

罗氏沼虾四倍体诱导的研究

张天澍 杨晓菁 邹中菊 朱朝兵 王玉凤

(华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079)

摘要:对罗氏沼虾卵子极体排出时间和第一次卵裂时间进行了观察,并在此基础上,采用热休克和细胞松弛素 B(C.B)两种诱导方法成功诱导出了罗氏沼虾四倍体。石蜡切片显示,当罗氏沼虾卵子完全成熟时,第一极体已经排出。第二极体排出的时间约在受精后 55min。经过雌性原核和雄性原核的联会,第一次卵裂的时间约在受精后 210—230min。设计了多种处理条件,其中热休克诱导罗氏沼虾四倍体的最好条件是:受精后 210min,用 40℃ 水温处理胚胎 1.5min,在这种条件下,最高可以得到 35.86% 的四倍体率;而 C.B 诱导罗氏沼虾四倍体的最好条件是:受精后 230min,用 1.0mg/L 的 C.B 处理胚胎 10min,此时最高四倍体诱导率达 33.78%。

关键词: 罗氏沼虾;极体;四倍体;诱导

中图分类号: Q173 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2005)05-0538-06

罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 又名马来西亚大虾,属节肢动物门,甲壳纲,十足目,长臂虾科,沼虾属,是一种大型淡水经济虾类,原产于印度太平洋区域和亚热带地区^[1]。由于目前国内罗氏沼虾生产几乎都是人工集约化养殖,成本较高,且易引起性成熟提前,个体偏小,抗逆性差等问题,因此采用细胞工程技术,对罗氏沼虾进行优良多倍体的选育研究。这不仅对种质的鉴定、保护、优良种质资源的有效利用研究和遗传育种研究具有重要的理论意义,而且对降低生产成本,提高经济效益,促进和带动其他虾、蟹类甲壳动物遗传育种工作的开展有着广阔的应用前景和重要的社会经济意义。本研究在罗氏沼虾生殖细胞的发生和受精细胞学研究的基础上^[2-4],对罗氏沼虾极体排出的时间和第一次卵裂时间进行了探索,并采用温度休克和 C.B 处理的方法成功地诱导出了罗氏沼虾四倍体胚胎。

1 材料和方法

1.1 实验用虾 罗氏沼虾由武汉市柏泉虾业公司罗氏沼虾种苗场友好赠送或购自武汉大东门市场,选其中活泼健壮的个体作为实验材料。

1.2 罗氏沼虾卵子极体排出时间和第一次卵裂时间的确定 当发现交配后的雌虾开始有产卵行为

时,捞出雌虾。取出其第三对步足基部内侧处附着的精英,在小容器中用少量水搅碎,使精子释放出来。再剪开背部头胸甲,取出卵巢,释放出其中的成熟卵子,与精子充分混合,5min 后将受精卵置于水中的绢布上培育,同时进行充氧,再按照设定的时间取样。将取出的受精卵用玻恩氏液固定 6—12h 后,去掉固定液,用 70% 乙醇反复冲洗,除去内含的酸类,再用 5% 福尔马林液保存。然后石蜡包埋切片,苏木精-伊红染色,日产 Nikon 显微镜下镜检并拍照。

1.3 热休克处理诱导四倍体 按照设计的处理起始时刻,到时间后取出抱卵雌虾,用干净纱布(或其他干净的防滑布)将虾的头胸甲轻轻包裹住,将其抱卵的腹部浸入调好水温(39—41℃)的水浴锅中,其间轻轻晃动虾体,使附肢上附着的受精卵得到均匀充分的热休克。处理完毕后,将虾放回原环境(水温 28℃)中继续精心饲养。分别于受精后 21h(囊胚期)和 45h(原肠期)^[6]取胚胎约 100 粒进行染色体制片,并取数个不经温度休克的等时龄的虾胚胎作对照。把染色体数为 230—236 的计为四倍体,114—118 的计为二倍体^[5]。

1.4 C.B 处理诱导四倍体 将 C.B 溶于 0.01% 二甲亚砜(DMSO)中,配成 10mg/L 母液,置于 4℃ 冰箱

收稿日期:2004-02-09;修订日期:2005-05-20

基金项目:教育部高等学校骨干教师资助计划项目;武汉市青年科技晨光计划项目(编号:995004092G);湖北省自然科学基金项目(编号:2001ABB114)资助

作者简介:张天澍(1977—),男,湖北宜都人;博士生;研究方向:水生动物遗传育种学

通讯作者:王玉凤, E-mail: yfengw@public.wh.hb.cn

中保存。实验时用 0.01% 二甲基亚砷,将 C.B 配成浓度分别为 0.5、1.0 和 1.5mg/L 的溶液。达到处理时刻后,将抱卵雌虾取出分别置于浓度为 0.5—1.5mg/L 的 C.B 溶液中处理,到预定时间(10—20min)后,用 0.01% 的 DMSO 将雌虾清洗两次,每次 10min,再用清水泡 10min,将雌虾放回 28℃ 水族箱中。每个实验至少采用 3 个平行处理,对照组只用 0.01% 的 DMSO 处理,处理完后同样放入 28℃ 水族箱中孵化。分别于受精后 21h(囊胚期)和 45h(原肠期)^[6],取胚胎至少 100 粒进行染色体制片。同时取数个等时龄的对照组的虾胚胎作对照。染色体计数标准同 1.2。

1.5 染色体制片 罗氏沼虾胚胎染色体制片方法见参考文献^[5]。

2 结果

2.1 罗氏沼虾卵子极体排出时间和第一次卵裂时

间的确定

切片观察表明,从正在排卵的雌虾卵巢中取出的成熟卵子,卵质中充满卵黄,在卵膜边缘可以见到排出第一极体(图版 I:1),此时在卵内,细胞核物质为开始第二次成熟分裂做准备。大约在受精后 55min,第二极体排出。之后,精核和卵核逐渐形成雄性原核和雌性原核,并向卵的中央迁移。在受精后 210min 左右,可以观察到雌雄原核联会(图版 I:2),即将进入第一次核分裂期。大约在受精后 230min,可以看到第一次核分裂的后期,受精卵中出现两组核物质,即姊妹染色体团块分离,形成两个子核,但这时还没有细胞质分裂的迹象(图版 I:3)。

2.2 热休克诱导罗氏沼虾四倍体

根据结果 2.1 和前人的研究^[7,8],设定如下试验因子和水平(表 1)。

表 1 热休克诱导罗氏沼虾四倍体的实验因子水平表

Tab.1 The factors and their levels used for the experiment of tetraploidy induction by heat shock in *M. rosenbergii*

水平 Levels	处理温度(℃) Treatment temperature	起始处理时刻(min) Time after fertilization	持续时间(min) Treatment duration
1	39	210	1.0
2	40	220	1.5
3	41	230	2.0

实验结果表明,用热休克诱导,在适当的条件下可以产生罗氏沼虾四倍体的胚胎,其染色体数比对照组的多一倍(图版 I:4,5)

表 2 的 1 至 3 组为受精后 210min、热休克处理受精卵 1.5min 时,不同的处理温度对四倍体诱导率的影响;4 到 6 组是不同的起始时间在 40℃ 下处理

1.5min 的四倍体率变化情况;最后三组显示的是 40℃ 下受精后 210min 时、经过不同处理持续时间的情况。由表中可以看出在所设计的因子和水平当中,热休克诱导罗氏沼虾四倍体的最好条件是:在受精后 210min,用 40℃ 水温处理 1.5min。在此条件下,最高可得 35.86% 的四倍体率。

表 2 热休克处理条件与四倍体率的关系

Tab.2 The tetraploidy rate induced by heat shock under different conditions

组别 Groups	温度(℃) Treatment temperature	起始时间(min) Time after fertilization	持续时间(min) Treatment duration	计数胚胎 Embryos counted	四倍体率(%) Rate of tetraploidy
1	39	210	1.5	78	20.54
2	40	210	1.5	60	34.62
3	41	210	1.5	80	28.63
4	40	210	1.5	65	35.32
5	40	220	1.5	93	25.33
6	40	230	1.5	96	14.45
7	40	210	1	87	18.67
8	40	210	1.5	70	35.86
9	40	210	2	69	20.85
对照	—	—	—	60	—

2.3 C.B 诱导罗氏沼虾四倍体

试验因子和水平(表 3)。

根据 2.1 结论及参考前人的研究^[7,9], 设定如下

表 3 C.B 诱导罗氏沼虾四倍体的实验因子水平表

Tab.3 The factors and their levels used for the experiment of tetraploidy induction by C.B in *M. rosenbergii*

水平 Levels	C.B 浓度(mg/L) Concentration of the C.B	起始时间(min)Time after fertilization	持续时间(min) Treatment duration
1	0.5	210	10
2	1.0	220	15
3	1.5	230	20

实验表明,用 C.B 处理罗氏沼虾早期胚胎,在适当的处理条件下也可以诱导出四倍体(图版 I: 6)。

不同处理条件下,C.B 处理与四倍体诱导率的关系见表 4。由 1 到 3 组的结果可以看出,受精后 230min,处理持续时间为 10min 时,浓度为 1.0mg/L 的

C.B 处理受精卵,诱导出的四倍体率最高;4 到 6 组表明,用 1.0mg/L C.B 处理 10min,在受精后 230min 处理,四倍体率最高;7 到 9 组是在受精后 230min 时,用 1.0mg/L 的 C.B 持续处理不同时间的结果。当处理时间为 10min 时,四倍体诱导率最高,达 30.21%。

表 4 C.B 处理条件与四倍体率的关系

Tab.4 The tetraploidy rate induced by C.B under different conditions

组别 Groups	C.B 浓度(mg/L) Concentration of the C.B	起始时间(min) Time after fertilization	持续时间(min) Treatment duration	计数胚胎 embryos counted	四倍体率(%) Rate of tetraploidy
1	0.5	230	10	102	20.42
2	1.0	230	10	87	32.63
3	1.5	230	10	82	15.87
4	1.0	210	10	75	10.24
5	1.0	220	10	113	20.68
6	1.0	230	10	95	33.78
7	1.0	230	10	76	30.21
8	1.0	230	15	85	22.75
9	1.0	230	20	68	11.13
对照	-	-	-	56	-

综上所述,在所设计的因子和水平当中,C.B 诱导罗氏沼虾四倍体的最好条件是:在受精后 230min,用 1.0mg/L 的 C.B 处理 10min 时具有最高的诱导率,最高的四倍体诱导率为 33.78%。

3 讨论

根据 2.1 结论,第一极体在卵子成熟时、受精前即已排出,所以无法通过阻止第一极体的排出来获得三倍体。第二极体排出的时间距离雌虾排卵的时间太短,此时抱卵雌虾若受到打扰,就会使附在其腹部的受精卵(胚胎)脱落,而受精卵和早期胚胎的离体培养技术还十分欠缺,故而通过阻止第二极体排出来获得三倍体的方法也不太可行。四倍体是通过

抑制第一次卵裂得到的,而第一次卵裂的时间距离雌虾排卵受精的时间相对较长,这个时候进行处理,一般不会对雌虾的抱卵及胚胎孵化有很大影响,所以这个技术比较可行。此外,由于三倍体一般是高度不育的,因此必须不断的育种,这样必然增加养殖成本;而四倍体则不存在这种问题,它具有偶数对染色体,因此一般是可育的,并且可通过四倍体与二倍体杂交从而获得三倍体。所以本研究主要是通过阻止第一次卵裂时的细胞质分裂来进行四倍体的诱导,这更具有可行性和经济性。

本实验通过热休克和 C.B 两种方法成功地诱导出罗氏沼虾四倍体胚胎,并对多倍体诱导中三因

素(诱导强度、起始处理时间和处理持续时间)的最佳组合进行了摸索。综合对处理温度、起始时间和处理持续时间的分别研究,得出热休克诱导罗氏沼虾四倍体的最佳诱导条件是受精后 210min,在 40℃ 下处理 1.5min,这与日本沼虾四倍体诱导条件相似^[8],而与爬行亚目的中华绒螯蟹相比,热休克的温度和处理时间相似,但处理的起始时间相差很大^[7],这主要是因为二者的胚胎发育速度不同,中华绒螯蟹的胚胎发育速度比罗氏沼虾要慢得多^[10]。对于 C.B 诱导四倍体,作者也得出了三个因子水平的最佳组合:在受精后 230min,用 1.0mg/L 的 C.B 处理 10min。在此条件下,最高的四倍体诱导率可达 33.78%。这个条件中的 C.B 浓度与中国对虾多倍体诱导时所用的最适浓度一致,但处理持续的时间要稍短一些^[9,11]。而中华绒螯蟹的 C.B 诱导条件则与罗氏沼虾的相差较大,中华绒螯蟹诱导多倍体所需的 C.B 浓度比罗氏沼虾的要高,为 1.5mg/L,其处理持续的时间也要比罗氏沼虾长,需要 18min^[12]。由此可以看出,亲缘关系越近的动物,其诱导多倍体的条件也越接近。当然这也与动物的生活习性、胚胎的发育速度有着密切的关系。因此,水生动物多倍体诱导条件的选择,可以参考与其亲缘关系较近的动物,这样可以减少一些盲目性,但具体情况还是要在实践中探索。

本次实验用热休克和 C.B 诱导四倍体,都是通过抑制受精卵的第一次卵裂来实现的。通过胚胎的石蜡切片可以看到,在受精后 210min 左右,雌雄原核正趋向联会,接近第一次有丝分裂的间期。而在受精后 230min 时,受精卵正处于第一次有丝分裂的核分裂后期,两个子核已经分开。有研究表明,热休克作用的效应期是在有丝分裂的间期^[13],这与实验结果相吻合。因为本试验表明,热休克的最佳处理时间是在受精后 210min,接近有丝分裂间期。而 C.B 的作用是在不影响核分裂的前提下,抑制细胞分裂时微丝的组装,从而抑制第一次卵裂。本研究显示,C.B 诱导罗氏沼虾四倍体的最佳时间是受精后 230min,正是接近胞质环形成的时期。当然这种处理时间上的差别也与受精卵发育的不同步、雌体间的个体差异有关。

人工诱导多倍体进行遗传育种研究,改良水生动物的养殖品种,已日益受到重视。因为多倍体一般具有生长快、个体大、肉质好和成活率高等特点^[14,16],比如,在高原和北方寒冷地区等较恶劣的条件下,发现天然多倍体的概率较高,也许就是和其

适应性强有关。借助染色体组操作进行育种,通过使染色体加倍,产生较大的遗传变异和杂合性。在鱼类和软体动物中,此作用已得到普遍肯定,但对虾类染色体组操作的研究则开始不久。罗氏沼虾四倍体的获得可以从根本上改变现有状况,其研究成果将开拓、带动其他甲壳动物细胞工程技术的研究与应用,对改善我国目前的养殖结构,促进现代水产养殖业的发展,提高经济效益,具有重要的社会和经济意义。对四倍体后期胚胎及苗种的培育正在进一步的研究中。

参考文献:

- [1] Pan J M. Breeding techniques of *Macrobrachium rosenbergii* [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing Company, 1997 [潘家模. 罗氏沼虾养殖技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1997]
- [2] Wang Y F, Du N S, Lai W. Relationships of organelles in oocytes with vitellogenesis of *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea, Decapoda) [J]. *Acta hydrobiologica sinica*, 1999, 23(1): 24—28 [王玉凤, 堵南山, 赖伟. 罗氏沼虾卵母细胞细胞器与卵黄发生的关系. 水生生物学报, 1999, 23(1): 24—28]
- [3] Wang Y F, Du N S, Lai W. Structure, biochemical composition and function of sperm spike in *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Acta hydrobiologica sinica*, 1998, 22(4): 346—350 [王玉凤, 堵南山, 赖伟. 罗氏沼虾精子棘状部的结构、化学组成和功能. 水生生物学报, 1998, 22(4): 346—350]
- [4] Wang Y F, Du N S, Lai W. Cytological study on fertilization mechanism in *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Acta zoologica sinica*, 1998, (2): 195—202
- [5] Zhang T S, Wang Y F. Studies on the chromosomes of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Journal of Central China Normal University (Natural Science)*, (2003, 37(2): 231—232 [张天澍, 王玉凤. 罗氏沼虾的染色体研究. 华中师范大学学报, 2003, 37(2): 231—232]
- [6] Zhao Y L, Wang Q, Du N S, et al. Embryonic development of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Decapoda): I. Morphogenesis of the external structures of the embryo [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1998, 44(3): 249—256 [赵云龙, 王群, 堵南山等. 罗氏沼虾胚胎发育的研究: I. 胚胎外部结构形态发生. 动物学报, 1998, 44(3): 249—256]
- [7] Chen L Q, Zhao Y L, Zhou Z L, et al. Studies on the induction of polyploid in the Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis*: II. Induction of triploidy embryos and tetraploidy zoeas in *Eriocheir sinensis* by heat shock [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1997, 43(4): 390—398 [陈立桥, 赵云龙, 周忠良等. 中华绒螯蟹多倍体的诱导研究: II 热休克诱导中华绒螯蟹三倍体胚胎和四倍体溞状幼体. 动物学报, 1997, 43(4): 390—398]
- [8] Qiu G F, Du N S, Lai W. A preliminary study on induction of tetraploidy in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense* by heat shock [J]. *Chin. J. Fisheries*, 1997, 21(1): 13—17

- [9] Bao Z M, Zhang Q Q, Wang H, *et al.* Studies on the induction of triploid in *Penaeus chinensis*: II. Treatment with cytochalasin B[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 1993, 15(3):101—105 [包振民, 张全启, 王海等. 中国对虾三倍体的诱导研究 II. 细胞松弛素 B 处理. 海洋学报, 1993, 15(3):101—105]
- [10] Lee T H, Yamazaki F. Cytological observations on fertilization in the Chinese fresh-water crab, *Eriocheir sinensis*, by artificial insemination (*in vitro*) and incubation [J]. *Aquaculture*, 1989, 76:347—360
- [11] Xiang J H, Zhou L H, Liu R Y, *et al.* Induction of the tetraploids of the Chinese shrimp, *Penaeus chinensis* [J]. *Marine Sciences*, 1992, 4:55—61 [相建海, 周令华, 刘瑞玉等. 中国对虾四倍体诱导研究. 海洋科学, 1992, 4:55—61]
- [12] Chen L Q, Zhao Y L, Wang Y F, *et al.* Studies on triploidy and tetraploidy induction by cytochalasin B in the Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Asian Fisheries Science*, 1997, 10(2): 131—137
- [13] Chourrout D. Genetic manipulations in fishes: review of methods. In: Tiews K ed, Selection, Hybridization and genetic engineering in aquaculture. Vol. 22[M]. Berlin:Heinemann, 1986, 111—127
- [14] Lou Y D. Studies on the polyploidy breeding in fishes abroad[J]. *J. Fish. China*, 1984, 8(4):147—155 [楼允东. 国外对鱼类多倍体育种的研究. 水产学报, 1984, 8(4):147—155]
- [15] Cesar A, Verdugo R, Allen S K Jr. Triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth, gametogenesis and suppression of functional hermaphroditism [J]. *Aquaculture*, 2000, 186:13—32
- [16] Wu C J. Retrospects and prospects of fish genetics and breeding research in China. *Aquaculture*, 1990, 85:61—68

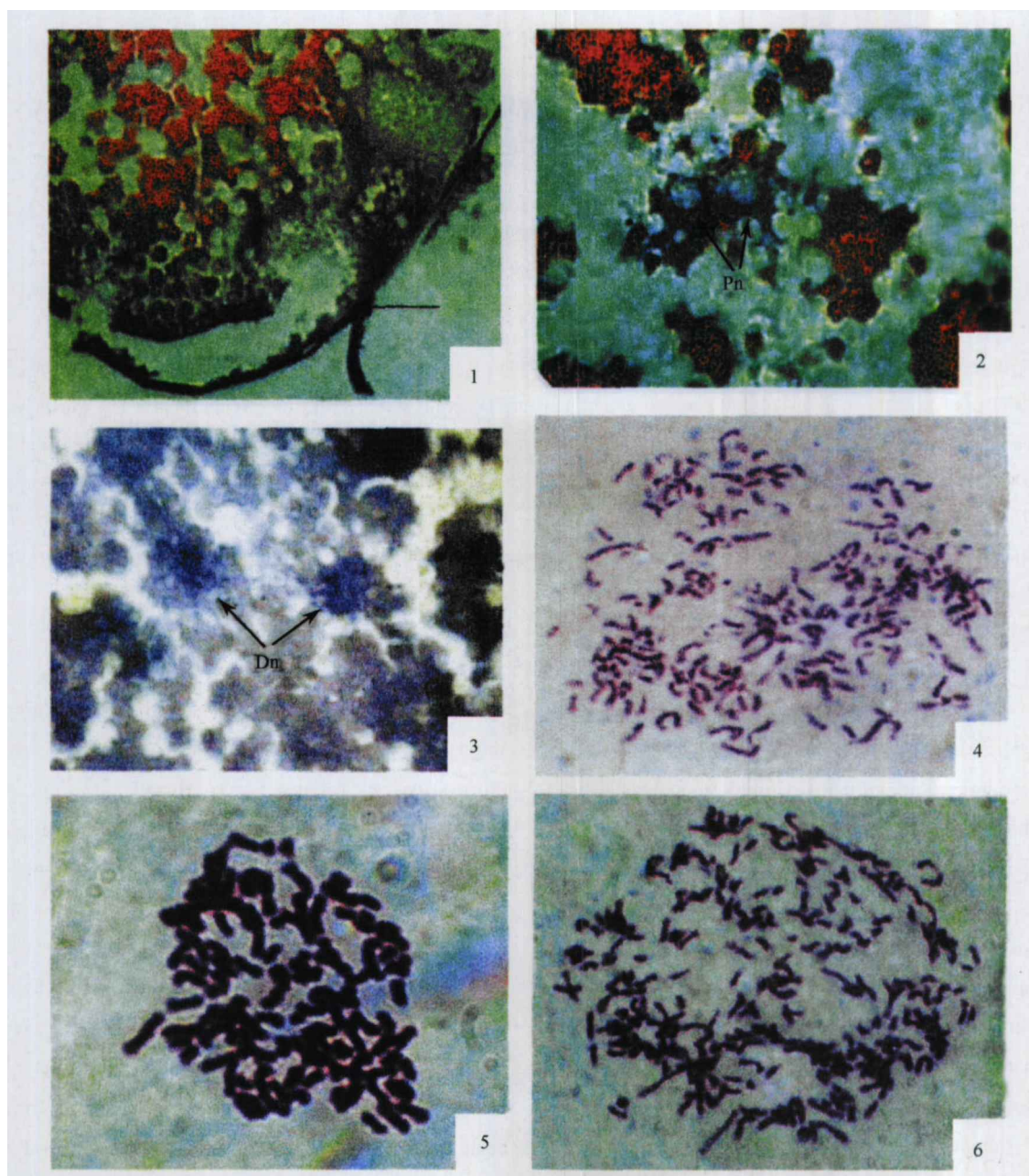
STUDIES ON THE TETRAPLOIDY INDUCTION IN THE GIANT FRESHWATER PRAWN, *MACROBRACHIUM ROSENBERGII*

ZHANG Tian-Shu, YANG Xiao-Jing, ZOU Zhong-Ju, ZHU Chao-Bing and WANG Yu-Feng

(College of Life Science, Central China Normal University Wuhan 430079)

Abstract: Triploid organisms are advantageous in agricultural breeding due to their rapid growth rate and more delicious meat. Triploid animals are also valuable because of their fertility and capacity of producing triploidy by crossing with normal diploid. The giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* is an important aquaculture species in China. The intensive breeding, which is widely used, may cause many problems, such as prematurity, being smaller in size, *etc.* Triploid induction may be a solution to solve these problems. Present study showed that the first polar body was released when the oocyte matured physiologically and the second polar body was extruded about 55 mins after fertilization. After the synapsis of male and female pronuclei, the first cleavage occurred around 210—230 mins following fertilization. Furthermore the tetraploidy embryos of this prawn were successfully induced by heat-shock and cytochalasin B (C. B) treatment. The tetraploid embryos of the prawn could be obtained by induction with either heat shock or C. B. The optimum condition of heat shock appeared to be at 210 minutes post-fertilization, duration for 1.5 minutes at 40℃, which could yield 35.86% tetraploidy embryos. While treated with 1.0mg/L C. B for 10 minutes at 230 minutes after fertilization, the maximum rate of tetraploid (33.78%) was obtained.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; Polar body; Tetraploid; Induction



1. 成熟的卵子(箭头示排出第一极体)($\times 1\,500$)。2. 受精后 210min, 雌雄原核靠近(Pn:原核)($\times 1\,200$)。3. 受精后 230min, 第一次卵裂后期, 两个子核(Dn)已经分开($\times 1\,200$)。4. 热休克诱导的罗氏沼虾四倍体染色体图($\times 3\,000$)。5. 对照组罗氏沼虾胚胎的染色体($\times 3\,000$)。6. C.B 诱导的罗氏沼虾四倍体染色体图($\times 3\,000$)

1. Matured egg(The arrow shows the extrusion of the first polar body)($\times 1\,500$). 2. 210min after fertilization, the female and male pronuclei(Pn)close with each other($\times 1\,200$). 3. 230min following fertilization, at the anaphase of the first cleavage, the arrow indicates the separated two daughter nuclei(Dn)($\times 1\,200$). 4. The tetraploidy chromosome of *M. rosenbergii* induced by heat shock ($\times 3\,000$). 5. The chromosome in control groups ($\times 3\,000$). 6. The tetraploidy chromosome of *M. rosenbergii* obtained by C.B treatment($\times 3\,000$)