



鱼类经济性状遗传解析及分子育种应用研究

童金苟^①, 孙效文^②

① 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;

② 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 淡水水产生物技术与遗传育种农业部重点实验室, 哈尔滨 150070

E-mail: jgtong@ihb.ac.cn

收稿日期: 2014-09-09; 接受日期: 2014-11-13

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2010CB126305)资助项目

摘要 人类需要不断改良养殖鱼类的生产性状以提供更多优质的动物蛋白. 鱼类的经济性状由多基因的数量性状位点所控制, 其中大部分基因是微效的, 但是少数基因可能具有决定性的影响. 基于近 10 年来遗传学和基因组学研究中的主要进展, 本文简要介绍和评述一些重要养殖鱼类在生长、抗病(逆)、性别等经济性状开展分子育种基础和应用研究的状况, 探讨组学和下一代测序技术在鱼类经济性状遗传解析和分子设计育种中的应用潜力. 这些研究有助于最终揭示鱼类经济性状的遗传调控机制并将相关研究成果应用于养殖鱼类目标性状的遗传改良.

关键词

养殖鱼类
经济性状
数量性状位点
主效基因
分子标记
分子育种

鱼类是人类重要的动物蛋白来源之一. 随着人民生活水平的不断提高, 人们迫切希望能培育出具有生长快、抗逆性强、饲料转化率高、优良性状的鱼类品种, 达到鱼类产量增加和效益提高的目的. 近几十年来鱼类遗传育种技术发展迅速, 育种方法从人工选择和杂交育种, 发展到分子育种等现代生物技术育种手段. 传统的选择育种是所有遗传育种方法的基础, 但是存在效率低、周期长等问题. 鱼类的一些重要经济性状, 如生长、抗病等是由多个基因控制的, 这些影响目标性状的基因被称为数量性状位点(quantitative trait locus, QTL), 其中大部分基因的作用是微效的, 但是也有少数基因可能发挥重要的调控作用, 即“主效基因”. 理论上如果能发现影响目标性状的基因或紧密连锁的遗传变异, 那么这些遗传变异就可作为辅助育种的技术手段. 利用遗传标记进行选择育种的设想早在 20 世纪 60 年代就已经被提出, 但是由于研究技术手段缺乏, 人类在很长一段时

间都不能非常有效地解析动植物经济(农艺)性状的遗传调控基础. 数量遗传学、分子遗传学、结构和功能基因组以及遗传标记技术的发展, 极大地促进了鱼类经济性状遗传调控机制的研究, 尤其是对鱼类等水产动物 QTL 的认识从无到有, 为分子育种的研究和实践奠定了良好基础.

鱼类经济性状遗传解析的手段主要包括: (i) 开发大量的分子标记; (ii) 构建中、高密度遗传图谱, 应用连锁分析进行 QTL/eQTL(expression quantitative trait locus, eQTL)定位; (iii) 应用关联分析法(association study)进行 QTL 精细定位, 包括候选基因关联分析(candidate gene association study)、分离群体法(bulked segregation analysis, BSA)、连锁不平衡分析法(linkage disequilibrium, LD)也称 LD 关联作图分析、全基因组关联分析法(genome-wide association study, GWAS)等.

分子遗传标记是鱼类经济性状遗传解析的重要

引用格式: 童金苟, 孙效文. 鱼类经济性状遗传解析及分子育种应用研究. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 1262–1271

英文版见: Tong J G, Sun X W. Genetic and genomic analyses for economic traits and their applications in molecular breeding of aquaculture fish. Sci China Life Sci, 2015, 58, in press

工具之一. 早期的同工酶等蛋白质标记不仅数量有限而且遗传变异水平低. 随后一些 DNA 分子标记如限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、随机扩增 DNA 多态性(random amplified polymorphic DNA, RAPD)和扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)被相继开发. 近十几年微卫星(microsatellite)或简单序列重复标记(simple sequence repeat, SSR)和单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)成为鱼类经济性状 QTL 定位和关联分析的主要工具, 因为这 2 种分子遗传标记具有基因组分布广泛、数量多且易于进行高通量遗传分型等优点^[1]. 分子育种概念主要是以分子标记为基础进行标记辅助选择、以转基因技术为基础进行的转基因育种以及通过计算机技术进行实施的分子设计与虚拟育种^[2]. 水产动物育种技术经过数 10 年发展已经进入基因组时代, 并朝着分子设计育种的目标迈进. 20 世纪 90 年代末, 美国、日本、挪威、加拿大、澳大利亚等国先后启动了多种水产经济动物基因组研究计划. 我国也实施了牡蛎(*Crassostrea gigas*)、扇贝(*Chlamys farreri*)、对虾(*Litopenaeus vannamei*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、大黄

鱼(*Pseudosciaena crocea*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、石斑鱼(*Epinephelus coioides*)等水产经济动物的基因组计划, 鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、鲫(*Carassius carassius*)等一批重要养殖鱼类的基因组奥秘也即将被揭示. 基因组学的发展赋予了分子育种新的内涵和意义^[3-5]. 本文概述了鱼类主要经济性状遗传解析中有关基因组学和遗传学方面的研究进展, 并讨论其在鱼类分子育种研究中的应用.

1 鱼类经济性状的遗传解析研究

1.1 遗传图谱

从 1998 年第一张罗非鱼(*Oreochromis spp.*)遗传连锁图谱发表以来^[6], 一些重要水产动物不同密度的遗传连锁图谱也相继发表, 大部分图谱都选用的是 SSR 和 SNP 标记. 随着分子标记技术的发展和各国对水产动物基因组研究投入的增加, 构建遗传连锁图谱的水产动物种类和图谱密度在不断增加. 至 2010 年, 近 30 种水产养殖动物的遗传连锁图谱被公布^[7]. 这一数字在近 4 年来又有所增加, 包括中国“四大家鱼”中的草鱼和鲢、鳙以及其他一些养殖鱼类(表 1).

表 1 养殖鱼类的高密度遗传图谱

物种	标记	标记数量	图谱密度(cM)	发表年份	连锁群数量	染色体单倍型数量	参考文献
大黄鱼 (<i>Pseudosciaena crocea</i>)	AFLP 和 SSR	375	>9	2007	24	24	[8]
草鱼 (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	SSR 和 SNP	279	4.2	2010	24	24	[9]
亚洲鲈 (<i>Lates calcarifer</i>)	SSR 和 SNP	790	3.4	2011	20	20	[10]
虹鳟 (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	SSR 和 SNP	1459	2.29	2012	29	30	[11]
牙鲆 (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	SSR	1487	1.22	2012	24	24	[12]
半滑舌鳎 (<i>Cynoglossus semilaevis</i>)	SSR	1009	1.67	2012	21	21	[13]
大菱鲆 (<i>Scophthalmus maximus</i>)	SSR 和 SNP	487	3.3	2013	24	22	[14]
罗非鱼 (<i>Oreochromis spp</i>)	SSR	401	3.3	2013	22	22	[15]
鲢 (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	SSR	703	2.2	2013	24	24	[16]
鲤 (<i>Cyprinus carpio</i>)	SSR 和 SNP	1209	3.5	2013	50	50	[17]
鳙 (<i>Aristichthys nobilis</i>)	SSR	659	2.9	2014	24	24	[18]
斑点叉尾鲷 (<i>Ictalurus punctatus</i>)	SNP	62870	0.4	2014	29	29	[19]
大西洋鲑 (<i>Salmo salar</i>)	SNP	6458	—	2014	29	29	[20]

1.2 生长性状 QTL 定位

快速生长是水产养殖动物最有价值的性状之一。据 2012 年的不完全统计, 已有超过 20 种水产动物开展了经济性状 QTL 定位研究^[7], 其中生长是被研究最多的性状。Wang 等人^[21]利用 380 个亚洲鲈 F_1 子代定位了 5 个主效 QTL 及 27 个微效 QTL, 其中体重、全长和体长的 3 个主效 QTL 被定位于 2 号连锁群的 Lca287 标记附近, 可解释的表型变异分别为 28.8%, 58.9% 和 59.7%; 另外 2 个体重主效 QTL 分别被定位于 2 号连锁群的其他位置。上述 5 个 QTL 在另外 2 个亚种鲈群体中得到验证^[22]。最近 Wang 等人^[10]对亚洲鲈进行了生长 QTL 精细定位, 从 QTL 区间鉴定出 3 个候选主效基因(*Cathepsin D*, *KCTD15*, *csmd2*); 其中 *Cathepsin D* 在人类的同源基因是细胞增殖和细胞生长的重要调控基因, 因此该基因可能也是亚洲鲈生长的主效基因之一。O'malley 等人^[23]定位了虹鳟体重相关 QTL 位点, 分布于 10 个连锁群。Wringe 等人^[24]使用更多虹鳟回交家系和 SSR 标记对 O'malley 的结果进行了验证, 并挖掘出几个影响生长的候选主效基因(如生长激素 2 和 *Pax7* 基因等)。Reid 等人^[25]在大西洋鲑的 2 个连锁群上定位了体重 QTL, 经比较发现它们与虹鳟的生长 QTL 同源。Houston 等人^[26]在大西洋鲑 LG1 和 LG5 上定位了体重相关 QTL, 而 Gutierrez 等人^[27]进一步用 6.5 k SNP 芯片在 6 个连锁群上发现了基因组水平显著相关的体重 QTL。Cnaani 等人^[28,29]先后利用罗非鱼 F_2 群体在 LG23 上定位了与生长相关的 QTL, 该连锁群上后来也定位了性别决定基因。Song 等人^[12]利用 1487 个 SSR 标记在牙鲆第 14 号连锁群上精确定位了体重和体长的 QTL。

利用候选基因关联分析法发掘生长相关基因已有一些鱼类中有所报道。Tao 和 Boulding^[30]发现红点鲑(*Salvelinus alpinus*)*GH* 多态性与其生长速率显著相关。Li 等人^[31]在 *IGF-1* 基因 5'非翻译区(untranslated region, UTR)区发现与大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)生长相关的 SNP。Sun 等人^[32]发现 *MSTN* 外显子 3 的 2 个 SNP 与鲤体重和肥满度呈显著或极显著性相关, Liu 等人^[33]也在鳊 *MSTN* 3'UTR 区发现 1 个 SNP 与全长、体长和体重均有极显著相关性。

1.3 抗病相关 QTL 定位

病害对水产动物的养殖和效益有重要影响。如

传染性造血组织坏死病(infectious hematopoietic necrosis, IHN)是北半球鲑科鱼常见的急性病毒性传染病, 常造成鱼苗或幼鱼 70%~100% 的死亡率。发掘与抗病紧密相关的分子标记, 可以为水产动物抗病品系的分子标记辅助育种提供理论依据。Rodriguez 等人^[34]利用硬头鳟(*Salmo gairdneri*)和虹鳟的杂种与虹鳟回交产生的 70 个家系(backcross, BC_1)进行 IHN 病毒感染, 表型性状分为 1(感染后死亡)和 0(感染后存活)2 种, 经过分离群体分析筛选到 6 个 SSR 标记与 IHN 病毒抗性有关。Ozaki 等人^[35]等用分布于虹鳟所有连锁群上的 51 个 SSR 标记在一个回交家系中进行 QTL 分析, 在 21 号连锁群发现与抗胰腺坏死病相关的 2 个 QTL 位点。Baerwald 等人^[36]利用 143 个 SSR 和 AFLP 标记在一个较大的虹鳟 F_2 家系($n=480$)中发现与幼鲑旋转病相关的 1 个 QTL 位于染色体 Omy9 上, 且该 QTL 在另外 3 个家系中得到验证。多个研究者先后报道了大西洋鲑抗胰腺坏死病相关的 QTL 作图研究, 大部分结果显示, 该鱼的抗性 QTL 也主要位于 21 号连锁群上^[37~40], 这表明虹鳟和大西洋鲑的抗胰腺坏死病的遗传控制机制可能具有进化保守性。大西洋鲑抗 IHN 相关 QTL 的遗传效应已在其他研究中得到验证^[41]。Fuji 等人^[42]利用一个分离群体将淋巴囊肿抗性 QTL 定位于牙鲆 15 号连锁群上, 可解释的抗性表型变异达 50%。进一步的分析表明, 1 个 SSR 位点的等位基因与抗淋巴囊肿表型紧密相关^[43]。

在免疫相关基因中也找到与鱼类抗病相关的分子标记。例如, Palti 等人^[44]在虹鳟发现 *MHCII* 等位基因多态性与 IHN 抗性显著相关。Zhang 等人^[45]和 Xu 等人^[46]通过比较鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)抗病群体和感染群体 *MHCII* 型基因的多态性, 筛选到与牙鲆抗病相关的分子标记。

1.4 饲料转化相关 QTL 定位

饲料转化率是鱼类的重要经济性状之一, 提高饲料转化率即是提高养殖效益。与饲料转化率相关的 QTL 定位研究主要在牛(*Bos taurus*)^[47]、猪(*Sus scrofa*)^[48]和鸡(*Gallus gallus*)^[49]等动物中被报道。在生长激素受体(growth hormone receptor, *GHR*)、神经肽 Y(*neuropeptide Y*, *NPY*)、解偶联蛋白 2(*uncoupling proteins 2*, *UCP2*)、脑肠肽(*ghrelin*, *GHRL*)和胰岛素样生长因子 2(*insulin-like growth factor 2*, *IGF-2*)等基因中都发现有 SNP 能显著影响牛的饲料转化率^[50]。

Liu^[51]利用 AFLP 标记构建了斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)图谱, 并得到了控制斑点叉尾鲷饲料转化率的 QTL 位点. Zimmerman 等人^[52]在虹鳟的 3 个连锁群上定位了与幽门盲囊数量相关的 3 个 QTL, 而幽门盲囊数是反映饲料转化效率的重要指标之一. 尽管最近有鲤饲料转化率 QTL 的初步研究^[53], 总体上目前国内外对养殖鱼类饲料转化率多基因决定机制的遗传解析仍非常欠缺.

1.5 性别决定相关 QTL 定位

鱼类的性别表型和性别决定具有特殊的进化地位和多样性. 在一些鱼类中雌、雄个体有很大的生长速度或附加值差异, 故单性育种和养殖的前景良好. 已有一些鱼类中开展了性别决定 QTL 研究, 如罗非鱼^[54]、虹鳟^[55]、鲑科鱼类^[56]等. 前期多个研究结果表明, 罗非鱼性别 QTL 可能位于 1, 2, 3, 6 和 23 号连锁群上^[29,54,57]. Eshel 等人^[58,59]在罗非鱼 LG23 上发现 1 个性别决定相关的主效 QTL 位点, 该位点被认为是性别决定区域; 在该 QTL 区间发现 51 个注释基因, 对其中 10 个基因进行定量分析验证, 最终发现抗穆氏管激素(anti-Müllerian hormone, *Amh*)在雌雄性别中的表达差异最大. Sun 等人^[60]最近发表了多个尼罗罗非鱼性别特异性分子标记, 其中一个标记与 LG23 上 Eshel 等人发现的性别决定区(SD)紧密连锁. 从上述结果推断, 罗非鱼可能有 2 个以上性别决定区, 目前看来 23 号染色体上的性别决定区的证据较充分. 虹鳟的性别决定位点被定位在 RT18 连锁群^[61], 且该位点也显著地影响虹鳟的耐热性和体长^[62]. 北极红点鲑(*Salvelinus alpinus*)^[63]、褐鳟(*Salmo trutta*)^[64]和大西洋鲑^[65]的性别决定位点分别被定位在 AC4, BT28 和 AS1 连锁群上. Woram 等人^[66]比较了上述 4 种鲑亚科鱼类的性别决定位点所在的连锁群, 发现性别决定位点附近的标记序列虽然在 4 种鱼类中比较保守, 但是标记所在的连锁群却多样化, 表明性别决定区域经过了重组. Loukovitis 等人^[67]在金头鲷第 21 号连锁群定位了生长和性别决定 QTL, 表明在该鱼中这 2 个性状之间的遗传调控具相似的染色体定位. Martínez 等人^[68]将大菱鲆性别决定 QTL 定位在 LG5 上, 并推断出该鱼是 ZW/ZZ 性别决定机制. Viñas 等人^[69]同样将性别决定主效 QTL 定位在大菱鲆的 LG5 上. 种种证据表明, 鲆的性别决定基因很可能就在第 5 号染色体上. Song 等人^[13]以高密度遗传图谱为基础定位了

半滑舌鳎 7 个性别 QTL, 它们分别位于 LG1f, 14f 和 LG1m 上. Chen 等人^[70]通过基因组测序揭示了半滑舌鳎的 Z 和 W 性别染色体的进化机制, 并鉴定出一批性别决定基因(*dmrt1* 和 *neurl3* 等), 为鱼类基因组学、性别决定基因鉴定和性别调控机制等方面的研究提供了重要参考.

1.6 抗逆相关 QTL 定位

最近的实验证据提示, 一些鱼类可能携带有足够的遗传变异来适应温度和盐度等环境的变化, 例如, 棘鱼类耐寒性状可能受到强烈的选择^[71]. 当降至最适温度以下, 罗非鱼生长速度也会明显下降甚至休克、死亡. Cnaani 等人^[28]利用莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)与奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)杂交子二代家系在 LG23 连锁群上定位了一个与耐低温和个体大小相关的标记. Moen 等人^[72]证实, 在罗非鱼 LG23 号上存在耐寒相关的 QTL. 冷水性的虹鳟对高温环境的耐受能力较差, Jackson 等人^[73]将耐高温 QTL 定位在虹鳟 2 个连锁群上并获得紧密连锁的 2 个分子标记. Danzmann 等人^[74]进一步发现 1 个微卫星标记 *Ssa20.19NUIG* 与虹鳟耐高温性状极显著相关, 且得到 Perry 等人^[75]的证实. Perry 等人^[62]随后又发现虹鳟性别标记与体长和耐高温性均显著相关. Sun 和 Liang^[76]将 1 个与耐寒性状连锁的标记定位到鲤 LG5 上. Rengmark 等人^[77]在罗非鱼中鉴定出耐高盐相关的基因. Norman 等人^[78]比较了鲑鳟鱼类基因组中耐盐 QTL 的位置, 发现大西洋鲑、北极红点鲑和虹鳟耐盐 QTL 分布于 9 个连锁群上.

2 鱼类分子育种研究的应用与探讨

2.1 鱼类分子标记辅助育种研究进展

近年来已有许多水产动物遗传育种学者开始利用基因或分子标记作为工具进行亲本选择等分子育种研究^[4]. 鲤是世界性的重要养殖鱼类, 也是中国最重要的养殖对象之一. 利用亲本间的分子遗传结构计算雌雄亲本的遗传距离, 根据遗传距离设计的镜鲤繁殖配组方案, 得到了很好的选育结果. 在鲤、鳊等鱼类中已经证实主效基因优势基因型的富集数量与生长性状的正相关关系, 基于 QTL 研究结果在纺锤型镜鲤和长型鲤选育研究中也较好成效^[4]. 以鲤

为主要研究对象所建立的多位点聚合育种技术, 为鱼类分子育种技术体系的建立奠定了基础(图 1)。

关于鱼类抗病分子育种, 尽管多数研究目前还未见实际效果, 但相关研究已在少数水产动物中卓有成效。例如, Fuji 等人^[42]所发现的与抗淋巴瘤肿瘤紧密连锁的 1 个 SSR 等位基因, 已大范围地应用于抗淋巴瘤肿瘤牙鲈品种选育和苗种商业生产和养殖中^[43]。

利用碘泡虫病抗性相关的 MHC 等位基因为标记的银鲫(*Carassius auratus gibelio*)抗病分子育种研究已取得良好进展^[79]。利用 BSA 方法和 QTL 作图鉴定的抗鳃弧菌抗病相关标记开展牙鲈病抗病分子标记辅助选育的研究进展良好^[80,81]。

性别特异的分子标记已在一些雌雄差异较大的养殖鱼类育种中得到应用。基于人工雌核发育、人工

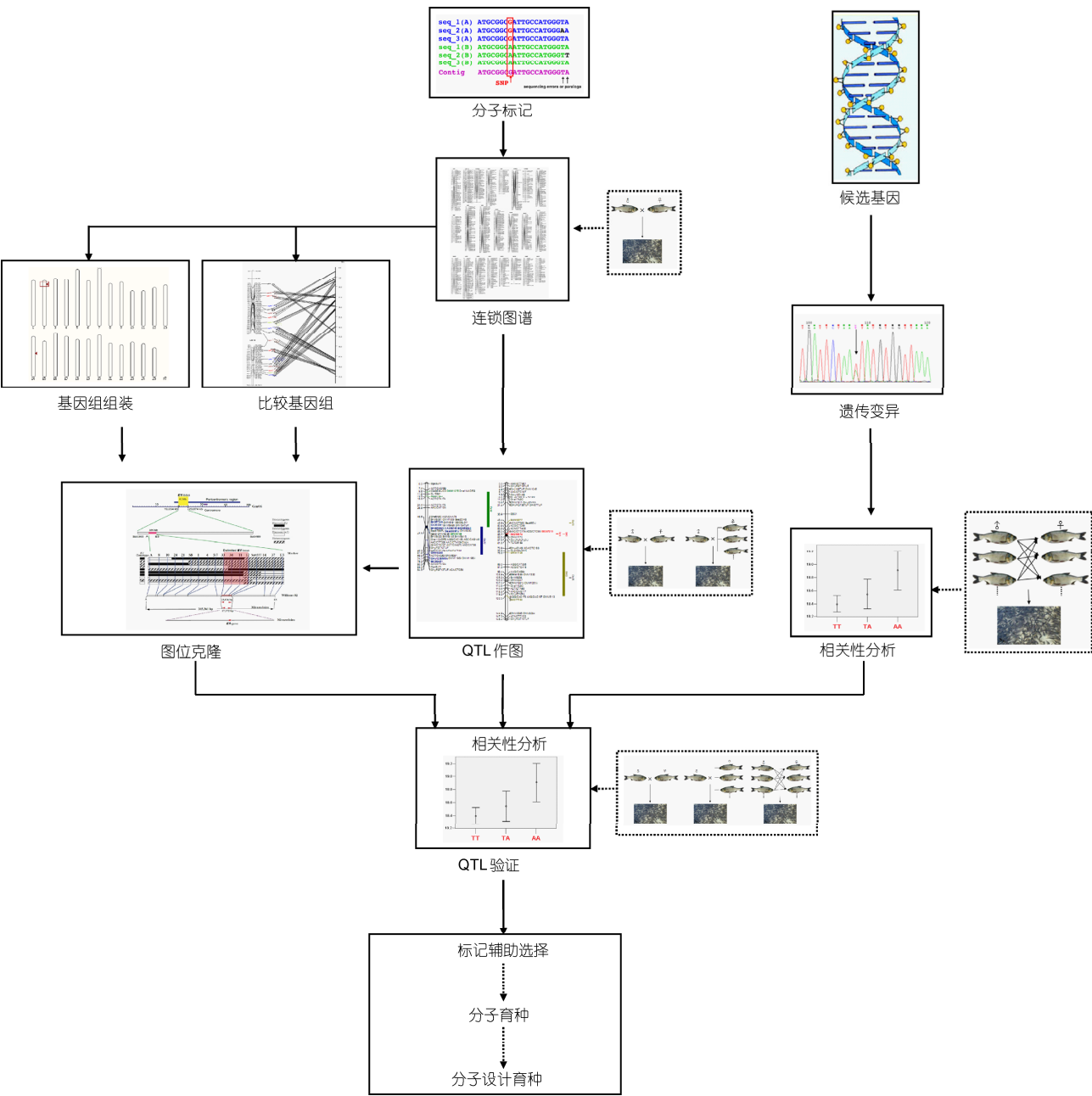


图 1 鱼类分子育种技术的研究策略示意图

性转化和 X 和 Y 染色体性别分子标记克隆分离等技术路线的结合, 开发了 YY 超雄黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)培育方法, 培育的“黄颡鱼全雄 1 号”已被应用于商品化生产^[82-84]. Chen 等人^[85,86]鉴定出半滑舌鲷的雌性特异 AFLP 标记和性别连锁微卫星标记, 使雌性鱼在生长早期就能够被鉴定出来. 尼罗罗非鱼的性别决定位点和分子标记的定位结果已基本得到确认^[59,60], 其性别标记辅助育种的商业化应用可能为期不远.

2.2 鱼类分子育种研究发展方向的探讨

作为高蛋白的健康食物, 水产品已得到人类的广泛关注与认同, 近年来世界水产品的消耗量逐年上升. 目前人类对水产品的需求主要依赖于人工养殖, 如草鱼、鲢、鳙、鲤、鲫、虹鳟、罗非鱼及沟鲈等养殖鱼类约占全世界养殖鱼类总量的 2/3. 然而, 经过多年的人工繁殖和人工养殖, 许多养殖种类出现了个体小型化、抗逆性下降、病害日益频繁等现象, 迫切需要进行选育和遗传改良. 目前为止, 已对超过 60 种鱼类和贝类进行了选育研究, 选育性状主要集中在生长相关的体质量性状, 抗病和抗逆性状也受到较多关注. 但是其他一些经济性状, 如饲料转化率、品质(如肌间刺)等, 可能由于性状表型观察和测量较困难等原因, 目前在鱼类中的报道还很少. 希望鱼类遗传育种学者更加关注这些重要的经济性状, 对其进行深入的遗传解析, 为更好地改良鱼类的综合经济性状提供理论和技术基础.

半滑舌鲷和鲤的全基因组测序和基因组组装已经由中国水产科学研究院完成^[70,87]. 在中国水产科学研究院黑龙江水产研究所和中国科学院水生生物研究所等单位共同努力下, 在各类鲤品系和群体中获得生长相关的 QTL 和分子标记达上百个之多, 也发掘了鲤免疫和抗病以及耐寒相关的基因与分子标记. 半滑舌鲷性别决定和生长性状相关 QTL 已得到定位, 加上性别染色体序列的测序组装完成, 为半滑舌鲷分子育种和单性育种的研究与应用奠定了坚实基础. 也有不少国外学者集中在鲑鳟鱼类和牙鲆等少数养殖种类中的 QTL 定位报道, 但 QTL 精细定位的研究报道还比较少. QTL 分析一般把影响性状的位点定位在连锁群的某一区间, 当然与这些区间紧密连锁的分子标记可直接用于分子辅助育种; 但更精细的方法是需要挖掘位于 QTL 区间内的基因, 然后

在群体内寻找基因内的 SNP, 最后利用这些 SNP 标记用于分子标记辅助育种上, 实现从 QTL 到 QTN(quantitative trait nucleotide)转移^[88]. 一般认为, 在置信区间内可作为影响目标性状的候选基因应符合以下条件: (i) 该基因的生理功能已经被发现, 并且被认为是影响目标性状的因素之一; (ii) 在其他物种中该基因有过转基因或基因敲除等基因功能方面的研究; (iii) 该基因能够在影响目标性状的组织器官中大量表达; (iv) 该基因在机体发育的整个时期都参与影响目标性状的调控. 发掘出影响目标性状的候选基因之后还要继续进行验证, 只有经过验证的基因变异位点才可以作为主效基因分子标记用于分子育种或分子设计育种.

基于连锁分析的 QTL 区间作图等定位分析方法虽然能在鱼类全基因组范围检测目标性状的 QTL 位点, 但它们一般使用家系材料, 有可能使得 QTL 研究结果在其他群体中不容易得到验证. 连锁不平衡定位一般以自然群体为材料, 且同时可用作许多性状的 QTL 定位分析. LD 作图是一种基于 LD 将遗传变异与目标性状表型建立关联性的技术, 具有更广泛的遗传变异和分辨率较高等优势^[89]. 连锁不平衡分析是对基因(或已定位的高分辨率 QTL)的功能进行鉴定的有效方法. DNA 测序技术和高通量 SNP 分析技术的发展, 使利用该方法进行优异基因的发掘成为了可能. 性别决定、抗病(抗逆)和生长等性状, 在一些鱼类中可能是在相同或临近的 QTL 区域. 因此要加强对那些具有多种性状遗传效应的 QTL 区域的精细解析, 利用 LD 关联分析和比较基因组分析等手段从各种育种材料中发掘优异基因和等位变异用于分子育种研究.

对于尚无连锁图谱或连锁图谱密度较低的物种, 利用候选基因关联分析^[90]和 BSA 也是快速获得与目标性状基因连锁分子标记的有效方法. 在水产动物中利用 BSA 法定位性别和抗病基因标记的研究已有报道^[34,91], 但利用 BSA 法发掘生长等性状的基因和相关标记的研究还较少. 今后应加强 BSA 技术在 eQTL 和生长等性状基因标记的发掘研究, 尤其是 BSA 法与高通量测序方法的结合使用.

GWAS 技术是发掘性状相关基因和等位变异的重要手段之一. 由于 GWAS 的开展有赖于物种全基因组范围大量分子标记的开发和分型, 且目前重测序成本还很高, 因此目前利用 GWAS 对复杂性状进

行遗传解析的报道还主要集中在人类。值得庆幸的是, 多种重要养殖鱼类的全基因组测序已经完成或正接近完成, 相信在不久的将来, 随着重测序成本的进一步降低, GWAS 方法将会逐步应用于鱼类重要经济性状的解析中。

随着影响目标性状的遗传变异的大量发现, 近 10 年来科学家提出分子设计育种的概念。分子设计育种就是整合存在不同品种中的有利基因和遗传变异, 为农业生产提供新品种^[2]。中国科学院学者也提出了“分子模块设计育种”的新型育种理念, 以期建立面向未来的新一代生物育种技术。分子设计或分

子模块设计育种是基于生物大分子三维结构的分子对接、分子模拟以及分子设计技术, 通过计算机分析、整合、筛选和模拟选出最佳育种方案或途径, 即品种的虚拟设计育种^[92]。在水稻(*Oryza sativa* L.)、小麦(*Triticum aestivum* L.)等主要农作物中已经率先启动了分子设计育种研究, 旨在通过培育出产量和抗性较高的超级品种。随着鱼类基因组学的发展、大量 QTL 定位结果和等位变异的发掘与验证, 在各种组学信息和分子模块元件不断丰富的基础上, 中国经济鱼类分子设计育种实践的前景光明, 在不久的将来取得育种成效也是完全可预期的。

致谢 感谢中国科学院水生生物研究所冯秀、王新华和付北德以及中国水产科学研究院黑龙江水产研究所张晓锋等人在写作中的帮助。

参考文献

- 1 Liu Z J, Cordes J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 2004, 238: 1–37
- 2 Peleman J D, van der Voort J R. Breeding by design. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 330–334
- 3 Varshney R K, Graner A, Sorrells M E. Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends Plant Sci*, 2005, 10: 621–630
- 4 孙效文. 鱼类分子育种学. 北京: 海洋出版社, 2010
- 5 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
- 6 Kocher T D, Lee W J, Sobolewska H, et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics*, 1998, 148: 1225–1232
- 7 Yue G H. Recent advances of genome mapping and marker-assisted selection in aquaculture. *Fish Fish*, 2014, 15: 376–396
- 8 Ning Y, Liu X, Wang Z Y, et al. A genetic map of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture*, 2007, 264: 16–26
- 9 Xia J H, Liu F, Zhu Z Y, et al. A consensus linkage map of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on microsatellites and SNPs. *BMC Genomics*, 2010, 11: 135
- 10 Wang C M, Bai Z Y, He X P, et al. A high-resolution linkage map for comparative genome analysis and QTL fine mapping in Asian seabass, *Lates calcarifer*. *BMC Genomics*, 2011, 12: 174
- 11 Palti Y, Genet C, Gao G, et al. A second generation integrated map of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) genome: analysis of conserved synteny with model fish genomes. *Mar Biotechnol*, 2012, 14: 343–357
- 12 Song W, Pang R, Niu Y, et al. Construction of high-density genetic linkage maps and mapping of growth-related quantitative trait loci in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *PLoS One*, 2012, 7: e50404
- 13 Song W, Li Y, Zhao Y, 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*). *PLoS One*, 2012, 7: e52097
- 14 Hermida M, Bouza C, Fernández C, et al. Compilation of mapping resources in turbot (*Scophthalmus maximus*): a new integrated consensus genetic map. *Aquaculture*, 2013, 414: 19–25
- 15 Liu F, Sun F, Li J, et al. A microsatellite-based linkage map of salt tolerant tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis* spp.) and mapping of sex-determining loci. *BMC genomics*, 2013, 14: 58
- 16 Guo W, Tong J, Yu X, et al. A second generation genetic linkage map for silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) using microsatellite markers. *Aquaculture*, 2013, 412: 97–106
- 17 Zhao L, Zhang Y, Ji P, et al. A dense genetic linkage map for common carp and its integration with a BAC-based physical map. *PLoS One*, 2013, 8: e63928
- 18 Zhu C, Tong J, Yu X, et al. A second-generation genetic linkage map for bighead carp (*Aristichthys nobilis*) based on microsatellite markers. *Anim Genet*, 2014, 45: 699–708

- 19 Li Y, Liu S, Qin Z, et al. A high-density genetic linkage map of channel catfish for the assembly of reference whole genome sequences. Plant and Animal Genome XXII Conference. San Diego: Scherago International, 2014
- 20 Gonen S, Lowe N R, Cezard T, et al. Linkage maps of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) genome derived from RAD sequencing. BMC Genomics, 2014, 15: 166
- 21 Wang C M, Lo L C, Zhu Z Y, et al. A genome scan for quantitative trait loci affecting growth-related traits in an F₁ family of Asian seabass (*Lates calcarifer*). BMC Genomics, 2006, 7: 274
- 22 Wang C M, Lo L C, Feng F, et al. Identification and verification of QTL associated with growth traits in two genetic backgrounds of Barramundi (*Lates calcarifer*). Anim Genet, 2008, 39: 34–39
- 23 O'malley K G, Sakamoto T, Danzmann R G, et al. Quantitative trait loci for spawning date and body weight in rainbow trout: testing for conserved effects across ancestrally duplicated chromosomes. J Hered, 2003, 94: 273–284
- 24 Wringe B F, Devlin R H, Ferguson M M, et al. Growth-related quantitative trait loci in domestic and wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). BMC Genet, 2010, 11: 63
- 25 Reid D P, Szanto A, Glebe B, et al. QTL for body weight and condition factor in Atlantic salmon (*Salmo salar*): comparative analysis with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Heredity, 2004, 94: 166–172
- 26 Houston R D, Bishop S C, Hamilton A, et al. Detection of QTL affecting harvest traits in a commercial Atlantic salmon population. Anim Genet, 2009, 40: 753–755
- 27 Gutierrez A P, Lubieniecki K P, Davidson E A, et al. Genetic mapping of quantitative trait loci (QTL) for body-weight in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using a 6.5 K SNP array. Aquaculture, 2012, 358: 61–70
- 28 Cnaani A, Hallerman M, Ron E M, et al. Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F₂ tilapia hybrid. Aquaculture, 2003, 223: 117–128
- 29 Cnaani A, Zilberman N, Tinman S, et al. Genome-scan analysis for quantitative trait loci in an F₂ tilapia hybrid. Mol Genet Genomics, 2004, 272: 162–172
- 30 Tao W J, Boulding E G. Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). Heredity, 2003, 91:60–69
- 31 Li X H, Bai J J, Ye X, et al. Polymorphisms in the 5' flanking region of the insulin-like growth factor I gene are associated with growth traits in largemouth bass *Micropterus salmoides*. Fish Sci, 2009, 75: 351–358
- 32 Sun Y H, Yu X, Tong J. Polymorphisms in myostatin gene and associations with growth traits in common carp. Int J Mol Sci, 2012, 13: 14956–14961
- 33 Liu L, Yu X, Tong J. Molecular characterization of myostatin (*MSTN*) gene and association analysis with growth traits in the bighead carp (*Aristichthys nobilis*). Mol Biol Rep, 2012, 39: 9211–9221
- 34 Rodriguez M F, LaPatra S, Williams S, et al. Genetic markers associated with resistance to infectious hema topoietic necrosis in rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) backcrosses. Aquaculture, 2004, 241: 93–115
- 35 Ozaki A, Sakamoto T, Khoo S, et al. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mol Genet Genomics, 2001, 265: 23–31
- 36 Baerwald M R, Petersen J L, Hedrick R P, et al. A major effect quantitative trait locus for whirling disease resistance identified in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Heredity, 2011, 106: 920–926
- 37 Moen T, Baranski M, Sonesson A K, et al. Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait. BMC Genomics, 2009, 10: 368
- 38 Houston R D, Guy D R, Hamilton A, et al. Mapping QTL affecting resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, 2007, 272: S269
- 39 Houston R D, Haley C S, Hamilton A, et al. Major quantitative trait loci affect resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Genetics, 2008, 178, 1109–1115
- 40 Houston R D, Haley C S, Hamilton A, et al. The susceptibility of Atlantic salmon fry to freshwater infectious pancreatic necrosis is largely explained by a major QTL. Heredity, 2009, 105: 318–327
- 41 Gheyas A A, Haley C S, Guy D R, et al. Effect of a major QTL affecting IPN resistance on production traits in Atlantic salmon. Anim Genet, 2010, 41: 666–668
- 42 Fuji K, Kobayashi K, Hasegawa O, et al. Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture, 2006, 254: 203–210
- 43 Fuji K, Hasegawa O, Honda K, et al. Marker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture, 2007, 272: 291–295
- 44 Palti Y, Nichols K M, Waller K I, et al. Association between DNA polymorphisms tightly linked to MHC class II genes and IHN virus

- resistance in backcrosses of rainbow and cutthroat trout. *Aquaculture*, 2001, 194: 283–389
- 45 Zhang Y X, Chen S L, Liu Y G, et al. Major histocompatibility complex class IIB allele polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mar Biotechnol*, 2006, 8: 600–610
- 46 Xu T J, Chen S L, Zhang Y X. MHC class II α gene polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Dev Comp Immunol*, 2010, 34: 1042–1050
- 47 Nkrumah J D, Sherman E L, Li C, et al. Primary genome scan to identify putative quantitative trait loci for feedlot growth rate, feed intake, and feed efficiency of beef cattle. *J Anim Sci*, 2007, 85: 3170–3181
- 48 Houston R D, Haley C S, Archibald A L, et al. A QTL affecting daily feed intake maps to Chromosome 2 in pigs. *Mamm Genome*, 2005, 16: 464–470
- 49 Van Kaam J B, Groenen M A, Bovenhuis H, et al. Whole genome scan in chickens for quantitative trait loci affecting growth and feed efficiency. *Poultry Sci*, 1999, 78: 15–23
- 50 Sherman E L, Nkrumah J D, Murdoch B M, et al. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. *J Anim Sci*, 2008, 86: 1–16
- 51 Liu Z J. Gene mapping, marker-assisted selection, gene cloning, genetic engineering and integrated genetic improvement programs at Auburn University. In: Gupta MV, Acosta BO, eds. *Fish Genetics Research in Member Countries and Institutions of the International Network on Genetics in Aquaculture*. Penang: ICLARM Conf, Proc, 2001, 64: 179
- 52 Zimmerman A M, Wheeler P A, Ristow S S, et al. Composite interval mapping reveals three QTL associated with pyloric caeca number in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 2005, 247: 85–95
- 53 王宣朋, 张晓峰, 李文升, 等. 鲤饲料转化率性状的 QTL 定位及遗传效应分析. *水生生物学报*, 2012, 36: 177–196
- 54 Lee B Y, Hulata G, Kocher T D. Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*). *Heredity*, 2004, 92: 543–549
- 55 Alfaqih M A, Brunelli J P, Drew R E, et al. Mapping of five candidate sex-determining loci in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genet*, 2009, 10: 2
- 56 Davidson W S, Huang T K, Fujiki K, et al. The sex determining loci and sex chromosomes in the family salmonidae. *Sex Dev*, 2009, 3: 78–87
- 57 Cnaani A, Lee B Y, Zilberman N, et al. Genetics of sex determination in tilapiine species. *Sex Dev*, 2008, 2: 43–54
- 58 Eshel O, Shirak A, Weller J I, et al. Fine-mapping of a locus on linkage group 23 for sex determination in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Anim Genet*, 2011, 42: 222–224
- 59 Eshel O, Shirak A, Weller J, et al. Linkage and physical mapping of sex region on LG23 of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *G3 (Bethesda)*, 2012, 2: 35–42
- 60 Sun Y L, Jiang D N, Zeng S, et al. Screening and characterization of sex-linked DNA markers and marker-assisted selection in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 2014, 433: 19–27
- 61 Sakamoto T, Danzmann R G, Gharbi K, et al. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics*, 2000, 155: 1331–1345
- 62 Perry G M L, Ferguson M M, Sakamoto T, et al. Sex-linked quantitative trait loci for thermotolerance and length in the rainbow trout. *J Hered*, 2005, 96: 97–107
- 63 Moghadam H K, Poissant J, Fotherby H, et al. Quantitative trait loci for body weight, condition factor and age at sexual maturation in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): comparative analysis with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mol Genet Genomics*, 2007, 277: 647–661
- 64 Gharbi K, Gautier A, Danzmann R G, et al. A linkage map for brown trout (*Salmo trutta*): chromosome homeologies and comparative genome organization with other salmonid fish. *Genetics*, 2006, 172: 2405–2419
- 65 Gilbey J, Verspoor E, McLay A, et al. A microsatellite linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Anim Genet*, 2004, 35: 98–105
- 66 Woram R A, Gharbi K, Sakamoto T, et al. Comparative genome analysis of the primary sex-determining locus in salmonid fishes. *Genome Res*, 2003, 13: 272–280
- 67 Loukovitis D, Sarropoulou E, Tsigenopoulos C S, et al. Quantitative trait loci involved in sex determination and body growth in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) through targeted genome scan. *PLoS One*, 2011, 6: e16599
- 68 Martínez P, Bouza C, Hermida M, et al. Identification of the major sex-determining region of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genetics*, 2009, 183: 1443–1452
- 69 Viñas A, Taboada X, Vale L, et al. Mapping of DNA sex-specific markers and genes related to sex differentiation in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mar Biotechnol*, 2012, 14: 655–663
- 70 Chen S, Zhang G, Shao C, 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
- 71 Barrett R D, Paccard A, Healy T M, et al. Rapid evolution of cold tolerance in stickleback. *Proc Biol Sci*, 2011, 278: 233–238
 - 72 Moen T, Agresti J J, Cnaani A, et al. A genome scan of a four-way tilapia cross supports the existence of a quantitative trait locus for cold tolerance on linkage group 23. *Aquac Res*, 2004, 35: 893–904
 - 73 Jackson T R, Ferguson M M, Danzmann R G, et al. Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families. *Heredity*, 1998, 80: 143–151
 - 74 Danzmann R G, Jackson T R, M Ferguson M. Epistasis in allelic expression at upper temperature tolerance QTL in rainbow trout. *Aquaculture*, 1999, 173: 45–58
 - 75 Perry G M L, Danzmann R G, Ferguson M M, et al. Quantitative trait loci for upper thermal tolerance in outbred strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Heredity*, 2001, 86: 333–341
 - 76 Sun X W, Liang L Q. A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and mapping of a locus associated with cold tolerance. *Aquaculture*, 2004, 238: 165–172
 - 77 Rengmark A H, Slettan A, Lee W J, et al. Identification and mapping of genes associated with salt tolerance in tilapia. *J Fish Biol*, 2007, 71: 409–422
 - 78 Norman J D, Robinson M, Glebe B, et al. Genomic arrangement of salinity tolerance QTLs in salmonids: a comparative analysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) with Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics*, 2012, 13: 420
 - 79 Zhai Y H, Zhou L, Wang Y, et al. Proliferation and resistance difference of a liver-parasitized myxosporean in two different gynogenetic clones of gibel carp. *Parasitol Res*, 2014, 113: 1331–1341
 - 80 Xu T J, Chen S L, Ji X S, et al. MHC polymorphism and disease resistance to *Vibrio anguillarum* in 12 selective Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25: 213–221
 - 81 Wang L, Fan C, Liu Y, et al. A genome scan for quantitative trait loci associated with *vibrio anguillarum* infection resistance in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by bulked segregant analysis. *Mar Biotechnol*, 2014, 16: 513–521
 - 82 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
 - 83 Liu H Q, Guan B, Xu J, et al. Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale breeding of YY super-male and XY all-male yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson)). *Mar Biotechnol*, 2013, 15: 321–328
 - 84 Dan C, Mei J, Wang D, Gui J F. 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
 - 85 Chen S L, Li J, Deng S P, et al. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Mar Biotechnol*, 2007, 9: 273–280
 - 86 Chen S L, Ji X S, Shao C W, et al. Induction of mitogynogenetic diploids and identification of WW super-female using sex-specific SSR markers in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Mar Biotechnol*, 2012, 14: 120–128
 - 87 Xu P, Zhang X, Wang X, et al. Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Nat Genet*, 2014, 46: 1212–1219
 - 88 Ron M, Weller J I. From QTL to QTN identification in livestock—winning by points rather than knock-out: a review. *Anim Genet*, 2007, 38: 429–439
 - 89 Remington D L, Thornsberry J M, Matsuoka Y, et al. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 11479–11484
 - 90 De-Santis C, Jerry D R. Candidate growth genes in finfish—Where should we be looking? *Aquaculture*, 2007, 272: 22–38
 - 91 Lee B Y, Penman D J, Kocher T D. Identification of a sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis. *Anim Genet*, 2003, 34: 379–383
 - 92 Moose S P, Mumm R H. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiol*, 2008, 147: 969–977