

# 水产生物技术发展战略研究

陈松林<sup>1,2</sup>, 邵长伟<sup>1,2</sup>, 徐鹏<sup>3</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术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 266273; 3. 中国水产科学研究院水产生物技术中心, 北京 100141)

**摘要:** 本文从水产养殖生物基因组测序、遗传连锁图谱绘制、重要经济性状相关分子标记 / 基因筛选、基因组编辑、基因组选择以及细胞培养与种质冷冻保存等方面综合介绍了水产生物技术的发展现状, 并深入分析了水产生物技术研究中存在的主要问题, 诸如基因功能分析平台不完善, 抗病与性控育种技术研究滞后, 基因组编辑与全基因组选择技术刚刚起步等。同时, 围绕上述主要问题, 提出了水产生物技术亟待突破的关键技术, 并建议“十三五”期间设立重点研究计划专项, 深入开展水产动物基因组资源开发与利用、重要经济性状遗传解析以及水产生物信息大数据平台构建等。

**关键词:** 水产; 生物技术; 基因

**中图分类号:** Q78      **文献标识码:** A

## Development Strategy for Fisheries Biotechnology

Chen Songlin<sup>1,2</sup>, Shao Changwei<sup>1,2</sup>, Xu Peng<sup>3</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China; 2. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266273, Shandong, China; 3. Centre for Aquaculture Biotechnology, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China)

**Abstract:** The recent developments in fisheries biotechnology are reviewed in this paper, including aquatic animal genome sequencing, genetic mapping construction, screening of molecular marker or genes for economically important traits, genome editing, genomic selection, and cell culture and germplasm conservation. The main problems addressed in the study of fisheries biotechnology are also analyzed, including the incomplete gene function analysis platform, the hysteresis of breeding techniques on sex control and disease resistance, the ongoing of genome editing and genomic selection and so on. The key technological breakthroughs that are needed to solve these problems are outlined. Meanwhile, this paper proposes a key major research project to be implemented, during the 13th Five Year Plan, in order to develop and utilize aquatic animal genome resources, analyze their commercially important genetic traits, and construct a megadata platform for aquatic organisms.

**Key words:** fisheries; biotechnology; gene

### 一、前言

我国是世界第一大农业生产与消费国, 也是世

界水产品生产大国, 产量连续 20 多年居世界首位。“国以农为本、农以种为先”, 种业作为现代农业发展的第一产业要素, 是确保主要农产品有效供给的

收稿日期: 2016-04-27; 修回日期: 2016-05-15

作者简介: 陈松林, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 研究员, 研究方向为水产生物技术和遗传育种; E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

基金项目: 中国工程院重点咨询项目“水产养殖业十三五规划战略研究”(2014-XZ-19-3); 国家自然科学基金重点项目(31130057); 山东省泰山学者攀登计划专家项目

本刊网址: www.enginsci.cn

重要物质基础, 种业科技的不断创新已成为提升养殖业核心竞争力的源泉。近年来, 伴随着国家一系列关于“现代种业”“蓝色经济”等战略性指导方针、规划的提出, 我国水产种业发展迎来了前所未有的重大机遇。

水产生物技术作为水产种业发展的核心技术, 涉及到养殖学、遗传学和育种学等多个学科, 从群体、个体、细胞到基因等多种水平, 从经典技术到组学技术等多种技术, 从鱼类、虾蟹类、贝类到藻类等各类生物, 可以说是一个庞大的系统工程。特别是随着基因组技术的发展, 以水产基因组技术为核心的水产生物技术在水产良种培育、苗种繁育、种质保存及病害防控等方面展现出巨大的应用潜力和广阔的应用前景。现代水产生物技术研究内容主要包括水产生物全基因组解析和基因资源发掘技术, 重要经济性状基因鉴定及功能分析技术, 基因组编辑、基因组选择和分子设计技术, 水产基因工程产品的研制与利用技术, 种质分子鉴定、评估与保存技术等。近年来, 国内外在水产生物全基因组测序和精细图谱绘制上取得很大进展, 获得了海量的基因资源信息, 但在重要经济性状功能基因鉴定和应用、基因组编辑和基因组选择、水产动物胚胎批量化保存以及无脊椎动物细胞培养等技术上还存在一些问题, 满足不了水产种业和养殖业发展的需要。我国“十三五”及今后相当长一段时间内水产养殖业的可持续发展对水产生物技术具有重大需求, 大力发展以水产基因组技术为核心的水产生物技术研发是我国“十三五”期间的重大研究课题。

## 二、水产生物技术发展现状

### (一) 水产生物全基因组测序和精细图谱绘制

近5年来, 国内外科学家在水产养殖生物全基因组测序和精细图谱绘制方面取得了一些重大进展。国外相继完成了大西洋鳕<sup>[1]</sup>、三棘刺鱼<sup>[2]</sup>、蓝鳍金枪鱼<sup>[3]</sup>、七鳃鳗<sup>[4]</sup>、腔棘鱼<sup>[5]</sup>、虹鳟<sup>[6]</sup>和罗非鱼<sup>[7]</sup>等水产动物的全基因组测序和精细图谱绘制。

国内, 中国科学院海洋研究所牵头完成了长牡蛎全基因组测序和精细图谱绘制, 并揭示了潮间带逆境适应的分子机制<sup>[8]</sup>; 中国水产科学研究院黄海水产研究所牵头完成了半滑舌鳎全基因组精细图谱绘制, 并揭示了ZW性染色体起源和进化以及适应

底栖生活的分子机制<sup>[9]</sup>, 这也是世界上第一个完成全基因组精细图谱绘制的比目鱼类; 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所牵头完成了鲤鱼全基因组测序和遗传多样性分析<sup>[10]</sup>; 浙江海洋大学牵头完成了大黄鱼全基因组测序和精细图谱绘制<sup>[11]</sup>; 中国科学院水生生物研究所牵头完成了草鱼全基因组测序和精细图谱构建<sup>[12]</sup>; 深圳华大基因研究院牵头完成了弹头鱼全基因组测序<sup>[13]</sup>; 中国科学院海洋研究所完成了桔黄东方鲀全基因组测序<sup>[14]</sup>。此外, 中国水产科学研究院黄海水产研究所完成了海带全基因组图谱的绘制<sup>[15]</sup>。上述水产生物全基因组结构的解析为筛选重要性状相关功能基因提供了基因资源。

### (二) 水产养殖生物重要性状相关功能基因发掘

在水产养殖动物性别决定、抗病免疫、生殖发育等相关基因筛选与鉴定方面国内外也取得了重要进展。近5年来, 国外科学家在多种鱼类上发现了性别决定基因, 例如, 青鳉的*dmy*基因、银汉鱼的*amhy*基因、河豚的*amhr2*基因、吕宋青鳉的*gsdf*基因、虹鳟的*sdY*基因<sup>[16-20]</sup>。

国内, 中国水产科学研究院黄海水产研究所克隆与表征了半滑舌鳎性别决定和生殖相关的10多个基因<sup>[21-23]</sup>, 特别是发现*dmrt1*基因是半滑舌鳎Z染色体连锁、精巢发育必不可少的雄性决定基因<sup>[9]</sup>。西南大学克隆了罗非鱼雄性性腺发育必不可少的基因*amhr*<sup>[24]</sup>。在抗病免疫相关基因筛选方面, 国内多家单位都开展了不同水产养殖生物抗病免疫相关基因克隆的研究, 其中, 代表性的单位包括: 中国科学院水生生物研究所解析了鲫鱼干扰素系统关键基因的抗病毒作用机理<sup>[25-28]</sup>, 中国水产科学研究院黄海水产研究所和中国科学院海洋研究所等单位克隆与表征了大菱鲆*stat2*、*grim-19*、牙鲆*akirin1*、*hepn*、*clq*, 半滑舌鳎*ghClq*、*irfl*等一批抗病免疫相关基因<sup>[29-34]</sup>。

### (三) 水产养殖生物高密度遗传连锁图谱绘制

近5年来, 水产养殖动物高密度遗传连锁图谱的构建主要采用单核苷酸多态性(SNP)标记进行, 目前已在多种水产养殖动物构建了高密度单核苷酸多态性遗传图谱。国外, 利用5950个单核苷酸多态性标记构建了大西洋鲑高密度遗传图谱<sup>[35]</sup>; 利用

2 226 个单核苷酸多态性标记构建了虹鳟高密度遗传图谱<sup>[36]</sup>；利用 2 235 个单核苷酸多态性标记构建了墨西哥脂鲤高密度遗传图谱，标记间平均距离为 0.94 cM<sup>[37]</sup>；构建了斑点叉尾鲷高密度单核苷酸多态性遗传连锁图谱<sup>[38]</sup>。

国内，中国水产科学研究院黄海水产研究所构建了半滑舌鳎高密度单核苷酸多态性遗传连锁图谱，定位单核苷酸多态性标记 12 142 个<sup>[9]</sup>，平均图距为 0.326 cM；构建了牙鲆高密度单核苷酸多态性遗传连锁图谱，平均图距为 0.47 cM<sup>[39]</sup>；构建了大菱鲆高密度单核苷酸多态性遗传图谱，平均图距为 0.4 cM<sup>[40]</sup>。中国水产科学研究院黑龙江水产研究所构建了鲤鱼微卫星遗传连锁图谱，共包含 1 025 个标记<sup>[41]</sup>。中国科学院海洋研究所构建了海湾扇贝高密度微卫星遗传连锁图谱<sup>[42]</sup>和南美白对虾高密度单核苷酸多态性遗传连锁图谱，标记间距达 0.7 cM<sup>[43]</sup>。中国海洋大学构建了扇贝高密度单核苷酸多态性遗传连锁图谱，平均图距为 0.41 cM<sup>[44]</sup>。此外，中国海洋大学还构建了海带高密度单核苷酸多态性遗传图谱，平均图距为 0.362 cM<sup>[45]</sup>。

#### (四) 水产养殖生物重要性状相关分子标记筛选与应用

国内外近几年来对水产养殖动物重要性状相关分子标记的筛选非常重视，其中欧盟国家对鱼类性别特异分子标记筛选投资很大，例如，法国主导启动了 20 多种养殖鱼类性别特异分子标记筛选的项目研究。美国发现了斑点叉尾鲷雄性特异分子标记 AUEST0678<sup>[46]</sup>。此外，法国科学家利用模式藻类水云性别决定区域的序列，开发了掌状海带、裙带菜和巨藻的性别特异分子标记<sup>[47]</sup>。而在抗病相关分子标记筛选方面，初步筛选出与虹鳟抗细菌性冷水病 (CWD) 的 12 个相关标记以及与传染性造血器官坏死病毒 (IHNV) 相关的 19 个单核苷酸多态性标记<sup>[48]</sup>。发现大菱鲆与盾纤毛虫病相关的微卫星标记 Sma-USC256<sup>[49]</sup>；发现斑节对虾抗白斑病 (WSD) 相关的 RAPD-SCAR 标记 1 个<sup>[50]</sup>。

国内近几年来在鱼类性别特异分子标记筛选方面取得了重要进展，筛选出半滑舌鳎和黄颡鱼等多种鱼类性别特异扩增片段长度多态性 (AFLP) 标记和微卫星标记<sup>[51]</sup>。其中，中国水产科学研究院黄海水产研究所筛选出半滑舌鳎雌性特异扩增片段长

度多态性标记和微卫星标记，发明了鉴别雄鱼、伪雄鱼、雌鱼和超雌鱼遗传性别的聚合酶链式反应 (PCR) 技术，研制了半滑舌鳎高雌性苗种制种技术，将苗种的生理雌鱼比例提高了 20 % 以上<sup>[9,52,53]</sup>。中国科学院水生生物研究所筛选出黄颡鱼雄性特异扩增片段长度多态性标记，建立了黄颡鱼遗传性别鉴定的聚合酶链式反应 (PCR) 方法<sup>[54]</sup>。浙江海洋大学筛选出条石鲷雄性特异分子标记，建立了条石鲷遗传性别鉴定技术<sup>[55]</sup>。上海海洋大学利用荧光原位杂交筛选出海带雌性特异标记<sup>[56]</sup>。在水产养殖动物抗病相关分子标记筛选方面报道较少，其中黄海水产研究所筛选出牙鲆抗鳃弧菌病相关微卫星标记<sup>[57]</sup>。

#### (五) 全基因组选择技术

基因组选择 (GS) 是挪威科学家 Meuwissen 在 21 世纪初期提出的方法。这一方法是以覆盖整个基因组的单核苷酸多态性标记信息为基础，能够鉴定出导致目标性状表型的所有遗传变异，可以同时选择抗病、高产、抗逆等多种经济性状，达到多性状选育的分子育种模式。这个方法特别适合于低遗传力的数量性状，例如抗病、抗逆等性状。全基因组选择技术在禽、牛和猪等养殖动物上得到应用并产生了很好效果。而在水产养殖动物上，由于全基因组测序的滞后，迄今国际上有关鱼类全基因组选择育种大多停留在理论研究，投入实际应用的还很少。其中，挪威科学家进行了大西洋鲑感染病原前后存活鱼和死亡鱼基因表达谱的比较研究，通过模拟计算，预测经 6~7 代选择后抗病力有可能提高 1 倍<sup>[58]</sup>。美国奥本大学开发了 250 K 的斑点叉尾鲷单核苷酸多态性标记的基因芯片，推进了全基因组选择在鳃鱼育种中的应用<sup>[59]</sup>。挪威、美国等国家目前启动了大西洋鲑、虹鳟鱼等抗病全基因组选择的项目研究。

“十二五”期间，我国启动了半滑舌鳎、大黄鱼、栉孔扇贝和对虾基于全基因组信息的遗传选育的课题研究，其中中国海洋大学建立了扇贝全基因组选择技术平台；中国水产科学研究院黄海水产研究所完成了半滑舌鳎和牙鲆抗病参考群体的构建及全基因组重测序，计算了全基因组单核苷酸多态性标记的遗传效应和基因组估计育种值 (GEBV)；集美大学开展了大黄鱼生长性状的全基因组选择技术

研究。上述进展为建立这些种类的全基因组选择育种技术奠定了重要基础。

#### (六) 水产养殖生物基因组编辑技术

基因组编辑技术是近几年来发展起来的对基因组进行精确修饰的一种先进技术,主要包括转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)和CRISPR/Cas9两项技术。这些基因组编辑技术在模式鱼类斑马鱼和青鳞上成功建立并得到应用<sup>[60,61]</sup>。有关水产养殖动物基因组编辑技术的成功报道目前还很少。Edwardsen等<sup>[62]</sup>采用CRISPR/Cas9技术对大西洋鲑色素沉积相关的两个基因*tyrosinase*和*slc45a2*进行了定点修饰,导致突变体在幼鱼阶段相比野生型鱼减少了色素沉积。

西南大学通过转录激活因子样效应物核酸酶技术敲除了罗非鱼性别相关的2个基因*dmrt1*和*foxl2*,揭示了这两个基因在罗非鱼性别分化过程中的功能<sup>[63]</sup>。苏州大学建立了鲤鱼转录激活因子样效应物核酸酶和CRISPR/Cas9基因组编辑技术,并对*sp7*、*runx2*、*spp1*和*mstn*基因进行了定点突变,研究了这些基因在鲤鱼肌间刺形成中的作用<sup>[64]</sup>。黄海水产研究所成功建立了海水鲆鲽鱼类半滑舌鳎受精卵显微注射和转录激活因子样效应物核酸酶基因组编辑技术,采用该技术成功将雄性决定基因*dmrt1*进行了突变,并观察到突变后的遗传雄鱼生长变快,接近正常雌鱼<sup>[65]</sup>。随着越来越多的水产动物的基因组被测序,它们的基因组功能研究会显得日益重要。基因组编辑是基因功能研究和基因组改造的一个重要手段。在水产领域,基因组编辑技术还处于研究的初期阶段,但其在基因敲除和基因组育种方面已经表现出巨大潜力,将对水产动物基因功能研究和遗传改良产生深远影响。

#### (七) 水产动物细胞培养

近几年来,国外在水产养殖动物细胞系建立方面取得一些进展。如印度建立了热带观赏鱼*Puntius fasciatus*和*Pristolepis fasciata*的尾鳍细胞系<sup>[66]</sup>,建立了南亚野鲮鱼鳃组织细胞系等<sup>[67]</sup>。特别是在水产无脊椎动物细胞培养上进行了一些有益探索,并取得可喜进展。Jayesh等<sup>[68]</sup>研制出一种斑节对虾细胞的施旺细胞培养液(SCCM),斑节对虾淋巴和卵巢细胞分别传了2代。Mercurio等进行了海胆卵巢

组织的原代培养<sup>[69]</sup>。

近5年来,我国在水产养殖动物细胞系建立上取得一些进展,新建立了多种鱼类组织细胞系,陈松林等主编出版了《鱼类细胞培养理论与技术》专著<sup>[70]</sup>。其中黄海水产研究所建立了3个半滑舌鳎组织细胞系,包括卵巢细胞系<sup>[71]</sup>,伪雄鱼性腺细胞系<sup>[72]</sup>以及神经胶质细胞系<sup>[73]</sup>;建立了1个云纹石斑鱼心脏细胞系<sup>[74]</sup>。

#### (八) 水产养殖动物种质冷冻保存

在水产养殖动物精子冷冻保存方面,国外已进入商业化应用阶段。其中精子冷冻保存技术在大西洋鲑种业发展和苗种推广中起到重要作用,挪威的大西洋鲑苗种繁育实行了采用冷冻精子授精鱼卵批量化生产鱼苗的生产模式。美国路易斯安那州立大学建立了鱼类精子高效冷冻保存技术,3个人每天可以冷冻保存1000管冻精的任务。在鱼类胚胎冷冻保存方面,伊朗科学家采用玻璃化冷冻方法,将波斯鲟鱼胚胎在液氮中冷冻保存后复活,成功获得冷冻复活的胚胎,最高复活率达69%<sup>[75]</sup>,从而证明玻璃化冷冻方法在鱼类胚胎超低温冷冻保存上的可行性和应用潜力。

国内近几年来不仅建立了性逆转七带石斑鱼、抗病牙鲆和抗病半滑舌鳎优良家系的精子冷冻保存技术和精子库,而且在石斑鱼冷冻精子产业化应用方面取得较大进展,实现了鱼类冷冻精子的产业化应用。在水产动物胚胎冷冻保存方面,自2005年我国首次突破海水鱼类牙鲆胚胎玻璃化冷冻技术,并在-196℃液氮温区获得冷冻复活且孵化出鱼苗的牙鲆胚胎以来,国内一些学者又相继在其他鱼类获得冷冻复活的胚胎,例如,采用玻璃化技术在七带石斑鱼上获得了14粒冷冻复活胚胎,其中2个冻胚孵化出鱼苗<sup>[76]</sup>。

### 三、水产生物技术研究中存在的主要问题

#### (一) 基因组资源开发进展迅速,但水产养殖动物基因功能分析平台尚未建立,满足不了基因功能研究的需要

近年来我国学者相继完成牡蛎、半滑舌鳎、鲤鱼、草鱼和大黄鱼等的全基因组测序,成果陆续在《Nature》《Nature Genetics》等顶级期刊上发表。然而,

在后基因组时代,重点将是基因功能验证和重要性状的遗传解析。但绝大多数水产养殖动物,我国尚未建立转录激活因子样效应物核酸酶和 CRISPR/Cas9 等基因组编辑技术和平台,严重影响了重要性状关键基因的发掘及其在遗传育种和水产养殖业中的应用。

## (二) 水产养殖动物抗病基础研究及抗病分子育种研究投入低、进展慢,满足不了产业发展的需求

抗病良种培育是我国水产养殖业提质增效的重要途径。然而由于对水产养殖动物抗病基因的功能及其调控机制的认识不足,限制了水产养殖动物抗病分子育种的研究进程,满足不了水产业对抗病高产良种的需求。

## (三) 性别特异分子标记和分子辅助性控技术研究满足不了鱼类养殖业发展的需求

水产动物中雌雄个体在产量性状方面的性别差异非常普遍,因此性别控制育种和相关性别决定基础研究是水产前沿技术研究的重要内容。尽管目前已经发现半滑舌鳎、黄颡鱼、罗非鱼、圆斑星鲈和条石鲷的性别特异分子标记,并进行了产业化应用,但是,在许多其他水产养殖动物尚未开发出性别特异分子标记,分子性控育种研究也比较滞后。

## (四) 基因组选择刚刚起步,离良种选育应用尚有距离

基因组选择将成为今后水产养殖动物育种的重要手段之一,但目前只在少数水产养殖动物上进行了前期研究,距离建立全基因组选择育种技术并在产业中进行应用仍然有相当距离,需要加大投入,重点突破。

## 四、水产生物技术发展战略与关键技术

### (一) 发展战略

以服务于水产养殖业创新驱动战略,提高现代渔业科技竞争力为主要目标,加快水产生物技术的原始创新研究,围绕水产重要经济物种基因组结构和功能解析、经济性状调控网络、基因组育种技术体系以及种质资源评价与保护,力争在理论方面有重大发现,在关键共性技术方面有所突破,支撑和

引领水产种业发展,为建设水产生物技术强国、引领世界水产养殖业发展、实现我国从水产养殖大国向水产养殖强国迈进做出贡献。

### (二) 关键技术

1. 水产生物高复杂度基因组的组装和分析技术  
水产生物高复杂度基因组的组装和分析技术主要包括高杂合度、高重复序列水产生物的全基因组或性染色体基因组拼接、组装及生物信息学分析技术。

#### 2. 重要水产养殖动物基因组编辑技术

重要水产养殖动物基因组编辑技术主要包括水产养殖动物(鱼、虾、蟹、贝等)基因组编辑(转录激活因子样效应物核酸酶和 CRISPR/Cas9)技术以及基因组编辑平台。

3. 水产动物重要经济性状关键基因及分子标记筛选与鉴定技术

水产动物重要经济性状关键基因及分子标记筛选与鉴定技术包括水产养殖动物生长、抗病、性别决定等重要性状相关分子标记和关键基因的筛选与鉴定技术。

#### 4. 水产动物基因组选择和分子设计技术

水产动物基因组选择和分子设计技术主要包括水产养殖动物抗病、抗逆和品质性状的全基因组选择和分子设计技术。

## 五、水产生物技术发展建议

鉴于水产生物技术在我国水产种业和水产养殖业可持续发展中的重要意义和应用潜力,考虑到国内外目前的发展现状和存在问题,建议我国围绕如下几个方面设立重点研究计划专项。

### (一) 水产养殖生物全基因组结构解析及基因资源的深度挖掘

进行鱼、虾、贝、蟹、藻等重要水产养殖生物全基因组测序和精细图谱构建,分析不同水产生物基因组的结构特征和进化规律,阐释不同水产养殖生物基因组的结构和功能,进行基因资源的深度挖掘。

### (二) 水产养殖生物重要经济性状的遗传解析及分子设计的基础研究

建立水产养殖生物基因组编辑公共平台和技术

体系, 筛选重要水产养殖生物生长、抗病、性别、环境适应等性状关键基因; 开展抗病、抗逆和品质性状的全基因组关联分析和基因组选择及分子设计的基础研究; 构建水产养殖生物重要基因高效重组表达技术体系, 研制基因工程重组蛋白; 探索重组表达产物提高水产养殖动物生长速率和抗病力的途径。

### (三) 重要水产养殖生物经济性性状形成的表观遗传与环境调控机制

以水产养殖生物生长、生殖、发育和免疫等重要经济性状为目标性状, 通过基因组甲基化分析、组蛋白修饰以及小核糖核酸 (RNA) 分析等技术手段解析环境因素介导的重要经济性性状形成的表观遗传调控机制; 建立甲基化修饰因子在水产动物中的检测技术体系, 筛选与重要经济性性状相关的表观标记。

### (四) 重要水产养殖生物基因信息大数据平台构建及应用

构建以种质资源数据和基因组数据为核心的水产生物基因资源信息大数据平台, 收集、储存和分析我国重要水产养殖物种丰富多样的种质资源和基因资源信息; 通过数据的加工和大数据分析, 为水产生物技术研发、遗传育种、病害防治和资源保护等提供必要的数据库支撑。

#### 参考文献

- [1] 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): 207–210.
- [2] 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.
- [3] Nakamura Y, Morib K, Saitoh K, et al. Evolutionary changes of multiple visual pigment genes in the complete genome of pacific bluefin tuna [J]. *PNAS USA*. 2013; 110(27): 11061–11066.
- [4] Smith J J, Kuraku S, Holt C, et al. Sequencing of the Sea Lamprey (*Petromyzon marinus*) genome provides insights into vertebrate evolution [J]. *Nat Genet*. 2013; 45(4): 415–421.
- [5] Amemiya C T, Alfoldi J, Lee A P, et al. The African Coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution [J]. *Nature*. 2013; 496(7445): 311–316.
- [6] Berthelot C, Brunet F, Chalopin D, et al. The Rainbow Trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates [J]. *Nat Commun*. 2014; 5: 3657.
- [7] David B, Catherine E W, Yang I L, et al. The genomic substrate for adaptive radiation in African Cichlid Fish [J]. *Nature*. 2014; 513(7518): 375–381.
- [8] Zhang G, Fang X, Guo X, et al. The Oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation [J]. *Nature*. 2012; 490(7418): 49–54.
- [9] 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 [J]. *Nat Genet*. 2014; 46(3): 253–260.
- [10] Xu P, Zhang X, Wang X, et al. Genome sequence and genetic diversity of the common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Nat Genet*. 2014; 46(11): 1212–1219.
- [11] Wu C, Zhang D, Kan M, et al. The draft genome of the Large Yellow Croaker reveals well-developed innate immunity [J]. *Nat Commun*. 2014; 5: 5227.
- [12] 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]. *Nat Genet*. 2015; 47(8): 625–631.
- [13] You X X, Bian C, Zan Q J, et al. Mudskipper genomes provide insights into the terrestrial adaptation of amphibious fishes [J]. *Nat Commun*. 2014; 5: 5594.
- [14] Gao Y, Gao Q, Zhang H, et al. Draft sequencing and analysis of the genome of pufferfish takifugu flavidus [J]. *DNA Res*. 2014; 21(6): 627–637.
- [15] Ye N, Zhang X, Miao M, et al. Saccharina genomes provide novel insight into kelp biology [J]. *Nat Commun*. 2015; 6: 6986.
- [16] Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, et al. DM-Y is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish [J]. *Nature*. 2002; 417(6888): 559–563.
- [17] Hattori R S, Murai Y, Oura M, et al. A Y-linked anti-müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination [J]. *PNAS USA*. 2012; 109(8): 2955–2959.
- [18] Myosho T, Otake H, Masuyama H, et al. Tracing the emergence of a novel sex determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis* [J]. *Genetics*. 2012; 191(1): 163–170.
- [19] Kamiya T, Kai W, Tasumi S, et al. A trans-species missense SNP in Amhr2 is associated with sex determination in the tiger pufferfish, takifugu rubripes (*Fugu*) [J]. *PLoS Genet*. 2012; 8(7): e1002798.
- [20] 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]. *Curr Biol*. 2012; 22(15): 1423–1428.
- [21] Meng L, Zhu Y, Zhang N, et al. Cloning and characterization of tesk1, a novel spermatogenesis-related gene, in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *PLoS One*. 2014; 9(10): e107922.
- [22] Hu Q, Zhu Y, Liu Y, et al. Cloning and characterization of wnt4a gene and evidence for positive selection in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Sci Rep*. 2014; 4: 7167.
- [23] Shao C, Liu G, Liu S, et al. Characterization of the cyp19a1a gene from a BAC sequence in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and analysis of its conservation among teleosts [J]. *Acta Oceanol Sin*. 2014; 32(8): 35–43.
- [24] Li M H, Sun Y L, Zhao J Y, et al. A tandem duplicate of anti-müllerian hormone with a missense SNP on the Y chromosome is essential for male sex determination in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *PLoS Genet*. 2015; 11(11): e1005678.
- [25] Liu Y, Zhang Y B, Liu T K, et al. Lineage-specific expansion

- of IFIT gene family: an insight into coevolution with IFN gene family [J]. *PLoS One*. 2013; 8: e66859.
- [26] Sun F, Zhang Y B, Jiang J, et al. Gig1, a novel antiviral effector involved in fish interferon response [J]. *Virology*. 2014; 448: 322–332.
- [27] Wang B, Zhang Y B, Liu T K, et al. Fish viperin exerts a conserved antiviral function through RLR-triggered IFN signaling pathway [J]. *Dev Comp Immunol*. 2014; 47(1): 140–149.
- [28] Zhang J, Zhang Y B, Wu M, et al. Fish MAVS is involved in RLR pathway-mediated IFN response [J]. *Fish Shellfish Immunol*. 2014; 41(2): 222–230.
- [29] Wang N, Wang X, Yang C, et al. Molecular cloning, subcellular location and expression profile of signal transducer and activator of transcription 2 (STAT2) from turbot, *Scophthalmus maximus* [J]. *Fish Shellfish Immunol*. 2014; 35(4): 1200–1208.
- [30] Wang N, Wang X, Yang C, et al. Molecular cloning and multifunctional characterization of GRIM-19 (gene associated with retinoid-interferon-induced mortality 19) homologue from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Dev Comp Immunol*. 2014; 43(1): 96–105.
- [31] Chen S, Li W, Meng L, et al. Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*. 2014; 22(3): 172–181.
- [32] Yang C, Wang X, Zhang B, et al. Screening and analysis of PoAkinin1 and two related genes in response to immunological stimulants in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *BMC Mol Biol*. 2013; 14: 10.
- [33] Zeng Y, Xiang J, Lu Y, et al. SghC1q, a novel C1q family member from half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*): identification, expression and analysis of antibacterial and antiviral activities [J]. *Dev Comp Immunol*. 2015; 48(1): 151–163.
- [34] Lu Y, Wang Q, Liu Y, et al. Gene cloning and expression analysis of IRF1 in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Mol Biol Rep*. 2014; 41(6): 4093–4101.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] Carlson B M, Onusko S W, Gross J B. A high-density linkage map for astyanax mexicanus using genotyping-by-sequencing technology [J]. *Genes, Genomes, Genetics (Bethesda)*. 2014; 5(2): 241–251.
- [38] Li Y, Liu S, Qin Z, et al. Construction of a high-density, high-resolution genetic map and its integration with BAC-based physical map in channel catfish [J]. *DNA Res*. 2015; 22(1): 39–52.
- [39] Shao C, Niu Y, Pasi R, et al. Genome-wide snp identification for the construction of a high-resolution genetic map of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) applied to QTL mapping of vibrio anguillarum disease resistance and comparative genomic analysis [J]. *DNA Res*. 2015; 22(2): 161–170.
- [40] Wang W, Hu Y, Ma Y, et al. High-density genetic linkage mapping in turbot (*Scophthalmus maximus*) based on SNP markers and major sex-and growth-related regions detection [J]. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0120410.
- [41] Zhang X, Zhang Y, Zheng X, et al. A consensus linkage map provides insights on genome character and evolution in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Mar Biotechnol*. 2013; 15(3): 275–312.
- [42] Li H, Liu X, Zhang G. A consensus microsatellite-based linkage map for the hermaphroditic bay scallop (*Argopecten irradians*) and its application in size-related QTL analysis [J]. *PLoS One*. 2012; 7(10): e46926.
- [43] Yu Y, Zhang X J, Yuan J B, et al. Genome survey and high-density genetic map construction provide genomic and genetic resources for the pacific white shrimp *litopenaeus vannamei* [J]. *Sci Rep*. 2015; 5: 15612.
- [44] Jiao W, Fu X, Dou J, et al. High-resolution linkage and quantitative trait locus mapping aided by genome survey sequencing: building up an integrative genomic framework for a bivalve mollusc [J]. *DNA Res*. 2014; 21(1): 85–101.
- [45] Zhang N, Zhang L, Tao Y, et al. Construction of a high density SNP linkage map of kelp (*Saccharina japonica*) by sequencing Taq I site associated DNA and mapping of a sex determining locus [J]. *BMC Genomics*. 2015; 16(1): 189.
- [46] Ninwichia P, Peatman E, Perera D, et al. Identification of a sex-linked marker for channel catfish [J]. *Anim Genet*. 2011; 43(4): 476–477.
- [47] Lipinska A P, Ahmed S, Peters A F, et al. Development of PCR-based markers to determine the sex of kelps [J]. *PLoS One*. 2015; 10(10): e0140535.
- [48] Campbell N R, LaPatra S E, Overturf K, et al. Association mapping of disease resistance traits in rainbow trout using restriction site associated DNA sequencing [J]. *Genes, Genomes, Genetics (Bethesda)*. 2014; 4(12): 2473–2481.
- [49] Rodriguez-Ramilo S T, Fernandez J, Toro M A, et al. Uncovering QTL for resistance and survival time to philasterides dicentrarchi in turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Anim Genet*. 2013; 44(2): 149–157.
- [50] Dutta S, Biswas S, Mukherjee K, et al. Identification of RAPD-SCAR marker linked to white spot syndrome virus resistance in populations of giant black tiger shrimp, penaeus monodon fabricius [J]. *J Fish Dis*. 2014; 37(5): 471–480.
- [51] 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 S L. Fish sex control and breeding by cell engineering [M]. Beijing: Science Press; 2013.
- [52] Chen S L, Li J, Deng S P, et al. Isolation of female specific AFLP markers and identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Mar Biotechnol (NY)* 2007; 9(2): 272–280.
- [53] 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*) [J]. *Mar Biotechnol*. 2012; 14(1): 120–128.
- [54] Dan C, Mei J, Wang D, et al. Genetic differentiation and efficient sex-specific marker development of a pair of Y- and X-linked markers in yellow catfish [J]. *Int J Biol Sci*. 2013; 9(10): 1043–1049.
- [55] Xu D D, Lou B, Xu H X, et al. Isolation and characterization of male-specific DNA markers in the rock bream *oplegnathus*

- Fasciatus [J]. *Mar Biotechnol.* 2013; 15(2): 221–229.
- [56] Liu Y, Bi Y, Gu J, et al. Localization of a female-specific marker on the chromosomes of the brown seaweed *saccharina japonica* using fluorescence in situ hybridization [J]. *PLoS One.* 2012; 7(11): e48784.
- [57] 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 [J]. *Mar Biotechnol.* 2014; 16(5): 513–521.
- [58] 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): 38–46.
- [59] Liu S, Sun L, Li Y, et al. Development of the Catfish 250K SNP array for genome-wide association studies [J]. *BMC Res Notes.* 2014; 7: 135.
- [60] Tatsumi Y, Takeda M, Matsuda M, et al. TALEN-mediated mutagenesis in zebrafish reveals a role for r-spondin 2 in fin ray and vertebral development [J]. *FEBS Lett.* 2014; 588(24): 4543–4550.
- [61] Ansai S, Kinoshita M. Targeted mutagenesis using CRISPR/Cas system in medaka [J]. *Biol Open.* 2014; 3(5): 362–371.
- [62] Edvardsen R B, Leininger S, Kleppe L, et al. Targeted mutagenesis in atlantic salmon (*Salmo salar*) using the CRISPR/Cas9 system induces complete knockout individuals in the F0 generation [J]. *PLoS One.* 2014; 9(9): e108622.
- [63] 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: 4814–4825.
- [64] 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]. *Sci Rep.* 2016; 6: 22953.
- [65] 陈松林, 崔忠凯, 郑汉其, 等. 一种基于基因组编辑的海水鲆鲷鱼类种质构建方法及应用[P]. 201610162019. 5.  
Chen S L, Cui Z K, Zheng H Q, et al. A genome editing-based breeding method in flatfish and its application [P]. 201610162019. 5.
- [66] Swaminathan T R, Basheer V S, Gopalakrishnan A, et al. Establishment of caudal fin cell lines from tropical ornamental fishes *Puntius fasciatus* and *Pristolepis fasciata* endemic to the western ghats of India [J]. *Acta Tropica.* 2013; 28(3): 536–541.
- [67] Abdul Majeed S, Nambi K S, Taju G, et al. Development, characterization and application of a new fibroblastic-like cell line from kidney of a freshwater air breathing fish *channa striatus* (Bloch, 1793) [J]. *Acta Tropica.* 2013; 127(1): 25–32.
- [68] Jayesh P, Jose S, Philip R, et al. A novel medium for the development of in vitro cell culture system from *penaeus monodon* [J]. *Cytotechnology.* 2013; 65(3): 307–322.
- [69] Mercurio S, Di Benedetto C, Sugni M, et al. Primary cell cultures from sea urchin ovaries: a new experimental tool [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2014; 50(2): 139–145.
- [70] 陈松林, 秦启伟. 鱼类细胞培养理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2011.  
Chen S L, Qin Q W. Fish cell culture theory and technique [M]. Beijing: Science Press Ltd.; 2011.
- [71] Sun A, Wang T Z, Wang N. et al. Establishment and characterization of an ovarian cell line from half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *J Fish Biol.* 2015; 86(1): 46–59.
- [72] Sun A, Chen S, Gao F, et al. Establishment and characterization of a gonad cell line from half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) pseudomale [J]. *Fish Physiol Biochem.* 2015; 41(3): 673–683.
- [73] Wang T Z, Sun A, Wang N. et al. Establishment and characterization of an astroglial cell line derived from the brain of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Zool Res.* 2015; 36 (5): 305–310.
- [74] 刘肖峰, 陈松林, 沙珍霞, 等. 云纹石斑鱼心脏细胞系的建立与鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(10): 1394–1400.  
Liu X F, Chen S L, Sha Z X, et al. Establishment and characterization of a new cell line from heart of *epinephelus moara* [J]. *J Agr Biotechnol.* 2015; 23(10): 1394–1400.
- [75] Keivanloo S, Sudagar M . Feasibility studies on vitrification of persian sturgeon (*Acipenser persicus*) embryos [J]. *J Aquac Res Dev.* 2013; 4: 172.
- [76] Tian Y, Jiang J, Song L, et al. Effects of cryopreservation on the survival rate of the seven-band grouper (*Epinephelus septemfasciatus*) embryos [J]. *Cryobiology.* 2015; 71(3): 499–506.