

AFLP 和 RAPD 标记技术在栉孔扇贝 遗传多样性研究中的应用比较^{*}

王玲玲^{①②} 宋林生^{①**} 李红蕾^① 胥 炜^① 李俊强^① 常亚青^③

(①中国科学院海洋研究所 青岛 266071; ②中国科学院研究生院 北京 100039;

③大连水产学院 大连 116023)

摘要: AFLP 和 RAPD 标记技术是近年来发展最快的基于 PCR 基础上的两种 DNA 标记技术,本文比较了两种标记技术在我国栉孔扇贝群体遗传多样性研究中的应用。共筛选 20 个 RAPD 引物和 7 个 AFLP 引物组合,检测到 AFLP 标记的有效等位基因数和平均多态信息量稍低于 RAPD 标记,但 AFLP 标记在每单位分析中扩增到的野生和养殖群体的多态性条带数(23.8, 24.8)分别高于 RAPD 标记(5.6, 5.6), AFLP 多态性检测效率显著高于 RAPD 标记。AFLP 和 RAPD 两种标记技术所揭示的野生种群与养殖群体间的近交系数、遗传距离两项指标均表明,我国栉孔扇贝养殖群体和野生种群之间尚未出现明显的遗传分化。研究表明:RAPD 和 AFLP 这两种标记技术均可用于栉孔扇贝遗传多样性的分析,其分析结果是一致的。

关键词: 栉孔扇贝; AFLP; RAPD; 遗传多样性; 群体

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)04-35-05

* 国家重点基础研究发展规划项目资助(No. G1999012008);

** 通讯作者, E-mail: lshsong@ms.qdio.ac.cn;

第一作者介绍 王玲玲,女,30岁,博士研究生;研究方向:分子遗传学;E-mail: llwan213@yahoo.com.cn.

收稿日期:2003-04-18

Comparison of Genetic Diversity between Populations of *Chlamys farreri* Revealed by AFLP and RAPD Analysis

WANG Ling-Ling^{①②} SONG Lin-Sheng^① LI Hong-Lei^①

XU Wei^① LI Jun-Qiang^① CHANG Ya-Qing^③

(^① Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071;

^② Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039;

^③ Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China)

Abstract: AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) and RAPD (Randomly Amplified Polymorphism DNA) techniques were used to study the genetic diversity of *Chlamys farreri*. The AFLP marker system has lower polymorphism information content (PIC) and lower effective numbers of alleles per locus (N_e) than RAPD but it has a much higher assay efficiency index (A_i) detected by 7 AFLP primer combinations and 20 RAPD primers. The inbreeding index was 0.038 6 and 0.028 3 and genetic distance was 0.028 0 and 0.027 1 as revealed by AFLP and RAPD respectively. This result indicates that there is no genetic differentiation between the natural population and hatchery stock and both AFLP and RAPD techniques are useful for the analysis of the genetic diversity of Zhikong scallop populations.

Key words: *Chlamys farreri*; AFLP; RAPD; Genetic diversity; Population

随机扩增多态 DNA (randomly amplified polymorphism DNA, RAPD) 和扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 是近年来发展最快、基于 PCR 基础上的两种 DNA 标记技术, 目前被相继应用于动植物和海洋生物种质资源鉴定及群体遗传结构的研究中。RAPD 技术具有快速、安全、简便、有效等优点, 但反应易受条件影响, AFLP 技术克服了 RAPD 稳定性差的缺陷, 因其所需模板少、多态性强、分辨率高、可靠性好、重复性好而成为最有效的分子标记之一, 但对试剂纯度和操作技术要求较高^[1]。目前贝类的遗传变异检测大都依赖同工酶技术, 应用分子标记技术的研究报道较少^[2-6]。目前尚未见到 AFLP 和 RAPD 标记技术在贝类遗传多样性研究中比较分析的报道。

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 肉味鲜美, 营养丰富, 其闭壳肌的干制品“干贝”为海产八珍之一, 栉孔扇贝是我国具有重要经济价值的海产资源。利用 DNA 分子标记技术开展海洋生物遗传多样性研究, 对于海洋生物资源保护和持

续利用具有十分重要的意义。本文比较分析了 RAPD 和 AFLP 两种标记技术揭示的我国栉孔扇贝群体遗传多样性的研究效果, 以期丰富分子遗传标记在栉孔扇贝及海洋贝类遗传多样性分析中的应用研究, 为栉孔扇贝标记辅助育种技术的建立提供遗传背景资料。

1 材料与方 法

1.1 材料 实验所用的栉孔扇贝野生个体采自大连远离养殖区的海域。养殖群体取自大连水产学院, 人工养殖两代以上。

1.2 基因组 DNA 的提取 随机抽取野生和养殖个体各 20 个, 剪取约 100 mg 闭壳肌, 加入 500 μ l 匀浆缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 50 mmol/L EDTA, pH 8.0), 混匀后加入终浓度为 1% SDS 和 100 μ g/ml 的蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 消化 3 h, 等体积的酚、氯仿: 异戊醇 (24:1) 抽提, 二倍体积乙醇沉淀, ddH₂O 溶解, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 RAPD 和 AFLP 分析 RAPD 反应参照 Williams^[7] 的报道并做一定改动。随机引物购

自上海 Sangon 公司,共筛选出 20 个引物进行扩增。基因组 DNA 在 PE9600 PCR 扩增仪上进行 45 个扩增循环。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色,紫外灯下观察拍照。

AFLP 分析参考 Vos 等^[8]的方法。引物和接头由上海 Sangon 合成。*EcoR* I 和 *Mse* I 双酶切 250 ng 基因组 DNA,用 T4 连接酶将酶切片段连上接头,连接产物经预扩增后,选用 7 对选择性扩增引物组合 E + AAC/M + CCT、E + ATG/M + CGA、E + ACA/M + CGA、E + ACA/M + CTG、E + AGA/M + CAC、E + ACT/M + CAC、E + AGT/M + CAC 分别进行扩增。扩增产物在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,银染干燥后统计带型。

1.4 数据分析 选取电泳后清晰的扩增片段进行数据统计。在相同迁移位置,按每一个体扩增片段的有无,出现扩增带记录为 1,无扩增带记录为 0。多态位点比例 $P = \text{多态扩增片段数}/\text{扩增片段总数}$ 。标记位点的多态性信息量 (polymorphism information content, PIC)^[9]按公式 $PIC = 1 - \sum p_i^2$ 计算;标记系统的有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e)^[10]按公式 $N_e = 1/\sum p_i^2$ 计算,其中 p_i 表示 i 位点的基因频率。多态性检测效率 (assay efficiency index, A_i)^[11]表示标记系统的有效性分析指数,按公

$A_i = Ne/p$ 计算,其中 p 表示标记总分析次数。

根据群体中各等位基因的频率用 PHYLIP^[12]软件中的 Gendist 程序计算种群间的遗传距离。两个群体之间的近交系数 (F_{st})^[13]由公式: $F_{st} = \sigma^2 q/\bar{p}\bar{q}$ 计算,其中 \bar{p} 和 \bar{q} 为平均基因频率, $\sigma^2 q$ 为基因频率方差, $\sigma^2 q = \sum (q_i - \bar{q})^2/n$ 。

2 结果

2.1 标记结果 RAPD 分析选取 20 个随机引物,野生种群共统计 116 条清晰的多态性扩增片段,养殖群体共统计 112 条清晰的多态性片段数,平均每个引物分别在野生和养殖群体中扩增到 5.58 和 5.56 条多态片段;AFLP 分析中使用了 7 个引物组合,野生和养殖群体统计到清晰的多态性扩增片段数分别为 173 和 166 条,平均每个引物组合有 24.8 和 23.8 条多态片段。AFLP 和 RAPD 为显性标记,理论上每个位点仅有 2 个等位基因形式。AFLP 标记在野生种群和养殖群体中检测到的每位点有效等位基因数低于 RAPD 标记。RAPD 标记系统的平均多态性信息量 (PIC) 值高于 AFLP 标记系统。AFLP 标记的多态性检测效率分别为 43.88 和 52.50,高于 RAPD 标记 (11.10 和 11.25)。统计及计算数据见表 1。

表 1 AFLP 和 RAPD 标记系统比较

参数	AFLP 标记系统		RAPD 标记系统	
	养殖群体	野生种群	养殖群体	野生种群
分析单位数目	7 引物对	7 引物对	20 引物	20 引物
多态性扩增带数目	112	116	166	173
每分析的多态性扩增带数目	24.8	23.8	5.6	5.6
有效等位基因数 (N_e)	1.35	1.38	1.45	1.47
平均多态性信息量 (PIC)	0.21	0.23	0.26	0.27
多态性检测效率 (A_i)	43.88	52.50	11.10	11.25

2.2 遗传距离 分别统计两群体各座位的基因频率,应用 PHYLIP 软件中的 Gendist 程序计算野生种群和养殖群体间的遗传距离及近交系数。依赖 AFLP 标记和 RAPD 标记结果统计计算的栉孔扇贝野生种群与养殖群体之间的遗传

距离分别为 0.027 1 和 0.028 0。分别利用 AFLP 标记和 RAPD 标记结果分析计算的栉孔扇贝野生种群与养殖群体之间的近交系数为 0.038 6 和 0.028 3。结果见表 2。

表 2 两群体之间的遗传距离和近交系数

参数	AFLP 标记	RAPD 标记
遗传距离	0.027 1	0.028 0
近交系数	0.038 6	0.028 3

3 讨论

分子标记在种质资源研究领域的应用主要体现在构建指纹图谱和分析遗传多样性两个方面。研究遗传多样性要求分子标记有高度的多态性,数量要丰富,而且能够均匀地覆盖整个基因组。在已有的文献报道中对常用于遗传多样性分析的几种主要 DNA 标记技术进行了比较,综合效应大小依次为 AFLP > SSR > RAPD > RFLP,对四种技术相关程度的分析结果显示,RAPD 与其它三种技术的相关系数最小,表明 RAPD 标记的可靠性最低,这与 RAPD 标记的重复性稳定性差有关^[10,11,14,15]。目前,分子标记已经应用于水生生物遗传结构及遗传多样性研究^[16-19],但分子标记技术的比较研究主要集中在玉米等作物上,在贝类遗传多样性检测中尚未见到 AFLP 与 RAPD 标记比较分析的报道。分子标记技术的发展为生物群体遗传多样性的研究提供了新的手段,不同的分子标记在遗传多样性研究中表现出各自的特性。虽然 AFLP 和 RAPD 两种标记技术都能检测到单碱基突变与插入缺失,但因为标记对不同变异的敏感程度差异造成多态性变化水平的不一致。本实验得到 AFLP 标记的平均多态性信息量和每位点有效等位基因数均低于 RAPD 标记,但 AFLP 标记在单位分析中(每引物对或引物)检测到的多态片段数显著高于 RAPD 标记,这与其它物种的遗传多样性分析结论一致^[15,20,21],本研究揭示的 AFLP 标记的多态性检测效率约是 RAPD 标记的 5 倍。多态性检测效率是单位分析数目和平均有效等位基因数的直接反映。AFLP 标记多态性检测效率高的原因在于一次分析中能够检测到大量的多态位点,而不是因为每个位点具有丰富的等位基因形式。在单位分析中 AFLP 标记技术得到的多态扩增片段数约为 RAPD 标记的 5 倍(表 1),理论上 AFLP 标记与

RAPD 标记一样,每个位点仅有两个等位基因形式,本实验检测到的两种标记的有效等位基因数差异不大(表 1),但典型的 AFLP 分析每次反应产物经过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测到的谱带在 50 ~ 100 条之间,这是 RAPD 标记远不能及的。AFLP 标记尽管也存在对模板反应迟钝,成本高,对技术要求苛刻等缺点,但由于对基因微小差异的高度敏感,以其独特的多态性检测效率而日益受到重视,成为遗传学家强有力的分子工具之一。RAPD 标记可靠性问题的核心是共迁移带间是否具有序列同源性,RAPD 标记由于使用较短的引物,与模板的错配几率较大,且易受实验条件干扰,系统误差很容易转变成随机误差使其重复性和稳定性受到质疑。但随着严谨程度的不断提高,可得到进一步完善,仍不失为一种简便有效的分子标记。

对 AFLP 和 RAPD 两种标记技术评估栉孔扇贝野生种群与养殖群体所得的遗传距离及近交系数等主要遗传参数进行检验以衡量结果的可靠度,结果显示两种标记技术检测得到的遗传距离和近交系数显著相关。在本实验中,分别用 AFLP 和 RAPD 两种标记技术揭示的两群体间的近交系数及遗传距离两项指标均表明,我国栉孔扇贝养殖和野生群体之间尚未出现明显的遗传分化。说明尽管 AFLP 和 RAPD 两种标记技术得到的观测数据存在一定差异,但两种标记技术揭示的主要遗传参数趋势是相同的,其分析结果是一致的,两种方法皆可用于栉孔扇贝遗传多样性的评估、*F_{st}* 同源性的评价及种群结构的测定。目前 AFLP 和 RAPD 标记技术在海洋贝类中的研究报道较少,但都表明运用这两种标记技术可以揭示 DNA 水平上丰富的多态性。已有文献报道,经过累代养殖的栉孔扇贝不同程度地出现了抗逆性差、性状退化等问题^[4,22,23]。生物群体遗传多样性的大小与该物种的进化潜力和抵御不良环境的能力密切相关^[24],因此加快分子标记在海洋贝类研究中的应用对于保护开发并永续利用海洋贝类资源具有重要的指导意义。本研究为两种标记技术在海洋贝类遗传变异检测及标记辅助育种中的

应用奠定了基础。对于构建指纹图谱和研究遗传多样性, AFLP 标记技术由于能够在一次 PCR 扩增中检测出 DNA 水平的微小差异而表现出最大的优势, 而 RAPD 标记因其快速简便, 在起步较晚的海洋生物遗传多样性的研究中也显示出广阔的应用前景。但近几年发展的 AFLP、RAPD 等多种显性标记技术的不足之处在于缺少数据处理和计算的方法及标准^[25], 因此为 RAPD 与 AFLP 标记技术提供统一全面的统计方法显得尤为迫切和重要。

参 考 文 献

- [1] 韩双艳, 郭勇. AFLP 在分子生物学研究中的应用. 生物技术通报, 2001, 2: 22 ~ 24.
- [2] 李太武, 孙修勤, 刘艳等. 栉孔扇贝种群的遗传变异分析. 高技术通讯, 2001, 4: 25 ~ 27.
- [3] 王志铮, 李太武, 刘艳等. 栉孔扇贝六种同工酶的生化遗传分析. 海洋与湖沼, 2002, 33(3): 232 ~ 238.
- [4] 李红蕾, 宋林生, 刘保忠等. 栉孔扇贝不同种群的遗传结构及其杂种优势. 海洋与湖沼, 2002, 33(2): 188 ~ 195.
- [5] Huang B X, Peakall R, Hanna P J. Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) populations using RAPD, minisatellite and microsatellite markers. *Marine Biology*, 2000, 136: 207 ~ 216.
- [6] Pogson G H, Zouros E. Allozyme and PEPD heterozygosity as correlates of growth rate in the scallop *Placopecten agellanicus*: a test of the associative overdominance hypothesis. *Genetics*, 1994, 137(1): 221 ~ 231.
- [7] Williams J G K, Kubelik A R, Livark K J, et al. DNA polymorphisms amplified by primers are useful as genetics markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6 531 ~ 6 535.
- [8] Vos P, Hogers R, Blecker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 4 407 ~ 4 414.
- [9] Sanjay S, Hemant T, Robert C E. On estimating the heterozygosity and polymorphism information content value. *Theoretical Population Biology*, 2000, 57: 265 ~ 271.
- [10] Powell W, Morgante M, Andre C, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis. *Mol Breeding*, 1996, 2: 225 ~ 228.
- [11] Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 1 248 ~ 1 255.
- [12] Felsenstein J. Phylip Phylogeny Inference Package, Version 3.5. University of Washington, Seattle, WA. 1992.
- [13] Wright S. Evolution and the genetics of populations. Volume 4. IL, Chicago: University of Chicago Press, 1978.
- [14] Garcia-Mas J, Oliver M, Gomez-Paniagua H, et al. Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theor Appl Genet*, 2000, 101: 860 ~ 864.
- [15] 袁力行, 傅骏骏, Warburton M 等. 利用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 标记分析玉米自交系遗传多样性的比较研究. 遗传学报, 2000, 27(8): 725 ~ 733.
- [16] 杜长斌, 孙孝文, 楼允东等. 应用微卫星技术对野鲤和两种鲤选育品系的遗传多样性分析. 上海水产大学学报, 2000, 9(4): 220 ~ 224.
- [17] Liu Z, Nichols A, Li P, et al. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2 and backcross hybrids. *Mol Gen Genet*, 1998, 258: 260 ~ 268.
- [18] 宋林生, 相建海, 李晨曦等. 日本对虾野生种群和养殖群体遗传结构的 RAPD 标记研究. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 261 ~ 266.
- [19] Waycott M, Barnes P A G. AFLP diversity within and between populations of the Caribbean seagrass *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae). *Marine Biology*, 2001, 139: 1 021 ~ 1 028.
- [20] Nakajima Y, Oeda K, Yamamoto T. Characterization of genetic diversity of nuclear and mitochondrial genomes in *Daucus* varieties by RAPD and AFLP. *Plant Cell Reports*, 1998, 17: 848 ~ 853.
- [21] Thierry M L, Panaud O, Toupance B, et al. Assessment of genetic relationships between *Setaria italica* and its wild relative *S. viridis* using AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1 061 ~ 1 066.
- [22] 王运涛, 相建海. 栉孔扇贝大规模死亡的原因探讨. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 770 ~ 774.
- [23] 张福绥, 杨红生. 栉孔扇贝大规模死亡问题的对策及应急措施. 海洋科学, 1999, 2: 1 ~ 5.
- [24] 张国范, 张福绥. 贝类遗传多样性及其永续利用. 海洋科学, 1993, 5: 17 ~ 21.
- [25] 汪永庆, 徐来祥, 张知彬. RAPD 技术的标准化问题. 动物学杂志, 2000, 35(4): 57 ~ 60.