

6-二甲氨基氨基嘌呤诱导栉孔扇贝三倍体

杨爱国 王清印 孔 杰 刘 萍 刘志鸿 孙慧玲 李 锋

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

王如才 姜 明

(青岛海洋大学水产学院, 266003)

摘 要 用 6-二甲氨基氨基嘌呤(6-DMAP)处理, 对抑制栉孔扇贝第二极体释放产生三倍体的适宜诱导参数进行了试验研究, 结合 DAPI 染色和荧光显微镜观察, 分析了开始处理前和处理结束时的受精卵染色体核相组成与三倍体诱导率和幼虫成活率的关系, 对三倍体处理组 and 对照组幼虫的生长进行了观察。结果表明, 获得充分成熟的卵子、起始处理时间以第一极体占 40%、药物浓度 60 mg/L、持续处理时间 15 min 及产卵至处理结束保持水温 20℃, 三倍体诱导率可稳定在 80% 以上, 孵化率达 70% 左右。

关键词 栉孔扇贝, 6-二甲氨基氨基嘌呤, 三倍体诱导

应用染色体组操作技术培育三倍体贝类新品种, 以提高养殖贝类单位面积产量、产品质量和抗逆性能等, 是水产业广泛尝试的一项新技术。与传统育种技术相比, 具有见效快、效率高、目的性强等优点。已有的研究表明, 许多贝类的人工三倍体具有不育性, 使其只有极少能量用于性腺发育, 更多能量用于生长, 因而表现出生长快、肉质好、死亡率低等优良性状 [Stanley 等 1984, Tabarini 1984, Allen Jr 和 Downing 1986, Allen Jr 等 1986, Mason 等 1988, Yamamoto 1988, 姜卫国等 1990, 1991, 王如才等 1993]。

许多方法可以诱导产生贝类三倍体, 其中以 CB 诱导效果较好。但 CB 是一种剧毒化学药物, 且价格昂贵, 不利于在生产中广泛使用。6-DMAP (6-Dimethylaminopurine) 是近年来开发出的一种诱导剂, 在多种贝类多倍体诱导中取得了良好效果 [Desrosiers 1993], 且低毒、高效、价廉, 可代替 CB 使用。栉孔扇贝是我国扇贝养殖的主要种类, 也是目前贝类三倍体研究的重点对象之一。本文报道了使用 6-DMAP 诱导栉孔扇贝三倍体的试验结果, 证明了 6-DMAP 是诱导栉孔扇贝三倍体的有效药物。

1 材料与方 法

1.1 材 料

栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 取自青岛太平湾海区, 壳长 7~8cm。6-DMAP 为美国 Sigma 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 亲贝暂养、产卵、受精

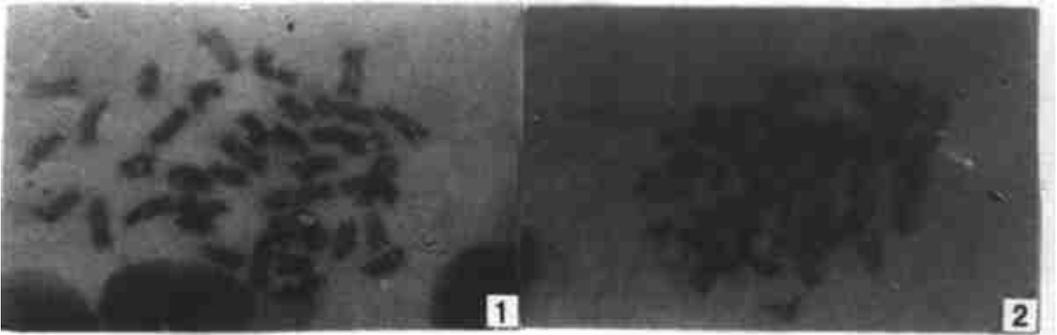
1996年3月25日亲贝入池暂养,每天升温 1°C ,至 16°C 恒温,4月15日个别开始产卵。试验时挑选性腺充分成熟的雌、雄亲贝,分别移入水温 17°C 和 20°C ,加满过滤海水容积为15L的塑料桶内,使之产卵排精,人工授精。

1.2.2 6-DMAP处理

卵子受精后10 min,分别经 $20\mu\text{m}$ 筛绢过滤浓缩入21个2000 mL烧杯内,卵子密度为200~3000个/mL,当第一极体占40%和50%时,用10~70mg/L的6-DMAP处理10~20 min,处理结束后,用 $20\mu\text{m}$ 筛绢过滤冲洗,移入烧杯内培养。

1.2.3 染色体倍性检查

取担轮期幼虫,浓缩后加入含0.03%秋水仙素的50%海水中处理30 min,除去上清液,加入25%的海水低渗30 min。去掉 $1/3$ 低渗液,缓慢地加入Camcy氏固定液(甲醇:丙醋酸=3:1),沉淀后去掉上清液,反复固定3次。滴片前去掉固定液,加入50%的丙醋酸,用吸管轻轻吹打解离成单细胞。用细管把胚胎细胞从50cm高处滴到加热板上温热的洁净载波片上($40\sim 50^{\circ}\text{C}$),每片3~5滴,每批样品滴10个片子。用10%的Giemsa在1:1磷酸二氢钠和磷酸氢二钾缓冲液中(pH 6.8)染色30min。自来水冲洗,晾干。在高倍镜下观察和计数染色体,二倍体栉孔扇贝有38条染色体,三倍体有57条(图版I-1,2)。



图版I Plate I

1. 二倍体染色体, $\times 1000$; 2. 三倍体染色体, $\times 1000$ 。

1.2.4 核相组成的观察

各试验组在开始处理前和结束时各取样一次,用2%戊二醛和2.5%多聚甲醛在 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.2)中固定,DAPI染色,用荧光显微镜在紫外光(365nm)下观察受精卵的核相组成与三倍体率和成活率的关系。

1.2.5 受精率、孵化率、成活率、三倍体率计算

受精率为分裂卵数占总处理卵数的百分比;孵化率为担轮幼虫数占受精卵数的百分比;成活率为D型幼虫数占受精卵数的百分比;三倍体诱导率为三倍体分裂相占分裂相总数的百分比。

1.2.6 生产性试验

1997年5月,在山东蓬莱市鱼种场贝类育苗车间,根据筛选出的适宜诱导参数,进行了小规模生产性育苗试验。处理后的受精卵移入 7m^3 的水池内孵化、培养。选择一个生产池与试验池作同步对照,幼虫密度均为5~6个/mL,投喂金藻、扁藻,按时测量试验组和对照组幼虫

壳长, 稚贝附着后, 待壳长达到 1mm 时装入 60 目网袋移入大池继续培养。

2 结果

2.1 不同药物浓度和持续处理时间对三倍体率及成活率的影响

卵子受精后 25 min (水温 20℃), 第一极体占 40% 时, 用 10~70mg/L 的 6-DAMP 处理 10~20 min, 结果见表 1、2。

表 1 不同药物浓度和持续处理时间对三倍体率的影响

Tab. 1 Effects of different concentration of 6-DAMP and treating time on triploid inducing rate

处理时间 (min)	药物浓度 (mg/L)						
	10	20	30	40	50	60	70
10	12.5	26.0	33.6	45.0	61.5	66.6	73.5
15	25.8	30.2	41.8	53.8	68.2	83.0	84.8
20	31.3	43.3	55.4	60.0	71.5	85.0	88.4

表 2 不同药物浓度和持续处理时间对 D 型幼虫成活率的影响

Tab. 2 Effects of different concentration of 6-DAMP and treating time on D-larva survival rate

处理时间 (min)	药物浓度 (mg/L)						
	10	20	30	40	50	60	70
10	95.0	95.0	91.8	90.0	85.0	80.5	70.5
15	95.0	90.4	91.0	85.5	80.2	75.0	43.2
20	90.0	90.5	89.5	80.0	70.5	50.2	—

综合分析表 1 和表 2 可以看出, 10~70mg/L 的 6-DAMP 均可诱导出三倍体, 其中以 60~70mg/L 的浓度诱导效果最好。

药物浓度增加到 70mg/L, 处理时间 20 min, 胚胎三倍体率最高达 88.4%, 但不能发育到 D 型幼虫; 药物浓度 70mg/L, 处理时间 15min 和药物浓度 60mg/L, 处理时间 20min, 这两种处理得到的三倍体率较高, D 型幼虫成活率分别为 43.2% 和 50.2%, 但是, 较合部呈凹陷的畸形幼虫数量明显增加, 在继续培养过程中死亡率较大。较理想的结果是药物浓度 60mg/L, 处理时间 15min, 获得 83.0% 的三倍体率, D 型幼虫成活率 75.0%, 幼虫易于培养, 便于在生产中应用。

2.2 不同起始处理时间对三倍体率和成活率的影响

水温 20℃ 条件下, 受精后 20min、25min、30min, 分别用 60mg/L 的 6-DAMP 处理 15min, 三倍体率和成活率见表 3。

试验结果表明, 处理时机的选择对三倍体率和 D 型幼虫成活率有显著影响, 也反映出 6-DAMP 处理后获得的三倍体率与受精卵成熟分裂的某一特定阶段密切相关。由于不同批次的卵子发育进程有所差异, 起始处理时间不应孤立的确定, 而应以受精卵发育的生物学时间, 即第一极体出现的百分率计算较为准确。

表 3 不同起始处理时间对三倍体率和 D 型幼虫成活率的影响

Tab. 3 Effects of different initiation treating on triploid inducing rate and survival rate of D-larvae

起始处理时间 (min)	20	25	30
三倍体率 (%)	35.5	82.2	67.2
成活率 (%)	27.3	75.8	59.5

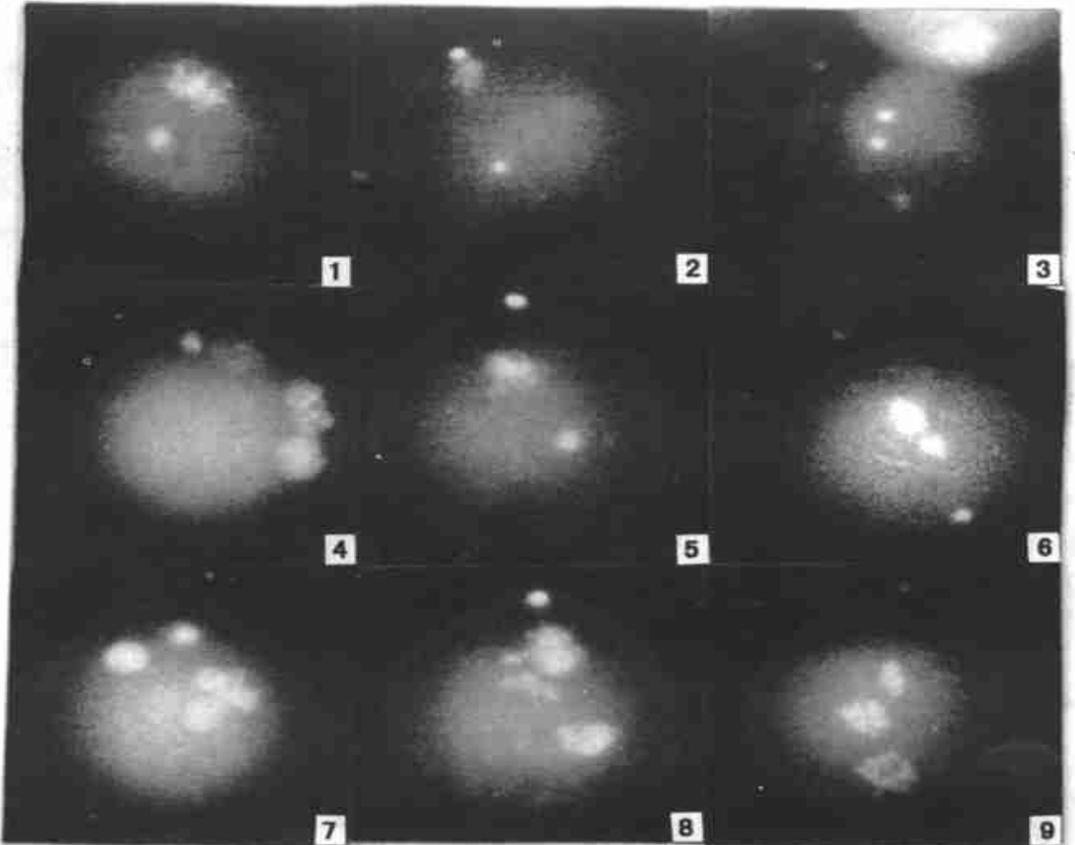
2.3 开始处理前和处理结束时的核相组成与三倍体率及成活率的关系

起始处理时间分别为受精后 20 min、25 min、30 min, 药物浓度 60 mg/L, 持续处理时间分别为 15 min、20 min, 开始处理前和处理结束时固定胚胎的核相见图版 II。图版 II—1~3 为开始处理前的核相; 图版 II—4~6 为处理 15 min 的核相; 图版 II—7~9 为处理 20 min 的核相。不同处理组各核相组成的百分率见表 4。

表 4 开始处理前和处理结束时的核相组成

Tab. 4 Percentages of nuclear stages before and after 6-DMAP treatment

起始处理时间 (min)	核相组成(%)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
20	63.0	24.5	12.5	64.0	24.0	12.0	41.2	18.5	7.0
25	14.0	58.4	27.6	13.5	59.4	27.1	7.2	23.0	13.0
30	0	33.0	67.0	0	35.0	65.0	0	14.0	23.0



图版 II Plate II

1. 第一次成熟分裂后期的受精卵, $\times 600$; 2. 第二次成熟分裂中期的受精卵, $\times 600$; 3. 第二次成熟分裂后期的受精卵, $\times 600$;
4. 持续处理 15min 的受精卵, $\times 600$; 5. 持续处理 15min 的受精卵, $\times 1000$; 6. 持续处理 15min 的受精卵, $\times 600$; 7, 8, 9. 持续处理 20min 的受精卵, $\times 1000$ 。

上述结果说明, 由于受精卵发育不同步, 在开始处理前存在三种基本核相, 第一种处于第

一次成熟分裂的后期(图版 II-1), 第二种处于第二次成熟分裂的中期(图版 II-2), 第三种处于第二次成熟分裂的后期(图版 II-3)。这三种核相所占的比例随起始处理时间的不同发生很大变化, 试验得出的最适起始处理时间是第一极体占 40%, 此时是受精后 25 min, 多数卵子处于第二次成熟分裂的中期。

持续处理时间在 15 min 之内, 核相组成与开始处理前基本相同, 只是原核较膨大(图版 II-4~6), 持续处理时间延长至 20 min, 部分受精卵出现了多个异常原核(图版 II-7~9)。

2.4 卵子的成熟度及产卵水温对受精卵发育的影响

据荧光显微镜的观察结果, 自然排放的卵子和人工刺激产出的卵子, 受精后各种核相所占的比例差异较大, 自然排放获得的受精卵, 处于某种减数分裂期的核相比较集中, 说明发育比较同步。观察了同一批雌雄亲贝在水温 17℃和 20℃条件下获得的受精卵, 较高水温下受精卵发育的同步性高。

2.5 人工育苗试验

选择产卵水温 20℃、受精后第一极体占 40%、药物浓度 60mg/L、处理时间 15 min、处理时卵子密度 3 000 个/mL 的诱导参数, 处理受精卵 4 600 万粒, 进行试验组和对照组的小规模试验性育苗。三倍体诱导率为 82%, D 型幼虫成活率为 75%, 培养水温 18℃条件下, 试验组胚胎发育较对照组慢, 至 D 型幼虫时相差 3~4h; D 型幼虫期, 试验组幼虫的生长规律与对照组基本相同(表 5)。t 检验表明, 处理组幼虫壳长的生长速度显著高于对照组 (P<0.05)。

表 5 处理组和对照组幼虫壳长生长比较(μm)

Tab 5 Comparison between the shell lengths of treatment and control young *C. farreri*(μm)

日期(日)	10	12	13	14	15	16	17	18	20
水温(℃)	17.5	18.0	18.0	18.2	18.5	18.8	18.5	19.0	19.0
处理组	119.3±3.2	130.1±3.2	136.8±3.3	139.7±3.5	148.7±2.9	153.4±2.3	163.7±3.7	184.7±3.8	195.9±3.1
对照组	118.3±1.1	123.5±2.8	131.1±1.5	134.8±0.7	144.4±3.7	149.8±1.7	153.9±5.1	158.4±3.1	176.3±2.7

3 讨论

3.1 6-DMAP 诱导三倍体的有效作用时机

受精卵发育的不同步性是栉孔扇贝的生物学特性决定的, 即使从一个雌贝和雄贝获得的受精卵也存在着发育不同步现象。在抑制第二极体释放诱导三倍体的试验中, 选择不同的起始处理时间, 均可观察到三种基本的核相组成, 但三种核相所占的比例可发生很大变化。综合分析处理开始前和处理结束时的核相组成与三倍体率和幼虫成活率的关系可以看出, 处理时受精卵处于第二次成熟分裂中期的核相比例愈高, 三倍体率和成活率愈高, 分析认为解除处理后, 由一个大的二倍体雌性原核和一个雄性原核联合后发育成三倍体, 这种核相是三倍体的主要来源; 处理时受精卵处于第二次成熟分裂后期的核相比例增加, 三倍体率和成活率有所增加, 但不成正比, 解除处理后, 可能是药物处理导致了部分受精卵染色体组未能协同一致, 产生了不平衡细胞, 造成嵌合的非整倍体胚胎, 使三倍体率和成活率降低; 处理时部分受精卵处于

第一次成熟分裂的后期, 药物处理阻止了两个极体的释放, 解除处理后, 两个雌性原核和一个雄性原核联合发育成五倍体胚胎, 导致胚胎死亡。

3.2 影响 6-DMAP 诱导效果的相关因子

起始处理时间、药物浓度、持续处理时间是影响三倍体诱导率和成活率的主要因素。起始处理时间取决于 6-DMAP 的有效作用时机, 由于受精卵发育的不同步性, 受精卵不可能同时处于第二次成熟分裂的中期, 而且第二次成熟分裂中期的时间相对较短, 根据试验结果, 可以第一极体占 40% 时作为开始处理的时间依据。6-DMAP 作为一种蛋白质磷酸化抑制剂, 可促使染色体浓缩, 并对微管组织同时发生作用, 使海胆胚胎的纺锤体在间期中断 [Rine 等 1989, Neant 等 1989, Dufresne 等 1991], 不同物种所需的浓度略有差别, 我们的研究结果表明 60mg/L 可有效抑制栉孔扇贝受精卵的染色体分离和原核移动, 诱导出三倍体, 未对胚胎造成明显的副作用。持续处理 15min 可获得较高的诱导率和成活率, 处理 20min 部分受精卵的染色质发生了分散, 胚胎死亡率明显增加。这是造成在试验范围内随着药物浓度和处理时间的增加, 胚胎三倍体率提高, 但是死亡率明显增加的主要原因。

另外, 获得发育同步的受精卵是提高和稳定三倍体诱导率的关键。受精卵发育的同步性与卵子的成熟度有明显关系, 本试验根据对核相组成观察的结果进行分析, 认为经过暂养自然排放的卵子比人工刺激产出的卵子受精后发育的同步性高, 产卵水温 20℃ 比 17℃ 受精卵发育的同步性高。在这个初步结果的基础上, 如何提高受精卵发育的同步性以获得最佳的三倍体诱导效果, 尚需进一步研究。

参 考 文 献

- 王如才, 王昭萍, 张建中. 1993. 海水贝类养殖学. 青岛: 青岛海洋大学出版社. 63~70
- 姜卫国, 李刚, 林岳光等. 1990. 三倍体合浦珠母贝的生殖腺观察. 热带海洋, 9(1): 24~29
- 姜卫国, 许国强, 林岳光等. 1991. 合浦珠母贝三倍体和二倍体的生长比较. 热带海洋, 10(3): 1~7
- Allen S K Jr, Downing S L. 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) I. Survival, growth, glycogen content and sexual maturation in yearlings. J Exp Mar Biol Ecol, 102(2/3): 197~208
- Allen S K Jr, Hidu H, Stanley J G. 1986. Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clam (*Mya arenaria*). Biol Bull, 170(2): 198~210
- Desrosiers R R, Gerard A, Peignon J M, et al. 1993. A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine. J Exp Mar Biol Ecol, 170(1): 29~43
- Dufresne L, Neant I, St-Pierre J, et al. 1991. Effects of 6-dimethylaminopurine on microtubules and putative intermediate filaments in sea urchin embryos. J Cell Sci, 99(4): 721~730
- Mason K M, Shumway S E, Allen S K, et al. 1988. Induced triploid in the soft-shell clam *Mya arenaria*; energetic implications. Mar Biol, 98(4): 519~523
- Neant I, Charbonneau M, Guerrier P. 1989. A requirement for protein phosphorylation in regulating the meiotic and mitotic cell cycles in echinoderms. Dev Biol, 132(3): 304~314
- Rine H, Neant I, Guerrier P, et al. 1989. 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP), a reversible inhibitor of the transition to metaphase during the first meiotic cell division of the oocyte. Dev Biol, 133(2): 169~179
- Stanley J G, Hidu H, Allen S K Jr. 1984. Growth of American oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I. but not meiosis II. Aquac, 37(2): 147~155
- Tabarini C L. 1984. Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. Aquac, 42

(2): 151~160

Yamamoto S, Sugawara Y, Nomura T, et al. 1998. Induced triploidy in Pacific oyster *Crassostrea gigas*, and Performance of triploid larvae. *Tohoku Jpimal of Agricultura Research*, 39(1): 47~ 59

TRIPLOID INDUCTION IN *CHLAMYS FARRERI* BY APPLICATION OF 6-DIMETHYLAMINOPURINE

YANG Ai-Guo, WANG Qing-Yin, KONG Jie, LIU Ping, LIU Zhi-Hong, SUN Hui-Ling, LI Feng

(*Yellow Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Qingdao 266071*)

WANG Ru-Cai, JIANG Ming

(*College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, 266003*)

ABSTRACT To produce triploids, fertilized eggs of *Chlamys (Azumapecten) farreri* were treated with 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) to inhibit the extrusion of the second polar body. Using dihydrochloride (DAPI) stain and fluorescence microscopic observation, the relation between chromosome karyotype and triploid induction and larval survival percentage, the effects of egg maturation and spawning temperature on the synchronous development of fertilized eggs were analyzed. It was concluded that the optimism induction parameters for farming industry are as following: completely mature eggs, initial treatment time when the first polar body occupied 40%, 60mg/L of drug concentration, 15 min of treatment duration and water temperature kept at 20 °C from spawning to the end of treatment. Under the conditions, triploids can be obtained with an induction rate higher than 80% and an hatching rate up to 70%.

KEYWORDS *Chlamys farreri*, 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP), Triploid induce