

团头鲂种质资源 与育种



王卫民 高泽霞 刘 红 著
王焕岭 黎 洁 刘 寒



科学出版社

团头鲂种质资源与育种

王卫民 高泽霞 刘 红 王焕岭 黎 洁 刘 寒 著

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书是本研究团队十年来开展团头鲂研究的总结,是一部遗传理论与育种实践相结合的专著,涵盖了团头鲂种质资源、遗传选育、基因组学及功能基因等方面的内容。具体内容包括:团头鲂形态学特征及群体遗传结构、野生群体的种质资源、分子标记的开发与应用、经济性状遗传参数的评估和性状关联分子标记的筛选、新品种团头鲂华海1号选育过程、三倍体和雌核发育的诱导及鉴定、全基因组与功能基因组及团头鲂性状相关基因的结构和功能分析。

本书可以作为高等院校和科研院所水产育种、水产养殖及其相关专业的本科生和研究生的参考用书,也可以作为广大水产科技工作者、渔业管理工作者和水产养殖生产从业人员的参考资料。

图书在版编目(CIP)数据

团头鲂种质资源与育种 / 王卫民等著. —北京: 科学出版社, 2018.9
ISBN 978-7-03-058581-3

I. ①团… II. ①王… III. ①团头鲂—种质资源—中国 ②团头鲂—遗传育种—中国 IV. ①Q959.46

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 194385 号

责任编辑: 罗 静 付 聪 / 责任校对: 郑金红
责任印制: 肖 兴 / 封面设计: 图阅盛世

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018 年 9 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2018 年 9 月第一次印刷 印张: 22 1/4 插页: 8

字数: 511 000

定价: 198.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

序

一条鱼，从烟波浩渺的梁子湖(古城樊湖)游过蜿蜒九十九里长港，在孙权东吴都城的武昌演绎出一篇惊心动魄、荡气回肠的三国史诗。

一条鱼，游弋于中华古韵文的海洋里，被孟浩然、杜甫、杜牧、苏轼、王安石、范成大、岑参、马祖常等文人墨客吟诵不已，绵延一千七百余年，经久不衰。

还是这条鱼，用深厚的文化底蕴繁衍出今天丰富多彩的武昌鱼文化，诗词、历史、旅游、烹饪、节庆、民间文学等一应俱全，绽放出五彩斑斓的似锦繁花，令人目不暇接。

还有令人怀念和自豪的一代伟人毛主席对武昌鱼倾注的深情厚谊，一句“才饮长沙水，又食武昌鱼”，让武昌鱼游出樊口、蜚声中外。

随着我国鱼类分类学和养殖学的不断发展，武昌鱼逐渐打开了这段被岁月尘封的历史，游进了鱼类学家的视野，并于1955年由易伯鲁教授正式命名为团头鲂。这是新中国成立后我国科学家命名的第一个鱼类种名，也是我国水产科学工作者人工驯化成功的第一个淡水养殖品种。由于抗病力较强、成活率高、脂多味美，在水产工作者的养殖研究和推广下，团头鲂很快跃升为我国淡水养殖的主要品种之一，年产量已达80万t。

在团头鲂产业发展过程中，有这样一些人物让我们敬佩和感激。易伯鲁教授，鉴定并命名团头鲂，被尊称为“武昌鱼之父”；曹文宣院士，开展团头鲂的生物学研究，为团头鲂的人工驯化奠定了坚实的基础；柯鸿文教授，是成功实现团头鲂人工繁殖和驯化的女科学家；杨干荣教授，先后制定了团头鲂及其鱼苗、鱼种国家级质量标准，是国家级团头鲂原种场的奠基人；陈楚星先生，终身致力于团头鲂的应用和推广，为团头鲂走向全国做出了较大贡献；李思发教授，选育出团头鲂新品种浦江1号，推动了团头鲂产业的新发展。

华中农业大学水产学院(原水产系)自20世纪60年代开始，在系主任易伯鲁教授的引领下，多位学者围绕团头鲂的科学命名、生物学、生理学、疾病学、营养学、人工养殖与繁育、种质资源保护等方面开展了系列的研究，积累了丰富的研究成果。

2008年，王卫民教授承担起了国家大宗淡水鱼类产业技术体系——团头鲂种质资源与育种岗位的研究任务，在广东海大集团股份有限公司的支持下，组建了团头鲂种质资源与育种研究团队，团队成员围绕团头鲂种质资源、遗传选育、基因功能及基因组学等开展了系列研究，致力于团头鲂分子育种技术体系的研究及高产抗逆优良品种的培育和推广，经过近十年的选育，培育出了生长快、成活率高的团头鲂华海1号。本书将近十年来部分研究成果进行了归纳总结，以供读者查阅与参考。参加过该项目研究的人员还有：魏开建、刘红、王焕岭、高泽霞、周小云、曹小娟、刘寒、黎洁、彭智、张学振、赵玉华等教师，李杨、曾聪、罗伟、刘肖莲、聂竹兰、温久福、张新辉、Tran Ngoc Tuan、段晓克、解宜兴、陈婷婷、邓伟、赖瑞芳、易少奎、宋文、王艺舟、吕烨锋、魏晋、詹凡玢、沈宇东、朱克诚、陈楠、王慧娟、张豹、吴鑫杰、丁祝进、崔蕾、苏利娜、魏伟、

周凤娟、扶晓琴、范君、詹柒凤、柴欣、胡晓坤、万世明等；同时还得到了国家大宗淡水鱼产业技术体系团头鲂种质资源与育种岗位 (nycytx-49-03, CARS-46-05, CARS-45-08), 国家自然科学基金“基于全基因组重测序的鲂属鱼类群体遗传学研究”(31772901)、“基于基因组学的团头鲂铁代谢基因功能解析及其与抗病性状的相关性”(31572613)、“团头鲂 let-7 microRNA 对其生长和性腺发育的共同调控作用及其分子机制”(31472271)、“基于 BP 人工神经网络探讨 PPARs 基因多态性与团头鲂营养性脂肪肝病易感性的关系”(31401976)、“团头鲂 HPG 轴相关基因对其性早熟的分子调控机理研究”(31201988), 新世纪优秀人才支持计划“团头鲂重要经济性状相关基因的挖掘及其功能研究”(NCET-10-0404), 中央高校基本科研业务费专项资金“重要淡水养殖鱼类优质种质资源的挖掘与遗传改良”(2011PY023)、“团头鲂和泥鳅重要经济性状的基因组解析”(2662015PY019)、“团头鲂耐低氧性状优良品系选育研究”(2013PY067)、“基于基因组数据的团头鲂重要经济性状的遗传机制解析”(2662015PY134)、“团头鲂生长性状优良品系选育研究”(2013PY066), 湖北省协同创新中心建设专项资金创新团队培育项目“团头鲂基因组资源发掘与创新利用”(2016ZXYPY04), 武汉市科技计划项目“武汉市武昌鱼繁育工程技术研究中心”(20130207510318), 武汉市国际科技合作计划项目“淡水鱼类分子设计育种技术体系的合作研发”(2015030809020365), 湖北省科技支撑计划(对外科技合作类)项目“基于分子设计育种技术体系的主要淡水鱼类新品种培育合作研发”(2013BHE006)等项目的资助, 在此表示感谢。

著 者

2018 年 8 月

前 言

团头鲂(*Megalobrama amblycephala* Yih), 又名武昌鱼, 隶属于鲤形目(Cypriniformes) 鲤科(Cyprinidae) 鲂亚科(Cultrinae) 鲂属(*Megalobrama*), 是我国特有的重要草食性经济鱼类之一, 同时是新中国成立后我国科学家命名的第一个鱼类新种名, 也是新中国成立后人工驯养成功的第一种鱼类。团头鲂具有味美、头小、含肉率高、体形好、规格适中、易加工、食用方便等优点, 已被作为优良的草食性鱼类在全国普遍推广, 其养殖规模、产量、产值等逐年增加, 目前年产量已达 80 万 t, 在全国养殖面积达 50 万 hm²。然而团头鲂自然分布非常狭窄, 主要分布在长江中游及其附属水体, 如湖北省梁子湖和淤泥湖及江西省鄱阳湖等水体, 其遗传多样性较低, 近亲繁殖极易引起经济性状衰退。三十多年来, 团头鲂在人工养殖过程中, 养殖群体先后出现了生长速度减慢、抗病抗逆能力降低、性成熟提早等不良现象。

华中农业大学水产学院自 2008 年承担农业部国家大宗淡水鱼类产业技术体系团头鲂种质资源与育种岗位以来, 联合广东海大集团股份有限公司下属湖北百容水产良种有限公司和湖北省团头鲂(武昌鱼)原种场, 立足于团头鲂种业可持续发展的需求, 开展团头鲂分子育种技术体系及高产抗逆优良品种的培育和推广研究。现经连续 4 代选育, 历经十年, 培育成遗传稳定、生长快、成活率高的团头鲂新品种, 于 2016 年 12 月在第五届全国水产原种和良种审定委员会第四次会议正式审定通过, 2017 年 4 月 13 日由中华人民共和国农业部公告第 2515 号文正式发布, 新品种定名为团头鲂“华海 1 号”(品种登记号: GS-01-001-2016)。

在团头鲂新品种的培育过程中, 本研究团队同时围绕团头鲂种质资源、遗传选育、转录组学、小 RNA 组学、全基因组学及功能基因等方面开展了系列研究, 积累了大量研究资料, 发表了 100 多篇学术论文, 其中 SCI 60 多篇, 授权专利 10 余项。为了总结过去和展望未来, 我们将部分研究结果整理成册, 供广大水产科学工作者参考。

本书以多年研究积累为基础, 是一部遗传理论与育种实践相结合的专著。全书共分十章, 第一章主要概述了团头鲂种质资源保护和遗传改良方面的研究进展; 第二章主要围绕形态学特征及群体遗传结构等方面介绍了团头鲂野生群体的种质资源; 第三章主要介绍了基于高通量测序的团头鲂分子标记的开发与应用; 第四章和第五章分别阐述了团头鲂经济性状的遗传参数评估和团头鲂性状关联分子标记的筛选; 第六章重点介绍了团头鲂新品种华海 1 号选育的理论和过程; 第七章介绍了团头鲂三倍体和雌核发育的诱导及鉴定; 第八章和第九章分别从团头鲂全基因组及功能基因组两方面着重介绍了团头鲂的基因组学研究; 第十章详细阐述了团头鲂性状相关基因的结构和功能分析。

本书具有较强的科学性和先进性，不仅为团头鲂遗传育种提供了理论基础和技术支撑，也为其他养殖鱼类遗传育种研究和品种培育提供借鉴，同时又不乏实用性，对养殖生产实践具有一定的指导作用。

由于著者水平有限，书中不当之处在所难免，敬请广大读者指正。

著 者

2018年8月于武汉

目 录

序

前言

第一章 总论	1
第一节 种质资源研究现状	1
一、形态学	1
二、细胞遗传学	2
三、生化遗传学	2
四、分子种群遗传学	3
五、功能基因	4
六、组学	5
第二节 遗传改良研究	5
一、杂交育种	5
二、选择育种	7
三、分子标记辅助育种	7
四、雌核发育育种	7
五、多倍体育种	8
第三节 种质资源保护存在的问题及保护策略	9
一、种质资源保护存在的问题	9
二、种质资源保护策略	9
第二章 团头鲂种质资源	11
第一节 团头鲂形态学特征	11
一、梁子湖团头鲂雌雄生长特征	11
二、梁子湖、鄱阳湖和淤泥湖团头鲂的形态学比较	15
三、团头鲂形态性状对体重的影响效果分析	24
第二节 群体遗传结构	29
一、线粒体基因组	29
二、微卫星标记	40
三、相关序列扩增多态性	46
第三章 团头鲂分子标记的开发与应用	50
第一节 微卫星分子标记的开发	50
一、群体构建及测序分析	51
二、微卫星分布特征及 EST-SSR 标记的开发	53
三、微卫星多重 PCR 体系的构建	54
第二节 SNP 标记的开发	56
一、基于转录组测序的 SNP 标记开发	56
二、基于简化基因组测序的 SNP 标记开发	58

第三节 基于微卫星标记的亲子鉴定	59
一、家系构建及亲子鉴定方法	59
二、亲子鉴定结果与分析	61
第四章 团头鲂经济性状的遗传参数评估	65
第一节 团头鲂经济性状的遗传力评估	65
一、生长性状	65
二、抗病性状	69
第二节 生长性状的育种值评估	73
一、个体单个性状的育种值估算	74
二、个体综合育种值	75
第三节 亲本对子代生长快和生长慢群体的贡献及优良亲本选择	75
一、生长快和生长慢群体的生长表型	76
二、亲子鉴定分析	76
三、亲本对生长快和生长慢群体的贡献分析	77
四、有效群体数量	79
五、亲本育种值分析	79
第四节 不同地理群体间杂交优势和配合力分析	81
一、6 月龄生长性状	82
二、20 月龄生长性状	87
第五章 团头鲂性状关联分子标记的筛选	93
第一节 生长性状相关的分子标记	93
一、生长性状关联微卫星标记筛选	94
二、生长性状的 QTL 定位	98
第二节 抗病性状相关的分子标记	101
一、MHC II α 基因序列的测定与 SNP 分析	102
二、转铁蛋白 <i>Tf</i> 及其受体 <i>TfR1-a</i> 基因 SNP 开发、鉴定及抗病关联分析	104
三、 <i>NLRC3-like</i> 基因的 SNP 开发、鉴定及抗病关联分析	106
第三节 耐低氧性状相关的分子标记	108
一、基于转录组的低氧相关 SNPs 的开发	109
二、 <i>fih-1</i> 基因耐低氧性状 SNPs 的开发	111
第六章 团头鲂新品种华海 1 号的选育	113
第一节 华海 1 号的选育过程	113
第二节 华海 1 号的遗传进展及稳定性分析	114
一、遗传进展分析	114
二、染色体遗传稳定性	115
三、群体遗传一致性	115
第三节 华海 1 号的养殖性能分析	118
一、历年对比试验结果	118
二、历年生产性能对比试验结果	120
第七章 团头鲂三倍体和雌核发育的诱导及鉴定	122
第一节 三倍体的诱导及鉴定	122

一、诱导方法	122
二、倍性的鉴定	123
第二节 团头鲂雌核发育的诱导及形态特征的分析	128
一、诱导方法	129
二、诱导结果及鉴定分析	129
第三节 雌核发育群体的微卫星分析	135
一、微卫星对雌核发育子代的鉴定	135
二、雌核发育后代纯合性的评价	137
三、团头鲂正常群体和雌核发育群体微卫星位点的遗传多样性分析	139
第八章 团头鲂全基因组测序及比较研究	141
第一节 团头鲂全基因组测序与进化分析	141
一、团头鲂全基因组测序	141
二、团头鲂全基因组进化分析	147
第二节 高密度遗传连锁图谱的构建	150
一、群体的建立及遗传连锁图谱构建的方法	150
二、RAD 测序数据分析	151
三、SNP 分子标记发掘与基因分型	151
四、高密度遗传连锁图谱的构建	152
第三节 不同食性鱼类内源性消化系统的比较基因组学研究	155
一、内源性消化酶基因家族分析	156
二、嗅觉基因家族分析	156
三、味觉受体基因家族结果分析	159
第九章 团头鲂功能基因组的研究	165
第一节 生长性状相关的组学分析	165
一、生长性状相关的转录组分析	165
二、生长性状相关的小 RNA 组分析	169
第二节 抗病性状相关的转录组分析	178
一、细菌感染后团头鲂肝脏的转录组学研究	178
二、细菌感染后团头鲂肝脏、脾脏、肾脏混合组织转录组学研究	183
三、细菌感染后团头鲂肝脏小 RNA 组学研究	187
第三节 耐低氧性状相关的转录组分析	199
第四节 肌间骨性状相关的组学分析	211
一、不同组织转录组分析	211
二、不同组织 miRNA 组分析	222
第十章 团头鲂性状相关基因的结构和功能分析	229
第一节 生长相关基因	229
一、生长相关基因的克隆	229
二、生长相关基因对其生长发育的表达调控	230
第二节 免疫相关基因	238
一、Toll 样受体基因	238
二、热激蛋白基因	247

三、 <i>MHC II</i> 基因·····	252
四、干扰素调节因子·····	255
五、白细胞介素 6 的表达及其启动子活性分析·····	259
六、补体系统基因·····	263
七、铁代谢相关基因·····	268
第三节 耐低氧相关基因·····	281
一、低氧感受基因—— <i>phd</i> 和 <i>fih</i> ·····	282
二、低氧响应基因—— <i>Hif-α</i> 家族·····	289
第四节 其他相关基因·····	290
一、 <i>ghrelin</i> 、 <i>NPY</i> 和 <i>CCK</i> 基因·····	290
二、团头鲂 <i>MRF</i> 家族基因的序列特征和功能分析·····	295
三、 <i>Dmrt</i> 家族基因·····	298
主要参考文献·····	306

第一章 总 论

团头鲂，隶属于鲤形目鲤科鲃亚科鲂属，俗称武昌鱼，原产于长江中游的一些大中型湖泊，1955 年易伯鲁先生在湖北省梁子湖发现并定名为新种。团头鲂具有食性广、养殖成本低、生长快、成活率高、易捕捞，能在池塘中产卵繁殖，且具有味美、头小、含肉率高、体形好、规格适中等优点，因而在 20 世纪 60 年代就被作为优良的草食性鱼种在中国普遍推广。据联合国粮食及农业组织 (FAO) 最新统计数据，团头鲂产量从 1984 年的 4.5 万 t 增至 2015 年的 79.68 万 t，现已成为中国主要淡水水产养殖对象之一。

自 20 世纪 50 年代以来，国内多家单位在团头鲂营养、疾病、免疫、杂交等方面开展了系统研究，主要涉及的单位包括华中农业大学、上海海洋大学、南京农业大学、中国科学院水生生物研究所、中国水产科学研究院淡水渔业研究中心、苏州大学、湖南师范大学等。本章主要综述了团头鲂种质资源保护和遗传改良方面的研究进展，以期对团头鲂养殖产业的可持续发展提供基础资料(高泽霞等，2014)。

第一节 种质资源研究现状

一、形态学

形态学标记研究主要是根据生物体外部形态特征的差异进行物种的划分，是分类学常用的标准。团头鲂体高而侧扁，略呈斜方形。侧线完全。头小，锥形；吻圆钝。口小，端位，口裂呈弧形。上、下颌有薄的角质层。头后部急剧隆起，腹部在腹鳍基前向上斜起，在腹鳍基到肛门间有腹棱。背鳍最后的不分枝鳍条在腹鳍起点的后上方；腹鳍不到肛门，肛门靠近臀鳍；臀鳍基较长；尾鳍叉形。背部灰黑色，腹部浅灰白色，体侧有若干黑条纹，各鳍浅灰色。

李思发等(1991)分别利用传统测定法和框架测定法分析了湖北省淤泥湖、牛山湖、南湖及江苏省邗江的团头鲂群体间的形态差异。研究发现，四个群体团头鲂的形态在总体水平上有显著差异，在用判别函数分析方法鉴别鱼的来源方面，单独使用传统测量法的参数时，平均判别率为 48.1%，单独使用框架测量法的参数时，平均判别率为 63.5%。此外，判别分析显示，淤泥湖、牛山湖及南湖三个群体关系较近，邗江群体与其他群体关系稍远。王卫民教授带领的团头鲂种质资源与遗传改良研究团队对来自梁子湖、鄱阳湖及淤泥湖的团头鲂群体的可量性状和可数性状进行了单因素方差分析、单因素协方差分析、聚类分析、判别分析和主成分分析。主成分分析、判别分析和聚类分析结果显示三个湖泊的团头鲂趋于同一群体。通过计算差异系数，根据 Mayr 等提出的 75% 规则，认为它们的形态差异仍然是种内不同地理群体的差异，差异还达不到亚种水平。此外，通过比较发现梁子湖和鄱阳湖的地理群体相比淤泥湖的而言在形态上更为相似。

(曾聪等, 2011)。

二、细胞遗传学

染色体组型的研究是细胞遗传学的基础, 是分类和系统发生研究较为有力的遗传学证据。团头鲂细胞遗传学的研究主要集中于染色体组型和细胞核 DNA 含量方面。团头鲂是鲤科中分类和进化位置比较经典的种类, 对团头鲂进行深入的细胞遗传学研究, 对其种质资源的保护和育种等均具有十分重要的理论意义和实践意义。关于团头鲂的核型及其细胞核的 DNA 含量已有一些报道, 但所报道的实验结果有所差异。在染色体组型方面, 咎瑞光和宋峥(1979)及李渝成等(1983a)报道的团头鲂核型公式均为 $2n=48=20m+24sm+4st$, 而余来宁(1991)和尹洪滨等(1995)报道的核型模式分别为 $2n=48=20m+48sm+4st$ 和 $2n=48=26m+18sm+4st$ 。通过建立团头鲂鳍条、肌肉和心脏 3 种细胞系, 分析其核型公式为 $2n=48=26m+18sm+4st$, 总臂数(NF)=92(祝东梅, 2013)。以上差异是因操作造成的, 还是因采集地不同或团头鲂存在群体差异而产生的, 有待进一步研究确认。但团头鲂染色体的数目($2n=48$)这一事实已被广泛认同。有关团头鲂的 DNA 含量, 李渝成等(1983b)、余来宁(1991)和尹洪滨等(1995)先后做过报道。我们以鸡血 DNA 含量为标准, 测定的团头鲂 DNA 含量为 2.92pg 左右。结果表明, 团头鲂二倍体细胞的 DNA 含量明显高于已知 $2n=48$ 的其他鲤科鱼类的含量。

三、生化遗传学

生化遗传标记即基因产物标记, 如血清蛋白、同工酶、等位酶等。从 20 世纪 80 年代开始, 许多学者相继开展了团头鲂的生化遗传学研究, 且多为同工酶。傅予昌和王祖熊(1988)用垂直的淀粉凝胶电泳方法分析了团头鲂胚胎发育阶段(1~105h)和成体 6 种组织中的乳酸脱氢酶(LDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、谷氨酸脱氢酶(GDH)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)、乙醇脱氢酶(ADH)、异柠檬酸脱氢酶(IDH)、酯酶(EST)和碱性磷酸酶(AKP)8 种同工酶系统的酶带, 研究发现共约有 23 个基因座位在其胚胎发育期和成体组织中表达。与许多其他鱼类不同, 团头鲂的 GDH 在整个胚胎发育过程中都有活性, 但在其成体组织中无特异性分布。

李思发等(1991)利用七种同工酶的 15 个位点分析了团头鲂不同群体间的生化遗传差异, 研究发现多态位点比例在淤泥湖、牛山湖及南湖是一致的, 都是 20%, 而在邗江为 13.3%。4 个群体的平均杂合度分别为 0.0816、0.0851、0.0808 和 0.0549。Nei's 遗传距离在邗江与淤泥湖间最大, 而在淤泥湖、牛山湖及南湖间较小。表明淤泥湖、牛山湖及南湖团头鲂三个群体的关系较近, 淤泥湖同牛山湖团头鲂群体间的遗传距离最小。

朱必凤等(1999)利用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析了鄱阳湖团头鲂肌肉中 EST、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)4 种同工酶, 结果表明, 团头鲂肌肉中 EST、SOD、CAT 均为 4 条酶带, 但 POD 未显示酶带。

吴兴兵等(2007)对采自涪湖国家级团头鲂良种场的团头鲂人工选育亲本后代进行了 7 种同工酶电泳分析, 结果发现, 团头鲂肌肉中 LDH 显示 5 条四聚体酶带, EST 显示 5 条酶带, ADH 显示 5 条酶带, MDH 显示 6 条酶带, 苹果酸酶(ME)显示 5 条酶带, GDH

检测到 5 条酶带。过氧化物酶(POX)由 3 个位点编码,位点 POX-1 和 POX-3 各编码 1 条酶带,位点 POX-2 表现多态性。与前人的研究结果相比(傅予昌和王祖熊,1988),就 LDH 和 MDH 来看,江苏水域人工选育的团头鲂繁殖群体仍保持着原种的遗传性状。

四、分子种群遗传学

20 世纪 80 年代以来,用于研究群体遗传多样性、物种亲缘关系和系统进化、种质鉴定及构建分子遗传连锁图谱等的各种分子标记方法发展迅速,主要有限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、微卫星(microsatellite)、线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)、随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)等。进入 21 世纪以后,一方面由于团头鲂人工驯养群体退化现象十分普遍,且日益严重,另一方面由于过度捕捞和水域污染等情况日益恶化,导致团头鲂天然种质资源也面临严重的威胁,鉴于此,许多研究者开始利用 RAPD、mtDNA、微卫星等分子标记来调查和评估团头鲂野生群体和养殖群体的遗传多样性现状。

张德春(2001)利用 RAPD 技术对淤泥湖和梁子湖的团头鲂野生群体进行了遗传结构分析,结果表明,淤泥湖和梁子湖团头鲂个体间的遗传相似度在 0.9395~0.9614,平均值为 0.9541,淤泥湖和梁子湖野生群体的遗传多样性水平较低。李弘华(2008)测定了淤泥湖、梁子湖及鄱阳湖团头鲂共 53 尾样本的线粒体 DNA 控制区序列,结果显示,在获得的 411bp 长度的控制区序列中,仅检测到 3 个突变位点、5 种单倍型,表明这三个群体的遗传多样性水平比较低,且淤泥湖群体最低。我们采用微卫星和相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)分子标记方法分析了梁子湖、鄱阳湖、淤泥湖三个团头鲂天然群体的遗传多样性,结果显示团头鲂三个群体之间遗传分化均很小,表明团头鲂之间地理隔绝造成的种内分化不明显。其中,梁子湖和鄱阳湖之间的遗传分化水平($F_{st}=0.0376$)极低,而梁子湖与淤泥湖之间的遗传分化水平相对较高($F_{st}=0.0733$)(李杨,2010;冉玮等,2010)。

在团头鲂人工繁殖群体遗传多样性研究方面,边春媛等(2007)采用 mtDNA D-loop 区段的限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)方法对采自天津市蓟县、宁河县及山西省太原的三个人工繁殖群体共 136 尾团头鲂进行遗传多样性分析。结果显示,蓟县和太原两个群体所有个体间没有差异,只有一种单倍型,宁河县群体 46 尾鱼中也仅存 2 种单倍型,说明这三个人工繁殖群体的遗传多样性很低。我们采用 SRAP 分子标记分析了团头鲂浦江 1 号养殖群体和南溪养殖群体的遗传结构,结果显示,养殖群体的遗传多样性显著低于其野生群体(Ji et al., 2012)。

为及时检测团头鲂多倍体群体内的遗传变异,并为选育不育的团头鲂提供理论依据和参考资料,唐首杰等(2007, 2008)分别利用微卫星标记和线粒体 DNA 标记对不同倍性(同源 4n-F1、正交 3n、反交 3n、异源 3n 和 2n)团头鲂群体进行了遗传多样性分析,结果一致表明,5 个群体的遗传多样性由大到小依次为:反交 3n>异源 3n>正交 3n>同源 4n-F1>2n,而且前面四个群体的遗传多样性水平显著高于 2n 群体。

五、功能基因

团头鲂的功能基因研究肇始于 2001 年,起初主要集中在与团头鲂生长、繁殖、内分泌及体形进化相关基因的研究。在生长相关基因方面,劳海华等(2001)采用 cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA end, RACE)技术克隆获得了团头鲂生长激素(growth hormone, *GH*)基因的 cDNA 序列。白俊杰等(2001)采用反转录-聚合酶链式反应(PCR)(reverse transcription-PCR, RT-PCR)方法获得了团头鲂胰岛素样生长因子-I(insulin-like growth factor-I, IGF-I)的 cDNA 序列。俞菊华等(2003)采用反转录(RT)和 RACE 法,分离和测定了团头鲂中生长抑素前体基因 I(preprosomatostatin I, *PSSI*)的 cDNA 全长核苷酸序列。在繁殖相关基因研究方面,曲宪成等(2007)利用 RT-PCR 和 RACE 克隆了团头鲂脑下垂体中两种促性腺激素 β (*GtH I β* 和 *GtH II β*)亚基的 cDNA 序列,并对其进行了结构和系统进化分析。曲宪成等(2008a)利用改进的锚定 PCR 方法克隆了团头鲂促性腺激素 *I β* (*GtH I β*)亚基基因 5'端侧翼序列,并在生物信息学方法分析的基础上构建了荧光素酶质粒表达载体。

自 2008 年以来,我们克隆了团头鲂一批基因并分析了其对相关性状的调控作用。包括生长性状相关基因,如生长激素受体(*GHR1*和 *GHR2*)、胰岛素样生长因子(*IGF-I*和 *IGF-II*)、肌肉生长抑制素(*MSTN a*和 *MSTN b*)等(Zeng et al., 2014);免疫与抗病相关基因,如热激蛋白 90(*Hsp90 α* 和 *Hsp90 β*)(Ding et al., 2013),主要组织相容性复合体(*MHC IIA*和 *MHC IIB*)(Luo et al., 2014a),肝脏表达抗菌肽(*LEAP-1*和 *LEAP-2*)(Liang et al., 2013a),转铁蛋白(transferrin, TF)及其受体 2(TFR2)(Ding et al., 2015)、铁蛋白重链和中链(FTH 和 FTM)(Ding et al., 2017)、内凝集素(intelectin, INTL)(Ding et al., 2017)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)(Fu et al., 2016a)、NOD 样受体 C 亚族基因(the nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors subfamily C3 like, NLRC3-like)(Zhou et al., 2017a)、趋化因子受体(chemokine receptor, *CXCR4b*)(Zhang et al., 2013a), β 防御素(β -defensin)(Liang et al., 2013b)等;摄食相关基因,如生长激素释放肽(ghrelin)、胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)、神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)等(Ping et al., 2013);繁殖相关基因,如 *Kiss* 基因(Kisspeptin)及其受体 *Kissr* 基因(Kiss receptor)(温久福等, 2013)、精子发生相关 4 基因(spermatogenesis associated 4, *SPATA4*)(韦新兰等, 2013)、*leptin* 基因及其受体基因(leptin receptor)(Zhao et al., 2015)等;耐低氧相关基因,脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylase domain, phd)基因家族(Wang et al., 2015)、低氧诱导因子抑制因子 1(factor inhibiting hypoxia inducible factor 1, *fiH1*)(Zhang et al., 2016a)等;肌间骨发育相关基因,如骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)家族基因(Zhang et al., 2018)、锌指结构转录因子 *osterix* 基因等;以及团头鲂性别决定和分化相关基因 *DMRT* 家族基因(Su et al., 2015)、调节心肌肌肉收缩的心肌肌钙蛋白 T(cardiac troponin T)(Chen et al., 2013)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)(Li et al., 2013)等基因。

六、组学

21 世纪, 第二代高通量测序技术的发展为组学研究带来了革命性的变化。团头鲂组学相关研究也逐渐开展, 我们团队相继构建了全面、丰富的团头鲂转录组、小 RNA 组、代谢组、蛋白组资源。包括采用转录组学的方法分析生长快慢品系不同组织的基因表达差异(Gao et al., 2012)、嗜水气单胞菌感染前后基因表达差异(Tran et al., 2015; 魏伟, 2015)、低氧处理前后(Chen et al., 2017)及肌间骨与外周结缔组织(Liu et al., 2017)的基因表达差异、肌间骨发生发育过程中的基因表达差异(Wan et al., 2016)等, 进而构建了差异表达基因的调控通路等; 采用小 RNA 组学分析方法筛选生长快慢品系的差异表达的 miRNA(Yi et al., 2013)、嗜水气单胞菌感染前后 miRNA 表达差异(Cui et al., 2016)、肌间骨及外周结缔组织(Wan et al., 2015)和肌间骨发生发育过程中 miRNA 表达差异(Wan et al., 2016)等; 采用代谢组分析方法筛选了团头鲂雌性性成熟前后血浆的差异代谢物(Zhou et al., 2017b); 采用蛋白组分析方法筛选了团头鲂肌间骨和肋骨的差异表达蛋白(Nie et al., 2017)。基于以上组学信息资源, 团头鲂大批量的简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)和单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)标记被开发出来并被充分用于团头鲂的分子辅助育种研究中。此外, 我们还完成了团头鲂及鲂属鱼类及其杂交子代线粒体全基因组(赖瑞芳等, 2014; Zhang et al., 2016a)和细胞核全基因组测序工作(Liu et al., 2017), 为从全基因组水平解析团头鲂关键性状的分子调控机制及开展其全基因组选择育种奠定了坚实的基础。

第二节 遗传改良研究

一、杂交育种

杂交(hybridization)是被广泛采用的育种手段。杂交的主要目的在于获得杂种优势, 选育新品种或新品系。杂交育种是培育鱼类优良新品系比较快捷和有效的方法之一(楼允东, 1989)。迄今为止, 有关团头鲂杂交育种的报道包括种间杂交(谢刚等, 2002; 杨怀宇等, 2002)、属间杂交(顾志敏等, 2008)和亚科间杂交(金万昆等, 2003a; 马波和金万昆, 2004)。

在种间杂交方面, 已有的研究主要针对对鲂属团头鲂、三角鲂(*Megalobrama skolkovii*)和广东鲂(*Megalobrama terminalis*)3 个种之间的杂交。谢刚等(2002)研究了杂交鲂(广东鲂♀×团头鲂♂)及其亲本的主要形态性状, 发现杂交鲂第一代的形态性状大多数介于父本和母本之间, 主要可数性状和可量性状有些偏近父本, 有些偏近母本, 而有些则介于父本和母本之间; 进一步的实验表明, 杂交鲂第一代的成活率偏高, 且可育, 其肉质近似广东鲂, 某些生理特性(如耐低氧、耐操作和运输等)均优于广东鲂, 但生长对比试验结果初步看出杂交一代的生长速度比团头鲂差, 期望的杂种生长优势不大明显。叶星等(2002)采用活体肾细胞直接制片法制作了广东鲂♀和团头鲂♂及其杂交子一代的染色体, 结果显示, 杂交子一代的染色体组型及总臂数与母本广东鲂相同。广东鲂和团头鲂的染色体组型较相似, 这从细胞遗传学的角度阐释了广东鲂与团头鲂杂交成功、杂种后代可育的原因。叶星等(2002)采用聚丙烯酰胺垂直平板电泳法对广东鲂、团头鲂及其杂交子一代肌肉、肝脏和眼

睛的4种同工酶(EST、LDH、MDH、SOD)进行电泳,分析其酶谱组成和活性差异,结果显示,父本和母本同种组织中大部分同工酶的表达酶谱较相似,表明这两种鱼的亲缘关系较近。杨怀宇等(2002)采用聚类分析、主成分分析和判别分析对团头鲂、三角鲂及其正反杂交 F_1 代的比例性状和框架参数进行分析,探讨了亲本形态性状在子代中的遗传传递情况,结果显示,正反杂交 F_1 代形态都表现出较多的母性遗传特征,但三角鲂母本对杂交 F_1 代遗传特征的影响强于团头鲂母本。我们比较了团头鲂与广东鲂、三角鲂及厚颌鲂(*Megalobrama pellegrini*)的正交、反交及每种鱼类自交的比较研究,结果显示,所有组合的受精率、孵化率和成活率均较高,证明鲂属种间杂交具有可行性;团头鲂与厚颌鲂正反交子代除体高杂种优势不明显外,体长与体重均表现出杂种优势;团头鲂与三角鲂正反交子代的体长、体重、体高均未表现出明显的杂种优势;团头鲂与广东鲂的正交子代表现出明显的抗嗜水气单胞菌疾病的优势(张大龙等, 2014; Tran et al., 2015)。

在属间杂交方面,团头鲂和翘嘴红鲌之间的杂交研究较多。翘嘴红鲌和团头鲂分属鲌亚科鲌属和鲂属,两者在生理和生态上有较大差异。翘嘴红鲌为强肉食性鱼类,具有生长快、体型佳、肉质细嫩等优点,不过也存在着鳞片细小而易脱落受伤、饲料成本高等不足;而团头鲂为草食性鱼类,具有饲料成本低、鳞片大而不易脱落、抗逆性强等优点。鉴于此,顾志敏等(2008)开展了翘嘴红鲌(♀)和团头鲂(♂)杂交 F_1 代的形态和遗传分析,结果表明,翘嘴红鲌(♀)和团头鲂(♂)间具有良好的亲和力,杂交受精率、孵化率均达到90%以上;翘嘴红鲌(♀)和团头鲂(♂)杂交 F_1 代的多数可数可量性状表现为中间型;进一步对框架参数的聚类 and 判别分析显示,杂交 F_1 代的染色体数($2n$)为48,核型公式为 $18m+26sm+4st(NF=92)$,杂交 F_1 代大部分RAPD扩增条带能在亲本中找到,有的仅来自父本,有的仅来自于母本,说明杂交 F_1 代为二倍体杂种;杂交 F_1 代与母本的相对遗传距离为0.4327,而与父本的相对遗传距离为0.2312,前者大于后者,表明杂交 F_1 代与两亲本的遗传差异不是对等的,偏向父本一方。金万昆等(2006)对团头鲂(♀)和翘嘴红鲌(♂)杂交 F_1 代的含肉率、肌肉营养成分及蛋白质的18种氨基酸进行了测定分析,结果表明,该杂种的含肉率、蛋白质含量、脂肪含量、氨基酸含量等许多指标都较高。康雪伟(2013)研究发现,团头鲂(♀)和翘嘴红鲌(♂)杂交 F_1 代中有二倍体鲂鲌($2n=48$)和三倍体鲂鲌($3n=72$);而翘嘴红鲌(♀)和团头鲂(♂)杂交 F_1 代中只有二倍体鲂鲌($2n=48$);正反交产生的两种二倍体鱼雌雄正常发育,分别自交后得到了两性可育的二倍体 F_2 代($2n=48$);杂交后代均继承了双亲的遗传特征。郑国栋等(2015)研究表明,团头鲂(♀)和翘嘴红鲌(♂)杂交 F_1 代的生长速度显著快于团头鲂浦江1号和翘嘴红鲌,表现出明显的超亲生长优势。我们对团头鲂、长春鲌及其杂交子代(F_1 代:团头鲂♀×长春鲌♂)的形态学差异和性腺发育进行了比较分析,结果表明,杂交子代的多数可数、可量性状同亲本相近,差异不显著;聚类分析显示,杂交子代在形态上与母本团头鲂更相似,但遗传了父本长春鲌的全腹棱特征;性腺发育检测发现,杂交子代的卵巢和精巢存在单侧发育和两侧不均衡发育的情况,但都能产生成熟的精子和卵子(赵博文等, 2015)。

在亚科间杂交方面,目前已在框鳞镜鲤(♀)与团头鲂(♂)、散鳞镜鲤(♀)与团头鲂(♂)及丁鲃(♀)与团头鲂(♂)这三个杂交组合中获得了杂交 F_1 代(金万昆等, 2003b; 马波和金万昆, 2004; Zou et al., 2007),但杂交种的养殖潜力尚需要进一步的研究才能确认。