

不同积温情况下栉孔扇贝雌性生殖腺中磷脂、核酸及水分的含量变化

周丽青, 杨爱国, 刘志鸿, 王清印

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 为研究某些生化组分与栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 雌性生殖腺成熟情况的关系, 在亲贝促熟的后期, 对不同积温情况下栉孔扇贝雌性生殖腺中的磷脂、核酸及水分的含量进行测定。结果表明, 磷脂含量、RNA/DNA 值及水分含量均随着积温升高 (从 210℃ 到 300℃) 而增加, 但成熟的卵子一经产出后, 雌性生殖腺中的磷脂含量、RNA/DNA 值及水分含量均降到最低。组织切片的结果表明雌性生殖腺中的卵子在成熟过程中体积明显增大, 以至于滤泡中充分成熟的卵子被挤压成不规则形状, 细胞核的核膜和核仁在卵子排出去之前一般都消失。成熟卵子产出后的滤泡中出现空泡, 未能排出的卵子部分被滤泡吸收, 形态模糊。

关键词: 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*); 积温; 雌性生殖腺; 磷脂; RNA/DNA 值; 水分含量
中图分类号: S985.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096 (2007) 09-0019-05

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 是一种重要的海水经济贝类, 能否准确鉴定栉孔扇贝生殖腺成熟度, 是精确掌握亲贝成熟至排放精卵的时间, 成功进行大规模人工育苗的关键, 按计划组织生产意义重大, 但至今未能找到非常可靠的预报方法, 生产上常采用的方法是观察生殖腺饱满程度^[1], 计算性腺成熟系数 (GSI)^[2]或计算有效积温^[3], 多为经验值, 不完全可靠。贝类组织内的磷脂、核酸和水分等成分在不同种类和发育阶段中的含量均有变化, RNA/DNA 值曾一度被用作鱼类或其他生物的生长指标^[4-5], 它们是否与扇贝生殖腺成熟度相关, 为此, 作者对不同积温情况下生殖腺中磷脂、核酸及水分的含量进行分析, 旨在为栉孔扇贝人工育苗提供基础资料和科学依据, 以期找到一种简便快速的方法来鉴定栉孔扇贝生殖腺的成熟度。

1 材料和方法

1.1 材料

2005 年 3 至 4 月份, 从山东省青岛市志诚水产

科技开发有限公司供人工育苗用畜养的亲贝中随机挑取雌性栉孔扇贝 2~3 枚, 立即剖取其生殖腺置于液氮罐中保存并运回实验室, 再转移至超低温冰箱中保存。该公司畜养的亲贝于 2005 年 2 月 28 日入池, 入池水温 3.2℃, 4 月 10 日雌性栉孔扇贝大规模产卵。取样时间、水温和积温见表 1。

1.2 方法

1.2.1 生殖腺切片制作

现场剖取生殖腺时, 立即切取 2~3 mm 厚生殖腺组织置于 Bouin 氏液中固定 4~6 h, 更换至 70%乙醇中, 所固定的样品经酒精系列脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, LeicaRM 2145 型切片机切片, 切片厚度为 5

收稿日期: 2007-06-18; 修回日期: 2007-07-16

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (2006AA10A408); 国家科技支撑计划专题项目 (2006BAD01A00)

作者简介: 周丽青 (1974-), 女, 湖南祁东人, 硕士, 助理研究员, 从事贝类遗传育种研究, 电话: 0532-85811982, E-mail: zhoulq@ysfri.ac.cn

µm。Harris 氏苏木精-伊红染色,中性树胶封片, Nikon 显微镜 (10×20) 观察并拍照。

表 1 取样时间、水温 and 积温

Tab. 1 The sample time, water temperature and accumulated temperature

项目	取样时间 (月-日)				
	03-28	04-01	04-05	04-10	04-11
水温 (°C)	14	15	15.6	16	16
积温 (°C)	160	210	250	300	-

1.2.2 生殖腺水分含量的测定

分别从所保存的样品个体中取部分生殖腺用电子天平称其鲜质量, 60°C 烘干至质量恒定 (约需 18~20 h), 并计算其含水量。

1.2.3 磷脂含量的测定

参照张韵梅^[6]的研究方法, 以样品个体为单位, 各取一部分生殖腺, 快速称质量, 加入少量预冷的 20% 三氯乙酸 (TCA), 匀浆。用 20% (TCA) 1.5 mL 提取, 4 000 r/min 冷冻离心 10 min, 倾出离心液, 再用 10% TCA 重复提取。将沉淀用 1.5 mL 预冷的无水乙醇提取 2 次, 在冰浴中搅拌成悬浮液, 4 000 r/min 冷冻离心 10 min, 合并上清液。再用乙醇和乙醚 3 : 1

混合液 1.5 mL 提取 2 次 (从这一步开始可在室温下进行, 而以前各步骤要求在 0~4 °C 进行), 搅拌离心, 合并所有脂溶性的提取物, 供测定磷脂用。磷脂含量测定用钼蓝比色法。

1.2.4 核酸含量的测定

参照张韵梅的研究方法^[6]。将已除去脂溶性物质的沉淀物作为提取 RNA 用, 用 1.5 mL 1 mol/L NaOH 溶液使 RNA 降解为核苷酸。在 37 °C 恒温水浴上保温 4~5 h (如果溶解状态不匀, 则需延长到 8 h), 当水解液呈均匀液体时, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。在 1.5 mL 碱水解液中加入 6 mol/L HCl (按摩尔数比 HCl : NaOH = 3 : 1 加入) 750 µL, 加 7.75 mL 水稀释至 NaCl 浓度为 0.15 mol/L, 放置冷却, 离心, 上清液供测定 RNA 用, 沉淀供测定 DNA 用。取全部沉淀物, 加入 10% 高氯酸 (PCA) 95 °C 水解 15 min, 冷却。用紫外分光光度法 (波长 260 nm) 测定 RNA 和 DNA 含量。并计算其 RNA/DNA 值。以上提取和测定步骤至少重复两次。

2 结果与讨论

不同积温情况下栉孔扇贝雌性生殖腺中磷脂、水分及核酸的含量见表 2 和表 3。

表 2 不同积温情况下栉孔扇贝生殖腺中磷脂及水分的含量变化

Tab.2 Changes of the contents of phospholipid and water at different stages of accumulative temperature in the female gonad

取样时间 (月-日)	样品数 (个)	积温 (°C)	磷脂湿质量比 (%)	水分 (%)	磷脂干质量比 (%)
03-28	2	160	0.351	84.94	2.33
04-01	3	210	0.242	81.48	1.307
04-05	3	250	0.247	82.65	1.424
04-10	2	300	0.311	84.19	1.967
4-11 (产后)	2	-	0.226	79.27	1.283

不同积温情况下栉孔扇贝雌性生殖腺组织切片能反映出生殖腺成熟程度, 3 月 28 日 (图 1-1), 滤泡之间较为疏松, 卵细胞数目还有可能增加, 卵细胞较小但形态规则, 细胞核圆、大而明显, 核仁清晰, 一般 1 个; 4 月 1 日 (图 1-2), 滤泡之间已经变得很紧凑, 卵细胞数目基本恒定, 体积有所增加, 许多卵细胞的核膜边缘变得不清晰; 4 月 5 日 (图 1-3), 大

部分卵细胞核膜和核仁消失, 卵细胞体积进一步增大, 排列紧密, 甚至相互挤压成不规则形状, 仅滤泡边缘有很少很小的营养粒; 4 月 10 日 (图 1-4), 卵细胞体积增至最大, 滤泡之间的界限很不明显, 成熟的卵细胞被相互挤压成不规则形状, 绝大部分卵细胞核膜消失或边界模糊。说明 3 月 28 日至 4 月 10 日是栉孔扇贝雌性生殖腺成熟和繁殖期。4 月 11 日, 蓄养

表 3 不同积温情况下栉孔扇贝生殖腺中 RNA 及 DNA 的含量和比值

Tab.3 Changes of contents of RNA, DNA and their ratio at different stages of accumulative temperature in the the female gonad

取样时间 (月-日)	RNA (%)	DNA (%)	RNA 干质量比 (%)	DNA 干质量比 (%)	RNA/DNA
03-28	1.723	0.355	11.441	2.357	4.854
04-01	1.238	0.456	6.685	2.462	2.715
04-05	1.261	0.417	7.268	2.403	3.028
04-10	1.566	0.380	9.905	2.404	4.121
04-11 (产后)	1.241	0.416	5.986	2.01	2.983

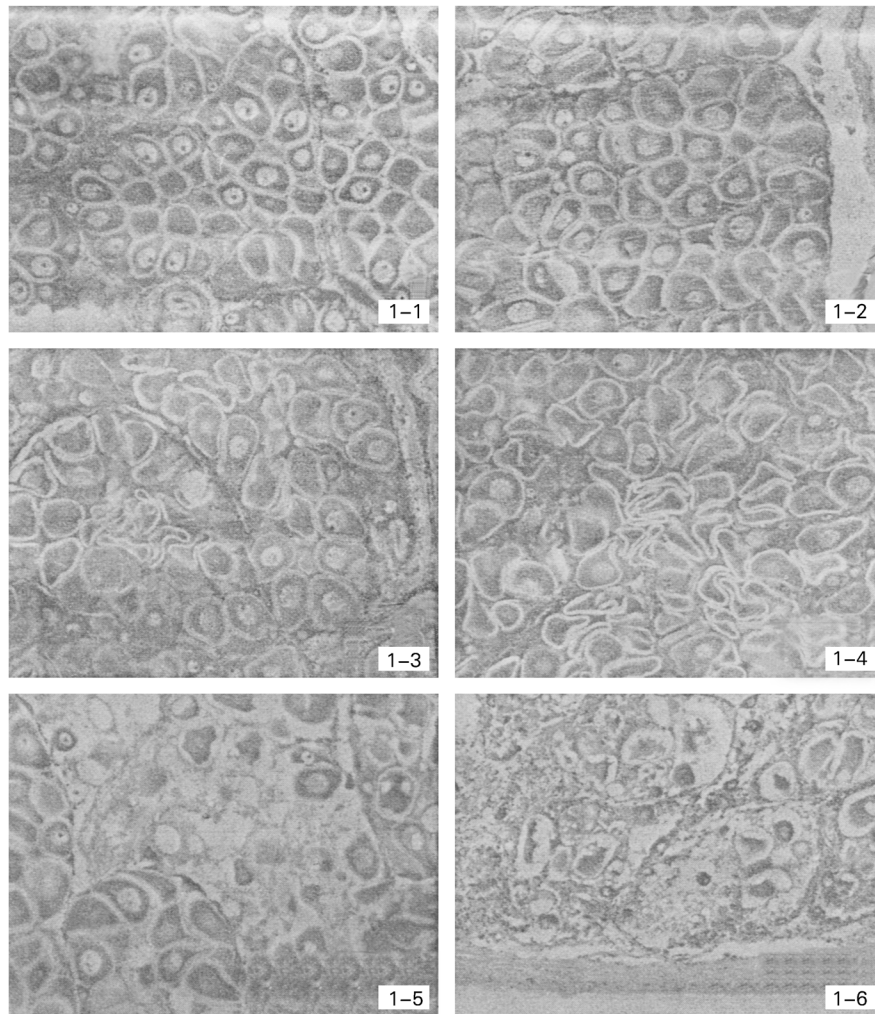


图 1 不同积温情况下栉孔扇贝雌性生殖腺的组织切片

Fig.1 Tissue slices of female scallop *Chlamys farreri* gonad at different stages of accumulative temperature

1-1. 3月28日雌性生殖腺; 1-2. 4月1日雌性生殖腺; 1-3. 4月5日雌性生殖腺; 1-4. 4月10日雌性生殖腺; 1-5. 产后雌性生殖腺, 仅排出少

量卵子, 仍具有细胞核的卵子较多; 1-6. 产后雌性生殖腺, 生殖腺中卵子几乎排空, 滤泡中仅残留为数不多的卵子, 多被滤泡吸收, 变得形态模糊
1-1. The gonad on March 28th; 1-2. The gonad on April 1st; 1-3. The gonad on April 5th; 1-4. The gonad on April 10th; 1-5. The gonad after having spawned only laid out a few eggs, nucleus still existed in most eggs; 1-6. The gonad after having spawned almost laid out all the eggs, only a few eggs remained in follicles, which were assimilated by the follicles and their shape became blurry

亲贝大规模排卵, 不同扇贝个体, 因为卵子成熟不完全同步, 生殖腺排空的程度不同, 如果生殖腺中核膜消失的卵子越多, 排空程度也就越大, 反之, 生殖腺排空程度就越低(图 1-5, 1-6)。生殖腺排空程度低的亲贝经一周的暂养促熟后仍能排放成熟卵。

参照廖承义等^[7]有关栉孔扇贝的生殖周期的研究内容, 得知作者所取研究对象都是处于生殖腺成熟期的雌性扇贝, 栉孔扇贝生殖腺中的磷脂含量在积温过程中变化不太大, 无论是湿质量比还是干质量比, 都呈上升趋势, 在产卵前夕磷脂含量达到最高, 产完卵后磷脂含量降低很明显, 依据生殖腺产空的程度, 磷脂含量降低程度不同, 产的越多, 磷脂含量降低越快, 同时也说明磷脂主要存在卵细胞中。RNA/DNA 值与磷脂含量呈相似的变化趋势。其原因可能是磷脂代谢与蛋白质合成在卵细胞成熟过程中都是由活跃达到峰值再转向静止, 直至扇贝产完卵后再降低。由于不同的栉孔扇贝生殖腺含水量不同, 不同时期的生殖腺含水量也不尽相同, 且随着积温增加, 生殖腺滤泡中的卵细胞体积也在增加。因而单纯从 RNA 与 DNA 湿质量比看不出卵细胞成熟与核酸之间的关系, RNA 干质量比依然保持着与磷脂含量或 RNA/DNA 值相似的变化趋势, 但 DNA 干质量比从 4 月 5 日到产卵前一直保持恒定。说明 4 月 5 日之前, 卵细胞已经完成 DNA 复制, 但 DNA 向 RNA 的转录一直持续到 4 月 10 日, 为卵细胞充分成熟和产出做好准备。

高温对生殖腺中 DNA 和 RNA 含量的影响, 涉及到 DNA 本身复制、DNA 转录成 RNA、RNA 翻译合成蛋白质等相当复杂的系列过程^[8]。3 月 28 日扇贝生殖腺磷脂含量比其他积温时的都高许多, 其原因可能是个体之间的差异造成的, 它们的 RNA 量和 RNA/DNA 值也较其他积温时高, 证明 3 月 28 日所取两个样品均为生殖腺发育非常好的扇贝, 而其 DNA 含量偏低, 且生殖腺切片中卵细胞体积偏小, 滤泡间间隙大, 又说明生殖腺有效积温不够, DNA

尚处在复制当中。至于 4 月 1 日卵巢 DNA 含量偏高, 是因为细胞在分化过程中, 不同组织细胞核 DNA 分子存在着重排、扩增及遗失现象, 这时卵细胞已经开始成熟分裂, 卵细胞核 DNA 复制, 生殖腺 DNA 含量因而增加^[9], 4 月 5 日以后, 卵细胞体积和含水量均增大, 相对来说, DNA 含量会有所下降。

本实验所采用的方法简单快速, 不考虑组织切片所要花费的时间, 测定磷脂、水分及核酸的含量只需要十多个小时, 对不同个体实验材料的操作具有可重复性, 正好与本实验中所用个体生殖腺成熟度相吻合, 因此, 结合生产实践中的育苗经验, 在观察性腺饱满程度的同时, 可借鉴本实验所测得的数据以检验栉孔扇贝生殖腺是否处在产卵的高峰。

参考文献:

- [1] 张春丹, 李祥云. 泥蚶苗种生产技术[J]. 河北渔业, 2005, 140: 23-24.
- [2] 邱盛尧, 杨建敏, 张锡佳, 等. 栉江珧的繁殖生物学[J]. 水产学报, 2000, 24 (1): 28-31.
- [3] 毕庶万, 徐宗发, 于光溥, 等. 海湾扇贝控温育苗采卵时间的预报方法[J]. 海洋与湖沼, 1996, 27 (1): 93-97.
- [4] Frank J. Bulow C B. Coburn J R, et al. Comparisons of two bluegill populations by means of the RNA-DNA ratio and liver-somatic index[J]. *Trans Am Fish Soc*, 1978, 107(6):799-803.
- [5] Buckley L J. RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea[J]. *Marine Biology*, 1984, 80:291-298.
- [6] 张韵梅. 测定昆虫卵巢内核酸、蛋白质等含量的方法研究[J]. 山东农业大学, 1987, 18 (4): 49-54.
- [7] 廖承义, 徐应馥, 王远隆. 栉孔扇贝的生殖周期[J]. 水产学报, 1983, 7 (1): 1-13.
- [8] 叶恭银, 胡萃, 龚和. 高温对珍贵绢丝昆虫——天蚕卵巢生长发育的影响[J]. 生态学报, 2000, 20 (3): 490-494.
- [9] 李赞, 郑晓东, 王昭萍, 等. 牡蛎不同组织细胞核 DNA 含量比较[J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(3): 453-456.

Changes of contents of phospholipid, nucleic acid and water at different stages of accumulative temperature in the female scallop *Chlamys farreri* gonad

ZHOU Li-qing , YANG Ai-guo, LIU Zhi-hong, WANG Qing-yin

(Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute , Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071 ,China)

Received: Jun.,18,2007

Key words: *Chlamys farreri*; accumulated temperature; female gonad; phospholipid; RNA/DNA ratio; water content

Abstract: This study was conducted to find the relationship between some biochemical substance contents and ripeness of the gonad of female *Chlamys farreri*. Changes of the contents of phospholipid, nucleic acid and water in the gonad at different stages of accumulative temperature were analyzed in late period of artificial ripening parent scallops. The results showed that RNA/DNA ratio, content of phospholipid and water increased gradually with the accumulated temperature increasing (from 210 to 300℃), but reduced dramatically after the eggs were spawned. The result of tissue slices showed that the eggs in the follicles became larger and larger so that they were extruded to be abnormal shapes, the nucleus membrane and nucleolus of mature eggs disappeared; vacuoles appeared in the follicles after mature eggs were laid out, and the residual eggs were assimilated by the follicles, at the same time, their shapes became blurry.

(本文编辑:张培新)