文章编号:1000-0615(2005)02-0161-05

快速近交对团头鲂遗传结构的影响和近交效应的估算

李思发, 杨怀宇, 邹曙明
(上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室,上海 200090)

摘要:利用RAPD技术定量分析了快速近交(全同胞近交,雌核发育)对团头鲂养育群体遗传结构的影响。经群体遗传学分析软件ARLEQUIN对RAPD图谱计算,在实测171个位点中,系统选育7代群体(F_7)、全同胞近交4代群体(S_4)及雌核发育2代群体(G_2)的多态位点个数从大到小依次为F_7(133) > S_4(117) > G_2(106);位点基因多样性从大到小依次为F_7(0.30) > S_4(0.28) > G_2(0.24);根据这两个指标,一代雌核发育对基因纯合的影响力度为一代全同胞交配的3.3倍和6倍。3群体的群体内方差百分比为83.10%,群体间方差百分比为16.90%,固定性系数F_{st}(0.169)的$P<0.01$,遗传差异极显著,证明同选育群体相比,近交群体的基因型发生了明显异化。通过试验估算的近交系数值低于理论上的近交系数值,应是环境影响的存在和作用所致。

关键词:团头鲂;遗传结构;近交;随机扩增多态性DNA;分子方差分析
中图分类号:S917 **文献标识码**:A

Effects on genetic structure from quick inbreeding and estimation of inbreeding response in cultured populations of *Megalobrama amblycephala*

LI Si-fa, YANG Huai-yu, ZOU Shu-ming
(*Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China*)

Abstract: The changes of genetic structure by quick inbreeding (full-sib breeding, gynogenesis) on blunt snout bream have been analyzed by random amplified polymorphism DNA (RAPD). Using the population genetic analysis software (ARLEQUIN), in 171 observed loci, the 7th selected population (F_7), 4th generation of systematic full-sib inbred population (S_4) and a 2nd systematic gynogenesis population (G_2) of blunt snout bream, the rank of number of polymorphic site was F_7(133) > S_4(117) > G_2(106), and the rank of average gene diversity over loci in above three populations was F_7(0.30), S_4(0.28), and G_2(0.24). Based on these two indicators, the effectiveness on the gene homogenization by one generation of gynogenesis was 3 and 6 times higher than that from one generation of full-sib inbreeding respectively. By AMOVA analysis, the variance percentage was 83.10% from within population and 16.90% from among population; Fixation index (F_{st}) was 0.169 ($P<0.01$), which indicates the difference among above three populations is very significant. It is proved that inbreeding can cause a significant change in genotype of fish. Because of the existence of environmental influence, the estimated value of inbreeding co-efficient is lower than that of theoretical inbreeding co-efficient.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; genetic structure; inbreeding; RAPD; analysis of molecular variance

近交,即近亲交配,指彼此有亲缘关系的个体之间的交配[1]。在近亲交配过程中,经常出现以下两种负面现象[2]:①与适应性(fitness)相关的性状(如繁殖和存活)的群体平均值的降低以及隐性有害基因的表达,也就是养殖过程中常见的近交衰退;②导致基因频率的变化和稀有基因的丢失,

收稿日期:2004-07-26
资助项目:团头鲂良种选育[农科攻字(98)01-12]
作者简介:李思发(1938-),男,江苏镇江人,上海水产大学首席教授,博士生导师,主要从事水产动物种质资源与苗种工程的研究。Tel:021-65710333, E-mail: lsf038@mail online.sh cn

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

即群体遗传多样性的丧失。国内外对近交问题的研究也主要集中在这两个方面：一是近交衰退，二是基因纯合。许多学者都对近交的产生、结果以及危害进行过不同程度的研究[3-10]；另一反面，有的育种学家提醒我们，近交对纯种的选育潜力巨大[11,12]。总之，近交对于遗传学家和育种学家是一个长期困惑的带有双刃剑性质的问题。时至今日，我们对近交的正面的和负面的影响，尤其是遗传机理的认识尚非常肤浅，水产动物种质资源的保护及苗种生产的产业化发展迫切需要提高有关认识，以利于制定有效的防范或利用措施。

本实验选用"上海水产大学团头鲂选育课题组"育成的团头鲂浦江1号[13](F_6)的后代(F_7)，以及育种过程中建立的两种育种材料(全同胞近交群体、雌核发育群体)，这些群体都有较为完整的家谱和繁殖记录，使得对他们近交效应的研究成为可能。实验手段方面则选用随机扩增多态性DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术。通过对这些具有不同遗传背景的团头鲂群体的遗传结构的研究，希望从DNA水平了解他们在基因型上的差异，并定量地分析不同近交水平所导致的杂合度的变化，为鱼类种质的创新、养殖群体尤其是选育群体的科学管理，以及分子标记辅助育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选育群体，是以1985－1986年引进的原种为奠基群，在数量遗传理论指导下，群体选育与生物技术集成获得的"浦江1号"良种(F_6)的持续选育的后代(F_7)，简称F_7。

全同胞近交群体，是1989年在选育群体第3代建立的1对全同胞兄妹近交系，其子代均随机留取，但仅1对鱼传代。本研究使用的是全同胞近交第4代，简称S_4。

雌核发育群体，为2000年对团头鲂选育系第五代进行减数分裂雌核发育，2002年从雌核发育群体中随机选取一条成熟雌鱼再次进行减数分裂雌核发育的子代，即两代雌核发育鱼，简称G_2。

所有材料均取自上海水产大学南汇种质资源实验场，每群体随机取样15尾鱼，提取核DNA。10碱基随机引物为上海生工公司产品，共20个。

1.2 实验方法

基因组DNA的提取　采用蛋白酶K消化、酚/氯仿法[6]从新鲜或－20℃保存的鱼尾鳍提取基因组DNA。

基因组DNA的RAPD分析　参照Williams[14]的方法。具体为：PCR反应混合物中含10 mmol·L^{-1} Tris-HCl，pH9.0，50 mmol·L^{-1} KCl，3.0 mmol·L^{-1} $MgCl_2$，0.001%的明胶，0.1 mmol·L^{-1}每种dNTP，引物浓度为0.2 μmol·L^{-1}，约125 ng基因组DNA，0.6单位*Taq*酶(Biostar产品)，反应总体积为25 μL，加入30 μL石蜡油。于PE480 PCR扩增仪上反应，循环程序为：94 ℃预变性4 min，接着94 ℃ 45 s，36 ℃ 45 s，72 ℃ 90 s。45个循环后，72 ℃延伸10 min。取8 μL扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳，EB染色于Syngene凝胶成像系统中照相、分析。

1.3 数据处理与分析

电泳获得的基因组指纹图谱，在同一电泳迁移位置上有扩增带(显性)的记为1，没有扩增带(隐性)的记为0，数据经群体遗传学分析软件Arlequin 2.0[15]处理，计算3个群体的多态位点数(number of polymorphic sites)，成对比较差异平均数(mean number of pairwise differences)[16,17]和位点基因平均多样性(average gene diversity over loci)[16-18]；并用这一软件进行分子方差分析(analysis of molecular variance, AMOVA)，计算群体间的遗传距离(Reynolds' distance)[19]，群体间差异显著性通过固定性系数(fixation index, F_{st})[15]判定。

成对比较差异平均数(π)[16,17]计算公式：

$$\hat{\pi}=\sum_{i=1}^{k}\sum_{j<i}P_iP_j\hat{d}_{ij} \tag{1}$$

式中$\hat{d}_{ij}$表示由于单倍型i和j的分离出现突变数目的估计。K表示单倍型的数目，P_i表示单倍型i的频率。

位点基因多样性(π_n)[16-18]计算公式：

$$\hat{\pi}_n=\frac{\sum_{i=1}^{k}\sum_{j<i}P_iP_j\hat{d}_{ij}}{L} \tag{2}$$

式中L表示位点数，余同式(1)。

遗传距离(D)用Reynolds' distance公式计算：

$$D=-\ln(1-F_{st}) \tag{3}$$

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

式中 F_{st} 为固定性指数(fixation index)[15]，表示群体间遗传分化程度，通过 AMOVA 计算。

2 结果

2.1 遗传多样性的变化

RAPD 实验共采用 45 个随机引物，选取其中 20 个谱带清晰，重复性佳的引物。引物序列如表 1。以这些引物的实验结果分析，分析结果如表 2。多态位点数、成对比较差异平均数及位点基因多样性 3 个指标均一致表明，选育群体(F_7)的遗传多样性高于全同胞近交群体(S_4)和雌核发育群体(G_2)，而 G_2 群体的遗传多样性最低。

2.2 群体间差异

从方差的百分比(即对差异的贡献率)来看，群体间方差百分比达 16.90%，群体内方差百分比为 83.10%。如表 3。

经 t 检验，群体间方差组分(v_a)及 F_{st} 的 P 值均小于 0.01，表明群体间差异极显著。

表 1 稳定扩增的 10 碱基随机引物序列

Tab.1 Sequences of the stably amplified random 10-base primers

引物序号 primer no.	5′~3′序列 5′-3′sequence	引物序号 primer No.	5′~3′序列 5′-3′sequence
S8	GTCCACACGG	S33	CAGCACCCAC
S13	TTCCCCCGCT	S34	TCTGTGCTGG
S14	TCCGCTCTGG	S35	TTCCGAACCC
S18	CCACAGCAGT	S41	ACCGCGAAGG
S21	CAGGCCCTTC	S51	AGCGCCATTG
S23	AGTCAGCCAC	S109	TGTAGCTGGG
S24	AATCGGGCTG	S113	GACGCCACAC
S25	AGGGGTCTTG	S133	GGCTGCAGAA
S28	GTGACGTAGG	S206	CAAGGGCAGA
S32	TCGGCGATAG	S208	AACGGCGACA

表 2 团头鲂选育群体(F_7)、全同胞近交群体(S_4)和雌核发育群体(G_2)的遗传多样性

Tab.2 Gene diversity of selected population (F_7), full-sib inbred population (S_4), gynogenesis population (G_2) of *Megalobrama amblycephala*

	引物数 number of primers	实测基因位点数 observed number of loci	多态位点数 number of polymorphic sites	成对比较差异平均数 mean number of pairwise differences (mean ± SE)	位点基因平均多样性 average gene diversity over loci (mean ± SE)
选育群体(F_7) selected population	20	171	133	50.98 ± 24.15	0.30 ± 0.16
全同胞近交群体(S_4) full-sib inbred population	20	171	117	47.93 ± 22.72	0.28 ± 0.15
雌核发育群体(G_2) gynogenesis population	20	171	106	40.56 ± 19.28	0.24 ± 0.13

表 3 团头鲂选育群体(F_7)、全同胞近交群体(S_4)和雌核发育群体(G_2)的分子方差分析

Tab.3 AMOVA of selected populations (F_7), full-sib inbred population (S_4) and gynogenesis population (G_2) of *Megalobrama amblycephala*

方差来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	方差组分 variance components	占总方差的百分比 percentage of variation
群体间 among populations	2	141.07	4.729(v_a)	16.90%
群体内 within populations	27	627.60	23.244(v_b)	83.10%
总和 total	29	768.67		
固定性系数(fixation index) F_{st} = 0.169				

3 讨论

在动植物的养殖生产中，近交对生产力造成负面影响远大于正面影响。在实验所用 3 个群体中，两个通过快速近交手段产生的群体，即全同胞近交群体(S_4)和雌核发育群体(G_2)，可认为属典型的近交群体，其近交效应必然在它们的基因型上有所反映，主要表现应是基因组纯合度的提

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

升[20,21]。这一提升有多大，其大小同近交方法有何关系？还有，许多研究者认为，由于环境因素的影响，近交所导致的杂合度的降低程度的理论计算值往往高于实际值[22-24]，这一偏差又有多大呢？依据上述实验结果，作如下探讨。

3.1 近交与基因纯合度

团头鲂选育群体(F_7)、全同胞近交群体(S_4)和雌核发育群体(G_2)的多态位点个数从大到小依次为F_7(133) > S_4(117) > G_2(106)；位点基因多样性从大到小依次为F_7(0.30) > S_4(0.28) > G_2(20.24)，两者一致，证明全同胞累代交配或雌核发育都能导致基因组的快速纯合。本试验所用全同胞近交群体，是1989年在选育群体第3代建立的1对全同胞兄妹近交系，累代近交产生的第4代，其1989基础群体(F_3)已不存在；雌核发育群体，为2000年对团头鲂选育系第5代进行减数分裂雌核发育，其子代再次进行减数分裂雌核发育的子代，其基础群体(F_5)也已不存在。故此，本实验仍以F_7为对照。同F_7相比，4代全同胞近交共使多态位点个数减少了12%，平均每近交一代减少3%；2代雌核发育共使多态位点个数减少了20%，平均每雌核发育一代减少10%；雌核发育一代对基因纯合的影响为全同胞交配一代的3.3倍。在对位点基因多样性的影响方面，平均每近交一代使之减少0.5%；平均每雌核发育一代使之减少3%，即雌核发育一代对基因纯合的影响为全同胞交配一代的6倍。如果选育系从F_3到F_5到F_7期间的遗传多样性也有所降低的话，则上述数据可能更大一些。

3.2 近交系数的估算

近交系数是度量近交效应的主要指标之一。我们在研究中发现，由于计算方法不同，所得近交系数值会有较大差异。现就理论近交系数和实际近交系数的计算进行讨论。

(1)理论近交系数的计算：

全同胞近交者：$F_t = 1/4(1 + 2F_{t-1} + F_{t-2})$[1]

雌核发育者：$F_t = 1/2(1 + F_{t-1})$[1]

式中F_{t-1}、F_{t-2}分别是$t-1$、$t-2$代的近交系数，$F = 1/2N_e$，Ne为繁育群体有效大小。

储明星[1]把上面两类近交系数同近交世代数的关系整理如表4所示：

表4 全同胞繁育、自体受精繁育的近交系数与世代的关系

Tab.4 Relationship between inbreeding coefficient and generation in full-sib breeding and self-fertilization breeding

世代 generation	全同胞近交 full-sib breeding	自体受精 self-fertilization breeding
0	0	0
1	0.250	0.500
2	0.375	0.750
3	0.500	0.875
4	0.594	0.938
5	0.672	0.969

在本实验所用3个群体中，全同胞近交群体(S_4)和雌核发育群体(G_2)是人为设计产生的近交群体。若把减数分裂雌核发育视为近似于自体受精，则由上表，全同胞近交群体4代的理论近交系数为0.594，雌核发育群体(G_2)的理论近交系数为0.750。

(2)实际近交系数的计算：

在没有人为选择等因素干扰情况下，近交系数可通过平均杂合度计算[24]：

$$F_t = \frac{H_0 - H_t}{H_0}$$

F_t表示第t世代的近交系数；H_0表示基础群体的实测平均杂合度；H_t表示t世代的实测平均杂合度。

以基因平均多样性代替平均杂合度[15]，则F_7、S_4及G_2的平均杂合度分别为0.30、0.28及0.24。假设F_7近似于S_4群体与G_1群体的基础群体，由此计算得S_4的实际近交系数为F = 0.066，是理论近交系数(0.594)的11%；G_2的实际近交系数为0.20，是理论近交系数的27%。

在鱼类，1代雌核发育的理论近交系数为0.55～0.79[25-27]，数值的大小因鱼的种类和实验方法而有差异。Tave[26]把这一差异归因于减数分裂雌核发育的细胞学机制的差异。本实验雌核发育二代的理论近交系数是0.75，实测近交系数是0.25；Rumball等[28]推测雌核发育理论近交系数为0.75时，实测近交系数为0.65。对于这种理论计算值较高，而实测值较低的现象，Mitton[29]等归其原因于自然选择总是倾向于杂合。也就是说，由于环境影响的存在和作用，近交所导致的杂合度降低，会遭到一定程度的缓冲。在估算和应用近交系数时，环境影响要予以考虑。

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.3 生长速度与近交系数大小的关系

同步试验表明,两近交群体的生长速度明显低于选育群体。日龄150 d时,全同胞近交群体(S_4)的绝对增重率比选育群体(F_7)慢46.74%,雌核发育群体(G_2)的绝对增重率比选育群体(F_7)慢40.80%①。此前的研究都反映了生长随近交系数增大而衰退的现象。Moav和Wohlfath[30]曾报道鲤(*Cyprinus carpio*)全同胞近交群体相对生长率降低了15%,Bridges[31]估计虹鳟(*Salmo gairdneri*)中,近交每增加10%,体重降低5.12%。Gjerde等[32]对虹鳟近交三个世代的研究表明,近交每增加10%,仔鱼生长率降低3.0%,18个月海水中生长率降低5.1%。Cooper[33]对美洲红点鲑(*Salvelinus fontinalis*)1代兄妹交配的研究表明近交衰退在7个月达到27.7%,在19个月达到34.4%。Kincaid[34,35]报道虹鳟的1代兄妹交配产生的近交衰退在147日龄时为11.0%,364日龄时为23.2%。上述近交衰退的表型现象同本试验所发现的全同胞交配和雌核发育导致基因组快速纯合、多态位点与位点基因多样性的快速减少现象一致,也为分子标志辅助育种提供了有益的思路。

王成辉博士协助作统计分析,特此致谢。

参考文献:

[1] 储明星(译). 数量遗传学导论[M](第四版). 北京:中国农业科技出版社,2000.194.
[2] Spiess E B. Genes in population[M]. USA, John Wiley & Sons Inc, 1977. 271-277.
[3] Fisher R A. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance [J]. Trans Roy Soc Edinburgh, 1918, 52:399-343.
[4] Wright S. Systems of mating[M] Ⅰ-Ⅴ. Genetics, 1921, 6:111-178.
[5] Dobzhansky T H. A review of some fundamental concepts and problems of population genetics[J]. C S H Symp, 1955, 20:1-15.
[6] 黄瑞复,魏蓉城,晏一祥(译). 生态遗传学[M]. 北京:科学出版社,1991.5.
[7] Dudash M R, Carr D E. Genetics underlying inbreeding depression in *Mimulus* with contrasting mating systems [J]. Nature, 1998, 393 (18): 682-684.
[8] Kaiser J. Inbreeding's kiss of death[J]. Science, 1998, 280: 35.
[9] Ebert D, Haag C, Kirkpatrich M, *et al*. A selective advantage to immigrant genes in a *Daphnia metapopulation* [J]. Science, 2002, 295:485-488.
[10] Xu J P. Analysis of inbreeding depression in *Agaricus bisporus* [J]. Genetics, 1995, 141:137-145.
[11] Dekkers J C M, Hospital F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations [J]. Nature Reviews Genetics, 2002, 3 (1):22-32.
[12] Moore A J, Kukuk P F. Quantitative genetic analysis of nature populations[J]. Nature Review Genetics, 2002, 3:971-978.
[13] 李思发,蔡完其. 团头鲂双向选育效应研究[J]. 水产学报,2000,24(3):201-205.
[14] Williams J G K, Kubilik A R, Liavk K J, *et al*. DNA polymorphisms amplified by arbitary primers are used as genetic markers[J]. Nuc Acids Res, 1990, 18:6531-6535.
[15] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin: manual arlequin ver2.0[M]. University of Geneva, 2000.
[16] Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations[J]. Genetics, 1983, 105:437-460.
[17] Tajima F. Measurement of DNA polymorphism[A]. In: Mechanisms of molecular evolution. introduction to molecular paleopopulation biology[M]. edited by Takahata N and Clark A G, Tokyo, Sunderland, MA: Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc, 1993. 37-59.
[18] Nei M. Molecular evolutionary genetics[M]. New York: Columbia University Press, 1987. 257.
[19] Reynolds J, Weir B S, Cockerham C C. Estimation for the conancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance [J]. Genetics, 1983, 105:767-779.
[20] Willis J H. The contribution of male-sterility mutations to inbreeding depression in *Mimulus gutatus* [J]. Heredity, 1999, 83:337-346.
[21] Frankham R, Ralls K. Conservation biology: inbreeding leads to extinction[J]. Narture, 1998, 392:441-442.
[22] Strauss S H. Heterosis at allozyme loci under inbreeding and crossbreeding in *Pinus attenuate*[J]. Genetics, 1986, 113:115-134.
[23] Mina N S, Sheldon B L, Yoo B H, *et al*. Heterozygosity at protein loci in inbred and outbred lines of chickens[J]. Poult Sci, 1991, 70:1864-1872.
[24] Komen J, Wiegertjes G F, Ginneken V J T, *et al*. Gynogenesis in common carp, *Cyprinus carpio* Ⅲ. The effects of inbreeding on gonadal development of heterozygous and homozygous gynogenetic offspring[J]. Aquac, 1992, 104:51-66.
[25] Sing C F, Berwer G J, Thirtle B. Inherited biochemical variation in *Drosophila melanogaster*: noise or signal: Ⅰ Single locus analyses[J]. Genetics, 1973, 75:381-404.
[26] Tave D. Inbreeding and brood stock management[M]. Rome: FAO. 1999.
[27] Thompson D. The efficiency of induced diploid gynogenesis in inbreeding[J]. Aquac, 1983, 33:237-244.
[28] Rumball W, Franklin I R, Frankham R, *et al*. Decline in heterozygosity under full-sib and double first-cousin inbreeding in *Drosophila melanogaster*[J]. Genetics, 1994, 136: 1039-1049.
[29] Mitton J B. Physiological and demographic variation associated with allozyme variation[A]. Isozymes in plant biology[M]. Porland: Dioscorides Press, 1989. 127-145.
[30] Moav R, Wohlfarth G W. Breeding schemes for the improvement of edible fish[R]. Prog Rep Fish Breeding Assoc, Israe, 1962, 44.
[31] Bridges W R. Rainbow trout breeding projects[R]. In: Progress in sport fishery research 1971. U S Bur Sport Fish Wildl Resour Publ, 121, 60-63.
[32] Gjerde B, Gunners K, Gjedrem T. Effect of inbreeding on survival and growth in rainbow trout[J]. Aquac, 1983, 34:327-332.
[33] Cooper E L. Growth of wild and hatchery strains of brook trout [J]. Trans Am Fish Soc, 1961, 90:424-438.
[34] Kincaid H L. Effects of inbreeding on rainbow trout populations [J]. Trans Am Fish Soc, 1976, 105 (2): 273-280.
[35] Kincaid H L. Inbreeding in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. J Fish Res Board Can, 1976, 33 (11): 2420-2426.

① 李思发等. 快速近交对团头鲂生长性能的影响. 2004.

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net