

黄颡鱼三倍体的诱导

杨彩卿, 韩焯 (1. 冀中职业学院, 河北定州 073000; 2. 河北大学生命科学学院分子与生化专业, 河北保定 071000)

摘要 [目的] 探讨影响黄颡鱼三倍体诱导率的因素和关键技术。[方法] 采用6-DMAP抑制受精卵极体的释放, 诱导黄颡鱼产生三倍体; 按6-DMAP浓度(300、450和600 $\mu\text{mol/L}$), 诱导时机(即精卵混合后的时间分别为10和30 min)和诱导持续时间(10、15、20 min), 设计正交实验, 寻求诱导黄颡鱼三倍体的最优水平组合。[结果] 黄颡鱼三倍体诱导明显受6-DMAP的浓度、诱导时机和诱导持续时间3因子的影响, 而诱导持续时间的长短将直接影响受精卵的诱导率。诱导黄颡鱼三倍体各因素的最优水平组合为: 6-DMAP诱导浓度为450 $\mu\text{mol/L}$, 精卵混合10 min, 诱导持续时间15 min。[结论] 在黄颡鱼三倍体诱导中, 应尽可能地采取温和的手段催产来获得所需要的精卵, 以获得高又稳定的三倍体倍化率。

关键词 黄颡鱼, 三倍体诱导, 6-DMAP, 受精卵, 抑制

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)19-08118-02

Triploid Induction in *Pelteobagrus fulvidraco*

YANG Cai-qin et al (Jizhong Vocational College, Dingzhou, Hebei 073000)

Abstract [Objective] The study aimed to discuss the factors effecting the triploid induction in the *Pelteobagrus fulvidraco* and the key techniques of induction. [Method] The triploid in *P. fulvidraco* was induced by inhibiting release of polar body of the zygotes with 6-dimethylaminopurine (6-DMAP). In orthogonal experiment with three levels of 6-DMAP (300, 450 and 600 $\mu\text{mol/L}$), the induced occasion (the time after sperms and eggs were confused) of 10, 15 and 30 min, and the induced duration of 10, 15 and 20 min, the optimum level combination was sought for inducing the triploid in *P. fulvidraco*. [Result] The induction of triploid in *P. fulvidraco* was obviously effected by 6-DMAP levels, the induced occasion and the induced duration, and the later could directly affect the induction rate of zygotes. The optimum level combination of inducing factors for triploid in *P. fulvidraco* was that the induction concn. 6-DMAP was 450 $\mu\text{mol/L}$, the time when sperms and eggs was confused was 10 min and the induced duration was 15 min. [Conclusion] In the induction of triploid in *P. fulvidraco*, it should be as much as possible to use gentle ways to induce spawning for getting the needed batch sperms and eggs, thus to obtain the high and stable triploid percentage.

Key words *Pelteobagrus fulvidraco*; Triploid induce; 6-DMAP; Zygotes; Blocking

黄颡鱼 [*Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson)] 俗称黄腊丁、黄鼓鱼等, 属鲶形目、鲶科、黄颡鱼属^[1]。其肉质细嫩, 无肌间刺, 蛋白质含量15.37%, 氨基酸总量14.19%, 必需氨基酸指数达73.34。同时因其肉性味甘、平, 有祛风、利尿之功效, 可主治疗水肿、喉痹肿痛等症, 有一定的药用价值而深受消费者青睐。目前由于黄颡鱼天然资源锐减, 市场价格逐年攀升(是普通鱼价格的2~4倍), 具有较好的市场前景。同时黄颡鱼在日本、韩国、东南亚等国家有巨大的市场潜力, 是出口创汇的优良品种^[2-4]。但由于该鱼生长速度慢、个体规格偏小, 通常要2年才能性成熟, 加之该鱼产卵量低, 从整体上影响其养殖产量, 远远不能满足市场的需求。

笔者在熟悉和掌握黄颡鱼繁殖习性的基础上, 采用化学的方法对黄颡鱼实行人工催产、人工授精、人工诱导产生三倍体, 从而达到改良品种性状, 加快鱼的生长速度、加大个体规格、提高养殖经济效益, 满足人们生活需求。该项目成功后, 不仅可提高黄颡鱼种苗生产规模化, 促进黄颡鱼养殖生产的产业化, 而且可为其他鱼类的多倍体育种奠定基础。

1 材料与方

黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 取自绍兴农贸市场。肉眼观察, 性腺发育良好。

诱导试剂: 6-二甲基氨基嘌呤(6-DMAP), 为美国Sigma公司产品, 纯度高于98%。雌雄鉴别主要看生殖孔, 即有生殖乳突为, 无生殖乳突为。雌雄比一般为1:1。注射部位以背鳍基部注射为主, 进针深度0.5~1.0 cm, 2次注射, 第1针药量为全剂量的1/4, 药液量为1 ml, 第2针为全剂量的3/4, 药液量为1 ml。为剂量的1/2。两针间隔10~12 h。

设3个组合: 绒毛膜促性腺激素(HCG) + 马来酸地欧酮

作者简介 杨彩卿(1975-), 女, 河北定州人, 高级讲师, 从事生物化学方面的研究。

收稿日期 2008-04-21

(DOM); 促黄体素释放激素类似物(LHRH A₂) + DOM; HCG + LHRH A₂ + DOM。解剖法获取精卵, 并进行人工授精。

用6-DMAP诱导黄颡鱼产生三倍体。采用正交试验: 6-DMAP浓度, 设300、450和600 $\mu\text{mol/L}$; 诱导时机(即精卵混合后的时间), 设10和30 min; 诱导持续时间, 设10、15、20 min。重复2次。决定三倍体诱导率的3因素主次顺序和最优水平组合以直观分析法得出。

2 结果与分析

从表1可看出, 6-DMAP浓度较低时, 适当延长诱导时机可提高三倍体的诱导率, 但是当浓度达到一定程度时, 如果再延长诱导时机诱导率反而降低, 可能是高浓度的药物对受精卵产生了毒性, 造成诱导率下降。虽然可以产生一定百分比的三倍体, 但是都没有达到50%, 也可能说明HCG + LHRH A₂催产率并不高。

表1 注射过HCG + LHRH A₂的三倍体诱导率

Table 1 Triploid induction rate after injecting HCG and LHRH A₂

6-DMAP 浓度 $\mu\text{mol/L}$ 6-DMAP concentration	诱导时机 min Induction time	持续时间 min Duration	诱导率 % Induction rate
300	10	10	18.90
450	10	15	38.35
600	10	20	40.00
300	30	10	38.35
450	30	15	43.30
600	30	20	36.70

从表2可看出, 6-DMAP诱导黄颡鱼三倍体时有个阈值, 其浓度低于或高于这个阈值时, 三倍体的诱导率都有所下降。可能原因是: 当浓度低于阈值时, 不能有效抑制极体的释放, 所以多倍体产生的几率变小; 当浓度高于阈值时, 对受精卵产生了毒害, 故造成诱导率下降。表2中诱导率较高, 可能说明HCG + DOM的催产率效果比较好。

表2 注射过 HCG+ DOM 的三倍体诱导率

Table 2 Triplid induction rate after injecting HCG and DOM

6-DMAP 浓度 $\mu\text{mol/L}$ 6-DMAP concentration	诱导时机 min Induction time	持续时间 min Duration	诱导率 % Induction rate
300	10	10	27.70
450	10	15	66.70
600	10	20	56.70
300	30	10	46.70
450	30	15	60.00
600	30	20	50.00

从表3 可看出,三倍体的诱导情况和表2 基本一致,6-DMAP 诱导黄颡鱼三倍体时有个阈值,其浓度低于或高于这个阈值时,三倍体的诱导率都有所下降。另外适当延长诱导时机可以提高三倍体的诱导率。表3 中三倍体诱导率处于中间水平,可能说明LHRH A₂+ DOM 催产效果一般。

表3 注射过 LHRH A₂+ DOM 的三倍体诱导率Table 3 Triplid induction rate after injecting LHRH A₂ and DOM

6-DMAP 浓度 $\mu\text{mol/L}$ 6-DMAP concentration	诱导时机 min Induction time	持续时间 min Duration	诱导率 % Induction rate
300	10	10	16.70
450	10	15	43.30
600	10	20	38.35
300	30	10	33.30
450	30	15	56.70
600	30	20	50.00

综合表1、2、3,得到的三倍体诱导率各影响因素最优水平组合是:诱导6-DMAP 浓度为450 $\mu\text{mol/L}$,诱导时机为10 min,诱导持续时间为15 min,催产素为HCG+ DOM。在此条件下诱导率为66.70%。

3 讨论

3.1 6-DMAP 的优点 近年报道,用6-DMAP 诱导长牡蛎取得很高的三倍体率^[5],尚未见用于黄颡鱼三倍体诱导的报道。6-DMAP 具有不致癌等优点^[6-7],较细胞松弛素B 便宜,易水溶性,并且有与CB 同样较高的三倍体诱导率,故易被人们普遍使用。当6-DMAP 与微管二聚体结合以后,对微管的正常结构和功能起到了抗有丝分裂的作用,因此抑制受精卵的极体释放可以产生三倍体^[8]。但它是一种蛋白激酶抑制剂^[9-10],是影响磷酸激酶作用的 呤毒素类似物^[6],因此,对胚胎有一定的毒性。试验结果表明,在特定诱导温度下,对达到一定成熟度的黄颡鱼,其三倍体诱导明显受到6-DMAP 的浓度、诱导时机和诱导持续时间等因子的影响。

3.2 影响三倍体诱导率的3 个因素 6-DMAP 浓度是诱导三倍体的一个重要因素,在抑制受精卵的极体释放有个阈值。卵受精后10 min 诱导效果较好。对黄颡鱼受精卵持续诱导15 min 的效果明显好于诱导10 和20 min 的效果。可见,在确定了适宜的处理温度和开始处理时间后,处理持

续时间的长短将直接影响受精卵的诱导率。

3.3 诱导的关键技术 如何确保批量精卵的同步成熟、同步受精和同步发育是多倍体诱导的关键技术,也是提高和稳定黄颡鱼三倍体倍化率的关键技术。在三倍体诱导中,应尽可能采取温和的手段催产来获得所需要的批量精卵,以获得较高、稳定的三倍体倍化率。批量的卵子放置的时间不同,也影响着同步成熟、同步受精和同步发育。排放的批量卵子最好能在较短的时间里进行人工授精。

实践表明,精子的活力对批量精卵的同步受精和同步发育有十分重要的影响。在三倍体诱导中,应取刚排放出来的精子进行授精为好。授精方式:把收集的卵子放入已预先加入精子的水体中,并立刻轻轻搅拌,让每个卵子能迅速地且尽可能地同时受精。

此外,确保良好的、稳定的受精环境,如合适的水温、pH 值、卵子的密度等对于提高和稳定三倍体倍化率也很重要。

3.4 三倍体孵化率 试验黄颡鱼的孵化率为零,主要原因是黄颡鱼受精卵黏性强,往往是一块块地堆在一起,很容易造成缺氧;同时由于采用棕榈片鱼巢体积大,通透性差,附卵不均匀,孵化容器中容纳量少,而且容易沉积污物;加之黄颡鱼受精卵又特别易长水霉,人工授精虽然催产率较高,但受精率反而较自然产卵的低,因此孵化率很低。此外笔者经验不足,实验室条件有限,均导致孵化失败。

3.5 倍性检测 试验采用DNA 含量测定的方法。由于核酸所含的 呤和 分子中都有共轭双键,使核酸分子在紫外260 nm 波长处有最大吸收峰,这个性质可用于核酸的定量测定。而普通三倍体细胞的DNA 含量是单倍体的3 倍,因此核酸可以通过在260 nm 处的吸光值比较诱导组和对照组的DNA 含量,从而得出诱导率。

参考文献

- [1] 郑葆珊. 中国动物图谱 M. 北京: 科学出版社, 1987.
- [2] 王卫民. 黄颡鱼的规模人工繁殖试验 J. 水产科学, 1999, 18(3): 9-12.
- [3] 罗玉双, 夏维福. 黄颡鱼大规格苗种育种培育技术试验 J. 河南水产, 2002, 25(2): 27-28.
- [4] 苏雪红. 黄颡鱼人工繁殖及批量育苗技术研究 J. 中国水产, 2005(9): 28-30.
- [5] 田传远, 王如才, 梁英, 等. 6-DMAP 诱导太平洋牡蛎三倍体——抑制受精卵第二极体释放 J. 中国水产科学, 1999, 6(2): 1-4.
- [6] RIME H, NEANTI, GUERIER P, et al. 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP): A reversible inhibitor of the transition to metaphase during the first mitotic cell division of the mouse oocyte [J]. Developmental Biology, 1989, 133(1): 169-179.
- [7] DESROSIERS R R, GERARD A. A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6-Dimethylaminopurine [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1993, 170(1): 29-43.
- [8] SCARPA J, VAUGHAN D E, LONGLEY R. Induction of triploidy in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, using 6-DMAP [J]. Journal of Shellfish Research, 1995, 14(1): 277.
- [9] NEANTI, DUB F. DNA replication initiation by 6-DMAP treatment in maturing oocytes and dividing embryos from marine invertebrates [J]. Mol Reprod and Dev, 1996, 44(4): 443-451.
- [10] TODOROM C V, KOI C S, Vujanac M, et al. Novel DNA binding protein from *Drosophila* embryos identified by binding site selection [J]. FFBS Letters, 1996, 396(1): 99-102.
- [4] 王君晖, 张毅翔, 刘峰, 等. 铁皮石斛种子、原球茎和类原球茎体的超低温保存研究 J. 园艺学报, 1999, 26(1): 59-61.
- [5] 史永忠, 潘瑞焱, 王小菁, 等. 铁皮石斛种质室温离体保存 J. 华南师范大学学报: 自然科学版, 1999(4): 73-77.
- [6] 宋锡金, 龚宁, 詹孝慈, 等. 金钗石斛种子非共生萌发和种质保存 J. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2004, 22(2): 13-16.
- [7] 罗远华, 郭丽霞, 莫饶, 等. 独占春种子非共生萌发和低温离体保存 [J]. 热带农业科学, 2007(4): 41-43.

(上接第8069 页)

参考文献

- [1] 张莉, 张明, 高宏秀. 兰花组织培养研究进展 J. 安徽农业科学, 2005, 33(11): 2134-2135.
- [2] 史永忠, 潘瑞焱, 王小菁, 等. 铁皮石斛种质资源的低温离体保存 J. 应用与环境生物学报, 2000, 6(4): 326-330.
- [3] 张治国, 刘骅, 夏志俊, 等. 铁皮石斛种子的超低温保存研究 J. 安徽中医学院学报, 1997(16): 40-42.