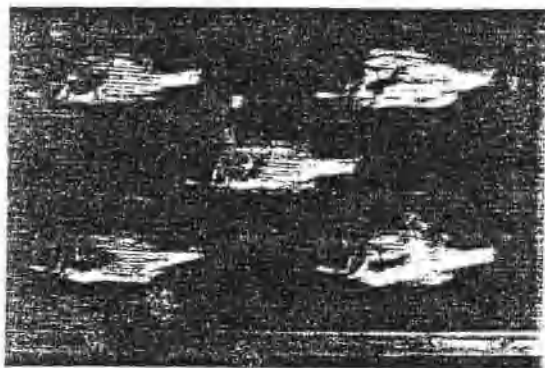


真鲷育种·生物技术 现状与未来

家户敬太郎

(近畿大学水产研究所)

应用染色体操作雌性发生技术,近畿大学水产研究所成功作出全雌克隆真鲷。本文以真鲷克隆化技术为中心,介绍一下全雌克隆真鲷作出方法和今后课题。



照片1 全雌克隆真鲷

就1997年度各养殖鱼种海面养殖产量(农林水产省统计情报部)而言,鲷类最多,约13.8万吨,其次是真鲷,约8.1万吨,往下是银鲑、牙鲆、东方鲀类,但均在1万吨以下,鲷类和真鲷合起来约达总产量86%。至于该年度养殖用苗种生产实绩(水产厅·日本栽培渔业协会),真鲷最多,约5,300万尾,随后是牙鲆(1,700万尾)、红鳍东方鲀(1,400万尾),而鲷类62.5万尾,只占总生产量0.7%。不同于依赖天然苗种的鲷类,真鲷基本全靠人工苗种,作为育种对象,整个生命周期受到人为良好控制的真鲷被认为是最重要的鱼种。

近畿大学水产研究所自60年代上半期着手养殖用真鲷品种改良,通过耗时30多年的选拔育种,作出生长迅速的真鲷品种(Murata et al., 1996),该品种现已用于西日本各地养殖。然而,受近年经济萧条,生产过剩导致鱼价低迷影响,现已要求生长较快,外观出色的真鲷。真鲷雄鱼

一进入产卵期,即因2次性征而体色发黑,商品价值下降,以致在这一时期,只好挑选雌鱼上市。于是,我们以生产优良性状得以固定的全雌克隆真鲷为目标,应用染色体操作雌性发生技术,致力新的养殖用真鲷品种作出。

在鱼类育种中,克隆有助于优良性状固化,有助于各种性状均化,并且,作为实验鱼,想必也很不错。作为通过染色体操作作出克隆鱼,在淡水鱼类中,见于斑马鱼(Kobayashi et al., 1994)、青鳉(Naruse et al., 1985)、香鱼(Han et al., 1991)、鲤鱼(Komen et al., 1991)、陆封琵琶湖大麻哈(Streisinger et al., 1981)等,但是,在海水鱼类中,除牙鲆(山本荣一,1995)之外,基本提不起来。此次,介绍一下应用染色体操作雌性发生技术作出全雌克隆真鲷情况。

真鲷雌性发生2倍体作出方法

对于鱼类雌性发生2倍体作出原理或其方法,已有许多优秀综述(铃木亮,1989,荒井克俊,1997),因而,这里只想简单谈谈。鱼类雌性发生2倍体是在用经紫外线处理等遗传灭活精子对鱼卵受精后,通过阻止第1卵裂或第2极体放出作出。就第1卵裂阻止型雌性发生2倍体而言,所获得的雌性发生2倍体各基因位点均为同祖接合型,因而,由该鱼所获得的鱼卵和精子的基因组成全都同一,通过对该鱼卵再度施以雌性发生,或用由第1卵裂阻止型雌性发生2倍体所取得的精子受精,即得到克隆。

就第2极体放出阻止型雌性发生2倍体而言,随着基因位点一动原体间互换,部分基因位点出现异祖接合型,因而,不作为克隆作出用亲

鱼。不过,鉴于第1卵裂阻止型雌性发生2倍体作出与饲养困难,最近,通过第2极体放出阻止型雌性发生2倍体继代克隆化也有尝试(荒井克俊,1997)。

对于真鲷第1卵裂阻止型雌性发生2倍体作出,泷川由宇登等(1994)已有报道,在用经紫外线处理的真鲷或条石鲷精子对真鲷鱼卵媒精后,通过自45分钟后施以5分钟700公斤/厘米²高压处理,有35.1%鱼卵孵化,所孵出的仔鱼有53.4%为正常2倍体仔鱼。

就第2极体放出阻止型雌性发生2倍体作出而言,在第2极体放出阻止上,与3倍体作出方法相同,若用普通精子媒精后,阻止第2极体放出,即作出3倍体,若用紫外线处理精子媒精,即作出雌性发生2倍体。对于真鲷3倍体作出方法,荒川敏久等(1987,1989)已有报告,通过自媒精后施以15分钟0℃低温处理,第2极体放出即可阻止。

在作出真鲷雌性发生3倍体时,我们使用经紫外线处理的条石鲷精子,条石鲷产卵水温比真鲷高数度,但在真鲷产卵期也可采精,采取挤出法,很容易采到精子,另外,即使用条石鲷精子对真鲷鱼卵媒精,也得不到正常仔鱼,因而,在使用紫外线处理条石鲷精子情况下,真鲷雌性发生3倍体作出证明变得容易,以真鲷鱼卵孵化率为指标,对条石鲷精子最适紫外线照射量探讨表明,3,000尔格/毫米²为宜。再者,在对条石鲷精子施以紫外线处理时,用海产鱼类用缓冲生理盐水,每升含NaCl 8.00克,KCl 0.45克,CaCl₂ 0.20克,NaHCO₃ 0.002克)稀释50倍后,再作紫外线处理。

克隆真鲷作出

第1卵裂阻止型雌性发生2倍体真鲷作出(村田修等,1995):前已述及,要想依赖雌性作出克隆真鲷,首先必须作出第1卵裂阻止型雌性发生2倍体。借鉴泷川由宇登等所报道的方法,我们于1995年3月对选拔育种真鲷鱼卵,用经紫外线处理遗传灭活条石鲷精子媒精,于媒精15分钟后施以5分30秒700公斤/厘米²的高水压处理,阻止第1卵裂。结果,孵化率为12.3%,孵出仔鱼中,35.0%为正常2倍体。第1卵裂阻止型雌性发生2倍体初期成活率低得多,同时饲养的普通2倍体孵化第20天成活率为45.0%,而第1卵裂阻止型雌性发生2倍体同期成

活率为11.3%,孵化后第50天,对照组为32.3%,而第1卵裂阻止型雌性发生2倍体组为3.6%。

第1卵裂阻止型雌性发生2倍体生长和饲料效率均不如普通2倍体,以生长为例,孵化后第1年前后,普通2倍体和第1卵裂阻止型雌性发生2倍体平均体重分别为233.4和194.9克,孵化后第2年前后,分别为1,009.4和657.7克。并且,作为第1卵裂阻止型雌性发生2倍体特征,外部形态分散,就是说,差异大,以孵化后第91天体重为例,第1卵裂阻止型雌性发生2倍体分散度约为普通2倍体4倍。

上述表明,第1卵裂阻止型雌性发生2倍体成活率、生长等均不如普通2倍体,规格不匀,这想必是由于全部基因位点为同祖接合型,产生近交弱勢效果、发生过程失稳所致。第1卵裂阻止型雌性发生2倍体看来不宜作为养殖苗种直接使用,即使在作为克隆用亲鱼使用场合,也必须从中选拔性状优良个体。鉴于在选拔优良个体时,母体群体尽可能大些,效果好些,对第1卵裂阻止型雌性发生2倍体作出方法还应进一步探讨,必须确立大批饲养技术。

克隆真鲷作出(家户敬太郎等,1999):1998年4月,由上述第1卵裂阻止型雌性发生2倍体采卵。对所采鱼卵,以紫外线处理遗传灭活条石鲷精子媒精,自媒精3分钟后施以15分钟0℃低温处理,阻止第2极体放出,作出基因全部与亲体相同的同祖型克隆(同祖克隆)。由于该同祖克隆与亲体相同,全部基因位点为同祖接合型,想必生长和成活不如普通个体。

同祖克隆、异祖克隆和普通2倍体的胚体形成率、孵化率和正常孵化率如表1所示。同祖克隆胚体形成率、孵化率和正常孵化率均显著低于普通2倍体,但异祖克隆各指标值等同或略高于普通2倍体。同祖克隆孵化后第30天初期成活率显著低于普通2倍体,但异祖克隆该指标较高,与普通2倍体之间并无显著差异。就孵化第30天以后成活率而言,同祖克隆和异祖克隆均呈高值走势(表2)。

同祖克隆和异祖克隆平均尾叉体长与普通2倍体平均尾叉体长比较如图1所示。在整个饲养期间,同祖克隆生长始终显著不如异祖克隆。可是,异祖克隆生长与普通2倍体基本相同。并且,异祖克隆孵化后第200天体重离散也显著小于普通2倍体(图2)。

表 1 同祖克隆、异祖克隆和普通 2 倍体胚胎形成率、孵化率和正常孵化率(%)

	同祖克隆	异祖克隆	普通 2 倍体
胚胎形成率 ^a	77.0 ^a	47.3 ^b	65.3 ^a
孵化率 ^b	45.3 ^a	36.3 ^b	83.3 ^a
正常孵化率 ^c	33.3 ^a	37.3 ^b	32.3 ^a

abc 不同数字之间, 差异显著 ($p < 0.05$).

a 胚胎形成率 = 胚胎形成数 / 总卵数 $\times 100$.

b 孵化率 = 孵化仔鱼数 / 总卵数 $\times 100$.

c 正常孵化率 = 正常孵化仔鱼数 / 总卵数 $\times 100$.

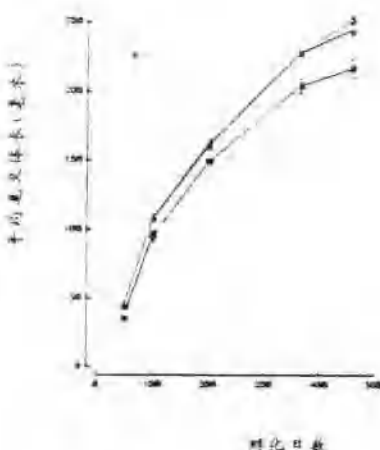


图 1 同祖克隆、异祖克隆和普通 2 倍体平均尾叉体长走势

方线: 同祖克隆; 圆点: 异祖克隆;

三角: 普通 2 倍体。

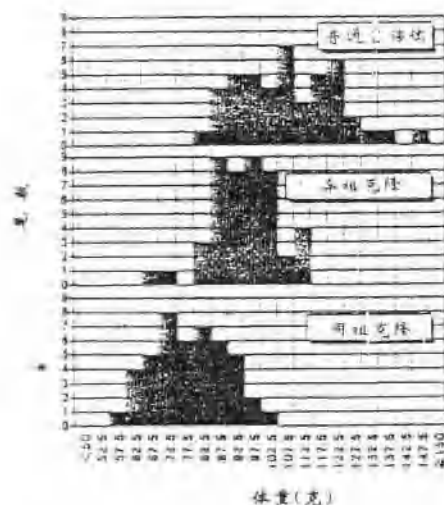


图 2 普通 2 倍体、异祖克隆和同祖克隆体重矩形图

表 2 同祖克隆、异祖克隆和普通 2 倍体成活率走势(%)

	同祖克隆	异祖克隆	普通 2 倍体
孵化~孵化后第 10 日	3.30 ^a	15.35 ^a	33.37 ^a
孵化后第 10~30 日	18.22 $\pm$ 5.30 ^a	19.38 $\pm$ 3.13 ^a	33.56 $\pm$ 10.13 ^a
孵化后第 30~100 日	70.46 $\pm$ 11.20	65.40 $\pm$ 2.49	38.36 $\pm$ 4.37
孵化后第 100~200 日	34.47 $\pm$ 5.77 ^a	33.33 $\pm$ 3.11 ^a	33.06 $\pm$ 5.51 ^a

ab 不同数字之间, 差异显著 ($p < 0.05$).

上述表明, 同祖克隆成活率和生长也都不如普通 2 倍体, 然而, 正如后面所谈到的, 同祖克隆并不用于成鱼养殖, 用作克隆大量生产所用亲鱼, 从而, 从孵化第 30 天以后成活率不低这点来看, 培育成亲鱼想必可能, 作为克隆大量生产用亲鱼利用想必可行。异祖克隆成活和生长均不次于普通 2 倍体, 加上规格均匀, 可望作为养殖品种利用。

克隆真鲷大量生产, 通过用 17 α -甲基睾酮等激素使雌性发生 2 倍体部分伪雄化, 让雌性发生 2 倍体雌鱼与伪雄自然产卵, 雌性发生 2 倍体产业规模大量生产即可办到。特别是性染色体同雄 (XX) 品系, 通过伪雄与雌鱼交配, 即可生产全雌。鉴于激素投喂必须赶在性分化时期进行, 我们对选拔育种真鲷性分化时期有过探讨, 结果表明, 在稚鱼期, 所有个体性腺均分化为卵巢, 半数个体依旧为雌性, 余下半数自孵化后第 3 个月开始出现精巢, 到 1~2 龄完全分化为雄性 (Katoh et al., 1999)。现在, 已在探讨真鲷伪雄化必用激素 (17 α -甲基睾酮) 投喂数量, 投喂时期, 投喂时数等。只要能够通过投喂激素伪雄化, 就能够通过使同祖克隆伪雄, 将其与别的品系同祖克隆雌鱼共同收容于亲鱼水槽, 让其自然产卵, 随之大量生产克隆真鲷。今后, 为了作出性状优良的克隆, 在确立伪雄化技术同时, 必须大量作出第 1 卵裂阻止型雌性发生 2 倍体和第 2 极体放出阻止型雌性发生 2 倍体, 从中挑选性状优良个体, 固定作为新的品种。

[译自日本《养殖》1999 年 36 卷 8 期 70~

74 页]

真鲷虹彩病毒病

通山哲郎

(阪大微生物病研究会观音寺研究所)

真鲷虹彩病毒病于1990年在真鲷养殖场突然发生,并造成大量死亡。尔后,约在10年内,该病逐渐蔓延到其它鱼种,现在,对于海产养殖业者,构成严重威胁。

症状:真鲷虹彩病毒病以西日本为中心见于水温超过20℃夏秋高温水期。作为病鱼症状,体色发黑,鳃因贫血而退色,游动异常。死鱼多半脾脏肥大,眼球突出。

病因与诊断:该病起因于认为属于虹彩病毒科的虹彩病毒(照片1)。水产厅养殖研究所病理部已经进行该病毒基础研究。结果,围绕诊断问题,已开发出简易诊断法,即应用Giemsa染色法检查主要见于脾脏组织的异形肥大细胞,并已开发出确定诊断法,即应用单克隆抗体间接荧光抗体法(照片2)或基于病毒基因配列的PCR法确认病毒,早期诊断已有可能。

应用上述方法确认该病毒感染的鱼种增加到20种以上,产业所受危害也随之扩大。

防治对策:该病为病毒性疾病,因而,不能指望用抗生物物质治疗,作为发病时应急对策,采取旨在减轻压力的停喂或合理调整密度等措施。

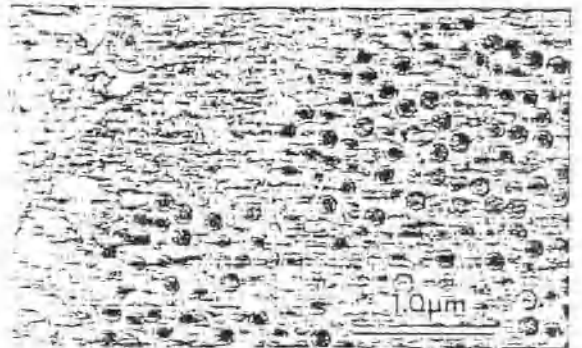
在欧洲,对发病前应用疫苗免疫处理预防重视程度要高于发病后治疗,这不只出自预防感染考虑,也出自环境保护、食品卫生等方面考虑。最近,在日本,应用疫苗免疫处理预防对策也日益普及。

在这种形势下,今春,作为有效预防真鲷虹彩病毒病的疫苗,即真鲷虹彩病感染症灭活疫苗(虹彩病毒灭活疫苗)(照片3),在世界率先用于生产,并上市。

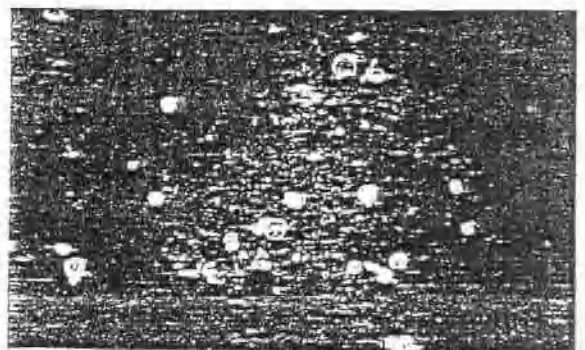
其预防效果通过以真鲷为对象的室内实验和野外试验得到充分证明,安全性也已确认。

该疫苗按每尾真鲷(5~20克左右)0.1毫升剂量利用连续注射器施以肌肉或腹腔注射。注射处理在日本首次尝试,不过,与其它接种方法相比,能够确保定量接种到体内,通过使用连续注射器,可以安全而有效地预防该病。

对鱼类传染性疾病的初期重要预防措施想必最好还是平素合理饲养与卫生管理。在这一基础上,疫苗预防效果势必得以充分发挥。在使用该疫苗时,希望认真确认制品所附资料内容。另外,要想购买疫苗,有必要参考指导机构所发给的水产疫苗使用指导书。



照片1 真鲷虹彩病毒



照片2 间接荧光抗体法



照片3 真鲷虹彩病毒病天活疫苗

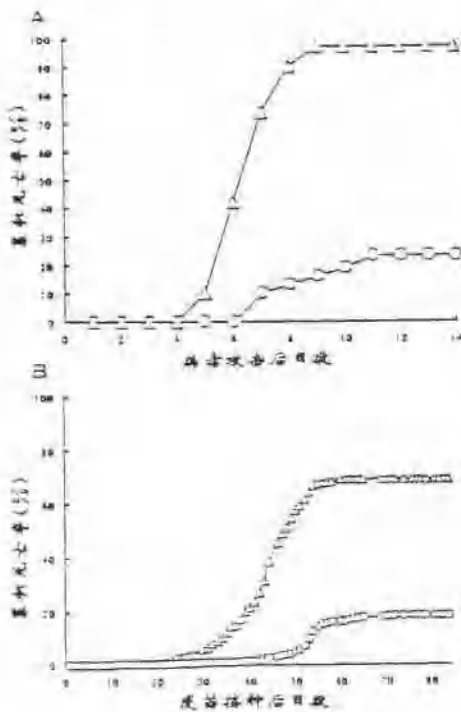


图1 疫苗预防效果

A: 室内实验; B: 野外试验;

三角: 未接种疫苗鱼群; 圆

圈: 接种疫苗鱼群。

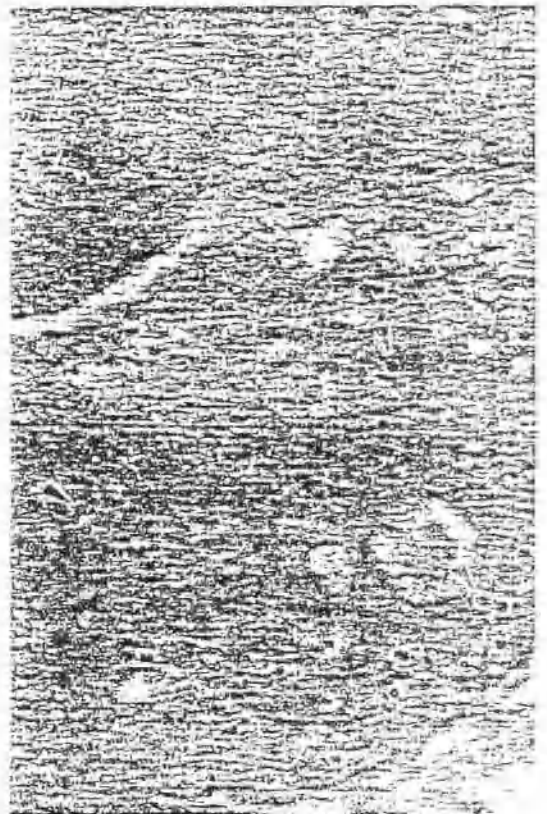
通过接种该疫苗,可以减轻真鲷虹彩病毒病所引起的真鲷死亡,真鲷养殖生产可望安定。

[译自日本《养殖》1999年36卷7期100~

101页]

〔二、讨论〕

贫血,毕竟难以发现。另外,电子显微镜观察发现,患病牙鲆造血组织有病毒样粒子(照片4),怀疑该粒子与贫血病有牵连,不过,尚未确切证实该粒子就是病毒。如果是病毒致病,那么,也可能是寄生虫传播病毒。



照片4 贫血牙鲆造血组织细胞内的病毒样粒子(箭头)

粒子直径接近30毫微米。

对策:由于病因不明,眼下,除努力实施一般性防疫之外,并无一定对策。该病病情发展想必缓慢,似乎不会一下子引起大量死亡,正因为如此,早期发现也就困难,容易蔓延。

尤其值得指出的是,在苗种生产现场,在引进新的亲鱼时,应长期隔离培育后备亲鱼,确认没有贫血病发生,不可掉以轻心。不用说起码要避开有贫血病症状的牙鲆,即使看似健康,也应检查口腔内有无寄生虫。

[译自日本《养殖》1999年36卷12期102

~103页]

— 3 —