



基于基因分型测序 (GBS) 技术分析鲂鲂鱼类及其杂交子代的遗传结构

刘 凯¹, 冯晓宇¹, 沈玉帮², 马恒甲¹,
李家乐², 郭 炜¹, 谢 楠^{1*}

(1. 杭州市农业科学研究院, 水产研究所, 浙江 杭州 310024;

2. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为利用基因分型测序 (GBS) 技术对三角鲂、翘嘴鲂、蒙古鲂及其杂交子代的遗传结构进行分析。本研究采用 GBS 技术对三角鲂、翘嘴鲂、蒙古鲂及其杂交子代 (F_1) 共 6 个个体的鳍条提取总 DNA 进行双酶切简化基因组测序, 使用 Stacks 软件构建 SNP 比对参考基因组进行分析。结果显示, 6 个个体共产生 clean data 7.01 GB, 平均每个样品 1.17 GB; 将所有样本作为一个群体检测 SNP 变异, 共检测出 SNP 位点 399 145 个, 质控过滤后得到 SNP 位点 97 911 个。基于亲本及其子代的 SNP 位点分析表明, 亲本及其子代的平均观测杂合度 (H_o) 为 0.339 4, 平均期望杂合度 (H_e) 为 0.285 3, 平均多态性信息含量 (PIC) 为 0.273 7, 平均核苷酸多样性 (P_i) 为 0.372 7, 平均最小等位基因频率 (MAF) 为 0.247 2, 平均可分型样品比例 (genotype rate) 为 93.94%。遗传分化指数和遗传距离分析结果表明, 三角鲂、翘嘴鲂、蒙古鲂及其杂交子代间的分化指数为 0.309 6~0.894 0, 遗传距离为 0.370 5~2.244 3。使用最大似然 (ML) 法构建的系统进化树显示, 三角鲂、翘嘴鲂、蒙古鲂及其杂交子代区分明显。本研究通过对三角鲂、翘嘴鲂、蒙古鲂及其杂交子代的遗传结构分析, 将为鲂鲂鱼类的杂交选育提供更多的遗传学数据。

关键词: 三角鲂; 翘嘴鲂; 蒙古鲂; 杂交; 单核苷酸多态性; 基因结构; 基因分型测序
中图分类号: Q 959.4; S 917.4 **文献标志码:** A

鲂鲂鱼类均隶属于鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 鲂亚科 (Cultrinae)。鲂通常指鲂亚科中鲂属 (*Megalobrama*) 物种, 主要包括三角鲂 (*M. terminalis*)、团头鲂 (*M. amblycephala*)、广东鲂 (*M. hoffmanni*) 等; 鲂通常指鲂亚科中鲂属 (*Culter*) 和红鲂属 (*Chanodichthys*) 物种, 主要包括红鳍鲂 (*C. erythropterus*)、翘嘴鲂 (*C. alburnus*)、蒙古鲂 (*C. mongolicus*)、达氏鲂 (*C. dabryi*) 等^[1]。

鲂亚科中主要经济鱼类也集中于鲂、鲂鱼类中, 其中, 三角鲂、团头鲂、翘嘴鲂的养殖已形成较大规模, 在一些地方成为区域性特色养殖品种^[2-3], 据 2016 年统计, 在浙江杭州、金华等地区, 钱塘江三角鲂的养殖面积已超 6.67 km²^[4]。

远缘杂交是水生动物种、属、亚科甚至科之间进行育种的重要手段之一, 可以把亲本的优势性状结合到一起, 从而获得优良杂交新品

收稿日期: 2020-07-03 修回日期: 2020-11-12

资助项目: 现代农业产业技术体系专项 (CARS-45-39); 杭州市农业科研主动设计项目 (20162012A03); 杭州市农科院创新基金 (2019HNCT-01)

第一作者: 刘凯 (照片), 从事水产动物遗传及免疫研究, E-mail: liukai0106@hz.cn

通信作者: 谢楠, E-mail: n.xie@163.com



种^[5]。以往的研究表明,通过远缘杂交,许多鱼类物种不仅获得了更好的生长优势,如尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)×奥利亚罗非鱼 (*O. aureus*)^[6]、黑鮑 (*Haliotis rubra*)×平滑鮑螺 (*H. laevigata*)^[7]和北极红点鲑 (*Salvelinus alpinus*)×利文鱒 (*Salmo trutta*)^[8]等,一些杂交子代的抗逆性也得到了显著提高^[9]。已有的鲂鮨远缘杂交的研究结果均表明,鲂鮨鱼类杂交子代具有显著的杂种优势,如生长快、饲料利用率高、肌肉品质好和肌间刺显著减少等^[10-17]。但目前对鲂鮨鱼类杂交的遗传结构分析仍相对有限^[18-21],主要研究分别集中在随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、序列相关扩增多态性 (sequence related amplified polymorphism, SRAP) 和微卫星标记等分析上,而对于单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 标记则研究得较少。单核苷酸多态性是基于单核苷酸的突变,在基因组中数量多、分布广,且具有相对较高的遗传稳定性,在动物遗传育种及遗传多样性评估中有着重要作用^[22],而基因分型测序 (genotyping by sequencing, GBS) 技术则给大量高质量 SNP 的获取提供了便利。作为一种高通量测序技术,GBS 技术适用于不同种生物的种群研究、种质鉴定和辅助育种,相比于重测序,GBS 以部分基因组信息代表全基因组信息,操作简便,降低了测序成本,同时又可以获得大量的 SNP 信息,如董世武等^[23]利用 GBS 技术对梅花鹿 (*Cervus nippon*)、马鹿 (*C. elaphus*) 及其杂交后代进行测序,获得了 31 630 个 SNP 标记;Shen 等^[24]利用 GBS 技术对草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 测序,获得了 43 310 个 SNP 标记。

鲂鮨鱼类作为不同的物种,其基因组中一定包含着物种之间相互区别的遗传信息,只在亲本间存在的微小遗传信息差异(如单核苷酸的突变)会伴随杂交传递给子代,使之在单核苷酸水平上显现出来。因此,本研究选择用 SNP 作为分子标记对三角鲂、翘嘴鮨、蒙古鮨及其杂交子代进行遗传多样性分析,而大量高质量的 SNP 则利用 GBS 技术获得。通过对三角鲂、翘嘴鮨、蒙古鮨及其杂交子代 SNP 标记的挖掘、遗传结构的分析,以期对三角鲂、翘嘴鮨、蒙古鮨及其杂交子代的鉴别提供理论依据,也将为鲂鮨鱼类的杂交选育提供更多的遗传学数据,如为构建高密度遗传图谱提供 SNP 标记,筛选性状关联 SNP 标记等。

1 材料与方法

1.1 实验材料

三角鲂(SJF)、翘嘴鮨(QZB)、蒙古鮨(MGB)原始亲本均采自于钱塘江,并于杭州市农业科学研究院水产研究所养殖池塘中保种繁育。三角鲂(♀)×翘嘴鮨(♂)(ZJFB-1)、三角鲂(♂)×翘嘴鮨(♀)(ZJFB-3)和三角鲂(♀)×蒙古鮨(♂)(ZJFM)杂交子代,采用人工杂交方法获得。各取三角鲂、翘嘴鮨、蒙古鮨及杂交子代 1 尾,均为 3 龄鱼,体质量 800~1 000 g,采集胸鳍后用无水乙醇保存,基因组 DNA 的提取采用传统的苯酚-氯仿提取法^[25]。

1.2 文库构建、测序及数据质控

GBS 测序文库构建参照 UGBS-Flex 分析方法^[26]进行,用 *Pst*I/*Msp*I 对基因组 DNA 进行双酶切,酶切后的片段两端用 T₄ 连接酶加接头和 barcode,采用磁珠回收系统回收片段大小,对回收片段使用高保真酶进行 PCR 扩增,构建好的文库混合后,交由上海欧易生物科技有限公司进行测序,测序采用 Illumina HiSeq Xten 进行,测序方式为双末端测序 (paired-end, 2×150 bp)。对原始下机数据 (Raw Reads) 进行数据的质控过滤,质控步骤:利用 FastQC 对 Raw Reads 进行检测,确保数据质量满足分析要求;使用 Stacks 软件包^[27]中的 process_radtags 程序,去除混池下机 Raw Reads 含有接头序列的 Reads,并依据建库样品与 barcode 对应关系拆分为单样品 Raw Reads;使用 Fastx-toolkit 软件包中的 fastx_trimmer 程序,去除酶切位点序列以及 3'端 FastQC 质控质量分数小于 20 的所有碱基,得到 Clean Reads。

1.3 SNP 分析

SNP 比对参考基因组的构建 使用 Stacks 软件中的 Ustacks 程序对每个样品聚类,之后使用 ASUstacks 方法对聚类结果进行处理。通过 Blastn 软件剔除相似度大于 98% 的标签,并选取至少 50% 个体共有的标签,构建 SNP 比对参考基因组。

样品测序结果评估 使用 Bowtie2 软件^[28]将 Clean Reads 比对到 SNP 比对参考基因组上,通过比对率检测样品与参考基因组的相似程度。一般比对率越高,相似程度越高,比对率偏低的原因可能是物种与参考基因组差异较大或样

品存在外源污染。根据比对结果统计样品测序深度信息并计算对 SNP 比对参考基因组的覆盖度。

SNP 检测 基于样品与 SNP 比对参考基因组的比对结果,利用 GATK 软件^[29]Haplotype-Caller 程序生成每个样品 gVCF 文件,再通过 GATK 软件 GenotypeGVCFs 程序进行群体 SNP 检测。对得到的群体 SNP 数据,使用 GATK 软件 SelectVariants 程序对预测结果进行筛选,得到初步 SNP 结果。为了降低 SNP 检测的错误率,使用 VCFtools 软件^[30]对获得的 SNP 分型结果进行过滤,过滤条件: Reads 支持数不低于 4;剔除 MAF<0.01 的位点;剔除 SNP 分型缺失率>20% 的位点。过滤后最终得到 SNP 分型结果。

1.4 遗传学分析

系统进化树分析 将每个个体 SNP 标记首尾相连,如果缺失相应的位点,则用“-”代替。获得的序列利用 IQ-TREE 软件^[31]基于 Maximum Likelihood (ML)方法构建系统进化树,参数设置为 -m TVM+F、-st DNA、-bb 1000、-alrt 1000、-pers 0.5、-nstop 100。进化树的可靠性通过 Ultrafast Bootstrap 法^[32]进行检验(重复 1 000 次)。利用 iTOL 软件^[33]对系统进化树进行美化。

主成分分析 主成分分析 (PCA) 是基于个体基因组 SNP 差异程度,按照不同性状特征将个体按主成分聚类成不同的亚群,同时用作和其他方法进行相互验证。使用 PLINK 软件^[34]对获得的 SNP 标记进行 PCA 分析,得到影响最

大的 2 个特征向量。

遗传结构分析 首先对基因组 SNP 进行过滤,过滤条件:仅选取 SNP 标记;剔除最小等位基因频率<0.05 的位点;通过 PLINK 软件选取不存在紧密连锁的位点。利用 Admixture 软件^[35],按照 K=2~10 进行群体结构分析,使用 Pong 软件^[36]进行聚类分析,绘制群体遗传结构图。

遗传特征分析 采用 VCFtools 软件^[30]分别统计整个群体和个体内 SNP 位点的观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e)、多态性信息含量 (PIC)、核苷酸多样性 (P_i)、最小等位基因频率 (MAF) 和可分型样品比例 (genotype rate)。使用 R 包 GenePOP^[37] 统计分析每个 SNP 位点在所有个体中的 F -统计指标 (F_{is} 、 F_{st} 、 F_{it}),并计算样品间的遗传分化系数 (F_{st}) 和 Reynolds' 遗传距离 (Reynolds' genetic distance, RD)。

2 结果

2.1 测序数据及 SNP 检测统计

GBS 测序共得到测序数据 (Raw Reads) 7.60 GB,其中 Q20>96%, Q30>91%。经数据质控过滤后,得到高质量 reads 51 581 564 条,高质量数据 7.01 GB,平均每个样品数据量 1.17 GB,质控后的数据质量满足数据分析需要(表 1)。构建的 SNP 比对参考基因组共有序列 155 140 条,将所有样本作为一个群体检测 SNP 变异,共检测出 SNP 位点 399 145 个,质控过滤后在 SNP 比对参考基因组 30 880 条序列上共得到 SNP 位点 97 911 个,平

表 1 GBS 测序数据统计

Tab. 1 Data statistics after genotyping by sequencing

样品 sample	原始测序数量 raw reads	原始测序大小/GB raw base	有效测序数量 clean reads	有效测序大小/GB clean base	≥Q20%	≥Q30%	比对率/% ratio	平均测序深度 average depth	覆盖度/% coverage rate
ZJFB-1	8 222 838	1.21	8 222 838	1.12	96.74	91.64	64.00	19.34	87.54
ZJFB-3	8 838 196	1.30	8 838 196	1.20	97.27	92.69	68.23	21.86	88.64
ZJFM	8 701 458	1.28	8 701 458	1.18	97.32	92.79	60.88	22.26	76.04
SJF	9 090 194	1.34	9 090 194	1.24	97.53	93.33	68.8	32.18	62.31
QZB	8 406 272	1.24	8 406 272	1.14	97.24	92.65	64.18	29.13	59.38
MGB	8 322 606	1.23	8 322 606	1.13	97.08	92.34	54.66	29.58	48.43

注: ratio 表示样品测序数据比对到 SNP 比对参考基因组的百分率, average depth 表示平均测序深度, cover 表示样品测序数据对 SNP 比对参考基因组的覆盖度。SJF 为三角鲂, QZB 为翘嘴鲌, MGB 为蒙古鲌, ZJFB-1 为三角鲂(♀)×翘嘴鲌(♂)杂交子代, ZJFB-3 为三角鲂(♂)×翘嘴鲌(♀)杂交子代, ZJFM 为三角鲂(♀)×蒙古鲌(♂)杂交子代, 下同

Notes: ratio represents the percentage of sample sequencing data compared to the reference genome for SNP analysis, average depth represents the average sequencing depth, and cover represents the coverage of the sample sequencing data for the reference genome for SNP analysis. SJF indicates *M. terminalis*; QZB indicates *C. alburnus*; MGB indicates *C. mongolicus*; ZJFB-1 indicates the hybrids of *M. terminalis*(♀)×*C. alburnus*(♂); ZJFB-3 indicates the hybrids of *M. terminalis*(♂)×*C. alburnus*(♀); ZJFM indicates the hybrids of *M. terminalis*(♀)×*C. mongolicus*(♂), the same below

均变异率为 0.006 3/kB, 样品的平均测序深度达到 19 以上。

2.2 遗传多样性分析

将所有样本作为一个群体检测 SNP 变异, 根据得到的 SNP 位点, 对三角鲂、翘嘴鲌、蒙古鲌及其杂交子代的 H_o 、 H_e 、 PIC 、 P_i 、MAF 和 genotype rate 进行分析, 从而评价亲本及其子代的遗传多样性以及对亲本及其子代的分型率。基于 SNP 位点分析表明, 亲本及其子代的平均 H_o 为 0.3394, 平均 H_e 为 0.2853, 平均 PIC 为 0.2737, 平均 P_i 为 0.3727, 平均 MAF 为 0.2472, 平均 genotype rate 为 93.94%。从 genotype rate 可见, 利用 GBS 技术获得的 SNP 标记, 可以很好地区分三角鲂、翘嘴鲌、蒙古鲌及其杂交子代, 对亲本及其子代的区分度可以达到 93.94%。SNP 位点在亲本及其子代的 PIC 为 0.2737, >0.25 , 表明利用 GBS 技术获得的 SNP 标记在三角鲂、翘嘴鲌、蒙古鲌及其杂交子代中呈现出中度多态性^[38]。

2.3 遗传分化分析

对三角鲂、翘嘴鲌、蒙古鲌及其杂交子代进行了主成分分析(图 1), 结果可见三角鲂、翘嘴鲌、蒙古鲌及其杂交子代分别聚在不同的点, 除了鲂鲌杂交子代 ZJFB-1 和 ZJFB-3 聚类点靠得

比较近, 表明三角鲂、翘嘴鲌、蒙古鲌及其杂交子代间存在明显的遗传分化, 而杂交子代 ZJFB-1 和 ZJFB-3 间遗传分化不是十分明显。基于不同群体间的 F_{st} 和 RD 的结果, 三角鲂、翘嘴鲌、蒙古鲌及其杂交子代间的 F_{st} 为 0.309 6~0.894 0, RD 为 0.370 5~2.244 3(表 2), 其中亲本间, 即三角鲂、翘嘴鲌和蒙古鲌之间, F_{st} 和 RD 均处于相对较高水平, 为 0.845 1~0.894 0, RD >1.8 , 而 2 个三角鲂和翘嘴鲌的杂交子代之间的 F_{st} 和 RD 最低, 三角鲂(♀)×蒙古鲌(♂)杂交子代的 F_{st} 和 RD 则稍高于三角鲂×翘嘴鲌 2 个杂交子代。该结果与系统进化树的分析结果基本一致(图 2)。进化树分析结果表明, 蒙古鲌聚为一支, 三角鲂(♀)×蒙古鲌(♂)杂交子代聚为一支, 三角鲂、翘嘴鲌及其杂交子代则聚为一大支。在这个大的分支中, 三角鲂首先分化出来, 单独聚为一支, 之后三角鲂(♀)×翘嘴鲌(♂)杂交子代再分化出来, 最后三角鲂(♂)×翘嘴鲌(♀)杂交子代和翘嘴鲌再分化开。利用 Admixture 软件^[35], 根据 CV 值筛选最优 K 值, 当 K=6 时为最优。但结合样品信息, 最优 K 值应为 3, 即所有样品划分为 3 个亚群, 并绘制了遗传结构图(图 3), 该遗传结构图进一步佐证了系统进化树的分析结果, 从该图可见, 3 个亲本划分为 3 个亚群, 三角鲂×翘嘴

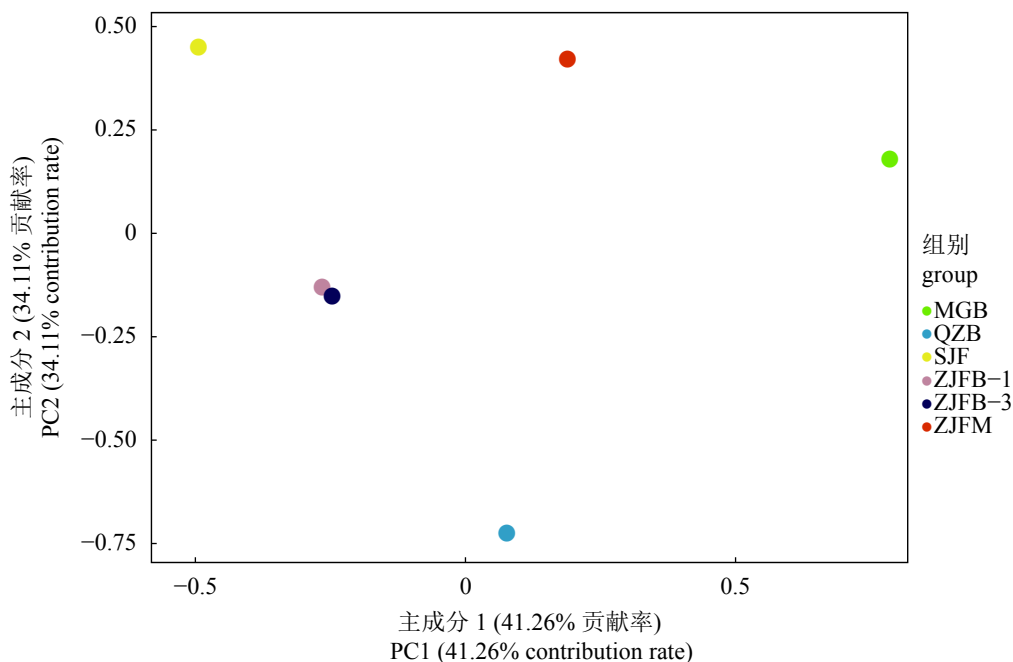


图 1 三角鲂、翘嘴鲌、蒙古鲌及其杂交子代的主成分分析

Fig. 1 Principal component analysis of *M. terminalis*, *C. alburnus*, *C. mongolicus* and their hybrids

表 2 三角鲟、翘嘴鲟、蒙古鲟及其杂交子代的遗传分化系数和遗传距离表

Tab. 2 Genetic differentiations and distance of *M. terminalis*, *C. alburnus*, *C. mongolicus* and their hybrids

样品 sample	ZJFB-1	ZJFB-3	ZJFM	SJF	QZB	MGB
ZJFB-1		0.370 5	0.597 5	0.751 6	0.786 4	1.312 3
ZJFB-3	0.309 6		0.582 7	0.749 1	0.758 0	1.309 3
ZJFM	0.449 8	0.441 6		0.737 7	1.164 4	0.727 1
SJF	0.528 4	0.527 2	0.521 8		2.056 5	2.244 3
QZB	0.544 5	0.531 4	0.687 9	0.872 1		1.865 0
MGB	0.730 8	0.730 0	0.516 7	0.894 0	0.845 1	

注: 下三角为样品间遗传分化系数, 上三角为样品间遗传距离

Notes: the lower triangle is the genetic differentiation coefficient between groups, and the upper triangle is the genetic distance between groups

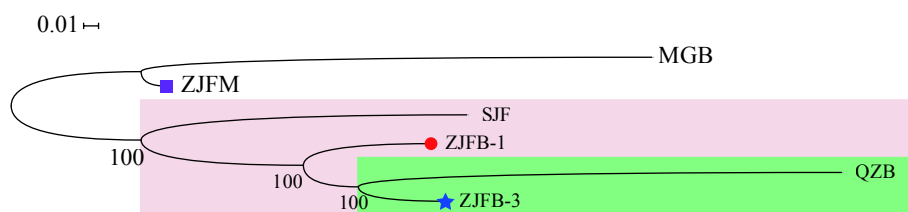


图 2 三角鲟、翘嘴鲟、蒙古鲟及其杂交子代的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *M. terminalis*, *C. alburnus*, *C. mongolicus* and their hybrids

鮠杂交子代由三角鲟、翘嘴鲟 2 个亚群杂交获得, 三角鲟(♀)×蒙古鲟(♂)杂交子代则由三角鲟、蒙古鲟 2 个亚群杂交获得。

3 讨论

鲟鮠远缘杂交研究已开展多年, 主要围绕团头鲟和翘嘴鲟杂交开展并取得了可喜的结果^[10-14,18-19,21], 但对于三角鲟和翘嘴鲟以及三角鲟和蒙古鲟的杂交研究还相对较少, 已有的报道则主要集中在三角鲟和翘嘴鲟及其杂交子代的形态特征、生长性能和肌肉营养成分等方面^[15-17], 而基于 SNP 标记对三角鲟和翘嘴鲟以及三角鲟和蒙古鲟的杂交研究尚未见报道。已有的鲟鮠杂交分子标记研究相关报道表明, RAPD 标记可用于

翘嘴鲟(♀)×团头鲟(♂)杂交 F₁ 及其父母本的鉴别^[18]。SRAP 标记则未发现翘嘴鲟(♀)×团头鲟(♂)杂交 F₁ 特异性条带^[19]。在三角鲟、团头鲟和翘嘴鲟及其杂交子代中, 微卫星标记 TTF3、TTF4、TTF10 和 Mam25 可用于团头鲟、三角鲟、翘嘴鲟、团头鲟(♀)×翘嘴鲟(♂)、三角鲟(♀)×翘嘴鲟(♂)的鉴别^[20]。在团头鲟和翘嘴鲟及其杂交子代以及回交子代中, 微卫星标记 Me.Am._15、Me.Am._1、TTF01、Mam25 可用于团头鲟(MA)、翘嘴鲟(CA)、团头鲟(♀)×翘嘴鲟(♂)杂交 F₂(MC-F₂)、团头鲟(♀)×MC(♂)回交 F₂(BC1-F₂)、翘嘴鲟♀×MC♂回交 F₂(BC2-F₂) 的鉴别^[21]。而以上报道均缺乏对正反交子代的鉴别研究, 在乌鳢(*Channa argus*)和斑鳢(*C. maculata*)的自交与杂

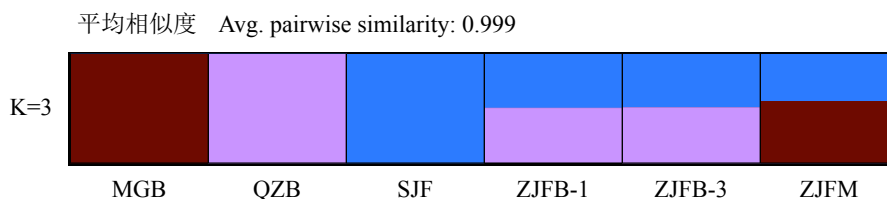


图 3 三角鲟、翘嘴鲟、蒙古鲟及其杂交子代的遗传结构图

Fig. 3 Genetic structure of *M. terminalis*, *C. alburnus*, *C. mongolicus* and their hybrids

Red, pink, and blue color blocks represent *C. mongolicus*, *C. alburnus*, and *M. terminalis*

交研究中, 微卫星标记不能区分杂交鳊中正交组合和反交组合^[39]。而本研究基于 GBS 技术开发的 97 911 个 SNP 标记则可以很好地区分三角鲂、翘嘴鲌和蒙古鲌及其杂交子代, 对亲本及其子代的区分度达到了 93.94%。董世武等^[23]利用 GBS 技术开发的 31 630 个 SNP 标记对梅花鹿、马鹿及其杂交后代的鉴别也获得了满意的结果。

UGbS-Flex 分析方法^[26], 可以不用考虑研究物种的育种、倍性以及是否有参考基因组等情况, 却可以更有效地识别 SNP 位点。因此, 本研究可以将三角鲂、翘嘴鲌、蒙古鲌及其杂交子代作为一个群体检测 SNP 变异。遗传多样性和遗传潜力可通过 H_e 、 H_o 和 PIC 等遗传参数反映^[40]。杂交鱼表现性状会产生杂交优势, 具有比双亲更为丰富的多态性^[41]。基于微卫星对团头鲂(♀)×翘嘴鲌(♂)、三角鲂(♀)×翘嘴鲌(♂)的遗传结构分析表明, 杂交使得三角鲂、团头鲂和翘嘴鲌的杂交子代具有更高的遗传多样性和明显的杂交优势^[20]。基于 UGbS-Flex 分析方法^[26]所得到的 97 911 个 SNP 标记在三角鲂、翘嘴鲌、蒙古鲌及其杂交子代中也具有明显的多态性。但亲本及其子代间测序样品数量较少, 而样本数量对遗传参数的影响也较大^[42], 使得本研究中亲本及其子代的 H_o 及 H_e 值都相对偏低。虽然本研究中亲本及其子代间测序样品数量较少, 对部分遗传多样性参数会产生一定的影响, 但总体而言, 本研究所得结果达到了对三角鲂、翘嘴鲌、蒙古鲌及其杂交子代遗传结构分析的目的, 所获得的 97 911 个 SNP 标记能够很好地区分三角鲂、翘嘴鲌和蒙古鲌及其杂交子代。由于 GBS 分析方法与传统分子标记方法, 如微卫星标记等, 有较大不同, 基于 GBS 分析方法所获得结果无法与传统分子标记方法直接进行比较^[43], 如本研究中 H_o 及 H_e 值等遗传参数偏低, 也可能由于分析方法的差异造成。但是, GBS 分析方法所获得 SNP 标记数量多, 相对传统分子标记, 能够更好地代表全基因组的遗传信息, 因此具有更高的准确性和稳定性^[43]。

利用 ML 法对三角鲂、翘嘴鲌、蒙古鲌及其杂交子代进行系统进化树分析, 通过系统进化树分析结果可见, 三角鲂×翘嘴鲌的 2 个杂交子代间的遗传距离最近, 三角鲂(♀)×蒙古鲌(♂)杂交子代的遗传距离则稍高于三角鲂×翘嘴鲌 2 个杂交子代, 而三角鲂、翘嘴鲌和蒙古鲌等亲本

间遗传距离较远。遗传分化指数和遗传距离分析, 以及遗传结构分析也均支持以上结果。该结果与基于微卫星对三角鲂、团头鲂和翘嘴鲌及其杂交子代的分析结果类似^[20]。此外, 从系统进化树中可见, 三角鲂×翘嘴鲌 2 个杂交子代都倾向于与母本优先聚类, 但从遗传结构图上看, 没有显著差异。而从遗传分化指数和遗传距离比较上看, 三角鲂(♀)×翘嘴鲌(♂)杂交子代稍偏向母本, 三角鲂(♂)×翘嘴鲌(♀)杂交子代稍偏向父本, 三角鲂(♀)×蒙古鲌(♂)杂交子代稍偏向父本。从遗传结构图上也直观看出, 三角鲂(♀)×蒙古鲌(♂)杂交子代稍偏向父本。基于对三角鲂、翘嘴鲌杂交子代形态特征的判别分析, 三角鲂、翘嘴鲌杂交子代在尾柄高/全长、尾长/全长、眼径/全长等指标上与其亲本之间差异显著; 对消化道长/体长的测量发现, 三角鲂(♀)×翘嘴鲌(♂)杂交子代 (2.07) 更接近于母本 (3.54), 而三角鲂(♂)×翘嘴鲌(♀)杂交子代 (1.48) 则更接近父本 (1.23)。郭洪洪等^[16]对三角鲂(♀)×翘嘴鲌(♂)杂交子代可数和可量性状的研究表明, 背鳍和臀鳍 2 个性状为偏父本性状, 侧线鳞、侧线上鳞和侧线下鳞 3 个性状偏向母本; 可量性状有 7 个性状分别与父母本有显著性差异, 平均杂种指数为 51.61, 接近理想的中间值。远缘杂交获得的杂交子代的形态变异较大^[16], 有的偏向于亲本一方, 有的近于中间型, 这可能是远缘杂交双亲的遗传物质对子代的贡献不对等的缘故^[19]。由此可见, 杂交子代的亲本偏向性都不是很大, 但继承亲本的遗传物质存在差异性, 这为定向育种提供了一定帮助^[20]。

参考文献 (References):

- [1] Froese R, Pauly D. FishBase[EB/OL]. [2020-05-15]. www.fishbase.org.
- [2] 徐薇, 熊邦喜. 我国鲂属鱼类的研究进展[J]. 水生态学杂志, 2008, 1(2): 7-11.
Xu W, Xiong B X. Advances in the research on genus *Megalobrama* in China[J]. Journal of Hydroecology, 2008, 1(2): 7-11(in Chinese).
- [3] 王红卫, 高士杰, 尹海富. 兴凯湖翘嘴鲌的研究进展[J]. 渔业经济研究, 2009(4): 19-22.
Wang H W, Gao S J, Yin H F. Research progress of top-mouth culter of Xingkai lake in Heilongjiang
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- Province[J]. Fisheries Economy Research, 2009(4): 19-22(in Chinese).
- [4] 胡雪松, 石连玉. 我国三角鲂种质资源的研究进展[J]. 水产学杂志, 2020, 33(3): 84-89.
- Hu X S, Shi L Y. A review: research progress on germplasm resource of black bream (*Megalobrama terminalis*) in China[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2020, 33(3): 84-89(in Chinese).
- [5] 楼允东, 李小勤. 中国鱼类远缘杂交研究及其在水产养殖上的应用[J]. 中国水产科学, 2006, 13(1): 151-158.
- Lou Y D, Li X Q. Distant hybridization of fish and its application in aquaculture in China[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1): 151-158(in Chinese).
- [6] Al-Harbi A H. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)[J]. Aquaculture, 2016, 464: 515-520.
- [7] Botwright N A. Karyotype comparison between *Halilobius rubra*, *H. laevigata* and the interspecific hybrid[J]. Aquaculture Research, 2015, 46(1): 236-241.
- [8] Refstie T. Hybrids between salmonid species. Growth rate and survival in seawater[J]. Aquaculture, 1983, 33(1-4): 281-285.
- [9] Lim C, Leamaster B, Brock J A. Riboflavin requirement of fingerling red hybrid tilapia grown in seawater[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1993, 24(4): 451-458.
- [10] Xiao J, Kang X W, Xie L H, et al. The fertility of the hybrid lineage derived from female *Megalobrama amblycephala* × male *Culter alburnus*[J]. Animal Reproduction Science, 2014, 151(1-2): 61-70.
- [11] 郑国栋, 张倩倩, 李福贵, 等. 团头鲂(♀) × 翘嘴鲌(♂) 杂交后代的遗传特征及生长差异[J]. 中国水产科学, 2015, 22(3): 402-409.
- Zheng G D, Zhang Q Q, Li F G, et al. Genetic characteristics and growth performance of different *Megalobrama amblycephala* (♀) × *Erythroculter ilishaeformis* (♂) hybrids[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(3): 402-409(in Chinese).
- [12] Zheng G D, Wu C B, Liu J, et al. Transcriptome analysis provides new insights into the growth superiority of a novel backcross variety, *Megalobrama amblycephala* ♀ × (*M. amblycephala* ♀ × *Culter alburnus* ♂) ♂[J]. Aquaculture, 2019, 512: 734317.
- [13] Zheng G D, Guo D D, Wu C B, et al. The obvious heterosis and genetic characters of intergeneric cross and backcross juveniles between blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) and topmouth culter (*Culter alburnus*)[J]. Aquaculture Research, 2019, 50(6): 1634-1643.
- [14] 蒋文秤, 贾永义, 刘士力, 等. 鲂鮠F₁、F₂及其亲本肌间骨的比较分析[J]. 水生生物学报, 2016, 40(2): 277-286.
- Jiang W P, Jia Y Y, Liu S L, et al. Comparative analysis of intermuscular bones in hybrid F₁, F₂ of (*C. alburnus*)(♀) × (*M. amblycephala*) (♂) and its parents[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(2): 277-286(in Chinese).
- [15] 马恒甲, 刘新轶, 黄辉, 等. 三角鲂(♀) × 翘嘴红鲌(♂)F₁及其亲本肌肉成分与必需氨基酸组成模式的比较分析[J]. 渔业研究, 2016, 38(4): 281-287.
- Ma H J, Liu X T, Huang H, et al. Comparative analysis on the composition and composition pattern of essential amino acids in muscle of crossbreed F₁ [*Megalobrama terminalis* (♀) × *Erythroculter ilishaeformis* (♂)] and its parents[J]. Journal of Fisheries Research, 2016, 38(4): 281-287(in Chinese).
- [16] 郭洪洪, 郑国栋, 吴成宾, 等. 三角鲂(♀) × 翘嘴鲌(♂) 杂交F₁的生长性能及形态差异[J]. 水产学报, 2018, 42(10): 1572-1581.
- Guo H H, Zheng G D, Wu C B, et al. Growth performance and morphological characteristics analysis of the hybrid F₁, *Megalobrama terminalis* (♀) × *Culter alburnus* (♂)[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(10): 1572-1581(in Chinese).
- [17] Guo H H, Zheng G D, Wu C B, et al. Comparative analysis of the growth performance and intermuscular bone traits in F₁ hybrids of black bream (*Megalobrama terminalis*) (♀) × topmouth culter (*Culter alburnus*) (♂)[J]. Aquaculture, 2018, 492: 15-23.
- [18] 顾志敏, 贾永义, 叶金云, 等. 翘嘴红鲌(♀) × 团头鲂(♂) 杂种F₁的形态特征及遗传分析[J]. 水产学报, 2008, 32(4): 533-544.
- Gu Z M, Jia Y Y, Ye J Y, et al. Studies on morphological characteristics and genetic analysis of the hybrid F₁, *Erythroculter ilishaeformis* ♀ × *Megalobrama amblycephala* ♂[J]. Journal of Fisheries of China, 2008,

- 32(4): 533-544(in Chinese).
- [19] 贾永义, 顾志敏, 叶金云, 等. 翘嘴红鲌(♀)×团头鲂(♂)杂种F₁的SRAP标记分析[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(2): 198-203.
- Jia Y Y, Gu Z M, Ye J Y, *et al.* Analysis on genetic variations of *Erythroculter ilishaeformis* (♀)×*Megalobrama amblycephala* (♂) Hybrids F₁ by SRAP markers[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(2): 198-203(in Chinese).
- [20] 苏晓磊, 郑国栋, 蒋霞云, 等. 三角鲂×翘嘴鲌、团头鲂×翘嘴鲌两种杂交后代微卫星遗传结构分析[J]. 水生生物学报, 2019, 43(2): 264-271.
- Su X L, Zheng G D, Jiang X Y, *et al.* Microsatellite markers analysis of two hybrids of *Megalobrama terminalis* × *Erythroculter ilishaeformis*, *Megalobrama amblycephala* × *Erythroculter ilishaeformis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(2): 264-271(in Chinese).
- [21] 崔文涛, 郑国栋, 苏晓磊, 等. 鲂鲌杂交及回交F₂群体的微卫星遗传结构及其生长性能分析[J]. 中国水产科学, 2020, 27(6): 613-623.
- Cui W T, Zheng G D, Su X L, *et al.* Analysis of microsatellite markers and growth performance of hybrid F₂ and two backcross F₂ populations of *Megalobrama amblycephala* ♀ × *Culter alburnus* ♂[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(6): 613-623(in Chinese).
- [22] 唐立群, 肖层林, 王伟平. SNP分子标记的研究及其应用进展[J]. 中国农学通报, 2012, 28(12): 154-158.
- Tang L Q, Xiao C L, Wang W P. Research and application progress of SNP markers[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(12): 154-158(in Chinese).
- [23] 董世武, 王天骄, 刘华淼, 等. 基于GBS技术对梅花鹿、马鹿及其杂交后代基因组SNP特征的分析[J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(12): 2422-2430.
- Dong S W, Wang T J, Liu H M, *et al.* Analysis of genomic SNP characteristics of sika deer, red deer and their hybrid progenies based on GBS technology[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2019, 50(12): 2422-2430(in Chinese).
- [24] Shen Y B, Wang L, Fu J J, *et al.* Population structure, demographic history and local adaptation of the grass carp[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20: 467.
- [25] Green M R, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012: 47-53.
- [26] Qi P, Gimode D, Saha D, *et al.* UGBS-Flex, a novel bioinformatics pipeline for imputation-free SNP discovery in polyploids without a reference genome: finger millet as a case study[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 117.
- [27] Catchen J, Hohenlohe P A, Bassham S, *et al.* Stacks: an analysis tool set for population genomics[J]. *Molecular Ecology*, 2013, 22(11): 3124-3140.
- [28] Langmead B, Salzberg S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(4): 357-359.
- [29] McKenna A, Hanna M, Banks E, *et al.* The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[J]. *Genome Research*, 2010, 20(9): 1297-1303.
- [30] Danecek P, Auton A, Abecasis G, *et al.* The variant call format and VCFtools[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(15): 2156-2158.
- [31] Nguyen L T, Schmidt H A, von Haeseler A, *et al.* IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2015, 32(1): 268-274.
- [32] Hoang D T, Chernomor O, von Haeseler A, *et al.* UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(2): 518-522.
- [33] Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W256-W259.
- [34] Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2007, 81(3): 559-575.
- [35] Alexander D H, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals[J]. *Genome Research*, 2009, 19(9): 1655-1664.
- [36] Behr A A, Liu K Z, Liu-Fang G, *et al.* Pong: fast analysis and visualization of latent clusters in population genetic data[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(18): 2817-2823.
- [37] Rousset F. GENEPOP '007: a complete re-implementation

- tion of the GENEPOP software for Windows and Linux[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(1): 103-106.
- [38] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Society of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [39] 朱树人, 李忠全, 冯晓宇, 等. 乌鳢和斑鳢微卫星制备及其对自交与杂交F₁代的初步鉴定[J]. *动物学杂志*, 2011, 46(4): 1-7.
- Zhu S R, Li Z Q, Feng X Y, *et al.* Isolation of microsatellite makers for *Channa argus* and *C. maculate* and primary identification of *C. argus*, *C. maculate* and their reciprocal hybrids[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2011, 46(4): 1-7(in Chinese).
- [40] 杨弘, 李大宇, 曹祥, 等. 微卫星标记分析罗非鱼群体的遗传潜力[J]. *遗传*, 2011, 33(7): 768-775.
- Yang H, Li D Y, Cao X, *et al.* Genetic potential analysis of six tilapia populations by microsatellite DNA markers[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2011, 33(7): 768-775(in Chinese).
- [41] 李思发, 陈林, 蔡完其. 吉奥罗非鱼(新吉富罗非鱼♀× 奥利亚罗非鱼♂)和4个近缘遗传型罗非鱼的遗传差异的RAPD、SSR比较分析[J]. *水产学报*, 2008, 32(5): 657-664.
- Li S F, Chen L, Cai W Q. Genetic variations among a new tilapia hybrid [new GIFT Tilapia (*Oreochromis niloticus*) ♀× blue tilapia (*O. aureas*)♂] and four closed genotypes of tilapia by RAPD and SSR analysis[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(5): 657-664(in Chinese).
- [42] 李鸥, 赵莹莹, 郭娜, 等. 草鱼种群SSR分析中样本量及标记数量对遗传多度的影响[J]. *动物学研究*, 2009, 30(2): 121-130.
- Li O, Zhao Y Y, Guo N, *et al.* Effects of sample size and loci number on genetic diversity in wild population of grass carp revealed by SSR[J]. *Zoological Research*, 2009, 30(2): 121-130(in Chinese).
- [43] 高磊, 鲍相渤, 于思梦, 等. 基于GBS技术的黄渤海沿岸托氏瑁螺遗传特征分析[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(2): 204-212.
- Gao L, Bao X B, Yu S M, *et al.* Analysis of the genetic characteristics of *Umbonium thomasi* populations along the Yellow and Bohai Seas using GBS[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(2): 204-212(in Chinese).

Genetic structure analysis of *Megalobrama terminalis*, *Culter alburnus*, *Chanodichthys mongolicus* and their hybrids based on genotyping by sequencing

LIU Kai¹, FENG Xiaoyu¹, SHEN Yubang², MA Hengjia¹,
LI Jiale², GUO Wei¹, XIE Nan^{1*}

(1. Institute of Fishery Science, Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310024, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Distant hybridization is an essential means of breeding among aquatic animal species, genera, subfamilies, and even families, combining parents' dominant traits to obtain excellent new hybrid varieties. Previous studies on *Megalobrama* and *Culter*'s distant hybridization show that *Megalobrama* and *Culter*'s hybrid offspring have significant heterosis. However, the analysis of the genetic structure of the fish hybridized from *Megalobrama* and *Culter* is still relatively limited, and there is little research on single nucleotide polymorphism markers (SNPs). This study aims to analyze the genetic structure of *Megalobrama terminalis*, *Culter alburnus*, *Chanodichthys mongolicus*, and their hybrids by high-quality SNPs obtained by genotyping by sequencing (GBS) technology. In the study, the total DNA extracted from the fin strips of 6 individuals that included *M. terminalis*, *C. alburnus*, *C. mongolicus*, and their hybrids (F₁), was double digested. Simplified genome sequencing was performed using Stacks software to construct a reference genome for SNP comparison. As a result, six individuals produced 7.01 GB of clean data, with an average of 1.17 GB per sample. All samples were used as a group to detect SNP mutations. A total of 399 145 SNP sites were detected. After quality control filtering, 97 911 SNP sites were obtained. SNP analysis indicated that, of parents and their hybrids, the average observed heterozygosity was 0.339 4. The average expected heterozygosity was 0.285 3. The average polymorphic information content was 0.273 7, average nucleotide diversity was 0.372 7, the average minimum allele frequency was 0.247 2, and the average genotyping rate was 93.94%. The principal component analysis (PCA) showed that *M. terminalis*, *C. alburnus*, *C. mongolicus*, and their hybrids clustered at different points, but the clustering points of the two hybrids of *M. terminalis* and *C. alburnus* were close. The PCA's result indicated apparent genetic differentiation among *M. terminalis*, *C. alburnus*, *C. mongolicus*, and their hybrids. Based on the genetic differentiation index and genetic distance between different populations, the results show that the differentiation indexes between *M. terminalis*, *C. alburnus*, *C. mongolicus*, and their hybrids are 0.309 6-0.894 0, and the genetic distance is 0.370 5-2.244 3. The phylogenetic tree constructed using the maximum likelihood (ML) method shows that *M. terminalis*, *C. alburnus*, *C. mongolicus*, and their hybrids are distinguished. *C. mongolicus* firstly formed a new branch. *M. terminalis* (♀) × *C. mongolicus* (♂) was separated as a single branch. However, *M. terminalis*, *C. alburnus*, and their hybrids formed a broad branch. In this big branch, *M. terminalis* first differentiated and formed a separate branch. *M. terminalis* (♀) × *C. alburnus* (♂) differentiated again. Finally, *M. terminalis* (♂) × *C. alburnus* (♀) differentiated. The genetic structure diagram further supports the analysis results of the phylogenetic tree. The three parents are divided into three subgroups. The hybrids of *M. terminalis* and *C. alburnus* are obtained by crossing *M. terminalis* and *C. alburnus*. In comparison, the hybrids of *M. terminalis* (♀) × *C. mongolicus* (♂) are obtained by crossing *M. terminalis* (♀) and *C. mongolicus* (♂). This study will provide more genetic data for the hybrid breeding of *M. terminalis*, *C. alburnus*, and *C. mongolicus*, such as providing SNPs for constructing a high-density genetic map and screening SNP s associated with traits.

Key words: *Megalobrama terminalis*; *Culter alburnus*; *Chanodichthys mongolicus*; hybrid; single nucleotide polymorphism; genetic structure; genotyping by sequencing

Corresponding author: XIE Nan. E-mail: n.xie@163.com

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-45-39); Hangzhou Agricultural & Social Development Research Program (20162012A03); Science & Technology Innovation Program of Hangzhou Academy of Agricultural Sciences (2019HNCT-01)