

合浦珠母贝印度家系 F_1 代的 AFLP 分析

王小玉^{1,2}, 喻达辉¹, 黄桂菊¹, 郭奕惠¹, 龚世园², 王爱民³

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430072; 3. 海南大学海洋学院, 海南 海口 570228)

摘要: 用 AFLP 标记对合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 印度家系的亲本及其子一代 (F_1) 进行了遗传分析。27 对引物共扩增出 1 013 个位点, 其中 835 个位点在 F_1 代分离, 178 个位点不分离, 多态位点比例 82.4%。分离位点中, 符合孟德尔分离规律的位点 458 个, 占分离位点数的 54.9%。偏离孟德尔分离规律的位点 377 个, 占分离位点数的 45.1%。分离比为 3:1 的位点共有 482 个, 占分离位点数的 57.7%, 符合孟德尔分离规律的位点 251 个, 占 52.1% (占分离位点数的 30.1%); 分离比为 1:1 的位点共有 353 个, 占分离位点数的 42.3%, 符合孟德尔规律的位点 207 个, 占 58.6% (占分离位点数的 24.8%)。半数以上的标记符合孟德尔遗传规律。表明 AFLP 标记适合于合浦珠母贝的遗传图谱构建。[中国水产科学, 2007, 14(1): 52-58]

关键词: 孟德尔分离规律; AFLP 标记; 合浦珠母贝; 家系

中图分类号: Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2007)01-0052-07

合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*), 属软体动物门、瓣鳃纲、珍珠贝科、珠母贝属。国外主要分布于自日本千页县以南至菲律宾、越南、印度、缅甸、印尼、斯里兰卡及澳大利亚等广大区域, 在中国主要分布于广东、广西、海南及台湾沿海^[1]。合浦珠母贝养殖的珍珠质量好, 是举世闻名的“南珠”, 也是目前海水珍珠养殖的主要贝种^[2]。但近年来, 由于多年的人工繁殖生产, 合浦珠母贝的养殖出现大规模死亡现象, 育珠质量严重下降, 致使珍珠养殖业受到严重影响。因此, 合浦珠母贝的遗传改良已迫在眉睫。

AFLP 指纹技术是近年来比较常用的一种分子标记技术^[3]。它不需要预先知道研究对象的基因组信息, 适用范围广。其基本过程包括用 2 个不同的限制性内切酶对基因组 DNA 进行酶切, 产生的片段连接接头后经过预扩增、选择性扩增和变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 形成 DNA 指纹。AFLP 指纹技术结合了 RFLP 和 RAPD 技术的优点^[4-5], 避免了 RAPD 分子标记重复性差、假阳性高和 RFLP 转膜、克隆、杂交等程序繁琐复杂的缺点, 具有分辨力高、重复性好、信息量大、灵敏度高等优点。因此在遗传多样性检测、系统分类与性别鉴定、遗传图谱

构建、基因克隆等诸多方面被广泛应用^[6-10]。随着分子标记技术的发展与应用, 已有标记技术用于珍珠贝的系统发育分析及种类鉴定^[11-12], 但尚未有利用分子标记构建合浦珠母贝遗传图谱的研究报道。由于印度产的合浦珠母贝 (以下简称印度贝) 虽然壳较薄但生长快, 抗病力强, 因此被引进中国用于珍珠养殖生产。本研究采用 AFLP 分子标记技术对合浦珠母贝印度家系 (印度贝 ♀ × 印度贝 ♂) F_1 代进行遗传分析, 旨在为遗传连锁图谱的构建与分子标记辅助选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

合浦珠母贝家系的繁殖与培育于 2003 年在海南三亚的南海水产研究所热带水产研究开发中心进行。用合浦珠母贝雌、雄单对亲本 1 对 1 解剖、授精, 孵化培育, 产生全同胞家系。一共制作了 8 个家系, 包括印度贝家系、印度贝与本地贝的正、反杂交家系和本地贝家系各 2 个, 每个家系分别在不同的水泥池中饲养, 培育方法按蒙钊美等^[2]。本实验随机选取 1 个印度贝家系的父母本和 62 个子代个体

收稿日期: 2006-04-03; 修订日期: 2006-06-05。

基金项目: 国家“863”重大科研项目 (2002AA603022); 广东省科技计划项目 (2002B2150101); 广东省自然科学基金项目资助 (037148)。

作者简介: 王小玉 (1976-), 硕士研究生, 从事水产种质资源与遗传育种。E-mail: yuexitan@163.com

通讯作者: 喻达辉, E-mail: pearlydh@pub.gz.gd.cn

用于遗传图谱构建。当幼贝长到1龄后取闭壳肌样品保存于95%乙醇溶液中备用。

1.2 DNA 模板的制备

DNA 的提取方法按郭奕惠等^[13]。取20 mg肌肉组织于培养皿中,用纯水洗净后放入1.5 mL高压灭菌后的离心管中,加200 μ L TEN9 细胞裂解缓冲液(Tris-Cl 50 mmol/L, pH 9.0, EDTA 100 mmol/L, NaCl 200 mmol/L),剪碎后再加 TEN9 溶液400 μ L,混匀后加10% SDS 溶液150 μ L、蛋白酶 K(20 mg/mL)10 μ L,摇匀后于56 $^{\circ}$ C 消化至澄清。然后依次用等体积的饱和酚、酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、氯仿:异戊醇(24:1)抽提,15 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心30 min,取上清,重复上述抽提步骤,直至无蛋白相。再加入2倍体积无水乙醇和0.1倍体积的 NaAc(3 mol/L, pH 5.2)于-20 $^{\circ}$ C 沉淀2 h以上。将沉淀后的样品取出,15 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心10 min,弃上清液,加75%乙醇洗涤2次,室温干燥后加100 μ L 去离子超纯水溶解。提取的基因组 DNA 用1%琼脂糖凝胶进行电泳检测, Biometra 紫外分光光度计测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 以检测 DNA 纯度和计算浓度,然后配成20 ng/ μ L 的 DNA 溶液保存于4 $^{\circ}$ C 备用。

1.3 AFLP 实验步骤

AFLP 引物和接头由北京赛百胜公司合成, *Eco*RI、*Mse*I 和 T4 DNA 连接酶为 New England Biolabs 公司产品。

1.3.1 酶切和连接 把20 ng 基因组 DNA 与2 μ L 10 $\times$ NE Buffer2, 0.125 μ L *Eco*RI(20 U/ μ L)和0.25 μ L *Mse*I(10 U/ μ L)混合,加 ddH₂O 至20 μ L,37 $^{\circ}$ C 消化3 h,70 $^{\circ}$ C 处理20 min。之后再加入5 μ L 连接混合液,包括:0.1 μ L T4 DNA 连接酶(400 U/ μ L),0.5 μ L 10 $\times$ NE Buffer 2,0.025 μ L BSA(10 mg/mL),0.05 μ L ATP (100 mmol/L), *Eco*RI 接头(5 pmol/L)和 *Mse*I 接头(50 pmol/L)各0.5 μ L。37 $^{\circ}$ C 温育3 h,72 $^{\circ}$ C 处理20 min。

1.3.2 预扩增和选择性扩增 PCR 连接产物用预扩增引物进行 PCR 扩增,反应体系为20 μ L:10 $\times$ PCR 缓冲液2 μ L,2 mmol/L dNTPs 2 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μ L, *Eco*RI 预扩增引物(10 μ mol/L)和 *Mse*I 预扩增引物(10 μ mol/L)各0.6 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L)0.1 μ L,连接产物1 μ L。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性2 min,然后20个循环,每个循环包括94 $^{\circ}$ C 30 s,53 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min。预

扩增产物用去离子超纯水稀释10倍备用。

从11个 *Eco*RI 和12个 *Mse*I 选择性扩增引物中筛选出27对(表1)进行选择扩增。PCR 反应体系为20 μ L:引物(10 μ mol/L)0.5 μ L, DNA 模板(即稀释10倍后的预扩增产物)5 μ L,其他成分与预扩增相同。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 变性2 min,65 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,然后10个循环:94 $^{\circ}$ C 30 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,每个循环退火温度降低1 $^{\circ}$ C,至56 $^{\circ}$ C,再进行30个循环,最后72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.3.3 电泳分析与条带统计 选择性扩增产物用5%的变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,银染,然后统计扩增位点数。在同一位点中,有扩增带的个体记为“+”,无扩增带的记为“-”。

1.4 数据统计分析

统计扩增出的位点数,计算 AFLP 标记的多态性水平,并用多态位点数/总位点数计算多态位点比例。

根据亲本的表型(即带型)及其在 F_1 代的分离情况来推断亲本的基因型(A 表示显性基因, a 表示隐性基因)。如果双亲均有而在 F_1 代发生分离,则双亲的基因型为 Aa,分离方式为 3:1,如果双亲的带型为多态而在 F_1 代发生分离,则双亲的基因型应为 Aa 和 aa,其分离方式应为 1:1。如果亲本的扩增带在 F_1 代不发生分离,则其中1个亲本的基因型为 AA。然后用卡方(Chi-square)检验来检测 AFLP 标记的遗传和分离是否符合孟德尔分离规律(显著性水平 $P=0.05$)。

2 结果与分析

2.1 AFLP 扩增结果

27对引物共扩增出1 013个位点(表1),其中多态位点835个,多态位点比例平均高达82.4%(46.9%~100%)。不同引物扩增的位点数差别较大,平均每对引物扩增37.5(21~66)个位点,其中多态位点平均为30.9(13~62)个。扩增片段大小在43~500 bp 之间。引物组合 E-ACT/M-CAA 扩增的位点最多(66条),多态位点比例最高(93.9%), E-ATC/M-CAG 扩增的位点最少(21条),但多态位点比例较高(61.9%),而 E-AGA/M-CTA 扩增的位点数较少(23条),多态位点比例最低(46.9%)。图1是引物 E-ATC/M-CCT 对合浦珠母贝印度家系的亲本和部分 F_1 代个体的扩增图。

表1 27对引物组合对合浦珠母贝家系扩增的位点数、多态位点数和孟德尔分离位点比例

Tab. 1 Numbers or ratios of total, polymorphic and Mendelian segregating loci amplified by 27 AFLP primer combinations in a familial population of *Pinctada fucata*

引物组合 Primer combination	扩增位点数 Nos. of loci	多态位点数 Nos. of polymorphic loci	多态位点比例/% Ratio of polymorphic loci	孟德尔位点比例/% Ratio of Mendelian loci
E-AAC/M-CCA	53	51	96.2	52.8
E-AAC/M-CGT	29	27	93.1	75.9
E-AAG/M-CAT	35	35	100	54.3
E-AAG/M-CTG	56	46	82.1	35.7
E-AAT/M-CCA	53	41	77.4	37.7
E-ACA/M-CGT	33	22	66.7	24.2
E-ACA/M-CCA	27	25	92.6	59.3
E-ACC/M-CGC	26	22	84.6	53.8
E-ACC/M-CGT	30	22	73.3	46.7
E-ACT/M-CAA	66	62	93.9	39.4
E-ACT/M-CCT	47	41	87.2	42.6
E-ACT/M-CGC	34	26	76.5	52.9
E-AGA/M-CCT	29	24	82.8	51.7
E-AGA/M-CGC	25	24	96.0	48.0
E-AGA/M-CTA	49	23	46.9	32.7
E-AGC/M-CGA	37	29	78.4	48.6
E-AGC/M-CGT	39	33	84.6	35.9
E-AGG/M-CAA	35	35	100.0	25.7
E-AGG/M-CCA	49	44	89.8	53.1
E-AGG/M-CTT	35	28	80.0	42.9
E-AGT/M-CAG	25	18	72.0	52.0
E-ATC/M-CAG	21	13	61.9	52.4
E-ATC/M-CAT	44	35	79.5	54.5
E-ATC/M-CCT	37	32	86.5	56.8
E-ATC/M-CGC	23	21	91.3	34.8
E-ATC/M-CGT	27	21	77.8	40.7
E-ATC/M-CTC	49	36	73.5	38.8
平均 Mean	37.5	30.9	82.4%	54.9
总位点数 Total	1 013	835		458

2.2 AFLP 标记的遗传分离

2.2.1 AFLP 标记的分离 在 1 013 个位点中有 835 个位点在子代发生分离, 178 个位点不分离。在 178 个不分离位点中, 2 个亲本的表型为 +/+ , 表明至少其中 1 个亲本的基因型为 AA 纯合型。分离位点中, 符合孟德尔分离规律的位点 458 个, 占分离位点数的 54.9% (表 1)。分离比为 3 : 1 的位点共有 482 个, 占分离位点数的 57.7% , 其中符合孟德尔分离规律的位点 251 个, 占 52.1% (占分离位点数的

30.1%) ; 分离比为 1 : 1 的位点共有 353 个, 占分离位点数的 42.3% , 符合孟德尔规律的位点 207 个, 占 58.6% (占分离位点数的 24.8%) , 见表 2。

在分离位点中, 共有 377 个位点的分离比例在统计学上偏离 1 : 1 或 3 : 1 的孟德尔分离比例, 占分离位点数的 45.1% 。其中偏离 1 : 1 的标记占总位点数的 14.4% , 偏离 3 : 1 的标记占总位点数的 22.8% 。

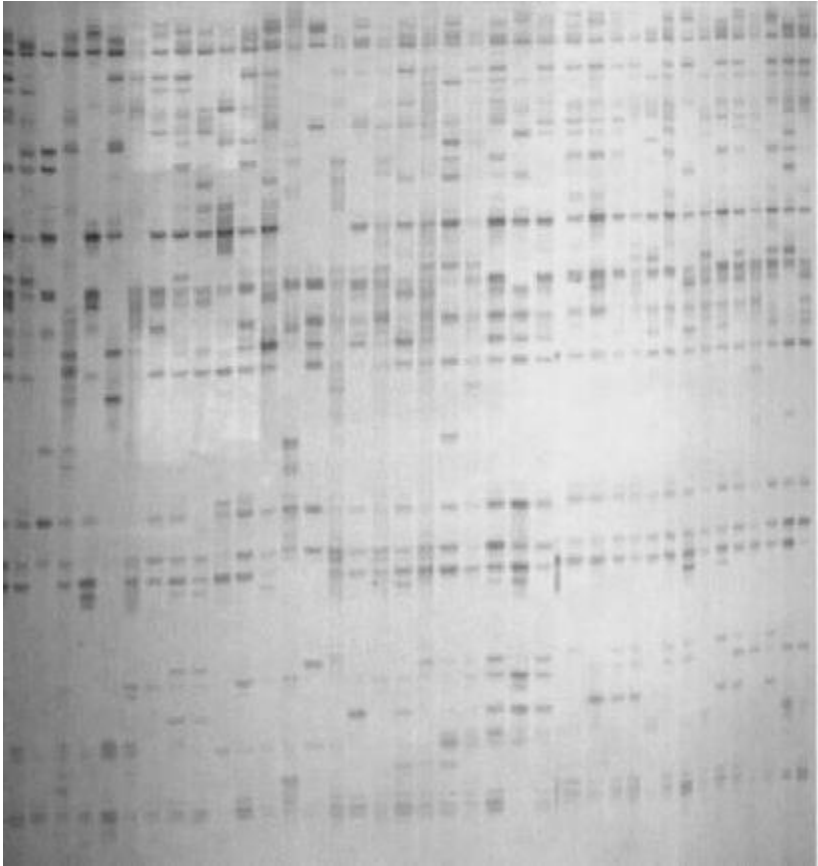


图 1 引物组合 E-ATC/M-CCT 对亲本和 F₁代部分个体的扩增图(左边 2 个为雌雄亲本)

Fig. 1 A representative gel showing amplification result of parents and some of F₁ *P. fucata* individuals using primer combination E-ATC/M-CCT(The two lanes on the left represent female and male parents)

表 2 AFLP 标记在合浦珠母贝 F₁代中不同分离方式的各种指数值

Tab. 2 Indices of different segregating patterns of AFLP markers in F₁ generation of *Pinctada fucata* family

指数 Index	分离方式 Segregating pattern		偏孟德尔分离 Distorted segregation	不分离位点 Non-segregating
	1 : 1 分离 1 : 1 segregation	3 : 1 分离 3 : 1 segregation		
位点数 Number of loci	207	251	377	178
出现频率/% Frequency	24. 8	30. 1	45. 1	17. 6

2.2.2 AFLP 标记在亲本中的分布 在 458 个符合孟德尔遗传规律的位点中,父本特有标记 107 个,母本特有标记 100 个,双亲共有标记 251 个,分别占符合孟德尔遗传规律位点总数的 23.4%、21.8%和 54.8%,父本特有标记稍多于母本。377 个偏离孟德尔遗传规律的位点中,父本特有标记 75 个,母本特有标记 71 个,双亲共有标记 231 个,分别占 19.9%、18.8%和 61.3%。

3 讨论

3.1 AFLP 标记中的多态性水平

AFLP 分子标记多态性高,能灵敏地反映种群的遗传多样性^[4-5],因此常用于种群遗传^[6]和遗传图谱构建^[9]等方面的研究。本研究中,AFLP 产生的多态标记比例很高,平均每对引物产生 30.9 个多态标记。而在栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)全同胞家

系中多态标记比例只占 21.3%, 平均每对引物仅产生 7.9 个多态标记^[14]。栉孔扇贝种内杂交系中多态标记比例为 31.1%, 每对引物产生 20.8 条多态标记^[15]。太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)的多态位点比例为 34.7%, 每对引物约产生 25.4 个多态标记^[16]。美洲牡蛎(Eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin)每对引物约产生 23 个多态标记^[17]。在籼稻(*Oryza sativa* subsp. *hsien*)的重组自交系中每对引物有 20 个多态标记^[18]。美洲黑杨(*Populus deltoids* Bartr.)×青杨(*P. cathayana* Rehd.) F_2 群体中平均每对引物产生 21.3 个多态标记^[19], 造成这些多态差异的原因可能与物种及杂交方式有关。由于 AFLP 分子标记为显性标记, 在分离比为 3 : 1 时无法区分杂合子。因此, 在作图时一般利用符合孟德尔 1 : 1 分离规律的标记。在本研究中 353 个 1 : 1 分离的多态位点中, 有 207 (58.6%) 个符合孟德尔遗传规律, 比牡蛎、对虾略低^[16-17, 20-21]。太平洋牡蛎回交家系中符合孟德尔 1 : 1 分离规律 AFLP 标记占 73.1%^[16], 美洲牡蛎家系为 91.8%^[17], 凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)为 64%^[20], 斑节对虾(*Penaeus monodon*)3 个家系中符合 1 : 1 分离的多态位点占 72.4%^[21]。由于合浦珠母贝家系中符合孟德尔遗传规律(1 : 1)的 AFLP 分子标记的比例仍较高, 适合于合浦珠母贝家系 F_1 代的遗传连锁图谱构建。

3.2 AFLP 标记的分离方式

AFLP 标记在本研究中的分离方式主要包括两类, 即符合孟德尔分离比例和偏离孟德尔分离比例。符合孟德尔遗传的分离方式包括: (1) 不分离, 即亲本均有扩增带而在 F_1 代不分离, 双亲的基因型为 $AA \times AA$ 、 $AA \times Aa$ 或 $Aa \times AA$, 或亲本呈多态而在 F_1 代不分离, 亲本的基因型为 $AA \times aa$ 或 $aa \times AA$; (2) 1 : 1 分离, 即亲本呈多态而在 F_1 代按 1 : 1 分离, 亲本的基因型为 $Aa \times aa$ 或 $aa \times Aa$; (3) 3 : 1 分离, 即亲本均有而在 F_1 代按 3 : 1 分离, 亲本的基因型为 $Aa \times Aa$ 。偏离孟德尔遗传的分离方式包括: 扩增带在亲本中呈多态而在 F_1 代中偏离 1 : 1 分离和亲本均有而在 F_1 代中偏离 3 : 1 分离比例, 本实验中这两种类型都有。在分离位点中符合孟德尔分离规律的位点比例(54.9%)与芒果(*Mangifera indic*)种间杂交家系(54.0%)相似^[22], 比苹果种间杂交家系(RAPD 标记, 45.0%)^[23]高, 但低于太平洋

牡蛎(70.1%)^[16]和茶树杂交系(73.4%)^[24]。本研究中, 父本的 182 个 1 : 1 多态标记只有 107 (58.8%) 个符合孟德尔分离规律, 母本的 171 个 1 : 1 多态标记只有 100 (58.5%) 个符合孟德尔分离规律, 这一比值较低。在太平洋牡蛎的回交家系中, 父本 117 个特有标记中有 82 (70.1%) 个, 母本 138 个特有标记中有 99 (71.7%) 个符合 1 : 1 孟德尔分离规律^[25]。栉孔扇贝杂交家系母本 247 个标记中有 205 个 (83%) 符合 1 : 1 孟德尔分离规律, 父本 298 个标记中有 243 个 (81.5%) 符合孟德尔 1 : 1 分离规律^[15]。由此表明 1 : 1 分离位点比例可能与物种以及亲本来源有关, 杂交家系一般高于种内交配家系。

AFLP 标记的偏分离现象是普遍存在的。如太平洋牡蛎的偏分离比例为 26.9%^[16], 栉孔扇贝为 6.2%^[14], 栉孔扇贝杂交家系为 14.7%^[15], 桃(*Prunus persica* (L.) Batsch)为 19.8%^[26], 西瓜(*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld var.)重组自交系为 30%^[27], 美洲黑杨×青杨中为 10.2%^[19], 家蚕(*Bombyx mori*)中偏分离与异常分离高达 50%^[28]。房经贵等^[22]在芒果上发现 42.7% 的 AFLP 分离位点表现偏分离。本实验中偏分离的比例比较高(37.2%), 但略低于芒果。对偏分离产生的原因有很多不同的分析, 可以概括为 3 个方面: (1) 生物因素, 即染色体缺失、遗传分离机制、隐性致死基因等都会引起偏分离。(2) 实验误差、酶切不彻底、DNA 本身存在大量的断裂片段等操作的失误会产生偏分离现象^[28]。(3) 人为误差, 包括实验过程中的污染, 或不同时间、不同人读数标准不一样均会导致偏分离的产生。研究群体样本太小及不同个体间标记清晰度差异等引起的误差因素也会导致偏分离现象; 另外 AFLP 片段的同形性(Homoplasy)也可能产生偏分离。所谓同形性, 即同一大小的扩增片段并不是来源于染色体上的同一位置, 这样该片段就不具有遗传一致性, 从而产生偏分离。本实验中偏分离的分子标记是由何种原因引起的, 还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 王祯瑞. 中国动物志·无脊椎动物第 31 卷·双壳纲珍珠贝亚目[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 68—98.
- [2] 蒙钊美, 李有宁, 邢孔武. 珍珠养殖理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [3] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for

- DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(21): 4407—4414.
- [4] Bensch S, kesson M. Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals[J]. *Mol Ecol*, 2005, 14(10): 2899—2914.
- [5] Liu Z J, Cordes J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics[J]. *Aquaculture*, 2004, 238(1—4): 1—37.
- [6] 王志勇, 王艺磊, 林利民, 等. 福建官井洋大黄鱼 AFLP 指纹多态性的研究[J]. *中国水产科学*, 2002, 9(3): 198—202.
- [7] 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.
- [8] Griffiths R, Orr K. The use of amplified fragment length polymorphism(AFLP) in the isolation of sex-specific markers[J]. *Mol Ecol*, 1999, 8(4): 671—674.
- [9] Li Y T, Byrne K, Miggiano E, et al. Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers[J]. *Aquaculture*, 2003, 219(1—4): 143—156.
- [10] Jia J H, Li C Y, Deng Q Y, et al. Rapid constructing a genetic linkage map by AFLP technique and mapping a new gene *tms5* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(5): 614—620.
- [11] 喻达辉, 朱嘉濠. 珠母贝属的系统发育: 核 rDNA ITS 序列证据[J]. *生物多样性*, 2005, 13(4): 315—323.
- [12] 喻达辉, 朱嘉濠. 珠母贝属 6 个种的 ITS2 rDNA 分子标记研究[J]. *南方水产*, 2005, 1(4): 6—12.
- [13] 郭奕惠, 黄桂菊, 喻达辉. 合浦珠母贝 DNA 的抽提和 RAPD 反应体系的优化[J]. *南方水产*, 2006, 2(4): 59—64.
- [14] Wang L L, Song L S, Chang Y Q, et al. A preliminary genetic map of Zhikong scallop(*Chlamys farreri* Jones et Preston 1904)[J]. *Aquacult Res*, 2005, 36(7): 643—653.
- [15] Li L, Xiang J H, 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[J]. *Aquaculture*, 2005, 245(1—4): 63—73.
- [16] Li L, Guo X M. AFLP—based genetic linkage maps of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Thunberg[J]. *Mar Biotechnol*, 2004, 6(1): 26—36.
- [17] Yu Z N, Guo X M. Genetic linkage of the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin[J]. *Biol Bull*, 2003, 204(3): 327—338.
- [18] 唐定中, 李维明, 吴为人, 等. 水稻 AFLP 标记的多态性、分布及分离的研究[J]. *福建农业大学学报*, 1998, 27(3): 265—270.
- [19] 黄秦军, 苏晓华, 张香华. 利用 AFLP 标记和 SSR 标记构建美洲黑杨×青杨遗传图谱[J]. *林业科学研究*, 2004, 17(3): 91—99.
- [20] Pérez F, Erazo C, Zhinaula M, et al. A sex-specific linkage map of the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* based on AFLP markers[J]. *Aquaculture*, 2004, 242(1—4): 105—118.
- [21] Wilson K, Li Y T, Whan V, et al. Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism[J]. *Aquaculture*, 2002, 204(1—4): 297—309.
- [22] 房经贵, 章镇, 马正强, 等. AFLP 标记在两个芒果品种间杂交 F₁ 代的多态性及分离方式[J]. *中国农业科学*, 2000, 33(3): 19—24.
- [23] 刘孟军, Shin Y U, Yae B W. RAPD 标记在苹果属种间杂交一代的分离方式[J]. *园艺学报*, 1998, 25(3): 214—219.
- [24] 黄建安, 李家贤, 黄意欢, 等. 茶树 AFLP 分子连锁图谱的构建[J]. *茶叶科学*, 2005, 25(1): 7—15.
- [25] 李莉, 郭希明. 利用 RAPD 和 AFLP 标记初步构建太平洋牡蛎的遗传连锁图谱[J]. *海洋与湖沼*, 2003, 34(5): 541—551.
- [26] 吴俊, 束怀瑞, 张开春, 等. 桃分子连锁图的构建与分析[J]. *园艺学报*, 2004, 31(5): 593—597.
- [27] 易克, 许勇, 卢向阳, 等. 西瓜重组自交系群体的 AFLP 分子图谱构建[J]. *园艺学报*, 2004, 31(1): 53—58.
- [28] 司马杨虎, 陈大霞, 赵爱春, 等. 家蚕 AFLP 分子标记分离规律的研究[J]. *蚕业科学*, 2003, 29(2): 131—135.

AFLP analysis on a familial F_1 population of pearl oyster *Pinctada fucata*

WANG Xiao-yu^{1,2}, YU Da-hui¹, HUANG Gui-ju¹, GUO Yi-hui¹, GONG Shi-yuan², WANG Ai-min³

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430072, China; 3. Ocean College, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The pearl oyster *Pinctada fucata* distributed in the Pacific, Atlantic and Indian Oceans is the most important species cultured for pearl production. It has been cultured along the coasts of Guangdong, Guangxi and Hainan Provinces in mainland China since 1960's. Yet there were large scale mortalities occurred in culture practices in the recent years. To resolve this problem, a selective breeding program has been initiated, including family selection. In this study the polymorphism and segregation of AFLP markers in the F_1 generation of an Indian *P. fucata* family were investigated using 27 selective primer combinations. A total of 1 013 loci were generated, among which 835 were polymorphic in F_1 generation, accounting for 82.4%, and 178 loci were monomorphic, accounting for 17.6%. Among 835 segregating loci, 458 loci (54.9%) segregated in Mendelian ratio while 377 loci (45.1%) segregated in distortion as indicated by Chi-square test ($P < 0.05$). There were 482 (57.7%) and 353 (42.3%) loci segregating in the ratios of 3 : 1 and 1 : 1, respectively. The numbers of loci segregating in Mendelian law were 251 (52.1%) and 207 (58.6%) for 3 : 1 and 1 : 1 loci, respectively. The number of loci segregating in Mendelian ratio is higher than that segregating in distortion. The results demonstrate that AFLP is highly efficient and can be used to construct genetic linkage map for pearl oyster *P. fucata*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(1): 52–58]

Key words: Mendelian segregation; molecular marker; genetic linkage map

Corresponding author: YU Da-hui. E-mail: pearlydh@163.com