

文章编号:1005-8737(2001)01-0018-05

虾夷扇贝三倍体诱导与培育技术的研究

常亚青¹, 相建海¹, 张国范², 王子臣², 宋 坚²

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 大连水产学院, 辽宁 大连 116023)

摘 要:取繁殖期虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)亲体, 采用阴干、流水和升温海水催产以及小水体、高密度、雌雄分池排放、人工授精的方法, 可获得批量受精卵。分别使用浓度为0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.50和0.70 mmol/L的6-DMAP诱导虾夷扇贝三倍体, 实验水温分别为12℃和14℃。结果表明, 水温12℃, 6-DMAP 0.05 mmol/L时, 在授精后67 min处理胚胎45 min诱导三倍体效果较好, 三倍体率达83.3%, 面盘幼虫相对孵化率达69.5%; 水温12℃和14℃时, 6-DMAP可诱导17.3%~100.0%的三倍体面盘幼虫; 6-DMAP处理组胚胎发育至面盘幼虫的时间比对照组慢, 故应推迟1 d选优; 处理组幼虫初始壳长、壳高及日生长速度皆高于对照组; 6-DMAP的残留会影响处理组幼虫的成活率, 用0.2 ml/L的DMSO海水浸洗处理可减轻6-DMAP的副作用。

关键词: 虾夷扇贝; 三倍体诱导; 6-DMAP; 幼体培育
中图分类号: S968.313 **文献标识码:** A

自从1981年Stanley首次在贝类中诱导出美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)三倍体后^[1], 由于三倍体个体的低育、生长快、软体部大等优点, 而成为贝类育种中的一个热门研究领域^[2~6]。

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)引自于日本, 已成为我国北方一种重要的增殖双壳类。曾有温度休克诱导其三倍体的报道^[7], 本文报道了6-DMAP诱导虾夷扇贝幼体三倍体的结果, 重点探讨了扇贝受精卵的批量获得、6-DMAP诱导三倍体及苗种培育的生产工艺、幼虫生长以及诱导药物的残留对幼虫的副作用等。

1 材料与方法

1.1 种贝

种贝系繁殖期个体, 于2月末至5月初采捕于大连沿海, 平均壳高8~12 cm, 洗刷干净后雌、雄分

别暂养于水槽中, 密度为20 m⁻³水体; 水温在8℃以下, 日换水1次, 投饵2~4次; 饵料为新月菱形藻(*Nitzschia closterium*, 日投喂量(20~30) × 10⁴ ml⁻¹)和螺旋藻干粉。

1.2 精、卵的获得

取雌贝阴干1~2 h, 雄贝在雌贝阴干1 h后阴干1 h, 将雌雄贝分别放入两个水槽中(10~20 m³)待产, 此期间充气, 种贝密度50~100 m⁻³, 加水20~40 cm, 水温比暂养水温高4~6℃, 每1 h换水1次。精、卵产出后, 当卵子密度超过100粒/ml后, 将雌贝捞出放入另外水槽中继续排放。取发育良好的卵子用于三倍体诱导。

1.3 授精及药物处理

在有卵子的水槽内加入适量精液, 水温为12℃或14℃。授精后10~15 min用500目绢网将受精卵滤出, 收集在2~10 L容器内, 卵子密度为(1.0~4.0) × 10³ 粒/ml。

诱导药物为6-二甲基氨基嘌呤(6-DMAP, Sigma公司)。处理浓度为0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.50和0.70 mmol/L。

收稿日期: 2000-06-15

基金项目: 国家八六三高新技术研究计划项目(863-819-01); 国家重点基础研究发展规划项目(G1999012009); 大连市科委资助项目

作者简介: 常亚青(1967-), 男, 大连水产学院副教授, 博士, 从事海水养殖动物育种及养殖研究。

处理的开始时间由授精预实验确定, 本实验在 12℃ 下抑制第一极体(PB₁)诱发三倍体分别在授精后 35 min、47 min 开始, 抑制第二极体(PB₂)诱发三倍体在 PB₁ 出现比例为 40%~50% 时开始。实验和生产中严防意外受精现象发生。

1.4 受精卵的孵化、幼虫选优和培养

受精卵在 10~15℃ 海水中孵化, 密度 30~50 粒/ml。每 1~2 h 搅 1 次池, 至受精卵上浮。胚胎发育至面盘幼虫时用 260 目筛网进行选优, 在 10~30 m³ 培养池中充气培养。幼虫培养前期密度小于 10 粒/ml, 中、后期 2~6 粒/ml。每日投饵 2~4 次,

饵料为湛江等鞭金藻、新月菱形藻和扁藻, 换水 1 次, 每次 1/2。3~5 d 倒池 1 次。水温 12~15℃。观测幼虫生长的处理组与对照组培养条件相同。当 20%~50% 幼虫出现眼点时在水中投入棕绳帘或聚氯乙烯网片附着基供幼虫附着变态, 稚贝壳长大于 500 μm 后下海培育。

1.5 药物对幼虫的后续作用

将 5-4 组(表 1)刚孵化的幼虫分入 2 个培养槽(60 L), 其中 1 个加入体积分数为 0.2 ml/L 的二甲亚砷(DMSO)保持 5 d, 每天换水 1 次, 补充并

表 1 6-DMAP 诱导三倍体实验结果
Table 1 Results on triploidy scallop induction with 6-DMAP

分组 Group	6-DMAP 浓度/ (mmol·L ⁻¹) Concentration	处理时间/min Treatment interval post-fertilization	处理温度/℃ Temperature	受精率/% Fertilization ratio	面盘幼虫相对 孵化率/% R _{RH}	综合评价 指数/% I _E	面盘幼虫倍性分布/% Ploidy of veliger larvae		
							N	2N	3N
1-1	0.30	35~70	14	94.2	2.86	0.65	—	68.5	22.8
1-2	0.50	35~70	14	94.6	1.25	0.24	—	81.0	19.0
对照 Control	—	—	14	95.9	100	0	—	100	0
2-1	0.30	60~80	14	88.0	2.6	2.07	—	20.2	79.8
2-2	0.50	60~80	14	92.7	0.6	0.42	—	25.6	74.4
2-3	0.70	60~80	14	89.8	0.4	0.25	—	41.9	58.1
对照 Control	—	—	14	95.9	100	0	—	100	0
3-1	0.10	47~82	12	86.2	48.2	33.9	—	29.5	70.5
3-2	0.10	47~97	12	80.6	9.3	8.84	—	5.0	95.0
3-3	0.20	47~82	12	83.3	5.9	5.62	—	4.9	95.1
3-4	0.20	47~97	12	82.4	3.1	3.10	—	0	100
对照 Control	—	—	12	72.7	100	0	—	100	0
4-1	0.15	62~92	12	76.1	4.7	3.25	3.1	27.8	69.1
4-2	0.15	62~102	12	82.5	3.4	2.32	0	31.9	68.1
4-3	0.15	62~112	12	81.3	2.7	2.05	0	23.9	76.1
4-4	0.20	62~92	12	79.4	4.4	2.19	12.6	37.7	49.7
4-5	0.20	62~102	12	74.7	1.8	1.13	2.8	34.4	62.8
4-6	0.20	62~112	12	74.6	2.3	0.78	10.6	55.5	33.9
4-7	0.30	62~92	12	81.3	1.2	0.21	9.4	73.3	17.3
4-8	0.30	62~102	12	73.7	2.9	0.87	14.1	55.9	30.0
4-9	0.30	62~112	12	72.1	0	0	10.5	57.5	30.1
对照 Control	—	—	12	73.1	100	0	0	100	0
5-1	0.05	58~93	12	50.7	92.4	25.6	0	72.3	27.7
5-2	0.05	58~103	12	51.0	75.8	35.7	0	52.9	47.1
5-3	0.05	67~102	12	52.4	66.7	27.5	0	58.8	41.2
5-4	0.05	67~112	12	47.2	69.5	57.9	0	16.7	83.3
5-5	0.10	58~93	12	53.8	82.6	39.5	0	52.2	47.8
5-6	0.10	58~103	12	42.6	44.2	26.9	0.34	21.8	77.8
5-7	0.10	67~102	12	47.7	45.8	27.9	0	39.1	60.9
5-8	0.10	67~112	12	45.9	45.0	38.9	0	7.2	86.4
对照 Control	—	—	12	64.5	100	0	0	100	0

保持 DMSO 的体积分数不变, 设对照组 1 个, 各组幼虫培养密度相同(9 粒/ml), 于受精后 5~25 d 观察 3 组幼虫的成活并检测其倍性变化情况。

1.6 倍性检测方法以及相关参数

采用 PAS-Ⅲ 细胞流式仪测定担轮幼虫、面盘幼虫的倍性。受精率、面盘幼虫相对孵化率(R_{RH}) 计算见文献[3]。

面盘幼虫相对孵化率(R_{RH}) = [面盘幼虫量 / (总卵量 × 受精率)] × 100 %

综合评价指数(I_E) = (R_{RH} × 三倍体率) × 100 %

2 结果

2.1 催产效果

在加入升温海水后 1.5~2.5 h, 40 % 以上雌贝开始大量排放卵子, 在 1 h 内产卵槽内卵子密度可达到 100~200 粒/ml, 4 h 内可得到 2~3 批次卵子和精子, 采用 400 个雌贝每次催产可得到(5~15) × 10⁸ 粒卵, 分 2~3 次分别在 10 L 桶中处理。平均每个扇贝产卵(1.5~8.0) × 10⁶ 粒。

2.2 不同温度下受精卵极体释放的时间与比例

12、14℃ 下, PB₁ 开始释放出的时间分别为受精后 45 和 41 min, 50 % PB₁ 释放的开始时间分别为受精后 84 和 74 min, PB₂ 开始释放出的时间分别为受精后 62 和 54 min。

2.3 三倍体诱导的结果

12℃ 或 14℃ 下, 用 0.05~0.7 mmol/L 的 6-DMAP 抑制 PB₁ 和 PB₂ 均可诱导虾夷扇贝三倍体, 面盘幼虫期三倍体比例在 17.3 %~100.0 % 之间。

6-DMAP 在 0.10~0.20 mmol/L 范围内抑制 PB₁, 三倍体率随其浓度增加而上升, 超过此范围, 三倍体率下降(表 1)。

6-DMAP 抑制 PB₂ 释放的各组幼虫孵化率随药品浓度增加而下降, 倍化率的变化较复杂。在 0.05~0.1 mmol/L 范围内, 三倍体率随药物浓度增大而上升, 最高为 86.4 %。在受精后 67 min 采用 0.05 mmol/L 处理受精卵 45 min, 三倍体率达 83.3 %, 面盘幼虫相对孵化率为 69.5 %, 综合评价指数为 57.9 % (表 1)。

2.4 处理组幼虫的早期发育、生长

对照组胚胎 90 % 发育至面盘幼虫需 72 h 左右, 而处理组需 96~108 h。处理时间和药物浓度越大, 胚胎发育速度越慢。处理组面盘幼虫初始壳长和壳高分别比对照组大, 生长速度也比对照组快($P < 0.05$, 表 2)。

表 2 对照组与 6-DMAP 处理组面盘幼虫的生长比较

授精后时间/d Days after fertilization	处理组 Treated groups		对照组 Control	
	壳长 Shell length	壳高 Shell height	壳长 Shell Length	壳高 Shell height
5	121.3	94.9	118.2	93.4
11	155.7	131.0	152.0	121.2
17	170.3	146.9	166.9	137.8
23	192.7	175.1	188.2	164.8
29	228.2	208.1	214.3	193.5
平均日增长 Average daily increment	4.45	4.72	4.00	4.17

表 3 表明, 未经 DMSO 浸泡的 5-4 组幼虫在浮游期内随时间推移, 成活率下降, 三倍体比例下降较多, 而经 DMSO 浸泡 5 d 的幼虫成活率与三倍体比例略有下降。

表 3 6-DMAP 处理三倍体组幼虫成活与倍性变化

时间/d Days after fertilization	5-4 组 Group 5-4		浸洗组 Group (5-4) Bathed with DMSO		对照组 Control	
	3N	成活率 Survival rate	3N	成活率 Survival rate	2N	成活率 Survival rate
5	83.3	100	83.3	100	100	100
15	60.5	70.6	77.8	89.7	100	92.5
25	43.5	51.6	73.5	78.9	100	81.6

2.5 幼虫的培养效果

由于三倍体处理组胚胎发育至面盘幼虫的时间比对照组晚 1 d, 因此, 生产中三倍体诱导组孵化幼

体应比二倍体推迟 1 d 选优。

培育期间, 三倍体和二倍体在同等密度下(2~10 粒/ml) 培养, 三倍体组幼虫比二倍体浮游期短 2

~3 d。眼点幼虫变态比例三倍体组为 37.8%, 而二倍体为 42.4%。

经过 15~22 d, 稚贝壳长大于 500 μm 后下海用网袋培育, 至壳长 2~4 mm 时, 海区保苗成活率在 10%~25% 之间, 采用聚氯乙烯网片为附着基的网袋稚贝成活率高于以红棕绳为附着基的网袋。

3 讨论

3.1 6-DMAP 的作用机理及应用前景

贝类的成熟卵细胞处于减数分裂的中期 I 状态, 受精后继续完成其减数分裂释放出 PB_1 和 PB_2 , 然后才有雌性原核与雄性原核的结合, 完成受精而成为受精卵。目前, 贝类主要以冷、热休克、静水压和药物(如细胞松弛素 B、6-DMAP 等)处理阻止 PB_1 或 PB_2 释放诱导三倍体^[2,3,5,7,8]。细胞松弛素 B 毒性较大且致癌, 在生产中使用不方便。6-DMAP 可以破坏细胞分裂中期纺锤丝的形成, 从而诱导三倍体, 操作较为方便, 利于生产使用。

Guo 等^[9]对太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)多倍体诱导过程中的染色体分离状况进行了详细的观察后, 说明在 PB_1 释放受阻后, 第 2 次减数分裂有 4 种不同的染色体分离形式, 导致倍性多样化。同时受精卵发育的不同步也是导致产生不同倍性的原因。本研究说明 6-DMAP 诱导虾夷扇贝多倍体也可能存在类似的情况。

3.2 三倍体诱导的操作条件

影响多倍体诱导效果的因素主要有处理起始时胚胎发育阶段、处理持续时间、处理药物浓度等 3 个方面。但由于卵的成熟情况不同, 胚胎发育具有不同步性, 因此处理起始时间应根据胚胎发育情况而定^[2,3,10]。本研究表明 6-DMAP 抑制 PB_2 的效果要好于抑制 PB_1 。同时采用小水体高密度集中产卵, 可以在 1~2 h 内批量获得卵子和精子, 进而控制受精时间, 并采用筛网收集受精卵, 药物定时处理, 可以满足生产单位规模生产三倍体苗种需要。

3.3 6-DMAP 药物的副作用

目前尚未见诱导多倍体药物在胚胎残存的有关报道, 本文研究表明, 6-DMAP 诱导三倍体组面盘幼虫在浮游期内的死亡率比对照组高, 同时三倍体

率也呈下降趋势, 在幼虫选优后的最初 5 d 内向培养水中加入体积分数 0.2 ml/L 的 DMSO, 可降低三倍体诱导组幼虫的死亡率, 同时浮游期结束时三倍体率明显比未经 DMSO 浸泡组高, 说明 DMSO 浸泡可缓解药物残存对处理组幼虫造成的副作用。因此, 采用一定含量的 DMSO 海水浸洗经药物处理的贝类胚胎和幼虫有待今后在多倍体诱导生产中得到充分重视。

致谢: 中国科学院海洋研究所周令华研究员对本实验提出宝贵意见, 农业部海洋水产增养殖生态学重点开放实验室孙旭东等同志参加了部分实验, 谨致谢忱。

参考文献:

- [1] Stanley J G, Allen S K Jr, Hidu H. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B[J]. Aquaculture, 1981, 23: 1-10.
- [2] 田传远, 梁英, 王如才, 等. 6-DMAP 诱导太平洋牡蛎三倍体-5. 孵化率和 D 幼畸形率与三倍体诱导率的关系[J]. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(3): 421-425.
- [3] Zhang Guofan, Wang Zichen, Chang Yaqing. Triploid induction in Pacific abalone *Haliotis discus hainai* Ino by 6-Dimethylaminopurine and The performance of triploid juveniles[J]. Journal of Shellfish Research, 1998, 17(3): 783-788.
- [4] Tabarini C L. Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis[J]. Aquaculture, 1984, 42: 151-160.
- [5] Downing S L, Allen Jr S K. Induced triploidy in the Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, optimal treatment with cytochalasin B depend on temperature[J]. Aquaculture, 1987, 61: 1-15.
- [6] 曾志南, 林琪, 吴建绍, 等. 僧帽牡蛎三倍体和二倍体的生长比较[J]. 中国水产科学, 1999, 6(4): 59-61.
- [7] 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): 2-5.
- [8] 田传远, 王如才, 梁英, 等. 6-DMAP 诱导太平洋牡蛎三倍体-抑制受精卵第二极体释放[J]. 中国水产科学, 1999, 6(2): 1-4.
- [9] Guo X, Hershberger W K, Cooper K, et al. Genetic Consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. II. Segregation of chromosomes[J]. Biol Bull, 1992, 183: 387-393.
- [10] 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.

Induced triploidy in scallop *Patinopecten yessoensis* and the larval cultivation

CHANG Ya-qing¹, XIANG Jian-hai¹, ZHANG Guo-fan², WANG Zi-chen², SONG Jian²

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266071, China;

2. Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: Triploid was induced in *Patinopecten yessoensis* using 6 – dimethylaminopurine (6 – DMAP) at different concentration levels: 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.50 and 0.70 mmol/L. The water temperature was designed at 12℃ and 14℃, respectively. At both temperatures the triploidy larva rate got to 17.3% ~ 100%. An optimum effect could be got at water temperature 12℃ and 6 – DMAP concentration 0.05 mmol/L when the treatment began at 67 th minute after the fertilization and went on for 45 min that the triploidy maxima was 83.3% and the corresponding hatching rate of veliger larvae was 69.5%. The residue of 6 – DMAP can affect the survival of triploidy larvae but the side effect can be lightened by using of DMSO at 2 ml/L sea water for 5 d. The embryos in 6 – DMAP – treated groups grow more slowly than those in control during their developing into veligers, so the treated larvae should be selected 1 day later for cultivation compared with the control. The initial shell length and height, as well as the daily growth rate of the larvae in treated groups are all higher than those in control.

Key words: *Patinopecten yessoensis*; triploid induction; 6 – DMAP; larval cultivation