

水产动物分子育种研究进展

孙效文, 鲁翠云, 贾智英, 梁利群, 曹顶臣

(中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 农业部北方鱼类生物工程育种实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要: 本文介绍了水产动物分子生物学尤其是分子标记的发展, 比较了共显性标记和显性标记用于水产动物育种研究的优缺点。介绍了开展分子标记育种研究的基础研究——连锁图谱和经济性状 QTL 定位研究进展。同时还对国内外已开展的标记辅助的家系育种和 QTL 研究为基础的性状选择育种等研究进行了综述。最后, 着重探讨了分子育种理论及作者建立的有关鲤的 3 种分子标记指导的育种技术。通过分子育种技术具有不同发展阶段的理论分析以及分子育种的实例介绍, 旨在加快分子选择手段与常规表型选择的结合, 从而推进分子育种技术在中国主要水产养殖动物育种研究中的应用。[中国水产科学, 2009, 16(6): 981-990]

关键词: 水产动物; 分子育种; 数量性状基因座(QTL)

中图分类号: S96

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)06-0981-10

优良品种是养殖业持续发展的基础。优良品种的获得一般要进行两方面操作, 一是通过遗传操作技术获得性状变异的群体; 二是通过选择在群体或家系中固定目标性状使之具有优于原选育群体的生产性状。早期的育种研究基本上都是利用表型差异进行优良性状的选择, 由于环境因素的干扰和选择强度的限制, 表型选择只对遗传力较高的性状才有好的选择效果, 换句话说, 遗传力较低的性状通过表型选择难以获得所希望的选育结果; 另一方面, “杂交—回交”等基因渐渗育种技术由于无法检测出遗传上的优良个体, 只能通过不断地回交、测交等遗传操作来获得优良品种, 这需要相当多的代数才能完成选育过程。对于这些仅利用表型性状进行选择的不不足之处, 育种学家很早就有阐述, 在摩尔根的基因论建立不久, Sax 等^[1]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^[2]和 Thoday 等^[3]在 20 世纪 60 年代就提出了基于标记选择育种技术的设想, 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低, 因而没有产生明显的育种效果, 标记辅助育种没有受到育种学家的足够重视^[4]。鱼类育种也有利用同工酶分型获得优势养殖品系的研究报道^[5], DNA 分子标记的出现使基于标记的选择育种技术有了实现的可行性。自 1990 年初, 有关作物、家畜的分子育种理论、技术和研究报道较多, 但有关水产动物的还不多见, 究其原因主要是水产动物的共显性分子标记及性状的 QTL 研究进展缓慢, 目前共显性标记的克隆和 QTL 研究都有了相当的积累, 基于分子标记的选择育种技术也到了开展培育新品种的研究阶段, 本文就此进行初步讨论, 旨在为水产动物分子育种研究提供科学借鉴。

1 水产动物分子育种的相关基础研究进展

1.1 水产动物 DNA 分子标记的开发

在 20 世纪 90 年代初, DNA (脱氧核糖核酸) 分子标记刚刚出现时, 水产遗传与育种学家就注意到

收稿日期: 2008-10-08; 修订日期: 2009-06-07.

基金项目: 国家基础研究计划项目(2004CB117405); 农业部引进计划项目(2007-G55).

作者简介: 孙效文(1955-), 男, 研究员, 博士生导师. E-mail: sunxw2002@163.com

分子标记在水产研究中的应用价值^[6],由于最早出现的DNA分子标记RFLP(Restriction Fragment Length polymorphism,限制性酶切片段长度多态)需要酶切、Southern Blot杂交、放射自显影等复杂的操作,这导致使用者不是很多,在水产中的研究也受到了限制。RFLP标记技术在利用线粒体DNA的研究中发挥了很大的作用,这主要是由于线粒体较核基因组小,获得清晰的带型相对容易一些。而后出现的RAPD分子标记很快用于水产研究中,中国学者也在这个时间认识到了分子标记在水产动物遗传育种研究中的价值^[7-8]。RAPD(随机引物扩增多态脱氧核糖核酸)虽然利用较多,但人们很快发现这个技术重复性低而难以用于种质鉴定,也难以应用到家系亲本追踪研究。之后,荷兰生物学家Vos和Blecker等^[9]将RAPD的简便和RFLP的稳定性高这2个优点结合在一起,设计出AFLP(扩增片段长度多态)标记技术,这项技术被很多研究机构用于多种生物的研究中,尤其是性状相关标记与基因的克隆,在水产动物上主要是用于种群的遗传结构分析。在20世纪80年代后期,另一类DNA序列重复数可变串联重复标记(VNTR)出现了,其中一种被称作小微卫星的标记(在几十到几百碱基重复),需要通过酶切、杂交还要有小卫星序列作为探针的标记技术;另一种被称作微卫星(1~13个碱基重复序列),可以根据重复序列两端的侧翼序列设计引物,通过PCR反应获得差异的标记技术。前者由于稳定且呈现多态成为亲子鉴定尤其是人类刑事案件鉴定的首选标记,后者则由于检测简便、稳定性高而成为遗传作图、性状分析的主要标记,也是目前为止用得最多的分子标记。Bentzen等和Wright等^[10-11]可能是最早开发养殖鱼类微卫星标记的科学家,几乎与斑马鱼微卫星的开发是同时进行的^[12]。这段时间到20世纪90年代后期,微卫星标记的发展并不是很快,先后有棕鲭(*Salmo trutta*)^[13]、鲤(*Cyprinus carpio* L.)^[14]、海鲈(*Lateolabrax maculatus*)^[15]、虹鲟(*Oncorhynchus mykiss*)^[16]、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[17]等几个种的微卫星被克隆出来,这时构建的遗传连锁图谱中AFLP标记还占很大

部分。自1997年10月美国农业部启动了水产养殖种的基因组计划^[18],微卫星标记的开发鉴定才大规模地在水产动物上展开,如虹鲟、斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)、罗非鱼等,也从EST库中筛选出大量的微卫星标记^[19]。2000年以后,中国学者也开始大规模地克隆主要水产养殖种的微卫星标记,其中鲤^[20-21]、草鱼(*Ctenopharyngodon idellu*)^[22]、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)^[23]、鳙(*Aristichthys mobilis*)^[24]、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[25]等都获得大批的微卫星标记。

1.2 遗传连锁图谱的制备和重要经济性状的QTL分析

第一代水产养殖动物的遗传连锁图谱大多出现于20世纪90年代后期,由于微卫星标记和I型标记的数量还不足够,这时的图谱多由微卫星标记、I型标记、RAPD标记和AFLP等几种标记组成,如Kocher等^[26]的罗非鱼图谱、Young等^[27]的虹鲟图谱、Liu等^[28]的斑点叉尾鲟图谱等。水产动物的大多数第一代图谱的标记密度都比较低,难于支撑性状精细的QTL研究,有的第一代图谱多数连锁群仅有2~3个标记,基本上无法进行QTL定位分析^[26,29]。随着研究的深入,有更多的多态性标记被鉴定出来,主要养殖种的第二代遗传连锁图谱也有了报道,罗非鱼的第二代遗传连锁图谱有微卫星标记525个微卫星标记,21个基因连锁标记,标记间平均距离为2.5 cM^[30],虹鲟的第二代连锁图谱有标记1359个^[31],大西洋鲑(*Oncorhynchus keta*)和斑点叉尾鲟的连锁图也有第二代连锁图的报道,这些图谱都具有进行QTL精细分析的标记密度,鲤第二代连锁图谱也已制备出来^[32]。但牙鲆(*Paralichthys solivaceu*)、中国明对虾、凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)、贝类等主要养殖种类还没有第二代图谱的报道,这些图谱增加标记的研究也在进行之中。

QTL定位是利用图谱对标记和表型等性状进行相关分析,遗传学史上的第一张图谱就是通过性状的连锁分析得到的^[33],可以说,性状的连锁分析与遗传图谱制备是遗传发展过程中密不可分的同一问题

的两个方面。有关虹鳟温度耐受性和传染性胰脏坏死病毒(IPNV)性疾病的抗性基因位点、斑点叉尾鲷经济性状的QTL等分析在养殖鱼类QTL分析中属于较早的报道^[34-36]。利用QTL结果进行育种研究也有报道^[37],但尚少见,产业上大规模使用于相关种类还需要一段时间。水产动物的QTL研究主要以经济性状研究为主,如上面提到的与抗感染病基因座位(或者IDL—infection disease loci)相关分析,还有性别相关^[38]、饲料转化率相关^[39]、体质量与体长^[40]等性状,养殖鱼类在QTL研究中积累最多的是虹鳟,OKAMOTO等^[41]在2005年综述中总结有疾病、产卵时间等6个性状的QTL,据不完全统计,迄今虹鳟QTL分析的性状已有16个。对于脊椎动物或进化层次更高级的动物而言,鱼类较其他类群更容易建立适于QTL分析的样本库,因此,对于性状的精细分析,鱼类无疑是比较好的研究对象,虽然目前还没有足够的证据和共识性的结论,但根据笔者研究组的初步实验结果分析,同一物种的不同遗传背景(亲本来自不同品种制备的QTL样本库或同一品种不同家系制备的QTL样本库等等)应有不完全相同的QTL结果,因此,以育种研究为目的的QTL分析应该与育种研究同步进行,这样的QTL结果才能有较实际的应用价值。

1.3 经济性状相关基因的克隆与功能分析

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。与模式生物功能基因研究的方式不完全一致的是,从水产养殖动物克隆到的基因多数不直接用于研究其功能,而多是先与模式生物已克隆的序列进行比较(basic local alignment search tool, BLAST),推断目的基因可能具有的功能^[42],然后或者通过表达载体在细胞中检测其功能,或由转基因实验鱼等技术来验证其功能^[43-44]。基因功能研究的过程有时很复杂,有很多连续多年研究同一基因功能的案例,如肌动蛋白基因(beta-actin)的研究过程就是这样,Liu等^[45]在1990年研究了鲤肌动蛋白基因的结构及其启动子的调控功能,Zhu^[46]将其用于

转基因研究;Hwang等^[47-48]在十几年后的2002年进一步地研究这个启动子与罗非鱼同一启动子的比较研究及银鲫的同一基因的结构与功能等。虹鳟生长激素基因(growth hormone gene of rainbow trout)也是经过较长时间的研究后,才逐步加深对其功能的认识。Agellon等^[49]在1986年克隆了虹鳟生长激素基因的cDNA并在大肠杆菌中表达,1988年又发现虹鳟生长激素基因有2种结构类型^[50],并研究了这个基因的进化意义^[51]。至2003年这个课题组又报道了新的生长激素蛋白家族的基因新成员^[52],虹鳟生长激素基因的内含子与调节区的相互作用与激素的调节、在垂体的表达等也由其他学者做了仔细的研究^[53-54]。水产养殖动物特有基因的发现与克隆也是很有意思的,比如美人鱼基因(mermaid gene)和美人基因(merman gene)^[55-56]的发现,与银鲫雌核发育有关的DNA片段等^[57],但这些类鱼类特有基因的功能和生物学意义目前还不清楚。通过cDNA库的建立、差减分析等分子生物学方法鉴定出一些经济性状相关基因,同时根据获得基因的结构信息,鉴定到与经济性状连锁的共显性分子标记即I型标记,这种标记更适于分子标记辅助育种研究^[58-60]。罗非鱼的催乳激素分子机制与基因标记的研究也是持续研究很好的例子,从20世纪90年代开始在DNA水平上研究鱼类PRL基因^[61-64],包括结构和功能,以及PRL与生长激素协同的对鱼类的促生长作用研究,发现罗非鱼的PRL基因有2种^[65],并研究分析了这2种PRL基因体内和体外的表达及表达水平与水环境的连锁关系^[66-68]。有趣的是Kocher等发现罗非鱼的一个PRL基因启动区有两段微卫星序列,且其中一个微卫星序列在不同品种中和不同个体中表现出多态性,进而发现具有不同基因型的个体在淡水和盐水中体内的PRL的表达量有明显差异,同时不同基因型的个体在不同水质中生长差异明显,这2种差异表现为紧密的负相关,即PRL基因表达高的生长速度慢^[69-70],PRL基因表达少的个体生长速度快。育种工作者可以根据这种多态性分子标记与抗盐能力的连锁关系进行品种选育,培育出适合高盐水质

或低盐水质的养殖品种。

一些鱼类雌性的价值高,一些鱼类雄性的价值高,控制性别的基因及其调控机制的研究是这些鱼进行单性生产的基础。近年来日本学者 ARAI 等^[71-74]在 COE 计划的资助下做了大量有关性别控制机制与相关基因功能方面的研究。但利用不同基因的基因型与性别的连锁来区分雌雄配子并用于单性生殖在十几年前就有很好的研究结果,如虹鳟的生长激素基因与雄性性别连锁,这个发现使虹鳟全雌鱼的生产有了技术上的保证^[75-76],即通过基因型分析删除遗传上的真雄鱼,完全用遗传上的假雄鱼与正常的雌鱼受精生产全雌鱼。近年来利用新型分子标记技术开展特种鱼类(雌雄个体在生长上差异较大的或雌雄个体在商业价值差异较大的)的鉴别技术,并进而开展全雌或全雄鱼的生产有许多成功的例子。陈松林等^[77]报道利用 AFLP 技术鉴定到半滑舌鳎雌性相关的标记,并结合其与雌性特殊染色体的连锁关系设计了高比例雌性半滑舌鳎的生产技术,得到雌鱼比例高于正常繁殖鱼苗约 30 个百分点的子代鱼苗,并正在利用这些分子与细胞生物学研究结果向建立半滑舌鳎的全雌鱼苗生产技术的方向发展^[78]。对黄颡鱼这个雌雄个体差异比较大的鱼类的性别相关的分子标记及单性苗种生产也取得了较大进步,辛文婷等^[79]利用 SRAP(sequence-related amplified polymorphism,序列相关扩增多态性)标记得到了雄性表达量明显高于雌性的序列,桂建芳等找到了既可鉴别雌性,也可鉴别雄性的标记,并已在全雄鱼的生产中加以利用(私人通讯)。

2 水产动物分子育种的研究进展

本文主要针对分子标记辅助育种展开论述,而水产动物分子育种的另一分支——基因工程育种研究不在此讨论。

养殖鱼类利用分子标记获得好的育种结果早在蛋白质技术时代就有研究报道了^[5],但真正能开展有效的分子标记辅助育种是在出现 DNA 分子标记尤其是共显性分子标记之后才开始的。

2.1 国外水产动物分子育种研究进展

几年前,由于养殖鱼类 QTL 研究结果积累较少,鱼类分子育种主要是利用基因型频率计算雌雄间遗传差异和亲子鉴别技术来选择亲本。这样的研究在鲆、斑点叉尾鲷和虹鳟中都有较好的研究结果,如美国 ARS 的科学家在分子标记选择技术的辅助下运用传统育种方法,经过 6 年研究获得比已有品种生长快 20% 的斑点叉尾鲷 NWAC-103 品系并通过了美国农业部的认定,已在生产中使用,并从 300 个微卫星中筛选出 10 个有效标记来区分这个品系与其他品系。另外,利用分子标记结合 BLUP 技术已开展了鲍等的育种研究^[80]。

2007 年,基于 QTL 和 IDL 等研究基础上的分子育种研究也有了报道,如牙鲆的抗淋巴囊肿病毒(Lymphocystis Disease,简称 LD)的分子育种就是利用 QTL 的分析结果进行的^[81],日本东京海洋大学 Okamoto 教授课题组设计了非常有效的研究战略:首先研究者利用合作单位获得的对淋巴囊肿病的 1 个敏感品系(KP-A)和 1 个抗病品系(KP-B)建立 QTL 分析家系(敏感家系与抗病家系的杂交子代与敏感家系的回交家系)并进行抗病性状的 QTL 分析,得到了一个可解释的遗传变异率高达 50% 基因位点(Poli.9-8TUF)。再利用这个基因位点检测出基因型纯合的抗淋巴囊肿个体,再将之与生长快的牙鲆品系杂交,得到了几乎不染病的牙鲆新品系,并已应用到生产当中,该课题组利用同样的研究战略在虹鳟和香鱼(*Plecoglossus altivelis*)中都取得了很好的育种结果。

从遗传与统计理论上分析基因水平估计育种值和 BLUP 统计方法估计育种值的比较研究证明前者具有更多优点^[82-83],分子育种技术在水产养殖动物将有非常好应用前景。

2.2 国内水产动物分子育种研究实例

虽然水产动物的 QTL 结果的报道在国内尚不多见,但有关利用分子标记开展品种培育的报道也在逐渐增多,如鲁翠云等^[84]报道了利用亲本间的分子遗传结构、分析结果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

育种结果^[84]。最近一两年来利用 QTL 研究结果开展良种研究的也有报道,如孙效文等^[85]利用镜鲤体重质量相关的 QTL 结果建立了镜鲤的新品系;另外,利用抗病相关标记开展牙鲆抗弧菌病^[86]、银鲫^[87]抗碘泡虫病低发品种等的抗病育种研究也有初步的研究结果。总之,随着分子生物学和基因组学研究工作的积累,中国很多从事水产动物遗传育种的研究工作者已经利用分子标记或基因作为工具进行亲本的选择,开展了分子育种研究,而不再仅仅利用分子标记描述育成品种的分子特征或在育成品种中找到提高新品种研究水平证据等利用分子标记的初级阶段。

3 鱼类分子育种理论探讨

3.1 鱼类分子育种理论基础

针对分子育种所依据的性状相关基因与标记的研究进展的复杂情况——如同一个物种在不同遗传背景条件下同一性状的 QTL 结果并不相同,以及最终控制性状的基因网络和基因与环境因子相互作用控制性状等研究的难度非常大(如至今多数养殖鱼类还没有开展这方面的研究),提出了分子育种技术具有阶段性的观点,同时也提出分子育种要有一个全面的育种技术理论作为支撑。

3.1.1 鱼类分子育种技术理论 对优势基因或标记的富集,结合传统育种技术和物种生物学特性,再结合分子标记检测的个体与群体的遗传组成,将上述遗传与表型数据经现代生物统计方法进行处理可以建立选择强度大、效果好的鱼类育种技术,即以基因和标记为核心的鱼类综合育种技术。此技术理论的核心要素有 4 个:(1)表型选择仍是获得好的经济性状关键步骤,基因型选择结合表型选择是建立优良基础群体和选择优良亲本的核心技术;(2)性状的优势基因型的富集是获得优良性状的遗传基础,依据群体或家系 QTL 等分析结果,可以通过标记检测和选择达到富集家系或群体内的优势基因型的目的;(3)避免近亲繁殖是建立优良品种和进一步保护品种优良性状的关键环节,利用共显性分子标记可以准确检测群体或家系的基因型频率,从而将群

体内或家系内的近交系数降到最低;(4)基因与综合性状的指数评估是将基因和标记融入育种技术的关键,优势基因和标记要通过群体并形成品种来体现其优势,将基因和标记及其他性状都利用指数来评估是建立优良种群所必须,包括基因和标记对性状的贡献值的综合指数的 BLUP 分析或其他统计分析可以实现这个目标。

鱼类分子育种技术定义为,在群体、家系或个体选择中使用了基因或标记并最终能形成品种的育种技术称为分子育种技术。

3.1.2 鱼类分子育种的不同发展阶段 分子育种技术的研究内容要与研究对象的分子遗传研究水平相适应,即有不同阶段。育种工作要根据个体、群体或家系的分子遗传组成来选择亲本,根据优势性状基因或标记的基因型聚合情况来选择亲本等选择手段是以特定物种的分子遗传学研究深度为基础的,只要能在育种的某个环节有所改进,并能提高选育强度和选育效率就可以获得好的育种结果。

鱼类分子育种的 3 个阶段:

第 1 阶段,是用标记分析群体间、家系间或个体间的遗传关系,根据雌雄亲本的遗传相似性和遗传距离确定亲本的取舍,建立优良的群体,从而得到家系和群体在性状上优良的新品种,通过避免近亲交配来保持品种的优良特征。目前,大多数物种都可以应用这种育种技术。由于这个技术可以在亲本和子代的遗传背景分析、雌雄配组技术等方面与传统育种技术结合起来,并使之在选择准确性有提高,克服了鱼类初生小无法标记的困难等,且操作简单也不需要太多基因组研究基础,因此,在鱼类育种研究中大有广阔的应用前景。

第 2 阶段,即利用性状与基因或标记的简单连锁关系来进行经济性状的聚合育种,中国大多数养殖鱼类的 QTL 还处在基础研究阶段。目前,国内能用此技术培育品种的水产养殖动物仅有鲤、罗非鱼、牙鲆等少数几个养殖种。

第 3 阶段,即是利用多种经济性状与基因的连锁关系、依据性状的基因网络调控与环境相互作用

的研究结果、依据性状的全基因组分析结果通过计算机软件来设计育种方案的技术,对大多数养殖鱼类来说,这类基础研究还没有开展,设计育种还很遥远,但 Robinson 等^[88]依据大西洋鲑在攻毒实验后的死亡鱼与存活鱼之间的基因表达谱的比较结果,设计了亲本的计算机选择模型,经 6~7 代选择抗病能力提高一倍以上。

3.1.3 养殖鱼类分子育种技术的生物学特殊性 养殖鱼类的生殖特点大多数为体外受精、体外孵化且产卵量大;生活在水中,不易分辨、难于标记,且出生时个体非常小,这些特点决定应该建立不同于陆生生物分子育种技术。

3.1.4 养殖鱼类分子育种技术的多样性 养殖鱼类(包括其他水产生物)物种繁多、生殖多样性高,再与不同的养殖方式结合(如中国养殖鱼类价值低,养殖成本低),以及不同的遗传操作技术的组合会形成多种多样的有效率的分子育种技术。

3.2 几种鲤的分子育种技术路线

3.2.1 分子标记指导的家系选育 传统的鱼类家系育种中,子代出生时个体太小无法进行物理标记而不得不先分池饲养待长大后再标记,然后置于同池饲

养。针对这一技术不足,作者设计了本育种技术路线。亲本选择时利用镜鲤雌、雄配组的阈值和表型性状 2 种选择技术来确定亲本,配组生产子代家系,并将各家系子代放在同一个池塘来减少环境的影响,待子代长大后对子代进行表型与基因型结合进行选择,这样一代一代选择下去,获得优良基因型富集且表型和生长性能优良的家系,最终获得新品种,其核心技术是在利用表型选择的优点基础上,增加基因标记选择来提高选择强度,也可以减少环境的干扰。

3.2.2 分子标记指导的群体选育 针对中国群体选育品种出现的衰退现象,依据上述理论,以避免近亲交配为原则,设计了此选育技术^[89]。简要技术路线是:在表型选择亲本的同时,利用多态性标记检测所有亲本的基因型并利用特定软件计算所有个体之间的亲缘关系,以群体内任一对雌、雄亲本间都没有近亲交配关系为原则,以此选择亲本、配组、繁殖子代,下一世代在繁殖前也根据此原则配组繁殖,这样一代一代重复下去,不断地提高群体的优良性状、富集优势基因型的比例,最终建立一个没有近亲交配且性状优良的品种。图 1 是鲤分子标记指导的群体选育技术路线示意图。

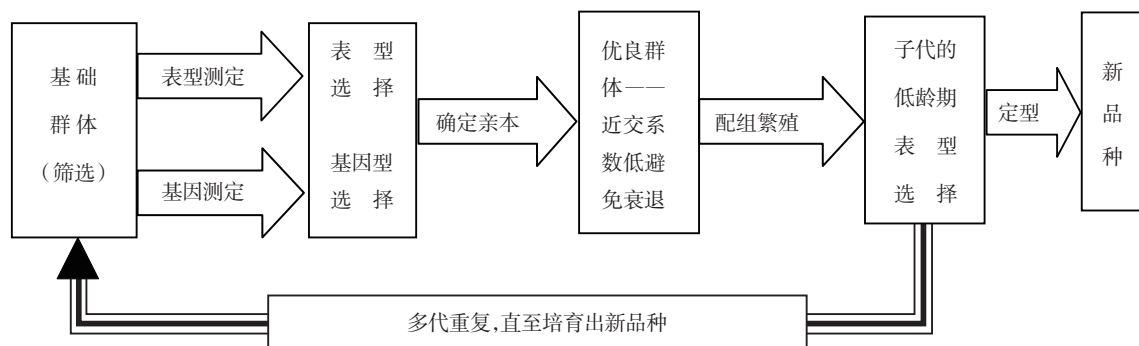


图 1 鲤分子标记指导的群体选育技术示意图

Fig. 1 Schematic drawing of marker-based mass selection for common carp

3.2.3 分子标记指导的育成品种遗传结构优化 针对中国鲤育成品种多,但繁殖群体衰退的种群也较多的现象,设计此技术以求有效利用这些多年培育出的优良品种。利用 40 对多态性标记对鲤繁殖亲本进行遗传结构分析,根据分析得到的个体基因型

数据计算出亲本群体任 2 个雌雄亲本间的亲缘关系。根据亲缘关系结合这些亲本的体型、体质量等表型性状,对亲本进行配组、繁殖子代,配组的结果是建立 2 个以上的繁殖群,控制每个繁殖群体内的任一对雌雄间的亲缘关系,使之都大于 3 代祖孙的亲缘关

系,从而可以避免繁殖时的近亲交配现象。此项技术可以解决长期以来鲤出现的由于近交产生的遗传衰退问题^[90],其操作过程与标记指导的群体选育基本相同,不同之处是优化育成品种的亲本群体。

4 结语

有关水产动物分子育种研究的讨论已有 15 年以上的时间,这期间,中国从事水产生物技术和遗传育种研究的科学家们在经费少、设备差的条件下,经过长期的艰苦努力,终于将此项技术实用化。目前有很多单位在开展这方面的育种研究,希望本篇文章能对此项工作有所帮助。笔者认为,无论采用何种技术育成的品种,具有能够区分本品种与其他类群(如其他品种、野生种群、衰退种群等等)的分子标记是基本的技术要求。

在基因组研究技术越来越复杂,数据量越来越大的今天,作者赞赏基础研究细致、育种过程简单的研究战略,即分子育种技术在研究阶段尤其是探索性状相关基因和标记的研究中尽量使用先进的实验设备,做大量分子水平和基因组水平的研究工作,但用到育种基地对目标物种进行选择时应该追求简单易行的方法,如能用 1 个基因座就能选出优良品种绝不应该利用 2 个以上的基因座。

参考文献:

- [1] Sax K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris* [J]. *Genetics*, 1923, 8: 552–560.
- [2] Neimann-Sorensen A, Roberstson A. The association between blood groups and several production characters in three Danish cattle breeds [J]. *Acta Agric Scand*, 1961, 11: 163–196.
- [3] Thoday J M. Location of polygenes [J]. *Nature*, 1961, 191: 368–370.
- [4] 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [5] 朱蓝菲, 蒋一珪. 银鲫不同雌核发育系的生物学特性比较研究 [J]. *水生生物学报*, 1993, 17 (2): 112–119.
- [6] Wright J M. DNA fingerprinting of fishes [J]. In Hochachka P W and Mommsen T., eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Vol.2, New Youk: ELSERVIER, 1993: 57–91.
- [7] 孙效文, 梁利群, 闫学春, 等. 遗传标记与鱼类育种 [J]. *水产学杂志*, 1995, 8 (1): 86–89.
- [8] 梁利群, 孙效文, 沈俊宝. RAPD 技术及其应用 [J]. *水产学杂志*, 1995, 8 (1): 90–93.
- [9] Vos P, Hogers R, Blecker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucl Acids Res*, 1995, 23: 4 407–4 414.
- [10] Bentzen P, Harris A, Wright J M. Cloning of hypervariable minisatellite and simple sequence microsatellite repeats for DNA fingerprinting of important aquaculture species of salmonids and tilapia [J]. In: Burke T, Dolf G A, Jeffreys A J, et al eds. *DNA Fingerprinting: Approches and Applications*, Basel: Birkhauser Verlag, 1991: 243–262.
- [11] Wright JM, Bentzen P. Microsatellites: genetic markers for the future [J]. *Fish Biol Fish*, 1994, 4: 344–388.
- [12] Goff D J, Galvin K, Katz H, et al. Identification of polymorphic simple sequence repeats in the genome of zebrafish [J]. *Genomics* 1992, 14: 200–202.
- [13] Estoup A, Presa P, Kring F. et al. {CT} and {GT} microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* (brown trout) [J]. *Heredity*, 1993, 71: 488–496.
- [14] Crooijmans R P M A, Bierbooms V A F, Komen J, et al. Microsatellite markers in common carp [J]. *Animal Genetics*, 1997, 28: 129–134.
- [15] Garcia de Leon F J, Dalla J F, Chatain B, et al. Development and use of microsatellite markers in sea bass [J]. *Molec Mar Biol Biotechnol*, 1995, 4: 62–68.
- [16] Brooker A L, Cook D, Bentzen P, et al. Organisation of microsatellite differs between mammals and cold-water teleost fishes [J]. *Can J Fish Aqu Sci*, 1994, 51: 1 959–1 966.
- [17] Lee W-J, Kocher T D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in the tilapia [J]. *J.fish Biol*, 1996, 49: 169–171.
- [18] Kocher T D. Genetic map of aquaculture species [P]. USDA regional project number: NE-186.1-11. 1999.
- [19] Liu Z J. Encyclopedia cDNA libraries of channel catfish and systematic analysis of genes, gene expression, and markers [C]. *Plant and Animal Genome X*, San Diego, 2002, W30.
- [20] 魏东旺, 楼允东, 孙效文, 等. 鲤微卫星分子标记的筛选 [J]. *动物学研究*, 2001, 22 (3): 238–241.
- [21] 孙效文, 贾智英, 魏东旺, 等. 磁珠富集法与小片段克隆法筛选鲤微卫星的比较研究 [J]. *中国水产科学*, 2005, 12 (2): 126–132.
- [22] 孙效文, 鲁翠云, 梁利群. 磁珠富集法分离草鱼微卫星分子标记 [J]. *水产学报*, 2005, 29 (4): 482–486.
- [23] 鲁翠云, 孙效文, 曹洁, 等. 磁珠富集法筛选白鲢的微卫星分子标

- 记[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13 (6): 772-776.
- [24] 鲁翠云, 孙效文, 梁利群. 鲮鱼微卫星分子标记筛选[J]. 中国水产科学, 2005, 12 (2): 192-196.
- [25] 刘萍, 孟宪红, 李健, 等. 中国对虾部分基因组文库的构建和微卫星 DNA 的筛选[J]. 高技术通讯, 2004, 14 (2): 87-90.
- [26] 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: 851-858.
- [27] Young W P, Wheeler P A, Coryell V H, et al. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. [J]. Genetics, 1998, 148: 839-850.
- [28] Liu Z, Karsi A, Li P, et al. An-AFLP-Based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family [J]. Genetics, 2003, 165: (2), 687-694.
- [29] 孙效文, 梁利群. 鲤鱼的遗传连锁图谱(初报)[J]. 中国水产科学, 2000, 7 (1): 1-6.
- [30] Lee B Y, Lee W J, Streelman J T, et al. A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.) [J]. Genetics. 2005, 170 (1): 237-244.
- [31] Nichol K M, Young W P, Danzmann R G. A consolidated linkage map for rainbow trout [J]. Animal Genetics, 2003, 34: 102-115.
- [32] Zhang Y, Liang L-Q, Sun X-W, et al. A second-generation genetic linkage map of common carp [J]. Genetics, 2009 (In press).
- [33] Sturtevant A H, Morgan T H. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association [J]. J Experim Zool, 1913, 14: 43-59.
- [34] Jackson T R, Ferguson M M, Danzmann R G, et al. Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout half-sib families [J]. Heredity 1998, 80: 143-151.
- [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 [J]. Mol Genet Genomics, 2000, 265: 23-31.
- [36] Liu Z J, Dunham R. Genetic linkage and QTL mapping of ictalurid catfish. Alabama Agr. Exp [J]. Sta. Cir. Bulletin, 1997, 321, 1-19.
- [37] Fuji K, Hasegawa O, Honda K, et al. Marker-based breeding of a lymphocytis disease-resistant Japanese Flounder [J]. Aquaculture, 2007, 272: 291-295.
- [38] Lee B-Y, Hulata G, Kocher TD. Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*) [J]. Heredity, 2004, 92 (6): 543-549.
- [39] 孙新, 魏振邦, 孙效文, 等. 鲤鱼饲料利用率的 QTL 定位分析[J]. 遗传, 2008, 30 (3): 359-366.
- [40] Reid DP, Szanto A, Glebe B, et al. QTL for body weight and condition factor in Atlantic salmon: comparative analysis with rainbow trout and Arctic charr [J]. Heredity, 2005, 94: 166-172.
- [41] Okamoto N K, Fuji E, Ohara T, et al. Strategy for marker-assisted breeding, status of genetic linkage maps, and QTL for aquaculture species [C]. // 生物技术对水产业的促进作用——2005 水产科技论坛论文集. 北京: 海洋出版社, 2006: 114-125.
- [42] Kim S, Karsi A, Dunham R A, et al. The skeletal muscle alpha-actin gene of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and its association with piscine specific SINE elements [J]. Gene, 2000, 252 (1-2): 173-181.
- [43] Caldovic L, Hackett P B. Development of position-independent expression vectors and their transfer into transgenic fish [J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1995, 4 (1): 51-61.
- [44] Powers D A. Fish as model systems [J]. Science, 1989, 246: 352-358.
- [45] Liu Z J, Zhu ZY, Roberg K, et al. Isolation and characterization of beta-actin gene of carp (*Cyprinus carpio*) [J]. DNA Seq, 1990, 1 (2): 125-136.
- [46] Zhu Z Y. Growth hormone gene and the transgenic fish [A]. Agricultural Biotechnology [M]. Beijing: China Science and Technology Press, 1992: 106-116.
- [47] Hwang GL, Azizur Rahman M, Abdul Razak S. Isolation and characterisation of tilapia beta-actin promoter and comparison of its activity with carp beta-actin promoter [J]. Biochim Biophys Acta. 2003, 1625 (1): 11-18.
- [48] Hwang U W, Han M S, Kim I C, et al. Cloning and sequences of beta-actin genes from *Rhodeus notatus* and the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Cyprinidae) and the phylogeny of cyprinid fishes inferred from beta-actin genes [J]. DNA Seq, 2002, 13 (3): 153-159.
- [49] Agellon L B, Chen T T. Rainbow trout growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli* [J]. DNA, 1986, 5 (6): 463-471.
- [50] Agellon L B, Davies S L, Lin C M, et al. Rainbow trout has two genes for growth hormone [J]. Mol Reprod Dev, 1988, 1 (1): 11-17.
- [51] Agellon L B, Davies S L, Chen T T, et al. Structure of a fish (rainbow trout) growth hormone gene and its evolutionary implications [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85 (14): 5136-5140.
- [52] Yang BY, Chen TT. Identification of a new growth hormone family protein, somatolactin-like protein, in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pituitary gland [J]. Endocrinology, 2003, 144 (3): 850-857.
- [53] Mori T, Deguchi F, Ueno K. Differential expression of Gh1 and Gh 2

- genes by competitive RT-PCR in rainbow trout pituitary [J]. Gen Comp Endocrinol, 2001, 123 (2): 137–143.
- [54] Bernardini S, Argenton F, Vianello S, et al. Regulatory regions in the promoter and third intron of the growth hormone gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum [J]. Gen Comp Endocrinol, 1999, 116 (2): 261–271.
- [55] Shimoda N, Chevrette M, Ekker M, et al. Mermaid, a family of short interspersed repetitive elements, is useful for zebrafish genome mapping [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 220: 233–237.
- [56] Kim S, Karsi A, Dunham R A, et al. The skeletal muscle-actin gene of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and its association with piscine specific SINE elements [J]. Gene, 2000, 252: 173–181.
- [57] Murakami M, Fujitani H. Polyploid-specific repetitive DNA sequences from triploid gibel carp (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*) [J]. Genes Genet. Syst., 1997, 72: 107–113.
- [58] Serapion J, Kucuktas H, Feng, et al. Bioinformatic Mining of Type I Microsatellites from Expressed Sequence Tags of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Marine Biotechnology, 2004, 6: 364–377.
- [59] Serapion J, Waldbieser G C, Wolters W, et al. Development of Type I markers in channel catfish through intron sequencing [J]. Animal Genetics, 2004, 35: 463–466.
- [60] Quilang J, Wang S, Li P, et al. Generation and analysis of ESTs from the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin and identification of microsatellite and SNP markers [J]. BMC Genomics, 2007, 8: 157.
- [61] Taniyama S, Kitahashi T, Ando H, et al. Changes in the levels of mRNAs for GH/prolactin/somatolactin family and Pit-1/GHF-1 in the pituitaries of pre-spawning chum salmon [J]. J Mol Endocrinol, 1999, 23 (2): 189–198.
- [62] Kelly S P, Chow I N, Woo N Y. Effects of prolactin and growth hormone on strategies of hypoosmotic adaptation in a marine teleost, *Sparus sarba* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1999, 113 (1): 9–22.
- [63] Zhu Y, Thomas P. Effects of somatolactin on melanosome aggregation in the melanophores of red drum (*Sciaenops ocellatus*) scales [J]. Gen Comp Endocrinol, 1997, 105 (1): 127–133.
- [64] Astola A, Pendon C, Ortiz M, et al. Cloning and expression of somatolactin, a pituitary hormone related to growth hormone and prolactin from gilthead seabream, *Sparus aurata* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1996, 104 (3): 330–336.
- [65] Swennen D, Poncelet AC, Sekkali B, et al. Structure of the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) prolactin I gene [J]. DNA Cell Biol, 1992, 11 (9): 673–684.
- [66] Ayson FG, Kaneko T, Hasegawa S, et al. Differential expression of two prolactin and growth hormone genes during early development of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in fresh water and seawater: implications for possible involvement in osmoregulation during early life stages [J]. Gen Comp Endocrinol, 1994, 95 (1): 143–152.
- [67] Auperin B, Baroiller JF, Ricordel MJ, et al. Effect of confinement stress on circulating levels of growth hormone and two prolactins in freshwater-adapted tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Gen Comp Endocrinol, 1997, 108 (1): 35–44.
- [68] Sohm F, Pezet A, Sandra O, et al. Activation of gene transcription by tilapia prolactin variants tiPRL188 and tiPRL177 [J]. FEBS Lett, 1998, 438 (1–2): 119–123.
- [69] Streelman J T, Kocher TD. Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenged tilapia [J]. Physiological Genomics, 2002, 9 (1): 1–4.
- [70] Kocher TD. Tilapia Genomics and Applications. [C]. The symposium on the genomic research for aquaculture species. Harbin, China, 2003: 1–5.
- [71] Saito T, Goto-Kazeto R, Arai K, et al. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation [J]. Biol Reprod, 2008, 78 (1): 159–166.
- [72] Bubenshechikova E, Kaftanovskaya E, Motosugi N, et al. Diploidized eggs reprogram adult somatic cell nuclei to pluripotency in nuclear transfer in medaka fish (*Oryzias latipes*) [J]. Dev Growth Differ, 2007, 49 (9): 699–709.
- [73] Yoshikawa H, Morishima K, Kusuda S, et al. Diploid sperm produced by artificially sex-reversed clone loaches [J]. J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol, 2007, 307 (2): 75–83.
- [74] Fujimoto T, Kataoka T, Sakao S, et al. Developmental stages and germ cell lineage of the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) [J]. Zoolog Sci, 2006, 23 (11): 977–989.
- [75] Forbes S H, Knudsen K L, North T W, et al. One of two growth hormone genes in coho salmon is sex-linked [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91 (5): 1628–1631.
- [76] Iturra P, Lam N, de la Fuente M, et al. Characterization of sex chromosomes in rainbow trout and coho salmon using fluorescence in situ hybridization (FISH) [J]. Genetica, 2001, 111 (1–3): 125–131.
- [77] Chen SL, Li J, Deng SP, et al. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole [J]. Mar Biotechnol, 2007, 9: 273–280.
- [78] Chen S L, Deng S P, Ma H Y, et al. Molecular marker-assisted sex control in half-smooth tongue sole [J]. Aquaculture, 2008, 283 (1–4): 7–14.

- [79] 辛文婷,孙中武,尹洪滨,等. Identification of Sex-associated SRAP Marker in *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. 东北林业大学学报,2009,37 (5): 112–113.
- [80] Hayes B, Baranski M, Goddard M E, et al. Optimisation of marker assistant selection for abalone breeding program [J]. Aquaculture, 2007,265: 61–69.
- [81] Fuji K, Hasegawa O, Honda K, et al. Marker-based breeding of a lymphocytis disease-resistant Japanese Flounder [J]. Aquaculture, 2007,291–295.
- [82] Sonesson AK. Within-family marker-assisted selection for aquaculture species [J]. Genet Sel Evol,2007,39: 301–317.
- [83] Nielson HM, Sonesson AK, Yazdi H, et al. Comparison of accuracy of genome-wide and BLUP breeding value estimates in sib based aquaculture breeding schemes [J]. Aquaculture,2009,289: 259–264.
- [84] 鲁翠云,曹顶臣,孙效文,等. 微卫星分子标记辅助镜鲤家系选育 [J]. 中国水产科学,2008,15 (6): 893–901.
- [85] 孙效文,鲁翠云,曹顶臣,等. 镜鲤体重相关分子标记与优良子代的筛选和培育 [J]. 水产学报,2009,33 (2): 177–181.
- [86] 陈松林,田泳胜,徐田军,等. 牙鲆抗病群体和家系的建立及其生长和抗病性能初步测定 [J]. 水产学报,2008,32 (5): 665–673.
- [87] 桂建芳. 异育银鲫养殖新品种——“中科3号”简介 [J]. 科学养鱼, 2009,236 (5): 21.
- [88] Robinson N, Hayes B. Modelling the use of gene expression profiles with selective breeding for improved disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Aquaculture,2008,285 (1–4): 38–46.
- [89] 孙效文,鲁翠云,匡友谊,等. 分子标记指导的镜鲤群体选育 [J]. 发明专利公报,2008,24 (07).
- [90] 孙效文,鲁翠云,匡友谊,等. 分子标记指导的镜鲤育成品种的遗传结构估化 [J]. 发明专利公报,2008,24 (07).

The progress of molecular marker-based breeding for aquatic species

SUN Xiao-wen, LU Cui-yun, JIA Zhi-ying, LIANG Li-qun, CAO Ding-chen

(Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: In this paper, the development of molecular biology and molecular markers for aquatic species was introduced, and the utilizations between dominant markers and co-dominant markers were also introduced. some other basic research for molecular marker-based breeding are also introduced, which are genetic linkage map and economic important quantitative traits loci researches. The progress on the technologies of molecular marker-based breeding and QTL based breeding for aquatic species was introduced here. Finally, the theory of molecular breeding for aquatic species was discussed, and three techniques on molecular marker-based breeding for common carp from writer also were recommended here. [Journal of Fishery Sciences of China,2009,16 (6): 981–990]

Key words: molecular; marker-based breeding; quantitative trait loci (QTL)