

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

李冰霞 罗琛

(湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081)

摘要: 用组织切片方法系统地观察了草鱼卵被经辐射处理的鲤精子激活后进行第一次卵裂的发育过程。实验表明: 在 24℃ 孵化水温下草鱼卵在被激活后 24min 进入第一次卵裂前期, 27—30min 处于中期, 33min 进入后期。由此可知被激活的草鱼卵子在第 24min 时已经完成染色体的复制, 使草鱼卵子雌核染色体人工加倍的最佳时期是在被激活后的 27—30min 这一时间区段内。此外, 用不同热休克温度和不同的热休克强度处理已完成染色体复制的被激活草鱼卵, 表明草鱼卵经 41℃ 处理 2min 可得到较高比例的基因纯合型雌核发育二倍体鱼。

关键词: 草鱼; 人工雌核发育; 第一次卵裂; 染色体加倍

中图分类号: S961.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)02-0155-006

人工诱导鱼类雌核发育是指鱼类的成熟卵子经遗传失活的精子激活后由雌核单独主导的发育。人工诱导雌核发育后形成的雌核单倍体须经人工染色体加倍处理后才能发育成为有正常生活力的个体。使雌核染色体加倍可在两个不同发育阶段进行: 一是受精后抑制第二极体外排, 即经照射处理的精子激活卵子, 启动卵子的发育后, 阻止卵子的第二次成熟分裂, 抑制第二极体的排出, 从而使染色体加倍。这样产生的雌核发育子代个体的基因型是高度纯合的, 但不是完全纯合的。二是抑制第一次卵裂, 即在卵子被激活后, 让第二极体排出, 在被激活卵的单倍染色体组完成复制后, 抑制卵子的第一次有丝分裂而成为二倍体, 由此产生的雌核发育个体的基因型是完全纯合的。

通过人工诱导草鱼雌核发育以产生基因纯合型草鱼, 进而快速建立草鱼纯系, 对我国这种重要的经济鱼类的遗传学研究和育种研究都是十分必要的。通过抑制第二极体排出而获得雌核发育草鱼已有较多的研究^[1-5], 但通过抑制第一次卵裂实现草鱼雌核发育以培育基因纯合型的草鱼尚未见报道。为此, 本文对草鱼被激活卵子在被激活后至第一次卵裂的早期发育过程进行了系统的切片观察, 以确定在一定孵化温度下, 被激活的草鱼卵子完成第一次染色体复制的准确时间, 及实施人工加倍处理的最

佳时机, 人工加倍处理的最佳方法和处理强度等; 为通过抑制第一次卵裂, 得到高比例基因纯合型的雌核发育草鱼提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus* Cuvier et Valenciennes) 和湘江野鲤 (*Cyprinus carpio* L.) 等实验鱼均取自湖南省湘阴县东湖渔场, 在生殖季节按常规方法注射激素, 获得草鱼卵子和鲤精子。

1.2 精子处理 按罗琛^[4]的方法进行。鲤精液用 2—4 倍体积 Hank's 液 (4℃) 稀释。两支 15W 的紫外灯照射 45—50min。用摇床缓慢摇动盛精皿, 使精子受到均匀照射。照射后在显微镜下检查精子的活力。处理过的精液置于 4℃ 冰箱中备用。

1.3 卵子激活 成熟草鱼卵子排出后, 立即用紫外线照射过的鲤精液激活。

1.3.1 孵化温度 24℃ 下, 用经紫外线照射过的鲤精子激活草鱼卵子, 在激活后 18—48min 内, 每隔 3min 取材一次, Smith's 液固定, 石蜡切片, 厚度 8μm, H. E 染色, 显微镜观察, 以确定雌核染色体完成复制的准确时间。

1.3.2 在确定雌核染色体完成复制和分离的时间后, 在此时间区段内 (激活后 27—30min) 取被激活卵, 分别在 39℃、40℃、41℃、42℃ 等不同的高温下进

收稿日期: 2001-10-10; 修订日期: 2002-03-09

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (39830300); 教育部高校骨干教师基金项目 (20065-12) 资助。

作者简介: 李冰霞 (1977—), 女, 湖南耒阳市人; 博士研究生

通讯作者 (Correspondence): 罗琛, E-mail: cluo@hunnu.edu.cn

行热休克处理,并分别在处理 1min 和 2min 后取材固定和进行石蜡切片观察。同时,各取一部分被激活卵在培养皿中观察其活体发育情况,统计其二倍体胚胎和二倍体仔鱼成活率。从而确定较佳的处理温度和强度。

1.3.3 在所确定的最佳加倍处理条件下对被激活草鱼卵子进行热休克处理 2min 后,解除休克,再置于 24℃水温下进行孵化。在解除休克后的前 10min 每 3min 取材一次,然后每 5min 取材一次直至 30min。材料均用 Smith's 液固定,石蜡切片,H. E 染色,以观察被处理后的卵子中有丝分裂器和染色体在一个分裂周期内的变化情况。

2 结果

2.1 草鱼成熟卵被激活后完成第一次染色体复制的时间
草鱼卵在被激活后 18—48min 的切片观察结果

见表 1。24min 的切片中,发现染色质凝聚形成染色体,第一次染色体复制完成,核膜逐渐解体,并且出现星体,表明激活卵已进入第一次卵裂前期(图版 I : 1); 27—30min 的切片中,大部分激活卵的核膜已经消失,染色体均匀地排列在赤道板上,表明激活卵处于有丝分裂中期(图版 I : 2); 33min 的切片中,染色体已被纺锤丝拉向两极,进入第一次卵裂后期(图版 I : 3)。因此被激活后 27—30min 应是对草鱼卵进行染色体加倍处理的最佳时机。

2.2 热休克的温度、强度及效果

在确定了染色体加倍处理的最佳时机之后,用呈梯度变化的不同高温和不同的热休克时间对草鱼被激活卵进行加倍处理,通过切片观察纺锤体的破坏程度(表 2)以及观察活体胚胎发育情况(表 3)以确定最佳的处理条件。

在激活后 27—30min,以 2min 为固定处理时间,经 39℃处理的草鱼激活卵的切片中,普遍观察不到

表 1 草鱼被激活卵进行第一次卵裂的基本发育时序(24℃)
Tab. 1 The successive developmental phase of the first cleavage of grass carp eggs after activated by UV-irradiated sperm

| 激活后 Minute after activation | 24min | | 27min | | 30min | | 33min | |
|-----------------------------|-------------|----------|------------------|-----------|---------------|----------|-------------|-----------|
| 观察到的所有时相 | 前期 | 前期 | 早中期 | 中期 | 中期 | 后期 | 后期 | 末期 |
| All observed phases | Prophase | Prophase | Prometaphase | Metaphase | Metaphase | Anaphase | Anaphase | Telophase |
| 观察卵数 No. of eggs | 30 | 6 | 14 | 3 | 11 | 2 | 11 | 2 |
| 百分比(%) Percentage | 100 | 26.1 | 60.9 | 13.0 | 84.6 | 15.4 | 84.6 | 15.4 |
| 所在时相 Phase | 前期 Prophase | | 早中期 Prometaphase | | 正中期 Metaphase | | 后期 Anaphase | |

表 2 不同热休克强度对草鱼被激活卵子雌核染色体加倍的影响
Tab. 2 The effects of varied heat shock on the spindle of the activated grass carp eggs

| 温度(℃)Temperature | 39 | | 40 | | 41 | | 42 |
|------------------------------|---------------|---------------|------------------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 处理时间 Heat shock time | 2min | 1min | 2min | 1min | 2min | 2min | 2min |
| 纺锤体破坏状态 | 未被破坏 | 未被破坏 | 部分破坏 | 部分破坏 | 完全破坏 | 完全破坏 | 完全破坏 |
| Destroy condition of spindle | Not destroyed | Not destroyed | Partly destroyed | Partly destroyed | Completely destroyed | Completely destroyed | Completely destroyed |

表 3 几种不同温度处理的草鱼卵子活体发育的情况
Tab. 3 Results of incubation of grass carp eggs after varied heat shock treatments

| 温度(℃)Temperature | 24(对照 1) Control 1 | 39 | 40 | 41 | 42 | 对照 2 Control 2 |
|------------------------|-----------------------|------|------|------|------|-------------------|
| 实验卵数 No. of eggs | 1000 | 300 | 300 | 300 | 300 | 100 000 |
| 热休克时间 Heat shock time | 0 | 2min | 2min | 2min | 2min | |
| 二倍体胚胎数 Diploid embryos | 0 | 0 | 0 | 37 | 0 | 0 |
| 二倍体仔鱼数 Diploid larvae | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 |

注:对照 2 是用未经过辐射处理的鲤精子直接与草鱼卵子受精的杂交组合 Control 2 is the hybrid of the grass carp eggs with common carp sperm without irradiation

有丝分裂器遭到破坏的图像(图版 I: 4), 因此, 以 39℃对草鱼卵的热休克处理是无效的。经 40℃处理的激活卵切片中, 普遍可见到有丝分裂器遭到破坏, 但这种破坏是不完全的(图版 I: 5)。经 41℃、42℃处理后的卵的切片中, 纺锤体则已完全被破坏, 只能见到仍留在赤道板处的染色体(图版 I: 6)。从活体胚胎发育情况观察到, 经 40℃处理的被激活卵在早期发育正常, 但胚体基本上不能拉长, 显示单倍体症状而不能发育成正常的鱼苗。经 42℃处理的被激活卵在囊胚期发育正常, 但进入原肠期后即开始出现发育障碍, 到神经胚时即已全部死亡。只有经 41℃处理的被激活卵发育正常, 并有 12.3% 的胚胎的胚体能拉长, 由此可以认定其为二倍体胚胎。这些二倍体胚胎能顺利地发育至卵黄囊消失和游动期。但其中只有部分的胚胎能发育至摄食期, 成为有生活力的基因纯合型雌核发育二倍体草鱼苗(表 3)。这些结果说明在雌核完成染色体复制后, 在 41℃进行 2min 的热休克处理是最有效的。

2.3 解除热休克后纺锤体恢复情况

用 41℃热休克处理激活卵, 休克条件解除后在激活卵子内部被破坏了的有丝分裂器会因每个卵子的具体情况不同而发生不同的变化。表 4 列出了切片上观察到的被激活卵子内有丝分裂器不同变化的情况和比例。解除抑制后 6min, 出现有丝分裂器的激活卵内约占观察卵数的 78.6%, 这部分被激活卵将继续完成被热休克打断了的第 1 次卵裂, 姐妹染色体分离而形成两个单倍体的卵裂球, 发育成单倍体胚胎而最终不能成活。有 21.4% 的被激活卵内在 6min 时未恢复纺锤体, 此时的切片上可见到染色体未分向两极而开始核化(图版 I: 7); 在 9min 的切片上, 则可见到新的二倍体细胞核已经形成(图版 I: 8)。说明这部分被激活卵在经过热休克处理后完成了染色体二倍化, 并有可能发育成有生活能力的二倍体仔鱼。

表 4 热休克解除后纺锤体恢复情况

Tab. 4 Reconstituting percent of the spindle in the activated eggs after the heat shock removed

| | 纺锤丝未恢复 Without reconstituted | 纺锤丝恢复 Reconstituted | 总卵数 Total number of eggs |
|------------------------------------|------------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| 被观察卵子数目 Observed number of eggs | 15 | 55 | 70 |
| 所占百分比(%) Percentage | 21.4 | 78.6 | 100 |

3 讨论

3.1 染色体二倍化的最佳时机

被激活卵雌核的染色体完成复制后在外观上没有可鉴别的形态标记, 而当第一次卵裂沟出现时, 染色体已经完全分离而进入了两个子细胞中。因此, 在被激活卵雌核染色体未完成复制时就对其进行加倍处理会阻碍复制的进程, 而难以形成完整的两套雌核染色体; 而当染色体已经分向两极时, 对被激活卵进行加倍处理, 则无法使分向两极的染色体核化成一个二倍体细胞核。所以, 通过抑制第一次卵裂实现雌核发育的关键就在于: 精确掌握草鱼卵子被激活后单倍体雌核完成染色体复制而又尚未发生染色体分离的时间, 和恰到好处地施加加倍处理的条件。本实验通过组织学切片系统地观察了在 24℃孵化水温下草鱼卵子被激活后第一次卵裂的发育过程, 观察在草鱼卵被激活后 24min 的切片, 发现核膜正逐渐解体, 核仁已消失, 染色质在凝集, 并出现星体, 此时卵正处于第一次卵裂前期, 观察被激活后 27—30min 的切片, 发现染色体整齐地排列在赤道板上, 处于第一次卵裂中期, 单倍体雌核已完成染色体复制。至 33min, 着丝粒分离, 染色单体分开, 并在纺锤丝的牵引下分向两极, 标志着卵处于后期。在第一次卵裂进入中期时进行热休克处理可以得到较高比例的二倍体仔鱼^[6-9]。因为在激活卵进入卵裂中期时, 对其进行适当的加倍处理既能有效地破坏纺锤体, 抑制分裂的进程, 又能使完成复制的两套雌核染色体不分离仍留在赤道板上, 有利于热休克解除后两套雌核染色体核化成一个二倍体细胞核, 从而得到比例较高的基因纯合型的二倍体仔鱼。因此, 在被激活后 27—30min 是对草鱼卵进行恰当的热休克处理的最佳时机。

在被激活的草鱼卵子进入第一次卵裂的 M 期以前, 也曾对其进行过同样强度的染色体加倍处理, 并得到过比例极少的二倍体仔鱼(未发表的结果), 在一些文献^[10-13]中也已有报道。但其染色体加倍的机制尚不清楚。从理论上推测, 可能是染色体完成复制后进行的热休克处理, 影响了被激活卵纺锤丝的形成, 阻碍了正常的有丝分裂由 S 期进入 M 期, 而滞留在 S 期; 在解除抑制后能够立即再进行一次 DNA 复制, 然后进入下一次有丝分裂; 从而使部分卵的染色体加倍, 得到了极少量的仔鱼。

3.2 热休克处理的温度和强度

同以 2min 为最佳处理时间, 经 41℃处理和

42℃处理的激活卵切片均可观察到有丝分裂器完全遭到破坏,但却只有经41℃处理的激活卵发育到二倍体仔鱼阶段,显然42℃处理2min对于草鱼卵强度太大,可能造成了卵子细胞质的较大损害,同时可能损害了染色体,从而使激活卵无法正常发育。是否可以缩短处理时间来达到较佳效果还有待进一步研究。经40℃处理的激活卵切片中普遍观察到有丝分裂器遭到破坏,但不完全,一旦将激活卵置于孵化水温,纺锤体就会马上恢复,从而将染色体拉向两极,最终无法形成二倍体胚胎。是否可以通过延长处理时间而达到完全破坏纺锤体的目的,同样有待进一步地研究。

3.3 纺锤丝的恢复情况与孵化率

在实验中,解除热休克处理后的激活卵有21.4%的纺锤体未马上恢复,但得到的二倍体胚胎却只占观察总卵数的12.3%,且仅有1.57%的卵能发育至二倍体仔鱼。对于三个比例的巨大差异,作者认为主要有如下三方面的原因:一是激活卵经高温处理后,使卵细胞质和细胞的结构受到某种程度的损害,部分耐受力较差的卵子在早期发育阶段便出现发育障碍而死亡,从而造成二倍体胚胎减少。二是由于纯合致死现象的存在,某些携带纯合致死基因的二倍体胚胎在发育的过程中会逐渐死亡,只有那些不带有致死基因的二倍体胚胎才能在纯合状态下发育成有生活力的仔鱼。三是热休克处理可能对卵子的染色体造成了某种损害,故部分受损卵在发育过程中死亡,也造成二倍体仔鱼数的减少。

参考文献:

- [1] Stanley J G. Gynogenesis as a possible method for producing monoses grass carp [J]. *Progressive Fish Culture*, 1987, 37(1): 25—26
- [2] Yang Y Q, Liu A Z, Lin K H, et al. The experiments of induce artificial gynogenesis in fishes [J]. *Freshwater fisheries*, 1981, 4: 1—4. [杨永铨,刘爱知,林克宏等.人工诱导鱼类雌核发育的实验研究[J].淡水渔业,1981,4:1—4]
- [3] Pan G B, The technique of induce artificial gynogenesis in fishes

[J]. *Freshwater fisheries*, 1988, 6: 17—20. [潘光碧.人工诱导鱼类雌核发育技术的研究[J].淡水渔业,1988,6:17—20]

- [4] Luo C, Liu Y, Studies on production of gynogenetic grass carp and crucian carp. [J]. *Acta Sci Nat Univ Norm Hunan*, 1991, 14(2): 154—159. [罗琛,刘筠.人工诱导草鱼和鲫鱼雌核发育的研究[J].湖南师范大学自然科学学报,1991,14(2):154—159]
- [5] Deng Y S, Luo C, Liu Y, A cytological observation on artificial gynogenesis in grass carp [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 1998, 7(3): 207—211. [邓岳松,罗琛,刘筠.草鱼人工雌核发育的细胞学观察[J].激光生物学报,1998,7(3):207—211]
- [6] 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(1—4): 283—290
- [7] Cherfas N B, Gomelsky B, Peretz Y, et al. Induced gynogenesis and polyploidy in the Israeli common carp line Dor 70 [J]. *The Progressive Fish Culturist*, 1998, 60: 288—293
- [8] Gallusera P, Volckaert F A. M., Ollevier F. Gynogenesis in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) III. Induction of endomitosis and the presence of residual genetic variation [J]. *Aquaculture*, 2000, 185(1—2): 25—42
- [9] Hussian M G, Perman D J, Mcandrew B J, et al. Suppression of first cleavage in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L.—a comparison of the relative effectiveness of pressure and heat shocks [J]. *Aquaculture*, 1993, 111(1—4): 263—270
- [10] Komen J, Bongers A B, Richter C J, et al. Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) II. The production of homozygous gynogenetic clones and F1 hybrids [J]. *Aquaculture*, 1991, 92(2—3): 127—142
- [11] Diter A, Quillet E, Chourrout D. Suppression of first egg mitosis induced by heat shocks in the rainbow trout [J]. *J. Fish Biol.*, 1993, 42: 777—786
- [12] Cherfas N B, Peretz Y, Berdom 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]. *Theor. Appl. Genet.*, 1994, 89: 281—286
- [13] László Váradi, István Benkó, János Varga et al. Induction of diploid gynogenesis using interspecific sperm and production of tetraploids in African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell (1822) [J]. *Aquaculture*, 1999, 173(1—4): 399—409

CYTOLOGICAL OBSERVATIONS ON INDUCTION OF MITOGYNOGENESIS BY HEAT-SHOCKING OF THE EGGS IN GRASS CARP, *CTENOPHARYNGODON IDELLUS*

LI Bing-Xia and IJUO Chen

(College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081)

Abstract: Mitogynogenesis referring to inducing gynogenesis by inhibiting the first cleavage could generate fully homozygous offspring and could product cloned fishes within short time. Generally, the optimum timing to induce mitogynogenesis have to be the metaphase of first cleavage, because at that time the chromosome sets have duplicated while the sister chromosomes have not separated yet. Since different species of fish needs different time for completing their copying of chromosome sets, obviously, a given species of fish should be suppressed the first cleavage in a specific time. Similarly, the suppressing intensity should be different for different species of fish. Therefore, in order to induce mitogynogenesis successfully for a given species of fish, the developmental procedure of the first cleavage must be understood fully and the proper parameters of suppression should be examined first. In this study, in order to induce mitogynogenesis in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*, effectively, the developmental procedure of first cleavage was investigated systematically and the optimum parameters for inducing mitogynogenesis by heat shocking of eggs were determined.

The grass carp eggs were activated by UV-irradiated common carp sperm. The reason for choosing the common carp sperm is that the heterozygote of common carp sperm and grass carp eggs is absolutely lethal. The activated eggs were fixed with Smith's solution for every 3 minutes after activation 18 to 48min. Then the fixed samples were sectioned according to rule procedure and observed under microscope. Results show that when incubated at 24 °C, the activated eggs entered the prophase after activation for 24min, the metaphase for 27—30min, the anaphase for 33min. Obviously, the optimum period for suppression of chromosome set separating of the grass carp is from 27 to 30min after the eggs were activated. At this time, the haploid chromosome set of the activated grass carp eggs had copied completely and had not separated yet.

After the optimum period of heat shocking was determined, the activated eggs were treated with gradient shocking temperatures and shocked for variable times. Then these heat shocked samples were fixed, sectioned and observed as described above. The observation revealed that no spindles of the activated eggs were destroyed by the heat shocking below and at 39 °C for 2min. If the activated eggs were heat shocked at 40 °C for 2min, the spindle was destroyed partly. Only when the temperature was at or over 41 °C, then the spindles were destroyed completely. In experiment of the survival rate of embryos, the survival rate in the groups with the treatment of 41 °C was the highest. In the groups of 42 °C the mortality rate was very high. These results means that the optimum heat shocking temperature for suppressing the first cleavage of the grass carp eggs is 41 °C and the effective intensity of heat shocking is 41 °C for 2min at the optimum time.

After the heat shocking was released, the reformation ratio of spindles of the heat shocking treated eggs is about 78.6% of the observed samples. This may be one of the reasons why the survival rate of the mitogynogenetic diploid is low in experiments.

Key words: Grass Carp; Artificial mitogynogenesis; First cleavage; Chromosome set doubling

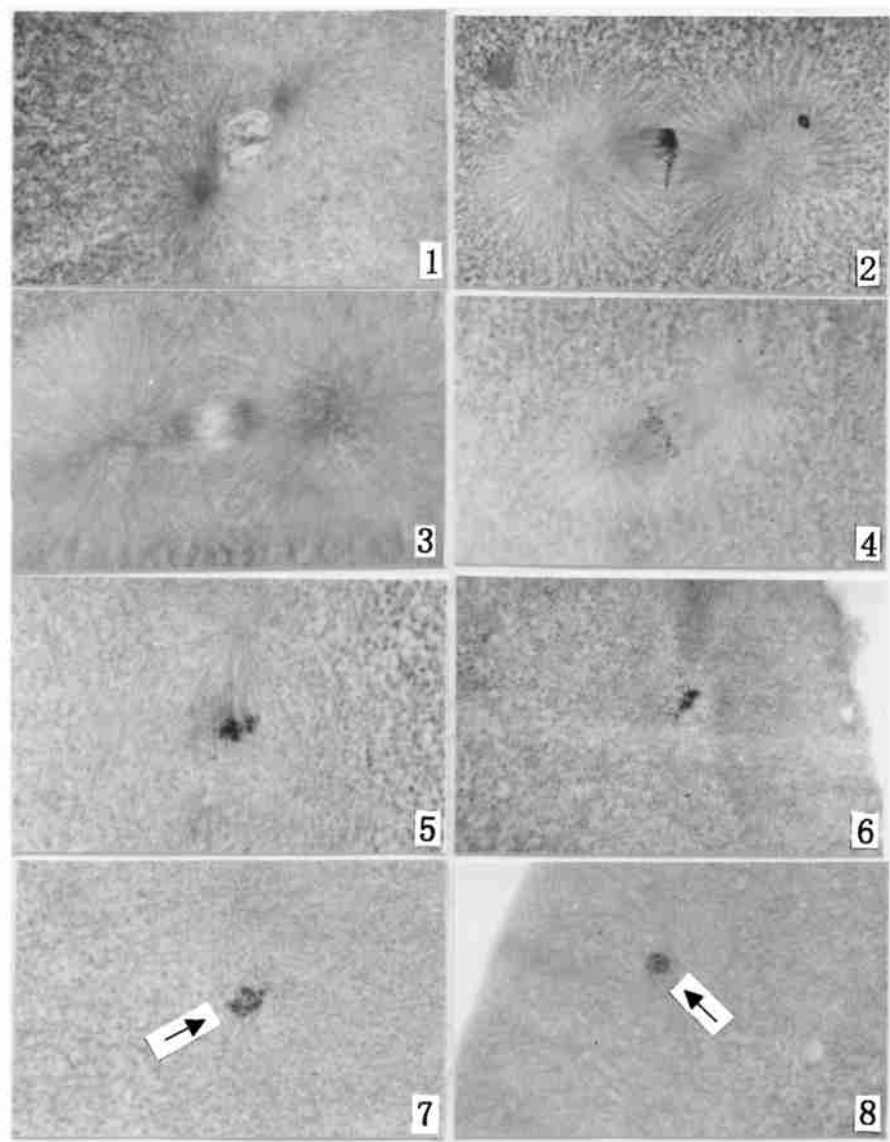


图 版 I

1 草鱼卵激活后 24min 切片, 示激活卵子处于第一次卵裂前期, $\times 1000$; 2 激活后 27—30min 切片, 示激活卵子处于第一次卵裂中期, $\times 1000$; 3 激活后 33min 切片, 示激活卵子处于第一次卵裂后期, $\times 1000$; 4 经 39℃ 热休克处理的草鱼卵, 示激活卵纺锤体无破坏, $\times 1000$; 5 经 40℃ 热休克处理的草鱼卵, 示激活卵纺锤体部分破坏, $\times 1000$; 6 经 41℃ 热休克处理的草鱼卵, 示激活卵纺锤体完全破坏, 只有仍排列在赤道板上的染色体(箭头) $\times 1000$; 7 热休克解除后 6min, 可见未分离的两套染色体开始核化(箭头), $\times 1000$; 8 热休克解除后 9min, 新的细胞核已形成(箭头), $\times 1000$

1 The section of grass cap egg at the prophase of the first cleavage (24 minutes after activated), $\times 1000$; 2 The section of the egg at the metaphase of the first cleavage (27—30 minutes after activated), $\times 1000$; 3 The section of the egg at the anaphase stage (33 minutes after activated), $\times 1000$; 4 The section of the egg heat shock treated at 39℃ for 2min, the spindle was not destroyed, $\times 1000$; 5 The section of the egg heat shock treated at 40℃ for 2min, the spindle was partly destroyed, $\times 1000$; 6 The section of the egg heat shock treated at 41℃ for 2min, the spindle was completely destroyed, $\times 1000$; 7 The section of the egg after the heat shock was removed for 6 minutes, the two chromosome sets were not segregated and the new nucleus was reconstituting (arrow), $\times 1000$;

8 The section of the egg after the heat shock was removed for 9 minutes the new nucleus had reconstituted (arrow), $\times 1000$