

# 冷冻对哺乳动物胚胎发育分子调控的影响

宁效斌<sup>1</sup>, 苏雷<sup>2,3\*</sup>

(1. 云南农业大学, 云南昆明 650201; 2. 热带/亚热带牛羊良种繁育生物工程国家地方联合工程研究中心, 云南昆明 650217; 3. 云南中科胚胎工程生物技术有限公司, 云南昆明 650217)

**摘要** 综述了几种与哺乳动物胚胎发育分子调控相关的重要蛋白质以及超低温冷冻保存在分子水平上对胚胎发育的影响。

**关键词** 哺乳动物; 冷冻; 胚胎发育; 分子调控

**中图分类号** S813.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)13-03926-04

## Effect of Cryopreservation on the Molecular Regulation of Mammalian Embryonic Development

NING Xiao-bin, SU Lei (Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201; National & Local United Engineering Research Center for Breeding and Reproduction of Tropical Subtropical Herbivore, Kunming, Yunnan 650217; Yunnan Zhongke Embryo Biotechnology Co. Ltd., Kunming, Yunnan 650217)

**Abstract** Several essential kinds of proteins related to the molecular regulation of mammalian embryonic development were reviewed, as well as effects of cryopreservation on embryonic development at the molecular level.

**Key words** Mammalian; Cryopreservation; Embryonic development; Molecular regulation

近年来,由于胚胎冷冻技术的不断进步,已成为一项成熟的胚胎工程技术,甚至克隆胚胎通过冷冻技术也获得了相应的后代<sup>[1]</sup>。尽管如此,胚胎冷冻的机理尚不十分清楚。除了冷冻保护剂的毒性、冷冻损伤、细胞内冰晶的形成等因素对胚胎产生影响外,冷冻本身可使胚胎内的一些固有结构、物质(如 mRNA)发生改变<sup>[2]</sup>,严重影响胚胎的存活率。冷冻/解冻后胚胎的基因表达分析可能是一种有效揭示这类胚胎早期发育分子机制的有效途径。

### 1 哺乳动物胚胎发育过程中相关的重要蛋白质

在哺乳动物早期胚胎发育过程中,细胞内物质的变化错综复杂。早期胚胎的发育是由卵母细胞中的一些因子来调控的,这些因子是在卵母细胞发育过程中合成和存储的。在胚胎基因组活性激活以前,胚胎的发育是由这些因子来调节的。胚胎形成后,基因组的转录和表达才被启动,胚胎的发育逐渐由自身合成的物质来调控。

**1.1 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase)** 目前,在哺乳动物中已发现 4 种 DNA 甲基转移酶(Dnmts),根据结构和功能的差异分为两大类:分别以 Dnmt1 和 Dnmt3 为代表。前者主要用于保持子代细胞与母细胞相同的 DNA 特异性甲基化模式,参与甲基化状态的维持,也是非 CpG 位点从头甲基化所必需的,并与甲基化状态的延伸有关;后者包括 Dnmt3a、Dnmt3b 以及 Dnmt3L 等,主要负责建立胚胎发育分化过程中的组织特异性甲基化模式,是主要的从头甲基化酶<sup>[3]</sup>。Dnmt 对早期胚胎的正常发育至关重要<sup>[4-5]</sup>。

在不同的序列类别中,哺乳动物的 DNA 甲基化对基因的转录活性是一种主要和关键的表现遗传调节机制(Epigenetic regulatory mechanism)。在小鼠的生殖细胞发育过程中,从头甲基化只在非常有限的时期发生,说明 Dnmt3a 和 Dnmt3b 在限制功能的表达有一定的机制作用<sup>[6]</sup>。分析 Dnmt3a

还能确定表观遗传重编程(Epigenetic reprogramming)的潜能差异<sup>[7]</sup>。Dnmt1 蛋白在胚胎发育时建立组织特异性甲基化模式方面发挥重要作用,在正常发育的胚胎中维持一种正确的 DNA 甲基化模式需要 Dnmt1 地正确表达和发育阶段特定的翻译后调节<sup>[8]</sup>。在绵羊的生发泡(Germinal vesicle, GV)期卵母细胞及早期胚胎发育过程中,GV 期卵母细胞中 Dnmt1 mRNA 含量最高,从 2-细胞胚胎开始直至囊胚,Dnmt1 基因的 mRNA 含量显著降低,Dnmt1 的含量在不同发育阶段的卵母细胞和胚胎中存在动态变化,这对卵子生长和胚胎发育具有重要意义<sup>[9]</sup>。

**1.2 缝隙连接蛋白(Connexins)** 此类蛋白是细胞间建立缝隙连接所必需的。在研究胚胎致密化的分子调控时发现,牛体内胚胎在桑椹胚期可检测到 connexin43(Cx43)的表达<sup>[10]</sup>,体外生产的牛胚胎有的不表达这类蛋白,导致胚胎不能致密化,无法形成桑椹胚<sup>[11]</sup>,从而降低胚胎潜能性。在绵羊卵母细胞和早期胚胎发育过程中,connexin26、connexin32、Connexin43 及 Connexin45 在各个时期均有表达,Cx43 在未成熟卵母细胞、体外成熟(IVM)卵母细胞、2-细胞中表达量较低,桑椹胚和囊胚期时达到最高;而 Cx45 在 8-细胞期表达量最高,未成熟卵母细胞、IVM 卵母细胞和 2-细胞期的表达量低于 8-细胞期,桑椹胚和囊胚期胚胎的表达量稍低于 8-细胞期;Cx43 和 Cx45 蛋白在体内受精胚胎中转录子的含量高于体外受精(IVF)胚胎<sup>[12]</sup>。Cx43 基因在水牛 IVM 卵母细胞中表达量最高,显著高于 IVF 2-细胞期胚胎、桑椹期胚胎、囊胚期胚胎<sup>[13]</sup>。

**1.3 上皮钙调素蛋白(Epithelial cadherin, E-cadherin)** 调节上皮细胞间粘连的重要蛋白,其功能的发挥需要 Ca<sup>2+</sup> 的参与。在研究胚胎致密化及细胞间连接的分子调控时发现, E-cadherin 是桑椹胚外层细胞或囊胚滋养层细胞间紧密连接复合体形成的主导因子,胚胎致密化或囊胚的形成主要依赖于此蛋白。如果这种蛋白质缺失或其功能达不到正常发挥,胚胎在桑椹胚或囊胚期的发育就会出现异常<sup>[14]</sup>,导致胚胎不能进入下一发育阶段。在水牛 IVM 卵母细胞及 IVF 早

**作者简介** 宁效斌(1985-),男,湖南邵东人,硕士研究生,研究方向:动物生殖生理与繁殖技术研究。\* 通讯作者,研究员,博士,从事动物生殖生物学和发育生物学研究。

**收稿日期** 2014-04-15

期胚胎发育过程中, E-cad 基因在各个时期中 mRNA 表达无显著差异<sup>[13]</sup>。

**1.4 紧密连接蛋白 (Tight junction protein)** 研究表明外层细胞间的紧密连接至少是由 5 种蛋白构成的复合体, 它们分别是 ZO-1、ZO-2、ZO-3、ZO-4、ZO-5 和 ZO-6。ZO-1 是构成细胞间连接的主要成分, 在小鼠和牛胚胎外层细胞的连接部位, 呈点状分布<sup>[14]</sup>。外层细胞的紧密连接在胚胎发育过程中具有重要功能: 调节相邻细胞间的物质运输; 维持外层细胞的极性; 维持 Na/K-ATP 酶的极性分布; 维持半透膜的稳定性, 防止过度膨胀<sup>[15]</sup>。

**1.5 干扰素- $\tau$  (Interferon $\tau$ , IFN- $\tau$ )** IFN- $\tau$  是一种孕体分泌蛋白, 在反刍动物的整个妊娠失败中早期胚胎死亡占有很大的比例, 它在很大程度上是由母体妊娠识别失败造成的。IFN- $\tau$  是由反刍动物孕体附植时发出的特有的妊娠识别信号, 是建立母体妊娠识别的一种主要因子。另外, IFN- $\tau$  在免疫方面也起着重要作用。

牛胚胎在体外生长发育过程中, IFN- $\tau$  在胚胎发育的各个时期均有表达, 除在未成熟卵母细胞中呈高表达外, 其余都呈低表达, 这与其维持黄体功能密切相关<sup>[16]</sup>。Rho G J 等也研究表明 IFN- $\tau$  在胚胎发育的各个时期均有表达<sup>[17]</sup>。然而, 也有研究表明 IFN- $\tau$  mRNA 在牛 IVF 第 4 天的 16-细胞胚胎期、体细胞核移植 (Somatic cell nuclear transfer, SC-NT) 第 5 天的桑椹期、孤雌激活 (Parthenogenetic activation, PA) 第 6 天的早期囊胚期首次表达<sup>[18]</sup>。

**1.6 热休克蛋白 (Heat shock proteins)** 哺乳动物中广泛存在一类热应激蛋白。当有机体暴露于高温时, 就会由热激发合成此种蛋白, 来保护有机体自身。许多热休克蛋白具有分子伴侣活性。按照蛋白的大小, 热休克蛋白共分为 5 类, 分别为 Hsp100、Hsp90、Hsp70、Hsp60 以及小分子热休克蛋白 (Small heat shock proteins, sHSPs)。

在牛胚胎体外生长发育过程中, Hsp70 在胚胎发育的各个时期均有表达, 但表达量稍低<sup>[16]</sup>。1999 年 C. WRENZYCKI 等在对牛体外胚胎进行培养时, 发现添加血清的培养液获得的早期胚胎比添加聚乙烯醇 (PVA) 的培养液获得的早期胚胎的潜能性更高, 差异显著, 同时, 在 2 个试验组中均发现 Hsp70 持续表达, 且添加血清的比添加 PVA 的试验组显著增加<sup>[19]</sup>, 表明 Hsp70 的表达量与体外生产的胚胎质量成正相关。Mishra A 等研究也发现 Hsp70 在胚胎发育的各个时期均有表达, 但在发育缓慢的胚胎中 Hsp70 的表达量较少, 8-16 细胞期后几乎不表达; 它与温度紧密相关, 随着温度的增加, Hsp70 mRNA 的表达量也相应提高, 说明 Hsp70 mRNA 的表达可能作为胚胎对温度敏感性的靶标<sup>[20]</sup>。

**1.7 葡萄糖转运蛋白 (Glucose transporters)** 此类蛋白与细胞代谢有关。2002 年 Knijn 等研究表明牛体内受精获得的囊胚期胚胎 Glut-1 表达量显著高于体外获得的囊胚期胚胎<sup>[21]</sup>。在牛胚胎体外生长发育过程中, Glut-1 基因一直持

续高表达, 这与体外培养的胚胎生长发育状况密切相关<sup>[16]</sup>。

Rajhans R 等研究也发现 Glut-1 在水牛体外生产胚胎发育的各个时期均有表达, 但在发育缓慢的胚胎中 Glut-1 的表达量较少, 8-16 细胞期后几乎不表达, 说明 Glut-1 的表达与胚胎发育阻滞密切相关<sup>[22]</sup>。2010 年 J. Zaraza 等研究表明 Glut-3 在 8-细胞、16-细胞时期表达水平低, 囊胚期表达量增加, 说明葡萄糖转运蛋白对囊胚期胚胎是非常必需的<sup>[23]</sup>。哺乳动物附植前胚胎能轻易地吸收及利用葡萄糖, 葡萄糖转运蛋白发挥了很大作用。另外, 有研究发现 Glut1、Glut3、Glut8 在胚胎发育早期各个时期均有表达, 而 Glut2 仅在囊胚期开始表达<sup>[24]</sup>。

**1.8 细胞凋亡相关蛋白** 细胞凋亡是细胞的一种基本生物学现象, 在多细胞生物去除不需要的或异常的细胞中起着必要的作用。细胞凋亡是个体发育过程中由一系列蛋白调控的细胞主动死亡过程。其中, bcl-2 家族、caspase 家族、p53 蛋白、survivin 蛋白都是重要的凋亡调节因子, 在细胞凋亡中相互联系, 相互作用, 从而调控细胞凋亡。

研究发现高浓度葡萄糖可诱导小鼠囊胚细胞凋亡相关基因 Caspase-3 的表达, 其表达在内细胞群尤其明显, 并伴有囊胚细胞数目明显减少, 从而证实高浓度葡萄糖对胚胎的毒性作用在胚胎着床前已经发生<sup>[25]</sup>。Bcl-2 基因通过阻止抑制细胞凋亡直接调控正常免疫器官的发育, 在淋巴细胞发育过程中 Bcl-2 是免疫细胞亚型选择的重要调节物<sup>[26]</sup>。在小鼠体内早期胚胎发育过程中, 随着胚胎细胞数目的增加, 凋亡比率逐渐增大; Bax 表达量在整个过程中基本不变, Bcl-2 表达量逐渐上调, Bak、Bcl-xl 的表达量逐渐降低<sup>[27]</sup>。2008 年 H. Y. Jang 等用牛输卵管上皮细胞 (BOEC) 与胚胎共培养时, 发现不管是共培养获得的早期胚胎还是单独培养得到的早期胚胎, 均检测到 Caspase-3 和 Bax 基因, 然而 p53 基因只在与 BOEC 共培养的胚胎中被检测到<sup>[28]</sup>。2006 年 Boon Chin Heng 等研究表明细胞凋亡而不是细胞坏死是降低冷冻/解冻后的人类胚胎干细胞 (hES) 生存能力的主要机制, 此 hES 是用传统冷冻法冷冻保存的<sup>[29]</sup>。

## 2 超低温冷冻对胚胎的分子调控研究现状

2007 年 Dhali 等采用微滴玻璃化冷冻法 (Droplet vitrification) 冷冻小鼠囊胚期胚胎时, 发现冷冻后的胚胎与鲜胚相比, Bax、Bcl-2 和 p53 3 个基因转录物相对量均下降, 同时冻胚的发育潜能性比鲜胚低, 表明此 3 种基因转录物与胚胎发育潜力有很大的联系<sup>[30]</sup>。然而, 2010 年 Kuzmany 等研究牛胚胎的冷冻时发现, 与冷冻前的胚胎相比, 冷冻后胚胎中的 Bax 及 Bcl-XL 转录物相对量均显著增加, 说明超低温冷冻对胚胎内细胞凋亡的相关基因转录物同样有影响<sup>[31]</sup>。2011 年 Anna Kuzmany 等也发现, 与体外培养获得的牛鲜胚相比, 冷冻后囊胚中的 Bax、Bcl-XL 基因表达显著上调 (Up-regulation), 结果表明冷冻后的胚胎已经开启 mRNA 合成, 为下一步胚胎发育做准备<sup>[32]</sup>。2012 年 Lisa Shaw 等研究超低温冷冻对人早期胚胎的基因表达时发现, 与鲜胚相比, 冷冻组的 4-细胞胚胎与囊胚 Bax 表达显著上调<sup>[33]</sup>。

2006 年 Sae Young Park 等用 2 种不同玻璃化冷冻法 (0.25 ml 麦管开放式拉管法和最小容积法) 对牛囊胚进行冷冻试验, 发现 survivin、Fas、caspase-3 及 Hsp70 的表达水平较非冷冻组显著增加, 表明冷冻程序可能导致胚胎损伤, 而引起 DNA 破裂且细胞凋亡相关基因转录物也随之增加, 最终降低了冷冻胚胎的发育潜能<sup>[34]</sup>。2010 年 Kuzmany 等研究也表明, 与冷冻前相比, 冷冻后扩张囊胚 (Re-expanded blastocysts) 中的 HSPA1A mRNA 显著增加<sup>[31]</sup>; 与牛 IVP 正常胚胎相比, 玻璃化法和传统冷冻法使孵化囊胚中的 HSP70 转录物的相对量受到明显影响, 揭示不同冷冻方法对牛孵化囊胚中的重要基因表达量具有很大影响<sup>[35]</sup>。2011 年 Stinshoff 等用传统冷冻法与玻璃化冷冻法对牛扩张囊胚期胚胎进行冷冻保存时, 发现用玻璃化法的 HSPA1A 与鲜胚组存在显著差异, 用传统冷冻法的 HSPA1A 与鲜胚组相比也存在显著差异, 而玻璃化法 (Vitrification) 比传统冷冻法 (Conventional slow freezing) 更适合于保存胚胎<sup>[36]</sup>。2011 年 Anna Kuzmany 等研究时发现, 与体外培养获得的牛囊胚期鲜胚相比, 冷冻后的囊胚中 Hsp 1A 的转录物显著地上调<sup>[32]</sup>。

与 IVP 的正常牛孵化囊胚相比, 用玻璃化法和传统冷冻法冷冻后的孵化囊胚中 GLUT-1 转录物的相对量受到明显影响, 用传统冷冻法冷冻后的孵化囊胚中的 GLUT-3 mRNA 量也受到显著影响, 结果表明冷冻处理过程本身及冷冻方法对牛孵化囊胚中的重要基因的表达有很大影响<sup>[35]</sup>。2011 年 Stinshoff 等发现用玻璃化法冷冻后的扩张囊胚中 Glut-1 表达丰度与鲜胚存在显著差异, 用传统冷冻法冷冻后的 Glut-1、Glut-3 与鲜胚组也存在显著差异, 揭示玻璃化法比传统冷冻法更适合于保存胚胎<sup>[36]</sup>。

在研究胚胎致密化及细胞间连接的分子调控时发现, 与 IVP 正常牛孵化囊胚相比, 用玻璃化法和传统冷冻法冷冻后的孵化囊胚中 ZO-1 转录物的相对量明显受到影响, 同时发育潜能也降低<sup>[35]</sup>。与正常鲜胚相比, 传统冷冻法冷冻后的孵化囊胚中 DNMT3a mRNA 量受到显著影响<sup>[35]</sup>。2011 年 Stinshoff 等发现用传统冷冻法冷冻后的胚胎中 DNMT3a mRNA 相对丰度与鲜胚组相比也存在显著差异<sup>[36]</sup>。对于干扰素的研究发现传统冷冻法冷冻后的牛孵化囊胚中的 IFN- $\tau$  mRNA 量受到显著影响<sup>[35]</sup>。2011 年 Stinshoff 等也发现用传统冷冻法冷冻后的牛胚胎 IFN- $\tau$  mRNA 量与鲜胚对照组存在显著差异, 此外玻璃化法与传统冷冻法相比 IFNT2 基因转录物也存在显著差异<sup>[36]</sup>。

### 3 小结

综上所述, 超低温冷冻保存对哺乳动物体外生产胚胎质量的影响在分子水平上清楚地得到反映。在胚胎冷冻过程中, 研究表明尽可能保证及维持早期胚胎基因组的正常表达, 冻融胚胎的潜能性就可以得到提高, 从而可以依此判断冷冻方法的可行性及高效性。从分子水平上来分析胚胎的质量, 可为拯救濒危动物和开发利用珍稀动物及解决基因克隆的低效率问题提供技术参考。随着分子检测技术的不断提高, 胚胎质量的鉴定也会更加方便准确, 胚胎冷冻损伤机

制也将得到进一步阐释。

### 参考文献

- [1] WILMUT I, SCHNIEKE A E, MCWHIR J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. Nature, 1997, 385: 810-813.
- [2] HA A N, LEE S R, JEON J S, et al. Development of a modified straw method for vitrification of *in vitro*-produced bovine blastocysts and various genes expression in between the methods[J]. Cryobiology, 2014, 68(1): 57-64.
- [3] GIRALDO A M, DECOURCY K, BALL S F, et al. Gene Expression of Dnmt1 Isoforms in Porcine Oocytes, Embryos, and Somatic Cells[J]. Cellular Reprogramming, 2013, 15(4): 309-321.
- [4] O'DOHERTY A M, O'SHEA L C, FAIR T. Bovine DNA methylation imprints are established in an oocyte size-specific manner, which are coordinated with the expression of the DNMT3 family proteins[J]. Biology of Reproduction, 2012, 86(3): 1-10.
- [5] DOBBS K B, RODRIGUEZ M, SUDANO M J, et al. Dynamics of DNA methylation during early development of the preimplantation bovine embryo[J]. PLoS One, 2013, 8(6): 1-10.
- [6] XU G L, BOURCHIS D, HSIEH C L, et al. Chromosome instability an immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene[J]. NATURE, 1999, 402(6758): 187-191.
- [7] OKANO M, BELL D W, HABER D A, et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian[J]. CELL, 1999, 99(3): 247-257.
- [8] CHUNG Y G, RATNAM S, CHAILLET J R, et al. Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression in cloned mouse embryos[J]. Biology Reproduction, 2003, 69(1): 146-153.
- [9] 侯敏, 林嘉鹏, 白洁, 等. 母源基因 Gd9、Zar1、Mater 和 Dnmt1 mRNA 在绵羊卵母细胞和早期胚胎中的表达[J]. 中国草食动物, 2010, 30(2): 5-10.
- [10] WRENZYCKI C, HERRMANN D, CARNWATH J W, et al. Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in ICM supplemented with BSA[J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1998, 112(2): 387-398.
- [11] NIEMANN H, WRENZYCKI C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions; implications for subsequent development[J]. Theriogenology, 2000, 53(1): 21-34.
- [12] 闫真. 间隙连接蛋白在绵羊早期胚胎中的表达和作用研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2009.
- [13] 黄时海, 孙洪亮, 康超, 等. 水牛体外培养早期胚胎中致密化相关基因 mRNA 的表达分析[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(6): 43-46.
- [14] 桑润滋. 动物繁殖生物技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [15] WATSON A J. The cell biology of blastocyst development[J]. Molecular Reproduction and Development, 1992, 33(4): 492-504.
- [16] 孙美玉, 陈静波, 毋状元, 等. 牛胚胎发育早期 MnSOD, Glut-1, Hsp70, IGF-II, IFN- $\tau$  基因表达差异的研究[J]. 草食家畜, 2011(1): 39-43.
- [17] RHO G J, KIM D S, SON W J, et al. Influence of *in vitro* oxygen concentrations on preimplantation embryo development, gene expression and production of Hanwoo calves following embryo transfer[J]. Mol Reprod Dev, 2007, 74(4): 486-496.
- [18] YAO N, WAN P C, HAO Z D, et al. Expression of interferon-tau mRNA in bovine embryos derived from different procedures[J]. Reproduction in Domestic Animals, 2009, 44(1): 132-139.
- [19] WRENZYCKI C, HERRMANN D, CARNWATH J W, et al. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA[J]. Molecular Reproduction and Development, 1999, 53(1): 8-18.
- [20] LI Q, HAN J, DU F, et al. Novel SNPs in HSP70A1A gene and the association of polymorphisms with thermo tolerance traits and tissue specific expression in Chinese Holstein cattle[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(1): 2657-2663.
- [21] KNIJN H M, WRENZYCKI C, HENDRIKSEN P J M, et al. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*[J]. Reproduction, 2002, 124(3): 365-375.
- [22] RAJHANS R, KUMAR G S, DUBEY P K, et al. Effect of timing of development on total cell number and expression profile of HSP-70.1 and GLUT-1 in buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes and preimplantation embryos produced *in vitro*[J]. Cell Biology International, 2010, 34(5): 463-

- 468.
- [23] ZARAZA J, OROPEZA A, VELAZQUEZ M A, et al. Developmental competence and mRNA expression of preimplantation *in vitro*-produced embryos from prepubertal and postpubertal cattle and their relationship with apoptosis after intraovarian administration of IGF-1[J]. *Theriogenology*, 2010, 74(1): 75-89.
- [24] AUGUSTIN R, POCAR P, NAVARRETE-SANTOS A, et al. Glucose transporter expression is developmentally regulated in *in vitro* derived bovine preimplantation embryos[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2001, 60(3): 370-376.
- [25] 尹芳, 张端莲, 熊彦娥, 等. 高糖诱导小鼠囊胚 Caspase-3 的表达及其意义[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2005, 14(5): 544-546.
- [26] 张书霞, 陈万芳, 于勇, 等. bcl-2 基因在成年和胚胎鸡免疫器官中的表达及其与细胞凋亡的关系[J]. *南京农业大学学报*, 1999, 22(4): 65-68.
- [27] 李威, 王连卿, 苏静艳, 等. 小鼠早期胚胎发育过程中细胞凋亡及凋亡基因表达的检测[J]. *细胞生物学杂志*, 2006, 28(4): 596-602.
- [28] JANG H Y, JUNG Y S, CHEONG H T, et al. Effects of cell status of bovine oviduct epithelial cell (BOEC) on the development of bovine IVM/IVF embryos and gene expression in the BOEC used or not used for the embryo culture[J]. *Asian-Aust J Anim Sci*, 2008, 21(7): 980-987.
- [29] HENG B C, YE C P, LIU H, et al. Loss of viability during freeze-thaw of intact and adherent human embryonic stem cells with conventional slow-cooling protocols is predominantly due to apoptosis rather than cellular necrosis[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2006, 13(3): 433-445.
- [30] DHALI A, ANCHAMPARUTHY V M, BUTLER S P, et al. Gene expression and development of mouse zygotes following droplet vitrification[J]. *Theriogenology*, 2007, 68(9): 1292-1298.
- [31] KUZMANY A, HAVLICEK V, WRENZYCKI C, et al. Effect of culture method on the mRNA expression before and after cryopreservation in bovine blastocysts[J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2010, 23(1): 143-144.
- [32] KUZMANY A, HAVLICEK V, WRENZYCKI C, et al. Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured under different conditions[J]. *Theriogenology*, 2011, 75(3): 482-494.
- [33] SHAW L, SNEDDON S F, BRISON D R, et al. Comparison of gene expression in fresh and frozen-thawed human preimplantation embryos[J]. *Reproduction*, 2012, 144(5): 569-582.
- [34] PARK S Y, KIM E Y, CUI X S, et al. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts[J]. *Zygote*, 2006, 14(2): 125-131.
- [35] STINSHOFF H, BRÜNING K, HANSTEDT A, et al. Effect of different cryopreservation methods on the quality of *in vitro*-produced bovine embryos[J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2010, 22(1): 217.
- [36] STINSHOFF H, WILKENING S, HANSTEDT A, et al. Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level[J]. *Theriogenology*, 2011, 76: 1433-1441.

(上接第 3898 页)

**3.3 药剂因素** 一是农药品种“多、杂、乱”, 农民缺乏正确的选择识别能力, 用药不对路, 影响防治效果。二是部分不法经销商以赢利为目的, 以次充好, 以假乱真, 销售假冒、伪劣农药。三是掌握不好农药正确的施药时期, 多数在幼虫大量为害后才施药防治, 错过低龄幼虫防治适期。四是市场上缺乏防治稻纵卷叶螟的长效药剂。锐劲特防治成本过高, 有机磷杀虫剂药效期短, 一般只有 5~7 d, 且对天敌杀伤力强。市场上缺乏长效、低毒、高效、低价位的专用药剂, 也是近年来稻纵卷叶螟重发的又一重要原因。

**3.4 栽培制度** 目前青阳县的水稻品种主要有传统的老品种系列、优质杂交稻系列、优质常规稻系列。栽培品种多元化, 特别是优质稻的大面积推广给稻纵卷叶螟提供了丰富嗜食的寄主。

另外, 近几年来, 早、中、晚、双晚稻等类型并存, 加上农民播种时间的随意性, 使水稻生育期参差不齐。在栽培方式上, 传统的大苗栽插仍继续保留, 塑料软盘抛栽已推广多年, 撒播直播已逐步推广等。在大田生产上从 5 月中旬开始到 8 月下旬, 几乎各个时段都有处于分蘖、孕穗、抽穗期的生长嫩绿、适宜稻纵卷叶螟取食的水稻, 从而有利于稻纵卷叶螟的发生。

#### 4 防治对策

**4.1 农业防治** ①清除杂草; ②选用抗虫品种; ③推广平衡施肥技术。

**4.2 生物防治** 青阳县稻纵卷叶螟天敌种类较多, 常见的

有稻螟赤眼蜂、螟蛉绒茧蜂、螟蛉瘤姬蜂等, 及捕食性天敌如稻田蜘蛛、青蛙等, 另外, 白僵菌的自然寄生率也较高。据试验苏云金杆菌(B·T)对卷叶螟的控制效果较好, 采用 8 000 IU/ $\mu$ l 的苏云金杆菌防治效果为 81.31%~91.68%<sup>[2]</sup>。大发生时可采用与毒死蜱、甲维盐配合的方式。

**4.3 物理防治** 推广频振式杀虫灯, 目前全县共安装诱虫灯 750 多盏。据 2008 年调查, 县灯诱区和非灯诱区, 稻纵卷叶螟为害率灯诱区比非灯诱区低 30%~40%。对天敌影响较小, 不污染环境, 生态效益和经济效益显著, 值得推广。

**4.4 化学防治** ①防治指标: 40~60 个虫苞/百丛。②防治时期: 2~3 龄幼虫高峰期。③药剂防治: 一是选用低毒、高效药剂。如选用毒死蜱、阿维菌素、甲维盐、丙溴磷、氯虫苯甲酰胺(康宽)等药剂。实践证明, 采用机动喷雾器弥雾施药, 不仅工效高, 而且效果好。防治该虫在 3 龄以前用药防效好, 3 龄期后对药剂的抗性增加, 防治时需要加大用药量。

#### 5 结语

要减轻和避免稻纵卷叶螟的猖獗为害, 除了加强测报, 密切注视迁入虫源, 健全农技推广体系, 搞好病虫手机信息平台 and 电视预报, 及时组织防治, 科学使用药剂外, 更重要的是要教育农民保护、利用天敌, 促进农田生态平衡稳定, 实现人与自然的和谐相处。

#### 参考文献

- [1] 丁锦华, 苏建亚. 农业昆虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 159-160.
- [2] 韦桥现, 廖世纯, 黎柳锋, 等. 5 种生物农药对稻纵卷叶螟的防治效果[J]. *南方农业学报*, 2011(8): 913-915.