

栉孔扇贝四倍体诱导效果的早期分析方法

龚丽贞¹ 张国范²

(¹大连水产学院 大连 116023)

(²中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 应用流式细胞仪检测栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)担轮幼虫、D型幼虫倍性组成,结合现场观察、压片观察及D型幼虫生成率分析了热休克抑制第一次卵裂(MI)诱导栉孔扇贝四倍体的诱导效果。该方法可快速、有效地分析出处理剂量、起始处理时间、处理持续时间对诱导效果的影响,从而筛选出合适的诱导指标。

关键词 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*),四倍体诱导,早期分析方法

中图分类号 Q81 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2003)07-0059-04

四倍体研究的兴起源于三倍体育种的研究。目前对三倍体诱导的大量工作表明,很难有一种方法能获得100%的三倍体,而且三倍体育种是不连续的,所以通过人工诱导四倍体,培育出可育的四倍体群体,使之与正常二倍体杂交,从理论上讲可以产生100%三倍体,从而实现大量、连续的三倍体育种。这就是人们研究四倍体的目的之所在。

栉孔扇贝是我国主要的传统养殖经济贝类,也是目前贝类多倍体研究的重点对象之一。采用热休克抑制第一次卵裂诱导栉孔扇贝四倍体,本文报道了一种分析其诱导效果的简便方法。

1 材料与方 法

1.1 材料

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)取自青岛地区,壳高6~8 cm,性腺好。

1.2 方 法

1.2.1 产卵及受精 阴干、升温、紫外消毒海水催产,分别收集精卵,人工授精。

1.2.2 诱导处理 从授精开始计时,授精10 min后洗卵,记录第一极体(pb1)、第二极体(pb2)及第一极叶(pL1)、第二极叶(pL2)出现时间,并记录发育水温。在出现5%~10% pL1时开始处理,处理持续至对照出现5%~10% pL2(约30 min)。根据栉孔扇贝对高温的适应力,在水温超过25℃时生长受阻,在水温35℃时即发生死亡,初步设定热休克温度梯度为:28℃(T-1),30℃(T-2),35℃(T-3)(T-1表示处理

1,以下同)。

1.2.3 取样及观察 开始处理时取样,卡诺固定;处理过程中取样观察第一次卵裂抑制效果;处理结束后处理组分裂情况观察,出现5%~10%极叶时再取样固定;18~20 h担轮幼虫及48 h D型幼虫取样,流式细胞仪分析;计算48 h D型幼虫生成率(D型幼虫生成率=D型幼虫量/受精卵量)。

2 结果与分析

2.1 实验结果

发育水温:18.4℃。

担轮幼虫期流式细胞仪检测结果显示无4n产生,T-1峰形与对照相似,T-2表现为单个宽峰;起始处理压片观察,伸出极叶的受精卵其核已完成分裂,处于MI后期,未伸出极叶的大部分处于MI中期;处理过程中观察,T-1中MI未抑制住,在处理过程中即伸出pL1,完成分裂,T-2的处理温度在开始处理后约5 min即升至32℃,结果一部分伸出的pL1又缩回,T-3中MI受抑制,且受处理卵多畸形;解除处理后T-3一直不再分裂;处理结束后压片观察,T-2部分受处理卵虽有极叶伸出但核未分裂,且多分裂紊乱。

第一作者:龚丽贞,出生于1977年,硕士,E-mail: glz0808@163.com

收稿日期:2002-03-11;修回日期:2002-05-20

从处理过程中观察 MI 受抑制情况及解除处理后受处理卵分裂情况分析, 热休克温度应在 32 ℃ 以上 35 ℃ 以下, 缩短处理持续时间。

2.2 实验调整结果

2.2.1 固定热休克温度 34 ℃, 起始处理时间不变, 处理持续时间: 4 min(T-1), 7 min(T-2), 10 min(T-3), 结果(水温 19.2 ℃): 担轮幼虫期流式细胞仪检测结果显示无 4n 产生, T-3 出现单个宽峰, T-1、T-2 峰形与对照相似, 但杂峰有所增大; 处理结束后受处理卵分裂情况观察, T-3 畸形分裂较多, T-1 及 T-2 分裂情况基本同对照组; 处理结束后压片观察, 三个处理组均有不同程度的染色体分离紊乱, T-3 部分受处理卵有极叶伸出但核未分裂。

从担轮幼虫期流式细胞仪检测的峰形分析, 热休克在持续处理 10 min 左右起作用。根据处理结束后压片观察结果, 热休克温度 34 ℃ 处理 10 min 有部分受处理卵处理结束后不再分裂, 调整热休克温度为 33 ℃。未得到 4n 峰的原因可能是起始处理时间设定不恰当, 调整起始处理时间。

2.2.2 固定热休克温度 33 ℃ 和处理持续时间 10 min, 起始处理时间设梯度: 15 minPpb2(T-1), 20 minPpb2(T-2), 25 minPpb2(T-3), 30 minPpb2(T-4), 35 minPpb2(T-5), 结果见表 1(水温 18.0 ℃) (Ppb2 表示出现 20% ~ 30% pb2 后)。

表 1 热休克温度 33 ℃ 持续处理 10 min 实验结果

Tab.1 Result of heat shock treatment with 33 ℃ for 10 min

处理	MI 抑制效	担轮幼虫	D 型幼虫
	果观察	FCM 结果	生成率 (%)
T-1	受抑制	无 4n	40
T-2	受抑制	约 30% 4n	10
T-3	受抑制	>50% 4n	1.79
T-4	受抑制	>50% 4n(杂峰大)	0.065
T-5	受抑制	单个宽峰	0.18

由流式细胞仪检测结果可看出: T-2, T-3, T-4 均可得到 4n 担轮幼虫, 尤其 T-3, T-4 得到的比例较高, 但 T-4 杂峰大, 再结合 D 型幼虫生成率分析, T-3 所得结果最佳, 也即 25 minPpb2 附近开始处理效果相对更好。

固定热休克温度 33 ℃ 和起始处理时间 27 minPpb2, 处理持续时间设梯度: 5 min(T-1), 8 min(T-2), 11 min(T-3), 结果见表 2(水温 19.5 ℃)。

表 2 热休克温度 33 ℃ 27 minPpb2 起始处理实验结果

Tab.2 Result of heat shock treatment with 33 ℃ beginning at 27 minPpb2

处理	MI 抑制效	担轮幼虫	D 型幼虫
	果观察	FCM 结果	生成率 (%)
T-1	未抑制住	无 4n	1.99
T-2	部分抑制	无 4n	0.69
T-3	抑制	无 4n	0.076

担轮幼虫期流式细胞仪检测无 4n 产生。与上次实验比较, 本次实验水温 (19.5 ℃) 高于上次实验水温 (18.0 ℃)。在水温 18.0 ℃ 时, 可得到较高比例 4n 胚胎的起始处理时间段在 25 ~ 30 minPpb2, 而在水温 19.5 ℃ 时, 27 minPpb2 起始处理得不到 4n 胚胎, 由此推测, 在水温相对较高时, 要得到 4n 胚胎的起始处理时间应相应靠前 (经再设起始处理时间梯度, 在水温 19 ~ 20 ℃ 时, 可获 4n 胚胎的适宜起始处理时间为 23 ~ 26 minPpb2, 最后确定两者的交叉点——26 minPpb2 为最佳起始处理时间)。

2.2.3 固定热休克温度 33 ℃ 和最佳起始处理时间 26 minPpb2, 处理持续时间设梯度: 7 min(T-1), 10 min(T-2), 13 min(T-3), 结果见表 3(水温 20.0 ℃)。

处理持续时间设梯度: 9 min(T-1), 12 min(T-2), 15

表 3 热休克温度 33 ℃ 26 minPpb2 起始处理实验结果 1

Tab.3 Result of heat shock treatment with 33 ℃ beginning at 26 minPpb2

处理	MI 抑制效	担轮幼虫	D 型幼虫
	果观察	FCM 结果	生成率 (%)
T-1	小部分受抑制	约 20% 4n	1.97
T-2	受抑制	约 50% 4n	0.83
T-3	受抑制	约 50% 4n(杂峰较大)	0.046

min(T-3), 结果见表 4(水温 20.0 ℃)。

从担轮幼虫期流式细胞仪检测结果及其峰形、D 型幼虫生成率分析, 处理持续时间 10 min 效果最佳。

表 4 热休克温度 33 ℃ 26 minPpb2 起始处理实验结果 2

Tab.4 Result of heat shock treatment with 33 ℃ beginning at 26 minPpb2

处理	MI 抑制效	担轮幼虫	D 型幼虫
	果观察	FCM 结果	生成率 (%)
T-1	大部分受抑制	约 30% 4n	0.53
T-2	受抑制	约 50% 4n(杂峰大)	0.08
T-3	受抑制	约 50% 4n(杂峰大)	0

表 5 26 minPpb2 起始处理持续 10 min 热休克实验结果

Tab. 5 Result of heat shock treatment beginning at 26 minPpb2 for 10min

处理	MI 抑制效果观察	担轮幼虫 FCM 结果	D 型幼虫生成率 (%)
T-1	小部分受抑制	几无 4n	4.72
T-2	受抑制	> 50% 4n	0.80
T-3	受抑制	单个宽峰	0

2.2.4 固定最佳起始处理时间 26 minPpb2 和最佳处理持续时间 10 min, 热休克温度设梯度: 32 °C (T-1), 33 °C (T-2), 34 °C (T-3), 结果见表 5(水温 20.0 °C)。

从担轮幼虫期 FCM 检测结果及其峰形、D 型幼虫生成率分析, 33 °C 为热休克的最佳处理温度。

3 讨论

倍性检测是多倍体育种中必不可少的一环, 流式细胞仪检测法能快速提供样品的倍性组成。在多倍体育种前期工作中应用流式细胞仪检测诱导结果, 再结合起始处理时压片观察, 分析起始处理时间对诱导结果的影响; 处理过程中取样观察第一次卵裂受抑制情况, 记录处理多长时间受处理卵出现形状变化, 如皱缩、细胞膜与细胞内容物间出现空隙, 伸出的极叶又缩回, 分析处理持续时间对诱导结果的影响; 结束后处理组分裂情况观察、开始分裂时取样压片观察染色体分离行为, 分析处理剂量对受处理卵的影响、处理组在处理后的分裂是否出现异常及其对诱导结果的影响。在流式细胞仪检测到 4n 的实验组合中, 再结合流式细胞仪检测结果的杂峰大小、D 型幼虫生成

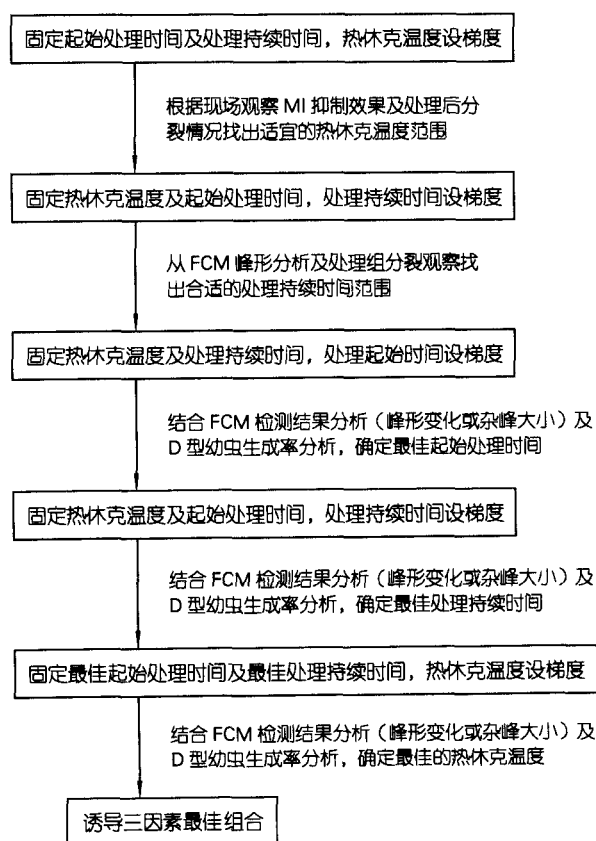


图 1 热休克技术路线

Fig. 1 Technology route for heat shock

率分析,选出最佳的处理组合。

该方法的技术路线见图 1。

综合热休克各次实验,热休克抑制第一次卵裂诱导栉孔扇贝四倍体的适宜诱导指标为:热休克温度 33 ℃,起始处理时间 26 minPpb2,处理持续时间 10 min。

采用以上热休克处理指标抑制第一次卵裂诱导栉孔扇贝四倍体,在担轮幼虫期均检出有较高比例的 4n 峰,在 D 型幼虫期也检出约 15% 的 4n 峰。

本实验证明,采用流式细胞仪检测诱导效果,再结合现场观察、压片观察及 D 型率分析,可以快速分析诱导效果,并调整下步实验,从而筛选出合适的诱导指标。

参考文献

- 1 陈立桥,赵云龙,周忠良,等.中华绒螯蟹多倍体的诱导研究 II.热休克诱导中华绒螯蟹三倍体胚胎和四倍体溞状幼体.动物学报,1997,43(4):390-398
- 2 孙振兴,王如才.经济海洋贝类多倍体研究的现状.齐鲁渔业,1998,15(2):10-15
- 3 张国范.贝类染色体组操作技术.见:曾呈奎,相建海.海洋生物技术.济南:山东科学技术出版社,1992.45-66
- 4 王运涛,相建海.栉孔扇贝大规模死亡的原因初探.海洋与湖沼,1999,30(6):770-773
- 5 吴玉萍,叶玉珍,吴清江.热休克诱导斑马鱼异源三倍体的研究.海洋与湖沼,2000,31(5):465-470

EARLY ANALYSIS METHOD FOR TETRAPLOID INDUCTION IN ZHIKONG SCALLOP *Chlamys farreri* JONES ET PRESTON

GONG Li-Zhen¹ ZHANG Guo-Fan²

(¹Dalian Fisheries University, Dalian, 116023)

(²Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Mar., 11, 2002

Key Words: hikong scallop *Chlamys farreri*, Tetraploid induction, Early analysis method

Abstract

With the results of FCM analysis of trochophore and D-stage larvae, observation during the experiment, cell squashed and yield of D-stage larvae, we analyse the tetraploid induction with heat shock inhibiting MI in zhikong scallop *Chlamys farreri* Jones et Preston. This method can quickly analyse the effect of treating dosage, the starting time and the duration time. And we obtained the optimization factors for tetraploid induction.

(本文编辑:刘珊珊)