

MI 三倍体杂色鲍生长优势的初步比较研究*

黄 勃 张 本

(海南大学水产系 海口 570228)

提要 自 1999 ~ 2001 年在三亚市渔业贸易公司龙坡鲍鱼基地对热带、亚热带暖水型杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 三倍体诱导进行了初步探索研究,采用冷休克抑制第二极体方法获得 MI 三倍体杂色鲍的胚胎、鲍苗及成鲍,并比较了低温:3, 9, 13, 15 °C 及低温与药物相结合两种方式的变化情况,结果表明在水温 13 °C 并结合药物刺激方法产生的三倍成活率、倍化率都比较高,适合于产业化推广。在 2001 年 3 ~ 4 月用此方法共培育 MI 三倍体杂色鲍 1.4×10^5 粒。三倍体与二倍体杂色鲍相比,在生长速度、成活率及出肉率方面都有明显的优势。

关键词 杂色鲍(*Haliotis diversicolor*),三倍体,生长优势

1981 年,Stanley 用 0.5 mg/L 的 CB 诱导牡蛎获得三倍体并报道了生长优势,如三倍体牡蛎的干肉比二倍体高 40%,生长速度快 12%;1984 年,Tabarini 诱导的三倍体海湾扇贝的闭壳肌比二倍体重 73%,其它软体部分重 30%,指出三倍体贝类表现出出肉率高、生长快、抗逆性强等优良性状,生物安全性好。因此,三倍体贝类诱导获得快速发展,如 1993 年 Desrosiers 等报道的太平洋牡蛎、1988 年 Yamamoto 等报道在紫贻贝等多种贝类中都获得了三倍体。鲍鱼三倍体的研究,1986 年 Arai 报道三倍体皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 的诱导。Fujino 1987 年报道抑制第一极体产生的三倍体皱纹盘鲍比二倍体耐高温;衫原顺郎 1989 年报道三倍体皱纹盘鲍比其二倍体平均壳长增加 18% ~ 25%、体重增加 53% ~ 77%;1990 年王子臣等人报道了三倍体皱纹盘鲍在中国大连诱导成功。

杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 属暖水型热带、亚热带品种,1990 年容寿柏等人报道九孔鲍三倍体低温诱导方法的初步探讨,获得了三倍体胚胎,至今尚未见杂色鲍三倍体幼鲍及三倍体成鲍与二倍体生长优势的比较研究,本文报道研究结果。

1 材料与方法

诱导方法:采用低温及低温与药物结合两种方法。诱导水温采用:3, 9, 13, 15 °C,持续时间为 15 min,另加两个对照组。开始处理时间以放出第二极体 60%以上为准。

2 三倍体检查方法

2.1 胚胎阶段及幼体的传统滴片方法倍性检查

取样浓缩后加入含 0.03%秋水仙素的 50%海水

中处理 30 min,除去上清液,加入 25%的海水低渗 30 min。去掉 1/3 低渗液,缓慢地加入 Carnoy 氏固定液(甲醇:冰醋酸=3:1),沉淀后去掉上清液,反复固定 3 次。滴片前去掉固定液,加入 50%的冰醋酸,用吸管轻轻吹打解离成单细胞。用细管把胚胎细胞从 50 cm 高处滴到加热板上温热的洁净载玻片上(40 ~ 50 °C),每片 3 ~ 5 滴,每批样品滴 10 个片子。用 10%的 Giemsa 在 1:1 磷酸二氢钠和磷酸氢二钾缓冲液中(pH 6.8)染色 30 min。自来水冲洗,晾干。在高倍镜下观察和计数染色体,二倍体杂色鲍有 32 条,三倍体有 48 条。

2.2 鲍苗(1.0 ~ 2.5 cm)及成体(大于 2 cm)的传统滴片方法的倍性检查

取杂色鲍于活体头足部肌肉注射 0.04%秋水仙素,按 $3 \sim 5 \times 10^{-6}$ 体重计(含壳重),16 ~ 20 h 后沿头足部肌肉上方剪开外套膜,顺外套膜仔细将整个栉状鳃剪下,尽量去其肌肉,按每段 4 mm 左右剪为 3 ~ 6 段。置 0.075 mol/L KCl 溶液中低渗 30 min。卡诺氏固定液固定 3 次,每次 1 h(换固定液时尽量不摆动鳃组织)。取洁净载玻片,在中心处加 1 滴 45%冰乙酸,轻

* 海南省优秀中青年教师奖励基金项目 hnyqj02 号;海南省自然科学基金资助项目 hnz04 号;课题完成得到上海水产大学李思发教授、中国科学院海洋研究所张国范教授的关注,以表谢忱。

第一作者:黄 勃,出生于 1956 年,教授,研究方向为水产养殖。电话:0898-66281441

收稿日期:2001-08-08;修回日期:2002-02-20

取固定好的鳃段,在45%的冰乙酸液中轻轻摆动几次,使鳃丝细胞脱落其中;取新鲜固定液从约30 cm高度滴于含有鳃细胞的45%冰乙酸液滴中使之迅速铺展。再空气干燥,10%Giemsa染色10 min,常规镜检。二倍体杂色鲍有32条,三倍体有48条。

2.3 鲍苗(1.0~2.5 cm)及成体(大于2 cm)活体的倍性检查

利用PA活体检测上足细胞:道数以精子的荧光强度作为参照,把精子的荧光强度调至50,记下此时的道数:364。轻取少量上足细胞,制备细胞悬浊液,过滤后DAPI染色10 min,在道数为364处检测鲍鱼苗或成体样的DNA相对含量。获得精子的DNA含量为50,二倍体DNA含量为100,三倍体为150。

3 结果与讨论

1999年12月,在三亚渔业贸易公司鲍鱼基地对三倍体杂色鲍诱导进行初步探索性实验,并建立了研究程序。2000年2~4月,9月,12月获得部分诱导参数,如开始处理时间与极体放出的时间关系、药物剂量及处理时间等,并正式进行批量生产三倍体杂色鲍。2001年1~3月共生产三倍体杂色鲍苗 1.4×10^5 多粒。

3.1 胚胎阶段

低温处理时,水温为3℃时三倍体诱导率为32%,成活率为0;9℃时诱导率为60%,成活率为11%;13℃诱导率为65%,成活率46%;15℃时诱导率为43%,成活率50%;对照组成活率为62%。

药物与低温结合的方法诱导结果:水温3℃时,三倍体诱导率为38%,成活率为0;9℃时诱导率为67%,成活率为10%;13℃时诱导率为70%,成活率

为56%;15℃时诱导率为60%,成活率为53%;对照组成活率为65%。

3.2 1.0~2.5 cm的鲍苗阶段

二倍体对照组平均壳长为1.8 cm,成活率为86%。三倍体的平均壳长为2.22 cm,成活率为93%。三倍体比二倍体生长速度快20%。

3.3 成鲍阶段

4~7 cm成鲍与同等壳长二倍体比较,三倍体比二倍体体重增加20%。

综上所述,与二倍体相比,三倍体杂色鲍不管在什么发育阶段,都表现出明显的成长优势。不同的水温处理,其诱导率及成活率差异明显,水温为3℃时诱导率低,成活率为0,水温9℃时,虽能获得一定数量的三倍体杂色鲍,但成功率很低。水温为15℃时,幼体成活率高,但诱导率低。从实验结果来看,水温13℃左右,诱导三倍体杂色鲍较为理想。在上述两种诱导方法中,低温与药物结合使用,三倍体的倍化率比只用低温诱导效果要好。

3.4 讨论

杂色鲍三倍体低温诱导结果与其它鲍类存在一定差异。据报道,皱纹盘鲍三倍体诱导采用低温冷休克:3~8℃,效果好,具有一定的生产价值。杂色鲍的诱导温度低于9℃时存活率、倍化率都很低,无生产价值。造成差异的原因估计是种间生物学特性引起的,尤其是地域水温的差异。胚胎阶段总体上与容寿柏等人的实验结果一致,存在的差异是在冷休克的最佳温度上的差异,原因有待于进一步探讨。由于未对三倍体的诱导进行深入研究,所以有许多问题尚需进一步探讨,如MII多倍体诱导,其他诱导方法的对比研究,四倍体杂色鲍的诱导等。

RESEARCH OF MII TRIPLOID *Haliotis diversicolor* GROWTH AND ITS SURVIVAL RATE

HUANG Bo ZHANG Ben

(Department of Fisheries, Hainan University, Haikou, 570228)

Received: Aug., 8, 2001

Key Words: *Haliotis diversicolor*, Triploid, Growth advantage

Abstract

MI triploid *Haliotis diversicolor* were produced by cold shock, low temperature and medicine. Triploid and diploid eggs were induced in 1999 and sampled in 2000. Results obtained by flow cytometry were verified by chromosome counts. Survival rate and triploid rate are higher when induced by medicines and water temperature of 13℃. 1.4×10^5 individuals of MII triploid *Haliotis diversicolor* were induced in April of 2001. Compared with diploid *Haliotis diversicolor*, triploid *Haliotis diversicolor* have many advantages of growth rate, survival rate and net weight. (本文编辑:李本川)