

皱纹盘鲍三倍体诱导条件 及其室内饲育试验

THE CONDITION OF TRIPLOID INDUCTION IN ABALONE *HALIOTIS DISCUS HANNAI* AND ITS INDOOR RAISED EXPERIMENT

孙振兴 李 诺

(山东省水产学校, 烟台 264001)

Sun Zhenxing and Li Nuo

(Shandong College of Fisheries, Yantai 264001)

宋志乐 赵玉山 关向华

(烟台市芝罘区水产局, 264001)

Song Zhile, Zhao Yushan and Guan Xianghua

(Fisheries Office of Zhifu District, Yantai 264001)*

关键词 皱纹盘鲍, 三倍体, 室内饲育

KEYWORDS abalone, *Haliotis discus hannai*, triploid, indoor raised

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)是我国重要的海洋经济贝类之一,近年来北方沿海已开展了人工养殖。但普通二倍体鲍需生长3—4年才能达到商品规格,养殖周期长。由于三倍体的不育性,其能量可全部用于生长,这对改善鲍的生长,缩短养殖周期有着积极的意义。有关鲍三倍体的研究起步较晚,在国外, Arai等[1986]、林崎孝志[1989]分别报道了用温度休克和静水压法及细胞松弛素B诱导皱纹盘鲍三倍体的发生和三倍体鲍的生长。在我国,王子臣等[1990]及孙振兴等[1990]报道了人工诱导皱纹盘鲍三倍体的发生。但对皱纹盘鲍三倍体的生长、生化特性等,国内尚未见报道。为进一步探讨皱纹盘鲍三倍体的特性,我们在人工诱导三倍体成功的基础上,对诱导三倍体的适宜条件以及室内人工饲育下三倍体鲍的生长、生化特性等进行了多方面的试验研究。本文报道1989—1991年的试验结果。

一、材料与 方法

1. 材料来源 亲鲍采自山东省长岛海区,经促熟培育后,排放的精、卵供试验用。

收稿日期:1992-07-23。

2. 三倍体诱导 低温处理的方法同孙振兴等 [1990]。细胞松弛素 B (Cytochalasin B, 以下简称 CB) 为美国 Sigma 公司产品, 先将 CB 溶于少量二甲亚砜 (DMSO) 中, 再加入海水, 使其浓度分别为 0.5mg/L、1.0mg/L 和 1.5mg/L, 并调整海水中 DMSO 的最终浓度为 100 μ l/L。将受精卵置于 CB 海水溶液中浸渍处理后, 再用 100 μ l/L 的 DMSO 海水溶液洗卵 30 分钟, 以除去残留在卵子表面的 CB, 然后将受精卵移入正常海水中。各试验组及对照组在相同条件下孵化培育。

3. 倍性判别与三倍体诱导率 用担轮幼虫制作染色体玻片标本 [孙振兴, 1991]。根据皱纹盘鲍染色体数 $2n=36$ [王桂云等, 1989; Arai 等, 1982], $3n$ 即为 54 [孙振兴等, 1990], 通过染色体计数判别倍性。三倍体诱导率的统计方法同孙振兴等 [1990]。

4. 室内饲养 稚鲍剥离后置于培育池的网箱中流水饲养, 投喂鲜嫩海带或配合饵料。

5. 生化指标的分析 以 3 龄鲍为分析对象。氨基酸用美国 Waters 高效液相色谱仪分析, DNA 含量用紫外吸收法测定, 糖元含量用蒽酮比色定糖法测定。

二、试验结果

(一) 三倍体诱导的适宜条件

1. 低温诱导三倍体的适宜条件 用低温诱导皱纹盘鲍三倍体时, 在处理水温和处理开始时间相同的情况下, 随着处理持续时间的延长, 受精率与孵化率呈下降趋势, 而三倍体诱导率则明显提高 (表 1 中的 I 组, 图 1)。

另外, 比较表 1 中的 II、III 组可以看出: 受精后 10 分钟开始处理、阻止第一极体放出而形成的三倍体 (以下记作 3N-1Pb) 的诱导率 (II-4 与 III-1 两组平均为 61.2%) 较之受精后 30 分钟开始处理、阻止第二极体放出而形成的三倍体 (以下记作 3N-2Pb) 的诱导率 (II-5 与 III-2 两组平均为 51.4%) 高, 但两者在受精率、孵化率方面无明显变化趋势。从上述试验结果可以看出, 水温 3 $^{\circ}$ C, 受精后 10 分钟开始处理, 持续时间 10 分钟是低温诱导皱纹盘鲍三倍体的适宜条件, 三倍体诱导率可达 53.3—68.6%。

2. CB 诱导三倍体的适宜条件 在处理开始时间相同、持续时间也相同的条件下, 不同的 CB 浓度对三倍体诱导率有一定影响。CB 浓度为 0.5mg/L 时, 3N-1Pb 的诱导率仅为 47.4%; 当 CB 浓度为 1.0mg/L 和 1.5mg/L 时, II 组的 3N-1Pb 诱导率分别为 75.0% 和 73.7%, III 组的 3N-1Pb 诱导率分

表 1 低温处理与受精率、孵化率及三倍体诱导率的关系
Table 1 Relationship between cold shock treatment and the percentage of fertilization, incubation and tripleid

组别	处理水温 (°C)	处理开始时间 (受精后, min.)	持续时间 (min.)	受精率 (%)	孵化率 (%)	三倍体诱导率 (%)
I-1	3	8-10	5	70.0	48.2	33.3
I-2	3	8-10	8	63.5	51.0	35.7
I-3	3	8-10	10	45.0	32.5	53.3
II-4	3	10	10	78.6	38.8	68.6
II-5	3	30	10	82.4	54.5	55.0
II-7	20(对照)	—	—	92.0	89.0	—
III-1	3	10	10	73.5	46.2	53.8
III-2	3	30	10	60.0	39.4	47.8
III-9	20(对照)	—	—	87.5	83.0	—

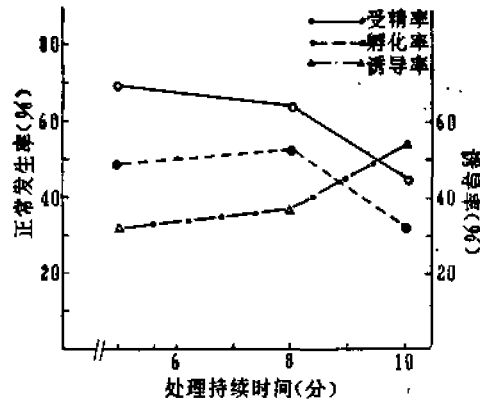


图1 低温处理持续时间与正常发生率、三倍体诱导率的关系

Fig.1 Relationship between the duration time of cold shock treatment and the normal developmental rate, the percentage of triploid

表2 CB 诱导皱纹盘鲍三倍体的试验结果

Table 2 Results of examination for triploid induction in *H. discus hannai* by cytochalasin B treatment

组别	CB 浓度 (mg/L)	DMSO 浓度 (μl/L)	处理开始时间(受精后, (min.))	持续时间 (min.)	受精率 (%)	孵化率 (%)	三倍体诱导率 (%)
II-1	0.5	100	10	15	89.0	61.5	47.4
II-2	1.0	100	10	15	83.4	52.6	75.0
II-3	1.5	100	10	15	86.3	55.9	73.7
II-6	0	100	10	45	87.7	85.2	—
II-7	0	0	—	—	92.0	89.0	—
III-3	1.0	100	10	15	87.0	55.1	68.8
III-4	1.0	100	30	15	80.6	53.2	81.0
III-5	1.5	100	10	15	81.3	46.8	71.4
III-6	1.5	100	30	15	76.4	40.8	60.9
III-7	0	100	10	45	77.0	72.3	—
III-8	0	100	30	45	83.2	70.0	—
III-9	0	0	—	—	94.5	81.6	—

注:处理时水温为 $20.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

别为 68.8% 和 71.4% (表 2)。由此可见, CB 浓度为 1.0mg/L 以上时, 3N-1Pb 的诱导率与 CB 浓度并不呈正相关。但是 CB 浓度在 1.0mg/L 和 1.5mg/L 时, 3N-2Pb 的诱导率分别为 81.0% 和 60.9%, 即随着 CB 浓度增加, 3N-2Pb 的诱导率下降。

从表 2 还可以看出, CB 浓度对受精率有一定影响, 但变化趋势不明显; 而随着 CB 浓度增大, 担轮幼虫孵化率呈下降趋势。另外, DMSO 对胚胎的正常发育也有一定影响。

从以上试验结果可以看出, CB 诱导鲍三倍体的适宜条件是: CB 浓度 1.0—1.5mg/L, 受精后 10 分钟或 30 分钟开始处理, 持续时间为 15 分钟。在此条件下, 三倍体诱导率可达 60.9—81.0%。

(二) 三倍体鲍的生长特性

本试验结果表明:在室内人工饲养条件下,三倍体诱导群与二倍体的当年稚鲍在壳长和体重的增长上无明显差异,两者在第二年前期的生长也无明显差异,但从第二年后期开始,三倍体的壳长、体重增长逐渐优于二倍体。平均壳长 12.2mm、体重 0.24g 的稚鲍,在室内饲养 19 个月后,三倍体诱导群的平均壳长达 39.8mm、平均体重 8.92g,而二倍体群的平均壳长为 36.1mm、平均体重 7.43g,前者较后者的平均壳长大 10.2%,平均体重大 20.1%,显示出三倍体的生长优势。有关三倍体鲍的生长特性的详细研究结果,将在另文专题报道。

(三) 三倍体鲍的某些生化特点

对皱纹盘鲍三倍体与二倍体的氨基酸分析比较的结果表明,两者的氨基酸组分相同,但三倍体的氨基酸总量高于二倍体,两者足肌中氨基酸含量的比值为 1.10,右侧壳肌与外套膜中的氨基酸含量比值为 1.11(表 3)。其中三倍体鲍各部位中的人体必需氨基酸、半必需氨基酸和非必需氨基酸的含量都比相应的二倍体高,且以谷氨酸的含量为最高。

对鲍足肌中的 DNA 和糖元含量的分析结果表明,三倍体组织中的 DNA 含量为 $1.91 \pm 0.15\text{mg/g}$

表 3 三倍体与二倍体鲍的氨基酸含量比较

Table 3 Comparison of the amino acid content between triploid and diploid of abalones

项目 含量(g/100g) 组分	足 肌			全 食 部		
	3N	2N	3N/2N	3N	2N	3N/2N
苏氨酸 THR	0.62	0.61		0.55	0.51	
缬氨酸 VAL	1.00	0.96		0.84	0.90	
蛋氨酸 MET	0.53	0.45		0.45	0.41	
异亮氨酸 ILE	0.60	0.68		0.55	0.56	
亮氨酸 LEU	0.90	0.86		0.85	0.81	
苯丙氨酸 PHE	0.57	0.40		0.39	0.35	
赖氨酸 LYS	0.89	0.74		0.75	0.68	
色氨酸 TRP	—	—		—	—	
必需氨基酸总量	5.11	4.70	1.09	4.38	4.22	1.04
组氨酸 HIS	0.53	0.51		0.43	0.41	
精氨酸 ARG	1.14	0.90		0.99	0.88	
半必需氨基酸总量	1.67	1.41	1.19	1.42	1.29	1.10
天门冬氨酸 ASP	0.96	0.87		0.89	0.78	
谷氨酸 GLU	1.64	1.89		1.45	1.29	
丝氨酸 SER	0.68	0.63		0.64	0.52	
甘氨酸 GLY	0.91	0.87		0.89	0.74	
丙氨酸 ALA	0.77	0.75		0.77	0.69	
脯氨酸 PRO	0.77	0.70		0.82	0.65	
酪氨酸 TYR	0.77	0.75		0.83	0.71	
胱氨酸 CYS	0.30	0.26		0.21	0.19	
非必需氨基酸总量	6.80	6.22	1.09	6.50	5.57	1.17
合 计	13.58	12.33	1.10	12.80	11.08	1.11

注:全食部包括右侧壳肌和外套膜。

(鲜重),二倍体为 $1.48 \pm 0.28\text{mg/g}$ (鲜重),三倍体显著高于二倍体,两者比率是 1.3。三倍体的糖元含量为 $21.95 \pm 4.76\text{mg/g}$ (鲜重),二倍体为 $11.58 \pm 2.29\text{mg/g}$ (鲜重),三倍体是二倍体的 1.9 倍。

三、讨 论

1. 一般认为,低温休克诱导贝类三倍体时,处理对象的亚致死水温是低温诱导多倍体的适宜温度[姜卫国等,1987]。有关皱纹盘鲍的致死水温、亚致死水温,尚未见报道。但与皱纹盘鲍生活环境相同的盘鲍(*H. discus*)在水温 -1.6°C 时心脏仍未停止跳动[猪野 峻,1971]。皱纹盘鲍在水温 $1.7-2.2^\circ\text{C}$ 时完全不摄食,大多数个体处于半麻痹状态[袁宗庆,1989]。另外从地理分布看,在冬季最低水温为 0°C 的我国北方一些海区,仍有皱纹盘鲍自然栖息。因此,估计皱纹盘鲍的致死水温应在 0°C 以下。此外,考虑到非整倍体数量随着低温处理强度的增强而增加[李诺,1992],所以我们以 3°C 作为低温休克诱导皱纹盘鲍三倍体的温度。

2. 诱导双壳类三倍体时,使用的 CB 浓度较低,一般为 $0.05-1.0\text{mg/L}$ [Tabarini, C. L., 1984; Yamamoto, S. 等,1988],而诱导鲍三倍体时 CB 浓度较高,本试验中为 $0.5-1.5\text{mg/L}$ 。这与双壳类的卵径较小($60-70\mu\text{m}$ 左右),而鲍的卵径较大($220-230\mu\text{m}$) 有关。由于卵子直接浸渍在 CB 海水溶液中,所以卵子的表面积愈大,或处理时卵子的密度愈大,卵子沾附的 CB 海水溶液愈多。采用较高的 CB 浓度,可以保证良好的诱导效果。

3. 用低温休克或 CB 诱导三倍体,在处理强度(水温或 CB 浓度)与持续时间一定的情况下,无论是诱导 3N-1Pb 还是 3N-2Pb,开始处理时间距离放出极体的时间愈接近,阻止极体放出愈有效,三倍体诱导率亦愈高。通过预先观察,发现在水温 $19-20^\circ\text{C}$ 时,皱纹盘鲍受精卵在受精后 15 分钟放出第一极体,35 分钟放出第二极体;在水温 21°C 时,受精后 12 分钟放出第一极体,32 分钟放出第二极体。由于在处理大量卵子的情况下,要有一定的操作时间余地,所以确定受精后 8-10 分钟、30 分钟分别为诱导 3N-1Pb 和 3N-2Pb 的处理开始时间。

4. 三倍体的特性往往表现在多方面。已有报道表明,银鲫二倍体与三倍体种群的肌肉组成及蛋白质组成基本一致,但血液中酶的活性不同,三倍体已糖激酶与磷酸果糖激酶的活性略高于二倍体,两者比率分别是 1.26 与 1.35;而三倍体丙酮酸激酶的活性则明显高于二倍体,其比率是 1.68 [楼允东,1984]。贝类多倍体在这方面的报道尚不多见。本试验对皱纹盘鲍三倍体与二倍体的氨基酸进行了比较分析,得到了与上述结果相类似的结果。

另外,本试验对 3 龄鲍的足肌糖元含量分析结果表明,三倍体明显高于二倍体,两者比率接近 2 倍。说明开始性腺发育的二倍体鲍,由于能量转移,正常组织中的糖元积累减少,而三倍体鲍性腺未发育,糖元积累增多。这与牡蛎三倍体的糖元含量明显高于二倍体的研究结果[山本 敏,1989]是一致的。

DNA 相对含量的差异是三倍体与二倍体的明显区别之一,一般细胞核中 DNA 的相对含量较高。本试验对鲍肌肉组织中 DNA 含量的分析比较也表明,三倍体明显高于二倍体。有关三倍体鲍的生化特性,还有待深入研究。

本文初稿承蒙黄海水产研究所张立言研究员、青岛海洋大学王如才教授审阅并提出宝贵意见,谨此致谢。试验过程中,得到烟台大学分析中心,长岛海珍品育苗增殖中心的热情帮助,在此一并表示感谢。

参 考 文 献

- [1] 王子臣等,1990。皱纹盘鲍三倍体的研究。大连水产学院学报,5(1):1-8。
- [2] 王桂云等,1988。皱纹盘鲍的染色体研究。动物学研究,9(2):171-174。
- [3] 孙振兴,1991。一种观察贝类染色体的制片法。动物学杂志,26(4):34-35。

- [4] 孙振兴等,1990.人工诱导皱纹盘鲍三倍体的研究.齐鲁渔业,(3):28—30.
- [5] 李 诺,1992.多倍体育种在贝类养殖上的应用.海洋通报,11(2):80—84.
- [6] 姜卫国等,1987.人工诱导合浦珠母贝多倍体的发生.热带海洋,6(4):37—45.
- [7] 聂宗庆,1989.鲍的养殖与增殖,44—46.农业出版社(京).
- [8] 楼允东,1984.国外对鱼类多倍体育种的研究.水产学报,8(4):343—354.
- [9] 山本 敏,1989.マガキ三倍体作出法の改良と養殖への応用.養殖,(6):134—137.
- [10] 林崎孝志,1989.エゾアワビの三倍体作出.養殖,(11):84—87.
- [11] 猪野 峻,1971.アワビの生物学的研究.浅海完全養殖(今井丈夫監修),265—274.恒星社厚生阁(东京).
- [12] Arai, K, et al., 1982. Chromosomes of *Haliotis discus hannai* Ino and *H. discus* Reeve. *Bull. Japan Soc, Sci, Fish.*,48(12); 1689—1691.
- [13] ———, 1986. Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Bull, Japan, Soc, Sci, Fish.* 52(3); 417—422.
- [14] Tabarini, C. L., 1984. Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. *Aquaculture*, 42: 151—160.
- [15] Yamamoto, S. et al., 1988. Induced triploidy in Pacific oyster *Crassostrea gigas*, and performance of triploid larvae. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 39(1): 47—59.

欢迎订阅《海洋渔业》

《海洋渔业》杂志是中国水产学会的科技刊物,由中国水产科学研究院东海水产研究所主办。

杂志主要刊登:海洋渔业资源开发与利用、繁殖保护、捕捞技术、鱼、虾贝、藻类的增养殖、海洋环境保护、水产品加工利用、保鲜技术、渔船渔港、渔业机械仪器等各类文章。实用性、资料性强是本刊特色。

本刊为16开本48页,一年6期,单月出版。定价每期1元全年6元,国内读者可向各地邮局订阅或向本编辑部直接订阅。邮发代号:4—265。期刊登记号:ON31—1341/S。国际标准期刊编号 ISSN1004—2490。国外由中国图书进出口公司、中国出版对外贸易公司上海分公司发行。

编辑部地址:上海市军工路300号; 邮政编码:200090。