

文章编号: 1004 - 7271(2007)05 - 0414 - 07

异源精子诱导栉孔扇贝雌核 发育早期胚胎发育及其倍性分析

王卫军^{1,2}, 杨爱国¹, 刘志鸿¹, 周丽青¹

(1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 上海水产大学生命学院, 上海 200090)

摘要:采用紫外线遗传灭活的长牡蛎(*Crassostrea gigas*)精子作激活源,经6-DMAP加倍诱导栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)第二极体抑制型雌核发育二倍体;运用荧光显微技术,对雌核发育二倍体卵子早期胚胎发育过程中的核相变化进行观察。结果显示,紫外线处理过的精子入卵后发生一次轻微膨胀,形成雄性原核,但不形成染色体,而是浓缩为致密的染色质小体(DCB),DCB或滞留于两卵裂球的分裂沟上或进入其一的细胞质中,不与雌原核融合;雌核发育胚胎的发育速度明显滞缓,经6-DMAP处理后胚胎发育速度加快,发育同步化;在雌核发育二倍体诱导过程中,还观察到杂交体、异源三倍体、雌核发育单倍体、雌核发育四倍体。结果为异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育提供了细胞学证据。

关键词:异源精子; 栉孔扇贝; 雌核发育二倍体; 细胞学观察

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Studies on pro-embryo development and the ploidy of gynogenesis induced by heterologous sperm in the scallop, *Chlamys farreri*

WANG Wei-jun^{1,2}, YANG Ai-guo¹, LIU Zhi-hong¹, ZHOU Li-qing¹

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Yellow Sea Fisheries
Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Gynogenetic diploid eggs by inhibiting the second polar body with 6-DMAP in *Chlamys farreri* were induced by genetically inactivated *Crassostrea gigas* sperms with ultraviolet. We observed nuclear behaviors of its gynogenetic embryos using fluorescent micro-technique during its early developmental stages. According to cytological observation, the ultraviolet-irradiated sperm nucleus could gently expand once after incorporating into egg and developed into a male pronucleus, but could not form chromosomes and became a dense chromatin body (DCB). DCB was seen either in the region of the furrow or in the cytoplasm of the blastomere, but could not fuse with the female pronucleus. The developmental progress of gynogenetic embryo was seriously delayed, but when added 6-DMAP, comparing with gynogenetic diploid, the developmental

收稿日期: 2006-12-11

基金项目: 国家科技攻关项目(2004BA526B0103); 国家自然科学基金项目(30600465)

作者简介: 王卫军(1979-), 男, 硕士研究生, 专业方向为贝类遗传育种。E-mail: wwj2530616@163.com

通讯作者: 杨爱国, Tel: 0532-85811982, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

progress of gynogenetic diploid embryo was quickened and was also synchronous. In this study, we also reported and analyzed the embryo with complicated ploidy yielded in gynogenetic diploid group, besides gynogenetic diploid, there were hybrid, heterologous triploid, gynogenetic haploid, gynogenetic tetraploid, etc. Cytological evidence of gynogenesis in *Chlamys farreri* induced by heterologous sperm was demonstrated.

Key words: heterologous sperm; *Chlamys farreri*; gynogenetic diploid; cytological observation

在海产经济贝类中,人工诱导雌核发育起步比较晚,仅在数十种重要的经济贝类中开展过同源雌核发育二倍体的研究。与同源雌核发育二倍体相比,采用远源精子的异源雌核发育可有效地排除外源精子基因组的干扰。但在贝类方面,异源精子诱导雌核发育仅在合浦珠母贝(*Pinctada martensii*)^[1]上诱导出二倍体胚胎。目前,贝类异源精子诱导雌核发育的体系尚未建立,有关其产生的细胞学机制还不是很清楚,因此,对贝类异源精子诱导雌核发育早期胚胎的核相行为进行研究,对摸索适宜诱导参数和探明异源精子诱导雌核发育的细胞学机理具有重要意义。本实验采用紫外线灭活的长牡蛎精子,经 6-DMAP 诱导,运用荧光显微技术,对雌核发育早期胚胎发育中的核相进行观察,旨在为研究贝类异源精子诱导雌核发育产生机制提供细胞学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

栉孔扇贝于 2005 年 5 月取自青岛志诚水产科技公司,壳高 6~8 cm。长牡蛎取自胶南琅琊镇附近海区,壳高 11~12 cm。6-二甲基氨基嘌呤(6-dimethylaminopurine, 简称 6-DMAP)和 4,6-二氨基苯基吡啶(4,6-diamidine-2-phenylindol, 简称 DAPI)均为美国 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 亲贝暂养与精卵收集

栉孔扇贝取回后洗刷干净,仅留雌性个体,暂养于 16℃ 海水中,牡蛎暂养于 22℃ 海水中,均投喂硅藻。使用前挑选性腺饱满的雌性栉孔扇贝,阴干升温法催产获得卵子,解剖法获得长牡蛎精子。用生物计数皿和血球计数板在显微镜下分别定量精、卵浓度至 1.0×10^7 个/mL 和 1.0×10^5 个/mL。

1.2.2 紫外线照射精子

取精液 2.5 mL,平铺于直径为 9 cm 的亲水塑料培养皿中。将培养皿放于有摇床的紫外线照射装置内,摇床振动频率为 60 次/min。紫外灭菌灯(18W, 254 nm;上海星星电器有限公司),用 UV-B 型紫外辐射强度仪(北京师范大学生产)测得此处的紫外辐射强度为 $1\ 500\ \mu\text{w}/\text{cm}^2$,参照李雅娟^[2]的方法照射 60 s,照射两次。照射后的精子立即加入有 100 mL 卵液的烧杯中,用玻璃棒搅拌均匀并稀释至 200 mL。受精卵在水温 18℃ 的避光条件下培养。设精子不照射的杂交组为对照组一。

1.2.3 卵子染色体的二倍体化

照射组受精后 11.5 h,显微镜下观察到照射组有 10%~15% 受精卵排出第一极体时,向处理组施加 6-DMAP,使其终浓度达到 60 mg/L,持续处理 25 min,之后用 500 目筛绢过滤,洗卵 2~3 次,移入盛有 10 L 清洁过滤海水的小桶中培养。设照射受精卵不加 6-DMAP 的单倍体照射组为对照组二。

1.2.4 受精卵早期发育过程的细胞学观察

分别从两对照组和加倍处理组取样固定,样品固定液参考董迎辉^[3],更换固定液两次,置于 4℃ 冰箱中保存。观察时,用 0.1 M PBS(pH7.4)洗卵 2~3 次,加少量 DAPI 染液于黑暗环境下染色 30~60 min,用荧光显微镜在 365 nm 的紫外光下观察、拍照。

1.2.5 染色体制备与观察

取担轮幼虫期胚胎用终浓度为 0.04% 的秋水仙素溶液处理 40~50 min,25% 海水低渗 30 min, Carnoy 氏液(甲醇:冰醋酸=3:1)充分固定,热滴片法制片及 Giemsa 染色,尼康显微镜下镜检并统计

染色体数。

2 结果

2.1 受精卵早期胚胎发育时间

杂交组受精后 35 min 开始排放第一极体,到受精后 3 h 发育到四细胞,各个发育阶段所需时间均滞后于对应的栉孔扇贝。而雌核发育组受精后大约 10~11 h 才开始排放第一极体,受精后 11.5 h 加 6-DMAP 处理加倍后,加药组胚胎发育速度与未加药的单倍体组相比明显加快,且发育同步。杂交对照组和雌核发育组在胚胎发育早期所用时间见表 1。

表 1 杂交对照组和雌核发育组在胚胎发育早期各阶段对应的时间
Tab.1 The corresponding time of hybrid control group and gynogenetic group in each early developmental stages

发育阶段	杂交对照组	雌核发育组	
		单倍体对照组	二倍体处理组
排放第一极体	35~40min	10~11h30min	10~11h30min
排放第二极体	55min	12h15min	-
2 细胞期	1h55min	13h40min~14h	13h~13h25min
4 细胞期	3h	15h	14h

注:杂交组受精后 4 h 受精率为 52.6%;雌核发育单倍体组 15 h 后受精率为 15.3%;雌核发育二倍体组 16 h 后受精率为 25.6%;试验重复 3 次

2.2 6-DMAP 第二极体抑制型雌核发育二倍体卵子的核行为

2.2.1 减数分裂过程中的核行为

异源诱导雌核发育受精卵的雌原核形成过程与栉孔扇贝正常发育受精卵中的雌核变化过程一致。精核的形成变化过程与正常发育卵中精核变化过程不同,只能发生一次轻微膨胀(图版 I-3~6),形成雄原核,但雄原核不能浓缩成染色体,而是形成致密的染色质小体(dense chromatin body,简称 DCB)(图版 I-6)。雌雄原核可以相向靠近,但并不融合。雌核发育单倍体受精卵能够排出第一极体和第二极体,当受精卵经 6-DMAP 处理后,第二次减数分裂受到明显抑制,二倍性雌核不发生分离(图版 I-6)。

2.2.2 两次卵裂过程中的核行为

第一次卵裂后期,母本染色体在纺锤丝牵引下移向两极,而 DCB 则滞留于两组母本染色体之间(图版 I-7,8),没有观察到 DCB 的分离。到二细胞期,DCB 存留于两个卵裂球之间的卵裂沟上(图版 I-9)或进入其中一个卵裂球的细胞质中(图版 I-10)。第二次卵裂至四细胞期(图版 I-11,12),发现 DCB 在其中相邻两细胞的卵裂沟上。

2.3 诱导雌核发育二倍体中的其他倍性

2.3.1 杂交体

在卵裂过程中,受精卵排出两个极体,合子核将染色体分配给两个子细胞(图版 II-1~4)。

2.3.2 雌核发育单倍体

第一次卵裂后期,当雌核分裂为两部分,胞质未分离时,可以看到 DCB(图版 II-5)。当核质都分裂时,也可看到停留于两卵裂球间的 DCB,且与极叶相对一端有两个极体(图版 II-6)。到二、四细胞时,仍能看到两个极体和 DCB(图版 II-7,8)。

2.3.3 异源三倍体

第一、第二次卵裂时,受精卵仅排放一个极体,DCB 不存在(图版 II-9~12)。这种异源三倍体中含有两套栉孔扇贝基因组染色体和一套长牡蛎基因组染色体而不同于栉孔扇贝三倍体。

2.3.4 雌核发育四倍体

第一次卵裂后期雌性原核发生分离时,可观察到停留于其间的 DCB,但与极叶相对一端并未见到极体排出(图版 II-13,14)。到二细胞和四细胞时,可以看到 DCB 或者位于其中一个卵裂球中(图版 II-15),或者位于卵裂球间的卵裂沟上(图版 II-16)。

3 对照组和处理组的染色体观察

观察并分别统计单倍体组,杂交组和药物处理组的染色体,观察结果如图版 III。杂交组中染色体分布范围较宽(图版 III-1,2);加药处理组染色体分布也较宽,在此组中有非整倍体染色体(46,图版 III-3),单倍体($N=19$,图版 III-4),二倍体($2N=38$,图版 III-5),四倍体($4N=76$,图版 III-6),染色体数目统计另

文发表。

4 讨论

4.1 源精子的选用

在我们长期的生产实践过程中发现,粘附有长牡蛎的栉孔扇贝在排卵后,有个别卵子受精排放极体。我们认为可能是长牡蛎精子激活了栉孔扇贝卵子从而导致受精现象。长牡蛎和栉孔扇贝在分类地位上相距甚远,长牡蛎染色体数目为 $2n = 20$,栉孔扇贝的染色体数目为 $2n = 38$,其杂种不能存活^[4],但是经过遗传灭活的精子可以有效地启动栉孔扇贝的雌核发育,即使有少量的精子不能灭活,也会在胚胎发育过程中被淘汰,这样排除了外源精子基因组的干扰,保障了试验的可靠性。

4.2 雌核发育过程中胚胎发育滞缓现象的分析

异源诱导的雌核发育二倍体在发育过程中与董迎辉^[5-6],潘英^[7]等观察的栉孔扇贝同源雌核发育过程相似,但在发育时间上滞缓。这种滞缓现象在合浦珠母贝^[1]、皱纹盘鲍^[8]、长牡蛎^[3]、栉孔扇贝^[4-6]等同源诱导的雌核发育二倍体中也有相似的报告,但是滞缓程度不同。Longo^[9]认为,调节雄性原核形成的物质与精核蛋白密切相关。精子经过紫外线照射后,其 DNA 结构以及其内部的一些与受精相关的蛋白因子遭到严重破坏,又因为长牡蛎和栉孔扇贝在亲缘关系上非常远,从而使得受精发育过程严重滞后。这种观察结果与在鱼类中有很大的不同,舒 琥^[10] 2000 年报道,同源和异源精子在彭泽鲫卵子的激活过程中在胚胎发育时间上基本相同。

在本研究中发现,经 6-DMAP 处理后雌核发育二倍体组与未加药的单倍体组相比,胚胎发育速度明显加快,发育更加同步。已有研究发现,6-DMAP 对哺乳动物 M II 期的卵母细胞有激活作用并可以加速原核的形成。用 Ionomycin 和 6-DMAP 共激活法激活绵羊卵,可产生高比例的二倍体孤雌胚^[11]。Lan 等^[12]发现,6-DMAP 和乙醇共同作用也可以有效地激活小鼠卵母细胞的孤雌生殖。因此,作者认为 6-DMAP 在抑制第二极体排放的同时也激活了卵子的胚胎发育,使得加药后雌核发育二倍体胚胎发育比单倍体要快。在其他贝类雌核发育诱导过程中没有发现这种激活现象,是因为其胚胎发育过程没有明显的滞缓现象,6-DMAP 的激活作用与正常的发育过程重合,而被忽视。对于贝类异源精子诱导的栉孔扇贝雌核发育受精发育过程如此明显滞缓和加药后发育速度明显加快这一现象,是一个非常有趣和值得研究的问题,相关机理正在探索中。

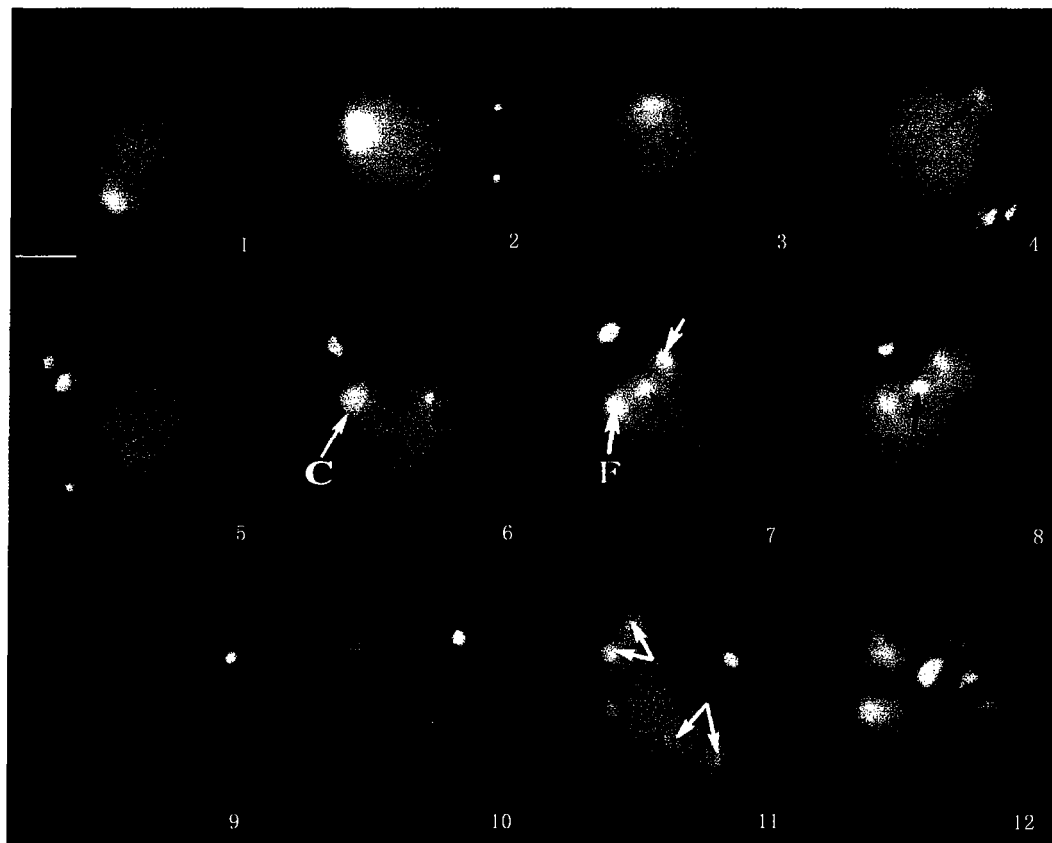
4.3 诱导雌核发育二倍体中出现的复杂倍性

在诱导雌核发育二倍体的过程中还产生了一定量的杂交体、雌核发育单倍体、异源三倍体、雌核发育四倍体,这与董迎辉^[6]观察的同源诱导雌核发育二倍体时结果相似。当长牡蛎精子经紫外线照射未失活时,如果 6-DMAP 处理无效,受精卵发育成杂交体;若 6-DMAP 成功抑制了第二极体排出则产生只排一个极体的异源三倍体。当精子遗传失活时,而 6-DMAP 处理无效,就会产生雌核发育单倍体;当 6-DMAP 抑制了第一、二极体的排出,则出现雌核发育四倍体。作者认为,出现复杂倍性有三个原因:一是长牡蛎与栉孔扇贝杂交,也会出现只排放一个极体或者不排放极体的现象^[4];二是精子经过紫外线照射以后遗传物质部分或全部被失活;三是异源精子诱导的栉孔扇贝雌核发育二倍体在受精过程中有明显滞缓现象,使得受精卵发育很不同步,因而起始处理时间和持续处理时间有待进一步的试验研究。

参考文献:

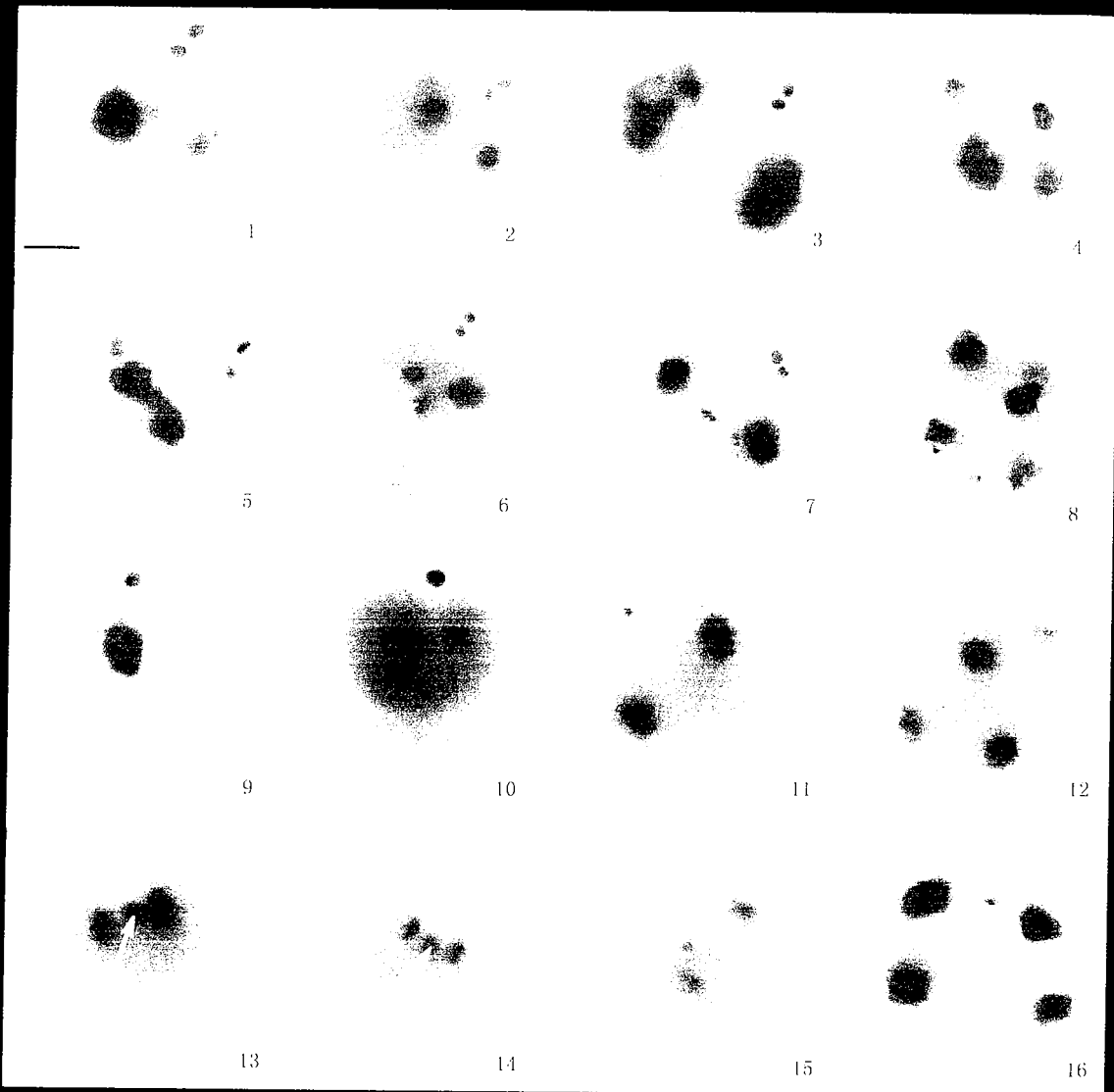
- [1] 许国强,林岳光,李刚,等.人工诱导合浦珠母贝雌核发育二倍体发生及 Hertwig 效应的初步研究[J].热带海洋,1990,9(2):1-9.
- [2] 李雅娟,毛连举,李霞,等.太平洋牡蛎人工诱导雌核发育精子遗传失活的初步研究[J].大连水产学院学报,2003,18(2):109-113.
- [3] Qi Li, Osada M, Kashihara M, et al. Cytological observations on nuclear behavior in normal and gynogenetic eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Suisanzoshoku, 2000, 48:193-198.

- [4] 任建峰,杨爱国,董迎辉,等. 栉孔扇贝♀×长牡蛎♂受精过程的荧光显微观察[J]. 中国水产科学,2005,12(5):643-647.
- [5] 董迎辉,杨爱国,刘志鸿,等. 栉孔扇贝正常发育和人工雌核发育二倍体早期胚胎核行为的细胞学观察[J]. 水产学报,2006,30(1):29-35.
- [6] 董迎辉,杨爱国,刘志鸿,等. 6-DMAP诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体的细胞学观察[J]. 高技术通讯,2004,14(增刊):343-348.
- [7] 潘英,李琪,于瑞海,等. 栉孔扇贝人工雌核发育的细胞学观察[J]. 水产学报,2004,28(6):616-622.
- [8] Qi Li, Osada M, Kashiwara M, *et al.* Cytological studies on artificially induced gynogenesis in the Pacific abalone[J]. Fisheries Science, 2000,66:701-707.
- [9] Longo F J, Anderson E. An ultrastructural analysis of fertilization in the surf clam, *Spisula solidissima*: II. Development of the male pronucleus and the association of the maternally and paternally derived chromosomes[J]. J Ultrastruct Res, 1970,33:515-527.
- [10] 舒琥,张海发,陈湘舜,等. 彭泽鲫雌核发育的细胞学研究[J]. 动物学杂志, 2000,35(5):12-16.
- [11] Moses R M, Kline D, Masui Y, *et al.* Maintenance of metaphase in colcemid-treated mouse eggs by distinct calcium and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) sensitive mechanisms[J]. Developmental Biology, 1995,167:329-337.
- [12] Lan G C, Ma S F, Wang Z Y, *et al.* Effects of post-treatment with 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) on ethanol activation of mouse oocytes at different ages[J]. J Exp Zoo, 2004,301:837-843.



图版 I 异源精子诱导栉孔扇贝第二极体抑制型雌核发育二倍体卵子的核行为变化
Plate I The nuclear behavior of gynogenetic diploid induced
by heterologous sperm in *Chlamys farreri* by inhibiting the second polar body

1. 第一次成熟分裂中期(未受精的成熟卵子);2. 精子附卵;3. 精子入卵;4. 第一次减数分裂后期;5. 排放第一极体;6. 二倍性雌原核和一个雄原核;7. 第一次卵裂后期早期;8. 第一次卵裂后期晚期;9. 2 细胞期(DCB 位于卵裂沟上);10. 2 细胞期(DCB 进入一个卵裂球中);11. 第二次卵裂后期(DCB 位于卵裂沟上);12. 4 细胞期(DCB 位于卵裂沟上);黑色箭头指示精子或精核。白色箭头指示雌核染色质或染色体。比例尺 = 20 μm



图版 II 异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体过程中产生的其他倍性胚胎的核相
 Plate II Complicated ploidies were generated during gynogenetic diploids
 being induced by heterologous sperm in *Chlamys farreri*

1~4. 杂交体:1. 第一次卵裂早期(雌雄原核未融合);2. 第一次卵裂后期;3. 2 细胞期;4. 4 细胞期. 5~8. 雌核发育单倍体:5. 第一次卵裂中后期(核分裂,胞质未分裂);6. 第一次卵裂后期;7. 2 细胞;8. 4 细胞期. 9~12. 异源三倍体:9. 第一次卵裂中期(雌雄原核融合);10. 第一次卵裂后期;11. 2 细胞期;12. 4 细胞期. 13~16. 雌核发育四倍体:13,14. 第一次卵裂后期;15. 2 细胞期;16. 4 细胞期,黑色箭头指示 DCB 位置,比例尺 = 20 μm



图版Ⅲ 对照组和药物处理组染色体

Plate III Chromosomes in hybrid control groups and medical treatment group

1,2. 杂交对照组:非整倍体 34,53; 3,4,5,6. 药物处理组:3. 非整倍体,46; 4. 单倍体, $N=19$; 5. 二倍体, $2N=38$; 6. 四倍体, $4N=76$.