

文章编号: 1000-0615(2019)01-0001-14

DOI: 10.11964/jfc.20181211599

· 综述 ·

鱼类基因组研究十年回顾与展望

陈松林^{1,2,3*}, 徐文腾¹, 刘洋¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237;
3. 山东省海洋渔业生物技术与遗传育种重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 本文回顾了我国鱼类基因组研究从无到有、从小到大的十年发展历程。分别介绍了我国在鱼类BAC文库构建、高密度遗传连锁图谱构建与QTL定位、全基因组测序和精细图谱绘制、基因组选择育种和基因组编辑等方面取得的重要进展和成果。结合国际上鱼类基因组研究进展, 通过分析、比较指出, 从2008—2013年, 我国鱼类基因组研究在国际上处于全面跟跑状态, 从2014—2018年, 我国水产科学家奋起直追, 加快鱼类基因组研究步伐, 在短短5年内, 在国际顶级刊物Nature Genetics、Nature上相继发表了半滑舌鳎、鲤、草鱼、牙鲆和海马等养殖鱼类的基因组精细图谱, 使我国鱼类基因组研究在国际上从全面跟跑进入跟跑、并跑、领跑并存状态, 特别是在个别方向和少数种类上实现了领跑。同时, 指出了我国现阶段鱼类基因组研究与应用方面存在的不足和问题, 并展望了我国鱼类基因组研究今后的发展方向和前景。

关键词: 鱼类; 基因组研究; 十年; 回顾; 展望

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

鱼类基因组学在理论研究和生产实践中均具有重要意义^[1], 主要表现在5个方面: ①鱼类物种进化分析: 作为最古老和数目最多的脊椎动物, 鱼类在进化中的地位极为特殊。鱼类基因组数据比较和同源基因分析, 对于研究物种进化和鱼类多样性至关重要; ②鱼类重要性状形成的遗传基础: 通过研究基因序列、表达和调控模式, 明确基因在鱼类生长、发育、生殖、性别决定及代谢过程中的功能和作用机制, 解析重要性状形成的遗传基础; ③鱼类重要性状相关分子标记筛选: 通过遗传连锁图谱构建和全基因组测序, 发掘重要经济性状(性别、生长、抗病、抗逆等)相关的分子标记, 建立鱼类分子标记辅助育种技术; ④鱼类基因组选择育种: 全基因组序列为基因组选择育种提供参考基因组序列, 而全基因组测序获得的

SNP位点数量多且覆盖整个基因组, 通过SNP基因型与表型数据关联, 为鱼类全基因组选择育种技术的建立奠定基础; ⑤鱼类基因组编辑育种: 通过全基因组测序和精细图谱绘制, 查明基因在基因组中的准确位置, 借助基因编辑技术对特定基因进行定点突变, 实现性状的精准改良。

鉴于鱼类基因组解析在鱼类遗传学、发育生物学、免疫学、生殖生物学、内分泌学等基础研究及良种培育技术创新等方面的重要意义和应用价值, 自20世纪90年代中期开始, 国外发达国家纷纷起步开展鱼类全基因组测序和精细图谱构建的研究。例如, 美国1996年启动了水产基因组计划, 开展凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus puncta-*

收稿日期: 2018-12-15 修回日期: 2018-12-26

资助项目: 国家自然科学基金(31530078, 31730099); 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山卓越人才培养项目(2017ASTCP-OS15); 山东省泰山学者攀登计划

通信作者: 陈松林, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

tus)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 等水产养殖动物的全基因组测序; 1997年在曼彻斯特的达尔茅斯成立了第一个水产基因组工作组; 2002年新加坡科学家领衔完成了模式鱼类红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)的全基因组测序^[2]; 2004年法国科学家领衔完成了黑青斑河鲀(*Tetraodon nigroviridis*)基因组测序^[3]; 2007年, 日本科学家领衔完成了模式鱼类青鳉(*Oryzias latipes*)全基因组测序^[4]。随后, 随着全基因组测序技术的快速发展和测序成本的大幅下降, 国外在鱼类全基因组解析上的投入越来越大, 完成基因组测序的鱼类种类越来越多。其中, 挪威科学家于2011年发表了大西洋鳕(*Gadus morhua*)全基因组测序和特殊的免疫机制结果^[5]; 美国科学家2012年发表了三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)全基因组测序和精细图谱绘制的结果^[6]; 英国桑格研究所2013年发表了重要模式鱼类斑马鱼(*Danio rerio*)的全基因组测序和精细图谱绘制结果^[7]。美国博德研究所领衔于2014年发表了多种非洲丽鱼(*Neolamprologus brichardi/pulcher*, *Metriaclichia zebra*, *Pundamilia nyererei*, *Astatotilapia burtoni*, 包括罗非鱼)的全基因组测序结果^[8]; 法国科学家于2014年发表了虹鳟全基因组测序和精细图谱绘制的结果^[9]; 随后, 挪威生命科学大学、西蒙弗雷德大学、卑尔根大学等于2016年发表了大西洋鲑(*Salmo salar*)全基因组测序和加倍机制的结果^[10], 美国奥本大学科学家2016年发表了斑点叉尾鲷全基因组精细图谱绘制和鳞片形成的分子机制的结果^[11]。

国内的鱼类全基因组测序和精细图谱绘制起步于2009年, 比国外晚了10多年, 与国际先进水平相比, 当时我国的鱼类基因组研究处于全面跟跑状态。尽管起步晚、基础差, 但国内学者协作攻关、奋起直追, 短短几年内就在重要养殖鱼类全基因组测序和精细图谱绘制上取得重大突破, 先后完成了半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)等多种养殖鱼类全基因组精细图谱绘制。其中, 中国水产科学研究院黄海水产研究所主导于2014年2月在Nature Genetics发表了我国第一种鱼类—半滑舌鲷全基因组测序和精细图谱绘制的结果^[12]; 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所主导于2014年9月在Nature Genetics发表了鲤(*Cyprinus carpio*)全基因组测序和群体基因组学研究结果^[13]。这些突破性论文大大激发了我国

鱼类科学家开展鱼类全基因组解析的积极性和创造性, 推动了我国鱼类基因组研究的进程, 使我国在短短5年间完成并发表了22种鱼类全基因组解析的论文, 将我国鱼类基因组研究提升至国际先进水平, 在某些方向达到国际领先水平。下面就对我国近10年来在鱼类BAC (bacterial artificial chromosome)文库构建、高密度遗传连锁图谱构建、全基因组测序和精细图谱绘制、基因组选择及基因组编辑等方面取得的重要进展和成果分别进行综合介绍, 并与国外的研究进展进行对比分析。

1 鱼类BAC文库构建研究进展

BAC文库是指以细菌人工染色体为载体构建的大片段重组DNA克隆文库, 可包含某个物种的全部基因, 是进行全基因组测序和组装、物理图谱构建的基础。

我国在鲤、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、半滑舌鲷、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)和鳊(*Siniperca chuatsi*)等5种鱼类构建了BAC文库(表1)。鲤BAC文库是通过HindIII酶消化基因组, 获得片段后连接BAC载体, 构建的文库平均插入片段长度141 K, 并与近缘的斑马鱼基因组进行了比较^[14]; 草鱼则是通过EcoRI和HindIII分别消化基因组, 构建了两个BAC文库, 其中EcoRI文库平均插入片段长度为139.7 K, 覆盖7.4倍基因组, HindIII文库平均插入片段长度为121.5 K, 覆盖6.3倍基因组^[15]; 在半滑舌鲷, 通过BamHI和HindIII构建了2个文库, 其中BamHI平均插入片段长度为160 K, HindIII文库平均插入片段长度为155 K, 共覆盖基因组13.36倍, 为性别决定基因筛选等研究奠定了基础^[16]; 大黄鱼BAC文库平均插入片段长度为120 K, 文库大小为324.73 G,

表1 国内养殖鱼类BAC文库构建结果一览表

物种名称 species name	所用限制性内切酶 restriction enzyme	插入片段大小/bp insertion size	文献 reference
鲤	HindIII	141 K	[14]
<i>C. carpio</i>			
草鱼	EcoRI/HindIII	139.7 K/121.5 K	[15]
<i>C. idella</i>			
半滑舌鲷	BamHI/HindIII	156 K	[16]
<i>C. semilaevis</i>			
大黄鱼	—	120 K	[17]
<i>L. crocea</i>			
鳊	HindIII	124.6 K	[18]
<i>S. chuatsi</i>			

覆盖基因组469.94倍, 在大黄鱼全基因组组装过程中发挥了重要作用^[17]; 在鳊中采用HindIII消化基因组构建了BAC文库, 片段平均插入长度124.6K, 覆盖全基因组10.5倍, 为重要性状相关基因克隆和功能基因组研究提供基础^[18]。

随着测序技术的发展, 全基因组组装和物理图谱构建对于BAC文库的依赖已大大降低, 但BAC文库在分子标记筛选、重要性状相关基因克隆等方面仍然具有重要的应用价值。

2 鱼类高密度遗传连锁图谱构建与QTL定位研究进展

遗传连锁图谱是根据标记间的重组率绘制的DNA标记在染色体上的排列图。DNA标记两两间发生重组事件的多少从小到大进行排序, 在同一连锁群上, 重组率越高的标记相隔越远。通过构建遗传连锁图谱, 可以将分子标记整合起来, 作为排列测序片段的锚定物, 辅助完成基因组的组装; 同时, 遗传连锁图谱结合表型性状, 也是进行QTL定位的基础工具。从这一角度来看, 遗传连锁图谱是一种承上启下的遗传学工具, 是链接基因组和表型性状研究的桥梁。衡量遗传连锁图谱质量的主要标准是上图标记数目和标记密度, 标记密度越高, 图谱的质量和准确度就越好, 应用的潜力也就越大。

高密度遗传连锁图谱的作图标记基本上是

SSR和SNP二种, 近年来大量分子标记获取的难度降低, 极大地促进了鱼类遗传连锁图谱构建研究(表2)。我国鱼类高密度遗传连锁图谱, 首先在几种重要养殖经济鱼类中由微卫星标记构建完成, 如鲤^[19]、半滑舌鳎^[20]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[21]、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)^[22]、鳙(*Aristichthys nobilis*)^[23]等。随着测序技术的发展, SNP图谱逐渐成为鱼类高密度遗传连锁图谱的主流。例如, 牙鲆通过12 712个SNP标记, 构建了标记平均间距为0.47 cM的牙鲆高密度遗传连锁图谱, 定位到9个鳃弧菌抗性相关的QTL位点和4个强相关的基因^[24]。大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)高密度遗传连锁图谱包含SNP标记6 647个, 平均标记间距为0.40 cM, 并通过图谱进行了生长和性别等性状相关基因座的定位^[25]。团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)高密度遗传连锁图谱包含SNP标记14 648个, 平均标记间距为0.57 cM, 并定位到了8个生长相关的QTL区间^[26]。此外, 在点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[27]、半滑舌鳎^[12]、大黄鱼^[28]、鲤^[29]、鳙^[30]、鲫(*Carassius auratus*)^[31]、南方鲇(*Silurus meridionalis*)^[32]、卵形鲳鲹(*Trachinotus blochii*)^[33]、中华鲟(*Acipenser sinensis*)^[34]等鱼类, 也都构建了高密度SNP遗传连锁图谱。

随着三代测序技术的普及, 高密度遗传连锁图谱已经不再是基因组组装过程中必不可少

表 2 国内养殖鱼类高密度SNP遗传连锁图谱构建一览表

Tab. 2 Reported high-density SNP genetic linkage maps of fish by Chinese scientists

物种名称 species name	标记类型 marker type	标记数量 no. of markers	图谱大小/cM map size	连锁群数目 no. of linkage groups	标记间平均间隔/cM average interval	文献 reference
鲤 <i>C. carpio</i>	SNP	28 194	10 595.94	50	0.75	[29]
半滑舌鳎 <i>C. semilaevis</i>	SNP	12 142		21	0.326	[12]
牙鲆 <i>P. olivaceus</i>	SNP	13 362	3 497.29	24	0.47	[24]
点带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	SNP	4 608	1 581.7	24	0.34	[27]
鳙 <i>A. nobilis</i>	SNP	3 121	2 341.27	24	0.75	[30]
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	SNP	10 150	5 451.3	24	0.54	[28]
大菱鲆 <i>S. maximus</i>	SNP	6 647	2 262.09	22	0.395	[25]
团头鲂 <i>M. amblycephala</i>	SNP	14 648	6 258.39	24	0.58	[26]
鲫 <i>C. auratus</i>	SNP	8 487	3 762.88	50	0.44	[31]
卵形鲳鲹 <i>T. blochii</i>	SNP	12 358	3 810.3	24	0.307	[33]
中华鲟 <i>A. sinensis</i>	SNP	2 560	10 001.32	60	4	[34]
南方鲇 <i>S. meridionalis</i>	SNP	26 714	5 918.31	29	0.89	[32]

的工具,但是,图谱构建技术本身仍然在发展,近年来,通过算法的优化,多个家系构建图谱整合等方法,得到了更精确的遗传连锁图谱。此外,遗传连锁图谱是基于家系材料的经济性状进行相关基因座定位的基础,日后,随着基因组技术在鱼类育种中应用的深入,针对特定表型构建的定位图谱,仍然具有重要的应用价值。

全基因组关联分析(GWAS)也是筛选经济性状相关SNP位点的重要手段,是进行QTL精细定位的重要工具,但在鱼类上目前研究报道不多,国外对斑点叉尾鲴的抗病性状进行了GWAS分析^[35];国内在鲤上进行了脂肪含量性状相关SNP位点的GWAS分析^[36]。随着鱼类基因组研究的发展,未来GWAS技术有望在养殖鱼类经济性状解析中得到广泛的应用。

3 鱼类全基因组测序与精细图谱绘制研究进展

高通量测序技术的飞速发展在降低测序成本的同时,也显著缩短了测序周期,推动了我国鱼类全基因组测序与精细图谱绘制的研究进程。从2014年完成国内第一个鱼类——半滑舌鳎全基因组精细图谱绘制开始,我国已完成鲤、草鱼、弹涂鱼(*Scartelaos histophorus*, *Boleophthalmus pectinirostris*, *Periophthalmodon schlosseri*, *Periophthalmus magnuspinnatus*)、大黄鱼、海马(*Hippocampus comes*)、牙鲆等22种鱼类的全基因组测序和精细图谱绘制工作(表3)。

其中,中国水产科学研究院黄海水产研究所陈松林领衔完成的半滑舌鳎全基因组精细图谱,是世界上首个鲽形目鱼类的精细图谱,同时他们还揭示了比目鱼类性染色体起源和进化的分子机制,探讨了半滑舌鳎底栖适应的分子基础^[12],通过全基因组甲基化测序,构建了全基因组甲基化图谱,发现半滑舌鳎性逆转的表观遗传学调控机制^[37]。中国水产科学研究院孙效文团队主导完成了鲤全基因组测序工作,为研究鲤基因组复制、亚种起源以及遗传改良提供了基础^[13]。华大基因石琰团队主导完成了4种弹涂鱼基因组测序和精细图谱绘制,阐明了弹涂鱼适应陆地生境的分子机制,为研究生物由水生到陆生的进化过程奠定了基础^[38]。浙江海洋学

院吴常文团队主导完成了大黄鱼的精细图谱绘制,解析了其先天免疫系统相关的基因组特征,发现大黄鱼具有完善的免疫系统^[39];中国科学院水生生物研究所汪亚平团队主导完成了草鱼的全基因组测序和精细图谱绘制,为研究草鱼的草食特性,解析其高强度摄食和快速生长等性状提供了基因组学基础^[40]。中科院南海海洋研究所林强团队完成了海马的全基因组测序和精细图谱绘制,从基因组层面对海马“雄性育儿”和垂直游动等特殊生物学现象进行了深入研究^[41]。继完成半滑舌鳎全基因组解析之后,黄海水产研究所陈松林主导并联合上海海洋大学鲍宝龙团队在2017年又完成了牙鲆全基因组测序和精细图谱绘制,发现视黄酸在牙鲆眼睛移动和变态发育中发挥重要的调控作用,揭示比目鱼类变态是通过甲状腺素和视黄酸的双重拮抗调控实现的^[42]。中国水产科学研究院生物技术中心徐鹏团队主导完成了雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)全基因组精细图谱绘制和碱性环境适应机制的研究^[52](表3)。

另外,数十种重要养殖鱼类的全基因组测序和基因组资源发掘工作也正在进行中,其中石斑鱼、鲢和黄姑鱼(*Nibea albiflora*)等鱼类的基因组结果有待发表。这些研究使我国鱼类基因组研究跃居国际先进水平,其中在个别种类和方向达到国际领先水平,同时为开展鱼类基因组选择育种研究提供了参考基因组序列,奠定了重要基础。

4 鱼类基因组选择育种研究进展

基因组选择技术是通过使用覆盖全基因组的SNP和已知的表型信息,建立基因组估计育种值(GEBV)的估计模型,并应用该模型计算出未知表型的候选群体中个体的GEBV,选择GEBV高的个体应用于实际育种中,达到遗传选育的目的。基因组选择的原理最早由挪威科学家Meuwissen提出^[58],至今已经广泛应用于畜牧业育种中,取得了极大的成功。基因组选择的一个重要步骤就是进行基因组尺度的基因型分析,科学家们通过基因芯片^[59]、简化基因组测序^[60]等技术进行基因型分析,此外,中国海洋大学包振民团队建立了高通量、低成本的基因型分析技术^[61]。随着基因组测序技术的发展及测序成本的大幅下降,人们可以通过全基因组重测序进

表 3 国内鱼类全基因组测序和精细图谱绘制一览表

Tab. 3 Reported de novo sequencing of fish genomes by Chinese scientists

物种名称 species name	基因组大小/bp genome size	contig N50/bp	scaffold N50/bp	第一单位 first contribution unit	文献 reference
半滑舌鳎 <i>C. semilaevis</i>	477 M	26.5 K	867 K	中国水科院黄海水产研究所	[12]
四种弹涂鱼 <i>S. histophorus</i>	806 M	8.4 K	14.3 K	深圳海洋基因组学重点实验室深圳华大基因	[38]
<i>B. pectinirostris</i>	983 M	20.2 K	2.31 M		
<i>P. schlosseri</i>	780 M	16.8 K	39.1 K		
<i>P. magnuspinnatus</i>	739 M	27.6 K	288.5 K		
鲤 <i>C. carpio</i>	1.53 Gb	68.4 kb	1 Mb	中国水科院	[13]
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	679 M	63.1 K	1.03 M	浙江海洋大学	[39]
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	728 M	25.711 kb	498.7 kb	国家海洋局第三海洋研究所	[17]
菊黄东方鲀 <i>T. flavidus</i>	390 M	2.8 K	305.7 K	中科院海洋所	[43]
草鱼 <i>C. idella</i>	雌0.90 G/ 雄1.07 G	雌40.8 K/ 雄18.3 K	雌6.46 M/ 雄2.28 K	中科院水生所	[40]
鳊 <i>Miichthys miiuy</i>	636.22 M	73.32 K	1.15 M	浙江海洋大学	[44]
亚洲龙鱼 <i>Scleropages formosus</i>	金色 780 M	30.73 K	5.97 M	深圳海洋基因组学重点实验室	[45]
	红色 750 M	60.19 K	1.63 M		
	绿色 760 M	62.80 K	1.85 M		
海马 <i>H. comes</i>	501.6 M	34.7 K	1.8 M	中科院南海所	[41]
翻车鱼 <i>Mola mola</i>	730 M	20 K	9 M	中科院昆明动物研究所	[46]
3种洞穴鱼 <i>Sinocyclocheilus graphami</i>	1.75 G	29.3 K	1.15 M	中科院昆明动物研究所	[47]
<i>S. rhinoceros</i>	1.73 G	17.6 K	894.6 K		
<i>S. anshuiensis</i>	1.68 G	16.7 K	1.25 M		
银鱼 <i>Protosalanx hyalocranius</i>	525 M	17.2 K	1.16 M	中国水科院淡水渔业研究中心	[48]
直立海马 <i>Hippocampus erectus</i>	489 M	14.57 K	1.97 M	中科院南海所	[49]
团头鲂 <i>M. amblycephala</i>	1.11 G	49 K	839 K	华中农业大学	[50]
乌鳢 <i>Ophiocephalus argus</i>	670.4 M	81.4 K	4.5 M	中国水科院	[51]
牙鲆 <i>P. olivaceus</i>	546 M	30.5 K	3.9 M	中国水科院黄海水产研究所	[42]
雅罗鱼 <i>L. waleckii</i>	752 M	37.3 K	447.7 K	中国水科院	[52]
黑鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i>	688 M	17.2 K	7.6 M	江苏海洋水产研究所	[53]
中国鳊 <i>Sillago sinica</i>	534 M	/	2.6 M	浙江海洋大学	[54]
花鲈 <i>Lateolabrax maculatus</i>	0.62 G	31 K	1 040 K	中国水科院黄海水产研究所	[55]
黑斑原鲌 <i>Glyptosternum maculatum</i>	662.3 M	993 K	20.9 M	西藏自治区农科院水产所	[56]
黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	732.8 M	1.1 M	25.8 M	华中农业大学	[57]

行基因型鉴定, 获取全基因组范围内的SNP位点, 从而解决基因组尺度的基因型鉴定问题。基因组选择的主要优点包括: ①通过全基因组水平的遗传变异得到个体的GEBV, 免去了对性状相关位点的发掘, 更加高效简洁, 适合于大多数微效多基因控制的数量性状的选育。②基因组选择技术基于全基因组重测序, 可以在候选群体个体刚出生或孵化时就进行较为准确的选择, 免去了候选群体养殖、繁育、筛选等过程, 可以节省育种成本。③基因组选择技术通过采集参考群体的表型性状即可预测候选群体的育种潜力, 无需对候选群体进行破坏性采样, 适用于难以测量的经济性状的选育。

鱼类基因组选择研究随着鱼类基因组测序的增加和重测序费用的降低, 也逐渐发展起来。我国近年来主要在牙鲆、大黄鱼和半滑舌鲷等鱼类上开展了基因组选择育种技术的研究。在大黄鱼, 集美大学通过重测序数据, 结合生长和肌肉中的不饱和脂肪酸含量等相关表型性状, 对适用的表型性状类型、群体大小、基因组选择算法等进行了研究, 为基因组选择技术在大黄鱼育种中的实际应用创造了条件^[62-64]。在牙鲆, 黄海水产研究所针对牙鲆抗迟缓爱德华氏菌病性状进行了基因组选择技术的研究, 他们通过对多年建立的牙鲆家系进行病原菌感染, 从中筛选出抗病家系、中等抗病家系和不抗病家系, 采用这些家系构建参考群体, 进行基因组重测序, 获得全基因组范围的大量SNP位点, 使用Bayes C π 和GBLUP二种算法, 估算参考群体中每个个体的GEBV, 从而建立了牙鲆抗病性状的基因组选择育种技术, 并将其应用到候选群体GEBV的估算中^[65], 采用这项技术培育出“鲆优2号”牙鲆新品种^[1]。同时, 该团队也采用这项技术开展了半滑舌鲷抗病性状基因组的选择技术研究^[1]。

随着基因组选择技术理论研究和算法的优化^[66], 基因组选择技术将在更多鱼类抗病、抗逆和优质良种培育上获得应用, 有望发展成为鱼类遗传育种的新的主流分子育种技术。

5 鱼类基因组编辑研究进展

基因组编辑是指对基因组进行精确修饰的基因操作技术, 可以实现基因组定点突变、基因定点敲入、多位点突变和小片段缺失。从早期的锌指核酸酶(ZFN)系统, 到近期的类转录激

活因子效应物核酸酶(TALEN)和人工核酸酶成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白9(CRISPR/Cas9)等技术^[67], 快速发展的基因组编辑技术已广泛应用于动植物和模式鱼类的基因功能研究中, 并随着技术平台的日益完善逐步在养殖鱼类中应用。迄今为止, 国内在4种淡水养殖鱼类(尼罗罗非鱼、鲤、黄颡鱼、南方鲇)和1种海水养殖鱼类(半滑舌鲷)中成功建立了基因组编辑技术。其中, 西南大学通过TALEN技术对尼罗罗非鱼*dmrt1*和*foxl2*基因进行了敲除, 证明这2个基因在尼罗罗非鱼性别分化过程中发挥重要作用^[68]。随后, 他们在罗非鱼中建立了CRISPR/Cas9技术平台并成功敲除*amhy*, 证明*amhy*是罗非鱼雄性决定基因^[69]。此外, 他们还建立了南方鲇CRISPR/Cas9技术并成功敲除*cyp26a1*基因, 为研究*cyp26a1*在减数分裂中的功能提供了有力支持^[70]。苏州大学建立了鲤TALEN和CRISPR/Cas9基因组编辑技术, 并对*sp7*和*mstnba*基因进行了定点突变, 进而研究了鲤肌间刺的形成机制^[71]。南京大学利用ZFN和TALEN技术在黄颡鱼中敲除*mstn*基因, 为研究*mstn*在黄颡鱼生长中的功能提供了材料^[72-73]。

相比之下, 由于受精卵显微注射难度大、注射后胚胎和仔鱼成活率低等问题, 海水养殖鱼类基因组编辑研究进展缓慢。中国水产科学研究院黄海水产研究所半滑舌鲷为研究材料, 突破了海水鲆鲷类胚胎的显微注射瓶颈, 建立了TALEN基因组编辑技术。对半滑舌鲷雄性决定基因*dmrt1*进行了功能研究, 发现*dmrt1*基因敲除后, 雄性性腺发育受阻, 形成不了精子, 而发育成具有卵巢腔样结构, 同时, 观察到有些*dmrt1*突变后的雄鱼生长变快^[74]。随着鱼类基因组研究的进一步发展和基因组编辑技术的改良, 基因组编辑技术将在更多的养殖鱼类中得以应用, 而通过对性别、致病基因和生长相关基因的改造, 基因组编辑技术有望在养殖鱼类良种培育上发挥重要作用。

6 国内外养殖鱼类基因组研究进展对比分析

有关鱼类基因组学和基因组育种技术研究, 国外开始于20世纪90年代中后期, 起步比我国早10多年。尽管我国鱼类基因组研究起步较晚, 但近年来奋起直追, 在鱼类基因组研究方面发展迅速, 取得了如上所述的一系列重大进展。

在BAC文库构建方面, 国外完成了10种鱼类的BAC文库构建, 包括牙鲆^[75]、青鲈^[76]、三棘鱼^[77]、尼罗罗非鱼^[78]、大西洋鲑^[79]、斑点叉尾鲷^[80]、虹鳟^[81]、亚洲鲈(*Lates calcarifer*)^[82]、五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)^[83]、大菱鲆^[84], 我国则在5种养殖鱼类上完成了BAC文库的构建工作(表1), 基本处于并跑状态。

在高密度遗传连锁图谱构建方面, 国外发表了10种鱼类的高密度遗传连锁图谱, 包括大西洋鲑^[85-86]、虹鳟^[87]、大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)^[88]、斑点叉尾鲷^[89]、欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[90]、大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)^[91]、亚洲鲈^[92-93]、大菱鲆^[94]、尼罗罗非鱼^[95]、黄尾鲷(*Seriola lalandi*)^[96], 我国发表了13种养殖鱼类高密度遗传连锁图谱(表2), 整体处于并跑状态。

在全基因组测序和精细图谱绘制方面, 国外完成了包括红鳍东方鲀、斑马鱼、青鲈在内的28种鱼类全基因组测序和精细图谱绘制, 其中红鳍东方鲀的基因组发表于2002年, 是国际上完成全基因组测序的第一种鱼类。我国的鱼类全基因组测序研究起始于2009年, 并于2014年2月发表了我国第一种鱼类——半滑舌鳎全基因组精细图谱绘制的结果^[12]。从2014年至2018年, 短短5年时间, 我国完成了22种养殖鱼类的全基因组测序工作(表3), 总体处于并跑状态, 其中在鲆鲽鱼类、鲤科养殖鱼类、海马基因组解析方面处于领跑水平。

在基因组选择育种方面, 国外主要在3种鱼类上开展了基因组选择育种研究(大西洋鲑^[97-101]、虹鳟^[102]、欧洲鲈^[103]), 我国则主要在大黄鱼和牙鲆上分别针对生长、脂肪酸含量和抗病性状展开了基因组选择育种技术研究, 总体处于并跑状态。

在养殖鱼类基因组编辑方面, 国外在5种养殖鱼类上展开了基因组编辑研究, 包括虹鳟^[104]、大西洋鲑^[105]、洞穴鱼(*Astyanax mexicanus*)^[106]、斑点叉尾鲷^[107]、真鲷(*Pagrus major*)^[108]。我国也在5种养殖鱼类(尼罗罗非鱼、鲤、黄颡鱼、南方鲇、半滑舌鳎)建立了基因组编辑技术, 并进行了基因功能分析, 总体上也是处于并跑状态, 其中半滑舌鳎是最早实现基因组编辑的海水养殖鱼类, 也是国内唯一实现基因组编辑的海水养殖鱼类。

综上所述, 目前我国鱼类基因组研究总体

上与国外处于并跑状态, 在个别种类和方向上处于领跑地位。

7 存在问题

尽管近年来我国鱼类基因组研究快速发展, 但笔者认为目前在以下方面仍存在问题或不足:

鱼类功能基因组学研究仍然滞后 现阶段基因组学的主要工作集中在全基因组测序和精细图谱绘制方面, 破译全基因组序列可以为基因组结构解析和基因注释提供数据, 然而这只是基因组学研究的开始, 阐明基因的功能和调控机制则是基因组学研究的主要目的, 实现这个目标需要结合转录组、蛋白组、表观组、代谢组等多组学数据, 同时还要采用基因组编辑、转基因过表达等手段才能完成。此外, 生物体中非编码元件的存在(如lncRNA, microRNA, circRNA), 也使得功能基因组的研究工作更加复杂。因此, 鱼类功能基因组学的研究任重而道远。

鱼类重要经济性状的遗传解析亟待加强 经济性状的遗传解析是鱼类育种的重要基础性研究。全基因组测序为筛选调控鱼类重要经济性状的基因提供了序列资源, 但要找到控制某个经济性状的基因(簇)及其信号通路则还有大量工作要做。目前我国只是在半滑舌鳎和罗非鱼等少数鱼类雄性性别决定基因发掘上取得一些重要进展, 但有关养殖鱼类抗病、抗逆、品质、饲料转化率等重要性状调控基因的筛选及这些性状形成的分子机制研究方面还有大量工作要做。

鱼类基因型及表型高效测定技术手段有待改进 高效、经济的基因型分析和表型测定技术是基因组技术产业化应用的重要前提。无论是进行鱼类经济性状的遗传解析, 还是进行基因组选择育种, 都需要精确、高效地进行基因型鉴定和表型性状测量, 但目前在这个方面还比较落后, 特别是鱼类多表型高效精准测定技术尚未建立, 也缺少鱼类表型高效测定的仪器设备, 需要加大力度进行研发。

开展基因组育种技术研究的鱼类种类还十分有限 采用基因组技术进行鱼类遗传改良(基因组选择育种和基因组编辑育种), 可以提高育种效率, 缩短育种周期, 精确改良性状, 具有

传统育种技术无法比拟的优势, 而我国作为一个水产养殖大国, 更是具有巨大的市场前景和应用潜力。现阶段, 国内只在7种养殖鱼类报道了基因组选择和基因组编辑等的研究结果, 这远远满足不了我国多达上百种养殖鱼类的育种需求, 需要继续在相关养殖鱼类基因组育种技术上开展研究, 实现突破, 让基因组育种技术在更多重要养殖鱼类上得到应用, 推动鱼类育种技术的更新换代, 促进鱼类种业的发展。

8 展望

建立以基因组数据为核心的养殖鱼类综合大数据平台势在必行 随着测序技术的飞速发展, 将会有更多的养殖鱼类基因组被解密。笔者乐观估计, 未来10年, 重要养殖鱼类中完成全基因组测序和精细图谱绘制的比例可达90%以上。然而, 仅有基因组数据是远远不够的, 还需要根据实际需要, 培育用于基因组育种的实验材料, 整合种质资源参数、家系数据、表型数据和其他多组学数据, 才能真正有效利用基因组资源, 为鱼类遗传育种提供有力支持。因此, 构建以基因组数据、表型组数据为核心的养殖鱼类综合大数据平台将成为今后几年的发展趋势。

基于全基因组水平的重要性状形成机制的遗传解析将更加受重视 经济性状遗传改良是良种培育的关键, 全基因组测序和精细图谱绘制为全面解析经济性状遗传基础和形成机制提供了基因组序列。我们相信, 针对抗病、抗逆、性别、发育、生长和品质等重要经济性状的形成机制开展全基因组水平的遗传解析工作, 将是未来几年鱼类基因组研究的重点, 也将为培育抗病高产优质鱼类新品种提供理论基础。

性别特异分子标记开发仍是研究热点 雌雄差异大的现象在鱼类中非常普遍, 因此高雌(雄)或单性苗种培育对于提高养殖产量至关重要^[109-110]。迄今, 性别特异分子标记只在少数养殖鱼类上发掘并在其性控育种上成功应用^[109-110]。还有很多养殖鱼类急需开发性别特异分子标记, 而雌雄鱼全基因组测序是筛选性别特异分子标记的有效手段。相信随着更多鱼类基因组序列的破译, 将会有更多养殖鱼类的性别特异分子标记问世和应用。

基因组育种技术将成为鱼类遗传改良的重要

技术手段 基因组选择是一种非常重要的基因组育种技术, 非常适合抗病性状这样难以测量的数量性状的选育, 可显著提高育种效率和准确性、缩短育种周期^[111]。目前, 国内开展抗病性状基因组选择的鱼类只有牙鲆和半滑舌鳎等少数几种鱼类, 采用该技术培育出“鲆优2号”牙鲆新品种, 笔者相信在未来5~10年里我国将在8~10种养殖鱼类中开展抗病性状基因组选择的研究, 将有可能通过基因组选择培育出更多抗病高产优质鱼类新品种。

基因组编辑是另一种重要的基因组育种技术。与转基因技术中导入外源基因不同, 基因组编辑技术可以定点敲除鱼体自有的基因, 因此基因组编辑育种技术和转基因技术具有本质上的差别, 应该较易得到消费者的认可和接受。但基因组编辑技术在养殖鱼类中的应用才刚刚起步, 尤其在海水养殖鱼类中亟待改进和推广。我们相信, 作为一种可以对养殖鱼类进行精确遗传改良的分子育种技术, 基因组编辑技术必将在更多养殖鱼类上得到应用, 成为鱼类遗传改良的重要手段和新途径^[111]。

参考文献:

- [1] 陈松林. 鱼类基因组学及基因组育种技术[M]. 北京: 科学出版社, 2017.
Chen S L. Fish Genomics and Genome Breeding Technologies[M]. Beijing: Science Press, 2017(in Chinese).
- [2] 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): 1301-10.
- [3] 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): 946-57.
- [4] Kasahara M, Naruse K, Sasaki S, *et al.* The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution[J]. *Nature*, 2007, 447(7145): 714-719.
- [5] Star B, Nederbragt A J, Jentoft S, *et al.* The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system[J]. *Nature*, 2011, 477(7363): 207-10.
- [6] Jones F C, Grabherr M G, Chan Y F, *et al.* The genomic basis of adaptive evolution in threespine sticklebacks[J]. *Nature*, 2012, 484(7392): 55-61.

- [7] Howe K, Clark M D, Torroja C F, *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498-503.
- [8] Brawand D, Wagner C E, Li Y I, *et al.* The genomic substrate for adaptive radiation in African cichlid fish[J]. *Nature*, 2014, 513(7518): 375-81.
- [9] Berthelot C, Brunet F, Chalopin D, *et al.* The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3657.
- [10] Lien S, Koop B F, Sandve S R, *et al.* The Atlantic salmon genome provides insights into rediploidization[J]. *Nature*, 2016, 533(7602): 200-+.
- [11] Liu Z J, Liu S K, Yao J, *et al.* The channel catfish genome sequence provides insights into the evolution of scale formation in teleosts[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11757.
- [12] 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[J]. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253-260.
- [13] Xu P, Zhang X F, Wang X M, *et al.* Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*[J]. *Nature Genetics*, 2014, 46(11): 1212-1219.
- [14] Li Y, Xu P, Zhao Z X, *et al.* Construction and characterization of the BAC library for common carp *Cyprinus carpio* L. and establishment of microsynteny with zebrafish *Danio rerio*[J]. *Marine Biotechnology*, 2011, 13(4): 706-712.
- [15] Jang S H, Liu H, Su J G, *et al.* Construction and characterization of two bacterial artificial chromosome libraries of grass carp[J]. *Marine Biotechnology*, 2010, 12(3): 261-266.
- [16] Shao C W, Chen S L, Scheuring C F, *et al.* Construction of two BAC libraries from half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* and identification of clones containing candidate sex-determination genes[J]. *Marine Biotechnology*, 2010, 12(5): 558-568.
- [17] Ao J Q, Mu Y N, Xiang L X, *et al.* Genome sequencing of the perciform fish *Larimichthys crocea* provides insights into molecular and genetic mechanisms of stress adaptation[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(4): e1005118.
- [18] Lv L Y, Liang X F, Tian C X, *et al.* Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library for mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basilewsky)[J]. *Genes & Genetic Systems*, 2016, 91(3): 189-191.
- [19] Zhang X F, Zhang Y, Zheng X H, *et al.* A consensus linkage map provides insights on genome character and evolution in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Marine Biotechnology*, 2013, 15(3): 275-312.
- [20] Song W T, Li Y Z, Zhao Y W, *et al.* Construction of a high-density microsatellite genetic linkage map and mapping of sexual and growth-related traits in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52097.
- [21] Song W T, Pang R Y, Niu Y Z, *et al.* Construction of high-density genetic linkage maps and mapping of growth-related quantitative trait loci in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50404.
- [22] Guo W J, Tong J G, Yu X M, *et al.* A second generation genetic linkage map for silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) using microsatellite markers[J]. *Aquaculture*, 2013, 412-413: 97-106.
- [23] Zhu C, Tong J, Yu X, *et al.* A second-generation genetic linkage map for bighead carp (*Aristichthys nobilis*) based on microsatellite markers[J]. *Animal Genetics*, 2014, 45(5): 699-708.
- [24] Shao C W, Niu Y C, Rastas P, *et al.* Genome-wide SNP identification for the construction of a high-resolution genetic map of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): Applications to QTL mapping of *Vibrio anguillarum* disease resistance and comparative genomic analysis[J]. *DNA Research*, 2015, 22(2): 161-170.
- [25] Wang W J, Hu Y L, Ma Y, *et al.* High-density genetic linkage mapping in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) based on SNP markers and major sex- and growth-related regions detection[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120410.
- [26] Wan S M, Liu H, Zhao B W, *et al.* Construction of a high-density linkage map and fine mapping of QTLs for growth and gonad related traits in blunt snout bream[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 46509.
- [27] You X X, Shu L P, Li S S, *et al.* Construction of high-density genetic linkage maps for orange-spotted

- grouper *Epinephelus coioides* using multiplexed shotgun genotyping[J]. *BMC Genetics*, 2013, 14: 113.
- [28] Ao J Q, Li J, You X X, *et al.* Construction of the high-density genetic linkage map and chromosome map of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(11): 26237-26248.
- [29] Peng W Z, Xu J, Zhang Y, *et al.* An ultra-high density linkage map and QTL mapping for sex and growth-related traits of common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26693.
- [30] Fu B D, Liu H Y, Yu X M, *et al.* A high-density genetic map and growth related QTL mapping in bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*)[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28679.
- [31] Liu H Y, Fu B D, Pang M X, *et al.* A high-density genetic linkage map and QTL fine mapping for body weight in crucian carp (*Carassius auratus*) using 2b-RAD Sequencing[J]. *G3-Genes Genomes Genetics*, 2017, 7(8): 2473-2487.
- [32] Xie M M, Ming Y, Shao F, *et al.* Restriction site-associated DNA sequencing for SNP discovery and high-density genetic map construction in southern catfish (*Silurus meridionalis*)[J]. *Royal Society Open Science*, 2018, 5(5): 172054.
- [33] Zhang G Q, Zhang X H, Ye H Z, *et al.* Construction of high-density genetic linkage maps and QTL mapping in the golden pompano[J]. *Aquaculture*, 2018, 482: 90-95.
- [34] Yue H M, Li C J, Du H, *et al.* A first attempt for genetic linkage map construction and growth related QTL mapping in *Acipenser sinensis* using Specific Length Amplified Fragment Sequencing (SLAF-seq)[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2018.
- [35] Geng X, Sha J, Liu S, *et al.* 2015 A genome-wide association study in catfish reveals the presence of functional hubs of related genes within QTLs for columnaris disease resistance[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 196.
- [36] Zheng X, Kuang Y, Lv W, *et al.* Genome-wide association study for muscle fat content and abdominal fat traits in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0169127.
- [37] Shao C, Li Q, Chen S, *et al.* Epigenetic modification and inheritance in sexual reversal of fish[J]. *Genome Research*, 2014, 24: 604-615.
- [38] You X X, Bian C, Zan Q J, *et al.* Mudskipper genomes provide insights into the terrestrial adaptation of amphibious fishes[J]. *Nature Communications*, 2014, 5.
- [39] Wu C, Zhang D, Kan M, *et al.* The draft genome of the large yellow croaker reveals well-developed innate immunity[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 5227.
- [40] Wang Y, Lu Y, Zhang Y, *et al.* The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation[J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(6): 625-31.
- [41] Lin Q, Fan S, Zhang Y, *et al.* The seahorse genome and the evolution of its specialized morphology[J]. *Nature*, 2016, 540(7633): 395-399.
- [42] Shao C W, Bao B L, Xie Z Y, *et al.* The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry[J]. *Nature Genetics*, 2017, 49(1): 119-124.
- [43] Gao Y, Gao Q, Zhang H, *et al.* Draft sequencing and analysis of the genome of pufferfish *Takifugu flavidus*[J]. *DNA Research*, 2014, 21(6): 627-637.
- [44] Xu T J, Xu G L, Che R B, *et al.* The genome of the miiuy croaker reveals well-developed innate immune and sensory systems[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21902.
- [45] Bian C, Hu Y C, Ravi V, *et al.* The Asian arowana (*Scleropages formosus*) genome provides new insights into the evolution of an early lineage of teleosts[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24501.
- [46] Pan H, Yu H, Ravi V, *et al.* The genome of the largest bony fish, ocean sunfish (*Mola mola*), provides insights into its fast growth rate[J]. *Gigascience*, 2016, 5(1): 36.
- [47] Yang J X, Chen X L, Bai J, *et al.* The *Sinocyclocheilus* cavefish genome provides insights into cave adaptation[J]. *BMC Biology*, 2016, 14: 1.
- [48] Liu K, Xu D P, Li J, *et al.* Whole genome sequencing of Chinese clearhead icefish, *Protosalanx hyalocranius*[J]. *Gigascience*, 2017, 6(4): 1-6.
- [49] Lin Q, Qiu Y, Gu R B, *et al.* Draft genome of the lined seahorse, *Hippocampus erectus*[J]. *Gigascience*, 2017, 6(6): 1-6.
- [50] Liu H, Chen C H, Gao Z X, *et al.* The draft genome of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) reveals the development of intermuscular bone and

- adaptation to herbivorous diet[J]. *GigaScience*, 2017, 6(7): 1-13.
- [51] Xu J, Bian C, Chen K C, *et al.* Draft genome of the Northern snakehead, *Channa argus*[J]. *GigaScience*, 2017, 6(4): 1-5.
- [52] Xu J, Li J T, Jiang Y L, *et al.* Genomic basis of adaptive evolution: The survival of Amur Ide (*Leuciscus waleckii*) in an extremely alkaline environment[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34(1): 145-159.
- [53] Zhang Z Y, Zhang K, Chen S Y, *et al.* Draft genome of the protandrous Chinese black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*[J]. *GigaScience*, 2018, 7(4): 1-7.
- [54] Xu S Y, Xiao S J, Zhu S L, *et al.* A draft genome assembly of the Chinese sillago (*Sillago sinica*), the first reference genome for Sillaginidae fishes[J]. *GigaScience*, 2018, 7(9).
- [55] Shao C W, Li C, Wang N, *et al.* Chromosome-level genome assembly of the spotted sea bass, *Lateolabrax maculatus*[J]. *GigaScience*, 2018, 7(11).
- [56] Liu H P, Liu Q Y, Chen Z Q, *et al.* Draft genome of *Glyptosternon maculatum*, an endemic fish from Tibet Plateau[J]. *GigaScience*, 2018, 7(9).
- [57] Gong G R, Dan C, Xiao S J, *et al.* Chromosomal-level assembly of yellow catfish genome using third-generation DNA sequencing and Hi-C analysis[J]. *GigaScience*, 2018, 7(11).
- [58] Meuwissen T H, Hayes B J, Goddard M E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps[J]. *Genetics*, 2001, 157(4): 1819-1829.
- [59] Xu J, Zhao Z, Zhang X, *et al.* Development and evaluation of the first high-throughput SNP array for common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 307.
- [60] Wang S, Meyer E, McKay JK, *et al.* 2b-RAD: a simple and flexible method for genome-wide genotyping[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(8): 808-810.
- [61] Wang S, Liu P, Lv J, *et al.* Serial sequencing of isolength RAD tags for cost-efficient genome-wide profiling of genetic and epigenetic variations[J]. *Nature Protocols*, 2016, 11(11): 2189-2200.
- [62] Dong L S, Fang M, Wang Z Y. Prediction of genomic breeding values using new computing strategies for the implementation of MixP[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 17200.
- [63] Dong L S, Xiao S J, Chen J W, *et al.* Genomic Selection Using Extreme Phenotypes and Pre-Selection of SNPs in Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2016, 18(5): 575-583.
- [64] Dong L S, Xiao S J, Wang Q R, *et al.* Comparative analysis of the GBLUP, emBayesB, and GWAS algorithms to predict genetic values in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 460.
- [65] Lu Y, Lu S, Liu F, *et al.* Genomic selection using BayesC π and GBLUP for resistance against *Edwardsiella tarda* in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2018, 20(5): 559-565.
- [66] Li H, Su G, Jiang L, *et al.* An efficient unified model for genome-wide association studies and genomic selection[J]. *Genetic Selection Evolution*, 2017, 49: 64.
- [67] Gaj T, Gersbach C A, Barbas III C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering[J]. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(7): 397-405.
- [68] Li M H, Yang H H, Li M R, *et al.* Antagonistic Roles of *dmrt1* and *foxl2* in sex differentiation via estrogen production in Tilapia as demonstrated by TALENs[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(12): 4814-4825.
- [69] Li M H, Sun Y L, Zhao J E, *et al.* A tandem duplicate of anti-Mullerian hormone with a missense SNP on the Y Chromosome is essential for male sex determination in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Plos Genetics*, 2015, 11(11).
- [70] Li M H, Feng R J, Ma H, *et al.* Retinoic acid triggers meiosis initiation via *stra8*-dependent pathway in Southern catfish, *Silurus meridionalis*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 232: 191-198.
- [71] Zhong Z M, Niu P F, Wang M Y, *et al.* Targeted disruption of *sp7* and myostatin with CRISPR-Cas9 results in severe bone defects and more muscular cells in common carp[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22953.
- [72] Dong Z J, Ge J C, Li K, *et al.* Heritable targeted inactivation of myostatin gene in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) using engineered zinc finger nucleases[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28897.

- [73] Dong Z J, Ge J C, Xu Z Q, *et al.* Generation of myostatin B knockout yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco*) using transcription activator-like effector nucleases[J]. *Zebrafish*, 2014, 11(3): 265-74.
- [74] Cui Z K, Liu Y, Wang W W, *et al.* Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 42213.
- [75] Katagiri T, Asakawa S, Hirano I, *et al.* Genomic bacterial artificial chromosome library of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Marine Biotechnology*, 2000, 2(6): 571-576.
- [76] Khorasani M Z, Hennig S, Imre G, *et al.* A first generation physical map of the medaka genome in BACs essential for positional cloning and clone-by-clone based genomic sequencing[J]. *Mechanisms of Development*, 2004, 121(7-8): 903-913.
- [77] Kingsley D M, Zhu B L, Osoegawa K, *et al.* New genomic tools for molecular studies of evolutionary change in threespine sticklebacks[J]. *Behaviour*, 2004, 141(11/12): 1331-1344.
- [78] Katagiri T, Kidd C, Tomasino E, *et al.* A BAC-based physical map of the Nile tilapia genome[J]. *BMC Genomics*, 2005, 6: 89.
- [79] Ng S H, Artieri A G, Bosdet I E, *et al.* A physical map of the genome of Atlantic salmon, *Salmo salar*[J]. *Genomics*, 2005, 86(4): 396-404.
- [80] Wang S L, Xu P, Thorsen J, *et al.* Characterization of a BAC library from channel catfish *Ictalurus punctatus*: indications of high levels of chromosomal reshuffling among teleost genomes[J]. *Marine Biotechnology*, 2007, 9(6): 701-711.
- [81] Palti Y, Luo M C, Hu Y Q, *et al.* A first generation BAC-based physical map of the rainbow trout genome[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 462.
- [82] Xia J H, Feng F, Lin G, *et al.* A first generation BAC-based physical map of the Asian seabass (*Lateolabrax japonicus*) [J]. *PLoS One*, 2010, 5(8): e11974.
- [83] Fuji K, Koyama T, Kai W, *et al.* Construction of a high-coverage bacterial artificial chromosome library and comprehensive genetic linkage map of yellowtail *Seriola quinqueradiata*[J]. *BMC Research Notes*, 2014, 7: 200.
- [84] Taboada X, Pansonato-Alves J C, Foresti F, *et al.* Consolidation of the genetic and cytogenetic maps of turbot (*Scophthalmus maximus*) using FISH with BAC clones[J]. *Chromosoma*, 2014, 123(3): 281-291.
- [85] Gonen S, Lowe N R, Cezard T, *et al.* Linkage maps of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) genome derived from RAD sequencing[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 166.
- [86] Lien S, Gidskehaug L, Moen T, *et al.* A dense SNP-based linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals extended chromosome homeologies and striking differences in sex-specific recombination patterns[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 615.
- [87] Guyomard R, Boussaha M, Krieg F, *et al.* A synthetic rainbow trout linkage map provides new insights into the salmonid whole genome duplication and the conservation of synteny among teleosts[J]. *BMC Genetics*, 2012, 13: 15.
- [88] McKinney G J, Seeb L W, Larson W A, *et al.* An integrated linkage map reveals candidate genes underlying adaptive variation in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(3): 769-783.
- [89] Li Y, Liu S K, Qin Z K, *et al.* Construction of a high-density, high-resolution genetic map and its integration with BAC-based physical map in channel catfish[J]. *DNA Research*, 2015, 22(1): 39-52.
- [90] Palaiokostas C, Bekaert M, Taggart J B, *et al.* A new SNP-based vision of the genetics of sex determination in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Genetics Selection Evolution*, 2015, 47: 68.
- [91] Waples R K, Seeb L W, Seeb J E. Linkage mapping with paralogs exposes regions of residual tetrasomic inheritance in chum salmon (*Oncorhynchus keta*)[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(1): 17-28.
- [92] Liu P, Wang L, Wong S M, *et al.* Fine mapping QTL for resistance to VNN disease using a high-density linkage map in Asian seabass[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32122.
- [93] Wang L, Wan Z Y, Bai B, *et al.* Construction of a high-density linkage map and fine mapping of QTL for growth in Asian seabass[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 16358.
- [94] Maroso F, Hermida M, Millán A, *et al.* Highly dense linkage maps from 31 full-sibling families of turbot (*Scophthalmus maximus*) provide insights into reco-

- mbination patterns and chromosome rearrangements throughout a newly refined genome assembly[J]. *DNA Research*, 2018, 25(4): 439-450.
- [95] Joshi R, Árnýasi M, Lien S, *et al.* Development and validation of 58K SNP-array and high-density linkage map in Nile tilapia (*O. niloticus*)[J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 472.
- [96] Nguyen N H, Rastas P M A, Premachandra H K A, *et al.* First high-density linkage map and single nucleotide polymorphisms significantly associated with traits of economic importance in yellowtail kingfish *Seriola lalandi*[J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 127.
- [97] Bangera R, Correa K, Lhorente K P, *et al.* Genomic predictions can accelerate selection for resistance against *Piscirickettsia salmonis* in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 121.
- [98] Odegård J, Moen T, Santi N, *et al.* Genomic prediction in an admixed population of Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Frontiers in Genetics*, 2014, 5: 402.
- [99] Robledo D, Matika O, Hamilton A, *et al.* Genome-wide association and genomic selection for resistance to amoebic gill disease in Atlantic salmon[J]. *G3-Genes Genomes Genetics*, 2018, 8(4): 1195-1203.
- [100] Tsai H Y, Hamilton A, Tinch A E, *et al.* Genomic prediction of host resistance to sea lice in farmed Atlantic salmon populations[J]. *Genetics Selection Evolution*, 2016, 48(1): 47.
- [101] Tsai H Y, Hamilton A, Tinch A E, *et al.* Genome wide association and genomic prediction for growth traits in juvenile farmed Atlantic salmon using a high density SNP array[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 969.
- [102] Vallejo R L, Leeds T D, Fragomeni B O, *et al.* Evaluation of genome-enabled selection for bacterial cold water disease resistance using progeny performance data in rainbow trout: insights on genotyping methods and genomic prediction models[J]. *Frontiers in Genetics*, 2016, 7: 96.
- [103] Palaiokostas C, Cariou S, Bestin A, *et al.* Genome-wide association and genomic prediction of resistance to viral nervous necrosis in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using RAD sequencing[J]. *Genetics Selection Evolution*, 2018, 50(1): 30.
- [104] Yano A, Guyomard R, Nicol B, *et al.* An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Current Biology*, 2012, 22(15): 1423-1428.
- [105] Edvardsen R B, Leininger S, Kleppe L, *et al.* Targeted mutagenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) using the CRISPR/Cas9 system induces complete knockout individuals in the F0 generation[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108622.
- [106] Ma L, Jeffery W R, Essner J J, *et al.* Genome editing using TALENs in blind Mexican Cavefish, *Astyanax mexicanus*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119370.
- [107] Qin Z K, Li Y, Su B F, *et al.* Editing of the luteinizing hormone gene to sterilize channel catfish, *Ictalurus punctatus*, using a modified zinc finger nuclease technology with electroporation[J]. *Marine Biotechnology*, 2016, 18(2): 255-263.
- [108] Kishimoto K, Washio Y, Yoshiura Y, *et al.* Production of a breed of red sea bream *Pagrus major* with an increase of skeletal muscle mass and reduced body length by genome editing with CRISPR/Cas9[J]. *Aquaculture*, 2018, 495: 415-427.
- [109] 陈松林. 鱼类性别控制与细胞工程育种[M]. 北京: 科学出版社, 2013.
- Chen SL. Fish Sex Control and Breeding by Cell Engineering[M]. Beijing: Scientific Press, 2013(in Chinese).
- [110] 梅洁, 桂建芳. 鱼类性别异形和性别决定的遗传基础及其生物技术操控[J]. 中国科学(生命科学), 2014, 44(12): 1198-1212.
- Mei J, Gui J F. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish[J]. *Science China (Life Science)*, 2014, 44(12): 1198-1212(in Chinese).
- [111] Xu W T, Chen S L. Genomics and genetic breeding in aquatic animals: progress and prospects[J]. *Science and Engineering*, 2017, 4(3): 305-318.

Fish genomic research: Decade review and prospect

CHEN Songlin^{1,2,3*}, XU Wenteng¹, LIU Yang¹

(1. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China;

3. Shandong Key Laboratory of Marine Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding, Qingdao 266071, China)

Abstract: This paper reviews the process of fish genomic research in China, which started with scratch and then developed from small to large. The important progress and findings regarding BAC library construction, high-density genetic linkage map construction, genome sequencing and fine mapping, genome selection and genome editing by Chinese scientists were introduced. Based on the comparison with the international progress in this field, it was pointed out that Chinese scientists followed the international research from 2008 to 2013. While from 2014 to 2018, China's fish genomic study has accelerated development and has been catching up. Just during the past five years, the top journals *Nature* and *Nature Genetics* have published several papers of genome sequencing and fine mapping in important aquatic fishes from China, such as half-smooth tongue sole, common carp, grass carp, Japanese flounder and sea horse. The progress has brought China's fish genomic research from full-scale following in the past to the present coexistence of following, running side-by-side, and even leading in some research directions and species. In the meanwhile, we summarized the current shortcomings and problems in fish genomic research and application field, and prospected the future development of aquatic genomic research in China.

Key words: fish; genomics; decade; review; prospect

Corresponding author: CHEN Songlin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31530078, 31730099); Aoshan Talents Cultivation Program Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (No.2017ASTCP-OS15); Taishan Scholar Climbing Project Fund of Shandong, China