

厚壳贻贝胚胎和早期幼虫神经系统发育的初步研究

杨金龙^{1,2*}, 李树恒^{1,2}, 刘志伟¹, 李无霜^{1,2},
梁 箫¹, 陈芋茹^{1,2}, 徐 灿¹, 李家乐¹

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 上海海洋大学海洋科学研究院, 上海 201306)

摘要: 采用免疫细胞化学技术和荧光染色技术初步研究了厚壳贻贝胚胎及早期幼虫的神经发育情况以及含有不同类型神经细胞的时空分布。在厚壳贻贝从受精开始至囊胚期的整个胚胎发育过程中, 均未发现 FMRF 酰胺类免疫阳性信号和 5-羟色胺免疫阳性信号, 神经最初形成于担轮幼虫阶段, 出现了 FMRF 酰胺类免疫阳性信号和 5-羟色胺免疫阳性信号, 36 hpf 时, 更多的 FMRF 酰胺类免疫阳性信号出现在幼虫顶部区域左右两侧, 伸出的阳性纤维延伸后形成基底神经纤维, 并延伸至正在发育的中足所在区域。在顶端区所有阳性信号中, 第一个免疫信号始终处于腹部, 位置未发生变化。D 形幼虫阶段神经系统的 FMRF 酰胺类免疫阳性信号分别是顶器官的 3 个顶部阳性信号、侧部 2 个阳性信号以及足区形成的 2 个阳性信号。顶器官中的信号延伸出免疫活性纤维形成基底神经纤维。18 hpf 时, 第 1 个 5-羟色胺免疫阳性信号出现在早期担轮幼虫的顶器官前端。在早期 D 形幼虫阶段, 阳性信号伸出一个短小的基底神经纤维, 并延伸至后来发育成的顶器官神经纤维网部位, 42 hpf 时, 更多 5-羟色胺阳性信号细胞出现在顶区域, 数量增至 2~3 个。D 形幼虫阶段(48 hpf), 5-羟色胺免疫阳性信号数量增至 4 个, 分布于脑神经节的周围, 其发出的基底纤维延伸至紧密的顶神经纤维网。

关键词: 厚壳贻贝; 胚胎; 早期幼虫; FMR 酰胺类; 5-羟色胺

中图分类号: Q 958.8; S 968.3

文献标志码: A

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 是我国重要的海水养殖贝类, 分布于黄海、渤海和东海沿岸^[1], 其中以浙江沿海资源量最大, 舟山嵊泗县是厚壳贻贝的主要产区^[2]。长期以来, 厚壳贻贝养殖所需苗种供应一直依赖于海区半人工采苗。近年来, 人为过度采捕导致厚壳贻贝自然资源逐渐减少, 自然海区附苗数量和质量明显下降, 厚壳贻贝养殖产业受到影响^[2]。目前, 厚壳贻贝规模化人工繁殖技术一直没有得到很好的解决, 育苗数量不稳定, 导致苗种供不应求。

厚壳贻贝在附着变态前有一个浮游幼虫阶段。理解和控制幼虫的附着变态行为对于水产养殖苗种生产技术的改善和海洋防污技术的发展具

有极其重要的理论意义和实践意义^[3-4]。神经系统在贝类幼虫的发育和变态过程中发挥了重要作用^[5-7]。例如, 5-羟色胺神经元能够调控东泥织纹螺 (*Ilyanassa obsoleta*) 幼虫的变态发育^[6], 诗博加衰海牛 (*Phestilla sibogae*) 幼虫的顶神经节具有感知和传导变态信号的功能^[8]。厚壳贻贝的神经递质同样能调控幼虫的变态发育, 然而其神经系统方面的研究尚未开展。

本实验利用免疫细胞化学技术和荧光染色技术研究了厚壳贻贝的胚胎至早期幼虫阶段的不同类型神经细胞的时空分布, 旨在通过开展厚壳贻贝发育生物学研究, 从神经生物学角度更好理解该种幼虫发育过程中的附着变态机制。

收稿日期: 2012-11-15 修回日期: 2013-01-13

资助项目: 国家自然科学基金项目(31101885); 上海市科委重点支撑项目(12230502100); 上海市科技启明星(10QA1403200); 上海市晨光计划(09CG54)

通信作者: 杨金龙, E-mail: jlyang@shou.edu.cn

<http://www.scxuebao.cn>

1 材料与方法

1.1 实验幼虫培育

厚壳贻贝亲贝采自浙江省嵊泗县枸杞岛附近海域。本实验依照 Yang 等^[9]所述方法进行人工授精和幼虫培育。厚壳贻贝早期幼虫(48 hpf)培育参照李一峰等^[10]所述方法进行。幼虫初始密度为 5 个/mL,培育水体为 2 L。培育期间,投喂等鞭金藻,饵料密度为 5×10^4 /mL,每天投喂 1 次。培育温度为 $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。在整个培育期间,无光照,每隔 1 天换水 1 次。实验所用海水均经过 $1.2 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,盐度为 30。

1.2 取样固定

从孵化开始至 48 h,每 6 小时取样 1 次。取样前,搅动水体,使样品分布均匀。利用筛绢网将胚胎和幼虫收集,使用过滤海水洗涤,后置入 7.5% MgCl_2 溶液,直到幼虫完全麻痹。用新鲜的 4% 多聚甲醛将幼虫固定在 PBS 缓冲液中(pH 7.4)。室温 2 h 后,用 PBS 缓冲液洗涤后转移至 70% 的乙醇中,存储在 -20°C 条件备用。

1.3 免疫细胞化学和荧光染色

将胚胎或幼虫样品在 PBS 缓冲液中洗涤 3 次,每次 15 min,后加入封闭液(0.25% 牛血清蛋白,1% triton-100,0.03% 叠氮化钠,PBS), 4°C 过夜。分别用 5-羟色胺抗体(来源于兔子,购于 ImmunoStar 公司,货号为 924005)或 FMRF 酰胺类抗体(来源于兔子,购于 ImmunoStar 公司,货号为 831001)和 α 微管蛋白抗体(购于 Sigma 公司,货号为 T6793,;来源于小鼠,在 PBS 溶液中 1:1 000 稀释 + 1.0% 正常牛血清 + 1.0% tritonX-100)结合标记,置于 4°C 下孵育 1~2 d,然后在 PBST 中洗涤 3 次,每次 1 h,并分别加入含有山羊抗兔 Alexa568(购于 Jackson Lab 公司,稀释至 1:1 000)和山羊抗鼠 Alexa 488(购于 Jackson Lab 公司,稀释至 1:1 000)的 PBS 中, 4°C 过夜。在二抗中孵育之后,所有胚胎及幼虫在 PBS 中洗涤若干次,然后用 80% 的甘油/PBS 封片。在预实验时,3 种一抗均设置不同稀释比例(0,1:500,1:1 000),确定 α 微管蛋白抗体的最佳比例为 1:1 000,5-羟色胺抗体的最佳比例为 1:1 000,FMRF 酰胺类抗体的最佳比例为 1:1 000。阴性对照组时,不添加一抗,直接加入二抗。

所有样品在荧光显微镜 Nikon ECLIPSE 90i

下检测。实验中,所检测的每个阶段每个抗体对应的胚胎或幼虫个数均大于 100 个。用 Photoshop CS(Adobe System)进行通道叠加和调整图片的对比度和明亮度。

2 结果

2.1 胚胎及幼虫发育

受精后不久出现第一极体,之后,细胞质流向植物极,并向该区延伸,使卵子成为梨形,突出部分比较透明,此即第一极叶。受精卵进行分裂,连续分裂的数目越来越多,6 hpf 时形成囊胚期,胚胎表面被有短而小的纤毛。12 hpf 时,胚胎发育至原肠胚期,18 hpf 时,胚体逐渐变梨形,顶端膨大,细胞加厚,长有一丛纤毛即顶纤毛束,其中央长有 1 根或 2 根粗大的触毛或鞭毛。胚孔闭合区继续内陷,逐渐形成口凹,此即为早期担轮幼虫。在无充气的烧杯中,幼虫在水层表面浮游。30 hpf 时,发育至担轮幼虫后期,胚体左右略变扁平,腹部宽,其顶端变平,将分泌形成贝壳。36 hpf 时,发育至早期 D 形幼虫,外壳不断生长并包围住幼体,同时外套膜,闭壳肌和腹部也逐渐形成。48 hpf 时,外壳完全包围幼虫,两侧覆盖 2 片较硬而透明的半圆形幼虫壳,侧面观形状如 D 形,称为 D 形幼虫。背部形成一个直线铰合部,又称直线铰合幼虫。D 形幼虫的顶端具有面盘,其四周细胞被有纤毛,幼虫靠面盘进行游动。D 形幼虫期形成了前闭壳肌和后闭壳肌,可闭合贝壳。

2.2 FMRF 酰胺类(FMRFamide-like)免疫活性

阴性对照组中 FMRF 酰胺类(FMRFamide-like)免疫阳性信号未出现。在厚壳贻贝从受精开始至囊胚期的整个胚胎发育的过程中,均无发现 FMRF 酰胺类免疫阳性信号(图版 I-1~3)。18 hpf 时,第 1 个 FMRF 酰胺类免疫阳性信号出现在早期担轮幼虫身体的最前部(a1,图版 I-4),推测其为第 1 个顶细胞,位于纤毛的顶端末尾处。24 hpf 时,担轮幼虫的 FMRF 酰胺类免疫阳性信号增加至 2 个(图版 I-5)。30 hpf 时,明显观察到 FMRF 酰胺类免疫阳性信号(左侧和右侧,分别是 rll 和 ll1)数量增加至 2 个,且均分布在顶端区 a1 顶细胞的背侧并贯穿在纤毛中(图版 I-6)。36 hpf 时,更多的 FMRF 酰胺类免疫活性阳性信号出现在幼虫顶部区域的左右两侧(图版 I-7),

这些免疫信号伸出的阳性纤维延伸后形成基底神经纤维,并延伸至正在发育的足所在区域。在顶端区所有细胞中,al 顶细胞始终处于腹部,位置未发生变化。

在 D 形幼虫阶段(48 hpf),FMRF 酰胺类免疫阳性信号,形成了一个紧凑的网状结构(图版 I-8),推测其可能是神经元形成的神经纤维网。这个神经纤维网以及其周围紧密连接的体细胞形成了顶器官,顶器官与之后的发育阶段保持一致。阳性信号 rl1 和 ll1 仍然与顶端器官的细胞相分离,每个细胞延伸出两条纤维:相对较短的那条从前部伸出,而较长的那条纤维伸入后腹部进入足区(足区有 1 对阳性信号出现——左侧免疫信号和右侧免疫信号,rp1 和 lp1)。

D 形幼虫阶段(48 hpf)神经系统的 FMRF 酰胺类免疫阳性信号分别是顶器官顶部 3 个阳性信号、左侧和右侧各 1 个阳性信号(rl1 和 ll1),以及足区形成的 2 个阳性信号(rp1 和 lp1)。顶器官中的阳性信号延伸出的免疫活性纤维形成基底神经纤维。此时,脑神经节形成,两侧阳性信号发出的神经纤维延伸至正在发育的足神经节。

2.3 5-羟色胺(serotonin)免疫活性

阴性对照组中 5-羟色胺(serotonin-like)免疫阳性信号未出现。在厚壳贻贝从受精开始至囊胚期的整个胚胎发育过程中,均无发现 5-羟色胺免疫阳性信号(图版 II-1~3)。18 hpf 时,第 1 个 5-羟色胺免疫阳性信号出现在早期担轮幼虫的顶器官前端(图版 II-4)。24 hpf 时,5-羟色胺免疫阳性信号增加至 2 个(图版 II-5)。30 hpf 和 36 hpf 时,即早期 D 形幼虫阶段,免疫阳性信号伸出一个短小的基底神经纤维,延伸至后来发育成的顶器官神经纤维网部位(图版 II-6,7)。42 hpf 时,更多 5-羟色胺免疫阳性信号出现在顶区域,其数量增加至 2~3 个(图版 II-8)。所有这些信号所在的细胞均具有顶纤毛,且这些基底纤维形成紧密神经纤维网。幼虫发育至 D 形幼虫阶段(48 hpf),5-羟色胺免疫阳性信号数量增加至 4 个(图版 II-9),这些信号分布于脑神经节的周围,其发出的基底纤维延伸至紧密的顶神经纤维网。

3 讨论

关于贝类的神经系统发育研究已取得诸多进展,主要集中在腹足类(Gastropods)^[11]和多板类

(Mollusca)^[12]。本研究首次探讨了厚壳贻贝胚胎和早期幼虫的神经发育情况,阐述了含有不同类型神经细胞的时空分布。在厚壳贻贝整个胚胎发育的过程中,均无发现 FMRF 酰胺类免疫阳性信号和 5-羟色胺免疫阳性信号。在担轮幼虫早期阶段,厚壳贻贝的神经开始形成,出现了 FMRF 酰胺类免疫阳性信号(图版 III-1)和 5-羟色胺免疫阳性信号(图版 III-7)。在担轮幼虫后期,左右两侧各 1 个 FMRF 酰胺类免疫阳性信号开始出现,并向后伸出神经活性纤维(图版 III-2,5)。至 D 形幼虫阶段,FMRF 酰胺类免疫阳性信号数量增加至 3 个,由左右两侧信号发出的神经纤维延伸至即将形成的足神经节部位(图版 III-3,6),推测其可能为左足细胞和右足细胞。担轮幼虫后期发育至 D 形幼虫阶段,5-羟色胺免疫阳性信号的数量增加至 4 个,且仅存在于顶器官(图版 III-8~9)。

FMRF 酰胺类抗体是神经节和神经系统发育主要通路的有效标记物^[13]。目前研究发现,厚壳贻贝幼虫的神经形成开始于前纤毛轮的 FMRF 酰胺类免疫活性细胞,且之后的发育方向严格按照从前到后方向。例如,在 rl1 和 ll1 神经纤维延伸到发育中的足神经节之前,没有在后部区域发现免疫活性细胞或纤维。这个发现与盖勒贻贝(*Mytilus trossulus*)幼虫体内 FMRF 酰胺类抗体标记的神经发育情况一致^[13]。然而,研究表明腹足类静水椎实螺(*Lymnaea stagnalis*)的神经发育最初始于幼虫后部和腹侧端,伴随着周围 FMRF 酰胺类免疫活性细胞的形成,逐渐构成支撑后来的成体中枢神经系统支架的基底纤维^[14]。掘足纲(*Antalis entalis*)的早期神经发育则开始于顶端并且以从前到后的方向发育^[15]。

5-羟色胺广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物的神经组织中,且能诱导许多海洋无脊椎动物幼虫的附着变态。5-羟色胺神经递质抗体也是神经节和神经系统发育主要通路的有效标记物^[13]。研究表明,5-羟色胺免疫阳性信号最初出现在双壳类紫贻贝(*Mytilus edulis*)30~32 hpf,即担轮幼虫后期和面盘幼虫的早期^[16]。在盖勒贻贝幼虫中,其 5-羟色胺免疫阳性信号最初出现 27 hpf 担轮幼虫阶段,至面盘幼虫后期细胞数进一步增加至 5 个^[13]。本研究发现,5-羟色胺免疫阳性信号最初出现在厚壳贻贝担轮幼虫的早期(18 hpf),

位于顶器官前端,表明不同种之间的神经发育存在一定的差异。在腹足类大西洋舟螺(*Crepidula fornicata*)幼虫的神经发育研究中发现,5-羟色胺免疫阳性信号出现在担轮幼虫的后期和早期面盘幼虫阶段的顶器官^[11]。多板类函馆铗石鳖(*Ischnochiton hakodadensis*)幼虫的神经发育研究表明 24 hpf 时 5-羟色胺免疫活性细胞出现在顶器官,含有感觉细胞和非感觉细胞^[12]。因而,这些研究表明 5-羟色胺免疫活性细胞在双壳类、腹足类及多板类早期幼虫的分布极为相似。

目前的研究发现在厚壳贻贝担轮幼虫至 D 形幼虫的发育过程中,5-羟色胺免疫阳性信号仅存在于顶器官。同属的盖勒贻贝在幼虫发育的整个过程中,甚至在变态阶段的早期,5-羟色胺免疫阳性信号也仅存在于顶神经区域^[13]。顶器官的功能之一是可感知诱导幼虫变态的外在化学信号^[19]。在腹足类幼虫的顶器官中包含 5 个 5-羟色胺 parampullary 神经元、5 个壶腹神经元及基底神经节,在变态发育时 5-羟色胺轴突开始分解^[19]。当顶器官中的细胞受到破坏时,幼虫将无法感知外在的化学信号物质从而难以完成变态过程^[8]。此外,研究发现顶感受器具有控制纤毛活动和面盘收缩的功能^[20]。5-羟色胺参与调节高背红螺(*Helisoma trivolvis*)^[17]、紫贻贝^[18]等软体动物胚胎旋转和幼虫的纤毛运动。厚壳贻贝 5-羟色胺存在于厚壳贻贝幼虫的顶感受器细胞中,并可能在幼虫变态发育过程发挥了重要的作用。

综上所述,本实验利用免疫细胞化学方法和荧光染色技术首次揭示了厚壳贻贝胚胎及早期幼虫神经发育情况以及神经细胞的时空分布。然而,目前的研究仅探讨了胚胎和早期幼虫神经发育的情况,对于后续幼虫及其稚贝的神经发育需要进一步深入的研究。

参考文献:

- [1] 常亚青. 贝类增殖殖学[M]. 北京:中国农业出版社,2007.
- [2] 常抗美,刘慧慧,李家乐,等. 紫贻贝与厚壳贻贝杂交及 F₁ 代杂交优势初探[J]. 水产学报,2008,32(4):552-557.
- [3] McClintock J B, Baker J B. Marine chemical ecology [M]. Boca Raton: CRC Press, 2001:431-461.
- [4] Yang J L, Satuito C G, Bao W Y, et al. Induction of metamorphosis of pediveliger larvae of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 using neuroactive compounds, KCl, NH₄Cl and organic solvents[J]. Biofouling, 2008, 24(6):461-470.
- [5] 王国栋,刘保忠,唐保军,等. 文蛤(*Meretrix meretrix*)幼虫和稚贝时期中枢神经系统的初步观察[J]. 海洋与湖沼,2006,37(3):297-301.
- [6] Couper J M, Leise E M. Serotonin injections induce metamorphosis in larvae of the gastropod mollusc *Ilyanassa obsoleta* [J]. The Biological Bulletin, 1996, 191(2):178-186.
- [7] Leise E M, Hadfield M G. An inducer of molluscan metamorphosis transforms activity patterns in a larval nervous system [J]. The Biological Bulletin, 2000, 199(3):241-250.
- [8] Hadfield M G, Meleshkevitch E A, Boudko D Y. The apical sensory organ of a gastropod veliger is a receptor for settlement cues [J]. The Biological Bulletin, 2000, 198(1):67-76.
- [9] Yang J L, Li Y F, Satuito C G, et al. Larval Metamorphosis of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 in response to Neurotransmitter Blockers and Tetraethylammonium [J]. Biofouling, 2011, 27(2):193-199.
- [10] 李一峰,杨金龙,王冲,等. 厚壳贻贝早期幼虫低温保存的影响研究[J]. 水产学报,2012,36(1):73-77.
- [11] Dickinson A J G, Nason J, et al. Histochemical localization of FMRFamide, serotonin and catecholamines in embryonic *Crepidula fornicata* (Gastropoda, Prosobranchia) [J]. Zoomorphology, 1999, 119(1):49-62.
- [12] Voronezhskaya E E, Tyurin S A, Nezlin L P. Neuronal development in larval chiton *Ischnochiton hakodadensis* (Mollusca: Polyplacophora) [J]. Journal of Comparative Neurology, 2002, 444(1):25-38.
- [13] Voronezhskaya E E, Nezlin L P, Odintsova N A, et al. Neuronal development in larval mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia) [J]. Zoomorphology, 2008, 127(2):97-110.
- [14] Croll R P, Voronezhskaya E E. Early elements in gastropod neurogenesis [J]. Developmental Biology, 1996, 173(1):344-347.
- [15] Wanninger A, Haszprunar G. The development of the serotonergic and FMRF-amidergic nervous system in *Antalis entalis* (Mollusca, Scaphopoda) [J]. Zoomorphology, 2003, 122(2):77-85.
- [16] Flyachinskaya L P. Localization of serotonin and

- FMRFamide in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* at early stages of its development [J]. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, 2000, 36 (2): 66 – 70.
- [17] Kuang S, Goldberg J I. Laser ablation reveals regulation of ciliary activity by serotonergic neurons in molluscan embryos [J]. Journal of Neurobiology, 2001, 47 (1): 1 – 15.
- [18] Beiras R, Widdows J. Effects of the neurotransmitters dopamine, serotonin and norepinephrine on the ciliary activity of mussel (*Mytilus edulis*) larvae [J]. Marine Biology, 1995, 122 (4): 597 – 603.
- [19] Hadfield M G. Biofilms and marine invertebrate larvae: what bacteria produce that larvae use to choose settlement sites [J]. Annual Review of Marine Science, 2011, 3: 453 – 470.
- [20] Page L R, Kempf S C. Larval apical sensory organ in a neritimorph gastropod, an ancient gastropod lineage with feeding larvae [J]. Zoomorphology, 2009, 128 (4): 327 – 338.

Primary study on neuronal development of the embryo and early larvae of the mussel *Mytilus coruscus*

YANG Jinlong^{1,2*}, LI Shuheng^{1,2}, LIU Zhiwei¹, LI Wushuang^{1,2},
LIANG Xiao¹, CHEN Yuru^{1,2}, XU Chan¹, LI Jiale¹

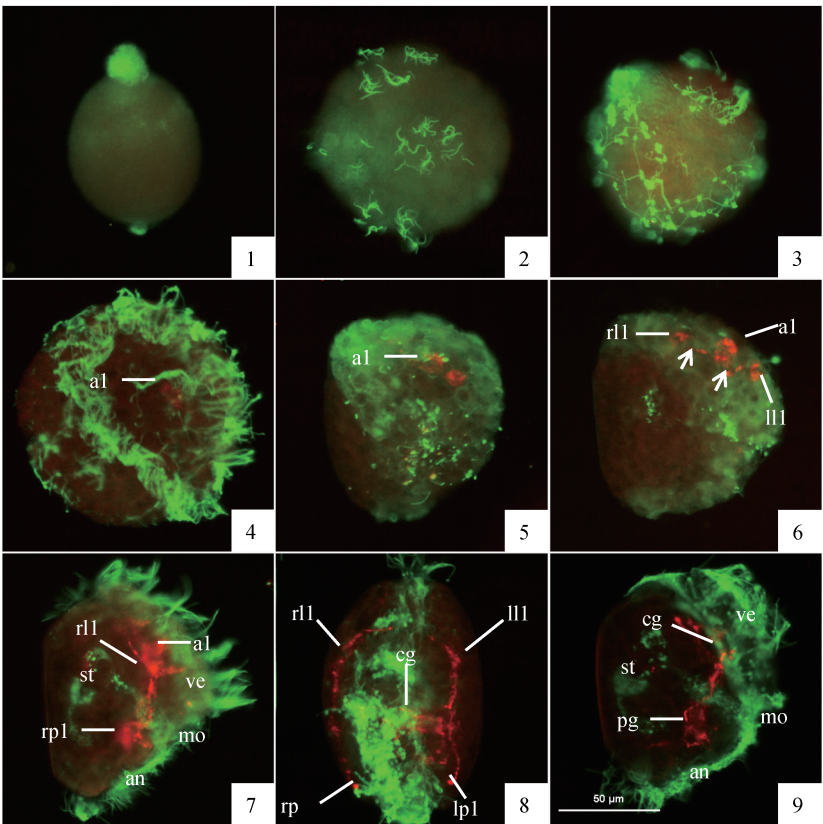
(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Institute of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In the present study, the development of FMRFamide – , serotonin-containing cells in the mussel *Mytilus coruscus* was examined using immunocytochemical and histofluorescent techniques. During the embryonic development, no FMRFamide-like immunoreactive (*lir*) and serotonin-*lir* sensory cell appeared. Neurogenesis started during the trochophore stage at the apical extreme with the appearance of one FMRFamide-*lir* cell and one serotonin-*lir* sensory cell. The numbers of FMRFamide-*lir* cell increased at 36 hours postfertilization (hpf) and appeared on the two sides of apical extreme. Fibres of two lateral FMRFamide-*lir* apical cells projected posteriorly and reached developing foot. The location of the first FMRFamide-*lir* apical cells in the most ventral apical region did not change during early development. At 48 hpf, three FMRFamide-*lir* apical cells, two lateral FMRFamide-*lir* apical cells and two cells of developing foot appeared. The FMRFamide-*lir* fibres projected and the basal neuropil formed. The earliest serotonin-*lir* cell appeared at 18 hpf at the anterior extreme of the apical region of developing apical organ. At 30 hpf and 36 hpf, the serotonin-*lir* cell extended a short basal fibre into the region of the developing neuropil of the apical organ. The numbers of the serotonin-*lir* cell increased to 2 – 3 at 42 hpf and appeared in the apical region of the D-shaped larvae. Four serotonin-*lir* cells were detected at 48 hpf and these cells projected basal fibres into the compact apical neuropil.

Key words: *Mytilus coruscus*; embryo; early larvae; FMRFamide; serotonin

Corresponding author: YANG Jinlong. E-mail: jlyang@shou.edu.cn

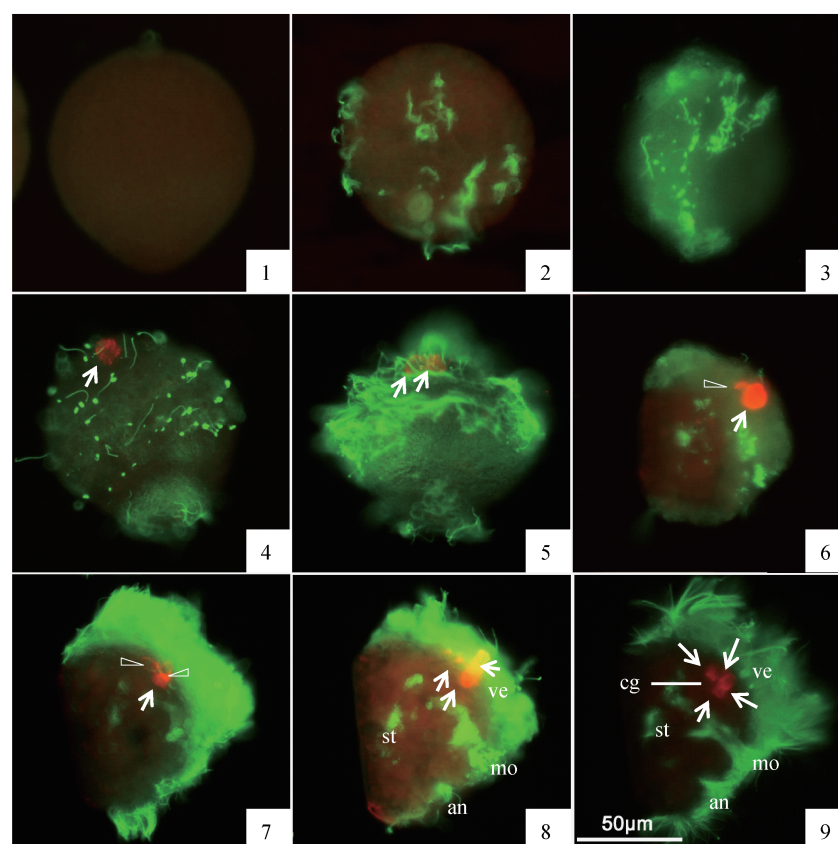


图版 I 厚壳贻贝胚胎以及早期幼虫体内 FMRF 酰胺类
免疫阳性信号(红色)和 α 微管蛋白(绿色)的定位

1. 受精卵,出现第一极叶; 2. 囊胚期(6 hpf),开始出现 α 微管蛋白; 3. 原肠胚期(12 hpf),无 FMRF 酰胺类阳性信号出现; 4. 早期担轮幼虫(18 hpf),第一个 FMRF 酰胺类免疫活性细胞(al)出现在幼虫体的顶端区域; 5. 担轮幼虫后期(24 hpf),FMRF 酰胺类免疫阳性信号数量增加至 2 个; 6. 早期 D 形幼虫(30 hpf),顶神经节(包含 3 个阳性信号)以及少量纤维,rll(右侧信号),lll(左侧信号); 7. 早期 D 形幼虫(36 hpf),免疫信号数量继续增加,且伸出前后两个纤维,并向体前后延伸,向后伸入到未来发育的足区域,mo(口),st(内脏),ve(面盘),rp1(右足信号),an(肛); 8. D 形面盘幼虫(48 hpf)的腹面观,足左右两侧的阳性信号出现,由之前的神经细胞发出的神经纤维延伸至足细胞,并与之连接,cg(脑神经节),lp1(左足信号); 9. D 形面盘幼虫(48 hpf)的侧面观,pg(足神经节)。

Plate I FMRFamide-like(red) and acetylated tubulin-like(green) immuoreactivity in embryo and early larvae of *M. coruscus*

1. Fertilized egg, release of the first polar lobe; 2. Morula stage(6 hpf); 3. Blastula stage(12 h); 4. Early trochophore stage(18 hpf). The first FMRFamide-like immunoreactive cell(al) appears in the apical region; 5. Late trochophore stage(24 hpf). Numbers of FMRFamide-like immunoreactive cell increased to 2; 6. Early D-shaped veliger larvae(30 hpf), rll(right lateral cell), lll(left lateral cell). Three cells and a few fibres appeared in the apical ganglion; 7. Early D-shaped veliger larvae(36 hpf), st(stomach), ve(velum), rp1(right pedal cell), an(anus). Cells increased, extended anteriorly and posteriorly the fibres and projected into the region of developing foot; 8. Ventral review of D-shaped veliger larvae(48 hpf). Left(lp1)-and right(rp1)-pedal cells appeared and the fibres projected into the region of developing foot; 9. Lateral review of D-shaped veliger larvae(48 hpf).

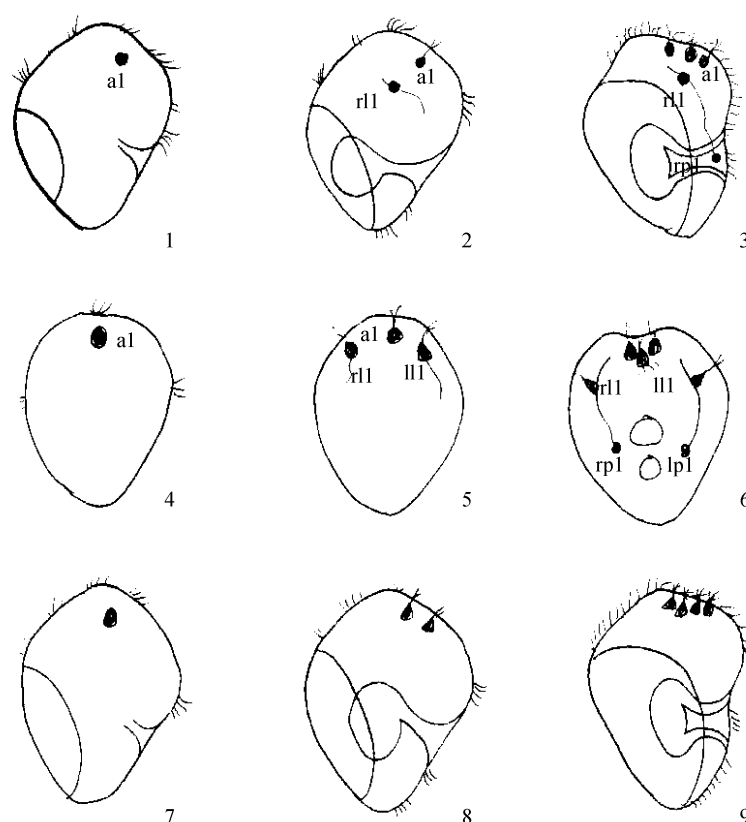


图版 II 厚壳贻贝胚胎及早期幼虫体内 5-羟色胺免疫
阳性信号 (红色) 和 α 微管蛋白 (绿色) 的定位

1. 受精卵, 出现第一极体; 2. 囊胚期 (6 hpf), 开始出现 α 微管蛋白; 3. 原肠胚期 (12 hpf), 无 5-羟色胺阳性信号出现; 4. 早期担轮幼虫 (18 hpf), 第一个 5-羟色胺免疫阳性信号出现; 5. 担轮幼虫后期 (24 hpf), 5-羟色胺免疫阳性信号数量增加至 2 个, 分布在幼虫体的顶端; 6. 30 hpf D 形面盘幼虫, 顶部阳性信号伸出细小的顶端纤毛簇; 7. 早期 D 形幼虫 (36 hpf), 没有观察到阳性信号数量增加, 免疫阳性信号伸出两条纤维向前延伸; 8. D 形幼虫 (42 hpf), 5-羟色胺免疫阳性信号数量增加至 2~3 个, 位置保持不变, 分布于脑神经节区域, 而且由它们发出的纤维延伸在脑神经节周围, st (内脏), ve (面盘), mo (口), an (肛); 9. D 形幼虫 (48 hpf), 5-羟色胺免疫阳性信号数量增加至 4 个, 位置仍然没有变化, cg (脑神经节)。

Plate II Serotonin-like (red) and acetylated tubulin-like (green) immunoreactivity in embryo and early larvae of *M. coruscus*

1. Fertilized egg, release of the first polar lobe; 2. Morula stage (6 hpf); 3. Blastula stage (12 hpf); 4. Early trochophore stage (18 hpf). The first serotonin-like immunoreactive cell (a1) appears in the apical region; 5. Late trochophore stage (24 hpf). Numbers of serotonin-like immunoreactive cell increased to 2; 6. Early D-shaped veliger larvae (30 hpf). The serotonin-like immunoreactive cell extended faint apical tuft of cilia; 7. Early D-shaped veliger larvae (36 hpf). Cells extended two fibres and projected anteriorly; 8. D-shaped veliger larvae (42 hpf). Numbers of serotonin-like immunoreactive cell increased to 2-3, located in the apical ganglion and projected fibres surrounding on the cerebral ganglion (cg), st (stomach), ve (velum), mo (mouth), an (anus); 9. D-shaped veliger larvae (48 hpf). Four serotonin-like immunoreactive cell were observed and these cell were restricted to locate in the apical region, cg (cerebral ganglion cell).



图版Ⅲ 厚壳贻贝早期幼虫神经发育示意图

1. 担轮幼虫早期 FMRF 酰胺类活性侧面观,顶部第一个 FMRF 酰胺类免疫阳性信号(al)出现在顶端区;2. 担轮幼虫晚期阶段 FMRF 酰胺类免疫活性侧面观,有顶部1个阳性信号(al)和侧部一个阳性信号(rl1,右侧信号);3. 在D形幼虫阶段 FMRF 酰胺类免疫活性侧面观,足右侧的阳性信号(rp1,右足信号)出现,由rl1发出的神经纤维延伸至足细胞,并与之连接;4. 担轮幼虫早期 FMRF 酰胺类免疫活性的腹面观,第一个 FMRF 酰胺类免疫阳性信号(al)出现在顶端区;5. 担轮幼虫晚期 FMRF 酰胺类免疫活性的腹面观,有1个顶阳性信号(al)和两个侧阳性信号(rl1和ll1;ll1,左侧信号);6. D形幼虫阶段 FMRF 酰胺类免疫活性的腹面观,左右两侧的足阳性信号(lp1和rp1,lp1,左足信号)出现,由rl1和ll1发出的神经纤维延伸至足细胞,并与之连接;7. 担轮幼虫早期5-羟色胺活性侧面观,第一个5-羟色胺免疫阳性信号出现;8. 担轮幼虫晚期5-羟色胺活性侧面观,5-羟色胺免疫阳性信号增加至2个;9. D形幼虫阶段5-羟色胺活性侧面观,5-羟色胺免疫阳性信号增加至3~4个,且位置保持不变,分布于脑神经节部位。

Plate III Summary diagram of the ontogeny of FMRFamidergic and serotonergic transmitter phenotypes in early larvae of *M. coruscus*

1. The right lateral view, the first FMRFamide-like immunoreactive apical cell(al) appears at the early trochophore stage; 2. The right lateral view, in late trochophores, the apical cell(al) and a right lateral cell(rl1) are present; 3. The right lateral view, in D-shaped larval stage, the rl1 cell project in the developing foot, and the first right pedal neurons appears(rp1); 4. The ventral view, the first FMRFamide-like immunoreactive apical cell(al) appears at the trochophore stage; 5. The ventral view, in late trochophores, the apical cell(al) and two lateral cells(rl1:right lateral cell; ll1:left lateral cell) are present; 6. The ventral view, in D-shaped larval stage, the rl1 and ll1 cells project in the developing foot, and the first pair of pedal neurons appears(rp1:right pedal cell; lp1:left pedal cell); 7. The right lateral view, the first serotonin-like immunoreactive apical cell appears at the trochophore stage; 8. The right lateral view, the number of serotonin-like immunoreactive cells increases to two; 9. The right lateral view, D-shaped veliger larvae, the number of serotonin-like immunoreactive cells gradually increases to four and locate inside the developing cerebral ganglion.