

研究简报

栉江珧解剖卵的体外促熟研究*

李浩浩, 王昌勃, 于瑞海, 牟宗宝, 李琪**

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 本研究探讨了在不同浓度或不同处理时间下氨海水、5-羟色胺、多巴胺和维生素对栉江珧(*Atrina pectinata*)解剖卵的促熟作用。通过体外浸泡的方法处理栉江珧卵母细胞使其成熟,并完成人工授精。研究表明:浓度0.008%~0.014%的氨海水处理40~60 min可显著提高栉江珧解剖卵的生发泡破裂率和受精率($P < 0.05$),且胚胎的畸形率较低,栉江珧解剖卵的促熟效果最好;而5-羟色胺、多巴胺和维生素对栉江珧解剖卵的体外促熟的效果不明显。通过人工授精、早期胚胎发育观察,本研究阐明了栉江珧卵子的最佳促熟条件,得到了育苗生产所需的幼虫量,为确立栉江珧人工育苗技术提供了基础资料。

关键词: 栉江珧;体外促熟;卵细胞;浓度;时间

中图分类号:S968.3

文献标志码:A

文章编号:1672-5174(2015)12-038-05

DOI: 10.16441/j.cnki.hdx.20140357

栉江珧(*Atrina pectinata*)隶属于软体动物门(Mollusca)瓣鳃纲(Lamellibranchia)贻贝目(Mytiloidea)江珧科(Pinnidae)江珧属(*Atrina*)^[1],俗称“海锹”、“大海红”,广泛分布于温、热带泥沙质近海海域,在中国渤、黄、东、南海均有分布。江珧柱肉质细嫩肥白,营养丰富,深受国内外市场的欢迎^[2]。近年来,由于环境污染和过度捕捞,造成栉江珧野生资源总量急剧减少,产量难以满足市场消费需求^[3]。为了提高产量,国内外学者开展了栉江珧的人工育苗和养殖技术等方面的研究^[4-5],发现栉江珧排卵较难,即使亲贝性腺饱满、成熟度高,自然排卵和人工催产仍很困难,这制约了栉江珧的人工育苗及规模化生产。而解剖法是一种快速、方便的育苗方式^[6],但在栉江珧育苗中应用很少。

贝类的繁殖中,精子活力和卵子的成熟度是决定受精作用和胚胎发育顺利的关键因素^[7]。目前,在双壳贝类人工育苗中常会遇到如何获取成熟卵子的问题,而双壳贝类的卵子多是分批成熟的,解剖获得的卵子存在成熟度不够及发育不同步的现象,即使亲贝性腺成熟度高,解剖获取的卵子仍需要体外促熟,才能受精和正常发育^[8]。目前,国内外学者开展了氨海水、5-羟色胺(5-HT)、多巴胺、维生素等药物在不同浓度、不同处理时间下对双壳贝类解剖卵的体外促熟研究^[9-12],为栉江珧体外促熟研究提供了借鉴。

栉江珧属于减数第一次分裂中期受精,解剖出的成熟卵大都处于减数第一次分裂前期,需要对卵子促熟,才能使其成熟^[13]。本实验用不同浓度的氨海水、5-羟色胺、多巴胺和维生素在不同处理时间下对栉江珧解剖卵进行促熟,通过观察生发泡破裂(Germinal Vesicle Break down, GVBD)^[14]、受精和畸形情况,分析得出栉江珧解剖卵适宜的促熟药品及其最适浓度、最适授精时间,建立栉江珧解剖卵的体外促熟技术,并进行育苗生产应用试验,规模化培育了育苗生产所需的幼虫,为建立相关类型贝类解剖卵的体外促熟技术和栉江珧人工育苗提供了基础资料。

1 材料与方法

1.1 精卵的获得

实验用栉江珧亲贝为烟台海区养殖的成熟2~4龄贝。亲贝经过暂养稳定后,挑选发育良好的亲贝,解剖获得精卵^[15]。将卵液用100目筛绢滤去较大组织块后,再用400目筛绢去除组织液和微小杂质;精液用300目筛绢过滤,收集。检查精卵状态,选用活性好的精子和成熟度高的卵子用于实验。

1.2 卵母细胞的促熟

1.2.1 药物浓度实验 室温下(23±1℃)用10 mL离心管分别加入等量卵液,再加入等量不同浓度的处

* 基金项目: 国家十二五科技支撑计划项目(2011BAD13B01);国家海洋公益性行业科研专项(201305005);山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2012HZ020)资助

收稿日期: 2014-10-30;修订日期: 2015-04-17

作者简介: 李浩浩(1991-),男,硕士生,主要从事贝类遗传育种研究。E-mail: haohaoli1110@126.com

** 通讯作者: E-mail: qili66@ouc.edu.cn

理液,控制卵密度为 500~1 000 个/mL,摇匀计时。氨海水处理浓度梯度设定为 0.002%、0.008%、0.014%、0.020%和 0.026% (以分析纯氨水 25%~26% 为 100%);5-羟色胺处理浓度梯度设定为 1、2、3 和 4 mmol/L;多巴胺处理浓度梯度设定为 0.001、0.01、0.1 和 1 mmol/L;维生素(维生素 A、维生素 B1、维生素 B2、维生素 B12、维生素 B6、维生素 D3、维生素 E、维生素 K3 和维生素 C 混合)处理浓度梯度设定为 0.5、2、10 和 30 mg/L,处理时间为 40 min。

1.2.2 处理时间实验 室温下(23±1℃),用 10 mL 离心管分别加入等量卵液,再加入海水、0.014% 的氨海水、2 mmol/L 的 5-羟色胺、0.01 mmol/L 的多巴胺和 2 mg/L 的维生素处理液,控制卵密度为 500~1 000 个/mL。摇匀计时,处理时间梯度设定为 20、40、60、120、180 和 240 min。选用在正常海水中浸泡的卵母细胞作为对照,每组实验设 3 个平行。

1.3 人工授精

取出处理完毕的卵液,用 400 目筛绢过滤,洗去处理液,加入 50 mL 离心管中,再滴入 1~2 滴活力旺盛的精子,摇匀(受精过程中多晃动)。

1.4 栉江珧解剖受精的育苗生产试验:

挑选活力好、外壳无损伤、发育良好的亲贝 6 只(4 雌 2 雄),解剖获得精卵,精子加入装有 300 mL 海水的烧杯中,卵子加入有 3 L 浓度为 0.014% 的氨海水的桶里,摇匀计时,浸泡卵子 40~60 min。取出处理完毕的卵液,用 400 目筛绢过滤,洗去处理液,然后向卵液加入 5 mL 活力好的精子,摇匀 15~20 min,倒入 15 m³ 的育苗池中孵化。

1.5 观察记录

处理液浸泡后,取样进行显微拍照,用于计算生发泡破裂率,受精 2~3 h 后,取样进行显微拍照,照片用于计算受精率和畸形率^[9]。

生发泡破裂率=生发泡破裂的细胞数/总细胞数×100%;

受精率=卵裂的细胞/总细胞数×100%;

畸形率=畸形卵裂的受精卵/总受精卵数×100%。

1.6 数据统计

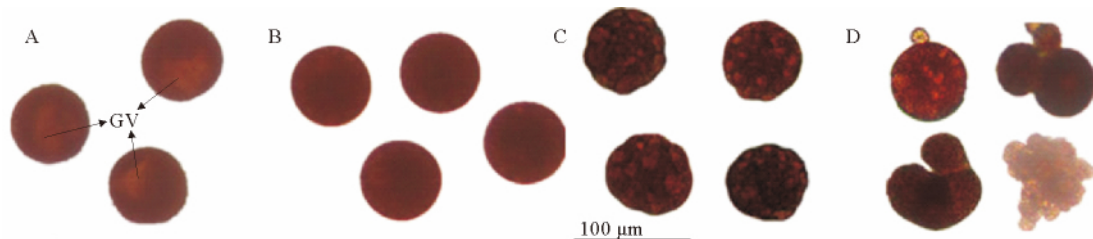
采用 SPSS 19.0 软件对所得数据进行统计分析。用单因素方差分析(ANOVA, Duncan)对实验组与对照组的差异进行显著性 *t* 检验,以 $P<0.05$ 作为差异显著水平。

2 结果

2.1 栉江珧卵细胞形态变化

解剖获得的栉江珧卵母细胞经过海水浸泡和药物处理后生发泡发生了不同程度的破裂。一般情况下,生发泡破裂标志着卵细胞的成熟^[16],因此观察卵细胞生发泡形态,对栉江珧解剖受精有重要的作用。生发泡未破裂的卵细胞卵质不均匀,且卵细胞中有白色的区域(见图 1A);生发泡破裂的卵细胞卵质均匀,且卵细胞无白色区域(见图 1B)^[17-18]。

氨海水、5-羟色胺、多巴胺、维生素等药物对卵细胞有一定的副作用,适宜的浓度和处理时间促熟的卵细胞受精后,可以正常发育(见图 1C);浓度过高或处理时间太长,卵子呈现不受精、发育过慢、发育畸形等情况(见图 1D)。



(A: 生发泡未破裂的卵细胞; B: 生发泡破裂的卵细胞; C: 正常发育的受精卵; D: 畸形卵。A: Oocytes with Germinal Vesicle; B: GVBD of oocytes; C: The normal fertilized egg; D: Malformation.)

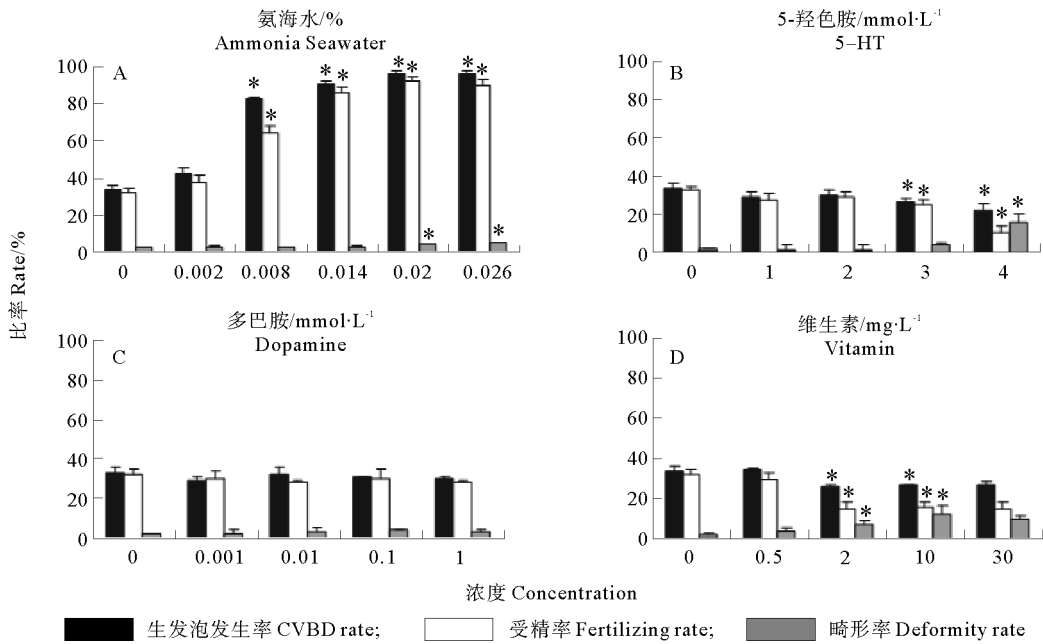
图 1 栉江珧卵的形态差异

Fig. 1 Morphology changes of oocyte stripped from *A. pectinata*

2.2 药物浓度对栉江珧解剖卵的促熟作用

浓度 0.008% 以上的氨海水显著提高了栉江珧解剖卵的生发泡破裂率和受精率($P<0.05$),但当氨海水浓度超过 0.020% 时,畸形率显著增大($P<0.05$) (见图 2A)。5-羟色胺对栉江珧解剖卵的体外促熟效果不明显,不能提高生发泡破裂率和受精率,且浓度超过 3 mmol/L 的 5-羟色胺溶液会抑制生发泡破裂和受精,

导致畸形率显著升高($P<0.05$) (见图 2B)。多巴胺对栉江珧解剖卵的生发泡破裂率、受精率和畸形率没有影响(见图 2C)。维生素对栉江珧解剖卵的体外促熟效果不明显,不能提高生发泡破裂率和受精率,且浓度超过 2 mg/L 的维生素溶液会抑制生发泡破裂和受精,导致畸形率显著升高($P<0.05$) (见图 2D)。故浓度为 0.008%~0.014% 的氨海水,促熟效果最好。



(图中*与对照(浓度0)之间有显著性差异($P < 0.05$)。Data with * were significantly different from control($P < 0.05$).)

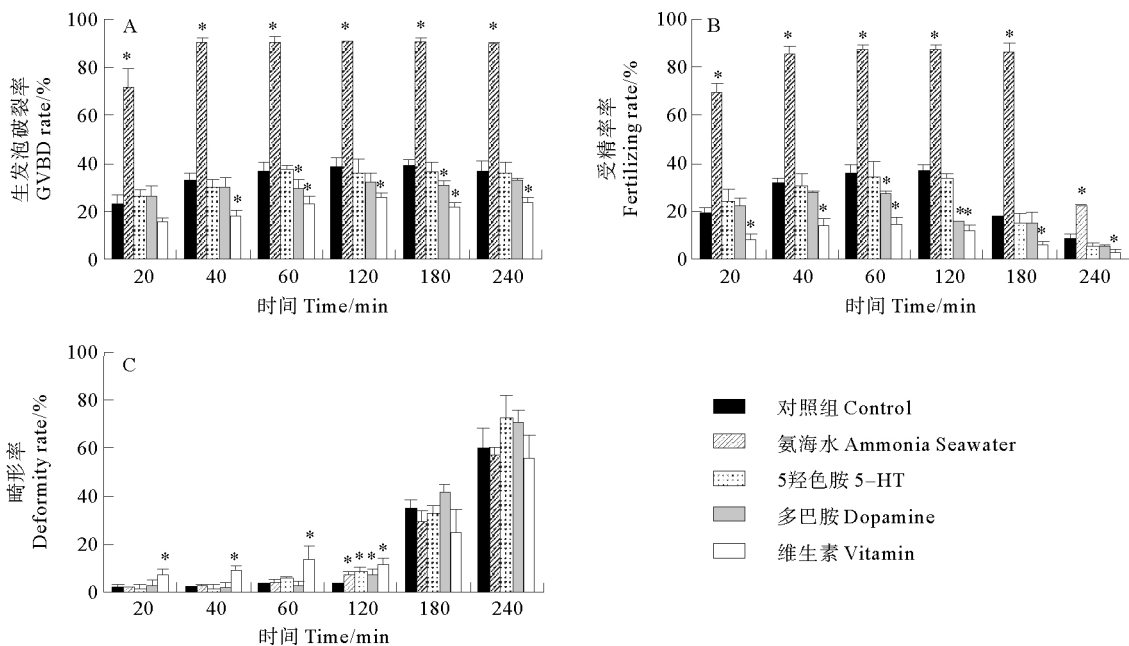
图2 药物浓度对栉江珧卵细胞催熟的影响

Fig. 2 The effect of drug concentration on maturation of oocyte stripped from of *A. pectinata*

2.3 处理时间对栉江珧解剖卵的促熟作用

海水、氨海水、5-羟色胺、多巴胺和维生素浸泡的卵,随着处理时间(20~240 min)的增加,生发泡破裂率和畸形率增加,受精率先增加后减小。生发泡破裂率在40或60 min增加到最大值并保持稳定,受精率在40或60 min增加到最大值,在180 min左右减小,畸形率在120~240 min,显著高于其他组($P < 0.05$)。5-羟色胺、多巴胺和维生素的促熟效果和同时间的海水处理组一致,氨海水优于其他各组(见图3)。

氨海水处理40 min,浸泡卵的生发泡破裂率达到最大值90%,显著高于同时间的海水处理组的33% ($P < 0.05$) (见图3A);受精率在40 min达到最大值88%,显著高于同时间的海水处理组的31% ($P < 0.05$),在240 min时,受精率显著减小(见图3B);胚胎发育的畸形率方面,处理120 min时,氨海水浸泡卵的畸形率(9%左右)显著高于同时间的海水处理组(3%) ($P < 0.05$),在240 min时,畸形率达到了60% (见图3C)。故药物处理时间范围控制在40~60 min,促熟效果最好。



(图中*与对照之间有显著性差异($P < 0.05$)。Data with * were significantly different from control($P < 0.05$).)

图3 处理时间对栉江珧卵细胞催熟的影响

Fig. 3 The effect of drug processing time on maturation of oocyte stripped from of *A. pectinata*

2.4 栉江珧解剖授精的育苗生产

经过解剖产卵,6 个亲贝(4 雌 2 雄),共得到 0.81 亿粒卵,受精率为 80%,在水温 26 °C、盐度 30 的海水中孵化,孵化率为 78%,共选出 D 型幼虫 0.56 亿个。经过解剖授精和人工升温促熟产卵的栉江珧亲贝在产卵量、受精率、孵化率等方面比较没有显著差异^[7],因此,采用栉江珧解剖卵的体外促熟技术,进行栉江珧的人工育苗是可行的。

3 讨论

3.1 栉江珧卵母细胞成熟及体外促熟的可行性

卵子的成熟度是双壳类遗传育种中十分关注的问题,卵母细胞的成熟对动物卵子的受精以及以后的发育过程是至关重要的,很大程度决定了育苗的成败^[19]。卵的大小和形状,生发泡是否存在及细胞器的状态等都被作为判断卵成熟度的依据^[20],因此在栉江珧解剖卵体外促熟过程中,应选择卵径在 65 μm 左右,形状圆整的卵细胞。解剖获得的栉江珧的卵母细胞处于第 1 次减数分裂的前期阻滞状态,经过激活,会在第 1 次减数分裂的中期发生第 2 次阻滞,之后通过受精作用的激活完成整个减数分裂过程,进一步发育成 D 型幼虫。本研究发现,生发泡未破裂的卵细胞,不受精,生发泡破裂的卵细胞,其受精率高达 97%,故卵细胞生发泡破裂意味着卵母细胞的成熟。

本研究用氨海水、5-羟色胺、多巴胺和维生素对栉江珧的解剖卵进行处理,发现氨海水能有效地促使卵母细胞生发泡破裂,生发泡破裂率可高达 90%,受精率高达 88%;5-羟色胺、多巴胺和维生素对栉江珧解剖卵的体外促熟不明显,不能提高生发泡破裂率和受精率。因此,氨海水可以有效的促进栉江珧解剖卵的成熟,这为进一步的试验及栉江珧人工育苗提供了良好的基础。

3.2 药物浓度和处理时间对栉江珧解剖卵受精发育的影响

多数研究人员认为,生发泡破裂意味着卵母细胞启动了减数分裂,是卵子成熟最明显的标志^[14],但卵母细胞的成熟最终是为了受精并发育成 D 型幼虫。因此,受精率和畸形率是检验促熟效果的最好评定标准。但药物浓度和处理时间对受精率和畸形率有很大的影响,多项研究表明,低浓度的药物处理,受精率随着浓度的增加而增加,当浓度值超过一定值时,随着浓度的增加,受精率降低,畸形率增大;短时间的药物处理,受精率随着时间的增加而增加,当处理时间超过一定值时,随着时间的增加,受精率降低,畸形率增大^[9,17,21]。

氨海水、5-羟色胺、多巴胺和维生素浓度和处理时间对卵促熟有影响^[9,21-22]。本研究发现,浓度为

0.008%~0.014%的氨海水可显著提高栉江珧解剖卵的生发泡破裂率和受精率,且胚胎发育的畸形率较低,5-羟色胺、多巴胺和维生素对栉江珧解剖卵的体外促熟效果不明显;各药物处理时间为 40~60 min 时,生发泡破裂率和受精率均达到最大值,畸形率较低。因此,对解剖卵体外促熟时,药物浓度和处理时间控制在一定范围内,可以保证高受精率和低畸形率,对育苗的成功至关重要。

3.3 解剖授精在生产育苗中的应用

对于双壳贝类,采用解剖取卵、人工授精进行繁育的研究报道,主要集中在太平洋牡蛎^[6]、紫扇贝^[23]、旗江珧^[24]和菲律宾蛤仔^[25]等几种贝类中。实验发现,栉江珧解剖卵在浓度为 0.008%~0.014%的氨海水处理 40~60 min 能够达到很好的促熟作用,方法比较简单,在生产育苗实验中也取得了很好的效果,因而对于栉江珧这类个体大、怀卵量大以及对外界因素刺激不敏感的双壳贝类,解剖法在实验及生产中是一种可取的方法。

参考文献:

- [1] 任建峰,杨爱国. 栉江珧研究现状及开发利用前景 [J]. 海洋水产研究, 2005, 26(4): 84-88.
- [2] Munguia P, Miller T E. Habitat destruction and metacommunity size in pen shell communities [J]. J Anim Ecol, 2008, 77(6): 1175-1182.
- [3] Tabata T, Hiramatsub K, Haradab M. Numerical analysis of convective dispersion of pen shell *Atrina pectinata* larvae to support seabed restoration and resource recovery in the Ariake Sea, Japan [J]. Ecological Engineering, 2013, 57: 154-161.
- [4] Satoshi O, Akihiko F, Hiroshi O, et al. The rearing of the pen shell *Atrina pectinata* larvae and juveniles (Preliminary note) [J]. Aquaculture Sci, 2008, 56(2): 181-191.
- [5] 张红云,严正凛,张静. 栉江珧生物学及人工育苗研究进展 [J]. 上海海洋大学学报, 2009, 18(5): 623-628.
- [6] 任素莲,绳秀珍,王如才,等. 太平洋牡蛎卵子体外发育的研究 [J]. 海洋科学, 2001(7): 35-38.
- [7] 于瑞海,王昭萍,李琪,等. 栉江珧亲贝室内升温促熟培育技术的研究 [J]. 海洋湖沼通报, 2010(1): 31-35.
- [8] 梁中波. 斗嫁(虫戚)配子体外促熟、早期胚胎发育及消化器组织研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012.
- [9] 邱炜鹏,王昭萍,于瑞海,等. 氨海水与 5-羟色胺对栉孔扇贝解剖卵的体外促熟作用 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2011, 41(4): 46-50.
- [10] Hui W, Jiahui L, Hongshuai Y, et al. Effect of simultaneous variation in temperature and ammonia concentration on percent fertilization and hatching in *Crassostrea ariakensis* [J]. Journal of Thermal Biology, 2014, 41: 43-49.
- [11] Terjesen B F, Finn R N, Norberg B, et al. Kinetics and fates of ammonia, urea, and uric acid during oocyte maturation and ontogeny of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) [J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2002, 131

- (2): 443-455.
- [12] 王昭萍, 王如才, 郑晓东. 维生素及海水浸泡对牡蛎卵子的体外促熟作用 [J]. 海洋湖沼通报, 1997(2): 70-75.
- [13] Yukio M, Kengo S, Tatsuya Y, et al. Maturation Process of Broodstock of the Pen Shell *Atrina pectinata* (Linnaeus, 1767) in Suspension Culture [J]. Journal of Shellfish Research, 2009, 28(3): 561-568.
- [14] Reyes R, Pulakat L, Miledi R, et al. Mammalian AT2 receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes couple to endogenous chloride channels and stimulate germinal vesicle break down [J]. Cell Physiol Biochem, 2009, 24(1-2): 45-52.
- [15] Allen R D. Fertilization and artificial activation in the egg of the surf clam *Spisulasolidissima* [J]. Biol Bull, 1953, 105: 213-239.
- [16] Lourenco B, Sousa A P, Almeida-Santos T, et al. Relation of cumulus cell status with single oocyte maturity, fertilization capability and patient age [J]. J Reprod Infertil, 2014, 15(1): 15-21.
- [17] 刘晓赫. 氨海水和 5-羟色胺对海湾扇贝 (*Argopecten irradians Lamarck*) 解剖卵的体外促熟研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [18] Masui Y, Clarke H J. Oocyte maturation [J]. Int Rev Cytol, 1979, 57: 185-282.
- [19] Enriquez-Diaz M, Caceres-Martinez C, Chavez-Villalba J, et al. Gametogenesis of *Atrina maura* (Bivalve: Pinnidae) under artificial conditions [J]. Invertebrate Reproduction & Development, 2003, 43(2): 151-161.
- [20] Yuan Y, Toru T, Makoto O, et al. Isolation and functional characterization for oocyte maturation and sperm motility of the oocyte maturation arresting factor from the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2012, 179: 350-357.
- [21] 姚岚, 孙立民. 皱纹盘鲍卵受精时间对受精率及孵化率的影响 [J]. 水产科学, 2002, 21(4): 7-8.
- [22] 董燕妮. 5-羟色胺和切眼柄对日本囊对虾卵巢协同促熟效应的研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2014.
- [23] Gloria M, Livia M, Miguel A P, et al. A method to eliminate self-fertilization in a simultaneous hermaphrodite scallop [J]. Aquaculture, 2007, 273: 459-469.
- [24] 叶富良, 余祥勇, 王梅芳, 等. 旗江珧早期胚胎发育的初步研究 [J]. 海洋科学, 1999(4): 62-65.
- [25] 刘青, 张越, 马师荃. 菲律宾蛤仔的研究进展 [J]. 河北渔业, 2011(1): 56-59.

Studies on Maturation Promotion in Vitro of Oocytes Stripped from the Pen Shell *Atrina pectinata*

LI Hao-Hao, WANG Chang-Bo, YU Rui-Hai, MU Zong-Bao, LI Qi

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: To test the effect of ammonium seawater, 5-HT, dopamine and vitamin at different concentrations and times of exposure on the maturation of oocytes stripped from *Atrina pectinata*, oocytes were treated with these drugs *in vitro*, and then fertilized artificially. Results showed that the concentration of 0.008%~0.014% of ammonium seawater and treatment time of 40~60 min on the maturation of oocytes was best, can improve germinal vesicle breakdown (GVBD) rate and fertilization rate of *A. pectinata* oocytes remarkably ($P < 0.05$), and the deformity rate was low in embryonic development. However, 5-HT, dopamine and vitamin were not obvious on the maturation of oocyte. In this research, we obtained the great amount of larvae of *A. pectinata* for the seed production, clarified the best condition on the maturation of oocytes stripped from *A. pectinata* through artificial insemination and observation of early embryonic development. Our findings provided the basis for the artificial breeding of *A. pectinata*.

Key words: *Atrina pectinata*; maturation improvement; oocyte; concentration; time

责任编辑 朱宝象