

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2014.01089

微卫星分离模式显示雄性三倍体鲫产生非整倍体精子

程磊, 曹顶臣, 鲁翠云, 李超, 孙效文

中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 农业部淡水水产生物技术与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070

摘要: 三倍体鲫(*Carassius auratus*)行天然雌核发育, 其自然种群中却有较高比例的雄性个体, 这些雄性个体的性腺发育正常, 能产生有活力的精子。而且其精子的 DNA 含量约为体细胞的一半, 显示三倍体鲫精子发生过程中可能经历了均等的减数分裂。流式细胞术虽然能够较准确地测定细胞群的平均 DNA 含量, 但是却很难检测到单个精子中的个别染色体增减, 要明确回答雄性三倍体鲫产生的精子是否为整倍体需要定量地检测单个精子的遗传组成。本研究用微卫星标记检测以雌性鲤(*Cyprinus carpio*)与雄性三倍体鲫为亲本构建的杂种家系的基因型, 结果发现母本鲤的多态位点在子代中呈孟德尔分离, 父本三倍体鲫具有三套鲫基因组, 其等位基因在子代中呈随机分离。上述研究结果提示: 三倍体鲫起源于二倍体鲫的同源加倍, 而非二倍体鲫和鲤的种间杂交; 三倍体鲫通过染色体的随机分离产生非整倍体的精子, 其精子发生过程中没有均等的减数分裂。三倍体鲫行雌核发育生殖, 却可能并非起源于种间杂交且群体中的雄性个体可育, 因而是单性生殖鱼类中的一个特例。

关键词: 鲫; 三倍体; 微卫星; 分离模式; 非整倍体

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2014)06-1089-09

鲫(*Carassius auratus*)是重要的淡水养殖鱼类, 其中不仅有体细胞具有 100 条染色体的二倍体生物型, 也有体细胞分别有约 150 和 200 条染色体的三倍体和四倍体生物型^[1]。脊椎动物的多倍化往往会破坏正常的减数分裂, 从而导致多倍体生物型不育^[2], 但是已知有多种多倍体鱼类能够通过单性生殖的方式克服减数分裂的障碍^[3]。就鲫而言, 二倍体生物型行两性融合生殖, 而三倍体和四倍体生物型则通过雌核发育繁育后代^[1]。鱼类的雌核发育是一种精子依赖型的孤雌生殖(sperm dependent pathogenesis), 雌核发育过程中卵子需要受精方能启动胚胎发育, 但是除了可能存在的少量父本遗传物质的渗入, 作为精子供体的父本对子代没有遗传贡献^[3-5]。由于只有母本将其基因组传递给后代, 雌核发育鱼类通常是全雌性的^[3-5]。

不同于一般的雌核发育鱼类, 三倍体鲫自然群体中可能有高达 25% 的雄性个体^[6-7]。三倍体鱼类的雄性个体通常是部分或完全不育的^[8], 而雄性三倍体鲫的性腺发育正常并能产生有活力的精子, 能诱导三倍体鲫的卵子雌核发育^[1, 9-13]。自 1984 年以来, 有多个实验室发现和证实三倍体鲫精子的 DNA 含量约等于其体细胞 DNA 含量的一半^[1, 9, 14-15]。基于这些观察和实验结果, 学者们多认为雄性三倍体鲫能够通过正常的减数分裂产生精子, 即精母细胞复制了的染色体能够平均地分配到四个配子之中^[1, 9, 14]。鲤科鱼类的基础染色体数是 48~50, 而目前做过核型分析的鲤亚科鱼类除多倍体鲫外均有 100 条染色体^[16], 多项研究已经指出鲤亚科可能起源于异源四倍体祖先^[17-18], 因此也有学者将三倍体鲫和四倍体鲫分别视为六倍体和八倍体^[19]。在核型分析中, 三倍体鲫的核

收稿日期: 2014-05-21; 修订日期: 2014-07-23.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271010); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(HSY201304).

作者简介: 程磊(1982-), 副研究员, 博士, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: chenglei1982@126.com

通信作者: 孙效文, 研究员, 博士生导师, 研究方向为水产生物技术及基因组学. E-mail: sunxw2002@163.com

型也常常被按照二倍体的方式而不是三倍体的方式来排列^[6, 20]。有学者认为三倍体鲫是偶数倍性的, 也就是说它们或者保持了古老的六倍体特征或者已经基本重新实现了二倍化, 因而能通过正常的减数分裂产生整倍性的“减数”精子^[1, 6, 9, 20]。

Flajšhans 等^[15]利用流式细胞术测定了三倍体鲫精子的 DNA 含量, 他们虽然也发现其精子 DNA 含量约为体细胞的一半, 但是却指出三倍体鲫精子的 DNA 含量变化幅度要比二倍体鲫精子的大得多, 三倍体鲫的精子可能是非整倍体。流式细胞术虽然能够较准确地测定细胞群的平均 DNA 含量, 但是却很难检测到单个精子中的个别染色体增减。要明确回答雄性三倍体鲫产生的精子是否为整倍体, 需要定量地检测单个精子的遗传组成。与 Xiao 等^[1]的研究类似, 我们发现雌性二倍体鲫或鲤与雄性三倍体鲫交配, 受精卵虽然不能孵化出正常的鱼苗, 但是受精率却几乎和二倍体间的两性生殖相当, 其胚胎直到发眼卵阶段的存活率都很高, 是检测配子基因型的良好材料。微卫星是一种具有高度多态性并呈共显性遗传的分子标记, 非常适合用来监测配子发生过程中的染色体行为^[21]。由于多数的微卫星等位基因在三倍体鲫和二倍体鲫间是共享的^[22-24], 相较而言以鲤和三倍体鲫分别作为母本和父本将能大大提高杂种家系中微卫星的多态性。本研究中, 我们用微卫星标记分析了以雌性鲤与雄性三倍体鲫为亲本的杂种家系的基因型, 并据此探讨了三倍体鲫的遗传组成和精子发生过程中的染色体行为。

1 材料与方法

1.1 人工授精

人工注射人绒毛膜促性腺激素(Human Chorionic Gonadotropin, HCG)辅以促黄体素释放激素 A2(Luteinizing Hormone Releasing Hormone Domperidone A2, LHRH-A2)和马来酸地欧酮(Domperidone Maleate, DOM)对鲤(*Cyprinus carpio*)和三倍体鲫(*Carassius auratus*)进行催产。从 1 尾激素催产的雌性鲤中采集约 2 000 粒成熟的卵子, 向卵子中加入约 0.5 mL 三倍体鲫的精液并充分

混匀, 随后将精卵混合物均匀洒在一装满曝气水的不锈钢面盆(直径约 36 cm)中。5 min 后, 更换新鲜的曝气水进行孵化, 受精和孵化的水温约 18℃。由于杂种胚胎会在孵化出膜前死亡, 本研究在受精后约 45 h 收集杂种胚胎, 获得 288 个胚胎样本。杂种胚胎浸泡在 95% 的酒精中于 -20℃ 保存备用。亲本则剪取鳍条组织放在滤纸上干燥后保存备用。

1.2 微卫星分型

用蛋白酶 K 消化, 酚氯仿抽提的方法从保存的鱼鳍组织和胚胎中纯化总 DNA。PCR 扩增体系为 10 μL, 含正、反向引物各 3 pmol, 200 μmol/L dNTPs, 20 ng DNA 模板, 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶(Promega, cat. no. M1665)和 1×PCR 缓冲液。PCR 反应程序如下: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 50~65℃退火 30 s (表 1), 72℃延伸 30 s, 扩增 35 个循环; 最后 72℃终延伸 15 min。在预实验中, 以亲本 DNA 为模板优化扩增条件, 筛选在亲本中扩增良好并有多态性的位点。选定的位点进一步检测 288 个杂交子代胚胎的基因型。用于基因型检测的微卫星标记来源于本实验室自行开发及相关文献报道(表 1)^[25-27], 杂交家系各个位点的基因型见表 2。PCR 产物用 8% 中性 PAGE 胶电泳分离, 如果等位基因的大小差别不大、在中性 PAGE 胶中不能很好的分离, 则改用 6% 测序 PAGE 胶电泳分离, 所有 PAGE 胶均用银染法显色。中性 PAGE 胶中用 20 bp DNA adder (Takara, cat. no. 3420A)为分子量标准, 测序 PAGE 胶中用 10 bp DNA ladder (Invitrogen, cat. no. 10821-015)为分子量标准, 等位基因大小用 Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, Inc.)软件加以判读。

1.3 标记记录与分离比检验

由于多倍体的每个座位有可能出现多种不同的基因型, 多倍体的基因型统计要比二倍体困难得多。Wu 等^[28]建议多倍体中每个等位基因可以按照显性标记统计, 这意味着每条电泳条带将被视为一个独立的标记, 每个个体的基因型可以用一系列具有不同浓度水平的显性标记来表示。每个标记用微卫星引物名称和等位基因大小来表示,

表 1 本研究用到的 20 个微卫星位点的信息
Tab. 1 Information of 20 microsatellite loci that used in this study

位点 locus	GenBank 登录号 GenBank accession no.	核心重复 repeat motif	正向引物(5'-3') forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') reverse primer(5'-3')	退火温 度 T_a / $^{\circ}\text{C}$
HLJYJ004	FJ827508	(CAG) ₁₈ *	GAGCCCGTGTTACAGACAGC	CATCCATGACCGACAGACAC	65
HLJYJ008	FJ827509	(AC) ₁₁	ATCGATCGCTCCGTGTGTTA	AGGAAAAATGCTCCCAAACC	55
HLJYJ015	FJ827511	(ACAG) ₅ (ATAG) ₈	AAACCGTCCAGGCTGAATAC	CTGTCTGGGTAGAGGCCTATCT	50
HLJYJ018	FJ827513	(AGAC) ₉ (AGAT) ₂₄	TCTGCCCAGTGACATAATTTTC	TGCAAGGAGAGTCTCAGCAA	65
HLJYJ092	FJ827529	(GCT) ₁₈	GCGCTGATTCTGTTGCATTA	GGCCATTAAAGAGGAGGTCA	55
HLJYJ094	FJ827548	(AGC) ₂₇ *	GGAGACTGCAGAAGGAAAGG	TCACCTTGCTCACACGAAAG	65
HLJYJ123	FJ827561	(TGC) ₃ (TGT) ₆	TGCAGATGTTTCTGTTGTTGGT	TTCATCGTCAGCACCAGATG	50
HLJYJ143	HM449131	(TGA) ₁₆	GCAGGATTCTCTCCGCTCTG	TTCTGCAGTGAGCAGCATGT	50
HLJYJ175	HM449146	(TCA) ₁₃ *	GAAATTTCTCGCGCAGAGTC	TCAGGAGCCTGTGGTTGAAT	65
HLJYJ177	HM449147	(GAT) ₁₆ *	GCTGACAGAGTTGTTGTTGAGT	CAGCATCGGATTGTCAGCTA	60
HLJYJ179	HM449148	(TCA) ₁₁ *	TGGGATGTAACCGTTGATGA	CAGATGTGGACATTGGATTTG	65
HLJYJ192	HM449155	(AC) ₁₃ (AG) ₅	TGATGGAGAATCTTTACCTGTGTG	CATTCCCTTGTGTCTGCGTCT	60
HLJYJ193	HM449156	(GAT) ₁₁	ACGCAGACACAAGGAATGAT	TTCATCAGCTGGTACTGCAAA	65
HLJYJ205	HM449159	(TGA) ₁₄ *	CTCGGACAGATGTGACGATG	TTCACACGTGTCACATGACCT	65
HLJL2560	JF764887	(AC) ₉	GTCAGGCTCTTGGCTTGTTT	TGTGCTCTGTCTAACCTTTGG	60
HLJL3130	N/A	(ATT) ₆	TGGTTGAGAGCTGAGCCATA	TGAGGCCATGCTGAAAATAG	60
HLJL3727	JN687079	(AAAC) ₁₆	TTGATTACAGAACACTCCCCTATC	TCACAACCAGCCCAACTTT	60
GF17	U35616	(GT) ₈	GGAAGTAGAGCCCACTGACA	TGCATTGGGAGACGATA	65
GF29	U35618	(TG) ₁₃ *	ATGCTAGGTGACTGTTTGT	CACCTCCACTCCTAATAAT	60
YJ0004	EF532920	(GATA) ₁₄	CATAGAGGCGTTTCATAGAG	CAGATAAATACAGTAAGCCA	50

注: “*”表示为非完美重复。

Note: “*” indicates imperfect repeat.

每个个体的基因型以“1”和“0”代表条带的有无加以记录。用 Excel 软件(Microsoft, Inc.)中卡方检验来检测每个标记的分离比是否符合理论预期。

2 结果与分析

2.1 杂种家系的微卫星组成

本研究中共筛选了 48 对鲫的微卫星引物和 10 对鲤的微卫星引物, 其中 46 对引物扩增出了预期大小的产物, 挑选出其中 20 对扩增较好的引物检测了共计 288 个子代的基因型。值得注意的是 HLJYJ175 标记似乎遗留了鲤亚科鱼类基因组的加倍特征, 它能在父本三倍体鲫中扩增出 4 条带, 而在母本鲤中扩增出 2 条在子代中不分离的条带。除了 HLJYJ175 外, 所有的引物对均只能在三倍体鲫中扩增出 1~3 条带, 而在二倍体鲤中扩增出 1~2 条带。这 20 个引物组合在本家系中共扩增出 56 条 DNA 条带, 其中 45 条 DNA 条带来源

于父本三倍体鲫, 14 条 DNA 条带来源于母本鲤, 有 3 条 DNA 条带是父、母本之间共享的, 有 7 对鲫引物(HLJYJ092、HLJYJ123、HLJYJ143、HLJYJ175、HLJYJ177、HLJYJ179 和 HLJYJ205)能同时在鲤中扩增出同源产物。

父本中那些没有遗留加倍特征的位点可以分成 3 种类型: (I) 完全杂合型, 即由 3 个大小均不相同的等位基因组成, 如 HLJYJ008、HLJYJ018、HLJYJ094、HLJYJ143、HLJYJ175、HLJYJ177、HLJYJ179、HLJYJ193、HLJYJ205、GF17、GF29 和 YJ4 12 个位点; (II) 部分杂合型, 由 2 份相同大小的等位基因和 1 份大小不同的等位基因组成, 如 HLJYJ004、HLJYJ015、HLJYJ123 和 HLJYJ177 共计 4 个位点; (III) 纯合型, 由 3 份大小相同的等位基因组成, 如 HLJYJ92 位点。HLJYJ192 位点有两个大小不同的等位基因, 从父本基因看该位点应该为部分杂合型。但是这两个等位基因在子

代中均符合 1:1 分离预期, 推测 HLJYJ192 位点可能还存在一个未被检测的零等位基因(Null allele), 因此该位点应为完全杂合型。

2.2 杂种家系的微卫星分离模式

母本鲤所有 14 条 DNA 条带中有 12 条在杂种家系中呈现正常的孟德尔分离, 即纯合的位点在子代中不分离, 而杂合的位点按照 1:1 的比例分离, 并且每个配子只会继承母本的一个等位基因。虽然每个杂种胚胎均只继承母本鲤 HLJL3130 位点的一个等位基因, 但是 HLJL3130 位点的两个等位基因则偏离预期的 1:1 分离比($P<0.01$)。如果我们假定父本三倍体鲫的精子发生过程中每条染色体是随机分配的, 每个等位基因进入精子细胞中的概率是 1/2, 则父本的 3 种类型的位点在子代中的分离模式如图 1 所示。父本的 45 条 DNA 条带分离情况如下: (1) 有 3 条 DNA 条带与母本不分离条带大小相同, 因而在子代中检测不到分离; (2) 有 37 条 DNA 条带在子代中符合 1:1 的分离预期; (3) 有 4 条 DNA 条带应由大小相同的两个等位基因组成, 在子代中应该呈 3:1 分离, 但是其中 2 条带偏离了该分离预期; (4) 有 1 条 DNA 条带由 3 个大小相同的等位基因组成, 该位

点在子代中符合 7:1 的分离预期。杂种家系各个位点分离比及相应的卡方检验结果见表 1, 基于父本等位基因随机分配到配子中的分离比预期几乎被所有位点的所有等位基因所证实。一个有趣的现象是, 有一些子代几乎未继承父本的任何等位基因, 而另一些子代则继承了父本的所有等位基因。HLJYJ177 位点的电泳结果见图 2, 母本鲤的 HLJYJ177 位点只有一个纯合的 197 bp 的等位基因, 因而在子代中未发生分离; 而父本三倍体鲫的 HLJYJ177 位点由一个 170 bp 一份浓度等位基因和一个 158 bp 两份浓度的等位基因组成, 父本三倍体鲫的等位基因在子代中的分布则符合随机分离预期。

3 讨论

3.1 三倍体鲫精子倍性

基于子代的基因型, 三倍体鲫的精子中每条染色体的拷贝数应该在 0~3。虽然特定的亲本染色体可能在胚胎发育过程中丢失, 但是这应该不是有些子代未能继承任何三倍体父本等位基因的主要原因。首先, 母本鲤的等位基因符合孟德尔分离预期。在普通的两性生殖二倍体生物中, 每

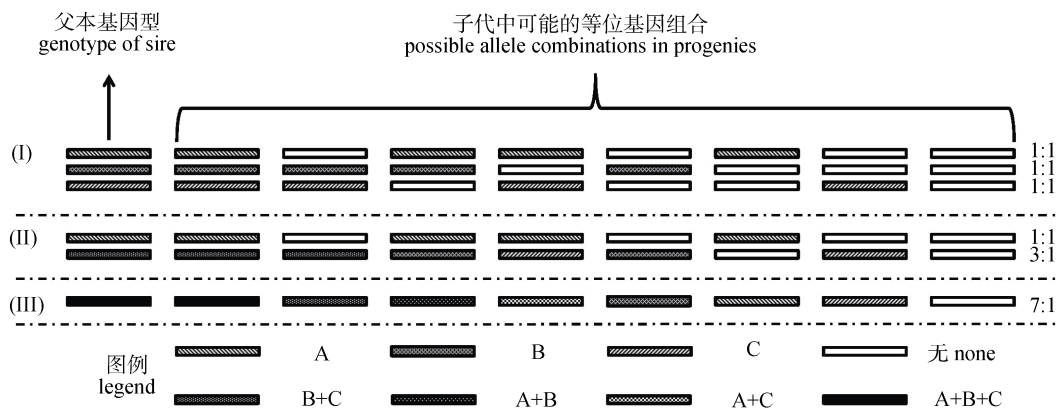


图 1 父本三倍体鲫 3 种类型位点的分离模式

(I) 完全杂合型: 父本 3 个等位基因大小各不相同($A \neq B \neq C$), 3 个等位基因分别按 1:1 分离; (II) 部分杂合型: 父本 3 个等位基因中有两个大小相等($B=C$), DNA 条带按 3:1 分离, 不同的一个等位基因(A)按 1:1 分离; (III) 纯合型: 父本 3 个等位基因大小均相同($A=B=C$), DNA 条带按 7:1 分离。

Fig. 1 Segregation patterns of three different type loci in the sire triploid *Carassius auratus*

(I) Complete heterozygote: three alleles of sire are different with each other, each allele segregate in a ratio of 1:1; (II) Partial heterozygote: two of three alleles of sire show the identical size with each other, which segregate in a ratio of 3:1, the other one with different size segregates in a ratio of 1:1; (III) Homozygote: three alleles of sire show identical size with each other, DNA band segregate in a ratio of 7:1.

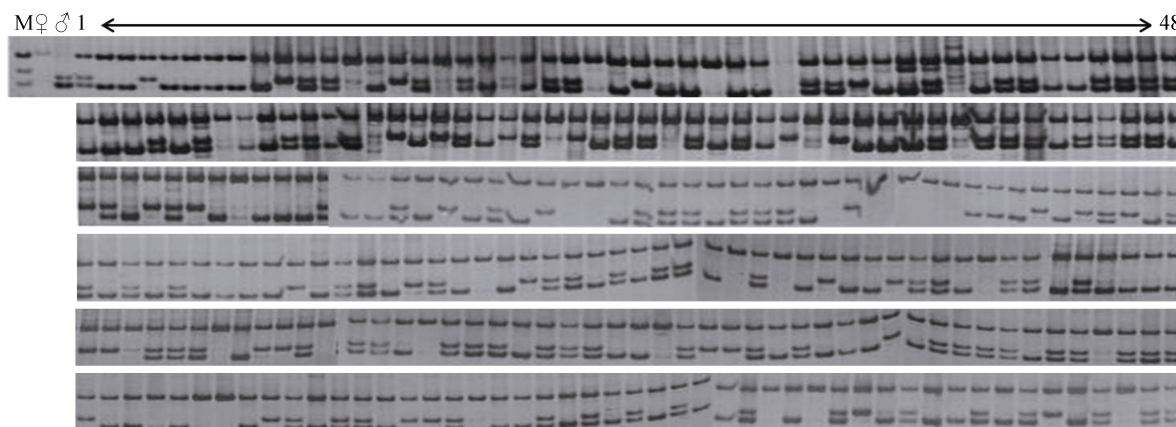


图 2 母本鲤 (*Cyprinus carpio* ♀)与父本三倍体鲫(*Carassius auratus* ♂)杂交家系的 HLJYJ177 位点基因型

每行 48 个子代, 共计 288 个杂种胚胎。♀、♂和 M 分别为母本、父本和 20 bp ladder (200 bp, 180 bp, 160 bp)。

Fig. 2 Genotypes of hybrid family between *Cyprinus carpio* (♀) and *Carassius auratus* (♂) at HLJYJ177 locus
48 progenies each line (in a total 288 hybrid embryos). ♀, ♂ and M represent dam, sire and 20 bp ladder (200 bp, 180 bp, 160 bp), respectively.

个配子只继承每个亲本每对同源染色体中的一条。如果胚胎发育过程中有染色体丢失的话, 母本的染色体应该在某些子代中也会缺失。如本研究中的 HLJYJ092 位点在父母本中均为单态, 母本鲤的等位基因在子代中未发现缺失; 其次, 三倍体鲫的等位基因在子代中符合随机分离的预期, 具有 3 条父本等位基因的个体大体与没有任何父本等位基因的个体数相等。因此, 我们认为胚胎发育过程中没有发生染色体丢失, 杂种胚胎的基因型能够代表配子的基因型。有一些三倍体鱼类的雄性个体部分可育, 其精子的平均 DNA 含量也大体上等于体细胞的一半, 减数分裂过程中染色体的随机分离会导致三倍体的配子倍性在 $1.5n$ 左右呈正态分布^[29]。本研究中, 父本三倍体鲫的微卫星分离模式显示精子发生过程中染色体是随机分离的, 这一结果支持三倍体鲫的精子是非整倍体, 三倍体鲫是一种典型的三倍体鱼类, 并未实现遗传学意义上的重新二倍化。

3.2 三倍体鲫的遗传组成

单性生殖的脊椎动物多起源于两性近缘种的种间杂交, 已知只有疣鳉属(*Lepidophyma*)中的单性谱系可能为非杂交起源^[30]。已知的雌核发育鱼类则均为杂交起源, 很多学者也认为三倍体鲫起源于鲤、鲫的种间杂交。自 1975 年以来, 有多个

实验室通过鲤、鲫杂交获得了三倍体和四倍体杂种^[31-35]。不仅人工杂交实验显示二倍体鲫与近缘种杂交可能形成多倍体, 部分学者还发现了多倍体鲫可能起源于种间杂交的分子生物学证据^[36-38]。然而本研究中, 多数鲫来源的微卫星引物不能在母本鲤中扩增出同源产物, 却能在父本鲫中同时扩增出 3 个等位基因, 反之所选择的三组鲤来源的微卫星引物也不能在父本三倍体鲫中扩增出同源产物。这一结果显示三倍体鲫不含有鲤的基因组, 其体细胞中应该是三套鲫的基因组。父本三倍体鲫的微卫星基因型特征显示三倍体鲫并非起源于鲤、鲫杂交, 三倍体鲫可能是单性生殖鱼类中起源于同源加倍的一个特例。

3.3 天然雄性三倍体鲫的生物学意义

多数三倍体鱼类的精巢发育会有不同程度的阻滞, 其精子活力会显著地低于近缘的二倍体物种。我们的结果显示三倍体鲫和多数的三倍体鱼类相似, 通过异常的减数分裂(染色体随机分离)产生非整倍体的精子。先前有研究观察到人工诱导获得的雄性三倍体鲫在减数分裂 I 中的染色体配对紊乱^[39], 这被认为是人工三倍体雄鲫鱼不育的主要原因, 但是有趣的是天然三倍体鲫的精巢发育和精子发生似乎未受到非整倍性的影响, 与正常的二倍体鲫无异^[1, 9-13], 这些观察和实验结

表 2 鲤(♀)与三倍体鲫(♂)杂交家系中微卫星位点的分离模式

Fig 2. Segregation patterns of microsatellite markers in a hybrid family of *C. carpio* (♀) and triploid *C. auratus* (♂)

位点 loci	母本/bp dam	父本/bp sire	有带 present	无带 absent	预期分离比卡方检验 expected segregation rate Chi-square test			
					1 : 1	3 : 1	7 : 1	不分离 non-segregation
HLJYJ004		153	124	164	0.018	0.000	0.000	0.000
		147	195	93	0.000	0.004*	0.000	0.000
HLJYJ008		150	137	151	0.409	0.000	0.000	0.000
		148	134	154	0.239	0.000	0.000	0.000
		142	149	139	0.556	0.000	0.000	0.000
HLJYJ015		171	149	139	0.556	0.000	0.000	0.000
		163	186	102	0.000	0.000*	0.000	0.000
HLJYJ018		230	137	151	0.409	0.000	0.000	0.000
		210	132	156	0.157	0.000	0.000	0.000
		206	146	142	0.814	0.000	0.000	0.000
HLJYJ092	166	175	247	41	0.000	0.000	0.373	0.000
			288	0	0.000	0.000	0.000	1.000
HLJYJ094		191	162	126	0.034	0.000	0.000	0.000
		185	150	138	0.480	0.000	0.000	0.000
		182	156	132	0.157	0.000	0.000	0.000
HLJYJ123	148	151	210	78	0.000	0.414	0.000	0.000
		148	288	0	0.000	0.000	0.000	1.000
		191	288	0	0.000	0.000	0.000	1.000
HLJYJ143		171	129	159	0.077	0.000	0.000	0.000
		165	143	145	0.906	0.000	0.000	0.000
		159	133	155	0.195	0.000	0.000	0.000
HLJYJ175	148	163	132	156	0.157	0.000	0.000	0.000
		154	129	159	0.077	0.000	0.000	0.000
		151	125	163	0.025	0.000	0.000	0.000
		145	288	0	0.000	0.000	0.000	1.000
		145	288	0	0.000	0.000	0.000	1.000
HLJYJ177	197		288	0	0.000	0.000	0.000	1.000
		170	145	143	0.906	0.000	0.000	0.000
		158	214	74	0.000	0.785	0.000	0.000
HLJYJ179	149	169	138	150	0.480	0.000	0.000	0.000
		158	130	158	0.099	0.000	0.000	0.000
			288	0	0.000	0.000	0.000	1.000
		147	137	151	0.409	0.000	0.000	0.000
HLJYJ192		157	141	147	0.724	0.000	0.000	0.000
		149	148	140	0.637	0.000	0.000	0.000
HLJYJ193		146	145	143	0.906	0.000	0.000	0.000
		141	154	134	0.239	0.000	0.000	0.000
		136	155	133	0.195	0.000	0.000	0.000
HLJYJ205	164	176	139	149	0.556	0.000	0.000	0.000
		167	135	153	0.289	0.000	0.000	0.000
		164	288	0	0.000	0.000	0.000	1.000
HLJL2560	159		127	161	0.045	0.000	0.000	0.000
		149	161	127	0.045	0.000	0.000	0.000

(待续 to be continued)

(续表 2 Tab.2 continued)								
位点 loci	母本/bp dam	父本/bp sire	有带 present	无带 absent	预期分离比卡方检验 expected segregation rate Chi-square			
					1 : 1	3 : 1	7 : 1	不分离 non-segregation
HLJL3130	239		171	117	0.001*	0.000	0.000	0.000
	235		117	171	0.001*	0.000	0.000	0.000
HLJL3727	167		153	135	0.289	0.000	0.000	0.000
	165		135	153	0.289	0.000	0.000	0.000
GF17		204	137	151	0.409	0.000	0.000	0.000
		200	129	159	0.077	0.000	0.000	0.000
		188	140	148	0.637	0.000	0.000	0.000
GF29		205	142	146	0.814	0.000	0.000	0.000
		201	135	153	0.289	0.000	0.000	0.000
		197	147	141	0.724	0.000	0.000	0.000
YJ4		201	130	158	0.099	0.000	0.000	0.000
		187	124	164	0.018	0.000	0.000	0.000
		177	130	158	0.099	0.000	0.000	0.000

注：分离比卡方检验中，每条 DNA 条带最大 *P* 值用加粗字体标出，如果该 *P* 值小于 0.01，则用“*”标出。
Note: In chi-square tests of segregation ratios, the maximum *P* value of each DNA band was marked in bold. If the *P* value was smaller than 0.01, then it would be indicated by “*”.

果表明天然三倍体鲫与人工三倍体鲫精子发生的细胞学机制可能是不同的。虽然出现可育的雄性三倍体鲫的机制我们还不清楚，但是雄性三倍体鲫在进化和生态上却有着重要的作用。首先，它使得雌核发育三倍体可以克服对两性生殖近缘种的生殖依赖^[40]，这可能是某些鲫地理群体中三倍体占据优势的原因之一。其次，雌核发育鱼类由于长期缺乏遗传重组，被认为是走入了进化的死胡同，有学者指出三倍鲫自交过程中会发生拟有性生殖，雄性三倍体鲫能使雌核发育子代获得一定程度的遗传补偿^[6, 20, 41]。

参考文献：

[1] Xiao J, Zou T, Chen Y, et al. Coexistence of diploid, triploid and tetraploid crucian carp (*Carassius auratus*) in natural waters[J]. BMC Genet, 2011, 12(1): 20.

[2] Mable B K. ‘Why polyploidy is rarer in animals than in plants’: myths and mechanisms[J]. Biol J Linn Soc, 2004, 82(4): 453–466.

[3] Avise J C. Clonality: The Genetics, Ecology, and Evolution of Sexual Abstinence in Vertebrate Animals[M]. Oxford: Oxford University Press, 2008.

[4] Lamatsch D K, Stöck M. Sperm-dependent parthenogenesis and hybridogenesis in teleost fishes[M]//Lost Sex. Netherlands: Springer, 2009: 399–432.

[5] Schlupp I. The evolutionary ecology of gynogenesis[J]. Annu Rev Ecol Evol Syst, 2005, 36: 399–417.

[6] Fan Z, Shen J. Studies on the evolution of bisexual reproduction in crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch)[J]. Aquaculture, 1990, 84(3): 235–244.

[7] Jiang F F, Wang Z W, Zhou L, et al. High male incidence and evolutionary implications of triploid form in northeast Asia *Carassius auratus* complex[J]. Mol Phylogenet Evol, 2013, 66(1): 350–359.

[8] Hulak M, Kaspar V, Psenicka M, et al. Does triploidization produce functional sterility of triploid males of tench *Tinca tinca* (L.)?[J]. Rev Fish Biol Fisher, 2010, 20(3): 307–315.

[9] 沈俊宝, 范兆廷, 李素文, 等. 方正银鲫与扎龙湖鲫体细胞, 精子的 DNA 含量及倍性的比较研究[J]. 动物学报, 1984, 30(1): 7–13.

[10] Abramenko M I, Nadtoka E V, Makhotkin M A, et al. Distribution and cytogenetic features of triploid males of crucian carp in Azov Basin[J]. Russ J Dev Biol, 2004, 35(5): 305–315.

[11] 范兆廷, 韩英, 马旭洲, 等. 黑龙江银鲫 (*Carassius auratus gibelio* Bloch) 精子生物学研究[J]. 东北农业大学学报, 2004, 34(4): 414–418.

[12] 范兆廷, 杨洁, 陈伟兴, 等. 三倍体和二倍体银鲫的精子发生[J]. 动物学报, 2008, 54(3): 467–474.

[13] 杨洁, 陈伟兴, 吴宏达, 等. 三倍体和二倍体银鲫精巢组织学的比较[J]. 水产学报, 2008, 32(1): 21–26.

[14] Wei W H, Zhang J, Zhang Y B, et al. Genetic heterogeneity

- and ploidy level analysis among different gynogenetic clones of the polyploid gibel carp[J]. *Cytom Part A*, 2003, 56(1): 46–52.
- [15] Flajšhans M, Rodina M, Halačka K, et al. Characteristics of sperm of polyploid Prussian carp *Carassius gibelio*[J]. *J Fish Biol*, 2008, 73(1): 323–328.
- [16] Yu X, Zhou T, Li K, et al. On the karyosystematics of cyprinid fishes and a summary of fish chromosome studies in China[J]. *Genetica*, 1987, 72(3): 225–235.
- [17] Risinger C, Larhammar D. Multiple loci for synapse protein SNAP-25 in the tetraploid goldfish[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(22): 10598–10602.
- [18] David L, Blum S, Feldman M W, et al. Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci[J]. *Mol Biol Evol*, 2003, 20(9): 1425–1434.
- [19] Luo J, Gao Y, Ma W, et al. Tempo and mode of recurrent polyploidization in the *Carassius auratus* species complex (Cypriniformes, Cyprinidae)[J]. *Heredity*, 2014, 112(4): 415–427.
- [20] 桂建芳, 周莉. 多倍体银鲫克隆多样性和双重生殖方式的遗传基础和育种应用[J]. *中国科学: 生命科学*, 2010 (2): 97–103.
- [21] Chistiakov D A, Hellemans B, Volckaert F A M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics[J]. *Aquaculture*, 2006, 255(1): 1–29.
- [22] Jia Z Y, Sun X W, Liang L Q, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers from Fangzheng silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch), and cross-amplification in the closely related species crucian carp, *Carassius auratus auratus* (Linnaeus)[J]. *Mol Ecol Notes*, 2006, 6(4): 1141–1143.
- [23] Zheng X H, Lu C Y, Zhao Y Y, et al. A set of polymorphic trinucleotide and tetranucleotide microsatellite markers for silver Crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) and cross-amplification in Crucian carp[J]. *Biochem Genet*, 2010, 48(7–8): 624–635.
- [24] 鲁翠云, 杨彦豪, 佟广香, 等. 同水体银鲫与普通鲫遗传多样性比较研究[J]. *水产学杂志*, 2007, 19(2): 42–50.
- [25] 曹柱, 鲁翠云, 郑先虎, 等. 磁珠富集法筛选方正银鲫的三、四核苷酸重复微卫星 DNA[J]. *淡水渔业*, 2011, 41(1): 22–28.
- [26] Zheng X H, Lu C Y, Zhao Y Y, et al. A set of polymorphic trinucleotide and tetranucleotide microsatellite markers for silver Crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) and cross-amplification in Crucian carp[J]. *Biochem Genet*, 2010, 48(7–8): 624–635.
- [27] Ji P F, Zhang Y, Li C, et al. High throughput mining and characterization of microsatellites from common carp genome[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(8): 9798–9807.
- [28] Wu K K, Burnquist W, Sorrells M E, et al. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments[J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 83(3): 294–300.
- [29] Zhang Q, Arai K. Aberrant meioses and viable aneuploid progeny of induced triploid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) when crossed to natural tetraploids[J]. *Aquaculture*, 1999, 175(1): 63–76.
- [30] Sinclair E A, Pramuk J B, Bezy R L, et al. DNA evidence for nonhybrid origins of parthenogenesis in natural populations of vertebrates[J]. *Evolution*, 2010, 64(5): 1346–1357.
- [31] Ojima Y, Hayashi M, Ueno K. Triploidy appeared in the back-cross offspring from funa-carp crossing[J]. *P Jpn Acad*, 1975, 51(9): 702–706.
- [32] Cherfas N B, Gomelsky B I, Emelyanova O V, et al. Triploidy in back-cross hybrids between crucian carp and common carp[J]. *Genetica*, 1981, 17(6): 1136–1139.
- [33] Zhang F, Oshiro T, Takashima F. Fertility of triploid back-cross progeny, (Gengoroubuna *Carassius auratus cuvieri* ♀ × carp *Cyprinus carpio* ♂) F₁ ♀ × carp or gengoroubuna ♂[J]. *Jpn J Ichthyol*, 1992, 39(3): 229–233.
- [34] 刘少军. 远缘杂交导致不同倍性鱼的形成[J]. *中国科学: 生命科学*, 2010 (2): 104–114.
- [35] 闫学春, 梁利群, 葛彦龙. 两种鲤鲫杂交回交子代染色体核型分析及比较[J]. *水产学杂志*, 2011, 24(2): 4–8.
- [36] 朱蓝菲, 桂建芳. 四类不同倍性鲫鱼在胚胎发育期间同工酶基因表达的比较分析[J]. *实验生物学报*, 1998, 31(4): 369–376.
- [37] Fan L C, Yang S T, Gui J F. Differential screening and characterization analysis of the egg envelope glycoprotein ZP3 cDNAs between gynogenetic and gonochoristic crucian carp[J]. *Cell Res*, 2001, 11(1): 17–27.
- [38] Yuan J, He Z, Yuan X, et al. Speciation of polyploid Cyprinidae fish of common carp, crucian carp, and silver crucian carp derived from duplicated Hox genes[J]. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2010, 314 (6): 445–456.
- [39] Gui J, Jia J, Liang S, Jiang Y. Meiotic chromosome behaviour in male triploid transparent coloured crucian carp, *Carassius auratus* L.[J]. *J Fish Biol*, 1992, 41(2): 317–326.
- [40] Neaves W B, Baumann P. Unisexual reproduction among vertebrates[J]. *Trends Genet*, 2011, 27(3): 81–88.
- [41] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) as revealed by RAPD assays[J].

J Mol Evol, 2000, 51(5): 498–506.

Segregation patterns of microsatellite markers indicate triploid *Carassius auratus* generate aneuploid sperm

CHENG Lei, CAO Dingchen, LU Cuiyun, LI Chao, SUN Xiaowen

Key Laboratory of Freshwater Aquatic Biotechnology and Breeding, Ministry of Agriculture, Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China

Abstract: Crucian carp (*Carassius auratus*) is an important aquaculture species, in which diploid, triploid and tetraploid forms coexist. Diploid crucian carp reproduce sexually, while both triploid and tetraploid crucian carp reproduce via gynogenesis. Because only females passed their genome to the next generation, gynogenetic fishes are usually all female and reproduce clonally. However, there are unusual high proportion of males in natural populations of triploid crucian carp. These males have normally developed testis, which can generate viable sperm. Additionally, DNA content of sperm was about half of that of somatic cell, which indicated that meiosis has occurred during spermatogenesis of triploid crucian carp. The average DNA content of a cell population can be accurately determined by flow cytometry, but it is difficult to detect the change of certain chromosome in the individual sperm. To answer the question whether or not the sperm of triploid crucian carp is aneuploidy, it is necessary to quantitatively analysis the genetic composition of single sperm. In this study, microsatellite markers were used to genotype a hybrid family between female common carp (*Cyprinus carpio*) and triploid crucian carp (*Carassius auratus*), the results were as follow: the alleles of dam *Cyprinus carpio* showed mendelian segregation patterns in the offspring; the sire triploid *Carassius auratus* contained three genomes of *Carassius* spp. and alleles of the sire showed random segregation patterns. These results suggested that triploid crucian carp originated from diploid crucian carp by autoduplication, rather than the hybridization between diploid *Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*. Our results also indicated that triploid crucian carp generated aneuploid sperm by random segregation of chromosomes which is similar to other triploid fishes, rather than generated reduced sperm through equal meiosis. In summary, triploid crucian carp is a unique bi-sexual fish that reproduce by gynogenesis but did not originate from interspecific hybridization.

Key words: *Carassius auratus*; triploid; microsatellite; segregation pattern; aneuploid

Corresponding author: SUN Xiaowen. E-mail: sunxw2002@163.com