

DOI: 10.12264/JFSC2021-0544

团头鲂“浦江 2 号”连续 2 代雌核发育群体的微卫星遗传结构

张彦锐^{1, 2, 3}, 李宝玉^{1, 2, 3}, 郑国栋^{1, 2, 3}, 邹曙明^{1, 2, 3}

1. 上海海洋大学农业农村部团头鲂遗传育种中心, 上海 201306;

2. 上海海洋大学农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

3. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306

摘要: 为获得团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)的纯合品系, 本研究以团头鲂“浦江 2 号”作为亲本, 采用紫外线灭活的鲤鱼精子刺激团头鲂卵子, 经冷休克抑制第二极体排出的方法获得异源雌核发育一代群体(Meio-G1)和雌核发育二代群体(Meio-G2)。利用筛选出的 20 对微卫星引物, 研究分析了团头鲂“浦江 2 号”正常群体、雌核发育一代群体(Meio-G1)和雌核发育二代群体(Meio-G2)的遗传特征。结果表明, 正常群体、Meio-G1 和 Meio-G2 中, 分别扩增出 129、99、84 个等位基因, 平均等位基因数(N_a)分别为 4.30、3.30、2.80, 平均有效等位基因数(N_e)分别为 3.23、2.24、1.76, 平均观测杂合度(H_o)分别为 0.8067、0.4067、0.1733, 平均纯合度(H)分别为 0.2035、0.6000、0.8263, 平均多态信息含量(PIC)分别为 0.6198、0.4701、0.3628, 表明 Meio-G1 和 Meio-G2 相较于正常群体其遗传多样性下降, 其中 Meio-G2 的遗传多样性最小。Hardy-Weinberg 平衡遗传偏离指数表明 Meio-G1 和 Meio-G2 出现杂合子缺失的现象, 而正常群体则表现为杂合子过剩。聚类分析显示, 正常群体与 Meio-G1 共同汇聚成为一支, 而 Meio-G2 单独成为一支, 产生了一定程度的遗传分化。本研究结果表明, Meio-G2 的纯合度高、遗传多样性低, 是良好的育种材料, 可为团头鲂的选育工作提供重要参考依据。

关键词: 团头鲂; 雌核发育; 微卫星标记; 遗传结构

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)05-0643-10

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)是我国重要的草食性鱼类, 其肉质鲜嫩、营养丰富, 深受人们喜爱。近年来, 由于养殖过程中片面追求生产规模、忽视良种的选育, 团头鲂养殖群体出现了种质资源衰退现象, 其生长性能、抗病以及抗逆的能力开始下降^[1]。人工诱导雌核发育(gynogenesis)通常是指在人为的因素下卵子经遗传失活的精子刺激后, 染色体加倍从而发育成二倍体后代的单性生殖方式^[2]。为了保留亲本的优良性状, 大多数的育种人员通过选择性状优良的母本个体, 运用人工雌核发育技术来获得较为纯合的后代, 从而获得性能良好的后代个体。迄今为止, 研究者已

对部分贝类、鱼类开展了雌核发育研究, 结果显示雌核发育能够快速纯合其遗传物质, 可以使优良性状的基因固定纯化^[3-6]。目前, 李倩等^[7]发现翘嘴鲌(*Culter alburnus* Basilewsky)经过两次雌核发育后群体的平均纯合度为 0.6667, 群体的遗传相似系数已提高到 1.0000, 表明翘嘴鲌连续两代减数发育群体已经是一个遗传特征高度一致的品系。叶小军等^[8]研究结果表明大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)连续两代雌核发育群体具有很高的纯合度, 可用于防止外来基因的污染, 保存良好的种质资源。

目前, 已培育出具有生长性能和耐低氧能力强的团头鲂“浦江 2 号”新品种^[9], 为了以后的育

收稿日期: 2021-11-22; **修订日期:** 2021-12-13.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31572220, 32002381); 国家重点研发计划“蓝色粮仓”项目(2020YFD0900400).

作者简介: 张彦锐(1995-), 男, 硕士研究生; 研究方向: 水产动物遗传育种. E-mail: 806620315@qq.com

通信作者: 邹曙明(1972-), 男, 教授; 研究方向: 鱼类遗传育种工程. E-mail: smzou@shou.edu.cn;

郑国栋(1987-), 男, 博士; 研究方向: 鱼类遗传育种. E-mail: gdzheng@shou.edu.cn

种工作,可以进一步纯化这些优良性状,获得遗传稳定的品系。由于团头鲂性腺发育成熟需要 2~3 年,传统的选育方式耗时费力,然而运用雌核发育技术能够快速提高群体遗传纯合度,只需要一代或者两代就可得到良好的纯系^[10]。本研究以团头鲂“浦江 2 号”、雌核发育一代群体(Meio-G1)和二代群体(Meio-G2) 3 个群体作为研究材料,利用 20 对多态性较好的微卫星引物分析比较各群体间的遗传多样性和纯合度,旨为团头鲂“浦江 2 号”优良性状的进一步纯化奠定基础,并为下一步团头鲂的种质改良提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究采用的团头鲂“浦江 2 号”群体、雌核发育一代群体(Meio-G1)和雌核发育二代群体(Meio-G2)均源于上海海洋大学农业农村团头鲂遗传育种中心。2018 年,通过人工催产团头鲂“浦江 2 号”正常群体的母本,参照邹曙明等^[11]处理方法,利用紫外线照射鲤鱼精子使其遗传失活,刺

激团头鲂(共 25 尾)的卵子,5 min 后将其置于 4 ℃冷水中经过冷休克处理 30 min 获得雌核发育一代群体(Meio-G1)。2020 年,利用性成熟的 Meio-G1(共 25 尾)为雌性亲本,按照上述的方法处理来获得雌核发育二代群体(Meio-G2)。

1.2 群体遗传结构的微卫星标记分析

1.2.1 基因组 DNA 的提取 从团头鲂“浦江 2 号”正常群体、Meio-G1 和 Meio-G2 群体中,均随机采集各 30 尾鱼。每尾鱼均剪取胸鳍放入含有 95%乙醇的试管中,并迅速放到-80 ℃条件下进行保存,使用天根生物有限公司的海洋动物组织基因组试剂盒进行 DNA 的提取。样本的 DNA 提取完成后,检测其质量与浓度,并保存于-20 ℃备用。

1.2.2 微卫星引物筛选和来源 本研究从 92 对微卫星引物中筛选出 20 对较好的、多态性高的微卫星引物,并且每对引物均能扩增出清晰明亮的条带。微卫星引物均来源于参考文献[3,12-13],所选用的引物由生工生物(上海)有限公司合成,微卫星引物序列信息如表 1 所示。

表 1 微卫星引物特征
Tab. 1 Characteristics of microsatellite primers

序号 No.	位点 locus	重复序列 repeat motif	等位基因大小/bp number of alleles	退火温度/℃ T_m	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
1	<i>Mam-EST5</i>	(TG) ₁₅	281-351	59.0	F: TTTCTGCCACTGGAGACC R: TTTGATGATGATTAGAGGAGG
2	<i>Mam-EST12</i>	(TCTT) ₁₃	205-259	54.0	F: TCGTGCGAAGTAAACAAG R: CAGGCAATAATAACAAAACC
3	<i>Mam-EST18</i>	(TC) ₁₀ (AC) ₁₈	206-258	54.5	F: CGAGTAAAATCCCAGAGG R: ATATGCCATTTTCTCACTTC
4	<i>Mam-EST37</i>	(TG) ₈	147-216	62.0	F: CACAAACCATAAACACAG R: AATGCCCATAAAACACAC
5	<i>Mam-EST45</i>	(ATCT) ₂₅	282-380	50.5	F: AGTATAAGTTGAGTGGGTG R: TAAAGGGAAATTCTGGT
6	<i>Mam-EST46</i>	(AC) ₁₉	206-228	50.0	F: ACGGTGTCAGTTCAGCA R: CTCCCACGACAGAAAGA
7	<i>Mam-EST61</i>	(AC) ₁₂	110-170	55.0	F: AATCCAGTCAGAGTCATC R: AGTCGTTTGTGCAAGTAA
8	<i>Mam-EST85</i>	(AC) ₁₂	206-298	57.0	F: CTTACAGACTCCGACAGG R: ATCCACGACTTCCAGAAC
9	<i>Mam-EST99</i>	(CT) ₂₀	208-256	57.0	F: GCGTATGAACGTCAGAGC R: TGTTGGATTATTATGGGATG
10	<i>Mam-EST110</i>	(AC) ₁₃	196-234	62.0	F: CTATTTACAGTTTCATGCTTTCCTC R: ATCCCGTCCGCCGCTTACT
11	<i>Mam-EST158</i>	(CT) ₁₆	117-151	60.0	F: GGTACTGTTTGTGCTGGGC R: CTGCTCACTCACTTATTGTAGGTC

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab. 1 continued)

序号 NO.	位点 locus	重复序列 repeat motif	等位基因大小/bp number of alleles	退火温度/℃ T_m	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
12	<i>Mam-EST841</i>	(ACGA) ₁₄	277-307	54.5	F: ATTGGTCCAGTCTGTTGT R: TGTATCTTGCACGCTCTA
13	<i>Me.Am-1</i>	(AGAAG) ₅	210-275	52.0	F: TGTGGATGCCCTGAGTGAA R: AGAGGCAGAAACAACAGA
14	<i>Me.Am-15</i>	(CATT) ₅	175-200	56.0	F: AGGCGAAAAGAAACACTGTGT R: AATGTGTTTCGTGTGGAGAG
15	<i>TTF1</i>	(CA) ₂₁	273-335	55.9	F: TGGAGATGAAAGCTGAAGGAA R: ATGCACGAAGTCCACATAA
16	<i>TTF2</i>	(CA) ₅ (CT) ₂₁	196-228	55.6	F: AAACAGCTGCTACCCTTGGA R: TTTGCCAGAAGAGCAAATCA
17	<i>TTF3</i>	(TC) ₂₇	224-279	56.4	F: AAGACGCCACGGAAACTTTA R: CTGACCGGATAGCAAAGTGA
18	<i>TTF4</i>	(CA) ₁₄	157-289	60.5	F: GACTGGAGTCGTCAGGCTTC R: TGCCCCACATTGTTAGACTG
19	<i>TTF6</i>	(GA) ₁₃	182-218	60.5	F: GGCAGGTCAGGCACATTTAT R: TCTCTACCTCACATCTCTCATTCT
20	<i>TTF8</i>	(GT) ₁₈	162-224	60.5	F: GGGGAAATAAAGGGAGAAAGTG R: TTTCTCCTGATCCGTTGACC

注: F 为正向引物序列, R 为反向引物序列; *Me.Am-1*–*Me.Am-15*, *Mam-EST5*–*Mam-EST841*, *TTF1*–*TTF8* 源于文献[3,12-13]。
Note: F is the forward primer sequence and R is the reverse primer sequence; *Me.Am-1*–*Me.Am-15*, *Mam-EST5*–*Mam-EST841*, and *TTF1*–*TTF8* are from literatures[3,12-13], respectively.

1.2.3 微卫星的 PCR 扩增体系及其产物检测

PCR 扩增总体系: 10 : 5 (体积比)含染料的 2×Taq PCR MasterMix (Taq DNA Polymerase: 0.1 U/μL; MgCl₂: 4 mmol/L; dNTPs:各 0.4 mmol/L), 上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, 0.5 μL 模板 DNA(30~50 ng), 3.5 μL ddH₂O。扩增程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 50~65 °C (按表 1 的退火温度进行设定) 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物检测: 取 1 μL PCR 扩增产物, 在 8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE)上进行电泳, 采用银染法^[14]染色后铺放在观片灯箱上拍照并统计。

1.3 数据处理和分析

微卫星数据通过 PopGene 软件进行分析, 根据 Botstein^[15]公式计算 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数(*D*), 软件 PIC-CLC 分析各位点的多态信息含量(PIC), 分析结果采用 SPSS 22.0 和 Excel 2018 处理, 采用独立样本 *T* 检验分析差异显著性, 利用群体间遗传距离构建群体之间的聚类关系图。

2 结果与分析

2.1 团头鲂 3 个群体的微卫星结果分析

本研究采用的 20 对微卫星引物均能扩增出

条带清晰、稳定的 PCR 产物, 图 1 为微卫星位点 TTF8 在团头鲂雌核发育群体(Meio-G1)和连续雌核发育群体(Meio-G2)中的扩增电泳图谱。

通过 20 对微卫星引物在 3 个群体中共检测出 312 个等位基因, 其中团头鲂“浦江 2 号”正常群体、Meio-G1 和 Meio-G2 群体分别扩增出 129、99、84 个等位基因, 每个位点检测到 2~5 个等位基因数。数据分析可知(表 2), 对照组、Meio-G1 和 Meio-G2 各群体的平均等位基因数(*N_a*)为 4.30、3.30、2.80, 平均有效等位基因数(*N_e*)为 3.23、2.24、1.76, 平均多态信息含量(PIC)分别为 0.6198、0.4701、0.3628。结果显示(表 3), 对照组、Meio-G1 和 Meio-G2 平均观测杂合度(*H_o*)分别为 0.8067、0.4067、0.1733, 平均纯合度(*H*)为 0.2035、0.6000、0.8263。通过 *T* 检验可知, 经过雌核发育后群体的平均观测杂合度显著(*P*<0.05)低于正常群体, 平均纯合度显著(*P*<0.05)高于正常群体。同时, Meio-G2 群体的平均观测杂合度低于 Meio-G1 群体, 平均纯合度则高于 Meio-G1 群体。除此之外, 根据数据结果可以得出, 团头鲂“浦江 2 号”正常群体的遗传多样性最高, Meio-G1 群体次之, Meio-G2 群体的遗传多样性最低。



图 1 TTF8 引物在团头鲂 Meio-G2 (上图)和 Meio-G1 (下图)中的 PAGE 图谱
M: maker III; 1~30: 团头鲂个体.

Fig. 1 PAGE analysis by primers TTF8 in Meio-G2 (upper), Meio-G1 (lower) populations of *Megalobrama amblycephala*
M: maker III; 1–30: *Megalobrama amblycephala*.

表 2 团头鲂群体在 20 个微卫星位点中的等位基因数、有效等位基因数和多态信息含量
Tab. 2 Number of alleles (N_a), effective alleles (N_e), and the average polymorphic information content (PIC) of 20 microsatellite loci in *Megalobrama amblycephala*

位点 locus	等位基因数 N_a			有效等位基因数 N_e			多态信息含量 PIC		
	对照组 control	Meio-G1	Meio-G2	对照组 control	Meio-G1	Meio-G2	对照组 control	Meio-G1	Meio-G2
<i>Mam-EST5</i>	5.00	4.00	3.00	3.90	2.56	1.51	0.6995	0.5406	0.3092
<i>Mam-EST12</i>	5.00	3.00	3.00	3.98	2.36	1.57	0.7074	0.5065	0.3311
<i>Mam-EST18</i>	5.00	4.00	3.00	3.71	2.55	1.68	0.6865	0.5367	0.3703
<i>Mam-EST37</i>	5.00	3.00	3.00	2.59	1.91	1.79	0.5379	0.3902	0.3585
<i>Mam-EST45</i>	5.00	4.00	3.00	3.70	2.29	1.91	0.6875	0.4763	0.4220
<i>Mam-EST46</i>	4.00	3.00	3.00	2.23	1.46	1.60	0.4976	0.2856	0.3335
<i>Mam-EST61</i>	3.00	3.00	3.00	2.54	2.10	1.92	0.5380	0.4601	0.4122
<i>Mam-EST85</i>	4.00	3.00	3.00	3.33	1.99	1.62	0.6454	0.4450	0.3514
<i>Mam-EST99</i>	3.00	3.00	3.00	2.49	2.13	1.75	0.5258	0.4745	0.3505
<i>Mam-EST110</i>	3.00	3.00	3.00	2.64	1.98	1.62	0.5466	0.4398	0.3212
<i>Mam-EST158</i>	3.00	3.00	2.00	2.42	2.13	1.97	0.5094	0.4211	0.3705
<i>Mam-EST841</i>	3.00	3.00	2.00	2.26	1.94	1.83	0.4778	0.3824	0.3515
<i>Me.Am-1</i>	4.00	2.00	2.00	2.56	1.87	1.83	0.5406	0.3566	0.3515
<i>Me.Am-15</i>	5.00	4.00	3.00	3.97	2.71	2.05	0.7069	0.5593	0.4406
<i>TTF1</i>	5.00	4.00	3.00	3.42	2.69	2.04	0.6519	0.5569	0.4505
<i>TTF2</i>	5.00	3.00	3.00	3.97	2.60	1.57	0.7069	0.5453	0.3095
<i>TTF3</i>	5.00	3.00	3.00	3.42	2.70	2.10	0.6519	0.5523	0.4403
<i>TTF4</i>	5.00	4.00	3.00	4.10	2.41	1.51	0.7166	0.5214	0.3092
<i>TTF6</i>	4.00	3.00	2.00	3.33	1.87	1.51	0.6454	0.4188	0.2819
<i>TTF8</i>	5.00	4.00	3.00	4.10	2.50	1.78	0.7166	0.5322	0.3906
平均 mean	4.30	3.30	2.80	3.23	2.24	1.76	0.6147	0.4435	0.3433

2.2 Hardy-Weinberg 平衡遗传偏离指数

3 个群体中各位点的 Hardy-Weinberg 平衡遗传偏离指数(D)为-0.8473~0.6018, 各位点 D 的平均值为-0.5991~0.1722(表 4)。其中, 团头鲂“浦江 2 号”正常群体 D 的平均值为 0.1722, 大多数位点在该群体中表现为杂合子过剩($D>0$); Meio-G1 和

Meio-G2 的 D 平均值分别为-0.2610、-0.5991, 在这两个群体多数位点出现杂合子缺失($D<0$)且 Meio-G2 更为严重。通过对 20 个微卫星位点进行 Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验, 显著性通过 Bonferroni 校正后, 各位点出现了不同程度的偏离。其中, 正常群体有 10 个位点极显著偏离, 4

个位点显著偏离; Meio-G1 群体有 2 个位点极显著偏离, 5 个位点显著偏离; Meio-G2 群体有 13 个位点极显著偏离平衡, 4 个位点显著偏离平衡 (表 4)。

表 3 团头鲂不同群体在微卫星位点的观测杂合度、期望杂合度和纯合度
Tab. 3 Observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), and homozygosity (H) of microsatellite loci in *Megalobrama amblycephala*

位点 locus	观测杂合度 H_o			期望杂合度 H_e			纯合度 H		
	对照组 control	Meio-G1	Meio-G2	对照组 control	Meio-G1	Meio-G2	对照组 control	Meio-G1	Meio-G2
<i>Mam-EST5</i>	0.9333	0.4667	0.2000	0.7565	0.6198	0.3435	0.0667	0.5333	0.8000
<i>Mam-EST12</i>	0.7333	0.2667	0.1333	0.7616	0.5859	0.3678	0.2667	0.7333	0.8667
<i>Mam-EST18</i>	0.9000	0.7333	0.3667	0.7429	0.6175	0.4130	0.1000	0.2667	0.6333
<i>Mam-EST37</i>	1.0000	0.4333	0.1667	0.6243	0.4842	0.4503	0.0000	0.5667	0.8333
<i>Mam-EST45</i>	0.7000	0.3000	0.1667	0.7418	0.5734	0.4842	0.3000	0.7000	0.8333
<i>Mam-EST46</i>	0.5333	0.2333	0.1333	0.5610	0.3181	0.3825	0.4667	0.7667	0.8667
<i>Mam-EST61</i>	0.6667	0.5333	0.2000	0.6164	0.5316	0.4881	0.3333	0.4667	0.8000
<i>Mam-EST85</i>	0.8000	0.2667	0.2000	0.7119	0.5062	0.3910	0.2000	0.7333	0.8000
<i>Mam-EST99</i>	0.9000	0.3667	0.0667	0.6079	0.5401	0.4367	0.1000	0.6333	0.9333
<i>Mam-EST110</i>	0.7333	0.3667	0.1333	0.6322	0.5034	0.3893	0.2667	0.6333	0.8667
<i>Mam-EST158</i>	0.7000	0.3333	0.1333	0.5966	0.5401	0.4994	0.3000	0.6667	0.8667
<i>Mam-EST841</i>	0.4667	0.3667	0.1000	0.5672	0.4932	0.4627	0.5333	0.6333	0.9000
<i>Me.Am-1</i>	0.7333	0.4667	0.1667	0.6198	0.4723	0.4627	0.2667	0.5333	0.8333
<i>Me.Am-15</i>	0.8000	0.3667	0.2667	0.7610	0.6424	0.5203	0.2000	0.6333	0.7333
<i>TTF1</i>	0.9667	0.4667	0.3000	0.7192	0.6395	0.5181	0.0333	0.5333	0.7000
<i>TTF2</i>	0.8000	0.3667	0.2000	0.7610	0.6254	0.3712	0.2000	0.6333	0.8000
<i>TTF3</i>	0.9667	0.5000	0.2000	0.7192	0.6401	0.5333	0.0333	0.5000	0.8000
<i>TTF4</i>	1.0000	0.5000	0.0667	0.7689	0.5949	0.3435	0.0000	0.5000	0.9333
<i>TTF6</i>	0.8000	0.2667	0.1000	0.7119	0.4723	0.3452	0.2000	0.7333	0.9000
<i>TTF8</i>	1.0000	0.5333	0.1667	0.7689	0.6107	0.4469	0.0000	0.4667	0.8333
平均 mean	0.8067	0.4067	0.1733	0.6875	0.5506	0.4325	0.2035	0.6000	0.8263

2.3 群体间的遗传关系和聚类分析

3 个群体的遗传距离为 0.0608~0.1708, 遗传相似系数为 0.8366~0.9410 (表 5)。其中 Meio-G2 与正常群体之间亲缘关系最远, 它们的遗传距离最大(0.1708), 其遗传相似系数最小为 0.8366; Meio-G1 与正常群体之间的亲缘关系最小, 它们之间的遗传距离最小为 0.0608, 其遗传相似系数最大为 0.9410; Meio-G1 和 Meio-G2 群体之间的遗传距离为 0.0671, 其遗传相似系数为 0.9351。实验数据表明, 随着雌核发育群体世代的增加, 其存在着一定的遗传变异。聚类结果如图 2 所示, 3 个群体聚类分为明显的两支, 正常群体与 Meio-G1 共同汇聚成为一支, Meio-G2 单独成为一支。Meio-G1 与正常群体存在的遗传分化较小, Meio-G2 与正常群体存在的遗传分化较大, 说明经过连续的

雌核发育会存在较大程度上的遗传分化。

3 讨论

3.1 人工诱导连续雌核发育的遗传多样性

微卫星(microsatellite)是一种具有共显性的分子标记, 由几个简单的核苷酸序列串联组成, 广泛存在于真核和原核生物体内^[16], 在水产动物群体遗传和选育系世代的遗传结构分析方面有着重要的价值^[17]。本研究筛选出的 20 对微卫星引物在团头鲂 3 个群体中检测出各位点的平均多态信息含量为 0.3628~0.6198, 具有较好的遗传多样性 (PIC>0.25), 能用于各群体的遗传分析。

等位基因数、杂合度和多态信息含量是研究生物群体遗传变异的重要评价参数^[18]。等位基因数易受到自然选择、漂变、遗传瓶颈等影响, 在

表 4 Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验概率值(P)与遗传偏离指数(D)
Tab. 4 Hardy-Weinberg equilibrium Chi-square test probability value (P) and genetic deviation index (D)

位点 locus	遗传偏离指数 D			偏离 Hardy-Winberg 平衡的显著性 P		
	对照组 control	Meio-G1	Meio-G2	对照组 control	Meio-G1	Meio-G2
Mam-EST5	0.2337	-0.2470	-0.4178	0.0001**	0.0434	0.0018*
Mam-EST12	-0.0372	-0.5448	-0.6376	0.0141	0.0001**	0.0000**
Mam-EST18	0.2115	0.1875	-0.1121	0.0008*	0.3541	0.4017
Mam-EST37	0.6018	-0.1051	-0.6298	0.0000**	0.0000**	0.0018*
Mam-EST45	-0.0563	-0.4768	-0.6557	0.0000**	0.0084	0.0000**
Mam-EST46	-0.0494	-0.2666	-0.6515	0.2184	0.0867	0.0000**
Mam-EST61	0.0816	0.0032	-0.5902	0.0654	0.2154	0.0000**
Mam-EST85	0.1238	-0.4731	-0.4885	0.0008*	0.0007*	0.0001**
Mam-EST99	0.4805	-0.3211	-0.8473	0.0011*	0.0181	0.0000**
Mam-EST110	0.1599	-0.2716	-0.6576	0.0028	0.0023*	0.0005*
Mam-EST158	0.1733	-0.3829	-0.7331	0.0023	0.0550	0.0000**
Mam-EST841	-0.1772	-0.2565	-0.7839	0.1376	0.3902	0.0000**
Me.Am-1	0.1831	-0.0119	-0.6397	0.0000**	0.9467	0.0003**
Me.Am-15	0.0512	-0.4292	-0.4874	0.0001**	0.0065	0.0014*
TTF1	0.3441	-0.2702	-0.4210	0.0003**	0.0000*	0.0028
TTF2	0.0512	-0.4137	-0.4612	0.0000**	0.0009*	0.0342
TTF3	0.3441	-0.2189	-0.6250	0.0003**	0.1064	0.0000**
TTF4	0.3006	-0.1595	-0.8058	0.0000**	0.1857	0.0000**
TTF6	0.1238	-0.4353	-0.7103	0.0008*	0.0017**	0.0000**
TTF8	0.3006	-0.1267	-0.6270	0.0000**	0.1960	0.0000**
平均 Mean	0.1655	-0.2681	-0.5977	0.0734	0.2014	0.1462

注: “*” 表示经邦弗朗尼校正后显著偏离哈迪-温伯格平衡($P<0.05$); “**”表示极显著偏离($P<0.01$).
Note: “*” indicates significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction ($P<0.05$). “**” indicates extremely significant deviations ($P<0.01$).

表 5 群体间的遗传相似系数(对角线上)和遗传距离(对角线下)
Tab. 5 Genetic similarity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between populations

群体 population	对照组 control	Meio-G1	Meio-G2
对照组 control	****	0.9410	0.8366
Meio-G1	0.0608	****	0.9351
Meio-G2	0.1784	0.0671	****

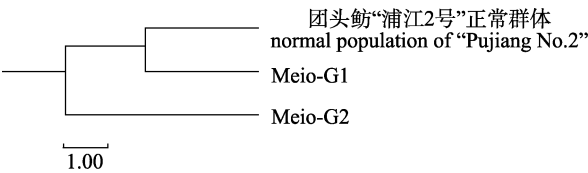


图 2 3 个团头鲂群体的 UPGMA 聚类图
Fig. 2 Dendrogram of relationships among three *Megalobrama amblycephala* populations using UPGMA method of clustering

生物的遗传变异过程中, 物种某遗传位点的积累情况可由等位基因数表现出来, 遗传位点的等位基因数越多, 意味着物种的生物多样性越丰富^[19-20]。

王桂兴等^[21]对牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)连续雌核发育群体的研究发现, 雌核发育后代的等位基因数减少, 遗传多样性降低。本实验结果显示, 团头鲂“浦江 2 号”正常群体的平均等位基因数(4.30)均高于 Meio-G1(3.30)和 Meio-G2(2.80), Meio-G2 值最小, 表明 Meio-G2 在遗传变异的过程中遗传位点的积累情况下降, 其物种的多样性降低。杂合度越高, 其遗传多样性越丰富^[22]; 多态信息含量值越低, 其遗传多样性越简单^[23]。本研究中, 正常团头鲂群体的观测杂合度为 0.8067、远远大于 Meio-G2 的观测杂合度 0.1733, 团头鲂“浦江 2 号”正常群体、Meio-G1 和 Meio-G2 平均多态信息含量分别为 0.6198、0.4701 和 0.3628, 这表明经过连续雌核发育后 Meio-G2 的遗传多样性大大降低。

3.2 Hardy-Weinberg 平衡指数和聚类分析

通常 Hardy-Weinberg 平衡指数的数值越接近 0, 基因型的分布状态越趋于平衡; 数值为负值,

则表示个体中杂合子缺失; 数值为正值, 则表现为杂合子过剩^[24]。团头鲂“浦江 2 号”正常群体的 Hardy-Weinberg 平衡指数部分为正值, 其表现为杂合子过剩; 但 Meio-G1 绝大多数的 Hardy-Weinberg 平衡指数为负值, Meio-G2 全部的 Hardy-Weinberg 平衡指数为负值, 其表现为杂合子缺失, 表明雌核发育能够快速使基因纯合, 并且随世代次数的增加而显著。研究表明, 样本的数量和等位基因的无效化是杂合子缺失的重要影响因素, 此外种群退化、近亲繁殖和人为干扰等都有可能引起基因碱基对的缺失^[25]。本研究所出现的杂合子缺失现象, 可能是选用亲本后代的基因座位点位于染色体着丝点距离较近, 基因重组的几率较小, 等位基因之间不发生重组导致纯合个体的比例增大; 也有可能是随机选择的这些母本自身缺少这些位点, 人工诱导雌核发育后群体中检测不到这些位点, 出现等位基因的缺失, 这与徐湛宁等^[3]研究的团头鲂耐低氧新品系减数分裂雌核发育群体的研究结果相符。

通过 20 个微卫星位点在 3 个群体中的分布情况并计算出遗传距离和构建聚类分析图, 可以较为直观地得出连续雌核发育群体的遗传变异情况。一般来讲, 遗传距离越大其亲缘关系越疏远, 相似系数也就越小, 遗传变异程度就越大^[26]。本研究中的 Meio-G2 是由 Meio-G1 雌核发育诱导而来, 但微卫星结果显示, Meio-G2 和 Meio-G1 之间的遗传距离(0.0671)大于 Meio-G1 与正常群体的遗传距离(0.0608), Meio-G1 与正常群体的遗传相似系数为 0.9410, 与 Meio-G2 的遗传相似系数为 0.9350。王桂兴等^[21]研究牙鲈雌核发育时发现, 牙鲈的 Meio-G1 与正常群体的遗传相似系数为 0.9166, 与 Meio-G2 的遗传相似系数为 0.9304, 这也表明经过减数分裂雌核发育群体仍具有很高的遗传相似性, 能够很好地保留母本的性状。本研究构建的聚类分析图显示, Meio-G1 与正常群体先聚为一支, 然后再与 Meio-G2 聚为一支, 这同翘嘴鲌^[8]和大黄鱼^[9]连续减数雌核发育所构建的聚类分析图相一致, 而唐首杰等^[27]研究认为团头鲂“浦江 1 号”Meio-G1 与 Meio-G2 首先聚为一支, 然后再与正常群体聚为一支。上述现象出现的原

因可能是本研究中所选取诱导 Meio-G1 的母本数量较多, 其基因来源较为复杂, 从而使 Meio-G1 的产生较大的遗传分化; Meio-G2 是以 Meio-G1 作为母本减数雌核发育而来, 其遗传结构更加纯合, 导致 Meio-G2 群体的遗传分化程度继续降低, 与正常群体的遗传距离加大。

3.3 人工连续雌核发育能够快速获得纯合品系

人工诱导雌核发育是一种快速获得纯合群体的重要方式, 科研人员相继在鲤(*Cyprinus carpio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)等多种淡水鱼及洄游性鱼类中进行人工雌核发育的诱导并取得成功^[28]。人工诱导雌核发育理论上讲, 都是在减数分裂过程中通过抑制极体不能正常排出, 获得发育正常的二倍体, 虽然抑制第一极体排出能得到 100% 的纯合个体, 但其难度较大, 很难获得大量后代, 因此通常采用抑制减数第二次分裂阻止第二极体的释放, 从而来获得目标的群体^[29]。本研究是采用抑制减数第二次分裂的方式来进行人工雌核发育诱导出 Meio-G2, 经统计结果显示, Meio-G2 的纯合度为 0.6333~0.9333, 其中 *Mam-EST99* 与 *TTF4* 微卫星位点的纯合度最大(0.9333), *Mam-EST18* 微卫星位点的纯合度最小(0.6333)。本研究通过 20 对微卫星位点对雌核发育群体的检测发现: 微卫星位点的纯合情况与雌核发育世代的增加呈正比例变化, 即世代越增加位点越纯合化。例如 *TTF4* 在正常群体中完全杂合, 其在 Meio-G1 的纯合度达到 0.5000, 在 Meio-G2 的纯合度到达峰值 0.9333。但不同位点的纯合速度是不同的, 如 *Mam-EST46* 在 Meio-G1 的纯合度就达到 0.7667, *TTF1* 和 *Me.Am-15* 在 Meio-G2 的纯合度分别为 0.7333、0.7000。此外, 本研究中 Meio-G2 平均纯合度已达到 0.8263, 这比团头鲂“浦江 2 号”正常群体的平均纯合度(0.2035)要高出 0.6228, 相较于 Meio-G1(0.6000)高出 0.2263, 这就表明 Meio-G2 已经成为具有很高遗传特征的品系。

综上所述, Meio-G2 的遗传多样性下降, 但纯合度显著提高, 能够有效的纯化和固定母本群体的优良基因。若对具有优良养殖性状的鳊鲂鱼类进行连续雌核发育诱导, 获得高度纯合的品系,

可极大地缩短育种年限, 显著提高鳊鲂类的遗传育种效率。

参考文献:

- [1] Cao J L, Wang W M. Construction of a high-density genetic linkage map and QTL mapping for gender of *Megalobrama amblycephala*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2021, 40(2): 188-196. [曹景龙, 王卫民. 团头鲂高密度遗传连锁图谱的建立及性别 QTL 定位[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(2): 188-196.]
- [2] You F, Wu Z H. Progress in the study and application of chromosome manipulation in marine fishes from China[J]. Marine Sciences, 2020, 44(8): 69-84. [尤锋, 吴志昊. 我国海水鱼类染色体操作研究与应用进展[J]. 海洋科学, 2020, 44(8): 69-84.]
- [3] Xu Z N, Li F G, Zheng G D, et al. Analysis of genetic structure of gynogenetic population in new strain of hypoxia-tolerant *Megalobrama amblycephala* using microsatellite markers[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(3): 330-338. [徐湛宁, 李福贵, 郑国栋, 等. 团头鲂耐低氧新品系雌核发育群体遗传结构的微卫星分析[J]. 水产学报, 2017, 41(3): 330-338.]
- [4] Yang F Y, Yang A G, Liu Z H, et al. Microsatellite analysis of artificial gynogenesis in the scallop, *Chlamys farreri*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(5): 680-686. [杨凤影, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 人工诱导栉孔扇贝雌核发育后代的微卫星标记分析[J]. 水生生物学报, 2008, 32(5): 680-686.]
- [5] Liu J X, Zhou L, Wei L H, et al. Microsatellite marker analysis on artificially gynogenetic pure line of red-white ornamental carp[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003, 27(6): 557-562. [刘静霞, 周莉, 魏丽华, 等. 红白锦鲤人工雌核发育纯系的微卫星标记分析[J]. 水生生物学报, 2003, 27(6): 557-562.]
- [6] 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. [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.]
- [7] Li Q, Gu Z M, Jia Y Y, et al. Analysis of genetic characteristics of two successive generation meiosis gynogenetic population in *Erythroculter ilishaeformis* Bleeker[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(1): 1-11. [李倩, 顾志敏, 贾永义, 等. 翘嘴鲌连续两代减数分裂雌核发育群体的遗传特征分析[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(1): 1-11.]
- [8] Ye X J, Wang Z Y, Liu X D, et al. Analysis of genetic homozygosity and diversity of two successive generation meio-gynogenetic population in *pseudosciaena crocea* using microsatellite markers[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 144-151. [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.]
- [9] Ministry of agriculture and rural affairs. Ministry of agriculture and rural affairs announced 14 new aquatic products[J]. Aquatic Science and Technology Information, 2020, 47(5): 292. [农业农村部. 农业农村部公布 14 个水产新品种[J]. 水产科技情报, 2020, 47(5): 292.]
- [10] Wu P. Progress and prospect of fish gynogenesis studies in China[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2004, 13(3): 255-260. [吴萍. 我国鱼类雌核发育研究的进展及前景[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(3): 255-260.]
- [11] Zou S M, Li S F, Cai W Q, et al. Establishing gynogenetic groups of genetic improved *Megalobrama amblycephala* and its genetic analysis[J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(4): 311-316. [邹曙明, 李思发, 蔡完其, 等. 团头鲂良种雌核发育群体的建立及其遗传变异[J]. 水产学报, 2001, 25(4): 311-316.]
- [12] Luo W. EST-SSR markers development and application in selective breeding of blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014. [罗伟. 团头鲂 EST-SSR 的开发及在育种中的应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.]
- [13] Tang S J, Li S F, Cai W Q. Development of microsatellite markers for blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* using 5' & apos;-anchored PCR[J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(3): 971-974.
- [14] Zhang Q Q, Chen J, Jiang X Y, et al. Establishment of DNA fingerprinting and analysis on genetic structure of different *Parabramis* and *Megalobrama* populations with microsatellite[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(1): 15-22. [张倩倩, 陈杰, 蒋霞云, 等. 不同鳊鲂鱼类群体微卫星 DNA 指纹图谱的构建和遗传结构分析[J]. 水产学报, 2014, 38(1): 15-22.]
- [15] 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.
- [16] Wang Y F, Li C J, Pan C L, et al. Alterations to transcriptomic profile, histopathology, and oxidative stress in liver of pikeperch (*Sander lucioperca*) under heat stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 95: 659-669.
- [17] Wang N, Zhou J X, Xu H, et al. Review of SSR research in aquaculture[J]. Hebei Fisheries, 2021(9): 27-31, 37. [王宁,

- 周金旭, 徐浩, 等. SSR 在水产养殖中的研究进展[J]. 河北渔业, 2021(9): 27-31, 37.]
- [18] Yang H, Li D Y, Cao X, et al. Genetic potential analysis of six *Tilapia* populations by microsatellite DNA markers[J]. *Hereditas*, 2011, 33(7): 108-115. [杨弘, 李大宇, 曹祥, 等. 微卫星标记分析罗非鱼群体的遗传潜力[J]. 遗传, 2011, 33(7): 108-115.]
- [19] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations[J]. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 1975, 29(1): 1-10.
- [20] Li H G, Xu J H, Du H Y, et al. Preliminary construction of core collection of *Eucommia ulmoides* based on allele number maximization strategy[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2018, 54(2): 42-51. [李洪果, 许基煌, 杜红岩, 等. 基于等位基因最大化法初步构建杜仲核心种质[J]. 林业科学, 2018, 54(2): 42-51.]
- [21] 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 Fishery Sciences of China*, 2012, 19(3): 381-389. [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.]
- [22] Kim M J, Wang A R, Kim S S, et al. Development and validation of microsatellite markers for the tiny dragonfly, *Nannophya pygmaea* (Odonata: Libellulidae), which is endangered in South Korea[J]. *Applied Entomology and Zoology*, 2018, 53(1): 151-156.
- [23] Missio R F, Caixeta E T, Zambolim E M, et al. Polymorphic information content of SSR markers for *Coffea* spp.[J]. *Cropps Breeding and Applied Biotechnology*, 2010, 10(1): 89-94.
- [24] Li P F, Liu P, Liu X Z, et al. Isozyme polymorphism in *Paralichthys*, *Paralichthys lethostigma*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(1): 13-19. [李鹏飞, 刘萍, 柳学周, 等. 漠斑牙鲆引进种群同工酶的遗传多态性分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(1): 13-19.]
- [25] Antoro S, Na-Nakorn U, Koedprang W. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers[J]. *Marine Biotechnology (New York, N Y)*, 2006, 8(1): 17-26.
- [26] Shao C W, Liao X L, Tian Y S, et al. Microsatellite marker analysis of genetic structures of three populations of cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(1): 41-46. [邵长伟, 廖小林, 田永胜, 等. 牙鲆 3 个养殖群体遗传结构的微卫星分析[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(1): 41-46.]
- [27] Tang S J, Li S F, Cai W Q. Analysis of genetic homozygosity and diversity of three successive generations of meiogynogenetic population in *Megalobrama amblycephala* using microsatellite markers[J]. *Freshwater Fisheries*, 2014, 44(2): 3-8. [唐首杰, 李思发, 蔡完其. 团头鲂连续三代减数雌核发育群体遗传变异的微卫星分析[J]. 淡水渔业, 2014, 44(2): 3-8.]
- [28] Komen H, Thorgaard G H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review[J]. *Aquaculture*, 2007, 269(1-4): 150-173.
- [29] Zhang X H, Xia X M, Luo W, et al. Microsatellite marker analysis of artificial gynogenetic *Megalobrama amblycephala*[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2012, 31(6): 737-743. [张新辉, 夏新民, 罗伟, 等. 团头鲂雌核发育后代的微卫星标记分析[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(6): 737-743.]

Microsatellite genetic structure analysis of two successive generations of gynogenetic populations of *Megalobrama amblycephala* “Pujiang No. 2”

ZHANG Yanrui^{1,2,3}, LI Baoyu^{1,2,3}, ZHENG Guodong^{1,2,3}, ZOU Shuming^{1,2,3}

1. Genetics and Breeding Center for Blunt Snout Bream, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: To breed a *Megalobrama amblycephala* “Pujiang No.2” pure strain, *M. amblycephala* varieties “Pujiang No.2” were selected as breeding parents, using UV-inactivated carp sperm stimulation of *M. amblycephala* eggs. Cold shock was used to inhibit second polar body eduction for the heterogeneous gynogenesis (Meio-G1) and gynogenesis second- (Meio-G2) generation groups. The genetic characteristics of “Pujiang No.2” normal population, Meio-G1, and Meio-G2 populations of *M. amblycephala* were analyzed using twenty pairs of microsatellite primers. The results showed that 129, 99, and 84 alleles were amplified from the normal population, Meio-G1, and Meio-G2, respectively. The average number of alleles (N_a) was 4.30, 3.30, and 2.80, and the average number of effective alleles (N_e) was 3.23, 2.24, and 1.76 for the three groups, respectively. The average observed heterozygosity (H_o) was 0.8067, 0.4067, and 0.1733; the average homozygosity (H) was 0.2035, 0.6000, and 0.8263; and the average polymorphic information content (PIC) was 0.6198, 0.4701, and 0.3628, respectively. The results showed that the genetic diversity of Meio-G1 and Meio-G2 decreased compared to that of the normal population, and the genetic diversity of Meio-G2 was the least. The mean Hardy-Weinberg index of Meio-G2 and Meio-G1 showed a heterozygote deficit, as did the gynogenetic normal population. Using the unweighted pair-group method with arithmetic means method based on their genetic distances, the normal and Meio-G1 populations were grouped into one cluster, while the Meio-G2 population was classified into another cluster, indicating a genetic differentiation between the two clusters. The results showed that Meio-G2 was a good breeding material, with high purity and low genetic diversity, providing an important reference value for breeding of *Megalobrama amblycephala*.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; gynogenesis; microsatellite; genetic structure

Corresponding author: ZOU Shuming. E-mail: gdzheng@shou.edu.cn;
ZHENG Guodong. E-mail: gdzheng@shou.edu.cn