

鱼类染色体组工程及其应用

张 四 明

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 沙市)

鱼类具有产卵量大、体外受精的特点, 是进行染色体组工程 (Genome Engineering) 研究的理想材料。运用染色体组工程技术可诱导鱼类的雌核发育 (Gynogenesis)、雄核发育 (Androgenesis) 和多倍体 (Polyploid)。雌核发育、雄核发育不仅可以用于建立近交系、生物学基础理论研究, 而且还可以用于鱼类的单性养殖。多倍体在提高鱼类的生长率、成活率、抗病力以及种群控制等方面具有很大潜力。

配子染色体组失活

鱼类染色体组工程必须掌握两方面技术, 即配子(精子和卵子)染色体组失活和受精卵染色体组加倍。雌核发育、雄核发育要掌握这两方面的技术, 多倍体诱导只掌握染色体组加倍技术即可。

自 Hertwing 于 1911 年以蛙为试验材料首次发现 γ 射线具有使精子遗传物质失活而又保持其受精能力的特性以来, 雌核发育研究有了很大进展。目前, 在鱼类雌核发育诱导中使精子失活除了用 γ 射线外^[9,15,25,30], 还有 X 射线、紫外线^[9,20,26,33,35,36] 和化学药物。 γ 射线和 X 射线具有良好的穿透力。紫外线的穿透力不及 γ 射线和 X 射线, 但处理稀薄的精液效果也很好, 此外, 紫外线比 γ 射线和 X 射线价廉, 操作起来更方便、安全, 被许多研究者采用。化学药物如甲苯胺兰 (Toluidine blue)、乙烯脲 (Ethyleneurea) 以及二甲基硫酸盐 (Dimethylsulfata) 也有使精子失活的功能, 但使用较少。

比较而言, 雄核发育研究比雌核发育研究要少得多。两栖类由于其卵膜透明, 大多采用紫外线辐射卵子, 已有用紫外线破坏卵子遗传

物质成功地诱导出爪蟾 (*Xenopus laevis*)^[21] 和蝾螈 (*Ambystoma mexicanum*)^[21] 雄核发育二倍体的报道。在鱼类方面,采用的使卵子失活物质大多是 γ 射线,前期工作大多只得到雄核发育单倍体,如雄核发育单倍体泥鳅 (*Misgurnus fossilis*) 和鲈 (*Pleuronectes platessa*)。近期 Parson 和 Thorgaard (1984, 1985) 用 γ 射线辐射卵子与正常精子受精获得了虹鳟 (*Salmo gairdneri*) 雄核发育单倍体胚胎^[27], 随后用压力为 9000 PSi (磅/平方英寸) 静水压处理卵子 1—3 分钟抑制卵子第一次有丝分裂诱导出了虹鳟雄核发育二倍体^[28]。在卵子的辐射处理过程中,各种射线都会不同程度地损伤卵子细胞质遗传物质(如线粒体 DNA、mRNA)及其本身的结构,紫外线比 γ 射线穿透力小些,因而具有对细胞质遗传物质及其结构损伤较小的优点^[26]。

物理因素有时也有使卵子染色体组失活的作用。Gervai 等^[29] 在鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 三倍体诱导过程中,在卵子受精后短时间的冷休克,发现有大量的雄核发育单倍体出现^[27]。

染色体组加倍方法

失活配子与正常配子结合得到的是单倍体 (Haploid) 胚胎,单倍体通常在孵化过程中夭折。因此必须进行染色体组加倍。多倍体诱导也必须掌握染色体组加倍方法,其加倍方法与雌核发育、雄核发育单倍体加倍方法相同。常用染色体组加倍方法有温度休克法、静水压法和化学药物法。

温度休克有热休克和冷休克之分。冷水性鱼类用热休克为好。实验证明,用冷休克诱导虹鳟、鲑 (*Salmo salar*) 雌核发育和多倍体几乎完全不成功^[30]。但热休克诱导虹鳟^[29] 和褐鳟 (*Salmo trutta*)^[11] 多倍体效果很好。温水性鱼类热冷休克都能使染色体组加倍,在鲤鱼雌核发育诱导过程中,无论是热休克^[20] 还是冷休克^[2,29] 都诱导了雌核发育鲤鱼。用热休克^[6] 和冷休克^[3] 诱导草鱼♀ × 团头鲂♂ (*Ctenopharyngodon idella* × *Megabrama amblycephala*)

(简称草团) 异源四倍体 (Allotetraploid), 其四倍化比例最高分别为 73.9% 和 33.3%, 热休克对多倍体诱导似乎比冷休克更有效。Bidwell 等^[14] 用 41℃ 水温处理斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 的受精卵 3 分钟,阻止卵子第一次卵裂,四倍体出现比例为 62%^[14]。陈敏容等^[7] 在白鲫 × 红鲤异源四倍体鱼诱导中发现冷休克成活率高,畸形率低,热休克四倍化比例高。胚胎染色体 4n 出现率与最终得到四倍体鱼这两者之间关系复杂,还待于进一步摸索^[7]。

静水压处理法需有专门设备,一次处理卵子数量有限,但它可能对卵子损伤更小。Gillespie 和 Armstrong^[13] 发现用静水压诱导三倍体蝾螈成活率比热休克诱导三倍体蝾螈成活率要高些^[18]。Chourrou^[15] 采用静水压法阻止卵子第二极体放出,诱导了虹鳟的雌核发育个体和三倍体;抑制卵子第一次有丝分裂,诱导了虹鳟四倍体和纯合雌核发育二倍体胚胎^[15]。Myers^[24] 用静水压法与冷休克相结合方法诱导了罗非鱼属的同源和异源四倍体^[24]。Naruse 等^[25] 用静水压抑制青鳉 (*Oryzias latipes*) 卵子第一次有丝分裂诱导了纯合雌核发育个体^[26]。桂建芳等^[8] 采用压力为 600—650 公斤/平方厘米的静水压,在水晶彩鲫卵子受精后 4—5 分钟处理 3 分钟,其三倍体比例为 100%。并指出静水压法条件容易掌握,处理也标准化,是用于鱼类染色体组操作的有效方法^[2]。

此外,物理机械刺激也能使染色体组加倍。刘汉勤等^[4] 用细胞核移植技术挑去大鳞副泥鳅♀ × 泥鳅♂ 杂种受精卵的雌核。得到泥鳅雄核发育单倍体胚胎,将这种雄核发育单倍体胚胎的囊胚细胞移入到大鳞副泥鳅去核卵内,经鉴定有 29.6% 的核移植体在操作过程中由于机械刺激发生了染色体加倍,形成了雄核发育二倍体^[4]。

化学药物也能使染色体组加倍。吴清江等^[9] 把失活精子与正常卵子受精后,在 2 细胞期用 25ppm 的秋水仙碱 (Colchicine) 处理,得到 31.6% 雌核发育鲤鱼^[9]。Refestie^[31] 用细胞松弛素 B (Cytochalasin B) 诱导了虹鳟四倍

体^[21]。

值得一提的是：鱼类有性杂交也能使染色体组加倍。刘思阳和李素文^[23]通过对草鱼♀×三角鲂♂ (*Ctenopharyngodon idella* × *Megalobrama terminalis*) 有性杂种的红细胞(核)大小和DNA含量分析,证实为三倍体^[23]。Stanly^[24]用散鳞镜鲤作母本,草鱼作父本进行杂交不仅产生了雌核发育和雄核发育二倍体,而且还出现了一定比例多倍体^[24]。我国用兴国红鲤作母本,草鱼作父本杂交也出现了鲤草四倍体杂种。有关鱼类有性杂交使染色体组加倍机制至今还不清楚。

染色体组加倍类型

在自然情况下,处于第二次减数分裂中期卵子排出体外与精子受精后,卵子随即排出第二极体。受精卵经过一系列胚胎发育后,可产生出具有双亲遗传性状的二倍体(见图1A)

失活精子与正常卵子受精,采用前述理化方法阻止卵子第二极体放出,形成雌核发育二倍体。这种雌核发育又叫极体雌核发育(Polar body gynogenesis)(见图1B)。大多数雌核发育鱼是通过此方式获得的。Streisinger等^[25], Chourrout^[15]和Naruse等^[26]采用阻止卵子第一次有丝分裂方法分别诱导了斑马鱼(*Brachyanio rerio*)^[25]、虹鳟^[15]和青鳉^[26]雌核发育纯合二倍体。这种雌核发育方式又叫有丝分裂雌核发育(Mitotic gynogenesis)(见图1C)。此外,鱼类雌核发育还有一条可能途径,即抑制卵子第一次减数分裂,防止早期减数分裂的染色体交换,这样就不会出现分离现象,这对优良杂种性状保存很有好处。由于第一次减数分裂发生在鱼体内,可望借助卵细胞体外培养技术找到出路。

失活卵子与正常精子受精,抑制卵子第一次有丝分裂,形成雄核发育二倍体(见图1D)。

正常精卵受精后,抑制卵子第二极体放出可诱导出三倍体(见图1E)。阻止卵子第一次有丝分裂可以诱导出四倍体(见图1F)。

在植物育种上,已经采用四倍体×二倍体

方式大量生产三倍体。在鱼类上,以前曾是一种设想,近期研究证实是可行的。Chourrout等^[15]用人工诱导的虹鳟四倍体×二倍体产生出了三倍体后代,并预期了四倍体可自繁出四倍体^[16], Blanc等^[13]进一步进行了虹鳟四倍体×二倍体产生出三倍体与人工诱导三倍体生长性能试验,发现两者并无差异^[13]。这些充分显示了四倍体鱼应用的广阔前景。

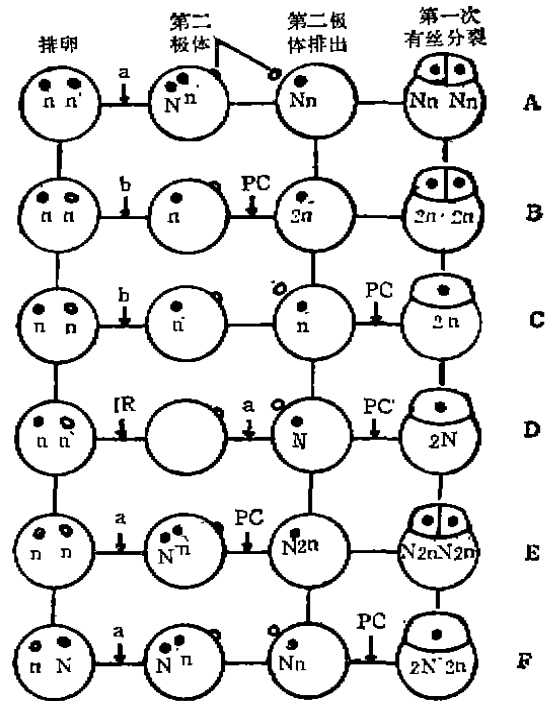


图1 染色体组加倍示意图

a. 正常精子 b. 失活精子 n. 母体染色体组 N. 父本染色体组 IR. 辐射处理 PC. 理化处理 A. 正常二倍体 B. 极体雌核发育 C. 有丝分裂雌核发育 D. 雄核发育 E. 三倍体 F. 四倍体

应用

(一) 建立近交系 Nagy等(1978)通过对雌核发育鲤鱼铁传递蛋白的研究指出:一代雌核发育(指极体雌核发育)的基因纯合程度相当于12代同胞兄妹相交配结果^[27]。一般连续两次极体雌核发育后便可建立近交系^[9]。有丝分裂雌核发育和雄核发育二倍化染色体是由单倍染色体复制而来,各基因位点完全纯合,故一代便可建立近交系^[28]。所以雌核发育、雄核发

育是一种培育鱼类近交系的有效途径。近交系对鱼类杂交育种,品种纯化,遗传学理论研究均很有用。

(二) 基因定位、突变体分离 极体雌核发育是通过抑制卵子第二极体放出制作的。但卵子在第一次减数分裂时便已发生了染色体交换,这样雌核发育后代便有一定杂合体 (Heterozygosity) 出现,从雌核发育后代杂合体与纯合体出现频率,可以推算出交换频率,交换频率又与基因和染色体着丝粒位置相关联。因而交换频率就可以用于绘制基因在染色体上相对位置图。此外,从雌核发育后代杂合体的百分比与相应的基因——着丝粒位置,可以估计待测基因是否存在连锁。

在绝大多数的种群中,隐性性状的表现频率相当于这一隐性基因的平方,而雌核发育、雄核发育后代隐性性状的表现频率相当于群体中这一基因的频率。这样一些隐性突变体便很快分离出,一些致死隐性基因则在此过程中被自然选择淘汰。

(三) 性别控制,单性养殖 性决定为 xy 型鱼类,雌核发育后代全部为雌鱼,可以用于一些雌性生长快鱼类(如鲤、鲫、草鱼等)单性养殖,提高鱼产量。还可以用于一些卵子名贵的鱼类(如鲑、鳟科鱼类)全雌养殖。同样性决定机制鱼类,雄核发育后裔将会有一半雌鱼 (xx),一半雄鱼 (yy)。子代雄鱼毋需鉴定便可断定是 yy 鱼,yy 鱼又叫超雄鱼,用它与正常雌鱼 (xx) 交配可产生全雄后代。已知罗非鱼雄性生长比雌性快。已有许多采用激素生产全雄罗非鱼的报道^[21]。此方法工作量大,且激素药物生产的鱼是否对人体产生副作用值得怀疑。用雄核发育技术生产全雄鱼可克服上述弊端。

多倍体最终应用于生产实践的是三倍体,三倍体大多是不育的^[17,22,36]。不育三倍体可以用于那些需控制的种群。

(四) 提高鱼类生长率,延长鱼类生长期 三倍体鱼生长速度种间差别大,且不同生长阶段也有差异。大多数鱼的三倍体比二倍体生长

快些。如草团^[3]、锦鲤^[36]、兰罗非鱼 (*Tilapia aurea*)^[40] 斑点叉尾鲷^[41]等,也有两者生长速度相似的情况^[27]。还有一种观点是:三倍体鱼早期生长不良,性成熟后比二倍体生长快,如虹鳟^[37]。

三倍体能提高鱼类食用价值。Wolter 等 (1982)发现雄性三倍体斑点叉尾鲷的头比二倍体雄鱼要大^[41]。减少了加工过程中的浪费。有些三倍体鱼性腺发育不良,体积较小,可以增加鱼体的相对含肉率。对于一些产卵后大量死亡鱼类,如香鱼、鲑、鳟。三倍体技术可有效地防止其死亡,提高鱼产品的商品价值。日本用染色体组工程技术生产的三倍体香鱼,克服了产卵后香鱼死亡和肉质变差的问题,可以跨年度生长,因而个体更大,且可全年上市^[40]。

鉴于有些鱼类雌性生长比雄性生长快。如何把三倍体优点和雌鱼生长特点有机地结合在一起。已有人进行了尝试,即预先把雌鱼转化为生理性雄鱼(假雄鱼),然后用这种生理性雄鱼作父本诱导三倍体,这样得到的三倍体全部是雌鱼^[23]。可望能产生出生长更快的品种。

(五) 提高鱼类成活率和抗病力 异源多倍体 (Allopolyploid) 的遗传构成是由亲缘关系不同的父母双方提供的,这样有可能把父母双方的优良性状集合在一个优良杂种内。Parson 等 (1986) 诱导的虹鳟×银大马哈鱼的异源三倍体 (Allotriploid) 比虹鳟低抗传染性造血器官坏死病毒 (Infection hematopoietic necrosis virus) 能力强些,且早期阶段苗种成活率比二倍体高。Sheerer 和 Thorgaard (1987) 诱导的三倍体虎鳟 (*Salmo trutta* × *Salvelinus fontinalis*) 在摄食阶段成活率比相应二倍体成活率高些。分别为 34% 和 5%。

(六) 性决定机制判别及其它 由于鱼类染色体多且小,难以从染色体水平区分是 XY 还是 ZW 型性决定机制。运用雌核发育、雄核发育方法可以将其区分开。例如,雌核发育后代全为雌鱼,则说明该鱼属 XY 型,一半雌鱼一半雄鱼便是 ZW 型。

在鱼类配子冷冻保存技术方面,精子保存

技术基本掌握, 卵子和胚胎保存技术还没有获得成功^[54]。鉴于此因, 把鱼类精子保存起来, 要用时取出进行雄核发育, 可以挽救那些濒于灭绝的鱼类。

雌核发育的一种新的可能用途是精子不完全失活或发生父性残留遗传物时作为一种基因转移技术^[55]。

雄核发育另一种可能用途是检测线粒体基因型对遗传性能的影响^[5]。动物线粒体 DNA 是母性遗传的^[53]。在核基因组失活了的雄核发育个体中, 很可能也是如此。所以采用雄核发育可以比较核基因型相同而线粒体基因型不同鱼的遗传性能。

参 考 文 献

- [1] 于豪建等 1986 爪蟾的细胞质对白化突变型细胞核功能的作用 科学通报 31(2): 160.
- [2] —— 1986 抑制第一次卵裂产生爪蟾的孤雄生殖二倍体成体和四倍体 科学通报 31(2): 160.
- [3] 中国科学院水生生物研究所二室多倍体小组等 1979 草鱼、团草人工诱导多倍体的研究 遗传学报 6(1): 77.
- [4] 刘汉勤等 1987 泥鳅雄核发育纯合二倍体的产生 水生生物学报 11(3): 241—245.
- [5] 刘思阳等 1987 三倍体草鱼杂种及其双亲红细胞(核)大小和 DNA 含量 遗传学报 14(2): 142—148.
- [6] 张兴忠等 1986 热休克诱导草鱼♀×团头鲂♂异源四倍体研究 第一届全国农业生物技术学术讨论会论文摘要汇编 132—133.
- [7] 陈敏容等 1987 人工诱导白鲫(♀)×红鲤(♂)异源四倍体鱼的初步研究 水生生物学报 11(1): 96—98.
- [8] 杜建芳等 1987 鱼类染色体组操作的研究 II. 静水压休克产生三倍体水层彩鲫 湖北省遗传学会第四次学术讨论会论文摘要汇编 第 126 页.
- [9] 吴清江等 1981 鲤鱼人工雌核发育及其作为建立近交系新途径的研究 遗传学报 8(1): 50—55.
- [10] 殷禄阁译 1986 日本利用生物工程培育出三倍体大型香鱼 水产科技情报 3: 29.
- [11] Arai, K. and N. P. Wilkins, 1987, Triploidization of brown trout (*Salmo trutta*) by heat shocks. *Aquaculture*, 64: 97—107.
- [12] Avise, J. C. and R. A. Lansman, 1983, Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals. In: M. Nei and R. K. Koehn (Editors), *Evolution of Genes and Proteins*, Sinauer Associates, Sunderland, MA, 147—164.
- [13] Blanc, J.-M. et al., 1987, Evolution of juvenile rainbow trout survival and growth in half-sib families from diploid and tetraploid series. *Aquaculture*, 65: 215—220.
- [14] Bidwell, C. A. et al., 1985, Polyploid induced by heat shock in channel catfish. *Aquaculture*, 51: 25—32.
- [15] Chourrou, D., 1984, Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: production of all-triploid, all-tetraploid, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture*, 37: 111—120.
- [16] Chourrou, D. et al., 1986, Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid male and diploid female parent of tetraploid fish. *Theor. Appl. Genet.*, 72(2): 193—206.
- [17] Gervat, J. et al., 1980, Induced triploid in carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish. Biol.*, 17: 667—671.
- [18] Gillespie, L. L. and J. B. Armstrong, 1979, Induction of triploid and gynogenetic diploid axolotls (*Ambystoma mexicanum*) by hydrostatic pressure. *J. Exp. Zool.*, 210: 117—122.
- [19] Gillespie, L. L. and J. B. Armstrong, 1980, Production of androgenetic diploid axolotls by suppression of first cleavage. *J. Exp. Zool.*, 213: 423—425.
- [20] Hollebecq, M. C. et al., 1986, Diploid gynogenesis induced by heat shocks after activation with UV-irradiated sperm in common carp. *Aquaculture*, 59: 69—79.
- [21] Hunter, G. A. and E. M. Donaldson, 1983, Hormonal sex control and its application to fish control. In: W. S. Hoar, et al. (Editors), *Fish Physiology*, 9B Academic press, New York, 223—303.
- [22] Johnson, D. W., 1986, Comparative growth and development of diploid and triploid coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture*, 57: 329—336.
- [23] Liocoln, R. F. and Scott, A. P., 1983, Production of all-female triploid rainbow trout. *Aquaculture*, 30: 375—380.
- [24] Myers, J. M., 1986, Tetraploid induction in *Oreochromis* spp. *Aquaculture*, 57: 281—287.
- [25] Nagy, A. et al., 1976, Investigation on carp, *Cyprinus carpio* L. gynogenesis. *J. Fish Biol.*, 13: 215—224.
- [26] Naruse, K. et al., 1985, The production of cloned fish in the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.*, 236: 335—341.
- [27] Parson, J. E. and G. H. Thorgaard, 1984, Induced androgenesis in rainbow trout. *J. Exp. Zool.*, 231: 407—412.
- [28] Parson, J. E. and G. H. Thorgaard, 1985, Production of androgenetic diploid rainbow trout. *J. Hered.*, 76: 177—181.
- [29] Parson, J. E. et al., 1986, Increased resistance of triploid rainbow trout coho salmon hybrids to infectious hematopoietic necrosis virus. *Aquaculture*, 57: 177—181.
- [30] Purdom, C. E., 1983, Genetic engineering by the manipulation of chromosome. *Aquaculture*, 33(1—4): 287—300.
- [31] Refestie, T., 1981, Tetraploid rainbow trout produced by Cytochalasin B. *Aquaculture*, 25: 51—58.
- [32] Sheerer, P. D. and G. H. Thorgaard, 1987, Perfor-

- mance and developmental stability of triploid tiger trout (brown troutxbrook trout). *Trans. Am. Fish. Soc.*, **116**(1): 10—16.
- [33] Stanley, J. G., 1976, Production of hybrid androgenetic and gynogenetic grass carp and carp. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **105**, 10—16.
- [34] Stoss, T., 1983, Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: W. S. Hoar, et al., (Editors), *Fish physiology*, **9B**. Academic press, New York, 305—350.
- [35] Streisinger, G. et al., 1981, Production of clons of homozygous diploid zerk fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* (London), **291**: 293—296.
- [36] Taniguchi, N. et al., 1986, Color, growth and maturation in ploid-manipulated fancy carp. *Aquaculture*, **57**: 321—328.
- [37] Thorgaard, G. H., 1983, Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: W. S. Hoar, et al., (Editors) *Fish Physiology*, **9B**. Academic Press, New York, 405—434.
- [38] ———— 1985, Unidirectional paternal inheritance in gynogenetic rainbow trout: implications for gene transfer. *Theor. Appl. Genet.*, **71**: 119—121.
- [39] ———— 1986, Ploidy manipulation and performance. *Aquaculture*, **57**: 57—64.
- [40] Valenti, R. J., 1975, Induced polyploid in *Tilapia aurca* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. *J. Fish Biol.*, **7**: 519—528.
- [41] Wolter, W. E., 1982, Effect of triploid on growth and gonad development of channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **111**: 102—105.