

文章编号: 1000-0615(2019)07-1549-11

DOI: 10.11964/jfc.20181111519

基于微卫星标记的洞庭青鲫倍性鉴定

谭俊杰¹, 刘科均¹, 吕丽刚¹, 余建波^{1,2}, 曾聪^{1,2*}, 肖调义^{1,2*}

(1. 湖南农业大学, 湖南省特色水产资源利用工程技术研究中心, 湖南长沙 410128;

2. 水产高效健康生产湖南省协同创新中心, 湖南常德 415000)

摘要:洞庭青鲫产于湖南省澧县北民湖, 因个体大且背部青灰而得名, 其快速生长的特性和异于普通鲫的体型令作者怀疑前人报道的“二倍体群体”结果。为此, 从银鲫微卫星文库中筛选9个位点构建微卫星鲫倍性鉴定体系, 同时采用流式细胞术和染色体核型分析完成了洞庭青鲫倍性鉴定。结果显示, 建立的微卫星鲫倍性鉴定体系能够100%区分二倍体、三倍体和四倍体鲫, 微卫星基因分型结果显示136尾洞庭青鲫均为三倍体, 各位点的等位基因数为1~3, 样本基因型包括AAA、AAB/ABB、ABC 3种类型; 洞庭青鲫血细胞DNA平均含量为 159.42 ± 5.64 , 与二倍体红鲫的血细胞DNA平均含量(102.43 ± 3.54)比值(DI)为1.56 : 1; 流式细胞术与微卫星体系判定结果匹配度100%; 染色体核型分析显示洞庭青鲫染色体数为 $3n=156 \pm$, 核型公式为 $3n=39m+36sm+81sta$, $NF=231$ 。建立了适用于鲫倍性鉴定的微卫星标记体系, 且系统地证实了洞庭青鲫为三倍体鲫品种。

关键词:洞庭青鲫; 倍性; 微卫星标记; 流式细胞术; 染色体核型

中图分类号: Q 343.2; S 917.4

文献标志码: A

洞庭青鲫(*Carassius auratus* var. *dongting*)隶属鲤科(Cyprinidae)、鲤亚科(Cyprininae)、鲫属(*Carassius*), 主要分布于湖南省澧县北民湖区, 俗称黑壳鲫, 是杨品红等^[1]首次报道的野生鲫新品种。它生长迅速、口味俱佳且营养丰富, 备受消费者喜爱, 具有重要的经济价值。有研究表明, 洞庭青鲫在体型和生长方面优势明显^[2-3]。刘良国等^[4]采用ISSR分子标记技术, 分析了洞庭青鲫与3个鲫品系的群体遗传多样性, 推测洞庭青鲫、彭泽鲫(*C. auratus* var. *pengze*)与三倍体鲫均起源于二倍体鲫。本团队于2016—2017年在北民湖采样300尾, 解剖发现洞庭青鲫雌(272尾)雄(28尾)比例接近10 : 1, 其红细胞数目、形态比例与二倍体红鲫^[5]相比存在显著差异(图版), 故推测其为多倍体。

鱼类倍性鉴定主要采用染色体核型分析和流式细胞术2种方法^[6-7]。前者能够直观地判断倍性, 但对于染色体数目众多、形态较小的鱼类,

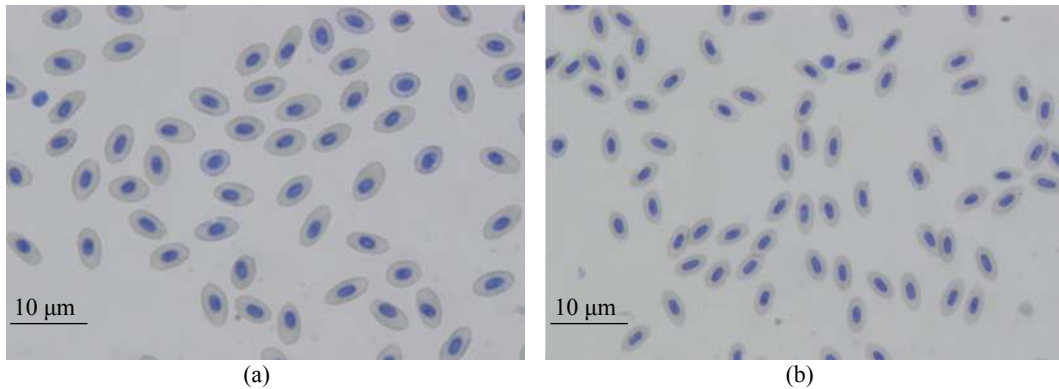
标本的制备和核型图的拼接均存在一定难度且费时费力^[8]; 后者是通过流式细胞仪对细胞理化生物学特征进行快速检测分析的新技术, 现已成为一种测定鱼类体细胞DNA含量的重要手段^[9]。两种方法均为活体取样, 对实验鱼造成的伤害不可逆^[10]。

多倍化可增加种群基因多样性, 是推进鱼类进化和多元发展的重要动力^[11]。低等硬骨鱼类多倍化现象较为普遍, 自然群体中的二倍体鲫($2n=100$)和三倍体鲫($3n=150 \pm$ 、 $156 \pm$ 、 $162 \pm$)通常混居生活^[6, 12-15], 二者难以通过表型进行区分^[16]。微卫星DNA具有高度的变异性, 是广泛分布于真核生物基因组中的共显性分子标记, 单个座位上可形成多个等位基因, 在群体中表现出丰富的多态性, 被广泛应用于水产动物遗传育种研究^[17]。近年来, 由于微卫星标记具有所需组织样品少、微创、经济实惠等优势, 被逐渐应用于倍性鉴定研究, 如三倍体长牡蛎(*Crassostrea gig-*

收稿日期: 2018-11-02 修回日期: 2019-03-20

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-45-48)

通信作者: 曾聪, E-mail: congcong@hunau.edu.cn; 肖调义, E-mail: tyxiao1368@163.com



图版 洞庭青鲫(a)与红鲫(b)红细胞

Plate Micrograph of erythrocytes of *C. auratus* var. *dongting* (a) and *C. auratus* var. *red* (b)

as)^[8]、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)^[10]、南非鲍(*Haliotis midae*)^[18]、达氏鳇(*Huso dauricus*)^[19]、秀美花鲃(*Poecilia formosa*)^[20]等。本研究通过微卫星标记、流式细胞术和染色体核型分析开展洞庭青鲫倍性研究,旨在建立快速高效的鲫倍性鉴定方法,同时明确洞庭青鲫倍性水平,为这一特色鲫资源的有效选育奠定科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用洞庭青鲫采自湖南澧县北民湖(29°42'45.60"N, 111°51'4.83"E),共计183尾,体质量30~1 168 g,其中用于微卫星基因型分型136尾,DNA含量测定31尾(24尾两组共用),染色体核型分析40尾。同时采用湖南安乡安福水产有限公司的红鲫(7尾,172~264 g)、异育银鲫“中科3号”(C. auratus var. zhongke-3)(以下简称“中科3号”)和长丰鲫(C. auratus var. changfeng)各15尾进行相关实验,其中“中科3号”体质量35~64 g,长丰鲫体质量33~105 g。取部分尾鳍组织浸泡于95%乙醇中,-20 °C保存备用。

1.2 DNA含量测定

本研究所用流式细胞仪(Cell Counter Analyser CCA-Ö)、DAPI染液及尼龙滤网均由德国Partec GmbH公司生产。用酸性柠檬酸葡萄糖溶液(ACD抗凝剂B)润洗2.5 mL注射器内壁,于鱼体尾静脉处采血0.2 mL,滴加1滴至装有1 mL ACD抗凝剂B的EP管中低温保存备用。测样前吸取500 μL血液和抗凝剂的混合物,加入500 μL DAPI染液,避光反应5~10 min后经20 μm尼龙滤器过滤。最

后加入适量双蒸水稀释,用流式细胞仪对各样品进行逐个测定。

1.3 微卫星基因型分型

DNA提取及引物合成 取组织样品约30 mg洗净、剪碎,采用美国Omega公司生产的Tissue DNA Kit (D3396)试剂盒提取DNA,通过1.0%琼脂糖凝胶电泳检测条带单一性,超微量检测仪检测浓度及质量(A_{260/280}为1.8~2.0),将DNA质量浓度稀释至50 ng/μL,-20 °C保存备用。根据有效等位基因数、多态性信息含量和重复单元从三碱基、四碱基重复银鲫标记^[21]中初筛获得18个位点,利用6-FAM、HEX、ROX及TAMRA 4种荧光标记对其进行5'端修饰,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

PCR扩增及产物检测 PCR反应体系为20 μL: 2×Taq Plus Master Mix II (Dye Plus)10 μL、Primer F和Primer R各1 μL、Template DNA 1 μL、DDH₂O 7 μL。PCR反应条件: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s,退火30 s,72 °C延伸1 min 30 s,30个循环; 72 °C终延伸15 min,4 °C保存。PCR产物通过ABI3730基因分析仪进行荧光检测, GeneMapper ID v3.2软件完成微卫星基因型分型。

倍性判断 通过各位点等位基因数及相应比值判断个体倍性水平。假设一个样本在某个位点存在2个等位基因,则微卫星分型图呈现2组峰,若峰值比例接近1:1,无法判断是二倍体还是四倍体,需要借鉴其他位点进行判断;若峰值比例接近2:1或1:2,可判断为三倍体,基因型类型为AAB或ABB;峰值比例接近3:1或1:3,可判断为四倍体,基因型类型为AAAB或

ABBB。因此, 通过位点的等位基因数和峰值比例(表1)即可推断个体的倍性水平和基因型类型。

最后由Excel统计各位点基因分型结果, SPSS Statistics 17.0软件进行逐步判别分析。

表 1 二倍体、三倍体及四倍体鲫群体不同峰值比例的预期基因型类型

Tab. 1 Expected genotypes of all kinds of ratios for diploid, triploid and tetraploid *C. auratus*

倍性 ploidy	等位基因数 number of alleles	比例 ratio	预期基因型类型 expected genotypes
二倍体 diploid	1		AA
	2	1 : 1	AB
三倍体 triploid	1		AAA
	2	2 : 1或1 : 2	AAB或ABB
	3	1 : 1 : 1	ABC
四倍体 tetraploid	1		AAAA
	2	3 : 1或1 : 3或1 : 1	AAAB或ABBB或AABB
	3	2 : 1 : 1或1 : 2 : 1或1 : 1 : 2	AABC或ABBC或ABCC
	4	1 : 1 : 1 : 1	ABCD

1.4 染色体核型分析

染色体核型分析材料备于(25±1) °C水族箱, 参照林义浩^[22]的方法制备染色体标本, 以10 µg/g 鱼体质量的剂量胸腔注射PHA, 间隔12 h再次注射等剂量PHA, 3 h后以4 µg/g 鱼体质量的剂量胸腔注射秋水仙素, 1.5 h后断尾放血10 min, 取头肾组织于0.8%的鱼用生理盐水中剪碎、洗涤, 离心制备细胞悬液, 1 000 r/min离心5 min收集细胞。加入0.075 mol/L的KCl溶液, 常温低渗45 min。预冷卡诺氏固定液[V(甲醇) : V(冰醋酸)=3 : 1]固定3次, 每次30 min, 1 000 r/min离心5 min。采用空气干燥制片法制片, 10%吉姆萨工作液染色20 min, 自然干燥后镜检、拍照。选取100个清晰可见的染色体中期分裂相(10×100)统计染色体数, 然后选取5个形态良好、染色清晰的中期分裂相, 借助Adobe Photoshop CS6和E-Ruler软件进行测量和统

计, 并根据Levan等^[23]的标准完成染色体核型分析。

2 结果

2.1 红鲫、中科3号、长丰鲫倍性确证

DNA指数值(DI值)表示相对DNA含量, 即待测样品细胞的DNA含量与标准二倍体DNA含量的比值, 用于判定倍性。当DI=1.00±0.10时, 样本为二倍体; DI=1.50±0.15时, 样本为三倍体; DI=2.00±0.20时样本为四倍体^[24]。通过流式细胞仪对7尾二倍体红鲫、15尾“中科3号”、15尾长丰鲫的血细胞DNA含量进行测定分析, 结果见表2。红鲫血细胞DNA平均含量为102.43±3.54, “中科3号”血细胞DNA平均含量为155.79±5.21, 与红鲫比值为1.52 : 1, 可证实为三倍体; 长丰鲫血细胞DNA平均含量为202.67±9.89, 与红鲫比值为1.98 : 1, 可证实为四倍体。

表 2 红鲫、“中科3号”和长丰鲫血细胞DNA平均含量

Tab. 2 Mean DNA contents (MDC) of blood cells in *C. auratus* var. *red*, *C. auratus* var. *zhongke-3* and *C. auratus* var. *changfeng*

种类 breed	DNA平均含量 MDC of blood cells	与红鲫血细胞平均含量比值 ratio of MDC (DI)	倍性 ploidy
红鲫 <i>C. auratus</i> var. <i>red</i>	102.43±3.54	1.00 : 1	2
“中科3号” <i>C. auratus</i> var. <i>zhongke-3</i>	155.79±5.21	1.52 : 1	3
长丰鲫 <i>C. auratus</i> var. <i>changfeng</i>	202.67±9.89	1.98 : 1	4

2.2 微卫星筛选及其基因型分型

为保证微卫星鉴定体系的准确率, 根据引

物扩增效果、峰值有序性、等位基因数和多态性等对银鲫的18个标记进行筛选, 最终获得9个

位点(HLJYJ004、HLJYJ034、HLJYJ070、HLJYJ-125、HLJYJ134)构建鲫倍性鉴定体系, 具体信息见表3。

表3 9个微卫星标记位点、引物序列、重复单元及退火温度

Tab. 3 Locus, primer sequence, repeat motifs and annealing temperature of 9 microsatellite loci

位点 locus	引物序列 primer sequence (5'-3')	重复单元 repeat motifs	退火温度/°C T_m
HLJYJ004	F: GAGCCCGTGTACAGACAGC, R: CATCCATGACCGACAGACAC	CAG	60
HLJYJ034	F: GGTCCCCTCCATCTCAAAC, R: TGGCCTTCAAAGACAGACA	TCTA	60
HLJYJ070	F: AATGCAACAGCGACCGATA, R: ATGTTGGCCATGTTTGAAC	CAG	60
HLJYJ085	F: GTACCAGGACCAGCAGAACC, R: CTGATCGGAGGAGAAAGGTG	CAG	60
HLJYJ090	F: GCATCAGCTCAGTGTGCTC, R: TAATGCACCGGTGAAACATC	CTG	60
HLJYJ117	F: CACGGCCAGCTTTTATTTGT, R: CGCTCGGCTGTAAGTAGGAG	(CAG) CAT (CAG)	60
HLJYJ120	F: GCTCAGACGGAGAGCTGTG, R: TCTCCTCAGCCTGGTGAAGT	GCT	59
HLJYJ125	F: ACTGCAGTCACAGCCACAAC, R: ATGTGCCACCTTGCTGTAG	CAG	59
HLJYJ134	F: CATATTACTTCCGGGGCAGA, R: CTTCTTGGGAGAGCGTGAAC	CAG	60

使用上述7尾红鲫、15尾“中科3号”和15尾长丰鲫个体对微卫星倍性鉴定体系进行可行性检验, 经PCR扩增和基因型分型, 9个位点在红鲫群体中共检测到35个等位基因, 各位点等位基因数2~6个; 在“中科3号”群体中共检测到27个等位基因, 各位点等位基因数2~5个; 在长丰鲫群体中共检测到等位基因29个, 各位点等位基因数2~5个。根据各位点等位基因数和峰值比例对各样本进行分析, 结果显示, 红鲫为二倍体, 各位点等位基因数为1~2; “中科3号”为三倍体, 各位点等位基因数为2~3; 长丰鲫为四倍体, 各位点等位基因数为2~4, 与流式细胞术结果一致, 匹配度为100%(图1)。对9个位点进行逐步判别分析, 得到贡献率最大的5个位点, 分别为HLJYJ034、HLJYJ070、HLJYJ090、HLJYJ117、HLJYJ125。

2.3 洞庭青鲫检验结果

通过微卫星倍性鉴定体系对136尾洞庭青鲫进行检测, 结果显示, 所有样本均为三倍体, 各位点等位基因数为1~3, 表现为3种基因型类型: 微卫星分型图出现单峰, 微卫星基因型为AAA类型; 出现2组峰, 峰值比例接近2:1或1:2, 为AAB或ABB类型; 出现3组峰, 峰值比例接近1:1:1, 为ABC类型(图2)。31尾洞庭青鲫血细胞DNA平均含量为159.42±5.64, 与红鲫比值为1.56:1, 可证实洞庭青鲫为三倍体群体(图3)。

其中24尾洞庭青鲫同时进行以上2组实验,

结果显示, 24个样本均为三倍体, 血细胞DNA含量介于147~168, 各位点等位基因数为1~3, 均存在基因型类型为ABC的位点。其中, 18号和19号样本不具AAA类型位点, 9个位点均可有效判断倍性。两种倍性鉴定方法结果一致, 匹配度为100%(表4)。通过对HLJYJ034、HLJYJ070、HLJYJ090、HLJYJ117、HLJYJ125 5个位点进行分析可获得相同结果, 说明微卫星标记鉴定倍性具有高效性。

2.4 洞庭青鲫染色体核型

对100个染色体中期分裂相进行染色体数统计, 结果显示, 洞庭青鲫常染色体众数为156, 占比41%(表5); 对5个形态良好、染色清晰的中期分裂相进行核型分析, 结果显示, 洞庭青鲫染色体可按照Levan等^[23]的标准分为3组, 中部着丝粒染色体(m)39条; 亚中部着丝粒染色体(sm)36条; 端部与近端部着丝粒染色体(sta)81条, 核型公式为 $3n=39m+36sm+81sta$, $NF=231$, 且存在数目不一的B染色体(图4)。

3 讨论

3.1 本鉴定体系的可靠性、科学性和前景

通常微卫星标记具有高度通用性, 可在种间甚至属间扩增^[25]。本研究基于已开发的银鲫微卫星标记建立了一个鲫倍性鉴定体系。前期研

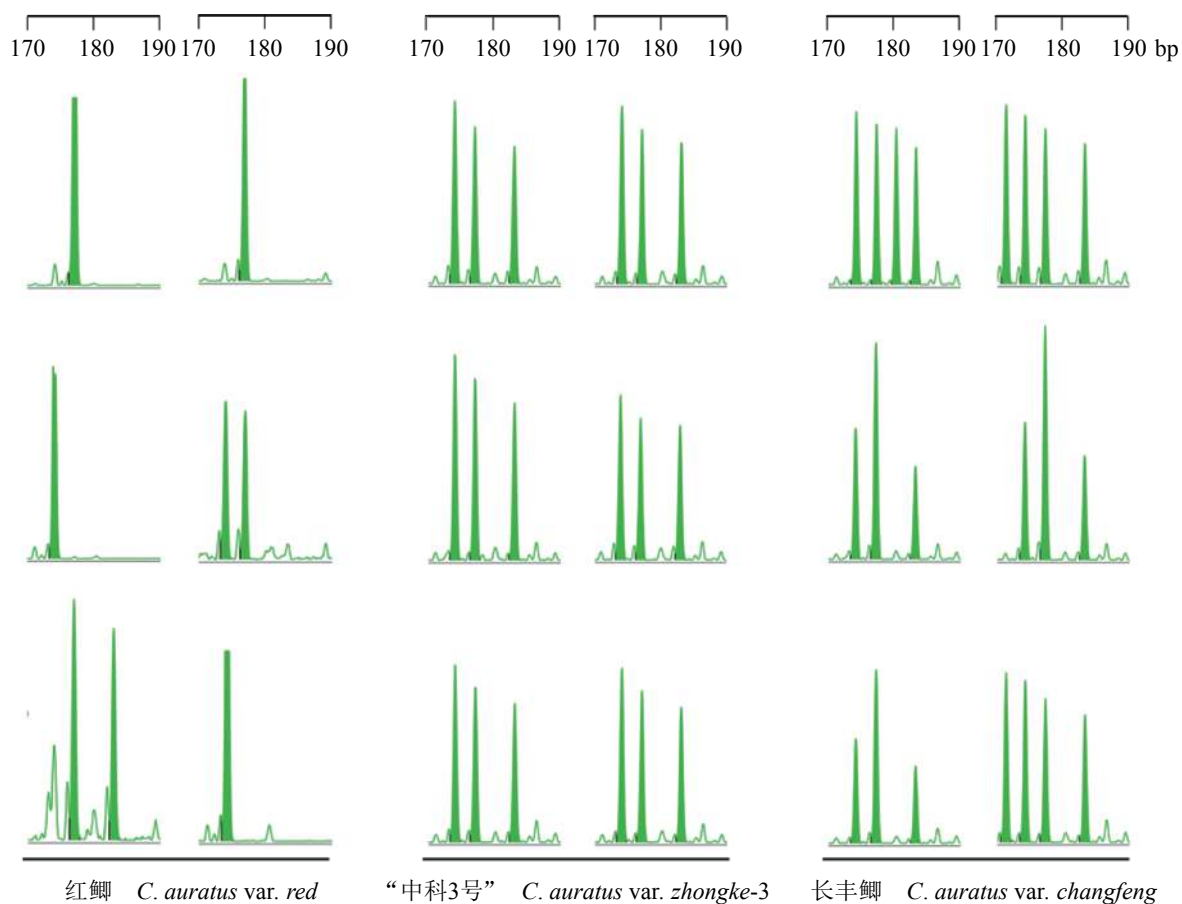


图1 部分红鲫、“中科3号”、长丰鲫个体在位点HLJYJ090的基因分型结果

Fig. 1 Diagram of locus HLJYJ090 genotyping in part of the *C. auratus* var. red, *C. auratus* var. zhongke-3 and *C. auratus* var. changfeng

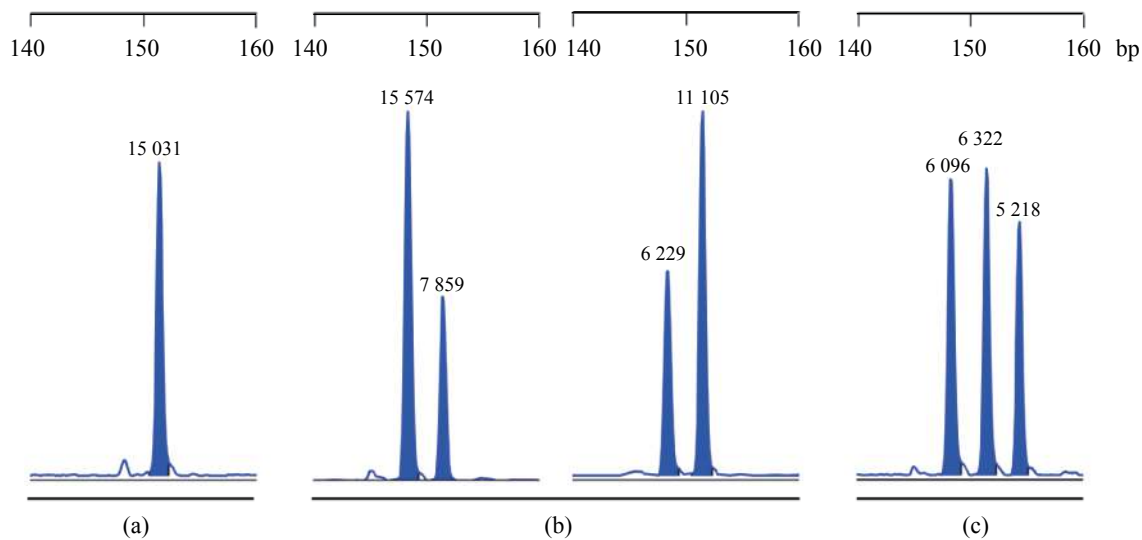


图2 洞庭青鲫不同基因型峰图

(a) AAA类型; (b) AAB/ABB类型; (c) ABC类型。每个波峰上的数值为吸光度

Fig. 2 Absorbances of different genotypes of *C. auratus* var. dongting

(a) AAA type; (b) AAB or ABB type; (c) ABC type. And the values near peaks were absorbance

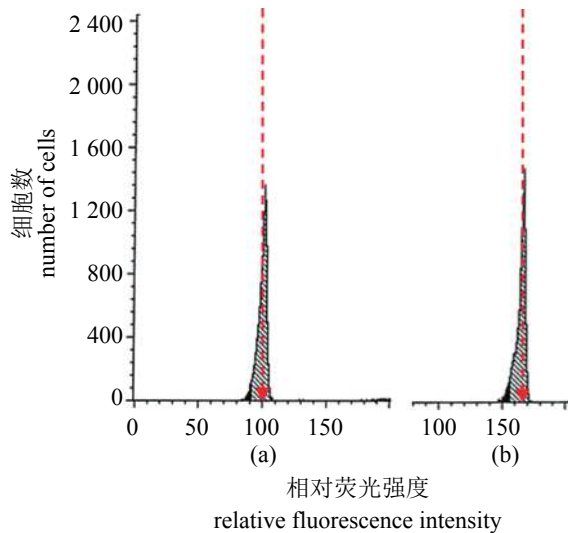


图3 红鲫(a)与洞庭青鲫(b)血细胞DNA含量

Fig. 3 Comparison of cellular DNA contents between *C. auratus* var. red (a) and *C. auratus* var. dongting (b)

研究表明, 基于微卫星的倍性鉴定主要受标记的多态性信息含量(PIC)和无效等位基因(null alleles)影响^[26]。无效等位基因是由引物结合部位的点突变、插入或缺失引起, 不能被PCR扩增的等位基因, 广泛存在于众多物种之中^[27]。对于未知倍性的鲫群体, 由于无效等位基因的存在, 在基因分型时部分或全部等位基因缺失可能导致倍性判断失误或无法判断。在实际分型过程中, 当选用的高多态性微卫星标记足够多时, 无效等位基因就不会在倍性鉴定中造成显著影响, 因为联合多个微卫星位点积累的大量变异足以弥补任何一个位点引入的潜在偏差, 保证鉴定结果的准确性^[28]。本研究通过对比扩增效果、峰值有序性等筛选出9个高多态性、条带清晰的微卫星标记, 能够100%区分3种已知倍性的鲫群体, 说明整个体系受无效等位基因影响较小, 可用于鲫倍性鉴定。本研究通过逐步判别分析发现, 倍性鉴定体系中发挥作用最大的是HLJYJ034、HLJYJ070、HLJYJ090、HLJYJ117、HLJYJ125这5个位点, 说明不同位点微卫星标记在倍性鉴定能力方面有所差异。

Feng等^[26]从转录组测序所获得EST-SSR标记中筛选出5个标记用于泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)倍性鉴定, 研究发现在特定条件下, 2个微卫星标记即可完全区分三倍体和四倍体泥鳅。Hernándezibarra等^[29]通过检测微卫星重组基因型确定鲍幼虫异源三倍体基因组组成。蔡明夷等^[30]

通过倍性鉴定和微卫星分析发现, 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)和黄姑鱼(*Nibea albiflora*)的异源三倍体子代基因组由大黄鱼的2个基因组和黄姑鱼的1个基因组组成。Bai等^[31]选取10个微卫星标记建立鲫复合体倍性鉴定体系, 用于研究营雌核发育的三倍体无性繁殖品系的演化。Mishina等^[32]亦成功构建鲫倍性鉴定体系用于日本琵琶湖鲫的生态和进化研究。以上研究表明, 基于微卫星的倍性鉴定体系是非常稳定且可靠的。

3.2 洞庭青鲫的倍性

洞庭青鲫选育于洞庭湖水域的北民湖区, 是当地一种重要经济鱼类。杨品红等^[33]采用PHA-体内注射的方法获得洞庭青鲫的染色体标本, 通过核型分析, 发现洞庭青鲫的染色体数为100, 其肌肉细胞DNA相对含量(17尾)与二倍体红鲫(15尾)基本一致, 因此判定其为 $2n=100$ 的二倍体鲫品种, 核型公式为 $2n=30m+20sm+26st+24t$, $NF=150$ 。然而, 本团队前期研究发现, 在北民湖中洞庭青鲫的雌雄比例接近10:1, 其红细胞与二倍体红鲫相比差异显著。有研究表明在自然群体中, 多倍体鱼类雌雄比例不均, 通常雌性占比高于雄性, 且相对于二倍体, 其细胞体积大而数量少^[34], 洞庭青鲫的异常性别比和细胞大小均符合多倍化特征。因此, 本研究通过搜集更大的样本(DNA含量测定31尾、微卫星基因型分型136尾、染色体核型分析40尾)进一步确认其倍性, 结果判定洞庭青鲫为三倍体群体, 在所有检测样品中未发现二倍体个体。刘良国等^[35]采用12对微卫星进行遗传多样性分析时, 发现洞庭青鲫遗传多样性低且与彭泽鲫($3n=150+$)^[12]亲缘关系更近, 类似结果通过ISSR分子标记^[4]和ATPase基因^[36]得到印证。这些分子标记也间接佐证本研究的结果, 即洞庭青鲫为三倍体。

染色体核型分析广泛应用于动植物染色体数目和结构变异的分析及倍性鉴定, 本研究中洞庭青鲫的常染色体众数为156, 占比为41%, 核型公式为 $3n=39m+36sm+81sta$, $NF=231$, 与彭泽鲫^[12]、淇河鲫(*C. auratus* var. *qihe*)^[13]、滁州鲫(*C. auratus* var. *chuzhou*)^[14]等三倍体鲫类似, 中期分裂相染色体数在150以上, 众数所占百分比介于40%~60%, 均存在数目不一的B染色体。有研究表明B染色体为三倍体鲫特有, 可能与穆勒氏齿轮效应(Muller's ratchet)有关, 该效应是雌核发

表 4 24尾洞庭青鲫在9个微卫星位点的基因型类型、相对DNA含量及倍性判定结果

Tab. 4 The genotypes types of 9 microsatellite loci, DNA contents and ploidy for 24 specimens

编号 no.	基因型类型(HLJYJ-) genotypes type									相对DNA含量 DNA contents	倍性 ploidy
	004	034	070	085	090	117	120	125	134		
1	/	ABB	AAA	/	ABB	ABC	ABB	ABB	ABB	167	3
2	AAA	AAB	ABC	AAB	ABC	AAA	AAB	AAB	AAB	163	3
3	ABC	AAB	ABC	ABB	ABC	AAA	ABC	/	AAB	165	3
4	AAB	/	ABC	AAA	ABB	ABB	ABB	AAA	AAA	155	3
5	AAA	AAB	ABC	AAB	ABC	AAA	ABB	AAA	AAB	168	3
6	AAB	AAB	AAA	ABC	AAA	/	AAA	ABC	AAA	165	3
7	AAA	AAB	ABB	ABB	/	ABC	AAB	ABC	AAA	162	3
8	AAA	AAA	ABC	AAB	AAA	AAA	AAB	ABB	ABB	165	3
9	AAB	AAA	AAB	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	AAB	148	3
10	AAB	ABC	ABC	AAA	ABB	ABB	AAB	AAA	AAA	160	3
11	AAB	ABB	AAB	ABB	AAB	ABC	ABB	AAA	ABC	162	3
12	AAA	ABC	ABC	AAB	ABB	ABC	ABC	ABC	ABB	161	3
13	ABB	AAA	AAB	AAA	ABC	ABB	/	AAA	ABC	168	3
14	ABC	ABC	ABB	AAB	ABC	AAA	ABC	ABB	ABB	158	3
15	ABC	AAA	ABC	ABC	/	AAA	AAB	ABC	AAA	157	3
16	ABC	AAA	ABC	AAB	ABC	ABC	AAB	AAA	AAB	147	3
17	ABC	/	ABC	ABB	ABC	AAA	AAB	ABC	AAB	151	3
18	ABC	ABC	AAB	ABC	ABC	ABB	AAB	ABC	ABC	155	3
19	ABB	ABC	ABC	AAB	AAB	ABB	ABC	ABB	ABB	161	3
20	AAB	AAA	AAA	ABC	AAA	ABC	AAA	/	AAA	159	3
21	ABB	AAA	AAB	AAA	ABC	/	AAB	AAA	ABC	156	3
22	AAB	AAB	ABC	ABC	ABB	ABC	AAB	ABB	AAA	155	3
23	AAB	AAA	ABB	ABC	ABB	ABB	AAB	ABC	ABB	158	3
24	ABC	/	ABC	ABB	ABC	AAA	AAB	AAB	ABB	160	3

注: “/”表示不确定类型

Notes: “/”means ambiguous types

表 5 洞庭青鲫染色体数目分布

Tab. 5 Distribution of chromosome number of *C. auratus* var. *dongting*

项目 item	染色体数目 chromosome number									总数 total
	≤152	153	154	155	156	157	158	≥159		
细胞数 metaphase cells	20	7	4	6	41	3	7	12	100	
比例/% percentage	20	7	4	6	41	3	7	12	100	

育鱼类的异源父本将遗传物质传递给其卵细胞的一种形式^[37-38]。本研究通过3种方法证实采自北民湖的洞庭青鲫为三倍体, 与以往研究存在

较大差异, 可能与采样点不同有关, 因为洞庭湖水域存在二倍体、三倍体及四倍体鲫混栖现象, 且三倍体和四倍体从二倍体中脱离形成独

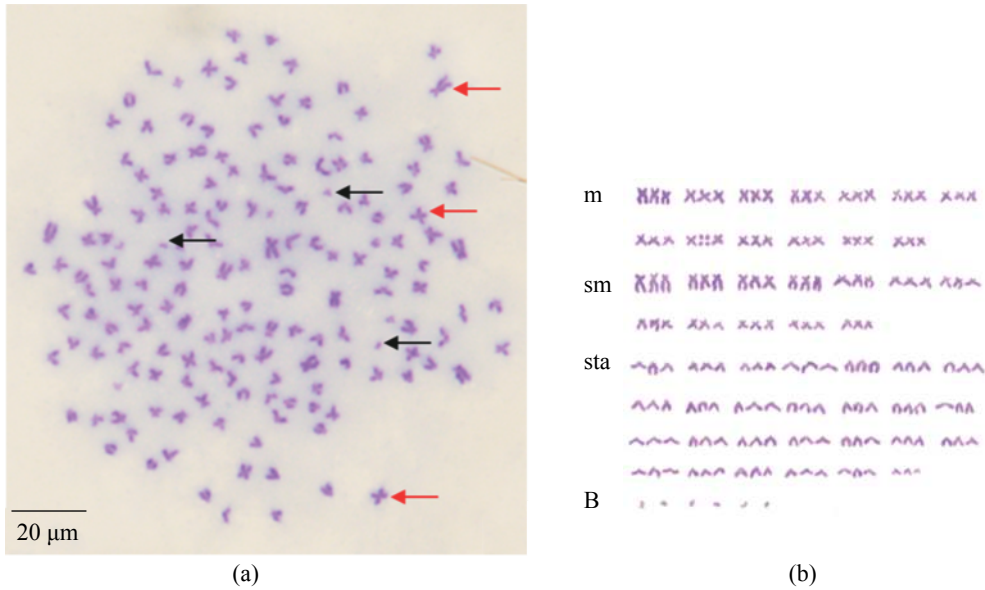


图 4 洞庭青鲫中期分裂相染色体及其核型

红色箭头表示常染色体，黑色箭头表示B染色体

Fig. 4 Metaphase chromosome and karyotype of *C. auratus* var. *dongting*

Red arrow means euchromosome, black arrow means B chromosome

立的群体^[37]，也可能因为洞庭青鲫倍性发生了转化，具体原因还需要进一步探讨。

参考文献:

[1] 杨品红, 吴维新, 王晓艳, 等. 洞庭青鲫增、养殖技术讲座(一): 洞庭青鲫的生物学特性[J]. *内陆水产*, 2005, 30(3): 44-45.
 Yang P H, Wu W X, Wang X Y, *et al.* Biological characterization of the Dongtingking crucian carp[J]. *Inland Fisheries*, 2005, 30(3): 44-45(in Chinese).

[2] 杨品红, 张倩, 谢春华, 等. 洞庭青鲫肌肉营养成分分析及营养价值评定[J]. *动物学杂志*, 2008, 43(1): 102-108.
 Yang P H, Zhang Q, Xie C H, *et al.* Analysis of nutritional composition and evaluation of nutritional quality in muscle of *Carassius auratus* var. *dongtingking*[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2008, 43(1): 102-108(in Chinese).

[3] 吴珊, 吴维新. 洞庭青鲫形态性状遗传分析[J]. *激光生物学报*, 2006, 15(1): 90-93.
 Wu S, Wu W X. The genetics analysis of morphological trait on *Carassius auratus* Tungting[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2006, 15(1): 90-93(in Chinese).

[4] 刘良国, 杨品红, 谢春华, 等. 洞庭青鲫(*Carassius*

auratus var. *Dongtingking*)与三个鲫品系群体遗传多样性的ISSR分析[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 44(2): 426-431.

Liu L G, Yang P H, Xie C H, *et al.* Genetic diversity of Dongtingking crucian carp and other three strains of crucian carp revealed by ISSR analysis[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 44(2): 426-431(in Chinese).

[5] 张纯, 刘少军, 李涛, 等. 红鲫(♀)×鲤(♂)杂交鱼的胚胎染色体组倍性研究[J]. *水产学报*, 2011, 35(9): 1369-1373.

Zhang C, Liu S J, Li T, *et al.* Studies of chromosome sets in embryonic cell of hybrid fish of red crucian carp (♀)×common carp (♂)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(9): 1369-1373(in Chinese).

[6] 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.

[7] 张纯, 刘少军, 伍艳红, 等. 二倍体雌核发育鲫卵子发生的DNA含量和细胞学分析[J]. *水产学报*, 2015, 39(1): 1-7.

Zhang C, Liu S J, Wu Y H, *et al.* DNA contents and cytological analyses of oogenesis of the diploid gynogen-

- etic progeny of allotetraploid hybrids[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(1): 1-7(in Chinese).
- [8] 姜群, 李琪, 于红, 等. 微卫星标记在长牡蛎三倍体鉴定中的应用[J]. *水产学报*, 2014, 38(12): 1970-1975.
- Jiang Q, Li Q, Yu H, *et al.* A microsatellite panel for triploid verification in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(12): 1970-1975(in Chinese).
- [9] 耿波, 孙效文. 流式细胞术在水生生物DNA含量和倍性分析中的应用[J]. *水产学杂志*, 2008, 21(2): 21-24.
- Geng B, Sun X W. The application of flow cytometry on the DNA content and ploidy analysis of hydrophilic organisms[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2008, 21(2): 21-24(in Chinese).
- [10] Hernández-Urcera J, Vera M, Magadán S, *et al.* Development and validation of a molecular tool for assessing triploidy in turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Aquaculture*, 2012, 330-333: 179-184.
- [11] Leggatt R A, Iwama G K. Occurrence of polyploidy in the fishes[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2003, 13(3): 237-246.
- [12] 杨睿姣, 李冰霞, 冯浩, 等. 彭泽鲫染色体数目及倍性的细胞遗传学分析[J]. *动物学报*, 2003, 49(1): 104-109.
- Yang R J, Li B X, Feng H, *et al.* Cytogenetic analysis of chromosome number and ploidy of *Carassius auratus* variety pengze[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2003, 49(1): 104-109(in Chinese).
- [13] 李学军, 王阅雯, 高丽霞, 等. 淇河鲫与野生鲫形态及染色体差异研究[J]. *水产科学*, 2010, 29(11): 674-676.
- Li X J, Wang Y W, Gao L X, *et al.* The morphometrical and chromosome differences in crucian carp *Carassius auratus* in Qihe River and in other waters[J]. *Fisheries Science*, 2010, 29(11): 674-676(in Chinese).
- [14] 张克俭, 万全, 李公行, 等. 滁州鲫染色体组型的研究[J]. *中国水产科学*, 1995, 2(4): 8-15.
- Zhang K J, Wan Q, Li G X, *et al.* Studies on karyotypes of Chuzhou crucian carp *Carassius auratus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1995, 2(4): 8-15(in Chinese).
- [15] 沈俊宝, 王国瑞, 范兆廷. 黑龙江主要水域鲫鱼倍性及其地理分布[J]. *水产学报*, 1983, 7(2): 87-94.
- Shen J B, Wang G R, Fan Z T. The ploidy of crucian carp and its geographical distribution in Heilongjiang main river[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1983, 7(2): 87-94(in Chinese).
- [16] 庄怡, 刘必谦, 唐杰. 利用PCR-RFLP技术对鲫鱼6个不同品系的鉴定[J]. *生物技术通报*, 2012(11): 144-149.
- Zhuang Y, Liu B Q, Tang J. Identifying six strains of *Carassius auratus* by PCR-RFLP on mtDNA ND3/ND4L/ND4 gene[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012(11): 144-149(in Chinese).
- [17] 闫路路, 秦艳杰, 闫喜武, 等. 基于转录组平台的蛤仔微卫星标记筛选[J]. *生态学报*, 2015, 35(5): 1573-1580.
- Yan L L, Qin Y J, Yan X W, *et al.* Development of microsatellite markers in *Ruditapes philippinarum* using next generation sequencing[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(5): 1573-1580(in Chinese).
- [18] Slabbert R, Prins N, Brink D. A microsatellite panel for triploid verification in the abalone *Haliotis midae*[J]. *African Journal of Marine Science*, 2010, 32(2): 259-264.
- [19] 张小敏, 马徐发, 吴文化, 等. 利用微卫星遗传标记探讨达氏鲤的多倍体倍性[J]. *动物学杂志*, 2013, 48(4): 507-512.
- Zhang X M, Ma X F, Wu W H, *et al.* Polyploidy of *Huso dauricus* as revealed by microsatellite genetic markers[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2013, 48(4): 507-512(in Chinese).
- [20] Lampert K P, Lamatsch D K, Schories S, *et al.* Microsatellites for the gynogenetic Amazon molly, *Poecilia formosa*: useful tools for detection of mutation rate, ploidy determination and overall genetic diversity[J]. *Journal of Genetics*, 2006, 85(1): 67-71.
- [21] 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]. *Biochemical Genetics*, 2010, 48(7-8): 624-635.
- [22] 林义浩. 快速获得大量鱼类肾细胞中期分裂相的PHA体内注射法[J]. *水产学报*, 1982, 6(3): 201-208.
- Lin Y H. A PHA injection method *in vivo* for the rapid obtainment of large numbers of metaphase figures from kidney cells of teleosts[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1982, 6(3): 201-208(in Chinese).
- [23] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. *Hereditas*, 1964, 52(2): 201-220.

- [24] 洗健安, 王安利, 孙敬锋. 流式细胞术在水产动物研究中的应用[J]. *水产科学*, 2009, 28(5): 290-294.
Xian J A, Wang A L, Sun J F. Applications of flow cytometry in aquatic animal research[J]. *Fisheries Science*, 2009, 28(5): 290-294(in Chinese).
- [25] Castillo A, Budak H, Varshney R K, *et al.* Transferability and polymorphism of barley EST-SSR markers used for phylogenetic analysis in *Hordeum chilense*[J]. *BMC Plant Biology*, 2008, 8: 97.
- [26] Feng B, Yi S V, Zhang M M, *et al.* Development of novel EST-SSR markers for ploidy identification based on *de novo* transcriptome assembly for *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0195829.
- [27] 文亚峰, Uchiyama K, 韩文军, 等. 微卫星标记中的无效等位基因[J]. *生物多样性*, 2013, 21(1): 117-126.
Wen Y F, Uchiyama K, Han W J, *et al.* Null alleles in microsatellite markers[J]. *Biodiversity Science*, 2013, 21(1): 117-126(in Chinese).
- [28] Lemer S, Rochel E, Planes S. Correction method for null alleles in species with variable microsatellite flanking regions, a case study of the black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera*[J]. *Journal of Heredity*, 2011, 102(2): 243-246.
- [29] Hernándezibarra N K, Morelos R M, Cruz P, *et al.* Allotriploid genotypic assignment in abalone larvae by detection of microsatellite-recombinant genotypes[J]. *Journal of Heredity*, 2010, 101(4): 476-490.
- [30] 蔡明夷, 刘贤德, 武祥伟, 等. 大黄鱼与黄姑鱼异源三倍体的诱导和微卫星分析[J]. *水产学报*, 2010, 34(11): 1629-1635.
Cai M Y, Liu X D, Wu X W, *et al.* Induction and microsatellite analysis of allotriploid between *Larimichthys crocea* and *Nibea albiflora*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(11): 1629-1635(in Chinese).
- [31] Bai Z Y, Liu F, Li J L, *et al.* Identification of triploid individuals and clonal lines in *Carassius auratus* complex using microsatellites[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2011, 7(3): 279-285.
- [32] Mishina T, Takada M, Takeshima H, *et al.* Erratum to: Molecular identification of species and ploidy of *Carassius* fishes in Lake Biwa, using mtDNA and microsatellite multiplex PCRs[J]. *Ichthyological Research*, 2014, 61(2): 176-177.
- [33] 杨品红, 王晓艳, 吴维新, 等. 洞庭青鲫的染色体核型分析及品种鉴定[J]. *淡水渔业*, 2007, 37(3): 3-7.
Yang P H, Wang X Y, Wu W X, *et al.* Chromosome karyotype analysis of *Carassius auratus* var. dongtingking and cultivar identification[J]. *Freshwater Fisheries*, 2007, 37(3): 3-7(in Chinese).
- [34] Mable B K. 'Why polyploidy is rarer in animals than in plants': myths and mechanisms[J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2004, 82(4): 453-466.
- [35] 刘良国, 陈海康, 许倩, 等. 基于微卫星标记的洞庭青鲫与三个鲫品系群体遗传多样性分析[J]. *海洋与湖沼*, 2016, 47(3): 647-654.
Liu L G, Chen H K, Xu Q, *et al.* Genetic analysis of dongtingking crucian carp and other three strains of crucian carp based on microsatellite markers[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(3): 647-654(in Chinese).
- [36] 刘良国, 杨品红, 杨春英, 等. 洞庭青鲫等5个鲫品系线粒体ATPase基因序列的比较分析[J]. *淡水渔业*, 2011, 41(1): 36-42.
Liu L G, Yang P H, Yang C Y, *et al.* Comparative analysis of the mitochondrial ATPase genes of five strains of *Carassius auratus* including Dongtingking crucian carp[J]. *Freshwater Fisheries*, 2011, 41(1): 36-42(in Chinese).
- [37] Xiao J, Zou T M, Chen Y B, *et al.* Coexistence of diploid, triploid and tetraploid crucian carp (*Carassius auratus*) in natural waters[J]. *BMC Genetics*, 2011, 12: 20.
- [38] Schartl M, Nanda I, Schlupp I, *et al.* Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish[J]. *Nature*, 1995, 373(6509): 68-71.

Ploidy identification for *Carassius auratus* var. *dongting* based on microsatellites

TAN Junjie¹, LIU Kejun¹, LÜ Ligang¹, YU Jianbo^{1,2}, ZENG Cong^{1,2*}, XIAO Tiaoyi^{1,2*}

(1. Hunan Engineering Research Center for Utilization of Characteristics of Aquatic Resources,
Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Collaborative Innovation Center for Efficient and Health Production of Fisheries in Hunan Province, Changde 415000, China)

Abstract: *Carassius auratus* var. *dongting* originates from Beimin Lake, Hunan. Compared to other *Carassius* spp., *C. auratus* var. *dongting* had a higher growth rate and larger body size, and we therefore hypothesized that these growth advantages were related to polyploidization. To verify this hypothesis, a 9 microsatellite ploidy identification method was developed to examine the ploidy level of *C. auratus* var. *dongting*, and flow cytometry assays and chromosome karyotype assays were used to further confirm the findings. The results showed that 9 microsatellites could completely distinguish 37 ploidy-known specimens. The genotyping results showed that all the 136 ploidy-unknown individuals were triploid, all three genotypes (AAA, AAB/ABB, and ABC) were observed in this population. The mean DNA content of blood cells in *C. auratus* var. *dongting* (159.42 ± 5.64) was 1.5 times that of blood cells in *C. auratus* var. *red* (102.43 ± 3.54), and the results from microsatellite markers were totally concordant with those from flow cytometry analysis. The karyotype analysis revealed that the number of chromosomes was $3n=156 \pm$ and the karyotypic formula was $3n=39m+36sm+81sta$, $NF=231$. This study not only established a microsatellite-based system for ploidy identification of *C. auratus*, but also systematically confirmed that *C. auratus* var. *dongting* is triploid.

Key words: *Carassius auratus* var. *dongting*; ploidy; microsatellites; flow cytometry; chromosome karyotype

Corresponding author: ZENG Cong. E-mail: congzeng@hunau.edu.cn;

XIAO Tiaoyi. E-mail: tyxiao1368@163.com

Funding projects: China Agriculture Research System(CARS-45-48)