

静水压休克诱导近江牡蛎三倍体的发生*

Triploidy Induction by Hydrostatic Pressure Shock in *Ostrea Rivularis*

陈晓汉 叶力 吴斌 刘汀
Chen Xiaohan Ye Li Wu Bin Liu Ting

(广西海洋研究所 北海市南珠路 536000)

(Guangxi Institute of Oceanography, Nanzhu Road, Beihai, Guangxi, 536000)

摘要 用静水压休克诱导近江牡蛎 (*Ostrea rivularis*) 三倍体的产生。静水压处理使受精卵的减数分裂纺锤体解体,处于中期 I 和后期 I 受处理的受精卵可恢复形成三、四极纺锤,之后产生两个单倍性雌原核而发育为 3n-1pb;处于末期 I 和中期 II 期与处一后期 II 期和末期 II 受处理的受精卵可不恢复形成纺锤体,分别产生一个二倍性雌原核或两个单倍性雌原核而发育为 3n-2pb。27℃ 下受精卵减数分裂的同步性较高。在授精后 26min 或 36min 以 230kg/cm² 的静水压持续处理 15min, 分别得到 3n-1pb (48%) 和 3n-2pb (62%) 的诱导峰值。实验表明,压力的起始时间应选择在减数分裂后期 I 或后期 II。本文还解释了四倍体和五倍体的形成机理。

关键词 近江牡蛎 三倍体 静水压休克

Abstract Hydrostatic pressure shock applied for triploidy induction in *Ostrea rivularis* was studied. Meiotic spindles of zygotes can be damaged by pressure treatment. The zygote treated in metaphase I or anaphase I may reform a 3- or 4- polar spindle after pressure released, and produces two haploid female pronuclei, then becomes a 3n-1pb. While the zygote treated in both telophase I or metaphase II and anaphase II or telophase II may not reform meiotic spindle after pressure released, and directly produces one diploid female pronucleus or two haploid ones respectively, and then becomes a 3n-2pb. Development of zygotes via meiotic division is more synchronous at 27.0℃ than at lower temperature. When 230kg/cm² hydrostatic pressure starts at 26 min or 36min after insemination and lasts for 15 min, the peak values of triploid inductivity, 48% for 3n-1pb and 62% for 3n-2pb, can be yielded respectively. Based on the cytogenetic observation on chromosome behavior of zygotes in treated groups, we think that optical starting time of hydrostatic pressure shock for triploidy induction should be in anaphase I or anaphase II. The mechanism of tetraploid and pentaploid formation is also explained in this paper.

Key words *Ostrea rivularis*, hydrostatic pressure shock, triploidy

人工诱导贝类多倍体的工作,已在美洲巨蛎 (*Crassostrea virginica*)⁽¹⁾、长巨蛎 (*C. gigas*)⁽²⁾、海湾扇贝 (*Argopecten irradians*)⁽³⁾、马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*)⁽⁴⁾、等十几种贝类中获得成功。三倍体贝类因其性腺发育受阻,而在生长速度、抗逆性、抗病性、生活力等方面具有明显的生物学优势。例如与二倍体相比,三倍体美洲巨蛎生长速度增加 12%,软体部

增重 40%,糖原含量增高 5 倍⁽⁵⁾,三倍体海湾扇贝也有类似的结果⁽³⁾。因此三倍体贝类的商业开发受到人们的普遍重视。

通常采用压力休克、温度休克和细胞松弛素(简称 CB)处理干预贝类的减数分裂而诱导三倍体的发生。既往的研究着重于诱导的操作方法,对 CB 处理^(6,7)、温度休克⁽⁸⁾和静水压休克⁽⁶⁾诱导贝类三倍体发生的细胞学过程和染色体行为仅作了初步观察。

近江牡蛎 (*Ostrea rivularis*) 个体大、肉质鲜美,是广东、广西沿海的主要养殖品种。但其养殖周期长、

1993-11-22 收稿。

* 国家自然科学基金资助项目。

繁殖期品质下降并时常出现大规模的死亡,因而有必要培育生长迅速、抗病性强、品质优良的三倍体牡蛎应用于养殖生产。本实验对近江牡蛎受精卵的早期发育以及对采用静水压休克诱导产生第一极体三倍体(3n-1pb)和第二极体三倍体(3n-2pb)的过程和机制进行了详细的细胞学研究,并筛选出适宜的静水压强度、压力起始时间和持续时间等处理条件,以期为牡蛎三倍体的规模化生产提供理论依据和技术。

1 材料和方法

亲贝取自广西北海市高笔海区,为人工养殖的1.5~2龄贝。静水压压机由中科院武汉水生生物研究所设计制造。

每次实验选用雌贝4~6个,雄贝2~3个。用剖取法获得精卵,在0.06%氨海水中授精。

1.1 不同温度下牡蛎受精卵的发育速度和同步性观察

在海水盐度(S)为26.2‰,水温(T)分别为21.0℃、24.0℃、27.0℃的条件下授精,其后间隔3~5min取样1次直至卵裂期。样品经Carnoy氏液固定后用蒸馏水洗涤1次,再以Carnoy氏液固定3次(每次10min),用2%醋酸地衣红染色1~2min,滴片、封片后经50%醋酸脱色。镜检观察,统计分布于减数分裂各期相的受精卵数目。

1.2 静水压处理后受精卵的发育和染色体行为的观察

在 $T=27.0℃$ 、 $S=26.2‰$ 、压力强度为230kg/cm²、处理持续时间为15min的条件下,A、B、C实验组分别以授精后18、28、37min作为压力起始时间。在压力处理起始和结束时分别取样1次,以后间隔3~5min取样,制片方法同上。

1.3 压力强度和持续时间的筛选

$T=27.0℃$ 、 $S=24.94‰$,压力强度分别为170、200、230、260kg/cm²,压力起始时间选择在授精后33min,持续时间分别为10min和15min。

1.4 压力起始时间的确定

在 $T=27.0℃$ 、 $S=26.2‰$ 、压力强度为230kg/cm²、处理持续时间15min的条件下,分别以授精后18、20、22、24、26、28、30、33、36、39min作为压力起始时间。担轮幼虫染色体标本制片:授精后5h取上浮担轮幼虫以0.02%秋水仙素处理30min,再以20%稀释海水低渗30min,Carnoy氏液固定4次(每次10min),然后经50%醋酸解离2~3min,54℃热滴片、空气干燥后以2%Giemsa液(pH=6.8)染色。各实验组中观察染色体分散良好、染色清晰、

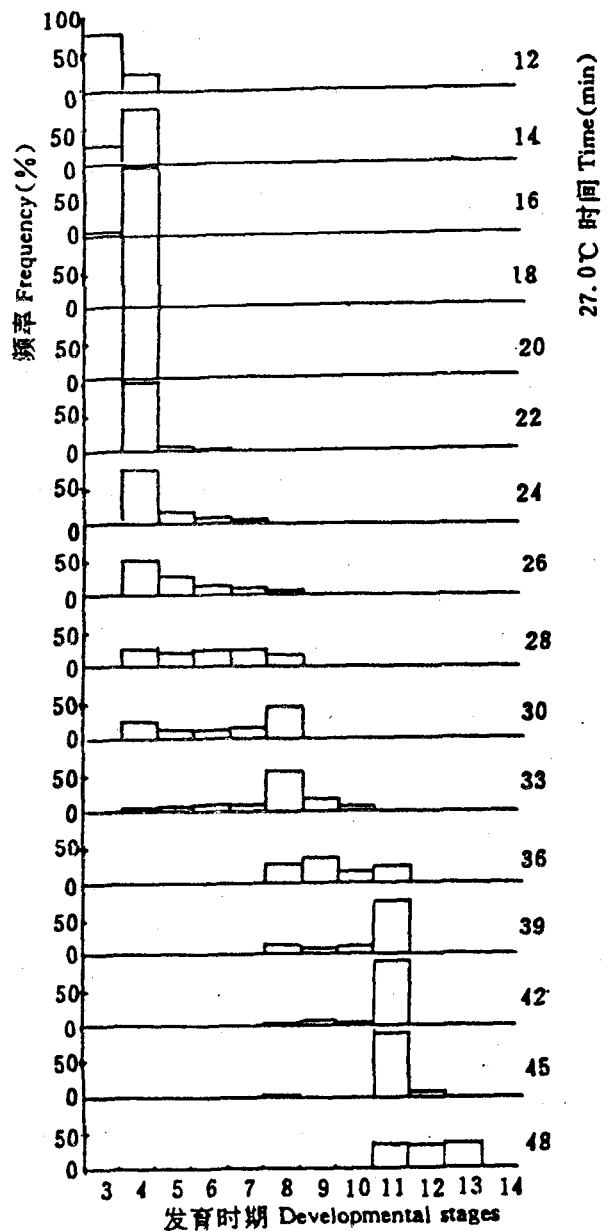


图1 27.0℃时受精卵在其早期发育各期相的频率分布
Fig 1 Frequency distribution of zygotes in different given developmental stages at 27.0℃.
min is the time after insemination.

Stage 3: 减数分裂前期 I (Prophase of first meiosis, prophase I for shor. Stage 4: 中期 I (Metaphase I). Stage 5: 后期 I (Anaphase I). Stage 6: 末期 I (Telophase I). Stage 7: 第一极体形成 (Formation of first polar bodies). Stage 8: 中期 I (Metaphase I). Stage 9: 后期 I (Anaphase I). Stage 10: 末期 I (Telophase I). Stage 11: 雌原核形成 (Formation of female pronulei). Stage 12, 13: 雌、雄原核染色体凝聚 (Chromatin condensation of female and male pronulei)

能确定染色体数目和倍性的分裂相 50 个以上。近江牡蛎 $n=10$, $2n=20$ 。

计算：受精率为受精卵占卵总数的百分比；孵化率为 D 形幼虫占受精卵的百分比；三倍体诱导率为担轮幼虫染色体标本的三倍体分裂相占分裂相总数的百分比。

2 结果

2.1 受精卵发育的同步性和速度

27.0℃时,早期发育各期相受精卵的频率分布动态如图 1 所示。受精卵的不同步性即受精卵发育速度的不均一性,致使受精卵非同步进入或通过某一期相,如在授精后 14min 受精卵处于第 1 次减数分裂中期和后期(分别简称中期 I 和后期 I,以下类同)两个期相。受精卵通过不同期相所需时间亦不相同,如中期 I 从授精后 12min 延续到 33min,其时滞 21min,受精卵在后期 I、中期 II、后期 II 的时滞分别为 9、13、12min。受精卵在时滞较长的期相,通常呈现较高的频率分布值,如中期 I 和中期 II。

随温度的上升,受精卵的发育速度加快,同步性

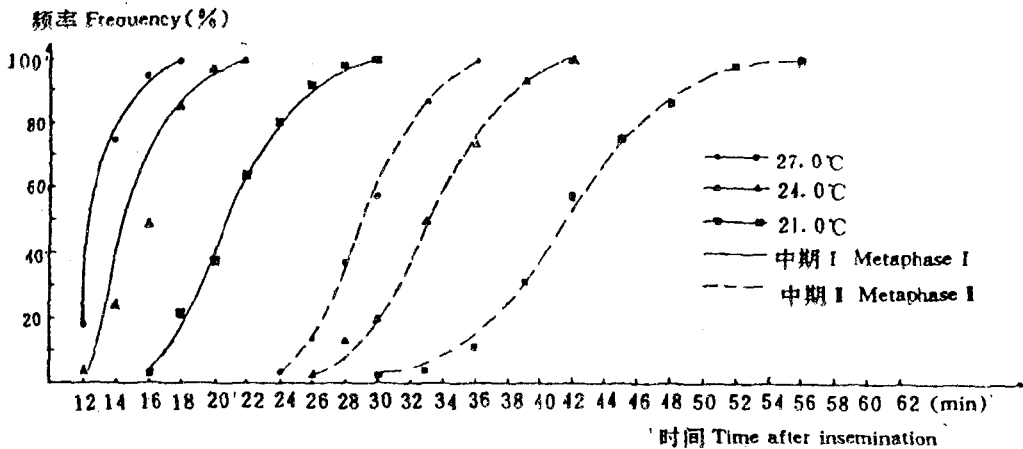


图 2 在 27.0℃、24.0℃、21.0℃ 受精卵发育到达中期 I 或中期 II 的频率

Fig 2 Frequency of zygotes developed to metaphase of first or second meiosis at 27.0℃, 24.0℃, 21.0℃

B 组实验(图 4):压力起始时,受精卵主要处于减数分裂中期 I、后期 I、中期 II 和后期 II 等四个期相。压力消失后,处于中期 I 受处理的受精卵以类似于 A 组的途径和比例发育成 3n-1pb 和二倍体;处于后期 I 受处理的受精卵大约 83% 恢复形成三、四极纺锤体发育为 3n-1pb, 约有 13% 恢复形成两极纺锤体发育为二倍体, 仅少数受精卵可不恢复纺锤体而直接形成两个二倍性(2n)雌原核发育成五倍体;处于中期 II 受处理的受精卵, 约有 50% 恢复两极纺锤体发育为二倍体, 另有 50% 左右不恢复纺锤体直接形成一个大的二倍性(2n)雌原核, 发育成为 3N-1pb;

也提高(图 2)。在 27.0℃、24.0℃、21.0℃ 条件下, 受精卵分别在授精后 16、22、30min 全部到达中期 I, 分别在授精后 33、42、56min 全部到达中期 II; 在以上各温度到达中期 I 和中期 II 所需时间分别为 6、10、12min 和 12、18、24min。受精卵在 27.0℃、24.0℃ 时发育正常, 受精率分别为 93.0% 和 95.7%, 孵化率为 32.8% 和 34.6%; 在 21.0℃ 时受精率虽较高(91.1%), 但孵化率有所下降(20.7%)。

2.2 静水压处理后受精卵的发育和染色体行为

A 组实验(图 3):压力起始时,受精卵均处于中期 I。压力处理使纺锤体解体,压力消失后 3min 可见纺锤体恢复形成。其中约有 82% 的受精卵恢复正常的两极纺锤体并按减数分裂的正常程序发育为二倍体; 约有 18% 的受精卵形成三极或四极纺锤体, 在排出一个 2n 极体之后, 形成大小、形状相似的两个单倍性雌原核和一个雄原核发育为 3n-1pb。形成三、四极纺锤体的受精卵完成减数分裂的时间比恢复两极纺锤体的受精卵约提前 10min。授精后 5h 检测出 3n-1pb 担轮幼虫占 18% 左右。

处于后期 II 受处理的受精卵在压力消失后大部分可直接形成大小和形状相似的两个单倍性(n)雌原核而发育成 3n-1pb, 小部分恢复两极纺锤体发育为二倍体。授精后 5h 检测三倍体担轮幼虫占 50%。

另外,处于中期 I 和后期 II 受处理的受精卵在恢复形成三、四极纺锤体后,有时可排出一个单倍性极体并形成三个单倍性雌原核而发育成四倍体。四倍体和五倍体都可发育至担轮幼虫,在担轮幼虫染色体标本中可以看到其分裂相,但比例很低,均为 1% 左右。

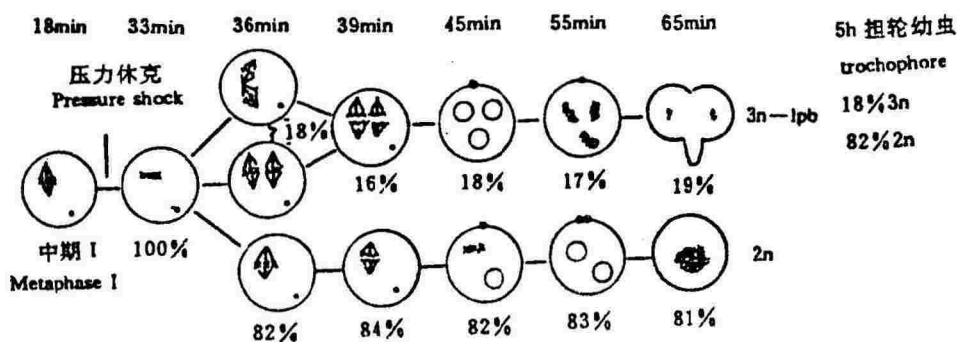


图3 授精后18min施压处理的受精卵的发育和染色体行为, 图右示担轮幼虫的染色体标本检测结果。

Fig 3 Schematic representation of typical chromosome behavior of zygotes treated with hydrostatic pressure shock starting at 18 min after insemination. Percentage of triploid trochophore verified by chromosome counts

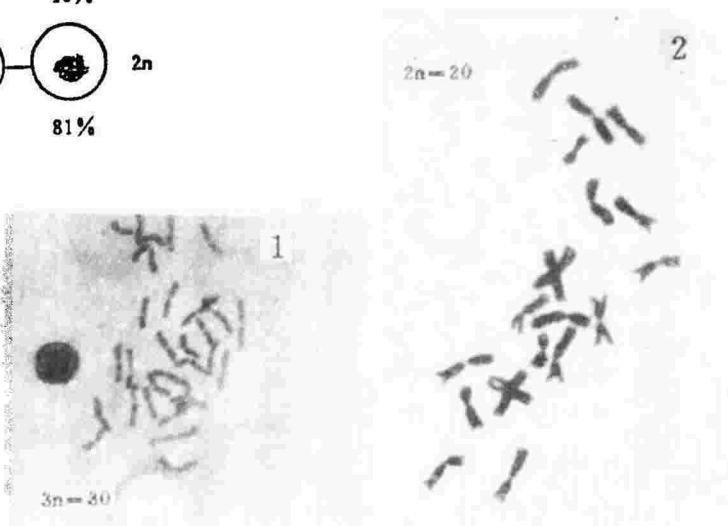
C组结果(图5): 处于末期I和中期I受处理的受精卵发育为3n-1pb和二倍体, 具有与B实验组中处于中期II受处理的受精卵相同的发育途径; 而处于后期II、末期II受处理的受精卵约86%可直接形成两个单倍性雌原核发育为3n-1pb, 其余的恢复两极纺锤体发育为二倍体; 在压力起始时已排出两个极体的受精卵, 在压力消失后均发育为二倍体。授精后5h检测三倍体担轮幼虫占54%。

2.3 压力强度及处理持续时间的筛选

表1 压力强度及持续时间对三倍体诱导率和孵化率的影响
Table 1 Influence of pressure intensity and treatment duration on triploid percentages and hatching rates

持续时间 (Min) Treatment duration	效应% Effect	压力强度 Pressure intensity (kg/cm ²)				
		0	170	200	230	260
10	三倍体诱导率 Triploid percentages	0	3	34	51	54
	孵化率 Hatching rates	12.8	27.6	24.3	21.5	10.3
15	三倍体诱导率 Triploid percentages		4	43	60	58
	孵化率 Hatching rates		25.3	21.0	19.8	8.2

随压力强度的增加和持续时间的延长, 三倍体诱导率提高, 而胚胎的孵化率下降。在压力为230kg/cm²、持续处理10min或15min可获得较理想的三倍体诱导率(51%、60%)与孵化率(21.5%、19.8%), 当压力上升到260kg/cm²时虽有较高的三倍体诱导率, 但胚胎的孵化率显著下降。



2.4 压力起始时间的确定

三倍体诱导率因压力处理起始时间的不同而有所变化, 在授精后26min和36min起始的压力处理组出现两个峰值, 分别代表3n-1pb(48%)和3n-1pb(62%)的诱导率峰值。处理组的孵化率在20%上下小幅度变动, 但明显低于对照组的孵化率(33.8%)。

3 讨论

静水压对微管的解聚作用可导致纺锤体的解体^[9]。处于减数分裂不同期相的受精卵经压和处理后, 重新形成纺锤体的能力和所形成的纺锤体类型是不同的。处于中期I和后期I受处理的受精卵可以恢复形成三、四极纺锤体, 而导致姊妹染色体分离, 并在排出一个2n极体后形成两个单倍性雌原核和一个雄原核成为3n-1pb。3n-1pb的形成则有两种情形: 处于末期I和中期I受处理的受精卵不恢复纺锤体, 一对尚未分离的母本姊妹染色体组直接形成一个大的二倍体(2n)雌原核成为3n-1pb; 种子后期I和末期I受处理的受精卵不恢复纺锤体, 而母本的姊妹染色体已经分离, 形成两个单倍性雌原核成为3n-1pb。显然, 由于3n-1pb中母本来源的染色体为一对姊妹染色体组, 因此3n-1pb的基因杂合度要高于3n-1pb。Komaru等人(1991)以静水压诱导扇贝(*Chlamys nobilis*) 3n-1pb的实验中采用DAPI荧光染色仅观察

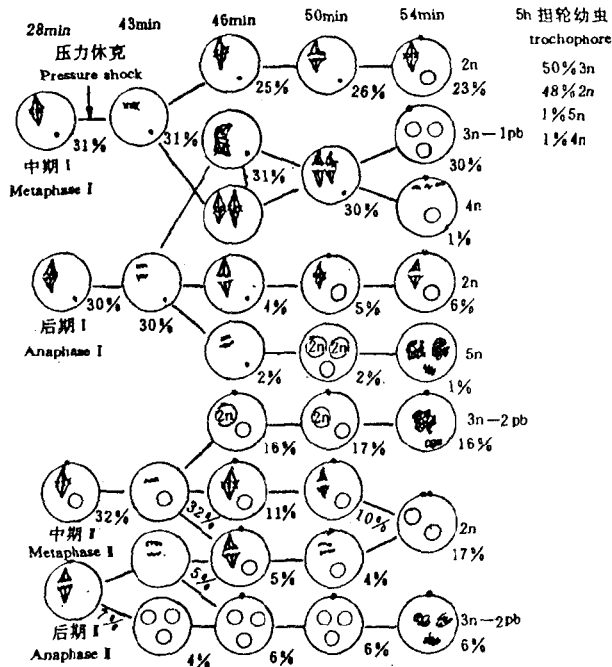


图4 授精后 28min 施压处理的受精卵的发育和染色体行为
Fig 4 Schematic representation of typical chromosome behavior of zygotes treated with pressure shock starting at 28 min after insemination. Percentage of triploid trochophore verified by chromosome counts

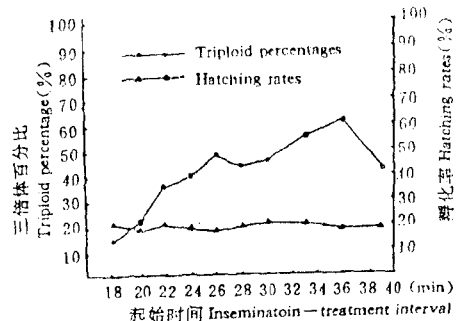


图6 静水压处理起始时间与三倍体诱导率、孵化率的关系
Fig 6 Triploid percentages and hatching rates versus the time when hydrostatic pressure was started.

到 2n 雌原核形成的情形，是因为起始时间选择在扇贝受精卵进入后期 II 之前进行压力处理的结果⁽⁶⁾。

静水压诱导近江牡蛎 3n-1pb 的敏感窗口是中期 I 和后期 I，但在中期 I 受处理的受精卵仅有 18% 左右恢复形成三、四极纺锤体，而后期 I 受处理的受精卵约有 83% 形成三、四极纺锤体。可见，同源染色体的分离有助于压力处理后三、四极纺锤体的形成。由于同源染色体的分离始于前中期 I 以后着丝点的分离，而染色体的着丝点可作为纺锤体微管的组成中心 (Microtubule organizing centers MTOC)⁽⁹⁾，因此我们推测，同源染色体着丝点的分离暴露了牵引姊妹染色体分离的纺锤体 MTOC 位点，在经压力处理后的纺锤体重建时，就有可能形成三、四极纺锤体。因而静水压诱导 3n-1pb 的适宜起始时间，应选择在处于减数分裂后期 I 的受精卵频率分布值较高的时间。静水压诱导 3n-1pb 的敏感窗口为末期 I、中期 II、后期 II 和末期 II。处于末期 I、中期 II 受处理的受精卵约有 50% 不恢复纺锤体而形成 2n 雌原核；而处于后期 II、末期 II 的受精卵约有 86% 不恢复纺锤体而形成两个单倍性雌原核。因而诱导 3n-1pb 的适宜的压力起始时间也应选择在处于减数分裂后期 II 的受精卵频率分布值较高的时间。事实上压力起始时间实验结果表明，产生 3n-1pb 和 3n-2pb 诱导率峰值的压力起始时间都是在受精卵全部到达中期 I 和中期 II 之后，进一步证实了上述结论。

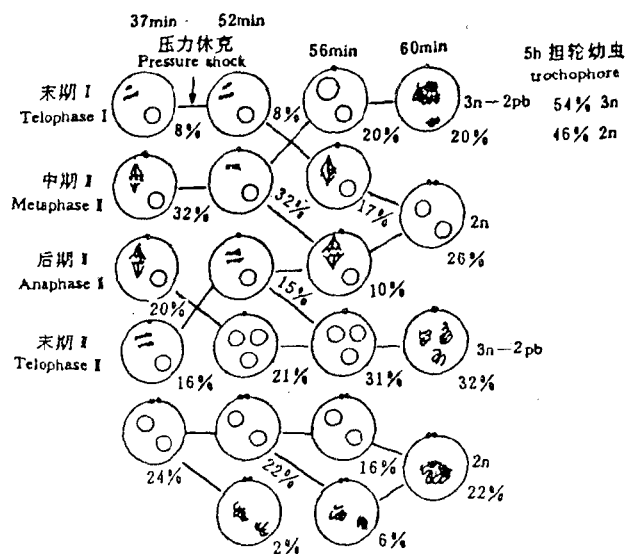


图5 授精后 37min 施压处理的受精卵的发育和染色体行为
Fig 5 Schematic representation of typical chromosome behavior of zygotes treated with pressure shock starting at 37 min after insemination. Percentage of triploid trochophore verified by chromosome counts

本实验中三倍体诱导率最高达 62%，这与长巨蛎和皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*)⁽¹⁰⁾ 的静水压诱导三倍体率 (均为 60%) 相似，而低于长巨蛎⁽³⁾、美洲巨蛎^(11,12) 等的 CB 诱导率。这是因为静水压处理同时破坏了纺锤丝 (微管) 和微丝的聚合，从而使胞质与核质活动均被抑制⁽¹¹⁾。故采用静水压休克诱导三倍体时，只有处于敏感窗口的受精卵发生诱导效应。而敏感窗口之外的受精卵不会被诱导。由于受精卵发育的异步性，理论上静水压处理难以达到 100% 的三

倍体诱导率；而 CB 处理仅对胞质分裂有抑制作用，核质活动并不被抑制^(7,11)，因此 CB 处理时处于敏感窗口以及持续处理期间可发育至敏感窗口的受精卵均被抑制其极体排出而发生诱导效应，故三倍体诱导率较高，理论上可达 100%⁽¹²⁾。

同一批卵在相同的条件下，采用静水压诱导 3n-2pb 的效率要高于 3n-1pb，我们分析有三个原因：首先，3n-2pb 的静水压诱导窗口要宽于 3n-1pb；其次，虽然处于后期 I 受处理与处于后期 II、末期 II 受处理的受精卵形成三倍体的效率相似，但处于中期 II 受处理的受精卵比处于中期 I 受处理的受精卵更易于形成三倍体；第三，压力处理并不影响雌雄原核的形成，适当延长压力处理时间有利于阻碍处于 3n-2pb 诱导窗口的受精卵恢复形成纺锤体而直接形成一个二倍性 (2n) 或两个单倍性雌原核，从而提高 3n-2pb 诱导率。

受精卵发育的不同步性是高三倍体诱导率的制约因素。虽然深入研究环境条件特别是温度对受精卵发育的影响以及三倍体形成的机制有助于确定适宜的诱导条件，但受精卵的发育速度和同步性还取决于卵子的成熟度和卵质的均一性⁽¹³⁾。即使在相同条件下，来源于同一亲贝或不同亲贝的受精卵的发育速度和同步性不尽相同甚至差异较大，这给确定适宜的压力处理起始时间带来了困难。实际操作中我们得出一个经验：当 50% 的受精卵出现第一极体时予以压力处理，效果较好且易于操作。这于 Baber 等人结论相同⁽¹⁴⁾，有可能是诱导 3n-2pb 时有部分 3n-1pb 产生。此外，实验方法本身亦有可能影响受精卵发育的速度与同步性。本实验以剖取法获得精卵进行人工授精，而 Komaru 等人在日本珠母贝 (*Pinctada fucata martensii*) 中采用催产授精⁽¹⁵⁾，对照与本文图 1 相似的发育分析，本实验中受精卵发育同步性偏低。因此，为获得理想的三倍体诱导率，有必要深入研究提高亲贝成熟率和卵质均一性的亲贝培育、挑选和催产技术。

参考文献

1 Stanley J G, Allen S K Jr, Hidu H. Polyploidy induced in the Amercian oyster, *Crassostrea virginica* with cytochalasin B. *Aquaculture*, 1981, 12: 1~10.

2 Allen S K Jr, Downing S L, Chaiton T, et al. Chemically and prussure-induced triploidy in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 1986, 57: 359~360.

3 Tabarini C L. Induced triploidy in the bay scallop *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. *Aquaculture*, 1984, 42: 151~160.

4 姜卫国, 李刚, 林岳光等, 人工诱导合浦珠母贝多倍体的发生. *热带海洋*, 1987, 6 (4): 36~45.

5 Stanley J G, Hidu H, Allen S K Jr, Growth of Amercian oyster increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. *Aquaculture*, 1984, 37: 147~155.

6 Komaru A, Wada K T. Different processes of pronucleus events in Scallop. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1991, 57 (7): 1219~1223.

7 Komaru A, Matsuda H, Yamakawa T, et al, Chromosome behavior of meriosis-inhibited eggs with cytochalasin B in Japanese pearl oyster. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1990, 56 (9): 1419~1422.

8 Durand P, Wada K T, Komaru A, Triploidy induction by caffein-heat shock in the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1990, 56 (9): 1423~1425.

9 郝水. 细胞生物学教程. 北京: 高等教育出版社. 1983: 234~257.

10 Arai K, Naito F, Fujion K, Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1984, 50 (12): 2019~2023.

11 Downing S L, Allen S K Jr. Induced triploidy in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture*, 1987, 61: 1~15.

12 Shatkin G M, Allen S K Jr. Recommendations for commercial production of triploid oysters. *J shellfish Res*, 1989, 8 (2): 449.

13 西村守央. 马氏珍珠贝苗生产中卵子质量的评价. 洪森译. 见: *水产增殖*, 1982, 30 (1): 33~38.

14 Baber J B, et al. 美国牡蛎三倍体的优化方法. 许文军译. *国外水产*, 1992, 106 (1): 21~36.

15 Komaru A, Matsuda H, Yamakawa T, et al. Meiosis and fertilization of the Japanese pearl oyster eggs at different temperature observed with a fluorescence microscope. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1990, 56 (3): 425~430.