

合浦珠母贝三倍体的卵诱导四倍体

何毛贤 沈 琪 林岳光 胡建兴 姜卫国

(中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301)

摘 要 将合浦珠母贝三倍体的卵与二倍体的精子授精, 用 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 细胞松弛素 B 抑制受精卵第一极体的释放诱导四倍体。研究了处理起始时间及持续时间对胚胎孵化率和四倍体诱导率的影响及幼虫的生长及存活。实验结果表明: 持续时间与胚胎孵化率呈负相关, 而与四倍体诱导率呈正相关, 持续时间一般为 15~18min, 处理起始时间一般在第一极体出现前 3~5min。在胚胎期, 四倍体诱导率平均为 20%。在幼虫培养阶段, 幼虫死亡严重, 收苗率极低, 平均只有 0.02%。处理组与未处理组的生长差异不明显 ($p > 0.05$), 但两组幼虫生长明显慢于二倍体组 ($p < 0.05$)。

关键词 合浦珠母贝, 三倍体, 诱导, 四倍体, 细胞松弛素 B

Inducement of tetraploid *Pinctada martensii* in eggs from triploid

He Maoxian, Shen Qi, Lin Yueguang, Hu Jiangxing, Jiang Weiguo

(South China Sea Institute of Oceanology CAS, Guangzhou 510301)

ABSTRACT Tetraploidy was induced by inhibiting the first polar body in eggs from triploid *Pinctada martensii* (Dunker) fertilized with haploid sperms with $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ cytochalasin B (CB) treatment. The effects of treatment duration and timing of treatment after fertilization on embryonic hatching rate and the percentage of tetraploid were examined, the growth and survival of larvae were compared between treated group, untreated group and diploid control. The results indicated that the hatching rate was inversely related to treatment duration time, but the percentage of tetraploid was positively related to treatment duration time. Two optimal moments for treatment application were determined. Optimal treatment duration time was 15-18min, optimal timing of treatment was 3-5min before the release of polar body 1. The percentage of tetraploidy embryos was 20% averagely, the percent harvest of spat was only 0.02% due to a heavy mortality of larvae. There was no difference in growth of larvae between treated group and untreated group ($p > 0.05$), but the growth of larvae in both groups was slower than that of diploid control and the difference was significant ($p < 0.05$).

KEYWORDS *Pinctada martensii*, triploid, inducement, tetraploid, cytochalasin B

合浦珠母贝 (*Pinctada martensii*) 三倍体较之二倍体有较好的生产性状^[1-3], 因此在生产上将会产生很大的经济效益。但人工直接诱导难以产生 100% 三倍体。于是, 人们寄希望于培育出四倍体, 而后与正常二倍体杂交得到全三倍体。姜卫国等^[4]用细胞松弛素 B (CB), 静水压和聚乙二醇 (PEG) 抑制第一次卵裂以及用 CB 抑制第一极体释放诱导四倍体, 胚胎期及担轮幼虫期四倍体比例最高分别占 40% 和 30% 以上, 但成贝中未检查到四倍体。在其它贝类也有很多用二倍体直接诱导四倍体的研究, 尽管在胚

国家 863 资助项目(合浦珠母贝多倍体育种和养殖研究), 863-819-01-03 号。

作者简介: 何毛贤, 男, 1969 年 3 月出生, 助理研究员, 在职博士生。E-mail: hmx@scsio.ac.cn

收稿日期: 1999-03-16

胎初期都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成贝。在总结太平洋牡蛎 *Crasostrea gigas* 四倍体诱导的试验结果后,提出通过二倍体直接诱导产生的太平洋牡蛎胚胎不能存活的原因是由于较大的四倍体核在正常体积的卵中卵裂造成细胞数目不足而引起的假说,并认为增大卵子的体积可能解决这个问题^[5]。三倍体产生的卵通常比二倍体的卵大,可能有利于产生具有生活力的四倍体。1994年,他们利用三倍体太平洋牡蛎的卵与正常精子受精后,以CB抑制处理第一极体的释放,首次成功地获得了具有生活力的太平洋牡蛎四倍体,证实了上述假说^[5]。

本文用合浦珠母贝三倍体产生的卵与正常精子授精,用CB抑制其第一极体释放来进行四倍体诱导,对诱导处理条件及幼虫生长和存活等进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

合浦珠母贝三倍体于1996年5月用CB抑制第一极体以及用6-二甲氨基嘌呤(6-DMAP)抑制第二极体产生,实验前用活体鳃细胞法进行染色体检查以鉴定倍性,并在900多个三倍体中选出生殖腺发育较好的雌性三倍体约20个作亲贝。二倍体也于同一时间培育养成。

1.2 四倍体诱导处理

剖取精卵,在浓度为 0.06×10^{-3} 的氨海水中授精,根据授精时水温和胚胎发育速度在授精后不同时间进行各种诱导处理,研究起始时间及持续时间对诱导率和孵化率的影响,并对培育的幼虫进行生长测定及存活率统计。

1.3 胚胎染色体检查

胚胎发育初期(2~4细胞期)的倍性检查采用压片法。染色体统计:2N= 28 ± 2 , 3N= 42 ± 2 , 4N= 56 ± 2 , 偏离整倍体染色体数目的为非整倍体。

1.4 培育幼虫的生长及存活

存活率指在各个时期存活的幼虫总数与下池时D形幼虫总数的百分比,收苗率是指出池时幼苗总数与下池时D形幼虫数的百分比。

2 结果

2.1 三倍体雌性生殖腺

合浦珠母贝三倍体雌性生殖腺发育较二倍体差,其饱满度明显不如二倍体。在选出的生殖腺发育较好的20个雌性三倍体中,三倍体怀卵量约207~6192万,平均为1312万,卵直径约57 μ m,比二倍体产生的卵(直径约50 μ m)大14%左右,卵体积增加约50%。

2.2 四倍体诱导

1997年10月20日进行第一次试验,主要研究处理起始时间对诱导结果的影响,授精后9min开始出现第一极体。从表1中可以看出,CB处理起始时间对胚胎孵化率影响较大,在授精后8min开始处理的孵化率最高,为2.41%,而在10min才开始处理孵化率最低,只有0.27%。起始时间对四倍体诱导率的影响不是太明显,未处理组的孵化率(2.42%)高于处理组,胚胎中未检查到四倍体。二倍体组的孵化率为56.53%,显著高于三倍体与二倍体杂交组。未处理组非整倍体比例为83.50%,明显高于处理组。

表 1 0.5 μ g/mL 细胞松弛素 B 抑制第一极体诱导四倍体Tab. 1 Tetraploid induction by inhibiting the first polar body with 0.5 μ g/mL CB

组别	起始时间 (min)	持续时间 (min)	孵化率 (%)	胚胎染色体倍性比例(%)			
				2N	3N	4N	非整倍体
处理组 1	6	15	1.67	1.00	1.00	16.00	60.00
处理组 2	8	15	2.41	2.00	1.00	13.30	67.35
处理组 3	10	15	0.27	5.00	4.00	14.00	61.00
未处理组	-	-	2.42	11.00	5.50	0.00	83.50
2N \times 2N	-	-	56.53	100.00	-	-	-

注: 实验水温为 26 $^{\circ}$ C, 3N \varnothing 1 个, 2N δ 2 个

1998 年 4 月 23 日进行第二次试验, 主要研究处理持续时间对诱导结果的影响, 授精后 8min 开始出现第一极体。从表 2 看出, 处理持续时间对胚胎孵化率的影响大于对四倍体诱导率的影响。随着持续时间延长, 孵化率下降而四倍体诱导率上升, 持续处理 18min 时的四倍体率最高, 为 28.71%, 但孵化率最低, 为 10.60%; 持续处理 12min 的孵化率最高, 为 22.72%, 而四倍体率最低, 为 22.22%。未处理组的孵化率高于处理组, 但四倍体率为零, 非整倍体比例高, 达 91.75%。

表 2 0.5 μ g/mL 细胞松弛素 B 抑制第一极体诱导四倍体Tab. 2 Tetraploid induction by inhibiting the first polar body with 0.5 μ g/mL CB

组别	起始时间 (min)	持续时间 (min)	孵化率 (%)	胚胎染色体倍性比例(%)			
				2N	3N	4N	非整倍体
处理组 1	13	12	22.72	9.62	5.77	22.22	55.72
处理组 2	13	15	13.18	0.00	4.67	24.07	60.67
处理组 3	13	18	10.60	0.00	5.94	28.71	55.45
未处理组	-	-	25.58	7.22	0.00	0.00	91.75

注: 实验水温 24.9 $^{\circ}$ C, 3N \varnothing 1 个, 2N δ 2 个

2.3 胚胎染色体分析结果

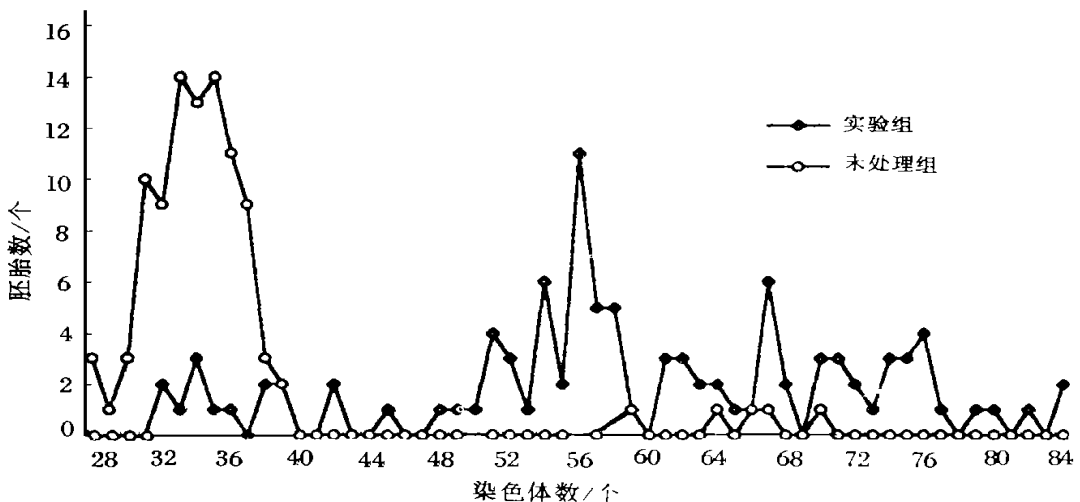


图 1 胚胎细胞染色体分布图

Fig. 1 The contribution of chromosomes of embryonic cells

每个组别共检查了 100 个左右的胚胎细胞分裂相, 处理组与未处理组胚胎染色体分布如图 1 所示: 未处理组染色体大部分分布于 2N~3N, 主要集中在 32~38; 而处理组染色体分布范围较广, 在 3N~4N, 4N~5N, 以至 5N 以上都有较多分布, 并且在 4N 有一个较明显的峰。二倍体, 三倍体及四倍体胚胎细胞染色体见图 2。



图2 二倍体,三倍体,四倍体胚胎细胞染色体中期分裂相

Fig. 2 The chromosome metaphases of diploid, triploid and tetraploid embryonic cells

(2A: 2N= 28, 2B: 3N= 42, 2C: 4N= 56)

2.4 培育幼虫的生长及存活

用于生长测量的幼虫于1997年10月20日诱导而得。处理条件为授精后6min用 $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ CB持续处理15min,幼虫于100L水族箱中培育,每3~4天用显微镜测量幼虫的壳长,其生长曲线如图3所示。

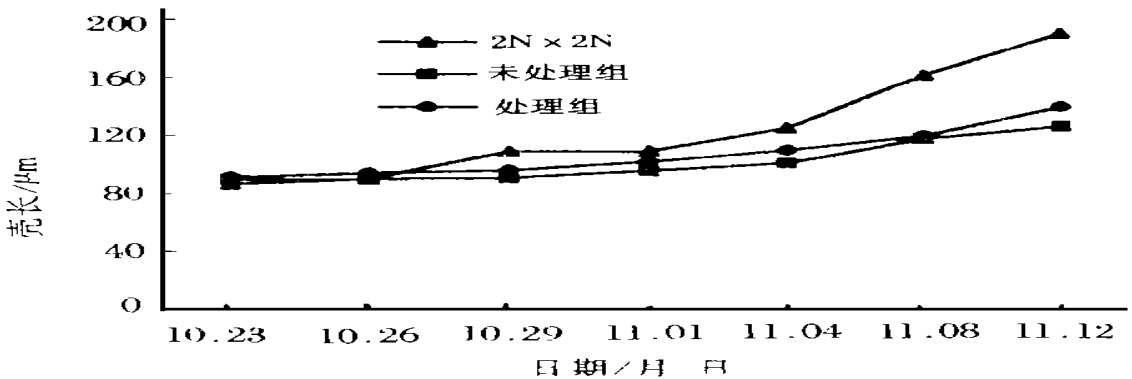


图3 培育幼虫各组别间的生长比较

Fig. 3 Comparison of growth between cultured groups

从图中可以看出二倍体组的生长曲线的斜率大于三倍体与二倍体杂交组,在培育后期,斜率进一步加大。而处理组与未处理组的生长曲线基本平行。二倍体组幼虫壳长平均日增长 $4.15 \pm 3.49\mu\text{m}$,处理组幼虫壳长平均日增长为 $2.28 \pm 1.60\mu\text{m}$,差异极显著($p < 0.05$)。但未处理组幼虫的壳长平均日增长($1.70 \pm 1.49\mu\text{m}$)与处理组差异不明显($p > 0.05$)。

表3 处理组幼虫的存活率及收苗率

Tab. 3 The survival percentage of cultured larvae and the harvest percentage of spat

组别	存活率(%)			收苗率(%)
	D形期	壳顶初期	壳顶后期	
处理组1	30.41	3.31	0.96	0.03
处理组2	-	-	-	-
处理组3	23.60	5.90	0.63	0.02
处理组4	18.45	6.31	0.67	0.01
未处理组	-	-	-	-
2N x 2N	-	-	-	-

用于存活统计的幼虫于1998年4月23日诱导而得。诱导条件为授精后18min用 $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ CB持续处理15min。分别于D形期、壳顶初期及壳顶后期统计幼虫的存活数。在收苗时计算收苗率(表3)。

因处理组第2组、未处理组和二倍体组幼虫在培养早期死亡,不能对其进行比较。从表中看出,在壳顶初期及后期存活率显著下降。三个组别共收幼苗2129个,收苗率平均为0.02%。

3 讨论

3.1 四倍体诱导

在本试验中, CB 诱导浓度的选择主要根据以前诱导三倍体及四倍体的实验来确定的。已有报道,在太平洋牡蛎中,随着大量非整倍体的死亡,四倍体的比例会逐渐上升^[5]。因此,在考虑诱导效果时,应以四倍体诱导率为主要前提,但孵化率也不能太低。结合本研究,表1中处理组1的诱导条件较理想。由于处理起始时间受水温及精卵成熟度的影响较大,特别是三倍体雌性生殖腺发育普遍较差,很难从外观上判断其成熟度。在诱导处理前,只能进行预备试验观察其第一极体出现的时间,而后确定处理起始时刻。实验表明:在第一极体出现前3~5min开始诱导处理较理想。从表2可以看出,处理组3产生了较好的诱导效果。但持续时间受水温影响较大,水温高时,持续时间可短一些;反之,当水温较低时,又要相应延长。结合诱导三倍体的实验结果,持续时间15~18min较合适。据此,获得较好四倍体诱导效果的诱导条件为:在第一极体出现前3~5min用0.5 μ g/mL CB持续处理受精卵15~18min。

用太平洋牡蛎三倍体产生的卵与单倍体的精子受精,实验组用CB处理受精卵阻止第一极体排出,大部分卵发育成非整倍体,倍性分布于3N~4N和4N~5N之间,小部分卵发育为四倍体,并认为是联合二极分离的结果^[5]。在本研究中,胚胎细胞染色体倍性分布与其一样,反映了合浦珠母贝也可能存在同样的分离情况。按照这种分离方式,两组二分体完全一致地以二极形式进行第二次减数分裂,42个染色单体作为第二极体被排出,42个染色单体保留于卵粒中,与14个来自父本的染色单体结合,形成四倍体。如果不经CB处理,来自母本的21个染色单体与父本的14个染色单体结合,形成35个染色体的胚胎。从图1可以看到,未处理组在2.5N处有一个明显的峰。因此,可以认为合浦珠母贝的染色体分离方式与太平洋牡蛎一样,不过还有待于今后详细的观察予以证明。

从第一次试验和第二次试验比较可以看出,受精卵第一极体出现时间差异较大,而且胚胎孵化率和四倍体率也有明显差异,这可能是水温等实验条件不同造成的,而雌性三倍体个体的卵的成熟度差异可能是决定性的。由于合浦珠母贝雌性三倍体生殖腺普遍发育较差,怀卵量少,利用三倍体与二倍体杂交来诱导四倍体,三倍体产生的卵将是一个很大的制约因素。

3.2 幼虫培育

该方法处理所获得的幼虫,在培育过程中死亡特别严重,特别是开始进入壳顶初期及壳顶中后期。这可能是 $3N \times 2N$ 杂交通过CB处理抑制第一极体产生了大量的非整倍体的缘故,这些非整倍体多数在胚胎发育和幼虫生长过程中不断死亡;此外,产生的四倍体幼虫也可能由于生活力较低,造成了整个处理组幼虫较高的死亡率。因此,在幼虫培育过程中必须创造较好的生态条件,不断清洁池底,排除死亡个体。1998年4月23日培育的幼虫,收苗率平均只有0.02%,低于太平洋牡蛎的0.074%^[5]。

从图3可以看到,在开始时,二倍体组的平均壳长小于处理组及未处理组,但很快就超过了,而且差异越来越大,说明二倍体的生长速度明显较快。在测量时,我们就发现下池时的三倍体与二倍体杂交组($3N \times 2N$)的D型幼虫比二倍体组的大,这主要是三倍体的卵比二倍体大的缘故。由于在 $3N \times 2N$ 中有很多非整倍体,这些非整倍体形态畸形,摄食差,游动不正常,生长缓慢,而最终不能存活,制约了整个组别的生长。几次试验中 $3N \times 2N$ 未处理组都未培育成功,以前的试验也未能培育出幼虫^[6]。但太平洋牡蛎 $3N \times 2N$ 虽未经CB处理仍可培育成功。在合浦珠母贝,是因为种的差异本身不能存活,还是因为培养条件影响而失败还有待实验分析。

我们对试验养成的9个稚贝初步进行了倍性检查,未发现四倍体,主要是二倍体,三倍体及一些非整倍体。由于这次检查的数量有限,还难以得出结论。对大量个体进行倍性鉴定及核型分析,以及是否

有存活的合浦珠母贝四倍体存在将继续研究。

参 考 文 献

- 1 姜卫国, 许国强, 林岳光等. 合浦珠母贝三倍体和二倍体的生长比较. 热带海洋, 1991, 10(3): 1~ 7
- 2 姜卫国, 林岳光, 何毛贤. 合浦珠母贝三倍体育珠的中间生产性试验的初步结果. 见: 邹仁林. 大亚湾海洋生物资源的持续利用. 北京: 科学出版社, 1996. 21~ 24
- 3 林岳光, 姜卫国. 三倍体和二倍体合浦珠母贝育珠比较的初步研究. 热带海洋, 1993, 12(3): 90~ 94
- 4 姜卫国, 林岳光, 何毛贤. 合浦珠母贝人工诱导四倍体的研究. 热带海洋, 1998, 17(2): 45~ 51
- 5 Guo X, Allen S K. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body 1 in eggs from triploids. Mol Mar Bio Biotech, 1994, 3(1): 42~ 50
- 6 何毛贤, 林岳光, 姜卫国. 三倍体合浦珠母贝不育性研究. 热带海洋, 1996, 15(2): 17~ 21