

文章编号:1000-0615(2006)05-0713-07

·研究简报·

海湾扇贝个体间单向人工授精的分子生物学验证

孙博¹, 刘晓¹, 张国范¹, 郑怀平¹, 郭希明²

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071 2. 美国新泽西州立大学 Haskin 贝类研究实验室, NJ 08349, USA)

关键词: 海湾扇贝; 人工授精; 杂交; 家系; RAPD; 分子标记

中图分类号: Q 173; Q 321; S 917 文献标识码: A

Molecular verification of fertilization between bay scallop individuals

SUN Bo¹, LIU Xiao¹, ZHANG Guo-fan¹, ZHENG Huai-ping¹, GUO Xi-ming²

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Haskin Shellfish Research Laboratory, Rutgers University, NJ 08349, USA)

Abstract: Hybrid family of *Argopecten irradians irradians* was created by fertilization between two northern bay scallop individuals. Two families were analyzed in this study. The first family, $P_a - P_b$, is a pair mating between two scallops named P_a and P_b , while the second one crossed by individuals of Y_1 and P_0 . Marker inheritance and segregation were studied in the 10 progenies of each family by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. 102 RAPD primers were first screened by parental animals of both families. Only the primers with polymorphisms between the two parental animals in each family were selected for further analysis. In both families, parents and 10 progeny were analyzed with selected primers. In family $P_a - P_b$, a total of 122 bands generated from 12 selected primers. 37 of them were polymorphic between two parents. The maternal P_a of this family had 17 molecular markers while paternal P_b had 20 markers. In $Y_1 - P_0$ 95 bands were produced by 10 selected primers. 32 bands were polymorphic between maternal Y_1 and paternal P_0 , who had 17 and 15 molecular markers respectively. In both families, each progeny analyzed in this study had at least 8 maternal markers and 5 paternal markers. Based on segregation patterns at all markers analyzed, we concluded that none of the progeny analyzed were from self-fertilization, and one-way hybridization between two individuals was successful in both of the two bay scallop families.

Key words: *Argopecten irradians irradians*; fertilization; hybridization; family; RAPD; molecular marker

海湾扇贝(*Argopecten irradians*)是雌雄同体型贝类,一般情况下每个个体的雌雄配子可在较短时间内相继排放,并且海湾扇贝没有自交不亲和现象^[1],因此在群体繁殖过程中自体受精与异体受精可同时发生。这种特殊的生殖方式给海湾扇贝不同个体或群体之间的人工授精带来了困难,并因此阻碍了相关遗传学研究工作的开展。我们从2001年开始开展海湾扇贝不同个体间杂交技术的研究,通过人为调控配子排放方式等多种措施实现了海湾扇贝群体

间或个体间的人工授精。并且,在不同个体间异体授精或不同群体间杂交的子代中均观察到杂种优势^[2-4]。由于海湾扇贝是雌雄同体型贝类,获得不受自体精子污染的卵子有相当的难度,同时个体或群体间的人工授精能否成功也主要取决于是否确实获得了不受自体精子污染的卵子。

本研究采用 RAPD 标记对由单对亲本间单向人工授精所培育的 2 个杂交家系的亲本及其成体 F_1 分别进行了遗传学分析,以检测这 2 个杂交家系中是否有自交子代,

收稿日期: 2005-05-12

资助项目: 山东省科技发展计划项目(022110107); 青岛市科技计划项目(03-1-HH-10); 中国科学院知识创新工程重要方向课题(ZKXC2-211); 国家杰出青年基金(39825121)

作者简介: 孙博(1978-),男,山东潍坊人,硕士,主要从事海洋生物技术研究

通讯作者: 刘晓, E-mail: liuxiao@ms.qdio.ac.cn

以此检验我们发展的海湾扇贝杂交技术是否可靠,并对杂交家系在海湾扇贝遗传连锁图谱构建中的应用前景进行初步评估。同时,本研究对正确评价海湾扇贝杂交优势等遗传学研究结果提供了重要的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所分析的2个海湾扇贝家系分别命名为 $P_a - P_b$ 和 $Y_1 - P_0$, 该2个家系分别建于2002年3月25日与4月5日,分别以 P_a 和 Y_1 等2个个体为母本、以 P_b 和 P_0 为父本对4个亲本采用独立催产、分别获得“无污染”的雌雄配子,在1对亲本之间实施单方向的人工授精、独立隔离培育等方式构建而成^[2]。所用亲本均系海湾扇贝北部亚种 (*A. irradians irradians*) 的 M-V 群体,是河北农业大学于1998年12月和1999年2月分别从美国马萨诸塞和弗吉尼亚两地引种^[5]后在秦皇岛以群体方式繁育的 F_3 。其中 P_a 、 P_b 、 P_0 等3个亲本的贝壳颜色均为紫色,亲本 Y_1 的贝壳为桔红色。 $P_a - P_b$ 家系所有 F_1 个体的贝壳颜色均为紫色, $Y_1 - P_0$ 家系 F_1 个体的贝壳颜色有橘红色和紫色等2种,2种颜色的子代接近1:1的分离比例^[3]。取每个家系的1对亲本及每家系的10个 F_1 成体进行 RAPD 分析。其中 $P_a - P_b$ 家系的 F_1 个体分别记录为 PP_1 、 PP_2 、…… PP_{10} , $Y_1 - P_0$ 家系的 F_1 分别记录为 YP_1 、 YP_2 、…… YP_{10} 。

1.2 亲本标记的引物筛选和 RAPD 分析

对2个家系的亲本及子代共24个个体,各取闭壳肌提取DNA并进行PCR分析^[5],PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离后用GDS-7600凝胶成像系统记录电泳图谱。

RAPD引物购自上海生物工程公司,用102条随机引物分别对2个家系的4个亲本的基因组DNA进行扩增。选出在每个家系的1对亲本之间具有明亮、清晰、可重复的亲本特异性扩增条带的引物,再对家系的亲本及其 F_1 个体进行 RAPD 分析。为确保 RAPD 分析的准确性,每个 PCR 反应均重复进行2次。

1.3 分子标记的识别及数据分析

PCR结果按文献6的方法进行识别和统计。在电泳图谱中标识出亲本特异性扩增的条带,即双亲中某一方亲本的分子标记。用图片分析软件Image Master 1 D Elite v 3.01测定每一个标记的分子量。用“引物编号-f-扩增片段分子量”对每个分子标记进行命名,其中引物编号为3位数,分子量4位数,如用编号为S30的RAPD引物扩增得到的1008 bp分子标记将标识为S030f1008。

在每个家系的10个子代个体中分别标识双亲的分子标记、子代个体的非亲标记(在双亲中未出现但子代中出现的扩增位点),并对标记结果进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 RAPD 引物的筛选

在102条RAPD引物中,有12条引物在 $P_a - P_b$ 家系的母本 P_a 与父本 P_b 之间检测到多态位点,10条引物在 Y_1 与 P_0 间具有差异条带,在2个家系中产生亲本特异性分子标记的引物见表1。

表1 在海湾扇贝 $P_a - P_b$ 或 $Y_1 - P_0$ 家系的双亲间存在差异的 RAPD 引物

Tab.1 RAPD primers showing difference between two parents of $P_a - P_b$ and $Y_1 - P_0$ families of bay scallop

家系名称 family	引物编号 primer	引物序列 sequence of the primer 5'—3'	
$P_a - P_b$	S30	GTGATCGCAG	
	S117	CACTCTCCTC	
	S121	ACGGATCCTG	
	S123	CCTGATCACC	
	S188	TTCAGGGTGG	
	S221	TGACGCATGG	
	S310	CCCTAGACTG	
	S366	CACCTTTC	
	S453	GTCAGAGTCC	
	S469	GTGGTCCGCA	
	S503	ACACAGAGGG	
	S517	CCGTACGTAG	
	$Y_1 - P_0$	S29	GGGTAACGCC
		S117	CACTCTCCTC
S182		CCTCTGACTG	
S184		CACCCCTTG	
S221		TGACGCATGG	
S376		GAGCGTCGAA	
S453		GTCAGAGTCC	
S463		CTGATACGCC	
S477		TGACCCGCCT	
S514		CAGGATTC	

2.2 RAPD 扩增结果

用表1中的引物分别对 $P_a - P_b$ 与 $Y_1 - P_0$ 两个家系的亲本及 F_1 个体进行 PCR 分析。其中,引物 S310 对 $P_a - P_b$ 家系的扩增结果见图 1-A,引物 S182 对 $Y_1 - P_0$ 家系的扩增结果见图 1-B。

在图 1-A 中,引物 S310 在 $P_a - P_b$ 家系的母本与父本中各得到2个标记,其中 S310f 2274 和 S310f 1760 是母本 P_a 的标记,而 S310f 1297 和 S310f 0448 是父本 P_b 的分子标记。母本的 S310f 2274 标记在检测的10个子代个体中均缺失, S310f 1760 则在10个 F_1 中出现分离,在 PP_3 、 $PP_6 \sim PP_{10}$ 等6个个体中出现而在另外的4个个体中缺失。父本的 S310f 1297 标记仅在 PP_1 、 PP_{10} 等2个个体中出现,在其它8个个体中缺失,父本标记 S310f 0448 则在 PP_1 、 $PP_4 \sim PP_6$ 、

PP₈ 等 5 个个体中出现,在另外 5 个个体中缺失。除双亲的分子标记外,引物 S310 还出现了 S310f2035 和 S310f1852 等 2 个非亲标记,前者仅出现在 PP₄ 中,后者则在 PP₂、PP₇、PP₉ 等 3 个 F₁ 中出现。

在图 1-B 中,引物 S182 在 Y₁-P₀ 家系的双亲和子代中共出现 4 个分子标记,其中母本标记 2 个、父本标记 1 个、非亲标记 1 个。母本 Y₁ 的标记 S182f 1022 在 10 个子代中均出现,未发生分离;S182f 0949 则在 YP₂、YP₄、YP₆、YP₇ 等 4 个个体中出现,在另外 6 个个体中缺失。父本标记 S182f 1229 在 YP₁、YP₂、YP₄~YP₈、YP₁₀ 等 8 个 F₁ 中出现,在 YP₃ 和 YP₉ 中缺失。非亲标记 S182f1740 在 YP₁、

YP₃、YP₅、YP₈、YP₉ 等 5 个个体中出现。

2 个家系的分子标记见表 2~表 4。在家系 P_a-P_b 中,12 条引物共产生 122 个扩增位点,多数扩增片段长度在 300~1500 bp 之间。有 37 个扩增片段在双亲间具多态性,占扩增片段总数的 30.3%,其中母本标记 17 个、父本标记 20 个。在 37 个亲本特异性分子标记中,31 个标记在 F₁ 个体中产生分离(母本 14 个、父本 17 个),6 个标记未发生分离(母本、父本各 3 个)。在 Y₁-P₀ 家系中,10 条引物共产生 95 个位点,大部分扩增片段长度在 300~1500 bp 之间。双亲间呈多态的标记 32 个,占 RAPD 标记总数的 33.7%。26 个多态标记在 F₁ 个体中产生分离(母本与父本各 13 个),6 个标记未分离(母本 4 个、父本 2 个)。

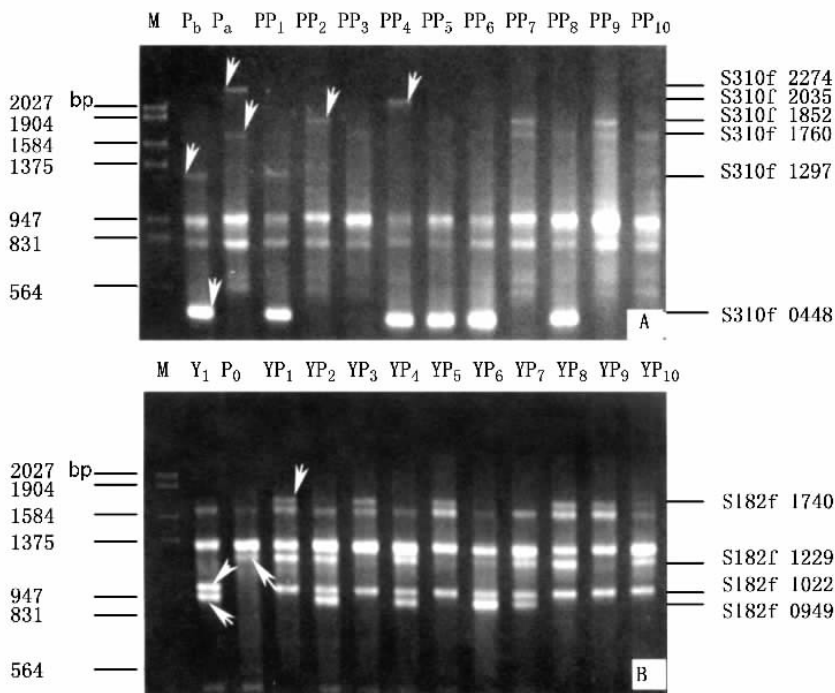


图 1 引物 S310 和 S182 对家系 P_a-P_b 和 Y₁-P₀ 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR Amplification Products of Families P_a-P_b and Y₁-P₀ by Primers S310 and S182

A. 引物 S310 对家系 P_a-P_b 的扩增结果 ;B. 引物 S182 对家系 Y₁-P₀ 的扩增结果。M, 分子量标准

A. PCR amplification products of family P_a-P_b by primer S310 ;B. PCR amplification products of family Y₁-P₀ by primer S182. M : Lambda DNA/EcoRI + HindIII

2.3 亲本特异性分子标记及其在子代中的分离

2 个家系的亲本特异性分子标记及其在 10 个子代个体中的分离数据分别列于表 2 (家系 P_a-P_b) 和表 3 (家系 Y₁-P₀)。符号“-”表示该 F₁ 个体中出现亲本的该分子标记。分离比是指出现该标记的个体数与缺失的个体数之比。

由表 2 可见,在 P_a-P_b 家系的 10 个 F₁ 的每一个体均出现了不少于 5 个父本或母本的分子标记。其中,在不同

的 F₁ 个体中分别出现了 17 个母本标记中的 8~14 个,占所有母本标记的 47.1~82.4%,而父本的 20 个标记在不同子代个体中则分别出现了其中的 5~14 个,占父本标记总数的 25%~70%。平均每个 F₁ 个体出现母本标记 9.7 个、母本标记出现的频率平均为 57.1%;每个个体平均出现父本标记 8.2 个,父本标记出现的频率平均为 41.0%。针对每个 F₁ 个体而言,仅在 PP₁、PP₄、PP₅ 等 3 个 F₁ 个体中出现父本标记百分率超过母本标记的百分率,其余个体中出现母本标记百分率高于父本标记百分率。

表 2 P_a - P_b 家系的亲本特异性分子标记及其在子代个体中的分布

Tab.2 Polymorphic bands in parents of family P_a-P_b and segregation of the bands in filial individuals

标记名称 marker	亲本 parents		子代 progeny										分离比 ratio of separate	基因型 genotype		均 average	
	P _a (♀)	P _b (♂)	PP ₁	PP ₂	PP ₃	PP ₄	PP ₅	PP ₆	PP ₇	PP ₈	PP ₉	PP ₁₀		P _a	P _b		
S030f0924	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8:2	Aa	aa	/	
S117f0567	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9:1	Aa	aa	/	
S121f0538	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2:8	Aa	aa	/	
S123f0917	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7:3	Aa	aa	/	
S188f0994	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8:2	Aa	aa	/	
S221f0562	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9:1	Aa	aa	/	
S310f2274	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0:10	不确定 uncertain	aa	/	
S310f1760	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6:4	Aa	aa	/	
S366f1209	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7:3	Aa	Aa	/	
S453f1755	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4:6	Aa	aa	/	
S453f1182	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9:1	Aa	aa	/	
S453f1037	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6:4	Aa	aa	/	
S469f0532	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3:7	Aa	aa	/	
S517f2105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5:5	Aa	aa	/	
S517f1806	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4:6	Aa	aa	/	
S517f0870	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0:10	不确定 uncertain	aa	/	
S503f0627	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10:0	AA	aa	/	
S030f1008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10:0	aa	AA	/	
S117f0480	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:9	aa	Aa	/	
S123f0810	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10:0	aa	AA	/	
S188f1473	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3:7	aa	Aa	/	
S188f1037	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10:0	aa	AA	/	
S221f0339	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2:8	aa	Aa	/	
S310f1297	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2:8	aa	Aa	/	
S310f0448	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5:5	aa	Aa	/	
S366f1515	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2:8	aa	Aa	/	
S453f1653	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3:7	aa	Aa	/	
S453f1106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7:3	aa	Aa	/	
S453f0764	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2:8	aa	Aa	/	
S453f0562	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2:8	aa	Aa	/	
S469f0868	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4:6	aa	Aa	/	
S469f0541	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4:6	aa	Aa	/	
S503f1320	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:9	aa	Aa	/	
S503f0693	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2:8	aa	Aa	/	
S517f1716	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6:4	aa	Aa	/	
S517f0631	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4:6	aa	Aa	/	
S517f0352	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2:8	aa	Aa	/	
母本标记数(个) maternal marker	17	/	8	9	11	9	8	11	14	10	9	8	/	/	/	/	9.7
母本标记的 出现频率(%) percent of maternal marker	/	/	47.06	52.94	64.71	52.94	47.06	64.71	82.35	58.82	52.94	47.06	/	/	/	/	57.06
父本标记数(个) paternal marker	/	20	14	5	5	11	10	10	6	7	5	9	/	/	/	/	8.2
父本标记的 出现频率(%) percent of paternal marker	/	/	70.00	25.00	25.00	55.00	50.00	50.00	30.00	35.00	25.00	45.00	/	/	/	/	41.00

表 3 $Y_1 - P_0$ 家系的亲本特异性分子标记及其在子代个体中的分布

Tab.3 Polymorphic bands in parents of family $Y_1 - P_0$ and segregation of the bands in filial individuals

标记名称 maker	亲本 parents		子代 progeny										分离比 ratio of separate	基因型 genotype		均 average
	$Y_1(\text{♀})$	$P_0(\text{♂})$	YP ₁	YP ₂	YP ₃	YP ₄	YP ₅	YP ₆	YP ₇	YP ₈	YP ₉	YP ₁₀		P _a	P _b	
S029fl569	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5:5	Aa	aa	/
S029fl194	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6:4	Aa	aa	/
S117fl460	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8:2	Aa	aa	/
S182fl022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10:0	AA	aa	/
S182fl0949	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4:6	Aa	aa	/
S184fl225	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7:3	Aa	aa	/
S221fl082	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10:0	AA	aa	/
S376fl296	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10:0	AA	aa	/
S376f0895	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3:7	Aa	aa	/
S376f0567	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9:1	Aa	aa	/
S463fl451	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4:6	Aa	aa	/
S463f0588	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10:0	AA	aa	/
S477fl174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5:5	Aa	aa	/
S514fl885	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9:1	Aa	aa	/
S514fl492	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4:6	Aa	aa	/
S514f0784	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6:4	Aa	aa	/
S453fl647	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:9	Aa	aa	/
S029fl483	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2:8	aa	Aa	/
S117f0566	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6:4	aa	Aa	/
S117f0475	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5:5	aa	Aa	/
S117f0380	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5:5	aa	Aa	/
S182fl229	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8:2	aa	Aa	/
S184fl451	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3:7	aa	Aa	/
S184fl015	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5:5	aa	Aa	/
S184f0812	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5:5	aa	Aa	/
S221fl251	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:9	aa	Aa	/
S453f0958	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10:0	aa	AA	/
S453f0727	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5:5	aa	Aa	/
S463fl169	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10:0	aa	AA	/
S463f0740	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2:8	aa	Aa	/
S477fl081	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4:6	aa	Aa	/
S514f0721	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5:5	aa	Aa	/
母本标记数(个) maternal marker	17	/	9	14	11	12	8	10	12	11	11	13	/	/	/	11.1
母本标记的 出现频率(%) percent of maternal marker	/	/	52.94	82.35	64.71	70.59	47.06	58.82	70.59	64.71	64.71	76.47	/	/	/	65.30
父本标记数(个) paternal marker	/	15	7	7	7	8	10	7	11	8	5	6	/	/	/	7.6
父本标记的 出现频率(%) percent of paternal marker	/	/	46.67	46.67	46.67	53.33	66.67	46.67	73.33	53.33	33.33	40.00	/	/	/	50.67

$Y_1 - P_0$ 家系 F_1 的每一个体都至少出现了 5 个或 8 个分别来自父本或母本的分子标记。其中母本标记在每个 F_1 个体中出现的百分率在 47.1% ~ 82.4% 之间, 而父本标记出现的百分率在 33.3% ~ 73.3% 范围内, 其中除 YP_5 和 YP_7 外的其它 8 个 F_1 中, 父本标记出现的百分率均低于母本标记的百分率(表 3)。平均每个体出现母本标记 11.1 个, 母本标记出现的频率平均为 65.3%; 每个体平均出现

父本标记 7.6 个, 父本标记出现的频率平均为 50.1%。

2.4 家系 F_1 个体中的非亲标记

表 1 中的引物对 2 个家系的 F_1 个体分别进行 PCR 分析后, 扩增产物中出现了少量的非亲标记, 即仅在子代中出现、在亲本中却未出现的分子标记(表 4)。家系 $P_a - P_b$ 的 10 个 F_1 中有 4 条 RAPD 引物的 6 个扩增位点在 8 个个体中出现了共 13 个非亲标记。其中非亲标记最多的个体

是 PP_2 共出现 3 个非亲标记。在家系 $Y_1 - P_0$ 中,有 4 条引物的 5 个扩增位点在 8 个个体中出现共 22 个非亲标记。其中 YP_3 和 YP_9 中各出现 4 个非亲标记,其次在 YP_5 、

YP_7 和 YP_8 中各出现 3 个非亲标记。但是与相应个体中出现的亲本标记总数或扩增位点总数相比,在每个个体中出现的非亲标记比例都很低。

表 4 家系子代个体中出现的非亲标记

Tab.4 Non-parental markers in filial individuals of the two families

家系 family	标记名称 marker	子代 progeny										合计(ind) total	
		PP_1	PP_2	PP_3	PP_4	PP_5	PP_6	PP_7	PP_8	PP_9	PP_{10}		
$P_a - P_b$	S117f2250			-		-							2
	S117f2177										-		1
	S188f0401		-	-	-				-		-		5
	S310f2035				-								1
	S310f1852		-						-		-		3
	S366f1123		-										1
	非亲标记合计(ind) total of nonparental marker	0	3	2	2	1	0	1	1	1	1	2	13
双亲标记总计(ind) total of parental marker	22	14	16	20	18	21	20	17	14	17	17	179	
RAPD 位点总数(ind) total of RAPD loci	84	79	85	80	87	77	84	77	79	83	83	815	
非亲标记百分率(%) percent of nonparental marker	0	3.80	2.35	2.5	1.15	0	1.19	1.30	1.27	2.41		1.60	
家系 family	标记名称 marker	子代 progeny										合计(ind) total	
		YP_1	YP_2	YP_3	YP_4	YP_5	YP_6	YP_7	YP_8	YP_9	YP_{10}		
$Y_1 - P_0$	S182f1740	-		-		-			-	-			5
	S184f2761								-	-			2
	S184f2133				-		-						2
	S463f1975			-	-	-		-	-	-	-		7
	S514f2412	-		-					-	-	-	-	6
	非亲标记合计(ind) total of nonparental marker	2	0	4	1	3	0	3	3	4	2	2	22
双亲标记总计(ind) total of parental marker	16	21	18	20	18	17	23	19	16	19	19	187	
RAPD 位点总数(ind) total of RAPD loci	59	57	71	63	58	50	62	57	58	54	54	589	
非亲标记百分率(%) percent of nonparental marker	3.39	0	5.63	1.59	5.17	0	4.84	5.26	6.90	3.70		3.74	

3 讨论

海湾扇贝为雌雄同体型贝类,精巢位于腹部外周缘,成熟时为乳白色;卵巢位于精巢内侧,成熟时橘红色。同一个体的雌、雄生殖腺发育基本同步。自然情况下每个海湾扇贝个体可出现数次脉冲式排放配子的过程,每次排放的持续时间仅数秒种,但两次排放之间可以有数分钟至数十分钟的间隔。配子排放的次数和间隔时间在不同个体间有差异,多数个体一次催产可以排卵 2~3 次,而排放精子的次数则更多,排放方式在不同个体或群体间也有所不同,对于海湾扇贝的北部亚种而言,在一次常规催产中,同一个体的雌雄生殖细胞可同时大量排放,也可能以雌性或雄性配子中的某一种为主。后者多数情况下是先排出精子然后排放卵子;反之,如果是卵子先行排出则绝大多

数情况下同时有少量的精子一并带出,然后在十多分钟后再次大量排出精子。海湾扇贝的这种配子排放方式与其生殖腺的结构有一定关系,多数个体的精子先于卵子排放到水体中,如此可以确保排出的卵子有高的受精机会,对于海区自然条件下生活的物种繁衍有利。但是因为在不同个体之间获得仅在一个方向上人工授精的子代很困难,因此对于一些遗传学研究的开展却是十分不便。

海湾扇贝的卵子与精子在形体上差异很大,因此通过物理的方法,比如使用 500 目的筛网过滤后可很容易获得没有卵子的精子。但无论是哪种排放配子的方式,按照现有的方法获得没有精子污染的卵子却都非常困难,因为自然情况下如果一旦有精子排放,则随后每次排放都会有精子一同排出,即便是卵子先于精子排出,其中也携带有少量的精子,并且由于精子的个体小、游泳能力强,很容易在

水体中散布开,因此这些精子有充分的机会与来自相同个体的卵子受精,而目前没有切实可行的技术可以从未受精的卵子中将受精卵剔除出去。

2001年8月初,我们在对1997年从北卡罗来那引进^[5]的海湾扇贝南部亚种(*A. irradians concentricus* Say)的亲本进行催产(将每个亲贝单独放置在一个容器中进行催产)时首次发现有部分个体的卵子可以先于精子排出体外,然后开展海湾扇贝个体间杂交的技术研究。获得了通过不同个体间人工授精建立的4个杂交家系和由相同个体自交建立的7个自交家系,两种类型的家系 F_1 都可以培育到次年夏天达到生殖成熟,但杂交家系 F_1 的存活率显著高于自交家系、生长速度也高于自交家系(张国范等,未发表)。2002年春,我们采取注射5-羟色胺等技术人为促使大量的精子先于卵子排出体外并且将精子排空与卵子开始排放之间的时间间隔延长到30min以上,期间通过频繁的冲洗亲贝、更换新鲜海水与培育容器等措施尽可能去除先行排出的精子。通过采取多种措施,在海湾扇贝北部亚种中也建立了杂交家系。在本研究中我们利用家系的亲本特异性标记位点来判别某子代个体是否由某一方亲本自交所产生,如果一个 F_1 仅出现母本一方的标记而父本标记不出现则初步认为该个体是母本的自交代,反之亦然。亲本特异性位点(即II型分子标记)包括两种类型:AA-aa或Aa-aa,前者在子代个体中不分离、后者则在子代中出现1:1的分离。本研究对两个家系均综合考虑了至少10条RAPD引物的扩增信息、分别使用了37和32个亲本标记对子代进行亲子分析。在两个家系中均使用了17个母本标记(在这些位点中母本为显性AA或Aa、父本为隐性aa)而 P_a-P_b 与 Y_1-P_0 家系中分析的父本标记(母本隐性aa、父本显性AA或Aa)则分别为20和15个。两个家系的每个 F_1 个体中出现的母本标记数均至少达到8个,而出现的父本标记数则至少达到5个,表明所分析的每个子代个体均同时传承了其父母双亲的多个基因位点,据此可初步说明所分析的所有个体均非某一方亲本自交产生的子代。说明我们发展的海湾扇贝不同个体间单方向人工授精技术是可靠的,按照这种方法所建立的杂交家系及其遗传学研究结果是可信的。在所分析的2个家系中均出现了少量非亲位点,但每个 F_1 个体中出现的非亲标记位点数均远低于亲本标记位点数。同时与每个 F_1 个体中出现的亲本标记(含父、母本特异性标记)的总和相比,相同个体非亲标记的总数相当低(表4)。该结果初步证明,所分析 F_1 个体均为相应家系的亲本所产生的子代。此外,在 P_a-P_b 与 Y_1-P_0 家系中非亲标记出现的百分率(每个 F_1 个体的非亲标记位点与相同个体RAPD扩增位点之和的百分率)平均仅为1.60%与3.74%,与其他生物(0.16%~10%)^[7,8]相比属中等偏低。非亲标记出

现于RAPD^[6,8]、微卫星^[7]等各种基于PCR技术的DNA标记中,其产生的原因可能有多种。首先,如果有家系外其他来源的个体混入,将会出现较大数量的非亲标记,从表4的结果看,本研究中非亲标记百分率最高为6.90%(Y_{P_0}),在58个PCR扩增位点中仅出现4个非亲位点,而该个体出现的双亲特异性分子标记共16个(母本标记11个、父本标记5个),亲本特异性标记数显著多于非亲标记数;其次,RAPD被认为稳定性不够好,非亲标记可能由此而产生,本研究为尽可能排除假阳性条带的出现,对每个标记都进行了2次PCR扩增;第三,RAPD标记通常是显性标记,但少数情况下也会出现共显性标记,其共显性标记有可能表现为非亲标记。

亲本 P_a 、 P_b 、 Y_1 、 P_0 的特异性分子标记数分别为17、20、17、15个,而其在 F_1 中分离的标记分别有14、17、13和13个,分别占亲本特异性标记位点的82.4%、85.0%、76.5%和86.7%。初步结果表明海湾扇贝这种杂交家系也可能通过拟测交策略构建遗传连锁图谱。每家系中各有6个标记在 F_1 中不分离,其中的10个不分离标记在所分析 F_1 中都出现,推测其一方亲本的基因型有可能是AA, P_a-P_b 家系中的2个母本标记S310f2274与S517f0870在10个 F_1 个体均未出现,该位点可能是Aa基因型,由于所分析 F_1 个体数不足所以未检测到存在该相应位点的个体,或者存在致死基因导致偏分离,上述可能性在被推测为AA基因型的位点中同样存在。

参考文献:

- [1] 张国范,刘述锡,刘 晓,等. 海湾扇贝自交家系的建立和自交效应[J]. 中国水产科学,2003,10(6):441-445.
- [2] 郑怀平,张国范,刘 晓,等. 海湾扇贝杂交家系与自交家系生长和存活比较[J]. 水产学报,2004,28(3):267-272.
- [3] 郑怀平. 海湾扇贝两个养殖群体数量性状及壳色遗传研究[D]. 中国科学院研究生院博士学位论文,2005.
- [4] 张海滨. 海湾扇贝近交生物学和遗传改良研究[D]. 中国科学院研究生院博士学位论文,2005.
- [5] 刘 晓,孙 博,张国范,等. 海湾扇贝4次引种后代的表型特征和遗传分化[J]. 海洋与湖沼,2006,37(1):61-68.
- [6] 肖 洁,刘 晓,张国范,等. 皱纹盘鲍杂交 F_1 代与亲本的RAPD标记及分离方式分析[J]. 海洋学报,2004,26(6):124-132.
- [7] 万俊芬,包振民,刘广绪,等. 扇贝种间单对杂交一代幼虫ISSR标记的分离方式[J]. 高技术通讯,2004,14(5):82-87.
- [8] Ayliffe M A, Lawrence G J, Ellis J G, et al. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands[J]. Nucleic Acids Research,1994,22(9):1632-1636.