

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00256

鲢鳙杂种亲本连锁图标记加密和共线性比较

张立楠¹, 杨官品¹, 邹桂伟², 危起伟², 王军¹, 张鹏¹, 刘昕¹, 杨静¹

1. 中国海洋大学海洋生物遗传育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000

摘要: 鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)与鳙(*Aristichthys nobilis*)杂种的养殖性能优于亲本, 在水产养殖中利用广泛。为促进鲢、鳙遗传资源管理、经济性状定位等研究, 已构建了鲢鳙种间杂种亲本的遗传连锁图, 但图谱以 AFLP 标记为主, 利用范围有限。为提高图谱质量和可用性, 本研究采用新开发的微卫星标记加密了鲢鳙杂种亲本连锁图。雌性亲本鳙的连锁图标记总数从 153 增加到 288(包括新开发微卫星标记 93 个), 雄性亲本鲢的连锁图标记总数从 271 增加到 511(包括新开发微卫星标记 136)。鳙图谱总长度从 852.0 cM 增加到 965.8 cM, 鲢图谱总长度从 952.2 cM 增加到 1 049.6 cM。鲢、鳙图谱共线性比较甄别出 22 个同缘连锁群, 标记排列只存在轻微重排现象。亲本间共享的 76 个微卫星标记界定的标记间隔总长度在亲本间无差异(雌:雄=1:1), 与鲢鳙种内杂种亲本共享微卫星标记界定间隔的总长度雌雄比(1:0.45)显著不同。与模拟自然受精(种内杂种)相比, 混精受精(种间杂种)可增加雄性亲本基因组范围的重组率。鲢鳙形态相似, 染色体组型相同, 杂种可育, 鲢鳙杂交对重组率没有影响或影响很小。根据研究结果, 认为混精受精回避了精子竞争, 强化了全基因组重排, 不利于新形成的和已有的优良单倍型的保留, 是鲢鳙养殖性能退化的原因之一。[中国水产科学, 2011, 18(2): 256–266]

关键词: 鲢; 鳙; 微卫星; 连锁图; 共线性比较

中图分类号: S96

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2011)02–0256–11

鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)是中国广泛养殖的淡水鱼种。这 2 个种最早被归于鲤科的雅罗鱼属(*Leuciscus*), 之后又调整到鲤科的鲢属(*Hypophthalmichthys*), 直到 Oshima^[1] 因鳙的特殊形态, 如腮丝结构、咽齿形状等, 专门建立鳙属(*Aristichthys*)。但是, Howes^[2]建议鳙仍应归于鲢属, 因为鲢、鳙具备很多共同特征。因此, 许多国家也称鳙为 *H. nobilis*^[3]。鲢、鳙主要分布于中国主要河流的下游盆地区, 包括黑龙江、长江和珠江, 其养殖历史可追溯到 1 000 多年前的唐朝^[4]。因生长快、养殖成本低、耐逆境等, 鲢、

鳙成为中国四大家鱼的两个主要成员。人工育苗技术发明后, 鲢、鳙鱼苗供给问题得以彻底解决^[5], 同时, 也使鲢、鳙被引种到许多国家和地区, 或食用、或用来控制池塘、水库等的水质^[3, 6]。2006 年, 世界鲢、鳙养殖产量分别达到 380 万 t 和 210 万 t(FAO, <http://www.fao.org/fishery/cultured-species/>)。

天然环境中, 鲢、鳙生活在不同水层。为有效利用水体, 人们经常混养鲢和鳙。鲢、鳙具有相同染色体数和相同核型^[7], 天然环境里, 鲢鳙杂种非常普遍^[8–9], 人们也进行了鲢鳙杂交研究^[10–11]。鲢鳙杂种成活率高, 因其养殖性能优于亲本, 鲢

收稿日期: 2010–04–05; 修订日期: 2010–07–21.

基金项目: 科技部国家支撑计划项目(2006BAD01A1205); 农业部现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(nycytx-49-01); 长江水产研究所鱼类种质资源和生物技术重点实验室开放课题(LFB20070601).

作者简介: 张立楠(1983–), 男, 博士, 研究方向为水产生物分子遗传学. E-mail: pumpkin_5112@yahoo.com.cn

现工作单位: 中国水产科学研究院南海水产研究所.

通讯作者: 杨官品, 教授, 博士生导师. E-mail: yguanpin@mail.ouc.edu.cn

鳙杂种已广泛用于养殖^[12-13]。另外, 鲢鳙杂种可育, 能繁育后代^[9, 14-15]。鲢鳙杂交和鲢鳙杂种利用会导致鲢、鳙种性特征丧失。因此, 需要有保持育苗亲本种群纯度的方法和防止自然环境自然群体遗传多样性扰动的措施。

一套定位在染色体上的微卫星标记将促进遗传资源评估、亲本选育和杂种养殖性能遗传基础探索。本课题组已构建了鲢、鳙遗传连锁图谱^[16]。鲢图谱有 271 个标记, 27 个连锁群; 而鳙图谱有 153 个标记, 30 个连锁群。但是, 图谱只有非常少的微卫星标记(鲢 48 个, 鳙 27 个), 应用范围有限。本研究利用新开发的微卫星标记增加了图谱标记密度, 使鲢、鳙图谱的微卫星标记分别达到 184 个和 119 个。另外, 根据相同微卫星标记界定的共同标记区间进行了鲢、鳙图谱的共线性比较, 并与鲢鳙种内杂种亲本连锁图^[17]进行了比较分析。

1 材料与方法

1.1 杂种群体

研究所用杂种群体与 Liao 等^[16]所用群体相同。这些杂种个体是通过一野生雌性鳙与一野生雄性鲢杂交获得的, 杂交方法是混精受精。将精、卵挤在容器中混合后获得受精卵, 将受精卵在跑道池中孵化。随机选择 90 个 6 月龄个体, 取其肌肉组织, 连同亲本鳍组织保存在缓冲液中, 保存方法和 DNA 提取参考 Liao 等^[16]的方法。

1.2 微卫星和 AFLP 基因型分型

研究使用的微卫星标记绝大部分是从草鱼和鲢含微卫星片段富集文库中分离的, 详细过程参照 Guo 等^[18]和 Zhang 等^[17]。研究还使用了已发表的能扩增亲本 DNA 或在亲本间存在多态性的含微卫星的 DNA 序列(引物重新设计)和微卫星标记引物。这些序列或引物来源物种包括鲢^[16-17, 19-21]、鳙^[22-23]和草鱼^[18, 24]。研究新开发微卫星标记列于表 1, 而已发表标记列于表 1 注释中。微卫星分型依 Zhang 等^[17]的方法。PCR 产物经 6% 变性聚丙烯

酰胺凝胶电泳分离等位基因, 银染分型。AFLP 分型共使用 96 对有选择碱基的 *EcoR* I 和 *Mse* I 接头引物组合。分析方法见 Vos 等^[25]。用与微卫星分型相同的电泳和染色方法。

1.3 图谱构建和图谱特征分析

JoinMap[®]3.0 软件研发者定义单倍体群体是从两个纯合亲本的杂种一代衍生而来, 标记连锁相未知的群体。因此, 如果忽略一个亲本的所有等位基因, 杂种就可以看做是单倍体群体, 将雌性和雄性亲本独立进行分析, 获取分离数据, 只使用亲本特异的微卫星或 AFLP 等位基因。亲本特异的 AFLP 等位基因可假定为与一个零等位基因分离, 记为“a”(存在带)和“b”(假定的零等位基因)。亲本特异的微卫星等位基因依情况而定, 如果等位基因组成是 AB×AA、AA×AB 和 AB×AC, 则亲本唯一的特异等位基因分离数据与 AFLP 数据一样录取; 如果是 AB×CC、AA×BC 和 AB×CD 有一对等位基因分离, 则一个记为“a”另一个记为“b”。

将获得的各标记位点基因型分离数据与以前获得的数据^[16]合并, 用 JoinMap[®]3.0 计算连锁图谱^[26]。无偏分离的标记先在 LOD 值为 4.0 时分组。位点间遗传距离导入 MapChart^[27]获得图谱数据, 最后用 Visio2003 编辑图谱。估计基因组长度、观察基因组长度以及基因组覆盖率等用 Liao 等^[16]的方法计算。

2 结果与分析

2.1 标记多样性

本研究共从文库中分离 78 个含微卫星的序列, 设计 78 对引物。与 342 对已发表^[17-18, 23-24]但没有出现在 Liao 等^[16]图谱中的引物一起进行多样性筛选, 发现有 235 对至少在一个亲本中存在多样性, 其中 199 是已发表的, 36 是本研究新开发的(表 1)。96 对 AFLP 引物中有 90 对检出多样性, 共检出 531 个以 1:1 比例分离的带(表 2)。其中, 175 为雌性亲本鳙特异, 356 为雄性鲢特异。

表 1 新开发并定位在鲢鳙杂种亲本连锁群上的微卫星标记

Tab.1 Newly developed microsatellites on parental linkage maps of interspecific hybrids of silver carp and bighead carp

座位 locus	数据库号 accession no.	正向引物 (5'-3') forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') reverse primer (5'-3')	复性温度/°C T_a
Hym02	GU120273	GTGTGGCTTCTGGCTGTGA	CCACCTGCTCTTGTTTCCA	55
Hym10	GU120274	TGATGGGTAACTTTAGGGC	TGTTTCATTGGGTTTGGT	56
Hym55	GU120275	GCGAAAACAGCCAGTGAGTAAG	GGTTGACGATGAAAAACAAGGTG	57
Hym62	GU120276	GCGAAGGGTTGAGTGAGATA	AACTGAAGACAGGGAAGAAGC	58
Hym80	GU120277	CACGCTGAACTTTCATTCC	CACTAAGCCACATCACCATC	59
Hym97	GU120278	AGACTAATCACTGCTGGAC	CAAGTGAGCAATGAGAAAC	60
Hym108	GU120279	CCCACATCCTTTCCTCA	TCTCCACCACTACCCAGA	61
Hym133	GU120280	TCGGATTACACCACAACATA	CACTCCCTCAGATTACATTTT	56
Hym154	GU120281	GCACATAGAGCGAGAAATA	TAGTCTGTTACAACCTGGGATA	58
Hym178	GU120282	TGTTTCATCAGGGTGTTTG	CTCTGTTCCAGGTTCTTGT	58
Hym187	GU120283	TGTGTTACTTGCCGTTTCTTTG	ATGTGCGTTTCCATCACCTTA	56
Hym194	GU120284	TGGACACGGTCTGGGATT	GCCACAAGCAACTAACAACA	59
Hym213	GU120285	CACGCTCTACTTACTTTATG	GAATGTCAGACCTCCAA	56
Hym221	GU120286	AAAGTTTCAGAGTGGGTGTA	ATTGGTCAAGTGGGTCATA	56
Hym225	GU120287	ATCTCACTTGCTCTTCCTCT	CTACTTTGTTGTCCCTGTCA	57
Hym236	GU120288	AGGACTTTCAGTGTGAGGTT	TGCCAAGATGTTGAGTATTC	56
Hym257	GU120289	GAATGAACTCACTAAGAGCAAG	TAAACCTACCCATCACAGAAA	56
Hym258	GU120290	CTTATTATGAGCGAGTGC	CGATCAGTAGCGTGGTT	56
Hym261	GU120291	GAATCCTGCTGATGTTTGC	AAGGCGAGTGGGTAGTCC	56
Hym291	GU120292	TGTATTCGCAATCTTCAC	ATGGGTAGGGTTAGGGTA	56
Hym292	GU120293	TTTGGACTGCTGGTGATTC	TCTTCTGATTGGCTGTTGC	56
Hym310	GU120294	TGCTTCCGCAGTATTCTTAG	CTTTTCATTTCTCCACCCA	55
Hym340	GU120295	CAGTGCCCTCTGAGCCTAC	TGATCTGGGACAGTTGTTGC	58
Hym360	GU120296	ACGAGTCTTGCTGCTTGAT	GCCAGTCCCTTATTTTAGTC	57
Hym376	GU120297	GCTGACTTTGTTTACCCCTTG	ACTTGGGCTGACCTCTTGTC	57
Hym382	GU120298	GCTACCTGATGGGCTAAAAGA	GCAGTGAAATGGAAAAGCAC	56
Hym386	GU120299	TCTGTGTTGCAGTATCGTGTG	AGAGACAGTGGGATGGAAAGAC	56
Hym394	GU120300	CTTCCTGAGTGCTGATCTTTG	TCAACAGTAATTCGGGTCTTTC	56
Hym399	GU120301	CCGTTGTAGTTCTTTCGGTATCA	AAAGGGAGGAAGAGGAAGG	58
Hym410	GU120302	CACACGACTATCAGCCAATCA	GTGACAAAACACTAAAGCGAGA	58
Hym420	GU120303	GCGTGGCTCAACACACTCT	TCCGCACTACAGAAGGATGA	56
Hym433	GU120304	GTGGATAGCCGAAGCCACT	CAGCACAGTTCGTGGTTATTG	57
Hym441	GU120305	AGGGAACACTAGACGGAGA	AGCGAGGGACAGATAAGCAA	57
Hym444	GU120306	GGAGAGAGAAGACAGGAAATGAG	GTTTTGGCACCGTATCCATC	56
cid20	GU120307	ACGGAGGTAACACGCAC	TGATAAACATCGGCAGG	58
cid22	GU120308	GTGTGAAAGCGTGAGAGTG	TGGGGAATACGAGCAAA	58
BL-19	DQ378928	TTGTAGGTGCCGAAACTTGA	ACAAAGCAGGGTCACAGCAT	56
BL-23	DQ378930	AAGCAACACTCCGCAGAAGA	CAGAATGAACGTGATGACCA	55
BL-27	DQ378931	CATAAAGACGAGGTCAGAAGTT	TCCTGCCACTGTACTGATGT	54
BL-35	DQ378934	GAGACGCAGTCAAAGCTGAA	GATGGCATTCTATTTCCTGT	54
BL-51	DQ378941	ATCGCAGGATGAGGAGAAT	AGCGTTGGCTTGCTCTGAA	54
BL-54	DQ378942	GTCGTTCTTTCCACCTCAT	TCCAGCCACTAAACTCAGCA	54
BL-75	DQ378947	CTGCTCCGTCAGCGTGTC	CCTGTGCCGTCGTGATGTCT	54
BL-76	DQ378948	CCAACCAAGCAAAGAATAG	GGGGTAATGTCCTCATAAGT	54
BL-110	DQ378951	TGCGTATGAATCCAACAGAG	GCGTGACAGACCGACAACCTT	54
HL-2	DQ378842	AGTTACTTGCGAGTTGTTCTT	CACGTCCTTGCTGAATAAAA	56
HL-33	DQ378853	GATCTCTACAGCCTGTTCAA	AGACCCTGTGAATTAGCAGC	53
HL-35	DQ378854	CTCTGGAGCTTAATGGTGG	TCTATGGAGAGTCCCTGTAAA	52
HL-41	DQ378856	GATTCATTCAAGCCTGTCGG	GGTTCCATCGCATACTTTGT	53
HL-56	DQ378861	CCCCTATCCCTAAACTTCCC	TGCCGCATTAAGGTTATCAT	56
HL-58	DQ378862	GATACAGCCGTGTCGTTTAG	GGCGTGTGTTTTTCATTCA	54
HL-95	DQ378870	AGGAGGCGATAACCGAGAAC	TTGGATTGTGTCAGCAGGTTG	57

表 1 注: 本研究还使用了 *Hym01*, *Hym06*, *Hym11-Hym14*, *Hym18*, *Hym22*, *Hym34*, *Hym35*, *Hym37*, *Hym39*, *Hym40*, *Hym44*, *Hym45*, *Hym47*, *Hym49*, *Hym50*, *Hym54*, *Hym57*, *Hym60*, *Hym61*, *Hym64*, *Hym68*, *Hym69*, *Hym71-Hym73*, *Hym78*, *Hym79*, *Hym83*, *Hym89*, *Hym91*, *Hym95*, *Hym101-Hym103*, *Hym111*, *Hym123*, *Hym124*, *Hym129*, *Hym135*, *Hym138*, *Hym139*, *Hym142*, *Hym145*, *Hym149*, *Hym159*, *Hym167*, *Hym170*, *Hym176*, *Hym179-Hym184*, *Hym186*, *Hym188*, *Hym191*, *Hym193*, *Hym195*, *Hym200-Hym202*, *Hym205*, *Hym208*, *Hym212*, *Hym230*, *Hym232*, *Hym233*, *Hym237-Hym239*, *Hym253*, *Hym255*, *Hym262*, *Hym263*, *Hym266*, *Hym267*, *Hym284*, *Hym296*, *Hym302*, *Hym309*, *Hym314*, *Hym321*, *Hym334*, *Hym348*, *Hym349*, *Hym357*, *Hym361*, *Hym362*, *Hym364*, *Hym366*, *Hym368*, *Hym384*, *Hym387*, *Hym392*, *Hym396*, *Hym403*, *Hym405*, *Hym423*, *Hym429*, *Hym430*, *Hym435*, *Hym440*, *Hym443*, *Hym445*, *Hym448*, *Hym450*, *Hym452-Hym455*, *Hym466*, *cid10* 和 *cid45*^[17]; *cid03*, *cid05*, *cid08*, *cid12*, *cid15*, *cid17*, *cid23*, *cid27*, *cid38*, *cid57* 和 *cid71*^[18]; *Ar26*, *Ar29*, *Ar64*, *Ar182* 和 *Ar275*^[23]; *Ci03*, *Ci07*, *Ci08*, *Ci12* 和 *Ci15-Ci17*^[24]; *BL5*, *BL13*, *BL15*, *BL18*, *BL42*, *BL43*, *BL46*, *BL52*, *BL54*, *BL55*, *BL58*, *BL62*, *BL63*, *BL65*, *BL66*, *BL68*, *BL69*, *BL73*, *BL82*, *BL90*, *BL96*, *BL101*, *BL106-2*, *BL109*, *BL118*, *BL123*, *BL125*, *BL132*, *BL144*, *BL145*, *BL149*, *BL151*, *BL173* 和 *HL-1*^[16, 21]; *hmo01*, *hmo11*, *hmo13*, *hmo15*, *hmo26*, *hmo31*, *hmo34*, *hmo36*, *hmo37* 和 *hmo39*^[20]; *BL-19*, *BL-23*, *BL-27*, *BL-35*, *BL-51*, *BL-54*, *BL-75*, *BL-76*, *BL-110*, *HL-2*, *HL-33*, *HL-35*, *HL-41*, *HL-56*, *HL-58* 和 *HL-95*^[19, 22]等已发表的微卫星标记或含微卫星的序列(引物重新设计)。

Note for table 1: *T_a*, annealing temperature. The microsatellites and microsatellite containing sequences (with primers redesigned) used in this study also include *Hym01*, *Hym06*, *Hym11-Hym14*, *Hym18*, *Hym22*, *Hym34*, *Hym35*, *Hym37*, *Hym39*, *Hym40*, *Hym44*, *Hym45*, *Hym47*, *Hym49*, *Hym50*, *Hym54*, *Hym57*, *Hym60*, *Hym61*, *Hym64*, *Hym68*, *Hym69*, *Hym71-Hym73*, *Hym78*, *Hym79*, *Hym83*, *Hym89*, *Hym91*, *Hym95*, *Hym101-Hym103*, *Hym111*, *Hym123*, *Hym124*, *Hym129*, *Hym135*, *Hym138*, *Hym139*, *Hym142*, *Hym145*, *Hym149*, *Hym159*, *Hym167*, *Hym170*, *Hym176*, *Hym179-Hym184*, *Hym186*, *Hym188*, *Hym191*, *Hym193*, *Hym195*, *Hym200-Hym202*, *Hym205*, *Hym208*, *Hym212*, *Hym230*, *Hym232*, *Hym233*, *Hym237-Hym239*, *Hym253*, *Hym255*, *Hym262*, *Hym263*, *Hym266*, *Hym267*, *Hym284*, *Hym296*, *Hym302*, *Hym309*, *Hym314*, *Hym321*, *Hym334*, *Hym348*, *Hym349*, *Hym357*, *Hym361*, *Hym362*, *Hym364*, *Hym366*, *Hym368*, *Hym384*, *Hym387*, *Hym392*, *Hym396*, *Hym403*, *Hym405*, *Hym423*, *Hym429*, *Hym430*, *Hym435*, *Hym440*, *Hym443*, *Hym445*, *Hym448*, *Hym450*, *Hym452-Hym455*, *Hym466*, *cid10* and *cid45*^[17]; *cid03*, *cid05*, *cid08*, *cid12*, *cid15*, *cid17*, *cid23*, *cid27*, *cid38*, *cid57* and *cid71*^[18]; *Ar26*, *Ar29*, *Ar64*, *Ar182* and *Ar275*^[23]; *Ci03*, *Ci07*, *Ci08*, *Ci12* and *Ci15-Ci17*^[24]; *BL5*, *BL13*, *BL15*, *BL18*, *BL42*, *BL43*, *BL46*, *BL52*, *BL54*, *BL55*, *BL58*, *BL62*, *BL63*, *BL65*, *BL66*, *BL68*, *BL69*, *BL73*, *BL82*, *BL90*, *BL96*, *BL101*, *BL106-2*, *BL109*, *BL118*, *BL123*, *BL125*, *BL132*, *BL144*, *BL145*, *BL149*, *BL151*, *BL173* and *HL-1*^[16, 21]; *hmo01*, *hmo11*, *hmo13*, *hmo15*, *hmo26*, *hmo31*, *hmo34*, *hmo36*, *hmo37* and *hmo39*^[20]; and *BL-19*, *BL-23*, *BL-27*, *BL-35*, *BL-51*, *BL-54*, *BL-75*, *BL-76*, *BL-110*, *HL-2*, *HL-33*, *HL-35*, *HL-41*, *HL-56*, *HL-58* and *HL-95*^[19, 22].

表 2 96 对 AFLP 引物及其在杂种中检测的多态性带的数量

Tab.2 Ninty-six AFLP primer combinations and the number of polymorphic bands detected in the interspecific hybrids

	E-ACC (A)	E-AGG (B)	E-ACA (C)	E-ACT (D)	E-ACG (E)	E-AGA (F)	E-AGT (G)	E-AGC (H)	总计 total
M-CTA(1)	3	7	6	5	3	11	7	4	46
M-CAA (2)	9	3	9	13	3	8	7	7	59
M-CGA (3)	7	4	6	6	2	4	-	7	36
M-CTT (4)	12	5	10	7	3	3	4	5	49
M-CTG (5)	7	1	8	9	5	7	-	3	40
M-CTC (6)	6	10	8	6	4	10	4	5	53
M-CAT (7)	8	2	-	8	3	11	9	2	43
M-CAG (8)	8	4	9	9	3	9	10	-	52
M-CAC (9)	9	13	4	5	4	6	6	6	53
M-CGT (10)	4	6	14	-	5	-	8	4	41
M-CGG (11)	3	1	2	8	4	2	4	2	26
M-CGC (12)	4	3	7	5	4	2	6	2	33
总计 total	80	59	83	81	43	73	65	47	531

注: E-, *Eco* RI 接头对应引物, 接有 1 个第一轮选择扩增和 2 个第二轮选择扩增延伸碱基; M-, *Mse* I 接头对应引物, 接有 1 个第一轮选择扩增和 2 个第二轮选择扩增延伸碱基; A 到 H 及 1 到 12 分别是 *Eco* RI 和 *Mse* I 对应引物编号。

Note: E-, *Eco* RI adaptor corresponding segment of primer followed by 1 (for the first round selective amplification) and 2 (for the second rond selective amplification) base overhangs; M-, *Mse* I adaptor corresponding segment of primer; A through H and 1 through 12, the names of *Eco* RI and *Mse* I specific primers, respectively.

2.2 亲本连锁图谱

本研究增加了鲢鳙杂种亲本连锁图的标记密度。雌性鳙连锁图谱有 39 个连锁群 (含 6 个三联体和 2 个二联体), 总共有 288 个标记(120 个微卫星和 168 AFLP) (图 1)。图谱总长度 965.8cM, 估计基因组 1 250.0 cM, 估计基因组覆盖率 77.3%。最大间隔 21.9 cM, 平均间隔 3.9 cM。连锁群从 2.1 cM 到 72.8 cM 不等。每连锁

群标记数从 2 到 27, 平均 7.4 (表 3)。雄性鲢连锁图有 27 连锁群(含 2 个三联体和 1 个二联体), 总共有 511 个标记(184 个微卫星和 327 AFLP) (图 2)。图谱总长 1 049.6 cM, 估计基因组 1 164.9 cM, 估计基因组覆盖率 90.1%。最大标记间隔 25.1 cM, 平均标记间隔 2.2 cM。连锁群大小从 2.2 cM 到 81.8 cM 不等。每群标记数从 2 到 38 不等, 平均 18.9 (表 3)。

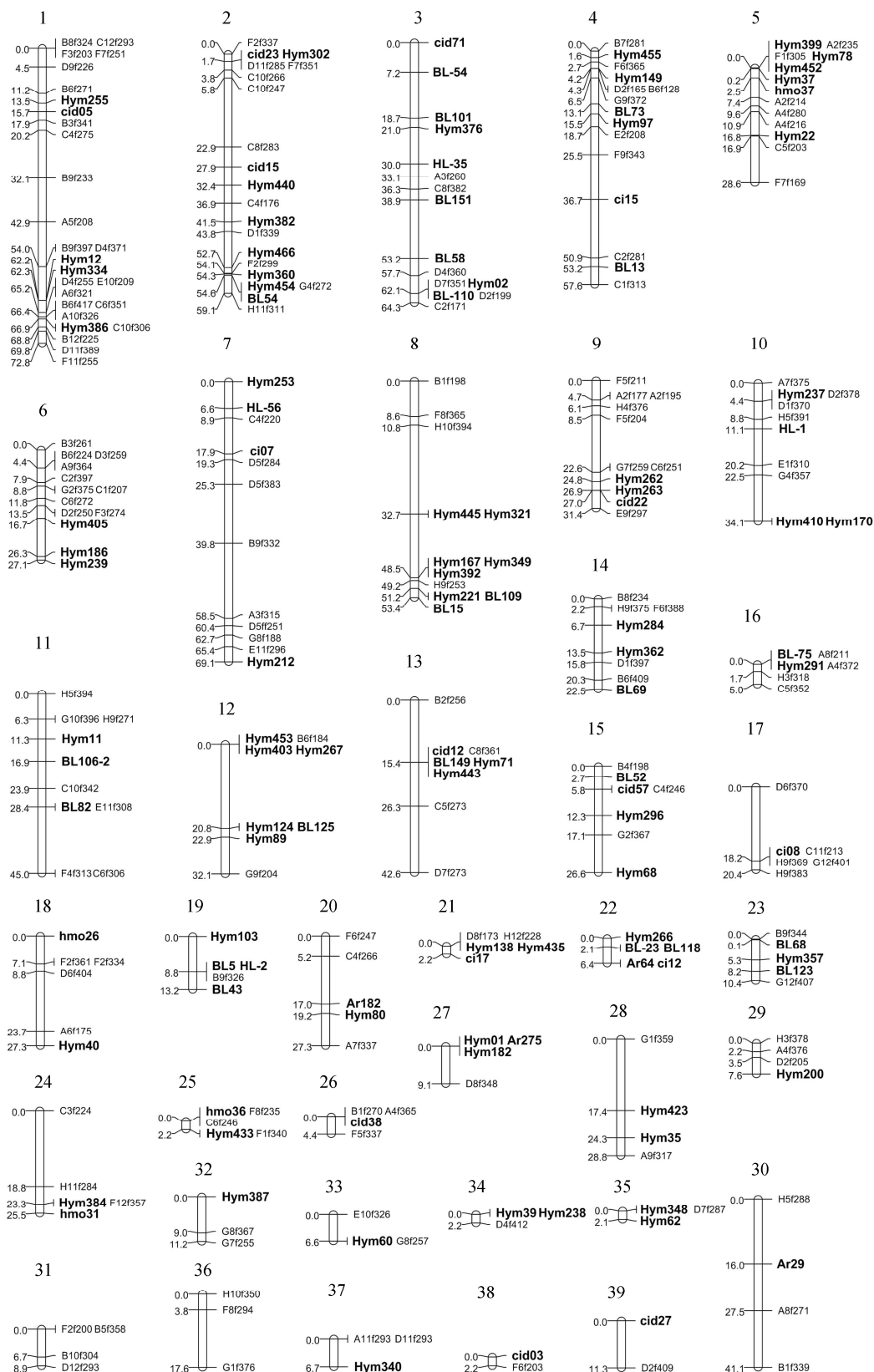


图 1 雌性鳙连锁图谱

Fig. 1 Female (bighead carp) parental linkage map

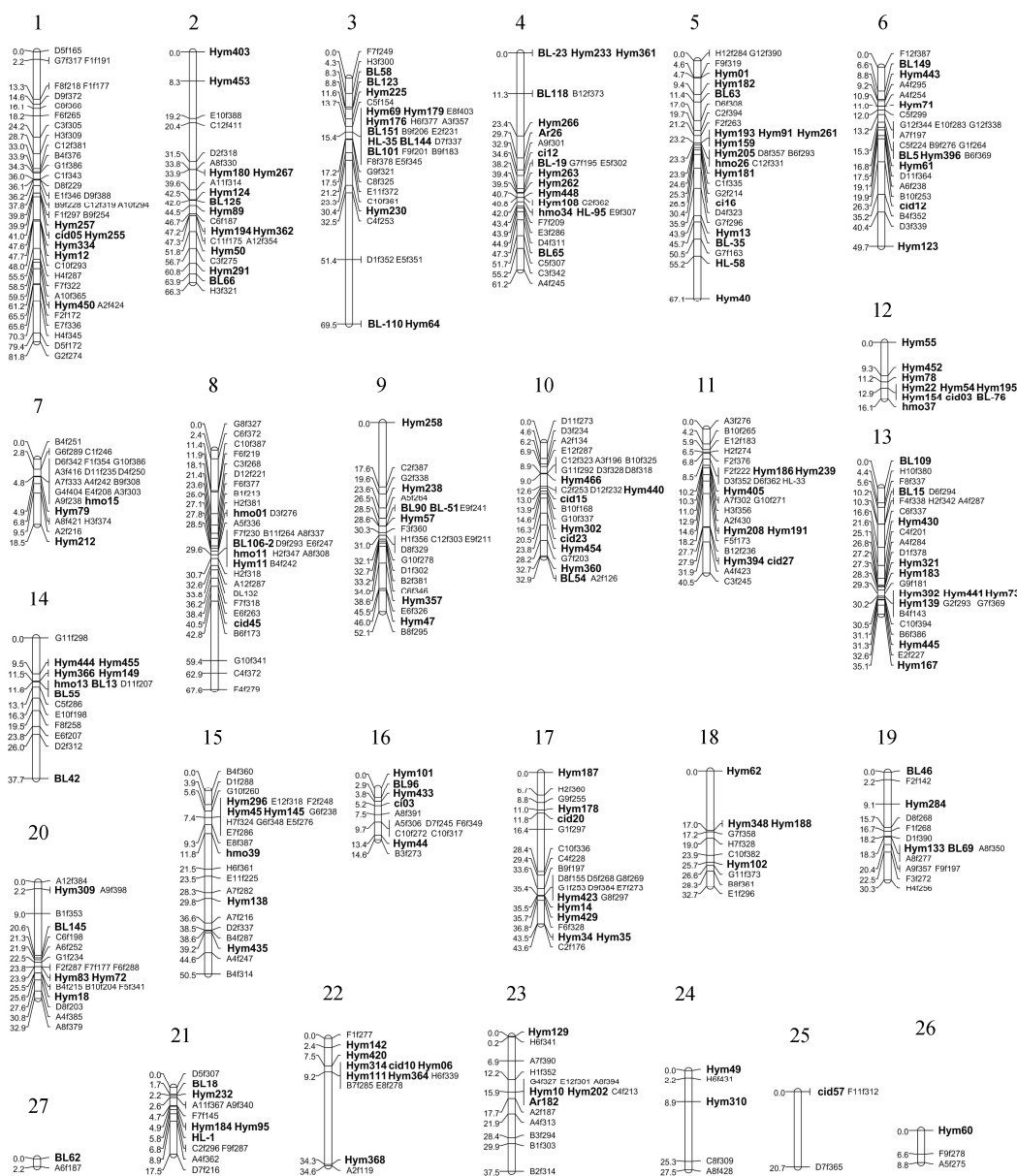


图 2 雄性鲢连锁图谱

Fig.2 Male (silver carp) parental linkage map

2.3 合适标记数量

从仅使用微卫星标记, 到使用微卫星标记和数量不等的 AFLP 标记, 构建雄性鲢连锁图谱使用了不同数目的标记。将 193 个微卫星标记与随机选取的不同数量的 AFLP (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 和 356) 结合构建了雄性亲本鲢连锁图谱。除不使用 AFLP 标记和全部 AFLP 标记的情况, 其他组合中的 AFLP 是随机从 AFLP 数据集中

选取的, 共选择 3 组。如表 4 所示, 随标记数量增加, 图谱总长度增加, 但当标记总数达到 360 左右的时候, 图谱长度增加达到一个平台期。因雌性鳙亲本的标记数量都在 300 左右, 本研究构建了 2 张雄性鲢的连锁图谱, 其中之一标记总数为 312, 与雌性鳙的 288 相当。理论上讲, 标记总数会影响图谱总长度和基因组覆盖率, 但标记间隔却不会因为标记数量变化而变化。

表 3 鲢鳙杂种亲本连锁图特征参数

Tab. 3 Characteristics of parental linkage maps of interspecific hybrids of silver carp and bighead carp

项目 item	加密后的亲本图谱 densified parental maps			已发表亲本图谱 ^[16] parental maps by Liao et al ^[16]	
	雌性(鳙) female <i>A. nobilis</i>	雄性(鲢) male <i>H. molitrix</i>	雄性(鲢)* male map <i>H. molitrix</i>	雌性(鳙) female <i>A. nobilis</i>	雄性(鲢) male <i>H. molitrix</i>
连锁群数 nos. of linkage groups	39	27	26	30	27
三联体数 nos. of triplets	6	2	1	8	2
二联体数 nos. of doubles	2	1	1	3	3
标记总数 nos. of markers	288	511	312	153	271
AFLP 标记数 nos. of AFLP markers	168	327	133	126	223
SSR 标记数 nos. of SSR markers	120	184	179	27	48
最大标记间隔/cM maximum space	21.9	25.1	22.3	26.0	23.6
平均标记间隔/cM average space	3.9	2.2	3.16	7.0	3.9
连锁群平均标记数 average nos. of markers	7.4	18.9	12	5.1	10.0
图谱总长/cM map length	965.8	1049.6	904.7	852.0	952.2
期望图谱长度/cM expected map length	1250.0	1164.9	1039.7	1209.0	1149.8
基因组覆盖率/% genome coverage	77.3	90.1	87.0	70.5	82.8

注: “*”-随机选择 AFLP 标记, 使鲢鳙种间杂种雄性鲢亲本标记数与雌性鳙标记数相近, 同时也与 Zhang 等^[17]构建的鲢鳙种内杂种亲本连锁图标记数相近.

Note: ‘ * ’, AFLP markers were randomly selected so that the number of markers of the male map was close to that of the female and the parental maps of the intraspecific hybrids of silver carp constructed by Zhang et al^[17].

表 4 不同标记数量下的雄性鲢亲本连锁图长度

Tab. 4 Total length of male (silver carp) parental linkage map length at different marker numbers assigned

使用的 SSR 标记 SSR primers	使用的 AFLP 标记 AFLP used	图谱上的标记数 makers assigned	图谱长度/cM map legth
193	0	173	503.0
193	50	221±3	662.1±22.3
193	100	268±1	804.3±20.8
193	150	315±3	892.8±19.9
193	200	363±2	957.1±19.8
193	250	410±1	954.0±10.7
193	300	458±2	1009.7±12.1
193	356	511	1049.6

2.4 共线性比较

因为雌性鳙图谱上的标记数量有限, 共线性比较是将雄性鲢的标记数量调整到 300 左右时进行的。调整后的雄性鲢图谱参数见表 3 中带星号列(图谱未显示)。图谱构建使用了 193 微卫星和

150 AFLP 标记。此时, 雌性鳙和雄性鲢图谱总长度分别为 965.8 cM 和 904.7 cM, 长度相似。亲本间共有 76 个微卫星标记是共享的, 分布在雌性鳙的 29 个连锁群和雄性鲢的 22 连锁群上。这些共享标记界定了一组共同的标记间隔。这些共同间

隔的大小分布在性别间是相似的(图 3)。共同间隔的总长度在性别间也相似(333.7 cM 对 328.7 cM; $P=0.743\ 6$, 表 5)。亲本间存在一些轻微的标记位点重排现象(图谱未显示), 这与鲢鳙种内杂种亲本连锁图相似^[17]。

共有 235 个微卫星标记在鲢鳙种间杂种中分离, 其中的 176 个也在鲢鳙种内杂种中分离。这些分离的微卫星标记绝大部分被定位在鲢鳙种间杂种(本研究)和鲢鳙种内杂种^[17]亲本连锁图上。这些相互定位的微卫星标记使笔者能进行种间、种内杂种亲本连锁图的共线性比较。种间、种内亲本共有 22 个同缘连锁群(图谱未显示)。但是, 种间杂种雌性亲本连锁群 LG22 未找到同缘连锁群, 因为该连锁群全部由 AFLP 标记构成, 来源鲢的微卫星标记虽然能扩增鳙 DNA, 但没有一个表现出多态性, 无法定位在该连锁群上。

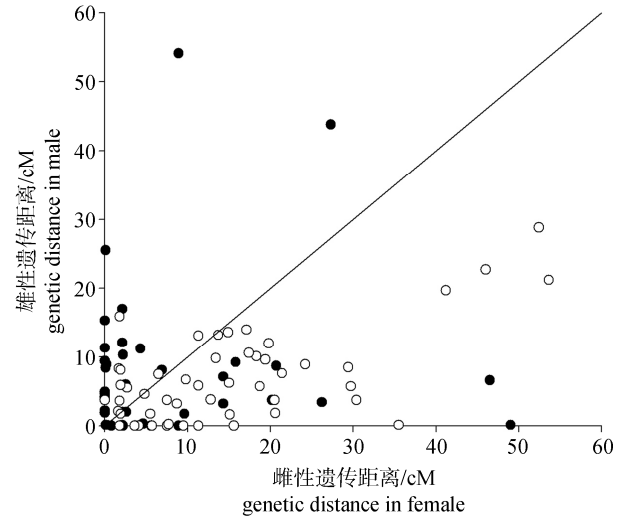


图 3 共享微卫星标记界定间隔的遗传距离在鲢鳙种内杂种亲本(○)和鲢鳙种间杂种亲本(●)间的分布
Fig. 3 Distribution of the genetic distances of microsatellites bounding common intervals in parental linkage maps of intraspecific hybrids (circles) and those in parental linkage maps of interspecific hybrids (dots)

表 5 鲢鳙种间杂种(本研究)和鲢鳙种内杂种^[17]亲本连锁图上共同标记间隔数及总长度
Tab.5 Number and total length of common intervals shared by parental linkage maps of interspecific hybrids in this study and intraspecific hybrids^[17]

共同间隔数 common intervals	雌性图谱上的长度/cm length in female	雄性图谱上的长度/cm length in male	雌性长度/雄性长度 female/male	数据来源 reference
44	333.7	328.7	1.01 (1:1)	本研究 this study
53	755.3	343.8	2.20 (1:0.45)	[17]

3 讨论

因其高多态性、共显性和可转移性等特点, 微卫星标记被广泛用于连锁图谱构建^[28]。与过去发表的连锁图谱相比^[16], 新构建的鲢鳙种间杂种亲本图谱微卫星标记数显著增加。本研究构建的图谱将可以促进 2 个物种的相关研究, 如基因资源评价、经济性状定位等(性状定位可使用性别平均图谱, 微卫星标记数量在 240 左右, 图谱未显示)。

雄性鲢亲本较雌性鳙亲本存在更多的可用 AFLP (327 : 168) 和微卫星标记 (184 : 120)。这能有机会使用不同数量的 AFLP 标记来构建雄性鲢图谱。AFLP 标记数量在 0~356 之间变化, 相隔 150 个左右。相应地, 图谱上的标记数量在 173 (纯微卫星)和 511 之间变化, 图谱总长度也从

503.0 cM 增加到 1 049.6 cM (表 4)。很明显, 高容量的 AFLP 标记可帮助改进图谱质量。相差显著地标记数量表明一种可能性, 就是鲢多样性显著高于鳙多样性, 这是一个值得深入研究的生态和进化问题。当使用所有的多态性标记时, 雄性鲢的图谱覆盖基因组 90.1%, 有 24 个连锁群的标记数量多于 3, 表明本研究获得的图谱是中等密度的图谱, 可用于经济、生理性状的 QTL 分析。但仍然有三联体和二联体存在。因此, 期望增加新的标记使连锁群数量与染色体数量相等^[7, 29]。另外, 作者也期望开发更多的 I 型(基因内)标记, 如 SNPs 和基因内微卫星等, 以方便相近物种的基因组比较作图和鱼类染色体进化关系研究。

因为有 176 个微卫星在鲢鳙杂种和鲢鳙种内杂种亲本间共享, 使比较这些亲本连锁图的共线性关系、甄别同缘连锁群成为可能。共存在 22 个

同缘连锁群,但雌性鳊的连锁群 LG22 未找到同缘连锁群,因为缺少共享的微卫星标记。所有定位在鳊种内杂种雌性亲本连锁图上的微卫星标记均来自鳊微卫星片段富集文库,只有 *cid10* 例外。这些标记都能扩增鳊种内杂种雌性亲本的 DNA,但都是纯合的,没有分离信息。这样的多态性标记数量偏分布情况再一次说明鳊的遗传多样性高于鳊。另外,还可能反映鳊之间的分化可能不在染色体结构上,而仅仅在染色体(或者染色体不同区域)变异程度上。

雌性连锁图谱的重组率总是高于雄性,没有例外。作者曾在鳊种内杂种亲本间发现,共享微卫星标记界定的共同标记区间总长度比值达到 2.20^[17],但本研究各种鳊种内杂种亲本间这一比值只有 1.01 (表 5)。如果将雌性中共同标记间隔的长度设为 1,则雌性与雄性共同标记间隔长度比对种内杂种亲本而言是 1:1,而对种内杂种亲本而言是 1:0.45。这种差异更直观地反映在共同间隔长度(遗传距离)的分布上(图 3)。简单地说,相对雌性亲本而言,鳊种内杂种雄性亲本的重组频率显著增加,图谱显著增长了。

回顾获得鳊种内杂种和鳊种内杂种的方法,可以发现种内杂种是通过混精受精(mixed milt fertilization)方法获得的,而鳊种内杂种是通过模拟自然受精获得的^[17]。单倍体选择已被认为是性别间重组率差异原因^[30-32]。笔者认为混精受精避免了精子和卵子的空间隔离,因而减弱了不同单倍型精子的选择。重组是基因组范围的基因型重新洗牌,而单倍型选择则保留历史上已经形成的和新形成的(低概率)优良单倍型。天然环境里,重组与优良单倍型保留可能处于一种平衡状态;但在混精受精过程中,所有单倍型被保留,导致优良单倍型稀释和最终消失。因此有理由相信,优良单倍型的消失是鳊养殖性能下降的原因之一。

种内杂种雄性亲本鳊重组频率的增加也可能是因为雌性亲本鳊引起的。鳊不仅形态高度相近,而且染色体组型相同^[7]。鳊杂种在天然环境里存在^[8-9],人工杂交也是成功的^[10-11]。因其高度

相似,鳊已被归入鳊属,称为 *H. nobilis*^[3,33]。在拟寄生蜂属(*Nasonia*)内,研究证明近缘种间杂交不影响基因组范围的重组率^[34]。尽管雌性鳊对重组率的影响在本研究中不能完全排除,但可以相信混精受精使优良单倍型丢失,导致养殖性能下降。用混精受精和模拟自然受精分别获得鳊或鳊种内杂种,构建连锁图谱,可以排除亲本影响,最终澄清混精受精是否导致养殖性能下降,这是本课题组正在开展的工作。

参考文献:

- [1] Oshima M. Contributions to the study of fresh water fishes of the island of Formosa [Z]. Annals Carnegie Museum, 1919, 12: 169-328.
- [2] Howes G. Anatomy and phylogeny of the Chinese major carps *Ctenopharyngodon* Steind., 1866 and *Hypophthalmichthys* Blkr., 1860 [J]. Bull Brit Muse (Natural History), Zoology, 1981, 41: 1-52.
- [3] Kolar C S, Chapman D C, Courtenay Jr W R, et al. Asian carps of the genus *Hypophthalmichthys* (Pisces, Cyprinidae): a biological synopsis and environmental risk assessment [R]. Report to US Fish and Wildlife Service, 2005: 94400-94403.
- [4] 李思忠, 方芳. 鳊、鳊、青、草鱼地理分布的研究 [J]. 动物学报, 1990, 36 (3): 244-250.
- [5] 钟麟, 李有广, 张松涛, 等. 家鱼生物学人工繁殖 [M]. 北京: 科学出版社, 1965.
- [6] Hulata G. A review of genetic improvement of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) and other cyprinids by crossbreeding, hybridization and selection [J]. Aquaculture, 1995, 129: 143-155.
- [7] de Almeida-Toledo L F, Bigoni A P V, Bernardino G, et al. Chromosomal location of Nors and C bands in F₁ hybrids of bighead carp and silver carp reared in Brazil [J]. Aquaculture, 1995, 135: 277-284.
- [8] Verigin B V, Makeeva A P, Shubnikova N G. A case of natural hybridization between *Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis* (Pisces, Cyprinidae) [J]. Zoologicheskii Zhurnal, 1979, 58:190-196 (in Russian with English abstract).
- [9] Mia M Y, Taggart J B, Gilmour A E, et al. Detection of hybridization between Chinese carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) in hatchery broodstock in Bangladesh, using DNA microsatellite loci [J]. Aquaculture, 2005, 247: 267-273.
- [10] Green B W, Smitherman R O. Relative growth, survival and harvestability of bighead carp, silver carp, and their

- reciprocal hybrids [J]. Aquaculture, 1984, 37: 87–95.
- [11] Wu C J. Retrospects and prospects of fish genetics and breeding research in China [J]. Aquaculture, 1990, 85: 61–68.
- [12] Issa M A, Horvath L, Kosba M A, et al. A note on the survival, growth, feed conversion and some morphological characters of the reciprocal hybrids of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and bighead carp (*Aristichthys nobilis* Rich.) raised in polyculture [J]. Aquacult Hung, 1986, 5: 7–14.
- [13] Bartley D M, Rana K, Immink A J. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries [J]. Rev Fish Biol Fish, 2000, 10: 325–337.
- [14] Krasnai Z L. Interspecific hybridization of warm water finfish [A]. Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture (Tiews K. ed) [M]. FAO, EIFAC and ICES, Rome, Italy and Copenhagen, Denmark, 1987: 35–45.
- [15] Brummett R E, Smitherman R O, Dunham R A. Isozyme expression in bighead carp, silver carp and their reciprocal hybrids [J]. Aquaculture, 1988, 70: 21–28.
- [16] Liao M, Zhang L, Yang G, et al. Development of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and bighead carp (*Aristichthys nobilis*) genetic maps using microsatellite and AFLP markers and a pseudo-testcross strategy [J]. Animal Genetics, 2007, 38: 364–370.
- [17] Zhang L, Yang G, Guo S, et al. Construction of a genetic linkage map for silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. Animal Genetics, 2010, 41: 523–530.
- [18] Guo S, Zou G, Yang G. Development of microsatellite DNA markers of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and their cross-species application in black carp (*Mylopharyngodon piceus*) [J]. Conservation Genetics, 2009, 10: 1515–1519.
- [19] 鲁翠云, 孙效文, 曹洁, 等. 磁珠富集法筛选白鲢的微卫星分子标记 [J]. 农业生物技术学报, 2005, 13 (6): 772–776.
- [20] Gheyas A A, Cairney M, Gilmour A E, et al. Characterization of microsatellite loci in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), and cross-amplification in other cyprinid species [J]. Molec Ecol Notes, 2006, 6: 656–659.
- [21] Liao M, Yang G, Wang X, et al. Development of microsatellite DNA markers of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and their cross-species application in bighead carp (*Aristichthys nobilis*) [J]. Molec Ecol Notes, 2007, 7: 95–99.
- [22] 鲁翠云, 孙效文, 梁利群. 鲢鱼微卫星分子标记的筛选[J]. 中国水产科学, 2005, 12 (2): 192–196.
- [23] Cheng L, Liu L, Yu X, et al. Sixteen polymorphic microsatellites in bighead carp (*Aristichthys nobilis*) and cross-amplification in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. Molec Ecol Res, 2008, 8: 656–658.
- [24] Li J L, Zhu Z Y, Wang G, et al. Isolation and characterization of 17 polymorphic microsatellites in grass carp [J]. Molec Ecol Notes, 2007, 7: 1114–1116.
- [25] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucl Acids Res, 1995, 23: 4407–4414.
- [26] van Ooijen J W, Voorrips R E. JoinMap®3.0, software for the calculation of genetic linkage maps [Z]. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands, 2001.
- [27] Voorrips, R.E. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs [J]. J Hered, 2002, 93: 77–78.
- [28] Rafalski J A, Vogel J M, Morgante M, et al. Generating and using DNA markers in plants [A]. Nonmammalian Genome Analysis. A Practical Guide (Birren B, Lai E eds.) [M]. San Diego: Academic Press. 1996: 75–134.
- [29] 姚红, 张四明, 曾勇. 鲢染色体图像电脑自动核型分析 [J]. 中国水产科学, 1994, 1: 18–25.
- [30] Trivers R. Sex differences in rates of recombination and sexual selection [A]. The evolution of sex (Michod R E, Levin B R eds.) [M]. Massachusetts: Sunderland, 1988: 270–286.
- [31] Lenormand T. The evolution of sex dimorphism in recombination [J]. Genetics, 2003, 163: 811.
- [32] Lenormand T, Dutheil J. Recombination difference between sexes: A role for haploid selection [J]. PLoS Biol, 2005, 3: 396–403.
- [33] Schofield P J, Williams J D, Nico L G, et al. Foreign Nonindigenous Carps and Minnows (Cyprinidae) in the United States: A Guide to Their Identification, Distribution, and Biology [R]. United States Geological Survey, 2005.
- [34] Beukeboom L W, Niehuis O, Pannebakker B A, et al. A comparison of recombination frequencies in intraspecific versus interspecific mapping populations of *Nasonia* [J]. Heredity, 2010, 104: 302–309.

Densification and syntenic comparison of parental linkage maps in interspecific hybrids of silver carp and bighead carp

ZHANG Linan¹, YANG Guanpin¹, ZOU Guiwei², WEI Qiwei², WANG Jun¹, ZHANG Peng¹, LIU Xin¹, YANG Jing¹

1. Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding of Chinese Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China

Abstract: Hybrids of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and bighead carp (*Aristichthys nobilis*) are widely accepted in aquaculture due to their better culturing performance than their parents. In order to facilitate diverse studies of the two species, such as genetic resource management and mapping of economic traits, we have constructed the parental linkage maps of the interspecific hybrids previously; however, the maps contained mainly AFLPs. In order to increase the quality of the parental maps and their applicability, they were densified with newly developed microsatellite markers in this study. For the bighead carp (female parent) and the silver carp (male parent) map, the number of assigned markers increased from 153 to 288 (including 93 new microsatellites) and from 271 to 511 (including 136 new microsatellites), respectively. The total length of the female map increased from 852.0 to 965.8 cM, while the total length of the male map increased from 952.2 to 1 049.6 cM. Syntenic comparison between bighead carp map and silver carp maps identified 22 homologous linkage groups, among them slight rearrangement of markers was found. The total length of the common intervals bounded by 76 parent-shared microsatellites was almost the same (female : male=1 : 1), which was significantly different from that of the intraspecific hybrids of silver carp (female:male=1 : 0.45^[17]). In comparison with the mimic natural fertilization (intraspecific hybrids^[17]), the mixed milt fertilization (interspecific hybrids, this study) caused the obvious increase of genome wide recombination rate. The hybridization of silver carp and bighead carp should not influence the recombination rate of either parent; they are morphologically similar to each other and interfertile and have identical karyotypes. We believe that mixed milt fertilization avoided the competition among sperms of an ejaculation, enhancing genome wide recombination accordingly. This fry raising method is not favorable to the reservation of the elite haplotypes either newly formed or previously selected, being one of the main reasons causing the depletion of culturing performance of these two species. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 256–266]

Key words: silver carp; *Hypophthalmichthys molitrix*; bighead carp; *Aristichthys nobilis*; microsatellite; linkage map; syntenic comparison

Corresponding author: YANG Guanpin. E-mail: yguanpin@mail.ouc.edu.cn