

文章编号: 1674 - 5566(2012)05 - 0650 - 06

## 利用 AFLP 方法筛选中华绒螯蟹性别相关标记

吕慧锋, 江学慧, 邱高峰

(上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 利用 AFLP (amplified fragment length polymorphism) 技术筛选中华绒螯蟹性别相关标记, 共使用 192 对引物组合检测中华绒螯蟹雌、雄和雌雄混合 3 个基因组池的多态性, 共扩增出 5 376 条多态性条带, 平均每对引物组合扩增出 28 条多态性条带, 获得 88 条雌雄差异条带。利用雌雄各 10 个个体再次进行 AFLP 验证, 共 62 条差异条带具有性别差异, 包括两种情况: (1) 有 49 条条带在雌性的 4~6 个个体中存在, 在雄性全部个体中缺失; (2) 有 13 条条带在雄性 4~6 个个体中存在, 在所有的雌性个体中缺失; 其余的 26 条没有性别差异性。差异条带经回收、克隆、测序, 结果发现有些条带包含多个序列, 共得到 77 条 DNA 序列, 其中 31 条序列与鸟类、两栖类和哺乳类等脊椎动物性染色体 DNA 部分片段具有同源性, 相似区间在 22~212 bp 不等, 其中 6 条 DNA 序列与命中序列之间具有生物学相关性。设计特异性的引物在基因组中检测, 没有获得性别特异 SCAR 标记。

**研究亮点:** 中华绒螯蟹是我国重要经济蟹类, 本研究应用 AFLP 技术首次分析了中华绒螯蟹雌、雄个体基因组的差异, 获得了性别差异片段, 克隆得到与其他动物性别染色体相关的片段序列, 发现其在雌、雄基因组中均存在, 暗示其存在于常染色体中, 并未汇集形成性染色体, 该结果可为理解中华绒螯蟹性别决定机制提供参考。

**关键词:** 中华绒螯蟹; AFLP; 性别标记; 性染色体

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 属于十足目 (Decapoda) 方蟹科 (Grapsidae) 绒螯蟹属 (*Eriocheir*), 又称河蟹, 是我国重要的经济蟹类。据全国渔业经济统计, 2010 年河蟹产量高达 59.33 万吨, 占全国淡水养殖产量的 2.53%。研究其性别分子标记, 可以帮助建立河蟹单性化养殖体系<sup>[1]</sup>, 避免雄蟹生长快, 导致的在蜕壳、争食、残杀斗争中对雌蟹的伤害, 做到了平衡生长, 使河蟹死亡率降低, 回捕率提高, 对进一步推动河蟹产业发展具有重要意义。

由于虾蟹等十足类甲壳动物有丝分裂染色体数目多, 且呈点状, 核型分析困难, 至今均未发现异型性染色体的存在<sup>[2-4]</sup>, 十足类甲壳动物的性别决定机制尚不明确。随着分子标记技术的发展, 利用分子标记研究动物性别决定机制成为

可能。AFLP (amplified fragment length polymorphism) 分子标记技术继承了 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 与 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 技术的优点, 省去了 RFLP 的繁杂过程, 同时又克服了 RAPD 稳定性差的缺点, 已成功应用于许多动植物分子标记筛选、遗传多样性研究以及高密度遗传图谱的构建。在鱼类中, 应用 AFLP 技术在半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis Gunther*)<sup>[5]</sup> 和尼罗罗非鱼 (*Tilapia nilotica*)<sup>[6]</sup> 均获得了性别差异 AFLP 标记, 并成功地转化为 SCAR (sequence characterized amplified region) 标记。在十足类甲壳动物中, 利用 AFLP 技术在罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)<sup>[7]</sup> 和斑节对虾 (*Penaeus monodon*)<sup>[8]</sup> 中均成功获得了雌性特异 SCAR 标记。应用

收稿日期: 2012-03-30 修回日期: 2012-05-07

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2012BAD26B04); 上海市河蟹产业技术体系建设项目 (D8003100208); 上海市科学技术委员会重点科研项目 (09391911100); 上海市教育委员会海洋生物学重点学科建设项目 (J50701)

作者简介: 吕慧锋 (1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为虾蟹类遗传育种与繁殖。E-mail: feng371269101@126.com

通讯作者: 邱高峰, E-mail: gfqiu@shou.edu.cn

AFLP 技术在锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 中发现雌雄个体基因组间存在 DNA 序列上的差异,筛选出了性别相关分子标记的候选片段,但未见 SCAR 报道<sup>[9]</sup>。本研究采用 AFLP 技术,筛选中华绒螯蟹雌雄基因组 DNA 差异片段,为寻找与其性别相关的分子标记,进行遗传性别鉴定以及进一步研究性别分化机制提供了理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用中华绒螯蟹雌、雄各 20 只,购自上海浦东新区果园农贸市场,取其肌肉迅速放入液氮中速冻,置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下保存备用。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 DNA 的提取

取中华绒螯蟹肌肉组织约 0.2 g,基因组 DNA 的提取参照《分子克隆实验指南》中 SDS 的提取方法。提取后用分光光度计检测其 OD 值,并在 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳中检测。

#### 1.2.2 酶切反应

选取雌雄各 20 个个体 DNA,各自混合成雌、雄两个 DNA 池,同时各取两个池中的一部分 DNA 做成雌雄混合池。分别选取 200 ng 基因组 DNA 用 *MseI/EcoRI* 进行酶切。酶切体系:10 × Buffer 1  $\mu\text{L}$ ;基因组 DNA 200 ng;限制性内切酶各 4 U;补无菌去离子水到 10  $\mu\text{L}$ 。37  $^{\circ}\text{C}$  消化 3 ~ 5 h,65  $^{\circ}\text{C}$  灭活 20 min。

#### 1.2.3 双链接头的制备

终浓度为 5 pmol/ $\mu\text{L}$  的 *EcoRI* 接头和终浓度为 50 pmol/ $\mu\text{L}$  的 *MseI* 接头如表 1。反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  10 min ;75  $^{\circ}\text{C}$  1 min ;70  $^{\circ}\text{C}$  2 min,69.8  $^{\circ}\text{C}$  2 min,69.6  $^{\circ}\text{C}$  2 min,分别设置温度降落 0.6  $^{\circ}\text{C}$ ,33 个循环;50  $^{\circ}\text{C}$  19 min;50  $^{\circ}\text{C}$  1 min,49.5  $^{\circ}\text{C}$  1 min,49  $^{\circ}\text{C}$  1 min,分别设置温度降落 1.5  $^{\circ}\text{C}$ ,14 个循环。

#### 1.2.4 连接接头

建立 20  $\mu\text{L}$  连接体系,包括 10 × Buffer 2  $\mu\text{L}$ ,酶切片段 10  $\mu\text{L}$ ,*EcoRI*、*MseI* 双链接头各 1.5  $\mu\text{L}$ ,*T<sub>4</sub>* 连接酶 0.5  $\mu\text{L}$  (1.5 U),补去离子水到 20  $\mu\text{L}$ ,16  $^{\circ}\text{C}$  连接过夜,稀释 10 倍备用。

#### 1.2.5 预扩增建立 25 $\mu\text{L}$ 的反应体系

10 × PCR Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ;25 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  1.5  $\mu\text{L}$ ;2.5 mmol/L dNTP 2  $\mu\text{L}$ ,预扩增引物各 1

$\mu\text{L}$ ,*Taq* DNA 聚合酶 1.5 U,连有接头的 DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ,补无菌水到 25  $\mu\text{L}$ 。反应程序为 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min;94  $^{\circ}\text{C}$  5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,56  $^{\circ}\text{C}$  1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,20 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。然后用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测酶切与预扩增结果。

#### 1.2.6 选择性扩增

将预扩增产物用无菌去离子水稀释 50 ~ 100 倍作为选择扩增的模板,反应体系与预扩增相同,反应程序为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,65  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  90 s,13 个循环,每个循环复性温度降 0.7  $^{\circ}\text{C}$ ;然后 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,56  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  90 s,25 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

#### 1.2.7 电泳

用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。6% 的变性胶配方:尿素 21 g,40% 丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺 (19:1) 7.5 mL,10 × TBE 5 mL,10% APS 450  $\mu\text{L}$ ,TEMED 35  $\mu\text{L}$ ,去离子水 20.5 mL,溶解后体积为 50 mL。电泳液为 1 × TBE,恒功率 65 W 预电泳 30 min,期间加入 10  $\mu\text{L}$  载样缓冲液 (98% 去离子甲酰胺 9.8 mL,10 mmol/L EDTA 0.2 mL,0.25% 溴酚蓝 0.025 g,0.25% 二甲苯青 0.025 g),95  $^{\circ}\text{C}$  5 min,然后迅速插到冰上 10 min,变性后取 6  $\mu\text{L}$  上样,电泳到适合位置停止。

#### 1.2.8 银染

电泳结束后室温冷却,凝胶板放入 0.1% 硝酸银染色 15 min,取出在蒸馏水中冲洗 2 ~ 3 次,放入显色液 (20 g 氢氧化钠,0.4 g 无水碳酸氢钠,加 10 mL 甲醛定容至 1 L) 中显色至条带清晰可见,取出胶板停止显色反应。

#### 1.2.9 差异条带的回收、克隆及测序

用干净无污染的刀片切下性别差异条带,切碎后加入 20  $\mu\text{L}$  无菌去离子水,65  $^{\circ}\text{C}$  水浴 40 min,离心回收上清液作为模板。用相应的引物组合扩增放大,反应体系和反应条件与选择性扩增相同,电泳检测后回收、克隆、测序。将测序结果在 NCBI 上进行相似性比对,并设计特异引物在 10 个雄性个体和 10 个雌性个体基因组中进行特异性扩增检验。

## 2 结果

共选用了 192 对引物组合 (表 1),对中华绒螯蟹雌、雄及雌雄混合 3 个 DNA 池进行 AFLP 分

析。结果显示:AFLP 条带主要集中在 100 bp ~ 500 bp 之间,带型稳定,分布均匀,能清楚地分辨出差异条带(图 1)。在中华绒螯蟹的基因组池中共扩增出 5 376 条多态性条带,平均每对引物扩增出 28 条多态性条带,获得雌雄差异条带 88 条,其中雌性差异条带为 72 条,雄性差异条带为 16 条,雌性条带数明显多于雄性。为了进一步验证差异片段,利用获得差异片段的引物组合,分别对中华绒螯蟹雌、雄各 10 个个体进行了第二轮的 AFLP 验证。结果显示,性别差异性的条带有 62 条,带型与混合样分析一致,非性别差异条带有 26 条(图 2)。将差异条带进行割胶回收、克隆、测序。

表 1 AFLP 接头及引物序列

Tab.1 The sequences of AFLP adaptors and primers

| 名称               | 序列   |
|------------------|--|
| <i>Eco</i> RI 接头 | 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'<br>3'-CTG ACG CAT GG TTAA-5'  |
| <i>Mse</i> I 接头  | 5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'<br>3'-TA CTC AGG ACT CAT-5'  |
| 预扩增引物            | <i>Eco</i> RI-A: 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'<br><i>Mse</i> I-C: 5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3'  |
| 选择性引物            | E1-AAC E2-AGG E3-AGC E4-ACT E5-ACG<br>E6-AAC E7-ACA E8-AAG M1-CTT M2-CAA<br>M3-CAT M4-CTG M5-CTC M6-CAG M7-CTA<br>M8-CAC M9-GCA M10-GCT M11-GCC M12-GCG<br>M13-GGA M14-GGT M15-GCC M16-GGG<br>M17-GAG M18-GAA M19-GAT M20-GAC<br>M21-CTC M22-GTA M23-GTT M24-GTC |

通过克隆测序,由于在 AFLP 胶上的有些条带(多见于小片段)并不是由单序列组成的,它包含了大小相似的多个 DNA 序列,所以共获得 77 个 DNA 序列。在 NCBI 中进行 BLAST 比对,其中有 31 条序列与哺乳类的 X 染色体、Y 染色体,两栖类的 X 染色体,鸟的 Z 染色体等性染色体 DNA 片段有部分同源性(表 2),同源片段大小为 22 ~ 212 bp,相似性在 70% ~ 96% 不等。其中片段 E2M8-138 与斑节对虾精巢生长和性别分化相关的标记具有较高的相似性,相似性可达 97%,另外 E2M2-149 片段同时与多个物种的性染色体相关。然而根据片段序列设计特异性引物,进行 SCAR 标记的转化,结果在雌性和雄性中均获得了目的条带,没有发现性别特异的 SCAR 标记。

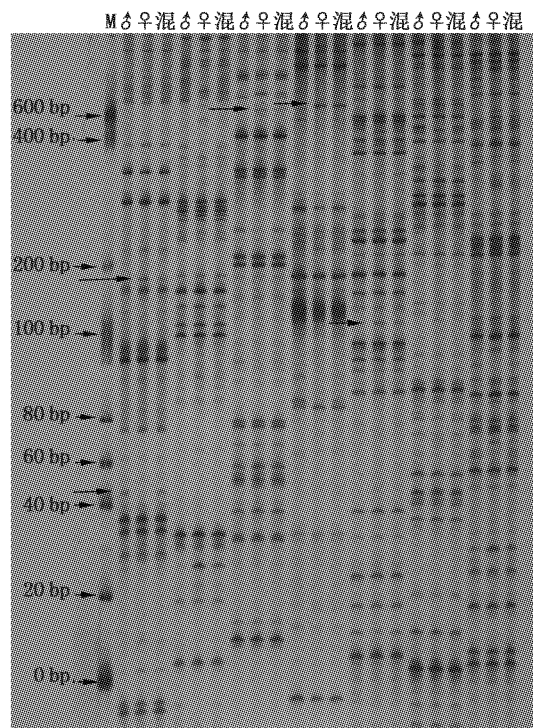


图 1 不同引物组合对雌雄 DNA 混合池的 AFLP 筛选

Fig.1 AFLP analysis of the male bulks, female bulks and mix bulks using different primer combinations

引物组合由左到右为 E1M6、E2M1、E2M2、E5M3、E8M1、E8M2、E8M6,黑色箭头表示差异的条带,3 个泳道为一组,分别为雄、雌、混合样。

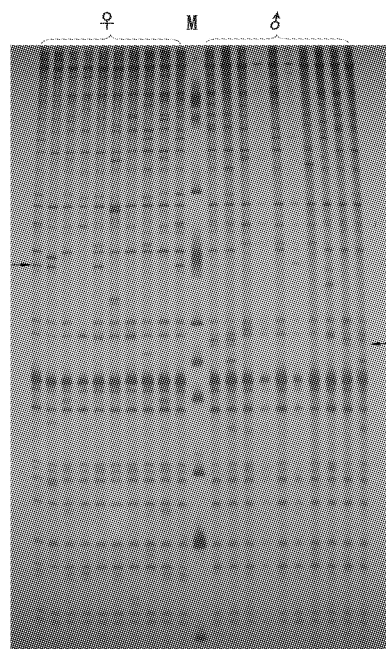


图 2 引物 E1M6 对雌雄 10 个个体的 AFLP 验证

Fig.2 AFLP validation of 10 females and 10 males using primer combinations E1M6

命中序列期望值(E-value)倾向于  $< 1e-04$  的数,说明命中序列和目标序列具有生物学相关性,E-value 越大,命中序列和目标序列之间的相似性仅仅是出于偶然的机会就越多。在生物信

息学一般把 E-value  $> 1e-04$  的结果认为是不可信的。本研究结果显示有 6 个片段的 E-value  $< 1e-04$ (表 2),说明这些片段与各自的命中序列之间具有生物学相关性。

表 2 性别相关序列在 NCBI 上的 BLAST 比对  
Tab. 2 BLAST on NCBI of sex-associated sequences

| 克隆 | 序列名称      | 相关物种 | BLAST N                     | E-value | 相似片段<br>大小/bp | 总分数  | 差异性 |   |
|----|-----------|------|-----------------------------|---------|---------------|------|-----|---|
|    |           |      |                             |         |               |      | ♂   | ♀ |
| 1  | E2M2-355  | 原鸡   | 染色体 Z 的 CH261-105D16        | 0.003   | 39            | 51.8 | -   | + |
| 2  | E2M2-349  | 老鼠   | 染色体 X 的 RP23-14614          | 1e-07 * | 58            | 189  | -   | + |
| 3  | E2M2-149  | 原鸡   | 染色体 Z 的 CH261-25P17         | 0.012   | 32            | 48.2 | -   | + |
| 4  | E2M7-125  | 斑节对虾 | 精巢生长和分化的 AFLP 标记            | 7e-23 * | 59            | 335  | -   | + |
| 5  | E2M8-153  | 老鼠   | X 染色体上的 RP23-30514          | 0.51    | 37            | 42.8 | -   | + |
| 6  | E2M8-138  | 斑节对虾 | AFE19M19.1 精巢生长和分化的 AFLP 标记 | 5e-07 * | 36            | 232  | -   | + |
| 7  | E5M1-193  | 猪    | X 染色体上的 CH242-453E12        | 0.85    | 41            | 42.8 | +   | - |
| 8  | E8M3-214  | 老鼠   | X 染色体上的 RP23-256J17         | 0.079   | 32            | 46.4 | -   | + |
| 9  | E6M19-102 | 老鼠   | Y 染色体 BAC RNAEX-308A01      | 0.009   | 63            | 48.2 | -   | + |
| 10 | E6M19-84  | 老鼠   | X 染色体上的 RP23-213K6          | 0.27    | 41            | 42.8 | -   | + |
| 11 | E2M22-380 | 老鼠   | Y 染色体 BAC RNECO-67P11       | 1e-12 * | 212           | 378  | -   | + |
| 12 | E4M23-71  | 黑猩猩  | Y 染色体的 CH251-267E22         | 0.73    | 30            | 41   | -   | + |
| 13 | E4M23-69  | 原鸡   | X 染色体上的 CH261-21B1          | 0.057   | 38            | 44.6 | -   | + |
| 14 | E4M23-97  | 猪    | X 染色体上的 CH242-149K13        | 2e-05 * | 70            | 140  | -   | + |
| 15 | E4M23-71a | 黑猩猩  | Y 染色体的 CH251-267E22         | 0.73    | 30            | 41   | +   | - |
| 16 | E6M24-181 | 老鼠   | Y 染色体的 CH250-448F15         | 4e-05 * | 108           | 144  | -   | + |

注:差异性中的“-”代表不存在差异片段;“+”代表存在差异片段; \* 表示符合生物信息学 E 值可信度标准的片段。

### 3 讨论

本研究应用了 192 对引物组合对中华绒螯蟹的基因组进行了 AFLP 分析,筛选出 77 条性别差异的候选片段,有 31 条与脊椎动物性染色体相关,其中 6 条 DNA 序列与命中序列之间具有生物学相关性(表 2),值得注意的是片段 E2M2-149 同时与哺乳类、鸟类、两栖类等多种脊椎动物的性染色体相关,说明它在进化过程中较保守,可能随着物种性染色体的进化而一直保留着。进一步验证 31 条性别相关片段,没有获得性别特异 SCAR 标记。但本实验室同时以罗氏沼虾为研究对象,仅用 64 对引物就获得了两个雌性特异的 SCAR 标记,说明本研究在技术方法上不存在缺陷,在第二轮用雌、雄各 10 个个体进行 AFLP 个体验证时,发现差异条带只在雌性的 4~6 个个体中存在,而雄性中完全缺失或者只在雄性 4~6 个个体中存在,在雌性个体完全缺失,最后都不能成功转化成性别特异的 SCAR 标记,而在罗氏沼虾成功转化成 SCAR 标记的两个片段,在第二轮个体验证时在雌性的 10 个个体中均存在

而在雄性的 10 个个体中均缺失,由此说明第二轮 AFLP 个体验证结果就能清楚预示后续能否成功转化成 SCAR 标记。

与罗氏沼虾相比,本研究虽然进行了更大规模筛查,但未获得性别差异的 SCAR 标记,可能是由于中华绒螯蟹的染色体数目( $2n = 146$ )远大于罗氏沼虾的染色体数目( $2n = 118$ ),还需要更多的引物组合覆盖整个基因组才能获得性别特异性标记。另外也有可能是因为虾和蟹之间存在不同的性别决定机制,中华绒螯蟹可能缺少性染色体。迄今,通过性逆转个体与正常个体交配后代的性比证明罗氏沼虾性别决定为 ZZ/ZW 遗传决定型<sup>[10]</sup>,暗示其存在性染色体,而中华绒螯蟹性别决定机制尚不明确。在鱼类中,已成功鉴定出性别差异标记的鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[11]</sup>,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[12]</sup>,太平洋鲑鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)<sup>[13]</sup>中,均有性染色体的存在。相反在没有成功获得性别差异标记的青斑河豚(*Tetraodon nigroviridis*)<sup>[14]</sup>,斑节对虾<sup>[15]</sup>和鲟鱼(*Acipenser baerii*)<sup>[16]</sup>中,都没有发现性染色体,由此说明性染色体的存在是获得性别特异

标记的前提条件。

许多研究表明,性染色体早期是由常染色体进化而来,通过其他常染色体中性别相关片段富集,逐步凝集而成<sup>[17]</sup>。对黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的Y染色体基因组分析表明所有的Y连锁基因可能来源于常染色体<sup>[18-19]</sup>。在普通卷甲虫(*A. vulgare*)中报道了在常染色体中存在一个显性雌性雄性化基因(M)<sup>[20]</sup>,本研究虽然没有获得性别差异 SCAR 标记,但是获得了性别相关片段,并且它们在雌雄基因组中同时存在,推测中华绒螯蟹性染色体可能处于原始类型,与性别相关分子标记散落在常染色体上尚未汇集形成性染色体。

#### 参考文献:

- [1] 张士罡,李为学,邱海波. 河蟹雌雄分养获高效[J]. 渔业致富指南,2011(9):43-44.
- [2] 邱高峰,楼允东,顾功超. 南美白对虾染色体的研究[J]. 上海水产大学学报,1997,6(1):50-53.
- [3] 姜叶琴,谢树海,周琴. 秀丽白虾染色体核型的初步分析[J]. 水产科学,2008,27(9):470-472.
- [4] 张天澍,王玉凤. 罗氏沼虾的染色体研究[J]. 华中师范大学学报:自然科学版,2003,37(2):231-232.
- [5] CHEN S L, LI J, DENG S P. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Marine Biotechnology, 2007, 9(2):273-280.
- [6] EZAZ M T, HARVEY S C, BOONPHAKDEE C. Isolation and physical mapping of sex-linked AFLP markers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Marine Biotechnology, 2004, 6(5):435-445.
- [7] VENTURA T, AFLALO E D, WEIL S. Isolation and characterization of a female-specific DNA marker in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Heredity, 2011, 107(5):456-461.
- [8] STAELENS J, ROMBAUT D, VERCAUTEREN I. High-density linkage maps and sex-linked markers for the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Genetics Society of America, 2008, 179(2):917-925.
- [9] 王艺磊,戴军,姚扬烈. 利用 AFLP 技术筛选锯缘青蟹性别差异 DNA 片段[J]. 中国水产科学,2004,11(4):286-290.
- [10] 解焱. 罗氏沼虾的性别决定机制及性逆转[J]. 国外水产,1994(3):10-11.
- [11] WANG D, MAO H, PENG J. Discovery of a male-biased mutant family and identification of a male-specific SCAR marker in gynogenetic gibel carp *Carassius auratus gibelio* [J]. Progress in Natural Science, 2009, 19(11):1537-1544.
- [12] FELIP A, YOUNG W P, WHEELER P A. An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquaculture, 2005, 247(1/4):35-43.
- [13] KOVACS B, EGEDI S, BARTFAI R. Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. Genetica, 2000, 110(3):267-276.
- [14] LI Y, HILL J A. Extensive search does not identify genomic sex markers in *Tetraodon nigroviridis* [J]. Fish Biology, 2002, 61:1314-1317.
- [15] KHAMNAMTONG B, THUMRUNGTANAKIT S, KLINBUNGA S. Identification of sex-specific expression markers in the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 39(1):37-45.
- [16] WUERTZ S, GAILLARD S, BARBISAN F. Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker [J]. Aquaculture, 2006, 258(1/4):685-688.
- [17] BACHTROG D. A dynamic view of sex chromosome evolution [J]. Current Opinion in Genetics and Development, 2006, 16(6):578-585.
- [18] CARVALHO A B, LAZZARO B P, CLARK A G. Y chromosomal fertility factors kl-2 and kl-3 of *Drosophila melanogaster* encode dynein heavy chain polypeptides [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(24):13239-13244.
- [19] CARVALHO A B, DOBO B A, VIBRANOVSKI M D. Identification of five new genes on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(23):13225-13230.
- [20] RIGAUD T, JUCHAULT P. Conflict between feminizing sex ratio distorters and an autosomal masculinizing gene in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr [J]. Genetics Society of America, 1993, 133(2):247-252.

## Isolation of the sex-associated fragments in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) using AFLP technique

LÜ Hui-feng, JIANG Xue-hui, QIU Gao-feng

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In the present study, amplified fragment length polymorphism (AFLP) was used for the isolation of sex-associated markers in the genome of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. By screening the male, female and male/female mix bulks with 192 selective AFLP primer combinations, we obtained 5 376 polymorphic fragments in total, each combination generated 28 fragments on average. A total of 88 sex difference AFLP candidates were retrieved. Subsequently, the candidates were further verified in 10 female and 10 male individuals by AFLP again. Sixty-two sex difference fragments were obtained finally, and they could be classified into two groups: (1) Thirteen bands were present in four to six male crabs and absent in all female crabs; (2) Forty-nine bands were present in four to six female crabs, but absent in all male crabs. No sex difference was found in the other 26 bands. The sex difference fragments were recovered, cloned and sequenced. The results showed that multiple sequences presented in some bands. Seventy-seven DNA sequences were obtained, thirty-one of which shared partial homology with sex chromosomal DNA sequence of birds, amphibians and mammals. The length of identical sequences ranged from 22 to 212 bp. Among them, six sequences had biological relevance with hit sequences. The SCAR (sequence characterized amplified region) primers were designed to identify sex-specific SCAR marker. However, none of the SCAR derived from the presumed sex-associated fragment showed sex specificity.

**Key words:** Chinese mitten crab; AFLP; sex marker; sex chromosomes