



鱼类遗传育种中生物学方法的应用及研究进展

徐康, 段巍, 肖军, 陶敏, 张纯, 刘筠, 刘少军*

湖南师范大学生命科学学院, 教育部蛋白质化学与鱼类发育生物学重点实验室, 长沙 410081

* 联系人, E-mail: lsj@hunnu.edu.cn

收稿日期: 2014-09-23; 接受日期: 2014-11-06

国家自然科学基金(批准号: 31210103918, 31430088, 31272651)、国家高技术研究发展计划(批准号: 2011AA100403)、高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 20114306130001)、湖南省“生物发育工程及新产品研发协同创新中心”项目(批准号: 20134486)和发育生物学国家重点学科、发育生物学湖南省重点学科建设项目资助

摘要 鱼类遗传育种是指利用生物学方法对鱼类进行遗传选择或改造, 从而获得新型改良鱼类的过程; 它可以通过人为选择优势遗传性状或者通过整合或改变已有的遗传性状而达到遗传改良的目的. 鱼类遗传育种是一个从稳定品系中筛选或研制变异品系, 再从变异品系中培育稳定品系的循环过程. 鱼类良种的培育成功将在很大程度上带动良种的饲养、加工、销售、休闲等后续产业的发展, 这在渔业经济发展中具有重要意义. 本文系统地总结了包括传统选择育种、分子标记辅助育种、全基因组选择育种和单性控制育种在内的选择育种技术, 综述了杂交育种(近缘和远缘杂交)、细胞核移植、生殖干细胞和生殖细胞移植、人工雌核发育和雄核发育技术、多倍体育种在内的性状整合育种技术, 以及以转基因育种为代表的性状改造育种技术, 乃至这些育种技术在鱼类育种中的应用情况, 同时结合本实验室在鱼类远缘杂交、雌核发育和雄核发育等染色体倍性育种方面的研究成果, 对国内外鱼类育种的研究现状以及存在的问题进行了系统的概述.

关键词

鱼类遗传育种
遗传改良
生物学方法
生物学性状
新品种

鱼肉富含蛋白质、不饱和脂肪酸、维生素和微量元素, 是一类高蛋白、低热量、有特色的重要营养食物. 鱼肉作为一种相对安全的动物性食物, 消费者不需要承担如疯牛病、口蹄疫、禽流感等各类家畜、家禽流行疾病带来的风险. 目前渔业发展中, 因环境恶化和过度捕捞导致自然鱼类资源减少, 同时也面临着水资源短缺和养殖面积有限的问题, 加强对鱼类遗传育种和健康养殖等方面的研究已是迫在眉睫. 研制出更多具有生长速度快、肉质好、抗逆性强等优点的优良鱼类品种是鱼类遗传育种工作者的重要目标与艰巨任务. 优良鱼类的研制在鱼类养殖、加工、饲料生产、销售、休闲等环节中处于龙头地位, 一个

良种可以带动一个产业的发展. 因此, 鱼类遗传育种在渔业发展中占有重要的地位.

人们用各种生物学方法对鱼类进行选择和改造, 其目的是为了获得生长速度、抗逆能力、肉质等方面具有优势的品种. 随着鱼类遗传育种技术的不断发展, 逐渐形成了选择育种、整合育种和改造育种为主的鱼类育种手段: (i) 选择育种, 从野生或已有的品种中进行筛选, 获得具有稳定优良性状的群体; (ii) 整合育种, 将 2 个或多个群体的多个优良性状整合在一起同时形成父母本都没有的变异性状, 获得优势品种; (iii) 改造育种, 利用已有的生物学技术对野生或人工品种进行改造, 从而获得优良性状.

引用格式: 徐康, 段巍, 肖军, 等. 鱼类遗传育种中生物学方法的应用及研究进展. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 1272–1288

英文版见: Xu K, Duan W, Xiao J, et al. Development and application of biological technologies in fish genetic breeding. Sci China Life Sci, 2015, 58, in press

选择育种是对目标鱼的相关性状进行有目的的选择, 选择可分为传统选择育种和分子标记辅助选择育种等. 选择在生长、肉质、抗性等方面具有优势的个体进行交配育种是传统选择育种的经典方法; 利用激素、温度等处理方法选择性获得全雌或者全雄鱼的方法也可以归于选择育种的范畴; 利用分子生物学方法来探究一些与功能基因相关的分子标记并应用于育种的过程属于分子标记辅助选择育种.

整合育种方法包括利用杂交(近缘杂交和远缘杂交)、静水压、秋水仙素处理等生物、物理及化学方法, 获得杂交、多倍体等变异个体的方法, 其本质是在后代中形成遗传物质改变的个体; 远缘杂交、雌核发育和雄核发育都涉及到对受精卵或者配子的遗传物质——染色体倍性进行遗传改变和整合. 核移植、生殖干细胞移植和生殖细胞移植等涉及到遗传物质的重组, 也可以归纳到整合育种. 通过远缘杂交不但可以形成具有杂交优势的品种, 还可以形成两性可育的二倍体杂交品系或者四倍体鱼品系, 甚至培育出新的物种.

转基因方法可以归纳到改造育种的范畴. 通过转基因方法可以达到遗传性状改造的目的, 以期获得优势的变异品系.

整合育种和改造育种的目的是一致的, 都是使得后代的基因型和表现型发生改变. 选育育种也可以应用到整合育种和改造育种中, 整合育种和改造育种也可以借助选育育种把获得变异的品种更好地遗传下去.

作者通过长期的鱼类遗传育种研究, 认为鱼类遗传育种实质是一个从稳定品系中选出或重新研制变异品系, 再从变异品系中培育稳定品系的循环过程. 通过查阅国内外有关文献和书籍, 结合本实验室长期的鱼类育种研究工作的积累, 本文对国内外鱼类育种的研究现状以及存在的问题进行了系统的概述, 为鱼类遗传育种的研究和应用提供了系统的综述材料.

1 鱼类遗传育种技术

1.1 选择育种技术

性状定向筛选是遗传育种中不可或缺的环节. 如何快速高效地筛选出具有优良经济性状的鱼类品系或品种, 一直是水产科学工作者的工作重点. 随着

遗传学、分子生物学等生物学技术的发展, 选择育种已从单一的传统选择育种模式发展为多元化的选择育种模式. 下面将从传统选择育种、分子标记辅助育种、全基因组选择育种和单性控制育种 4 个方面对性状选择育种进行系统的综述.

(1) 传统选择育种. 传统选择育种是鱼类遗传育种的经典方法, 也是最基础的方法之一. 其主要目的是从某个或多个群体中筛选出具有优良遗传性状的个体或群体. 鱼类选择育种的常用方法有群体选育法、家系选育、亲本选育和综合选育等; 还有一种是基于对育种值最佳线性无偏预测的 BLUP(best linear unbiased prediction)选择育种的方法. 在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[1]、银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)^[2]、黑鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[3]等多种鱼类的育种中有应用到 BLUP 的方法.

传统选择育种作为经典的性状选择方式, 利用生物所固有的遗传变异性直观地获得所需优良遗传性状, 在鱼类遗传育种中占据重要的地位, 在动植物育种中经常被用到. 世界范围内, 鱼类选择育种已成功培育出了虹鳟^[1]、白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)^[4]和斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[5]等鱼类的新品种. 早在 1919 年, Embury 和 Hayford^[6]就对溪红点鲑(*Salvelinus fontinalis*)进行了选择育种, 使新品种感染疫病后成活率从 2% 上升到 69%. 目前在多个国家, 经过选育的虹鳟形成了多个优良品系, 有的品系生长快、有的品系怀卵量增加、有的品系产卵期提前等. 在中国, 传统选择育种较多的应用于淡水鱼类中. 所熟知的有: 群体选择与家系选择相结合获得的荷包红鲤(*Cyprinus carpio* var. *wuyuanensis*)^[7]; 群体选育法获得的兴国红鲤(*Cyprinus carpio* var. *singuanensis*)^[7]; 综合选择和定向选育相结合获得的墨龙鲤(*Cyprinus carpio* var. *molong*)^[7]; 群体人工定向选育方法获得的甘肃金鳟(*Gansu Golden Trout*)^[8]. 此外, 还有群体选育方法获得的“浦江 1 号”团头鲂(*Carnis megalobrama*)^[9], 综合选育获得的新吉富罗非鱼(GIFT, *Oreochromis niloticus*)^[10]、松浦镜鲤(*Cyprinus carpio* Songpu carp)^[7]等多个新品种和新品系. 在海水鱼类中, 已选育出了牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[11]、大黄鱼(*Pseudosciaenacrocea*)^[12]和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[13]等多种海洋鱼类的新品种^[14].

(2) 分子标记辅助育种. 分子标记是 DNA 分子

水平的标记,它是 DNA 水平上遗传多样性的直接反映.随着分子生物学技术的发展,目前已形成可变数目串联重复序列(variable number of tandem repeats, VNTR)、随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、DNA 扩增指纹分析(DNA amplification fingerprinting, DAF)、单核苷酸多态性技术(single nucleotide polymorphism, SNP)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、简单序列重复区间扩增多态性(inter-simple sequence repeat, ISSR)、简单序列重复标记(simple sequence repeat, SSR)、单链构象多态性分析(single-strand conformation polymorphism, SSCP)、限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、序列特异性扩增区域标记(sequenced characterized amplified region marker, SCAR)等多种分子标记技术^[15],并被广泛应用于遗传多样性分析^[16]、品种或品系的鉴定^[17]、基因的鉴定与克隆^[18]、遗传图谱的构建^[19]、亲缘关系分析^[17]、杂交优势的预测和分子标记辅助育种^[20]等多个领域.

随着 DNA 分子标记技术的发展,性状的选择更加精确和高效.20 世纪 90 年代以来,水产动物基因组和基因图谱研究发展迅速,以 DNA 分子标记为基础的研究方法非常活跃.斑马鱼(*Danio rerio*)是第 1 个被用于建立遗传连锁图谱的鱼类^[21].随着 DNA 分子标记技术的发展和完善,国内外学者除了构建青鳉(*Oryzias latipes*)^[22]、河鲀(*Takifugu rubripes*)^[23]、剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)^[24]、三棘刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)^[25]等模式鱼类遗传连锁图谱外,还构建了虹鳟^[26]、罗非鱼^[27]等 10 多种经济鱼类的遗传连锁图谱.这些图谱的构建,已陆续应用于多性状复合选择育种,在亲本选择、杂交组合选择、子代鉴定和家系鉴定与评价中发挥着作用^[28,29].

在中国,科研工作者们构建了鲤鱼不同密度的遗传连锁图谱, DNA 耐寒和肌纤维相关的数量性状位点(quantitative trait loci, QTLs)被相继定位^[30],并且以细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)文库为基础成功的构建了鲤鱼基因组物理图谱^[31].另外,草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[32]、团头鲂、红鲫(*Carassius auratus*)、银鲫(*Carassius auratus gibelio*)^[33]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[34]等鱼类的 BAC 文库已经构建,为物理连锁图谱的构建提供了保障^[31].

DNA 分子标记较多地应用于对目标性状实施间接选择以达到选择育种的目的. DNA 分子标记具有信息量大、扫描遗传位点多等特点,利用其进行选择不受其他基因效应、内外环境因素以及基因表达与否等因素的影响.然而,怎样把 DNA 分子标记与鱼类遗传育种更好地结合在一起从而形成有特色的育种模式,是后续值得研究的问题.

(3) 全基因组选择育种技术. 随着部分模式动植物全基因组的破译,基因组信息潜在的基础研究和应用价值已得到更为广泛的关注^[35].世界范围内,已有多国政府或民间组织相继启动了其地区的农业特色生物的基因组计划,其中就包含了许多水产动物.在基因组破译的基础上,利用遗传连锁图谱和分子遗传标记技术,探索与生长、性别、抗病等性状相关的基因在遗传连锁图谱上的具体位置,探索和设计数量性状的 DNA 分子标记辅助育种的技术路线已成为大家关注的内容.在鱼类全基因组测序方面,模式鱼类斑马鱼、青鳉、河鲀、绿河鲀(*Tetraodon nigroviridis*)和三棘刺鱼以及经济鱼类尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、剑鱼(*Xiphophorus maculatus*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、虹鳟、大西洋鲑(*Salmo salar*)、欧鲈(*Dicentrarchus labrax*)和大西洋鳕(*Gadus morhua*)等的全基因组序列相继被破译^[31,36,37].自 2010 年以来,我国相继宣布破译了半滑舌鳎^[38]、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[39]、大黄鱼、橙点石斑鱼(*Epinephelus bleekeri*)、鲤(*Cyprinus carpio*)^[40]和牙鲆的全基因组序列^[31].2011 年,中国科学院水生生物研究所等研究机构也开始了我国“四大家鱼”中的草鱼、鲢和鳙(*Aristichthys nobilis*)的全基因组测序^[31].此外,本实验室与云南大学张亚平团队合作已基本完成红鲫的全基因组测序工作,红鲫全基因组序列的获得不仅有利于探索四倍体鲫鲤与亲本之间的遗传和变异关系,而且对于鲤科鱼类的分子遗传育种也具有重要的指导意义.另外,本实验室已开展肉食性鱼类翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)的全基因组测序工作,该鱼是本实验室创制的优良品种-杂交翘嘴鲂(国家良种委员会审定的新品种登记号:GS-02-003-2014)的亲本之一.翘嘴红鲌基因组序列的获得将有利于解析杂交翘嘴鲂的杂交优势等性状的生物学机制.鱼类基因组信息的深入挖掘,将有利于获得鱼类重要经济性状的遗传信息,同时为培育出高产、品质更优和抗病力更强的鱼类新品种提供重要参考.

在进行基因组测序的同时,本实验室通过新一代测序技术(next generation sequencing, NGS)获得了红鲫、鲤鱼、团头鲂、翘嘴红鲌、黄尾密鲴(*Xenocypris davidi*)、草鱼等多种鲤科鱼类,以及人工制备的异源四倍体鲫鲤(allotetraploid hybrids of female *Carassius auratus* red var. $\times$ male *Cyprinus carpio* L.)、同源四倍体鱼(autotetraploid fish derived from hybrids of female *Carassius auratus* red var. $\times$ male *Megalobrama amblycephala*)、三倍体湘云鲫(allotriploid hybrids of female *Carassius auratus cuvieri* T. et S. $\times$ male allotetraploid hybrids of *Carassius auratus* red var. $\times$ male *Cyprinus carpio* L.)、三倍体草鲂(allotriploid hybrids of female *Ctenopharyngodon idellus* $\times$ male *Megalobrama amblycephala*)和二倍体草鲂(diploid hybrids of female *Ctenopharyngodon idellus* $\times$ male *Megalobrama amblycephala*)等多种鱼的多个组织的转录组信息,对于从分子水平全面地解析各鲤科鱼类的遗传特性具有重要的意义.此外,利用这种方法还获得了大量简单序列重复标记(SSR)和单核苷酸多态性(SNP)位点,为寻找特异性分子标记提供了便利.值得注意的是,在获得包括全基因组序列在内的大量遗传信息的情况下,怎样将这些遗传信息与遗传育种工作有机结合起来,仍是广大科研工作者要思考的内容.

(4) 单性控制育种.雌雄异体动物的雌雄个体之间在外部形态或生理功能上存在差异是较为普遍的现象.作为物种资源丰富的鱼类,许多种类的雌雄个体间存在着明显的生物学性状的差异,诸如个体大小、体型、体色、生长率、成熟年龄、繁殖方式等.因此,人们可以通过性别控制来进行优势单性群体的养殖,获得较高的效益.

鱼类性别的表达方式是多种多样的,其中主要由依赖于染色体决定的遗传性别和在内部遗传与外部环境因子的相互作用下而表现出的生理性别所构成.总体来说,鱼类的性别决定机制有染色体型决定和环境型决定 2 种.前者指子代的性别主要由遗传基因来决定,胚胎发育的性别取决于其性染色体的组成或性别决定的基因;后者指子代的性别主要由外界环境因子决定,受精卵或幼苗所处的温度、湿度、pH 及其他一些作用因素均有可能影响到子代的性别^[41].鉴于鱼类环境型性别决定机制,人们可以利用类固醇激素对鱼类的性别加以控制和改变.

据不完全统计,20 世纪 60 年代以来,利用激素进行性反转已相继在青鳉、金鱼(*Carassius auratus*)、鲫鱼(*Carassius auratus*)、鲤、斑马鱼、虹鳉、大西洋鲑、银大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)、大鳞大麻哈鱼(*O. tshawytscha*)、莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)、罗非鱼、孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)、玛丽鱼(*Mollienisia velifera*)、红剑尾鱼(*Xiphophorus hellerii*)、鲮鱼(*Mugil cephalus*)、点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、巨石斑鱼(*Epinephelus tauvina*)、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)等多种鱼类中试验成功^[41-43].

不同类别的性激素诱导鱼类性转化的机理和效力也各不相同.在各类雄性激素中,17 α -甲基睾丸酮易于生产、饲喂稳定且有效从而应用最为广泛;雌激素中,用于性反转的主要有 17 β -雌二醇和雌酮.1955 年, Yamamoto^[44]用雌激素诱导金鱼和青鳉雄性变为雌性,该雌性个体与正常雄鱼交配,产生了 YY 型雄鱼.1975 年,菲律宾的 Guerrero^[45]用含甲基睾丸酮的饲料投喂性腺未分化的奥利亚罗非鱼鱼苗,获得了全部为雄性的群体.本实验室也较早地开始了相关工作. Liu 等人^[46]用雌二醇投喂革胡子鲶(*Clarias leather*)仔鱼一段时间,解剖性成熟的试验鱼,其性腺绝大部分为卵巢,仅在卵巢的表面残留少许精巢样组织,说明雌二醇在很大程度上已把遗传型雄性的个体转化成雌性个体;同时,用甲基睾丸酮(methyltestosterone, MT)饲喂革胡子鲶仔鱼一段时间,获得了雌性性反转的功能性雄鱼和雌雄同体的革胡子鲶,其中雌雄同体鱼自体受精获得了全部为雌性的后代,证明了雌性革胡子鲶配子的性别遗传方式为同配类型(XX),并提供了一种选育纯合体的新型途径^[46,47].

陈荣德等人^[48]通过雄激素将雌性散鳞镜鲤(*C. carpio haematopterus*)人工性逆转成为功能性的雄鱼,使之与人工雌核发育纯系红鲤杂交产生全雌鲤.此外,本实验室用 MT 饲喂雌核发育白鲫幼苗,获得具有性反转功能的性成熟雄性白鲫,使之分别与普通雌性白鲫和雌性异源四倍体鲫鲤交配获得了全雌二倍体白鲫和全雌三倍体鱼^[49].其中的全雌二倍体白鲫群体可用来与雄性四倍体生产三倍体湘云鲫鱼.刘汉勤等人^[50]采用激素性逆转获得功能性 XY 雌性黄颡鱼,并结合雌核发育技术获得了 XX 雌鱼、XY 雄鱼和 YY

超雄鱼. 在此基础上, Wang等人^[51]应用AFLP分子标记和SCAR标记技术, 筛选得到黄颡鱼X染色体和Y染色体连锁的特异分子标记, 将其应用到对YY超雄鱼的筛选上, 开拓出一条X和Y染色体连锁标记辅助的全雄黄颡鱼培育技术路线^[31,52]. 采用这一育种路线培育出的性状稳定的全雄黄颡鱼, 已被国家水产原良种委员会审定为新品种“黄颡鱼全雄1号”. 由于黄颡鱼雄性比雌性生长快, 并最终导致有2~3倍的大小差异.

1.2 性状整合育种技术

(1) 杂交育种. 杂交育种(cross breeding)是通过杂交将2个或2个以上品种的部分优良性状整合的育种方法, 它是最基础且被广泛采用的育种手段之一. 杂交的目的在于通过整合亲本的优良遗传性状和获得杂种优势, 最终得到在生长速率、繁殖率、抗病性、产量和品质等方面比亲本改良的新品种, 在鱼类的品种改良和生产增值中发挥着巨大的作用.

根据亲本亲缘关系的远近, 杂交被分为远缘杂交和近缘杂交. 远缘杂交是分类距离在种以上的2个亲本间的杂交, 近缘杂交即种内杂交. 种内杂交是同种内的不同品系、不同品种、不同生态类型、不同种群的个体间的交配. 远缘杂交是指不同种的个体之间进行交配, 又称种间杂交, 包括不同目、不同科、不同亚科、不同属的种间杂交.

近缘杂交由于亲本间亲缘关系较近, 一般都可交配并且杂种后代可育, 是杂交育种中比较常用的方法. 在鱼类的近缘杂交育种中, 最成功的当属鲤鱼^[53]. 鲤鱼的种内杂交主要采用不同地理品系间和家养品系与野生种间的杂交^[54]. 乌克兰育成的闻名世界的乌克兰鳞鲤和乌克兰镜鲤; 前苏联获得的耐寒性能高的杂交一代^[54]; 匈牙利学者利用国内的几个不同基因型鲤鱼, 育成两系、三系和四系杂交种^[54]. 迄今为止, 中国已获得丰鲤、荷元鲤、三杂交鲤、红镜鲤、岳鲤、芙蓉鲤、建鲤、荷包红鲤抗寒品系、松浦鲤、松荷鲤和蓝色鳞鲤、墨龙鲤、兴德鲤等15个鲤鱼优良品系^[7,53,55]. 此外, 上海水产大学等单位利用混合杂交获得了生长、体型等方面都具有优势的新吉富罗非鱼^[56]. 本实验室在种内杂交育种方面, 除了岳

鲤外, 近年来还以日本白鲫和红鲫品种间杂交获得了2种新型的杂交鱼, 目前已获得国家专利¹⁾. 这2个杂交新品系不仅整合了父母本亲鱼的多项优良性状, 表现出明显的杂交优势, 还显著提高了杂交后代的受精率和孵化率, 提供了一种快速形成优良新品种的途径, 这在生物进化研究和鱼类遗传育种方面具有重要的生物学意义. 因为白鲫和红鲫的分类地位存在争议, 也有把红鲫和白鲫立为两个种, 所以这个组合也有可能为远缘杂交. 以白鲫为母本, 红鲫为父本, 进行杂交获得的新型杂交鱼-合方鲫具生长速度快、体型好、肉质鲜等优点(图1).

近缘杂交存在杂交后代的变异幅度有限等局限. 目前, 鱼类育种学家将目光放到了远缘杂交上. 远缘杂交能扩大和丰富鱼类遗传育种的基因库, 促进物种间的基因交流, 因而能够创造出较多的养殖新群体, 甚至形成新的物种^[57]. 据统计, 1558~1980年, 已有56科1080种鱼类被用于杂交试验^[58]. 20世纪50年代开始, 中国国内开始进行大量的鱼类远缘杂交试验, 主要涉及3个目(鲤形目、鲈形目、鲇形目)、7个科(鲤科、鲮科、鲴科、鲷科、胡子鲇科、鳊科), 40多种鱼类, 100多个杂交组合, 其中大多数是鲤科不同亚科之间、属间和属内种间的杂交.

鱼类远缘杂交中亲缘关系最远的是目间杂交. 关于鱼类目间远缘杂交成功的报道有鲤形目的团头鲂(♀)与鲈形目的鳊(*Siniperca chuatsi*, ♂)杂交以及鲤形目的鲢(♀)与鲈形目的鲈(*Pagrosomus Major*, ♂)杂交, 都能孵出鱼苗, 但未用于生产^[59]. 鱼类科间远缘杂交有鲈形目丽鱼科的奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*, ♀)与鲈形目脂科中的鳊(♂)杂交, 鱼苗成活率为0.3%~0.5%, 未被用于生产^[59].

亚科之间、属间和种间的远缘杂交组合众多, 很多杂交组合已用于生产, 产生了很好的经济效益. 鲢和鳊杂交种的成活率和产量比双亲都高, 而且比较温顺^[60]; 莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*, ♀)和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, ♂)杂交获得的福寿鱼的生长速度比双亲都快^[61]; 条纹鲈(*Morone saxatilis*, ♀)与白鲈(*M. chrysops*, ♂)杂交后代太阳鲈(*Centrarchus macropterus*)具有明显的杂交优势^[62]. 近年来, 中国进行了鲤科(Cyprinidae)、牙鲆科

1) 刘少军, 刘筠, 肖军, 等. 日本白鲫和红鲫品种间杂交的方法. 中华人民共和国发明专利, ZL 2010 1 0291988. 3, 2010-9-26



图 1 合方鲫: 白鲫(♀) × 红鲫(♂)

(Paralichthyidae)^[63]、鲇科(Siluridae)、鲷科(Sparidae)、慈鲷科(Cichlid)、真鲈科(Percichthyidae)等多种鱼类的科间杂交^[59]。

在鲤科鱼类中不同亚科间、属间和属内种间的杂交组合较多, 亲本以鲤鱼、鲫鱼、草鱼、鳊鱼、鲢鱼、团头鲂、黄尾密鲴和翘嘴红鲌等为主。本实验室进行了红鲫(♀)×鳊鱼(*Elopichthys bambusa*, ♂)^[61]等亚科间鱼类杂交组合和红鲫(♀)×湘江野鲤(*Cyprinus carpio Xiangjiangnensis*, ♂)^[64]等属间鱼类杂交组合

的实验(表1)。目前, 鱼类远缘杂交优势的利用大多被限制于杂交F₁代, 建立性状稳定并且可遗传的杂交后代对于杂种优势的多代利用具有重要的价值。鉴于此, 本实验室在红鲫(♀)×湘江野鲤(♂)杂交品系中成功建立了异源四倍体鲫鲤品系^[57,64]; 同时, 在红鲫(♀)×团头鲂(♂)远缘杂交后代F₁中培育出异源四倍体鲫鲂(4*n*=148)群体, 在其自交后代中获得了同源四倍体鱼(F₂~F₉, 4*n*=200)品系^[69]。这2种稳定的四倍体鱼品系的建立都可以作为可遗传和持续利用的基因库应用于三倍体鱼的生产^[61]。此外, 本实验室在团头鲂与翘嘴红鲌的正反交试验中发现, 这2种杂交组合的F₁和F₂代雌雄都可育, 并且分别获得了F₁~F₃代品系。随后, 利用雌性二倍体鲂鲌与雄性团头鲂回交制备了1种新型杂交鱼——杂交翘嘴鲂, 它们具有生长速度快、抗逆性强、肉质好、体形优美等特征。

作者在长期的远缘杂交鱼类育种研究中, 总结出在亲本选择上要考虑到亲本间的染色体数目、系统发育关系、生殖方式、食性、外形特性、生长速度、

表 1 鲤科鱼类远缘杂交组合试验

亲缘关系	编号	杂交组合	食性组合	遗传代数
亚科间	1	团头鲂(♀)×黄尾密鲴(♂) ^[65] (2 <i>n</i> =48)×(2 <i>n</i> =48)	草食性×杂食性	F ₁ ~F ₂
	2	黄尾密鲴(♀)×团头鲂(♂) ^[59] (2 <i>n</i> =48)×(2 <i>n</i> =48)	杂食性×草食性	F ₁
	3	草鱼(♀)×团头鲂(♂) ^[66] (2 <i>n</i> =48)×(2 <i>n</i> =48)	草食性×草食性	F ₁
	4	黄尾密鲴(♀)×翘嘴红鲌(♂) ^[59] (2 <i>n</i> =48)×(2 <i>n</i> =48)	杂食性×肉食性	F ₁
	5	翘嘴红鲌(♀)×黄尾密鲴(♂) ^[59] (2 <i>n</i> =48)×(2 <i>n</i> =48)	肉食性×杂食性	F ₁
	6	团头鲂(♀)×鳊鱼(♂) ^[59] (2 <i>n</i> =48)×(2 <i>n</i> =48)	草食性×肉食性	F ₁
双亲染色体数目 不同	1	红鲫(♀)×团头鲂(♂) ^[67] (2 <i>n</i> =100)×(2 <i>n</i> =48)	杂食性×草食性	F ₁ ~F ₉
	2	红鲫(♀)×黄尾密鲴(♂) ^[59] (2 <i>n</i> =100)×(2 <i>n</i> =48)	杂食性×杂食性	F ₁
	3	红鲫(♀)×翘嘴红鲌(♂) ^[68] (2 <i>n</i> =100)×(2 <i>n</i> =48)	杂食性×肉食性	F ₁
	4	红鲫(♀)×鳊鱼(♂) ^[59] (2 <i>n</i> =100)×(2 <i>n</i> =48)	杂食性×肉食性	F ₁
属间	1	红鲫(♀)×鲤鱼(♂) ^[64] (2 <i>n</i> =100)×(2 <i>n</i> =100)	杂食性×杂食性	F ₁ ~F ₂₄
	2	锦鲤(♀)×红鲫(♂) ^[59] (2 <i>n</i> =100)×(2 <i>n</i> =100)	杂食性×杂食性	F ₁ ~F ₂
	3	团头鲂(♀)×翘嘴红鲌(♂) ^[59] (2 <i>n</i> =48)×(2 <i>n</i> =48)	草食性×肉食性	F ₁ ~F ₃
	4	翘嘴红鲌(♀)×团头鲂(♂) ^[59] (2 <i>n</i> =48)×(2 <i>n</i> =48)	肉食性×草食性	F ₁ ~F ₃

抗逆性等因素的相互关系. 根据亲本鱼类所特有的性状, 进行有目的的匹配组合, 对于获得具有不同特殊性状的不同倍性的后代并通过选育研制出多种不同类型的优良鱼类品系具有重要的意义. 在上述的多种鲤科鱼类的杂交组合中无不体现了对亲本组合选择的重要性. 同时, 作者认为, 对每一个设计好的远缘杂交组合的研究都是一项系统的研究工程, 需要长期的不懈努力.

本实验室通过实验证明, 远缘杂交可以形成异源四倍体鱼品系、同源四倍体鱼品系、异源二倍体鱼品系和天然雌核发育二倍体鱼品系, 为证明远缘杂交可以形成新品系乃至新物种提供了重要证据. 在鱼类的生产应用中, 遗传性状稳定的同源和异源四倍体鱼能够提供充足且宝贵的二倍体配子, 并通过与普通二倍体倍间杂交获得三倍体鱼, 为三倍体鱼的大规模生产奠定了坚实的基础.

(2) 鱼类细胞核移植. 细胞核移植是应用显微操作技术将供体细胞核移植到去除细胞核的未受精卵细胞中, 使受体卵细胞得以继续分裂和发育的生物技术. 在鱼类遗传育种中, 核移植技术多应用于核质杂种鱼的培育、纯合二倍体鱼的获得和多倍体鱼类育种等方面, 该技术的应用可以打破生物的种间生殖隔离, 改变传统的育种模式, 在培育新品种方面具有良好的应用前景.

童第周等人^[70]在 1963 年率先以金鱼和中华鲟(*Rhodeus sinensis*)为材料进行了同种核移植的试验, 首次证明了囊胚中期的硬骨鱼类细胞核具有指导去核卵发育成胚胎及成体的全能性.

核移植后胚胎发育的程度主要由移植核的发育全能性和移植核与受体细胞质的融合关系两方面所决定. 在鱼类细胞核全能性对核移植成功率的影响方面, 陈宏溪等人^[71]采用连续核移植的方法, 将短期培养的三倍体鲫鱼肾细胞的细胞核移植到二倍体鲫鱼的去核卵中, 获得了可育的克隆鱼, 第一次验证了鱼类分化的体细胞核具有遗传和发育的全能性. Lee 等人^[72]利用斑马鱼胚胎长期培养细胞进行种内核移植试验, 获得了斑马鱼成鱼, 证明了在体外经过长期培养鱼类体细胞, 仍具有完整的遗传信息和发育全能性.

在鱼类中移植核和受体细胞质的融合性对核移植的影响方面, 严绍颐^[73]认为, 在亲缘关系较远的鱼

类之间, 用胚胎细胞核移植能获得核质杂种鱼, 这可能与鱼类的进化地位较低有关, 也可能是因为鱼类物种间的“不相容性”限制较小, 因而它们之间获得有性杂交个体的可能性也较大, 但 2 种鱼类之间的亲缘关系愈远, 核移植成功率愈小. 余来宁等人^[74]研究表明, 核移植中供体和受体的亲缘关系越近, 核质矛盾较小, 核移植的败育率越低. 例如, 鲤鲫核质杂交鱼成活率较高, 草鱼和团头鲂、鲢鱼和团头鲂的核质杂交鱼成活率较低.

虽然, 鱼类细胞核移植中普遍存在核质杂交鱼成活率低、部分核移植个体表现生理或免疫缺陷等问题, 但是中国已成功进行了鱼类属间、亚科间、目间的核移植试验, 并获得了多种核移植成体鱼. Yan^[75]成功地将鲫鱼、草鱼、罗非鱼的囊胚细胞核分别移植到鲤鱼、团头鲂和鲤鱼的去核卵中, 其中获得的鲫鲤核质杂交鱼具有良好的养殖价值; 余来宁等人^[76]成功将鲤鱼、草鱼、罗非鱼的囊胚细胞核分别移植到鲫鱼、团头鲂和金鱼的未去核未受精的卵中, 并获得了鲤鲫核质杂交成鱼, 草鱼团头鲂核质杂交幼鱼. Lin 等人^[77]利用鲫、鲮(*Cirrhinus molitorella*)和罗非鱼的头肾培养细胞的细胞核移植进鲤鱼去核未受精卵, 进行了鱼类属间、亚科间和目间的核移植实验. 在鱼类纯合二倍体的生产方面, 刘汉勤等人^[78]利用雄核发育和核移植相结合的方法, 得到了 5 尾养至 2~7 个月以上的雄核发育纯合二倍体泥鳅幼鱼和成鱼.

中国学者开创了鱼类核移植研究, 并成功进行了多种鱼类的核移植实验. 但是, 鱼类核移植中普遍存在核质杂交鱼成活率低、部分核移植个体表现生理或免疫缺陷等问题. 这些问题主要是由鱼类细胞核移植技术和核移植胚胎发育的内在调控机制的研究深度不够等因素造成的. 此外, 鱼类细胞核移植结果的检测手段也有待于进一步完善和提高. 虽然, 鱼类核移植研究工作已有较长的历史, 但是, 怎样将其广泛地应用到生产实践中还需做更深层次的研究.

(3) 生殖干细胞和生殖细胞移植. 鱼类生殖细胞移植是调节鱼类生殖的重要细胞工程技术. 自 1993 年原始生殖细胞(primitive germ cells, PGCs)移植技术首次在鸡(*Gallus domestica*)中获得成功以来^[79], 该技术还广泛的应用于山羊(*Capra aegagrus hircus*)和猪(*Sus scrofa domestica*)等动物中^[80-82]. 在鱼类的生殖细胞移植方面, Takeuchi 等人^[83]于 2003

年获得了鱼类的第一个 PGCs 移植体系. 2004 年, 在青鳉中, Hong 等人^[84]利用成鱼精巢成功地培育出第一个正常的成体精原干细胞系 SG3, 该细胞系具有在培养系统中产生游动精子的能力. 这不仅证实了成体精原细胞在不经永生生化或转化的情况下也具有形成细胞系的能力, 同时为生殖干细胞的获得提供了新的途径, 简化了鱼类生殖细胞的移植程序. 2006 年, Okutsu 等人^[85]建立了一个虹鳟精原细胞移植体系. 2009 年, Yi 等人^[86,87]成功地从青鳉雌核发育单倍体胚胎获得了单倍体胚胎干细胞系(embryonic stem cells, ES cells), 并使用半克隆(semi-cloning)技术将单倍体细胞核移植到未受精的卵中创造出可育的半克隆雌性青鳉. 在鱼类中, 目前用于移植的生殖细胞大多是从幼鱼中获得的 PGCs 和雄性成鱼中获得的精原干细胞、精原细胞等. 根据生殖细胞的供体、受体的关系, 目前, 鱼类生殖细胞的移植试验分为 3 类: 鱼类生殖细胞的种内移植、鱼类生殖细胞的种间移植以及生殖细胞移植到不育三倍体受体.

鱼类生殖细胞的种内移植大多用于鱼类生殖细胞和生殖发育机制的研究. Nobrega 等人^[88]将斑马鱼精原干细胞移植到雄、雌斑马鱼中, 分别观察到了生精和生卵现象, 从另一个角度证明了生殖细胞分化受其环境影响. 鱼类生殖细胞的种间移植方面的实验较多, 也具有广阔的应用前景. 2004 年, Takeuchi 等人^[89]将虹鳟 PGCs 移植到马苏大麻哈鱼(*Oncorhynchus masou*)中, 移植后供体虹鳟的 PGCs 在马苏大麻哈鱼中能产生正常的配子, 这些配子产生的后代发育正常. Majhi 等人^[90]将银汉鱼的生殖细胞移植到性成熟的巴塔哥尼亚银汉鱼(*O. hatcheri*)内, 6 个月后, 移植的生殖细胞能产生精子. 在这 2 例种间生殖细胞移植实验中, 亲本 PGCs 在异源受体中能更快的分化产生精子, 与供体种类自身相比, 能更快地达到性成熟. 在生殖细胞移植到不育的三倍体受体的方面, Okutsu 等人^[91]将纯合橘色虹鳟(*O. mykiss*)突变体生殖细胞移植到不育三倍体马苏大麻哈鱼中, 获得了能产生 100%虹鳟后代的马苏大麻哈鱼.

鱼类生殖干细胞和生殖细胞移植发展已将近 20 年, 为濒危种质资源的保护和恢复以及遗传育种提供了新的思路和方法, 但是从实验室走向生产应用还有一定的距离, 需要广大鱼类育种工作者的不断探索与不懈努力.

(4) 人工雌核发育和雄核发育技术.

(i) 人工雌核发育技术. 雌核发育是指卵子经精子激活而产生主要由母系遗传物质控制发育的繁殖方式. 鱼类的雌核发育可分为天然雌核发育和人工诱导雌核发育. 据报道, 自然界中能天然雌核发育的鱼有 10 多种, 如亚马逊花鳉(*Poecilia formosa*)、黑龙江方正银鲫、滇池高背鲫、淇河鲫、彭泽鲫、普安鲫 A、B、C 型、滁州鲫、克氏美洲原银汉鱼(*Menidia clarkhubbsi*)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)等^[92]. 异育银鲫是中国水产科研工作者利用了黑龙江方正银鲫的天然雌核发育的生殖方式而培育出来的^[93]. 本实验室在红鲫(♀)×团头鲂(♂)的杂交后代中发现了两性可育的天然雌核发育红鲫, 并获得了一个性状优良的红鲫遗传纯系, 为建立新的鲫鱼品系奠定了基础^[94].

人工诱导雌核发育, 是指以遗传物质失活的精子激活卵子, 合子主要由雌性原核控制而发育成胚胎的育种技术. 在人工雌核发育过程中, 常采用异源精子来刺激卵子的发育. 人工雌核发育在对配子遗传物质提纯的同时, 也产生了异精效应, 使鱼类获得新的遗传物质和新的遗传性状. 对于雌性配子同型的鱼类来说, 人工诱导雌核发育的结果是子代全部是雌性. 雌核发育不单能很好的控制鱼类性别, 同时也是快速获得纯系近交系的有效途径, 对物种提纯复壮起着重要作用.

人工雌核发育已在鲤鱼、银鲫、鲢、草鱼、稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)、团头鲂、大黄鱼、小体鲟(*Acipenser ruthenus*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、虹鳟、庸鲮(*Hippoglossoides platessoides*)、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)、漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)、大菱鲆、河鲈(*Perca fluviatilis*)、北美狗鱼(*Esox masquinongy*)等近百种鱼类中得以应用^[92,95]. 目前, 真鲷(*Pagrosomus major*)、虹鳟、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)、大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)和牙鲆等已获得了雌核发育品系, 并已应用于生产^[96-102].

在鱼类雌核发育育种方面, 本实验室已在红鲫、日本白鲫、金鱼、鲤鱼、锦鲤、团头鲂、草鱼、翘嘴红鲮、黄尾密鲮等多个自然鱼种及人工制备的四倍体鲫鲤、四倍体鲫鲂等人工培育的品系中成功建立了雌核发育鱼体系^[103-107]. 利用异源精子(团头鲂精子)刺

诱导获得的雌核发育红鲫、白鲫个体具有成活率高和易鉴别的优点。把雌核发育技术与性反转技术相结合, 为全雌二倍体、三倍体鱼的生产打下了良好的基础^[103,104]。此外, Zhang等人^[105]利用异源四倍体鲫鲤的精子刺激诱导获得了雌核发育草鱼, 成功建立了雌核发育抗病草鱼品系, 证明雌核发育后代在获得全雌性的同时, 也能获得优良的遗传性状。存活的雌核发育鱼具有较强的抗逆性与其经历了卵子冷休克及精子失活等逆境筛选过程有关, 在逆境中存活的后代自然具有较强的抗逆能力。

此外, 刘少军等人^[106]还利用异源四倍体鲫鲤产生的二倍体卵子, 进行不经染色体数加倍的雌核发育操作, 获得了雌核发育二倍体鲫鲤子代。通过长期的研究, 建立了雌核发育二倍体鲫鲤克隆体系($G_1 \sim G_8$), 该体系具有可育并可稳定产生二倍体卵子的特点, 不但为研究二倍体配子形成机制提供了材料, 且该克隆体系具有生长速度快、抗逆性强、生殖力强等优点。利用该雌核发育二倍体鲫鲤克隆体系产生的二倍体卵子与异源四倍体鲫鲤产生的二倍体精子受精, 获得了在生长速度、繁殖力等方面有明显改善的改良异源四倍体鲫鲤群体, 利用改良四倍体鲫鲤与有关二倍体鱼交配制备的改良三倍体鲫鱼(包括国家良种委员会审定的湘云鲫2号)已在全国推广养殖, 产生了很好的经济、社会和生态效益。

虽然人工诱导鱼类雌核发育在理论研究、生产实践方面有着广泛的应用, 但是还存着成活率低和雌核发育鱼鉴定复杂等方面的难题。目前, 随着精子灭活和卵子加倍处理方法的改善, 雌核发育鱼的成活率有了较大提高, 这些都在很大程度上促进了鱼类雌核发育育种技术的应用。另外, 实验证明, 选择有效的刺激源(远缘种鱼的精子)是一种切实可行的方法, 该方法既能提高雌核发育鱼的成活率, 又能简化雌核发育鱼的鉴定, 如本实验室利用团头鲂的精子刺激诱导鲫鱼进行雌核发育研究, 获得了比用鲤鱼精子诱导成活率高, 并且容易鉴别的雌核发育鱼^[103]。

(ii) 人工雄核发育技术。与雌核发育相反, 雄核发育是用遗传失活的卵子和正常的精子形成“受精卵”, “受精卵”主要在精子核遗传物质的控制下发育成个体的方式。人工诱导雄核发育与雌核发育步骤相类似, 主要包括雌核遗传物质灭活和雄核二倍化的诱导。雄核发育技术在快速建立纯系、判别性别决

定、利用单性种群、保护濒危鱼类等方面起着重要作用^[92]。

自然界中很少有天然雄核发育个体的存在, 但是, 在鱼类杂交后代中发现有雄核发育个体的存在, 如在鲤(♀)与草鱼(♂)的杂交后代中发现了雄核发育二倍体草鱼^[108]。据不完全统计, 进行过人工诱导雄核发育的鱼类主要包括虹鳟、川鲮(*Platichthys flesus*)、红点鲑(*Salvelinus japonicus*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、斑马鱼、马苏大麻哈鱼、金鱼、鲤鱼、草鱼、狗鱼(*Esox reticulatus*)、鲫、泥鳅、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)等^[92,109-111]。值得注意的是, 类似罗非鱼具有雄性个体生长优势的鱼类, 用雄核发育方法快速获得超雄个体(YY), 与普通雌鱼(XX)杂交可繁育出全雄(XY)罗非鱼后代, 是全雄单性鱼类种群获得的一条快速有效的途径。

到目前为止, 利用单倍体精子形成人工雄核发育鱼群体还未见报道。其限制主要是卵子遗传物质失活以及精核染色体组的人工加倍对雄核发育个体胚胎和后期的生命活动造成了较大的负面影响, 从而导致雄核发育的个体存活率很低。值得关注的是, 利用四倍体鱼产生的有2套染色体组的二倍体精子进行人工雄核发育, 不经过染色体加倍处理就能获得二倍体雄核发育鱼, 避免了染色体加倍处理对胚胎造成的损伤, 极大地提升了雄核发育的成功率。此前, 已有学者利用人工四倍体虹鳟和天然四倍体泥鳅产生的二倍体精子在无染色体加倍的处理下进行雄核发育, 获得了二倍体雄核发育鱼。相对于利用普通二倍体鱼的单倍体精子产生的雄核发育鱼, 这些二倍体雄核发育鱼具有较高的存活率^[112-114]。

本实验室利用异源四倍体鲫鲤产生的二倍体精子, 在无雄核染色体加倍处理情况下, 成功地获得了两性可育的二倍体雄核发育鱼(A_0)。该二倍体雄核发育鱼自交获得两性可育的四倍体, 与普通异源四倍体鲫鲤比较, 这种四倍体鱼表现出了明显的生长优势和较强的抗逆性, 起到了对异源四倍体鲫鲤进行遗传改良的效果^[115,116]。非常有意思的是, 本实验室利用鲫鲂杂交体系中的同源四倍体雄鱼产生的二倍体精子进行无染色体加倍人工雄核发育, 从其后代中选育获得了超雄(YY)二倍体鱼, 它们能产生不减数的二倍体精子, 分别与单倍体和二倍体卵子受精获得全雄三倍体、四倍体鱼群体(数据待发表)。其中,

全雄四倍体鱼是三倍体鱼生产的重要保障,省去了人工选择雄性种鱼的步骤,降低了种鱼饲养成本,在生产应用中具有重要意义。

(5) 多倍体育种. 多倍体是含有3套或3套以上完整染色体组的生物体,在动植物中广泛存在,是物种发生的一种重要方式^[117]. 多倍体育种(polyloid breeding)是指利用人工诱导染色体加倍或自然染色体加倍等方法,通过细胞染色体组加倍获得多倍体育种材料,用以选育符合人们需要的优良品种. 鱼类的染色体组具有较大的可塑性,易于加倍,对于鱼类多倍化的应用研究非常多。

三倍体生物通常表现出生长快、抗逆性强、品质好、产量高等优势,具有较高的经济价值和应用意义^[118]. 另外,由于异源三倍体鱼具有不育的特性,因此,三倍体的培育对控制养殖鱼类的密度避免过度繁殖、保护天然种质资源、防止基因混杂等都具有重要意义. 因而鱼类三倍体育种在鱼类育种中具有非常重要的地位。

三倍体鱼的产生主要通过2种途径: 直接诱导法和通过制备四倍体亲本群体,并与二倍体杂交形成三倍体群体. 事实证明,直接诱导很难保证100%三倍体群体的形成,但是利用四倍体和二倍体之间的杂交能保证后代中100%三倍体的比例。

目前广泛用于鱼类多倍体诱导的方法主要有生物学、物理学和化学方法3大类. 生物学方法中远缘杂交、核移植以及细胞融合是诱导鱼类多倍体化的有效途径; 物理方法主要包括温度休克法、静水压法以及近年来尝试的高盐高碱法和电休克法等; 化学方法主要是采用不同的化学诱导剂对受精卵诱导以达到使其多倍化的目的,这些化学试剂主要包括细胞松弛素、咖啡因、聚乙二醇、秋水仙素、6-二甲氨基嘌呤等。

物理、化学方法人工诱导鱼类多倍体种类形成,其原理是通过抑制卵母细胞第一极体或第二极体排出,或抑制受精卵第一次卵裂达到使其多倍化的目的^[117]. 桂建芳等人^[119]成功地采用静水压法诱导出三倍体水晶彩鲤(*C. auratus transparent colored var.*); 陈松林等人^[120]采用静水压处理抑制受精卵第二极体排出进行染色体加倍获得了三倍体半滑舌鲷. 诱导鱼类多倍体的生物学方法主要是通过杂交方法获得异源多倍体. Wu 等人^[121]以兴国红鲤(♀)×红鲤(♂)获得

的雌性鲫鲤杂交后代与雄性散鳞镜鲤杂交,获得了雌性可育的人工复合三倍体鲤鱼. 这些直接诱导试验虽然均可获得三倍体鱼,但无法保证三倍体在后代中100%的比例。

银鲫作为天然的三倍体,与其他的单性的行雌核发育物种不同,在其自然种群和人工繁育群体中,雄性银鲫占据一定的比例,为三倍体两性型群体;当银鲫卵子用其他鱼类的精子激活时,其后代为全雌性. 桂建芳和周莉^[122]利用分子标记鉴定技术获得了银鲫不同克隆品系,并利用银鲫双重生殖的特性进行了大量品系间的交配繁育,从高体型(D系)异育银鲫(♀)与平背型(A系)异育银鲫(♂)有性繁殖后代中选育出一个新克隆系A⁺. 对克隆系A⁺的遗传组成的研究表明,新克隆系的核基因组与A系的核基因组相同,而线粒体基因组与D系银鲫的线粒体基因组相同,并由此揭示克隆系A⁺是一个新的核质杂种克隆,其形成是A系银鲫的精子在D系银鲫的卵质中经雄核发育实现的^[123]. 此A⁺克隆系仍保持行单性雌核生殖的能力,产生遗传性状稳定并且与其核质杂种母本完全一致的后代,已被国家原良种委员会鉴定为水产养殖新品种,命名为异育银鲫“中科3号”,已在全国大范围内进行推广养殖^[123].

在鱼类四倍体制备方面,已有报道利用热休克诱导获得了四倍体虹鳟^[124]、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[125]、丁鲷(*Tinea tinea*)^[126]和泥鳅^[127]等;利用静水压处理法获得的四倍体半滑舌鲷^[128];利用静水压与冷休克结合处理获得四倍体罗非鱼(*Oreochromis spp.*)^[129]、四倍体水晶彩鲤^[130]. Zou等人^[131]以系统选育的团头鲂良种“浦江1号”为亲本,采用热休克方式抑制第1次卵裂的方法获得了人工同源四倍体团头鲂. 利用杂交方法获得四倍体方面,Zhu和Gui^[132]在异育银鲫人工繁殖群体中发现了少数的复合四倍体个体,它们在获得银鲫全部染色体的同时,也融入了红鲤(*Cyprinus carpio*)精子单倍染色体组. 然而,上述研究中未见获得两性可育的四倍体鱼群体并形成四倍体品系的报道。

20世纪70年代以来,本实验室在红鲤(♀, $2n=100$)×鲤(♂, $2n=100$)杂交获得的F₁中发现部分可育的二倍体个体,F₁可育个体自交获得F₂代,在F₂自交后代F₃中发现了异源四倍体鲫鲤($4n=200$ 或 $2n=4X=200$)^[57,64]. 这个遗传性状稳定的异源四倍体

群体已稳定繁殖到 F_{24} 代, 为不育三倍体鱼的大规模生产提供了充足的亲本保证。目前, 用异源四倍体鲫鲤为父本分别与鲫鱼和鲤鱼等二倍体鱼制备的不育三倍体鱼已在全国推广养殖多年, 受到了广大水产养殖者的欢迎, 产生了显著的社会、经济和生态效益。这个遗传稳定的异源四倍体鲫鲤品系, 为形成新的物种奠定了基础^[57]。同时, 异源四倍体鲫鲤品系的形成成为探讨自然界鱼类多倍体的起源和进化提供了重要研究模型。

本实验室对双亲染色体数目不同的红鲫(♀, $2n=100$)与团头鲂(♂, $2n=48$)的远缘杂交也进行了系统的研究^[67,133]。鲫鲂杂交 F_1 代中有两性可育的异源四倍体鲫鲂($4n=148$)群体和不育的异源三倍体鲫鲂($3n=124$)群体。 F_1 代中的异源四倍体鲫鲂具有能同时产生减数和不减数配子的特殊繁殖特性。 F_1 代中的异源四倍体鲫鲂自交形成的 F_2 中存在同源四倍体鱼($4n=200$), 目前已形成了一个同源四倍体鱼品系(F_1 - F_9 , $4n=200$)^[69]。该同源四倍体鱼品系与二倍体鲫鱼交配制备了三倍体鲫鱼($3n=150$)。第一代四倍体鲫鲂(♀, $4n=148$)与团头鲂(♂, $2n=48$)回交获得了五倍体鲫鲂($5n=172$), 与红鲫回交获得了另一种新型的五倍体鲫鲂($5n=198$)。

此外, 本实验室在红鲫(♀, $2n=100$)×黄尾密鲴(♂, $2n=48$)远缘杂交后代中检测到三倍体鲫鲴($3n=124$)和四倍体鲫鲴($4n=148$); 红鲫(♀, $2n=100$)×翘嘴红鲌(♂, $2n=48$)远缘杂交后代中检测到二倍体($2n=74$)、三倍体($3n=124$)和四倍体鲫鲌($4n=148$)^[68]; 在草鱼(♀, $2n=48$)×团头鲂(♂, $2n=48$)的远缘杂交后代中检测到二倍体($2n=48$)和三倍体($3n=72$)草鲂^[66]。这些鱼类远缘杂交系统的研究工作的开展, 有利于指导培育出更多的多倍体鱼。

刘少军总结了20多年从事鱼类远缘杂交的实验结果, 撰写了《鱼类远缘杂交》^[134]专著, 该书较系统地描述了远缘杂交形成异源和同源四倍体鱼品系的过程和原理; 同时也描述了通过远缘杂交形成二倍体鱼品系的过程和原理; 并介绍了不育三倍体鱼在生产应用中的特点、优点和实用价值。

1.3 性状改造育种技术

鱼类遗传育种实质是从稳定品系中选出或研制变异品系, 再从变异品系中培育稳定品系的循环过

程。合理的性状改造手段对于理想变异品系的快速获得至关重要, 而理想变异品系的研制在很大程度上决定了鱼类遗传育种的效率和成效。转基因育种作为行之有效的性状改造手段, 能够较为快速地获得新的变异品系。

转基因指采用基因转移技术, 将外源基因导入受体基因组内, 使其稳定整合并能遗传给后代的技术。鱼类是脊椎动物中较原始的类群, 遗传可塑性大, 怀卵量大, 受精卵易得, 胚胎体外发育快, 显微操作方便, 再加上鱼类为高蛋白健康食品, 有较好的经济价值, 因而成为研制转基因动物和培育优良品种的良好材料。

鱼类转基因的研究最早的报道是, 1985 年中国学者 Zhu 等人^[135]率先研制出世界首例转基因鲫鱼。此后, 朱作言团队又建立了多个转基因鱼的模型, 为转基因鱼的研究发展奠定了理论基础。随后, 世界各国都相继开展了转基因鱼的研究, 先后获得转基因青鳞、虹鳟、沟鲈、鲑鱼(*Salmo salar*)、斑马鱼、罗非鱼、白斑狗鱼(*Esox lucius*)、非洲鲶鱼(*Clarias gariepinus*)、大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)、大麻哈鱼、银大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)等^[136-139]。

转基因技术本身的一个特点就是将对人类有利的外源基因导入受体鱼内, 从而得到人们期望的具有优良性状的变异品系。传统的遗传育种需经过多代反复选育交配才能获得理想的变异品系, 而转基因技术则可超越自然界的生物进化历程, 在短时间内创造出自然界中没有的变异品种或品系, 这是常规育种难以比拟的。

转基因技术的应用, 一方面是转基因鱼类作为一种好的研究材料便于进行科学探索, 另一方面是转基因鱼具有重要的经济价值。当前鱼类转基因技术在鱼类遗传育种中的应用主要围绕 3 个方面进行: (i) 培育高产品种, 提高生长速度和饵料转化率, 增加产量; (ii) 培育抗逆(病害、寒冷)品种, 改善抗病和抵御恶劣环境的能力; (iii) 作为模式动物进行基础研究, 探讨生长、发育、繁殖等生命活动的机理。

在培育高产品种方面, 朱作言团队通过研究获得了生长速度提升的转基因鲤鱼^[140-142]。本实验室与中国科学院水生生物研究所合作利用显微注射方法制备了转草鱼生长激素基因的异源四倍体鲫鲤, 并通过自交获得了具有外源生长激素基因的转基因异

源四倍体鱼 F_1 , 转基因鱼 F_1 具有明显的生长优势^[143]. 冯浩等人^[144]成功制备了以青鱼 $\beta\text{-actin}$ 基因为启动子的青鱼生长激素重组基因, 并用显微注射方法获得了生长速度比对照组快 2.65 倍的转基因异源四倍体鲫鱼. 转生长激素基因鱼的促生长效应明显, 并且具有少食快长、适应性强等特点.

鱼类抗逆性包括鱼类的抗寒能力、抗病能力和抗污染能力, 还有耐低氧能力. Hew 等人^[145]将一种冬鲮 (*Pleuronectes americanus*) 的抗冻蛋白基因导入大西洋鲑鱼, 使后者在进入盐水之前对低温有了一定的抗性. 增强鱼类抗病能力的可选抗病基因相当多, 如某些反义 RNA、干扰素、溶菌酶等基因, 通过转入抗病基因提高鱼类的抗病力是具有潜在的巨大利益^[146]. Dunham 等人^[147]证明, 转入 *Cecropin B* 基因的斑点叉尾鲷对病原菌的免疫有所增强. Mao 等人^[148]通过精子载体法将类乳铁蛋白的基因导入草鱼受精卵中, 获得了对嗜水气单胞菌免疫能力提高的转基因草鱼. 抗逆性基因的导入, 使得受体鱼获得对抗恶劣环境的性状, 经过选育可以得到具有抗逆性性状的新品种, 大大提升渔业养殖的效益.

转基因育种作为行之有效的性状改造手段, 已频繁地用于新变异品系的快速建立, 但由于安全等因素的影响还未能进入大规模的生产应用阶段^[139]. 在解决转基因鱼的安全方面, 把转基因鱼的终端产品限制在不育的三倍体鱼的范围内, 可以从根本上解决转基因鱼的生态安全问题, 而且应用“全鱼”基因作为外源基因, 可以最大限度的降低转基因鱼的食物安全风险. 通过应用四倍体鱼及倍间交配的方式来生产转基因三倍体鱼可以保证生产 100% 的不育三倍体鱼, 因此在转基因鱼的研究方面, 通过最终生产不育的转“全鱼”基因的三倍体鱼是目前转基因鱼研究中最理想的生物安全模式之一. 本实验室与中国科学院水生生物研究所合作, 通过转草鱼生长激素基因二倍体黄河鲤与改良异源四倍体鲫鱼进行倍

间杂交, 获得了转基因三倍体鲤鱼(阳性鱼)以及非转基因三倍体鲤鱼(阴性鱼)2 种后代, 在此基础上, 研究了这 2 种三倍体鲤鱼的生长与生殖发育特性, 为转生长激素基因鲤鱼的产业化提供了重要的实验数据, 不仅证实了转基因三倍体鲤鱼的快速生长特性, 而且第一次用实验消除了转基因鲤鱼养殖应用上的生态安全之虑^[149].

2 鱼类遗传育种的不足和展望

经过长期的努力, 国内外水产工作者将传统技术与现代生命科学结合发展, 在鱼类育种方面取得了重大的进步, 建立了杂交、倍性、细胞核移植、染色体工程以及基因工程等育种技术, 并形成了多技术结合的育种路线, 推出了一些具有重要经济价值和社会价值的养殖新对象, 大大提高了渔业生产力, 同时也丰富了鱼类的遗传多样性.

但是, 总体来说, 目前水产养殖鱼类的优良品种还相对较少, 其主要原因之一是鱼类遗传育种基础理论研究和育种实践的联系还不够紧密. 另一方面, 在实验室中摸索出的新技术怎样快速应用到育种实践中需要得到重视. 还有诸如远缘杂交和雌核发育等细胞工程技术经过实践证明是行之有效的方法, 但是在研究实施过程中, 因为需要有条件较好的育种基地(包括大量的养殖场地和完善的养殖设施)和系统的遗传育种检测方法的配套以及长时间的系统研究, 因此用上述细胞工程方法培育出的新品种的数量是有限的, 但是在这方面如果坚持长期不懈的定向研究, 却是很有发展潜力和大有作为的. 总之, 怎样把鱼类遗传育种中的基础性研究与实际需求联系在一起是应该思考的问题; 坚持长期定向而系统的遗传育种研究方向并把遗传育种技术综合运用到育种实践中也是广大科技工作者需要努力的方向.

参考文献

- 1 Kause A, Ritola O, Paananen T, et al. Genetic trends in growth, sexual maturity and skeletal deformations, and rate of inbreeding in a breeding programme for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 2005, 247: 177–187
- 2 Neira R, Díaz N F, Gall G A E, et al. Genetic improvement in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). II: selection response for early spawning date. *Aquaculture*, 2006, 257: 1–8
- 3 Saillant E, Dupont-Nivet M, Haffray P, et al. Estimates of heritability and genotype environment interactions for body weight in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) raised under communal rearing conditions. *Aquaculture*, 2006, 254: 139–147

- 4 Gheyas A A, Woolliams J A, Taggart J B, et al. Heritability estimation of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) harvest traits using microsatellite based parentage assignment. *Aquaculture*, 2009, 294: 187–193
- 5 Rezk M A, Smitherman R O, Williams J C, et al. Response to three generations of selection for increased body weight in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, grown in earthen ponds. *Aquaculture*, 2003, 228: 69–79
- 6 Embury G C, Hayford C O. The advantage of rearing brook trout fingerlings from selected breeders. *Trans Am Fish Soc*, 1925, 55: 135–142
- 7 Main K L, Reynolds E. *Selective Breeding of Fishes in Asia and the United States*. Hawaii: The Oceanic Institute, 1993. 206–213
- 8 Wang H F, Liu X, Su J H, et al. Effects of starvation and subsequent refeeding on growth and biochemical compositions of Gansu Golden Trout. *J Anim Vet Adv*, 2013, 12: 289–294
- 9 Tang S J, Li S F, Cai W Q, et al. Microsatellite analysis of variation among wild, domesticated, and genetically improved populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Zool Res*, 2014, 35: 108–117
- 10 Li S F, Tang S J, Cai W Q. RAPD-SCAR markers for genetically improved NEW GIFT Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus niloticus* L.) and their application in strain identification. *Zool Res*, 2010, 31: 147–153
- 11 Liu Y G, Chen S L, Li B F, et al. Analysis of genetic variation in selected stocks of hatchery flounder, *Paralichthys olivaceus*, using AFLP markers. *Biochem Syst Ecol*, 2005, 33: 993–1005
- 12 Ning Y, Liu X D, Wang Z Y, et al. A genetic map of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture*, 2007, 264: 16–26
- 13 Zhang T S, Kong J, Liu B S, et al. Genetic parameter estimation for juvenile growth and upper thermal tolerance in turbot (*Scophthalmus maximus* Linnaeus). *Acta Oceanol Sin*, 2014, 33: 106–110
- 14 Hong W S, Zhang Q Y. Review of captive bred species and fry production of marine fish in China. *Aquaculture*, 2003, 227: 305–318
- 15 Agarwal M, Shrivastava N, Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep*, 2008, 27: 617–631
- 16 Yang W J, Kang X L, Yang Q F, et al. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *J Anim Sci Biotechnol*, 2013, 4: 2
- 17 Arif I A, Khan H A. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Anim Bioiv Conserv*, 2009, 32: 9–17
- 18 Jander G. Gene identification and cloning by molecular marker mapping. *Methods Mol Biol*, 2006, 323: 115–126
- 19 Luo Z W, Hackett C A, Bradshaw J E, et al. Construction of a genetic linkage map in tetraploid species using molecular markers. *Genetics*, 2001, 157: 1369–1385
- 20 Montaldo H H, Meza-Herrera C A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Electron J Biotechnol*, 1998, 1: 1–7
- 21 Postlethwait J H, Johnson S L, Midson C N, et al. A genetic linkage map for the zebrafish. *Science*, 1994, 264: 699–703
- 22 Naruse K, Tanaka M, Mita K, et al. A medaka gene map: the trace of ancestral vertebrate protochromosome revealed by comparative gene mapping. *Genome Res*, 2004, 14: 820–828
- 23 Kai W, Kikuchi K, Fujita M, et al. A genetic linkage map for the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Genetics*, 2005, 171: 227–238
- 24 Walter R B, Rains J D, Russell J E, et al. A microsatellite genetic linkage map for *Xiphophorus*. *Genetics*, 2004, 168: 363–372
- 25 Peichel C L, Nereng K S, Ohgi K A, et al. The genetic architecture of divergence between three spine stickleback species. *Nature*, 2001, 414: 901–905
- 26 Young W P, Wheeler P A, Coryell V H. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. *Genetics*, 1998, 148: 839–850
- 27 Lee B Y, Woo J L, Streelman J T, et al. A second generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.). *Genetics*, 2005, 170: 237–244
- 28 Liu Z J, Cordes J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 2004, 238: 1–37
- 29 Chauhan T, Rajiv K. Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Adv Biosci Biotech*, 2010, 1: 281–291
- 30 Laghari M Y, Lashari P, Zhang X, et al. QTL mapping for economically important traits of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J Appl Genet*, 2014, in press
- 31 桂建芳, 朱作言. 水产动物重要经济性状的分子基础及其遗传改良. *科学通报*, 2012, 57: 1719–1729
- 32 Jang S H, Liu H, Su J G, et al. Construction and characterization of two bacterial artificial chromosome libraries of grass carp. *Mar Biotechnol*, 2010, 12: 261–266
- 33 Geng F S, Zhou L, Gui J F. Construction and characterization of a BAC library for *Carassius auratus gibelio*, a gynogenetic polyploid fish. *Anim Genet*, 2005, 36: 535–536
- 34 Zhang J, Shao C, Zhang L, et al. A first generation BAC-based physical map of the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) genome. *BMC Genomics*, 2014, 15: 215

- 35 赵寿元. 基因组研究与生命科学工业的崛起. 生命科学, 1999, 11: 1–5
- 36 Sarropoulou E, Nousdili D, Magoulas A, et al. Linking the genomes of nonmodel teleosts through comparative genomics. Mar Biotechnol, 2008, 10: 227–233
- 37 Star B, Nederbragt A J, Jentoft S, et al. The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system. Nature, 2011, 477: 207–210
- 38 Chen S L, Zhang G J, Shao C W, et al. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. Nat Genet, 2014, 46: 253–260
- 39 Zhang G F, Fang X D, Guo X M, et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. Nature, 2012, 490: 49–54
- 40 Xu P, Zhang X F, Wang X M, et al. Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. Nat Genet, 2014, 46: 1212–1219
- 41 Devlin R, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, 2002, 208: 191–364
- 42 Pandian T J, Sheela S G. Hormonal induction of sex reversal in fish. Aquaculture, 1995, 138: 1–22
- 43 Piferrer F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Aquaculture, 2001, 197: 229–281
- 44 Yamamoto T. Progeny of artificially induced sex reversal male genotype (XY) in the medaka (*Oryzias latipes*) with special reference to YY male. Genetics, 1955, 40: 406–429
- 45 Guerrero R D. Use of Androgens for the production of all male *Tilapia aurea* (Steindacher). Trans Amer Fish Soc, 1975, 104: 342–348
- 46 Liu S J, Yao Z Z, Wang Y Q. Sex hormone induction of sex reversal in the teleost *Clarias lazera* and evidence for female homogamety and male heterogamety. J Exp Zool, 1996, 276: 432–438
- 47 Liu S J, Yao Z Z. Self-fertilization of hermaphrodites of the teleost *Clarias lazera* after oral administration of 17- α -methyltestosterone and their offspring. J Exp Zool, 1995, 273: 527–532
- 48 陈荣德, 黄文郁, 吴清江, 等. 全雌鲤的培育及其养殖效果. 水利渔业, 1990, 3: 21–23
- 49 Luo K K, Xiao J, Liu S J, et al. Massive production of all-female diploids and triploids in the crucian carp. Int J Biol Sci, 2011, 7: 487–495
- 50 刘汉勤, 崔书勤, 侯昌春, 等. 从 XY 雌鱼雌核发育产生 YY 超雄黄颡鱼. 水生生物学报, 2007, 31: 718–725
- 51 Wang D, Mao H L, Chen H X, et al. Isolation of Y- and X-linked SCAR markers in yellow catfish and application in the production of all-male populations. Anim Genet, 2009, 40: 978–981
- 52 Dan C, Mei J, Wang D, et al. Genetic differentiation and efficient sex-specific marker development of a pair of Y- and X-linked markers in Yellow Catfish. Int J Biol Sci, 2013, 9: 1043–1049
- 53 Hulata G. A review of genetic improvement of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) and other hybrids by crossbreeding, hybridization and selection. Aquaculture, 1995, 129: 143–155
- 54 Kirpichnikov V S, Ilyasov J I, Shart L A, et al. Selection of Krasnodar common carp (*Cyprinus carpio* L.) for resistance to dropsy: principal results and prospects. Aquaculture, 1993, 111: 7–20
- 55 Zhou J, Wu Q, Wang Z, et al. Genetic variation analysis within and among six varieties of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in china using microsatellite markers. Russ J Genet, 2004, 40: 1144–1148
- 56 Li S F, He X J, Han F J, et al. Third 2 Fifth Feneration Selective Evaluation of GIFT Strain Nile Tilapia. Beijing: World Aquaculture, 2002. 410
- 57 刘少军. 远缘杂交导致不同倍性鱼的形成. 中国科学: 生命科学, 2010, 40: 104–114
- 58 Schwartz F J. World Literature to Fish Hybrids with an Analysis by Family, Species and Hybrid. Seattle: National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, 1981. 750
- 59 张卓慧, 陈婕, 黎玲, 等. 动物远缘杂交研究进展. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 161–174
- 60 Beck M L, Biggers C J, Dupree H K. Karyological analysis of *Hypophthalmichthys molitrix*, *Aristichthys nobilis* and their F₁ hybrid. Trans Am Fish Soc, 1980, 109: 433–438
- 61 Sulaiman A H. Toxicity of malathion to red tilapia (hybrid *Tilapia mossambica* $\times$ *Tilapia nilotica*): behavioural, histopathological anti-cholinesterase studies. Malays Appl Biol (Malaysia), 1989, 18: 163–170
- 62 Harms C A, Kennedy-Stoskopf S, Horne W A, et al. Cloning and sequencing hybrid striped bass (*Morone saxatilis* $\times$ *M. chrysops*) transforming growth factor-beta (TGF-beta), and development of a reverse transcription quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay to measure TGF-beta mRNA of teleost fish. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10: 61–85
- 63 Sui J, Liu Q H, Xiao Z Z, et al. The viability, melanophore and embryo genesis of first- and second-generation hybrids between *Paralichthys olivaceus* and *P. dentatus*. Mar Biol Res, 2013, 9: 220–226

- 64 Liu S J, Liu Y, Zhou G J, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp $\times$ common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization. *Aquaculture*, 2001, 192: 171–186
- 65 Hu J, Liu S J, Xiao J, et al. Characteristics of diploid and triploid hybrids derived from female *Megalobrama amblycephala* Yih $\times$ male *Xenocypris davidi* Bleeker. *Aquaculture*, 2012, 364–365: 157–164
- 66 He W G, Xie L H, Li T L, et al. The formation of diploid and triploid hybrids of female grass carp $\times$ male blunt snout bream and their 5S rDNA analysis. *BMC Genetics*, 2013, 14: 110
- 67 Liu S J, Qin Q B, Xiao J, et al. The formation of the polyploid hybrids from different subfamily fish crossing and its evolutionary significance. *Genetics*, 2007, 176: 1023–1034
- 68 He W G, Qin Q B, Liu S J, et al. Organization and variation analysis of 5S rDNA in different ploidy-level hybrids of red crucian carp $\times$ topmouth culter. *PLoS One*, 2012, 6: e38976
- 69 Qin Q B, Wang Y D, Wang J, et al. The autotetraploid fish derived from hybridization of *Carassius auratus* red var. (Female) $\times$ *Megalobrama amblycephala* (male). *Biol Reprod*, 2014, 91: 93
- 70 童第周, 吴尚勳, 叶毓芬, 等. 鱼类细胞核的移植. *科学通报*, 1963, 7: 60–61
- 71 陈宏溪, 易泳兰, 陈敏容, 等. 鱼类培养细胞核发育潜能的研究. *水生生物学报*, 1986, 10: 1–7
- 72 Lee K Y, Huang H G, Ju B S, et al. Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term cultured cells. *Nature*, 2002, 20: 795–799
- 73 严绍颐. 鱼类细胞核移植的历史回顾与讨论. *生物工程学报*, 2000, 16: 541–547
- 74 余来宁, 左文功, 方耀林, 等. 用电融合结合继代移核方法构建草鱼抗病体细胞工程鱼. *水产学报*, 1996, 20: 312–318
- 75 Yan S Y. The nucleo-cytoplasmic interaction as revealed by nuclear transplantation in fish. In: Malacinski G M, ed. *Gytoplasm Organization System*. New York: McGraw-Hill, 1989. 61–81
- 76 余来宁, 杨永铨, 柳凌, 等. 用未去核卵作受体的鱼类细胞核移植研究. *淡水渔业*, 1989, 3: 3–7
- 77 Lin L T, Xia S L, Zhu X P. Studies on nuclear transplantation of somatic cells in teleost. *Zool Res*, 1996, 17: 337–340
- 78 刘汉勤, 易泳兰, 陈宏溪. 泥鳅雄核发育纯合二倍体的产生. *水生生物学报*, 1987, 11: 241–246
- 79 Tajima A, Naito M, Yasuda Y, et al. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology*, 1993, 40: 509–519
- 80 Lee Y M, Jung J G, Park T S, et al. A testis-mediated germline chimera production based on transfer of chicken testicular cells directly into heterologous testes. *Biol Reprod*, 2006, 75: 380–386
- 81 Hill J R, Dobrinski I. Male germ cell transplantation in livestock. *Reprod Fertil Dev*, 2006, 18: 13–18
- 82 Dobrinski I. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Anim Reprod Sci*, 2005, 89: 137–145
- 83 Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biol Reprod*, 2003, 69: 1142–1149
- 84 Hong Y H, Liu T M, Zhao H B, et al. Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 8011–8016
- 85 Okutsu T, Suzuki K, Takeuchi Y, et al. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 2725–2729
- 86 Yi M S, Hong N, Hong Y H. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science*, 2009, 326: 430–433
- 87 易梅生, 洪旒, 李振东, 等. 青鳉干细胞及其应用. *中国科学: 生命科学*, 2010, 40: 115–123
- 88 Nobrega R H, Greebe C D, van de K H, et al. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *PLoS One*, 2010, 5: e12808
- 89 Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. Surrogate broodstock produces salmonids. *Nature*, 2004, 430: 629–630
- 90 Majhi S K, Hattori R S, Yokota M, et al. Germ cell transplantation using sexually competent fish: an approach for rapid propagation of endangered and valuable germlines. *PLoS One*, 2009, 4: e6132
- 91 Okutsu T, Shikina S, Kanno M, et al. Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science*, 2007, 317: 1517
- 92 Komen H, Thorgaard G H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review. *Aquaculture*, 2007, 269: 150–173
- 93 Liu J, Yang G. Changes in copper content of allogynogenetic silver crucian carp after application of copper sulfate to fishponds. *Isr J Aquacult-Bamid*, 2009, 61: 351–355
- 94 Liu S J, Qin Q B, Wang Y Q, et al. Evidence for the formation of the male gynogenetic fish. *Mar Biotechnol*, 2010, 12: 160–172
- 95 Felip A, Zanuy S, Carrillo M, et al. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica*, 2001, 111: 175–195
- 96 Komen J, Wiegertjes G F, Van Ginneken V J T, et al. Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) III. The effects of inbreeding on gonadal development of heterozygous and homozygous gynogenetic offspring. *Aquaculture*, 1992, 104: 51–66
- 97 Fopp-Bayat D, Kolman R, Woznicki P. Induction of meiotic gynogenesis in sterlet (*Acipenser ruthenus*) using UV-irradiated bester sperm.

- Aquaculture, 2007, 264: 54–58
- 98 Morgan A J, Murashige R, Woolridge C A, et al. Effective UV dose and pressure shock for induction of meiotic gynogenesis in southern flounder *Paralichthys lethostigma* using black seabass (*Centropristis striata*) sperm. Aquaculture, 2006, 259: 290–299
- 99 Piferrer F, Cal R M, Gsmez C, et al. Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age. Aquaculture, 2004, 238: 403–419
- 100 Rougeot C, Ngingo J V, Gillet L, et al. Gynogenesis induction and sex determination in the Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. Aquaculture, 2005, 43: 411–415
- 101 Lin F, Dabrowski K. Induction of gynogenesis in muskellunge (*Esox masquinongy*). Aquaculture, 1995, 137: 153–154
- 102 Li Q, Kijima A. Microsatellite analysis of gynogenetic families in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. J Exp Mar Biol Ecol, 2006, 331: 1–8
- 103 Sun Y D, Tao M, Liu S J, et al. Induction of gynogenesis in red crucian carp using spermatozoa of blunt snout bream. Prog Nat Sci, 2007, 17: 163–167
- 104 Sun Y D, Zhang C, Liu S J, et al. Induction of Gynogenesis in Japanese crucian carp (*Carassius cuvieri*). Acta Genetica Sinica, 2006, 33: 405–412
- 105 Zhang H, Liu S J, Zhang C, et al. Induced gynogenesis in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) using irradiated sperm of allotetraploid hybrids. Mar Biotechnol, 2010, 13: 1017–1026
- 106 刘少军, 段巍, 陶敏, 等. 雌核发育二倍体鲫鲤鱼杂交克隆品系建立. 中国科学: 生命科学, 2007, 37: 28–34
- 107 Xiao J, Zou T M, Chen Y B, et al. Coexistence of diploid, triploid and tetraploid crucian carp (*Carassius auratus*) in natural waters. BMC Genetics, 2011, 12: 20
- 108 Stanley J G. Production of hybrid, androgenetic and gynogenetic grass carp and carp. T Am Fish Soc, 1976, 105: 10–16
- 109 Arai K, Onozato H, Yamazaki F. Artificial androgenesis induced with gamma irradiation in masou salmon (*oncorhynchus masou*). Bull Fac Fish Hokkaido Univ, 1979, 30: 181–186
- 110 Araki K, Shinma H, Nagoya H, et al. Androgenetic diploids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced by fused sperm. Can J Fish Aquat Sci, 1995, 52: 892–896
- 111 Babiak I, Dobosz S, Goryczko K, et al. Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factors. Theriogenology, 2002, 57: 29249
- 112 Thorgaard G H, Scheerer P D, Hershberger W K, et al. Androgenetic rainbow trout produced using sperm from tetraploid males show improved survival. Aquaculture, 1990, 85: 215–221
- 113 Arai K, Ikeno M, Suzuki R. Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* using spermatozoa of natural tetraploids. Aquaculture, 1995, 137: 131–138
- 114 Fujimoto T, Yasui G S, Hayakawa M, et al. Reproductive capacity of neo-tetraploid loaches produced using diploid spermatozoa from a natural tetraploid male. Aquaculture, 2010, 308: s133–s139
- 115 Sun Y D, Zhang C, Liu S J, et al. Induced interspecific androgenesis using diploid sperm from allotetraploid hybrids of common carp × red crucian carp. Aquaculture, 2007, 264: 47–53
- 116 段巍, 覃钦博, 陈松, 等. 用雄核发育方法制备改良异源四倍体鲫鲤群体. 中国科学: 生命科学, 2007, 37: 530–539
- 117 宋灿, 刘少军, 肖军, 等. 多倍体生物研究进展. 中国科学: 生命科学, 2012, 42: 173–184
- 118 Benfey T J. The physiology and behavior of triploid fishes. Rev Fish Sci, 1999, 1: 39–67
- 119 桂建芳, 肖武汉, 梁绍昌, 等. 静水压休克诱导水晶彩鲫三倍体和四倍体的细胞学机理初探. 水生生物学报, 1995, 28: 49–55
- 120 陈松林, 李文龙, 季相山, 等. 半滑舌鲷三倍体鱼苗的人工诱导与鉴定. 水产学报, 2011, 35: 925–931
- 121 Wu C, Ye Y, Chen R, et al. An artificial multiple triploid carp and its biological characteristics. Aquaculture, 1993, 111: 255–262
- 122 桂建芳, 周莉. 多倍体银鲫克隆多样性和双重生殖方式的遗传基础和育种应用. 中国科学: 生命科学, 2010, 40: 97–103
- 123 Wang Z W, Zhu H P, Wang D, et al. A novel nucleo-cytoplasmic hybrid clone formed via androgenesis in polyploid gibel carp. BMC Res Notes, 2011, 4: 82
- 124 Chourrout D. Tetraploidy induced by heat shocks in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Reprod Nutr Dev, 1982, 22: 569–574
- 125 Bidwell C A, Chrisman C L, Libey G. Polyploidy induced by heat shock in channel catfish. Aquaculture, 1985, 51: 25–32
- 126 Flajshans M, Linhart O, Kvasnicka P. Genetic studies of tench (*Tinea tinea* L.): induced triploidy and tetraploidy and first performance data. Aquaculture, 1993, 113: 301–312
- 127 Nam Y K, Choi G C, Park D J, et al. Survival and growth of induced tetraploid mud loach. Aquacult Int. 2001, 9: 61–71
- 128 李文龙, 陈松林, 季相山, 等. 半滑舌鲷四倍体鱼苗的诱导与鉴定. 中国水产科学, 2012, 19: 196–201
- 129 Myers J M. Tetraploid induction in *Oreochromis* spp. Aquaculture, 1986, 57: 281–287
- 130 桂建芳, 孙建民, 梁绍昌, 等. 鱼类染色体组操作的研究: 静水压处理和静水压与冷休克结合处理诱导水晶彩鲫四倍体. 水生生物

- 学报, 1991, 15: 333–342
- 131 Zhu H P, Gui J F. Identification of genome organization in the unusual allotetraploid form of *Carassius auratus gibelio*. *Aquaculture*, 2007, 265: 109–117
- 132 Zou S M, Li S F, Cai W Q, et al. Establishment of fertile tetraploid population of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Aquaculture*, 2004, 238: 155–164
- 133 Qin Q B, He W G, Liu S J, et al. Analysis of 5S rDNA organization and variation in polyploid hybrids from crosses of different fish subfamilies. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)*, 2010, 314: 403–411
- 134 刘少军. 鱼类远缘杂交. 北京: 科学出版社, 2015
- 135 Zhu Z Y, Li G, He L, et al. Novel genen transfer into fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus* L. 1758). *Z Angew Ichthyol*, 1985, 1: 31–34
- 136 Houdebine L M, Chourrout D. Transgenesis in fish. *Experientia*, 1991, 47: 891–897
- 137 Rembold M, Lahiri K, Foulkes N S, et al. Transgenesis in fish: efficient selection of transgenic fish by co-injection with a fluorescent reporter construct. *Nat Protoc*, 2006, 1: 1133–1139
- 138 Devlin R H. Production and evaluation of transgenic fish for aquaculture. *Australas Biotechnol*, 1998, 8: 222–226
- 139 Maclean N, Laight R J. Transgenic fish: an evaluation of benefits and risks. *Fish Fish*, 2000, 1: 146–172
- 140 Fu C, Hu W, Wang Y, et al. Developments in transgenic fish in the People's Republic of China. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 2005, 24: 299–307
- 141 Fu C, Cui Y, Hung S S O, et al. Growth and feed utilization by F₄ human growth hormone transgenic carp fed diets with different protein levels. *J Fish Biol*, 1998, 53: 115–129
- 142 Wu G, Sun Y, Zhu Z Y. Growth hormone gene transfer in common carp. *Aquat Living Resour*, 2003, 16: 416–420
- 143 冯浩, 曾志强, 刘少军, 等. 转基因异源四倍体鲫鲤 F₁ 的研究. *遗传学报*, 2002, 29: 434–437
- 144 冯浩, 傅永明, 骆剑, 等. 转青鱼生长激素基因异源四倍体鲫鲤. *中国科学: 生命科学*, 2011, 41: 202–209
- 145 Hew C L, Davies P L, Fletcher G. Antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1992, 1: 309–317
- 146 Dunham R A. Transgenic fish resistant to infectious diseases, their risk and prevention of escape into the environment and future candidate genes for disease transgene manipulation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2009, 32: 139–161
- 147 Dunham R A, Warr G, Nichols A, et al. Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish, *Ictalurus punctatus*, possessing cecropin genes. *Mar Biotechnol*, 2002, 4: 338–344
- 148 Mao W F, Wang Y P, Wang W B, et al. Enhanced resistance to *Aeromonas hydrophila* infection and enhanced phagocytic activities in human lactoferrin-transgenic grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture*, 2004, 242: 93–103
- 149 于凡, 肖俊, 梁向阳, 等. 转生长激素基因三倍体鲤鱼的快速生长与不育特性. *科学通报*, 2010, 55: 1987–1992