

人工诱导青田田鱼雌核发育子代形态和遗传分析

支宇, 刘其根, 吴嘉敏, 刘东

Morphologic and genetic analysis of the artificially induced gynogenesis in Qingtian paddy field carp

ZHI Yu, LIU Qigen, WU Jiamin, LIU Dong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210403428>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

雌核发育翘嘴胚胎发育和形态特征的研究

Study on morphological characteristics and embryonic development of the gynogenesis top mouth culter (*Culter alburnus*)

上海海洋大学学报. 2017, 26(2): 203 <https://doi.org/10.12024/jsou.20160401753>

浙江南部近海银姑鱼的年龄与生长

Age and growth of *Pennahia argentata* in the offshore waters of southern Zhejiang

上海海洋大学学报. 2022, 31(3): 739 <https://doi.org/10.12024/jsou.20220303768>

异枝江蕨与凡纳滨对虾室内零换水混养

Indoor Polyculture of *Gracilaria bailinae* and *Litopenaeus vannamei* with Zero Water Exchange

上海海洋大学学报. 2021, 41(3): 131 <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-9159.2021.03.017>

复合益生菌对锦鲤性腺脂肪酸组成、繁殖力及仔鱼成活率的影响

Effects of complex probiotics on fatty acid composition of gonad, fecundity and survival rate of larvae in koi carp *Cyprinus carpio*

上海海洋大学学报. 2020, 35(5): 680 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-251>

2018年长江安庆段洄游汛期刀鲚年龄结构和生长特征

Age Structure and Growth Characteristics of *Coilia nasus* in Anqing Section of Yangtze River During Fishing Season in 2018

上海海洋大学学报. 2021, 41(3): 36 <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-9159.2021.03.005>

文章编号: 1674-5566(2022)04-0839-10

DOI:10.12024/jsou.20210403428

人工诱导青田田鱼雌核发育子代形态和遗传分析

支 宇^{1,2,3}, 刘其根^{1,2,3}, 吴嘉敏^{1,2,3}, 刘 东^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘 要: 为了开发浙江青田稻田田鱼优良种质资源, 采用紫外线灭活精子、染色体加倍等雌核发育技术, 成功获得青田田鱼雌核发育子一代(G_1)。对照普通子一代(F_1), 测量和观察 160 日龄 G_1 的形态特征和性腺发育情况; 在全基因组水平上, 利用 SNP 技术, 鉴定和分析 G_1 遗传物质。结果发现 G_1 有 3 种体色, 个体间生长差异大, 黑色生长最快, 平均体质量达 392.45 g。 G_1 平均生长速度慢于 F_1 。 G_1 形态参数与 F_1 存在差异, 全长与体高之比差异极显著。 G_1 个体之间卵巢发育不一致, 大个体的卵巢发育类似于 F_1 , 主要为 III 时相的初级卵母细胞。SNP 检测发现, 通过 1 次雌核发育技术的种质改良, 田鱼遗传物质的纯合性由母本平均 38.42% 提高到 G_1 平均 61.85%, 并有父本遗传物质渗入 G_1 个体, 致使个体在体色和生长速度方面均表现出显著的差异性。本研究成功得到了青田田鱼人工雌核发育群体, 为今后青田田鱼育种和种质资源开发奠定了良好基础。

关键词: 青田田鱼; 雌核发育; 形态特征; 性腺发育; SNP

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

浙江青田“稻鱼共生系统”延续了 1 300 余年, 2005 年被联合国粮农组织 (FAO) 认定为首批 5 个全球重要农业文化遗产 (Globally Important Agricultural Heritage System, GIAHS) 保护项目之一。FAO 开启 GIAHS 项目, 旨在发掘、保护、利用和传承世界范围内有重要意义的包括农业物种资源与生物多样性等在内的传统农业系统, 以满足当地经济与文化发展的需要^[1]。浙江青田稻鱼共生系统中的鲤和水稻共同生活于稻田浅水环境, 这两类物种的正相互作用维持了稻鱼共生系统的可持续性^[2]。青田田鱼 (*Cyprinus carpio* var *qingtianensis*) 作为青田稻鱼共生系统中重要养殖品种, 是一种极具特色的稻田养殖鲤鱼, 因其长期生活于稻田之中, 人们习惯称之为“田鱼”, 其抗应激能力强, 营养丰富, 肉质鲜美, 鳞片可食, 体色鲜艳^[3-6]。经长期的自然选择及人工驯化, 青田田鱼已完全适应稻田环境, 适合稻田养殖, 但因当地农民长期自繁自养或随意引入外

来鲤品种混养, 导致田鱼优良性状有一定的退化, 田鱼的种质资源遭受破坏^[7]。

鱼类雌核发育技术是鱼类遗传育种最为有效的技术之一, 用遗传物质失活的精子刺激成熟卵子发育, 通过人工诱导染色体加倍得到子代^[8]。人工诱导雌核发育可快速建立纯系, 培育良种, 也为鱼类性别决定机制的研究提供极佳材料。目前, 人工诱导鱼类雌核发育技术广泛应用于鱼类育种, 如草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[9]、鲫 (*Carassius auratus auratus*)^[10]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[11]、罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)^[12]、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)^[13] 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[14] 等。由于精子遗传物质失活的失败率高, 对于雌核子代的鉴定至关重要, 利用分子标记技术探索亲本与子代的关系, 可有效鉴别雌核发育子代^[14-15]。SNP 又称“单核苷酸多态性”, 属于第三代分子标记技术, 广泛应用于亲缘关系鉴

收稿日期: 2021-04-30 修回日期: 2021-09-27

基金项目: 上海市科委“一带一路”海洋生物科学国际联合实验室项目 (19590750500); 上海海洋大学双一流学科建设项目 (ZF1206)

作者简介: 支 宇 (1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产种质资源与苗种工程。E-mail: zhiyu999@163.com

通信作者: 刘 东, E-mail: dliu@shou.edu.cn

定^[16]、品种鉴定^[17]、遗传多样性分析^[15]、遗传图谱构建^[18]等领域。

本研究利用灭活的田鱼精子诱导田鱼卵子发育,通过冷休克促使染色体加倍获得雌核发育子代,对雌核发育子代形态特征及性腺发育进行研究,利用 SNP 标记技术对雌核发育子代进行遗传鉴定及分析。研究结果将极大缩短田鱼选育时间,降低选育成本,建立田鱼纯系,为田鱼优良种质资源保护和开发利用奠定坚实基础^[19]。

1 材料与方法

1.1 实验材料和亲鱼催产

2020 年 5 月,在浙江省青田县愚公生态农场挑选出年龄、大小一致的田鱼作为亲本,在该农场开展田鱼的人工繁殖,所用催产药物为促黄体素释放激素类似物(LRH-A2)和绒毛膜促性腺激素(HCG),雌鱼注射量为(LRH-A2 8 μg + HCG 1 000 单位)/kg,雄鱼注射量减半^[20]。雌核发育实验时,2 尾红色雌性田鱼(M1, M2)卵子,与 1 尾青灰色雄性田鱼(D1)灭活精子“受精”,获得雌核发育鱼 G_1 ;普通对照实验时,1 尾红色田鱼(♀)与 1 尾青灰色田鱼(♂)交配繁殖,获得普通实验鱼 F_1 。实验组与普通组均在同等条件下进行催产、孵化和养殖。

1.2 雌核发育子代制备

精子灭活:用 Hank's 液以体积比 4:1 稀释精液,将其均匀涂在预冷培养皿上,保证精液厚度不超过 1 mm,用 180 W 紫外灯照射灭活精子,灯管与精液表面垂直距离为 25 cm,照射时间为 90 s,照射过程中培养皿放置于摇床上以 110 r/min 缓慢摇动,精子灭活全程遮光,灭活精液保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用^[21]。

染色体加倍:灭活精液与卵子“受精”3 min 后,放入 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 冰水混合物中对卵子进行冷休克处理 30 min,抑制卵子第二极体排出使染色体加倍^[22],之后将卵子置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 的水中孵化,每隔 3 h 换 1 次水,直至鱼苗孵出。随机选取 160 日龄 G_1 鱼苗 10 尾,用丁香酚麻醉,使用预先加入 ACD 抗凝剂的无菌注射器,采用尾静脉抽血的方法,抽取 10 尾 G_1 静脉抽血 0.5 mL,注入 1.5 mL 无菌 EP 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.3 形态特征测量和统计

对 160 日龄的 G_1 和 F_1 统计体色,各随机抽取 60 尾用游标卡尺(精确度 0.01 cm)及电子天平(精确度 0.1 g)测量体长和体质量。用 Image J 软件^[23]对全长、体高、头长、尾柄高和尾柄长进行测量。

参考唐晓阳^[24]的方法,比较全长/体长、全长/头长、全长/体高、全长/尾柄长、体高/尾柄高和尾柄长/尾柄高。计算相关数据的均值(mean)、标准差(standard deviation, SD)、标准误差(standard error of mean, SEM)及变异系数(coefficient of variation, CV),其中 $CV(\%) = SD/Means \times 100$ 。Excel 分析数据,SPSS 软件进行非参数检验(Kruskal-Wallis)等分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

1.4 性腺组织学切片观察

对 160 日龄的 G_1 和 F_1 随机选取 15 尾,用丁香酚麻醉,解剖取出性腺,肉眼观察之后,剪刀剪取 0.3 cm^3 的性腺组织块,水冲洗后保存于 Bouin 氏液 24 h。依据 WANG 等^[25]的方法进行组织切片,包括乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、苏木精-伊红(H. E)染色、中性树胶封片等步骤。切片厚度为 6~8 μm 。在 Axio Scope. A1 光学显微镜下观察、拍照和记录。性腺分期参照刘筠^[26]的划分标准。

1.5 SNP 变异位点分析

1.5.1 DNA 提取

利用动物基因组 DNA 快速提取试剂盒(上海生工),提取亲本和 G_1 样本血液的 DNA,操作依照试剂盒说明书,紫外分光光度计检测 DNA 浓度,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存^[27]。

1.5.2 高通量测序和数据处理

由武汉希望组生物科技有限公司对样本采用 Illumina Hiseq 技术进行基因组重测序。根据鲤鱼参考基因组 1.53 Gb (NCBI GenBank project accession PRJNA202478),青田田鱼雌核发育中的亲本(M1、M2、D1)基因组重测序深度为 30 \times ,雌核发育子代基因组重测序深度为 10 \times 。原始数据(Raw Reads)经 fastp 软件^[28]处理,得到高质量的 Clean Reads,利用 BWA 软件^[29]将 Clean Reads

比对到参考基因组上, 比对结果经 GATK Mark Duplicates^[30] 去除重复。

1.5.3 遗传鉴定

样本与参考基因组进行比对之后, 采用 GATK Haplotype Caller^[30] 检测 SNP, 过滤参数设置为 MAF (Minor allele frequency) > 0.05, 检出率 > 80%。统计样本检测到的 SNP, 然后进行遗传纯度比较及 SNP 同源性分析。比较每个子代的 SNP 位点与可能的亲本 SNP 位点的百分比, 判断子代来自于哪个亲本。将母本 M1 和 M2 共有 SNP 纯合位点去除之后, 计算子代与母本共享的 SNP 纯合位点的百分比, 确定子代的母本来源。雌核发育的子代, 如果因紫外线照射精子灭活不彻底, 可能有父母本交配子代混入其中。因此, 通过去除双亲 (M1、M2、D1) 共有 SNP 纯合位点后, 计算子代与父本 D1 共享的 SNP 纯合位点的百分比, 确定子代的父本来源。

2 结果与分析

2.1 形态特征

观察实验获得的田鱼 G₁ 发现有 3 种体色: 黑色 (whole black, WB)、红色 (whole red, WR) 和红色体表参杂少许黑斑的小花色 (whole red with small black spots, RSB), 见图版 I。G₁ 中选取的 60 尾, 包括 WR 24 尾, WB 2 尾, RSB 34 尾。体长和体质量, WB > WR > RSB; WB 平均体质量为 392.45 g, 最大为 569.20 g, 平均体长为 24.52 cm, 最大为 29.00 cm; WR 平均体质量为 41.56 g, 最大体质量为 96.20 g; 而 RSB 平均体质量为 29.49 g, 最大体质量为 95.90 g。WR 和 RSB 两种体色最大个体体长不超过 16 cm。WB 体型显著大于 WR 和 RSB, 生长速度明显较快, 表明田鱼具有较强的生长潜力 (表 1)。



1. 黑色 G₁; 2, 4, 6. 不同大小的红色 G₁; 3, 5. 不同大小的花色 G₁。

1. Black G₁; 2, 4 and 6. Red G₁ with different sizes; 3 and 5. Red with small black spots.

图版 I 青田田鱼雌核发育子代形态观察

Plate I Morphology of gynogenetic offspring of paddy field carp

表 1 雌核发育子代 160 日龄生长性状描述性统计

Tab. 1 Descriptive statistics of 160 days growth traits in the gynogenetic offspring

体色 Color	数量 Number/尾	体质量 Body mass/g			体长 Body length/cm		
		平均 Mean	最小 Min	最大 Max	平均 Mean	最小 Min	最大 Max
红色 WR	24	41.56	6.20	96.20	10.09	5.22	15.97
黑色 WB	2	392.45	215.70	569.20	24.52	20.04	29.00
花色 RSB	34	29.49	1.10	95.90	8.59	3.27	14.90

田鱼 G_1 与 F_1 在生长性状方面存在极显著性差异 ($P < 0.01$), 在体质量、体长、全长等生长指标方面, F_1 均显著大于 G_1 (表 2), 说明雌核发育技术在制备 G_1 的过程中冷休克处理在一定程度上影响了 G_1 的早期生长。

表 2 雌核组 G_1 与普通组 F_1 的 160 日龄生长性状描述性统计

Tab. 2 Descriptive statistics of 160 days growth traits in gynogenetic individuals and normal individuals

性状 Traits	G_1 组 Gynogenetic group	F_1 组 Normal group
体质量 Body mass/g	46.42 ± 9.86	80.76 ± 5.11 **
体长 Body length/cm	9.72 ± 0.51	12.96 ± 0.33 **
全长 Total length/cm	11.99 ± 0.57	16.02 ± 0.39 **
体高 Body depth/cm	3.55 ± 0.18	4.90 ± 0.12 **
头长 Head length/cm	2.80 ± 0.13	3.65 ± 0.11 **
尾柄高 Caudal peduncle depth/cm	1.10 ± 0.06	1.56 ± 0.04 **
尾柄长 Caudal peduncle length/cm	1.37 ± 0.09	1.88 ± 0.05 **

注: ** 代表存在极显著性差异 ($P < 0.01$)。

Notes: ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

田鱼 G_1 与 F_1 的形态特征统计: 两者的全长/体长、尾柄长/尾柄高、体高/尾柄高无显著性差异; 全长/头长和全长/尾柄长存在显著性差异 ($P < 0.05$); 全长/体高存在极显著性差异 ($P < 0.01$)。 G_1 的全长/体长、全长/头长等变异系数为 8.00% ~ 18.40%。除全长/尾柄长之外, 其余特征的变异系数均大于普通群体, 绝大多数变异系数超过 10%, 这说明 G_1 经过 1 次遗传物质纯化, 表征在形态上与 F_1 存在一定差异 (表 3)。

2.2 性腺发育

2.2.1 雌核发育子代性腺发育情况

从 160 日龄田鱼 G_1 中随机选取 15 尾, 经测量, 平均体长为 12.11 cm, 平均体质量为 104.50 g, 最大个体体质量为 568.60 g, 最小个体体质量为 6.80 g, 用手挤压后均无精液流出, 解剖后, 肉眼观察到性腺粉红色, 经过性腺组织学切片观察, 15 尾 G_1 样本全部为雌性。不同大小 G_1 样本的性腺发育程度不一样, 小体型样本的卵巢处于 I 期, 生殖细胞基本为卵原细胞, 呈细胞团结构 (图版 II-1)。大多数中等大小样本的卵巢处于 II 期, 正逐步向 III 期过度, 生殖细胞大多数为 II 时相初级卵母细胞, 进入小生长阶段, 出现卵黄核及滤泡细胞, 少数为 III 时相初级卵母细胞 (图版 II-2)。大体型样本的卵巢处于 III 期, 生殖细胞多数为 III 时相初级卵母细胞, 仅有少数 II 时相初级卵母细胞, 卵巢进入大生长阶段, 滤泡细胞数量明显增加, 开始出现卵黄粒, 正逐渐向 IV 期过度^[31], 进入繁殖期 (图版 II-3)。

2.2.2 普通田鱼子代性腺发育情况

从 160 日龄田鱼 F_1 中随机挑选 15 尾, 平均体长 14.47 cm, 平均体质量 103.20 g, 最大个体体质量为 193.70 g, 最小个体体质量为 49.00 g。其中有 2 尾可以直接挤出精液, 解剖后肉眼观察到乳白色的精巢和粉红色的卵巢, 性腺组织学切片观察发现样本中包含有 5 尾雄鱼。卵巢基本处于 II 期至 III 期的过渡阶段, 生殖细胞既有 II 时相卵母细胞, 也有 III 时相卵母细胞 (图版 II-4), 精巢处于 V 期阶段, 性腺中布满成熟精子, 有部分精子细胞、精母细胞以及少数精原细胞 (图版 II-5, 6), 表明田鱼雄性个体已经发育成熟^[32]。

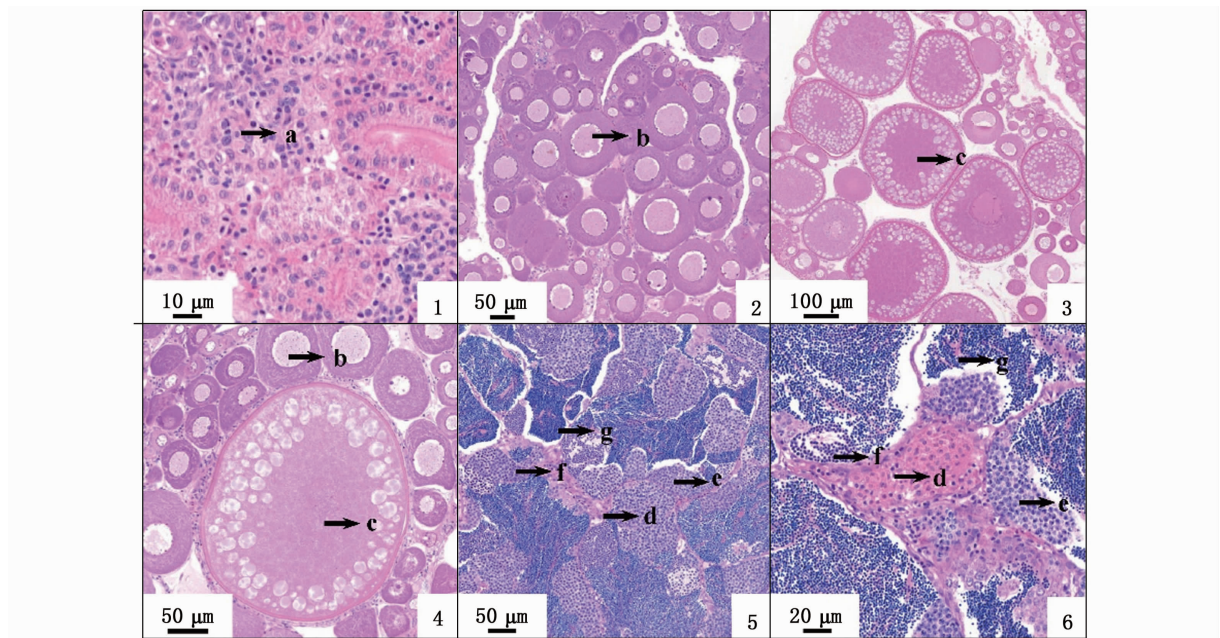
表 3 雌核组 G_1 与普通组 F_1 形态参数和变异系数

Tab. 3 Morphological traits and coefficient of variation in gynogenetic individuals and normal individuals

性状 Traits	G_1 组 Gynogenetic group		F_1 组 Normal group	
	Mean \pm SD	变异系数 CV/%	Mean \pm SD	变异系数 CV/%
全长/体长 Total length/ Body length	1.25 \pm 0.10	8.00	1.24 \pm 0.06	4.84
全长/体高 Total length/ Body depth	3.44 \pm 0.35	10.17	3.27 \pm 0.16 **	4.89
全长/头长 Total length/ Head length	4.33 \pm 0.67	15.47	4.42 \pm 0.31 *	7.01
全长/尾柄长 Total length/ Caudal peduncle length	9.15 \pm 1.27	13.88	8.70 \pm 1.27 *	14.60
体高/尾柄高 Body depth/ Caudal peduncle depth	3.28 \pm 0.38	11.59	3.18 \pm 0.32	10.06
尾柄长/尾柄高 Caudal peduncle length/ Caudal peduncle depth	1.25 \pm 0.23	18.40	1.21 \pm 0.19	15.70

注: * 代表存在显著性差异($P < 0.05$), ** 代表存在极显著性差异($P < 0.01$)。

Notes: * indicates significant difference($P < 0.05$), ** indicates extremely significant difference($P < 0.01$).



1~3 均为田鱼 G_1 卵巢结构; 4 为田鱼 F_1 卵巢结构; 5~6 为田鱼 F_1 精巢结构; a. I 时相卵母细胞; b. II 时相卵母细胞; c. III 时相卵母细胞; d. 精原细胞; e. 精母细胞; f. 精子细胞; g. 精子。

From 1 to 3 represent the ovary of G_1 ; The picture 4 represents the ovary of F_1 ; The pictures 5 and 6 represent the testis of F_1 ; a. primary oocytes in stage I; b. primary oocytes in stage II; c. primary oocytes in stage III; d. spermatogonia; e. spermatocytes; f. spermatids; g. sperms.

图版 II 田鱼雌核发育 G_1 及普通繁殖 F_1 性腺发育情况Plate II Gonadal development of gynogenetic offsprings (G_1) and normal offspring (F_1) of Qingtian paddy field carp

2.3 SNP 位点分析

随机选取 10 尾 G_1 样本,及其母本 M1、M2 和父本 D1,进行基因组测序,3 尾父母本高质量的基因组数据为 38.8~42.5 Gb,10 尾 G_1 高质量的基因组数据为 11.7~14.1 Gb。通过 SNP 检测,与参考基因组比较发现:母本 M1 的纯合位点数为 39.09%,杂合位点数为 60.91%;母本 M2

的纯合位点数为 37.76%,杂合位点数为 62.24%;父本 D1 的纯合位点数为 37.11%,杂合位点数为 62.89%。父母本的杂合位点数目明显高于纯合位点数,亲本杂合度较高(表 4)。 G_1 平均纯合位点数为 61.85%,平均杂合位点数为 38.15%,这说明通过 1 次雌核发育技术处理,大幅度提高了田鱼 G_1 的遗传纯合位点比例(表 5)。

表 4 SNP 位点数目统计
Tab. 4 Statistics of SNP

样本 Sample	纯合位点数 Alt (homo)	纯合位点占比 Alt (homo)/%	杂合位点数 Het	杂合位点占比 Het/%	总位点数 Total
M1	4 351 928	39.09	6 782 353	60.91	11 134 281
M2	4 255 635	37.76	7 013 659	62.24	11 269 294
D1	4 166 860	37.11	7 061 579	62.89	11 228 439
G ₁ -1	5 167 657	62.47	3 105 017	37.53	8 272 674
G ₁ -2	4 149 789	48.08	4 481 485	51.92	8 631 274
G ₁ -3	5 280 535	65.27	2 809 363	34.73	8 089 898
G ₁ -4	5 347 735	66.05	2 749 122	33.95	8 096 857
G ₁ -5	5 153 461	61.71	3 197 395	38.29	8 350 856
G ₁ -6	5 167 345	60.96	3 308 757	39.04	8 476 102
G ₁ -7	5 186 851	61.16	3 293 823	38.84	8 480 674
G ₁ -8	5 248 339	64.35	2 908 034	35.65	8 156 373
G ₁ -9	5 074 673	62.94	2 987 707	37.06	8 062 380
G ₁ -10	5 240 721	65.54	2 755 679	34.46	7 996 400

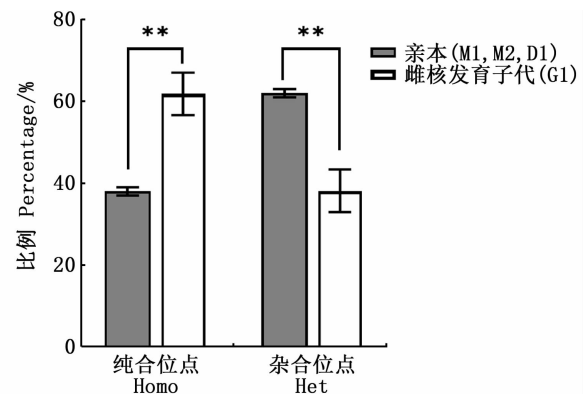
表 5 SNP 位点描述性统计
Tab. 5 Descriptive statistics of SNP

样本 Sample	数量 Number/尾	纯合位点占比 Alt (Homo)/%			杂合位点占比 Het/%		
		平均 Mean	最小 Min	最大 Max	平均 Mean	最小 Min	最大 Max
父本 D1	1	37.11	37.11	37.11	62.89	62.89	62.89
母本 M1, M2	2	38.42	37.76	39.09	61.58	60.91	62.24
雌核子代 G ₁	10	61.85	48.08	66.05	38.15	33.95	51.92

亲本 (M1、M2) 的 SNP 平均纯合位点数为 38.42%，平均杂合位点数为 61.58%，而 G₁ 的 SNP 平均纯合位点数为 61.85%，平均杂合位点数为 38.15%。G₁ 的 SNP 纯合位点数极为显著地高于亲本 ($P < 0.01$)，而杂合位点数极为显著地低于亲本 ($P < 0.01$)，表明雌核发育技术极为显著地提高了田鱼 G₁ 的基因纯度 (图 1)。

除去亲本之间共有 SNP 纯合突变位点后，统计 G₁ 样本与亲本一致的 SNP 纯合突变位点数 (表 6)，G₁-1、5、6、7、9、10 样本与母本 M2 的相同 SNP 纯合位点数为 18.42% ~ 19.49%，而与母本 M1 相同 SNP 纯合位点数不超过 6%，说明这些 G₁ 样本的母系物质来自母本 M2。G₁-3、4、8 样本与母本 M1 的相同 SNP 纯合位点数为 19.27% ~ 19.45%，而与母本 M2 相同 SNP 纯合位点数不超过 6%，说明这些 G₁ 样本的母系物质来自母本 M1。上述 G₁ 样本与父本 D1 相同 SNP 纯合位点数不超过 4%，表明父本没有为 G₁ 样本贡献遗传物质。值得注意的是，G₁-2 与亲本 M1、M2、D1 的相同 SNP 纯合位点数分别为 10.65%、10.52%、5.82%。G₁-2 与 M1 或 M2 的相同 SNP 纯合位点

数远大于 D1，但与 G₁ 其他样本比较，G₁-2 与 D1 的 SNP 一致纯合突变位点数偏高，可能是由于 G₁-2 遗传物质中渗入了少量的 D1 遗传物质，这一现象也在其他雌核发育鱼中发现^[33]，总体上降低了与母本的一致 SNP 纯合位点比例。



* * 代表极显著性差异 ($P < 0.01$)。
* * indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 1 亲本与雌核发育子代的 SNP 纯合位点及杂合位点统计
Fig. 1 Alt (homo) and het of parents and gynogenetic offspring

表 6 雌核子代 SNP 纯合突变位点统计
Tab. 6 Statistics of SNP homozygous sites in the gynogenetic offsprings

雌核子代 G_1	M1 共有 M1 homo	M1 共有占比 M1 homo/%	M2 共有 M2 homo	M2 共有占比 M2 homo/%	D1 共有 D1 homo	D1 共有占比 D1 homo/%
G_1 -1	470 055	5.68	1 562 254	18.88	280 686	3.39
G_1 -2	918 801	10.65	907 977	10.52	502 096	5.82
G_1 -3	1 568 117	19.38	464 481	5.74	285 016	3.52
G_1 -4	1 574 763	19.45	457 940	5.66	296 911	3.67
G_1 -5	465 212	5.57	1 566 186	18.75	281 004	3.36
G_1 -6	453 661	5.35	1 576 129	18.59	269 539	3.18
G_1 -7	458 079	5.40	1 572 991	18.42	274 638	3.24
G_1 -8	1 572 001	19.27	460 860	5.65	287 931	3.53
G_1 -9	477 151	5.92	1 559 234	19.34	280 310	3.48
G_1 -10	478 428	5.98	1 558 387	19.49	297 064	3.71

3 讨论

对青田田鱼采用人工诱导雌核发育技术,成得到田鱼雌核发育子一代。此次雌核发育母本体色为红色,但 G_1 出现 3 种体色,这可能是由于雌核发育导致基因座位纯化,从而产生性状分离^[15],也可能是由于微量父本染色体进入子代胚胎所致^[34]。雌核发育操作对胚胎造成了一定程度的损伤^[20],导致 G_1 平均生长速度明显慢于普通 F_1 ,而 G_1 群体生长速度两极化:部分个体生长迅速,极为显著地超过普通 F_1 ;部分个体生长慢,出苗 1 个月后几乎停止生长。 G_1 与 F_1 的形态特征参数存在极显著性差异,说明 G_1 在形体上有所变化。赵海涛等^[23]比较分析牙鲆雌核发育群体、养殖群体和野生群体的形态差异,发现 38 个形态学指标存在显著差异。翘嘴鲌雌核发育群体与普通群体之间亦存在形态差异^[35]。经济鱼类通常携带有隐性有害基因,且以杂合态存在,正常养殖过程中不会显现,雌核发育技术将基因座纯化后有害基因关联的性状便表现出来,由此淘汰携带有害基因的个体,筛选优良隐性基因的个体,有利于优良品种的培育。 G_1 表现出的体色和生长分化,表明其具有很大潜在的优良养殖性状选育价值^[36]。 G_1 和 F_1 的性腺组织学切片结果表明, G_1 样本全部为雌性个体,没有发现雄性个体,性腺能够进行正常发育。 G_1 与 F_1 的卵巢早期发育阶段差异不大,160 日龄的卵巢中没有 IV 时相卵母细胞,为 II 时相向 III 时相过度,III 时相卵母细胞中有卵黄出现。 F_1 部分样本的精巢完全发育成熟。

采用 SNP 分型技术,在全基因组水平上根据 SNP 纯合位点数比例,对 G_1 样本遗传物质来源

进行鉴定和分析,发现 G_1 样本的 SNP 纯合位点数比例得到快速提高,极为显著地高于其亲本,而杂合位点数比例显著地低于亲本,说明雌核发育技术有助于田鱼纯系培育。通过 SNP 纯合突变位点数百分比的高低,判断 G_1 是否混入了双亲交配产生的子代。 G_1 与其来源母本的共有纯合 SNP 的百分比,高达 18.42% ~ 19.49% (G_1 -2 除外),而与其非来源母本的共有纯合 SNP 的百分比,仅为 5.35% ~ 5.98% (G_1 -2 除外)。依据 G_1 纯合 SNP 偏向亲本比例的大小,表明 G_1 遗传物质为母本来源。推测田鱼的性别决定方式为 XX/XY 型^[37]。雌核子代与其非亲母本的共有纯合 SNP 的百分比,不超过 6%,以此为子代与亲本亲缘关系的判定阈值,从 G_1 与其可能父本 D1 的共有纯合 SNP 的百分比不超过 4% (G_1 -2 除外)来看,可判断 G_1 与父本 D1 无亲缘关系,故而排除 G_1 由双亲交配产生的可能性。例外的是, G_1 -2 样本,较其他 G_1 样本而言,与母本的一致 SNP 纯合位点数比例偏低,与可能父本 D1 的一致 SNP 纯合位点比例偏高,达 5.82%,但小于 6%,很可能因为其基因组中混入了少量父系遗传物质,这种现象常见于人工雌核发育鱼^[38]。这可能是由于父系遗传物质的渗入,降低了子代与母本一致 SNP 纯合位点数,引起母本偏向性不明显,但可导致体色和生长方面明显差异,需进一步深入研究。本研究成功得到了田鱼人工雌核发育群体,为今后的田鱼育种及种质资源开发奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] XIE J, HU L L, TANG J J, et al. Ecological mechanisms underlying the sustainability of the agricultural heritage rice-fish coculture system [J]. Proceedings of the National

- Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(50): E1381-E1387.
- [2] HU L L, ZHANG J, REN W Z, et al. Can the co-cultivation of rice and fish help sustain rice production? [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28728.
- [3] REN W Z, HU L L, GUO L, et al. Preservation of the genetic diversity of a local common carp in the agricultural heritage rice-fish system[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(3): E546-E554.
- [4] 齐明, 侯懿玲, 刘韬, 等. 急性低氧胁迫和复氧恢复对青田田鱼幼鱼氧化应激和能量代谢的影响[J]. *淡水渔业*, 2020, 50(6): 92-98.
- QI M, HOU Y L, LIU T, et al. The effects of acute hypoxia stress and re-oxygenation on oxidative stress and energy metabolism of juvenile *Cyprinus carpio* var *qingtianensis*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2020, 50(6): 92-98.
- [5] 胡文静, 苏超群, 刘韬, 等. 青田田鱼和金华田鱼肌肉营养成分的比较[J]. *上海海洋大学学报*, 2020, 29(4): 552-558.
- HU W J, SU C Q, LIU T, et al. Analysis of muscle nutrient composition of *Cyprinus carpio* var. *color* in Qingtian and Jinhua[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(4): 552-558.
- [6] 龚小玲, 岳丽佳, 王米雪, 等. 软、硬鳞瓯江彩鲤鳞片生化成分比较[J]. *上海海洋大学学报*, 2014, 23(5): 663-668.
- GONG X L, YUE L J, WANG M X, et al. Comparison of biochemical compositions in the soft scale and the hard scale of the Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. *color*)[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(5): 663-668.
- [7] 郭梁, 任伟征, 胡亮亮, 等. 传统稻鱼系统中“田鲤鱼”的形态特征[J]. *应用生态学报*, 2017, 28(2): 665-672.
- GUO L, REN W Z, HU L L, et al. Morphological traits of indigenous field carps maintained in traditional rice-based farming systems [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(2): 665-672.
- [8] 徐康, 段巍, 肖军, 等. 鱼类遗传育种中生物学方法的应用及研究进展[J]. *中国科学: 生命科学*, 2014, 44(12): 1272-1288.
- XU K, DUAN W, XIAO J, et al. Development and application of biological technologies in fish genetic breeding [J]. *Science China Life Sciences*, 2015, 58(2): 187-201.
- [9] MAO Z W, FU Y Q, WANG S, et al. Further evidence for paternal DNA transmission in gynogenetic grass carp [J]. *Science China Life Sciences*, 2020, 63(9): 1287-1296.
- [10] 董传举, 李学军, 孙效文. 我国鲫种群遗传多样性及起源进化研究进展[J]. *水产学报*, 2020, 44(6): 1046-1062.
- DONG C J, LI X J, SUN X W. Research progress of the genetic diversity, origin and evolution of *Carassius auratus* in China[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(6): 1046-1062.
- [11] 梁拥军, 孙向军, 史东杰, 等. 用团头鲂精子诱导红白锦鲤雌核发育研究[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(29): 16262-16265, 16270.
- LIANG Y J, SUN X J, SHI D J, et al. Induction of gynogenesis in *Cyprinus carpio*. L by heterologous sperms of *Megalobrama amblycephala* [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(29): 16262-16265, 16270.
- [12] 肖俊, 甘西, 罗永巨. 罗非鱼育种研究进展[J]. *湖南科技大学学报(自然科学版)*, 2014, 29(1): 106-112.
- XIAO J, GAN X, LUO Y J. The progress of tilapia breeding [J]. *Journal of Hunan University of Science & Technology (Natural Science Edition)*, 2014, 29(1): 106-112.
- [13] MORISHIMA K, YOSHIKAWA H, ARAI K. Meiotic hybridogenesis in triploid *Misgurnus loach* derived from a clonal lineage[J]. *Heredity*, 2008, 100(6): 581-586.
- [14] VALE L, DIEGUEZ R, SÁNCHEZ L, et al. A sex-associated sequence identified by RAPD screening in gynogenetic individuals of turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(3): 1501-1509.
- [15] OCALEWICZ K, GURGUL A, POLONIS M, et al. Preliminary identification of candidate genes related to survival of gynogenetic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) based on comparative transcriptome analysis[J]. *Animals*, 2020, 10(8): 1326.
- [16] 刘峻宇, 刘均辉, 孔杰, 等. 凡纳滨对虾 SNP 标记开发与家系亲缘关系验证分析[J]. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 108-116.
- LIU J Y, LIU J H, KONG J, et al. Development of SNP markers and verification analysis of relationship on family in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 108-116.
- [17] 刘加林, 贾永义, 刘士力, 等. 太湖鲂鮰 F₂ 代 GH 基因结构、系统发育和表达特征[J]. *海洋与湖沼*, 2020, 51(6): 1440-1451.
- LIU J L, JIA Y Y, LIU S L, et al. Structure, phylogeny and tissue distribution of GH in *Culter alburnu* ♀ × *Megalobrama terminalis* ♂ [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2020, 51(6): 1440-1451.
- [18] JAAFAR R, ÅDEGØRD J, MATHIESSEN H, et al. Quantitative trait loci (QTL) associated with resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* against the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2020, 43(12): 1591-1602.
- [19] LUO K K, XIAO J, LIU S J, et al. Massive production of all-female diploids and triploids in the crucian carp [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2011, 7(4): 487-495.
- [20] 李兰兰, 肖伟, 邢露梅, 等. 雌核发育兰州鲂胚胎发育和形态特征的研究[J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(5): 820-828.

- LI L L, XIAO W, XING L M, et al. Study on morphological characteristics and embryonic development of the gynogenesis *Silurus lanzhouensis* [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2020, 42(5): 820-828.
- [21] 陶敏, 宋祯彦, 肖军, 等. 翘嘴红鲌 (*Erythroculter ilishaeformis*) 精子诱导的雌核发育团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 细胞及其分子遗传学分析 [J]. 动物学研究, 2013, 34(5): 479-486.
- TAO M, SONG Z Y, XIAO J, et al. Cytogenetic and molecular genetic analysis of gynogenesis in *Megalobrama amblycephala* using spermatozoa of *Erythroculter ilishaeformis* [J]. Zoological Research, 2013, 34(5): 479-486.
- [22] 李停, 贾永义, 刘士力, 等. 二次正交旋转组合设计优化人工诱导翘嘴鲌雌核发育 [J]. 中国水产科学, 2016, 23(1): 77-89.
- LI T, JIA Y Y, LIU S L, et al. Optimizing conditions to induce artificial gynogenesis in *Culter alburnus* using a quadratic orthogonal rotation design [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(1): 77-89.
- [23] 赵海涛, 范宁宇, 万玉美, 等. 雌核发育、野生及养殖牙鲆形态差异分析 [J]. 河北渔业, 2019(11): 1-7, 27.
- ZHAO H T, FAN N N, WAN Y M, et al. Analysis on morphological variations of gynogenesis, wild and cultured *Paralichthys olivaceus* [J]. Hebei Fisheries, 2019(11): 1-7, 27.
- [24] 唐晓阳. 克隆牙鲆形态、遗传特性以及温度对杂合克隆牙鲆生长发育影响的研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
- TANG X Y. Morphologic and genetic characteristics of clones and temperature influence on growth and development of heterozygous clones of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014.
- [25] WANG J, LIU S J, XIAO J, et al. Evidence for the evolutionary origin of goldfish derived from the distant crossing of red crucian carp × common carp [J]. BMC Genetics, 2014, 15(1): 33.
- [26] 刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1993: 22-30.
- LIU Y. Reproductive physiology of cultural fish in China [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1993: 22-30.
- [27] JEFFRIES D L, COPP G H, HANDLEY L L, et al. Comparing RAD seq and microsatellites to infer complex phylogeographic patterns, an empirical perspective in the Crucian carp, *Carassius carassius* L. [J]. Molecular Ecology, 2016, 25(13): 2997-3018.
- [28] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y R, et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884-i890.
- [29] LI H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM [J/OL]. arXiv preprint arXiv, 2013, 13(3): 3997-3999. [2013-05-26]. <https://arxiv.org/abs/1303.3997v1>.
- [30] MCKENNA A, HANNA M, BANKS E, et al. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data [J]. Genome Research, 2010, 20(9): 1297-1303.
- [31] ZHOU R, SHANG R J, GONG D B, et al. Characterization of H3 methylation in regulating oocyte development in cyprinid fish [J]. Science China Life Sciences, 2019, 62(6): 829-837.
- [32] 陈松, 王静, 刘少军, 等. 改良三倍体鲫鱼的生物学特性研究 [J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39(5): 479-484.
- CHEN S, WANG J, LIU S J, et al. Biological characteristics of an improved triploid crucian carp [J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2009, 52(8): 733-738.
- [33] LIMBORG M T, WAPLES R K, ALLENDORF F W, et al. Linkage mapping reveals strong chiasma interference in Sockeye Salmon: implications for interpreting genomic data [J]. G3-Genes | Genomes | Genetics, 2015, 5(11): 2463-2473.
- [34] URIBE M C, GRIER H J, DE LA ROSA-CRUZ G, et al. The occurrence of spermatozoa in the ovary of the gynogenetic viviparous teleost *Poecilia formosa* (POECILIIDAE) [J]. Journal of Morphology, 2016, 277(3): 341-350.
- [35] 刘月亮, 贾永义, 蒋文枰, 等. 雌核发育翘嘴鲌胚胎发育和形态特征的研究 [J]. 上海海洋大学学报, 2017, 26(2): 203-211.
- LIU Y L, JIA Y Y, JIANG W P, et al. Study on morphological characteristics and embryonic development of the gynogenesis top mouth culter (*Culter alburnus*) [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26(2): 203-211.
- [36] SHAO G M, LI X Y, WANG Y, et al. Whole genome incorporation and epigenetic stability in a newly synthetic allopolyploid of gynogenetic gibel carp [J]. Genome Biology and Evolution, 2018, 10(9): 2394-2407.
- [37] MEI J, GUI J F. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish [J]. Science China Life Sciences, 2015, 58(2): 124-136.
- [38] 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.

Morphologic and genetic analysis of the artificially induced gynogenesis in Qingtian paddy field carp

ZHI Yu^{1,2,3}, LIU Qigen^{1,2,3}, WU Jiamin^{1,2,3}, LIU Dong^{1,2,3}

(1. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The resources of the indigenous common carp was exploited which are bred in paddy field to become a paddy-field carp in Qingtian, Zhejiang Province. The gynogenesis in Qingtian paddy field carp was artificially induced by sperm inactivated via ultraviolet irradiation, and followed by meiotic chromosome doubling in the method of cold shock. The gynogenesis offspring (G_1) were obtained. Using common offspring (F_1) as standard, the morphological characteristics and gonad developments of the 160-day-old G_1 were observed. SNP technology was used for genetic identification of G_1 at the genomic level. The results showed G_1 had 3 types of body colors and different growth rates. Out of them, the black type shows the fastest growth, and an average body mass reached 392.45 g. The average growth rate of G_1 was significantly slower than F_1 . G_1 showed morphological proportion's difference from F_1 , and the ratio of total length/body depth was significantly different. In individuals, G_1 's ovaries developed in various periods, and ovaries of the large individuals had predominantly primary oocytes in stage III which was similar to F_1 . For the purity rate of genetic material of paddy field carp by SNP detecting, the average rate of homozygous loci 61.85% of G_1 was higher than 38.42% of maternal genome through gynogenesis technology, and some paternal genetic materials integrated into G_1 's individuals, resulting in the differences in body colors and growth rate. G_1 will be used for the conservation of genetic resources, and further for the selected breeding of Qingtian paddy field carp.

Key words: Qingtian paddy field carp; gynogenesis; morphological characteristic; gonadal development; SNP