

海产鱼类多倍体育种的研究

RESEARCH OF POLYPLOIDY BREEDING IN MARINE FISHES

尤 锋

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

鱼类多倍体育种 70, 80 年代以来得到了迅猛发展。80 年代后期 90 年代初更是在其实用化研究上取得较大成绩。其中海产鱼类研究成功的鱼种已有 10 余种, 鲮、川鲮、大菱鲆、牙鲆、黑鲷、真鲷、大西洋鲑等^[5, 14, 25, 28, 31], 像三倍体牙鲆等已生产实用化^[17]。在国内, 淡水鱼有关研究开展得较早也较广泛, 在鲤、草、鲢、鳙等多种主要经济鱼类上都均有成功的报道; 而针对海水鱼类的有关研究刚刚起步, 仅进行了黑鲷、牙鲆三倍体^[2, 3]和真鲷三、四倍体等的初步探讨, 至于将其应用于生产上仍尚有一定距离。本文仅就近年来国内

外有关海水鱼多倍体诱导和倍性鉴定方法、研究热点以及发展趋势进行介绍。

1 关于多倍体诱导方法的研究

多倍体是由于细胞内染色体加倍而形成的, 即通过抑制受精卵第二极体的放出产生三倍体或抑制第一次卵裂产生四倍体。目前被广泛采用的诱导方法有生

收稿日期: 1996 年 5 月 5 日

物、物理学和化学方法三大类。

1.1 生物学方法

生物学方法主要是通过杂交方法尤其是种间杂交获得异源多倍体。海水鱼中种间杂交获得异源多倍体的报道较少,而淡水鱼类的有关报道则很多,研究也较深入。用雌性草鱼($2n = 48$)与雄性三角鲂($2n = 48$) (即不同科、属、种的远缘)杂交获得子一代染色体数目为72的草鲂杂种三倍体,其中草鱼提供了二倍体数目的染色体(48),三角鲂提供了单倍体数目的染色体(24)^[6]。异育银鲫与兴国红鲤杂交获得的复合四倍体,通过细胞学方法证明其产生的原因是受精卵发生了两性融合。至于种间杂交所产生三倍体的机理,还有待于进一步探索。

1.2 物理学方法

物理学方法包括温度休克法、水静压法和高盐高碱法等。前两种方法较为常用且效果较好。相比之下高盐高碱法是近几年来才有人尝试的方法,是用高pH或高盐诱导产生多倍体,尚需完善。

1.2.1 温度休克法

又包括冷休克法(0~5℃)和热休克法(30℃左右)两种,即用略高于或略低于致死温度的冷或热休克来诱导三倍体或四倍体的方法。温度休克法中首先应确定的是否能成功地阻止第一次卵裂发生的处理时刻(处理开始时间,TA)、处理持续时间(D)和处理温度(T)这3个因素。我们曾就这三个因素在黑鲟三倍体诱导中的作用进行了单因子梯度试验,找出了各因素影响三倍体率和相对孵化率的关系及其适宜范围,依此进行正交试验并作方差分析,获得了三因素之最佳值,即最适诱导条件为TA:5m in、D:10~15m in、T:4~5℃(培育水温17~20℃),并发现3个因素在一定范围内影响黑鲟三倍体诱导的主次顺序为D、TA、T^[2]。处理温度也不宜过低或过高,考虑到孵化率的高低,最好选用其亚致死温度进行短期处理。不同鱼种的受精卵对温度休克敏感性也存在着明显的差异——处理时间的不同,可能与其遗传背景的不同有关。我们进行过的黑鲟和牙鲆三倍体诱导实验中,黑鲟的处理时间只需10~20m in就有明显效果,延长处理时间对导致孵化率呈明显下降趋势;而牙鲆处理时间一般则在45~60m in之间最佳,这与其他作者的结果是类似的^[18,29]。值得指出的是,同一种鱼不同的人用同样的方法诱导多倍体也可能得出不同的结果,这可能与卵子的成熟度、诱导工艺的差异、倍性鉴定方法的不同和鱼种地理种群的不同等因素有关。

一般来说,冷水性鱼类如鲑科鱼类应用热休克,而

温水性鱼类如鲤科和鲷科鱼类用冷休克效果较好,这可能是增加了刺激强度所致^[19]。但是最近的一些研究结果表明也不尽然,如鲤鱼用热休克同样也可以获得较高比例的三倍体,香鱼三倍体的诱导用冷、热休克法均可获得令人满意的结果^[13]。

1.2.2 水静压法

就是采用较高的水静压(65kg/cm²)来抑制第二极体的放出或第一次卵裂产生多倍体。这种方法诱导率高(一般在90~100%)、处理时间短(3~5m in),对受精卵损伤小、成活率高,因而受到许多学者的青睐^[23]。但是,该法需要专门的设备——水压机,成本较高,样本室容量又有限,处理卵数不多,所以不适于大规模生产。

1.3 化学方法

有些化学物质也可用来诱导受精卵产生三倍体或四倍体

1.3.1 秋水仙碱

其可以抑制细胞分裂中纺锤丝的形成,在植物多倍体诱导中被广泛采用,在动物中因容易形成在育种实践上没有价值的镶嵌体且使成活率较低而不常用。现在有些学者用秋水仙碱与种间杂交相结合来诱导异源多倍体。

1.3.2 细胞松弛素B

简称CB,能抑制肌动蛋白聚合成微丝,从而干扰活细胞分裂。不过用此法也大多产生镶嵌体。

诱导多倍体形成的其他药物还有麻醉剂(如N₂O, CHClF₂)和聚乙二醇等。如用上述麻醉剂处理大西洋鲑受精卵可诱导出较高比例的三倍体^[27]。需指出的是,化学药品一般较贵,且具有的毒性再加上所诱导的多倍体往往是镶嵌体,而较少被使用。

上述各类方法各有其利和弊,其中物理方法中的温度休克法简单便宜易操作,效果也好,因而最适于在生产中推广,当然水静压法的高诱导率和成活率也使得具有条件的研究者对其情有独钟。

2 倍性鉴定方法的研究

由于诱导率不能达到100%,且所形成的多倍体常常表现为嵌合体,因此需要进行染色体倍性的测定。测定的方法很多,可分为直接和间接两类方法。直接方法包括染色体计数法和DNA含量测定法等,间接方法则包括细胞测量、蛋白质电泳、生化分析和形态学检查等。

随着发育时期的不同,采用的鉴定方法也不同。对于卵裂至原肠胚期的受精卵只能用染色体制片直接计

数法测定;刚孵出的仔鱼则用红血球核体积或面积测量计算法测定较为合适;到了鱼苗期乃至成鱼期若不想杀死鱼可采用取血测量红血球体积、DNA含量测定、蛋白质电泳法或采用血、鳍细胞培养法直接进行染色体计数;若可杀死鱼则取其肾脏做染色体制片进行染色体计数或蛋白质电泳分析法来测定。

这些方法各有其特点,像染色体直接计数法准确、直接,但较费时;血红细胞体积或面积测量法省时、简单,在生产现场就可进行而广为人们采用,但缺乏准确性,亦不能测出嵌合体,往往需要直接法校正;DNA含量测定法是较为先进常用的方法,其测定快速准确,并能测出嵌合体,缺点是需特殊的仪器设备。因此,采用何种方法进行鉴定主要依赖于所测样本的发育时期、实验的要求和所具备的仪器设备条件。

3 多倍体育种研究的热点及发展趋势

多倍体育种研究的早期阶段主要侧重于三倍体诱导研究——诱导方法、最佳诱导效果的研究即如何获得大量的多倍体。到了80、90年代则转向了三倍体倍性效应的研究和四倍体诱导的研究,对于具有三倍体优势的鱼种又陆续开展了生产实用化的研究,另外,以此为基础学者们结合雌核发育、性转换技术还进行了更深入的研究以期获得更具优良品性的种苗。现就目前有关研究的热点和发展趋势介绍如下以供参考。

3.1 倍性效应的研究

人工诱导的多倍体是否如所预期的那样具有天然多倍体的诸多优良性状,对此许多学者从各方面对人工诱导的多倍体与正常二倍体之间的差异性进行了比较研究。

3.1.1 生活力和生长的比较

多数学者发现人工诱导的三倍体与二倍体的生活力没有太大的差别,如用热休克诱导鳙鱼获得的四倍体,其成活率及畸形率与二倍体的差异不明显^[11];类似的情况在牙鲆、鳊和川鲮中也有^[18, 28]。不过也有例外,象虹鳟、银大麻哈鱼等人工诱导三倍体的生活力就比二倍体的略差一些。有的时候人工诱导的三倍体可能导致种间杂种生活力的提高,如草鱼与花链三倍体杂种比其二倍体杂种更健壮,而二倍体杂种往往畸形^[21]。因此,种间三倍体杂种在鱼类养殖提高成活率上也许具有一定的价值。

三倍体鱼的早期生长可能比二倍体快,红鲤×镜鲤得到的三倍体孵出8个月内的体重比二倍体重2.6~2.63倍^[7];三倍体奥利亚罗非鱼14周时比二倍体鱼的个体大^[9]。但大多数研究者的结果是三倍体和二

倍体之间的早期生长无明显差异^[18-26]。还有极个别的例子表明,三倍体鱼的生长低于二倍体鱼的,如太平洋鲑在17个月时二倍体大于三倍体,且随着鱼的长大三倍体成活率减小^[32]。

3.1.2 性腺发育的研究

三倍体预期是不育的,许多实验也都证明了这一点。如诱发的尼罗罗非鱼三倍体雌、雄皆为不育^[15]。桂建芳(1995)^[12]对水晶彩鲫的人工三倍体减数分裂染色体配对过程进行了组织学观察,发现大多数是不能正常配对的。但是,许多人观察发现三倍体雄鱼的性腺能发育,尽管可能不排精。像黑鲷三倍体性腺也明显小于二倍体,即使2~4龄鱼能形成精子但其形态异常且浓度也低^[31]。对于三倍体雌鱼,多数学者认为其性腺不能发育,受抑制程度远较雄性的。当然,具有一或两套完整染色体的卵子可以发育^[4, 8],田畑就在牙鲆三倍体中发现了成熟且可育的雌、雄个体^[18]。

生产上培育鱼类三倍体主要是利用其不育的特性,因为三倍体鱼不需要消耗能量用于生殖腺的发育,而是将有关能量用于生长,避免了因性腺发育阶段和繁殖季节鱼肉质量下降而延误了上市时间或影响了商品价值,也避免了该阶段的生长停滞和死亡率的增高,缩短了养殖周期,减少了养殖成本,可养成大型个体,这一特性已在美国被用来提高鲍鱼的产量。日本长崎1987年^[17]培育的三倍体牙鲆明显比二倍体大;二龄鱼二倍体平均为670g,而三倍体平均为900g,三倍体是二倍体的1.4倍,成活率也高。三倍体香鱼早期生长与二倍体相比没有什么优势,但到了产卵期其生长速度明显较快^[19]。此外,还可以利用三倍体的不育性培育不育的群体以控制养殖密度,防止品种混杂等。

与三倍体不同,四倍体是可育的。目前如何大量诱导四倍体并培育至性成熟,尔后与正常二倍体杂交获得不育的三倍体,进行三倍体育种是许多学者正在致力研究的课题。

3.1.3 其他性状

人们对三倍体的鱼肉质量、含氧量、抗病性和感觉特性等性状进行了研究^[5, 13, 24],结果表明,三倍体虹鳟的鱼肉质量确实优于二倍体;三倍体大西洋鲑耐低氧,故可适于低氧环境养殖;在抗病力上三倍体香鱼与二倍体无明显差异;三倍体香鱼对声音和光线的感受能力比二倍体香鱼略显迟钝,故可适于在噪音较大的环境中放养。

总之,对某些经济品种来说其三倍体较之二倍体还是具有其较好性状的。

3.2 不育性的研究

鱼类性成熟会使其商品价值带来影响,如鲑、鳟鱼类性成熟时不仅死亡率提高,生长率降低而且肉质和外观都很差。诱导不育的鱼可以避免这些弊病,并把本来用于性腺发育的能量直接用于鱼类的生长,提高饵料转化系数从而提高产量。由前所述三倍体预期是不育的,但经实验观察雌性三倍体一般不育,可雄性三倍体的性腺一般照常发育,甚至产生精子并伴随第二性征出现使其生长也同样停滞,所以单纯诱导三倍体不能彻底解决不育的问题,需要结合雌核发育性转换技术诱导全雌三倍体,才能达到完全的不育性,即以甲基睾丸酮等雌性激素诱导由雌核发育获得的全雌二倍体鱼产生伪雄鱼(即雄性化雌鱼,性染色体为XX),然后与普通雌鱼交配得到受精卵,再通过三倍体诱导培育而成。许多学者目前正在开展这项研究,已报道成功且实用化生产的鱼有虹鳟、马苏大麻哈鱼^[13,14,16]等,牙鲆也有有关报道^[23]。

3.3 用四倍体进行多倍体育种

多倍体目前直接应用的对象是三倍体鱼,而三倍体需每次进行人工诱导既繁琐又并非100%有效,因此限制了三倍体诱导在生产上的大规模应用。如果能获得可育的四倍体再与正常二倍体杂交则可大量生产三倍体即进行三倍体育种。另外,从四倍体还可获得四倍体(自交)、更高倍数体(加倍处理)以及结合雌核发育、雄核发育技术得到雌核或雄核发育二倍体(精子或卵子失活,受精卵不加倍处理)。可见通过四倍体的简单方式可以将各种染色体操作联系在一起,是一个很有潜力的研究方法。因此,近几年来,人们越来越重视对四倍体鱼诱导研究,报道日益增多,但由于技术要求高,成功者尚少^[22]。另外,有的学者发现四倍体诱导实验中,尽管在胚胎阶段测有大量四倍体存在,但鱼种阶段的试验鱼则无四倍体存在^[10],是四倍体孵化率低,还是其他原因需要学者们继续研究。

3.4 人工诱导多倍体的理论研究

在进行多倍体生产应用研究的同时,许多学者也开始对多倍体产生的过程和性腺发育进行组织学观察,以期阐明多倍体产生的机制和性腺不育的组织学依据,而为提高多倍体诱导率提供理论基础和方法学指导^[1,4,6,12]。

多倍体育种技术由于方法简便、见效快而具有潜在的理论和应用价值,国内外有关研究日趋深入和广泛,由此也许会产生更新更高的多倍体。但是在进行多倍体育种研究中还存在一些难点亟待解决:(1)处理时刻的确定。这主要体现在四倍体诱导时,第一次卵裂抑制时刻的确定,只有这一关键技术得到突破,才能使三

倍体或多倍体育种成为可能。(2)诱导率的提高。如何采用较简便而实用的诱导方法,象温度休克法来获得高的诱导率和诱导量,即如何同时大量地均匀高效地处理受精卵。同时如何保持多倍体成活率和孵化率也是需要亟待解决的问题。(3)准确可靠的倍性鉴定方法的确定。前面述及的倍性鉴定方法有许多种,其各有利弊,所以需要在此基础上探寻出一种既准确可靠又简便可行的鉴定方法。

上述难点的存在直接影响了海水鱼多倍体育种技术在生产上的大规模应用。因此,需要水产工作者更加努力地研究和开拓,为极早地填补我国海水鱼多倍体实用化研究的空白,为能培育出更具优良品性的新鱼种做出贡献。

参考文献

- [1] 丁军等,1992.水生生物学报 16(2):186~187.
- [2] 尤锋,1993.海洋与湖沼 24(3):248~255.
- [3] 尤锋等,1995.海洋与湖沼 26(5)增刊:115~118.
- [4] 叶玉珍等,1994.水生生物学报 18(1):17~21.
- [5] 孙振兴等,1993.国外水产 2:1~5.
- [6] 刘思阳,1987.水生生物学报 11(1):52~58.
- [7] 吴清江等,1979.水生生物集刊 6(4):445~452.
- [8] 吴清江等,1986.水生生物学报 10(3):265~270.
- [9] 吴仲庆,1991.水产生物遗传育种学.厦门大学出版社,144~151.
- [10] 张四明,1992.国外水产 3:25~28.
- [11] 洪云汉,1990.动物学报 36(1):70~75.
- [12] 桂建芳等,1995.水生生物学报 19(3):223~226.
- [13] 常建波等,1995.国外水产 2:1~5.
- [14] 山本荣一等,1990(周宽典译,1992).养鱼世界 123~132.
- [15] 上野一,1986(张淑梅译,1987).水产科技情报 6:24~26.
- [16] 小林,1990.养殖(日)27(12):134~137.
- [17] 长崎县水产试验场,1987.养殖(日)24(8):130.
- [18] 田烟和男等,1989.水产增殖 36(4):267~276.
- [19] 谷口顺彦,1986.水产の研究 5(5):86~90.
- [20] 稻田善和等,1992.水产增殖 40(1):99~104.
- [21] Beck, et al., 1983. *Trans of the Amer. Fish Soc.* 112(6):808-811.
- [22] Don, J., et al., 1988. *J. Fish Biol* 32: 665-672.
- [23] Flajshans, M., et al., 1993. *Aquac.* 113: 301-312.
- [24] Graham, M. S., et al., 1985. *Aquac.* 50: 133-139.
- [25] Ihssen, O. W., et al., 1990. *Trans of the Amer. Fish Sci.* 119: 698-717.
- [26] Johnstone, R., et al., 1986. *Aquac.* 55: 145-148.

- [27] Johnstone, R. , *et al.* , 1989. *Aquac.* 78: 229-236.
- [28] Purdom , C. E. , 1972. *Heredity* 29: 11-24.
- [29] Sugama, K. , *et al.* , 1988. *Rep. Usa. Mar. Biol. Inst. Kochi Univ.* 10: 75-81.
- [30] Sugama, K. , *et al.* , 1992. *Aquaculture and Fisheries Management* 23: 149-159.
- [31] Thorgaard, G. H. , 1986. *Aquac.* 57: 57-64.
- [32] Utter, F. M. , *et al.* , 1983. *Aquac.* 35: 125-135.
- [33] Yamazaki, F. , 1983. *Aquac.* 33: 329-354.