

运用拟测交策略构建遗传图谱的理论依据及研究进展

The theory base of constructing genetic map using "pseudo-testcross" mapping strategy and its development

刘贤德^{1,2}, 张国范¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 福建省高校水产科学技术与食品安全省重点实验室, 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)10-0081-05

遗传图谱(genetic map), 又称连锁图谱(linkage map)或遗传连锁图谱(genetic linkage map), 是指依据基因(或 DNA 标记)在染色体上的重组值(或交换值), 将染色体上的各个基因/标记之间的距离和顺序标志出来, 绘制而成的图谱。

长期以来, 各种生物的遗传图谱几乎都是根据诸如形态、细胞学标记和生化常规标记来构建的。在 20 世纪 80 年代以前的几十年中, 尽管进行了 100 余种作物经典图谱的构建^[1], 但事实上所建成的遗传图谱仅限少数种类的生物, 而且图谱分辨率大都很低, 标记少, 图距大, 饱和度低, 因而应用价值十分有限。

进入 20 世纪 80 年代, 遗传学领域最激动人心的进展之一是利用 DNA 水平上的变异作为遗传标记进行遗传作图^[2]。1987 年, Donis-Keller 等^[3]在 Cell 上发表了第一张人类的 RFLP 分子标记连锁图, 其饱和度远远超过了经典的遗传图谱。之后, 许多生物的 RFLP 图谱相继问世^[4,5]。随着新的 DNA 标记技术的发展, 生物遗传图谱名单上的新成员不断增加, 图谱上标记的密度也越来越高。

但迄今为止, 分子标记的连锁分析主要还是应用到由两个同源二倍体亲本杂交得到的 F₁ 代的衍生系, 如 BC₁, F₂, RILs 及双单倍体。一个重要的原因是这种群体的连锁分析或多或少都可以直接进行, 并且通过连续回交可以将已定位的基因进行导入(基因渐渗)^[6]。

对来自于自交系杂交的子代和异源动植物杂交所得的全同胞家系子代的连锁分析的主要差异在于亲本每个位点分离的等位基因个数及位点的连锁相不同。对于分离群体如 BC₁, F₂, RILs (作者认为 BC₁, F₂, RILs 是来源于两个完全纯合的亲本) 是建立在两个非一致(non-identical)的自交系基础之上

的, 因此, 所有发生分离位点中仅有两个等位基因发生分离, 而且所有来源于一个亲本的等位基因在 F₁ 都以相引相存在。相对的, 对于一个来源于非自交系的杂交, 一个位点最多可能有 4 个等位基因发生分离, 并且因位点的不同而发生变化, 同时连锁相也不知道。这些差异使异交(异源亲本杂交)全同胞家系的连锁分析变得复杂, 目前已有多种方法可以解决这些问题并使之在异源动植物品种上的连锁分析变得可能。一个比较直接的方法就是所谓的双拟测交(two-way pseudo-testcross)^[7,8], 即对每一个亲本进行单独的连锁分析。

1 拟测交策略

拟测交策略开始的时候主要是应用于林木等多年生异交植物, 由于林木的遗传组成高度杂合, 一般都有自交不亲和和近交衰退现象, 要像作物那样利用近交系或其他高世代群体进行遗传构图是不太可能的, 因此, 近年来在林木的图谱构建中发展出来一种策略, 即以亲缘关系相对较远的杂合亲本交配所得的 F₁ 为作图群体, 因亲本杂合, 许多位点在 F₁ 中即发生分离, 选取在亲本中多态且在 F₁ 中以 1:1 分离的位点来模拟近交系中的测交位点作图, 这种作图方法称为拟测交策略。

1.1 拟测交位点

对于显性分子标记 AFLP 及 RAPD 标记来讲, 在一个位点上, 双亲共有 2 类组合类型, I 在子代中

收稿日期: 2007-12-10; 修回日期: 2008-05-10

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA10A407), 集美大学创新团队基金项目(2006A001)

作者简介: 刘贤德(1974-), 男, 山东枣庄人, 博士, 讲师, 研究方向: 水产动物遗传育种与生物技术, E-mail: xdlu@jmu.edu.cn; 张国范, 通讯作者, 电话: 0532-82898701, E-mail: gzfzhang@ms.qdio.ac.cn

不分离 AA×AA、AA×Aa、Aa×AA、AA×aa 和 aa×AA (A、a 分别表示同一标记位点的显、隐性标记)。II 在子代中分离。当双亲的标记组合分别为 Aa×aa、aa×Aa 与 Aa×Aa 时,符合此分离方式。对于双亲是 Aa×aa 和 aa×Aa 这样的分离位点,称之为拟测交位点,将这种位点所有的标记分别收集起来,可以分别进行雌性图谱和雄性图谱的构建。而对亲本的分类型是 Aa×Aa 的所有标记都收集起来,可以进行双亲共同图谱的构建。

1.2 拟测交位点重组频率的计算

对于 AFLP 及 RAPD 等显性分子标记来讲,由于隐性位点与无效等位基因的情形在实验结果上表

表 1 $\frac{AB}{OO} \times \frac{OO}{OO}$ 配子频率分布

配子类型/配子频率	OO/[(1-p)/2]	OO/[(1-p)/2]	OO/(p/2)	OO/(p/2)
AB/[(1-p')/2]	AB	AB	AB	AB
OO/[(1-p')/2]	OO	OO	OO	OO
AO/[p/2]	AO	AO	AO	AO
OB/[p'/2]	OB	OB	OB	OB

如果经过检验,证明 A 和 B 连锁,那么重组频率的估计值可以通过求解最大似然等式 1 来解决:

$$\frac{\partial \ln L(p)}{\partial p} = \sum_j Z_j \frac{1}{p_j} \frac{\partial p_j}{\partial p} = 0 \quad (1)$$

式中, p_j 为期望频率, Z_j 为观察到的表型个数。在等式(1)和以下的等式(2)中,式中各项的计算见表 2,重组率的估计质量可由信息函数 I_p 反应出来^[9]。

$$-E\left(\frac{\partial^2 \ln L(p)}{\partial p^2}\right) = n \sum_j \frac{1}{p_j} \left(\frac{\partial p_j}{\partial p}\right)^2 = ni = I_p \quad (2)$$

这里 n 为样本量(作图群体的个体数),估计重组率 p 的方差为

$$V(p) = \frac{1}{I_p} \quad (3)$$

表 2 式(1)各项值的计算

表型	p_j	$\frac{\partial p_j}{\partial p}$	$\frac{1}{p_j} \frac{\partial p_j}{\partial p}$	$\frac{1}{p_j} \left(\frac{\partial p_j}{\partial p}\right)^2$	Z_j
AB	(1-p)/2	-1/2	-1/(1-p)	1/2(1-p)	a
AO	p/2	1/2	1/p	1/2p	b
OB	p/2	1/2	1/p	1/2p	c
OO	(1-p)/2	-1/2	-1/(1-p)	1/2(1-p)	d
合计	1	0		$i=1/p(1-p)$	n

其标准差为 $\sqrt{V(p)}$,最大似然估计值为重组率 p 最小方差的无偏估计^[10],在表 2 中,期望频率 p_j 是由特

现是一致的,均为无带出现,所以统一计为 0。对于两位点 A、B,假设它们在双亲中的重组率相等($p=p'$),则这两个位点在子代中的分离情形如表 1(以 AB/OO×OO/OO 为例)。表 1 中,如果 A、B 完全连锁($p=0$),则双亲表型在 F_1 子代中各占 50%,即 AB:AO:OB:OO 的比例应为 8:0:0:8。如果自由分离($p=0.5$),则出现 4 种表型(两个双亲型,两个重组型),频率各为 25%,即 AB:AO:OB:OO 的比例应为 4:4:4:4,所以重组率可以通过与完全连锁和独立分配带型的差异进行计算。利用卡方检验,可以检验表型(带型)分离是否严重偏离独立分配的期望分离比例^[9]。

定表型配子乘积加和得到的,如:

$$p_{AB} = \left(\frac{1-p}{2} \frac{1-p'}{2}\right) + \left(\frac{1-p}{2} \frac{1-p'}{2}\right) + \left(\frac{p}{2} \frac{1-p'}{2}\right) + \left(\frac{p}{2} \frac{1-p'}{2}\right) = \frac{1-p}{2}$$

其中,雄性配子的重组频率(p)等于雌性配子的重组频率(p'),其他类型的期望频率可以用类似的方法得到。由于其他各项均为 p_j 的导数,将上述各项代入方程 1,则方程 1 变为:

$$\frac{-a}{1-p} + \frac{b}{p} + \frac{c}{p} + \frac{-d}{1-p} = 0$$

对 p 求解,可以得到 p 的估计值:

$$p = \frac{b+c}{a+b+c+d} = \frac{b+c}{n}$$

由 2、3 式可以得到:

$$\hat{V}(p) = \frac{p(1-p)}{n}$$

上面分析是两位点情形,实际可检测到的这种位点是很多的,通过多点分析和基因的直线排序,利用 Kosambi 函数完成重组率与图距间的转换,就可以完成图谱构建。

2 研究进展

由于作图群体容易建立,连锁分析也相对简单,因此,自从拟测交策略提出来之后,利用这种方法进行遗传图谱构建的工作进展很快。目前,应用拟测

交策略已构建了很多林木的遗传图谱^[7, 8, 11~15]。

海洋生物遗传图谱构建工作起步较晚,但发展很快,目前已有不少运用拟测交策略进行遗传图谱构建的报道。Li 等^[16]运用 AFLP 标记技术,对日本对虾(*Penaeus japonicus*)进行了图谱构建,在父本定位了 227 个标记,分布在 43 个连锁群上,标记间的平均距离为 9.68 cM;母本定位了 125 个标记,分布在 31 个连锁群上,标记的平均间距达到 10.9 cM。Wang 等^[17],Li 等^[18],Wang 等^[19]利用 AFLP 标记技术,进行了栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)图谱的构建;万俊芬^[20]利用拟测交策略进行了皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)和日本盘鲍(*Haliotis discus discus* Ino)遗传图谱的初步构建,皱纹盘鲍共得到 12 个连锁群,包括 35 个位点,总图距为 366 cM,日本盘鲍得到 14 个连锁群,包括 39 个位点,总图距为 410 cM,由于整合的位点较少,该图谱并没有发表。Liu 等^[21]运用 AFLP、RAPD 和微卫星标记技术构建了皱纹盘鲍的遗传图谱,雌性图谱包括 119 个标记、分布于 22 个连锁群,覆盖 1 773.6 cM,雄性图谱包括 94 个标记,分布于 19 个连锁群,总长度为

1 365.9 cM。近来,海湾扇贝(*Argopecten irradians*)的遗传图谱已有报道^[22, 23]。Wang 等^[22]的图谱以引进中国并开展人工大规模养殖的海湾扇贝为对象,利用 AFLP 和 EST-SSRs 两种标记构建,雌性图谱由 147 个标记组成,分布于 17 个连锁群,总长度 1 892.4 cM,雄性图谱包括 146 个标记、18 个连锁群,总长度为 1 937.1 cM。Qin 等^[23]的海湾扇贝雌雄图谱包含 120 个标记,分布于 15 个连锁群,覆盖基因组 479.6 cM,平均间隔为 7.0 cM,雄性图谱包含 190 个标记,覆盖基因组 883.8 cM 平均间隔 7.2 cM,雌性和雄性图谱的平均覆盖率分别为 70.4% 和 81.1%。另外,黑鲍(*Haliotis rubra*)^[25]、贻贝(*Mytilus edulis*)^[26]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[27]、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[28, 29]、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)^[30]、光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)和中间球海胆(*S. intermedius*)^[31]、玻璃海鞘(*Ciona intestinalis*)^[32]、白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)和鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)^[33]、孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)^[34]等海洋生物的遗传图谱也已构建,具体总结如表 3。

表 3 使用拟测交策略构建的海洋生物遗传图谱

水产动物	图谱类别	标记种类	标记个数	连锁群个数	图谱长度(cM)	平均密度(cM)	覆盖率(%)	参考文献
栉孔扇贝	雌性图谱	AFLP	97	20	1 610.2	20.91	60.1	[17]
	雄性图谱		94	19	1 511.4	20.15	66.6	
栉孔扇贝	雌性图谱	AFLP	166	19	1 503.9	10.2	79.6	[18]
	雄性图谱		197	20	1 630.7	9.2	81.7	
栉孔扇贝	雌性图谱	AFLP	198	25	3 130.0	15.8	66.05	[19]
	雄性图谱		166	23	2 468.0	14.9	66.56	
皱纹盘鲍	雌性图谱	AFLP, RAPD, SSR	119	22	1 773.6	18.3	74.9	[21]
	雄性图谱		94	19	1 365.9	18.2	73.1	
皱纹盘鲍	雌性图谱	AFLP	174	18	2 031.4	13.0	81.2	[24]
	雄性图谱		195	19	2 273.4	12.9	82.1	
黑鲍	雌性图谱	Microsatellite	98	20	765.9	9.8	64.0	[25]
	雄性图谱		102	17	621.0	7.3	80.0	
海湾扇贝	雌性图谱	AFLP, SSR	147	17	1 892.4	12.9	-	[22]
	雄性图谱		146	18	1 937.1	13.3	-	
海湾扇贝	雌性图谱	AFLP	120	15	479.6	7.0	70.4	[23]
	雄性图谱		190	17	883.8	7.2	81.1	
贻贝	雌性图谱	AFLP	121	14	862.8	8.0	76.7	[26]
	雄性图谱		116	14	825.2	8.09	75.9	

表 3 续

水产动物	图谱类别	标记种类	标记个数	连锁群个数	图谱长度(cM)	平均密度(cM)	覆盖率(%)	参考文献
凡纳滨对虾	雌性图谱	AFLP	212	51	2 771.0	17.1	62.0	[27]
	雄性图谱		182	47	2 116.0	15.6	59.0	
中国明对虾	雌性图谱	AFLP	197	35	2 191.1	13.5	69.6	[28]
	雄性图谱		194	36	1 737.3	11.0	68.1	
中国明对虾	雌性图谱	AFLP	66	22	712.7	10.7	35.6	[29]
	雄性图谱		74	25	951.5	12.8	47.5	
大黄鱼	雌性图谱	AFLP, SSR	188	24	2 959.1	18.0	77.3	[30]
	雄性图谱		161	23	2 205.7	15.9	74.3	
海胆	雌性图谱	AFLP	194	24	2 988.3	17.1	78.1	[31]
	雄性图谱		199	23	2 614.8	15.4	79.1	
玻璃海鞘	雌性图谱	AFLP	276	14	4 218.9	16.1	74.1	[32]
	雄性图谱		125	14	2 086.9	18.9	69.2	
鲤鱼	雌性图谱	AFLP, SSR	153	30	852.0	7.0	70.0	[33]
	雄性图谱		271	27	952.2	3.9	82.8	
孔雀鱼	雌性图谱	AFLP, SSR	135	22	1 267.7	11.2	72.5	[34]
	雄性图谱		172	20	1 771.2	11.7	79.3	

注：“-”表示没有进行图谱覆盖率的计算

3 小结

作为过渡,拟测交策略在海洋生物初期遗传图谱构建方面做出了贡献,并为下一步高密度图谱的构建奠定了基础。但同时也应该指出目前利用拟测交策略构建的遗传图谱还有很多不足的地方,比如密度偏低、不同图谱的标记无法共享等。为此,下一步需要进一步开发微卫星、SNP 等共显性分子标记和使用 RIL 高世代群体进行构图,从而得到密度更高、通用性更广的连锁图谱。

参考文献:

[1] 徐云碧,朱立煌. 分子数量遗传学 [M]. 北京: 中国农业出版社,1994.

[2] Bostein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314-331.

[3] Donis-Keller H, Green P, Helms C, *et al.* A genetic linkage map of human genome [J]. *Cell*, 1987, 51: 319-337.

[4] Bonierbale M W, Plaisted R L, Tanksley S D. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato [J]. *Genetics*, 1988, 120: 1 095-1 103.

[5] Wang D, Karle R, Brettin T S, *et al.* Genetic linkage map in sour cherry using RFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 1 217-1 224.

[6] Maliepaard C, Jansen J, Van Ooijen J W. Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications [J]. *Genetical Research*, 1997, 70: 237-250.

[7] Grattapaglia D, Sederoff R R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD marker [J]. *Genetics*, 1994, 137: 1 121-1 137.

[8] Hemmat M, Weeden N F, Manganaris A G, *et al.* Molecular marker linkage map for apple [J]. *Journal of Heredity*, 1994, 85: 4-11.

[9] Mather K. The Measurement of Linkage in Heredity [M]. London: Methuen, 1951.

[10] Rao R C. Advanced Statistical Methods in Biometric Research [M]. New York: John Wiley & Sons,1952.

[11] Grattapaglia D, Bertolucci F L G, Penchel R R, *et al.*

- Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers [J]. **Genetics**, 1996, 144; 1 205-1 214.
- [12] Conner P J, Brown S K, Weeden N F. Molecular-marker analysis of quantitative traits for growth and development in juvenile apple trees [J]. **Theor Appl Genet** 1998, 96; 1 027-1 035.
- [13] Kaya Z, Sewell M M, Neale D B. Identification of quantitative trait loci influencing annual height and diameter-increment growth in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) [J]. **Theor Appl Genet**, 1999, 98; 586-592.
- [14] Lespinasse D, Grivet L, Troispoux V, et al. Identification of QTLs involved in the resistance to South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) in the rubber tree [J]. **Theor Appl Genet**, 2000, 100; 975-984.
- [15] Scalfi M, Troggio M, Piovani P, et al. A RAPD, AFLP and SSR linkage map, and QTL analysis in European beech *Fagus sylvatica* L. [J]. **Theor Appl Genet**, 2004, 108; 433-441.
- [16] Li Y, Byrne K, Miggiano E, et al. Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers [J]. **Aquaculture**, 2003, 219; 143-156.
- [17] Wang S, Bao Z, Pan J, et al. AFLP linkage map of an intraspecific cross in *Chlamys farreri* [J]. **J Shellfish Res**, 2004, 23; 491-499.
- [18] Li L, Xiang J, 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; 63-73.
- [19] Wang L, Song L, Chang Y, et al. A preliminary genetic map of Zhikong scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston 1904). **Aquaculture Research**, 2005, 36; 643-653.
- [20] 万俊芬. 鲍与扇贝遗传育种中的分子标记研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2003.
- [21] Liu X, Liu X, Guo X, et al. A preliminary genetic linkage map of the Pacific Abalone *Haliotis discus hannai* Ino [J]. **Mar Biotechnol**, 2006, 8(4); 386-397.
- [22] Wang L, Song L, Zhang H, et al. Genetic linkage map of bay scallop, *Argopecten irradians irradians* (Lamarck 1819) [J]. **Aquaculture research**, 2007, 38(4); 409-419.
- [23] Qin Y J, Liu X, Zhang H B, et al. Genetic mapping of size-related quantitative trait loci (QTL) in the bay scallop (*Argopecten irradians*) using AFLP and microsatellite markers [J]. **Aquaculture**, 2007, 272; 281-290.
- [24] Li Q, Xu Y, Yu R, et al. An AFLP genetic linkage map of Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) [J]. **Journal of Ocean University of China**, 2007, 6(3); 259-267.
- [25] Baranski M, Loughnan S, Austin C M, et al. A microsatellite linkage map of the blacklip abalone, *Haliotis rubra* [J]. **Animal Genetics**, 2006, 37; 563-570.
- [26] Lallias D, Lapègue S, Hecquet C, et al. AFLP-based genetic linkage maps of the blue mussel (*Mytilus edulis*) [J]. **Animal Genetics**, 2007, 38; 340-349.
- [27] Pe'rez 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; 105-118.
- [28] Li Z, Li J, Wang Q, et al. AFLP-based genetic linkage map of marine shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis* [J]. **Aquaculture**, 2006, 261; 463-472.
- [29] 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; 88-93.
- [30] Ning Y, Liu X, Wang Z Y, et al. A genetic map of the large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* [J]. **Aquaculture**, 2007, 264; 16-26.
- [31] Zhou Z, Bao Z, Dong Y, et al. AFLP linkage map of sea urchin constructed using an interspecific cross between *Strongylocentrotus nudus* (♀) and *S. intermedius* (♂) [J]. **Aquaculture**, 2006, 259; 56-65.
- [32] Kano S, Satoh N, Sordino P. Primary genetic linkage maps of the ascidian, *Ciona intestinalis* [J]. **Zoological Science**, 2006, 23; 31-39.
- [33] Liao M, Zhang L, Yang G, et al. Development of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and bighead carp (*Aristichthys nobilis*) genetic maps using microsatellite and AFLP markers and a pseudo-testcross strategy [J]. **Animal Genetics**, 2007, 38; 364-370.
- [34] Shen X, Yang G, Liu Y, et al. Construction of genetic linkage maps of guppy (*Poecilia reticulata*) based on AFLP and microsatellite DNA markers [J]. **Aquaculture**, 2007, 271; 178-187.

(本文编辑:张培新)