

人工诱导南方鲇雌核发育的最适参数

吴风瑞 张修月 王德寿*

(西南大学生命科学学院 重庆市水产科学技术重点实验室 重庆 400715)

摘要:用紫外线照射南方鲇(*Silurus meridionalis*)精子,用遗传失活的精子人工授精,采用热休克方法抑制南方鲇第二极体的排出。根据热休克起始时间、持续时间和休克温度三因子三水平设计正交试验,探索获得人工诱导南方鲇雌核发育的最理想条件。结果表明,紫外线照射精子 15 min,热休克起始时间为受精后 5 min,持续时间为 1 min,休克温度为 41℃,对人工诱导南方鲇雌核发育最有利。该实验为进一步分析人工繁殖南方鲇的雌化机制以及南方鲇性别决定的分子机制奠定了基础。

关键词:南方鲇 雌核发育 技术参数

中图分类号: S965.117 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2006)01-27-05

Optimal Parameters for Artificial Gynogenesis in Southern Catfish

WU Feng-Rui ZHANG Xiu-Yue WANG De-Shou

(School of Life Science, Southwest University, the Key Laboratory of Aquatic Science and Technology, Chongqing 400715, China)

Abstract: Gynogenetic fries were produced after eggs had been activated with UV-irradiated Southern Catfish (*Silurus meridionalis*) sperm (1:4 diluted, 254 nm, 3.3×10^{-4} J/mm²) and the second polar body extrusion had been inhibited with heat shock. The effects of treatment conditions including heat shock temperature, treatment initiation time after fertilization and treatment duration on development were investigated. The optimal conditions for gynogenesis were 15-min UV-irradiation of sperm, heat shock of eggs for 1 min at 41℃ after 5 min of fertilization. This experiment provides basis for understanding the sex determination and feminization mechanism after artificial propagation in Southern Catfish.

Key words: *Silurus meridionalis*; Gynogenesis; Optimal parameters

南方鲇(*Silurus meridionalis*)也称南方大口鲇,是我国长江流域特产的重要经济鱼类,具有肉质细嫩、味道鲜美、生长快、抗病力强、自然越冬等经济状况与特点,深受广大消费者的喜爱^[1]。

野生环境中的南方鲇的性比约为 1:1^[2],人工繁殖为全雌鱼苗^[3,4]。目前对南方鲇全雌化的机制以及南方鲇性别决定的类型及分子机制还不清楚。若以雌核发育的个体作亲鱼,人工诱导雌核发育,就能获得遗传上完全相同的纯合后代。通过药物诱导处理人工雌核发育的雌鱼使其转化为生理雄性(XX,产生精子),再进行兄妹配对^[5],就能获得全雌性的纯系。通

通过对正常繁殖后代、性逆转个体和雌核发育后代杂交性比及有关基因的表达进行研究,对深入分析南方鲇性别决定类型和人工繁殖后代的雌化机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验鱼

2005年4月,在长江支流嘉陵江

基金项目 教育部重点项目(No. 2004-104161),重庆市科委自然科学基金(No. CSTC2004BB8450);

* 通讯作者, E-mail: wdeshou@swnu.edu.cn;

第一作者介绍 吴风瑞,男,硕士研究生,研究方向:动物分子生物学, E-mail: fengruiwu@126.com.

收稿日期: 2005-07-17, 修回日期: 2005-11-15

下游合川(东经 106°17', 北纬 29°58')至北碚(东经 106°27', 北纬 29°51')段收集野生健康且性成熟的南方鲇雌雄亲鱼。

1.2 采集精子和卵子 用人绒毛膜促性腺激素(HCG)和鱼用促黄体释放激素类似物(LRH-A)混合注射法进行人工催产,注射剂量为雌鱼 6~8 IU/g,雄鱼 2 IU/g。待发情时,将亲鱼捞起,擦干体表并对其生殖孔用 75% 的酒精消毒,挤出卵子(约 50 000 粒并分为 9 份)于孵化碗中,并将精液挤进培养皿中。

1.3 筛选精子最佳照射时间 取精液约 0.8 ml,分成 4 份加入到 4 个培养皿(各 0.2 ml)中,分别用 Hanks 溶液稀释(精液与 Hanks 溶液的比例为 1:4)并轻轻振荡以让精子均匀分散。在暗室里将装有精子的培养皿放在冰块上,置于紫外灯下(254 nm, 3.3×10^{-4} J/mm²)分别照射 10、15、20、25 min,再将处理后的每份精液分成 2 份(总共 8 份),避光 3 min 后,取其中 4 份(如表 1, A11、A21、A31、A41)加入到装有卵子的孵化碗中进行干法授精(各组授精温度均为 17℃),不进行温度休克,直接在 24℃ 水中孵化,作为精子遗传失活效果的质量控制(理论上无一成活);另外 4 份(如表 1, A12、A22、A32、A42)加入到装有卵子的孵化碗里授精,授精 5 min 后放入 40℃ 的恒温水浴锅中热休克 2 min,再放入 24℃ 水中孵化。再取一份正常的精子(如表 1, A0)和卵子授精,不进行热休克直接于

24℃ 水温孵化,作为卵子的质量控制。设立 9 个批次的试验(表 1),供观察统计及计算^[6]。

1.4 诱导极体雌核发育 根据热休克起始时间、持续时间和休克温度三因子三水平设计正交试验(表 2)。由步骤 1.3 得出的最佳精子照射时间作为本次试验精子的紫外照射时间进行照射,然后与卵子在孵化碗中进行授精,并分别在授精后 1~3 min 将受精卵迅速放进预先置于 39~41℃ 恒温水浴锅中的孵化网中进行热休克,轻轻摆动以使受精卵受热均匀,热休克 1~3 min 后,取出受精卵并置于 24℃ 进行孵化(表 2,试验组 X_n , $X = B, C, D$, $n = 1 \sim 3$)。设立正常精子与卵子授精、不进行热休克的一组为卵子质量控制组(表 2,对照组 1),另取最佳照射时间处理的精子与卵子授精、不进行热休克的一组为精子质量控制组(如表 2,对照组 2)^[7]。

1.5 数据处理 分别统计试验组及对照组在原肠期和孵化期受精卵存活数与初孵仔鱼成活个体数,结果 2.1 中以 A0 组发育至原肠期的受精卵存活数占卵粒的比例为标准受精率,结果 2.2 中以对照组 1 发育至原肠期的受精卵存活数占卵粒的比例为标准受精率,折算出对照组在各个阶段的存活率,以此得到各试验组各个时期的存活率和仔鱼成活率,进而得到雌核发育率^[7,8]。再用 *t*-检验法比较各组数值差异,当 $P < 0.05$ 时,认为有显著差异。

表 1 精子最佳处理时间试验分组

Table 1 UV treatment on Southern Catfish sperm with different times

试验组编号 Trial No.	精子照射时间 Sperm irradiation time (min)	热休克起始时间 Time of shocking triggered (min)	热休克持续时间 Duration (min)	热休克处理温度 Temperature (°C)	原肠期成活率 Survival at gastrula stage (%)	孵化期成活率 Survival at hatching (%)
A0	0	0	0	0	79.634	73.22
A11	10	0	0	0	60.892	45.561
A12	10	5	2	40	43.526	40.323
A21	15	0	0	0	5.725	3.648
A22	15	5	2	40	18.06	14.874
A31	20	0	0	0	4.423	2.821
A32	20	5	2	40	10.783	5.295
A41	25	0	0	0	0	0
A42	25	5	2	40	0	0

2 结果

2.1 筛选精子最佳照射时间结果分析 根据精子照射时间、热休克起始时间、持续时间和休克温度 4 个参数, 设立 9 个批次的试验结果见表 1。

结果表明, 未进行热休克的 A11 组出现了与正常组相当的孵化期成活率, 说明精子照射时间过短, 因此精子照射时间必须大于 5 min。精子照射 15 min 进行热休克的 A22 组有 14.87% 的成活率, 而精子照射 15 min 不进行热

休克的 A21 组由于单倍体不能正常发育, 其成活率只有 3.64%, 这说明精子照射 15 min 后绝大部分精子的遗传物质已经失活。当精子照射时间长于 15 min, 不进行热休克的 A31、A41 组的孵化期成活率都趋近于 0, 说明精子照射 15 min 后, 其活力基本丧失, 因此精子照射 15 min 为最佳照射时间。

2.2 诱导极体雌核发育结果分析 根据筛选的精子最佳处理时间结果, 进行热休克起始时间、持续时间和休克温度三因子三水平正交试验, 结果见表 2。

表 2 热休克起始时间、持续时间、热休克温度三因子试验分组

Table 2 Heat shock treatment with different initiation times, durations and shock temperatures

试验组编号 Trial No.	热休克 起始时间 Time of shocking triggered(min)	热休克温度 Temperature (°C)	热休克 持续时间 Duration (min)	原肠期 成活率 Survival at gastrula stage(%)	孵化期 相对存活率 Survival at hatching(%)	仔鱼 相对存活率 Survival at hatching(%)	雌核发育率 Ratio of gynogenesis(%)
B1	3	39	1	6.433	4.781	2.950	1.411
B2	3	40	2	2.951	2.183	1.872	0.407
B3	3	41	3	0	0	0	0
C1	5	39	3	3.624	2.944	1.22	0.359
C2	5	40	2	3.581	2.244	0.984	0.221
C3	5	41	1	6.752	4.957	3.245	1.601
D1	7	39	3	4.008	3.815	2.678	1.021
D2	7	40	1	2.069	1.635 9	0.643	1.051
D3	7	41	2	3.287	1.972 2	0.795	0.157
对照组 1 Control 1	0	0	0	90.044	88.025	80.312	—
对照组 2 Control 2	0	0	0	12.568	10.289	3.253	—

除对照组 1 其余各组精子的照射时间均为结果 2.1 中所得到的最佳照射时间 15 min。

With the exception of control group 1, the sperm UV-irradiated time of the rest groups is 15 min obtained from the result 2.1.

结果显示, 在受精后 5 min, 热休克温度为 41°C, 持续时间为 1 min 的试验组 C3 的存活率最高, 雌核发育率为 1.601%, 且 $P < 0.05$, 差异极显著, 由此可以得出以上处理参数为获得南方鲇雌核发育最佳条件。

3 讨论

精子遗传失活的处理在人工雌核发育试验中非常重要, 精子紫外线照射时间过短或遇到光修复, 遗传物质不能彻底失活^[9], 而精子照射时间过长, 精子活力降低、丧失甚至死亡, 而且照射时间过长, 精子还易形成聚合体^[10]。不同鱼

类的精子理化性质不同, 其最佳的照射时间也可能不同, 如印尼须鲃 (*Puntius gonionotus*) 精子 196 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 照射 1 min^[11], 欧亚河鲈 (*Perca fluviatilis*) 精子 15 W 照射 400 s^[10], 丁鲷 (*Tinca tinca*) 精子 15 W 照射 12 min^[12], 鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 精子 15 W 照射 10 ~ 20 min^[13], 精子活力保持良好而遗传物质基本失活。另外, 精子最佳照射时间还与季节分布有关, 如大梭鱼 (*Esox masquinongy*) 精子在 4 月中旬最佳照射时间是 12 s, 而在下旬最佳照射时间却是 4 min, 这可能与不同季节精子的敏感度不同有关^[14]。本实验对南方鲇精子的最佳照射时间是

15 min 比上述几种鱼类照射时间都要长,从实验结果也可看出长于或短于这个时间都不能得到理想的结果。

在卵子的第二极体排出之前,存在一个休克敏感期。在敏感期间进行休克处理可以很好地抑制卵子的第二极体的排出,休克时间过早、过迟均可能导致“受精卵”发育不正常^[7]。休克敏感期可能与第二极体排出的时间有关,冷水性鱼类第二极体排出时间一般较迟,其热休克处理起始时间也较晚,如鲑科(Salmonidae)鱼类多在受精后 15~40 min 处理最好^[15],温水性鱼类第二极体排出时间较早,其热休克处理起始时间也较早,如鳊(*Carassius auratus*)在受精后 4~5 min^[16]。Galbusera 等在诱导北非鲃(*Clarias gariepinus*)雌核发育后,认为第二极体的排出时间可能与营天然雌核发育鱼类的母性效应相似^[17]。此外也有研究表明,第二极体的排出时间与受精水温、卵子质量、孵化温度等有关^[18]。在受精水温 17℃ 的条件下,南方鲃受精卵第二极体的排出时间大约在受精后 20 min 左右*,因此本实验在受精后 5 min 进行热休克处理最佳。

此外,热休克温度要考虑到鱼类卵子对高温的耐受能力,必须控制在其致死温度以下。由于长期生活的环境引起的适应性,不同鱼类其耐受能力不同。冷水性鱼类的卵子耐高温能力一般较温水性鱼类差,因此冷水性鱼类的热休克温度一般比温水性鱼类低,如北非鲃休克温度为 40℃、1 min 或 39℃、1.5~2 min^[17],罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的是 41℃、4.5~7.5 min^[19],而冷水性大梭鱼(*Esox masquinony*)是(31±1)℃、6 min^[14]。一般而言,较长的处理时间和较低的处理温度效果会更好,对受精卵的伤害要轻微些。南方鲃属于温水性鱼类,本研究发现,其 41℃ 热休克 1 min 处理效果最好,这与对北非鲃和罗非鱼的研究结果基本一致。

鱼类性别控制的研究对水产养殖业具有重要的实用价值。实践证明,单性群体的生产是提高产量的一条有效途径,许多人工雌核发育鱼类个体的生长速度明显快于普通鱼类^[20]。

因此,如何通过人工控制性别的途径获得快速生长的纯系并应用于生产,已经成为水产科学上既有理论意义又有经济价值的研究课题。而且雌核发育技术通过人工对鱼类染色体组的操作获得全雌鱼类,避免了众多消费者担心的激素药物处理的潜在危害和生物安全问题。但目前对雌核发育的有关生物大分子的结构、功能和基因表达调控方式仍不清楚,雌核发育率也很低。如何解决这一系列问题,尚待进一步探索。

参 考 文 献

- [1] 罗相忠, 邹桂伟, 潘光碧. 大口鲈精子生理特征的研究. 淡水渔业, 2002, 32(2): 51~53.
- [2] 谢小军, 龙天澄, 曹振东. 南方鲃的繁殖群体的结构及生长. 西南师范大学学报(自然科学版), 1994, 19(1): 71~78.
- [3] 邓思平, 王德寿, 张耀光等. 外源激素对南方鲃血清促性腺激素水平的影响. 西南师范大学学报(自然科学版), 2003, 28(4): 614~617.
- [4] 张修月, 焦保卫, 吴天利等. 南方鲃性腺分化的组织学观察. 动物学杂志, 2005, 40(1): 41~48.
- [5] Grant F, Choo-Guan Y, Martin S F, et al. The production of functional sex-reversed male Rainbow trout with 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione. *Aquaculture*, 1995, 131: 145~152.
- [6] Qi L, Mokoto O, Masaru K, et al. Effects of ultraviolet irradiation on genetical inactivation and morphological structure of sperm of Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Aquaculture* 2000, 186: 233~242.
- [7] 贾方均, 王剑伟, 吴清江. 异源精子诱导稀有鮠鲫的人工雌核发育. 水生生物学报, 2002, 26(3): 246~252.
- [8] Recoubratsky A V, Gomelsky B I, Emelyanova O V, et al. Triploid common carp produced by heat shock with industrial fish-farm technology. *Aquaculture*, 1992, 108: 13~19.
- [9] 潘光碧, 邹桂伟, 胡德高. 荷元鲤雌核发育后代体色和性比的初步研究. 水产学报, 1995, 19(4): 366~368.
- [10] Carole R, Jean V N, Laurent G, et al. Gynogenesis induction and sex determination in the Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquaculture* 2005, 243: 411~415.
- [11] Pongthana N, Penman D J, Kamasuta, et al. Induced

* 张修月. 人工繁殖南方鲃性别决定与分化相关因子的初步研究. 西南师范大学硕士论文. 2005. 5.

- Gynogenesis in the Silver barb(*Puntius gonionotus* Bleeker) and evidence for female homogamety. *Aquaculture* ,1995 ,**135** : 267 ~ 726.
- [12] Linhart O ,Flajshans M ,Kvasnicka P ,*et al.* Gynogenesis of tench(*Tinca tinca* L.) after short-term storage of eggs. *Aquaculture* ,1995 ,**129** :133 ~ 137.
- [13] 叶玉珍 ,吴清江 ,周建峰. 鲢人工雌核二倍体群体的产生及其遗传分析. 华中农业大学学报 ,2003 ,**22**(2) :147 ~ 151.
- [14] Rinchar J ,Garcia-Abiado M A ,Dabrowski K ,*et al.* Induction of gynogenesis and gonad development in the muskellunge. *Journal of Fish Biology* 2002 ,**60** :427 ~ 441.
- [15] Lou Y D. Diploid gynogenesis induced by hydrostatic pressure in Rainbow trout ,*Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology* ,1984 ,**14**(6) :665 ~ 670.
- [16] 桂建芳 ,梁绍昌 ,孙建民等. 鱼类染色体组操作的研究 I 静水压休克诱导三倍体水晶彩鲫. 水生生物学报 , 1990 ,**14**(1) :49 ~ 55.
- [17] Galbusera P ,Filip A M ,Frans O. Gynogenesis in the African catfish *Clarias gariepinus*(Burchell ,1822) III . Induction of endomitosis and the presence of residual genetic variation. *Aquaculture* 2000 ,**18** :25 ~ 42.
- [18] 程汉良 ,张永春 ,马国文等. 热休克诱导鲫鱼异源三倍体的研究. 哲里木畜牧学院学报 ,1998 ,**8**(1) :20 ~ 29.
- [19] Müller-Belecke A ,Gabriele H. Sex determination in tilapia (*Oreochromis niloticus*) sex ratios in homozygous gynogenetic progeny and their offspring. *Aquaculture* ,1995 ,**136** :57 ~ 65.
- [20] 潘光碧 ,邹桂伟 ,罗相忠等. 雌核发育鲢生长、体型的研究. 淡水渔业 ,2004 ,**34**(3) :3 ~ 6.