

利用高pH高Ca溶液誘發鯉魚三倍體之初步探討

趙乃賢·蔡惠萍·廖一久

一、前言

爲了因應魚類高效率成長的需求及品種改良之目的，多倍體誘發技術的研究逐漸受到重視。

一般多倍體誘導的方法大致可分下列幾項，(一)物理方法：1.冷擊(Cold shock) 2.熱擊(Heat shock) 3.壓力震擊(Pressure shock)，(二)化學方法：常用聚醯乙二醇[polyethylene glycol(PEG)]，秋水仙鹼(Colcemid)等，(三)生物方法：利用種間雜交處理；均可能誘發多倍體的生成。而目前在實驗室中多採用冷刺激或壓力處理受精卵來誘發多倍體的生成，但如果將來應用於民間之繁殖場，則因所採用之儀器等設備費用太過於昂貴，故其在推廣應用上可能較爲不易。本試驗係利用高pH高Ca溶液來處理受精卵，期能以簡便方法誘發魚類多倍體的產生，此法僅需使用數種價格低廉的化學藥劑調配成溶液，如證實可行則不失爲一種方便、低廉的誘發多倍體的方法。此種方法原本是利用在植物方面誘發其多倍體的生成，而後 Ueda et al., 在1988年曾經利用於誘導虹鱒(Rainbow trout)產生三倍體，本試驗係參考其方法，嘗試利用高pH高Ca溶液試驗誘發鯉魚產生三倍體之效果。

二、材料與方法

本試驗所採魚種乃來自中壢陳先生私人養殖場之大型鯉魚種魚，搬運回所後，蓄養於 $1.1\text{M} \times 1.0\text{M} \times 0.5\text{M}$ 之不透明塑膠桶中，並於一星期後，注射鯉魚腦下垂體及puberogen進行人工催熟，而後定時檢查其卵之成熟度。

另外，配製高pH高Ca溶液，以NaCl 78g、KCl 2.8g、 CaCl_2 111g溶於10ℓ的蒸餾水中，再以NaOH調整其pH值至10，亦可視擬處理之卵量增加配製之溶液量。待卵至最適成熟度時，即以人工擠出其卵與精液，施行人工受精。將受精卵分成4組，A組爲對照組，B、C、D各組分別於

受精後5、10、15分鐘時浸泡於配製好之高pH高Ca溶液中20分鐘，而後移至正常水中孵化，24小時後計算其受精率，2天後計算其孵化率，另外從各組分別取出100尾稚魚，每隔10天記錄其活存率共4次。

同時將各組小魚飼養至可供採血階段，利用中央研究院的Flow cytometer，依據流式細胞計算法測量其細胞核內遺傳物質的含量。首先抽血後將細胞固定於70%的ethanol中並貯存於 -20°C 中。臨測試前再以1000 rpm離心10分鐘後倒去上層液；後添加PBS 550 μl ，5% triton x-100, 200 μl ，20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，PI 200 μl ，10mg/ml RNase A 50 μl ，搖勻後以40 μm 之尼龍網過濾，其次以儀器自動測量每個細胞核的螢光放射量，再換算成核內遺傳物質之多寡，藉此判定多倍體誘發成效。



抽取試驗魚的血液以粒度分析儀判讀是否爲多倍體

三、結果與討論

本法曾嘗試於多種魚種，但因繁殖季節及繁殖場地等因素，最後選擇鯉魚爲試驗魚種，做初步的試驗。如經方法確定可誘發多倍體，再行試驗其他較高經濟價值之魚種。

試驗中正常授精之受精卵分成 4 組，除對照組外，各在受精後 5、10、15 分鐘施予 20 分鐘之高 pH 高 Ca 溶液處理，並立即改用正常孵化用之淡水供胚胎發育，分別追蹤記錄其受精率、孵化率及活存率，其結果分別如下列各表所示：

表 1 以高 pH 高 Ca 溶液在不同時間開始處理之鯉魚受精卵其受精率與孵化率之比較

	受精率(%)	孵化率(%)
A. 對照組	39.56	38.29
B. 受精後 5 分鐘組	42.43	47.78
C. 受精後 10 分鐘組	30.27	48.56
D. 受精後 15 分鐘組	43.82	37.19

表 2 以高 pH 高 Ca 溶液在不同時間開始處理之鯉魚 40 天內活存率之比較

活存率 組別 \ 天數	1天	10天	20天	30天	40天
A. 對照組	100	94	63	57	56
B. 受精後 5 分鐘組	100	95	48	48	46
C. 受精後 10 分鐘組	100	92	33	31	30
D. 受精後 15 分鐘組	100	33	0	0	0

由表 1 所見 A、B、C、D 4 組其受精率，以受精後 10 分鐘浸泡於高 pH 高 Ca 溶液中持續 20 分鐘之 C 組其受精率偏低，其它各組則其受精率多在 40% 左右相差不明顯。在孵化率上則各組平均值在 37~48% 之間，C 組之受精率不高，但其孵化率則較高。在活存率比較方面，受精後 15 分鐘放入溶液中處理 20 分鐘之 D 組其活存率相當低

，至 20 天後已全部死亡，其他 3 組其活存率分別為 56%，46%，30%，對照之 A 組比受精後 5 分鐘處理 20 分鐘之 B 組高，B 組又比 C 組高。

Flow cytometer 係利用流式細胞計算法分析測量細胞核內遺傳物質的含量。初步試驗結果 B 組 DNA 之中間數 (mean unit) 為 24.4，大約為其他 3 組 (A、B、C 及 D 組) 之 33，32.7，36 之 2/3。

因為此次測定的小鯉魚，尚未達到可抽足量血之體型 (1×10^6 個/尾)，所以比較效果不佳。今後使用 Flow cytometer 來測定，還是待一段時日長大一點後再進行為宜。

四、摘要

一般魚類多倍體誘發的方法，大致使用冷擊、熱擊、壓力震擊及秋水仙鹼處理、聚醯乙二醇處理等方法，除此之外，植物方面曾以高 pH 高 Ca 溶液來誘發多倍體之生成，此法是一種價格較低廉且方便，可在民間繁殖場上實地使用而較不受儀器、場地之限制的一種新方法，值得引進比較。

高 pH 高 Ca 溶液的配置是以 78g NaCl，2.8g KCl，111g CaCl_2 溶於 10ℓ 之蒸餾水中，並以 0.1N 之 NaOH 將其溶液酸鹼度調成高鹼度 (pH=10)。將鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 之受精卵，分別在受精 5，10，15 分鐘後置入高 pH 高 Ca 溶液，持續 20 分鐘，再移入正常水中孵化，愈遲開始之組受精率、孵化率及 40 天之活存率愈低，D 組 20 天後完全死亡。

綜上所述，魚類三倍體之誘發方法及使用 flow cytometer 為工具測定其多倍體，是為可行之道。