

从野生群体的基因型图案追踪银鲫雌核发育生殖特征

孙效文^{1,2}, 郑先虎^{2,3}, 鲁翠云², 曹顶臣², 雷清泉¹

(1. 哈尔滨理工大学 材料科学与工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150080; 2. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 3. 上海海洋大学, 上海 201306)

摘要: 银鲫(*Carassius auratus gibelio*)是行雌核发育的三倍体物种,但在自然水域与二倍体普通鲫(*Carassius auratus* L.)生活在一起,外形上无法区分,在群体遗传学的各种参数上两者也没有明显区别。本研究利用17个二碱基微卫星标记和51个三碱基微卫星标记对2次采样共6个样本组进行了基因型分析。通过对电泳图案及电泳结果的简单描述和比较来分析银鲫和普通鲫在群体遗传学上的差别。在2次采样所得群体的等位基因数和基因型数这2个参数上,普通鲫都明显高于银鲫(第1次所采样本普通鲫与银鲫的基因型数之比217:175;等位基因数之比188:163;第2次样本基因型数之比537:349,等位基因数之比353:282)。结果也表明在纯合子占优势的基因座,纯合子比例银鲫高于普通鲫,杂合子比例则是普通鲫远远高于银鲫;与此完全相反,在杂合子占优势的基因座,纯合子比例银鲫低于普通鲫,杂合子比例则是银鲫远远高于普通鲫。研究还通过比较普通鲫的基因座遗传平衡数据,讨论了银鲫群体基因座不平衡现象的特征和产生的原因。[中国水产科学,2010,17(1):1-10]

关键词: 野生群体; 银鲫; 雌核发育; 普通鲫

中图分类号: S91

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)01-0001-10

银鲫(*Carassius auratus gibelio*)行雌核发育,其子代的遗传物质基本上与母本是一致的^[1],分子生物学检测发现,银鲫子代与母本的基因型完全一致,但仍有极个别子代或因得到了父本的等位基因,或因得到了变异的新等位基因^[2-3],而使其基因型与母本不同。在最早鉴定行雌核发育银鲫的黑龙江水域,银鲫与普通鲫(*Carassius auratus* L.)生活在同一个水体中,且外形上无法区分。利用DNA分子标记对野生群体的遗传组成进行分析,未发现同一水体中银鲫与普通鲫在群体遗传结构上表现出差异^[4-5],如双龙水库普通鲫的观测杂合度是0.630 0,同水体的银鲫观测杂合度是0.603 4;双凤水库普通鲫观测杂合度是0.588 5,同水体银鲫是0.531 1。而同水体银鲫与普通鲫间的相似性还高于不同水体银鲫群体间的相似性^[6]。分类学家认为银鲫和普通鲫是一个

种^[7],而遗传学家则认为二者是2个不同的亚种^[8]。作为不同亚种,并具有2种不同的生殖方式,银鲫与普通鲫在群体遗传组成上应该有明显的差别,但利用现有群体遗传参数分析软件得到的数据显示,2种鲫无明显差异,也未发现雌核发育银鲫有不同于普通二倍体鲫的群体遗传结构特征。

银鲫这种行雌核发育的脊椎动物是很好的研究进化生物学的实验模型,中国学者对此也投入了比较多的研究,但多数研究集中在个体发育和个体遗传上,在群体遗传上的研究较少,没有发现银鲫与普通鲫在群体遗传组成上有明显的不同^[4-5]。但在生殖上差异很大的2种鲫应该在群体遗传结构上有很大的不同,除非两者间有明显的遗传交流。而且,行雌核发育的银鲫较普通鲫是否具有更强的遗传竞争力,最终也要通过群体来实现。因此,弄清银鲫与

收稿日期: 2009-04-06; 修订日期: 2009-06-23.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30271010).

作者简介: 孙效文(1955-),男,研究员,博士生导师,从事水产经济动物遗传育种研究. E-mail: sunxw2002@163.com

普通鲫在群体遗传组成上的异同,对银鲫雌核发育机制在群体水平上的表现形式的理解以及对银鲫和普通鲫是否具有亚种关系等理论问题都很有意义。

本研究试图通过分析同一水体中2种鲫的微卫星电泳图谱及由此鉴定出的基因型图案,来描述银鲫与普通鲫在群体遗传学上的特征,探索银鲫与普通鲫在群体遗传组成上的异同,也试图利用不同基因座上的基因型数与等位基因数的算术统计分析来说明同一水体中2种鲫的群体遗传差异。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用的样品鱼分2次取自黑龙江方正县双龙水库和双凤水库。样品鱼体长8~15 cm。第一次取双龙水库普通鲫55尾,银鲫14尾,取双凤水库普通鲫12尾,银鲫43尾;第二次在双凤水库取普通鲫21尾,银鲫21尾。

1.1.1 样品倍性检测 剪取软鳍条组织约0.2 g,编号,取其中0.1 g新鲜样品提取DNA后,置于-20℃冰箱保存备用。剩余的样品放入70%乙醇中脱水固定染色体,用德国产的Partec PasIII型流式细胞仪检测染色体倍性。

1.1.2 基因组DNA的提取 将约0.1 g软鳍条组织放入EP管中,每管中加入约300 μL的组织裂解液(100 mmol/L EDTA, pH 8.0; 200 μL/mL蛋白酶K; 0.5% 十二烷基肌氨酸钠),50℃空气浴消化3 h,中间不时轻轻摇动,待组织完全消化,用等体积的酚:氯仿:异戊醇混合液(体积比25:24:1)抽提2次,取上清加入去Dnase的Rnase,使其终质量浓度为20 μg/mL,37℃保温30 min,再用等体积水饱和氯仿抽提1次,加入预冷的无水乙醇沉淀DNA,再用预冷70%乙醇洗涤1次,自然干燥后溶解于200 μL 5 mmol/L Tris-Cl 中(pH 8.0),4℃保存备用。

1.1.3 样品纯度和含量测定 利用UV-120-02(PC)紫外分光光度计(SHIMACZU公司产品)测定样品中DNA的含量和纯度。根据260 nm下的OD值计算样品中的核酸浓度,OD值为1时,相当于约50 μg/mL双链DNA,40 μg/mL单链DNA或RNA及20

μg/mL的单链寡核苷酸。根据在260 nm和280 nm时的OD值之比(OD_{260}/OD_{280})估计核酸的纯度。

1.2 PCR扩增

建立25 μL PCR反应体系。其中含有50 mmol/mL KCl, 10 mmol/mL Tris·Cl (pH 8.0), 1.5 mmol/mL MgCl₂, 100 μg/mL的明胶, 4种dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)各100 μmol/mL,上下游引物终浓度为0.25 μmol/mL, *Taq* 酶1 U,模板30~50 ng。

94℃预变性3 min; 94℃变性30 s, 50~58℃复性30 s, 72℃延伸30 s, 35个循环;最后72℃延伸5 min。反应于PERKING Gene Amp System 9700型PCR仪上进行。

1.3 微卫星引物的设计及合成

微卫星引物序列由本实验室克隆所得^[9-10],使用美国白头医学研究所的Primer 3程序设计引物,微卫星引物由上海生工生物工程公司合成。

1.4 PCR产物电泳分析

PCR产物检测采用2%琼脂糖凝胶(或8%的聚丙烯酰胺凝胶)电泳,在5 V/cm低电压条件下电泳,内含有1/20体积的Goldview。用GDS8000凝胶成像仪(UVP公司)照相,经Gel-Pro Analyzer 4.5软件处理凝胶相片,获取其分子量和浓度峰值。

1.5 数据处理与分析

电泳带型统计与数据分析:从电泳图上确定各基因座的等位基因,按片段从大到小编号,对每个群体的每个基因座都统计出所有等位基因,作为等位基因数记录,所有的基因型作为基因型数记录。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增的电泳图分析

本研究利用17个二碱基微卫星标记检测第1次所取样品,51个三碱基微卫星标记检测第2次所取样品。电泳结果显示,在杂合子多的基因座上可以清楚地看出银鲫雌核发育特征,即子代的基因型与母本相同,即在同一基因座,银鲫的杂合子比例高于普通鲫且相同基因型的个体比较多(图1);但在以纯合子为主的基因座上,银鲫与普通鲫在扩增片段的带型上没有明显差异。

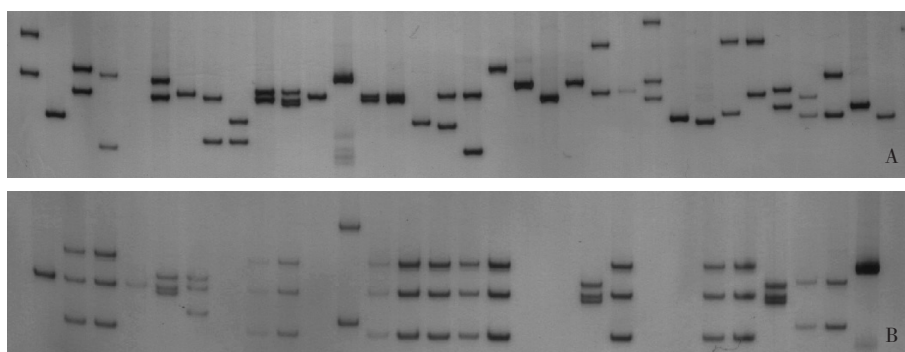


图1 YJ046 标记在普通鲫和银鲫群体样本 PCR 扩增产物的电泳图
A: YJ046 标记在普通鲫群体 PCR 扩增产物的电泳图; B: YJ046 标记在银鲫群体 PCR 扩增产物的电泳图。

Fig. 1 Electrophorogram of PCR amplification products by primer YJ046

A: normal crucian carp *Carassius auratus* L. of Shuangfeng Reservoir; B: silver crucian carp *C. auratus gibelio* of Shuangfeng Reservoir.

2.2 第1次所取样品的等位基因数与基因型数

第1次所取样品的等位基因数和基因型数分别列在表1-4中,其中表1与表2为双龙水库的数据(在文献[9]中已报道,但数据的分析及比较方法与本研究不同),普通鲫的等位基因数是113个,出现的基因型数是130种,基因型数较等位基因数有明显的增加;银鲫的总等位基因数是87个,出现的总基因型数是86种,基因型数较等位基因数没有增加。但双凤水库的数据(表3、4)则是普通鲫等位基因数是75个,出现的基因型数是87种;银鲫总等位基因数是76个,出现的基因型数是89种,2种鱼的基因型数较等位基因数都没有明显增加。

2.3 第2次所取样品的等位基因数与基因型数

根据表5的数据,得出如下规律:

(1)在纯合子占优势的基因座,纯合子比例银鲫高于普通鲫,杂合子比例则是普通鲫远远高于银鲫。在普通鲫和银鲫群体中纯合子比例均超过50%的18个基因座中,普通鲫的杂合子数为141个,纯合子为237个;银鲫的杂合子数是82个,纯合子数是296个;银鲫全部个体均为纯合子的有2个基因座,有1个杂合子的有3个基因座,有2个杂合子的有2个基因座,普通鲫低于3个杂合子的只有1个基因座,完全纯合的基因座没有。

(2)在杂合子占优势的基因座,纯合子比例银鲫低于普通鲫,杂合子比例则是银鲫远远高于普通鲫,

与第一条规律完全相反。银鲫群体中纯合子比例低于50%的33个基因座中,杂合子数为617个,纯合子数为72个;纯合子比例低于50%的普通鲫群体中的杂合子数是471个,纯合子为209个。银鲫中完全杂合的基因座有12个,普通鲫中完全杂合的基因座有2个。

(3)银鲫的等位基因数和基因型数都低于普通鲫,但基因型数的差异更为显著。普通鲫的等位基因数为353个,银鲫为282个;普通鲫基因型数为537种,银鲫为349种;银鲫的基因型数较等位基因数增加了23.8%,普通鲫的基因型数较等位基因数增加了52.1%,即普通鲫的基因型数的增加比值是银鲫基因型增加比值的2倍多($52.1/23.8=2.19$)。

(4)普通鲫各基因座的基因型分布比较平衡,而银鲫各基因座上的基因型分布非常不平衡。普通鲫所有基因座上具有同一种基因型的杂合子数多于10的仅有1个,大于6的只有2个,其他基因座上多为2、3个杂合子是相同基因型的,表现出很好的平衡状态;银鲫所有基因座上同一种基因型的杂合子数多于10的有13个,多于7的有14个,表现出严重的不平衡。

(5)银鲫杂合子比例高的基因座上有相近基因型共遗传现象,而普通鲫没有这种现象。银鲫基因座上次高比例的杂合子基因型与最高比例杂合子至少有1个等位基因是相同的,如YJ029基因座上最

表 1 17 对微卫星引物扩增双龙水库三倍体银鲫和普通鲫群体所得的等位基因
Tab. 1 Alleles of triploid silver crucian carp *Carassius auratus gibelio* and diploid crucian carp *Carassius auratus* L. amplified by 17 pairs of microsatellite markers (Shuanglong Reservior)

微卫星标记 Microsatellite marker	普通鲫 <i>Carassius auratus</i> L.		三倍体银鲫 <i>Carassius auratus gibelio</i>	
	等位基因 Allele	数量 Number	等位基因 Allele	数量 Number
SCM4	147; 156; 159; 163; 168; 171; 175; 178; 188; 192	10	147; 156; 163; 192	4
SCM8	217; 240; 248; 254; 260; 268; 275; 283	8	217; 228; 240; 248; 254; 260	6
SCM9	154; 175	2	154; 175; 2 个	2
SCM10	162; 165; 168; 172; 175; 181; 184; 187; 190; 194; 197	11	162; 165; 168; 172; 175 ; 178 ; 181; 183	8
SCM12	218	1	218; 1 个	1
SCM13	172; 175; 180; 183; 189; 192; 195; 200	8	168; 175; 186; 192; 195	5
SCM14	131; 134; 164; 169; 178; 187; 207; 211; 224; 230; 236; 243	12	131; 134; 164; 187; 198; 207 ; 211; 224; 230; 243	10
SCM17	145; 148; 151; 154; 157; 160; 164; 167; 170; 173; 176; 179 ; 182; 194; 200	15	145; 148; 151; 154; 157; 160; 164; 170; 173; 179; 182; 185	12
SCM21	148; 151; 159; 162; 165; 168; 171; 174; 177; 183; 189	11	151; 156; 159; 162; 165; 171 ; 174; 177; 180; 183; 189; 192	12
SCM22	220; 225; 2 个		220; 225	2
YJ5	164; 167; 172; 175; 178; 181; 184; 187	8	164; 167; 175; 178; 181; 184; 190; 193	8
YJ6	155; 158	2	155; 158	2
YJ8	197; 208; 211; 214	4	211; 214	2
YJ12	238; 242; 245; 251; 260; 264; 267; 270; 8 个		242; 245; 251; 267 ; 270; 274; 278	7
YJ13	164; 167; 171; 177; 182; 187	6	164; 177; 182; 187	4
YJ15	252	1	229; 252	2
YJ17	143; 147; 152; 155	4	147; 152	2
合计 Total		113		87

表 2 17 对微卫星引物扩增双龙水库三倍体银鲫和普通鲫样品所得的基因型
Tab. 2 Genotypes of triploid silver crucian carp *Carassius auratus gibelio* and diploid crucian carp *Carassius auratus* L. amplified by 17 pairs of microsatellite markers (Shuanglong Reservior)

微卫星标记 Microsatellite marker	普通鲫 <i>Carassius auratus</i> L.		三倍体银鲫 <i>Carassius auratus gibelio</i>	
	基因型 Genotype	数量 Number	基因型 Genotype	数量 Number
SCM4	156; 159; 163; 175; 178; 188; 192; 168 156; 171 163 147	9	147; 156; 163; 192	4
SCM8	283; 275; 268; 260; 254; 248; 240; 254 217; 275 217; 268 217; 260 217; 283 254; 275 248; 268 240	14	254; 248; 240; 228; 217; 260 228; 248 217; 254 217; 240 217	9
SCM9	154; 175; 175 154	3	154; 175; 175 154	3
SCM10	165; 162; 175 165; 181 165; 184 165; 184 168; 184 172; 187 168; 190 165; 190 168; 194 165; 194 172; 197 172 162	13	175 165; 178 168; 181 165; 183 172; 183 168 162	5
SCM12	218	1	218	1
SCM13	172; 175; 180; 183; 189 180; 192 175; 195 180; 200 175	8	175; 186 175; 192 175; 195 168	4
SCM14	243; 236; 230; 224; 211; 187; 178; 169; 164; 207 134; 207 131; 211 178	12	243; 207; 187; 224 198; 224 134; 211 131; 211 134; 230 164; 207 134; 198 134	10

接上表

SCM17	148; 151; 154; 157; 160 145; 160 148; 167 154; 170 154; 170 157; 173 154; 176 164; 179 167; 176 160 151; 176 164 154; 182 164 154; 182 160 148; 194 170 154; 200 170 148	18	157; 157 151; 164 148; 170 151; 179 151; 185 154; 173 157 151; 182 160 145	8
SCM21	159; 165; 174; 183; 165 148; 168 148; 171 148; 171 151; 174 148; 174 151; 174 162; 177 162; 183 148; 183 162 151; 183 171 156; 189 174; 151	16	171 156; 177 151; 177 159; 180 151; 192 159; 174 159 151; 183 171 156; 189 171 151; 180 174 165 151; 83 174 162 151	10
SCM22	220; 225	2	220; 225	2
YJ5	164; 175; 184; 178 172; 181 175; 184 175; 187 178; 184 178 167	8	167; 175; 178; 190; 175 164; 190 167; 193 167; 184 178 167; 190 178 164; 193 181 164	10
YJ6	155; 158	2	155; 158	2
YJ8	208; 211; 214; 211 197	4	211; 214	2
YJ12	245; 251; 260 245; 264 245; 264 251; 267 251; 270 242; 270 251; 267 245 238	9	245; 251; 267 251; 270 245; 278 251; 274 251 242	6
Yj13	187; 182; 177; 171; 167; 164	6	187; 182; 177; 164; 187 182; 187 164	6
Yj15	252	1	252; 229	2
YJ17	155; 152; 147; 143	4	152; 147	2
合计 Total		130		86

表 3 17 对微卫星引物扩增双凤水库银鲫和普通鲫样品所得的等位基因

Tab. 3 Alleles of triploid silver crucian carp *Carassius auratus gibelio* and crucian carp *Carassius auratus* L. amplified by 17 pairs of microsatellite markers (Shuangfeng Reservoir)

微卫星标记 Microsatellite marker	普通鲫 <i>Carassius auratus</i> L.		三倍体银鲫 <i>Carassius auratus gibelio</i>	
	等位基因 Allele	数量 Number	等位基因 Allele	数量 Number
SCM4	142; 147; 156; 168; 171; 188	6	147; 156; 168; 171; 188	5
SCM8	248; 254; 260; 268; 275; 283	6	260; 268; 283	3
SCM9	154; 175	2	154; 175	2
SCM10	144; 149; 155; 162; 175; 181	6	144; 149; 152; 162; 165; 172; 175; 181	8
SCM12	240	1	240	1
SCM13	168; 175; 183; 195	4	152; 168; 175; 183; 189 ; 195; 200	7
SCM14	178; 187; 207; 224; 236; 243; 265	7	164; 178; 198; 207; 224; 230; 243	7
SCM17	120; 134; 145; 148; 154 ; 160; 164; 179	8	120; 134; 145; 148; 151; 154; 157; 164; 170; 173; 179; 185; 190	13
SCM21	141; 148; 168; 189; 195; 202; 210	7	141; 168; 174; 177; 183; 195; 202	7
SCM22	225; 242	2	225; 242	2
YJ5	151; 155; 167 ; 172; 178; 184; 187	7	151; 167; 181; 184	4
YJ6	150	1	150	1
YJ8	230; 235; 240; 245	4	230; 235; 240; 245	4
YJ12	251; 260; 270; 278	4	270; 278	2
Yj13	171; 187; 191; 200; 210	5	182; 187; 191; 200 ; 210; 215	6
Yj15	252; 261	2	252; 261	2
YJ17	116; 110; 120	3	116; 110	2
合计 Total		75		76

表 4 17 对微卫星引物扩增双凤水库三倍体银鲫和普通鲫样品所得的基因型^[9]
Tab. 4 Genotypes of triploid silver crucian carp *Carassius auratus gibelio* and diploid crucian carp *Carassius auratus* L. amplified by 17 pairs of microsatellite markers (Shuangfeng Reservior)

微卫星标记 Microsatellite Marker	普通鲫 <i>Carassius auratus</i> L.		三倍体银鲫 <i>Carassius auratus gibelio</i>	
	基因型 Genotype	数量 Number	基因型 Genotype	数量 Number
SCM4	168; 156; 147; 142; 171 156; 168 147; 168 142; 188 168 147	8	168; 156; 147; 188 171; 171 147; 171 156; 168 156; 168 147; 188 168 147	9
SCM8	283; 268; 283 268; 275 268; 275 260; 268 248; 268 254; 283 268 254	8	268; 283 260; 268 260; 283 260	4
SCM9	154; 175 154	2	154; 175 154	2
SCM10	155; 149; 144; 181 162; 175 155; 175 144; 175 149; 175 155 144	8	181 162; 181 152; 175 162; 172 152; 165 144; 165 149; 162 144; 162 149	8
SCM12	240	1	240	1
SCM13	183; 168; 195 175; 195 168; 183 168	5	200 183; 195 183; 195 175; 195 168; 189 168; 183 168; 183 152; 175 152; 195 175 168; 195 175 152; 200 189 183; 195 183 168; 195 189 175; 183 168 152	14
SCM14	224; 207; 265 178; 243 207; 236 187; 236 178; 236 207; 224 187	8	243; 230; 224; 243 224; 224 178; 224 207; 224 198; 207 164	8
SCM17	179 160; 179 148; 179 134; 164 134; 164 120; 154 120; 148 134; 154 145; 134 120	9	120; 190 173; 190 170; 179 151; 179 154; 173 157; 173 151; 173 145; 170 148; 170 145; 164 145; 145 120; 185 170 145; 170 151 134	14
SCM21	202; 189; 210 148; 195 168; 202 141; 189 148; 189 141; 210 189 141; 210 189 148; 210 195 148	10	168; 202 177; 195 168; 195 177; 183 168; 202 174 141; 202 177 141; 202 177 168	8
SCM22	225; 242 225	2	225; 242 225	2
YJ5	172; 187 178; 178 155; 187 184 167; 184 167 151; 178 167 151	6	181; 181 151; 184 167 151	3
YJ6	150	1	150	1
YJ8	240; 235; 230; 245 240; 240 235; 234 230	6	235; 230; 245 230; 240 230; 240 235	5
YJ12	270; 278 260; 278 260 251	3	278; 278 270	2
Yj13	187; 210 191; 210 187; 200 187; 187 171	5	187; 210 187; 200 187; 191 182; 215 200 182	5
Yj15	261 252	1	261 252	1
YJ17	116; 110; 120 110; 120 116	4	110; 116 110	2
合计 Total		87		89

表 5 51 对三碱基微卫星引物扩增双凤水库银鲫和普通鲫样品所得的结果
Tab. 5 Amplification results by 51 of pairs of microsatellite markers in triploid silver crucian carp *Carassius auratus gibelio* and diploid crucian carp *Carassius auratus* L. (Shuangfeng Reservior)

基因座 Locus	普通鲫 <i>Carassius auratus</i> L.		三倍体银鲫 <i>Carassius auratus gibelio</i>	
	等位基因数, 基因型数, 纯合子数; 最高比例杂合子基因型(杂合子数), 最高比例纯合子基因型(纯合子数) Allele number, genotype number, homozygote; genotype of dominant heterozygote (number), genotype of dominant homozygote (number)	基因型数 / 等位基因数 Ratio of genotype number to allele number	等位基因数, 基因型数, 纯合子数; 最高比例杂合子基因型(杂合子数), 最高比例纯合子基因型(纯合子数) Allele number, genotype number, homozygote; genotype of dominant heterozygote (number), genotype of dominant homozygote (number)	基因型数 / 等位基因数 Ratio of genotype number to allele number
YJ011	5, 6, 16; 35 (4), 5 (9)	6/5=1.2	3, 3, 21; 0, 3 (10)	3/3=1
YJ102	2, 3, 14; 12 (7), 2 (2)	3/2=1.5	2, 2, 21; 0, 2 (12)	2/2=1
YJ091	2, 3, 16; 12 (4), 1 (13)	3/2=1.5	3, 4, 20; 12 (1), 2 (13)	4/3=1.33
YJ123	2, 2, 17; 12 (4), 2 (17)	2/2=1	3, 2, 20; 12 (1), 2 (20)	2/3=0.67

接上表

YJ115	3,4,16; 13 (4),2 (14)	4/3=1.33	3,4,20; 13 (1),2 (15)	4/3=1.33
YJ090	4,6,13; 34 (4),1 (6)	6/4=1.5	5,7,19; 35 (3),3 (7)	7/5=1.4
YJ089	3,5,16; 13 (4),2 (14)	5/3=1.67	4,5,19; 34 (1),1 (6)*,3 (6)	5/4=1.25
YJ100	3,3,19; 12 (2),2 (2)	3/3=1	3,3,18; 12 (1),2 (18)	3/3=1
YJ131	4,5,11; 23 (6),2 (10)	5/4=1.25	4,4,17; 123 (2),3 (17)	4/4=1
YJ050	4,7,16; 67 (3),9 (1)	7/4=1.75	3,5,16; 23 (2),1 (9)	5/3=1.67
YJ085	5,9,10; 24 (3),2 (6)	9/5=1.8	5,9,15; 25 (2),3 (11)	9/5=1.8
YJ127	5,10,10; 34 (4),3 (4)	10/5=2	4,6,14; 24 (4),4 (9)	6/4=1.5
YJ076	8,13,8; 16 (2),1 (3)	13/5=2.6	6,8,13; 34 (5),2 (10)	6/4=1.5
YJ056	12,14,11; 7,10 (2),9 (3)	14/12=1.17	9,10,13; 34 (3),3 (6)	10/9=1.11
YJ078	5,7,14; 24 (3),2 (12)	7/5=1.4	4,9,12; 23 (2),1 (5)	9/4=2.25
YJ040	6,9,15; 15 (2),5 (7)	9/6=1.5	3,4,12; 12 (4),2 (10)	4/3=1.33
YJ120	5,7,12; 34 (3),4 (5)	7/5=1.4	4,5,14; 24 (4),2 (10)	5/4=1.25
YJ101	6,13,6; 24 (4),2 (2)	13/6=2.17	7,10,11; 36 (4),6 (4)	10/7=1.42
YJ105	7,13,3; 16 (3),5 (1)	13/7=1.86	4,7,8; 24 (6),13 (4)*,4 (3)	7/4=1.75
YJ070	10,16,4; 36 (2),2 (2)	16/10=1.6	9,12,5; 23 (5),5 (2)	12/9=1.33
YJ116	5,8,3; 13 (4),2 (14)	8/5=1.6	5,6,5; 24 (7),45 (5)*,4 (3)	6/5=1.2
YJ121	3,5,14; 13 (3),1 (8)	5/3=1.67	5,8,7; 24 (6),4 (7)	8/5=1.6
YJ130	8,12,10; 14 (2),5 (6)	12/8=1.5	9,10,2; 57 (7),3 (2)	10/9=1.11
YJ071	4,6,14; 24 (3),2 (11)	6/4=1.5	5,7,4; 24 (7),1 (2)	7/5=1.4
YJ075	4,6,13; 13 (5),3 (11)	6/4=1.5	4,6,2; 13 (9),34 (4)*,3 (2)	6/4=1.5
YJ124	3,3,1; 13 (16),2 (1)	3/3=1	3,4,4; 13 (15),134 (2)*,1 (3)	4/3=1.33
YJ004	3,4,17; 13 (4),1 (8)	4/3=1.33	3,3,6; 13 (17),3 (4)	3/3=1
YJ015	4,6,11; 23 (4),3 (10)	6/4=1.5	4,5,4; 12 (6),23 (4)*,1 (3)	5/4=1.25
YJ134	5,7,11; 23 (4),2 (9)	7/5=1.4	6,10,4; 35 (6),36 (3)*,1 (2)	10/6=1.67
YJ094	5,9,6; 12 (4),2 (3)	9/5=1.8	6,8,3; 35 (9),3 (2)	8/6=1.33
YJ017	6,11,3; 46 (4),3 (1)	11/6=1.83	3,4,0; 234 (14),0	4/3=1.33
YJ019	8,12,12; 46 (4),3 (1)	12/8=1.5	6,8,4; 234 (11),14 (2)*,4 (2)	8/6=1.33
YJ026	6,8,8; 15 (3),5 (7)	8/6=1.33	4,5,6; 134 (9),3 (6)	5/4=1.25
YJ029	12,18,4; 69 (2),9 (2)	18/12=1.5	6,9,1; 256 (6),245 (5)*,4 (1)	9/6=1.5
YJ030	9,16,6; 36 (2),6 (3)	16/9=1.78	5,6,0; 134 (10),14 (4)*,0	6/5=1.2
YJ031	6,10,12; 34 (2),4 (4)	10/6=1.67	5,7,3; 35 (9),2 (2)	7/5=1.4
YJ032	12,15,0; 34 (2),0	15/12=1.25	6,14,3; 156 (4),256 (4)*,5 (1)	14/6=2.67
YJ084	5,7,4; 12 (5),1 (4)	7/5=1.4	8,11,2; 36 (6),2 (2)	11/8=1.38
YJ033	7,14,11; 45 (3),5 (3)	14/7=2	5,6,0; 45 (9),24 (5)*,0	6/5=1.2
YJ034	10,16,2; 29 (4),9 (1)	16/10=1.6	8,5,0; 35 (12),0	5/8=0.6
YJ039	13,20,2; 34 (1),6 (2)	20/13=1.54	7,8,1; 357 (10),35 (3)*,3 (1)	8/7=1.14
YJ119	8,12,10; 14 (2),1 (3)	12/8=1.5	4,3,0; 23 (13),123 (3)*,0	3/4=0.75
YJ041	12,19,2; 2,10 (2),9 (2)	19/12=1.58	11,10,0; 69 (6),11 (6)*,0	10/11=0.91
YJ042	9,17,7; 38 (5),3 (1)	17/9=1.89	9,9,1; 36 (9),9 (1)	9/9=1
YJ046	15,20,0; 3,11 (2),0	20/15=1.33	11,10,0; 469 (10),0	10/11=0.91
YJ048	10,17,5; 78 (2),6 (2)	17/10=1.7	5,5,0; 24 (11),14 (4)*,0	5/5=1
YJ049	9,14,2; 67 (3),9 (1)	14/9=1.56	7,8,0; 456 (9),0	8/7=1.14
YJ018	12,17,3; 11,12 (2),7 (3)	17/12=1.42	7,9,0; 356 (8),56 (6)*,0	9/7=1.29
YJ122	18,20,5; 11,12 (1),12 (2)	20/18=1.11	11,11,0; 348 (6),0	11/11=1
YJ051	9,15,8; 46 (3),2 (2)	15/9=1.67	8,8,0; 24 (10),0	8/8=1
YJ055	12,18,9; 67 (2),5 (3)	18/12=1.5	8,7,1; 248 (10),3 (1)	7/8=0.99

注: * 表示次高比例杂合子基因型(杂合子数)。

Note: * donates genotype of the second highest percentage with the number of corresponding heterozygotes in the bracket.

高比例杂合子基因型为 256, 次高的为 245, 2 种基因型共有 2 和 5 两个等位基因相同。再如 *YJ018* 基因座最高的是 356, 次高的是 56, 两者有 5 和 6 两个等位基因是相同的。

3 讨论

3.1 电泳图谱

51 个核心序列为三碱基的微卫星标记中有 13 个为 3 个等位基因, 而同一基因座的普通鲫群体中多为 2 个等位基因, 显示银鲫在多个基因座有 3 种异质的基因, 这是杂交起源对银鲫基因座产生的影响所致^[8, 11], 即不同物种杂交在同一基因座上留下多个等位基因。银鲫的多个三等位基因座的电泳结果对银鲫杂交起源是一个旁证, 三等位基因也可能是基因组多倍化的遗迹。普通鲫的部分基因座也有三等位基因的现象, 反复几次的 PCR 结果都一致, 这一现象是基因组多倍化的遗迹还是其他原因所致有待进一步的研究。

3.2 群体等位基因数与基因型数

第 1 次取样双龙水库的普通鲫等位基因数多于同水体的银鲫(113:87), 与样本数比例一致(普通鲫样本数是 55, 银鲫是 14); 同时取样的双凤水库的普通鲫与同水体的银鲫的等位基因数基本相同(75:76), 虽然 2 种鱼仅差 1 个等位基因, 但银鲫样本量大得多(普通鲫的样本数是 12 个, 银鲫是 43 个), 推测在同样大小的群体中普通鲫的等位基因数要多于银鲫; 第 2 次取样都是 21 尾, 普通鲫与银鲫等位基因数分别是 353 和 282, 也是普通鲫高于银鲫。这个结果与作者预计的银鲫等位基因数要高于普通鲫不同, 银鲫的等位基因数没有因为具有获得新基因的特殊遗传机制而增加^[12]。从等位基因数到基因型数的增加值, 普通鲫也远远大于银鲫。如第 1 次取样 2 个水体普通鲫基因型数是 217, 银鲫是 175, 普通鲫基因型数较等位基因数增加了 29 个, 而银鲫只增加了 12 个; 而第 2 次所取样本的普通鲫的基因型数是 537, 银鲫为 349, 较等位基因数分别增加了 184 个和 67 个。普通鲫的基因型数增加值较高和普通鲫行有性生殖且其子代形成过程经过

完整的减数分裂这一生殖方式是相联系的, 而银鲫基因型数增加值少也是由于其子代形成过程中没有发生减数分裂、没有遗传重组决定的, 因此没有组成更多的基因型。虽然根据鲁翠云等^[3]的报道, 银鲫有特殊的生理机制使其基因型有所增加, 但根据本研究结果, 这种增加对提高基因型总量的作用远远低于遗传重组。对于有性生殖群体, 一个群体的基因型数是各等位基因随机组合的结果, 等位基因越多得到的基因型也越多; 但对于没有遗传重组的生物, 基因型主要由原始群体遗传而来或由某种突变而来, 本研所得银鲫的基因型数远小于同水体的普通鲫, 表明雌核发育银鲫由于缺乏遗传重组而使其基因型数量较少; 第 2 次取样样本 2 种鲫的样本数相同, 普通鲫的基因型数与等位基因数之比为 $537/353=1.52$, 银鲫为 $349/282=1.23$, 也说明银鲫基因型增加的几率远远低于普通鲫。

3.3 纯合子占优势和杂合子占优势的基因座均表现出银鲫特殊的遗传方式

当纯合子个体在普通鲫和银鲫(第 2 次所取样品)都占优势时(有 18 个基因座), 普通鲫杂合子数多于银鲫(141:82), 银鲫有全部纯合的 3 个基因座和接近全部纯合的 5 个基因座, 而普通鲫只有 1 个基因座是纯合子占优势(18 个纯合子, 3 个杂合子); 而在杂合子占优势的 33 个基因座中, 银鲫的杂合基因型数却大大高于普通鲫的杂合基因型数(617:471), 纯合子却是银鲫远低于普通鲫(72:209)。对于纯合子占优势的座位, 普通鲫群体内个体间可以通过不同等位基因间的重组形成下一代的杂合基因型, 而银鲫由于没有个体间的遗传重组, 尽管个体间的等位基因不同, 下一代仍保持纯合状态, 这是在纯合子占优势的基因座上银鲫纯合个体多于普通鲫的原因。对于杂合子占优势的基因座, 普通鲫在每次传代过程中都要发生重组, 即有机会形成纯合子, 根据群体遗传学概念, 一个孟德尔群体在随机繁殖 1 代后即达到遗传平衡, 高比例的等位基因大多与稀有等位基因形成杂合子, 同时高比例的等位基因通过重组将形成很多纯合子, 从而使高比例的杂合基因型比例在传代过程中降低; 反之,

银鲫由于没有等位基因的重组过程,在原始已是杂合子的基因座上,其子代仍是杂合基因座,从而在杂合子占优势的基因座上,银鲫的杂合基因型比例远远高于普通鲫。归纳上述分析,可以得出结论:在纯合子占优势的基因座上,银鲫纯合个体比例远远高于普通鲫,在杂合子占优势的基因座上,杂合个体比例还是银鲫远远高于普通鲫。

3.4 银鲫基因座的遗传不平衡

由于没有计算三倍体平衡参数的计算软件,所以本实验的银鲫平衡参数也难于通过现有软件获得,因此,本实验以二倍体不平衡出现的同基因型最大杂合子数和最大纯合子数为例来评估普通鲫和银鲫群体平衡状态。对于第2次样本数为21,等位基因纯合子数多于9个是不平衡的临界值(作为临界值I),但相同基因型的杂合子过多也出现了不平衡,这里以相同基因型杂合子超过9为临界值(临界值II)。根据临界值I,普通鲫基因座上纯合子数大于9的有10个基因座,银鲫有13个;根据临界值II,普通鲫所有基因座上基因型相同的杂合子数多于9的仅有1个,银鲫所有基因座上基因型相同的杂合子数多于9的有19个。将利用临界值I和临界值II比较2种鱼的平衡结果结合在一起,可以看出普通鲫较为平衡,即同样基因型的个体在群体的总基因座所占比例较低(10/51);银鲫严重的不平衡,即同基因型的个体在总基因座所占比例较高(32/51)。由于基因座的平衡与等位基因数、杂合子数密切相关,而对于等位基因数较多的基因座,样本数量少是难于得出平衡结果的,银鲫和普通鲫基因座和整个群体的平衡性还需要更多地研究,至少要对一个更大的野生群体进行检测才能得出更准确的评估结果。

3.5 银鲫杂合子比例高的基因座上有相近基因型共遗传现象

在鲁翠云等^[3]的研究中,银鲫子代在一些来自父本或突变形成的新基因座中,有的等位基因丢失了,形成与原基因座有1~2个等位基因相同的新基因座。在本次银鲫群体等位基因型分析时发现银鲫在同一基因座中次高比例的杂合子上的基因型多

与最高比例杂合子有1个以上的等位基因是相同的,如YJ029基因座上最高的杂合子基因型为256(6),次高的为245(5),有2和5两个等位基因相同,再如YJ018基因座最高的是356(8),次高的是56(6),有5和6两个等位基因是相同的。这个结果预示着这些等位基因可能是在传代过程中银鲫发生的同一基因座,只是丢失了1个或2个等位基因,暗示这些基因型可能是非常古老的基因型,在银鲫多倍化之前就存在了,只是有的基因座在进化过程中丢失了1个等位基因。这个群体中出现的等位基因丢失的现象与鲁翠云等^[3]发现的父本银鲫向子代传递新的基因座且等位基因有部分丢失的现象是一致的。

3.6 遗传参数

先前利用分析群体遗传结构的遗传分析软件和遗传参数(如杂合度和多态信息含量)得到的结果均显示2种鲫差异很小,但由于银鲫是三倍体不发生减数分裂,对于这样的群体目前还没有针对性的群体遗传分析软件,套用二倍体分析软件不能反映银鲫基因型数目少、基因型在传代中不发生重组的事实,其结果也就不能真正代表银鲫的群体遗传性质。为了比较普通鲫与银鲫在群体遗传组成上的不同,作者利用基因型数与等位基因数之间的变动和比值来描述2种鲫群体间的差异,虽然这种比较还没有先例,但分析结果还是表现出2种鲫的群体遗传特征,也证实2种鲫在群体上差异很大。作者还创造了表示群体不平衡的2个临界值,虽然目前尚未有利用这样的临界值来表述群体遗传平衡状况的报道,但对于无法用现行统计参数处理的银鲫群体,用这2个临界值处理后可以明显区分出银鲫与普通鲫在群体遗传平衡状态上的巨大差异,而这种差异也恰恰反映了银鲫由于没有减数分裂和遗传重组,其必然处于群体上的高度不平衡状态。

致谢:感谢大连水产学院丁君副教授帮助分析倍性,向参加本实验的其他实验人员李立坤和硕士研究生杨彦豪、贾智英、邢晶晶等表示感谢。

参考文献:

- [1] 俞豪祥. 银鲫雌核发育的细胞学观察 [J]. 水生生物学集刊, 1982, 7 (4): 481-487.
- [2] 周莉, 桂建芳. 银鲫两个雌核发育克隆间两性生殖子代的遗传多样性分析 [J]. 实验生物学报, 2001, 34 (3): 169-176.
- [3] 鲁翠云, 曹顶臣, 张义凤, 等. 雌核发育银鲫子代中微卫星特异序列分析 [J]. 动物学报, 2007, 53 (3): 537-544.
- [4] 李因传. 黑龙江银鲫与普通鲫的遗传多态的比较研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2001.
- [5] 滕春波, 孙效文, 沈俊宝. 利用异源精子激发雌核发育的银鲫及亲本的 RAPD 分析 [J]. 水产学报, 1999, 23 (4): 240-243.
- [6] 贾智英. 方正银鲫亲本遗传物质在子代中的遗传特性研究 [D]. 上海: 上海水产大学, 2007.
- [7] 张觉民. 黑龙江省鱼类志 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1995.
- [8] 沈俊宝, 刘明华, 范兆廷. 黑龙江银鲫 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1997.
- [9] Jia Z, Sun X, Liang L, 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 (*C. auratus auratus* (Linnaeus)) [J]. MEN, 2006, 6: 1141-1143.
- [10] 孙效文, 杨彦豪, 鲁翠云. 银鲫与普通鲫群体遗传结构的比较分析 [J]. 淡水渔业, 2009, 39 (4): 34-39.
- [11] Yuan J, He Z, Yuan X, et al. Evidence for duplicated Hox genes in polyploid cyprinidae fish of common carp, crucian carp and silver crucian carp [J]. J Exp Zool, 2009, 312B: 1-12.
- [12] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Analysis of genetic heterogeneity among five gynogenetic clones of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch, based on detection of RAPD molecular markers [J]. Cytogenet Cell Genet, 2000, 88: 133-139.

Tracing gynogenesis features of silver crucian carp from electrophoresis pattern of wild populations

SUN Xiaowen^{1,2}, ZHENG Xianhu^{2,3}, LU Cuiyun², CAO Dingchen², LEI Qingquan¹

(1. Harbin University of Science and Technology, Harbin 150080, China; 2. Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy Fisheries Science; Key Laboratory of Bioengineering and Breeding of Northern Finfish, Ministry of Agriculture, Harbin 150070, China; 3. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) is a gynogenetic species and lives in the same body of water with normal diploid crucian carp (*C. auratus* L.). The two kinds of fish can not be discriminated through phenotype, while there is no obvious difference in genetic parameters between the two populations. In this study, electrophoresis patterns of the PCR products for the two crucian carps and the simple description of these patterns were used to find out the difference between silver crucian carp and normal diploid crucian carp in population genetic composition. 17 SSR markers with two motifs of repeated sequences and 51 SSR markers with three motifs of repeated sequences were used to analyze the genotypes of 6 sample groups obtained in two times. The number of allele is much more in normal crucian carp than silver crucian carp (For the first time samples, the ratio of genotypes is 217 : 175, and the ratio of alleles is 188 : 163; for the second time samples, the ratio of genotypes is 537 : 349, and the ratio of alleles is 353 : 282). There are distinct difference between crucian carp and silver crucian carp on the patterns of electrophoresis pictures of PCR products. The results also showed that in the locus where most individuals are homozygotes, silver crucian carp have more homozygotes and much fewer heterozygotes than normal crucian carp. In contrast, silver crucian carp have more heterozygotes and fewer homozygotes than crucian carp in the locus where most individuals are heterozygotes. In the paper, by comparing the data of genetic equation between crucian carp and silver crucian carp, imbalance of silver crucian carp in each locus and its origin were discussed. Our data suggested that the two crucian carps are very different in population genetic composition. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (1): 1-10]

Key words: wild population; *Carassius auratus gibelio*; gynogenesis; *Carassius auratus* L.