

文章编号: 1000-0615(2008)02-0161-13

中国对虾遗传连锁图谱的构建

李 健, 刘 萍, 王清印, 李朝霞, 孙昭宁, 何玉英

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 利用 RAPD、SSR 和 AFLP 三种标记技术结合“拟测交”策略, 以中国对虾“黄海 1 号”雌虾与野生雄虾作为亲本进行单对杂交产生的 F_1 家系为作图群体, 初步构建了中国对虾雌、雄性遗传连锁图谱。对 460 个 RAPD 引物和 44 对 SSR 引物进行筛选, 共选出 61 个 RAPD 和 20 对 SSR 引物, 结合 88 对 AFLP 引物组合对父母本和 82 个 F_1 个体进行了遗传分析。共得到 783 个分离标记(RAPD 标记 237 个, 微卫星标记 45 个, AFLP 标记 501 个), 761 个标记用于连锁分析。雌性图谱包括 40 个连锁群和 15 个三联体, 20 个连锁对, 标记间平均间隔为 12.5 cM, 图谱共覆盖 2835.5 cM, 覆盖率为 73.5%; 雄性图谱包括 41 个连锁群和 6 个三联体, 12 个连锁对, 标记间平均间隔为 11.9 cM, 图谱共覆盖 2776.7 cM, 覆盖率为 73.3%。中国对虾遗传图谱的构建为其分子标记辅助育种、比较基因组作图及数量性状位点(QTL)的定位与克隆奠定了基础。

关键词: 中国对虾; 遗传连锁图谱; RAPD; SSR; AFLP

中图分类号: Q 75; S 917

文献标识码: A

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是我国重要的水产养殖品种, 主要分布于渤海、黄海、东海及南方的部分海域。早在二十世纪 50 年代, 就已开展中国对虾的遗传育种工作, 在 1986-1992 年期间, 无论在对虾的苗种繁育及养殖方面, 中国一直处于世界领先地位。但自从 1993 年对虾病毒病爆发以来, 中国对虾养殖产量急剧下降, 养殖业受到重挫, 开始陷入低谷。其主要原因是养殖用苗种基本上都没有经过系统的人工定向选育, 其遗传基础还是野生型的, 经过累代养殖, 出现了遗传力减弱、抗逆性差, 性状退化严重等问题, 已成为产业可持续发展的“瓶颈”^[1]。中国水产科学院黄海水产研究所自 1997 年率先实施中国对虾人工选育计划^[2], 进行了中国对虾优良性状人工选育研究。2003 年, 选育后的中国对虾快速生长新品种“黄海 1 号”已通过全国水产原良种审定委员会的审定, 成为我国第一个人工选育而成的海水养殖动物新品种^[3]。至 2004 年, 快速生长中国对虾群体已进行了 8 代人工选育, 其生长速度明显

加快, 这不仅促进了良种产业化发展, 也为进一步的研究工作提供了材料。

遗传连锁图谱的构建是基因组研究中的重要环节, 是基因定位与克隆乃至基因组结构与功能研究的基础, 其最主要的应用是数量性状位点(QTL)的定位和分子标记辅助育种(MAS)。近年来, 许多重要水产养殖动物的遗传连锁图谱相继报道, 包括斑马鱼(*Danio rerio*)^[4-5], 虹鳟(*Onchorhynchus mykiss*)^[6], 大西洋鲑(*Salmo salar*)^[7-9], 罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[10-11], 日本青鳉(*Oryzias latipes*)^[12], 鲶(*Clarias macrocephalus*)^[13-15], 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[16], 牡蛎(*Crassostrea virginica*)^[17-18], 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[19], 鲱(*Seriola quinqueradiata* and *Seriola lalandi*)^[20]等。至于对虾属, 部分品种的遗传连锁图谱已经构建, 如日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)^[21-22], 斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[23], 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[24]等, 中国对虾遗传连锁图谱的研究进

收稿日期: 2007-01-02

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A406); 国家科技支撑计划(2006BAD01A13)

作者简介: 李 健(1961-), 男, 山东招远人, 研究员, 从事中国对虾健康养殖与遗传育种。Tel: 0532-85830183, E-mail: lijian@ysfri.

ac.cn

展较慢,其主要限制因素是由于中国对虾难以建立家系。

本文利用 RAPD、SSR 和 AFLP 三种分子标记方法,初步构建了中国对虾遗传连锁图谱,为构建高密度中国对虾遗传连锁图谱,定位重要经济性状基因和进行标记辅助选育奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的中国对虾为 2004 年通过人工精英移植技术建立的 F_1 家系,其中母本来源于快速生长选育群体“黄海 1 号”;父本为野生型,来源于黄海近海。家系材料养殖于青岛胶南卓越水产养殖基地,5 月龄时随机抽取 82 尾子代个体作为样本,平均体长为 (8.137 ± 0.746) cm,平均体重为 (5.872 ± 1.885) g。将新鲜样品速冻,运回实验室后 -70°C 保存。

1.2 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取参照文献 Strauss^[25] 的方法略作修改。采用常规的蛋白酶 K 消化,苯酚、氯仿/异戊醇抽提,无水乙醇沉淀的方法,提取对虾肌肉组织的基因组 DNA,用 TE 缓冲液稀释至终浓度 $200\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,用于以下分析。

1.3 RAPD 分析

RAPD 反应体系 DNA 扩增在 Gene PCR system 9600 上进行。PCR 反应混合物中含 $10\times$ PCR 反应缓冲液 $2.5\text{ }\mu\text{L}$ (成分: $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $500\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+} , $1.3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA, 0.01% Gelatin, pH 8.4), $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的各种 dNTP, $0.25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的引物,约 20 ng 基因组 DNA, 1 U Taq 酶 ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$),反应总体积为 $25\text{ }\mu\text{L}$ 。460 个 RAPD 引物为上海生工生物公司合成的 S161-S500, S1001-S1100, S1161-1180 系列。

循环程序 94°C , 5 min 预变性,45 个 3 步循环是 94°C , 1 min ; 92°C , 30 s ; 37°C , 1 min ; 72°C , 2 min ,最后 72°C 延伸 10 min 。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶于 120 V 电压下电泳,EB 染色,紫外灯下拍照。

引物的筛选 (1)首先用一个模板扩增一组引物(20 个);(2)选择有两条以上清晰条带的引物进行预实验,预实验中用 2 个亲本和 5 个子代个体来筛选能够在双亲中扩增出多态带,而在

子代中呈分离的谱带的引物;(3)利用(2)筛选的引物扩增双亲和 15 个子代,选择重复性好,信号强,至少有一条片段在 15 个子代中符合 1:1 分离规律的引物。经过三步筛选后,完成剩余子代个体的扩增。

1.4 SSR 分析

每个微卫星 PCR 反应总体积为 $25\text{ }\mu\text{L}$,包括 100 ng 中国对虾基因组 DNA、 $10\times$ PCR 缓冲液 $2.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 Mg^{2+} ($2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、 1 U Taq 酶、dNTP 各 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,引物各 $0.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。PCR 条件为: 94°C 变性 2 min ; 94°C 40 s ,退火 1 min , 72°C 1 min ,25 个循环; 72°C 延伸 5 min 。PCR 产物在 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶中分离,硝酸银染色。44 对微卫星引物是从本实验室构建的中国对虾部分基因组文库中得到。

引物的筛选 选择扩增产物条带清晰,杂带少且在一个以上亲本中为杂合基因型的引物,用于全部个体的分析。

1.5 AFLP 分析

AFLP 分析方法参照文献[26]的方法。取 200 ng 基因组 DNA,用 *Eco*RI 和 *Mse* I 进行双酶切,酶切片段与 *Eco*RI 和 *Mse* I 接头连接。

*Eco*RI 接头: $5' - \text{CTCGTAGACTGCGTACC} - 3'$

$3' - \text{CATCTGACGCATGGTTAA} - 5'$

Mse I 接头: $5' - \text{GACGATGAGTCCTGAG} - 3'$

$3' - \text{TACTCAGGACTCAT} - 5'$

酶切-连接产物经 1:10 比例稀释后,取出 $5\text{ }\mu\text{L}$ 用于预扩增。采用 3'末端带 1 个选择性碱基的引物扩增限制性片段。PCR 反应程序为: 94°C 30 s , 56°C 60 s , 72°C 60 s ,共 24 个循环; 72°C 延伸 5 min 。

预扩增产物 1:20 稀释后,用于选择性扩增。选择性扩增引物 5'和 3'端各带有 3 个选择性碱基,选取 12 种引物组合进行选择扩增。PCR 程序为: 94°C 30 s , 65°C 30 s , 72°C 60 s ,然后每个循环复性温度降低 0.7°C ,经 13 个循环后,退火温度降至 56°C ,再进行 30 个循环的扩增,条件为: 94°C 30 s , 56°C 60 s , 72°C 60 s 。选择性扩增产物通过 4.5% 的聚丙烯酰胺变性胶在 $1\times$ TBE 缓冲液中电泳分离, 75 W ,预电泳 0.5 h ,上样后电泳 2 h 。

电泳结束后参照 Merril 等^[27]的方法进行银染检测。

1.6 数据统计

RAPD 和 AFLP 为显性标记,其表型分为扩增片段的有(记为 1)和无(记为 0),相应的基因型为 AA、Aa(有扩增片段)和 aa(没有扩增片段),统计只在一个亲本中出现,而在另一个亲本中缺失的片段。SSR 是共显性标记,而且一个反应只有一个基因座位,微卫星标记的筛选,是在同一位点对父母本分别统计,把一个等位基因作为一个位点来进行筛选的。利用卡方($P < 0.05$)检验,鉴定多态标记在子代的分离比是否符合 1:1 孟德尔分离规律,符合规律的分离标记及部分偏分离标记 ($0.05 < P < 0.01$)用来构建中国对虾的遗传连锁图谱。

各种标记是根据此条带的引物名称及其条带的分子量大小来命名的,用 Gel-pro Analyzer 4.5 软件确定片段的分子量大小,AFLP 标记的 *Eco*RI 和 *Mse* I 选择性扩增引物分别用字母和数字来表示(表 1),其后字母 f 是 fragment 的首字母,最后的几位数字表示片段的分子量大小。比如,位点 D9f460 是指由选择性 *Eco*RI 引物 D (ACA)和 *Mse* I 引物 9 (CGA)扩增得到的片段,分子量为 460 bp。

1.7 连锁分析

本试验利用软件连锁分析软件 MAPMAKER/EXP 3.0 (Whitehead Institute, <ftp://ftp-genome.wi.mit.edu/distribution/software/mapmaker3/>, F_2 回交模型),采用拟测交策略^[29]分别构建父、母本的遗传连锁图谱。

卡方($P < 0.05$)检验以鉴定多态标记在子代的分离比是否符合 1:1 孟德尔分离规律。除在一个亲本中出现,且在子代中呈 1:1 孟德尔分离规律 ($Aa \times aa$ 或 $aa \times Aa$)的标记,另有部分偏分离位点 ($0.01 < P < 0.05$)也用于连锁分析。偏分离标记后缀为“-”表示纯合子缺失,“+”表示纯合子过剩。

用 A 代替 0, H 代替 1,将母本和父本 1:1 分离标记分别转化成 MAPMAKER/EXE 3.0 的数据格式(表 2)。设置 $LOD \geq 3.0$,标记间最大遗传距离为 45 cM(Haldane),利用两点分析,将所有的分离遗传标记分成若干组。小于或等于 8 个标记的连锁群,采用 COMPARE 命令进行排序,大于 8 个标记的连锁群,用 THREE POINT 命令将连锁群分为几个亚群,对每个亚群分别进行排序后,再确定亚群之间的顺序。当连锁群中的标记序列排好之后,利用 MAP 命令计算标记间距离。对于应用以上命令还未能定位的标记,采用 TRY 命令进行定位,用

RIPPLE 命令来检验排序的可靠性。通过 CENT FUNC 命令将 Haldane 转化为 Kosambi。最后利用 Mapchart 2.0^[29]版本绘制该连锁图谱。

1.8 遗传图谱预期长度和覆盖率的计算

首先计算标记平均间隔(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)。采用两种方法来计算基因组预期长度:

(1) G_{e1} :参考文献[30]的方法。每个连锁群的长度加上标记平均间隔的两倍,来补偿连锁群最末端的标记和端粒距离。

(2) G_{e2} :参考文献[31]的方法。每个连锁群的长度乘以系数 $(m+1)/(m-1)$, m 为每个连锁群所包含标记的数目。

将两种方法的平均值作为中国对虾基因组预期长度 G_e 。

遗传图谱的实际长度分两个方面,一为框架图谱的长度 G_{of} ,二为所有连锁群的总长度,即包括连锁对在内的所有连锁群的总长度 G_{oa} ^[32]。相应的框架图覆盖率为 $C_{of} = G_{of}/G_e$,总的图谱覆盖率为 $C_{oa} = G_{oa}/G_e$ 。

2 结果

2.1 RAPD 和 SSR 分析

筛选了 460 个 RAPD 引物,其中 100 个用于分析亲本和 5 个子代,而最终用于所有子代个体的有 62 个引物,占全部引物的 13.48%。扩增产生 376 条片段。有 250 条(66.48%)片段在两亲本间呈现多态,平均每个引物扩增出 6.06 个片段,其中有 4.03 个为多态标记,在子代中产生了分离。母本分离标记有 128 个,其中 10 个偏分离($P < 0.05$),占分离标记的 7.81%。父本分离标记有 109 个,有 5 个偏分离,占父本分离标记的 4.59%。其他引物扩增产物为单态,或者产生的多态片段的重复性和清晰度较差未做统计。

筛选了 44 对微卫星引物,其中 20 对为多态引物,用于对全部个体进行 PCR 扩增和数据分析,经卡方检验,20 对引物全部符合孟德尔遗传规律 ($P > 0.05$),可分别用于父本或母本作图,其中有 5 对引物可同时用于父本和母本作图。

2.2 AFLP 标记

采用 88 种引物组合共检测到 5128 条清晰的扩增带,其中 641 条呈现多态性。每个引物对产生的条带数目在 30 ~ 105 条,产物分子量在 50 ~ 1300

表 1 选择性扩增引物编号及选择性碱基序列;

88 个引物组合产生的 F 总扩增位点、多态位点数目及其多态位点比例

Tab.1 The polymorphoic (before slashes), the total (after slashes) number of bands and percentage of polymorphic bands produced by 88 AFLP primer combinations in the mapping family of *F. chinensis*

引物对 primer set		多态位点数/ 总位点数 polymorphic loci number/ total loci number	多态位点比例(%) percentage of polymorphic loci	引物对 primer set		多态位点数/ 总位点数 polymorphic loci number/ total loci number	多态位点比例(%) percentage of polymorphic loci
<i>Eco</i> RI	<i>Mse</i> I			<i>Eco</i> RI	<i>Mse</i> I		
AAC(A)	CAC(2)	9/39	23.1	AGA(H)	CTC(12)	4/59	6.8
AAG(B)	CCT(8)	8/58	13.8	AGC(I)	CAA(1)	4/68	5.9
AAG(B)	CGA(9)	9/72	12.5	AGC(I)	CAC(2)	10/68	14.7
AAG(B)	CGT(10)	6/52	11.5	AGC(I)	CAG(3)	3/42	7.1
AAG(B)	CTA(11)	4/48	8.3	AGC(I)	CAT(4)	7/48	14.6
AAG(B)	CTC(12)	15/56	26.8	AGC(I)	CCA(5)	3/37	8.1
AAG(B)	CTG(14)	7/52	13.5	AGC(I)	CCC(6)	8/45	17.8
AAT(C)	CAA(1)	11/79	13.9	AGC(I)	CCG(7)	1/30	3.3
AAT(C)	CAC(2)	10/74	13.5	AGC(I)	CTT(14)	8/51	15.7
AAT(C)	CAG(3)	11/89	12.4	AGG(J)	CAA(1)	11/77	14.3
AAT(C)	CAT(4)	2/65	3.1	AGG(J)	CAC(2)	4/52	7.7
AAT(C)	CCA(5)	10/62	16.1	AGG(J)	CAG(3)	5/49	10.2
AAT(C)	CCC(6)	7/50	14.0	AGG(J)	CAT(4)	12/72	16.7
AAT(C)	CCG(7)	4/54	7.4	AGG(J)	CCA(5)	7/55	12.7
AAT(C)	CTT(14)	8/51	15.7	AGG(J)	CCC(6)	10/66	15.1
ACA(D)	CCT(8)	12/67	17.9	AGG(J)	CCG(7)	5/34	14.7
ACA(D)	CGA(9)	17/61	27.9	AGT(K)	CCT(8)	12/57	21.1
ACA(D)	CGT(10)	4/49	8.2	AGT(K)	CGA(9)	3/72	4.2
ACA(D)	CTA(11)	5/45	11.1	AGT(K)	CTA(11)	8/61	13.1
ACA(D)	CTC(12)	5/47	10.6	ATA(L)	CAA(1)	6/91	6.6
ACA(D)	CTG(13)	3/43	7.0	ATA(L)	CAC(2)	8/86	9.3
ACC(E)	CAC(2)	7/49	14.3	ATA(L)	CAG(3)	3/58	5.2
ACC(E)	CAG(3)	7/48	14.6	ATA(L)	CAT(4)	4/74	5.4
ACC(E)	CAT(4)	13/55	23.6	ATA(L)	CCA(5)	5/53	9.4
ACC(E)	CCA(5)	8/52	15.4	ATA(L)	CCC(6)	5/58	8.6
ACC(E)	CCC(6)	6/38	15.8	ATA(L)	CCG(7)	3/39	7.7
ACC(E)	CCG(7)	3/43	7.0	ATA(L)	CTT(14)	7/84	8.3
ACC(E)	CTT(14)	10/55	18.2	ATC(M)	CCT(8)	7/53	13.2
ACG(F)	CAA(1)	9/66	13.6	ATC(M)	CGA(9)	9/59	15.2
ACG(F)	CAC(2)	7/59	11.9	ATC(M)	CTA(11)	10/46	21.7
ACG(F)	CAG(3)	7/54	13.0	ATC(M)	CTC(12)	11/52	21.2
ACG(F)	CAT(4)	13/59	22.0	ATC(M)	CTG(13)	7/63	11.1
ACG(F)	CCA(5)	8/48	16.7	ATG(N)	CCT(8)	9/54	16.7
ACG(F)	CCC(6)	4/45	8.9	ATG(N)	CGA(9)	6/68	8.8
ACG(F)	CCG(7)	4/38	10.5	ATG(N)	CTA(11)	8/66	12.1
ACG(F)	CTT(14)	5/48	10.4	ATG(N)	CTC(12)	6/50	12.0
ACT(G)	CCT(8)	4/46	8.7	ATG(N)	CTG(13)	8/66	12.1
ACT(G)	CGA(9)	14/54	25.9	ATT(O)	CAA(1)	9/10	58.6
ACT(G)	CGT(10)	3/44	6.8	ATT(O)	CAG(3)	4/69	5.8
ACT(G)	CTA(11)	12/67	17.9	ATT(O)	CAT(4)	6/86	7.0
ACT(G)	CTC(12)	9/51	17.6	ATT(O)	CCA(5)	7/71	9.9
ACT(G)	CTG(13)	6/54	11.1	ATT(O)	CCC(6)	7/56	12.5
AGA(H)	CCT(8)	5/72	6.9	ATT(O)	CCG(7)	8/53	15.1
AGA(H)	CGA(9)	8/70	11.4	ATT(O)	CTT(14)	14/97	14.4
总和(平均值) summation(mean)	-	641/5128 (7/58)	(12.5)	-	-	-	-

表 2 用于构建中国对虾雌性和雄性连锁图谱的所有分离标记,
框架图上的标记数目,以及未被等位和未连锁的标记数目(括号中为偏分离标记数目)

Tab.2 Summary of the female and male segregating markers in *F. chinensis* with
the distorted markers in parenthesis; the significantly distorted markers ($P < 0.01$)
were excluded from the linkage analysis

	雌性连锁图(偏分离标记) female (distorted markers)	雄性连锁图(偏分离标记) male (distorted markers)
所有分离标记 segregating markers	404(38)	379(39)
参与分析的标记 no. of markers in linkage analysis	393(24)	368(23)
框架图中的标记 mapped AFLP markers	266(13)	275(11)
没有被定位的标记 unplaced markers	2(0)	10(2)
三联体 triplets	45(3)	18(3)
未连锁的连锁对 unlinked doublets	40(3)	24(0)
未连锁的单个标记 unlinked singles	40(5)	41(7)

bp。不同引物对的多态检出率变化较大,C4 引物对的多态检出率仅为 3.1%,而 D9 引物对的多态检出率却达 27.9%。多态性片段中,254 个母本分离标记,247 个父本分离标记。其中 61 个偏离 1:1 孟德尔分离规律($P < 0.05$),27 个属于母本,34 个属于父本,偏分离比例为 12.2%。

2.3 遗传连锁图谱

分别对 393 个母本分离标记和 368 个父本分离标记进行连锁分析,构建了中国对虾雌、雄两个

连锁图谱。雌性框架图谱含有 266 个标记,构成了 40 个连锁群(linkage group),各连锁群标记数从 4 到 15 个不等(图 1-A),连锁群长度变化范围在 15.5 ~ 161.8 cM,相邻标记间最大间隔为 41.8 cM,平均间隔为 12.5 cM,总长度为 2835.5 cM。另有 15 个三联体(triplet)和 20 个连锁对(doublet),连锁图谱总长度增至 3606.0 cM。雌性图谱的预期长度为 3858.8 cM,其框架图谱覆盖率为 73.5%,图谱总长度覆盖率为 93.4%(表 3)。

表 3 中国对虾雌性和雄性连锁图谱

Tab.3 The female and male linkage map for *F. chinensis*

	雌性连锁图 female	雄性连锁图 male
连锁群数目 linkage groups	40	41
平均每个连锁群的标记数目 average no. of markers per group	6.7	6.7
每个连锁群最少标记数目 minimum marker no. per group	4	4
相邻标记间平均间隔(cM) average marker spacing	12.5	11.9
相邻标记间最大间隔(cM) maximum marker spacing	41.8	44.3
最短连锁群长度(cM) minimum length of linkage group	15.5	4.9
最长连锁群长度(cM) maximum length of linkage group	161.8	127.7
图谱观察值(cM) observed genome length		
G_{of}	2835.5	2776.7
G_{oa}	3606.0	3077.6
图谱预期长度(cM) estimated genome length		
G_{el}	3835.5	3752.5
G_e	23882.0	3820.5
G_e	3858.8	3786.5
图谱覆盖率(%) genome coverage		
C_{of}	73.5	73.3
C_{oa}	93.4	81.3

雄性框架连锁图谱含有 275 个标记,分布于 41 个连锁群中,平均每个连锁群含 4~16 个(图 1-B)。连锁群长度在 4.9~127.7 cM,相邻标记间最大间隔为 44.3 cM,平均间隔为 11.9 cM,框架图总长度为 2776.7 cM。另外有 6 个三联体和 12 个连锁对,连锁图谱总长度达 3077.6 cM。雄性图谱的预期长度为 3786.5 cM,框架图谱覆盖率为 73.3%,图谱总长度覆盖率为 81.3%(表 3)。

3 讨论

3.1 作图分子标记

RAPD 在进行连锁分析时在许多方面都优于其它的方法。只需要少量的 DNA,不需特殊的仪器、昂贵的试剂或复杂的过程,适用于以低成本进行大范围的分析。RAPD 标记的主要缺陷在于对反应条件比较敏感,稳定性较差。在本实验中,通过保持稳定的反应条件,并通过多次筛选和分组重复,选择稳定存在的分离带进行统计来保证其准确性。结果表明,可以通过高质量的引物获得很好的重复性,RAPD 因其快速,方便,经济,仍然是构建遗传连锁图谱不可缺少的遗传标记。

在本实验中发现,少数 RAPD 引物扩增的多态带中,如雌性图谱中的 s1043f1000 和 s1043f1735 位点,是由同一个引物扩增产生的两个相邻的位点,它们相互连锁构成一个连锁对,这两个相邻的位点事实上可能是同一位点的等位基因,但是没有对这些位点进行测序,因此还不能得出这样的结论。Agresti 等^[11]和 Roupe 等^[33]在 AFLP 标记中发现过类似的情况。

SSR 标记因其共显性分离、稳定、作图信息量大,可以进行不同家系间图谱的比较,被认为是当前最好的作图标记,但是要发展足够构建中国对虾遗传图谱的 SSR 标记,需要建立相应的文库,进行大量的测序,因此使其应用受到了很大的限制。

扩增片段长度多态性(AFLP)是一种基于 PCR 基础上的,多位点指纹识别技术,它兼有 RFLP 技术的可靠性和 PCR 技术的高效性,且具有快速、灵敏、稳定、所需 DNA 量少、多态性检出率高、重复性好、可以在不知道基因组序列特点的情况下进行研究等特点,所以被认为是一种十分理想的、有效的、先进的分子标记,因此很适用于构建遗传图谱。由于 AFLP 具有不需预先知道基因组 DNA 情况,即可检测出大量的多态性位点,鉴于 AFLP 的高效

性,在虾类遗传图谱的构建中得到广泛的应用。本试验采用 88 对 AFLP 引物组合产生的多态位点检测效率为 12.5%,略少于 Moore 等^[21]对日本对虾的检测结果,比 Li 等^[22]同样对日本对虾的多态检出率要高。在本实验的亲本材料选择中,作图群体的母本来自于人工选择快速生长群体“黄海 1 号”;父本材料为野生型,捕自黄海近海,这种亲本组合,有利于尽可能增加分离群体之间的遗传差异,获得更多的信息量,也为我们进行生长相关的数量性状位点的定位作了准备。

3.2 拟测交理论

本实验借鉴最初由 Grattapaglia 等^[28]报道的拟测交理论来构建中国对虾的遗传连锁图谱。他们用采用此策略结合 RAPD 标记分析,构建了第一张梭树的遗传连锁图谱。这种方法是利用高度杂合的生物,杂交会产生大量类似测交的分离标记,即某些标记在一个亲本中表现为杂合,在另一个亲本中表现为纯合,其后代产生 1:1 的分离比,与测交方式相同。这种方法最初主要用于林木等多年生异交作物^[34-37],由于林木等生命周期长,而其遗传组成高度杂合,且具有自交不亲和和近交衰退现象,因此难以建立近交系。与植物或其他家畜等相比,海洋生物的遗传育种工作的发展比较落后,建立近交系或高世代群体仍需要大量的工作,鉴于这种情况,拟测交理论为构建这类水生生物的遗传连锁图谱提供了一条快速而有效的途径。近年来,采用这种方法构建的遗传连锁图谱不断报道^[16-18,20,22-24]。本试验采用此策略也取得了理想的结果。

3.3 图谱的评估

岳志芹等^[38]仅用 28 个中国对虾 F_1 个体构建了其 AFLP 图谱,雌雄图谱分别包括 66 和 74 个标记,分布于 22 个雌性连锁群(包括三联体和连锁对)和 25 个雄性连锁群,雌雄图谱的基因组覆盖率分别为 35.6%和 47.5%。与之相比,本研究中用了更多的 F_1 子代,避免了由于样本数量较少造成的连锁互换无法观察到的现象,得到了 31 个雌性连锁群(包括三联体和连锁对)和 29 个雄性连锁群。

理论上一个完整的遗传连锁图谱的连锁群数目应该与其单倍体染色体数目相等,本实验雌性框架连锁图构成了 40 个连锁群,雄性框架连锁图构成了 41 个连锁群,均少于中国对虾的单倍体染色体数目,另外两个图谱均都存在着大量未连锁的三

联体和连锁对,反映了图谱的不完整性,还需要更多的标记来增加中国对虾图谱的覆盖率和密度。估计的雌性基因组 DNA 长度为 3858.8 cM,雄性基因组 DNA 长度为 3786.5 cM,本试验所估计的中国对虾基因组长度大约为 3800 cM。Wilson 等^[23]采用 AFLP 方法构建斑节对虾的遗传图谱,20 个连锁群覆盖了 1412 cM。Moore 等^[21]用 AFLP 构建日本对虾的遗传图谱,假设基因组中遗传标记是平均分布的,不同性别的重组率相同的情况下,估计日本对虾基因组总长度为 2300cM,我们估计的长度均长于上述的研究结果。Li 等^[18]用 RAPD 和 AFLP 两种方法构建太平洋牡蛎的遗传图谱,估计的基因组长度 1005~1256,远长于太平洋牡蛎的理论长度 550~650 cM,他们认为两者之间的偏差主要是由于标记的密度过低造成的,这一结论也适用于我们的实验结果。一般来说,当遗传图谱的覆盖率非常低时,其长度会随着遗传标记的增加而增大,而当覆盖率达到了一定数值后,遗传图谱标记的平均间隔和遗传图谱的总长度会降低。以家蚕为例,1018 个 RAPD 标记产生的图谱长度为 2000 cM^[39],而 356 个 AFLP 标记产生的遗传连锁图谱有 6512 cM^[40]。因此,还需要增添大量标记以增加此图谱的密度和覆盖率。当然,还需要进一步的实验来确定中国对虾基因组的实际长度。

中国对虾基因组单倍体染色体数目为 44,大于许多水产动物。例如,太平洋牡蛎 $n = 10$ ^[18],栉孔扇贝 $n = 19$ ^[19],日本牙鲆 $n = 23$ ^[16]。因此,要获得中国对虾高密度遗传连锁图谱需要相当大量的分子标记。在本实验中,雌、雄性图谱连锁群分别是 40 和 41,均小于对虾的单倍体染色体数目,我们认为作图群体较小,以及标记数目少影响了重组的检测,因此,导致连锁群数目与染色体数目不符。

本研究中,首次将微卫星标记定位于中国对虾遗传连锁图谱。雌、雄图谱共有的微卫星标记有 5 个,并且发现在雌性图谱中相连锁的微卫星标记,在雄性图谱中,也相互连锁,雌、雄图谱的 5 个连锁组具有共同的微卫星标记(图 1)。这些标记,可用于连接中国对虾的雌、雄图谱。随着可用于构建中国对虾连锁图谱的微卫星标记的增多,将用于构建中国对虾的性别平均图谱。

遗传连锁图谱应用于遗传学领域的许多方面,包括 QTL 分析,基于图谱的定位克隆,比较基因作图以及标记辅助选育(MAS)等。本图谱的构建,旨

在为以后中国对虾高密度遗传图谱的构建打下基础,并最终用于中国对虾重要及经济性状定位,促进中国对虾的遗传育种工作。

参考文献:

- [1] 刘 萍,孔 杰,石 拓,等. 爆发性流行病病原对中国对虾亲虾人工感染及对子代影响的 PCR 检测[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(2):139-144.
- [2] 李 健,王清印. 中国对虾健康养殖品种选育的初步研究[J]. 中山大学学报, 2003, 39(增刊): 86-90.
- [3] 李 健,刘 萍,何玉英,等. 中国对虾快速生长新品种“黄海 1 号”的人工选育[J]. 水产学报, 2005, 29(1):1-5.
- [4] Postlethwait J H, Johnson S L, Midson C N, et al. A genetic linkage map for the zebrafish [J]. Science, 1994, 264: 699-703.
- [5] Kelly P D, Chu F, Woods L G, et al. Genetic linkage mapping of zebrafish genes and ESTs [J]. Genome Res, 2000, 10: 558-567.
- [6] 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, 48:839-850.
- [7] Lundin M, Mikkelsen B, Moran P, et al. Cosmid clones from Atlantic salmon: physical genome mapping [J]. Aquaculture, 1999, 173: 59-64.
- [8] Norris A T, Bradley D G, Cunningham E P. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* using microsatellite markers [J]. Aquaculture, 2000, 182: 73-83.
- [9] Moen T, Hoyheim B, Munck H, et al. A linkage map of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals an uncommonly large difference in recombination rate between the sexes [J]. Animal Genetics, 2004, 35: 81-92.
- [10] 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.
- [11] 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]. Aquaculture, 2000, 185: 43-56.
- [12] Naruse K, Fukamachi S, Mitani H, et al. A detailed linkage map of medaka, *Oryzias latipes*, comparative genomics genome evolution [J]. Genetics, 2000, 154: 1773-1795.
- [13] Liu Z, Li P, Argue B J, et al. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping

- and analysis of genetic variation of catfish [J]. Aquaculture, 1999, 174: 59–68.
- [14] Waldbieser G C, Bosworth B G, Nonneman D J, *et al.* A microsatellite-based genetic map for channel catfish [J]. Genetics, 2001, 158: 727–434.
- [15] Poompuang S, Na-Nakorn U. A preliminary genetic map of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) [J]. Aquaculture, 2004, 232: 195–203.
- [16] Coimbra M R M, Kobayashi K, Koretsugu S, *et al.* A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 2003, 220: 203–218.
- [17] Yu Z, Guo X. Genetic linkage map of the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin [J]. Biol Bull, 2003, 204: 327–338.
- [18] Li L, Guo X. AFLP-Based genetic linkage maps of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Thunberg [J]. Mar Biotechnol, 2004, 6: 26–36.
- [19] Li L, Xiang J H, Liu X, *et al.* Construction of AFLP-based genetic linkage map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston and mapping of sex-linked markers [J]. Aquaculture, 2005, 245: 63–73.
- [20] Ohara E, Nishimura T, Nagakura Y, *et al.* Genetic linkage maps of two yellowtails (*Seriola quinqueradiata* and *Seriola lalandi*) [J]. Aquaculture, 2005, 244: 41–48.
- [21] Moore S S, Whan V, Davis G P, *et al.* The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. Aquaculture, 1999, 173: 19–32.
- [22] Li Y, Byrne K, Miggiano E, *et al.* Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers [J]. Aquaculture, 2003, 219: 143–156.
- [23] 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.
- [24] Pérez F, Erazo C, Zhinaula M, *et al.* A sex-specific linkage map of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* based on AFLP markers [J]. Aquaculture, 2004, 242: 105–118.
- [25] Strauss W M. Preparation of genomic DNA from mammalian tissues [M]//Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, eds. Current protocol in molecular biology. John Wiley and Sons, New York, 1989: 221–222.
- [26] Vos P, Hogers R, Bleeker M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 4407–4414.
- [27] Merrill C R, Switzer R C, van Keuren M L. Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain [J]. Proc Natl Acad Sci, 1979, 76: 4335–4339.
- [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] Voorrips R E. Map chart version 2.0: windows software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs [M]. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands, 2001.
- [30] Fishman L, Kelly A J, Morgan E, *et al.* A genetic map in the *Mimulus guttatus* species complex reveals transmission ratio distortion due to heterospecific interactions [J]. Genetics, 2001, 159: 1701–1716.
- [31] Chakravarti A, Lasher L K, Reefer J E. A maximum likelihood for estimating genome length using genetic linkage data [J]. Genetics, 1991, 128: 175–182.
- [32] Cervera M T, Storme V, Ivens B, *et al.* Dense genetic linkage maps of three populus species (*Populus deltoids*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers [J]. Genetics, 2001, 158: 787–809.
- [33] Roupe van der Voort J N A M, Zandvoort P M, van Eck H J, *et al.* Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes [J]. Mol Gen Genet, 1997, 255: 437–447.
- [34] Marques C M, Araujo J A, Ferreria J G, *et al.* AFLP genetic maps of *Eucalyptus globules* and *E. tereticornis* [J]. Theor Appl Genet, 1998, 90: 1119–1127.
- [35] Terauchi R, Kahl G. Mapping of the dioscorea toloro genome: AFLP markers linked to sex [J]. Genome, 1999, 42: 752–762.
- [36] Arcade A, Anselin F, Rampant P F, *et al.* Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 299–307.
- [37] Scaffi M, Troggio M, Piovani P, *et al.* A RAPD, AFLP and SSR linkage map, and QTL analysis in European beech *Fagus sylvatica* L [J]. Theor Appl Genet, 2004, 108: 433–441.
- [38] 岳志芹, 王伟继, 孔杰, 等. AFLP 分子标记构建中国对虾遗传连锁图谱的初步研究 [J]. 高技术通讯, 2004, 4: 88–93.
- [39] Yasukochi Y. A dense genetic map of the silkworm I

Bombyx mori, covering all chromosome based on 1018 molecular markers [J]. Genetics, 1998, 150: 1513 – 1525.

[40] Tan Y, Wan C, Zhu Y. An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm[J]. Genetics, 2001, 157: 1277 – 1284.

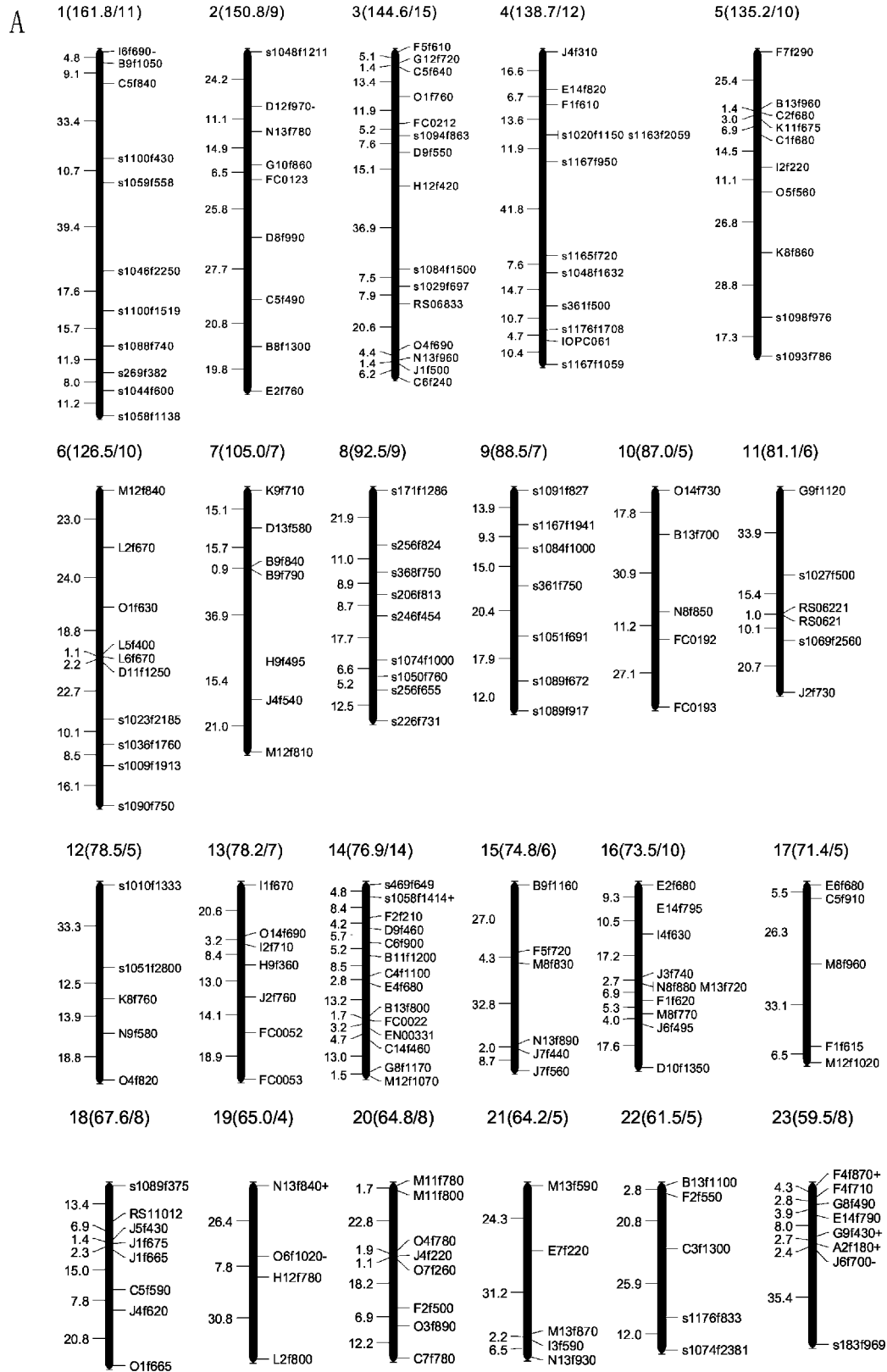
The construction of a genetic linkage map of marine shrimp *Fenneropenaeus chinensis*

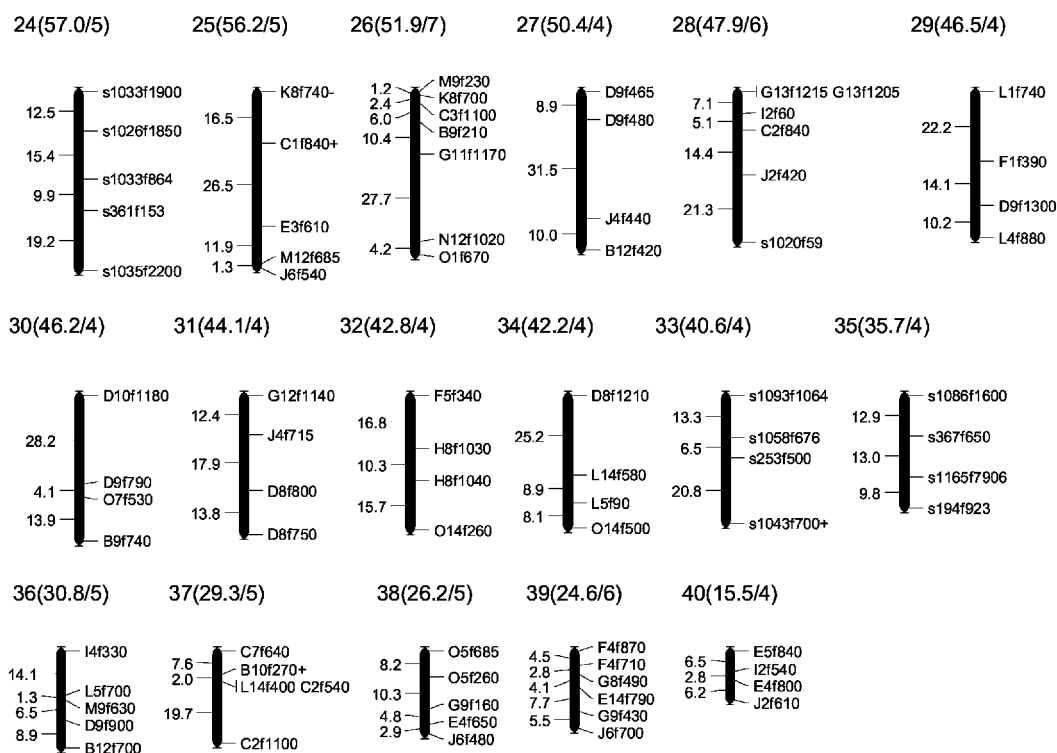
LI Jian, LIU Ping, WANG Qing-yin, LI Zhao-xia, SUN Zhao-ning, HE Yu-ying

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

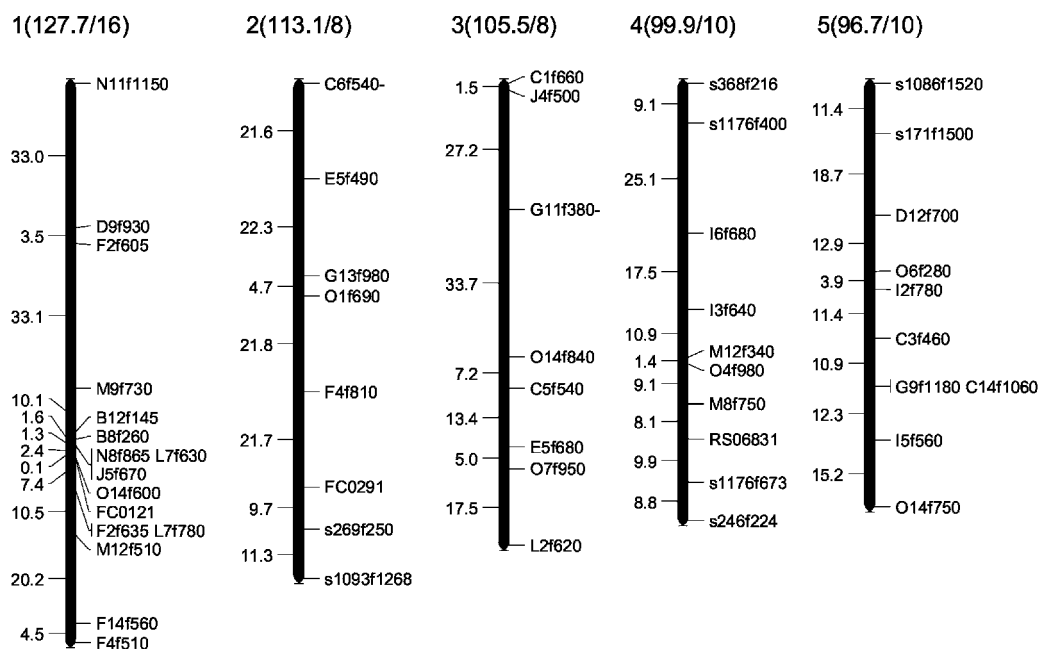
Abstract: Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) is one of the most important farmed species in China. During 1986–1992, China was a world leader in both the artificial propagation of shrimp larvae and harvest of cultured shrimp. However, the epizootic breakout in 1993 caused a serious decrease in the total harvest of cultured shrimp. One of the measures was to genetically improve the farming species. Many molecular genetics of *F. chinensis* were carried out to accelerate the breeding programs such as the analysis of mitochondrial genome and population genetic structures, screening of genetic markers linked to growth traits, etc. While the construction of the linkage map has been relatively slow. In the study, the primary genetic linkage maps of *F. chinensis* were constructed using “two way pseudo testcross” strategy with RAPD, SSR and AFLP markers. Parents and F_1 progeny were used as segregating population. 61 RAPD primers, 20 pairs of microsatellite primers screened from 460 RAPD primers and 44 pairs of SSR primers combined 88 pairs AFLP primers were used to analyze the parents and 82 progeny of the mapping family. 783(237 RAPD, 45 microsatellites and 501 AFLPs) were segregating markers in which 761 markers were used to analysis. The female linkage map included 40 linkage groups, 15 triplets and 20 doublets, spanning 2835.5 cM with the average marker density of 12.5 cM, and the observed coverage was 73.5%. The male linkage map included 41 linkage groups, 6 triplets and 12 doublets, spanning 2776.7 cM, and the observed coverage was 73.3%. In addition, 5 microsatellite markers were mapped in both female and male linkage map that can be used for the construction of sexual linkage map of *F. chinensis*. Genetic linkage maps play a prominent role in many areas of genetics, including QTL analysis, map-based cloning of genes, marker-assisted selection (MAS) and comparative genomics. The main purpose of the study was to provide a theory basis for the construction of high consistency linkage map and promote the progress of genetic breeding programs of *F. chinensis*.

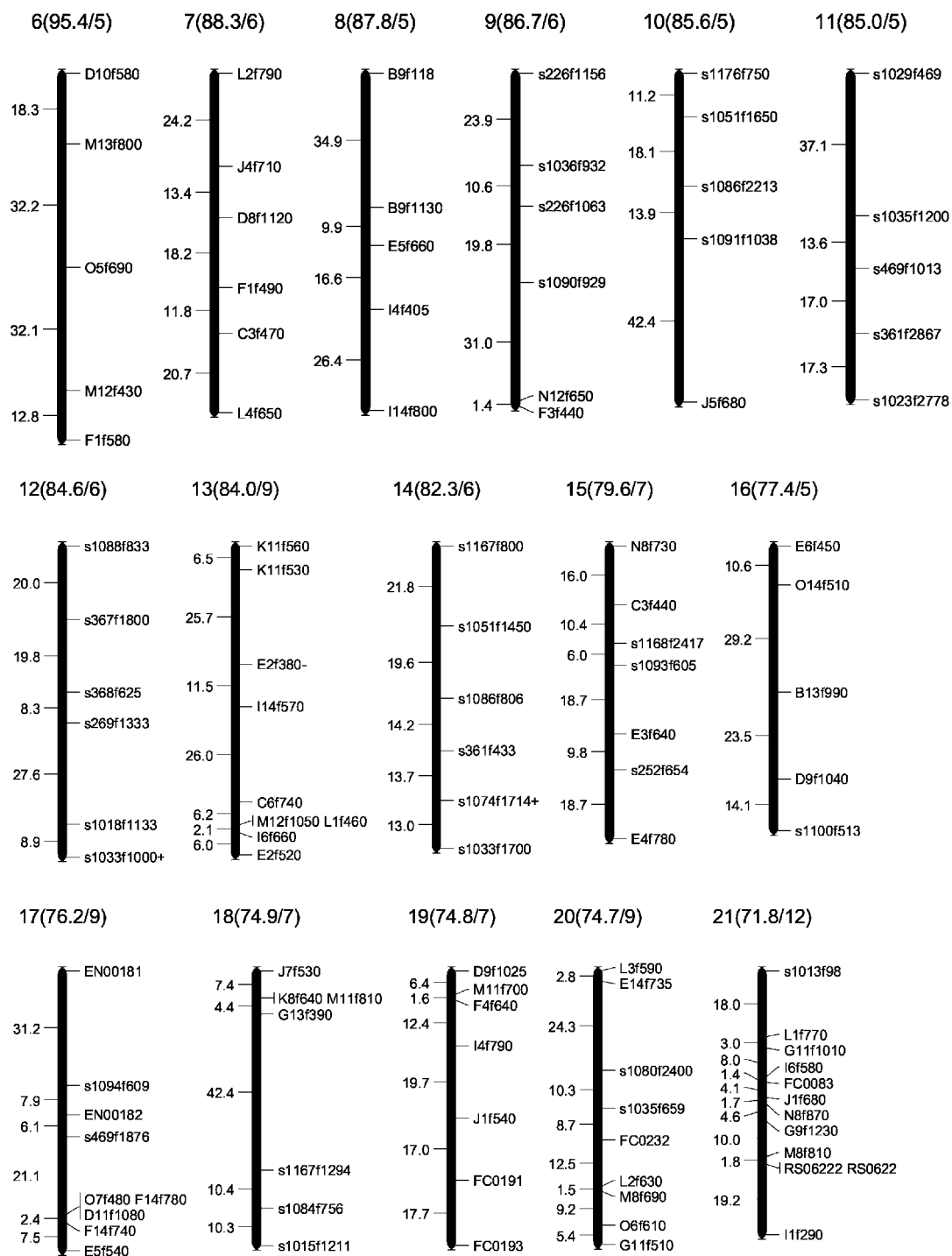
Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; genetic linkage map; RAPD; SSR; AFLP





B





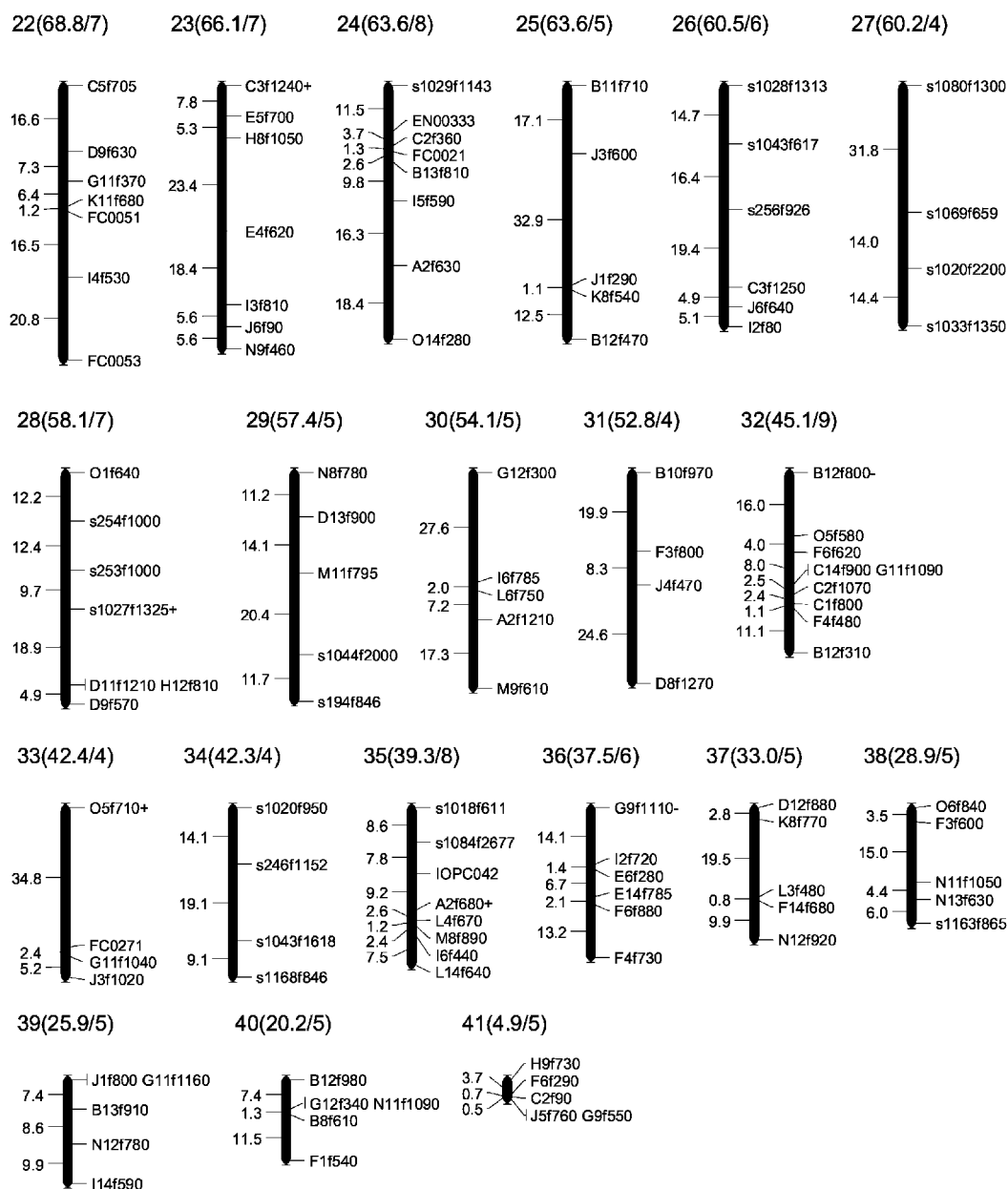


图 1 中国对虾雌性(A)和雄性(B)连锁图谱

Fig.1 Female (A) and male (B) linkage maps in *F. chinensis*

括号中斜线左侧为连锁群长度(cM),右侧为标记数目。连锁群右侧为标记名称,左侧为相邻标记间遗传距离

Size of the linkage group (before slashes) and the marker number (after slashes) of each group are at the top in parenthesis. AFLP markers are shown on the right of each group and the adjacent marker spacing is displayed on the left in cM Kosambi