

三疣梭子蟹微卫星标记与生长相关性状的相关性分析

刘磊^{1,2}, 李健^{2*}, 刘萍², 赵法箴², 高保全², 杜盈¹, 马春艳³

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

摘要: 选用35个多态性微卫星标记, 对三疣梭子蟹人工选育快速生长自交家系F₂代(以2008年莱州湾群体雄蟹为父本和海洲湾群体雌蟹为母本交配产生F₁代, 随机选取F₁代后代进行交配产生F₂代自交家系)的110个个体进行遗传多样性研究。结果表明: 35个位点共检测出87个等位基因, 各位点等位基因数为2~4个不等, 平均有效等位基因数为2.2个, 观测杂合度平均值为0.6465, 期望杂合度平均值0.5130, 多态信息含量平均值0.4491。经卡方检验, 多数位点显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)偏离Hardy-Weinberg平衡。采用SAS 9.1中的一般线性模型(general linear model, GLM)对微卫星标记与生长相关性状(全甲宽、甲宽、甲长、体高、体质量、第II侧齿间距、第I步足长节长、大螯长节长)进行连锁分析。结果表明, Pot08位点与体质量、全甲宽、甲长、体高、第II侧齿间距显著相关($P<0.05$), Pot42位点与体质量、甲长、大螯长节长、第I步足长节长显著相关($P<0.05$), Pot53位点与全甲宽、甲宽、大螯长节长显著相关($P<0.05$), 与第II侧齿间距极显著相关($P<0.01$), Pot57位点与第I步足长节长显著相关($P<0.05$), PTR8a位点与第I步足长节长、体高、甲长显著相关($P<0.05$), 与体质量、第II侧齿间距、全甲宽、甲宽极显著相关($P<0.01$), PTR30位点与体质量和甲长显著相关($P<0.05$), PTR131位点与体质量、全甲宽、甲宽显著相关($P<0.05$)。其中, 位点PTR8a可作为以体质量为选育目标的首选标记。

关键词: 三疣梭子蟹; 微卫星标记; 相关性分析; 遗传多样性分析

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是一种重要的海洋经济动物, 主要分布于黄海、渤海、东海、南海、日本海等海域, 是我国重要的海水养殖对象^[1-2], 和其它养殖蟹类相比较, 三疣梭子蟹生长快、个体大、肉味鲜美, 含有丰富的营养物质。2009年人工养殖产量达到9.58万t^[3]。但是, 近年来由于种质退化造成的养殖苗种品质下降、病害多发、养殖生态失衡等现象日益严重。中国水产科学研究院黄海水产研究所自2005年起, 用传统选育和生物技术相结合的方法, 经过多代选育, 获得三

疣梭子蟹快速生长新品系, 新品系生长速度较野生对照组提高13.89%。由于新品系不同家系或者家系不同个体的一些生长相关性状如全甲宽、体质量等差别较大。因此, 为了获得优良生长性状稳定遗传的新品种, 该品系需要进一步选育和遗传评价。

遗传改良的快速方法是找到控制生长性状的主效基因或遗传标记, 进而通过分子标记辅助选择(marker-assisted selection, MAS)缩短世代间隔, 提高新品种选择的效率和准确性。进行分子标记辅助选择, 首先要实现标记和性状的连锁

收稿日期: 2011-12-09 修回日期: 2012-02-20

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A409); 农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室开放课题(开-10-02)

通讯作者: 李健, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

分析或数量性状位点 (quantitative trait loci, QTL) 定位。微卫星是近年来发展迅速的分子标记, 在水产动物的研究中应用广泛^[4-5], 鱼类育种中借助微卫星进行性状连锁分析或 QTL 定位已有报道^[6-9]。已有微卫星标记应用于三疣梭子蟹遗传多样性分析^[10]、家系鉴定^[11]、遗传连锁图谱的构建^[12]等方面, 但未实现 QTL 定位和连锁分析。本研究选择 35 个微卫星标记, 探讨这些标记与三疣梭子蟹生长相关性状(全甲宽、甲宽、甲长、体高、体质量、第 II 侧齿间距、第 I 步足长节长、大螯长节长)之间的相关性, 为 QTL 定位和 MAS 提供数据支持。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

2007 年从三疣梭子蟹海洲湾野生群体中挑选个体大, 发育良好的 30 只未交尾雌蟹, 10 只未交尾雄蟹, 进行雌雄比 3 : 1 交配。2008 年 4 月培育出 F₁ 代家系。2009 年 8 月从 F₁ 代家系中挑选符合上述条件的雌、雄蟹。按照雌雄比 3 : 1 的方式进行家系内交配, 越冬后于 2010 年 4 月培育出 F₂ 带家系, 家系父母本保存。同年 7 月上旬, 当 F₂ 代幼蟹长至 100 日龄时[平均体质量(100±0.5) g], 采用地笼捕获法, 随机取一个家系的 110 个个体, 生长性状测量完毕后编号, 取新鲜大螯部肌肉, 样品收集后保存于-80 °C 超低温冰箱中。

1.2 实验方法

生长性状的测量和个体获得 参照刘磊等^[11]的方法。三疣梭子蟹 100 日龄。用游标卡尺(精确到 0.1 mm)测量全甲宽、甲宽、甲长和体高, 用天平(精确到 1 g)测量体质量。

基因组 DNA 的提取 微卫星 DNA 的提取参照刘萍等^[13]的方法, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, GENEQUANTpro (Pharmacia Biotech Ltd) RNA/DNA 定量。

PCR 反应条件 微卫星引物序列见表 1。25 μL 总反应体积, 包括 100 ng 三疣梭子蟹基因组 DNA 模板(50 ng/μL), 10 mmol/L 10×buffer(Mg²⁺ free), 2.0 mmol/L MgCl₂ (25 mmol/L), 0.2 mmol/L dNTP (10 mmol/L each), 引物各 0.8 μmol/L, 1.0 U Taq DNA 酶 (5 U/μL)。反应条件为 94 °C 预变性 5 min ; 然后 94 °C 变性 40 s , 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min,

25 个循环; 72 °C 延伸 5 min , 4 °C 保存。

扩增产物的处理 PCR 产物在 SDS-PAGE 中分离, 银染法显色, 定影。凝胶干燥后扫描仪扫描记录凝胶图像。条带模糊个体重复进行 PCR 反应, 保证统计条带清晰和结果准确性。

统计分析 用 PopGene 3.2 软件进行数据处理、遗传多样性分析, 计算等位基因数(numbers of the alleles, N_a), 有效等位基因数(numbers of the effective alleles, N_e), Hardy-Weinberg 平衡检验(P 值), 期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)及观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)。参照 Botstein 等^[14] 的方法计算多态性信息含量(polymorphism information content, PIC):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \frac{n-1}{n} \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2P_i P_j$$

式中, P_i、P_j 分别为群体中第 i 和第 j 个等位基因频率, n 为等位基因数。

用 SAS 9.1 软件中的一般线性模型(GLM)对三疣梭子蟹生长相关性状与 35 个微卫星标记相关性进行分析。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果和 SDS-PAGE 检测结果

35 个微卫星位点在 110 个个体中经过 PCR 扩增和 SDS-PAGE 检测, 均能扩增出清晰的条带, 且均具多态性。图 1 和图 2 分别显示位点 PTR8a 和

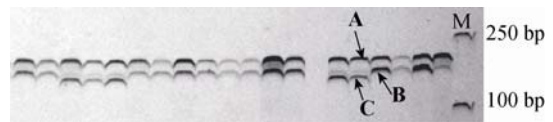


图 1 PTR8a 在三疣梭子蟹 F₂ 家系部分个体的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 Electrophoresis pattern of PCR product of partial individuals in the F₂ family of *P. trituberculatus* amplified with microsatellite marker PTR8a

M denotes DNA marker DL2000.

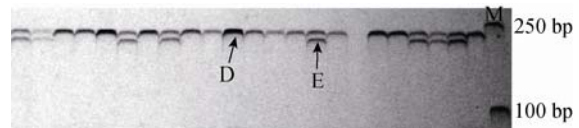


图 2 Pot57 在三疣梭子蟹 F₂ 家系部分个体的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 Electrophoresis pattern of PCR product of partial individuals in the F₂ family of *P. trituberculatus* amplified with microsatellite marker Pot57

M denotes DNA marker DL2000.

表 1 三疣梭子蟹微卫星引物信息
Tab.1 Characteristics of the 35 polymorphic microsatellite loci from *P. trituberculatus*

位点 locus	引物序列(5'—3') primer sequence	重复序列 repeat motif	片段长度/bp size	退火温度/°C T_m	GenBank 登录号 GenBank accession no.
Pot07	F:ATCGTGACCTGAGAAGAGCA R:CCCAAACCTGGCTAATCAATG	(TCA) ₈ (GCA) ₅ ...(TAG) ₄ CAG(TAG) ₆	185-215	58	GQ463626
Pot08	F:CCACACGAAAAATGCAACTG R:TCACCGTGCAGAAATTGAAAG	(GA) ₁₂	200-215	60	GQ463627
Pot09	F:CTTTCAATTCTGCACGGTGA R:ACCTAACCCCTGCCCCATCC	(TAGGT) ₇	190-205	60	GQ463628
Pot10	F:GAACGAAAAGGCTGGGTAAAT R:TTCTGTACACCTGCCATCA	(CA) ₃₁	180-225	60	GQ463629
Pot12	F:TTGTGTGCGAAATGAGGAAG R:CAACAAACACCGACAACAACA	(AG) ₃₅	175-246	60	GQ463631
Pot14	F:AGCGTCTGTCAAAGGAAGGA R:CCAACAAGAAGCGAGTCTCC	(TG) ₂₂	154-167	60	GQ463633
Pot16	F:CACAAAACCTGCCATCCTTA R:TTAGTGTGCGTATGTCATCC	(CAG) ₅ (CAA) ₂	135-189	59	GQ463635
Pot17	F:TTTGCTCTACCTTCTCACC R:ATGCAATCATGTTTTCGTCT	(TAG) ₁₆ ...(TAG) ₁₄	215-242	55	GQ463636
Pot18	F:CGCTGTATCATAGCCCTTGC R:GGGCTTTGGAAAAAGATGTGA	(AC) ₉ AT(AC) ₂₂ AT(AC) ₄ GG(AC) ₁₅	202-243	60	GQ463637
Pot25	F:AGGAAAATGAGACGCACAGG R:CGAAAAACCAACTTCACAGG	(TTA) ₁₆	176-238	60	GQ463644
Pot30	F:GTCTAGTGATTCTGCCCGTA R:CCACCACCACTACTACCAAT	(GTA) ₁₀	135-206	55	GQ463649
Pot31	F:TGCCTTCCCATCTGATAAC R:AGCCATAAAGGAAACCAGCA	(GT) ₃ GC(GT) ₄ ...(AG) ₉	187-244	60	GQ463650
Pot34	F:AGGAATGGTTGCAAAGATCG R:TGGACTTGACACTCACCTC	(GT) ₁₀ AT(GT) ₇ AT(GT) ₂₁	156-239	60	GQ463653
Pot42	F:TCATCACACAGGCTCACTCA R:CATCTTCCACCTTCTCCAA	(CT) ₁₀	164-226	60	GQ463661
Pot44	F:ATTCACCTATTTCGCACTGCT R:GCAAGGGAAAAATAGAAGACA	(CACT) ₈ CAAC(CACT) ₄ CAGC(CACT) ₃ CATT(CACT) ₄	178-237	55	GQ463663
Pot48	F:CTTCACGTTTCCGTTTTTCG R:GGTGGGAGACAATCTTGACC	(CT) ₁₂	134-173	60	GQ463667
Pot53	F:TTGCTGCTGCTGTTACTGCT R:CCTCCTCGTAACTTGGGATG	(TAC) ₁₀ ...(TAC) ₁₈	180-241	60	GQ463672
Pot54	F:CGTCGTATGCCTGAAGTGAG R:TCCTTCTCTCCAACCAAGA	(GT) ₃₀	164-211	60	GQ463673
Pot56	F:TCACAGGACATTCATACACC R:CAGACAATATTCTTACCTACCC	(GT) ₃₈	167-230	54	GQ463675
Pot57	F:TCTCAITTTCTCCCCCTCCT R:TCCTCCTTCTGCTGACCAC	(CCA) ₃ TTG(CCA) ₇ TCA(CCA) ₂	153-206	60	GQ463676
PTR8a	F:AAGGACAGACCGAGGAT R:TTCAGGGCATAAACAAGG	(TG) ₂₂ ...(GT) ₂₁	202-233	55	GQ466021
PTR10	F:TGGTGTATGCCGCAACT R:CAAACGAAAGGGTTAATGT	(TC) ₁₄ (TG) ₃₅ ...(GT) ₃₀ (TG) ₁₄	195-245	54	GQ466023
PTR16a	F:TTGCGGAAGTAATAACG R:TGACGGAGATCGGTTGTG	(CA) ₂₃ ...(AC) ₁₉ ...(AG) ₂₁	112-154	53	GQ466024
PTR30	F:CCATTCTGCCTTGTCTTC R:TCTTACCCATTACGGAGC	(AC) ₁₁ (AC) ₂₈	246-367	58	GQ466028
PTR33a	F:ACAACGCCAACAATAGCA R:CACCGCACTTACAGCAC	(CT) ₁₆ ...(GT) ₃₉	359-442	63	GQ466030
PTR45	F:AGAGGAGTGACTGGAGGGTA R:TAAGGCTAAGGACAGGATGA	(AC) ₁₅ ...(CA) ₁₁	250-317	63	GQ466032
PTR54	F:TGAGCTGGATGGATTGAA R:GGTCTCTGGCTTGTGAA	(AC) ₃₂	250-353	57	GQ466033
PTR81	F:GCAAAGGTGCCACAGTCC R:TCACCCAGCCAGTCTTCC	(AC) ₃₅	367-438	61	GQ466037
PTR93	F:AAGACAAAGCGACAAGCC R:CGCAATAACTCCAACAA	(TG) ₉ ...(TG) ₃₃	250-321	56	GQ466039
PTR95	F:CCTTGCCTTCACTATAACAC R:GACCCACTTGTATCGTTTT	(GT) ₃₁ ...(CCT) ₅ ...(TCA) ₅ (TCT) ₆	312-359	58	GQ466041
PTR98a	F:GGATGAAGAGGAGGACTG R:TGGTGGAGGATTATGAGA	(CTA) ₇ ...(CTA) ₁₄ ...(TC) ₃₁	169-204	56	GQ466042
PTR100	F:ACCTATTATTGCTAAGTGA R:CAAGTGATTGTGCTGTCT	(GT) ₉ (GT) ₈ (GT)	250-367	53	GQ466043
PTR103b	F:GGAGTGTGGTGGTGGGT R:AGGATTGGTATGCCGAGA	(GT) ₂₈ ...(TGT) ₈	258-283	61	GU177171
PTR131	F:GTGGAACAGTAAGCAAACG R:AACCAAACAAAGGTAGTGAAG	(AC) ₁₆	375-404	65	GU177193
PTR135	F:TTACACTCTGGCTCCTG R:ATTGGCTTATGTCACCTC	(TG) ₁₄ ...(AG) ₁₂	227-268	56	GU177196

Pot57在三疣梭子蟹 F_2 家系部分个体中的扩增结果, A、B、C、D、E 分别为两位点得到的等位基因, 已用箭头标出。

2.2 遗传多样性分析

用 PopGene 3.2 软件进行数据处理、遗传多样性分析, 结果如表 2 所示。35 个微卫星位点等位基因数为 2~4, 共得到 87 个等位基因, 平均有效等位基因数为 2.2 个。观测杂合度为 0.247 2~0.667 7, 平均值为 0.487 0, 期望杂合度为 0.332 3~0.752 8, 平均值

为 0.513 0, 多态信息含量为 0.283 0~0.702 4, 平均值为 0.449 1。经卡方检验, 大部分位点显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 位点 PTR54, PTR131, PTR135 符合 Hardy-Weinberg 平衡。

2.3 三疣梭子蟹微卫星标记与生长相关性状的相关性分析

采用 SAS 9.1 软件中的一般线性模型(GLM)进行方差分析和 Duncan 氏多重比较, 对微卫星位点和各性状进行连锁显著性检验。分析结果表明:

表 2 35 个微卫星位点在家系中的检测值
Tab. 2 Detective values of thirty five microsatellite loci

位点 locus	等位基因数 N_a	基因型数 N_g	有效等位基因数 N_e	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量 PI_C	P_{HWE}
Pot07	2	2	1.796 7	0.763 6	0.445 5	0.345 1	**
Pot08	3	4	2.408 2	0.454 5	0.587 4	0.516 4	**
Pot09	3	3	2.346 8	0.481 8	0.576 5	0.510 8	**
Pot10	2	2	1.680 1	0.472 7	0.406 6	0.322 9	**
Pot12	2	2	1.494 2	0.445 5	0.332 3	0.276 1	**
Pot14	4	4	3.943 3	0.572 7	0.749 8	0.699 1	**
Pot16	2	2	1.756 0	0.690 9	0.432 5	0.337 8	**
Pot17	2	2	1.623 2	0.800 0	0.385 7	0.310 2	**
Pot18	4	4	3.965 9	0.363 6	0.751 3	0.700 7	**
Pot25	3	2	2.662 0	0.472 7	0.627 2	0.533 8	**
Pot30	2	2	1.657 5	0.363 6	0.398 5	0.318 0	**
Pot31	3	4	2.466 1	0.781 8	0.597 2	0.527 2	**
Pot34	2	2	1.691 2	0.436 4	0.410 6	0.325 2	**
Pot42	3	4	2.611 4	0.545 5	0.619 9	0.547 3	**
Pot44	3	4	2.581 3	0.309 1	0.615 4	0.543 8	**
Pot48	3	2	2.648 0	1.000 0	0.625 2	0.551 0	**
Pot53	4	4	3.990 1	0.754 5	0.752 8	0.702 4	**
Pot54	2	2	1.611 6	0.572 7	0.381 2	0.307 5	**
Pot56	3	3	2.767 9	0.518 2	0.641 6	0.564 1	**
Pot57	2	2	1.541 4	1.000 0	0.352 8	0.289 6	**
PTR8a	3	4	2.599 1	0.663 6	0.618 1	0.546 1	**
PTR10	2	3	1.936 0	0.681 8	0.485 7	0.366 6	**
PTR16a	3	4	2.798 0	0.736 4	0.645 5	0.569 6	**
PTR30	2	2	1.541 4	0.545 5	0.352 8	0.289 6	**
PTR33a	2	3	1.936 0	0.509 1	0.485 7	0.366 6	**
PTR45	3	4	2.530 3	1.000 0	0.607 6	0.537 1	**
PTR54	2	3	1.999 8	0.563 6	0.502 2	0.375 0	NS
PTR81	2	2	1.517 8	1.000 0	0.342 7	0.283 0	**
PTR93	2	2	1.657 5	0.454 5	0.398 5	0.318 0	**
PTR95	2	3	1.786 8	1.000 0	0.442 3	0.343 4	**
PTR98a	3	4	2.787 1	1.000 0	0.644 1	0.568 3	**
PTR100	2	3	1.657 5	0.790 9	0.398 5	0.318 0	*
PTR103b	2	2	1.564 9	0.418 2	0.362 6	0.295 9	**
PTR131	2	3	1.929 7	0.836 4	0.484 0	0.365 7	NS
PTR135	2	3	1.963 5	0.627 3	0.492 9	0.370 3	NS
平均值 mean	2.514 3	2.885 7	2.212 8	0.646 5	0.513 0	0.449 1	

注: P_{HWE} 为 Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验; **表示偏离极显著($P<0.01$), *表示偏离显著($0.01<P<0.05$)。表 3 同。

Notes: P_{HWE} is possibilities to fit Hardy-Weinberg equilibrium test. NS demonstrates conformance. The double superscript(**) demonstrates significant departure, while the single superscript(*) means departure, same to those in Table 3.

35 个微卫星位点中,有 7 个微卫星位点分别与各性状显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)相关。Pot08 位点与体质量、全甲宽、甲长、体高、第 II 侧齿间距显著相关($P<0.05$), Pot42 位点与体质量、甲长、大螯长节长、第 I 步足长节长显著相关($P<0.05$), Pot53 位点与全甲宽、甲宽、大螯长节长显著相关($P<0.05$), 与第 II 侧齿间距极显著相关($P<0.01$), Pot57 位点与第 I 步足长节长显著相关($P<0.05$), PTR8a 位点与第 I 步足长节长、体高、甲长显著相关($P<0.05$), 与体质量、第 II 侧齿间距、全甲宽、甲宽极显著相关($P<0.01$), PTR30 位点与体质量和甲长显著相关($P<0.05$), PTR131 位点与体质量、全甲宽、甲宽显著相关($P<0.05$)。

2.4 显著相关的标记位点各基因型间重要经济性性状的多重比较

7 个微卫星位点基因型与各性状的最小二乘均值见表 3。对差异显著的标记根据不同基因型间的不同性状进行 Duncan 氏多重比较。

由表 3 可见,在三疣梭子蟹微卫星 Pot08 座位上, AB、BC 基因型个体的体质量、全甲宽、甲长和体高的均值显著高于 AC、CC 基因型的个体,推测等位基因 B 对体质量、全甲宽、第 II 侧齿间距、甲长和体高具有正效应。

在微卫星 Pot42 座位上, AC 基因型个体体质量、甲长、大螯长节长和第 I 步足长节长均值显著高于 AA、AB、BC 基因型个体,说明基因型 AC 对体质量、甲长、大螯长节长和第 I 步足长节长具有正效应。

在微卫星 Pot53 座位上, BD 和 CD 基因型个体全甲宽、甲宽、大螯不动指长、大螯长节长、第 II 侧齿间距均值显著高于 AB 和 AC 基因型个体,说明等位基因 D 对全甲宽、甲宽、大螯不动指长、大螯长节长、第 II 侧齿间距具有正效应。

在微卫星 PTR8a 座位上, AB 和 BC 基因型个体第 I 步足长节长、体高、甲长、体质量、第 II 侧齿间距、全甲宽、甲宽均值显著高于 AC 和 CC 基因型个体,其中 AC 和 BC 基因型差异最大,各性状分别相差 2.3 mm、1.6 mm、2.7 mm、14.1 g、2.6 mm、8.5 mm、4.5 mm,说明等位基因 B 对全甲宽、甲宽、大螯不动指长、大螯长节长、第 II 侧齿间距具有正效应,位点 PTR8a 可以作为以体质量为选育目标的首选标记。

在微卫星 PTR30 座位上, BB 基因型个体体质量

和甲长均值显著高于 AB 基因型个体,推测等位基因 A 对体质量和甲长具有负面效应。

在微卫星 PTR30 座位上, BB 基因型个体体质量、全甲宽、甲宽均值显著高于 AA 基因型个体,与 AB 基因型个体差异不显著,说明基因型 BB 对在体质量、全甲宽和甲宽上起正面作用。

3 讨论

3.1 微卫星标记应用于三疣梭子蟹近交家系生长相关性状的连锁分析

分子标记为实现对基因型的直接选择提供了可能,如果目标基因与某个分子标记紧密连锁,那么通过对分子标记基因型的检测,就能获知目标基因的基因型,称为标记辅助选择(MAS)^[15-16]。而大量精确的数量性状位点定位(QTL)是实现 MAS 的基础。遗传背景的干扰和分离群体大小是影响 QTL 定位精度的两个重要因素,本研究成功构建可用于 QTL 和连锁分析的 F₂ 代家系作为分离群体,并取得 110 个个体进行分析,排除了遗传背景和分离群体大小对连锁分析的负面影响。标记与性状之间的连锁分析,是根据标记位点的基因型以及数量性状的表型对个体进行显著性检验,差异显著则说明标记与数量性状存在关联^[17]。借助微卫星进行性状连锁分析或 QTL 定位,在禽畜育种中已有广泛的研究^[18-19],在水产动物育种也有较多报道。由于三疣梭子蟹染色体数较多($2n=106$)^[20],基因组信息量庞大,进行 QTL 定位需要大量的遗传标记,而三疣梭子蟹遗传标记的开发较少,不足以满足遗传作图和 QTL 定位的需要。所以,有必要应用有限的微卫星标记对三疣梭子蟹生长相关性状进行连锁分析,旨在寻找与三疣梭子蟹生长性状相关的标记,最终为将分子标记辅助育种应用于三疣梭子蟹的选育提供依据。

3.2 三疣梭子蟹家系遗传多样分析

N_e 、 H 和 PIC 都是度量群体遗传变异的参数。等位基因在群体中分布的越均匀,即各个等位基因的频率越接近,有效等位基因数是反映群体遗传变异大小的一个指标,等位基因在群体中分布越均匀,其数值越接近所检测到的等位基因的绝对数^[21]。本研究中,35 个位点共检测出 87 个等位基因,统计有效等位基因数为 77,接近于实际等位基因数,表明所检测的基因座位的等位基因在

表 3 7 个微卫星位点不同基因型在表型性状上的多重比较

Tab. 3 The correlation analysis between genotype of the seven microsatellites and the phenotypic traits					
位点 locus	基因型 genotype	数量 no.	全甲宽 FCW	甲宽 CW	甲长 CL
Pot08	AB	10	124.9590±2.7048 ^a	64.8910±1.4667 ^a	57.2990±1.1797 ^a
	AC	50	119.3750±1.2096 ^{ab}	61.5556±0.6559 ^b	55.1766±0.5276 ^{ab}
	BC	27	121.9929±1.6460 ^a	62.6604±0.8926 ^{ab}	56.1274±0.7179 ^a
	CC	23	116.1378±1.7835 ^b	60.8739±0.9671 ^b	53.5804±0.7778 ^b
Pot42	AA	27	116.4833±1.6594 ^b	60.4193±0.8936 ^b	53.6463±0.7197 ^b
	AB	34	120.8614±1.4787 ^{ab}	62.3803±0.7963 ^{ab}	55.9929±0.6413 ^a
	AC	25	122.8824±1.7246 ^a	63.4684±0.9287 ^a	56.3400±0.7479 ^a
	BC	24	119.0383±1.7601 ^{ab}	61.6525±0.9478 ^{ab}	54.9542±0.7633 ^{ab}
Pot53	BD	31	122.5213±1.5410 ^a	64.0681±0.8140 ^a	56.5745±0.6711 ^a
	CD	25	121.9964±1.7160 ^a	62.5392±0.9064 ^a	56.0268±0.7473 ^a
	AB	20	117.2225±1.9185 ^a	60.4775±1.0134 ^a	54.0410±0.8355 ^a
Pot57	AC	34	117.6000±1.4936 ^a	60.6200±0.7889 ^a	54.2973±0.6505 ^a
	AB	50	119.3918±1.2508 ^a	61.8532±0.6685 ^a	55.0228±0.5437 ^a
	BB	60	120.2288±1.1418 ^a	62.0993±0.6102 ^a	55.4745±0.4964 ^a
PTR8a	AB	30	122.1033±1.5247 ^{ab}	63.4063±0.8120 ^{ab}	56.1280±0.6827 ^a
	AC	25	115.6164±1.6703 ^c	59.5128±0.8895 ^c	53.9360±0.7479 ^b
	BC	21	124.1743±1.8224 ^a	64.0333±0.9705 ^a	56.6500±0.8160 ^a
PTR30	CC	34	118.2985±1.4322 ^{bc}	61.2915±0.7628 ^{bc}	54.6388±0.6413 ^{ab}
	AB	50	118.4450±1.2388 ^a	61.3590±0.6637 ^a	54.3964±0.5327 ^a
	BB	60	121.0178±1.1309 ^a	62.5112±0.6058 ^a	55.9965±0.4863 ^b
PTR131	AA	13	114.8207±2.3994 ^b	59.0330±1.2802 ^b	53.0361±1.0438 ^b
	AB	63	119.8267±1.0900 ^a	62.1967±0.5815 ^a	55.3000±0.4742 ^a
	BB	34	121.8109±1.4837 ^a	62.7294±0.7916 ^a	56.0659±0.6454 ^a
位点 locus	体高 BH	第 II 侧齿间距 SOMW	第 I 步足长节长 MLFP	大鳌长节长 MLC	体质量 BW
Pot08	32.3880±0.6698 ^a	47.1790±0.8805 ^a	27.6820±0.8764 ^a	40.1830±1.4829 ^a	114.7000±5.9869 ^a
	30.9716±0.2995 ^b	45.5078±0.3938 ^{ab}	27.1432±0.3919 ^a	39.4960±0.6632 ^a	100.8300±2.6774 ^b
	31.5111±0.4076 ^{ab}	46.0859±0.5358 ^{ab}	27.0556±0.5334 ^a	39.4248±0.9025 ^a	106.8444±3.6435 ^{ab}
	31.2278±0.4416 ^b	44.3904±0.5805 ^b	26.5787±0.5779 ^a	39.1717±0.9778 ^a	94.9826±3.9477 ^b
Pot42	30.3819±0.4136 ^b	44.4515±0.5387 ^b	25.6737±0.4960 ^c	38.2489±0.8664 ^b	93.5778±3.6525 ^b
	31.3759±0.3686 ^{ab}	45.9762±0.4801 ^{ab}	27.1735±0.4420 ^b	38.6556±0.7721 ^b	105.3264±3.2549 ^a
	31.6428±0.4298 ^a	46.3744±0.5599 ^a	28.6712±0.5155 ^a	41.7144±0.9004 ^a	108.2240±3.7957 ^a
	30.8475±0.4386 ^{ab}	45.4058±0.5715 ^{ab}	26.7467±0.5261 ^b	39.6742±0.9190 ^{ab}	101.8583±3.8741 ^{ab}
Pot53	31.5813±0.3827 ^b	46.7203±0.4849 ^a	27.8665±0.4863 ^a	41.6503±0.8058 ^a	108.6839±3.4168 ^a
	31.4980±0.4261 ^a	46.4352±0.5400 ^a	27.2476±0.5415 ^a	39.1480±0.8974 ^a	106.1760±3.8048 ^a
	31.0660±0.4764 ^a	44.5825±0.6038 ^a	26.2250±0.6055 ^{ab}	37.8715±1.0033 ^a	97.5600±4.2539 ^a
	30.3891±0.3709 ^{ab}	44.4764±0.4700 ^a	26.7630±0.4713 ^b	38.7048±0.7810 ^a	97.0030±3.3117 ^a
Pot57	31.0198±0.3087 ^a	45.3650±0.4044 ^a	26.4666±0.3830 ^a	39.3826±0.6579 ^a	101.4480±2.7674 ^a
	31.1252±0.2818 ^a	45.7372±0.3692 ^a	27.5410±0.3497 ^b	39.5487±0.6006 ^a	103.0917±2.5262 ^a
	31.5540±0.3856 ^{ab}	46.0947±0.5006 ^{ab}	27.6343±0.4860 ^a	40.1763±0.8315 ^{ab}	108.4667±3.4216 ^a
PTR8a	30.3444±0.4224 ^c	44.3228±0.5484 ^c	25.7184±0.5324 ^b	37.9040±0.9109 ^b	95.7680±3.7483 ^b
	31.9452±0.4609 ^a	46.9133±0.5984 ^{ab}	27.9671±0.5809 ^a	41.0976±0.9938 ^a	109.6381±4.0897 ^a
	30.6594±0.3622 ^{bc}	45.1879±0.4703 ^b	26.9555±0.4565 ^{ab}	39.0032±0.7811 ^{ab}	97.2735±3.2141 ^b
PTR30	30.7550±0.3059 ^a	45.3304±0.4041 ^a	26.5648±0.3854 ^a	39.0048±0.6552 ^a	97.9860±2.7110 ^b
	31.3458±0.2793 ^a	45.7660±0.3689 ^a	27.4592±0.3518 ^a	39.8635±0.5981 ^a	105.9767±2.4748 ^a
	30.0323±0.5945 ^b	44.4246±0.7828 ^b	26.4231±0.7660 ^a	38.5400±1.2883 ^a	90.4923±5.2887 ^b
PTR131	31.0168±0.2700 ^{ab}	45.4289±0.3556 ^{ab}	27.0400±0.3480 ^a	39.2930±0.5852 ^a	102.3507±2.4025 ^a
	31.5888±0.3676 ^a	46.2629±0.4840 ^a	27.3167±0.4737 ^a	40.1638±0.7966 ^a	106.8647±3.2703 ^a

群体中分布较均匀,在短期三疣梭子蟹选育过程中,选择压力还不足以使所选择的基因座位等位基因在群体中分布不均匀。多态性信息含量(PIC)是等位基因频率和等位基因数的变化函数,是衡量一个遗传标记所包含的或能提供的遗传信息容量的较好指标^[22]。根据 Botstein 等^[14]提出的多态信息含量(PIC)是衡量基因变异程度的指标,本实验 35 个多态位点中,15 个位点为高度多态位点 ($PIC > 0.5$),其余 20 个位点为中度多态位点 ($0.25 < PIC < 0.5$),多态信息含

量平均值 0.449 1,表明所选微卫星标记多态性较丰富,可作为有效的遗传标记用于三疣梭子蟹遗传多样分析和相关分析。杂合度是评价遗传变异的参数之一,本实验 35 个多态位点中,观测杂合度平均值为 0.646 5,期望杂合度平均值 0.513 0,说明该家系还具有较大的遗传变异和遗传多样性,选择潜力大。经卡方检验,多数位点显著 ($P < 0.05$)或极显著 ($P < 0.01$)偏离 Hardy-Weinberg 平衡,结果与陈蒙等^[23]研究结果一致。这可能是家系个体间都存

在亲缘关系,导致标记偏离平衡的现象。同时也说明群体内的基因型频率发生了较大的改变,这种改变与杂交、选择等因素有着密切的关系^[24]。

3.3 生长相关性状和微卫星标记的相关性

标记和性状连锁分析是根据标记位点的基因型以及数量性状的表型对个体进行显著性检验,差异显著则说明标记与数量性状存在关联。因此,如果一个群体的性状差异显著,或两个群体的差异很大,就可以通过标记与性状的相关分析,找出性状与一个或多个标记的遗传相关,一旦发现显著相关,即可认为存在一个数量性状位点,从而实现从表型到基因型选择育种的转变^[25]。显著性和极显著相关结果中,与体质量相关的位点有 5 个,与全甲宽、甲长相关的位点分别有 4 个,与甲宽、第 I 步足长节长、第 II 侧齿间距相关的位点分别有 3 个,与体高、大鳌长节长相关的位点分别有 2 个。在这些关联中,出现了一个标记同几个性状相关,或者几个标记同一个性状相关,说明这些位点存在一因多效或多因一效的现象,并符合数量性状位点 (QTL) 的定义。也说明这些性状可能是由一个以上的 QTL 所控制。遗传相关可以用来描述不同性状之间由于遗传原因造成的相关程度大小,实际为两性状基因型值间的相关。刘磊等^[26]遗传相关研究表明,三疣梭子蟹全甲宽、甲宽、甲长、体高分别与体质量遗传相关较大,说明它们之间的基因型值相关较大。本研究中与体质量相关的位点 Pot08, Pot42, PTR8a, PTR30 和 PTR131 与全甲宽、甲宽、甲长和体高等性状皆都存在显著的相关性,说明本研究结果和形态数据分析的研究结果一致,符合一因多效或多因一效的现象。PTR8a 位点与体重、第 II 侧齿间距、全甲宽、甲宽极显著相关 ($P < 0.01$),有可能作为以体质量为选育目标的首选标记。有关三疣梭子蟹 QTL 定位的研究在国内外尚未见到报道,由于没有与三疣梭子蟹生长相关的 QTL 结果比较,本试验所得遗传标记结果需进一步分析和验证。

参考文献:

- [1] 薛俊增, 堵南山, 赖伟. 中国三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 的研究[J]. 东南海洋, 1997, 15(1): 60-65.
- [2] 戴爱云, 杨思谅, 宋玉枝. 中国海洋蟹类[M]. 北京:

海洋出版社, 1986: 213-214.

- [3] 农业部渔业局. 中国渔业年鉴 2010[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [4] Chistiakov D A, Tsigenopoulos C S, Lagnel J, *et al.* A combined AFLP and microsatellite linkage map and pilot comparative genomic analysis of European sea bass *Dicentrarchus labrax* L [J]. *Animal Genetics*, 2008, 39: 623-634.
- [5] Guyomard R, Mauger S, Tabet-Canale K, *et al.* A type I and type II microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with presumptive coverage of all chromosome arms [J]. *BMC Genomics*, 2006, 7: 302. doi: 10.1186/1471-2164-7-302.
- [6] Cnaani A, Hallerman E M, Ron M, *et al.* Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F2 tilapia hybrid [J]. *Aquaculture*, 2003, 223: 117-128.
- [7] Rodriguez M F, Lapatra S, Williams S, *et al.* Genetic markers associated with resistance to infectious hematopoietic necrosis in rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) backcrosses [J]. *Aquaculture*, 2004, 241: 93-115.
- [8] 孙新, 魏振邦, 孙效文, 等. 镜鲤繁殖群体的遗传结构及微卫星标记与经济性状的相关性分析[J]. *遗传*, 2008, 30(3): 359-366.
- [9] 李建林, 唐永凯, 陈文华, 等. 吉富罗非鱼微卫星标记与体质量、体形性状相关性分析[J]. *中国水产科学*, 2009, 16(6): 824-832.
- [10] 李晓萍. 三疣梭子蟹微卫星富集文库的构建及五个野生地理群的多样性分析[D]. 青岛: 中国水产科学, 2010.
- [11] 刘磊, 李健, 刘萍, 等. 微卫星 DNA 标记用于三疣梭子蟹家系亲子关系的鉴定[J]. *渔业科学进展*, 2010, 31(5): 76-82
- [12] 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.
- [13] 刘萍, 孔杰, 石拓, 等. 中国对虾黄、渤海沿岸地理群的 RAPD 分析[J]. *海洋学报*, 2000, 22(5): 88-94.
- [14] Botstein D, White R L, Skolnick M. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [15] 李素红. 中国对虾选育群体的抗病特征分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2007.
- [16] 王高富, 吴登俊. 凉山半细毛羊微卫星标记与羊毛性状的相关分析[J]. *遗传*, 2006, 28(12): 1505-1512.
- [17] Ovilo C, Perez-Enciso M, Barragan C, *et al.* A QTL for intramuscular fat and backfat thickness in lacated on porcine chromosome 6 [J]. *Mammalian Genome*, 2000, 11: 344-346.
- [18] 孙桂荣, 田亚东, 康相涛, 等. 微卫星标记与商品代固始鸡体型参数和屠体性状的关联分析 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2007, 35(8): 49-54.

- [19] 邵根宝, 贾超, 赵茹茜, 等. 猪 13 号染色体部分微卫星标记与肉质性状关系的研究[J]. 遗传学报, 2005, 32(5): 476-480.
- [20] 朱东发, 王春琳, 李志强. 三疣梭子蟹核型分析[J]. 水产学报, 2005, 29(5): 649-653.
- [21] Hines H C, Zikakis J P, Haenlein G F, *et al.* Linkage relationships among loci of polymorphism in blood and milk of cattle [J]. Dairy Science, 1981, 64(14): 71-76
- [22] 朱广琴, 王利心, 孙瑞萍, 等. 6 个微卫星基因座与西农萨能奶山羊产羔数相关性的研究[J]. 中国农业大学学报, 2008, 13(3): 63-69.
- [23] 陈蒙, 常亚青, 孙谦, 等. 虾夷扇贝群体的遗传结构及微卫星标记与体尺、体重的相关性分析[J]. 大连水产学院学报, 2009, 24(4): 311-316.
- [24] 朱晓东, 耿波, 李娇, 等. 利用 30 个微卫星标记分析长江中下游银鲫群体的遗传多样性[J]. 遗传, 2007, 29(6): 705-713.
- [25] 钟金城, 陈智华. 分子遗传学与动物育种[M]. 成都: 四川大学出版社, 2001.
- [26] 刘磊, 李健, 高保全, 等. 三疣梭子蟹不同日龄生长性状相关性及其对体重的影响[J]. 水产学报, 2009, 33(6): 965-972.

Correlation analysis of microsatellite DNA markers with growth related traits of swimming crab (*Portunus trituberculatus*)

LIU Lei^{1,2}, LI Jian^{2*}, LIU Ping², ZHAO Fa-zhen², GAO Bao-quan², DU Ying¹, MA Chun-yan³

(1. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

Abstract: In this study, total 35 microsatellite DNA markers were selected to analyze the genetic structure of 110 individuals in an F₂ family which is obtained by directional mating techniques for the selective program on fast growing *Portunus trituberculatus*. (The F₂ family was created by F₁ family which was generated by wild populations from Laizhou Bay and Zhoushan Island.) The results showed that total 87 different alleles were found, and the number of alleles was 2 to 4 in each locus, with 2.2 effective alleles on average. The value of mean observed heterozygosity, the value of mean expected heterozygosity and the mean Polymorphism Information Content (PIC) was 0.646 5, 0.513 0 and 0.449 1, respectively. The probability value of chi-square test showed that most of the loci deviated from Hardy-Weinberg equilibrium significantly. The GLM procedure in SAS9.1 was used to analyze the correlation between these 35 microsatellite markers and growth related traits of *P. trituberculatus*. The growth related traits included full carapace width, body weight, carapace width, carapace length, body height, second orbital margin width, meropodit length of the claw, meropodit length of the first peraeopod. Results indicated that Pot08 had a significant impact on full carapace width, body weight, carapace length, body height, second orbital margin width; Pot42 had a significant impact on body weight, carapace length, meropodit length of the claw, meropodit length of the first peraeopod; Pot53 had a significant impact on carapace width and meropodit length of the claw, and had a very significant impact on second orbital margin width; Pot57 and PTR30 had a significant impact on meropodit length of the first peraeopod and carapace length, body weight, respectively; PTR8a had a significant impact on the first peraeopod and carapace length, body height, and had a very significant impact on body weight, second orbital margin width, full carapace width and carapace width; PTR131 had a significant impact on body weight, full carapace width and carapace width. Finally, PTR8a can be used for marker assisted selection which could be used for body weight selection.

Key words: *Portunus trituberculatus*; microsatellite; correlation analysis; genetic polymorphism

Corresponding author: LI Jian. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn