

中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 四倍体诱导研究*

相建海¹⁾ 周令华 刘瑞玉 朱谨钊

李富花 李笑虹 王洪发 刘旭东

(中国科学院海洋研究所, 青岛266071)

收稿日期 1991 年10 月28 日

关键词 中国对虾, 四倍体诱导

提要 利用光控和行为学原理, 控制中国对虾在适当时候产卵, 在一定的时刻以温度休克和细胞松弛素的方法诱导受精卵发育成为四倍体。作者发展了对虾染色体制备技术, 以中肠和触角腺、精巢为材料, 从后期幼体直到8~9cm左右次成虾均获得较好的分裂中相。染色体倍性检测结果表明, 最好的四倍体诱导成功率达66.7%。共获得10cm左右的实验对虾几千尾。初步观察表明, 四倍体中国对虾具有一定的生长优势。

作者早在1986年申请到中国科学院青年基金, 对中国对虾染色体和生化遗传进行了研究, 于1988年正式报道了研究方法, 确定了 $2n=88$ 和 $n=44$ 的准确数目, 并初步分析了核型^[1]。戴继勋、林峰等后来的研究证实了 $2n=88$ 的正确性^[2]。自1989年起, 我们在国家自然科学基金的赞助下, 又进行了“经济虾类染色体的研究”, 先后报道了世界上13种重要经济虾类染色体核型研究结果, 其中9种是

国际上首次报道^[9]。与此同时还发展了若干新的染色体制备技术。1989年6~12月, 相建海又与Clark进行了合作, 以锐脊单肢虾为对

* 中国科学院实验海洋生物学开放实验室研究报告第62号。本研究得到国家自然科学基金的赞助和实验海洋生物学开放实验室的赞助。

1) 第一作者为本刊编委。

开展了虾类染色体组操作可行性研究,在国际上首次获得对虾类的三倍体、四倍体幼体,并以确凿的细胞学证据证明了雌核发育的可行性^[8]。该论文于1990年7月在澳大利亚国际甲壳动物学会上宣读后,引起许多国家学者的关注。在这段时间,我国的同行们也开展了不少工作,不同程度取得了一些进展,如戴继勋、林峰等先后报道了中国对虾三倍体诱导的实验结果^[5,6](文章中倍性检测均采用了胚胎,实验数目小于1 000尾/批)。

三倍体育种的前景是诱人的,最理想的途径是首先育出四倍体,然后将其与二倍体杂交,则可达到大批制种的目的。所以我们的实验主要是开展四倍体的诱导。为此,解决了三个技术难题,成功地培育出了四倍体的中国对虾,现将实验方法与结果报道如下:

1 适时获得批量受精卵的人工控制技术

自然界中国对虾的生殖方式比较特殊,一是交配时间较排卵提早半年左右,精子在纳精囊中大概要经历一个“获能”的过程;二是亲虾产卵通常在夜间;三是卵子一遇海水就激活,使精卵相互作用的时间窗口变得很窄,一般仅数分钟,这就使对虾生殖和遗传操作,如杂交、多倍体诱导、雌核发育等十分棘手。通常的作法是“守株待兔”式地夜间静候亲虾产卵,很不容易等到产卵时,再用长吸管吸出卵子进行操作^[5,6]。有人还采用了“杀虾取卵”的办法进行人工受精。这两种方法都难以获得数量较多、质量较高的成熟卵子,而且夜间操作人乏力倦,观察和操作都难以正常进行。显然,要实现多倍体大量诱导,“适时”获得批量的受精卵是必须突破的技术难关之一。所谓“适时”,一是应该在便于操作的白天进行,二是要能及时观察到产卵的过程,以较准确把握操作开始的“零时”。

我们于1991年4月10日起先后从胶州湾购入50只亲虾,当时水温12°C,分成三池喂养。适应室内环境两天后,开始升温,每天增

加1°C,同时在两个池子实行光照控制,白天遮挡光线,夜间以灯光照明;同时有一池作对照。为促进性腺成熟,每天喂以足量的新鲜沙蚕或蛤仔肉。保持通气良好、换水及时。待温度上升到16°C时,维持该温度。4月18日起开始有虾产卵。为了便于观察,又采用了8个玻璃缸,从人工控光的虾中根据性腺发育和产卵行为的不同将快产卵的分开饲喂,亦继续光控。白天随时注意观察产卵情况,除准确看到对虾产卵的批号外,其余的可根据被检查卵的发育情况,减去正常发育所需时间,推算出产卵的时间。

对照组亲虾产卵的时间,绝大多数在夜间。而光控组的共观察37批次,产卵的时间见表1。

可以看出,产卵高峰集中在10~16时,占总批次的65.2%,夜间产卵的仅有2批,占5.4%。在人工控制条件下,自然虾的产卵时间完全“颠倒”过来。我们在四倍体诱导实验时,共进行20批,全部在白天进行,且大多数批次看到了对虾产卵的过程每次可获得的卵数以10万计。

2 染色体倍性的检测

判别对虾染色体的倍性,必须要有可靠、易行的鉴别方法。直接查数染色体分裂中期相数目,无疑是准确和最直观的方法。除此而外,国外曾有人报道过以DAPI荧光染色后再用荧光显微分光光度计检测染色体倍性以及用细胞流术器检测的技术。后两种方法固然有快速、易操作的优点,但受价格昂贵的仪器限制。在虾类多倍体诱导实验中,一般是利用胚胎为材料。但据相建海^[8]以胚胎和无节幼体两种材料对同一批单肢虾诱导实验所作的检验结果来看,由于多倍体孵化率大大低于正常二倍体胚胎,若干多倍体胚胎在未孵化前已“胎死卵中”,所以以胚胎为材料检测的多倍体诱导率远远高于以无节幼体为材料得到的结果,见表2。

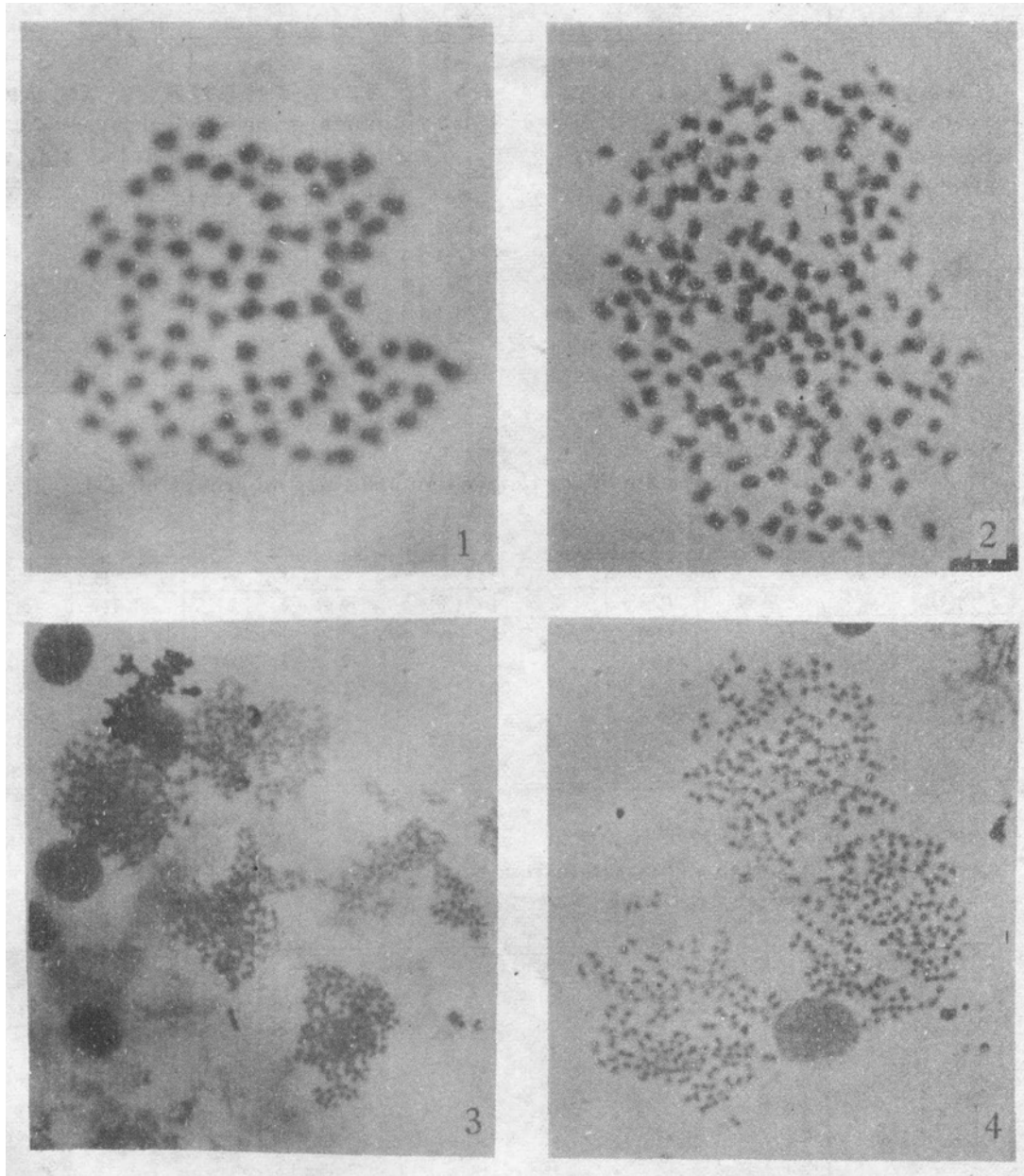


图 版

1. 中国对虾二倍体核相(中肠组织), $\times 800$; 2. 中国对虾四倍体核相(中肠组织), $\times 800$; 3. 多个四倍体的中期核相(触角腺), $\times 200$; 4. 3个四倍体的中期核相(中肠组织), $\times 400$ 。

1. Metaphase of the diploid (from mid-gut of *P. chinensis*), $\times 800$; 2. Metaphase of the tetraploid (from mid-gut of *P. chinensis*), $\times 800$; 3. Metaphase of several cells of the tetraploid (from antennal gland), $\times 200$; 4. Metaphase of three cells of the tetraploid (from mid-gut), $\times 400$.

表1 人工控制的条件下, 中国对虾产卵时间

Tab.1 Spawning time of the shrimps (*Penaeus chinensis*) under the artificial controlled light

时间(h)	6~8	8~10	10~12	12~14	14~16	16~18	18~20	20~22	合计
批次	2	3	10	6	8	3	3	2	37
百分比(%)	5.4	8.2	27	16.2	22.0	8.2	8.2	5.4	100

表2 以单肢虾胚胎和无节幼体为材料检测的多倍体诱导率比较

Tab.2 Different induced polyploidy rates detected with embryo or nauplius (*Sicyonia ingentis*)

处理方法	胚胎(%)	无节幼体(%)
热休克	59.6	17.1
冷休克	62.1	11.1

表3 7月29日实验与对照组存活的虾数
Tab.3 Numbers of the survival juvenile shrimps (*Penaeus chinensis*) on July 29

批号	产卵日期	处理方法	7月29日存活尾数
10-2	4月30日	CB	450
17-1	5月11日	温度	720
18	5月12日	温度	384
20-1	5月13日	温度	6400
20-2	5月13日	CB	81
对照	5月12日	-	1680

表4 各批号染色体倍性检测结果

Tab.4 Chromosomal detecting results of the induced and the control groups of shrimps (*Penaeus chinensis*)

批号	检测尾数	二倍体		三倍体		四倍体		嵌合体	
		尾数	(%)	尾数	(%)	尾数	(%)	尾数	(%)
10-2	42	30	71.4	-	-	9	21.4	3	7.14
17-1	35	12	34.0	-	-	21	60.0	2	6.0
18	36	24	66.7	-	-	12	33.3	-	-
20-1	73	43	58.9	-	-	30	41.1	-	-
20-2	12	2	16.7	2	16.7	8	66.7	-	-
对照	30	29	96.7	-	-	-	-	1	3.3

表5 各批号中国对虾体长9月27日测量结果

Tab.5 Body length of the shrimps (*Penaeus chinensis*) hatched from eggs spawned during April 30-May 13, measured on September 27

批号	7月29日放养密度(尾/m ²)	测量数(尾)	体长平均值±偏差(cm)	备注
10-2	112.5	40	7.23±0.862	室内
17-1	360	21	6.65±0.954	室内小池
18	96	42	7.18±0.836	室内
20-1a	225	40	6.92±0.863	室内
20-1b	156.3	40	7.95±0.636	室外
20-1c	156.3	40	6.70±1.148	室外树荫下
20-1d	156.3	40	7.04±0.57	室外
20-1e	156.3	40	6.93±0.676	室外
对照	210	40	6.32±0.634	室内

除上述原因外, 由于需要在对虾发育不同阶段都可以检测出染色体倍性, 因而探索新的制备染色体方法是必需的。Milligan 曾采用幼肝胰脏, 林健一曾采用再生附肢制备了染色体。我们曾利用上述两种方法也得到分

裂中期相。但前者片子经常很脏, 后者虽有不杀死虾可得到染色体倍性资料, 但周期过长(至少4~5d)。通过大量反复实验, 终于找到了比较理想的材料和方法, 使我们能够从6月直到现在(实验室饲养的虾体长范围0.8

cm ~10cm) 的对虾中获得分裂中期相。(见图版1~4)。

具体作法是, 根据对虾体长大小分别采用药浴或注射。药浴的浓度是秋水仙 $10 \sim 20 \times 10^{-6}$, 注射则视虾的体长不同, 从腹部体侧处注入 $0.05 \sim 0.1\text{mL}$ 浓度为 2mg/mL 的秋水仙水溶液。二甲亚砜(DMSO)有助于改变细胞膜的渗透性, 配置母液时可少量添加一些DMSO。秋水仙处理 $4 \sim 5\text{h}$ 后, 无节幼体和蚤状幼体等采用整体, 稍大一些的虾将触角腺和中肠取出; 在虾到了一定大小时, 精巢也是一种很好的材料。用 $0.7\%\text{KCL}$ 低渗 30min 左右, 尔后用新配制的甲醇: 冰乙酸(3:1) 卡诺氏溶液固定两次, 每次 15min , 再换用1:1 的卡诺氏液固定 20min 以上即可制片。其他步骤参见[1]。

制备染色体过程中有两种方法可以使用:

A. 逐条虾分开制备染色体, 这样可以准确了解每一个体的倍性或是否嵌合体, 也可以为今后进一步分析多倍体与正常二倍体的个体差异创造条件。缺点是检查时效率较低。

B. 多条虾组织混合处理, 采用细胞悬液法。即低渗时就将几条甚至十几条虾的组织混在一起, 制片时用滴管吸取细胞悬液滴片, 这样在同一张片子上就可通过计数大致估计该批虾的多倍体诱导率。

3 中国对虾四倍体的诱导

从理论上推断, 四倍体诱导是采用理化刺激的手段阻止正常的第一次有丝分裂的完成, 从而使已经加倍后的染色体滞留在卵细胞中, 恢复正常条件便卵细胞继续卵裂发育即可形成四倍体。

从4月23日~5月13日, 我们共得到20批刚刚产下的卵, 每次卵量均达几万至几十万。分别用细胞松弛素B和温度休克法处理共25组, 其中21组用细胞松弛素B处理, 4组用温度休克。

细胞松弛素B(CB) 处理: 于适当的时刻将卵收集在筛网内, 浸于CB溶液中处理 $15 \sim 20\text{min}$, 为了提高CB的渗透效果, CB母液

采用二甲亚砜配制。处理好的卵再用 1% 浓度的DMSO将残余的CB洗去, 转入正常的孵化池。

温度休克: 于适当的时刻将卵收集于筛网内, 浸于一定温度的海水中, 处理适当时间, 然后放回孵化池孵化, 孵化的无节幼体按常规办法进行管理。由于各批处理方法不一, 卵的质量不同, 死亡率变异幅度很大: 有的全军覆没, 有的存活较多。仅将7月29日虾的体长已达到 $3.3 \sim 5.3\text{cm}$ 时较精确的存活数量列于表3。

6月20日虾的体长达 $0.8 \sim 1.7\text{cm}$ 时, 就开始陆续用中肠、触角腺和精巢方法检测染色体倍性。现将染色体倍性检测结果列于表4。

实验均在海洋研究所水族楼进行, 由于实验虾数量、批次都较多, 而容器有限, 只能就地取材。利用水族楼室内外的玻璃水槽喂养, 因此比起生产中池养的中国对虾来, 实验虾生长都较慢。9月27日, 测量情况见表5。

与对照组相比, 实验组的虾平均生长都快一些, 利用统计检验方法(t 检验), 除17-1差异不显著外, 其他均有显著或极显著差异。当然, 对虾的生长除了与种类有关外, 还与密度、环境有很大关系。比较有说服力的是20-1a与对照组的比较, 20-1a系5月13日产卵, 对照组则在5月12日, 两批均养在室内, 且20-1a放养密度还略高于对照组, 但生长结果的统计比较 $t=3.3503$, 在 $p=0.01$ 的情况下, 有显著差异($t_{0.01,40}=2.704$)。相比之下20-1a较对照组增长 9.5% , 考虑到该批四倍体诱导率为 41.4% , 若喂养的全是四倍体可望增长 22.9% 。

四倍体的育成, 有着应用和科学上的双重价值。目前的工作虽已取得了突破性进展, 但需要作的工作还很多, 特别是四倍体与二倍体的性状差异比较, 越冬后性腺发育以及能否与二倍体交配产生三倍体等。

参考文献

- [1] 相建海, 1988。中国对虾染色体的研究。海洋与湖沼 19 (3): 205 ~ 209。

- [2] 戴继勋、张全启、包振民, 1989。中国对虾的核型研究。青岛海洋大学学报 19 (4): 99 ~ 104。
- [3] Cai, N.E. and Lin, F., 1991. Artificial induction of gynogenesis in Chinese shrimp, *Penaeus orientalis*. Presented at the 4th Intern. Symposium on Genetics in Aquaculture. Wuhan, China, April 29-May 3, 1991.
- [4] Clark, W.H., A.I.Yudin, F.J. Griffin and K.Shigekawa, 1984. The control of gamete activation and fertilization in the marine *Penaeidae*, *Sicyonia ingentis*. In: Advances in Invertebrate Reproduction 3, Eds. E. Engels *et al.*, Elsevier, Amsterdam, 459-472.
- [5] Dai, J.X., Bao, Z.M. and Zhang, Q.Q., 1991. Studies on the triploid induction in *Penaeus orientalis* by temperature shocks. Presented at the 4th Intern. Symposium on Genetics in Aquaculture, Wuhan, China, April 29-May 3, 1991.
- [6] Lin, F. and Cai, N.E., 1991. Triploid induction in Chinese shrimp, *Penaeus orientalis*. Presented at the 4th Intern. Symposium on Genetics in Aquaculture, Wuhan, China, April 29-May 3, 1991.
- [7] Pillai, M.C., Griffin, F.J. and Clark, W.H., 1988. Induced spawning of the Decapod crustacean, *Sicyonia ingentis*. Biol. Bull 174: 181-185.
- [8] Xiang, J.H., Clark, W.H. *et al.*, 1990. Study on feasibility of chromosome set manipulations in the marine shrimp, *Sicyonia ingentis*. Presented at the International Crustacea Conference. Brisbane, Australia, 2-6 July, 1990.
- [9] Xiang, J.H., Liu, R.Y. and Zhou, L.H., 1991. Studies on chromosome in marine shrimps with special reference to the different techniques. Presented at the 4th Intern. Symposium on Genetics in Aquaculture, Wuhan, China, April 29-May 3, 1991.

INDUCTION OF THE TETRAPLOIDS OF THE CHINESE SHRIMP, *PENAEUS CHINENSIS*

Xiang Jianhai, Zhou Linghua, Liu Ruiyu, Zhu Jinzhao, Li Fuhua, Li Xiaohong, Wang Hongfa and Liu Xudong

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao, 266071)

Received: Oct., 28, 1991

Key Words: *Penaeus chinensis*, Tetraploid induction

Abstract

Tetraploids of *Penaeus chinensis* were induced by temperature shocking and chemical treatment with cytochlasin B(CB). To get batches of fertilized eggs at suitable time, a combination method of manipulation of light cycle and selection of the animal with pre-spawning behavior was used. In contrast to the natural spawning time, which is mainly at night, the induced spawning occurred in the day time. Among the 37 gravid individuals controlled under artificial light, 24 shrimps laid eggs between 10:00-16:00. The chemical or temperature treatment were used just before the first cleavage of the fertilized eggs. Altogether 25 batches of eggs were induced in this way. Among them more than two thousand individuals from 5 groups survived to the sub-adult stage with size between 7-10 cm.

To detect ploidy level of the different chromosomal set manipulations, a new technique for obtaining metaphase chromosome spreads has been developed. The midgut tissues were proved to be suitable for this purpose. The results of chromosomal analysis showed that the most effective treatment with temperature produced 60% tetraploid, whereas the most

1 effective CB treatment produced 66.7% tetraploid. Some chromosomal mosaic individuals were observed as well. The preliminary comparison study of the growth rate showed that the tetraploid had statistically significant dominance of growth rate by about 22% ($p=0.01$) than the diploid.