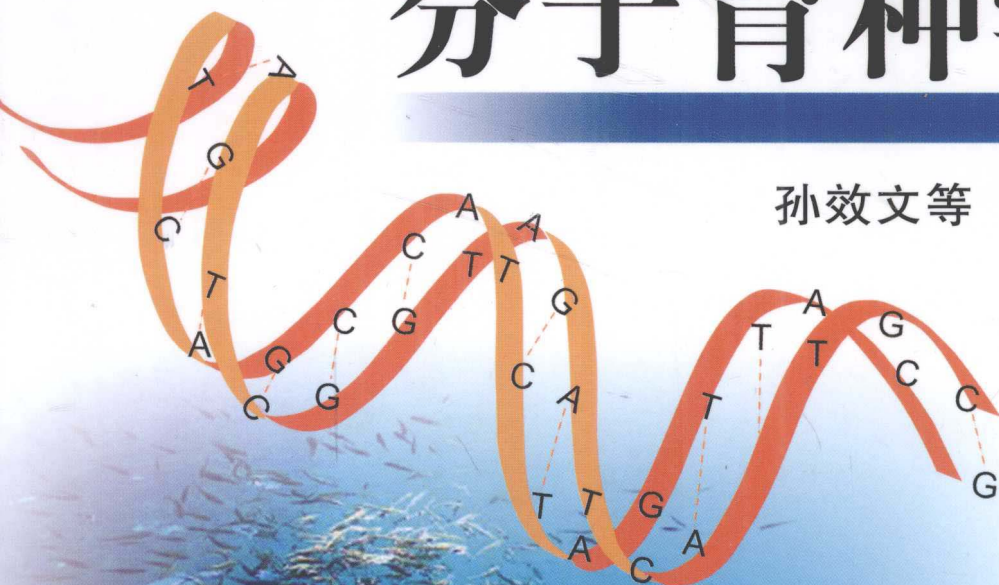


鱼类

分子育种学

孙效文等 编著



 海洋出版社

鱼类分子育种学

孙效文等 编著

海洋出版社

2010年 · 北京

内 容 简 介

本书是一部鱼类分子育种学专著。由于分子育种是刚刚开始的技术,相关的理论和技术方法都在发展之中,本书全面介绍了已报道的理论、技术方法和新的育种成果。全书分10章,内容包括绪论、分子育种的理论基础、分子育种的技术基础、分子育种的数据分析、基于遗传背景分析的分子育种技术、基于基因—性状分析结果的育种技术、鱼类基因工程育种、分子标记在种质鉴定与评估中的应用、分子育种实例分析和结论。另外,在附录中列入了我国水产新品种良种审定办法、水产新品种种质检测规范、全国水产原良种审定委员会审(认)定并通过的水产品种、中英文对照的分子育种相关名词等。

本书可供从事鱼类遗传育种学、水产养殖学等方面的科研人员与大专院校师生参考。

图书在版编目(CIP)数据

鱼类分子育种学/孙效文等编著. —北京:海洋出版社,2010.5
ISBN 978-7-5027-7698-5

I. ①鱼… II. ①孙… III. ①鱼类养殖—遗传育种 IV. ①S962

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 051253 号

责任编辑:方 菁

责任印制:刘志恒

海洋出版社 出版发行

<http://www.oceanpress.com.cn>

北京市海淀区大慧寺路8号 邮编:100081

北京盛兰兄弟印刷装订有限公司印刷 新华书店发行所经销

2010年5月第1版 2010年5月北京第1次印刷

开本:787mm×1092mm 1/16 印张:18.5

字数:410千字 定价:68.00元

发行部:62147016 邮购部:68038093 总编室:62114335

海洋版图书印、装错误可随时退换

序 言

本书作者是一个很好的团队,这个团队自 1987 年开始从事鱼类基因工程育种研究以来就在一起工作。该团队在孙效文研究员的带领下,一边从事鲤鱼的基因工程育种研究,一边开发与积累基因组资源,从鲤鱼的标记开发到遗传连锁图的制备,再到经济性状的遗传分析,并利用分子标记开展了多种类型的分子育种工作的探索。本书是这个团队利用分子生物学知识开展鱼类育种研究的总结,也包含了作者对分子育种理论和技术的思考。

分子育种技术将是水产养殖动物育种研究的更新技术,所涉及的理论与技术问题很多,尤其是水产生物具有多种多样的生殖方式和不同的养殖方式以及不同的苗种生产方式,这些决定鱼类分子育种技术是多样性的。本书是一个好的开端,还会有更多的知识和更好的技术被开发出来。

我乐于向读者推荐这本有关鱼类分子育种技术和理论的书,希望她能够在鱼类育种技术的发展中起到好的推进作用。

孙效文

2010 年 1 月于北京

前 言

种质是养殖生产的物质基础,品种是提高养殖生产效果的最重要的物质条件。我国水产业在从以捕捞为主的产业向以养殖为主的产业转变过程中,良种起到的作用已充分证明我国的水产业与大农业一样,种质与品种是制约产业发展的第一技术要素。进入新世纪以来,我国在水产生物育种尤其是海洋生物的育种研究方面做了大量的创新性工作,在传统育种技术的基础上,引进与开发了多性状复合育种技术,开展了标记指导的分子育种技术等,性状选择方面在保持生长性能的基础上开展了抗病育种、抗逆育种、单性生殖和优良品质选择等。这些研究都取得了相当好的育种结果,也都保持了我国养殖业的特色,一些新品种已经或将持续通过全国水产原良种审定委员会的审定,并在生产中发挥作用。

分子育种是基于分子生物学和基因组学在鱼类等水产生物的研究结果之上,结合生物统计学、生物信息学和计算机软件等理论和技术而建立的综合育种技术。它强调选择是基于育种对象的遗传基础、性状的基因调控机制、雌雄亲本在全基因组上的同异,但不排斥传统育种的表型选择方法,并将两者的优势结合在一起形成的新一代育种技术。由于鱼类相关的基础研究较农作物和畜禽晚一些,因此积累也少一些。鱼类的分子育种结果报道也只有2~3年的时间,相关的理论还不完善,积累的技术方法还很少,作为研究工作者深感需要一本专著来推动这项新兴事业。本书的所有编著者是抱着学习的态度来撰写这本《鱼类分子育种学》的,当今是分子生物学和基因组学飞速发展的时代,以其为基础鱼类分子育种技术也将会迅速发展,本书提及的技术和方法只是这发展过程中瞬时存在的手段而已,但愿本书的出版能对我国水产生物分子育种技术的发展和成型起到一点推动作用。

本书介绍了目前已报道的有关鱼类分子育种结果,尤其是近1~2年的报道,并试图从遗传学和育种学的发展角度阐述分子育种技术的发展基础与形成途径,如:分子标记参与育种已经提出了近80年,真正用

到育种实践中是分子标记大量出现和基因组研究技术出现以后,这也说明技术在落后于理论时,技术瓶颈可以长期制约该技术的发展,瓶颈的打破这时就起到决定性作用,整体水平上的基因组研究技术和可以得到代表亲本遗传本质的分子标记就是决定分子育种是否可行的决定性技术。本书还介绍了作者在分子育种理论和发展阶段等方面的认识,以期得到读者的批评指正。

本书由本人主持撰写,参加撰写的还有中国水产科学研究院黑龙江水产研究所的同事和集美大学的教授。具体分工是:孙效文撰写第一章、第二章、第五章、第六章、第十章,第三章的第一节、第二节和第四节;鲁翠云撰写第三章第三节;匡友谊撰写第四章;梁利群撰写第七章;赵莹莹撰写第八章;王志勇撰写第九章;张晓锋撰写附录。我们的合作是非常愉快的。另外,在撰写过程中还得到了黑龙江水产研究所领导和其他同事的支持、协助,在此一并致以诚挚的谢意。

撰写这样一本技术尚在发展中的学术专著,对我们来说是比较困难的,尽管我们尽了很大努力,多次修改,但还是会有不少欠妥甚至错误之处,恳请广大同行批评指正。意见可直接发给本人:sunxw2002@163.com,对于您的批评与指正表示深深谢意。

孙效文

2009年8月于黑龙江水产研究所

目 次

第一章 绪 论	(1)
第一节 育种从经验走向科学	(1)
第二节 传统育种技术的贡献与技术发展	(2)
第三节 分子育种时代的来临	(12)
第四节 鱼类育种的有关名词	(14)
第二章 分子育种的理论基础	(19)
第一节 性状的遗传基础	(19)
第二节 基因的化学基础	(22)
第三节 性状通过基因的形成机制	(26)
第四节 性状在群体中的遗传与变异	(31)
第三章 分子育种的技术基础	(38)
第一节 基因克隆技术	(38)
第二节 PCR 及其他基因型分析技术	(40)
第三节 DNA 分子标记	(43)
第四节 性状的遗传分析技术	(54)
第四章 分子育种的数据分析	(65)
第一节 群体遗传参数计算	(65)
第二节 连锁分析	(84)
第三节 QTL 定位分析	(98)
第五章 基于遗传背景分析的分子育种技术	(115)
第一节 鱼类分子育种技术理论	(115)
第二节 家系选育	(118)
第三节 群体选育	(123)
第四节 群体的遗传结构优化	(126)
第五节 鱼类分子育种的实验基础	(129)
第六章 基于基因—性状分析结果的育种技术	(140)
第一节 基于简单 QTL 分析结果的育种技术	(140)

第二节	多个经济性状相关基因的聚合育种技术·····	(141)
第三节	基于全基因组解析性状的研究结果的育种技术·····	(144)
第四节	利用性别相关的分子育种开展单性生殖及育种·····	(145)
第七章	鱼类基因工程育种 ·····	(152)
第一节	转基因鱼的制备·····	(153)
第二节	转基因鱼的安全性评价·····	(157)
第三节	生态适应性评估·····	(160)
第八章	分子标记在种质鉴定与评估中的应用 ·····	(167)
第一节	线粒体 DNA 标记在种质鉴定和评估中的应用·····	(167)
第二节	核基因标记在种质鉴定和评估中的应用·····	(171)
第九章	分子育种实例分析 ·····	(188)
第一节	虹鳟抗病分子标记的筛选和标记辅助选择试验·····	(188)
第二节	利用分子标记辅助选择大量培育牙鲆抗病苗种·····	(194)
第十章	结 论 ·····	(200)
附录一	水产新品种审定办法·····	(211)
附录二	水产新品种种质检测规范·····	(214)
附录三	全国水产原良种审定委员会审(认)定通过的水产品种·····	(217)
附录四	中英文对照的分子育种相关名词·····	(219)
附录五	鲤、鲫、鲢、鳙、草鱼、河蟹、牙鲆等主要养殖种的微卫星标记的引物 序列及群体遗传参数值·····	(271)

第一章 绪 论

第一节 育种从经验走向科学

培育品种作为生产行为远远早于遗传学和育种学形成的年代,考古学已在多处早期文明发祥地发现动植物养殖与培育的证据。养殖鱼类也有许多利用经验而非科学方法培育出优良品种的例子;如我国宋代开始的金鱼的培育,日本培育出的锦鲤,我国浙江省渔民培育的彩鲤,江西省培育的“江西三红”即荷包红鲤、兴国红鲤和玻璃红鲤等都是利用经验,在自然突变体的基础上经过选育、扩繁等方法得到的,这些人工培育的品种是以经验和技巧为手段,无意识地利用了遗传学和育种学的知识,获得了可供人类生产生活利用的生物品种。

人类利用科学概念和技术手段开展较大规模的育种实践始于 17—18 世纪的欧洲植物杂种竞赛实验,当时到世界各地的殖民者带回大量异地植物和花卉的种子,他们通过种植各种名优植物和花卉来展示自己富有的同时,客观上促进了植物杂交实验研究,也提高了人们对遗传现象的认识水平。欧洲植物学会也开始举办每年一度的杂交实验竞赛,遗传学奠基人孟德尔也参与了这样的竞赛,并最终发现了现代遗传学理论。

尽管现代遗传学理论在 20 世纪 20—30 年代已非常完善,但在育种研究中仅仅作理论指导,无法用于育种的实际操作,而指导育种实际操作的还仅限于统计遗传学。这时的遗传学理论远离育种工作的原因至少有如下 3 个:①多数育种研究要获得的性状是数量性状,这种性状在传代过程中表现的是非孟德尔遗传现象;②没有确切的工具代表孟德尔遗传因子即基因,所以没有办法在育种的实际操作中运用遗传学知识;③培育品种要建立一个群体而不是一个个体,仅仅知道什么基因控制性状还不能直接用于育种当中,这也是在基因工程育种研究中仍然十分重视基因工程育种技术与传统育种技术的结合,以形成既有目的基因又具有综合性状优势的(有群体的)品种的原因。

育种工作在有了现代统计学作为工具以后,也有了孟德尔遗传学作为宏观的指导理论,也有世界各国政府对大量生产粮食、肉类的需求而大力支持,这些多方力量最终促成了育种学这一应用科学的形成,这个时间点是在 20 世纪 20—30 年代,第一部系统育种专著在 1927 年出版,书名为《作物育种》。我国最早的育种学专著有 1936 年出版的王绶^[1]所著的《中国作物育种学》、1948 年出版的沈学年^[2]所著的《作物育种学泛论》。国际上最早的鱼类育种专著没有足够的信息资源去获得,能查到的国内最早的两本专著都是在 1988 年出版的,一是李骏珉^[3]编写的《鱼

类遗传与育种学》;二是张兴忠等^[4]编写的《鱼类遗传与育种》。目前使用较多的有1998年楼允东^[5]主编的《鱼类育种学》、1999年出版的由沈俊宝等^[6]编著的《鲤鱼育种研究》和2005年范兆廷^[7]主编的《水产动物育种学》。

虽然鱼类育种研究中多采用传统的生物统计方法作为分析手段,但现代的遗传学理论还是不断地渗入到育种过程中,如在开展生长、体质量、体长等性状选择时,有时会利用体色、鳞被等明显特征作为选择的辅助手段,例如要将与红色鲤鱼具有的耐肥水能力强的性状转到青灰色鲤鱼中,则在第二代中选择青灰色且耐肥水的子代,再向下选择时多利用自交红色出现的几率来验证选择的纯度,如果杂色过多则表示选择的纯度不够而需要继续选下去。有鳞与无鳞也可以作为一个明显的遗传标记来利用,这些明显的遗传标记可以通过遗传学理论来分析,使育种研究可以置于现代遗传理论的指导之下。准确运用现代遗传理论于育种工作之中的设想比较早,大约在摩尔根基因论建立不久,Sax等^[8]在1923年就鉴定到种质性状相关的标记并提出利用标记进行选择育种的可能性,而Neimann-Sorensen等^[9]和Thoday等^[10-15]在20世纪60年代提出了基于标记选择的育种技术设想,这时可利用的标记主要是同工酶和其他蛋白质标记,标记数量少且多态性又低,从而没有产生明显的育种效果,因此标记辅助育种也没有受到育种学家的足够重视。真正将现代遗传学理论转化成育种技术手段(选择操作或遗传操作)开展育种研究是基因工程育种技术的出现,科学家可以利用克隆到的基因直接导入受体生物并开展育种研究,基因在传代过程中的规律是符合孟德尔遗传的,这是20世纪80年代发生的育种学的重大技术革命。而科学家们早期设想的基于标记的育种研究由于DNA分子标记的出现才有了实现的可行性,这就是目前所讲的分子标记辅助育种技术。可以说基因与DNA标记都是遗传物质本身,他们的结构和多态性不受环境影响,与发育的时空也无关系,尤其是共显性标记也不受显隐性影响,可以完全按孟德尔遗传理论来分析,将根据基因和标记分析种质(基础群体、亲本及子代)所得结果用于指导育种过程,从而使育种学发展到分子育种时代并进一步发展到基因组育种时代。

第二节 传统育种技术的贡献与技术发展

分子育种技术出现之前的常规育种尤其是近几十年的育种研究为人类带来了极大的物质利益,如墨西哥的杂交小麦、美国的杂交玉米都给当地的生产者带来了极大的经济利益,而我国的杂交水稻为我国和全世界解决粮食问题也作出了巨大贡献,可以说近几十年粮食危机的缓解最大的贡献者就是传统育种技术。

育种基本上有两大方面的技术:一是选择操作;二是遗传操作。前者是通过选择优秀个体或家系使目标生物群体达到经济性状优于原有群体的目的,选择操作技术的对象既包括自然群体,也经常利用经过遗传改造过的群体。而遗传操作多是在对现有目标群体的经济性状不满意而采取的遗传操作以动摇、改变选育对象

的遗传基础,杂交、染色体操作、放射突变、转基因等都是改变目标生物的遗传组成的技术,以此来获得有优异表现的个体,而选育则是将遗传性状优良的目标个体建成品种的过程。育种研究成为一门科学之后,有记载的技术进步基本上都表现在选择操作和遗传操作这两个方向上。由于细胞工程和基因工程技术的出现使遗传操作显得更为重要,这些技术在作物育种研究中都有非常大的突破和非常好的应用结果,有兴趣的读者可以阅读作物育种方面的专门著作,这里主要介绍有关养殖鱼类品种培育涉及到的遗传操作和选择操作这两方面的技术进展。

鱼类育种中应用的遗传操作技术比较多,如杂交技术、放射诱变技术、细胞工程技术、基因工程技术,其中最为成功的是杂交育种技术,虽然基因工程育种技术可以获得性状非常优良的个体但在产业中应用还有待时日。目前鱼类养殖中正在发挥作用的来自遗传操作技术的品种多是杂交育种的产品,我国和东欧地区在杂交优势利用和杂交品种的选择等方面取得了一批成果,如前苏联选育出的罗普莎鲤,我国 20 世纪 80 年代培育的建鲤,近年的杂交鲈等都是杂交育种的结果。

在鱼类育种过程中应用的选择操作技术主要有家系选育和群体选育。使用的选择手段多是观察外观和测量可数可量性状。记录个体主要是采用物理标记,标记技术的发展过程大致是物理标记的发展(有色塑料管、电子标记、颜料组合标记、有符号的塑料膜标记等)到生物标记(同工酶、染色体、DNA 分子标记等)。伴随着物理标记的发展和现代统计方法的利用使鱼类育种技术有了非常大的进步,前些年世界银行向发展中国家大力推广的鱼类育种技术就是基于物理标记的家系及综合性状选育技术,即利用电子标记和 BLUP(Best linear unbiased prediction,即最佳线性无偏估计)算法来估计育种值。在我国,利用这项技术开展水产新品种的培育研究正在由国家水产推广总站和中国水产科学研究院黄海水产研究所孔杰研究员所在课题组执行之中,所涉及的研究单位都会在育种研究中得到很好的育种结果。在鱼类育种研究中选择操作的技术发展过程是:早期仅测定表型和观察外观的选择技术,后来表型选择技术之外增加了同工酶分析技术,但同工酶的分析技术很少与个体选择建立直接联系;虽然物理标记运用很早,但在有了电子标记之后尤其是大西洋鲑的标记家系的综合性状选育的成功大大促进了选择育种的技术进步,近年来又发展了 DNA 分子标记的选择技术,这项选择技术刚刚开始。虽然一些学者认为 DNA 标记辅助育种是辅助作用不能算是一个新兴的育种技术,但作者的认识与这些观点恰恰相反,我们认为,作为育种研究两大技术之一的选择操作技术,只要是明显的技术进步都可以作为新育种技术来看待、来发展,而不考虑这种技术是辅助地位还是核心地位。

育种是以获得市场接受的养殖对象为目标,在育种研究中对上述两种主要育种技术及更多的细节技术(如遗传操作中的侧交、回交、反交等;细胞工程的核移植,倍性育种的同源多倍体、异源多倍体等;选择操作的表型标记选择、物理标记选择、生化标记和 DNA 分子标记选择等)都是混合使用而没有严格的使用界限。如通过杂交选育出的建鲤,在育种过程中运用了杂交、侧交、回交、雌核发育、系统选育等育种技术,其育种程序非常复杂,育种结果却非常优秀,是至今生产苗种最多、

覆盖面最广的国内鱼类育成品种。只经选择操作而无遗传操作的天然品种在我国也有很多,如我国长江流域的长江蟹和辽河流域的辽河蟹都是中华绒螯蟹的地理种群,在国家原良种场的系统选择中也获得了比较好的天然种群,有些可以作为品种来利用。除了中华绒螯蟹,荷包红鲤、玻璃红鲤、兴国红鲤、乌鳢等也都是只经过选择育成的品种。但没有只经过遗传操作而不经选择的品种,即使是杂交优势利用,其亲本也大多是经选择获得优良的个体或群体。我国育种学家历来比较重视遗传操作,把育种技术进步的侧重点主要放在遗传操作的进步上,这显然与我国人民宗教色彩不浓而敢于创造新物种的文化基础有关,也与我国对杂交品种没有限制地广泛使用的政策有关;而欧美国家则更重视选择操作的技术进步,这也当然与相信物种是上帝创造而反对人为创造新物种的文化传统有关,也与欧美对杂种商品化限制较为严格有一定关系,到最近一些年可能与野生动物保护的理念也有相当大的关系。从养殖品种对野生同种或相近种的遗传干扰的角度看,杂交种或杂交后选育品种的遗传干扰是比较大的。下面介绍鱼类遗传操作的主要技术及其特征。

一、杂交育种技术

杂交多指种间以上的交配,虽然种内不同种群间的交配也经常用杂交这个词来描述。在我国水产业中,目前使用的品种基本上是传统育种技术获得的。在遗传操作上以动摇靶动物遗传组成为目标的技术当中,最经济的手段是杂交。这种以利用雌雄遗传物质天然重组的技术包括了种内不同品种或不同地理种的杂交、种间杂交、属间杂交和科目间杂交。杂交的技术方法简单,只是将雄鱼的精子通过人工方法对雌鱼的卵子进行干法受精,即可得到杂交子代。由于鱼类产卵量大,后代多,获得有效杂交结果的可能性远远大于畜禽等高等动物,这也是养殖鱼类科间杂交也有成功例子的原因之一。鱼类杂交在前苏联地区开展得比较早,大约在20世纪20年代就开展了鲤鱼的种内杂交研究。我国杂交优势利用和杂交品种培育大多工作开始于1970年,较国外晚了几十年,主要是因为1970年以前我国的科技队伍不稳定造成的。在1970—1980年之间我国开展鱼类杂交育种的种类非常多,包括种内杂交和种间以上的杂交。据沈俊宝等的统计,此期间在我国至少有112个以上的种间杂交组合,比较多的是鲤鲫杂交。遗憾的是,多数杂交工作只停留在杂交上,得到的杂交种没能继续利用,长期坚持下来的代表成果是湖南师范大学培育的湘云鲫、湘云鲤系列并已申请国家级良种,这项研究还在继续培育远缘杂交的杂交种和育成品种。其他远缘杂交多数的结果没有后续报道,也没有申请国家良种,但鱼类的远缘杂交工作在我国一直没有停止,如罗非鱼与鳊鱼的杂交,团头鲂与翘嘴红鲌杂交等研究经常有报道。日本在鲑科鱼类的种间杂交研究持续相当长的时间,早期研究从子代的表型和子代可育等方面做了大量的工作,近年来,利用荧光原位杂交技术对可育和不可育的远缘组合做了非常详细的研究,探讨可育与不可育的细胞机制和分子机制,初步研究结果表明:杂交子代存活的个体表现出其染色体数与父母本单倍体数之和一致,而不能存活的杂交子代的染色体数与父母

本单倍体数之和不一致。种内杂交在国内多在鲤鱼的不同品系间进行,目前有颖鲤等6个杂交种得到国家原良种审定委员会的认定。作为一个物种,鲤的不同地理种群或不同品系间杂交能得到优势是前苏联的科学家长期研究的结果,后来我国、日本、以色列等国在鲤的种内杂交都取得非常好的选育品种。作者近年来利用分子标记对鲤种内的杂交做了很多分析,推测鲤种内杂交可以得到很多优势组合是与其为四倍体未完全二倍化的基因组特征相联系的,这与其天然地理群多、适应性强、人工选择品种多的原因相似,都与其遗传基础丰富、基因组传递过程中变异较大有关。另一个人工选育品种多、养殖区域广的物种——未完全二倍化的四倍体鲢科鱼类情况也是如此。远缘杂交同样具有利与弊,种间以上杂交是改变目标生物遗传基础的有效方法,这是有利的一面,可以帮助育种学家得到自然物种没有的特殊经济性状,这是远缘杂交最大的优点,至今也鲜有替代技术。还有这种方法操作简单,更容易为一般良种场所掌握,鱼类或其他水生动物由于处于较低的进化层级,较禽畜更容易得到可育的杂种后代;但缺点也十分明显,这些可育的后代很容易进入天然水域而破坏水体中原有物种或相近种的遗传组成或带来生物(入侵)灾害,如孟加拉引进我国鲢、鳙物种后,进行了许多鲢、鳙杂交,可育杂种进入天然水域后,对放养鳙鱼品质有很大的损害。远缘杂交也是研究种属屏障的好材料,尤其鱼类远缘种杂交有相当高的成活率和可育子代,使之更加成为这一基础研究的好材料。沈俊宝在总结远缘杂交获得可育子代的工作时认为,得到可育子代的机会与分类学中的亲缘关系无明显的相关性。日本最近的研究提示,可育性与子代获得双亲完整染色体数目有关,分子标记和原位杂交技术为探索远缘杂交机制提供了好的手段。远缘杂交也被利用生产全雄鱼如罗非鱼(尼罗罗非鱼与奥利亚罗非鱼杂交可获得近100%的雄鱼子代)和不育鱼(哲罗鱼与细鳞鱼杂交得到子代不育,鲤鲫杂交子代仅极少数可育,绝大多数不育)。作者认为:远缘杂交作为实验研究确实可以获得很好的实验材料,但可育子代的商业化生产还应多持谨慎态度。

杂交是通过不同种(属、科等)间的染色体重新组合来改变靶生物的遗传组成,达到获得新性状的目的,但对现代遗传学理论的利用是模糊的。

二、多倍体育种技术

楼允东对鱼类的多倍化操作写过一个非常详细的综述,介绍了通过染色体操作可以直接获得三到六倍体的所有途径。鱼类获得多倍体的基本技术见表1-1。

表1-1 多倍体和雌雄核可能发育的操作步骤

精子类型	卵子类型	处理时间	结果
正常精子	同源正常卵子	抑制第二极体排出	同源三倍体
正常精子	同源正常卵子	抑制第一次卵裂	同源四倍体
正常精子	灭活卵子	抑制第一次卵裂	雄核发育二倍体
灭活精子	正常卵子	抑制第二极体排出	减数分裂雌核二倍体
灭活精子	正常卵子	抑制第一次卵裂	有丝分裂雌核二倍体

续表

精子类型	卵子类型	处理时间	结果
正常精子	异源正常卵子	抑制第二极体排出	异源三倍体
正常精子	异源正常卵子	抑制第一次卵裂	异源四倍体

注:①楼允东先生还介绍了六倍体、八倍体的制备步骤,由于难于实现,本表没有包含这些内容;②这里的异源卵子指的是与精子是种间差别以上的;③受精卵的处理方式本表没有列出,处理方式包括:温度、压力等;④精子和卵子的灭活方法也没有列出,灭活方法比较常见有放射照射法、紫外照射法;⑤受精卵处理时间点和时间长度都没有列出,同时精子和卵子的灭活时间和时间点也没有列出,这些参数建议有兴趣者可查找斑马鱼操作手册,找到相关参数后还要根据所研究的物种而仔细测定实际数据,因为这些参数都应该与物种的不同而不同,也与实验条件的差异而有所不同。

异源多倍体获得杂交优势是至今为止最成功的例子,这方面的研究还在继续。鱼类和其他水生动物确实多倍化操作方面具有优势,其优势就是体外受精体外孵化,同时大量的卵子和精子也是开展多倍体研究的有利条件。多倍体能产生新的优良性状至今还没有遗传学的证据,也没有合理的解释。利用三倍体不育节省下来的能量损失是最为育种学家重视的结果,虹鳟三倍体在2龄以后较二倍体具有生长优势而且背高明显,但多数物种的三倍体没有明显优点,如成功获得三倍体鲤近20年之后仍没有在生产中加以利用。三倍体是明显的染色体组成不平衡,这种不平衡状态如能产生优良的经济性状,也应该经个案分析才能确定,即可能有的物种在遗传基础不平衡时产生了生产上可以利用的性状,不能设想三倍体生物都能有优良性状,而多数物种的三倍体没有优良性状确是普遍现象。异源多倍体利用杂种优势可以创造新的基因组合并得到新性状,也可以利用三倍体不育的特点,除了湘云鲤系列之外目前其他成功报道不多,至少在国内达到申请品种的研究结果不多。据研究人员介绍,海洋多倍体研究计划中确有一些异源多倍体的研究方案,研究报道也比较多,但在国内用于产业的海水养殖三倍体还几乎没有。

多倍体育种是以前目标生物获得不同于常规方法的异型遗传物质为获得新性状的手段,同源多倍体得到优异性状的报道几乎没有,而异源多倍体和异源细胞工程得到优异性状已有报道,如我国湖南师范大学的刘筠教授等获得的鲤鲫异源多倍体具有较好的经济性状,也推广到了产业当中。多倍体品种在遗传上是否具有优良性状到目前为止得到的证据并不足以得出结论性意见,而公认的是三倍体由于不育而具有节省性腺发育所失能量的优点而在特定养殖对象上具有优越性,如日本由于吃生鱼片和加工烤鱼等需要个体较大的虹鳟而将虹鳟养殖到3龄,这时三倍体虹鳟在3龄时生长速度快的优点就显露出来了。而法国人喜食1龄小个体鱼,三倍体虹鳟在法国基本上没有人养殖。我国大多数养殖鱼类在1~2龄上市,如果在2龄之前没有显示出性别上的生长差异或者倍性上有生长差异优势的,基本上其商业利用价值就不会很大。除了利用生长特性外,利用性腺也是单性养殖的目标之一,如鲟鱼卵和河鲀的精巢都具有超高价值,也是单性养殖的目标之一。

三、雌核发育育种技术

鱼类雌核发育技术是前苏联科学家在20世纪40年代首先用于鱼类遗传研究

和单性(全雌化)生殖研究,而且在研究工作获得了相当的成就,如雌性银鲫与鲤等其他物种交配得到全雌的银鲫子代。但不知什么原因又过了几十年欧美其他国家才开始逐渐在研究或在生产中运用这项技术,我国也是在20世纪80年代才开始使用这项技术于育种的操作过程当中。这项技术主要应用在三个方面。

(1)在通过杂交再选育成品种的选育过程之中,如张建森等^[16]在建鲤的选育过程中运用了雌核发育技术、沈俊宝等^[17]在人松浦鲤的选育过程中也运用了雌核发育技术。20年前利用雌核发育技术虽然还没有分子标记来检测和鉴定每个个体是否是纯合,但运用了遗传育种研究中的精巧实验来选出雌核发育子代,如利用灭活的鲫鱼精子对研究对象的鲤鱼卵受精,如果子代是鲤鲫杂交的中间表现型则子代不是雌核发育发生的,如果子代是鲤鱼的表现型则子代就是雌核发育子代。

(2)通过雌核发育技术建立纯系,可以通过分子标记检测,发现抑制有丝分裂的雌核发育就是抑制第一次卵裂获得的雌核发育子代技术。但子代个体中有纯合子也有杂合子,纯合子是来自卵子发生过程中的四分体中的一个,其在第二极体排出之后自身加倍而形成纯合子;而杂合子是来自卵子中四分体的两个结合在一起,其中一个就是第二极体没有排出;另一个就是受精后人们认为留下的那个可以发育成纯合子的四分体。如果实验者观察得仔细,在实验中能注意到一些受精卵有延迟发育的现象,虽然这种延迟发育的几率很低,但考虑到抑制卵裂获得的成活个体的几率也非常低,这就使有些抑制有丝分裂的雌核发育得到的子代中有很大比例是杂合子。克服的办法一是实验者细心观察可以确定那些延迟发育的个体,另一种办法就是利用共显性标记如微卫星标记检测,在远着丝点的标记如果杂合比例高基本上都是第二极体没有排出的杂合型子代;另一种雌核发育技术是抑制第二极体排出得到的,过去认为基本上纯合的子代但经过分子标记检测,这种技术获得的子代基本上是杂合子,至少在鲤鱼和牙鲆中是这样的,因此这种技术获得的子代是不适合建立纯合子的,子代的二倍体染色体组成原则上是一个加倍而成,但由于在第一次减数分裂时同源染色体在DNA复制过程中发生重组使大部分离着丝点远端染色体区段发生重组,表现出等位基因与母本完全一致——尤其是杂合位点更是与亲本的基因型完全相同。理论上是如此,许多抑制第二极体的雌核发育结果也基本与理论预测相同。中国水产科学研究院的刘海金等^[18-21]制备了大量牙鲆的雌核家系,基因型分析结果与理论预测完全相同,即重组率为1的杂合位点,所有子代与母本完全相同都是杂合子,而纯合子出现的几率也基本上随重组率的降低而增大,可以推测如果表型性状的控制位点在远离着丝点的位置,子代多为杂合基因型,这就与其母本完全一致,从而其性状与母本也基本相同,刘海金等在抑制牙鲆第二极体的研究中获得了大批表型与母本完全一致的子代,建立了所谓的“克隆系”并已用于生产之中。可以预见,通过抑制第二次卵裂获得与母本性状完全相同的子代,如果母本非常优秀则得到非常优秀的子代的可能性就非常高,这也是快速建立优良品系的有效途径之一。但由于这种雌核发育个体在近着丝点基本上纯合,也具有基因座纯合带来的不利因素,如由于纯合引起的抗病力低、死亡率高、经济性状下降等。

(3)通过雌核发育获得全雌子代而用来进行单性养殖,这对一些鱼类如鲟鱼、半滑舌鳎等是非常有意义的。全雌子代的生产还有许多方法上的技巧,20多年前科学家发现与生长激素基因连锁的性状标记可以用来鉴别具有雌鱼遗传基础的假雄性虹鳟,再用这种假雄性虹鳟的精子给虹鳟卵子受精就能生产出100%的全雌虹鳟。近年来运用不同温度处理可以得到理想的全雌后代,如刘海金等运用牙鲆性别分化与温度关系比较显著的特点,生产出全雌牙鲆、全雄牙鲆等,其全雌牙鲆率已接近100%。陈松林等^[22]利用鉴定到的与半滑舌鳎性别相关的标记生产雌雄比例高达70%的半滑舌鳎鱼苗,已达到生产水平。

四、雄核发育育种技术

雄核发育育种技术指仅仅由精子或精子的遗传物质获得子代的遗传操作技术。雄核发育最大的优势是所得子代纯度非常高,主要是由于精子发生过程与卵子发生过程的环境条件和遗传机制的差别决定的,如卵子在受精前还是四分体中至少两个在一起,即卵子本身的一套染色体与第二极体所具有的一套染色体都还在卵子之中,这决定雌核发育中或有含第二极体的子代个体而产生杂合子;而精子在发生过程中四分体都是分开的,由此,精子这个独立的单倍体遗传材料借助无核卵子并自身加倍形成二倍体时纯合度高是非常自然的。由于雄核发育子代的纯合度极高,是建立纯系的极好方法。其他开展全雄的单性鱼生产也是雄核发育技术成为产业中有价值的应用技术之一。但雄核发育技术难度很大,至目前为止,得到雄核发育的二倍体纯系和全雄鱼生产的例子还不多。雄核发育的操作技术比较复杂,有兴趣的读者可参考楼允东的《鱼类育种学》或其他参考文献。下面简介一下获得人工雄核发育子代的几种技术途径。

(一)人工诱发雄核发育

(1)静水压休克法。将实验卵子用放射线或紫外线照射致死,然后用目标精子受精,在第一次卵裂前用静水压力计处理卵子3~4 min,由于卵子的发育时间各不相同,发育时间也与温度有关,实际操作中最好是用解剖显微镜观察卵子的发育确定最佳的卵裂前的时间。多用异源卵子和精子,这样可以易于分辨雄核发育子代和杂交子代。

(2)热(冷)休克法。将实验卵子用放射线或紫外线照射致死,然后用目标精子受精,在第一次卵裂前在热水42.5℃或在冷水0℃中处理3~4 min,不同物种所需的水温不尽相同,可以参考文献或通过实验确定。其他处理原则与上述相同。

(3)雄核移植法。刘汉勤等^[23]利用核移植技术获得了雄核发育仔鱼。最近洪云汉等^[24]报道了从青鳉精子获得单倍体细胞系,并从其出发将核移到卵子经二倍化发育获得来自精子的纯合鱼。

(二)自发雄核发育

(1)四倍体个体的精子与二倍体卵结合可能会出现一些雄核发育个体。如日本北海道大学函馆水产学院的荒井克俊教授曾用此方法得到的二倍体雄核发育泥

鳅,我国的陈敏荣等获得的雄核发育鲫鱼。

(2) 精子给远缘失活的卵子受精可以获得雄核发育子代。

(3) 远缘杂交子代可能出现一定比例的雄核发育子代,但是比例相当低,如湖南水产研究所用草鱼精子与红鲤卵受精,10 万粒卵子得到 1 尾雄核发育的草鱼。

直至今日,多倍体、雌核发育和雄核发育等作为育种技术是从对染色体操作:整套染色体加倍、单套染色体加倍等手段来获得新的性状及控制性状的遗传变异,但是染色体操作技术还不是直接来自以性状的遗传基础是基因这一孟德尔遗传学的基本原理,染色体操作技术与杂交技术的理论一样还是很模糊、远距离地利用现代遗传学思想。

五、核移植育种技术

核移植是实验生物学家进行异体移植观察组织发育情况和组织相容等现象时获得的扩展技术。核移植主要是将供体的核取出来再放到(假)受精生物的去核卵中,正常发育以达到异源核质融合的目的。这项技术发明初期的一段时间被作为可以打破种属障碍的技术而获得高度重视,后来发现此技术没有打破种属障碍的生物学例证,少数获得的核质杂交的物种与天然种属可能杂交的组合也基本一致,如鲤鲫移核鱼、泥鳅种(属)间等可以获得移核鱼的组合,常规人工授精技术也可以获得这些组合的杂种。同时移核鱼中,仅仅是核质的杂交,核内遗传物质并没有杂交。鱼类核移植技术在我国开展得较多,也为我国后续的基因工程育种培养了大量技术人才,但核移植作为育种技术目前使用的并不多。

核移植是通过细胞核与细胞质的杂交来获得新的性状,其遗传的改变是获得新的细胞质并希望新的细胞质能带来新的优良性状。作者认为,核移植技术与杂交技术的理论一样还是很模糊、远距离地利用现代遗传学思想。

六、诱变育种技术

诱变育种分为辐射诱变育种和化学诱变育种,可以使目标动物的遗传组成发生较大变化,是获得新性状的有效手段。在鱼类的研究中近年来在斑马鱼有成功的例子,斑马鱼通过辐射诱变和化学诱变都获得了很多有益性状,有兴趣者可查阅斑马鱼的实验手册。虽然在养殖鱼类历史上,诱变育种研究有进展,但育成品种未见报道。诱变育种的难度在于子代的分析与处理上,经诱变发生的突变多数为隐性突变,即发生突变的性状在当代没有表现。而诱变产生的个体数量极多,要获得有显性性状的个体要将子二代饲养成熟再经全同胞交配才能获得有突变的纯合子,工作量巨大,难以完成。必须指出,在 DNA 分子标记出现和高密度连锁图谱没有建立之前,要在子一代中筛选有益突变是很难的。但是有了这些工具后,尤其在有了较精细的 QTL 图谱作为工具时,筛选有益的突变是可行的。从诱变育种技术中获得性状优异的新品种应该是未来养殖鱼类育种的一个有效方向甚至可能成为鱼类育种的新亮点。德国和美国科学家利用化学突变技术分别建立了成千上万个