

蟹类多倍体诱导的研究进展

Progresses of polyploidy induction in crab

张成松^{1,2}, 李富花^{1,2}, 相建海^{1,2}

(1. 中国科学院 海洋研究所(南通), 江苏 南通 226004; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

中图分类号: Q968.25 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)07-0110-04

doi: 10.11759/hyxx20131106001

蟹类是水产养殖的重要种类之一, 在中国水产养殖业中占有举足轻重的地位。据统计, 2011 年中国淡水养殖及海水养殖蟹的养殖总产量已达到 88.1 万 t^[1], 蟹类养殖业在提高劳动就业, 增加农民经济收入等方面发挥了重要作用。作为种质改良的重要途径之一, 多倍体诱导已在多种鱼、贝类中成功开展, 某些种类已经达到商业化生产规模, 例如, 美国的太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)、日本的牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、中国的鲫(*Carassius auratus*)、鲤(*Cyprinus carpio*) 鱼等。实践证明, 三倍体水产动物具有生长迅速、肉质改善及生物基因污染风险降低等优势^[2-3], 另一个普遍特征是性腺发育受阻。近年来, 养殖蟹类特别是淡水养殖中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 个体小型化、性早熟等现象比较突出, 三倍体性腺的不育性有望解决其性早熟问题, 从而培育大规格的河蟹, 提高养殖产量和经济效益^[4]。但同时, 三倍体的性腺不育也会带来某些不便, 例如三倍体无法繁殖产生后代, 每年都需要专门人员进行诱导处理, 限制了三倍体蟹类苗种的生产规模并增大了劳动成本, 而四倍体可留作原种, 既避免了经常育种增加的生产成本, 又是获得 100%三倍体的有效途径^[5]。因此开展蟹类的多倍体诱导研究十分必要并具有重要的研究和生产意义。

自 Lu 等^[6]1993 年首次报道利用热休克方法成功诱导日本绒螯蟹(*E. japonicus*) 三倍体的研究方法以来, 至今已过去 20 年了, 尽管其后也陆续有关于蟹类多倍体诱导方法的报道^[5, 7-9], 但到目前为止, 成熟的、大批量诱导蟹类多倍体的工艺方法并不成熟, 其距离商业化生产更是有很长的路要走。分析其中原因, 蟹类特殊的繁殖生物学特点, 例如抱卵、产卵时间长、受精卵发育同步率低等限制了其发展, 因此

蟹类多倍体研究进展相对缓慢, 目前还存在着一些亟待解决的问题。柏爱旭等^[10]对中华绒螯蟹多倍体诱导的研究进展进行了综述, 作者对蟹类多倍体诱导的研究进展、存在问题及研究重点进行了综述和探讨, 以期为中国蟹类养殖业的种质改良提供参考和基础资料。

1 研究进展

1.1 受精卵的适时获得技术

适时获得大批量同步发育的受精卵是水产动物多倍体育种的关键环节之一, 但是蟹类特殊的繁殖生物学特点给其染色体组操作造成了巨大的障碍。早期的研究采取解剖性腺获得精子和卵子, 而后通过人工授精获得受精卵的方法^[6-8], 这种方法可以准确把握受精时间, 但是由于离体孵化技术的不成熟, 受精卵不能正常孵化获得幼体。为了获得能够正常发育的受精卵并培育出幼体, 崔朝霞等^[5, 9]采取自然交配自然产卵的方法获得了中华绒螯蟹受精卵, 并成功培育出了多倍体苗种, 但是这种方法需要每隔 1~2 h 检查一次亲蟹以确定产卵与否, 这种频繁的产卵检查一方面不便于操作, 另一方面也不可避免地导致亲蟹产卵过程被打断从而出现“流产”现象, 抱卵量通常较低。张成松等^[11]针对这种受精卵流失率高, 抱卵量偏小现象自制了一套产卵监控设施, 较好地解决了这个问题。简单说就是: (1)使亲蟹单只隔

收稿日期: 2013-11-06; 修回日期: 2014-01-03

基金项目: 江苏省产学研联合创新资金项目(BY2011190); 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201103034)

作者简介: 张成松(1977-), 男, 山东临沂人, 副研究员, 博士, 主要从事甲壳动物遗传育种研究, 电话: 0532-82898569, E-mail: chs-zhang@163.com; 相建海, 通信作者, 电话: 0532-82898568, E-mail: jhxiang@qdio.ac.cn

离,以避免产卵过程中亲蟹间的相互干扰;(2)通过视频监控设备跟踪观察亲蟹的行为状态,在准确判断产卵时间的同时尽量减少人为干扰;(3)在交配、产卵池底部铺沙,避免硬质底面导致的受精卵流失。该设施可以较好地解决中华绒螯蟹多倍生产中存在的亲蟹抱卵量低及准确产卵时间难以确定等难题,为规模化生产多倍体苗种提供了可行性方案;另外,该设施简便实用且成本低廉,便于推广,并大大降低了劳动强度。

1.2 蟹类多倍体诱导方法

1.2.1 物理方法

物理方法如温度休克(冷休克和热休克)和静水压是水产动物多倍体诱导最常用的方法,同时该方法还具有高效、无环境污染等优势。例如,在中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的多倍体诱导中,采用热休克方法的多倍体最高诱导率可以达到100%^[12];在鱼类的多倍体育种中,静水压法是最常用的多倍体诱导手段^[13-15]。另外,外加电场刺激和低渗透压方法,在贝类也可以获得一定比例的三倍体胚胎或幼体^[16-17]。

Lu等^[6]利用热休克方法抑制日本绒螯蟹第一极体(Pb₁)释放,成功获得了三倍体胚胎。陈立侨等^[8]利用热休克抑制Pb₁和第一次有丝分裂的方法获得了一定比例的中华绒螯蟹三倍体胚胎(50%)和四倍体溞状幼体。需要注意的是,上述两篇文献中的受精卵均来源于性腺解剖后的人工授精,受精卵为脱离亲蟹的离体卵,在离体孵化技术并不成熟的条件下,这种处理方法并不具有生产推广价值。

1.2.2 化学方法

化学方法是通过化学试剂抑制极体释放或第一次细胞分裂产生三倍体或四倍体的方法。常用的多倍体诱导剂主要有细胞松弛素B(CB)、6-二甲氨基嘌呤(6-DMAP)、咖啡因、秋水仙素等。目前,细胞松弛素B因价格高且对人体及生物具有较大的生物毒性,目前应用已不多。崔朝霞等^[9]报道了利用细胞松弛素B(CB)、6-二甲氨基嘌呤(6-DMAP)和氯化钾(KCl)诱导中华绒螯蟹三倍体和四倍体的方法,分别利用上述诱导剂处理抱卵蟹,在囊胚期检测的最高三倍体率分别为49.1%,51.7%和77.5%,四倍体最高诱导率依次是50.3%,54.9%和79.8%。并且使用KCl对抱卵蟹诱导处理获得的溞状幼体最高三倍体诱导率为85.3%,最高四倍体诱导率为27.3%。该研究克

服了以往三倍体诱导中离体培养困难,首次获得了中华绒螯蟹三倍体溞状幼体,并极大提高了溞状幼体阶段四倍体诱导率。张成松等^[4]对利用KCl诱导中华绒螯蟹三倍体的关键参数进行了优化,优化的结果为:15℃下,将产卵后1.5~2h孵化膜形成并举起作为中华绒螯蟹三倍体诱导起始点的形态学标记,以6g/L的KCl溶液处理4h,获得了最高为100%的离体卵三倍体诱导率。另外,作者还对三疣梭子蟹的三倍体诱导进行了尝试,利用6-DMAP和KCl处理获得的最高诱导率分别为53.43%和59.49%。

1.3 染色体倍性检测技术

染色体倍性检测是多倍体诱导中的必要步骤。Lu^[6]和陈立侨等^[7,8]在蟹类多倍体诱导研究中采用了传统的染色体计数方法来确认诱导效果,此种方法可以确定实验样品的染色体倍性,但其耗时较长,而且不能保证每次制片都能获得清晰的中期分裂相,而且染色体计数法需要杀死实验样品,无法适用活体检测的要求^[18]。随着流式细胞仪技术的发展及推广应用,该方法可以较好地解决上述问题,目前在多倍体检测应用中应用广泛。国内,周岭华等^[19]首先在对虾染色体倍性操作中发展了流式细胞仪检测技术,并配套发展了相应的细胞分散液和细胞染色液^[12],崔朝霞等^[5,9,20]也在中华绒螯蟹多倍体检测中应用流式细胞仪进行了检测。流式细胞仪检测技术极大地促进了虾蟹类甲壳动物染色体组操作技术的发展。

1.4 蟹类三倍体生物学研究

蟹类多倍体研究进展缓慢,关于三倍体蟹类生产性状的研究较少。在国内,批量生产三倍体蟹苗并对其生长情况的研究仅见一篇文献,而在国外则未见报道。崔朝霞等^[20]将培育的80000尾大眼幼体三倍体群体检测倍性后放养到1亩池塘,同等条件下设二倍体对照组,进行常规养殖。与二倍体群体相比,放养后68~106d,三倍体群体在壳长、壳宽、体质量上都表现出明显的生长优势($P<0.01$),并且其营养组成与二倍体蟹存在差异。三倍体幼蟹蟹体氨基酸总量高于正常二倍体幼蟹,必需氨基酸中苏氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、精氨酸、异亮氨酸、组氨酸和赖氨酸的含量高于二倍体,而蛋氨酸的含量则低于二倍体幼蟹。蟹体中不饱和脂肪酸所占比例三倍体幼蟹低于正常二倍体,EPA、DHA及多不饱和脂肪酸所占的比例也低于二倍体。因此,开展蟹类多倍体培育技术研究是十分必要和亟需的任务。

2 蟹类多倍体存在的问题及研究重点

蟹类特殊的繁殖生物学特性是导致其多倍体研究进展缓慢的主要原因。尽管对于蟹类特别是中华绒螯蟹多倍体的研究已经持续了多年,并且已对 KCl 诱导条件进行了优化,但是其实验可重复性较差。总结目前存在的问题主要有以下几点。

2.1 大批量同步发育受精卵的获得相对困难

在鱼类和贝类的苗种繁育种,通过人工催产和人工授精的方法获得大批量同步发育的受精卵相对容易,而在甲壳动物蟹类中则困难得多。首先,蟹类通常在交配后数小时至数天内产卵(例如中华绒螯蟹),更有甚者如三疣梭子蟹是在秋季交配第二年春节产卵,准确的产卵时间很难把握;其次,蟹类具有抱卵的特性,受精卵需要粘附在腹部刚毛上完成胚胎发育并孵化,在离体孵化技术尚未成熟的情况下,通过解剖获得成熟精卵并实施人工授精的方法只适用于实验室内的早期胚胎研究,而无法应用于生产,同时抱卵的繁殖特性导致了受精时间无法准确判断;最后,蟹类的人工催产技术尚未成熟,在目前的技术条件下只能采取单只跟踪单只诱导的方法,极大地增加了劳动量及劳动成本。因此,进行蟹类的人工催产,例如 5-羟色胺等针对无脊椎动物的催产剂应用研究或同步化产卵技术研究是十分必要的。

2.2 受精卵流失率高,抱卵量偏小

在河蟹苗种生产过程中,亲蟹的交配多是在土池中完成的,雌蟹可以找到合适的遮蔽物或洞穴在其中不受干扰地完成产卵过程,而多倍体的诱导因需要准确掌握产卵时间,亲蟹的交配和产卵是在小的水泥池或水槽中完成的。为便于掌握产卵时间,池底会水槽中不设遮蔽物也无洞穴,并且每隔 1~2 h 要检查一次产卵情况,因此雌蟹的产卵过程往往会因为其他蟹或人为的干扰而中断,并且观察也发现在硬质底面产卵的受精卵流失率高,甚至会达到自然抱卵量的 80% 以上。因此解决雌蟹抱卵量少的问题也是摆在面前的难点之一。

2.3 药物的诱导有效浓度与亲蟹可耐受性的矛盾

KCl 在蟹类多倍体诱导中的有效性和高效性已被证实^[4-5, 9],但在实验过程中作者发现亲蟹对 KCl 的耐受性与在咸淡水(盐度 18~20)的驯化时间呈正相关关系,KCl 诱导的最低有效浓度与亲蟹最高耐受浓

度重合(0.6%),而且随驯化时间延长而提高,这就直接导致部分亲蟹在诱导处理过程中四肢僵硬甚至死亡,处理后的亲蟹养殖死亡率也偏高,且可以操作的时间窗口(海水驯化后第 4~6 天)也较短。另外,在三疣梭子蟹三倍体的处理过程中还发现 KCl 最低有效浓度高于亲蟹最高耐受浓度的问题,直接浸泡处理后亲蟹的死亡率为 100%。为此,作者进行了新的尝试,以期能找到新的可代替的诱导剂,目前已经初步筛选了一种绿色环保的新型诱导剂,正在优化相关实验参数。

2.4 活体整蟹处理诱导率低于离体卵的诱导率的问题

张成松等^[4]利用优化的实验条件(处理起始时刻:受精膜形成并举起;KCl 浓度:0.6%处理持续时间:4 h)处理的抱卵蟹整蟹其平均三倍体率(32.78%)明显低于优化阶段剪取卵块诱导获得三倍体率(100%)。分析其中的原因可能有 3 点:(1)河蟹的产卵过程相对较长且发育不同步,观察时所剪取的卵块发育阶段不能代表大部分受精卵的发育进程,导致整蟹处理的时机或过早或过晚,而在优化实验阶段,所取的受精卵数量很少,基本处于同一发育时期,所以导致两者之间差异显著;(2)受精卵本身的质量问题,由于受精质量差或卵质本身较差,导致无法获得正常发育的三倍体胚胎,所以在检测时无法确认倍性;(3)中华绒螯蟹的抱卵特性可能限制了 KCl 的渗透作用,导致 KCl 发挥作用的时间延迟,即相当于处理时间拖后而错过了最佳处理时机,而在实验优化阶段所用的受精卵为剪取所得的少数卵,不存在 KCl 渗透受限的问题;这些原因或单独或综合作用限制了整蟹处理中三倍体率的提高。在实际生产中,前两个方面的原因无法改善太多,但对于抱卵特性导致的药物渗透性差的问题却是可以改进的。例如,采用模拟自然状态下亲蟹摆动腹甲为胚胎保持供氧的方式增加药物与受精卵接触面积和药物渗透性,以晾衣夹(竹夹子)撑开抱卵蟹腹甲以增大受精卵与药物接触面,并每隔 10~20 min 用手撑开亲蟹腹甲在诱导液中轻轻摆动以利于诱导药物的渗透。实验结果表明,这种增加药物渗透的方法可以大大提高处理蟹的整体诱导率。

2.5 KCl 诱导蟹类多倍体的工作机理尚未阐明

利用免疫荧光组织化学方法研究细胞骨架结构在多倍体诱导处理前后的变化可以阐明其工作

机理^[21-23]。作者也曾利用类似的技术手段进行了研究以期阐明利用 KCl 诱导中华绒螯蟹多倍体的工作机理,但由于其受精卵卵径大、卵黄颗粒多,再加上外被坚韧的卵膜阻止了免疫抗体进入卵内与细胞骨架的结合,故在这方面的研究进展缓慢。KCl 诱导多倍体工作机理的阐明或许可以加快蟹类多倍体育种的进程。

参考文献:

- [1] 农业部渔业局. 2012 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012: 24-27.
- [2] Benfey T J. The physiology and behavior of triploid fishes[J]. Reviews in Fisheries Science, 1999, 7: 39-67.
- [3] Guo X. Superior growth as a general feature of triploid shellfish: evidence and possible causes[J]. Journal of Shellfish Research, 1999, 18: 266-267.
- [4] 张成松, 李富花, 于奎杰, 等. 氯化钾诱导中华绒螯蟹三倍体参数的优化[J]. 海洋科学, 2009, 33(12): 106-113.
- [5] 崔朝霞, 相建海, 周岭华. 中华绒螯蟹四倍体诱导研究[J]. 高技术通讯, 2002, 12: 97-102.
- [6] Lu R, Zhang J, Liu X, et al. An experiment on induction of triploidy in *Eriocheir japonicus heouensis* Dai by heat treatment[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 1993, 11: 21-24.
- [7] 陈立侨, 赵云龙, 王玉凤, 等. 中华绒螯蟹多倍体的诱导研究 I. 细胞松弛素 B 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.
- [8] 陈立侨, 赵云龙, 周忠良. 中华绒螯蟹多倍体的诱导研究: 热休克诱导中华绒螯蟹三倍体胚胎和四倍体溞状幼体[J]. 动物学报, 1997, 43(4): 390-398.
- [9] 崔朝霞, 相建海, 周岭华, 等. 中华绒螯蟹多倍体诱导技术改进[J]. 海洋学报, 2005, 27(1): 149-153.
- [10] 柏爱旭, 周鑫. 中华绒螯蟹多倍体诱导的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(11): 248-251.
- [11] 张成松, 相建海, 李富花, 等. 一种稳定提高中华绒螯蟹多倍体诱导效率的便利设施: 中国, ZL 2013 2 0014475.5[P]. 2013-7-31.
- [12] Li F H, Xiang J H, Zhou L H, et al. Optimization of triploid induction by heat shock in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Aquaculture, 2003, 219: 221-231.
- [13] 桂建芳, 梁绍昌. 鱼类染色体组操作的研究 I: 静水压休克诱导三倍体水晶彩鲫[J]. 水生生物学报, 1990, 14(4): 336-343.
- [14] 尤锋. 海产鱼类多倍体育种的研究[J]. 海洋科学, 1997, 21(1): 33-37.
- [15] 林琪, 吴建绍, 曾志南. 静水压休克诱导大黄鱼三倍体[J]. 海洋科学, 2001, 25(9): 6-9.
- [16] Cadoret J P. Electric field-induced polyploidy in mollusc embryos [J]. Aquaculture, 1992, 106(2): 127-139.
- [17] 王昭萍, 赵婷, 于瑞海, 等. 一种新方法—低渗透诱导虾夷扇贝三倍体的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(2): 193-196.
- [18] 李富花, 相建海, 周岭华. 对虾三倍体育种研究的最新进展[C]//高振会, 等. 甲壳动物学论文集(第五辑). 北京: 海洋出版社, 2009: 68-74.
- [19] 周岭华, 邓田, 张晓军, 等. 利用流式细胞计进行虾类倍性检测的研究[J]. 海洋科学, 1999, 23(2): 42-45.
- [20] 崔朝霞, 相建海, 周岭华, 等. 中华绒螯蟹三倍体群体早期生长及营养的研究[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(1): 19-26.
- [21] Dufresne L, Néant I, ST-Pierre J, et al. Effects of 6-dimethylaminopurine on microtubules and putative intermediate filaments in sea urchin embryo[J]. Journal of Cell Science, 1991, 99, 721-730.
- [22] Morelli M. Effects of heat-shock on cell division and microtubule organization in zygotes of the shrimp *Pen. aeus indicus* (Crustacea, Decapoda) observed with confocal microscopy[J]. Aquaculture, 2003, 216: 39-53.
- [23] Zhu X P, You F, Zhang P J. Effects of hydrostatic pressure on microtubule organization and cell cycle in gynogenetically activated eggs of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Theriogenology, 2007, 68(6): 673-681.

(本文编辑: 谭雪静)