

利用不同盐度诱导长牡蛎三倍体的研究*

于瑞海¹, 王昭萍¹, 孔 静², 沈建平¹, 左仔荣²

(1 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003; 2 山东海益宝水产股份有限公司, 山东 烟台 265100)

摘要: 采用低盐度(4、6、8、10、12、14、16)和高盐度(40、45、50、55、60、65、70)在40%~50%受精卵出现第一极体时处理10和15 min,进行长牡蛎三倍体的诱导。在低盐度诱导三倍体实验中,随着盐度降低,D型幼虫孵化率逐渐降低,处理10和15 min的卵裂率差异显著($P < 0.05$),孵化率差异不显著($P > 0.05$)。当盐度为8时,处理受精卵10与15 min,三倍体诱导率最高分别可达84.4%和91.0%,两处理组三倍体诱导率差异显著($P < 0.05$)。在高盐度诱导三倍体实验中,随着盐度升高,D型幼虫孵化率逐渐降低,处理10和15 min的卵裂率和孵化率均差异显著($P < 0.05$)。当盐度为55时,处理受精卵10 min,三倍体诱导率最高为80.3%;当盐度为60时,处理受精卵15 min,三倍体诱导率最高为97.1%,两处理组三倍体诱导率差异显著($P < 0.05$)。研究发现,在盐度为8和60条件下,40%~50%的受精卵出现第一极体时,处理15 min,长牡蛎三倍体诱导率最高。

关键词: 长牡蛎;低盐;高盐;诱导;三倍体率

中图分类号: S968.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2015)01-026-05

自1981年美国学者Stanley^[1]采用细胞松弛素成功地诱导出美洲牡蛎(*C. virginica*)三倍体以来,三倍体贝类就以其育性差、生长快、口味不受繁殖季节限制等优势,养殖前景广阔^[2-3]而成为贝类遗传育种研究的热点。诱导牡蛎多倍体的方法多以使用细胞松弛素B(CB)、6-DMAP等药物^[1,4-7]为主,虽然CB、6-DMAP诱导效果较好,但诱导剂毒性较大,从而降低了幼虫的成活率和孵化率,而且诱导剂的安全性也有待验证。作者利用不同海水盐度梯度变化进行牡蛎三倍体的诱导,借鉴文献^[7-8]的研究,相对于药物诱导法,利用海水盐度梯度变化诱导贝类产生三倍体具有无毒、成本低、适合产业化生产等优点,具有广阔的推广前景。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料:长牡蛎亲贝为二龄贝,于2009年6月购自威海市乳山牡蛎养殖场。

器材和药品:所用器材为3、2和1 L的烧杯,纯净水,氯化钠,显微镜等。

1.2 实验方法

1.2.1 精卵获取及受精 将性腺成熟度较好的牡蛎洗刷干净,开壳,通过镜检将雌雄长牡蛎分开。用解剖刀将卵子剥离到盛有海水的3 L的烧杯中,先用100目的筛绢初滤,再用250目的筛绢过滤,最后用500目的筛绢过滤掉组织液,放入3 L的烧杯中加入过滤海水并

进行定量。在受精前10 min左右,将雄贝性腺剥离到盛有海水的1 L的烧杯中,并用250目的筛绢过滤后使用。卵子浸泡30~40 min后,将一定量的精液加入到卵液中人工授精,受精过程中不断搅动,受精5~10 min后用500目筛绢洗卵,去除多余的精子和组织碎屑。

1.2.2 低盐、高盐梯度设计 实验用盐度为30的正常海水作为对照组,低盐梯度设定为4、6、8、10、12、14和16 7个低盐度组,是通过向正常海水中加纯净水的方法配制而成;高盐梯度设定为40、45、50、55、60、65和70 7个高盐度组,是通过向正常海水中加NaCl配制。各组平行试验设置3个重复。

1.2.3 三倍体诱导方法 当40%~50%的受精卵出现第一极体时,将一定量的受精卵立即放至上述不同盐度梯度的烧杯中,分别处理10和15 min,抑制受精卵第二极体的释放,处理结束后迅速移至正常的海水中。

1.2.4 倍性分析 将幼虫用300目筛绢滤出浓缩,收集到1.5 mL离心管中,加入1 mL DAPI荧光染料,于-20℃低温保存。进行荧光分析时,将样品于常温下解冻,振荡器震荡0.5 min,制成细胞悬液,在4℃下24 h内采用Partec PA II流式细胞仪(FCM)进行倍性分析。

1.3 数据统计分析

统计卵裂率、D幼孵化率。卵裂率是统计发育到两细胞以上受精卵占所有受精卵的百分率。D幼孵化率是统计刚孵化后的D型幼虫占所有受精卵的比率。

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2012AA10A412);广东省部产学研结合专项资金项目(2012B091000102)资助

收稿日期: 2013-05-11; 修订日期: 2013-10-31

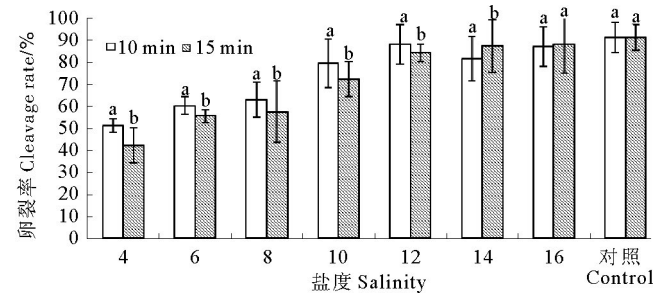
作者简介: 于瑞海(1964-),男,教授级高级工程师。E-mail: yuruihai@ouc.edu.cn

数据统计分析使用 Excel 软件。三倍体诱导率由 FlowMax 软件计算出。

2 结果与分析

2.1 低盐诱导处理后的长牡蛎卵裂和孵化

孵化水温为 22~23 °C, 24 h 孵化出 D 幼后, 统计卵裂率和 D 幼孵化率。结果见图 1 和 2。



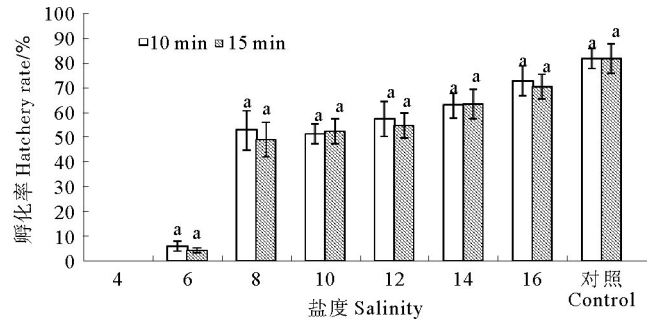
(标相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 标有不同字母表示差异显著 ($P<0.05$). The same letters mean no significant difference ($P>0.05$), the different letters mean significant difference ($P<0.05$).

图 1 受精卵低盐处理 10 和 15 min 的卵裂率变化情况

Fig. 1 Cleavage rate with treatments of low-salinity under different duration of treatment (10 minutes and 15 minutes)

从图 1 可以看出, 随着盐度趋向正常海水, 各处理组卵裂率逐渐升高, 正常盐度下(对照组)卵裂率最高。在盐度 4~14 各实验组中, 处理 10 与 15min 卵裂率差异性显著 ($P<0.05$), 当盐度达到 16 时, 2 组差异以及对照组差异不显著 ($P>0.05$)。

从图 2 可以看出, 随着盐度趋向正常海水, 各处理组孵化率逐渐升高, 正常盐度下(对照组)孵化率最高。在盐度 4 和 6 实验组中, 处理 10 与 15 min 孵化率极低, 各盐度条件下, 10 与 15 min 处理组差异不显著 ($P>0.05$)。



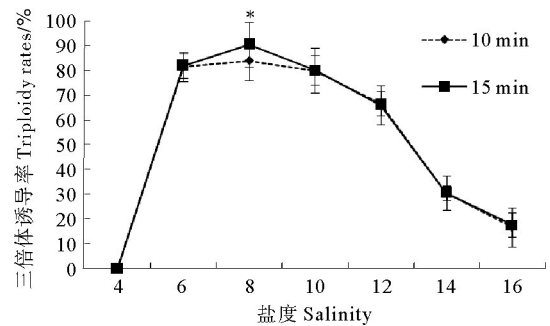
(标相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 标有不同字母表示差异显著 ($P<0.05$). The same letters mean no significant difference ($P>0.05$), the different letters mean significant difference ($P<0.05$).

图 2 受精卵低盐处理 10 和 15 min 的孵化率变化情况

Fig. 2 Hatchery rate with treatments of low-salinity under different duration of treatment (10 minutes and 15 minutes)

2.2 低盐诱导长牡蛎三倍体率的分析结果

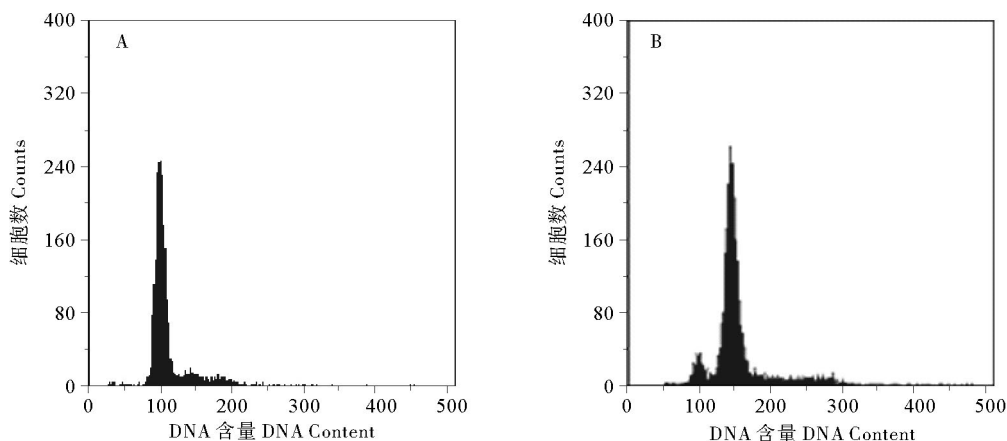
用流式细胞仪进行三倍体诱导率分析, 其结果见图 3 和 4。



(* 表示差异显著 ($P<0.05$). * In each row mean significant difference ($P<0.05$).

图 3 长牡蛎受精卵低盐处理 10 和 15 min 的三倍体诱导率

Fig. 3 Results of triploidy rate with treatments of low-salinity under different duration of treatment (10 and 15 min)



(A: 对照组 2n control; B: 盐度为 8 的诱导组 Group induced by salinity of 8)

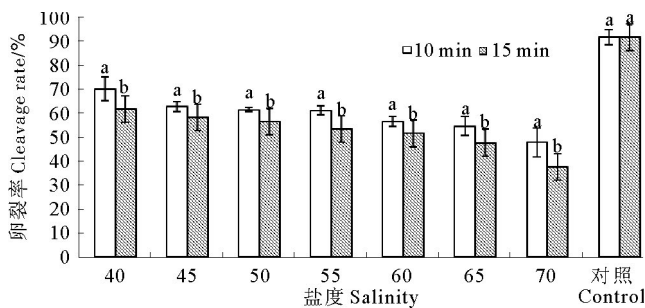
图 4 低盐诱导长牡蛎流式细胞仪倍性检验结果

Fig. 4 Ploidy level revealed by Flow Cytometry induced by treatments of low-salinity

通过图3可以看出,处理15 min与处理10 min组的D幼三倍体率,在盐度为8的条件下差异显著($P < 0.05$),其它各盐度组差异不显著($P > 0.05$)。分别处理10和15 min,其盐度在6~10时,诱导的D幼三倍体率达到80%以上;其中盐度为8时,处理受精卵10 min,三倍体诱导率达84.4%;处理受精卵15 min时,三倍体诱导率最高,为91.01%。当盐度为4时,三倍体率最低;盐度在16以上时,D幼三倍体诱导率较低。

2.3 高盐诱导处理后的长牡蛎卵裂和孵化

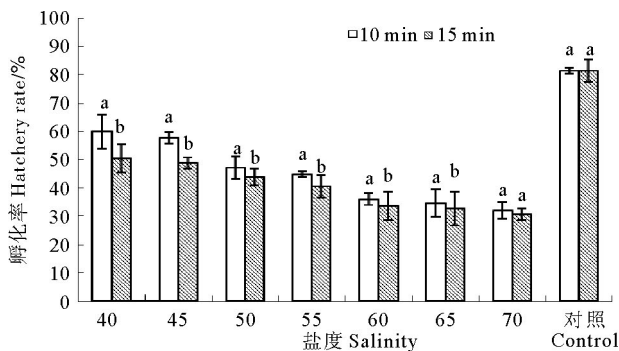
分别将受精卵在不同高盐度梯度中处理10和15 min后,移到正常海水中孵化,孵化水温为22~23℃,24 h孵化出D幼后,统计卵裂率和孵化率。结果见图5和6。



(标相同字母表示差异不显著($P > 0.05$),标有不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。The same letters mean no significant difference ($P > 0.05$), the different letters mean significant difference ($P < 0.05$.)

图5 长牡蛎受精卵高盐处理10和15 min的卵裂率

Fig. 5 Cleavage rate with treatments of high-salinity under different duration of treatment (10 and 15 min)



(标相同字母表示差异不显著($P > 0.05$),标有不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。The same letters mean no significant difference ($P > 0.05$), the different letters mean significant difference ($P < 0.05$.)

图6 长牡蛎受精卵高盐处理10和15 min的孵化率

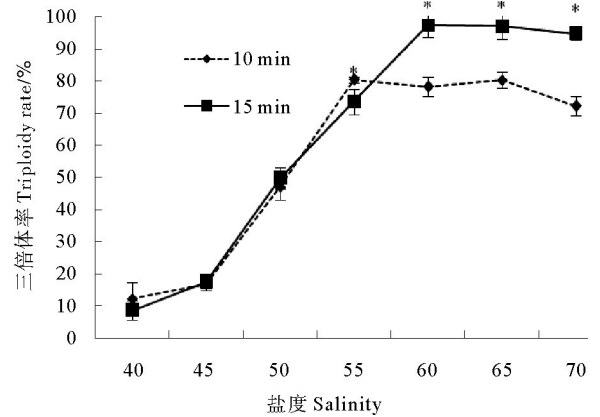
Fig. 6 Hatching rate with treatments of high-salinity under different duration of treatment (10 and 15 min)

从图5和6可看出,随着盐度升高,卵裂率与孵化率逐渐降低,对照组最高。处理10与15 min的对照组的卵裂率与孵化率差异不显著($P > 0.05$),盐度为70时,处理10与15 min组孵化率差异不显著($P > 0.05$),其它各盐度条件下,处理10 min组与处理15 min组,卵

裂率与孵化率差异显著($P < 0.05$)。

2.4 高盐诱导长牡蛎三倍体率的分析结果

用流式细胞仪进行三倍体诱导率检测。测量结果见图7和8。



(*表示差异显著($P < 0.05$)。* In each row mean significant difference ($P < 0.05$.)

图7 长牡蛎受精卵高盐处理10和15 min的三倍体诱导率
Fig. 7 Results of triploidy rate with treatments of high-salinity under different duration of treatment (10 and 15 min)

通过图7可以看出,处理15 min组和10 min组三倍体率均随着盐度的升高而升高,且在盐度为55~70时,两者差异显著($P < 0.05$)。盐度在60~70时,诱导的D幼三倍体率比较高,为90%以上,其中盐度60组最高,处理受精卵15 min,三倍体诱导率为97.13%。当盐度为40时,三倍体率小于10%。当盐度为55时,处理受精卵10 min,三倍体诱导率最高为80.3%。

3 讨论

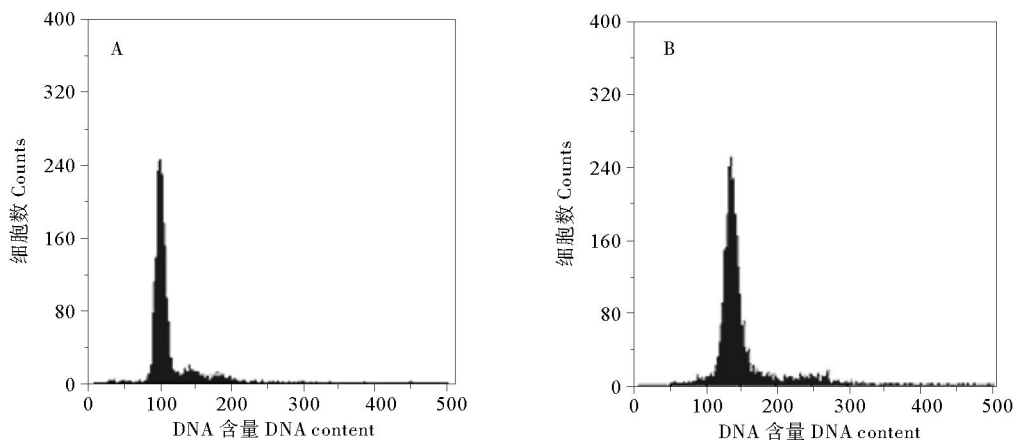
3.1 不同盐度梯度对卵裂和D幼孵化率的影响

不同低盐和高盐梯度处理,会影响受精卵发育(至D型幼虫)过程,不同盐度梯度可引起长牡蛎D幼率明显下降,这一结果与王昭萍、张晨晨及于瑞海等^[8-10]在栉孔扇贝、虾夷扇贝、海湾扇贝中研究的结果一致。这种现象说明不同盐度梯度可能引起牡蛎受精卵发育过程中的渗透压变化,引起一种特定环境胁迫作用,造成发育过程中成活率下降。这一现象有待于进一步开展生理学方面的研究。

3.2 不同盐度、不同处理时间对三倍体诱导效果的影响

本实验在低盐6~10范围内三倍体诱导率最高,当盐度为4时,因盐度过低对受精卵的抑制作用过大,使长牡蛎胚胎发育无法继续发育,因此,没有D型幼虫孵出,这与扇贝^[8-10]的实验结果相似。

本实验在高盐55~60范围内获得的三倍体诱导率最高;当盐度为70时,因盐度较高对受精卵的抑制作用较大,影响了长牡蛎受精卵的胚胎发育,因此,D



(A:对照组; A: Control; B: 盐度为 60 的诱导组; B: Group induced by salinity of 60.)

图 8 高盐诱导的长牡蛎的流式细胞仪倍性检验结果

Fig. 8 Ploidy level revealed by Flow Cytometry induced by treatments of high-salinity

型幼虫孵化率较低。

处理盐度相同,处理时间也存在“最适”现象,本实验范围内 15 min 的处理效果好于 10 min。本实验的长牡蛎最适盐度和最适处理时间和扇贝^[8-10]存在明显差异,可能与物种不同有关。

3.3 盐度诱导三倍体与其他方法的比较

三倍体诱导自研究初期便采用多种方法,包括物理、化学、生物方法,也进行了一些对比工作。与理化方法相比,生物杂交可产生全三倍体,一度吸引研究方向转向四倍体的研究,但因价格昂贵,研究者在探讨新的方法。物理方法普遍采用的是温度休克,与化学诱导三倍体相比,方法安全但诱导率低。盐度诱导是近年提出的新的物理诱导方法,已在虾夷扇贝^[8]、栉孔扇贝^[9]、海湾扇贝^[10]、太平洋牡蛎^[11]中进行验证,三倍体诱导率非常高。本研究中太平洋牡蛎的诱导条件与已报道的虾夷扇贝的诱导条件不同,可能与物种不同有关,但两者获得的三倍体组幼虫均表现出明显的生长优势。

王清印等认为化学诱导剂 6-DMAP 能有效抑制受精卵的染色体分离和原核移动而产生三倍体,未发现对胚胎发育造成明显的不良影响^[12]。但这种化学试剂的残留对三倍体贝类食用安全是否具有潜在隐患还有待于进一步的探讨。目前低渗透诱导三倍体的作用机理还不明确,王昭萍等^[9]认为可能与低渗引起的能量代谢紊乱影响微管和微丝的形成有关。具体作用机理仍有待于进一步研究。

4 结语

本文以中国北方重要贝类养殖品种长牡蛎为实验材料,采用不同盐度的低盐、高盐来诱导长牡蛎三倍体。通过实验得出的结论为,低盐为 8 和高盐为 60 时,且 40%~50% 的受精卵出现第一极体时,对受精卵处

理 15 min,三倍体诱导率最高分别为 91.0% 和 97.1%。采用盐度处理受精卵诱导三倍体是近年贝类三倍体诱导的新方法,该诱导方法操作简单、成本低廉、无毒,本文提出后高盐诱导长牡蛎三倍体的方法,非常适合在贝类三倍体育苗技术产业化中进行推广应用。

参考文献:

- [1] Stanley J G, Alen S K Jr, Hidu H. Ployploidy induced in the American oyster *Crasostrea virginica* with Cytochalasin B[J]. *Aquaculture*, 1981, 23: 1-10.
- [2] 王昭萍,王如才,于瑞海,等. 多倍体贝类的生物学特性[J]. *青岛海洋大学学报*, 1998, 28(3): 309-403.
- [3] 常亚青,王子臣,杨旦光. 贝类多倍体育种研究现状[J]. *水产科学*, 2002, 21(1): 31-36.
- [4] Guo X, Allen S K Jr. Viable tetraploids in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*(Thunberg), produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids[J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, 3: 42-50.
- [5] Downing S L, Allen S K Jr. Induced triploid in the pacific oysters *Crassostrea gigas*, optimal treatment with Cytochalasin B depend on temperature[J]. *Aquaculture*, 1987, 61: 1-15.
- [6] 于瑞海,王昭萍,王如才,等. 两种方法诱导太平洋牡蛎三倍体在生产上的应用效果[J]. *海洋湖沼通报*, 2003(1): 57-61.
- [7] 田传远,梁英,王如才,等. 6-DMAP 诱导太平洋牡蛎三倍体孵化率和 D 幼畸形率与三倍体诱导率的关系[J]. *青岛海洋大学学报*, 1998, 28(3): 421-425.
- [8] 王昭萍,赵婷,于瑞海,等. 一种新方法-低渗透诱导虾夷扇贝三倍体的研究[J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2009, 39(2): 193-196.
- [9] 张晨晨,王昭萍,于瑞海,等. 低渗透诱导栉孔扇贝三倍体及与其他方法的比较[J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2010, 40(增刊): 71-75.
- [10] 于瑞海,王昭萍,邱炜鹏,等. 低盐诱导海湾扇贝三倍体育苗技术的研究[J]. *渔业科学进展*, 2010, 31(5): 47-51.
- [11] 孔静,王昭萍,于瑞海,等. 低渗透诱导太平洋牡蛎三倍体以及与其他诱导方法的比较[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(3): 581-587.
- [12] 王清印,杨爱国. 栉孔扇贝三倍体研究进展和展望[J]. *中国水产科学*, 2000, 7(3): 93-96.

(下转第 82 页)

Model Tests on Lateral Bearing Capacity of Single Piles Under Cyclic Loads in Saturated Silt

LIU Hong-Jun, ZHANG Dong-Dong, LV Xiao-Hui, WANG Hu

(Ocean University of China, 1. The Key Lab. of Marine Environmental Science and Ecology, Ministry of Education; 2. College of Environmental Science and Engineering, Qingdao 266100, China)

Abstract: Model tests on single pile under static and cyclic loads in saturated silt were carried out. Relationship between pile bending moment and depth, as well as the relationship between pile maximum bending moment and cycle times were obtained by measuring the strain. P-y curves of silty soil under static and cyclic loads were deduced, the API specification related parameters in the silt foundation was given accordingly. Results of single pile tests under cyclic loads showed that in a certain depth range, the ultimate resistance of silt significantly decreased as the cycles of loading increased. Moreover, recommended values of ultimate resistance reduction factor were proposed for silt foundation under different cycles and depth.

Key words: cyclic load; single pile foundation; p-y curve; saturated silty soil

责任编辑 徐环

(上接第 29 页)

A Methodological Study on the Induction of Triploidy Oyster with Different Salinities

YU Rui-Hai¹, WANG Zhao-Ping¹, KONG Jing², SHEN Jian-Ping¹, ZUO Zi-Rong²

(1. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Shangdong Haiyibao Aquatic Products Co., LTD, Yantai 265100, China)

Abstract: Triploidy *Crassostrea gigas* was induced by inhibiting polar body II (PB2) releasing with low salinities (4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16) and high-salinities (40, 45, 50, 55, 60, 65 and 70) when 40%~50% of PB1 were observed. The inducing time was 10 and 15 min, respectively. The results showed that triploid was inducible with both low and high salinities. When the salinity converged to the natural, hatchery rate increased. The difference of cleavage rate among low salinities and reducing times was significant ($P < 0.05$) while the difference of hatchery rate was similar ($P > 0.05$). Flow cytometry analysis showed that the highest triploidization rate was 84.4% (10 min) and 91.0% (15 min) at low-salinities ($S=8$), and the difference of triploidization rate was significant ($P < 0.05$). The differences of cleavage and hatchery rates of high salinities were significant ($P < 0.05$). The highest triploidization rate were 80.3% ($S=55$, 10 min) and 97.1% ($S=60$, 15 min), and the difference of triploidization rate was significant ($P < 0.05$). The zygotes of *C. gigas* induced for 15 min at 8 and 60 salinities when 40%~50% of PB1 appeared could yield the highest triploidy.

Key words: *Crassostrea gigas*; low salinity; high salinity; induction; triploidization rate

责任编辑 朱宝象