

文章编号: 1004 - 7271(2008)05 - 0520 - 05

## 金鱼雌核发育诱导的 $\tau_0$ 度量法优化

赵晓勤, 李家乐, 汪桂玲

(上海海洋大学水产与生命学院, 上海 200090)

**摘要:**引入相对胚龄 $\tau_0$ 作为计时单位,通过系列试验确定热休克法抑制第一次卵裂的起始时间,以实现対金鱼(*Carassius auratus*)雌核发育诱导过程中的卵子染色体加倍操作进行优化的目的。研究表明,在固定热休克处理温度为38~39℃,热休克处理持续时间为2 min的前提下,20℃、22℃和25℃三种不同预处理水温组的孵化率与正常仔鱼数量曲线都形成一个单一的峰,且均在3.4 $\tau_0$ 时达到最佳优化点,对应胚胎发育阶段为第一次卵裂中期。结果提示了以 $\tau_0$ 单位度量热休克处理时机的准确性以及该优化方法在鲤科鱼类雌核诱导操作中的通用性,从而为相关鱼类的雌核发育操作提供了有价值的资料。

**关键词:**金鱼;雌核发育; $\tau_0$ 度量法;相对胚龄;优化

中图分类号:S 917 文献标识码:A

## Application of the unit $\tau_0$ in optimizing induction of diploid gynogenesis goldfish, *Carassius auratus*

ZHAO Xiao-qin, LI Jia-le, WANG Gui-ling

(College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** Experiments on initiating time of heat shock during the first cleavage for optimizing induction of diploidization of the chromosome set were conducted in goldfish, *Carassius auratus*. Dimensionless measure of relative embryological age  $\tau_0$  was used to express the time of heat shock operation. Water temperature of heat shock was 38 - 39 °C, and duration time was 2 min, in all experiments, while incubation temperature prior to treatment was switched to 20 °C, 22 °C or 25 °C in different groups. The results indicated, that the curves of hatching rate and normal diploid larva output showed a single peak, with the highest point at 3.4  $\tau_0$ , corresponding to metaphase of the first mitotic division, the results were obtained irrespective of the different pre-treatment water temperatures, thus confirming the veracity of measuring heat-shock timing by  $\tau_0$  and the wild applicability of this method in cyprinid and also suggesting a new way to the operations of induced gynogenesis in related fish.

**Key words:** *Carassius auratus*; gynogenesis; unit  $\tau_0$ ; relative embryological age; optimization

诱导卵子染色体加倍是人工雌核发育中的一项关键技术,而温度休克因其价廉和易操作性已成为染色体组二倍化的最常用手段<sup>[1]</sup>。目前在确定温度休克的起始时间与持续时间长度时大多采用正交分析法<sup>[2]</sup>。该法虽然简单易行,却有着工作量大、研究结果通用性差等缺陷,究其原因可能与不同预孵

收稿日期:2008-01-15

基金项目:上海市科技兴农重点攻关项目(2006-6-3);上海市博士后科研资助项目(07R214139)

作者简介:赵晓勤(1977-),女,上海市人,博士后,主要从事水生动物种质遗传学方面的研究。E-mail:zhaoantl@263.net

通讯作者:李家乐, Tel:021-65710216, E-mail:jlili@shou.edu.cn

育水温所产生的受精卵发育速度不一致有关<sup>[3]</sup>。 $\tau_0$ 度量法是在 Dettlaff 氏相对胚龄 (relative embryological age) 理论上发展出来的一种用相对时值代替绝对时值来优化温度休克处理参数的方法。该方法具有不受预孵育水温因子限制、重复性好、通用性较强等优点,已被以色列研究者首先运用到锦鲤的雌核发育诱导中<sup>[3]</sup>。但此法对于其它观赏鱼适用性如何,目前国内尚无人尝试。金鱼 (*Carassius auratus*) 被誉为我国的“国鱼”,不仅是世界上最早被人工饲养的观赏鱼类,也是研究种内演化的绝佳实验材料<sup>[4-5]</sup>。本研究尝试引入相对胚龄  $\tau_0$  作为计时单位,对金鱼雌核发育的热休克过程进行优化,以达到使卵子染色体加倍操作标准化的目的。研究既可为金鱼品种纯化工作的大规模开展奠定基础,同时也可对相关鱼类的雌核发育操作提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

母本金鱼为墨龙睛蝶尾,父本金鱼为红顶白高头,均为二龄。亲本均购自上海万金观赏鱼养殖有限公司,随后置于上海水产大学生命科学与技术学院水产种质资源实验室温控水族箱中进行养殖,试验期自 2007 年 3 月至 6 月。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 精子的遗传失活处理

精子的遗传失活采用紫外线照射法。将采得的成熟红顶白高头精液用 Hank 氏液 (NaCl 7.5 g, CaCl<sub>2</sub> 0.4 g, KCl 0.2 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.3) 以 1:5 稀释后均匀涂铺于直径为 9 cm 的玻璃培养皿中,精液厚度不超过 5 mm,再将培养皿置于冰盘上以紫外线进行照射,并在照射期间时时摇动,以确保精液受到均匀处理<sup>[6]</sup>。辐射源为 1 支 30 W 的紫外灯管,波长 253.7 nm,辐照度 92  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 。紫外灯管与混合精液面垂直距离为 10 cm。照射时间分别设置为 3 min、6 min、9 min、12 min 和 15 min 五个梯度。以未进行照射的正常精子作为对照。

#### 1.2.2 受精卵染色体加倍操作

用挤压法采得金鱼的成熟卵子后,以人工干法授精(即激活过程)获得受精卵。

根据朱洗等对金鱼受精过程的显微观察发现,当水温维持在 25  $^{\circ}\text{C}$  时,金鱼卵裂一次平均需时 10 min<sup>[7]</sup>,也即 25  $^{\circ}\text{C}$  条件下金鱼一个  $\tau_0$  的绝对时间值为 10 min。用此方法作进一步观察,得到 22  $^{\circ}\text{C}$  和 20  $^{\circ}\text{C}$  下的  $\tau_0$  绝对时间值分别为 13 min 和 15 min。

试验着重研究通过抑制第一次卵裂来实现染色体加倍,故将热休克处理启动时间段设定在 2.2~4.2 $\tau_0$  范围。取一定数量的受精卵置于按 0.2  $\tau_0$  间隔梯度设置的系列培养皿中,并在热休克处理前分置于 25  $^{\circ}\text{C}$ 、22  $^{\circ}\text{C}$  和 20  $^{\circ}\text{C}$  水温中预孵育,之后再同时转入水浴中进行热休克处理,每个试验组设 3 个平行,各试验组的热休克处理时间详见图 1。试验以未经紫外线照射且不进行热休克处理的受精卵为阳性对照,以经紫外线照射但不进行热休克处理的受精卵为阴性对照,并根据近缘种的研究结果,将热休克处理温度设为 38~39  $^{\circ}\text{C}$ ,热休克处理持续时间为 2 min<sup>[2]</sup>。

#### 1.2.3 受精卵发育的观察与计数

受精卵胚胎发育时期的判定参考朱洗等的标准进行<sup>[7]</sup>。以能够达到原肠期的胚胎为受精卵,并进

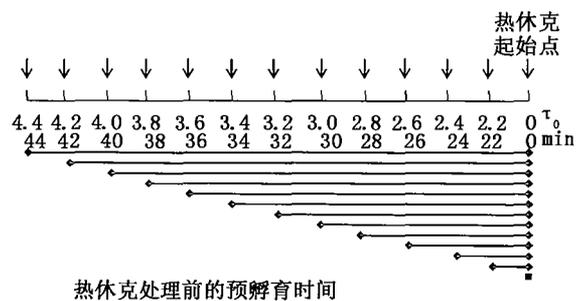


图 1 25  $^{\circ}\text{C}$  时的热休克处理时间安排示例  
Fig. 1 An example of schedule for heat shock treatment at 25  $^{\circ}\text{C}$

行计数、记录。

#### 1.2.4 鱼苗孵化

将热休克处理后的受精卵置于  $21 \pm 1$  °C 的恒温水浴环境中静水孵化,孵化期间第一天每隔 2 h 换水 1/3,第二天起换水间隔改为 6 h,换水同时吸出死卵,直至鱼苗出膜。

孵化后计数各组出膜仔鱼数量(处理组计数单倍体仔鱼数目,对照组计数正常仔鱼数目),并转换成孵化率。

#### 1.2.5 子代的形态鉴别

根据亲本的三对显隐性性状(表 1)对诱导所得的子代进行外观鉴别<sup>[8-9]</sup>。以同时具备三对隐性性状的子代为雌核发育纯合二倍体。

表 1 金鱼亲本的三对特征性状  
Tab. 1 Three pairs of marker characters of parental goldfish

性状	父本	母本
眼型	正常眼	龙睛 *
头型	高头	平头 *
体色	白色	黑色 *

注: \* 表示隐性性状,无星号表示显性性状。

## 2 结果

### 2.1 紫外线照射时间对精子遗传失活效果的影响

以不同时长的紫外线照射精子后,受辐射精子与卵子结合的受精率、胚胎孵化率和单倍体综合征发生率见表 2。从表中数据可知,当紫外照射仅 3 min 时,胚胎孵化率已从对照组的 77.21% 下降到 57.33%,并随着处理时间的延长不断下降,而受精率则在照射时间达到 12 min 后方始大幅下降,提示照射时间对受精卵发育能力的影响要大于其对精子受精能力的影响。从另一方面看,当照射时间达到 12 min 以后,单倍体综合征发生率才提升到 100%。因此,综合 3 项指标来考虑,精子的遗传失活处理时间设为 12 min 较为适宜。

表 2 不同的紫外线照射时间对精子受精率、胚胎孵化率及单倍体并发症发生率产生的影响

Tab. 2 The influence of different UV radiating time on fecundation rate, hatching rate and haploid syndrome rate

照射时间(min)	取样卵子数(个)	受精率(%)	孵化率(%)	单倍体综合征发生率(%)
0(对照)	630	92.51 ± 8.97	77.21 ± 7.49	0
3	826	89.77 ± 8.75	57.33 ± 5.50	9.42 ± 0.97
6	806	87.61 ± 8.50	56.75 ± 5.59	30.51 ± 2.90
9	875	88.89 ± 8.61	50.11 ± 4.86	81.24 ± 7.84
12	650	85.74 ± 8.35	47.12 ± 4.53	99.56 ± 9.62
15	604	62.34 ± 6.05	32.75 ± 3.18	99.67 ± 9.68

### 2.2 热休克处理起始时间对卵子染色体加倍效果的影响

不同的热休克处理起始时间对卵子染色体加倍效果的影响见表 3。可见,热休克处理起始时间由  $2.2 \tau_0$  向  $4.4 \tau_0$  推移的过程中,孵化率呈现先由低升高,再由高回落的趋势,并在  $3.4 \tau_0$  时达到孵化率的最高值。精子经紫外线照射但受精卵不经热休克处理的阴性对照组,在预处理温度为 20 °C、22 °C 和 25 °C 时的孵化率分别为 86.5%、84.5% 和 85.6%,但均为具小眼、小头、躯干短小、尾巴弯曲等特征的单倍体;而精子未经紫外线照射且受精卵亦不进行热休克处理的阳性对照组,在热休克预处理温度为 20 °C、22 °C 和 25 °C 时的孵化率分别达到了 96.2%、97.4% 和 95.3%。

从正常仔鱼的数量方面来看,该指标与孵化率呈现相同的先上升后下降的趋势,且无论预处理水温如何均在  $3.4 \tau_0$  时达到其最高值。当预处理温度为 25 °C 时最高数量达 44 尾,22 °C 时为 39 尾,20 °C 时为 37 尾;作为阴性对照的  $0 \tau_0$  组的正常仔鱼数量为 0,而阳性对照组的正常仔鱼产率均在 90% 左右。

再分别比较 20 °C、22 °C 和 25 °C 三种预处理水温对受精卵孵化率的影响(图 2),可以发现,预处理水温越高,受精卵的孵化率峰值点也越高,变化曲线外观越陡峭;反之,热休克处理温度越低,受精卵孵化率峰值点也越低,变化曲线外观越平缓。但无论预处理水温为何,孵化率均在  $3.4 \tau_0$  时达到峰值。

表 3 不同热休克处理起始时间对卵子染色体加倍效果的影响

Tab. 3 The influence of different heat shock initiating time on diploidization effects of the egg chromosome set

处理组	预处理温度 25 °C			预处理温度 22 °C			预处理温度 20 °C		
	受精卵总数(颗)	孵化率 (%)	正常仔鱼数(尾)	受精卵总数(颗)	孵化率 (%)	正常仔鱼数(尾)	受精卵总数(颗)	孵化率 (%)	正常仔鱼数(尾)
0 $\tau_0$ <sup>a</sup>	505	85.6	0	520	84.5	0	495	86.5	0
2.2 $\tau_0$	504	2.3	0	478	4.4	0	496	4.5	0
2.4 $\tau_0$	528	2.5	0	560	3.9	0	493	4.7	0
2.6 $\tau_0$	515	4.4	2	542	6.4	0	479	7.1	0
2.8 $\tau_0$	589	8.9	5	602	10.4	5	507	11.5	2
3.0 $\tau_0$	504	15.6	11	523	20.1	12	523	22.1	7
3.2 $\tau_0$	496	33.2	13	546	30.3	17	489	26.8	16
3.4 $\tau_0$	532	42.4	44	491	35.3	39	454	30.2	32
3.6 $\tau_0$	522	35.6	21	545	31.4	25	518	26.9	28
3.8 $\tau_0$	534	24.2	13	504	23.6	14	501	22.7	22
4.0 $\tau_0$	542	12.6	5	482	16.8	0	492	17.5	23
4.2 $\tau_0$	531	5.8	0	516	8.9	0	494	9.8	8
4.4 $\tau_0$	484	4.1	0	474	5.2	0	503	5.7	0
Ctrl <sup>b</sup>	586	95.3	521	595	97.4	553	497	96.2	460

注:a 为阴性对照;b 为阳性对照。

### 2.3 雌核发育子代形态鉴别

根据母本的三对隐性性状对子代进行鉴别,以同时具备龙睛、平头、黑体色三种性状的子代为雌核发育纯合二倍体。经过鉴定,除阳性对照组外,所得 364 尾正常仔鱼中具备上述特征体标者占 360 尾,即雌核发育纯合二倍体诱导率约为 98.90%。

## 3 讨论

### 3.1 紫外线照射时间对精子遗传失活的影响

精子染色体的遗传失活处理是人工诱导雌核发育的关键环节之一<sup>[10]</sup>。本试验在固定照射强度、照射距离、精液稀释比例及精液涂层厚度等因子的前提下,探讨了父本红顶白高头的适宜紫外照射时长,结果表明当处理达到 12 min 时精子的遗传失活比较彻底,这与林莲英等对鲤鱼精子的失活条件研究结果基本一致<sup>[5]</sup>。但在相似条件下,牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 精子在紫外线照射时间超过 2min 时就基本失活,失去受精能力<sup>[11]</sup>,而虹鳟精子的处理时间却要长达 30 min 左右<sup>[12]</sup>。可见,精子遗传失活处理时间与鱼的种类密切相关。

### 3.2 热休克处理对卵子染色体加倍的影响

温度休克处理因具有操作简便、设备要求简单、效果较好、适于养殖场大批量生产鱼种需求等优点,而成为鱼类人工雌核发育诱导的主要方法之一。一般冷水性鱼类如鲑科鱼类,采用 35~40 °C 的热休克处理较为合适,而温水性鱼类采用 0~5 °C 的冷休克处理效果较好。对于金鱼相近种类而言,采用热休克处理的研究较多<sup>[2-3,13-17]</sup>,也有少量采用冷休克处理的报道<sup>[6,18-20]</sup>。然而根据 Cherfas 等人分别采用 39.4 °C 高温和 1.4 °C~2.6 °C 低温对锦鲤雌核发育所进行的热、冷休克效果比较研究表明<sup>[15]</sup>,冷休克处理组受精卵的存活率与雌核二倍体的形成率在受精后的 0.05~0.10  $\tau_0$  和 0.30~0.40  $\tau_0$  时期呈现两个平缓低峰;而采用热休克处理时,两项数据仅在 0.15~0.25  $\tau_0$  时期出现一个明显的陡峰。鉴于热休克操作的优化峰明显,时间长度易于掌控,故本研究采用 38~39 °C 热休克法处理,在固定热休克持续时间的条件下,探讨金鱼雌核发育过程中的热休克处理最佳起始时间。

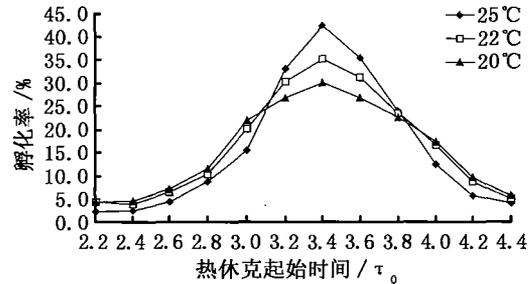


图 2 不同预处理温度条件下的各实验组孵化率  
Fig. 2 The hatching rate of each group which had been treated by different water temperature prior to heat shock

由于预处理水温的微小变化引起的热休克操作结果缺乏通用性,在以往的雌核诱导试验中屡屡显现。为了克服这个技术障碍,在本试验中我们尝试引入相对胚龄 $\tau_0$ 作为计时单位。 $1\tau_0$ 的时间长度等于在胚胎发育早期的同步卵裂阶段一个有丝分裂周期的时间长度。根据 Dettlaff 氏理论<sup>[21]</sup>,虽然 $1\tau_0$ 的绝对时间长度是随温度的变化而变化的,但是对于某一物种而言,只要在它的适宜发育温度范围之内,由受精卵发育到一个既定胚胎期所需的 $\tau_0$ 数值却是固定不变的。因此,我们设想如果采用 $\tau_0$ 来标定热休克起始点的胚胎发育阶段,就可以忽略预处理水温这个影响因子,从而达到热休克操作计时标准化的目的。

本试验结果表明,在热休克处理温度设为 $38\sim 39\text{ }^\circ\text{C}$ ,持续时间为 $2\text{ min}$ 的条件下, $20\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $22\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 三种预处理水温组的孵化率与正常仔鱼产量曲线都形成一个单一的峰,且均在 $3.4\tau_0$ 时达到最佳优化点,而 $3.4\tau_0$ 所对应的胚胎发育阶段为第一次卵裂中期。这些结果与 Cherfas 等对锦鲤(*Cyprinus carpio* L)雌核发育的研究结论十分一致<sup>[3]</sup>,从而印证了以 $\tau_0$ 单位度量金鱼卵子染色体加倍热休克处理时间的精确性以及该优化方法在鲤科鱼类雌核诱导操作中的通用性。

然而,虽然以 $\tau_0$ 度量法确定热休克处理最佳起始点有着不受预处理水温干扰的准确性,但预处理水温仍在某些方面显现出其对诱导效果的影响。如图2所示的受精卵孵化率峰值点随预处理水温升高而升高,降低而降低的现象。造成这种现象的原因可能与实验鱼的生理特性和遗传因素有关<sup>[10,22]</sup>,需要进一步深入研究。此外,本试验是在固定热休克处理温度和处理持续时间两项因子的前提下对热休克起始时间进行的单独探讨,有关热休克处理最佳起始点与上述因子之间的关系亦将是我们的下阶段的研究内容。

#### 参考文献:

- [1] 杨桂军,王卫民,郝汉舟. 鱼类人工雌核发育[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(1): 134-137.
- [2] 程汉良,潘黔生,马国文,等. 热休克诱导鲫鱼纯合雌核发育二倍体的研究[J]. 水利渔业, 2005, 25(3): 25-27.
- [3] Cherfas N B, Hulata G, Kozinsky O. Induced diploid gynogenesis and polyploidy in the ornamental (koi) carp, *Cyprinus carpio* L. 2. Timing of heat shock during the first cleavage[J]. Aquaculture, 1993, 111: 281-290.
- [4] 陈 桢. 金鱼的家化与变异[M]. 北京: 科学技术出版社, 1959: 1-45, 133-135.
- [5] 桂建芳. 鱼类品种改良的遗传和发育基础研究的现状和将来[J]. 生命科学, 2005, 17(2): 112-118.
- [6] 林莲英,宗琴仙,李永强. 人工诱导雌核发育金鱼的研究[J]. 水产科技情报, 1993, 20(1): 15-19.
- [7] 朱 洗,陈兆熙,王幽兰. 金鱼与鳊鱼卵球受精的细胞学研究[J]. 实验生物学报, 1960, 7(1-2): 29-46.
- [8] 王春元,陈幼臣,白琴华. 金鱼性状形成过程中遗传因素作用的研究 II. 金鱼正常眼和龙睛的遗传[J]. 遗传学报, 1979, 6(1): 76.
- [9] 操明权. 观赏金鱼的性状遗传[J]. 生物学通报, 1992, (3): 24.
- [10] Gomelsky B. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: a review[J]. Aquatic Living Resources, 2003, 16: 408-415.
- [11] 连建华. 性别控制技术与选择标记在牙鲆育种中的应用研究[D]. 山东青岛: 中国海洋大学, 2004: 24-44.
- [12] 李胜忠,陈 琳,杜劲松. 热休克诱导虹鳟二倍体雌核发育[J]. 动物学杂志, 1997, 32(5): 7-9.
- [13] Cherfas N B, Kozinsky O, Rothbard S, et al. Induced diploid gynogenesis and polyploidy in the ornamental (koi) carp, *Cyprinus carpio* L. 1. Experiments on the timing of temperature shock[J]. Israeli Journal of Aquaculture Bamidgheh, 1990, 42(1): 3-9.
- [14] Cherfas N B, Peretz Y, Ben-Dom N, et al. Induced diploid gynogenesis and polyploidy in the ornamental (koi) carp, *Cyprinus carpio* L. 3. Optimization of heat-shock timing during the 2nd meiotic division and the 1st cleavage[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 89: 281-286.
- [15] Cherfas N B, Peretz Y, Ben-Dom N, et al. Induced diploid gynogenesis and polyploidy in the ornamental (koi) carp, *Cyprinus carpio* L. 4. Comparative study on the effects of high- and low-temperature shocks[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 89: 193-197.
- [16] Paschos I, Natsis L, Nathanailides C, et al. Induction of gynogenesis and androgenesis in goldfish *Carassius auratus* (var. oranda) [J]. Reprod Dom Anim, 2001, 36: 195-198.
- [17] 李冰霞,罗 琛. 热休克法抑制第一次卵裂实现草鱼雌核发育的细胞学观察[J]. 水生生物学报, 2003, 27(2): 155-160.
- [18] 俞豪祥,徐 皓,关宏伟,等. 冷休克诱导天然雌核发育银核发育银鲫♀×鲤鱼♂四倍体[J]. 水产科技情报, 1991, 18(6): 165-168.
- [19] 大越徹夫. 金鱼和锦鲤的雌核发育育种[J]. 黑龙江水产, 1996, (3): 50-52.
- [20] 孙远东,陶 敏,刘少军,等. 用团头鲂精子诱导红鲫雌核发育的研究[J]. 自然科学进展, 2006, 16(12): 1633-1638.
- [21] Dettlaff T A, Dettlaff A A. On relative dimensionless characteristics of the development duration in embryology[J]. Arch Biol (Leige), 1961, 72: 1-16.
- [22] Rothbard S. A review of ploidy manipulations in aquaculture: the Israeli experience[J]. Israeli Journal of Aquaculture Bamidgheh, 2006, 58(4): 266-279.