

中华绒螯蟹 37 个多态性微卫星标记 在亲子遗传中的分离方式分析

熊良伟^{1,2}, 刘志强¹, 严银龙³, 邱高峰^{1*}

(1. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 江苏农牧科技职业学院水产科技系, 江苏 泰州 225300;

3. 上海市水产研究所, 上海 200433)

摘要: 为了研究中华绒螯蟹基因组特征及评估基因组扫描方法获得的中华绒螯蟹候选微卫星标记用于构建遗传图谱的可靠性, 随机选择 60 个候选三核苷酸微卫星标记, 首先利用中华绒螯蟹一个 F_1 家系双亲及其 6 个 F_1 子代共 8 个样品进行 PCR 扩增验证和多态性检测, 随后利用该家系 80 个子代对多态性微卫星标记的亲子遗传分离类型及连锁关系进行分析。结果显示, 42 个 (70.00%) 微卫星位点得到清晰扩增产物, 家系中每个检测位点最多检测到 4 个等位基因, 每个检测个体微卫星位点上有 1 或 2 个等位基因。42 个位点中有 5 个单态微卫星位点和 37 个多态微卫星位点, 多态位点中有 23 个位点的子代基因型比为 1:1:1:1, 11 个位点基因型比为 1:1, 余下 3 个位点基因型比为 1:2:1。在 37 个多态位点中有 35 个位点 (94.59%) 的分离比符合孟德尔分离规律, 连锁关系分析 scaffold240262_150253、scaffold216209_138892、scaffold293154_172768 等 3 个标记之间发生连锁关系, scaffold285640_169721 和 scaffold427534_212914 发生连锁关系, scaffold507500_231891 和 scaffold92860_68250 标记发生连锁关系。研究表明, 中华绒螯蟹是二倍体生物, 利用 F_1 家系结合开发的候选微卫星标记可构建中华绒螯蟹遗传图谱。

关键词: 中华绒螯蟹; 微卫星; 孟德尔分离; 多态性; 连锁分析

中图分类号: Q 785; S 968.2

文献标志码: A

微卫星 DNA (microsatellite DNA), 又称简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR), 一般指基因组中由 1~6 个碱基为重复单元串联组成的 DNA 串联重复序列^[1-2]。微卫星是一种共显性标记, 广泛分布在动植物基因组中, 多态性强、数量丰富, 而且具有 PCR 扩增、检测等实验操作简便等优点, 因此, 微卫星作为一种常用分子标记广泛应用于生物亲子关系鉴定、遗传连锁图谱构建及分子标记辅助选择育种 (molecular marker-assisted selection, MAS) 等研究中^[3-4]。与 AFLP、RAPD 等其他分子标记相比, 用微卫星标

记构建的遗传连锁图可以实现同一物种不同家系和不同实验室构建图谱整合, 也方便利用连锁图谱来构建物理图谱^[5], 因此, 微卫星标记成为构建连锁图谱的理想标记之一, 已广泛应用于鱼^[6]、虾^[7]、蟹^[8]等水产动物遗传图谱构建。

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*), 俗称河蟹, 主要分布在中国长江、辽河、瓯江等流域, 是我国当前最重要的淡水养殖蟹类。中华绒螯蟹的规模化养殖始于 20 世纪 80 年代, 经过 30 多年的人工饲养实践, 中华绒螯蟹人工养殖技术较为成熟, 与其他主要养殖水产动物相比, 中华绒

收稿日期: 2014-09-18 修回日期: 2014-11-03

资助项目: 国家科技支撑计划 (2012BAD26B04); 上海高校水产学一流学科建设项目; 江苏农牧科技职业学院科研项目 (NSFYB1306); 上海市河蟹产业技术体系建设项目 (D8003100208)

通信作者: 邱高峰, E-mail: gfqiu@shou.edu.cn

蟹蟹新品种选育工作研究很少。传统选育方法主要根据生物表现型进行选择,对于生长相关等数量性状选择效率低、成本高;分子标记辅助选择育种利用遗传图谱对目标数量性状进行选择,选择准确,育成速度快。迄今为止,已经开发得到中华绒螯蟹微卫星标记不足 100 个^[9-11],其数量远不满足中华绒螯蟹图谱构建需要。为了构建中华绒螯蟹微卫星标记遗传连锁图谱,服务于中华绒螯蟹分子标记辅助育种,本实验室利用 Solexa 测序方法扫描其基因组,开发得到 15 125 个候选微卫星标记^[12],并随机选取 60 个三核苷酸微卫星标记,在一个中华绒螯蟹 F₁ 家系中扩增,研究该物种基因组特征,判断其是否存在多倍化现象,并评价这些候选标记应用于构建中华绒螯蟹遗传图谱的可靠性。

1 材料与方法

1.1 中华绒螯蟹 F₁ 家系构建及样品采集

2011 年 3 月,用来自于辽宁盘锦某养殖场养殖的中华绒螯蟹为母本,用江苏兴化某养殖场中华绒螯蟹为父本,以一对一交配方法构建 10 个 F₁ 家系,各家系雌雄亲本分别在排幼和交配结束后取肌肉组织浸泡于 100% 酒精并置低温保存。蟹苗室内培育一个月,选择其中 3 个子代较多的家系到室外面积为 667 m² 左右的池塘培育蟹种,5 个月从其中一个家系中随机采集 100 只扣蟹取肌肉样品浸泡于 100% 酒精中置低温保存。家系构建过程均在相对独立的水体中进行,避免不同家系子代混杂。

1.2 DNA 提取及检测

取约 0.20 g 肌肉组织,先用洁净滤纸吸干肌肉中酒精,再用小手术剪剪碎肌肉,置于 37 °C 烘箱中 20 ~ 30 min,待肌肉中酒精完全挥发,加裂解液消化肌肉,采用苯酚-氯仿法提取基因组 DNA,用微量蛋白核酸分析仪测定 DNA 浓度和纯度,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性,将检测符合要求的基因组 DNA 置于 -80 °C 保存备用。

1.3 候选微卫星标记检验及多态位点筛选

从开发出的候选微卫星标记中随机选取三核苷酸微卫星标记 60 个,标记引物由上海生工生物工程公司合成。先用家系父母本和 6 个子代共 8 个个体基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增验证

和多态位点筛选。PCR 反应总体积为 10 μL,其中 DNA 模板(约 10 ng/μL) 1 μL, 2 × Taq PCR MasterMix(北京诺维森) 5 μL,正向和反向引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,去离子水 3 μL。PCR 反应程序:95 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 45 s,最佳退火温度 45 s,72 °C 延伸 1 min,循环 30 次;72 °C 延伸 5 min;4 °C 保存。

PCR 产物用北京六一仪器厂 DYCZ-24B 型加宽垂直电泳槽和 DYY-6C 型电泳仪电源进行电泳,采用 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)进行检测,150 V 电压电泳 8 h,银染法显色^[13]。筛选家系多态性位点,要求家系至少有一个亲本在该位点处于杂合状态。

1.4 多态位点的遗传分析

将筛选到的该家系多态微卫星标记通过 PCR 扩增检测家系 80 个子代在每一个位点的基因型,PCR 扩增体系、扩增程序、各引物退火温度见表 1,电泳检测方法参照“1.3”,银染显色结束后将 PAGE 胶置于观片灯上观察记录每个个体基因型并用照相机拍照保存。亲本及子代在每个多态位点 PCR 扩增条带由小到大分别用字母 A、B、C、D 表示,无效等位基因用 N 表示,每个多态位点等位基因大小用 50 bp DNA Ladder(上海生工)参照判读,个体扩增失败位点基因型用“-”表示,用 SPSS 19.0 软件中的卡方检验分析家系子代在每个多态位点基因型比是否符合孟德尔期望比。

1.5 微卫星标记连锁分析

使用 JoinMap 4.0 软件进行多态性位点连锁分析^[14]。参考软件使用说明书,将家系个体各位点基因型转化成分析软件要求的格式。先点击 File 用“New project”命令创建一个新的文件,再点击 Dataset 用“Create New Datasets”命令创建数据,输入文件名、分析标记个数和个体数,“Pop. type”选择 CP,最后导入家系检测个体在每个标记位点基因型数据。利用 χ^2 检验鉴定各位点子代基因型比值是否符合孟德尔分离比,记录偏离标记;利用“Similarity of Loci”命令去掉值等于 1 的标记;利用“Similarity of individuals”命令去掉相似个体。在基于检测限(limit of detection, LOD)从 3.0 到 10.0 逐渐增加条件下,采用软件中“Grouping Tree”命令将参试标记进行分群,观察标记间连锁关系。

表 1 37 个多态微卫星位点在中华绒螯蟹 F_1 家系的统计信息
 Tab. 1 Statistic information for 37 polymorphic microsatellite loci in an F_1 family of *E. sinensis*

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence	重复单元 repeat motif	T_m / °C	亲本基因型 genotypes of parents		子代基因型 genotypes of progeny	期望比例 expected ratio	观测比例 observed ratio	P
				♀	♂				
scaffold222057_141755	F: TCCTCCTTTGGCACCTAGATGTTCT R: TGGAGGAAAGAAATGACGATGAGTT	(TCT) ₈	62	CD	AB	AC/AD/BC/BD	1:1:1:1	20:16:19:18	0.923 4
scaffold4430598_213690	F: GGCTGAAACAATAACGCTTCAA R: TCCAAGTTTCCCTCCCTCTCTAC	(GAG) ₈	63	AD	BC	AB/AC/BD/CD	1:1:1:1	18:28:21:9	0.020 4*
scaffold296936_174311	F: CCAITCTCTTCTCTCTCTCTCC R: CGAGCTTGTGTTAATTGAATGG	(CCT) ₁₀	63	AA	AB	AA/AB	1:1	41:34	0.418 9
scaffold21303_16865	F: AATCTCTTTTCCCTTACCTTTCTCTCTAC R: AAGAGATTTTAGGACGCTGAGGA	(CTC) ₉	60	BC	AB	AB/AC/BB/BC	1:1:1:1	19:15:10:26	0.049 7*
scaffold180490_120612	F: AATGAAGAAGGGGAAGAGACCAC R: GATCGGAGCTGGGTACGTGTTAT	(AAC) ₁₀	63	AD	BC	AB/AC/BD/CD	1:1:1:1	15:20:20:21	0.763 1
scaffold240262_150253	F: GGAGGAAACTGAGACGAAACAA R: GAGGTGAATGAAATGACTACACGG	(GAT) ₁₀	62	BC	AD	AB/AC/BD/CD	1:1:1:1	20:20:14:20	0.691 7
scaffold449600_218112	F: GGGAGATAAACAGGACCCCTCTGAG R: ACGAGGAGCTGCAGATTGAAGTA	(TCC) ₉	63	BD	AC	AB/AD/BC/CD	1:1:1:1	15:16:28:21	0.151 1
scaffold230655_145766	F: AACCCACTATCAACATTAGTCCCG R: TCTTCTTCAACACCTCCTCCTC	(GAG) ₉	62	AB	NN	AN/BN	1:1	34:38	0.637 3
scaffold441956_216249	F: ACACGCAACACACACACACATAAA R: CCTTCTTCCCTTCCCTTACCT	(AGG) ₉	62.5	BB	AC	AB/BC	1:1	41:34	0.418 9
scaffold285640_169721	F: TCTGTTTTCTATCCGATGGGTC R: GGGAAAGGTGTATACAAAGGGAGG	(CCT) ₉	63	AN	BN	AB/AN/BN/NN	1:1:1:1	26:13:13:19	0.091 1
scaffold507500_231891	F: CGGGCTAACGACGATGTAT R: GCGTCGTCCTTCCCTTATATAAT	(TAC) ₁₃	63.5	CD	AB	AC/AD/BC/BD	1:1:1:1	24:12:14:23	0.103 3
scaffold40005_31072	F: GCTGCAAAAACAACAATTGAAA R: GGGTATGGCCACACGTAGTATATTA	(CTA) ₁₁	63	AB	AA	AA/AB	1:1	40:35	0.563 7
scaffold130570_92282	F: AACTAGGCCAGTAGGGAACCCAGAC R: TATAATGAGGGGTGTTACCCGTG	(CCT) ₉	63	BC	AB	AB/AC/BB/BC	1:1:1:1	21:19:17:18	0.926 2
scaffold427534_212914	F: TTCCTTAACTATATCCGCCCTCC R: TGAGGGGTAATTTGTTTTCTGTCA	(CTC) ₈	63	BB	AN	AB/BN	1:1	39:37	0.818 5
scaffold293154_172768	F: CCAACCCACCTGTAATATGCTTC R: AGAAAAGGTGAAAGGAAAGGACGTG	(TTC) ₁₀	63	BC	AC	AB/AC/BC/CC	1:1:1:1	12:26:18:20	0.153 5
scaffold378118_200349	F: ATTATAAACACCCCAACCCCTCACAC R: TGTGCTTCTGCTCTACTTCTCT	(CTA) ₈	62	AD	BC	AB/AC/BD/CD	1:1:1:1	12:22:25:17	0.160 6
scaffold462348_221359	F: GGTTCGACTCGAGGTGGATAAAC R: AACGTGGAGAAAATGTAGGATCG	(TAC) ₈	63	BB	AC	AB/BC	1:1	32:43	0.204 0
scaffold89014_65649	F: TAAACGAAAGGAAAGGAAATGAAACA G: GCCCCTCGAAGTTAGGAAATACAT	(AGG) ₈	63	AB	AC	AA/AB/AC/BC	1:1:1:1	15:22:23:14	0.319 0
scaffold34278_26927	F: AGGCCTAATACAATGGTTCTTTGG R: CTACCCACGTTCACTTCCAAATC	(GTA) ₈	63	AC	BD	AB/AD/BC/CD	1:1:1:1	18:13:26:18	0.201 3

续表 1

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence	重复单元 repeat motif	T _A / ℃	亲本基因型 genotypes of parents		子代基因型 genotypes of progeny	期望比例 expected ratio	观测比例 observed ratio	P
				♀	♂				
scaffold24580_19418	F:AAAAAAGAGGTAAAAGGAGGAGGAGC R:GTGCAGTGGATGAAAGAGTGAAGA	(GAG) ₁₀	62.5	CD	AB	AC/AD/BC/BD	1:1:1:1	22:25:15:11	0.081 2
scaffold5222679_234602	F:ACAATACGACGACACGTTACCTT R:CTTGTGTAAACCCATCGGTACTGG	(GAG) ₈	63	CC	AB	AC/BC	1:1	39:35	0.641 9
scaffold268305_162698	F:TGTCCACCCCTATCCTTTCAGTT R:ATAATATATGACGCTGGCGATGGT	(CTA) ₈	63	AC	AB	AA/AB/AC/BC	1:1:1:1	13:18:21:22	0.449 0
scaffold186302_123658	F:TACCATCACCCACACTACGATCAC R:TCTTTTCTGGACCTTTAAACCCC	(ACT) ₈	63	AA	BC	AB/AC	1:1	37:37	1.000 0
scaffold216209_138892	F:GGGAGAAAGAAAGAGGAAAGGAA R:CTTCTTTCTCGCTGGCTGCTAAG	(AGG) ₉	63	AC	BN	AB/AN/BC/CN	1:1:1:1	20:19:18:17	0.965 5
scaffold92860_68250	F:TTCATAAAAACGAAGTGGAAACG R:TTTCCTCTTGAAGATCCTCCTCT	(GAG) ₈	63	AB	CC	AC/BC	1:1	40:35	0.563 7
scaffold126473_89738	F:GGTAGACAGATGCCAGGAAAGAA R:ACCATAAAATTCATCCAGAGAAAGCG	(GAG) ₈	63	AB	AN	AA + AN/AB/BN	2:1:1	36:23:15	0.409 9
scaffold229927_145410	F:TGCTTTCCGTTTCTCTATTTTACA R:AAAGCGGGAATTAATTGCTAATCC	(CAA) ₈	62	AD	BC	AB/AC/BD/CD	1:1:1:1	14:17:15:28	0.080 0
scaffold39945_31026	F:CACTTTTCTCATCCAATGATCTCC R:GTAGGATGCTGGATGGTAGGAAGAGA	(CTC) ₉	62	BC	AB	AB/AC/BB/BC	1:1:1:1	17:19:23:15	0.592 4
scaffold143732_100067	F:TAATGAGGTCCTTTGTCCTGTTCC R:CAAAACAAAGAAAGCAAAATAACGA	(TTG) ₉	62.5	AN	BC	AB/AC/BN/CN	1:1:1:1	24:15:20:14	0.314 6
scaffold375585_199635	F:TCGTCACTAGCTTCTCCACCTC R:AGGAAAGAGGAGTCAACAGGAGTCA	(CTC) ₈	63	BC	AC	AB/BC/AC/CC	1:1:1:1	16:24:19:17	0.572 4
scaffold381978_201428	F:CTCAGGATGCAAGCTGTGTTAGAA R:CAAGACAGGTCACCCTTAAGCACT	(GTG) ₈	63	AA	AB	AA/AB	1:1	32:44	0.168 7
scaffold465996_222297	F:GAGATACCTGGATGTTGGGGTACA R:CCGAGTAGAGGAACACATCTCTCC	(AGG) ₉	63	BD	AC	AB/AD/BC/CD	1:1:1:1	28:13:17:17	0.083 8
scaffold141241_98672	F:CCTCCACCTCCTTACCTCATCTT R:AGGGGAATTCAGTTTTAGTACCCA	(TAC) ₈	62.5	AN	AB	AA + AN/AB/BN	2:1:1	37:19:18	0.986 6
scaffold92820_68234	F:GGTGTACGAGGAGTGCAGTA R:ACCAITATGGAGTGGAAATGGTGT	(TAG) ₉	62.5	BD	AC	AB/AD/BC/CD	1:1:1:1	19:17:18:20	0.965 5
scaffold306931_178040	F:CGGCTTCTCCAGTTATGCGTAATA R:AGGAAAGGAAAGGAAAGAAATGCCAA	(ATT) ₈	63	AB	BB	AB/BB	1:1	42:34	0.358 7
scaffold452029_218734	F:CAATTTGCGCTAAATAGATGTCC R:CCTCGAAAGTTGGGGTTAAAGGTA	(AGT) ₉	63	AC	AB	AA/AB/AC/BC	1:1:1:1	19:18:16:22	0.801 3
scaffold214490_138104	F:TACCACATCACAATCCCTTTTCC R:AGTTAAGTGGGAGGATGTGGTTG	(CCT) ₈	63	AB	AB	AA/AB/BB	1:2:1	20:38:19	0.980 7

注：“*”表示该位点显著偏离孟德尔分离定律(P < 0.05)
Notes: “*” means the segregation ratio of the markers was deviated from Mendelian law ratio(P < 0.05)

2 结果

2.1 DNA 提取

将提取的中华绒螯蟹基因组 DNA 用超微量核酸蛋白分析仪检测,结果显示,大多数 DNA 样品 OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.8 ~ 2.0,基因组 DNA 纯度高;DNA 浓度约为 2 800 ng/ μ L,提取的 DNA 产量高;用 0.8% 琼脂糖电泳检测发现,大多数提取的 DNA 片段集中在 23 kb 处,主带清晰,说明提取 DNA 完整性好。最后选择 DNA 提取质量较高的 80 个子代样品稀释到约 10 ng/ μ L 用作 PCR 模板。

2.2 微卫星标记验证及多态位点筛选

60 个候选标记在实验家系亲本及子代共 8 个样品进行 PCR 扩增分析,扩增产物经 12% PAGE 电泳检测。结果显示,其中 18 个 (30.00%) 微卫星位点在 8 个供试样品 PCR 扩增

条带不清晰或条带复杂,个体基因型难以准确统计;42 个 (70.00%) 位点扩增条带清楚,每个扩增微卫星位点有 1 ~ 4 个等位基因,家系中每个测试个体一个位点有 1 ~ 2 个等位基因。42 个微卫星位点中有 5 个位点呈单态,其中 2 个位点亲本基因型为 AA/BB,1 个位点亲本基因型为 AA/NN,2 个位点亲本基因型为 AA/AA (或 AA/AN),其余 37 个位点表现出多态性 (表 1)。

2.3 多态位点的遗传分析

37 个多态性位点在供试的 80 个子代中扩增结果稳定、条带清晰,家系双亲及前 46 个子代在 scaffold427534_212914 等 4 个多态位点分离情况见图 1。在分析的 80 个子代中,第 13、24、28 和 40 号共 4 个子代在大多数微卫星位点出现亲本中未出现的等位基因 (图 1),可以判断该 4 个个体与实验家系亲本间不存在亲子关系,故在多态位点遗传方式分析过程中去掉该 4 个个体。

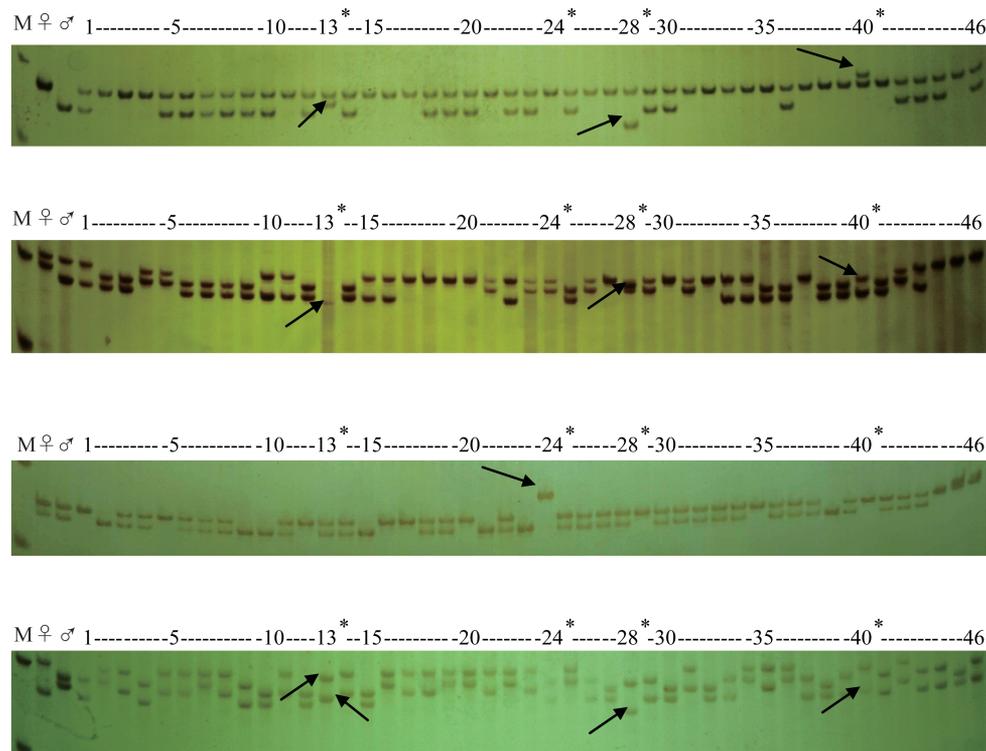


图 1 部分位点 (scaffold427534_212914、scaffold375585_199635、scaffold214490_138104 和 scaffold378118_200349) 在 F_1 家系的分离方式

M. 50 bp DNA Ladder; ♀、♂. 家系雌雄亲本; 1 ~ 46. 家系中前 46 个个体; *. 家系中可疑个体; 箭头显示非家系等位基因

Fig. 1 Segregation pattern of locus scaffold427534_212914, scaffold375585_199635, scaffold214490_138104 and scaffold378118_200349 in an F_1 family of *E. sinensis*

M. 50 bp DNA Ladder; ♀, ♂. male and female parent; 1 - 46. individual code in the family; *. suspicious individual of the family; alleles not belonging to the family are shown with arrows

在 scaffold427534_212914 位点,父本只有一条扩增条带,其基因型为 AA 或 AN,若基因型为 AA 则每个子代都会有 A 等位基因存在,而统计发现有近半数(20/42)子代缺少父本 A 等位基因扩增条带,表明父本是存在无效等位基因的杂合子,基因型应为 AN(图 1)。在对 37 个多态位点遗传方式分析中,共统计家系在其中 7 个(18.92%)位点存在无效等位基因。

37 个位点共有 1:1:1:1(AB × CD/AB × AC/AN × BN/AB × CN)、1:1(AA × AB/AA × BC/AA × BN/AB × NN)和 1:2:1(AB × AB/AN × AB)等 3 种分离类型,其中,23 个位点为 1:1:1:1 的分离类型;11 个位点为 1:1 分离类型;余下 3 个位点为 1:2:1 分离类型(表 1)。对 37 个多态位点基因型分离比进行 χ^2 检验,有 35 个(94.59%)位点的 P 值为 0.080 ~ 1.000 (>0.05)(表 1),位点基因型比值符合孟德尔分离比;而 scaffold430598_213690 和 scaffold21303_16865 的 P 值分别为 0.020 4 和 0.049 7,均小于 0.05,显著偏离 1:1:1:1 的孟德尔分离比,偏分离位点占多态位点的 5.41%。

2.4 微卫星标记连锁分析

在用 JoinMap 4.0 软件进行多态位点连锁分析时先舍去 scaffold430598_213690 和 scaffold21303_16865 偏分离微卫星标记 2 个,余下的 35 个分离标记和家系 76 个子代中没有发现相似位点和个体。在 LOD \geq 3.0 情况下,有 7 个位点发生连锁关系,其中, scaffold240262_150253、scaffold216209_138892、scaffold293154_172768 等 3 个标记发生连锁关系,scaffold285640_169721 和 scaffold427534_212914 发生连锁关系,scaffold507500_231891 和 scaffold92860_68250 发生连锁关系。

3 讨论

无效等位基因是指部分个体由于在引物结合位点存在碱基突变、插入或缺失而导致该位点等位基因不能被合成引物通过 PCR 扩增出来的等位基因。目前,通过重新设计引物、PCR 扩增、测序等方法在大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*)^[15] 和长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[16-17] 等水产动物及人类^[18] 和挪威云杉 (*Picea abies*)^[19] 等生物基因组中证实存在无效等位基因。本研究用筛选的 37

个多态微卫星标记在中华绒螯蟹一个 F_1 家系中扩增,其中 7 个微卫星位点存在无效等位基因,说明同大麻哈鱼等一样,中华绒螯蟹基因组也存在一定比例的无效等位基因。

微卫星在基因组中分布广泛、变异程度高,而且呈共显性遗传,是进行个体识别、亲子鉴定、系谱论证等遗传学研究理想标记,已成功应用于大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[20]、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[21] 等水产动物的亲子关系鉴定。本研究随机选用 60 个候选微卫星标记进行 PCR 扩增,有 42 个标记得得到清晰扩增产物,家系中每个个体在每个微卫星位点得到 1 或 2 个等位基因,家系中双亲每个位点最多检测到 4 个等位基因,说明中华绒螯蟹为二倍体生物,基因组没有加倍现象。37 对多态微卫星标记检测实验中华绒螯蟹家系 F_1 80 个个体基因型,发现第 13、24、28 和 40 号共 4 个子代在多数微卫星位点出现该亲本间不存在的等位基因(图 1),因此,该 4 个个体与该家系亲本不存在亲子关系,可能是在家系育苗或养殖过程中隔离不充分或操作不严谨,导致其他家系个体混入,在微卫星分离方式分析过程中舍去该 4 个个体。微卫星、AFLP 等分子标记的偏分离现象在半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)^[22]、大黄鱼^[23]、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)^[8]、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)^[24] 等水产动物遗传学研究中均有报道,本实验研究的 37 个多态位点中仅有 2 个位点显著偏离孟德尔分离 ($P < 0.05$)。在不考虑样本量和统计误差情况下,偏分离现象的产生说明生物群体中某种类型基因型个体缺失或偏少,发生的原因可能是受精过程中配子间存在选择或环境对某些致死基因进行了选择等^[16,25]。60 个候选微卫星标记在家系中产生 37 个多态标记,绝大部分多态性标记(94.59%)符合预期分离比,连锁分析发现其中有 7 个标记发生连锁关系,从而说明,中华绒螯蟹为二倍体生物,利用开发的候选微卫星标记结合 F_1 作图群体可构建中华绒螯蟹遗传连锁图谱。

参考文献:

- [1] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 16(17): 6463-6471.
- [2] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA) n.

- (dG-dT) n polymorphisms [J]. *Genomics*, 1990, 4 (7): 524 - 530.
- [3] Jarne P, Lagoda P J L. Microsatellites, from molecules to populations and back [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 1996, 10(11): 424 - 429.
- [4] Liu Z, Cordes J. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics [J]. *Aquaculture*, 2004, 1(238): 1 - 37.
- [5] Hubert S, Hedgecock D. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Genetics*, 2004, 1(168): 351 - 362.
- [6] Xia J H, Liu F, Zhu Z Y, *et al.* A consensus linkage map of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on microsatellites and SNPs [J]. *BMC Genomics*, 2010, 1(11): 135 - 151.
- [7] Qiao H, Wu Y, Fu H T, *et al.* Construction of a genetic linkage map for oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) using SSR and SRAP markers [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(2): 202 - 210. [乔慧, 吴滢, 傅洪拓, 等. 应用 SSR 和 SRAP 标记构建青虾遗传连锁图谱. *中国水产科学*, 2012, 19(2): 202 - 210.].
- [8] Liu L, Li J, Liu P, *et al.* A genetic linkage map of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) based on SSR and AFLP markers [J]. *Aquaculture*, 2012 (344): 66 - 81.
- [9] Chang Y M, Liang L Q, Li S W, *et al.* A set of new microsatellite loci isolated from Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 4(6): 1237 - 1239.
- [10] Hanfling B, Weetman D. Characterization of microsatellite loci for the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2003, 1(3): 15 - 17.
- [11] Mao R X, Zhao Y Y, Liu F J, *et al.* Development and characterization of new microsatellite loci from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Conservation Genetics*, 2009, 4(10): 1117 - 1119.
- [12] Xiong L W, Wang Q, Qiu G F. Large-scale isolation of microsatellites from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* via a solexa genomic survey [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 12(13): 16333 - 16345.
- [13] Qu L J, Li X Y, Du Z Q, *et al.* The comparison of denatured and non-denatured PAGE-Silver-Staining detection of PCR product of microsatellites [J]. *Hereditas (Beijing)*, 2004, 26(4): 522 - 544. [曲鲁江, 李显耀, 杜志强, 等. 微卫星 PCR 产物变性与非变性 PAGE-银染检测方法的比较. *遗传*, 2004, 26(4): 522 - 544.]
- [14] Van Ooijen J W. JoinMap[®] 4: Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations [M]. *Plant Research International*, Wageningen, Netherlands: Kyazma BV, 2006.
- [15] Kordicheva S I, Rubtsova G A, Shitova M V, *et al.* A search for null alleles at the microsatellite locus of chum salmon (*Oncorhynchus keta* Walbaum) [J]. *Genetika*, 2010, 8(46): 1143 - 1147.
- [16] Hedgecock D, Li G, Hubert S, *et al.* Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2004, 2(23): 379 - 385.
- [17] Reece K S, Ribeiro W L, Gaffney P M, *et al.* Microsatellite marker development and analysis in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): Confirmation of null alleles and non-Mendelian segregation ratios [J]. *Journal of Heredity*, 2004, 4(95): 346 - 352.
- [18] Callen D F, Thompson A D, Shen Y, *et al.* Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)n microsatellite markers [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1993, 5(52): 922 - 927.
- [19] De Sousa S N, Finkeldey R, Gailing O. Experimental verification of microsatellite null alleles in Norway spruce (*Picea abies*): Implications for population genetic studies [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2005, 2(23): 113 - 119.
- [20] Miao G D, Du M, Yang J F, *et al.* Development of two microsatellite multiplex PCR systems for turbot (*Scophthalmu smaximus*) and its application for family management [J]. *Periodical of Ocean University of China: Natural Sciences*, 2011, 41(1/2): 97 - 106. [苗贵东, 杜民, 杨景峰, 等. 大菱鲆亲子鉴定的微卫星多重 PCR 技术建立及应用. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2011, 41(1/2): 97 - 106.]
- [21] Li J K, Wang Z Y, Wei X J, *et al.* Development and application of three multiplex PCR panels of microsatellites in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(4): 470 - 475. [李佳凯, 王志勇, 韦信键, 等. 大黄鱼微卫星多重 PCR 体系的建立及其应用. *水产学报*, 2014, 38(4): 470 - 475.]
- [22] Jiang L M, Yu H Y, Zhang Q Q, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite markers for half-

- smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and an analysis of segregation in the F_1 [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18 (6): 1384 - 1391. [姜黎明,于海洋,张全启,等.半滑舌鳎微卫星标记的开发及其在 F_1 家系中分离方式分析.中国水产科学,2011,18(6):1384-1391.]
- [23] Liu X D, Wei X J, Cai M Y, *et al.* The segregation patterns of microsatellite markers in an F_1 family of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and correlation analysis with growth-related traits [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36 (9): 1322 - 1330. [刘贤德,韦信键,蔡明夷,等.大黄鱼 22 个微卫星标记在 F_1 家系中的分离方式及与生长性状的相关分析.水产学报,2012,36(9):1322-1330.]
- [24] Baranski M, Gopikrishna G, Robinson N A, *et al.* The development of a high density linkage map for black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) based on cSNPs [J]. PLoS One, 2014, 1 (9): e85413.
- [25] Lyttle T W. Segregation distorters [J]. Annual Review of Genetics, 1991 (25): 511 - 557.

The segregation patterns of 37 polymorphism tri-nucleotide microsatellite markers in an F_1 family of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

XIONG Liangwei^{1,2}, LIU Zhiqiang¹, YAN Yinlong³, QIU Gaofeng^{1*}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education,

Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Department of Aquatic Science and Technology, Jiangsu Agri-animal Husbandry Veterinary College, Taizhou 225300, China;

3. Shanghai Fisheries Research Institute, Shanghai 200433, China)

Abstract: The aim is to study the genomic characteristics and evaluate the candidate microsatellites (or simple sequence repeat, SSR) isolated via a genomic survey for genetic linkage mapping of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. In this study, a set of 60 candidate tri-nucleotide microsatellite markers were randomly selected. Their validation and polymorphism were investigated in an F_1 family of mitten crab using the genomic DNA of the parents and 6 offspring, and the segregation patterns and linkage relationship of polymorphic loci were subsequently investigated in 80 F_1 individuals. The results are as follows: Forty-two primer sets (70.00%) successfully yielded amplicons. The number of alleles per locus of the family varied from 1 to 4, and the number of alleles for each individual per locus was 1 or 2. In the 42 SSRs, 5 SSRs were mono-morphism and 37 SSRs were polymorphism. In the 37 polymorphic loci analysed using the F_1 family, twenty-three loci exhibited a segregation ratio of 1:1:1:1, eleven loci exhibited a segregation ratio of 1:1, and three loci exhibited a segregation of 1:2:1. Polymorphism analysis showed that 35 (94.59%) SSRs consisted with Mendelian segregation ratio, while the other 2 (5.41%) SSRs (scaffold430598_213690 and scaffold21303_16865) deviated from the expected Mendelian segregation pattern. Linkage analysis showed that scaffold240262_150253, scaffold216209_138892 and scaffold293154_172768 had linkage relationship, scaffold285640_16972 and scaffold427534_212914 had linkage relationship, and so had scaffold507500_231891 and scaffold92860_68250. The results suggest that the Chinese mitten crab were diploid and its genetic linkage map could be constructed using the candidate SSRs and an F_1 family.

Key words: *Eriocheir sinensis*; microsatellite; Mendelian segregation pattern; polymorphism; linkage analysis

Corresponding author: QIU Gaofeng. E-mail: gfqiu@shou.edu.cn