

# 贝类上诱发的三倍体及其应用前景

吴 融

(浙江省海洋水产养殖研究所,温州 325005)

近几年来,利用染色体工程在贝类上进行育种的研究有了很快的进展(Stanley等,1981、1984; Allen等,1982、1986、1988; Tabarini, 1984; Quillet等,1986; Downing等,1987; Arai等,1986; Standish等,1986; 古丸明,1987; Komaru等,1988; 和田克彦,1987; 姜卫国等,1987; Fujino等,1987; 藤野和男,

1988)。

本文综述了在牡蛎、扇贝、鲍和珠母贝上诱发三倍体的方法及其机理。在养殖上,主要是利用三倍体的不育性。这样,在牡蛎上可防止夏天肉的质量下降;在扇贝上可增加闭壳肌所占的比例;在鲍上可加速生长速度、提高存活率及增强对不良环境的抗性;在珠母贝上有利于

插核。最后探讨了在诱发三倍体上存在的问题及其前景。

## 一、牡 蛎

在牡蛎养殖上，常有在繁殖期发生大量死亡的现象，而且肉的质量也下降，如在太平洋牡蛎上，夏天生殖腺占肉总重的 60—70%。已知三倍体是不育的，这不仅提高肉的质量，又可改善产卵期的生长速度和存活率。

在贝类上，排出的卵是处于第一次成熟分裂中期，受精后不久用高温、低温、高压或细胞

松弛素 B 处理都可抑制第一极体或第二极体的排出，这样就可产生三倍体(图 1、图 2)。据 Quillet (1986) 在太平洋牡蛎上，于受精后 5—45 分钟用高温 (30—38℃) 处理 10 分钟或于受精后 5 分钟和 30 分钟用 32℃ 和 35℃ 处理 20 分钟，试验结果表明，在用热处理 10 分钟的一组中，以 35℃ 和 38℃ 于受精后 10—15 分钟和 35—40 分钟处理产生的三倍体为有效，用高温处理 20 分钟更为有效，产生的三倍体可高达 60%。

Stanley 等(1981)在美洲牡蛎上，于受精后

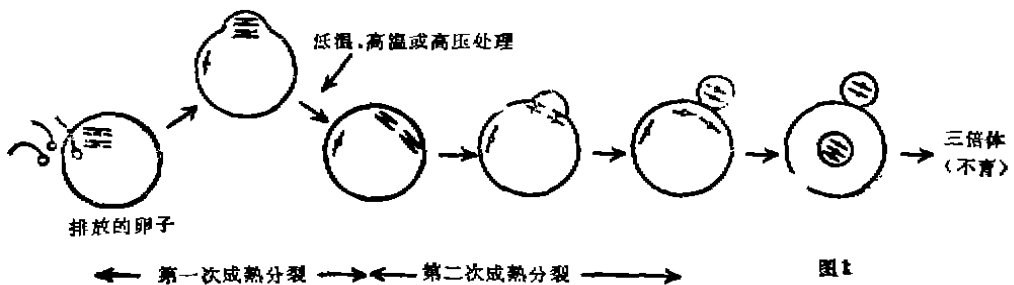


图 1

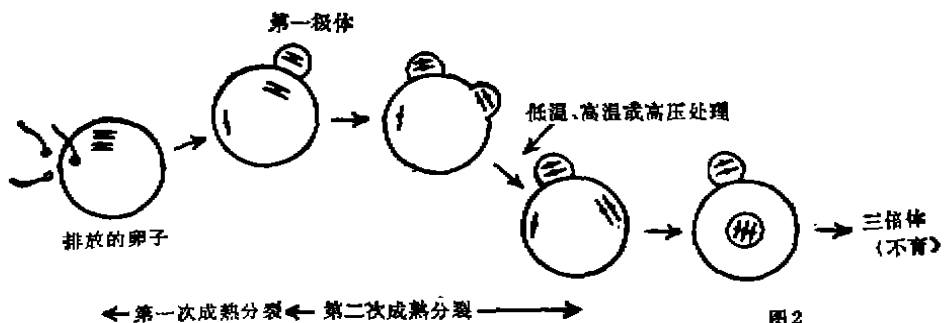


图 2

15—30 分钟，用 0.5ppmol/L 浓度的细胞松弛素 B 处理，受精后 24 小时的幼体存活率为 15—33%，多倍体出现率为 50—75%，在幼体上见有三倍体和四倍体，但在 8 个月的稚贝上只见有三倍体，由于诱发产生的多倍体存活率较低，还未得到最适的处理条件。为了获得更高的、稳定的三倍体百分率，认为还需作进一步的研究。产生的三倍体经 9 个月养殖后，在生长速度上与二倍体比较未见有什么大的差异。

有趣的是 Stanley 等于 1984 年继续报道了他们的研究结果。在受精后 15 分钟内，相当于第一次成熟分裂时，用 0.5ppmol/L 浓度的细胞松弛素 B 处理，产生的三倍体为 61%，干肉重比二倍体上高 40%，生长速度快 12%。从测定杂合的同功酶等位基因在二倍体，第一极体三倍体和第二极体三倍体上的频率，已知二倍体上为 26%，在第一极体三倍体上为 38%，在第二极体三倍体也为 26%，这说明加快生长

速度与增加等位基因的杂合性有关,并不是由于染色体倍性的增加。

Dawning 等(1987)在太平洋牡蛎上,用 1ppmol/L 浓度的细胞松弛素 B 在 25℃ 下于受精后 30—45 分钟处理的效果为最佳,诱发的三倍体可高达 88±9%,但在第一次卵裂时用同样浓度的细胞松弛素 B 处理,未见有产生四倍体。

Allen (1988)对太平洋牡蛎二倍体和诱发三倍体的配子发生进行了比较,发现在诱发的三倍体上有 12% 个体是雌雄同体,除这些雌雄同体个体外,雌雄性比为 1:1。对生殖腺发育的影响,对雌的比对雄的影响更大。在雌性三倍体上,仅见有少数卵母细胞,雄性三倍体的生殖腺发育只有雄性二倍体上的  $\frac{1}{2}$ ,但为雌性三倍体生殖腺的二倍。在糖元含量上,二倍体牡蛎在产卵前减少 72%,但在三倍体上只减少 8%。

据赵晋德介绍(1978年),现在美国生产的太平洋牡蛎有 30% 是三倍体,解决了过去夏天因牡蛎肉的质量差没有市场的问题。冬天和夏天牡蛎肉的质量比较是:

	冬天	夏天
硬度	结实	软
味道	可口	差

此外,在生长速度上,也发现二倍体牡蛎开始长得较好,但到了繁殖期开始下降,而三倍体牡蛎一直继续生长。在测定的 34 个幼体上,发现二倍体有 10 个,三倍体有 24 个,在一年后的 177 个牡蛎中,二倍体有 7 个,三倍体有 170 个,这说明三倍体的存活率比二倍体的存活率高。

## 二、扇 贝

Tbarini (1984) 在海湾扇贝上,于受精后 10 分钟用 0.05ppmol/L 浓度的细胞松弛素 B 处理 20 分钟,获得 66% 三倍体,如果用 0.1ppmol/L 浓度的细胞松弛素 B 处理,则获得 94% 三倍体。经 16 个星期试养后,发现三倍体的闭壳肌重比二倍体上高 73%,软体部湿重比

二倍体上高 36%,闭壳肌指数和肌肉糖元含量也比二倍体上明显高。到夏天繁殖季节时,三倍体是不育的,这样就把本来用于生殖腺发育的糖元用在肌肉生长上,因此三倍体的壳就比二倍体的壳来得膨大鼓出。

Beaumont (1986) 在大扇贝上进行诱发三倍体的试验,结果表明用细胞松弛素 B 处理的最有效浓度为 0.5ppmol/L,获得 30% 三倍体。文中还指出,根据受精后只排出一个极体也可作为鉴定诱发三倍体的一种简单方法。

据古丸明(1987)报道,日本于 1987 年用华贵栉孔扇贝作为试验材料,用 0.5ppmol/L 浓度的细胞松弛素 B 在受精后 15 分钟处理 15 分钟,再用溶有一定浓度的二甲基亚砷(DMSO)的海水浸渍 15 分钟,以后放入通常的海水中,经变态附着后,将壳长 2mm 的幼苗放在育苗笼内。5 个月后,当稚苗生长到壳长 2—3cm 时,用显微荧光测定法鉴定倍性,发现获得了 66.1% 的三倍体,其机理也是抑制第一极体的排出。在用 0.1ppmol/L 浓度的细胞松弛素 B 处理组中,没有发现三倍体。

已知在华贵栉孔扇贝的二倍体上,当生殖腺成熟时,雌性的生殖腺为桔红色,雄的生殖腺为乳白色,那是很容易区别的,但在诱发的三倍体上,生殖腺是退化的,呈半透明状,用肉眼区别雌雄很困难,因此是不育的。现在拟进一步用高温、低温或高压来处理,诱发产生三倍体。

## 三、 鲍

Arai 等(1980)用高温、低温、水静压在皱纹盘鲍上进行诱发三倍体的试验。首先求得在 20℃ 下卵排出第一极体是在受精后 15—20 分钟,排出第二极体是在受精后 35—40 分钟。试验结果表明,用低温 3℃ 于受精后 12 分钟或 32 分钟处理 15 分钟,获得的三倍体可达 70—80%;用高温 35℃ 于受精后 7 或 22 分钟处理 3 分钟,获得三倍体各为 50—70% 和 60—80%,用水静压(200 公斤/厘米<sup>2</sup>)于受精后 7 或 22 分钟处理 5 分钟,获得三倍体为 60%。Arai 等也认为抑制第一极体排出产生的三倍

体比抑制第二极体排出产生的三倍体的杂合性为高,因此就获得优良的经济性状而言,应在卵第一次成熟分裂时处理为宜。

Fujino 等(1987)以 4 个同功酶等位基因位点作为鉴定皱纹盘鲍杂合性的遗传标志,分析用低温 3℃ 处理受精卵获得的第一极体三倍体(3n·1Pb)(受精后 12 分钟处理)和第二极体三倍体(3n·2Pb)(受精后 32 分钟处理)的杂合性及其对高温(30℃)的耐受性,结果发现 3n·1Pb 对高温的耐受性为最大,对照组(2n)次之,最差的为 3n·2Pb,并认为现在对诱发的三倍体的存活率和特性还知道的不多,对高水温、低水温及对氧不足和低盐度耐受性还需作进一步研究。

藤野和男(1988)在发表的“鲍的遗传、育种研究”一文中指出,从原理上来讲,通过抑制正常卵的第一次卵裂获得的四倍体,再与二倍体交配,也可获得三倍体(3n·cv),但这一技术尚未解决。

#### 四、珠母贝

已知在珠母贝上,在插核前要采用抑制生殖腺发育或促进生殖腺发育诱导排放精卵的方法。据和田克彦(1987)报道,合浦珠母贝在 24—25℃ 下,于受精后 10—15 分钟排出第一极体,受精后 15—30 分钟排出第二极体。日本已用 0.1ppmol/L 浓度的细胞松弛素 B 处理受精后 5—20 分钟和 15—30 分钟的合浦珠母贝卵,都可诱发产生三倍体,前者的诱发率为 40%,后者的诱发率为 77%,但在处理组上,受精后 24 小时的 D 型幼体比例较低(65%),在无处理组上为 98%。值得注意的是,用细胞松弛素 B 处理合浦珠母贝受精卵产生的多倍体所占的百分率,随着幼体的日龄增加而减少,尤其是在用低温处理组上,到第 24 日差不多不见有三倍体了,分析其原因,可能是由于三倍体幼体的存活力比二倍体幼体的存活力差,或由于具有二倍体细胞和三倍体细胞的嵌合体幼体的死亡,或由于非整倍体幼体的死亡。和田克彦认为今后对如何提高合浦珠母贝三倍体的比率,详

细调查三倍体的生长特性、养殖特性及通过异种精子间的杂交获得异源三倍体是值得进一步研究的课题。

姜卫国等(1987)也用细胞松弛素 B 和低温诱发合浦珠母贝获得三倍体,但随着细胞松弛素 B 处理时间的延长,出现一定数量的五倍体。试验结果表明亚致死温度(12℃)是诱发三倍体的合适温度,认为低温处理幼体死亡较高与非整倍体数量增加有关,也观察到 3n·1Pb 的幼体日生长率和幼体大小都超过对照组。

据姜卫国最近介绍,用细胞松弛素 B 诱发合浦珠母贝获得的 3n·1Pb 和 3n·2Pb 的诱发率,在胚胎细胞分裂初期检查时分别为 37% 和 80% 左右,幼贝下海后经 18 个月海上养殖达到成贝时,三倍体诱发率分别为 11.8% 和 33.6%。为什么诱发三倍体的频率到成贝时会下降,这是一个值得探讨的与生产直接有关的问题。

#### 五、检定贝类染色体倍数性的方法

最常用的染色体计数法,可采用压片法或空气干燥法。取用的组织是生殖腺、鳃等,但采用这种制片方法很麻烦,而且在成贝上也很难看到中期的分裂相。另外二种方法为:

(1) 显微荧光测定法(microfluorimetry)。取出鳃、外套膜组织,用卡诺氏液固定,再剪碎,使细胞成游离状,涂于玻片上,用荧光色素

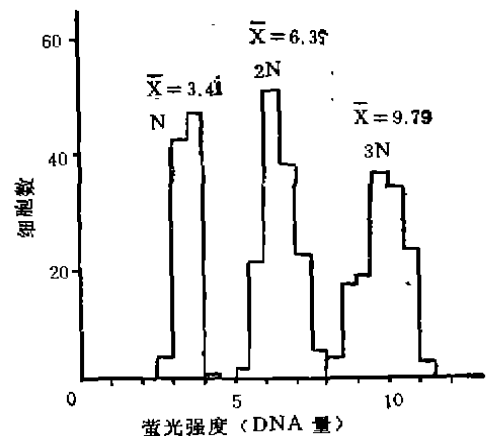


图 3 由荧光测定法,华贵栉孔扇贝倍数性的鉴定 (古丸明, 1987)

N: 精子, 2N: 二倍体鳃细胞核, 3N: 三倍体鳃细胞核

DAPI 染色, 由测定装置就可求得二倍体和三倍体细胞内发生的荧光强度(图 3)。

(2) 流动细胞测定法 (flow cytometry)。原理与前述的显微荧光测定法同, 使用这一高级仪器可测定 DNA、RNA、酶等的相对量和细胞大小等 (Allen, 1983)。优点为在短时间数秒钟内可测定数百万细胞, 但此仪器价钱甚贵, 一般单位是无力购买的。

## 六、讨 论

不育性是三倍体的一个共同特征, 这样, 在能量代谢上有利于个体在繁殖季节时的继续生长, 而且提高肉的糖元含量及其存活率 (Tabarini, 1984; Allen 等, 1986; Stanley 等, 1984)。有趣的是 Standish 等 (1986) 在诱发的海螂 (*Mya arenaria*) 三倍体上, 发现诱发的 59 个三倍体, 全部都是雌性的。姜卫国在诱发的合浦珠母贝三倍体上, 也发现全部都是雌性的。

诱发三倍体的机理是抑制第一极体或第二极体的排出, 因此就要掌握: (1) 受精后 (在一定水温下) 开始处理的时间; (2) 处理经过时间; (3) 细胞松弛素 B 或低温、高温、高压的强度 (Downing, 1987)。

从现有的资料看来, 在贝类上用静水压、或升温、降温的方法来处理获得三倍体的诱发率较低。用细胞松弛素 B 处理的最佳条件为:

温度	25℃
卵数	3—5 百万/升
受精后时间	30 分钟
CB 浓度	1mg/升
CB 持续时间	15 分钟

这样诱发太平洋牡蛎三倍体的百分率可达 87%。如果改变处理时的 CB 浓度, 则有

CB 浓度/升	三倍体百分率
0mg	0%
0.1mg	0%
0.5mg	77%
1.0mg	87%

已知无论在鱼类或贝类上却不易得到诱发的四倍体, 同源四倍体的可育性也是差的, 如果

认为通过同源四倍体与二倍体间的交配就可产生大量的三倍体, 这是值得探讨的。作者认为利用染色体工程在贝类养殖上的应用已取得了初步成果, 它是大有发展潜力的。

## 参 考 文 献

- [1] 姜卫国等 1987 人工诱导合浦珠母贝多倍体的发生 热带海洋 6(4): 31—45。
- [2] 古丸明 1987 マイテク应用技术 (4)——二枚貝の二倍体作出 养殖 24(8): 74—76。
- [3] 和田克彦 1987 アコヤズイの育种(上)——最近の研究メモ——水产の研究 6(5): 44—49。
- [4] 藤野和男 1988 アワビの遗传、育种研究 养殖 25(5): 54—59。
- [5] Allen S. K. Jr. et al. 1982 Induced triploidy, in the soft-shell clam: cytogenetic and allozymic confirmation. *J. Hered.* 73: 421—428.
- [6] Allen S. K. Jr. et al. 1986 Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*). *Biol. Bull.* 170: 198—210.
- [7] Allen S. K. Jr. et al. 1986 Performance of triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearling. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 102: 197—208.
- [8] Allen S. K. Jr. 1986 Genetic manipulations — Critical review of methods and performances for shellfish. Proceeding of World Symposium on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture of Fish and Shellfish for Consumption and Stocking, Bordeaux, France, 27—30 May 1986
- [9] Allen S. K. Jr. 1988 Cytology of gametogenesis in triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*, Vol. 7, no. 1, p. 107 (Abstract).
- [10] Arai K. et al. 1986 Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatment. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 52: 417—422.
- [11] Beaumont A. R. 1986 Genetic aspects of hatchery rearing of the scallop, *Pecten maximus* (L.). *Aquaculture*, 57: 99—110.
- [12] Downing S. L. et al. 1987 Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: optimal treatment with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture*, 61: 1—15.
- [13] Fujino K. et al. 1987 Temperature tolerance difference among normal diploid and triploid Pacific abalone. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 53: 15—21.
- [14] Quillet E. et al. 1986 Triploidy induction by thermal shock in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 57: 271—279.
- [15] Komaru A. et al. 1988 Detection of induced triploid scallop, *Chlamys nobilis*, by DNA microfluorometry with DAPI staining. *Aquaculture*, 69: 201—209.
- [16] Stanley J. G. et al. 1981 Ployploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cyto-

(下转第60页)

(上接第52页)

chalaian B. *Aquaculture*; 23: 1—10.

- [17] Stanley J. G. et al. 1984 Growth of American oyster increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. *Aquaculture*. 37: 147—155.
- [18] Standish K. et al. 1986 Gametogenesis in three species of triploid shellfish: *Mya arenaria*, *Crassostrea gigas*

and *Crassostrea virginica*. Proc. World Symp. on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux 27—30 May, 1986, Vol. II. Berlin 1987.

- [19] Tabarini C. L., 1984 Induced triploidy in the bay scallop. *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. *Aquaculture*. 42: 151—160.