

# 皱纹盘鲍三倍体的研究

王子臣 张国范 王一平\* 吴龙胜\*

杨辉\* 朱雷阳\* 常亚青\*

(养殖系)

夏福祖 王奇

(大连碧龙海珍品有限公司)

**摘要** 本文报道了用细胞松弛素B(cytochalasin B)和高温及低温休克诱导皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 三倍体的结果。在23℃条件下,选用0.1mg/L,0.3mg/L,0.5mg/L CB 浓度;MI 处理组倍化率分别为3.7%,51.3%,23.6%;MII 处理分别为1.1%,48.6%,27.9%。高温休克选用25℃,30℃,32℃ (MI、MII) 且倍化率最高为40.0%(30℃,MII)。低温休克选用3.0℃ (MI), 1.0℃,2.0~3.0℃, 4.0~5.0℃ (MII), 倍化率最大值为88.3%(3℃MI)。大多数实验组MI处理的倍化率高于MII 处理。孵化率与倍化率呈负相关。

**关键词** 皱纹盘鲍, 三倍体, 细胞松弛素B, 温度休克

## 前言

动物多倍体现象及其生物学意义在本世纪六十年代就已为科学家们所注意<sup>(2) (12)</sup>,但其商业价值的发现还是在七十年代以后<sup>(4) (11)</sup>,而贝类多倍体的研究和利用则稍迟一些<sup>(5)(7) (13)(14)(15)(16)</sup>。目前美国市场已出售三倍体牡蛎 (*Crassostrea gigas*), 价格高于二倍体牡蛎<sup>(7)</sup>。

三倍体的生物学优势现已为人们所认识,这方面的研究有Stanley等<sup>(14)(15)(16)</sup>。他们在研究中发现三倍体美洲牡蛎 (*C. Virginica*) 比二倍体生长快12%,软体部比二倍体重40%,糖原多5倍;海湾扇贝 (*Argopecten irradians*)<sup>(16)</sup>闭壳肌比二倍体重73%,软体部重36%,糖原也有明显增加。目前,国内已有一些科研和生产单位开始从事贝类三倍体的研究并试图进一步向生产规模转化。我院1986~1989年在大连碧龙海珍品有限公司和大连水产养殖公司石庙苗种场同时进行了温度(高、低温)休克诱导皱纹盘鲍三倍体的研究,成功地诱导出了三倍体幼鲍。1989年又在大连凌水养殖二场和碧龙公司进行了CB诱导皱纹盘鲍三倍体的研究,亦培育出三倍体幼鲍。各次实验重现性均较为理想。

## 1 材料和方法

实验用皱纹盘鲍之精卵,取自大规模生产人工促熟亲鲍。受精及孵化采用常规方法<sup>(1)</sup>。

细胞松弛素B(CB),为美国 Sigma 公司产品。由于CB不溶于水,故先将其溶到二甲亚

本文于1989年11月1日收到。\* 系我院历届毕业生。

砒 (DMSO) 水溶液中, 依所需浓度按比例加入实验海水中。用CB诱导三倍体时, 分别在第一次成熟分裂(M I)和第二次成熟分裂(M II)期间处理受精卵。CB浓度分别选用0.1mg/L, 0.3mg/L, 0.5mg/L; 并分别佐以 0.2ml/L DMSO。处理持续时间为17分钟。CB 处理后再用 0.2ml/L DMSO处理20分钟, 以除去细胞表面剩余之CB。经清洁海水冲洗后, 移到正常海水中孵化。实验水温为23℃ ± 0.2℃ (表 1)。

表 1      细胞松弛素B诱导皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)三倍体各组实验条件组合( 986—1989)

组 别	项 目	CB(mg/l) DMSO(ml/l)	处理开始时间 (分)	分 裂 时 期	处理持续时间 (分)
A		0.1 0.2	受精后 5 分钟	M I	17
B		0.1 0.2	受精后22分钟	M II	17
C		0.3 0.2	受精后 5 分钟	M I	17
D		0.3 0.2	受精后22分钟	M II	7
E		0.5 0.2	受精后 5 分钟	M I	17
F		0.5 0.2	受精后22分钟	M II	17
G		0.0 0.2	受精后 5 分钟	M I	7
H		0.0 0.2	受精后22分钟	M II	17
I		0.0 0.0	皱纹盘鲍正常发育对照		

低温休克诱导三倍体时, 将受精后12分钟 (M I) 的受精卵移到3.0℃ 低温海水中静置一<sup>5</sup>分钟, 滤出受精卵后移到20℃ 海水中进行正常培育。同一批受精卵的另一半在受精后32分钟 (M II) 分别移到1.0℃ , 2.0~3.0℃ , 4.0~5.0℃ , 海水中; 并分别静置 5 分钟, 15分钟, 20分钟后滤出; 移到正常海水中继续培育 (图 1) 。

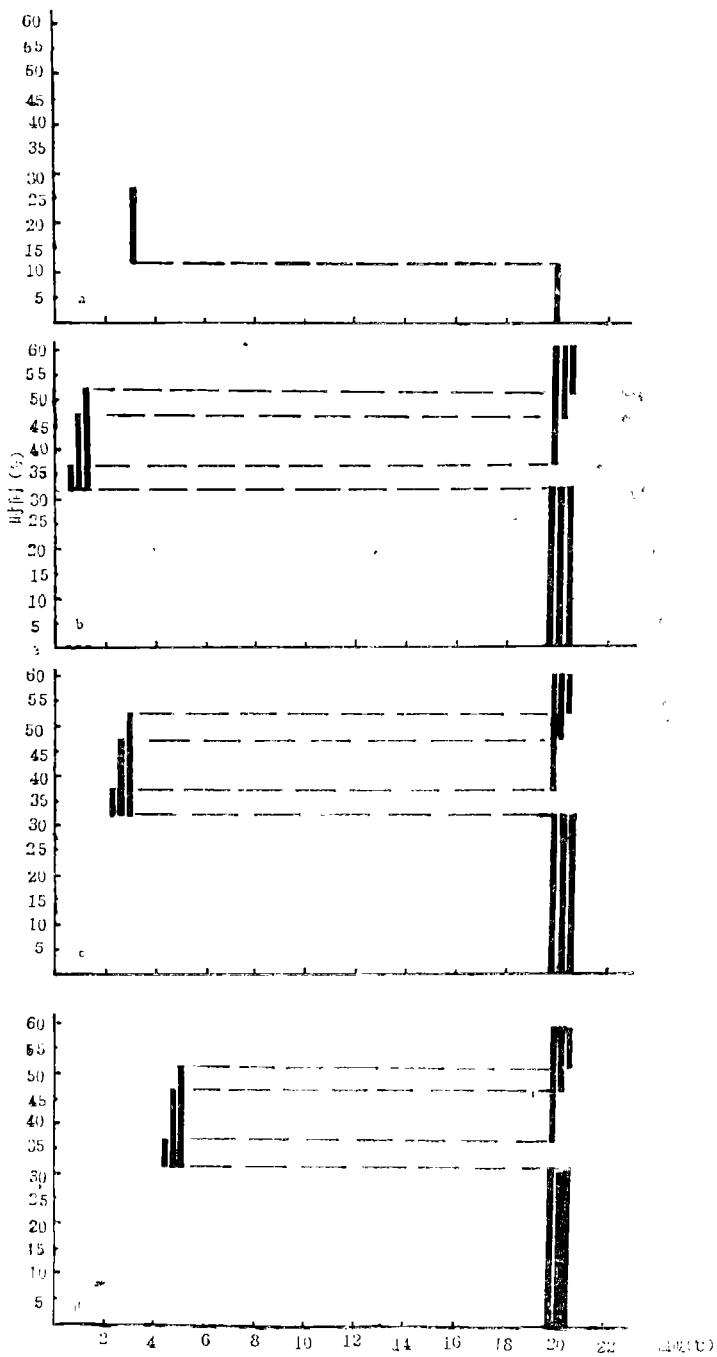
高温休克的温度分别取25℃ , 30℃ , 32℃ ; M I 处理在受精后 7 分钟进行, 处理持续时间分别为 3 分钟, 3 分钟, 2.5 分 钟; M II 处理在受精后22分钟进行, 处理持续时间分别为 3 分钟, 2.5 分钟, 2.5 分钟 (图 1) 。处理完毕皆移到20℃ 海水中继续培育。

倍性检查系采用染色体计数法。皱纹盘鲍2n = 36, 3n = 54 (图版 I , 见72页) 。

2 结 果

1) 细胞松弛素B试验组的倍化率, 以0.3mg/L CB浓度组最高, 为51.3% , 0.5mg/L CB浓度组平均倍化率比 0.1mg/L CB浓度组高23.3%。倍化率与CB浓度间不呈正相关。M I 处理的倍化率大多高于M II 处理 (表 2; 图 2) 随着 CB 浓度的升高, 担轮幼虫孵化率降低, 畸形率增加, 到面盘幼虫亦如此。而M I 处理则比 M II 处理担轮幼虫及面盘幼虫的生成率要高, 畸形率稍低。除0.1mg/L CB浓度组外, 其余两组亦为M I 处理比M II 处理的存板率高一些。DMSO对胚体的发育及存活有一定影响, 但不发生多倍体 (表 2) 。

2) 低温休克试验组, 在 3.0℃ 条件下处理受精卵的倍化率为 88.2% , 到66小时的面盘幼体生成率为 38.8%。在相似温度条件下 (2.0—3.0℃) , M II 处理的倍化率则较低, 为 13.3% , 但生成率较高, 为 82.4% (66小时) 。M II 低温休克的倍化率结果规律性不强。在 1.0℃ 条件下处理15分钟的倍化 率为 13.3% , 66小时生成率最大值出现在 5 分钟处理组, 为 61.4%。在 2.0~3.0℃ 条件下倍化率及66小时生成率最大值皆出现在15分钟组。在 4.0~5.0℃ 条件下, 倍化率最大值出现在20分钟组, 而生成率出现在15分钟组 (表 3) 。由此可见, 随



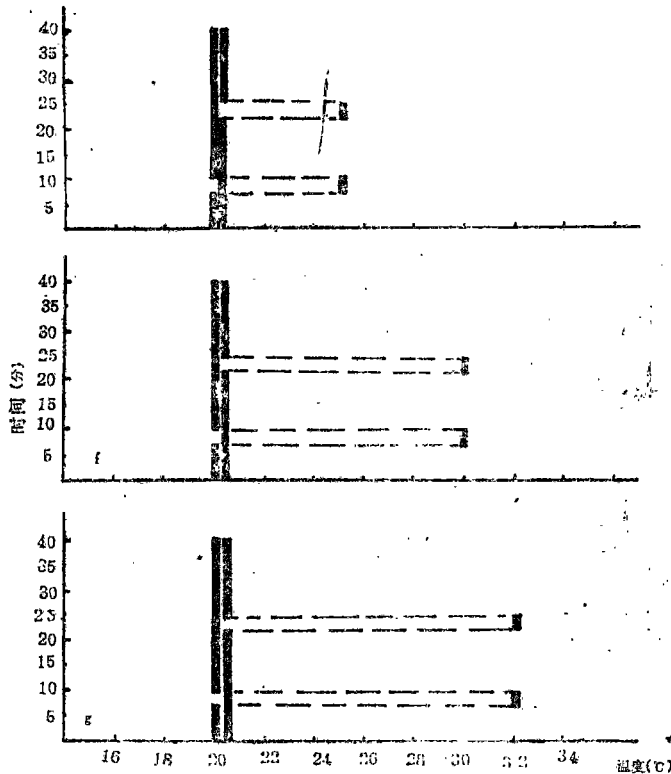


图1 温度休克诱导皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)三倍体的起始温度、处理温度和处理时间(大连水产学院1986~1989)

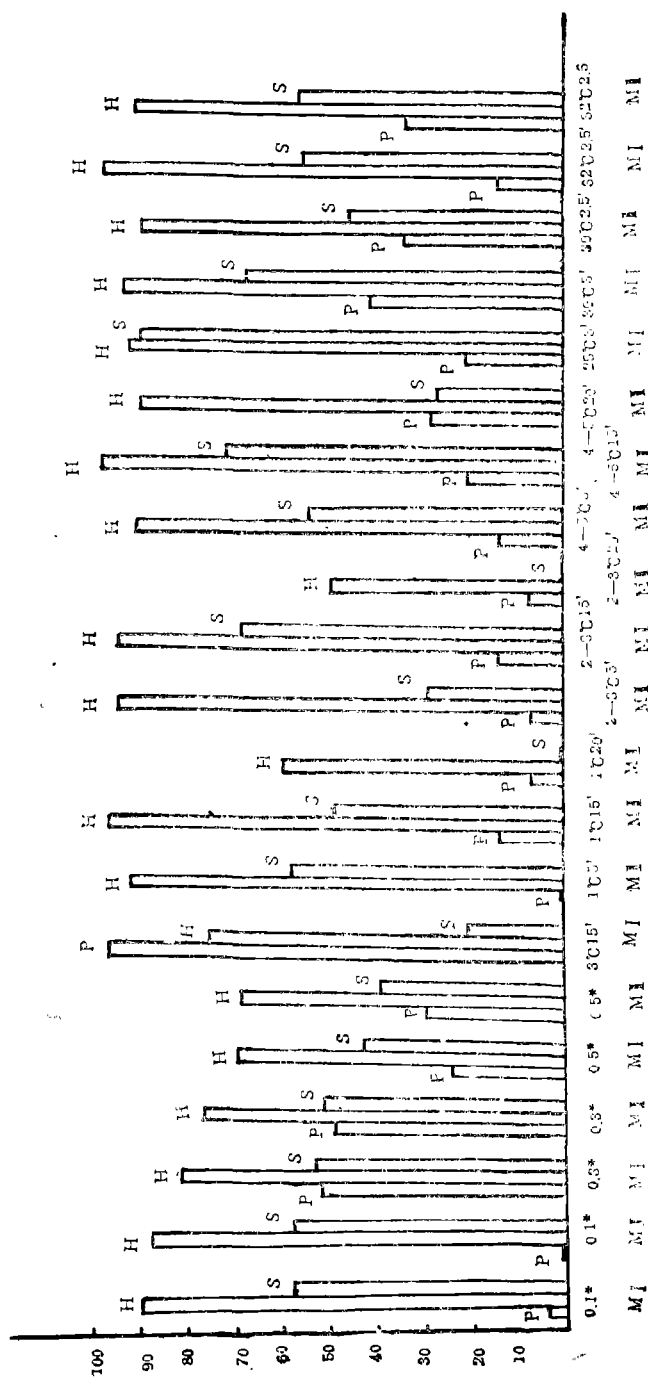
a 低温休克3°C处理时间15分钟(MI) b 低温休克1.0°C处理时间5,15,20分钟(MI)  
c 低温休克2-3°C处理时间5,15,20分钟(MI) d 低温休克4-5°C处理时间5,15,20分钟(MI)  
e 高温休克25°C处理时间3分钟(MI, MI) f 高温休克30°C处理时间3分钟(MI) 2.5分钟(MI) g 高温休克32°C处理时间2.5分钟(MI, MI)。

表2 细胞松弛素B诱导皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)三倍体的倍化率、畸形率和生成率(1988~1989)

组别	项目 (%)	15小时担轮幼虫			54小时面盘幼虫		13天上板	25天存板
		孵化率(%)	畸形率(%)	倍化率(%)	生成率(%)	畸形率(%)	率(%)	率(%)
A	92.1	89.2	2.9	3.7	57.3	4.7	57.2	85.7
B	93.8	87.2	6.6	1.1	55.7	9.4	56.2	86.3
C	90.5	79.6	11.4	51.3	52.4	14.5	51.5	73.4
D	92.6	76.6	16.1	48.6	50.4	19.7	49.8	71.5
E	93.4	68.7	22.5	23.6	42.4	27.3	40.5	60.8
F	91.5	68.0	24.3	27.9	38.7	31.1	41.7	58.7
G	90.5	87.2	1.7	—	65.4	5.3	65.6	80.4
H	91.5	87.5	2.0	—	63.2	7.0	64.3	76.7
I	92.5	90.2	0.9	—	68.4	1.5	72.7	90.4

随着水温的升高,则处理的时间必须延长。

3) 高温休克试验组,在25°C、30°C和32°C三个温度梯度下,MI和MI'处理组的倍



细胞松弛素B、温度休克纹纹鲈(*H. alicis discus hamneri*)三倍体各组实验结果比较 (大连水产学院 95—9.9)

表 3 低温休克诱导皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)三倍体的倍化率、畸形率和生成率 (1976~1989)

分裂 时期	温 度 (℃)	处理开始 时间(分)	处理持 续时间 (分)	18小时担轮幼虫		42小时面盘幼虫			65小时面盘幼虫		
				孵化率 (%)	倍化率 (%)	生成率 (%)	变态率 (%)	畸形率 (%)	生成率 (%)	变态率 (%)	畸形率 (%)
M I	3.0	受精后2分	15	73.6	88.2	51.7	62.7	17.2	38.8	68.5	21.3
		受精后32分	5	90.9	0.0	17.7	73.7	16.7	64.4	80.0	26.7
		受精后32分	15	95.0	13.3	84.4	71.9	21.7	57.4	77.4	24.1
		受精后32分	20	59.4	6.7	83.4	50.0	10.0	0.0	0.0	0.0
M II	2. --3.	受精后32分	5	92.9	6.7	17.5	77.5	22.6	32.3	51.6	29.0
		受精后32分	15	93.6	13.3	81.3	71.9	30.4	82.4	82.4	17.7
		受精后32分	20	47.3	6.7	26.3	26.3	100.0	0.0	0.0	0.0
		受精后32分	5	89.3	13.3	91.3	73.3	22.2	58.1	74.2	29.0
	4. --5.	受精后32分	15	96.2	20.0	93.0	76.7	26.1	75.5	79.2	20.4
		受精后32分	20	87.7	26.7	80.0	68.0	76.5	32.3	38.7	41.9
		受精后32分	20	87.7	26.7	80.0	68.0	76.5	32.3	38.7	41.9
		受精后32分	20	87.7	26.7	80.0	68.0	76.5	32.3	38.7	41.9

表 4 高温休克诱导皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)三倍体的倍化率、畸形率、和生成率、(1936~1989)

项目 分裂 时期	温 度 (℃)	处理开始 时间(分)	处理持 续时间 (分)	18小时担轮幼虫		42小时面盘幼虫			66小时面盘幼虫		
				孵化率 (%)	倍化率 (%)	生成率 (%)	变态率 (%)	畸形率 (%)	生成率 (%)	变态率 (%)	畸形率 (%)
M I	25	受精后 7 分	3	90.0	20.0	90.9	90.9	15.0	97.0	93.0	42.4
	30	受精后 7 分	3	91.3	40.0	68.3	15.4	42.4	95.0	90.0	30.0
	32	受精后 7 分	2.5	95.6	13.3	61.5	80.5	19.4	87.5	17.5	62.5
M II	25	受精后22分	3	67.2	—	19.1	78.3	39.3	87.5	68.8	43.3
	30	受精后22分	2.5	17.2	33.3	60.0	82.5	62.5	74.1	67.3	22.4
	32	受精后22分	2.5	91.5	33.1	66.0	10.7	42.9	13.7	74.4	7.0

化率是不同的。M I 组在30℃ 条件下持续 3 分钟的倍化率最高，为 40.0%。孵化率和生成率亦有相同的趋势（表 4）。

3 讨 论

从温度休克的实验结果看，以低温休克 3℃ M I 处理的倍化率最高，为 88.2%。高温休克(25℃, 30℃, 32℃)的倍化率 (M I, M II) 最高为40.0%。这种差异除了可能与处理的方法差异有关外，也可能与大连地区的皱纹盘鲍对温度的适应能力有关。故在选定温差时，应考虑亲鲍的培育水温（人工催熟亲鲍），催产水温及亲鲍采集地的环境条件，亦应保证一定的处理时间。本实验证明，用低温休克法，无论M I 处理，还是M II 处理，其持续时间以15分钟最好，即倍化率和生成率最高。高温休克的持续时间本实验选择在 2.5~3.0 分钟，对高温的最佳处理强度还有待进一步探讨。

目前尚未见到有关用CB诱导皱纹盘鲍三倍体的报道。在双壳类(7)(14)(16)倍化率与CB浓度在一定范围内一般呈正相关，即随 CB 浓度增加，倍化率升高。但在皱纹盘鲍，倍化率最大值出现在0.3mg/L CB,而在0.5mg/L CB的倍化率反而较低，但亦高于0.1mg/L CB组。同双壳类的比较可以看出，在 CB 浓度 相 同 的 条 件 下，倍化率与受处理的受精卵的表面积

(绝对值)和密度有关,即受处理的受精卵的直径越大,或其密度越大,CB浓度亦应相应增加,但0.5mg/L CB组的倍化率低于0.3mg/L CB组,其原因目前还不清楚。

虽然温度休克和CB处理两种方法都可诱导三倍体,但其机制却稍有不同。温度休克可引起细胞内酶构型的变化,不利于酶促反应,导致细胞分裂时形成纺锤丝所需ATP的供应途径受阻<sup>(3)</sup>,使细胞质不能随染色体加倍而分裂,从而形成多倍体细胞。由于温度休克是抑制染色体向两极移动,只有在一定时刻处理方有效,而细胞分裂存在一定的不同步性,故不可能百分之百都形成三倍体。此外,温度休克的作用主要发生在细胞内部,故在处理时必然会影响到其它细胞器的结构和功能,从而对孵化率和以后的发育都会产生比较大的影响。而CB处理的作用主要是阻止微丝网的组装,细胞赤道收缩带不能充分形成,以阻碍细胞分裂<sup>(3)(6)</sup>。由于所有细胞在不同时期对CB都是敏感的<sup>(6)</sup>,故形成三倍体的比率就较大。从理论上讲,可达到百分之百的。此外由于CB主要作用于细胞表面,对细胞器的影响不大,故畸形率也可望较低。但从本实验结果看,倍化率最大值仅为51.3%,这除了与细胞大小、处理卵的密度等因素有关外,可能与处理的水温有关<sup>(7)</sup>。今后应加强CB诱导鲍三倍体的研究,以尽可能缩小理论与实验结果之间的差距。

人们利用三倍体的目的是希望在相似条件下(如设备、饵料、投资、管理),获得更大的商业利益(在美国还利用三倍体保护生态平衡<sup>(2)</sup>),但在三倍体研究工作开展的比较早的鱼类,特别是生长速度较慢的种类,这种利益往往不显著,其主要原因可能是由于形成三倍体的时期(M I或M II)不同,从而使个体的等位基因杂合度(Heterozygosity)高低不同所致。从杂合子减数分裂过程可以预测,保留第一极体并参加新个体染色体组的构成比保留第二极体将会增加等位基因的杂合度。如二倍体牡蛎(*C. virginica*)的杂合度为26%,保留第一极体形成的三倍体杂合度为38%,而保留第二极体的二倍体与二倍体一样也是26%<sup>(15)</sup>。杂合子的耗氧率较低,能量转化率较高,抗逆性强,在很多情况下杂合度与生长和体重呈正相关<sup>(8)(9)(10)(11)</sup>。由此可见正确掌握形成三倍体的时间既可以增加等位基因的杂合度从而提高能量的利用率,也可以促使形成配子的能量转化,使机体经济价值较大部分的比例增加、质量提高<sup>(7)</sup>。故在生长速度慢而经济价值较大的种类,应选择在第一次成熟分裂期诱导三倍体。而且从本文结果看,其倍化率亦较高。

由于药物处理和温度休克都会造成受精卵的损伤,当然有些可能是由于形成嵌合体的原因,使孵化率及存活率都有所下降,其下降的比率与处理强度和持续时间有关(图2),一般来说,处理强度大,对细胞损伤愈大,畸形率越高,处理时间过长亦然。由于我国现行鲍人工育苗所采用的亲鲍大多要经过近三个月的人工催熟,因此如果生产单位欲进行三倍体的生产就必须增加亲鲍的使用量(大约需增加1~2倍)。而采苗时所投放的后期面盘幼虫数亦应相应增加。考虑到三倍体对现行人工育苗工艺的影响,选择合适的处理强度及处理时间是十分重要的。从本文结果可以看出,对于人工催熟亲鲍(大连沿海)选用低温休克3℃(M I)处理是适宜的。而CB处理的最佳组合,特别在CB浓度、DMSO浓度、处理的起始和持续时间及处理温度等方面还需进一步研究。

本研究在实验期间曾得到大连普龙海珍品有限公司夏福祖、王琦;大连水产养殖公司石庙种场宋协民、张金世、姜宗信、刘国勇;大连市凌水养殖二场牛明宽的大力支持,在此表示衷心感谢。

## 参 考 文 献

- (1) 陈永等, 皱纹盘鲍人工自苗的初步研究. 动物学报, 1977; 13(1): 35~40
- (2) 姜允东, 国外对鱼类多倍体育种的研究. 水产学报 1934; 8(4): 343~353
- (3) 吉斯A.E著, 高天礼译. 细胞生理学. 北京: 科学出版社, 1984
- (4) Allen, S.K., Jr., P.S. Gagnon and H.Hidu, Induced triploidy in the soft shell clam cytogenetic and allozymic confirmation. J. Hered., 1932 73:421~428
- (5) Arai, K., F. Naito and K. Fujino, Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatment. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1936; 52(3):417~422
- (6) Copeland, M., The cellular response to cytochalasin B: a critical overview. Cytologia, 1974; 39:709~727
- (7) Downing, S.L. and S.K. Allen, Jr., Induced triploidy in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*: optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. Aquaculture, 1987; 61:1~15
- (8) Garton, D. W., Relationship between multiple locus heterozygosity and physiological energetics of growth in the estuarine gastropod *Thais haemastoma*. Physiol. Zool., 1984; 57(5): 530~543
- (9) Gaffney, P.M. and T.M. Scott, Genetic heterozygosity and production traits in natural and hatchery populations of bivalves. Aquaculture, 1984; 42: 289~302
- (10) Koehn, R.K. and P.M. Gaffney, Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. Mar. Biol., 1934; 52:1~7
- (11) Longo, F.J., The effects of cytochalasin B on the events of fertilization in the surf clam *Spisula solidissima*. Polar body formation J. Exp. Zool., 1972; 12~344
- (12) Merrell, D.J., 1934. Ecological genetics. Longman, London.
- (13) Quillet, E. and P.J. Panelay, Triploidy induction by thermal shocks in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. Aquaculture, 1936; 57:271~279
- (14) Stanlay, J.G., A.S. K. Allen, Jr. and H. Hidu, Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. Aquaculture, 1931; 23:1~10
- (15) Stanlay, J.G., H.Hidu and S.K. Allen, Jr., Growth of American oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. Aquaculture, 1934; 37:147~155
- (16) Tabarini, C.L., Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effects on growth and gametogenesis. Aquaculture, 1984; 42: 151~160

## Triploidization of the Pacific Abalone with Cytochalasin B and Temperature Shock

Wang Zichen, et al

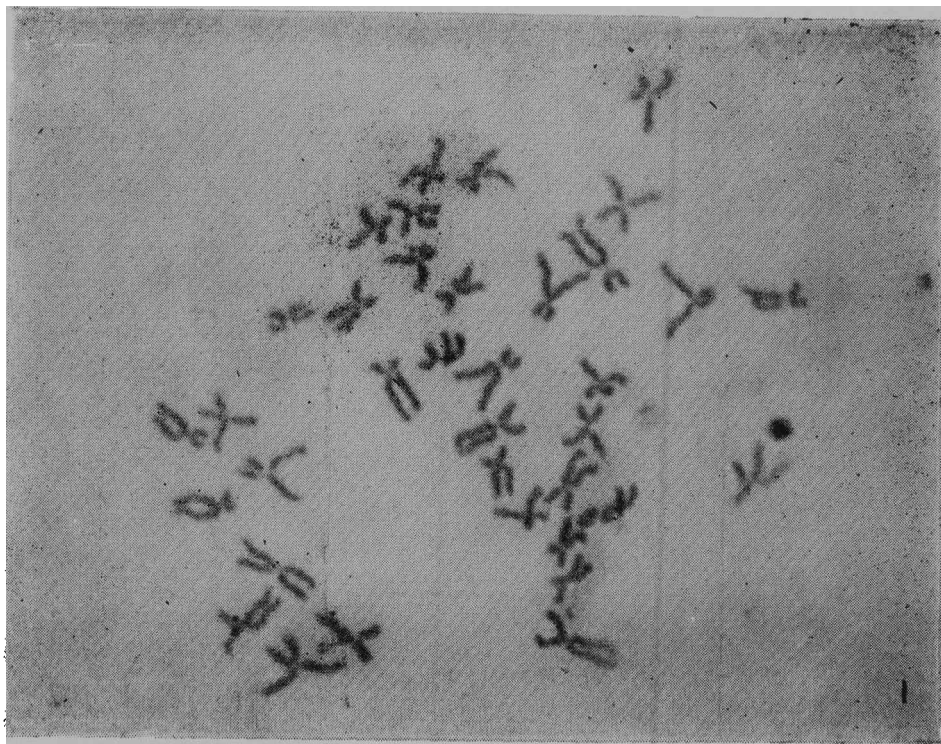
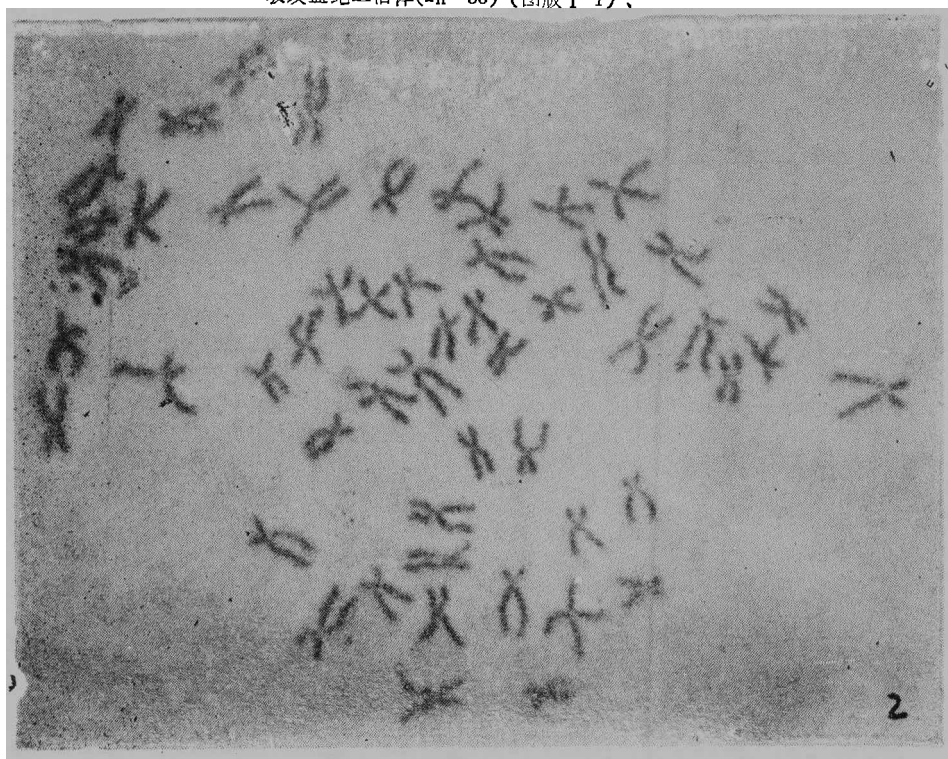
### Abstract

Triploidy was induced in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*, by treating newly fertilized eggs with cytochalasin B and temperature shock. After examining number of times, intensity and duration of treatments, it became evident that treating eggs at the 0.3mg/l cytochalasin B treatment for 17 min, 5min after insemination, at 3°C of cold shock for 15 min, 12 min after insemination can inhibit release of the first and the second polar body and result in induction of thousands of triploid animals of the Pacific abalone in quite a high frequency.

**Key words:** *Haliotis discus hannai*; Triploidy; Cytochalasin B; Temperature shock



图版 I

皱纹盘鲍二倍体( $2n=36$ ) (图版 I·1),三倍体( $3n=54$ ) (图版 I·2)