

文章编号: 1674-5566(2015)01-0001-11

## 翘嘴鲌连续两代减数分裂雌核发育群体的遗传特征分析

李倩<sup>1</sup>, 顾志敏<sup>1</sup>, 贾永义<sup>1</sup>, 罗琛<sup>2</sup>, 蒋文枰<sup>1</sup>, 刘士力<sup>1</sup>, 李飞<sup>1</sup>

(1. 浙江省淡水水产研究所, 浙江湖州 313001; 2. 浙江大学生命科学学院, 浙江杭州 310058)

**摘要:** 通过异源精子冷休克技术获得翘嘴鲌减数分裂雌核发育一代 (meio-G1)、减数分裂雌核发育二代 (meio-G2), 以太湖野生翘嘴鲌 (*Culter alburnus* Basilewsky) 为对照群体, 采用微卫星 (SSR) 标记和随机扩增多态性 DNA (RAPD) 标记分析了 3 个群体的遗传特征。SSR 结果显示, 12 个微卫星位点在 meio-G1、meio-G2 和对照组 3 个群体中, 分别扩增到 38、16 和 47 个等位基因, 平均等位基因数为 3.166 7、1.333 3 和 3.916 7, 平均观测杂合度 ( $H_o$ ) 分别为 0.430 6、0.333 3 和 0.675 0, 平均纯合度分别为 0.569 4、0.666 7 和 0.325 0。3 个群体内个体间的平均遗传相似系数分别为 0.543 0、1.000 0 和 0.571 9; 聚类分析结果表明, meio-G1 和对照组聚为一支, meio-G2 单独聚为另一支。RAPD 结果显示, 14 个引物在 3 个群体中检测到的位点数分别为 74、61 和 64, 3 个群体的多态位点比例分别为 63.51%、0 和 51.56%, 按照 Nei's 指数统计的 3 个群体的遗传相似度分别为 0.801 8、1 和 0.846 0, meio-G2 的基因组 DNA 同质性远高于 meio-G1 和对照组。两种分子标记结果均表明, meio-G2 的纯合度、个体间的遗传相似系数均高于 meio-G1 和对照组, 且个体间的基因型完全一致, 是良好的育种材料。

**研究亮点:** 人工诱导雌核发育被认为是加速动物有利基因纯合及固定的有效方法, 应用价值很大。本课题组利用减数分裂雌核发育技术诱导了两代翘嘴鲌雌核发育家系, 利用 SSR 和 RAPD 技术首次报道了翘嘴鲌连续两代减数分裂雌核发育群体的遗传特征, 为翘嘴鲌良种选育提供理论依据。

**关键词:** 翘嘴鲌; 人工雌核发育; 微卫星; RAPD; 纯合度

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

翘嘴鲌 (*Culter alburnus* Basilewsky) 俗称白鱼、白条, 分类上属于鲤形目 (Cypriniformes)、鲤科 (Cyprinidae)、鲌亚科 (Culterinae)、鲌属 (*Erythroculter*)。近十年来, 随着人工繁殖及养殖技术的突破, 翘嘴鲌在我国浙江、江苏、上海、安徽、湖北等十余个省市得到了大面积的养殖, 形成了近 100 亿元的产值, 尤其在浙江湖州地区, 年繁育苗种近 20 亿尾, 占全国 40% 左右。目前对翘嘴鲌的研究主要集中在营养饲料、生长、人工繁殖、池塘养殖、遗传多样性等方面<sup>[1-8]</sup>, 虽然从养殖状况来看, 翘嘴鲌未出现明显的经济性状衰退现象, 但对养殖群体遗传多样性的分子研究表明, 翘嘴鲌的遗传多样性处于较低水平<sup>[7-8]</sup>。为了防止翘嘴鲌种质资源的衰退及进一步挖掘

其养殖性状潜力, 选育工作显得尤为重要。人工诱导雌核发育是快速固定母本性状和进行性别控制的有效手段, 同时可加快鱼类尤其是世代周期较长种类的育种进程和效率, 经过一次人工雌核发育诱导约相当于 14 世代全同胞交配选育, 多数鱼类经过连续两次雌核发育就可以作为品系 (种) 亲本用于育种生产<sup>[9-13]</sup>。目前, 有关翘嘴鲌雌核发育的研究未见公开报道, 本实验室自 2006 年开始进行翘嘴鲌减数分裂雌核发育的研究, 先后培育出多批次翘嘴鲌异源减数分裂雌核发育一代群体和多个减数分裂雌核发育二代家系, 并应用于翘嘴鲌的选育种工作。

本研究利用微卫星 (SSR) 标记对获得的连续两代减数分裂雌核发育翘嘴鲌群体的遗传多样

收稿日期: 2014-03-21

修回日期: 2014-09-12

基金项目: 浙江省水产新品种选育重大专项 (2012C12907-7); 浙江省重点科技创新团队项目 (2010R50026-4)

作者简介: 李倩 (1984—), 女, 硕士, 研究方向为鱼类繁育学及育种技术。E-mail: 2008feelkaka@sina.com

通信作者: 顾志敏, E-mail: guzhimin2006@163.com

性、群体内和群体间的遗传变异及纯合度进行了研究,以太湖捕捞的野生翘嘴鲌群体作为对照,比较了连续两代雌核发育群体间的遗传差异,并以随机扩增片段多态性(RAPD)标记作为辅助标记,检测了鲤基因组对雌核发育群体的遗传污染情况,以期为后续翘嘴鲌选育及全雌育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

减数分裂雌核发育一代(meio-G1)群体为2010年6月由数尾优选的太湖野生翘嘴鲌诱导培育的异源雌核发育后代,减数分裂雌核发育二代(meio-G2)群体系2012年7月用1尾性状优良的性成熟翘嘴鲌减数分裂雌核发育一代个体再次异源雌核发育诱导获得的后代。以鲤精子作为异源精子,减数分裂雌核发育诱导方法参照

ZHENG等<sup>[13]</sup>的方法,并略做修改。2012年和2013年分别从meio-G1和meio-G2群体随机取30尾个体,2013年5月从太湖捕捞30尾野生群体作为对照,剪尾鳍保存在100%乙醇中,运回实验室于-20℃冰箱保存。

从上述每个群体中随机抽取10尾鱼,剪尾鳍用于RAPD分析。

### 1.2 基因组DNA提取

按照OMEGA基因组DNA提取试剂盒(美国OMEGA公司)说明书提取基因组DNA,ddH<sub>2</sub>O溶解,琼脂糖电泳和紫外分光光度计检测其完整性和浓度,并调整终浓度为50 ng/μL,-20℃保存待用。

### 1.3 微卫星引物

引物来源于已发表的引物序列<sup>[14-16]</sup>,由上海生工生物工程股份有限公司合成,具体序列和退火温度见表1。

表1 12对微卫星引物序列和特异退火温度

Tab.1 Sequence and specific annealing temperature of 12 microsatellite primers

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence	产物大小/bp product size	退火温度/℃ annealing temperature
E155	F: ACTAAGACAGCATGGAGGGA R: ATATAGCGGAACAAGCAGGG	146 ~ 240	62.9
E125B	F: AATCCCTGTGTGCTGCAT R: CACTGGAACCGGTGCAT	173 ~ 208	62
E156B	F: TTATCAGTCTCCCTGGGAA R: GCTGGGCTCATTAGCACA	183 ~ 228	53.8
E124	F: GTTGTACAGTTTGGTGGC R: CTCTCATCTCCAATGATGGC	168 ~ 190	58.4
TC01	F: GTTGCTGACACAACTTTTGAATG R: AACAGACCGGACTGATGACAGAGAG	200 ~ 240	53
TC14	F: AAGGTATACTGCAGAACAAAGGGG R: GAGATTCATGCCACCTGTTTTGTA	145	51
HLJHB01	F: AATATAGGCAGAGATGACTTCAGAC R: TTGAAAAGTGGGACATGG	176 ~ 200	55
HLJHB07	F: AGACAGGCAGGCAGTGAGAG R: CTTGGTTAGGGCAGTTGAG	172 ~ 200	55
HLJHB17	F: GTGGCTTGGGTTAGTCTGT R: ATGGCAGGACTTATGATGG	233 ~ 297	48
HLJHB22	F: GGGAGTTTAGAAGATTGCCTGT R: AGGGAGTTGAGAAGACACC	309 ~ 373	48
HLJHB28	F: CTGCTGGTGGACAGACTTCA R: GGTCCCCAGGTAACATTTCT	265 ~ 300	48
HLJHB43	F: AGTGTGTTCTGGGATGTTGCT R: CATGTCTGGTGGATTGTTAGA	403 ~ 456	55

### 1.4 RAPD引物

RAPD引物购自上海生工生物工程股份有限公司,每条引物重复扩增3次,筛选出14条重

性好、图谱清晰的引物用于上述3个群体基因组扩增,引物序列及其编号见表2。

表 2 14 个 RAPD 引物分别在 3 个群体中扩增出的位点数和多态位点数  
 Tab. 2 The number of loci and number of polymorphic loci amplified within three groups with 14 RAPD primers respectively

编号 code	序列 sequence	扩增出的位点数 number of loci			多态位点数 number of polymorphic loci		
		meio-G1	meio-G2	对照 control	meio-G1	meio-G2	对照 control
S11	GTAGACCCGT	4	4	6	3	0	4
S119	CTGACCAGCC	4	5	5	3	0	2
S122	GAGGATCCCT	2	3	6	2	0	2
S124	GGTGATCAGG	6	3	5	5	0	4
S126	GGGAATTCGG	7	5	4	4	0	1
S129	CCAAGCTTCC	8	6	4	2	0	1
S130	GGAAGCTTGG	4	3	5	3	0	4
S405	GGGAACGTGT	3	4	3	2	0	2
S406	CTGGGCAACT	5	5	3	3	0	0
S407	CCGTGACTCA	4	5	5	0	0	0
S409	GTCTTCCGGA	8	6	5	5	0	5
S412	GGGACGTTGG	8	4	5	5	0	4
S415	GACCTACCAC	5	3	3	4	0	1
S416	GTAACCAGCC	6	5	5	6	0	3
位点总数 total		74	61	64	47	0	33
多态位点比例 percent of polymorphic loci					63.51%	0	51.56%

### 1.5 微卫星 PCR 及电泳

PCR 反应体系 25  $\mu\text{L}$ : DNA 模板 1.5  $\mu\text{L}$  (50 ng/ $\mu\text{L}$ ), 12.5  $\mu\text{L}$  2  $\times$  Taq PCR Master Mix [ Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 400  $\mu\text{mol}$  dNTP each, 20 mmol pH 8.3 Tris-HCl, 100 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub> (天根生物公司)], 上下游引物各 1  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol}$ /L), 加灭菌去离子水至反应体积为 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 复性 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 30 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min, 每对微卫星引物退火温度见表 1。PCR 扩增在 ABI9700PCR 仪(美国 ABI 公司)上进行。扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 上样 8  $\mu\text{L}$ , 10 V/cm 恒压电泳 4 h 左右, 银染显色, 数码相机拍照, Bio-Rad Gel Image System 4.0 软件分析条带大小。

### 1.6 RAPD-PCR 扩增及产物分离

总体积 25  $\mu\text{L}$ , 内含 2.5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  Reaction Buffer, 50 ng 基因组 DNA, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu\text{mol}$ /L 引物, 0.1 mmol/L dNTPs, 1 U Taq DNA 聚合酶, 用灭菌去离子水补足体积。反应程序参照张永正等<sup>[7]</sup>。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖电泳上进行分离, 溴化乙锭染色, 紫外灯下拍照。

### 1.7 统计指标

#### 1.7.1 微卫星统计指标

用 Popgene 32<sup>[17]</sup> 软件统计各微卫星位点的

等位基因数 ( $A$ )、观测杂合度 ( $H_o$ )、期望杂合度 ( $H_e$ )、遗传相似系数 ( $G_s$ )、遗传距离 ( $D$ ) 等参数。利用 MEGA 软件, 根据群体间的遗传距离按照 UPGMA 法构建 3 个群体的聚类图。

多态信息含量 (polymorphism information content, PIC) 的计算公式<sup>[18]</sup>为:

$$P_{IC} = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2 \quad (1)$$

式中:  $P_{IC}$  为多态信息含量;  $P_i$  和  $P_j$  分别为第  $i$  和第  $j$  个等位基因频率;  $n$  为等位基因数。

遗传相似系数  $G_s$  计算公式<sup>[19]</sup>为:

$$G_{Sij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j) \quad (2)$$

式中:  $G_{Sij}$  为个体  $i$  和  $j$  之间的遗传相似系数;  $N_{ij}$  为个体  $i$  和  $j$  共有的基因型;  $N_i$  和  $N_j$  分别为个体  $i$  和  $j$  自有的基因型。纯合度  $H$  的计算公式<sup>[20]</sup>:

$$H = 1 - H_o \quad (3)$$

式中:  $H$  为纯合度;  $H_o$  为群体的平均观测杂合度。

#### 1.7.2 RAPD 统计指标

$$P = (k/n) \times 100\% \quad (4)$$

式中:  $P$  为多态位点比例;  $k$  为多态位点数;  $n$  为所测定位点的总数。

个体间的遗传相似度和遗传距离参照 Nei's<sup>[19]</sup> 的公式计算, 每个座位上相应谱带存在时记为 1, 缺失时记为 0, 将谱带转换为 01 矩阵。

$$\text{样品个体间相似系数 } F = 2N_{xy} / (N_x + N_y) \quad (5)$$

式中: $F$  为个体间相似系数; $N_{xy}$  为  $x$ 、 $y$  个体共同拥有的 RAPD 带数; $N_x$ 、 $N_y$  分别为  $x$ 、 $y$  个体各自拥有的 RAPD 带数。

样品个体间的遗传距离: $D = 1 - F$  (6)

式中: $D$  为个体间的遗传距离; $F$  为个体间的遗传相似系数。

群体内遗传相似度和遗传距离通过对群体内所有个体间的遗传相似度  $F$  和遗传距离  $D$  值平均求得。

## 2 结果

### 2.1 微卫星分析结果

#### 2.1.1 等位基因频率、平均等位基因数及多态信息含量

12 对引物均能在 3 个群体中扩增出稳定清晰的条带,其中,基因座 TC14 在 3 个群体中只扩

增出一条条带。12 对引物在对照组、meio-G1、meio-G2 中分别扩增出 47、38 和 16 个等位基因,平均等位基因数分别为 3.916 7、3.166 7 和 1.333 3,对照组最高,meio-G1 次之,meio-G2 最低;平均多态信息含量对照组最高,为 0.596 9,其次为 meio-G1 (0.481 6),meio-G2 最低 (0.125 0),见表 3。图 1 为引物 HLJHB01 在 3 个群体中的扩增结果。

#### 2.1.2 基因纯合度和杂合度

利用所选的 12 个微卫星位点对 meio-G1、meio-G2 及对照组进行检测,统计了 3 个群体的观测杂合度 ( $H_o$ )、期望杂合度 ( $H_e$ ) 和纯合度,见表 4。结果显示,meio-G1、meio-G2 的  $H_o$ 、 $H_e$  等遗传指标均低于对照组,而 meio-G2 低于 meio-G1;meio-G1、meio-G2 的纯合度分别为 0.569 4、0.666 7,高于对照组的 0.325 0。

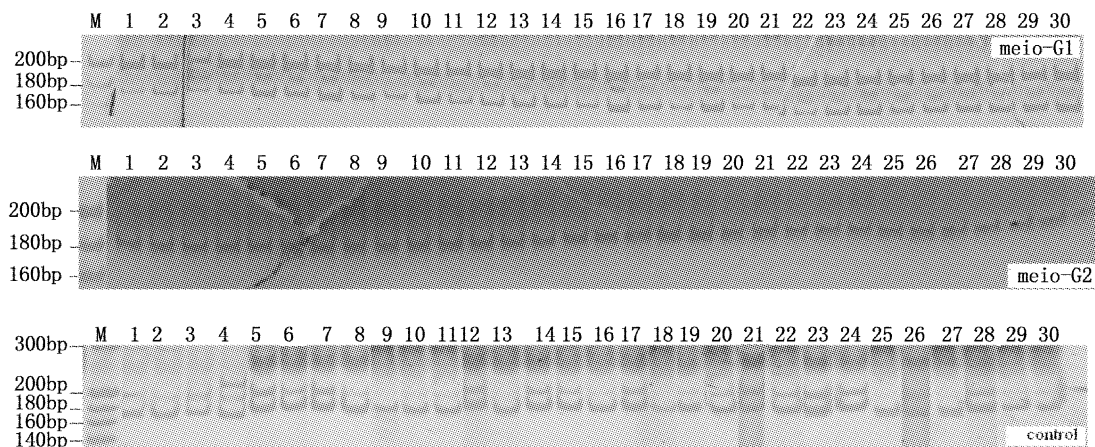


图 1 引物 HLJHB01 在 3 个群体中的扩增结果

Fig. 1 Amplification results of primer HLJHB01 in three groups

meio-G1 代表减数分裂雌核发育一代群体;meio-G2 代表减数分裂雌核发育二代群体;control 代表太湖群体;M 为 20 bp DNA marker; 1~30 为个体编号。

meio-G1 represents the first generation meiosis gynogenetic group; meio-G2 represents the second generation meiosis gynogenetic group; M represents 20 bp DNA ladder marker; 1-30 represent individual numbers.

#### 2.1.3 个体间的遗传相似度

根据所检测的 12 个微卫星位点的基因型,计算了 meio-G1、meio-G2 和对照组 3 个群体内个体间的遗传相似系数(表 5)。结果表明,meio-G2 的遗传相似系数为 1.000 0,显著高于 meio-G1 (0.543 0) 和对照组 (0.571 9)。

#### 2.1.4 群体间的遗传分化及聚类图

meio-G1 和对照组之间的遗传相似系数最

大,为 0.775 7,meio-G1 和 meio-G2 之间的遗传相似系数最小为 0.471 3;与此对应,meio-G1 和 meio-G2 之间的遗传距离最大,为 0.752 4,meio-G1 和对照组之间的遗传距离最小,为 0.254 1 (表 6)。在聚类图上,meio-G1 和对照组聚为一支,而 meio-G2 自成距离较远的独立分支(图 2)。

表 3 3 个群体在 12 个微卫星位点的遗传参数  
 Tab. 3 Genetic parameters on 12 microsatellite loci in the three groups

位点 locus	等位基因大小/bp size of alleles	等位基因频率 alleles frequencies		
		meio-G1	meio-G2	对照 control
HLJHB07	172	-	-	0.216 7
	176	0.566 6	-	0.250 0
	180	0.066 7	0.5000	0.333 3
	200	0.366 7	0.5000	0.200 0
E125B	173	0.183 3	-	0.283 3
	182	0.416 7	0.500 0	0.116 7
	187	-	-	0.316 7
	196	0.200 0	-	0.150 0
	208	0.200 0	0.500 0	0.133 3
E124	168	0.066 7	-	0.216 7
	174	0.066 7	-	0.333 3
	178	0.033 3	-	0.316 7
	184	0.400 0	0.500 0	0.050 0
	190	0.433 3	0.500 0	0.083 3
E155	146	0.166 7	-	0.100 0
	153	0.316 7	-	0.200 0
	184	0.200 0	1.000 0	0.283 3
	193	0.149 9	-	0.133 3
	240	0.166 7	-	0.283 3
E156B	183	0.033 3	-	0.083 3
	192	0.566 7	-	0.450 0
	208	0.250 0	-	0.216 7
	228	0.150 0	1.000 0	0.250 0
TC14	145	1.000 0	1.000 0	1.000 0
HLJHB43	403	0.266 7	-	0.100 0
	410	0.333 3	-	0.300 0
	426	0.183 3	1.000 0	0.266 7
	440	0.216 7	-	0.266 7
	456	-	-	0.066 7
TC01	200	0.500 0	1.000 0	0.500 0
	240	0.500 0	-	0.500 0
HLJHB28	265	0.166 7	-	0.266 7
	283	0.800 0	-	0.266 7
	292	0.033 3	1.000 0	0.250 0
	300	-	-	0.216 7
HLJHB22	309	0.083 3	-	0.500 0
	373	0.916 7	1.000 0	0.500 0
HLJHB17	233	-	-	0.200 0
	244	0.316 7	-	0.133 3
	251	0.433 3	0.200 0	-
	266	0.250 0	0.500 0	0.166 7
	289	-	0.500 0	0.050 0
	297	-	-	0.250 0
HLJHB01	176	0.500 0	-	0.320 0
	180	-	1.000 0	0.320 0
	200	0.500 0	-	0.360 0
平均多态信息含量 PIC		0.481 6	0.125 0	0.596 9
等位基因总数 total number of alleles		38	16	47
平均等位基因数 average number of alleles		3.166 7	1.333 3	3.916 7

注:“-”表示此等位基因在群体中缺失。

Note:“-” indicates the locus lost in the whole group.

表 4 3 个群体基因杂合度和纯合度

Tab. 4 Gene heterozygosity and homozygosity of the three groups

位点 locus	meio-G1			meio-G2			对照 control		
	观测杂合度 ( $H_o$ )	期望杂合度 ( $H_e$ )	纯合度	观测杂合度 ( $H_o$ )	期望杂合度 ( $H_e$ )	纯合度	观测杂合度 ( $H_o$ )	期望杂合度 ( $H_e$ )	纯合度
	observed heterozygosity	expected heterozygosity	homozygosity	observed heterozygosity	expected heterozygosity	homozygosity	observed heterozygosity	expected heterozygosity	homozygosity
HLJHB07	0.733 3	0.549 2	0.266 7	1.000 0	0.508 5	0.000 0	0.733 3	0.752 0	0.266 7
E125B	0.800 0	0.724 9	0.200 0	1.000 0	0.508 5	0.000 0	0.633 3	0.778 5	0.366 7
E124	0.366 7	0.653 1	0.633 3	1.000 0	0.508 5	0.000 0	0.966 7	0.744 6	0.033 3
E155	0.566 7	0.793 8	0.433 3	0.000 0	0.000 0	1.000 0	0.700 0	0.784 7	0.300 0
E156B	0.166 7	0.602 8	0.833 3	0.000 0	0.000 0	1.000 0	0.700 0	0.692 7	0.300 0
TC14	0.000 0	0.000 0	1.000 0	0.000 0	0.000 0	1.000 0	0.000 0	0.000 0	1.000 0
HLJHB43	0.700 0	0.749 7	0.300 0	0.000 0	0.000 0	1.000 0	0.466 7	0.766 1	0.233 9
TC01	1.000 0	0.508 5	0.000 0	0.000 0	0.000 0	1.000 0	1.000 0	0.508 5	0.000 0
HLJHB28	0.066 7	0.336 7	0.933 3	0.000 0	0.000 0	1.000 0	0.733 3	0.761 0	0.239 0
HLJHB22	0.166 7	0.155 4	0.833 3	0.000 0	0.000 0	1.000 0	1.000 0	0.508 5	0.491 5
HLJHB17	0.533 3	0.660 5	0.466 7	1.000 0	0.508 5	0.000 0	0.700 0	0.823 2	0.176 8
HLJHB01	0.066 7	0.499 4	0.933 3	0.000 0	0.000 0	1.000 0	0.466 7	0.569 5	0.430 5
平均 mean	0.430 6	0.519 5	0.569 4	0.333 3	0.169 5	0.666 7	0.675 0	0.640 8	0.325 0

表 5 3 个群体个体间的遗传相似系数

Tab. 5 Genetic similarity of the three groups between individuals

参数 parameter	meio-G1	meio-G2	对照组 control
遗传相似系数 genetic similarity	0.543 0	1.000 0	0.571 9

表 6 群体间遗传相似系数(对角线上)和遗传距离(对角线下)

Tab. 6 Genetic similarity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among groups

家系 family	对照组 control	meio-G1	meio-G2
对照组 control	-	0.775 7	0.548 5
meio-G1	0.254 1	-	0.471 3
meio-G2	0.600 6	0.752 4	-

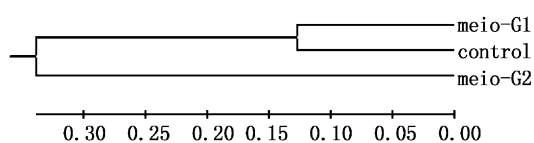


图 2 3 个群体的亲缘关系图

Fig. 2 Dendrogram for three groups

## 2.2 RAPD 结果

### 2.2.1 不同减数分裂雌核发育群体特有 DNA 片段的检出

用 14 个随机引物对 3 个翘嘴鲌群体共 30 个个体的基因组 DNA 进行了 RAPD 分析, 单个引物检测的位点数在 2 ~ 8 之间, PCR 扩增片段的长度在 130 ~ 2 400 bp 之间。14 个随机引物共检测到 199 个位点。其中有部分引物扩增出群体特异

性条带, 如引物 S129 在 meio-G1 中扩增出一条特异的条带(图 3a 中箭头所示), 在 meio-G2 中扩增出两条特异的条带(图 3b 中箭头所示), 且在其他 RAPD 图谱中未发现来自父本鲤基因组的特有条带。

### 2.2.2 多态位点比例

单个引物在 3 个群体中扩增出的位点数、多态位点数及多态位点比例见表 2。结果表明, 14 个随机引物在 3 个群体的基因组 DNA 中分别扩增到 74、61、64 个位点, 检测到的平均位点数分别为 5.3、4.4、4.6 个, 其中多态位点数分别为 47、0、33, 多态位点比例的大小顺序为 meio-G1 (63.51%) > 对照组 (51.56%) > meio-G2 (0)。

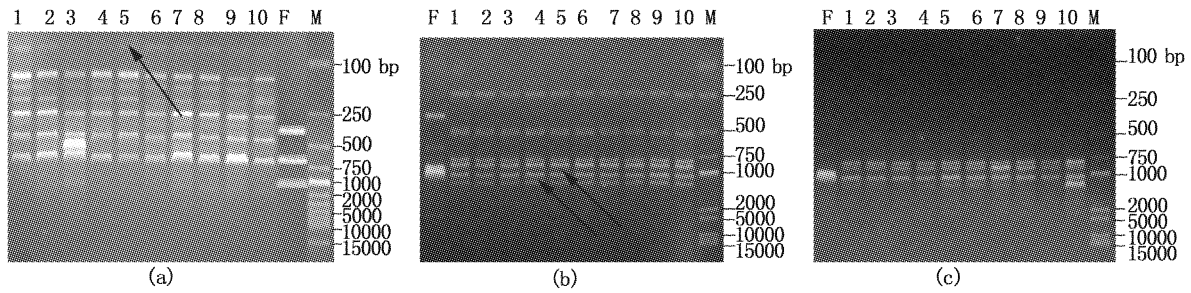


图3 引物 S129 在 3 个群体中的扩增图

Fig.3 RAPD-PCR amplification profile in three groups of primer S129

(a) meio-G1 群体; (b) meio-G2 群体; (c) 太湖对照群体; F 为父本; M 为 D15000 + 2000 DNA marker。

(a) represents meio-G1 population; (b) represents meio-G2 population; (c) represents control population; F. represents father; M. represents D 15000 + 2000 DNA marker.

### 2.2.3 3 个群体内遗传相似度和遗传距离

参照 Nei's 的方法对 3 个群体的群体内遗传相似度和遗传距离进行了计算,3 个翘嘴鲌群体的群体内遗传相似度分别为 0.801 8、1.000 0 和 0.846 0,即 meio-G2 群体的遗传相似度最大,对照组次之,meio-G1 群体的最小;3 个群体内的遗传距离大小顺序相反,meio-G1 (0.198 2) > 对照组 (0.154 0) > meio-G2 (0)。

## 3 讨论

### 3.1 人工诱导减数分裂雌核发育加快了翘嘴鲌基因座位的纯合

利用人工雌核发育技术诱导了连续两代的减数分裂雌核发育翘嘴鲌家系,经 RAPD 标记鉴定,均未发现父本鲤基因组特有的等位基因。在检测的 12 个微卫星基因座位中,发现存在一些杂合位点,这是由卵母细胞减数分裂时同源染色体之间发生交换引起的<sup>[21-23]</sup>。虽然存在一定比例的杂合子,但连续两代雌核发育的诱导加快了翘嘴鲌基因座位的纯合。从群体水平分析,在 12 个微卫星基因座中,meio-G1 群体仅有 1 个基因座纯合,而 meio-G2 有 8 个基因座表现纯合。从纯合度分析,meio-G1 群体在所检测的 12 个微卫星位点上的平均纯合度为 0.569 4, meio-G2 的平均纯合度达到 0.666 7 (表 4),高于对照组和 meio-G1 群体,且个体间的基因型完全相同,个体间的遗传相似系数为 1.000 0,个体间的遗传差异进一步缩小,这和牙鲈<sup>[24]</sup>、大黄鱼<sup>[25]</sup>、草鱼<sup>[26]</sup> 等的研究结果相似。从群体间的遗传分化来看,meio-G2 群体和对照组之间的遗传距离为 0.600 6,

与 meio-G1 的遗传距离也大于 meio-G1 与对照组之间的遗传距离 (表 6),说明 meio-G2 群体已经与对照组和 meio-G1 群体产生了较为明显的遗传分化。这些结果表明,减数分裂雌核发育能加快翘嘴鲌基因座位的纯合速率,使控制优良性状的基因快速纯合化。

### 3.2 meio-G1 和 meio-G2 之间遗传相似系数和遗传多样性最小

本文中 meio-G2 由 meio-G1 诱导而来,但 SSR 结果显示,meio-G2 和 meio-G1 之间遗传相似系数最小,在聚类图上,meio-G1 和对照组聚为一支,meio-G2 自成距离较远的独立分支。原因可能是 meio-G1 作为异质减数分裂雌核发育家系,其母本来自较早捕捞的太湖野生群体,且选用了数尾鱼作为 meio-G1 的母本,由不同母本的卵子诱导而来,其基因组来源复杂,基因高度杂合,导致 meio-G1 子代遗传性状分化显著,meio-G1 个体间具有较高的遗传异质性;而 meio-G2 是由 1 尾一代减数分裂雌核发育雌鱼的卵子诱导获得,是单一家系,meio-G2 在检测的 12 个 SSR 位点中,有 8 个位点为纯合子,纯合度相对较高,经过两次减数分裂雌核发育诱导后,meio-G2 家系内个体的遗传同质性也显著提高,导致了 meio-G2 和 meio-G1 之间遗传相似系数较小。本研究中,减数分裂雌核发育群体的平均等位基因数 ( $A$ )、平均观测杂合度 ( $H_o$ )、平均期望杂合度 ( $H_e$ ) 及平均多态信息含量均明显低于对照组,说明减数分裂雌核发育群体的遗传多样性低于对照组。从群体遗传学角度考虑,对照组群体是自然状态下多条雌、雄鱼的后代,而本研究中的减数分裂

雌核发育群体为 1 尾或较少尾雌鱼的后代;人工诱导减数分裂雌核发育群体可视为经历了极端的遗传瓶颈,在卵子染色体二倍体化的过程中,异源精子只起到激活的作用,并非两性生殖细胞的融合,其后代的遗传物质来自母本,当选用基因组杂合度较低的雌鱼作为母本时,经过减数分裂雌核发育的诱导后,遗传多样性也较低,可见,亲本数量和雌核发育都对其遗传多样性造成了一定的影响。本研究中,meio-G1 在 4 个位点(E156B、HLJHB01、HLJHB22、HLJHB28)有较低的杂合子比例,meio-G2 在 12 个微卫星位点中,有 8 个位点杂合度为 0,meio-G1 在 12 个位点上的平均观测杂合度为 0.430 6,meio-G2 在 12 个位点上的平均观测杂合度为 0.333 3,均低于对照组,这与这些位点距离着丝粒的位置远近有关。在诱导减数分裂雌核发育时,距离着丝粒近的位点,等位基因之间不易发生重组交换,使其杂合子比例较低,遗传多样性较低;距离着丝粒位置远的位点,等位基因之间容易发生重组交换,杂合子比例较高,遗传多样性也较高。在本研究的 12 个微卫星基因座位中,3 个群体在位点 TC14 上都只检测到 145 bp 的条带,基因型完全相同,而 meio-G1 和对照组在位点 TC01 和 HLJHB22 中均表现杂合,且只有两个等位基因,在其他位点所检测的等位基因类型丰富,杂合度较高,可见,分子标记的选择对分析减数分裂雌核发育群体遗传多样性的结果也有较大的影响。

### 3.3 人工诱导减数分裂雌核发育致使翘嘴鲌部分基因位点快速丢失

本研究的 RAPD 结果表明,meio-G1 的多态位点数为 47,占总位点数的 63.51%,而在 meio-G2 群体中,多态位点数为 0,经过连续两代人工诱导雌核发育后,47 个多态性位点在 meio-G2 群体中全部丢失,说明在人工诱导雌核发育的过程中存在 RAPD 位点的快速丢失现象。刘正华等<sup>[27]</sup>的研究结果表明,在湘江流域普通草鱼群体中检测到的 30 个多态位点数,有 17 个在 meio-G2 草鱼群体中丢失。RAPD 位点的快速丢失是基因纯化和人工选择双重作用造成的。当部分 RAPD 位点在 meio-G1 某些个体的基因组中缺失时,人工诱导减数分裂雌核发育过程中这些位点被纯化后,当人工选择的母本是缺失这些位点的个体时,所诱导的减数分裂雌核发育群体中所有

个体就完全检测不到这些位点,造成部分等位基因的丢失。大量等位基因的丢失会导致翘嘴鲌群体适应不同生存环境的能力下降,因此,在利用人工雌核发育技术进行人工育种的同时,还应该注意保护翘嘴鲌群体种质资源的遗传多样性,为遗传育种提供更多的遗传选择性状。

### 3.4 人工诱导减数分裂雌核发育可快速获得翘嘴鲌基因型纯合系

传统的良种选育过程是不断纯合和杂交的过程,建立一个遗传纯系或选育系一般要通过连续数代的近交来完成,不仅时间漫长,还需要大量的资金、场所和人力<sup>[28]</sup>。减数分裂雌核发育能够快速实现纯化,高效率获得高纯度的育种材料,是快速获得纯系近交系的有效途径。翘嘴鲌是我国重要的淡水经济鱼类之一,借助减数分裂雌核发育技术快速培育出优良性状稳定遗传的品系具有重要意义。本课题组利用抑制第二极体释放的方法诱导了两个不同类型的减数分裂雌核发育家系,经 RAPD 标记分析,未发现鲤鱼基因组特异条带。SSR 结果显示,经过连续两代的减数分裂雌核发育后,meio-G2 群体不仅纯合度较对照组和 meio-G1 有了明显的提高,且个体间的基因型完全一致,遗传相似系数已经提高到 1.000 0,这些结果表明 meio-G2 已经是一个遗传特征高度一致的品系。根据 STREINGER 等<sup>[9]</sup>提出的方案,通过对连续两代雌核发育后代进行筛选,结合分子标记辅助育种,从中挑选基因型相同、纯合度高的个体和借助雄性激素转变的生理雄性个体进行交配,就可以在较少的世代数中建立高纯品系,缩短育种时间。由此可见,本研究中诱导培育的 meio-G2 群体为翘嘴鲌良种选育和遗传研究提供了优良材料,对快速选育生长性状优良、抗病、抗逆性强的新品种(系)具有重要意义。

### 参考文献:

- [1] 钱曦,王桂芹,周洪琪,等. 饲料蛋白水平及豆粕替代鱼粉比例对翘嘴红鲌消化酶活性的影响[J]. 动物营养学报, 2007,19(2):182-187.  
QIAN X, WANG G Q, ZHOU H Q, et al. Effect of dietary protein on the activities of digestive enzymes of topmouth culter (*Erythroculter ilishaeformis* Bleeker) [J]. Journal of Animal Nutrition, 2007, 19(2): 182-187.
- [2] 刘波,唐永凯,俞菊华,等. 饲料脂肪对翘嘴红鲌生长、葡萄糖激酶和葡萄糖-6-磷酸酶活性与基因表达的影



- 响[J]. 中国水产科学, 2008, 15(6): 1024 - 1033.
- LIU B, TANG Y K, YU J H, et al. Effects of dietary lipids on growth, GK and G6Pase activities and mRNA levels in topmouth culter (*Erythroculter ilishaefomis* Bleeker) [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(6): 1024 - 1033.
- [3] 王桂芹, 周洪琪, 赵朝阳, 等. 饲料蛋白对翘嘴红鲌蛋白质周转代谢的影响[J]. 水产学报, 2006, 30(2): 246 - 253.
- WANG G Q, ZHOU H Q, ZHAO C Y, et al. The effect of dietary protein on protein turnover of *Erythroculter ilishaefomis* Juveniles [J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(2): 246 - 253.
- [4] 王伟, 陈立侨, 顾志敏, 等. 六个群体翘嘴红鲌肌肉生化组成的比较[J]. 水产学报, 2007, 31(s1): 92 - 99.
- WANG W, CHEN L Q, GU Z M, et al. Comparative study on muscle nutritional quality of six different geographical populations of culter alburnus [J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(s1): 92 - 99.
- [5] 张永正. 翘嘴红鲌人工繁殖技术研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- ZHANG Y Z. Study on artificial propagation and nursing techniques of *Erythroculter ilishaefomis* Bleeker [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.
- [6] 李池陶, 徐伟, 王进, 等. 池塘养殖兴凯湖翘嘴鲌的人工繁殖和胚胎发育观察[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(2): 87 - 91.
- LI C T, XU W, WANG J, et al. The artificial propagation and observation of embryonic development in Xingkai Lake Topmouth culter *Erythroculter ilishaefomis* farmed in a pond [J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2008, 23(2): 87 - 91.
- [7] 张永正, 张海琪, 邵庆均, 等. 翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaefomis* Bleeker)种群遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(6): 581 - 584.
- ZHANG Y Z, ZHANG H Q, SHAO Q J, et al. The Genetic diversity of germplasms of *Erythroculter ilishaefomis* Bleeker revealed by RAPD markers [J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2007, 38(6): 581 - 584.
- [8] 王伟. 翘嘴鲌(*Culter alburnus*)群体遗传多样性及鲌亚科鱼类系统发生的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2007.
- WANG W. Study on population genetic diversity of *Culter alburnus* and Phylogeny of cultrinae [D]. Shanghai: East China Normal University, 2007.
- [9] STREINGER G, WALKER C, DOWER N, et al. Production of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. Nature, 1981, 291(5813): 293 - 296.
- [10] KOMEN H, THORGAARD G H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review [J]. Aquaculture, 2007, 269(1/4): 150 - 173.
- [11] 刘静霞, 周莉, 赵振山, 等. 锦鲤 4 个人工雌核发育家系的微卫星标记研究[J]. 动物学研究, 2002, 23(2): 97 - 105.
- LIU J X, ZHOU L, ZHAO Z S, et al. Studies on microsatellite markers of four artificially gynogenetic families in ornamental carp[J]. Zoological Research, 2002, 23(2): 97 - 105.
- [12] 刘海金, 刘永新, 王玉芬, 等. 牙鲈减数分裂与有丝分裂雌核发育的遗传差异[J]. 水产学报, 2010, 34(6): 898 - 904.
- LIU H J, LIU Y X, WANG Y F, et al. Genetic difference between meiotic gynogenesis and mitotic gynogenesis in the Japanese flounder [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(6): 898 - 904.
- [13] ZHENG K, LIN K D, LIU Z H, et al. Comparative microsatellite analysis of grass carp genomes of two gynogenetic groups and the Xiangjiang river group [J]. Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34(4): 321 - 330.
- [14] LI Y, THANH T, WANG W M. Development of polymorphic microsatellite markers in top mouth culter (*Culter alburnus*) [J]. Conservation Genet Resour, 2010(2): 43 - 46.
- [15] CHEN S Q, LIU Q G, REN S J, et al. Polymorphic microsatellite loci isolated from the top mouth culter (*Culter alburnus* Basilewsky) [J]. Conservation Genet Resour, 2009(1): 337 - 339.
- [16] 张义凤, 孙效文, 鲁翠云, 等. 磁珠富集法制备翘嘴红鲌微卫星分子标记[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(4): 610 - 615.
- ZHANG Y F, SUN X W, LU C Y, et al. Microsatellite enrichment by magnetic beads in *Erythroculter ilishaefomis* (Bleeker) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2008, 16(4): 610 - 615.
- [17] YEH F, YANG R C, BOYLE T, et al. POPGENE: the user-friendly shareware for population genetic analysis [M]. Edmonton: Molecular and Biotechnology Center, University of Alberta, 1997.
- [18] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314 - 331.
- [19] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(10): 5269 - 5273.
- [20] FRANCESCO A, BARBARO A, BERTOTTO D, et al. Assessment of homozygosity and fertility in meiotic gynogens of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. Aquaculture, 2005, 243(1): 93 - 102.
- [21] 王伟, 尤锋, 高天翔, 等. 人工诱导牙鲈异质雌核发育群体的微卫星标记分析[J]. 高技术通讯, 2005, 15(7): 107 - 110.
- WANG W, YOU F, GAO T X, et al. Microsatellite markers analysis on artificial meio gynogenetic stock of *Paralichthys*

- olivaceus [J]. High Technology Letters, 2005, 15 (7): 107 - 110.
- [22] 朱晓琛, 刘海金, 孙效文, 等. 微卫星评价牙鲆雌核发育二倍体纯合性[J]. 动物学研究, 2006, 27(1): 63 - 67.  
ZHU X C, LIU H J, SUN X W, et al. Assessment of homozygosity in gynogenetic diploid using microsatellite markers in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Zoological Research, 2006, 27(1): 63 - 67.
- [23] 李冰霞, 罗琛. 热休克法抑制第一次卵裂实现草鱼雌核发育的细胞学观察[J]. 水生生物学报, 2003, 27(2): 155 - 160.  
LI B X, LUO C. Cytological observations on induction of mitogynogenesis by heat-shocking of the eggs in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003, 27(2): 155 - 160.
- [24] 王桂兴, 刘海金, 张晓彦, 等. 牙鲆连续两代减数分裂雌核发育家系的遗传特征[J]. 中国水产科学, 2012, 19(3): 381 - 389.  
WANG G X, LIU H J, ZHANG X Y, et al. Analysis of homozygosity and genetic similarity between two successive generations in a meiogynogenetic Japanese flounder family [J]. Journal of Fisheries Sciences of China, 2012, 19(3): 381 - 389.
- [25] 叶小军, 王志勇, 刘贤德, 等. 大黄鱼连续两代雌核发育群体的微卫星标记分析[J]. 水生生物学报, 2010, 34(1): 144 - 151.  
YE X J, WANG Z Y, LIU X D, et al. Analysis of genetic homozygosity and diversity of two successive generation meiogynogenetic population in *Pseudosciaena crocea* using microsatellite markers [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 144 - 151.
- [26] 陈金辉, 黄明敏, 郑康, 等. 两个不同的人工雌核发育草鱼群体基因组 DNA 的 RAPD 分析[J]. 水生生物学报, 2004, 28(5): 471 - 477.  
CHEN J H, HUANG M M, ZHENG K, et al. RAPD analysis on genomic DNA of two artificial gynogenetic groups of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2004, 28(5): 471 - 477.
- [27] 刘正华, 陈金辉, 黄明敏, 等. 草鱼基因组 DNA 一些 RAPD 位点的遗传分析及分子标记筛选[J]. 水生生物学报, 2006, 30(3): 292 - 297.  
LIU Z H, CHEN J H, HUANG M M, et al. Genetic analysis on some RAPD Loci for identification of molecular markers in grass carp genomic DNA [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2006, 30(3): 292 - 297.
- [28] 张龙岗, 李娟, 付佩胜. 人工诱导雌核发育技术在淡水鱼类遗传育种研究中的应用[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(7): 1430 - 1434.  
ZHANG L G, LI X, FU P S. Application of artificially induced gynogenesis on research of freshwater Fish [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011, 50(7): 1430 - 1434.

## Analysis of genetic characteristics of two successive generation meiosis gynogenetic population in *Erythroculter ilishaeformis* Bleeker

LI Qian<sup>1</sup>, GU Zhimin<sup>1</sup>, JIA Yongyi<sup>1</sup>, LUO Chen<sup>2</sup>, JIANG Wenping<sup>1</sup>, LIU Shili<sup>1</sup>, LI Fei<sup>1</sup>

(1. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, Zhejiang, China; 2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

**Abstract:** In this study, meiosis gynogenesis was induced in *Erythroculter ilishaeformis* Bleeker using heterologous sperm, and cold-shock was performed to diploidize the female chromosome. The genomes of three groups of *E. ilishaeformis*, namely the Tai Lake group (control group), the first generation artificially induced meiosis gynogenetic group (meio-G1) and the second generation artificially induced meiosis gynogenetic group (meio-G2) were comparatively analyzed by simple sequence repeats (SSR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD). The results of SSR indicated that the numbers of alleles among 12 loci were 38, 16 and 47 respectively, and the average numbers of alleles were 3.166 7, 1.333 3 and 3.916 7 respectively. The average values of observed heterozygosity in the three groups were 0.430 6, 0.333 3 and 0.675 0, and the average homozygosity were 0.569 4, 0.666 7 and 0.325 0. The average similarity indices among individuals within meio-G2 and control group were 1.000 0 and 0.571 9, which were higher than those within the meio-G1 group (0.543 0). The cluster results showed that meio-G1 and control groups cluster together firstly and the meio-G2 group clusters another branch independently. The results of RAPD showed the examined numbers of loci among 14 primers in the three groups were 74, 61 and 64, and the percent of polymorphic loci were 63.51%, 0 and 51.56% accordingly. The genetic similarities calculated according Nei's index were 1 for meio-G2 and 0.849 0 for control group, which were slightly higher than that in meio-G1 (0.801 8). The results of SSR and RAPD markers both indicated that the homozygosity and genetic similarity among individuals in meio-G2 were higher than those in meio-G1 and control group, and the genotypes of all the analyzed individuals in meio-G2 were the same. The meio-G2 family cultured in our study may be a good material in further selective breeding research.

**Key words:** *Erythroculter ilishaeformis* Bleeker; artificial gynogenesis; microsatellite; RAPD; homozygosity