

文章编号:1000-0615(2003)06-0528-05

6-DMAP 诱导扇贝异源三倍体的细胞学观察

杜方勇^{1,2}, 杨爱国¹, 刘志鸿¹, 周丽青^{1,2}, 王清印¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:分别在受精后 15 和 30min, 用 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-二甲氨基嘌呤(6-DMAP)处理栉孔扇贝(♀) × 虾夷扇贝(♂)受精卵诱导异源三倍体, 持续处理 5~25min。采用二氨基苯基吲哚(DAPI)染色和荧光显微镜观察对处理前后受精卵的染色体行为变化进行了研究, 空气干燥法制备染色体检测胚胎倍性。结果表明, 无论抑制第一极体或是第二极体释放均能获得正常发育的异源三倍体胚胎; 抑制第一极体释放, 产生异源三倍体、非整倍体, 延长处理时间能获得五倍体; 抑制第二极体释放, 产生异源三倍体; 6-DMAP 使染色体运动终止, 处理前后, 核相无变化, 随着处理时间的延长, 核相泡状化增强。

关键词: 扇贝; 6-二甲氨基嘌呤; 异源三倍体; 细胞学观察

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

Cytological description on allotriploid induction in scallop hybrid by application of 6-DMAP

DU Fang-yong^{1,2}, YANG Ai-guo¹, LIU Zhi-hong¹, ZHOU Li-qing^{1,2}, WANG Qing-yin¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Allotriploid induction, which combines crossing breeding and polyploid breeding techniques together and may have their both advantages in theory, is hopeful to provide a new way for genetic improvement of cultured scallop. Preliminary attempt to induce allotriploid of *Chlamys farreri* and *Patinopecten yessoensis* by application of 6-DMAP was reported in this paper. The fertilized eggs crossing between scallop *Chlamys farreri* (♀) and *Patinopecten yessoensis* (♂) were treated with $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-DMAP at 15 and 30 min after fertilization respectively for 5-25min duration. Using DAPI stain and fluorescence microscope observation, the differences of chromosome behavior of the fertilized eggs before, during and after treatments were analyzed. Chromosomes of embryos were prepared by air-drying method to examine the ploidy. The results showed that either inhibiting extrusion of the first polar body or the second polar body could induce normal allotriploidy embryos. Inhibiting extrusion of the first polar body could induce allotriploid and aneuploid; prolonging the treatment to 25min,

收稿日期: 2002-10-29

资助项目: 国家重大基础研究规划(973)课题(G1999012004)、国家海洋“863”项目(2001AA620106)

作者简介: 杜方勇(1977-), 男, 上海水产大学 2000 级硕士研究生, 主要从事遗传育种研究

通讯作者: 王清印(1952-), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事海洋生物技术和遗传育种研究。Tel: 0532-5822959, E-mail: qywang@

public.qd.sd.cn

pentaploid were observed. Inhibiting extrusion of the second polar may induce allotriploid; the experiments proved that 6-DMAP could terminate the movement of chromosomes. There were no remarkable differences in nuclear phase before, during and after treatments; the bulliform structure was strengthened with the prolongation of treatment.

Key words: scallop; 6-DMAP; allotriploid; cytological description

多倍体育种是近年来贝类遗传育种研究的热点之一,尤其是三倍体诱导,在多种贝类取得了卓有成效的进展。已有结果显示,贝类三倍体在养殖成活率、生长速度和出肉率等方面明显优于二倍体^[1-3]。杂交育种是传统的品种改良手段,能培育出具有双亲优良性状的杂交后代,在多种贝类的品种改良中发挥了重要作用^[4-5]。异源三倍体诱导,结合了杂交和多倍体育种两种方法,理论上应具有双重优势,即杂交优势和多倍体优势,因此有着良好的应用前景。异源多倍体研究在鱼类已有成功的先例^[6],但在贝类中还未见报道。栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)和虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)是我国北方重要的海水养殖贝类,两者生物学性状差异明显,有互补性,具有诱导异源多倍体的可行性。诱导和培育异源三倍体有可能为克服扇贝养殖过程中出现的高死亡率、品质下降等问题提供新的解决途径。本文拟通过观察异源扇贝受精卵极体被抑制后的染色体行为变化,探索异源三倍体形成的机理和规律,为扇贝异源多倍体诱导研究提供细胞学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

栉孔扇贝和虾夷扇贝均取自山东长岛海区,栉孔扇贝壳高 7~8cm,虾夷扇贝壳高 10~12cm。6-二甲基氨基嘌呤(6-dimethylaminopurine,简称 6-DMAP)和二氨基苯基吲哚(4,6-diamidine-2-phenylindole,简称 DAPI)为 Sigma 公司产品。

1.2 方法

诱导试验于 2002 年 5 月在中国水产科学院长岛增殖站进行。分别选取性腺充分发育成熟的栉孔扇贝雌贝和虾夷扇贝雄贝。栉孔扇贝于 16℃ 水温暂养,升温法促其产卵;虾夷扇贝 8℃ 以下水温暂养,阴干法刺激排精。精卵以适当比例混合受精。分别在受精后 15 和 30min,用 60mg·L⁻¹的 6-DMAP 处理 5~25min,处理结束后移入 1 000mL 烧杯中,17℃ 下培养。处理期间每隔 5min 取样,用 60% 甲醇固定,样品换固定液一次,DAPI 染色,荧光显微镜在紫外光(365nm)下观察照相。取担轮幼虫滴片法制备染色体。

2 结果

2.1 抑制第一极体排放时的染色体行为

栉孔扇贝成熟卵的染色体核相停留在第一次成熟分裂的中期(图版 I-1),虾夷扇贝精子入卵后完成第一、第二次成熟分裂,排出第一、第二极体(图版 I-2,3)。在水温 17℃ 条件下,受精后 15min 可观察到个别受精卵的同源染色体已经分离,移动到动物极的边缘,即将形成第一极体。因此,将抑制第一极体的起始处理时间定为受精后 15min,持续处理 5min、15min 和 25min。解除处理后,染色体分离形式随着持续处理时间的不同有很大的变化。持续处理 5min,大部分受精卵可排出第一、第二极体;处理 15min,多数受精卵不排出第一极体;处理 25min,多数受精卵未见排出第一、第二极体。胚胎期间染色体制片观察显示:持续处理 5min,染色体多为 38 条,是二倍体(图版 II-1);处理 15min 的染色体数主要是 57 条,并有较大的变化,是三倍体和非整倍体(图版 II-2,3);处理 25min,观察到染色体 95 条,产生了

五倍体(图版 II - 4)。上述结果表明,持续处理 5min, 6 - DMAP 对染色体分离影响较小;持续处理 15min, 抑制了第一极体释放产生三倍体的同时, 也出现了部分非整倍体;持续处理 25min, 处理结果是第一、第二极体均被抑制, 此时, 对照组部分受精卵排出第二极体。

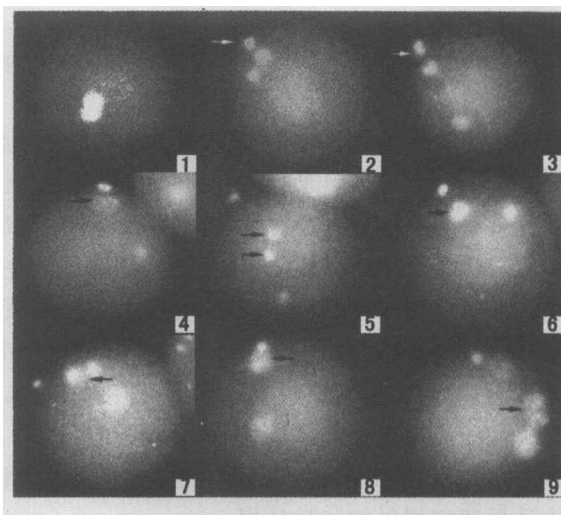
2.2 抑制第二极体排放时的染色体行为

水温 17℃ 条件下, 35min 时可见个别受精卵排出第二极体, 因此以受精后 30min 作为抑制第二极体释放的起始处理时间。开始处理前, 受精卵核相有两种基本类型, 一种处于第二次成熟分裂中期, 受精卵内染色体排列在赤道板上(图版 I - 4); 第二种处于第二次成熟分裂后期, 染色单体已经分离(图版 I - 5)。分别处理 5min、15min、25min, 受精卵核相组成未发生变化, 但随着处理时间的延长, 泡状化明显增强(图版 I - 6, 7, 8, 9)。解除处理后, 染色体开始移动。持续处理 5min, 大部分受精卵可以排出第二极体, 对第二次成熟分裂过程未造成明显影响; 持续处理 15min, 受精卵不排出第二极体, 雌雄原核相互融合, 进入正常的细胞分裂; 持续处理 25min 的受精卵也不排出第二极体, 但雌雄原核不能正常融合, 并造成了受精卵的死亡。

3 讨论

3.1 6 - DMAP 的作用效果

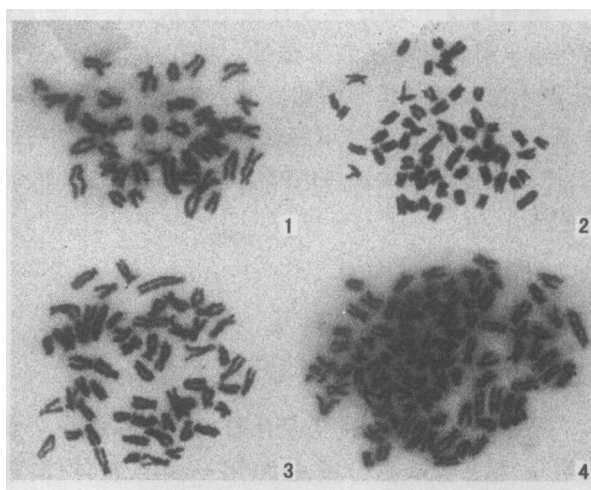
6 - 二甲基氨基嘌呤是嘌呤霉素的类似物, 是蛋白质磷酸激酶的抑制剂, 通过抑制蛋白质磷酸激酶参加的生化反应, 使纺锤丝不能形成, 并抑制染色体的分离和极体形成^[7-8], 由于其低毒、易溶和低价, 近年来代替细胞松弛素 B(简称 CB)在贝类多倍体诱导研究中被广泛使用。6 - DMAP 抑制栉孔扇贝(♀) × 虾夷扇贝(♂)受精卵极体的释放, 处理前后染色体核相无明显变化。即开始处理后, 染色体分离便停止, 表明 6 - DMAP 有终止染色体运动的作用, 因此 6 - DMAP 在处理时能立即产生抑制作用, 作用时效较短。杨爱国等^[9]曾报道了 6 - DMAP 诱导栉孔扇贝三倍体的机理, 栉孔扇贝受精卵接受 6 - DMAP 处理后, 其染色体行为变化和本研究中栉孔扇贝(♀) × 虾夷扇贝(♂)受精卵的染色体行为基本相同, 即 6 - DMAP 对二者染色体行为的影响在细胞学上没有明显差异。与 6 - DMAP 不同, CB 是真菌的一种代谢产物, 主要通过特异性破坏微丝, 使由微丝构成的“收缩环”解体, 胞质分裂沟不能形成, 从而抑制细胞分裂或是极体释放, 但不影响细胞核的



图版 I Plate I

1. 栉孔扇贝成熟卵; 2. 释放第一极体(箭头); 3. 释放第二极体(箭头); 4. 第二次成熟分裂中期: 染色体排在赤道板上(箭头); 5. 第二次成熟分裂后期: 染色单体(箭头)已分开; 6-9. 泡状化逐渐增强

1. ripe eggs of *C. farreri*; 2. first polar body (arrow) released; 3. second polar body (arrow) released; 4. metaphase of second meiosis: chromosomes aligning on the plate (arrow); 5. anaphase of second meiosis: chromatids (arrow) divided; 6-9. bulliform structure (arrow) strengthened



图版 II Plate II

1. 二倍体 $2n = 38$; 2. 非整倍体 $3n - 1 = 56$; 3. 三倍体 $3n = 57$; 4. 五倍体 $5n = 95$

1. diploid $2n = 38$; 2. aneuploidy $3n - 1 = 56$; 3. triploid $3n = 57$; 4. pentaploid $5n = 95$

分裂和染色体的分离。受精卵接受处理后,染色体分离继续进行,CB 只在形成“收缩环”时产生作用,其作用时效比 6-DMAP 长,可以提高诱导率。但 CB 是剧毒药物,处理得到的胚胎死亡率很高,且对环境和人体影响较大,不利于生产中应用。

3.2 异源三倍体的诱导

虾夷扇贝精子进入栉孔扇贝成熟卵后,能正常激发卵子发育,释放第一极体和第二极体,并形成雌雄原核,最后雌雄原核融合,完成受精过程。6-DMAP 处理该异源受精卵,无论抑制第一极体或是第二极体的释放,均能得到正常发育的三倍体胚胎,这从染色体制片的观察结果中已得到证实。抑制第二极体释放产生三倍体,能获得较高的三倍体率,这是目前贝类三倍体研究中应用最多的方法。已有研究表明,抑制第二极体释放产生的三倍体主要来源于发育至第二次成熟分裂中期的受精卵^[9]。因此,抑制第二极体诱导异源三倍体时,要得到较高的诱导率,同步发育卵的获得和诱导时机的选择非常重要。目前一般三倍体育种中多以第二极体出现的数量来确定处理的起始时机^[10]。

3.3 非整倍体现象

实验中,抑制异源受精卵第一极体释放,产生三倍体的同时也会产生部分非整倍体。高等动物染色体数目的增减会产生严重的后果,非整倍体通常是致死的或是导致发育障碍,而在植物和低等动物中非整倍体普遍存在^[11-12]。贝类多倍体研究尤其是抑制第一极体释放诱导多倍体,常产生高比例的非整倍体^[13]。现有资料表明,某些非整倍体是可以生存的,合浦珠母贝能耐受 7%~14% 单倍体染色体的增减^[14]。异源多倍体扇贝虽然能在胚胎阶段检测到非整倍体,但能否存活还有待于进一步观察。

3.4 同时抑制第一、第二极体释放的结果

延长 6-DMAP 处理时间,第一、第二极体释放均被抑制,雌雄原核融合后将会形成五倍体,胚胎染色体观察亦证明了这一点。但也有可能雌雄原核融合不完全,从而产生其他各种倍性。Scarpa 等^[15]曾用 CB 同时抑制第一极体和第二极体的释放,获得地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*) 成活至成体的四倍体个体,这是目前少数能得到成活四倍体贝类的先例之一,说明抑制两个极体释放在多倍体研究中也具有重要应用价值。

参考文献:

- [1] Stanley J G, Hidu H, Allen S K. Growth of American oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II [J]. Aquac, 1984, 37: 147-15.
- [2] Zhang G F, Chang Y Q, Song J, et al. Comprehensive comparison between triploid oysters induced with CB and 6-DMAP [J]. J Fish China, 2000, 24(4): 76-83. [张国范,常亚青,宋 坚,等.不同方法制备三倍体长牡蛎的对比研究[J].水产学报,2000,24(4):76-83.]
- [3] Yang A G, Wang Q Y, Zhang Y, et al. Comparison of the growth characters between the triploid and diploid *Chlamys (Azumapekten) farreri* [J]. Marine Sciences, 2000, 24(8): 21-23. [杨爱国,王清印,张 岩,等.栉孔扇贝三倍体与二倍体的生长比较[J].海洋科学,2000,24(8):21-23.]
- [4] Zhou M D, Kao Y T, Wu R. Preliminary studies on hybridization of *Crassostrea gigas* with *Ostrea rivularis* and *Ostrea plicatula* [J]. J Fish China, 1982, 6(3): 236-241. [周茂德,高允田,吴 融.太平洋牡蛎与近江牡蛎、褶牡蛎人工杂交的初步研究[J].水产学报,1982,6(3)236-241.]
- [5] Yan J P, Sun H L, Fang J G, et al. Study on the technology of crossbreeding abalones *Haliotis discus discus* and *Haliotis discus hannai* Ino [J]. Marine Fisheries Research, 1999, 20(1): 35-39. [燕敬平,孙慧玲,方建光,等.日本盘鲍与皱纹盘鲍杂交育种技术研究[J].海洋水产研究,1999,20(1):35-39.]
- [6] Chen M R, Yang X Q, Yu X M, et al. Chromosomes ploid manipulations of allotetraploids and their fertility in Japanese phytophagous crucian carp (JPCC)(♀)(red crucian carp (RCC)(♂)[J]. Acta Hydrobiol Sin, 1997, 21(3): 197-206. [陈敏容,杨兴棋,俞小牧,等.白鲫×红鲫异源四倍体鱼的倍性操作及其生殖力的研究[J].水生生物学报,1997,21(3):197-206.]
- [7] Neant I, Guerrier P. 6-dimethylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity [J]. Exp Cell Res, 1988, 176(1): 68-79.

- [8] Szollosi M, Debey S P, Szollosi D H, *et al.* Chromatin behaviour under influence of puromycin and 6 - DMAP at different stages of mouse oocyte maturation[J]. *Chromosoma*, 1991, 100:339 - 354.
- [9] Yang A G, Wang Q Y, Kong J, *et al.* Preliminary studies on the cytological mechanism of triploid induction in scallop *Chlamys (Azumapecten) farreri* by application of 6 - dimethylaminopurine(6 - DMAP)[J]. *Marine Fisheries Research*, 2000, 21(1): 22 - 26. [杨爱国, 王清印, 孔杰, 等. 6 - 甲基氨基嘌呤诱导栉孔扇贝三倍体的细胞学机理[J]. *海洋水产研究*, 2000, 21(1): 22 - 26.]
- [10] Yang A G, Wang Q Y, Kong J, *et al.* Triploide induction in *Chlamys farreri* by application of 6 - dimthylaminopurine[J]. *J Fish China*, 1999, 23(3): 241 - 247. [杨爱国, 王清印, 孔杰, 等. 6 - 二甲基氨基嘌呤诱导栉孔扇贝三倍体[J]. *水产学报*, 1999, 23(3): 241 - 247.]
- [11] Fu J, Zhao J X, Yang Q H, *et al.* Transmission and genetic effect of ting chromosomes in cross progenies from octoploid *Tritileymus* with 4D nullisomic[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2000, 27(6): 532 - 537. [傅杰, 赵继新, 杨群慧, 等. 八倍体小滨麦与4D缺体杂交后代小染色体的传递与遗传效应[J]. *遗传学报*, 2000, 27(6): 532 - 537.]
- [12] Wang D H, Liao S L, Gao Z F, *et al.* Prognostic significance of DNA relative content in non-small cell lung carcinonma[J]. *Journal of Yunyang Medical College*, 1998, 17(1): 6 - 9. [王德华, 廖松林, 高子芬, 等. 非小细胞肺癌中的DNA相对含量预后意义的研究[J]. *南阳医学院学报*, 1999, 17(1): 6 - 9.]
- [13] Guo X M, Cooper K, Hershberger W K. Genetic consequences of blocking polar body 1. Ploidy of resultant larvae[J]. *Biol Bull*, 1992, 183: 381 - 386.
- [14] He M X, Lin Y G, Shen Q, *et al.* Production of aneuploid *Pinctada martens* (Dunker) in tetraploid induction[J]. *Tropic Oceanolog*, 2000 (4): 59 - 64. [何毛贤, 林岳光, 沈琪, 等. 合浦珠母贝四倍体诱导过程中非整倍体的产生[J]. *热带海洋*, 2000, (4): 59 - 64.]
- [15] Scarpa J, Wada K T, Komaru A. Induction of tetraploidy in mussels by suppression of polar body formation[J]. *Bull Jap Fish Sci Soc*, 1993, 59(12): 2017 - 2023.