

低盐诱导海湾扇贝三倍体育苗技术的研究

于瑞海 王昭萍 邸炜鹏 张晨晨 高倩 段金龙

(中国海洋大学水产学院, 青岛 266003)

摘 要 通过低盐海水浸泡海湾扇贝受精卵抑制受精卵第二极体释放的方法诱导海湾扇贝产生三倍体。当海湾扇贝的受精卵 40% 出现第一极体时, 立即用不同盐度梯度即 22.5、20、17.5、15、12.5、10、7.5、对照组(盐度 30)的海水对受精卵进行处理 10、15 min 后, 马上将处理的受精卵移入正常海水中孵化。实验结果表明, 不同梯度低盐海水可以诱导海湾扇贝产生三倍体, 盐度为 20 以上时, 三倍体诱导率小于 2.91%, 但随着盐度的下降, 三倍体诱导率迅速提高, 当盐度为 12.5 时, 三倍体诱导率高达 85.91%。当盐度低于 7.5 时, 由于 D 形幼虫极少, 三倍体诱导率无法测出。在处理时间上, 15 min 的处理效果比 10 min 处理效果好。因此, 本研究在低盐度条件下抑制受精卵第二极体产生海湾扇贝三倍体的最佳处理方法是低盐范围在 12.5~15 之间, 处理时间为 15 min, 三倍体诱导率高, 孵化率也较高, 适合生产上推广应用。

关键词 海湾扇贝 低盐度 三倍体 D 形幼虫孵化率

中图分类号 S96 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)05-0047-05

Study on triploid induction of *Argopectens irradians* (Lamarck) in low salinity seawater

YU Rui-hai WANG Zhao-ping DI Wei-peng
ZHANG Chen-chen GAO Qian DUAN Jin-long

(College of Fishery, Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT Triploid induction of *Argopectens irradians* (Lamarck) was achieved through inhibiting the second polar body release by soaking fertilized eggs in sea water with low salinity, and the effect of different salinity treatment on triploid induction was examined. When 40% eggs reached the first polar body stage, the eggs were soaked in sea water with salinities of 30, 22.5, 20, 17.5, 15, 12.5, 10 and 7.5 for 10 min or 15 min respectively. The eggs were then transferred into the normal salinity seawater for 24h hatching. Triploid rate was no more than 2.91% when the salinity was above 20. However, with the decrease of salinity, triploid induction was enhanced so dramatically that the rate of triploid reached up to 85.91% at salinity of 12.5. Though, when the salinity was below 7.5, due to the lack of D-shaped larvae, the triploid rate could not be measured. The results show that the induction effect of 15-min treatment

国家 863 项目(2006AA10A401)和国家科技基础条件平台项目(2005DKA30470)共同资助

收稿日期:2009-11-07;接受日期:2009-12-04

作者简介:于瑞海(1964-),男,高级工程师,主要从事贝类育种研究。E-mail:yuruihai@ouc.edu.cn, Tel:(0532)82032873

is better than 10-min. The experiment results suggest that the best triploid induction of *A. irradians* is achieved by bathing in seawater at salinities of 12.5~15 for 15 min.

KEY WORDS *Argopectens irradians* Low salinity Triploid
D-shaped larvae hatching rate

贝类多倍体研究起始于20世纪80年代初,至今已有近30年的历史,目前已在30多种贝类中开展了多倍体诱导技术的研究,其中牡蛎的多倍体诱导技术已达到了产业化水平(王如才等 2002;王清印等 2000)。目前诱导贝类多倍体的方法主要有3种:一是采用细胞松弛素B(简称CB)或6-DMAP等化学诱导剂抑制极体释放(于瑞海等 2000、2001、2003;田传远等 1999);二是采用温度休克(于瑞海等 2003;田传远等 1999)或静水压物理诱导;三是生物杂交,即利用四倍体与二倍体杂交产生全三倍体(Guo *et al.* 1994)。由于CB、6-DMAP等化学试剂都具有较强的毒性,化学诱导对诱导贝类的胚胎及操作人员都有一定的毒害作用,且其价格昂贵,不易生产推广应用;物理诱导中静水压处理需要特殊的仪器,且诱导效率低,诱导效果不稳定;温度休克虽然相对简单,但诱导效果较差;生物杂交简单有效,但四倍体亲贝的获得是该方法应用的一个难以解决的瓶颈。

因此,探索一种无毒、成本低廉,对幼体无毒害作用的诱导方法,是实现我国贝类多倍体养殖产业化的必经之路。为此,2007~2008年春,作者在山东省海阳市海力海洋资源公司育苗场进行了低盐诱导海湾扇贝三倍体育苗技术的研究,取得比较理想的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 海湾扇贝种贝

本实验采用的海湾扇贝种贝,取自山东省海阳市海力海洋资源公司育苗场的种贝,种贝经升温促熟培育45 d后成熟待产,亲贝蓄养期间的管理按常规方法进行。

1.1.2 不同盐度海水的配制

所用正常海水的盐度为30,淡水为饮用的矿泉水,其盐度为0;然后用正常海水分别加入一定量淡水配制出盐度为22.5、20、17.5、15、12.5、10、7.5的低盐海水,供实验用。

1.2 方法

1.2.1 精、卵获取及受精

经过45 d蓄养的种贝,即将成熟产卵,此时挑选个体较大、健康、性腺饱满、发育好的个体50个。阴干1 h后,将阴干后的亲贝放入大容器中,再流水刺激15 min,将刺激后的亲贝单独放入有编号的小桶(体积3L),每个小桶只放入1个种贝,观察排精、产卵。因海湾扇贝是雌雄同体,每个亲贝产精、排卵的时间是不同的,海湾扇贝在产卵之前先产精,所以在受精之前,如发现小桶内有卵子,此桶水要倒掉,重新加水,直到无排精,进入产卵时,再收集卵。收集的卵选用300目筛绢过滤,去除大的杂质和粪便,再用500目筛绢反复洗卵几次。

受精时,取适当精液加入收集的卵液中,迅速搅动受精,5 min后要洗卵,开始计时观察极体出现情况,根据观察,在23℃温度下,12 min大部分出现第一极体,30 min后出第二极体,24 h后孵化为D型幼虫。

1.2.2 低盐度诱导海湾扇贝三倍体

当受精卵发育至第一极体出现率约为40%时,迅速将受精卵液加至盐度为30(对照组)、22.5、20、17.5、15、12.5、10、7.5的小桶(3L)中进行处理,处理时间为10和15 min,处理结束后,迅速将处理的受精卵转移到正常过滤海水的大桶(体积10L)中进行孵化。

1.2.3 孵化

受精卵的孵化在10L的桶中进行,水温维持在22.5~23℃。在孵化过程中定期取样观察胚胎发育情况,

受精后 24 h 发育到 D 形幼虫,并计算 D 形幼虫孵化率。

1.2.4 受精率和孵化率的计算方法

受精率是在从受精时间开始后的 15 min,未处理之前测得的,受精率就是受精卵的个数与总卵个数的比值,实验取 100 粒卵子观察,经取样计算为 80.48%。孵化率就是孵化的 D 形幼虫个数与受精卵的总个数的比值。

2 试验结果

2.1 低盐诱导处理后海湾扇贝的孵化情况

分别将受精卵在不同盐度梯度中处理 10 和 15 min 后,移到正常海水中孵化,孵化水温为 22.5~23 °C,24 h 孵化出 D 形幼虫后,计数孵化出的 D 形幼虫数量。孵化率为测量 3 次的平均数,其结果见表 1。

表 1 低盐诱导处理 10、15 min 孵化率情况比较

Table 1 Hatching rate of eggs subjected to low salinity treatments for 10 minutes or 15 minutes

盐度 Salinity	处理 10 min 的孵化率(%) Hatching rate of eggs in 10min treatment	处理 15 min 的孵化率(%) Hatching rate of eggs in 15min treatment	盐度 Salinity	处理 10 min 的孵化率(%) Hatching rate of eggs in 10min treatment	处理 15 min 的孵化率(%) Hatching rate of eggs in 15min treatment
7.5	0	0	17.5	35	32.5
10	1	0	20	55	45
12.5	20	15	22.5	62.5	55
15	25	22.5	30	75	70

从表 1 可看出,处理 10 min 比处理 15 min D 形幼虫的孵化率高,但差异不显著。因此,处理时间长短对孵化率的影响差异不明显。

2.2 不同盐度诱导海湾扇贝三倍体的分析结果

将不同盐度梯度试验组孵化出的 D 形幼虫进行收集,用流式细胞仪进行三倍体诱导情况测量,其测量结果见图 1 和表 2。

通过表 2 可以看出,处理 15 min 比处理 10 min 的 D 形幼虫三倍体率明显高些,差异较明显。但不论处理 10、15 min,其盐度在 12.5~17.5 时,诱导的 D 形幼虫三倍体比率较高,为 51.57%~85.91%,其中当盐度为 12.5 时最高,三倍体诱导率为 85.91%。当盐度为 7.5 以下时,三倍体率为 0,盐度在 20 以上时,D 形幼虫三倍体诱导率非常低,盐度在 22.5 以上时为 0。

当盐度为 7.5 时,可能因低盐抑制作用过大,影响了海湾扇贝受精卵的胚胎发育,无 D 形幼虫孵出;而盐度 20 以上,已是海湾扇贝生存的盐度范围,对受精卵没有影响和抑制作用,因此,起不到诱导效果所致。

3 讨论

3.1 低盐度诱导海湾扇贝三倍体方法的优点

通过利用矿泉水降低海水盐度诱导海湾扇贝三倍体的方法,操作步骤简便易行,无需大型的仪器设备,也不需要昂贵的药品诱导,低盐度因渗透压的作用可能对受精卵会产生一定程度的机械损伤,但不会对受精卵产生毒害,更不会危害消费者的健康。本试验中,得到的最高三倍体诱导率达到了近 86%,其 D 形幼虫孵化率都比较高。从诱导试验效果来看,这说明低盐诱导处理对幼虫成活率和诱导率均较高,是一种十分理想的诱导方法。其优越性主要体现在:无毒、安全、环保、不需特别装置、成本低、诱导效果好,经对诱导工艺完善后,可以大规模进行生产推广和应用。

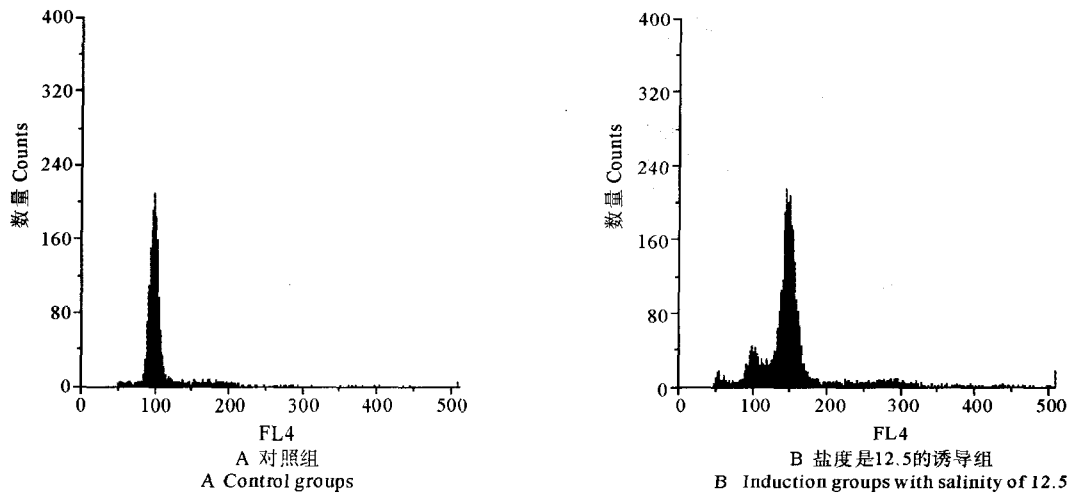


图 1 用细胞流式仪测量海湾扇贝三倍体率的流式

Fig. 1 Triploid rate of *Argopectens irradians* eggs revealed by flow cytometry

表 2 低盐诱导海湾扇贝三倍体的诱导结果

Table 2 Results of low salinity treatment on triploid rate of *Argopectens irradians* eggs

盐度 Salinity	三倍体率(%) Triploid rate		盐度 Salinity	三倍体率(%) Triploid rate	
	处理 10 min 10 min treatment	处理 15 min 15 min treatment		处理 10 min 10 min treatment	处理 15 min 15 min treatment
7.5	0.00	0.00	17.5	46.52	51.57
10	23.66	28.56	20	3.25	2.91
12.5	76.69	85.91	22.5	0.00	1.31
15	74.69	81.00	30	0.00	0.00

3.2 不同盐度、不同处理时间对海湾扇贝三倍体诱导效果的影响

根据以上实验结果看出,不同盐度处理和不同处理时间三倍体诱导效果是不同的,而诱导效果好坏主要从D型幼虫孵化率和三倍体诱导率两个方面综合考虑,处理时间相同,因盐度不同,三倍体诱导效果会出现一个最适盐度范围,在此范围内诱导率最高,孵化率也较高。低于或高于最适盐度,诱导率下降。处理盐度相同,处理时间也存在“最适”现象,某一处理时间范围内的诱导效果最好。本实验的最适低盐范围在12.5~15,与王昭萍等(2009)在虾夷扇贝的低盐诱导试验范围12~14相似,三倍体最高诱导率也接近。

3.3 影响低盐度诱导贝类多倍体效果的因素

影响诱导效果的因素主要有有人为因素和非人为因素,人为因素包括操作时间、处理的时机和处理的强度(处理的浓度和处理的持续时间);非人为因素包括盐度、温度、卵子密度和卵子质量。已报道的大多数研究主要集中在分析人为因素,对于非人为因素的研究,特别是水中物质对诱导效果的影响不可忽略。

3.3.1 非人为因素

3.3.1.1 卵子要同步成熟

实践证明,要保证较高而稳定的三倍体诱导率,种贝的成熟度非常重要,在保证种贝成熟度的前提下,对获取的精卵进行离体促熟和必要的洗卵,可防止精子过多对卵子造成的伤害,可提高受精率、胚胎孵化率和降低D形幼虫畸形率(于瑞海等 2002)。

3.3.1.2 受精卵处理密度要适宜

理论上讲受精卵密度低,三倍体诱导率较高,但对于生产上来说出苗量就低,相对造成生产成本就高,不适于大规模生产。反之,受精卵密度若过大,一方面影响三倍体诱导率,另一方面死亡的卵会败坏水质,可能影响孵化率和D型幼虫成活率,三倍体诱导率就低,另外受精卵密度过大,也妨碍受精卵的发育,因此,三倍体诱导时受精卵处理密度要适宜(于瑞海等 2002)。

3.3.1.3 水温等环境条件的影响

不同水温对三倍体诱导率也有一定的影响,据于瑞海等(2000)报道,在CB的诱导研究中,较高温下的三倍体率较高,相反低温下三倍体率较低。因此,在诱导过程中一定要考虑当地的环境条件,在适宜条件下进行诱导,可以保证三倍体诱导率的稳定性。

3.3.2 人为因素

人为因素对于诱导效果有着一定的影响,如在添加卵液于实验盐度的溶液中,如果不能很快完成,可能导致受精卵接受的处理时间不一致,以影响实验结果。在收集卵液的时候,不免有遗漏或洒出的卵液没有计算在内,可能导致实验结果不准确,并且,在细胞仪测定前,收集处理后的D型幼虫,也会因为认为操作的遗漏而产生误差,其中也包括细胞仪测定分析过程的处理等,因此在操作过程中,要仔细、细心、认真。

参 考 文 献

- 于瑞海,王昭萍,王如才,田传远. 2000. 3种化学诱导剂诱导太平洋牡蛎三倍体的比较研究. 青岛海洋大学学报, 30(4): 589~592
- 于瑞海,王昭萍,田传远,王如才. 2001. 利用咖啡因和热休克诱导太平洋牡蛎三倍体. 青岛海洋大学学报, 31(4): 518~522
- 于瑞海,王昭萍,王如才,田传远. 2002. 提高太平洋牡蛎三倍体诱导率的几项技术措施. 海洋湖沼通报, 4: 68~71
- 于瑞海,王如才,田传远,王昭萍,郑小东. 2003. 两种方法诱导太平洋牡蛎三倍体在生产上的应用效果. 海洋湖沼通报, 1: 57~61
- 王如才,王昭萍,田传远,于瑞海,李 云. 2002. 我国太平洋牡蛎三倍体育苗与养殖技术研究进展. 青岛海洋大学学报, 32(2): 193~200
- 王清印,杨爱国. 2000. 栉孔扇贝三倍体研究进展和展望. 中国水产科学, 7(3): 93~96
- 王昭萍,赵 婷,于瑞海,张晨晨. 2009. 一种新方法-低渗诱导虾夷扇贝三倍体的研究. 2009. 中国海洋大学学报, 39(2): 193~196
- 田传远,王如才,梁 英,王昭萍,于瑞海. 1999. 6-DMAP 诱导太平洋牡蛎三倍体—抑制受精卵第二极体释放. 中国水产科学, 6(2): 1~4
- 田传远,王如才,梁 英,于瑞海,王昭萍. 1999. 低温诱导太平洋牡蛎产生三倍体. 海洋科学, 1: 53~55
- Guo, X., and Allen, S. K. Jr. 1994. Viable tetraploids in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3: 42~50