

贝类三倍体培育技术

于瑞海

(青岛海洋大学水产学院)

多倍体(Polyploid)这个名词是由 Winklor (1916年)首先提出来的,它是指每个体细胞中含有三个或更多个染色体组的个体。植物的多倍体育种起步较早,成效也很显著,目前已育出一些新品种在生产上得到应用,如三倍体甜菜,三倍体无籽西瓜等。用人工方法诱导的多倍体可以得到一般二倍体所没有的优良经济性状。在动物方面, Fankhauser 和 Griffiths (1939)首先在两栖类中成功地诱发出两栖类三倍体。在鱼类方面,早在四十年代 Makin 与 Ojima (1943)就曾培育出鲤鱼的三倍体。其后发展也较迅速,到目前已在 20 多种鱼类中获得成功¹⁾。美国、日本等国家已开始进行贝类多倍体育种这方面的工作,其发展速度很快,已成功地培育出三倍体海湾扇贝、华贵栉孔扇贝、马氏珠母贝、美洲牡蛎、太平洋牡蛎、鲍鱼等十几种贝类,有的已应用于生产中。而我国多倍体贝类育种刚刚起步。

一、人工诱导三倍体的方法

Makin 与 Ojima 后来许多学者所进行的细胞学研究表明,多倍体的产生需要卵子第二极体的保留或第一次有丝分裂的抑制,可用人为的处理而获得,归纳起来有生物、物理、化学三种方法。

1. 生物方法 即采用贝类远缘杂交培育多倍体新品种,这是目前遗传育种研究的重要课题。由于选种工作较复杂,这种方法在贝类上还没有应用过,在鱼类上应用很多,如国外报道用鲤鱼×草鱼等十几种正、反交鱼都能产生三

倍体。

2. 物理方法 温度刺激(冷休克、热休克)和水静压(水压机处理)^[4]已被广泛用来抑制第二次减数分裂或第二极体放出,培育出贝类三倍体。温度处理是廉价的,可以被养殖场采用进行大规模生产。据 Quillet 在太平洋牡蛎上,以 35℃ 和 38℃ 于受精后 10—15 min 和 35—40 min 热处理 10 min,产生的三倍体有效。“用高温”处理 20 min 产生三倍体可高达 60%。

3. 化学方法 在贝类上常用细胞松弛素 B、秋水仙素、聚乙烯乙二醇等阻止第二极体的排出或受精卵的有丝分裂而产生三倍体。如日本用 0.5 mg/l 的细胞松弛素 B 处理华贵栉孔扇贝的受精卵,66.3% 为三倍体;美国用 0.05 mg/l, 0.1 mg/l 两种浓度的细胞松弛素 B 处理海湾扇贝,其中前者 66%,后者 94% 为三倍体。用化学药品处理受精卵,必须掌握最佳处理方法。

热处理与水静压处理对阻止贝类极体排出和第一次有丝分裂比较成功,也较容易。化学处理成功率虽很高,但必须掌握其最佳处理浓度、温度、时间、密度,药品价格也很昂贵,不易在社会上推广应用。热处理价格低廉、方法简单,易在群众中推广应用,但现在由于处于初期研究阶段,大部分仍采用细胞松弛素 B 处理获得三倍体贝类。美国华盛顿大学赵晋德教授曾在实验室用 1 ppm 的细胞松弛素 B 处理牡蛎受精卵获得四倍体,然后四倍体牡蛎再与二倍体

1) 上海水产大学养殖系。遗传与育种。

牡蛎杂交可得三倍体牡蛎,成功率 100%。

二、三倍体贝类的鉴别方法

由于用上述方法处理并不是 100% 的成功,而且处理过的群体中也可能由多倍体、多倍体与二倍体的嵌合体等混合组成,因此需对染色体倍数进行鉴定。贝类三倍体的鉴定常用染色体直接计数法、显微荧光测光法和流动血球计数法等。

1. 染色体计数法 是一个准确鉴定倍数的直接方法,但比较麻烦,质量好的染色体标本可以从胚胎获得,它具有高度的有丝分裂系数,用细胞松弛素 B 处理过的栉孔扇贝、太平洋牡蛎的受精卵,胚胎发育至 2—4 细胞采用乙酸地衣红压片法制成很多标本,即采用秋水仙素处理、低渗、固定、滴片、染色、晾干,在显微镜下观察其染色体,栉孔扇贝的三倍体为 58 条、太平洋牡蛎三倍体为 30 条。

2. 显微荧光测光法 三倍体细胞核的 DNA 量为二倍体的 1.5 倍,用显微荧光测光法测定细胞核的 DNA 量,然后根据比较来判断贝类的倍数。这种方法的装置是由荧光显微镜和显

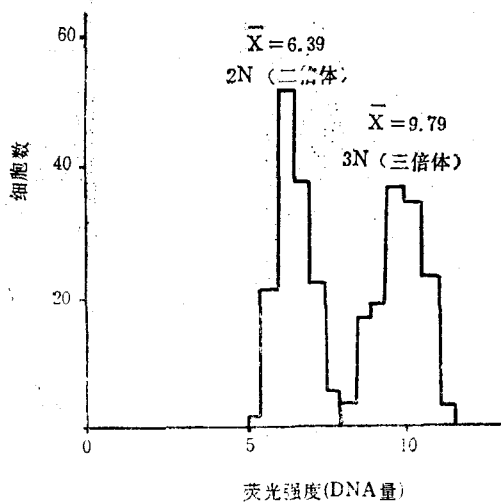


图 1 用显微荧光测光法测得的华贵栉孔扇贝 DNA 相对含量曲线

微测光组成的。日本曾将华贵栉孔扇贝的鳃、外套膜等组织,用 Carnoy 液固定后,用手术

刀和剪刀把细胞弄碎,涂抹在幻灯片的玻璃上,幻灯片用 DAPI 这种对 DNA 有特异结合的荧光色素染色,把幻灯片放置在荧光显微镜上,通入适宜的紫外线,用测光装置测定从细胞核中发出的荧光强弱,从而判断是二倍体还是三倍体。图 1。

3. 流动血球计数法 用这种方法可很快测定大量染过色的荧光。图 2 为美国 1982 年用其测定海湾扇贝的三倍体与二倍体 DNA 的相对含量频率曲线(括号内为众数的频率)。此法有很多优点:速度快、准确性高、血量少,可检查三倍体和多倍体与二倍体的嵌合体。

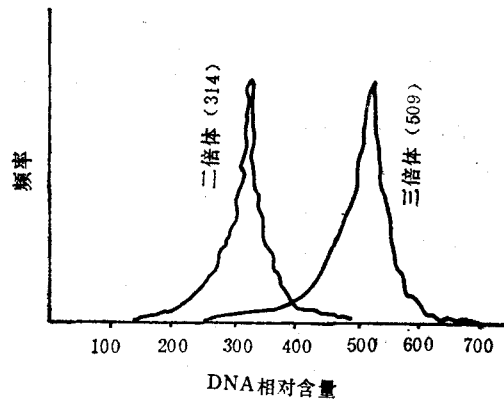


图 2 海湾扇贝脱氧核糖核酸 (DNA) 相对含量频率曲线

三、贝类三倍体的生产意义

贝类的三倍体具有生长快、不育性、肉体大、闭壳肌大、肉质好、味道鲜美等优点,深受群众欢迎。在贝类的养殖中,繁殖期贝类的大批死亡,主要是由于贝类的成熟和产卵引起的。三倍体贝类由于在第一次减数分裂的后期没有联会的同源染色体,达不到性成熟,不至于因繁殖季节消耗营养体质差而引起死亡,从而提高了成活率。使牡蛎美味的主要成分是肝醣,随着性成熟,体内肝醣降低,因此味美不鲜,而三倍体牡蛎由于不育,繁殖季节内的肝醣不降低,一年四季均可吃到美味可口的牡蛎肉。利用珠母贝进行插核时必须进行排放精卵工作,操作

麻烦、时间长、死亡率高，而三倍体的珠母贝不繁殖后代，没有成熟的精子和卵子，因此利用三倍体的珠母贝养殖珍珠意义甚大。养殖扇贝的目的主要是获得大的闭壳肌，利用人工育苗方法培育三倍体扇贝既因生产快缩短了养殖周期，又可获得大的闭壳肌，提高干贝的产量和质量。美国曾报道过，海湾扇贝的三倍体闭壳肌

大小是二倍体的 1.47 倍，体组织增加 36%，闭壳肌指数和肌肉醣元含量比二倍体明显增高。BLake 等 1981 年曾指出，扇贝在性腺发育时，闭壳肌指数和重量下降，闭壳肌醣源浓度降低，在产卵后达最低值。总之，人工培养的贝类三倍体在海水养殖上已表现明显的优越性，它对提高产量，提高经济效益将起积极的作用。