

罗非鱼育种研究进展

肖俊^{1,2}, 甘西¹, 罗永巨¹

(1. 广西壮族自治区水产研究所 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西 南宁 530021;
2. 广西大学动物繁殖研究所 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西 南宁 530004)

摘要: 罗非鱼是世界性的养殖鱼类, 同时也是我国水产业重要养殖品种. 我国罗非鱼产业发展迅速, 罗非鱼养殖产量、产值和出口额均居世界第一位. 但由于引种时间较长, 我国罗非鱼繁殖也较普遍的存在种质退化的问题. 针对罗非鱼育种研究, 从选择育种、杂交育种、细胞工程育种及分子辅助育种几个方面对其育种的基本原理和应用技术进行了系统的阐述, 希望较全面的反应国内外罗非鱼育种研究的进展和动态, 并对今后科研工作者开展罗非鱼良种繁育工作提供参考.

关键词: 罗非鱼; 品种; 育种

中图分类号: S917.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9102(2013)04-0106-07

The progress of tilapia breeding

XIAO Jun^{1,2}, GAN Xi¹, LUO Yong - ju¹

(1. Guangxi Fisheries Research Institute, Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture, Nanning 530021, China;
2. Guangxi University, State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro - bioresources, Nanning 530004, China)

Abstract: Tilapia, as an important cultured species of China, is an extensively cultured aquaculture species in worldwide. The tilapia industry grows fast in our country, which production, output value and export volume are ranking first in the world. Because of long time to introduction it to China, genetic degradation problems become common in tilapia industry. Tilapia breeding was summarized from several aspects that hope to respond the progress of tilapia breeding. With the development to tilapia industry, it provides reference to the researcher.

Key words: tilapia; variety; breeding

罗非鱼原产非洲大陆, 隶属硬骨鱼纲、鲈形目、鲷鱼科、罗非鱼属, 该属现有约 600 多个种. 因其具有生长快、食性杂、肉质细腻、无肌间刺等一系列优点, 自 1956 年我国首次从越南引进莫桑比克罗非鱼后, 先后历经不同研究单位多次引种和遗传改良, 目前罗非鱼发展成为我国水产养殖业养殖的优势品种. 我国是世界罗非鱼养殖大国, 其养殖产量、产值和出口额均居世界第一位, 接近全球总量的一半. 同时, 罗非鱼适宜产业化生产, 因此在水产品国际贸易中占有重要地位, 国际需求和贸易量逐年上升. 中国是罗非鱼出口大国, 2010 年我国罗非鱼出口量首次排在水产品出口第一位, 如今出口量和年

均增长速度均居我国水产品出口第一. 罗非鱼产业上下游产业链完备, 为社会提供了大量就业岗位, 每年可为社会提供罗非鱼产业有关的就业岗位约 300 万个左右. 总而言之, 罗非鱼产业对我国水产业以及新型农业的发展都起到了较大的推动作用.

“一粒种子可以改变一个世界, 一个品种可以造福一个民族”. 品种是养殖生产的物质基础. 在我国罗非鱼产业的发展过程中, 时刻可以看到罗非鱼育种工作对整个罗非鱼产业的推动作用, 并已取得大量的科研成果. 但是, 由于罗非鱼属种间杂交容易, 加之引种时间过长, 导致现有的罗非鱼商品苗出现种质退化等一些问题. 因此, 本文系统地

收稿日期: 2013-05-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31260637); 中国博士后科学基金资助项目(20110490867); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-49); 广西壮族自治区科技攻关与新产品试制项目(1123006-1); 广西壮族自治区直属公益性科研院所基本科研业务费专项基金资助项目(2060302 CXIF-2011-04)

通信作者: 罗永巨(1967-), 男, 广西博白人, 博士生, 研究员, 主要从事水生经济动物繁育研究. E-mail: lfylzc123@163.com

阐述罗非鱼育种的基本原理和应用技术,力图反应国内外罗非鱼育种技术的进展和动向,希望对科研工作者有所启迪并对我国罗非鱼产业的发展起到一定推动作用。

1 选择育种

选择育种(selective breeding)又称系统育种,它是对一个原始材料或品种群体实行有目的、有计划地反复选择淘汰,而分离出几个有差异的系统.将这样的系统与原始材料或品种比较,筛选出一些经济性状显著优良而又稳定的新品种.于是形成新的品种^[1].选择育种是在动物育种中采用最为广泛,也最为行之有效的育种手段,即使在杂交代种或新技术育种时,对它们的亲本或者后代同样要进行选择育种,以达到主要经济性状的提高和稳定的目的。

选择育种也是罗非鱼育种中最主要、最有效的育种手段.目前,养殖最为广泛的罗非鱼品种—吉富(GIFT)品系尼罗罗非鱼就是世界渔业中心(The World Fish Centre)与挪威、菲律宾等国家的水产研究机构合作,收集了亚洲和非洲8个国家和地区的尼罗罗非鱼种质资源的基础上,将其混合作为基础群进行群内杂交,杂交后代经过连续6个世代的选育,形成了吉富品系尼罗罗非鱼,其生长速度较基础群提高了85%^[2].目前,吉富品系尼罗罗非鱼已推广到以亚太地区为主的十多个国家,在其被引入我国后,就因其生长快速的特点,深受养殖户的欢迎,成为我国罗非鱼养殖数量最多和养殖面积最大的品种.同时,吉富品系尼罗罗非鱼引入国内后,国内的各个研究机构在其基础上,也一直在继续进行选择育种工作.上海海洋大学在将吉富罗非鱼引进我国后,就在其基础上进行连续9代选育,获得了生长速度逐代提高,尾鳍条纹逐代趋整齐的新品种,该品种经过全国水产原种和良种审定委员会确定为新品种—新吉富^[2-6],现已在全国范围内推广养殖,取得了较好的经济效益。

家系选择(family selection)又叫家系育种,是根据某个性状或某几个性状明显优于其亲属、生产性能显著高于其亲属的混有不同类型的原始群中选出一些优良个体留种,建立几个或若干个家系并繁殖后代,逐代与原始群体及对照品种相比较,选留那些符合原定选择指标的优良家系,进而参加品系产量测定^[1].但是,家系选育过程需多代近交,可能出现因近亲繁殖而带来的近交衰退的现象,因此必须要构建足够多的家系,才能有效避免.鱼类后代数量巨大,并且个体间标记不易,因此进行家系选育对选育场地和投入资金要求较高,选育成本巨大.在家系选育中结合其他育种方法进行选育也许是一个较好的思路.目前,广西水产研究所广西罗非鱼遗传育种中心研发团队从中国水产科学研究院淡水渔业研究中心引进4个世界渔业中心的家系作为基础群开展选育,希望采用综合选择

(combined selection)的方法对其进行选育.具体选育路线为:首先,通过家系选择,构建若干个性状优良的罗非鱼家系;然后,在2~3个较好的家系中进行混合选择,根据后代来检验亲鱼.这样不但能提高选育效率、避免近交衰退,同时生产出的商品苗又不会存在种质资源流失的担忧.目前,这项育种工作正在按计划进行中,已完成了尼罗罗非鱼生长相关分析及生长模型构建,运用Pearson相关分析对尼罗罗非鱼可量性状进行分析,并采用Logistic, Gompertz, Bertallanffy3种非线性模型对尼罗罗非鱼生长相关参数进行生长模型构建^[7].

2 杂交育种

杂交在本质上是一种利用雌雄遗传物质天然重组的技术,杂交育种一直是我国水产养殖业中的传统育种技术,已培育出许多具有杂交优势的优良品种^[8].杂交不仅在生产应用上前景广阔,而且在进化生物学等基础生物学研究上,有着重要的地位.目前越来越多的进化生物学和分子生物学研究表明:物种杂交是增加遗传变异的重要途径^[9].进化历程中不断发生的杂交事件,可在不同群体中引入不同的遗传物质导致其群体间遗传多样性高.这些遗传物质的增加又为物种在分子水平的演化提供了物质基础,进而不断产生新的适应机制.因此,杂交和杂交后的一系列事件在物种进化过程中起着非常重要的作用^[10-11].

真骨鱼类是脊椎动物中种类最丰富的一个类群,确认的物种数目超过了28000个,占现存脊椎动物种类数目的一半还要多^[12].真骨鱼类在物种形成和环境适应性上演化得如此成功是一个非常有趣而值得深入研究的问题.很多研究认为由于鱼类特殊的生殖方式(体外受精、水中受精、体外发育)、基因组的可塑性大,使得杂交较易发生,而真骨鱼类更容易相互杂交使得群体遗传多样性增加,最终导致真骨鱼类进化出如此丰富的生物多样性.杂交对鱼类物种起源、群体间遗传多样性产生作出了贡献,很多鱼类被认为在其进化历程中发生过杂交事件^[13-15].随着研究的不断深入,这些鱼类的种类在随着时间的增长不断增加,甚至现在认为在鱼类进化过程中多次发生的多倍化事件^[16],也是由杂交引起的异源多倍化导致^[17-18].但是,这些杂交事件都发生在进化历程中,科学家只能根据不同层次的基因组水平信息来推测.因此,进行人工杂交实验不但是有效的遗传育种手段,有利于获得优良品种提高产量,而且有助于理解杂交对于生物进化的意义,更能有助于在细胞水平和亚细胞水平了解杂种优势形成的遗传学基础。

在鱼类中,2个不同的物种杂交,除了不能存活的单倍体后代外,其后代中通常会有3类情况^[19]:第一,由于鱼类可产生不减半配子^[20](多为第二极体不排出,也可能多精受精等)的潜在能力.杂交会导致杂交子代中出现少量的杂交多倍体

个体。即杂交子代除具有双亲染色体外,还额外具有一套或以上的双亲染色体的异源多倍体。如:鲤鱼与鲮鱼杂交^[21]、草鱼和鲢鱼的杂交^[22-23]、红鲫和团头鲂杂交等^[24];第二,杂交会导致产生天然雌核发育或天然雄核发育。如:草鱼(♀)×鲤(♂)^[25]、鲫(♀)×鲢(♂)^[26]、兴国红鲤(♀)×草鱼(♂)^[27]、红鲤(♀)×草鱼(♂)^[28]和异育银鲫(♀)×兴国红鲤(♂)^[29]均可导致天然雄核发育;第三,雌雄原核融合产生真正意义的二倍体杂种后代。

在罗非鱼杂交育种上,最成功的品种是奥尼杂交罗非鱼。尼罗罗非鱼(♀)×奥利亚罗非鱼(♂)生产的奥尼杂交罗非鱼是我国罗非鱼养殖的主要品种,不但表现生长速度快(个体增重比母本高10%~20%、比父本高20%~70%)、抗逆性强的优势,而且最重要的是具有高雄性率的优点。奥尼杂交罗非鱼高雄性率的原理是基于父母本不同的性别决定方式。尼罗罗非鱼的性别决定方式为雌性同配型(即XY型)^[30-31]。而奥利亚罗非鱼的性别决定方式较复杂,Campos-Ramos等^[32]对奥利亚罗非鱼的联会复合体进行分析时发现,雄鱼中没有不配对的双价体,而在雌鱼中有不配对的区域或环状区域存在,其性别决定方式为雄性同配。但是性别决定基因没有分布在一对染色体上,还没有进化出一对真正的性染色体^[33],即SRY基因(sex-determining region Y)位于多条染色体上。但是因为其雄性同配的性别决定方式,通常也简化地认为其性别决定方式为ZW型。因此,在生产上用尼罗罗非鱼(XX,♀)×奥利亚罗非鱼(ZZ,♂)就可生产XZ型高雄性率奥尼杂交罗非鱼。通常认为,奥尼杂交罗非鱼的雄性率高低与亲本纯度相关^[34],一般生产上得到的奥尼杂交罗非鱼雄性率可达80%~90%,如果亲本纯度高,雄性率最高可达95%以上。由于奥尼杂交鱼的这一系列优点,在近年自然灾害频发(2008年、2010年冰冻灾害)、疾病频发(链球菌病)等情况下,越来越受到养殖户的欢迎。

当前杂交育种工作多为随机选取2个近缘物种进行交配,目的性和可预见性不强。今后杂交育种进一步的工作重点将在通过各种研究方法阐明杂种优势产生的生物学机制,达到可控的对不同物种进行有目的杂交,从而获得预期性状的新品种。同时,将杂交育种与多倍体育种等细胞工程育种技术相结合,也将是今后一个重要的研究方向。

3 细胞工程育种

选择育种和杂交育种是目前动植物普遍采用,也是最为有效的育种手段,在罗非鱼育种工作中同样如此。但常规的选择育种及杂交育种也存在一定的局限性,例如纯系构建在鱼类中往往需要进行8~10次兄妹交配,而利用人工雌核发育技术快速构建鱼类纯系有非常明显的效果。该技术一般用于品种、种群的加快选育,任何鱼类经过2次雌核发

育,其纯度就可相当于14个世代全同胞交配的结果,可以当作纯系亲本直接用于育种生产,大大节约了育种时间,因此具有极其广泛的应用前景^[35-39]。如果选用纯度较高的亲本进行雌核发育,甚至一次雌核发育就能作为纯系直接用于进一步的遗传育种生产^[39]。因此,国内外目前对罗非鱼细胞工程育种也开展了大量的工作,主要有雌核发育与雄核发育、多倍体育种、性别控制技术、转基因技术等。

3.1 雌核发育与雄核发育

自Opperman^[40]首次证明鱼类雌核发育可以人工诱导以来,人工雌核发育研究就是鱼类细胞工程遗传育种领域中的一个热点,相关研究十分活跃^[37-38,41-44]。雌核发育技术广泛应用于基因位点纯化^[36,39],只需经过一次抑制第一次卵裂的雌核发育产生的后代就可使基因座位全部纯合,并在遗传上是彼此一致的^[42]。育种工作中,可再将获得的雌核发育系作为母本与遗传背景较远的天然两性群体中雄性作为父本进行杂交,就可获得抗逆性能较强的杂交苗种,可直接进行商品化生产。目前,人工雌核发育草鱼制成的杂交抗病菌种已投入商品生产阶段,生产出的苗种抗病力强,苗种价值较普通草鱼苗种提高了10倍以上,产生了较好的经济效益^[45]。根据天然雌核发育鱼类的细胞学原理,人工诱导二倍体两性繁殖鱼类雌核发育主要要解决2个重要方面的技术:一为精子的遗传失活技术,二为卵子染色体加倍技术,以获得正常生命力的雌核发育后代^[42]。

根据Penman等^[46]和Mair等^[47]对尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼人工雌核发育研究可知,雌核发育尼罗罗非鱼为全雌(XX型),而雌核发育奥利亚罗非鱼中有雌雄两性(ZZ和ZW型)的个体,通过雌核发育的方法很好地阐明了不同罗非鱼的性别决定方式。Mair等^[48]在尼罗罗非鱼中采用紫外灭活的方法使精子染色体失活,采用热休克和静水压方法使卵子染色体加倍,获得了成活率1.9%~24%的雌核发育二倍体;Mair等^[48]在奥利亚罗非鱼中采用紫外灭活的方法使精子染色体失活,采用热休克方法使卵子染色体加倍,获得了成活率0%~3.6%的雌核发育二倍体;Muller等^[49]采用雌核发育技术构建了尼罗罗非鱼纯合克隆系,获得成活率4%的雌核发育后代。

雄核发育技术因卵子灭活后,更容易影响后续发育过程,因此较雌核发育技术难度更高,少有成功报道。Myers等^[50]对尼罗罗非鱼雄核发育进行了研究,获得一定数量存活的二倍体,但是否为雄核发育二倍体仍有疑问。Marengoni等^[51]获得的雄核发育二倍体因父母本染色体数目相同,是否为雄核发育后代也仍有疑问。但雄核发育尼罗罗非鱼后代中会出现XX和YY2种后代,YY后代在全雄罗非鱼生产中具有重大意义。因此,开展罗非鱼雄核发育研究,是获得超雄罗非鱼(YY)的一条很好的思路。

3.2 多倍体育种

多倍体主要指含有3套或3套以上染色体组数目的生物体。在物种进化过程中,丰富多彩的大自然产生了形形色色的天然多倍体。特别是在被子植物中,就有约70%的种类在进化史中曾经发生过一次甚至多次多倍化的过程^[52]。多倍化在植物进化中的作用,已经得到了广泛承认,例如小麦、玉米、甘蔗、咖啡、棉花、烟草等物种中都具有天然多倍体。目前,随着分子生物学的飞速发展,人们对多倍化在整个生物进化中的重要性有了越来越多的认识,多倍化已被认为是整个真核生物基因组演化的重要特征。研究表明,从原生动植物到人类的所有生物的进化历程中都可能发生过多倍化事件^[53]。

Ohno^[54]认为早期的脊椎动物进化过程中经历了2轮多倍体化过程。而在脊椎动物中,则以鱼类中的多倍体现象最为普遍。已有的研究甚至发现,在脊椎动物中最繁盛的类群—真骨鱼类中还发生了第三轮基因组复制,即鱼类特异的基因组复制^[16, 55-57]。世界上现存真骨鱼类约28 000多种,占现存脊椎动物种类数目的一半还要多。这些鱼类的染色体绝大多数都是偶数,许多鱼类的染色体数目之间呈现倍性或接近倍性的分布^[58]。多倍化直接导致基因组的倍增,从而产生了大量的冗余基因,为物种在分子水平的演化提供了遗传的物质基础。所以,多倍化被认为与硬骨鱼种和生物多样性增加有关^[16, 55-57]。

鱼类人工多倍体的制备方法主要有物理学方法、杂交繁育法、化学药物处理几种。国内外学者通过这3种方法在多种鱼类中成功地获得了大量的人工多倍体鱼^[1]。在罗非鱼中,也开展了一系列多倍体诱导的工作。Valenti^[59]在奥利亚罗非鱼中,在受精后15 min分别采用冷休克(11℃)和热休克(38℃)1 h的方法,获得一定数量的多倍体幼鱼。Myers^[60]在尼罗罗非鱼中卵裂前采用静水压和冷休克(492.15 kg/cm², 7.5℃)相结合的方法处理7 min获得四倍体幼鱼,并采用染色体计数法进行检测。Don等^[61]在受精后0~15 min采用冷休克(11℃)60 min的方法,获得三倍体幼鱼,幼鱼采用染色体计数法进行检测。Don等^[62]在受精后3.5 min采用热休克(40.5℃)3.5~4 min的方法,获得三倍体幼鱼,幼鱼采用染色体计数法进行检测。Myers^[60]在莫桑比克罗非鱼中卵裂前采用静水压和冷休克(492.15 kg/cm², 7.5℃)相结合的方法在卵裂前处理7 min获得四倍体幼鱼,并采用染色体计数法进行检测。国内罗非鱼多倍体诱导也开展了一定的工作,容寿柏等^[63]采用热休克的方法,受精后60 min采用39.5±0.5℃处理3 min获得了四倍体罗非鱼。通过温度休克法和静水压法抑制第一次卵裂制备的鱼类四倍体,往往只能达到单性可育的程度,或只是雌性可育,或只是雄性可育,难以通过自身的繁殖形成四倍体群体。目前,这些获得的多倍体罗非鱼都没有应用于大规模苗种生产的

报道。

3.3 性别控制技术

罗非鱼因其生活力强、易繁殖,在养殖池塘中往往造成繁殖过剩、密度过大从而使单个个体较小,达不到商品鱼标准,同时容易造成池塘缺氧,影响池塘总产量。并且,在罗非鱼中,雄鱼生长速度比雌鱼快30%,利用性别控制技术生产全雄罗非鱼苗种进行养殖是一个很有发展前途的育种思路。

我国从上世纪就开始采用类固醇激素诱导罗非鱼性反转,取得较好的效果。目前在罗非鱼中,普遍采用人工合成的17 α -甲基睾酮诱导雄性化,技术已非常成熟,并在生产中广泛采用。虽然甲基睾酮在鱼体内代谢速度较快,但其代谢产物在鱼体内存留时间等研究开展较少,考虑食品安全问题,使用激素进行人工性反转似乎仍有不妥之处。因此,各研究单位都在寻找代替人工投喂激素的性反转方法。杨永铨等^[64]采用三系配套技术,先采用激素诱导获得YY型雄鱼,然后用YY型雄鱼与自然群体中的雌鱼交配,可获得全雄后代。采用三系配套的思路所用外源激素没有直接使用到商品苗上,而是只对亲本使用,更能有效保证食品安全。

目前,罗非鱼性别控制最易掌握且安全性最好的方法是采用种间杂交的方法。尼罗罗非鱼的性别决定方式为雌性同配型(即XY型)^[30-31]。而奥利亚罗非鱼的性别决定方式较复杂,Campos-Ramos^[32]等对奥利亚罗非鱼的联合会复合体进行分析时发现,雄鱼中没有不配对的双价体,而在雌鱼中有不配对的区域或环状区域存在,其性别决定方式为雄性同配。但是性别决定基因没有分布在一对染色体上,还没有进化出一对真正的性染色体^[33],即SRY基因(sex-determining region Y)位于多条染色体上。但是因为其雄性同配的性别决定方式,通常也简化地认为其性别决定方式为ZW型。因此,在生产上用尼罗罗非鱼(XX、♀)×奥利亚罗非鱼(ZZ、♂)就可生产XZ型高雄性率奥尼杂交罗非鱼。通常认为,奥尼杂交罗非鱼的雄性率高低与亲本纯度相关^[34],一般生产上得到的奥尼杂交罗非鱼雄性率可达80%~90%,如果亲本纯度高,雄性率最高可达95%以上。尼罗罗非鱼(♀)×奥利亚罗非鱼(♂)生产的奥尼杂交罗非鱼是我国罗非鱼养殖的主要品种,不但表现生长速度快(个体增重比母本高10%~20%、比父本高20%~70%)、抗逆性强的优势,而且最重要的是具有高雄性率的优点。但到目前为止,无论使用多么纯的家系作为亲本,没有一家机构生产的奥尼杂交罗非鱼商品苗雄性率能达到100%。为什么理论上雄性(XZ型)的奥尼杂交罗非鱼中,总会产生一定数量雌性的产生?对这个问题进行深入研究,很有可能找到罗非鱼性别决定基因,从分子生物学机制上阐明罗非鱼的性别决定机制。

3.4 转基因技术

转基因技术是将人工分离和修饰过的基因导

入到生物体基因组中,由于导入基因的表达,引起生物体的性状的可遗传的修饰,这一技术称之为转基因技术(Transgene technology). 鱼类的转基因技术研究,虽然起步稍晚于哺乳类,但由于鱼类具有产卵量大等一系列作为转基因研究的有利条件,从而研究进展巨大. 转基因鱼是国内外目前最成功的转基因动物之一. 在罗非鱼转基因技术研究上,同样有较多应用例证. 1988年, Brem等^[65]就运用显微注射的方法将人生长激素基因转移到罗非鱼中. 随着转基因研究发展,从安全性和人们心理承受能力角度考虑,现在国内外学者均一致强调构建“全鱼基因”(All fish gene). 因为罗非鱼是热带鱼类,在罗非鱼转基因研究中,转入抗冻相关基因也是一条较有前景的思路. Rahman等就将大鳞大马哈鱼生长激素基因拼接到美洲大锦鲷抗冻启动子上,将其转入尼罗罗非鱼中,获得转基因罗非鱼 C86系. 然而目前世界上的转基因鱼都没有进入产业化阶段,制约其产业化的瓶颈因素在于对转基因鱼潜在生态安全的担忧. 转基因鱼的潜在生态风险之一为转基因鱼可能通过有性交配方式与自然生态系统中的近缘物种杂交,导致转植基因漂移,造成野生基因库被污染,影响遗传多样性^[66-67].

4 分子标记辅助育种

分子标记辅助育种是指通过在分子水平上分析与目标基因紧密连锁的分子标记的基因型来判别目标基因是否存在和对其进行间接选择的一种育种方法. 其基本原理是利用与目标基因紧密连锁或表现共分离关系的分子标记对选择个体进行目标区域以及全基因组筛选,从而减少连锁累赘,获得期望的个体,达到提高育种效率的目的^[68]. 早在上世纪60年代, Thoday等^[69]就提出基于分子标记辅助育种的设想. 但由于当时分子标记主要是同工酶和其他蛋白质标记,多态性较少且数量也不够,因此未能引起研究人员足够重视. 近年来,随着分子辅助育种的技术发展的日新月异,分子辅助育种开展如火如荼,在罗非鱼中也开展了大量分子辅助育种的研究. 1998年, Kocher等^[70]用62个微卫星标记和112个 AFLP 标记首次构建了罗非鱼的遗传连锁图谱. 目前,罗非鱼的微卫星、AFLP 和结构基因标记数已达到934个^[71]. Shirak等^[72]与 Lee等^[73]均找到一些与罗非鱼性别决定相关的位点. 同时,水产养殖动物一些基因的克隆和功能研究结果可以运用在生产中,也使人们对生物学相关性状的遗传机制加深理解^[74]. 笔者所在研究团队同样也在寻找一些特异的分子标记用以辅助育种,在尼罗罗非鱼中运用 HRM 技术进行生长相关的 SNP 筛选,目前已获得一定研究数据. 同时,本团队也采用分子生物学手段对罗非鱼的繁殖生理学进行了一定研究,研究了奥利亚罗非鱼 vasa 基因克隆以及 LHRH-A 对其表达的影响,发现 LHRH-A 对精巢细胞中 vasa 的表达有抑制作用,揭示 LHRH

对精巢 vasa 基因表达有重要调控作用^[75];研究了 LHRH-A 和 hCG 对尼罗罗非鱼精巢 Piwi 表达的影响,发现与对照组相比 LHRH-A 和 hCG 显著的抑制 Piwi-1 和 Piwi-2 在 RNA 和蛋白质水平的表达. 同时,组织和细胞表达显示 Piwi 蛋白质主要在精母细胞上表达,而不是在成熟精子表达. 这些结果表明 Piwis 表达的降低可能在精巢分化和发育的过程中起重要作用^[76].

虽然分子辅助育种手段及技术均飞速发展,但正如笔者曾写到“鱼类遗传标记技术的发展直接体现了生物学研究手段的发展与进步. 虽技术手段层次有所差别,但只需根据研究的目的,选取合适的遗传标记,就能很好地达到实验目的”^[77]. 目前,分子辅助育种研究广泛开展,但绝大多数仍需与传统育种手段相结合,方能较大程度提高选育效率和取得较好育种结果.

综上所述,在各国研究人员的不懈努力下,罗非鱼育种工作已取得较大进展,但要如何获得大量成熟的配子进行罗非鱼育种研究仍然是提高罗非鱼选育效率的关键问题. 由于罗非鱼的一系列生理特点(如:产卵为多次产卵,口含孵化等),目前罗非鱼选育效率较其他鱼类低. 在进行罗非鱼家系选育时,因进行家系评估需要获得同期产卵的家系才能有效评估结果,往往为获得同期产卵的罗非鱼家系需要配对很多组,才能达到育种所需家系数. 如能通过繁殖生理学研究使其同期产卵并孵化,将大大提高工作效率;在罗非鱼杂交育种工作中,由于是种间杂交,如何提高尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼的配合力是一个提高产量的关键;因雌核发育技术、多倍体育种技术和转基因技术成功率都不高,需要大量操作才有可能获得理想结果. 在细胞工程育种中,获得足够多的成熟配子,更是一个关键问题. 这些育种工作中的问题,最终都需要我们通过加深对罗非鱼繁殖生理学的认识才能解决,这些问题都需要进一步的基础研究才能最终解决,最终罗非鱼育种工作会走上基础研究越细致而育种过程越简单的育种战略.

参考文献:

- [1] 楼允东,刘明华,沈俊宝. 鱼类育种学[M]. 北京:中国农业出版社,1999.
- [2] 刘峰,谢新民,郑艳红. 罗非鱼优良品系-吉富罗非鱼的育成始末[J]. 水产科技情报,2006(1): 8-12.
- [3] 胡国成,李思发,何学军,等. 吉富品系尼罗罗非鱼选育 F6-F8 生长改良效果[J]. 上海水产大学学报,2005(3):3327-3331.
- [4] 张涛涛,李思发,颀晓勇. 吉富品系尼罗罗非鱼选育系 F6-F9 遗传变异的 RAPD 分析[J]. 上海水产大学学报,2007(1):7-10.
- [5] 赵金,李思发,何学军,等. 吉富品系尼罗罗非鱼选育 F6 评估[J]. 上海水产大学学报,2003(3):201-204.
- [6] 颀晓勇,李思发,蔡完其. 吉富品系尼罗罗非鱼选育过程中遗传变异的微卫星分析[J]. 水产学报,2007(3):385-390.

- [7] 肖俊,凌正宝,唐瞻杨,等. 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 生长相关分析及生长模型构建[J]. 海洋与湖沼, 2012(6): 1272-1278.
- [8] 楼允东,李小勤. 中国鱼类远缘杂交研究及其在水产养殖上的应用[J]. 中国水产科学, 2006(1): 151-158.
- [9] Grant P R, Grant B R, Petren K. Hybridization in the recent past [J]. *American Naturalist*, 2005, 166(1): 56-67.
- [10] Mallet J. Hybrid speciation [J]. *Nature*, 2007, 446(7133): 279-283.
- [11] Chapman M A, Burke J M. Genetic divergence and hybrid speciation [J]. *Evolution*, 2007, 61(7): 1773-1780.
- [12] Cossins A R, Crawford D L. Fish as models for environmental genomics [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(4): 324-333.
- [13] Roques S, Svigny J M, Bernatchez L. Evidence for broadscale introgressive hybridization between two redfish (genus *Sebastes*) in the Northwest Atlantic; a rare marine example [J]. *Molecular Ecology*, 2001, 10(1): 149-165.
- [14] Xiao J, Zou T M, Chen Y B, et al. Coexistence of diploid, triploid and tetraploid crucian carp (*Carassius auratus*) in natural waters [J]. *BMC Genetics*, 2011, 12(1): 1-20.
- [15] Aboim M A, Mavùrez J, Bernatchez L, et al. Coelho. Introgressive hybridization between two Iberian endemic cyprinid fish: a comparison between two independent hybrid zones [J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 2010, 23(4): 817-828.
- [16] Vandepoele K, Vos W D, Taylor J S, et al. Major events in the genome evolution of vertebrates; Paraname age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(6): 1638-1643.
- [17] Otto S P. The evolutionary consequences of polyploidy [J]. *Cell*, 2007, 131(3): 452-462.
- [18] 刘少军,曹运长,何晓晓,等. 异源四倍体鲫鲤群体的形成及四倍体化在脊椎动物进化中的作用 [J]. 中国工程科学, 2001(12): 33-41.
- [19] Chevassus B. Hybridization in fish [J]. *Aquaculture*, 1983, 33(1-4): 245-262.
- [20] Zhang C, Sun Y D, Liu S, et al. Evidence of the unreduced diploid eggs generated from the diploid gynogenetic progeny of allotetraploid hybrids [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32(2): 136-144.
- [21] Vasil'ev V P, Makeeva A P, Riabov I N. Triploidy in hybrids of carp with other representatives of the Cyprinidae family [J]. *Genetika*, 1975, 11(8): 49-56.
- [22] Marian T, Kraszai Z. Karyological investigation on *Ctenopharyngodon idella* and *Hypophthalmichthys nobilis* and their cross-breeding [J]. *Aquacultura Hungarica*, 1978(1): 44-50.
- [23] Beck M, Biggers C, Barker C. Chromosomal and electrophoretic analyses of hybrids between grass carp and bighead carp (Pisces: Cyprinidae) [J]. *Copeia*, 1984(2): 337-342.
- [24] Liu S J. Distant hybridization leads to different ploidy fishes [J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2010(53): 416-425.
- [25] 叶玉珍,吴清江,陈荣德. 草鱼和鲤杂交的细胞学研究-鱼类远缘杂交核质不同步现象 [J]. 水生生物学报, 1989(3): 234-239, 299-300.
- [26] 桂建芳,梁绍昌,朱蓝菲,等. 鱼类远缘杂交正反杂种胚胎发育差异的细胞遗传学分析 [J]. 动物学研究, 1993(2): 171-177, 202.
- [27] 刘国安,吴维新,林临安,等. 兴国红鲤同草鱼杂交的受精细胞学研究 [J]. 水产学报, 1987(1): 17-21.
- [28] 李传武,吴维新,徐大义,等. 鲤和草鱼杂交中雄核发育子代的研究 [J]. 水产学报, 1990(2): 153-156.
- [29] 俞豪祥,张海明. 雌核发育异育银鲫出现杂交种 [J]. 水产科技情报, 1994(3): 131-131.
- [30] Foresti F, Oliveira C, Galetti J P M, et al. Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) [J]. *Genome*, 1993, 36(6): 1124-1128.
- [31] Carrasco L A P, Penman D J, Bromage N. Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes [J]. *Aquaculture*, 1999, 173(1-4): 207-218.
- [32] Campos-Ramos R, Harvey S, Masabanda J, et al. Identification of putative sex chromosomes in the blue tilapia, *Oreochromis aureus*, through synaptonemal complex and FISH analysis [J]. *Genetica*, 2001, 111(1): 143-153.
- [33] Cnaani A, Lee B Y, Zilberman N, et al. Genetics of sex determination in tilapiine species [J]. *Sexual Development*, 2008, 2(1): 43-54.
- [34] 夏德全. 现代生物技术在中国水产育种中的应用 [J]. 江苏科技信息, 2004(7): 1-4.
- [35] 刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学 [M]. 北京: 农业出版社, 1993.
- [36] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Nature*, 1981, 291(5813): 293-296.
- [37] Peruzzi S, Chatain B. Induction of tetraploid gynogenesis in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *Genetica*, 2003, 119(2): 225-228.
- [38] Liu S J, Duan W, Tao M, et al. Establishment of the diploid gynogenetic hybrid clonal line of red crucian carp \times common carp [J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2007, 50(2): 186-193.
- [39] Xiao J, Zou T M, Chen L, et al. Microsatellite analysis of different ploidy offspring of artificial gynogenesis in *Cyprinus carpio* [J]. *Journal of Fish Biology*, 2011, 78(1): 150-165.
- [40] Opperman K. Die entwicklung von forelleneiern nach befruchtung mit radiumbestrahlten samenfaden [J]. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 1913(83): 307-323.
- [41] 肖俊,彭德姣,段巍,等. 用团头鲂精子诱导金鱼雌核发育研究 [J]. 水生生物学报, 2009, 33(1): 83-89.
- [42] 楼允东. 人工雌核发育及其在遗传学和水产养殖上的应用 [J]. 水产学报, 1986(1): 111-123.
- [43] Liu S J, Sun Y D, Zhang C, et al. Production of gynogenetic progeny from allotetraploid hybrids red

- crucian carp × common carp [J]. *Aquaculture*, 2004, 236(1-4): 193-200.
- [44] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Nature*, 1981(291): 293-296.
- [45] Zhang H, Liu S J, Zhang C, et al. Induced gynogenesis in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) using irradiated sperm of allotetraploid hybrids [J]. *Marine Biotechnology*, 2011, 13(5): 1-10.
- [46] Penman D J, Shah M S, Beardmore J A, et al. Sex ratios of gynogenetic and triploid tilapia [J]. *Selective Hybrid Genetic Engineering of Aquaculture*, 1986(18): 18-19.
- [47] Mair G C, Scott A G, Penman D J, et al. Sex determination in the genus *Oreochromis* [J]. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 1991, 82(2): 144-152.
- [48] Mair G C. Chromosome - set manipulation in tilapia - techniques, problems and prospects [J]. *Aquaculture*, 1993, 111(1): 227-244.
- [49] Müller - Belecke A, Hörstgen - Schwark G. Performance testing of clonal *Oreochromis niloticus* lines [J]. *Aquaculture*, 2000, 184(1): 67-76.
- [50] Myers J M, Penman D J, Basavaraju Y, et al. Induction of diploid androgenetic and mitotic gynogenetic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) [J]. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 90(2): 205-210.
- [51] Marengoni N G, Onoue Y. Ultraviolet - induced androgenesis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and hybrid Nile × blue tilapia, *O. aureus* (Steindachner) [J]. *Aquaculture Research*, 2008, 29(5): 359-366.
- [52] Masterson J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms [J]. *Science*, 1994, 264(5157): 421-424.
- [53] Baatout S. Molecular basis to understand polyploidy [J]. *Hematology and Cell Therapy*, 1999, 41(4): 169-170.
- [54] Ohno S. *Evolution by gene duplication* [M]. Berlin: Springer - Verlag, 1970.
- [55] Taylor J S, Braasch I, Frickey T, et al. Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray - finned fish [J]. *Genome Research*, 2003, 13(3): 382-90.
- [56] Aparicio S, Chapman J, Stupka E, et al. Whole - genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes* [J]. *Science*, 2002, 297(5585): 1301-1310.
- [57] Jaillon O, Aury J M, Brunet F, et al. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto - karyotype [J]. *Nature*, 2004, 431(7011): 946-957.
- [58] 余先觉. *中国淡水鱼类染色体* [M]. 北京: 科学出版社, 1989.
- [59] Valenti R J. Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment [J]. *Journal of Fish Biology*, 2006, 7(4): 519-528.
- [60] Myers J M. Tetraploid induction in *Oreochromis* spp [J]. *Aquaculture*, 1986, 57(1): 281-287.
- [61] Don J, Avtalion R. Production of viable tetraploid tilapias using the cold shock technique [J]. *Bamidgeh*, 1988, 40(1): 17-21.
- [62] Don J, Avtalion R. Comparative study on the induction of triploidy in tilapias, using cold - and heat - shock techniques [J]. *Journal of Fish Biology*, 1988, 32(5): 665-672.
- [63] 容寿柏, 周泉涌, 安艳芳. 用热休克诱导罗非鱼四倍体 [J]. *中国实验动物学杂志*, 1994(2): 97-101.
- [64] 杨永铨, 张中英, 林克宏, 等. 应用三系配套途径产生遗传上全雄莫桑比克罗非鱼 [J]. *遗传学报*, 1980(3): 241-246.
- [65] Brem G, Brenig B, Hörstgen - Schwark G, et al. Gene transfer in tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture*, 1988, 68(3): 209-219.
- [66] 胡炜, 汪亚平, 朱作言. 转基因鱼生态风险评估及其对策研究进展 [J]. *中国科学(C辑: 生命科学)*, 2007(4): 377-381.
- [67] 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 [J]. *科学通报*, 2010, 55(20): 1987-1992.
- [68] 张建勇. 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 基因组 SNP 标记的开发与应用 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- [69] Thoday J M. Location of polygenes [J]. *Nature*, 1961, 191(4786): 368-370.
- [70] Kocher T D, Lee W J, Sobolewska H, et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Genetics*, 1998, 148(3): 1225-1232.
- [71] Agresti J J, Seki S, Cnaani A, et al. Breeding new strains of tilapia; development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci [J]. *Aquaculture*, 2000, 185(1): 43-56.
- [72] Shirak A, Palti Y, Cnaani A, et al. Association between loci with deleterious alleles and distorted sex ratios in an inbred line of tilapia (*Oreochromis aureus*) [J]. *Journal of Heredity*, 2002, 93(4): 270-276.
- [73] Lee B Y, Hulata G, Kocher T D. Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*) [J]. *Heredity*, 2004, 92(6): 543-549.
- [74] 孙效文, 鲁翠云, 贾智英, 等. 水产动物分子育种研究进展 [J]. *中国水产科学*, 2009(6): 981-990.
- [75] Xiao J, Luo Y J, Chen L B, et al. Molecular cloning of vasa gene and the effects of LHRH - A on its expression in blue tilapia *Oreochromis aureus* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2012, 39(4): 931-940.
- [76] Xiao J, Zhou Y, Luo Y J, et al. Suppression effect of LHRH - A and hCG on Piwi expression in testis of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 189(1): 43-50.
- [77] 肖俊. 洞庭湖水域不同倍性野生鲫鱼生物学特性及进化关系研究 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2010.