

文章编号: 1004-7271(2007)06-0524-07

RAPD 标记在罗氏沼虾杂交 F_1 中分离的研究

张雷

(连云港师范高等专科学校自然科学系, 江苏 连云港 222006)

摘要:利用 RAPD 标记技术对罗氏沼虾缅甸引进群体和浙江本地群体及其一对一杂交产生的 F_1 的分离方式进行了研究,并分析了双亲及 F_1 的遗传结构。结果显示,50 个 RAPD 随机引物中有 9 个可扩增出多态性位点,共产生 47 个位点,其中 22 个有多态性,占总位点的 46.8%; 9 个位点可用于遗传连锁作图;13 个为偏分离位点,1 个为异常分离位点。克隆分析该异常分离位点发现,其大小为 707 bp,与已知序列同源性极低。父母本之间的遗传距离为 0.185 7,双亲与 F_1 间的距离分别为 0.158 2 和 0.107 3。以上结果表明, F_1 群体可以作为作图群体应用于罗氏沼虾遗传图谱的构建。

关键词:罗氏沼虾;杂交;遗传结构;偏分离

中图分类号:S 917 文献标识码:A

The segregation patterns of RAPD profiles in the F_1 progenies from the crossbreeding of two different geographic populations of *Macrobrachium rosenbergii*

ZHANG Lei

(Nature Science Department of Lianyungang Teacher's College, Lianyungang 222006, China)

Abstract: The segregation pattern of RAPD markers in 21 intraspecific F_1 progenies of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), that came from crossbreeding between Burma introduced population (BP) (♀) and Zhejiang cultured population (ZP) (♂) was studied. The genetic structure of the offspring and application of RAPD markers in construction of linkage map were also assessed. Nine of 50 primers can produce polymorphic result. 47 loci were obtained from the nine primers and 22 loci (46.8%) were polymorphic in this study. 9 loci were segregated in the expected Mendelian ratio and could be used for construction of linkage map. Thirteen loci were segregation distortion, and one was the abnormal locus which can only be found in some of the offspring but not in parents. After cloning and sequencing the abnormal locus, it was found that the sequence was 707 bp long and no homogenous sequences were found in NCBI. Its function needs more research work. The genetic distance between two parents, father and progeny, mother and progeny are 0.185 7, 0.185 2, 0.107 3 respectively. The result suggests that the F_1 population can be used in construction of linkage map, but the RAPD marker can not be applied to construction of linkage map because of relatively few polymorphic amplified loci.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii* deMan; genetics; molecular markers; segregation pattern

收稿日期:2006-08-05

作者简介:张雷(1980-),男,江苏连云港人,主要从事水生生物遗传育种方面的研究。E-mail: yutian0927@126.com

罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 隶属十足目 (Decapoda), 长臂虾科 (Palaemonidae), 沼虾属 (*Macrobrachium*), 是淡水虾中主要养殖品种。目前我国养殖的罗氏沼虾为 20 世纪 70 年代末、80 年代初从马来西亚引进种的繁殖后代, 由于亲本得不到更新, 种质退化现象严重^[1-3]。水产动物的选育一般采取群体选育的办法, 而采用近亲交配选育的方法较少。近亲交配可增加后代纯合体的比例, 结合一定选育技术, 可育成具有不同特点的新的品系或家系^[4]。而传统的罗氏沼虾选育都是根据表现型的差异来进行的, 对各世代杂交分离系间真正基因结构上的差异研究较少。本研究探讨了 RAPD 标记在罗氏沼虾单对交配亲本及 F_1 的分离规律, 以期罗氏沼虾遗传图谱的构建, QTL 定位和分子标记辅助选择育种模型的建立提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本实验所用两个罗氏沼虾亲本及其杂交 F_1 由浙江南太湖淡水水产种业有限公司提供, 其中雌虾来自浙江养殖群体, 雄虾来自缅甸自然群体, 共产生近 2 万个子一代, 在该公司养殖三个月 (性别尚未分化) 后采集 40 只作为样本。

1.2 DNA 的提取

取虾肌肉约 0.2 g, 按杨弘^[5]等方法提取基因组 DNA。

1.3 RAPD 扩增

实验所用 RAPD 引物购自上海生工生物工程公司 (引物序号前为 S) 和上海生达生化有限公司 (引物序号前为 M), 其他试剂均购自上海生工生物工程公司。PCR 扩增体系为 25 μ L, 包括 1 \times PCR buffer、10 pmol/ μ L、0.2 mmol/L dNTP、1U Taq 聚合酶、10 ngDNA 模板, 在 Eppendorf Mastercycler gradient 扩增仪上进行。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 接着 35 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 36 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖电泳检测, 拍照。

1.4 数据 处理

根据琼脂糖凝胶同一迁移位置上 DNA 带的有无进行统计分析, 有带的记作 1, 无带的记作 0。根据父母本及 F_1 的扩增结果确定标记的来源及标记的类型, 具备某个位点的个体将每个扩增位点作为一对等位基因, 统计每个扩增位点的不同等位基因的比例, 用统计分析软件 SPSS11.5 对预期分离比例与实际分离比例的符合程度进行卡方检测, 当 $P < 0.05$ 为差异显著。

利用 PopGene32 (Version 1.31) 计算亲本与子代的遗传距离及遗传相似系数。

1.5 目的片段回收、克隆和测序

利用 E. Z. N. A 胶回收试剂盒从琼脂糖凝胶回收纯化在子代中出现而在父母本中未出现的 DNA 条带, 与 pGEM-T 载体 (TaKaRa 公司) 连接后, 转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 挑取白色单菌落, 酶切鉴定, 经上海英骏生物技术有限公司测序后, 在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中, 进行 BLAST 分析。

2 结 果

2.1 RAPD 扩增结果

利用亲本和子代对 50 个引物进行筛选, 共筛选出 9 个引物可扩增出稳定清晰并在双亲间呈现多态性的位点。这 9 个引物共扩增出 47 个位点 (表 1), 片段大小为 200 bp 到 2 000 bp, 平均每条引物产生 5.2 个位点, 其中父本和母本中出现的位点分别为 41 个和 37 个, 平均每条引物在父本和母本中可分别扩增出 4.6 个和 4.1 个位点; 47 个位点中有 21 个在父母本或子代中出现多态性, 占总位点的 44.7%, 平均每条引物产生 2.3 个多态位点。

表1 引物序列及扩增位点数
Tab.1 The sequence and number of polymorphic sites with different primer

引物	序列(5'-3')	位点数			
		父本	母本	总数	多态数
M12	未知	6	6	7	3
S222	AGTCACTCCC	5	2	5	3
S301	CTGGGCACGA	5	5	5	2
S315	CAGACAAGCC	5	5	5	2
S326	GTGCCGTCA	4	4	5	3
S330	CCGACAAACC	2	3	3	2
S331	CTCAGTCCGA	6	4	6	2
S333	GACTAAGCCC	5	4	6	3
S337	CCTTCCCACT	3	4	5	1
合计		41	37	47	21
平均		4.6	4.1	5.2	2.3
P%					44.7%

2.2 RAPD 标记在 F_1 中的分离

根据引物号和片段排列顺序对所有位点进行编号,如将引物 S337 扩增得到的 4 个位点分别标记为 a、b、c、d,见图 1。进行描述时分别记作 S337-a、S337-b、S337-c、S337-d。

本实验共产生 47 个 RAPD 标记位点,其中有 22 个位点发生了分离,占总位点数的 46.8%,其分离情况见表 2。

表2 RAPD 分离位点的分布及显著性检测
Tab.2 The distribution of segregation loci of RAPD and significance test(χ^2)

RAPD 位点	基因型		观测比率	期望比率	卡方检验	
	父本	母本			χ^2	P
M12-e	1	1	30:10	3:1	1.600	1.000
M12-f	0	1	22:18	1:1	4.900	0.527
M12-g	1	0	19:21	1:1	6.400	0.752
S222-c	1	0	24:16	1:1	19.600	0.206
S222-d	1	0	13:27	1:1	8.533	0.027*
S222-e	1	0	12:28	1:1	16.900	0.011*
S301-b	1	1	29:11	3:1	0.133	0.715
S301-c	1	1	36:4	3:1	2.133	0.144
S315-a	1	1	16:24	3:1	4.800	0.028*
S315-c	1	1	38:2	3:1	8.533	0.003*
S326-a	1	1	31:9	3:1	10.000	0.715
S326-b	1	0	15:25	1:1	16.900	0.114
S326-e	0	1	31:9	1:1	25.600	0.001*
S330-b	1	1	38:2	3:1	0.000	0.003*
S330-c	0	1	33:7	1:1	0.400	0.000*
S331-a	1	0	30:10	1:1	0.100	0.002*
S331-b	1	0	7:33	1:1	0.133	0.000*
S331-f	1	0	36:4	1:1	2.500	0.000*
S333-a	0	1	21:19	1:1	12.100	0.752
S333-d	1	0	11:29	1:1	0.100	0.004*
S333-e	1	0	18:22	1:1	8.100	0.527
S337-c	0	0	34:6	0:0	0.400	0.000#

注: * 表示差异显著

2.3 RAPD 标记位点在 F_1 中的分离类型

9 个 RAPD 引物共扩增出 47 个位点,其中 22 个位点为多态位点(表 2)。47 个位点具体的杂交 F_1

的分离情况可分为 3 种类型:

2.3.1 符合孟德尔遗传规律

符合孟德尔遗传规律的位点有 32 个,占位点总数的 68%,可分为以下 2 种类型:(1)RAPD 标记在 F_1 不分离。在 F_1 不分离的 RAPD 标记包括双亲共有标记和单亲特有标记。 F_1 不发生分离的有双亲共有标记位点,如 S331-c、S331-d、S331-e (见图 1),这样的位点共有 23 个占总位点数的 48.9%;没有 F_1 不发生分离单亲特有标记位点。其父母本的基因型应为 $AA \times AA$ 或 $AA \times Aa$ 。(2)RAPD 标记在 F_1 按 1:1 或 3:1 正常分离。这类位点有 9 个,如图 2 中 M12-e 和 M12-f 位点,占总位点数的 19.1%,该类型的位点可以作为遗传标记用于遗传连锁图谱的构建。

2.3.2 偏离孟德尔遗传规律

经过卡方检测, F_1 个体中偏离 1:1 和 3:1 的孟德尔分离比例分别为 8 和 3 个,占总位点的 17.0% 和 6.4%,如图 1 中 S331-a、S331-b、S331-f 位点。

2.3.3 异常分离

F_1 个体中发现 1 个异常分离位点,占位点总数的 1.9% :主要是非亲 RAPD 标记,即双亲均无,却在 F_1 出现;还有一种是双亲均有而子代却无扩增产物。本实验仅出现了前一种情况(如图 3 中 S337-c 位点)。

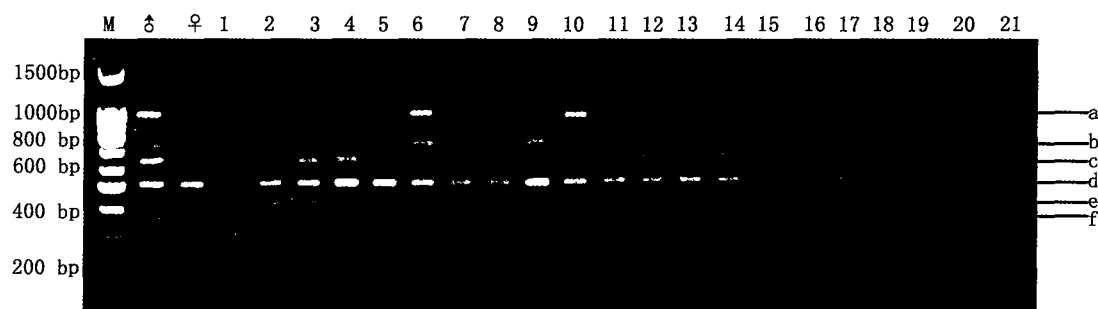


图 1 引物 S331RAPD 扩增结果

Fig.1 RAPD patterns of S331 primers

M:100 bp ladder marker; ♂, ♀:父母本 RAPD 扩增结果;1~21:不同 F_1 RAPD 扩增结果

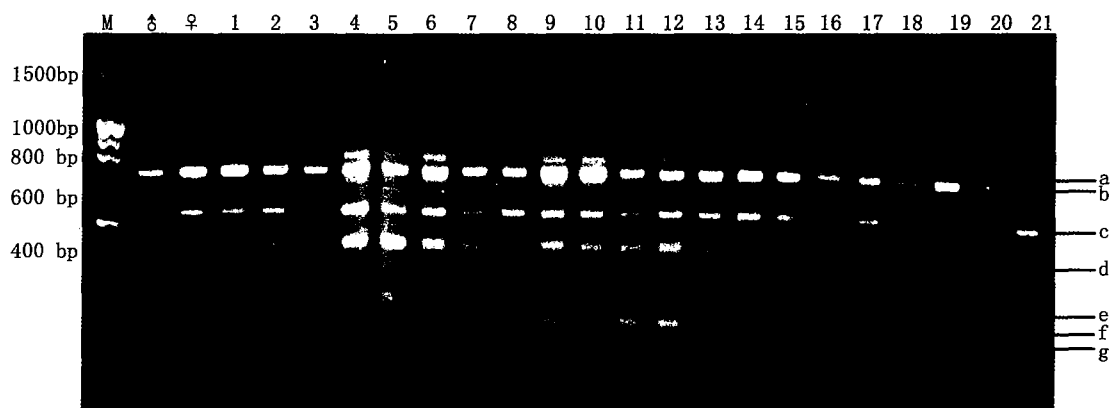


图 2 引物 M12RAPD 扩增结果

Fig.2 RAPD patterns of M12 primers

M:100 bp ladder marker; ♂, ♀:父母本 RAPD 扩增结果;1~21:不同 F_1 RAPD 扩增结果

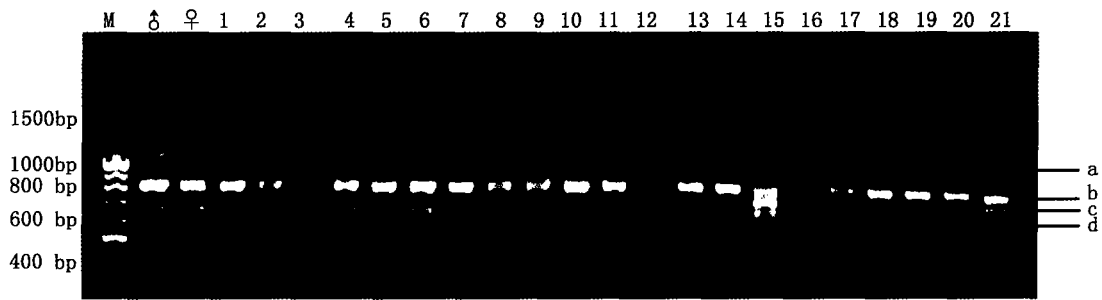


图3 引物 S337RAPD 扩增结果

Fig. 3 RAPD patterns of S337 primers

M:100 bp ladder marker; δ, ♀:父母本 RAPD 扩增结果;1~21:不同 F₁ RAPD 扩增结果

2.4 F₁ 与双亲的遗传结构

杂交 F₁ 及双亲的相似性指数及遗传距离见表3。父本与母本间的相似性指数为0.890 0,遗传距离为0.185 7;杂交 F₁ 与父本之间的相似性指数为0.827 5,遗传距离为0.158 2,与母本的分别为0.912 7和0.107 3。从中可以看出父母本之间的遗传距离较远,大于其与子代间的遗传距离,这说明双亲在遗传上具有较大的差异,而以其作为父母本杂交产生的 F₁ 杂合了双亲的遗传信息。F₁ 个体与母本之间的距离要小于父本,这说明它们的杂交后代更偏向于母本,同样根据相似性指数也可得到类似的结果。

表3 双亲与 F₁ 的相似性指数(对角线上)及遗传距离(对角线下)

Tab.3 Genetic identity(above diagonal) and genetic distance(below diagonal) between parents and their offspring of F₁

样本	父本	母本	F ₁
父本	-	0.890 0	0.827 5
母本	0.185 7	-	0.912 7
F ₁	0.158 2	0.107 3	-

利用 PopGene32 绘制了父母本与它们的杂交 F₁ 的聚类分析图(如图4)。母本与 F₁ 相聚,然后再与父本相聚,这说明 F₁ 群体更接近母本。

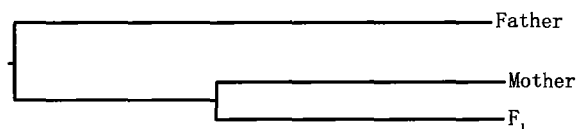


图4 双亲与 F₁ 间遗传距离的聚类分析图

Fig.4 Dendrogram based on genetic distance of parents and their offspring of F₁

2.5 异常分离位点的克隆与分析

本研究中,发现引物 S337 在部分 F₁ 个体中扩增出一条特殊的条带,即 S337-c(图3),该条带在父母本中未出现(图2)。回收将此条带,并克隆测序。结果显示该位点大小为707bp,碱基序列见图5。经 BLAST 比较分析,未发现与该序列具有较高同源性的 DNA 序列,见图6。

3 讨论

3.1 RAPD 标记的偏分离

遗传偏分离是自然界非常普遍的现象,并被认为是生物进化的动力之一^[6],它见诸于 SRAP、SSR、RAPD、AFLP 等各种分子标记^[7-10]。产生偏分离的因素主要有:(1)隐性纯合致死的等位基因的存在^[11];(2)与研究材料有关,如种间杂种比种内杂种的偏分离比例大^[12];(3)单个亲本的细胞质基因组的细微影响^[13];(4)染色体在杂交过程中存在结构重排、缺失、插入和突变原因^[14]。偏分离现象在水产

```

CCTTCCCAGT GACACTATTTAACATTTAGATAGCATTAGTTCTTCATACTGTGCTGACAGAATTCATAACCAAAAGATTACAAGTACA
CTTGACTAAAGACTAACCACTGTGCAGAAATATCAATCTTTCAAATCTTCTAAAAGTCCCATACCTGACTTTCATAAAAACCTATCGTTCAA
CATGGCCAATTTACAGTTAATGGAGTTAACGGGCAAACTATTCTAACTGTACCAGTTCAATGTCATACAGATAATTTAAGGCACTA
GTCTCACATTTACAATAAAGCAGAATAATTCTAGTTTCATTTAGGCCCTACCATTAAAGGATGTGGATCCAGATGATAAACGGTCTTCTTG
GCCACAAGTATGAAACGTACAGGGCTCCTCAGGTGTCAACCCCATCAAGTATAAAACACACAGGAATTGTAAGTCTTCTTTCTCCAAGCG
AGTCTCATTCGCCAGGTGCTTAGCCTGAAAGAAAACTAAATCAGATCCTGGTTGTATAATTATTGTTTGAAGTGTAACTACTGTTTG
GGTTTAAATGGACAGTTTGTGTTAAGGTATTCTGTTGTTGTTGGGTTATTAAGGAAGAGGTGTAATGACTAGTTATGACTAGTTGAGTT
TGTATATTACTGTTGTCGATTGTCAATGATTATTAATATGTTCTTGGAGAGTGGGAAGG
  
```

图 5 S337-c 的 DNA 序列

Fig. 5 Nucleotide sequence of S337-c

表示引物序列

动物研究中也多篇报道。申雪艳等^[15]在分析了
中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 子一代中 RAPD
标记分离情况发现,偏孟德尔分离的位点占总分离
位点的 24.9%;肖洁等^[8]在研究两个来自不同地理
群体皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Iino) 的杂交 F₁
RAPD 标记分离时,发现偏分离比例为 50%,高于长
牡蛎、美洲牡蛎等其他相似物种,这可能由于除物种
差异外,同时还与选用不同分子标记有关。本研究
偏离 1:1 和 3:1 分离的位点分别为 8 和 3 个(表 2),占分离位点(22 个)36.4% 和 13.6%,与肖洁等的
结果非常相似,无独有偶,本实验中的亲本也来自两个不同的地理种群。

同时本研究还发现了一个异常分离的位点,即 S337-c,占总分离位点的 4.5%。这种现象在皱纹盘
鲍^[8]、中国对虾^[15]、家蚕 (*Bombyx mori*)^[16]、水稻 (*Oryza sativa* L.)^[17] 等许多物种有报道,其具体原因尚
不清楚。有人推测可能是由于两亲本不同长度的等位核苷酸序列在子代形成的异源双链体或是配子形
成过程中染色体的不等价交换产生的新序列^[15]。我们将该序列进行克隆测序分析,发现该序列与
Genbank 中的已知序列同源性极低,可能该序列在罗氏沼虾中为无功能序列,究竟它是如何形成的我们
将作进一步研究。

3.2 RAPD 标记对罗氏沼虾遗传作图的意义

水产动物中已经有许多物种构建了不同密度的连锁图谱,但罗氏沼虾遗传作图未见报道。本实验
试图根据建立 Hemmat 等^[18]理论上“双假测交构想”(double pseudo testcross format),利用两个不同
地理群体(缅甸和浙江群体)的杂交 F₁ 为作图群体,即“假测交群体”。由于只经一代杂交,虽各基因位
点进行重组交换,但是有些位点的基因并没有发生分离,因此势必会损失部分位点的信息。其他常见的
作图群体有回交、RIL、DH、F₂ 分离群体,这些群体提供的信息量大,可供分析的位点多,但对家系培育
投入大,特别有些水产动物周期比较长,一般认为多态性高的自然群体产生 F₁ 群体也可满足遗传作图。
李明云等^[19]研究发现罗氏沼虾缅甸自然群体的遗传多样性较低,这就为利用罗氏沼虾自然群体产生 F₁
群体进行遗传作图带来了困难。本家系的父母本分别来自缅甸自然群体和浙江养殖群体,其杂交产生
的 F₁ 群体在表型上发生较大的分化,如平均体重为 (5.80 ± 1.66) g,最大与最小的分别为 10.02 和
1.45 g,对其双亲间的遗传结构分析也表明它们存在较高的遗传差异(表 3),可以用于构建连锁图谱。
但本研究对亲本特异性标记的筛选及亲本标记在子代中的分离方式研究结果表明,50 个引物只有 9 个
可扩增多态位点,其中发生分离的只有 22 个位点,而符合孟德尔比例的位点只有 9 个,其中父母本特

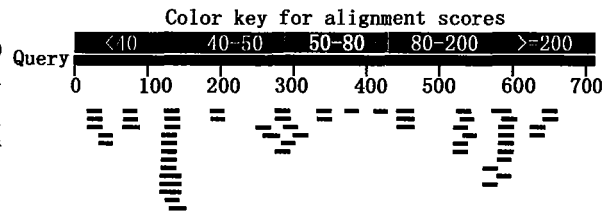


图 6 S337-c 的 BLASTn 结果

Fig. 6 The BLASTn result of S337-c in GeneBank

有的位点分别为4和2个(表2),也就是说,根据 Hemmat 等提出的理论,50个 RAPD 引物只可以扩增出4个和2个 RAPD 标记构建雄虾和雌虾的遗传图谱;同样道理,50个 RAPD 引物只可以扩增出4个(符合3:1)RAPD 标记可用于两个亲本遗传图谱的整合。所以,构建罗氏沼虾遗传连锁图谱,需结合应用 RFLP, AFLP, SSR 等多种方法,同时培育 F_2 群体。

参考文献:

- [1] 史建华,肖雨,徐琴英. 罗氏沼虾引种复壮技术的研究[J]. 水产科技情报, 2001, 28(2): 64 - 67.
- [2] 陈宗永. 罗氏沼虾卵亲虾质量差和数量不足的成因与对策探讨[J]. 广西水产科技, 2000, (8): 26 - 28.
- [3] 相建海. 海洋动物细胞和种群生化遗传学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1999: 6 - 7.
- [4] 甘西. 罗氏沼虾遗传多样性的 RAPD 研究[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 2000, 46(2): 215 - 218.
- [5] 杨弘,夏德全,刘蕾,等. 奥利亚罗非鱼(♀)、鳊(♂)及其子代间遗传关系的研究[J]. 水产学报, 2004, 28(5): 594 - 598.
- [6] Lytle T W. Segregation distorters[M]. US: Annu Rev Genet, 1991: 511 - 557.
- [7] Z Lin. Linkage map construction and mapping QTL for cotton fibre quality using SRAP, SSR and RAPD[J]. Plant breeding, 2005, 124(3): 180 - 187.
- [8] 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, 2006, 26(6): 124 - 132.
- [9] 房经贵,章镇,马正强,等. AFLP 标记在两个芒果品种间杂交 F_1 代的多态性及分离方式[J]. 中国农业科学, 2000, 33(3): 19 - 21.
- [10] Ziniu Yu, Ximing Guo. Genetic Linkage Map of the Eastern Oyster *Crassostrea virginica* Gmelin[J]. Biol Bull, 2003, 204(6): 327 - 338.
- [11] O'Leary M C, Boyle T H. Segregation distortion at isozyme locus Lap-1 in *Schlumbergera* (Cactaceae) is caused by linkage with the gametophytic self-incompatibility[J]. Locus J Hered, 1998, 89: 206 - 210.
- [12] Byrne M, Murrell J C, Allen B. An integrated genetic linkage map for eucalypts using RFLP, RAPD and isozyme markers[J]. Theor Appl Genet, 1995, 91(6): 869 - 875.
- [13] Heun M, Helentjaris T. Inheritance of RAPDs in F_1 hybrids of corn[J]. Theor Appl Genet, 1993, 85(6): 961.
- [14] Faure S, Noyer J L, Horry J P. A molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa acuminata*) [J]. Theor Appl Genet, 1993, 87(4): 517 - 526.
- [15] 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.
- [16] 司马杨虎,陈大霞,孙德斌,等. 家蚕杂交分离系间的分子标记特征研究[J]. 蚕业科学, 2005, 31(1): 36 - 41.
- [17] 郭晶心,刘耀光. 水稻籼粳杂交 F_2 群体中分子标记的异常分离及染色体定位[J]. 分子植物育种, 2003, 1(3): 331 - 336.
- [18] Hemmat M, Weeden N F, Manganaris A G, et al. Molecular marker linkage map for apple[J]. The Journal of Heredity, 1994, 85(1): 4 - 11.
- [19] 李明云,张海琪,朱俊杰,等. 罗氏沼虾浙江养殖群体与缅甸自然群体遗传差异的 RAPD 分析[J]. 水产学报, 2004, 28(4): 360 - 364.