

基于微卫星标记整合长牡蛎遗传图谱

郭 香, 李 琪*, 孔令锋, 于 红

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 为了提高长牡蛎遗传图谱上的微卫星标记密度, 实验采用 6 个家系图谱间的共有微卫星标记作为锚定标记, 构建了长牡蛎的整合图谱。该整合图谱共有 161 个微卫星标记, 覆盖 10 个连锁群, 图谱长度和平均间距分别为 615.4 和 3.8 cM。各连锁群的标记数介于 10~24 个之间, 连锁群长度为 47.3~73.3 cM, 是目前密度最高的长牡蛎微卫星图谱。不同作图家系连锁群上的标记分组保持一致, 但标记顺序出现差异, 可能与长牡蛎自然群体中存在大量的染色体重排现象有关。结果表明, 该图谱可以为今后长牡蛎的遗传育种研究提供新的遗传工具。

关键词: 长牡蛎; 微卫星; 整合图谱; 染色体重排; 共显性标记

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 又称太平洋牡蛎, 是一种广泛分布于世界各地的海水养殖贝类, 具有重要的经济价值。但是, 目前养殖的长牡蛎遗传基础仍然多为野生型。近年来, 随着养殖规模的扩大, 长牡蛎的种质也出现退化, 表现为养殖的长牡蛎出肉率低、形态不规则及肉质不好等, 严重影响长牡蛎养殖业的发展。因此, 亟需培育出产量高、品质好的长牡蛎优良品种, 保证长牡蛎养殖产业的可持续健康发展^[1]。世界上许多地区已开展了长牡蛎的人工选育工作, 但是传统选育工作耗时长、劳动量大, 且表型易受环境影响, 使得选育精准度偏低^[2]。现代分子标记的应用将加快该物种的分子育种进程, 遗传图谱的构建是基因组研究中的重要环节, 是基因定位与克隆以及基因组结构与进化研究的基础, 其最重要的应用是数量性状位点定位 (quantitative trait loci, QTL) 和分子标记辅助育种 (markers-assisted selection, MAS)^[2-4]。

扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphisms, AFLPs) 和微卫星 (simple sequence repeats, SSRs) 标记已先后应用于长牡蛎遗传图谱的构建。相比于其他分子标记, AFLP

技术不需要预知扩增片段的序列信息, 可以快速低成本地产生大量的分子片段, 但是该标记为显性标记, 在不同的家系和实验室之间的通用性较差^[5]。微卫星标记具有共显性、多态性丰富以及良好的可重复性等优点, 可以在不同的家系间通用, 是一种理想的锚定标记^[6]。

近几年, 经过多个实验室的努力, 已完成 4 个长牡蛎的遗传图谱^[2,5,7-8]。但是, 长牡蛎的遗传图谱仍然存在着以 AFLP 显性标记为主、缺乏共显性标记以及图谱分辨率较低等问题。其中, Guo 等^[2]采用 AFLP 和 SSR 标记相结合的方法构建的长牡蛎性别平均图谱, 标记密度最高, 覆盖度最大; 但是, 图谱上的 SSR 标记也仅为 106 个。其他的遗传图谱标记数量均较少, 覆盖率较低。长牡蛎遗传图谱上共显性标记的缺乏, 限制了其重要经济性状基因定位研究的开展。与单个家系的连锁图谱相比, 整合图谱将大量标记定位到一个图谱上, 提供标记在基因组上的相对位置, 为染色体重排, 基因重复等现象的存在提供了证据^[9]。许多物种的整合图谱已经被构建, 如黑麦^[6]、苜蓿^[10]、鸡^[11]、大豆^[12]等。目前, 一些水

收稿日期: 2012-11-09 修回日期: 2013-03-15

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2012AA10A405-6); 国家重点基础研究发展计划 (2010CB126406)

通信作者: 李 琪, E-mail: qili66@ouc.edu.cn

产动物,如罗非鱼^[13],草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[14],斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[15]等也构建了整合图谱。

为了获得密度更高,覆盖率更大,通用性更好的长牡蛎图谱,实验通过整合目前已有的6个作图家系的微卫星基因型数据,构建了长牡蛎基于微卫星标记的整合图谱。

1 材料与方法

1.1 作图家系

1个作图家系的微卫星数据来自我们以前的

长牡蛎图谱构建研究,另外5个作图家系的微卫星标记数据分别取自 Hubert 等^[7]和 Plough 等^[16]的研究结果,并由美国南加州大学 Dennis Hedgecock 教授提供微卫星分离原始数据。6个作图家系用于该整合图谱的构建:(1)3个作图家系来自 Hubert 等^[7]的 F₂ 群体,分析的个体数量分别为 188,94 和 188 个体;(2)1个作图家系为第二代人工选育的中国(♀)和日本(♂)群体杂交获得的 F₁ 群体,共 83 个体^[2], (3)2个作图家系为 Plough 等^[16]的 F₂ 家系,分别包含 49 和 94 个体(表 1)。

表 1 构建太平洋牡蛎整合图谱的 6 个作图家系的信息

Tab.1 Summary of the six mapping families used to construct the consensus map of *C. gigas*

家系 family	亲本 parents	群体设计 population design	作图群体大小 population size	图谱 map reference
F ₂ -1	(7×9)×(2×5)	F ₂	188	[7]
F ₂ -2	(2×5)×(7×9)	F ₂	94	[7]
F ₂ -3	(7×6)×(5×2)	F ₂	188	[7]
F ₂ -4	46×10 6_11	F ₂	94	[16]
F ₂ -5	51×35 6_11	F ₂	49	[16]
F ₁ -1	China F ₂ ×Japan	F ₁	83	[2]

1.2 微卫星标记

所有在 6 个家系中产生分离的微卫星标记^[2,7,16]均用于整合图谱的构建。根据在父母本中出现的等位基因数量,1:1:1:1,1:2:1 和 1:1:3 种基因型标记用于遗传图谱的构建。其中,为简化微卫星标记的名称,来自 Qi 等^[17]的微卫星标记,以“otgfa”作为开头,按照标记出现的顺序,重新命名为 otgfa01~otgfa31。

1.3 整合图谱构建

采用 JionMap 4.0 软件^[18],设置优势对数比值(logarithm of odds, LOD)为 3、重组率(recombination rate, REC)小于或等于 0.4。选用 Kosambi 函数分别构建了每个家系的性别平均连锁图谱,并最终把所有家系数据整合获得整合图谱。首先,逐个分析每个连锁群(linkage groups, LGs),单独构建了各家系的连锁图。Hubert 等^[7]构建的遗传图谱采用 11 日龄幼虫作为作图材料,图谱上的标记顺序受偏分离的影响最小。因此,当标记顺序与其比较有显著差异时,采用软件中的“fixed order”功能进行了人工调整,或者将个别标记剔除(如带型不清晰的标记),重新作图,直到获得标记顺序较一致的稳定的整合连锁群为

止。然后,将不同家系连锁群上共有的 SSR 标记作为锚定标记,通过 JionMap 4.0^[18]软件中的“combine groups for map integration”功能对其进行整合。最后,用 Mapchart^[19]绘制图谱。

2 结果

2.1 各作图家系遗传图谱

6个作图家系的微卫星分离数据经 JoinMap 4.0^[18]软件分析后,获得的连锁图谱密度均较低,标记数量介于 10~109 个之间,图谱长度为 57~555 cM,平均标记密度为 5.1~9.0 cM,形成的连锁群数为 1~11 个,标记间的最大间隔为 24.2~42.5 cM。除 F₂-1 和 F₁-1 之外,其余的家系产生的连锁群数与长牡蛎的染色体单倍体数不一致(表 2)。F₁-1 家系形成的单个图谱饱和度最高,且在第 4,6,7,8 等连锁群上形成了密集的标记簇。

2.2 微卫星标记

84 个 SSR 标记为特有标记,即仅出现在一个作图家系中。其中,5 个 F₂ 家系的特有标记均较少,F₁-1 家系中的特有标记最多。余下的 79 个标记出现在多个家系里(38 个出现在 2 个家系中,

30 个出现在 3 个家系中,10 个出现在 4 个家系(表 3)。以共有标记为锚定位点,通过对各作图家系的对应连锁群的逐一整合,构建长牡蛎的整合图谱。

表 2 构建太平洋牡蛎整合图谱的六个家系连锁图谱信息

Tab.2 Statistics of six component maps used to construct the consensus map of *C. gigas*

家系 family	连锁群数 no. of LGs	标记数 no. of markers	图谱长度/cM map length	标记密度/cM marker density	最大间隔/cM largest gap
F ₂ -1	10	57	456	8.0	30.0
F ₂ -2	1	10	57	5.7	24.2
F ₂ -3	11	63	383	6.1	26.5
F ₂ -4	6	27	162	6.0	25.2
F ₂ -5	6	29	263	9.0	36.3
F ₁ -1	10	109	555	5.1	42.5

表 3 不同家系图谱上的共有标记信息

Tab.3 Summary of number of loci common between genetic maps for different mapping families

家系 family	图谱标记数 no. of mapped loci	整合图谱标记数 no. of mapped loci used in consensus map	和 <i>n</i> 个其他作图家系共有的标记 no. of markers in common with <i>n</i> other mapping families				
			<i>n</i> = 0	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 2	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 4
F ₂ -1	57	57	6	19	21	10	1
F ₂ -2	10	9	1	0	4	4	1
F ₂ -3	63	62	8	19	27	8	1
F ₂ -4	27	27	4	6	10	6	1
F ₂ -5	29	27	3	12	11	3	0
F ₁ -1	109	104	62	20	17	9	1

2.3 整合图谱

6 个家系图谱上 98.8% (161/163) 的微卫星标记被连锁到整合图谱上。该整合图谱覆盖 10 个连锁群,图谱长度为 615.4 cM,各连锁群的标记数介于 10 ~ 24 之间(表 4),遗传距离在 47.3 ~ 73.3 cM 之间。各连锁群的标记密度从连锁群 6

的 2.0 cM 到连锁群 10 的 6.5 cM 不等,平均标记密度为 3.8 cM。除连锁群 10 之外,其余 9 个连锁群的最大标记间隔都在 10 cM 以上,其中最大的标记间隔出现在连锁群 9 上的 *ucdCg184* 和 *ucdCg182* 之间为 23.4 cM(图 1)。

表 4 太平洋牡蛎整合图谱上的基本信息

Tab.4 Summary of the consensus map of *C. gigas*

连锁群 linkage groups	标记数量 No. of markers	遗传距离/cM genetic distance	标记密度/cM marker density	最大间隔/cM largest gap
1	19	66.5	3.5	13.6
2	12	67.6	5.6	15.4
3	17	73.3	4.3	11.2
4	13	54.1	4.2	17.0
5	17	68.2	4.0	11.1
6	24	47.3	2.0	12.9
7	17	59.1	3.5	16.7
8	15	58.9	3.9	17.9
9	10	64.5	6.5	23.4
10	17	55.9	3.3	6.2
总共	161	615.4	3.8	23.4

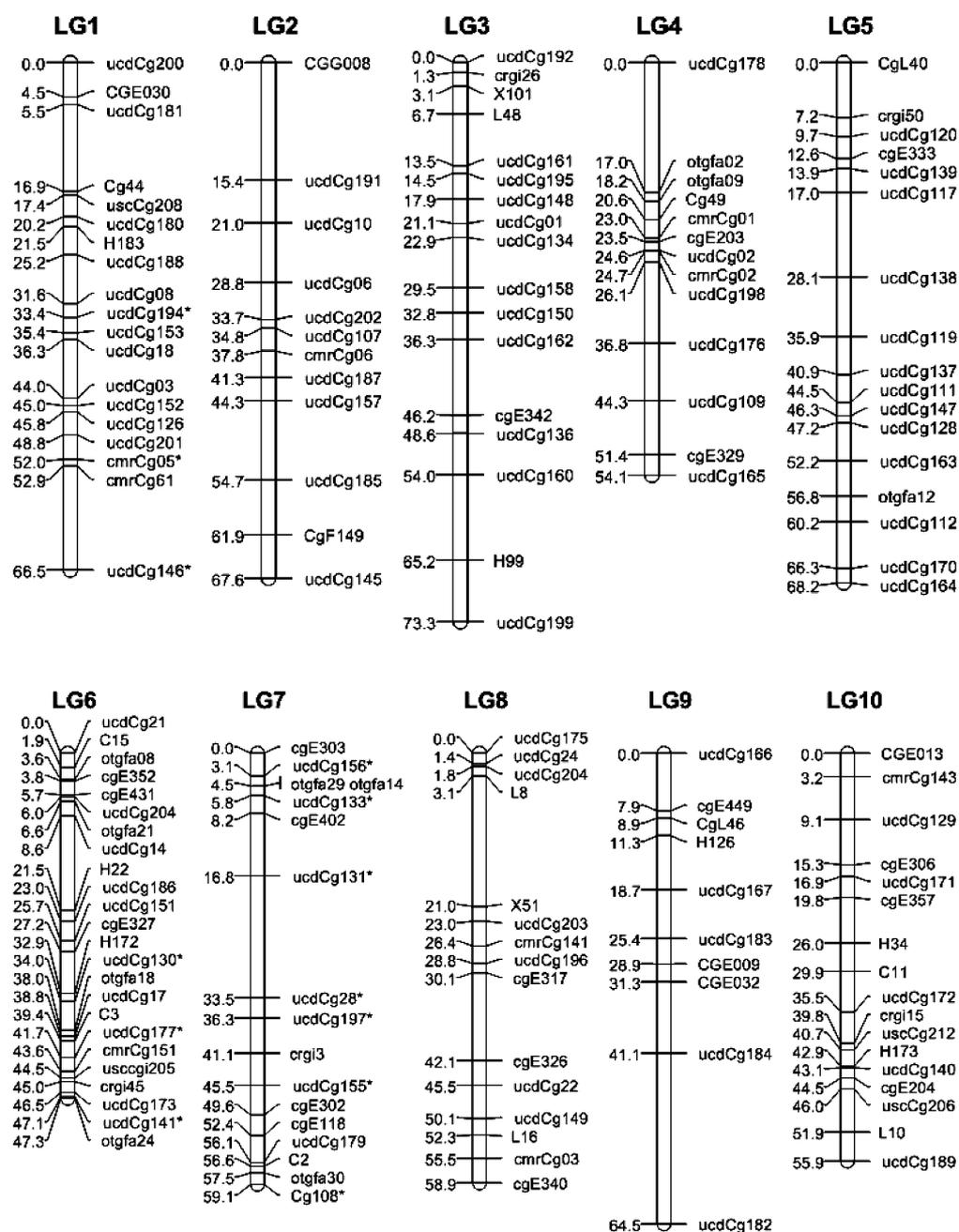


图1 基于微卫星标记构建的太平洋牡蛎整合图谱

采用5个 F_2 家系和1个 F_1 家系构建整合图谱;通过JoinMap 4.0软件中的“combine groups for map integration”进行整合;选用Kosambi函数构建连锁图谱;整合图谱共包含161个微卫星标记,图谱长度为615.4 cM;被固定顺序的锚定位点用星号标注。

Fig. 1 SSR-based consensus map of *C. gigas*

The consensus linkage map was developed using five F_2 mapping populations and one F_1 population. Mapping data were joined using the Combine Groups for Map Integration function of JoinMap 4.0. The Kosambi mapping function based on regression mapping was used for map construction. The consensus linkage map contains 161 SSR markers. The total map length was 615.4 cM. Fixed order anchor loci are highlighted in asterisk.

对比6个作图家系和整合图谱上的标记,标记的分组在各图谱上保持一致。在Hubert等^[7]构建的遗传图谱中,ucdCg181和ucdCg200这两个标记组成的连锁对被划分成LG10。但在基于

微卫星构建的其他图谱中,ucdCg181和(或)ucdCg200被连锁到LG1上^[2,8]。在实验中,ucdCg181和ucdCg200这两个标记也均被连锁到LG1的端部,表明这两个标记可能位于LG1。整

合图谱上的多数标记按照原有的位置被整合进来,但是各连锁群上的标记顺序在不同的遗传图谱上存在小区域内的差异(图 1)。

3 讨论

3.1 微卫星标记

5 个 F_2 家系中的特有标记均较少,只有 F_1-1 家系中的特有标记数较多。但是, F_1-1 中的许多特有标记形成了多个小的标记簇。小簇中的标记之间高度连锁,有助于其整合到图谱中。单个家系中的绝大多数标记(98.8%, 161/163)被连锁到整合图谱上,这可能主要是源于各家系图谱上

的标记间连锁程度均较强,而且锚定标记数量相对比较多^[20]。

3.2 整合图谱

通过整合 6 个作图家系的基因型数据,构建整合图谱,将大量微卫星标记连锁进一个图谱中。与各家系的图谱相比,整合图谱的标记密度显著提高,连锁群数与长牡蛎染色体单倍体数相一致(表 2,表 4)。而且,与之前基于共显性标记构建的长牡蛎图谱相比^[7-8],该整合图谱上的标记数量增加了一倍,图谱的平均密度也提高了一倍,是目前基于共显性标记所构建的密度最高的长牡蛎连锁图谱(表 5)。

表 5 已发表的基于共显性标记构建的遗传图谱基本信息

Tab.5 Summary of published co-dominant markers based genetic maps

图谱类型 type of map	连锁群数量 no. of LGs	标记数量 no. of markers	图谱长度/cM map length	平均距离/cM average distance	参考文章 map reference
雌性整合图	10	86	770.5	10.4	[7]
雄性整合图	10	88	616.1	8.0	[7]
整合图	10	80	1 016.5	12.7	[8]
整合图	10	161	615.4	3.8	本实验 this paper

同时,也应该注意到整合图谱上依然存在许多较大的标记间隔,不同的连锁群平均标记密度相差较大。这可能是由于标记数量依然较少、在基因组上的分布不均匀、作图家系个体数量较少、标记间隔内缺少多态性标记等因素造成的^[2]。随着越来越多长牡蛎基因组序列信息的获得^[21],更多的共显性标记将被开发并补充到各连锁群上去,这些问题将逐步解决。

在 Hubert 等^[7]构建的连锁图谱中, *ucdCg181* 和 *ucdCg200* 这两个标记组成的连锁对被划分成 LG10。但是,在整合图谱上, *ucdCg181* 和 *ucdCg200* 两个标记被定位在 LG1 的端部,表明连锁群上的标记划分更加合理。同时,各图谱上标记的分组也保持一致,表明实验采用的作图参数是合理的。整合图谱的构建为研究者提供了标记在基因组上的相对位置。与已发表图谱相比,整合图谱上的多数标记按照原先的相对位置被整合进来,但是,需要指出的是基因组上一些区域的标记顺序有差异,这可能主要是由于长牡蛎自然群体中存在丰富的染色体重排现象,在不同作图家系中,存在重组率异质性^[7]。此外,使用不同的作图软件和作图参数也会导致标记之间的距离和顺序出现差异^[9]。Hubert 等^[7]采用

Mapmarker^[22] 软件构建 3 个家系的整合图谱。Guo 等^[2]采用 Joinmap^[18] 软件构建了 F_1-1 家系的遗传图谱,而且使用的作图参数更加严格,另外图谱中有大量的 AFLP 标记,可能对微卫星标记顺序的确定也产生了影响。检测方法的精度较低以及基因型读取错误等原因也会导致不同家系间的标记顺序出现差异^[7,20]。

整合图谱的构建为今后长牡蛎的遗传育种提供了新的遗传工具。通过将多个群体的分子标记和 QTL 定位信息整合进一个图谱中,可以开展长牡蛎的 Meta-QTL 分析,有利于 QTL 精细定位、图位克隆、不同家系 QTL 整合比较分析等工作的开展。此外,高密度整合图谱的构建有利于开展基于连锁不平衡的 QTL 定位分析,并为连锁不平衡研究提供标记在基因组上的相对位置等重要信息^[23]。

参考文献:

- [1] 于红. 牡蛎良种选育的遗传学基础研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [2] Guo X, Li Q, Wang Q Z, et al. Genetic mapping and QTL analysis of growth-related traits in the Pacific oyster [J]. Marine Biotechnology, 2012, 14 (2):

- 218 – 226.
- [3] 李建,刘萍,王清印,等. 中国对虾遗传连锁图谱的构建[J]. 水产学报,2008,32(2):161 – 173.
- [4] 徐燕,谢潮添,陈昌生,等. 坛紫菜遗传连锁图谱的构建[J]. 水产学报,2010,34(9):1354 – 1362.
- [5] Li L, Guo X M. AFLP-based genetic linkage maps of the pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg [J]. Marine Biotechnology, 2004, 6(1) : 26 – 36.
- [6] Studer B, Kölliker R, Muylle H, *et al.* EST-derived SSR markers used as anchor loci for the construction of a consensus linkage map in ryegrass (*Lolium* spp.) [J]. BMC Plant Biology, 2010, 10: 177.
- [7] Hubert S, Hedgecock D. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Genetics, 2004, 168 (1) : 351 – 362.
- [8] Sauvage C, Boudry P, de Koning D J, *et al.* QTL for resistance to summer mortality and OshV-1 load in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. Animal Genetics, 2010, 41(4) : 390 – 399.
- [9] Gautami B, Fonceka D, Pandey M K, *et al.* An international reference consensus genetic map with 897 marker loci based on 11 mapping populations for tetraploid groundnut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. PLoS One, 2012, 7(7) : e41213.
- [10] Isobe S, Kölliker R, Hisano H, *et al.* Construction of a consensus linkage map for red clover (*Trifolium pratense* L.) [J]. BMC Plant Biology, 2009, 9: 57.
- [11] Groenen M A M, Cheng H H, Bumstead N, *et al.* A consensus linkage map of the chicken genome [J]. Genome Research, 2000, 10(1) : 137 – 147.
- [12] Hyten D L, Choi I Y, Song Q, *et al.* A high density integrated genetic linkage map of soybean and the development of a 1536 universal soy linkage panel for quantitative trait locus mapping [J]. Crop Science, 2010, 50(3) : 960 – 968.
- [13] Liu F, Sun F, Li J, *et al.* A microsatellite-based linkage map of salt tolerant tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis* spp.) and mapping of sex-determining loci [J]. BMC Genomics 2013, 14: 58.
- [14] Xia J H, Liu F, Zhu Z Y, *et al.* A consensus linkage map of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on microsatellites and SNPs [J]. BMC Genomics 2010, 11: 135.
- [15] You E M, Liu K F, Huang S W, *et al.* Construction of integrated genetic linkage maps of the tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using microsatellite and AFLP markers [J]. Animal Genetics 2010, 41 (4) : 365 – 376.
- [16] Plough L V, Hedgecock D. Quantitative trait locus analysis of stage-specific inbreeding depression in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Genetics, 2011, 189(4) : 1473 – 1486.
- [17] Qi H G, Wu Q, Li L, *et al.* Development and characterization of microsatellite markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Conservation Genetics Resources, 2009, 1(1) : 451 – 453.
- [18] Van Ooijen J W. JoinMap 4: Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations [M]. Plant Research International, Wageningen. Netherlands; Kyazma BV, 2006.
- [19] Voorrips R. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs [J]. Journal of Heredity, 2002, 93(1) : 77 – 78.
- [20] Gustafson J P, Ma X F, Korzun V, *et al.* A consensus map of rye integrating mapping data from five mapping populations [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2009, 118(4) : 793 – 800.
- [21] Zhang G F, Fang X D, Guo X M, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. [J]. Nature, 2012, 490 (7418) : 49 – 54.
- [22] Lander E S, Green P, Abrahamson J, *et al.* MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations [J]. Genomics, 1987, 1(2) : 174 – 181.
- [23] Marone D, Laidò G, Gadaleta A, *et al.* A high-density consensus map of A and B wheat genomes [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 125 (8) : 1619 – 1638.

Microsatellite-based consensus map of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)

GUO Xiang, LI Qi*, KONG Lingfeng, YU Hong

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In order to improve the density of microsatellite markers, a consensus map of *C. gigas* was constructed based on common microsatellite markers among six mapping populations. The consensus map contained 161 microsatellite markers, spanning 10 linkage groups. The map length and average genetic distance is 615.4 cM and 3.8 cM respectively. The number of loci on linkage group ranged from 10 to 24 and the genetic length of linkage group varied from 47.3 to 73.3 cM. At present, this consensus map is the densest SSR-based map of *C. gigas*. Among different mapping populations, the grouping of markers is consistent; however, the order of markers is a little different, which is likely attributed to polymorphism for chromosomal rearrangements in the natural population of Pacific oysters. The results show that the consensus map will provide a new reference tool for genetics and breeding of *C. gigas* in the future.

Key words: *Crassostrea gigas*; microsatellite; consensus map; chromosomal rearrangements; co-dominant markers

Corresponding author: LI Qi. E-mail: qili66@ouc.edu.cn.