

文章编号: 1000-0615(2001)05-0413-06

内部切片法测定淡水贝类的年龄

华丹¹, RICHARD J. NEVES², JESS JONES²

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081;

2. Virginia Tech and State University, Blacksburg, Virginia 24061)

摘要:采用外部生长线估算法测定淡水贝类年龄具有局限性,对年龄偏大或生长较慢的品种不适用。本文介绍一种新的方法——内部切片法,是精确和准确测定贝类年龄的有效方法。通过对美国的两种淡水贝类扇贝和厚实珍珠贝进行内部切片法和外部生长线估算法的研究和实验数据的统计分析,证明内部切片法的结果更代表贝类的实际年龄。同时,还分析了淡水贝壳类年龄、长度、高度之间的相互关系。

关键词:扇贝;厚实珍珠贝;淡水贝类;内部切片法;年龄

中图分类号: S917; S931.1 文献标识码: A

Age determination of freshwater mussels using the method of thin section

HUA Dan¹, RICHARD J. NEVES², JESS JONES²

(1. Freshwater Fisheries Research Center, CAFS, Wuxi 214081, China;

2. Virginia Tech and State University, Blacksburg, Virginia 24061, U. S. A)

Abstract: The method of enumerating growth lines to determine the age of freshwater mussels has its limitation and not applicable to the older specimens and those species with slow growth. The new method of thin section introduced in this report is the accurate and precise way to determine the ages of bivalves. It is demonstrated that results from thin section represent the real ages of bivalves based on statistical analysis of the experimental data and comparison of age estimates for two species Fanshell (*Cyprogenia stegaria*) and Slabside pearlymussel (*Lexingtonia dolabellodes*) in U. S. A. determined by the thin section and external growth ring method. The relationship among age, length and height of freshwater mussels has also been discussed in this report.

Key words: *Cyprogenia stegaria*; *Lexingtonia dolabellodes*; freshwater mussels; thin section; age

测定贝类的绝对年龄对其现存量的统计和资源保护具有十分重要的意义。贝壳的角质层和棱柱层随着贝类的生长而逐渐增大面积,但是这种增长常因生长的休止而间断,因此形成了贝壳表面的生长线或生长轮^[1]。随着贝类个体的不断增大,生长线之间的距离渐渐缩小。国外许多学者自1912年就开始研究用外部生长线法来估算贝类的年龄,最早的学者有 Lefevre 和 Curtis^[2], Isley^[3] 和 Coker 等^[4]。尽管该方法可以进行一些种类的年龄测定,如生活在静水中的种类,其早期生长很快,生长线以及生长线之

收稿日期: 2001-01-19

基金项目: The Project of U. S. Geological Survey

第一作者: 华丹(1965-),女,江苏无锡人,助研,主要从事淡水贝类及优质珍珠的研究。Tel: 0510-5559775, E-mail: mussel@pub.wx.jsinfo.net 或 haud@ffrc.wx.net.cn

间条纹都很清晰且有规则,很容易区分。但对于生活在溪流中的种类,其表面特征不是很明显,外部生长线很难估算出其真实年龄^[5]。另外,由于贝壳表面角质层的腐蚀特别是壳顶部位的磨蚀使得生长线无法辨认;有些贝类壳面颜色较暗使得生长线不易区分;老龄贝类近腹缘部位生长线排列紧密而无法进行计数;以及测定人员的主观因素等,外部生长线估算法就不再适用^[6-8]。内部切片法最早用于海水贝类年龄的确定^[9-11],以后被证实在淡水贝类上也同样适用^[12]。本文就内部切片法与外部生长线估算法对淡水贝类年龄的测定进行了研究比较。

1 材料与方方法

1.1 样本的采集

扇贝贝壳采自田纳西州 Hancock 县的 Clinch 河,在 1999 年间共采集样本 60 个,厚实珍珠贝贝壳采自弗吉尼亚州 Smythe 县的 North Fork Holston 河,在 1999 年间共采集样本 152 只。

1.2 方法

1.2.1 内部切片法

取每一样本中的一片贝壳用 Buchler Isomet 低速切割机沿壳顶到腹缘的生长线的最大矢量方向进行切割,使得内部切片与生长线成直角。因为刀片的直径仅为 114mm,如果贝壳长度超过 60mm,将贝壳分段切割成几个部分来完成。将切下的半面贝壳用无色透明的环氧树脂胶水与载玻片(27mm×46mm)粘合。等胶水干燥固定后,将粘有一半贝壳的载玻片通过真空吸封在切割机臂上,进行第二次切割,一薄层贝壳的截面——内部切片就出现在载玻片上。最后所获得的切片应包括壳顶和所有的内部生长线。内部切片的厚度直接影响到切片的质量,适宜的切片厚度为 200~380 μm ,以 280 μm 为最佳。将内部切片置于显微镜($\times 4\sim 10$)下观察,内部切片的年轮线为从壳顶中心到达角质层外缘的连续线,一条内部生长线代表着一龄,每一条内部生长线与贝壳外缘都有一个交叉点,因而根据交叉点即可计数贝类的年龄(图 1),示意图中贝类的年龄为 5 龄。为确保数据的准确性,样本由三人分别进行计数,删掉差异较大的数据,取计数结果相同或相近数值的平均值。

1.2.2 外部生长线估算法

由三人分别通过肉眼对贝壳外部的生长线进行计数,结果取较为接近的二个数值的平均数,如果三个数据较为分散,则取三个数据的平均数为最后的结果。

2 结果

2.1 贝壳内部的生长线

内部切片清楚显示了贝壳内部的生长线(图 2)为连续不断的曲线,从壳顶开始延伸至贝壳边缘,相交于贝壳外表面,与贝壳内表面不相交。



图 1 贝壳内部切片

Fig. 1 Diagram of thin-section of shell

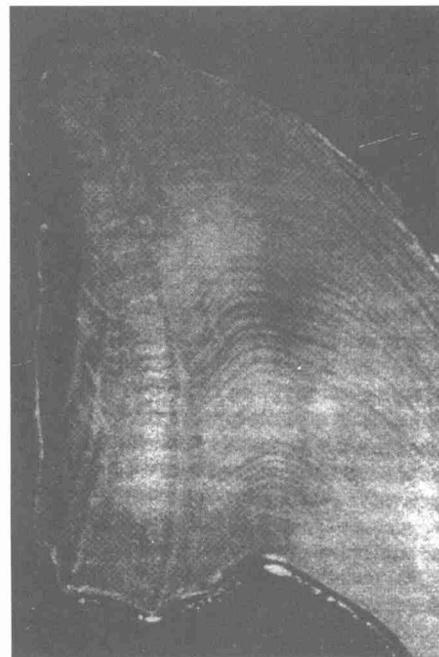


图 2 内部切片中贝壳的内部生长线

Fig. 2 Thin section showing internal growth lines of shells

2.2 方差分析结果

厚实珍珠贝和扇贝年龄的方差分析结果显示,外部生长线估算法和内部切片法的测定结果具有显著差异,两者的 P 值都大大小于 0.001(表 1)。外部生长线估算法所得年龄的平均值、最小值、最大值都小于内部切片法,随着年龄的增长低估值越大,老龄贝的低估值为最大。厚实珍珠贝外部生长线法估算的最小值略高于内部切片法是由于其壳面严重腐蚀而造成辨别困难,更说明了外部生长线估算法的不确定性。

厚实珍珠贝和扇贝生长情况进行比较,厚实珍珠贝生长比扇贝缓慢。

表 1 两种淡水贝的生物学统计结果

Tab.1 The biological statistic results of two freshwater mussels

	厚实珍珠贝				扇贝			
	年龄 (内)	年龄 (外)	长度 (mm)	高度 (mm)	年龄 (内)	年龄 (外)	长度 (mm)	高度 (mm)
平均值	18.79	13.24	52.0	39.51	15.42	10.0	45.67	43.57
最小值	7.00	8.00	33.5	28.1	8.00	5.00	33.4	32.1
最大值	45.0	29.0	75.4	54.5	26.0	20.0	59.9	58.2
标准误	0.58	0.28	0.65	0.48	0.56	0.40	0.81	0.81
样本(个)	152	152	152	152	60	60	60	
方差分析 P 值	$P < 0.001$				$P < 0.001$			

2.3 厚实珍珠贝的年龄分布

内部切片法测定结果中,厚实珍珠贝以 13~20 龄的群体数量为较多,14 龄群体最为密集,低于 8 龄和高于 31 龄的种群量较少(图 3A)。而外部生长线估算法中,厚实珍珠贝种群量以 10~15 龄的群体数量为较多,12~13 龄群体最为密集,低于 8 龄和高于 18 龄的种群量较少,大于 29 龄的群体没能得到反应(图 3B)。外部生长线估算法对于这种生长缓慢的品种很不适用。从扇贝也得到相同的分析结果。

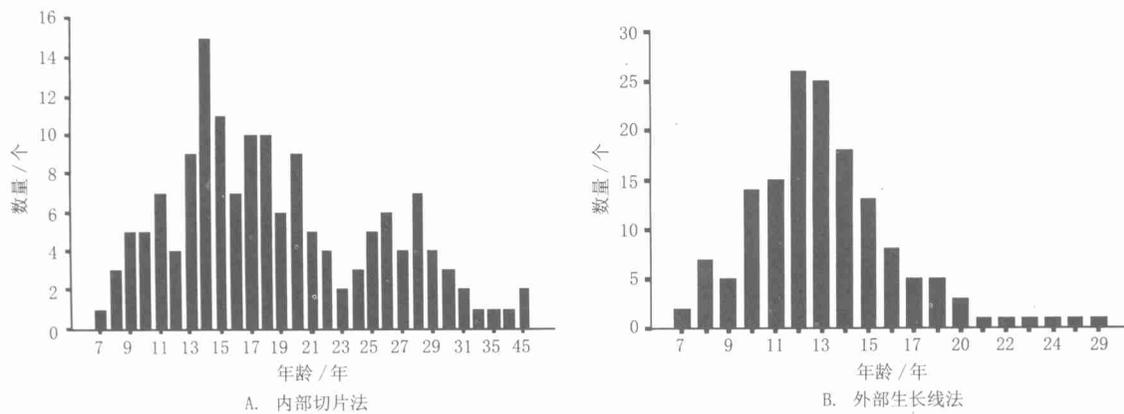


图 3 年龄分布

Fig.3 The distribution of ages

2.4 两种淡水贝类长度和高度的相关性

贝类长度和高度的关系十分密切,相关性非常显著,厚实珍珠贝长度(y)与高度(x)的回归方程式为 $y = 1.23x + 3.51$; $R^2 = 0.80$ (图 4)。扇贝长度(y)与高度(x)的回归方程式为 $y = 0.96x + 3.89$; $R^2 = 0.91$ (图 5)。

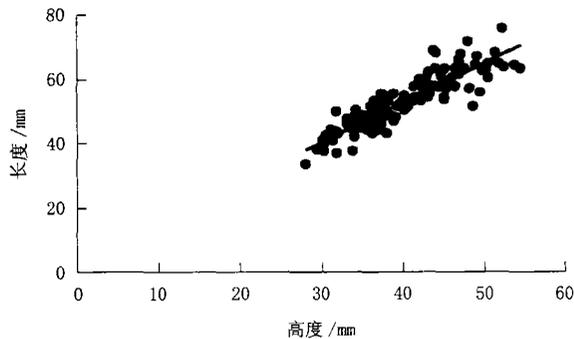


图4 厚实珍珠贝长度与高度的关系

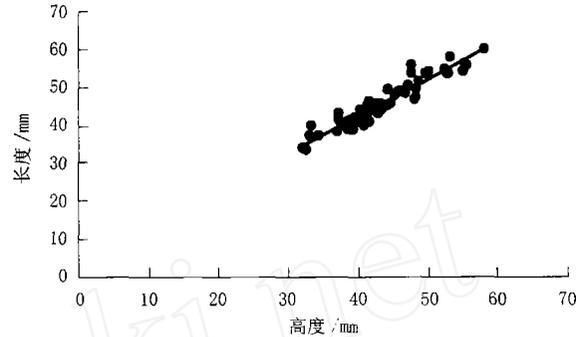
Fig. 4 The relationship between length and height of *Lexingtonia dolabelloides*

图5 扇贝长度与高度的关系

Fig. 5 The relationship between length and height of *Cyprogenia stegaria*

3 讨论

扇贝的外部年龄特征比厚实珍珠贝明显,其内部年龄特征更清楚,而厚实珍珠贝的角质层颜色很暗,使得其外部年龄特征很模糊,但其内部年龄特征很明显,内部生长线非常清楚,所以只有内部切片法才能真实反映厚实珍珠贝的年龄。

淡水贝壳的表面常呈现一些细弱的线条或突出的深色粗条纹——伪年轮,凭肉眼很难与生长线区分开。Neves 和 Moyer^[12]证明每一条外部年龄生长线总对应着一条内部的年龄生长线,而在贝壳外表面所出现的伪年轮在内部切片中找不到相对应的连续生长线,呈现出的是不完整的生长线。伪年轮的出现,原因很多,如水体的搅动、干旱等都会在贝壳表面产生伪年轮。这种伪年轮线出现在许多被测定的样本中,特别是出现在雌性贝类的样本中,它的形成据报道可能与角质蛋白层的外来侵害有关^[13], Tevesz 和 Carter^[14]也认为这是因为丰富的角质蛋白被破坏而形成的结构,且经常在薄形贝类的顶部发现。这些伪年轮是为了缓和由外界的水环境、底泥或其它物质损害的情况下,通过在外套膜和贝壳边缘的异常畸形分裂而形成。

外部生长线估算法不仅受贝类种类的限制,而且由于贝壳表面、特别是壳顶部位受到腐蚀,而很难确定其真实年龄。在自然状态下,一般3~6龄年幼的贝类很少受影响,但当贝类的年龄达7~15龄时,其第一和第二年龄常被腐蚀,特别是那些年龄超过15~20龄的贝类,就根本不能用外部生长线法来确定其年龄,因为贝壳表面的角质层被彻底地损坏了。表1通过对二种淡水贝类进行统计分析(SPSS),扇贝($N=60$),厚实珍珠贝($N=152$),结果显示,内部切片法和外部生长线估算法所测定的贝类年龄存在极显著差异($P<0.001$)。

厚实珍珠贝用外部生长线法估算时,样本为7~8龄时就开始出现差异,当年龄为8~15龄时,壳面生长线变得很紧密,不容易分别;而且,壳顶部位由于腐蚀而无法分辨,老龄贝的壳面也经常受到磨蚀。另外,其外部角质层呈暗黑色使得生长线很模糊,再加上人为的主观因素,外部生长线法就很难进行其真实年龄的测定,其结果与实际年龄相差甚远。由此而进行的种群统计数值也受到较大影响(图3)。外部生长线法估算的年龄数值总比内部切片所得值低(图6)。

假设内部切片法与外部生长线估算法所得结果是一致的,则图6中的点应集中在 $y=x$ 附近,但图6中绝大部分点都在 $y=x$ 线的下方,外部生长线法估算的年龄都低于实际年龄,少数8~12龄的厚实珍珠贝由于壳面的腐蚀和生长线的紧密,外部生长线法估算的数值略偏高,但随着年龄的增大,集聚在腹缘的生长线根本无法分辨,必然造成估算值低于实际值的现象,所以随着年龄的增大,外部生长线法估算的年龄误差越大。用外部生长线法所得的年龄低估值与被测定的贝类年龄成正比,被测定的贝类

年龄越大,则被低估的值越高,外部生长线法估算的年龄趋势线距离45(角平分线)越远。图6显示,扇贝8~10龄的群体,被低估3~4年,11~20龄的群体,被低估5~8年,21~26龄的群体,被低估10~13年。而厚实珍珠贝在26~45龄的群体,被低估了15~22年,低估值接近实际年龄的50%,超过25龄的贝类,外部生长线法已不能成为年龄测定的方法,只有依靠内部切片法才能测定其真实年龄。厚实珍珠贝属生长较慢的品种,通过内部切片法测定其年龄分布为7~45龄,其长度为33.5~75.4mm,高度为28.1~54.5mm。最年长为45龄(图7),长寿品种(大于44龄)仅2只,大部分群体为13~20龄,占总群体的50.7%,其长度为37~63mm,高度为30~48.6mm。对于这种贝壳较厚的品种,幼贝时期增长较快,以后渐渐缓慢,生长线变得十分紧密很难区分^[12]。厚实珍珠贝的年龄与生长情况比较,也得出了相同的结论(图7),当幼贝生长至7龄,其体长已超过30mm,有些已达45mm,随后其生长逐渐减慢,生长线变得越来越紧密,当成贝的年龄超过30龄时,其长度都在趋势线的下方,老龄贝(大于44龄)的增长速度几乎为零,贝壳表面的外部生长线用放大镜也无法辩论。

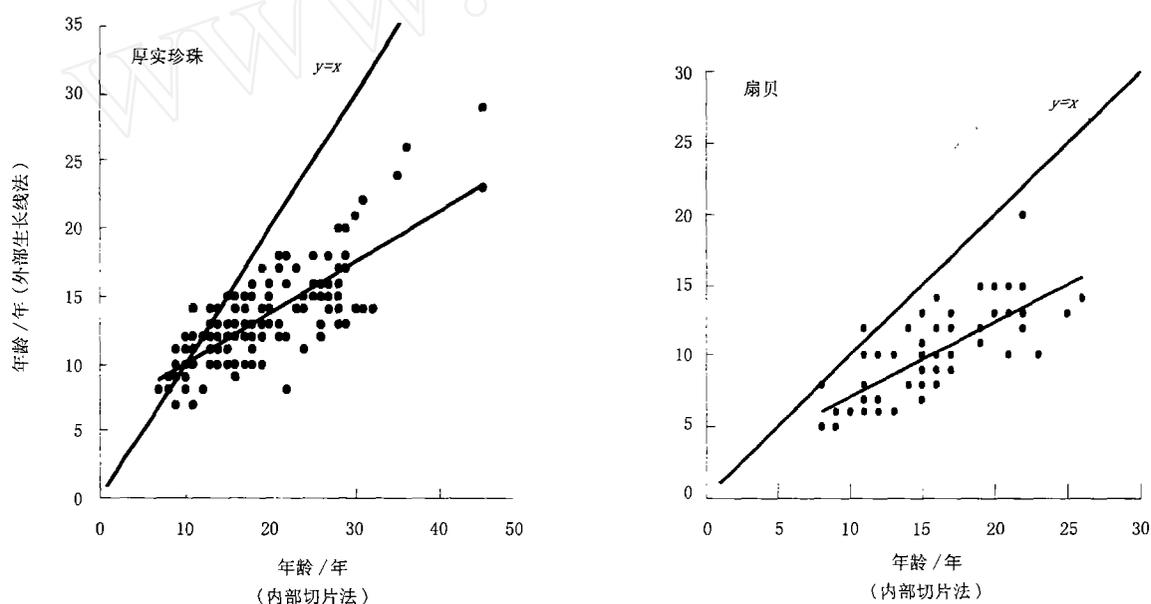


图6 两种贝类年龄的内部切片法和外部生长线估算法的比较

Fig. 6 A comparison of ages of two species by the method of thin section and external growth ring method

淡水贝类表面及内部的生长线是决定年龄的重要依据,对于它的形成许多生物学家都作了大量的研究。淡水贝类的贝壳表面出现的生长线条纹有二种,一种是间隔相当规则的宽、暗带,另一种是间隔不规则的明条带^[14]。这种结构的形成原理还不十分清楚,根据 Lutz 和 Rhoads^[15]对海水贝类的研究,在适宜的生长环境下,这些条纹由碳酸钙和由外套膜所分泌的有机物—贝壳硬蛋白组成的薄层状进入壳面所至;在不适宜的生长环境下,如冬季,会出现厌氧新陈代谢过程,从而产生暗而细的有机生长线。Coker 等^[4]及 Tevesz 和 Carter^[14]通过对淡水贝类的研究,提出了另一种解释,弯曲的贝壳层由外套膜的收缩和扩展所形成,同时在壳面产生了深浅的条纹。由于持续的生长被寒冷的季节(如冬天)的出现而

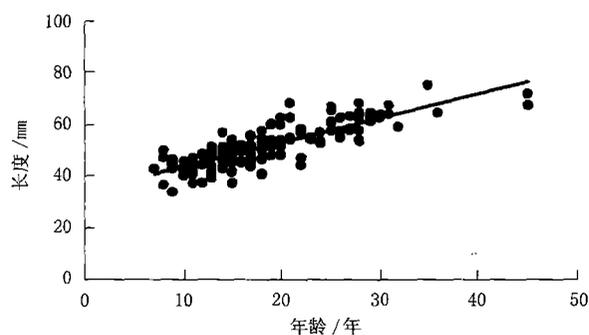


图7 厚实珍珠贝年龄与生长速度的关系

Fig. 7 The relationship of *L. dolabelloides* between age and growth rate

打断,因此沿生长边缘产生了暗色的年龄条纹。以上的研究都能解释我们所观察到的年龄的形成过程,即在冬天形成,在春天就可观察到。

内部切片法是测定贝类年龄的最准确的方法,它适用于所有淡水和海水种类,在切片样本中,真伪年龄很容易被区分开。我们的研究也证实了外部生长线估算法这个技术的不适用性,就如 Lutz 和 Rhoads^[8]所提到的,当贝壳被腐蚀和侵蚀、从伪年龄中分辨出真年龄,用外部生长线估算法都非常困难,而计数老龄贝累积的生长条纹,往往容易造成对样本年龄低估的现象。这种误差现象,在生长线相对清楚的贝类如扇贝也同样会出现,不容置疑,在大多数的其它贝类也会产生类似的误差,结果导致错误的种群分析结果。不管是生长缓慢、外部生长线紧密的个体以及老龄贝,还是那些生长迅速,外部生长线比较清楚的个体以及幼贝,测定他们的种群数量和确定年龄组成群体时,都需要对样本的年龄进行精确的测定,内部切片法为贝类的年龄测定提供了更精确的方法。

参考文献:

- [1] 蔡英亚,张英,魏若飞. 贝类学概论[M]. 上海:科学技术出版社,1995. 193-194.
- [2] Lefevre G, Curtis W C. Studies on reproduction and artificial propagation of fresh water mussels[J]. Bull US Bureau Fish, 1912, (30):105-201.
- [3] Isley F B. Experimental study of the growth and migration of fresh-water mussels[J]. Bureau Fish Docum, 1914, (792):24.
- [4] Coker R E, Shira A F, Clark H W, et al. The natural history and propagation of fresh-water mussels[J]. Bull Bureau Fish, 1921, (37): 75-181.
- [5] Grier N M. Observation on the rate of growth of the shell of lake dwelling freshwater mussels[J]. American Midland Naturalist, 1922, (8):129-148.
- [6] Ansell A D. The rate of growth of the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L.) throughout the geographic range[J]. J du Conseil, 1968, (31):364-409.
- [7] Coon T G, Eckblad J W, Trygstad P M. Relative abundance and growth of mussels (Mollusca: Eumellibranchia) in pools 8, 9 and 10 of the Mississippi River[J]. Freshwater Biol, 1977, (7):279-285.
- [8] Lutz R A, Rhoads D C. Growth patterns within the molluscan shell[A]. Skeletal Growth in Aquatic Organisms[M]. New York: Plenum Press, 1980. 203-254.
- [9] Barker R M. Microtextural variations in pelecypod shells[J]. Malacologia, 1964, (2):69-86.
- [10] Clark G B. Study of molluscan shell structure and growth lines using thin sections[A]. Skeletal Growth in Aquatic Organisms[M]. New York: Plenum Press, 1980. 603-606.
- [11] Ropes J W, O'Brien L. A unique method of aging surf clams[A]. Bulletin of the American Malacological Union for 1979[C]. 1980. 58-61.
- [12] Neves R J, Moyer S N. Evaluation of techniques for age determination of freshwater mussels (Unionidae)[J]. American Malacological Bulletin, 1988, 6(2):179-188.
- [13] Beedham G E. Repair of the shell in species of Anodonta[J]. London:Proceedings of the Zoological Society. 1965, (145): 107-124.
- [14] Tevesz M J S, Carter J G. Environment relationships of shell form and structure of unionacean bivalves[A]. Skeletal Growth in Aquatic Organisms[M]. New York:Plenum Press, 1980. 295-322.
- [15] Lutz R A, Rhoads D C. Anaerobiosis and a theory of growth line formation[J]. Science, 1977, (198):1222-1227.