

海水养殖技术资料汇编 第八十辑

海珍品实用养殖技术 (十八)

中国科学院海洋研究所科技情报研究室

2003 年元月 青岛

目 录

海洋经济贝类育种研究进展·····	包振民, 万俊芬等(1)
海洋贝类雌核发育研究进展和展望·····	潘 英, 李 琪等(6)
贝类多倍体育种研究现状·····	常亚青, 王子臣等(11)
贝类多倍体研究中部分问题的探讨·····	吕振明, 李太武等(15)
海洋贝类四倍体的研究进展与展望·····	吕振明(18)
地下井水用于贝类育苗生产研究·····	于瑞海, 王如才等(19)
化学物质对不同发育天数海湾扇贝幼虫变态的诱导·····	张 涛, 阙华勇等(20)
提高海湾扇贝孵化率的技术措施·····	林燕红(25)
海湾扇贝亲贝培育技术·····	赵艳珍, 李豫红等(27)
多元缓释营养片在海湾扇贝养殖中的应用试验·····	徐振行, 于会霆等(28)
四十里湾栉孔扇贝的生长余力和 C、N、P 元素收支·····	周 毅, 杨红生等(30)
栉孔扇贝中国种群与日本种群杂交一代的早期生长发育·····	常亚青, 刘小林等(35)
药物诱导虾夷扇贝四倍体的初步研究·····	常亚青, 相建海等(41)
虾夷扇贝高产育苗技术研究·····	于瑞海, 王如才等(48)
虾夷扇贝控温育苗高产技术·····	刘锡胤, 顾本学等(50)
积温对虾夷扇贝育苗效果的影响试验·····	刘锡胤, 于炳礼等(52)
黑碟贝养殖与黑珍珠培育·····	余祥勇, 叶富良(55)
马氏珠母贝人工育苗稳产、高产技术·····	邓远球, 邓陈茂等(59)
马氏珠母贝在不同条件下育苗效果的比较·····	吴剑波, 周运和(67)
厚壳贻贝人工繁殖的研究·····	刘德经, 王聪明等(61)
黄斑海蜇的生态习性及其移殖放流的可行性探讨·····	蒋 双, 鲁 男等(68)
利用育苗设施人工养殖海蜇技术·····	王广成, 王 权(71)
虾池养海蜇经验谈·····	张有清, 李小进等(73)
虾池套养海蜇技术·····	曹洪泽(72)
虾蛄繁殖生物学与繁育技术研究·····	王春琳, 叶选怡等(74)
虾蛄的繁殖生物学及人工繁殖概述·····	翟兴文, 蒋霞敏(79)
西施舌人工育苗及稚贝培育技术的研究·····	刘德经, 谢开恩等(82)
西施舌盘架式人工立体育苗·····	刘德经, 王家滂等(87)
西施舌的人工养殖·····	蔡英亚, 邓陈茂等(90)
池养大海马的摄食、生长和生态转换效率·····	吕军仪, 李秉记等(93)
海马人工养殖及病害防治技术·····	张晓锋(99)
虾夷马粪海胆秋季人工育苗技术要点·····	刘明玉, 刘锡胤等(110)

中间球海胆早繁育苗技术的研究·····	刘明清, 钟 伟等(102)
饵料对中间球海胆生长发育的影响初探·····	王 波, 张春利等(105)
筏式养殖中间球海胆生殖腺发育周年变化·····	孔泳滔, 程振明等(111)
中间球海胆精子的超低温保存技术·····	王笑月, 周遵春等(115)
盐度和温度对中间球海胆摄食与存活的影响·····	马福恒 (118)
K ⁺ 对几种海胆幼虫变态的诱导效果·····	王 波, 张春利等 (120)
可食用海胆的增养殖初探·····	蔡清海 (123)
日本虾夷马粪海胆养殖技术简介·····	薛清儒, 刘光胜等 (124)

噬菌蛭弧菌(<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>)在虾蟹病害防治上的作用及其使用方法·····	赵明森(125)
河蟹生态育苗关键技术·····	赵春民 (128)
河蟹大水面生态养殖试验·····	滕利荣, 宣云峰等(131)
温棚分级强化培育中华绒螯蟹仔蟹试验·····	张树林, 刑克智等(132)
河蟹养殖管理技术参考表·····	徐祥刚 (135)
小网箱河蟹养殖试验·····	陈 凡 (136)
规模化池塘生态养蟹的技术经济效益分析·····	赖年悦, 徐金云 (138)

三疣梭子蟹人工育苗关键技术探讨·····	陈 波, 谢海妹(141)
梭子蟹人工育苗高产技术·····	何建平 (147)
塑料大棚培育梭子蟹大苗技术 ·····	丁天宝等(149)
三疣梭子蟹苗种孵化中幼体的不正常变态及采取的相应措施·····	刘卫滨 (150)
三疣梭子蟹全人工工厂化育苗技术·····	孙玉忠, 王雪梅等(144)
三疣梭子蟹亲蟹的越冬促产及抱卵蟹培育·····	李爱民 (151)
三疣梭子蟹土池越冬及亲蟹培育试验·····	王希升, 曹建亨(152)
如何促进三疣梭子蟹正常蜕壳生长·····	宋宗岩, 王世党等(154)
利用地下卤水进行三疣梭子蟹大棚越冬的探讨·····	唐玉光, 柴孟友等(157)
梭子蟹池塘沉箱式单养试验·····	原永党, 孙本腾等(159)
三疣梭子蟹的浅海筏式养殖技术·····	王文堂, 丁 原(171)
浅海筏式笼养梭子蟹试验·····	任宗伟, 解相林等(163)
三疣梭子蟹池塘养殖试验·····	李仁伟 (165)
三疣梭子蟹高潮岩礁区低坝高网暂养育肥试验·····	吕永林, 苏友山等(169)
利用虾池养殖梭子蟹技术要点·····	张志强, 李 伟(167)
浅海延绳式笼养梭子蟹技术·····	王华青 (155)
笼养梭子蟹技术·····	姜卫蔚, 张宏义等(156)
三疣梭子蟹养殖及病害防治·····	林克文 (168)

锯缘青蟹繁殖生物学的研究·····	吴琴瑟 (176)
锯缘青蟹抱卵蟹孵化的初步研究·····	郑金宝, 谢仰杰(173)
锯缘青蟹工厂化规模育苗技术要点·····	周友富, 丁理法等(187)
锯缘青蟹人工苗中间培育试验报告·····	丁理法, 周友富等(193)

锯缘青蟹大眼幼体标粗的试验·····	罗志平, 于方兆等(185)
青蟹秋苗高密度越冬试验·····	竺俊全, 丁理发等(190)
锯缘青蟹低盐度养殖试验·····	丁理法, 竺俊全等(182)
滩涂低坝高网养殖锯缘青蟹技术·····	丁理法, 竺俊全等(181)
锯缘青蟹虾池养成技术·····	杨正兵, 戴卫平等(184)
锯缘青蟹的人工养殖·····	艾春香 (196)
锯缘青蟹池塘养殖技术·····	丁理法, 丁雪燕(199)
三门青蟹养殖技术概要·····	叶春宇, 马文俊等(201)
青蟹病害的防治·····	潘良坤, 朱 刚(203)

信息简讯

新式水产养殖增氧剂(17) 日本把养殖鱼苗、养鱼饲料都力争达到商标化(24) 新型鱼饲料(26)
 日本用人工灯光照射培养小球藻(26) 养殖大菱鲆市场潜力大(29) 高涂蓄水泥蚶苗种培育(49)
 栉孔扇贝换季养殖技术(51) 虾蛄冬季室内暂养技术(54) 转基因食品的定义(90) 日本
 岩手县特产花缘牡蛎的养殖(90) 梭子蟹亲蟹的越冬管理(138) 梭子蟹养殖管理(98) 赣榆
 养殖海蜇成功(122) 三疣梭子蟹全人工繁育技术(148) 梭子蟹苗的选购(153) 海湾扇贝亲贝浅
 海越冬注意问题(158) 贻贝养成期的防护与管理(164) 牙鲆南方人工育苗及产业化首获成功
 (175) 海蜇人工育苗及池塘养殖(180) 法国科学家研究植物性鱼饲料(195) 网箱养
 鱼投饵机(195) 类似水耕法的陆上养殖系统(195) 罗非鱼饲料中棉子饼的适宜用量(204)
 对虾白点综合病毒的克星——提高水温(204)

海洋经济贝类育种研究进展

包振民^{1**} 万俊芬¹ 王继业² 汪小龙¹ 王如才¹

(1 青岛海洋大学, 青岛, 266003; 2 山东省海洋工程研究院, 青岛, 266071)

摘 要 本文简要回顾了近些年来海洋经济贝类育种现状, 综述了传统的杂交育种和各种现代生物技术如多倍体、转基因和分子标记技术在贝类育种中所取得的成就, 特别是近年来分子标记技术应用于贝类杂种优势预测, 群体遗传结构分析和标记辅助选择等。为新品种的培育提供了高效而可靠的手段。该技术的应用可望在较短的时间内改变目前海洋贝类品种培育的落后局面。

关键词 贝类育种; 杂交; 多倍体; 转基因; 分子标记

中图分类号 S968.3

文章编号 1001-1862(2002)04-0567-07

80年代以来海产贝类养殖发展迅速, 如扇贝、牡蛎、鲍等皆已进行了大规模人工养殖。但目前大多养殖种类仍处于野生状态, 选种工作刚刚起步, 还没有象具有长期选种历史的农作物那样形成稳定的品系。由于养殖上没有好的品种, 一些种类经过累代养殖, 出现生活力下降, 个体变小和抗逆性差等症状, 造成产量低, 经济效益下降, 严重困扰着贝类养殖业的发展。人们逐渐认识到培育生长快, 品质优, 抗逆性强的海水养殖新品种是贝类养殖业中亟待解决的问题。因此世界各国纷纷加大了对海洋贝类种质开发的研究。国内外学者利用传统的杂交育种选择技术及近些年来发展起来的各种现代生物技术, 如多倍体技术、转基因技术和分子标记技术等对贝类新品种的培育进行了广泛的研究, 并已取得了可喜的成果。特别是分子标记技术为新品种的培育提供了高效可靠的选择手段, 大大提高了育种进程。本文对几种育种技术在海洋经济贝类品种培育中的应用情况作一简要回顾, 以期对海洋贝类育种研究提供参考。

1 传统杂交和选择育种技术在海洋贝类育种中的应用

杂交选择育种技术是培育优良新品种常用有效的方法, 在农作物和畜牧业中已通过杂交育种培育出许多优良品种, 如玉米杂交种能提高产量2~3倍; 奶牛的年产奶量由过去2 000kg提高到5 000kg以上。海洋贝类中, 牡蛎种内、种间杂交育种研究较为广泛^[1-2], 在这些研究中多数杂种牡蛎在生长率、抗逆性等方面表现出杂种优势, 但也出现少数杂种劣势组合。在扇贝方面, 通过对2种扇贝(*Patinopecten yessoensis*和*P. canrinus*)进行杂交育种成功地培育出一抗病品系^[3]; Gruz在对2个不同地区扇贝(*Argopecten ventricosus*)杂交分析时发现杂交种在一定的选择压力下才表现出杂种优势。在鲍中, Leighton对加利福尼亚沿岸绿鲍(*Haliotis fulgens*)、红鲍(*H. rufescens*)等4种鲍进行杂交, 红鲍×绿鲍的杂交子一代具明显的生长优势且是可育的, 其它几个杂交组合也多表现出生长优势^[4]。在我国王子臣曾将从美国引进的红鲍、绿鲍与我国的皱纹盘鲍(*H.*

* 国家重点基础研究规划项目(G1999012009)、国家“十五863”计划项目(2001AA520106)和山东省优秀中青年科学家科研奖励基金课题(01BS10)资助

收稿日期: 2001-09-28; 修订日期: 2002-03-04

** 包振民, 男, 1961年4月出生, 教授, 博导, 通讯联系人。

discus hannai)进行了杂交,聂宗庆将日本盘鲍(*H. discus discus*)和皱纹盘鲍进行了杂交;近两年燕敬平对二者的杂交育种进行了深入的研究,表明杂交子代在成活率、生长率方面确实存在杂种优势,并对杂交 F_2 代和回交群体进行了研究^[58]。另外对硬壳蛤(*M. mercenaria*)、贻贝(*M. galloprovincialis*)、珠母贝(*P. martensii*)等也进行了杂交育种的研究。另一方面通过对养殖贝类施加外界压力,如人为感染病原菌或使其处于恶劣环境中,然后进行选择培育,来获得抗病抗逆的优良品系。如在美国对牡蛎抗病品系的筛选已进行了多年,已培育出几个抗病品系,如抗*Haplosporidium nelsonoo*(Ford, 1990)和抗*Bonamia Odtreae*品系^[5-6]。我国近几年对栉孔扇贝抗病品系的筛选也取得了明显效果,同样养殖条件下,选择群体的生长率和抗病性明显提高,AFLP标记分析显示,选择群体的遗传组成已发生了一些改变^[7]。

2 多倍体和转基因技术在海洋贝类育种研究中的应用

随着现代生物技术的发展,许多新手段如多倍体技术、转基因技术等直接对贝类的染色体和基因组进行操作,大大促进了品系改良的强度,为新品种的培育提供了新的途径。多倍体贝类特别是三倍体贝由于其生长快、品质优等特点,已受到人们的普遍重视,并从三倍体诱导方法和多倍体的生物学特性等方面展开了广泛研究。其中对三倍体牡蛎的研究较广泛也较成功,并已在生产中得到了大面积推广^[5-9];对各种扇贝如栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、海湾扇贝(*Argopecten irradians*)、虾夷扇贝(*Patinpecten yessoensis*)等的三倍体的研究也卓有成效^[10]。对皱纹盘鲍和太平洋鲍等也进行了多倍体培育^[11]。据报道三倍体皱纹盘鲍表现出明显生长优势,养殖19个月的三倍体鲍比二倍体增重20.1%,足肌增重17.6%。另外对珠母贝、文蛤等三倍体的诱导也进行了系列研究^[12-13]。目前多数是通过药物诱导获得三倍体,此法诱导率达不到100%,且一些常用的诱导剂如CB等有毒性。若能获得可育的贝类四倍体,通过四倍体和二倍体杂交的途径可得到100%的三倍体。国内外学者分别对牡蛎、鲍和蛤仔等进行了四倍体的诱导研究^[14-15],Guo等通过四倍体和二倍体杂交已成功获得了牡蛎三倍体^[16]。

转基因技术是80年代发展起来的一项新的品种培育方法,它直接将外源有利基因导入目标动物引入新的生产性状,它克服了物种间的生殖隔离,是迄今定向培育新品种的有效途径。水产动物中研究较成功的是转基因鱼,如转基因鲑鱼比对照生长快2~6倍^[17]。在贝类中对蛤、牡蛎、贻贝、鲍等皆进行了转基因研究^[18]。转基因鲍是研究较多的,也较成功的。Tsai等研究了用电脉冲介导的精子载体法将外源基因(OPAFP-2000CAT)导入杂色鲍中,其导入率可达65%^[19]。Powers通过电转移法将鲑的生长素基因导入红鲍卵中,培育出可快速生长的鲍^[20]。最近发现聚乙烯亚胺(PEI)与精子载体法相结合在将外源基因转入皱纹盘鲍时的转导率、表达率都很高^[21]。在这些转基因研究中,通过报告基因可检测到外源基因在幼虫中表达,但转导率不稳定,同时外源基因与贝类本身基因组DNA的整合等问题还有待于进一步去探讨。

3 DNA分子标记技术在贝类育种中的几方面应用

近年来,DNA分子标记的研究十分活跃,相继有数十种标记技术问世,并已广泛应用于生物遗传多样性、群体遗传、亲缘关系分析、连锁图谱构建、基因定位等许多研究领域。近几年其在海洋贝类的遗传育种方面也得到了广泛的应用,为传统的杂交育种工作注入了新的活力。DNA标记来源于DNA水平的变异,较传统育种形态标记选择,不受环境和发育阶段的影响,标记较丰富,可大大提高杂交育种的有效性和可靠性,而且在对杂种优势机理的认识、杂种优势的预测、目的性状的选择等方面已显示无可比拟的优越性。同时,许多以前无法进行的研究,如环境因素的影响、数量性状的多重效应等在分子标记技术的帮助下已经开展。因此将传统育种技术与分子标记技术相结合可减少育种选择的盲目性,缩短育种进程,是进行新品种培育行之有效、快速简便的途径。

3.1 在杂种优势机理探讨及预测中的应用

杂种优势是一种非常普遍的生物遗传现象,很久以来即被应用

于各领域品种培育中,并在生产实践中取得了突出成就。为了更有效地利用杂种优势现象为人类服务,从理论上揭示杂种优势形成的理论基础,国内外学者已做了大量探讨,提出了一些假说,如显性假说、超显性假说等。但这些研究大多停留在理论模型阶段,未能从实践上加以证实。近年来分子生物学,特别是分子标记技术的发展,为人们从分子水平上探讨杂种优势形成机制提供了有力手段。分子标记在农作物杂种优势机理探讨方面研究较多,如利用RFLP等标记技术分别分析了水稻和玉米中标记位点与杂交产量的关系,认为水稻的杂种优势主要取决于亲本基因的显性互补,而超显性和基因互作在数量性状优势形成中也起一定作用,玉米中决定产量的数量性状优势与位点的杂合度呈正相关^[54-57]。在贝类中,Grant等对扇贝的杂交优势形成机理进行了探讨,已知研究用扇贝的同工酶的杂合性和生长率间存在正相关关系。他们的RFLP分析结果表明DNA的多态性与生长率无相关性,因此他们同意同工酶的杂合性是由于选择压力所引起的观点,认为在扇贝中用超显性来解释杂种优势与杂合性的关系是行不通的^[22]。另外Dennis等通过对牡蛎各自交群体及其杂交 F_1 、 F_2 代进行的同工酶和数量性状的标记分析发现,用显性或超显性假说都不能很好地解释杂交实验中出现的现象,而上位效应对所出现的正负杂种优势都能给予很好的解释^[23]。

杂种优势的形成受多方面的调控。对不同的生物,不同的质量性状、数量性状,杂种优势形成的机理也不尽相同。因而杂种优势的表现比较复杂,为了减少杂交育种的盲目性,需要对杂交亲本的遗传组成有所了解,以对杂交子代的表现性状进行预测。最初使用数量遗传学的方法,即通过对配合力和遗传距离的推测来预测杂种优势^[24],但强优势组合的挑选都需要对大量组合的筛选评价来获得,费时费力。DNA标记技术可显示不同亲本组合基因组的差异情况,预测亲本的组成差异、亲本间的遗传距离与杂种优势的关系,为杂交育种中亲本的选择、杂交子代优势预测提供了有力的依据。近年来用分子标记来预测杂种优势的研究取得了可喜进展。Zhang等用分布于水稻整个基因组的RFLP和微卫星标记,来检测杂交水稻的杂种优势与双亲标记基因型差异的相关性,发现了16~30个影响产量的阳性座位,亲本中阳性座位数与杂交稻的产量呈正相关^[25]。吕雪梅在研究蛋鸡品系RAPD标记与杂种优势的关系时发现,父系的相似系数与 F_1 的杂合性正相关^[26]。在贝类中关于同工酶标记与杂种优势的关系研究较多,这些研究普遍表明同工酶标记位点的杂合性与 F_1 代的生活力、生长率等存在正相关^[27]。从DNA水平上研究贝类不同群体遗传差异,目前多集中在线粒体DNA的RFLP标记分析,如对鲍、牡蛎、扇贝、贻贝等分别进行了研究^[28-31]。这些研究揭示了各种贝类不同群体间亲缘关系及遗传变异的大小,对于杂交育种中亲本的选择、 F_1 代杂种优势的预测具有很好的指导意义。

3.2 在群体遗传结构分析中的应用 利用各种分子标记技术对贝类不同的自然群体或养殖群体的遗传差异程度、遗传变异能力的大小等进行了广泛研究。如Blake对中国多年养殖海湾扇贝群体和引种地野生群体间mtDNA的多态性进行了分析,寻找引种及近交对海湾扇贝遗传结构的影响,得出多年养殖群体的杂合度降低。同时在我国生产养殖中也表现出个体变小、抗逆性差等表型特征,说明多年近交养殖会导致种质的遗传力下降,种质退化^[30]。Graves等对牡蛎的四个抗Mx和Clermo品系和四品系各自的选择前群体mtDNA进行了RFLP分析,发现四品系间及与各自的来源群体间mtDNA表现出丰富的多样性,并分析这些差异可能是由于选择压力和基因漂移造成的^[29]。在对台湾不同地区的杂色鲍mtDNA酶切图谱分析时发现不同鲍mtDNA长度差异明显,据此可进行种质鉴定,同时还发现养殖群体mtDNA的多态性低于野外群体^[31]。刘必谦等对4个不同地区的大连湾牡蛎自然群体进行了RAPD标记,表明地理位置越远,其遗传差异越明显^[32];利用RAPD技术对皱纹盘鲍、日本盘鲍及二者的正反杂交子代进行了分析,表明杂交子代与两亲本的遗传距离不是对等的,而是更偏向于日本盘鲍^[33]。另外,对栉孔扇贝的生长快、抗逆性强的2个人工选育群体和野生群体的AFLP标记显示,选育群体杂合度明显低于野生群体,说明人工选择压力对选育群体的遗传结构产生了明显的影响^[9]。Naciri等还以卫星DNA为标记研究了欧洲牡蛎(*Ostrea edulis*)的遗传多样性^[34]。以上这些研究对于了解种质资源的分布、群体间的遗传差异及杂交亲本的选择提供了有益参考。

3.3 分子遗传图谱的构建 经济动植物的遗传连锁图谱的建立以及对控制经济性状的基因进行标记定位,是应用分子标记作为辅助选择手段的新一代育种技术的基础。要构建遗传图谱首先要根据遗传材料选择合适的作图群体,再应用分子标记技术对基因型进行标记分析,确定标记间的连锁关系。DNA标记技术虽有十几种,但可用作图谱构建的标记技术应符合:1)高度多态,即标记座位具有尽可能多的等位位点。2)操作方

便,应适合于大规模的基因型分析。3) 遗传共显性,在分离群体中能够区分3种基因型^[35]。目前常用的标记技术主要有RFLP、微卫星和AFLP技术,RAPD标记是显性标记,用于作图时应将其转化成RFLP或STS标记。许多经济动植物如玉米、水稻、绵羊、鸡等RFLP/微卫星图谱均已构建。近年在水产动物中遗传图谱的构建工作也已展开,如鲤鱼、罗非鱼、斑马鱼和虹鳟等的标记图谱已部分构建起来。其中虹鳟图谱中已有的标记包括22个AFLP,96个VNTR,40个SINE,5个RAPD,2个SSR标记^[36]。在对虾中也先后用RFLP、RAPD及卫星DNA等技术对其基因组进行了标记。目前美国正在与澳、法等有关研究机构合作开展对虾基因作图工作。贝类的基因作图工作还刚刚起步,Hedgcock研究小组正在进行太平洋牡蛎和美洲牡蛎的基因作图工作,目前已分离了30个微卫星标记。在鲍中也发现了几个小卫星标记,如Huang在黑唇鲍(*Haliotis rubra*)中发现了2个小卫星(VNTRs),分别位于生长素和胰岛素有关蛋白基因3'端非翻译区^[37]。在其它贝类中也已开展了部分基因标记工作^[35]。

3.4 分子标记辅助选择技术在贝类育种中的应用 传统的杂交育种常是根据个体表型上的差异进行选择。当差异性状的遗传基础简单或表现为加性基因效应时,根据表型的选择是很有效的。但因环境因素或基因的非加性效应造成的差异,根据表型的选择是无效的。利用分子标记辅助选择育种技术(Marker-assisted Selection, MAS),对目的性状进行标记定位,通过分析目标基因紧密连锁的标记的基因型来判断选择个体中目标基因是否存在,是近年来迅速发展起来的一项崭新的育种技术,为育种改良提供了有力的新手段。目前应用于MAS的遗传标记主要有RFLP、RAPD、AFLP、SSR等。应用分子标记进行辅助选择在农作物和畜牧业的种质改良中取得了可喜的成果,并已证明MAS在育种选择中是一种非常有效的选择手段,与常规育种相结合,可大大缩短育种进程。近年来在海洋贝类育种中,纷纷加大了对分子标记的研究,其中对线粒体DNA的RFLP标记研究的较多。另外在牡蛎^[39]、扇贝^[40]和鲍^[41]等中进行了小/微卫星标记分析;扇贝中进行了RAPD标记^[38]及在牡蛎中进行了SSCP的标记研究^[42]。但与经济性状相连的,可用于辅助选择DNA标记未见报道。另外还没有一种贝类的遗传图谱构建起来,MAS应用于贝类育种选择中还需要一段时间。由于MAS技术对育种选择的高效性和可靠性,各国已竞相开展了应用MAS对贝类品种培育的研究。美国Hedgcock为首的研究小组正在进行牡蛎基因作图和标记工作,并在多年培育抗病牡蛎品系的基础上克隆了Dome基因。日本及欧洲各国也在牡蛎、鲍等贝类基因标记定位方面加大了工作力度。在这一领域内,我国和欧美国家差距不大,目前在“863”项目的支持下也正在采用RAPD、AFLP等标记技术,寻找与高产抗病性状相连锁QTL基因。

4 海产贝类功能基因的研究现状

随着贝类育种工作的逐步深入,对一些与生产有关的功能基因已进行克隆测序,并进行相关功能分析,从基因水平上为贝类种质改良提供了新途径。如对贝类浮游幼虫附着时体内有关蛋白及基因的变化研究的较清楚,Degnan等发现在变态期幼虫体内原肌球蛋白等的表达量显著增加,而在浮游期幼虫时没有发现其相应mRNA转录^[43];Wodicka等从鲍浮游幼虫纤毛中分离出一种RNA,并进行反转录PCR和克隆测序,结果表明它是编码信息传导蛋白—G蛋白,其在幼虫附着变态时与体内的诱导蛋白结合,促进幼虫附着^[44]。Inoue等对贻贝的与附着有关蛋白的基因进行了克隆测序等系列研究^[45]。对鲍特异性受精蛋白及其基因研究的也较多,鲍精子顶体上存在两种受精蛋白,分子量分别为16kd和18kd,对它们cDNA序列分析显示,在不同种鲍及同种鲍的不同地理群间存在很大的种属特异性,这两种蛋白可能决定了鲍受精的特异性^[46]。另外Baginsky等还对鲍受精蛋白进行了晶体衍射分析^[47]。贝类的另一些重要的功能蛋白基因也已克隆出,如对扇贝的肌球蛋白^[48]、肌钙蛋白^[49]等基因的cDNA进行了测序和相关功能分析;对牡蛎的金属硫蛋白、珍珠层蛋白基因进行了克隆,并分析了其在代谢中的作用^[50-51];在鲍中编码血清蛋白、肌红蛋白及与生长素等有关的基因均已克隆出,并进行了相关功能的分析研究^[52-54]。这些功能基因的研究从分子水平上揭示了贝类的一些生长发育机制,为贝类基因组研究和贝类基因工程育种奠定了基础。

优良品种是贝类养殖业稳定健康和高效持续发展的关键所在。通过杂交育种已取得了一些成果,如所得

的杂交鲍在生产中表现出生长快,存活率高等而受到人们的关注。但进行传统的杂交育种所需的周期长,同时海产贝类缺乏家系交配产生的近交系及纯系等限制了其应用。各种现代生物技术的开发为新品种的培育提供了高效可靠的手段,其已成为育种工作发展趋势,对海洋贝类亦如此。相信随着各种育种技术的完善和育种者的努力,一定会加快贝类优良新品种的开发研究,有望在较短的时间内改变目前海洋贝类品种培育的落后局面。

参考文献

青岛海洋大学学报,2002,32(4):567-571

- [1] Scarpa J. Comparative kinetics in hybrid crosses of Pacific oyster *Crassostrea gigas* and Suminoe oyster *C. rivularis* with American oyster *C. virginica*. [J] Exp Zool, 1992, 263:316~322
- [2] Allen S K, Gaffney P M, Scarpa J, et al. Inviabile hybrids of *Crassostrea virginica* (Gmelin) with *C. rivularis* (Gould) and *C. gigas* (Thunberg). [J] Aquaculture, 1993, 113:269~289
- [3] Heath W A. Developments in shellfish culture in British Columbia. [J] Journal of shellfish Research, 1995, 14(1):228
- [4] Leighton D L, Lewis C A. Experimental hybridization in abalones. [J] Int J Invertebr Reprod, 1982, 5(5):273~282
- [5] Ford S, Figueras A J, Haskin H. Influence of selective breeding, geographic origin and disease on gametogenesis and sex ratio od oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to the parasite haplosporidium nelsoni (MSX). [J] Aquaculture, 1990, 88:285~301
- [6] Martin A G, Gerard A, Cochennec N, et al. Selecting falt oyster, *ostrea edulis*, for survival against the parasite *bonamia ostreae*: assesment of the resistance of a first selected generation. [C] In Peoduction, Environment and Quality, Boreaux Aquaculture '92 ed. Ghent Belgium: Europ Aquac Soc Spec Publ, 1992, 18: 547~554
- [7] 潘洁,王小龙,万俊芬,等. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)人工选育群体的 AFLP 分析. [C] 第二届全国海珍品养殖研讨会论文集. 青岛:[s. n.], 2000:77~88
- [8] Allen S K, Busheck D. Large scale production of triploid oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using "stripped" gametes. [J] Aquaculture, 1992, 103:241~251
- [9] Stanley J G, Allen S K, Hidu H jr. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea viginica*, with cytochalasin B. [J] Aquaculture, 1981, 23(1-4):1~10
- [10] 王子臣,毛连菊,陈来钊,等. 温度休克诱导栉孔扇贝和虾夷扇贝三倍体的初步研究. [J] 大连水产学院学报, 1990, 5(3-4):1~6
- [11] 孙振兴,李诺,宋志乐,等. 皱纹盘鲍三倍体诱导条件及其室内饲养试验. [J] 水产学报, 1993, 17(3):243~248
- [12] 姜卫国,许国强,林岳光,等. 合浦珠母贝三倍体和二倍体的生产比较. [J] 热带海洋, 1991, 10(3):1~7
- [13] 常建波,魏利平,杨建敏,等. 文蛤染色体核型及三倍体诱导初步研究. [J] 水产学报, 1996, 20(3):269~274
- [14] Guo X M, Hershberger W K, Cooper K, et al. Tetraploid induction with mitosis I inhibition and cell fusion in the Pacific oyster(*Crassostrea gigas* Thnberg). [J] J Shellfish Res, 1994, 13:193~198
- [15] Zhang G, Wang Z, Chang Y, et al. Tetraploid induction in the Pacific abalone *Haliotis discus nannai* ino with 6-DMAP and CB. [J] J shellfish Res, 2000, 19(1):540~541
- [16] Guo X, Kebrosse G A, Allen S K. All triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. [J] Aquaculture, 1996, 142:149~162
- [17] Du S J, Gong Z Y, Fletcher G L, et al. Growth enhancement in transgenic atlantic salomn by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. [J] BioTechnology, 1992, 10:176~181
- [18] 范晓,张士瑞,秦松,等. 海洋生物技术新进展. [M] 北京:海洋出版社, 2000:48~55
- [19] Tsai, Lai C H, Yang H S. Sperm as a carrier to introduce an exogenous DNA fragment into the oocyte of Japanese abalone (*Haliotis diversicolor suptexta*). [J] Transgen. -Res, 1997, 6(1):85~95
- [20] Powers D A, Kirby V. Genetic engineering abalone: gene transfer and ploidy manipulation [J] J -Shellfish-Res, 1996, 15(2):477
- [21] 汪小龙,张志峰,潘洁,等. 皱纹盘鲍肌动蛋白启动子克隆及其转基因活性检测. [C] 中国海洋生物技术的发展国际研讨会. 青岛:[s. n.], 2000:129

文章编号:1000-0615(2002)05-0465-07

·综述·

海洋贝类雌核发育研究进展和展望

潘英^{1,2}, 李琪¹, 王如才¹, 于瑞海¹

(1. 青岛海洋大学国家教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 广西大学动物科技学院, 广西 南宁 530005)

关键词: 海洋贝类; 雌核发育; 综述

中图分类号: S917 文献标识码: A

Progress and perspectives of gynogenesis research in marine molluscs

PAN Ying^{1,2}, LI Qi¹, WANG Ru-cai¹, YU Rui-hai¹

(1. The Key Laboratory of Mariculture Certificated by the Ministry of Education, Qingdao Ocean University, Qingdao 266003, China;

2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: The paper summarized the progresses and achievements of the studies on the gynogenesis of the marine mollusks at home and abroad in recent years, and pointed out the study direction on gynogenetic shellfishes and 6-DMAP used as an ideal medicine for raising the induced rate of marine shellfish gynogenesis.

Key words: marine molluscs; gynogenesis; review

近三十年来,国内外海洋贝类的培养殖业发展迅速,因而以提高培养殖贝类产量和质量为主要目的的染色体组工程已成为海洋贝类育种的热点。有关贝类染色体组操作技术已有广泛的报道^[1-2],主要包括多倍体的人工诱导、雌核发育、雄核发育等相关研究,其中贝类多倍体的人工诱导及相关的基础和应用研究方面,已做了许多工作,进展迅速,并在诱导技术、苗种培育及产业化方面取得了很大进展,这些进展表明贝类的染色体操作技术已达到一个比较成熟的水平。然而,贝类雌核发育的研究相对要少得多,在国内几乎是空白。本文拟对国内外近十几年来有关贝类雌核发育发生机理、研究进展与现状作一综合评述,为今后进一步开展贝类雌核发育研究提供参考。

1 贝类人工雌核发育二倍体的研究历史及现状

人工诱导雌核发育(artificially induced gynogenesis)是指通过用物理或化学方法使遗传失活的精子激活卵,精子不参与合子核的形成,卵仅靠雌核发育形成胚胎的现象。在二倍体生物中这样的胚胎是单倍体,没有存活能力。通过阻止极体排出或卵裂使其恢复二倍性后,便成为具有存活能力的雌核发育二倍体。近十几年来,人工诱导雌核发育作为快速建立纯合系、克隆的有效手段受到各国学者的极大关注。通过该方法,已成功地培育出香鱼、牙鲆、真鲷、鲤、罗非鱼、鲈等经济鱼类的克隆品系^[3-8],为养殖新品种的开发以及性别决定机制、单性生殖等基础生物学研究提供了极为宝贵的素材。

然而,在海洋经济贝类方面,人工雌核发育的研究开展较晚,至今还没有取得完全成功。近年来,在美洲牡蛎

收稿日期:2001-12-27

资助项目:国家自然科学基金资助项目(30170735)

作者简介:潘英(1968-),女,广西南宁人,讲师,博士研究生,主要从事贝类遗传育种研究。Tel:0532-2032873, E-mail:panying@

ouqd.edu.cn

Crassostrea virginica^[9,10]、太平洋牡蛎 *C. gigas*^[11-14]、贻贝 *Mytilus edulis*^[15]、地中海贻贝 *M. galloprovincialis*^[16]、皱纹盘鲍 *Haliotis discus hannai*^[17-20]、华贵栉孔扇贝 *Chlamys nobilis*^[21]、虾夷扇贝 *Patinopecten yessoensis*^[22]、合浦珠母贝 *Pinctada martensii*^[23] 和休儒蛤 *Mulinia lateralis*^[24,25] 等贝类。通过用人工失活精子的方法获得了雌核发育单倍体和二倍体胚胎。据统计,目前已有近 10 种海洋经济贝类进行了人工诱导雌核发育的研究(详见表 1),其中双壳类 8 种,腹足类 1 种。1992 年以后,人工诱导贝类雌核发育二倍体取得了突破性进展,美国、日本的学者分别在太平洋牡蛎^[12,14,26]、皱纹盘鲍^[18,20]、贻贝^[15] 和地中海贻贝^[16] 中成功诱导并获得了具有生活力的雌核发育二倍体,但还没有培育到成体的报道。有关贝类雌核发育二倍体诱导的细胞学机制和有效诱导程序还没有像鱼类那样建立起来。在国内,迄今未见有二倍体化的贝类雌核发育个体存活的报道。

2 人工诱导贝类雌核发育二倍体的方法和原理

贝类雌核发育二倍体人工诱导可以通过两个步骤实现,即精子染色体的遗传失活以及卵子染色体的二倍体化。

2.1 精子染色体的遗传失活

贝类雌核发育的有效诱导需要精子的遗传失活和较高的卵子受精率。目前使贝类精子染色体遗传失活的方法主要是采用辐射处理。到目前为止,已经被成功使用的辐射处理包括 γ 射线、x 射线以及紫外线(ultraviolet, UV)。在人工诱发雌核发育二倍体时,必须解决精子的辐射剂量和处理受精卵的开始时间这两个关键问题^[27]。选择一个合适的剂量使精子染色体完全失活而不影响其受精能力,才能得到雌核发育单倍体胚胎。Stiles^[9] 用 10 000R 的 X 射线失活美洲牡蛎精子 DNA,结果激活 66% 卵成熟发育。各种辐射处理各具有优缺点。用 UV 处理使精子遗传失活因其有效性及便利性被广泛地用于雌核发育的人工诱导。此外,UV 还有照射后精核染色体碎片少的优点^[28]。其作用机理主要是:精子 DNA 经紫外线照射后形成胸腺嘧啶二聚体(thymine dimers),使 DNA 双螺旋的两链间的氢键减弱,从而使 DNA 结构局部变形,阻碍 DNA 的正常复制和转录^[29]。

贝类卵子也有与鱼卵相似的“Hertwig 效应”。Guo 等^[12]、Arai 等^[17]、许国强等^[23] 分别在太平洋牡蛎、皱纹盘鲍、合浦珠母贝的早期胚胎存活率中观察到“Hertwig 效应”的存在。适量 UV 处理并未影响精子的受精能力,但随着 UV 照射时间的增加,卵的受精率明显降低^[12,15,17,19],表明精子激活卵子的能力随着 UV 照射剂量的增加而降低。这一现象与鱼类有所不同,可能与贝类受精机制及精子对紫外线照射的敏感性与鱼类不同有关^[14]。Kijima^[19] 认为 UV 照射对精子遗传失活的影响不仅表现在精核的染色体组上,而且还在于精子顶体结构的破坏。UV 照射还可能引起精子鞭毛中微管纤维的解聚^[30]。李琪等^[14,20] 认为紫外线照射会破坏精子顶体和鞭毛的结构,其破坏程度与紫外线照射强度存在正相关的关系,并指出 UV 照射引起的精子顶体破坏和鞭毛脱落是受精率降低的原因。使贝类精子遗传失活的 UV 照射最佳剂量因种类、精液的浓度和体积以及紫外线强度而异。获得雌核单倍体是人工诱发雌核二倍体的关键。

2.2 卵子染色体的二倍体化

用遗传失活的精子与卵子受精,发育出来的胚胎通常为单倍体。贝类雌核发育单倍体通常表现为胚胎发育速度变慢,并且一般在 D 形幼虫前停止发育或死亡。因此,要获得具有生存能力的雌核发育二倍体,除失活精子之外,还必须恢复卵子染色体的二倍性。

2.2.1 诱导原理

与鱼类不同,海洋贝类排出的成熟卵停留在第一次成熟分裂(MI)的前期或中期^[31],只有在受精或经精子激活后卵子才完成 MI 和第二次成熟分裂(MII),释放出第一极体(PB1)和第二极体(PB2)。贝类雌核发育二倍体的人工诱导原理就是在第一次或第二次成熟分裂时采用物理或化学方法通过抑制第一和第二极体的排放或第一次卵裂,使得卵核染色体加倍,形成二倍体的卵核,从而发育成为雌核发育二倍体个体。在诱导贝类雌核发育二倍体的过程中,由于遗传物质完全来源于母体,则雌核发育后代的纯合程度将因二倍化的情况不同,存在以下三种情况:1)若二倍化是由于阻止了第一极体的形成和排出,则导致 2/3 甚至几乎 100% 的杂合后裔^[32];2)若二倍化是由于阻止第二极体的形成和排出,该雌核发育二倍体的遗传物质是由雌性原核和第二极体的再融合构成的,基因的纯合性较高,但仍有些基因处于杂合状态,杂合程度取决于第一次成熟分裂期间的基因互换频率;3)若二倍化是阻止第一次卵裂,使本应分属于两个单倍体细胞的染色体重新融合为二倍体,则由此发育起来的二倍体由于不含有第一极体或第二极体的遗传成分,每一对同源染色体中的一条是以另一条为模板如实复制而得到,故所有的基因都处于纯合状态,是理想的纯合体,可直接用于建立纯系^[33]。在后代染色体的纯合程度方面,因三种方法存在着各自的差异,因此将人工诱导雌核发育分为两种类型:一种是抑制第

一、二极体排放,称为减数分裂(I、II)型雌核发育(Meiotic-G2N)或极体抑制型雌核发育,杂合子雌核发育;另一种是阻止第一次卵裂(有丝分裂),称为有丝分裂型雌核发育(Mitotic-G2N)或第一次卵裂抑制型雌核发育,纯合子雌核发育。两者比较,有丝分裂型雌核发育由于通过阻止第一次卵裂,可在当代产生纯合二倍体,下一代如重复雌核发育便形成克隆品系;而减数分裂型雌核发育只做到部分纯合,要经过多代连续雌核发育才有可能建立纯合度较高的品系^[34]。因此,有丝分裂型雌核发育比减数分裂型雌核发育的研究价值要大得多,但也困难得多。近年来 Meiotic-G2N 在皱纹盘鲍^[18,30]、太平洋牡蛎^[11,14]、贻贝^[15]及地中海贻贝^[16]等有过相关报道,而有存活力的 Mitotic-G2N 个体始见于 Guo^[12]、李琪等^[30,35,35]的报道。

2.2.2 诱导方法

目前人工诱导贝类雌核发育二倍体的方法主要有物理方法和化学方法(表1)。物理方法主要采用温度休克处理,化学方法主要是用一些化学诱导剂,如细胞松弛素 B(cytochalasin B, CB)、秋水仙素(colchicine)、6-二甲氨基嘌呤(6-DMAP)以及咖啡因(cafeine)。

表1 不同方法诱导各种海洋经济贝类雌核发育二倍体
Tab.1 Marine shellfish gynogenesis diploids induced by various methods

贝类种名 Species	失活精子染色体的方法 methods of genetic inactivation of sperm	加倍卵子染色体的方法 methods of doubling egg chromosomes	诱导结果 induction results	文献 references
美洲牡蛎 (<i>Crassostrea virginica</i>)	X-射线(10 000R) UV254nm, 1.5~4min, 8W/支		激活 66% 卵至 第一次卵裂 50% 卵发育至 GN	[9] [10]
太平洋牡蛎 (<i>Crassostrea gigas</i>)	UV254nm, 5.5min, 1 080 μ W $\cdot$ cm ⁻² ·s ⁻¹ UV UV	CB 1.0mg $\cdot$ L ⁻¹ , 抑制 PB2	28% G2N, 8.9% G4N 且 G2N 4.0%, 存活至 10 个月 G2N, 未成活。 GN	[12] [11] [13]
	UV254nm, 60s, 72erg $\cdot$ mm ⁻² ·s ⁻¹	CB 0.5 μ g $\cdot$ mL ⁻¹ , 咖啡因(10mmol $\cdot$ L ⁻¹ , 32℃), 抑制 PB2	Meiotic-G2N 63.7~74.6%, Mitotic-G2N 25.4%, 其中 0.002~0.4% 附着变态	[14]
地中海贻贝 (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	UV254nm, 2min, 620 μ W $\cdot$ cm ⁻² ·s ⁻¹	CB 1mg $\cdot$ L ⁻¹ , 抑制 PB2	GN 30%~88%, G2N 50.7%, G4N 1.2%	[16]
贻贝 (<i>Mytilus edulis</i>)	UV254nm, 15min	CB 0.5 mg $\cdot$ L ⁻¹ , 抑制 PB1, PB2 或第一次卵裂	G2N 100%, 未存活	[15]
侏儒蛤 (<i>Mulinia lateralis</i>)	UV	CB 抑制 PB2 或 第一次卵裂	54% G2N 达到 2 细胞期, 存活 1d	[24]
	UV 1 400 μ W $\cdot$ cm ⁻² , 15min	CB 0.5mg $\cdot$ L ⁻¹ , 抑制 PB2	G2N 存活率 0.7%, 发育至 3 个月性成熟	[25]
合浦珠母贝 (<i>Pinctada martensii</i>)	UV 254nm, 120s, 4 μ W $\cdot$ cm ⁻²	CB 0.1mg $\cdot$ L ⁻¹ , 15min, 抑制 PB2	GN 98.0%, G2N 74%, 孵化率为 2.1%	[23]
华贵栉孔扇贝 (<i>Chlamys nobilis</i>)	UV254nm, 20s, 1 140 μ W $\cdot$ cm ⁻² ·s ⁻¹		GN 80.92%	[21]
虾夷扇贝 (<i>Patinopecten yessoensis</i>)	UV254nm, 50~60s, 720 μ W $\cdot$ cm ⁻² ·s ⁻¹		GN	[22]
皱纹盘鲍 (<i>Haliotis discus hannai</i>)	UV		导致 GN 和非整倍体 幼虫出现(52h)	[17]
	UV254nm, 20s, 1 200 erg $\cdot$ mm ⁻²	冷休克 3℃, 15min, 抑制 PB2	G2N 50%~60%, 存活至 6 个月	[18] [19]
	UV			
	UV254nm, 20s, 720 μ W $\cdot$ cm ⁻² ·s ⁻¹	CB 0.5 μ g $\cdot$ mL ⁻¹ , 20min, 抑制 PB2 和第一次卵裂; 咖啡因抑制 PB2	Meiotic-G2N 76.7%, Mitotic-G2N 40.6% 至附着变态	[20]

注:GN 雌核发育单倍体;G2N 雌核发育二倍体;G4N 雌核发育四倍体

Notes:GN gynogenetic haploid;G2N gynogenetic diploid;G4N gynogenetic tetraploid

温度休克:通常采用高温或低温抑制卵子的第一或第二极体排放,进而达到卵子染色体加倍的目的。Fujino 等^[18]采用冷休克(3℃)处理 15min,阻止 PB2 排出而获得皱纹盘鲍 G2N。

咖啡因-热休克:咖啡因的作用效果在于提高细胞内的 Ca^{2+} 浓度。由于微管对 Ca^{2+} 浓度非常敏感,当 Ca^{2+} 浓度极低或高于 10^{-3} 时,会引起微管二聚体的解聚,阻止分裂。李琪等^[14,20]利用咖啡因($10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)—高温(32°C)处理可以有效地抑制第二极体释放,产生太平洋牡蛎皱纹盘鲍 G2N,但未获得存活的雌核二倍体个体;并认为咖啡因处理阻止了核分裂和胞质分裂,导致二倍性雌性原核的形成。

CB 处理:CB 作为一种抑制细胞分裂而不影响染色体复制和分离的真菌类代谢产物,只有在核分裂后期进行处理,才能起到抑制极体排放或卵裂的作用。目前 CB 在贝类雌核发育人工诱导中应用最广泛。CB 的使用浓度及处理时间因种类而异。至今,采用 CB 处理阻止 PB2 释放或第一次卵裂的方法已成功地获得了一些贝类的 Meiotic-G2N^[14-16,18,20]或 Mitotic-G2N 胚胎^[12,20,26,35]。此外,李琪等^[14]、Guo 等^[36]采用 CB 处理同时阻止 PB1 和 PB2 排出的方法还产生了高比例的太平洋牡蛎雌核发育四倍体(G4N)胚胎,但到 2 月龄时,再没有检测出四倍体存在。因此,G4N 是通过第一、二极体同时抑制产生的。等位基因酶分析表明^[37],太平洋牡蛎雌核发育二倍体仍有较高的杂合度,表明 Meiotic-G2N 并非是一个适合近交系快速建立的有效手段。

另外,贝类雌核发育诱导过程中也报道出现大量的非整倍体^[12,15-18,19,22,23,38,39],这可能是由于 UV 低剂量造成精核染色体部分失活^[23]或精核 DNA 修复造成的结果^[38]。

6-DMAP:近年来,采用 6-DMAP 处理也能抑制细胞分裂,使染色体加倍,在贝类多倍体诱导中获得了成功,但在诱导雌核发育二倍体贝类方面还未见报道。6-DMAP 作为一种嘌呤类似物,抑制蛋白质磷酸化,通过作用于特定的激酶,破坏微管的聚合中心,使微管不能形成,从而抑制极体的形成和释放。6-DMAP 是一种非致癌剂,价格也比 CB 便宜,今后是一种很有应用前景的贝类雌核发育诱导剂。

此外,姜卫国等^[40,41]报道珠母贝属种间杂交得到的为数不多的杂交后代可能来自雌核发育。

3 倍性检测

由于人工失活精子的处理并非百分之百成功,因而当雌核发育二倍体产生的时候,必须有充分的证据证明精子在雌核发育中对胚胎确实没有提供遗传物质。由此才能对精子失活以及雌核发育的百分率有个精确的了解。倍性检测结果可以作为判断诱导有效性的一种技术指标。染色体倍性的检测方法主要有染色体计数法和使用仪器检测的方法。在仪器检测中,流式细胞计数法使用流式细胞仪(flow cytometry)快速鉴定倍性的有效性得到了广泛的认可。另外,显微荧光光度计(microfluorometry)通过测定荧光的强度,比较 DNA 的相对含量,以确定其倍性。该法提供了一个快捷而可靠地检测倍性的途径,对雌核发育二倍体的倍性确定显得尤其重要^[14,15]。此外,采用电泳校准法(electrophoretic verification)进行等位酶分析对今后的雌核发育倍性研究是必要的^[37]。

4 雌核发育贝类的生物学特性

总的来说,由于雌核发育所产生的后裔是纯合的或高度纯合的,因此它与正常受精所得到的胚胎相比发育速度变慢,成活率低。Scarpa 等^[16]认为地中海贻贝 G2N 幼虫的个体大小总是小于对照组,且其附着变态的时间也迟于对照组大约 3 周。Fujino 等^[18]报道皱纹盘鲍 G2N 与正常 2N 相比,在大小上存在较大差异。而太平洋牡蛎 Meiotic-G2N 发育至 8 月龄时,与对照组之间在大小上无太大差别^[37]。此外,Guo 等^[25]发现侏儒蛤 G2N 发育至 3 月龄(已成熟)时,雌核发育个体与正常雌性个体间,在长度和重量上无显著差别,表明近交衰退对有丝分裂Ⅱ(MⅡ)雌核发育影响很小。根据已报道的研究结果,雌核发育二倍体侏儒蛤性腺发育至 3 个月大部分个体均可观察到配子,且雌核发育怀卵量(2.4×10^5)比普通二倍体(3×10^5)的少,相对生殖力为 79%。其卵径($48.6 \pm 3.1\mu\text{m}$)与普通二倍体($49.1 \pm 3.1\mu\text{m}$)相当。Guo 等^[25]在进行侏儒蛤的雌核发育诱导时发现,至个体达性成熟时,所有雌核发育二倍体均为雌性,说明了侏儒蛤中雌性是同型配子(XX)形成的,由此提出侏儒蛤的性别决定类型属于 XX(♀)—XY(♂)型。这可能是首次在贝类中发现的性别决定类型。由于目前存活的 G2N 个体很少,对贝类雌核发育二倍体的生物学性状只是进行了初步的观察。有关雌核发育贝类的生长、发育及后代的能育性问题还有待今后深入研究。

5 雌核发育的细胞学研究

近年来,国外一些学者在贝类雌核发育发生机理、细胞学研究方面取得了一系列突破性进展,从而提供了贝类雌核发育的细胞学证据。李琪等^[39]在太平洋牡蛎 G2N 研究中表明,紫外线照射可以有效地使精子失活,UV 不仅可以破坏精子遗传物质还可使精子入卵后行为发生变化。UV 照射的精子入卵后虽然与正常精子一样发育成雄性原核,但在第一卵裂

中期,该雄性原核没有像雌性原核那样形成染色体而是浓缩为一染色质小体(DCB),游离在细胞质中,不参与核分裂^[10,14-16]。胞质分裂结束时,DCB游离于卵裂球中或滞留在卵裂沟上^[14]。雌性原核和雄性原核没有像鱼类那样相互融合形成合子核,而是在各自浓缩后进行染色体混合,进而形成第一次卵裂的中期分裂相^[22]。与正常卵相比,UV照射并没有影响成熟分裂以及雌性原核的形成,但使雌核卵的发育速度出现明显的滞缓^[23,38,42],表明抑制极体或卵裂产生三倍体的最佳时机并非适用于G2N的诱导。

6 雌核发育在贝类遗传育种中的意义和应用

在贝类遗传育种学的研究中,贝类人工雌核发育有着十分广泛的应用前景,如快速建立纯系并通过纯系间杂交选育个体大、生长快和抗逆性强的优良新品种^[27,43];基因定位^[34];基因-着丝点重组^[17,18,44]、贝类性别的遗传控制^[25]及其它贝类基础遗传学研究,其成果具有重要的学术意义和应用价值。

7 存在问题及展望

在海洋经济贝类方面,至今还没有成功培育出雌核发育二倍体成体的报道。与普通二倍体和三倍体相比,贝类雌核发育二倍体存活率较低,通常认为是近交衰退造成的。但Guo等^[12]认为经UV照射的精子DNA片段受损造成的遗传损伤可能是存活率下降的潜在原因。目前,贝类雌核发育二倍体的人工诱导非常困难,主要原因在于贝类雌核发育二倍体的生存率很低。作者认为这可能是由于(1)贝类含有的隐性致死或有害基因比鱼类多,因而诱发的雌核发育后代难存活;(2)经UV照射的精子本身虽不能参与细胞分裂,但精核仍残留在卵内,可能对卵的正常发育产生不利的影响,从而使G2N生存率降低。因此,在今后的雌核发育诱导中,进一步研究贝类雌核发育的诱导机制,精子超微结构变化与照射条件之间的关系可有效地提高贝类雌核发育的诱导效率;同时,进一步探讨贝类精子最佳失活及卵子染色体加倍条件将有助于改善贝类雌核发育二倍体的存活率。与贝类多倍体研究相比,贝类雌核发育的研究工作开展较晚,仍有许多问题需要深入探讨。如何提高雌核二倍体的诱导率及孵化率,培育出贝类雌核发育二倍体个体,仍是下一步研究所必须解决的问题及今后研究的重点。此外,G2N对环境条件的耐受能力、抗病性、在不同养殖条件下的表现等生产和生物学性状尚待今后进一步深入研究。

张全启教授、王昭萍副教授、郑小东博士给本文提出了宝贵的修改意见,在此一并表示衷心感谢。

参考文献:

水产学报2002,26(5):465-469

- [1] Allen Jr S K. Genetic manipulations-critical review of methods and performances for shellfish[A]. Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture(Vol.2)[M]. H Heenemann GmbH & Co. Berlin, Germany, 1987. 127-143.
- [2] Ihssen P E, McKay L R, McMillan I, et al. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications[J]. Trans Amer Fish Soc, 1990, 119: 698-717.
- [3] Lou Y D, Purdom C E. Diploid gynogenesis induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson[J]. J Fish Biol, 1984, 24: 665-670.
- [4] Han H, Taniguchi N, Tsujimura A. Production of clonal ayu by chromosome manipulation and confirmation by isozyme marker and tissue grafting[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1991, 57: 825-832.
- [5] Yamamoto E. Studies on sex manipulation and production of cloned populations in hiramé. *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquac, 1999, 173: 235-246.
- [6] Kado K. Breeding and biotechnology of aquaculture species. Red sea bream[J]. Youshoku(in Japanese), 1999, 36(8): 70-74.
- [7] Arai K. Chromosome manipulation[A]. Fish DNA: Molecular Genetic Approaches(in Japanese)[M]. Koseisha-Koseikaku, Tokyo, 1997. 32-62.
- [8] Pandian T J, Kooteswaran R. Ploidy induction and sex control in fish[J]. Hydrobiologia, 1998, 384: 167-243.
- [9] Stiles S. Conventional and experimental approaches to hybridization and inbreeding research in the oyster [A]. Proc 9th Ann Mtg World Mariculture Soc[C], 1978, 577-586.
- [10] Stiles S, Cromanski J, Longwell A. Cytological appraisal of prospects for successful gynogenesis, parthenogenesis, and androgenesis in the oyster [A]. Int Council for the Exploration of the Sea, Mariculture Committee Paper[C], 1983, F: 10.
- [11] Ma A P H. Gynogenesis induction in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) using ultraviolet light and cytochalasin B[D]. University of Washington, Seattle, USA, 1987.
- [12] Guo X, Hershberger W K, Cooper K, et al. Artificial gynogenesis with ultraviolet light-irradiated sperm in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

贝类多倍体育种研究现状

常亚青¹, 王子臣¹, 杨旦光²

(1. 农业部海洋水产增养殖生态学重点开放实验室, 大连水产学院, 辽宁 大连 116023;

2. 大连虎滩乐园有限公司水下世界, 辽宁 大连, 116001)

摘 要: 我国是世界海水养殖大国, 海水贝类在海水养殖中占有重要的地位, 开展贝类多倍体育种、育苗和养殖, 对于提高养殖贝类生长速度、增加出肉率、提高抗逆性意义重大。本文综述了国内外贝类多倍体育种的最新研究进展, 特别对主要经济贝类多倍体诱导的物理、化学和生物方法、多倍体的检测方法以及多倍体贝类的生物学性状进行了论述。

关键词: 贝类; 多倍体

中图分类号: S968.37

文献标识码: A

文章编号: 1003-1111(2002)01-0031-06

贝类多倍技术主要是通过化学、物理和生物等方法诱导产生三倍体, 对现有的养殖种类进行种质改良, 以提高养殖群体的生长速度, 改善养殖贝类经济性状、增强养殖生物的抗逆性。特别是在贝类、虾蟹类养殖比较发达的国家和地区, 更希望通过生产三倍体动物达到降低繁殖能量输出, 摄食能量较多地转化为生长的目的, 从而满足人们养殖生产中对提高生长速度、增加出肉率的渴求。

由于多数养殖贝类是将生殖细胞排放到水域环境中进行受精和发育, 卵子产出时处于第一次减数分裂的中期, 在受精后才完成成熟分裂, 放出第一极体和第二极体, 而且, 多数贝类产卵量较大, 因此, 贝类的多倍体相对容易操作。

1 已开展诱导多倍体研究的贝类种类

自1981年Stanley等最早诱导出美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)三倍体后^[1], 贝类的多倍体诱导技术受到普遍关注。目前已在32种以上的贝类开展了多倍体诱导研究(见表1, 表2), 其中包括7种牡蛎、9种扇贝、2种珠母贝、3种贻贝和蛤仔、4种鲍等一些经济双壳类和腹足贝类。

表1 诱导多倍体的腹足贝类种类

种 类
鲍 皱纹盘鲍 (<i>Haliotis discus hannai</i> Ino) ^[2-6]
杂色鲍 (<i>H. diversicolor</i>) ^[7,8]
(<i>H. diversicolor diversicolor</i>) ^[9]
九孔鲍 (<i>H. diversicolor suptexta</i>) ^[8]

2 多倍体诱导方法

2.1 温度及其他物理方法诱导贝类多倍体

温度休克和压力处理主要是破坏受精卵细胞微管的形成, 使微管解体、阻止微管的聚合过程, 染色体失去移动的动力, 从而抑制了染色体向两极移动, 形成多倍体细胞。电脉冲休克可使细胞发生融合, 进而诱发多倍体。

温度休克充分低温休克和热休克。温度休克具有成本低的特点, 经常被采用。温度的选择极为重要, 在确定休克温度时应根据贝类原生活海区的水温确定, 不可太低或太高, 否则多倍体的诱导效率低, 并导致胚胎死亡或发育畸形, 亚致死温度是诱发多倍体的合适温度。温度和其他物理方法诱导贝类多倍体的条件

收稿日期: 2001-09-07; 修回日期: 2001-10-24.

基金项目: 国家“863”重大资助项目(863-819-01)

作者简介: 常亚青(1967-), 男, 副教授, 博士; 研究方向: 海洋经济动物育种、育苗和养殖。

和结果见表3。

表2 诱导多倍体的双壳贝类种类

种 类	
牡蛎	太平洋牡蛎 (<i>Crassostrea gigas</i>) ^[10-16]
	美洲牡蛎 (<i>C. virginica</i>) ^[1,17]
	食物牡蛎 (<i>Ostrea edulis</i>) ^[18]
	大连湾牡蛎 (<i>C. talienwanensis</i>) ^[19]
	悉尼岩牡蛎 (<i>Saccostrea commercialis</i>) ^[20]
	近江牡蛎 (<i>C. rivularis</i>) ^[7,21]
	僧帽牡蛎 (<i>O. cucullata</i>) ^[22]
	海湾扇贝 (<i>Argopecten irradians</i>) ^[23]
扇贝	大扇贝 (<i>Pecten maximus</i>) ^[24]
	华贵栉孔扇贝 (<i>Chlamys nobilis</i>) ^[25]
	黑扇贝 (<i>C. varia</i>) ^[26]
	栉孔扇贝 (<i>C. farreri</i>) ^[27]
	虾夷扇贝 (<i>Patinopecten yessoensis</i>) ^[28-30]
	大西洋扇贝 (<i>Placopecten magellanicus</i>) ^[15]
	<i>A. purpuratus</i> ^[31]
	<i>A. ventricosus</i> ^[32]
珠母贝	合浦珠母贝 (<i>Pinctada martensii</i>) ^[33,34]
	日本珠母贝 (<i>P. fucata martensi</i>) ^[35,36]
贻贝	贻贝 (<i>Mytilus edulis</i>) ^[14]
	紫贻贝 (<i>M. galloprovincialis</i>) ^[37,38]
	(<i>M. chilensis</i>) ^[39]
蛤仔	菲律宾蛤仔 (<i>Ruditapes philippinarum</i>) ^[40]
	(<i>Tapes semidecussatus</i>) ^[41]
其他	文蛤 (<i>Meretrix meretrix</i>) ^[42]
	砂海螂 (<i>Mya arenaria</i>) ^[43]
	鸟蛤 (<i>Fulvia mutica</i>) ^[44]

表3 温度和其他物理方法诱导贝类多倍体的条件和结果

处理强度	种 类	处理起止时间 /min	诱导结果
37℃	近江牡蛎	3~6	28% 4n [*] [21]
38℃	长牡蛎	10~20	45% 3n ^[11]
35℃	长牡蛎	55~78/5~28	45% 4n/19.4% [13]
12℃	合浦珠母贝	17~32	52.6% 3n ^[33]
8~11℃	杂色鲍	12~27	12%~52% 3n ^[7]
32℃/8℃	文蛤	10~25/10~25	40% 3n/53.1% [42]
0~1℃, 37℃	僧帽牡蛎	22~32, 18~28	55.2% 3n ^[22]
8℃/32℃	文蛤	10~25/10~25	40% 3n ^[42]
1.96×10 ⁴ pa	皱纹盘鲍	7~18	60% 3n ^[2]
静水压			
3℃/35℃	皱纹盘鲍	12~27/22~23	60% 3n ^[2]
600v/m电脉冲	长牡蛎	80~230/100~250	55% 3n/20% 4n ^[45]
600v/m电脉冲	贻贝	80~380/100~400	26% 4n ^[45]

* 授精后 min, * 3n 和 4n 分别代表三倍体和四倍体, 下同。

2.2 化学药物诱导多倍体

药物诱导多倍体贝类报道较多, 经常使用的药物主要有细胞松弛素 B (CB)、6-二甲氨基嘌呤 (6-DMAP)、秋水仙素、咖啡因和聚乙二醇等。

CB 能破坏构成微丝的肌动蛋白纤维, 通过阻止分裂沟的形成, 抑制细胞质分裂, 阻止极体的释放。6-DMAP 是蛋白激酶抑制剂, 可以破坏细胞分裂中期纺锤丝的形成, 从而诱导三倍体。秋水仙素和咖啡因对微管具有特异性作用, 可阻断微管蛋白组装成微管结构, 从而阻止细胞分裂, 咖啡因一般与热休克结合使用。聚乙二醇是常用的细胞融合剂, 通过细胞融合而使细胞染色体加倍。药物诱导条件和结果见表4。

表4 药物诱导贝类多倍体的条件和结果

药物种类	药物质量浓度	种 类	处理起止时间 /min	诱导结果
CB	0.25 mg/L	美洲牡蛎	FB1 出现 50% 后 处理 10~15 min	95% 3n ^[1]
CB	1.0 mg/L	长牡蛎	30~45	90% 3n ^[12]
CB	1.5 mg/L	僧帽牡蛎	18~33	55.2% 3n ^[22]
CB	0.05~0.1 mg/L	海湾扇贝	10~30	66% 3n, 94% 3n ^[23]
CB	0.5 mg/L	大扇贝	10	94% 3n ^[24]
CB	0.5 mg/L	华贵栉孔扇贝	15~30	75% 3n ^[25]
CB	1 mg/L	黑扇贝	20~35	56% 3n ^[26]
CB	0.1/0.5 mg/L	<i>A. ventricosus</i>	FB1 出现 50% 后 处理 15 min	8% ± 0.5% 3n, 5% ± 0.5% 4n ^[32]
CB	1.2 mg/L	合浦珠母贝	3~8/17~32	52.6% 3n ^[33]
CB	1 mg/L	地中海贻贝	7~35	17.2% 3n(贻贝) ^[38]
CB	1 mg/L	菲律宾蛤仔	20~35	65% 4n(胚胎) ^[40]
CB	0.5 mg/L	<i>T. semidecussatus</i>	15~30	70% 3n ^[41]
CB	1 mg/L	砂海螂	15~30	68% 3n ^[43]
6-DMAP	50~100 μM	虾夷扇贝	12~14	83.3%~95.1% [28]
6-DMAP	600 μM	太平洋牡蛎	10~25	71.3% 3n ^[16]
6-DMAP	300 μM	长牡蛎	15~35	85% 3n ^[15]
6-DMAP	400 μM	太平洋扇贝	70~85	72% 3n ^[15]
6-DMAP	60 mg/L	栉孔扇贝	FB1 出现 40% 后 处理 15 min	80% 3n ^[27]
咖啡因	2.5~32.5~15nM	皱纹盘鲍	12~27	30%~85% 3n ^[6]

2.3 生物方法诱导贝类多倍体

采用种内杂交或种间杂交并经药物、温度处理产生异源多倍体等方法诱导多倍体贝类。如 Guo 等采用四倍体太平洋牡蛎和二倍体杂交, 后代均为三倍体^[46], 为贝类三倍体的规模生产和产业化提供了良好的范例。

3 多倍体贝类的生物学性状

3.1 多倍体的成活

三倍体处理组在胚胎及幼虫期, 由于物理、化学的处理, 使胚胎细胞受到一定程度的伤害, 因此, 造成胚

胎的幼虫比二倍体对照组较高的死亡和畸形现象^[34],但对成体的研究结果差异较大。林岳光等研究表明,三倍体和二倍体合浦珠母贝成体在养殖期成活率无明显差别^[47](表5)。张国范等(2000)对比了不同海区的三倍体长牡蛎的养殖情况,三倍体除在个体重与出肉率等方面分别比二倍体高42.1%和16.2%外,三倍体的养殖成活率也比二倍体高^[48]。

研究表明,四倍体诱导贝类,无论通过抑制正常受精卵的极体释放,还是通过抑制正常受精卵第一次有丝分裂,或细胞融合,绝大部分贝类得不到具有成活能力的四倍体稚贝,仅在紫贻贝和栉孔扇贝通过抑制第一极体得到比例很低四倍体稚贝^[38]。

表5 三倍体贝类与二倍体成活情况

种 类	三倍体和二倍体的成活对比	三倍体(3n)和二倍体(2n)幼、成体成活对比
扇贝 ^[26]	实验组三倍体比二倍体低	
合浦珠母贝 ^[47]	三倍体明显低于二倍体	成体无明显差别
皱纹盘鲍 ^[49]		在高温下,减数分裂Ⅰ-3n成活率最高,2n次之,减数分裂Ⅱ-3n最低
<i>T. sinensis</i> ^[39]	三倍体早期成活率明显低于二倍体	

3.2 多倍体的发育和生长

关于贝类多倍体在生长中的优势体现,除在贻贝的幼虫发现三倍体与二倍体存在差异外^[14],多数研究认为,贝类在达成熟期后,三倍体才显示出生长方面的优势^[50]。表6列出了部分贝类多倍体与对照在生长方面的比较。

3.2.1 牡蛎

悉尼岩牡蛎在2.5年后三倍体平均比二倍体重41%,在达到上市前的10个月中,三倍体比二倍体保持着较高的干肉重和条件指数,三倍体经二倍体提前6-18个月达市场规格,同时保持了较高的出肉率,此外避免了冬季悉尼岩牡蛎的死亡危险^[20]。

对美洲牡蛎和长牡蛎等的研究结果显示,人工诱导的三倍体在正常的二倍体性腺未成熟前的生长情况,与二倍体大致相同或比二倍体略差,但在二倍体产卵期,三倍体的生长不停滞,产卵期之后的生长明显优于二倍体。这表明三倍体生长速度快主要是由于其性腺发育受到了抑制,体内积累的能量转移到体细胞生长的缘故。三倍体牡蛎周年软体肉重、糖原等含量比二倍体高^[5]。

表6 三倍体的生长特性

种类	三倍体和二倍体幼虫生长对比	三倍体和二倍体幼虫或成体生长对比
美洲牡蛎		得卵幼虫到6月前与二倍体对照组同,3年后个体,由于抑制第一极体三倍体存活率高,生长速度快于对照组和抑制第二极体三倍体 ^[1] 2.5年时三倍体比二倍体体重大41% ^[20]
悉尼岩牡蛎		
文蛤	无显著性差异 ^[42]	3周内的稚贝三倍体比二倍体壳长大4%,但无显著性差异 ^[32]
<i>T. doratus</i>	无显著性差异	三倍体在壳长、壳宽和体重上明显高于二倍体 ^[53]
合浦珠母贝		205 d时,三倍体处理组总重比二倍体对照大28%,软体部比二倍体重37%,闭壳肌比二倍体重63% ^[32]
<i>A. ventricosus</i>		
扇贝	无显著性差异 ^[26]	

3.2.2 扇贝

研究表明,同条件下养殖的*A. ventricosus*,在达到205 d时,三倍体处理组总重比二倍体重63%,同年龄下三倍体处理组与二倍体对照组相比,壳高和壳宽分别增加9%和10%。280 d时,三倍体个体重比二倍体增加86%,软体重增加111%,闭壳肌增加182%^[32]。海湾扇贝三倍体和二倍体对照个体在同一海区养殖100 d,三倍体的壳厚比二倍体有明显的生长优势,三倍体的闭壳肌重量和软体部重量分别比二倍体大73%和36%,同时糖原含量也有所增加^[23]。

华贵栉孔扇贝,9个月时二倍体和三倍体之间没有明显的数量特征差异,但是在14个月时,三倍体的壳宽和肉重比二倍体的明显大。林岳光等(1995)报道,华贵栉孔扇贝三倍体肉重和闭壳肌分别比二倍体增加39.5%和67.4%^[47]。

3.2.3 珍珠贝

姜卫国等(1991)对比了合浦珠母贝三倍体与二倍体的生长结果,三倍体的壳长、壳宽、壳高和体重均大于二倍体($P < 0.01$),抑制第一极体三倍体壳高和体重分别比二倍体增加13%和44%,特别是在繁殖期显著高于二倍体^[53]。

3.3 多倍体的性腺发育及其他性状

大多数三倍体贝类的性腺发育受阻或不发育。海湾扇贝二倍体的性腺中发现活液精子和发育良好的卵子时,三倍体性腺中未发现成熟的精子和卵子^[22]。三倍体华贵栉孔扇贝的性腺虽然在组织切片中可以观察到精母细胞和卵母细胞,但不形成正常的配子。组织学方法观察到三倍体砂海螂的卵原细胞发育不正常,配子发生停滞。姜卫国等(1990)观察三倍体合浦珠母贝三倍体能形成成熟的