

用温度和水压处理以诱导虾夷盘鲍三倍体

荒井克俊、内藤文隆、藤野和男

摘 要

本文作者曾评论过染色体控制水产动物的研究进展,并结合前文业已报道过成功地诱导虾夷盘鲍的雌核发育。本研究试图诱导三倍体虾夷盘鲍*Haliotis discus hannai*作为本种遗传、育种一系列研究的一部分。用消毒和加热海水刺激虾夷盘鲍取得卵和精液标本,使之人工授精。观察授精卵的正常发育过程,以便测定供作诱导三倍体虾夷盘鲍开始处理卵的适当时间。应用低温、高温或水压冲击以抑制放出第一和/或第二极体。通过染色体组型的观察和染色体计数来检验受精卵的倍性状态。

检验几组时间条件、强度和处理的持续时间之后业已查明,授精后12或32分钟,用3℃低温冲击处理卵15分钟,授精后7或22分钟用35℃高温冲击3分钟,或用200公斤/厘米²水压冲击5分钟,这样处理能抑制放出第一或第二极体。结果能诱导出几千枚三倍体虾夷盘鲍,其倍化率极高。

导 言

最近几年,利用染色体工程开展养殖的可能性极大的激励着这方面的研究领域。藤野评论过水产脊椎动物这方面的早期工作,而且讨论过养殖鱼类使用这种技术的重要性。最近技术发展包括诱导脊椎动物如香鱼*Plecoglossus altivelis*、鲤鱼*Cyprinus carpio*和泥鳅*Misgurnus anguillicaudatus*以及无脊椎动物诸如美国牡蛎*Crassostrea virginica*、沙海螂*Mya arenaria*和海湾扇贝*Argopecten irradians*三倍体等都取得了一定的效果。本文根据受精卵早期正常发育的观察和早期细胞遗传的研究,叙述了各种处理条件,以诱导虾夷盘鲍*Haliotis discus hannai*三倍体,并评估了用温度或水压处理以诱导三倍体的结果。

材 料 和 方 法

卵和精液取得方法

由岩手县当地水域有选择地采集,并在岩手县县立养殖试验站饲养虾夷盘鲍,用以

取得卵和精液。根据菊池等的方法，把虾夷盘鲍放在紫外线消毒和同时升温的海水中，以诱导其产卵。

受精和早期发育的观察

把两枚雌鲍产出的卵汇集在内装0.5—1.0升海水的塑料水槽里，在室温下用两枚雄鲍产在海水中的精液授精。为了观察正常发育过程，使雌、雄单个交配。用不同容量的精液调整卵和精子的相对浓度。在授精后，使卵经受不同水温（15~25℃），以检验发育过程如第一和第二极体放出以及第一次卵裂的任何“时滞”（时间延迟）。授精后每隔三或六分钟采集卵样，用布安氏液固定，用以观察发育阶段。在这些检验中，根据受精卵的发育阶段出现率约为40%以上做为测定每个阶段的确定时间。

对三倍体诱导的处理

对温度的处理，精心地把授精卵放入塑料圆柱体（直径5厘米，深6厘米）内，底下铺好一层40微米网目的滤网。然后，将圆柱体浸入特定温度的冷却或加热海水中几分钟。采用本文后述的各种条件，如：开始时间、持续时间和处理温度等。对水压处理，将悬浮于海水中的卵装进塑料袋（直径约1.3厘米，长9厘米）里。严密封闭后，把塑料袋放在充满蒸馏水的高压室内。与温度处理相同，应用压力处理的开始时间、强度和持续时间的几组不同条件。在每种处理中以未处理卵为对照卵。处理后立即把卵移至装有几升海水的塑料水槽里，并用灭菌海水彻底冲洗几次，以清除过剩精子。这些程序在室温下进行。然后用20℃孵化这些卵，以观察发育过程如受精率、估算成活率和染色体倍化率及其组型等。

估算受精率和成活率

授精后约四小时，在那些实验中根据分裂卵的出现率，对每个实验组估算受精率。在检验的幼体样品中根据授精后约20小时担轮幼虫的出现率、成活率和游泳能力，对各实验组估算成活率。

染色体的制备和倍性观察

根据荒井等，使用由各个实验组孵出的若干幼体制备染色体标本。一般根据大约150个细胞概括染色体计数为其出现的频率分布。将它们与虾夷盘鲍36个二倍体染色体数相比较，以便检验所生产的虾夷盘鲍的倍性状态。对染色体组型的检验，根据Levan等制备染色体的方法并加以改进。

结 果

受精卵的发育

图1示出放在不同环境温度中的虾夷盘鲍受精卵早期发育过程的一系列观察。三条抛物线状曲线表示，根据环境水温的差异，授精后经过的放出第一极体和第二极体以及受精卵开始第一次分裂的时间回归。从该图可以看出，水温大约在20℃开始放卵，授精后大约在15~20分钟放出第一极体，35~40分钟第二极体，80~85分钟开始第一次分裂（参看图2, a, b和c）。

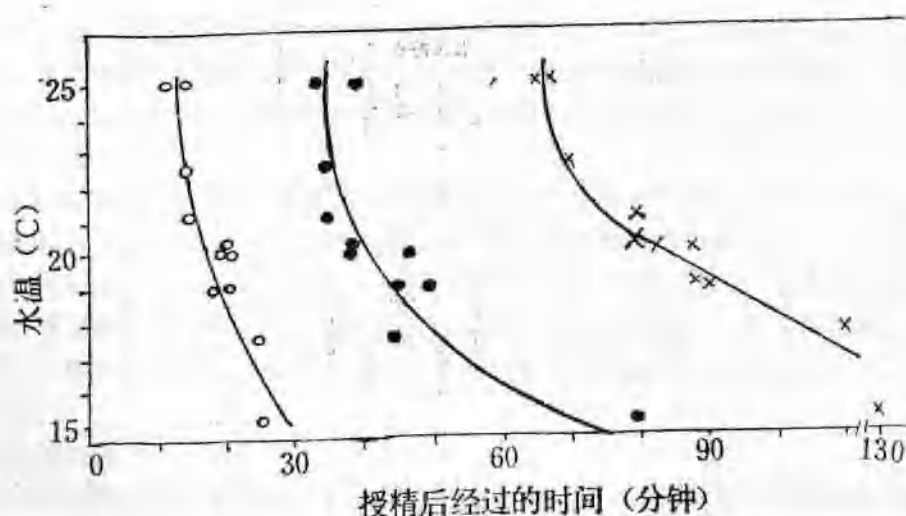


图1

图1.在不同水温条件下虾夷盘鲍受精卵

早期发育过程的“时滞”（时间延迟）。空圆、实圆和 $\otimes$ 字分别表示开始放出第一和第二极体以及受精卵的第一次分裂的时间。

（图2略）

图2. 虾夷盘鲍的早期发育阶段：a) 授精后15分钟由卵放出的第一极体 (1pb)；b) 授精后35分钟从卵放出的第二极体 (2pb)；c) 授精后80分钟第一次卵裂。

三倍体的诱导

根据上述对受精卵发育过程的观察，选择条件是：对卵处理的定时十例，各处理示意图中两个连续例间每个“时滞”为五分钟，如图3所示。在产卵和授精期间对卵、精液和受精卵的环境水温要保持在大约 $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，以后除了处理的持续时间外，在受精卵的孵化和观察期间，则保持在 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。在每次处理时应用强度条件和处理的持续时间的组合数值。这些数值包括：低温冲击每种温度在 0°C 、 3°C 和 6°C 时，用1、5、10、15、30和45分钟，高温冲击在 30°C 、 35°C 和 40°C 时，用1、3、5、7和9分钟，水压冲击在200、400和600公斤/厘米²时用5分钟。在授精后20小时检验的三倍体幼体的较大成活率和正常状态基础上评估处理结果。

从图3可以看出，在每种处理中有两个分散时间，即较早和较晚，适合于诱导三倍体。

图3. 授精后在不同时间用低温（上）、高温（中）和水压冲击（下）处理受精卵所生产的三倍体虾夷盘鲍的差分比例。授精后两分钟进行最早处理，接着连续处理九例，两次连续处理例间的“时滞”各为五分钟（详见本文）。每种处理的上半截和下半截分别表示三倍体和二倍体受精卵的比例。高温和水压冲击组柱形图的孵出部分表示偶然生产大概的四倍体和/或非整倍体。每种处理所用的条件各自为：低温处理用 3°C 五分钟，高温处理用 35°C 三分钟，水压处理用200公斤/厘米²五分钟。

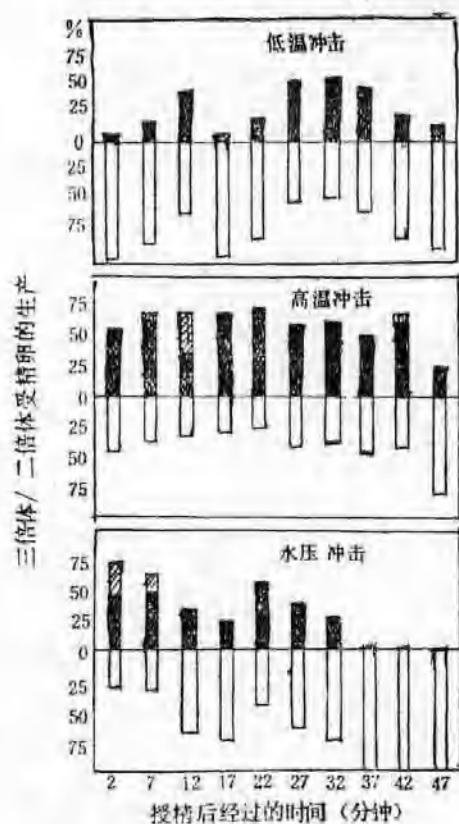


图3

表1. 适于诱导三倍体虾夷盘鲍的温度和水压处理的选择条件

处 理	开始处理时间	※1 处理持续 时间(分钟)	诱导三倍 体的百分 比※2	备 注※3	
低温冲击	a)	12	15	70-80	97×70-90×86-90
(3℃)	b)	32	15	70-80	95×70-84×30-90
高温冲击	a)	7	3	50-70	95×60-80×60-70
(35℃)	p)	22	3	60-80	96×80-90×80-90
水压冲击	a)	7	5	60	90×90×50
(200公斤/厘米 ²)	b)	22	5	60	94×80×65

※1 授精后分钟, a和b分别符合于抑制放出第一和第二极体的二例。

※2 授精后20小时所检验的幼体三倍体。

※3 授精后3.20和30小时分别检验的卵和/或幼体中受精率、成活率和正常率。

虾夷盘鲍。在低温处理例中，它们是授精后12和32分钟，在高温处理或水压处理例中，则是授精后7和12分钟。综合考虑前述发育阶段瞬间次序的观察结果（参看图1水温约在20℃的观察），较早和较晚时间的处理可以分别看做是抑制放出第一极体和第二极体的结果。

表1示出三种处理的选择条件，其结果是前文所述那些组合数值中的一些成功的诱导三倍体虾夷盘鲍。如本表所示，一组相同的强度条件和持续时间可用于分组为a和b两例，在每种处理中用以抑制放出第一和第二极体。在生产的稚鲍中，就诱导三倍体的效率而论，通过染色体计数来评估这样处理的结果，如前文所述。一系列最新研究成果证明，诱导三倍体的百分比、受精率、成活率和正常卵或稚鲍的重大改进远比表1和图2所叙述的高。

染色体组型

由虾夷盘鲍对照组采集的标本呈现36个染色体，其中包括10对中央着丝粒染色体（M）和8对亚中央着丝粒染色体（SM），和二倍体虾夷盘鲍的染色体组型完全相同（图4a和c）。反之，由温度和/或水压处理所诱导的稚鲍标本出现54个染色体，其中有一组三个10组中央着丝粒染色体和8组亚中央着丝粒染色体（见图4b和d）。把这些结果看做是诱导的鲍的三倍体。

讨 论

现在很清楚，在其定时、强度和持续时间的最适条件下，用温度或水压冲击对授精卵的处理，一次可诱导几千枚三倍体虾夷盘鲍，其出现率极高。

（图4略）

图4 虾夷盘鲍二倍体和三倍体染色体，每个刻度表示5微米。a) 由二倍体稚鲍细胞伸展的中期染色体（ $2n=36$ ），b) 由三倍体稚鲍细胞伸展的中期染色体（ $3n=54$ ），c) 二倍体染色体组型，d) 三倍体染色体组型。

低温冲击和高温冲击或水压冲击（前者比后者晚5或10分钟，如表1所示）之间，其开始处理的时间差别表明，包括抑制放出第一极体和第二极体的机制在上述处理之间彼此有些差异。在下一步研究中阐明这种机制将是有趣的。

由抑制放出第一极体所诱导的三倍体虾夷盘鲍组，其遗传性变异的程度比由抑制放出第二极体所诱导的大，这是由于卵的第一和第二减数分裂间染色体配对分离阶段的差别所致。把三倍体虾夷盘鲍和正常的二倍体虾夷盘鲍这两组间在生产性能上遗传性变异的程度加以比较，这对鲍鱼养殖的遗传改进应用这样处理或技术将是极为重要的。

吴尚忠译自《日本水产学会志》，1986，52（3），423~433 王子臣校