

中国对虾三倍体诱导的研究*

林 峰 蔡 难 儿

(中国科学院海洋研究所)

中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 主要分布于我国北方沿海, 是我国水产养殖业的主要养殖对象, 具有极其重要的经济价值。随着养殖事业的发展和人民生活水平的提高, 提供优良的对虾品种已势在必行, 于是遗传育种的研究引起了人们极大的重视。国家把生物技术在对虾上的应用列为国家“七五”和“八五”攻关课题。

近年来海洋生物多倍体诱导引起了水产养殖界的广泛兴趣(楼允东, 1984; 吴宝玲等, 1986; 姜卫国等, 1987; 王子臣, 1990; 相建海等, 1992; Stanley, 1981; Johnstone, 1985; Downing, 1987; Gosling, 1989; Cai *et al.*, 1991), 主要原因是三倍体较二倍体的生长速度快, 长出的个体也比二倍体大, 可得到较高的经济效益; 同时, 多倍体的诱导方法对染色体调控、性别决定和人工雌核发育(蔡难儿等, 1995)等的研究都具有重要的意义。中国对虾的多倍体诱导不论从理论上还是从应用上都具有积极的意义, 是一条值得探索的改良对虾品种的良好途径。

一、材料与 方法

实验用虾部分为日照水产研究所养殖的人工越冬亲虾, 平均体长约 13 cm; 部分是从青岛近海捕获的自然亲虾, 体长在 20 cm 以上。亲虾暂养于 100 m³ 的水泥池中, 按人工育苗常规管理, 提温催产。当虾在池中自然排卵时, 以捞网将其移入盆中继续产卵, 盆中水温及以后培养的水温除特别指明外, 都控制在 18.5℃。在分组实验和正交实验中, 用洗冲器从排卵孔附近吸取刚排出的卵, 置入一结晶皿中, 以卵自排卵孔排出的时间为起点开始计时, 在一定时刻据实验设计对起始处理时刻的要求移出卵子进行处理, 每组约取卵 1000 粒, 处理后的卵均放在 10cm × 5cm 结晶皿中, 于恒温水浴内培养至孵化。大批量处理是让虾在盆中产卵, 以开始产卵为时间起点计时, 2 min 后将虾移入另一盆中, 收集其中一个盆中之卵为一组进行处理, 每次实验取出部分作为对照用, 处理后将卵移入 1 m³ 网箱中, 于 6 m³ 水体的水泥池中培养, 常规管理。实验分冷休克和细胞松弛素 B 处理两部分。

1. 冷休克部分 实验分组见表 1, 实验分三部分, 为起始处理时刻、处理温度和处理持续时间对卵子的影响: (1) 在 7 个编号的结晶皿中加入冷海水, 并调至 4℃, 分别在

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 2428 号。

收稿日期: 1994 年 10 月 20 日。

表1 冷休克分组实验设计*

影响因素 \ 组别	I							II								III						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7
起始时刻 (min)	1	5	10	15	20	25	30	7				22				7						
温度(°C)	4							0 2 4 6				0 2 4 6				4						
持续时间 (min)	30							30				30				15 30 45 60 90 120 150						

* 处理起始时刻的时间零点以卵自排卵孔排出为准,处理过程温度波动控制在 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$,处理持续时间为冷环境中的时间

虾产卵后 1 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min 和 30 min 时将卵子依次移入各结晶皿中,处理 30 min 后移去冷海水,加入常温海水于恒温水浴中培养;(2)分两组,每组用 4 个结晶皿,分别调水温至 0°C , 2°C , 4°C , 6°C ,在产卵后 7 min 和 22 min 时分别在各组的 4 个结晶皿中加入卵子,冷处理持续 30 min 后换常温海水培养;(3)在一结晶皿中预先调好 4°C 海水,在产卵后 7 min 将卵移入,分别在冷处理持续 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min 和 150 min 后从中移出部分卵子依次加入有编号的 7 个盛有常温海水的结晶皿中进行培养。每部分实验设一对照组,冷处理的温度波动范围控制在 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

正交实验设计见表 2,对影响孵化率的 3 个因素分别做水平分析,按 $L_9(3^4)$ 正交表安排实验分组,按表 3 中所列温度在 9 个编号的结晶皿中预先调好水温,同分组实验相同,分别在各自要求的起始时刻将卵移入对应的结晶皿中进行处理,一定时间后换常温海水培养,实验设一对照组。

表2 影响孵化率三因素的水平正交试验

组别 \ 因素	起始时刻 (min)	温度(°C)	持续时间 (min)
1	1	0	15
2	7	3	30
3	22	6	60

表3 按 $L_9(3^4)$ 正交表安排实验分组

组别 \ 因素	起始时刻 (min)	温度(°C)	持续时间 (min)
1	1	0	15
2	1	3	30
3	1	6	60
4	7	0	30
5	7	3	60
6	7	6	15
7	22	0	60
8	22	3	15
9	22	6	30

大批量处理选择的处理条件为: 产卵后 7 min 于 4℃ 海水中处理 30 min。产卵后 7 min 直接加冰水于盆中, 将温度调至 4℃, 处理持续 30 min 后倒入网箱中培养, 实验也设一对照组。

2. CB 处理部分 实验分组见表 4。实验分三部分: (1) 在 7 个编号的解剖杯中各加入 20 mL 浓度为 0.25 mg/L 的 CB [细胞松弛素 B, 含 0.04% DMSO (二甲基亚砜)] 溶液, 在产卵后 1 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min 和 30 min 时将卵依次移入各杯中, 持续处理 10 min 后移去上部 CB 液, 转入具有相应编号的盛有 0.04% DMSO 的结晶皿中, 洗去残余的 CB, 10 min 后换正常海水培养; (2) 分两组, 每组用 4 个杯子, 分别加入浓度为 0.1 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L 的 CB 液 20 mL。产卵后 7 min 和 22 min 各在一组的 4 个杯子中加入卵子, 处理 10 min 后转入相应编号的结晶皿中, 以 0.04% DMSO 洗 10 min, 然后换入正常海水培养; (3) 也分成 4 个杯子为一组的两组, 8 个杯中分别都加入 0.25 mg/L CB 液 20 mL, 在产卵后 7 min 和 22 min 各在一组的 4 个杯中加入卵子进行处理, 处理持续时间分别为 5 min, 10 min, 20 min 和 30 min。处理完后转入相应编号的结晶皿中, 以 0.04% DMSO 洗去残余的 CB 液, 再换入正常海水培养。每部分设两个对照组, 处理步骤与实验组相同, 对照 1 组只加 0.04% DMSO, 而不含 CB; 对照 2 组在解剖杯和结晶皿中都只加正常海水, 处理过程温度都控制在 18.5℃。

表 4 CB 处理分组实验设计*

组别 影响因素	I							II								III							
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
起始时刻 (min)	1	5	10	15	20	25	30	7				22				7				22			
浓度 (mg/L)	0.25							0.1 0.25 0.5 1.0				0.1 0.25 0.5 1.0				0.25				0.25			
持续时间 (min)	10							10				10				5 10 20 30 5 10 20 30							

* CB 浓度中含 0.04% DMSO (二甲基亚砜), 持续时间指在 CB 液中的时间

正交实验设计见表 5。对影响孵化率的 3 个因素做三水平分析, 按 $L_9(3^4)$ 正交表安排实验分组 (表 6)。在 9 个解剖杯中分别加入 CB 液, 同分组实验一样, 在各自要求的起始处理时刻将卵子移入解剖杯中开始处理, 一定时间后转入相应编号的结晶皿中, 洗去残留的 CB 液后换正常海水培养, 实验设两个对照组。

大批量处理选择的处理条件为产卵后 22 min 于 0.25 mg/LCB (含 0.04% DMSO) 溶液中处理 10 min。将一个处理组的卵收集于 200 mL 的烧杯中, 在产卵后 22 min 加入

表 5 影响孵化 3 因素的水平正交试验

组别	因素	起始时刻 (min)	CB 浓度 (mg/L)	持续时间 (min)
1		1	0.1	5
2		7	0.25	10
3		22	0.5	20

表 6 按 $L_9(3^4)$ 正交安排实验分组

组别	因素	起始时间 (min)	CB 浓度 (mg/L)	持续时间 (min)
1		1	0.1	5
2		1	0.25	10
3		1	0.5	20
4		7	0.1	10
5		7	0.25	20
6		7	0.5	5
7		22	0.1	20
8		22	0.25	5
9		22	0.5	10

CB 液,使其最终浓度达到 0.25 mg/L (含 0.04% DMSO),处理 10 min 后移去上部 CB 液,转入 1000 mL 烧杯中,以 0.04% DMSO 换洗 10 min,然后转入 1 m³ 网箱中,于 6 m³ 水体的水泥池中培养,常规管理,设一对照组。

对以上各实验组和对照组做以下检查:

(1) 早期发育情况检查 在第一次卵裂之前,用倒置显微镜对各实验组和对照组进行观察,记录皮质棒扩散、举膜和极体排放等情况,观察并记录 40 粒卵中可见 2 个极体、1 个极体和看不见极体的数目,分析极体排放情况。

(2) 早期胚胎正常率检查 在卵子发育到 4 个细胞时,用解剖镜对各实验组和对照组进行观察,记录正常分裂的卵子个数与不分裂卵及破卵个数,计算正常胚胎率,以对照组作为 1,换算成相对正常胚胎率,做出与相应因素之关系图。

(3) 孵化率检查 在卵子发育到无节幼体时期,观察并记录各实验组与对照组无节幼体个数与未孵化卵的个数,计算出孵化率,以对照组作为 1,换算出相对孵化率,做出关系曲线图。

在 CB 实验中以对照组 2 为标准,对照组 1 与对照组 2 作了比较。

(4) 染色体数目检查 选择性地对实验组和对照组进行染色体制备检查。待卵子发育到胚芽期时取正常胚胎进行处理。从各组的卵中随机取样,每组不少于 50 个胚胎,在含有 0.02% 秋水仙素的海水中处理 90 min,去离子水中低渗 2.5—3 h, Carnoy (甲醇:冰醋酸=3:1) 中固定 50—60 min,捣碎卵子使细胞游离,气干片滴片,用 2% Giemsa (溶于 pH 7.0 的磷酸缓冲液中) 溶液中染色,用去离子水冲洗掉多余染料,自然干燥、镜检。随机选择 50 个较好的分裂相在 OPTON 油镜下显微摄影、放大、计算各分裂相的染色体数目,算出多倍体率。

二、结 果

1. 对照组 在温度为 18.5℃, 卵子刚排出时多呈不规则形状,皮质棒开始向外排出,1 min 后卵子变圆形,皮质棒向外扩散,5 min 时皮质棒扩散增大,近卵一端已透明,远卵一端呈颗粒状,尚可分辨,8 min 时完全透明形成胶膜。10—11 min 排第一极体,23 min

左右开始出现受精膜,并慢慢举起;30 min 左右排第二极体,随后第二极体移向受精膜内侧;75 min 左右卵子开始变方形,随后逐渐拉长;85 min 时完全分裂成2个细胞,随后约每30 min 分裂一次。卵裂前多数卵可看见两个极体,也有少数卵只能看见一个极体或看不到极体。个别能看见第一极体在膜外分裂成两个呈8字形连在一起的极体,若温度较高,则第一极体分裂的比率增大。不受精的卵亦能正常举起卵膜和排放极体,但不正常卵裂。在虾产卵接近尾声时卵子不受精的现象明显增多。

2. 冷休克部分 (1) 不同起始处理时刻 产卵后1 min,5 min 时处理,卵子在4℃海水中可继续缓慢形成胶膜,但不出现第一极体,处理30 min 后恢复常温培养,经过一段时间后看不见排第一极体即开始举膜,膜举大后能排出一个较大的极体,然后进行卵裂。产卵后10 min 时处理,正要向外排第一极体的卵能受到抑制,处理30 min 后取出时看不见有正要向外排极体的现象,回温培养一段时间后部分卵子仍能似对照组排两个极体,部分则与产卵后5 min 时处理一样,只排一个极体。产卵后15 min 时处理,处理时间在120 min 以内,回温培养后能正常举膜和排两个极体,不起抑制作用。产卵后20—30 min 处理,处理时间在60 min 以内不起抑制作用,处理时间大于60 min 可部分抑制第二极体的排放。对早期胚胎正常率的影响见图1a。产卵后1 min 处理,破卵出现较多,其它的与对照组相差不大,对孵化率的影响见图1b。图形呈波动状,在产卵后1 min,10 min,和30 min 时较低,而中间则较高。

(2) 不同温度处理 产卵后10 min 以前处理,4℃以下处理30 min 能起到抑制

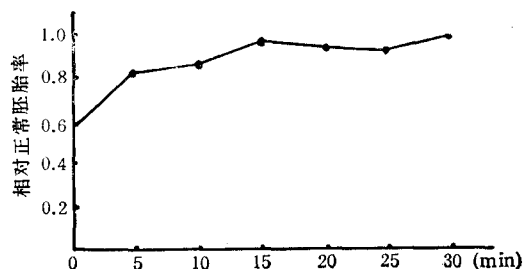


图1a 不同处理起始时刻与早期正常胚胎率关系
(处理温度4℃;持续时间30 min)(下同)

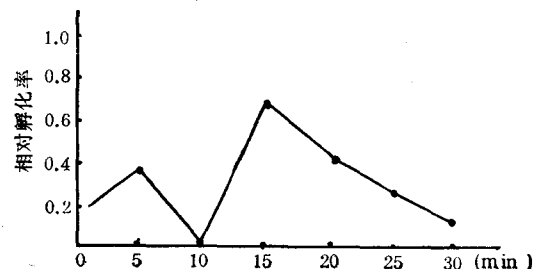


图1b 不同处理起始时刻与孵化率关系

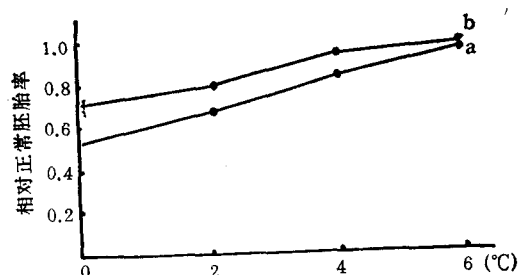


图2a 不同处理温度与早期正常胚胎率关系
起始时刻: a. 产卵后7 min; b. 产卵后22 min;
持续时间30 min (下同)

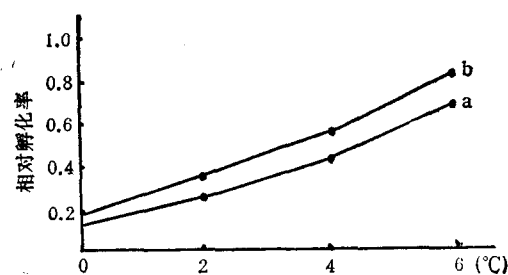


图2b 不同处理温度与孵化率关系

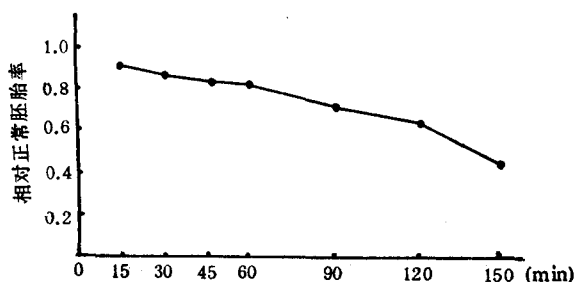


图 3a 不同持续时间与早期正常胚胎率关系

起始时刻: 产卵后 7 min; 处理温度 4℃ (下同)

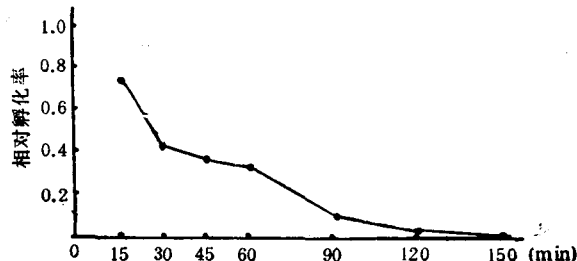


图 3b 不同持续时间与孵化率关系

作用,只排膜内一个较大极体即进行卵裂;0℃时处理能中止皮质棒的扩散;6℃时处理45 min之内则不起抑制作用,处理时间在60—120 min仍能看见部分卵排出两个极体。产卵后15 min时处理,几个温度都起不到抑制作用。产卵后20—30 min处理,0℃,2℃处理30 min能部分抑制第二极体的排放,4℃,6℃处理60 min以内不起作用,多于60 min能部分起到抑制作用。不同温度对早期正常胚胎率的影响呈正相关关系(图2a),温度越低,正常胚胎率越低,温度低容易导致卵子涨破。对孵化率影响也呈正相关关系(图2b)。

(3) 不同持续时间 在产卵后10 min以内,4℃时处理15 min以内多数不能起到抑制作用,处理30—90 min,则只排膜内一个极体即进行卵裂;处理时间在90 min以上看不见极体排放即进行卵裂。处理时间对早期胚胎正常率的影响呈负相关关系(图3a)。在60 min之内影响不明显,处理时间大于120 min时下降率较大,出现不能进行正常卵裂,细胞停留在1个细胞的阶段。孵化率也呈负相关关系(图3b)。

正交实验结果及方差分析见表7。从表中可以看出,极差的顺序为持续时间(0.38)>温度(0.33)>起始时刻(0.04),即持续时间对孵化率影响最大,温度其次,起始时刻最小。统计推断表明,持续时间和温度对孵化率影响是很显著的($P < 0.01$),而起始时刻的影响是不显著的。

大批量处理与相应分组实验相似,只排膜内一个较大的极体即进行卵裂,但早期正常胚胎率和孵化率都较分组实验低,这主要是由于降温过程中加入的冰水引起局部温度过低,及卵子与碎冰相撞使卵子破裂等原因造成的。在池中培养较在结晶皿中培养到无节幼体的孵化率为低。

3. CB 处理部分 (1) 不同起始处理时刻 在第一极体排放之前以0.25 mg/L CB液处理的卵子,皮质棒的扩散、呈透明状、并形成胶膜均不受影响,但第一极体排放却受到抑制。除去CB换入正常海水后部分卵子可排出两个极体,部分卵子只排一个极体或看不到极体排放即行卵裂,然而在各次重复实验中上述出现的现象变化较大,产卵后1 min时处理的较产卵后5 min时处理的两极体出现率高。产卵后15 min时处理不起抑制作用,换入正常海水后仍能排出两个极体;产卵后20—30 min时处理,卵在CB液中不能举膜,除去CB液后,受精膜可慢慢举起,但看不见第二极体的排放即进行了卵裂。CB处理对早期正常胚胎率的影响见图4a,产卵后1 min时处理正常率较低,破卵出现多,其

表 7 冷休克正文实验结果及方差分析

组别	因素	起始时刻 (min)	温度(°C)	持续时间 (min)	相对孵化率
1		1	0	15	0.35
2		1	3	30	0.43
3		1	6	60	0.28
4		7	0	30	0.14
5		7	3	60	0.33
6		7	6	15	0.68
7		22	0	60	0
8		22	3	15	0.72
9		22	6	30	0.46
k_1		1.06	0.49	1.75	
k_2		1.15	1.48	1.03	
k_3		1.18	1.42	0.61	
R		0.04	0.33	0.38	SZ=0.4298
S		0.0026	0.2054	0.2216	SE=0.0002
F		13.0	1027.7	1108.8	$F_{0.01}(2,2)=99.0$

k——水平和, R——极差, S——平方和, SZ——总平方和, SE——误差平方和, F——统计量(下同)

它差别不大。对孵化率的影响见图 4b, 在卵子处于敏感期处理则孵化率较低。

(2) 不同浓度 CB 处理 CB 浓度为 0.1 mg/L 时, 在第一极体排放之前处理 10 min, 除去 CB 液后仍能正常发育, 却起不到抑制极体排放的作用; 在产卵后 20—30 min 时处理, 部分看不见第二极体排放即进行了卵裂, 对卵膜和卵裂无明显的作用。CB 浓度大于 0.25 mg/L 时, 第一极体排放之前处理 10 min。能部分抑制极体排放, 看见两个极体的比数较对照组为低; 在产卵后 20—30 min 处理 10 min, 则看不见第二极体的排放即进行卵裂。CB 浓度较大时受精膜举不大, 且会出现皱折现象, 有些卵子膜内会出现数个类似第二极体的小粒, 有些卵子会突出一块胞质小泡。CB 处理强度较小时, 有时会出现第一次分裂时只核分裂而胞质不分裂的现象, 待第二次分裂时, 一下由 1 个细胞分裂成 4 个细胞, 与正常分裂无明显区别; 处理强度较大者又会变成 1 个细胞, 还可见到 1 个细胞直接分裂形成 3 个细胞或 5 个细胞的现象。CB 对早期正常胚胎率的影响见图 5a, 随

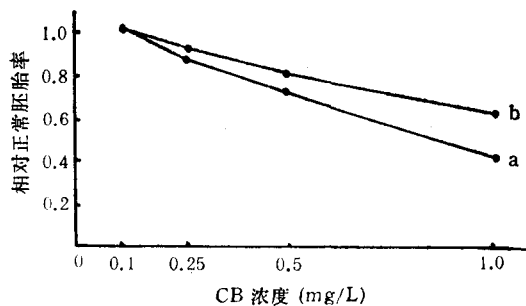


图 4a 不同处理起始时刻与早期正常胚胎率关系
CB 浓度为 0.25 mg/L; 持续时间为 10 min (下同)

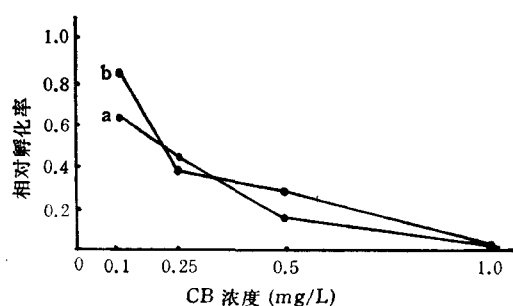


图 4b 不同处理起始时刻与孵化率关系

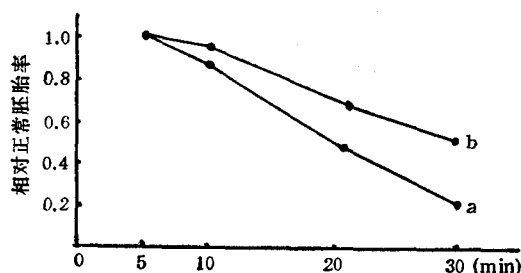


图 5a CB 浓度与早期正常胚胎率关系

起始时刻: a. 产卵后 7 min; b. 产卵后 22 min;
持续时间 10 min(下同)

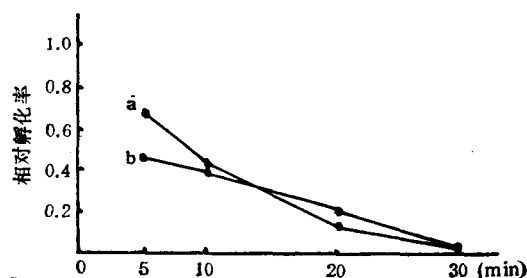


图 5b CB 浓度与孵化率关系

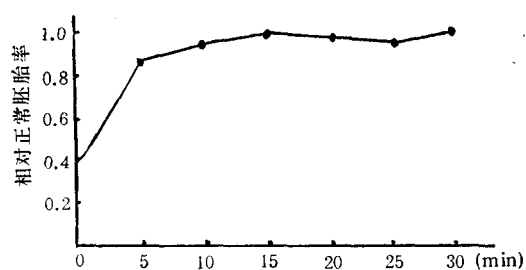


图 6a 处理持续时间与早期胚胎正常率关系

CB 浓度为 0.25 mg/L。起始时刻: a. 产卵后 7 min;
b. 产卵后 22 min(下同)

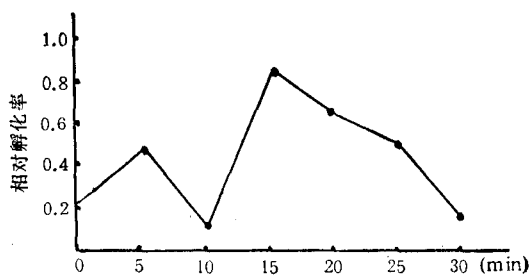


图 6b 持续时间与孵化率关系

着 CB 浓度的增大,破卵和不正常分裂的情况也会增多。对孵化率的影响见图 5b, 孵化率亦随 CB 浓度增大而降低。

(3) 不同处理持续时间 第一极体排放之前以浓度为 0.25mg/L CB 液处理 10min 以内只能部分起到抑制作用,处理时间大于 20 min, 则极体排出的现象很少,但卵子出现胞质突起、受精膜皱折及第一次卵裂时不完全分开等情况增多,在产卵后 20—30 min 时处理, 0.25 mg/L CB 液处理 5 min。不能起到抑制作用,处理持续 10 min 以上则可抑制第二极体的排放,若处理时间过长不正常的情况也会增多。对早期正常胚胎率的影响见图 6a, 对孵化率的影响见图 6b。

正交实验结果及方差分析见表 8, 从表中可以看出,三者极差的顺序为浓度 (0.41) > 持续时间 (0.21) > 起始时刻 (0.15), 即浓度对孵化率的影响最大,持续时间其次,起始时刻最小。统计推断表明,浓度的影响是很显著的 ($P < 0.01$), 持续时间是显著的, 而起始时刻是不显著的。

大批量处理与相应分组实验都能起到抑制第二极体排放的作用,但处理过程中出现卵子涨破现象较分组实验多,小心操作可减少破卵率,与冷休克一样孵化率为低。

4. 倍性检查 肢芽期染色体制备表明,中国对虾二倍体染色体 ($2n$) 数目为 88 条 (图版 I:1), 这与相建海(1988)和戴继勋等 (1989) 的结论一致,三倍体染色体 ($3n$) 数目

表 8 CB 正文实验结果及方差分析

组别	因素	起始时刻 (min)	浓度 (mg/L)	持续时间 (min)	相对孵化率
1		1	0.1	5	0.59
2		1	0.25	10	0.24
3		1	0.5	20	0
4		7	0.1	10	0.64
5		7	0.25	20	0.13
6		7	0.5	5	0.26
7		22	0.1	20	0.54
8		22	0.25	5	0.45
9		22	0.5	10	0.28
k_1		0.83	1.49	1.30	
k_2		1.03	0.82	1.16	
k_3		1.27	0.54	0.67	
R		0.15	0.41	0.21	SZ=0.3838
S		0.0324	0.2771	0.073	SE=0.0042
F		23.9	204.4	53.8	$F_{0.01}(2,2)=99.0$

为132条(图版 I:2), 五倍体染色体 ($5n$) 数目为 220 条(图版 I:3, 4)。对照组中未出现染色体数目明显增加现象, 实验组中起不到抑制极体排放作用的处理组与对照组一样, 染色体数目也不增加; 而能部分起到抑制极体排放作用的处理组则出现染色体数目成倍增加的现象; 能很好地抑制极体排放的处理组染色体数目多数都有增加, 极体抑制作用与多倍体出现呈正相关关系。高强度阻止第一次成熟分裂的实验组, 五倍体出现率较高, 个别还出现数百个染色体的现象(图版 I:5)。由于采用随机取样的方法, 以一组染色体片子上得到的三倍体个数与总数相比做为该组的三倍体率, 产卵后 7min 以 4°C 冷休克 30min 的大批量处理组三倍体出现率为 70% 左右; 产卵后 22min 以 0.25mg/L CB 液处理 10min 的大批量处理组三倍体出现率为 48% 左右。

三、分析与讨论

1. 极体排放状况是判断诱导率范围的重要条件 目前许多学者在鱼类、贝类和虾类中对雌核发育和多倍体诱导等方面作了大量的研究, 所采用的诱导手段有冷、热休克、静水压等物理处理法和细胞松弛素 B、氧化亚氮、秋水仙素、咖啡碱等化学处理法。这些方法的作用就是抑制极体的排放, 使卵核染色体加倍, 然后与精核结合导致多倍体的形成, 或者抑制卵裂形成四倍体。因此, 从极体的排放情况即可大体上判断多倍体诱导率的一定范围。当然, 有时少数卵子的极体不易看清, 但从统计概率分析, 一定范围的诱导率还是可以判断出来的, 况且, 同一条件下不同批次的诱导率也不尽相同。至于染色体的倍性, 是整倍性还是非整倍性, 还有待染色体制片或去氧核糖核酸 (DNA) 含量测定作出判断。

2. 抑制极体排放可能出现几种类型的多倍体 动物卵母细胞发育到成熟需要经过二次成熟分裂,第一次成熟分裂前期,染色体和 DNA 都已经复制了,每条染色体是由两条姐妹染色单体组成;二次成熟分裂间期,染色体和 DNA 不再进行复制。第一次成熟分裂后,染色体数目减半,但每条染色体是由两条染色单体构成;第二次成熟分裂将染色单体分离,形成单倍体。

中国对虾的卵母细胞刚产出卵子的雌核处于间期,不久才进入第一次成熟分裂中期,即二次成熟分裂是卵子产于水中之后进行的。依据上述这一现象,抑制对虾卵子极体排放,可能出现如下几种类型的多倍体:

(1) 抑制第一极体 a. 阻止胞质分裂,又抑制细胞核分裂,二倍体的卵核与单倍体的精核结合形成了三倍体; b. 阻止第一次成熟分裂,第二次成熟分裂仍在进行,膜内出现一个比正常卵细胞进行第二次成熟分裂排出的要大得多的极体,此为 $2n$ 的极体,其卵内为 $2n$ 的雌核与精核结合形成了 $3n$; c. 如果在第一次成熟分裂前期受抑制,染色体已复制并联合,每条染色体是由两条染色单体组成,所以与精核结合成为五倍体; d. 阻止胞质分裂,卵核的二次成熟分裂仍在进行,卵内形成四套染色体,与雄核结合成为五倍体。

(2) 抑制第二次成熟分裂 阻止胞质分裂,染色体数目虽然已减半,但每条染色体是由两条染色单体构成的,实质上是 $2n$,与精核 ($1n$) 结合成为 $3n$,抑制第二次成熟分裂不可能形成 $5n$ 的个体。

3. 抑制极体和卵孵化的适宜条件、作用以及形成多倍体的机理 我们的试验是以低温和 CB 处理为条件的,冷休克法是在 18.5°C 水温中,产卵后 7 min 时用 4°C 处理 30min 为佳;CB 处理是产卵后 22min 以 0.25mg/LCB 液(含 0.04% DMSO)处理 10min 为佳。其作用机理是温度休克对微丝和微管可能起作用,它既阻止胞质分裂,又能抑制染色体运动,同时对细胞内代谢活动产生影响,使卵子发育缓慢,但这种作用只有在卵子发育过程中某一敏感时期才起作用。如抑制第二次成熟分裂时,产卵后 15min 处理都不能起到抑制作用,只有产出 20min 之后才能起作用。CB 的作用机理是抑制或破坏微丝的活动和形成,从而使纺锤体不能形成,细胞分裂自然也就无法进行。在这种适量的 CB 作用下,一旦失去抑制状态,细胞分裂就可以仍然继续进行。同样,卵子对 CB 也有一个敏感期,如产卵后 15min 时用一定浓度 CB 处理是不起作用的,而需待到 20min 之后,才能起到有效的作用。

参 考 文 献

- 王子臣,1990,皱纹盘鲍三倍体的研究,大连水产学院学报,5(1): 1—8。
 吴宝玲、蔡难儿,1986,生物工程与海洋生物遗传育种研究,生物学杂志,12: 14—19。
 相建海,1988,中国对虾染色体的研究,海洋与湖沼,19(3): 205—209。
 相建海等,1992,中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 四倍体诱导研究,海洋科学,4:55—61
 姜卫国等,1987,人工诱导合浦珠母贝多倍体发生,热带海洋,6(4): 37—44。
 楼允东,1984,中国鱼类遗传育种研究的进展,水产学报,13(1): 93—100。
 戴继勋等,1989,中国对虾的核型研究,青岛海洋大学学报,19(4): 97—104。
 蔡难儿等,1995,中国对虾人工诱导雌核发育的研究,海洋科学,3: 35—41。
 Cai, N. E. and F. Lin, 1991, Artificial induction of gynogenesis in *Chinensis* shrimp, *penaeus orien-*

- talis. Presented at the 4th Intern. Symposium on Genetics in Aquaculture, Elsevier science publishers B. V., 314.
- Downing, S. L. and S. K. Allen, 1987, Induced triploidy in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Optimal treatments with Cytochalasin B depend on temperature, *Aquaculture*, **61**:1—15.
- Gosling, E. M. and A. Nolan, 1989, Triploidy induction by thermal shock in the Manila clam, *Tapea Semidecussatus*, *Aquaculture*, **78**:223—228.
- Johnstone, R., 1985, Induction of triploidy Atlantic salmon by heat shock, *Aquaculture*, **49**:133—139.
- Refstie, T., V. Cassvik, and T. Gjedrem, 1977, Induction of polyploidy in salmonids by cytochalasin B, *Aquaculture*, **10**:65—74.
- Stanley, J. G., S. K. Allen, and H. Hidu, 1981, Polyploidy induced in the American Oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B, *Aquaculture*, **23**:1—10.
- Xiang, J. H., R. Y. Liu, and H. L. Zhou, 1991, Studies on chromosome in marine shrimps with special reference to the different techniques. Presented at the 4th Intern. Symposium on Genetics in Aquaculture, Elsevier Science publishers B. V., 321.

TRIPLOIDY INDUCTION IN *PENAEUS CHINENSIS**

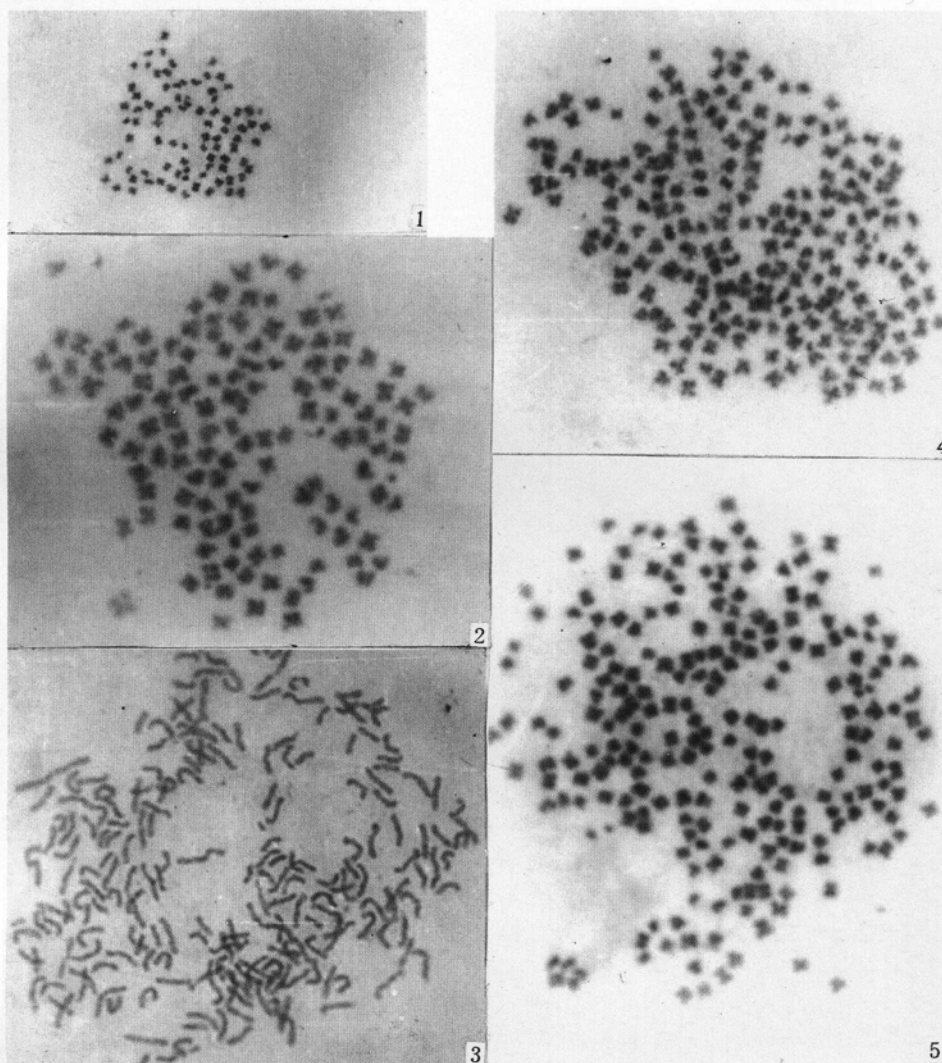
Lin Feng and Cai Naner

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences)

ABSTRACT

This paper reports results from cold shock and Cytochalasin B treatment experiments designed to induce triploidy in Chinese shrimp, *P. orientalis*, One of the most important commercial species in China. Three major factors influencing the rate of triploids and hatching were analysed respectively to seek for the most suitable treatment conditions. Ploidy was assessed by counting the number of polar bodies associated with early embryos and the number of chromosome in appendage-budding stage. Best results were achieved with cold shock (at 4°C for 30min administered 7 min after spawning) or with cytochalasin B at 0.25mg/L (administered 22 to 32 min after spawning). The triploidy percentages were 70% by cold shock and 48% by cytochalasin B treatment. Orthogonal analysis indicated that hatching rates were affected significantly by duration and temperature (for treatment by cold shock) and by dosage and duration (for treatment with cytochalasin B).

* Contribution No. 2428 from the Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences.



1. 二倍体中国对虾染色体图 $2n=88$; 2. 三倍体中国对虾染色体图 $3n=132$; 3. 4. 五倍体染色体图;
5. 数百条染色体图