

长牡蛎非整倍体的制备、 胚胎发育及存活能力

巩 宁^{1,2}, 张国范¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要:通过二倍体、三倍体杂交的方法制备长牡蛎(*Crassostrea gigas*)非整倍体。实验组设为 $2n♀ \times 3n♂$ 组、 $3n♀ \times 2n♂$ 组和 $3n \times 3n$ 组, 对照组为 $2n \times 2n$ 组。与对照组相比, 实验组畸形率高, 担轮虫孵化率及D形幼虫生成率等参数均降低, 幼虫死亡率高。在担轮幼虫向D形幼虫转化期, 实验组发育滞后。培育过程中染色体数为25左右的非整倍体不能存活, 整倍体和染色体数与整倍体接近的非整倍体能够存活。实验证实该方法是进行贝类非整倍体制备的有效手段。

关键词:长牡蛎; 非整倍体; 制备; 胚胎发育; 存活能力

中图分类号: Q959.215

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2003)01-005-05

非整倍体是整倍体中某一条或几条染色体增加或缺少的变异类型。在曼陀罗、玉米和番茄等植物中均有发现^[1]。但在高等动物中, 非整倍体常常不能存活或引起发育障碍。在鱼类, 非整倍体的胚胎发育畸形, 中途死亡^[2-3]。

近几年随着海洋贝类多倍体研究的开展, 人们发现了非整倍体的长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、合浦珠母贝(*Pinctada martensii*)和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*), 证明贝类可以耐受个别染色体的增减^[4-7]。通过研究人们发现, 贝类非整倍体是遗传育种研究中十分特殊的实验材料。研究非整倍体发生的机制、各种非整倍体类型及其生物学特性, 对基因定位、基因组作图及多倍体育种等均有重要的意义^[8-9]。

长牡蛎是进行贝类多倍体及非整倍体研究较早的种类。其正常二倍体的染色体数目为 $20(2n=20)$ 。目前发现, 至少有7种类型的非整倍体可以存活至成体^[6]。由于非整倍体在遗传育种研究中的特

殊性和珍贵性, 制备各种非整倍体并探讨它们的形成机制就显得非常重要。本研究通过二倍体与三倍体杂交的方法来制备非整倍体长牡蛎, 并对其胚胎发育及存活能力进行初步探讨, 以期对贝类遗传和基因组研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

长牡蛎取自大连开发区大孤山海区人工养殖群体, 三倍体牡蛎1998年用6-DMAP诱导处理产生。二倍体与三倍体牡蛎在同一条件下人工促熟。

1.2 方法

亲贝性成熟后, 采用解剖法获取精卵, 分4组授精: $2n \times 2n$ (DD组)、 $2n♀ \times 3n♂$ (DT组)、 $3n♀ \times 2n♂$ (TD组)、 $3n \times 3n$ (TT组)。常规方法培育幼虫。担轮幼虫期采用热滴片法检查染色体数目。培育过程中取样用流式细胞仪(FCM)测定倍性组成。

2 结果

2.1 子代胚胎发育

与对照组(DD组)相比, DT、TD、TT组在囊胚期畸形率较高, 分裂球甩出体外或不规则(图1)。在担轮幼虫向D形幼虫转变时期, 实验组明显滞后于DD组(表1), 担轮幼虫孵化率、D形幼虫生成率等

收稿日期: 2002-03-11。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970590); 国家杰出青年基金资助项目(39825121)。

作者简介: 巩宁(1975-), 女, 博士研究生, 从事贝类遗传育种研究。

通讯作者: 张国范, E-mail: gkzhong@ms.qdio.ac.cn

表 1 实验各组发育情况

Table 1 Embryonic development ratios of experimental groups

%

受精时间/h Hours after fertilization	对照组(DD) Control group		实验组(DT,TD,TT) Experimental groups	
	担轮幼虫 Trochophore	D形幼虫 D-stage	担轮幼虫 Trochophore	D形幼虫 D-stage
22	76.5	23.5	> 95	< 5
24	15	85	70	30
26	5	95	32	68
28	< 5	> 95	20	80

表 2 实验各组参数比较

Table 2 Comparison of parameters among experimental groups

%

组别 Group	受精率 Fertilization rate	担轮幼虫 Trochophore		D形幼虫 D-stage	
		孵化率 Rate of hatchery	畸形率 Rate of abnormality	生成率 Rate of D-stage	畸形率 Rate of abnormality
DD	88.3	76.8	13.6	83.5	19.3
DT	89.1	65.3	54.6	16.7	53.7
TD	75.4	49.1	55.9	15.6	42.5
TT	28.6	34.8	63.8	8.9	46.8

参数均较低、畸形率较高(表 2),幼虫大量死亡。

片结果见图版 I。

3 讨论

3.1 贝类非整倍体的类型及其发生的途径

贝类非整倍体的类型及其发生途径主要有以下几种:(1)抑制正常二倍体卵子第一极体(PBI)的排放。这将会改变染色体的正常分离而产生新的分离方式。其中,三极分离方式导致非整倍体的发生^[10]。(2)二倍体、三倍体杂交,由于三倍体会产生非整倍体的配子^[11],与二倍体配子结合将产生 $2n$ 与 $3n$ 之间的非整倍体。(3) $2n♀ \times 4n♂$,在产生三倍体的同时,也发现了 $2n-1$ 、 $3n-1$ 、 $3n-2$ 、 $3n+1$ 等多种类型的非整倍体^[5-6],这可能是四倍体父本配子形成过程中个别染色体不分离,而出现染色体数目的增多或减少。(4)污染海区的自然群体和养殖群体中偶发非整倍体^[12-13]。

对多倍体育种来说,非整倍体的存在会影响幼虫的成活率和倍化率,从而直接关系到育苗的成败。因此,设法降低非整倍体的比率十分必要。

3.2 非整倍体的制备和鉴定

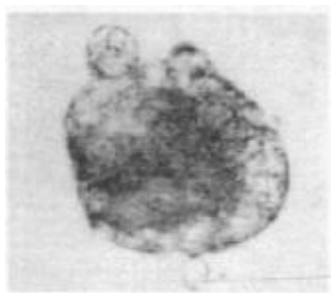


图 1 畸形幼虫(分裂球甩出体外)

Fig. 1 Abnormal embryo

2.2 非整倍体的存活能力

通过流式细胞仪(FCM)检测 DD、DT、TD 组幼虫的倍性组成。DD 组始终为二倍体($2n$)。DT 组在受精后 12 h 和 30 h 时,幼虫倍性主要为 $2.5n$,受精后 5 d 变为 $2n$ 。TD 组在受精后 12 h 为 $2.5n$,30 h 时形成 $2n$ 和 $3n$ 2 个峰(图 2)。担轮幼虫染色体滴

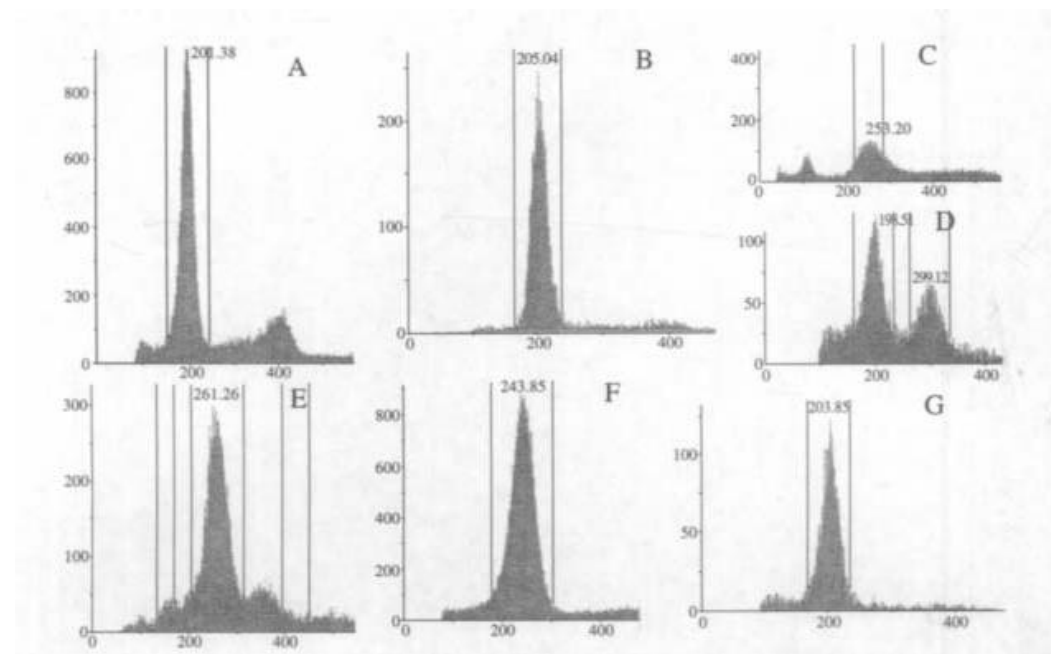


图2 长牡蛎幼虫 FCM 图

Fig.2 Flow cytometry analysis of Pacific oyster larvae

本文所研究的非整倍体主要是染色体数在 $2n$ 与 $3n$ 之间的个体。通过 $2n$ 与 $3n$ 杂交的方法制备非整倍体的比例较高,在 50% 以上。但由于三倍体牡蛎育性较差,难以得到性腺发育良好的亲贝,给制备带来一定困难。

关于非整倍体的鉴定,我们采用担轮幼虫期染色体滴片法。牡蛎科的染色体数目在国内外均有报道,无论是采用成体鳃、生殖腺等组织还是胚胎,其二倍体染色体数目均为 20。由此可见,该科种类的染色体数目表现出很大的保守性^[14]。因此,我们得到的染色体分布结果,除制片过程中染色体丢失造成的误差外,可以看出确实存在非整倍体的胚胎。从本研究来看,二倍体、三倍体杂交是进行贝类非整倍体制备的一种有效的方法。

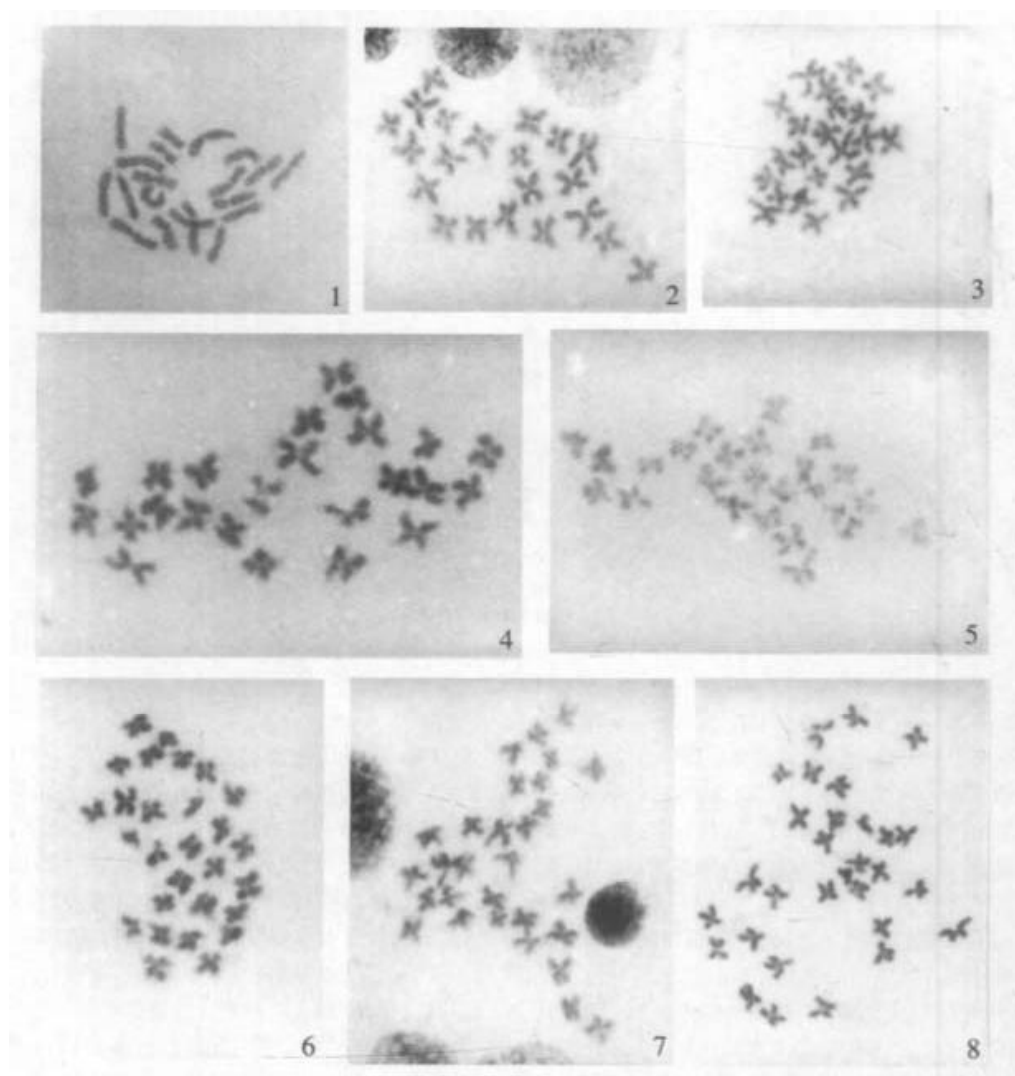
对成体非整倍体的筛选来说,在确定非整倍体确切染色体数目只能采用染色体计数法的条件下,难以获得已知倍性的非整倍体活体,这就为其生殖生理研究造成困难。因此,需要寻找一种取样量少,能保持被测对象生活力的染色体制片方法。

3.3 非整倍体的存活能力

Guo 等^[15]用流式细胞仪(FCM)检测了 TD 组在受精后第 1 天和第 7 天的倍性,发现受精后第 1 天的幼虫其 FCM 检测峰为 $2.5n$,第 7 天的峰向 $2n$ 靠近。到 13 d 时,幼虫大量死亡,在受精后 35 d,检测了 2 个存活的稚贝,发现 1 个为二倍体,另 1 个为三倍体。我们在实验中发现 TD 组、DT 组幼虫分别在 2 d 和 5 d 后就大量死亡,与 Guo 的数据有偏差,这可能与精卵的质量及培养条件的差异有关。但实验结果均表明:染色体数在 25 左右的非整倍体不能成活,到面盘幼虫后期,杂交组中只有整倍体和与整倍体染色体数接近的非整倍体成活。TT 组亲贝产生的配子数量少,且受精率低,幼虫数目较少,难以培养。

3.4 非整倍体的形成机制

有关非整倍体的形成机制,目前的研究还比较少。Wang 等^[6]报道非整倍体的形成可能是减数分裂中联会时出现多倍体的结果。三倍体、二倍体杂交过程中形成的非整倍体,主要是三倍体产生了非整倍体配子的结果。非整倍体的配子与正常二倍体配子杂交或它们之间交配,就形成了非整倍体的子



图版 I 长牡蛎二倍体、三倍体及各种非整倍体幼虫期染色体分裂相
Plate I Chromosome metaphases from diploid, triploid and aneuploid Pacific oyster

代。关于受精过程中染色体的配对情况,还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 李国珍.染色体及其研究方法[M].北京:科学出版社,1985.
- [2] 单仕新,梁绍昌,蒋一桂.三倍体方正银鲷同二倍体红鲷杂交胚胎的非整倍体发育[J].水产学报,1985,9(2):199-201.
- [3] Zhang Q, Arai K. Aberrant Meiosis and viable aneuploid progeny of induced triploid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) when crossed to natural tetraploids[J]. Aquaculture, 1999, 175:63-76.
- [4] 李 飏,张国范,刘淑范,等.三倍体牡蛎性腺发育的组织学研究[J].大连水产学院学报,1999,14(2):1-6.
- [5] 何毛贤,林岳光,沈 珏,等.合湾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.
- [6] Wang Z, Guo X, Allen S K, et al. Aneuploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) as incidentals from triploid production[J]. Aquaculture, 1999, 173:347-357.
- [7] Yang H, Que H, He Y, et al. Chromosome segregation in fertilized eggs from Zhikong scallop *Chlamys farreri* (Jones & Preston) following polar body I inhibition with cytochalasin B[J]. J Shell Res, 2000, 19(1):101-105.
- [8] Chetelat R T, Rick G M, Cisneros P, et al. Identification, transmission, and cytological behavior of *Solanum lycopersicoides* Dun., monosomic alien addition lines in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)[J]. Genome, 1998, 41 (1):40-50.
- [9] Yen Y, Baenziger P S. Chromosomal locations of genes that control major RNA degrading activities in common wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Theor Appl Gen, 1996, 93(4): 645-648.
- [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*: II. Segregation of Chromosomes[J]. Biol Bull, 1992, 183:381-386.
- [11] Que H, Guo X, Zhang F, et al. Chromosome Segregation in Fertilized Eggs from Triploid Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), Following Inhibition of Polar Body [J]. Biol Bull, 1997, 193:14-19.
- [12] Thiriot-quiévreux C, Noel T, Baugrier S, et al. Relationships between aneuploidy and growth rate in pair matings of the oyster *Crassostrea gigas* [J]. Aquaculture, 1988, 75:89-96.
- [13] Leito A, Boudry P, Thiriot-quiévreux C. Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: ten years of evidence [J]. Aquaculture, 2001, 193:39-48.
- [14] 相建海.海洋动物细胞和种群生化遗传学[M].济南:山东科学技术出版社,1999.
- [15] 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]. Mol Marine Biol Biot, 1994, 3(1):42-50.

Embryo development and survival of aneuploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* produced by mating its triploids and diploids

GONG Ning^{1,2}, ZHANG Guo-fan¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. The Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The aneuploids Pacific oyster *Crassostrea gigas* were produced by $2n\text{♀} \times 3n\text{♂}$ (DT group), $3n\text{♀} \times 2n\text{♂}$ (TD group) $3n \times 3n$ (TT group). The control group was $2n \times 2n$ (DD group) and Compared to the DD group, the other three groups had more abnormal embryos and their embryo development delayed much more during the D-stage. The embryos with 25 chromosomes couldn't survive during the cultivation, but only got 2n larvae peak in number at fifth day. For the DT group, 2.5n larvae dominated when tested at 12th hour and 30th hour after the fertilization. For the TD group, 2.5n larvae got to the peak in number in 12 h after the fertilization, and 30 h later, 2n and 3n larvae both got to their peaks. The results show that the way of aneuploid producing used in this experiment is reliable.

Key words: *Crassostrea gigas*; aneuploid; embryo development; survival

Corresponding author: ZHANG Guo-fan.