

细胞松弛素 B 对日本沼虾四倍体的适宜诱导条件的研究

钱国英^{1,2} 朱秋华² 汪财生² 尹尚军²

(1. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310007; 2. 浙江万里学院生物与环境学院, 宁波 315100)

摘要: 本文研究了用细胞松弛素 B (Cytochalasin B, CB) 诱导日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 多倍体的处理条件和方法。试验水温分别为 18—19℃、22—23℃, CB 浓度为 1.0—2.0 mg/L, 处理的起始时间在受精后 5—9 h, 处理的持续时间为 10—20 min。结果表明, 在水温为 18—19℃ 时, 四倍体卵子的最适诱导条件为: 受精后 7—8 h, CB 溶液的浓度为 1.5 mg/L, 处理 20 min, 四倍体诱导率最高可达 56.1%; 在水温为 22—23℃ 时, 最适诱导条件为: 在受精后 6 h 左右, CB 溶液浓度为 1.5 mg/L, 处理 15—20 min, 四倍体诱导率最高可达 54.3%。处理的起始时间和 CB 溶液的浓度对胚胎的四倍体率有显著影响 ($P < 0.05$); 胚胎的成活率随 CB 浓度的提高与处理的持续时间的延长而下降。考虑到胚胎成活率因素, 建议选择 CB 浓度为 1.5 mg/L, 处理持续时间 15—20 min。

关键词: 日本沼虾; 胚胎; 四倍体; 细胞松弛素 B

中图分类号: Q132.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-3207(2006)05-0587-06

日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*), 又名青虾, 营养价值高, 风味独特, 是我国个体较大的一种主要淡水经济虾类。但近年来由于多种原因, 其天然的优良生长性能与商品性状发生严重退化。人工诱导多倍体, 是改良养殖动物品种的一种有效的方法, 业已证实基因组的叠加将影响细胞中酶和蛋白质的表达^[1-4]。本试验旨在通过日本沼虾四倍体的诱导, 培育日本沼虾四倍体种质群体, 并通过四倍体与二倍体杂交, 以获得百分之百的三倍体苗种群体, 提高养殖日本沼虾的生长速度和商品虾的规格与品质, 提升传统渔业产业, 并为探索甲壳类动物的三倍体育苗技术打基础。

十足类甲壳动物的多倍体育种的研究极为缺乏, 至今仅有中国对虾、日本绒螯蟹的三倍体和中华绒螯蟹的多倍体进行过诱导实验和研究^[5-8], Qiu 等^[9]以热休克抑制日本沼虾受精卵第一次卵裂, 获得了最高比例达 30.8% 四倍体胚胎, 但用细胞松弛素 B 对四倍体的诱导技术, 迄今尚无相关的研究报道。本文研究了用细胞松弛素 B (Cytochalasin B, CB) 诱导日本沼虾四倍体的适宜处理条件。

1 材料与方法

1.1 亲虾的培育与促产

试验用亲虾于 2003 年 3 月—5 月, 采自绍兴狭湖外荡水域, 选择雌虾体长 5—8 cm, 体重 6—8 g; 雄虾体长 7—10 cm, 体重 7—10 g。收集的亲虾雌雄分开, 暂养在置于土池中的网箱内。依水温变化每天投喂一定量的新鲜小杂鱼。待水温稳定在 18℃ 以上后, 将亲虾转入用于交配促产的置于室内水泥池中的 1×1×1 m 网箱内, 雌雄按 1:2 比例并箱促产, 让其自然交配产卵。水泥池大小为 3×1.5×1 m, 充气增氧, 每天换水 1/5。全期水温恒定在 18℃ 和 22℃。

1.2 抱卵虾采集与处理

翌日凌晨 4 时起每小时检查抱卵情况, 并将抱卵虾取出, 另箱暂养待处理。把开始产卵的时间记为受精零时。

1.3 CB 液配制与四倍体诱导

细胞松弛素 B (CB) 为美国 Sigma 公司产品, 现配现用。将 CB 溶于 0.01% 二甲基亚砜 (DMSO), 配成浓度分别为 1.0、1.5 和 2.0 mg/L 的溶液。

自然顺产的抱卵虾培育至预定处理时间取出,

迅速用纸吸干虾身上的水分,放入有 CB 溶液的脸盆中,按设计时间处理。处理完毕后,用池水清洗两遍,将母虾小心放网箱中孵化,常规管理。

试验在水温 18—19℃和 22—23℃分 A、B 两个批次进行。每次的试验按正交 $L_9(3^4)$ 表设计(见表 1)。

表 1 CB 处理与四倍体率、出膜成活率和孵化率的关系
Tab 1 Relationship of cytochalasin treatment with the tetraploidy occurrence rate, the survival rate and hatch rate of the embryos

组别 Group	CB 浓度 Concentration of CB(mg/L)	处理起始时间 Time after fertilization(h)	处理持续时间 Treatment duration(min)	计数胚胎数 Embryos counted	出膜成活率 Survival rate(%)	四倍体率 Tetraploidy rate(%)	孵化率 Hatch rate(%)
A1	1. 0	7	10	96	94. 8	28. 5	53. 8
A2	1. 0	8	15	98	91. 8	30. 6	49. 3
A3	1. 0	9	20	101	90. 1	23. 8	46. 5
A4	1. 5	7	15	96	92. 7	49. 7	47. 6
A5	1. 5	8	20	102	88. 2	56. 1	45. 2
A6	1. 5	9	10	109	92. 7	39. 6	39. 6
A7	2. 0	7	20	101	78. 4	46. 5	35. 7
A8	2. 0	8	10	92	86. 9	52. 3	40. 1
A9	2. 0	9	15	89	85. 3	35. 1	37. 5
B1	1. 0	5	10	100	90. 0	20. 1	46. 1
B2	1. 0	6	15	98	90. 8	26. 3	45. 3
B3	1. 0	7	20	105	89. 5	28. 4	40. 7
B4	1. 5	5	15	93	86. 0	52. 0	42. 3
B5	1. 5	6	20	103	83. 5	54. 3	39. 8
B6	1. 5	7	10	89	84. 9	35. 3	43. 6
B7	2. 0	5	20	101	79. 2	43. 6	40. 9
B8	2. 0	6	10	94	82. 6	50. 9	33. 2
B9	2. 0	7	15	102	80. 4	43. 5	28. 4

1.4 存活率统计与倍性鉴定

在原肠期和出膜期取样,每组 100 个胚胎左右,分别统计各试验组胚胎的存活率,出膜后统计孵化率。

倍性鉴定在受精后 13.5—4.5h 的多细胞期进行。用 500μg/L 秋水仙碱于 20℃下培养 1h,在 37℃水浴锅中用 0.1M 的 KCl 低渗溶液处理 40—50min,移去低渗液,缓慢加入预冷的卡诺氏固定液,4℃下静止 1h,其间更换固定液 2 次。然后改用 1:1 的甲醇和冰醋酸液固定。制片时,取单个胚胎置于载玻片上,滴上 1—2 滴 50% 醋酸使其软化,并除去部分卵黄物质。日产 Olympus 显微镜下镜检并拍照。日本沼虾的 2n 染色体数约为 104 左右(图 1),与邱高峰等^[10]对日本沼虾的染色体研究结果相似,以染色

体数 208 左右为四倍体(图 2)。

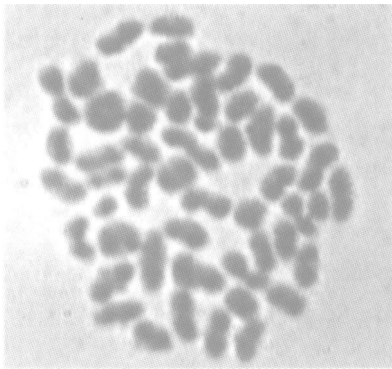


图 1 低渗法胚胎细胞减数分裂中期的二价体染色体
(2000×, 2n= 104)

Fig. 1 Embryos at meiotic diplotene using the Chromosome low-osmosis method(2000×, 2n= 104)

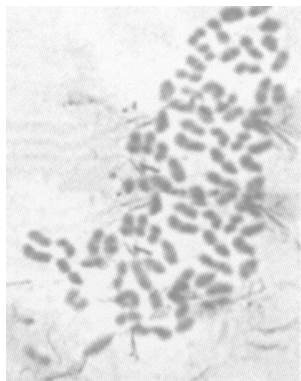


图 2 低渗法胚胎细胞减数分裂中期的二价体染色体
(2000×, 4n= 208)

Fig. 2 Embryos at meiotic tetraplote using the Chromosome low-osmosis
method(2000×, 4n= 208)

试验结果用方差分析检验。

2 结果

试验设计与出膜期取样的试验结果均列于表 1。各试验组在原肠期的胚胎成活率在 92%—97% 之间, 各组之间差异不显著。

2.1 CB 处理条件与四倍体诱导率的关系

于表 1 可见, 水温为 18—19℃ 时, 受精后 8h 的受精卵, 用 1.5mg/L 的 CB 溶液, 处理 20min, 四倍体诱导率最高可达 56.1% (A5 组); 最低的四倍体诱导率发生在 A1 组, 为 28.5%, 处理条件为: CB 浓度

1.0mg/L, 处理的起始时间在受精后 7h, 处理的持续时间为 10min。水温为 22—24℃ 时, 受精后 6h 的受精卵, 用 1.5mg/L 的 CB 溶液, 处理 15min, 四倍体诱导率最高可达 54.3% (B5 组)。最低的四倍体诱导率发生在 B1 组, 为 20.1%, 处理条件: CB 浓度 1.0mg/L, 处理的起始时间在受精后 5h, 处理的持续时间为 10min。

将 A 类与 B 类的试验设计与结果相比较, 两类设计的区别仅仅在于水温变化导致处理起始时间的差异, 在 CB 浓度和处理的持续时间上做了平行试验。结果表明, 两类组平均四倍体诱导率比较接近, 分别为 40.20% 和 39.57%。两类组别间四倍体的诱导率变化趋势也非常类同, 说明在此水温段, 合适的 CB 溶液浓度和处理的持续时间是比较接近的, 将水温差异归结为控制处理起始时间的差异是合适的。

方差分析的结果表明(表 2), 处理起始时间对四倍体率的影响差异是显著的($P < 0.05$), 两水温段的影响趋势是一致的。经多重比较(t 检验, 表 3), 在水温为 18—19℃ 时, 处理起始时间在受精后 7—8h 与 9h 间的四倍体率, 差异是显著的($P < 0.05$), 以选择 7—8h 为宜。在水温为 22—23℃ 时, 1.0mg/L 与 1.5—2mg/L 的 CB 溶液浓度对四倍体诱导率的影响差异也是显著的($P < 0.05$), 而 1.5mg/L 与 2mg/L 的四倍体诱导率差异不显著的($P > 0.05$), 适宜的 CB 溶液浓度为 1.5—2mg/L。

表 2 四倍体诱导率的方差分析结果
Tab. 2 Results of the variance analysis for the tetraploidy occurrence rate

变因 Source		平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 比 $F_{0.05}(2, 2) = 19$ $F_{0.01}(2, 2) = 99$
18—19℃	CB 浓度 CB concentration	737.72	2	368.86	51.44*
	处理起始时间 Time after fertilization	281.24	2	140.62	19.61*
	处理持续时间 Treatment duration	20.22	2	10.11	1.11
	误差 Error	14.34	2	7.17	
	总和 Sum	1053.52	8		
22—23℃	CB 浓度 CB concentration	964.21	2	482.11	59.23*
	处理起始时间 Time after fertilization	93.44	2	46.72	5.74
	处理持续时间 Treatment duration	198.92	2	99.46	12.23
	误差 Error	16.27	2	8.14	
	总和 Sum	1240.30	8		

* 差异显著, significant difference

表3 四倍体率均值差数多重比较结果(t-检验)
Tab. 3 The results of means comparison with the tetraploidy occurrence rate(t-test)

因子 Factor	一、二水平间 Between 1 and 2	二、三水平间 Between 2 and 3	一、三水平间 Between 1 and 3	临界值 LSD	
				0.05	0.01
处理起始时间 Time after fertilization(18—19℃)	4. 76	13. 5*	8. 74	9. 41	21. 70
CB 浓度 Concentration of CB(18—19℃)	20. 84*	3. 84	17. 00*	9. 41	21. 70
CB 浓度 Concentration of CB(22—23℃)	23. 27*	0. 63	22. 64*	10. 02	23. 71

* 同表 2, the same as table 2

2.2 CB 处理条件与胚胎成活率的关系

原肠期的胚胎成活率差异不大,且都高达 92%—97%,表明, CB 处理对胚胎早期发育的影响不大。但当胚胎从原肠期发育至出膜前期的各器官形成过程中,各处理组间的成活率有不同表现。在水温为 18—19℃时, CB 处理的胚胎出膜期成活率最高可达 94.8% (A1 组),处理条件为: CB 浓度为 1.0mg/L,处理的起始时间在受精后 7h,处理的持续时间为 10min;最低胚胎成活率发生在 A7 组, CB 浓度最高,为 2.0mg/L,处理的持续时间最长,为 20min。

水温为 22—23℃时,有相近的结果出现:胚胎成活率最高可达 90.8%,也发生在 CB 浓度低、持续时间短的 B1 与 B2 组。处理条件: CB 浓度为 1.0mg/L,处理的起始时间在受精后 6h,处理的持续时间为 10—15min;最低胚胎成活率发生在 B7 组, CB 浓度最高,为 2.0mg/L,处理的持续时间最长,为 20min。

从图 3 与图 4 明显可见,胚胎成活率随 CB 浓度升高和处理的持续时间增长而下降,在两个水温段都呈此趋势。但方差分析结果表明, CB 浓度和处理持续时间的三个水平间未有显著的差异($P>0.05$)。

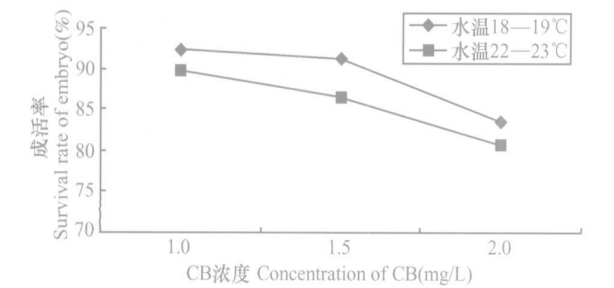


图3 不同水温下不同 CB 浓度对胚胎成活率的影响
Fig. 3 The effect of different CB concentration on survival rate of embryo under different water temperature

从胚胎发育状况来看,处理的起始时间对胚胎发育无明显影响。但随 CB 浓度的提高,受精卵正常卵裂发生一定的变化; CB 浓度为 2.0mg/L 时,在卵裂晚期,约有 3%—6% 的胚胎出现大小不等的分裂球,没多久便夭折了。在高温组(22—23℃),这种畸形分裂胚胎的比率要高于低温组(18—19.5℃)。

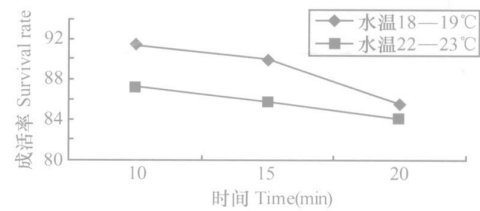


图4 不同水温下不同持续时间对胚胎成活率的影响
Fig. 4 The effect of different duration time on survival rate of embryo under different water temperature

2.3 CB 处理条件与胚胎孵化率的关系

对孵化率进行方差分析的结果表明,随 CB 浓度升高,对胚胎的毒害作用加剧,三个处理水平间的孵化率有显著的差异($P<0.05$),以 CB 浓度为 1.0mg/L 时的孵化率为最高;处理的持续时间对孵化率的影响不显著($P>0.05$)。两个水温段都呈此趋势。

3 讨论

3.1 水温与处理时间的关系

水生动物的胚胎在适温范围内随温度的升高发育速度加快,因而在多倍体处理时应根据温度的变化,选择不同的处理起始时间。本试验在日本沼虾的胚胎发育已做了预备观察,发现在水温为 18℃时, 7.5h 的受精卵正处于第一次有丝分裂中期;在水温为 22℃时, 6h 的受精卵正处于第一次有丝分裂中期。此结果与卢建平^[11]在水温为 21℃时对日本沼虾受精卵核行为的研究结果相近: 6.5h 的受精卵正处于第一次有丝分裂中期。本试验在 18—19℃时,选择受精后 7—8h 和 22—23℃时,选择受精后 6h 左右进行四倍体处理,是比较合适的,这与 Qiu 等的研究结果相近^[10]。

在水温为 18—19℃时,处理起始时间在受精后 9h 的四倍体率显著地低于受精后 7—8h 处理的四倍体率,说明此时处于第一次有丝分裂中期的受精卵的比例已经减少,部分受精卵已进入第一次有丝

分裂晚期,对 CB 药物的处理已不是十分敏感。因而水温为 18—19℃时,建议处理的时间在受精后 7—8h 为好。水温为 22—23℃时,处理的时间在受精后 5.5—6.5h 为好。由于低温时,受精卵的胚胎发育速度较慢,在第一次有丝分裂中期停留的时间相对较长,有条件时宜控制在低温(18—19℃)时处理为好,有利于延长诱导染色体加倍的效应期,从而提高四倍体诱导率^[12]。

3.2 CB 浓度与处理持续时间选择

CB 的诱导机制是抑制细胞膜微丝网状系统的形成,细胞不能进行分裂,而细胞内的核分裂则不受其影响,因而是比较理想的染色体加倍药物,这在贝类中也得到了证实^[13]。但随着 CB 浓度上升与处理持续时间的增长,对胚胎的毒害作用也会加剧,导致成活率下降。一定的 CB 浓度和处理持续时间是日本沼虾四倍体诱导的必要条件,在相对安全的前提下,选择合适的 CB 浓度与处理持续时间将会有效地提高四倍体诱导频率。本试验的结果表明,选择 CB 浓度 1.5—2.0mg/L,处理持续 15—20min,其四倍体的诱导率显著高于 CB 浓度 1.0mg/L,处理持续 10min,但考虑到胚胎的成活率因素,宜选择 CB 浓度为 1.5mg/L,处理持续 15—20min。这一结果与陈立侨^[8]等在中华绒螯蟹多倍体的诱导中所得结果相同。

本文得到楼允东老师的指导,在此谨致谢意!

参考文献:

- [1] Wu Y P, Ye Y Z, Wu Q J. The expression patterns of genes in different biotypes by genome addition[J]. Acta Genetica Sinica, 2000, 27(2): 108—113 [吴玉萍,叶玉珍,吴清江. 基因叠加生物型的基因表达特征. 遗传学报,2000, 27(2): 108—113]
- [2] Schmidke J. Gene action in fish of tetraploid origin. ① Cellular and biochemical parameters in clupeoid and salmonid fish [J]. Biochem Genet, 1976, 13: 301
- [3] Danzmann R G, Bogart J P. Gene dosage effects on MDH isozyme expression in diploid, triploid, and tetraploid treefrogs of the genus Hyla[J]. J Heredity, 1982, 73: 277—280
- [4] Beck M L. Chromosomal and electrophoretic analyses of hybrids be-

tween grass carp and bighead carp[J]. Copeia, 1984, 81: 337—342

- [5] Bao Z M, Zhang Q Q, Wang H, et al. Studies on the triploidy induction in *Fenneropenaeus Chinensis*, ①. Treated by cytochalasin B [J]. Marine Science, 1990, 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①: 细胞松弛素 B 处理. 海洋学报, 1990, 15(3): 101—105]
- [6] Dai J X, Bao Z M, Zhang Q Q, et al. Studies on the triploidy induction in *Fenneropenaeus Chinensis*, iv. Treated by heat shock [J]. Hereditas, 1993, 15(5): 15—18 [戴继勋, 包振民, 张全启. 中国对虾三倍体的诱导研究iv: 温度休克. 遗传, 1993, 15(5): 15—18]
- [7] Lu R H. An experiment on induction of triploidy in *Eriocheir japonicus hepuensis* by heat treatment. Chin J Oceanol Limnol, 1993, 11(1): 21—24
- [8] Chen L Q, Zhao Y L, Wang Y F, et al. Studies on the polyploid induction in the chinese mitten-handed crab, *eriocheir sinensis*, iv. Induction of triploidy and tetraploidy embryos in *eriocheir sinensis* by cytochalasin B [J]. J Fisheries China, 1997, 21(1): 19—25 [陈立侨, 赵云龙, 王玉凤等. 中华绒螯蟹多倍体的诱导研究iv: 细胞松弛素诱导中华绒螯蟹三倍体和四倍体胚胎[J]. 水产学报, 1997, 21(1): 19—25]
- [9] Qiu G F, Du N S, Lai W. a Preliminary study on induction of tetraploidy in the freshwater prawn *Macrobrachium Nipponenses* by heat shock. J Fisheries China, 1997, 21(1): 13—18
- [10] Qiu G F, Du N S, Lai W. Chromosomal and karyological studies on the freshwater prawn *Macrobrachium Nipponenses* (Crustacea, Decapoda) [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1994, 25(5): 493—498 [邱高峰, 堵南山, 赖伟. 日本沼虾染色体及其核型的研究. 海洋与湖沼, 1994, 25(5): 493—498]
- [11] Lu J P. Nucleus behaviour in fertilized eggs of the fresh-water prawn *Macrobrachium nipponense* [J]. Donghai Marine Science, 2001, 19(4): 17—20 [卢建平. 日本沼虾受精卵核行为的初步研究. 东海海洋, 2001, 19(4): 17—20]
- [12] Zhao Y L, Meng F L, Chen L Q, et al. Effects of different gradient temperatures on embryonic development of the *Cherax Quadricarinatus* (Crustacea, Decapoda) [J]. J Lake Sciences, 2000, 12(1): 59—62 [赵云龙, 孟凡丽, 陈立侨等. 不同水温对红螯螯蟹胚胎发育的影响. 湖泊科学, 2000, 12(1): 59—62]
- [13] Li B, Wang Z P, Wang R C. Variance of triploid rate of induced pacific oyster *crassostrea gigas* during development [J]. J Ocean University of Qingdao, 2001, 31(5): 666—672 [李斌, 王昭萍, 王如才. 诱导三倍体太平洋牡蛎群体发育过程中三倍体率的变化. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(5): 666—672]

STUDY ON INDUCEMENT CONDITION OF TETRAPLOID IN *MACROBRACHIUM NIPPONENSE* BY CYTOCHALASIN B

QIAN Guo-Ying^{1,2}, ZHU Qiu-Hua², WANG Cai-Sheng² and YIN Shang-Jun²

(1. Zhejiang University, Hangzhou 310007; 2. Zhejiang Wanli University, College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Ningbo 315100)

Abstract: Cytochalasin B (CB) was used for inhibiting the first cleavage of zygotes to induce tetraploid in *Macrobrachium nipponense*. At 18—19 °C and 22—23 °C water temperature, two tetraploid induction trials designed by $L_9(3^4)$ were carried out using CB treatment at different beginning time after fertilization (5 hours, 6 hours, 7 hours, 8 hours, 9 hours), different concentration of CB (1.0 mg/L, 1.5 mg/L, 2.0 mg/L), and different treatment duration time of the eggs (10 min, 15 min, 20 min). The results indicated that the highest induction rate at 18—19 °C and 22—23 °C were 56.1% and 54.3% respectively. The optimum condition of inducement tetraploid at 18—19 °C was that treatment beginning time was 7—8 hours after fertilization, CB concentration was 1.5 mg/L, and treatment duration was 20 min. The optimum condition of inducement tetraploid at 22—23 °C was that treatment beginning time was 6 hours after fertilization, CB concentration was 1.5 mg/L, and treatment duration was 15—20 min. The lowest induction rate at 18—19 °C and 22—23 °C were 28.5% and 20.1% respectively at the experimental condition of 1.0 mg/L CB concentration, beginning treatment at 5—7 hours after fertilization, and 10 min treatment duration time. Beginning time of CB treated and the concentration of CB significantly affected the induction rate of tetraploid ($P < 0.05$). The higher concentration of CB and the longer treatment duration time were, the higher induction rate of tetraploid was. The development of embryo was improved at higher temperature, so the best treatment time was 7—8 hours after fertilization at 18—19 °C, and the best treatment time was 5.5—6.5 hours after fertilization at 22—23 °C. Survival rate of embryo at gastrula was high to 92%—97% at different treatments. Along with the increase of CB concentration and treatment duration time, and the survival rate of embryo was reduced slightly. But there were no significant different survival rate of embryo between different treatments ($P > 0.05$). Significantly different hatching rate were observed between three different CB concentration ($P < 0.05$). As the increase of CB concentration, the damage of embryo was increased, the hatching rate was reduced ($P < 0.05$). Combining to induction rate of tetraploid, the survival rate of embryo and hatching rate, the treatment condition of 1.5 mg/L of CB concentration and 20 min treatment duration were recommended.

Key words: *Macrobrachium nipponense*, Embryo, Tetraploid, Cytochalasin B (CB)