应用 SSR 和 SRAP 标记构建青虾遗传连锁图谱

乔慧^{1,2},吴滟²,傅洪拓^{1,2},龚永生²,蒋速飞²,熊贻伟²

1. 南京农业大学 渔业学院, 江苏 无锡 214081;

 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心,淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081

摘要:采用 SSR 和 SRAP 标记结合拟测交策略构建青虾(*Macrobrachium nipponense*)遗传连锁图谱。共有 175 个标记(含 27 个 SSR、148 个 SRAP 标记)分布在 53 个连锁群上。每个连锁群含 2~8 个标记,其中不少于 3 个标记的连锁群有 35 个,连锁对 18 个,平均每个连锁群的标记数为 3.3 个;连锁群长度在 6.7~91.2 cM 之间,相邻标记间最大间隔为 49.0 cM,最小为 1.4 cM,平均间隔为 13.1 cM。青虾框架图谱长度为 997.2 cM,图谱观察总长度为 2 270.5 cM,根据估算,青虾遗传连锁图谱预期长度为 4 380.6 cM,图谱的覆盖率为 51.83%。本研究构建了青虾遗传连锁图谱,该图谱也是淡水虾蟹类第一张遗传连锁图谱,可为青虾 QTL 定位、基因克隆、遗传选育等提供指导,并为进一步构建高密度的青虾遗传连锁图谱奠定了基础。

关键词:青虾;日本沼虾;SSR;SRAP;遗传连锁图谱 中图分类号:S96 文献标志码:A 文章编号:1005-8737-(2012)01-0202-09

遗传连锁图谱构建是遗传学研究的一个重要 领域、它为进一步认识基因组组成、克隆染色体 的基因及定位重要经济性状的主效基因奠定了基 础, 也是实现分子标记辅助育种 (marker assisted selection, MAS)的重要手段。目前,已有多种重要 经济鱼类和贝类构建了遗传连锁图谱,包括鲤 (Cyprinus carpio)、虹鳟(Oncorhynchus mykiss)、 罗非鱼(Oreochromis spp.)、太平洋牡蛎(Crassostrea gigas)、贻贝(Mytilus edulis)等^[1-6],其中虹鳟^[2]、罗 非鱼^[3]等已构建第二代图谱, 可满足进一步 QTL 精细定位的需要。虾蟹类方面、已报道了中国对 虾(Penaeus chinensis)^[7]、日本对虾(Penaeus japonicus)^[8]、凡纳滨对虾(Penaeus litopenaeus vanmanici)^[9]、斑节对虾(Penaeus monodon)^[10]和三 疣梭子蟹(Portunus trituberculatus)^[11]等的遗传连 锁图谱, 但密度均较低, 而淡水虾蟹类遗传图谱 构建还未见报道。

青虾(*Macrobrachium nipponense*)学名日本 沼虾,是中国重要的淡水养殖虾种类,随着累代 养殖规模的扩大,养殖过程中普遍出现品种退化 现象,因此必须加强青虾的遗传改良与良种选 育。有关青虾群体遗传多样性分析及性状相关分 子标记初步筛选等已有报道^[12-15],但其遗传连锁 图谱构建迄今未见报道。本研究采用微卫星标记 (simple sequence repeat, SSR)和相关序列扩增多 态性标记(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)结合拟测交策略构建青虾遗传连 锁图谱,旨在为青虾高密度遗传连锁图谱的构建奠 定基础,并为分子标记辅助育种工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 作图群体

试验用青虾的亲本均来自野生种群,捕获后 经单独驯养用于实验,其中父本采自珠江河口段,

收稿日期: 2011-08-08; 修订日期: 2011-10-26.

通信作者:傅洪拓,研究员,博士生导师. E-mail: fuht@ffrc.cn

基金项目:江苏省高技术研究项目(BG2007328);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(2011JBFA02).

作者简介: 乔慧(1981-), 女, 博士, 主要从事水产动物遗传育种研究. E-mail: qh1212000@126.com

母本采自太湖无锡湖区。在实验室饲养至性成熟 后,于 2009 年 5 月挑选性腺发育良好、身型较大 的雌雄青虾完成 5 组一对一杂交试验,构建家系。 于 2009 年 10 月随机取其中的一组 64 个 F₁青虾 个体作为作图群体,子代中雌雄比例为 35:29。样 本储存于无水乙醇中,-20 备用。

1.2 研究方法

从青虾尾部肌肉提取 DNA, 提取方法参照 Strauss^[16]的方法(略作修改)进行。

1.2.1 SRAP 分析 引物来自 Li 等^[17]发表的 10 个 上游引物和 10 个下游引物组成 100 个 SRAP 引物 组合(表 1)。引物均合成自上海生工生物技术有限 公司。

PCR 反应体系:包括 10×PCR 反应缓冲液 2.5 µL, MgC1₂(25 mmoL/L)1.5 µL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/µL)0.16 µL, 正反向引物(10 µmol/L)各 2.0 µL, dNTP(2.5 mmol/L)1.5 µL,基因组 DNA 1.0 µL,用 ddH₂O 补足至 25 µL。PCR 扩增程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 1min, 35℃退火 1 min, 72℃延伸 1min,共5个循环;94℃变性 1min,50℃退火 1min, 72℃延伸 1min,共35 个循环;72℃延伸 10 min; 4℃保存。

扩增产物检测: 经 8%浓度聚丙烯酰胺凝胶 电泳分离。银染法显示扩增位点。

1.2.3 SSR 分析 青虾 SSR 标记来源:本实验室 开发的 40 对具有多态性的 SSR 引物(GenBank 登 录号 GU189600-GU189639),其余 106 微卫星序

列均由 GenBank 下载, 登录号分别为 GU078555-GU078569, GU586071-GU586097, EU130924-EU130935, GQ257616-GQ257566。采用 primer5 设计引物, 并对引物进行反应条件优化。共设计 得到 96 对引物, 首先在亲本和 4 个子代中扩增, 扩增稳定且在亲本中呈现多态的引物用于整个作 图群体基因型分析。

PCR 反应体系:包括 10×PCR 反应缓冲液 2.5 µL, MgC1₂(25 mmoL/L)1.5 µL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/µL)0.16 µL, 正反向引物(25 µmol/L)各 0.1 µL, dNTP(2.5 mmol/L)1.5 µL,基因组 DNA 1.0 µL,用 ddH₂O 补足至 25 µL。PCR 扩增程序:94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s,退火 30 s,72℃延伸 45 s, 共 30 个循环; 72℃延伸 10 min; 4℃保存。

扩增产物检测和显色同 SRAP 标记。

1.2.4 数据统计 利用卡方(*P* > 0.05)检验, 在子 代中呈现1 1和1 3分离比的 SRAP 标记以及 呈现1 1和1 2 1分离比的 SSR 标记用来构 建青虾的遗传连锁图谱。SRAP 标记上游引物以 字母 M(1-10)编号, 下游引物以字母编号 E(1-10) (图1)。遗传标记的命名采用引物代号-扩增片段大 小。如 M7E10-194 表示该片段由引物组合 Me7 和 Em10 产生, 估算其片段大小为 194 bp。微卫 星标记直接用引物名来命名。

1.2.5 遗传连锁分析绘图相关软件 将 0、1 矩阵 保存于记事本中(扩展名为".loc"),并进行格式数 据转换后,用 JoinMap3.0(Van Ooijen and Voorrips,

SRAP 标记 SRAP marker	上游引物 forward primer	SRAP 标记 SRAP marker	下游引物 reverse primer
Mel	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Me6	TGAGTCCAAACCGGACA	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Me7	TGAGTCCAAACCGGACG	Em7	GACTGCGTACGAATTCAA
Me8	TGAGTCCAAACCGGACT	Em8	GACTGCGTACGAATTCAC
Me9	TGAGTCCAAACCGGAGG	Em9	GACTGCGTACGAATTCAG
Me10	TGAGTCCAAACCGGAAA	Em10	GACTGCGTACGAATTCAT

表 1 SRAP 标记上下游引物序列及编号 Tab.1 List of SRAP forward and reverse primer used in this study

2001)软件, 假设雌雄重组率相同, 群体类型设置 为 CP(cross-pollinating), 构建雌雄共同遗传连锁 图谱(LOD 值 3.5)。符合 1 1 分离规律(P>0.05) 的标记用于连锁分析。使用 Kosambi 函数(Kosambi, 1944)将重组率转换为图距单位(centimorgan, cM), 计算每个连锁群的图距。利用 MapChart version 2.2 软件(Voorrips, 2002)绘制遗传连锁 图谱。

1.2.6 基因组长度预测和图谱覆盖率 连锁图谱总 间隔数=图谱标记总数-连锁群数(*n*);连锁图标记 的平均间隔(*s*)=连锁图谱总长度/总间隔数;连锁 群上的间隔数=连锁群标记数-1;每个连锁群的 标记平均间隔=连锁群长度/连锁群上的间隔数。

(1)遗传连锁图谱的观察长度分为两个方面:
 框架图长度(G_{of})为 4 个标记的连锁群的长度之
 和;图谱总长度(G_{oa})为所有连锁群的长度。

(2)连锁图谱预期长度(G_{e}),分两种方法来估 计 G_{e1} 和 G_{e2} G_{e1} 是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。具体计算方法: $G_{e1}=G_{oa}$ +2×s×n; G_{e2} 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。遗传连锁图谱的预 期值 G_{e} 为 G_{e1} 和 G_{e2} 的平均值。

(3)图谱的框架覆盖率 $C_{of}=G_{of}/G_{e}$ 总的图谱覆盖率 $C_{oa}=G_{oa}/G_{e}$ 。

2 结果与分析

2.1 SRAP 标记分析结果

利用 100 对 SRAP 引物组合对亲本和部分子 代个体进行了分析, 共扩增出 2 724 条片段, 共有 88 对引物组合能够扩增出多态条带, 平均每个引 物组合扩增出 30.2 个片段。其中有 493 个标记在 父母本中呈现多态, 平均每个引物组合产生 5.4 个多态标记, 多态比例 18.1%。多态标记中符合孟 德尔分离比(1 1 和 3 1)的标记有 344 个, 占多 态标记总数的 69.8%, 占总扩增片段的 12.6%。其 中符合1 1 分离比的共 309 个标记, 母本分离标 记 132 (38.4%)个; 父本标记 177(51.4%)个。其余 符合 3 1 分离比的共同标记 35 个(10.2%)。149 个偏分离标记占多态标记总数的 30.2%。

2.2 微卫星标记分析结果

共得到96 对青虾 SSR 引物,在亲本和6个子 代中进行检测后,有52 对引物表现为多态。将这 52 对引物应用于整个作图群体进行基因型分析, 有38 对微卫星引物在亲本和作图群体中呈现孟 德尔分离,占多态标记总数的73.1%。38 个作图 标记中,符合1:1分离比的标记共21个(父本标 记10个、母本标记11个),符合1:2:1分离比 的标记17个(父、母本共同标记)。14个偏分离标 记占多态标记总数的26.9%。

2.3 遗传连锁图谱构建

将本次得到的符合孟德尔分离比的 344 个 SRAP 标记和 38 微卫星标记进行连锁分析、初步 得到青虾的遗传连锁图谱。有27个微卫星(表2)、 148 个 SRAP 标记被定位在 53 个连锁群上, 其中 不少于 3 个标记的连锁群有 35 个, 另外有 18 个 连锁对。每个连锁群含 2~8 个标记、 平均每个连 锁群的标记数为 3.3 个、连锁群长度在 6.7~91.2 cM 之间,相邻标记间最大间隔为 49.0 cM,最小 为 1.4 cM, 平均间隔为 13.1 cM。青虾框架图谱长 度为 997.2 cM, 加上三联体和连锁对的长度, 青 虾连锁图谱观察总长度增长为 2 270.5 cM。采用 两种方法估计中国对虾的基因组长度,得到预期 长度 Ge1 为 4 243.2 cM, Ge2 为 4 507.9 cM, 取其平 均值作为图谱预期长度、则青虾遗传连锁图谱预 期长度为 4 380.6 cM。青虾框架图谱的覆盖率分 别为 22.76%、图谱总覆盖率为 51.83%(表 3)。

利用 MapChart 软件绘制的青虾遗传连锁图 谱, 如图 1 所示。

3 讨论

3.1 作图群体选择

在构建遗传图谱过程中,首先要根据遗传材 料选择合适的作图群体,再应用分子标记技术对 基因型进行标记分析,确定标记间的连锁关系。 在作图群体的构建中,拟测交策略(又名双假测交, two way pseudo-testcross)是一种很好的选择。该 方法采用亲缘关系相对较远的杂合亲本交配所得

Tab. 2 Microsatenne foci on the mikage map of <i>Macrobrachium hipponense</i>							
位点	引物序列 (5'-3')		退火温度	登录号			
locus	primers sec	quence (5'-3')	$T_{\rm m}/{\rm °C}$	accession no.			
WXM01	F:TTCCCCACGCACCTCAAT	R:GACATCCATGCAAAGCAACAG	54	GU189600			
WXM02	F:GCCATTTTCTCATAAGGGT	R: ACGGTGGTATTCAGGGAT	54	GU189601			
WXM06	F: TTGGCAAGTCTCGTCTGATG	R: CGAGGAAACGCCTGCTAC	54	GU189605			
WXM07	F: CGACGAGGCAACAGAATA	R: TGATAATGCGAGGGAGTA A	54	GU189606			
WXM13	F: ATGAAGGTAAGTGGCTGAGA	R: TCACACGTAAAGTTTTTGGA	58	GU189611			
WXM15	F: TGACAACGAGACTGCTAA	R: TTGACGCTGCTTACATC	60	GU189613			
WXM17	F: GAAAGGAACTTCAAGAGGC	R: GGACAGTGAGCAAAGCATC	54	GU189615			
WXM18	F: TCGATGGCGACTTGCA	R: CCTCTGCCCTGACTTGAA	60	GU189616			
WXM20	F: TCCCGATGAAAGGCACA	R: TAAAGGCGGTGATGAT	60	GU189618			
WXM27	F: ACAATTTAGGTGACGCTC	R: TGCATGAATGCTGGTAT	58	GU189623			
WXM32	F: TTGTGACGCCAGAGTG	R: GCTTGTAGAGCGCCTAT	60	GU189628			
WXM33	F: TGGTCCTGTTGTCTTTCT	R: GTTGCTCGGTCTATGC	54	GU189629			
WXM35	F: GTAACAGGGACTAGCAATG	R: ACCGCAAGACTCAACC	58	GU189631			
WXM41	F: GTGGCCTTTGACTACG	R: TGTCAGCAACAACGAGA	54	GU189637			
WXM42	F: GTGGGGTTTCACTGGT	R: AGCTGCCTCCTGACTAA	54	GU189638			
MaN27	F: CATCGAGTGAAGAGGTGT	R: GTCATAAATGCTGCTACG	52	GU078564			
A28	F: TGCATTCCCAATTTCTC	R: CTTAACCAACTTCCATCGT	50	GU586071			
<i>B9</i>	F: TGGTGGTAGTTGAATTAGAAGG	R: AGCACAGGAAGGGAAGG	52	GU586074			
B21	F: GCTTGCTGTAACCGAC	R: TTGCTACACCAGGAAAT	50	GU586075			
<i>B70</i>	F: CCAACCATCGGCTTTC	R: TGACCCGTTTGTAGTGC	50	GU586091			
C77	F: GTCCGATAAATCCCACA	R: TCCTGCTCTTCCGTTC	50	GU586080			
Mni009	F: AGAAAGGGACTGGTGG	R: GTCTACAGGAAATGTAAAGC	50	EU130930			
Mni055	F: ATCACCCTCAATAGCA	R: CCAAGCCTGTAAAATG	50	GQ257552			
Mni100	F: GAAATAGAAGACCTCCTGC	R: TGTAAACAATCCCACTCAC	50	GQ257597			
Mni102	F: ACCTCGGGAATATCTCATC	R: AGTGGCATCGTGTCAGC	50	GQ257599			
Mni105	F: TGGTCCACCCAAGTCT	R: CCTGGCGTCTCATTTA	52	GQ257602			
Mni115	F: AACAGTAAACGGAGTAGAAA	R: CGAATGGGAATGAAAG	50	GQ257611			

表 2 青虾遗传连锁图谱上的微卫星标记

表 3 青虾遗传连锁图谱总结 Tab.3 Summary of the linkage maps of M.

nipponense					
项目 item	结果 result				
连锁群数目 linkage groups	53				
平均每个连锁群的标记数	33				
average no.of markers per group 相邻标记间平均间隔/cM	13.1				
average marker spacing 相邻标记间最大间隔/cM	10.0				
maximum marker spacing	49.0				
最短连锁群长度/cM	6.7				
最长连锁群长度/cM	91.2				
maximum length of linkage group 图谱观察值/cM observed genome length					
$G_{ m of}$	997.2				
G_{oa}	2270.5				
图谱预期长度/cM estimated genome length					
G_{el}	4243.2				
G_{e2}	4507.9				
G_{e}	4380.6				
图谱覆盖率/% genome coverage					
Cof	22.76				
C_{oa}	51.83				

的 F_1 为作图群体,相比较常用的 F_2 和 BC1 代等, 可大大缩短作图群体的繁育周期。由于当前养殖 青虾尚未建立纯系,为此本研究借鉴拟了测交策 略采用 F_1 作为作图群体构建连锁图谱。中国野生 青虾种群资源丰富,并且保持了较高的遗传多样 性。根据前期对中国长江、珠江、多地湖泊等地 区野生青虾种群遗传多样性研究调查结果^[12-14], 本研究选取遗传多样性高且遗传距离大的珠江种 群和太湖种群作为作图亲本群体,以增加分离群 体之间的遗传差异,获得更多的多态标记和遗传 信息,提高了作图效率。

3.2 作图标记

当前常用于作图的分子标记有十多种,常见 作图标记有随机引物扩增多态性 DNA 标记 (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、 AFLP 扩增片段长度多态性标记(amplified fragment length polymorphism, AFLP)及 SSR 标记,其中





图1 青虾连锁图谱

连锁群右侧为标记名称,左侧为相邻两个标记间的距离,单位为 cM.

Fig. 1 Linkage map of Macrobrachium nipponense

Markers are shown on the right of each group and the adjacent marker spacing is displayed on the left in Kosambi, cM.

SSR 标记具有共显性、重复性好等优点, 被认为 是目前构建连锁图谱的首选标记。作者下载了截 至本研究开始时 GenBank 公布的所有青虾 SSR 序列并设计筛选得到了 56 对引物,连同本实验室开

发的 40 个 SSR 标记^[18]全部用于构建青虾遗传连 锁图谱。共得到 52 个多态 SSR 标记, 多态比例为 54.2%。在已有虾蟹类以 SSR 标记联合其他标记 作图的研究中, 青虾 SSR 标记多态比例最高(中 国对虾 52.4%^[19], 斑节对虾 51.8%^[10], 三疣梭子 蟹 33.3%^[11])。共有 27 个标记被定位在 20 个连锁 群上, 分布均匀。

SRAP 标记作为一种新型的显性分子标记, 多态 性好、重复性和稳定性高、近年来已成为遗传多样性 分析、连锁图谱构建工作中的重要标记^[20-25]。在甘 薯、花生和烟草等植物连锁图谱中, SRAP 引物组合 的多态比率在 11.3%~35.5%之间, 每个 SRAP 引物组 合平均产生的多态标记数在 0.7~3.7 个不等^[25-27]。 在水产动物黄颡鱼(Pelteobagrus fulvidraco)遗传图 谱构建中, SRAP 引物组合多态比率为 33.2%^[28]。 本研究 100 对 SRAP 引物组合中, 共有 88 对引物 组合可以扩增得到多态标记、引物组合多态比率 达到 88%, 平均每个 SRAP 引物组合产生 5.4 个多 态标记,引物组合多态比率明显高于该标记在上 述物种中所获值。与虾蟹类连锁图中常用的 AFLP 标记相比, SRAP 标记技术操作更简便, 成本更 低。本研究中多态 SRAP 标记比例为 18.1%, 与中 国对虾、凡纳滨对虾和三疣梭子蟹连锁图谱中的 多态 AFLP 标记比例相近^[7,11,25,29]。本研究结果进 一步表明,简便、高效、经济的 SRAP 标记完全 可以作为水产动物遗传图谱构建及其他遗传学相 关领域的研究的又一可靠的分子标记。

在应用分子标记构建遗传连锁图谱中,分子标记发生偏分离现象十分普遍。如太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)连锁图中报道了 20.9%的 SSR 位点^[30]、26.9%的 AFLP 位点^[31]偏分离;栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*),两个作图家系分别有 29.96%和 30.45%的 SSR 偏分离^[32]。欧洲牡蛎(*Ostrea edulis*) 遗传图谱中发现 32.8%的分离标记偏离了孟德尔 分离规律^[33],在斑节对虾^[9]及中国对虾^[7]的遗传 图谱构建过程中均有较高比例的 AFLP 标记出现 了偏分离现象。不同物种之间偏分离水平差异较大,可能与物种基因组之间的差异有关。本研究 中分别有 26.9%的 SSR 标记和 30.2%的 SRAP 标 记发生偏离孟德尔分离比的现象,偏分离比率在 正常范围之内。导致做图标记偏分离现象的原因 有很多,包括检测群体数量较小形成统计误差、 受精过程中配子间的竞争和选择^[34]、不同基因型 生存能力的差异、遗传负荷和对隐性致死突变的 选择^[35]等。由于1 1分离比的前提是杂合子(Aa) 和隐性纯合子(aa)各占 50%,如果由于隐性纯合 子生存能力较低等原因导致个体数量下降,则杂 交后代将偏离1 1分离比。本研究中,在对发生 偏离分离比的163个标记进行分析发现,偏离1:1 分离比的标记共 154 个,其中 85.1%的偏分离表 现为纯合子缺失,发生3 1偏分离的9个标记也 全部表现为纯合子缺失,因此隐性纯合子比例下 降或缺失可能是形成本文偏分离的主要原因。

3.3 连锁图谱

理论上,一个完整的连锁图谱连锁群数目应 该和其染色体数目相等。青虾二倍体含 104 条染 色体^[36],理论上应该是 52 个连锁群,本研究中青 虾连锁图谱获得 53 个连锁群,与青虾染色体单倍 体数目较为接近。出现多于单倍体染色体数的连 锁群,表明可用于该遗传连锁图谱定位的标记数 目还不够多,导致某些连锁群无法连接起来。如 果可用于定位的分子标记足够多,某些连锁群就 可能被合并到一起组成一个更大的连锁群,从而 使连锁群的数目与单倍体染色体的数目更接近。

本研究中青虾遗传连锁图谱的覆盖率为 51.83%,在其他虾类如斑节对虾^[37]、日本对虾 (*Penaeus japonicus*)^[8]及凡纳滨对虾^[9]的研究中, 也同样出现了覆盖率不高、标记间平均距离较大 的现象。根据已报道的资料,高等甲壳类染色体 数目大,平均为 125^[38],因此在实际实验操作过 程中,尤其是在标记数量不够多的情况下,获得 连锁群只能覆盖部分基因组。

已有的对虾图谱研究中,中国对虾估测值在 4 580.5 cM^[25],凡纳对虾基因组估测长度在 3 584~5 407 cM之间^[9],日本对虾的基因组估计值 为 2 300 cM 左右^[39],斑节对虾^[36]的基因组估计 值在 2 000 cM 左右。本研究中青虾估测基因组平 均长度在 4 380.6 cM,不同虾类基因组长度估测 值存在较大差异可能与基因组大小差异有关,更 可能与估测方法不同有关。

遗传连锁图谱是基因组研究中的重要环节, 为基因定位、图位克隆、标记辅助选育、比较基 因组作图等研究奠定了基础。采用高信息量的 DNA 分子标记、构建高密度的连锁图谱、对重要 经济性状的基因进行标记定位、采用图位克隆技 术克隆这些基因、再结合常规育种方法对水产动 物进行遗传改良、加快育种进程、最终可以生产 出优质高产抗逆的优良品种。本研究首次构建了 青虾遗传连锁图谱,为进一步构建高密度的青虾 遗传连锁图谱奠定了基础,并可为青虾数量性状 座位定位(QTL)、基因克隆、分子标记辅助育种等 工作提供参考。该图谱也是淡水虾蟹类第一张遗 传连锁图谱,可为其它尚未报道遗传连锁图的淡 水虾蟹类图谱构建工作提供借鉴。与此同时、本 研究结果也表明 SRAP 标记作为一种稳定且可靠 的作图标记用于水产动物连锁图谱构建是可行 的。目前已开发的青虾 SSR 标记数量有限, 因此 大规模开发青虾的 SSR、SNP 等共显性标记、进 一步构建高密度遗传连锁图谱, 是未来青虾分子 标记辅助育种研究亟待解决的问题。

参考文献:

- Cheng L, Liu L, Yu X, et al. A linkage map of common carp (*Cyprinus carpio*) based on AFLP and microsatellite markers
 [J]. Animal Genetics, 2010, 41(2): 191–198.
- [2] Nichols K, Young W, Danzmann R, et al. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Animal Genetics, 2003, 34: 102–115.
- [3] Lee B Y, Lee W J, Streelman J T, et al. A Second-Generation Genetic Linkage Map of Tilapia (*Oreochromis spp.*) [J]. Genetics, 2005, 170: 37–44.
- [4] Lallias D, Lape'gue S, Hecquet C, et al. AFLP based genetic linkage maps of the blue mussel (*Mytilus edulis*) [J]. Anim Gen, 2007, 38: 340–349.
- [5] Li L, Guo X M. AFLP-based genetic linkage maps of the pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg [J]. Mar Biotechnol, 2004, 6: 26–36.
- [6] 孙效文, 鲁翠云, 贾智英, 等. 水产动物分子育种研究进展[J].中国水产科学, 2009, 16(6): 981-990.
- [7] 田燚, 孔杰, 王伟继. 中国对虾遗传连锁图谱的构建[J].科学通报, 2008, 53(5): 544-555.

- [8] Li Y T, Byme K., Miggiano E., et al. Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers [J]. Aquaculture, 2003, 219: 143–156.
- [9] Pèrez F, Erazo C, Zhinaula M, et al. A sex specific linkage map of the white shrimp *Penaeus(Litopenaeus)*vanmanici based on AFLP markers [J]. Aquaculture, 2004, 242: 105–118.
- [10] You E M, Liu K F, Huang S W, et al. Construction of integrated genetic linkage maps of the tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using microsatellite and AFLP markers [J]. Anim Gen, 2010,41(4): 365–376.
- [11] 罗云,高保全,刘萍,等.三疣梭子蟹遗传连锁图谱的初 步构建[J]. 渔业科学进展,2010,31(3):56-65.
- [12] 蒋速飞,傅洪拓,熊贻伟,等.日本沼虾 4 个地理群体遗 传变异的 RAPD 分析[J].长江大学学报:自然科学版, 2006,3(2):179-182.
- [13] 吴滟, 傅洪拓, 李家乐, 等. 太湖日本沼虾的遗传多样性 分析[J]. 上海水产大学报, 2008, 17(5): 620-624.
- [14] 傅洪拓, 乔慧, 李法君, 等. 长江不同江段青虾遗传多样 性研究[J]. 水产学报, 2010, 34 (2): 204-212.
- [15] 傅洪拓,万山青,付春鹏,等.青虾生长性状相关的微卫 星标记筛选[J].水生生物学报,2010,34(5):1043-1048.
- [16] Strauss W M. Preparation of genomic DNA from mammalian issues [C]. Current Protocol in Molecular Biology. New York: John Wiley and Softs. 1989: 221–222.
- [17] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. Theoret Appl Gen, 2001, 103: 455–461.
- [18] Qiao H, Li F J, Fu H T, et al. Isolation and characterization of 40 microsatellite loci for oriental river prawn (*Macro-brachium nipponense*) and cross-species utility [J]. Conservation Genetics Resources, 2011, 3:319–322.
- [19] Liu B, Wang Q Y, Li J, et al. A genetic linkage map of marine shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis* based on AFLP, SSR, and RAPD markers [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2010, 28(4): 815–825.
- [20] 傅洪拓, 乔慧, 姚建华, 等. 基于 SRAP 分子标记的海南 沼虾种群遗传多样性[J]. 生物多样性, 2010, 18(2): 150-154.
- [21] 周劲松,曹哲明,杨国梁,等.罗氏沼虾缅甸引进种和浙 江本地种及其杂交种的生长性能与SRAP分析[J].中国水 产科学,2006,13(4):667-673.
- [22] 张志伟,韩曜平,仲霞铭,等. 草鱼野生群体和人工繁殖
 群体遗传结构的比较研究[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5):
 720-726.
- [23] 丁炜东,曹丽萍,曹哲明,等.草鱼种质相关 SRAP 及 SCAR 的分子标记[J]. 动物学报, 2008, 54(3): 475-481.
- [24] 张红玉,何毛贤,管云雁.马氏珠母贝红色壳家系不同世 代遗传变异的 SRAP 分析[J].水产学报, 2009, 33(5): 727-

733.

- [25] 王强, 张新友, 汤丰收, 等. 基于 SRAP 分子标记的栽培 种花生遗传连锁图谱构建[J]. 中国油料作物学报, 2010, 32(3): 374-379.
- [26] 吴洁, 谭文芳, 何俊蓉, 等. 甘薯 SRAP 连锁图构建淀粉含量 QTL 检测[J]. 分子植物育种, 2005, 3(6): 841-845.
- [27] 马红勃, 祁建民, 李延坤, 等. 烟草 SRAP 和 ISSR 分子遗 传连锁图谱构建[J]. 作物学报, 2008, 34(11): 1958-1963.
- [28] 葛学亮, 尹洪滨, 毕冰, 等. 黄颡鱼遗传图谱构建及生长 相关性状的 QTL 定位[J]. 水产学报, 2010, 34(2): 185-193.
- [29] 张留所. 凡纳滨对虾分子标记筛选、遗传图谱构建和 QTL 定位[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2006.
- [30] Launey S, Hedgecock D. High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Genetics, 2001, 159: 255-265.
- [31] Li L, Guo X M. AFLP-based genetic linkage maps of the pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg [J]. Marine Biology, 2004, 6: 26–36.
- [32] 战爱斌. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) 微卫星标记的筛选及 应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.

- [33] Lallias D, Beaumont A R, Haley C. et al. A first-generation genetic linkage map of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.) based on AFLP and microsatellite markers [J]. Animal Genetics, 2007, 38(6): 560–568
- [34] Lyttle T W. Segregation distorters [J]. Annu Rev Genet, 1991, 25: 511–557
- [35] Causse M A, Fulton T M, Cho Y G, et al. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population [J].Genetics, 1994, 138: 1251–1274.
- [36] 邱高峰, 堵南山, 赖伟. 日本沼虾染色体及核型的研究[J]. 海洋与湖沼, 1994, 25(5): 493-498.
- [37] Wilson K, Li Y, Whan V, et al. Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus mondon* with amplified fragment length polymorphism [J]. Aquaculture, 2002, 204: 297–300.
- [38] 中村宏,刘萍.十足目(甲壳纲)染色体检索[J]. 国外水产, 1991,1:13-19.
- [39] 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.

Construction of a genetic linkage map for oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) using SSR and SRAP markers

QIAO Hui^{1, 2}, WU Yan², FU Hongtuo^{1, 2}, GONG Yongsheng², JIANG Sufei², XIONG Yiwei²

1. College of Fisheries, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisher-

ies Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: The oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*, is widely distributed throughout China, Japan, Korea, and Burma. This species is of economic importance in China where about 209 000 t are produced annually by intensive culture. However, the economic value of the species has declined significantly in recent years due to genetic retrogression. To facilitate genetic improvements, we constructed a genetic linkage map for oriental river prawn using SRAP and SSR markers and pseudo-testcross mapping. A total of 175 makers including 27 microsatellite and 148 SRAP makers were mapped in 53 linkage groups. The number of markers per group ranged from 2 to 8 and thirty-five groups included no less than three markers. The average number of markers per group was 3.3. The length of groups ranged from 6.7 cM to 91.2 cM (Kosambi). The maximum space between adjacent markers was 49.0 cM while the minimum space was 1.4 cM, with an average distance between markers of 13.1 cM. The framework map contained 16 groups with a length of 997.2 cM. The total length of the map was 2 270.5 cM. The average estimated genome size for oriental river prawn was 4 380.6 cM. Based on the estimated genome lengths, the map accounted for 51.83% of the genome. This is the first genetic linkage map of oriental river prawn. Our data may be used to aid quantitative trait loci (QTL) mapping, gene cloning, and genetic selection. The map also provides a basis for the construction of a higher density genetic linkage map for oriental river prawn.

Key words: oriental river prawn; *Macrobrachium nipponense*; SSR; SRAP; genetic linkage map Corresponding author: FU Hongtuo. E-mail: fuht@ffrc.cn