

## 三疣梭子蟹遗传连锁图谱的初步构建

罗 云<sup>1,2</sup> 高保全<sup>1</sup> 刘 萍<sup>1\*</sup> 李 健<sup>1</sup> 戴芳钰<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>2</sup>上海海洋大学生命科学与技术学院, 201306)

**摘 要** 利用 AFLP 和 SSR 标记技术结合“拟测交”策略, 以三疣梭子蟹莱州湾、舟山野生群体杂交(1♂×3♀)产生的 F<sub>2</sub> 代家系为作图群体, 初步构建了三疣梭子蟹雌、雄性遗传连锁图谱。用经过筛选的 60 对 AFLP 引物和 3 对 SSR 引物对亲本及 108 个 F<sub>2</sub> 代个体进行遗传分析, 共得到母本分离标记 214 个, 其中 155 个标记(AFLP 标记 153 个, SSR 标记 2 个)符合 1:1 孟德尔分离规律; 父本分离标记 195 个, 139 个标记(AFLP 标记 138 个, SSR 标记 1 个)符合 1:1 孟德尔分离规律。雌性图谱包括 100 个遗传标记, 分布在 9 个连锁群, 6 个三联体, 15 个连锁对, 图谱总长度为 1 544 cM, 标记平均间隔 22.0 cM, 总覆盖率为 52.9%。雄性图谱包括 71 个遗传标记, 分布在 6 个连锁群, 6 个三联体, 11 个连锁对, 图谱总长度 1 174.2 cM, 标记平均间隔 24.0 cM, 总覆盖率为 49.5%, 图谱中遗传标记分布比较均匀。

**关键词** 三疣梭子蟹 AFLP SSR 遗传连锁图谱

**中图分类号** S931.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)03-0056-11

## Construction of a genetic linkage map of *Portunus trituberculatus*

LUO Yun<sup>1,2</sup> GAO Bao-quan<sup>1</sup> LIU Ping<sup>1\*</sup> LI Jian<sup>1</sup> DAI Fang-yu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup>College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 201306)

**ABSTRACT** Genetic linkage map of *Portunus trituberculatus* was constructed using “double pseudo-testcross” strategy with AFLP and SSR molecular labeling techniques. In this study, maternal and paternal broodstock were sampled from Laizhou Bay and Zhoushan Island wild populations of *P. trituberculatus*, respectively. Through the directional mating (1♂×3♀), the wild parents were used to generate F<sub>1</sub> family. The 108 progenies of directional mating F<sub>2</sub> family coming from sisterhood intercross between F<sub>1</sub> family and its parents were used as experiment materials. Sixty AFLP primer combinations and 3 pairs of SSR primers were screened to produce 214 maternal markers and 195 paternal markers. There were 155 markers which included 153 AFLP markers and 2 SSR markers segregating as 1:1 model from 214 maternal mark-

国家高技术研究发展计划项目“863”(2006AA10A406)、国家自然科学基金课题(30871933)和青岛市科技计划项目(07-2-3-5-jch)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: liuping@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)5823291

收稿日期: 2009-04-15; 接受日期: 2009-11-14

作者简介: 罗 云(1982-), 男, 硕士研究生, 主要从事海洋生物种质资源与遗传育种研究。E-mail: suflytnt@hotmail.com, Tel: 18970965508

ers. 139 markers which contained 138 AFLP markers and 1 SSR marker segregated in 1 : 1 model in 195 parental markers. The female linkage map consisted of 100 markers distributed in 9 linkage groups (more than three markers), 6 triplets and 15 doublets, which covered a total length of 1 544 cM. Average marker spacing of female linkage map was 22.0 cM and the observed genome length accounted for 52.9% of the estimated genome length. The paternal linkage map consisted of 71 markers distributed in 6 linkage groups, 6 triplets and 11 doublets, spanning the distance about 1 174.2 cM with average marker spacing of 24.0 cM and its genome coverage was 49.5%. The Pearson analysis results showed that all the genetic markers distributed in linkage map uniformly. This study provided a starting point for further construction of high density linkage maps, as well as for the mapping of functional genes and the location of quantitative trait loci (QTL) in *P. trituberculatus*.

**KEY WORDS** *Portunus trituberculatus* AFLP SSR Genetic linkage map

三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 隶属甲壳纲 Crustacea、十足目 Decapoda、梭子蟹科 Portunidae, 梭子蟹属 *Portunus* (戴爱云等 1977), 是一种大型海洋蟹类, 因其具有生长速度快、营养丰富、分布广泛等特点而成为我国重要的渔业资源之一。目前, 由于三疣梭子蟹产量过度依靠人工捕捞, 其养殖苗种尚未经过大规模的人工定向选育, 良种化程度不高, 养殖水平参差不齐, 导致三疣梭子蟹资源总量呈现下降趋势。为保护这一自然资源, 开发高效、科学的选育方法对三疣梭子蟹种苗业稳定、健康发展意义重大。

分子标记辅助选育(MAS)是育种中重要环节之一, 它的原理是根据与某一目标性状紧密连锁的分子标记的出现来对目标性状的基因型进行选择。MAS在鉴定优良亲本, 筛选早期优良性状个体, 加快育种进程中发挥重要作用, 其实现的关键问题就是要找到与性状紧密连锁的分子标记。遗传连锁图谱正是实现这一目的的重要工具之一, 目前它已广泛应用在分子标记辅助育种(Rance *et al.* 2001)、QTL定位分析(Moen *et al.* 2004)、杂种优势遗传基础研究(Jones *et al.* 2004)等方面。

本研究利用 AFLP 和 SSR 分子标记初步构建了三疣梭子蟹遗传连锁图谱, 以期三疣梭子蟹基因克隆及重要经济性状定位奠定基础, 并为三疣梭子蟹分子标记辅助育种提供必要的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

2005年8月从三疣梭子蟹莱州湾野生群体(采自山东莱州湾)中挑选个体大, 无任何机械损伤及其他疾病、发育良好的30只未交尾雌蟹。从舟山野生群体中挑选个体比较大、无任何机械损伤及其他疾病、发育良好的10只雄蟹, 进行1♂×3♀交配。次年4月初培育出F<sub>1</sub>代家系。2006年8月从一个F<sub>1</sub>代家系中挑选符合上述条件的雌、雄蟹。按照1♂×3♀的方式进行家系内交配, 越冬后于2007年4月上旬培育出F<sub>2</sub>代家系。同年7月上旬, 当F<sub>2</sub>代幼蟹长至90日龄时随机取一个家系的108个个体及亲本, 记录全甲宽、甲宽、甲长等相关试验数据后, 取蟹的大螯肌肉装入灭菌的1.5ml Eppendorf管中编号后置于-80℃中保存。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA提取

基因组DNA提取参照Strauss(1989)的方法(略作修改)进行。用核酸定量仪(GeneQuant pro)与1%琼脂糖凝胶电泳检测纯度, 并最终将DNA稀释至终浓度100 ng/μl, -20℃保存备用。

#### 1.2.2 AFLP分析

参照Vos等(1995)方法略加修改。试验中, *EcoR* I 和 *Mse* I 限制性内切酶、T4 DNA连接酶、DNA聚合

酶均购自 MBI 公司,正反向接头以及与内切酶相应的 *EcoR* I 和 *Mse* I 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成,其余试剂购自 Solarbio 公司。

酶切反应:模板基因组 DNA 200ng, *EcoR* I (10 U/ $\mu$ l) 和 *Mse* I (10 U/ $\mu$ l) 各 0.5  $\mu$ l, 10 $\times$ Buffer(Tango) 8  $\mu$ l, 加超纯水至 40  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C 水浴 3 h。

连接反应:酶切产物 20  $\mu$ l, *EcoR* I 接头(50  $\mu$ mol/L) 1 $\mu$ l, *Mse* I 接头(5  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ l, T4 连接酶(5 U/ $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l, 10mU ATP 0.5  $\mu$ l, 加超纯水至 25  $\mu$ l, 22  $^{\circ}$ C 反应 12 h。接头序列如下:

*EcoR* I 接头:5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'; 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'

*Mse* I 接头:5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'; 3'-TACTCAGGACTCAT-5'

预扩增反应:连接产物 5  $\mu$ l, E01 预扩增引物(10 $\mu$ mol/L) 1.5  $\mu$ l, M02 预扩增引物(10  $\mu$ mol/L) 1.5  $\mu$ l, 10 $\times$ PCR Buffer 5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (25mmol/L) 3  $\mu$ l, Taq 酶(5 U/ $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l, dNTP(2.5 mmol/L) 4  $\mu$ l, 加超纯水至 50  $\mu$ l。PCR 反应程序为 94  $^{\circ}$ C 2 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 20 cycles; 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

选择性扩增反应:预扩增产物用 TE 稀释 20 倍后取 5  $\mu$ l 待用,从 8 个 *EcoR* I 引物、9 个 *Mse* I 引物共 72 对引物组合中(引物序列、组合编号见表 1)挑选 60 对 AFLP 引物组合用以选择性扩增反应。用两个亲本及 10 个个体的引物进行筛选,引物筛选原则为:扩增条带数目较多,个体间多态性丰富,电泳条带清晰。*EcoR* I 选择性引物(10  $\mu$ mol/L) 0.1  $\mu$ l, *Mse* I 选择性引物(10  $\mu$ mol/L) 0.6  $\mu$ l, 10 $\times$ PCR Buffer 2  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.2  $\mu$ l, Taq 酶(5 U/ $\mu$ l) 0.1  $\mu$ l, dNTP(2.5 mmol/L) 1.6  $\mu$ l, 加超纯水至 20  $\mu$ l。PCR 反应程序为 94  $^{\circ}$ C 2 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 65  $^{\circ}$ C 30 s, -0.7  $^{\circ}$ C/cycle, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 11 cycles; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 22 cycles; 4  $^{\circ}$ C 15 min。

### 1.2.3 SSR 分析

SSR 引物来源自宋来鹏等(2008),由上海生物工程技术服务有限公司合成。

SSR 筛选方法同上,筛选原则为:条带清晰,杂代较少且在一个以上亲本为杂和基因型。每个 PCR 反应总体积为 15  $\mu$ l, 包括:50 ng 三疣梭子蟹基因组 DNA, 10 $\times$ PCR 缓冲液 1.5  $\mu$ l, Mg<sup>2+</sup> (2.0 mmol/L), 0.6 U Taq 酶, dNTP 各 0.2 mmol/L, 引物各 0.8  $\mu$ mol/L。

PCR 反应程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 25 个 cycles: 94  $^{\circ}$ C 变性 40 s, 退火(各引物序列及退火温度见表 2) 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 最后于 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

扩增产物通过 6% 的聚丙烯酰胺变性凝胶在 0.5 $\times$ TBE 电极缓冲液中以 60 W 功率预电泳 0.5 h, 点样后电泳 2 h, 银染方法参照(Merrill *et al.* 1995)(略加改动)检测电泳产物。

### 1.2.4 数据统计

由于 AFLP 分子标记是显性标记,所以其带形在电泳图谱上表现为有带跟无带,有带(基因型 AA/Aa)记为“1”,无带(基因型 aa)记为“0”,缺失条带记“-”,统计在一亲本中有带,在另一亲本中无带,子代条带按 1:1 分离的片段。SSR 是共显性标记,一对引物对某一个家系扩增反应只能产生一个基因座位,把一个等位基因作为同一位点对父、母本分别统计。子代出现分离的条带经  $\chi^2$  检验后( $P>0.05$ ),符合 1:1 孟德尔分离规律的标记用来构建三疣梭子蟹遗传连锁图谱。AFLP 标记命名规则为:引物组合编号(见表 1)+“-”+产物估计片段大小,如“A1-210”表示该标记是 *EcoR* I (AAG)与 *Mse* I (CAC)引物组合在 210bp 左右的扩增产物。由于 SSR 引物数量较少,所以得到的标记名称直接用引物名表示。

### 1.2.5 连锁分析

构建图谱所用软件为 MAPMAKER/EXP3.0 (Whitehead Institute, ftp://ftp-genome.wi.mit.edu/distribution/software/mapmaker3/),采用 F2 回交模式结合拟测交策略,分别构建三疣梭子蟹雌性、雄性连锁图谱。按照软件要求格式对原始数据进行转换,位点连锁采用多点连锁分析,首先用“GROUP” (LOD $\geq$ 2.8, 标记间最大图距为 50cM) 命令对所有标记进行分组。对小于 9 个遗传标记的连锁群,用 COMPARE 命令进行排序,MAP 命令计算标记间距离。对于应用以上命令还未能加入的标记,用 TRY 命令进行定位,并根据 Kosambi 函数,将重组率转换成图距单位,用 MapDraw 2.1 绘制图谱(Kosambi *et al.* 1944)。

表 1 AFLP 扩增选择性扩增引物序列、编号及 60 对选择性引物组合产生多态位点数、总位点数及多态位点比例  
Table 1 The NO and sequence of 60 selective AFLP primer combinations,  
the total number polymorphic loci and percentage of polymorphic loci in *P. trituberculatus*

引物组合 Primer Combinations		多态位点数/总位点数 Polymorphic loci number/total number of loci	多态位点比例 Percentage of polymorphic loci (%)	引物组合 Primer combination		多态位点数/总位点数 Polymorphic loci number/total number of loci	多态位点比例 Percentage of polymorphic loci (%)
<i>EcoR</i> I	Mse I			<i>EcoR</i> I	Mse I		
AAG(A)	CAC(1)	6/45	13.3	AGA(D)	CTG(8)	13/55	23.6
AAG(A)	CAT(2)	7/43	16.3	AGA(D)	CAA(9)	7/43	16.3
AAG(A)	CCT(3)	9/55	16.4	AGT(E)	CAC(1)	12/55	21.8
AAG(A)	CGA(4)	15/43	34.5	AGT(E)	CAT(2)	9/60	15.0
AAG(A)	CGT(5)	8/32	25.0	AGT(E)	CCT(3)	18/50	36.0
AAG(A)	CTA(6)	7/32	21.9	AGT(E)	CGA(4)	12/45	26.7
AAG(A)	CTC(7)	11/38	28.9	AGT(E)	CGT(5)	9/47	19.1
AAG(A)	CTG(8)	16/46	34.8	AGT(E)	CTA(6)	11/45	24.4
ACA(B)	CAC(1)	13/52	25.0	AGT(E)	CTC(7)	9/53	17.0
ACA(B)	CAT(2)	5/42	11.9	AGT(E)	CAA(9)	10/49	20.4
ACA(B)	CGA(4)	5/30	16.7	ATC(F)	CAC(1)	11/57	19.3
ACA(B)	CGT(5)	6/38	15.8	ATC(F)	CAT(2)	8/47	17.0
ACA(B)	CTA(6)	9/50	18.0	ATC(F)	CCT(3)	8/51	15.7
ACA(B)	CTG(8)	7/50	14.0	ATC(F)	CTA(6)	5/51	9.8
ACA(B)	CAA(9)	9/48	18.8	ATC(F)	CTG(8)	10/53	18.9
ACT(C)	CAC(1)	5/52	9.6	ATC(F)	CAA(9)	11/58	19.0
ACT(C)	CAT(2)	10/43	23.2	ATG(G)	CAC(1)	12/52	23.1
ACT(C)	CGA(4)	8/29	27.6	ATG(G)	CAT(2)	12/47	25.5
ACT(C)	CGT(5)	9/30	30.0	ATG(G)	CCT(3)	12/45	26.7
ACT(C)	CTA(6)	13/53	24.5	ATG(G)	CGA(4)	8/42	19.0
ACT(C)	CTC(7)	2/37	5.4	ATG(G)	CTA(6)	15/59	19.5
ACT(C)	CTG(8)	6/32	18.8	ATG(G)	CTC(7)	6/48	12.5
ACT(C)	CAA(9)	12/62	19.4	ATG(G)	CTG(8)	9/49	18.4
AGA(D)	CAC(1)	13/48	27.1	AAC(H)	CAC(1)	15/46	32.6
AGA(D)	CAT(2)	7/55	12.7	AAC(H)	CAT(2)	8/49	16.3
AGA(D)	CCT(3)	8/45	17.7	AAC(H)	CCT(3)	12/54	22.2
AGA(D)	CGA(4)	14/48	29.2	AAC(H)	CGA(4)	8/46	17.4
AGA(D)	CGT(5)	8/58	13.8	AAC(H)	CGT(5)	8/47	17.0
AGA(D)	CTA(6)	10/43	23.2	AAC(H)	CTA(6)	14/43	32.6
AGA(D)	CTC(7)	9/43	20.9	AAC(H)	CTG(8)	11/49	22.4
总计 Total		581/2 799	平均(%)Mean	20.6			

### 1.2.6 遗传图谱相关参数的统计

标记平均间隔( $s$ ),其值为图谱总长度除以间隔总数(标记总数减去连锁群数)。遗传连锁图谱实际长度分为两个方面:(1)框架图谱长度( $G_{of}$ )等于连锁群( $>3$ 个标记)长度之和;(2)所有连锁标记的长度( $G_{oa}$ ),包括三联体和连锁对在内的图谱长度的总和。用两种方法来计算遗传图谱的估计长度( $G_e$ ):

(1)  $G_{e1}$ ,参照 Postlethwait 等(1994)的方法,每个连锁群的长度加上整个连锁图谱的平均间隔的两倍来补偿连锁群最末端的标记和端粒距离。

(2)  $G_{e2}$ ,参照 Chakravarti 等(1991)的方法,各个连锁群的估计长度之和。每个连锁群的估计长度为实际长度乘以系数 $(m+1)/(m-1)$ 。 $m$ 为每个连锁群的遗传标记数。

表 2 三疣梭子蟹微卫星引物序列及退火温度  
Table 2 Sequence of SSR primers and annealing temperature for *P. trituberculatus*

引物名称 Primer	引物序列 5'-3' Primer sequence 5'-3'	退火温度 Annealing temperature(°C)	GenBank 登录号 Registration No
ptssr13	F:CGTCTGGCTGTCTCGTCA R:TCCCTGGTCATCCACCTGG	49	EU267684
ptssr15	F:GGCGTCTGTGATAATGGTCTG R:CGTAAGCAAGTCAAGGAAAA	51	EU267686
ptssr17	专利申请号:200810017118. X Patent number:200810017118. X	54	EU267687
ptssr18	F:AGCCCAAGCACAACTAA R:CGGCAAACCTCACATA	55	EU267688
ptssr36	专利申请号:200810017119. 4 Patent number:200810017119. 4	53	EU267695
ptssr38	F:TTTCTGCTGGTGTAGATAAGGC R:AAGTGAGGGAAGTGTGGAG	60	EU267696
ptssr45	F:TGAATGGGACGAAGATAAGAAG R:GTGGAAATGGTGTAGTTGGGT	48	EU267698
ptssr48	F:ACCAAGGGAACCTGCTGAG R:CTGGCGTAATGGACAAACAC	55	EU267700
ptssr53	F:TCGCCAGACAGAAAAGAAGT R:CTGAGGAGGCTCGCAGTA	56	EU267701

将两种方法的平均值作为三疣梭子蟹预期长度  $G_e$ 。框架图覆盖率为  $G_{of} = G_{of}/G_e$ ，总的图谱覆盖率为  $G_{oa} = G_{of}/G_e$ 。

### 1.2.7 遗传标记分布分析

利用 Pearson 相关分析 AFLP 与 SSR 标记在连锁群的分布情况,计算公式为:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

## 2 结果与分析

### 2.1 AFLP 和 SSR 分析

从 8 个 *EcoR* I 引物,9 个 *Mse* I 引物共 72 对自由组合中挑选出 60 对 AFLP 引物对三疣梭子蟹亲本与 108 个子代进行扩增,共产生 2 799 个位点,在子代分离的多态位点 581 个,多态百分率为 20.6%,平均每对引物产生 9.7 个多态位点。 $\chi^2$  检验后( $P > 0.05$ )发现,母本分离标记 212 个,其中 153 个符合 1:1 孟德尔分离规律,59 个标记偏分离(包括两个异常分离位点),占母本分离标记的 27.8%;父本分离标记 194 个,其中 138 个符合 1:1 孟德尔分离规律,56 个标记偏分离,占父本分离位点的 28.9%,母本偏分离位点与父本偏分离位点均表现出多数为纯合子过剩。各引物组合产生多态比率为 5.4%~36.0%,具体每对引物产生位点数见表 1。

从 9 对 SSR 引物中筛选出 5 对多态引物,PCR 扩增反应经  $\chi^2$  检验( $P > 0.05$ )得到 3 对引物 ptssr15、ptssr18、ptssr36,符合 1:1 孟德尔分离规律。其中,ptssr15 与 ptssr18 在母本带型为杂和基因型,在父本带型为纯和基因

型,用来对母本作图;ptssr36在父本带型为杂和基因型,在母本带型为纯和基因型,用来对父本作图。

## 2.2 遗传标记分布分析

由于本实验主要用 AFLP 分子标记构建三疣梭子蟹遗传连锁图谱,而 SSR 标记数量较少,所以可以将 AFLP 标记在整个连锁群的分布情况看作是遗传标记的分布情况。经计算得到 Pearson 相关系数在 0.85~0.94 之间,遗传连锁群的长度和 AFLP 标记数量呈明显的正相关,这说明在本试验中 AFLP 与 SSR 遗传标记在三疣梭子蟹遗传连锁图谱上分布是比较均匀的。

## 2.3 遗传连锁图谱分析

三疣梭子蟹雌性连锁图谱分析包括 155 个遗传标记,未连锁标记数为 55 个,连锁标记数为 100 个,分布于 9 个连锁群,6 个三联体,15 个连锁对(图 1),最大连锁群长度为 140.5 cM,最短连锁群长度为 7.9 cM。标记间最大图距为 46.7 cM,最小图距为 4.4 cM,标记平均间隔 22.0 cM。雌性框架图谱总长度( $G_{oa}$ )为 904.6 cM,图谱预期长度( $G_e$ )为 2 918.2 cM,框架图谱覆盖率为( $C_{of}$ )为 31.0%,总覆盖率( $C_{oa}$ )为 52.9%。

三疣梭子蟹雄性连锁图谱共有 139 个遗传标记参与分析,其中未连锁标记数为 68 个,连锁标记数为 71 个,分布在 6 个连锁群,6 个三联体,11 个连锁对上(图 2),最大连锁群长度为 156.2 cM,最短连锁群长度为 13.3 cM。标记间最大图距为 44.4 cM,最小图距为 2.4 cM。标记平均间隔 24.0 cM。雄性框架图谱总长度( $G_{of}$ )为 535.2 cM,图谱预期长度( $G_e$ )为 2 372.4 cM,框架图谱覆盖率( $C_{of}$ )为 22.6%,总覆盖率( $C_{oa}$ )为 49.5%。三疣梭子蟹雌、雄连锁图谱相关参数见表 3。

## 3 讨论

本实验中,三疣梭子蟹雌性连锁图谱包括 100 个遗传标记,共覆盖 1 544cM,标记间平均间隔 22.0 cM。雄性连锁图谱包括 71 个遗传标记,共覆盖 1 174.2 cM。雌性连锁图谱标记平均间隔略小于雄性连锁图谱,由于图谱中的标记平均间隔距离与重组率具有线性相关,说明在三疣梭子蟹定向交配  $F_2$  代家系中,母本的重组率要低于父本。在合浦珠母贝 *Pinctada fucata* 遗传连锁图谱中,雌性图谱标记平均间隔小于雄性图谱,表明其母本重组率也低于父本(喻达辉等 2007)。导致三疣梭子蟹两性之间重组率存在较大差异的原因可能是多方面的,如其本身基因组序列、染色体结构、染色体定位等都有可能造成这种差异。Lindahal 等(1991)认为两性之间重组率不同可能是因为某一性别减数分裂初期时间不同或减数分裂时转录活动不同而引起的。不同物种两性之间重组率也会不同,同一物种的不同群体不同家系也可能导致重组率的不同。与之相反,在某些水产动物中如凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei*、斑马鱼 *Danio rerio*、虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* 等雌性重组率高于其雄性重组率(Perez *et al.* 2004; Singer *et al.* 2002; Sakamoto *et al.* 2000)。由于目前关于三疣梭子蟹遗传连锁图谱的数据非常有限,所以还无法确定造成图谱性别差异的具体原因。

在运用 DNA 分子标记对生物进行遗传分析尤其是构建遗传连锁图谱的过程中,经常会出现某些位点的基因频率偏离正常孟德尔分离规律的情况。本实验中,581 个多态位点有 153 个偏分离,占总分离位点比例的 26.3%。在罗非鱼 *Oreochromis niloticus* 的遗传连锁图谱中有 8.0% 的 SSR 与 AFLP 偏分离标记(Thomas *et al.* 1998),太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* 连锁图谱中 AFLP 与 RAPD 偏分离标记的比例分别为 29.0% 与 21.2% ( $P < 0.05$ ) (李莉等 2003),凡纳滨对虾分子标记图谱中偏分离标记比例为 11.5% ( $P < 0.05$ ),南美白对虾 *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* 中偏分离标记比例为 4.4% (Flanklin *et al.* 2004)。Xu 等(1997)认为偏分离现象是由于遗传搭车效应引起的, Ly 等(2000)则认为偏分离现象是因为生殖细胞在减数分裂时染色体上的位点不同源或易位等原因使其很难发生联会而造成的。另外,实验群体的大小也会对分子标记的分离产生影响,分离群体过小可能造成某些位点不发生分离,因此在统计上无法客观反应某个位点在整个群体中的分离规律。

分子连锁群是染色体在分子水平上的反映,理论上一个完整的连锁群图谱的连锁群数目应该和其单倍体染色体数目相等,三疣梭子蟹的染色体数目  $2n=106$ (朱冬发等 2005),其连锁图谱,应有 53 个连锁群与染色

表3 雌、雄图谱的相关数据统计  
Table 3 The statistics of female and male linkage map of *P. trituberculatus*

相关参数 Statistics		雌性连锁图谱 Female linkage map	雄性连锁图谱 Male linkage map
作图标记数目	Number of mapping markers	155	139
连锁标记数目	Number of unlinked markers	100	71
未连锁标记数目	Number of unlinked markers	55	68
连锁群数目(>3个标记)	Linkage groups(>3 markers)	9	6
三联体	Triplets	6	6
连锁对	Doublets	15	11
平均每个连锁群标记数目	Average number of markers per group	3.3	3.1
相邻标记间平均间隔(cM)	Average marker spacing	22.0	24.0
相邻标记间最大间隔(cM)	Maximum marker spacing	46.7	44.4
相邻标记间最小间隔(cM)	Minimum marker spacing	4.4	2.4
最短连锁群长度(cM)	Minimum length of linkage group	7.9	13.3
最长连锁群长度(cM)	Maximum length of linkage group	140.5	156.2
图谱观察值(cM)	Observed genome length		
$G_{of}$		904.6	535.2
$G_{oa}$		1 544	1 174.2
图谱预期长度(cM)	Estimated genome length		
$G_{e1}$		2 864	2 301.2
$G_{e2}$		2 972.4	2 443.6
$G_e$		2 918.2	2 372.4
图谱覆盖率(%)	Genome coverage		
$C_{of}$		31.0%	22.6%
$C_{oa}$		52.9%	49.5%

体一一对应。本文中三疣梭子蟹雌性连锁图谱有连锁群 30 个,雄性连锁图谱有 23 个连锁群,与其基因组单倍体染色体数相差较大。这主要因为参与构建三疣梭子蟹连锁图谱的标记数目还不够多,造成大量染色体未被标记覆盖的现象。AFLP 分子标记是一种显性标记,它不能象 SSR 标记一样区分纯和显性个体与杂和个体,理论上丢失了 1/4 的遗传信息,这也可能是造成图谱中连锁群数与单倍体染色体数相差较大的原因之一。三疣梭子蟹染色体数目庞大,遗传信息在染色体中分布相对分散,这就需要更多的分子标记来增加图谱的覆盖率和密度,使图谱更加完整。

本文中,连锁群长度与分子标记数目间的 Pearson 相关系数在 0.89~0.95 之间,遗传连锁群的长度和 AFLP 标记数量呈明显的正相关,这说明 AFLP 分子标记在雌、雄图谱连锁群上分布比较均匀,并未出现在其他物种遗传连锁图谱中的分子标记普遍出现的成簇分布现象。AFLP 标记成簇分布的现象在虹鳟(Young *et al.* 1998)、罗非鱼(Agresti *et al.* 2000)、太平洋牡蛎(Li *et al.* 2004)等均有报道。在虹鳟的连锁图谱中,AFLP 标记有集中于着丝粒分布的现象(Castiglioni *et al.* 1998)。Nichols 等(2003)在虹鳟的遗传图谱中发现,除了 AFLP 标记以外,SSR 标记在连锁群的中间区域呈现成簇分布现象,并且认为连锁群上标记成簇分布的区域代表了染色体的着丝粒区域。在鲈鱼 *Ictalurus punctatus* 的 AFLP 分子标记连锁图谱中,有约 30% 的分离标记倾向于分布在几个主要连锁群的末端(Liu *et al.* 2003)。本实验中三疣梭子蟹连锁图谱并没有发现标记成簇分布的现象,这主要是因为已有的连锁群和连锁标记数远少于三疣梭子蟹染色体数。由于 AFLP 分子标记成簇现象会由于连锁标记的数量增加而加剧,所以在已有图谱的基础上,开发更多的新型分子标记将有利于进一步构建高密度的三疣梭子蟹遗传连锁图谱。

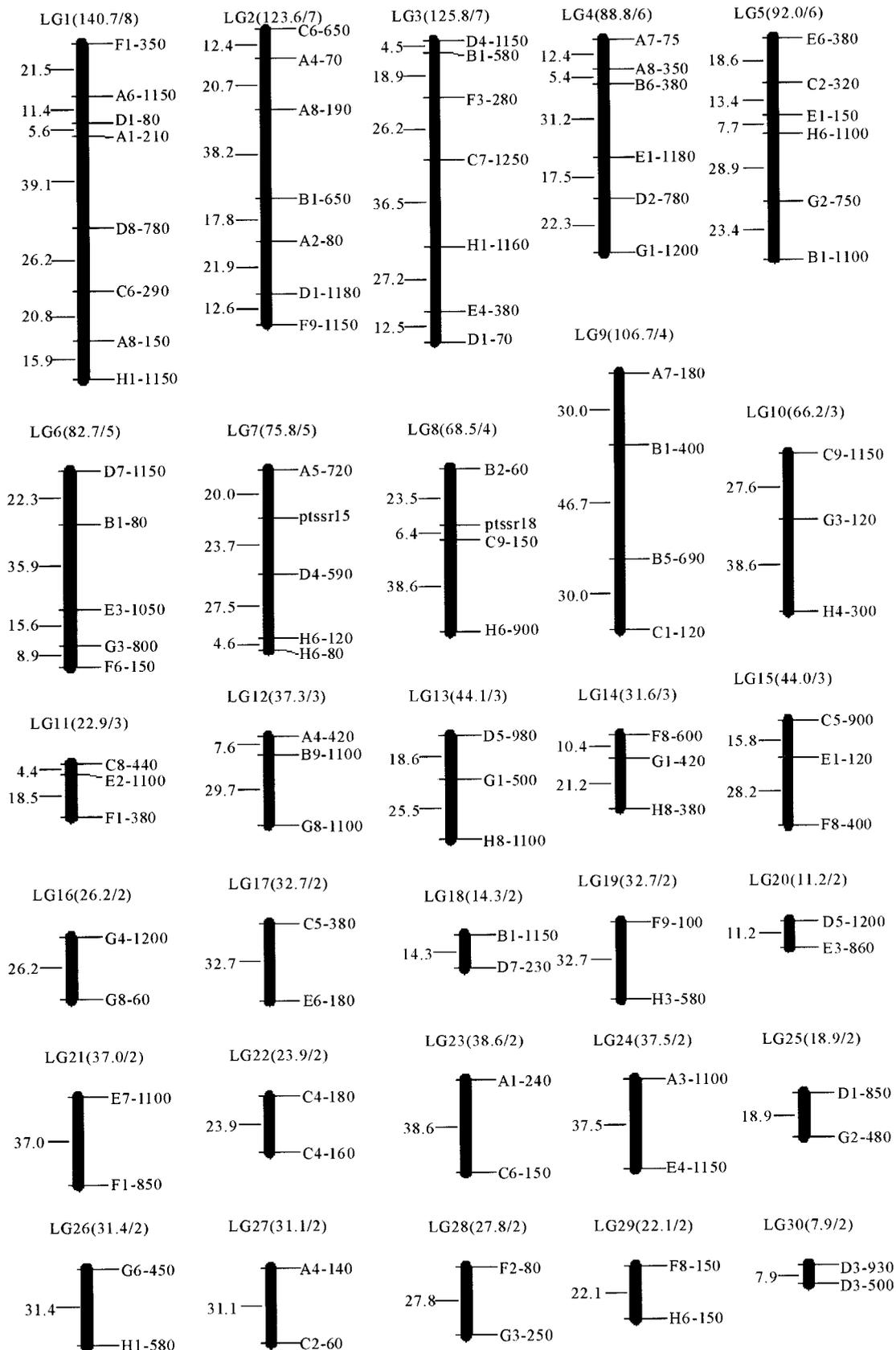


图 1 三疣梭子蟹雌性连锁图谱

Fig. 1 Female genetic linkage map of *P. trituberculatus*

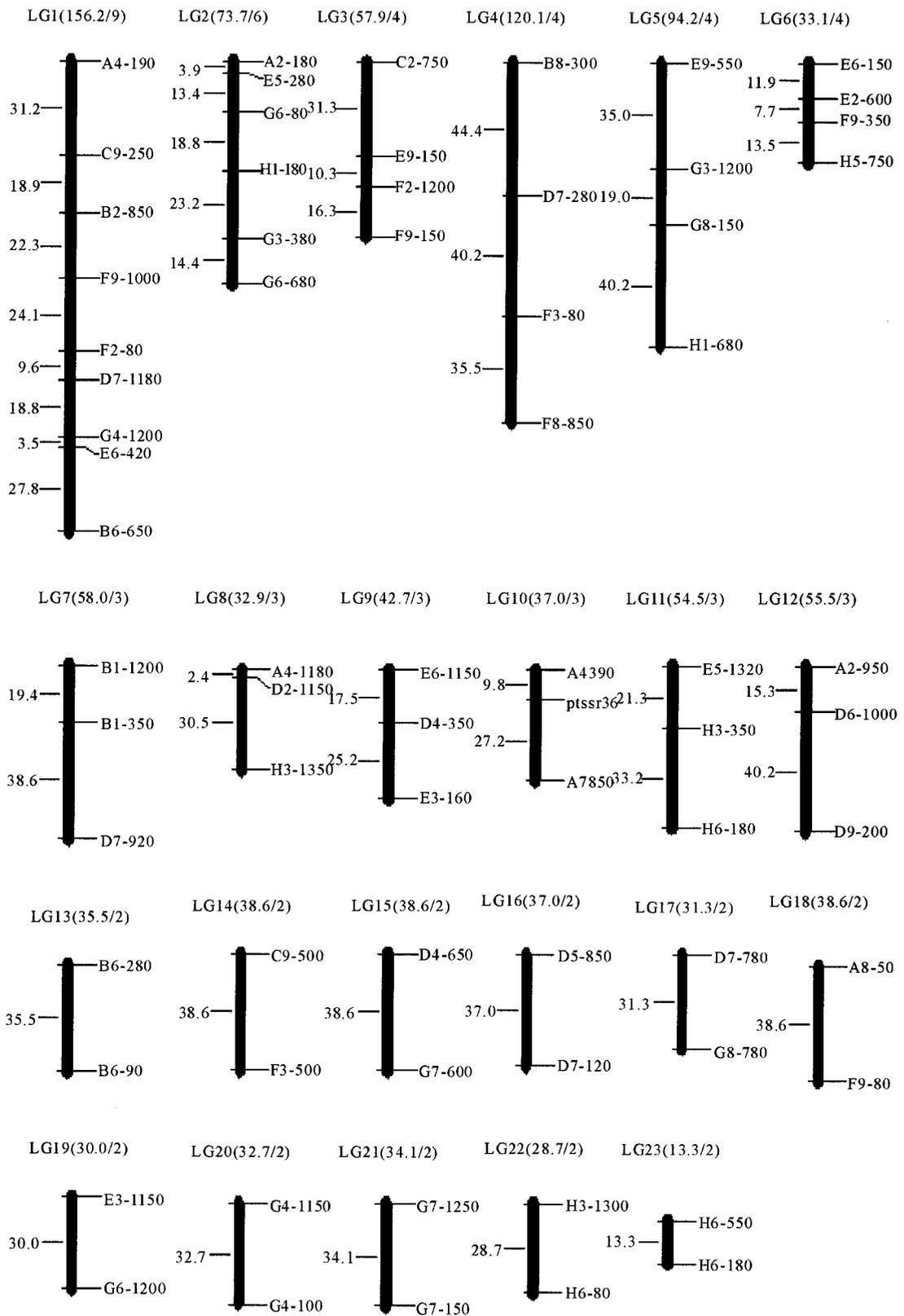


图 2 三疣梭子蟹雄性连锁图谱

Fig. 2 Male genetic linkage map of *P. trituberculatus*

## 参 考 文 献

- 刘仁虎,孟金陵. 2003. MapDraw,在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏. 遗传, 25(3): 317~321
- 朱冬发,王春琳,李志强. 2005. 三疣梭子蟹核型分析. 水产学报, 29(5): 649~654
- 宋来鹏,刘萍,李健,刘振辉. 2008. 三疣梭子蟹基因组微卫星特征分析. 中国水产科学, 15(5): 738~744
- 李莉,郭希明. 2003. 利用 RAPD 和 AFLP 标记初步构建太平洋牡蛎的遗传连锁图谱. 海洋与湖沼, 4(5): 541~551
- 喻达辉,王小玉,黄桂菊,郭奕惠,龚世园,王爱民. 2007. 合浦珠母贝遗传连锁图谱的构建. 中国水产科学, 14(3): 361~368
- 戴爱云,冯钟琪,宋玉枝,黄志翔,吴赫昌. 1977. 三疣梭子蟹渔业生物资源的初步调查. 动物学杂志, 2: 30~33
- Agresti, J. J., Seki, S., Cnaani, A., Poompuang, S., Hallerman, E. M., Umiel, N., Hulata, G., Gall, A. E., and May, B. 2000. Breeding new strains of tilapia; development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. Aquaculture, 185: 43~56
- Castiglioni, P., Pozzi, C., Heun, M., Terzi, V., Muller, K. J., Rohde, W., and Salamini, F. 1998. An AFLP-based procedure for the efficient mapping of mutations and DNA probes in barley. Genetics, 149: 2 039~2 056
- Chakravarti, A., Lasher, L. K., and Reefer, J. E. 1991. A maximum likelihood for estimating genome length using genetic linkage data. Genetics, 128: 175~182
- Jones, E. S., Hughes, L. J., Drayton, M. C., Abberton, M. T., Michaelson-Yeates, T. P. T., Bowen, C., and Forster, J. W. 2003. An SSR and AFLP molecular marker-based genetic map of white clover (*Trifolium repens* L.). Plant Sci. 165: 531~539
- Kosambi, D. D. 1944. The estimation of map distance from recombination values. Annals of Eugenics, 12(3): 172~175
- Li, L., and Guo, X. M. 2004. AFLP-Based genetic linkage maps of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Thunberg. Mar. Biotechnol. 6: 26~36
- Lindahal, K. F. 1991. His and hers recombinational hotspots. Trends Genet. 7: 273~276
- Liu, Z. L., Karsi, A., Li, P., Cao, D., and Dunham, R. 2003. An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family. Genetics, 165: 687~694
- Ly, C. L., Baree, P., and Lorieux, M. 2000. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). Theor. Appl. Genet. 1(4): 669~676
- Merril, C. R., Switzer, R. C., and van Keuren, M. L. 1995. Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluid detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4 335~4 339
- Moen, T., Kjalestad, T., Fjalestad, K. T., Munck, H., and Gomez-Raya, L. 2004. A multistage testing strategy for detection of quantitative trait loci affecting disease resistance in Atlantic salmon. Genetics, 167: 851~858
- Nichols, K., Young, W., Danzmann, R. G., and Robison, B. D. 2003. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Animal Genetic, 34: 102~115
- Pe'rez, F., Erazo, C., Zhinaula, M., Volekaert, F., and Caldero'n, J. 2004. A sex specific linkage map of the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* based on AFLP markers. Aquaculture, 242: 105~118
- Postlethwait, J. H., Johnson, S. L., Midson, C. N., Talbot, W. S., Gates, M., Ballinger, E. W., Africa, D., Andrews, R., Carl, T., and Eisen, J. S. 1994. A genetic linkage map for the zebrafish. Science, 264: 699~703
- Rance, K. A., Mayse, S., Price, Z., Jack, P. L., and Corley, R. H. V. 2001. Quantitative trait loci for yield components in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Theor. Appl. Genet. 103: 1 302~1 310
- Sakamoto, T., Danzmann, R. G., Gharbi, K., Howard, P., Ozaki, A., Khoo, S., Woram, R. A., Okamoto, N., Ferguson, M. M., Holm, L. E., Guyomard, R., and Hoyheim, B. 2000. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large-sex-specific differences in recombination rates. Genetics, 155: 1 331~1 345
- Singer, A., Perlman, H., Yan, Y., Walker, C., Corley-Smith, G., Brandhorst, B., and Postlethwait, J. 2002. Sex-specific recombination rates in zebrafish (*Danio rerio*). Genetics, 160: 649~657
- Strauss, W. M. 1989. Preparation of genomic DNA from mammalian tissues. Current Protocol in Molecular Biology. New York: John Wiley and sons, 221~222
- Kocher, T. D., Lee, W. J., Sobolwaska, H., Penman, D., and McAndrew, B. 1998. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). Genetics, 148: 1 225~1 232
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., and Kuiper, M. 1995. AFLP, a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23: 4 407~4 414
- XU, S. J., Singh, R. J., and Hymowitz, T. 1997. Establishment of a cytogenetic map soybean; progress and prospective. Soybean Genet. Newsletter. 24: 121~122
- Young, W. P., Wheeler, P. A., Coryell, V. H., Keim, P., and Thorgaard, G. H. 1998. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. Genetics, 148: 1~13