

ISSR 标记在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)与石鲈(*Kareius bicoloratus*)种间杂交一代的分离方式分析*

徐建鹏^{1,2} 张全启¹ 王志刚¹ 齐洁¹ 王旭波¹

(1. 中国海洋大学海洋生物遗传学与基因资源利用教育部重点实验室 青岛 266003;

2. 鲁东大学生命科学学院 烟台 264025)

提要 利用 ISSR 标记对牙鲆与石鲈单对杂交亲本及其子一代(全同胞家系)的分离方式进行了研究。结果表明, 8 个 ISSR 引物共扩增出 181 个标记, 其中 116 个为多态性, 占总数的 64.09%; 标记在 F_1 代呈三种分离方式: 符合孟德尔分离比例、偏离孟德尔分离比例和异常分离。符合孟德尔分离比例的情况包括: 不分离(代表了亲本基因型的 5 种组合: $AA \times AA$ 、 $AA \times Aa$ 、 $Aa \times AA$ 、 $AA \times aa$ 、 $aa \times AA$); 1:1 分离(代表了亲本基因型的 2 种组合: $Aa \times aa$ 、 $aa \times Aa$); 3:1 分离(代表了亲本基因型的 1 种组合: $Aa \times Aa$)。偏分离的标记包括: 亲本中呈多态而在子代中偏离 1:1 分离的标记和亲本均有而在子代中偏离 3:1 分离的标记。异常分离的标记包括: F_1 代出现双亲均不具备的标记和双亲或单亲有而子代却无的标记。3 种分离位点出现的频率和数量分别为: 82.87%、150, 11.05%、20, 6.08%、11; 双亲共有标记中 85.33% 的不发生分离, 单亲特有标记中 28.57%—35.85% 发生正常分离, 该研究结果可为进一步利用该群体构建牙鲆和石鲈遗传连锁图谱奠定良好的工作基础并提供一定的理论依据。

关键词 单对杂交, 牙鲆, 石鲈, ISSR 标记, 分离方式, 连锁图谱

中图分类号 Q953

ISSR(Inter-Simple Sequence Repeat, 简单重复序列中间区域)是由 Zietkiewicz 等(1994)创建的一种新型微卫星类分子标记技术。ISSR 标记结合了 SSR 和 RAPD 的优点, 具有模板需要量少、多态性丰富、结果记录方便、实验成本低、实验稳定性较高等优点, 现已成功地应用于动植物遗传连锁图谱的构建(Kojima *et al.*, 1998; Arcade *et al.*, 2000; Casasoli *et al.*, 2001; Carlier *et al.*, 2004)。

要构建遗传图谱, 除了选用理想的遗传标记外, 具备优良的作图群体也是重要条件之一。其中利用 F_1 作为作图群体的理论依据是 Hemmat 等(1994)在传统的果树杂交育种理论上提出的“双假测交构

想”(double pseudo testcross format), 这一“构想”解决了基因组高度杂合而自交不亲和的生物中构建连锁图谱的难题, 克服了构建连锁图谱通常需要 F_2 、回交群体等。其基本原理是: 两杂合亲本杂交得到的 F_1 的遗传位点已发生分离重组, 其中一些位点对一亲本为杂合, 而对另一亲本为纯合。而利用 F_1 群体构建 ISSR 遗传图谱, 首先需了解 ISSR 标记在 F_1 的分离情况。

鲆鲈鱼类是我国重要的海水养殖鱼类, 自 20 世纪 80 年代以来, 以 DNA 多态性为基础的遗传标记技术迅猛发展, ISSR 技术已应用于鲆鲈鱼类的群体遗传学研究(Liu *et al.*, 2006; 房新英等, 2006), 但尚未

* 国家自然科学基金资助项目, 30671624 号; 国家“863”项目资助, 2006AA10A404 号; 鲁东大学人才基金资助, LY20083304 号。徐建鹏, 博士, 讲师, E-mail: jpxu_ld@yahoo.com.cn

通讯作者: 张全启, 博士, 教授, E-mail: qzhang@ouc.edu.cn

收稿日期: 2008-10-16, 收修改稿日期: 2008-12-19

见应用 ISSR 技术构建鲈鱼遗传连锁图谱的报道。本研究以牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*)和石鲈 (*Kareius bicoloratus*)单对杂交亲本及其子一代(全同胞家系)为材料,借助于“双假测交”理论,研究了 ISSR 标记在牙鲈和石鲈单对杂交亲本及其 F₁ 代的分离方式,以期为牙鲈和石鲈遗传连锁图谱的构建和遗传育种研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选择性成熟的牙鲈雌鱼和石鲈雄鱼进行单对杂交实验,获得全同胞家系。子一代孵化出来后选取 32 尾作为分离群体,70%酒精保存子一代样品。同时,分别从杂交亲本牙鲈、石鲈采集血液 0.1ml,混匀于 5ml TNES 缓冲液 (10mmol/L, Tris-HCl, pH 8.0, 125mmol/L NaCl, 10mmol/L EDTA, 0.5% SDS, 4mol/L Urea)中,常温保存备用。

1.2 DNA 模板制备

基因组 DNA 的提取按照常规酚/氯仿抽提法进行,提取的 DNA 调整浓度到 15ng/μl 备用。

1.3 ISSR 反应

ISSR 引物购自 British Columbia 大学,本研究从 62 个 ISSR 引物中筛选出多态性高、能扩增清晰明亮谱带的 8 个引物用于正式扩增。20μl 的 PCR 反应混合物中含 10 × buffer 2μl, 2mmol/L 的 MgCl₂, 0.2mmol/L 的 dNTP, 0.25μm 的引物,约 15ng 基因组 DNA, 0.8U 的 *Taq* 酶。扩增程序为:94 预变性 5min、40 次 PCR 循环(94 变性 30s, 52 退火 30s, 72 延

伸 1.5min)和 72 延伸 5min。扩增产物采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染方法显色分型。

1.4 数据处理

ISSR 标记为显性标记,将每一条带作为一个位点,统计带的有无,有带的记为“1”,无带的记为“0”,统计各位点在亲子间的传递分离情况,应用 Cross checker 208 软件将扩增图谱转换成 1-0 矩阵。根据亲本及 F₁ 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,由此推断谱带在子代中的理论分离。 χ^2 检验这些分离条带是否符合孟德尔遗传规律。

ISSR 标记名称用引物名加扩增片段的分子量表示。引物名称与其扩增的特异性的条带的分子量大小用“-”分隔,如“823-0750”,表示由引物 823 扩增出的分子量为 750bp 条带。根据与 Gene Ruler DNA ladder mix 的相对位置估计多态性 ISSR 带分子量大小。

2 结果

2.1 ISSR 扩增结果

在 62 个 ISSR 引物中筛选出 8 个引物可扩增出稳定、清晰并在双亲间呈现多态性的谱带。由这 8 个引物共扩增得到 181 个清晰的标记(表 1),片段大小为 200—3000bp,平均每条引物产生 22.63 个标记,其中牙鲈和石鲈出现的标记分别为 131 和 120 个,平均每条引物在牙鲈和石鲈中分别可扩增出 16.38 和 15 个标记;181 个标记中有 116 个在牙鲈、石鲈或子代中出现多态性,占标记数的 64.09%,平均每条引物产生

表 1 ISSR 引物序列及扩增得到的标记数

Tab.1 The sequences of ISSR primers and the number of markers obtained from PCR amplification

引物	序列(5'-3')	标记数			
		牙鲈	石鲈	总数	多态数
823	TCTCTCTCTCTCTCC	10	9	17	13
810	GAGAGAGAGAGAGAT	19	19	27	19
841	GAGAGAGAGAGAGAYC	30	26	36	19
842	GAGAGAGAGAGAGAYG	21	17	26	14
873	GACAGACAGACAGACA	14	13	20	11
859	TGTGTGTGTGTGTGR	19	16	28	21
822	TCTCTCTCTCTCTCA	9	15	17	13
844	CTCTCTCTCTCTCTRC	9	5	10	6
合计	8	131	120	181	116
平均	—	16.38	15	22.63	14.5
多态率(%)					64.09%

14.5 个多态性标记(表 1)。

2.2 ISSR 标记在牙鲆与石鲈种间杂交一代的分离方式

通过对 ISSR 扩增结果的统计分析表明:ISSR 标记在牙鲆与石鲈杂交 F_1 代的分离情况可分为符合孟德尔分离规律、偏离孟德尔分离规律和异常分离 3 类。

2.2.1 符合孟德尔分离规律 符合孟德尔分离规律的情况有以下三种类型:

(1) ISSR 标记在 F_1 代不分离。在 F_1 代不分离的 ISSR 标记包括双亲共有标记和单亲特有标记。鉴于 ISSR 为显性遗传标记, F_1 代不发生分离的双亲共有标记反映了双亲相应 ISSR 标记的 3 种组合, 即 $AA \times AA$ 、 $AA \times Aa$ 或 $Aa \times AA$, 如标记 810-1180(图 1a); 牙鲆特有标记反映的双亲相应 ISSR 标记组合为 $AA \times aa$, 如标记 810-1050(图 1b); 石鲈特有标记反映的双亲相应 ISSR 标记组合为 $aa \times AA$, 如标记 810-350(图 1c)。该研究中这类标记共有 114 个, 占总标记数的 62.98%。

(2) ISSR 标记在 F_1 代按 1:1 分离。这类标记包括牙鲆特有标记, 如标记 810-530 (图 1d); 石鲈特有标记, 如 810-1110 (图 1e), 对应的双亲相应 ISSR 标记组合分别为 $Aa \times aa$ 、 $aa \times Aa$ 。这类标记共有 31 个, 占总标记数的 17.13%。

(3) ISSR 标记在 F_1 代按 3:1 分离。这类标记仅发生在双亲共有标记上, 如标记 810-1010 (图 1f), 双亲中的相应 ISSR 标记组合为 $Aa \times Aa$ 。此类标记的共有 5 个, 占总标记数的 2.76%。

2.2.2 偏离孟德尔分离规律 F_1 个体中 ISSR 标记存在与缺失的比例在统计学上偏离 1:1 和 3:1 的孟德尔分离比例。如石鲈特有标记 810-700 (图 1g); 双

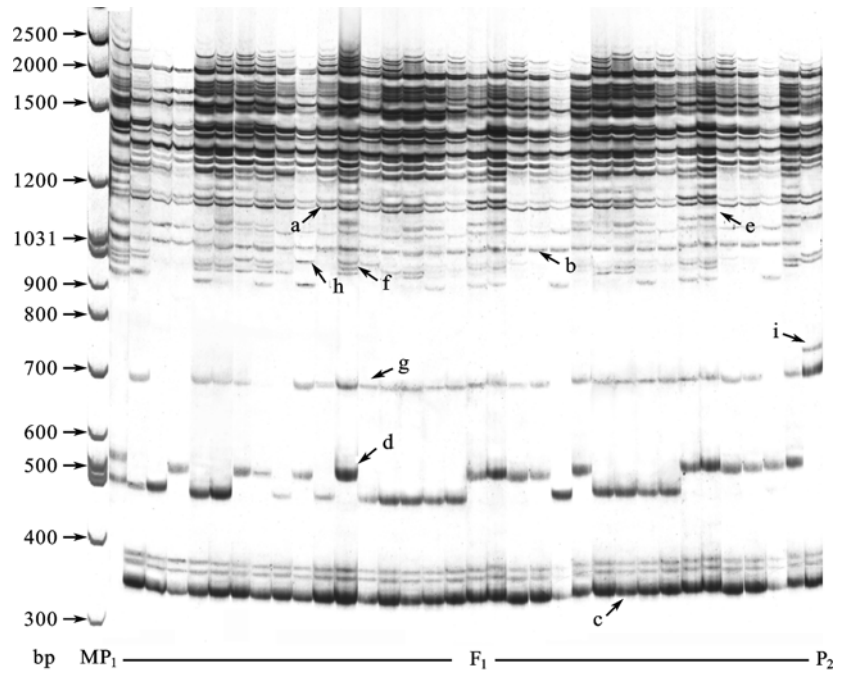


图 1 引物 810 的扩增结果

Fig.1 The result of PCR amplification with primer 810

注 P_1 表示母本牙鲆, P_2 表示父本石鲈, F_1 为子一代个体, M 表示 Gene Ruler DNA ladder mix

亲共有标记 810-1030 (图 1h)。这类标记有 20 个, 占总标记数的 11.05%。

2.2.3 异常分离 异常分离包括双亲均无, 但在 F_1 代出现的标记, 还有一种是双亲或单亲有, 而子代却无扩增产物, 如标记 810-730(图 1i)。这类标记有 11 个, 占总标记数的 6.08%。

2.3 不同分离类型 ISSR 标记的出现频率

对扩增效果良好的 ISSR 引物(823, 810, 841, 842, 873, 859, 822, 844)产生的 181 个 ISSR 标记在牙鲆和石鲈杂交 F_1 代分离情况进行统计分析和 χ^2 检验, 结果表明, 不发生分离的占 62.98%; 符合 1:1 或 3:1 孟德尔分离比例的占 19.89%; 偏离孟德尔分离比例的占 11.05%; 异常分离的占 6.08%(表 2)。

在 F_1 代不发生分离的 ISSR 标记中, 双亲共有标

表 2 ISSR 标记在牙鲆与石鲈单对杂交 F_1 代的分离方式

Tab.2 The segregation patterns of ISSR markers in F_1 progeny of interspecies crossbreed between *P. olivaceus* and *K. bicoloratus*

分离方式	双亲共有标记	牙鲆特有标记	石鲈特有标记	合计	出现频率(%)
不分离	64	28	22	114	62.98
3:1 和 1:1 分离	5	19	12	36	19.89
偏孟德尔分离比例	6	6	8	20	11.05
异常分离				11	6.08

记占 56.14%, 牙鲆特有标记占 24.56%, 石鲈特有标记占 19.30%; 从另一个角度看双亲共有标记中 85.33% 的不发生分离, 该结果表明双亲共有标记在 F_1 代大多不发生分离, 是不分离标记的主体。在 F_1 代符合 1:1 或 3:1 孟德尔分离比例的 ISSR 标记中, 双亲共有标记、牙鲆特有标记、石鲈特有标记分别占 13.89%、52.78%、33.33%, 该结果表明单亲特有标记是正常分离标记的主体。另一方面, 双亲共有标记、牙鲆特有标记、石鲈特有标记中, 符合 1:1 或 3:1 孟德尔分离比例的分别占 6.67%、35.85%、28.57%, 这表明单亲特有标记发生正常分离的比例高于双亲共有标记。

3 讨论

3.1 ISSR 标记的非孟德尔分离

3.1.1 ISSR 标记的偏孟德尔分离 有关分子标记的偏分离现象在很多研究中已有报道。Faure 等(1993)在香蕉上曾发现 36% 的 RAPD 位点表现出偏分离, 且大都偏向于父本, 并认为导致偏分离的主要原因是染色体结构重排。万俊芬等(2004)在研究栉孔扇贝 \times 华贵栉孔扇贝 F_1 代 ISSR 标记分离时, 也发现了较高比例的偏分离, 并且认为双亲遗传差异较大可能是导致较高比例的偏分离位点出现的主要原因。房经贵等(2000)在芒果上发现 15.74% 的 AFLP 位点表现偏分离, 并推测群体大小、染色体结构变异、双亲配子传递率的差异以及不同个体间标记清晰度的差异引起的误差可能与这种偏分离有关。甘四明等(2001)在研究尾叶桉 \times 细叶桉 F_1 代 RAPD 标记分离时, 发现偏分离比例非常高, 推测亲本的较大遗传差异可能是导致偏分离严重的重要原因。Virk 等(1998)在对水稻的研究中也发现较高比例 AFLP 标记偏分离, 并且认为这种分离可能与非等位位点的共带现象(Co-migrating bands)有关。

本研究中也出现了一定数量的偏离孟德尔分离的标记, 这可能是由于双亲的遗传差异较大造成的。因为杂交种的两个亲本为不同的种, 牙鲆属于牙鲆科、牙鲆属, 石鲈属于鲈科、石鲈属, 二者同属于鲈形目, 双亲间这种较大的遗传差异可能是导致偏孟德尔分离的出现的重要原因; 另外, 研究的个体数目不够大也可能是引起偏分离位点出现的原因之一。Heun 等(1993)为了解决偏分离的问题, 提出判读位点时可把标记分为“质量多态性”和“数量多态性”, 前者指直观的有/无谱带, 后者指谱带强度的多态

性, 即把相同长度的片段按强度不同而分别统计。这虽可在一定程度上减少偏分离位点的数量, 但在实际操作中, 谱带强弱的判读有很大的主观性, 所以在实用中难于把握, 较少应用。

3.1.2 ISSR 标记的异常分离 异常分离的标记包括两种情况: 双亲无而 F_1 有, 双亲有而 F_1 无(刘孟军等, 1998; 甘四明等, 2001)。本研究中两种情况均观察到, 占分离位点总数的 6.08%。这种现象在扇贝、西瓜、苹果的分子标记分离方式方面均有类似报道(万俊芬等, 2004; Hashizume *et al.*, 1996; 刘孟军等, 1998), 其原因尚不清楚。从已有的研究报道推测可能是因为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(Ayliffe *et al.*, 1994; 刘孟军等, 1998)或者是配子形成过程中染色体的不等价交换产生的新序列(刘孟军等, 1998; 房经贵等, 2000; 甘四明等, 2001)。

3.2 ISSR 标记在牙鲆和石鲈遗传作图中的前景展望

由于 ISSR 技术具有简单模板需要量少、高效、多态性丰富、不需预先获得所研究生物的基因组信息等优点, 所以目前已广泛应用于遗传作图、群体遗传结构分析及动植物育种等方面。依据 Hemmat 等(1994)提出的“双假测交构想”, 符合 1:1 和 3:1 孟德尔分离规律的 ISSR 标记中, 牙鲆特有标记和石鲈特有标记可分别用于构建牙鲆和石鲈的遗传连锁图谱, 双亲共有标记可用于构建双亲的遗传连锁图, 并可用于判断双亲间的同源连锁群。本研究中单对杂交 F_1 群体中有 37.02% 的检出位点发生了分离, 其中 19.89% 的位点发生了孟德尔分离, 证明 ISSR 结合“双假测交构想”构建牙鲆和石鲈的遗传连锁图谱是可行的, 构建出高密度的牙鲆和石鲈遗传连锁图谱, 将为最终培育出高产、优质、抗逆性强的牙鲆和石鲈优良品种提供有利的理论支持。

参 考 文 献

- 万俊芬, 包振民, 刘广绪等, 2004. 扇贝种间单对杂交一代幼虫 ISSR 标记的分离方式. 高技术通讯, 5: 82—87
- 甘四明, 施季森, 白嘉雨等, 2001. RAPD 标记在桉属种间杂交一代的分离方式研究. 林业科学研究, 14(2): 125—130
- 刘孟军, Shin Y U, Yae B W, 1998. RAPD 标记在苹果属种间杂交一代的分离方式. 园艺学报, 25(3): 214—219
- 房经贵, 章 镇, 马正强等, 2000. 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. 中国农业科学, 33(3): 19—24
- 房新英, 张全启, 齐 洁等, 2006. 野生和养殖牙鲆

- (*Paralichthys olivaceus*)遗传差异的 RAPD 和 ISSR 研究. 海洋与湖沼, 37(2): 138—142
- Arcade A, Anselin F, Faivre P *et al*, 2000. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000(10): 299—307
- Ayliffe M A, Lawrence G J, Ellis J G *et al*, 1994. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. *Nucleic Acid Research*, 22(9): 1632—1636
- Carlier J D, Reis A, Duval M F *et al*, 2004. Genetic maps of RAPD, AFLP and ISSR markers in *Ananas bracteatus* and *A. comosus* using the pseudo-testcross strategy. *Plant Breeding*, 123(2): 186—192
- Casasoli M, Mattioni C, Cherubina *et al*, 2001. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 1190—1199
- Faure S, Noyer J L, Horry J P, 1993. A molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa accuminata*). *Theoretical Applied Genetics*, 87(4): 517—526
- Hashizume T, Shimamoto I, Harushima Y *et al*, 1996. Construction of a linkage map for watermelon (*Citrullus lanatus*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Euphytica*, 90(3): 265—273
- Hemmat M, Weeden N F, Manganaris A G *et al*, 1994. Molecular marker linkage map for apple. *The Journal of Heredity*, 85(1): 4—11
- Heun M, Helentjaris T, 1993. Inheritance of RAPDs in F₁ hybrid of corn. *Theoretical Applied Genetics*, 85(6): 961—968
- Kojima T, Nagaoka T, Noda K *et al*, 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1: 96(1): 37—45
- Liu Y G, Chen S L, Li J *et al*, 2006. Genetic diversity in three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) populations revealed by ISSR markers. *Aquaculture*, 255: 565—572
- Virk P S, Ford-Iloyd B V, Newbury H J, 1998. Mapping AFLP markers associated with subspecific differentiation of *Oryza sativa* (rice) and an investigation of segregation distortion. *Heredity*, 81: 613—620
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176—183

THE SEGREGATION OF ISSR MARKERS IN THE F₁ PROGENY OF INTERSPECIES CROSSBREED BETWEEN *PARALICHTHYS OLIVACEUS* AND *KAREIUS BICOLORATUS*

XU Jian-Peng^{1,2}, ZHANG Quan-Qi¹, WANG Zhi-Gang¹, QI Jie¹, WANG Xu-Bo¹

(1. Key Laboratory of Marine Genetics and Gene Resource Exploitation, Ministry of Education, College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao, 266003; 2. College of Life Science, Ludong University, Yantai, 264025)

Abstract The segregation pattern of ISSR markers in the F₁ of interspecies cross between *Paralichthys olivaceus* and *Kareius bicoloratus* was studied. Eight primers yielded 181 markers, of which 116 (64.09%) were polymorphic. The segregation showed three patterns: Mendelian, deviated Mendelian, and abnormal. The Mendelian segregation included three types: (1) non-segregation that reflects five genotypic combinations of the parents: AA×AA, AA×Aa, Aa×AA, AA×aa, and aa×AA; (2) 1 : 1 segregation, reflecting two genotypic combination of the parents, Aa×aa and aa×Aa; (3) 3 : 1 segregation, reflecting one genotypic combination of the parents, Aa×Aa. The deviated pattern includes two types: polymorphic in the parents and deviated from 1 : 1 ratio in the progenies and the appeared in the parents and deviated from 3 : 1 ratio in progenies. The abnormal pattern includes two types: absent in the parents but present in the progenies, and present in the parents but absent in the progenies. The percentages and amounts of the three patterns were 82.87%, 150; 11.05%, 20; and 6.08%, 11; respectively. In addition, 85.33% of the markers presenting in both the parents did not segregate and 28.57%—35.85% of the markers presenting in only one parent showed normal segregation. The above results could provide certain theoretical basis for further work to the construction of linkage map of *P. olivaceus* and *K. bicoloratus*.

Key words Tairmating, *Paralichthys olivaceus*, *Kareius bicoloratus*, ISSR markers, Segregation pattern, Linkage map