

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15065

二次正交旋转组合设计优化人工诱导翘嘴鲌雌核发育

李婷^{1,3}, 贾永义², 刘士力², 蒋文枰², 李宁^{1,3}, 杨润清³, 顾志敏²

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

2. 浙江省淡水水产研究所, 浙江 湖州 313001;

3. 中国水产科学研究院, 北京 100141

摘要: 采用紫外线照射鲤鱼(*Cyprinus carpio*)精子使其遗传物质失活, 并用冷休克方法抑制翘嘴鲌(*Culter alburnus*)卵第二极体的排出, 诱导出翘嘴鲌雌核发育二倍体。运用 3 因素 5 水平二次正交旋转组合设计方法, 分别建立冷休克起始时间(x_1)、处理时间(x_2)和处理温度(x_3) 3 个因素与翘嘴鲌雌核发育率(y_1)和孵化率(y_2)两个指标之间的二次回归模型, 探究翘嘴鲌减数分裂雌核发育的最优诱导条件组合。并采用响应面分析法(RSM), 讨论各因素水平的单因素效应、互作效应对响应值的影响。结果表明, 受精后 6 min 进行冷休克, 处理时间为 18 min, 休克温度为 7℃时, 雌核发育率达最大(18.60%); 受精后 6 min 进行冷休克, 处理时间为 23 min, 休克温度为 5℃时, 孵化率达最大(33.00%)。各因素对响应值的影响均是呈开口向下的抛物面关系。根据因素贡献率得到, 起始时间对翘嘴鲌雌核发育影响极显著, 冷休克处理温度次之, 而冷休克处理时间的影响最小。

关键词: 翘嘴鲌; 雌核发育; 二次正交旋转组合设计; 响应面法

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)01-0077-13

翘嘴鲌(*Culter alburnus*)又名翘嘴白鱼, 白条鱼, 为“太湖三白”之一, 广泛分布于我国长江中下游各地区水域。翘嘴鲌隶属于鲤科、鲌亚科、鲌属, 其体型较大, 体细长, 生长快, 广温性, 属于优质中、上层大型淡水经济鱼类。近年来翘嘴鲌天然资源量下降, 优良品质发生杂交退化, 亟待培育性状稳定、优良的翘嘴鲌新品系, 而保护翘嘴鲌种质资源则是育种工作的首要问题。同时, 雌性翘嘴鲌性成熟后, 生长速度并无明显下降, 且比雄鱼生长快, 因此, 养殖全雌翘嘴鲌成为提高养殖产量和经济效益的重要途径。人工诱导雌核发育指用物理或化学方法使精子遗传失活, 精子只负责激活卵子, 不参加合子核的形成, 卵子仅靠雌核发育形成胚胎并通过染色体加倍措施, 获得正常的雌核发育后代。雌核发育(gynogenesis)

是进行鱼类遗传改良的重要手段之一, 为母系遗传, 是快速建立纯系、稳定优良性状的有效育种方式^[1]。国内外已经在大黄鱼(*Pseudosciaena crocea* Richardson)^[1]、漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)^[2]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[3-4]、南方牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)^[5]、非洲鲇鱼(*Clarias gariepinus* Burchell)^[6]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[7]等海水鱼和鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[8]、丁鲷(*Tinca tinca* (L.))^[9]、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[10-11]、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[12]、翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)^[13]、南方鲇(*Silurus meridionalis*)^[14]等淡水鱼中开展了雌核发育研究, 并取得一定的成果。已有研究证明, 人工雌核发育子一代作为初步纯合的亲本育种材料, 且连续二代雌核发育稳定就可作为纯系亲本进行

收稿日期: 2015-02-06; 修订日期: 2015-05-18.

基金项目: 浙江省农业新品种选育重大科技专项(2012C12907-7).

作者简介: 李婷(1990-), 女, 在读硕士研究生. E-mail: tinating610@163.com

通信作者: 杨润清, 教授. E-mail: runqingyang@sjtu.edu.cn; 顾志敏, 研究员. E-mail: guzhimin2006@163.com

育种^[8]。雌核发育技术还可以与性逆转相结合,通过性别控制产生全雌群体^[15],研究环境和基因之间的互作对性别的控制等。

中国对鱼类雌核发育技术研究开展较多,但未见人工诱导翘嘴鲌雌核发育的报道。同时,由于影响雌核发育冷休克最主要的因素只有 3 个:冷休克起始时间、处理时间、处理温度,所报道的实验方案中大多是控制其一研究其二^[2, 9-10, 12-13],对因素间的相互作用分析甚少。为减少实验组合,降低实验成本,正交设计被分别应用于鲟鱼^[16]、南方鲇^[14]的雌核发育实验因素分析。然而正交设计的重点是放在各现有处理组合的比较上,主要分析每个因素对实验指标的单独影响。为了研究因素水平之间的交互作用以及因素的高阶水平对雌核发育效果的影响,有必要引入二次正交旋转组合探索鱼类雌核发育的最佳条件。正交旋转组合设计(quadratic orthogonal rotation combination design)是旋转设计的一种,结合响应面法(response surface methodology, RSM)对因子空间的任一点进行非线性数学模型拟合。它不仅具有计算简便、回归系数无相关性的优点,而且克服了预测值的方差对实验点在因子空间中位置的依赖性,是一种较好的设计方案^[17]。近年来,这种设计方案在农业^[18]和生物^[19]实验中的应用逐渐增多。本实验根据影响雌核发育的 3 个主要因素,应用三因素五水平二次正交旋转组合实验设计对翘嘴鲌雌核发育的诱导条件进行系统研究,找出最佳诱导条件组合,为翘嘴鲌雌核发育的进一步研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

2014 年 6 月,于浙江省淡水水产研究所八里店综合实验基地选取体色健康、性腺发育良好的健康 2~3 龄普通翘嘴鲌雌雄亲鱼和 3 龄雄鱼鲤鱼各 3 尾。

1.2 设备和材料

玻璃器皿, Hank 氏液,水泥池,绒毛膜促性腺激素(HCG),促黄体生成素释放激素类似物

(LRH-A),紫外灯,培养皿,摇床,4 避光玻璃瓶

1.3 方法

1.3.1 精卵的采集 实验用的亲鱼采用人绒毛膜促性腺激素和促黄体释放激素类似物混合体腔注射法进行人工催产。注射剂量为:雌鱼(LRH-A₂10 μg+HCG1200 IU)/kg,雄鱼注射量减半。然后将催产过的亲鱼分别置于经曝气 24 h,半径约 3 m 的两个圆形水泥池中,并佐以微流水刺激,为亲鱼模拟创造自然产卵环境。到达效应时间后(一般 8~10 h),亲鱼开始发情,将亲鱼捕起后,用干毛巾揩干亲鱼体表和生殖孔水分,人工挤压亲鱼腹部,采集翘嘴鲌成熟的卵子于孵化碗中,鲤鱼精子保存于 4℃避光玻璃瓶中。

1.3.2 精子的失活处理 取一定量经 Hank 氏液(精液:Hank 氏液=1:4)稀释过的精液,并将其均匀地平铺于 4 预冷培养皿中,培养皿放置于盛有碎冰块的水平托盘上,控制精液的厚度约为 1~2 mm。采用两支功率为 15 W 的平行紫外灯对精子进行照射,照射时灯管距精液表面约 15 cm,照射过程中用摇床不停地缓慢摇动,以便精子受到均匀的照射。在对精子进行紫外照射前,将紫外灯打开进行预热 15 min。开始时每隔 5 min 用显微镜涂片观察精子的活力,20 min 后,每隔 3 min 观察 1 次,直到观察到部分鲤鱼精子活力明显减弱但大部分精子还具有较强的运动能力,停止照射。失活后的鲤鱼精子立即与刚挤出的翘嘴鲌的卵进行干法授精,将灭活的鲤鱼精液加入盛有翘嘴鲌卵(800~1000 粒)的培养皿中,轻轻搅拌均匀,加入适量的池塘水,震荡 1 min 左右。按照三因素五水平设计正交旋转实验,进行诱导条件的优化,23 组实验共同启功,实验组 1~12,实验组 13~23 号分别由 1 个人操作和 1 人计时。分别在授精后 1 min、2 min、5 min、7 min、8 min 后将受精卵快速置于 1℃、2℃、5℃、7℃、8℃中冷休克 5 min、12 min、23 min、33 min、40 min(水平组合见表 2)。另设立翘嘴鲌精液与未经处理的翘嘴鲌卵子正常受精的一组为卵子质量控制组(对照组 1),取未经紫外线照射的鲤鱼精子与未经处理的翘嘴鲌卵授精设为杂交组(对照组 2)。受精卵于(25±2)℃

下静水孵化, 每 2 h 换 1 次水, 直至鱼苗孵化(约 20~36 h)。计算其雌核发育率和孵化率。

1.4 实验设计

根据二次正交旋转组合实验设计原理, 选择影响雌核发育的 3 个主要因素: 冷休克起始时间、处理时间和处理温度进行条件摸索, 根据其他学者的冷休克单因素诱导条件实验结果^[2-3, 9-10]以及本课题组多年来从事翘嘴鲌雌核发育研究的经验, 确定各因素的适宜有效范围如下: 冷休克起始时间(x_1): 1~8 min、处理时间(x_2): 5~40 min、休克处理温度(x_3): 1~8℃。

采用三因素五水平二次正交旋转组合实验^[20]

(全实施), 进行雌核发育诱导条件的优化。根据 3 因素的上下限值(x_{1j} , x_{2j}), 计算各影响因素的零水平 x_{0j} 和变化间隔 Δ_j , 并根据公式:

$$x_{0j} = \frac{x_{1j} + x_{2j}}{2}; \quad \Delta_j = \frac{x_{1j} + x_{0j}}{\gamma} (\gamma = 1.682),$$
 编制因素水平编码表(表 1)。

按照三因素二次正交旋转组合设计要求, 得到 23 组翘嘴鲌雌核发育实验, 其中 15~23 号 9 个实验组是零水平的 9 次重复实验, 其实验指标结果如表 2 所示。由表 2 可知, 对照组 1(翘嘴鲌自交)的孵化率最高(81.31%), 说明翘嘴鲌卵质量良好; 对照组 2 的胚胎能发育到高囊胚期但不能产生杂交子代(孵化率为 0)。

表 1 翘嘴鲌雌核发育诱导条件各因素水平编码表
Tab. 1 Coding list of various factors levels for induced conditions in gynogenesis

因素 factor	间距 interval	因子水平设计 level factorialial design				
		(-γ)	(-1)	0	(+1)	(+γ)
起始时间/ min time after fertilization, x_1	2.10	1	2.40	4.50	6.60	8
处理时间/min treatment duration, x_2	10.40	5	12.10	22.50	32.90	40
处理温度/℃ shock temperature, x_3	2.10	1	2.40	4.50	6.60	8

注: 3 个因素在实际实验操作和取最优值时均取整。
Note: The above three factors are all rounding in the actual experimental operation and getting the optimal values.

表 2 三因素二次正交旋转组合试验设计方案及结果
Tab. 2 Design scheme for three-factor quadratic orthogonal rotation and experimental results

试验号 experimental number	x_1	x_2	x_3	雌核发育率/% gynogenesis rate, y_1	孵化率/% hatching rate, y_2
1	1	1	1	13.58	30.73
2	1	1	-1	4.96	27.37
3	1	-1	1	17.64	25.03
4	1	-1	-1	6.50	14.81
5	-1	1	1	2.92	4.17
6	-1	1	-1	0.67	2.01
7	-1	-1	1	0.44	9.84
8	-1	-1	-1	1.32	2.23
9	-1.682	0	0	4.50	6.17
10	1.682	0	0	10.30	25.17
11	0	-1.682	0	13.00	24.00
12	0	1.682	0	3.39	7.21
13	0	0	-1.682	5.90	15.89
14	0	0	1.682	14.39	24.54
15	0	0	0	13.43	31.75
16	0	0	0	18.00	32.09
17	0	0	0	14.90	28.27
18	0	0	0	10.80	26.40
19	0	0	0	17.48	30.14
20	0	0	0	16.91	32.01
21	0	0	0	14.02	27.24
22	0	0	0	13.58	20.42
23	0	0	0	17.10	32.07
对照组 1 control group 1	-	-	-	-	81.31
对照组 2 control group 2	-	-	-	-	0

1.5 数据分析

实验采用不同的亲鱼进行 3 次重复实验, 取其平均值。利用 DPS 软件进行三元二次回归方程的建立及方差分析, 再利用 Design Expert 作出响应面图及等高线。计算其雌核发育率和孵化率公式如下:

孵化率(%)=初孵仔鱼数量/受精卵数×100%

雌核发育率(%)=正常初孵仔鱼数/受精卵数×100%

2 结果与分析

2.1 二次回归模型的建立

通过对二次正交旋转组合实验结果的拟合分析, 建立雌核发育率(y_1)、孵化率(y_2)对起始时间(x_1 , min)、处理时间(x_2 , min)、处理温度(x_3 , $^{\circ}\text{C}$)3 个实验因子的回归模型(在 $\alpha=0.10$ 的显著水平, 剔除不显著项简化后的回归方程)。

$$y_1 = 0.15188 + 0.03525x_1 - 0.01490x_2 + 0.02516x_3 + 0.02205x_1x_3 - 0.03170x_1^2 - 0.02889x_2^2 - 0.02199x_3^2$$
(1)

$$y_2 = 0.28974 + 0.08175x_1 + 0.02774x_3 - 0.05088x_1^2 - 0.05112x_2^2 - 0.03482x_3^2$$
(2)

由表 3 可知, 在显著水平 $\alpha=0.1$ 的条件下通过方差分析求出雌核发育率拟合的模型 $F_{1 \text{ 失拟}} = 2.32 < F_{0.01(5, 8)} = 6.63$, 表明未知因素对实验结果没有显著影响, 失拟变异基本上是由实验误差等偶然因素引起的。 $F_{2 \text{ 回归}} = 8.94 > F_{0.01(9, 13)} = 4.19$ 达到极显著水平, 说明模型成立。预测值和实际吻合较好, 故此模型具有较好的预测性。

由表 4 可知, 在显著水平 $\alpha=0.1$ 的条件下通过方差分析求出受精卵孵化率拟合的模型, $F_{1 \text{ 失拟}} = 2.86 < F_{0.01(5, 8)} = 6.63$, $F_{2 \text{ 回归}} = 9.16 > F_{0.01(9, 13)} = 4.19$ 达到极显著水平, 说明模型成立。预测值和实际吻合较好, 此模型具有较高的可行性。

2.2 单因素效应分析

采用降维法分别研究起始时间(x_1)、处理时间(x_2)、休克温度(x_3)对雌核发育的影响, 即固定其他因子为零水平时, 分析单一因子对实验结果的影响。

(1) 各因素分别对雌核发育率(y_1)的影响:

$$y_{1x_1} = 0.15188 + 0.03525x_1 - 0.03170x_1^2$$
(3)

$$y_{1x_2} = 0.15188 - 0.01490x_2 - 0.02889x_2^2$$
(4)

$$y_{1x_3} = 0.15188 + 0.02516x_3 - 0.02199x_3^2$$
(5)

(2) 各因素分别对孵化率(y_2)的影响:

表 3 以翘嘴鲇雌核发育率(y_1)为指标的二次多项式模型及其各项的方差分析表
Tab. 3 Variance analysis table and quadratic polynomial model using ratio of gynogenesis (y_1) as index

变异来源 source of variation	平方和 sum of squares	自由度 degree of freedom	均方 mean square	偏相关 partial correlation	F	P
x_1	0.0178	1	0.0178	0.8133	21.1351	0.0007
x_2	0.0033	1	0.0031	-0.4812	3.6698	0.0842
x_3	0.0089	1	0.0089	0.6755	10.7686	0.0081
x_1^2	0.0167	1	0.0164	-0.8278	19.8902	0.0009
x_2^2	0.0133	1	0.0139	-0.7979	16.0599	0.0018
x_3^2	0.0083	1	0.0081	-0.6885	9.2736	0.0112
x_1x_2	0.0008	1	0.0008	-0.2505	0.9042	0.3861
x_1x_3	0.0042	1	0.0040	0.5244	4.8726	0.0460
x_2x_3	0.0000	1	0.0000	0.0273	0.0094	0.9980
回归 regression	0.0698	9	0.0084	$F_{2}=8.93997$		0.0003
剩余 residual	0.0122	13	0.0009			
失拟 lack of fit	0.0068	5	0.0014	$F_{1}=2.32301$		0.1498
误差 error	0.0048	8	0.0006			
总和 sum	0.0878	22				

表 4 以翘嘴鲌孵化率(y_2)为指标的二次多项式模型及其各项的方差分析表
Tab. 4 Variance analysis table and quadratic polynomial model using hatching rate (y_2) as index

变异来源 source of variation	平方和 sum of squares	自由度 degree of freedom	均方 mean square	偏相关 partial correlation	F	P
x_1	0.0944	1	0.0959	0.8983	36.4785	0.0001
x_2	0.0019	1	0.0020	-0.2370	0.7185	0.4306
x_3	0.0112	1	0.0109	0.5049	4.1482	0.0678
x_1^2	0.0432	1	0.0436	-0.7965	16.4267	0.0017
x_2^2	0.0432	1	0.0424	-0.7810	17.0117	0.0015
x_3^2	0.0204	1	0.0207	-0.6088	7.8219	0.0179
x_1x_2	0.0074	1	0.0075	0.4256	2.9320	0.1223
x_1x_3	0.0002	1	0.0002	0.0777	0.0725	0.8271
x_2x_3	0.0020	1	0.0019	-0.2428	0.7395	0.4111
回归 regression	0.2208	9	0.0247	$F_2=9.16449$		0.0003
剩余 residual	0.0350	13	0.0026			
失拟 lack of fit	0.0223	5	0.0044	$F_1=2.85777$		0.0959
误差 error	0.0123	8	0.0016			
总和 sum	0.2571	22				

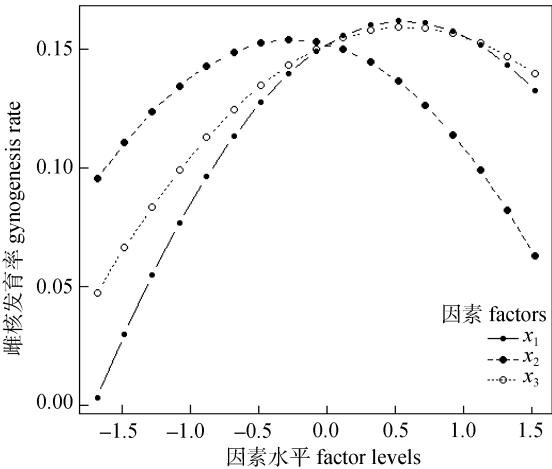


图 1 各诱导条件对翘嘴鲌雌核发育率的影响
Fig.1 The effects of various inducing factors on gynogenesis rate

$$y_{2x_1} = 0.28974 + 0.08175x_1 - 0.05088x_1^2 \quad (6)$$

$$y_{2x_2} = 0.28974 - 0.05112x_2^2 \quad (7)$$

$$y_{2x_3} = 0.28974 + 0.02774x_3 - 0.03482x_3^2 \quad (8)$$

根据单因子效应分析结果显示, 各因素的相对重要性在不同水平下对 y_1 和 y_2 是不同的。三因素均能在某一水平上获得最佳值, 当取值分别大于 $x_1=0.56$, $x_2=0.26$, $x_3=0.57$ 这些水平时, 对 y_1 产生负效应, 当取值大于 $x_1=0.80$, $x_2=0$, $x_3=0.40$ 时, 对 y_2 产生负效应。由图 1、2 可知, 起始时间(x_1)

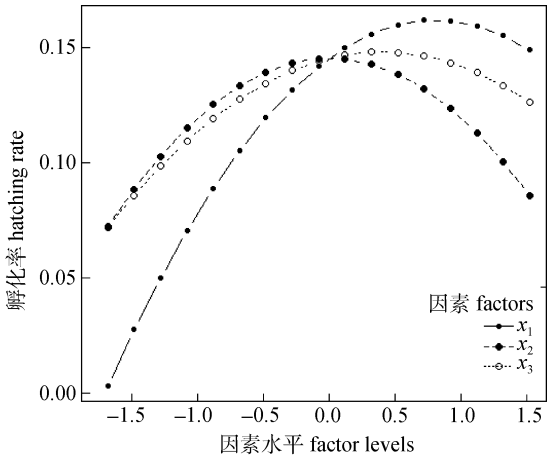


图 2 各诱导条件对翘嘴鲌孵化率的影响
Fig.2 The effects of various inducing factors on hatching rate

处于最低水平(-1.682)时, 雌核发育率和孵化率极低接近于 0; 由图形看出, 三因素对指标值的影响曲线都呈开口向下的抛物线, 即先升高后降低的趋势。

2.3 因子互作效应分析

将一个因素固定为零水平, 可得到其他两个因素的互作方程。由表 3 可知, 只有 x_1 、 x_3 交互作用对 y_1 影响显著, 即休克起始时间(x_1)和处理时间(x_3)的相互作用显著影响翘嘴鲌雌核发育率。

2.3.1 两因素互作效应对雌核发育率(y_1)的影响
 方程 1(雌核发育率 y_1)中, 当把 x_3 分别固定在 0 编码水平上时, 可以得出起始时间(x_1)与处理时间(x_2)间的交互作用方程:

$$y_{1x_1x_2} = 0.15188 + 0.03525x_1 - 0.01490x_2 - 0.03170x_1^2 - 0.02889x_2^2 \quad (9)$$

同理, 可得到起始时间(x_1)与处理温度(x_3), 处理时间(x_2)和处理温度(x_3)的交互作用方程:

$$y_{1x_1x_3} = 0.15188 + 0.03525x_1 + 0.02516x_3 + 0.02205x_1x_3 - 0.03170x_1^2 - 0.02199x_3^2 \quad (10)$$

$$y_{1x_2x_3} = 0.15188 - 0.01490x_2 + 0.02516x_3 - 0.02889x_2^2 - 0.02199x_3^2 \quad (11)$$

根据响应面分析法, 以雌核发育率(y_1)为响应值, 分别绘制方程(9)、(10)、(11)的响应面图及其等高线图(图 3-5)

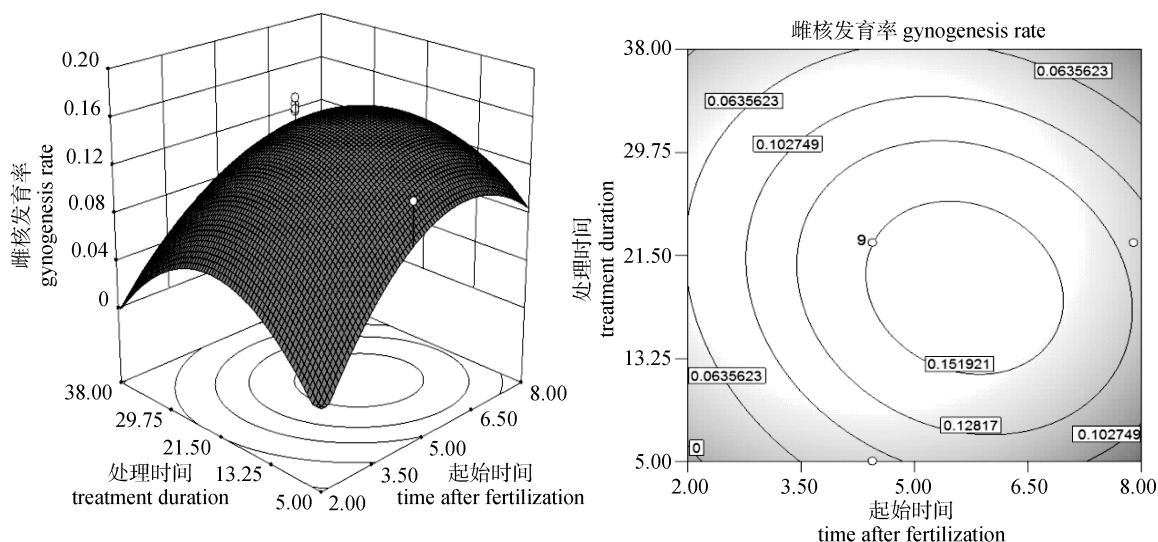


图 3 x_1 (起始时间)与 x_2 (处理时间)对 y_1 (雌核发育率)的互作效应响应面图及其等高线

Fig.3 Response surface and contour plot for interaction effect between x_1 (time after fertilization) and x_2 (treatment duration) on y_1 (gynogenesis rate)

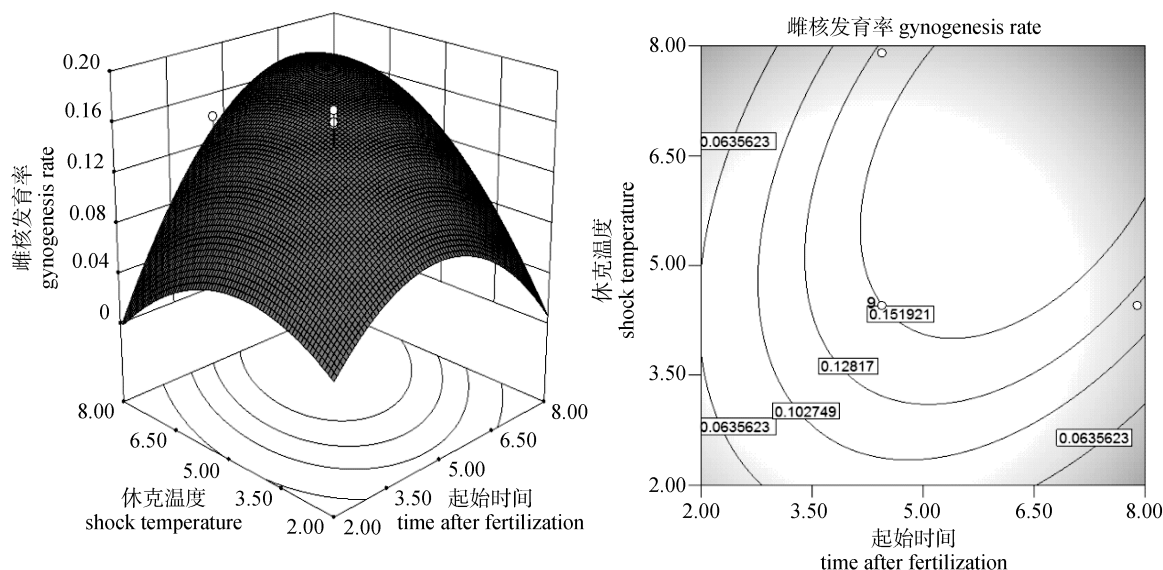


图 4 x_1 (起始时间)与 x_3 (休克温度)对于 y_1 (雌核发育率)的响应面图及其等高线

Fig.4 Response surface and contour plot for interaction effect between x_1 (time after fertilization) and x_3 (shock temperature) on y_1 (gynogenesis rate)

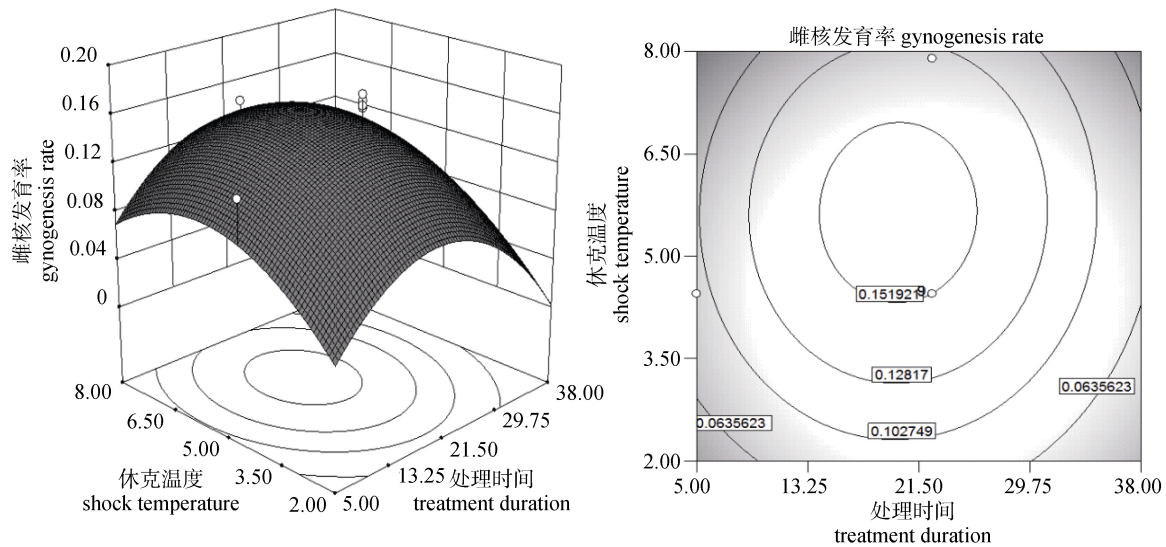


图 5 x_2 (处理时间)与 x_3 (休克温度)对于 y_1 (雌核发育率)的响应面图及其等高线

Fig.5 Response surface and contour plot for interaction effect between x_2 (treatment duration) and x_3 (shock temperature) on y_1 (gynogenesis rate)

由图 3 可知, 在本实验水平范围内, 在休克温度一定条件下, 随着起始时间(x_1)和处理时间(x_2)的增加, 雌核发育率(y_1)逐渐升高至最高点又缓慢降低。当起始时间较短时, 随着处理时间(x_2)的延长, 雌核发育率(y_1)的值较低且变化趋于平缓。起始时间(x_1)处于较短或较长时, y_1 变化较明显, 可看出冷休克起始时间(x_1)对雌核发育率(y_1)的影响较为显著。由图 4 可知, 在处理时间一定的条件下, 起始时间(x_1)与休克温度(x_3)对雌核发育率的影响相似。当起始时间(x_1)与休克温度(x_3)都较短时或较长时, 雌核发育率(y_1)都较低。随着起始时间(x_1)和休克温度(x_3)的增加, 雌核发育率(y_1)逐渐提高至最高点, 两者的交互作用显著。由图 5 可知, 休克温度(x_3)对雌核发育率(y_1)的影响相对于处理时间(x_2)较为显著, 表现为变化弧度较大。休克温度(x_3)较低时, 随着处理时间(x_2)的延长, y_1 呈先升高后降低, 但是变化幅度较小且其值较低(同图 3)。随着休克温度(x_3)的升高, 雌核发育率(y_1)升高较快且值较高。

2.3.2 两因素互作效应对孵化率(y_2)的影响 方程(2)(孵化率 y_2)中, 可得到三因素之间两两互作效应的方程:

$$y_{2x_1x_2} = 0.28974 + 0.08175x_1 - 0.05088x_1^2 - 0.050112x_2^2 \quad (12)$$

$$y_{2x_1x_3} = 0.28974 + 0.08175x_1 + 0.02774x_3 - 0.05088x_1^2 - 0.03482x_3^2 \quad (13)$$

$$y_{2x_2x_3} = 0.28974 + 0.02774x_3 - 0.05112x_2^2 - 0.03482x_3^2 \quad (14)$$

方程(12)、(13)、(14)的交互作用响应面图及其等高线图如图 6~8 所示。

由图 6 知, 起始时间(x_1)较低时, 处理时间(x_2)在一定范围内并不能使 y_2 明显升高, 继续延长处理时间(x_2), 孵化率(y_2)略微升高后降低。当处理时间(x_2)延长时, 随着起始时间(x_1)的增加, y_2 增加较快; 由图 7 对比图 4, 结合方差分析表可知, 两因素的交互作用对孵化率(y_2)的影响不及对雌核发育率(y_1)的影响, 在图中表现为整个曲面的弧度变化。由图 8 可知, 随着休克温度(x_3)与处理时间(x_2)的增加, 孵化率(y_2)增加较快。相对于处理时间(x_2), 当休克温度(x_3)较低或较高时, y_2 变化较明显。说明休克温度(x_3)对孵化率(y_2)的影响比处理时间(x_2)显著。

图 3~图 8 可知, 起始时间较低(2 min)时, 指标值都非常低且接近于 0; 随着交互项的增加, 响应值逐渐升高至极值后降低; 且两因素交互效应的最优值均为某两个因素分别处于零水平(4.50 min, 22.50 min, 4.50℃)时, y_1 (雌核发育率)极值均为 18.00%, y_2 (孵化率)极值均为 32.09%。

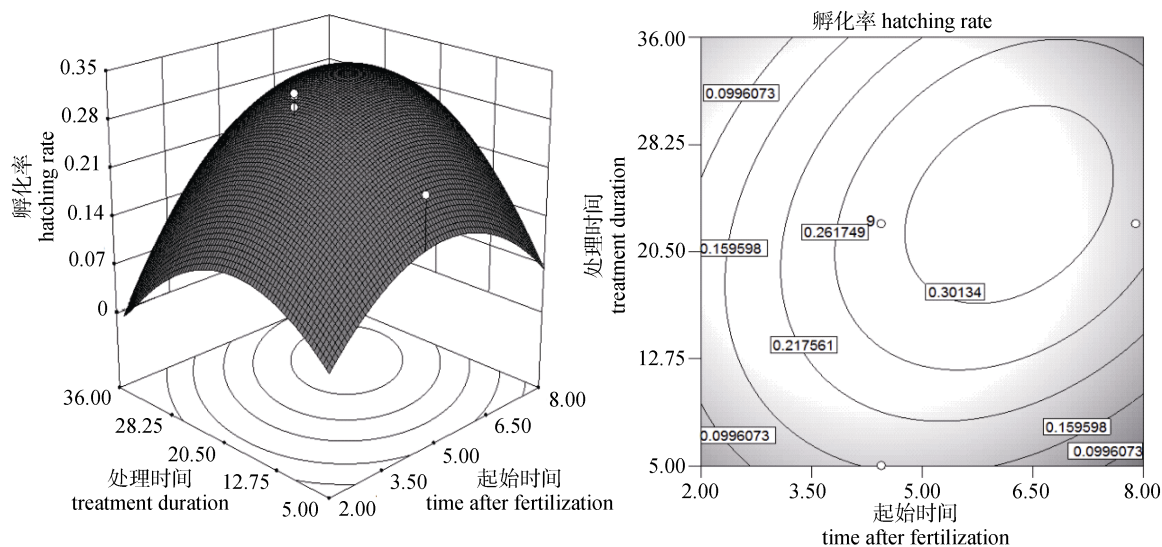


图 6 x_1 (起始时间)与 x_2 (处理时间)对于 y_2 (孵化率)的响应面图及其等高线

Fig.6 Response surface and contour plot for interaction effect between x_1 (time after fertilization) and x_2 (treatment duration) on y_2 (hatching rate)

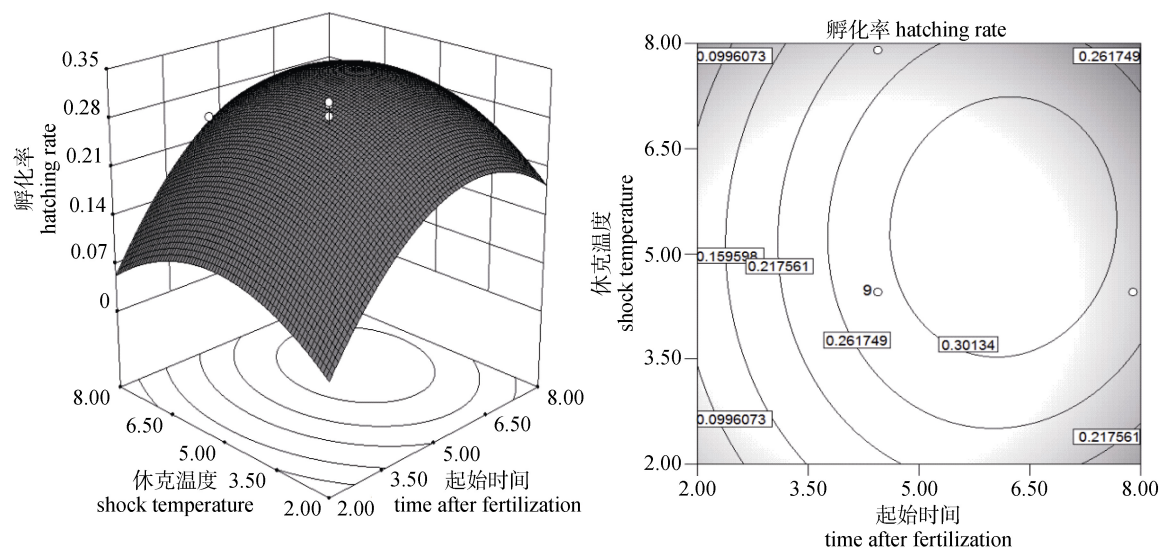


图 7 x_1 (起始时间)与 x_3 (休克温度)对于 y_2 (孵化率)的响应面图及其等高线

Fig.7 Response surface and contour plot for interaction effect between x_1 (time after fertilization) and x_3 (shock temperature) on y_2 (hatching rate)

2.4 模型的优化及验证

通过软件对不同水平条件组合模型的模拟实验, 从 $5^3=125$ 个组合中, 雌核发育率大于 10.00% 的方案有 30 个(表 5); 获得孵化率大于 21% 的实验方案有 26 个(表 6)。通过对二次回归模型寻优, 得到响应值 y_1 (雌核发育率)最大值时, 最佳诱导条件组合水平(0.99, -0.39, 1.09), 即冷休克起始时间为 6 min, 处理时间为 18 min, 休克温度为

7℃时, y_1 (雌核发育率)最优值为 18.60%。当响应值 y_2 (孵化率)取最大值时, 3 个因素的水平编码为 0.85、0.07、0.44, 即冷休克受精起始时间为 6 min, 处理时间为 23 min, 休克温度为 5℃时, 孵化率最优值为 33.00%。

为验证本实验回归模型及预测结果的可靠性, 采用诱导条件优化结果进行验证实验。以得到的雌核发育率的最佳诱导组合条件进行 3 次重复实

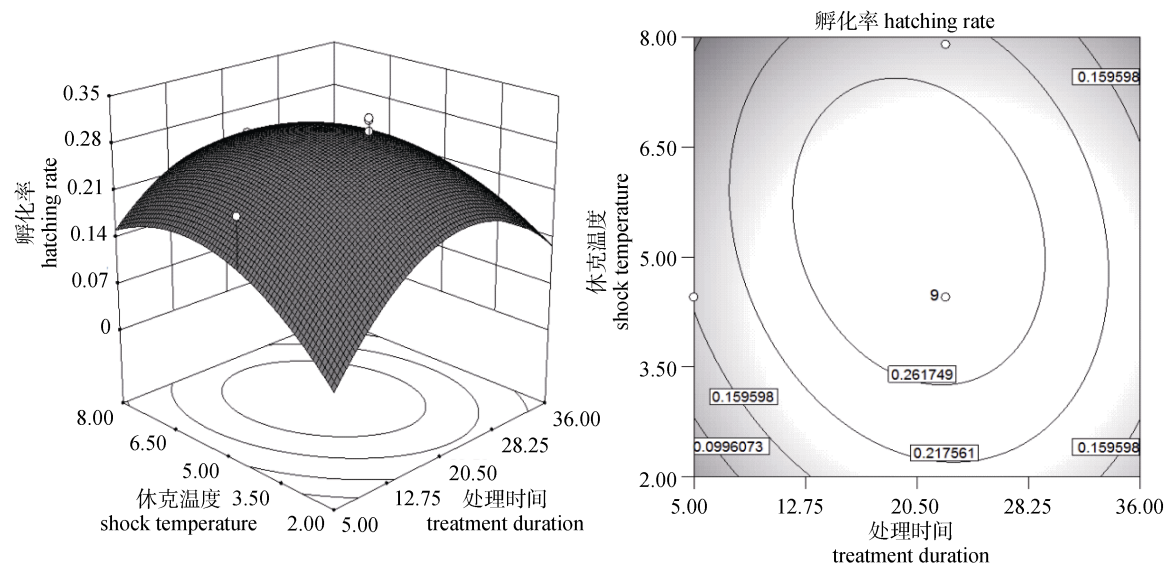


图 8 x_2 (处理时间)与 x_3 (休克温度)对于 y_2 (孵化率)的响应面图及其等高线

Fig.8 Response surface and contour plot for interaction effect between x_2 (reatment duration) and x_3 (shock temperature) on y_2 (hatching rate)

表 5 翘嘴鲌雌核发育率大于 10.00%方案水平组合的频率分析

Tab.5 Frequency analysis of the level combination in gynogenesis rate more than 10.00%

水平 level	x_1		x_2		x_3	
	次数 time	频率 frequency	次数 time	频率 frequency	次数 time	频率 frequency
-1.68	0	0.0000	4	0.14410	0	0.0000
-1	0	0.0000	10	0.3255	1	0.0360
0	10	0.3054	10	0.3393	8	0.2797
1	11	0.3733	7	0.2518	11	0.3956
1.68	10	0.3417	0	0.0000	10	0.3483
平均编码 average coding	0.9437		-0.314		0.9163	
标准误 standard error	0.1242		0.1735		0.1416	
95%的置信区间	0.687-1.167		-0.616-0.034		0.630-1.158	
95% confidence interval	0.687-1.167		-0.616-0.034		0.630-1.158	
最佳方案 optimum scheme	5.93-6.93		16.09-22.85		5.81-6.91	

表 6 翘嘴鲌孵化率大于 21.00%方案水平组合的频率分析

Tab.6 Frequency analysis of the level combination in hatching rate more than 21.00%

水平 level	x_1		x_2		x_3	
	次数 time	频率 frequency	次数 time	频率 frequency	次数 time	频率 frequency
-1.68	0	0.0000	0	0.0000	0	0.0000
-1	0	0.0000	7	0.2787	3	0.1193
0	9	0.3234	13	0.4800	9	0.3579
1	10	0.4008	7	0.2717	9	0.3538
1.68	8	0.3105	0	0.0000	5	0.1988
平均编码 average coding	0.9101		0		0.5950	
标准误 standard error	0.1352		0.1489		0.1709	
95%的置信区间	0.647-1.157		-0.282-0.282		0.233-0.875	
95% confidence interval	0.647-1.157		-0.282-0.282		0.233-0.875	
最佳方案 optimum scheme	5.85-6.91		19.57-25.43		4.98-6.32	

验, 分别得到雌核发育率(y_1)的值为 18.00%、17.89%、17.12%, 平均值为 $(17.67 \pm 0.48)\%$, 预测值(18.60%)与验证值没有显著性差异($P > 0.05$)。以孵化率的最佳诱导组合条件进行验证, 得到孵化率(y_2)分别为 32.03%、31.29%、32.45%, 平均值为 $(31.92 \pm 0.59)\%$, 预测值(33.00%)与验证值没有显著性差异($P > 0.05$), 预测值与验证值基本相符。

2.5 因素重要性分析

可利用各因素对指标值的贡献率大小^[20]分析回归方程中各个因素重要性。对于二次回归方程, 根据各回归系数的方差比 F_j 、 F_{ij} 、 F_{jj} , 令

$$\delta = \begin{cases} 0 & (F \leq 1) \\ 1 - \frac{1}{F} & (F > 1) \end{cases}, \text{ 求出第 } j \text{ 个因素其贡献率为:}$$

$$\Delta_j = \delta_j + \frac{1}{2} \sum_{\substack{i=1 \\ i \neq j}}^m \delta_{ij} + \delta_{jj}, \text{ 其中 } \delta_j, \delta_{jj} \text{ 分别表示第 } j \text{ 个因素一次项、二次项的贡献。} \delta_{ij} \text{ 表示交互项中的贡献。}$$

对于指标 y_1 的 3 个因素其贡献率分别为 $\Delta_1=2.30$, $\Delta_2=1.67$, $\Delta_3=2.20$, 可知 $\Delta_1 > \Delta_3 > \Delta_2$ 。对于指标 y_2 的 3 个因素其贡献率分别为 $\Delta_1=2.24$, $\Delta_2=1.27$, $\Delta_3=1.63$, 可知 $\Delta_1 > \Delta_3 > \Delta_2$ 。说明三因素对翘嘴鲌雌核发育的影响程度由高到低依次为冷休克起始时间、休克温度、处理时间。

3 讨论及结论

3.1 冷休克最佳诱导条件

因同源精子诱导雌核发育很难剔除精子的污染, 导致雌核发育后代与正常受精个体区分较困难, 本实验采用异源精子激活翘嘴鲌卵子诱导雌核发育, 可较快地鉴定出雌核发育二倍体。因母本翘嘴鲌(*Culter alburnus*)($2n=48$)的染色体数目小于父本鲤鱼(*Cyprinus carpio*)($2n=100$)的染色体数, 后代杂交个体难以成活^[21], 所以单倍体综合征和杂交致死保证了本实验中所有存活个体都是雌核发育二倍体^[16]。正常雌核发育的仔鱼与普通二倍体翘嘴鲌仔鱼在形态上没有区别, 表现为躯干笔直, 身体透明, 直线游泳。未成功诱导雌核发育的单倍体畸形鱼表现为头部或胸腔膨大, 体短,

尾部弯曲。传统实验费时而且需要大量的实验组合来解释, 二次正交旋转组合设计与传统的正交实验相比, 能以较少的实验获得较大的信息量, 能以一个经验公式来表达实验指标与实验因素间的单因素效应, 交互效应及二次项之间的关系。根据回归模型, 由预测值直接寻找最优区域, 寻求最佳实验方案^[22]。根据 DPS 方差分析结果与 Design Expert 响应面分析, 可以得出雌核发育率达最大值时最佳诱导条件组合是: 受精后 6 min, 在冷休克 7°C 下处理 18 min。孵化率达最大值时最佳诱导条件组合为受精后 6 min, 在冷休克 5°C 时处理 23 min。且无论是单因素分析还是交互作用分析, 均是凸面的开口向下的图形, 即随着因素水平的提高, 指标值增加到极值后又降低。这说明这 3 个因素相互作用, 共同影响雌核发育。

3.2 冷休克参数讨论

影响雌核发育的 3 个主要因素中, 以受精的起始时间对诱导结果影响最为显著, 其后依次是休克温度、处理时间, 这与徐加涛等^[2]、Felip 等^[23]和 Zhang 等^[12]的结论一致。冷休克起始时间过早, 受精卵不能启动整个受精过程; 起始过晚, 第二极体已经外排, 后续处理无效^[23]。冷休克处理时间太短无抑制作用, 太长会对胚胎造成更大的损伤。由响应面图可知, 随着处理时间的延长, 指标值变化较平缓; 相反, 延长至 30 min 左右继续增加处理时间, 可能此时受精卵已明显冻伤, 雌核发育率还会下降。Xu 等^[4]诱导大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)的雌核发育发育, 认为在最佳休克时间(25 min)的基础上, 延长处理时间并不能增加雌核发育诱导率。Zhang 等^[12]首次采用异源四倍体杂交的二倍体精子诱导草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)雌核发育, 认为延长处理时间或者低于休克温度都将影响胚胎的生存能力, 增加死亡率。这可能因为不同鱼类的卵子对温度水温的敏感性不同, 也可能因为这一处理时间与温度具有较强的交互作用。

丁鱕减数分裂雌核发育的最佳诱导条件为: 授精后 5 min, 在冰牛奶(4°C)里处理 20 min^[9]。草鱼减数分裂雌核发育的最佳诱导条件为在授精后

2~3 min, 冷休克 4~6℃下处理 10~12 min^[12]。这些结果与本实验稍有差异, 可能与这两种鱼同属于鲤科, 淡水鱼, 但又属于不同种属有关。半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)雌核发育最适诱导条件是受精后 5 min, 在 5℃条件下实施冷休克, 处理 20~25 min^[7]。翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)最适诱导条件是受精后 5 min, 在 0~3℃条件下实施冷休克, 处理 30 min^[13]。因染色体加倍的起始时刻是影响冷休克最重要的因素, 然而翘嘴鲌受精后冷休克的起始时间晚于团头鲂^[10](*Megalobrama amblycephala*) (3 min)、漠斑牙鲈^[12](*Paralichthys lethostigma*) (4 min)、半滑舌鲷^[7](*Cynoglossus semilaevis*) (5 min) 等暖温性鱼类, 原因可能是不同种类亲鱼的年龄、授精条件(环境温度、季节)、卵子的成熟度不同造成的^[24]。邹曙明等^[10]发现同样在受精后 3 min, 诱导条件在不同龄的鱼卵表现出差异。并且同种鱼在不同的操作环境下, 诱导条件也会存在一定的差异。在冷休克起始时间和处理温度相同的条件下, 邹曙明等^[10]认为 3 龄团头鲂在(23±1)℃环境下冷休克处理 30 min 孵化效果最佳; 张新辉等^[11]认为团头鲂在 27℃环境下冷休克处理 20 min 孵化效果最佳。本实验得出的结论与上述同为暖温性鱼类或淡水鱼存在差异的另一原因, 也可能是因为本实验给出的最佳组合是三因素共同作用下的翘嘴鲌雌核发育的最优组合。因为正交旋转实验克服了正交实验只能给出实验所用的某种水平组合, 而无法找出整个区域上因素的最佳水平组合和实验结果最优值的缺陷, 而以上报道结果大多是以某一因素为控制变量时的最佳组合。

3.3 对雌核发育技术的探讨

雌核发育诱导率和孵化率低是人工雌核发育技术面临的普遍难题^[5, 9, 13], 可能因为雌核发育仔鱼胚胎发育的关键阶段缺少来自父本的遗传物质, 同时有害纯合隐性基因出现的频率增加; 冷休克对雌核发育卵的损害也是雌核发育率低的另一原因之一。诱导雌核发育既要考虑环境因素和亲鱼选择, 又要把握诱导条件的操作时机; 既要保证卵子和精子的损伤降到最低, 又要保证雌核发育能成功获得较高的诱导率, 因此如何优化雌核

发育的诱导条件有待于研究者进一步探索。苏鹏志等^[3]采用不经紫外线照射的鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)冷冻精子诱导出了大菱鲆雌核发育二倍体, 避免了精子的损伤, 保证了受精率, 为得到更高的雌核发育诱导率提供了一个途径; Wang 等^[9]用大口牛胭脂鱼(*Ictiobus cyprinellus*)、红鲤(*Cyprinus carpio* var *singuanensis*)、草鱼作为异源精子诱导丁鲷雌核发育, 发现大口牛胭脂鱼精子诱导雌核发育存活率显著低于红鲤和草鱼, 说明异源精子的选择也是影响雌核发育率的一个重要因素; 一般来说, 同源精子诱导雌核发育成功率大于异源精子, 然而 Luckenbach 等^[5]研究南方牙鲈的雌核发育, 发现同源精子诱导雌核发育率为 2.1%, 鲮鱼(*Mugil cephalus*)作为异源精子诱导雌核发育率为 1.6%~11.4%, 说明不同鱼类的雌核发育具有其种属特异性; 此外, 利用不同染色体数目的异源精子诱导雌核发育也成为鱼类雌核发育的新方法^[6]。

本研究摸索出的翘嘴鲌雌核发育诱导条件仅是本课题的第一步, 还需进一步检测雌核发育亲本、正常受精后代及后代间遗传纯度的差异, 解决其雌核发育群体后代遗传稳定性和建立高产优质群体的问题。目前本课题组已在进行伪雄鱼的培育, 本研究为进一步分析人工诱导翘嘴鲌雌核发育机制以及性别决定机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Ye X J, Wang Z Y, Liu X D, et al. Analysis of genetic homozygosity and diversity of two successive generation meio-gynogenetic population in *Pseudosciaena crocea* using microsatellite markers[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 144-151.[叶小军, 王志勇, 刘贤德, 等. 大黄鱼连续两代雌核发育群体的微卫星标记分析[J]. 水生生物学报, 2010, 34(1): 144-151.]
- [2] Xu J T, You F, Xu J H, et al. Induction of diploid gynogenesis in southern flounder *Paralichthys lethostigma* by black porgy *Acanthopagrus schlegelii* sperm[J]. Fisheries Science, 2011, 30(12): 744-748.[徐加涛, 尤锋, 许建和, 等. 黑鲷精子诱导漠斑牙鲈雌核发育研究[J]. 水产科学, 2011, 30(12): 744-748.]
- [3] Su P Z, Chen S L, Yang J F, et al. Induction of gynogenesis

- in *Scophthalmus maximus* by heterologous sperms of *Lateolabrax japonicus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(5): 715–721.[苏鹏志, 陈松林, 杨景峰, 等. 异源冷冻精子诱导大菱鲆的雌核发育[J]. 中国水产科学, 2008, 15(5): 715–721.]
- [4] Xu J H, You F, Sun W, et al. Induction of diploid gynogenesis in turbot *Scophthalmus maximus* with left-eyed flounder *Paralichthys olivaceus* sperm[J]. Aquacult Int, 2008, 16(6): 623–634.
- [5] Luckenbach J A, Godwin J, Daniels H V, et al. Induction of diploid gynogenesis in southern flounder RJ(*Paralichthys lethostigma*) with homologous and heterologous sperm[J]. Aquaculture 2004, 237(1): 499–516.
- [6] Varadi L, Benko I, Varga J, et al. Induction of diploid gynogenesis and using interspecific sperm and production of tetraploids in African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell(1822)[J]. Aquaculture, 1999, 173(1): 401–411.
- [7] Chen S L, Tian Y S, Yang J F, et al. Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole(*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Mar Biotechnol, 2009, 11(2): 243–251.
- [8] Wu C J, Chen R D, Ye Y Z, et al. Investigation on the carp gynogenesis with reference to establishing a pure line[J]. Acta Genetica Sinica, 1981, 8(1): 50–55.[吴清江, 陈德容, 叶玉珍, 等. 鲤鱼人工雌核发育及其作为建立近交系新途径的研究[J]. 遗传学报, 1981, 8(1): 50–55.]
- [9] Wang J X, Liu H J, Min W Q, et al. Induced meiotic gynogenesis in tench, *Tinca tinca*(L.) using irradiated heterogenic sperm[J]. Aquacult Int, 2006, 14(1–2): 35–42.
- [10] Zou S M, Li S F, Cai W Q, et al. Establishing gynogenetic groups of genetic improved *Megalobrama amblycephala* and its genetic analysis[J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(4): 311–316.[邹曙明, 李思发, 蔡完其, 等. 团头鲂良种雌核发育群体的建立及其遗传变异[J]. 水产学报, 2001, 25(4): 311–316.]
- [11] Zhang X H, Xia X M, Luo W, et al. Microsatellite marker analysis of artificial gynogenetic *Megalobrama amblycephala*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2012, 31(6): 737–743.[张新辉, 夏新民, 罗伟, 等. 团头鲂雌核发育后代的微卫星标记分析[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(6): 737–743.]
- [12] Zhang H, Liu S J, Zhang C, et al. Induced gynogenesis in grass carp(*Ctenopharyngodon idellus*) using irradiated sperm of allotetraploid hybrids[J]. Mar Biotechnol, 2011, 13(5): 1017–1026.
- [13] Yu R, Liang X F, Zhang J, et al. Induction of gynogenesis in *Siniperca chuatsi*[J]. Freshwater Fisheries, 2012, 42(3): 84–87.[余锐, 梁旭方, 张进, 等. 翘嘴鲈人工雌核发育的初步研究[J]. 淡水渔业, 2012, 42(3): 84–87.]
- [14] Wu F R, Zhang X Y, Wang D S. Optimal parameters for artificial gynogenesis in southern catfish[J]. Chinese Journal of Zoology, 2006, 41(1): 27–31.[吴风瑞, 张修月, 王德寿. 人工诱导南方鲇雌核发育的最适参数[J]. 动物学杂志, 2006, 41(1): 27–31.]
- [15] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences[J]. Aquaculture, 2002, 208(3–4): 191–364.
- [16] Zou Y C, Wei Q W, Pan G B, et al. Induction of meiotic gynogenesis in paddlefish (*Polyodon spathula*) using UV-irradiated Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) sperm[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(5): 728–735.[邹远超, 危起伟, 潘光碧, 等. 施氏鲟精子诱导匙吻鲟雌核发育[J]. 中国水产科学, 2009, 16(5): 728–735.]
- [17] Bose R C, Carter R L. Complex representation in the construction of rotatable designs[J]. Ann Mathemat Stat, 1959, 30(3): 771–780.
- [18] Jiang N, Zhang A Z, Yang R Q, et al. An experimental approach to optimize several processing conditions when extruding soybeans[J]. An Feed Sci Technol, 2011, 170(3–4): 277–283.
- [19] Wang T P, Yin J, Zheng Z M, et al. Optimization of reaction conditions for polyurethane foam synthesis with liquefied corn stalk by response surface methodology[J]. J Appl Polymer Sci, 2012, 125(SI): 278–282.
- [20] Xu Z R. Analysis of Regression and Experimental Design[M]. Beijing: China Statistics Press, 1998: 69–74, 155–157.[徐中儒. 回归分析与实验设计[M]. 北京: 中国统计出版社, 1998: 69–74, 155–157.]
- [21] Zhang Z H, Chen J, Li L, et al. Research advances in animal distant hybridization[J]. Science China: Life Science, 2014, 44(2): 161–174.[张卓惠, 陈婕, 黎玲, 等. 动物远源杂交研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(2): 161–174.]
- [22] Baş D, Boyacı İ H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology[J]. J Food Eng, 2007, 78(3): 836–845.
- [23] Felip A, Zanuy S, Carrillo M, et al. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species[J]. Genetica, 2001, 111(1–3): 175–195.
- [24] Várkonyi E, Bercsényi M, Ozouf-Costaz C, et al. Chromosomal and morphological abnormalities caused by oocyte ageing in *Silurus glanis*[J]. J Fish Biol, 1998, 52(5): 899–906.

Optimizing conditions to induce artificial gynogenesis in *Culter alburnus* using a quadratic orthogonal rotation design

LI Ting^{1,3}, JIA Yongyi², LIU Shili², JIANG Wenping², LI Ning^{1,3}, YANG Runqing³, GU Zhimin²

1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China;

3. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China

Abstract: *Culter alburnus* gynogenetic diploids were created by activating eggs with ultraviolet-irradiated common carp sperm and preventing extrusion of the second polar body using cold shock to induce chromosome duplication in the eggs. A three-factor five-level quadratic orthogonal rotation combined design was used to determine the optimal combination of three experimental factors, including time after fertilization (x_1), treatment duration (x_2), and shock temperature (x_3) to induce artificial gynogenesis in *C. alburnus*, using gynogenesis rate (y_1) and hatching rate (y_2) as indicators in the quadratic regression model. Furthermore, the response surface method was used to determine the effect of single factors and their interactive effect on the response value. We found that the optimal combination of factors to induce gynogenesis (18.00%) was cold shock for 18 min at 7°C, applied 6 min after fertilization, whereas that for maximal egg hatch (33.00%) was cold shock for 23 min at 5°C, applied 6 min after fertilization. The relationship between the various factors on the response values was parabolic with a downward opening. According to the factor contribution rates, cold shock start time had a highly significant effect on cold shock, followed by shock temperature and treatment duration. This is the first study to use a quadratic orthogonal rotation combined design to determine the optimal combination of factors to induce gynogenesis in *C. alburnus*. These results provide a basis to explore the sex-determining mechanism in *C. alburnus*.

Key words: *Culter alburnus*; gynogenesis; quadratic orthogonal rotation combination design; response surface method

Corresponding author: YANG Runqing, E-mail: runqingyang@sjtu.edu.cn; GU Zhimin, E-mail: guzhimin2006@163.com