

研究简报

人工诱导泥鳅雌核发育及人工转性的研究

刘同明 吴清江 叶玉珍

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

STUDIES ON THE ARTIFICIAL INDUCED GYNOGENESIS AND THE ARTIFICIAL SEX REVERSAL IN LOACH, *MISGURNUS ANGULLICAUDATUS*

LIU Tong-Ming, WU Qing-Jiang and YE Yu-Zhen

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 泥鳅; 雌核发育; 冷休克; 转性; RAPD

Key words: Loach; Gynogenesis; Cold shock; Sex reversal; RAPD

中图分类号: S966.4 文献标识码: A 文章编号: 1009-3207(2004)04-0445-03

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)肉味鲜美, 营养价值高, 是市场上畅销的特种水产品之一。但泥鳅生活周期短, 一定程度上限制了群体生长。

雌核发育技术是产生单性后代, 用来控制某些鱼类过量繁殖或建立近交系(纯系)进行育种的有效方法。因此国内外许多科学家已开展了鱼类人工雌核发育的研究并诱导出鲤、鳙、斑马鱼、虹鳟、稀有鲫和非洲鲫^[1-5]等。养殖单性鱼在一定程度上可以防止某些养鱼塘中鱼类过度繁殖而影响其个体的生长和商品质量, 况且对于那些具有性别生长差异的种类优势性别的单性养殖将显著提高产量和经济效益。关于泥鳅的人工雌核发育虽很早就有报道, 但主要是欧洲泥鳅(*Misgurnus fossilis*)^[6], 而且结合人工性别控制的试验到目前为止却没有人尝试过。本文应用人工雌核发育方法诱导泥鳅的雌核发育并对部分个体进行人工转性, 结果获得成功, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验鱼的采集 成熟的泥鳅从武汉大东门市场购买。每次购回后立即放入圆形白瓷桶中用水蚯蚓养殖一周, 而后将雌雄分开待人工催产。供泥鳅雌核发育用的成熟红鲫雄鱼由本实验室养殖。

1.2 人工催产 按常规淡水鱼的方法进行。用鲤脑垂体、HCG 和 LRH-A 合剂注射, 大约 9h 左右雌雄就开始发情产卵。

1.3 雌核发育与冷休克 泥鳅的人工雌核发育按以前报道

的方法进行^[6]。雌核发育“受精卵”置入孵化缸孵化。孵化大约 30min 左右, 胚胎即将开始进行第一次卵裂(2 胞期), 这时取部分“受精卵”迅速在 0℃条件下冷休克 30min, 留部分“受精卵”不进行冷休克任其自身加倍。用正常红鲫精子受精的组合为对照组。

1.4 RAPD 检测 按照 Taggart 等^[7]的方法剪普通泥鳅、雌核发育泥鳅和普通红鲫的尾鳍提取 DNA。RAPD 反应体系为 25μL, 其中 1μL dNTP (2.5mmol/L), 1μL 引物 (2.5μmol/L), 2.5μL 10× 反应缓冲液, 0.5μL Taq 酶 (2U/μL, Biosar International), 18μL 无菌蒸馏水, 2μL 模板 DNA (200ng)。PCR 反应条件为: 94℃预变性 5min, 94℃变性 30s, 37℃退火 45s, 72℃延伸 90s, 共进行 40 个循环。终延伸 72℃, 10min, 扩增产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后置凝胶成像系统中照像。

1.5 荷尔蒙处理 经人工方法获得的雌核发育二倍体泥鳅用含有 17α 甲基睾酮(MT)的雄性激素饲喂。剂量为每公斤人工饲料中含 30mg MT。泥鳅性控是在室内进行, 定时光照, 每天换水吸污。

2 结果与讨论

2.1 雌核发育与冷休克

在试验中, 所用的成熟卵和成熟精子都分别取自同一尾亲本。成熟的雌性泥鳅经人工催产后大约 9h 左右开始采卵置于玻璃培养皿中, 然后用玻璃吸管吸入已用 UV 照射过的红鲫精子, 加生理盐水后用羽毛轻轻搅动让其充分受精。受

收稿日期: 2003-07-29; 修订日期: 2004-01-10

基金项目: 国家自然科学基金(30170738, 39823003)资助

作者简介: 刘同明(1963—), 男; 博士; 主攻方向: 鱼类遗传学

通讯作者: 叶玉珍, E-mail: yyzh@ihb.ac.cn

精完毕即放入常温孵化,并在光学解剖镜下连续观察。当胚胎即将开始进行第一次卵裂(2胞期)时取部分“受精卵”迅速置于0℃条件下冷休克30min,以抑制第一次有丝分裂。留部分“受精卵”不进行冷休克。实验结果表明:在泥鳅人工雌核发育后的第一次卵裂时期进行冷休克可以大幅度的提高雌核二倍体的比例。以UV照射的红鲫精子与泥鳅卵子“受精”进行人工诱导雌核发育,不进行冷休克处理而让其自然加倍,结果雌核二倍体比例只有0.05%。以UV照射的红鲫精子与泥鳅卵子“受精”人工诱导雌核发育,并在胚胎第一次成熟分裂时进行了冷休克处理,结果获得了高达2%的雌核二倍体群体。

在对照组中可以清楚地观察到,正常泥鳅成熟卵与成熟红鲫精子受精,胚胎发育到鱼苗孵出期时全部死亡,没有一尾存活。这是由于泥鳅和红鲫的亲缘关系较远所致。

表1 雌核发育泥鳅的人工性别转化结果(出生后9个月)

Tab 1 The results of artificial sex reversal in gynogenetic loach (9 months after hatching)

开始处理日龄 Day-old of initial treatment	MT 处理时间 Time of MT treatment	处理数量 Number of treatment	成活数 number of Survival	成活率 Survival rate (%)	雄性 ♂	雌性 ♀	间性 intersex	雄性率 Male rate (%)
15		40	1	2.5	1			100
	80							
30	80	15	8	53.33	7		1	87.5
50	80	15	12	80	2	3	7	16.67
15 (Control)		162	149	91.98		162		0

一般情况下,从胸鳍的外部形态就能比较容易区别泥鳅的雌雄性别,雌性胸鳍短而圆,雄性胸鳍长而尖。从本实验结果发现,转性后的雄性泥鳅和非转性的雌性泥鳅在胸鳍的形态的差别比较明显,未转性的雌核发育个体胸鳍短而较圆,而经过MT处理转为雄性的泥鳅胸鳍都较长而尖(图1)。

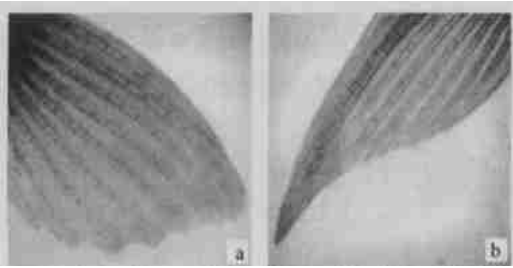


图1 雌雄泥鳅胸鳍外形比较

a: 正常雌性泥鳅的胸鳍 b: 转性雄性泥鳅的胸鳍

Fig. 1 Comparison between morphological traits of pectoral fin from male and female loach. a: pectoral fin of normal female loach; b: pectoral fin of sex reversed male loach

2.2 分子遗传标记分析

以筛选的6个RAPD引物Opp6、7、9、14、16和18对泥鳅红鲫和雌核发育泥鳅的总DNA进行扩增,从泥鳅中共扩增出42条带,普通红鲫中共扩增出44条带,雌核发育泥鳅的扩增带谱与母本泥鳅完全一致,未发现红鲫的任何特有带。这一结果充分证明,雌核发育泥鳅的遗传物质主要来源于母本,父本的遗传物质可能没有参与发育。

2.3 人工性别控制

人工雌核发育二倍体泥鳅鱼苗在出生后15d、30d和50d分别用17α-甲基睾丸酮(MT)饲喂80d后组织学切片观察结果列表1。出生15d的雌核发育泥鳅以MT处理,成活率低,但雄性转化率高。出生30d的雌核发育泥鳅以MT处理,成活率高且雄性转化率也较高。出生50d的雌核发育泥鳅以MT处理,成活率高但雄性转化率则很低。详细情况见表1。

解剖观察发现,具有典型雄性胸鳍形态的个体均有正常的精巢。组织切片观察显示精巢中含大量成熟的正常精细胞(图2)。这些结果充分说明:经人工性别控制的泥鳅已从雌性个体转变为生理雄性个体。这一研究的成功,无论对于泥鳅的遗传育种及人工集约化养殖还是阐明性别分化和性别决定机制理论,都具有十分重要的意义。

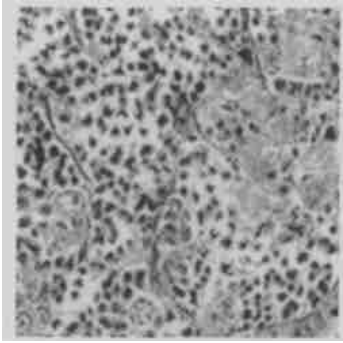


图2 人工转性泥鳅的精巢

Fig. 2 Spermatogenesis of the artificial sex reversed loach

参考文献:

[1] Hussain 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**: 263—270

[2] Gallusera P, Volckaert FAM V, Ollevier F. Gynogenesis in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burdell, 1822): III. Induction of endomitosis and the presence of residual genetic variation. *Aquaculture*, 2000. , **185**: 25—42

[3] Gomelsky B, Mins S D, Onders R J, *et al.* Homonal sex reversal and evidence of female homogamety in Black Crappie. *N. Am J Aquacult*, 2002, **64**(1): 66—69

[4] Ye Y Z, Wu Q J. Preliminary studies on artificial haploid breeding of bighead carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(1): 106—1017. [叶玉珍, 吴清江. 鳙人工单倍体育种研究初报, 水生生物学报, 2003, **27**(1): 106—1017]

[5] Jia F J, Wang J W, and WU Q J. Gynogentic rare minnow (*Gobiocypris rarus*) induced by heterogeneous sperms. [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26**(3): 246—252. [贾方钧, 王建伟, 吴清江. 异源精子诱导稀有 鲫的人工雌核发育. 水生生物学报, 2002, **26**(3): 246—252]

[6] Neyfakh AA. The effect of ionizing radiation on gametes of the loach (*Misgurnus fossilis* L). Dokl Akad Nauk. SSSR, 1956. **111**(3): 585—588

[7] Taggart JB, Hynes RA, Prodohl PA, Ferguson A. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes [J]. *J Fish Biol* 1992, **40**: 963—965