

研究简报

# 文蛤染色体核型及三倍体诱导的初步研究

## A PRELIMINARY STUDY ON THE KARYOTYPE AND TRIPLOID INDUCTION IN *MERETRIX MERETRIX*

常建波 魏利平 杨建敏 官向红 孙逢贤  
(山东省海洋水产研究所, 烟台 264000)

Chang Jianbo, Wei Liping, Yang Jianmin, Gong Xianghong and Sun Fengxian  
(Shandong Marine Fisheries Research Institute, Yantai 264000)

戴继勋  
(青岛海洋大学, 266003)

Dai Jixun  
(Ocean University of Qingdao, 266003)

关键词 文蛤, 染色体核型, 温度休克, 三倍体

KEYWORDS *Meretrix meretrix*, Karyotype, Temperature shock, Triploid

近十年来,应用多倍体诱导技术改良贝类养殖品种,已成为国内外研究的热点。目前,已有十余种贝类获得了三倍体,有的已进入生产实用阶段[Stanley等,1981;Tabarini,1984;Quillet等,1986;Arai等,1986;姜卫国等,1987;Yamamoto等,1988;古丸明等,1989;Wada等,1989;Gendeau等,1990;王子臣等,1990a、b;孙振兴等,1993;工藤真弘等,1994;梁英等,1994]。但有关文蛤染色体数目、核型及多倍体诱导的研究,在国内外还未见报道。

文蛤(*Meretrix meretrix* Linnaeus)是蛤中上品,享有“天下第一鲜”的盛誉,也是我国滩涂养殖的主要经济贝类之一。但是文蛤一般在二龄期性腺成熟并排放精卵,这时壳长仅2~3cm,尚未达到商品规格。由于精卵的排放,肥满度急剧下降,体质变差,生长缓慢且易感染疾病,常导致大量死亡,这对文蛤的养殖生产造成严重威胁。已知三倍体具有不育、生长快、个体大、肉质好、抗逆力强和存活率高等特性,为了加快文蛤的生长并提高其生殖期间的存活率,我们于1993~1994年进行了文蛤多倍体诱导的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

文蛤亲贝采自文登市长会口养贝场,壳长3~5cm,常规促熟培育。

## 1.2 受精卵的获取

当性腺发育成熟、开始排精时,取出亲贝阴干6~8h,再用 $150 \times 10^{-6}$ 的氨海水和流水刺激,在精卵排放时分别选出雌雄亲贝,洗净放入4L玻璃缸中产卵排精,进行人工授精。产卵水温为23~25℃。

## 1.3 三倍体诱导

受精卵的处理温度分别是:热休克时为32、35、38和41℃;冷休克时为2、5和8℃。处理的起始时间为受精后10min。温度休克的持续时间为5、10、15和20min。

## 1.4 染色体制备

当各处理组和对照组受精卵发育到8~16细胞期胚胎时,取样用0.05%的秋水仙素海水处理40min,用3:1无水乙醇和冰醋酸固定。使用醋酸铁苏木精水合氯醛染色液[Wittmann, 1965]的改良法染色,以压片法制片,再按Levan等[1964]的方法进行核型分析和染色体倍性计数。

## 1.5 培养和饲育

各处理组和对照组受精卵分别培养于4L玻璃缸中,而这些培养缸全部置于400L方形玻璃钢水槽中,并保持流水、水温在23~25℃。当发育至D形幼虫时,分别移入400L圆形玻璃钢水槽中常规饲育,饵料为金藻和扁藻。到壳顶后期,幼虫出现平衡囊时,在水槽中投放粒径为150~200 $\mu\text{m}$ 、厚度为0.5cm的细砂作为附着基。

# 2 结果

## 2.1 染色体核型分析

镜检二倍体胚胎细胞中期分裂相124个,其中染色体数目为38的,有80个(表1),占总数的64.52%。由此可确定文蛤的染色体数目为 $2n=38$ 。细胞学观察未发现染色体异形的性染色体。高温和低温诱导的三倍体,染色体数为57。二倍体和三倍体胚胎细胞的中期分裂相和二倍体染色体的组型见图1和图2。根据二倍体染色体的相对长度、臂比和着丝粒指数的统计结果(表2),得出文蛤染色体的核型为: $2n=38=18m+20sm, NF=76$ 。

表1 文蛤的染色体数目

Table 1 The chromosome number of *M. meretrix*

染色体数	33	34	35	36	37	38	39	40	总数
细胞数	2	6	5	12	16	80	2	1	124
百分比	1.61	4.84	4.03	9.68	12.90	64.52	1.61	0.81	100

## 2.2 温度休克诱导三倍体

### 2.2.1 适宜温度处理起始时刻的选定

温度处理前对二倍体受精卵极体释放的观察结果表明,水温23~25℃时,一般受精后12min开始释放第一极体,因此,处理起始时刻定为受精后10min,以通过抑制第一极体的释放诱导三倍体。

表 2 文蛤染色体的核型分析

Table 2 The karyotype analyses of *M. meretrix*

染色体对	相对长度( $\bar{X} \pm S. D$ )	臂 比( $\bar{X} \pm S. D$ )	着丝粒指数( $\bar{X} \pm S. D$ )	染色体类型
1	6.24±0.12	2.25±0.11	31.17±0.92	SM
2	5.84±0.07	2.24±0.10	31.17±0.99	SM
3	5.58±0.07	2.25±0.13	31.18±1.23	SM
4	5.46±0.04	2.21±0.10	31.30±0.76	SM
5	5.22±0.06	2.25±0.10	31.07±0.94	SM
6	5.10±0.06	2.26±0.19	31.38±1.45	SM
7	4.98±0.07	2.07±0.10	32.76±1.01	SM
8	4.80±0.06	2.12±0.10	31.68±1.07	SM
9	4.59±0.08	1.90±0.06	34.57±0.62	SM
10	4.32±0.06	1.98±0.08	33.77±0.86	SM
11	6.46±0.15	1.27±0.06	44.37±1.16	M
12	5.96±0.07	1.35±0.04	42.61±0.77	M
13	5.68±0.06	1.34±0.05	42.99±0.10	M
14	5.52±0.03	1.37±0.05	42.33±0.89	M
15	5.25±0.03	1.34±0.07	43.08±1.32	M
16	5.04±0.04	1.40±0.05	41.79±0.87	M
17	4.94±0.04	1.42±0.04	41.46±0.72	M
18	4.71±0.10	1.31±0.04	43.48±0.92	M
19	4.29±0.11	1.38±0.04	42.02±0.66	M



图 1 文蛤二倍体(A)和三倍体(B)的中期分裂相

Fig. 1 The metaphase chromosomes of diploid(A) and triploid(B) in *M. meretrix*

## 2.2.2 高温诱导的适宜条件

各处理组均获得文蛤三倍体胚胎(表 3)。试验结果表明,三倍体诱导率随处理水温的升高和处理时间的延长而有上升趋势,但孵化率却相反。32℃和 35℃水温处理 20min 以及 38℃和 41℃水温的各处理组胚胎皆不能发育成正常的 D 形幼虫,全部为畸形的担轮或 D 形幼虫。从三倍体诱导率和幼虫的正常发育情况看,以 32℃处理 15min 的效果最好。

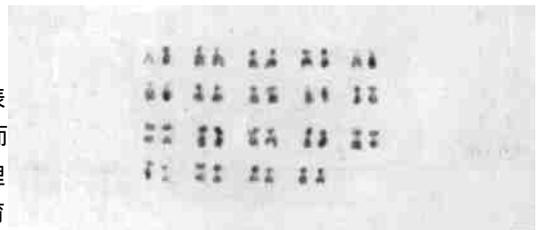


图 2 文蛤二倍体的染色体组型

Fig. 2 The karyotype of diploid in *M. meretrix*

表 3 高温诱导文蛤三倍体的试验结果

Table 3 Results of examination on triploid induction in *M. meretrix* by heat shock

组别	处理水温(°C)	持续时间(min)	受精率(%)	孵化率(%)	三倍体诱导率(%)
1	32	5	77.2	91.1	30.1
2	32	10	65.7	75.4	33.3
3	32	15	70.0	62.3	40.0
4	32	20	57.9	畸形	31.4
5	35	5	79.5	73.7	32.4
6	35	10	71.0	36.6	30.0
7	35	15	62.5	9.0	42.2
8	35	20	42.8	畸形	53.0
9	38	5	81.3	畸形	41.5
10	38	10	80.0	畸形	56.0
11	38	15	50.5	畸形	57.1
12	38	20	42.0	畸形	57.8
13	41	2	78.1	畸形	36.1
14	41	5	43.9	畸形	57.1
15	41	10	27.5	畸形	59.5
16	41	15	36.4	畸形	61.0
对照	23	-	84.6	89.2	-

### 2.2.3 低温诱导的适宜条件

各处理组也均获得文蛤的三倍体胚胎(表 4)。试验结果表明,三倍体诱导率随处理水温的降低和处理时间的延长而上升,相反,D形幼虫的孵化率则表现出下降趋势。从表 4 可以看出,用 8°C 水温处理 15min,三倍体的诱导率和幼虫的发育情况最好,其次是 8°C 处理 20min 和 5°C 处理 15min 及 20min。从整体水平看,低温处理的受精率和 D 幼孵化率均高于高温处理组,畸形胚胎和幼虫的发生率较低。

表 4 低温诱导文蛤三倍体的试验结果

Table 4 Results of examination on triploid induction in *M. meretrix* by cold shock

组别	处理水温(°C)	持续时间(min)	受精率(%)	孵化率(%)	三倍体诱导率(%)
1	8	10	79.5	55.0	23.8
2	8	15	90.6	69.6	53.1
3	8	20	79.6	38.5	52.7
4	5	10	83.1	58.7	42.6
5	5	15	73.4	47.1	50.0
6	5	20	75.0	40.0	50.9
7	2	10	84.3	53.3	39.0
8	2	15	80.0	28.8	44.2
9	2	20	86.0	30.0	55.6
对照	25	-	98.0	88.2	-

### 2.3 幼虫生长比较

生长情况如表 5 所示。7 月 30 日受精的高温处理组及其对照组和 8 月 9 日受精的低温处理组及其对照组分别于 8 月 7 日和 8 月 18 日投附着基。至 8 月 22 日,对稚贝的测量结果经方差分析,  $F < F_{0.05}$ , 得出处理组

和对照组幼虫及稚贝的生长差异不明显。

表 5 处理组和对照组幼虫的生长比较(壳长×壳高,  $\mu\text{m}$ )

Table 5 Growth of shell length and width ( $\mu\text{m}$ ) of larvae in treated and control groups

测定时间	8月4日	8月7日	8月14日	8月18日	8月22日
饲养水温( $^{\circ}\text{C}$ )	25.0	25.5	25.2	25.0	24.2
高温处理组	156.2×132.8	164.9×141.6	—	225.1×195.2	239.7×211.5
对照组	154.7×139.4	173.8×154.6	—	221.2×192.3	234.7×208.8
低温处理组			178.2×159.0	197.6×189.6	219.6×197.6
对照组			179.1×158.1	202.4×188.5	221.2×197.0

### 3 讨论

关于三倍体诱导的适宜温度, Quillet 等[1986]认为诱导紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 的三倍体, 应用热休克似乎比冷休克更有效。姜卫国等[1987]认为合浦珠母贝 (*Pinctada martensii*) 的亚致死温度是低温诱导多倍体的合适温度, 过低温度的处理不但不会增加三倍体的诱导率, 而且还会造成胚胎异常和幼虫的大量死亡。我们在文蛤卵受精后 10min, 用  $8^{\circ}\text{C}$  低温和  $32^{\circ}\text{C}$  的高温持续处理 15min, 受精率、孵化率和三倍体诱导率都获得了较好的结果。至于  $8^{\circ}\text{C}$  以上或  $32^{\circ}\text{C}$  以下是否还有更佳温度, 尚需进一步试验。过高温度 ( $35^{\circ}\text{C}$  以上) 虽能提高三倍体诱导率, 但胚胎都为畸形, 幼虫不能存活。过低温度 ( $8^{\circ}\text{C}$  以下) 处理对受精卵的影响不如过高温度强烈, 但总的趋势是一致的。因此, 我们认为文蛤的三倍体诱导, 不仅存在亚致死低温, 而且也存在亚致死高温, 用这些温度诱导三倍体, 不仅三倍体诱导率增加不明显, 更重要的是胚胎发育不正常, 畸形率很高, 绝大多数幼体死亡。

关于处理的持续时间, 试验表明持续时间越短, 受精率和孵化率越高, 但三倍体的诱导率较低。随着处理时间的延长, 虽然能提高三倍体的诱导率, 但孵化率较低, 幼虫的死亡率增高。因此, 我们认为在授精后一定时间内, 处理水温的高低和处理持续时间的长短, 这两种因素对三倍体的诱导率、受精率和孵化率都有重大影响, 并且往往存在交互作用。

本文仅报道了文蛤的核型及温度诱导文蛤三倍体, 至于三倍体文蛤的生长速度和性腺发育等有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] 王子臣等, 1990a. 皱纹盘鲍三倍体的研究. 大连水产学院学报, 5(1): 1~8.
- [2] 王子臣等, 1990b. 温度休克诱导栉孔扇贝和虾夷扇贝三倍体的初步研究. 大连水产学院学报, 5(3~4): 1~6.
- [3] 孙振兴等, 1993. 皱纹盘鲍三倍体诱导条件及其室内饲养试验. 水产学报, 17(3): 243~248.
- [4] 梁英等, 1994. 三倍体大连湾牡蛎的初步研究. 水产学报, 18(3): 237~240.
- [5] 姜卫国等, 1987. 人工诱导合浦珠母贝多倍体的发生. 热带海洋, 6(4): 37~45.
- [6] 工藤真弘等, 1994. フクトコブシム为三倍体の生残、成長および成熟. 水产増殖, 42(4): 605~613.
- [7] 古丸明等, 1989. ヒオウギガ三倍体の配偶子形成と成長. 日本水产学会志, 55(3): 447~452.
- [8] Arai, K. et al., 1986. Triploidization of the Pacific Abalone with Temperature and Pressure Treatments. *Bull. Jpn. Soc. Sic. Fish.*, 52: 417~422.
- [9] Gendreau, S. et al., 1990. Induced Triploidy and Tetraploidy in the European Flat Oyster, *Ostrea edulis* L. *Aquaculture*, 90: 229~238.
- [10] Levan, A. et al., 1964. Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. *Hereditas*, 52: 201~220.
- [11] Quillet, E. et al., 1986. Triploidy Induction by Thermal Shocks in the Japanese Oyster *Crassostrea gigas*.

Aquaculture, **57**: 271~ 279.

- [12] Stanley, J. G. *et al.*, 1981. Polyploid Induced in the America Oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*, **23**: 1~ 10.
- [13] Tabarini, C. L., 1984. Induced triploidy in the Bay Scallop, *Argopecten irradians* and Its Effect on Growth and Gametogenesis. *Aquaculture*, **42**: 151~ 160.
- [14] Wada, K. T. *et al.*, 1989. Triploid Production in the Japanese Pearl Oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Aquaculture*, **76**: 11~ 19.
- [15] Wittmann, W., 1965. Acetoirron haemaloxylir chloral Hydrate for Chromosome Staining. *Stain Tech.*, **40**: 161~ 164.
- [16] Yamamoto, S. *et al.*, 1988. Induced Triploidy in the Mussel, *Mytilus edulis*, by Temperature Shock. *Aquaculture*, **72**: 21~ 29.

## 青岛海洋大学水产学院(山大水产系、海院水产系) 50 周年纪念暨面向 21 世纪水产科学发展学术研讨会公告

1996 年 10 月 25 日是水产学院(山大水产系、海院水产系) 半百华诞, 学院特举行“面向 21 世纪水产科学发展学术研讨会”等活动。

自 1946 年创建水产学院的前身——山东大学水产系以来, 水产学院已发展到 3 个系、7 个专业、2 个研究院所、1 个海水养殖试验场、1 个国家级重点学科、2 个博士点、4 个硕士点、1 个国家教委开放实验室、1 个省重点实验室, 国家海洋药物工程技术研究中心的建设也已进入实施阶段。在校学生近 600 人, 其中硕士、博士研究生 100 余人; 教职工 128 人, 其中教授 24 人(含博士生导师 7 人)、副教授 31 人。由于学校的迅速发展, 已于 1996 年 1 月通过了国家重点发展高等教育的“211”工程预审, 并开始实施“211 工程”建设。

学院决定今年 10 月 25 日至 26 日举行热烈、隆重的庆祝活动。诚邀广大海内外校友届时返回母校参加 50 周年庆典和学术报告会, 开展各类联谊活动, 为学院的发展献计献策, 并欢迎各界人士莅临指导, 共襄盛举。

联系人: 张心义、刘淑敏, 电话: 2891209, 2864361- 2973。

青岛海洋大学水产学院院长 高清廉 谨启  
院庆 50 周年筹备委员会主任

### 《海洋渔业》杂志 1997 年征订启事

《海洋渔业》杂志是中国水产学会和中国水产科学研究院东海水产研究所主办的中级水产科技期刊。主要刊登海洋渔业管理、资源开发与利用、繁殖保护、捕捞技术、鱼虾贝藻类的增养殖、海洋环境保护、水产品加工利用、保鲜技术、渔业机械仪器等各类文章。

《海洋渔业》杂志为国内外公开发行, 刊号  $\frac{ISSN\ 1004-2490}{CN31-1341/S}$ , 1997 年仍为季刊, 16 开, 48 页, 逢季中月 25 日出版。每期订价 3.50 元, 全年 14.00 元, 由杂志编辑部自行发行。欢迎广大读者订阅。

编辑部地址: 上海市军工路 300 号; 邮政编码: 200090; 电话: 65434690×95。