

文章编号:1005-8737(2000)01-0095-04

·综述·

## 遗传连锁图谱及其在鱼类遗传育种中的应用

Genetic linkage map and its application in fish breeding

林红,夏德全,杨弘

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,无锡214081)

LIN Hong, XIA De-quan, YANG Hong

(Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

关键词:遗传连锁图谱;DNA分子标记;鱼类遗传育种

Key words: genetic linkage map; DNA molecular marker; fish breeding

中图分类号:S961.2, Q789

文献标识码:A

基因组图谱的构建,是遗传学研究的一个重要领域,它是对基因组进行系统性研究的基础,也是动植物遗传育种和人类遗传病诊断的依据,它将使标记辅助选择技术的应用成为现实,从而可能从根本上改变传统的育种方法,进一步改良畜禽品种和大幅度提高畜禽生产效率。因此,从1913年, A H Sturtevant 在果蝇的性染色体上确定了6个性连锁位点,构建了第1张连锁图至今,科学家已经在人类及动植物的基因图谱构建方面做了大量的工作。近年来,许多国家投入大量的人力、物力,对陆生农业经济作物及牛、猪、鸡等畜禽进行了遗传图谱的构建工作,使一些有重要经济价值的基因得以定位和克隆,为加速优良品种的培育和分子育种打下了基础,并已经在猪、牛、羊、鸡上取得了突破性进展<sup>[1]</sup>。

### 1 遗传图谱

基因组图谱包括物理图谱和遗传图谱,前者以DNA的核苷酸序列为基础,把克隆的基因定位于染色体上,后者则以染色体重组交换为基础,将遗传标记作为路标将2位点间的重组值作为遗传标记间的距离。近年来,在欧美等发达国家的人类基因组计划的带动下,对动植物重要经济性状的基因定位已成为国际前沿研究课题,而构建出饱和度高、覆盖面广的遗传图谱则是进行数量性状位点(QTL)定位的前提。在第1张遗传图出现以后的几十年间,各种生物遗传图谱的研究都是根据可分辨的形态学、生理学及生化常规标记来构

建的<sup>[1]</sup>。由于这些遗传标记的数量在用来构成作图群体的1对亲本材料中极为有限,所以经典遗传图谱的发展缓慢,而且图谱的分辨率很低、标记少、图距大、饱和度低,应用价值也十分有限。进入80年代,由于分子生物学技术的发展,使利用DNA分子水平上的变异作为遗传标记进行遗传作图成为可能,从而诞生了一种现在被广泛使用的重要遗传标记——DNA分子标记。1980年, Bostein<sup>[2]</sup>首先提出了利用RFLPs标记构建遗传图谱的构想。1987年由Donis-keller<sup>[3]</sup>构建了第1张人类RFLPs连锁图。随着新的DNA分子标记技术的发展,图谱上的标记密度也越来越高。仅以家畜为例,到1998年,在GENEBANK中公布的以微卫星为标记的连锁图上,牛有1074个标记、绵羊584个、猪1197个。

与在陆生动物及植物基因组图谱方面已取得成果相比,对鱼类的研究起步较晚。直到80年代初期,才有人利用虹鳟的雌核发育后代进行基因与着丝点间连锁关系的研究<sup>[4-7]</sup>。即使是在这类工作开展的较好的斑马鱼,到1994年才构建了具29个连锁群的遗传图谱<sup>[8]</sup>。2年之后,又利用着丝点连锁分析技术将额外4个连锁群合并,使连锁群数目与其单倍体染色体数目相吻合<sup>[9]</sup>。而对那些经济价值较高的水产养殖对象的基因组遗传图谱的研究工作基本上还处于空白。其主要原因是可供作图的遗传标记的探针数量太少,不足以连接成为高密度的连锁图谱。到目前为止,国外对罗非鱼所做的工作较为深入,最近Thomas等<sup>[10]</sup>利用微卫星 AFLP 标记检测了尼罗罗非鱼雌核发育的基因型,并构建了包含全部22条染色体的连锁图。

收稿日期:1999-09-10

基金项目:中国水产科学研究院科研基金资助

作者简介:林红(1970-),女(回族),山东泰安人,扬州大学畜牧兽医学院讲师,博士。

## 2 应用于构建鱼类遗传图谱的分子标记

任何遗传分析都是以遗传标记为基础的,它能反映不同群体或不同个体的差异,在群体遗传学研究、基因定位、动植物育种上均有重要意义。DNA 分子标记则是 DNA 水平遗传变异的直接反映。与前者相比,具有标记数量大、遗传稳定、大多数呈中性突变、共显性或完全显性遗传的特点。所有这些特点都奠定了其具有广泛应用性的基础。

### 2.1 基于 Southern 杂交技术的分子标记

该技术是利用限制性内切酶酶切基因组 DNA 后,电泳分离,用特异性探针进行 Southern 杂交,通过放射自显影或非同位素显色技术来揭示 DNA 的多态性,其中最具有代表性的是发现最早,迄今应用最广泛的限制性片段长度多态性标记(RFLPs),探针为单拷贝或低拷贝的 DNA 克隆。由于目前已获得的鱼类 DNA 克隆及其探针还十分有限,所以能应用于鱼类遗传图谱的 RFLPs 几乎没有。

### 2.2 基于 PCR 技术的分子标记

PCR 技术虽然问世的时间不长,但由于其简便、快速等特点而迅速成为分子生物学研究的重要手段,尤其在 DNA 分子标记技术上发挥了巨大作用。应用于鱼类遗传图谱构建的这类分子标记主要有以下几种

**2.2.1 RAPD 标记** 该技术是 Williams 等<sup>[11,12]</sup>1990 年提出的一种运用随机引物对基因 DNA 进行扩增而产生多态性的 DNA 片断的新型遗传标记技术。与 RFLP 相比,RAPD 标记不具有种群特异性,可广泛用于不同生物基因组分析;一般表现为显性遗传,可以对整个基因组 DNA 进行多态检测,对 RFLP 难以区分的区域作出遗传连锁图<sup>[13]</sup>。但若某 RAPD 片断不是重复序列,也可将其转化为 RFLP 标记;每个 RAPD 标记都相当于基因组分析中的靶序列(Sequence-tagged sites, STS)<sup>[14]</sup>。由于 RAPD 技术操作简单、分析速度快、所需样品量少,目前已广泛应用于遗传作图、基因的快速定位、特殊染色体区段的鉴定和分离及动植物育种方面。RAPD 技术不需要预先获得生物基因组本身特异的核苷酸序列,所以非常适合应用于尚在起步阶段的鱼类分子生物学技术中。1995 年 Bielawski 确定了海鲈利用 RAPD 分析的最佳条件<sup>[15]</sup>。作为脊椎动物发育实验模型的斑马鱼,其第 1 张遗传图谱就是利用 401 个 RAPD 标记及 13 个微卫星构建的,并得到了与 1 个致死基因连锁的 RAPD 标记。虽然有些学者怀疑 RAPD 检测手段选择参数的可重复性<sup>[16,17]</sup>,但现有的资料表明,通过优化反应条件和严格筛选底物,RAPD 技术仍适于研究遗传多样性 DNA 指纹图谱<sup>[18,19]</sup>,快速鉴定重要基因连锁的标记<sup>[20]</sup>以及构建高密度的基因组遗传图谱<sup>[21]</sup>。

**2.2.2 SSR 标记** 真核细胞基因组中含有大量的串联重复序列,根据其重复的单位长度和重复次数,这种串联序列分为卫星 DNA、小卫星 DNA、微卫星 DNA 等。微卫星 DNA 的重复单位一般为 1~6 bp,重复次数为几次到几百次,同一类

微卫星 DNA 可分布于整个基因组的不同位置上,由于重复次数的不同及重复程度的不完全造成了每个座位的多态性。SSR 标记根据真核生物基因组中某个微卫星两侧的序列设计引物,经 PCR 扩增后分析其多态性。同一类的微卫星 DNA 可分布于整个基因组的不同座位上,其多态性的信息量比较高。由于其重复次数在同一物种的不同基因型间差异很大,于是这一技术很快便发展为一种分子标记<sup>[22,23]</sup>,并成为人类遗传连锁图谱的热点。在鱼类上,这一技术的运用相对较晚,但近年来,使用哺乳动物的重复序列、噬菌体 M13 及人工合成的寡聚核苷酸探针,已克隆许多硬骨鱼的微卫星,在斑马鱼和尼罗罗非鱼上发展的微卫星标记,已用于遗传作图中<sup>[9]</sup>。但是在方法上必须针对染色体每个座位的微卫星发现其两端的单拷贝序列以设计引物,这给微卫星标记的开发带来了一定的困难。

**2.2.3 AFLPs 标记** 即选择性扩增基因组 DNA 双酶切片段<sup>[24]</sup>。它是 RFLP、RAPD 技术相结合的产物,兼具两者的优点,既有 RFLPs 的可靠性,又有 RAPDs 的简便灵敏性,并且不需要知道研究对象的遗传背景。限制性内切酶和引物选择可以有无数个组合,从理论上讲,AFLPs 的标记数目是无限的,平均每次反应可检测到 50~100 条谱带,而且分辨率极高,是一种十分理想和有效的遗传标记,广泛应用于植物基因组图谱的构建和遗传育种方面。由于目前商品出售的试剂盒都是针对植物基因组设计的,所以 AFLP 技术在动物,特别是鱼类遗传分析研究中应用还不多。1998 年,Thomas 等<sup>[10]</sup>曾利用 AFLP 植物基因组图谱试剂盒构建尼罗罗非鱼的遗传图谱,筛选出 12 个 AFLP 引物,共产生了 112 个 AFLPs 标记,证实了利用 AFLPs 构建鱼类高密度遗传连锁图的可行性。

## 3 遗传图谱在鱼类遗传育种中的应用及前景

### 3.1 基因定位与克隆

基因定位一直是遗传学研究的重要范畴之一,其对绘制生物的物理图谱和由此研究生物的进化具有重要意义。基因克隆也是基因组作图的最重要应用之一。

质量性状的基因定位可在已知道目标基因位于某一染色体或连锁群的前提下,选择该连锁群上下不同位置的标记与目标基因进行连锁分析。但定位的目标基因与标记间的距离取决于所用连锁图上的标记密度,不适合连锁图饱和和程度较低的鱼类。

分离群体分组分析法可以克服上述局限性,其原理是将分离群体中的个体依据研究的目标性状分成 2 组,将每 1 组群中的个体 DNA 等量混合,形成 2 个 DNA 混合池,由于分组时仅对目标性状进行选择,因此 2 个 DNA 混合池之间理论上主要在目标基因区段存在差异。斑马鱼的 brass, sparse, leopard 等 9 个基因就是用这种方法定位的。

大多数代表重要经济价值的性状,如产量、品质、成熟期等均表现数量性状的遗传特点。它受到数量基因座位

(QTLs)和环境因子的共同作用。传统的数量遗传学将控制数量性状的多基因作为一个整体,无法确定 QTLs 的数目、单个 QTLs 的遗传特征及其在染色体上的位置。如果能够将多基因性状分解成若干遗传组分,就可以用研究单基因的方法研究 QTLs,并将其定位、克隆。而饱和遗传图谱的建立可实现这个设想。

到目前为止,鱼类的基因定位、克隆工作开展的不多,已分离的有价值的基因也很少<sup>[25~27]</sup>,特别是对那些代表重要经济价值的基因的位置和结构几乎一无所知。如果用常规的克隆方法,在 DNA 探针数量有限的情况下,这项工作则无法进行。如果能得到高密度遗传图谱,就可以找到目的基因的侧翼连锁非常紧密的分子标记,然后用这些标记去筛选大片断 DNA 文库,得到与分子标记有关的克隆,继之分离出目的基因。这一方法已用于斑马鱼体色基因的克隆。如果大量有经济价值的基因,特别是抗病基因得到分离,将对未来从本质上防治鱼病、虾病具有重要意义。法国 IFREMER (水产开发研究所)继大菱鲆和鳟鱼的研究之后,又开发鉴定了尖吻鲈的 7 个遗传标记,正努力鉴定牡蛎抗 bonamid(寄生虫感染)基因<sup>[28]</sup>。

### 3.2 标记辅助选择

几乎所有育种过程都贯穿着选择这一基本环节。长期以来,鱼类遗传育种工作一直以表型性状为基础,当性状的遗传基础较为简单或较为复杂但表现加性基因效应遗传时,表型选择是非常有效的,但鱼类的许多性状为数量性状,其表型受许多微效基因的控制,而且易受环境的影响。根据表型对性状的选择往往是低效的,所以育种周期很长。遗传学家们很早就提出利用标记和遗传图谱进行辅助选择,以加速遗传改良进程的理论。标记辅助选择,就是通过标记对目标性状实施间接选择,其前提是标记与目标性状紧密连锁。常规的标记辅助选择单是在数量上就难以实现上述条件,而随着分子标记技术的不断发展,分子标记辅助选择正成为育种的有利工具。英国的 Thomas 及其同事正准备利用罗非鱼遗传图谱中的 62 个微卫星标记鉴别不同品系罗非鱼的数量性状位点,用于培育品质更优良的品种。在鱼类遗传育种中,目前急需进行的,就是利用现有的分子标记技术,建立各种鱼类的高密度遗传图谱,为今后对重要经济性状进行标记辅助选择奠定基础。

### 3.3 全基因组选择

构建高密度分子连锁图谱,可以同时确定各个体在数百个甚至更多个基因座位上的分子标记基因型,由此推断出各个体在全基因组上任何区域的遗传组成,从而使鱼类遗传育种实现全基因组选择,在鉴别目的基因的同时评价整个基因组,对重要经济性状进行全面而又精细的遗传操作,极大地提高育种效率。

### 3.4 比较基因组

比较基因组研究最早是在双子叶植物番茄和马铃薯间进行的<sup>[29]</sup>,是利用相同的 DNA 分子标记在相关物种之间进

行遗传或物理作图,比较这些标记在不同物种基因组中的分布特点,揭示染色体或染色体片断上的基因及其排列顺序的相同性或相似性,由此对相关物种的基因组结构和起源进行分析。包括人类、大鼠、小鼠、牛、绵羊在内的许多哺乳动物的较完整的遗传图谱已构建完成<sup>[30~35]</sup>,而在非哺乳动物中鸡的遗传连锁图谱的构建工作开展最快<sup>[36]</sup>。将这些脊椎动物的基因连锁图谱与已构建的斑马鱼遗传图谱比较,将有助于搞清脊椎动物基因组的进化过程<sup>[37]</sup>。另外,比较基因组研究还可以显著增加各种鱼类可供利用的遗传标记数量,罗非鱼具有的许多遗传标记已经被用于丽鱼科鱼类遗传图谱的构建,这对遗传研究已经相对落后的鱼类来说尤为重要。

利用 DNA 分子标记技术进行基因组作图的研究一直处于飞速发展,且应用深度和广度也在不断发展。基因组图谱的使用价值将日益提高,这必将促进包括鱼类在内的各种生物基因组研究的深入,最终成为生物技术改造和利用生物的依据。

### 参考文献:

- [1] 李 宁,等. 畜禽基因图 - 中国动物遗传育种研究[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995. 321 - 135.
- [2] Botstein D, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1980, 32:314 - 331.
- [3] Donis - kell H, et al. A genetic linkage map of human genome [J]. Cell, 1987, 51:319.
- [4] Gervai J, et al. Artificial gynogenesis and mapping of gene - centromere distance in the paradise fish, *Macropodus opercularis* [J]. TAG, 1984, 68:481 - 485.
- [5] Guyomard R. High level of residual heterozygosity in gynogenetic rainbow trout, *Salmo gairdner*. Richardson[J]. TAG, 1984, 67:307 - 316.
- [6] Lou Y D, et al. Diploid gynogenesis induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdner*. Richardson[J]. J Fish Biol, 1984, 24:665 - 670.
- [7] Tompson D, et al. An analysis recombination data in gynogenetic diploid rainbow trout[J]. Heredity, 1984, 53:441 - 452.
- [8] John H P, et al. A genetic linkage map for the zebrafish[J]. Science, 1994, 264: 699 - 703.
- [9] Stephen L J, et al. Centromere - linkage analysis and consolidation of the zebrafish genetic map[J]. Genetics, 1996, 12:1 277 - 1 288.
- [10] Thomas D K, et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. Genetics, 1998, 148:1 225 - 1 232.
- [11] Welsh D, et al. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acid Research, 1990, 18:1 213 - 1 218.
- [12] Williams J C K, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic

- Acids Research, 1990, 18:6 531 - 6 535.
- [13] Olson M A. Common language for physical mapping of the human genome[J]. Science, 1989, 245:1 434 - 1 435.
- [14] Bielawski H P, et al. 脊椎动物 DNA, RAPD 标记的重复性扩增[J]. 生物技术通报, 1995, 2:39.
- [15] Dvovs K M, et al. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat[J]. Theor Appl Genet, 1992, 84:567 - 572.
- [16] Reidy M F, et al. Excess of nonparental bands in offsprings from unknown primate pedigrees assayed using RAPD - PCR [J]. Nucleic Acid Res, 1992, 20:818 - 826.
- [17] Elsie J, et al. Parentage determination in maize hybrids using arbitrarily primed polymerase chain reaction(AP - PCR)[J]. Theor Appl Genet, 1991, 82:473 - 476.
- [18] Vierthig R A, et al. Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid wheat genotypes[J]. Theor Appl Genet, 1992, 84:835 - 838.
- [19] Kimmei C. Genetics and early development of zebrafish[J]. Trends Genet, 1989, 5:283 - 288.
- [20] Klein - Lankhorst R M, et al. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*), using random amplified polymorphic DNA(RAPD)[J]. Theor Appl Genet, 1991, 83:108 - 114.
- [21] 林凤, 等. 高粱遗传图谱初探[J]. 国外农学, 1997, 1:11 - 14.
- [22] Hamada H, et al. A novel repeated element with Z - DNA - forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79: 6 465 - 6 469.
- [23] Nakamura Y, et al. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping [J]. Science, 1987, 235: 1 616 - 1 622.
- [24] Lee W J, et al. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus* [J]. Journal of Fish Biology, 1996, 49:169 - 171.
- [25] Vos P, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Research, 1995, 23(21):4 407 - 4 441.
- [26] 朱作言, 等. 鲤鱼和草鱼基因文库的构建及其生长激素基因和肌动蛋白基因筛选[J]. 水生生物学报, 1990, 14:176 - 178.
- [27] 蒋耀青. 鱼类抗冻蛋白的研究 II. 黄盖鲮抗冻基因 cDNA 的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 遗传学报, 1990, 17:202 - 212.
- [28] Johnson S L, et al. Genetic control of adult pigment stripe development in zebrafish[J]. Dev Biol, 1995, 167:27 - 33.
- [29] IFREMER. 指纹法水产品育种的运用[J]. 生物技术通报, 1996, 12:13.
- [30] Murray J C, et al. A comprehensive human linkage map with centimorgan density[J]. Science, 1994, 265:2 049 - 2 054.
- [31] Copeiaud N A, et al. A genetic linkage map of the mouse current applications and future prospects[J]. Science. 193, 262:57 - 66.
- [32] Dietrich W F, et al. A genetic map of the mouse with 4. 006 simple sequence length polymorphisms[J]. Natl Genet, 1994, 7:220 - 245.
- [33] Jacob H D, et al. A genetic map of the Laboratory rat[J]. Natl Genet, 1995, 9:63 - 69.
- [34] Barendse W, et al. A genetic map of bovine genome[J]. Natl Genet, 1994, 6:227 - 235.
- [35] Broad T E, et al. Mapping the sheep genome: practice progress and promise[J]. Brit Veterin J, 1994, 150:215 - 217.
- [36] Burt D W, et al. Chicken genome mapping a new era in avian[J]. Genetic Trends, 1995, 11:190 - 194.
- [37] Moruzor D G. Reconstructing the gene map of the vertebrate ancestor[J]. Anim Biotech, 1994, 5:113 - 122.