

抑制栉孔扇贝第一极体对受精卵染色体行为及胚胎倍性组成的影响

李永仁^{1,2} 阙华勇¹ 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 采用细胞松弛素 B (CB) 处理, 栉孔扇贝 (*Chlamys ferrerii*) 抑制其受精卵的第一极体 (PB1), 研究抑制 PB1 对受精卵减数分裂过程及胚胎倍性组成的影响。结果发现, 抑制第一极体显著改变了受精卵的染色体行为, 在第二次减数分裂过程中共发现 4 种典型染色体分离类型, 分别是三极分离 (41.7%)、二极分离 (11.7%)、双二极分离 (24.9%) 和非同步分离 (2.8%), 其余的受精卵 (19.0%) 染色体分离行为紊乱。对 4-8 细胞期胚胎的倍性组成进行分析, 发现处理组中含有二倍体 (10.9%)、三倍体 (12.5%)、四倍体 (19.5%)、五倍体 (12.6%) 以及非整倍体 (46.6%) 胚胎。研究结果表明, 二极分离和双二极分离分别是形成三倍体和四倍体的主要机制, 而其他的染色体分离行为将主要形成非整倍体。

关键词: 栉孔扇贝 (*Chlamys ferrerii*); 第一极体; 染色体分离; 胚胎; 倍性组成

中图分类号: S917.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2005)08-0066-05

三倍体贝类因其具有生长快、肉质佳等优良的经济性状而在水产养殖业中具有重要应用价值^[1]。贝类三倍体的诱导除用细胞松弛素 B (CB) 等药物抑制第一极体 (PB1) 或第二极体 (PB2) 的排放外, 还可通过四倍体与二倍体的杂交获得 100% 的三倍体^[2]。应用雄性四倍体与雌性二倍体杂交, 获得了 100% 的三倍体长牡蛎^[3]。四倍体贝类的培育对规模化生产三倍体贝类具有重要的意义。目前已经发展出包括 PB1 阻断在内的多种四倍体诱导方法^[4]。其中, 通过三倍体产生的卵子与来自二倍体的精子受精后, 采用 CB 阻断 PB1 的排出, 成功获得了有存活力的长牡蛎四倍体。抑制长牡蛎 PB1 造成受精卵出现一系列复杂的染色体分离行为, 导致三倍体、四倍体、五倍体以及非整倍体的形成^[5]。

采用 CB 抑制受精卵 PB1 的释放已经成功获得了栉孔扇贝四倍体幼虫和少量稚贝, 但由于四倍体幼虫存活率低, 迄今尚未得到四倍体成体^[5]。Yang 等利用铁-苏木精染色方法观察 PB1 受阻断的栉孔扇贝受精卵, 发现了一些特殊的染色体分离形式^[6]。本研究采用改良的乙酸-地衣红压片方法观察了受精卵染色体分离行为, 并追踪研究 4~8 细胞期胚胎倍性组成, 探讨 CB 抑制第一极体对栉孔扇贝第二次减数分裂后期的染色体分离行为以及胚胎倍性组成的影响, 揭示各种倍性胚胎的发生机制。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

栉孔扇贝 *Chlamys ferrerii* 亲贝购于山东蓬莱, 选择性腺发育良好的雌贝和雄贝, 干露 1h, 分别置入经紫外线照射 30min 的砂滤海水催产。卵子悬浮液以 90μm 筛绢过滤去除组织碎片,

30μm 筛绢收集, 置入 5000mL 塑料杯; 精子用 30μm 筛绢过滤, 收集待用。

取适量精子, 加入卵子悬浮液中, 镜检每个卵子周围附上 3~8 个精子为宜。受精后的卵子分成 2 组, 即对照组和处理组。对照组个别受精卵出现 PB1 (约受精后 15min) 时, 处理组加入 0.5mg/L CB (SIGMA)。CB 处理持续至对照组中出现 PB1 的受精卵比例达到 50% (约受精后 40min), 以 25μm 筛绢洗卵, 去除 CB, 重新悬浮在新鲜的砂滤海水中。催产和受精的温度为 19℃, 盐度 30。

自受精后处理组和对照组分别取样, 每隔 5min 取样一次, 至受精后 75min。取样采用 25μm 筛绢过滤去除海水, 用卡诺液 (甲醇: 冰醋酸 = 3:1) 固定。4~8 细胞期胚胎样品以 0.01% 秋水仙素处理 15min, 0.075mol/L KCl 溶液低渗 10min, 卡诺液固定, 4℃保存待用。

1.2 染色和制片

受精卵或胚胎样品经 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (PBS) 冲洗, RNase (200μg/mL) 25℃处理 1~2h, 再以卡诺液进行二次固定。取样滴片, 加入含 0.5% 地衣红 (SIGMA) 的 60% 乙酸溶液 2~

收稿日期: 2005-04-28; 修回日期: 2005-05-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30100141, 30471326); 国家 863 计划资助项目 (2001AA628060); 山东省博士基金资助项目 (20000410)

作者简介: 李永仁 (1978-), 男, 天津宁河人, 硕士生, 从事海水贝类遗传研究, E-mail: lyr1018@163.com; 阙华勇, 通讯作者, E-mail: hque@ms.qdio.ac.cn

3 滴^[5], 覆以盖玻片, 30min 后压片, 树脂或指甲油封片。利用 NIKON E-600 显微摄影系统观察染色体, 乐凯 SHD100 黑白胶卷拍照。栉孔扇贝二倍体具有 19 对 38 条染色体^[8], 三倍体 55 ~ 57 条, 四倍体 73 ~ 76 条, 五倍体 91 ~ 95 条, 其余为非整倍体^[4]。

2 结果

2.1 第二次减数分裂后期染色体分离类型

未受精卵处于第一次减数分裂前中期。受精后, 卵子重新启动减数分裂。对照组的受精卵完成两次减数分裂, 先后释放出 PB1 和 PB2。处理组本应作为 PB1 排出的二分体组留存在卵子中, 独立存在或与卵内的另一组二分体联合进入第二次减数分裂。在第二次减数分裂后期, 存在多种类型的染色体分离行为, 分述如下。

2.1.1 二极分离

来自第一次减数分裂的两组二分体联合并共同排列于一个二极纺锤体的赤道板上, 至后期每个二分体的两条姊妹染色单体相互分离, 各自向相对的两极移动, 形成两组染色体(图 1-1)。

2.1.2 三极分离

第一次减数分裂产生的两组二分体被随机牵引到三极纺锤体的三个赤道板上, 在第二次减数分裂后期, 组成每一条二分体的两条染色单体相互分开, 形成的两条染色体各自移入相邻的两极, 至第二次减数分裂末期, 形成 3 组染色体, 每组的染色体数目随机(图 1-2)。

2.1.3 双二极分离

来自第一次减数分裂的两组二分体各自独立进入第二次减数分裂, 在第二次减数分裂中期分别处于两个独立纺锤体的赤道板上, 在后期姊妹染色单体分别拉向两极, 形成四组染色体(图 1-3)。

2.1.4 非同步分离

在一组二分体发生姊妹染色单体分离时, 另一组二分体并不进入第二次减数分裂过程(图 1-4)。

此外, 部分受精卵在第二次减数分裂过程中的染色体分离行为紊乱, 无法确定其分离规律。

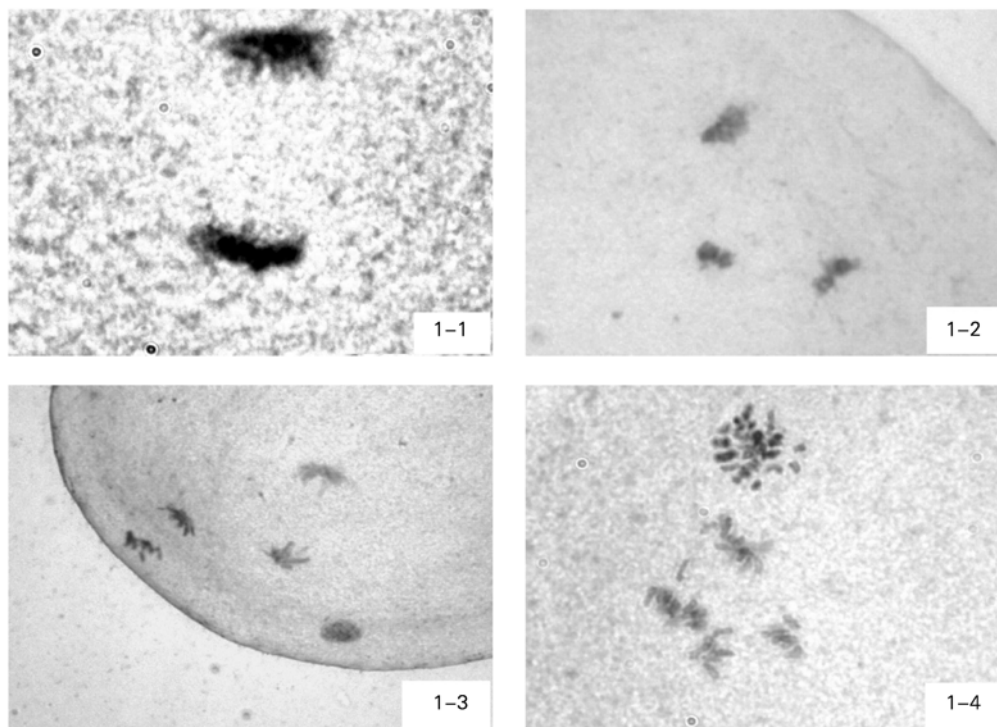


图 1 PB1 受抑制的栉孔扇贝受精卵第二次减数分裂后期染色体分离形式 (× 1000)

Fig. 1 Chromosome segregation patterns observed during meiosis II in fertilized eggs following inhibition of PB1 in *Chlamys farreri*

1-1. 二极分离; 1-2. 三极分离; 1-3. 双二极分离; 1-4. 非同步分离。

1-1. bipolar segregation; 1-2. tripolar segregation; 1-3. double bipolar segregation; 1-4. unsynchronized segregation

2.2 染色体各分离类型的发生频率

对两个处理组的受精卵染色体分离类型进行统计,各种染色体分离类型的比例见表1。三极分离最多,占41.7%,其次是双二极分离,非同步分离最少,仅为2.8%。除此之外,染色体发生紊乱分离的受精卵具有一定的比例,达19%。

2.3 4~8 细胞期胚胎的倍性组成

对栉孔扇贝诱导组4~8 细胞胚胎的染色体观察,发现二倍体、三倍体、四倍体、五倍体以及大量的非整倍体胚胎(图2,表2)。染色体数介于三倍体与四倍体之间的非整倍体胚胎最多,

其他依次是介于二倍体与三倍体之间、二倍体以下、介于四倍体与五倍体之间的非整倍体。

3 讨论

3.1 传统地衣红染色方法的改进

地衣红染色的过程中,卵质染色较深,与染色体反差并不十分明显。本研究采用 RNase 处理样品,显著提高了染色体和卵质的染色反差。我们认为,栉孔扇贝卵质内存在大量的信使

表1 PB1 受抑制的栉孔扇贝受精卵在第二次减数分裂中的染色体分离类型所占比例

Tab.1 Percentage of chromosome segregation patterns observed in MII eggs from *Chlamys farreri*, following inhibition of PB1 with cytochalasin B

组别	染色体分离类型所占比例(%)(统计数)				
	二极分离	三极分离	双二极分离	非同步分离	紊乱分离
1	12.2 (24)	38.6 (76)	25.4 (50)	3.0 (6)	20.8 (41)
2	11.2 (17)	44.7 (68)	24.3 (37)	2.6 (4)	17.1 (26)
平均值	11.7	41.7	24.9	2.8	19.0

RNA, 与地衣红染料结合导致卵子背景加深。通过 RNase 的降解作用,降低了背景染色强度。

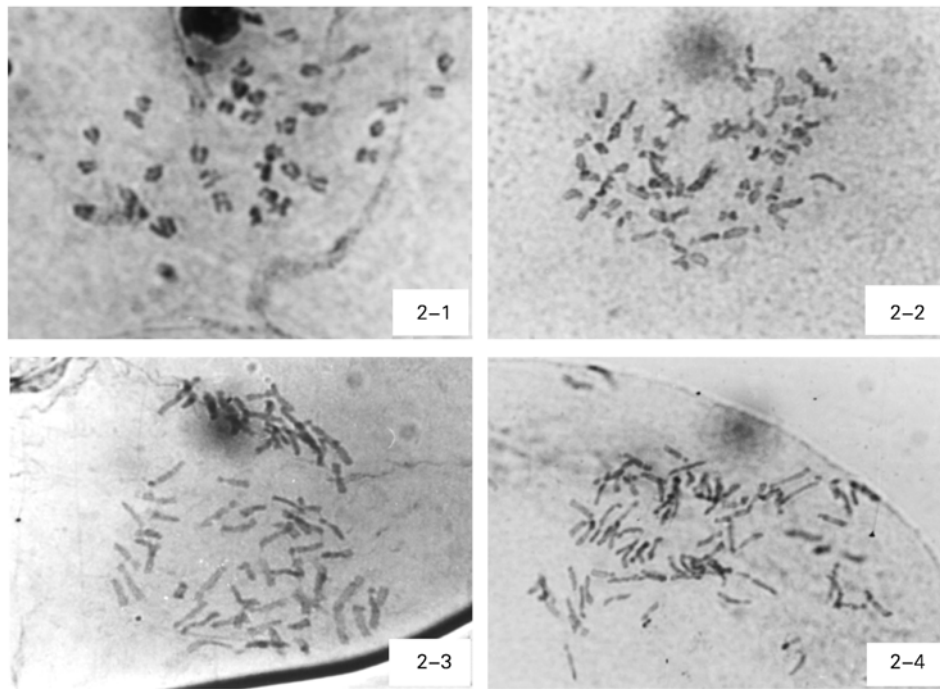


图2 栉孔扇贝4~8 细胞期胚胎不同倍性的中期分裂相

Fig. 2 Example metaphase of 4~8 cell embryos of *Chlamys farreri*

1-1. 二倍体; 1-2. 三倍体; 1-3. 四倍体; 1-4. 五倍体

1-1. diploid; 1-2. triploid; 1-3. tetraploid; 1-4. aneuploid

3.2 各种染色体分离类型的发生机制

PB1 受抑制的受精卵在第二次减数分裂后期出现的各种染色体分离类型,估计与中心体的行为有密切的联系。在对紫贻贝(*Mytilus edulis*)以及大西洋浪蛤(*Spisula solidissima*)的受精生物学研究中发现纺锤体的形成与中心体的动态密切相关^[7,8]。在一项 CB 对长牡蛎卵子减数分裂过程影响的研究发现中心体在建立三极减数分裂纺锤体中发挥重要作用^[9]。采用压片法观察染色体分离动态,具有一定局限性。通过观察减数分裂纺锤体装配动态和空间形态将更直观地揭示染色体分离行为,为充分阐明染色体的各种分离类型的发生机制提供更翔实的实验证据。

3.3 第二次减数分裂染色体分离形式对胚胎倍性的影响

取决于第二次减数分裂的染色体分离行为和作为 PB2 释放的染色体数目,PB1 受阻断的栉孔扇贝受精卵具有相应的倍性,不同染色体分离类型对胚胎倍性组成的影响见表 3。

研究结果证实,二极分离是三倍体胚胎产生的主要机制。

部分双二极分离和三极分离将导致四倍体的形成。三极分离仅

表 2 栉孔扇贝 CB 处理组 4~8 细胞期胚胎倍性组成

Tab.2 Ploidy composition of 4~8 cell stage embryos of zhikong scallop from CB treated group

倍性	胚胎个数	胚胎个数占总数比例(%)
二倍体	19	10.9
三倍体	18	12.5
四倍体	34	19.5
五倍体	22	12.6

在释放 19 条染色体时才形成四倍体,所以三极分离形成四倍体的几率较小。四倍体胚胎的比例(19.5%)接近于双二极分离的平均比例(24.9%),说明双二极分离是形成四倍体胚胎的主要机制。而三极分离、非同步分离以及紊乱分离将主要形成非整倍体。

表 3 栉孔扇贝成熟分裂染色体分离类型对胚胎倍性组成的影响

Tab.3 Effect of chromosome segregation patterns on the ploidy composition of consequent embryos of *Chlamys farreri*

染色体分离类型	主要遗传行为	胚胎倍性
二极分离	母本形成 2 组 38 条染色单体,其中 1 组随第二极体释放,精子提供 1 组 19 条染色体	三倍体
双二极分离	形成 4 组 19 条染色单体 (1)释放 1 组 (2)释放 2 组 (3)释放 3 组	四倍体 三倍体 二倍体
三极分离	染色体随机分配到三个赤道板上, (1)其中一极为 19 条染色单体并且该极的染色单体随第二极体释放 (2) 19 条染色单体的该极保留在卵内,其余 2 极的染色单体释放 (3) 其他行为	四倍体 二倍体 非整倍体

参考文献:

- [1] Guo X. Superior growth as a general feature of triploid shellfish: evidence and possible causes[J]. *J Shellfish Res*, 1999, **18**(1): 266–267.
- [2] Guo X, DeBrosse G, Allen S K Jr. All triploid pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids[J]. *Aquaculture*, 1996, **142**: 149–161.
- [3] 阙华勇, 张国范, 刘晓, 等. 雄性四倍体与雌性二倍体杂交培育全三倍体长牡蛎的研究[J]. *海洋与湖沼*, 2003, **34**(6): 656–662.
- [4] Yang H, Zhang F, Guo X. Triploid and tetraploid Zhikong scallop *Chlamys farreri* Jones et preston, produced by inhibiting PB1[J]. *Mar Biotechnol*, 2000, **2**: 466–475.
- [5] Que H, Guo X, Zhang F, et al. Chromosome segregation in fertilized eggs from triploid pacific oysters, *Crassostrea gigas*(Thunberg), following inhibition of polar body I[J]. *Biol Bull*, 1997, **193**: 14–19.
- [6] Yang H, Que H, He Y et al. Chromosome segregation in fertilized eggs from zhikong scallop *Chlamys farreri* following polar body I inhibition with CB[J]. *J Shellfish Res*, 2000, **19**(1): 101–105.
- [7] Longo F J, Anderson E. Cytological aspects of fertilization in the lamellibranch, *Mytilus edulis*. II. Development of the male pronucleus and the association of the maternally and

- paternally derived chromosomes[J]. **J Exp Zool**, 1969, 172: 97–120.
- [8] Longo F J, E Anderson. An ultrastructural analysis of fertilization in the surf clam, *Spisula solidissima*. I. Polarbody formation and development of the female pronucleus[J]. **J Ultrastruct Res**, 1970, 33: 495–514.
- [9] Longo F J, Mathews L, Hedgecock D. Morphogenesis of maternal and paternal genomes in fertilized oyster eggs(*Crassostrea gigas*): effects of cytochalasin B at different periods during meiotic maturation[J]. **Biol Bull**, 1993, 185: 197–214.

Effect of inhibiting the first polar body on chromosome segregation in fertilized eggs and ploidy composition of embryos in the zhikong scallop, *Chlamys farreri*

LI Yong-ren^{1,2}, QUE Hua-yong¹, ZHANG Guo-fan¹

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China ; 2. The Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Apr., 28, 2005

Key words: *Chlamys farreri*; the first polar body(PB1); chromosome segregation; embryo; ploidy composition

Abstract: Effect of inhibiting the first polar body (PB1) on chromosome segregation in fertilized eggs and ploidy composition of 4~8 cell embryos was studied in Zhikong scallop, *Chlamys farreri*. Cytochalasin B was applied to newly fertilized eggs to block the release of PB1. Four types of segregation were observed in meiosis II, namely, tripolar segregation (41.7%), bipolar segregation (11.7%), double bipolar segregation (24.9%) and unsynchronized segregation (2.8%). The remains could not be classified because of chromosome disorganization. In treated group, diploid (10.9%), triploid (12.5%), tetraploid (19.5%), pentaploid (12.6%) and aneuploid (46.6%) were found in 4~8 cell stage embryos. Results presented here indicate that bipolar segregation would lead to the formation of triploids. Tetraploids, however, are mainly resulting from double bipolar segregation. The remaining segregation would primarily produce aneuploids.

(本文编辑：刘珊珊)