

文章编号: 1004-7271(2002)03-0248-05

长牡蛎四倍体诱导技术

林 琪

(福建省水产研究所, 福建 厦门 361012)

摘 要 报道了长牡蛎四倍体诱导的新技术。采用长牡蛎二倍体卵子与精子授精, 用 $1.5\text{mg}/\text{dm}^3$ CB 在受精后 4min 处理受精卵 40 min 抑制第一和第二极体排放诱导四倍体, 获得稚贝(1~3mm)2000 粒, 其中四倍体占 85%, 三倍体占 5%, 三倍体/四倍体嵌合体占 10%。本文首次报道了可存活的三倍体/四倍体嵌合体稚贝。

关键词 长牡蛎; 四倍体; 诱导

中图分类号 S917 文献标识码: A

The technology of induction tetraploid in *Crassostrea gigas*

LIN Qi

(Fujian Fisheries Research Institute, Xiamen 361012, China)

Abstract The new technology of induction tetraploid is reported. Tetraploid was induced by inhibiting polar body I and II in eggs from dioploid *Crassostrea gigas* fertilized with haploid sperms at concentration of $1.5\text{mg}/\text{dm}^3$ CB for 40min at 4 min after fertilisation, and 2000 spats were obtained. The tetraploid was 85%, the triploid was 5% and the triploid/tetraploid mosaics was 10%. This is the first report about the survival triploid/tetraploid mosaics spats.

Key words *Crassostrea gigas*; tetraploid; induction

由于三倍体长牡蛎具有肉质好、生长快、产量高和整年可食用等优良性状^[1], 越来越受到人们的重视, 并得到广泛的推广和应用。但由于目前采用物理、化学方法直接诱导三倍体, 诱导率不稳定且很难达到 100% 三倍体, 同时理化手段对受精卵的处理也影响孵化率和早期幼虫的存活率。因此人工诱导贝类四倍体研究是近几年贝类多倍体育种的主攻方向。通过人工诱导培育出四倍体, 成熟后再与正常二倍体交配生产三倍体, 就能够克服以上这些问题, 同时从理论上讲也可获得 100% 纯三倍体, 这为三倍体贝类的大规模生产提供了一条有效途径^[2]。目前仅 Guo 和 Allen^[3]报导的长牡蛎三倍体卵子与二倍体精子授精, 用细胞松弛素 B 处理抑制第一极体排放的方法诱导培育出可存活的长牡蛎四倍体。笔者采用上述方法进行了实验^[4], 由于三倍体长牡蛎的能育性差, 要获得三倍体卵子很困难, 而诱导培育出的稚贝大部为二倍体, 成贝后未能检测出四倍体。为此, 笔者在诱导长牡蛎四倍体的新技术方面进行了研究, 采用长牡蛎二倍体卵子与精子授精, 用 CB 抑制第一极体和第二极体排放诱导四倍体。

1 材料和方法

1.1 材料

二倍体长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 亲贝是采自福建漳浦县的二龄贝,在养虾池中暂养育肥。

1.2 实验方法

1.2.1 四倍体诱导实验

用解剖法取得二倍体长牡蛎精卵,卵子经 200 目筛绢滤去组织块,在 500 目筛绢框里经砂滤海水清洗后,授精。授精处理的水温 25℃,海水比重 1.021。授精后分别采用 0.5、0.8、1.0、1.2、1.5 mg/dm³ CB (美国 Sigma 公司产品),在授精后 3、4、5、6、7min 开始处理受精卵,处理持续时间分别为 30、40、50min。处理后在含 1 × 10⁻³ 二甲基亚砜(DMSO)的海水中浸洗 2 次,移至砂滤海水中孵化。

1.2.2 四倍体种苗培育

采用 1.5mg/dm⁻³ CB 在授精后 4min 开始处理受精卵 40min,然后用含 1 × 10⁻³ DMSO 的海水浸洗两次,移至砂滤海水中孵化,收集上浮担轮幼虫培育至 D 型幼虫,培育密度 2 个/cm³,常规育苗。

1.2.3 倍性确定

在担轮幼虫阶段,取样滴片制做染色体样本检查倍性,每个实验组一般统计 60~80 个担轮幼虫,在确定每个担轮幼虫的倍性时,一般计数 10 个左右良好的分裂相。长牡蛎二倍体染色体数为 20 条,三倍体为 30,四倍体为 40,染色体数在 20~30 和 30~40 之间为非整倍体(图 1)。附着稚贝(1~3mm)采用 CCA-II 型倍体分析仪检测倍性,荧光相对值在 115 左右为二倍体,在 170 左右为三倍体,在 230 左右为四倍体,具两个峰为嵌合体(图 2)。

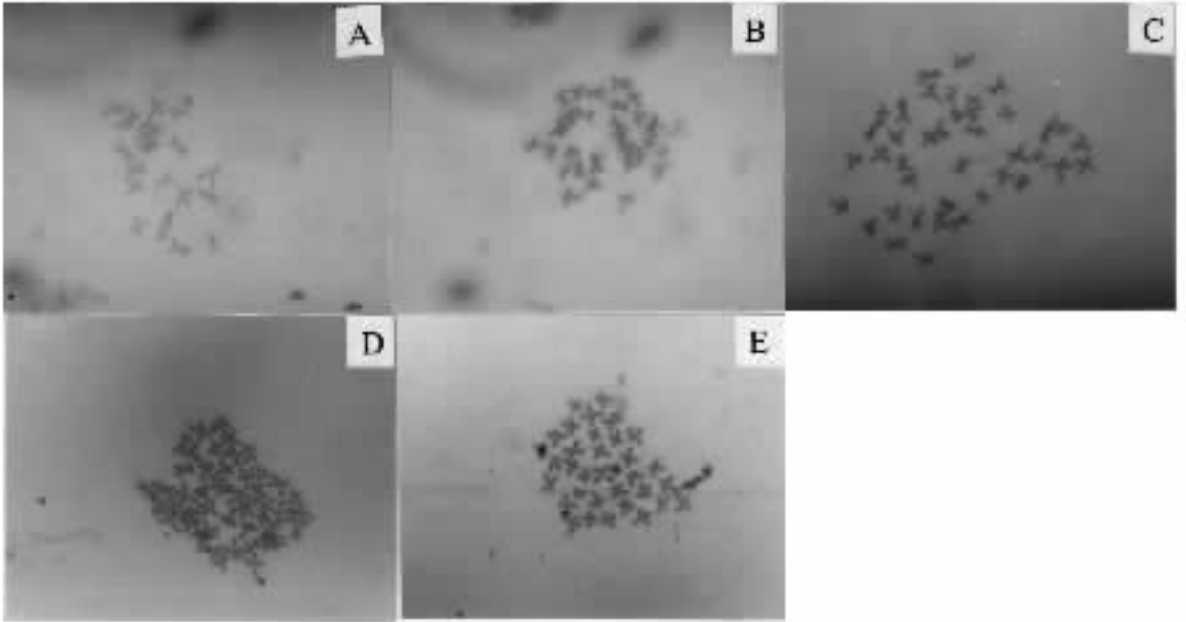


图 1 长牡蛎担轮幼虫二倍体、三倍体、四倍体及非整倍体染色体分裂相

Fig.1 Diploid, triploid, tetraploid, triploid and aneuploid metaphase chromosomes of developing zygotes reaching larval phase

注:A 20; B 30; C 40; D 50; E 34

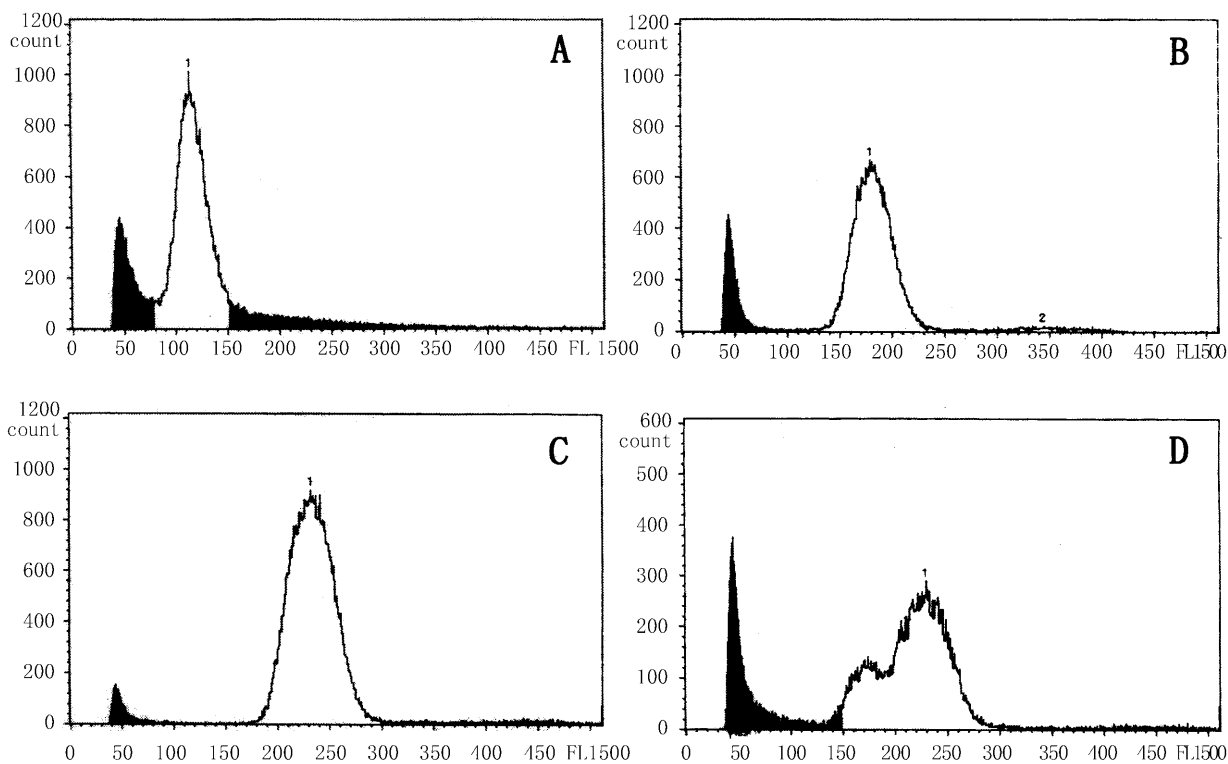


图 2 稚贝倍性分析结果

Fig.2 Flow cytometer analysis of spats

注:A二倍体,B三倍体,C四倍体,D三倍体/四倍体嵌合体

2 结果

2.1 不同浓度的诱导效果

在授精后 4min,分别采用浓度为 0.5、0.8、1.0、1.2、1.5mg/dm³ CB 处理受精卵 40min,诱导结果见表 1。当 CB 浓度为 1.5 mg/dm³时,没有产生二倍体和三倍体。

2.2 不同起始时间的诱导效果

采用 1.5 mg/m³CB,分别在受精后 3、4、5、6、7min 处理受精卵 40min,结果见表 2,当处理起始时间在授精后 4min 以前,没有产生二倍体和三倍体,授精 5min 后再处理,均不同程度地产生了一些二倍体和三倍体。

2.3 不同处理持续时间的诱导效果

采用 1.5mg/dm³CB,授精后 4min,分别处理受精卵 30、40、50min,结果见表 3。从表 3 结果可见,处理持续时间超过 40min,没有产生二倍体和三倍体。

表 1 不同浓度 CB 诱导长牡蛎四倍体的实验结果

Tab.1 Trial results of tetraploidy induction in *Crassostrea gigas* by treating eggs with different concentrations of CB

浓度 (mg/dm ³)	4n (%)	2n (%)	3n (%)	其它倍性 (%)
0.5	8.9	10.7	17.3	63.1
0.8	8.7	8.7	11.5	71.1
1.0	9.4	0	5.3	85.3
1.2	13.1	0	2.0	84.9
1.5	15.3	0	0	84.7

表 2 不同起始时间诱导长牡蛎四倍体的实验结果

Tab.2 Trial results of tetraploidy induction in *Crassostrea gigas* by treating eggs with CB at different time of initiation

处理起始时间	4n (%)	2n (%)	3n (%)	其它倍性 (%)
受精后 3min	14.2	0	0	85.8
受精后 4min	15.3	0	0	84.7
受精后 5min	8.1	0	13.5	88.4
受精后 6min	5.2	3.1	18.9	82.8
受精后 7min	3.5	5.5	25.3	65.7

2.4 培育结果

我们采用 1.5 mg/dm^3 CB, 在受精后 4min 处理受精卵 40min 的方法, 诱导处理受精卵 6 亿粒, 经过精心培育, 最后得到 1 ~ 3mm 附着稚贝约 2000 粒。随机抽取 20 个稚贝, 用 CCA - II 倍体分析仪进行倍性检测, 结果见表 4。

我们成功获得可存活的四倍体稚贝, 四倍体比率达 85%, 同时有 5% 的三倍体, 10% 的嵌合体。

3 讨论

关于贝类四倍体的诱导方法, 已报导用

普通二倍体卵子受精, 并通过抑制第一极体^[1,7]、第一和第二极体^[1]或第一次卵裂^[5], 以及采用细胞融合^[5]、人工雌核发育结合抑制两个极体^[6]等方法来诱导四倍体。迄今仅见 Guo 和 Allen^[3]报导的长牡蛎三倍体卵子与二倍体精子受精, 用 CB 处理抑制第一极体排放的方法诱导培育出可存活的长牡蛎四倍体, 存活率为 0.0739%。其它诱导方法尽管在胚胎和幼虫都能检查到一定比例的四倍体, 但都未能培育出有生活力的四倍体稚贝。然而, 采用三倍体来诱导四倍体, 必需先获得三倍体的卵子, 由于三倍体的不育性^[2], 要获得三倍体卵子完全靠运气, 大量三倍体卵子的获得非常困难。作者^[4]曾采用这种方法进行了三年的实验, 并在 2000 年获得含 30% 四倍体的稚贝, 但由于数量太少, 在养成过程中逐渐死亡。

获得可存活的四倍体稚贝有两大困难: ①四倍体存活率很低。1994 年 Guo 和 Allen^[3]认为长牡蛎四倍体胚胎难以存活的原因在于长牡蛎受精卵发育类型是镶嵌式发育, 由二倍体受精卵经人工诱导处理形成四倍体核的细胞, 由于四倍体细胞核较大, 细胞质不能满足四倍体核完成所需的分裂次数, 造成分裂细胞数目不足而引起四倍体个体发育困难。此后他们采用体积较大的三倍体卵子诱导培育出四倍体。②诱导四倍体难度较大。由于卵子发育不同步, 使得卵子受精后极体排放的时间不同步。卵子对药物处理的灵敏度也不相同, 低浓度短时间的药物处理对部分卵子有效, 而对另一部分卵子无效; 高浓度长时间的药物在有效的同时又对部分卵子造成了损害。前人在进行四倍体诱导时常采用折中的方法, 即采用中等药物浓度, 中等处理时间, 在诱导率不低的情况下又保证一定的存活率。由于四倍体的存活率低, 而二倍体和三倍体的存活率很高(可达 90% 以上), 如果在诱导过程中产生了二倍体和三倍体, 即使是少量的, 到稚贝及成贝时可能大部分是二倍体和三倍体, 要从中找到四倍体几乎不可能。这正是采用普通二倍体卵子诱导四倍体不成功的原因。采用三倍体卵子诱导四倍体, 一方面提高了四倍体的存活率, 另一方面这种诱导方法除产生四倍体外, 其余均为非整倍体, 这些非整倍体在培育过程中会逐渐死亡, 到稚贝时四倍体比例反而比胚胎期时要高得多。

因此本研究采用高浓度、长时间的诱导方法, 而不考虑存活率, 其目的就是保证诱导产生的都是四倍体和非整倍体, 不含二倍体或三倍体, 而非整倍体在生长过程中会逐渐死亡。二倍体受精卵可大量获得, 弥补了存活率低的不足。从实验结果看, 用 1.5 mg/dm^3 CB 在受精后 4min 处理受精卵 40min 抑制第一和第二极体排放, 第一极体受抑制留在受精卵内仍继续参与第二次减数分裂, 发生复杂的染色体分离行为, 诱导结果产生了大量的非整倍体和五倍体等, 四倍体诱导率为 15.3%。由于四倍体存活率低, 因此在种苗培育过程中采取措施提高种苗的存活率尤为重要。在普通长牡蛎育苗中, 存活率高的达到 95% 以上, 低的只有 10% 以下甚至全部死亡也不鲜见。因此种苗培育过程的几个关键点的正确处理非常重要, 包括投喂藻类的营养、投饵量、换水量和光照强度、时间的控制等。

我们诱导处理了 12 亿粒受精卵, 最后获得 2000 粒稚贝, 存活率仅为 0.0017%。其中 85% 为四倍

表 3 不同持续时间 CB 诱导效果

Tab. 3 Trial results of tetraploidy induction in *Crassostrea gigas* by treating eggs with CB at different time of duration

处理持续时间 (min)	4n (%)	2n (%)	3n (%)	其它倍性 (%)
30	8.7	12.5	34.6	44.2
40	15.3	0	0	84.7
50	13.2	0	0	86.8

表 4 稚贝倍性检测结果

Tab. 4 Ploidy analysis of spats in *Crassostrea gigas*

倍性	4n	3n	嵌合体
数量	17	1	2
%	85	5	10

体 5% 为三倍体, 10% 为嵌合体, 而在担轮幼虫期的染色体检查结果并没有发现三倍体, 由此也证实了三倍体的存活率远比四倍体高得多。考虑到养成阶段的风险, 我们将继续采用该方法诱导培育四倍体, 以获得较多数量的四倍体稚贝。此外我们在实验中首次发现了可存活的嵌合体, 其形成机理及生长等方面有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Stephens L B, Downing S L. Inhibiting first polar body formation in *Crassostrea gigas* produces tetraploids, not meiotic I triploids[J]. J Shellfish Res, 1988. 7: 550 - 551.
- [2] 林琪, 吴建绍, 于子长, 等. 三倍体长牡蛎不育性研究[J]. 福建水产, 2001, 4: 44 - 47.
- [3] Guo X, Allen S K. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) produced by inhibiting polar body I in eggs from triploid[J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1994. 3(1): 42 - 54.
- [4] 林琪, 吴建绍, 曾志南, 等. 长牡蛎四倍体诱导的研究[J]. 台湾海峡, 2001, 20(4): 529 - 532.
- [5] Guo X, Hershberger W K, Cooper K, et al. Tetraploid induction with mitosis I inhibition and cell fusion in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg)[J]. J shellfish Res, 13(1): 193 - 198.
- [6] Guo X, Hershberger W K, Cooper K, et al. Artificial gynogenesis with ultraviolet light-induced sperm in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: I Induction and survival[J]. Aquaculture, 1993. 113: 201 - 214.
- [7] Gendreau S, Grizel H. Induced triploidy and tetraploidy in the European flat oyster, *Ostrea edulis* L[J]. Aquaculture, 1990. 90: 229 - 238.