

# 皱纹盘鲍杂交 $F_1$ AFLP 标记偏分离现象初析

刘贤德<sup>1,2</sup>, 刘 晓<sup>1</sup>, 张国范<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

**摘要:**运用 AFLP 标记技术对皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino) 及杂交  $F_1$  代共 86 个个体进行分析, 检测了 32 对 AFLP 引物组合, 共产生 2 688 个 AFLP 片段, 平均每个引物组合产生 84 个片段。在子代中分离的片段有 483 个, 包括母本标记 230 个, 父本标记 135 个, 双亲本共有的标记 118 个。卡方检验表明 167 个母本和 100 个父本标记符合 1:1 的孟德尔分离比例, 78 个标记符合 3:1 的分离比例, 其偏分离比例分别达到 27.4%, 25.9% 和 33.9%。本研究发现无论是雌性还是雄性偏分离标记都主要是纯合子过剩, 初步推测造成偏分离的原因可能与两个鲍鱼群体的某些基因不兼容有关。

**关键词:**皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino); AFLP; 偏分离

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2007)10-0070-07

遗传过程中等位基因的偏分离, 是生物界普遍存在的现象, 被认为是生物进化的动力之一<sup>[1]</sup>。偏分离的产生, 可以由配子选择或存在遗传致死基因所引起。近年来, 随着分子生物学技术的兴起, 在运用 DNA 分子标记构建生物遗传图谱的时候, 经常会出现某些位点的基因频率偏离正常孟德尔分离定律的情况。由于 DNA 分子标记不存在表型分辨的问题, 因而可直接从分子水平探讨偏分离产生的原因, 从而进一步确定偏分离对后代基因型产生的影响, 这对了解生物的进化、遗传及育种选择等都有重要的价值。目前, 在罗非鱼、虹鳟、鲑鱼、牡蛎、对虾等重要水生生物遗传研究中报道了大量的偏分离现象<sup>[2~8]</sup>, 而在皱纹盘鲍中却较少报道。本研究应用 AFLP 标记技术, 对皱纹盘鲍杂交  $F_1$  代的偏分离现象进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及 DNA 提取

实验材料为来源于日本和中国的两个皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino) 单交  $F_1$  的 86 个个体<sup>[9]</sup>, DNA 的提取参照肖洁等<sup>[9]</sup>的方法。

### 1.2 AFLP 分析

AFLP 分析程序主要参照李莉等<sup>[10]</sup>并作了一定的改动, 主要改动之处是在选择性扩增产物的检测

部分。本研究的选择性扩增产物的检测是在 Meg-BACE1000 DNA 测序仪上进行的。上机前, 取 5  $\mu$ L 的选择性扩增产物, 用酒精沉淀法进行纯化, 纯化后加入 9.75  $\mu$ L 0.1% Tween 20 和 0.25  $\mu$ L Mega-BACE ET550-R size standard (Amersham Biosciences, USA) 溶解, 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 立即置于冰浴中。上机采用 Genotyping 模式。利用 Instrument Control Manager software 软件进行数据的收集, 利用 Genetic Profiler 1.5 软件, 进行数据的分析和处理。

### 1.3 数据统计

统计只在一个亲本中出现而在另一个亲本中缺失或者两者都有但在子代产生分离的片段。由于 AFLP 标记的谱带强度很难区分, 作者只统计谱带的有和无。有带的记为 1, 无带的记为 0, 缺失或模糊不清的以“-”表示。

利用卡方检验, 检测 AFLP 的标记分离是否符合 1:1 或者 3:1 孟德尔分离定律。

收稿日期: 2005-12-29; 修回日期: 2006-04-20

基金项目: 国家 863 计划项目 (2004AA626070); 国家自然科学基金项目 (30371117)

作者简介: 刘贤德 (1974-), 男, 山东枣庄人, 博士研究生, 研究方向: 海洋生物学, E-mail: xdlu@jmu.edu.cn; 张国范, 通讯作者, 电话: 0532-82898701, E-mail: gzfzhang@ms.qdio.ac.cn

2 结果与分析

2.1 引物筛选结果

AFLP 产物在 MegaBACE 1000 DNA 测序仪上以峰带的形式检出。利用亲本和 6 个子代,从 120 个

AFLP 引物组合中选择出 32 个扩增产物质量好,多态性高的引物组合,对所有子代个体进行了 AFLP 分析。32 个引物组合共扩增出 2 688 条片段,平均每个引物组合扩增出 84 个片段(表 1)。

表 1 引物组合编号及父本、母本和共同标记

Tab.1 The code of AFLP primer combinations and the male, female and common markers

| EcoRI 引物 | MseI 引物 | 所有片段数 | 母本标记 | 父本标记 | 共同标记 |
|----------|---------|-------|------|------|------|
| AAC(A)   | CTA(5)  | 67    | 14   | 5    | 8    |
| AAC(A)   | CTG(7)  | 79    | 11   | 9    | 2    |
| AAC(A)   | CTT(8)  | 49    | 3    | 3    | 1    |
| AA G(B)  | CAC(2)  | 64    | 11   | 5    | 3    |
| AA G(B)  | CTT(8)  | 59    | 6    | 3    | 3    |
| AA G(B)  | CAT(4)  | 76    | 10   | 5    | 3    |
| AAC(A)   | CAG(3)  | 49    | 9    | 4    | 0    |
| AA G(B)  | CTC(6)  | 73    | 10   | 4    | 4    |
| ACG(E)   | CTG(7)  | 54    | 6    | 5    | 3    |
| AGC(G)   | CAA(1)  | 80    | 7    | 3    | 0    |
| AAC(A)   | CTC(6)  | 65    | 3    | 6    | 4    |
| AAC(A)   | CAA(1)  | 82    | 10   | 7    | 1    |
| ACT(F)   | CTA(5)  | 51    | 7    | 3    | 0    |
| AGG(H)   | CTC(6)  | 53    | 7    | 3    | 3    |
| AGC(G)   | CAT(4)  | 90    | 8    | 2    | 2    |
| ACA(C)   | CAC(2)  | 85    | 4    | 3    | 4    |
| ACC(D)   | CAC(2)  | 71    | 4    | 5    | 5    |
| ACC(D)   | CAG(3)  | 41    | 5    | 5    | 3    |
| ACC(D)   | CAT(4)  | 58    | 8    | 3    | 3    |
| ACG(E)   | CAA(1)  | 73    | 5    | 1    | 4    |
| ACT(F)   | CAG(3)  | 80    | 5    | 7    | 1    |
| ACA(C)   | CAG(3)  | 77    | 8    | 5    | 2    |
| AGC(G)   | CTT(8)  | 57    | 7    | 3    | 3    |
| AA G(B)  | CAA(1)  | 137   | 7    | 5    | 1    |
| TAA(L)   | CTT(8)  | 98    | 4    | 4    | 9    |
| TAA(L)   | CAA(1)  | 141   | 6    | 4    | 6    |
| TAA(L)   | ACA(9)  | 112   | 10   | 4    | 6    |
| TAC(K)   | ACT(0)  | 137   | 9    | 3    | 11   |
| TTA(M)   | CTT(8)  | 102   | 8    | 2    | 4    |
| TAC(K)   | CAT(4)  | 153   | 6    | 3    | 3    |
| TAC(K)   | CAA(1)  | 121   | 6    | 9    | 7    |
| TAA(L)   | CTG(7)  | 155   | 6    | 2    | 9    |
| 合计       |         | 2 688 | 230  | 135  | 118  |

## 2.2 AFLP 标记在子代的分离方式

### 2.2.1 在 $F_1$ 代不分离

据已有报道, AFLP 为显性遗传标记(存在为显性, 缺失为隐性), 因此, 双亲的 3 种标记组合, 即

AA  $\times$  AA、AA  $\times$  Aa、Aa  $\times$  AA 与 AA  $\times$  aa (A、a 分别表示同一标记位点的显、隐性 AFLP 标记) 在后代不分离, 见图 1 中的 A。

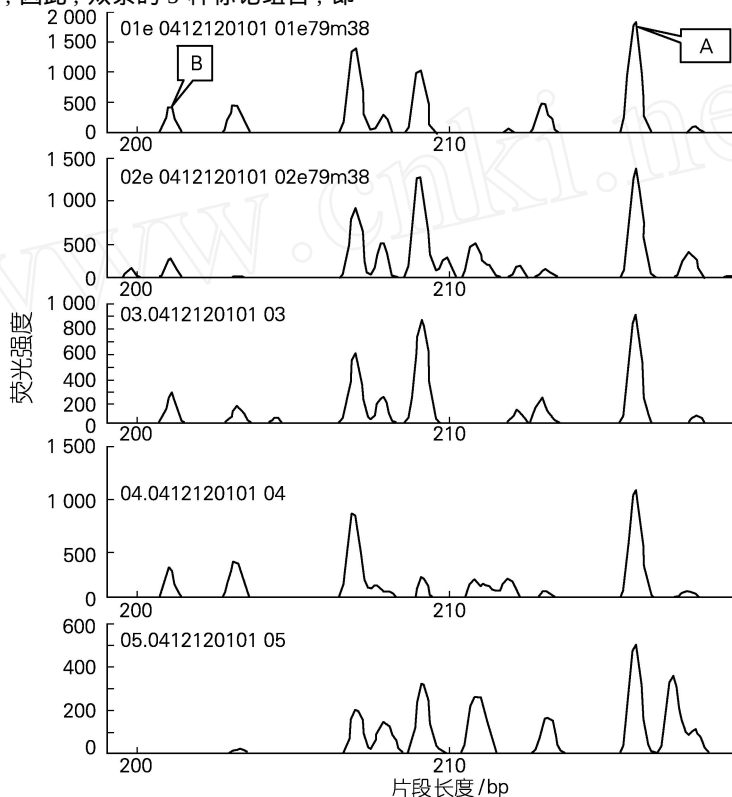


图 1 AFLP 选择性扩增产物检测结果

Fig. 1 The result of AFLP selective amplification product

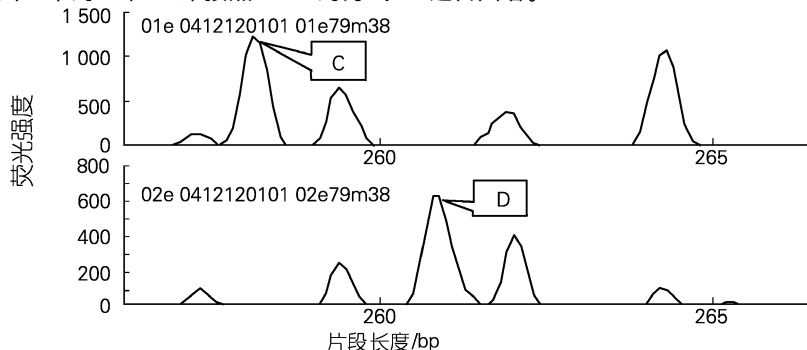
注:上面两个为亲本,下面三个为子代个体,图 2,图 3 与此相同

Above two were parents, the following three were offspring. The fig. 2 and fig. 3 showed the same order of parents and offspring as the fig. 1

### 2.2.2 在 $F_1$ 代分离

在  $F_1$  代分离比例符合孟德尔定律,即按照 1:1 或者 3:1 的比例进行分离。当双亲的 AFLP 标记组合分别为 Aa  $\times$  aa、aa  $\times$  Aa 与 Aa  $\times$  Aa 时,符合此分离方式。如图 2 中的 C 和 D 即按照 1:1 的方式

进行分离。图 1 中的 B,即按照 3:1 的方式进行分离。在所有发生分离的 483 个标记中,有 140 个标记偏离孟德尔定律 ( $P < 0.01$ ), 361 个符合孟德尔定律 ( $P \geq 0.01$ ), 这些标记可进一步用来构建皱纹盘鲍的遗传图谱。



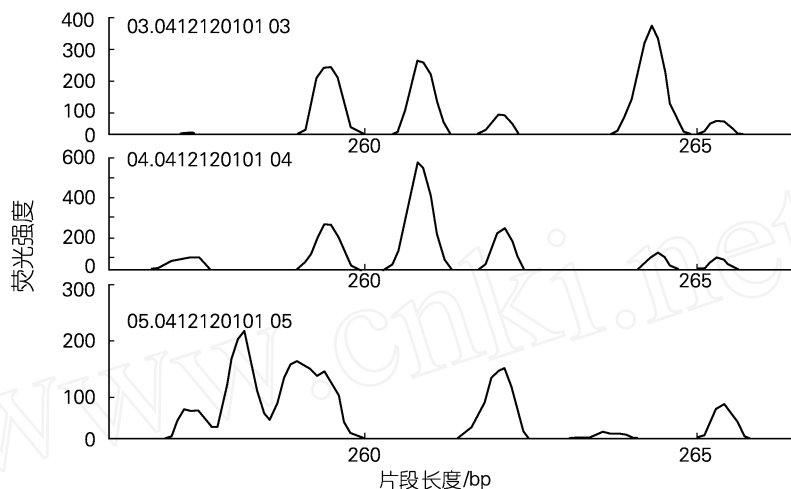


图2 AFLP 选择性扩增产物检测结果

Fig. 2 The result of AFLP selective amplification product

### 2.2.3 $F_1$ 异常分离的标记

表现为双亲均无,但在  $F_1$  出现的标记,见图 3 中的 E。

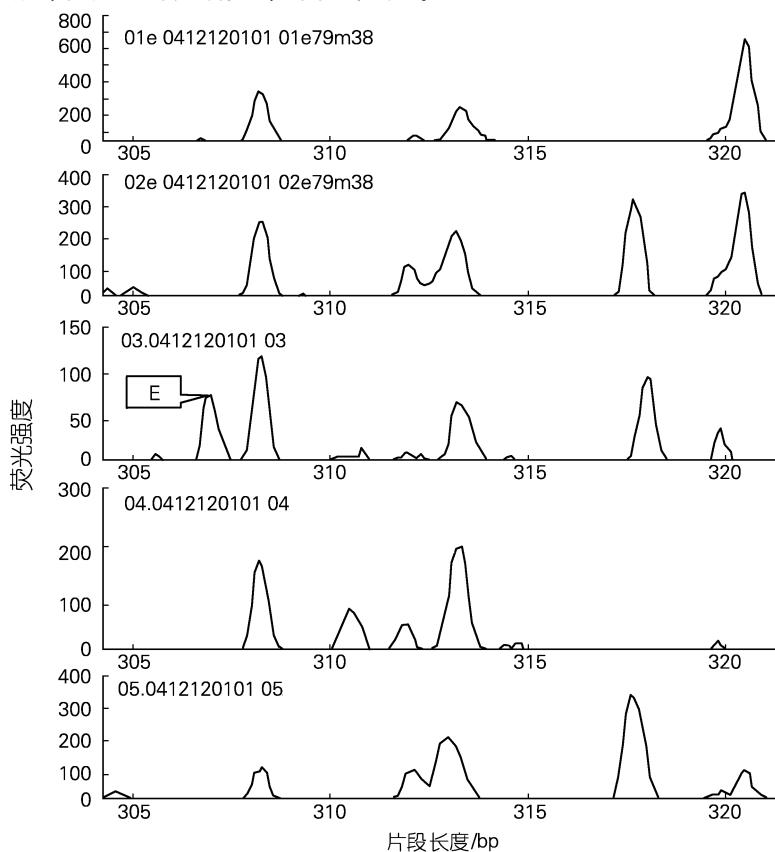


图3 AFLP 选择性扩增产物检测结果

Fig. 3 The result of AFLP selective amplification product

## 2.3 AFLP 标记的偏分离情况

在子代中分离的标记有 483 个,包括母本标记 230 个,父本标记 135 个,双亲本共有的标记 118 个(表 2)。卡方检验表明 167 个母本和 100 个父本标记符合 1:1 的孟德尔分离比例,78 标记符合 3:1

的分离比例,其偏分离比例分别达到 27.4%,25.9% 和 33.9%。偏分离的 AFLP 标记的片段分布比较均匀,略微偏向于小片段(图 4~6)。无论雌性偏分离标记,还是雄性偏分离标记,都主要是纯合子过剩。

表 2 AFLP 总标记、偏分离标记统计

Tab. 2 The total and distorted markers of AFLP

| 标记类别 | 偏分离标记 | 纯合子过剩 | 纯合子缺少 | 总标记 | 偏分离比例 (%) |
|------|-------|-------|-------|-----|-----------|
| 母本标记 | 63    | 38    | 25    | 230 | 27.4      |
| 父本标记 | 35    | 27    | 8     | 135 | 25.9      |
| 共同标记 | 40    | -     | -     | 118 | 33        |

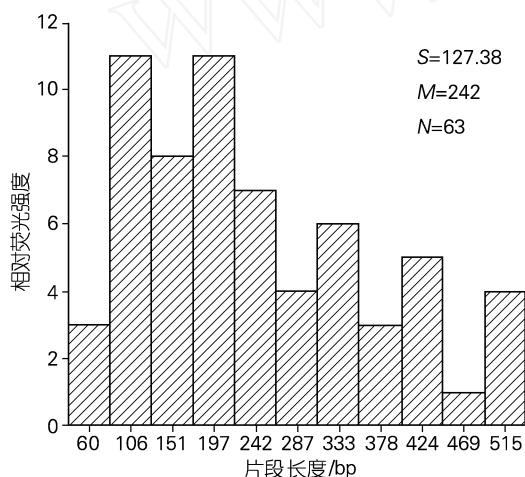


图 4 雌性偏分离标记的片段分布

Fig. 4 The distributing of female distorted markers  
S 表示标准偏差, M 表示平均值, N 表示偏分离标记个数。图 5, 6 与此同  
S stand for standard deviation, M stand for mean and N stand for the number of distorted markers

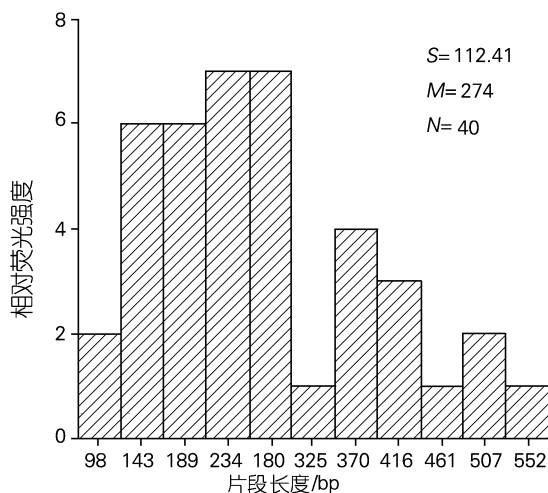


图 6 共同标记的偏分离片段分布

Fig. 6 The distributing of common distorted markers

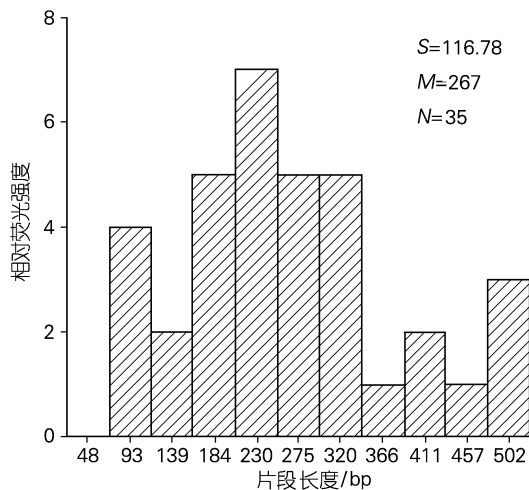


图 5 雄性偏分离标记的片段分布

Fig. 5 The distributing of male distorted markers

## 3 讨论

偏分离现象普遍存在,在土豆上,26%的 RFLP 标记表现偏分离<sup>[11]</sup>,在谷物上相应的偏分离比例为 44%<sup>[12]</sup>。对于 AFLP 标记,牡蛎的偏分离比例为 8.2%<sup>[14]</sup>,罗非鱼 8.0%<sup>[2]</sup>,虹鳟 13.3%<sup>[31]</sup>,家蚕的偏分离标记高达 54.0%<sup>[13]</sup>。本实验的研究发现, AFLP 的偏分离比例为 28.6%,介于上述研究结果最高值与最低值之间。实验结果表明,无论是雌性还是雄性偏分离标记,都主要是纯合子过剩,这显然不能单独用存在遗传致死基因来解释。作者推测,造成偏分离的原因可能有如下几种:第一,两个鲍鱼群体(日本和中国)之间可能存在不兼容基因,导致一些杂合度较高的鲍鱼死亡,从而造成纯合子过剩。这种解

释与杂种优势的理论并不矛盾,因为并不是任何两个组合杂交就可以产生杂种优势,也有可能产生杂种劣势。第二,可能与作图群体有关,作者采取的是拟测交策略进行构图,子代是全同胞家系,由于是同一个不可避免在某些位点是纯合的,从而造成在某些位点纯合子过剩。另外,子代群体是86个,个体数偏少,由于取样的随机性,也可能会造成了偏分离位点增多。第三,可能存在一定程度的基因型统计误差。第四,非等位基因的共带现象<sup>[15,16]</sup>,一些分子量相同的片段来自不同位点的扩增,这种情况下标记的分离不符合孟德尔定律。作者认为,造成偏分离的原因可能是上述一种也可能是多种原因的混合。在作者后续的微卫星研究中发现,雄性鲍鱼亲本可能存在着染色体复制,而染色体复制是导致物种形成的重要原因之一,这也可能是导致两个鲍鱼群体某些基因不兼容的重要原因。由于地理隔绝,而皱纹盘鲍的活动范围又有限,随着群体内变异的积累,因此逐渐形成新的物种。这只是一种推测,需要进一步验证。

较高的偏分离会对遗传图谱的构建产生一定的影响,凸显出实验材料的重要性。为了更深入地研究偏分离产生的原因,构建遗传图谱应在下列方面开展工作:(1)运用 $F_2$ 或其他高世代群体进行标记分析;(2)幼虫或者浮游期取样,从而研究偏分离标记是否是因存在遗传致死基因而造成;(3)开发新的微卫星标记引物,进一步分析两个群体之间是否存在不兼容基因。

#### 参考文献:

- [1] Sandler L, Novitski E. Meiotic drive as an evolutionary force [J]. *Am Nat*, 1957, 91: 105-110.
- [2] Kocher T D, Lee W J, Sobolewska H, *et al.* A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. *Genetics*, 1998, 148: 1 225-1 232.
- [3] Young W P, Wheeler P A, Coryell V H, *et al.* A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids [J]. *Genetics*, 1998, 48: 839-850.
- [4] Sakamoto T, Danzmann R G, Gharbi K, *et al.* A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates [J]. *Genetics*, 2000, 155: 1 331-1 345.
- [5] Waldbieser G C, Bosworth B G, Nonneman D J, *et al.* A microsatellite-based genetic map for channel catfish [J]. *Genetics*, 2001, 158:727-434.
- [6] Li Y T, Byrne K, Miggiano E, *et al.* Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers [J]. *Aquaculture*, 2003, 219:143-156.
- [7] Moore S S, Whan V, Davis, G P, *et al.* The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Aquaculture*, 1999, 173:19-32.
- [8] Wilson K, Li Y T, Whan V, *et al.* Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism [J]. *Aquaculture*, 2002, 204: 297-309.
- [9] 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.
- [10] 李莉,郭希明. 利用RAPD和AFLP标记初步构建太平洋牡蛎的遗传连锁图谱[J], 海洋与湖沼, 2003, 34(5): 541-551.
- [11] Gebhardt C, Ritter E, Debener T, *et al.* RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum* [J]. *Theor Appl Genet*, 1989, 78: 65-75.
- [12] Graner A, Jahoor A, Schondelmaier J, *et al.* Construction of an RFLP map of barley [J]. *Theor Appl Genet*, 1991, 83: 250-256.
- [13] Tan Y D, Wan C, Zhu Y, *et al.* An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm [J]. *Genetics*, 2001, 157: 1 277-1 284.
- [14] Yu Z, Guo X. Genetic linkage map of the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin [J]. *Biol Bull*, 2003, 204: 327-338.
- [15] Negi M S, Devic M, Delseny M, *et al.* Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 101:146-152.
- [16] Nikaido A, Yoshimaru H, Tsumura Y, *et al.* Segregation distortion for AFLP markers in *Cryptomeria japonica* [J]. *Genes Genet Syst*, 1999, 74:55-59.

# Genetic analysis of segregation distortion of AFLP markers in an $F_1$ population of the Pacific abalone

LIU Xian-de<sup>1,2</sup>, LIU Xiao<sup>1</sup>, ZHANG Guo-fan<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Received**: Dec. 29, 2005

**Key words**: Pacific abalone; AFLP; segregation distortion

**Abstract**: Using AFLP markers, we analyzed the  $F_1$  hybrid family of Pacific abalone including 86 individuals, 32 AFLP primer combinations were selected from 120 AFLP primer combinations. Totally 2688 AFLP fragments were produced in the parents and the  $F_1$  family. Among which, 483 were segregation fragments including 230 female, 135 male and 118 common markers. Chi test showed that 167 female and 100 male markers were in agreement with the Mendelian 1:1 ratio ( $P \geq 0.01$ ), and 78 markers were in agreement with the 3:1 ratio ( $P \geq 0.01$ ). The ratios of segregation distortion were 27.4%, 25.9% and 33.9%, respectively. Analysis of the high ratio of segregation distortion indicated that both female and male distorted markers were homozygote excess. We hypothesized that the segregation distortion may be associated with the incompatibility of genes between the two population of abalones in this study.

(本文编辑:张培新)