

人工诱导栉江珧雌核发育的初步研究

杨青¹, 李琪¹, 于瑞海¹, 李吉清²

(1. 中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 文登市水产综合育苗试验基地, 山东 威海 264210)

摘要:利用紫外线诱导进行栉江珧(*Atrina pectinata*)雌核发育单倍体的研究,用强度为 $2\,561\,\mu\text{W}/(\text{cm}^2\cdot\text{s})$ 的紫外线(254 nm)照射不同时间的精子与正常卵子受精展开实验。结果发现随照射时间的增加,卵裂率、早期胚胎存活率和D型幼虫发生率总体呈下降趋势,遗传失活的精子与正常卵子受精后其胚胎发育至D型幼虫前期停止。经紫外线照射的精子受精后所产生的单倍体胚胎发育速度慢于正常受精所产生的二倍体胚胎,各照射组均出现非整倍体。40 s照射组中卵裂率达到51.2%,D型幼虫发生率为0,单倍体率最高,达到36.8%,出现“Hertwig效应”。由于雌核发育单倍体的有效诱导既需要精子遗传物质失活,又需要保证较高的卵裂率,因而在强度 $2\,561\,\mu\text{W}/(\text{cm}^2\cdot\text{s})$ 的紫外线下照射40 s是获得栉江珧雌核发育单倍体的最佳条件。[中国水产科学,2006,13(2):310-315]

关键词:栉江珧;雌核发育;紫外线照射;Hertwig效应

中图分类号:Q959.215 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)02-0310-06

目前有关水产动物雌核发育的研究多见于鱼类^[1-4]。在海洋贝类方面,人工雌核发育的研究开展较晚,有关贝类雌核发育二倍体的有效诱导程序尚未完全建立起来,已报道的研究限于皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)^[5]、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[6]、贻贝(*Mytilus edulis*)^[7]、地中海贻贝(*M. galloprovincialis*)^[8]、华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)^[9]、栉孔扇贝(*C. farreri*)^[10]、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)^[11]和合浦珠母贝(*Pinctada martensii*)^[12]等海洋经济贝类^[13]。

栉江珧(*Atrina pectinata*)广泛分布于温、热带泥沙质近海海域,是中国近海渔业生产的重要贝类资源之一。然而,由于近年来栉江珧资源因滥捕而严重衰退,很多地区已较难采集。目前,国内外关于栉江珧的研究主要集中在人工育苗生产、繁殖生物学和系统分类方面,其他方面的研究报道相对较少。为保护和利用栉江珧这种珍贵的海产贝类资源,积累有关遗传学资料,本研究利用紫外线人工诱导栉江珧雌核发育并探索其最佳条件,以期栉江珧雌核发育二倍体品系的培育和优良品种的开发提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验于2004年6月在山东省文登市水产综合育苗实验基地进行。亲贝取自山东荣成俚岛湾海区的2~3龄贝26只,壳长 $(27.6 \pm 1.2)\text{ cm}$,壳高 $(14.2 \pm 0.9)\text{ cm}$ 。亲贝经洗刷干净后入池,于浮动网箱中暂养(水温 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$),每天换水投饵,饵料为扁藻和叉鞭金藻。

1.2 精卵的采集

采用阴干升温法获取成熟精、卵,分别定量精子和卵子密度,用海水稀释至浓度为 $1.0 \times 10^7/\text{mL}$ 和 $1.5 \times 10^4/\text{mL}$,所用海水为四级砂滤海水。

1.3 紫外线处理精子和受精

精悬液(1.0 mL)置于丹麦Nalge Nunc公司生产的直径9.0 cm的塑料培养皿中,轻微振荡使精子均匀分散于培养皿底部。将培养皿置于日本东芝公司生产的15 W紫外线杀菌灯下15 cm处,用美国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 $2\,561\,\mu\text{W}/(\text{cm}^2\cdot\text{s})$ 。精子在紫外线下分别照射处理0 s、10 s、15 s、20 s、25 s、30 s、

收稿日期:2005-06-27; 修订日期:2005-10-28。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571442);教育部重点项目(104114);海水养殖教育部重点实验室开放课题(200401);山东省科技厅项目(2003077)。

作者简介:杨青(1980-),男,硕士研究生,主要从事贝类遗传育种研究。

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

35 s、40 s、45 s、50 s、55 s 和 60 s。照射过程中精子处于避光状态。照射结束后,每个培养皿中加入 10 mL 卵悬液,充分混合后转移至烧杯培养,温度保持在 23~25℃。

受精后 8 h 通过计算分裂卵数占总处理卵数的百分比获得卵裂率;受精后 14 h 通过计算担轮幼虫数占总受精卵数的百分比获得早期胚胎存活率;受精后 24 h 通过计算 D 型幼虫数占总受精卵数的百分比获得 D 型幼虫发生率。采用不同的亲贝,该实验重复进行 3 次。

1.4 倍性检查

1.4.1 染色体制片法测定担轮幼虫倍性 采用空气干燥法制备胚胎染色体标本,测定受精后 14 h 担轮幼虫的倍性。将含 0.1% 秋水仙素的海水加入至各组担轮幼虫样品的浓缩液中处理 2 h,然后加入 0.075 mol/L 的 KCl 溶液低渗处理 30 min,去掉低渗液,用 Carnoy 氏液(甲醇与冰醋酸体积比 3:1)固定,反复固定 3 次。滴片前去掉固定液,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% Giemsa 染色。观察和计数分散较好的中期分裂相以获得染色体数目。

1.4.2 流式细胞仪(FCM)分析 收集受精后 24 h 各组担轮幼虫或 D 型幼虫样品,滤除海水、杂质和组织块后,移入盛有 1.0 mL DAPI 染液的 1.5 mL 离心管中, -20℃ 冷冻保存。上机检测前将解冻后样品在旋涡混合器上充分振荡解离成单细胞悬液,

经 20 μm 筛绢过滤样品至流式细胞仪专用样品管中,进一步去除组织块,用德国 Partec 公司生产的流式细胞仪进行 DNA 的相对含量分析。

1.5 统计方法

用 SPSS13.0 软件对数据进行 ANOVA 分析,不同组间的平均值通过两独立样本的 *t* 检验进行比较。

2 结果

2.1 紫外线照射时间对卵裂率、早期胚胎存活率和 D 型幼虫发生率的影响

紫外线照射时间与卵裂率、早期胚胎存活率和 D 型幼虫发生率的关系见表 1。其中卵裂率总的趋势是随紫外线照射时间的增加而降低,对照组为 72.9%,30 s 照射组为 57.2%,60 s 照射组仅为 10.7%。早期胚胎存活率随照射时间的加大而逐渐下降,对照组为 79.5%,30 s 照射组降为 44.0%,之后随着照射剂量的增加而回升,至 40 s 照射组达到最高 67.2%,之后再次急剧下降,60 s 照射组仅为 9.4%。对照组 D 型幼虫发生率为 95.1%,随着照射时间的增加,D 型幼虫发生率显著降低,自 25 s 照射组开始,其值变为 0。

2.2 对照组和雌核发育组的胚胎发育速度

对照和雌核发育各实验组胚胎发育速度见表 2。自受精后出现第一极体至 D 型幼虫之间各期,对照组胚胎的发育速度显著快于雌核发育组胚胎的发育速度($P < 0.05$)。

表 1 卵裂率、早期胚胎存活率和 D 型幼虫发生率与不同紫外线照射时间的关系

Tab.1 Relationships between ultraviolet irradiation duration and cleavage rate, survival rate at early embryo stage and development at rate of D-larvae

$n = 3; \bar{X} \pm SD$

实验组编号 Group No.	精子照射时间/s UV irradiation duration of sperm	卵裂率/% Cleavage rate	早期胚胎存活率/% Survival rate at early embryo stage	D 型幼虫发生率/% Developmental rate of D-larvae
1	0	72.9±4.5	79.5±1.2	95.1±0.9
2	10	62.5±3.7	68.7±4.8	50.4±8.0
3	15	61.2±1.7	64.0±3.9	28.2±4.0
4	20	61.1±2.1	56.7±3.2	11.9±1.7
5	25	59.8±3.3	53.5±4.7	0
6	30	57.2±4.2	44.0±5.1	0
7	35	52.6±4.9	52.1±5.7	0
8	40	51.2±6.2	67.2±5.9	0
9	45	36.5±8.6	40.6±6.2	0
10	50	24.9±5.2	29.9±3.3	0
11	55	16.7±3.8	16.7±2.6	0
12	60	10.7±2.7	9.4±1.3	0

表2 对照组和雌核发育组的幼虫发育速度

Tab.2 Embryonic development speed of control and gynogenesis

 $\bar{X} \pm SD$

发育阶段 Developmental stage	对照组/h Control	雌核发育组/h Gynogenesis
第一极体 The first polar body	0.92 ± 0.03 (n = 57)	1.17 ± 0.04 (n = 33)
第二极体 The second polar body	1.25 ± 0.03 (n = 59)	1.50 ± 0.05 (n = 27)
2 细胞 2-cell	1.83 ± 0.05 (n = 62)	2.67 ± 0.09 (n = 17)*
4 细胞 4-cell	2.67 ± 0.09 (n = 78)	3.83 ± 0.13 (n = 22)**
8 细胞 8-cell	3.33 ± 0.09 (n = 66)	5.75 ± 0.17 (n = 43)*
32 细胞 32-cell	4.42 ± 0.12 (n = 51)	7.17 ± 0.22 (n = 25)**
囊胚期 Blastula stage	6.58 ± 0.16 (n = 64)	9.33 ± 0.29 (n = 36)**
原肠期 Gastrula stage	7.83 ± 0.16 (n = 67)	10.50 ± 0.33 (n = 38)**
担轮幼虫 Trochophore	9.33 ± 0.17 (n = 72)	12.42 ± 0.46 (n = 49)**
D 型幼虫 D-larvae	21.25 ± 1.63 (n = 82)	—

注: * 表示与对照组差异显著, $P < 0.05$; ** 表示与对照组差异极显著, $P < 0.01$ 。Note: * Means significant difference between trial and control, $P < 0.05$; ** Means extremely significant difference between trial and control, $P < 0.01$.

2.3 染色体频率分布

各实验组细胞染色体数目的频率分布见图1, 细胞有丝分裂的中期分裂相见图2。对照组染色体数目主要为 $2N=32$, 比例为 81.9% (图2A)。随着照射时间增加, 各照射组染色体 $2N$ 的比例减少, $N=16$ 的单倍体和非整倍体比例都逐渐增加 (图2B, C)。40 s 照射组大部分染色体数目为 16, 单倍体比例为 36.8%, 已无二倍体细胞。60 s 照射组各染色体比例均不具有代表性。

2.4 流式细胞仪测定结果

对照组 (0 s) 和雌核发育组 (40 s) 担轮幼虫的 DNA 相对含量以 DNA 直方图的形式表示 (图3)。对照组和 40 s 照射组的 DNA 相对含量均有 2 个峰: 一个为存在比率较高、DNA 没有开始复制的 G_1 期细胞; 另一个为存在比率较低、DNA 复制完全的 G_2 和 M 期细胞^[14]。其中对照组主峰值为 99.26; 40 s 照射组主峰值为 49.17。二者的比值为 2.02, 说明对照组的 DNA 相对含量基本上为 40 s 照射组的 2 倍, 即 40 s 照射组能有效地诱导产生雌核发育单倍体。

3 讨论

人工诱导雌核发育需要精子的遗传失活和较高的卵裂率, 因此选择一个合适的紫外线照射剂量使精子染色体完全失活而不影响其受精能力是得到雌核单倍体胚胎的关键。在已报道的贝类雌核发育研

究中, 太平洋牡蛎雌核发育单倍体的最佳诱导剂量是紫外线照射强度 $1\ 080\ \mu\text{W}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$, 照射时间 $5 \sim 6\ \text{min}$ ^[6]; 地中海贻贝 $620\ \mu\text{W}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$, $2\ \text{min}$ ^[8]; 栉孔扇贝 $2\ 561\ \mu\text{W}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$, $30\ \text{s}$ ^[10]。可见, 诱导贝类精子遗传失活的紫外线照射剂量因种类的不同而异, 且与精液的密度、厚度以及紫外线的照射强度有关。

本实验从染色体数目分析和流式细胞仪分析的结果可以看出, 虽然栉江珧精子经过强度为 $2\ 561\ \mu\text{W}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 的紫外线照射 $20 \sim 35\ \text{s}$ 均能诱导出雌核发育单倍体, 但二倍体仍然存在。照射精子的时间达到 40 s 时, 二倍体完全消失, 因此诱导栉江珧精子遗传失活而获得雌核发育单倍体的适宜剂量是强度为 $2\ 561\ \mu\text{W}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 的紫外线照射 40 s。

紫外线照射导致精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), 致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^[15]。本实验中随紫外线照射时间的增加, 卵裂率、早期胚胎存活率和 D 型幼虫发生率总体呈下降趋势, 经紫外线照射的精子受精后所产生的单倍体胚胎发育速度明显慢于正常受精所产生的二倍体胚胎。其中照射 25 s 后 D 型幼虫发生率降为 0, 30~40 s 时早期胚胎存活率出现回升, 呈现“Hertwig 效应”。卵裂率下降表明精子激活卵子

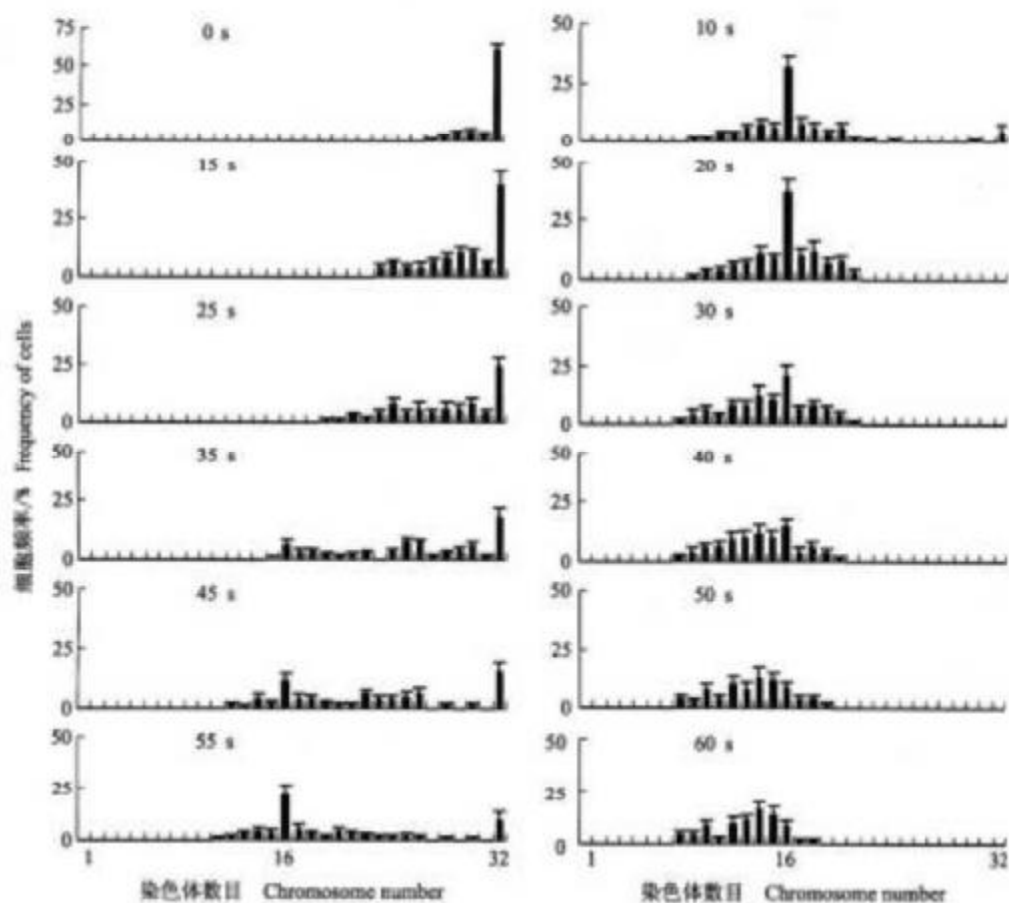


图1 各实验组细胞染色体数目分布频率($n = 1\ 069, \bar{X} \pm SD$)

Fig.1 Frequency distribution of chromosome number in larval cells by various durations of ultraviolet irradiation in three experiments ($n = 1\ 069, \bar{X} \pm SD$)

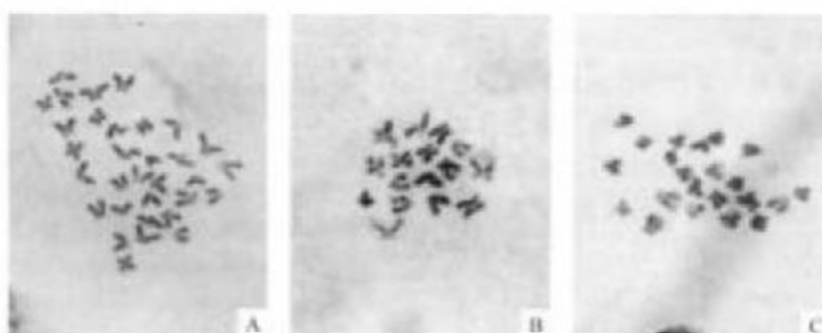


图2 各实验组细胞染色体有丝分裂中期相

A: 对照组二倍体细胞, 染色体数目 32; B: 40 s 照射组单倍体细胞, 染色体数目 16;
C: 25 s 照射组非整倍体细胞, 染色体数目 22.

Fig.2 Mitotic metaphase plates of the larval cells from various experimental groups

A: A diploid cell with 32 chromosomes from the control group, $\times 330$;
B: A haploid cell with 16 chromosomes from the 40 s irradiation group, $\times 330$;
C: An aneuploid cell showing 22 chromosomes from the 25 s irradiation group, $\times 330$.

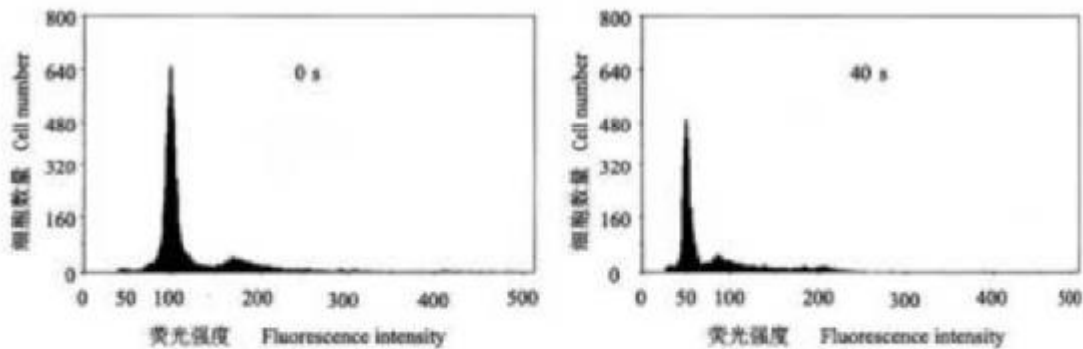


图3 对照二倍体组(0 s)和雌核发育组(40 s)担轮幼虫的DNA相对含量

Fig. 3 Histograms of fluorescence intensity from diploid control and 40 s irradiated trochophore larvae by flow cytometry

的能力随紫外线照射剂量的增加而降低,原因可能是精子中一些与受精力、胚胎发育相关的功能结构受到破坏的程度增大,从而减弱了精子的受精力,造成受精率下降。Pan等^[16]在栉孔扇贝的精子遗传失活研究中发现,紫外线照射不仅可以破坏精子的顶体和鞭毛,还可以损伤细胞膜、核膜、线粒体嵴等内部构造。“Hertwig效应”产生的原因可能是由于高辐射剂量能完全破坏精子的遗传物质,导致产生的单倍体胚胎比低剂量诱发出来的具有显性致死突变基因的非整倍体胚胎存活时间长^[17]。该现象在鱼类的雌核发育单倍体诱导中较为常见^[18-21],在皱纹盘鲍^[22]、太平洋牡蛎^[23]、合浦珠母贝^[12]、栉孔扇贝^[16]等贝类的雌核发育研究中有报道。

各照射组均出现非整倍体,贝类中有关非整倍体的报道已见于皱纹盘鲍^[5,24]、太平洋牡蛎^[6]、贻贝^[7]、虹彩扇贝^[11]的雌核发育和栉孔扇贝的雄核发育^[25]。由于紫外线的照射剂量决定精子染色体的失活程度,因此实验中出现非整倍体可能是低剂量紫外线造成精核染色体部分失活的结果,即未完全失活的精子染色体入卵后与卵核结合,所生成的合子则为非整倍体。Watson等^[26]认为在特定的酶作用下,由紫外线引起的DNA损伤可以被光修复,这同样可以导致父本染色体部分参与核分裂,从而导致非整倍体的产生。因此,在紫外线照射精子的过程中提高处理的均一性十分重要。

参考文献:

- [1] Arai K. Chromosome manipulation. Fish DNA: Molecular Genetic Approaches (in Japanese) [M]. Tokyo: Koseisha - Koseikaku, 1997, 32-62.
- [2] Purdom C E, Thompson D, Lou Y D. Genetic engineering in rainbow trout *Salmo gairdnerii* Richardson, by suppression of meiotic and mitotic metaphase [J]. J Fish Biol, 1985, 27:73-79.
- [3] Oozano H. Diploidization of gynogenetically activated salmonid eggs using hydrostatic pressure [J]. Aquaculture, 1984, 43:91-97.
- [4] Taniguchi N, Kijima A, Fukai J, et al. Conditions to induce triploid and gynogenetic diploid in ayu *Plecoglossus altivelis* [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1986, 52:49-53.
- [5] Li Q, Osada M, Kashiwara M, et al. Artificially induced gynogenetic diploid in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* [J]. Fish Genet Breed Sci, 1999, 28:85-94.
- [6] Li Q, Osada M, Kashiwara M, et al. Induction of gynogenetic diploids and cytological studies in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Suisanronboku, 2000, 48 (2):185-191.
- [7] Fairbrother J E. Viable gynogenetic diploid *Mytilus edulis* (L.) larvae produced by ultraviolet light irradiation and cytochalasin B shock [J]. Aquaculture, 1994, 126:25-34.
- [8] Scurpa J, Komaru A, Wade K T. Gynogenetic induction in the mussel, *Mytilus galloprovincialis* [J]. Bull Natl Res Inst Aquac, 1994, 23:33-41.
- [9] Gorwani U. Sperm density required for inducing gynogenetic haploidy in scallop *Chlamys nobilis* [J]. Indian J Mar Sci, 1991, 20:255-258.
- [10] Pan Y, Li Q, Yu R H, et al. Induction of gynogenetic diploids and cytological studies in the shikong scallop, *Chlamys farreri* [J]. Aquat Living Resour, 2004, 17:201-206.
- [11] Li Q, Osada M, Kashiwara M, et al. Effects of ultraviolet irradiation on genetical inactivation and morphological structure of sperm of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis* [J]. Aquaculture, 2000, 186:233-242.
- [12] 许国强, 林岳光, 李刚, 等. 人工诱导合浦珠母贝雌核二

- 倍体发生及“Hertwig”效应的初步研究[J]. 热带海洋, 1990, 9(2):1-7.
- [13] 潘英, 李琪, 王如才, 等. 海洋贝类雌核发育研究进展和展望[J]. 水产学报, 2002, 26(5):465-471.
- [14] Bruce A, Dennis B, Julian L, et al. Molecular biology of the cell [M]. New York: Garland Publishing, 1994.
- [15] 楼允东. 人工雌核发育及其在遗传学和水产养殖上的应用[J]. 水产学报, 1986, 10(1):111-123.
- [16] Pan Y, Li Q, Yu R H, et al. Induction of gynogenesis and effects of ultraviolet irradiation on ultrastructure of sperm of the Zhikong scallop, *Chlamys farreri* [J]. Fish Sci, 2004, 70:487-496.
- [17] Ijiri K I, Egami N. Hertwig effect⁺ caused by UV irradiation of sperm *Oryzias latipes* (teleost) and its photoactivation [J]. Mutation Res, 1980, 69:241-248.
- [18] Nagy A, Rajki K, Horvath L, et al. Investigation on carp, *Cyprinus carpio* L. gynogenesis [J]. J Fish Biol, 1978, 13:214-224.
- [19] Chourrout D, Chevassus B, Hericux F. Analysis of the Hertwig effect⁺ in the rainbow trout *Salmo gairdneri* (Richardson) after fertilization with irradiated sperm [J]. Reprod Nutr Dev, 1980, 20:719-726.
- [20] Ijiri K I. Gamma-ray irradiation of the sperm of the fish *Oryzias latipes* and induced gynogenesis [J]. J Radiat Res, 1980, 21:263-270.
- [21] Onozato H. The Hertwig effect⁺ and gynogenesis in chum salmon *Oncorhynchus keta* eggs fertilized with ⁶⁰Co γ ray irradiated milt [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1982, 48:1237-1244.
- [22] Arai K, Naito F, Sasaki H, et al. Gynogenesis with ultraviolet ray irradiated sperm in the Pacific abalone [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1984, 50:2019-2023.
- [23] Guo X, Hershberger W K, Cooper K, et al. Artificial gynogenesis with ultraviolet light-irradiated sperm in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Induction and survival [J]. Aquaculture, 1993, 113:201-214.
- [24] Kijima A. Effect of UV irradiation on genetic inactivation of sperm using marketing tissue culture petri dish in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* [J]. Tohoku J Agric Res, 1992, 42:73-81.
- [25] 袁媛, 李琪, 于瑞海, 等. 紫外线诱导栉孔扇贝雌核发育的研究[J]. 水产学报, 2004, 28(2):133-138.
- [26] Watson J D. Molecular Biology of the Gene [M]. London: W A Benjamin, Inc. 1975.

Artificial induction of gynogenesis in *Atrina pectinata*

YANG Qing¹, LI Qi¹, YU Rui-hai¹, LI Ji-qing²

(1. The Key Laboratory of Mariculture of the Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Wendei Mariculture Company, Weihai 264210, China)

Abstract: The effects of ultraviolet (UV) irradiation on genetic inactivation of sperm were examined in the *Atrina pectinata*. The sperms irradiated by UV at an intensity of 2 561 W/(cm²·s) for various durations were fertilized with the normal eggs. With increasing irradiation time, the rates of cleavage, survival at the early embryo stage, and development of D-larvae decreased, and the development of the eggs fertilized with the genetically inactivated sperm terminated before reaching the D-larvae stage. The development speed of gynogenetic embryos was later than that of the control group, and aneuploids were found in this study. The obvious improved survival of trochophore larvae with a peak at 40 s UV exposure suggested the presence of a Hertwig effect in the gynogenesis of *A. pectinata*. When sperms were irradiated for 40 s, the cleavage rate was relatively high (51.2%), the developmental rate of D-larvae became zero, and the rate of haploid reached the highest (36.8%). As effective induction of haploid gynogenesis required the inactivation of sperm DNA and high cleavage rate, UV irradiation at an intensity of 2 561 W/(cm²·s) for 40 s was considered to be the optimum dose to achieve haploid gynogenesis in the *A. pectinata*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2):310-315]

Key words: *Atrina pectinata*; gynogenesis; ultraviolet irradiation; Hertwig effect

Corresponding author: LI Qi. E-mail: qili66@mail.ouc.edu.cn