

2B-RAD测序技术在水产动物中的研究进展

贾彬茜, 马菁菁, 孙金辉, 崔培, 杨燕菁*

天津农学院水产学院, 天津

收稿日期: 2022年9月26日; 录用日期: 2022年10月16日; 发布日期: 2022年10月31日

摘要

后基因组时代背景下测序技术的不断提升推动了水产中模式生物和非模式生物基因组的研究, 其中基于IIB型限制性内切酶进行大规模SNP标记开发及分型的2B-RAD测序技术广泛应用在水产动物的群体进化和遗传结构功能分析。本文综述了2B-RAD测序技术发展历程及其在水产动物种群遗传学分析、进化分析、重要性状关联等研究领域的应用, 以期水产动物分子辅助育种及种质资源保护的研究工作提供参考依据。

关键词

2B-RAD, SNP, 水产动物, 遗传多样性, 性别

The Research Progress of 2B-RAD Sequencing Technology in Aquatic Animals

Chengqian Jia, Jingjing Ma, Jinhui Sun, Pei Cui, Yanjing Yang*

College of Aquatic, Tianjin Agricultural University, Tianjin

Received: Sep. 26th, 2022; accepted: Oct. 16th, 2022; published: Oct. 31st, 2022

Abstract

In post-genomic era, a constant improvement in sequencing technology enhanced the study on genome in aquatic model and non-model organisms. 2B-RAD, a sequencing technology for developing large-scale molecular markers and genotyping based on type IIB restriction enzymes, is widely used in the population evolution and genetic structure function analysis of aquatic animals. This paper summarizes the basic work principle and application of 2B-RAD in the research fields of aquatic population genetic analysis, evolutionary analysis, importance traits and so on to pro-

*通讯作者。

vide a referential basis for the research of molecular marker-assisted breeding and germplasm conservation.

Keywords

2B-RAD, SNP, Aquatic Animals, Genetic Diversity, Gender

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

随着水产品 in 膳食结构中比重的增加,水产养殖业在全球粮食和营养安全中的作用与日俱增[1]。近年来,我国水产养殖产业总产值稳定增长的同时也面临着种质资源退化、生物多样性迅速下降、疾病感染率不断攀升等问题,通过对生产等优良性状进行遗传改良的选择育种技术是推进水产养殖业绿色发展和促进产业转型升级的关键,而基因组工具可在有限的资源下加速和优化选择育种的进程[2]。

测序技术是基因组研究的主要制约点,基于测序技术进行基因分型可广泛应用于分子辅助育种及性状关联解析,其中 2B-RAD 技术是对等长的标签进行测序分型的 RAD 技术,具有准确率高、建库快捷简便和成本易控等优点,尤其适用于遗传背景不清晰的非模式水生生物的分子标记开发[3]。本文综述了 2B-RAD 测序技术发展历程、技术原理及其在水产动物种群遗传学分析、进化分析、重要性状关联分析等研究领域的应用,以期期为水产动物分子辅助育种及种质资源保护的研究工作提供参考依据。

2. 2B-RAD 测序技术的发展及原理

近四十多年来,测序技术经历了飞速发展的一、二、三代技术革新(见图 1)。1977 年 Sanger 和 Coulson 的双脱氧链终止法以及 Maxam 和 Gilbert 的化学降解法的问世打开了基因组测序大门,并真正踏入了基因组学时代。一代测序具有准确性高(~0.1%ER)、读长较长(约 1 kb)等优势,但其通量低、价格昂贵阻碍了一代测序的大规模应用[4] [5]。测序技术经过不断地改进革新,二代测序 Roche 454 焦磷酸测序、Illumina Solexa 合成测序、ABI SOLiD 连接法测序等技术的诞生推动组学研究进入了高通量测序时代,在大规模平行测序的同时提高了灵敏度、降低了测序成本,是当前市面上主流的测序技术[6]。三代测序以单分子测序为主要特点,DNA 分子测序过程中免除了 PCR 扩增,以单分子荧光测序和纳米孔测序技术为主,在二代测序的基础上大大增加了测序长度(约 10 kb [7]),自此测序技术进入了新的里程碑。2007 年 Miller 等提出了简化基因组测序(Reduced-Representation Genome Sequencing, RRGs),是在二代测序的基础上对酶切片段进行生物信息学分析进而实现基因高通量分型的一种技术。此技术可以降低物种基因组复杂度,实施过程简便,不过分依赖参考基因组,在基因组学和进化学中被大量应用。常见的 RRGs 有低覆盖度分形测序(GBS 和 MSG [8])、简化代表库测序(RRLs [9])以及 CROPS [10]和限制性酶切位点关联 DNA 测序(RAD-seq [11])等,其中 RAD-seq 技术发展迅速并衍生出 mbRAD、2B-RAD、ezRAD、ddRAD、nextRAD 等。

2B-RAD 测序技术于 2012 年由 Wang [12]提出并被广泛应用于水产动物基因组测序。2b-RAD 测序技术特别之处在于选用 IIB 型限制性内切酶,如 BsaXI、Alf 和 Bae ,I 能够迅速识别 DNA 双链的 6 个特异性碱基对,对靠近识别位点的上、下游基因组 DNA 序列进行酶切,其切割位点位于识别位点的左右两

侧。酶切后可产生3'端带有3个碱基突变的等长标签，随后通过黏性末端的匹配使标签和接头连接，经PCR扩增富集后进行高通量测序，通过生物信息学分析实现全基因组范围高通量SNP筛查和分型分析(见图2) [12]。相较于传统测序，2B-RAD技术具有样品要求低、标签分布均匀、测序深度均一、标签密度灵活可控和分型准确性高等优势，主要表现在：1) 测序样本的DNA起始含量可低至1 ng，即使降解的DNA模板仍可成功建库测序；2) 酶切位点为全基因组覆盖，标签除着丝粒位置外呈均匀性分布；3) 其酶切片段均保持在等长的32~36 bp间，扩增效率和测序深度较一致；4) 可通过内切酶和选择性接头控制标签密度及测序深度；5) 无参物种的基因分型算法基于混合泊松分布模型的全基因组de novo SNP分型新算法(iML)，准确率较国际主流算法提高了20%。目前，2B-RAD广泛应用于遗传图谱构建、群体分析和全基因组关联分析等研究方向。

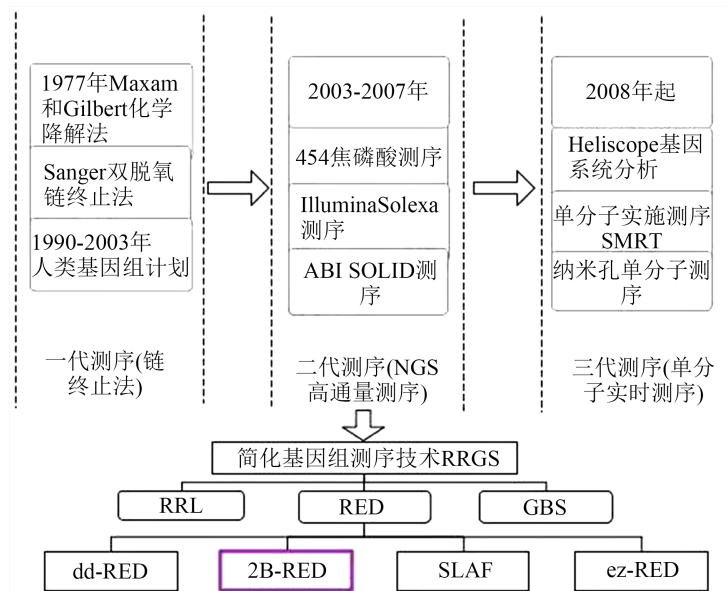


Figure 1. Evolution of sequencing technology
图 1. 测序技术演变历程

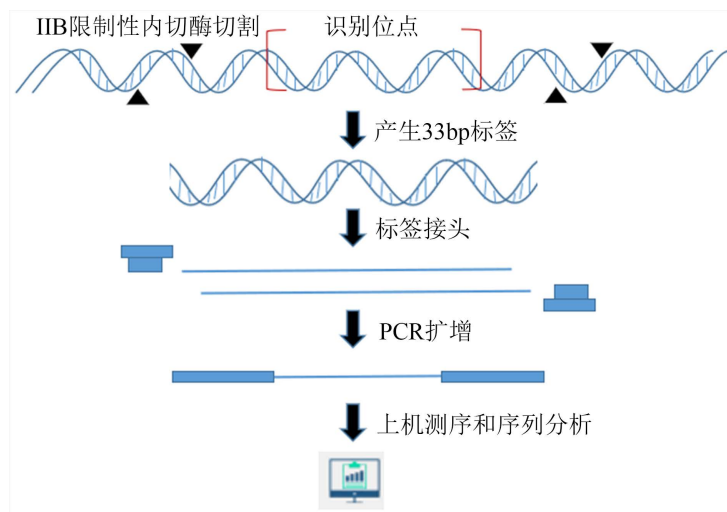


Figure 2. 2B-RAD technology flow chart
图 2. 2B-RAD 技术流程图

3. 2B-RAD 技术在水产动物研究中的应用

3.1. 2B-RAD 技术在水产动物遗传图谱构建及 QTL 基因定位中的应用

遗传图谱的构建和数量性状定位(QTL)是分子标记辅助选育(MAS)和遗传改良的重要手段,其根据 DNA 片段多态性在群体中的分离情况将基因和分子标记在染色体上线性排列或定位。随着高通量测序的发展 2B-RAD 技术实现了 QTL 快速大批量精准定位,是否有参照基因组已不再是阻碍水产动物测序的门槛。

据不完全统计,目前已有乌鲫、鳢、克氏原螯虾、中国对虾、栉孔扇贝、刺参、鲫鱼和花鲈等使用 2B-RAD 技术构建高密度遗传图谱。Liu 等[13]通过 2B-RAD 技术获得了共计 8487 个 SNP 标记、基因组覆盖率达 98.8%的鲫(*Carassius auratus*)高密度遗传连锁图谱,在 5 个连锁群上检测到与 2 个月体重相关的 QTL 8 个,并在 QTL 区间内鉴定了候选的生长相关基因;刘等[14]通过 2B-RAD 技术绘制了包含 3151 个 SNP、平均标记间隔为 0.87 cM 的乌鳢(*Channa argus*)高密度遗传连锁图谱,发现了 14 个与体重和体长相关的 QTL,并发现了一个潜在的候选生长相关基因 SATB homeobox 2 (*satb2*)和一个性别鉴定的主位点;Guo 等[15]利用 2B-RAD 测序技术构建了克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)全同胞家族的连锁图谱,共计 4878 个 SNP 标记分属于 94 个连锁群,其中在 9 个连锁群中发现了 28 个与生长相关的 QTL,一个潜在的性别决定位点位于 LG20;Meng 等[16]通过 2B-RAD 技术绘制了中国对虾(*Penaeus chinensis*)的第一张高分辨率遗传图谱,图谱总长度 5257.81 cM,共含 12884 个标记,平均标记间隔为 0.41 cM,对体型、性别和抗病等 29 个性状进行了 QTL 定位和关联分析获得了 87 个显著 QTL;Jiao 等[17]利用 2B-RAD 技术构建的栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)遗传图谱的分辨率可达 0.41 cM,其中共鉴定到 7458 个多态性标记、2196 个共显性标记和 4646 个显性标记,几乎覆盖了 99.5%的全基因组,QTL 映射和关联分析揭示了 2 个生长相关 QTL 和 1 个潜在的性别决定区;田等[18]利用 2B-RAD 方法构建了共含 7839 个标记的刺参(*Apostichopus japonicus*)高密度遗传图谱,其基因组覆盖率为 99.57%,在此基础上捕获了一个与生长相关的 QTL 并在此区域识别出了细胞增殖的重要调控因子视网膜母细胞瘤结合蛋白 5 (*retinoblastoma-binding protein 5, RbBP5*);Liu 等[19]对含 333 个 F1 代个体的全同胞家族的花鲈(*Lateolabrax maculatus*)进行了 2B-RAD 测序和分析,构建了第一个花鲈高密度遗传连锁图谱,共含 6883 个 SNP,平均标记间隔为 0.33 cM,分别检测到 13 个和 11 个与体重和体长相关的 QTL,并识别到了相应的候选基因。综上,现今通过 2B-RAD 测序绘制遗传图谱和进行 QTL 基因定位的水产动物主要集中在我国仍处于遗传改良初级阶段的淡水养殖经济品种,2B-RAD 技术的出现打破了无参物种遗传图谱的壁垒,为进一步解析水产动物复杂的遗传机制奠定了基础。

3.2. 2B-RAD 技术在水产动物种群遗传和进化分析中的应用

中小尺度的水产动物通常具有群体数量大、遗传背景复杂和高频基因流等特点,其在种群遗传分析和进化研究中具有一定的挑战和争议性。高灵敏度、低成本和不依赖参考基因组等特点使 2B-RAD 技术在获取水生动物大量变异信息方面具有显著优势,其在获得成百上千分子 markers 的同时能够研究不受平衡群体限制的种群遗传结构、多样性和物种形成机制等问题。

在种质资源遗传多样性研究中,Pecoraro 等[20]对大西洋、印度和太平洋的黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)进行遗传结构评估,首次证明了 2b-RAD 基因分型技术在高基因流物种群体遗传多样性和分化研究中的有效性;季等[21]对我国贵州省水田养殖的金背鲤(*Cyprinus carpio var. Jinbei*)进行 2B-RAD 测序发现 5 个群体的遗传多样性指标均呈低多样性,为今后金背鲤的保护和养殖提供可靠的基础数据;王等[22]采用 2B-RAD 技术对浙江省三门湾海域的白姑鱼(*Pennahia argentata*)、中华栉孔虾虎鱼(*Ctenotrypauchen*)

chinensis)以及龙头鱼(*Harpadon nehereus*)3种优势鱼种的种质资源进行了评估,发现遗传总体上呈低多样性,需进一步加强种质保护和恢复;Vera等[23]利用2b-RAD基因分型技术对欧洲大西洋东北海岸的食用贝(*Cerastoderma edule*)进行了环境变量下的遗传结构分析,分别发现了与海洋温度和盐度呈相关性的742个和36个与分歧和平衡选择相关的snp位点,为食用贝类的管理、保护策略和繁育河床的建立提供了参考。在基因流的系统地理学研究中,Blanco等[24]在比较北大西洋浮游动物桡足类(*Centropages*)的种群结构差异时,证实强基因流下浮游动物连通性采用2B-RAD技术进行分析更具优势;Galaska等[25][26]通过2B-RAD技术对南极海蛇尾(*Ophionotus Victoria*)进行分析发现在罗斯海到威德尔海东部的区域划分为地理上不同的居群,对传统上认为的强洋流的扩散造成“大量开放种群”的想法提出了质疑,而在对南极峰(APF)两侧*Astrotoma agassizii* Lyman的研究发现其同时存在基因交流和分化的证据,指出南极峰是一个强大但不完全的屏障;Vera等[5]在法国布列塔尼北部和南部确定了两个主要的食用贝(*Cerastoderma edule*)遗传群体,并发现其幼体扩散障碍与威桑岛海岸线有关。在系统发生与进化研究中,Dahms等[27]通过2B-RAD技术对15个亚得里亚海棘鱼(*Gasterosteus aculeatus*)种群和19个太平洋、大西洋和里海种群进行了遗传分化和平行性研究,结果发现亚得里亚海种群分化程度高、遗传多样性和连通性都较低,指出其可能与地中海的棘鱼灭绝后亚得里亚海种群持续遗传变异有关;崔[28]使用2B-RAD技术对中国、澳大利亚和日本的黄条鲮(*yellowtail kingfish*)进行群体遗传结构、主成分(PCA)和系统进化分析,发现中国与日本的群体聚为一支且存在较高的基因交流,而澳大利亚的群体与其它两个群体亲缘关系较远。

综上,2B-RAD技术在群体进化和遗传分析中的应用主要是对同一地理分布的同一物种的不同个体、同一地理分布的不同亚种或品系、不同地理的分布群体等研究对象的遗传差异进行比较分析,从而在分子层面上阐释相关遗传进化机制。

3.3. 2B-RAD 技术在水产动物全基因组关联重要性状中的应用

通过分子标记从基因组水平上关联重要性状是选择育种的一种新策略。2B-RAD 测序技术获得的海量单核苷酸多态性(SNP)可以覆盖全基因组范围,通过全基因组关联分析(GWAS)可发现与复杂性状相关联的位点,从而进一步鉴定相关性状的主效基因。目前2B-RAD技术已广泛应用于水产动物的性别二态性、生长、抗病等领域。

3.3.1. 性别鉴定

水产动物的性别具有高度的可塑性和复杂性,2B-RAD 技术可对无参和有参的雌雄群体进行性别特异分子标记筛选。

通过对雌雄各10尾以上的样本进行2B-RAD测序可直接筛选性别特异的tags和SNPs。2B-RAD测序所筛选到的Tags通常为32~36bp大小的片段,Wei等[29]应用2b-RAD方法在海参(*Apostichopus japonicus*)中鉴定了两个雄性特异的tags,两个tags之间相隔313bp的雄性特异性片段可映射至雄性基因组scaffold MRZV01000576.1上;Liu等[30]基于2B-RAD和基因组重测序技术在鳙鱼(*Hypophthalmichthys nobilis*)中筛选验证得到一个雄性特异性tag并通过染色体步移得到8661bp的雄性特异片段,根据雄性特异性片段设计的三个性别特异性引物不仅可准确鉴定出鳙鱼(*Hypophthalmichthys nobilis*)F1代和后代的性别,而且同样适用于鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)的性别鉴定;Wang等[19]通过2B-RAD技术在兰州鲌(*Silurus lanzhouensis*)中发现41个雄性特异的候选tags,且所有雄性特异的tags都匹配到了该雄性参考基因组的一个支架上;此外,在乌苏里拟鲿(*Pseudobagrus ussuriensis*) [31]、光棘球海胆(*Mesocentrotus nudus*)和大刺鳅(*Mastacembelus armatus*)中利用2B-RAD测序所筛选出的Tags亦得到了验证。在性别特异SNP位点的筛选中,Shi等[32]通过2B-RAD技术在拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)中获得了20个性别特异的SNPs位点,其中10个SNPs同位于一个285bp片段上且呈现出雌性杂合、雄性纯合的状态,此外分别有9个

和 4 个 SNPs 在紫螯青蟹(*Scylla tranquebarica*)和锯缘青蟹(*Scylla serrata*)中的性别特异性也得到了验证; Zhou 等[33]在丝尾鳢(*Mystus wyckioide*)发现了一个雄性异配型 SNP 位点并在野生种群和育种种群的基因组中通过基因组调研分析和 PCR 扩增进行了验证; Han [34]在虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedium*)中发现了一个位于雄性特异表达基因 *spata4* 上的 SNP, 对 *spata4* 进行 RNA 干扰会导致雄性精巢分化相关的基因下调。Guo 等[15]对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)进行 QTL 分析发现有 31 个 SNPs 定位于与性别相关的 LG20 上, 其中 28 个 SNPs 呈雌性杂合子状态。

基于 2B-RAD 筛选出性别特异 tags 和 SNPs, 可结合碱裂解法提基因组和 PCR 扩增等技术建立快速、低成本且可靠的性别鉴定方法。性别特异分子标记的筛选为定向性控育种奠定了基础, 尤其为具有性别二态性的养殖水产品打开了提高经济效益的新思路。

3.3.2. 生长性状

生长是水产养殖业最重要的经济性状之一, 全基因组关联研究(GWAS)使与重要性状相关联的 SNPs 和基因得以识别, 而 2B-RAD 技术为产生 GWAS 所需全基因组 SNP 数据提供了一种简化且成本较低的测序方法。

体重、体长、体高、体宽通常作为 2B-RAD 技术基因分型的生长性能指标。在淡水养殖品种中, 全基因组关联研究主要聚焦于大宗淡水鱼, Huang 等[35]在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) 中鉴定了 7 个与体重相关的 QTLs、9 个与体长相关的 QTL 和 5 个与体高相关的 QTLs; Fu 等[36]在鳙(*Hypophthalmichthys nobilis*)中鉴定了与生长相关性状的 1 个全基因组显著 QTL 和 37 个潜在 QTLs; Su 等[37]在黄河鲤(*Cyprinus carpio Linnaeus*)中发现了 18 个与生长参数相关的 QTLs, 并指出 3 月龄的体长和 3、8 月龄的体重受多基因效应控制, 而 8 月龄的身体尺寸则受主效应因子上的一些位点影响, IGF2 基因作为唯一的重叠的 QTL 在控制体长、体高和体宽方面具有显著作用, 此外, 在黄河鲤衍生品种新隆鲤(*Cyprinus carpio Linnaeus*)中发现了在不同生长阶段没有重叠的 39 个生长相关的 SNPs, 这些 SNPs 相关的基因分别属于免疫反应、应激反应、神经发生、胆固醇代谢和发育以及细胞增殖和分化相关的功能类别, 亦揭示了驱动新龙鲤早期生长和后期生长的机制不同[38]; Liu 等[39]在 2 月龄鲫 (*Carassius auratus*) 中发现了 8 个与体重相关的 QTLs, 并鉴定出了 EGF-like、TGF- β 等潜在的生长相关的候选因子。在广盐性的养殖品种中, Wang [21] 在南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)中发现了位于 LvSRC 中数个错义突变与体重密切相关; Liu 等[19]在花鲈(*Lateolabrax maculatus*)中鉴定了 13 个体重相关的 QTLs 和 11 个体长相关的 QTLs, 并于 QTLs 中鉴定到了与肌肉形成和骨骼生长相关的 *fgfr4* 基因。在海产品中, Tian 等[18]对刺参(*Apostichopus japonicus*)进行 QTL 定位和关联分析时捕获到一个与生长相关的位于 LG 5 区域的 QTL, 并在此区域鉴定到了一个重要的细胞增殖调节因子 *RbBP5*; Jiao 等[17]在栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)中发现了两个与生长相关的 QTLs, 并从 LG3 上的 QTL 区域中鉴定到一个与脊椎动物生长激素的产生密切相关的基因 *PROP1*; Chen 等[40]在海蜇(*Rhopilema esculentum*)中发现了 27 个与伞径和体重等性状相关的候选基因, 且定位在 LG 14 和 LG 15 的 QTL 区域中, 其中 RE13670 基因可能在控制海蜇生长中起重要作用。

3.3.3. 抗病性状

病害直接威胁着水产动物的健康及生产, 通过人工选择增强宿主对感染性病原体抵抗力(宿主避免被感染或患病的能力)和耐力(被感染的宿主在感染后生存的能力)的遗传疾病控制策略逐渐兴起, 面对复杂的宿主防御机制, 2B-RAD 测序技术为 SNP 与抗病性的关联分析提供了一种可行性高的研究模式。

在寄生虫感染方面, Aslam 等[41]通过 2B-RAD 研究金头鲷(*Sparus aurata*)鳃寄生的单殖吸虫(*Sparicotyle chrysophrii*)病时发现, 宿主的生产性状, 如体重和特定生长率与寄生虫数量之间具有良好的遗传相关性, 宿主对鳃单殖吸虫(*Sparicotyle chrysophrii*)抗性的遗传力虽低但显著, 其 17 号连锁群(LG)具有一个抗性相关

联的 SNP 位点; Saura 等[42]基于 2B-RAD 技术分析大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)对盾纤虫病(*Philasterides dicentrarchi*)的抵抗力和耐受力,发现这两个性状均存在遗传多样性,其中抗性和耐受性的遗传率分别为 0.26 和 0.12,而复合性状抗逆性的遗传率为 0.15,并在 LG19 上发现了一个含免疫反应和防御机制相关基因的抗逆性候选 QTL 区域。在细菌性疾病方面,Aslam 等[43]对进行发光杆菌(*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) (*Phdp*)攻毒感染的 177 个金头鲷(*Sparus aurata*)全同胞家族进行 2B-RAD 基因分型,发现 *Phdp* 抗性具有中等遗传力,并发现了一个包含 11 个 SNPs 的 QTLs 位于 LG17 上。可见,结合 2b-RAD 基因分型技术和攻毒感染实验可有效捕获抗病相关的遗传变异,其预测精度明显高于使用谱系信息获得的准确性。

4. 小结

本文从遗传图谱构建、QTL 定位、种群遗传和进化分析以及全基因组关联重要性状等方面论述了当前水产动物基于 2b-RAD 测序技术的研究进展。与传统测序技术相比 2B-RAD 测序技术秉持“小而精”优势开发出更合理高效的数据集,易于进行基因组全覆盖功能分析,减缓了传统测序的冗余性,实现多物种基因分型和基因解密。2B-RAD 测序技术的应用可缓解种质资源退化、提高物种多样性、增加育种遗传优势,对推进水产养殖业绿色发展和稳定增长提供有力帮助。

随着基因组研究重心由揭示结构转向全基因组功能研究,测序技术和水产动物的融合使水产行业展现出众多应用潜力,基因组研究的不断深入使水产模式生物和非模式生物性别决定机制等重要性状逐渐攻破,QTL 基因定位与基因编辑技术协同发展也为高质量定向遗传育种和种质资源保护建立了桥梁。

参考文献

- [1] Zhang, W., Belton, B. and Edwards, P. (2022) Aquaculture Will Continue to Depend More on Land than Sea. *Nature*, **603**, E2-E4. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04331-3>
- [2] Houston, R.D., Bean, T.P., Macqueen, D.J., Gundappa, M.K., Jin, Y.H., Jenkins, T.L., Selly, S.L.C., Martin, S.A.M., Stevens, J.R., Santos, E.M., Davie, A. and Robledo, D. (2020) Harnessing Genomics to Fast-Track Genetic Improvement in Aquaculture. *Nature Reviews Genetics*, **21**, 389-409. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0227-y>
- [3] 胡景杰, 任红艳. RAD 测序技术及其在水生生物研究中的应用[J]. 水产科学, 2018, 37(1): 125-132. <https://doi.org/10.16378/j.cnki.1003-1111.2018.01.020>
- [4] Sanger, F., Brownlee, G.G. and Barrell, B.G. (1965) A Two-Dimensional Fractionation Procedure for Radioactive Nucleotides. *Journal of Molecular Biology*, **13**, 373-398. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80104-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80104-8)
- [5] Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1977) A New Method for Sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 560-564. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560>
- [6] Hendure, J. and Hanlee, L. (2008) Next-Generation DNA Sequencing. *Nature Biotechnology*, **26**, 1135-1145. <https://doi.org/10.1038/nbt1486>
- [7] Rhoads, A. and Au, K.F. (2015) PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, **13**, 278-289. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.002>
- [8] Peluffò, A.E., Nuez, L., Debate, V., et al. (2015) A Major Locus Controls a Genital Shape Difference Involved in Reproductive Isolation between *Drosophila yakuba* and *Drosophila santomea*. *G3: Genes Genomes Genetics*, **5**, 2893-2901. <https://doi.org/10.1534/g3.115.023481>
- [9] Van Tassell, C.P., Smith, T.P., Matukumallil, K., et al. (2008) SNP Discovery and Allele Frequency Estimation by Deep Sequencing of Reduced Representation Libraries. *Nature Methods*, **5**, 247-252. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1185>
- [10] Van Orsouw, N.J., Hogers, R.C., Janssen, A., et al. (2007) Complexity Reduction of Polymorphic Sequences (CROPS). *PLOS ONE*, **2**, e1172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001172>
- [11] Aird, N.A., Etter, P.D., et al. (2008) Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLOS ONE*, **3**, e3376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>
- [12] Wang, S., Meyer, E., McKay, J.K. and Matz, M.V. (2012) 2b-RAD: A Simple and Flexible Method for Genome-Wide Genotyping. *Nature Methods*, **9**, 808-810. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2023>

- [13] Liu, H.Y., Fu, B.D. and Pang, M.X. (2017) A High-Density Genetic Linkage Map and QTL Fine Mapping for Body Weight in Crucian Carp (*Carassius auratus*) Using 2b-RAD Sequencing. *G3: Genes Genomes Genetics*, **7**, 2473-2487. <https://doi.org/10.1534/g3.117.041376>
- [14] Liu, H.Y., Luo, Q., et al. (2020) High-Density Genetic Linkage Map and QTL Fine Mapping of Growth and Sex in Snakehead (*Channa argus*). *Aquaculture*, **519**, Article ID: 734760. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734760>
- [15] Guo, X.F., Zhou, Y.L., Liu, M., Li, Z., Zhou, L., Wang, Z.W. and Gui, J.F. (2022) A High-Density Genetic Map and QTL Fine Mapping for Growth- and Sex-Related Traits in Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarkii*). *Frontiers in Genetics*, **13**, Article ID: 852280. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.852280>
- [16] Meng, X., Fu, Q., Luan, S., Luo, K., Sui, J. and Kong, J. (2021) Genome Survey and High-Resolution Genetic Map Provide Valuable Genetic Resources for *Fenneropenaeus chinensis*. *Scientific Reports*, **11**, Article No. 7533. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87237-4>
- [17] Jiao, W., Fu, X., Dou, J., et al. (2014) High-Resolution Linkage and Quantitative Trait Locus Mapping Aided by Genome Survey Sequencing: Building up an Integrative Genomic Framework for a Bivalve Mollusc. *DNA Research*, **21**, 85-101. <https://doi.org/10.1093/dnares/dst043>
- [18] Tian, M., Li, Y., Jing, J., Mu, C., Du, H., Dou, J., Mao, J., Li, X., Jiao, W., Wang, Y., Hu, X., Wang, S., Wang, R. and Bao, Z. (2015) Construction of a High-Density Genetic Map and Quantitative Trait Locus Mapping in the Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*. *Scientific Reports*, **5**, Article No. 14852. <https://doi.org/10.1038/srep14852>
- [19] Liu, Y., Wang, H.L., Wen, H.S., et al. (2020) First High-Density Linkage Map and QTL Fine Mapping for Growth-Related Traits of Spotted Sea Bass (*Lateolabrax maculatus*). *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, **22**, 526-538. <https://doi.org/10.1007/s10126-020-09973-4>
- [20] Pecoraro, C., Babbucci, M., Villamor, A., Franch, R., Papetti, C., Leroy, B., Ortega-Garcia, S., Muir, J., Rooker, J., Arocha, F., Murua, H., Zudaire, I., Chassot, E., Bodin, N., Tinti, F., Bargelloni, L. and Cariani, A. (2016) Methodological Assessment of 2b-RAD Genotyping Technique for Population Structure Inferences in Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Marine Genomics*, **25**, 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2015.12.002>
- [21] Ji, D., Su, X., Yao, J., Zhang, W., Wang, R. and Zhang, S. (2022) Genetic Diversity and Genetic Differentiation of Populations of Golden-Backed Carp (*Cyprinus carpio* var. *jinbei*) in Traditional Rice Fields in Guizhou, China. *Animals (Basel)*, **12**, Article No. 1377. <https://doi.org/10.3390/ani12111377>
- [22] 王星火, 常雪晴, 程方平, 马路阔, 徐旭丹, 王有基, 黄伟. 基于 2b-RAD 简化基因组测序的三门湾海域 3 种优势鱼类群体遗传多样性分析[J]. 海洋渔业, 2021, 43(5): 513-520.
- [23] Vera, M., Maroso, F., Wilmes, S.B., Hermida, M., Blanco, A., Fernández, C., Groves, E., Malham, S.K., Bouza, C., et al. (2022) Genomic Survey of Edible Cockle (*Cerastoderma edule*) in the Northeast Atlantic: A Baseline for Sustainable Management of Its Wild Resources. *Evolutionary Applications*, **15**, 262-285. <https://doi.org/10.1111/eva.13340>
- [24] Blanco-Bercial, L. and Bucklin, A. (2016) New View of Population Genetics of Zooplankton: RAD-seq Analysis Reveals Population Structure of the North Atlantic Planktonic Copepod *Centropages typicus*. *Molecular Ecology*, **25**, 1566-1580. <https://doi.org/10.1111/mec.13581>
- [25] Galaska, M.P., Sands, C.J., Santos, S.R., Mahon, A.R. and Halanych, K.M. (2017) Crossing the Divide: Admixture across the Antarctic Polar Front Revealed by the Brittle Star *Astrotoma agassizii*. *Biology Bulletin*, **232**, 198-211. <https://doi.org/10.1086/693460>
- [26] Galaska, M.P., Sands, C.J., Santos, S.R., Mahon, A.R. and Halanych, K.M. (2017) Geographic Structure in the Southern Ocean Circumpolar Brittle Star *Ophionotus victoriae* (Ophiuridae) Revealed from mtDNA and Single-Nucleotide Polymorphism Data. *Ecology and Evolution*, **7**, 475-485. <https://doi.org/10.1002/ece3.2617>
- [27] Dahms, C., Kemppainen, P., Zanella, L.N., Zanella, D., Carosi, A., Merilä, J. and Momigliano, P. (2022) Cast Away in the Adriatic: Low Degree of Parallel Genetic Differentiation in Three-Spined Sticklebacks. *Molecular Ecology*, **31**, 1234-1253. <https://doi.org/10.1111/mec.16295>
- [28] 崔爱君. 黄条鰺种群遗传特性研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海海洋大学, 2020. <https://doi.org/10.27314/d.cnki.gsscu.2020.000227>
- [29] Wei, J.-L., Cong, J.-J. and Sun, Z.-H. (2021) A Rapid and Reliable Method for Genetic Sex Identification in Sea Cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture*, **543**, Article ID: 737021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737021>
- [30] Liu, H., Pang, M. and Yu, X. (2018) Sex-Specific Markers Developed by Next-Generation Sequencing Confirmed an XX/XY Sex Determination System in Bighead Carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) and Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *DNA Research*, **25**, 257-264. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsx054>
- [31] Zhu, C., Liu, H. and Cheng, L. (2021) Identification of Sex-Specific Sequences through 2b-RAD Sequencing in *Pseudobagrus ussuriensis*. *Aquaculture*, **539**, Article ID: 736639. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736639>

- [32] Shi, X., Waiho, K. and Li, X. (2018) Female-Specific SNP Markers Provide Insights into a WZ/ZZ Sex Determination System for Mud Crabs *Scylla paramamosain*, *S. tranquebarica* and *S. serrata* with a Rapid Method for Genetic Sex Identification. *BMC Genomics*, **19**, Article No. 981. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5380-8>
- [33] Zhou, Y., Wu, J. and Wang, Z. (2019) Identification of Sex-Specific Markers and Heterogametic XX/XY Sex Determination System by 2b-RAD Sequencing in Redtail Catfish (*Mystus wyckioides*). *Aquaculture Research*, **50**, 2251-2266. <https://doi.org/10.1111/are.14106>
- [34] Han, Y.L., Sun, Z.H. and Chang, S. (2021) Application of SNP in Genetic Sex Identification and Effect of Estradiol on Gene Expression of Sex-Related Genes in *Strongylocentrotus intermedius*. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, **12**, Article ID: 756530. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.756530>
- [35] Huang, X., Jiang, Y., Zhang, W., Cheng, Y., Wang, Y., Ma, X., Duan, Y., Xia, L., Chen, Y., Wu, N., Shi, M. and Xia, X.Q. (2020) Construction of a High-Density Genetic Map and Mapping of Growth Related QTLs in the Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *BMC Genomics*, **21**, Article No. 313. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6730-x>
- [36] Fu, B., Liu, H., Yu, X. and Tong, J. (2016) A High-Density Genetic Map and Growth Related QTL Mapping in Big-head Carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Scientific Reports*, **6**, Article No. 28679. <https://doi.org/10.1038/srep28679>
- [37] Su, S., Li, H., Du, F., Zhang, C., Li, X., Jing, X., Liu, L., Li, Z., Yang, X., Xu, P., Yuan, X., Zhu, J. and Bouzoualegh, R. (2018) Combined QTL and Genome Scan Analyses with the Help of 2b-RAD Identify Growth-Associated Genetic Markers in a New Fast-Growing Carp Strain. *Frontiers in Genetics*, **9**, Article No. 592. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00592>
- [38] Su, S., Raouf, B., He, X., Cai, N., Li, X., Yu, J., Li, J., Yu, F., Wang, M. and Tang, Y. (2020) Genome Wide Analysis for Growth at Two Growth Stages in a New Fast-Growing Common Carp Strain (*Cyprinus carpio* L.). *Scientific Reports*, **10**, Article No. 7259. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64037-w>
- [39] Liu, H., Fu, B., Pang, M., Feng, X., Yu, X. and Tong, J. (2017) A High-Density Genetic Linkage Map and QTL Fine Mapping for Body Weight in Crucian Carp (*Carassius auratus*) Using 2b-RAD Sequencing. *G3 (Bethesda)*, **7**, 2473-2487. <https://doi.org/10.1534/g3.117.041376>
- [40] Chen, B., Li, Y., Tian, M., Su, H., Sun, W. and Li, Y. (2022) Linkage Mapping and QTL Analysis of Growth Traits in *Rhopilema esculentum*. *Scientific Reports*, **12**, Article No. 471. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04431-0>
- [41] Luqman, A.M., et al. (2020) Genetic Variation, GWAS and Accuracy of Prediction for Host Resistance to *Sparicotyle chrysophrii* in Farmed Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *Frontiers in Genetics*, **11**, Article ID: 594770. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.594770>
- [42] Saura, M., Carabaño, M.J., Fernández, A., Cabaleiro, S., Doeschl-Wilson, A.B., Anacleto, O., Maroso, F., Millán, A., Hermida, M., Fernández, C., Martínez, P. and Villanueva, B. (2019) Disentangling Genetic Variation for Resistance and Endurance to Scuticociliatosis in Turbot Using Pedigree and Genomic Information. *Frontiers in Genetics*, **10**, Article No. 539. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00539>
- [43] Aslam, M.L., Carraro, R., Bestin, A., et al. (2018) Genetics of Resistance to Photobacteriosis in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Using 2b-RAD Sequencing. *BMC Genetics*, **19**, Article No. 43. <https://doi.org/10.1186/s12863-018-0631-x>