

研究简报

## 虾夷扇贝雄核发育单倍体的人工诱导研究

杨青 李琪 于瑞海 袁媛

(中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室,青岛 266003)

### STUDIES ON THE INDUCTION OF HAPLOID ANDROGENESIS IN THE JAPANESE SCALLOP *PATINOPECTEN YESSOENSIS* BY ULTRAVIOLET IRRADIATION

YANG Qing, LI Qi, YU Rui-Hai and YUAN Yuan

(The Key Lab of Mariculture of the Ministry of Education, Ocean University of China Shandong, Qingdao 266003)

关键词: 虾夷扇贝; 雄核发育单倍体; 紫外线照射; 遗传失活

Key words: *Patinopecten yessoensis*; Haploid androgenesis; Ultraviolet irradiation; Genetic inactivation

中图分类号: S961.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2006)03-0360-03

人工雄核发育, 是利用遗传失活的卵子与正常精子受精, 再利用染色体加倍技术使受精卵恢复为二倍体的遗传操作技术。利用该技术可大大加速品系纯化的过程, 对遗传育种学研究有重要意义。目前有关鱼类雄核发育的研究已见于鲤 (*Gyrinus carpio*)<sup>[1,2]</sup>、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[3]</sup>、红点溪鱒 (*Salvelinus fontinalis*)<sup>[4]</sup>、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)<sup>[5,6]</sup>、斑马鱼 (*Danio rerio*)<sup>[7]</sup>、马苏大麻哈鱼 (*Oncorhynchus masou*)<sup>[8]</sup> 等种类。人工诱导贝类雄核发育的研究资料在国内外都很少, 目前只有栉孔扇贝和太平洋牡蛎雄核发育诱导条件及其发育早期荧光显微观察方面的报道<sup>[9,10]</sup>。

虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 原产于日本, 目前已成为北方沿海地区一种重要的增养殖种类, 具有很高的经济价值, 同时也是目前海洋贝类育种研究的对象之一。本实验首次研究了紫外线照射对虾夷扇贝卵子遗传失活的影响, 成功诱导出雄核发育单倍体, 为今后开展虾夷扇贝雄核发育二倍体的人工诱导奠定了基础, 现将其结果予以报道。

#### 1 材料和方法

1.1 材料来源 实验于2004年3—4月在山东省文登市水产综合育苗实验基地进行。所用亲贝取自大连长海养殖海区的2龄贝(壳长 $9.8 \pm 0.4$ cm, 壳高 $9.5 \pm 0.3$ cm)。亲贝经洗刷干净后入池于浮动网箱中暂养(水温 $9^{\circ}\text{C}$ ), 每天换水投

饵, 饵料为扁藻、叉鞭金藻。

1.2 精卵的采集 采用阴干升温的方法获取成熟精、卵, 并分别定量精子和卵子密度, 分别用海水稀释至浓度为 $5.0 \times 10^6/\text{mL}$ 和 $1.5 \times 10^4/\text{mL}$ 。所用海水为四级砂滤海水, 培养温度是 $14\text{—}16^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 紫外线处理卵子和受精 卵悬液(4.0mL)置于丹麦 Nalge Nunc 公司生产的直径9.0cm的塑料培养皿中, 轻微振荡使卵子均匀地分散于培养皿底部。将培养皿置于日本东芝公司生产的15W紫外线杀菌灯下25cm处, 用法国 Cole-Parmer 公司生产的紫外线强度测定仪测得此条件下紫外线强度为 $1698\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{s}$ 。卵子在紫外线下分别处理0, 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70和80s。照射结束后, 每个培养皿中加入1.0mL精悬液, 充分混合后转移至烧杯培养。

卵裂率在受精后6h通过计算分裂卵数占总处理卵数的百分比获得, 早期胚胎存活率在受精后26h通过计算轮幼虫数占总受精卵数的百分比获得, D形幼虫发生率在受精后3d通过计算D形幼虫数占总受精卵数的百分比获得。采用不同的亲贝, 该实验重复进行3次。

1.4 倍性检查 采用空气干燥法制备胚胎染色体标本, 测定受精后24h担轮幼虫的倍性。每一组的轮幼虫样品浓缩后用0.1%秋水仙素的海水处理2h, 加入0.075mol/L的KCl溶液低渗处理30min, 去掉低渗液, 用Carnoy氏液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定, 反复固定3次。滴片前去掉固

收稿日期: 2004-11-02; 修订日期: 2005-10-31

基金项目: 国家自然科学基金(30170735); 教育部重点项目(104114); 海洋养殖教育部重点实验室开放课题(200401)资助

作者简介: 杨青(1980—), 男, 山东青岛人; 硕士生; 主要从事贝类遗传育种研究

通讯作者: 李琪, E-mail: qili66@mail.ouc.edu.cn

定液,加入 50% 冰醋酸,用吸管轻轻吹打解离成单细胞。样品滴到已经加热的载玻片上,空气干燥后经磷酸缓冲液 (pH=6.8) 稀释的 10% Gemsa 染色。观察和计数分散较好的中期分裂相 ( $n=2378$ ) 以获得染色体数目。

## 2 结果与讨论

### 2.1 紫外线照射时间对卵裂率、早期胚胎存活率和 D 形幼虫发生率的影响

表 1 虾夷扇贝卵裂率、早期胚胎存活率和 D 形幼虫发生率与不同紫外线照射时间之间的关系。各数据表示平均值  $\pm$ SD

Tab. 1 Relationships between ultraviolet irradiation duration and the rates of cleavage as well as survival at the early embryo stage and development of D-larvae in *Patinopecten yessoensis*. Each value represents the mean  $\pm$ SD

实验组 编号 Group No.	照射时间 Ultraviolet irradiation duration (s)	卵裂率 Rates of cleavage (%)	早期胚胎存活率 Survival rates at the early embryo stage (%)	D 形幼虫发生率 Developmental rates of D-larvae (%)
1	0	76.9 $\pm$ 1.1	83.3 $\pm$ 1.2	94.7 $\pm$ 0.6
2	10	73.0 $\pm$ 3.0	81.8 $\pm$ 2.0	85.7 $\pm$ 2.0
3	20	71.5 $\pm$ 3.3	73.4 $\pm$ 5.7	59.1 $\pm$ 9.2
4	30	69.6 $\pm$ 3.5	68.0 $\pm$ 3.6	45.5 $\pm$ 6.7
5	35	69.2 $\pm$ 3.8	57.2 $\pm$ 4.7	33.4 $\pm$ 4.9
6	40	68.2 $\pm$ 3.7	55.6 $\pm$ 6.0	27.6 $\pm$ 3.3
7	45	66.7 $\pm$ 4.6	53.3 $\pm$ 5.2	16.7 $\pm$ 2.0
8	50	61.1 $\pm$ 5.2	45.5 $\pm$ 7.3	0
9	55	41.9 $\pm$ 5.9	35.7 $\pm$ 6.7	0
10	60	32.0 $\pm$ 4.3	30.8 $\pm$ 4.2	0
11	70	29.4 $\pm$ 3.2	23.0 $\pm$ 2.2	0
12	80	11.4 $\pm$ 2.2	11.1 $\pm$ 1.1	0

### 2.2 染色体频率分布

图 1 显示了虾夷扇贝幼虫细胞有丝分裂的中期分裂相。对照组中几乎全部为二倍体,染色体数目为 38 (图 1 A)。在 45s 照射组中染色体数目为  $2N=38$  的幼虫仍占一定比例,但随照射时间增加, $2N$  比例减少,染色体数目为  $N=19$  的单倍体细胞和非整倍体细胞比例都逐渐增加 (图 1 B)。50s 照射组大部分细胞染色体数目均为 19,单倍体比例为 37.7%,此时已无二倍体细胞 (图 1 C)。80s 照射组中仍能见到染色体数目为 19 的细胞,但其所占比例明显减少,已不具有代表性。

### 2.3 讨论

卵核染色体遗传失活是人工诱导雄核发育单倍体的先决条件,而紫外线是一种安全、廉价、易得的射线,在实验、生产中具有极大的实用价值,因此选择一个合适的紫外线照射剂量使卵子染色体完全失活而不影响其受精能力,是得到雄核单倍体胚胎的关键。有关栉孔扇贝雄核发育的研究表明,强度为  $2.8 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{s}$  的紫外线 (254nm) 照射 20—30s 均能成功地诱导出雄核发育单倍体。本次实验中,从染色体数目分析结果可以看出,尽管经过强度为  $1698 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{s}$  的紫外线照射卵子 30—45s 均能诱导出虾夷扇贝雄核发育单倍体,但二倍体仍然存在。照射卵子的时间达到 50s 时,二倍体完全消失,因此强度为  $1698 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{s}$  的紫外线照射 50s 可以认为

是使虾夷扇贝卵子遗传失活、获得雄核单倍体的适宜剂量。

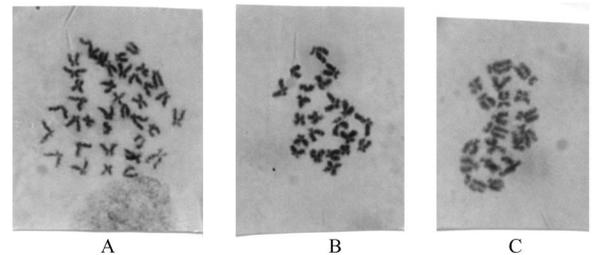


图 1 虾夷扇贝幼虫细胞染色体有丝分裂中期相

A 对照组二倍体细胞,染色体数目为 38; B 45s 照射组中的非整倍体细胞,染色体数目为 22; C 50s 照射组中的单倍体细胞,染色体数目为 19

Fig. 1 Mitotic metaphase plates from the larval cells of *Patinopecten yessoensis*. A A diploid cell with 38 chromosomes from the control group,  $\times 330$ ; B An aneuploid cell showing 22 chromosomes from the 45s irradiation group,  $\times 330$ ; C A haploid cell with 19 chromosomes from the 50s irradiation group,  $\times 330$

紫外线辐射使卵子染色体遗传失活的原理在于它能够使 DNA 氢键断裂,同一链上相邻的或双螺旋相对应的两条链上的胸腺嘧啶之间形成胸腺嘧啶二聚体 (thymine dimers),使双螺旋两链间的氢键减弱, DNA 结构局部变形,从而严重影响 DNA 的正常复制和转录。与人工诱导鱼类雄核发育的

研究结果相比较,可以发现以贝类作为研究对象,利用紫外线作为使卵子DNA失活的手段,贝类所需紫外线照射剂量要比鱼类低。原因可能是贝类卵子相对鱼类卵子要小,因而较低剂量的紫外线就能够使卵细胞DNA失活,从而有效地诱导雄核发育。由此可知,诱导贝类卵子遗传失活的紫外线照射剂量因品种的不同而异,而且与卵液的密度、体积以及紫外线的照射强度有关。尽管如此,本实验中利用紫外线照射使虾夷扇贝卵子染色体遗传失活这一处理的可重复性依然很强。

本实验发现随虾夷扇贝卵子紫外线照射时间的增加,其卵裂率明显下降,表明卵子激活精子的能力随着紫外线照射剂量的增加而降低。这可能是受精子、胚胎发育相关的功能结构基因受到破坏的原因所致。该结果与袁媛等关于紫外线人工诱导栉孔扇贝雄核发育的研究结果<sup>[9]</sup>以及Arai等关于紫外线人工诱导泥鳅雄核发育的研究结果有相似之处。

各照射组均出现非整倍体,其原因可能是低剂量紫外线造成卵核染色体部分失活的结果。关于贝类中非整倍体的报道已见于皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)、贻贝(*Mytilus edulis*)的雌核发育诱导和栉孔扇贝(*Chlamys fareri*)的雄核发育诱导,因此在紫外线照射过程中提高处理的均一性是十分必要的。尽管紫外线照射可能破坏卵细胞质中的重要成分,降低雄核发育单倍体的诱导效率,但是通过进一步研究紫外线照射对卵子超微结构变化的影响,优化受精率、早期胚胎存活率、D形幼虫发生率和紫外线照射条件之间的关系,将有助于改善虾夷扇贝雄核发育单倍体的诱导效率,为进一步开展人工诱导虾夷扇贝雄核

发育二倍体的研究奠定基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Horvath L, Orban L. Genome and gene manipulation in the common carp [J]. *Aquaculture*, 1995, **129**:157—181
- [ 2 ] Gmelsky B. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: a review [J]. *Aquat Living Resour*, 2003, **16**:408—415
- [ 3 ] Kim H, Brown A, Gary H, et al. Mitochondrial and nuclear inheritance in an androgenetic line of rainbow trout [J]. *Aquaculture*, 2002, **204**:323—335
- [ 4 ] May B, Henley K J, Krueger C C, et al. Androgenesis as a mechanism for chromosome set manipulation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) [J]. *Aquaculture*, 1988, **75**:57—70
- [ 5 ] Arai K, Ikono M, Sizki R. Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* using spermatozoa of natural tetraploids [J]. *Aquaculture*, 1995, **137**:131—138
- [ 6 ] Zhao Z S, Wu Q J, Liu H Y, et al. Study on the development of androgenetic haploid of *Paramisgurnus dabryanus* [J]. *Zoological Research*, 1998, **46**(3):353—356 [赵振山, 吴清江, 刘辉宇, 等. 大鳞副泥鳅雄核单倍体的早期发育. *动物学报*, 1998, **46**(3):353—356]
- [ 7 ] Corley-Smith G E, Lim C J, Brandhorst B P. Production of androgenetic Zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Genetics*, 1996, **142**:1265—1276
- [ 8 ] Nagoya H, Okamoto H, Nakayama I, et al. Production of Androgenetic diploids in amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae* [J]. *Fisheries Sci*, 1996, **62**(3):380—383
- [ 9 ] Yuan Y, Li Q, Yu R H, et al. Induction of androgenesis in *Chlamys fareri* by ultraviolet irradiation [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, **28**(2):133—138 [袁媛, 李琪, 于瑞海, 等. 紫外线诱导栉孔扇贝雄核发育的研究. *水产学报*, 2004, **28**(2):133—138]