

文章编号: 1000-0615(2001)03-0270-09

·综述·

# 鱼类和水生动物基因组作图研究的现状及前景

## Current status and prospect of studies on genome mapping in fish and aquatic animals

童金苟<sup>1</sup>, 朱嘉濠<sup>2</sup>, 吴清江<sup>1</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072; 2. 香港中文大学生物系, 香港 沙田)

TONG Jin-gou<sup>1</sup>, CHU Ka-hou<sup>2</sup>, WU Qing-jiang<sup>1</sup>

(1. Institute of Hydrobiology, CAS, Wuhan 430072, China;

2. Department of Biology, Chinese University of Hong Kong, Shatin, Hong Kong, China)

关键词: 鱼类; 水生动物; 基因组作图

Key words: fish; aquatic animals; genome mapping

中图分类号: Q789; S917 文献标识码: A

鱼类和水生动物基因组作图 (genome mapping) 研究落后于陆生动物。水生经济动物的遗传图谱只是最近二、三年才有报道<sup>[1-3]</sup>。虽然起步晚, 但以鱼类为代表的水生动物的基因组研究已经有了可观进展。本文试图从如下几个方面作一综述: 1. 分子遗传标记及其在基因组作图研究中的应用, 2. 水生动物基因组研究的现状, 3. 水生动物基因组作图的前景。

## 1 分子遗传标记及其在基因组作图研究中的应用

### 1.1 分子遗传标记

遗传标记一般可分为形态学标记、细胞学标记、生化标记和 DNA 分子标记。其中只有 DNA 分子标记是核苷酸水平上遗传变异的直接反映, 其余 3 种类型都是以基因表达的结果 (表现型) 为基础。DNA 分子标记具有能对各个发育时期的个体、各种组织器官甚至单个细胞做出检验, 不受环境因素或基因表达与否的限制, 且数量丰富、遗传稳定和操作相对简便等优点, 从而奠定了它们在基因组作图研究中的绝对优势地位。

分子标记据其属性又可分为 3 大类。Type I 为基因标记, 包括克隆基因, RFLP, EST; Type II 为高度变异座位, 一般是重复序列, 包括 RAPD, AFLP, 小卫星和微卫星 DNA; Type III 为单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphism, SNP)。Type I 和 Type II 标记在动物遗传作图中最常用, 予以简介如下。

#### 1.1.1 限制性片段长度多态性及多座位 DNA 指纹标记

这类标记是基因组 DNA 被限制性内切酶酶切、电泳后, 利用特异或多座位探针进行 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。共显性标记。特异探针为单拷贝或低拷贝的 DNA 克隆 (cDNA 或基因组 DNA), 由此产生的多态性为限制性片段长度多态性 (RFLP)。多座位探针的核心序列为串联重复序列<sup>[4]</sup>, 它与基因组中

收稿日期: 2000-09-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970587), 部分工作由香港特别行政区研究资助局研究项目 (CUHK4062/98M) 及香港中文大学博士后研究员计划资助

第一作者: 童金苟 (1961 -), 男, 湖北武汉人, 副研究员, 博士, 主要从事鱼类和水生动物遗传育种研究。Tel: 027-87867751, E-mail: jgtong@ihb.ac.cn

的小卫星 DNA(VNTRs)杂交。由于 VNTRs 的重复次数和散布在基因组中的位置的不同,杂交后产生不同的 DNA 指纹图谱(fingerprinting)。多座位 DNA 纹标记的优点是一次杂交可产生大量变异座位,几乎对任何生物基因组有效,有利于那些缺少标记的物种的基因组作图。

### 1.1.2 随机扩增多态性 DNA

随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)是建立在单引物 PCR 基础上的标记技术<sup>[5]</sup>。经过设计的大约 10 bp 寡核苷酸引物在较低的退火温度下与基因组上的多个位置结合随机扩增,从而得到不同长度的 PCR 扩增片段。RAPD 一般为显性遗传,由于其方法简单、快速,已在许多动植物遗传图谱中应用。但有学者认为 RAPD 重复性不高,其扩增带系专一性较强,不利于多个图谱的整合和比较。类似 RAPD 的还有 AP-PCR (arbitrary primer PCR)<sup>[6]</sup>。区别是 AP-PCR 所用的引物较长(10~50 bp),反应的前 2 个循环条件较低。

### 1.1.3 扩增长度多态性 DNA

扩增长度多态性 DNA(amplified fragment length polymorphism, AFLP)的原理是选择性地扩增基因组的双酶切片段。它既有 RFLP 的可靠性,也有 RAPD 的灵敏性,克服了前者杂交步骤烦琐和后者重复性较差的缺点,因而它一经出现,特别是经 Vos 等<sup>[7]</sup>改进、完善后已广泛应用于种系鉴定、遗传图谱构建和基因定位研究。由于 AFLP 扩增引物的设计是依据人工接头(adaptor)中已知的核心序列和特定限制性内切酶切点序列再加上 2~3 bp 的随机选择序列,退火温度较高(约 56℃),特异性强。人工接头的核心序列可按要求设计,而每一个人工接头通过连接不同的选择序列又可合成一系列的扩增引物,因此 AFLP 标记系统可以产生大量的带型标记,是近年来基因组分析的理想和有效的遗传标记。

### 1.1.4 微卫星 DNA

微卫星 DNA(microsatellite DNA)也称 SSR 或 SSCP,重复单位由 1~6 bp 不等。微卫星 DNA 两端通常是较为保守的单拷贝序列,故可用来设计特异的双引物,然后经 PCR 扩增、电泳分析因重复次数不同而显示出不同基因型个体间的多态性和特异性<sup>[8]</sup>。由于微卫星 DNA 多态性高(有些座位的等位基因数目可达 50 个),在基因组中分布广,且为共显性标记,因此,该 DNA 标记技术出现后很快成为基因组作图研究中最有效的标记之一<sup>[9]</sup>。

### 1.1.5 表达序列标签

表达序列标签(expressed-sequence tag, EST)是 cDNA 文库中的随机克隆。通过测序后,根据单拷贝 DNA 片段两端序列设计一对特异引物扩增基因组 DNA,产生一段长度为几百 bp 的特异序列在基因组中往往只出现一次,从而能够界定基因组的特异座位<sup>[10]</sup>。像 EST 这样以核苷酸序列为基础的标记也称为序列标签位点(sequence tag site, STS)。STS 还包括微卫星和克隆基因。在人类基因组作图中 STS 被用来作为将遗传连锁图与物理图谱整合的共同位标,这在基因组作图上有很重要的作用<sup>[11]</sup>。

## 1.2 分子标记在基因组作图中的应用

### 1.2.1 遗传图谱构建

20 世纪 80 年代以前生物的遗传作图是依据几种表型遗传连锁分析的基础上进行的。但是常规遗传标记的数量在用来产生作图群体的一对亲本材料中极为有限,因此经典遗传图谱的发展极为缓慢。过去几十年中所建成的遗传图谱仅限少数种类的生物(如果蝇),且图谱的分辨力大都很低,表现为标记少,图距大,饱和度低,在基因组研究和遗传育种研究中的应用价值十分有限。

利用 DNA 分子标记进行遗传作图是基因组作图研究划时代的事件。Bostein 等<sup>[12]</sup>首先提出了利用 RFLP 标记构建遗传连锁图的设想。1987 年第一个人类 RFLP 连锁图面世<sup>[13]</sup>,其饱和度远远超过了经典遗传图谱。随着新的 DNA 分子遗传标记不断出现,已报道遗传图谱的动物的名单不断增加,图谱的密度也越来越高。

### 1.2.2 物理图谱构建

据产生方法的不同,物理图谱可分为限制性酶切图谱(restriction map)、跨叠片段图谱(contig map)、细胞遗传图谱(cytogenetic map)和 DNA 序列图谱(sequence map)。限制性酶切图谱以限制性内切酶为标记,过去主要用于小基因组,如噬菌体、质粒、线粒体等,大基因组所产生的限制性片段数太多以至无法进行长度测定和排序。然而,利用稀有切点内切酶和脉冲电泳技术,大基因组的限制性酶切图谱的制作已成为可能。跨叠片段图谱以基因标记制作,首先建立含有重叠克隆的基因组文库,然后通过重叠克隆间所共有的核苷酸序列将所有的克隆沿染色体排成连续的跨叠序列。不同克隆间的重叠关系可通过比较各克隆片段的酶切图谱来确定。利用能克隆几百至上千 kb DNA 片段的 YAC、BAC 等新型载体,已构建了许多高等生物的跨叠片段图谱。细胞遗传图谱是运用目的物种-鼠体细胞杂交及荧光原位杂交的方法将连锁基因定位到特定的染色体上,并与特定的细胞遗传带纹相连系。杂交探针的制备根据已知基因和 EST 等标记。全

序列图谱是基因组作图的终极图谱。随着 DNA 大规模测序技术的不断改进,酵母、线虫、大肠杆菌、果蝇等生物的全序列图谱已经完成,人类基因组全序列测定有望在今年全部完成。

## 2 水生动物基因组研究的现状

我们对水生动物基因组仍缺乏了解。20世纪60年代以来对1600多种鱼类及少数其它水生动物的细胞遗传研究表明,水生动物基因组大小差异很大<sup>[14]</sup>。以鱼类为例,多数鱼类单倍体染色体数在20~25,单倍体组DNA含量在0.7~2.7 pg,这相当于人类基因组大小的50%~70%。甲壳类的基因组大小可能也在此范围。但有些鱼类染色体数和DNA含量都很低(如鳞形目、鲑形目某些鱼类染色体总数只有12~40,DNA单倍体组含量低至0.4 pg<sup>[15]</sup>)。另一方面,鲤科和鲑科某些种类染色体数达100。有观点认为,像鲤和鲑等具有众多染色体的鱼类在进化上经历了一次四倍化过程<sup>[16,17]</sup>。

由于许多鱼和水生动物的染色体数目大都超过人类46条的水平,进行遗传作图就需要更多标记才能覆盖每一个染色体。迄今水生动物基因组研究主要在一些小型实验鱼类中进行,已报道了10余个图谱,以斑马鱼的图谱分辨率最高。然而,因为染色体多且小,即使采用分带等技术目前仍无法分辨鱼类和水生动物单个染色体并编号,这使得将某一个遗传连锁群定位到特定的染色体上(构建物理图谱)目前还存在一定困难。迄今只在斑马鱼有构建物理图谱的尝试<sup>[18,19]</sup>,但也只能与某一个连锁群而不是一个染色体相关。

水产经济动物基因组计划5年前才启动。美国首先提出开展中等密度遗传图谱构建国际合作构想,第一批对象包括鱼类3种(罗非鱼、鲑鳟鱼类、鲈)、对虾2~3种(斑节对虾、南美白对虾或日本对虾)、牡蛎1种(太平洋牡蛎)<sup>[20]</sup>。对上述种类以及其它水生动物基因组作图研究的进展逐一简介如下。

### 2.1 水生无脊椎动物

#### 2.1.1 太平洋牡蛎

尽管太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)的多倍体育种已有很大进展,有关这个种的基因组作图研究却仍未真正起步,目前仅限于分子标记的分离与多态性研究<sup>[21,22]</sup>。

#### 2.1.2 对虾

全球性虾病引起的巨大损失使加快对虾品种遗传改良变得更加必须和紧迫。对虾基因组研究的国际合作网已经形成<sup>[20]</sup>。Moore等<sup>[3]</sup>利用246个多态性的AFLP标记,构建了一个具有44个连锁群的日本对虾(*Penaeus japonicus*)初步AFLP图谱。这是甲壳动物以至水生无脊椎动物中首次报道的连锁图谱。第一大养殖对虾的斑节对虾(*P. monodon*)图谱构建是目前的攻关重点,业已培育出四个参考家系,分离出大量多态性微卫星座位<sup>[23]</sup>和一些EST<sup>[20,24]</sup>、AFLP<sup>[25]</sup>等分子标记。第一个斑节对虾图谱据信不久将面世。另外南美白对虾(*P. vannamei*)中也有大量微卫星座位等标记的报道<sup>[26,27]</sup>,将用于遗传作图。

### 2.2 鱼类

鱼类是最早开展基因组作图研究且进展最大的水生动物类群。在每年的动植物基因组研究进展国际大会(Plant and Animal Genome, PAG)上,所有鱼类基因组研究都是放在“Aquaculture”专题内。主办者的考虑可能是因为所有鱼类在基因组进化特征上是相似的。下面分别予以介绍。

#### 2.2.1 罗非鱼

以尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和奥利亚罗非鱼(*O. aurea*)及其杂种的应用较广。Kocher等<sup>[1]</sup>发表了尼罗罗非鱼的第一个遗传连锁图。他们共利用62个微卫星和112个AFLP标记。其中162个有连锁关系,可分为30个连锁群覆盖22条染色体,总图距约1000~1200 cM。由于连锁群数比尼罗罗非鱼单倍体染色体数多出8个,说明存在少量误差,也可能是罗非鱼基因组存在高水平的干扰,使得重组值偏大,连锁群中间出现较大间隙(gap)。同一年, Lee和Kocher用微卫星标记将prolactin基因定位到罗非鱼基因组中<sup>[28]</sup>。目前, Kocher小组正在进行罗非鱼单基因座位和数量性状的定位研究<sup>[29]</sup>。受到植物杂交育种的启发,一个包括美国、日本、以色列和泰国科学家在内的小组获得了三杂交罗非鱼,试图获得性状优良的超级品系。利用AFLP和微卫星标记,这个小组已经绘制了三杂交罗非鱼的连锁图<sup>[30]</sup>,其饱和度明显高于Kocher的图谱。

#### 2.2.2 鲑鳟鱼类

鲑鳟鱼类是欧洲及北美商业养殖最重要的鱼类之一。20年前就有对其进行连锁分析和基因组作图的初步研究。例如, Seeb J E和Seeb L W<sup>[31]</sup>在大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)中以4个酶座位间的重组值来估计基因-着丝粒图距时发现

Aa3 和 Mpi 的图距与虹鳟 (*Salmo gairdneri*) 不同,从而认为鲑科鱼类属内和属间连锁距离是保守的看法可能是不对的。Johnson 等<sup>[17]</sup>发现褐鳟 (*Salmo trutta*)和虹鳟以及它们与其他属间杂交中同工酶标记的重组频率雌性大于雄性,复制座位相互间不连锁,由此推断现存鲑科鱼类可能来自同一个部分异源四倍体祖先。May 等<sup>[32]</sup>从溪红点鲑 (*Salvelinus fontinalis*)和北极红点鲑 (*Salvelinus alpinus*)的杂种及回交个体的表型性别与 3 种同工酶的连锁关系,推断鲑科鱼类中可能存在一个性别决定座位。May 和 Johnson<sup>[33]</sup>用同工酶标记绘制了鲑鳟鱼类遗传图,但由于饱和度太低,没有实际意义。

近 10 年来,鲑鳟鱼类中出现了大量克隆分离微卫星的报道。Slettan 等<sup>[34]</sup>利用单倍体遗传方法研究了大西洋鲑 (*Salmo salar*)微卫星座位的分离规律和连锁关系。Young 等<sup>[2]</sup>报道了利用虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)双单倍体绘制的遗传连锁图,所用标记包括 AFLP,多座位 DNA 指纹 (VNTR)、5' 或 3' 端核小体 (SINE)、RAPD 和微卫星,另加一个表型性别标记,共 476 个标记。42 个连锁群 (31 个大群,11 个小群)覆盖 2 627 cM 基因组。性别决定座位被确定到其中一个连锁群的远端。另外发现分子标记在染色体上的定位是:AFLP 位于着丝粒, VNTR 位于远端, SINE 居中。在一个微卫星座位上检测到明显与鲑科鱼类多倍体起源有关的多体遗传现象 (tetrasomic inheritance)。虹鳟双单倍体有效染色体为 30 个,与所得到的大连锁群数 (31 个)十分接近。另外 11 个小连锁群的存在说明图谱中仍有间隙需要填补,同时证明鲑鳟鱼类的干扰较大<sup>[35]</sup>。尽管如此,Young 等的图谱是迄今鲑鳟鱼类中最为完整,也是所有鱼类中最为详尽的图谱之一<sup>[2]</sup>。

### 2.2.3 剑尾鱼属

剑尾鱼属 (*Xiphophorus*) 的优点主要是由于它们的杂交种 (*X. maculatus* × *X. helleri*) 及其回交种是研究原癌基因和肿瘤抑制基因的良好模型<sup>[36]</sup>。Leslie<sup>[37]</sup>发现 17 个同工酶的连锁关系在几个属中是保守的。Morizot 等<sup>[38]</sup>报道的第一个剑尾鱼属遗传图共用了 76 个蛋白编码座位,其中 55 个以及 1 个与性染色体连锁的色素基因有连锁关系 (17 个连锁群)。通过与其它鱼类、两栖类和哺乳类比较, Morizot 等发现鱼类的基因图谱是非常相似的,这表明种类众多的鱼类来源于同一个古老的祖先。随后, Kazianis 等<sup>[39]</sup>又添加了 43 个 AP-PCR/RAPD 和同工酶标记到图谱中。最近已相继克隆和定位了一批剑尾鱼基因,如 DNA ligase 1<sup>[40]</sup>, ribosomal protein 15<sup>[41]</sup>, tyrosine kinase<sup>[42]</sup>。

### 2.2.4 斑马鱼

斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 由于体型小、周年繁殖、受精卵透明易于观察等优点已成为分子遗传学、发育生物学等研究的良好模型<sup>[43]</sup>。Streisinger 等<sup>[44]</sup>首次以单倍体遗传的方法研究了斑马鱼的体色突变基因的连锁关系和基因-着丝粒作图。Postlethwait 等<sup>[45]</sup>以单倍体遗传法主要用 RAPD 标记绘制了斑马鱼第一张连锁图,总图距为 2 317 cM,平均间隔 5.8 cM。Johnson 等<sup>[46]</sup>用着丝粒连锁分析进一步巩固了这个分子图谱。Postlethwait 等的图谱促进了斑马鱼突变基因定点克隆、染色体重排和脊椎动物基因组进化的研究。然而,这个以 RAPD 为主的图谱只是由一个品系的单一交配群体而来,同样的 RAPD 标记在其它品系可能就不适用。为此 Knapiak 等<sup>[47]</sup>利用 5 个斑马鱼品系绘制了一个共有 705 个微卫星标记的具有完整意义的斑马鱼遗传连锁图 (25 条染色体中每一条都有一个连锁群),总图距为 2 350 cM,平均精度达 3.3 cM。1998 年 Postlethwait 等<sup>[48]</sup>仍以单倍体遗传法绘制了一个新的斑马鱼图谱,共利用了 144 个克隆基因,202 个 RAPD,101 个微卫星和 15 个突变标记。由于 Postlethwait 的新图谱集中了多种标记的优点,在脊椎动物比较基因组作图研究中意义较大。迄今,在斑马鱼图谱中已标定的 type II 标记 (微卫星) 已达 2 000 个,仅次于人和大、小鼠,而鉴定出与人类基因组同线性的保守片段是最多的 (表 1)<sup>[49]</sup>。依据微卫星连锁图最近已定点克隆出斑马鱼 ferroportin 1 基因,经鉴定它是一个在脊椎动物中保守的离子转运蛋白<sup>[50]</sup>。

斑马鱼-小鼠细胞杂交研究是整个水生动物中最早的细胞遗传图谱研究<sup>[18]</sup>。最近 Geisler 等<sup>[19]</sup>用此方法将 1 451 个 STS 标记定位到斑马鱼饱和遗传图谱<sup>[47,48,51]</sup>的第一连锁群 (LG1) 中,精度约 350 kb。这是鱼类首个准物理图谱。

### 2.2.5 青鳉

青鳉 (*Oryzias latipes*) 是另一个具有潜力的脊椎动物模型。然而,直到 5 年以前,除几个有关体色的连锁遗传报道<sup>[52,53]</sup>以外,对青鳉的基因组还所知甚少。1995 年 Wada 等<sup>[54]</sup>用 170 个标记座位 (其中 RAPD 161 个,色素类型 3 个,同工酶 5 个和雄性决定因子 1 个) 产生了青鳉的第一个连锁图,共有 28 个连锁群,覆盖 2 480 cM 基因组。由于作图群体是 F1 雄性与亲本交配得到的回交群体,故是雄性遗传图谱。青鳉中有一个双臀鳍 (Da) 突变系。为了定向克隆 Da 基因, Ohtsuka 等<sup>[55]</sup>以 RAPD 为主的 163 个标记构建了雌性青鳉的新的连锁图,共 26 个连锁群,图距为 1 776 cM。通过与 Wada 等的图谱、斑马鱼和人类图谱的比较,鉴定出 4 个同线区,其中一个与 Da 基因相邻。检测到 2 个与 Da 基因紧密连锁的分子标记 (图距分别为 0.32 和 0.80 cM),为更精细地定位 Da 基因打下了基础。

### 2.2.6 鲮

鲮科鱼类 (主要是斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus*) 包括微卫星、EST 和 AFLP 在内的分子遗传标记的报道近年来较多。以微卫星为主要标记的斑点叉尾鲷遗传图谱已由美国农业部 Waldbieser 小组基本绘制完毕<sup>[56]</sup>。奥本大学的 Liu 小组正在绘制另一张包括 AFLP 在内的图谱,并开始鉴定生长速度、抗病性等数量性状基因座位 (quantitative trait loci, QTL) 和

遗传标记辅助选种等研究<sup>[57,58]</sup>。

表 1 脊椎动物高级遗传图谱及与人类基因组的比较

Tab.1 Advanced maps of vertebrates and human genome

种类	目	单倍体染色体数目(条)	图谱中定位的标记数		总图距(cM)	与人类同线性保守片段数目
			type I (编码基因)	type II (微卫星)		
人	灵长目	23	30 000	8 000	3300	-
小鼠	啮齿目	20	6 992	7 377	1 450	180
大鼠	啮齿目	21	552	8 000	1 500	109
猫	食肉目	19	500	254	3300	32
狗	食肉目	39	218	276	2 700	68
水貂	食肉目	15	77	0	-	33
牛	偶蹄目	30	400 ~ 500	1236	2 990 ~ 3 532	50
山羊	偶蹄目	30	257	307	3 100	107
羊	偶蹄目	27	254	504	3 063	40
猪	偶蹄目	19	369	100	2 300 ~ 2 500	47
马	奇蹄目	32	53	309	2 000	47
鸡	鸡形目	39	220	677	4 000 ~ 4 200	79 ~ 116
斑马鱼	鲤形目	25	275	2 000	2 145	252

注:引自 O'Brien 等<sup>[49]</sup>。

### 2.2.7 东方鲀

Hinegardner<sup>[5]</sup>发现科中包括东方鲀属(*Fugu*)在内的一些鱼类的基因组很小。红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)的基因组比人类小 6~8 倍,其单倍体基因组估计只有 0.4~0.5 pg。随后的随机序列测定和分子杂交证实,东方鲀属的基因组为 400Mb,重复 DNA 少于 10%<sup>[59]</sup>。东方鲀的基因组虽然小而致密,一般推测它可能含有哺乳动物相类似的基因数目和基因组结构。这个猜测近年来不断得到比较基因组学研究成果的证实。例如, Gilley 和 Fried<sup>[60]</sup>发现红鳍东方鲀中的 7 个基因与人类染色体 9q34 上大约 3Mb 的区域同线性。最近更多的实验证实了河鲀与人类基因组的高度同线性<sup>[61-63]</sup>。众多的结果表明通过研究红鳍东方鲀是预测人类基因组结构和定向克隆目的基因的一个经济而有效的手段<sup>[64]</sup>。

### 2.2.8 鲤

鲤(*Cyprinus carpio*)染色体总数为 100。从细胞和亚细胞水平的遗传行为看鲤是二倍体,但近年来已有证据显示鲤经历了四倍化过程<sup>[16,65]</sup>。最近国内学者报道了鲤的第一个初步遗传图(50 个连锁群,覆盖 5 789 cM 基因组)<sup>[66]</sup>。此图谱遗传意义上的基因组异常偏大(是虹鳟总图距的 2 倍多),这究竟是由于鲤较多的染色体和因多倍体起源而产生的可能的干扰,或是由其它原因所造成,有待深入研究。

### 2.2.9 牙鲆

从牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)中分离 EST 和克隆基因<sup>[67,68]</sup>以及微卫星座位<sup>[69]</sup>等分子标记的报道较多。从研究趋势来看,牙鲆应是即将绘制遗传连锁图的对象之一。

## 2.3 蛙类

有些蛙类具有肉用(如牛蛙)或药用价值(如中国林蛙),但目前基本上仍是野生,其人工养殖规模无法同鱼类等水产动物相比。有关蛙类的少量遗传连锁分析报道是利用同工酶<sup>[70]</sup>和功能蛋白(如运铁蛋白、白蛋白、血红蛋白)作为标记在豹纹蛙(*Rana pipiens*)中进行的,得到了几个连锁群<sup>[71]</sup>。中国林蛙中有乳酸脱氢酶多基因系统及基因连锁分析的报道<sup>[72]</sup>。Wright 和 Richards<sup>[73]</sup>发表了豹纹蛙的二个性连锁座位,从而证实了这种蛙的性别决定是雄性配子异型。尽管蛙类是最早进行繁殖和发育生物学研究的脊椎动物,但由于分子标记的分离、多态性研究等方面非常欠缺,所以,蛙类基因组作图的研究仍有待开展。

## 2.4 水生动物基因组作图的难度

周期较长、难度较大:除斑马鱼、青鳉等生活周期短鱼类以外,大多数经济鱼类和水生动物性成熟期达 3~5 年甚至更长,建立和维持作图家系需时。例如双单倍体作图在植物中很容易,但获得虹鳟双单倍体则较难<sup>[2]</sup>。没有完整的家系,大规模作图无从谈起。例如,由于南美白对虾家系的培育起步迟,遗传图谱研究进展明显落后于斑节对虾。

多倍化起源动物中的干扰:由于鲑鳟鱼类许多种经历了四倍化,较多的非同源染色体间的交换对正常减数分裂重组的估计是一种干扰<sup>[35]</sup>,表现为总图距过大。今后在有多倍体起源的鱼类或水生动物遗传作图中的干扰情况值得注

意。

**遗传标记少:**目前,分子遗传标记的克隆、分离的报道主要集中于斑马鱼等实验鱼类,其它种类中的报道很少。特别是微卫星等共显性标记,在大部分鱼类及新兴的养殖对象(如软体动物、甲壳类和爬行类)中罕有报道。在这些种类中构建图谱的难度较大。

**费用高:**分离微卫星、EST 等标记需要建立文库并筛选;像 AFLP 等新的标记技术由于费用较高等原因并不是所有实验室都能进行。

**水生动物细胞遗传学技术有待突破:**准确地鉴定鱼类和水生动物的单个染色体并逐一编号是获得物理图谱及深入研究它们基因组的关键所在。

### 3 水生动物基因组作图的前景

#### 3.1 有利条件

分子生物学技术的快速发展提供了技术和方法学上的支撑:人类基因组计划中大量新技术新方法的应用,为在更多的水生动物开展基因组作图研究提供了可能性。

互连网的发展促进了公共数据库资源共享:网上每天发布的核酸、蛋白质序列成百上千。一些模型动物的基因组研究细节在网上发布得更详细。网上还可得到一些免费遗传作图软件,如 MAPMAKER, LINKAGE, MAPMANAGER 等。如今,生物信息学(Bioinformatics)已成为发达国家的热门学科。据不完全统计,水生动物方面基因组研究的网站有斑马鱼(<http://zfish.uoregon.edu/>),东方鲀(<http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk>),对虾(<http://shrimpmap.tag.csiro.au>),等。

**单倍体作图法的优点:**作为一种快速建立参考图谱的方法,单倍体作图法的好处是不必建立一个完整的家系,只需测定单一性别减数分裂中的重组。人工雌核发育和雄核发育在多种鱼类已有报道<sup>[74]</sup>,在进行加倍后还可以研究基因一着丝粒作图。单精子遗传分型也是可行的<sup>[75]</sup>。当然,多数情况下完整的家系是必要的,它可同时了解父母本的遗传贡献,特别是合作研究的种类,完整的家系可保证稳定地提供相同的 DNA 样本予不同的研究者,利于多个遗传图谱的整合。

公众及政府机构对基因组作图的认识提高,资助逐步加大:美国、日本、挪威等水产大国已提出了海洋(或水产)生物基因组计划。美国农业部除了资助斑点叉尾鲷等水产基因组项目外,还大力支持每年规模宏大的动植物基因组研究进展国际大会。此外,还有一些私人基金会资助动物基因组研究。

#### 3.2 发展方向和展望

**筛选标记:**已报道的水产动物遗传图谱的标记密度还较低。可以预料,随着基因文库建立和筛选技术的不断成熟和简化,将会开发出更多分子标记,尤其是那些尚未开展基因组作图种类。已有图谱的种类,也需更多的标记以增加饱和度。微卫星的共显性高、与经济性状连锁程度高及可以用 PCR 分析等优点使得它与其它标记相比具有明显的优势<sup>[9]</sup>,将是开发的重点。

**QTL 作图:**鱼类和水生动物基因组作图的首要任务是在尽可能多的经济种类中得到饱和遗传图,为物理图谱和比较作图以及功能基因定位、克隆打下基础。像其它生物一样,水产动物经济性状(如生长速度、成熟期及抗逆性等)是许多数量性状基因座位和环境因子共同作用的结果。以寻找和定位 QTL 为目的的 QTL 作图是将来的重点之一。分子标记的应用使在全基因组范围内比较精确地检测 QTL 成为可能<sup>[76,77]</sup>。

**标记辅助育种:**分子标记在育种计划的遗传多态性研究中有潜在应用价值<sup>[25]</sup>,这包括亲-子关系,遗传力分析,杂合度分析,人工单性发育鉴定等。不过,前提条件是多态性分子标记的遗传规律需经证实是按孟德尔式遗传的<sup>[78]</sup>。

**比较基因组作图:**人类基因组计划的重点将从数据积累转向基因鉴定和功能分析。比较基因组学将是分析数以亿计序列数据的有力工具。利用简单生物(如大肠杆菌、酵母、果蝇和线虫)来预测和发现基因的优点是它们的基因组很小,但它们毕竟与人类进化上相距太远。作为脊椎动物的鱼类在这方面可谓前途无限。目前,在斑马鱼中已开展了与其它动物(包括鱼类、哺乳类及人类)基因组的比较研究<sup>[48]</sup>。在人类后基因组研究中斑马鱼仍有重要作用。但是,斑马鱼的基因组还偏大。近 5 年以来,利用红鳍东方鲀的比较基因组学研究明显增多。该鱼的引人之处就是其特别小而致密的基因组,本身又是脊椎动物<sup>[59-64]</sup>。东方鲀属鱼类将为克隆人类致病基因、抗衰老和药物开发等领域作出贡献。比较基因组学研究还可以清晰地提供鱼类和水生动物各自类群以及相互之间基因组水平上的进化关系,克隆、鉴定质量和数量性状座位,达到高产、抗逆或环保健康的目的。

**核 DNA 遗传标记的研究与开发:**基因组作图研究的一个附属结果是为其领域提供大量有潜在应用价值的核

DNA 标记,例如用于种群遗传、家系分析、分子进化等。目前,水生动物中这类研究主要是依赖线粒体等核外 DNA 标记,而可供选择的核 DNA 标记非常有限。可以预料,利用微卫星等核 DNA 标记的群体遗传研究会越来越多。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Kocher T D, Lee W J, Sobolewska H, et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Genetics*, 1998, 148: 1225 - 1232.
- [ 2 ] Young W P, Wheeler P A, Coryell V H, et al. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids[J]. *Genetics*, 1998, 148: 839 - 850.
- [ 3 ] Moore S S, Whan V, Davis G, et al. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*[J]. *Aquac*, 1999, 173: 19 - 32.
- [ 4 ] Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA[J]. *Nature*, 1985, 314: 67 - 73.
- [ 5 ] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531 - 6535.
- [ 6 ] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7213 - 7218.
- [ 7 ] Vos P, Hogers R, Bleeker M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 4407 - 4414.
- [ 8 ] Wright J M, Bentzen P. Microsatellites: Genetic markers for future[A]. Carvalho G R, Pitcher T J, eds: *Molecular Genetics in Fisheries*[M]. New York: Chapman and Hall, 1995. 117 - 121.
- [ 9 ] O'Connell M, Wright J M. Microsatellite DNA in fishes[J]. *Rev Fish Biol Fisheries*, 1997, 7: 331 - 363.
- [ 10 ] Primrose S B. Principles of Genome Analysis[M]. Oxford: Blackwell Science, 1997. 24 - 40.
- [ 11 ] Deloukas P, Schuler G D, Gyapay G, et al. A physical map of 30 000 human genes[J]. *Science*, 1998, 282: 744 - 746.
- [ 12 ] Bostein D, White R, Skolnick M H, et al. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism[J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314 - 331.
- [ 13 ] Donis-Keller H. A genetic linkage map of human genome [J]. *Cell*, 1987, 51: 319.
- [ 14 ] 陈曾龙, 雍文岳. 鱼类染色体研究的历史和现状[A]. 张兴忠, 仇潜如, 陈曾龙, 等编译: 鱼类遗传与育种[M]. 北京: 农业出版社, 1985. 1 - 32.
- [ 15 ] Hinegardner R. Evolution of cellular DNA content in Teleost fishes[J]. *Am Nat*, 1968, 102: 517 - 523.
- [ 16 ] Larhammar D, Risinger C. Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp *Cyprinus carpio*[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1994, 3: 59 - 68.
- [ 17 ] Johnson K R, Wright J E Jr, May B. Linkage relationships reflecting ancestral tetraploidy in salmonoid fish[J]. *Genetics*, 1987, 116: 579 - 591.
- [ 18 ] Chevrette M, Joly L, Tellis P. Contribution of zebrafish-mouse cell hybrids to the mapping of the zebrafish genome[J]. *Biochem Cell Biol*, 1997, 75: 641 - 649.
- [ 19 ] Geisler R, Rauch G J, Baier H, et al. A radiation hybrid map of zebrafish genome[J]. *Nature Genet*, 1999, 23: 86 - 89.
- [ 20 ] 朱嘉濛, 童金苟. 对虾基因组图谱的国际合作研究[A]. 苏永全主编: 虾类的健康养殖[C]. 北京: 海洋出版社, 1998. 62 - 67.
- [ 21 ] Hubert S, English L J, Landau, et al. Microsatellite analysis of trisomic families in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Thunberg. Grant D, Lazo G R. eds: *Plant and Animal Genome III*[C]. San Diego: Scherago Co, 2000, 10.
- [ 22 ] Huvet A, Oudry P, Ohressr M, et al. Variable microsatellites in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and other cupped oyster species[J]. *Anim Genet*, 2000, 31: 71 - 72.
- [ 23 ] Tassanakajan A, Tiptamonnukul A, Supungul C. Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) [J]. *Mol Mar Biol Biotechn*, 1999, 7: 55 - 61.
- [ 24 ] Lehnert S A, Wilson K J, Byrne K, et al. Tissue-specific expressed sequence tags from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. *Mar Biotechnol*, 1999, 1: 465 - 476.
- [ 25 ] Moore S S, Wilson K J, Whan V, et al. Molecular tools for mapping the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) genome[J]. *Aquac*, 2001(in press).
- [ 26 ] Wolfus G M, Garcia D K, Alcivar-Warren A. Application of the microsatellite technique for analysis genetic diversity in shrimp breeding program[J]. *Aquac*, 1997, 152: 35 - 47.
- [ 27 ] Alcivar-Warren A. Efforts towards developing a linkage map for penaeid shrimp[A]. Grant D, Lazo G R, eds: *Plant and Animal Genome II*[C]. San Diego: Scherago Co, 1999. 34.
- [ 28 ] Lee W J, Kocher T D. Microsatellite mapping of the prolactin locus in the tilapia genome[J]. *Anim Genet*, 1998, 29: 698 - 69.
- [ 29 ] Kocher T D. Progress in tilapia genetic mapping[A]. Grant D, Lazo G R, eds: *Plant and Animal Genome III*[C]. San Diego: Scherago Co, 2000. 8.

- [30] Agresti J J, Seki S, Cnaani A, et al. Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci[J]. *Aquac*, 2000, 185: 43 – 56.
- [31] Seeb J E, Seeb L W. Gene mapping of isozyme loci in chum salmon[J]. *J Hered*, 1986, 77: 399 – 402.
- [32] May B, Johnson K R, Wright J E Jr. Sex linkage in salmonids: evidence from a hybridized genome of brook trout and Arctic char[J]. *Biochem Genet*, 1989, 27: 291 – 301.
- [33] May B, Johnson K R. Composite linkage map for salmonid fishes[A]. O'Brien S J, ed: *Genetic Maps* (ed. 5)[M]. New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. 4151 – 4159.
- [34] Slettan A, Olsaker I, Lie  $\varphi$ . Segregation studies and linkage analysis of Atlantic salmon microsatellite using haploid genetics[J]. *Heredity*, 1997, 78: 620 – 627.
- [35] Thorgaard G H, Allendorf F W, Knudsen K L. Gene-centromere mapping in rainbow trout: high interference over long map distance[J]. *Genetics*, 1983, 103: 771 – 783.
- [36] Friend S. Genetic models for studying cancer susceptibility[J]. *Science*, 1993, 259: 774 – 775.
- [37] Leslie J F. Linkage analysis of seventeen loci in Poeciliid fish (genus *Poeciliopsis*) [J]. *J Hered*, 1982, 73: 19 – 23.
- [38] Morizot, D C, Staugenaupt S A, Kallman K D, et al. Genetic linkage map of fishes of the genus *Xiphophorus* (Teleostei: Poeciliidae) [J]. *Genetics*, 1991, 127: 399 – 410.
- [39] Kazianis S, Morizot D C, McEntire B B, et al. Genetic mapping in *Xiphophorus* hybrid fish: assignment of 43 AP – PCR/RAPD and isozyme markers to multipoint linkage groups[J]. *Genome Res*, 1996, 6: 280 – 289.
- [40] Walter R B, Rolig R L, Kozak K A, et al. Cloning and gene map assignment of *Xiphophorus* DNA ligase 1 gene[J]. *Mol Biol Evol*, 1993, 10: 1227 – 1238.
- [41] Walter R B, Obermoeller R D, Moore, D D, et al. Characterization and mapping of the *Xiphophorus maculatus* (Teleostei: Poeciliidae) RPS 15 gene[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1996, 75: 140 – 144.
- [42] Morizot D C, McEntire B B, Dellacolella L, et al. Mapping of tyrosine kinase gene family members in a *Xiphophorus* melanoma model[J]. *Mol Carcinog*, 1998, 22: 150 – 157.
- [43] 桂建芳. 脊椎动物分子发育生物学的理想模式——斑马鱼[J]. *生物工程进展*, 1995, 15: 30 – 33.
- [44] Streisinger G, Singer J, Walker C, et al. Segregation analyses and gene-centromere distance in zebrafish[J]. *Genetics*, 1986, 112: 311 – 319.
- [45] Postlethwait J H, Johnson S L, Midson C N, et al. A genetic linkage map for the zebrafish[J]. *Science*, 1994, 264: 699 – 703.
- [46] Johnson S L, Gate M A, Johnson M, et al. Centromere-linkage analysis and consolidation of the zebrafish genetic map[J]. *Genetics*, 1996, 142: 1277 – 1288.
- [47] Knapik E W, Goodman A, Ekker M, et al. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish[J]. *Nature Genet*, 1998, 18: 338 – 343.
- [48] Postlethwait J H, Yan Y L, Gate M A, et al. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map[J]. *Nature Genet*, 1998, 18: 345 – 349.
- [49] O'Brien S J, Menotti-Raymond M, Murphy, W J, et al. The promise of comparative genomics in mammals[J]. *Science*, 1999, 286: 458 – 481.
- [50] Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter[J]. *Nature*, 2000, 402: 776 – 781.
- [51] Shimoda N. Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers[J]. *Genomics*, 1999, 53: 219 – 232.
- [52] Yamamoto T, Oikawa T. Linkage between albino gene (*i*) and color interfere (*ci*) in the medaka, *Oryzias latipes* [J]. *Jap J Genet*, 1973, 38: 36 – 47.
- [53] Naruse K, Shima A. Linkage relationships of gene loci in the medaka, *Oryzias latipes* (Pisces: Oryziatidae), determined by backcross and gynogenesis[J]. *Biochem Genet*, 1989, 27: 183 – 198.
- [54] Wada H, Naruse K, Shimada A, et al. Genetic linkage map of a fish, the Japanese medaka *Oryzias latipes* [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1999, 4: 269 – 274.
- [55] Ohtsuka, M, Makino S, Yoda K, et al. Construction of a linkage map of the medaka (*Oryzias latipes*) and mapping of the Da mutant locus defective in dorsoventral patterning[J]. *Genome Res*, 1999, 9: 1277 – 1287.
- [56] Waldbieser G C, Bosworth B G, Wolters W R. A microsatellite – based linkage map of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*, genome[A]. Grant D, Lazo G R, eds: *Plant and Animal Genome III* [C]. San Diego: Scherago Co, 2000. 157.
- [57] Lin P, Cao D F, Kars A, et al. An AFLP – based catfish genetic linkage map and QTL detection for growth and disease resistance [A]. Grant D, Lazo G R. eds: *Plant and Animal Genome III* [C]. San Diego: Scherago Co, 2000. 157.
- [58] Liu Z J. Functional genomics: performance traits-linked DNA markers and normalized cDNA libraries in catfish[A]. Grant D, Lazo G R. eds. *Plant and Animal Genome III* [C]. San Diego: Scherago Co, 2000. 9.
- [59] Brenner S, Elgar G, Sandford R, et al. Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome[J]. *Nature*,



- 1993, 366: 265 - 268.
- [60] Gilley J, Fried M. Extensive gene order differences within regions of conserved synteny between the *Fugu* and human genomes: implication from chromosomal evolution and the cloning of disease genes [J]. *Hum Mol Genet*, 1999, 8: 1313 - 1320.
- [61] Yamaguchi F, Yamaguchi K, Tokuda H, et al. Molecular cloning EDG-3 and N-Shc genes from the puffer fish, *Fugu rubripes*, and conservation of synteny with the human genome[J]. *FEBS Letter*, 1999, 459: 105 - 110.
- [62] Gellner K, Brenner S. Analysis of 148 kb of genomic DNA around the Wnt1 locus of *Fugu rubripes*[J]. *Genome Res*, 1999, 9: 251 - 258.
- [63] Brunner B, Todt T, Lenzner S, et al. Genomic structure and comparative analysis of nine *Fugu* genes: conservation of synteny with human chromosome Xp22.2 - p22.1[J]. *Genome Res*, 1999, 9: 437 - 448.
- [64] Elgar G, sandford R, Aparicio S, et al. Small is beautiful: comparative genomics with the pufferfish (*Fugu rubripes*) [J]. *Trends Genet*, 1996, 12:145 - 150.
- [65] Crooijmans R P M H, Bierbooms V A F, Komen J, et al. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Anim Genet*, 1997, 28: 129 - 134.
- [66] 孙效文,梁利群. 鲤鱼的遗传连锁图谱(初报)[J]. *中国水产科学*, 2000, 7:1 - 5.
- [67] Aoki T, Nam B H, Hirono I. Sequences of 596 cDNA clones (565,977bp) of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) leukocytes infected with hirme rhabdovirus[J]. *Mar Biotechnol*, 1999, 1: 477 - 488.
- [68] Inoue S, Nam, B H, Hirono I, et al. A survey of expressed genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) liver and spleen[J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1997, 6: 376 - 380.
- [69] Coimbra M R, Hasegawa O, Kobayash K, et al. Four microsatellite markers in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Anim Genet*, 2000, 31:72 - 73.
- [70] Wright D A, Richards, C M, Nace G M. Inheritance of enzymes and blood proteins in the leopard frog, *Rana pipiens*: three linkage groups established[J]. *Biochem Genet*, 1980, 18: 591 - 616.
- [71] Wright D A, Richards C M. Peptidase isozymes of the leopard frog *Rana pipiens*: properties and genetics[J]. *J Exp Zool*, 1982, 221: 283 - 293.
- [72] 张 辉,吴清江. 中国林蛙乳酸脱氢酶多基因系统及基因间连锁关系的研究[J]. *遗传学报*, 1996, 23: 11 - 17.
- [73] Wright D A, Richards C M. Two sex-linked loci in the leopard frog, *Rana pipiens* [J]. *Genetics*, 1983, 103: 249 - 261.
- [74] 吴清江,桂建芳. 鱼类遗传育种工程[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999.94 - 102.
- [75] Arnheim N, Li H, Cui X. Genetic mapping by single sperm typing[J]. *Anim Genet*, 1991, 22: 105 - 115.
- [76] Lander E S, Bostein D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps[J]. *Genetics*, 1989, 121: 185 - 189.
- [77] Zeng Z B. Precision mapping of quantitative trait loci[J]. *Genetics*, 1994, 136: 1457 - 1460.
- [78] Spruell P, Pilgrim K L, Greene B A, et al. Inheritance of nuclear markers in gynogenetic haploid pink salmon[J]. *J Hered*, 1999, 90: 289 - 296.