

泥蚶(*Tegillarca granosa*)遗传连锁图谱的构建*

刘 博^{1,2} 滕爽爽^{1,2} 柴雪良^{1,2} 邵艳卿^{1,2} 肖国强^{1,2} 张炯明^{1,2} 方 军^{1,2}

(1. 浙江省海洋水产养殖研究所 温州 325000; 2. 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室 温州 325000)

提要 采用 AFLP 标记技术结合“拟测交”策略,对泥蚶父、母本和 109 个 F₁ 全同胞个体进行了遗传连锁的分析研究,构建了泥蚶的遗传连锁图谱。结果表明,在 638 个分离标记中,符合 1 : 1 孟德尔分离类型位点的母本和父本分离标记分别为 235 和 259 个;3 : 1 孟德尔分离类型位点 59 个。雌性图谱包括 21 个连锁群,标记间平均间隔为 8.12cM,图谱共覆盖 1737.8cM,覆盖率为 83.1%;雄性图谱包括 20 个连锁群,标记间平均间隔为 5.81cM,图谱共覆盖 1388.2cM,覆盖率为 84.7%。

关键词 泥蚶, AFLP, 遗传连锁图谱, 拟测交策略
中图分类号 Q75

泥蚶(*Tegillarca granosa* Linnaeus)隶属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、列齿目(Taxodonta)、蚶科(Arcidae)、泥蚶属(*Tegillarca*),是一种栖息于沿海滩涂的广温性双壳贝类,主要分布于印度洋和西太平洋海域的中国、韩国、泰国、菲律宾、马来西亚等地,在我国主要分布在山东以南沿海,是山东、浙江、福建和广东等省沿海滩涂的主要经济养殖贝类(王日昕等, 2005)。

由于过度捕捞和环境恶化等问题,自 20 世纪 60 年代以来,我国沿海泥蚶自然苗种资源逐渐枯竭。20 世纪 90 年代初期,浙江省海洋水产养殖研究所等单位率先突破了泥蚶规模化人工育苗技术,自此以后,泥蚶养殖获得快速发展,泥蚶养殖所用苗种也绝大部分由人工苗种所替代。但近年来研究发现,长期以来生产性养殖的泥蚶,主要通过人工育苗提供苗种,经过多年自繁自养和亲贝的随意选留,加剧了泥蚶的近交衰退,已不同程度地出现了遗传多样性减低、杂合度下降、生长速度减缓、抗逆性差、性状退化等严重的问题(吕振明等, 2005),因此,尽早培育出优质、抗逆性强的苗种是当前泥蚶养殖业急需解决的难题。遗传连锁图谱不仅是重要数量性状遗传定位的基

础,也是分子标记辅助选育(Marker assisted selection, MAS)的前提。在用于构建遗传连锁图谱的众多遗传标记中, AFLP 具有可重复性高、信息量大和无需预知基因序列等优点,被广泛用于水产养殖鱼类(Darrin *et al.*, 2007)、虾类(Li *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010)和贝类(刘卫东等, 2009)等的遗传连锁图谱的构建中。目前,有关泥蚶分子标记方面的研究仅限于少量微卫星标记的开发(顾晓英等, 2008)、不同地理群体泥蚶遗传分化(王日昕等, 2005; 郑文娟等, 2009)、亲缘关系(Dai *et al.*, 2010)研究及泥蚶遗传多样性分析(吕振明等, 2005)。有关开发和利用 AFLP 标记分析泥蚶遗传结构、构建泥蚶遗传连锁图谱及生长抗逆等重要经济性状 QTL 定位的研究至今还没有报道。本研究以 F₁ 代泥蚶家系为作图群体,采用拟测交策略构建了遗传连锁图谱,以期对重要性状基因的克隆和分子标记辅助选择奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验所用的泥蚶(*Tegillarca granosa*)为 2007 年 7 月通过人工受精技术构建的 F₁ 全同胞家系,其中母

* 国家高技术研究发展计划(863 计划), 2012AA10A410-1 号; 浙江省自然科学基金项目, Y3110003; 浙江省科研院所专项, 2009F20010 号; 温州市科技兴海项目, S20080019 号。刘 博, 博士, E-mail: liubomusic@126.com

通讯作者: 柴雪良, 教授级高级工程师, E-mail: cxl-5888@163.com

收稿日期: 2011-10-12, 收修改稿日期: 2011-12-19

本来自江苏野生群体,父本源于乐清湾野生群体。实验用家系隔离饲养于浙江省海洋水产养殖研究所清江实验场,2009年9月随机抽取109颗子代个体为样本,平均体长为29.15mm,平均体重为8.29g。将新鲜样品速冻,运回实验室后-70℃保存。

1.2 基因提取

基因组DNA的提取采用常规的蛋白酶K消化,苯酚、氯仿/异戊醇抽提,无水乙醇沉淀的方法,提取泥蚶肌肉组织的基因组DNA,用TE缓冲液稀释至终浓度100ng/ μ l用于以下分析。

1.3 AFLP分析

AFLP反应体系参照Vos等(1995)的实验方法进行。相应的EcoRI和MseI选择性引物,由上海生工生物公司合成,DNA聚合酶为MBI公司产品,其余试剂购自上海生工(SANGON)公司。AFLP选择性PCR扩增产物采用变性聚丙烯酰胺(凝胶浓度6%,7.5mol/L尿素)高压电泳分离,银染方法检测电泳产物(Li *et al.*, 2006)。

1.4 数据统计

AFLP为显性标记,其表型分为扩增片段的有(记为1)和无(记为0),相应的基因型为AA、Aa(有扩增片段)和aa(没有扩增片段),统计分析AFLP指纹图谱中,在一个亲本中出现或两个亲本中都出现,而在后代中呈现分离状态的清晰条带。利用 χ^2 ($P < 0.05$)检验,鉴定多态标记在子代的分离比是否符合1:1或3:1孟德尔分离规律及部分偏分离($0.01 < P < 0.05$)标记,符合1:1分离比的用来构建泥蚶的雄性及雌性遗传连锁图谱。

AFLP标记是根据此带的引物名称及其条带的分子量大小来命名的,即用EcoRI和MseI选择扩增引物分别用字母和数字表示(表1),其后字母f是fragment的首字母,最后的几位数字表示片段的分子量大小。比如,位点A2f600是指由选择性EcoRI引物A(AAC)和MseI引物2(CTT)扩征得到的片段,分子量为600bp。

1.5 连锁分析

本试验利用连锁分析软件Joinmap3.0,采用拟测交策略(Grattapaglia *et al.*, 1994)分别构建父、母本的遗传连锁图谱。AFLP标记可将无带记为1,有带记为2,缺失记为0。

将整理好的数据文件导入JoinMap3.0构建遗传连锁图谱,首先用Locus genot. Freq命令对各标记的分离比率进行适合性检测,删除出现严重偏分离的

标记;再用Individual genot. Freq命令排除在基因型上缺失的数据高于总标记数的2.4%的个体;然后用Group命令采用LOD = 4.00对所有标记进行分组,最后用Calculate Map命令构建连锁图谱,采用Kosambi函数计算图距;为确保连锁群(Lingkage group, LG)的可靠性,剔除连锁群内遗传距离大于40cM(厘摩)的相邻标记。

1.6 遗传图谱预期长度和覆盖率的计算

首先计算标记平均间隔(s),其值为图谱总长度除以间隔总数(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。遗传连锁图谱实际长度为两个方面,一为框架图长度(Gof),二为包括三联体和连锁对在内的所有连锁标记的长度(Goa)。采用两种方法计算基因组预期长度(Ge):

(1) $Ge1$: 参照Fishman等(2001)。每个连锁群的长度加上标记平均间隔的两倍,来补偿连锁群最末端的标记和端粒距离。

(2) $Ge2$: 参照Chakravarti等(1991)。每个连锁群的长度乘以系数 $(m+1)/(m-1)$, m 为每个连锁群所包含标记的数目。

将两种方法的平均值作为泥蚶基因组预期长度 Ge 。

遗传图谱的实际长度分两个方面,一为框架图谱的长度 Gof ,二为所有连锁群的总长度,即包括连锁对在内的所有连锁群的总长度 Goa 。总的图谱覆盖率 $Coa = Coa / Ge$ 。

1.7 AFLP标记在连锁图谱上的分布

本文采用两种方法检测AFLP标记在连锁群上的分布情况。首先,用SPSS17.0软件分别计算父、母本连锁图谱上连锁群长度与标记之间的Pearson相关系数,并用 t -检验验证相关系数的显著性($\alpha = 0.01$);其次,分别对父、母本所有相邻标记间的距离进行单样本Kolmogorov-Smirnov检验,以检验各连锁群上的标记是否符合正态分布($\alpha = 0.05$)。

2 结果

2.1 AFLP标记分析

采用66对AFLP引物组合,产生2836条清晰条带,其中638(22.5%)个标记在双亲中表现为多态性位点。每对引物产生的条带数从40—80条不等,多态位点从3个至20个不等,平均每对引物产生9.7条多

态标记, 产物分子量在 30—2300bp。不同引物对的多态检出率变化较大, A3 引物对的多态检出率仅为 7.5%, 而 H7 引物对的多态检出率为 39.4%。所有的多态标记中母本标记 260 个, 父本标记 300 个, 另有

78 个共同标记; 其中 53 个偏离 1 1 孟德尔分离规律 ($P<0.05$), 23 个属于母本, 30 个属于父本; 共同标记中有 18 个偏离 3 1 孟德尔分离规律 ($P<0.05$); 总偏离分离比约为 11.13% (71/638) (表 1)。

表 1 泥蚶作图家系中 66 对 AFLP 引物组合及产生的多态性位点
Tab.1 Distribution of polymorphic markers from 66 AFLP primer combinations in *T. granosa* mapping family

引物对	EcoR - AAC (A)	EcoR -AAG (B)	EcoR - ACA (C)	EcoR - ACT (D)	EcoR - AGA (E)	EcoR - AGT (F)	EcoR - ATC (G)	EcoR - ATG (H)
<i>Mse</i> -CTG (1)	—	13 (2)	11 (2)	10 (3)	14 (2)	11 (1)	—	9
<i>Mse</i> -CTT (2)	11 (1)	7 (1)	—	12 (2)	20 (4)	10 (1)	—	10 (1)
<i>Mse</i> -CTC (3)	3	9 (2)	8 (1)	12 (3)	15 (4)	10	8	7
<i>Mse</i> -CAT (4)	12 (2)	8 (1)	—	8	9 (2)	8 (1)	—	—
<i>Mse</i> -CCA (5)	9 (1)	8	8	7 (1)	9 (2)	15	—	—
<i>Mse</i> -CCT (6)	5	6	10 (1)	17 (3)	7 (1)	6	—	—
<i>Mse</i> -CGA (7)	15 (2)	9	5 (1)	5	—	9	6 (1)	13 (1)
<i>Mse</i> -CGT (8)	15 (1)	13 (2)	7 (2)	3	6	13 (2)	—	—
<i>Mse</i> -CTA (9)	4	8 (1)	8 (1)	9	6	8 (1)	—	16 (2)
<i>Mse</i> -CAC (10)	16	17 (3)	10	18 (2)	4	12 (2)	16 (2)	5
合计	638 (71)							

注: 括弧内(表中的右侧括弧)为偏分离标记数($P<0.05$)

2.2 泥蚶遗传连锁图谱的构建

利用 Joinmap3.0 分别对 249 个母本分离标记(12 个偏分离标记 $0.01<P<0.05$)、287 个父本分离标记(17 个偏分离标记 $0.01<P<0.05$)进行连锁分析, 构建了泥蚶雌性、雄性遗传连锁图谱。其中雌性框架图谱含有 235 个标记, 分布于 21 个连锁群上, 各连锁群标记数从 4—33 个不等, 平均每个连锁群含有 13.2 个标记, 标记间平均间隔 8.12cM, 图谱观测长度 *Gof* 为 1737.8cM, 估计长度 *Ge* 为 2092.19, 其框架图谱覆盖率 *Cof* 为 83.06%(表 2, 图 1); 雄性框架图谱含有 259 个标记, 分布于 20 个连锁群上, 各连锁群标记数从 4—25 个, 平均每个连锁群含有 14.3 个标记, 标记间平均间隔 5.81cM, 图谱观测长度 *Gof* 为 1388.20cM, 估计长度 *Ge* 为 1638.62, 其框架图谱覆盖率 *Cof* 为 84.72%(表 2, 图 2)。

2.3 AFLP 标记在连锁图谱上的分布

雌性连锁图谱上连锁群长度与标记数的相关系数 $r = 0.885$ ($P<0.01$), 雄性连锁图谱上连锁群长度与标记数的相关系数 $r = 0.683$ ($P<0.01$), 上述结果表明, 雌、雄连锁图谱上的连锁群长度与标记数呈正相关。而采用单样本 Kolmogorov-Smirnov 检验时, 雌、雄各连锁图谱的 $P>0.05$, 表明雌、雄连锁群各连锁图上的 AFLP 标记的分布都是均匀的, 未出现 AFLP 标记成簇分布的现象。

表 2 泥蚶雌性、雄性遗传连锁图谱

Tab.2 The female and male linkage maps for *T. granosa*

连锁群	雌性连锁图	雄性连锁图谱
所有分离标记	260 (23)	300 (30)
参与分析的标记	249 (12)	287 (17)
框架图中的标记	235 (8)	259 (10)
连锁群数目	21	20
平均每个连锁群的标记数	13.2	14.3
每个连锁群最少标记数	4	4
相邻标记间平均间隔(cM)	8.12	5.81
相邻标记间最大间隔(cM)	25.8	29.8
最短连锁群长度(cM)	24.5	31
最长连锁群长度(cM)	202.8	99.8
图谱观察值 <i>Gof</i> (cM)	1737.8	1388.2
图谱预期长度(cM)		
<i>Ge1</i>	2078.86	1620.53
<i>Ge2</i>	2105.52	1656.71
<i>Ge</i>	2092.19	1638.62
图谱覆盖率 <i>Cof</i> (%)	83.06%	84.72%

注: 括弧内(表中的右侧括弧)为偏分离标记数($P<0.05$)

3 讨论

3.1 拟测交策略

本实验采用 Grattapaglia 等(1994)报道的拟测交理论构建泥蚶的遗传连锁图谱。这种方法是利用高度

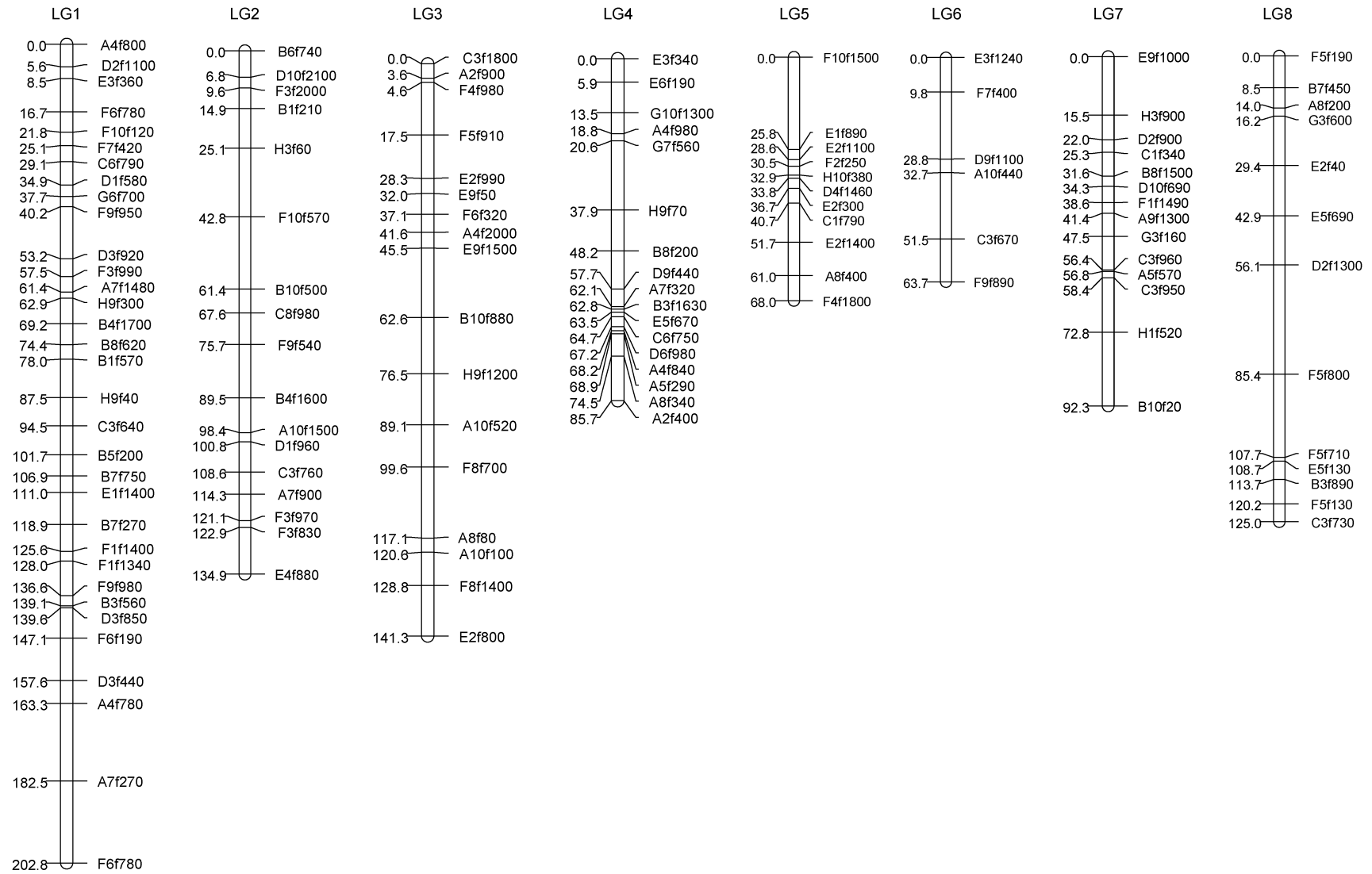
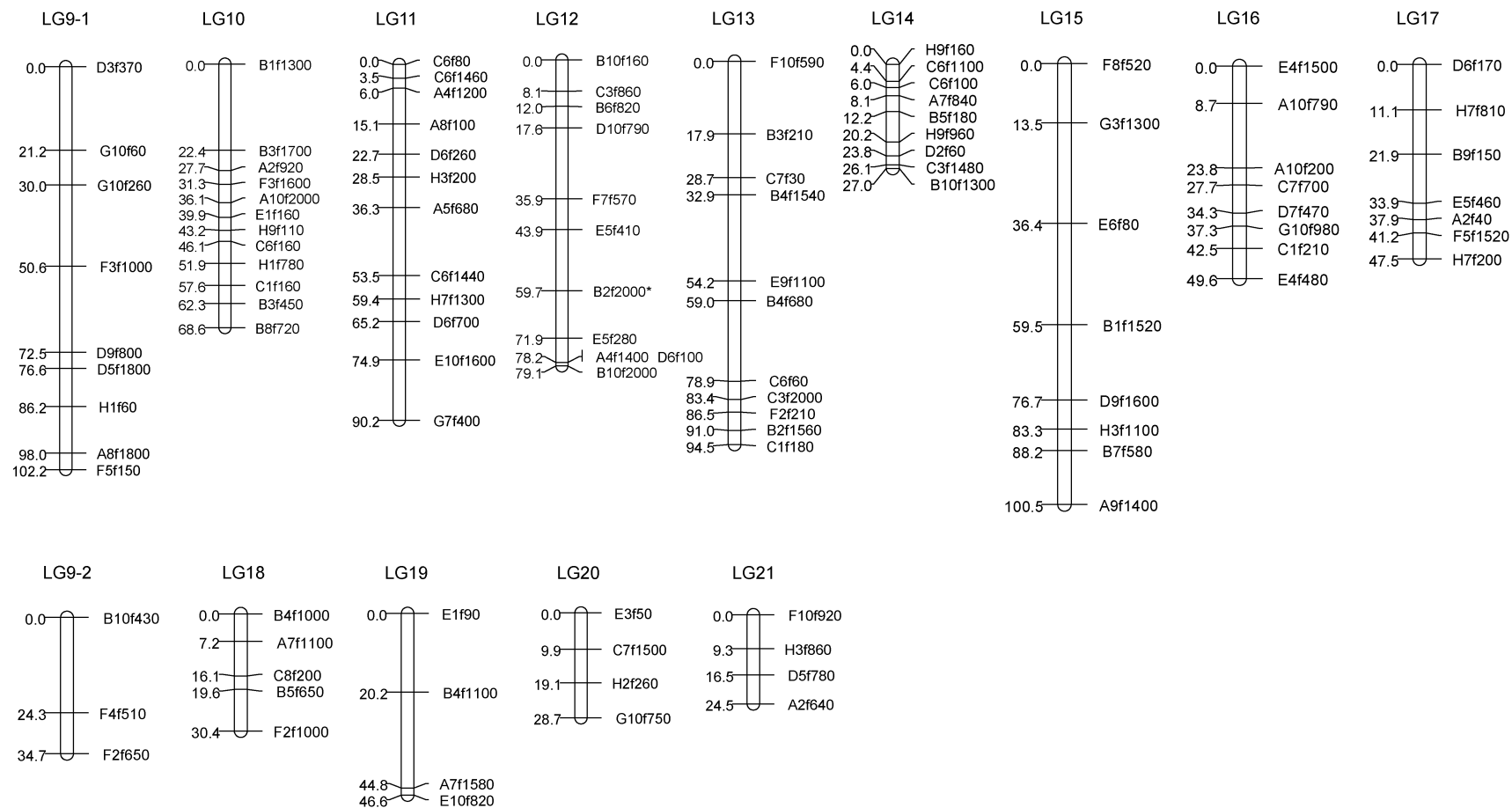


图 1 泥蚶雌性遗传连锁图谱

Fig.1 Female linkage maps of *T. granosa*

(续图 1)



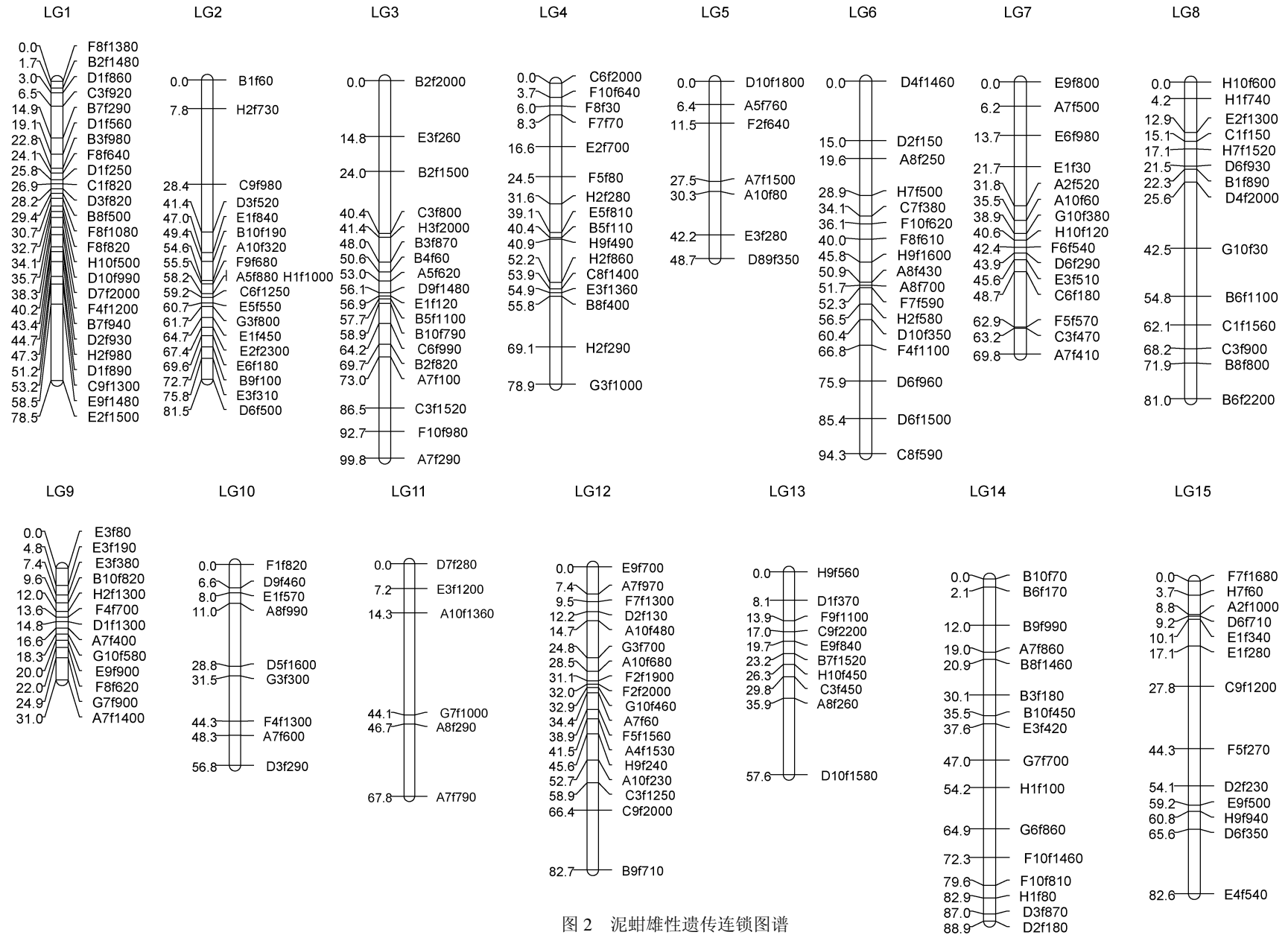
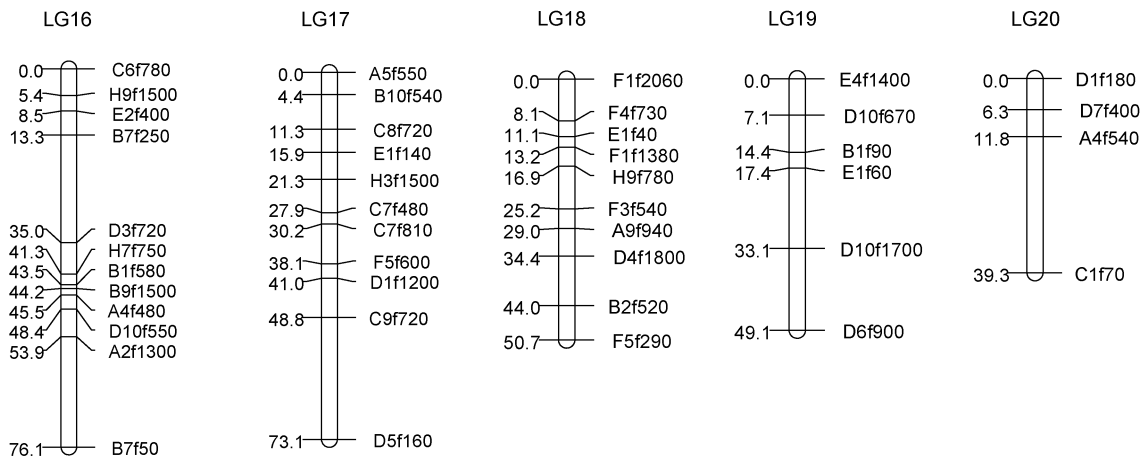


图 2 泥蚱雄性遗传连锁图谱
Fig.2 Male linkage maps of *T. granosa*

(续图 2)



杂合的生物, 杂交会产生大量类似测交的分离标记, 即一些标记在一个亲本中表现为杂合, 在另一亲本中表现为纯合, 其后代产生 1:1 的分离比, 与测交方式相同。泥蚶达到性成熟需要 2 年时间, 而其寿命一般为 4 年左右, 所以很难建立回交家系进行连锁图谱的绘制。然而, 不同地理野生群体泥蚶遗传差异大且杂合度高, 本实验所用泥蚶亲本分别来自江苏和乐清野生泥蚶群体, 它们的杂交 F_1 代群体家系在很多位点上都会发生分离, 因此, 利用泥蚶杂交 F_1 代家系, 采用拟测交理论为泥蚶遗传连锁图谱的构建提供了一条快速而有效的途径。近年来, 采用该方法相继构建了日本褐牙鲷(Coimbra *et al.*, 2003)、太平洋牡蛎(Yu *et al.*, 2003)、南美白对虾(Perez *et al.*, 2004)、中国对虾(Li *et al.*, 2006; 李健等, 2008)等。本实验采用此策略也取得了理想的结果。

3.2 作图标记

扩增片段长度多态性(AFLP)是一种基于 PCR 基础上的, 多位点指纹识别技术, 它兼有 PCR 技术的高效性和 RFLP 技术的可靠性, 且具有快速、灵敏、稳定、所需 DNA 量少、多态性检出率高、重复性好、可以在不知道基因组序列特点的情况下进行研究等特点, 因此被认为是一种十分理想的、有效的、先进的分子标记, 鉴于 AFLP 的高效性, 在各种水生生物遗传连锁图谱的构建中被广泛应用(Li *et al.*, 2006; 刘卫东等, 2009; Liu *et al.*, 2010)。本文选取遗传差异大的不同地理群体的泥蚶个体作父、母本, 以提高 AFLP 多态性, 进而提高作图效率。通过对 109 个 F_1 代同胞家系个体的多态性分析, 得到 66 对 AFLP

引物组合的多态性检出率为 22.5%, 这一数据高于皱纹盘鲍的 13.6% (Liu *et al.*, 2006), 与美洲牡蛎的 27.2%相近(Yu *et al.*, 2003), 低于栉孔扇贝的 31.1% (Li *et al.*, 2005)及紫贻贝的 33.6% (Lallias *et al.*, 2007)。

3.3 AFLP 分子标记在连锁群上的分布及偏分离现象

衡量遗传图谱质量的一个重要标准是标记分布的均匀程度, 而标记类型是影响连锁群上的标记均匀分布与否的重要因素之一。AFLP 分子标记的聚集现象在虾夷扇贝(刘卫东等, 2009)、海胆(Zhou *et al.*, 2006)等水产动物中均有报道。本文所得泥蚶雌性、雄性连锁群中, 连锁标记数与连锁群长度呈正比 ($P < 0.01$), 相邻标记间隔也呈正态分布 ($P > 0.05$), 说明无论从整个基因组看还是从各连锁群看, AFLP 标记都是均匀分布的, 并未出现成簇分布的现象, 这可能是种间差异造成的。

构建遗传图谱时, 通常采用经典的极大似然法估算标记间的遗传距离, 该算法的前提是符合孟德尔遗传规律, 标记不存在偏分离。但在连锁图谱制作过程中, 常常会遇到大量 DNA 标记偏离孟德分离比例的偏分离现象。严重偏分离的标记不仅会影响标记间的正常连锁, 还会影响到连锁图谱的正确性, 因此在图谱绘制的过程中必须剔除偏分离严重的标记。AFLP 标记在 F_1 代出现偏分离的现象在中国对虾(李健等, 2008)、太平洋牡蛎(Yu *et al.*, 2003)和海湾扇贝(Wang *et al.*, 2007)等物种中均有报道。

一般认为导致偏分离的原因可能有以下几个方面的原因: (1) 在统计 AFLP 片段的时候, 会出现一些相同的片段来自不同的位点, 导致非孟德尔遗传, 从

而造成偏分离。(2) 遗传负荷和对隐性致死突变的选择。(3) 来自于染色体着丝粒区域的标记也容易导致偏分离。(4) 有些标记可能由转座因子区域扩增而来, 这些标记不服从孟德尔分离定律, 另外作图群体的样本量较少以及 DNA 片断受到损伤等。已有研究表明, 类似双壳类和棘皮类这种 r 策略繁殖的物种, 遗传负荷原本就较大, 而群体间的基因流动和种间杂交能增加 F_1 代的遗传负荷, 导致偏分离比例增加, 这一现象曾在海胆杂交后代中检测到(Zhou *et al.*, 2006)。本研究扩增的多态位点中, 偏分离比例为 11.13%, 而在 53 个 1 : 1 偏分离位点中纯合子缺失高达 91.79%, 也说明对隐性不利基因的选择是形成偏分离的重要原因。

3.4 泥蚶遗传连锁图谱

遗传连锁群是染色体在分子水平上的反映, 连锁群的数目应该同相应物种染色体的数目一致。泥蚶染色体数目 $2n = 38$, 从理论上讲, 应该找到 19 个连锁群与染色体一一对应。但由于分子标记在染色体上分布的随机性及染色体不同区段交换值的异质性, 连锁群上常常会产生较大的间隙, 严重者则出现小片段的连锁群。本研究得到泥蚶的雄性、雌性遗传连锁图谱分别具有 21、20 个连锁群(图 1), 均高于泥蚶单倍染色体数($n = 19$), 说明雌、雄图谱中至少分别有 2 条和 1 条染色体中存在频繁交换或标记空缺区段, 这表明属于同一条染色体的连锁群之间缺少中间标记, 反映了图谱的不完整性。分析原因, 可能是作图群体较小、标记数量和标记类型不够, 影响了重组的检测, 从而导致连锁群的数目与染色体数目不符。由于本实验所得的共同标记 3 : 1 分离位点数较少且偏分离标记严重, 经连锁分析后发现标记间距离太大, 因而未用来构建泥蚶共同图谱。

本实验估计的雌性基因组 DNA 长度为 2092.19cM, 大于雄性基因组长度 1638.62cM, 这一现象在其它图谱研究中也有发现(Yu *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006)。雌、雄性图谱的长度在一定程度上反映了雌、雄个体重组率的差异。人类和其它物种的基因组研究都显示在不同的染色体区域和在雌、雄个体上的重组率并不相同(Nachman, 2002)。雌、雄连锁图谱覆盖率分别为 83.06%和 84.72%, 标记间平均距低于 10cM(雌、雄连锁图谱标记间的平均距离 8.12cM 和 5.81cM)的各紧密连锁群, 已能基本满足相关 QTL 的精确定位(Dekkers *et al.*, 2002)。尽管作者在本研究中得到了较高的图谱覆盖率, 但在图谱中仍然存在较

大的间隙(相邻标记间距离 > 20cM), 如雌性图谱中 LG1、5、7、8、10、13、15、19; 雄性图谱中 LG1、2、11、13、16、17、20, 这表明在相应的区段缺乏连锁标记。而利用不同分子标记特性的互补, 将有助与减小遗传图谱中的空隙, 提高连锁群的饱和度。因此, 后续图谱密度的提高, 除了需要增加 AFLP 标记数以外, 开发不同类型的共显性的 SSR 和 SNP 标记, 将有助于雌、雄连锁图谱的整合, 并且随着分子标记的增加和高密度遗传连锁图谱的构建, 泥蚶连锁群的数量将和单倍染色体数相等。

参 考 文 献

- 王日昕, 李太武, 吕振明等, 2005. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)不同地理居群同工酶变异及遗传分化的研究. 海洋与湖沼, 36(3): 227—234
- 吕振明, 李太武, 苏秀榕, 2005. 泥蚶遗传多样性的研究. 高技术通讯, 15(12): 104—110
- 刘卫东, 鲍相渤, 宋文涛等, 2009. 虾夷扇贝遗传连锁图谱的初步构建. 遗传, 31(6): 629—637
- 李 健, 刘 萍, 王清印等, 2008. 中国对虾遗传连锁图谱的构建. 水产学报, 32(2): 161—173
- 郑文娟, 朱世华, 沈锡权等, 2009. 基于线粒体 COI 基因序列探讨泥蚶的遗传分化. 动物学研究, 30(1): 17—23
- 顾晓英, 曾庆国, 尤仲杰等, 2008. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)6 个微卫星引物的分离和鉴定. 海洋与湖沼, 39(6): 661—664
- Chakravarti A, Lasher L K, Reefer J E, 1991. A maximum likelihood method for estimating genome length using genetic linkage data. Genetics, 128: 175—182
- Coimbra M R M, Kobayshi K, Koresugu S *et al.*, 2003. A genetic linkage map of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture, 220: 203—218
- Dai W, Guo Y J, Wang X M *et al.*, 2010. RFLP analysis of the ribosome 1DNA ITS region of three geographical populations of *Tegillarca granosa*. Agric Sci Tech, 11(2): 92—94
- Darrin P R, Cheryl-Anne S, Melissa R *et al.*, 2007. A genetic linkage map of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L). Genetics, 177: 1193—1205
- Dekkers J C M, Hospital F, 2002. Multifactorial genetics: the use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. Nat Rev Genet, 3: 22—32
- Fishman L, Kelly A J, Morgan E *et al.*, 2001. A genetic map in the *Mimulus guttatus* species complex reveals transmission ratio distortion due to heterospecific interactions. Genetics, 159: 1701—1716
- Grattapaglia D, Sederoff R, 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD marker. Genetics, 137: 1121—1137

- Lallias D, Lapegue S, Hecquet C *et al*, 2007. AFLP-based genetic linkage maps of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Anim Genet*, 38: 340—349
- Li L, Xiang J, Liu X *et al*, 2005. Construction of AFLP-based genetic linkage map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston and mapping of sex-linked markers. *Aquaculture*, 245: 63—73
- Li Z X, Li J, Wang Q Y *et al*, 2006. AFLP-based genetic linkage map of marine shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis*. *Aquaculture*, 261: 463—472
- Liu B, Li J, Wang Q Y *et al*, 2010. A genetic linkage map of marine shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis* based on AFLP, SSR, and RAPD markers. *Chin J Oceanol Limnol*, 28(4): 808—814
- Liu X, Guo X, Zhao H *et al*, 2006. A preliminary genetic linkage map of the pacific abalone *Haliotis discus hannai* ino. *Mar Biotechnol*, 8: 386—397
- Nachman M W, 2002. Variation in recombination rate across the genome: evidence and implications. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12: 657—663
- Perez F, Erazo C, Zhinaula M *et al*, 2004. A sex-specific linkage map of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* based on AFLP makers. *Aquaculture*, 242: 105—118
- Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al*, 1995. AFLP, a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23: 4407—4414
- Wang L, Song L, Zhang Huan *et al*, 2007. Genetic linkage map of bay scallop, *Argopecten irradians irradians* (Lamarck 1819). *Aquac Res*, 38: 409—419
- Yu Z, Guo X, 2003. Genetic linkage map of the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Biol Bull*, 204: 327—338
- Zhou Z, Bao Z, Dong Y *et al*, 2006. AFLP linkage map of sea urchin constructed using an interspecific cross between *Strongylocentrotus nudus* (♀) and *S. intermedius* (♂). *Aquaculture*, 259: 56—65

CONSTRUCTION OF GENETIC LINKAGE MAP OF *TEGILLARCA GRANOSA* LINNAEUS

LIU Bo^{1,2}, TENG Shuang-Shuang^{1,2}, CHAI Xue-Liang^{1,2}, SHAO Yan-Qing^{1,2},
XIAO Guo-Qiang^{1,2}, ZHANG Jiong-Ming^{1,2}, FANG Jun^{1,2}

(1. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou, 325000; 2. Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Reservation of Coastal Bio-Resource, Wenzhou, 325000)

Abstract Based on segregation of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers, the first genetic linkage map of *Tegillarca granosa* Linnaeus was constructed using the “two-way pseudo-testcross” strategy. A segregation population (F₁) including 109 progenies (full-sib family) from the cross between two wild populations of *T. granosa* from Jiangsu and Yueqing was obtained. The parents and the F₁ progeny were used as the segregation population. A set of 66-pair primer combination were used to analyze the parents and the 109 progenies of the mapping family. A total of 638 segregation sites were identified. Among them, 494 (235 for female and 259 for male) fitted in the expected 1 : 1 Mendelian segregation ratio and 59 fitted in a 3 : 1 Mendelian ration. The female linkage maps included 21 linkage groups, spanning 1737.8cM with the average marker density of 8.12cM, and the observed coverage was 83.1%. The male linkage maps included 20 linkage groups, spanning 1388.2cM with the average marker density of 5.81cM, and the observed coverage was 84.7%.

Key words *Tegillarca granosa*, AFLP, Genetic linkage map, Double pseudo-testcross strategy