

文章编号: 1000-0615(2017)03-0330-09

DOI: 10.11964/jfc.20160410379

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

徐湛宁, 李福贵, 郑国栋, 陈杰, 蒋霞云, 邹曙明*

(上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为了指导团头鲂耐低氧群体的后续选育工作开展, 利用筛选出的20对微卫星引物, 比较分析了团头鲂耐低氧群体(TN)及其减数分裂(TNM)、有丝分裂(TNDH)雌核发育后代群体的遗传结构; 结果显示, 团头鲂TN、TNM、TNDH及团头鲂“浦江1号”(TPJ1)对照的平均等位基因数(N_a)分别为3.90、3.55、3.45、4.25, 平均观测杂合度(H_o)分别为0.7853、0.3934、0.2768、0.8075, 平均期望杂合度(H_e)分别为0.6491、0.5563、0.4870、0.6855, 平均多态信息含量(PIC)分别为0.5695、0.4796、0.4181、0.6105, TPJ1对照群体的遗传多样性最高, TN群体较TPJ1群体的遗传多样性有所降低, 但不存在显著差异, 仍保持了较高的遗传杂合度, 而2个雌核发育群体(TNM和TNDH)的遗传多样性显著低于TPJ1和TN群体, TNDH群体的遗传多样性显著低于TNM群体。Hardy-Weinberg平衡遗传偏离指数也表明团头鲂TPJ1和TN群体出现杂合子过剩现象, 而TNM、TNDH雌核发育群体则出现了杂合子缺失现象, 纯合子比例高。聚类分析表明, TPJ1和TN群体聚类成一个分支, 而TNM、TNDH雌核发育群体聚类成另一分支, 产生了一定程度的遗传分化。在TN群体中实施雌核发育可加速遗传物质的纯合, 可用于团头鲂进一步耐低氧性状基因的纯化。

关键词: 团头鲂; 耐低氧群体; 雌核发育; 遗传结构; 微卫星标记

中图分类号: Q 343.3; S 917.4

文献标志码: A

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)俗称武昌鱼, 属鲤形目(Cypriniformes), 鲤科(Cyprinidae), 鲂亚科(Cultrinae), 鲂属(*Megalobrama*), 原产于我国长江中下游及其江河湖泊中, 是我国特有的重要草食性经济鱼类之一。由于食物链短、病害少、繁殖简单、鱼苗成活率高及肉质鲜美等特点, 是我国重要养殖对象之一^[1]。经过多年的选育, 现已有体型好、生长快的“浦江1号”团头鲂良种^[2], 为团头鲂养殖业的发展做出了重要贡献。为进一步培育出具有优良性状的团头鲂生产型良种, 本实验室正在选育耐低氧的团头鲂新品系, 其在鱼类抗逆选择育种和生物进化方面具有重要意义。但伴随着人工选育工作的不断开展, 有可能出现增加近交机率、有效群

体数不断减少等情况, 从而导致选育群体的遗传变异程度下降和遗传多样性相应减少^[3], 造成隐性有害基因的积累。因此, 在选育过程中有必要对遗传变异程度和遗传多样性进行监测, 了解其遗传结构的变化, 并通过人工诱导团头鲂雌核发育快速建立纯系, 为培育耐低氧的团头鲂优良品种构建奠基群体。

目前, 人工诱导团头鲂雌核发育有减数分裂和有丝分裂两种方式。虽然同为雌核发育, 二者具有本质的不同。减数分裂雌核发育是通过抑制第二极体排出, 诱导染色体加倍并且在重组时发生交换, 为杂合子; 有丝分裂雌核发育是通过抑制第一次卵裂而形成, 其染色体组是由同一套染色体为模板复制而成, 理论上遗

收稿日期: 2016-04-25 修回日期: 2016-08-13

资助项目: 国家科技支撑计划(2012BAD26B00); 国家自然科学基金(31272633, 31201760); 上海高校知识服务平台(ZF1206)

通信作者: 邹曙明, E-mail: smzou@shou.edu.cn

传组成为纯合, 亦称双单倍体(doubled diploid)^[4]。诱导团头鲂雌核发育不仅可以加快遗传物质的纯合, 还可使优良性状基因以最快的速率纯化。有关团头鲂人工雌核发育群体的遗传结构分析已有报道, 邹曙明等^[5]通过随机扩增多态性DNA (RAPD)技术比较了雌核发育群体G₁和团头鲂选育群体(F₆)基因组DNA的遗传差异情况。唐首杰等^[6]报道采用17个多态性微卫星标记比较分析了团头鲂连续三代减数雌核发育群体的遗传结构及其基因座位的纯合度。张新辉等^[7]采用10个微卫星标记位点对团头鲂正常群体和减数分裂雌核发育群体的遗传多样性进行比较分析。尽管如此, 从分子遗传多样性的角度来看, 尚未见利用微卫星标记技术研究团头鲂有丝分裂雌核发育后代遗传结构的报道。

本研究以团头鲂“浦江1号”(TPJ1)作为对照, 通过微卫星标记技术对耐低氧团头鲂良种选育过程中的团头鲂耐低氧品系(TN)、团头鲂耐低氧品系减数分裂雌核发育后代(TNM)、团头鲂耐低氧品系有丝分裂雌核发育后代(TNDH)的遗传变异和遗传多样性进行跟踪检测, 比较分析选育过程对选育群体遗传结构的影响, 以此制订相应的科学措施来保证选育工作的持续开展, 同时可以增进人工选育对干涉鱼类群体遗传结构和进化影响的了解, 为今后团头鲂耐低氧新品系群体遗传物质的纯合以及耐低氧基因性状的进一步纯化、巩固和发展提供遗传学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

TN、TNM、TNDH均采集自上海海洋大学农业部团头鲂育种中心。TN为在团头鲂“浦江1号”的基础上进行低氧胁迫并开展家系选育获得的F₃代。通过人工催产TN-F₂母本, 采用UV照射遗传失活的鲤(*Cyprinus carpio*)精子刺激TN卵子后冷休克诱导获得TNM和TNDH。TPJ1后代采集自上海松江国家级团头鲂良种场群繁后代。

TN的制备 TN-F₂ ♀92×♂56。分别采用人工挤压腹部的方法获取精液和卵子, 将精液与卵子充分混合, 加水“授精”后倒入滑石粉悬浮液并搅拌脱粘, 之后移至孵化桶中孵化。

TNM的诱导 将紫外线(UV)处理的鲤精液与部分TN-F₂♀92卵子混合, 加水授精并脱

粘, 3~5 min后置于4 °C冷休克处理21~23 min后移至孵化桶中孵化^[5]

TNDH的诱导 将紫外(UV)处理的鲤精液与部分TN-F₂♀92卵子充分混合, 加水授精并脱粘, 20~25 min后置于4 °C冷休克处理21~23 min后移至孵化桶中孵化。

1.2 基因组DNA的提取

DNA提取材料为团头鲂TN、TNM、TNDH及TPJ1的60日龄鱼苗, 每个群体随机选择30尾鱼, 共120尾, 剪取右胸鳍放入95%酒精中-20 °C保存。DNA提取方法参照天根生物科技有限公司生产的海洋动物组织基因组试剂盒(离心柱型)说明书, 提取完成后用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测条带是否单一, 通过分光光度计检测DNA质量和浓度, 保存于-20 °C备用。

1.3 微卫星引物筛选与来源

本研究从60对微卫星引物中筛选出20对扩增稳定且条带清晰的引物, 其中有5对是本实验室人员通过转录组测序EST序列自行开发的团头鲂微卫星引物, 4对标记来自Gao等^[8]通过转录组测序分析设计的EST-SSR引物, 2对标记来自Li等^[9]通过磁珠富集设计的SSR引物, 另外9对来自Tang等^[10]通过5'锚定PCR技术开发设计的团头鲂SSR引物。本研究所用引物全部委托生工生物(上海)有限公司合成。SSR位点及引物信息见表1。

1.4 PCR反应体系与扩增程序

反应体系10 μL, 包含5 μL含染料的2×Taq PCR MasterMix (Taq DNA Polymerase: 0.1 U/μL; MgCl₂: 4 mmol/L; dNTPs each: 0.4 mmol/L), 上下游引物各0.5 μL(10 μmol/L), 0.5 μL模板DNA (30~50 ng), 3.5 μL ddH₂O。PCR反应在Eppendorf Mastercycler ep gradients型PCR仪上进行, 反应程序: 94 °C预变性5 min, 94 °C 30 s, 52~62 °C(可根据表1进行调整)30 s, 72 °C 30 s, 30个循环, 最后72 °C延伸10 min。

1.5 扩增产物凝胶电泳分析

PCR产物在8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)上200 V电泳1.5~2 h, 电泳缓冲液为1×TBE, 胶片大小为195 mm(长)×120 mm(宽)×1 mm(厚)。产物上样量均为1 μL, DNA Marker (50 bp DNA Ladder)上样量为0.5 μL。电泳完成后

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	等位基因大小范围/bp number of alleles	退火温度/°C T_m	引物序列(5'→3') primer sequence
1	EST13	(AC) ₁₄	209~266	57	F: TCTTTCACAAACAAACCCTT R: GGATTATCAAACGCGGACT
2	EST23	(AC) ₁₂	265~352	55	F: GCGATCATCAAGGCAACG R: AGATTCATCAGTCCTGTAGTGT
3	EST37	(TG) ₈	147~216	62	F: CACAAACCATAAAACACAG R: AATGCCATAAAAACACAC
4	EST66	(GT) ₂₀	290~349	60	F: TCAATCAGGCATAAACAT R: AACTAACTAGCACGCAAA
5	Mam03	(CA) ₁₈	231~324	60	F: TTGCAGGTACTGTGGGAAAA R: AGCAACATGCAACATCAAA
6	Mam25	(AC) ₅ (AC) ₁₄	166~252	62	F: TCACACCAACAACCCGAAT R: CCTGTCTTCTCCAGGCATC
7	Me.Am._1	(AGAAG) ₅	210~275	52	F: AGCGTGAGGATTCCAATT R: AGAGGCAGAAACAACAGA
8	Me.Am._15	(CATT) ₅	175~200	56	F: GTGGATGCCCTGAGTGAA R: AATGTGTTTCGTGTGGAGAG
9	Me.Am._17	(TGGA) ₅	180~320	56	F: AGGCGAAAAGAAACACTGTGT R: GGTGTTTCGTGCGATGTTGTA
10	Me.Am._35	(AC) ₉ ...(GT) ₇	123~212	59	F: GACGACTGAGGGGTTAGAGG R: AGCGAGTGATGCCAGAAAAC
11	Me.Am._36	(GT) ₉ ...(GT) ₇	124~247	57	F: TCTCGATGGACACGTATGG R: AGCATCTCTGGTTGTGGACA
12	TTF1	(CA) ₂₁	243~335	55.9	F: GGAGATGAAAGCTGAAGGAA R: ATGCACGAACTGCCACATAA
13	TTF3	(TC) ₂₇	224~279	56.4	F: AAGACGCCACGAAACTTTA R: CTGACCGGATAGCAAAGTGA
14	TTF4	(CA) ₁₄	157~282	60.5	F: GACTGGAGTCGTCAGGCTTC R: TGCCCCACATTGTTAGACTG
15	TTF5	(CA) ₁₅	150~222	60.5	F: CTAGTGGGTAGGTGGCAGGT R: GACTGGGAGAGACAGAGGAG
16	TTF6	(GA) ₁₃	182~218	60.5	F: GGCAGGTCAGGCACATTTAT R: TCTCTACCTCACAT CTCTATTCT
17	TTF7	(GT) ₁₃	279~335	60.5	F: ATGGGTAAGCCGATGGATTC R: GTGTCAGCATTCCAGCTCCT
18	TTF8	(GT) ₁₈	162~224	60.5	F: GGGAAATAAAGGGAGAAAAGTG R: TTTCTCCTGATCCGTTGACC
19	TTF9	(TC) ₁₉	269~319	56.9	F: AAGACGCCACGAAACTTTA R: GAGGTGGGACTGTGTGGAAT
20	TTF10	(TC) ₆ (TG) ₅	255~308	55.9	F: AAACAGGCTCGCAATTTTC R: TACCCACACACTC TTATTCTCTC

注: F为正向引物; R为反向引物; EST13~EST66、Mam03~Mam25和TTF1~TTF10是团头鲂微卫星引物, 分别来源于文献[8]、[9]和[10]

Notes: F. forward primer; R. reverse primer; EST13~EST66, Mam03~Mam25 and TTF1~TTF10 are microsatellite primers and are respectively from reference [8], [9] and [10]

进行银染, 染色方法根据张倩倩等^[11]的方法稍作修改。最后将胶片铺放在观片灯箱上用相机进行拍照。

1.6 数据统计与分析

通过Quantity One软件读取微卫星位点的条带大小, 依据个体产生的条带位置的方法确定基因型。用Popgene 1.32软件进行分析, 统计每个微卫星位点在4个团头鲂群体中的等位基因数(number of alleles, N_a)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)、计算群体间的Nei's遗传相似性(genetic identity)和遗传距离(genetic distance), 并基于该遗传距离利用MEGA 5.1软件对4个团头

鲂群体进行基于非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)的树状聚类图的绘制。根据Botstein公式^[12]计算Hardy-Weinberg遗传偏离指数(D)^[13], 最后用Cervus 3.0软件计算多态信息含量(PI_C)。

2 结果

2.1 微卫星位点电泳检测结果

本实验筛选出的20对微卫星引物具有多态性良好的特征, 在检测群体中均能扩增出稳定的PCR产物, 图1为微卫星位点TTF6在团头鲂减数分裂和有丝分裂雌核发育群体中的扩增电泳图谱。

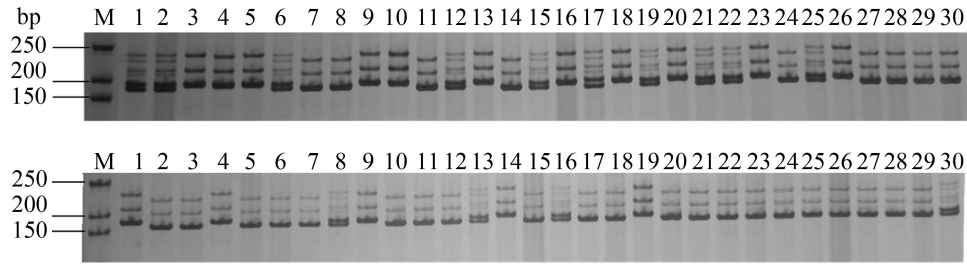


图1 TTF6引物在团头鲂减数分裂(上图)和有丝分裂(下图)群体中的PAGE图谱

M. 50 bp DNA Ladder; 1~30. 团头鲂雌核发育个体

Fig. 1 PAGE analysis by primers TTF6 in meiotic gynogenesis (upper), mitotic gynogenesis (lower) populations of *M. amblycephala*

M. 50 bp DNA Ladder; 1-30. *M. amblycephala* gynogenesis individuals

2.2 团头鲂4个群体的SSR扩增结果

本研究共筛选出了20对清晰且重复性好的SSR引物, 利用这20对微卫星引物对团头鲂TN、TNM、TNDH及TPJ1共120尾样品进行扩增分析, 团头鲂TN、TNM、TNDH及TPJ1 4个群体分别扩增到78、71、69、85个等位基因, N_a 分别为3.90、3.55、3.45、4.25, H_o 分别为0.7853、0.3934、0.2768、0.8075, H_e 分别为0.6491、0.5563、0.4870、0.6855, PIC 分别为0.5695、0.4796、0.4181、0.6105, 这能够在分子水平上准确反映群体内的遗传关系(表2)。从遗传参数中可得出, 这4个群体的遗传多样性为TPJ1>TN>TNM>TNDH, 即TPJ1对照群体的遗传多样性最高, TNDH群体遗传多样性最低。

2.3 Hardy-Weinberg平衡遗传偏离指数

各位点的Hardy-Weinberg平衡遗传偏离指数(D)为-0.8412~0.9051, 各位点 D 平均为-0.6305~0.2073。TPJ1群体和TN群体平均Hardy-Weinberg平衡遗传偏离指数为0.2150、0.2359, 大多数位点在这两个群体中表现为杂合子过剩($D>0$)。TNM群体和TNDH群体平均Hardy-Weinberg平衡遗传偏离指数为-0.2595、-0.4200, 大多数位点在这两个群体中表现为杂合子缺失($D<0$), 实际纯合子过量现象(表3)。

2.4 团头鲂4个群体间的遗传关系和聚类分析

通过Popgene 1.32软件计算不同团头鲂群体间的Nei's相似性和遗传距离(表4)。4个团头鲂群体间的Nei's相似系数为0.8240~0.9281, 遗传距离为0.0746~0.2236。其中, TNM群体与TNDH群体间遗传距离最小(0.0746), 遗传相似性最高

(0.9281); TPJ1群体与TNDH群体间遗传距离最大(0.2236), 遗传相似系数最小(0.7796)。在不同群体间Nei's遗传距离的基础上利用MEGA5.1软件构建了4个团头鲂群体间的UPGMA聚类关系(图2)。结果显示, 4个群体聚类成明显的两支, TPJ1和TN群体共同聚类成一个分支, 而2个雌核发育群体(TNM和TNDH)共同聚类成另一个分支, 表明TN群体和雌核发育群体(TNM和TNDH)间产生了一定程度的遗传分化。

3 讨论

研究表明等位基因的数目、观测杂合度、期望杂合度和多态性信息含量等遗传参数可从多个角度反映群体的遗传多样性和遗传潜力^[14]。通常当 $PIC>0.5$ 为高度多态性位点, $0.25<PIC<0.5$ 为中度多态性位点, $PIC<0.25$ 为低度多态性位点^[12]。本研究中TPJ1群体与TN群体的 N_a 为4.25、3.90, H_o 为0.8075、0.7853, H_e 为0.6855、0.6491, PIC 为0.6105、0.5695, 说明TN群体较TPJ1群体的遗传多样性有所降低, 但不存在显著差异($P>0.05$), 仍保持了较高的遗传杂合度, 表现为较高的多态性($PIC>0.5$)。TNM、TNDH群体的 N_a 为3.55、3.45, H_o 为0.3934、0.2768, H_e 为0.5563、0.4870, PIC 为0.4796、0.4181, TNDH群体的遗传多样性显著低于TNM群体($P<0.05$), 表明诱导有丝分裂雌核发育群体相对于减数分裂可以得到更纯合的后代。而且2个雌核发育群体(TNM和TNDH)的遗传多样性显著低于TPJ1和TN群体($P<0.05$)。这与刘海金等^[15]诱导牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)有丝分裂雌核发育比减数分裂雌核发育能更有效获得纯合后代, 并且两种雌核

表2 团头鲂4个群体在20个微卫星位点的多样性指数

Tab. 2 The polymorphic information at 20 microsatellite loci in the four populations of *M. amblycephala*

位点 locus	等位基因数 N_a				观测杂合度 H_o				期望杂合度 H_e				多态信息含量 PIC			
	TPJ1	TN	TNM	TNDH	TPJ1	TN	TNM	TNDH	TPJ1	TN	TNM	TNDH	TPJ1	TN	TNM	TNDH
EST13	3	3	3	3	0.8000	0.7333	0.6000	0.3661	0.6486	0.5893	0.5588	0.5554	0.5650	0.5044	0.4646	0.4532
EST23	4	4	4	3	1.0000	1.0000	0.5333	0.2837	0.6000	0.7582	0.5040	0.5181	0.5039	0.6981	0.4416	0.3956
EST37	6	5	5	5	0.8333	0.8333	0.5011	0.2333	0.7418	0.7638	0.6876	0.4480	0.6874	0.7106	0.6358	0.4170
EST66	3	3	2	2	0.8667	0.8031	0.3667	0.1000	0.6401	0.5237	0.2825	0.1554	0.5570	0.4244	0.2392	0.1411
Mam03	5	5	5	5	0.6667	0.8334	0.3333	0.3212	0.7390	0.7350	0.6226	0.5288	0.6835	0.6768	0.5784	0.4704
Mam25	4	4	3	2	0.9667	0.9334	0.4667	0.2667	0.7588	0.6955	0.4842	0.2825	0.6988	0.6269	0.3776	0.2392
Me.Am_1	6	6	3	3	0.1333	0.2667	0.2100	0.3764	0.8395	0.7599	0.6266	0.5944	0.8002	0.7071	0.5346	0.4945
Me.Am_15	5	5	4	4	0.8333	0.9012	0.5333	0.4356	0.7921	0.7542	0.7288	0.6910	0.7425	0.7013	0.6638	0.6136
Me.Am_17	3	3	2	2	0.7010	0.6012	0.2667	0.1956	0.6198	0.5492	0.3045	0.3254	0.5374	0.4495	0.2546	0.2688
Me.Am_35	5	3	4	3	0.8011	0.7667	0.2314	0.2233	0.7893	0.5695	0.6486	0.4537	0.7391	0.4612	0.5676	0.4039
Me.Am_36	3	3	4	4	1.0000	0.8667	0.4322	0.2333	0.5249	0.5644	0.7294	0.5712	0.3991	0.4583	0.6664	0.5157
TTF1	7	7	6	6	0.8333	0.7667	0.4112	0.3667	0.7667	0.8480	0.6638	0.6977	0.7214	0.8124	0.5892	0.6514
TTF3	4	3	3	3	0.8333	0.8010	0.3334	0.2333	0.7158	0.6305	0.5791	0.5808	0.6480	0.5478	0.4767	0.4863
TTF4	6	4	4	4	0.9667	0.8667	0.2333	0.2333	0.7090	0.6571	0.5181	0.3153	0.6443	0.5812	0.4675	0.2792
TTF5	6	5	5	5	0.9000	0.8667	0.4221	0.4321	0.7650	0.7475	0.6441	0.6452	0.7169	0.6950	0.5686	0.5787
TTF6	3	3	2	3	0.8112	0.7667	0.3331	0.1333	0.6706	0.5237	0.5062	0.3864	0.5851	0.4344	0.3739	0.3418
TTF7	2	2	2	2	0.8012	0.7667	0.5000	0.2643	0.5062	0.5079	0.4627	0.4994	0.3739	0.3747	0.3515	0.3705
TTF8	5	5	5	5	0.8021	0.8333	0.4113	0.2516	0.7243	0.7062	0.5723	0.4040	0.6649	0.6468	0.5329	0.3794
TTF9	3	3	3	3	0.8333	0.8333	0.4153	0.3221	0.6559	0.5893	0.5757	0.5927	0.5694	0.5044	0.4747	0.4935
TTF10	2	2	2	2	0.7667	0.6667	0.3333	0.2643	0.5034	0.5085	0.4271	0.4944	0.3725	0.3750	0.3318	0.3680
平均 mean	4.25	3.90	3.55	3.45	0.8075	0.7853	0.3934	0.2768	0.6855	0.6491	0.5563	0.4870	0.6105	0.5695	0.4796	0.4181

发育二倍体均比普通二倍体纯合度高的结论相符。另一方面根据群体遗传学的角度, 1尾或多尾雌鱼后代的雌核发育群体可视为经历了最极端的遗传瓶颈, 因此在遗传多样性水平上应明显降低^[16]。理论上雌核发育可以获得后代为纯合的个体, 但实际操作中并不全是, 刘海金等^[17]通过静水压抑制卵裂获得牙鲈的有丝分裂雌核发育后代, 其平均杂合子比例为0.2338。刘海金等^[15]对牙鲈的有丝分裂雌核发育后代进行遗传分析, 表明有丝分裂雌核发育后代纯合度高, 并且在10个微卫星位点实现了等位基因的完全纯合, 无杂合个体出现。本实验的20个微卫星位点检测的团头鲂雌核发育后代既有纯合, 也有杂合, 因为用于雌核发育的母本为92尾团头鲂, 导致有丝

分裂雌核发育后代纯合度不高, 由于雌核发育的遗传物质均来自于母本, 从而群体遗传的多态性应明显降低, 在遗传纯合度方面雌核发育团头鲂群体已获得了明显提高。

Hardy-Weinberg平衡遗传偏离指数(D), 可以反映 H_o 和 H_e 二者之间的平衡关系, D 值越接近0, 基因型的分布越接近于平衡状态, D 值为正($D>0$)时表现为杂合子过剩, D 值为负($D<0$)时则表现为杂合子缺失^[18]。本研究中的 D 值变化范围为 $-0.4200\sim 0.2359$, TPJ1和TN在20个位点的 D 值基本为正, 表现为杂合子过剩严重。一般养殖群体中的子代群体往往由于亲本数量所限, 奠基者效应(founder effect)会导致连锁不平衡现象, 继而造成

表 3 团头鲂4个群体遗传偏离指数(D)
Tab. 3 *D* assessed on the four populations of
M. amblycephala

位点 locus	遗传偏离指数 <i>D</i>			
	TPJ1	TN	TNM	TNDH
EST37	0.1233	0.0910	-0.2712	-0.4792
EST13	0.2334	0.2444	0.0737	-0.3408
EST23	0.6667	0.3189	0.0581	-0.4524
EST66	0.3540	0.5335	0.2981	-0.3565
Mam03	-0.0978	0.1339	-0.4647	-0.3926
Mam25	0.2740	0.3421	-0.0361	-0.0559
Me.Am._1	-0.8412	-0.6490	-0.6649	-0.3668
Me.Am._15	0.0520	0.1949	-0.2682	-0.3696
Me.Am._17	0.1310	0.0947	-0.1241	-0.3989
Me.Am._35	0.0149	0.3463	-0.6432	-0.5078
Me.Am._36	0.9051	0.5356	-0.4075	-0.5916
TTF1	0.0869	-0.0959	-0.3805	-0.4744
TTF3	0.1642	0.2704	-0.4243	-0.5983
TTF4	0.3635	0.3190	-0.5497	-0.2601
TTF5	0.1765	0.1595	-0.3447	-0.3303
TTF6	0.2097	0.4640	-0.3420	-0.6550
TTF7	0.5828	0.5095	0.0806	-0.4708
TTF8	0.1074	0.1800	-0.2813	-0.3772
TTF9	0.2705	0.4141	-0.2786	-0.4566
TTF10	0.5230	0.3111	-0.2196	-0.4654
平均 mean	0.2150	0.2359	-0.2595	-0.4200

杂合子过剩^[19], 分析本实验所出现的杂合子过剩现象, 可能的原因: ①采集样本数都在封闭群体中; ②与采集样本数密切相关; ③正常耐低氧群体等位基因均来自父母本, 杂合度和多态性较高。2个雌核发育群体(TNM和TNDH)在20个位点的*D*值基本为负, 表现为杂合子缺失, 实际

表 4 团头鲂不同群体的Nei's遗传相似性
(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)

Tab. 4 Nei's genetic identity (above diagonal) and distance
(below diagonal) in *M. amblycephala*

群体 populations	TPJ1	TN	TNM	TNDH
TPJ1		0.8881	0.8240	0.7996
TN	0.1187		0.8715	0.8576
TNM	0.1936	0.1375		0.9281
TNDH	0.2236	0.1536	0.0746	

纯合子过量, 反映了雌核发育更利于基因的纯合。杂合子缺失除与无效基因和研究样本范围大小有关外, 还可能与种群退化、性别比例不均衡、亲缘近交和人为干扰所造成的稀有碱基丢失等因素有关^[20], 分析本实验所出现的杂合子缺失现象, 可能的原因: ①减数分裂雌核发育群体的母本为92尾团头鲂, 母本产生的后代多表现为在着丝粒较近的位点, 等位基因之间不易发生重组导致产生纯合个体的比例高。其原理为重组的发生和基因座位与着丝点的距离有关, 距着丝点越近重组发生的机率越小, 多表现为纯合, 反之距离越远越易发生重组, 多表现为杂合^[15]。②经过抑制第一次卵裂而形成的团头鲂有丝分裂雌核发育群体, 其染色体组是由同一套染色体为模板复制而成, 理论上遗传组成为纯合。

本研究通过多态性的微卫星位点计算遗传距离和聚类分析, 可以真实反映4个团头鲂群体间的遗传变异程度。研究表明群体之间的亲缘关系越近, 则遗传距离越小, 相似系数值越大, 遗传变异程度越低^[21]。本研究中TNM群体和TNDH群体间的遗传距离最小为0.0746, 遗传相似系数最大为0.9281, 说明人工诱导团头鲂雌核发育的方法能明显加快基因的纯合速率, 使控制优良性状的基因实现快速纯合化, 对快速选育耐低氧的团头鲂新品系有着重要意义; 并且

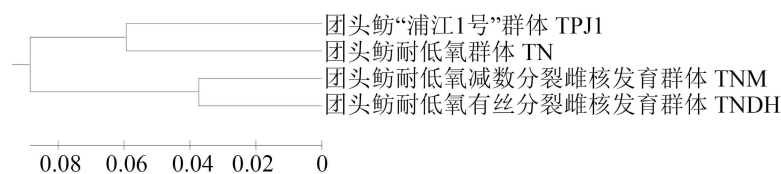


图 2 不同团头鲂群体的UPGMA聚类图

Fig. 2 Dendrogram of relationships among *M. amblycephala* populations using UPGMA method of clustering

所培育的团头鲂耐低氧雌核发育群体(TNM和TNDH)已经是一个遗传一致性较高的品系。根据聚类分析研究结果, TPJ1群体和TN群体单独聚为一个分支, 而2个雌核发育群体(TNM和TNDH)单独聚成另一个分支, 说明人工诱导雌核发育群体(TNM和TNDH)与TN群体之间发生了明显的遗传分化, 同时也说明对于快速建立具有特定遗传特征的品系, 雌核发育是一种有效方法, 这在以往的研究报道^[22-24]中已得到验证。

本研究中人工诱导团头鲂雌核发育群体(TNM和TNDH)的各项遗传结构指数均低于正常团头鲂群体, 充分表明了这一人为干预选择育种的方法降低了选育群体的遗传变异程度和遗传多样性。研究表明, 遗传多样性的丧失或过低将导致其适应各种不同环境的能力下降, 为更好地适应环境变化, 需要在人工选择育种中维持一定程度的群体遗传多样性, 这样才有利于养殖业的可持续健康发展^[16]。因此, 在团头鲂人工选育过程中如何保持群体遗传多样性的平衡和控制遗传变异的程度显得尤为必要, 今后应继续开展对选育群体的遗传结构进行检测的研究, 进一步发掘其选育潜力。本实验对团头鲂耐低氧群体(TN)和耐低氧雌核发育群体(TNM和TNDH)的遗传结构研究将为以后团头鲂耐低氧新品系的人工选育工作提供理论依据。

参考文献:

- [1] 柯鸿文. 团头鲂的人工繁殖与饲养试验[J]. 水生生物学集刊, 1965, 5(2): 282-283.
Ke H W. An excellent fresh-water food fish *Megalobrama amblycephala* and its propagating and culturing[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1965, 5(2): 282-283 (in Chinese).
- [2] 李思发. 鱼类良种介绍团头鲂浦江1号[J]. 中国水产, 2001(11): 52.
Li S F. Introduction of improved varieties of fish No. 1 Pujiang *Megalobrama amblycephala*[J]. China Fisheries, 2001(11): 52 (in Chinese).
- [3] 唐首杰. 团头鲂野生群体、驯养群体、遗传改良群体的遗传变异[D]. 上海海洋大学, 2009.
Tang S J. Genetic variation in wild, domesticated and genetically improved populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2009(in Chinese).
- [4] Komen H, Thorgaard G H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review[J]. Aquaculture, 2007, 269(1-4): 150-173.
- [5] 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.
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 (in Chinese).
- [6] 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.
Tang S J, Li S F, Cai W Q. Analysis of genetic homozygosity and diversity of three successive generations of meio-gynogenetic population in *Megalobrama amblycephala* using microsatellite markers[J]. Freshwater Fisheries, 2014, 44(2): 3-8 (in Chinese).
- [7] 张新辉, 高泽霞, 罗伟, 等. 雌核发育团头鲂的形态和遗传特征分析[J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 126-132.
Zhang X H, Gao Z X, Luo W, et al. Studies on morphological characteristics and genetic analysis of the gynogenesis blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(1): 126-132 (in Chinese).
- [8] Gao Z X, Luo W, Liu H, et al. Transcriptome analysis and SSR/SNP markers information of the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42637.
- [9] Li W T, Liao X L, Yu X M, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7(5): 771-773.
- [10] Tang S J, Li S F, Cai W Q. Development of microsatellite markers for blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* using 5'-anchored PCR[J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(3): 971-974.
- [11] 张倩倩, 陈杰, 蒋霞云, 等. 不同鳊鱼类群体微卫星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.
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 (in Chinese).
- [12] 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.
- [13] 耿波, 孙效文, 梁利群, 等. 利用17个微卫星标记分析鳙鱼的遗传多样性[J]. 遗传, 2006, 28(6): 683-688.
- Geng B, Sun X W, Liang L Q, *et al.* Microsatellite analysis of genetic diversity of *Aristichthys nobilis* in China[J]. Hereditas, 2006, 28(6): 683-688 (in Chinese).
- [14] 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): 768-775.
- Yang H, Li D Y, Cao X, *et al.* Genetic potential analysis of six tilapia populations by microsatellite DNA markers[J]. Hereditas (Beijing), 2011, 33(7): 768-775 (in Chinese).
- [15] 刘海金, 刘永新, 王玉芬, 等. 牙鲮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): 718-724.
- 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): 718-724 (in Chinese).
- [16] 徐营, 邵长伟, 邓寒, 等. 半滑舌鳎养殖群体和减数分裂雌核发育群体的微卫星标记遗传多样性分析[J]. 渔业科学进展, 2011, 32(4): 14-19.
- Xu Y, Shao C W, Deng H, *et al.* Genetic analysis of cultured and gynogenetic stocks of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* by using SSR markers[J]. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(4): 14-19 (in Chinese).
- [17] 刘海金, 陆桂, 王晓梅, 等. 有丝分裂雌核发育牙鲮的微卫星鉴定[J]. 中国水产科学, 2010, 17(5): 889-894.
- Liu H J, Lu G, Wang X M, *et al.* Identification of mitogynogenetic Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using microsatellite marker[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(5): 889-894 (in Chinese).
- [18] 李鹏飞, 刘萍, 柳学周, 等. 漠斑牙鲮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.
- 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 (in Chinese).
- [19] 王蕾, 张立冬, 万玉美, 等. 牙鲮微卫星标记的筛选及群体遗传结构分析[J]. 遗传, 2010, 32(10): 1057-1064.
- Wang L, Zhang L D, Wan Y M, *et al.* Isolation of microsatellite markers from *Paralichthys olivaceus* and its application in genetic structure analysis[J]. Hereditas (Beijing), 2010, 32(10): 1057-1064 (in Chinese).
- [20] 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, 2006, 8(1): 17-26.
- [21] 邵长伟, 廖小林, 田永胜, 等. 牙鲮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.
- 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 (in Chinese).
- [22] 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.
- 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 (in Chinese).
- [23] 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.
- [24] 周裕华, 邹桂伟, 梁宏伟, 等. 人工雌核发育鲢近交F₂微卫星DNA变异分析[J]. 淡水渔业, 2007, 37(4): 30-33.
- Zhou Y H, Zou G W, Liang H W, *et al.* Variation in microsatellite DNA of inbreeding F₂ progeny of artificial gynogenetic silver carp[J]. Freshwater Fisheries, 2007, 37(4): 30-33 (in Chinese).

Analysis of genetic structure of gynogenetic population in new strain of hypoxia-tolerant *Megalobrama amblycephala* using microsatellite markers

XU Zhanning, LI Fugui, ZHENG Guodong, CHEN Jie, JIANG Xiayun, ZOU Shuming*

(Key Laboratory of Genetic Resources for Freshwater Aquaculture and Fisheries,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To guide the subsequent breeding of hypoxia-tolerant population of *Megalobrama amblycephala*; genetic structures of hypoxia-tolerant (TN), meiotic gynogenesis (TNM), mitotic gynogenesis populations (TNDH) of *M. amblycephala* were analyzed using twenty microsatellite markers in this study. The mean value of number of alleles (N_a) of *M. amblycephala* TN, TNM, TNDH and the control TPJ1 was 3.90, 3.55, 3.45 and 2.56, respectively. The mean value of observed heterozygosity (H_o) was 0.7853, 0.3934, 0.2768 and 0.8075, respectively. The mean value of expected heterozygosity (H_e) was 0.6491, 0.5563, 0.4870 and 0.6855, respectively. And the average value of polymorphism information content (PIC) was 0.5695, 0.4796, 0.4181 and 0.6105, respectively. It demonstrated that the genetic diversity of TPJ1 was the highest, and TN population had lower genetic diversity, but there is no significant difference and there was the high genetic heterozygosity. The genetic diversity of TNDH population was significantly lower than TNM population, and the genetic diversity of the gynogenetic (TNM and TNDH) was significantly lower than TPJ1 and TN populations. The mean Hardy-Weinberg index of the TPJ1 and TN had heterozygote excess and the gynogenetic populations (TNM and TNDH) showed heterozygote deficit. Using unweighted pair-group method with arithmetic means method (UPGMA) based on their genetic distances, TPJ1 population and TN population were grouped in one cluster, while TNM population and TNDH population were classified into another cluster, indicating a genetic differentiation between the two clusters. Our results show that the hypoxia-tolerant group in *M. amblycephala* (TN) in gynogenesis can accelerate homozygosity of genetic material and will have further purification of *M. amblycephala* hypoxia-tolerant genes.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; hypoxia-tolerant; gynogenesis; genetic structure; microsatellite

Corresponding author: ZOU Shuming. E-mail: smzou@shou.edu.cn

Funding projects: The Key Technologies Research and Development Program of China (2012BAD26B00); National Science Foundation of China (31272633, 31201760); Shanghai University Knowledge Service Platform (ZF1206)