

栉孔扇贝(♀)×虾夷扇贝(♂)杂交子代胚后发育过程中遗传构成变化研究

杨璞^{1,2} 杨爱国^{1*} 单伟华³ 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, 青岛 266071)

(² 上海海洋大学 生命科学与技术学院, 200090)

(³ 即墨市海洋与渔业局, 青岛 266200)

摘要 采用 RAPD 和 GISH 技术对栉孔扇贝(♀)和虾夷扇贝(♂)杂交子代胚后发育 4 个重要时期(担轮幼虫期、D 形幼虫期、壳顶幼虫期和眼点幼虫期)的遗传构成进行了检测。在 RAPD 检测中, 50 条随机引物在亲贝中共扩增出 35 条栉孔扇贝的特异条带和 28 条虾夷扇贝特异条带, 其中栉孔扇贝特异条带在杂交子代 4 个时期出现的条数分别为: 担轮幼虫期 21 条、D 形幼虫期 19 条、壳顶幼虫期 23 条和眼点幼虫期 23 条; 而虾夷扇贝特异条带在杂交子代 4 个时期出现的条数分别为: 17、16、1 和 1。GISH 结果表明, 杂交扇贝在担轮幼虫期和 D 形幼虫期均继承了来自父母本遗传物质, 而在壳顶幼虫期和眼点幼虫期未检测到来自父本的遗传物质。结果表明, 杂交子代遗传结构在进入壳顶幼虫期时发生重大改变, 大部分父本遗传物质从杂交贝基因组中丧失。

关键词 栉孔扇贝 虾夷扇贝 杂交 RAPD GISH

中图分类号 S968.3; Q953⁺.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)02-0066-05

Research on genetic variation of hybrid scallop from *Chlamys farreri* ♀ × *Patinopecten yessoensis* ♂ during post-embryo growth

YANG Pu^{1,2} YANG Ai-guo^{1*} SHAN Wei-hua³

LIU Zhi-hong¹ ZHOU Li-qing¹

(¹ Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Minister of Agriculture, Yellow Sea Fisheries, Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² School of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, 200090)

(³ Oceans & Fisheries Bureau of Jimo Qingdao 266200)

ABSTRACT RAPD analysis and genome in situ hybridization (GISH) were applied to research into the genetic variation of the *Chlamys farreri* ♀ × *Patinopecten yessoensis* ♂ hybrid scallop larvae during the four life-history stages (trochophore, D-shaped larvae, umbo-stage larvae and eye-spot larvae). For RAPD analysis, 50 random primers were used and 35 *C. farreri* specific bands and 28 *P. yessoensis* specific bands were detected in the broodstock. Different

国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA10A408)、国家科技支撑计划项目(2006BAD01A00)和国家自然科学基金项目(30600465)共同资助

* 通讯作者。E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2008-01-15; 接受日期: 2008-04-21

作者简介: 杨璞(1982-), 男, 硕士研究生。主要从事贝类遗传育种研究。E-mail: masyp@163.com, Tel: 13791917750

numbers of *C. farreri* specific bands were found in the hybrid during the four life-history stages, and the numbers were: 21 in trochophore, 19 in D-shaped larvae, 23 in umbo-stage larvae, and 23 in eye-spot larvae. The numbers of the *P. yessoensis* specific bands found during these stages were 17, 16, 1 and 1, respectively. Meanwhile, the result of GISH analysis indicated that the hybrid scallop separately inherited one set of chromosomes ($n=19$) from both *C. farreri* and *P. yessoensis* broodstock during both the trochophore stage and the D-shaped larvae stage, while no *P. yessoensis* germ plasm was founded in the umbo-stage larvae and the eye-spot larvae. It was found that, a big transformation of the genetic composition of the hybrid happened in umbo-stage larvae when most of the paternal germ plasm was lost in the genome of the hybrid scallops.

KEY WORDS *Chlamys farreri* *Patinopecten yessoensis* Hybrid RAPD
GISH

杂交育种是遗传育种的主要手段之一,是改良遗传性状和培育优良品种的可靠途径。栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 和虾夷扇贝 *Patinopecten yessoensis* 是同科不同属的两种经济贝类,双方在性状方面有明显的互补性,通过二者杂交所获得的杂交子一代表现出了一定的杂种优势(杨爱国等 2004)。

栉孔扇贝(♀)和虾夷扇贝(♂)的杂交子代在早期胚胎阶段为真正的杂交种,已经被前人的研究所证实。周丽青等(2003)等利用受精细胞学方法观察到栉孔扇贝卵子在处于第 1 次成熟分裂中期时接纳虾夷扇贝精子入卵,并且胚胎正常发育;吕振明等(2006)采用 GISH 手段对杂交贝担轮幼虫期染色体进行研究。结果表明,杂交子代分别继承了双亲各 1 套染色体($n=19$)。然而当杂交贝长至成体时,其外部形态与栉孔扇贝相近,未出现明显的中间性状(杨爱国等 2004)。这些研究结果让人感到困惑,杂交贝在继承了父母本各 1 套染色体的同时为什么仅表现出母本的特征?吕振明等(2006)对处于担轮幼虫期、附着变态期、幼贝期和成贝期的杂交贝的外源物质进行了检测,发现杂交贝在附着变态期时,已经检测不到来自父本的遗传物质,并确定了杂交子代中父本遗传物质消失的时间是在担轮幼虫以后至附着变态前的早期胚胎发育阶段。

本试验将杂交贝在担轮幼虫期至附着变态前的早期胚胎发育阶段进一步细分为担轮幼虫期、D 形幼虫期、壳顶幼虫期和眼点幼虫期 4 个时期,利用 RAPD 和 GISH 技术对杂交贝在这 4 个时期的遗传构成进行检测,以期了解杂交贝中父本遗传物质丧失时间和确切机制,为扇贝远缘杂交中父本遗传物质丧失现象的研究提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

栉孔扇贝和虾夷扇贝亲贝分别取自山东即墨海区和大连海区,取回后严格挑选出雌性栉孔扇贝和雄性虾夷扇贝,在山东即墨养殖场分池暂养。2007 年 3 月选取性腺发育良好的亲贝经人工催产进行杂交试验。按时收集担轮幼虫期、D 形幼虫期、壳顶幼虫期和眼点幼虫期杂交子代,用于染色体和 DNA 的制备。

1.2 仪 器 和 试 剂

1.2.1 仪 器

PCR 扩增仪(Eppendorf, Mastercycler gradient 5331),生物凝胶成像系统(UVP, EC3 Systems),荧光显微镜(尼康 E800, FITC/PI 滤镜组合)。

1.2.2 试 剂

RAPD 引物(S200—S249),购于上海生工公司;生物素切口平移探针标记试剂盒(ROCHE);Propidium I-

odide(PI, VECTOR); Fluorescein Avidin DCS(VECTOR); 海水配制的 0.4%秋水仙素母液; 25%的海水; 预冷卡诺氏液(甲醇:冰醋酸=3:1); 50%冰醋酸; 2×SSC; 0.1%SDS; 10%硫酸葡聚糖; 0.1%TWEEN20(上海生工); 鲑精 DNA; 蛋白酶 K(Prok, 上海生工)。

1.3 方法

1.3.1 RAPD 分析

1.3.1.1 DNA 模板的制备

取栉孔扇贝、虾夷扇贝及 4 个时期杂交子代各 20 个, 亲贝 DNA 的提取采用常规酚-氯仿抽提法进行。单个杂交子代 DNA 的提取参照万俊芬等(2004)的方法进行: 在只含有 1 个个体的 PCR 管内各加入 15 μ l 的裂解液(10mmol/L Tris-Cl, 50mmol/L KCl, 0.5% Tween-20, 0.3 mg/ml ProK, pH 8.0) 于 55 $^{\circ}$ C 恒温裂解 3 h 左右, 再置于 85 $^{\circ}$ C 下 15 min 以灭活蛋白酶 K。将亲贝和各时期杂交子代 DNA 分别混合成基因组池 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.1.2 RAPD 扩增

RAPD 的扩增体系采用优化后的 25 μ l 总反应体系, 其中含: 2.5mmol/L MgCl₂, 0.2mmol/L dNTPs, 0.2 μ mol/L 引物, 1×buffer, 1U Taq 酶, 亲贝采用 30ngDNA 作为模板, 各时期幼虫取 3 μ l 裂解液作为模板。在正式实验之前, 对 RAPD 随机引物进行大规模筛选, 从中选取能稳定扩增父本虾夷扇贝特异片段的引物, 用于杂交扇贝遗传构成的检测。每条引物扩增 3 次以保证稳定性。

1.3.1.3 扩增产物的检测

采用预先筛选出的引物, 对栉孔扇贝♀、虾夷扇贝♂及它们的杂交子代同时进行扩增, RAPD 扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 凝胶成像系统进行检测。每个引物重复操作 3 次以上。

1.3.2 基因组荧光原位杂交分析

1.3.2.1 染色体的制备

杂交贝各时期幼虫染色体的制备方法参照吴宝铃等(1999)进行。具体方法: 各期杂交子代用 0.04%秋水仙素溶液处理 30 min 后, 入 25%海水中低渗 30 min, 预冷卡诺氏液充分固定, 热滴片法制片。染色体标本老化 2d 后置于湿盒中保存备用。

1.3.2.2 基因组荧光原位杂交

扇贝基因组 DNA 的提取采用常规酚-氯仿抽提法进行。栉孔扇贝基因组探针采用生物素缺口平移法标记, 具体方法及其纯化参照 Roche 公司提供的产品说明进行。荧光原位杂交采用分别变性的方法, 具体为: (1)染色体标本的变性: 70%甲酰胺/2×SSC 溶液中 70 $^{\circ}$ C 变性 3min, 立即置于 -20 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ 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 μ l 加到染色体标本上, 盖上盖玻片, 37 $^{\circ}$ C 杂交过夜。杂交后的染色体标本经 50%甲酰胺/2×SSC 溶液和 1×SSC 溶液洗脱后, FITC(20 μ g/ml)染色, PI(1.5 μ g/ml)复染, 荧光显微镜观察并拍摄记录。

2 结果与分析

2.1 杂交贝胚后发育遗传构成变化的 RAPD 检测

实验使用 50 条随机引物扩增出 35 条栉孔扇贝的特异条带(如图 1-a)和 28 条虾夷扇贝特异条带(如图 1-b 和图 1-c)。35 条栉孔扇贝特异条带在杂交子代各个时期出现的条数为: 担轮幼虫期 21 条、D 形幼虫期 19 条、壳顶幼虫期 23 条和眼点幼虫期 23 条和而虾夷扇贝特异条带在杂交子代各个时期出现的条数分别为: 17、16、1 和 1, 仅有引物 S201 扩增出来的 1 条虾夷扇贝特异条带在杂交子代的各个时期都出现(如图 1-b)。

2.2 杂交贝胚后发育遗传构成变化的 GISH 检测

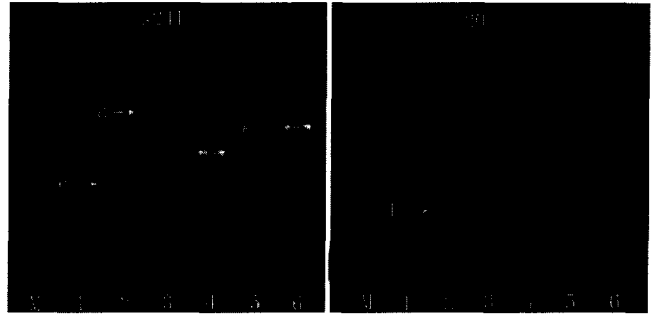
采用栉孔扇贝基因组作探针, 虾夷扇贝基因组作封阻, 对杂交子代担轮幼虫的染色体及 D 形幼虫、壳顶幼

虫和附着变态期幼虫的间期细胞进行荧光原位杂交。结果表明,杂交扇贝担轮幼虫染色体中只有来自母本的 19 条染色体被标记上(绿色),而来自父本的 19 条染色体未被标记上(红色)(如图 2-a)。D 形幼虫每个间期细胞中均有来自父母本的染色质(如图 2-b),而所有的壳顶幼虫和眼点幼虫间期细胞均被栉孔扇贝探针完全标记上(如图 2-c 和图 2-d)。

3 讨论

RAPD 的扩增结果表明,在担轮幼虫期和 D 形幼虫期,杂交贝获得了大部分栉孔扇贝和虾夷扇贝的特异性条带,而当杂交贝发育到壳顶幼虫后能够检测到的虾夷扇贝特异条带就非常少了,仅有引物 S201 扩增出来的 1 条虾夷扇贝特异条带在杂交子代的各个时期稳定出现。这些结果说明,杂交贝在胚胎发育过程中发生了遗传变动,杂交贝发育到壳顶幼虫期时部分虾夷扇贝的遗传物质已从幼虫基因组中消失。GISH 的结果也说明了这一点,杂交贝在担轮幼虫期和 D 形幼虫期时继承了来自父母本的遗传物质,而所有的眼点幼虫期和壳顶幼虫期杂交贝间期细胞均未检测到父本的遗传物质。由于常规的 GISH 方法只能将 80%~85% 的同源序列分开,超过 85% 就很难将其区分(Schwarzacher *et al.* 1989),所以两种方法的结果并不矛盾。可以肯定杂交贝基因组在进入壳顶幼虫期时发生重大改变,大部分父本遗传物质通过某种机制从杂交贝基因组中丧失。

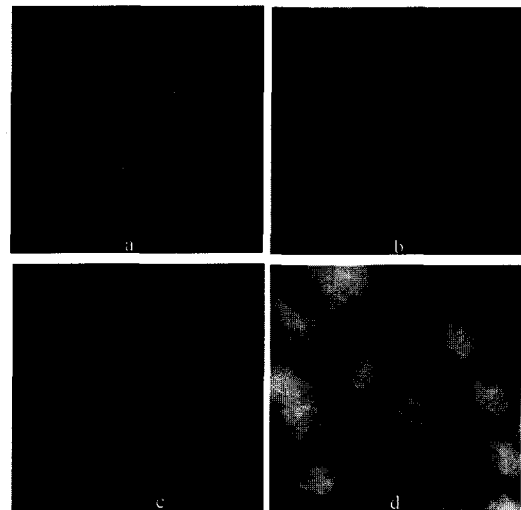
物种在长期的进化中形成了生殖隔离,远缘杂交常具有不亲和性,在农作物远缘杂种中父本的染色体常被(部分)排除,Hezi 等(2001)在小麦 *Ae. sharonensis* × *Ae. umbellulata* 的杂交中发现,杂种中有 14% 的父本基因通过某种机制被删除掉,仍维持正常的二倍性;Faur 等(2002)在向日葵 *Helianthus annuus* × *H. mollis* 或 *H. annuus* × *H. orgyalis* 的杂交中发现,杂种约有 95% 的父本基因被删除掉,但仍具有 2n 的染色体;在海洋贝类中,万俊芬等(2003)在栉孔扇贝和华贵栉孔扇贝的杂交中曾探讨过父本遗传物质在胚胎发育过程中被排除的可能性,认为杂交子代中父本华贵栉孔扇贝的染色体可能发生部分丢失,但其一些优良基因保留下来,并且认为这可能是杂种具有杂种优势的遗传基础;姜卫国等(1983)推测,在珠母贝的种间杂交中,父本的遗传物质通过某种机制(如通过三倍体杂种)被排除掉,而仅保留二倍化的母本遗传物质是有可能的。



M 为 DNA 分子量 DGL-2000;1-6 分别为栉孔扇贝、虾夷扇贝、担轮幼虫、D 形幼虫、壳顶幼虫和眼点幼虫的 RAPD 扩增图谱;a 为栉孔扇贝特异条带;b 和 c 为虾夷扇贝特异条带

Note: M: DNA molecular weight marker DL-2000; 1-6: The electrophoresis patterns of RAPD of *C. farreri*, *P. yessoensis* and their hybrid scallop larvae during the four life-history stages (trochophore, D-shaped larvae, umbo-stage larvae and eye-spot larvae); a: *C. farreri*'s specific bands; b, c: *P. yessoensis*'s specific bands

图 1 杂交贝不同发育时期遗传构成变化的 RAPD 分析
Fig. 1 Genetic composition of hybrid scallop at different development stages as revealed by RAPD analysis



a-d 分别为杂交贝担轮幼虫期、D 形幼虫期、壳顶幼虫期、眼点幼虫期的 GISH 分析

Note: The results of genome in situ hybridization to trochophore, D-shaped larvae, umbo-stage larvae and eye-spot larvae of the hybrid scallop

图 2 杂交贝各个时期 GISH 检测

Fig. 2 The results of genome in situ hybridization to different development stages of the hybrid scallop

值得注意的是,在本试验中当杂交贝生长至壳长 $130\mu\text{m}$ 时,有相当一部分幼虫停止了生长而逐渐死亡,仅有一小部分进入壳顶幼虫期。相同的情况在杂交组合 *Crassostrea gigas* × *C. virginica* 中也有出现, Kavanagh (1939)、Davis (1950)、Imai 等 (1961) 和 Stiles (1978) 均报道二者能正常受精,但发育到壳顶幼虫时期便开始大量死亡;宋志乐等 (1986) 对栉孔扇贝和海湾扇贝 *Argopecten irradians* 的杂交进行了初步研究,发现栉孔扇贝和海湾扇贝正反交都能受精,但胚后发育困难,至面盘幼虫后大量死亡;姜卫国等 (1983) 在珠母贝的种间杂交中发现绝大部分幼虫仅停留在直线铰合期,随后陆续死亡,因而认为异种精卵的染色体可能造成细胞分裂过程的不协调,以及可能由于某些遗传物质的缺少影响到幼虫的发育过程和生理代谢活动,致使多数胚胎发育异常和绝大部分幼虫死亡。杂交贝幼虫出现大量死亡的时间与父本遗传物质丧失的时间大致相吻合,其中是否存在联系还需要进一步的研究。

参 考 文 献

- 万俊芬. 2003. 鲍与扇贝遗传育种中的分子标记研究. 见:中国海洋大学博士学位论文
- 万俊芬,包振民,刘广绪,潘洁,王如才. 2004. 扇贝种间单对杂交一代幼虫 ISSR 标记的分离方式. 高技术通讯, 5:82~87
- 吕振明. 2006. 栉孔扇贝和虾夷扇贝杂交过程中的细胞与分子遗传学分析. 见中国海洋大学博士学位论文
- 吕振明,杨爱国,王清印,刘志鸿,周丽青. 2006. 栉孔扇贝和虾夷扇贝杂交子代的 GISH 鉴定及其免疫学特性. 中国水产科学, 13(4):587~602
- 宋志乐,张玉琨,赵玉山. 1986. 栉孔扇贝与海湾扇贝杂交试验初报. 齐鲁渔业, 2:31~32
- 吴宝铃. 1999. 贝类繁殖附着变态生物学. 济南:山东科学技术出版社, 137~144
- 杨爱国,王清印,刘志鸿,周丽青. 2004. 栉孔扇贝与虾夷扇贝杂交及子一代的遗传性状. 海洋水产研究, 25(5):1~5
- 周丽青,杨爱国,刘志鸿,杜方勇,张立敬,王清印. 2003. 栉孔扇贝(♀) × 虾夷扇贝(♂)受精细胞学观察. 动物学杂志, 38(4):20~24
- 姜卫国,魏贻尧,李刚. 1983. 合浦珠母贝、长耳珠母贝和大珠母贝种间人工杂交的研究 II. 受精过程和杂交后代的染色体观察. 热带海洋, 2(4):316~322.
- Davis, H. C. 1950. On interspecific hybridization in *Ostrea*. Science, 111~522
- Faur, N., Serieys, H., Cazaux, E. et al. 2002. Partial hybridization in wide crosses between cultivated sunflower and the *Perennial helianthus* species *H. mollis* and *H. orgyalis*. Annals of Botany, 89:31~39.
- Hezi Shaked, Khalil Kashkush, Hakan Ozkan, et al. 2001. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. The Plant Cell, 13:1 749~1 759
- Imai, T., and Sakai, S. 1961. Study of breeding of Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. Tohoku Journal of Agricultural Research, 12:125~171
- Kavanagh, L. D. 1939. Preliminary report on an experiment in oyster hybridization. Louisiana Conservation Review. Winter, 34:19~22
- Schwarzacher, T., Leitch, A. R., Bennett, M. D. et al. 1989. In situ localization of parental genomes in a wide hybrid. Ann. Bot. 64:315~324
- Stile, S. 1978. Conventional and experimental approaches to hybridization and inbreeding research in the oyster. In: Avault, J. W. (Editor). Proceeding in the Ninth Annual Meeting, World Mariculture Society, 577~586