



陈松林, 中国工程院院士, 研究员, 博士生导师。中国水产科学研究院生物技术领域首席科学家、黄海水产研究所水产生物技术及基因组研究室创室主任。中国水产学会副理事长、水产生物技术与遗传育种专业委员会主任委员、全国水产原种和良种审定委员会副主任委员。长期从事鱼类种质保存、性别控制与抗病分子育种研究。建立鱼类种质冷冻保存技术体系; 发现我国首个鱼类性别特异分子标记; 破译我国首个鱼类基因组, 揭示鱼类性别决定机制, 创建分子标记辅助性控技术; 解析鲆鳎鱼变态分子机制; 研制我国鱼类首款抗病育种基因芯片“鱼芯1号”, 建立抗病基因组选择育种技术; 创建海水养殖鱼类基因组编辑育种技术。育成新品种4个, 第一和通信作者发表SCI论文230多篇, 包括Nature Genetics论文2篇, 获国家技术发明二等奖2项, 国家科技进步二等奖1项。获第十二届光华工程科技奖、首届全国创新争先奖、第四届中华农业英才奖和第三届中国青年科技奖等荣誉称号。

· 综述 ·

中国鱼类基因组编辑育种研究现状及存在问题与展望

陈松林^{1,2*}, 王德寿³, 匡友谊⁴, 崔忠凯^{1,2}, 李明辉³

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,

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功能实验室, 山东 青岛 266071;

2. 山东省海洋渔业生物技术与遗传育种重点实验室, 山东 青岛 266071;

3. 西南大学生命科学学院, 重庆 400715;

4. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要: 该文首次系统介绍了我国鱼类基因组编辑育种的研究现状、存在问题和发展前景。首先, 作者简要介绍了 ZFN (Zinc Finger Nucleases)、TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) 和 CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 等 3 种基因组编辑技术的优缺点。其次, 提出了鱼类基因组编辑育种的定义和 workflows。第三, 作者重点介绍了我国鱼类基因组编辑育种的主要进展。包括我国科学家建立的尼罗罗非鱼、鲤、鲫、半滑舌鲷、团头鲂、南方鲇等多种养殖鱼类基因组编辑育种技术。尤其是利用 TALEN 和 CRISPR 技术创制了雌雄反转、颜色不同的罗非鱼, 通过 TALEN 方法创制了半滑舌鲷 *dmrt1* 基因突变、生长快速的 F₃ 雄鱼新种质, 研制出无肌间刺鲫和团头鲂新种质。这些进展使我国鱼类基因组编辑育种与国际上同类研究相比, 实现了从过去的跟跑到现在的并跑, 甚至在某些鱼类上领跑的转变。作者最后梳理了目前鱼类基因组编辑育种研究中存在的不足和问题, 并对我国鱼类基因组编辑育种的未来发展方向进行了展望, 提出了今后鱼类基因组编辑育种的研究重点。该文对于推动我国鱼类基因组编辑育种的研究进程, 创制基因组编辑突破性新品种具有重要意义和参考价值。

关键词: 鱼类; 基因组编辑育种; 现状; 问题; 展望

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

收稿日期: 2022-10-11 修回日期: 2022-10-29

资助项目: 国家自然科学基金重点项目 (31730099); 海水鱼产业技术体系半滑舌鲷种质资源与遗传改良专项 (CARS-47-G03); 中国水产科学研究院创新团队项目 (2020-TD-20); 山东省泰山学者攀登计划

通信作者: 陈松林, 中国工程院院士, 从事水产生物技术与遗传育种研究, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

鱼类养殖业是保障我国粮食安全的重要产业, 2021 年我国水产养殖产量 5394 万 t, 其中鱼类产量为 2824 万 t, 占比 52%。我国水产养殖产量占世界的 60% 以上, 稳居世界水产养殖第一大国位置, 为解决我国城乡居民吃鱼难、增加优质动物蛋白供应、提高全民营养健康水平、保障我国食物安全和促进全球水产品有效供给均做出了重要贡献。但随着鱼类养殖业的快速发展, 一些问题相继出现, 甚至长期存在。例如, 许多养殖鱼类存在生长较慢、养殖周期长、经济效益不高的问题; 绝大多数养殖鱼类出现种质退化、抗病力差及病害频发的问题, 每年造成经济损失多达数百亿元; 鱼类养殖业中普遍存在某一性别生长慢、产量低、商品价值不高、影响产业发展的问题。例如, 大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 和半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 等海水养殖鱼类雌鱼比雄鱼大 30%~400%, 雄鱼生长慢、个体小; 而黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 和罗非鱼等淡水养殖鱼类雄鱼比雌鱼大 35%~200%, 雌鱼生长明显慢于雄鱼; 另外, 鲫 (*Carassius auratus*)、鲤 (*Cyprinus carpio*)、鳊 (*Parabramis pekinensis*) 等许多鲤科鱼类有肌间小刺, 降低商品价值, 影响大众消费。上述这些问题严重影响了鱼类养殖业的绿色高质量发展。

为解决上述问题, 过去 20 多年来, 我国水产科技工作者针对不同鱼类开展了良种培育的研究, 并取得重要进展。据统计, 截至 2022 年, 我国共审定水产新品种 266 个, 其中鱼类新品种 134 个, 占比 50%。其中, 鱼类代表性的新品种包括“中科 3 号”鲫、“中科 5 号”鲫、湘云鲫、合方鲫, 福瑞鲤和“建鲤 2 号”鲤, “鲟优 2 号”和“北鲟 2 号”牙鲟 (*Paralichthys olivaceus*), “丹法鲟”和“多宝 2 号”大菱鲟 (*Scophthalmus maximus*), “鲟优 1 号”半滑舌鳎, “龙虎斑”和“云龙斑”石斑鱼 (*Epinephelus* spp.), “闽优 1 号”和“东海 1 号”大黄鱼等, 这些新品种对于我国鱼类养殖业的快速发展、解决人民吃鱼难的问题发挥了重要作用。但我国鱼类种业中也存在一些短板和不足。例如, 绝大多数新品种是采用传统杂交、群体选育和家系选育技术培育而成, 选育性状比较单一, 主要是生长性状, 特别是选育周期长、选育效率低等问题严重影响了鱼类突破性重大新品种的培育。而采用分子标记辅助性控、基因组选择等现代分子育种技术培育的具有抗病、抗逆、优质、高产等多个优良性状的突破性新品种很少; 有些产业

问题, 如半滑舌鳎等鱼类雄鱼个体小、生长慢的问题, 鲤、鲫和鳊等淡水鲤科养殖鱼类的肌间刺等问题, 都是依靠传统育种技术难以解决的, 必须借助现代分子育种技术才能解决, 而基因组编辑技术便是最有潜力的现代分子育种技术之一。

1 基因组编辑技术简介

基因组编辑技术是指可以对生物体基因组进行定点修饰的一种基因操作技术, 如点突变、基因敲除、多位点同时编辑、小片段甚至大片段 DNA 删除、DNA 重排、基因表达开启和关闭、基因沉默和激活、引导编辑以及外源基因定点敲入等。基因组编辑技术主要包括 ZFN (Zinc Finger Nucleases, 锌指核酸酶技术)^[1]、TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases, 转录激活因子样效应物核酸酶技术)^[2] 和 CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, 成簇规律间隔短回文重复序列技术)^[3] 等 3 种人工核酸内切酶介导的基因修饰技术。

ZFN 是最早报道的可用于基因组定点改造的人工核酸酶。ZFN 由锌指蛋白 (Zinc finger protein, ZFP) 结构域和核酸内切酶 *FokI* 切割结构域人工融合而成^[4]。其中, ZFP 特异识别并结合靶 DNA 序列, 而 *FokI* 通过二聚化造成识别位点之间的 DNA 双链断裂, 随后生物体通过自我修复机制如同源重组 (homologous recombination, HR) 或非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 将断裂处修复, 以达到定向编辑 DNA 的目的^[1,5]。ZFN 技术属于第一代人工核酸酶基因组编辑技术, 问世不久就被新的基因组编辑技术所取代。

TALEN 技术是基于 TALE 蛋白特异识别并结合 DNA 碱基的原理, 将 TALE 与 *FokI* 的切割结构域融合, 产生能够在特定基因组位点制造双链断裂的融合酶—TALEN, 属于第二代人工核酸酶基因组编辑技术。与 ZFNs 相比, TALENs 具有更广泛的 DNA 序列识别特性, 并且识别特异性和切割效率进一步提高。因此, TALEN 技术一经问世就很快应用于斑马鱼 (*Danio rerio*)、牛、大/小鼠及养殖鱼类等物种的基因组编辑研究。不过, TALE 的串联难度比较大, 操作比较复杂, 影响了 TALEN 技术的规模化应用。

鉴于 ZFN 和 TALEN 基因组编辑技术都依赖于 DNA 特异性结合蛋白的组装、合成, 尽管已有多种方法能快速组装表达载体、翻译特异蛋白,

但这两个技术非常繁琐、操作复杂、需要时间长, 使用成本高, 难以大规模推广应用。因此, 国外许多科学家都在探索新的基因组编辑技术。其中, 美国学者 2013 年报道了一种全新的人工核酸内切酶-CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术^[6], 这项技术主要是根据细菌获得性免疫系统改造而成^[3, 7-9]。该技术主要利用 Watson-Crick 碱基互补配对的原则, 利用一段短的 RNA 分子 (single guide RNA, sgRNA) 识别靶 DNA 序列, 同时介导 Cas9 核酸酶在 DNA 的特异位点上制造双链断裂。与 ZFN 和 TALEN 技术相比, CRISPR 技术具有识别序列更广泛、效率更高、操作更简单、成本更低、毒性更低等优点, 尤其重要的是可同时编辑任意数量的基因^[3], 因此, CRISPR 技术一经问世, 迅速广泛应用于生物基因修饰、定点突变、遗传学改造、生物育种以及人类基因疾病的治疗等领域, 掀起了一场生物技术的革命。

2 基因组编辑育种的定义与流程

本文所指的基因组编辑育种是指采用 TALEN 或 CRISPR 等基因组编辑技术对靶标基因进行定点突变 (敲除) 而定向改良生物的经济性状并培育出新种质的育种活动, 其特征是突变的基因和性状可以遗传, 其目的是培育出新品种。本文所讲的基因组编辑育种不包括基因组编辑介导的外源基因定点整合 (敲入) 所进行的转基因育种。为此, 本文主要涉及到利用 TALEN 或 CRISPR 基因组编辑技术对性别决定、肌间刺形成、体色形成及肌肉发生等性状的调控基因进行敲除, 获得性状改变的新种质的有关进展。和传统转基因育种技术相比, 基因组编辑育种主要是对基因组的特定 DNA 序列进行突变, 敲除 1~n 个碱基, 是在生物自身基因组上做“减法”, 让生物获得优良性状, 并不转入外源基因。而传统的转基因育种是转入了外源基因, 是在生物基因组上做“加法”。例如, 中过科学院水生生物研究所研发的全球首个转基因鲤和美国上市的转基因大西洋鲑 (*Salmo salar*) 都是在基因组中转入另外一种鱼类的生长激素基因, 从而使它们的生长速度提高 1 倍以上, 成为生长快速的超级鱼。

与转基因相比, 基因组编辑育种技术产生的新品种不含外源基因, 在美国、日本、德国、瑞典和阿根廷等许多国家都视为与常规育种培育的

新品种相同, 不属于转基因生物监管范围。通过基因组编辑育种技术研制的含肉量增加的真鲷 (*Pagrus major*) 和红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 已被日本政府允许上市销售^①。

鱼类基因组编辑育种流程包括: 靶标基因筛选、克隆与功能分析, 基因组编辑载体构建, 受精卵显微注射及阳性鱼筛选, 基因组编辑鱼建系与表型性状鉴定, 基因组编辑亲鱼的培育、繁育与示范养殖, 基因组编辑鱼的食用安全性和生态安全性评价、基因组编辑鱼生产许可证的申请及基因组编辑鱼商业化生产等 (图 1)。

3 我国养殖鱼类基因组编辑育种研究进展

随着我国第一种鱼类 (半滑舌鳎) 全基因组测序的完成^[10], 近 8 年来, 我国科学家共完成了 50 多种养殖鱼类全基因组测序和精细图谱绘制^[11], 为鱼类重要性状关键基因的发掘和基因组编辑研究奠定了重要基础。鉴于基因组编辑技术在鱼类基因功能分析及遗传改良上的重大意义和应用价值, 近年来国内外科学家竞相在不同鱼类建立了基因组编辑技术并应用于基因功能分析和遗传育种。除模式鱼类斑马鱼和青鳉 (*Oryzias latipes*) 外^[12-20], 迄今, 国内外已在 20 多种养殖鱼类上开展了基因组编辑技术研究和育种工作, 鉴定了一系列与性别、生长、体色、肌间刺发育等性状密切相关的候选基因^[21]。我国是将基因组编辑技术应用在养殖鱼类育种上较早的国家, 目前已在淡水养殖鱼类尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[22-24]、黄颡鱼^[25]、鲤^[26]、黄鳝 (*Monopterus albus*)^[27]、鲟 (*Acipenser ruthenus*)^[28]、鲫^[29] 和南方鲇 (*Silurus meridionalis*)^[30-31], 以及海水养殖鱼类半滑舌鳎^[32-33]、牙鲆^[34] 和大黄鱼^[35] 等建立了基因组编辑技术, 并开展了基因功能分析。特别是近年来, 我国水产科技工作者在鱼类基因组编辑育种研究上取得一系列突破性进展。通过 TALEN 和 CRISPR/Cas9 突变罗非鱼性别决定通路基因 *dmrt1*、*gsdf*、*foxl2*、*cyp19a1a* 等实现了由雌向雄或由雄向雌的性逆转^[22, 24, 36]。采用 TALEN 基因组编辑技术突变了半滑舌鳎雄性性别决定基因 *dmrt1* 并获得 F₃ 突变鱼, 这是我国在海水鱼类建立的第一个纯合突变鱼^[33, 37]。筛选到鲤科鱼类肌间刺形成关键基因, 并采用 CRISPR 技术研制出无肌间刺鲫品系并传到 F₃^[38]。以黄河鲤 *cyp17a1* 为靶点进行了 CRISPR/Cas9 介

① Japan embraces CRISPR-edited fish. Nature Biotechnol. 2022 Jan;40(1):10. doi: 10.1038/s41587-021-01197-8.

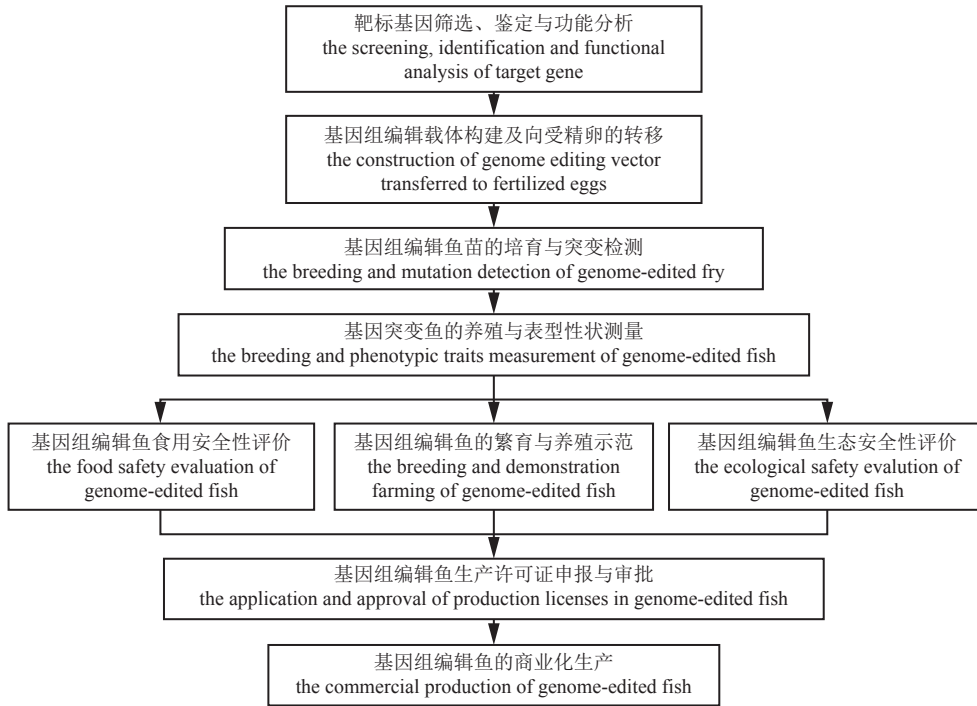


图 1 鱼类基因组编辑育种流程

Fig. 1 The genome editing breeding process in fish

导的基因组编辑操作, 利用 *cyp17a1* 敲除后形成的 XX 伪雄鲤与 XX 野生型雌鱼繁殖, 成功构建了全雌鲤群体^[39]。发现了鲤科鱼类肌间刺发育关键基因 *runx2b*^[40], 利用基因组编辑技术获得了无肌间刺的团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)。

3.1 罗非鱼基因组编辑育种研究进展

靶标基因的挖掘与功能分析 性别决定是鱼类生殖、生理和遗传育种等领域的研究热点和难点。为此, 西南大学在国内率先开展了罗非鱼基因组编辑性控育种的研究。采用基因组测序和重测序、转录组测序等方法, 挖掘了多个雌、雄通路的关键基因, 如雌性通路的 *foxl2/3*、*cyp19a1a*、*esr2a/2b* 和雄性通路的 *amhr2*、*dmrt1*、*gsdf* 等^[36,41]。采用性别特异分子标记在构建的罗非鱼微阵列 Fosmid 基因组文库筛选到 2 个分别含 X 和 Y 染色体特异片段的克隆。通过测序、组装和精细比对, 图位克隆了尼罗罗非鱼性别决定基因 *amhy*^[24], 发现 *amhy* 通过与 II 型受体 *amhr2* 结合招募 I 型受体 *alk2/3/6* 并磷酸化 *smad1/5/8* 从而抑制 *cyp19a1a* 的表达和雌激素的合成决定雄性性别, 初步揭示了 *amhy* 决定鱼类性别的信号传导途径与分子机制^[42]。此外, 基于斑马鱼和青鳞体色形成的保守性, 挖掘了 *tyrb*、*hps4*、*pmela/b*、*csflra* 等多个罗

非鱼体色形成的关键基因, 解析了体色形成的遗传基础, 并通过基因组编辑技术创制出金色、银白色、白化、灰色和灰体黑尾的罗非鱼。肌肉生长抑制素 *myostatin(mstn)* 是保守的调控肌肉生长的抑制因子, 通过基因组编辑技术突变 *mstn* 创制出生长快的罗非鱼。因此, 通过基因组编辑在罗非鱼实现了性别、体色、生长性状的人工操作。

所用的基因组编辑方法简介 建立了罗非鱼 TALEN 和 CRISPR/Cas9 两种基因组编辑技术, 实现了靶标基因的高效突变, 利用 DNA 双链断裂和随机修复导致的靶标基因移码突变, 进而获得缺失功能突变体。利用双靶点 gRNA 实现了非编码序列如 microRNA 和启动子的大片段删除。通过利用 Cas9-Vasa-3'UTR 载体实现了生殖细胞的高效突变与传递, 目前已在罗非鱼构建了 100 多个纯合突变系, 表现出性逆转、配子发生缺陷、不育、体色改变以及生长快等表型, 使其成为当前通过基因组编辑建立突变系最多的养殖鱼类。

基因突变鱼的检测与基因组编辑鱼的繁育突变体罗非鱼检测主要采用限制性内切酶酶切法、T7 核酸内切酶 I (T7 Endonuclease I, T7EI) 酶切法、PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis) 电泳法及 DNA 序列测定法。限制性内切酶酶切法需要在靶点处具有合适的酶切位点。采用 PCR 扩

增含有靶点的 DNA 片段, 然后进行酶切, 如靶点处 DNA 发生突变, 则酶切位点可能被破坏, 不能被限制性内切酶切割成 2 条 DNA 条带, 仍保留一条完整 DNA 片段, 如未发生突变, 则扩增的 DNA 片段被全部切割成 2 条 DNA 条带。T7EI 酶切法基于突变的靶点 DNA 可与野生型 DNA 片段退火时产生非完全配对的 DNA 片段被非配对内切酶 T7EI 酶切割的原理识别阳性突变体; 反之, 若靶点未发生突变, 则产生完全配对的 DNA 片段, 无法被 T7EI 切割。PAGE 法是基于突变和野生型 DNA 形成的异源杂合双链 DNA 存在碱基不配对区, 可形成环形不配对部分, 在非变性凝胶电泳条件下, 会产生与相应的同源双链 DNA 不同的迁移率。

首先, 尽量在靶基因靠前的外显子上选择合适的靶点, 设计用于 gRNA 的引物用于模板扩增, 体外合成并纯化 RNA。采用显微注射方法在 XY 罗非鱼受精卵 (1~2 细胞期) 注射基因组编辑组分 gRNA 和 Cas9 mRNA, 在注射后 72 h 收集部分胚胎用于基因组 DNA 提取, 然后扩增含有靶点的 DNA 片段, 利用限制性内切酶酶切法/T7EI 酶切法/PAGE 法检测靶点是否工作。待其性成熟时, 通过挤压腹部获取精液, 提取基因组 DNA, 通过限制性内切酶酶切法/T7EI 酶切法/PAGE 法和 DNA 测序分析精子中含有的突变类型。如果精子中含有移码突变的类型, 则将 F₀ 的 XY 阳性鱼与 XX 野生型雌鱼繁殖获得 F₁ 个体, 筛选出靶点处移码突变的 F₁ 杂合子。最后将 F₁ 杂合子进行姊妹交获得 F₂ 纯合子^[43]。

生长是一种重要的经济性状。肌肉生长抑制素 *mstn* 是骨骼肌生长的负调节因子。利用 CRISPR 基因组编辑技术获得了罗非鱼 *mstnb* 纯合突变体。与野生型相比, 5 月龄 *mstnb* 突变鱼具有明显的双肌表型。实验室养殖条件下 5 月龄突变鱼的平均体重、体高、体宽分别是野生型的 149.45%、132.74% 以及 137.21%。突变鱼增重率、肥满度以及特定生长率分别是野生型的 1.99、1.77 以及 1.23 倍^[52](图 2)。

基因组编辑鱼的性状改良 许多养殖鱼类呈现生长的性别二态性现象, 单性养殖具有更好的经济价值。因此, 性控育种是水产动物遗传育种领域研究的重点。迄今为止, 采用激素诱导产生性反转个体是水产养殖业构建单性群体最普遍使用的方法, 但是这既不利于消费者身体健康,

又危害环境。通过分子标记辅助选育和基因组编辑等手段获得单性鱼苗是水产养殖的首选。目前, 在罗非鱼通过 TALEN 和 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术突变了多个性别决定通路关键基因, 实现了由雌向雄或由雄向雌的性逆转。例如突变 *foxl2*、*cyp19a1a*、*cyp17a1* 导致 XX 罗非鱼性腺发育为精巢; 突变 *amhy*、*dmrt1*、*gsdf*、*amhr2* 导致 XY 罗非鱼性腺发育为卵巢^[22, 44-47]。因此, 通过基因组编辑可以实现养殖鱼类的性别控制。

体色是鱼类重要的经济性状之一。传统上, 锦鲤、金鱼等观赏鱼都是通过数百年甚至上千年的人工选育得到的, 而基因组编辑为快速获得体色突变体提供了可能。采用 CRISPR 技术突变了罗非鱼数十个体色形成关键基因, 发现纯合突变黑色素前体蛋白关键编码基因 *pmela* 和 *pmelb*, 创制出了金色罗非鱼^[48]; 纯合突变黑色素合成关键基因 *hps4*, 创制出银白色罗非鱼^[49]; 突变黄色素细胞分化的关键基因 *csflra*, 创制出灰色和灰体黑尾罗非鱼^[50]; 通过突变黑色素合成酶关键基因 *tyrb* 导致完全白化的表型, 在红罗非鱼中突变 *tyrb* 导致黑色素细胞缺失但并不影响红色素细胞的存在, 结合性别连锁的分子标记辅助技术获得 *tyrb* 缺失的 YY 超雄红罗非鱼, 与 XX 红罗非鱼繁殖, 建立了遗传全雄无黑斑红罗非鱼的生产技术^[51]。

3.2 半滑舌鳎基因组编辑育种研究进展

半滑舌鳎是我国特有的重要海水养殖鱼类, 是一种名贵比目鱼类, 也是入选国家海水鱼产业技术体系的 9 大品种之一。不过, 半滑舌鳎雌、雄鱼生长差异巨大, 雌鱼比雄鱼生长快 2~4 倍, 2 龄的雌鱼可长到 1 kg, 而雄鱼不到 0.25 kg, 雄鱼个体小、生长慢的问题严重影响了渔民养殖积极性, 限制了其养殖产业的发展。我们过去 10 多年的研究表明, 采用传统的染色体操作、雌核发育、家系选育等技术难以解决半滑舌鳎雄鱼生长慢、个体小的问题, 因此, 基因组编辑技术成为破解半滑舌鳎雄鱼长不大难题的必然选择。

靶标基因的克隆与功能分析 中国水产科学研究院黄海水产研究所在国内率先建立了海水养殖鱼类基因组编辑技术。首先, 我们完成了半滑舌鳎全基因组测序和精细图谱绘制, 发现 *dmrt1* 基因是半滑舌鳎 Z 染色体连锁、雄性性腺特异表达、精巢发育必不可少的基因, 是雄性决定候选基因^[10]; 为研究 *dmrt1* 基因的功能, 采用

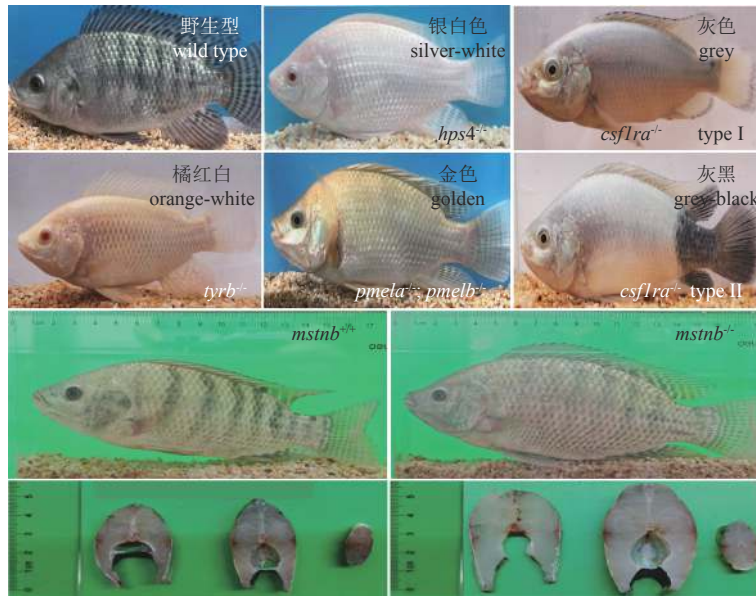


图2 基因组编辑技术创制的彩色和速生罗非鱼 (图片引自文献 [48-52])

Fig. 2 Colored and fast-growing tilapia created by genome editing technology (Figures cited from references [48-52])

基因组编辑技术将 *dmrt1* 基因突变后, 发现遗传雄鱼性腺发育成卵巢样结构, 具有卵巢腔, 雄性性腺发育受阻, 精子难以形成, 进一步证明了 *dmrt1* 基因是半滑舌鲷的雄性决定基因, 同时, 发现 *dmrt1* 基因纯合突变的遗传雄鱼生长变快, 1 龄时的大小是普通雄鱼的 2 倍, 接近正常雌鱼, 由此表明 *dmrt1* 基因也调控着半滑舌鲷的生长^[33]。

所用的基因组编辑方法简介 进行半滑舌鲷雄性决定基因 *dmrt1* 编辑主要采用 TALEN 方法。根据 *dmrt1* 的基因组序列, 在外显子 1 起始密码子 ATG 下游 80~140 个核苷酸的区段设计一对 TALEN 结合位点。按照常规方法, 利用 Addgene 公司的试剂盒 TALEN Golden Gate toolkit 构建了 TALEN 质粒。采用此种方法构建的 TALEN 质粒经验证有 90% 的克隆序列正确。这样设计构建的 TALEN 质粒具有高的突变效率。通过显微注射将 TALEN 质粒 mRNA 注射到半滑舌鲷 1~2 细胞期的受精卵中^[33, 37]。

基因突变鱼的检测与基因组编辑鱼的繁育 *dmrt1* 的突变检测主要通过 PCR 扩增目标基因片段和序列分析方法进行, 检测基因片段的缺失判断是否发生突变。Cui 等^[33] 对 17 尾转移了 *dmrt1* TALEN mRNA 的半滑舌鲷 F₀ 鱼苗进行 PCR 扩增和测序检测, 观察到其中 10 尾发生了基因定点突变, 突变效率为 58.82%。由测序可知, *dmrt1* TALEN 成功突变了 *dmrt1* 基因, 突变位点在距离起始密码子下游 100~120 bp 处, 存在不同

数目的碱基突变, 其中含有缺失 3 的倍数 (不移码) 和非 3 的倍数 (移码) 的碱基, 根据转录翻译原理, 会产生变异蛋白, 从而影响其功能^[37]。

海水鱼类在鱼苗阶段养殖成活率低, 这对于基因组编辑鱼苗的培育非常不利, 因此, 建立基因组编辑鱼苗的精准培育技术至关重要。近几年, 黄海水产研究所科技人员优化了半滑舌鲷鱼苗培育方法, 建立了受精卵孵化、鱼苗培育的标准化技术 (图 3), 将基因组编辑的少量鱼苗培育长大并达到性成熟, 尽管从显微注射胚胎到成鱼的成活率大约只有 1/5000, 但仍然获得了一些 *dmrt1* 基因编辑后长大的成鱼。

基因组编辑鱼的表型测定 *Dmrt1* 基因编辑半滑舌鲷的表型性状主要包括性腺形态结构和生长参数。为观察基因组编辑舌鲷的性腺发育情况, 我们采集基因组编辑鱼和对照鱼的性腺组织, 用 Bouin 氏固定液固定 4~16 h, 然后保存在 70% 酒精里。固定后的组织经过修整、常规洗涤、脱水、透明、浸蜡、包埋和切片等步骤制成石蜡切片。石蜡切片进行苏木素和伊红染色 (H.E 染色) 后可在显微镜下观察基因敲除鱼的性腺结构或其它相关组织的结构。通过半滑舌鲷 *dmrt1* 基因定点突变鱼苗的性腺组织切片可知, 当遗传雄鱼的 2 个 *dmrt1* 基因都被突变后雄鱼精巢发育不正常, 横切面呈现卵巢的圆形; 精巢结构发育不全, 不能正常进行减数分裂, 形成不了正常精子; 中间有一个正常精巢没有而正常卵巢才有的空腔, 退

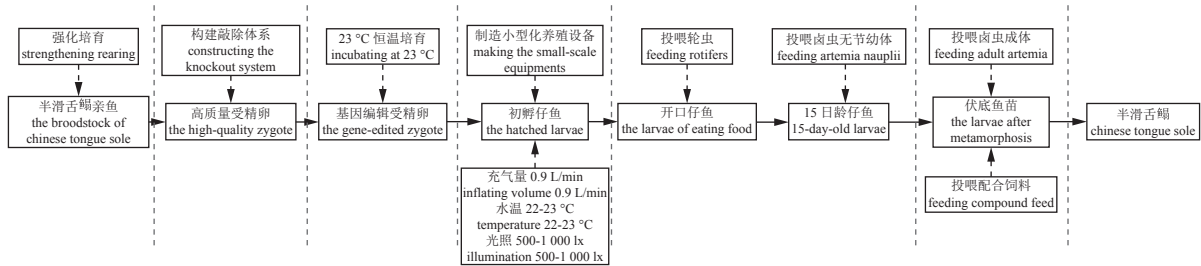


图 3 半滑舌鲷基因组编辑鱼苗精细培育技术

Fig. 3 The breeding technology of gene-edited Chinese tongue sole

化区域有类似卵细胞结构^[33, 37]。

为比较基因组编辑半滑舌鲷的生长表型, 我们在基因组编辑鱼生长发育的不同阶段, 采集样品进行体长、体重测量, 比较基因组编辑鱼和对照鱼的大小差异。对 6 月龄的 *dmrt1* 敲除 F₃ 鱼苗进行了大小测定和分拣, 大鱼 (体重 20 g 以上, 体长 16 cm 以上) 2 975 尾, 比例为 62.96%; 小鱼为 1 750 尾, 比例为 37.04%。随机取 24 尾 F₃ 中的大鱼进行检测, 有 17 尾为遗传雄性 (其中纯合突变为 15 尾), 7 尾为遗传雌性, 遗传雌鱼的平均体重为 23.7 g, 纯合突变雄鱼的平均体重为 23.4 g。2021 年 8 月, 对 2020 年获得的 *dmrt1* 纯合突变的部分 F₃ 雄鱼进行了专家现场验收, 发现 *dmrt1* 纯合突变 F₃ 雄鱼体重为 386 g, 而对照雄鱼体重为 167 g, 对照雌鱼体重 415 g, 表明基因组编辑雄鱼比普通雄鱼生长快 2 倍以上, 大小接近普通雌鱼 (图 4) (专家验收报告, 未发表)。

3.3 鲫基因组编辑育种研究进展

鲫基因组编辑育种涉及饲料转化率、性别控制和肌间刺等性状。中国科学院水生生物研究所开展了银鲫饲料转化率的基因组编辑育种。*pik3r1* 是磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3Ks) 的一员, PI3Ks 是 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的核心元件, 参与营养摄入、细胞生长、繁殖、合成代谢等生物学过程, 并被 GH/IGF 内分泌调控轴和胰岛素信号通路激活。Huang 等^[29] 通过 Zifit (<http://zifit.partners.org/ZiFit/>) 设计了银鲫 *pik3r1* 基因的 CRISPR/Cas9 敲除靶位点 (GGGACTTTCCTG-GTACGTACGTGG), 在 F₀ 中获得了缺失 4bp (TACG) 的突变体, 采用雌核发育构建了银鲫 F₂ 群体, 4 个月的同池塘生长对比实验表明 F₂ 群体的体重比野生型增加了 1 倍, 8 周的饲料转化率实验表明 F₂ 群体的特定生长速度和饲料转化率显著高于野生型, 饲料转化率提升了约 10%。

图 4 半滑舌鲷基因组编辑 F₃ 雄鱼与普通雌鱼、雄鱼对比Fig. 4 Comparison of gene-edited F₃ males with common females and males in the Chinese tongue sole

中国科学院水生生物研究所也在银鲫的性别控制基因组编辑育种中取得显著进展。采用 3'RACE 和 5'RACE 从银鲫中克隆了 3 个 *foxl2* 的同源基因 (*foxl2a-A*, *foxl2a-B*, *foxl2b-B*), 采用 ZiFit 设计了 CRISPR/Cas9 基因敲除靶位点, 通过敲除 *foxl2a-B* 导致 F₀ 突变体卵巢发育停止或完全性逆转, 而 *foxl2b-A* 和 *foxl2b-B* 的同时敲除致使 F₀ 生殖细胞消失, 导致不育^[53]。Wang 等^[54] 克隆了 *gsdf* 的 2 个同源基因 (*gsdf-A* 和 *gsdf-B*), 采用 CRISPR/Cas9 敲除 *gsdf-A* 或 *gsdf-B* 导致 F₂ 中约 80% 的雄性突变体性逆转为雌性, 而完全敲除 *gsdf-A* 和 *gsdf-B* 则导致 F₂ 中全部雄性突变体性逆转为雌性。

肌间刺影响鲫的食用, 无肌间刺品种的培育将提升鲫的品质, 具有重要意义。中国水产科学研究院黑龙江水产研究所利用 CRISPR 技术在国内率先获得了无肌间刺鲫。在斑马鱼中率先发现了肌间刺发育的关键基因 *bmp6*^[55-58], 2019 年建立了鲫基因组编辑技术, 通过 CRISPR/Cas9 敲除鲫的 *bmp6*, 于 2021 年获得无肌间刺鲫 F₂ 群体^[38, 59], 2022 年获得了无肌间刺鲫 F₃ 群体 (图 5), 创制出无肌间刺种质。因鲫基因组经历了第 4 轮基因组复制事件, *bmp6* 在鲫中具有 2 个同源基因 (*bmp6a*

和 *bmp6b*), 需要将 *bmp6a* 和 *bmp6b* 同时敲除方可获得无肌间刺个体。为加快无肌间刺品系培育, 此研究设计了两轮基因敲除和群体繁育策略 (图 5-a): 首先采用 *bmp6a* 和 *bmp6b* 进行第 1 轮多位点显微注射, 构建 F₀ 群体; 筛选出 *bmp6a* 或 *bmp6b* 体细胞突变率 95% 以上的亲本自然交配, 对其受精卵进行 *bmp6a* 和 *bmp6b* 第 2 轮多位点显微注射, 构建 F₁ 群体; 在 F₁ 中筛选双基因体细胞突变率大于 95% 个体, 采用 X 射线活体扫描, 筛选出无肌间刺突变体自然交配构建 F₂ 群体; 对 F₂ 群体进

行基因型和肌间刺表型筛选, 筛选出双基因突变的无肌间刺个体自然交配, 繁殖 F₃ 无肌间刺群体。在此研究中, 针对 *bmp6a* 和 *bmp6b*, 在 1 号外显子各设计 3 个靶位点, 对这 6 个 sgRNA 和 Cas9 蛋白进行混合注射, 经两轮显微注射, 在体细胞突变率不少于 95% 的 F₁ 中筛选到 35 尾无肌间刺个体 (图 5-b), 占比 12.96%, 并筛选到肌间刺数量减少 50% 以上的突变体 110 尾, 占比 40.74%。利用 35 尾 F₁ 无肌间刺个体自然交配, 繁殖 F₂ 群体, 在 1 500 尾样本中获得 285 尾无肌间刺个体,

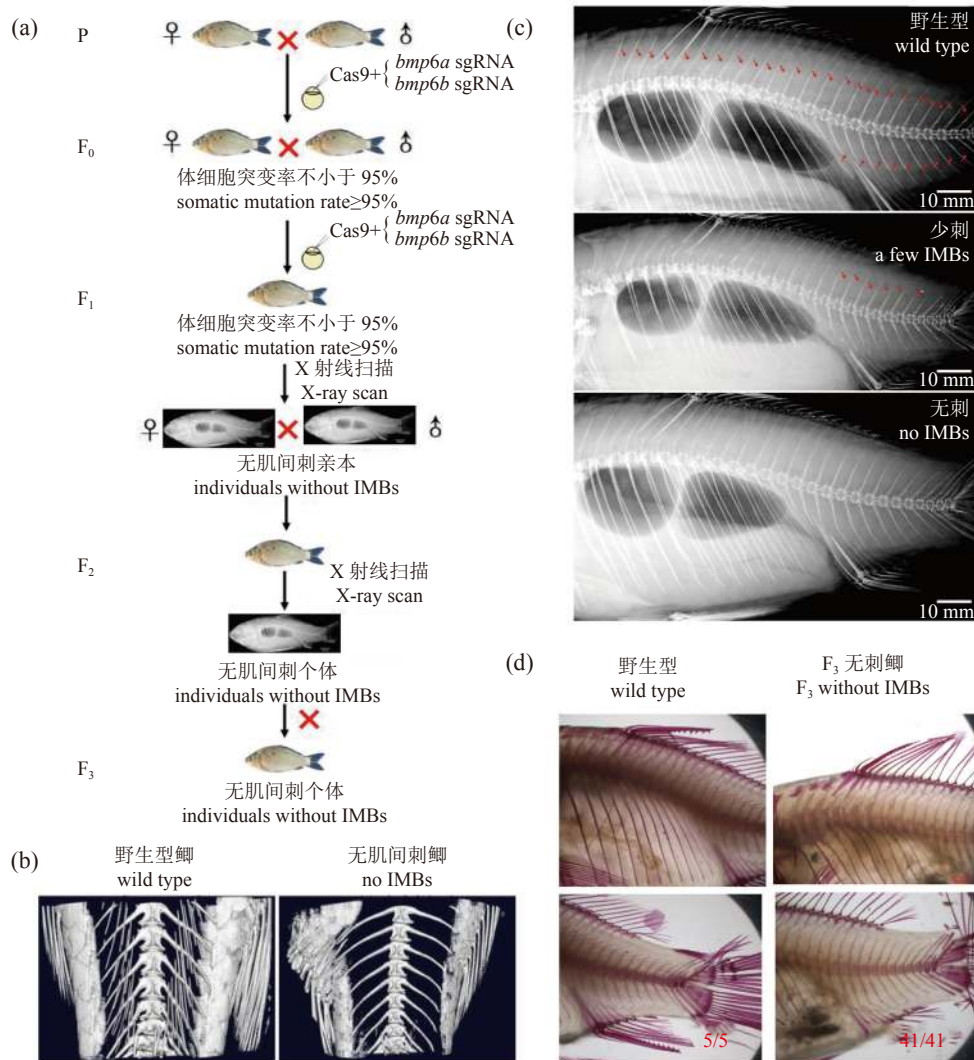


图 5 无肌间刺鲫种质创制

(a) 无肌间刺鲫种质创制技术路线; (b) F₁ 无肌间刺突变体骨骼 micro-CT 照片; (c) F₂ 群体 X 射线活体扫描, 标尺为 10 mm; (d) F₃ 群体骨骼染色, 图中数字分母表示样本数, 分子表示表现出肌间刺表型的样本数, 标尺为 2000 μ m

Fig. 5 Generation of crucian carp germplasm without intermuscular bones

(a) The technical route for generating the crucian carp germplasm without intermuscular bones; (b) Skeletal micro-CT photos of the F₁ generation mutants without intermuscular bones; (c) X-ray images of the F₂ generation, the scale bar is 10 mm; (d) Skeletal staining of the F₃ generation, the denominator in the figure represents the number of samples, the numerator represents the number of samples showing the phenotype of intermuscular bones, and the scale bar is 2000 μ m

占比 19.00%, 肌间刺数量减少 50% 以上的样本 380 尾, 占比 25.33% (图 5-c)。利用 F_2 无肌间刺个体自然交配构建 F_3 群体, 骨骼染色表明无肌间刺个体比例达 100% (图 5-d), 生长对比实验表明 F_3 的体长和体重与对照组相比无显著性差异。

3.4 鲤基因组编辑育种研究进展

国内多个单位开展了鲤基因组编辑育种技术的研究, 主要包括生长、体色、性别控制和肌间刺等性状的关键基因的编辑。苏州大学开展了鲤 *mstn* 的基因组编辑育种研究。因鲤经历了第 4 轮基因组复制事件, *mstn* 在鲤中具有 4 个同源基因, Zhong 等^[26] 研究发现, *mstnba* 在肝脏、鳃、眼、心脏、肠、精巢、肌肉等组织中广泛表达, 采用 CRISPR/Cas9 敲除 *mstnba*, 获得了快速生长的 F_0 鲤突变体, 3 月龄突变体的体重增加了 20%, 体长增加了 12.5%, 突变体中肌肉细胞数量增加了约 28%, 肌纤维面积增加了约 50%。

鱼类的体色十分丰富, 体色的形成涉及色素和色素模式的发育, 其中黑色素的形成起到关键作用。目前共鉴定到 662 个与体色发育相关的基因^[60](<http://www.ifpcs.org/colorgenes/>), 涉及黑色素发育的基因有 282 个, 其中黑色素细胞诱导转录因子(Melanocyte inducing transcription factor, *MITF*)、刺鼠信号蛋白基因(Agouti signaling protein, *ASIP*)、黑色素内皮质素受体 1(Melanocortin receptor 1, *MC1R*)、酪氨酸酶(Tyrosinase, *tyr*) 等基因起到重要作用。上海海洋大学开展了瓯江彩鲤体色的基因组编辑育种研究, 他们克隆了 *MC1R*、*ASIP* 和 *tyr* 等基因, 采用 CRISPR 技术获得了色素突变的突变系。*MC1R* 的隐性突变导致黑色素减少, 与红罗非鱼^[61]、日本锦鲤^[62]、洞穴鱼^[63] 的黑色素发育有关。Mandal 等^[64] 在瓯江彩鲤中发现 *MC1R* 的表达量与皮肤组织中黑色素斑点的形成相关, 利用 CRISPR 技术敲除 *MC1R* 基因构建了 F_0 突变系, 表现出皮肤黑色素显著性减少。*ASIP* 是黑色皮质素及 *MC1R* 的内源性拮抗剂, 在脊椎动物色素形成中起到重要的调控作用, *ASIP* 可调控黑色素斑点及背腹色素模式的形成^[65]。Chen 等^[66] 在瓯江彩鲤中鉴定了 *ASIP* 的 2 个同源基因(*ASIP1* 和 *ASIP2*), 两者在背部黑色皮肤中的表达量显著高于其在腹部白色皮肤中的表达量, 和瓯江彩鲤背腹体色的形成相关, 通过在序列相似性高的 3 号外显子区

设计单一 CRISPR/Cas9 靶位点敲除 *ASIP1* 和 *ASIP2*, 获得 4 种不同黑色素模式的 F_0 突变体。*Tyr* 是 *ASIP*、*MC1R* 和 *MITF* 基因的下游靶基因, Xu 等^[67] 通过敲除瓯江彩鲤中 2 个 *tyr* 同源基因, 在 F_0 中获得了无黑色素的金黄色突变体。

在鱼类性别控制研究中已鉴定到多个鱼类性别决定和分化相关基因, 其中细胞色素 P450 17A1 (Cytochrome P450 17A1, *cyp17a1*) 是合成 17-羟基孕酮的关键酶, 其功能的缺失使斑马鱼雌性分化受阻, 产生全雄群体。中国科学院水生生物研究所通过敲除鲤 *cyp17a1* 获得了鲤全雄群体, 进一步利用 *cyp17a1*^{-/-} 的 XX 雄鱼与野生型雌鱼交配, 获得了全雌鲤群体, 6 月龄全雌群体的平均体重比对照组高 6.60%, 而 12 月龄全雌群体的平均体重比对照组高 32.66%^[39]。

肌间刺是鲤遗传改良的重要目标。*sp7* 调控成骨细胞的分化, 促进骨形成, 苏州大学采用 CRISPR 技术在鲤中敲除了 *sp7a* 和 *sp7b*, 发现 *sp7* 的敲除导致了严重的骨发育异常^[26]。近年来, 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所利用调控斑马鱼肌间刺发育的关键基因 *bmp6*^[55-58], 建立了鲤基因组编辑技术, 通过 CRISPR 技术敲除鲤 *bmp6* 的 2 个同源基因 *bmp6a* 和 *bmp6b*, 于 2021 年获得了 F_1 突变群体, 突变群体平均肌间刺数量减少 30.6% (专家验收报告, 未发表)。

3.5 团头鲂基因组编辑育种研究进展

华中农业大学通过多组学鉴定到调控肌间刺发生相关候选基因, 采用 CRISPR 技术分析了 *runx2a*、*runx2b*、*scxa*、*scxb*、*bmp6*、*bmp3*、*bmp2a*、等 60 多个基因对斑马鱼肌间刺发生发育的调控作用, 发现其中 3 个基因在斑马鱼肌间刺发生过程中起着调控作用。其中, *scxa* 基因功能缺失导致肌间刺的数目显著减少, 突变体斑马鱼背部肌间刺完全缺失, 仅保留了尾部少数肌间刺, 肌间刺总数较野生型减少 70% 左右, 但 *scxa* 基因突变鱼的肋骨发育不全^[68]。此外, 发现斑马鱼 *bmp6* 基因的缺失导致肌间刺变少, 突变鱼比野生型鱼的肌间刺总数减少约 30%。

继 *scxa* 和 *bmp6* 基因后, 又筛选到斑马鱼 *runx2b* 基因, 通过基因组编辑发现 *runx2b* 突变斑马鱼肌间刺完全缺失^[40], 但突变个体生长和其他骨骼单元形成等性状未受影响, 获得的 *runx2b* 突变斑马鱼品系肌间刺缺失性状可稳定遗传。

2020年建立了团头鲂 CRISPR 基因组编辑技术, 2021年进行了团头鲂 *runx2b* 基因编辑研究, 获得了 F₀ 基因组编辑鱼。团头鲂突变鱼的肌间刺明显减少, 部分个体肌间刺数量减少 30% 以上, 表明 *runx2b* 基因对团头鲂肌间刺形成亦具有重要调控作用。2022年, 选取 F₀ 有突变的雌雄个体交配繁育出了 F₁ 群体。在 F₁ 群体中, 他们获得了没有肌间刺的团头鲂个体。由此培育出基因组编辑的无肌间刺团头鲂新种质^②。

4 鱼类基因组编辑育种中存在的主要问题和 发展建议

4.1 目标基因挖掘不够

目标基因挖掘不够影响了基因组编辑育种研究的进程, 亟待加强重要性状关键基因的鉴定和功能验证。迄今为止, 尽管我国完成了 50 多种养殖鱼类全基因组测序和精细图谱绘制, 发掘了海量基因资源, 但基因组精细图谱及基因注释仍存在不足, 鉴定出的重要性状调控关键基因还很少, 特别是通过基因组编辑验证了基因功能, 可以用于基因组编辑育种的基因更少, 目前主要包括半滑舌鳎 *dmrt1* 和罗非鱼 *amhy* 等性别决定基因, 斑马鱼等鲤科鱼类肌间刺形成关键基因等, 但有关鱼类致病基因、病原微生物易感基因、温度耐受基因等则未见报道, 满足不了基因组编辑育种的需要, 限制了鱼类基因组编辑育种的研究进程。

建议我国今后要加强鱼类基因组精细图谱的绘制、加强鱼类病原微生物易感基因、病毒受体基因、生长抑制基因、温度敏感基因等重要性状负调控关键基因的发掘和功能研究, 寻找适合进行基因组编辑的靶标基因, 为基因组编辑育种提供基因资源。

4.2 显微注射胚胎成活率低

显微注射胚胎成活率低成为海水鱼类基因组编辑育种的瓶颈, 加强非显微注射基因组编辑技术研究成为今后的重要研究方向。

尽管显微注射技术在淡水鱼类上成功建立并在基因组编辑中广泛应用, 但显微注射技术在海水养殖鱼类上的难度比淡水养殖鱼类上大很多, 目前成功建立显微注射技术海水养殖鱼类不多。主要原因是海水养殖鱼类受精卵的膜较难以注射, 受精卵浮在水面上难以固定, 注射后受精卵

容易死亡等。尽管黄海水产研究所突破了半滑舌鳎胚胎显微注射技术难关, 建立了基因组编辑育种技术, 研制出基因组编辑 F₃ 成鱼, 但是显微注射后胚胎成活率很低, 从显微注射的胚胎到成鱼的成活率约为 1/5 000。这严重影响了基因组编辑技术在其他海水鱼类上的应用。因此, 基于非显微注射的高效基因组编辑技术的缺乏成为限制海水养殖鱼类基因组编辑育种发展的重要问题。

建议加快非显微注射的海水鱼类胚胎基因组编辑技术的研究, 探索建立基因组编辑元件的纳米递送和电穿孔等技术, 提高海水鱼类基因组编辑胚胎成活率, 推动基因组编辑育种技术在更多海水鱼类上应用。

4.3 抗病基因组编辑育种技术研究落后

鱼类抗病基因组编辑育种技术研究落后, 满足不了抗病良种培育的需要, 亟待加强基因组编辑技术在鱼类抗病良种培育中的应用研究。

迄今, 基因组编辑技术主要用于快速生长罗非鱼、半滑舌鳎, 无肌间刺鲫和团头鲂, 以及背厚肉多真鲷和红鳍东方鲀的种质创制, 但有关基因组编辑抗病鱼类种质创制目前还未见报道, 主要原因是目前尚未找到合适的靶标基因。例如, 鱼类病毒结合受体基因、细菌结合蛋白基因, 抗病免疫信号通路中的负调控基因等的缺乏限制了基因组编辑技术在鱼类抗病种质创制中的应用。

建议今后加强鱼类病毒-宿主、细菌-宿主相互作用机制的研究, 鉴定病毒和细菌的受体和/或结合蛋白基因, 寻找可以用于基因组编辑抗病育种的靶标基因, 为基因组编辑抗病良种创制提供基因资源和技术手段。

4.4 基因组编辑原创性技术的缺乏

鱼类基因组编辑原创性技术的缺乏影响了我国基因组编辑育种研究进程。目前, 我国鱼类基因组编辑研究中所用的基因组编辑技术和专利基本都是国外原创, 而我国自己研发的原创技术很少, 影响了我国鱼类基因组编辑育种技术的商业化应用, 限制了我国鱼类基因组编辑育种技术的推广和新品种的培育。

建议今后加强鱼类基因组编辑技术的原创性研究, 研发出具有自主知识产权的高效、精准基因组编辑育种技术, 为我国鱼类基因组编辑良种

^② 高泽霞. 团头鲂肌间刺性状遗传选育最新研究进展. 科学养鱼微信公众号 <https://mp.weixin.qq.com/s/xBn6Pc5f1nF70a0bfuQJJg>.

创制和商业化应用提供技术支撑。

4.5 基因组编辑鱼类管理条例的缺乏

基因组编辑鱼类管理条例的缺乏影响了鱼类基因组编辑育种的产业化进程。目前,我国已经制定并颁发了基因组编辑植物管理办法和良种审定办法,但是,有关基因组编辑鱼类等水生生物的管理办法尚未出台,影响了鱼类基因组编辑育种进程和基因组编辑新品种的审定。

建议我国加快基因组编辑水生生物管理办法的编制进程,加快基因组编辑水生生物新品种审定办法的制定和发布,为基因组编辑鱼类育种提供法规指导,为基因组编辑鱼类新品种审定提供操作指南和审定标准。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Porteus M H, Carroll D. Gene targeting using zinc finger nucleases[J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(8): 967-973.
- [2] Boch J, Scholze H, Schornack S, *et al.* Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors[J]. *Science*, 2009, 326(5959): 1509-1512.
- [3] Cong L, Ran F A, Cox D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [4] Kim Y G, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to *Fok I* cleavage domain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(3): 1156-1160.
- [5] Durai S, Mani M, Kandavelou K, *et al.* Zinc finger nucleases: Custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(18): 5978-5990.
- [6] Mali P, Yang L, Esvelt K M, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [7] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [8] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. *Science*, 2010, 327(5962): 167-170.
- [9] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [10] Chen S L, Zhang G J, Shao C W, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic life-style[J]. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253-260.
- [11] 陈松林, 徐文腾, 刘洋. 鱼类基因组研究十年回顾与展望[J]. *水产学报*, 2019, 43(1): 1-14.
- [12] Chen S L, Xu W T, Liu Y. Fish genomic research: Decade review and prospect[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(1): 1-14 (in Chinese).
- [13] Doyon Y, McCammon J M, Miller J C, *et al.* Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(6): 702-708.
- [14] Huang P, Xiao A, Zhou M G, *et al.* Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(8): 699-700.
- [15] Ansai S, Sakuma T, Yamamoto T, *et al.* Efficient targeted mutagenesis in medaka using custom-designed transcription activator-like effector nucleases[J]. *Genetics*, 2013, 193(3): 739-749.
- [16] Hwang W Y, Fu Y F, Reyon D, *et al.* Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 227-229.
- [17] Zu Y, Tong X J, Wang Z X, *et al.* TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(4): 329-331.
- [18] Ansai S, Kinoshita M. Targeted mutagenesis using CRISPR/Cas system in medaka[J]. *Biology Open*, 2014, 3(5): 362-371.
- [19] Zhang X, Guan G J, Chen J B, *et al.* Parameters and efficiency of direct gene disruption by zinc finger nucleases in medaka embryos[J]. *Marine Biotechnology*, 2014, 16(2): 125-134.
- [20] Ablain J, Durand E M, Yang S, *et al.* A CRISPR/Cas9 vector system for tissue-specific gene disruption in zebrafish[J]. *Developmental Cell*, 2015, 32(6): 756-764.
- [21] Shah A N, Davey C F, Whitebirch A C, *et al.* Rapid reverse genetic screening using CRISPR in zebrafish[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(6): 535-540.
- [22] Yang Z T, Yu Y P, Tay Y X, *et al.* Genome editing and its applications in genetic improvement in aquaculture[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2022, 14(1): 178-191.

- [22] 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(12): 4814-4825.
- [23] Li M H, Yang H H, Zhao J E, *et al.* Efficient and heritable gene targeting in tilapia by CRISPR/Cas9[J]. *Genetics*, 2014, 197(2): 591-599.
- [24] Li M H, Sun Y L, Zhao J E, *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 Genetics*, 2015, 11(11): e1005678.
- [25] Dong Z J, Ge J C, Xu Z Q, *et al.* Generation of *Myostatin b* knockout yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco*) using transcription activator-like effector nucleases[J]. *Zebrafish*, 2014, 11(3): 265-274.
- [26] 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]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 22953.
- [27] Feng K, Luo H R, Li Y M, *et al.* High efficient gene targeting in rice field eel *Monopterus albus* by transcription activator-like effector nucleases[J]. *Science Bulletin*, 2017, 62(3): 162-164.
- [28] Chen J, Wang W, Tian Z H, *et al.* Efficient gene transfer and gene editing in sterlet (*Acipenser ruthenus*)[J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 117.
- [29] Huang J F, Shi C, Gao Y P, *et al.* Heterozygous depletion of *pik3r1* improves growth and feed conversion efficiency in Gibel carp (*Carassius gibelio*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 545: 737207.
- [30] Li M H, Feng R J, Ma H, *et al.* Retinoic acid triggers meiosis initiation via *stra8*-dependent pathway in Southern catfish, *Silurus meridionalis*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 232: 191-198.
- [31] Zheng S Q, Tao W J, Yang H W, *et al.* Identification of sex chromosome and sex-determining gene of southern catfish (*Silurus meridionalis*) based on XX, XY and YY genome sequencing[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2022, 289(1971): 20212645.
- [32] 陈松林. 鱼类基因组学及基因组育种技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2017.
- Chen S L. Fish Genomics and Genome Breeding Technologies[M]. Beijing: Science Press, 2017 (in Chinese).
- [33] Cui Z K, Liu Y, Wang W W, *et al.* Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 42213.
- [34] Wang L, Tan X G, Wu Z H, *et al.* Targeted mutagenesis in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) using the CRISPR/Cas9 system with electroporation[J]. *Biologia*, 2021, 76(4): 1297-1304.
- [35] Yan M Z, Li B J, Wang J Y, *et al.* Disruption of *mstn* Gene by CRISPR/Cas9 in Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2022, 24(4): 681-689.
- [36] Li M H, Wang D S. Gene editing nuclease and its application in tilapia[J]. *Science Bulletin*, 2017, 62(3): 165-173.
- [37] 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: 中国, CN201610162019.5[P]. 2017-07-14.
- Chen S L, Cui Z K, Zheng H Q, *et al.* A genome editing based method and its application for germplasm construction of marine flounder: China, CN201610162019.5[P]. 2017-07-14 (in Chinese).
- [38] 匡友谊, 郑先虎, 佟广香, 等. 一种无肌间刺鲫鱼品系培育方法: 中国, CN202110478410.7[P]. 2021-07-23.
- Kuang Y Y, Zheng X H, Dong G X, *et al.* A breeding method of crucian carp without intramuscular spines: China, CN202110478410.7[P]. 2021-07-23 (in Chinese).
- [39] Zhai G, Shu T T, Chen K X, *et al.* Successful production of an all-female common carp (*Cyprinus carpio* L.) population using *cyp17a1*-deficient neomale carp[J]. *Engineering*, 2022, 8: 181-189.
- [40] Nie C H, Wan S M, Chen Y L, *et al.* Single-cell transcriptomes and *runx2b*^{-/-} mutants reveal the genetic signatures of intermuscular bone formation in zebrafish[J]. *National Science Review*, 2022, 9(11): nwac152.
- [41] Zhou L Y, Li M H, Wang D S. Role of sex steroids in fish sex determination and differentiation as revealed by gene editing[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2021, 313: 113893.
- [42] Liu X Y, Dai S F, Wu J H, *et al.* Roles of Anti-Müllerian hormone and its duplicates in sex determination and germ cell proliferation of Nile tilapia[J]. *Genetics*, 2022, 220(3): iyab237.
- [43] Li M H, Dai S F, Liu X Y, *et al.* A detailed procedure for CRISPR/Cas9-mediated gene editing in Tilapia[J]. *Hydrobiologia*, 2021, 848(16): 3865-3881.
- [44] Jiang D N, Yang H H, Li M H, *et al.* *gsdf* is a down-

- stream gene of *dmrt1* that functions in the male sex determination pathway of the Nile tilapia[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2016, 83(6): 497-508.
- [45] Zhang X B, Li M R, Ma H, *et al.* Mutation of *foxl2* or *cyp19a1a* results in female to male sex reversal in XX Nile tilapia[J]. *Endocrinology*, 2017, 158(8): 2634-2647.
- [46] Dai S F, Qi S S, Wei X Y, *et al.* Germline sexual fate is determined by the antagonistic action of *dmrt1* and *foxl3/foxl2* in tilapia[J]. *Development*, 2021, 148(8): dev199380.
- [47] Yang L Y, Zhang X F, Liu S J, *et al.* Cyp17a1 is required for female sex determination and male fertility by regulating sex steroid biosynthesis in fish[J]. *Endocrinology*, 2021, 162(12): bqab205.
- [48] Wang C X, Xu J, Kocher T D, *et al.* CRISPR knockouts of *pmela* and *pmelb* engineered a golden tilapia by regulating relative pigment cell abundance[J]. *Journal of Heredity*, 2022, 113(4): 398-413.
- [49] Wang C X, Kocher T D, Lu B Y, *et al.* Knockout of hermansky-pudlak syndrome 4 (*hps4*) leads to silver-white tilapia lacking melanosomes[J]. *Aquaculture*, 2022, 559: 738420.
- [50] Lu B Y, Wang C X, Liang G Y, *et al.* Generation of ornamental Nile tilapia with distinct gray and black body color pattern by *csflra* mutation[J]. *Aquaculture Reports*, 2022, 23: 101077.
- [51] Lu B Y, Liang G Y, Xu M M, *et al.* Production of all male amelanotic red tilapia by combining MAS-GMT and *tyrb* mutation[J]. *Aquaculture*, 2022, 546: 737327.
- [52] Wu Y, Wu T F, Yang L Y, *et al.* Generation of fast growth Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by myostatin gene mutation[J]. *Aquaculture*, 2023, 562: 738762.
- [53] Gan R H, Wang Y, Li Z, *et al.* Functional divergence of multiple duplicated *Foxl2* homeologs and alleles in a recurrent polyploid fish[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(5): 1995-2013.
- [54] Wang M T, Li Z, Ding M, *et al.* Two duplicated *gsdf* homeologs cooperatively regulate male differentiation by inhibiting *cyp19a1a* transcription in a hexaploid fish[J]. *PLoS Genetics*, 2022, 18(6): e1010288.
- [55] Xu H, Tong G X, Yan T, *et al.* Transcriptomic analysis provides insights to reveal the *bmp6* function related to the development of intermuscular bones in zebrafish[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10: 821471.
- [56] 杨建, 佟广香, 郑先虎, 等. 肌间刺缺失突变对斑马鱼胚胎发育过程中肌肉发育的影响 [J]. *中国水产科学*, 2019, 26(2): 296-303.
- Yang J, Tong G X, Zheng X H, *et al.* Comparative analysis of embryonic muscle development in wildtype zebrafish and its intermuscular bone deficiency mutant. *Journal of Fishery Sciences of China*[J], 2019, 26(2): 296-303 (in Chinese).
- [57] 杨建, 佟广香, 郑先虎, 等. 肌间刺缺失对斑马鱼骨骼发育的影响[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(3): 546-553.
- Yang J, Tong G X, Zheng X H, *et al.* Comparative analysis of skeletal development between wildtype zebrafish and intermuscular bone-deficient mutants[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(3): 546-553 (in Chinese).
- [58] 匡友谊, 佟广香, 郑先虎, 等. 发育正常无肌间刺鱼类新品种培育方法: 中国, CN202011352379.4[P]. 2021-05-11.
- Kuang Y Y, Dong G X, Zheng X H, *et al.* Cultivation method of normal developing without inter-muscular bones fish variety: China, CN202011352379.4[P]. 2021-05-11 (in Chinese).
- [59] 杨阳. 解开水产生物生长品质性状的基因谜题[J]. *中国农村科技*, 2021(8): 12-15.
- Yang Y. The mystery of aquatic growth quality[J]. *China's Rural Science and Technology*, 2021(8): 12-15 (in Chinese).
- [60] Baxter L L, Watkins - Chow D E, Pavan W J, *et al.* A curated gene list for expanding the horizons of pigmentation biology[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2019, 32(3): 348-358.
- [61] Zhu W B, Wang L M, Dong Z J, *et al.* Comparative transcriptome analysis identifies candidate genes related to skin color differentiation in red tilapia[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31347.
- [62] Bar I, Kaddar E, Velan A, *et al.* *Melanocortin receptor 1* and black pigmentation in the Japanese ornamental carp (*Cyprinus carpio* var. Koi)[J]. *Frontiers in Genetics*, 2013, 4: 6.
- [63] Gross J B, Borowsky R, Tabin C J. A novel role for *Mclr* in the parallel evolution of depigmentation in independent populations of the cavefish *Astyanax mexicanus*[J]. *PLoS Genetics*, 2009, 5(1): e1000326.
- [64] Mandal B K, Chen H L, Si Z X, *et al.* Shrunken and scattered black spots turn out due to *MC1R* knockout in a white-black Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. *color*)[J]. *Aquaculture*, 2020, 518: 734822.
- [65] Ceinos R M, Guillot R, Kelsh R N, *et al.* Pigment pat-

- terns in adult fish result from superimposition of two largely independent pigmentation mechanisms[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2015, 28(2): 196-209.
- [66] Chen H L, Wang J, Du J X, *et al.* *ASIP* disruption via CRISPR/Cas9 system induces black patches dispersion in Oujiang color common carp[J]. *Aquaculture*, 2019, 498: 230-235.
- [67] Xu X D, Chen H L, Mandal B K, *et al.* Duplicated *Tyr* disruption using CRISPR/Cas9 reveals melanophore formation in Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. *color*)[J]. *Reproduction and Breeding*, 2022, 2(2): 37-45.
- [68] Nie C H, Wan S M, Chen Y L, *et al.* Loss of scleraxis leads to distinct reduction of mineralized intermuscular bone in zebrafish[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2021, 6(2): 169-177.

Fish genome editing breeding in china: status, problems and prospects

CHEN Songlin^{1,2*}, WANG Deshou³, KUANG Youyi⁴, CUI Zhongkai^{1,2}, LI Minghui³

- (1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;
2. Key Lab of marine fisheries biotechnology and genetic breeding of Shandong Province, Qingdao 266071, China;
3. College of Life Science, Westsouthern University, Chongqing 400715, China;
4. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: Genome editing breeding is a powerful technique in aquaculture organisms. China has made a big progress in genome editing researches and breeding in fish during last 10 years. The present paper is the first systematic review of the status, problems and prospect of fish genome editing breeding in China. Firstly, the authors gave a brief introduction to advantages and disadvantages of three genome editing technologies including Zinc Finger Nucleases(ZFN), Transcription Activator-Like Effector Nucleases(TALEN)and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats CRISPR-Associated(CRISPR/Cas9). Secondly, the definition and workflow of genome editing breeding in fish was proposed. Thirdly, the authors gave a detail introduction to the progress in genome editing breeding in fish in China. In brief, Chinese scientists have carried out genome editing in several important cultured fish such as tilapia, carp, crucian carp, half-smooth tongue sole, southern catfish et al. Especially, a variety of tilapia with sex-reversed female and with different color were generated by means of TALEN and CRISPR/Cas9 method. Also, *dmrt1*-mutated F₃ males with fast growth speed similar to females were generated by TALEN method in Chinese tongue sole. Crucian carp and blunt snout bream with less or no inter muscular bones were obtained. These genome edited fish can mature and spawn. The progress has brought China's fish genome editing breeding from following-up in the past to the present coexistence of following, running side-by-side, and even leading in some fish species. Finally, the authors summarized the current shortcomings and problems in fish genome editing breeding and prospected the future development direction of genome editing breeding in China, and proposed research focuses in fish genome editing breeding. The paper will have important role and significance for fish genome editing breeding in China.

Key words: fish; genome editing breeding; status; problems; prospect

Corresponding author: CHEN Songlin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31730099); CARS for Marine Fish Culture Industry (CARS-47-G03); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD20); Taishan Scholar Climbing Project Fund of Shandong, China