

利用 RAPD 和 AFLP 标记初步构建 太平洋牡蛎的遗传连锁图谱*

李 莉 郭希明[†]

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室 青岛 266071; 中国科学院研究生院 北京 100039)

[†](中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室 青岛 266071; Rutgers University, Port Norris, NJ 08349, USA)

提要 利用 RAPD 和 AFLP 标记,以一回交家系[(Miyagi × Hiroshima) × Miyagi]为作图群体,构建了太平洋牡蛎的遗传连锁图谱。用经过筛选的 33 个 RAPD 引物和 11 个 AFLP 引物组合,对父母本和 80 个子代个体进行了遗传分析。共得到母本分离标记 193 个,其中 144 个符合 1:1 孟德尔分离规律。父本分离标记 156 个,其中 111 个符合 1:1 孟德尔分离规律。雌性框架图包括 99 个遗传标记,定位在 12 个连锁群中,覆盖 985.2cM,标记间平均间隔 11.3cM。另外有 3 个三联体,7 个连锁对,图谱共覆盖 1165.7cM。雄性框架图包括 72 个遗传标记,分布在 8 个连锁群,覆盖 811cM,标记间平均间隔 12.7cM。另外有 4 个三联体,3 个连锁对,图谱共覆盖 931.8cM。

关键词 太平洋牡蛎, RAPD, AFLP, 分子标记, 遗传连锁图谱, 基因组 DNA

中图分类号 Q75

近年来,生物遗传连锁图谱的构建是遗传学热点研究领域,很多动植物包括水产动物的基因连锁图谱已经建立。斑马鱼(Postlethwait *et al*, 1994; Gates *et al*, 1999; Kelly *et al*, 2000)、虹鳟(Sakamoto *et al*, 2000)、罗非鱼(Kocher *et al*, 1998; Agresti *et al*, 2000)、鲤鱼(孙效文等, 2000)、对虾(Moore *et al*, 1999; Wilson *et al*, 2002)、鲶鱼(Waldbieser *et al*, 2001)、美洲牡蛎(Yu *et al*, 2003)¹⁾等均有遗传连锁图谱的报道。遗传图谱的建立,为基因定位,特别是一些重要经济性状和数量性状基因(QTL)定位,以至最终克隆这些基因提供了基础,这将最终推动生物的标记辅助选育(MAS)和遗传改良。另外,遗传图谱还是研究基因组结构,生物进化的重要工具。

基因连锁图谱的建立需要大量遗传标记,而近些年来多种分子标记特别是以 PCR 为基础的分子标记得到了很好的发展,这些标记符合孟德尔遗传,多态性丰富,较易检测,为各种生物遗传连锁图谱的快速建立提供了可能。最近几年应用比较广泛的作图标记有 RAPDs(Williams *et al*, 1990; 张国范等, 2002; 李红蕾等, 2002), AFLPs(Vos *et al*, 1995)和微

* 国家杰出青年基金资助项目,39825121 号;国家自然科学基金重点基金资助项目,30140017 号;美国 NJCST 资助项目,00-2042-007-20 号。李 莉,女,出生于 1976 年 1 月,博士生, E-mail: xiaosaner@yahoo.com

1) Yu Z, Guo X, 2003. A genetic linkage map of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Biological Bulletin(in press)

收稿日期:2003-01-06,收修改稿日期:2003-02-24

卫星标记(Litt *et al.*, 1989;徐鹏等,2001)。

贝类的基因组研究相对滞后,太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)属于我国自然分布的种类,也是世界上重要的经济水产动物。Hedgecock 等(2002)利用 100 个微卫星标记构建太平洋牡蛎的遗传图谱,但是详细的图谱还没有正式发表。作者利用 RAPD 和 AFLP 标记,初步构建了太平洋牡蛎的遗传连锁图谱。这是构建高密度的太平洋牡蛎遗传连锁图谱,定位重要的经济性状基因和最终实现太平洋牡蛎的标记辅助选育和遗传改良的第一步。

1 材料与amp;方法

1.1 动物材料

实验所用的太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)为一品系间回交群体[(Miyagi × Hiroshima) × Miyagi]。Miyagi × Hiroshima F₁ 杂交于 1993 年,一雌性 F₁ 个体与来自于 Miyagi 品系的另一雄性个体回交于 1994 年,80 个一龄的牡蛎取样后冰冻保存于 -80℃。

1.2 试剂、引物及仪器

RAPD 随机引物购自 Operon 公司,AFLP 引物购于 MWG 公司,限制性内切酶 *EcoR* I、*Mse* I 和 T4 连接酶购于 New England BioLabs 公司,PCR 反应体系和 DNA Ladder 购于 Promega 公司,其他未作说明试剂均购自 PE 公司。PCR 反应在 PE 公司生产的 9700 PCR 仪上进行。

1.3 DNA 的提取

DNA 的提取参照 Grewe 等(1993)的方法。取牡蛎闭壳肌组织约 15mg,置于 700μl 2 × CTAB 缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, pH = 8.0, 0.7mol/L NaCl, 10mmol/L EDTA, 1% CTAB, 0.1% 2-巯基乙醇),以最终浓度为 150μg/ml 的蛋白酶 K 于 65℃ 消化 1h,酚-仿抽提,用一倍体积的异丙醇沉淀,70%酒精清洗 2 遍,灭菌双蒸水中溶解, -20℃ 保存备用。

1.4 RAPD 分析

RAPD 反应条件参照 Williams 等(1990)的方法。为了减少实验过程中假带的出现,作者采用了两个步骤来筛选引物:(1)利用亲本和 5 个子代个体筛选能够在双亲中扩增出呈现多态,而在子代中呈分离的谱带的引物;(2)利用步骤(1)选出的引物扩增双亲和 15 只子代,选择重复性好,信号强,至少有一条片段在 15 个子代中符合 1:1 分离规律的引物。经步骤(1)、(2)选出引物后完成剩余 60 只子代个体的扩增。PCR 反应分为单引物和双引物体系,单引物体系只有一个随机引物,引物浓度为 25pmol,双引物体系引物为单个引物的随机两两组合,其中单个引物浓度分别为 10pmol。两体系均为 Taq DNA 聚合酶 1U, 0.2mmol/L 每种 dNTP, 1.5mmol/L MgCl₂。PCR 反应共有 45 个循环,每个循环包括 94℃ 1min、36℃ 1min、72℃ 2min。开始循环前 94℃ 预变性 5min,最后 72℃ 延伸 10min。每次反应都设不含模板 DNA 的空白对照。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶于 120V 电压下电泳,然后在 EB 染液中染色,数码相机在紫外灯下拍照。RAPD 标记的鉴定是根据与 100bp DNA ladder 标准谱带的相对位置,估计 RAPD 标记的分子量大小,用引物名称加扩增片段大小,中间加“f”(fragment)来命名 RAPD 标记,例如 Y10f300 表示用引物 Y10 扩增出约 300bp 的片段。

1.5 AFLP 分析

AFLP 分析参照 Vos 等(1995)和 PE 公司“AFLP 植物作图手册”,并作一定的改动。

1.5.1 总 DNA 限制性酶切反应以及人工接头的连接 11 μ l 的反应体系含有 1.1 μ l 10 \times T4 DNA 连接酶缓冲液, 1.1 μ l 0.5mol/L 的 NaCl, 0.55 μ l 1mg/ml BSA, 1U *Mse* I 内切酶, 5U *EcoR* I 内切酶, 50pmol *Mse* I 人工接头和 5pmol *EcoR* I 人工接头。加入 200ng 基因组 DNA, 室温下过夜, 然后用 150 μ l 的 TE_{0.1} (20mmol/L Tris-HCl, 0.1mmol/L EDTA, pH = 8.0) 稀释。

1.5.2 预扩增 反应总体体系为 20 μ l, 其中有 2 μ l 10 \times Taq 酶缓冲液 (50mmol/L KCl, 20mmol/L MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 10mmol/L Tris-HCl pH = 9.0 at 25 $^{\circ}$ C)、dNTP 各 0.2mmol/L, 0.5U Taq 酶, *Mse* I 和 *EcoR* I 引物各 5pmol, 4 μ l 稀释的酶切连接产物。扩增反应条件为: 72 $^{\circ}$ C 2min, 随后是 25 个循环, 每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 25s、56 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 2min。25 个循环之后 60 $^{\circ}$ C 延伸 30min。

1.5.3 选择性扩增 选择性扩增引物是在预扩增引物的基础上随机增加 3 个选择性碱基, 而且 *EcoR* I 引物 5-末端被荧光物质 FAM 或 JOE 标记。选择性扩增反应除 *EcoR* I 和 *Mse* I 选择性扩增引物浓度分别为 1pmol 和 5pmol, 模板为 3 μ l 稀释 10 倍的预扩增产物之外, 反应体系和预扩增反应相同。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 2min, 紧接着 11 个退火温度依次降低 1 $^{\circ}$ C 的循环, 这 11 个循环的第一个循环为: 94 $^{\circ}$ C 20s、66 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 2min, 之后 60 $^{\circ}$ C 延伸 30min。

1.5.4 选择性扩增产物的检测 选择性扩增产物是在 ABI PRISM 310 DNA 测序仪上进行检测的。上样前, 0.5 μ l 的选择性扩增产物, 0.5 μ l 的 GeneScan 500 TAMRATM 标准分子量连同 12 μ l 的去离子甲酰胺, 95 $^{\circ}$ C 变性 3—5min, 立即置于冰浴中。上样后利用数据收集软件和分析软件, 自动检测出 AFLP 片段的大小。AFLP 标记的命名根据 *EcoR* I 和 *Mse* I 选择性扩增引物的选择性碱基加扩增片段的大小。例如 ACACTA98 表示所用的 *EcoR* I 和 *Mse* I 选择性扩增引物的选择性碱基分别为 ACA 和 CTA, 而扩增片段的大小为 98bp。

1.6 分子标记的鉴定

多态片段是指只在一个亲本中出现, 而在另一个亲本中缺失的片段。多态片段在两亲本中互称多态分子标记或简称分子标记。RAPD 和 AFLP 标记的表型分为扩增片段的有 (1) 和无 (0) 两种, 相应的基因型为 AA、Aa (有扩增片段) 和 aa (没有扩增片段)。AA、Aa 都表现为呈现扩增片段, 它们的谱带强度基本不能区分, 所以 RAPD 和 AFLP 标记皆作为显性标记进行筛选。

利用卡方 ($P > 0.05$) 检验, 鉴定多态标记在子代的分离比是否符合 1:1 孟德尔分离规律。这些在一个亲本中出现, 而且在子代中呈 1:1 分离的标记用来构建太平洋牡蛎的遗传连锁图谱。

1.7 连锁分析

作者采用 Kosambi 函数计算图距 (Kosambi, 1944), 单位为“厘摩” (cM, centiMorgan) (Paterson, 1996)。而遗传图谱的绘制应用软件 Mapchart (Voorrips, 2001)。

用 A 代替 0, H 代替 1, 将母本和父本 1:1 分离标记分别转化成 MAPMAKER/EXE (3.0) (Lander *et al.*, 1987) 的数据格式, 利用 GROUP 命令 (LOD \geq 3.0, 标记之间的两两最大距离为 30cM), 对现有标记进行了分组。大于 9 个标记的连锁群, 用 THREE POINT 命令或利用比分组更为严谨的条件将连锁群分为几个亚群, 对每个亚群分别进行排序后, 再确定亚群之间的顺序。小于或等于 9 个遗传标记的连锁群, 采用 COMPARE 命令进行排序。

当连锁群中的标记排好序之后,利用 MAP 命令计算标记间距离。对于应用以上命令还未能加入的标记,采用 TRY 命令进行定位。

1.8 遗传图谱的平均间隔、实际长度、预期长度和覆盖率的计算

遗传图谱的标记平均间隔为图谱长度除以总间隔数,而总间隔数为图谱上标记总数减去连锁群数。每个连锁群的标记平均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。遗传图谱实际长度分为两个方面:一为框架图长度(G_{of}),二为包括三联体和连锁对在内的所有连锁标记的长度(G_{oa})。计算遗传图谱的预期长度(G_e)参照 Chakravarti 等(1991)的方法,每个连锁群的估计长度为实际长度乘以系数 $(m+1)/(m-1)$, m 为每个连锁群的遗传标记数。而相应的框架图覆盖率 $C_{of} = G_{of}/G_e$,总的图谱覆盖率 $C_{oa} = G_{oa}/G_e$ 。

2 结果

2.1 RAPD 和 AFLP 分析

120 个 RAPD 单引物和 20 对引物组合用于分析亲本和 5 个子代个体,而最终用于所有子代个体的有 27 个单引物和 6 对引物组合。这些引物,共产生 338 条片段,大部分片段大小在 300—1500bp 之间。有 102(30.2%)条片段在两亲本间呈现多态,平均每个引物扩增出 10.2 个片段,其中有 3.1 个为多态标记,有 94 个遗传标记在子代中产生了分离。母本分离标记有 55 个,父本分离标记有 39 个。母本有符合孟德尔遗传的分离标记 45 个,父本有孟德尔遗传分离标记 29 个。其他引物或者没有多态片段,或者产生的多态片段可重复性和清晰度欠佳。

AFLP 产物在 ABI PRISM™ 310 DNA 测序仪上以峰带的形式被检出。利用亲本和 5 个子代,从 40 个 AFLP 引物组合中选择出 11 对扩增产物质量好,多态标记多的引物组合,对所有子代个体进行了 AFLP 分析。11 个引物组合共扩增出 883 条片段,平均每个引物组合扩增出 80.3 个片段。其中有 279 个标记在父母本中呈现多态,占总扩增片段的 31.6%,平均每个引物组合产生 25.4 个多态标记。母本分离标记 138 个,有 99(71.7%)个符合 1:1 孟德尔分离规律;父本有 117 个分离标记,其中有 82(70.1%)个符合 1:1 孟德尔分离规律。

RAPD 和 AFLP 共产生 144 个母本 1:1 分离标记,111 个父本 1:1 分离标记。94 个偏分离标记有 72 个(76.6%)标记为纯合子缺乏,22 个(23.4%)标记杂合子缺乏。所有 RAPD 和 AFLP 引物扩增结果见表 1。

表 1 33 个 RAPD 引物和 11 个 AFLP 引物组合在一太平洋牡蛎家系中的扩增结果

Tab.1 Summary of 33 RAPD and 11 AFLP primers combination detected in a Pacific oyster

Crassostrea gigas backcross family

引物(组合)	多态标记/总片段数	母本 1:1 分离标记/ 总分离标记	父本 1:1 分离标记/ 总分离标记	偏分离标记/亲本中总 的分离标记数
33 个 RAPD 引物	102/338(30.2)	45/55	29/39	20/94(21.2)
11 个 AFLP 引物组合	279/883(31.6)	99/138	82/117	74/255(29.0)
总计	381/1221(31.2)	144/193	111/156	94/349(26.9)

注:括号内数字为百分比

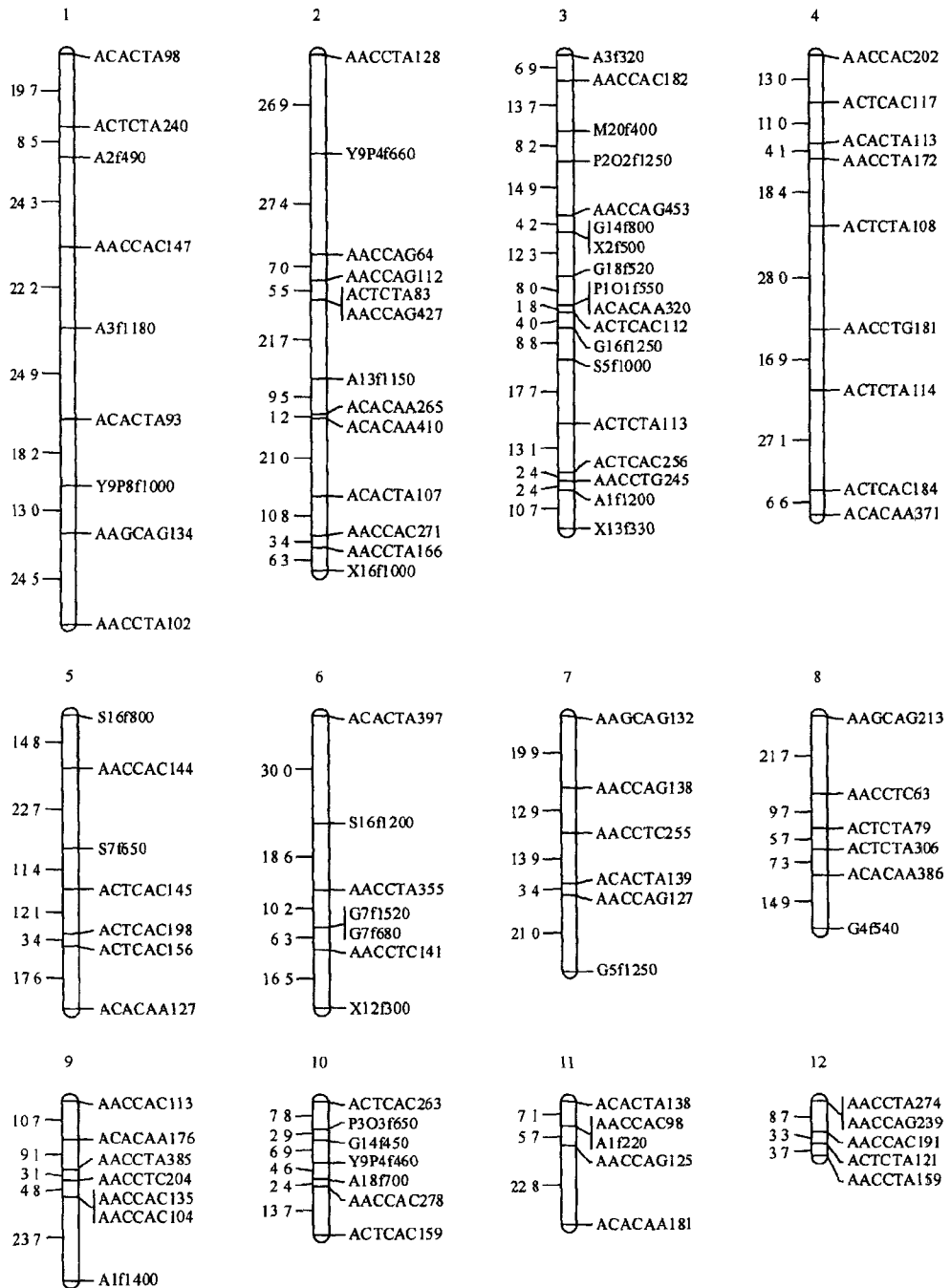


图 1 太平洋牡蛎雌性遗传连锁图谱

Fig.1 The female genetic linkage map for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*
 连锁群右侧为遗传标记名称,左侧为相邻两个标记间的距离,单位为 cM Kosambi

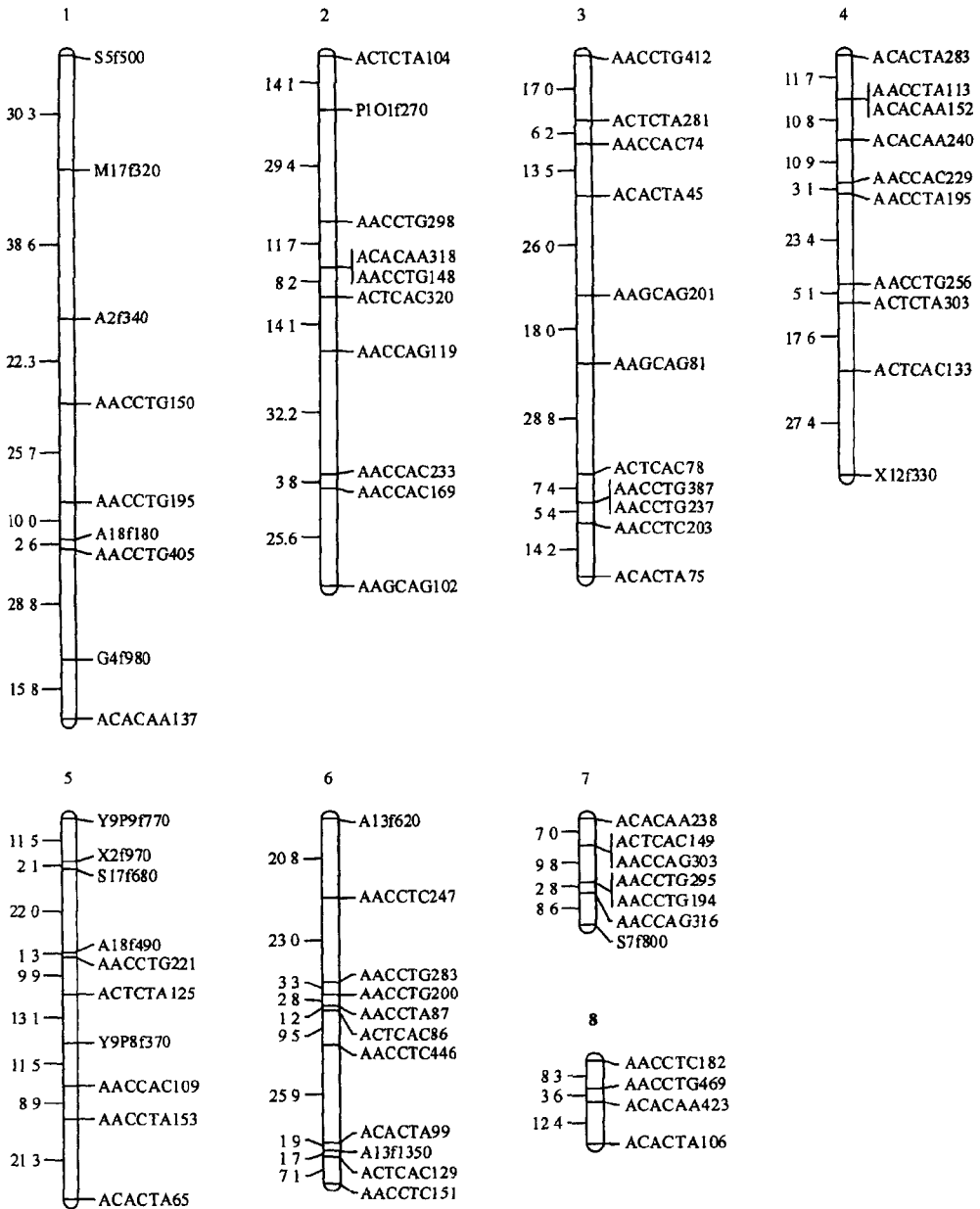


图2 太平洋牡蛎雄性遗传连锁图谱

Fig.2 The male genetic linkage map for the Pacific oyster *C. gigas*

2.2 遗传连锁图谱

分别对 144 个母本分离标记和 111 个父本分离标记进行了连锁分析,得到了雌、雄两个遗传连锁图谱。雌性图谱共有 99 个标记构成了 12 个连锁群(4 个或 4 个以上标记)。

连锁群长度在 15.7—155.3cM 之间(图 1), 框架图总长度(G_{of})为 985.2cM。各连锁群的标记平均间隔在 3.9—19.4cM 之间, 所有标记平均间隔为 11.3cM。另外有 3 个三联体, 7 个连锁对。15 个标记和其他标记没有连锁关系。连锁图谱总长度(G_{oa})为 1165.7cM。有 7 个标记和连锁群上的标记有连锁关系, 但是没有呈现很好的线性关系, 它们的加入会拉长遗传图谱, 所以未将这些标记定位到连锁图谱中。经计算雌性图谱的预期长度为 1256.2cM, 相应的框架图谱的覆盖率 C_{of} 为 78.4%, 图谱总长度覆盖率 C_{oa} 为 92.8%。

在雄性连锁图谱中, 有 72 个标记定位在 8 个连锁群(4 个或 4 个以上标记)(图 2), 连锁群长度在 24.3—174.1cM 之间共覆盖 811cM。各连锁群标记平均间隔在 4.7—21.8cM 之间。图谱总标记平均间隔为 12.7cM。另外有 4 个三联体、3 个连锁对、17 个未连锁标记和 4 个连锁但未定位的标记。所有连锁标记的长度为 931.8cM。雄性图谱的预期长度为 1004.7cM, 相应的框架图谱的覆盖率 C_{of} 为 80.7%, 图谱总长度覆盖率 C_{oa} 为 92.7%。遗传连锁图谱的框架图的总结列表于 2。

表 2 太平洋牡蛎雌性和雄性连锁图谱总结

Tab.2 Summary of the female and male linkage map for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

连锁群	连锁群长度(cM)	标记数	平均间隔(cM)	最大间隔(cM)	估计连锁群长度(cM)	
♀	1	155.3	9	19.4	24.9	194.1
	2	140.7	13	11.7	27.4	164.2
	3	129.1	18	7.6	17.7	144.3
	4	125.1	9	15.6	27.1	156.4
	5	82.0	7	13.7	22.7	109.3
	6	81.6	7	13.6	18.6	108.8
	7	71.1	6	14.2	19.9	99.5
	8	59.3	6	11.9	21.7	83.0
	9	51.4	7	8.6	23.7	68.5
	10	38.3	7	6.4	13.7	51.1
	11	35.6	5	8.9	22.8	53.4
	12	15.7	5	3.9	8.7	23.6
合计	985.2	99	11.3	27.4	1256.2	
♂	1	174.1	9	21.8	38.6	217.6
	2	139.1	10	15.5	32.2	170.0
	3	136.5	11	13.7	28.8	163.8
	4	110.0	10	12.2	27.4	134.4
	5	101.6	10	11.3	21.3	124.2
	6	97.2	11	9.7	25.9	116.6
	7	28.2	7	4.7	9.8	37.6
	8	24.3	4	8.1	12.4	40.5
合计	811.0	72	12.7	38.6	1004.7	

注:图距单位为 cM Kosambi

3 讨论与结论

3.1 遗传连锁图谱

利用 RAPD 和 AFLP 标记,初步构建了太平洋牡蛎雌性和雄性遗传连锁图谱。与其他种如虹鳟(Young *et al*, 1998)、罗非鱼(Agresti *et al*, 2000)和一些植物(Castiglioni *et al*, 1999; Haanstra *et al*, 1999) AFLP 标记在连锁图上成簇分布相比较,太平洋牡蛎图谱的遗传标记分布较为均匀。这可能是种间的差异,也可能是因为本文中所报道的遗传图谱密度较低造成的。另外雌性图中有 7 对标记,雄性图中有 5 对标记在子代基因型完全相同,在图谱中处于同一个位点,这可能由于两个标记紧密连锁,有限的作图群体不足以检测到两标记之间的重组交换。细胞学观察显示,太平洋牡蛎一个染色体平均有 1.1—1.3 个交叉(Chiasmata)(未发表数据),理论上对应的遗传图谱长度应为 550—650cM,然而此文报道的两个图谱的长度都远远大于这一数值。造成这一现象可能有以下几个原因:(1) 子代基因型分析过程中有错误发生(Collins *et al*, 1996);(2) MAPMAKER 这个作图软件本身能够使遗传连锁图谱的长度加大(Sybenga, 1996);(3) 遗传图谱的长度会因为图谱密度过低而加大。一般来说,当遗传图谱的覆盖率非常低时,其长度会随着遗传标记的增加而增大,而当覆盖率达到了一定数值后,遗传图谱标记的平均间隔和遗传图谱的总长度会降低。以家蚕为例,1018 个 RAPD 标记产生的图谱长度为 2000cM(Yasukochi, 1998),而 356 个 AFLP 标记产生的遗传连锁图谱有 6512cM(Tan *et al*, 2001)。显然,还需要大量的标记来增加这两个太平洋牡蛎连锁图的标记密度和图谱覆盖率。理论上一个完整的连锁图谱连锁群数目应该和其单倍体的染色体数目相等。太平洋牡蛎基因组有 10 条染色体,完整的连锁图谱应有 10 个连锁群,而本文中的雌性连锁图谱有 12 个连锁群,说明雌性遗传连锁图谱中至少存在着 2 个大的间隙,还需要更多的标记使得这 12 个连锁群的 2 个连锁群和其他连锁群合并。而雄性框架图谱只有 8 个连锁群,还需要更多的标记定位到至少两个染色体所对应的连锁群上。不同染色体之间的重组值有所差异会造成连锁群之间长度不同,但是本图谱中连锁群长度的差异很可能是由于遗传图谱的不完整造成的。另外,雌性和雄性两个图谱都有相对较多的三联体,连锁对以及未连锁标记(见结果 2.3),都反映了图谱的不完整性,尚需更多的标记来增加图谱的覆盖率和密度。

3.2 作图标记

Pejic 等(1998)证明 AFLP 的检测指数(Assay Efficiency Index)为 RAPD 的 10.7 倍。本文中每个 AFLP 引物组合产生的多态标记(平均 25.4)远远大于 RAPD(平均 3.1)的事实也证明了这一点。显然 AFLP 是一种比 RAPD 更高效的作图标记。较高比例的偏分离是太平洋牡蛎的一个重要特征,McGoldrick 等利用同工酶报道了 31% 的偏分离(McGoldrick *et al*, 1997),作者利用 RAPD 和 AFLP 标记分别检测出了 21.2% 和 29.0% 的偏分离。RAPD 偏分离标记比例低于 AFLP 标记,可能是因为在筛选 RAPD 引物时有目的的剔除掉只扩增出偏分离而没有 1:1 分离标记的引物造成的。关于太平洋牡蛎较高的偏分离,Launey 等(2001)解释为太平洋牡蛎含有很高的遗传负荷(Genetic Load),当分子标记和这些致死基因相连锁时,就表现为较高比例的偏分离。本文中所报道的 94 个偏分离标记有 23.4% 为杂合子缺乏,76.6% 为纯合子缺乏也证明了这一点。基于此原因,为了降低偏分离,利用幼虫作为作图群体是一很好的策略(Hedgecock *et al*, 2002)。当然作图群体数量的有限性

也可能是出现较高偏分离的原因。

RAPD 和 AFLP 作为显性标记有两个弱点:其一是不能区分纯合子和杂合子,造成本实验雌性和雄性图谱之间没有相同的分子标记,从而不能对两个图谱进行比较和整合;其二是在不同的家系间兼容性较差。可以将 RAPD 和 AFLP 标记转化成共显性标记来克服此弱点。Beeman 等(1999)对 18 个 RAPD 片段进行测序,最终鉴定出 4 个共显性 STS 多态位点。RAPD 标记因其片段大小一般在 500—1500bp 之间,所以很容易转化成 SCARs(Sequence Characterized Amplified Region)或 CAPSs(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)等共显性标记(Barret *et al*, 1998)。Meksen 等(2001)将 10 个和黄豆抗性基因相连锁的 AFLP 标记成功的转化成了 6 个 STS 标记。Negi 等(2000)将一个和决定豆粒颜色基因相连锁的 AFLP 标记转化成为 SCAR 标记。另外,由于 RAPD 尤其是 AFLP 标记可以在某个家系中相对快速建立,所以使得两种标记在不同家系中的转移不是必需的。

除 RAPD 和 AFLP 标记,微卫星标记也是一种应用比较多的作图标记。微卫星标记同一基因座位有很多等位基因,呈共显性分离,决定了微卫星标记可以在不同的家系之间转移,这都是 AFLP 和 RAPD 等显性标记所不能企及的,所以是一种非常理想的作图标记。但是要发展一定数量的微卫星标记需要建立相应的文库和进行大量的测序,使其大规模发展受到一定限制。RAPD 因其快速,方便,经济;AFLP 因其高效,可靠性高,分辨率强等优点使其成为构建遗传连锁图谱不可缺少的遗传标记。

参 考 文 献

- 孙效文,梁利群,2000. 鲤鱼的遗传连锁图谱(初报) 中国水产科学,7(1):1—5
- 李红蕾,宋林生,刘保忠等,2002. 栉孔扇贝不同种群的遗传结构及杂种优势 海洋与湖沼,33(2):188—195
- 张国范,王继红,赵洪恩等,2002. 皱纹盘鲍中国群体和日本群体的自交与杂交 F₁ 的 RAPD 标记 海洋与湖沼,33(5):484—491
- 徐 鹏,周岭华,相建海,2001. 中国对虾微卫星 DNA 的筛选 海洋与湖沼,32(3):255—259
- Agresti J J, Seki S, Cnaaani A *et al*, 2000. Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. *Aquaculture*, 185:43—56
- Barret P, Delourme R, Foisset N *et al*, 1998. Development of a SCAR (sequence characterized amplified region) marker for molecular tagging of the dwarf BREIZH(Bzh) gene in *Brassica napus* L. *Theor Appl Genet*, 97:960—967
- Beeman R W, Brown S J, 1999. RAPD-based genetic linkage maps of *Tribolium castaneum* *Genetics*, 153:333—338
- Castiglioni P, Ajmone-Marsan P, Wijk R V *et al*, 1999. AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. *Theor Appl Genet*, 99:425—431
- Chakravarti A, Lasher L K, Reefer J E, 1991. A maximum likelihood for estimating genome length using genetic linkage data. *Genetics*, 128:175—182
- Collins A, Teague J, Keats B J B *et al*, 1996. Linkage map integration. *Genomics*, 36:157—162
- Gates M A, Kim L, Egan E S *et al*, 1999. A genetic linkage map for zebrafish comparative analysis and localization of genes and expressed sequences. *Genome Res*, 9:334—347
- Grewe P M, Krueger C C, Aquadro C F *et al*, 1993. Mitochondrial DNA variation among lake trout (*Salvelinus namaycush*) strains stocked into Lake Ontario. *Can J Fish Aquat Sci*, 50:2397—2403
- Haanstra J, Wye C, Verbakel H *et al*, 1999. An Integrated high-density RFLP-AFLP map of tomato based on two *Lycopersicon esculentum* × *L. pennellii* F₂ populations. *Theor Appl Genet*, 99:254—271
- Hedgecock D, Hubert S, Li G *et al*, 2002. A genetic linkage map of 100 microsatellite markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* J

- Shellfish Res, 21(1):381
- Kelly P D, Chu F, Woods L G *et al*, 2000 Genetic linkage mapping of zebrafish genes and ESTs Genome Res, 10:558—567
- Kocher T D, Lee W, Sobolewska H *et al*, 1998. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) Genetics, 148:1225—1232
- Kosambi D D, 1944. The estimation of map distances from recombination values. Ann Eugen, 12:172—175
- Lander E S, Green P, Abrahamson J *et al*, 1987. MAPMAKER, an interactive computer package for constructing primary genetic linkage map of experimental and natural populations. Genomics, 1:174—180
- Launey S, Hedgecock D, 2001 High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Genetics, 159:155—165
- Litt M, Luty J, 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle acting gene. Am J Hum Genet, 44:391—401
- McGoldrick D J, Hedgecock D, 1997. Fixation, segregation and linkage of allozyme loci in inbred families of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg): implications for the causes of inbreeding depression. Genetics, 146:321—334
- Meksen K, Ruben E, Hyten D *et al*, 2001 Conversion of AFLP bands into high-throughput DNA markers. Mol Genet Genomics, 265:207—214
- Moore S S, Whan V, Davis G P *et al*, 1999. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Aquaculture, 173:19—32
- Negi M S, Devic M, Delseny M *et al*, 2000. Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection. Theor Appl Genet, 101:146—152
- Paterson A H, 1996. Genome Mapping in Plants. New York: R. G. Landes Company, 1—32
- Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M *et al*, 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs Theor Appl Genet, 97:1248—1255
- Postlethwait J H, Johnson S L, Midson C N *et al*, 1994. A Genetic linkage map for the zebrafish. Science, 264:699—703
- Sakamoto T, Danzmann R G, Gharbi K *et al*, 2000 A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. Genetics, 155:1331—1345
- Sybenga J, 1996. Recombination and chiasmata: a few intriguing discrepancies. Genome, 39:473—484
- Tan Y, Wan C, Zhu Y *et al*, 2001 An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm. Genetics, 157:1277—1284
- Voorrips R E, 2001. Mapchart Version 2.0: Windows Software for the Graphical Presentation of the Linkage Maps and QTLs Plant Research International, Wageningen, The Netherlands, 1—15
- Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al*, 1995 AFLP: a new technique for DNA fingerprinting Nucleic Acids Res, 23:4407—4414
- Waldbieser G C, Bosworth B G, Nonneman D J *et al*, 2001 A microsatellite-based genetic linkage map for Channel catfish, *Ictalurus punctatus* Genetics, 158:727—734
- Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J *et al*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res, 18:6531—6535
- Wilson K, Li Y, Whan V *et al*, 2002. Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism. Aquaculture, 204:297—309
- Yasukochi Y, 1998. A dense genetic map of the silkworm I *Bombyx mori*, covering all chromosome based on 1018 molecular markers. Genetics, 150:1513—1525
- Young W P, Wheeler P A, Coryell V H *et al*, 1998. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. Genetics, 148:1—13

THE CONSTRUCTION OF A PRELIMINARY GENETIC LINKAGE MAP IN THE PACIFIC OYSTER USING RAPD AND AFLP MARKERS

LI Li, GUO Xi-Ming[†]

(*Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology,
The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071;
Graduate School, The Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039*)
[†](*Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology,
The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071;
Rutgers University, Port Norris, NJ 08349, USA*)

Abstract RAPD and AFLP markers were used to construct the primary linkage map in a backcross population [(Miyagi × Hiroshima) × Miyagi] for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Thirty-three RAPD primers and 11 AFLP primer combinations were selected from 120 RAPD and 40 AFLP primer combinations. The primers produced 338 RAPD and 883 AFLP fragments in the parents and 80 progeny of the mapping family. Among the 1221 fragments, 381 were polymorphic between the parents. One hundred and ninety-three in the female and 156 in the male were segregating markers, among which 144 female and 111 male markers were in agreement with the Mendelian 1:1 ratio, and 94 segregating markers were distorted markers. Twenty-two (23.4%) distorted markers were heterozygote-deficiency, and 72 (76.6%) were homozygote-deficiency. Two genetic linkage maps were constructed based on the female and male 1:1 segregating markers. The female framework map was composed of 99 segregating markers which were linked in 12 linkage groups (with or more than 4 markers), covering a total of 985.2cM with the average interval of 11.3cM. With 3 triplets and 7 doublets, the total length of the female map was 1165.7cM. Additionally, 15 markers were unlinked and 7 markers were linked but unmapped in the female map. For the male map, the framework map contained 72 markers which were linked in 8 large linkage groups (with or more than 4 markers), spanning 811cM with the average marker density of 12.7cM. The other linked markers were resolved into 4 triplets and 3 doublets. The total male map covered 931.8cM. The unlinked and unmapped markers in the male map were 17 and 4, respectively. The estimated genome length of the Pacific oyster was 1256.2cM for the female and 1004.7cM for the male, and the observed coverage was 78.4% for the female and 80.7% for male map. The evaluation of the map, the reason for the high percentage of distorted markers and the features of RAPD and AFLP as mapping markers were also discussed in the paper.

Key words Pacific Oyster *Crassostrea gigas*, RAPD, AFLP, Marker, Genetic mapping, Genome DNA