

美国牡蛎三倍体诱导的优化方法

Bruce J. Barber 等

【摘要】在美国西北部,采用常规方法进行牡蛎三倍体生产,往往会导致美国牡蛎(*Crassostrea virginica*) 90% 以上的死亡率,这个高比例在东海岸的大多数孵化场是不能接受的。我们就细胞松弛素B(CB)浓度、受精后的处理时间及处理持续时间对美国牡蛎胚胎的成活及三倍体诱导的影响进行了试验。结果表明D形幼虫成活率与CB浓度及其处理时间成反比。三倍体率则取决于CB剂量。当半数胚胎发育至第一次减数分裂时进行0.25mg/L CB处理10~15min可获得平均成活率为对照组84%的D形幼虫,而相应的三倍体率可达96%。

虽然三倍体牡蛎的生产最早源于美国东海岸,但大规模的三倍体牡蛎商品化生产仅限在育苗尚保持原始水平的美国西北部。有代表性的三倍体太平洋牡蛎生产是通过在预定时间内(受精后20~45min)用浓度为0.5~1 mg/L的CB浸泡胚胎15~30min获得。

弗吉尼亚海洋研究所(VIMS)自1989年开始对美国牡蛎三倍体的生长及疾病抵抗能力等特征进行了研究。最初试验中,采用以前的一些三倍体生产方法几乎均遭到了失败,主要是由于胚胎的死亡率太高。本文论述了处理胚胎的CB剂量、时机及持续时间的试验,从而获得优化三倍体美国牡蛎生产的方法。

1 方法与材料

实验均是通过升高水温至30℃对暂养的美国牡蛎进行诱导产卵。产卵开始后,将种

贝从产卵池内移出,按性别或单独分开。事先将晶体CB溶解在二甲亚砜(DMSO)中,分装成1 ml在0℃下保存(Allen等,1989)。试验按下述方法进行:集卵洗卵后将精子加入盛卵的容器中;胚胎集中到盛有1 L海水的烧杯中,除第一个实验外,其余均在预定时间即当50%以上胚胎排出第一极体时加入CB,处理结束后,用筛绢过滤胚胎,重新稀释至1 L,再加入0.5 ml DMSO处理15 min。对照组加入等量的DMSO。取1 ml样品计数起始胚胎,D形幼虫成活率于24 h后计数1 ml等分试样中的D形幼虫获得。成活的D形幼虫通过37 μm的滤网,漂洗后放至离心试管中,然后用巴斯德吸管移至1.5 ml的微型离心试管中。每试管加入1 ml荧光染色缓冲液,制备数千只幼体用作细胞荧光分析,这些幼体在-90℃下保藏。

第1次实验中(1990年8月28日),收集

陆起源。关于北美南部区域的鲑和欧洲鲑有不同的线粒体基因型已被人们证实。看来仅一部分北美北部区域(特别是在纽芬兰和魁北克)的鲑有和欧洲鲑线粒体基因型一致的基因型。由于这些群体作为大陆起源专一rDNA多态性已被筛选了出来,没有证据证明是属于欧洲类型。所以,我们的研究将代

表今后研究方向是可能的。

(表明 译自《Can. J. Fish. Aquat. Sci.》, 1991, 48(9): 1655~1661.)

(译者单位: 黄海水产研究所, 青岛 266003)

9只雌性个体的卵子与6只雄性个体的精子进行受精。每组试样约184000个胚胎,分别按CB浓度0.1、0.5或1mg/L,处理10min(受精后25~35min)或22min(受精后20~42min)。温度为29℃,盐度为18ppt。对照组在同样的时间加入1ml DMSO。计数每个烧杯内的起始胚胎数,24h后计数D形幼虫数量。但由于样品在分析前已解冻,故未能获得三倍体百分比。

第2次实验中(1990年9月11日),雌雄比为7:5,每组试样约有339000个胚胎,分别按CB浓度0.25或0.5mg/L,处理15min(受精后13min)。温度为29℃;盐度为17.5ppt。对照组加入1ml DMSO处理15min。计数起始的胚胎数,受精后24h计数D形幼虫数量,成活的D形幼虫被用作三倍体分析。

第3次实验(1990年10月9日),分别收集5个雌性亲体的卵子与1个雄性亲体的精子进行受精。各组卵子分作3个试样,每个试样约含360000~ 1.46×10^6 个胚胎。其中2个试样采用0.1或0.25mg/L CB浓度(保存在0.5ml DMSO中)处理10min(受精后15min);第3个试样(对照组)在预定时间加入0.5ml DMSO,温度为27℃,盐度为18ppt。处理后将胚胎密度调整至大约100个/ml,计数起始的胚胎数,24h后计数D形幼虫数量,幼虫样品用作三倍体分析。

前2个试验因并非为真正的重复,故未能进行统计分析;第3次试验,采用反正弦运算后的单因子方差分析法就CB浓度对成活率和三倍体诱导的影响进行了试验。通过Student-Neumann-Keuls多重比较检验获得了明显差异的平均值($P \leq 0.05$)。

2 结果

第1次实验中,经处理的胚胎在24h后发育为D形幼虫的百分比随CB浓度及其处理持续时间的增加而减少(见表1)。处理时间10min组的成活率:对照组为71%~79%;

0.1mg/L CB处理组为50%;0.5mg/L CB处理组为11%~22%;1mg/L CB处理组为9%。处理时间22min组的成活率:对照组为83%~90%;0.1mg/L CB处理组为15%~19%;0.5和1mg/L CB处理组为0~2%。

表1 3种CB浓度下分别处理10min和22min的D形幼虫成活率(%) (每组重复2份)

样 品 组	处理10min		处理22min	
	1	2	1	2
对 照	79	71	83	90
0.1mg/L CB	50	50	19	15
0.5mg/L CB	22	11	0	2
1.0mg/L CB	9	9	2	0

第2次实验: D形幼虫成活率,对照组与0.25mg/L CB处理组相同(32%~44%),但0.5mg/L CB处理组要低(12%~23%)(见表2)。对照组中有1%的三倍体,0.25mg/L CB处理组中有97%~98%三倍体,0.5mg/L CB处理组中则有99%~100%三倍体。因此这两个CB浓度均能产生高比例的三倍体,但0.25mg/L CB处理组的成活率占对照组成活率的99%,而0.5mg/L CB处理组则只占46%。

表2 用0.25和0.5mg/L CB浓度进行处理的成活率与三倍体率(%) (每组重复2份)

样 品 组	成活率(%)		三倍体率(%)	
	1	2	1	2
对 照	44	32	1	1
0.25mg/L CB	34	41	98	97
0.5mg/L CB	12	23	100	99

第三次实验中,各组发育至D形幼虫的成活率:对照组为80%~96%;0.1mg/L CB处理组为57%~93%;0.25mg/L CB处理组为45%~86%(见表3)。三倍体率对照组占0~17%;0.1mg/L CB处理组为22%~

76%；0.25mg/L CB处理组为92%~98%。0.1mg/L和0.25mg/L CB处理组D形幼虫的平均成活率与对照组无明显差异($P>0.05$)。但0.25mg/L CB处理组的三倍体平均百分比明显大于($P\leq 0.05$)0.1mg/L CB处理组及对照组。

表3 用0.10和0.25mg/L CB浓度处理的D形幼虫成活率与三倍体率(%)

重 复 组	1	2	3	4	5	平均±s.d.
1.成活率:						
对 照	93	80	96	85	83	87.4±6.8
0.10mg/L CB	57	93	74	69	71	72.8±13.0
0.25mg/L CB	45	79	86	66	59	67.0±16.2
2.三倍体率:						
对 照	5	14	0	11	17	9.4±6.9
0.10mg/L CB	22	49	48	76	21	53.2±21.5
0.25mg/L CB	95	98	98	97	92	96.0±2.5

在3个试验中,所有的试验结果都表明:0.25mg/L CB处理组能产生最高的平均成活率(相对于对照组成活率)(见表4)。0.1mg/L与0.25mg/L CB处理组的成活率比0.5mg/L与1.0mg/L CB处理组高;平均三倍体诱导率0.5mg/L CB处理组为100%,0.25mg/L CB处理组为96%,均比0.1mg/L CB处理组高得多。因此,0.25mg/L CB处理组能获得最高的成活率和近乎最高的三倍体率。

表4 不同CB浓度(处理10~15min)下的平均三倍体率与成活率(相对于对照组的百分比)

CB剂量 (mg/L)	平均成活率±s.d. -(对照组的%)	三倍体率±s.d. (%)
0.10	79±19	53±22
0.25	84±23	96±2
0.50	36±25	100±1
1.00	12±1	—

3 讨 论

经CB处理后的胚胎成活率及其相应的三倍体比例取决于CB浓度。当CB浓度由1.0mg/L减少至0.1mg/L时,通常成活率增加而三倍体率则随之下降。CB浓度为0.25mg/L时,无论成活率还是三倍体率均能获得较好的比例。

同样CB浓度下,CB处理的胚胎成活率随处理时间由20min减至10~15min而增加。为了产生最大量的三倍体,CB处理的时间既要足以使最多数量的个体达到减数分裂,又要使其死亡率降为最小。

除了CB浓度与处理时间外,如果在处理期间没有较大比例的胚胎达到胞质分裂的某一程度,就不能产生较大比例的四倍体,而其时机主要取决于温度(Downing等,1987)。因此除了在给定温度下估算发育率外(亦会因其他因子而变化),最直接的方法就是当50%胚胎排出第一极体时进行CB处理。我们发现此法比较有效且易于操作。

三倍体美国牡蛎的生长速度比二倍体快,这使得有较大比例的牡蛎在遭寄生虫(*Perkinsus marinus*)侵害死亡之前达到商品规格(Barber等,1991)。另外,三倍体牡蛎具有不育性,这使其在夏季比二倍体牡蛎具有更高的肉质(Allen等,1986)。因此本文讨论的方法对正在遭受病害困扰的美国东海岸的牡蛎养殖业具有较高的利用价值。本技术在三倍体美国牡蛎的大规模生产中的应用正在进展中。

(许文军 译自《Aquaculture》, 1992, 106(1): 21~26.

吕华庆 校)

(译者单位:浙江省海洋水产研究所,舟山 316100)