

大黄鱼雌核发育二倍体的人工诱导

许建和^{1,2}, 尤 锋¹, 吴雄飞³, 蒋宏雷³, 徐永立¹, 张培军¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 淮海工学院, 江苏 连云港 222005; 3. 宁波市海洋渔业研究院, 浙江 宁波 315012)

摘要: 采用紫外线照射对大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea* Richardson) 精子遗传物质进行完全灭活, 灭活后精子与卵子受精获得雌核发育单倍体受精卵, 再通过冷休克对单倍体受精卵进行倍性恢复, 成功诱导出大黄鱼雌核发育二倍体。实验结果表明: (1) 在紫外照射过程中照射剂量与大黄鱼精子和卵子受精后其成活率和孵化率呈现出明显的 Hertwig 效应, 紫外照射时间超过 2 min (剂量 > 2 400 ergs/mm²), 可使大黄鱼精子遗传物质完全灭活。大黄鱼雌核发育诱导中精子遗传灭活的最适紫外照射时间为 2.5 min (剂量为 3 000 ergs/mm²); (2) 冷休克法可成功抑制大黄鱼受精卵第二极体排放, 诱导效果受处理时刻、处理时间和处理温度三因素的影响。综合雌核发育二倍体的诱导率、处理后受精卵早期胚胎存活率和仔鱼孵化率等因素, 较适合的染色体加倍条件为 23℃ 培育水温下授精后 2 min, 在 3~4℃ 海水中处理 10 min。

关键词: 大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*); 雌核发育; 人工诱导; 紫外照射; 冷休克

中图分类号: Q321.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2006) 12-0037-06

鱼类雌核发育工作开始于 20 世纪 50 年代, 在淡水鱼类中开展的研究较多^[1], 海水鱼类此方面研究相对滞后, 目前仅在牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[2]、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[3]、漠斑牙鲆 (*Paralichthys lethostigma*)^[4]、真鲷 (*Pagrosomus major*)^[5]、欧鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[6] 等种类中有相关报道。开展鱼类雌核发育人工诱导一方面可以进行全雌鱼的培育, 在雌性生长性状优于雄性的种类中获得较高的养殖效益, 另一方面可以在较短时间内建立纯系或近交系, 通过不同纯系之间的杂交获得性状优良的品种, 为鱼类的品种改良提供重要手段^[7]。

大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea* Richardson) 是我国重要经济海水鱼类, 随着其人工育苗关键技术的突破, 目前已成为我国南方沿海网箱养殖面积最大产量最高的海水鱼类^[8]。与大多海水鱼类相似, 雌性大黄鱼生长性状要优于雄性, 有必要在大黄鱼养殖生产中开展全雌鱼培育和养殖。开展大黄鱼雌核发育诱导可使全雌大黄鱼培育和养殖成为可能, 而目前关于大黄鱼雌核发育诱导研究国内外均未见相关文章报道, 仅有其三倍体诱导相关文章报道^[9,10]。作者采用紫外照射对大黄鱼精子遗传物质进行完全灭活, 获得了大黄鱼精子紫外照射剂量与胚胎成活率

之间关系的 Hertwig 效应曲线, 并结合冷休克法对单倍体受精卵进行倍性恢复, 成功诱导出雌核发育二倍体大黄鱼, 为全雌大黄鱼应用于养殖生产提供了重要的科学依据。

1 材料与 方法

1.1 亲鱼培育和精卵收集

实验用亲鱼购自宁波象山港海区养殖网箱, 充氧后运至亲鱼培育车间。选取性腺已经开始发育、无病害的亲鱼, 用 LRH-A₃ 直接进行人工催产, 催产剂量: 雌鱼为 10 μg/kg, 雄鱼减半。催产后雌鱼、雄鱼分别放于同一水体的两个网箱, 到达效应时间 (28~40 h) 后, 选取性腺发育良好雌鱼数尾, 人工挤卵后混合, 并均分成若干等分待用。选取数尾性腺发育良好的雄鱼, 用吸水纸吸干其腹部, 轻压雄鱼腹部获得精子, 沾有海水或排泄物的精子不予使用。精子挤出后放于冰面上、避光待用。

收稿日期: 2006-01-26; 修回日期: 2006-09-28

基金项目: 中国科学院合作种子资金 宁波市科技计划项目 (2002D21004); 宁波市科技攻关项目 (01N40111)

作者简介: 许建和 (1976), 男, 江苏淮安人, 副教授, 博士, 研究方向: 鱼类遗传育种, E-mail: xujianhe@tom.com

1.2 精子遗传物质灭活

在对精子进行紫外照射前,将紫外灯打开进行预热。然后将精液用预冷的 Ringer 氏液稀释,均分到 4 个已预冷的培养皿(内径 13 cm)中,对精子进行 0~420 s 照射(照射强度为 0~8 400 ergs/mm²,用 VLX-3W 数字紫外辐射照度计(Cole Parmer Instrument Company)测定,照射后的精子样品放于冰面上避光保存直到授精。

1.3 人工授精

将经不同紫外照射时间照射后的精子与正常的卵授精。人工授精过程如下:将精子加入到盛有卵子的受精容器中,混合后,加入少量 23℃ 海水进行激活,再加入适量海水并保持水温恒定。

1.4 染色体倍性恢复

采用冷休克法对单倍体受精卵进行倍性恢复。根据相关文献^[11]和预实验结果,处理水温设在 3~4℃,首先进行处理时刻(Treatment after fertilization, TA)实验,设置受精后 1, 2, 3, 4 min 4 个处理时刻(处理温度 3~4℃,处理时间 10 min);根据 TA 诱导实验结果再进行处理时间(Duration, D)实验,设置 5, 8, 10, 12, 15, 20 min 6 个处理时间梯度(处理温度 3~4℃,TA 2 min)。每次实验设二倍体对照组和单倍体对照组。未照射的精子与正常卵受精用来获得二倍体对照组,紫外照射精子和正常卵受精用来产生雌核发育单倍体。实验和对照组受精水温都为 23℃,孵化水温为 23℃±0.5℃。各组受精卵的受精和发育状况在解剖镜下进行观察。

1.5 倍性鉴定

采用初孵仔鱼形态学观察与流式细胞仪检测细胞中 DNA 相对含量两种方法,来鉴定各实验组初孵仔鱼是否为雌核发育单倍体、雌核发育二倍体。

流式细胞仪检测 DNA 相对含量:采取 10 尾以上初孵仔鱼整鱼,分别加分散液并捣碎、过 260 目筛绢、DAPI 染色、PARTEC Cell Counter Analyser (CCA-II) 细胞计数分析检测 DNA 相对含量。二倍体对照组初孵仔鱼的 DNA 相对含量设为 100。

1.6 存活率、孵化率和诱导率计算

实验中,各实验组均计算存活率、孵化率和诱导率。受精后 6 h 的胚胎存活率为此时存活的胚胎与该组受精卵总数的比值。孵化率为各组中初孵仔鱼数(紫外照射实验组初孵仔鱼指出膜的单倍体和二倍体仔鱼之和)占用于孵化卵的百分数。各处理组诱

导率以每组二倍体仔鱼孵化率来表示。每一组用于计算存活率、孵化率和诱导率的卵子数不低于 150。

1.7 统计分析

每组实验进行 2~3 次重复。所有数据经 SPSS11.5 数学软件处理,多重比较采用 One Way ANOVA 方法进行,差异显著性用 *t* 检验 ($P < 0.05$)。进行多重比较时,存活率、孵化率进行反正弦转换。

2 结果

2.1 精子遗传物质的失活

不同紫外照射时间对大黄鱼精子的遗传物质灭活效果见图 1。从图中可看出,大黄鱼精子的紫外照射剂量与所获胚胎成活率、孵化率、单倍体率之间表现出明显的 Hertwig 效应。在一定照射时间范围内,早期胚胎存活率随紫外照射时间的延长变化不大,照射时间 3 min 内(照射强度 < 3 600 ergs/mm²) 各组受精后 6 h 存活率无显著差异,但超过 3 min 后存活率明显下降,在 7 min(照射强度为 8 400 ergs/mm²) 达最低,为 6.53%。而孵化率,则随照射时间延长先降低,在 1.5 min(约 1 800 ergs/mm²) 达到最低,为 26.80%,之后随照射时间增加又开始上升,在 2.5 min 时达到最高,为 72.58%,接着又随照射时间延长开始下降。在照射时间 2~7 min 内照射组单倍体率为 100%。综合考虑照射后精子启动卵子发育的能力,受精后 6 h 胚胎存活率、孵化率以及初孵仔鱼单倍体率,大黄鱼精子紫外灭活的最适照射剂量为 3 000 ergs/mm²(照射时间 2.5 min)。

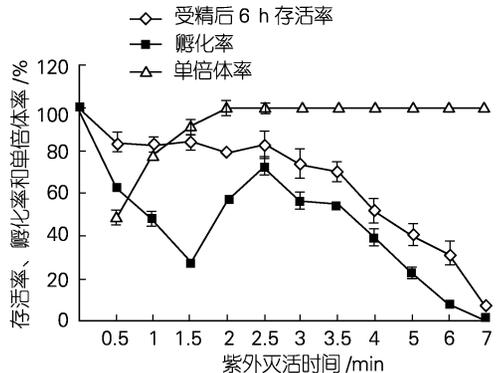


图 1 大黄鱼精子紫外照射的 Hertwig 效应
Fig. 1 The Hertwig's effects in sperm of *P. crocea* with UV irradiation

2.2 染色体倍性恢复

2.2.1 处理时刻诱导结果

冷休克法人工诱导大黄鱼雌核发育二倍体不同处理时刻的结果见图 2。从图中可以看出受精后不同时刻实施处理,其受精后 6 h 存活率较二倍体和单

倍体对照组都有所下降,但处理组之间无太大差异,而孵化率则是处理时刻为授精后 2 min 时最高,到 4 min 时已经下降为零。综合受精后 6 h 胚胎存活率和孵化率,冷休克法诱导大黄鱼雌核发育处理时刻在实验水温条件下为受精后 2 min 较适合。

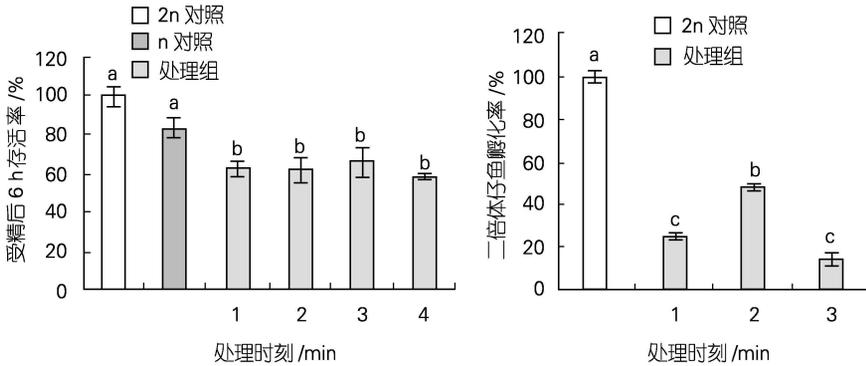


图 2 不同处理时刻冷休克诱导大黄鱼雌核发育二倍体受精后 6 h 的胚胎存活率和二倍体仔鱼孵化率

Fig. 2 Survival rates at 6 h after fertilization and hatching rates of the experimental and control groups by different treatments after fertilization of cold shock

D 10 min; T 3 ~ 4°C; 上标字母相同表示差异不显著,不同表示差异显著, $P < 0.05$

D 10 min; T 3 ~ 4°C; Means at the same stage with a common superscript were not significantly different, $P < 0.05$

2.2.2 处理时间诱导结果

根据 2.2.1 实验结果,进行冷休克诱导大黄鱼雌核发育二倍体的不同处理时间实验,结果见图 3。从图中可看出,各实验组受精后 6 h 存活率都低于对照组,且在处理时间范围内随处理时间延长而降低;5~

12 min 范围内各组间差异不显著,达到 12 min 后存活率明显降低。处理组中二倍体仔鱼孵化率也都明显低于对照组,10 min 组最高。综合受精后 6 h 胚胎存活率、二倍体仔鱼孵化率,冷休克法诱导大黄鱼雌核发育的处理时间 10 min 较适合。

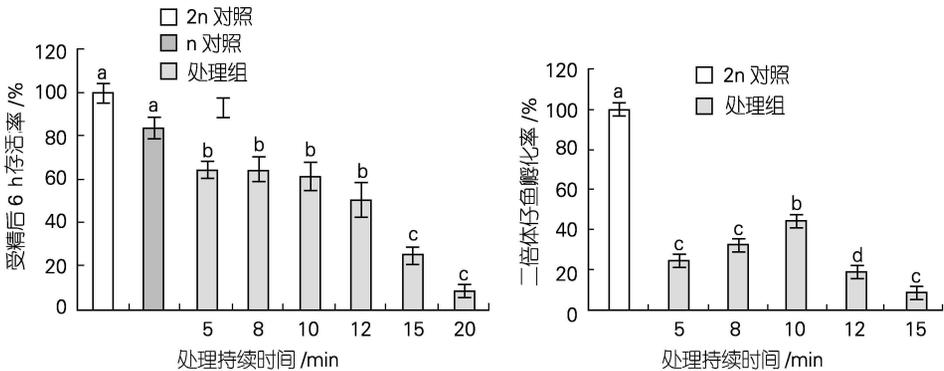


图 3 冷休克不同处理持续时间诱导大黄鱼雌核发育二倍体受精后 6 h 胚胎相对存活率和二倍体仔鱼孵化率

Fig. 3 Survival rates at 6 h after fertilization and hatching rates of the experimental and control groups by different durations of cold shock

T A 2 min; T 3 ~ 4°C; 上标字母相同表示差异不显著,不同表示差异显著, $P < 0.05$

T A 2 min; T 3 ~ 4°C; Means at the same stage with a common superscript were not significantly different, $P < 0.05$

2.3 倍性鉴定

单倍体初孵仔鱼都表现为不正常发育, 具有典型的“单倍体综合症”(图 4 b), 出膜后很快就死亡。相反, 二倍体对照组初孵仔鱼具有正常的外部形态

(图 4 a)。雌核发育组中加倍后的初孵仔鱼表现为与二倍体对照组相似的外部形态(图 4 c), 未加倍的胚胎和初孵仔鱼则与单倍体对照外部形态相似。

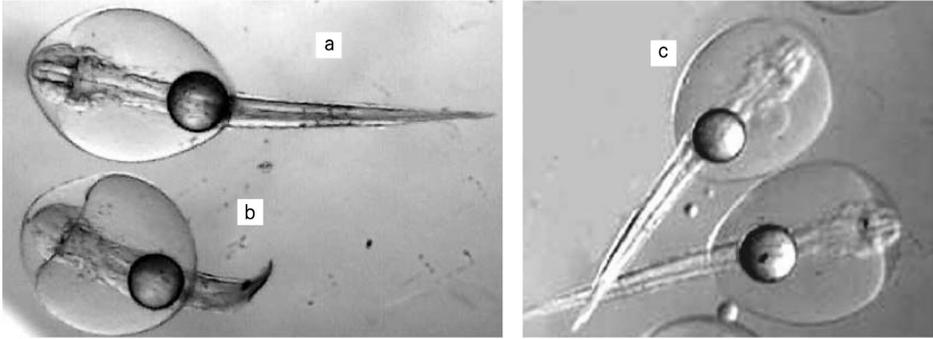


图 4 大黄鱼二倍体对照(a)、雌核发育单倍体(b)和雌核发育二倍体(c)初孵仔鱼

Fig. 4 External morphology of diploid control (a), haploid (b) and gynogenetic diploid (c) larvae of *P. crocea*

二倍体对照和雌核发育单倍体、二倍体初孵仔鱼细胞中 DNA 相对含量见图 5。正常二倍体对照组 DNA 含量设为 100(图 5 b), 单倍体组检测的相对值

为 50(图 5 a), 而雌核发育二倍体组检测的相对值为 100(图 5 c)。

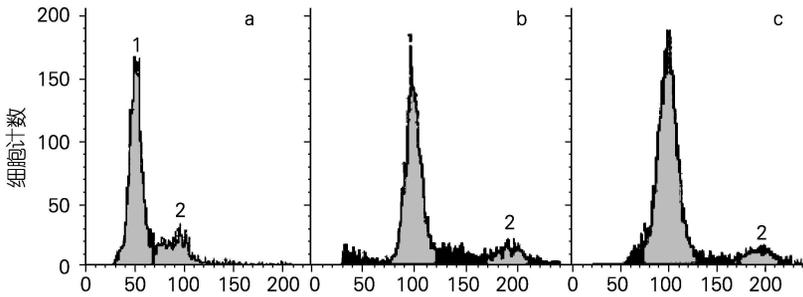


图 5 大黄鱼雌核发育单倍体(a)、二倍体对照(b)和雌核发育二倍体(c)初孵仔鱼细胞中 DNA 相对含量流式细胞仪检测图

Fig. 5 DNA values of gynogenetic haploid (a), diploid control (b) and gynogenetic diploid (c) cell of *P. crocea* measured by flow cytometry

3 讨论

在进行鱼类雌核发育诱导时首先要对精子遗传物质进行完全灭活, 目前常用的是紫外线照射。大部分鱼类精子经不同剂量紫外照射与其胚胎成活率、孵化率等之间出现明显的 Hertwig 效应, 这种现象在牙鲆^[2]、大菱鲆^[3]、欧鲆^[6]等海水鱼类精子紫外照射

实验中已有报道。本研究的结果表明大黄鱼精子在紫外照射过程中也出现明显的 Hertwig 效应, 即随照射时间延长照射后的精子与卵子受精后孵化率先降低后上升达到一个最大值最后又降低的现象。造成这一现象的主要原因是低剂量的紫外线照射会使精子遗传物质灭活不彻底, 受精后具有显性致死突变基因的二倍体胚胎和非整倍体胚胎数量随照射时间延

长而增加,出现孵化率随照射剂量增加而下降;较高剂量时,精子遗传物质完全被灭活,受精后全为单倍体胚胎,单倍体胚胎比照射诱发出来的具有显性致死突变基因的二倍体胚胎和非整倍体胚胎存活时间长,其孵化率上升;但随照射剂量的再增大,精子启动卵子发育的能力开始下降,从而其孵化率再次下降^[1]。本研究在紫外照射剂量 3 000 ergs/mm²时大黄鱼精子遗传物质完全灭活,同时受精后孵化率最高。这一最适灭活剂量远低于其它一些海水鱼类雌核发育诱导过程中精子遗传物质灭活的紫外照射剂量^[3,4]。不同鱼类精子的这种差别可能是因为不同鱼类精子对紫外照射敏感性存在种属差异^[3]。此外,实验中精液的稀释倍数、照射时周围环境温度也都会影响灭活效果^[6]。

根据在真鲷^[5]、欧鲈^[6]等海水鱼类中的报道,雌核发育诱导中染色体倍性恢复效果受处理起始时刻、处理持续时间和处理强度的影响,其中处理时刻对诱导结果影响最大。本文中处理时刻实验研究结果表明,在 23℃水温条件下仅受精后 1~3 min 内,实施冷休克处理可抑制大黄鱼卵子的第二极体的排放,超过此时间范围实施处理则无效,且在受精后 2 min 实施处理获得了较高的诱导率,这一结果与王军等^[8]报导 22~26℃水温下大黄鱼第二极体排放时间为受精后 1~3 min 相吻合。与已有报道的海水鱼类雌核发育处理时刻相比,这一处理时刻明显提前(例如欧鲈^[6]受精后 5~6 min、大菱鲆^[3]受精后 6.5 min 处理诱导效率最高),不同鱼类适合处理时刻差别可能与实验中亲鱼培育水温、受精卵培育水温、所用卵子的成熟度以及实验时的室温不同有关^[7]。在本实验中冷休克处理最适条件为 TA, 2 min; T, 3~4℃; D, 10 min。这与王军等^[8]在大黄鱼三倍体诱导中所用的处理条件相似。但与牙鲆(T, 0~1℃; TA, 3~5 min; D, 45~60 min)^[2]和大菱鲆(T, -1~0℃; TA, 6.5 min; D, 25 min)^[3]等雌核发育二倍体冷休克诱导条件相比,大黄鱼的冷休克诱导条件明显温和,而与真鲷抑制第二极体排放条件(T, 2~3℃; TA, 3~5 min; D, 5 min)^[5]相近。造成这一差别的原因可能与不同鱼类耐受水温和对低温耐受时间不同有关。大黄鱼和真鲷都是暖温性鱼类,牙鲆、大菱鲆则为冷温性鱼类,前两种鱼的最低耐受温度要高于后者,而对低温的耐受时间也明显地要短于后两者。在采用温度休克时通常要用亚致死温度才能有效地抑制第二极体的放出,并且,处理时间太短无抑制作用,太长则会对胚体造成较大损伤,导致孵化率下降、畸形率上升而影响整体诱导效果。这种现象在大菱鲆^[3]等种类雌核发育诱导中亦得到证实。采用本实验的诱导

条件大黄鱼雌核发育诱导率最高为 49.04%,远低于牙鲆、大菱鲆等种类中诱导率(接近 100%)^[2,3]。大黄鱼较低的雌核发育诱导率一方面可能与本实验中所用卵子为未经营养强化的网箱养殖成鱼直接人工催产挤卵所获得,卵子本身质量较差、成熟度不一致、受精率低有关;另一方面则可能是大黄鱼卵子本身对低温休克不敏感,这一点作者在其三倍体诱导时就发现静水压较低温刺激更能有效地抑制其第二极体的排放,所以,有必要在今后进行静水压法诱导大黄鱼雌核发育研究。

参考文献:

- [1] 吴清江,桂建芳. 鱼类遗传育种工程[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [2] Tabata T. Studies on chromosome manipulation in hirame *Paralichthys olivaceus* [J]. **Fish Genetics and Breeding Science**, 1992, 13: 9~18.
- [3] Piferer F, Cal R, Castora G, *et al.* Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): Effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age [J]. **Aquaculture**, 2004, 238: 403~419.
- [4] Luckenbach A, Godwin H, Harry V, *et al.* Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) with homologous and heterologous sperm [J]. **Aquaculture**, 2004, 237: 499~516.
- [5] Kato K, Hayashi R, Yuasa D, *et al.* Production of cloned red sea bream, *Pagrus major*, by chromosome manipulation [J]. **Aquaculture**, 2002, 207: 19~27.
- [6] Felip A. The relationship between the effects of UV light and thermal shock on gametes and the viability of early developmental stages in a marine teleost fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. **Heredity**, 1999, 83: 387~397.
- [7] Arai K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan [J]. **Aquaculture**, 2001, 197: 205~228.
- [8] Hong W, Zhang Q. Review of captive bred species and fry production of marine fish in China [J]. **Aquaculture**, 2003, 227: 1~14.
- [9] 林琪, 吴建绍, 曾志南. 静水压休克诱导大黄鱼三倍体 [J]. 海洋科学, 2001, 25(9): 6~9.
- [10] 王军, 王德祥, 尤颖, 等. 大黄鱼三倍体诱导的初步研究 [J]. 厦门大学学报, 2001, 40(4): 927~928.
- [11] Yamamoto S. Studies on sex manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck *et* Schlegel) [J]. **Aquaculture**, 1999, 173: 235~246.

Preliminary study on artificial induction of diploid gynogenesis in the large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*

XU Jiar-he^{1,2}, YOU Feng¹, WU Xiong-fei³, JIANG Hong-lei³, XU Yong-li¹, ZHANG Pei-jun¹

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 3. Marine Fisheries Research Institute of Ningbo, Ningbo 315012, China)

Received: Jan., 26, 2006

Key words: *Pseudosciaena crocea*; diploid gynogenesis; artificial induction; UV-irradiation; cold shock

Abstract: Gynogenetic diploids of *Pseudosciaena crocea* were induced by activating egg development with UV irradiated sperm combined with cold shock to prevent extrusion of the second polar body. The typical Hertwig's effect was observed when the sperm was exposed to UV light and the effective UV intensity for sperm irradiation covered a wide range from 2 400 to 8 400 erg/mm² (i.e. exposing time from 2 to 7 min), and the optimal UV dosage for gynogenetic haploid induction was 3 000 erg/mm² (2.5 min). Cold shock could inhibit the extrusion of second polar body successfully and the induction rates of gynogenetic diploids in the experimental groups were mainly affected by the starting time, intensity and duration of shocks. Treatment optimal parameters are follows: treatment temperature was 3~4 °C for 10 mins and timing was 3 min after fertilization.

(本文编辑: 刘珊珊)