

# 中国明对虾 AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建\*

王伟继<sup>1,2\*\*</sup> 孔杰<sup>1</sup> 董世瑞<sup>1,2</sup> 栾生<sup>1,2</sup> 王清印<sup>1</sup>

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

2. 中国海洋大学生命与科学技术学部, 山东 青岛 266003

**摘要** 以中国明对虾抗 WSSV (白斑综合症病毒, White Spot Syndrome Virus) 选育群体第四代为母本, 野生中国明对虾为父本, 采用单对杂交方式产生 F<sub>1</sub> 代, F<sub>1</sub> 代个体姊妹交产生 F<sub>2</sub> 代共 42 个个体为做图群体。62 对 AFLP 选择性引物组合共产生 529 个分离位点, 符合 1:1 孟德尔分离类型位点共 253 个, 3:1 孟德尔分离类型位点共 276 个。利用拟测交理论分别构建中国明对虾雌虾、雄虾的遗传连锁图谱, 利用 F<sub>2</sub> 自交模型构建共同的分 AFLP 分子标记连锁图谱。三张连锁图上分别有 31、25 和 44 个连锁群, 图谱分辨率为分别为 2.4 cM、2.4 cM 和 2.1 cM。标记间隔距离分别为 12.20 cM、11.45 cM 和 11.12 cM 图谱覆盖率分别达到 50.21%、51.93% 和 48.08%。能够基本满足进行 QTL (数量性状位点, Quantitative Trait Locus) 定位的需要。将该图谱和其他对虾类遗传连锁图谱进行了比较分析, 探讨了利用相关分子标记将已有图谱进行整合的可能 [动物学报 52 (3): 575-584, 2006]。

**关键词** 中国明对虾 AFLP 分子标记 遗传连锁图谱

## Genetic mapping of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* using AFLP markers\*

WANG Wei-Ji<sup>1,2\*\*</sup>, KONG Jie<sup>1</sup>, DONG Shi-Rui<sup>1,2</sup>, LUAN Sheng<sup>1,2</sup>, WANG Qing-Yin<sup>1</sup>

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Fishery Science Academy, Qingdao 266071, Shandong, China

2. College of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong, China

**Abstract** Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) markers were used to construct the linkage map of *Fenneropenaeus chinensis*. We sampled maternal individual from the fourth successively selected generation of disease resistance population of *F. chinensis* and paternal individual from wild population, respectively. Artificial insemination was used to generate F<sub>1</sub> family; F<sub>2</sub> families totally 42 bodies came from sisterhood intercross between F<sub>1</sub> families. Sixty-two primer combinations produced 529 segregating bands; of which 253 segregate in a 1:1 model and 276 in a 3:1 model. The female and male 1:1 ratio makers were used to construct the respective linkage based on the pseudo-testcross strategy. The female linkage map contained 94 segregating markers, which were linked in 31 linkage groups (including linkage couples), covering 51.39% of *F. chinensis* genome with the interval of 12.20 cM. The male linkage map contained 81 segregating markers, which were linked in 25 linkage groups, covering 50.21% of *F. chinensis* with the interval of 11.45 cM. The 276 markers in a 3:1 model were used to construct the common *F. chinensis* linkage map based on F<sub>2</sub> intercross model strategy. The common linkage map consists of 44 linkage maps with 129 markers, covering 48.08% of *F. chinensis* genome with the interval of 11.12 cM. Based on the marker density and the resolution of the map, the linkage map can satisfy the need for QTL location. The linkage map was compared with the maps of other shrimps and the possibility of combining the three maps through other molecular markers was discussed [Acta Zoologica Sinica 52 (3): 575-584, 2006].

2006-01-19 收稿, 2006-03-06 接受

\* 863 青年项目 (No.2002AA628070) 及 863 项目 (No.2003AA603021) 的资助 [This research was funded by the grants from the Youth Project of National High-Tech Research and Development Program of China (863) (No.2002AA628070) and the National High-Tech Research and Development Program of China (863) (No.2003AA603021)]

\*\* 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: wangwj@ysfri.ac.cn

© 2006 动物学报 Acta Zoologica Sinica

**Key words** *Fenneropenaeus chinensis*, AFLP, Genetic linkage map

中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 是我国特有的经济虾类, 在海洋捕捞和养殖生产中都有重要的地位。自 20 世纪 70 年代开始人工养殖以来, 已经成为我国北方沿海重要的养殖对象, 创造了可观的经济效益 (邓景耀等, 1990)。但是由于对虾养殖业缺乏经过人工培育的具有优良性状的新品种, 生产多以野生体为亲本进行苗种繁殖, 无法保证苗种的规格和质量。面对 1992 年以来开始暴发的流行性对虾疾病和日益恶化的养殖环境条件, 迫切需要培育优质、高产、抗病的中国明对虾新品种, 保证对虾养殖业健康可持续地发展。

除利用传统的选育手段进行品种培育外, 分子标记辅助育种技术在筛选优良亲本、早期鉴定优良性状个体以及加快育种进程等方面起着重要的作用。而构建高分辨率的遗传连锁图谱, 实现中国明对虾重要的经济性状 (生长、抗病等) 的 QTL 定位, 是进行分子标记辅助育种的前提。现代分子生物学技术的迅速发展为连锁图谱构建所需要的大量标记提供了选择。扩增片段长度多态性技术 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) 是 1992 年荷兰科学家发明的以 DNA 双酶切位点为多样性分析基础的分子生物学技术, 由于其稳定、信息丰富以及无需了解基因组 DNA 的背景等优点, 在遗传连锁图谱构建方面得到了广泛的应用 (Vos et al., 1995)。在对虾类中, 已经在斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 和凡纳对虾 (*Penaeus vannamei*) (Wilson et al., 2002; Yutao et al., 2003; Pérez et al., 2004) 有报道。岳志芹等 (2004) 对中国明对虾 AFLP 分子标记遗传连锁图谱进行了初步研究。为了进一步提高中国明对虾遗传连锁图谱的连锁群数量、标记数量, 满足重要经济性状的 QTL 定位及进行分子标记辅助育种的要求, 我们利用 AFLP 分子标记构建中国明对虾中等密度的遗传连锁图谱, 从连锁群对基因组的覆盖程度、图谱密度等方面改善、提高图谱质量, 为中国明对虾分子标记辅助育种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 构图群体建立

2003 年春季从中国明对虾抗 WSSV 选育群体第四代中选取一尾未交尾的雌虾 ( $G_{\text{♀}}$ ), 另选取一

尾野生中国明对虾雄虾 (捕捞自山东省海阳市沿海) ( $G_{\text{♂}}$ ), 采用人工精荚移植技术产生  $F_1$  代。2003 年 10 到 11 月  $F_1$  代家系内个体姊妹交并人工越冬, 2004 年春季交尾雌虾产生  $F_2$  代 (仔虾期 500 尾左右)。2004 年 7 月份个体体长为 2–5 cm 时, 随机抽取 60 个个体, 采集样品相关数据, 排除实验过程中损失和丢失的个体, 总共 42 尾实验样品冰冻运回实验室,  $-70^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.2 基因组 DNA 制备

DNA 制备参照岳志芹等 (2004) 的方法进行。

### 1.3 AFLP 反应体系

参照 Vos et al. (1995) 的实验方法进行。实验选用 *EcoR* I 和 *Mse* I 两种限制性内切酶 (MBI 公司), 相应的 *EcoR* I 和 *Mse* I 选择性引物各 8 条, 由上海博亚 (BIOASIA) 公司合成, DNA 聚合酶为 Promega 公司产品, 其余试剂购自上海生工 (SANGON) 公司。

### 1.4 AFLP-PCR 产物检测

AFLP 选择性 PCR 扩增产物采用变性聚丙烯酰胺 (凝胶浓度: 6%, 7.5 mol/L 尿素) 高压电泳分离, 银染方法检测电泳产物 (王伟继等, 2005)。

### 1.5 连锁图谱构建

**1.5.1 分离位点统计** 由于 AFLP 分子标记是显性标记, 在电泳谱带上表现为两种类型, 即有带和无带。有带记为“1”, 无带记为“0”。根据构建遗传连锁图谱需要, 对符合以下分离类型的位点进行统计 (表 1)。所有分离位点有带的个体记为“1”, 无带的个体记为“0”。对分离位点进行卡方 ( $\chi^2$ ) 检验,  $P < 0.05$  的分离位点记为偏分离位点, 不作为构图位点。

**1.5.2 遗传连锁图谱的构建** 表 1 中 I 型和 II 型分离类型的位点, 按照  $F_2$  代自交模型构建中国明对虾遗传连锁图谱。表 1 中 III 型和 IV 型分离类型的位点, 按照拟测交理论 (Pseudo-testcross mapping strategy) 分别构建中国明对虾雄虾和雌虾的遗传连锁图谱 (Grattapaglia and Sederoff, 1994)。构建连锁图谱所用的软件为 MAPMAKER/EXP3.0 (Whitehead Institute, ftp://ftp-genome.wi.mit.edu/distribution/software/mapmaker3/)。按照软件要求格式对原始“1”“0”矩阵进行数据转换。位点连锁采用多点连锁分析, 首先用

表 1 中国明对虾 AFLP 分子标记分离类型统计

Table 1 AFLP marker segregation types in *F. chinensis*

类型序号 Type No.	G♀	G♂	F <sub>1</sub> ♀	F <sub>1</sub> ♂	F <sub>2</sub> (分离比) F <sub>2</sub> (Segregation ratio)	构图策略/模式 Mapping strategy/model
I	有带 Band	无带 No band	有带 Band	有带 Band	3:1	F <sub>2</sub> 自交模式 F <sub>2</sub> self-breeding model
II	无带 No band	有带 Band	有带 Band	有带 Band	3:1	
III	\	\	无带 No band	有带 Band	1:1	拟测交理论 Pseudo-testercross mapping strategy
IV	\	\	有带 Band	无带 No band	1:1	
V	\	\	有带 Band	有带 Band	1:1	/

“GROUP” (LOD $\geq$ 3.0, 标记间最大图距为 50 cM) 命令对所有分离位点进行分群。对少于 7 个标记的连锁群直接用“COMPARE”命令进行标记排序, 然后用 MAP 进行图距运算, 标记间图距分别以实际图距 (Haldane centimorgans, cM) 和相对应的重组交换率 (Recombination-fraction, rf) 数据记录并在图谱中表示。对多于 7 个标记的连锁群在适当提高 LOD 值的基础上, 本实验采用的 LOD 值从 4-6 不等, 用“SUGGEST SUBSET”命令对标记进行初步连锁, 然后用“COMPARE”命令进行标记排序, 用“TRY”命令对其他未连锁的标记定位, 最后用 MAP 进行图距运算。连锁标记名称及对应标记间的图距输入到 Mapdraw 软件进行连锁图谱绘制 (刘仁虎、孟金陵, 2003)。

**1.5.3 连锁图谱的平均间隔、实际长度、预期长度和覆盖率的计算** 连锁图谱的平均间隔为连锁图谱的实际长度除以标记间隔数, 标记间隔数为标记

数目减去 1, 总间隔数为连锁群总标记数减去连锁群数 (李莉、郭希明, 2003)。连锁图谱的预期长度和覆盖率参照 Chakravarti et al. (1991) 的方法估算, 即每个连锁群的估算长度为实际长度乘以系数  $(m+1)/(m-1)$ , 其中  $m$  为每个连锁群的标记数。图谱覆盖率为连锁群实际总长度除以连锁群估计总长度。

## 2 结果

### 2.1 做图群体分离位点统计

实验用 *EcoR* I 和 *Mse* I 选择性引物各 8 条共 62 种组合进行了 PCR 扩增, 每对引物组合产生的分离位点数从 1 到 16 不等, 图 1 示引物组合 E8M8 在 F<sub>1</sub> 代亲本和 42 个 F<sub>2</sub> 子代的电泳图谱及位点分离类型。未经卡方检验前, 所有引物组合共产生分离位点数 529 个, 每对引物组合平均产生的分离位点数为 8.53 个 (表 2)。

表 2 实验用选择性引物组合及统计分离位点数

Table 2 Summary of selective primer combinations and segregation loci producing

	E1-AAC	E2-AAG	E3-ACA	E4-ACT	E5-AGA	E6-AGC	E7-ATC	E8-ATG
M1-CAT	7	1	4	14	12	11	7	9
M2-CAA	12	9	9	12	10	8	15	12
M3-CCA	3	9	6	10	12	5	8	9
M4-CCT	13	10	13	5	11	3	8	5
M5-CTA	8	6	7	13	8	3	10	8
M6-CTT	7	9	13	9	13	10	8	11
M7-CGA	2	7	13	16	11	5	8	10
M8-CGC	\	\	5	3	4	3	6	11

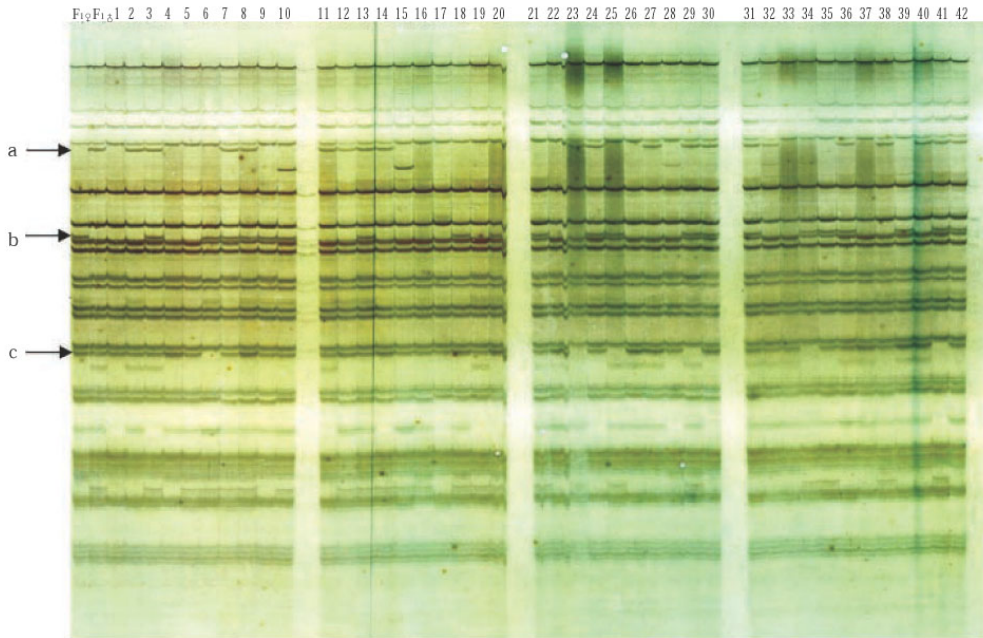


图 1 引物 E8M8 (E-ATG, M-CGC) 在中国明对虾  $F_1$  亲本和  $F_2$  子代的 AFLP 电泳图谱

“a”箭头所示分离标记为 1:1 分离类型的标记, 用来构建雄虾遗传连锁图谱, “b”箭头所示分离标记用来构建雌虾连锁图谱, 以上两种标记采用“拟测交”理论构图。“c”箭头所示 1:3 分离类型的标记, 用“ $F_2$  自交模式”构建图谱。

**Fig.1 Electrophoresis pattern of E8M8 (E-ATG, M-CGC) selective primers combination came from  $F_1$  parents and  $F_2$  filial generation of *F. chinensis***

Arrows “a” and “b” show 1:1 segregation ratio loci used to construct male and female linkage maps based on “Double Pseudo-testcross”, respectively. Arrow “c” shows 1:3 segregation ratio loci used to construct linkage map based on the “ $F_2$  intercross model”.

## 2.2 中国明对虾遗传连锁图谱的构建

表 1 中 I 型和 II 型位点 (3:1) 计 253 个, 利用它们构建的中国明对虾 AFLP 分子标记遗传连锁图谱见图 1 (LOD 值为 2.8, 最大遗传距离为 50.0 cM), 该图谱包括 44 个连锁群, 129 个连锁标记, 平均每个连锁群的标记数为 2.93 个, 图谱总长度达到 945.6 cM, 图谱覆盖率 48.08%, 标记间平均图距为 11.12 cM。表 1 中 III 型和 IV 型位点 (1:1) 分别用于构建中国明对虾雄虾和雌虾的遗传连锁图谱 (图 2, 图 3)。其中, III 型位点 (1:1) 104 个, 此类标记用来构建中国明对虾雄虾 AFLP 分子标记遗传连锁图谱, 获得 25 个连锁群 (LOD 值为 3.0, 最大遗传距离为 50.0 cM), 连锁标记数 81 个, 平均每个连锁群的标记数为 3.24 个。图谱总长度为 641.3, 图谱覆盖率为 48.08%, 标记间平均图距为 11.45 cM; IV 型位点 (1:1) 计 110 个, 构建获得中国明对虾雌虾 AFLP 分子标记遗传连锁图谱

(LOD 值为 3.0, 最大遗传距离为 50.0 cM), 连锁标记 94 个, 连锁群 31 个, 平均每个连锁群的标记数为 3.24 个。图谱实际长度为 768.7, 覆盖率 51.93%, 标记间平均图距为 12.20 cM。相关统计数据见表 3。所有图谱中, 最大连锁群的图谱长度为 103.8 cM, 连锁群最多标记数为 8 个, 图谱分辨率 2.4 cM (不包括完全连锁的连锁对, 即标记间图距为 0 cM), 标记间最大图距为 32.3 cM。绘制获得的连锁图中, “LG” 表示连锁群 (Linkage group), 括号内的数字表示连锁群总长度, “/” 后的数字表示该连锁群的连锁标记数目。连锁群右侧标记 “AF72-9”, “AF” 表示 AFLP 分子标记, “72” 表示 *EcoR* I 第 7 条和 *Mse* I 第 2 条选择性引物组合, “9” 表示该引物组合在 PCR 扩增产物电泳分离后第 9 个分离位点。连锁群左侧括号中数字表示交换率 (Recombination-fraction, rf), 括号外数字表示实际图距 (Haldane centimorgans, cM)。



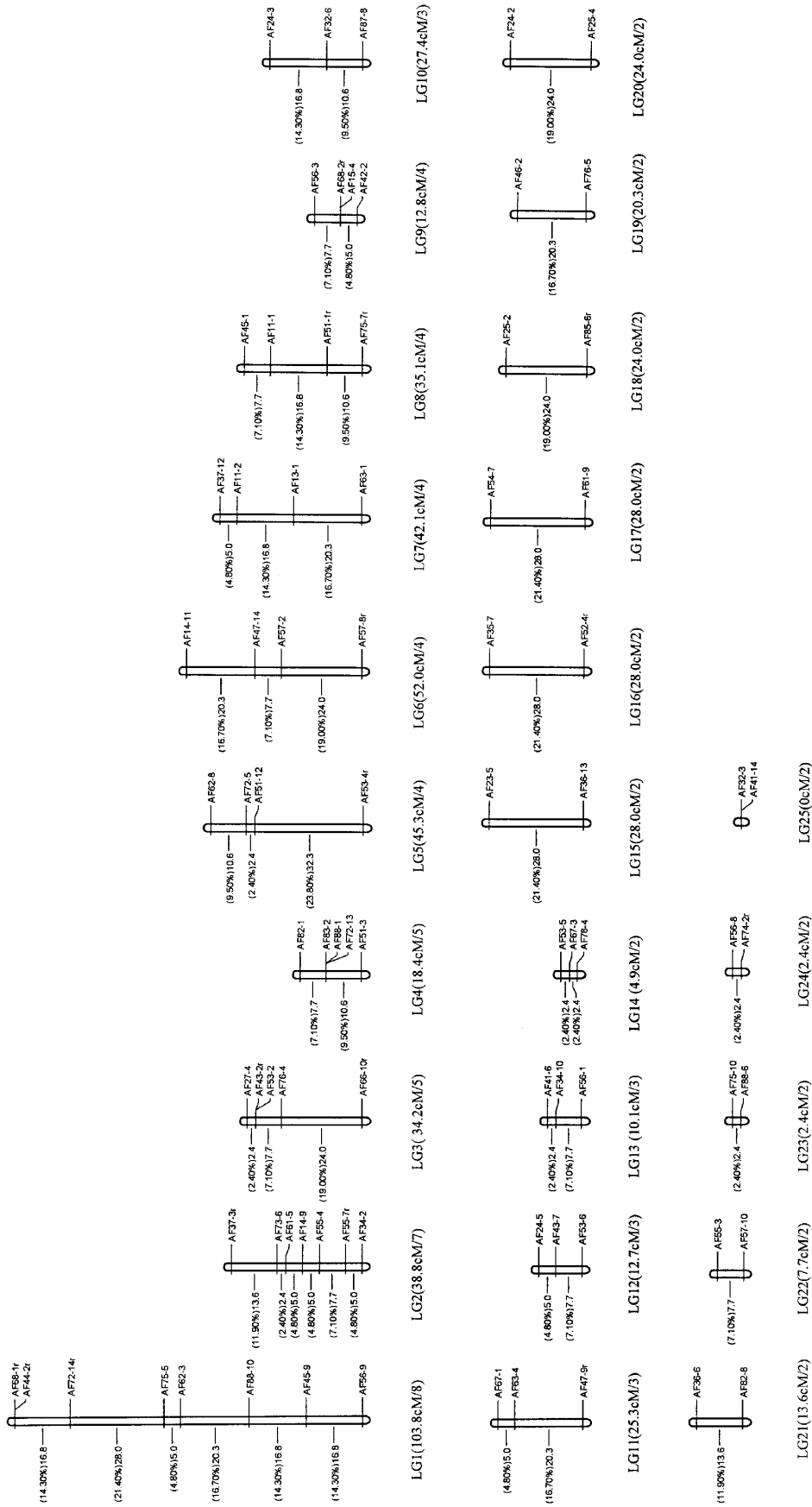


图 3 中国明对虾雄虾 AFLP 分子标记遗传连锁图谱  
 Fig.3 Male linkage map of AFLP of *F. chinensis*

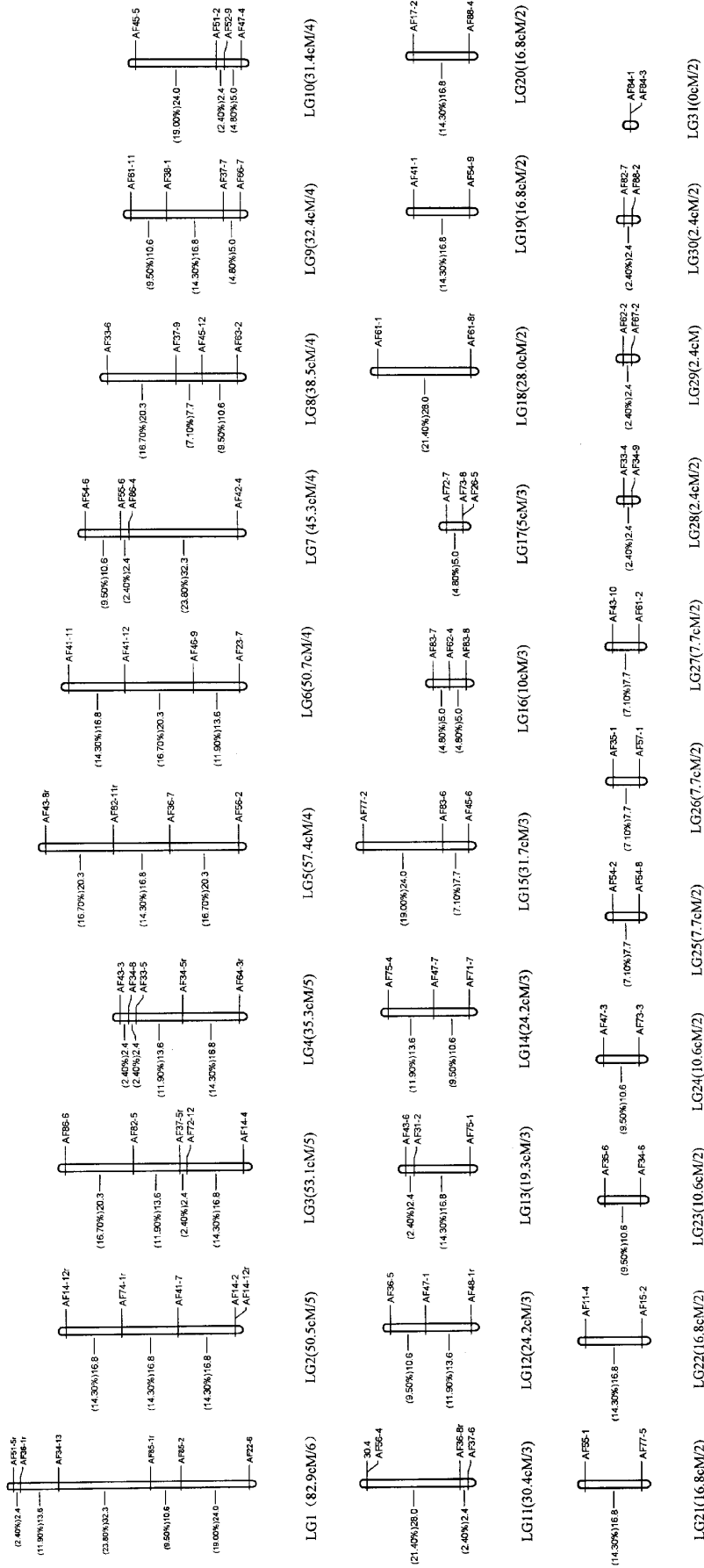


图 4 中国明对虾雌虾 AFLP 分子标记遗传连锁图谱  
 Fig.4 Female linkage map of AFLP of *F.chinensis*

表 3 中国明对虾 AFLP 分子标记遗传连锁图谱相关数据

Table 3 Summary of linkage map of *F. chinensis* based on AFLP markers

连锁图谱名称 Names of linkage map	分离标 记总数 Total number of segregation loci	偏分离 标记数 Number of distorted loci ( $P < 0.05$ )	连锁标 记数目 Linkage loci	连锁群 数目* Linkage groups	标记平均 间隔距离 Average marker spacing (cM)	图谱实 际图距 Observed genome length (cM)	图谱估 算图距 Estimated genome length (cM)	图谱 覆盖率 Genome coverage (%)
中国明对虾遗传连锁图谱 Linkage map of <i>F. chinensis</i>	276	23	129	44	11.12	945.6	1 966.92	48.08
雄虾遗传连锁图谱 Male linkage map	119	15	81	25	11.45	641.3	1 277.14	50.21
雌虾遗传连锁图谱 Female linkage map	123	13	94	31	12.20	768.7	1 480.26	51.93

\*包括连锁对在内。

\* Including linkage doublets.

还有一类位点符合表 1 中 V 型分离类型, 共有 11 个位点, 本文没有对其进行做图尝试, 对其可能的应用进行了讨论。

### 3 讨论

#### 3.1 现阶段图谱构建工作和前期工作的比较

岳志芹等 (2004) 利用拟测交理论对中国明对虾的 AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建进行了初步研究。本研究与其工作相比, 有以下改进: 1) 增加了做图群体的数量、标记的数目, 从而在图谱的密度、质量都有较大的提高。做图群体数量由 28 个子代增加到 42 个, 62 对引物组合产生分离位点总数 518 个, 最终连锁标记 308 个。相应的, 遗传连锁图谱的分辨率由 3.7 cM 提高到 2.4 cM, 标记间隔距离从前期工作的大约 19 cM 提高到现阶段的大约 11 cM。同时, 随着做图群体数量的扩大, 偏分离位点比例也有所下降, 约为 9.8% 左右。2) 连锁图谱的可信度提高。前期构建图谱, 采用的 LOD 值为  $\geq 2.0$ , 这是一个低于 MAP-MAKER/EXP3.0 软件阈值默认值的数值, 本文在进行标记聚群分析时, 将 LOD 值提高到 2.8, 提高了连锁图谱的可信度。3) 连锁群数目的提高。中国明对虾有 44 对染色体, 本文构建的遗传连锁图谱连锁群达到 44 个, 从理论上可以覆盖整个中国明对虾染色体。

#### 3.2 对虾类 AFLP 分子标记遗传连锁图谱及相关构图策略

除了中国明对虾, 已有的对虾类 AFLP 分子标

记遗传连锁图谱比如斑节对虾 (*Penaeus monodon*), 日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 和凡纳对虾 (*Penaeus vannamei*) (Wilson et al., 2002; Yutao et al., 2003; Pérez et al., 2004) 都采用拟测交理论进行构建。中国明对虾属一年生虾类, 无法建立回交群体 (BC), 对虾类目前也缺乏人工培养选育的品种, 没有建立具有稳定遗传性状的品系, 这些都为对虾遗传连锁图谱的构建带来了困难。利用拟测交理论, 仅需两代系谱的材料可以在较短的时间内建立做图群体; 同时, 可以避免显性标记无法区分显性纯合个体和杂合个体的问题, 因此利用拟测交理论进行遗传连锁图谱的构建不失为一种捷径。

中国明对虾的遗传变异程度比较低, 从构图效率角度考虑更适合建立  $F_2$  代作为构图群体 (尹冬明等, 1996), 这也解释了本研究中所有 529 个分离位点中 3:1 分离类型位点占到 50% 以上的原因。由于显性标记无法区分显性纯合型个体和杂合型个体, 理论上会丢失 1/4 的遗传信息。本文采用中国明对虾抗 WSSV 连续选育第四代的个体为母本, 野生中国明对虾为父本, 单对亲本杂交产生  $F_1$  代, 通过家系内个体姊妹交产生  $F_2$  代, 构图策略包括  $F_2$  代自交群体和拟测交理论, 所以整个连锁图谱包括中国明对虾抗 WSSV 连续选育 4 代群体雌性个体和野生中国明对虾雄性个体杂交  $F_1$  代的遗传连锁图谱, 也包括  $F_1$  代雄虾和雌虾的遗传连锁图谱。

对虾类基因组的长度大约是人类基因组长度的 2/3 (Chow et al., 1990), 为  $2 \times 10^9$  bp, 这个数



据和文中估算出的中国明对虾图谱图距 1 966.92 cM 长度基本相同，但和中国明对虾雌虾以及雄虾的图谱估算长度有一定差距，这是因为我们没有能将来自于雌虾和雄虾的分离标记通过在两者中都出现并在子代分离的标记整合起来，从而构建整张图谱的缘故。

### 3.3 AFLP 分子标记在连锁群上的分布以及偏分离现象

AFLP 分子标记在虹鳟、罗非鱼等物种的连锁群中经常表现为成簇分布。本文研究中，AFLP 分子标记在连锁群的分布比较均匀，并未出现大量标记成簇分布的现象，分析认为可能是以下几种原因造成的：1) 连锁标记数目的限制。虽然本文应用 AFLP 技术检测到大量分离的分子标记，但和中国明对虾比较庞大 ( $2n=88$ ) 的染色体组相比，还是比较有限。2) 染色体结构的影响。虽然中国明对虾染色体的制备直到目前还存在一定程度的困难，但可以肯定的是，大多数染色体为中部着丝粒结构。如果可以制备获得理想的染色体图谱，了解染色体结构和互换规律，将有助于掌握相关分子标记在染色体上的分布以及可能产生的偏分离的原因。

一般认为，偏分离现象是由以下几方面的原因造成的：1) 子代个体数目的限制导致数据统计产生偏差；2) 配子选择导致后代群体中等位基因的频率偏离期望的孟德尔比例。在自然界中，这种情况多出现在生物的远源杂交组合中，李莉和郭希明 (2003) 利用 AFLP 和 RAPD 分子标记构建太平洋牡蛎回交家系的遗传连锁图谱时，记录的偏分离标记达到 26.9%。徐云碧等 (1995) 认为异常分离的程度会随着杂交组合中双亲亲缘关系的疏远有增强的趋势，中国明对虾属于遗传变异程度比较低的海洋生物，经过连续四代抗病选育的群体和野生对虾群体可能并不存在较高的遗传水平差异，也是造成偏分离位点比例比较低的原因之一。

### 3.4 其他分离类型位点的分析

位点统计发现，除用于构图的 4 类分离位点之外，还有一类位点，即在  $F_1$  雄虾和雌虾中都有带，在  $F_2$  个体中呈现 1:1 分离类型的位点，即符合表中的 V 型分离位点。本文共检测到这种类型的位点 11 个。参照张新叶等 (2000) 分析认为此类位点属于复等位基因位点，即在该位点存在两个以上的等位基因， $a_1$ 、 $a_2$ 、 $a_3$  和  $a_4$ ， $a_1a_2$  和  $a_3a_4$  分别为亲本基因型，表现为有带， $a_1a_3$  和  $a_2a_4$  为子代基因型，也表现为有带。此类标记为  $F_1$  代雌虾和雄虾

共有的分离标记，可以借助此类标记将两者分别的连锁群整合为一个连锁群。由于此类标记数目比较少，本文没有进行图谱合并的尝试。使用显性标记，对于符合拟测交理论分离的位点，可以以双亲中都出现、子代中分离的位点为桥梁，借助马尔可夫链 (Markov chain) 过程来完成两个图谱的整合 (张新叶等, 2000)。也可以利用双亲中都出现，后代中符合 1:3 分离的位点进行同源连锁群的确认 (Yutao et al., 2003)。连锁图谱的整合对于提高图谱密度，提高连锁群在染色体上的分布定位精确程度及确认连锁群间的相互关系具有重要意义。

本文与前期工作相比，在构图材料、分离位点统计以及图谱密度、连锁图数量等方面都有很大的提高，基本满足重要经济性状的 QTL 定位研究分析。由于中国明对虾染色体数目庞大 ( $2n=88$ )，目前连锁群只是理论上覆盖整个染色体组，对于实现重要基因的定位克隆以及 QTL 定位分析，尚需要更高密度遗传连锁图谱的构建。下一阶段研究将从提高做图群体数量、筛选更多的分离位点以及增加新的分子标记 (比如 SSR) 等方面展开研究。

致谢 感谢澳大利亚 CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization) 分子动物遗传中心 Yutao Li 博士在遗传连锁图谱构建方面提供的大力帮助!

### 参考文献 (References)

- Chakravarti A, Lasher K, Reefer J, 1991. A maximum likelihood for estimating genome length using genetic linkage data. *Genetics* 128: 175-182.
- Chow S, Dougherty WJ, Sandifer PA, 1990. Meiotic chromosome complements and nuclear DNA contents of four species of shrimps of the genus *Penaeus*. *Crustacbiol.* 10: 29-36.
- Deng JY, Ye CC, Liu YC, 1990. *Penaeid Shrimp—Its Biology and Management in the Yellow and Bohai Seas*. Beijing: Ocean Press, 36-39 (In Chinese).
- Grattapaglia D, Sederoff R, 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137: 1 121-1 137.
- Li L, Guo XM, 2003. The construction of a preliminary genetic linkage map in the Pacific Oyster using RAPD and AFLP markers. *Oceanologia Et Limnologia Sinica* 13 (5): 541-551 (In Chinese).
- Liu RH, Meng JL, 2003. MapDraw: a Microsoft Excel macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data. *Hereditas* 25 (3): 317-321 (In Chinese).
- Pérez F, Erazo C, Zhinaula M, Volckaert F, Calderón J, 2004. A sex-specific linkage map of the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* based on AFLP markers. *Aquaculture* 242: 105-118.
- Vos P, Hodgders R, Bleek M, Reijmans M, van de Lee Y, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M, 1995. AFLP, a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4 407-4 414.

- Wang WJ, Gao H, Kong J, Wang QY, 2005. Genetic variation between Chinese shrimp population from Korean South Sea and from Chinese cultured detected by AFLP markers. *High Technology Letters* 15 (9): 81–86 (In Chinese).
- Wilson J, Li Y, Whan V, Lehnert SA, Byne K, Moore SS, Pongsomboon S, Tassanakajon A, Posenberg G, Ballment E et al., 2002. Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphisms. *Aquaculture* 204: 297–309.
- Xu YB, Shen ZT, Chen Y, Zhu LH, 1995. Distorted segregation of RFLP makers and their distribution on chromosomes in an indica/japonica F<sub>2</sub> population of rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Botanica Sinica* 37 (2): 91–96 (In Chinese).
- Yin DM, Huang MR, Zhu LH, 1996. Construction of genetic linkage map in forest tree using dominant molecular markers and F<sub>1</sub> pedigree. *China Biotechnology* 16 (4): 91–96 (In Chinese).
- Yue ZQ, Wang WJ, Kong J, Dai JX, Wang QY, 2004. Construction of genetic linkage map of *Fenneropenaeus chinensis* based on “Double Pseudo-testcross” strategy and AFLP markers. *High Technology Letters* 5: 88–93 (In Chinese).
- Yutao Li, Keren B, Emanuela M, Emanuela M, Vicki W, Stephen M, Sandy K, Peter C, Nigel P, Sigrid L, 2003. Genetic mapping of the Kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers. *Aquaculture* 219: 143–156.
- Zhang YX, Yin DM, Zhu GQ, Huang MR, Zhu LH, Zhai WX, Wu RL, Wang MX, 2000. RAPD linkage map in a *Populus deltoids* × *Populus euramericana* F<sub>1</sub> family. *Hereditas* 22 (4): 209–213 (In Chinese).
- 邓景耀, 叶昌臣, 刘永昌, 1990. 黄渤海的中国对虾及其资源管理. 北京: 海洋出版社, 36–39.
- 李 莉, 郭希明, 2003. 利用 AFLP 和 RAPD 标记初步构建太平洋牡蛎的遗传连锁图谱. *海洋与湖沼* 13 (5): 541–551.
- 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.
- 王伟继, 高 焕, 孔 杰, 王清印, 2005. 利用 AFLP 技术对中国明对虾的两个种群进行遗传差异分析. *高技术通讯* 15 (9): 81–86.
- 徐云碧, 申宗坦, 陈 英, 朱立煌, 1995. 水稻籼粳杂种 F<sub>2</sub> 群体中 RFLP 标记的异常分离及其染色体分布. *植物学报* 37 (2): 91–96.
- 尹冬明, 黄敏仁, 朱立煌, 1996. 利用显性分子标记和 F<sub>1</sub> 群体进行林木遗传连锁图谱的构建. *生物工程进展* 16 (4): 12–16.
- 岳志芹, 王伟继, 孔 杰, 戴继勋, 王清印, 2004. AFLP 分子标记构建中国对虾遗传连锁图谱的初步研究. *高技术通讯* 5: 88–93.
- 张新叶, 尹冬明, 诸葛强, 黄敏仁, 朱立煌, 翟文学, 邬荣领, 王明麻, 2000. 利用 RAPD 标记构建美洲黑杨 × 欧美杨分子标记连锁图谱. *遗传* 22 (4): 209–213.