

中国对虾遗传连锁图谱的构建

田焱^{①②③④}, 孔杰^{*}, 王伟继

中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071;

大连水产学院, 大连 116023;

中国科学院海洋研究所, 青岛 266071;

中国科学院研究生院, 北京 100049

* 联系人, E-mail: kongjie@sina.com

2007-11-02 收稿, 2008-01-16 接受

引进国际先进农业科学技术计划(批准号: 2006-G55(B))和国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA10A406)资助项目

摘要 中国对虾是中国重要的水产资源之一, 其自然群体主要分布于中国黄渤海沿海海域和朝鲜半岛海域. 中国对虾遗传连锁图谱的构建, 可以加速分子标记辅助育种和控制重要经济性状基因鉴定的研究, 为中国对虾遗传改良和优良品种的培育提供基础信息. 利用中国对虾 F_2 群体家系和 AFLP 分子标记技术进行了中国对虾遗传连锁图谱的构建. 利用 55 对 AFLP 引物组合对 F_2 家系的 110 个个体进行了研究, 检测到 532 个符合作图策略的 AFLP 标记. 对于符合 3:1 比例的分离位点利用 F_2 自交模型构建性别平均连锁图谱, 对于符合 1:1 比例的分位点利用拟测交理论分别构建中国对虾的雌性和雄性遗传连锁图谱. 雌性遗传图谱分别由 103 标记组成 28 个连锁群, 没有未连锁标记, 图谱长度分别为 1090 cM. 雄性遗传图谱由 144 个标记构成 35 个连锁群, 有 10 个未连锁标记, 图谱长度分别为 1617 cM. 中国对虾雄性遗传连锁图谱比雌性遗传连锁图谱长 32.6%, 这可能说明中国对虾不同性别存在不同的重组率. 性别平均遗传图谱有 44 个连锁群, 由 216 个标记组成, 有 2 个未连锁标记, 图谱实际长度为 1772.1 cM. 中国对虾遗传连锁图谱基因组估计长度为 2420 cM, 符合与人类基因组相比的对虾类基因组长度. 通过皮尔逊相关系数检测认为 AFLP 标记在中国对虾图谱上分布均匀. 本研究利用 AFLP 标记构建的中国对虾遗传连锁图谱为中国对虾基因组研究和遗传改良提供一定的基础, 同时开发的微卫星标记也为遗传连锁图谱的整合提供条件.

关键词

AFLP

中国对虾

遗传连锁图谱

对虾养殖是中国海水养殖业的重要组成部分, 在 20 世纪 80 年代对虾的年产量达到 20 万吨. 随着水产养殖业的快速发展, 对虾养殖业也日益受到大家的关注. 中国对虾是我国主要的海水养殖品种, 也是中国重要的海水资源之一. 中国对虾主要分布在中国的黄渤海近海海域和朝鲜半岛西海岸. 但是自从白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)爆发后, 对虾的产量急速下降, 只是在最近才出现回升的趋势^[1]. 大规模病毒病的爆发和高的死亡率严重影响了对虾产业的发展. 目前, 对虾养殖业主要还是依靠捕捞野生对虾和幼体来满足生产的需要, 这

种状态限制了其发展, 同时这些捕捞的野生对虾可能携带感染性病毒, 使对虾养殖业处于一种潜在的危险中. 另一方面, 由于环境恶化和过度捕捞导致野生资源下降. 为了改善这种状况以及实现对虾产业的可持续性发展, 开展对虾系统的育种工作, 培育优良的品种是非常必要的.

利用传统方法改善对虾的遗传基础, 为对虾的系统选择育种计划的开展工作已经取得了一定的进展. 数量遗传参数的估计将有助于更好地理解遗传因素对特定群体某一性状的表型影响程度. 目前, 蓝对虾^[2]、日本对虾^[3~5]、斑节对虾^[6]和凡纳对虾^[7~11]

等的重要经济性状遗传参数的估计已经取得了很大的进展。同时,遗传连锁图谱也是一个非常有利的进行遗传改良的方法。遗传连锁图谱已经广泛应用在分子标记辅助育种^[12,13]、QTL定位^[14,15]、杂种优势遗传基础研究^[16,17]、基因组进化^[18]和基因组分离模式^[19-22]等方面。

目前,一些重要水生动物的遗传连锁图谱研究工作已经取得了一定的进展,得到了虹鳟鱼^[23,24]、罗非鱼^[25]、斑点鲶鱼^[26,27]、大西洋鲑^[14]、鲱鱼^[28]、日本牙鲆^[29]、栉孔扇贝^[30]和太平洋牡蛎^[31]等。对虾类的遗传连锁图谱的研究工作相对比较落后,目前已经构建连锁图谱的种类有日本对虾^[32]、斑节对虾^[33]、凡纳对虾^[34]和中国对虾^[35,36]。

用于构建遗传连锁图谱的标记有同工酶、RFLP、RAPD、SSR、SNP和EST等,但是由于各种条件和具体情况其应用受到一定的限制。而AFLP分子标记是一种比较理想的构建连锁图谱的标记。因为AFLP标记无需知道基因组的情况,对DNA量要求少,多态性强,检测效率高,稳定性较好^[37]。

遗传连锁图谱的构建是中国对虾遗传学研究的一个重要方向,为进一步了解基因组成、基因克隆及重要经济性状定位奠定基础,实现对中国对虾遗传改良和培育新品种提供资料。本研究利用 F_2 分离群体和AFLP分子标记技术进行中国对虾遗传连锁图谱的构建,以期为中国对虾分子标记辅助育种提供必要的理论依据。

1 材料与方法

() 实验材料。实验所用的3代材料均采自黄海水产研究所即墨实验基地。实验使用的亲本为朝鲜半岛南海岸群体和黄渤海群体。2004年5月获得中国对虾 F_1 家系, F_1 家系越冬后,通过人工精英移植技术进行家系内交配,获得 F_2 家系。 F_2 家系生长4个月后,随机抽取110个个体测量其生长性状,将新鲜样品速冻,运回实验室后-70℃保存。

() DNA提取。从肌肉里进行DNA的提取,方法参照岳志芹等^[35]的制备过程。

() AFLP分析。AFLP分析方法参照Vos等^[38]的报道,作简单的修改。利用EcoR和Mse对基因组DNA进行酶切,酶切体系包括中国对虾基因组DNA 200 ng, EcoR 5 U, Mse 5 U, 酶切缓冲液 Tango Y⁺ 7 μ L, 加水至 35 μ L, 37℃ 酶切 5 h。酶切样

品用 2.0%琼脂糖胶电泳检测效果。连接反应体系 35 μ L, 含酶切样品 25 μ L, EcoR 接头和Mse 接头各 1 μ L, 10 mmol/L ATP 1.0 μ L, T₄-DNA连接酶 2 U, 10×连接缓冲液 3.5 μ L, 加水至 35 μ L, 22℃ 过夜连接。预扩增反应需要 5 μ L DNA连接样品, 加入EcoR 接头和Mse 预扩引物各 75 ng, 10×PCR缓冲液 5.0 μ L, 2 U Taq酶, 2.5 mmol/L dNTP, 加水至 50 μ L混匀后, 在如下PCR条件下扩增: 94℃ 变性 2 min; 94℃, 30 s, 56℃, 30 s, 72℃, 1 min, 30 个循环。预扩增产物用 0.1×TE 缓冲液稀释 20 倍后, 作为选择性扩增反应的模板。取稀释后的预扩增产物 5 μ L, 加入EcoR 引物 5 ng, Mse 引物 30 ng, 0.2 mmol/L dNTP, 1 U Taq酶, 10×PCR缓冲液 2.0 μ L, 加水至 20 μ L。按如下PCR程序扩增: 94℃ 变性 2 min; 94℃, 30 s, 65℃, 30 s, 72℃, 1 min, 12 个循环, 每个循环退火温度降低 0.7℃, 至 56℃。然后 94℃, 30 s, 56℃, 30 s, 72℃, 1 min再进行 23 个循环。

PCR产物在 6%的变性垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳, 利用银染方法进行检测^[39]。根据作图群体基因组DNA的AFLP标记检测结果, 选取清晰可辨的多态谱带来数据统计分析。在相同电泳条件下, 将这些片段作为基因位点进行分析, 并且认为在基因组上被AFLP-PCR扩增的区域以显性等位基因的形式进行分离。AFLP标记的表型分为扩增片段的有(1)和无(0)两种, 相应的基因型分别为AA, Aa(有扩增片段)及aa(无扩增片段)。记录每对引物组合的总扩增带数及亲本间出现分离的多态带。显性的AFLP标记的每条多态条带都作为一个座位来处理, 当某一扩增带出现(显性)时记为 1, 缺失则记为 0, 缺失数据记为“-”。AFLP 标记是根据产生此条带的选择性扩增的引物的名称代码及其条带命名的, EcoR -和Mse -选择性扩增引物用数字来表示, 最后的一位数字表示产物分离后的位点。例如, “AF48-5”中的AF表示AFLP分子标记, 48 表示EcoR 第 4 条和Mse 第 8 条选择性引物组合, 5 表示产物分离后的第 5 个位点。所有引物组合列于表 1 中。

() 分离位点的连锁分析。利用 χ^2 ($P > 0.05$) 检验, 鉴定多态标记在子代的分离比是否符合孟德尔分离规律。对于符合 1:1 孟德尔分离规律的标记和另有部分偏分离位点($0.01 < P < 0.05$), 利用拟测交策略分别构建雌性和雄性遗传连锁图谱^[40]。对于符合 3:1 孟德尔分离规律的标记和另有部分偏分离位

表 1 在 110 个个体中使用的不同引物组合

	M-CAT	M-CAA	M-CCA	M-CCT	M-CTA	M-CTT	M-CGA	M-CGC	M-CTG	M-CAC	M-CGT
E-AAG	AF11	AF12	AF13	AF14	AF15	AF16	AF17	AF18	AF19	AF110	AF111
E-ACT	AF21	AF22	AF23	AF24	AF25	AF26	AF27	AF28	AF29	AF210	AF211
E-AGC	A31	AF32	AF33	AF34	AF35	AF36	AF37	AF38	AF39	AF310	AF311
E-ATG	AF41	AF42	AF43	AF44	AF45	AF46	AF47	AF48	AF49	AF410	AF411
E-AGT	AF51	AF52	AF53	AF54	AF55	AF56	AF57	AF58	AF59	AF510	AF511

点($0.01 < P < 0.05$)利用 F_2 自交模式构建共同的遗传连锁图谱. 偏离标记后缀为“-”表示杂合子缺失, “+”表示杂合子过剩. 对于严重偏离分离比例的标记不用于遗传连锁图谱的构建.

本研究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/>)进行中国对虾遗传连锁图谱的构建. 用A代替 0, H代替 1, 将分离标记分别转化成MAPMAKER/EXE 3.0 的数据格式. 设置LOD = 5.0, 标记间最大遗传距离为 25 cM, 将所有的分离遗传标记分成若干组. 大于 7 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. 当框架图建立以后, 采用LOD = 3.0, 标记间最大遗传距离为 30 cM, 检测是否有其他标记可以连锁. 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函数转化为Kosambi函数^[41].

() 遗传图谱相关参数的统计. 每个连锁群的间隔数为连锁群上标记的数目减去 1, 总的间隔数为图谱上标记的总数与连锁群的差值, 每个连锁群的平均间隔为连锁群长度除以间隔数目. 标记间的平均间隔为图谱总长度除以间隔总数.

遗传连锁图谱实际长度为两个方面: 一为框架图长度(G_{of}), 二为包括三联体和连锁对在内的所有

连锁标记的长度(G_{oa}). 用两种方法来计算遗传图谱的估计长度(G_e). G_{e1} 参照Postlethwait等^[42]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 2 倍来补偿连锁群最末端的标记和端粒距离. G_{e2} 参照Chakravarti等^[43]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. 本研究取两种算法的平均值作为图谱的估计长度 G_e , 框架图覆盖率 $C_{of}=G_{of}/G_e$, 总的图谱覆盖率 $C_{oa}=G_{oa}/G_e$.

() AFLP 标记的分布. 利用皮尔逊相关分析 AFLP 标记和连锁群长度间的关系, 检测 AFLP 标记在整个连锁群的分布情况.

2 结果

2.1 AFLP 标记的多态性分析

55 对 AFLP 选择性引物组合对 110 个个体进行了扩增, 共产生了 3123 个清晰的标记. 平均每对引物产生 57 个标记, 其中多态性标记为 9.7 个. 每对引物产生的标记在 20~98 个之间, 多态标记在 4~18 个之间. 在所有的标记中, 532 个标记是多态的, 即多态的比例为 17.03%. 532 个多态标记中, 母本标记 120 个父本标记 171 个, 共有的标记有 241 个, 每对引物产生的多态比例在 40%~5.4%之间. 每个引物产生的多态性位点见表 2.

2.2 标记分离分析

在 532 个多态标记中父母本共有的标记有 241

表 2 每个引物产生的多态性位点

	M-CAT	M-CAA	M-CCA	M-CCT	M-CTA	M-CTT	M-CGA	M-CGC	M-CTG	M-CAC	M-CGT
E-AAG	13	11	6	9	9	9	11	8	13	12	18
E-ACT	10	11	10	9	9	8	8	9	8	10	10
E-AGC	10	9	8	9	9	5	9	8	8	9	9
E-ATG	10	8	10	12	13	6	6	9	12	13	12
E-AGT	13	4	12	9	11	6	10	10	11	12	9

个, 父本标记 171 个, 母本标记 120 个。母本的 120 个标记中, 有 23 个偏离 1:1 分离比例, 其偏分离比例为 19.16%。父本的 171 个标记中, 有 34 个偏离孟德尔分离比例, 其偏分离比例为 19.88%。按照 3:1 分离的父母本共有的标记中, 有 25 个标记出现偏分离现象, 其比例为 10.37%。总之, 在这 55 对 AFLP 扩增出的所有分离标记中, 有 82 个标记出现偏离预期比例的情况, 其分离比例为 15.41%。在所有分离标记中, 1:1 和 3:1 比例分别为 43.98% 和 40.6%。母本偏分离标记中多为纯合子缺失, 而父本偏分离标记中多为纯合子过剩。

2.3 遗传连锁图谱

符合 3:1 分离比例的标记利用 F_2 自交模式构建共同遗传连锁图谱, 对于 1:1 比例的标记利用拟测交策略分别构建雌性和雄性遗传连锁图谱。3 张图谱的相关数据列于表 3。

表 3 中国对虾雌性、雄性和共同的连锁图谱总结

	共同图谱	雌性	雄性
连锁群数量	44	28	35
每个连锁群平均标记	5	3.7	3.83
每个连锁群最少标记	2	2	2
每个连锁群最多标记	9	6	6
标记间平均间隔/cM	10.42	14.53	16.36
标记间最大间隔/cM	31.6	48.1	48.5
标记间最小间隔/cM	0.5	0.9	0.9
最小连锁群长度/cM	2.3	8.8	5.8
最大连锁群长度/cM	193.2	99.5	124.8
图谱观察值/cM			
G_{of}	1667.3	895.5	1219
G_{oa}	1772.1	1090	1619.9
图谱估计长度/cM			
G_{el}	2689.42	1903.87	2765.28
G_{e2}	2589.33	1852.92	2723.94
G_e	2639.38	1878.39	2744.61
图谱覆盖率(%)			
C_{of}	63.17%	47.67%	44.41%
C_{oa}	67.14%	58.03%	59.02%

用于雌性图谱连锁分析的 103 个标记被分成 28 个连锁群, 其中有 6 个偏分离标记, 每个连锁群的标记在 2~6 个之间, 连锁群平均标记为 3.7。所有雌性连锁群的总长度为 1090 cM (图 1), 每个连锁群的长度在 8.8~99.5 cM 之间, 平均长度为 38.93 cM。标记间的平均间隔为 14.53 cM, 每个连锁群的平均间隔

变动范围为 4.4~24.8 cM。

144 个标记参与雄性遗传连锁图谱的构建, 分布于 35 个连锁群, 其中有 10 个未连锁的单一标记, 7 个为偏分离标记。雄性遗传连锁图谱长度为 1619.9 cM (图 2), 变化范围在 5.8~124.8 cM 之间, 连锁群的平均长度为 46.28 cM。每个连锁群分布的标记为 2 到 6 个不等, 平均标记数为 3.8。标记间的间隔在 2.9~41.6 cM 之间, 连锁群的平均间隔为 16.36 cM。雄性遗传连锁图谱比雌性遗传连锁图谱长 32.6%。

参与共同遗传连锁图谱构建的 216 标记, 分布于 44 个连锁群, 其中有 2 个标记是未连锁的单一标记。连锁群长度在 2.3~193.2 cM 之间, 总长度为 1772.1 cM (图 3)。每个连锁群分布的标记为 2~9 个, 平均标记数为 4.86。标记间的间隔的范围为 1.15~24.15 cM, 总的平均间隔为 10.42 cM。

2.4 基因组长度和图谱覆盖率

利用 2 种方法估计的雌性基因组长度分别为 1903.87 和 1852.92 cM, 平均基因组长度为 1851.3 cM, 而雌性基因组估计长度为 2765.28 和 2723.94 cM, 平均基因组长度 2744.61 cM, 利用共同遗传连锁图谱估计的基因组长度 2689.42 和 2589.33 cM, 平均长度为 2639.38 cM。取其平均值作为基因组长度, 其中国对虾基因组长度为 2420 cM。图谱观察值占预期长度的百分比率为图谱的覆盖率, 雌性、雄性和共同连锁图框架图谱的覆盖率分别为 47.67%, 44.41% 和 63.17%。当把连锁对和三联体考虑在内, 雌性、雄性和共同连锁图谱覆盖率分别增至 58.03%, 59.02% 和 67.14% (表 3)。

2.5 AFLP 标记的分布

AFLP 标记在连锁图谱中的整体分布情况列于表 4。利用皮尔逊相关分析 AFLP 标记和连锁群长度间的关系, 检测 AFLP 标记在整个连锁群的分布情况。皮尔逊相关系数在 0.73~0.86 之间, 遗传连锁群的长度和 AFLP 标记数量呈明显的正相关, 可以说明 AFLP 标记在中国对虾遗传图谱上分布是均匀的。

表 4 连锁图谱的所有分离标记情况(括号中为偏分离标记)

	共同图谱	雌性图谱	雄性图谱
分离标记	241(25)	120(23)	171(34)
用于连锁分析的标记	216	103(6)	144(7)
框架图中的标记	192	62(1)	88(2)
未连锁标记	2	0	10

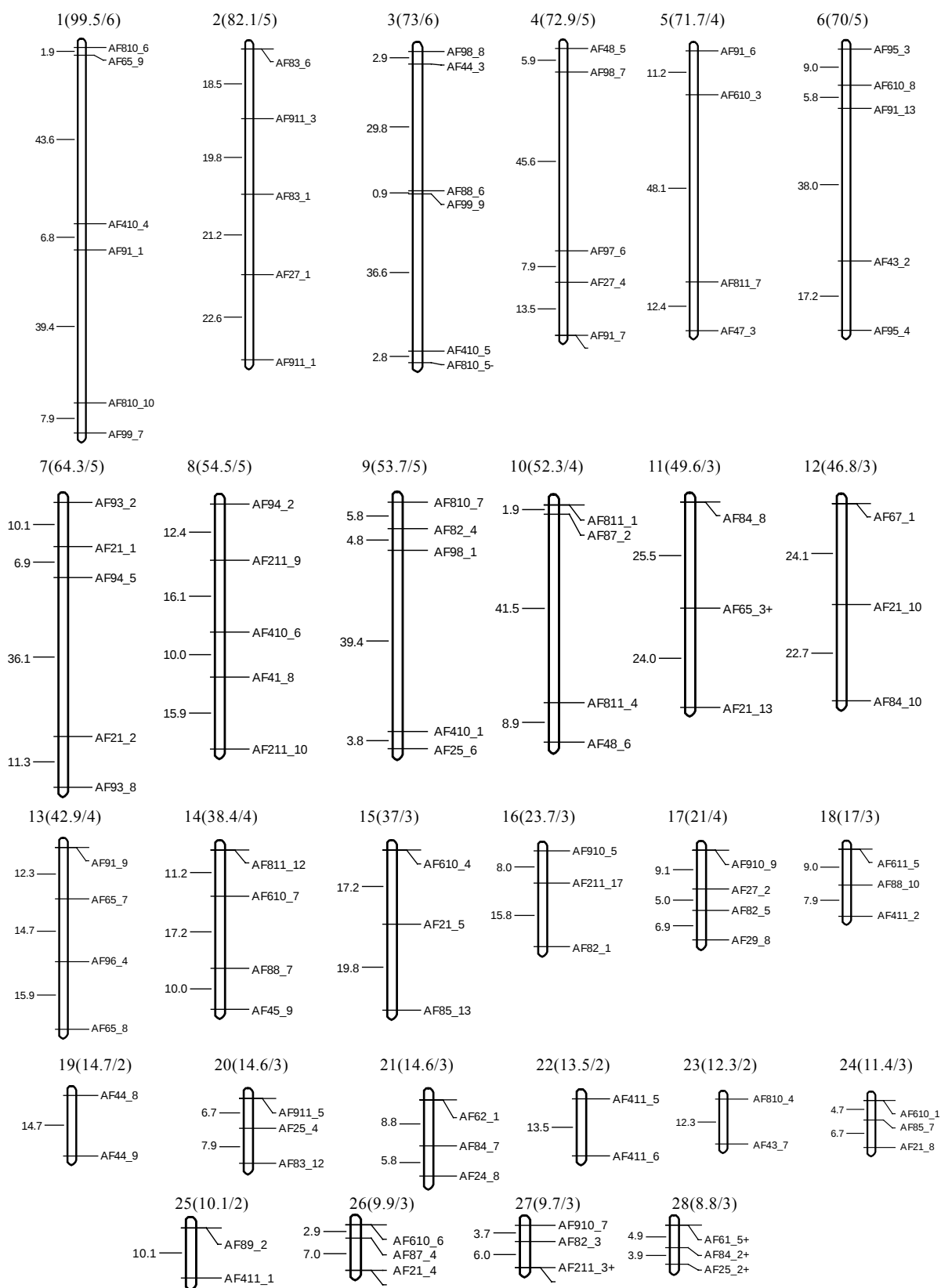


图 1 中国对虾雌性遗传连锁图谱

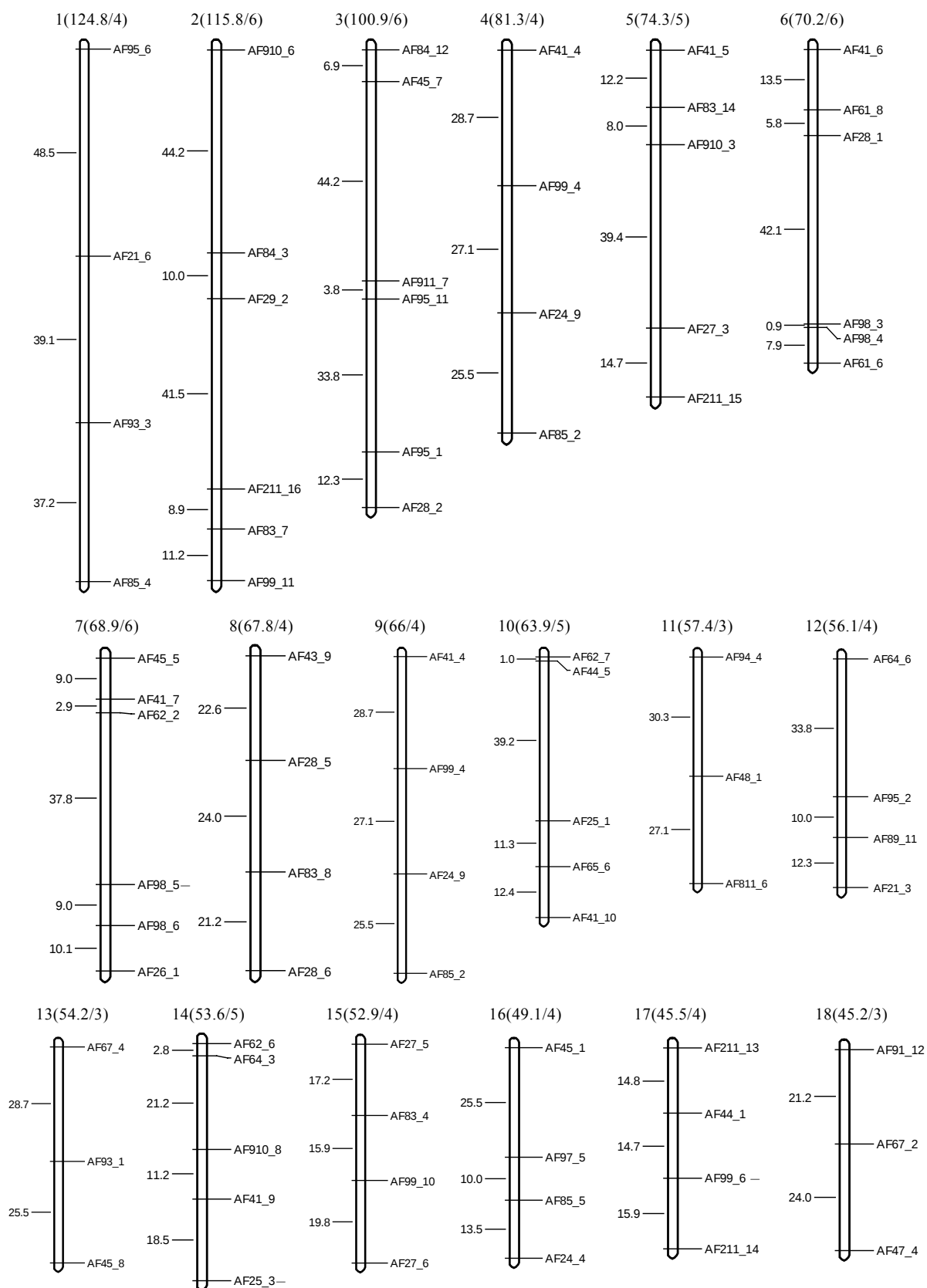


图 2 中国对虾雄性遗传连锁图谱

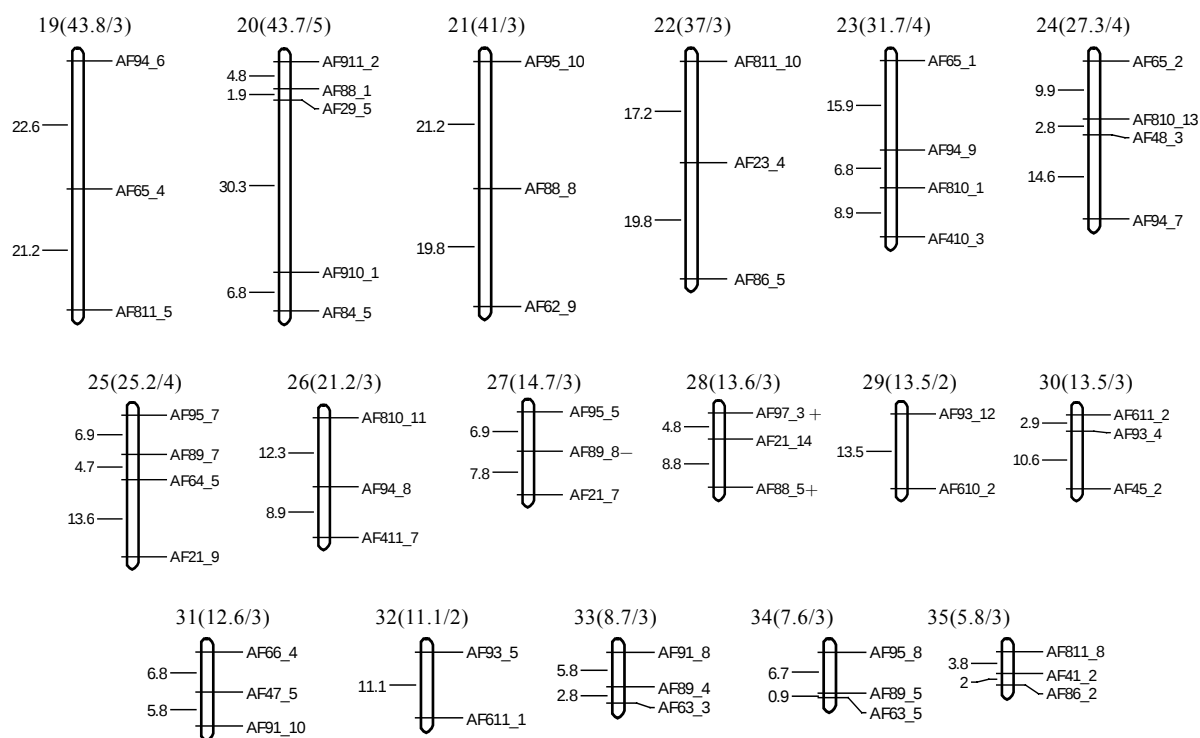


图 2(续) 中国对虾雄性遗传连锁图谱

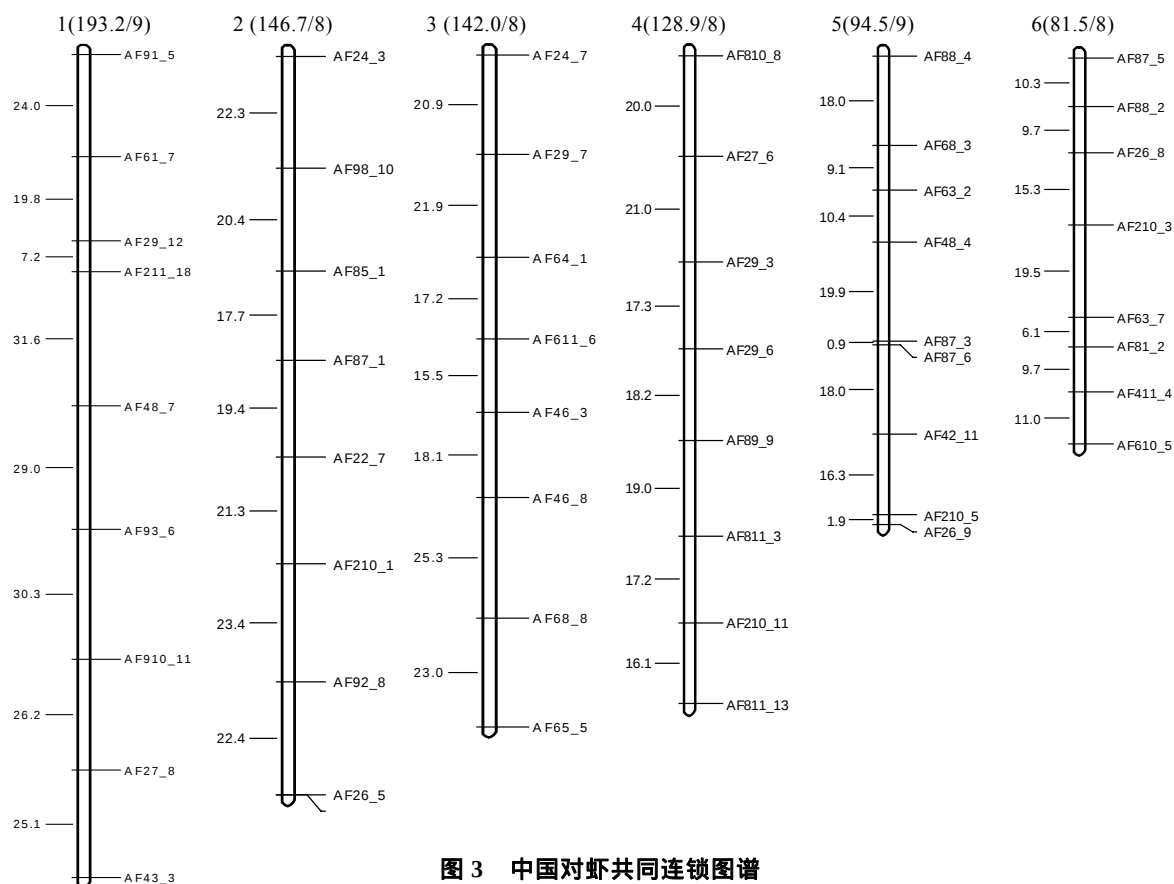


图 3 中国对虾共同连锁图谱

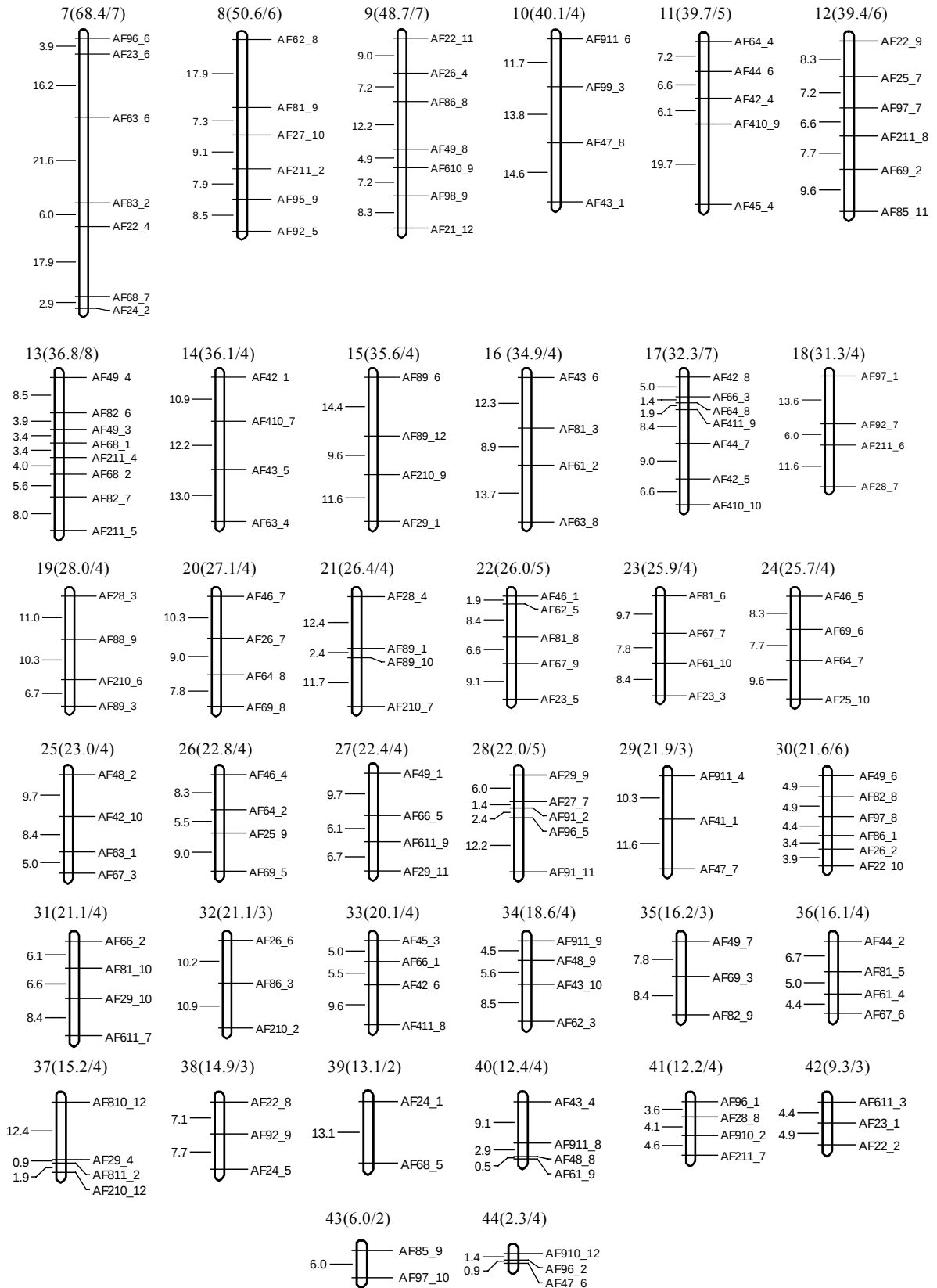


图 3(续) 中国对虾共同连锁图谱

3 讨论

利用 F_2 群体和AFLP标记构建了中国对虾遗传连锁图谱. 本研究得到的遗传连锁图谱与前期得到的图谱 [35,44,45]有了一定程度的改善. 岳志芹等 [35,36]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个雌性连锁群和25个雄性连锁群, 雌雄图谱的覆盖率分别为35.6%和47.5%. 与之相比, 本研究在实验材料的数量、作图群体类型、图谱的间隔和图谱覆盖率均有所改善. 作图数量由42个增加到110个体, 作图采用信息量较丰富的 F_2 群体, 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28个雌性连锁群、35个雄性连锁群和44个共同遗传连锁群, 其相应的图谱覆盖率分别增加至58.03%, 59.02%, 67.14%.

本研究中AFLP标记的多态率(每个引物组合9.7个多态标记)与Wilson等 [33]在斑节对虾中每对引物组合可以得到10个多态标记结果相一致. Moore等 [46]利用21对AFLP引物组合对日本对虾进行扩增, 每对引物组合得到15个多态标记; 比Moore等报道的相对低. 这种在不同群体不同品种之间不同的具体原因还不是很清楚, 可能与其基因组的组成有关.

构建遗传图谱时, 通常采用经典的极大似然法估算标记间的遗传距离, 该方法的前提是符合孟德尔遗传分离规律. 但在连锁图谱制作过程中, 常常会遇到大量DNA标记偏离孟德尔分离比例的偏分离现象. 发生严重偏分离的标记一般不应用于连锁作图, 因为偏分离会使连锁分析受到影响, 一些本来不存在连锁的标记由于各自的偏分离, 可能误导出连锁的结论, 而另一些本来相连锁的标记也有可能由于偏分离而无法检测到连锁.

偏分离现象是分子遗传分析中一种常见的现象. 实验中55对引物组合检测到的532个多态位点中, 有82个位点出现偏分离, 总的偏分离比例为15.41%, 这种现象在其他对虾类也有发现, Perez等 [34]利用AFLP标记构建凡纳对虾的遗传连锁图谱中检测到2.8%的偏分离. 这种偏分离现象在其他水产动物和分子标记也有出现. 利用AFLP标记构建栉孔扇贝图谱中偏分离为17.8% [30]和35.42% [47], 美洲牡蛎 [48]为8.2%. 利用微卫星标记构建的太平洋牡蛎 [49]图谱时偏分离比例为20.9%, 利用AFLP和微卫星两个标记构建的鲈鱼 [25]图谱的偏分离比例为8%, Young等 [50]

利用AFLP, RAPD, SSR和VNTR等几个标记构建虹鳟鱼图谱时检测到的偏分离比例为13.3%. 中国对虾出现偏分离现象的原因可能有: 受精过程中配子间的竞争和选择 [51]; 不同位点的片段分子量大小相同使得一条AFLP电泳条带可能是多个位点扩增产物的重叠表现 [22], 高的遗传负荷和对隐性致死基因的选择和实验取样误差所引起 [52]. 在凡纳对虾 [34]中符合1:1分离比和符合3:1分离比的比例分别为64%和24.5%, 这与本研究中中国对虾的分离比有所不同(43.98%和40.6%). 这种不同可能是由于作图群体比较小, 并且只是来自一个家系有关.

分子连锁群是染色体在分子水平上的反映, 分子连锁群的数目应该与相应物种染色体的数目一致. 中国对虾基因组单倍体染色体数目为44, 其对应的理想连锁群数目应该为44个. 本研究构建的共同遗传连锁图谱有44个连锁群, 而雌性和雄性遗传连锁图谱分别为28和35个, 这种情况在其他的研究结果中也有出现 [50,53]. 在实际作图过程中很难获得与单倍体数量一致的连锁群, 尤其是作图标记数量少、图谱覆盖率低的情况 [54]. 本实验这种结果可能是中国对虾染色体数目多而实验所得到的AFLP标记比较少. AFLP标记作为一种显性标记, 不能区分AA和Aa这样的标记, 其提供的信息没有微卫星等共显性标记多. 这也可能是另一个原因.

如果标记在基因组中均匀分布, 每个连锁群上标记的数目与连锁群长度呈线性相关, 因为染色体越长, 可以分到一个连锁群上的标记数目就越多 [55]. 本实验利用皮尔逊相关分析AFLP标记和连锁群长度间的关系来检测AFLP标记在整个连锁群的分布情况. 皮尔逊相关系数在0.73~0.86之间, 遗传连锁群的长度和AFLP标记数量呈明显的正相关, 可以说明AFLP标记在中国对虾遗传图谱上分布是均匀的. Perez等 [34]得到了相同的结果, 认为AFLP标记在凡纳对虾遗传图谱上也是均匀分布的.

Chow等 [56]估计对虾属基因组总长度大约为人类基因组(大约 3×10^9 bp, 3000 cM)的70%, 即为 2×10^9 bp左右. 本研究中中国对虾基因组长度的估计是在假设基因组中遗传标记是平均分布的, 不同性别重组率相同的情况下所得到的 [57]. 本实验所得到的中国对虾基因组平均长度为2420 cM. Moore等 [46]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, 不同性别重组率相同的情况

下,估计日本对虾基因组总长度为 2300 cM. Wilson 等^[33]采用 AFLP 标记估计斑节对虾雄性基因组长度为 2000 cM. 这些实验结果与对虾属基因组长度相一致.

在目前研究的大多数动物中包括人、鼠、牛、猪、鱼和大多数脊椎动物,雌雄之间的重组率存在一定的差异. 本研究中雌性和雄性遗传连锁图谱的标记数量和连锁图大小存在不同. 实验结果得出中国对虾雌性连锁群的总长度为 1090 cM, 雄性遗传连锁图谱长度为 1619.9 cM, 雄性遗传连锁图谱比雌性遗传连锁图谱长 32.6%, 这可能反应出中国对虾雄性重组率要高于雌性的重组率. 对于两性之间重组率不同的具体原因目前还不是很清楚. 不过中国对虾雌雄重组率的不同可能与基因组序列、染色体结构、染色体定位和大小密切相关^[58]. Lindahal 等^[59]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、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及不同的取样群体也可能导致重组率的不同. Coimbra 等^[29]也得到了类似的结果,日本牙鲆雄性重组率比雌性的. 这种两性之间重组率的差异在其他水产动物中也普遍存在,如凡纳对虾^[34]、斑节对虾^[33]、虹鳟鱼^[23]、斑马鱼^[60]和大西洋鲑^[14]等,这些水产动物的雌性重组率高于其雄性重组率. Sakamoto 等^[23]认为,虹鳟鱼重组率的不同可能是因为雄性在减数分裂过程中四价体的形成导致的. Singer 等^[60]认为,斑马鱼的雄性出现了重组抑制导致其雄性重组率低于其雌性. 到目前为止,中国对虾两性之间的重组率不同的控制机制还没有明确合理的

解释.

中国对虾遗传连锁图谱的构建是遗传学研究的一个重要方向,为重要基因克隆及主要经济性状定位奠定基础,实现中国对虾遗传改良和培育新品种的计划. 本实验利用 F_2 分离群体和 AFLP 分子标记技术进行中国对虾遗传连锁图谱的构建,以期为中国对虾分子标记辅助育种提供必要的理论依据. 本实验验证了利用 AFLP 标记构建中国对虾遗传连锁图谱是非常有效的工具. 但是 AFLP 标记是显性标记,不能利用共同标记进行图谱的整合,并且 AFLP 标记很难在不同群体、不同品种及不同实验室进行转移,这限制了 AFLP 标记的发展. 实验所建立的中国对虾的遗传连锁图谱的密度和覆盖率还需进一步完善,以后可以从几个方面进行研究. 首先可以另外更换 AFLP 标记的不同种类的酶切组合类型(如 *Pst* 等),及其相应的引物组合进行 AFLP 分析,以使图谱能够用于进一步的 QTL 定位及标记辅助育种. 其次,可以选择其他共显性标记,如微卫星标记, RFLPs 或 SCARs, SNP, EST 等标记,通过“ballelic bridges”^[61]等方法将不同的图谱整合. 再次,利用比较基因组作图,使本图谱能够与其他实验室的同物种图谱甚至不同物种图谱之间进行信息交流及图谱整合. 我们还需要发展基因标记,用于进一步 QTL 分析的生长性状的定位,并最终用于标记辅助育种. 目前,中国对虾中连锁群与染色体对应关系的研究还未见报道,原位杂交技术的发展为这一问题的解决提供了切实可行的途径.

致谢 非常感谢李玉涛博士和董士瑞博士在论文写作方面提供的帮助,同时感谢中国水产科学院黄海水产研究所育种室所有工作人员的帮助.

参考文献

- 1 FAO. World review of fisheries and aquaculture: Pare 1. In: Group FAO Information Division, eds. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA 2002). Rome, Italy: FAO Fisheries Department, 2002
- 2 Goyard E, Patrois J, Peignon J M, et al. Selection for better growth of *Penaeus stylirostris* in Tahiti and New Caledonia. Aquaculture, 2002, 204: 461—468^[doi]
- 3 Hetzel D J S, Crocos P J, Davis G P, et al. Response to selection and heritability for growth in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture, 2000, 181: 215—223^[doi]
- 4 Coman G J, Crocos P J, Preston N P, et al. The effect of temperature on the growth, survival and biomass of different families of juvenile *Penaeus japonicus* Bate. Aquaculture, 2002, 214: 185—199^[doi]
- 5 Preston N P, Crocos P J, Keys S J, et al. Comparative growth of selected and non-selected Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus)*

- japonicus* in commercial farm ponds; implications for broodstock production. *Aquaculture*, 2004, 231: 73—82[doi]
- 6 Benzie J A H, Kenway M, Trott L. Estimates for the heritability of size in juvenile *Penaeus monodon* prawns from half-sib matings. *Aquaculture*, 1997, 152: 49—53[doi]
- 7 Argue B J, Arce S M, Lotz J M, et al. Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. *Aquaculture*, 2002, 204: 447—460[doi]
- 8 Perez-Rostro C I, Ibarra A M. Quantitative genetic parameter estimates for size and growth rate traits in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone 1931) when reared indoors. *Aquac Res*, 2003a, 34: 543—553[doi]
- 9 Perez-Rostro C I, Ibarra A M. Heritabilities and genetic correlations of size traits at harvest size in sexually dimorphic Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) grown in two environments. *Aquac Res*, 2003b, 34: 1079—1085[doi]
- 10 Arcos F G, Racotta I S, Ibarra A M. Genetic parameter estimates for reproductive traits and egg composition in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, 2004, 236: 151—165[doi]
- 11 Gitterle T, Rye M, Salte R. et al. Genetic (co) variation in harvest weight and survival in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* under standard commercial conditions. *Aquaculture*, 2005, 243: 83—92[doi]
- 12 Rance K A, Mayes S, Price Z, et al. Quantitative trait loci for yield components in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 1302—1310[doi]
- 13 Kelly J D, Gepts P, Miklas P N, et al. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic important in bean and cowpea. *Field Crops Res*, 2003, 82: 135—154[doi]
- 14 Moen T, Fjalestad K T, Munck H, et al. A multistage testing strategy for detection of quantitative trait loci affecting disease resistance in Atlantic salmon. *Genetics*, 2004, 167: 851—858[doi]
- 15 Somorjai M L, Danzmann R G, Ferguson M M. Distribution of temperature tolerance quantitative trait loci in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and inferred homologies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genetics*, 2003, 165: 1443—1456
- 16 Jones E S, Hughes L J, Drayton M C, et al. An SSR and AFLP molecular marker-based genetic map of white clover (*Trifolium repens* L). *Plant Sci*, 2003, 165: 531—539[doi]
- 17 Hua J, Xing Y, Wu W, et al. Single-locus heterotic effect and dominance by dominance interactions can adequately explain the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 2574—2579[doi]
- 18 Naruse K, Fukamachi S, Mitani H, et al. A detailed linkage map of Medaka, *Oryzias latipes*: comparative genomics and genome evolution. *Genetics*, 2000, 154: 1779—1784
- 19 Rieseberg L H, Baird S J E, Gardner K A. Hybridization, introgression and linkage evolution. *Plant Mol Biol*, 2000, 42: 205—224[doi]
- 20 Whitkus R. Genetic of adaptive radiation in Hawaii and Cook Island species of *Tetramolopium* (Asteraceae). II. Genetic linkage map and its implications for interspecific breeding barriers. *Genetics*, 1998, 150: 1209—1216
- 21 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. *Genetics*, 2001, 159: 1701—1716
- 22 Faris J D, Laddomada B, Gill B S. Molecular mapping of segregation distortion loci in *Aegilops tauschii*. *Genetics*, 1998, 149: 319—327
- 23 Sakamoto T, Danzmann R G, Gharbi K, et al. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics*, 2000, 155: 1331—1345
- 24 Nichols K M, Young W P, Danzmann R G, et al. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim Genet*, 2003, 34: 102—115[doi]
- 25 Kocher T D, Lee W J, Sobolewska H, et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics*, 1998, 148: 1225—1232
- 26 Waldbieser G C, Bosworth B G, Nonneman D J, et al. A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Genetics*, 2001, 158: 727—734
- 27 Liu Z, Karsi A, Li P, et al. An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family. *Genetics*, 2003, 165: 687—694
- 28 Ohara E, Nishimura T, Nagakura Y, et al. Genetic linkage maps of two yellowtails (*Seriola quinqueradiata* and *Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 2005, 244: 41—48[doi]
- 29 Coimbra M R M, Kobayashi K, Koretsugu S, et al. A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 2003, 220: 203—218[doi]
- 30 Li L, Xiang J, 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. *Aquaculture*, 2005, 245: 63—73[doi]

- 31 Hubert S, Hedgecock D. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, 2004, 168: 351—362[doi]
- 32 Li Y, Byrne K, Miggianno E, et al. Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers. *Aquaculture*, 2003, 219: 143—156[doi]
- 33 Wilson K, Li Y, Whan V, et al. Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism. *Aquaculture*, 2002, 204: 297—309[doi]
- 34 Perez F, Erazo C, Zhinaula M, et al. A sex-specific linkage map of the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* based on AFLP markers. *Aquaculture*, 2004, 242: 105—118[doi]
- 35 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. *高技术通讯*, 2004, 5: 88—93
- 36 王伟继, 孔杰, 董世瑞, 等. 中国明对虾 AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建. *动物学报*, 2006, 52: 575—584
- 37 Liu Z, Cordes J. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 2004, 238: 1—37[doi]
- 38 Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 4407—4414[doi]
- 39 Dinesh K R, Chan W K, Lim T M, et al. RAPD markers in fishes—an evaluation of resolution and reproducibility. *Asia-Pac J Molec Biol Biotechnol*, 1995, 3: 112—118
- 40 Grattapaglia D, Sederoff R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a Pseudo-Testcross: Mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, 1994, 137: 1121—1137
- 41 Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* 1944, 12: 172—175
- 42 Postlethwait J H, Johnson S L, Midson C N. A genetic linkage map for the zebrafish. *Science*, 1994, 264: 699—703[doi]
- 43 Chakravarti A, Lasher L K, Reefer J E. A maximum likelihood method for estimating genome length using genetic linkage data. *Genetics*, 1991, 128: 175—182
- 44 Li Z X, Li J, Wang Q Y, et al. AFLP-based genetic linkage map of marine shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis*. *Aquaculture*, 2006, 261: 463—472[doi]
- 45 孙昭宁, 刘萍, 李健, 等. RAPD 和 SSR 两种标记构建的中国对虾遗传连锁图谱. *动物学研究*, 2006, 27: 317—324
- 46 Moore S S, Whan V, Davis G P, et al. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 1999, 173: 19—32[doi]
- 47 Wang S, Bao Z, Pan J, et al. AFLP linkage map of an intraspecific cross in *Chlamys farreri*. *J Shellfish Res*, 2004, 23: 491—499
- 48 Yu Z, Guo X. Genetic linkage map of the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Biol Bull*, 2003, 204: 327—338[doi]
- 49 Launey S, Hedgecock D. High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, 2001, 159: 155—165[doi]
- 50 Young W P, Wheeler P A, Coryell V H, et al. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. *Genetics*, 1998, 148: 1—13
- 51 Lyttle T W. Segregation distorters. *Annu Rev Genet*, 1991, 25: 511—557
- 52 Causse M A, Fulton T M, Cho Y G, et al. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics*, 1994, 138: 1251—1274
- 53 Vivek B S, Simon P W. Linkage relationships among molecular markers and storage root traits of carrot (*Daucus carota* L. ssp *sativus*). *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 58—64[doi]
- 54 Yasukochi Y. A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics*, 1998, 150: 1513—1525
- 55 Cervera M T, Storme V, Ivens B, et al. Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. *Genetics*, 2001, 158: 787—809
- 56 Chow S, Dougherty W J, Sandifer P A. Meiotic chromosome complements and nuclear DNA contents of four species of shrimps of the genus *Penaeus*. *J Crustacean Biol*, 1990, 10: 29—36[doi]
- 57 Hulbert S H, Illott T W, Legg E J, et al. Genetic analysis of the fungus, *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphisms. *Genetics*, 1988, 120: 947—958
- 58 Robinson W P. The extent, mechanism, and consequences of genetic variation, for recombination rate. *Am J Hum Genet*, 1996, 59: 1175—1183
- 59 Lindahl K F. His and hers recombinational hotspots. *Trends Genet*, 1991, 7: 273—276
- 60 Singer A, Perlman H, Yan Y, et al. Sex-specific recombination rates in Zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics*, 2002, 160: 649—657
- 61 Gebhardt C, Ritter E, Barone A, et al. RFLP maps of potato and their alignment with the homologous tomato genome. *Theor Appl Genet*, 1991, 83: 49—57