

## 三疣梭子蟹莱州湾、舟山野生个体定向交配产生 F<sub>2</sub>代家系的 AFLP 分析

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> 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** 以三疣梭子蟹莱州湾、舟山野生群体杂交(莱州湾♀×舟山♂)产生F<sub>2</sub>代家系63个个体及F<sub>1</sub>代亲本为实验群体,采用AFLP分子标记对其进行遗传分析。35对选择性引物共扩增出1742个位点,其中分离位点为417个,不分离位点为1325个,多态位点比例为23.9%。在分离位点中,符合1:1孟德尔分离比例的位点为226个,占总分离位点数的54.2%;偏离1:1孟德尔分离比例的位点为31个,占总分离位点数7.4%。符合3:1孟德尔分离比例的位点为128个,占总分离位点数的30.7%;偏离3:1孟德尔分离比例的位点为32个,占总分离位点数的7.7%。家系内基因多样性指数为0.130, Shannon指数为0.193。遗传距离分析显示,子代个体与母本Nei's遗传距离介于0.064~0.111之间,与父本Nei's遗传距离介于0.065~0.107之间。其中,63号个体与48号个体分别与父、母本亲缘关系最远。本实验中,偏分离位点比例属正常范围,杂交F<sub>2</sub>代家系遗传多样性偏低。本研究结果为三疣梭子蟹野生群体及家系遗传多样性分析,遗传连锁图谱构建等方面提供一定的技术支持。

**关键词** 三疣梭子蟹 定向交配 F<sub>2</sub>家系 AFLP分析

**中图分类号** Q953+.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)06-0048-08

## AFLP analysis of F<sub>2</sub> family generated by directional mating between wild *Portunus trituberculatus* from Laizhou Bay and Zhoushan Island

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

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

**ABSTRACT** *Portunus trituberculatus* is one of the most important fishery resources in China because of its high commercial value. In recent years, it has suffered from overfishing and various diseases, and the total resource of wild populations has decreased year by year. Considering for this situation, it is necessary to study the genetic diversity and genetic linkage map of *P.*

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)85823291

收稿日期:2008-12-02;接受日期:2009-02-20

作者简介:罗云(1982-),男,硕士研究生,主要从事海水养殖生物种质资源与遗传多样性研究。E-mail: suflytnt@hotmail.com, Tel: 15864213606

*trituberculatus*. In this study, maternal broodstock and paternal broodstock were sampled from Laizhou Bay and Zhoushan Island wild population, respectively. Through directional mating ( $1 \text{ ♂} \times 3 \text{ ♀}$ ), they generated  $F_1$  family. 63 individuals of  $F_2$  family came from sisterhood intercross between  $F_1$  family and these broodstock were used as experiment materials. The AFLP analyses showed that a total of 1 742 loci were produced, of which 417 loci were polymorphic, accounting for 23.9%. In these polymorphic loci, there were 226 (accounting for 54.2% of total segregating loci) loci segregating as 1 : 1 Mendelian model while 31 (7.4%) loci segregating as distorted model. 128 loci (30.7%) segregated as 3 : 1 model and the numbers of 32 (7.7%) loci were distortion bands. Additionally, several AFLP bands which segregated neither as 1 : 1 nor as 3 : 1 were named with odd segregating loci. They were treated as non-segregating loci in order to reduce the influence of statistical error. Genetic diversity index of the  $F_2$  was 0.130, and Shannon genetic diversity index was 0.193. Analysis of distances showed that Nei's genetic distance of family with male parent and female parent were between 0.064~0.111, 0.065~0.107 respectively. In the mean time, No63 individual was most distant from its male parent and No48 individual was most distant from its female parent. The main purpose of the study was to provide the technical support for genetic diversity analysis of wild populations or families and construction of high density genetic linkage map of *P. trituberculatus*.

**KEY WORDS** *Portunus trituberculatus* Directional mating  $F_2$  family AFLP analysis

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, 具有生长速度快, 肉质细腻, 分布广泛等特点, 目前, 它已成为我国重要的渔业资源之一。近年来, 由于过度捕捞和各种病害的大规模发生, 三疣梭子蟹的资源量呈不断下降趋势。为保护这一自然资源, 海洋生物科学工作者对三疣梭子蟹发育生物学、生理生态及生化资源保护等方面已陆续展开研究 (薛俊增等 1997)。其中, 三疣梭子蟹遗传育种工作是重中之重。目前, 我国三疣梭子蟹育种主要集中在选择育种与杂交育种两方面, 分子标记辅助育种尚未大规模开展, 所以, 对三疣梭子蟹遗传特性进行分子水平的研究是极为必要的。

分子标记辅助育种技术在鉴定优良亲本, 筛选早期优良性状个体以及加快育种进程等方面起着重要作用 (王伟继等 2006)。高密度的遗传连锁图谱为三疣梭子蟹重要经济性状如体重、甲宽和体高等 QTL 定位提供了技术保证, 也是实现分子标记辅助育种的基本前提。AFLP 分子标记技术是一种建立在 PCR 技术和 RFLP 标记基础上的新的 DNA 指纹技术, 具有多态性丰富、结果稳定可靠、重复性好、所需 DNA 量少, 且可以在不需预先知道基因序列的情况下进行研究等特点, 现已被广泛应用于遗传图谱构建、遗传多样性分析、系统进化及分类学、遗传育种和种质鉴定以及基因定位等方面 (王伟继等 2005)。目前, 在甲壳类动物中已有日本对虾 *Penaeus japonicus*、凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 和中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 等运用 AFLP 分子标记技术构建遗传连锁图谱, 但三疣梭子蟹遗传连锁图谱的研究尚未见报道。本实验采用 AFLP 分子标记技术对三疣梭子蟹莱州湾、舟山野生群体杂交 (莱州湾 ♀, 舟山 ♂)  $F_2$  家系代进行 AFLP 分析, 旨在初步了解了该家系的遗传多样性水平, 验证采用 AFLP 分子标记构建三疣梭子蟹遗传连锁图谱的可行性并为其提供技术支持, 为分子标记辅助育种奠定基础。

## 1 材料与方 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 30 只未交尾雌蟹, 雌蟹符合的条件:

个体比较大,无任何机械损伤及其他疾病,发育良好。从舟山野生群体(采自浙江舟山群岛附近)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♀杂交。次年4月初培育出F<sub>1</sub>代家系。2006年8月随机从一个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63个个体及亲本,记录全甲宽、甲宽和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 基因组DNA提取

基因组DNA提取参照Strauss(1989)的方法(略作修改)进行。取50mg肌肉组织于475μl pH 8.0的TE缓冲液中,研磨剪碎后加入10% SDS 25μl震荡混匀。然后加入10mg/ml的RNase 2μl,37℃消化0.5h后再加入20ng/ml蛋白酶K 4μl,混匀封口后,55℃水浴消化3h至澄清。然后采用酚/氯仿抽提,无水乙醇沉淀的方法,提取三疣梭子蟹肌肉组织DNA,TE缓冲液溶解后用核酸定量仪检测纯度与浓度,并将DNA稀释至终浓度100ng/ml,-20℃保存备用。

## 1.3 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引物由上海生工合成,其余试剂购自Solarbio公司。

### 1.3.1 基因组DNA双酶切和接头连接

酶切反应:模板基因组DNA 200ng,*EcoR*I (10U/μl)和*Mse*I (10U/μl)各0.5μl,10×Buffer(Tango) 8μl,加超纯水至40μl,37℃水浴3h。

连接反应:酶切产物20μl,*EcoR*I接头(50μmol/L)1μl,*Mse*I接头(5μmol/L)1μl,T4连接酶(5U/μl)0.2μl,10mU ATP 0.5μl,加超纯水至25μl,22℃12h。

### 1.3.2 限制性片段PCR扩增

预扩增反应:连接产物5μl,E01预扩增引物(10μmol/L)1.5μl,M02预扩增引物(10μmol/L)1.5μl,10×PCR Buffer 5μl,MgCl<sub>2</sub> (25mmol/L) 3μl,Taq酶(5U/μl)0.2μl,dNTP(2.5mmol/L)4μl,加超纯水至50μl。PCR反应程序为94℃ 2min;94℃ 30s,56℃ 30s,72℃ 1min,20 cycles;72℃延伸5min。

选择性扩增反应:预扩增产物用TE稀释20倍后取5μl待用,从8条*EcoR*I引物,9条*Mse*I引物中(表1)挑选35对电泳图谱清晰,多态位点丰富的引物组合用以选择性扩增反应。*EcoR*I选择性引物(10μmol/L)0.1μl,*Mse*I选择性引物(10μmol/L)0.6μl,10×PCR Buffer 2μl,MgCl<sub>2</sub> (25mmol/L) 1.2μl,Taq酶(5U/μl)0.1μl,dNTP(2.5mmol/L)1.6μl,加超纯水至20μl。PCR反应程序为94℃ 2min;94℃ 30s,65℃ 30s,-0.7℃/cycle,72℃ 1min,11 cycles;94℃ 30s,56℃ 30s,72℃ 1min,22 cycles;4℃ 15min。

表1 AFLP预扩增预选择性扩增引物序列

Table 1 Pre-selective primers and selective primers sequence used in AFLP analysis			
<i>EcoR</i> I引物 <i>EcoR</i> I primers	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	<i>Mse</i> I引物 <i>Mse</i> I primers	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
E01	GACTGCGTACCAATTCA	M02	GATGAGTCCTGAGTAAC
A	GACTGCGTACCAATTC AAG	1	GATGAGTCCTGAGTAACAC
B	GACTGCGTACCAATTCACA	2	GATGAGTCCTGAGTAACAT
C	GACTGCGTACCAATTCACT	3	GATGAGTCCTGAGTAACCT
D	GACTGCGTACCAATTCAGA	4	GATGAGTCCTGAGTAACGA
E	GACTGCGTACCAATTCAGT	5	GATGAGTCCTGAGTAACGT
F	GACTGCGTACCAATTCATC	6	GATGAGTCCTGAGTAAC TA
G	GACTGCGTACCAATTCATG	7	GATGAGTCCTGAGTAAC TC
H	GACTGCGTACCAATTC AAC	8	GATGAGTCCTGAGTAAC TG
		9	GATGAGTCCTGAGTAAC AA

注:表1中,*EcoR*I引物用大写字母A-H编号,*Mse*I引物用阿拉伯数字1-9编号

1.3.3 凝胶电泳

选择性扩增产物通过 6% 的聚丙烯酰胺变性凝胶在 0.5×TBE 电极缓冲液中以 60W 功率预电泳 0.5h, 点样后电泳 2h, 银染方法参照 Merril 等(1979) (略加改动)检测电泳产物。

1.3.4 数据分析

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, 有带记为“1”, 无带记为“0”。根据亲本及子带的电泳分离情况可以判断亲本的基因型, 以此可以判断出父本分离条带, 母本分离条带及双亲共有的分离条带(表 2)。其中, II 型带可以用来构建雌雄共同连锁图谱, III 型带则可分别构建雌、雄连锁图谱。所有在子代出现分离的条带经  $\chi^2$  检验后 ( $P > 0.05$ ) 是否符合 1 : 1 或 3 : 1 分离规律。

采用 Pop gene Version

1.32 软件计算多态位点百分比率 ( $P$ ), 家系内基因多样性 ( $H$ ), Shannon 指数 ( $I$ ), 另外还计算出个体与父、母本的 Nei's 遗传距离。根据遗传距离计算结果利用 NTSYS 2.1 软件对 63 个个体及父、母本进行聚类分析, 确定了子代与亲本间的亲缘关系。

2 结果与分析

2.1 AFLP 选择性扩增结果

2.1.1 多态位点检测结果

35 对选择性引物组合共扩增出 1 742 个位点, 多态位

点达 417 个, 多态位点比例达 24.1%; 其中, 符合孟德尔分离比的多态位点达 354 个, 占扩增位点总数的 20.5%。平均每对引物组合产生 49.8 个位点, 产生 11.9 个多态位点, 包括 10.1 个符合孟德尔分离比的多态位点。其中, E3 引物组合扩增出的多态位点数最多为 18 个, 多态位点比例 36.0%; G4、G8 引物组合扩增出的多态位点最少均为 9 个, 多态位点比例分别为 21.4% 和 18.4% (表 3)。

表 2 AFLP 分离位点类型统计

Table 2 AFLP segregating loci types

类型 Type No	F <sub>1</sub> ♀	F <sub>1</sub> ♂	F <sub>2</sub> 分离情况 F <sub>2</sub> segregation ratio	亲本基因型 Broodstock gene type	位点类型 Loci type
I	有带 Band	有带 Band	全部有带 All band	AA×AA; AA×Aa	不分离位点 Non-segregating loci
II	有带 Band	有带 Band	3 : 1	Aa×Aa	双亲共同分离位点 Co-segregating loci
III	有带 Band	无带 No band	1 : 1	Aa×aa	母父本分离位点 Female parent loci
	无带 No band	有带 Band		aa×Aa	父本分离位点 Male parent loci
IV	有带 Band	无带 No band	全部有带 All band	AA×aa	不分离位点 Non-segregating loci
	无带 No band	有带 Band		aa×AA	
V	有带 Band	有带 Band	无带 No band	/	异常分离位点 Odd-segregating loci
	无带 No band	无带 No band			

表 3 35 对选择性引物组合扩增产生多态位点数、多态位点比例、孟德尔位点数、孟德尔位点比例及扩增总位点数

Table 3 The number and ratio of polymorphic and Mendelian segregation loci, and total segregation loci amplified by 35 selective primer combinations in AFLP analysis

引物组合 Primer combinations	多态位点数 Number of polymorphic loci	多态位点比例 (%) Ratio of polymorphic loci	孟德尔位点数 Number of Mendelian loci	孟德尔位点比例 (%) Ratio of Mendelian loci	扩增位点总数 Total loci
A3	10	18.2	10	18.2	55
A4	16	37.2	11	25.6	43
A7	10	26.3	7	19.1	38
A8	14	30.4	11	23.9	46
B1	15	28.8	12	23.1	52
B9	10	20.8	10	20.8	48
C2	10	23.2	7	16.3	43
C6	14	22.6	10	18.9	53
C9	12	19.4	8	12.9	62

续表3

引物组合 Primer combinations	多态位点数 Number of poly- morphic loci	多态位点比例(%) Ratio of polymorphic loci	孟德尔位点数 Number of Mendelian loci	孟德尔位点比例(%) Ratio of Mendelian loci	扩增位点总数 Total loci
D1	11	22.9	8	16.7	48
D3	11	24.4	9	20.0	45
D4	15	31.2	14	29.2	48
D5	10	17.2	6	10.3	58
D6	10	23.2	8	18.6	43
D8	13	23.6	11	20.0	55
E1	12	21.8	10	18.2	55
E2	11	18.3	11	18.3	60
E3	18	36.0	17	34.0	50
E4	12	26.7	11	24.4	45
E5	10	21.3	10	21.3	47
E6	11	24.4	10	22.2	45
E9	10	20.4	9	18.4	49
F1	10	17.5	9	15.8	57
F8	10	18.9	9	16.9	53
F9	11	18.9	10	17.2	58
G1	12	23.1	11	21.2	52
G2	12	25.5	10	21.3	47
G3	12	26.7	11	24.4	45
G4	9	21.4	8	19.4	42
G6	15	25.4	13	22.0	59
G8	9	18.4	8	16.3	49
H1	15	32.6	12	26.1	46
H3	12	22.2	10	18.5	54
H6	14	32.6	13	30.2	43
H8	11	22.4	10	20.4	49
总计 Total	417	/	354	/	1 742
平均 Mean	11.9	24.1	10.1	20.5	49.8

### 2.1.2 孟德尔分离位点

在本试验中,经凝胶电泳银染后检测到的符合孟德尔分离比的位点数为354个。按1:1模式分离的位点数为226个,其中母本分离位点115个,父本分离位点111个,分别占多态位点总数的27.6%与26.6%。按3:1模式分离的为双亲共同位点,总数为128个,占多态位点总数的30.7%。

### 2.1.3 偏分离及异常分离

在417个多态位点中,经 $\chi^2$ 检验后( $P>0.05$ )找到63个偏分离位点。偏离1:1分离的位点为31个,共有母本分离位点14个,父本分离位点17个,分别占多态位点总数的3.4%与4.1%;偏离3:1分离的位点数为32个,占多态位点总数的7.7%。

在电泳图谱中还出现了两种条带异常分离的现象,即双亲中有带而在子代中无条带及双亲中无带却在子代中产生条带的现象(图1)。这种分离位点称为异常分离位点,因其个数极少,故把这种位点划入不分离位

点来统计以减小统计误差。

### 2.2 遗传多样性分析

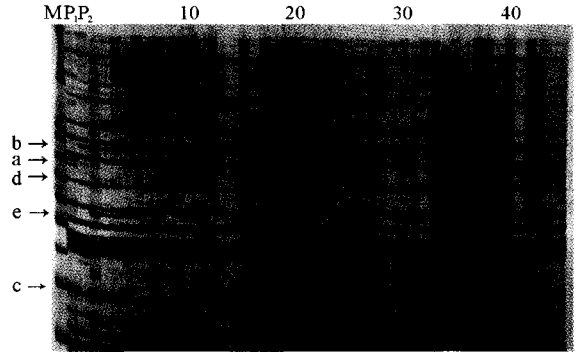
子代与母本遗传距离介于 0.064~0.111 之间,与父本遗传距离介于 0.065~0.107 之间,具体见表 4。由 Pop gene version 1.32 软件计算得到家系内基因多样性指数为 0.130,Shannon 指数为 0.193。

利用 NTSYS2.1 软件对子代及父、母本进行聚类分析(图 2),Nei's 遗传距离表明,48 号个体与母本亲缘关系最远(遗传距离 0.111),63 号个体与父本亲缘关系最远(遗传距离 0.107)。

## 3 讨论

### 3.1 家系遗传多样性

生物群体的遗传多样性水平是评估生物资源状况的一个重要标准,遗传多样性水平与生物的生长速度、抗病能力等生产性状密切相关(Oinwa *et al.* 1994;孙 博等 2003)。本实验中,三疣梭子蟹杂交 F<sub>2</sub> 代家系基因多样性指数、Shannon 指数和多态位点比例均明显低于三疣梭子蟹野生群体(刘 爽等 2008),与中国对虾不同世代的选育群体 AFLP 分析结果相类似(李朝霞等 2006),这表明三疣梭子蟹家系经过连续的选育,家系内优良经济性状基因频率增加而不良性状基因频率减少,个体的基因型和表型趋于一致导致其遗传结构发生了改变。笔者认为 F<sub>2</sub> 代家系较



注:“M”表示 marker;“P<sub>1</sub>”为母本,“P<sub>2</sub>”为父本;“a”为母本分离位点,“b”为父本分离位点;“c”为双亲共同分离位点;“d”为不分离位点;“e”为异常分离位点

Note:“M” DNA marker;“P<sub>1</sub>” and “P<sub>2</sub>” female and male broodstock respectively;“a” female segregating locus and “b” male segregating locus;“c” co-segregating locus;“d” non-segregating locus and “e” odd segregating locus

图 1 D8 引物组合在三疣梭子蟹 F<sub>2</sub> 代中的 AFLP 扩增电泳图谱  
Fig.1 AFLP electrophoresis result of D8 primer combinations in broodstock and F<sub>2</sub> generation of *Portunus trituberculatus*

表 4 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、48 号个体和 63 号个体的 Nei's(1972) 遗传距离及相似性系数

Table 4 Genetic distances and identity indexes of P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, No48 and No63

	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	48	63
P <sub>1</sub>	* * * *	0.891	0.889	0.908
P <sub>2</sub>	0.109	* * * *	0.894	0.893
48	0.111	0.106	* * * *	0.880
63	0.092	0.107	0.120	* * * *

注:对角线以下为遗传距离,对角线以上为相似性系数

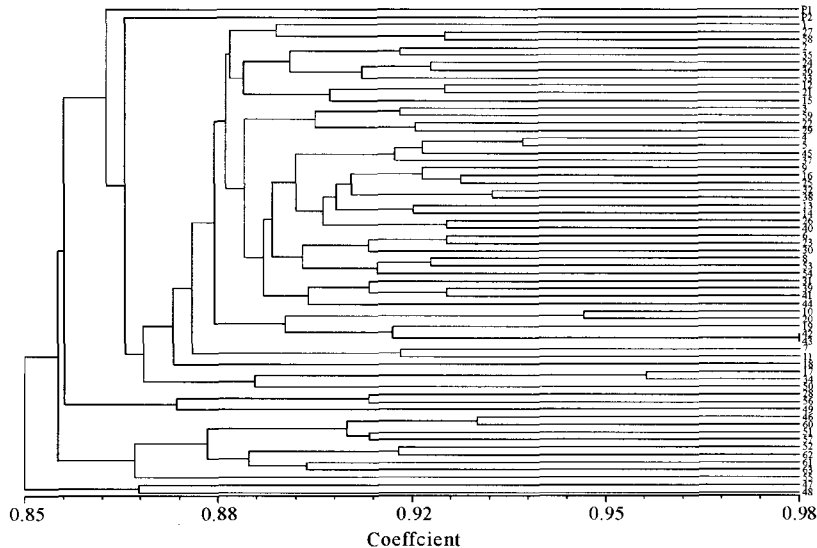


图 2 三疣梭子蟹杂交 F<sub>2</sub> 代家系 63 个个体及亲本 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类

Fig.2 UPGMA dendrogram for 63 individuals and broodstock of *P. trituberculatus* based on Nei's genetic distance

野生群体遗传多样性下降是一个普遍的现象,由于 $F_2$ 代家系包含的基因组合多,作图信息量丰富,因而被广泛地用作作图群体。根据遗传距离分析, $F_2$ 代家系父、母本间遗传距离较大(0.109),Boppenmaie等(1993)研究认为,在一定范围内亲本间的遗传距离越大,杂种优势越明显。DNA多态性丰富的亲本更有利于作为作图亲本,但亲本的差异过大,杂种染色体之间的配对和重组会受到抑制,导致连锁座位间的重组率偏低、偏分离现象加重。根据表4,48号个体与63号个体与父、母本的遗传距离均超过亲本间的遗传距离,这可能跟家系内的遗传变异有关,但其究竟是由于个体差异还是位点差异所导致还有待于进一步的研究。

多态位点的比例是能够有效地反应种群遗传变异及其种质资源状况的重要参数之一(李鹏飞等 2007)。海洋鱼类多态位点比例在0.30左右(相建海 1998),在甲壳类中,赵金良等(1999)报道了中国大陆沿海六水系绒螯蟹群体多态位点比例为31.25%。何玉英等(2005)对中国对虾3个连续选育群体进行RAPD分析得到3个群体的多态位点比例分别是37.86%、36.89%和33.01%。本实验结果表明,三疣梭子蟹家系多态位点比例为23.9%,说明三疣梭子蟹家系遗传多样性低于其野生群体,未出现较高水平的遗传水平变异。

### 3.2 位点偏分离

遗传过程中等位基因的偏分离,是生物界普遍存在的现象,被认为是生物进化的动力之一(Sandler *et al.* 1957)。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。例如,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*回交家系构建连锁图谱中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%( $P < 0.05$ )(Pe'rez *et al.* 2004);南美白对虾*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*中偏分离标记比例为4.4%(Franklin *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,根据这个假说,分子标记偏分离程度与影响等位基因频率的遗传因子连锁有关,即与影响偏分离的遗传因子紧密连锁的分子标记则表现有严重偏分离。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。对于本实验中出现的异常分离现象,很可能由于在远缘杂交时,野生品种的等位基因经常不平衡的丢失(Xu *et al.* 1998),或是来源于不同长度的等位基因序列之间形成的异源双链体(Aylife *et al.* 1994),甚至当DNA发生断裂或酶切不完全都有可能产生异常分离位点。本实验中偏分离标记比例为7.4%,远小于太平洋牡蛎的29.0%,与罗非鱼的8.0%非常接近,偏分离比例属于正常范围。

### 3.3 AFLP分子标记构建遗传连锁图谱

本试验采用35对AFLP选择性引物组合共对三疣梭子蟹扩增出354个符合孟德尔分离比的分离位点,平均每对引物产生10.1个位点。在遗传连锁图谱构建方面,罗非鱼平均每对引物产生9.3个位点;牙鲆*Paralichthys olivaceus*(Maria *et al.* 2003)平均每对引物产生5.5个位点;中国对虾平均每对引物产生8.5个多态位点。引物扩增效率较高的是栉孔扇贝*Chlamys farreri*(Li *et al.* 2005),32对引物扩增出545个位点,平均每对引物产生17.0个多态位点。常玉梅等(2006)认为构建中等密度遗传连锁图谱标记数应在400~1000,例如黑虎虾*Penaeus monodon*(Wilson *et al.* 2002),欧洲海鲈*Dicentrarchus labrax*(Chistiakov *et al.* 2005)等。遗传连锁图谱标记数过低,则图谱的分辨率不能满足QTL定位的基本要求。因此,在本实验的基础上可以通过适当增加AFLP选择性引物组合及分子标记的种类来进一步构建高密度的三疣梭子蟹遗传连锁图谱并对位QTL位点定位。

本研究利用AFLP分子标记分析了三疣梭子蟹定向交配 $F_2$ 代家系的遗传多样性并验证了利用AFLP分子标记构建连锁图谱的可行性,旨在为以后构建三疣梭子蟹高密度的遗传连锁图谱打下基础,促进三疣梭子蟹的分子标记辅助育种工作。

## 参 考 文 献

- 王伟继,孔杰,董世瑞,栾生,王清印. 2006. 中国明对虾 AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建. 动物学报, 52(3):575~584
- 王伟继,岳志芹,孔杰,王清印. 2005. AFLP 分子标记技术的发展及其在海洋生物中的应用. 海洋水产研究, 26(1):80~85
- 孙博,刘晓,张国范,赵洪恩,郭希明. 2003. 一个皱纹盘鲍人工群体内个体大小遗传变异的 RAPD 分析. 海洋科学, 27(5):27~30
- 刘爽,薛淑霞,孙金生. 2008. 黄海和东海三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 的 AFLP 分析. 海洋与湖沼, 39(2):152~156
- 李鹏飞,刘萍,李健,戴方钰,何玉英. 2007. 莱州湾三疣梭子蟹的生化遗传分析. 海洋水产研究, 28(2):90~96
- 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
- 李朝霞,李健,何玉英,刘萍,王清印. 2006. 中国对虾人工选育快速生长群体不同世代间的 AFLP 分析. 高技术通讯, 16(4):434~440
- 何玉英,刘萍,李健,孔杰,王清印. 2005. 中国对虾快速生长选育群体的 RAPD 分析. 海洋水产研究, 26(4):8~13
- 杨东,余来宁,张繁荣,刘红艳. 2007. 筛选与尼罗罗非鱼性别相关的 AFLP 标记. 水生生物学报, 31(6):901~904
- 相建海. 1998. 海洋生物技术. 济南:山东科技出版社, 238~309
- 赵金良,李思发. 1999. 中国大陆沿海六水系统绒螯蟹(中华绒螯蟹和日本绒螯蟹)群体亲缘关系:生化遗传差异分析. 水产学报, 23(4):331~336
- 常玉梅,孙效文. 2006. 水产养殖动物遗传连锁图谱及 QTL 定位研究进展. 动物学研究, 27(5):533~540
- 薛俊增,堵南山,赖伟,吴惠仙. 1997. 中国三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) Miers 的研究. 东海海洋, 15(4):60~65
- 戴爱云,冯钟琪,宋玉枝,黄志翔,吴赫昌. 1997. 三疣梭子蟹渔业生物资源的初步调查. 动物学杂志, (2):30~33
- Aylife, M. A., Lawrence, G. J., Ellis, J. G., and Pryor, A. 1994. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. Nucleic Acids Res. 22(9):1 632~1 636
- Boppenmaier, J., Melchinger, A. E., and Seit, G. 1993. Genetic diversity for AFLPs in European versus between heterotic groups for grain traits. Plant Breeding, 111(2):217~226
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B., and Haley, C. S. 2005. A Microsatellite linkage map of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. Genetics, 170:1 821~1 826
- Kocher, T. D., Lee, W. J., Sobolwowska, 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
- Li, L., Xiang, J. H., Liu, X., Zhang, Y., Dong, B., and Zhang, X. J. 2005. Construction of AFLP-based genetic linkage map for ZhiKong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston and mapping of sex-linked markers. Aquaculture, 245:63~73
- Ky, C. L., Lorieux, M., Trouslot, P., Akaffou, S., Louarn, J., Charrier, A., Hamon, S., Noirot, M., and Barea, P. 2000. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp). Theor. Appl. Genet. 101(4): 669~676
- Maria, R. M. C., Kazunobu, K., Shinichiro, K., Osamu, H., Eriko, O., Akiyuki, O., Takashi, S., Kiyoshi, N., and Nobuaki, O. 2003. A genetic linkage map of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture, 220:203~218
- Merril, C. R., Switzer, R. C., and Keuren, M. L. V. 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
- Kiyoko, O., Akihiro, K., and Yoshihisa, F. 1994. Relationship between genetic variability and quantitative traits in *Japanese scallop*, *Patinopecten yessoensis*. Tohoku. J. Agri. Res. 45:110~121
- Perez, F., Erazo, C., Zhinaula, M., Volckaert, F., and Calderon, J. 2004. A sex-specific linkage map of the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* based on AFLP markers. Aquaculture, 242:105~118
- Sandler, L., and Novitski, E. 1957. Meiotic drive as an evolutionary force. Am. Nat. 91:105~110
- Strauss, W. M. 1989. Preparation of genomic DNA from mammalian tissues. Current Protocol in Molecular Biology. John Wiley and Sons. New York, 221~222
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijmans, M., Lee, V. D. 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
- Wilson, K., Li, Y. T., Vick, W., Sigrid, E., Keren, B., Stephen, M., Siriporn, P., Anchalee, T., George, R., Elizabeth, B., Zahra, F., Jennifer, S., Matthew, K., and Benzie, J. 2002. Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism. Aquaculture, 204:297~300
- 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
- Xu, Y., Zhu, L., Xiao, J., Huang, N. and McCouch, S. R. 1998. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F<sub>2</sub>, backcross, double haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). Mol. Gen. Genet. 253:535~545