

基于转录组技术的枫叶鲑亲本鉴定和杂交优势分析

刘玉猛¹, 蒋洁兰^{2,3}, 毛明光^{2,3*}, 朱诗裕³, 王伟¹ (1. 大连海洋大学海洋科技与环境学院, 辽宁大连 116023; 2. 海南热带海洋学院崖州湾创新研究院, 海南三亚 572024; 3. 海南热带海洋学院/海南热带海洋生物资源利用与保护教育部重点实验室, 海南三亚 572022)

摘要 为探究枫叶鲑的亲本来源及杂种抗病优势, 采用 Illumina 高通量测序技术对枫叶鲑的胸腺和头肾组织转录组进行测序分析。结果获得胸腺组织原始数据 8 224 345 800 bp, 拼接获得 169 204 条单基因序列 (Unigene); 头肾组织原始数据 7 409 864 400 bp, 拼接获得 132 292 条 Unigene。利用生物信息学方法对 Unigene 进行 NR 库相似搜索, 还进行了 GO、KOG 和 KEGG 分类注释。通过比对线粒体 DNA (mtDNA) 基因序列发现, 枫叶鲑与虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的线粒体基因同源性达 99% 以上, 可判定枫叶鲑母本是虹鳟; E3、TNF- α 、IGM 等基因的同源性在大鳞大麻哈鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*) 中比虹鳟高, 推测枫叶鲑父本可能是大鳞大麻哈鱼。对免疫相关基因分析发现, IgM、TNF- α 和 T、B 淋巴细胞相关基因序列与父、母本同源性均较高, 因此初步判定枫叶鲑抗病优势是父、母本双方杂交的结果。通过转录组分析杂交种的抗病优势存在盲区, 但该技术可以快速判断父、母本的来源, 获得大量遗传信息, 优势明显。

关键词 枫叶鲑; 转录组; 亲本鉴定; 抗病优势分析

中图分类号 S917.4

文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2023)01-0098-06

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2023.01.021

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Parental Identification and Hybrid Vigor Analysis of Maple Salmon Based on Transcriptome Technology

LIU Yu-meng¹, JIANG Jie-lan^{2,3}, MAO Ming-guang^{2,3} et al (1. College of Ocean Technology and Environment, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023; 2. Yazhouwan Innovation Research Institute, Hainan Tropical Ocean University, Sanya, Hainan 572024; 3. Key Laboratory of Utilization and Conservation for Tropical Marine Bioresources, Ministry of Education/Hainan Tropical Ocean University, Sanya, Hainan 572022)

Abstract In order to explore the parent origin and hybrid disease resistance of maple salmon, Illumina high-throughput sequencing technology was used to sequence and analyze the transcriptome of thymus and head kidney tissues of maple salmon. The original data of thymus tissue was 8 224 345 800 bp, and 169 204 Unigene were obtained by splicing; the original data of head kidney tissue was 7 409 864 400 bp and 132 292 Unigenes were obtained by splicing. Using bioinformatics method, we searched the NR database of Unigene, and annotated GO, KOG and KEGG. By comparing the mitochondrial DNA (mtDNA) gene sequence, it was found that the mitochondrial gene homology of *Oncorhynchus mykiss* and maple salmon was more than 99%, and it could be determined that the female parent of maple salmon was rainbow trout; the homology of E3, TNF- α IGM and other genes in *Oncorhynchus tshawytscha* is higher than that in rainbow trout. It is speculated that the male parent of maple salmon may be *Oncorhynchus tshawytscha*. Analysis of immune related genes revealed that IgM and TNF- α sequences of genes related to T and B lymphocytes are highly homologous with their parents, so it is preliminarily determined that the disease resistance of maple salmon is the result of hybridization between parents. There is a blind spot in the disease resistance advantage of hybrids by transcriptome analysis, but this technology can quickly determine the source of parents and mothers, obtain a lot of genetic information, and has obvious advantages.

Key words Maple salmon; Transcriptome; Parent identification; Disease resistance advantage analysis

鲑鳟, 是鲑鱼和鳟鱼的统称^[1]。我国鲑鳟养殖是从 20 世纪 60 年代开始的, 经历了 60 多年的发展, 已经形成了一定的产业规模, 并带来了巨大的经济效益^[2]。随着国内需求的增加, 养殖体量也不断增加, 2018 年我国第一个深海网箱建成并投入使用^[3], 我国鲑鳟受精卵受制于欧洲, 苗种是目前亟待解决的问题, 优质的苗种可为下游养成打好基础 and 保障。

丹东华美渔业有限公司位于丹东市鸭绿江畔, 该公司以鸭绿江为基地, 从国外引种优质杂交鲑, 并进行了推广养殖, 是当地重要的创汇来源之一。其引进的杂交鲑优点明显, 生长速度快, 抗病力强, 肉质优良, 因肉色似枫叶的颜色, 故名“枫叶鲑”。由于枫叶鲑属于外来物种, 且商业品系的信息不全面, 尤其是其遗传信息不明确, 这为我国自主繁育造成了

瓶颈, 也对该地区物种来说是一种潜在的风险。

转录组测序技术已广泛应用于生物学领域^[4-5], 但其在鱼类亲本鉴定方面鲜见报道。笔者利用 Illumina 高通量测序技术对枫叶鲑胸腺和头肾组织进行转录组测序, 通过转录本拼接、基因功能注释, 揭示枫叶鲑的基因表达特点, 根据线粒体母源传递的特点, 通过对转录组中线粒体基因比对分析, 确定其母本来源, 并根据免疫相关基因的转录探讨枫叶鲑抗病优势的原因, 旨在为今后利用转录测序技术快速揭示未知来源物种的遗传信息提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 枫叶鲑由丹东华美渔业有限公司提供, 为 400 g。采样所需的手术剪、咬骨钳、镊子等器械均事先通过高压灭菌锅进行 121 ℃, 2 h 灭菌, 采样前使用 75% 乙醇擦拭且经火焰消毒。将试验鱼解剖, 分别取胸腺和头肾组织储存于 10 倍体积的 RNA later。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取及质量检测。 利用 RNA 提取试剂盒提取枫叶鲑胸腺和头肾的总 RNA。为了保证试验数据的高质量, 将上述提取的 RNA 用琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 紫外分光光度计检测其纯度与浓度。将检验合格的 RNA 用

基金项目 海南热带海洋学院崖州湾创新研究院开放课题(2022CXKYK-FKT06); 海南省自然科学基金项目(322RC716, 422MS083); 海南热带海洋学院引进人才科研启动资助项目(RHDC202119, RHDC202206)。

作者简介 刘玉猛(1996—), 男, 湖南郴州人, 硕士研究生, 研究方向: 海洋生物学。* 通信作者, 副教授, 硕士生导师, 从事海洋生物学研究。

收稿日期 2022-02-07

于构建 cDNA 文库。将上述 cDNA 文库利用 Qubit DNA 检测试剂盒对回收的 DNA 精确定量,以方便按照 1:1 的比例等量混合后进行测序。

1.2.2 文库质检和测序。将上述检验合格的 cDNA 文库在 Illumina 平台进行测序,首先过滤原始数据中低质量、末端质量低、含测序引物的 reads,得到 clean reads,然后再进行 de novo 拼接,最后通过 CAP3 软件拼接来获得最终 Unigene 序列集合^[6]。cDNA 文库构建与测序由生工生物工程(上海)股份有限公司协助完成。

1.2.3 转录组数据质控与组装。测序得到的原始数据中含有带接头的、低质量的序列[去除带 N 碱基的序列;去除 reads 中的接头序列;reads 3'—5'去除低质碱基(Q 值 <20);reads 5'—3'去除低质碱基(Q 值 <20);去除 reads 长度小于 35 nt 的 reads 及其配对 reads]。为了保证信息分析质量,必须对原始数据过滤,得到 Clean 数据。

1.2.4 基因功能注释和分类。利用 BLAST 软件^[7]将 Unigene 序列分别与 NR (NCBI non-redundant protein sequences)^[7]、NT (NCBI non-redundant nucleic acid sequences)^[7]、GO (Gene ontology)^[7]、KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes)^[8]、KOG (kyoto encyclopedia of genes and genomes)^[9]、Uniprot (universal protein)^[10]以及 PFAM (protein family)^[11]7 个数据库进行比对分析,获得 Unigene 的注释信息,并对基因功能进行分类。获取枫叶鲢胸腺和头肾基因序列与近缘物种基因序列的相似性以及枫叶鲢胸腺和头肾基因的功能信息,并按照分子功能、细胞组分和生物过程 3 个大类对其进行 GO 功能分类。此外,还进行了 KOG 功能分类,同时获得 KEGG 代谢通路分析结果。

1.2.5 基于转录组测序的枫叶鲢亲本鉴定和杂种抗病优势分析。通过对转录组测序结果数据进行筛选以及利用 BLAST 软件进行比对分析,将筛选得到的线粒体 DNA (mtDNA) 基因序列和基因组基因序列在 NCBI 数据库中进行比

对,分别确定枫叶鲢的母本及父本来源。将筛得到的免疫相关基因序列进行比对分析,探讨枫叶鲢所具有的抗病优势来源。

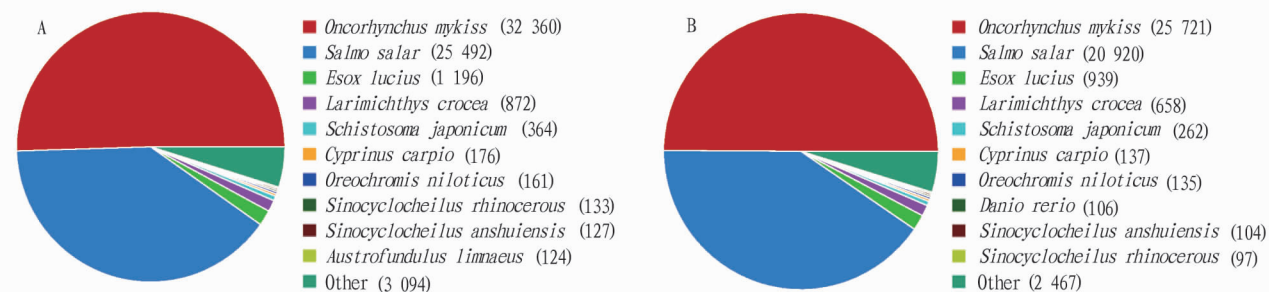
2 结果与分析

2.1 样本原始数据统计及数据质控 采用双端测序法并经过质量控制后^[12],共获得胸腺的 7.29 Gb 总碱基数,GC 含量为 47.73%,Q30 碱基比例平均超过 95.33%;共获得头肾的 6.30 Gb 总碱基数,GC 含量为 48.63%,Q30 碱基比例平均超过 95.12%。

2.2 转录组拼接结果统计 对测序结果进行组装、拼接^[12],结果表明,胸腺样本共得到 358 880 条 Transcript 和 169 204 条 Unigene, Transcript 与 Unigene 的 N50 分别为 1 463 和 896 bp;头肾样本共得到 282 289 条 Transcript 和 132 292 条 Unigene, Transcript 与 Unigene 的 N50 分别为 1 491 和 918 bp,表明组装完整性较高。

2.3 基因注释 将枫叶鲢胸腺和头肾转录组测序筛选所得的 Unigene 序列与数据库进行比对和注释。依据各数据库注释的 Unigene 序列数量和比例可知,各数据库由于筛选条件不同,成功注释的基因数也不同。胸腺和头肾基因中以 NT 数据库成功注释的 Unigene 序列最多,胸腺基因达 116 178 条,占 68.66%;头肾基因达 92 700 条,占 70.07%,这与其采用序列相似性比对搜索有关。KEGG 数据库注释的信息最少,胸腺基因仅有 3 451 条,占 2.04%;头肾基因仅有 3 203 条,占 2.42%。

2.4 NR 库比对注释 通过与 NR 库的比对,结果见图 1。从图 1 可见物种转录本序列与相近物种的近似情况,以及同源序列的功能信息。在所有注释成功的 Unigene 中,与 NR 库比对的物种相比,枫叶鲢与虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的基因相似度最高,其次是大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*),胸腺分别达 32 360 条 (50.48%) 和 25 492 条 (39.77%),头肾分别达 25 721 条 (49.90%) 和 20 920 条 (40.59%)。



注:A 为胸腺,B 为头肾。

Note: A is thymus, B is head kidney.

图 1 NR 库比对注释

Fig. 1 NR database comparison note

2.5 功能分类注释 通过 GO 数据库比对注释,结果如图 2、3 所示,胸腺中共得到 50 027 条注释基因,约占总 Unigene 的 29.57%;头肾中共得到 40 853 条注释基因,约占总 Unigene 的 30.88%。GO 数据库将注释基因总共分为三大类别,分别为分子功能 (molecular function)、生物过程 (biological

process) 和细胞组分 (cellular component)。胸腺和头肾基因中生物过程 (biological process) 占比最多的是细胞过程 (cellular process), 分别为 33 722 条 (67.51%) 和 27 959 (68.44%);细胞组分 (cellular component) 占比最多的是细胞 (Cell), 分别为 34 404 (68.77%) 和 28 662 (70.16%);分子功

能(molecular function) 占比最多的是结合活性(binding), 分别为 31 739(63.44%)和 26 151(64.01%)。

胸腺和头肾基因中分别有 22 962 条和 19 648 条 Unigenes 在 KOG 数据库中成功进行功能注释, 合计 25 类。其中数量最多的是信号转导机制 (signal transduction mechanisms), 胸腺有 5 044 条 (21.97%), 头肾有 4 072 条 (20.72%)。

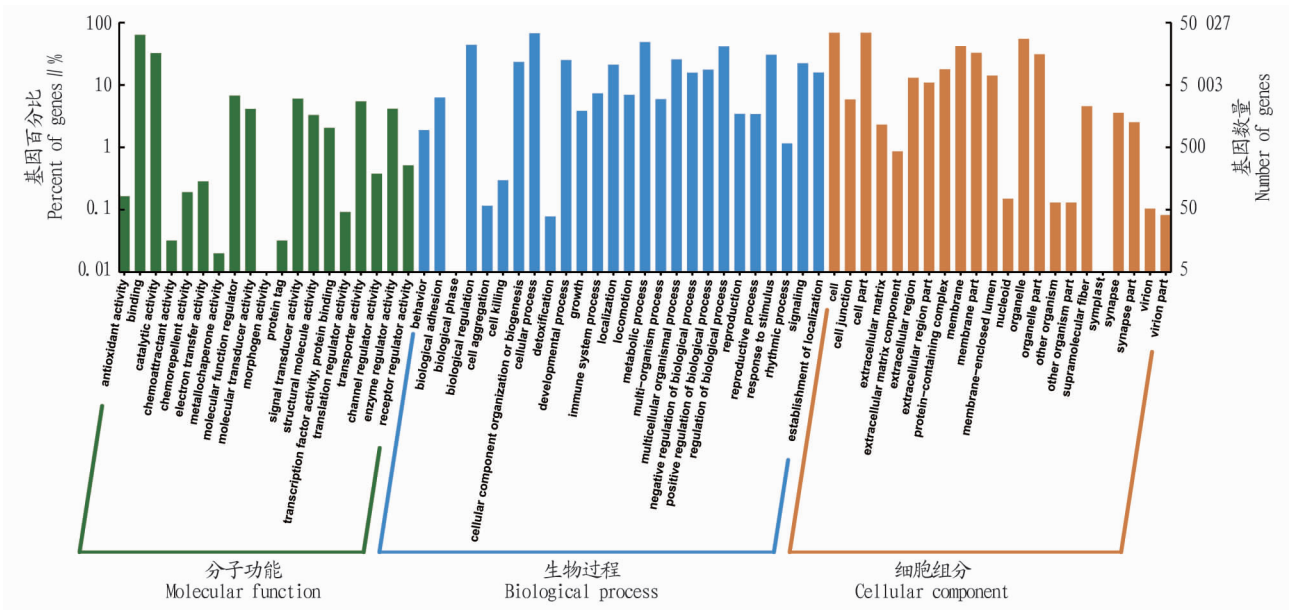


图 2 GO 注释上的胸腺基因功能分类

Fig. 2 The functional classification of thymus genes on GO annotation

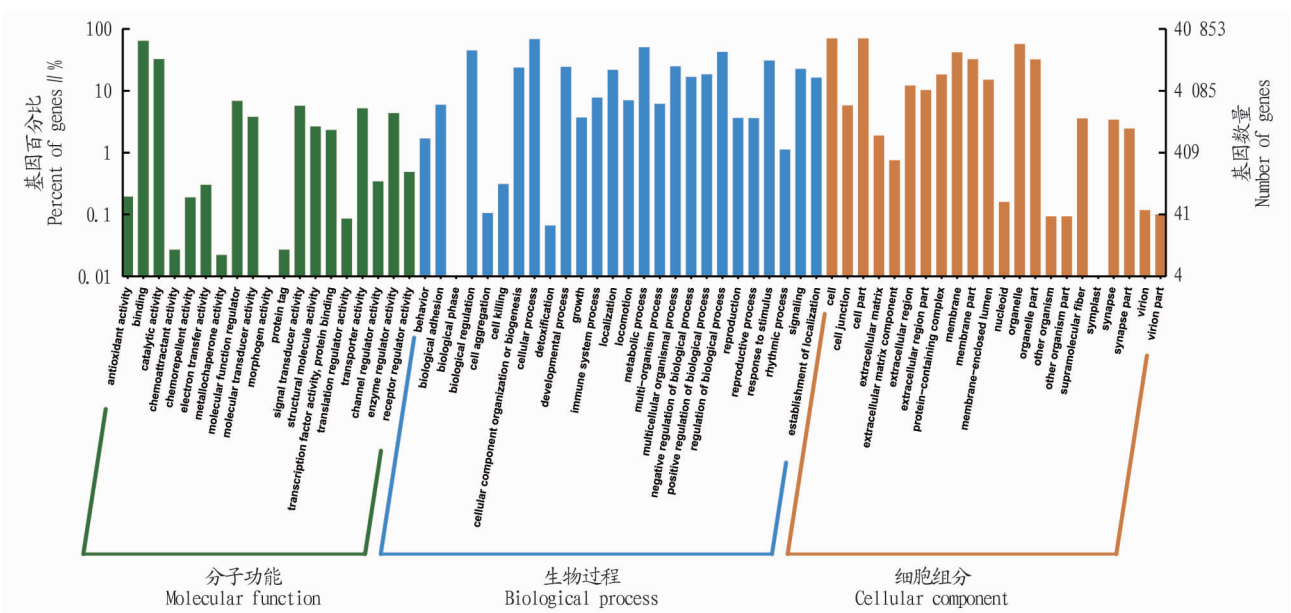


图 3 GO 注释上的头肾基因功能分类

Fig. 3 The functional classification of head and kidney genes on GO annotation

2.6 枫叶鲑 mtDNA 及基因组信息分析 将胸腺和头肾 Unigene 序列中与 mtDNA 相关的基因和基因组基因进行筛选, 分别筛选出与 mtDNA 相关基因序列和基因组基因序列, 再利用 Blast 软件进行比对分析, 比对结果见表 1、2。通过 mtDNA 基因序列包含 12S rRNA、16S rRNA、28S rRNA、细胞

胸腺和头肾 KEGG 通路富集分类中分别有 5 275 和 4 820 个差异表达基因参与到四大类 23 小类代谢通路中。注释基因最多的 3 个通路首先是信号转导通路 (signal transduction pathway), 其次是运输和分解代谢通路 (transport and catabolism pathway), 排第 3 位的通路在胸腺和头肾中分别为细胞群落通路 (cellular community pathway) 和折叠分类和降解通路 (folding sorting and degradation pathway)。

色素 b (Cytochrome b, Cyt b) 和细胞色素 c 氧化酶 (Cytochrome c oxidase) 在内的基因序列比对结果以及根据 mtDNA 具有的母系遗传特点^[13-14], 可以初步判断枫叶鲑的母本为虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (表 1)。

通过比对基因组基因序列包含 E3 泛素蛋白连接酶 (E3

ubiquitin-protein ligase, E3)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、免疫球蛋白 M (Immunoglobulin M, IgM)、T 细胞表面抗原 CD2 (T-cell surface antigen CD2, CD2)、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF)、不依赖阳离子的甘露糖-6-磷酸受体 (Cation-independent mannose-6-phosphate receptor, CI-MPR)、细胞因子诱导型含 SH2 蛋白 (Cytokine-inducible SH2-containing protein, CISH)、肌生成调节糖

苷酶 (Myogenesis-regulating glycosidase, MYORG) 结果可知, 在大鳞大麻哈鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*)、红大麻哈鱼 (*Oncorhynchus nerka*)、银大麻哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*) 和大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) 4 种鱼的基因序列比对中, 基因组基因序列的同源性和大鳞大麻哈鱼最高, 因此初步判断父本为大鳞大麻哈鱼。

表 1 线粒体基因序列比对结果
Table 1 Results of mitochondrial gene sequence alignment

基因 Gene	基因 ID Gene ID	物种比对及一致性 Species comparison and consistency//%				
		虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	大鳞大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	红大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus nerka</i>	银大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus kisutch</i>	大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus keta</i>
12S rRNA	TRINITY_DN44359_c2_g9	100				
16S rRNA	TRINITY_DN35650_c1_g2	99.65	97.49	96.56	98.13	98.13
28S rRNA	TRINITY_DN33161_c0_g1	99.92	97.78	97.49	97.34	97.71
	TRINITY_DN37583_c2_g1	100				
Cyt b	TRINITY_DN35612_c5_g3	99.73	94.07	98.93	98.65	98.93
	TRINITY_DN46091_c5_g5	99.93	95.76	95.95	97.88	97.21
	TRINITY_DN18242_c0_g1	100	96.96	96.05	96.41	94.38
	TRINITY_DN43833_c1_g3	99.80	98.17	98.41	98.63	98.11
	TRINITY_DN38405_c5_g3	99.16	97.41	97.88	95.80	97.41
	TRINITY_DN37871_c8_g2	99.07	96.86	97.10	96.98	95.16
	TRINITY_DN4425_c0_g1	99.85	97.42	97.42	96.99	97.99
	TRINITY_DN29660_c0_g1	100	98.63	98.56	98.81	98.17
	TRINITY_DN26051_c0_g1	99.58	96.89	98.08	97.37	96.56
	TRINITY_DN32639_c0_g1	99.84	97.34	97.90	98.69	97.82
	TRINITY_DN44249_c2_g2	99.41	98.15	97.98	97.79	98.06
	TRINITY_DN37344_c2_g1	99.85	96.81	96.80	97.11	97.24
	TRINITY_DN37417_c5_g1	100	97.87	97.71	97.84	96.25
	TRINITY_DN33365_c0_g1	99.13	97.22	97.91	98.09	97.40
细胞色素 c 氧化酶 Cytochrome c oxidase	TRINITY_DN38084_c0_g2	100	99.42	99.00	99.41	98.67
	TRINITY_DN30103_c1_g1	100	99.37	97.78	99.16	97.37
	TRINITY_DN29628_c3_g14	99.83	97.28	96.32	97.23	96.57
	TRINITY_DN29628_c3_g10	99.85	93.01	94.55	93.90	95.79
	TRINITY_DN36162_c4_g2	100	99.18	99.18	98.90	98.65
	TRINITY_DN36162_c4_g4	100	98.72	99.23	98.45	98.72

表 2 基因组基因序列比对结果
Table 2 Genomic gene sequence alignment results

基因 Gene	基因 ID Gene ID	物种比对及一致性 Species comparison and consistency//%				
		大鳞大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	银大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus kisutch</i>	红大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus nerka</i>	大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus keta</i>
E3	TRINITY_DN44104_c4_g5	100	99.51	99.51	98.73	
TNF- α	TRINITY_DN42033_c1_g2	96.13	95.21	96.13	95.03	95.21
IGM	TRINITY_DN41988_c6_g5	99.14	98.96	99.14	98.93	98.22
CD2	TRINITY_DN46359_c2_g1	98.36	96.61	96.61	98.31	98.31
IGF	TRINITY_DN23835_c0_g1	99.67	99.67	99.67	98.00	99.00
	TRINITY_DN48201_c0_g1	98.51	97.08	98.13	97.76	98.13
	TRINITY_DN45590_c0_g2	98.25	98.24	97.90	97.90	98.25
	TRINITY_DN69807_c0_g1	99.10	99.10	98.21	97.29	98.72
	TRINITY_DN37817_c3_g2	100	100	99.13	99.42	99.13
CI-MPR	TRINITY_DN37817_c3_g2	100	100	99.13	99.42	99.13
CISH	TRINITY_DN4366_c0_g1	93.51	93.51	92.44	93.07	93.51
MYORG	TRINITY_DN5153_c0_g1	100	100	100	99.07	99.30

2.7 枫叶鲑抗病优势基因 将胸腺和头肾 Unigene 序列中与免疫相关的基因进行筛选,再利用 BLAST 在线分析软件对免疫球蛋白 M(Immunoglobulin M,IgM)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、T 淋巴细胞相关基因(T lymphocyte related genes)和 B 淋巴细胞相关基因(B lymphocyte related genes)的基因序列进行比对分析,比对结果见表 3。根据序列比对结果,推测杂交优质品种枫叶鲑所具有的抗病优势是遗传其亲本虹鳟而来。

表 3 免疫相关基因序列比对结果
Table 3 Sequence alignment results of immune-related gene

基因 Gene	基因 ID Gene ID	物种比对及一致性 Species comparison and consistency//%				
		虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	大鳞大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	红大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus nerka</i>	银大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus kisutch</i>	大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus keta</i>
IgM	TRINITY_DN43825_c4_g1	99.11	98.36	98.44	98.67	98.44
	TRINITY_DN36566_c1_g3	99.84	98.10	98.05	97.84	98.11
	TRINITY_DN39425_c7_g4	99.81	97.37	98.02	96.82	97.78
	TRINITY_DN38035_c0_g5	99.60	98.94	98.28	98.94	98.79
	TRINITY_DN41988_c6_g7	99.75	99.49	98.48	98.98	98.72
	TRINITY_DN19585_c0_g1	98.60	97.88	97.19	97.19	96.84
	TRINITY_DN32744_c0_g1	99.27	99.17	98.70	99.09	98.29
	TRINITY_DN34109_c1_g3	100	98.79	98.94	99.02	99.02
	TRINITY_DN34109_c1_g1	99.80	98.82	93.09	99.21	93.00
	TRINITY_DN37611_c1_g2	100	95.94	95.22	96.66	85.83
TNF- α	TRINITY_DN37617_c4_g1	98.10	97.55	95.13	94.55	94.96
	TRINITY_DN39917_c0_g1	100	97.21	94.34	97.15	95.91
	TRINITY_DN35357_c0_g1	95.64	94.52	94.46	94.43	95.31
	TRINITY_DN35357_c0_g2	100	96.08	95.97	90.76	95.54
	TRINITY_DN35372_c1_g14	100	99.05	98.14	99.05	96.79
	TRINITY_DN37013_c0_g2	100	99.55	96.77	99.55	98.64
	TRINITY_DN5767_c0_g1	100	95.63	94.54	94.26	93.99
	TRINITY_DN16181_c0_g1	99.69	99.10	96.79	98.01	97.77
	TRINITY_DN32244_c4_g3	99.49	97.66	97.93	98.28	97.18
	TRINITY_DN36685_c3_g1	99.85	98.92	99.18	98.48	98.01
T 淋巴细胞相关基因	TRINITY_DN36899_c4_g2	99.77	98.11	98.64	98.36	98.21
T lymphocyte related genes	TRINITY_DN36899_c4_g3	99.91	99.30	99.13	99.39	98.87
	TRINITY_DN36597_c1_g1	99.38	97.84	96.91	97.84	98.15
	TRINITY_DN36597_c1_g2	97.47	96.42	96.24	96.02	96.47
	TRINITY_DN33373_c5_g1	98.94	97.89	98.21	97.56	97.56
B 淋巴细胞相关基因	TRINITY_DN36899_c4_g2	99.85	97.66	96.56	98.03	97.63
B lymphocyte related genes	TRINITY_DN36899_c4_g3	99.83	96.96	98.67	96.52	98.17
	TRINITY_DN36597_c1_g1	99.87	96.12	96.61	95.36	94.71
	TRINITY_DN36597_c1_g2	97.13	97.04	96.08	97.00	96.31
	TRINITY_DN33373_c5_g1	99.87	97.62	97.42	97.25	97.44

3 讨论与结论

3.1 枫叶鲑胸腺和头肾无参转录组的组装与注释 该研究对枫叶鲑进行了转录组分析,并结合转录组信息作出了亲本鉴定和杂种优势相应的数据分析。为了获取枫叶鲑转录组信息,在未参照基因组的情况下对其胸腺、头肾这 2 种组织转录组进行了高通量转录组测序,对数据进行过滤和质控后,采用 Trinity 软件^[15] 组装、拼接和转录本功能注释,共得到 13.59 Gb 的转录组 clean data 信息,Q30 碱基比例均超过 95%。从转录组质量来看,测序数据的各项指标测序质量较高,达到后续数据组装分析的要求。

该研究分别对枫叶鲑胸腺和头肾组织转录组文库组装的 169 204 条 Unigene 和 132 292 条 Unigene 进行了 GO 功能分类、KOG 功能分类和 KEGG 代谢通路等分析。通过 GO 数

据库比对注释,胸腺 Unigene 注释比例较头肾少 1.31 百分点。在 KOG 数据库中成功进行功能注释的胸腺和头肾 Unigene 序列,其中数量最多的是信号转导机制,胸腺 Unigene 注释比例较头肾多 1.25 百分点。通过 KEGG 代谢通路分析得到的胸腺 Unigene 注释比例较头肾少 1.13 百分点。该研究通过功能分类注释获得了大量的枫鲑胸腺和头肾组织转录组信息,并且初步阐明枫鲑胸腺和头肾组织相关的基因功能以及生物学过程、代谢途径和信号传导途径。这对将来深入了解枫叶鲑基因功能至关重要,并为发掘枫叶鲑相关功能基因和研究相关生理功能提供基础数据。

3.2 利用线粒体基因与基因组基因信息判断枫叶鲑的遗传背景 线粒体是具有自身基因组的细胞内细胞器,现已被证明至少有 4 种表观遗传机制:①调节核基因组表达的表观遗传

传机制通过调节核编码线粒体基因的表达来影响线粒体;②核基因的甲基化模式由细胞特异性 mtDNA 含量和线粒体活性决定;③核基因表达模式和核 DNA 甲基化水平受 mtDNA 变异影响;④mtDNA 也被表观遗传修饰^[16]。表观遗传修饰往往在不改变 DNA 序列的情况下引起基因表达的改变,包括 DNA 甲基化、非编码 RNA 活性、组蛋白修饰和染色质重塑等^[17-18]。作为一种常见的表观遗传现象,DNA 甲基化可以改变 DNA 构象或染色质结构,以及 DNA 的稳定性,DNA 与蛋白质相互作用的方式,并最终调节基因的表达^[19-21]。动物 mtDNA 几乎完全遗传其母系而来,父本线粒体在受精过程中迅速降解^[22]或在此后的复制过程中缺失^[23]。最新研究结果倾向于支持“瓶颈假说”,即 mtDNA 的母系遗传是由上一代基因型的少数特殊种系 mtDNA 分子的差异扩增介导的^[24]。在现有的用于系统发育研究的基因中,Cyt b 的结构和功能在 mtDNA 上是较为清楚的,也是常用于进行物种分类鉴定的基因^[25]。基于线粒体表观遗传受多种机制调控及 DNA 甲基化修饰调节机体基因表达等特点,再结合 mtDNA 母系遗传的特点,该研究对枫叶鲢的转录组信息进行处理分析,将筛选得到的 mtDNA 基因序列及基因组基因序列进行比对分析,最终初步得出虹鳟是母本,大鳞大麻哈鱼是父本的结论。比对结果中发现,有的基因组基因如肌生成调节糖苷酶与银大麻哈鱼的同源性也达到 100%,这可能由枫叶鲢商业化生产中父本的来源不确定造成,因此对于父本鉴定的准确性仍有待进一步完善。

3.3 杂交鲢抗病优势 杂交育种在水产动物的品种改良和生产中发挥了重要作用。该方法利用孟德尔遗传定律,如分离和自由组合定律及连锁互换定律,重新构建生物体的遗传力,创造出理想的变异体^[26]。杂交育种不产生新的基因,而是将现有生物资源的基因和性状进行重组,将分散在不同群体中的基因组合起来,建立符合人们意愿的基因型和表型^[26-27]。而杂种优势是自然界普遍存在的生物现象,是指杂种后代在多个性状(品质、产量、适应性、抗逆性、繁殖能力和生长优势等)上超越亲本的现象^[28-30]。该研究中的枫叶鲢则是具有优良抗病性状的杂交鲢,对其抗病优势的遗传信息进行分析能更好地为其他水产动物的杂交育种奠定基础。

硬骨鱼类的 IgM 为四聚体免疫球蛋白,在鱼类的体液免疫中发挥着重要作用^[31],并对各种抗原产生有效的特异性体液抗体反应。IgM 是 B 淋巴细胞最早产生的免疫球蛋白分子,也是 B 淋巴细胞分化过程中的主要表面标志^[32]。细胞因子在免疫系统的调节反应中起着至关重要的作用。研究发现,细胞因子在调节和控制免疫反应的分子进化过程中是高度保守的^[33]。TNF- α 是细胞因子家族的重要成员之一,是导致细胞凋亡和抵抗细胞内病原体的重要因素,是一种重要的抗癌因子^[34]。除了引起肿瘤细胞出血性坏死而凋亡外,它还可以介导炎症和调节免疫功能^[34-35]。综合 IgM 和 TNF- α 在鱼类机体免疫调节过程中所起到的重要作用,该研究筛选出了枫叶鲢转录组信息中的 IgM、TNF- α 基因序列和 T、B 淋巴细胞相关基因序列,并进行了物种同源性比较。

该研究在探讨了枫叶鲢品种的亲本分别是虹鳟(母本)和大鳞大麻哈鱼(父本)之后,对其抗病优势进行分析,尽管该研究列出的免疫相关基因序列与母本虹鳟的同源性更高,但根据杂交所产生的基因、性状重组以及杂交子代会出现的杂种优势,又因为枫叶鲢在商业化生产过程中父本的来源具有不确定性,因此,初步判断枫叶鲢所具有的杂种抗病优势是由其亲本双方的抗病优势基因的基因重组所产生的结果。

该研究应用 Illumina 高通量测序技术对枫叶鲢遗传信息进行了探讨,可以快速判断父、母本的来源,并获得大量遗传信息,具有较好的应用前景,后续也可为其其他水产养殖动物的亲本鉴定和杂种优势分析提供科学依据。

参考文献

- [1] 唐莉萍. 鲢鳙鱼大有潜力养殖[J]. 渔业致富指南, 2005(6): 7-9.
- [2] 王建波. 我国鲢鳙鱼养殖产业 SWOT 分析及对策建议[J]. 中国水产, 2016(2): 37-42.
- [3] 陈家勇. 我国首座全潜式大型智能网箱下水[J]. 中国水产, 2018(6): 12.
- [4] BARBOSA E G, ABURJAILE F F, RAMOS R T, et al. Value of a newly sequenced bacterial genome[J]. World J Biol Chem, 2014, 5(2): 161-168.
- [5] MARIAN A J. Sequencing your genome: What does it mean[J]. Methodist Debakey Cardiovasc J, 2014, 10(1): 3-6.
- [6] 李琳, 冯帅, 汪莹, 等. 鼠伤寒沙门菌 ATCC13311 诱导耐药株的转录组测序和分析[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(7): 1088-1094, 1111.
- [7] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHÄFFER A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [8] OGATA H, GOTO S, SATO K, et al. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(1): 29-34.
- [9] TATUSOV R L, GALPERIN M Y, NATALE D A, et al. The COG database: A tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(1): 33-36.
- [10] UniProt Consortium. UniProt: A hub for protein information[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43: D204-D212.
- [11] FINN R D, COGGILL P, EBERHARDT R Y, et al. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44: D279-D285.
- [12] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [13] 赵凯. 鱼类线粒体 DNA (mtDNA) 及其在分子系统学中的应用[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2006, 24(2): 49-53.
- [14] 闫华超, 高岚. 线粒体 DNA 遗传特性的研究新进展[J]. 生物技术, 2003, 13(6): 63-65.
- [15] HAAS B J, PAPANICOLAOU A, YASSOUR M, et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis[J]. Nat Protoc, 2013, 8(8): 1494-1512.
- [16] MANEV H, DZITOYEVA S. Progress in mitochondrial epigenetics[J]. Biomed Concepts, 2013, 4(4): 381-389.
- [17] WOLFFE A P, MATZKE M A. Epigenetics: Regulation through repression[J]. Science, 1999, 286(5439): 481-486.
- [18] MANTEROLA M, BROWN T M, OH M Y, et al. BRDT is an essential epigenetic regulator for proper chromatin organization, silencing of sex chromosomes and crossover formation in male meiosis[J]. PLoS Genet, 2018, 14(3): 1-30.
- [19] FINNEGAN E J, KOVAC K A. Plant DNA methyltransferases[J]. Plant Mol Biol, 2000, 43(2/3): 189-201.
- [20] BALL M P, LI J B, GAO Y, et al. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells[J]. Nat Biotechnol, 2009, 27(4): 361-368.
- [21] WALKER C G, LITTLEJOHN M D, MEIER S, et al. DNA methylation is correlated with gene expression during early pregnancy in *Bos taurus*[J]. Physiol Genomics, 2013, 45(7): 276-286.
- [22] VAUGHN K C, DEBONTE L R, WILSON K G, et al. Organelle alteration as a mechanism for maternal inheritance[J]. Science, 1980, 208(4440): 196-198.

展方式转变、绿色生态产业体系建设等方面仍不够完善^[7]。在当前产业结构深度调整,发展方式加速转型,加快建设生态文明的重要时期,如何在工程区生态环境得到改善的同时,促进产业发展、保护农民权益、引导农民增收致富,是工程后期面临的重要挑战。

3 改进策略

3.1 深化造林工程改革,推动造林工程可持续 首先,要注重扩大造林规模,开拓造林面积,深化造林工程的改革;在平原造林的同时,也应当加大对山区如昌平区、延庆区、密云区以及怀柔区造林的投资力度,通过扩大造林规模,带动北京市生态、经济、社会的共同发展。其次,应加强技术进步,引导造林工程向对提高技术、引进人才等深层次方向的转移,加大人力资本的投入,以技术创新引领造林工程的全面创新发展。最后,造林的综合产出效率较低,不利于造林工程的可持续发展^[12],因此要合理利用造林资金。因此,可以将部分造林资金用于造林地区的树木养护、护林员的培训等后续林业发展,以提升造林工程的可持续性。

3.2 加大工程投资力度,完善森林治理措施 随着建设区域的不断扩大,建设难度不断增加,建设成本越来越高,加之近年来物价和劳动力成本的逐年提高,造林工程建设的投资标准也需要得到提升。因此,建议在确保政府投入的基础上,积极鼓励民营企业、外资企业、社会团体和个人采取股份制、股份合作制、个体承包等多种形式投资和参与工程建设,努力开拓资金筹措渠道,建立稳定多元化的工程建设投资新机制,加大投资力度。

3.3 确立合理补贴制度,促使政策完善 北京市北部山区造林工程的后续建设应关注农户收益,通过合理的补贴制度增加农户收入^[13]。目前造林覆盖区域农户参与意愿弱的主要原因是农户停止种植农作物,将耕地上交国家用于造林,使其种植业农作物收成及种植业收入均相应减少。因此,应适当提高造林补贴金额,除此之外,还可适当延长造林补贴年限,以确保农户在参与造林工程后仍有经济来源以供生活^[14]。此外,还需要适当完善造林补贴政策,并将造林补贴政策与其他相关配套政策相关联,使得各项政策相互配合,

从而取得效益最大化,促进政策的顺利实施。

3.4 发展林业绿色产业,促进工程转型升级 造林工程实施应当促进工程区域的产业融合发展,以更生态、更环保的方式促进产业结构升级,同时提升经济的竞争能力,增强造林工程区域的经济效益,建设更加生态宜居的社会环境。创建以示范基地建设为依托的发展模式,重点发展林药、林菌新品种,探索林药、林菌发展的长效机制,结合低收入农户精准帮扶工作,提高林下经济发展水平,增加当地农民收入并拓宽农民就业空间。促进传统林业向休闲旅游、“互联网+”等多产品、多功能、多效益的方向迈进,大力发展森林旅游、花卉园艺、游客采摘等新型林业产业,建设一批新型森林休闲和森林文化示范区。

参考文献

- [1] 王金龙. 京冀合作造林工程绩效评估创新研究[D]. 北京:北京林业大学, 2016.
- [2] 黄杰龙, 幸绣程, 彭秋原, 等. 基于生态文明视角的北京平原造林工程绩效评价[J]. 林业经济, 2017, 39(9): 37-42.
- [3] 马江. 承德市京津风沙源二期治理工程第一阶段生态效益评价[D]. 石家庄:河北经贸大学, 2019.
- [4] 师贺雄. 长江、黄河中上游地区退耕还林工程生态效益特征及价值化研究[D]. 北京:中国林业科学研究院, 2016.
- [5] 王亚明, 王江, 余涛, 等. 基于京津风沙源治理工程的林业生态工程建设效果实证分析[J]. 林业经济, 2017, 39(7): 46-50, 83.
- [6] 刘笑冰, 李宇佳, 刘芳. 基于生态文明视角的造林工程成本核算研究:以北京市京津风沙源治理二期工程为例[J]. 林业经济, 2019, 41(3): 119-124.
- [7] 李松桦. 我国林业生态工程建设存在的问题及对策[J]. 乡村科技, 2020(8): 77-78.
- [8] 幸绣程, 张超群, 黄杰龙, 等. 北京平原造林工程效果居民满意度模糊综合评价[J]. 林业经济问题, 2017, 37(5): 18-22, 100.
- [9] 王昌海, 温亚利, 李强, 等. 秦岭自然保护区群成本效益研究(I):成本效益比较[J]. 资源科学, 2012, 34(5): 836-843.
- [10] 宋元媛, 黄波, 全世文. 京津风沙源治理工程对农户收入影响实证研究:以“退耕还林”项目为例[J]. 林业经济, 2013, 35(9): 36-42.
- [11] 董战峰, 邵超峰. 我国可持续发展目标生态环境评价情况与建议[J]. 中国国情国力, 2020(8): 47-50.
- [12] 李祖铭. 浅谈森林管护及造林存在的问题及有效措施[J]. 种子科技, 2020, 38(2): 89, 92.
- [13] 卢悦, 田相辉. 退耕还林对农户收入的影响分析:基于 PSM-DID 方法[J]. 林业经济, 2019, 41(4): 87-93.
- [14] 杨伶, 张大红, 单永娟, 等. 京冀水源保护林建设农户后续参与意愿研究:基于河北省四县 104 户农户的调查数据[J]. 林业经济问题, 2015, 35(5): 418-423, 429.
- [23] MELAND S, JOHANSEN S, JOHANSEN T, et al. Rapid disappearance of one parental mitochondrial genotype after isogamous mating in the myxomycete *Physarum polycephalum*[J]. Curr Genet, 1991, 19(1): 55-59.
- [24] KOEHLER C M, LINDBERG G L, BROWN D R, et al. Replacement of bovine mitochondrial DNA by a sequence variant within one generation[J]. Genetics, 1991, 129(1): 247-255.
- [25] MOJICA C L, MEYER A, BARLOW G W. Phylogenetic relationships of species the genus *Brachyrhaphis* (Poeciliidae) inferred from partial mitochondrial DNA sequences[J]. Copeia, 1997(2): 298-305.
- [26] HAREL T, LUPSKI J R. Mendelian, non-Mendelian, multigenic inheritance, and epigenetics[M]//Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease. Amsterdam:Elsevier, 2020:3-25.
- [27] 朱华平, 卢迈新, 黄樟翰, 等. 鱼类遗传改良研究综述[J]. 中国水产科学, 2010, 17(1): 168-181.
- [28] 张天真. 作物育种学总论[M]. 北京:中国农业出版社, 2005:156-157.
- [29] HOECKER N, KELLER B, PIEPHO H P, et al. Manifestation of heterosis during early maize (*Zea mays* L.) root development[J]. Theor Appl Genet, 2006, 112(3): 421-429.
- [30] MEYER S, POSPISIL H, SCHOLTEN S. Heterosis associated gene expression in maize embryos 6 days after fertilization exhibits additive, dominant and overdominant pattern[J]. Plant Mol Biol, 2007, 63(3): 381-391.
- [31] 宿斌, 王荻, 刘红柏. 硬骨鱼类免疫球蛋白分类及多样性产生机制研究进展[J]. 水产学杂志, 2013, 26(1): 60-64.
- [32] 侯月娥, 冯娟, 杨清华, 等. 鱼类免疫球蛋白的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010(17): 37-39.
- [33] CHEN G, GOEDDEL D V. TNF-R1 signaling: A beautiful pathway[J]. Science, 2002, 296(5573): 1634-1635.
- [34] BALKWILL F. Tumour necrosis factor and cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(5): 361-371.
- [35] 邱丽华, 张汉华, 吴进锋. 鱼类肿瘤坏死因子基因和受体的研究进展[J]. 中国水产科学, 2004, 11(5): 482-487.

(上接第 103 页)