

扇贝异源三倍体诱导

孟庆磊¹, 黄晓婷¹, 赵海波¹, 赵婷², 李宁¹, 王昭萍², 胡晓丽¹, 胡景杰¹, 包振民¹

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 荧光显微观察表明, 20℃水温下, 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 的卵与海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 的精子可以正常受精和发育, 具备人工诱导三倍体的可行性。亲贝充分促熟后, 分开催产, 以 20:1 的精卵比授精; 在 50% 的受精卵排出第 1 极体时, 以 60 mg/L 6-二甲基氨基嘌呤 (6-DMAP) 处理受精卵 10~25 min, 可诱导 75.23%~92.14% 的三倍体; 6-DMAP 处理 15 min 综合诱导效果最好, 三倍体诱导率可达 88.56%, 孵化率可达 53.52%。得到的三倍体幼虫经基因组原位杂交 (Genomic *in situ* hybridization, GISH) 验证, 为含有 2 套栉孔扇贝染色体组和 1 套海湾扇贝染色体组的异源三倍体。孵化后诱导组与杂交对照组 (未经 6-DMAP 处理) 幼虫生长越来越缓慢, 受精后 14 d 其幼虫存活率分别下降到 0.000 67% 和 0.002 24%, 没有幼虫度过附着变态期。GISH 分析显示, 栉孔扇贝与海湾扇贝不同倍性的杂种后代早在担轮幼虫阶段就出现母本偏向性染色体转变。[中国水产科学, 2009, 16(5): 718-727]

关键词: 扇贝; 异源三倍体; 基因组原位杂交; 染色体转变

中图分类号: S91

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)05-0718-10

多倍体育种已在多种经济贝类中取得了突破性进展^[1-2]。应用化学或物理等诱导方法通过抑制第一极体或第二极体的排放从而培育贝类的多倍体, 已经是较为成熟的技术^[3]。扇贝很容易发生种间远缘杂交。毕克等^[4]发现扇贝种间杂交时, 异源精子能够正常进入卵子, 激发卵子的受精生物学进程, 如排出极体, 雄核原核化, 雄核雌核融合, 进而发生第一次卵裂等。这提示, 如人工抑制种间异源受精的扇贝卵子第一或第二极体的释放, 诱导产生异源多倍体, 是否会产生新的遗传性状、新的种质, 乃至新的物种。异源多倍体的诱导和应用在鱼类已有成功的先例^[5,6], 而在贝类中报道很少, 仅见栉孔扇贝 (♀) × 虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) (♂) 异源多倍体诱导技术与机理方面的探讨^[7-9]。理论上, 异源三倍体具有杂交育种和多倍体育种的双重优势, 因此具有良好的应用前

景^[10]。栉孔扇贝是中国北方养殖的重要经济贝类, 海湾扇贝是引进的广温性贝类, 二者同科不同属, 生物学差异明显且具有互补性。本研究应用 6-二甲基氨基嘌呤 (6-DMAP) 抑制第二极体释放以诱导栉孔扇贝异源三倍体, 并通过对栉孔扇贝 (♀) × 海湾扇贝 (♂) 受精过程和早期胚胎发育的细胞学观察, 以及对诱导后代的遗传组成进行基因组原位杂交 (Genomic *in situ* hybridization, GISH) 分析, 探讨异源三倍体扇贝的诱导机理和细胞遗传学等问题, 旨在丰富扇贝的多倍体诱导理论, 为开展贝类异源多倍体育种, 研究贝类物种进化以及研制新型遗传材料提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 和海湾扇贝 (*Argopecten*

收稿日期: 2009-02-13; 修订日期: 2009-03-03.

基金项目: 国家 863 计划项目 (2006AA10A408); 农业部公益性行业科研专项 (nyhyzx07-047); 国家支撑计划项目 (2006BAD01A13); 国家科技基础条件平台建设项目 (2005DKA30470).

作者简介: 孟庆磊 (1980-), 博士研究生, 从事贝类遗传育种研究. E-mail: qingleimeng@126.com

通讯作者: 胡晓丽 (1970-), 副教授. 主要从事贝类遗传育种研究. Tel: 0532-82031970; E-mail: hxl707@ouc.edu.cn

irradians) 亲本均取自烟台常飞海珍品育苗场, 积温法促熟。HOECHST33258 荧光染料购自江苏碧云天公司。6-二甲基氨基嘌呤(6-dimethylaminopurine, 简称 6-DMAP) 为 Sigma 公司产品。地高辛-切口平移探针标记试剂盒(DIG-Nick translation Kit) 为 Roche 公司产品。流式细胞仪为 Partec 公司 PA II 型。

1.2 方法

1.2.1 受精与荧光显微观察 栉孔扇贝雌贝于 16 °C 水温暂养, 升温法刺激产卵。海湾扇贝雄贝于 20 °C 水温暂养, 阴干法刺激排精; 如果精卵同时排放, 以 500 目筛绢过滤除卵。授精于 20 °C 沙滤海水中进行。授精后 30 min 内, 每隔 5 min 取样 1 次; 从 30 min 到 60 min, 每隔 10 min 取样 1 次; 从 60 min 到 150 min, 每隔 30 min 取样 1 次。取出的样品分别在用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.2) 配制的 2% 戊二醛和 2.5% 多聚甲醛中固定。样品经 0.1 μg/mL HOECHST33258 荧光染料于黑暗中染色 5 min, 轻微压片后, 在 Nikon E-600 荧光显微镜紫外激发光(365 nm) 下观察。得到的图象通过 CCD 摄相机(CHCO) 进行拍摄和记录^[4]。

1.2.2 异源三倍体诱导与培育 以 10 只栉孔扇贝雌贝为母本, 催产后将 1/6 的卵子与 3 只雄性栉孔扇贝的精子授精, 用作自交对照。剩余卵子用 3 只海湾扇贝的精子授精, 为促进受精过程同步化, 授精时精卵比例控制在 20:1 左右^[11]; 授精后 7~10 min, 以 500 目筛绢洗卵 3 次, 并将受精卵等分成 5 组。诱导在 100 mL 水体中进行, 受精卵浓度为 10 000~30 000 粒/mL。根据已报道的扇贝三倍体诱导条件, 选择 50% 的受精卵排出第 1 极体作为处理时机^[12], 以 60 mg/L 6-DMAP 为诱导药物剂量^[13], 分别处理 0 min (杂交对照组)、10 min、15 min、20 min、25 min。诱导结束后, 洗卵 3 次, 移入 60 L 大桶孵化, 孵化密度为 40~50 粒/mL。胚胎发育至 D 形幼虫时用 260 目筛绢选优, 幼虫培育密度为 10~20 粒/mL。投喂等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)、新月菱形藻(*Nitzschia closterium*) 和扁藻(*Platymonas subcordiformis*), 每日换水 1 次, 每次 1/2, 3~5 d 倒桶 1 次。

授精、孵化和幼虫培育均于 20 °C 沙滤海水中进

行。统计受精率为分裂卵数占总卵数的百分比, D 形幼虫孵化率为 D 形幼虫数占分裂卵数的百分比。三倍体率采用流式细胞仪检测 D 形幼虫的相对 DNA 含量确定。综合评价指数(I_E) 为三倍体率与孵化率乘积的百分数。诱导实验采用不同的亲本重复 3 次。

1.2.3 基因组原位杂交 染色体制作: 以担轮幼虫为材料, 使用海水配制的 0.01% 秋水仙素处理 2.5 h, 0.075 mol/L KCl 低渗处理 20~30 min, 卡诺氏固定液(乙醇: 冰醋酸体积比 3:1) 充分固定, 热滴片法制片。以海湾扇贝或者栉孔扇贝基因组 DNA 制作探针, 采用地高辛-切口平移探针标记试剂盒进行标记, 具体方法参照 Roche 公司提供的产品说明进行。

杂交方法参照 Huang 等^[14]略作修改。荧光原位杂交采用分别变性的方法, 具体包括: (1) 染色体标本的变性: 在含有 70% 甲酰胺的 2×SSC 溶液中 70 °C 变性 3 min, 立即置于 -20 °C 预冷的 70%、90% 和 100% 酒精中逐级脱水, 空气干燥; (2) 探针变性: 含探针杂交液 80 °C 变性 5 min, 立即置软冰中冷却 10 min 以上; (3) 杂交: 将变性后的杂交液 20 μL 加到染色体标本上, 盖上盖玻片, 封口膜包好, 37 °C 杂交过夜。杂交后的染色体标本经 2×SSC 溶液溶解的 50% 甲酰胺和 1×SSC 溶液洗脱后, 加 30 μL 封阻液(3% BSA, 4×SSC, 0.1% 吐温-20), 加盖玻片置暗盒中 37 °C 温育 20 min。加 30 μL 10 μg/mL 的罗丹明(Rhodamine Avidin DCS) 于标本上, 加盖玻片置暗盒中 37 °C 温育 1 h。标本于洗脱液(4×SSC, 0.1% 吐温-20) 中洗脱后, 加 30 μL 1 μg/mL DAPI 复染。结果采用 Nikon E-600 荧光显微镜罗丹明/DAPI 滤镜组合观察, 通过 CCD 摄相机(CHCO) 进行拍摄, 得到的数字图象经 LUCIA 分析系统进行分析。

2 结果与分析

2.1 栉孔扇贝(♀) × 海湾扇贝(♂) 受精过程与早期胚胎发育

20 °C 水温条件下, 栉孔扇贝(♀) × 海湾扇贝(♂) 远缘杂交的受精率可达 75% 以上。精子、卵子、受精卵及胚胎核 DNA 被 HOECHST33258 染色后在 365 nm

激发光下呈现出亮蓝色荧光,受精卵发育过程中的染色体形态及行为如图1所示。受精后5 min,大多数卵膜周围已经有精子附着,此时卵子处于第1次减数分裂中前期(图1-A);受精后10~15 min,大部分精子完成顶体反应开始进入卵子,并激活卵子开始第1次减数分裂(图1-B);受精后20~25 min,大部分受精卵完成第1次减数分裂,开始排放第1极体(图1-C);受精后30 min,受精卵第1极体完全排出(图1-D);受精后30~40 min大部分受精卵开始进行第2次减数分裂,开始排放第2极体(图1-E);受精后40~50 min,

受精卵第2极体完全排出,同时早期精卵原核形成(图1-F);受精后60~90 min,精卵原核继续膨大扩散,逐渐靠近并完成融合,形成胚胎染色质(图1-G);部分胚胎极叶开始伸出并进行第1次有丝分裂(图1-H);受精后120~150 min,大部分胚胎开始进行第2次有丝分裂(图1-I)。与母本栉孔扇贝自交对照组相比,栉孔扇贝和海湾扇贝杂种受精卵发育表现迟缓。杂种受精卵出现第1极体的时间较对照平均推迟约10 min,出现第2极体的时间平均推迟约20 min。

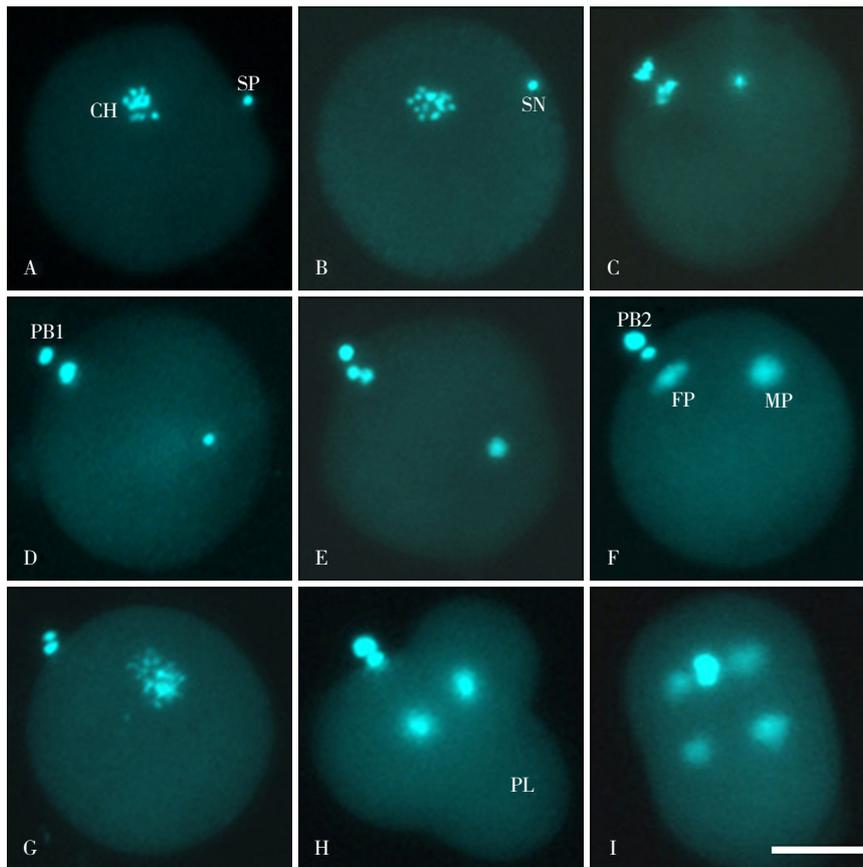


图1 栉孔扇贝(♀)×海湾扇贝(♂)受精过程与早期胚胎发育

A: 精子附卵; B: 精子入卵; C: 第1次减数分裂; D: 排出第1极体; E: 第2次减数分裂; F: 排出第2极体,形成雌雄原核; G: 雌雄原核融合; H: 第1次有丝分裂,伸出极叶; I: 第2次有丝分裂,进入4细胞期。

CH: 染色体; FP: 雌性原核; MP: 雄性原核; PB1: 第1极体; PB2: 第2极体; PL: 极叶; SP: 精子。A-I放大比例相同,标尺=20 μm。

Fig. 1 Fertilization of *C. farreri* (♀) × *A. irradians* (♂) cross and early embryonic development

A: Sperm attaching to the egg; B: sperm penetrating into the egg; C: meiosis metaphase I; D: release of the first polar body; E: meiosis metaphase II; F: release of the second polar body and formation of female and male pronucleus; G: fusion of female and male pronucleus; H: first cleavage and forming polar lobe; I: second cleavage.

CH: chromosome; FP: female pronucleus; MP: male pronucleus; PB1: first polar body; PB2: second polar body; PL: polar lobe; SP: sperm. A-I are at the same magnification, scale bar=20 μm.

2.2 异源三倍体诱导

20 ℃水温条件下,以50%的受精卵排出第1极体为处理时机,用60 mg/L 6-DMAP处理10~25 min均可诱导异源三倍体。诱导持续时间对受精率影响

不显著,但随着持续时间的延长,三倍体比例逐渐提高,而孵化率随之下降。综合评价指数表明,处理15 min效果最好,三倍体诱导率可达88.56%, D形幼虫孵化率可达53.52%(表1)。

表1 异源三倍体诱导结果
Tab. 1 Results of allotriploid induction

组别 Group	诱导持续时间/min Duration time	受精率/% Fertilization rate	D形幼虫孵化率/% Incubation rate	三倍体率/% Triploidy rate	综合评价指数/% I_E
异源三倍体诱导组 FFI	10	77.73 ± 16.72	60.25 ± 5.45	75.23 ± 8.05	45.33
	15	76.26 ± 17.48	53.52 ± 5.27	88.56 ± 7.01	47.40
	20	74.71 ± 17.42	50.31 ± 3.59	91.25 ± 6.42	45.90
	25	74.88 ± 18.54	44.63 ± 4.66	92.14 ± 5.02	41.12
栉孔扇贝与海湾扇贝海 杂交对照 FI	0	78.25 ± 16.96	77.39 ± 9.80	0	0
栉孔扇贝自交对照 FF	0	80.50 ± 14.31	83.03 ± 7.52	0	0

注: 受精率为分裂卵数占总卵数的百分比; 孵化率为D形幼虫数占分裂卵数的百分比; 三倍体率采用流式细胞仪检测D形幼虫相对DNA含量确定; 综合评价指数(I_E)为三倍体率与孵化率乘积的百分数。

Note: Fertilization rate is the percentage of divided eggs in total eggs. Incubation rate is the percentage of D-stage larvae in total fertilized eggs. Triploidy rate of D-stage larvae was determined by flow cytometry. General evaluation index (I_E) is the product of triploidy rate and incubation rate.

2.3 幼虫生长与存活

孵化后诱导组幼虫平均壳长($109.75 \pm 3.19 \mu\text{m}$)比杂交对照组($112.75 \pm 2.63 \mu\text{m}$)和自交对照组($113 \pm 2.16 \mu\text{m}$)稍小($P < 0.05$),两对照组壳长无显著差异($P < 0.05$);诱导组与杂交对照组生长越来越慢,受精后14 d壳长分别为($148.42 \pm 2.57 \mu\text{m}$)和($147.50 \pm 3.11 \mu\text{m}$),而此时自交对照组平均壳长达($173.25 \pm 4.92 \mu\text{m}$) (图2-A)。诱导组受精后2 d存活率仅(52.18 ± 6.14)%,显著低于杂交对照组(77.33 ± 9.80)%和自交对照组(83.03 ± 7.52)% ($P < 0.05$);各组受精后6~10 d存活率均明显下降;受精后14 d诱导组幼虫存活率为(0.00067 ± 0.00054)%,杂交对照组为(0.00224 ± 0.00187)%均急剧下降,而自交对照存活率达(40.35 ± 4.08)% (图2-B)。受精后15 d,自交对照组幼虫约30%出现眼点,而诱导组与杂交对照组均未出现眼点或足,各组均投聚氯乙烯网片附着基供幼虫附着变态。受精后60 d,诱导组与杂交对照组均未见存活稚贝,而自交对照组平均存活率为(3.30 ± 0.52)%。

2.4 GISH分析

每组选取100个分散较好的分裂相进行染色体数目统计(表2)和GISH分析(图3)。以栉孔扇贝基因组DNA为探针进行基因组原位杂交时,母本来源的染色体被稳定地涂成红色,父本来源的染色体则显示DAPI复染的蓝色荧光。结果表明,不同诱导时间处理组均有44%以上的分裂相为三倍体,染色体数目为54条,包括38条显示红色荧光的母本栉孔扇贝染色体和16条显示蓝色荧光的父本海湾扇贝染色体(图3-A);分裂相的染色体构成符合异源三倍体理论预期型,即分别继承了2套母本染色体组和1套父本染色体组。三倍体比例比流式细胞仪检测结果低,但变化趋势与之一致。20 min和25 min处理组出现个别5n分裂相。未经诱导处理的对照组,65%的分裂相为二倍体,染色体数目为35条,分别继承了母本栉孔扇贝的19条染色体(红色荧光)和父本海湾扇贝的16条染色体(蓝色荧光)(图3-B)。

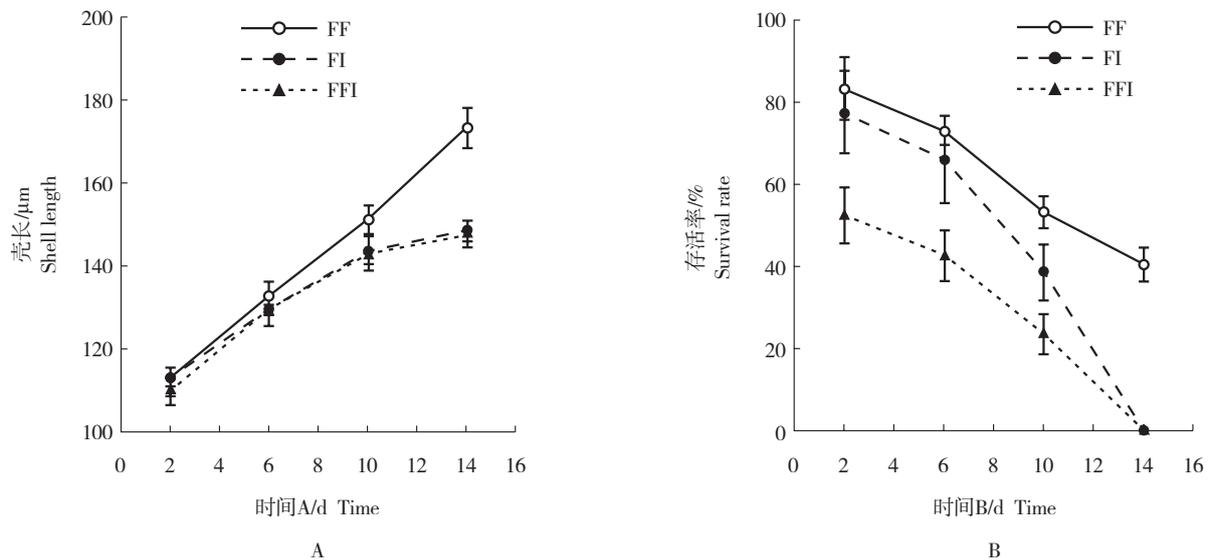


图2 后代生长(A)与存活(B)

FFI(▲): 栉孔扇贝(♀)和海湾扇贝(♂)异源三倍体诱导组; FI(●): 栉孔扇贝(♀)和海湾扇贝(♂)杂交对照组; FF(○): 栉孔扇贝自交对照组

Fig. 2 Growth and survival of progeny

FFI(▲): allotriploid induction group of *C. farreri*(♀) × *A. irradians*(♂); FI(●): control group of *C. farreri*(♀) × *A. irradians*(♂); FF(○): control group of *C. farreri*(♀) × *C. farreri*(♂).

表2 不同诱导时间产生栉孔扇贝(♀)和海湾扇贝(♂)杂交后代的染色体分裂相倍性分布
Tab. 2 Distribution of chromosome ploidy of hybrids induced by different durations

诱导持续时间/min Duration time	倍性 Ploidy					
	单倍体 n	二倍体 2n	三倍体 3n	四倍体 4n	五倍体 5n	非整倍体 Aneuploid
0	0	65 %	0	0	0	35%
10	0	16%	44%	0	0	40%
15	0	7%	51%	0	0	42%
20	0	3%	52%	0	1%	44%
25	0	2%	51%	0	1%	46%

另外, GISH分析发现约2%的分裂相出现母本偏向性染色体转变, 并且转变后染色体着丝粒类型不变。栉孔扇贝的染色体核型为 $2n=38=6m+10sm+22st^{[15]}$, 海湾扇贝的染色体核型为 $2n=32=8st+24t^{[16]}$, 这2种扇贝的染色体之间无论从数目还是形态上均存在明显的差别。中部着丝粒染色体为栉孔扇贝特有, 海湾扇贝没有该类型的染色体, 因此可作为特征性的栉孔扇贝染色体来鉴定杂种分裂相; 而端部着丝粒染色体为海湾扇贝特有, 栉孔扇贝同样缺乏, 因此可作为海湾扇贝的特征性染色体。

图4-A示以栉孔扇贝基因组DNA为探针杂交的结果, 三倍体分裂相的54条染色体中, 除母本栉孔扇贝来源的38条染色体外, 父本海湾扇贝来源的4条端部着丝粒染色体和3条亚端部着丝粒染色体也被涂成红色。图4-B示以海湾扇贝基因组DNA为探针杂交的结果, 二倍体分裂相的35条染色体中, 来自父本海湾扇贝的染色体只有9条端部着丝粒染色体和1条亚端部着丝粒染色体显示红色荧光, 另3条端部着丝粒染色体和3条亚端部着丝粒染色体与来自母本栉孔扇贝的19条染色体都显示蓝色荧光。

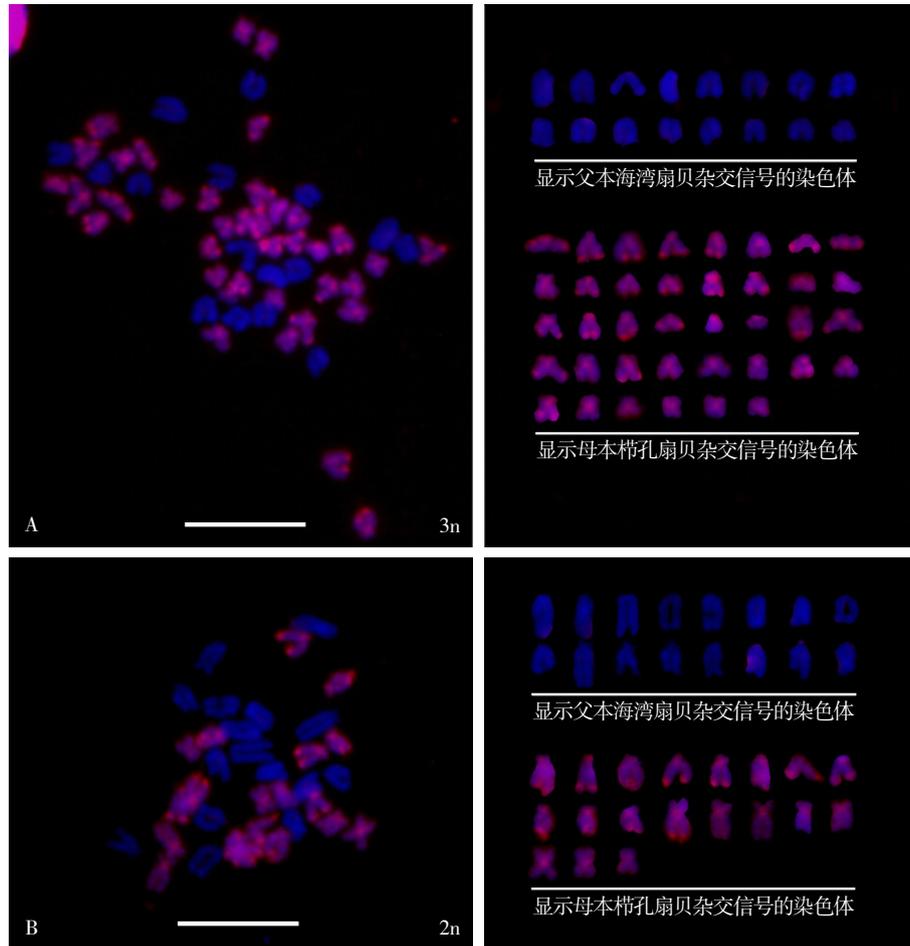


图3 基因组原位杂交分析

A: 栉孔扇贝(♀)和海湾扇贝(♂)异源三倍体染色体中期分裂相; $3n=54=38+16$; B: 栉孔扇贝(♀)和海湾扇贝(♂)二倍体杂种对照中期分裂相; $2n=35=19+16$ 。以栉孔扇贝基因组DNA为探针; 红色荧光示继承于母本栉孔扇贝的染色体, 蓝色荧光示继承于父本海湾扇贝的染色体。标尺=10 μm。

Fig. 3 GISH analysis

A: Allotriploid metaphase chromosomes; $3n=54=38+16$. B: Metaphase chromosomes of diploid hybrid; $2n=35=19+16$. *C. farreri*'s genomic DNA was labeled as probe. Red fluorescence shows the chromosomes inherited from maternal *C. farreri*, and blue fluorescence shows the chromosomes inherited from paternal *A. irradians*. Scale bar=10 μm.

3 讨论

自然界异源多倍体现象在植物中十分普遍, 被认为在植物的物种形成及进化过程中起着重要的作用, 但在动物中极其罕见。目前普遍认为, 远缘杂种偶然自发产生的未减数分裂的配子是自然界异源多倍体形成的主要途径。刘筠等^[17]以红鲫(*Carassius auratus red var*)为母本、湘江野鲤(*Cyprinus carpio*)为父本进行人工杂交所得到的杂种“鲫鲤” F_1 和 F_2 是异源二倍体, F_3 以后是可育的异源四倍体。Liu等^[6]

发现, 杂种“鲫鲤” F_2 一些未减数分裂的雌雄配子是形成 F_3 异源四倍体的原因。以异源四倍体鲫鲤为父本, 分别与二倍体白鲫和鲤杂交, 便可大批量培育出生长快、个体大、肉质好、抗逆性强的不育异源三倍体后代即“湘云鲫”和“湘云鲤”。陈敏容等^[5]通过热休克抑制白鲫(*Carassius auratus cuvieri* T. et S., ♀) × 红鲫(♂)受精卵第1次卵裂诱导异源四倍体白鲫也获得成功, 同时用异源四倍体白鲫雄鱼与二倍体白鲫雌鱼杂交育出了规格较整齐、不易脱鳞、抗病力强、生长迅速的异源三倍体白鲫。

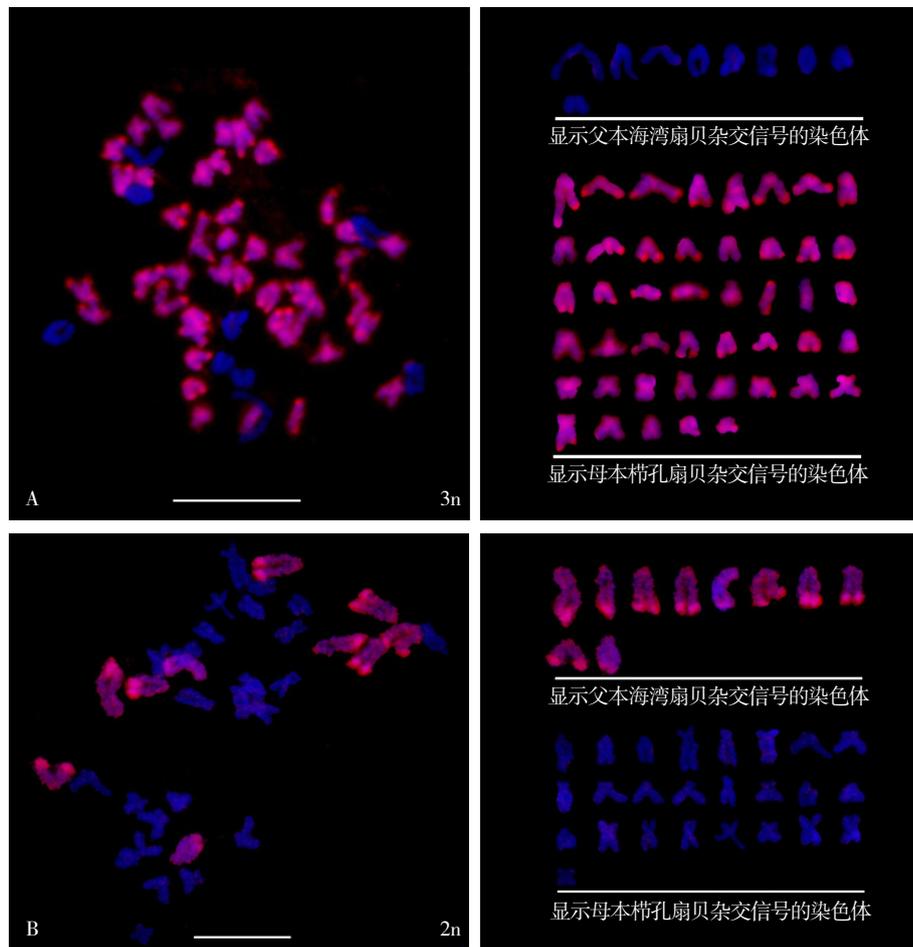


图4 母本偏向性染色体转变

A: 栉孔扇贝(♀)和海湾扇贝(♂)异源三倍体染色体中期分裂相; $3n=54=45+9$; 以栉孔扇贝基因组DNA为探针. B: 栉孔扇贝(♀)和海湾扇贝(♂)二倍体杂种对照中期分裂相; $2n=35=25+10$; 以海湾扇贝基因组DNA为探针. 红色荧光为标记探针杂交信号, 蓝色荧光为DAPI复染信号. 标尺=10 μm .

Fig. 4 Maternally biased chromosome conversion

A: Allotriploid metaphase chromosomes; $3n=54=45+9$; *C. farreri* genomic DNA was labeled as probe. B: Metaphase chromosomes of diploid hybrid; $2n=35=25+10$; *A. irradians* genomic DNA was labeled as probe. Red fluorescence is the hybridization signal of labeled probe, and blue fluorescence is the signal counterstained by DAPI. Scale bar=10 μm .

理论上,由于贝类产出的成熟卵子停滞于第1次减数分裂中前期,用异源精子授精后,在精子的刺激下减数分裂方可启动,因此此时采用物理或化学方法抑制卵母细胞第1或第2次减数分裂可获得未减数分裂卵核,精卵原核融合便可形成异源多倍体受精卵。本研究对栉孔扇贝(♀)×海湾扇贝(♂)异源三倍体诱导后代的基因组原位杂交分析表明,诱导操作有效抑制了杂交受精卵第2极体的释放,绝大多数的三倍体分裂相分别继承了2套母本扇贝染色体组和1套父本扇贝染色体组,确为异源三倍体。

受精卵发育不同步现象在贝类中广泛存在。不同个体甚至同一个体产生的卵发育也不同步,而贝类通过抑制第2极体释放形成的三倍体主要产生于诱导前处于第2次减数分裂中期的卵^[13],因此受精卵发育不同步对三倍体率影响很大。细胞学观察表明,发育不同步现象在栉孔扇贝(♀)×海湾扇贝(♂)杂交受精过程中同样存在。20℃水温下,受精后15 min有个别受精卵排出第1极体;30 min时大多数受精卵才完成第1极体的排出,而此时个别受精卵已经排出第2极体。因此,提高杂交受精卵同步发育的比例是提高

扇贝异源三倍体诱导率的基础。目前促进贝类受精卵同步发育的措施主要是优化亲本培育条件,促进性腺充分成熟;同时将雌、雄亲本严格分开暂养,避免意外受精;授精操作选用较高精卵比例等。

影响三倍体诱导的关键因素有药物浓度、诱导时机、诱导持续时间等。细胞学研究表明60 mg/L的6-DMAP可通过有效抑制栉孔扇贝受精卵的染色体分离和原核移动而诱导出三倍体,未发现对胚胎发育造成明显的不良影响^[12,18]。本研究发现,栉孔扇贝(♀) × 海湾扇贝(♂)杂交受精卵发育相对迟缓,普遍出现第1极体的时间较母本自交对照平均推迟约10 min,出现第2极体的时间平均推迟约20 min。显然,异源三倍体诱导时机不能机械地以受精后的时间尺度来确定。Allen等^[19]较早提出以极体出现的百分率为指标来确定药物处理时机。以受精卵发育的生物学事件为指标,可客观地反映受精卵减数分裂的进程。以50%左右的受精卵排出第1极体为诱导时机,在栉孔扇贝^[12,18]以及其他扇贝^[20~22]都得到了较高比例的四倍体。本研究表明,在50%左右的栉孔扇贝(♀) × 海湾扇贝(♂)受精卵排出第1极体时,以60 mg/L的6-DMAP处理受精卵10~25 min,可诱导产生栉海异源三倍体。处理15 min综合诱导效果最好,三倍体诱导率可达88.56%,孵化率可达53.52%。孵化后诱导组与杂交对照组幼虫生长越来越缓慢,14 d幼虫存活率分别降至0.000 67%和0.002 24%,没有幼虫度过附着变态期。

异源基因组间复杂的相互作用,包括遗传重组和各种结构重排在异源多倍体植物上报道很多,在动物上报道较少。在鱼类,Zhu等^[23]通过FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 分析发现,孤雌生殖三倍体银鲫(*Carassius auratus gibelio*)和普通红鲤(*Cyprinus carpio*)杂交产生的异源四倍体其45S rDNA存在大小变异和奇数性分布,并由此推测异源四倍体可能发生了染色体重排。在两栖类,Bi等^[24-25]用GISH技术揭示了自然存在的异源三倍体、四倍体蝾螈(*Ambystoma*)基因组间的染色体易位与重组。然而,目前这些报道都是染色体片段或点上的变异,本

研究在栉孔扇贝(♀) × 海湾扇贝(♂)的异源三倍体和二倍体后代中发现父本来源的基因组存在整条染色体的母本偏向性遗传转变。这一现象同样出现在栉孔扇贝(♀) × 虾夷扇贝(♂)异源二倍体^[26]、三倍体和四倍体^[9]后代中。这可能是贝类所特有的遗传学现象,但其产生的原因和机制目前尚不清楚。吕振明等^[26]推测可能是由于个别杂种胚胎在发育过程中分裂不同步,而造成一方亲本染色体丢失,而另一方亲本染色体部分替换,这与人鼠杂交细胞中的人类染色体不断被鼠染色体替换最终接近完全消失相似,但这种现象出现的比例是极低的。本研究还发现个别父本来源的染色体其端部出现母本GISH信号的现象(未发表结果),迟长风等^[9]在栉孔扇贝(♀) × 虾夷扇贝(♂)异源四倍体诱导中也有类似现象的报道。作者认为这可能是一种中间类型,最终导致整条父本来源染色体的偏向性遗传转变,而不是简单的染色体丢失与替换。GISH分析表明(图4),“转变”后染色体的着丝粒类型没有改变,这也进一步排除了染色体丢失与替换的可能,证明遗传转变的确存在。本课题组王师^[27]应用PCR-RFLP检测栉孔扇贝与海湾扇贝杂交种的ITS序列,发现来自母本的特征ITS序列始终存在,而父本ITS的拷贝数随着杂种的发育而逐渐减少,在受精后14 d几乎完全消失;应用FISH分析发现在杂种基因组内母本ITS序列被发现存在于父本来源的染色体上,而父本ITS序列却未被发现存在于母本来源的染色体上;进而推断rDNA家族在栉孔扇贝与海湾扇贝杂种早期发育过程中发生了由偏向性基因转变引发的快速的协同进化。GISH杂交产生的信号主要来源于基因组中的重复序列,扇贝异源基因组母本偏向性染色体转变是否与重复序列的协同进化有关还需要进一步研究验证。

参考文献:

- [1] Guo X, DeBrosse G A, Allen S K Jr. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids[J]. *Aquaculture*, 1996, 142: 149-161.
- [2] He M, Lin Y, Shen Q, et al. Production of tetraploid pearl oyster

- (*Pinctada martensii* Dunker) by inhibiting the first polar body in eggs from triploids[J]. J Shellfish Res, 2000, 19 (1): 147-151.
- [3] 包振民, 万俊芬, 王继业, 等. 海洋经济贝类育种研究进展[J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32 (4): 567-573.
- [4] 毕克, 包振民, 黄晓婷, 等. 栉孔扇贝♀×华贵栉孔扇贝♂受精及早期胚胎发育过程的细胞学荧光显微观察[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35 (02): 283-286.
- [5] 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.
- [6] Liu S J, Liu Y, Zhou G J, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp×common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization[J]. Aquaculture, 2001, 192: 171-186.
- [7] 杜方勇, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 6-二甲氨基嘌呤诱导扇贝异源三倍体[J]. 海洋水产研究, 2004, 25 (4): 13-16.
- [8] 迟长风, 杨爱国, 王清印, 等. 扇贝异源四倍体诱导的初步研究[J]. 水产学报, 2009, 33 (1): 165-170.
- [9] 迟长风, 杨爱国, 王清印, 等. 扇贝异源四倍体诱导后代的细胞遗传学研究[J]. 高技术通讯, 2008, 18 (3): 318-323.
- [10] 王清印, 杨爱国. 栉孔扇贝三倍体研究进展和展望[J]. 中国水产科学, 2000, 7 (3): 93-96.
- [11] Ruiz-Verdugo C A, Ramírez J L, Allen Jr S K, et al. Triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth, gametogenesis, and suppression of functional hermaphroditism[J]. Aquaculture, 2000, 86: 13-32.
- [12] 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.
- [13] Desrosiers R R, Gérard A, Peignon J M, et al. A novel method to produce triploids in bivalve mollusks by the use of 6-deimethylaminopurine[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1993, 70: 29-43.
- [14] Huang X, Hu J, Hu X, et al. Cytogenetic characterization of the bay scallop, *Argopecten irradians irradians*, by multiple staining techniques and fluorescence *in situ* hybridization [J]. Genes Genet Syst, 2007, 82 (3): 257-263.
- [15] 王梅林, 郑家声, 余海. 栉孔扇贝 *Chlamys farreri* (Jones & Preston, 1904) 染色体核型[J]. 青岛海洋大学学报, 1990, 20 (1): 81-85.
- [16] Wada K T. Chromosome karyotypes of three bivalves: the oysters *Isognomon alatus* and *Punctada imbricata* and the bay scallop *Argopecten irradians* [J]. Biol Bull, 1978, 155: 235-245.
- [17] 刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1993: 117.
- [18] 董迎辉, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 6-DMAP 诱导栉孔扇贝三倍体的细胞学观察[J]. 海洋水产研究, 2007, 28 (2): 71-75.
- [19] Allen S K Jr, Bushek D. Large scale production of triploid, *Crassostrea virginica* using "stripped" gametes[J]. Aquaculture, 1992, 103: 241-251.
- [20] Ruiz-Verdugo C A, Racotta I S, Ibarra A M. Comparative biochemical composition in gonad and adductor muscle in triploid and diploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842) [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2001, 259: 155-170.
- [21] Maldonado-Amparo R, Ramírez J L, Ávila S, et al. Triploid lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby): growth, gametogenesis, and gametic cell frequencies when grown at a high food availability site[J]. Aquaculture, 2004, 235: 185-205.
- [22] Racotta I S, Palacios E, Ibarra A M, et al. Comparative biochemical composition of ploidy groups of the lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby) supports the physiological hypothesis for the lack of advantage in triploid mollusc's growth in food-rich environments[J]. Mar Biol, 2008, 153: 1 245-1 256.
- [23] Zhu H P, Gui J F. Identification of genome organization in the unusual allotetraploid form of *Carassius auratus gibelio* [J]. Aquaculture, 2007, 265: 109-117.
- [24] Bi K, Bogart J P, Fu J. Intergenomic translocations in unisexual salamanders of the genus *Ambystoma* (Amphibia, Caudata) [J]. Cytogenet Genome Res, 2007, 116: 289-297.
- [25] Bi K, Bogart J P. Identification of intergenomic recombinations in unisexual salamanders of the genus *Ambystoma* by genomic *in situ* hybridization (GISH) [J]. Cytogenet Genome Res, 2006, 112: 307-312.
- [26] 吕振明, 杨爱国, 王清印, 等. 栉孔扇贝(♀)×虾夷扇贝(♂)杂交子代的细胞遗传学研究[J]. 高技术通讯, 2006, 16 (8): 853-858.
- [27] 王师. 栉孔扇贝遗传图谱的构建及重复元件的进化分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007: 51.

Induction of scallop allotriploid

MENG Qing-lei¹, HUANG Xiao-ting¹, ZHAO Hai-bo¹, ZHAO Ting², LI Ning¹, WANG Zhao-ping², HU Xiao-li¹, HU Jing-jie¹, BAO Zhen-min¹

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Induction of triploidy is of great importance in mollusk breeding, and can be modified further with interspecific hybridization techniques to create allotriploids which may benefit both from triploidization and hybridization. Prior to the allotriploid induction, the feasibility of fertilization between Zhikong scallop *Chlamys farreri* eggs and Bay scallop *Argopecten irradians* sperm was verified by epifluorescence microscopy. Parental scallops were fully induced mature separately and induced spawning. Insemination was carried out with the ratio of sperms and eggs being 20 : 1. Triploidy rates of D-stage larvae ranging from 75.23% to 92.14%, were obtained by inhibiting the second polar body with 60 mg/L 6-deimethylaminopurine (6-DMAP) for 10, 15, 20 and 25 min durations when 50% zygotes released the first polar body in 20 °C seawater. An optimum effect with triploidy rate of 88.56% and incubation rate of 53.52% was gained under 15 min duration. With genomic *in situ* hybridization (GISH) method, the consequent larvae were validated to be real interspecies hybrids from *C. farreri* × *A. irradians* cross with two *C. farreri* genome and one *A. irradians* genome. Overall, allotriploid scallop can be readily produced, but no statistical advantages of growth or survival was found in triploid induction groups compared with controls during larvae development. Larva survival rate of triploid and diploid hybrids were 0.000 67% and 0.002 24%, at the 14 th day after insemination. All larvae died before metamorphosis without forming eyespot or foot. Furthermore, maternal biased chromosome conversion was revealed by GISH in both triploid and diploid hybrids, as early as at trophore-larvae stage. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (5): 718–727]

Key words: scallop; allotriploid; GISH; chromosome conversion

Corresponding author: HU Xiao-Li. E-mail: hx1707@ouc.edu.cn