

应用猪精液抑制素主动免疫法诱导黄牛孪生

杨利国¹,张居农²,王进荣¹,叶 荣³,桑润滋⁴,牛树理¹,刘成海⁴

(¹ 南京农业大学动物科技学院,南京 210095;² 石河子大学动物科技系,石河子 832003;
³ 新疆农业大学畜牧兽医系,乌鲁木齐 830000;⁴ 河北农业大学畜牧兽医系,保定 071001)

摘要:270头经产母黄牛分成3组,每组90头,分别在产后13个月用2mg(Th组)或1mg(TI组)精液抑制素和福氏完全佐剂进行主动免疫,34周后进行加强免疫。加强免疫所用抑制素剂量减半,佐剂为福氏不完全剂。另一组牛用不含抑制素生物活性的精液提取物和上述佐剂进行主动免疫和加强免疫,用作对照组(C组)。母牛发情时,间隔8-12h用冷冻精液进行人工授精。在主动免疫和加强免疫后812d采集颈静脉血,收集血清,分别用双扩散凝胶沉淀法和酶联免疫吸附测定法测定抗抑制素抗体的效价。根据记录完整的247头牛资料,发现Th组87头母牛中有73头(83.9%)发情,其中51头排单卵,19头排双卵。妊娠期末,15头产双胞胎(孪生26.3%,15/57)。而在TI组(72头)和C组(88头)中,分别只有44头(61.1%)和55头(62.5%)母牛发情;其中排双卵的母牛分别为4头和0。妊娠期末,孪生率分别为3.1%(1/32)和0(0/34)。分析血清抗体水平,证明排双卵的母牛血清抗抑制素水平显著高于排单卵和不排卵的母牛,排卵数与抗抑制素抗体水平呈正相关($r=0.7507, P<0.01$)。

关键词:肉牛;液精抑制素;主动免疫;孪生;排卵率

Artificial Induction of Twinning by an Active Immunization of Beef Cows Against Inhibin Partially Purified from Porcine Seminal Plasma

YANG Li-guo¹, ZHANG Ju-nong², WANG Jin-rong¹, YE Rong³,
SANG Run-zi⁴, NIU Shu-li¹, LIU Cheng-hai⁴

(¹ Research Laboratory of Animal Reproduction, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; ² College of Animal Science and Technology, Shihezi Agricultural University, Shihezi 832003; ³ Department of Animal Science and Veterinary Medicine, Xinjiang Agriculture University, Wulumuqi 830000; ⁴ Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Hebei Agricultural University, Baoding 071001)

Abstract: Two hundred and seventy multiparous Chinese Yellow cattle (beef) cows were selected at 1 to 3 months postpartum and divided into three groups (90 cows for each). Animals were given both a primary and a booster immunizations with a total dose of 3 mg (Group Th) or 1.5 mg (Group TI) of seminal preparation containing inhibin activity, emulsified with Freund's complete adjuvant and incomplete adjuvant (for booster), at 3 or 4 weeks intervals. Other cows were treated with same volume of seminal preparation without inhibin activity as procedures mentioned above to serve as a control (Group C). Artificial inseminations were given twice at 8 to 12 h intervals when the cow was in heat. Jugular venous blood samples were collected from each cow and used to assay the presence of antibody against seminal preparation by double-diffusion in agar precipitation test and to detect the titer of inhibin antibody by an ELISA method. Data from 247 cows showed that 83.9% (73/87) of cows were in estrus and ovulated 89 ova altogether, of which 19 cows ovulated twin ova and 15 cows produced

收稿日期:2000-07-31

基金项目:国家自然科学基金(39370512)、教育部博士点基金(960204)和国家“九五”重中之重专题(960030311)资助

作者简介:杨利国(1962-),男,研究员,湖南邵阳人,理学博士,博士生导师,主要从事家畜繁殖学研究。Tel:025-4395306;E-mail:lgy@njau.edu.cn

twins in group Th ($n=87$). However, only 61.1% (44/72) of cows in group T1 ($n=72$) and 62.5% (55/88) of cows in Group C were in estrus and ovulated 46 and 52 ova altogether respectively. The ovulation rate (1.27 ± 0.03), calving rate (126.3%) and twinning rate (26.3%) in Group Th were greater than those in groups T1 or C ($P < 0.01$). Furthermore, the ovulation rate was associated with antibody titer in sera of immunized animals ($r=0.7507$, $P < 0.01$). These results indicate that active immunization of postpartum cows against inhibin purified from porcine seminal plasma may increase the ovulation rate and induce twinning, suggesting the potential to develop a method to improve fertility in cows.

Key words: Beef cows; Seminal inhibin; Active immunization; Twinning; Ovulation rate

自1983年以来,本实验室一直进行人工诱导黄牛和水牛的孪生机理和技术研究^[1-6]。虽然结合应用孕马血清促性腺激素(PMSG)及其抗体已成功地诱导54%妊娠母牛生双胎^[7],但由于该法成本较高,而且操作麻烦,所以推广应用比较困难。为了简化人工孪生技术的操作程序,降低使用成本,促进推广应用,自1995年开始改变研究思路,采用抑制素主动免疫方法进行了人工孪生试验,成功地诱导了20%左右母牛排双卵^[8]。

抑制素是由卵巢颗粒细胞或睾丸支持细胞分泌的异二聚体糖蛋白质,具有抑制垂体促卵泡素(FSH)分泌的作用^[9-12]。迄今,虽然应用从卵泡液中提取的抑制素制剂或基因重组的卵泡抑制素 α 亚基片段主动免疫母牛^[13-18]、母猪^[19]和母羊^[20-23],均提高了卵泡数,并成功地诱导了4头母牛生双胎^[24]。虽然用基因重组的卵泡抑制素 α 亚基主动免疫公牛^[25]和公羊^[26],可以改善生殖内分泌机能,提高精液品质。但是,除本实验室于1996年首次报道应用精液抑制素主动免疫提高母牛排卵率外,有关应用精液抑制素主动免疫诱导母牛孪生及精液抑制素抗体与排卵数相互关系的研究,国内外尚未报道。本研究通过扩大实验牛群数量,旨在研究应用精液抑制素主动免疫方法诱导母牛孪生的效果,分析血中抑制素抗体效价与排卵数的关系,为进一步完善肉牛人工孪生新技术提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 精液抑制素制剂

根据参考文献^[27]从猪精液提取并纯化抑制素,冷冻干燥后抑制素纯度为1000单位/mg蛋白。抑制素生物活性采用Chari(1978)介绍的人绒毛膜促性腺激素诱导小白鼠卵巢增重抑制法^[9]。

1.2 牛群及其处理

从安徽和新疆两省农户牛群中共选择270头体重275~325kg,年龄4~9岁的经产母黄牛,各省分

成Th、T1和C3组。自母牛产后1~3月开始,Th和T1两组母牛分别在颈部肌肉注射1ml含精液抑制素2mg和1mg的福氏完全佐剂乳化液(主动免疫),3~4周后,分别在颈部肌肉注射1ml含精液抑制素1mg和0.5mg的福氏不完全佐剂乳化液(加强免疫)。C组母牛用同样剂量,但不含抑制素生物活性的精液抽提物冷冻干燥物与福氏完全佐剂或不完全佐剂进行主动免疫或加强免疫,用作对照。自加强免疫后第8天开始,每天观察母牛发情情况。母牛发情时,经直肠触摸卵巢上的卵泡,以判断输精时间。应用冷冻精液间隔8~12h输精两次。在配种后第8~12d,由有经验的配种员经直肠触摸卵巢上的黄体判断排卵数。

1.3 血样收集和抗抑制素抗体测定

在主动免疫前和加强免疫后第8~12天,采集颈静脉血5~10ml,室温静置2~6h,分离血清,-20℃冷冻保存。用双扩散凝胶沉淀法(DDAP)检测血中抗抑制素抗体的存在,用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定血中抗抑制素抗体滴度及精液抑制素抗体与卵泡抑制素的免疫交叉反应性。

抗抑制素抗体凝胶沉淀法操作方法简述如下:在凝胶板中打间距为3mm的3排孔,在中间一排孔中加10 μ l抑制素溶液(用0.04mol/L,pH7.2的磷酸缓冲液稀释成含抑制素制剂2mg/ml),两边孔中加10 μ l待测血清,在室温于湿盒中静置16h,观察沉淀线。

抗抑制素抗体ELISA方法简述如下:用戊二醛法^[28]将分子量为32000的牛卵泡抑制素 α 亚基N端1-29片段(由美国生产,德国Elsaesser F博士惠赠)与辣根过氧化物酶(HRP,Sigma公司产品)偶联(HRP-1NB),用纯化的抗卵泡抑制素抗体免疫球蛋白(日本Taya博士惠赠)作阳性参考血清。测定抗体效价时,先用pH9.6,0.05mol/L碳酸缓冲液将阳性血清作梯度稀释,将待测血清作100倍稀释,在微量反应板各孔内加稀释后的抗血清100 μ l,每样重复

3 孔,4℃静置过夜。倾出反应液,加 HRP-INB 磷酸缓冲液(pH7.4,0.04 mol/L,100μl/孔),37℃避光反应 2h 后,倾出反应液并洗涤反应板,于各孔内加 150μl 四甲基联苯胺(TMP)-过氧化脲底物液显色,用 2 mol/L 硫酸(50μl/孔)终止反应后读取 450nm 波长吸光值。根据标准曲线计算抗抑制素抗体效价,各测定的板内和板间变异系数分别为 4.3% 和 8.9%。

1.4 统计分析

该试验是在生产条件下进行的。由于 23 头牛在处理后被出售或死亡,所以实际只有 247 头牛有完整记录。采用 Genstat5 软件包(Release3.1,1994,Lawes Agricultural Trust,英国)进行统计分析,百分数比较采用卡方分析法,排卵数平均值比较采用 ANOVA 法,排卵数与抗体效价的关系采用回归分析法。

2 结果与分析

2.1 抗抑制素抗体水平

应用双扩散凝胶沉淀法检测血中抗抑制素抗体,发现在用猪精液抑制素主动免疫后 8~12d 的所有母牛血样中均出现明显的沉淀线;而在对照组母牛血清以及所有抑制素免疫母牛在免疫前收集的血清中,未发现明显的沉淀线,表明抑制素免疫牛血中存在抗精液抑制素抗体。

应用 ELISA 方法进一步证明,抗精液抑制素抗体与牛卵泡抑制素 α 亚基片段有交叉反应。所有用抑制素免疫的母牛血清中抗抑制素抗体滴度变动于 1/100~1/3200。卵巢上有 2 个黄体的母牛,血中抗抑制素抗体平均水平为 1/(2800±253),显著高于卵巢上只有一个黄体[1/(1361+231)](P<0.01)或没有黄体的母牛[1/(500±188),P<0.01],

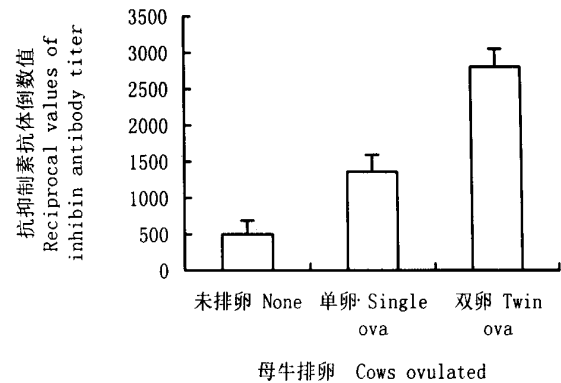


图 未排卵和排 1 2 枚卵的母牛血中抗卵泡抑制素抗体水平

Fig. Antibody level against follicular inhibin in blood serum of cows ovulated 0, 1 and 2 ova

图]。而在对照组母牛和所有免疫组母牛在免疫前的血清中,未检出抗卵泡抑制素抗体。

2.2 发情

在 Th 组有完整记录的 87 头母牛中,73 头(83.9%,73/87)在加强免疫后 4 周内出现发情征状。在 T1 和 C 组中,有完整记录的母牛头数分别为 72 和 88,在加强免疫后 4 周内发情的母牛数分别为 44(61.1%,44/72)和 55(62.5%,55/88)。Th 组发情率分别比 T1 和 C 组高 22.8% 和 21.4%(P<0.05,表 1)。

2.3 排卵率及其与抗抑制素抗体水平的关系

在 Th 组 73 头发情母牛中,3 头未排卵,51 头排单卵,19 头排双卵。70 头排卵牛共排卵 89 枚,平均排卵率为 1.27±0.03;平均每头发情母牛排卵 1.22±0.03 枚;平均每头处理母牛排卵 1.02±0.03 枚。与 T1 组和 C 组比较,发情率分别增加 22.8% 和 21.4%(P<0.01),平均每头排卵母牛的排卵率分别增加 0.17(P<0.01)和 0.27(P<0.01),平均每头发情母牛的排卵率分别增加 0.17(P<0.05)和

表 1 各组母牛的发情和排卵情况比较¹⁾

Table 1 Comparison of estrus and ovulation among three groups of cows

组别 Group	观察牛数 Cows observed	发情牛数 Cows in estrus	发情率 Estrus rate (%)	排卵牛数 Cows ovulated	排双卵 Twin ovulation		排卵率 Ovulation rate (M±SE)	发情母牛平均排卵率 Ovulation rate of estrous cows (M±SE)	处理母牛平均排卵率 Ovulation rate of treated cows (M±SE)
					母牛数 No. of cows	(%)			
Th	87	73	83.9a	70	19	27.1a	1.27±0.03a	1.22±0.03a	1.02±0.03a
T1	72	44	61.1A	42	4	9.5b	1.10±0.03b	1.05±0.04B	0.64±0.04b
C	88	55	62.5A	52	0	0.0c	1.00±0.00c	0.95±0.02b	0.60±0.02b
合计 Total	247	172	69.6	164	23	14.0	1.14±0.02	1.09±0.03	0.76±0.02

¹⁾ 表中大小写字母分别代表 5% 与 1% 差异显著水平。下同

The capital and small letter represent significant differences at levels of 5% and 1%, respectively. The same as below

0.27 ($P < 0.01$), 平均每头处理母牛的排卵率分别增加 0.38 ($P < 0.01$) 和 0.42 ($P < 0.01$); 排双卵率分别增加 17.6% ($P < 0.05$) 和 27.1% ($P < 0.01$, 表 1)。

所有母牛在加强免疫后第 8~12 天, 外周血中抗精液抑制素抗体滴度与排卵率有显著的正相关关系 ($r = 0.7507, P < 0.01$), 排双卵的母牛, 血中抗精液抑制素抗体水平显著高于排单卵或不排卵的母牛 ($P < 0.01$, 图)。

2.4 产犊率和孪生率

在 Th 组中, 59 头母牛配种后受胎, 其中 57 头

母牛在妊娠期末正常分娩, 共产下 72 头犊牛, 孪生母牛占分娩母牛总数的 26.3%, 产犊数占分娩母牛总数、妊娠母牛总数、发情母牛总数和处理母牛总数的百分比分别为 126.3%、122.0%、98.6% 和 82.8%。与 T1 组和 C 组相比, 孪生率分别增加 22.8% ($P < 0.05$) 和 26.3% ($P < 0.01$), 产犊率分别增加 23.2% ($P < 0.05$) 和 26.3% ($P < 0.05$), 产犊数占处理母牛数的百分比分别增加 37% ($P < 0.05$) 和 36.2% ($P < 0.05$, 表 2)。

表 2 各组母牛的妊娠率和产犊率比较 (Mean \pm SE)

Table 2 Comparison of conception rate and calving rate among three groups

组别 Group	妊娠母牛数 Cows pregnant	受胎率 Conception rate (%)	产犊母牛数 Cows calving			孪生率 Twinning rate (%)	产犊率 Calving rate (%)			
			单胎 Single	双胎 Twin	合计 Total		占发情母牛数 Of estrous cows (%)	占处理母牛数 Of treated cows (%)	占妊娠母牛数 Of pregnant cows (%)	占分娩母牛数 Of labored cows (%)
Th	59	80.8	42	15	57	26.3a	98.6a	82.8a	122.0a	126.3a
T1	33	75	31	1	32	3.1b	75.0a	45.8b	100.0b	103.1B
C	43	78.2	41	0	41	0c	74.5b	46.6b	95.4b	100.0B
合计 Total	135	78.5	114	16	130	12.8	76.2	59.1	108.2	112.3

3 讨论

本研究结果表明, 应用猪精液抑制素主动免疫方法可以诱导母牛孪生, 尤其当主动免疫所用抑制素剂量为 2 mg、加强免疫所用免疫原为 1 mg 时 (Th 组), 孪生率达到 26.3%。此外, 应用双扩散凝胶沉淀试验和 ELISA 证明, 用猪精液抑制素免疫所产生的抗体可与猪精液抑制素和牛卵泡抑制素结合, 而且抗抑制素抗体滴度与排卵数呈正相关关系。这些试验结果进一步证明精液抑制素与卵泡抑制素有类似的生物学作用与免疫活性。

迄今, 关于精液抑制素主动免疫诱导母牛孪生的研究, 国内外尚无报道。即使关于卵泡抑制素主动免疫诱导母牛孪生的报道, 也仅检索到 2 篇, 据 Morris 等报道, 他们应用人工合成的牛卵泡抑制素 α -亚基 5 种片段 (氨基端 8-20, 8-30, 63-72, 107-122, 153-167) 共处理了 25 头海福特杂交青年母牛, 结果有 7 头产双胎, 孪生率达 28% (4/15)^[24,29]。本研究应用精液抑制素主动免疫母牛的孪生率 (26.3%, 15/57) 与卵泡抑制素主动免疫的效果接近。

由表 1 可知, Th 组的发情率为 83.9%, 分别比 T1 组和 C 组高 22.8% ($P < 0.05$) 和 21.4% ($P < 0.05$), 说明精液抑制素主动免疫可以促进母牛发

情。而在 Morris 等的研究中, 所有免疫牛和对照牛均表现正常的发情周期, 因此认为免疫对发情周期长度和发情母牛比率没有影响^[24,29]。引起这种差异的原因, 可能与牛群的生殖状况有关, 即 Morris 等的研究是在试验条件下进行, 所用牛群均正常发情, 而本研究是在生产条件下进行, 部分牛群在分娩后的发情周期可能异常。

比较各组母牛的情期受胎率 (表 2), 发现统计差异不显著 ($P > 0.05$), 表明用精液抑制素主动免疫对情期受胎率没有影响, 这一结果与 Morris 等的报道一致^[24,29]。

关于抗抑制素抗体水平与排卵数或孪生率的关系问题, 迄今的报道结果尚不一致。Glencross 等应用人工合成的牛卵泡抑制素 α -亚基片段免疫母牛后, 发现随着加强免疫次数的增加, 排卵数增加^[15]。Morris 等比较人工合成的牛卵泡抑制素 α -亚基 3 种片段 (F_1, F_2 和 F_3) 的免疫效果, 发现用 F_1 免疫的母牛孪生率最高, 为 60% (3/5), F_3 免疫组其次 (20%, 1/5), F_2 免疫组最低 (0, 0/5)。这 3 组免疫牛血清与抑制素的结合率依次为 27.5% (范围 22%~33.5%), 5.5% (范围 2.9%~8.8%) 和 21.5% (范围 16.5%~27.1%)。在 F_2 组, 排卵率与抗抑制素抗体效价呈正相关; 而在 F_3 组, 排卵数与抗体效价

呈负相关^[24]。Scanlon 等用牛卵泡抑制素 α -亚基片段 N 端 1-26 主动免疫青年母牛,并进行 3 次加强免疫,结果发现在第 2 次和第 3 次加强免疫后不同时期的排卵率与抗抑制素抗体水平的相关系数变化较大,最高的发生于第 3 次加强免疫后第 36 天,相关系数达 0.89,最低的发生于第 2 次加强免疫后第 69 天,相关系数为 0.04。第 3 次加强免疫后各发情周期排卵数与抗抑制素抗体水平的相关系数(0.4 ~ 0.89)高于第 2 次加强免疫后的值(0.4 ~ 0.42)^[30]。本研究证明,排双卵的母牛血中抗抑制素抗体水平显著高于排单卵或未排卵的母牛,而且排卵数与抗精液抑制素抗体水平呈强正相关($r = 0.75$)。值得指出的是,本研究的排卵数资料是由有经验的配种员经直肠触摸卵巢法得到的,不及用内窥镜观察得到的结果准确,因此仅供参考。

Scanlon 等用牛卵泡抑制素 α -亚基片段免疫青年母牛时认为,免疫效果(抗体滴度和排卵率)与免疫程度有关,而与免疫原用量无关^[30]。而在本研究中,Th 组的免疫效果明显优于 T1 组,说明免疫效果与免疫原用量有关。引起这种差异的原因,可能与免疫原的纯度有关。本研究所用免疫原是用化学方法提取纯化的,其纯度不及用抑制素 α -亚基片段与大分子蛋白质偶联后制备的免疫原。在免疫原纯度有限的情况下,可能需要一定量的免疫原才能保证免疫原对动物免疫系统的刺激作用,所以在一定范围内免疫效果可能与免疫原用量有关。

与 T1 组和 C 组相比较,Th 组的产犊率高 32% 以上,产犊数占处理母牛的比例高 22% 以上(表 2),说明猪精液抑制素主动免疫方法对于提高母牛繁殖效率是有效的。

References:

- [1] Yang L G, et al. Artificial induction of twinning in Yellow cattle and water buffaloes. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1986, (4):93 - 98. (in Chinese)
杨利国,等.人工诱导黄牛和水牛生双胞胎.南京农业大学学报,1986,(4):93 - 98.
- [2] Sieh C X, et al. Artificial induction of twin pregnancy and the levels of plasma progesterone and estradiol in water buffaloes. *Buffalo Journal*, 1986, (1):37 - 45.
- [3] Yang L G, et al. Twinning mechanism of cows, *Journal of Grass and Animals*, 1991, (2):8 - 13. (in Chinese)
杨利国,等.母牛孪生机理研究.草与畜杂志,1991,(2):8 - 13.
- [4] Yang L G, et al. Regulation of artificial twinning by hypothalamus-pituitary-sexual gland axis in beef cattle. In: NNFC ed. *Proceedings of the 1st National Conference on Life Science*, Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 1993: 132. (in Chinese)
- [5] Yang L G, et al. Regulation of GnRH on hypothalamus-pituitary-sexual gland axis of cows artificial twinning treated. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 1995, 27(6):243 - 246. (in Chinese)
杨利国,等. GnRH 对人工孪生处理母牛下丘脑-垂体-性腺轴的调控.畜牧与兽医,1995,27(6):243 - 246.
- [6] Wu F, et al. Effect of PMSG antibodies on artificial induction of twinning in beef cattle. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1990, 13(3):87 - 91. (in Chinese)
吴峰,等.抗 PMSG 血清在人工诱导黄牛双胞胎中的作用.南京农业大学学报,1990,13(3):87 - 91.
- [7] Yang L G, et al. Application of PMSG and its antiserum to artificial induction of twinning in beef cows. *Proceedings of 12th ICAR, The Netherlands*, 1992, 1:91 - 93.
- [8] Niu S L, et al. Application of active immunization with porcine seminal inhibin to superovulation of beef cows. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1996, 19(4):52 - 55. (in Chinese)
牛树林,等.猪精液抑制素主动免疫黄牛诱导超数排卵的研究.南京农业大学学报,1996,19(4):52 - 55.
- [9] Chari S, et al. Isolation and characterization of inhibin from bull seminal plasma. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1978, 87:434 - 448.
- [10] Baker H W G, et al. Testicular control of FSH secretion. *Recent Prog Horm Res*. 1976, 32:429 - 476.
- [11] Keogh E J, et al. Selective suppression of FSH by testicular extracts. *Endocrinology*, 1976, 98:997 - 1004.
- [12] Setchell B P, et al. Inhibin-like activity in rete testis fluid. *J Endocrinol*, 1974, 62:675 - 676.
- [13] Bindon B M, et al. Superovulation in pubertal heifers immunized against ovine inhibin purified by monoclonal antibody affinity chromatography. *Proceedings of Austrian Society of Reproduction Biology*, 1988, 20:(Abst)28.
- [14] Glencross R G, et al. Effect of active immunization of heifers against inhibin on plasma FSH concentrations, ovarian follicular development and ovulation rate. *J. Endocrinol.* 1992, 134:11 - 18.
- [15] Glencross R G, et al. Active immunization of heifers against inhibin: effects on plasma concentrations of gonadotrophins, steroids and ovarian follicular dynamics during prostaglandin-synchronized cycles. *J. Reprod. Fertil.* 1994, 100:599 - 605.
- [16] Konishi M, et al. Effect of active immunization of cattle against inhibin on ovarian follicular development and ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration. *Theriogenology*, 1996, 46:33 - 43.
- [17] Rocha A, et al. Effect of unilateral ovariectomy, gonadotropin stimulation and immunization against a synthetic peptide of the inhibin α -subunit on follicular development and oocyte recovery in cattle. *Theriogenology*, 1996, 46:605 - 616.
- [18] Scanlon A R, et al. Active immunization of heifers against a synthetic fragment of bovine inhibin. *J. Reprod. Fertil.* 1993, 97:213 - 222.
- [19] Brown R W, et al. Immunization against recombinant bovine inhibin α -subunit causes increased ovulation rate in gilts. *J. Reprod. Fertil.* 1990, 90:199 - 205.
- [20] Dhar A, et al. Effect of immunization against the amino-terminal peptide (α N) of the α 43-subunit of inhibin on follicular atresia and expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in ovarian follicles of sheep. *J. Reprod. Fertil.* 1998, 114:147 - 155.
- [21] Findlay J K, et al. Effect of immunization against recombinant bovine inhibin α -subunit on circulating concentrations of go-

- nadotrophins in ewes. J. Endocrinology, 1989, 120 :59 - 65 .
- [22] Mizumachi M, et al. Superovulation of ewes immunized against the human recombinant inhibin α -subunit associated with increased pre- and postovulatory follicle stimulating hormone levels. Endocrinology, 1990, 126 :1058 - 1063 .
- [23] Wheaton J, et al. Active and passive immunoneutralization of inhibin increases follicle stimulating hormone levels and ovulation rate in ewes. Biol. Reprod. 1992, 47 :361 - 367 .
- [24] Morris D G, et al. Effect of immunization against synthetic peptide sequences of bovine inhibin α -subunit on ovulation rate and twirl calving rate in heifers. J. Reprod. Fertil. 1993, 97 :255 - 261 .
- [25] Martin T L, et al. Immunization of inhibin modifies hormone secretion and sperm production in bulls. Biol. Reprod. 1991, 45 :73 - 77 .
- [26] Voglmayr J, et al. Immunization of rams against human recombinant inhibin α -subunit delays, augments and extends season-related increase in blood gonadotrophin levels. Biol. Reprod. 1990, 42 :81 - 86 .
- [27] Ye R, et al. Abstract and purification of porcine seminal inhibin and its detection of biological activity. Journal of Xinjiang Agricultural University, 1996, 19(3) :8 - 11 . (in Chinese)
叶 荣,等.猪精液抑制素的提取与纯化及其生物学测定.新疆农业大学学报,1996,19(3) :8 - 11
- [28] Yang L G, et al. EIA Technology. Nanjing: Nanjing University Press, 1998 :199 - 203 . (in Chinese)
杨利国,等.酶免疫测定技术.南京:南京大学出版社,1998,199 - 203 .
- [29] Morris D G, et al. Effect of immunization against synthetic peptide sequences of the α 4 - subunit of bovine inhibin on ovulation rate, gonadotrophin concentrations and fertility in heifers. J. Reprod. Fertil. 1995, 103 :285 - 291 .
- [30] Scanlon A R, et al. Active immunization of heifers against a synthetic fragment of bovine inhibin. J. Reprod. Fertil. 1993, 97 :213 - 222 .

红麻雄性不育株的发现

Discovery of Male Sterile Plants in Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.)

红麻以收获韧皮纤维或茎秆为生产目的,易于获得营养体生长优势。其杂种优势率可高达 35% ~ 40%,但目前尚无雄性不育系用于杂交制种,一般采用化学杀雄法。既污染环境,又增加成本。为节约成本,仅利用 F_2 代。

1998 年,在湖北荆州,周瑞阳在卫星搭载红麻 SP_4 代(卫星搭载种子第 4 代)发现了两株雄性可育不育与半不育并存的红麻植株。此后两年一直没有找到使其稳定表现雄性不育的方法,仅进行自交和互交。2000 年底,由于“红麻长花柱突变体的遗传与杂种优势利用研究”获得国家自然科学基金资助,首次将红麻材料在海南冬繁。2001 年 3 月,发现了大量全株稳定表现雄性不育,并能正常受粉结实材料;同年 5 月,将备份种子在湖北荆州(30° 24' N)种植,结果发现:出苗后即开始短日处理的植株表现雄性不育,而自然条件下生长 40d(株高 1.3m 左右)之后同等条件下的短日处理株和对照株均表现雄性可育;蕾期插梢繁殖株表现不育,而本株可育或半不育;还观察到分枝不育远多于主茎不育的现象。说明其雄性不育性是由“大幅度缩短营养生长期”导致某些基因型雄性器官的碳水化合物亏缺所

致,因为海南冬繁和出苗后即开始短日处理的植株,花前生长仅 60d 左右;而在荆州春播,红麻的营养生长期一般在 100d 以上;蕾期插梢繁殖株本身没有经过营养生长期,插梢仅 30 ~ 50cm 长而直接进入生殖生长。暂时称之为“营养亏缺型雄性不育”。

此类雄性不育株与光(温)敏感核不育或生态雄性不育是完全不同的:前者不存在育性转换的光温敏感期(因为红麻是无限花序),光温通过缩短或延长营养生长期而起作用;后者则明显存在光温敏感期,光温直接作用于雄性器官的发生和发育过程,与营养生长期的长短无关。可见,“营养亏缺型雄性不育”属于新的不育类型,具有重要的理论研究意义。

由于插梢株能稳定表现雄性不育,因此,在红麻杂交制种中,可采用母本插梢的方法。既不影响母本纤维的适时收获,又有利提高制种产量;同时,父本授粉后也可适时收获。有较大的利用价值。

目前,正在将其雄性不育性转育到长花柱突变体中,以利杂交授粉。其不育机理和遗传规律正在研究中。

周瑞阳

(湖北农学院农学系,荆州 434103; ruiyang@hbnxy.org)