

3 种染色体组加倍方法诱导黄河鲇雌核发育的比较

彭新亮, 李学军, 程 果, 乔志刚, 石 灵

(河南师范大学生命科学院, 河南 新乡 453007)

摘要: 用经紫外线照射后遗传失活的黄河鲇精子、刺激性成熟的黄河鲇卵子, 进行雌核发育, 采用冷休克、热休克和秋水仙素浸泡等 3 种染色体组加倍方法诱导黄河鲇卵进行二倍体雌核发育。实验结果表明: 在人工诱导黄河鲇二倍体雌核发育过程中, 以冷休克处理组的效果最好, 胚胎孵化率达到 8.1%; 其次为秋水仙素处理组, 胚胎孵化率达到 6.3%; 热休克处理组诱导效果较差, 胚胎孵化率仅为 4.0%。

关键词: 黄河鲇; 二倍体雌核发育; 冷休克; 热休克; 秋水仙素

中图分类号: Q343.244 文献标志码: A 文章编号: 1674-3075(2008)02-0044-04

鱼类人工雌核发育是近年来鱼类遗传育种研究工作中的活跃领域之一。通过人工诱导鱼类雌核发育可以产生纯基因型鱼, 进而快速建立鱼的纯系, 为鱼类种质的改良、优良性状的组合及种质中某些基因的改造创造条件。目前, 国内外已有泥鳅 (*Misgurnus fossilis*)、鲟 (*Acipenser dabryanus*)、鲤 (*Cyprinus carpio*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、虹鳟 (*Salmo gairdneri*) (Ramashov D & Bebyaeva V N, 1965; Nagy A et al, 1978; Chourmout D & Quillet E, 1982; Oppemann K, 1913; Purdam C E, 1969) 等 40 多种鱼类先后获得了雌核发育的后代。

黄河鲇 (*Silurus asotus*) 属鲇形目 (Siluriformes)、鲇科 (Siluridae)、鲇属 (*Silurus*), 是鲇分布于黄河流域的地方种群, 也是黄河中的珍贵鱼类, 有较高营养价值, 是目前内陆水域中具有较大发展潜力的养殖对象之一。本文以黄河鲇为材料, 以紫外线照射处理后的黄河鲇精子刺激成熟黄河鲇卵子, 采用冷休克、热休克、秋水仙素浸泡 3 种方法人工诱导黄河鲇雌核发育二倍体, 以确定诱导黄河鲇雌核发育的最佳方法, 并为培育全雌黄河鲇优良养殖新品种和深入研究黄河鲇雌核发育理论提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验在河南师范大学水产养殖基地进行, 实验

材料为该实验基地培育的健康且已性成熟的雌、雄黄河鲇亲鱼, 雌亲平均个体重 (639 ± 62) g, 雄亲平均个体重 (328 ± 22) g。

1.2 实验方法

1.2.1 精卵采集 对黄河鲇亲鱼采用绒毛膜促性腺激素 (HCG) 和促黄体素释放激素类似物 (LRH-A) 进行催产。雌黄河鲇亲鱼注射剂量为 HCG 5 000 IU/kg 和 LRH-A 25 μg/kg, 雄黄河鲇亲鱼注射剂量减半, 均为一次性注射。催产后亲鱼放入 21~30 °C 曝气自来水中培育, 效应时间 10 h 左右。待黄河鲇亲鱼发情时, 将亲鱼捞起, 擦干体表水分, 挤出雌鱼卵子放在干净碗中, 同时将雄黄河鲇精液挤进培养皿中。

1.2.2 精子灭活 取出的黄河鲇精液用 Hank's 溶液稀释 (精液与 Hank's 溶液的体积比为 1:4), 移入另一培养皿中, 并轻轻振荡让精子分散均匀。在暗室里将盛有稀释精液的培养皿放在冰块上, 在 30 W 紫外线灭菌灯 (波长 253.7 nm) 下照射 15 min, 照射过程中不断摇动精液 (约 35 次/min)。

1.2.3 卵子的激活 在黄河鲇卵子上滴加经紫外线照射后遗传失活的稀释精液, 干法授精。

1.2.4 染色体加倍 将受精卵分为 4 等份, 其中 3 份分别采用冷休克法、热休克法、秋水仙素浸泡法进行处理, 另外 1 份作为对照。

冷休克法: 精卵结合 5 min 后, 将受精卵放入 2 °C 冰箱内, 处理 40 min; 热休克法: 精卵结合 5 min 后, 将受精卵放入 41 °C 的水浴锅中, 处理 1.5 min; 秋水仙素法: 精卵结合 5 min 后, 将受精卵放入 25 mg/L 的秋水仙素溶液中, 浸泡 30 min; 对照组: 精卵结合后, 常温下自行孵化。以上每实验组均设 3 个

收稿日期: 2007-07-26

基金项目: 河南省科技攻关项目 (0324030026); 河南省动物学重点学科资助项目。

通讯作者: 李学军, E-mail: xjl67@126.com

作者简介: 彭新亮, 1979 年生, 河南周口人, 主要研究方向为水产动物种质资源与遗传育种, E-mail: xwpeng01@hotmail.com

重复。通过比较各实验组原肠胚期、神经胚期、出膜期、孵化期的成活率来确定诱导染色体加倍的最佳方法。

1.2.5 数据统计与处理 试验数据整理和图表制作使用 Excel 软件。用 SPSS 11.5 对不同处理方法各时期胚胎成活率进行单因素方差分析和 LSD 多重比较, $P < 0.05$ 差异显著, $P < 0.01$ 差异极显著。

2 结果

2.1 最佳诱导方法的确定

不同处理条件下, 各个时期胚胎存活情况见表 1。由表 1 可知: 3 种处理方法中, 冷休克处理组各个时期胚胎存活率均显著高于热休克处理组和秋水仙素处理组 ($P < 0.05$), 而热休克处理组的诱导效

果相对是最差的。各个处理组之间的出膜期、孵化期成活率均存在显著性差异 ($P < 0.05$), 孵化率也以冷休克处理组最高, 可达 8.1%, 最低的仍为热休克处理组, 对照组孵化期成活率为 0。因此, 可以确定用冷休克法诱导二倍体黄河鲇雌核发育的效果相对最好。

2.2 不同时期各处理组胚胎成活率的变化

各个发育时期黄河鲇胚胎成活率的变化见图 1。在胚胎发育过程中, 各实验组胚胎成活率随着胚胎发育的进行而降低, 越接近胚胎发育后期死亡率越高。冷休克处理组和秋水仙素处理组都是在出膜期到孵化期间, 胚胎存活率下降最剧烈; 热休克处理组是在神经胚期到出膜期间, 胚胎存活率下降最剧烈; 对照组胚胎成活率从出膜期开始急剧下降, 到孵化期后胚胎全部死亡。

表 1 3种处理方法胚胎发育成活率的 LSD 多重比较

Tab 1 The results of LSD multiple comparison to survival rate of fertilized eggs under the different treatments

处理方法 Treatments	受精卵粒 number of fertilized eggs	各期胚胎存活率/% The survival rate at different stage			
		原肠胚期	神经胚期	出膜期	孵化期
		Gastrula stage	Neurula stage	Hatching stage	Firstfeeding stage
冷休克 Cold-shocking	432	73.7 ^a	61.2 ^a	40.9 ^a	8.1 ^a
热休克 Hot-shocking	337	65.6 ^{ab}	31.7 ^b	19.8 ^b	4.0 ^b
秋水仙素 Colchicines	571	70.3 ^b	54.9 ^b	31.4 ^c	6.3 ^c
对照组 Control	496	66.7 ^b	40.3 ^c	16.2 ^d	0 ^d

注: 同一列数据具不同上标的表示显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: Different upper script in the row indicate significant difference ($P < 0.05$).

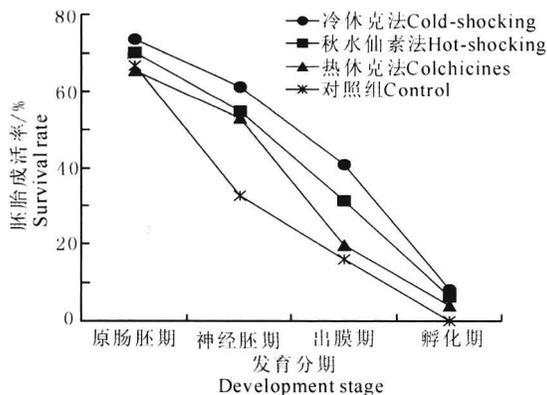


图 1 3种处理方法各胚胎发育时期成活率的变化

Fig 1 The change of survival rate of the fertilized eggs under different treatments

3 讨论

3.1 精子灭活的方法

人工诱导鱼类雌核发育二倍体成活率的高低与精子的灭活程度和卵子的质量密切相关。此外, 适合的孵化水温、孵化用水的 pH、受精卵的密度等对于提高雌核发育诱导率也很重要 (刘筠, 1993), 以

确保精卵结合后在一个良好、稳定的环境里孵化。

目前常用各种辐射源 (X 射线、 γ 射线和紫外线) 照射精子, 或者采用化学药物 (甲苯胺兰、乙烯脲以及二甲基硫酸盐) 处理使精子染色体失活 (楼允东, 1986)。用化学药物处理虽然有较好的效果, 但需对其最佳处理浓度和最佳处理时间进行实验摸索, 工作量较大。各种辐射源照射各有其优缺点, 相比之下, 紫外线法更容易操作, 比 X 射线和 γ 射线危险性要小, 技术也更成熟, 成为目前比较常用的处理方法, 因此本试验采用紫外线照射灭活黄河鲇精子。同时, 紫外线穿透力不强的弱点可以通过稀释精液降低精子密度或铺薄来弥补 (刘筠, 1997), 因此, 本实验用 Hank's 溶液将精液稀释 5 倍, 从而降低了精子密度, 并将精液铺薄, 以期得到灭活效果较好的黄河鲇精子。

3.2 卵子质量对雌核发育成活率的影响

卵子的质量也是影响雌核发育成活率的重要因素 (潘光碧, 1988), 因为卵子过熟, 将导致卵巢液的渗透压、pH 值降低, 而卵巢液的渗透压、pH 与卵子的受精率、孵化率和仔鱼上浮率等呈正相关 (San-

drine A & Bernard J 2004)。本次实验胚胎成活率和孵化率偏低,分析原因认为实验时间是 7 月下旬,有可能因黄河鲇的成熟度过高导致卵子的质量降低。

3.3 诱导染色体加倍方法的比较

常用的人工诱导鱼类卵细胞染色体加倍的方法归纳起来有物理(温度与静水压)、化学以及生物(杂交)3种(吴仲庆,1991)。冷水性鱼类用热休克法较好,温水性热水性鱼类用冷休克法、热休克法都能使染色体加倍(戴世行和尹立刚,1991),但热休克对胚胎的损伤较大,冷休克似乎效果更好。静水压法需要专门的设备(如水压机),且一次处理的卵子数量有限,一般采用的较少。用化学药物处理的方法目前应用较少,已报道的细胞松弛素和秋水仙素处理的方法是有效的(楼允东,1989)。此外,采用异源精子刺激产生的“异精雌核发育”在一些鱼类的雌核发育中已得到了应用(楼允东,1999)。

相比之下,温度休克法比其他方法操作更简便、效果更稳定,因此,目前该法是使卵子染色体加倍最常用的方法。黄河鲇作为一种温水性鱼类,最宜采用冷休克法诱导,本实验的结果也证明了这一点。虽然本次实验秋水仙素处理组也有较高的成活率,但秋水仙素为一种强治癌物且价格昂贵,因此在实际生产时,建议用冷休克法代替。此外,能否用异源精子刺激黄河鲇二倍体雌核发育,有待进一步研究。

3.4 不同发育时期雌核发育成活率的探讨

目前鱼类人工雌核发育普遍存在着成活率低的现象。本实验各组黄河鲇胚胎在历时 35 h 总积温 840~875°C·h 的发育后,也只有少部分胚胎顺利发育到摄食期,其畸形率偏高,正常生长、存活者仅为少数。分析其原因可能是不同的诱导处理均对胚胎发育造成了一定的影响,特别是温度休克,采用胚胎发育的极限温度,不仅对胚胎的生理代谢有一定的影响,而且导致部分染色体的畸变如断裂、错位等(王炳谦等,2005),造成胚胎大部分死亡,即使存活,畸形率也较高。此外,部分受精卵由于精子被紫外线照射死亡,或者由于卵子染色体没有完成加倍,因此出膜时出现了大量畸形,出膜的仔鱼大多数出现头小、心脏和血管系统畸形、围心腔扩大、尾部短而弯曲等单倍体综合症(凌去非等,2005),在出膜后 3 d 之内全部死亡,这与罗琛(1991)认为单倍体胚胎不能发育到摄食期的研究结果相符。

另外,各处理组胚胎从原肠胚期后开始大量死亡,特别是到了出膜期,又出现了一个死亡率高峰。

这主要是因为原肠胚期、出膜期均为胚胎发育的“敏感期”(陈宏溪,1983),一些质量差、耐受能力不强的胚胎均不能顺利渡过这些时期,这与大多数学者对胚胎发育的研究结果相符合。

参考文献:

- 陈宏溪. 1983 鱼类的雌核生殖 [C] // 鱼类学论文集: 135-146
- 戴世行, 尹立刚. 1991 鱼类人工雌核发育中两个技术处理的最好选择 [J]. 重庆师范学院学报, 8(2): 51-55
- 凌去非, 李思发, 张海军, 等. 2005 丁鱥雌核发育鱼的异源精子诱导及其与亲本的 RAPD 比较分析 [J]. 水产学报, 29(1): 120-123
- 刘筠. 1993 中国养殖鱼类繁殖生理学 [M]. 北京: 农业出版社.
- 刘筠. 1997 我国淡水养殖鱼类育种的实践和思考 [J]. 生命科学, 1(1): 1-8
- 楼允东. 1986 人工雌核发育及其在遗传学和水产养殖上的应用 [J]. 水产学报, 10(1): 111-123
- 楼允东. 1989 中国鱼类遗传育种研究的进展 [J]. 水产学报, 13(1): 93-100
- 楼允东. 1999 鱼类育种学 [M]. 北京: 中国农业出版社: 117-147.
- 罗琛. 1991 人工诱导草鱼和鲫鱼雌核发育的研究 [J]. 湖南师范大学: 自然科学版, 14(2): 154-159
- 潘光碧. 1988 人工诱导鱼类雌核发育技术研究 [J]. 淡水渔业, 18(6): 17-20
- 王炳谦, 徐连伟, 贾钟贺, 等. 2005 热休克诱导全雌虹鳟三倍体 [J]. 水产学杂志, 18(2): 22-27
- 吴仲庆. 1991 水产生物遗传育种学 [M]. 厦门: 厦门大学出版社: 152-158
- Chourrou D, Quillet E. 1982 Induced gynogenesis in the rainbow trout sex and survival of progenies production of all-triploid populations [J]. Theor Appl Genet 83: 201-205
- Nagy A, Rajkik Horvath L. 1978 Investigation on carp *Cyprinus carpio* L. gynogenesis [J]. J Fish Biol 13: 215-224
- Oppermann K. 1913 Die Entwicklung von Forelleneiern nach Befruchtung mit rädium behandelten Samenfasern [J]. Arch Mikrosk Anat 83: 141-189
- Purdum C E. 1969 Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish [J]. Heredity 24: 431-444
- Romashov D, Belyaeva V N. 1965 The increase in the yield of diploid gynogenetic larvae in loach *Misgurnus fossilis* L. achieved by heat shocks Bull Moskovskogo Odeskogo Universiteta Seriya Biologicheskie Nauki 60(5): 93-109
- Sandrine A, Bernard J 2004 Effects of post ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occur-

cee of triploid fry in rainbow trout [J]. Aquaculture, 23
(1): 59~71

(责任编辑 杨春艳)

The Contrastive Study on Induction of Gynogenesis by Three Different Methods of Chromosome Doubling in *Silurus asotus*

PENG Xin-liang LIXue-jin CHENG Guo QIAO Zhigang SHILing

(College of Life Science, Normal University of Henan, Xinxiang 453007, China)

Abstract The *Silurus asotus* eggs were activated by UV-irradiated *Silurus asotus* sperm, chromosome doubling was made on the induction of gynogenesis in *Silurus asotus* by cold-shocking, hot-shocking and colchicines. The study showed that the optimum method for chromosome doubling in induction of gynogenesis in *Silurus asotus* was cold-shocking, the hatch rate may reach 81%, the second fine method was the induced by colchicines, and its hatch rate was 63%, the hot-shocking method for chromosome doubling in induction of gynogenesis in *Silurus asotus* was worst, its hatch rate only reached 40%.

Key words *Silurus asotus*; gynogenesis of diploid; cold-shocking; hot-shocking; colchicines