

基于遗传连锁图谱筛选虾夷扇贝性别相关 AFLP 分子标记的方法*

周丽青¹ 杨爱国^{1①} 刘志鸿¹ 王清印¹ 吴彪¹
孙秀俊¹ 郑利兵² 郑言鑫²

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 基于近年来他人构建的遗传连锁图谱,对 2011–2013 年 2–5 月期间采集的雌性、雄性及雌雄同体虾夷扇贝进行性别相关 AFLP 分子标记筛选。从雄性和雌性遗传连锁图谱上选取合计 18 对引物组合,经 3 批次试验,有 8 对引物扩增出性别相关的条带,其中 EbMc、EjMf 和 EiMk 重复性好,有 4 对引物扩增出雌雄同体特异性条带,5 对引物扩增出雌性特异性条带。结果表明,基于高密度遗传连锁图谱筛选性别相关分子标记的方法简单可行,雌雄同体的基因组 DNA 与雌性和雄性存在显著差异,可能是一个单独的群体。

关键词 虾夷扇贝; 性别相关标记; AFLP; 雌雄同体

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0103-07

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)相对我国北方土著种栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)而言,具有个体大、抗病力强、冷水性特点,20 世纪 80 年代初引进我国试养后,已经发展成为我国北方沿海重要的养殖品种。虾夷扇贝一般为雌雄异体型,且雌雄性比接近 1:1,但是养殖群体中常常有一定比例的个体表现为雌雄同体。于瑞海等(2011)粗略统计了人工育苗的养殖虾夷扇贝成贝中雌雄同体比例,2006 年占 5%–6%,2007 年占 8%–9%,2008–2009 年超过 10%,最高可达 18%。本课题组从 2011 年至今对虾夷扇贝生殖腺观察,也发现雌雄同体比例呈逐年上升的趋势,并存在性逆转现象。虾夷扇贝无性染色体,尚未见有性别相关基因和雌雄同体形成机制的报道。AFLP 分子标

记技术具有信息量大、灵敏度高、多态性丰富等特点,成功用于多种水产动物遗传连锁图谱构建、性别之间差异分析及性别特异性扩增片段筛选(刘卫东等,2009;臧云鹏¹,2011;李静等,2007;张超等,2010;姜龙等,2013)。为探讨虾夷扇贝雌雄同体形成的分子机制,并筛选性别相关 AFLP 分子标记,基于刘卫东等(2009)、徐科凤(2009)²和赵海波(2009)³已构建的虾夷扇贝遗传连锁图谱开展了性别相关 AFLP 分子标记筛选方法的探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

2011–2013 年 2–5 月,多批次从青岛市南山水产

* 黄海所基本科研业务费项目(20603022012003)和国家科技基础条件平台项目(2007DKA30470)共同资助。周丽青, E-mail: zhoulq@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 杨爱国, 研究员, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-11-14, 收修改稿日期: 2013-12-20

1) 臧云鹏. 仿刺参微卫星 DNA 标记的筛选与应用及性别差异研究初探. 上海海洋大学硕士学位论文, 2011, 45–66

2) 徐科凤. 虾夷扇贝分子生物学研究. 中国海洋大学博士学位论文, 2009, 27–39

3) 赵海波. 虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)遗传连锁图谱的构建. 中国海洋大学硕士学位论文, 2009, 37–50

品市场采购 2-4 龄虾夷扇贝雌性 20 只、雄性 20 只和雌雄同体 30 只,产地分属山东威海、长岛、荣成、烟台和辽宁大连等海区,均为人工养殖。通过生殖腺外观观察和解剖涂片确定性别。剖取闭壳肌冻存,用于 DNA 提取。相机拍摄并记录生殖腺类型。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 每个个体取闭壳肌约 0.1 g,参照《分子克隆实验指南》(第三版)中常规的酚-氯仿 DNA 提取方法,提取基因组 DNA,超纯水溶解,1%的琼脂糖和核酸定量仪检测 DNA 的质量并测定其浓度。

1.2.2 AFLP 分析 参照 Vos 等(1995)的方法并加以优化,进行 AFLP 分析。选择不同实验对象,重复实验 3 次。雌性(Female)简称 F,雄性(Male)简称 M,雌雄同体(Hermaphrodite)简称 H,生殖腺以雌性为主的雌雄同体简称 Hf,以雄性为主简称 Hm,雌雄相间简称 Ha。实验用限制性内切酶 *EcoR* I、*Mse* I 及 T4-DNA 连接酶均购自 Fermentas 公司, *Taq* DNA 聚合酶为北京全式金生物技术有限公司 Easy Taq 系列,所有引物均由上海生工生物工程公司合成。选择性扩增引物及接头序列见表 1,选择性引物对引自刘卫东

等(2009)、徐科凤(2009)¹⁾和赵海波(2009)²⁾构建的雄性及雌性遗传连锁图谱(引物对选取方法暂不详述,拟申报专利)。扩增产物用 5%变性聚丙烯酰胺凝胶 50 W 恒功率电泳 2.5 h,进行银染检测,用相机拍摄胶板并记录,查找性别相关的 AFLP 条带,条带记为有或无。

2 结果与分析

18 对引物组合中,8 对引物可扩增出性别相关特异性条带,3 次重复实验引物对 EbMc、EjMf 和 EiMk 扩增出明显的性别相关特异性条带,且 3 次实验特定条带均有比较好的对应性,详见图 1、图 2 和图 3。其他 5 对引物扩增出的特异性条带在不同批次试验中会出现个别样品的特例,各引物对扩增出的特异性条带情况见表 2。

EbMc 稳定扩增出雄性全无的条带(图 1 中的箭头 1),EjMf 稳定扩增出雌性全无的条带(图 2 中的箭头 1);EiMk 扩增出雌性特有而雄性全无的条带(图 3 中的箭头 5)。其他 5 对引物扩增结果见图 4, EgMa、E33M51 分别扩增出一条雌性特异性条带, E38M58 扩增出一条雌雄同体全无和一条雄性全无的特异性条带, E39M60

表 1 所用接头和引物组合
Tab.1 List of AFLP primers and adapters used in the experiments

序列名称 Name	<i>EcoR</i> I	<i>Mse</i> I
接头 Adapters	EA ₁ : 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	MA ₁ : 5'GATCATGAGTCCTGCT-3'
	EA ₂ : 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'	MA ₂ : 5'-CGAGCAGGACTCAGAA-3'
预扩引物 Preamplification primers	E0: 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'	M0: 5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGG-3'
选扩引物对 Selective amplification primer combinations	E33(Eb): 5'-E0+AAG-3'	M51: M0+CCA-3'
	E33(Eb): 5'-E0+AAG-3'	M60(Mg): M0+CTC-3'
	Ec: 5'-E0+ACG-3'	Mk: M0+TGC-3'
	Eg: 5'-E0+CAG-3'	Ma: M0+ATG-3'
	Eh: 5'-E0+CTA-3'	M60(Mg): M0+CTC-3'
	E38: 5'-E0+ACT-3'	M58: M0+CGT-3'
	E33(Eb): 5'-E0+AAG-3'	Mc: M0+CAG-3'
	Ec: 5'-E0+ACG-3'	Mf(M59): M0+CTA-3'
	Ee: 5'-E0+ATC-3'	Mk: M0+TGC-3'
	Eg: 5'-E0+CAG-3'	M60(Mg): M0+CTC-3'
	Ei: 5'-E0+GTG-3'	Mk: M0+TGC-3'
	Ej: 5'-E0+TAG-3'	Mf(M59): M0+CTA-3'
	E35: 5'-E0+ACA-3'	M48: M0+CAC-3'
	E39: 5'-E0+AGA-3'	M48: M0+CAC-3'
	E39: 5'-E0+AGA-3'	M60(Mg): M0+CTC-3'

1) 徐科凤. 虾夷扇贝分子生物学研究. 中国海洋大学博士学位论文, 2009, 27-39

2) 赵海波. 虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)遗传连锁图谱的构建. 中国海洋大学硕士学位论文, 2009, 37-50

表 2 扩增出性别相关特异性条带的引物组合及特异性条带
Tab.2 The primer-combinations amplified sex specific markers and the related bands

引物组合 Primer-combinations	雌性特有带 Female-specific bands	雄性特有带 Male-specific bands	雌雄同体特有带 Hermaphrodite-specific bands
EbMc	10/19	0	33/34
EjMf	0	7/14	18/22
EiMk	14/14	0	8/21
EgMa	19/19	0	1/34
E33M51	19/19	0	1/34
E38M58	14/14	3/14	0
	14/14	0	22/22
E39M60	4/14	3/14	21/22
	0	0	9/22
E39M48	0	1/14	14/22
	9/9	0	24/24

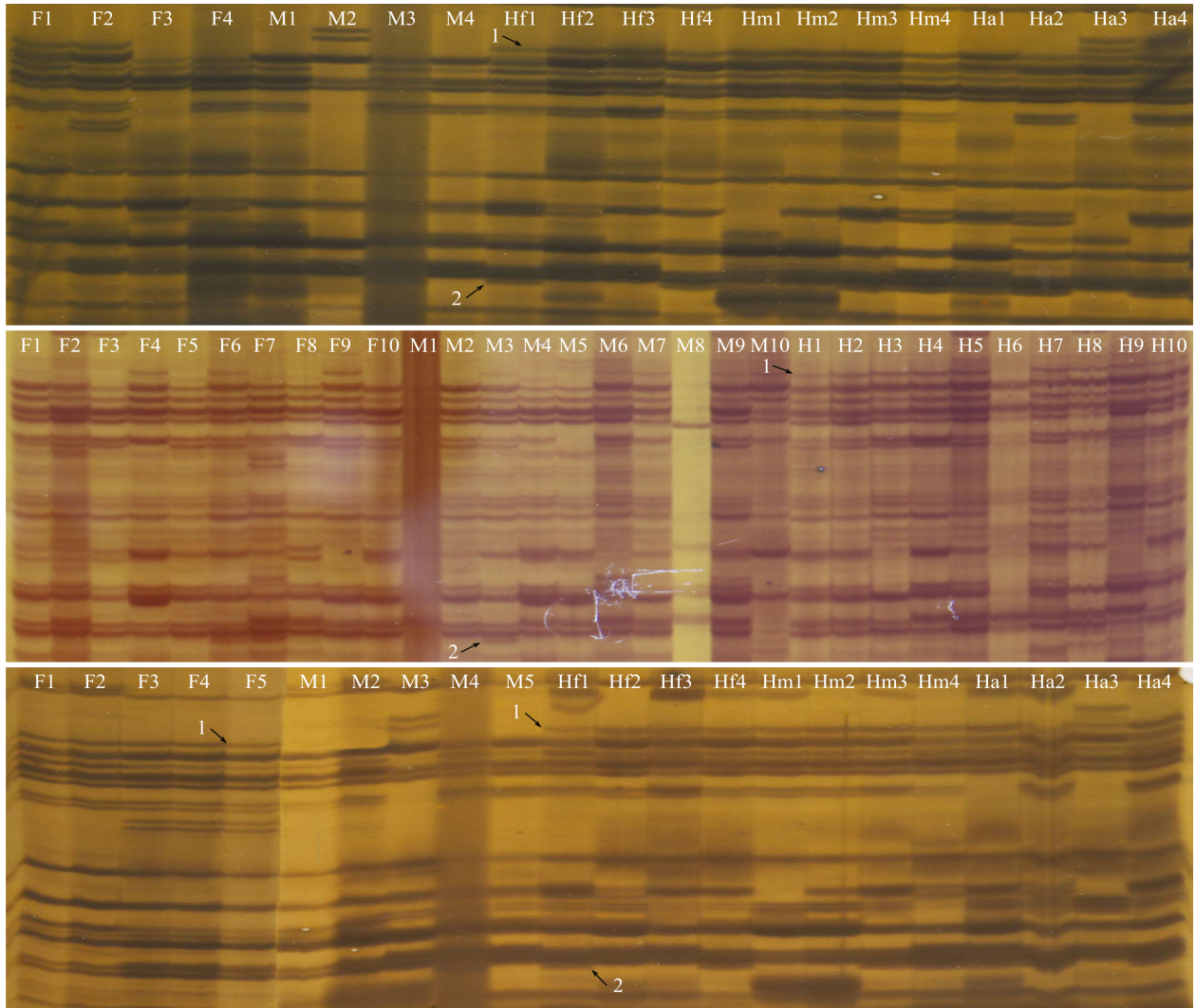


图 1 引物 EbMc 三批次 AFLP 实验均扩增出雌雄同体特异性条带
Fig. 1 Primer-combination EbMc amplified hermaphrodite-specific bands in three AFLP experiments

1. 雄性无、雌雄同体特异性条带; 2. 不同批次试验相对应的条带
1. Non-male but hermaphrodite-specific bands; 2. Corresponding DNA bands in different experiments

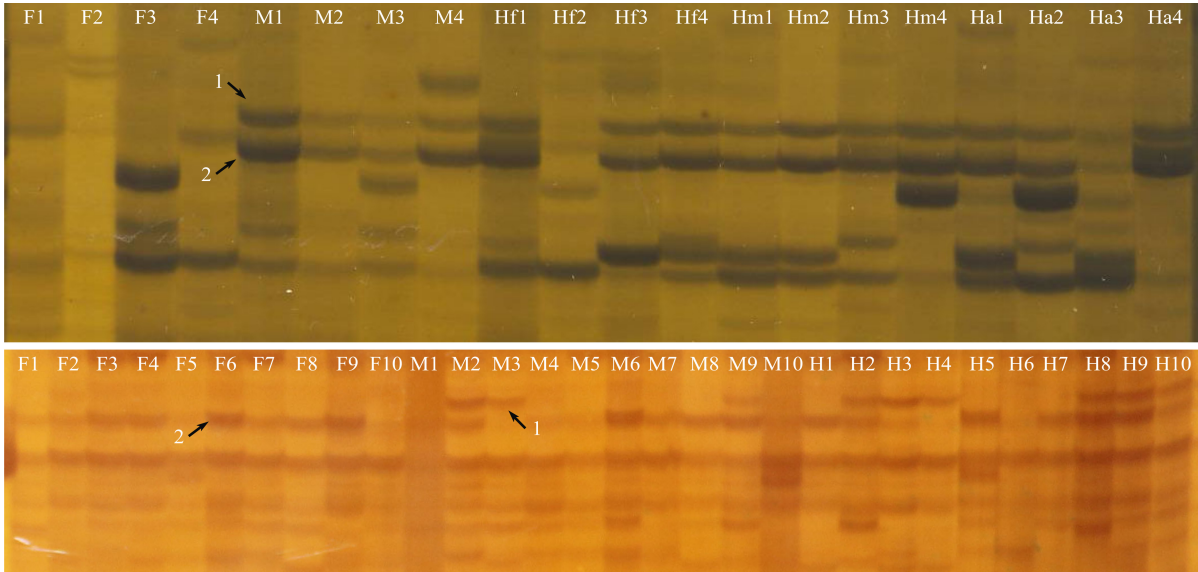


图 2 引物 EjMf 两批次 AFLP 实验扩增雌性全无的特异性条带
 Fig.2 Primer-combination EjMf amplified non-female specific DNA bands in two AFLP experiments

1. 雌性全无的特异性条带; 2. 不同批次试验相对应的条带
 1. Non-female DNA specific bands; 2. Corresponding DNA bands in different experiments

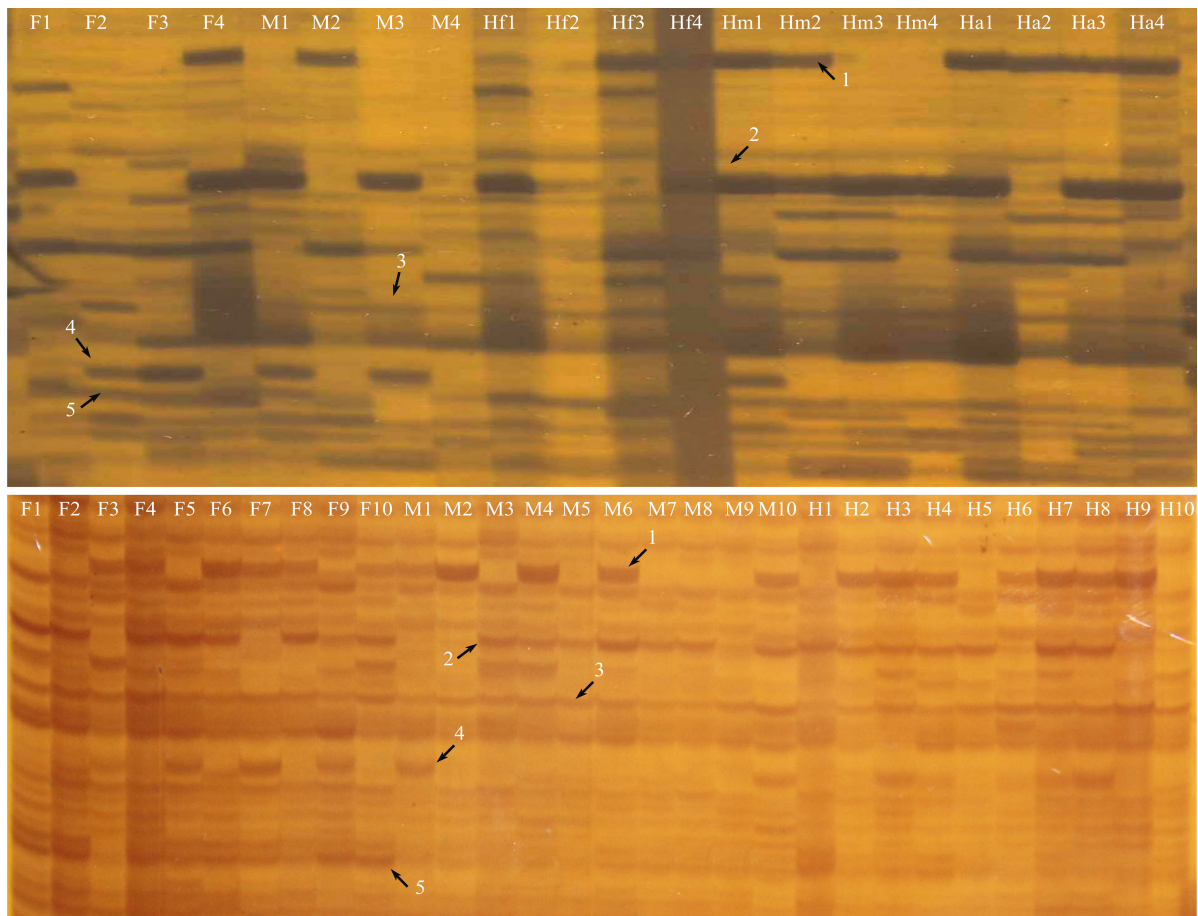


图 3 引物 EiMk 两批次 AFLP 实验扩增结果
 Fig.3 The amplified results of three sex types *P. yseooensis* by primer-combination EiMk in two experiments

1、2、3、4. 不同批次试验相对应的条带; 5. 雌性特有的条带
 1, 2, 3, and 4. Corresponding DNA bands in different experiments; 5. Female-specific bands

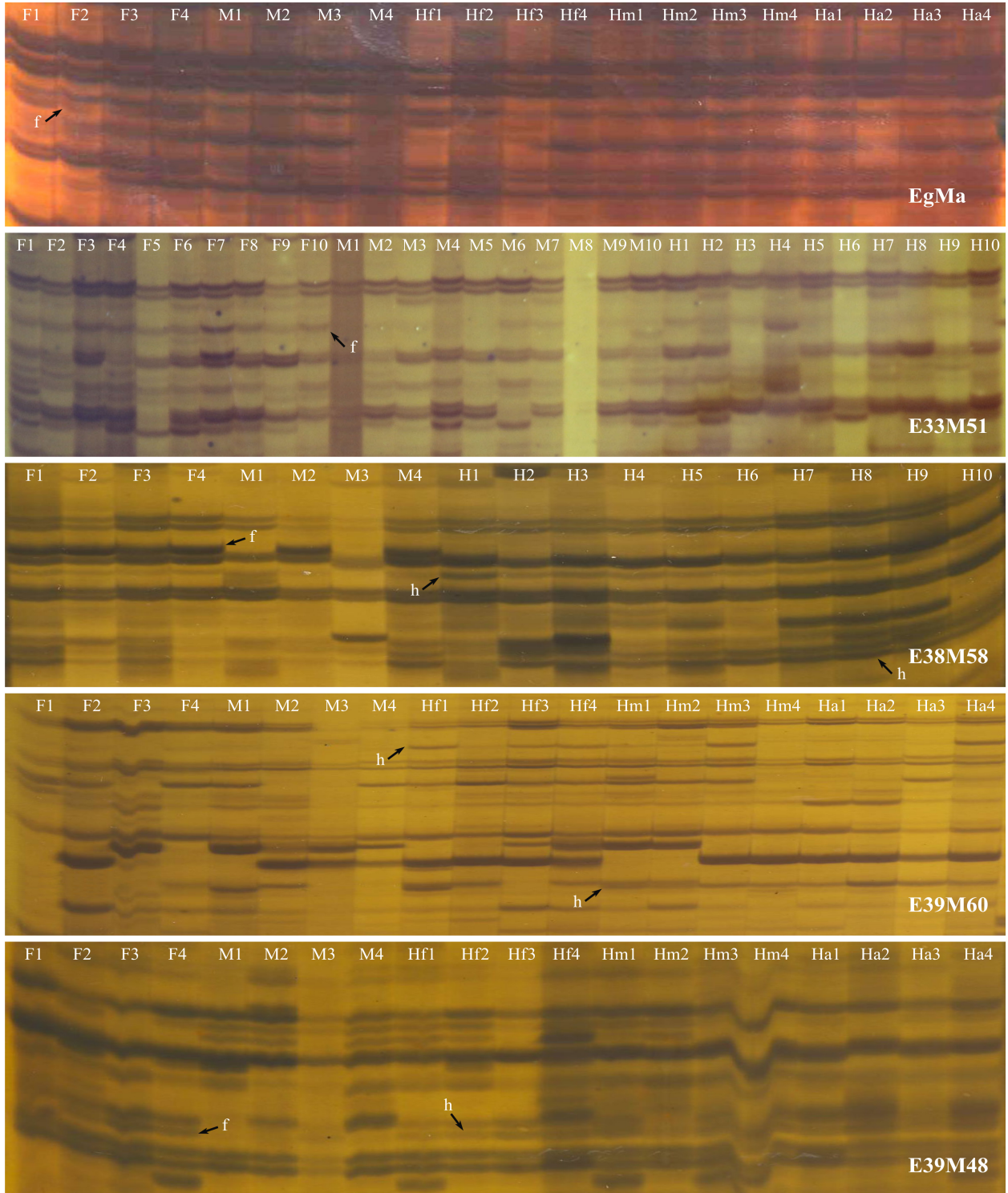


图 4 5 对引物扩增结果

Fig.4 The amplified results of three sex types *P. yseeoensis* of primer-combinations EgMa, E33M51, E38M58, E39M60 and E39M48

f. 雌性特异性条带; h. 雌雄同体特异性条带

f. Female-specific bands; h. Hermaphrodite-specific bands

扩增出两条有性别偏向性的条带, E39M48 扩增出一条雄性全无的特异性条带。EbMc、EjMf、E38M58

和 E39M48 在雌雄同体中扩增出特异性条带, 反映出雌雄同体基因组 DNA 与雌性和雄性均存在明显的差

异。5 对引物筛选出雌性相关 AFLP 分子标记 6 个, 4 对引物扩增出雌雄同体特异性条带 5 条, 其中有两个为雌性和雌雄同体所特有, 而相对应的雄性却未扩增出条带(表 2)。

3 讨论

遗传连锁图谱是重要数量性状遗传定位的基础, 也是分子标记辅助育种的前提(刘卫东等, 2009)。遗传连锁图谱的构建一般采用“双假测交”理论(Two-way pseudotestcross strategy), 对 F_1 代的父、母本分别作图, 获得两张遗传连锁图谱, 只有符合孟德尔遗传的标记才能用于作图。刘平等(2002)将对父本表现为杂合而对母本表现为纯合隐性的标记用于父本作图, 将对母本表现为杂合而对父本表现为纯合隐性的标记用于母本作图。根据这个原理, 分别从雌性和雄性遗传连锁图谱中筛选出可能与性别相关的标记。2009 年前后虾夷扇贝遗传连锁图谱的构建开展较多, 可供选择的标记数量也很多, 大大减少了标记选择的盲目性和工作量, 增加了标记选择的精准度。EbMc 中雌雄同体特异性条带、EjMf 中雌性全无的条带及 EiMk 中雌性特异性条带的筛出便是很好的证明。

AFLP 技术无 RFLP 技术的繁杂过程, 较 RAPD 技术稳定, 被用于多种水产动物的高密度遗传连锁图谱的构建(Zhang *et al*, 2007; Li *et al*, 2005; Lallias *et al*, 2007)、性状相关分子标记筛选(董迎辉等, 2012; 李三磊等, 2012)及遗传多样性的研究(鲍相渤等, 2009; 孟鹏等, 2008; 韩志强等, 2006; 汪开毓等, 2013; 陈见等, 2014)。基于同一种生物不同性别之间存在 DNA 水平差异的理论, Watanabe 等(2004)利用 AFLP 技术筛选出一条 141 bp 的香鱼雄性特有带; 李静等(2007)经 3 轮筛选和验证, 4 个引物组合扩增出 7 个雌性个体出现频率为 100% 的 DNA 片段, 并认为这 7 个 AFLP 标记是半滑舌鲷雌性特异性标记; 王亮晖等(2007)从 64 对引物组合中筛选出 9 对引物, 共发现 18 条带在不同性别中出现的比例差异显著。Xia 等(2005)采用 AFLP 技术, 结合 BSA 法对长江江豚进行性别相关分子标记的筛选, E-AGT/ M-CTC 引物组合扩增出一条分子量约为 200 bp 的雄鱼特异性条带, 此带在雌鱼中均未能得到扩增, 认为此带与性别相关。本研究基于遗传连锁图谱也成功筛选出雌性相关 AFLP 分子标记 6 个, 雌雄同体相关标记 5 个, 实验可重复性强, 证明 AFLP 分子标记可作为寻找低等无性染色体动物性别特异性分子标记的一种有效技术。

研究发现 5 个雌雄同体特异性的标记, 说明雌雄同体可能是一个独立于雌性和雄性的群体, 从连续 3 年

成熟生殖腺组织切片的结果来看, 雌雄同体虾夷扇贝存在雌性向雄性性逆转的趋势, 出现雌雄同体情形是在每年的 2、3、4、5 月, 而这之前和之后未能见有雌雄同体(周丽青等, 2014)。杨东等(2007)采用 AFLP 方法, 筛选雌雄尼罗罗非鱼雄性特异性片段, 所筛选的片段在雄性中比例为 100%, 但在雌性中缺失比例高达 90%, 因此认为此片段应该与性别相关。在本研究的 3 批次实验中也发现了一些这种类型的条带, 即在一种性别中 100% 有或无, 在另一种性别中出现个别特例, 这可能是雌雄同体被误判为雌性或雄性所导致。因此, 这些标记将来可以被用来在育种中选择雌雄同体型虾夷扇贝, 控制其同时排放精卵进行自交, 也能被用来研究性别决定机制。所筛选出的这些特异性条带所对应的位点也有可能位于性别决定基因的相邻区域, 它们与 3 种性别类型的确切关系还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 于瑞海, 王昭萍, 赵雪琳, 等. 虾夷扇贝雌雄同体自体受精繁殖生物学的研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2011, 41(11): 23-26, 56
- 王亮晖, 司伟, 傅洪拓, 等. 运用 AFLP 技术分析鲤鱼雌雄之间的差异. 安徽农学通报, 2007, 13(12): 41-43
- 刘卫东, 鲍相渤, 宋文涛, 等. 虾夷扇贝遗传连锁图谱的初步构建. 遗传, 2009, 31(6): 629-637
- 刘平, 彭士琪, 刘孟军, 等. 分子标记在果树上的应用及前景展望. 河北农业大学学报, 2002, 25(1): 100-105
- 李三磊, 徐冬冬, 楼宝, 等. 褐牙鲈耐热相关分子标记筛选及遗传多样性分析. 上海海洋大学学报, 2012, 21(4): 516-523
- 李静, 陈松林, 邓恩平, 等. 半滑舌鲷雌性特异性扩增片段长度多态性标记的筛选与应用. 水产学报, 2007, 31(5): 591-597
- 张超, 佟广香, 匡友谊, 等. 利用 AFLP 技术筛选与哲罗鱼 *Hucho taimen* (Pallas) 性别相关的分子标记. 东北农业大学学报, 2010, 41(5): 96-102
- 汪开毓, 牟巧凤, 黄锦炉, 等. 38 株维氏气单胞菌分离株的 AFLP 基因分型研究. 水生生物学报, 2013, 37(5): 905-911
- 陈见, 李清, 王贵英, 等. 嘴红鲌(♀) × 黑尾近红鲌(♂) 杂种 F_1 的 AFLP 分析. 水生生物学报, 2014, 38(6): 891-896
- 孟鹏, 刘晓敏, 王伟继, 等. 中国对虾家系遗传多样性的 AFLP 分析. 海洋水产研究, 2008, 29(3): 21-26
- 杨东, 余来宁, 张繁荣, 等. 筛选与尼罗罗非鱼性别相关的 AFLP 标记. 水生生物学报, 2007, 31(6): 901-904
- 周丽青, 杨爱国, 王清印, 等. 繁殖期雌雄同体虾夷扇贝生殖腺组织学观察. 高技术通讯, 2014, 24(8): 874-880
- 姜龙, 王忠卫, 周莉, 等. 乌鳢一个养殖群体中性别连锁 AFLP 标记的筛选. 水生生物学报, 2013, 37(6): 1175-1179
- 董迎辉, 姚韩韩, 林志华, 等. 泥鳅生长性状相关 AFLP 分子标记的筛选. 水产学报, 2012, 36(6): 825-831
- 韩志强, 高天翔, 王志勇, 等. 黄姑鱼群体遗传多样性的 AFLP 分析. 水产学报, 2006, 30(5): 640-646

- 鲍相渤, 董颖, 赫崇波, 等. 基于 AFLP 技术对中国虾夷扇贝群体种质资源的研究. 生物技术通报, 2009, (4): 126–129
- Lallias D, Lapegue S, Hecquet C, *et al.* AFLP-based genetic linkage maps of the blue mussel (*Mytilus edulis*). Anim Genet, 2007, 38(4): 340–349
- Li L, Xiang JH, Liu X, *et al.* Construction of AFLP-based genetic linkage map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston and mapping of sex-linked markers. Aquaculture, 2005, 245(1–4): 63–73
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4407–4414
- Watanabe T, Yamasaki K, Seki S, *et al.* Detection of ayu sex-linked DNA markers using homologous clones. Fisheries Science, 2004, 70(1): 47–52
- Xia J, Zheng J, Wang D. Study on the sex-related AFLP marker of the Yangtze finless porpoise. High Technol Lett, 2005, 11(3): 325–328
- Zhang LS, Yang CJ, Zhang Y, *et al.* A Genetic linkage map of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rate. Genetica, 2007, 131(1): 37–49

(编辑 冯小花)

Screening the Sex-Related AFLP Molecular Markers in *Patinopecten yessoensis* Based on the Genetic Linkage Map

ZHOU Liqing¹, YANG Aiguo¹①, LIU Zhihong¹, WANG Qingyin¹, WU Biao¹,
SUN Xiujun¹, ZHENG Libing², ZHENG Yanxin²

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;
2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract *Patinopecten yessoensis* is one of the most important germplasm resources in scallop breeding in north coast of China. It has male, female and hermaphrodite phenotypes. A rising hermaphroditism percentage in cultured populations was observed in gonochorism *P. yessoensis*. The previous studies indicated that hermaphroditisms were intermediate states of sex-reversal, and that the development of gonad was simultaneous in some hermaphroditic scallops. The hemaphroditisms could provide useful materials for inbred line construction and genetic improvement of scallop. AFLP (amplified fragment length polymorphism) markers have been used to construct the genetic linkage maps in the scallop *P. yessoensis* by several research groups since 2009. The sex-related AFLP molecular markers were utilized to screen female, male and hermaphrodite *P. yessoensis* from samples that were collected from March to May, 2011–2013. Eighteen AFLP primer-combinations were chosen to screen sex-related bands and 8 primer-combinations were sex-specific markers. Three of eight markers (EbMc, EjMf and EiMk) had a good repeatability. Hermaphrodite-specific bands were found in four primer-combinations and female-specific bands were detected in five primer-combinations. The present results indicate that the method of sex-related molecular markers screening based on the highly dense genetic linkage map was practical and feasible, and that the hermaphroditism is probably an independent group since the sex-related molecular markers in hermaphrodite genomic DNA were apparently different from those of the female and male. The method of sex-related markers screening and the sex-related bands screened may contribute to the efficiency improvement of sex control and breeding, and help to identify the hermaphrodite and then induce the female- and male-gametes to mature synchronously to construct self-bred-lines.

Key words *Patinopecten yessoensis*; Sex-related markers; AFLP; Hermaphrodite

① Corresponding author: YANG Aiguo, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn