

合浦珠母贝遗传连锁图谱的构建

喻达辉¹, 王小玉^{1,2}, 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 430070; 3. 海南大学海洋学院, 海南 海口 570228)

摘要:用 AFLP 标记构建了印度合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)全同胞家系的遗传图谱。用经过筛选的 36 对引物组合对父母本和 62 个子代个体进行遗传分析, 共得到 1 547 个标记, 包括 581 个 1:1 分离标记。母本分离标记 294 个, 其中 178 个符合 1:1 孟德尔分离规律; 父本分离标记 287 个, 其中 182 个符合 1:1 孟德尔分离规律。雌性框架图包括 33 个遗传标记, 分布在 14 个连锁群中, 标记间平均间隔 24.3 cM, 有 2 个 3 联体, 11 个连锁对, 图谱总长度为 488.5 cM。雄性框架图包括 53 个遗传标记, 分布在 19 个连锁群中, 标记间平均间隔 30.5 cM, 有 4 个 3 联体, 10 个连锁对, 图谱总长度为 1 035.5 cM。雌雄两个框架图中 AFLP 标记的分布都较均匀。雌雄基因组估算长度分别为 1 168.4 cM 和 2 037.1 cM, 图谱覆盖率分别为 41.8% 和 50.8%。本研究为进一步构建高密度遗传连锁图谱及 QTL 定位分析奠定了基础。[中国水产科学, 2007, 14(3): 361—368]

关键词:合浦珠母贝; 遗传连锁图谱; AFLP 标记

中图分类号: Q959.213

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)03-0361-08

近年来, 随着各种分子标记技术的开发, 遗传连锁图谱构建逐渐成为遗传学领域的研究热点。遗传连锁图谱为数量性状位点(QTL)定位、功能基因克隆等提供了技术支持, 是遗传改良与分子标记辅助选育技术(MAS)的重要基础, 也是研究基因组结构与进化的重要工具。目前构建遗传连锁图谱常用的分子标记有 AFLP^[1]、微卫星^[2]和 RAPD^[3-4]。这些分子标记数量丰富, 符合孟德尔遗传规律, 多态性高, 重复性好, 且易于检测, 为遗传连锁图谱的构建提供了可能。尤其是 AFLP 技术, 可产生大量的标记, 且不需要预先了解研究对象基因组的任何信息, 因此特别适合于遗传背景不明确的物种的遗传图谱构建。目前 AFLP 标记已广泛应用于各种生物的遗传图谱构建, 水生动物主要有罗非鱼(*Oreochromis*)^[5-6]、青鳉(*Oryzias latipes*)^[7]、沟鲈(*Ictalurus punctatus*)^[8]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[9]、日本对虾(*P. japonicus*)^[10-11]、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[12-13]、美洲牡蛎(*C. virginica*)^[14]和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[15-16]等。

合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)又称马氏珠母贝, 广泛分布于热带、亚热带海域, 是中国生产海水

珍珠的主要种类^[17]。近年来合浦珠母贝的养殖中出现大量死亡现象, 育珠质量也严重下降, 因此合浦珠母贝的遗传改良与良种选育十分迫切。

本课题组开展了一系列合浦珠母贝的分子标记辅助选育技术研究。对养殖种群和野生种群的遗传多样性进行了详细分析^[18], 同时开展了混合选育与家系选育实验^[19-20]。日本在 20 世纪 70~80 年代开展了合浦珠母贝的选择育种研究, 并对选育材料进行了等位酶多态分析^[21-23]。遗传连锁图谱的构建是分子标记辅助育种、基因定位克隆和 QTL 分析的基础, 目前国内外尚未见合浦珠母贝遗传连锁图谱的研究报道。本研究采用“拟测交”理论^[24], 探索利用 AFLP 分子标记对所构建的家系进行遗传连锁图谱构建, 旨在为合浦珠母贝的高密度遗传图谱构建和分子标记辅助育种提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 家系材料

作图所用家系为印度合浦珠母贝(简称印度贝)母本(♀)与印度贝父本(♂)单对亲本繁殖所获得的 F₁ 代群体。家系的构建于 2003 年在南海水产研

收稿日期: 2006-07-21; 修订日期: 2006-10-26。

基金项目: 国家 863 基础研究计划(2002AA603022); 广东省科技计划(2002B2150101); 广东省自然科学基金(037148)。

作者简介: 喻达辉(1963-), 研究员, 博士, 从事海洋生物技术研究。E-mail: pearlydh@163.com

究所热带水产研究开发中心进行,其人工繁殖、养殖按合浦珠母贝的常规育苗方法^[17]进行。当幼贝长到1龄后随机采集62个个体,取闭壳肌组织保存于95%乙醇溶液中备用。

1.2 DNA提取

DNA的提取方法参照王小玉等^[25]。主要步骤为:取20 mg肌肉组织用蒸馏水洗净,加TEN9细胞裂解缓冲液600 μL ,剪碎后再加10% SDS 150 μL 和蛋白酶K(20 mg/mL) 10 μL ,摇匀后于56 $^{\circ}\text{C}$ 消化至澄清。然后分别用等体积的饱和酚、酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、氯仿:异戊醇(24:1)抽提,取上清,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 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀2 h以上。离心后加75%乙醇洗涤2次,室温干燥后加100 μL 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纯度并计算浓度,然后配成20 ng/ μL 的DNA溶液于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 AFLP实验步骤

1.3.1 酶切和连接 AFLP的实验方法参照Vos等^[1]并作一定修改^[26]。首先将100 ng基因组DNA用EcoRI(0.125 μL , 20 U/ μL)和MseI(0.25 μL , 10 U/ μL)酶切(20 μL 反应体系),37 $^{\circ}\text{C}$ 温育3 h,70 $^{\circ}\text{C}$ 处理20 min。之后再加入5 μL 连接混合液,包括:0.1 μL T4 DNA连接酶(400 U/ μL),0.5 μL NE Buffer 2(10 $\times$),0.025 μL BSA(10 mg/mL),0.05 μL ATP(100 mmol/L),EcoRI adapter(5 pmol/L)和MseI adapter(50 pmol/L)各0.5 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 温育3 h,72 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL :10 $\times$ PCR缓冲液2 μL ,2 mmol/L dNTPs 2 μL ,25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μL ,EcoRI预扩引物(10 $\mu\text{mol/L}$)和MseI预扩引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各0.6 μL ,Taq酶(5 U/ μL) 0.1 μL ,连接产物1 μL 。PCR反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,然后20个循环,每个循环包括94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。预扩增产物用去离子超纯水稀释10倍后作为模板用于选择性扩增,所用选择性扩增引物组合为:E1M1、E1M2、E1M5、E1M12、E2M3、E2M12、E3M1、E4M1、E4M2、E4M12、E4M13、E5M2、E5M4、E5M7、E5M10、E5M12、E6M4、E6M5、E6M6、E7M4、E7M6、E7M7、E8M2、E8M8、E8M9、E9M1、E9M5、E9M9、

E10M10、E11M2、E11M3、E11M4、E11M6、E11M10、E11M11、E12M12(表1),其中EcoRI引物(代码为E)的选择性碱基为:1-AAC、2-AAG、3-AAT、4-ACA、5-ACC、6-ACT、7-AGA、8-AGC、9-AGG、10-AGT、11-ATC、12-ACG;MseI引物(代码为M)的选择性碱基为:1-CCA、2-CGT、3-CAT、4-CGC、5-CAA、6-CCT、7-CTA、8-CGA、9-CTT、10-CAG、11-CTC、12-CTG、13-CAC,其他成分与预扩增相同。PCR反应程序94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,然后37个循环,每个循环包括:94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,65~56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。前9个循环的退火温度每个循环降1 $^{\circ}\text{C}$,然后保持不变完成后面的循环数。最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。

1.3.3 选择性扩增产物的检测 选择性扩增产物采用聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染的方法来检测。将选择性扩增产物加上样缓冲液,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 min,立刻置于冰上冷却。然后上样进行电泳,恒功率110 W,1 $\times$ TBE缓冲液。电泳完成后,用1%的冰醋酸固定30 min,AgNO₃(2 mg/mL)染色30 min,水洗后用Na₂CO₃(2.5 mg/mL)显影,再用固定液定影、水洗、晾干。

1.4 AFLP扩增条带的统计

对所有个体扩增清晰的条带进行记录,有扩增带的个体相应位点记为1,对应的无扩增带的个体相应位点记为0。然后进行多态片段(或多态位点、多态标记)分析和遗传分离规律检测。多态片段是指在一个亲本中出现,而在另一个亲本中缺失的片段,多态片段在两亲本中互称为多态分子标记或简称分子标记。有扩增带的位点相应的基因型为AA或Aa,无扩增带的基因型为aa。只有基因型为Aa/aa的亲本组合的多态标记在后代按1:1比例分离。利用卡方检验检测每个位点是否符合孟德尔分离规律,计算公式为: $\chi^2 = (\text{Aa观测值} - \text{Aa期望值} - 0.05)^2 / \text{Aa期望值} + (\text{aa观测值} - \text{aa期望值} - 0.05)^2 / \text{aa期望值}$,当 χ^2 小于或等于 $\chi_{0.05}^2$ (3.86)时,即 $P \geq 0.05$ 时,该位点符合孟德尔分离规律。本研究只应用符合1:1孟德尔分离规律的标记构建连锁图谱。标记的命名采用“引物组合名称+f+多态性片段分子量”。

1.5 连锁分析

分别将“1”转换为“H”,“0”转换为“A”,用作图软件Mapmaker/exp 3.0^[27]进行标记连锁分析。先用GROUP命令(似然比的对数值LOD值大于等于2.0,重组率小于等于50%),对现有标记分组,少于

或等于 9 个标记的连锁群,用 COMPARE 命令排序,对于标记数较多的连锁群,用 COMPARE 和 BUILD 命令建立基本框架图,其他标记采用 TRY 命令进行定位,将连锁群中的标记排好序后,利用 MAP 命令根据 Kosambi 函数^[28]计算图距,单位为“厘摩”(centiMorgan, cM)。最后用 Mapdraw 2.1^[29]软件绘制遗传连锁图谱。

1.6 连锁图谱平均间隔、实际长度、估计长度和图谱覆盖率的计算

连锁图谱的标记平均间隔为图谱长度除以总间隔数,总间隔数为图谱上标记总数减去连锁群数。每个连锁群的平均标记间隔为连锁群长度除以连锁群上的间隔数,连锁群上的间隔数为连锁群上的标记数减去 1。连锁图谱的实际长度为包括三联体、连锁对在内的所有连锁标记的长度($G_{\text{实}}$),连锁图谱的估计长度(G_e)参照 Chakravarti 等^[30]的方法,计算公式为: $G_e = G_{\text{实}} \times (m + 1) / (m - 1)$, m 为每个连锁群的遗传标记数,总的图谱覆盖率 $C_{\text{实}} = G_{\text{实}} / G_e$ 。

2 结果与分析

2.1 AFLP 扩增结果

用 50 对引物组合分析亲本和 1 个子代个体以

筛选引物。以在亲本中多态性高,带型清晰为标准,共筛选出 36 对引物,将其用于亲本和所有子代的 AFLP 分析。36 对引物扩增共得到 1 547 个位点,其中有 1 345 个多态位点。多态位点中 780 个符合孟德尔遗传规律,565 个偏分离。有 581 个标记在父母本中呈现多态(即 1 : 1 分离位点),占总扩增片段数的 37.6%。其中父本分离标记 287 个,有 182 (63.4%)个符合孟德尔 1 : 1 分离规律;母本分离标记 294 个,有 178(60.5%)个符合孟德尔 1 : 1 分离规律。平均每对引物扩增出 37.5 个位点,16.1 个为多态位点。

2.2 遗传连锁图谱分析

在合浦珠母贝雌性连锁图谱中,符合孟德尔 1 : 1 分离规律的 178 个母本分离标记中只有 33 个连锁(表 1),分布在 14 个连锁群上(图 1)。其中遗传标记数量大于 3 的连锁群有 1 个,三联体 2 个,连锁对 11 个。最大连锁群的长度为 139.4 cM,最短的为 1.9 cM(表 1)。标记间的最大图距为 41.8 cM,最小图距为 1.8 cM,平均间隔为 24.3 cM。雌性连锁图谱总长度($G_{\text{实}}$)为 488.5 cM,估计长度(G_e)为 1 168.4 cM,图谱总覆盖率($C_{\text{实}}$)为 41.8%。

表 1 合浦珠母贝雌性/雄性连锁图谱相关数据
Tab. 1 Summary of female/male linkage maps for Pinctada fucata

连锁群 LG	连锁群实际长度/cM LG Length	连锁标记数 Marker no.	平均间隔/cM Average interval	最大间隔/cM Largest interval	估计连锁群长度/cM Estimated length
1	139.4/154.7	5/5	34.9/38.7	36.4/41.8	209.1/232.1
2	44.1/123.0	3/4	22.1/41.0	29.0/43.8	88.2/205.0
3	43.6/115.1	3/4	21.8/38.4	41.8/40.5	87.2/191.8
4	36.4/115.7	2/4	36.4/38.6	36.4/42.3	109.2/192.8
5	33.7/79.8	2/4	33.7/26.6	33.7/39.9	101.1/133.0
6	32.0/74.3	2/3	32.0/37.2	32.0/38.9	96.0/148.6
7	36.4/79.9	2/3	36.4/40.0	36.4/41.0	109.2/159.8
8	36.4/64.9	2/3	36.4/32.5	36.4/33.3	109.2/129.8
9	31.2/40.1	2/3	31.2/20.1	31.2/32.9	93.6/80.2
10	27.3/40.1	2/2	27.3/40.1	27.3/40.1	81.9/120.3
11	20.3/39.1	2/2	20.3/39.1	20.3/39.1	60.9/117.3
12	3.8/33.8	2/2	3.8/33.8	3.8/33.8	11.4/101.4
13	2.0/31.0	2/2	2.0/31.0	2.0/31.0	6.0/93.0
14	1.9/29.1	2/2	1.9/29.1	1.9/29.1	5.4/87.3
15	—/9.1	—/2	—/9.1	—/9.1	—/27.3
16	—/4.0	—/2	—/4.0	—/4.0	—/12.0
17	—/1.8	—/2—	/1.8	—/1.8	—/5.4
合计 Total	488.5/1 035.5	33/53	25.7/30.5	41.8/43.8	1 168.4/2 037.1

在雄性连锁图谱中,182个父本分离标记中共有53个连锁标记(表1),分布在19个连锁群上(图2)。其中遗传标记数量大于3的连锁群有5个,三联体4个,连锁对10个。最大连锁群的长度为154.7 cM,最短的为1.8 cM(表1)。标记间的最大

图距为43.8 cM,最小图距为1.8 cM(除去零重组率的连锁群),平均间隔为30.5 cM。雄性连锁图谱总长度(G_{α})为1 035.5 cM,估计长度 G_e 为2 037.1 cM,图谱总覆盖率(C_{α})为50.8%。

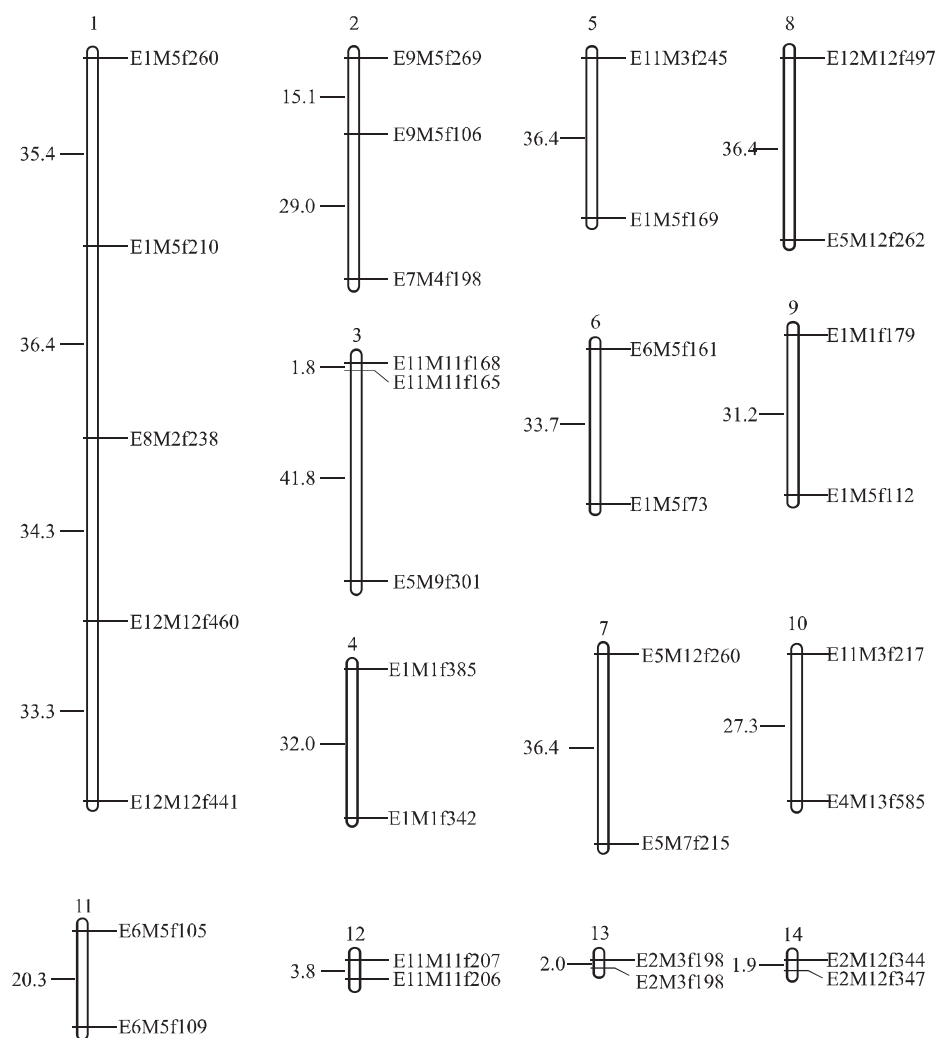


图1 合浦珠母贝雌性遗传连锁图谱

Fig. 1 Female genetic linkage map of *P. fucata*

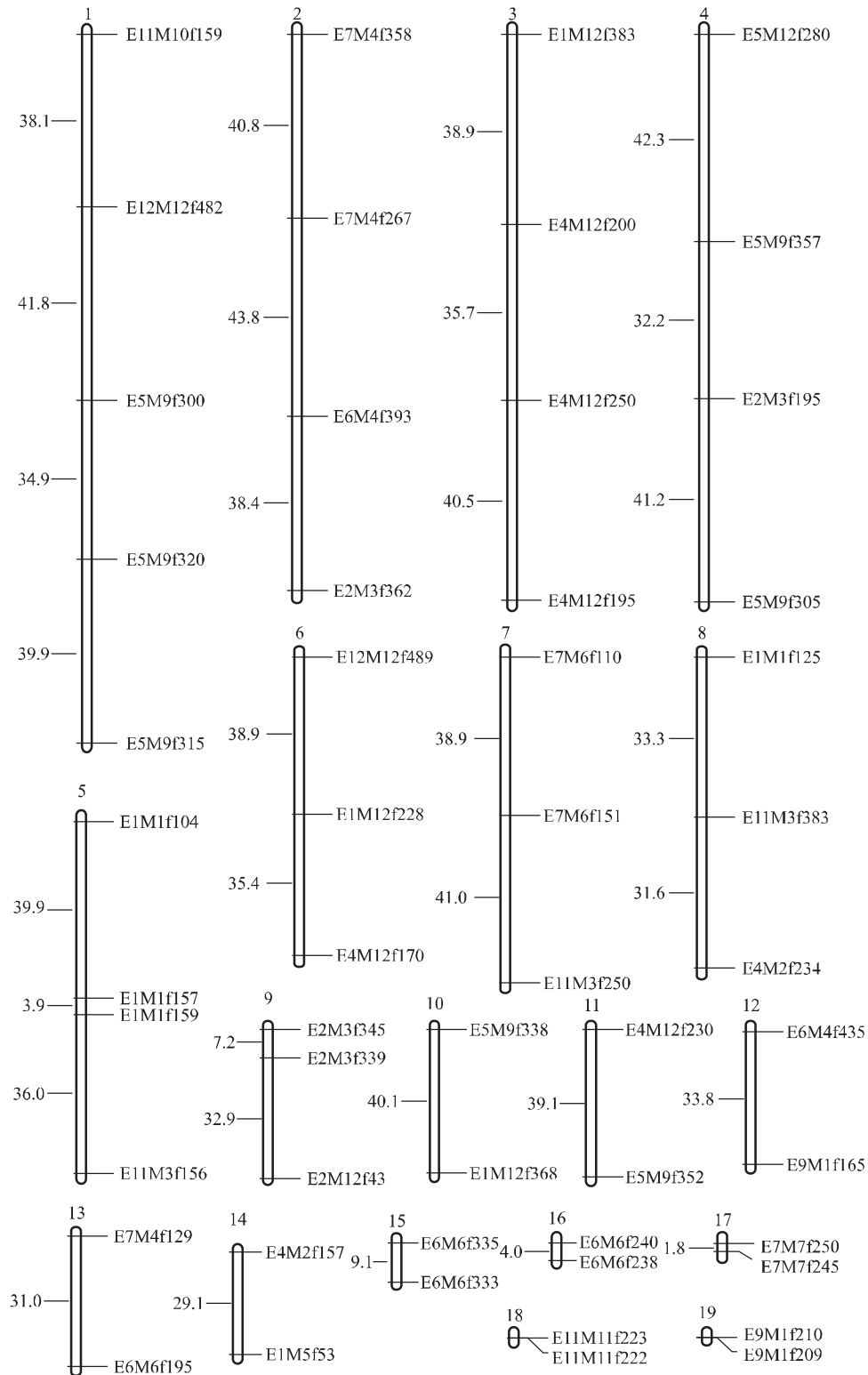


图 2 合浦珠母贝雄性遗传连锁图谱

Fig. 2 Male genetic linkage map of *P. fucata*

3 讨论

在海洋生物的相关研究中,有的学者采用双单倍体或雌核发育后代^[31]作为作图群体,有的采用回交群体^[13],也有的则直接采用 F_1 代群体^[32]。AFLP标记在合浦珠母贝全同胞家系 F_1 代的分离研究表明,AFLP标记适合于合浦珠母贝遗传连锁图谱构建^[33]。因此选用合浦珠母贝全同胞家系的 F_1 代进行作图是可行的。

本研究发现,合浦珠母贝的AFLP标记在家系遗传中偏离孟德尔分离规律的比例较大,不能连锁的标记也较多。在总共1 345个分离位点中,只有60%多的分离位点符合孟德尔规律。这一比例在栉孔扇贝中分别为80%(93个子代)^[15]和90%(60个子代)^[16],在太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)中为70%(80个子代)^[12-13],在美洲牡蛎(*C. virginica*)中高达90%(81个子代)^[14]。由于1:1分离位点理论上包含50%的纯合子,因此该类位点的比例失调表明纯合子在自然选择中受到一定的选择作用,一般认为有害纯合基因型的生存能力差,因此在自然选择作用下基因型比例会发生改变^[12]。合浦珠母贝雌雄个体产生的配子数量很大,但在繁殖过程中存活下来的却是少数,因此具有生存优势的基因型的比例就会在存活后代中增加,从而出现基因型比例偏离孟德尔规律的现象。在太平洋牡蛎中也发现纯合子缺失的现象^[12]。在本研究中,对144个1:1偏分离位点进行初步分析发现,因纯合子低于50%而引起偏分离的位点仅有65个,表明合浦珠母贝也存在纯合子缺失的情况,且比太平洋牡蛎更严重。

在连锁分析中,合浦珠母贝母本178个符合孟德尔1:1分离规律的位点中只有18.5%的标记能组成连锁群,在182个1:1的父本标记中也只有29.1%的标记连锁,未连锁的标记较多。可能是标记数量较少造成的,因此在分析中LOD的取值较低。理论上,一个完整的连锁图谱的连锁群数目应该和其单倍体染色体数目相等,合浦珠母贝的染色体数目 $2n=28$,即应有14个连锁群与染色体一一对应。本研究得到合浦珠母贝的雄性连锁图谱有19个连锁群,说明至少有5个较大的间隙,可能是由于LOD值取值较低缘故,因此还需要更多的分子标记使这19个连锁群中的5个连锁群与其他连锁群合并;雌性连锁图谱有14个连锁群,与染色体数目对应。不同染色体的重组值之间有差异会造成

连锁群间长度不同^[13],但本研究中连锁群的长度差异可能是由于图谱的不完整造成的。且雄性和雌性图谱都具有较多的三联体、连锁对和未连锁的标记,也说明了图谱的不完整性,此外由于较低的LOD值部分标记间的距离较大,因此还需要更多的分子标记来增加图谱的覆盖率和密度。

本研究中,雄性连锁图谱有两个连锁群(雄性第18、19个连锁群)其两标记间的遗传图距为0,这些标记是由相同的引物扩增得到的。在很多物种的图谱构建中都出现过这种零重组率的情况^[11,32]。对于这种零重组率的出现,可能与AFLP标记在基因组中的随机分布有关^[34],有的AFLP标记在基因组中的物理距离很近,不发生交换,它们在遗传图谱上的遗传距离就为零。

参考文献:

- [1] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(21): 4 407—4 414.
- [2] Litt M, Luty J. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle acting gene[J]. *Am J Hum Genet*, 1989, 44(2): 391—401.
- [3] Welsh J, Michael M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(24): 7 213—7 218.
- [4] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6 531—6 535.
- [5] Agresti J J, Seki S, Cnaani A, et al. Breeding new strains of tilapia, development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci[J]. *Aquaculture*, 2000, 185(1—2): 43—56.
- [6] Kocher T D, Lee W, Sobolewska H, et al. A genetic linkage map of cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Genetics*, 1998, 148(3): 1 225—1 232.
- [7] Naruse K, Fukamachi S, Mitani H, et al. A detailed linkage map of medaka, *Oryzias latipes*: comparative genomics and genome evolution[J]. *Genetics*, 2000, 154(4): 1 773—1 795.
- [8] Liu ZJ, Karsi A, Li P, et al. An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family[J]. *Genetics*, 2003, 165(2): 687—694.
- [9] Wilson K, Li Y, Whan V, et al. Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism[J]. *Aquaculture*, 2002, 204(3—4): 297—309.
- [10] Li Y, 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.

- [11] 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(1-4): 19-32.
- [12] Li L, Guo X M. AFLP-based genetic linkage maps of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg[J]. *Mar Biothechnol*, 2004, 6(1): 26-36.
- [13] 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.
- [14] Yu Z N, Guo X M. Genetic linkage map of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin[J]. *Biol Bull*, 2003, 204(3): 327-338.
- [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] Wang L, Song L, Chang Y, et al. A preliminary genetic map of Zhikong scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston 1904) [J]. *Aqu Res*, 2005, 36(7): 643-653.
- [17] 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.
- [18] Yu D H, Chu K H. Genetic variation in wild and cultured populations of the pearl oyster *Pinctada fucata* in southern China[J]. *Aquaculture*, 2006, 258(1-4): 220-227.
- [19] 何毛贤, 史兼华, 林岳光, 等. 马氏珠母贝选育子一代的生长特性研究[J]. *热带海洋学报*, 2006, 25(1): 19-22.
- [20] 王爱民, 阎冰, 叶力, 等. 马氏珠母贝不同地理种群内自繁和种群间杂交子一代主要性状的比较[J]. *水产学报*, 2003, 27(3): 200-206.
- [21] Wada K T. Breeding study of the pearl oyster, *Pinctada fucata* [J]. *Bull Natl Res Inst Aqu*, 1984, 6(1): 79-157.
- [22] Wada K T. Genetic selection for shell traits in the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* [J]. *Aquaculture*, 1986, 57(1-4): 171-176.
- [23] Wada K T. Genetic variability at four polymorphic loci in Japanese pearl oysters, *Pinctada fucata martensii*, selected for six generations[J]. *Aquaculture*, 1986, 59(2): 139-146.
- [24] Grattapaglia D, Sederoff R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-test-cross mapping strategy and RAPD markers[J]. *Genetics*, 1994, 137(4): 1121-1137.
- [25] 王小玉, 喻达辉, 郭奕惠, 等. 七种珍珠贝 RAPD 鉴别标记的初步研究[J]. *南方水产*, 2006, 2(1): 18-22.
- [26] Yu D H, Chu K H. Low genetic differentiation among widely separated populations of the pearl oyster *Pinctada fucata* as revealed by AFLP[J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2006, 333(1): 140-146.
- [27] Lander E S, Green P, Abrahamson J, et al. MAPMAKER, an interactive computer package for constructing primary genetic linkage map of experimental and natural populations[J]. *Genomics*, 1987, 1(2): 174-180.
- [28] Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination values[J]. *Ann Eugen*, 1944, 12(2): 172-175.
- [29] Voorrips R E. MapChart, software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs[J]. *J Hered*, 2002, 93 (1): 77-78.
- [30] Chakravarti A, Lasher L K, Reefer J E. A maximum likelihood for estimating genome length using genetic linkage data [J]. *Genetics*, 1991, 128(1): 175-182.
- [31] Young W P, Wheeler P W, Coryell V, et al. A detailed genetic linkage map of rainbow trout produced using double haploid lines[J]. *Genetics*, 1998, 148(2): 839-850.
- [32] 岳志芹, 王伟继, 孔杰, 等. AFLP 分子标记构建中国对虾遗传连锁图谱的初步研究[J]. *高技术通讯*, 2004, 5(1): 88-93.
- [33] 王小玉, 喻达辉, 黄桂菊, 等. 合浦珠母贝家系 F1 代的 AFLP 分析[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(1): 52-58.
- [34] 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.

Construction of genetic linkage maps in pearl oyster *Pinctada fucata* using AFLP markers

YU Da-hui¹, WANG Xiao-yu^{1,2}, GUO Yi-hui¹, HUANG Gui-ju¹, 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 430070, China; 3. Ocean College, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Pearl oyster *Pinctada fucata* is the most important species cultured for pearl production in China. It is cultured mainly along the coasts of Guangdong, Guangxi and Hainan Provinces in south China. Yet great mortalities occurred frequently in recent years, possibly due to genetic degradation. Thereby, a selective breeding program has been initiated for genetic improvement of this animal, including family selection. In this study, male and female linkage maps were constructed preliminarily using AFLP markers based on an Indian family of *Pinctada fucata*. A total of 1 547 markers were generated in two parents and 62 progenies of the mapping family by using 36 screened AFLP primer combinations. Among the 1 547 markers, 581 were polymorphic between the parents. Chi square analysis indicated that among the 294 female and the 287 male segregating markers 178 (60.5%) female and 182 (63.4%) male markers were in agreement with the Mendelian segregating ratio of 1 : 1, based on which the female and male genetic linkage maps were constructed. The female framework map was composed of 33 segregating markers in 14 linkage groups (LGs) including 2 triplets and 11 doublets, covering a total of 488.5 cM with the average interval of 24.3 cM between markers. The male framework map consisted of 53 markers in 19 LGs including 4 triplets and 10 doublets, spanning 1 035.5 cM with the average interval of 30.5 cM. The estimated genome length of the pearl oyster was 1 168.4 cM for the females and 2 037.1 cM for the males, and the observed coverage was 41.8% for the female map and 50.8% for the male map. The genetic linkage maps demonstrated that the AFLP markers appeared to be evenly distributed within the linkage groups. These maps, though preliminary, provide a starting point for further construction of denser maps, as well as for the mapping of functional genes and quantitative trait loci (QTL) in *P. fucata*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 361—368]

Key words: *Pinctada fucata*; genetic linkage map; AFLP marker