



鱼类化学诱变的研究

A REVIEW OF CHEMICAL MUTAGENESIS OF FISH

刘世英

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心)

Liu Shiying

(Freshwater Fisheries Research Centre, Chinese Academy of Fisheries Sciences)

国外诱变育种工作始于1927年。Muller(1927)和 Stadler(1928)发现用X射线辐照,可以提高动植物的突变频率。1943年 Anerbach 和 Robson在果蝇研究中发现了第一个化学诱变剂——芥子气,这又为诱变的研究揭开新的一页^[1]。目前已知有突变活性的化合物达数百种,并每年都在增加着。我国诱变育种始于1958年,廿多年来,用诱变方法育成的农作物新品种(或品系),在数量和推广面积方面都已超过外国,成绩巨大。但在动物方面还很少应用,在家蚕、鱼类上的试验表明,仍有应用前景。鱼类化学诱变国内刚开始研究,国外则在六十年代就已开始,对象主要为鲤、鲢、鳙、淡水鲑、高白鲑和胭脂鱼等,不论在诱变方法和实践成果方面都取得了较大进展^[3,16]。现就国外鱼类化学诱变研究概况、进展作一评述。

化学诱变后代获得的方法

化学诱变剂可分下列几类:烷化物;氧化剂、还原剂和自由基;前体核酸抑制剂、碱基类似物;吡啶类染料等。

由于养殖鱼类体外受精,具有很高的繁殖力,这就允许选择精子、卵子、或不同发育阶段的胚胎进行化学诱变。目前一般采用诱变剂作用于鱼的成熟精子。因为精子的头部主要由高含量DNA的核物质组成,各种诱变剂容易作用于雌性细胞的遗传结构,其遗传效应最大^[11]。诱变处理时,用生理盐水配制的诱变剂溶液,对精液作四倍稀释;处理持续时间和温度取决于该种鱼的产卵温度,温水性鱼类(如鲤科)采用20—22°C、处理30分钟;冷水性鱼类(淡水鲑),采用4—5°C、处理一小时。

鱼类化学诱变,当前主要利用一类具有反应能力强的烷化物,其中包括:亚硝基甲基脲(Nitrosomethylurea, NMU);亚硝基乙基脲(Nitrosoethylurea, NEU);亚硝基甲基双缩脲(Nitrosomethylbiurea, NMB);亚硝基二甲基脲(Nitrosodimethylurea, NDMU);硫酸二甲酯(Dimethylsulphate, DMS);硫酸二乙酯(Diethylsulphate, DES);乙烯亚胺(Ethylenimine, EI);环氧乙烷(Ethyleneoxide, EO);1,4-双-重氮乙酰基丁烷(1,4-bis-Diazoacetylbutane, DAB);甲基磺酸乙酯(Ethylmethane sulfonate, EMS)。这一类物质烷化DNA分子,自由基如甲基(CH₃)、乙基(C₂H₅)、丙基(C₃H₇)进入其中,从而引起碱基结构的变化和可能出现配对错误,以致发生基因突变。

化学诱变剂对池塘养殖鱼类的影响

在比较各种诱变剂对试验鱼产生诱变效应时,必须从不同水平上(染色体、细胞学、生物体)进行判

定:

一、诱变剂的总致死效应与遗传致死效应。

在诱变剂作用后不久(近期内)鱼类生命力的降低,可认为是各种诱变剂总的致死效应。鱼类出现诱变剂的遗传致死效应(利用化学诱变剂处理鱼的精子而受精的鱼)是由于发生显性致死突变的结果。必须区分遗传效应和总的致死效应,因为只有前者才是化学诱变剂所特有的。

精子受精能力的影响是总的致死效应的原因,这与性细胞原生质结构的损伤有关。利用强化学诱变剂(以较大剂量变幅)处理过的精子的受精能力仍较强,只有在诱变剂浓度很高时,处理组的发育胚胎才显著低于对照组;诱变剂之间抑制精子受精能力的差异也只有在较高浓度下(0.02%)出现;其中毒性最大的是NMB、NMU、DMS^[10];试验中发现,化学诱变剂处理精子可以提高其受精能力,尤其是当对照组发育胚胎数(鲢、鲤)不高时,出现上述情况,烷化物对鱼类成熟精子的刺激作用,可能与诱变剂和酶之间复合体的激活作用有关^[13]。

遗传致死效应是由于化学诱变剂作用的结果。试验表明^[12],在精子受处理过的情况下,其基因物质中发生致死变化的实现,不是受精一开始立即产生,而是从囊胚后期开始,以后取决于诱变损伤的特点,致死变化贯穿于不同胚胎期和胚胎期后;不同的诱变剂,其诱发的显性致死突变出现的时期不同,如利用DMS处理鲤鱼精子后,诱发的大部分显性致死突变是在胚胎期、主要在原肠期发生,而以后阶段死亡率不大;与DMS处理组相反,NEU处理组不仅不增加胚胎死亡率,而可能对其生命力有刺激作用。NEU诱发鲤鱼的致死突变主要发生于胚胎期后阶段。DMS和NEU诱发致死突变动态的这种差异是与这些诱变剂引起的损伤特性不同有关。用DMS作用于鲤鱼精子时,主要发生了导致胚胎期死亡的染色体畸变,而NEU常引起点突变。能够引起胚胎死亡的基因致死突变频率(尤其对多倍体鲤鱼)不高。但是在个体发育的往后阶段,随着所有遗传信息的作用,出现所有的致死突变,包括基因突变。

随着诱变剂浓度的增加(从亚生活力到致死),细胞中染色体各种形式的畸变数量增加,这是所有化学诱变剂作用的一般规律。产生单个的和一群染色单体桥及染色体桥、染色体融合和发生多极有丝分裂,是化学诱变剂作用下发生的最典型的染色体畸变。一般来说,大部分烷化物主要在染色单体水平上诱发重建,但在DMS作用下常发生染色体型的畸变。

二、可见基因突变的频率

采用控制鲤鱼鳞型的基因的分析法,可以判明诱变剂诱发鱼类基因突变的效率。研究发现,鲤鱼的鳞型是受两对常染色体基因(S和s,N和n)控制的,这些基因的不同组合,可出现表型不同的四种鲤鱼(鳞鲤、散鳞镜鲤、线鳞镜鲤、革鲤)。试验中采用未经处理过的散鳞镜鲤的成熟鱼卵(基因型为ssnn),与诱变处理过的精子受精,雄鱼的选择应考虑到所得后代中可以发现某个等位基因的突变。例如,这样的杂交组合($\text{♀ ssnn} \times \text{♂ SSnn} \rightarrow \text{Ssnn}$)中,按常规所有的后代基因型都为Ssnn的鳞鲤,如后代中出现散鳞镜鲤(ssnn),这与S等位基因突变为等位基因s有关;而后代中出现线鳞镜鲤(SsNn),则是等位基因n突变为N。

试验表明^[6,10,11],NEU提高鲤鱼鳞被基因突变频率500倍以上,EI和DES在基因水平上诱变也有高效,但其诱变效率为NEU的1/3~1/4,DMS的诱变效率较低。

用两种诱变剂(DMS和NEU)处理鲤鱼成熟精子。在染色体和基因水平上比较其诱变效率表明,NEU处理组基因突变频率高,染色体畸变频率低,而DMS处理组则情况相反。

三、形态变异频率与变异谱

强诱变剂常引起相当大量的鱼出现形态明显变异,Tzoy的试验^[10,9]表明,形态变异的诱变频率首先取决于诱变剂浓度,用EI和NEU处理鲤鱼精子,其当年鲤的形态变异最具多样性,变异频率也最高;致

死突变(根据诱变死亡率确定)与非致死突变形态变异的比例,各种诱变剂的情况不一样^[13],如用 EI 作用于鱼的精子时,观察到变异个体的比例最大(50%),但使用的浓度超过其半致死浓度;而 NEU 处理组,变异个体比例最大时,其使用的浓度低于半致死浓度。

研究中发现^[4,5,7~10],在各种诱变剂作用下发生的形态变异范围是很广的,最有效的诱变剂(NEU、NMU、EI)可提高各种形态生理性状(包括可数性状和指数)的变异性;用强诱变剂处理精子,可使当年鳃生长速度变异增加到2~3倍。近于半致死浓度的诱变剂处理精子,其诱变效果最好,有时生长突快的突变体,其生长速度较对照组中最大的个体要快一倍^[16]。出现这些新的生长类型鱼,可能由非遗传因子引起的:竞争食物能力的提高;也有可能诱变剂对个别个体有刺激生长(但不遗传)变异的作用。但可以推测,在某些状况下,改善鱼类的生产性能是与遗传诱变有关。提高遗传诱变在总的变异中的比重是诱变育种者的重要任务。

由于池塘养殖鱼类的世代交替慢,如根据第二代或更后世代指标来评定诱变效率是有疑问的。为了了解某种诱变剂的诱变效率,应尽快(在第一代)得到有关试验资料。通过对不同诱变剂作用下特有的某些生物学指标的比较,综合一起进行评价,可以获得诱变剂总诱变效率的资料,国外用烷化物作鲤鱼的诱变试验中,其总诱变效率按高、低排列如下(详见附表):EI,NEU,NMU,DMS,DES,NMB,DAB,NDMU。显然,在鱼类诱变育种中前几种药物是最有应用前景的。

鱼类化学诱变育种的展望和研究方向

人们在廿多年来的鱼类化学诱变试验工作中,找到了一些有效的诱变剂、以及适宜的浓度和处理方法,并得出了经诱变处理后某些鱼类生物指标变异的规律性,在鱼类实际育种工作中已得到应用,取得了可喜的进展。

随着国民经济的发展,对鱼类育种工作提出更高的要求,当前育种工作的主要趋势是培育高产、抗逆、优质的新品种。虽然,鱼类化学诱变目前还有一系列理论问题和处理方法问题有待研究,但研究工作表明,化学诱变可以作为一种鱼类育种的新手段。现代科学的特点是各学科相互渗透、相互交叉、综合应用。为此,对今后这方面的应用前景和研究方向,提出一些粗浅的看法。

一、应用前景

诱变处理是提高遗传变异的新方法,高效诱变剂能够诱发基因物质的深刻变化。人工诱变的另一种可能性在于超诱变剂能引起高频率的体细胞交换——在分裂胚胎细胞中染色体间区段的交换,导致染色体上基因的新组合。因为体细胞交换是在早期胚胎细胞之一中进行,基因新组合携带者——染色体就有可能进入性细胞中,并将传给后代。因此在种间或更远缘的杂交时,利用这种效应可提高来自双亲性状理想组合发生的概率。

诱变和杂交相结合,允许解决另一个重要问题,即与长期选择有关的品种缺陷的消除。研究表明,由超诱变剂引起的许多突变中,会见到效应与原有正常的等位基因相同,但程度较小的亚效等位基因(Hypomorph)的突变;从作用表达程度较小的突变转为表达程度很强的超效等位基因(Hypermorph)突变,以及导致出现新功能等位基因——新效等位基因(Neomorph)的突变。

苏联在哈萨克斯坦进行鲢和鲤鱼育种过程中,采用化学诱变^[12]和少量的紫外线诱变处理^[14],同时接合雌核发育(鲤鱼)。应用雌核发育的目的在于使之转变为纯合状态,从而使诱发性致死基因迅速得到暴露,利于淘汰清除;另一方面也能使优良基因纯合,出现有利突变,因而在品系间杂交时,提供了有利性状综合的前景。利用上述方法已生产了超诱变剂 NEU、EI 诱变的两群哈萨克斯坦突变鲤^[8,16],其 F₂ 和 F₃ 在最初两年生命期内,生长加速;形态发生变化(头变小,体高和相对体厚、体高指数增加);加速或延迟性成熟;对促性腺作用的灵敏度升高,诱导两倍体雌核发育的能力提高了。

这里列举了一些在鱼类实际育种工作中利用化学诱变的一些重要途径,总的来讲,利用诱变方法的

附表 按诱变效率区分诱变剂等级
Attached table Rank of mutagens in the order efficiencies

根据不同指标对不同化合物的等级评价

rank evaluation of various chemical compounds according to indices

形态变化频率 frequency of morphological variation		形态变异谱 spectrum of morphological variation		染色体畸变频率 frequency of chromosome aberration		染色体畸变谱 spectrum of chromosome aberration		基因突变率 frequency of genic mutation		数量性状变异性 variability of quantitative character		总诱变效率 over-all mutagenic efficiency	
诱变剂 mutagen	等级 rank	诱变剂 mutagen	等级 rank	诱变剂 mutagen	等级 rank	诱变剂 mutagen	等级 rank	诱变剂 mutagen	等级 rank	诱变剂 mutagen	等级 rank	诱变剂 mutagen	等级 rank
E1	1	NEU	1	DMS	1	DMS	1	NEU	1	E1	1	E1	1
NEU	2	E1	2	E1	2	E1	2	E1	2	NEU	2	NEU	2
NMU	3	NMU	3	NMU	3	NMU	3	NMU	3	NMU	3	NMU	3
DES	4	DES	4	NEU	4	NEU	4	DES	4	DES	4	DMS	4
DMS	5	NMH	5	DES	5	DES	5	NMB	5	DMS	5	DES	5
NMB	6	DMS	6	NMB	6	NMB	6	DMS	6	NMB	6	NMB	6
DAB	7	DAB	7	NDMU	7	NDMU	7	DAB	7	DAB	7	DAB	7
MDMU	8	NDMU	8	DAB	8	DAB	8	NDMU	8	NDMU	8	NDMU	8

注: 诱变剂等级意指诱变作用强弱排列次序, 等级 1 和等级 8 相应的为最高和最低诱变效率。总诱变效率是根据不同指标的等级评定。

Notes: Rank of mutagens implies the orientation order according to their mutation action force, ranks 1 and 8 are the max. and min. mutagenic efficiencies respectively. Over-all mutagenic efficiencies are evaluated from the different indices.

可能性是很广的。

二、今后研究方向

(一) 提高突变效率, 研究诱变方法

1. 研究提高突变频率的诱变剂适宜浓度、处理方法及处理条件;
2. 研究化学诱变和其他育种手段相结合(如雌核发育、杂交、选择), 加速获得优良突变体。
3. 综合因子处理, 各种理化诱变因子配合使用, 在农作物上已取得良好效果。如采用紫外线、 γ 射线、快中子等和化学诱变剂轮换处理鱼的精子, 探讨其诱变效率;
4. 探索新诱变剂的诱变效能;
5. 利用先进的科学技术, 以提高筛选突变体的效率, 加速鱼类育种的进程。

(二) 开展诱变的基础理论研究

国外非常重视化学诱变的理论研究, 着重研究化学诱变对基因突变的机理, 取得了重大进展。发现各种诱变剂有特异的专一性, 能引起替换 (Base-Pair Substitution) 的诱变剂有碱基类似物、羟胺、亚硝酸、烷化物; 能引起移码突变 (Frameshift Mutation) 的诱变剂有吖啶类染料、氮芥类衍生物等。目前正在研制和合成对 DNA 不同区段有专一性功能的化学诱变剂, 试图在 DNA 复制过程的不同时期进行诱变, 改变核苷酸序列, 产生特殊的变异, 查明遗传物质的本质, 为定向控制迈出新的第一步。

在鱼类化学诱变基础理论方面, 我们应进行下述几项研究:

1. 研究突变鱼类生长率、抗病力、抗寒性和品质突变性状的遗传传递规律;
2. 化学诱变鱼类后代染色体突变、基因突变及其机制的研究;
3. 诱变剂的专一性和特定变异的调控;
4. 化学诱变剂刺激作用及其机制的研究。

参 考 文 献

- [1] 史密斯-凯利, P. F. (褚启人译), 1980. 遗传结构与功能。上海科学技术出版社。
- [2] 卓齐, P. M. (刘世英译), 1975. 化学诱变剂对鲤鱼精子作用的特异性。淡水渔业, 8:25—29。
- [3] Kirpichnikof, V. S., 1981. Genetic Bases of Fish Selection. Springer-Verlag Berlin Heidelberg-New York, 18~19, 302~303.
- [4] Tzoy, R. M., 1969a. Action of dimethylsulfate and nitrosomethylurea on the developing eggs of the rainbow trout and the peled. Tzitolgiya, 11(11): 1440~1448.
- [5] —, 1969b. Action of nitrosomethylurea and dimethylsulfate on the sperm cells of the rainbow trout and the peled. Dokl Akad Nauk SSSR (DAN), 189(1): 411~414.
- [6] —, 1971. Action of dimethylsulfate on the mutation frequency of the genes S and Nin the carp (*Cyprinus carpio* L.). Dokl Akad Nauk SSSR (DAN), 197(3): 701~704.
- [7] —, 1976. Problems of artificial mutagenesis in fish culture. Izvestija Gosud. nauchnoissled. Inst Ozern Rechn Rybn Khos (GosNIORKh), 107:109~118.
- [8] —, 1978. Artificial mutagenesis in practical selection of pond fishes. In: Increasing productivity of fishes by selection and hybridization, F Müller, Szarvas, 121~141.
- [9] —, 1980. Chemical mutagenesis in selection of East-Kazakhstan carp (*Cyprinus carpio* L.). In: Karyological variability, mutagenesis and gynogenesis in fishes. Inst Cytol Acad Sci USSR, Leningrad, 55~62.
- [10] Tzoy, R. M., Golodov, Yu. F., Menshova, A. I., 1973. Influence of chemical mutagens on variability of morphological and physiological traits in carp (*Cyprinus carpio* L.). In: Biochem Genet Fish. Inst Cytol Acad Sci USSR, Leningrad, 97~103.
- [11] Tzoy, R. M., Menshova, A. I., Golodov, Yu. F., 1974b. Frequency of spontaneous and induced mutations in the genes coding scale pattern in common carp. Genetika. (Moscow) 10(11):

60~62.

- [12] Кормякин, В. В.; Цой, Р. М., 1981. Направления и методы селекционного толстолобика в Казахстане. - В кн.: Генетика, селекция, гибридизация рыб. - Тезисы докладов и Всесоюзное совещания, Ростов-на-Дону, 100—101.
- [13] Рапопорт, И. А.; Снягх, Р., 1971. Градиентный механизм стимуляции, вызываемый химическими мутагенами. - В кн.: Химический мутагенез и селекция, 395—406.
- [14] Шустова, С. Ф.; Цой, Р. М., 1980. Эффект Уф-лучей при воздействии на зрелые спермии карпа. - В сб.: Генетика и селекция рыб, 28, 97—105.
- [15] Черфас, Н. Б.; Цой, Р. М., 1984. Новые генетические методы селекции рыб, 26—42, 61—73.