间取决于种类和温度。

在受精前或受精后的20-30分钟内估计卵的数量是非常必要的,如果单位体积内胚胎的密度超过其早期分裂阶段所适宜的限度,就会影响到胚胎的正常发育。这一密度会在下文中详细列出,决定卵和幼虫数量的方法将在5.1.2.3节中加以介绍。

4.3 参考文献

Bourne, N., Hodgson, C.A. & Whyte, J.N.C. 1989. A Manual for Scallop Culture in British Columbia. Canadian Tech. Rep. Fish and Aquatic Sciences, No. 1694: 215 pp.

Breese, W.P. & Malouf, R.E. 1975. Hatchery manual for the Pacific oyster. Sea Grant Program Publ., No. ORESU-H-75-002. Oregon State Univ., Corvallis, Oregon, USA: 22 pp.

Castagna, A. & Kraeuter, J.N. 1981. Manual for growing the hard clam, *Mercenaria*. Spec. Rep. Virginia Institute of Marine Sci., Gloucester Point, Virginia, USA

Chew, K.K., Beattie, J.H. & Donaldson, J.D. 1987. Bivalve mollusc hatchery techniques, maturation and triggering of spawning, p 229-248. In: Working Group on Technology, Growth and Employment (eds.) Shellfish Culture Development and Management. International Seminar, La Rochelle, France, March 4-9, 1985, IFREMER, Centre de Brest, France

Couturier, C., Dabinett, P. & Lanteigne, M. 1995. Scallop culture in Atlantic Canada. p. 297-340. In: A.D. Bogen (ed.) Cold-Water Aquaculture in Atlantic Canada. The Canadian Institute for Research on Regional Development, Moncton, Canada: 672 pp.

- Dao, J.C., Buestel, D., Gerard, A., Halary, C. & Cochard, J.C.** 1988. Scallop (*Pecten maximus*) restocking program in France: goals, results and prospects. *Can. Transl. Fish Aquat. Sci.*, 5343: 22 pp.
- Dupuy, J.L., Windsor, N.T. & Sutton, C.F.** 1977. Manual for design and operation of an oyster hatchery. *Spec. Rep. Appl. Mar. Sci. Ocean Eng.*, No. 142. Virginia Inst. Mar. Sci., Gloucester Point, Virginia, USA: 104 pp.
- Helm, M.M.** 1990a. Modern design and operation of bivalve mollusc hatcheries. p 59-73. *Proc. 4th Int. Conf. on Aquafarming, Acquacultura 88*, October 14-15, Verona, Italy: 216 pp.
- Helm, M.M.** 1990b. Managing Production Costs - Molluscan Shellfish Culture. p 143-149. *Congress Proceedings, Aquaculture International*, September 4-7, 1990, Vancouver, BC, Canada: 480 pp.
- Helm, M.M.** 1991. Development of industrial scale hatchery production of seed of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in Cuba. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO: TCP/CUB/8958*: 46 pp.
- Helm, M.M., Holland, D.L. & Stephenson, R.R.** 1973. The effect of supplementary algal feeding of a hatchery breeding stock of *Ostrea edulis* L. on larval vigour. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 53: 673-684
- Helm, M.M., Holland, D.L., Utting, S.D. & East, J.** 1991. Fatty acid composition of early non-feeding larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis* L., *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 71: 691-705
- Helm, M.M. & Pellizzato, M.** 1990. Riproduzione ed allevamento in schiuditoio della specie *Tapes philippinarum*. p 117-140. In: G. Alessandra (ed) *Tapes philippinarum: Biologia e Sperimentazione*. Ente Sviluppo Agricolo Veneto, Venice, Italy: 299 pp.
- Jia, J. & Chen, J.** 2001. Sea farming and sea ranching in China. *FAO Fisheries Tech. Paper*, No 418, Food and Agriculture Organization, UN, Rome: 71 pp.
- Lewis, T.E., Garland, C.D. & McMeekin, T.A.** 1986. Manual of hygiene for shellfish hatcheries. Department of Agricultural Science, University of Tasmania. University of Tasmania Printing Dept., Hobart, Tasmania: 45 pp.
- Loosanoff, V.L. & Davis, H.C.** 1963. Rearing of bivalve mollusks. *Advances in Marine Biology*, 1, Academic Press Ltd, London: 1-136
- Matsutani, T. & Nomura, T.** 1982. Induction of spawning by serotonin in the scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay). *Mar. Biol. Lett.*, 4: 353-358
- Millican, P.F. & Helm, M.M.** 1994. Effects of nutrition on larvae production in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 123: 83-94
- Morse, D.E., Hooker, H., Duncan, H. & Morse, A.** 1977. Hydrogen peroxide induces spawning in molluscs, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Science*, 196: 298-300

Muniz, E.C., Jacob, S.A. & Helm, M.M. 1986. Condition index, meat yield and biochemical composition of *Crassostrea brasiliiana* and *Crassostrea gigas* grown in Cabo Frio, Brazil. *Aquaculture*, **59**: 235–250

Rosenthal, H., Allen, J.H., Helm, M.M. & McInerney-Northcott, M. 1995. *Aquaculture Technology: Its Application, Development, and Transfer*. p 393–450. In: Boghen, A.D. (ed) *Cold-Water Aquaculture in Atlantic Canada*. The Canadian Institute for Research on Regional Development, Moncton, Canada: 672 pp.

Utting, S.D., Helm, M.M. & Millican, P.F. 1991. Recent studies on the fecundity of European flat oyster (*Ostrea edulis*) spawning stock in the Solent. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **71**: 909–911

Utting, S.D. & Millican, P.F. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*, **155**: 45–54

Utting, S.D. & Millican, P.F. 1998. The role of diet in hatchery conditioning of *Pecten maximus* L.: a review. *Aquaculture*, **165**: 167–178

Walne, P.R. 1974. *Culture of Bivalve Molluscs*. Fishing News (Books) Ltd, Surrey, England: 189 pp.

