

文章编号:1000-0615(2009)01-0165-06

· 研究简报 ·

## 扇贝异源四倍体诱导的初步研究

迟长凤<sup>1,2</sup>, 杨爱国<sup>1</sup>, 王清印<sup>1</sup>, 刘志鸿<sup>1</sup>, 周丽青<sup>1</sup>, 吴常文<sup>2</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 浙江海洋学院海洋科学学院, 浙江 舟山 316004)

**关键词:** 栉孔扇贝; 虾夷扇贝; 异源四倍体; 流式细胞术

**中图分类号:** S 917

**文献标识码:** A

目前国内外已经开发出多种诱导四倍体的方法,如抑制受精卵第一极体的释放、抑制受精卵的卵裂、细胞融合和人工雌核发育等。迄今,国内外学者已利用多种诱导方法<sup>[1]</sup>对贝类进行了四倍体育种研究,都获得了一定比例的四倍体胚胎和幼虫,甚至是稚贝,但除太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas* Thunberg)<sup>[2]</sup>外都未获得两性可育且形成群体的四倍体贝类。异源四倍体的诱导研究目前在鱼类方面多有报道,直接利用杂交方法在某些鱼类中也可获得四倍体鱼。Liu等<sup>[3]</sup>在红鲫(*Carassius auratus* red variety ♀)与湘江野鲤(*Cyprinus carpio* ♂)的杂交三代(F<sub>3</sub>)中发现了异源四倍体鱼,该四倍体鱼雌雄可育且能自然繁殖,已形成了一个稳定四倍体鱼种群;丁军等<sup>[4]</sup>利用异育银鲫♀与兴国红鲤♂获得复合四倍体银鲫;俞豪祥等<sup>[5]</sup>采用冷休克诱导银鲫♀×鲤鱼♂四倍体;陈敏容等<sup>[6]</sup>利用热休克诱导白鲫♀×红鲤♂四倍体。目前尚未见关于贝类异源四倍体诱导研究的报道。

栉孔扇贝和虾夷扇贝是我国北方两种重要的经济贝类,两者的生态习性与外部形态差异明显<sup>[7]</sup>。虾夷扇贝个体大,经济价值高,但适温低,只能在我国北方局部海域进行养殖。与栉孔扇贝相比,两者在性状方面具有一定的互补性,且两者染色体数目相同,都是38条。本实验室利用栉孔

扇贝与虾夷扇贝进行杂交,成功获得了可成活的杂交个体,且子代在生长和抗逆性方面已经初步显示出一定杂种优势<sup>[8]</sup>。以上特点使诱导异源四倍体成为可能。本文通过6-二甲氨基嘌呤(6-dimethylamino-purine, 6-DMAP)抑制栉孔扇贝♀×虾夷扇贝♂异源受精卵第一极体的释放诱导扇贝异源四倍体,对诱导的适宜条件进行了筛选,旨在为扇贝四倍体的诱导研究提供技术参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

栉孔扇贝亲贝♀(壳高7~9 cm),虾夷扇贝亲贝♂(壳高10~12 cm),贝龄均为2~3年,性腺成熟、饱满。6-DMAP为Sigma公司产品、NIKON E-800显微镜,Parctec流式细胞仪。

#### 1.2 方法

异源四倍体的诱导 选择性腺发育良好的栉孔扇贝♀和虾夷扇贝♂分别采用阴干升温法(16℃)和流水-氨水刺激法(12℃)促其产卵、排精。收集精、卵,在15.2℃条件下人工授精,严格控制精卵比例。实验设计5组,即当个别受精卵排放第一极体时,用50 mg/L的6-DMAP持续处理受精卵0(对照组)、10、15、20和25 min,以过滤海水洗卵,每组设3个重复。各处理组分别命名为ZXP<sub>1</sub>0、ZXP<sub>1</sub>10、ZXP<sub>1</sub>15、ZXP<sub>1</sub>20、

收稿日期:2007-11-27 修回日期:2008-06-25

资助项目:国家科技支撑计划专题项目(2006BAD01A00);国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A403);国家自然科学基金项目(30600465)

通讯作者:王清印, E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

ZXP<sub>1</sub>25。受精卵在 18.0 ~ 19.0 °C 砂滤海水中孵化,盐度为 28 ~ 30,孵化密度为 30 ind/mL。

流式细胞仪检测 取各处理组活的 D 形幼虫滤除海水后直接冻存于液氮中,检测时室温下解冻,加入一定量 DAPI 染色液,用漩涡振荡器震碎组织,再用孔径为 20 ~ 40 μm 的筛绢过滤,将细胞悬液加入测试管中,保证管中溶液达到 1.5 ~ 2.0 mL,流式细胞仪检测倍性。

数据统计 在光镜下观察各组受精卵的发育情况,取样统计裂卵数和 D 形幼虫数,计算受精率和 D 形幼虫成活率(D 形幼虫数占受精卵数的百分比)。当发育到 D 形幼虫时,取样准备倍性流式细胞仪分析,计算各倍性比率(各倍性峰的细胞数(面积)占检测出的所有峰的细胞数(面积)之和的百分比)。

## 2 结果

### 2.1 不同 6-DMAP 处理时间对受精率、D 形幼虫率的影响

各处理组受精率和 D 形幼虫率的统计见表 1。由表 1 可知,各处理组均能正常受精,但各施药处理组的受精率远远低于正常杂交受精组,各处理组与对照组受精率具有极显差异( $P < 0.001$ )。从 D 形幼虫成活率来看,各药物处理组均能获得一定比例的 D 形幼虫,其中药物处理 10 min 的受精卵 D 形幼虫成活率最高,为 54.9%;药物处理 15 min 的受精卵 D 形幼虫成活率最低,为 14.6%,但各处理组的 D 形幼虫成活率都远远低于正常杂交组,各处理组与对照组 D 形幼虫成活率具有极显差异( $P < 0.001$ )。

表 1 不同 6-DMAP 处理持续时间对受精率和 D 形幼虫成活率的影响

Tab. 1 Effects of various duration time of 6-DMAP on fertilization rates and D-larvae hatching rates

组别 groups	受精率/(%) fertilization rates	D 形幼虫率/(%) D-larvae hatching rates
ZXP <sub>1</sub> 0	67.5	95.3
ZXP <sub>1</sub> 10	28.7***	54.9***
ZXP <sub>1</sub> 15	28.7***	14.6***
ZXP <sub>1</sub> 20	31.0***	37.0***
ZXP <sub>1</sub> 25	27.7***	41.0***

注:与 ZXP<sub>1</sub>0 组比 \*\*\*  $P < 0.001$

Notes: compared with ZXP<sub>1</sub>0 \*\*\*  $P < 0.001$

### 2.2 6-DMAP 处理组幼虫的发育状况

6-DMAP 处理组幼虫的发育状况见表 2。异源精卵受精后,受精卵能够正常发育,前期未见明显的胚胎发育畸形现象。但当幼虫发育至 D 形幼虫后,部分幼虫发育畸形,主要表现在幼虫的异

常活跃、摄食状况差、铰合部不直等方面。随着发育时间的延长,部分幼虫开始死亡。根据现场观察,总体上四个加药处理组的发育速度相似,处理 20 min 的幼虫发育稍慢。加药处理组的发育速度远远慢于正常杂交受精组。

表 2 6-DMAP 处理组幼虫的发育状况

Tab. 2 The development situation of larvae in the treatment groups with 6-DMAP

组别 groups	不同时间发育状况/(h) development situation			
	24 ~ 25	36 ~ 37	80 ~ 81	90 ~ 91
ZXP <sub>1</sub> 10	担轮幼虫	D 形幼虫	生长良好, D 形幼虫铰合部直	生长良好、幼虫铰合部直、摄食状况良好、少部分幼虫死亡
ZXP <sub>1</sub> 15	担轮幼虫	D 形幼虫	生长良好, D 形幼虫铰合部直	生长良好、幼虫铰合部直、摄食状况良好、部分幼虫死亡
ZXP <sub>1</sub> 20	担轮幼虫	无 D 形幼虫,正在向其转变	D 形幼虫异常活跃,铰合部不直	幼虫个体较小、壳异常张开、异常活跃、畸形幼虫多、幼虫铰合部不直
ZXP <sub>1</sub> 25	担轮幼虫	D 形幼虫	D 形幼虫异常活跃,畸形幼虫多,铰合部不直	幼虫个体较小、部分壳异常张开、异常活跃、畸形幼虫多、幼虫铰合部弯曲、部分幼虫死亡

2.3 不同 6-DMAP 处理时间对幼虫倍性比率的影响 流式细胞仪检测结果如图 1 和图 2 所示,统计结果如表 3 所示。通过对栉孔扇贝、正常杂交二倍体和 50 mg/L 6-DMAP 处理 10、15、20

和 25 min 四个加药处理组 D 形幼虫的 DNA 相对含量比较,结果发现对照组二倍体率为 83.75% (图 1-B)。ZXP<sub>1</sub>10 min 处理组获得 12.65% 的四倍体,同时获得 36.56% 介于二倍体与三倍体之

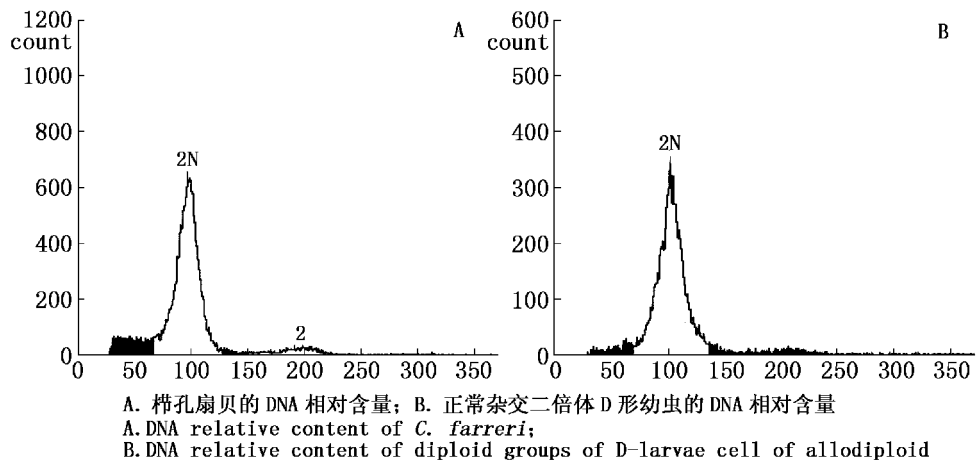


图 1 栉孔扇贝和正常杂交二倍体 D 形幼虫的 DNA 相对含量

Fig. 1 DNA relative content of *C. farreri* and diploid groups of D-larvae cell of allodiploid (control)

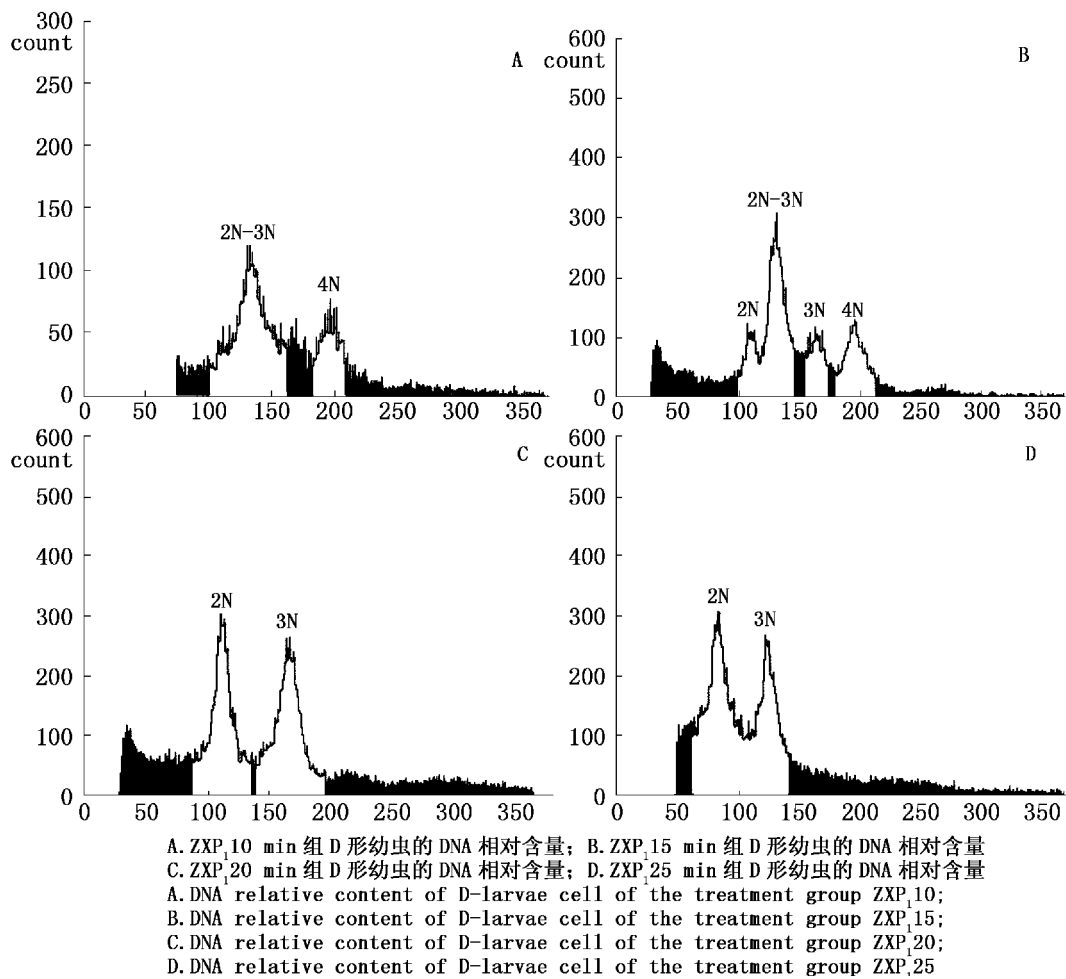


图 2 6-DMAP 处理组 D 形幼虫的 DNA 相对含量

Fig. 2 DNA relative content of D-larvae cell of the treatment groups with 6-DMAP

间的非整倍体(图 2-A)。ZXP<sub>15</sub> min 诱导组的倍性复杂,获得 17.30%的四倍体和 10.53%三倍体,同样获得 30.85% 介于二倍体与三倍体之间的非整倍体(图 2-B),同时存在部分二倍体。ZXP<sub>20</sub> min 获得 29.92% 的三倍体,同时存在 29.46% 二倍体(图 2-C)。ZXP<sub>20</sub> min 获得

25.562% 的三倍体,同时存在 36.04% 二倍体(图 2-D)。综合受精率、D 形幼虫率、幼虫的发育状况及诱导后代四倍体率各个方面的情况,本实验得出 50 mg/L 6-DMAP 持续处理异源受精卵 15 min 抑制第一极体为适宜诱导组合。

表 3 不同 6-DMAP 持续处理时间幼虫倍性比率的影响

Tab. 3 Effects of various duration time of 6-DMAP on ployploid rates of the treatment larvae

组别 groups	2N(%)	2N~3N(%)	3N(%)	4N(%)	其他(%)
栉孔(肉柱)	84.59	—	—	—	15.41
ZXP <sub>0</sub>	83.75	—	—	—	16.25
ZXP <sub>10</sub>	—	36.56	—	12.65	50.79
ZXP <sub>15</sub>	9.54	30.85	10.53	17.30	31.78
ZXP <sub>20</sub>	29.46	—	29.92	—	40.62
ZXP <sub>25</sub>	36.04	—	25.56	—	38.40

### 3 讨论

实验药物处理组受精率相比对照组低很多,处于 27%~31% 之间,分析原因可能有两点:第一点,对异源受精卵实施药物处理,虽然 6-DMAP 毒性较低,但对胚胎的受精与发育仍然具有一定的毒性;第二点,精卵结合时间影响受精率,精卵应以最快的速度授精,卵子虽然可以放置一段时间,但时间不可过长,否则将导致受精率下降<sup>[9]</sup>。本实验中受精率低,可能与卵子放置时间稍长有关。今后,为了提高受精率应从提高精卵质量、缩短授精时间等方面着手。实验观察结果表明药物处理组的 D 形幼虫率很低,原因可能有两点:首先是存在发育障碍。实验中我们发现在担轮幼虫期之前药物处理组的幼虫发育正常,但在担轮幼虫期向 D 形幼虫期过渡时,很多幼虫无法实现变态而死亡。这种发育障碍可能来自药物处理对幼虫的伤害以及药物抑制第一极体的释放导致胚胎发育紊乱畸形。其次可能是在实际统计过程中由于幼虫发育的不同步而产生的误差所致。精卵发育不同步是由于卵子自身发育不同步和受精过程发育不同步等原因引起的。

诱导扇贝异源四倍体过程中产生后代的倍性组成复杂,包括四倍体、三倍体、二倍体和非整倍体。在多种贝类的多倍体诱导研究中都发现了一定比例的非整倍体。采用细胞松弛素 B 处理太平洋牡蛎<sup>[10-11]</sup>和栉孔扇贝<sup>[12-13]</sup>受精卵,抑制第一极体(PB1)排放,均产生了一定比例的非整倍

体。本实验四倍体诱导率低以及诱导后代倍性复杂并产生大量非整倍体,作者认为存在以下几点原因:首先,影响四倍体诱导率的因素有起始处理时间、药物处理时间、药物浓度,以及后续培养条件等。本实验以对照组个别受精卵出现 PB1(约受精后 25 min)时,向处理组施加 6-DMAP,处理时机经过多次实验反复摸索仍然很难把握,本实验的结果可能与处理时机把握不准有关,从而导致没有抑制住第一极体却将第二极体抑制住,结果导致大量三倍体的产生。虽然与 CB 相比 6-DMAP 具有便宜、水溶性好、低毒等优点,但是作为一种蛋白质磷酸化抑制剂,它对胚胎仍具有一定的毒性,会影响到受精卵的孵化与幼虫的发育,因此本实验 6-DMAP 终浓度采用生产上诱导三倍体使用的浓度 50 mg/L,而不是前人在诱导多倍体时所经常采用的 60 mg/L。6-DMAP 处理持续时间是根据异源受精卵胚胎发育时间确定,选择 15 min。诱导条件有待于进一步优化以获得高比率的四倍体诱导率。

其次,已有大量研究<sup>[14-18]</sup>结果表明受精卵第一极体被抑制后可能出现多种分离形式,有“二极分离”、“三极分离”、“四极分离”和“非同步分离”。不同的分离方式将产生不同的倍性。“二极分离”可能导致三倍体的形成;“二极分离”、“三极分离”和“四极分离”可能导致四倍体的形成;“三极分离”及其它不规则的分离行为将主要形成非整倍体。作者认为本实验结果中出现大量的非整倍体除了染色体制片上可能存在的随机误

差之外,主要原因为 6-DMAP 抑制了异源受精卵第一极体的排出导致染色体分离复杂化,出现了多种分离形式,“三极分离”和不规则的分离行为导致了大量非整倍体的形成。何毛贤等<sup>[19]</sup>认为大量非整倍体的产生可能是由于 CB 处理使第二次减数分裂染色体的分离方式发生了改变,从而使染色体的分离不平衡,产生了非整倍性的胚胎。Guo 等<sup>[20]</sup>认为四倍体后代中非整倍体数量增加是因为减数分裂中同源染色体的不完全配对形成单价体和三价体的结果。王昭萍等<sup>[21]</sup>在四倍体的后代中也发现了非整倍体,认为主要是由于四倍体的父本在精子发生过程中减数分裂发生失误,产生了非整倍性的精子所致。水域污染、辐射及化学诱变等都可能非整倍体的产生。有关非整倍体的研究结果暗示某些非整倍体类型可能具有较大的生长优势,从而启示我们通过对非整倍体选择育种,培育出优质种苗。由于非整倍体所具有的这些特殊价值,对其开展研究将具有重要的理论与现实意义。

#### 参考文献:

- [1] 王昭萍,李慷均,于瑞海,等. 贝类四倍体育种研究进展[J]. 中国海洋大学学报,2004,34(2):195-202.
- [2] Guo X, Allen S K. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids [J]. Molecular Mar Biol Biotechnology, 1994, 3(1): 42-50.
- [3] Liu S J, Liu Y, Zho G J, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization [J]. Aquaculture, 2001, 192: 171-186.
- [4] 丁 军,蒋一珪,单仕新,等. 复合四倍体异育银鲫产生的细胞学机制[J]. 水生生物学报,1992,16(2):186-187.
- [5] 俞豪祥,徐 皓,关宏伟,等. 冷休克诱导天然雌核发育银鲫♀×鲤鱼♂四倍体[J]. 水产科技情报,1991,18(6):165-168.
- [6] 陈敏容,杨兴棋,俞小牧,等. 人工诱导白鲫(♀)×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] 刘世禄,杨爱国. 中国主要海产贝类健康养殖技术[M]. 北京:海洋出版社,2005.
- [8] 杨爱国,王清印,刘志鸿,等. 栉孔扇贝与虾夷扇贝杂交及子一代的遗传性状[J]. 海洋水产研究,2004,25(5):1-5.
- [9] 杨蕙萍. 栉孔扇贝四倍体的诱导研究[D]. 中国海洋大学博士学位论文,1997.
- [10] Guo X, Cooper K, Hershberger W K, et al. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, I. Ploidy of resultant embryos [J]. Biol Bull, 1992, 183: 387-393.
- [11] Guo X, Cooper K, Hershberger W K, et al. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*: II. Segregation of chromosomes [J]. Bio Bull, 1992, 183: 381-386.
- [12] Yang H, Zhang F, Guo X. Triploid and tetraploid zhikong Scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston, produced by inhibiting polar body I [J]. Mar Biotechnol, 2000, 2(5): 466-475.
- [13] 李永仁. 栉孔扇贝四倍体诱导机理的初步研究[D]. 中国科学院海洋研究所硕士学位论文,2005.
- [14] 姜卫国,李 刚,林岳光,等. 三倍体合浦珠母贝的生殖腺的观察[J]. 热带海洋,1990,9(1):24-29.
- [15] 何毛贤,姜卫国,潘金培. CB 抑制合浦珠母贝受精卵第一极体释放的染色体分离[J]. 水产学报,2002,26(1):15-20.
- [16] 李永仁,阙华勇,张国范. 抑制栉孔扇贝第一极体对受精卵染色体行为及胚胎倍性组成的影响[J]. 海洋科学,2005,29(8):66-70.
- [17] Que H Y, Guo X M, Zhang F S, et al. Chromosome segregation in fertilized eggs from triploid pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), following inhibition of polar body I [J]. Biol Bull, 1997, 193: 14-19.
- [18] 常亚青,吴伟明,杨旦光. 细胞松弛素 B 诱导虾夷扇贝多倍体的受精卵染色体分离状况[J]. 大连水产学院学报,2001,16(4):235-240.
- [19] 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,2000,19(4):59-64.
- [20] Guo X, Allen S K. Sex and meiosis in autotetraploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) [J]. Genome, 1997, 40: 397-405.
- [21] 王昭萍. 三倍体太平洋牡蛎的遗传学基础研究[D]. 青岛:青岛海洋大学,1998.

**Primary study on induction of scallop allotetraploid in cross-fertilized  
eggs of *Chlamys farreri* ♀ × *Patinopecten yessoensis* ♂**

CHI Chang-feng<sup>1,2</sup>, YANG Ai-guo<sup>1</sup>, WANG Qing-yin<sup>1</sup>,  
LIU Zhi-hong<sup>1</sup>, ZHOU Li-qing<sup>1</sup>, WU Chang-wen<sup>2</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;  
2. School of Marine Science, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004, China)

**Abstract:** The allotetraploid in cross-fertilized eggs of *Chlamys farreri* ♀ × *Patinopecten yessoensis* ♂ was induced in this paper. In order to find out the appropriate duration time of 6-DMAP treatment, ploidy status of induction offspring was analyzed by flow cytometry. The results showed that the optimal duration time of 6-DMAP treatment was to treat the fertilized eggs with 50 mg/L 6-DMAP for 15 min based on the integrated evaluation of the results of fertilization rate, survival rate of D-larvae, development status of larvae, and percentage of tetraploid. The results of flow cytometry showed that 17.3% tetraploid was obtained which showed that allotetraploid could be gotten with this method. The causes of the problems in the work were also discussed in this paper.

**Key words:** *Chlamys farreri*; *Patinopecten yessoensis*; allotetraploid; flow cytometry (FCM)