

文章编号:1005-8737(2000)03-0093-04

·综述·

栉孔扇贝三倍体研究进展和展望

Progress and perspectives of triploid research on scallop *Chlamys farreri*

王清印, 杨爱国

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

WANG Qing-yin, YANG Ai-guo

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

关键词: 栉孔扇贝; 三倍体

Key words: *Chlamys farreri*; triploid

中图分类号: S968.313

文献标识码: A

扇贝养殖具有食物链短、定居性强、育苗和养殖基础好、成本相对较低等特点,已成为我国沿海地区海水养殖的重要支柱产业之一。近十几年来,我国的扇贝养殖业发展迅速。1985年全国扇贝养殖产量只有0.6万t,至1996年已达上百万t,在养殖规模和产量上均居世界第一位。随着社会经济迅速发展,人们对扇贝产品的需求量也越来越大。而国内外市场的不断扩大,又为扇贝养殖业的发展创造了十分有利的条件。但从整体上讲,我国扇贝养殖产量的提高主要依靠养殖规模的扩大和人力、物力的大量投入。随着养殖面积和养殖密度的不断增大以及生态环境的改变,近几年出现了严重制约产业发展的“瓶颈”问题。单产降低、品质下降、大面积死亡现象时有发生,造成了严重的经济损失。从品种的角度来讲,我国开展扇贝养殖的各个种类,迄今为止基本未进行过系统地品种选育和品种改良工作,其遗传基础仍是野生型的,经过累代养殖,均不同程度的出现了遗传杂合度降低,抗逆性差,性状退化等问题。水产养殖业迫切要求科研单位培育出生长快、品质优、抗逆能力强的养殖扇贝新品种,以推动扇贝养殖业的发展。

应用海洋生物技术培育海水养殖新品种是近年来的研究热点,其中应用染色体操作技术培育多倍体的研究是最活跃和最具应用潜力的领域之一。多倍体培育具有投入相对少、目的性强、见效快、效益高等特点。扇贝多倍体研究的主要目的是生产不育的三倍体。已有研究结果证实,扇贝三倍体是很有实用价值的养殖新品种。繁殖期的二倍体扇贝由

于性成熟而影响了生长速度,并降低对不良环境和疾病的抵抗能力以及肉质的鲜美度。开展扇贝三倍体研究,有助于充分利用三倍体的不育性和生长优势,促进扇贝养殖业的发展。在国家海洋“863”计划的支持下,1996年以来,我们对应用细胞工程技术诱导和培育栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 三倍体进行了系统研究,旨在对养殖栉孔扇贝进行遗传改良,研究开发先进、稳定的扇贝三倍体诱导、苗种培育和养殖技术,为促进我国扇贝养殖业的健康、稳定和可持续发展作出贡献。

1 栉孔扇贝三倍体的研究现状

在我国,栉孔扇贝三倍体的研究工作始于1987年^[1~3],但进展较快。通过深入系统的研究,现在的三倍体诱导率可稳定在80%以上,成体的三倍体率达70%左右。这个结果是通过受精卵的减数分裂过程进行了详细研究和分析^[4],筛选出适宜的诱导剂,对诱导剂的细胞学作用机理进行深入探索^[5],在此基础上对各种诱导参数进行反复对比试验,并在生产规模的试验过程中进行多次检验修正,确定并形成了一套较完整的三倍体扇贝生产工艺的基础上取得的。养殖试验表明,三倍体技术的开发和应用,将使栉孔扇贝养殖产量在现有条件下提高20%~30%,鲜肉柱得率提高60%左右,可有效地遏制目前存在的品质下降、出柱率低的问题,为扇贝养殖业摆脱困境,推动产业的发展,找到一条理想的途径。研究结果的开发和应用,也必将产生显著的经济效益和社会效益。

1.1 诱导方法

目前人工诱导扇贝三倍体的方法主要包括细胞松弛素B(CB)处理法、6-二甲氨基嘌呤(6-DMAP)处理法、热休克法、冷刺激法、静水压法等。根据文献资料,经这些方法处理

收稿日期:2000-05-08

基金项目:国家海洋863计划重大项目资助(863-819-01-02)

作者简介:王清印(1952-),男,山东菏泽人,黄海水产研究所研究员,从事海水养殖和海洋生物技术研究。

的贝类三倍体诱导率有很大差别,其中部分原因是由于不同实验操作过程和卵子质量的差异造成的,但主要原因是方法本身不同所致。物理方法,无论是温度刺激还是压力处理,一般认为只能达到70%的倍化率^[6,7],CB及6-DMAP处理的最大倍化率可达到或接近100%^[8-10]。CB与6-DMAP相比,CB只作用于细胞骨架内的肌动蛋白丝,通过阻止分裂沟的形成来阻止极体的排放而非抑制减数分裂,对染色体的运动并无影响。如果在极体出现之前施加CB处理,减数分裂仍继续进行直到极体开始排出(胞质分裂),这时CB才开始起作用。因此,CB的有效作用时间较长,允许更多发育程度有差别的受精卵发生染色体加倍。6-DMAP能终止染色体的分离和原核的运动,并能造成染色质的分散,有效作用时间较短,在处理时机的把握上要求更严格。从三倍体诱导率和幼虫的存活率看,6-DMAP对悉尼岩牡蛎 *Saccostrea commercialis* 的三倍体诱导率比CB处理组差^[11];对太平洋牡蛎、大扇贝和紫贻贝的诱导效果与CB相当,但成活率明显提高^[9]。与CB相比,使用6-DMAP诱导三倍体还具有许多优点:比CB毒性小,对操作者的潜在危害小;为水溶性,配制药物容易,处理结束时不需要洗卵可直接入池孵化。CB则需用二甲亚砜(DMSO)溶解及在处理结束后浸洗去除残留的药物。因此,6-DMAP的使用比CB简便,更适用于大规模生产。试验结果表明,6-DMAP可以取得和CB同样的诱导效果,而孵化率大为提高,可达到60%以上,是目前三倍体栉孔扇贝规模化生产的首选诱导剂。在诱导技术上,则主要是通过抑制第2极体的释放来获得三倍体。

1.2 主要诱导参数

受精卵发育的不同步性是栉孔扇贝的生物学特性决定的,即使是从同一对雌贝和雄贝获得的受精卵也存在着发育不同步现象。在抑制第2极体释放诱导栉孔扇贝三倍体的试验中,选择不同的起始处理时间,均可观察到3种基本的核相组成^[4,5],而且3种核相所占的比例随起始处理时间不同有很大变化。综合分析处理开始前和处理结束时的核相组成与三倍体率和幼虫成活率的关系可以看出,处理时受精卵处于第2次减数分裂中期的核相比比例愈高,三倍体率和成活率愈高。分析认为,解除处理后融合的双倍性雌核能与单倍性雄核联合产生三倍体合子,这种核相是三倍体合子的主要来源;处理时受精卵处于第2次减数分裂后期的核相比比例增加,三倍体率和成活率有所增加,但不成正比。解除处理后,可能是药物作用导致了部分受精卵的染色体组未能协同一致,2个雌核和1个雄核在融合及分离过程中发生了异常,造成非整倍体胚胎,使三倍体率和成活率降低。

使用6-DMAP诱导栉孔扇贝三倍体,影响三倍体率和成活率的主要因素有:起始处理时间、药物浓度、持续处理时间和卵子发育的同步性等。有关这些诱导参数的探讨,多采用重复试验的方法。关于起始处理时间,各研究报道因试验条件、研究种类不同而异,可重复性较差。Allen等^[12]较早提出以观察极体出现的百分率为指标来确定药物处理的时

机。以受精卵发育的生物学为指标,可客观地反映受精卵减数分裂的进程。以6-DMAP作为诱导剂,起始处理时间的确定取决于6-DMAP的有效作用时机。根据试验得出的结果,处于第2次减数分裂中期的受精卵是6-DMAP诱导获得三倍体的主要来源。由于受精卵发育的不同步性,在第1极体和第2极体释放过程中有一些重叠,受精卵不可能同时处于第2次减数分裂的中期,而且第2次减数分裂中期的时间相对较短。我们认为以观察到40%的受精卵排出第1极体时作为起始处理的时间依据效果较好。在规模化生产中,还需要参照受精卵的发育时间过程,留有充分的准备时间。

对于药物处理的持续时间,尚无一个可遵循的直观的生物学指标。从已报道的文献看,一般为15~20 min。在试验条件下处理10~20 min,延长6-DMAP处理时间,三倍体率有所增加,但胚胎死亡率也明显上升。对照核相组成分析,当持续处理时间延长至对照组的第1次有丝分裂期,雌核泡状化明显并发生离散,可形成多个雌核,非正常染色体比例增加,这是造成胚胎死亡的主要原因。持续处理15 min,可获得较高的诱导率和成活率,能够满足规模化生产的要求。

6-DMAP在浓度300~600 $\mu\text{mol/L}$ 范围内都能有效地抑制贝类极体的释放,但不同物种所需的适宜浓度略有差别。研究表明,10~70 mg/L的6-DMAP都可以诱导栉孔扇贝产生三倍体,孵化率随着药物质量浓度的增加而下降。60 mg/L的6-DMAP可有效抑制受精卵的染色体分离和原核移动,诱导出三倍体,未对胚胎发育造成明显的副作用。

获得发育同步的受精卵是提高和稳定三倍体诱导率的关键。受精卵发育的同步性与卵子的质量有关,Utting和Doyou^[13]报道菲律宾蛤仔的卵子质量与其脂类储量有关,提高卵子脂类储量有助于增强卵子对CB处理造成危害的承受能力。对栉孔扇贝而言,尽量延长亲贝暂养时间,避免人为刺激而提早产卵,是目前研究条件下获得充分成熟卵子的有效方法。虽然有用积温方法来判别栉孔扇贝卵子成熟度的研究,但因暂养亲贝的时间差异,仍然不能用一个确切数据来表示。只能从亲贝的性腺发育状况、暂养过程中饵料、水质、温度等暂养条件做出判断,等待部分亲贝开始产卵时,再移入另外的水池内进行集中产卵。一般不采用人工刺激的方法进行催产。

受精卵发育的同步性也与操作方法有关,如受精过程是否同步、避免精子污染等。因此,雌雄亲贝要严格分开暂养。诱导栉孔扇贝三倍体时,一般先将卵子收集在一个较大的容器内。常用0.3 m³水槽,卵子密度达到2 000/ml左右开始受精。精子的用量要比正常二倍体生产时稍多。受精后再浓缩冲洗入标有16.6 L刻度的较小水槽内,观察到40%的受精卵释放出第1极体时,加入1 g 6-DMAP进行处理,处理卵子的密度在 $3 \times 10^7/\text{L}$ 左右。为保证受精及药物作用均匀,必须不断搅动水体,处理15 min后直接入池孵化。

诱导时水温对三倍体率也有影响。用CB诱导太平洋

牡蛎三倍体,在较高水温下三倍体率高^[10]。Desrosiers 等^[9]在 10℃ 下对大扇贝进行 6-DMAP 处理,三倍体率和成活率比在同样水温下用 CB 处理的结果好,因此认为 6-DMAP 诱导贝类三倍体对温度没有依赖性,在较低温度下并不影响减数分裂恢复的能力。通过对同一批栉孔扇贝受精卵在不同温度条件下核相组成的观察,证明在正常情况下,水温主要影响受精卵减数分裂的进程^[4,5]。水温 20℃ 时比 17℃ 时受精卵处于某一阶段的核相较集中。因此,尽管 6-DMAP 在低温条件下比 CB 的诱导效果好,但因在较高温度下受精卵发育的同步性较高,在诱导栉孔扇贝三倍体时仍应采用较高的水温,以获得较高的三倍体率。

1.3 倍性检测

三倍体倍性的检测方法主要包括染色体制片法和使用仪器检测的方法。在制片法中,使用胚胎和成体的鳃组织较容易作出染色体图象,而 D 形幼虫和稚贝的染色体制片难度较大。在没仪器的条件下,一般选择胚胎作为检测材料。在仪器检测中,使用流式细胞计快速鉴定倍性的有效性得到了广泛的认可。流式细胞计可以精确测量经荧光染料 DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) 染色的每个细胞发出的荧光值。因细胞内染色体的组数与 DNA 的含量成正比,可得到不同荧光强度的分布峰值,与同种精子细胞的荧光强度对比,可判断被检查细胞群体的倍性组成。这种方法能快速准确地分析大量样品,但是较难检测出 DNA 小剂量的差别,其显示的整倍体可能包括增加或减少了几条染色体的非整倍体^[14]。由于在人工诱导过程中卵子发育不同步的客观事实,造成了受精卵染色体分离的复杂性,从检测结果的荧光强度分布峰值中可以看出胚胎中倍性分布的广泛性,所显示的三倍体率可能包括了部分非整倍体。研究表明,胚胎阶段的倍性检测结果与 D 形幼虫及稚贝阶段的检测结果之间不存在可比性。胚胎期的三倍体率可以作为判断诱导有效性的一种技术指标,但不能用于表示成体的三倍体率。D 形初期幼虫的倍性检测结果与实际获得的三倍体率基本相吻合,可用于参考表示成体的三倍体率。

1.4 三倍体栉孔扇贝的生物学特征

人工诱导的三倍体栉孔扇贝的胚胎发育较正常二倍体稍慢,但在幼虫阶段生长较快。经 14 个月的养成试验,三倍体栉孔扇贝比二倍体的壳高平均增加 12.6%;闭壳肌明显大于二倍体,鲜肉得率提高 66.3%。在近两年我国北方养殖栉孔扇贝出现大量死亡的情况下,在同一海区养殖的二倍体栉孔扇贝几乎全部死亡,而三倍体试验群体的死亡率明显降低,表现出了明显的优势。

三倍体栉孔扇贝生殖腺不发育,在繁殖季节呈透明状。检测结果表明,生殖腺不发育的全部是三倍体。而同期培育的二倍体扇贝性腺发育正常,雌雄区分明显。组织学观察显示,三倍体扇贝雌性滤泡基本上是一大的空腔,沿滤泡壁排列着单层不连续的卵原细胞,许多个体滤泡内的原始生殖细胞尚未分化,滤泡的组织学特征难以区分出雌性。电镜下可

发现在雄性滤泡内存在原始精母细胞。初步判定三倍体栉孔扇贝的生殖腺属基本不发育类型。

根据已报道的研究结果,三倍体贝类的性腺发育及配子发生均受到一定程度的抑制,但在繁殖季节可以发育分化出一些性腺组织。何毛贤等^[15]、姜卫国等^[16]对三倍体合浦珠母贝在春秋两个繁殖盛期的生殖腺进行了外观和组织学观察,发现大多数三倍体在外观上没有生殖腺或者只有发育不全的生殖腺。组织学检查可见多数三倍体的生殖腺停留在休止期和增殖期,有极少个体可见到成熟卵母细胞和精子。三倍体的配子能完成受精作用,但胚胎不能正常发育。三倍体太平洋牡蛎的雄性大多数能产生精子细胞,部分雌性可以产生相当数量的卵子^[12]。虽然生殖细胞的发育程度随种类不同而有很大差别,但用组织学切片的方法可以区分出雌雄个体。在繁殖季节,三倍体栉孔扇贝的雌性生殖细胞发育停止在卵黄形成的早期阶段,部分个体无法根据滤泡的组织学特征区分雌雄,难以确定雌雄比例,只有在电镜下才可发现雄性个体的存在。表明三倍体栉孔扇贝的生殖腺发育严重受阻,这在生产上具有更大的应用价值。

大多数双壳贝类自然群体的性比大致为 1:1。在抑制极体产生的三倍体群体中,许多种类的雌雄比例发生了很大变化,雌性明显多于雄性。如三倍体合浦珠母贝,雌性占 94.3%,雄性占 5.7%^[16]。三倍体僧帽牡蛎雌雄比为 7:1^[17]。三倍体砂海螂中雌性占 77%,具有雄性组织学特征的占 16%,其余 7% 不能确定性别,未发现雄性个体^[8]。在三倍体栉孔扇贝中,由于雄性的不发育比雌性更加严重,用组织学观察的方法不能判别雄性个体。电镜下虽然发现了雄性个体的存在,但由于观察的个体少,尚无法确定雌雄比例。切片观察中可以确定为雌性的个体比无法判别性别的个体数量多,表明在三倍体栉孔扇贝中性别比例失调,雌性多于雄性。

关于贝类三倍体性腺发育受到抑制的机理,至今尚不完全明了。三倍体不育的一般解释是,奇数染色体组在减数分裂时同源染色体无法配对。有些种类由于多价染色体的存在,染色体分离呈现复杂的状态,也可产生少数成熟的精子和卵子。雄性三倍体栉孔扇贝生殖细胞的发生严重受阻,可以解释为染色体在减数分裂过程中配对时发生了障碍。而雌性个体产出的成熟卵子停留在第 1 次减数分裂中期,尚未完成减数分裂,卵子发生受阻应发生在染色体完全复制后的联会期或联会前期。从生殖腺的组织学检查结果看,雌性三倍体的生殖腺中只有卵黄形成前期的初级卵母细胞,没有成熟的卵子。雌性生殖细胞在减数分裂以前就已经分化出初级卵母细胞,生殖细胞停止在减数分裂的早期阶段,与减数分裂无直接关系,所以不能完全用减数分裂受阻来解释。三倍体本身如何影响到原始生殖细胞的分化和增值过程,造成生殖腺不发育及有关性别比例失调、同性个体比例增加等问题尚待进行深入研究。

我们对同期培育的栉孔扇贝三倍体和二倍体的氨基酸

组成进行了分析。分别取肉柱、裙边和生殖腺,分析了18种氨基酸的含量。结果表明,三倍体和二倍体的肉柱和裙边的氨基酸组成和含量基本相同,但生殖腺的氨基酸组成和含量差异明显,三倍体的氨基酸含量明显低于二倍体,这与三倍体栉孔扇贝生殖腺不发育的生物学特征是相吻合的¹⁾。

2 问题和展望

已有的研究结果证明,三倍体栉孔扇贝和二倍体相比,具有明显的生长优势。但是由于栉孔扇贝三倍体的研究工作开展较晚,仍有许多问题需要深入探讨。特别是三倍体栉孔扇贝对异常环境条件的耐受能力、抗病性、在不同养殖条件下的表现等生产和生物学性状尚待深入研究。另外,因卵子发育不同步的客观事实,采用抑制极体释放的方法不可能达到100%的诱导率,而三倍体的培育需要每年进行诱导,无论采用何种方法,诱导处理带来的副作用都会导致受精卵和早期胚胎的大量死亡,在苗种生产过程中比正常二倍体需要更多的亲贝,操作繁琐,生产的稳定性较差,如此等等,都需要进一步的研究来加以解决。四倍体能与二倍体杂交产生100%的三倍体,这在太平洋牡蛎中已得到证实。因此,同源四倍体贝类的培育技术已成为目前多倍体研究的热点之一。四倍体与二倍体杂交,方法简便,能高效、稳定地生产三倍体,是实现三倍体产业化的最佳途径。但迄今为止只在太平洋牡蛎、贻贝等少数贝类中诱导出可成活的四倍体,对其它贝类诱导出成活四倍体的难度很大,而同源四倍体的繁殖能力如何,能否建立稳定的四倍体品系,是今后栉孔扇贝多倍体育种必须解决的问题。另外,异源多倍体的研究也是今后多倍体研究的发展方向。理论上异源多倍体的诱发有可能综合杂交育种和多倍体育种的优势,扩展多倍体育种研究的领域,培育出满足人们需要的新品种。由于异源四倍体的高度可育性,可以克服同源四倍体育性较差及亲本群体的自繁殖问题,可望有效地实现四倍体与二倍体杂交解决生产中三倍体苗种来源的途径。

1) 杨爱国,王清印,张岩,等. 栉孔扇贝三倍体与二倍体的生长比较[J]. 海洋科学(待刊).

参考文献:

[1] 王子臣,毛连菊,陈来钊,等. 温度休克诱导栉孔扇贝和虾夷扇贝三倍体的初步研究[J]. 大连水产学院学报,1990,5(3/4):

1-6.

- [2] 王如才,王昭萍,张建中. 海水贝类养殖学[M]. 青岛:青岛海洋大学出版社,1993.
- [3] 吕隋芬,王如才. 细胞松弛素B诱导栉孔扇贝产生三倍体的研究[J]. 海洋湖沼通报,1992,(2):40-45.
- [4] 杨爱国,王清印,孔杰,等. 栉孔扇贝受精卵减数分裂的细胞学研究[J]. 中国水产科学,1999,6(3):96-98.
- [5] 杨爱国,王清印,孔杰,等. 6-二甲氨基嘌呤诱导栉孔扇贝三倍体[J]. 水产学报,1999,23(3):241-247.
- [6] 曾志南,陈木,林琪,等. 僧帽牡蛎三倍体的研究[J]. 海洋通报,1994,13(6):34-40.
- [7] Wade K T. Triploid production in the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* [J]. Aquaculture, 1989, 76:11-19.
- [8] Allen, S K Jr, S L Downing, J Chaiton, et al. Chemically and pressure-induced triploidy in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Aquaculture, 1986, 57:359-360.
- [9] Desrosiers R R, Gerard A, Peignon J M, et al. A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1993, 170:29-43.
- [10] Downing S L. Estimating polyploid percentages using oyster larvae: a valuable hatchery management and research tool [J]. J Shellfish Res, 1989, 8(1):320. (Abstract).
- [11] Nell J A, Cox E, Smith I R, et al. Studies on triploid oysters in Australia. I. The farming potential of triploid Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley) [J]. Aquaculture, 1994, 126: 243-255.
- [12] Allen S K Jr, Bushek D. Large scale production of triploid, *Crassostrea virginica* using "stripped" gametes [J]. Aquaculture, 1992, 103:241-251.
- [13] Urring S D, J Doyou. The increased utilization of egg lipid reserves following induction of triploidy in the Manila clam (*Tapes philippinarum*) [J]. Aquaculture, 1992, 103: 17-28.
- [14] Guo X, Guo X, Allen S K Jr, et al. Viable tetraploids in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids [J]. Mol Mar Biol. Biotechnol, 1994, 3(1): 42-50.
- [15] 何毛贤,林岳光,姜卫国. 三倍体合浦珠母贝不育性研究[J]. 热带海洋, 1996, 15(2):17-21.
- [16] 姜卫国,李刚,林岳光,等. 三倍体合浦珠母贝的生殖腺观察[J]. 热带海洋,1990,9(1):24-29.
- [17] 曾志南,林琪,吴建绍,等. 三倍体僧帽牡蛎生殖腺发育观察[J]. 水产学报,1998,22(2):97-105.