

皱纹盘鲍人工诱导雌核发育精子遗传失活的初步研究*

张国范

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 用波长 253.7 nm、光照强度 1.108 mW/cm² 的不同剂量紫外线照射皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino) 精子, 然后与皱纹盘鲍的正常卵受精, 在 0~120 s 的照射范围内, 受精作用都仍能正常发生, 从早期胚胎存活率上可观察到“Hertwig”效应的存在, 单倍体和非整倍体胚胎在孵化前死亡。在 150 000 个精子/cm² 的条件下, 精液厚度 5 mm 左右, 经 70 s 以上紫外线照射后, 精子染色体可完全失活。

关键词 皱纹盘鲍, 雌核发育, 精子遗传失活

雌核发育 (Gynogenesis) 技术的原理是人工使遗传上失活的精子激活未受精的成熟卵, 形成一种孤雌生殖。由于雌核发育是单性遗传, 子代基因容易纯合, 从而可以迅速地建立纯系, 一次人工诱导雌核发育的纯合度约相当于 14 个世代全同胞交配选育的结果, 而且遗传衰退比近亲交配慢得多。雌核发育子一代再经过一次雌核发育就可以作为亲本用于苗种生产, 因此, 应用范围广泛。

现在, 人工诱导雌核发育技术已经成功地应用于许多鱼类和两栖类的育种^[1]。自 Romashov 1960 年在泥鳅 *Misgurnus fossilis* 获得人工诱导雌核发育二倍体子代以来, 楼允东 1986 年, Felip 等 1999 年先后又在 10 多种鱼类中获得成功。海产贝类雌核发育研究起步较晚, Fujino 等 1990 年, Li 等 2000 年诱导了日本产皱纹盘鲍雌核发育, Guo 1993 年诱导了长牡蛎 (*Cnossostrea gigas*) 的雌核发育。在国内, 则仅有许国强等 1990 年作了人工诱导合浦珠母贝雌核二倍体发生及“Hertwig”效应的初步研究。

雌核发育人工诱导技术主要由两部分组成, 一是使精子遗传失活并用其激活卵子的发生, 二是染色体加倍技术, 使卵子由单倍性成为二倍性。精子遗传失活可以由 X 射线、 γ 射线、紫外线 (UV) 和化学试剂等方法, 其中紫外线法由于方便有效而较为常用。

本文课题选择了具较高经济价值的皱纹盘鲍为实验对象, 初步研究了使皱纹盘鲍精子遗传失活适宜的紫外线照射剂量。

1 材料和方法

皱纹盘鲍取自大连市水产研究所, 经人工促熟, 积温达 1 000 °C/d。

种鲍经阴干刺激, 用紫外线照射海水 (500~700 mWh/L) 结合升温 (2~4 °C) 方法进行催产, 精卵产生

后分别收集, 用血球计数板在显微镜下定量精子密度, 并用生物计数皿在镜下定量卵子密度, 使精子密度约为 3×10^6 个/ml, 卵密度约为 50 个/ml。

把紫外线灯管 (功率 15 W \times 2) 固定在一个玻璃箱内顶部, 底部放一微量振荡器, 精液均匀铺于直径 10 cm 的洁净培养皿里, 放在微量振荡器上照射, 同时不断振荡, 振荡频率为 100~150 次/min。紫外光源至培养皿底部的垂直距离为 22 cm。用紫外强度计测得此处光照强度为 1.08 mW/cm², 电压为 220 V。

设 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 120 共 11 个照射组, 设对照组和两个平行组。每组取 30 ml 精液, 液体高 5 mm 左右, 约 150 000 个精子/cm²。照射后立即与 500 ml 成熟卵子受精 (水温 23 °C), 受精在黑暗条件下进行, 并在黑暗状态中孵化 15 min 后, 移回到正常光照下发育, 每 1 h 洗一次卵。为防止精子活力随时间延长而减退, 实验中每 40~50 min 换一次精液, 密度同前。

授精后 5 h, 计数各组的受精卵和总卵数量, 观察早期胚胎发育情况, 待担轮幼虫上浮后选育, 测定担轮幼虫密度 (受精后 12 h), 计算孵化率。受精后 17 h, 计数正常和畸形面盘幼虫数量。

染色体检查采用染色体计数法, 在担轮幼虫期用浓度 1%秋水仙素处理 30 min, 再以 0.075 mol/L KCl 低渗液低渗 30 min, Carnoy 液固定, 热滴片法滴片, 染色后镜下观察, 选取较好的分裂相计数, 计算单倍体、二倍体或非整倍体占总分裂相的百分率。

受精率为受精卵占总处理卵数的百分比, 早期胚胎存活率是能发育到膜内囊胚, 原肠胚和担轮幼虫的受精卵数占总卵的百分比; 孵化率为选育后担轮幼虫

* 国家自然科学基金资助项目 39870700 号。

收稿日期: 2001-02-26; 修回日期: 2001-07-10

表 1 不同剂量紫外线照射条件下皱纹盘鲍的受精率、面盘幼虫孵化率等。

Tab.1 The fertilization and velar survival of *Haliotis discus hannai* under different dosage of UV radiation

照射时间 (s)	受精率 (%)	早期胚胎存活率 (%)	孵化率 (%)	面盘幼虫成活率 (%)	面盘幼虫畸形率 (%)
0	90.6	96.6 ± 2.8	90.0 ± 6.2	86.6 ± 5.4	1.8 ± 1.1
10	93.3	90.0 ± 5.1	31.5 ± 4.5	9.1 ± 5.1	50.0 ± 5.4
20	88.8	89.9 ± 6.5	19.8 ± 5.7	7.2 ± 2.3	66.6 ± 6.5
30	85.8	75.8 ± 8.2	10.1 ± 6.4	4.7 ± 2.4	62.5 ± 8.1
40	83.0	87.7 ± 8.3	11.0 ± 5.7	3.5 ± 2.1	70.5 ± 7.9
50	75.8	62.3 ± 9.4	9.8 ± 4.4	2.0 ± 1.1	75.0 ± 8.4
60	76.3	48.4 ± 9.8	6.0 ± 6.6	0.4 ± 0.1	80.0 ± 8.8
70	64.3	10.1 ± 5.5	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	/
80	63.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	/
90	62.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	/
120	53.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	/

占总卵的百分比;面盘幼虫成活率为面盘幼虫占总卵的百分比;面盘幼虫畸形率为畸形面盘幼虫占总面盘幼虫的百分比。

2 结果

由于上浮的幼虫较少,畸形很多,给染色体制片造成困难,仅有 10 s 组、20 s 组、40 s 组、50 s 组作出染色体鉴定结果。

从表 1 中看出,精子经一定剂量的紫外线照射后仍能正常受精,总的趋势是受精率随着照射剂量的增加而下降。受精卵在 0~70 s 组都能发育到早期担轮幼虫且能破膜,但畸形特别多,幼虫形态怪异,运动无方向性,上浮能力差。照射 80 s 后的卵只有少部分能分裂成几到十几个细胞,大部分排出极体后就不再发育了。在 20 s, 30 s, 40 s 组受精率较为接近。所有的组孵化率和面盘幼虫成活率都很低。在 70 s 以后无面盘幼虫。由此可看到“Hertwig”效应的存在。检查出的单倍体百分率最多达 48.5%,二倍体百分率最低到 10.6%。

在低照射剂量(10 s 和 20 s)组,随着剂量增加,二倍体明显下降,但非整倍体比单倍体增加明显,在较高照射剂量(40 s 和 50 s)组,单倍体比非整倍体增加的明显(图 1)。

3 讨论

紫外线使染色体失活的机理是紫外线与 DNA 作用时,在同一条多核苷酸链 (Single polynucleotide chain) 内相邻的胸腺嘧啶之间相互联结,形成胸腺嘧啶二聚体 (Thymine dimers),此种胸腺嘧啶二聚体阻止 DNA 复制,而某些物种透明卵子里含有光复活酶

(Photoactivating enzyme),单细胞期在可见光存在的条件下可修复这种损伤。实验中受精 15 min 后卵就暴露在室内灯光下,因而极有可能使 70 s 以前组损伤较低的一些精子染色体被修复了。作者曾尝试做了受精后 15 min 把照射组在低温海水 (4.2 °C) 中处理 15 min 的实验,以期将染色体组加倍。10 s 组作出了染色体检

查,结果三倍体 6.8%,二倍体 57.0%,单倍体 25.8%,这比没加倍的 10 s 组单倍体百分率更多,是令人费解的。但是这 15 min 的低温处理是在黑暗条件下进行的就相当于受精后 30 min 都在黑暗中,且 4.2 °C 的低温也不利于酶的活动,所以这极有可能是没有被“修复”的结果。建议今后实验中作一对比实验澄清此疑点。

要选择的紫外线照射最佳剂量应该是单倍体百分率较高,接近 100%,而受精率仍保持在较高水平,现在看来受精率在 120 s 都是可以接受的。测出的单倍体百分率最高达到 48.5%,这虽然是不够的,但如果考虑上述原因,在 70~120 s 左右这段时间的单倍体百分率应很高,所以重点推荐给今后的实验。

随着单倍体和非整倍体百分率的增加,早期胚胎存活率、孵化率、面盘幼虫成活率都下降,且畸形很多,形态怪异,70 s 后无面盘幼虫,可以推断单倍体和非整倍体胚胎由于“Hertwig”而不能发育到面盘幼虫。

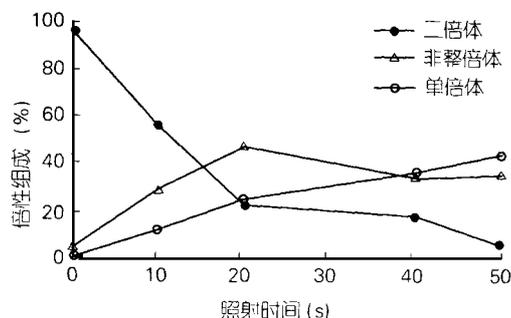


图 1 UV照射时间对染色体倍性的影响

Fig.1 Effect of radiating duration of UV on ploidization

研究报告 *REPORTS*

80 s ± 120 s 组受精率仍在 53.9% ~ 65.1%, 但却未见有早期胚胎, 仅有个别能发生卵裂, 最多达十几个细胞, 这可能是由于精子被照射时间加长后只能刺激卵排出极体, 而不能发生卵裂。在 40 s 组早期胚胎存活率有一较高值, 这可能是由于此组单倍体百分率虽增加, 但非整倍体百分率有所下降引起, 由此推断非整倍体的早期胚胎存活能力比单倍体差。

实验的染色体鉴定主要是取样担轮幼虫, 而幼虫很少且畸形太多。且对于 70 s 组后无担轮幼虫上浮的无法鉴定, 而单倍体率能达到 100% 的往往可能不会发育到上浮, 建议今后的实验采取压卵法, 在卵裂早

期用 0.05% 的秋水仙素处理 20 min, 用 Carnoy 液固定、制片、染色, 并且可以观察到退化的精核和仍残留的精子染色体碎片, 有助于分析结果。

在紫外线照射的操作上, 每次精液取 30 ml, 液面高 5 mm, 这个高度比 Guo 1992 年、许国强等 1990 年实验中受照射精液厚度要大些, 虽然有振荡器振荡但也可能使精子接受光线不均匀, 建议今后的实验中采用 2 ~ 3 mm 可能更好些。☀

参考文献

- 1 Felip A. et al. . *Heredity*, 1999, 83:387 ~ 397
- 2 Li Q. et al. . *Fishes Sciences*, 2000, 64(4) :701 ~ 707

GENETIC INACTIVITY OF ABALONE SPERM BY UV FOR GYNOGENESIS

ZHANG Guo-fan

(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071*)

Received: Feb., 26, 2001

Key Words: *Haliotis discus hannai* Ino, Gynogenesis, Genetic inactivity of sperm

Abstract

The genetic inactivity of sperm in Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino by UV in 253.7 nm wave length and a dosage of 1.108 mW/cm² was investigated. The inactive sperm was used to fertilize with normal eggs and the “hertwig” effect was observed. The fertilization happened during 0 ± 120 s radiation. The sperm radiated for 70 min would be inactive under the 150 000 sperm/cm² with 5 mm thickness shaking in 100-150 time/min. Most of haploid and aneuploid embryos would not developed to the trochophore stage. (本文编辑:李本川)