

魚類多倍體子代誘發之探討

白志年

鹿港分所



紫外線照射箱及震盪機



實施冷擊處理之低溫水槽



測量紅血球細胞核大小之粒徑分析儀

一、前言

生物科技之研究與應用是目前水產養殖學上發展之趨勢。而誘發魚類多倍體子代之研究，則是水產生物科技發展中重要的一環。所謂誘發魚類多倍體子代就是將魚類之精子、卵子或受精卵做特殊處理，以破壞、改變或增加其遺傳物質，藉以改變子代染色體之套數或來源。

魚類多倍體子代的應用主要有下面幾點：

- (一)保留單親的遺傳特性
- (二)改變魚類生殖的性狀
- (三)魚類品系的改良
- (四)改進魚類生長速率

以下將討論一般誘發魚類多倍體子代的理論和方法、誘發多倍體子代的模式以及常見幾種判斷多倍體的方法。

二、誘發多倍體子代的理論和方法

在討論如何誘發多倍體子代之前，我們先要了解魚類卵細胞形成過程中，染色體複製與極體釋出之時機，藉以進一步了解誘發多倍體

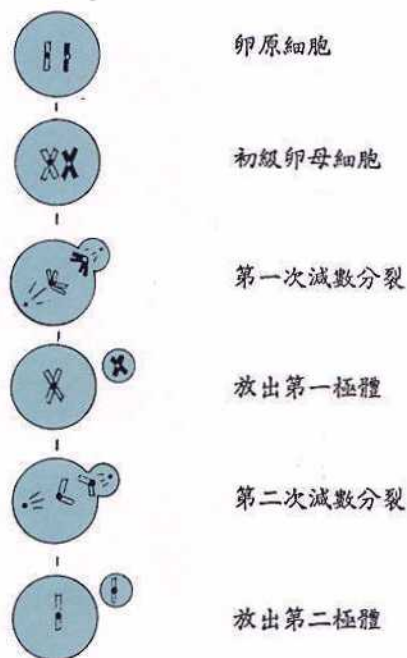
子代之主要機制與處理方法。

(一)魚類卵細胞之形成過程(圖1)：

- 1、卵原細胞(oogonium)經過有絲分裂產生許多卵原細胞，這些卵原細胞具雙套染色體。
 - 2、在適當生理環境條件下，卵原細胞膨大，形成初級卵母細胞(primary oocyte)，初級卵母細胞具雙套染色體。在進行第一次減數分裂前期染色體變粗，同源染色體發生聯會(synapsis)。
 - 3、第1次減數分裂進行時染色體複製，初級卵母細胞產生次級卵母細胞(secondary oocyte)同時會釋放出第一極體(first polar body)，次級卵母細胞及第一極體均具雙套染色體。
 - 4、第2次減數分裂進行時，次級卵母細胞會產生單套染色體之卵細胞(ootid)並釋放出第二極體(secondary polar body)；卵細胞及第二極體則均僅具單套染色體。
- 在魚類第一極體放出是發生在卵巢內，待

受精後才發生第二極體的釋出。而在貝類或甲殼類，第一極體與第二極體的放出都是在受精後才發生。

圖 1 魚類卵細胞之形成



(二)誘發魚類多倍體子代的主要機制與方法：

由以上的過程我們可以了解誘發染色體倍數性的機制大致可分成二種：(1)阻斷正常分裂過程 (2)破壞親代之遺傳物質。

所謂阻斷正常分裂過程又可分為阻斷減數分裂及阻斷有絲分裂，其中阻斷第1減數分裂就是抑制第一極體之釋出，阻斷第2減數分裂就是抑制第二極體之釋出。而阻斷有絲分裂就是阻止受精卵的第1次卵分裂。

在貝類、甲殼類的多倍體操作試驗中，通常是由抑制第一極體放出或抑制第二極體放出，來達成卵細胞的倍數化。而在魚類的試驗中因為第1次減數分裂是在卵巢內完成，所以一般試驗都是在受精後，以抑制第二極體釋出或阻止第1次卵分裂來達成染色體之倍數化。

日本水產廳養殖研究所古丸 明等人曾觀察牡蠣受精卵，發現在25℃時牡蠣受精卵的第1次減數分裂是在受精後15分鐘內完成，而第2次減數分裂則是在受精後27分鐘內完成。

至於極體的抑制或阻止卵分裂的方法，一般不外是破壞紡錘絲的形成，而使細胞無法分裂為2，一般常應用的方法有下列幾種：

1、溫度刺激(Thermal shocks)

溫度刺激分為冷擊處理或熱擊處理，因魚種之不同其處理方法如溫度、時間等亦有所差異。

在印度馬德里Pandian及Varadaraj發表了一篇以莫三比克吳郭魚所做的試驗結果；在受精後2.5分鐘以42℃熱擊莫三比克吳郭魚的受精卵3分鐘，可得63%之活存率，其中並有100%之三倍體出現率。

由於處理的溫度及時間因魚種的不同而有所差異，所以探討各種魚類適當之刺激溫度及時間，正是研究人員的試驗重點。

2、靜水壓(Hydrostatic pressure)

靜水壓處理乃是利用壓力槽對受精卵施以靜水壓力，以達到抑制極體釋出或阻止第1次卵分裂的效果。

在大陸(武漢大學)有人以牡蠣受精卵做試驗，得到如下的結果；受精後5分鐘或17分鐘各以200-250 kg/cm²靜水壓處理10分鐘，結果可得到72-76%之三倍體出現率。

3、化學藥劑處理(Chemical treatment)

常用之化學藥劑有細胞鬆弛素(Cytochalasin B.)及高鹼、高鈣溶液(High pH, High-calcium)。一般認為細胞鬆弛素能夠在細胞分裂時抑制紡錘絲(microtubules)之形成。而高鹼、高鈣溶液主要是以NaCl, KCl及CaCl₂配製而成，並調整其pH值到10。

日本宇都宮大學教育學部上田高嘉等人，曾以高鹼、高鈣溶液刺激虹鱔受精卵，在14.7%之活存率中得到80%的三倍體虹鱔苗。

而破壞親代之遺傳物質，一般是利用放射線處理將精子或卵子之遺傳物質破壞，使形成不具遺傳特性的不活化精子或卵子。就精子而言，其運動力與授精能力都未喪失，只是不具有遺傳物質，所以受精後受精卵只含有雌性親代的遺傳特性。相反地，破壞卵細胞的遺傳物質再經受精作用，則可使受精卵只具雄性親代的遺傳特性。

在處理方法上，主要是用游離輻射線或紫外線照射。

游離輻射線如 γ (珈瑪)射線、X射線或 Co (鈷)等具有較強的穿透能力，對於卵壁厚的卵細胞效果較好，但其危險性也大（所謂危險性是指對操作者的傷害程度），此外，所需設備費也較高。還有一點就是因為其穿透力強，所以照射時間短，常導致對染色質的破壞力不均勻，容易產生 DNA 之片斷物質。此外，游離輻射線容易破壞到其它物質而產生畸形子代，所以一般使用並不普遍。

相形之下，紫外線照射就顯得安全且方便多了，其理由主要為紫外線的穿透能力較弱，所以對操作者比較沒有危險性，而且設備簡單，操作方便，適合一般實驗室使用。

就效果而言，紫外線的破壞能力比較緩和、需要時間較長、對遺傳物質之破壞比較均勻，且比較不會造成畸形子代，但對一些卵壁厚的卵細胞，其效果會比較差。

一般在做照射處理時，樣品需先經稀釋並以震盪機震動，這樣破壞能力才能平均到達。

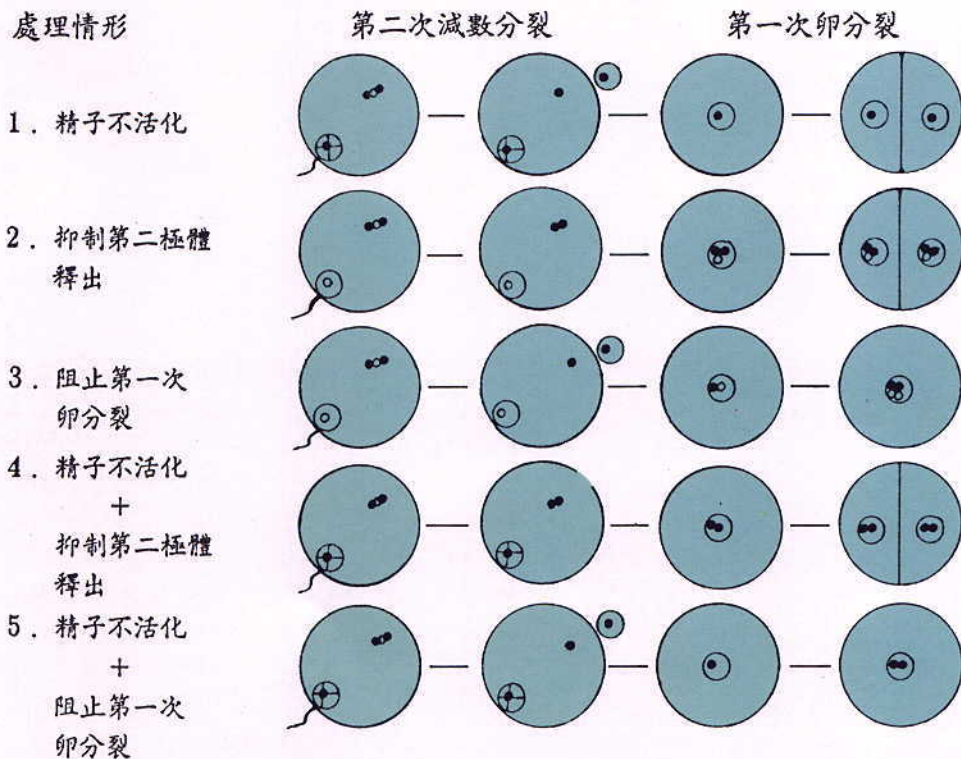
三、誘發魚類多倍體子代之操作模式

以下是法國 Daniel Chourrout 對虹鱒所做

三倍體、四倍體及雌核發生等多倍體子代之操作模式(圖 2)：

- (一)以不活化精子與卵結合，經過正常的細胞分裂過程，會產生具單套染色體的孤雌子代。
- (二)正常精子與卵結合後，抑制受精卵第二極體之釋出，結果形成具有三套染色體之子代。其中一套是來自雄性親代，一套屬於雌核本身具有，另一套來自未釋出之第二極體所有。
- (三)正常精子與卵結合釋出第二極體後，形成二倍體受精卵。這時阻止第 1 次受精卵分割，則會形成具 4 套染色體之四倍體子代。其中 2 套來自精核，2 套來自雌核。
- (四)以不活化精子與卵結合後，抑制受精卵第二極體之釋出，則形成只具雌性遺傳物質之雙套孤雌子代。其中 1 套屬於雌核所有，另 1 套則來自未釋出之第二極體。
- (五)以不活化精子與卵結合釋放出第二極體，形成單倍體受精卵後，阻止第 1 次受精卵分割，則形成具雙套染色體之孤雌子代。

圖 2 誘發魚類多倍體子代之操作模式



四、判斷多倍體常用的方法

判斷染色體倍數常用的材料為受精卵、魚苗之體細胞、紅血球細胞或細胞核及其他分生組織之細胞。其方法概述如下：

(一)染色體數觀察法

將魚類分生組織之細胞固定後，利用顯微鏡觀察細胞核，並計算染色體數，以判斷其套數。或可利用標識染色體(marker chromosome)即其中一對形狀比較特殊之染色體來做判斷。這是比較直接可靠的方法。

(二)紅血球長軸徑大小判別法

利用顯微鏡測量魚類紅血球之長軸徑大小，以判斷染色體的倍數。

日本廣島大學荒井克俊等人(1991)比較不同倍數性泥鰍之紅血球細胞，結果發現其平均長軸徑在二倍體為9.5至 10.8 μm ，三倍體為11.5到 12.0 μm ，而四倍體則為12.4到 14.2 μm 之間。

(三)紅血球細胞核粒徑分析法

目前所使用的儀器為粒徑分析儀。此儀器為應用美國 Mr. Wallace Henry Coulter 於1949年提出之 Coulter原理所製造，其係利用電阻快速而精確地測量粒子數目及大小。分析時將待測之顆粒先與電解液製成稀釋懸浮液，然後將懸浮液經由一特定口徑之小孔抽引進入一小管(aperture tube)內，此小孔兩側有一

電極片，當顆粒通過小孔時，每一個顆粒會取代與其相等體積之電解液，以致電阻呈現改變（即電位差暫時改變），其改變幅度與顆粒之大小成正比。顆粒所產生之脈衝(pulses)再經過放大、測量並顯示出來。我們可依需要之條件算出樣品的數量、體積、表面積....等資料。

美國 Beck和Biggers曾測量草魚之紅血球，發現三倍體魚之紅血球細胞平均大小為二倍體魚之1.62倍，而紅血球細胞核則平均為1.51倍。

一般而言，紅血球細胞核比紅血球細胞更能準確判斷染色體之倍數性，因為紅血球細胞較容易因新生、老化、魚體年齡或環境因素而影響其體積大小。

(四)細胞核內 DNA含量測量法

一般以螢光劑將細胞核內的遺傳物質染色，再用 Flow-cytometer 分析其 DNA含量，以判斷染色體之倍數。

五、結語

魚、貝類多倍體子代的誘發試驗，在許多國家有相當的成就，並已達到商業化發展的程度。而我國在這方面的研究報告不多，更不用說應用到實際養殖事業上。因此，早日開發出成長快速、具優良遺傳性狀等優點之多倍體魚、貝類，應是養殖業者對國內研究人員的殷切期盼，這也是我們試驗人員應該努力的目標。