

中国对虾三倍体的诱导研究

II. 细胞松弛素B处理

包振民 张全启 王海 高洁* 戴继勋

(青岛海洋大学生物系)

摘要 用细胞松弛素B(C.B)处理中国对虾(*Penaeus chinensis*)的受精卵,诱发三倍体,经培养已获得蚤状幼体.实验所用C.B浓度为 $0.1\sim 2.5\text{mg}/\text{dm}^3$.处理的起始时间是在受精后 $5\sim 20\text{min}$,处理的持续时间为 $10\sim 40\text{min}$.三倍体的诱导率达 62.5% .C.B处理浓度越高,对极体排放的抑制力越强,但胚胎畸形率和非整倍体数量则增多.对虾三倍体的诱导成功,为对虾的多倍体育种提供了可能.

关键词 中国对虾 多倍体 细胞松弛素B

前言

人工诱发多倍体进行遗传和育种研究,以改良水产动物的养殖品种,已日益受到重视^[1].已知三倍体是不育的^[2~4].它们具有个体大^[5]、生长快^[6~8]、肉质好^[9]和成活率高^[10]等特点.70年代以来,已有20多种鱼类诱发获得了多倍体.贝类的多倍体研究是从80年代才开始的,但进展很快,仅几年时间,就有近10个种诱发成功^[11~14].

中国对虾由于雄虾性腺早成熟,明显地影响雄虾生长,因此雌雄对虾在晚秋季节,其体长和体重相差十分悬殊^[15].同时雄虾在秋季交配后,由于体质衰弱,又出现大量死亡.为了阻止对虾性腺的发育成熟,提高雄虾生殖季节的存活率,培育大规格对虾个体,我们开展了对虾的多倍体诱发研究.

关于对虾的多倍体诱发研究,目前在国内外还未见报道.本文报道的是利用细胞松弛素B,诱导中国对虾的多倍体情况.

本文于1992-05-25收到,修改稿于1992-07-03收到.

* 现在青岛黄海海藻工业公司工作.

1 材料和方法

1. 实验材料取自山东省即墨市青岛海洋大学金口对虾育苗基地和昌邑县青乡海水养殖场的越冬和海捕中国对虾(*Penaeus chinensis*)。亲虾是选择性腺成熟好、无伤害的健壮个体。细胞松弛素B (Cytochalasin B简称C.B)为美国Sigma公司产品。

2. C.B溶液的配制是用含有0.01%的二甲基亚砷(DMSO)新鲜过滤海水,将C.B配成 $2.5\text{mg}/\text{dm}^3$ 、 $1.0\text{mg}/\text{dm}^3$ 、 $0.5\text{mg}/\text{dm}^3$ 和 $0.1\text{mg}/\text{dm}^3$,少数处理曾用过 $0.05\text{mg}/\text{dm}^3$ 。

3. 受精卵处理的间隔时间是在受精后5、10、15和20min,处理的持续时间为10、20、30和40min,少数实验曾用45min,处理结束后,用吸管吸出C.B处理液,再用0.01%的DMSO海水洗2次,每次8~10min,对照组只用0.01%的DMSO处理,最后将各处理组和对照组用 1000cm^3 新鲜海水,在培养缸中培养,每组取卵约500粒,培养温度为 $18\sim 20^\circ\text{C}$,大量处理为 $1.0\text{mg}/\text{dm}^3$,持续时间为20min。

4. 细胞学和染色体制片,是将对照组和各处理组的受精卵,经过12h左右的培养,大量处理的培养到无节幼体和溞状幼体,用3:1的无水乙醇和冰醋酸固定,染色制片根据前面报道^[16],然后进行细胞学观察和染色体计数。

2 结果

2.1 C.B对受精卵的影响

不同浓度的C.B处理和不同的持续时间,对极体的排出情况见表1。从表1看出,随着C.B处理浓度的增加,极体的排出数则减少,同时随着处理持续时间的延长,极体的排出

表1 不同C.B浓度和处理持续时间对极体排出的影响

组别 (mg/dm^3)	持续时间 (min)	阻止极体排出的卵数	2个极体均排出的卵数	有2个极体的 卵占总卵%
对 照	0	38	38	50
0.2	10	34	22	39.3
	20	31	20	39.2
	40	63	14	18.2
0.4	10	16	15	48.4
	20	39	21	35.0
	40	63	5	7.4
0.8	10	37	29	43.9
	20	65	4	5.8
	40	55	0	0

各组处理的起始时间均为产卵后10min。

数也减少. 用 $0.8\text{mg}/\text{dm}^3$ 的C. B处理40min未观察到极体的排出. 但是不同浓度的C. B处理, 持续时间在10min时, 对极体排出的影响, 似乎不是很明显. 用C. B处理的卵, 极体排出的时间都推迟了10min以上.

用 $0.5\text{mg}/\text{dm}^3$ 和 $1.0\text{mg}/\text{dm}^3$ 的C. B处理受精卵. 经过30min以后, 不少卵细胞的胶质膜皱缩、松弛, 卵膜局部开始突起(图版I-1), 细胞质逐渐外溢, 在卵膜外形成不规则的分裂小球. 这种畸形卵发育的小球, 有的脱离卵细胞, 有的则附着于卵膜上(图版I-2). 经过10h培养, 在不同的处理组存在明显的不同(表2). 浓度为 $0.1\text{mg}/\text{dm}^3$, 卵的畸形分裂较少. 在 $1.0\text{mg}/\text{dm}^3$ 有50%的卵处于畸形分裂. 浓度为 $2.5\text{mg}/\text{dm}^3$, 卵细胞质收缩, 卵细胞分裂受到抑制, 卵膜松散、破碎. 细胞分裂数极少, 最后逐渐死亡. 在 $0.5\text{mg}/\text{dm}^3$ 一组, 经过30h培养, 约有2%孵化发育成无节幼体(图版I-3), 经过6d培养, 约有1.2%发育到蚤状幼体(图版I-4).

表2 不同剂量和处理起始时间对胚胎发育的影响

组别 (mg/dm^3)	起始时间 (min)	总胚胎数	正常胚胎数	畸形率(%)
对照	0	77	71	7.8
0.1	10	128	104	18.8
0.5		135	113	16.3
1.0		106	46	56.6
2.5		142	7	95.1
0.1		20	111	102
0.5	140		106	24.3
1.0	105		48	54.3
2.5	105		2	98.1

处理持续时间均为15min.

2.2 染色体计数

中国对虾的染色体研究表明, 其二倍体数目为 $2n=88$ (图版I-5). 用C. B处理受精卵诱导的三倍体胚胎为 $3n=132$ (图版I-6). 从不同的C. B处理的结果表明(表3), 在受精后5~10min, 其三倍体的诱导率以 $1.0\text{mg}/\text{dm}^3$ 为最高, 占62.5%. $0.05\text{mg}/\text{dm}^3$ 未诱导出三倍体. 用C. B

表3 不同浓度的C. B诱发三倍体的情况

C. B浓度 (mg/dm^3)	2n 胚胎数	3n 胚胎数	非整倍体 胚胎数	胚胎总数	3n%	非整倍体%
0.05	50	0	0	50	0	0
0.1	44	2	0	46	4.3	0
0.5	22	19	4	45	42.3	8.9
1.0	8	20	4	32	62.5	12.5
2.5	0	2	2	4	50.0	50.0

处理持续时间均为15min.

处理受精卵所发育的胚胎,其染色体有二倍体、三倍体,还有一些胚胎细胞中存在各种非整倍体。其中非整体是随C.B浓度的增加而增加。从大量处理中,培养的无节幼体和溞状幼体,经染色体检查发现有三倍体。

3 讨论

C.B处理贝类受精卵引起畸形的增加或成活率降低,已在美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)^[17]、太平洋牡蛎(*C.gigas*)^[18]、沙海螂(*Mya arenaria*)^[19]、海湾扇贝(*Argopecten irradians*)^[20]、合浦珠母贝(*Pinctada martensii*)^[11,21]等物种上发现。我们用C.B处理中国对虾的受精卵结果表明,卵细胞的极体排出延迟。随着C.B浓度的增加,染色体的非整倍体增多,畸形胚胎也增多。

有关受精率、胚胎发育状况和孵化率的影响因素,Allen等^[19]认为沙海螂早期胚胎成活率低的原因,是由于C.B处理卵后,引起无目标的细胞分裂。姜卫国等^[11]、Downing等^[17]、Wada等^[20]认为卵的质量如成熟度,或雌体状况和实验方法的差异等都是重要的影响因素。根据C.B处理中国对虾的受精卵,随着浓度的提高,胚胎畸形率增多,孵化率降低等,C.B的作用可能是主要的。但是在实验过程中,对照组也常表现畸形胚胎和孵化率低。因此,不良的环境条件和卵的成熟度也是不可忽视的因素。如何提高对虾卵的受精率和孵化率,防止畸形胚胎产生,这是当前对虾育苗中所急待解决的问题。也是提高多倍体成活率的前提条件。很有进一步研究的必要。

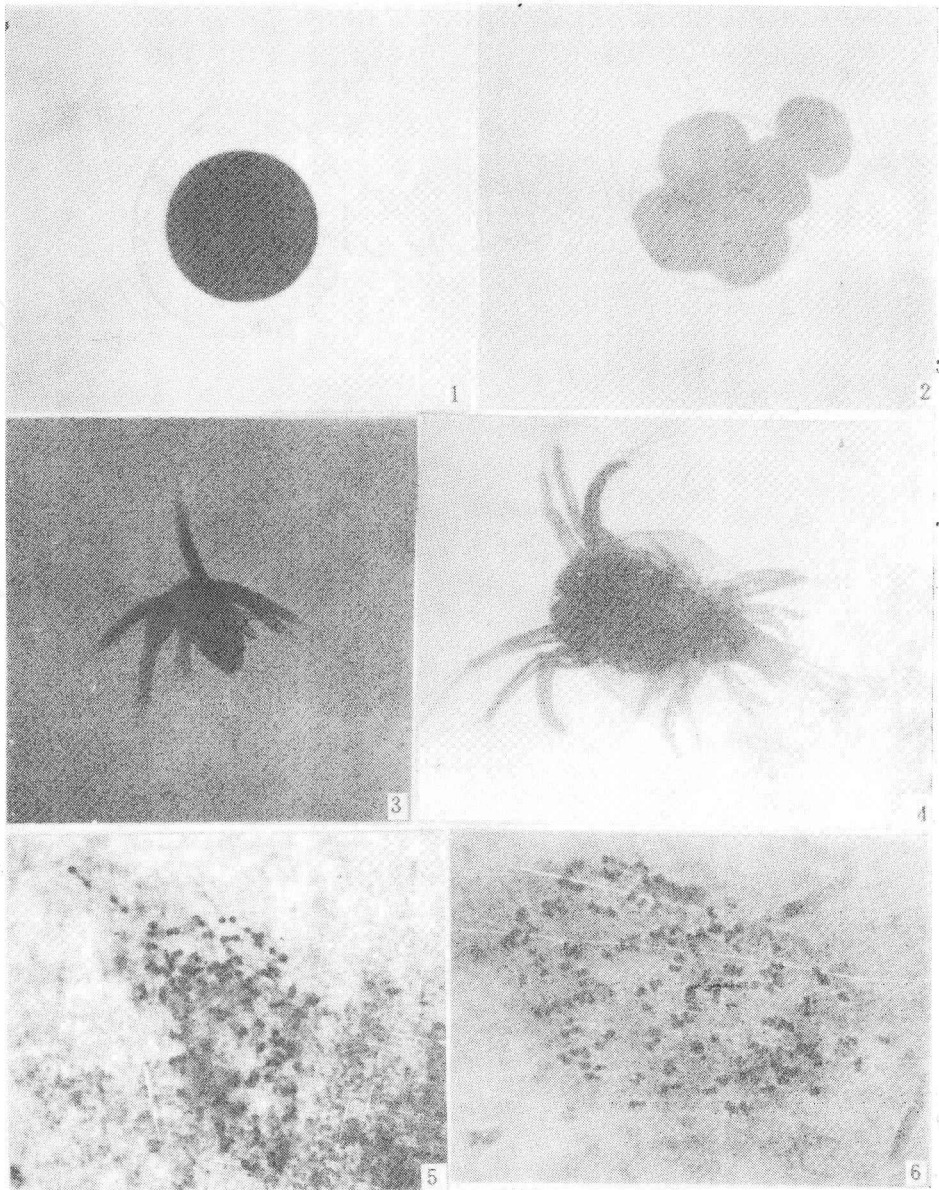
Downing等认为C.B比物理因素(温度和压力)可能给予三倍体诱导的更高百分率,因为C.B抑制细胞膜微丝网状系统的形成,细胞不能进行分裂,但不影响细胞内的核分裂。温度和压力是同时抑制微丝和微管,这既阻止染色体运动,又阻止细胞分裂。因此,用温度(和压力)处理,也许停止了全部发育。我们用温度诱导对虾三倍体的最高频率为43.75%,它比C.B诱导三倍体的最高频率低。这与姜卫国等、Wada等的情况相一致。但Gosling等^[12]用热休克半交叉缎锦蛤(*Tapes semidecussatus*)的三倍体最好诱导率为55%,而用C.B处理,三倍体的最好诱导率为50%。因此,人工诱导对虾三倍体的最有效频率,除不同的诱导因素外,关于这些因素的作用强度、诱导的起始时间和持续时间等,都是值得深入探讨的。

利用理化因素诱导多倍体,在鱼类和贝类方面已做了大量工作,但是对虾多倍体的诱导成功还是刚开始。已知三倍体动物是不育的,这样有可能使用于性腺发育的营养物质,转变为用于肌肉的生长上,从而培育大规模的对虾个体。同时还可能克服雄虾因性腺早熟造成的大量死亡,而提高繁殖期的成活率。

参考文献

- 1 Purdom C E. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture*, 1983, 33, 287~300
- 2 Allen S K Jr and J G Stanley. Reproductive sterility in polyploid brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 1978, 107, 473~478
- 3 Allen S K Jr, H Hidu and J G Stanley. Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid

- soft-shell clams (*Mya arenaria*). *Biol.Bull.*, 1986a, 170, 198~210
- 4 Yamazaki F. Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture*, 1983, 33, 329~354
- 5 上野紘一. あゆ养殖に対する倍数体育種の導入. 养殖, 1985, 22(5): 62~65
- 6 中国科学院水生生物研究所二室多倍体小组等. 草鱼、团草鱼人工诱导多倍体的研究. 遗传学报, 1979, 6(1): 77
- 7 Stanley J G, H Hidu and S K Jr Allen. Growth of American oyster increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. *Aquaculture*, 1984, 37, 147~155
- 8 Wu Chingjiang. Retrospects and prospects of fish genetics and breeding resaerch in china. *Aquaculture*, 1990, 85, 61~68
- 9 楼允东. 国外对鱼类多倍体育种的研究. 水产学报, 1984, 8(4): 344~356
- 10 Scheerer P D and G H Thorgaard. Increased survival in salmonid hybrids by induced triploidy. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.*, 1983, 40, 2040~2044
- 11 姜卫国, 李刚, 林岳光, 庆宁. 人工诱导合浦珠母贝多倍体的发生. 热带海洋, 1987, 6(4): 37~45
- 12 Gosling E M and A Nolan. Triploidy induction by thermal shock in the Manila clam, *Tapes semidecussatus*. *Aquaculture*, 1989, 78, 223~228
- 13 Yamanoto S and Y Sugawara. Induced triploidy in the mussel, *Mytilus edulis*, by temperature shock. *Aquaculture*, 1988, 72, 21~29
- 14 Arai K, F Naito and K Fujino. Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Bull.Jpn.Soc.Sci.Fish.*, 1986, 52, 417~422
- 15 张乃禹. 中国对虾生长的数理分析. 海洋科学, 1985, 9(4): 1~7
- 16 戴继勋, 张全启, 包振民. 中国对虾的核型研究. 青岛海洋大学学报, 1989, 19(4-I): 97~105
- 17 Stanley J G, S K Jr Allen and H Hidu. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*, 1981, 23, 1~10
- 18 Downing S L and S K Jr Allen. Induced triploidy in the Pacific oyster *Grassostrea gigas*, optimal treatment with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture*, 1987, 61, 1~15
- 19 Allen S K Jr, P S Cagnon and H Hidu. Induced triploidy in the soft-shall; calm cytological and allozmic confirmation. *J.Hered.*, 1982, 73, 421~428
- 20 Tabarini C L. Induced triploidy in the bay scallop. *Argopecten irradians* and its effect on growth and gametogenesis. *Aquaculture*, 1984, 42, 151~160
- 21 Wada K T, A Komaru and Y Uchimura. Triploid production in the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Aquaculture*, 1989, 76, 11~19



1. 卵膜松弛, 局部突起 2. 卵膜外形成的分裂球 3. C.B处理后培养的无节幼体 4. C.B处理后培养的蚤状幼体
5. $2n=88$ 6. $3n=132$