

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00939

半滑舌鳎微卫星标记遗传连锁图谱的构建

赵永伟^{1,2}, 宋文涛², 廖小林², 牛余泽², 庞仁谊², 高峰涛², 沙珍霞²,
陈松林²

1. 青岛农业大学 动物科技学院, 山东 青岛 266109;

2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点开放实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 利用全基因组测序方法筛选出微卫星标记, 以渤海近海野生个体和人工养殖的半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)为亲本交配产生的 F₁ 全同胞家系作为图群体, 构建了半滑舌鳎雌、雄微卫星标记遗传连锁图谱。用 320 对引物对父母本和 92 个 F₁ 个体进行遗传分析, 共得到 288 个分离标记, 其中包含 112 个偏分离标记($P<0.05$)。其中雌性框架图包含 242 个标记, 分布在 21 个连锁群上, 总长度 1 311.9 cM, 标记间平均距离为 4.9 cM, 图谱覆盖率为 83.3%; 雄性框架图定位标记 218 个, 21 个连锁群, 总长度 1 316.2 cM, 标记间平均距离为 5.5 cM, 覆盖率为 82%。半滑舌鳎遗传连锁图谱的构建为半滑舌鳎重要经济性状 QTL 定位、分子标记辅助育种和性别控制奠定了重要基础。

关键词: 半滑舌鳎; 微卫星; 遗传连锁图谱; 分子标记辅助育种

中图分类号: Q959

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)06-0939-07

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)属鲽形目、舌鳎科、舌鳎属, 俗称牛舌头、鳎目、鳎板、鳎米, 是一种暖温性近海大型底层鱼类, 主要分布于中国东海、黄海、渤海以及日本和朝鲜。该物种的产地在山东烟台, 其肉质细嫩, 味道鲜美, 营养丰富, 深受广大消费者青睐, 是一种具有极大推广前景的养殖名优鱼类, 在中国海水养殖业中占有重要的地位。

目前, 半滑舌鳎人工催产和人工繁殖技术已经突破^[1], 为半滑舌鳎人工雌核发育和家系建立以及良种培育奠定了基础。在此基础上, 近几年有关专家开展了半滑舌鳎家系构建和抗病高产家系选育的研究^[2], 同时还开展了半滑舌鳎性别特异标记筛选与遗传性别鉴定的研究工作, 筛选到半滑舌鳎雌性特异 AFLP 标记^[3]。此外还建立了半滑舌鳎人工雌核发育技术, 获得了半滑舌鳎雌

核发育鱼苗^[4]。为了快速获得优良品种, 开展分子标记辅助育种工作是我们育种中面临的重要课题, 但是由于没有高密度的遗传连锁图谱, 并且家系的选育工作还处于起步阶段, 无法完成相关性状的 QTL 定位, 因此获得较高密度的遗传连锁图谱是目前遗传育种、分子标记辅助育种及基因组学研究的基础和有效工具之一。

自 Bosteijn 等^[5]提出构建遗传连锁图谱的构想以来, 已建立了多种鱼类的遗传连锁图谱, 包括剑鱼(*Ziphias gladius*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)、罗非鱼(*Tilapia*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、金头鲷(*Sparus aurata*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、黄尾𫚕(*Seriola lalandi*)、尖吻鲈(*Lates calcarifer*)、慈鲷、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[6-21]等。

收稿日期: 2011-12-16; 修订日期: 2012-02-07.

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(200903046); 山东省泰山学者工程专项.

作者简介: 赵永伟(1986-), 硕士研究生, 主要从事遗传育种研究.

通信作者: 陈松林, 研究员, 博士, 主要从事水生生物技术研究. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

在半滑舌鳎遗传连锁图谱构建方面, Liao 等^[22]用 103 个 AFLP 标记、33 个微卫星标记和 1 个雌性特异的标记建立了半滑舌鳎第一代遗传连锁图谱。该图谱由 26 个连锁群组成, 图谱总长度分别为 934.6 cM, 标记间平均间隔为 8.4 cM; 其图谱的长度、标记密度较低, 而且有关半滑舌鳎全微卫星标记遗传连锁图谱还未见报道。

本研究利用基因组测序所筛选出的微卫星序列, 采用 PCR 及 PAGE 电泳技术, 使用 JoinMap4.0 软件, 分别构建了半滑舌鳎雌雄遗传连锁图谱。该图谱共定位微卫星标记 288 个, 雌、雄连锁图谱的总长度分别达到 1 311.9 cM 和 1 316.2 cM, 雌、雄图谱标记密度分别达到了 4.9 cM 和 5.5 cM, 其图谱的长度和标记密度均达到较高水平, 为半滑舌鳎数量性状的定位、比较基因组作图及分子标记辅助育种奠定了基础, 加快了其遗传改良的进程。

1 材料与方法

1.1 作图群体

2008 年 6 月在莱州明波水产有限公司通过人工授精技术建立的 F₁ 家系, 其父本是渤海近海野生个体、母本为人工养殖的个体。2009 年 10 月随机抽取 200 尾个体, 使用 8 对微卫星引物进行分析, 剔除其中非本家系样品, 分别从雌雄鱼中抽取雌雄比例基本一致群体作为作图个体, 共计 92 尾, 同时记录其体长、体质量等性状。

1.2 作图标记

作图标记来自于本实验室半滑舌鳎基因组测序所得的微卫星序列, 从中选取 1 000 条作为本次实验的作图标记。

1.3 实验方法

采用海洋动物组织 DNA 提取试剂盒提取亲本及群体总 DNA, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和核酸测定仪(Pharmacia Biotech Ltd.)检测基因组 DNA 的质量和浓度, 并将 DNA 的浓度稀释为 100 ng/ μ L, -20℃ 保存。

微卫星多态性筛选和扩大样本采用常规 PCR、PAGE 电泳及银染的方法进行。

PCR 反应体系: 基因组 genomic DNA 1.0 μ L; dNTPs (2.5 mmol/L) 1.0 μ L 10×PCR buffer (含 Mg²⁺) 1.5 μ L; 上游引物 (10 μ mol/L) upstream primer 0.5 μ L; 下游引物 (10 μ mol/L) downstream primer 0.5 μ L; Taq DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.1 μ L; ddH₂O 15.4 μ L; 总体积 20 μ L。

PCR 反应程序为: 95℃ 4 min 1 个循环; 95℃ 35 s, 57.5℃ 35 s, 72℃ 35 s, 32 个循环; 72℃ 7 min 1 个循环; 4℃ 保存。

PCR 产物经变性后利用 DYCZ-20C 序列分析电泳槽进行电泳。电泳条件为: 电压 1 300 V, 功率 150 W, 电流 150 mA。电泳约 3 h。然后用冰醋酸固定、银染、水洗、固定、自然晾干后拍照保存。

利用 JoinMap4.0 软件构建半滑舌鳎遗传连锁图谱。利用 χ^2 检验鉴定微卫星标记在子代中是否符合 1:1 孟德尔分离规律。获得标记偏分离信息, 将所有分离标记纳入遗传连锁分析, 符合分离规律($P<0.05$)的标记用于构建连锁图谱框架图, 观察偏分离标记对框架图的影响。群体类型设置为 CP(cross-pollinating), 利用“Locus genot. freq.”和“Exclude selected items”命令去掉不符合分离规律的标记, 利用“Individual genot. freq.”命令去掉缺失了较多基因型的个体, 利用“Similarity of individuals”命令(the value>0.95)去掉相似的个体, 利用“Similarity of loci”命令(the value=1)去掉相似的位点, 利用“Grouping tree”和“Calculate”命令将所有作图标记分群(LOD 值 ≥ 3.0)。使用 Kosambi 函数将重组率转换为图距单位(centimorgan, cM), 计算每个连锁群的图距, 绘制出雌雄连锁图谱。

2 结果与分析

2.1 SSR 扩增结果

本研究共合成 1 000 对 SSR 引物用于遗传分析, 所有引物均来源于本实验室基因组测序的结果, 筛选出多态性的引物 362 对, 多态率为 36.2%。选出多态性清晰的引物 320 对, 以引物名命名其座位名称。图 1 是筛选出来的具有多态性

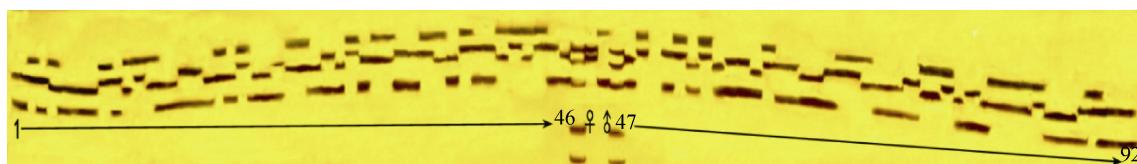


图 1 1 对引物在做图群体中的扩增结果

两侧分别是 1~46、47~92 个 F_1 个体, 中间是两个亲本(左侧母本♀, 右侧父本♂).

Fig. 1 The result of amplification of one pair primer in mapping population

Lanes 1~46 and 47~92 on the two sides are F_1 individuals respectively; parents are on the middle(left ♀, right ♂)

的其中一对引物在做图群体中的扩增结果, 两侧分别是 1~46、47~92 个 F_1 个体, 中间是两个亲本(左侧母本♀, 右侧父本♂), 基因型的分型是由上往下依次读取的, 图 1 中, 父、母本基因型分别为 BC 和 AD, F_1 个体基因型为 AB、AC、BD、CD 4 种。

在雌、雄亲本中无多态而在后代中出现分离的标记 19 个(亲本基因型为 HK×HK), 其中 12 个不符合孟德尔遗传规律($\chi^2 < 0.05$), 出现偏分离现象; 父本分离标记有 53 个, 其中偏分离标记 18 个; 母本分离标记有 71 个, 其中偏分离标记 16 个; 在父母本中均出现分离的标记有 157 个, 其

中包含 80 个偏分离标记; 另外将获得两个雌性特异分子标记(F-382, F-783)作为形态学标记参与连锁分析。

2.2 遗传连锁图谱的构建

运用在筛选出来的多态性标记对作图群体进行分析。320 个 SSR 标记连锁分析表明, 共有 288 个引物整合到连锁群上, 其中雌、雄图谱分别包含 242 和 214 个标记, 最终雌、雄遗传连锁图谱都得到 21 个连锁群。连锁群长度变动范围在 18.7~111.9 cM 之间, 连锁群上的标记数为 5~29 个(表 1, 图 2)。

表 1 半滑舌鳎遗传连锁图谱的特点

Tab. 1 The characterization of *Cynoglossus semilaevis* genetic linkage map

性别 sex	连锁群数目 number of linkage groups	总标记数 total number of markers	平均标记数 number of markers per group	平均间隔/cM average marker interval	观测长度 Gof/cM observed consensus map length	预测长度 Goa/cM estimated consensus map length	覆盖率 / % coverage
雌性 female	21	242	11.7	4.9	1092.6	1311.9	83.3
雄性 male	21	214	10.8	5.5	1079.2	1316.2	82.0

3 讨论

3.1 作图标记的选择

微卫星标记因其共显性分离、多态性高、信息量丰富, 并且实验操作简单、样品需要量少、扩增的等位基因条带易于识别的特点, 被认为是当前最理想的作图标记^[23~24], 因此本实验利用 SSR 构建半滑舌鳎遗传连锁图谱。

但是, SSR 在半滑舌鳎图谱上分布不均匀(图 2)。不同连锁群上标记数目相差较大, 变化幅度在 5~29 个, 而且同一连锁群上的相邻标记间距离也较大, 在第 14 号连锁群上两标记间距离为 41 cM, 第 4、5、9、17、19 等连锁群上也存在较大的间

隙, 其主要原因可能是由标记数量少, 导致图谱密度低, 以及标记类型单一引起的。因此, 我们在增加现有标记数量的同时也应增加标记类型, 如 AFLP、SNP 等。

本研究中, 偏分离位点 114 个, 其中雌性图谱包含 96 个偏分离位点, 偏分离比率为 39.7%, 雄性图谱包含 95 个偏分离位点, 偏分离比率达到 43.5%。偏分离现象是遗传作图研究中普遍存在的现象, 斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus* R.)^[25]、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas* T.)^[26]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[22]等物种中均有报道。偏分离可以影响标记间的重组距离, 也影响连锁群上标

记的顺序^[28]。分析引起偏分离现象原因，可能是由实验统计误差、取样的随机性以及隐形致死突变的选择等因素所引起的。

3.2 作图群体的选择

本实验的亲本材料选择中，作图群体的父本为渤海近海野生个体，母本来自于烟台海阳黄海水产有限公司人工养殖的半滑舌鳎，这种亲本组合，有利于增加子代群体之间的遗传差异，同时选择家系间亲本间遗传差异性较大的家系作为作图家系，有利于获得更多的多态性标记和遗传信息量，从而能有效地提高作图效率。

近年来“拟测交”理论^[28]已广泛用于构建水生

生物的遗传连锁图谱^[29-31]。由于半滑舌鳎性成熟需要2年时间，难以建立高世代或回交家系群体，因此本研究运用“拟测交”策略，仅用亲代和F₁构建其遗传连锁图谱，必将加快遗传育种改良的进程。

3.3 图谱分析及评价

Liao等^[22]用60个半滑舌鳎F₁个体建立了半滑舌鳎第一代遗传连锁图谱，其中包含103个AFLP标记、33个微卫星标记和1个雌性特异的标记，该图谱由26个连锁群组成，图谱总长度为934.6 cM，标记间平均间隔为8.4 cM，图谱覆盖率为64.4%；然而本研究中用了92个F₁个体，构

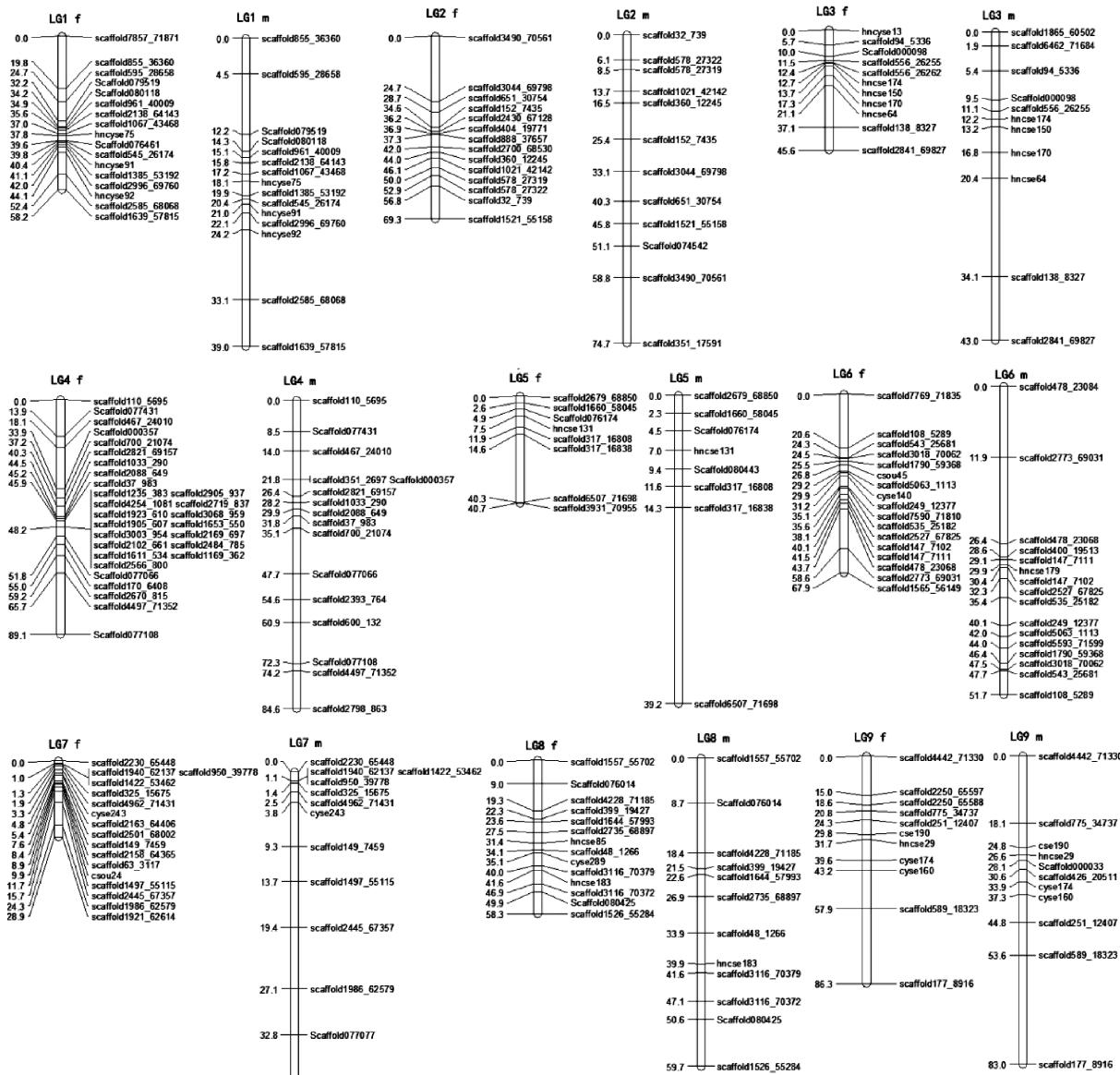
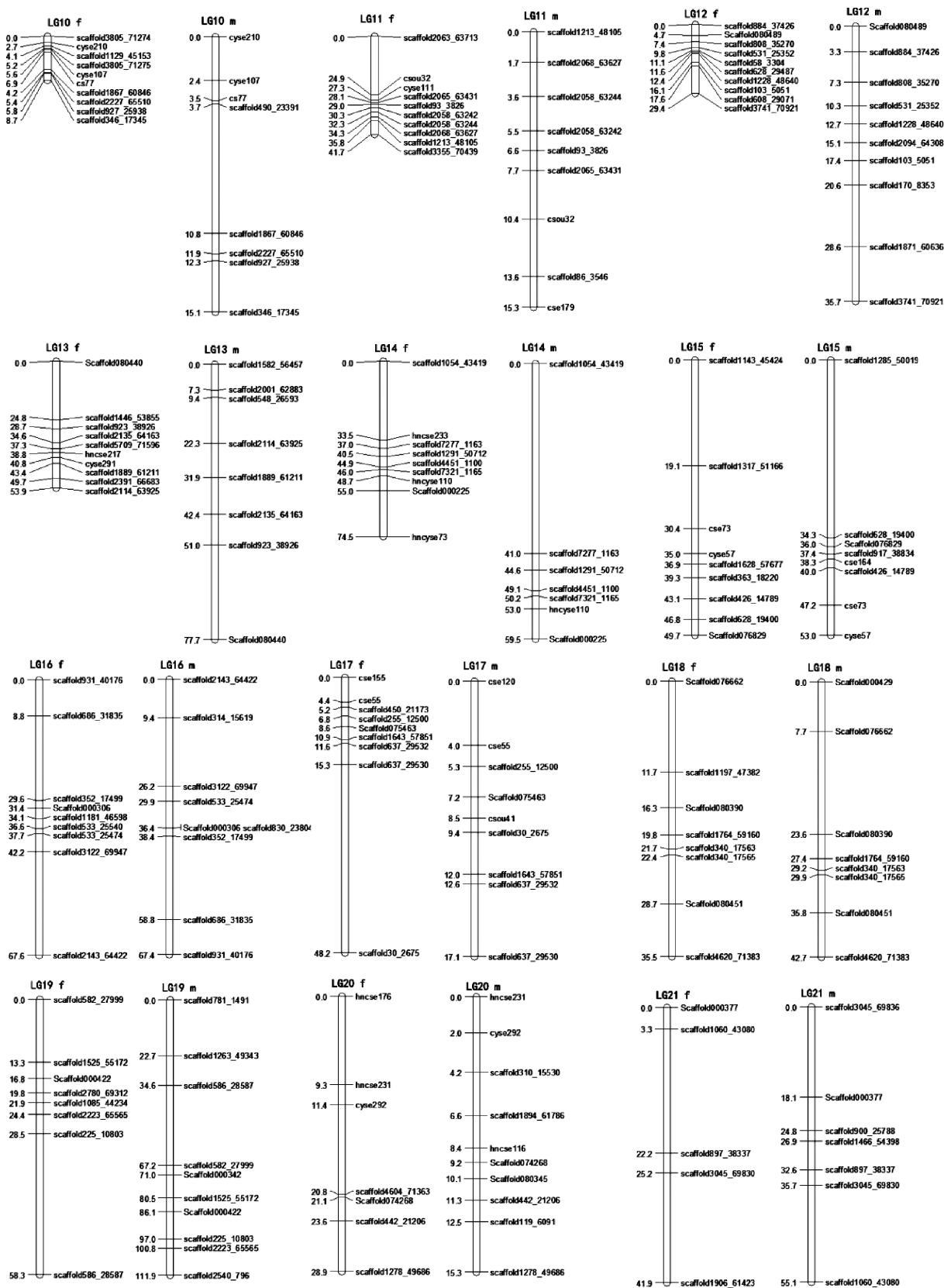


图2 半滑舌鳎遗传连锁图谱(待续)

Fig. 2 Genetic linkage map of *Cynoglossus semilaevis*(to be continued)



(续)图2 半滑舌鳎遗传连锁图谱

连锁群左侧为相邻标记间的遗传距离, 右侧为标记名称。

(continued)Fig. 2 Genetic linkage map of *Cynoglossus semilaevis*

The adjacent marker spacing is displayed on the left in cM Kosambi and SSR markers are shown on the right of each group.

建的遗传连锁图谱由 21 个连锁群组成, 包含 288 个 SSR 标记, 总长度为 1 408.1 cM, 标记间平均间隔 4.5 cM, 图谱覆盖率为 85.9%。与之相比, 在个体数目、标记数目、图谱长度等各个方面均比第一代图谱有了较大提高。

据研究表明, 半滑舌鳎的染色体核型为 $2n=42t$, 单倍体染色体数目为 21 个^[22]。本研究中雌雄图谱连锁群数目均为 21 个, 与其单倍体染色体数目一致。但是其中 SSR 标记不均匀的分布在连锁群上, 标记数在 5~29 个之间, 雌、雄图谱标记间的平均间隔为 4.9 cM 和 5.5 cM, 其 14、17、19、21 号连锁群上存在较大的标记空白区。这表明图谱的 SSR 标记数量还不够多, 密度相对较低, 有待进一步增加 SSR 标记来填补标记空隙。图谱满足 QTL 分析要求的标记平均间隔应小于 20 cM^[32], 因此, 该图谱能够为后续的 QTL 研究提供较高的标记密度。

本研究中雌、雄遗传连锁图谱的长度(Goa)分别为: 1 311.9 cM 和 1 316.2 cM, 每个连锁群上平均标记数分别为 11.7 和 10.8 个。该图谱的长度和标记密度均达到中等水平, 可以进行初步的 QTL 定位分析, 并在一定程度上指导遗传育种实际工作。但是, 本图谱中标记间的遗传距离仍然较大, 随着实验的进行会有更多的 SSR 标记整合到图谱中, 将构建出更高密度的遗传连锁图谱, 为开展半滑舌鳎基因克隆和 QTL 定位的研究及分子辅助育种等提供更有效的依据。

参考文献:

- [1] 杨景峰, 陈松林, 翟介明, 等. 半滑舌鳎人工催产技术的研究[J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2010, 25(2): 185~190.
- [2] 陈松林, 杜民, 杨景峰, 等. 半滑舌鳎家系建立及其生长和抗病性能测定[J]. 水产学报, 2010, 34(12): 1789~1794.
- [3] Chen S L, Li J, Deng S P, et al. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Mar Biotechnol, 2007, 9: 273~280.
- [4] Chen S L, Tian Y S, Yang J F, et al. Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Mar Biotechnol, 2009, 11: 243~251.
- [5] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Human Genet, 1980, 32: 314~331.
- [6] Donald C, Morizot, Susan A, et al. Genetic linkage map of fishes of the genus *Xiphophorus* [J]. Genetics, 1991, 127: 999~1010.
- [7] Postlethwait J H, Johnson S L, Midson C N, et al. A genetic linkage map for the zebrafish[J]. Science, 1994, 264: 699~703.
- [8] Lisa K, Elizabeth S E, Timothy C, et al. A genetic linkage map for zebrafish: comparative analysis and localization of genes and expressed sequences [J]. Genome Res, 1999, 9(4): 334~347.
- [9] Peter D K, Felicia C, Ian G W, et al. Genetic linkage mapping of zebrafish genes and ESTs [J]. Genome Res, 2000, 10: 538~567.
- [10] Sun X W, Liang L Q. A genetic linkage map of common carp [J]. J Fish Sci Chin, 2000, 7: 1~5.
- [11] Takashi S, Roy G D, Karim G, et al. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates[J]. Genetics, 2000, 155: 1331~1345.
- [12] Geoffrey C W, Brian G B, Danny J N et al. A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish(*Ictalurus punctatus*) [J]. Genetics, 2001, 158: 727~734.
- [13] Bo Y L, Woo J L, Justin E S, et al. A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis spp.*) [J]. Genetics, 2005, 170: 237~244.
- [14] Tetsuaki K, Keiko Y, Atsuko S, et al. Genetic linkage map of medaka with polymerase chain reaction length polymorphisms[J]. Gene, 2005, 363: 24~31.
- [15] Rafaella F, Bruno L, Matina T, et al. A genetic linkage map of the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* [J]. Genetics, 2006, 174: 851~861.
- [16] Suquet M, Billard R, Cosson J, et al. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact [J]. Aquaculture, 1995, 133: 83~90.
- [17] Eriko O, Takuya N, Yoshitomo N, et al. Genetic linkage maps of two yellowtails (*Seriola quinqueradiata* and *Seriola lalandi*) [J]. Aquaculture, 2005, 244: 41~48.
- [18] Chun M W, Felicia F, Grace L, et al. A microsatellite linkage map of barramundi, *Lates calcarifer* [J]. Genetics, 2007, 175: 907~915.
- [19] Matthias S, Frederico H, Shoji F, et al. Microsatellite based genetic linkage map of the cichlid fish, *Astatotilapia burtoni* (Teleostei): A comparison of genomic architectures among

- rapidly speciating cichlids [J]. *Genetics*, 2009, 182: 387–397.
- [20] Maria R M, Kazunobu K, Shinrokuro K, et al. A genetic linkage map of the Japanese flounder(*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Aquaculture*, 2003, 220: 203–218.
- [21] Kang J H, Kim W J, Lee W J. Genetic linkage map of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Intl J Biol Sci*, 2008, 4: 143–149.
- [22] Liao X L, Ma H Y, Xu G B, et al. Construction of a genetic linkage map and mapping of a female specific DNA marker in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Mar Biotechnol*, 2009, 11: 699–709.
- [23] Fergusson A. Molecular genetics in fisheries: current and future perspective [J]. *Rey Fish Biol Fish*, 1994, 4: 379–383.
- [24] Goldstein D B, Roemer G W, Smith D A, et al. The use of microsatellite variation to infer population structure and demographic history in a natural model system[J]. *Genetics*. 1999, 151: 791–801.
- [25] Liu Z, Karisi A, Li P, et al. An AFLP based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)constructed by using an interspecific hybrid resource family[J]. *Genetics*, 2003, 165(2): 687–694.
- [26] Li L,Guo X. AFLP-based genetic linkage maps of the pacific oyster *Crassostrea virginica* Gmelin[J]. *Biol Bull*, 2003, 204: 327–338.
- [27] Lorieus M, Goffinet B, Perrier X, et al. Maximum-likelihood models for mapping genetic markers showing segregation distortion.1.1Backcross populations[J]. *Theoretic Appl Genet*, 1995, 90: 73–80.
- [28] Grattapaglia D, Sederoff R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD marker [J]. *Genetics*, 1994, 137: 1121–1137.
- [29] Yu Z, Guo X. Genetic linkage map of the eastern oyster *Crassotrea virginica* Gmelin [J]. *Biol Bull*, 2003, 204: 327–338.
- [30] Li L, Guo X. AFLP-Based genetic linkage maps of the Pacific oyster *Crassostea gigas* Thunberg[J]. *Mar Biotechnol*, 2004(6): 36–36.
- [31] Wilson K J, Li Y, Whan V A, et al. Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphisms[J].*Aquaculture*, 2002, 204: 297–309.
- [32] Dekkers J, Hospital F. Multifactorial genetics: the use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations[J]. *Nat Rev Genet*, 2002(3): 22–32.

Construction of a microsatellite-based genetic linkage map for *Cynoglossus semilaevis*

ZHAO Yongwei^{1,2}, SONG Wentao², LIAO Xiaolin², NIU Yuze², PANG Renyi², GAO Fengtao², SHA Zhenxia, CHEN Songlin²

1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: Female and male linkage maps were constructed using SSR markers based on a full sub-family of the tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). A total of 320 markers were generated in two parents and 92 F₁ progenies of the mapping family by using 320 screened SSR primer combinations containing 112 segregation distortion markers ($P<0.05$). The female linkage map included 21 linkage groups and 242 pairs of SSR markers spanning 1 311.9 cM with the average marker interval of 4.9 cM and the observed coverage was 83.3%. The male linkage map included 21 linkage groups and pairs of 218 SSR markers spanning 1 316.2 cM with the average marker interval of 5.5 cM and the observed coverage was 82.0%. The genetic linkage maps are very significant for QTL analyses marker-assisted selection (MAS) breeding programs for economically important traits and sex control in *C. semilaevis*.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; SSR; genetic linkage map; MAS

Corresponding author: CHEN Songlin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn