

曹景龙,王卫民.团头鲂高密度遗传连锁图谱的建立及性别 QTL 定位[J].华中农业大学学报,2021,40(2):188-196.

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.02.020

团头鲂高密度遗传连锁图谱的建立及性别 QTL 定位

曹景龙,王卫民

华中农业大学水产学院/农业动物遗传育种与繁育教育部重点实验室/
农业农村部淡水生物繁育重点实验室,武汉 430070

摘要 以团头鲂自交 197 个 F₁ 个体为作图群体,通过 RAD-Seq 测序挖掘 SNP 分子标记,构建团头鲂最新一代高质量、高密度的遗传连锁图谱,并对性别相关 QTL 进行定位。结果显示,该遗传连锁图谱包括 10 795 个 SNP 标记,24 个连锁群,图谱全长为 2 578.54 cM,平均标记间隔为 0.24 cM。使用 MapQTL6.0 软件的多 QTL 区间作图法,在已构建的连锁图谱上对性别 QTL 进行定位。取 LOD 值为 3.0 为 QTL 存在的阈值,共定位出 4 个性别相关 QTL,分别位于 LG8、LG12、LG15、LG18 号连锁群上,单个 QTL 位点的 LOD 值范围为 3.18~4.17,可解释表型变异范围为 7.7%~10.0%。在团头鲂基因组内筛选 QTL 区间内 SNP 标记附近的基因,通过基因功能注释分析,筛选到一个参与生殖过程的关键候选基因 *DCTN2*。

关键词 团头鲂;遗传连锁图谱;QTL 定位;分子标记辅助选择育种;性别控制育种;单性化养殖;性别功能基因定位

中图分类号 S 917;Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)02-0188-09

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*),俗称武昌鱼,隶属鲤形目(Cypriniformes)鲤科(Cyprinidae)鲂属(*Megalobrama*),是我国特有的草食性养殖经济鱼类。目前已有 2 个团头鲂新品种在全国推广应用,年总产量近 80 t。由于团头鲂生长快,肉质细嫩,营养价值高,深受广大消费者的喜爱。然而团头鲂自然分布非常狭窄,主要分布在长江中下游及其附属水体,其遗传多样性低,近亲繁殖极易引起经济性状衰退^[1]。各地团头鲂养殖群体先后出现了生长速度减慢、性成熟提早、抗逆性能降低、体型变薄和肉质品位下降等种质衰退现象,故开展团头鲂种质资源和遗传改良相关研究势在必行。

鱼类的生长和生殖关系密切^[2],许多重要的经济性状都在雌雄间表现出明显的差异,了解此类鱼的性别决定机制对于研究其性别控制育种至关重要。2015 年梅洁^[3]总结出 14 种养殖鱼类雌性个体明显大于雄性,例如:半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)^[4]、鲤(*Cyprinus carpio*)、褐牙鲂(*Paralichthys olivaceus*)^[5]和泥鳅(*Misgurnus anguill-*

caudatus)^[6]、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[7]等。有 11 种养殖鱼类雄性个体显著大于雌性,如黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[8]等。在传统的养殖模式中,部分鱼类雌雄个体生长速度不同,雌性较雄性个体性成熟早,进行繁育活动消耗大量的能量,导致其生长速度减缓以及影响群体均匀度^[9]。通过调控此类鱼类性别比例,实现单性化养殖,可避免鱼类生长过程中因生殖活动而消耗能量,使吸收的营养物质主要在肌肉中沉积,提高鱼体生长速度、肉质和经济价值^[10]。人工养殖条件下团头鲂 1~2 a 就可以达到性成熟,但是雌性团头鲂因为怀卵导致个体生长速度下降,抗应激能力下降,活鱼运输容易死亡。因此,了解团头鲂性别决定机制以及性别相关 QTL 的定位对团头鲂的性别控制育种具有重要意义。

性别控制育种需要准确判别亲本的遗传性别,但对于团头鲂群体,其两性的外部形态差异不明显^[11],也没有异形性染色体^[12-13],依靠传统方法无法根据外部形态或组织学观察鉴定其遗传性别,甚

收稿日期:2020-06-13

基金项目:国家自然科学基金项目(31772901)

曹景龙.E-mail:847689213@qq.com

通信作者:王卫民, E-mail:wangwm@mail.hzau.edu.cn

至无法准确地判别其表型(生理)性别,所以需要开发团头鲂的性别相关的分子标记,用以辅助性别控制育种。水产养殖动物的多数重要经济性状都是数量性状,不仅由多个基因控制,且易受环境等因素的影响,例如性别、生长速度、肉质、抗病抗逆以及饲料的利用率等^[14]。挖掘数量性状位点(quantitative trait locus, QTL)的最终目的是利用与目标性状紧密连锁的分子标记进行分子标记辅助选择育种(marker-assisted selection, MAS),从而促进对性状的遗传改良^[15]。而要快速获得与性状相关的 QTL 位点,首先要构建高密度、高质量,且能覆盖整个基因组的遗传连锁图谱。

自1997年美国农业部启动5种水产养殖动物基因组计划以来,水产养殖动物的基因组研究取得快速进展,构建遗传连锁图谱的水产动物种类和图谱密度也在不断增加^[16]。在2014年时就已经有40多个水产养殖物种构建了遗传连锁图谱,并绘制出超过20个水产养殖动物的重要经济性状的 QTL 位置^[17]。近几年,更多的水产养殖动物以及更加精确的遗传连锁图谱也陆续被公布^[18-21]。而团头鲂遗传连锁图谱的研究起步较晚,发展缓慢。2000年,林红^[22]采取互为测交的远缘杂交作图策略及 RAPD 标记第一次构建了团头鲂的遗传图谱,该图谱包含14个遗传标记和4个连锁群。2002年葛芹玉^[23]在林红研究的基础上,采用远缘杂交和单配子分型技术结合 RAPD 构建了团头鲂的遗传图谱,共获得6个连锁群,由21个标记组成。2017年, Wan 等^[24]构建出基于 SNPs 分子标记的团头鲂的高密度遗传连锁图谱,14 648个高质量的 SNP 标记被成功分配至24个连锁群。

本研究采用拟测交策略构建作图群体,通过简化基因组测序并参考笔者所在实验室自行组装的团头鲂第3代全基因组开发 SNP 标记,构建出团头鲂新一代高质量、高密度遗传连锁图谱,对性别性状进行了 QTL 定位,并在 QTL 的置信区间中筛选到一个性别相关的候选基因,以期对团头鲂性别分子标记辅助育种以及单性化养殖奠定基础,从而进一步推动团头鲂的遗传改良工作。

1 材料与方法

1.1 作图群体

试验选择团头鲂“华海1号”^[1]正常生长性成熟雌雄个体,采用拟测交策略构建 F₁ 代为作图群体,

本研究所有动物和实验均按照国家科学技术委员会的《实验动物管理条例》进行。于2016年在华中农业大学水产学院教学基地进行团头鲂的人工繁育,剪取父母本鳍条样本,分装于冻存管中用液氮速冻,24 h后转至-80℃超低温冰箱长期保存备用。繁殖后子代在此基地培育。子代1龄时,随机抽取197尾子代个体,解剖检测并记录其生理性别,剪取个体鳍条,用95%乙醇固定后,于-20℃保存用于 DNA 提取。

1.2 DNA 提取

采用醋酸铵法提取 DNA 样本,方法步骤如下:

(1)剪取适当鳍条样本,剪碎并放置于 600 μL 的组织裂解液中;(2)加入 6 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL),混匀;(3)放于 65℃水浴锅中水浴 2~4 h,每隔 15 min 摇晃 1 次,或 56℃过夜;(4)组织裂解后冷却至室温,加入 200 μL 醋酸铵 (7.5 mol/L),混匀并放置冰上 5 min;(5)4℃,12 000 r/min,离心 10 min。取上清液 500 μL 至干净的 1.5 mL 离心管;(6)4℃,12 000 r/min,离心 10 min,转移上清液于新离心管;(7)加入等体积约 500 μL 的异丙醇,轻轻摇动可见白色丝状沉淀;(8)4℃,12 000 r/min,离心 10 min,弃上清;(9)加入 1 mL 70%乙醇,轻摇混匀,4℃,12 000 r/min,离心 10 min,弃上清;(10)重复步骤(9),弃上清,干燥 15 min;(11)加入 50 μL 或 100 μL ddH₂O,溶解 DNA;(12)使用 Nandrop2000 (Thermoscientific, 美国)检测 DNA 的浓度和质量,并用 1%琼脂糖凝胶电泳检测完整性。提取合格的样本 DNA 送至华大公司测序建库。

1.3 文库建立及群体 SNP 的筛选

本研究采用 RAD 测序方法,使用 Hiseq2500 (华大基因,中国)对 199 个样本的 DNA 文库进行测序。建库成功样本包含 2 个亲本及 197 F₁ 子代个体。以笔者所在实验室完成的第 3 代团头鲂基因组为参考挖掘 SNP 标记。首先对原始数据进行过滤处理,去除接头污染和低质量 reads,得到高质量的 Clean data 数据用于后续的比对分析。过滤采用华大自主研发的 Soapnuke (华大基因,中国)软件进行,具体过滤条件如下:(1)去除含有 adapter 的 reads;(2)去除低质量 reads(碱基质量值小于等于 15 的碱基占 10%);(3)去除含 N 碱基的比例大于 10%的 reads。然后将过滤到的 Clean data 按照 reads 前段 4~8 bp 的 barcode 序列信息拆分为每个

文库数据,并去除 barcode 碱基,最后统计每个样本的数据量。使用短序列比对软件 BWA (Version: 0.7.12-r1039)的 mem 算法将 Clean reads 比对到参考基因组上,最后将每个样本数据经过过滤和校正后,采用 GATK 3.3.0 和 SAMtools 2.6.2 两个软件对群体的 SNP 进行变异检测,挖掘高质量 SNP 标记。

1.4 作图 SNP 的筛选及注释

接下来对适合构图的分子标记进行筛选。SNP 标记的基因型编码根据遗传学通用的二等位编码规则,可分为 8 种分离模式(aa×bb、ab×cc、ab×cd、cc×ab、ef×eg、hk×hk、lm×ll、nn×np)。其中 aa×bb 仅适用于近交群体(如 RIL、DH、F₂ 等),其余标记适用于杂交群体(如 CP)^[25]。本研究作图群体属于 CP 群体,根据群体类型,对开发的标记进行如下筛选:

1) 亲本筛选:首先过滤掉亲本中有缺失的位点,接着过滤掉亲本都为纯合的位点。

2) 子代筛选:对于子代中的位点其 GQ(genotype quality) < 20 的,标记为缺失;若子代为纯合位点,其深度 < 4 的标记为缺失;若子代为杂合位点,其深度 < 5 的以及次等位碱基深度 < 2 的都标记为缺失。

3) 缺失率筛选:将材料与方法“1.4 2)”中得到的结果,进行缺失率筛选,将缺失率 > 10% 的位点过滤,并且在 1 kb 的物理距离上只允许有 1 个 marker 存在。

4) 卡方筛选:根据 CP 群体各类型标记的分离情况,我们用卡方检验过滤偏分离标记,在 $\alpha=0.01$ 水平进行卡方检验,最终获得的标记用于遗传图谱的构建。

1.5 遗传图谱的构建

将上述过滤后的 SNP 标记,导入 LepMap2.0 软件进行遗传图谱的构建。首先采用该软件 Filtering 功能对标记进行进一步过滤,获得可用的作图

标记。再采用该软件的 Separate Chromosomes 功能进行连锁群的划分,将 LOD 值设置为 10 时,可将剩余标记分配至不同连锁群,最后使用 Order Markers 功能计算各个连锁群遗传距离,最终获得团头鲂的遗传图谱。

1.6 QTL 定位及候选基因的筛选

根据第 F₁ 子代雌雄性状的统计,结合得到的团头鲂高密度遗传图谱,采用 MapQTL6.0 分析软件的多 QTL 区间作图法(multi-QTL mapping, MQM)对性别性状进行 QTL 定位。具体方法为:

(1) 按照 CP 群体类型分别整理性状数据、连锁群数据、样品基因型数据成 MapQTL6.0 要求的格式,导入软件。(2) 对性别表型进行置换检测(permutation test)检验,确定各表型在每个连锁群上的 LOD 阈值。(3) 选择 MQM mapping 分析方法。(4) 根据显著性阈值,对结果进行过滤,筛选出跟性状显著关联的位点。(5) 以 LOD 值 3.0 作为初始阈值,确定 QTL 数目及其在连锁群上的位置。

QTL 命名方法按照 QTL+连锁群+编号命名,其中 QTL 以大写 Q 表示。统计 QTL 置信区间内包含的 SNP 标记,参考团头鲂第 3 代全基因组,对标记上下游 500 kb 进行基因筛选,并在 NR 数据库内完成基因功能注释。

2 结果与分析

2.1 原始数据的产出及 SNP 的筛选

研究共获得 1 863.65 Mb Reads 数据,测序平均 Q20 为 94.26%,平均 Q30 为 89.69%,平均 GC 含量为 37.51%,样本 GC 分布正常。碱基识别结果显示,各样本 Q30(即碱基测序准确率为 99.9% 以上)比例均在 90% 左右;利用碱基类型分布分析调查了 AT、GC 分离情况,结果显示父本、母本和子代的 GC 含量分别为 37.61%、37.62% 和 37.51% (表 1)。

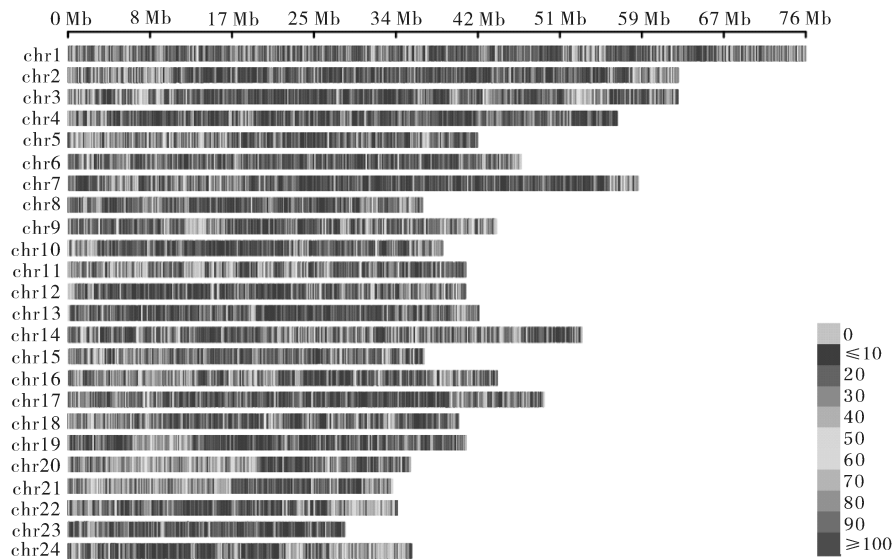
表 1 各样本测序数据统计

Table 1 Summary of sequencing information

样本 Sample ID	测序 reads 数/Mb Reads	碱基数目/Mb Bases	GC 含量/% GC	Q20/% Q20	Q30/% Q30
父本♂	28.84	3 496.58	37.61	94.59	90.32
母本♀	31.24	3 818.99	37.62	94.70	90.53
F ₁ 子代 Offspring	9.11	1 109.96	37.51	94.26	89.69

将得到的 Clean data 与团头鲂参考基因组序列进行比对,每个样本数据经过过滤和校正后,采用 GATK3.3.0 和 SAMtools 2.6.2 两个软件对群体的

SNP 进行变异检测,共获得高质量 SNP 标记 324 733 个。SNP 在基因组各染色体上的密度分布见图 1。



颜色梯度表示 0.1 Mb 内 SNP 的数量 The color gradient represents the number of SNPs within 0.1 MB window size.

图 1 SNP 在基因组各染色体上的密度

Fig.1 The density of SNPs on each chromosome of the genome

2.2 作图 SNP 的筛选

群体变异检测共得到 SNP 位点 324 733 个, 根据通用的二等位基因编码规则, 对所得标记进行分型, 本研究家系属于 CP 作图群体, 选择 3 种亲本的多态性位点, 使其对应 3 类基因型。雄性杂合与雌性纯合编码基因型为 $lm \times ll$, 雄性纯合和雌性杂合编码基因型 $nn \times np$, 雄性、雌性均杂合编码基因型为 $hk \times hk$ 。通过亲本筛选、子代筛选、缺失率筛选以及卡方筛选, 最终获得构图标记 10 809 个, 这些 SNP 中, 转换标记有 6 328 个, 占 58.54%; 颠换标记有 4 481 个, 占 41.46%, 转换颠换之比为 1.41 (表 2)。

表 2 SNP 标记类型与分类

Table 2 SNP marker types and classification

标记类型 Type	SNP 数量 SNPs number	比例/% Percentage	
转换 Transition	A<_>G C<_>T	3 144 3 184	29.09 29.46
颠换 Transversion	G<_>T	1 248	11.55
	A<_>C	1 205	11.15
	G<_>C	594	5.50
	A<_>T	1 434	13.26

2.3 遗传图谱的构建

以筛选到的 10 809 个 SNP 标记为基础, 采用 LepMap2.0 软件的 Filtering 功能对所得 SNP 标记进行进一步过滤, 最终共获得 10 795 个作图标记, 被分配至 24 个连锁群, 与团头鲂单倍体染色体数目一致。该遗传连锁图谱全长 2 578.45 cM, 包含 10 795 个 SNP 标记, 包括 3 703 个雌性特异标记、

3 947 个雄性特异标记和 3 145 个共有标记, 可整合为 4 034 个簇 (Bin Marker), 平均遗传距离为 0.24 cM (表 3)。

24 个连锁群长度介于 61.702 cM (LG24) 至 165.672 cM (LG14) 之间, 平均长度为 107.439 cM, 标记间平均遗传间隔介于 0.14 cM (LG7) 至 0.37 cM (LG14) 之间。其中 LG1 上分布了最多的 SNP 标记 (720 个), 该连锁群长度为 158.107 cM, 相邻标记间平均遗传距离仅为 0.22 cM; 而 LG24 上分布了最少的 SNP 标记 (216 个), 其长度为 61.702 cM, 相邻标记间平均遗传距离为 0.29 cM。24 条连锁群的 Max Gap 长度介于 2.546 cM (LG7) 至 54.066 cM (LG14) 之间, 而每个连锁群中 Gap < 5 cM 的平均比例为 99.49% (介于 98.12% 至 100.00% 之间)。使用 JoinMap 4.0 软件绘制遗传连锁图谱 (图 2)。

2.4 性别相关 QTL 定位结果

利用软件 MapQTL6.0 对团头鲂性别相关 QTL 进行定位。取 LOD 显著阈值 3.0 进行分析, 取 97% 的置信区间, 即 LOD 峰值降低 1 时对应的区域。这样共检测到 4 个 QTL。表 4 统计了团头鲂性别相关 QTL 的连锁群位置、置信区间大小、区间内 SNP 标记名称及数目、各标记的遗传位置、LOD 值和表型解释率等信息。4 个性别相关 QTL 分布于 LG8、LG13、LG15、LG18 连锁群上, 置信区间内共包含 14 个 SNP 标记, 单个 SNP 位点的 LOD 值介于 3.18~4.17, 解释表型变异介于 5.1%~

表 3 遗传连锁图谱信息统计表

Table 3 Information of genetic linkage map

连锁群 LG ID	SNP 标记数量 SNP marker	簇数量 Binmarker	全长/cM Total distance	标记平均间隔/cM Marker interval	间隔<5 cM/% Gap <5 cM	最大间隔/cM Max gap
LG1	720	259	158.107	0.22	99.22	8.70
LG2	649	180	118.151	0.18	99.44	5.25
LG3	600	228	134.101	0.22	100.00	4.06
LG4	580	237	161.894	0.28	99.58	7.59
LG5	564	233	136.288	0.24	100.00	3.36
LG6	548	202	137.138	0.25	100.00	4.44
LG7	545	156	74.894	0.14	100.00	2.55
LG8	537	161	122.812	0.23	98.12	15.00
LG9	517	174	124.973	0.24	98.27	11.10
LG10	496	156	87.543	0.18	100.00	4.15
LG11	453	153	93.033	0.21	100.00	3.71
LG12	453	188	110.027	0.24	100.00	3.97
LG13	450	194	129.087	0.29	99.48	10.47
LG14	448	193	165.672	0.37	99.48	54.07
LG15	441	148	88.522	0.20	100.00	3.95
LG16	429	155	100.476	0.23	100.00	3.37
LG17	359	140	101.430	0.28	98.56	9.20
LG18	347	138	72.531	0.21	100.00	2.56
LG19	321	124	80.671	0.25	98.37	7.19
LG20	310	119	85.804	0.28	99.15	5.04
LG21	293	143	76.950	0.26	100.00	4.98
LG22	291	145	82.288	0.28	100.00	4.28
LG23	228	111	74.443	0.33	99.09	9.02
LG24	216	97	61.702	0.29	98.96	6.49
总 Total	10 795	4 034	2 578.540	—	—	—
平均 Average	449.79	168.08	107.440	0.24	99.49	8.10

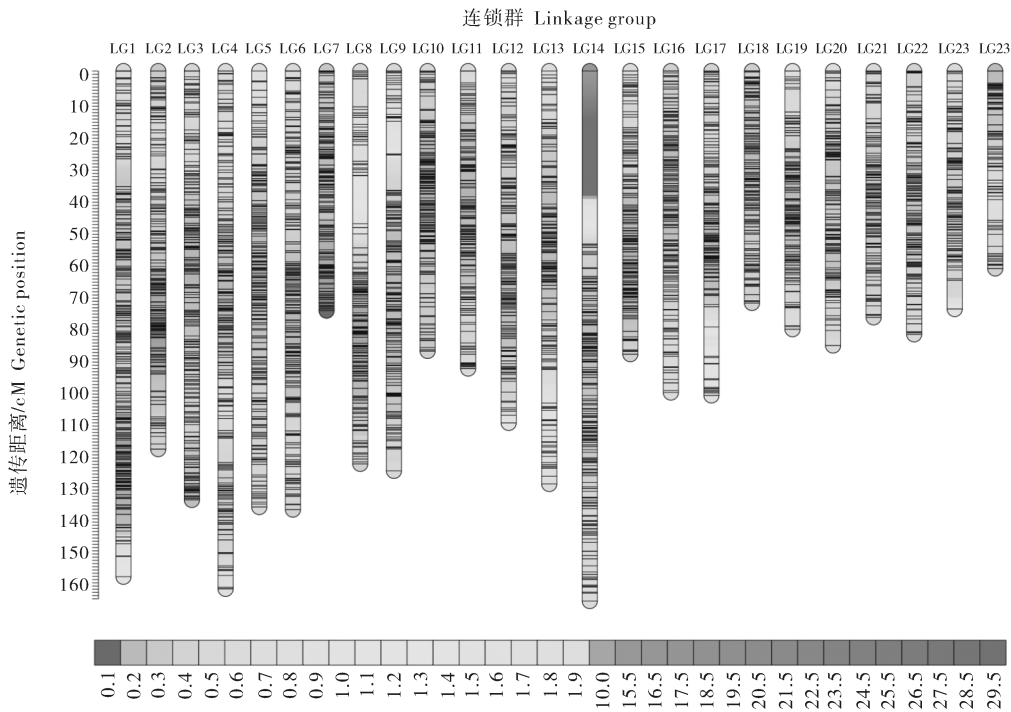


图 2 团头鲂高密度遗传连锁图谱

Fig.2 The high-density genetic linkage map of *M. amblycephala*

表 4 团头鲂性别 QTL 定位结果
Table 4 Sex related QTL mapping results in *M. amblycephala*

QTL	连锁群 LG ID	置信区间/cM Confidence interval	基因数 Gene	标记数目 SNP	标记名称 SNP name	位置/cM Position	LOD	解释表型变异/% Variation
Q-8-1	LG8	82.20~83.01	132	3	chr11_18782772	82.20	3.18	7.7
					chr11_21723120	82.20	3.19	7.7
					chr11_21532086	82.54	4.17	10.0
					chr8_59666	4.98	2.82	6.9
					chr8_146487	4.98	2.95	7.2
					chr8_3170653	5.48	2.74	6.7
Q-13-1	LG13	3.95~7.35	31	9	chr8_1887121	5.58	2.71	6.6
					chr8_1540105	5.61	3.18	7.7
					chr8_3076586	5.96	2.96	7.2
					chr8_9903320	7.33	2.1	5.1
					chr8_198262	7.34	2.77	6.7
					chr8_65049	7.34	2.79	6.8
Q-15-1	LG15	53.29~53.42	22	1	chr12_32700085	53.30	3.44	8.3
Q-18-1	LG18	72.00~72.22	68	1	chr18_25443726	72.00	3.27	7.9

10%。根据 QTL 的定位信息,使用 Map Chart2.2 软件绘制了团头鲂性别相关 QTL 在连锁群上相对位置图(图 3)。

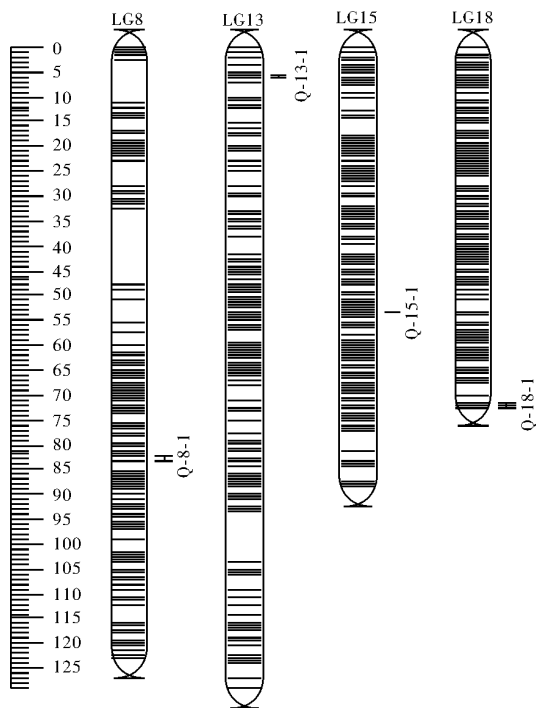


图 3 性别 QTL 在遗传连锁图谱上的位置

Fig.3 The position of gender QTL on the genetic linkage map

2.5 性别相关候选基因的筛选

参考团头鲂的第 3 代全基因组信息,对 QTL 置信区间进行基因查找,共得到 253 个基因(Q-8-1 区间包含 132 个基因、Q-13-1 区间包含 31 个基因、Q-15-1 区间包含 22 个基因、Q-18-1 区间包含 68 个基因),在 NR 数据库内完成基因功能注释。通过基

因功能分析,发现 1 个参与生殖过程的基因,该基因位于 Q-13-1 号 QTL 区间内,chr8-3076586 号 SNP 位点附近,编号为 TTF29452。将此基因序列在 NCBI 数据库进行比对,注释到了基因 *DCTN2*。*DCTN2* 全称为动力蛋白激活蛋白 2(p50)(dynactin 2 (p50)),参与微管形成,有丝分裂和细胞增殖以及细胞极性的建立和维持。此基因在斑马鱼、鲫和金线鲃(*Sinocyclocheilus*)等水产动物基因组中均有发现。此基因很可能是与团头鲂性别决定密切相关的关键候选基因。TTF29452 基因序列信息见图 4。

3 讨论

遗传图谱被广泛地应用于图位克隆、目标基因定位、比较基因组和分子标记辅助育种等研究中,高密度、高质量的遗传图谱的构建是在基因组水平进行遗传学研究的重要基础。团头鲂遗传图谱的研究较少,已发表的图谱属于中低密度的遗传图谱,标记数目少,分辨率低,无法进行 QTL 的精准定位、分子标记的筛选和目标基因的定位。

遗传图谱的构建受到亲本的多态性、作图群体和作图标记的影响。团头鲂达到性成熟需要 1~2 a 时间,世代周期长,建立近交群体难度较大。所以本研究在大规模的团头鲂养殖群体中,挑选性成熟度较好的雌雄个体作为亲本,在保证亲本的基因信息多态性的同时,通过拟测交法构建 F_1 子代群体为作图群体,作图群体构建简单快速,满足水产动物遗传图谱构建的要求。

简化基因组测序能大幅降低基因组的复杂度,

```

1   GTCTCGCAGGAGGAGCTGTGCAGCGACAGCGTGGAGCGGATCGTCGTCA
51  TCCCAACGCTGCTTACGACAAGTTCAAAGACAAAACGTCAGCGCCAAGG
101 GTTTGGATTCTCGGACCGCATCAGTAAGAATCGCCGGGTGGGCTACGAG
151 TCTGGAGAATACGAGCTTTTAGCCGAGGGTTGTGGCGTGAAGGAACTCC
201 TCAGCAGAAATATCAGCGGCTGGTTAACGAGATTCACGAGCTCTGCCAGG
251 ATGTGGAACGCATTCAGGTCAGCACGAAAGGAGAGCAGTGGCGGAGGAGCG
301 TTGACTCCGGTGGCTTTGGCTCAGCAGGCGGCGCAGCTCAAACAGCAGCT
351 GGTTTCTGCTCACCTGGACTCTCTGCTCGGACCCAACGCCACATCAACC
401 TCACCGACCCTGATGGAGCTCTTGCCAAGCGGTTGTTGACTCAGCTGGAG
451 GTGGCGCGGGGCGTGCAGGAGCGGGTGGGTTGAGAGGGCAAGACGGCGCC
501 ACCTAAAGGCCCGGATGGAGTGATTCTCTACGAGCTTACAGCCGACCAG
551 AGCAAGAGAAGTTCACTGAATCTGCCAAGGTCGCTGAGCTGGAGAGGCGG
601 TTGGCTGAACTGGAGATGTCGGTGGGCTCCGGCTCAGATAAACAGGGTCC
651 GCTCAGCGCCGGGTGCAGGGAGCCAGTCTGACGGACACTATAGAGCTGC
701 TGCAGGCTCGGGTCAAGTGCAGTGGACGCCGCACTCTGGACCAGGTGAA
751 GCCAGACTACAGAGTGTCTGGGGAAGATGAATGAAATCGCCAAACACAA
801 GGCGGCCATTGAGGATGCTGAGACCCAAAATAAGGTGTCGCAGCTGTACG
851 ATGTGGTTCAGAAGTGGGATGCGATGGCGACGTCTCTCCCGCAGGTGGTG
901 CAGCGACTGACGGCTGTCAAAGAAGTGCATGAACAGGCGATGCAGTTTGG
951 TCAGCTGTTGACCCATCTGGACACGACACAACAGATGATCAACAACCTCGC
1 001 TGAAGGACAACACCACTCTGCTGACTCAGGTCCAGCAAACCATGAAAGAG
1 051 AACCTGGTGGCCGTGGAGGAGAACTTCGCCGCACTGGACCAGAGGATGAA
1 101 GAAACTCTCCAAATAA

```

图 4 TTF29452 序列信息

Fig.4 DNA sequence of TTF29452

能够低成本地开发大量的 SNP 位点,常用于遗传变异检测、高密度遗传图谱构建、重要性状候选基因定位和群体遗传进化分析。单核苷酸多态性(SNP)标记作为目前最具应用潜力的第 3 代分子标记,具有遗传稳定性高、位点丰富且分布广泛以及检测快速、易实现自动化分析等特点,被广泛地应用到遗传图谱构建、QTL 定位和标记辅助选育等众多方面。本实验通过 RAD-seq 测序构建基因文库,并开发 SNP 标记。最后得到 1 863.65 Mb Reads 数据,样本 Q30 比例均在 90%,测序深度分别为 $52.344 \times$ 、 $56.002 \times$ 和 $17.301 \times$,表明此次测序质量较好。

通过筛选得到的 324 733 个高质量 SNP 标记,最终得到 10 795 个 SNP 标记,用以团头鲂遗传连锁图谱的构建。该图谱拥有 24 个连锁群,连锁群数目与团头鲂单倍体染色体数目一致,全长 2 578.45 cM,平均长度为 107.439 cM,标记的平均遗传距离为 0.24 cM,表明本研究构建的遗传图谱密度高,质量好且标记分布均匀。相对于团头鲂已经发表的遗传连锁图谱,本研究构建的遗传连锁图谱在连锁群的完整度、标记数量、图谱长度以及标记平均距离等方面均有所提升,是团头鲂现阶段密度及质量最好的遗传连锁图谱。

以团头鲂高密度遗传图谱为基础,在 LOD 阈值 >3.0 下,共检测到 4 个性别相关 QTL。其中位于 8 号连锁群上的 QTL, Q-8-1 区间峰值 SNP 标记

chr11_21532086, LOD 值最大为 4.17。其表型解释率为 10%。虽然 Wan 等^[24]对团头鲂性别性状进行了 QTL 定位,但是其 LOD 值仅为 2.18,表型解释率为 4%,相对其结果,本研究定位的 QTL 更加准确。

通过基因功能分析,在 Q-13-1 号 QTL 区间内,chr8-3076586 号 SNP 位点附近,注释到基因 DCTN2(TTF29452)。该基因功能为细胞极性的建立和维持。DCTN2 基因属于动力蛋白激活蛋白(dynactin, DCTN)家族的亚基之一, DCTN 是拥有的 6 个亚基的多亚基蛋白质,包括 DCTN1、DCTN2、DCTN3、DCTN4、DCTN5 和 DCTN6。DCTN 家族基因的研究主要集中于哺乳动物肿瘤的发生、癌细胞的病变等,在水产动物研究报道较少。根据已有的报道, DCTN 家族已有 2 个亚基被发现可能参与性别形成过程:郑波等^[26]以小鼠精子为研究对象,向小鼠的生精小管内注射 DCTN1 的小干扰 RNA(siRNA)进而干扰 DCTN1 的表达。3 周后取附睾尾部精子进行形态学分析,发现注射 DCTN1 siRNA 组的精子尾部畸形率明显上升,说明 DCTN1 在精子变形中发生重要作用,影响了精子尾部的形成。魏敏^[27]对半滑舌鳎的 DCTN5 基因进行了相关的功能研究。通过 RACE-PCR 获得了 DCTN5 的 2 个转录本(DCTN5-tv1、DCTN5-tv2)。通过荧光定量 PCR 测定了 2 个转录本在性腺、肝、脑、鳃、皮肤、肌肉、肠、脾、肾、心脏、胃、鳍条

12 种组织中的表达水平。最后发现 DCTN5-tv2 主要在性腺中表达,在其他组织中表达量非常低,推测 DCTN5-tv2 可能参与性腺的发育和分化过程。本研究筛选到的性别关键候选基因 *DCTN2* 是否参与团头鲂性别分化的具体过程,还需要进一步的验证。

综上,本研究所构建的高密度遗传连锁图谱,筛选到的性别相关 QTL 位点、连锁标记以及候选基因,为我们后续开展团头鲂的分子标记辅助育种、性别相关功能基因精细定位等研究提供了丰富的基础资料和重要的理论依据。

参考文献 References

- [1] 王卫民,高泽霞,刘红,等.团头鲂“华海 1 号”[J].中国水产,2018(5):65-70.WANG W M,GAO Z X,LIU H,et al.*Megalobrama amblycephala* "Huahai No 1"[J].China fisheries,2018(5):65-70(in Chinese).
- [2] LI W,LIN H.The endocrine regulation network of growth hormone synthesis and secretion in fish:emphasis on the signal integration in somatotropes [J].Science China life sciences,2010,53(4):462-470.
- [3] MEI J,GUI J.Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish[J].Science China life sciences,2015,58(2):124-136.
- [4] 邓思平,陈松林,田永胜,等.半滑舌鳎的性腺分化和温度对性别决定的影响[J].中国水产科学,2007,14(5):714-719.DENG S P,CHEN S L,TIAN Y S,et al.Gonadal differentiation, and effects of temperature on sex determination in half-smooth tongue-sole *Cynoglossus semilaevis*[J].Journal of fishery sciences of China,2007,14(5):714-719(in Chinese with English abstract).
- [5] YAMAMOTO E.Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame,*Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel)[J].Aquaculture,1999,173(1):235-246.
- [6] 雷逢玉,王宾贤.泥鳅繁殖和生长的研究[J].水生生物学报,1990,14(1):60-67.LEI F Y,WANG B X.Studies on reproduction and growth of loach[J].Acta hydrobiologica sinica,1990,14(1):60-67(in Chinese with English abstract).
- [7] 林晓煜,肖世俊,李完波,等.大黄鱼性别特异 SNP 标记的开发与验证[J].水产学报,2018,42(9):1329-1337.LIN X Y,XIAO S J,LI W B,et al.Development and validation of sex-specific SNP markers in *Larimichthys crocea*[J].Journal of fisheries of China,2018,42(9):1329-1337(in Chinese with English abstract).
- [8] BEARDMORE J A,MAIR G C,LEWIS R I.Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects[J].Aquaculture,2001,197(1):283-301.
- [9] 姜建萍,袁翔,邱庆庆,等.罗氏沼虾性别相关基因研究进展及其单性化养殖现状[J].南方农业学报,2019,50(9):2111-2118. JIANG J P,YUAN X,QIU Q Q,et al.Research progress of sex-related genes and research status of monosex culture in *Macrobrachium rosenbergii*: a review[J].Journal of southern agriculture,2019,50(9):2111-2118(in Chinese with English abstract).
- [10] 夏德全.生物技术在水产养殖中的应用[J].科学养鱼,2002(2):3-4.XIA D Q.Application of biotechnology in aquaculture[J].Scientific fish farming,2002(2):3-4(in Chinese).
- [11] 曾聪.团头鲂生长相关性状的形态和遗传分析[D].武汉:华中农业大学,2012.ZENG C.Morphological and genetic analysis of the growth traits of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [D].Wuhan: Huazhong Agricultural University,2012(in Chinese with English abstract).
- [12] 张新辉,高泽霞,罗伟,等.雌核发育团头鲂的形态和遗传特征分析[J].水生生物学报,2015,39(1):126-132.ZHANG X H,GAO Z X,LUO W,et al.Studies on morphological characteristics and genetic analysis of The gynogenesis blunt snout bream (*Megalobrama Amblycephala*)[J].Acta hydrobiologica sinica,2015,39(1):126-132(in Chinese with English abstract).
- [13] 尹洪滨,范兆廷,孙中武,等.团头鲂核型与 DNA 含量分析研究[J].水产学杂志,1995,8(1):22-26.YIN H B,FAN Z T,SUN Z W,et al.The Karyotype and DNA content analyses of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J].Chinese journal of fisheries,1995,8(1):22-26(in Chinese with English abstract).
- [14] HOSPITAL F,DEKKERS J C M.The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations [J].Nature reviews genetics,2002,3(1):22-32.
- [15] NAISH K A,HARD J J.Bridging the gap between the genotype and the phenotype;linking genetic variation, selection and adaptation in fishes[J].Fish and fisheries,2008,9(4):396-422.
- [16] 常玉梅,孙效文.水产养殖动物遗传连锁图谱及 QTL 定位研究进展[J].动物学研究,2006,27(5):533-540.CHANG Y M,SUN X W.Advancements in genetic linkage maps and quantitative trait locations of aquatic farming animals [J].Zoological research,2006,27(5):533-540(in Chinese with English abstract).
- [17] YUE G H.Recent advances of genome mapping and marker-assisted selection in aquaculture[J].Fish and fisheries,2014,15(3):376-396.
- [18] 王金鹏.牡蛎生长与高温耐受性状的遗传解析[D].青岛:中国科学院研究生院(海洋研究所),2016.WANG J P.Genetic architecture dissection of growth-related and thermo-tolerant traits in oysters[D].Qingdao:University of Chinese Academy of Sciences,2016(in Chinese with English abstract).
- [19] 李祥孔.牙鲆家系建立和生长、性别相关性数量遗传分析及 QTL 定位[D].大连:大连海洋大学,2016.LI X K.Family establishment, quantitative genetic analysis of growth and sex related traits and QTL mapping of *Paralichthys olivaceus* [D].Dalian:Dalian Ocean University,2016(in Chinese with English abstract).
- [20] 邱昌亮.黄姑鱼高密度遗传连锁图谱的构建及其应用[D].厦门:集美大学,2018.QIU C L.Construction and application of an ultra-high density genetic linkage map of *Nibea albiflora*

- [D].Xiamen:Jimei University,2018(in Chinese with English abstract).
- [21] 周童.合浦珠母贝遗传连锁图谱构建、QTL 定位及热休克蛋白基因 Hsp22 的克隆与表达研究[D].上海:上海海洋大学,2018.ZHOU T.Genetic linkage map construction and QTL mapping and cloning and expression of heat shock protein 22 gene in the pearl oyster *Pinctada fucata* [D].Shanghai:Shanghai Ocean University,2018(in Chinese with English abstract).
- [22] 林红.远缘杂交法结合 RAPD 技术对鲢、团头鲂遗传图谱的构建[D].南京:南京农业大学,2000.LIN H.Construction of genetic linkage map for *Hypophthalmichthys molitrix* and *Megalobrama amblycephala* using outbreeding mapping strategy and RAPD markers [D].Nanjing:Nanjing Agricultural University,2000(in Chinese with English abstract).
- [23] 葛芹玉.白鲢与团头鲂遗传连锁图谱的构建[D].南京:南京农业大学,2002.GE Q Y.Genetic map construction in *Hypophthalmichthys molitrix* and *Megalobrama amblycephala* [D].Nanjing:Nanjing Agricultural University,2002(in Chinese with English abstract).
- [24] WAN S M,LIU H,ZHAO B W,et al.Construction of a high-density linkage map and fine mapping of QTLs for growth and gonad related traits in blunt snout bream [J].Scientific reports,2017,7(1):10686-10703.
- [25] SUN X W,LIU D Y,ZHANG X F,et al.SLAF-seq:an efficient method of large-scale de novo SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing [J/OL].PLoS One,2013,8(3):e58700[2020-06-13].<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0058700>.
- [26] 郑波,蒋敏,李苏影,等.Dctn1 在小鼠睾丸和精子中的定位及在变形过程中的功能初探[J].中华男科学杂志,2011,17(9):799-804.ZHENG B,JIANG M,LI S Y,et al.Location of Dctn1 in the mouse testis and sperm and its role in spermiogenesis [J].National journal of andrology,2011,17(9):799-804(in Chinese with English abstract).
- [27] 魏敏.半滑舌鲷抗哈维氏弧菌病相关 QTL 定位及免疫相关基因筛选和功能分析[D].南京:南京农业大学,2018.WEI M.QTL mapping for resistance to *Vibrio harveyi* and screening and functional analysis of immune-related genes in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [D].Nanjing:Nanjing Agricultural University,2018(in Chinese with English abstract).

Construction of a high-density genetic linkage map and QTL mapping for gender of *Megalobrama amblycephala*

CAO Jinglong, WANG Weimin

College of Fisheries, Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics/Breeding and Reproduction of Ministry of Education/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract *Megalobrama amblycephala* is one of the most important herbivorous economic fish in China. In this study, hybrid F1 individuals of *M. amblycephala* were used as the mapping population, the high-quality and high-density genetic linkage map was constructed and sex-related QTLs (quantitative trait loci) were mapped by mining SNP molecular markers through restriction-site associated DNA sequencing (RAD-seq) technology. The result showed that the linkage map included 10 795 SNPs and 24 linkage groups, with a total length of 2 578.54 cM and an average marker interval of 0.24 cM. Based on the linkage map, Multi-QTL mapping (MQM) was analyzed to fix QTLs related to gender traits by using Map QTL 6.0 software. The experiential LOD value of 3.0 was taken as the threshold for the existence of QTL tags, and 4 sex-related QTLs were located in the LG8, LG12, LG15 and LG18 linkage groups. The LOD value of each QTL ranged from 3.18 to 4.17, which explained phenotypic variation ranged from 7.7% to 10.0%. After screening genes near SNP markers in the QTL confidence interval, DCTN2, a key candidate gene, which may be involved in the reproductive process of *M. amblycephala*, was screened by functional annotation analysis. This research will provide a reference for the development of gendered molecular markers of *M. amblycephala*.

Keywords *Megalobrama amblycephala*; genetic linkage map; QTL mapping; marker-assisted selection (MAS); gender control breeding; single culture; gender functional gene mapping

(责任编辑:边书京)