

文章编号:1000-0615(2007)05-0598-09

中国对虾连续两代的 DNA 随机扩增多态性 及其遗传规律分析

李晓静^{1,2}, 孔 杰¹, 王伟继¹, 孟宪红¹,
田 燚^{1,3}, 孟 鹏^{1,2}, 毛连菊²

(1. 中国水产科学院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 大连水产学院, 辽宁 大连 116023;

3. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:为评估 DNA 随机扩增多态性标记在中国对虾遗传连锁图谱构建中的应用前景, 利用中国对虾单对交配亲本及其子二代材料, 对 RAPD 标记及其遗传规律进行了研究。22 条 RAPD 随机引物扩增结果的统计分析表明, 标记在中国对虾 F₂ 的遗传规律可归为不分离标记和分离标记: 不分离标记, 指在亲本和后代中均不分离的标记, 占总位点的 54.1%; 分离标记占总位点的 45.9%。其中, 分离标记又包括符合孟德尔遗传分离的标记、偏离孟德尔遗传分离标记和异常分离标记。符合孟德尔分离的标记中, 分离比例为 3:1 的标记占分离标记的 14.7%; 总的 1:1 标记占分离标记的 64.7%; 偏离孟德尔分离和异常分离的标记分别占分离标记的 11.7% 和 8.9%。在这些分离的标记中, 有 76.5% 的位点在“双假测交理论”的策略中适合构建中国对虾的遗传连锁图谱, 这为以中国对虾 F₂ 为作图群体, 并利用 RAPD 标记构建中国对虾遗传连锁图谱提供了理论支持。

关键词:中国对虾; 子二代(F₂); RAPD 标记; 分离方式

中图分类号:S 917

文献标识码:A

The segregation patterns of RAPD markers in the F₂ progenies of Chinese fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*

LI Xiao-jing^{1,2}, KONG Jie¹, WANG Wei-ji¹, MENG Xian-hong¹,
TIAN Yi^{1,3}, MENG Peng^{1,2}, MAO Lian-ju²

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China;

3. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The genetic structure and segregation of molecular markers in F₂ of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) were studied by random amplified polymorphic DNA (RAPD) technology to explore its usefulness in linkage mapping construction. Two heritable types of DNA markers, the non-

收稿日期:2006-11-28

资助项目:引进国际先进农业科学技术计划(948)项目(2006-G55(B)); 国家自然科学基金项目(30500378)

作者简介:李晓静(1980-), 女, 江苏徐州人, 硕士, 从事种质资源与遗传育种研究. Tel: 13964204765, E-mail: dawnlee2004@163.com

通讯作者:孔 杰, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

segregating type and segregating type, were identified from the amplification results of 22 random primers. The non-segregating marks in both parents and progenies accounted for 54.1% of all markers, reflecting one genotypic combinations of G_{φ} and G_{δ} ($AA \times AA$). There were three kinds of segregation, including Mendelian segregation, deviated segregation and abnormal segregation, which accounted for 45.9% of all marks. The standard Mendelian segregating markers were divided in 3 : 1 ratio and 1 : 1 ratio, the former accounted for 14.7% of all segregated markers and the latter accounted for 64.7% respectively. The 3 : 1-segregated markers in the F_2 represented four genotypic combinations of G_{φ} and G_{δ} ($AA \times aa$, $Aa \times aa$, $Aa \times Aa$ and $Aa \times AA$), and one genotypic combinations of $F_{1\varphi}$ and $F_{1\delta}$ ($Aa \times Aa$); the 1 : 1-segregated markers in the F_2 represented two genotypic combinations of G_{φ} and G_{δ} ($Aa \times aa$ and $Aa \times Aa$), and one genotypic combinations of $F_{1\varphi}$ and $F_{1\delta}$ ($Aa \times aa$); non-parental heteroduplex, so far, has not be conjectured their genotypic combinations, which were segregated 1 : 1 ratio in the F_2 progenies. Non-standard Mendelian segregating marks and abnormal segregating marks accounted for 11.7% and 8.9% of all segregated markers respectively. Totally, 76.5% segregating markers, explained by two way pseudo-testcross, could be used to construct genetic maps of *F. chinensis*. Accordingly, the result would lay a theoretical basis for genetic linkage map construction using RAPD markers and F_2 population.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; second filial generation (F_2); random amplified polymorphic DNA RAPD marker; segregation patterns

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是我国特有的重要经济虾类,由于遭受过度捕捞、环境污染,尤其是1992年流行性中国对虾疾病的暴发,其育苗的成活率和养殖的成活率低、规格小^[1],所以中国对虾养殖业的持续发展迫切需要培育出生长快、抗病强的中国对虾新品种。

白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是传染性和致死性强的一种病原,传统的选择育种技术培育优良品种很难奏效,分子标记辅助育种便成为培育中国对虾新品种的重要途径。构建高密度的遗传连锁图谱,实现中国对虾重要经济性状的 QTL 定位,是进行分子标记辅助育种的前提。RAPD (random amplified polymorphic DNA) 标记是构建遗传连锁图谱常用的作图标记之一,因其不需预先知道研究对象的遗传背景的特点,在连锁分析及遗传连锁图谱的绘制方面有其独到的特点和优势^[2]。利用 RAPD 标记构建连锁图谱的作图群体通常有 BC、RIL、DH、 F_1 或 F_2 分离群体,由于中国对虾的变异程度低,从构图的效率角度考虑更适合利用 F_2 作为作图群体^[3]。利用 F_2 群体构建连锁图谱的理论基础是“双假测交(two way pseudo-testcross)理论”^[4],这是目前构建遗传连锁图谱应用较广泛的理论依据。基本原理:两亲本杂交得到 F_1 , F_1 姊妹交得到的 F_2 的遗传基因座已发生分离重

组,其中一些基因座在 $F_{1\varphi}$ 和 $F_{1\delta}$ 上分别表现出杂合和隐性纯合,同时在 F_2 个体中呈现 1 : 1 分离,这种情况相当于测交,这些基因座可以用于分别构建两亲本的分子连锁图谱;而某些基因座在 $F_{1\varphi}$ 和 $F_{1\delta}$ 中均表现为杂合,这种情况相当于自交,并同时在 F_2 中出现 1 : 2 : 1 或 3 : 1 分离,这些基因座可以用于构建两亲本共同的分子连锁图。因此以 F_2 群体作图的策略包括两方面:拟测交策略(1 : 1)和自交模式策略(3 : 1)。若以 F_2 群体构建中国对虾的遗传连锁图谱,必须首先了解 RAPD 标记在 F_2 中的分离情况。

关于中国对虾遗传连锁图谱的构建已经有了初步的研究:岳志芹等^[5]利用 F_1 群体和 AFLP 分子标记,对中国对虾的遗传连锁图谱做了初步研究;孙昭宁等^[6]利用 RAPD 标记和 SSR 标记,并以 F_1 为作图群体构建了中国对虾的遗传连锁图谱;王伟继等^[7]以 F_2 为作图群体,构建了中国对虾 AFLP 分子标记的遗传连锁图谱。由于中国对虾染色体较多($2n=88$),已经得到的遗传连锁图谱不够紧密,为了增加连锁群数量、提高分子标记密度和满足重要经济性状的 QTL 定位,本研究主要分析了 RAPD 标记在亲代、子一代(first filial generation, F_1)和子二代(second filial generation, F_2)的分离方式,以期利用 RAPD 技术和 F_2 群体构建中国对虾的遗传连锁图谱提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

2004年春季选取1尾未交配的雌虾($G_{\text{♀}}$)黄勃海培育群体,另选取1尾野生中国对虾雄虾($G_{\text{♂}}$)(朝鲜半岛沿岸野生群体),采用人工精英移植技术产生 F_1 。2004年10月到11月从 F_1 家系中选取40尾对虾进行人工越冬。2005年春季

从 F_1 (家系内)的越冬中国对虾中选1尾雌虾和1尾雄虾进行人工交尾,产生 F_2 (仔虾期600尾左右)。随机抽取 F_1 的12个个体、 F_2 的53个个体及其亲本($G_{\text{♀}}$ 、 $G_{\text{♂}}$),置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰柜内保存备用。

随机引物(表1)、dNTPs、*Taq*DNA聚合酶均购自上海生工生物工程有限公司。

表1 随机引物序列

Tab.1 The sequences of RAPD primers

引物 Primer	序列 Sequence	引物 Primer	序列 Sequence	引物 Primer	序列 Sequence	引物 Primer	序列 Sequence
S82	GGCACTGAGG	S266	AGGCCCGATG	S475	GGAAGCCAAC	S1231	ACCGTGCCGT
S202	GGAGAGACTC	S302	TTCGCCACC	S494	GGACGCTTCA	S1297	CTCGAACCCC
S215	GGATGCCACT	S431	TCGCCGAAA	S1090	AAGGCCCTG	S1396	GGAACCCACA
S224	CCCCTACGA	S436	AAGCGACCTG	S1091	GTCACGTCCT	S1391	ACCCGACCTG
S246	ACCTTTGCGG	S440	GGTGCTCCGT	S1092	CCCAGGCTAC		
S261	CTCAGTGTC	S442	ACGTAGCGTC	S1093	GAATGGCACC		

1.2 方法

基因组DNA制备 中国对虾基因组DNA的提取参照孟宪红等^[8]的方法,用GENEQUANT pro (Pharmacia Biotech Ltd.) RNA/DNA分析定量仪定量和1%琼脂糖电泳鉴定。

RAPD-PCR反应 RAPD反应体系为:PCR反应混合物中含 $10\times$ PCR反应缓冲液 $2.5\text{ }\mu\text{L}$ (成分: $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $500\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA,pH 9.0), $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+} , $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs, $0.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物, 20 ng 基因组DNA, 1 U *Taq*DNA聚合酶($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$),总反应体积为 $25\text{ }\mu\text{L}$ 。RAPD反应的循环程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后进入45个循环,每个循环包括 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min 、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min 、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min ,最后在 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 充分延伸 10 min 。反应在PTC-200型PCR仪上进行,产物用2%的琼脂糖凝胶电泳分离,EB染色,后用Gel Doc 1000凝胶成像仪进行图像处理(反应产物在电泳前存放于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$,电泳和制胶缓冲液用1倍的TAE)。

引物的筛选 为增加实验结果的可信度,对引物进行多重选择并优化RAPD反应体系。①用一个模板筛选110个引物,选出能扩增出清晰条带的引物;②利用步骤①选出的引物扩增 $G_{\text{♀}}$ 、 $G_{\text{♂}}$ 、 $F_{1\text{♀}}$ 、 $F_{1\text{♂}}$ 及10个 F_1 的姊妹个体,选出产

生多态性的引物;③利用步骤②选出的理想引物扩增 F_2 的53个个体。

结果检测 取 $5\text{ }\mu\text{L}$ 扩增产物用2%的琼脂糖凝胶电泳分离,EB染色,然后用Gel Doc1000凝胶成像仪进行图像处理。

2 数据处理

2.1 RAPD标记的分离分析

RAPD标记主要为显性标记,分离后代中主要表现为有、无PCR条带两种类型。有带的记为“1”,无带的记为“0”,缺失记为“-”,统计多态性RAPD带在每个个体中的表现。根据RAPD标记在亲本、 F_1 及 F_2 的扩增结果确定标记的来源及标记类型,具有某条谱带的个体在该位点的基因型为AA或Aa,而无该谱带的个体为aa,由此推断该谱带在子代中的理论分离。利用卡方检验($\alpha>0.05$)鉴定这些分离条带是符合孟德尔分离规律。

2.2 遗传标记命名

引物名加多态性RAPD带的分子量表示RAPD标记名称。用Gel-pro Analyzer 4.5软件确定片段的分子量大小。引物名称与其扩增的特异性条带的分子量大小用“-”分隔,如S82-1703表示该片段由S82引物扩增产生,其分子量约为1703 bp。

3 结果

3.1 引物筛选结果

本研究所用的引物均为来自上海 Sangon 公司的 S 系列随机引物,在 110 条可扩增的引物中有 86 条引物可扩增出稳定、清晰的谱带,每个引物扩增的条带数从 5 到 12 条不等。利用 G_{φ} 、 G_{δ} 、 $F_{1\varphi}$ 、 $F_{1\delta}$ 及其 10 个 F_1 的姊妹个体进行筛选,复筛后共选出 22 个引物(见表 1)。最后用这 22 个引物对 F_2 的 53 个个体进行扩增,共得到 148

条产物,其中有 68 条多态性遗传标记,平均每个引物可产生 3.09 个多态标记。

3.2 RAPD 标记在中国对虾 F_2 群体中的分离方式

通过对 RAPD 引物扩增结果的分析表明:根据 RAPD 标记在中国对虾 F_2 的传递情况包括不分离标记和分离标记。对分离的 RAPD 标记进行卡方检验(见表 2)得出,分离标记可分为符合孟德尔分离规律(1:1 和 3:1)的标记、偏离孟德尔分离规律的标记和异常分离标记。

表 2 亲本 RAPD 标记的基因型、分离率及其卡方检验

Tab.2 Genotype of parents' RAPD markers, ratio of segregation and χ^2 -test

位点 Loci	亲本表现型				F_1 表现型 Phenotype(F_1)	F_2 期望比值 expected ratio(F_2)	F_2 观测比值 actual ratio(F_2)	卡方值 χ^2
	G_{φ}	G_{δ}	$F_{1\varphi}$	$F_{1\delta}$				
S82-0472	-	+	+	-	多态	1:1	27:26	0.02
S82-0802	-	-	+	-	多态	1:1	22:31	1.53
S82-1703	+	-	+	+	全带	3:1	35:18	2.08
S202-0667	+	-	+	+	多态	1:1	31:22	1.53
S202-0935	+	+	-	+	多态	1:1	30:23	0.92
S202-1026	-	-	+	-	多态	1:1	28:25	0.17
S215-0442	-	-	+	-	多态	1:1	28:25	0.17
S215-0368	-	-	+	+	多态	1:1	33:20	3.18
S215-0500	-	+	-	-	多态	无	8:45	无
S224-0376	-	+	+	+	全带	3:1	39:14	0.18
S224-0913	-	+	-	+	多态	1:1	25:28	0.17
S224-1236	+	+	-	-	多态	无	0:57	无
S246-0375	+	+	+	-	多态	1:1	25:28	0.17
S246-0237	+	-	+	-	多态	1:1	29:24	0.47
S246-1738	-	+	-	-	多态	1:1	22:31	1.53
S246-0685	-	-	-	-	多态	无	3:47	无
S246-0743	-	+	-	+	多态	1:1	27:26	0.02
S261-0462	+	+	-	+	多态	1:1	39:14	11.8
S261-0745	-	-	+	-	多态	1:1	19:34	4.26
S261-0721	+	-	-	-	多态	无	4:46	无
S266-0681	-	-	+	-	多态	1:1	24:29	0.47
S266-0707	+	+	-	+	多态	1:1	25:28	0.17
S266-0986	+	+	+	-	多态	1:1	26:27	0.02
S266-1775	-	+	+	-	多态	1:1	29:24	0.47
S302-0325	-	-	+	+	多态	1:1	29:24	0.47
S302-1178	+	-	+	-	多态	1:1	28:25	0.17
S431-0818	+	+	+	-	多态	1:1	29:24	0.47
S431-0607	-	+	-	+	多态	1:1	23:30	0.92
S431-1679	-	+	+	-	多态	1:1	27:26	0.02
S436-0446	-	-	-	+	多态	1:1	23:30	0.92
S436-0657	+	+	+	-	多态	1:1	27:26	0.02
S436-1293	+	-	+	-	多态	1:1	40:13	13.8
S440-0413	-	+	-	+	多态	1:1	31:22	1.53
S440-0578	-	+	+	+	全带	3:1	40:13	0.18
S442-0327	+	-	-	+	多态	1:1	24:29	0.47
S442-0634	-	+	-	+	多态	1:1	30:23	0.92
S442-1721	+	-	+	+	全带	3:1	42:11	0.74
S475-0343	+	-	+	-	多态	1:1	26:27	0.02
S475-0491	-	+	+	+	全带	3:1	35:18	2.08
S475-0400	-	-	-	+	多态	1:1	19:34	4.26

· 续表 2 ·

位点 Loci	亲本表现型				F ₁ 表现型 Phenotype(F ₁)	F ₂ 期望比值 expected ratio(F ₂)	F ₂ 观测比值 actual ratio(F ₂)	卡方值 χ^2
	G _♀	G _♂	F _{1♀}	F _{1♂}				
S494-1237	+	-	+	-	多态	1:1	29:24	0.47
S494-0489	-	+	-	+	多态	1:1	24:29	0.47
S494-0750	-	+	+	-	多态	1:1	21:32	2.28
S1090-0571	-	+	+	-	多态	1:1	20:33	3.18
S1090-0714	-	+	-	+	多态	1:1	29:24	0.47
S1090-0986	-	-	-	+	多态	1:1	18:35	5.45
S1090-1091	-	+	-	-	多态	无	4:46	无
S1092-0292	-	-	-	+	多态	1:1	32:21	2.28
S1092-1200	-	+	+	+	多态	3:1	37:16	0.76
S1093-0879	-	-	+	-	多态	1:1	28:25	0.17
S1093-0618	-	+	-	+	多态	1:1	17:36	6.81
S1231-0787	-	+	+	+	全带	3:1	40:13	0.18
S1231-1211	+	-	+	+	全带	1:1	28:25	0.17
S1297-0462	+	-	-	+	多态	1:1	27:26	0.02
S1297-0647	+	+	+	-	多态	1:1	20:33	3.18
S1297-0647	-	-	+	-	多态	1:1	22:31	1.53
S1297-0917	-	+	+	-	多态	1:1	30:23	0.92
S1297-1115	+	+	+	+	多态	3:1	38:15	0.38
S1358-0494	+	-	+	+	多态	3:1	全带	53
S1358-0955	+	+	+	+	多态	3:1	40:13	0.18
S1391-1536	-	-	+	-	多态	1:1	21:32	2.28
S1391-0520	-	+	-	+	多态	1:1	全带	53
S1391-0750	+	+	+	+	全带	3:1	41:12	0.28
S1391-1667	-	-	+	-	多态	1:1	20:33	3.18
S1396-0729	+	-	+	-	多态	1:1	22:31	1.53
S1396-0929	-	+	-	-	多态	1:1	34:19	4.24
S1396-0671	-	-	+	-	多态	1:1	24:29	0.47
S1396-1000	+	+	+	+	多态	1:1	23:30	0.92

注：“+”表示有带，“-”表示无带

Notes: “+” showed “band”, “-” showed non-band

不分离标记 不分离标记指的是 RAPD 标记为双亲和子代共有标记,即 RAPD 标记在双亲、F₁ 和 F₂ 中均表现有带(见图 1 中 a)。推测 G_♀ 和 G_♂ 基因型是 AA × AA,这类标记占位点总数的 54.1%。

符合孟德尔分离规律的标记 符合孟德尔分离规律的标记占位点总数的 36.49%,有以下两大类型:

(1) RAPD 标记在 F₂ 群体呈现 3:1 分离。包括单亲特有标记和双亲共有标记。单亲特有标记占分离标记的 11.76%,指在 G_♀ 和 G_♂ 中呈现多态,在 F_{1♀} 和 F_{1♂} 中都有带,在 F_{1♀} 和 F_{1♂} 的姊妹个体中全有带和呈现多态时,在 F₂ 中呈现 3:1 分离的 RAPD 标记,推测其在 G_♀ 和 G_♂ 的基因型分别是 AA × aa(见图 1 中 b 带)和 Aa × aa(见图 1 中 c 带);双亲共有标记占分离标记的 2.94%,指在二代双亲都有带,在 F_{1♀} 和 F_{1♂} 的姊妹个体中

全有带和呈现多态时,在 F₂ 中呈现 3:1 分离的标记,推测其基因型为 Aa × AA(见图 1 中 e 带)和 Aa × Aa(见图 1 中 d 带)。

(2) RAPD 标记在 F₂ 中呈现 1:1 的分离。通过其分离情况又分为两种类型:可推测出父母本双亲基因型的 1:1 标记和不能推测出父母本基因型、但在 F₂ 群体中呈现 1:1 分离的异倍标记^[9]。

可推测出父母本双亲基因型的 1:1 标记包括两种类型,单亲特有标记(见图 1 中 f 带)和双亲共有标记(见图 1 中 g 带)。单亲特有标记占分离标记的 30.88%,推测 G_♀ 和 G_♂ 的基因型为 Aa × aa;双亲共有标记占分离标记的 10.29%,推测 G_♀ 和 G_♂ 的基因型为 Aa × Aa。这两种 RAPD 标记在 F_{1♀} 和 F_{1♂} 中的基因型均为 Aa × aa。

异倍标记又称非亲标记,这种标记的分离方式有 3 种类型:①标记在 G_♀ 和 G_♂ 中均没发现谱

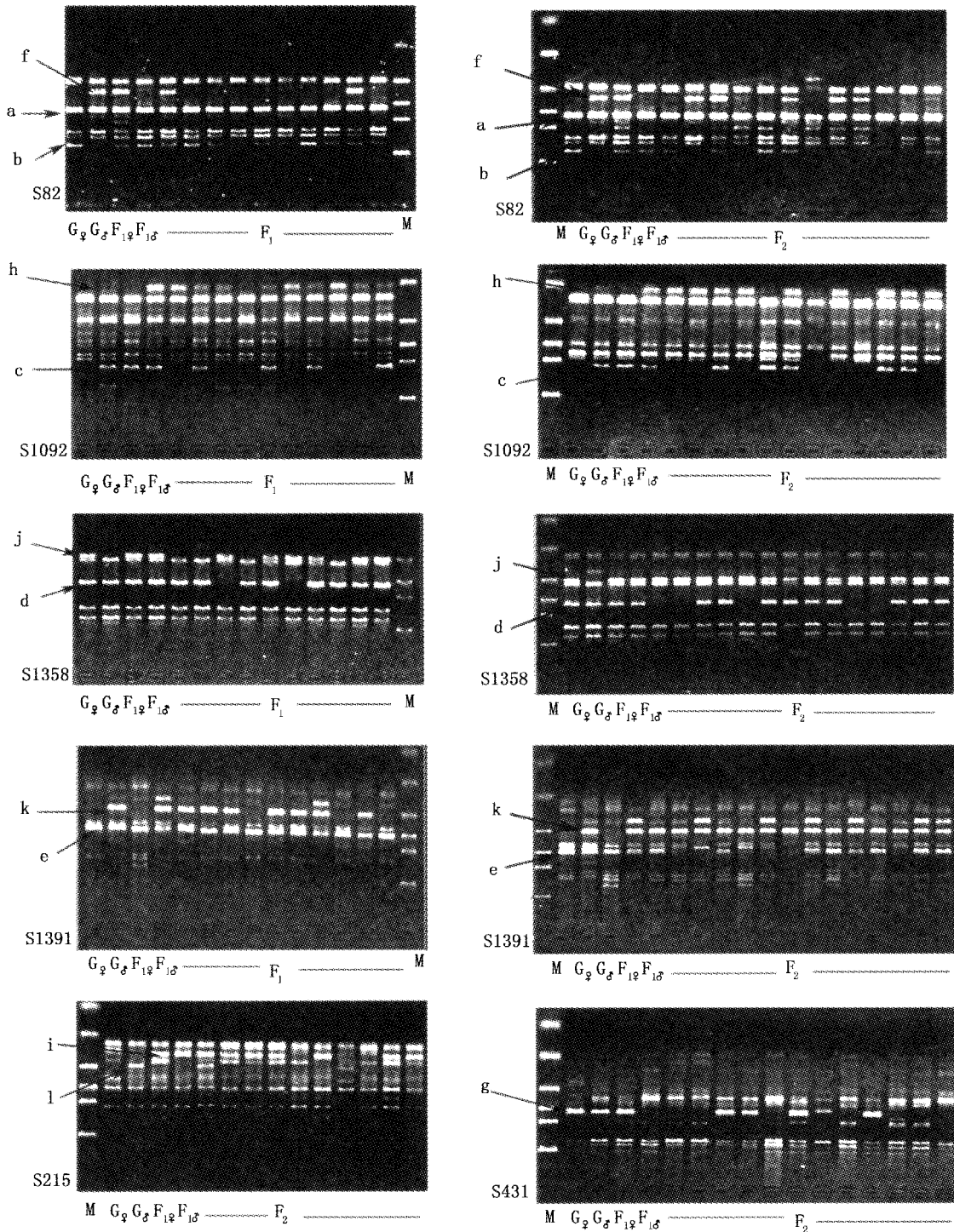


图1 RAPD 标记在亲本、F₁ 和 F₂ 的分离方式

Fig. 1 The segregation patterns of RAPD markers in the parents, F₁ and F₂ of *F. chinensis*

上图分别为引物 S82、S1092、S1358、S1391、S215、S431 对两亲本、F₁ 和 F₂ 个体扩增的结果。G_♀、G_♂ 和 F_{1♀}、F_{1♂} 分别表示两代亲本,F₁ 为子一代个体,F₂ 为子二代个体;a~l 表示不同分离方式的分离位点;M 为 DL-2000

Fig. 1 showed the results of amplification with the primers (S82, S1092, S1358, S1391, S215, S431). G_♀ lane, G_♂ lane, F_{1♀} lane and F_{1♂} lane were two pairs of parents; F₁ lane and following lanes were first filial generation, F₂ lane and following lanes were second generation; a~l showed segregated loci; M lane was molecular weight marker

带,在 $F_{1\sigma}$ 和 $F_{1\delta}$ 中有多态,但在 F_2 中呈 1:1 分离(见图 1 中 h 带),此类标记占总分离标记的 16.18%;②标记在 G_{σ} 和 G_{δ} 中均发现谱带和在 G_{σ} 和 G_{δ} 中均无谱带,但在 $F_{1\sigma}$ 和 $F_{1\delta}$ 中均有带,且在 F_2 中呈 1:1 分离(见图 1 中 i 带),此类标记占分离标记的 4.41%;③标记在双亲 G_{σ} 和 G_{δ} 中呈现多态,在 $F_{1\sigma}$ 和 $F_{1\delta}$ 中均有带,在 F_2 呈现 1:1 分离,此类标记占分离标记的 2.94%。

根据自交模式,发生 3:1 分离的单亲特有标记可以构建中国对虾雌虾和雄虾共同的遗传连锁图谱;根据拟测交理论,1:1 的标记可以用来分别构建雌虾和雄虾的遗传连锁图谱。本研究中,符合构建雌虾和雄虾共同的遗传图谱的标记占分离标记的 11.76%,符合构建雌虾图谱的 1:1 标记占分离标记总数的 26.47%,符合构建雄虾遗传连锁图谱的标记占分离标记总数的 20.59%。值得指出的是,根据张新叶等^[10]的研究,异倍标记中的②、③型标记可用于整合雌虾与雄虾的图谱。

偏分离标记 在 F_2 个体中有些 RAPD 标记的分离比在统计学上偏离了 1:1 和 3:1 的孟德尔分离比例,偏离孟德尔遗传规律的位点占分离标记的 11.7%。其中一些标记发生了严重的偏分离,例如在双亲呈现多态、且在 F_1 中发生分离的标记,在 F_2 中不分离(见图 1 中的 j 带和 k 带)。

异常分离标记 异常分离标记占分离标记的 8.9%,这种标记有两种类型:一种是 RAPD 标记在 G_{σ} 和 G_{δ} 个体中均无带,但后代却有相当少的扩增产物;另一种类型是 RAPD 标记在 G_{σ} 和 G_{δ} 均有带或呈现多态,同时在 $F_{1\sigma}$ 和 $F_{1\delta}$ 中无带,却在 F_2 中发生分离,分离比不符合 1:1 或 3:1 的分离比例(见图 1 中 l 带)。本研究中主要出现后一种情况。

4 讨论

4.1 RAPD 标记中 3:1 和 1:1 标记的分布

本研究得到的符合孟德尔分离规律 3:1 和 1:1 分离的位点中,3:1 标记占 18.5%,1:1 标记占 81.5%。3:1 分离位点的比例显著低于利用“双假测交构想”对 F_1 代分离方式的报道。肖洁等^[11]对皱纹盘鲍杂交子一代分离方式中得到 3:1 标记占 28.6%,1:1 标记占 71.4%。申雪

艳等^[12]利用 RAPD 标记在中国对虾单对交配亲本及其子一代的分离方式中得到了 3:1 标记占 32%,1:1 标记占 68%。本研究中 3:1 标记相对已研究的报道较低,1:1 分离标记占了很大的比例,作者认为主要是考虑了在 F_2 群体中发生 1:1 分离的异倍标记的原因,这一结果说明了利用 F_2 作图群体比利用 F_1 作图群体为亲本的基因型提供了更多的基因组信息。

4.2 异倍标记

关于异倍标记在很多研究中均有报道(一些学者还称为这些标记为“非亲本带”),Aliflé 等^[13]解释这是基因型异螺旋化引起的,即在一个基因位点上存在 2 个不同的等位基因 a_1 、 a_2 ,基因型 a_1a_1 和 a_2a_2 在电泳谱带相同,而基因型 a_1a_2 的谱带因为产生异螺旋而不同于 a_1a_1 和 a_2a_2 ,因此产生了不同的基因型组合。Riedy 等^[14]认为,人类后代的此种标记出现的频率约为 4.4/引物,并解释这是基因漂变的结果,或者是异源基因相互作用发生重排的结果。张新叶等^[10]认为这是由多等位基因引起的,即:假设在一个基因座上存在 4 个不同等位基因 a_1 、 a_2 、 a_3 和 a_4 ,基因型 a_1a_2 和 a_3a_4 在电泳分析中不出现谱带,而基因型 a_1a_3 和 a_2a_4 出现谱带。这样 $a_1a_2 \times a_3a_4$ 在双亲中不出现谱带,但在下一代呈现 1:1 分离; $a_1a_3 \times a_2a_4$ 在双亲中出现谱带,但在下一代中亦呈 1:1 分离。本研究中异倍标记的比例占总的 1:1 分离标记的 37.2%,相对来讲这个比例很高。关于异倍标记比例高的解释,根据已有报道^[10,13],作者认为:可能是该群体的双亲遗传基础复杂,而且双亲之间的亲缘关系较近,即遗传基础复杂的近缘杂交群体,这样的群体产生异螺旋的等位基因(或者复等位基因)的可能性较大。值得指出的是,在异倍标记的位点中,来自母本 $F_{1\sigma}$ 的标记(55.6%)远远高于父本 $F_{1\delta}$ (16.7%),这一结果说明异倍分离的标记可能更易于在母本中表达。

4.3 偏分离标记

RAPD 标记的偏分离现象在自然界中普遍存在,导致偏分离的原因很多。有人认为进行群体基因型分析时,标记基因型划分、统计错误会导致系统性偏分离^[15]。生物因素是导致偏分离的主要因素,被认为是生物进化的动力之一。Lyttle 等^[16]认为偏分离现象与配子体的选择有关。Brummer 等^[17]认为杂合基因型具有较强的杂种

优势,在分离群体中偏分离主要倾向于杂合体的情况,这也部分解释了本研究中观察到的偏分离标记偏向杂合带型的事实。Kianian 等^[18]认为作图群体双亲亲缘关系变远,标记偏分离有加重趋势,例如培育种与野生种种间杂交时会引起非同源重组、染色体重排等基因组结构变异,最后导致严重的偏分离。这一结果与本研究得到的结果相反,可能是中国对虾是遗传变异较低的生物,培育群体与野生群体的遗传差异不大,导致偏分离标记相对较低(11.9%)的现象。本研究中偏离 3:1 标记和 1:1 标记占分离位点的 1.5% 和 10.4%,相对来讲 3:1 标记的偏分离率较低,这一结果正好与 Byrne 等^[19]报道的种间杂交要比种内交配偏分离比例高的结论相一致。

4.4 异常分离标记

异常分离标记指在双亲无带,在子代发生分离,且分离比严重偏离孟德尔分离比例的分子标记;或者双亲都有带或呈现多态,子代不分离的标记。本研究中异常分离的标记占分离标记的 10%,这种现象在苹果、桉树等的 RAPD 标记分离方式方面均有类似报道^[20, 21],其原因尚不清楚。从已有的研究报道推测可能是配子形成过程中染色体的不等价交换产生的新序列。总之,异常分离现象可能说明了中国对虾在 F₂ 群体中发生了一定程度的变异。

4.5 RAPD 标记在中国对虾遗传连锁图谱中的前景展望

由于 RAPD 技术简单高效,可以构建和扩展已有的遗传图谱或增加标记的密度,还可以迅速寻找到同所定位基因相连锁的 DNA 标记进行 QTL 定位^[2]。依据“双假测交理论”,由符合孟德尔分离的 1:1 标记分别构建雌虾遗传连锁图谱和雄虾遗传连锁图谱,由 3:1 标记构建双亲共有的遗传连锁图谱;另外,利用在 F_{1♀} 和 F_{1♂} 均有带但在 F₂ 中呈现 1:1 分离的异倍标记整合雌虾和雄虾的遗传连锁图谱。本研究中单对交配亲虾的 F₂ 群体中有 45.95% 的检出位点发生了分离,其中 36.49% 的位点发生了孟德尔分离,结果证明 RAPD 标记结合“双假测交理论”构建中国对虾的遗传连锁图谱的可行性。进一步的工作是以 F₂ 为作图群体,利用 RAPD 技术构建中国对虾的遗传连锁图谱,并尝试进行雌虾遗传连锁图谱和雄虾遗传连锁图谱进行整合,在已研究的基础上,

提高中国对虾的连锁群数量、标记数量,来加大连锁群对基因组的覆盖程度、图谱密度,为中国对虾分子标记辅助育种奠定基础。

参考文献:

- [1] 邓景耀,庄志猛.渤海对虾补充量变动原因的分析及对策研究[J].中国水产学科学,2001,7(4):125-128.
- [2] 柳淑芳,杜立新.基因图谱的构建及其在动物遗传育种中的应用[J].黄牛杂志,2000,(1):44-47.
- [3] 尹冬明,黄敏仁,朱立煌,等.利用显性分子标记和 F₁ 群体进行林木遗传连锁图谱的构建[J].生物工程进展,1996,16(4):12-16.
- [4] Grattapaglia D, Sederoff R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: map-ping strategy and RAPD markers[J]. Genetics, 1994, 137: 1121-1137.
- [5] 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, 14(5): 88-93.
- [6] 孙昭宁,刘萍,李健,等.用 RAPD 和 SSR 两种标记技术构建中国对虾的遗传连锁图谱[J]. 动物学研究, 2006, 27(3): 317-324.
- [7] 王伟继,孔杰,董世瑞,等.中国明对虾 AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建[J]. 动物学报, 2000, 52(3): 575-584.
- [8] 孟宪红,孔杰.“高效 RAPD”技术的初步研究及其 PAGE 检测[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(2): 13-17.
- [9] 张蕴哲,刘红霞,邬荣领,等.毛新杨×毛白杨 AFLP 分子遗传图谱[J]. 林业科学研究, 2003, 16(5): 595-603.
- [10] 张新叶,尹冬明,诸葛强,等.利用 RAPD 标记构建美洲黑杨×欧美杨分子标记图谱[J]. 遗传, 2000, 22(4): 209-213.
- [11] 肖洁,张国范,刘晓,等.皱纹盘鲍杂交 F₁ 代与亲本的 RAPD 标记及分离方式分析[J]. 海洋学报, 2004, 26: 124-132.
- [12] 申雪艳,孔杰,岳志芹,等. RAPD 标记在中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 单对交配亲本及其子一代的分离方式[J]. 高技术通讯, 2004, 9: 100-105.
- [13] Ayliffe M A, Lawrence G J, Ellis J G, et al. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands [J]. Nucleic Acid Res, 1994, 22: 1632-1636.
- [14] Reidy M F, Hamilton W J, Aquadro C F. Excess of

- nonparental bands in offspring from known pedigrees assayed using RAPD PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20: 918 - 919.
- [15] Sibov S T, de Souza Jr C L, Garcia A F, *et al.* Molecular mapping in tropical maize using microsatellite markers: 1. Map construction and localization of loci showing distorted segregation [J]. *Hereditas*, 2003, 139: 96 - 106.
- [16] Lyttle T W. Segregation distorters [J]. *Annu Rev Genet*, 1991, 25(1): 5111 - 557.
- [17] Brummer E C, Bouton J H, Kochert G, *et al.* Development of an RFLP map in diploid alfalfa [J]. *Theoretical Applied Genetics*, 1993, 86: 329 - 332.
- [18] Kianian S F, Quiros C F. Generation of a Brassica composite RFLP map: linkage arrangements among various population and evolutionary implication [J]. *Theoretical Applied Genetics*, 1992, 84: 544 - 554.
- [19] Byrne M, Murreli J C, Allen B, *et al.* An integrated genetic linkage map for eucalypts using RFLP, RAPD and isozyme markers [J]. *Ther Appl Genet*, 1995, 91(6-7): 869 - 875.
- [20] 刘孟军. RAPD 标记在苹果属种间杂交一代的分离方式 [J]. *园艺学报*, 1998, 25(3): 214 - 219.
- [21] 甘四明, 施季森, 白嘉雨, 等. RAPD 标记在桉属种间杂交一代的分离方式研究 [J]. *林业科学研究*, 2001, 14(2): 125 - 130.

欢迎订阅 2008 年度《南方水产》

《南方水产》是由中国水产科学研究院南海水产研究所主办, 国内外公开发行的综合类水产科技期刊。主要报道渔业资源、捕捞技术、渔业设施、渔业环境保护、水产养殖与增殖、渔业生物病害、水产品加工与综合利用以及水产基础研究等方面的研究论文、研究简报、综述等。

《南方水产》立足南方, 面向全国, 突出学术性、地域性、实用性、可读性, 重点报道我国南方地区渔业科研、生产的新技术、新成果及新动向。

《南方水产》为双月刊, 80 页, 大 16K, 逢双月 5 日出版。邮发代号 46 - 65, 每期定价 8 元, 全年 6 期 48 元(含邮费)。读者可到当地邮局订阅, 也可将款汇至《南方水产》编辑部订阅或补订。

编辑部地址: 广州市新港西路 231 号

邮 编: 510300

电 话: 020 - 84458694

传 真: 020 - 84451442

网 址: <http://schinafish.cn>

E-mail: nfsc@vip.163.com