

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00483

雌核发育银鲫微卫星突变速率和突变模式

刘晓锋^{1,2}, 鲁翠云¹, 曹顶臣¹, 孙效文¹, 梁利群¹

1. 黑龙江水产研究所北方鱼类生物工程育种重点开放实验室, 哈尔滨 150070;
2. 大连水产学院生命科学与技术学院, 大连 116023

摘要: 银鲫是天然雌核发育的三倍体两性型种群, 因其遗传背景和生殖方式的特殊性, 已经成为研究单性和多倍体脊椎动物进化遗传学的理想模式鱼类。利用 33 个微卫星序列对雌核发育银鲫的突变速率和突变模式进行研究, 结果表明: (1) 22 个子代个体中, 检测到 1 尾个体在 15 个微卫星位点具有 18 个突变等位基因; (2) 每个微卫星位点每代总体平均突变率是 1.16×10^{-2} , 95% 置信区间是 $6.87 \times 10^{-3} \sim 1.83 \times 10^{-2}$, 与其他鱼类相比, 雌核发育银鲫的突变率明显偏高, 这与天然雌核发育鱼类处在单性生殖和两性生殖的过度阶段有密切关系; (3) 具有突变等位基因的 13 个位点的重复单元数目都在 10 次以上, 11 个复合型微卫星位点的突变率 (1.31×10^{-2}) 与 21 个完美型位点 (1.00×10^{-2}) 的突变率没有明显差异 ($P = 0.67$), 微卫星突变率受到重复单元数目的影响, 然而与重复结构类型和侧翼序列 GC 碱基含量无相关性; (4) 序列分析表明, 雌核发育银鲫的微卫星突变模式并不严格遵守逐步突变模型。

关键词: 银鲫; 微卫星; 突变

Mutation rate and pattern of microsatellites in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*)

LIU Xiao-Feng^{1,2}, LU Cui-Yun¹, CAO Ding-Chen¹, SUN Xiao-Wen¹, LIANG Li-Qun¹

1. Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;
2. College of Aqua-life Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China

Abstract: The natural gynogenetic triploid silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) provides a good system for studying evolutionary genetics of the unisexual and polyploidy vertebrate. Microsatellites are abundant across genomes and show high levels of polymorphism and mutational rate, so they have been widely used for studying evolutionary biology. In this study, the mutation rate and pattern at 33 microsatellite loci of silver crucian carp were investigated. As a result, it was found that the only one of 22 offspring had 18 mutant alleles at 15 microsatellite loci. The overall mutation rate of the 33 loci was 1.16×10^{-2} /locus/generation (95% confidence interval 6.87×10^{-3} and 1.83×10^{-2}). The mutation rate in the gynogenetic triploid silver crucian carp was obviously higher than other fish, which was closely related to the transitional phase of parthenogenesis and gamogenesis in the natural gynogenetic fish. The repeat numbers had more than 10 times at 13 loci of the mutant alleles, and there was no obviously different in the mutant rate between the 11 compound microsatellite loci (1.31×10^{-2}) and the 21 perfect microsatellite loci (1.00×10^{-2}) ($P = 0.67$). The mutant rate had affinity with repeat numbers instead of repeat types and GC content in flanking sequences of microsatellite. The mutation pattern of silver crucian carp

收稿日期: 2007-09-28; 修回日期: 2008-01-14

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30271010)资助[Supported by National Natural Science Foundation of China (No.30271010)]

作者简介: 刘晓锋(1982-), 男, 硕士研究生, 专业方向: 分子遗传学。E-mail: lxf1715@163.com

通讯作者: 孙效文(1955-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 鱼类基因育种。E-mail: sunxw2002@163.com

was very complexional, as well as some loci did not follow the Stepwise Mutation Model.

Keywords: silver crucian carp; microsatellite; mutation

银鲫(*Carassius auratus gibelio* Bloch)是天然雌核发育的两性型三倍体种群,在脊椎动物的进化历程中处于单性生殖和两性生殖的过渡阶段,与其他雌核发育的单性脊椎动物相比,雌核发育银鲫具有许多独特的性质。例如,银鲫的天然群体中具有一定比例(5%~25%)的雄性个体^[1~3];银鲫卵子对同源和异源精子具有不同的应答机制^[4],分别以两性生殖和雌核发育的方式繁殖后代等等。银鲫具有这独特的遗传背景和生殖方式,因而成为研究单性和多倍体脊椎动物进化遗传学及其生殖方式调控机制的一个独特系统^[3,5]。

随着大量基因组序列信息的获得以及分子进化和群体遗传学理论的成熟,曾经占主导地位的选择学说和中性理论,两者之中任意一个都不足以解释我们现在所观察到的各物种基因组的进化速度和差异程度^[6]。事实上,最近的研究表明^[7],基因组进化的首要驱动力是新突变的产生(包括基因复制和DNA变异)。微卫星(Microsatellite)又称简单序列重复(Simple Sequence Repeat, SSR),作为高度多态性的DNA序列,在基因组范围内分布非常广泛,与编码序列相比,其突变率相当高,因此广泛应用于进化生物学研究^[8~10]。微卫星长度的变异机制主要是DNA复制过程中滑动链的错配。目前普遍采用逐步突变模型(Stepwise Mutation Model, SMM)来解释微卫星突变的机制,但也不能完全解释这一机制的发生^[11]。研究微卫星突变率最直接和最确切的方法就是在家系基因型分析(亲

本和子代等位基因的传递)中对突变事件直接进行检测^[12,13]。这一方法已经广泛应用到对其他物种的研究,人类^[14]、鼠^[15]、羊^[16]和猪^[17]等等。

与其他物种相比,人们对鱼类特别是雌核发育鱼类的微卫星突变率和突变模式的了解还很少,本研究利用 33 个微卫星位点对雌核发育银鲫突变率和突变模式进行研究,初步认识银鲫微卫星序列的突变过程,进一步理解突变在天然雌核发育鱼类基因组进化中的意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料

雌核发育银鲫(*C. auratus gibelio*)于 2003 年 9 月取自黑龙江水系方正县双龙水库,经德国产 Partec Pas 型流式细胞仪检测倍性(大连水产学院农业部海水增养殖生态重点实验室),选取三倍体进行杂合位点检测,获得具有杂合位点的银鲫作为亲本(三倍体方正银鲫♀与同种群三倍体方正银鲫♂)于 2004 年 5 月繁育子代,分为两组。选取第 1 组中得到 F₁ 子代个体 22 尾^[18],这样亲本和子代总计 24 尾作为本次实验研究对象。

1.2 微卫星序列

本次实验选取 33 个多态性较高的微卫星序列^[19,20](表 1),其中包括完美型^[21] Cca02(TA)₂₀、Cca04(TA)₂₄、Cca12(GT)₂₀、Cca23(GT)₁₁、Cca67(CA)₃₀、

表 1 33 对微卫星引物及其扩增结果

Table 1 33 SSR primers and PCR amplification in silver crucian carp

位点 Locus	GenBank 登录号 GenBank accession no.	重复单元 Repeat	引物序列 Primer sequence(5' 3')	复性温度 Annealing temperature (°C)	片段大小 Size range (bp)	等位基因数目 Number of alleles
Cca02	D37887	(TA) ₂₀	F: ATGCAGGGCTCATGTTGCTCATAG R: GCAGACAGACAGTTGCTCTCG	50	173~194	1
Cca04	AF132287	(TA) ₂₄	F: ATCCCTTACCGCCCTGTGT R: AGCTGAAAAACGCTGTCACG	50	294~359	3
Cca12	AU183353	(GT) ₂₀	F: ACGCGTCCGGCTGACATTAGAGC R: ACAACCCCGATCCCCAACACA	50	176~182	4
Cca14	C88441	(GT) ₇ TT(GT) ₂₄	F: GCAAAGTCCATTCTACCCACTCA R: CTGCCACCTGCTGTTTCATTCAAA	50	106~128	7
Cca19	AB003585	(TTTG) ₆	F: CCTGACCCTGAAGAGAACAACACTAC R: TGGCCTCATCAAAGACATCAAG	50	229~234	2

续表

位点 Locus	GenBank 登录号 GenBank accession no.	重复单元 Repeat	引物序列 Primer sequence(5 3)	复性温度 Annealing temperature (°C)	片段大小 Size range (bp)	等位基因数目 Number of alleles
<i>Cca22</i>	M14088	(TC) ₂₁ (AC) ₃₂ (AT) ₁₄	F: AGGGCTTTTATAGCTTTTCCTACC R: CAGCTTCTCTGTGGAGCAACTGT	50	104~160	1
<i>Cca23</i>	M14088	(GT) ₁₁	F: CACCGTGTTTAACCTGATTACCA R: GCTTATCCAGTCCTTCACACTCA	50	136~145	2
<i>Cca65</i>	AY169247	(TG) ₆ (TATG) ₆	F: CAAGTGAGCGGGAGACAGAGA R: TCAGCGGTTAGGAGACAGTAGG	55	187~225	4
<i>Cca67</i>	AY169248	(CA) ₃₀	F: GTAGCCCCAAAAGATGTAGCA R: TGGTCAAGTTCAGAGGCTGTAT	55	180~201	1
<i>Cca86</i>	AY169253	(AC) ₁₀	F: GTATTCTCTGCCTTTCCACAA R: CACTTCATGCACTCGTTCACC	55	197~231	5
<i>Cca90</i>	AY169254	(AC) ₁₂	F: CCTCTGCCACAGTGCCAGTG R: AGGGCCACAGACAAGAGATACCA	55	209~222	3
<i>J1</i>	AY115092	(AC) ₁₄	F: CATTCTTTGAGCCTCAGTGTCTG R: GGGGAACATTTCTGTCGGTCATT	60	129~155	4
<i>J12</i>	AY115097	(AT) ₄ (GT) ₁₆	F: TTCTGCACCACTAATGACAAACAA R: ACCCGGATGAATATTAAGAAACAA	55	105~131	4
<i>J58</i>	AY115102	(CA) ₁₄	F: GCGGTCTGCCTCAAAGTA R: GAACCCCTAAAGGCGACATCAA	55	106~132	7
<i>SCM4</i>	DQ378974	(CA) ₁₈	F: TTCACTAGAACAGCAGGAGT R: ACAATGGTAACAGGGACAC	52	117~126	4
<i>SCM8</i>	DQ378979	(GA) ₁₇	F: GCTGTTTGCTCAGGGAC R: TGGAGGAGGGTTAGGGT	52	196~296	6
<i>SCM9</i>	DQ378981	(TG) ₃₅	F: GCTTGTTTGTCTGCTCAAGA R: ATATGACTGGGCCACAGAGG	52	136~176	2
<i>SCM10</i>	DQ378986	(GT) ₁₄	F: GAGCCGCTCTTACCTTGATG R: GTCTCATCCGCTCCAAACTG	60	137~167	5
<i>SCM12</i>	DQ378994	(AC) ₁₀	F: AAGCACCGGAGATCATTCTG R: GGGGCCTCTCTGTTATTCCT	60	238~263	5
<i>SCM13</i>	DQ403234	(CA) ₁₀	F: ACCGTTTTGAGAGCGAGTGT R: AACCAGGTGTGACACAATGC	60	146~160	4
<i>SCM14</i>	DQ403235	(TA) ₃₄ (CA) ₁	F: ACCGGGGATCTGCATTTTAT R: TGCCAATTCATTGCAGACAG	51.5	159~176	3
<i>SCM17</i>	DQ403236	(GT) ₃ T(TG) ₃₂	F: CGGATCAGTCACCAAGTCAG R: CGACAGACGCATGAGGTAGA	60	113~154	6
<i>SCM21</i>	DQ403237	(AG) ₁₁ (TG) ₁₈	F: CCGCAGTATGCTCTGCTGT R: CTAGAGGATCCGCATGGAAA	57	142~172	6
<i>SCM22</i>	DQ403238	(GT) ₁₄	F: CGGAGACAGTCTTGGAGGAG R: GGCATCATTTGCTTTGACCT	57	238~255	2
<i>SCM28</i>	DQ403240	(GT) ₁₄	F: TTGGGAGGAGAAATGGAGTG R: GGCATCATTTGCTTTGACCT	57	232~245	2
<i>YJ05</i>	DQ378987	(CA) ₂₁	F: CGGGGATCAATAACAACC R: GACGCCATTTTACCAGTG	51.5	151~179	6
<i>YJ06</i>	DQ378973	(GA) ₅ GG(GA) ₄	F: AGACCCGATTTCATTGTTT R: GCTCTGAGTCACCGCTAT	51.5	149~175	4
<i>YJ08</i>	DQ403241	(GT) ₁₄	F: CGGAGACAGTCTTGGAGG R: ATGGCATCATTTGCTTTG	55	240~261	3
<i>YJ11</i>	—	(GT) ₁₀	F: GTCATCTTCTTACACCAGCAT R: CTCCTCCTCAACATCTACAATCA	51.5	300~351	3
<i>YJ12</i>	DQ403242	(GT) ₉ GC(GT) ₅	F: GGTCCTTAGAACTTCACAA R: AGTGTCTACCCCTCGCTAT	55	255~303	3
<i>YJ13</i>	DQ403243	(GA) ₁₀ (GT) ₁₈	F: CTTATCCTGTATAGCTCGTC R: TCATCCCGTATAGACCAC	50	154~162	4
<i>YJ15</i>	DQ378985	(GT) ₈ (CA) ₄	F: GTCGTTGCACTGCGGTAT R: CCTGGTGAGGAATGTGGC	55	248~306	2
<i>YJ17</i>	DQ378991	(GT) ₁₂	F: AGGTAGCCCCACATCAAG R: TAAGCATCCTGCAAACAC	58	101~110	3

Cca86(AC)₁₀、*Cca90*(AC)₁₂、*J1*(AC)₁₄、*J58*(CA)₁₄、*SCM4*(CA)₁₈、*SCM8*(GA)₁₇、*SCM9*(TG)₃₅、*SCM10*(GT)₁₄、*SCM12*(AC)₁₀、*SCM13*(CA)₁₀、*SCM22*(GT)₁₄、*SCM28*(GT)₁₄、*YJ05*(CA)₂₁、*YJ08*(GT)₁₄、*YJ11*(GT)₁₀和 *YJ17*(GT)₁₂；复合型 *Cca14*(GT)₇TT(GT)₂₄、*Cca22*(TC)₂₁(AC)₃₂(AT)₁₄、*Cca65*(TG)₆(TATG)₆、*J12*(AT)₄(GT)₁₆、*SCM14*(TA)₃₄(CA)₁₁、*SCM17*(GT)₃T(TG)₃₂、*SCM21*(AG)₁₁(TG)₁₈、*YJ06*(GA)₅GG(GA)₄、*YJ12*(GT)₉GC(GT)₅、*YJ13*(GA)₁₀(GT)₁₈和 *YJ15*(GT)₈(CA)₄；非完美型的 *Cca19*(TTTG)₆。

1.3 基因组 DNA 提取

将剪取的约 0.1 g 鳍条加入约 300 μ L 的裂解液 (10 mmol/L EDTA, pH 8.0; 200 μ g/mL 蛋白酶 K; 0.5% 十二烷基肌氨酸钠), 50 $^{\circ}$ C 消化 2 h, 标准苯酚、氯仿抽提, 无水乙醇沉淀, 自然干燥后溶解于 TE 中, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 PCR 扩增及电泳分析

PCR 反应体系为 25 μ L, 包括模板 DNA 1 μ L (50 ng), 10 \times PCR 混合缓冲液 2.5 μ L (10 mmol/L Tris-Cl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl₂, 0.01% 明胶, 0.1% Tween-20, dATP、dGTP、dTTP、dCTP 各 2 mmol/L), 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (上海生工生物工程技术服务有限公司) 1 U, 加 ddH₂O 补足体系。扩增反应均在 PE9700 型 PCR 仪 (PE 公司) 上完成。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50~60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 各组反应的复性温度见表 1。PCR 产物用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离, 在 5 V/cm 的低电压常温下进行电泳, 电泳完毕后用银染的方法显色, 扫描。使用 Gel-Proanalyzer 4.5 软件对微卫星等位基因大小检测。扩增片段大小参照标准 Marker, DL2000 (TaKaRa, 大连)。

1.5 扩增产物测序

电泳完毕后, 对具有突变等位基因的微卫星位点测序 (测序片段包括非突变等位基因片段和突变等位基因片段)。相应的等位基因片段回收具体方法参照鲁翠云等^[22], 使用同一位点的引物进行二次 PCR 扩增, 然后 PCR 产物纯化 (Biospin PCR 产物纯化试剂盒, 博日公司) 去掉多余的引物及 dNTP, 连接 pMD18-T 载体 (TaKaRa, 大连), 转化入感受态大肠杆菌, 对测序位点的相应等位基因片段, 挑取 3 个阳性克隆测序 (测序工作由北京诺赛基因组研究中

心完成), 用软件 DNA ssist Version 2.0 进行重复序列比对。

1.6 突变率计算

使用公式 $R=N/T$ 计算微卫星突变率 (在一代中所研究的微卫星位点, N 代表突变等位基因的数目, T 代表亲本传递到子代所有等位基因的数目), 置信区间利用 Poisson 分布模型进行估算^[11]。

2 结果与分析

2.1 微卫星位点突变率

F₁ 子代个体中, 检测到 1 尾在 15 个微卫星位点具有 18 个突变等位基因, 33 个微卫星位点每代总体平均突变率是 1.16×10^{-2} , 95% 置信区间是 $6.87 \times 10^{-3} \sim 1.83 \times 10^{-2}$, 亲本传递到子代所有等位基因是 1 554 个, 突变等位基因 18 个。

15 个具有突变等位基因的微卫星位点, 其中 6 个是复合型的, 分别是 *Cca14*、*J12*、*SCM17*、*SCM21*、*YJ06* 和 *YJ12*, 复合型位点的平均突变率 1.31×10^{-2} , 95% 置信区间是 $5.24 \times 10^{-3} \sim 2.69 \times 10^{-2}$, 在 11 个复合型位点, 亲本传递到子代 536 个等位基因中突变等位基因 7 个; 8 个是完美型的, 分别是 *Cca12*、*Cca86*、*J58*、*SCM8*、*SCM12*、*SCM13*、*YJ05* 和 *YJ17*, 完美型位点平均突变率是 1.00×10^{-2} , 95% 置信区间是 $4.81 \times 10^{-3} \sim 1.84 \times 10^{-2}$, 在 21 个完美型位点, 亲本传递到子代 997 个等位基因中突变等位基因 10 个; 1 个非完美型的是 *Cca19*, 突变率是 4.76×10^{-2} , 95% 置信区间是 $1.20 \times 10^{-3} \sim 2.65 \times 10^{-1}$, 非完美型位点, 亲本传递到子代 21 个等位基因, 突变等位基因 1 个。具有突变等位基因的部分位点聚丙烯酰胺凝胶电泳见图 1。

2.2 突变等位基因的观测

我们对 15 个突变位点的突变等位基因进行观测, 在具有突变等位基因的位点 *Cca14*、*YJ06*、*SCM12*, 突变等位基因最有可能追溯到母本; 位点 *Cca12*、*J58*、*SCM8*, 突变等位基因可能追溯到父本 (表 2); 位点 *J12*、*SCM21*、*SCM13*, 突变等位基因有可能是父母本基因组重组产生; 位点 *YJ12*、*YJ17*、*Cca19*, 突变等位基因的产生也许是由偶然突变事件的发生; 同时, 可以观察到一些复合情况, 在位点 *SCM17* 和 *Cca86*, 突变等位基因 (136) 和 (203) 可能来源于父母本基因组重组, 而突变等位基因 (113) 和 (178) 产生于偶然突变事件的发生; 位点 *YJ05*,

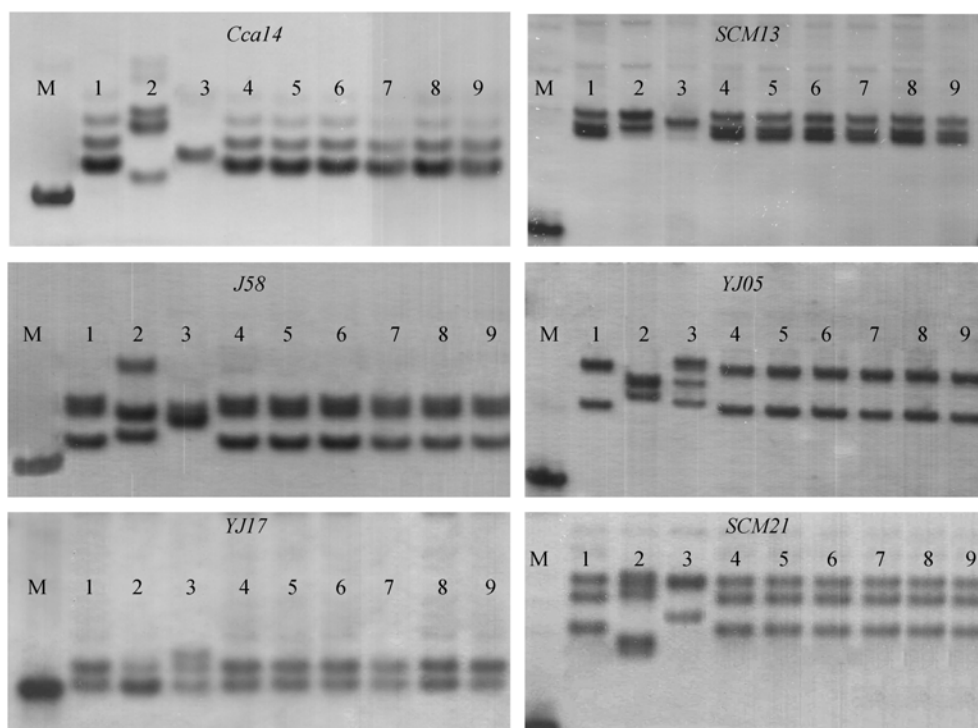


图 1 部分样本在 6 个微卫星突变位点的电泳图谱

M: 分子量标准; 1: 母本; 2: 父本; 3: 具有突变等位基因的子代个体; 4~9: 具有正常等位基因的子代个体。

Fig. 1 Electrophoresis patterns of partial samples in the 6 SSR mutational loci

M: Molecular marker; 1: Dam; 2: Sire; 3: Offspring of the mutational alleles; 4~9: Offspring of the normal alleles.

表 2 雌核发育银鲫在 15 个位点检测到的微卫星突变

Table 2 Microsatellite mutation detected at fifteen microsatellite loci in gynogenetic silver carp

位点 Locus	重复序列 Repeat	亲本基因型 Parental genotypes		子代基因型 Offspring genotypes		突变率 Mutation rate
		母本 Dam	父本 Sire	正常 Normal	突变 Mutant	
<i>Cca14</i>	(GT) ₇ TT(GT) ₂₄	125/117/110	128/123/106	125/117/110	113/ 113 /113	1.59×10^{-2}
<i>J12</i>	(AT) ₄ (GT) ₁₆	121/105/105	131/121/105	121/105/105	121/ 111 /105	2.27×10^{-2}
<i>SCM17</i>	(GT) ₃ T(TG) ₃₂	154/132/116	127/116/116	154/132/116	136 / 113 /113	3.18×10^{-2}
<i>SCM21</i>	(AG) ₁₁ (TG) ₁₈	172/164/149	172/166/142	172/164/149	172/ 156 /156	1.56×10^{-2}
<i>YJ06</i>	(GA) ₅ GG(GA) ₄	175/161/149	149/149/149	175/161/149	168 /161/149	1.54×10^{-2}
<i>YJ12</i>	(GT) ₉ GC(GT) ₅	303/258/258	303/259/259	303/258/258	255 /255/255	2.38×10^{-2}
<i>Cca12</i>	(GT) ₂₀	181/181/181	182/177/177	181/181/181	182/ 175 /175	4.55×10^{-2}
<i>Cca86</i>	(AC) ₁₀	231/206/200	231/206/200	231/206/200	203 / 178 /178	3.18×10^{-2}
<i>J58</i>	(CA) ₁₄	120/117/106	132/115/108	120/117/106	117/ 113 /113	1.56×10^{-2}
<i>SCM8</i>	(GA) ₁₇	296/266/246	266/240/196	296/266/246	296/246/ 233	1.54×10^{-2}
<i>SCM12</i>	(AC) ₁₀	260/245/238	251/245/245	260/245/238	263 /251/245	1.54×10^{-2}
<i>SCM13</i>	(CA) ₁₀	160/151/146	160/151/151	160/151/146	154 /154/154	1.59×10^{-2}
<i>YJ05</i>	(CA) ₂₁	177/151/151	166/157/157	177/151/151	179 /166/ 155	4.65×10^{-2}
<i>YJ17</i>	(GT) ₁₂	106/101/101	106/101/101	106/101/101	110 /106/101	2.27×10^{-2}
<i>Cca19</i>	(TTTG) ₆	234/234/234	234/234/234	234/234/234	229 /229/229	4.76×10^{-2}

注: 黑体表示突变等位基因。

Note: The mutant allele is indicated by bold fonts.

突变等位基因(179)可能追溯到母本,而突变等位基因(155),可能源于父母本基因组重组。

2.3 突变位点测序结果

选取 15 个具有突变等位基因的位点,对其亲本和子代相应的非突变等位基因和突变等位基因片段测序,总共测得等位基因片段 45 个。序列分析表明微卫星重复单元的数目改变是造成序列多态性的主要原因。这些微卫星位点中,有 4 个位点 *SCM17*、*SCM21*、*YJ06*、*YJ12*, 亲本和子代扩增片段的侧翼序列有单个碱基的插入或缺失;其余 11 个位点,亲本和子代扩增片段的侧翼序列完全相同;在位点 *Cca14*、*SCM17*、*YJ12*、*Cca86*、*SCM8*、*SCM12* 和 *SCM13*, 突变等位基因由 2~3 个相应重复单元的插入或者缺失造成;在位点 *Cca12*、*J58*、*YJ05* 和 *Cca19*, 突变等位基因由 1 个相应重复单元的插入或缺失造成;在位点 *J12*、*SCM21*、*YJ06* 和 *YJ17*, 突变等位基因由 4~5 个相应重复单元的插入或缺失造成。例如,突变位点 *SCM13*, 突变等位基因 (154 bp) 由 3 个 CA 重复单元的插入造成;突变位点 *YJ05*, 2 个突变等位基因 (179 bp 和 155 bp) 分别由 1 个 CA 重复单元的插入和 1 个 CT 重复单元的缺失造成;突变位点 *YJ17*, 突变等位基因 (110 bp) 由 4 个 GT 重复单元的缺失造成。

3 讨论

实验选取的 22 尾子代个体,只在 1 尾个体检测到了突变等位基因 (占检测个体的 4.55%), 其余 21 尾个体的基因型完全与母本一致,这并不违背传统雌核发育观点。同时我们可以看到,越来越多的研究结果表明^[3]: 雌核发育生物,父本的遗传物质在随机水平、亚基因组水平或基因组水平传递给了子代,我们所检测到具有突变等位基因的突变个体,在其他位点同样检测到了与父本同样大小的等位基因片段,这能否证明雌核发育银鲫父本的遗传物质以小概率事件在基因组水平传递给了子代,还需要更详细的测序信息来说明。

本次实验利用 33 对多态性较高的微卫星序列,计算得到平均每代突变率是 1.16×10^{-2} , 与人类^[14]、鼠^[15]、羊^[16]和猪^[17]的微卫星突变率相似;但是与鲤鱼 Common carp (*Cyprinus carpio* L.) (5.56×10^{-4})^[23]、宽吻海龙 Pipefish (*Syngnathus typhle* L.) (2×10^{-3})^[24]、细鳞大麻哈鱼 Pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha* W.) ($3.9 \sim 8.5 \times 10^{-3}$)^[25] 和缘边太阳鱼 Dollar sunfish

(*Lepomis marginatus* H.) (2×10^{-3})^[26] 相比,雌核发育银鲫的突变率偏高,这也许与雌核发育鱼类处在单性生殖和两性生殖的过度阶段有密切关系。周莉等 (2002)^[27] 研究结果表明,单性生殖动物可能分别通过突变、三倍化、异精效应和采用不同生殖方式等多种途径来实现进化上的成功,我们对雌核发育银鲫微卫星高突变率的研究结果也说明了突变对单性生殖动物实现进化上的成功具有非常重要的意义。

微卫星序列突变率受到很多因素的影响,譬如:重复单元、等位基因大小、染色体位置、侧翼序列 GC 碱基含量、细胞分裂(有丝分裂和减数分裂)、性别和基因型^[8]。其中,我们主要研究了重复单元和 GC 碱基含量对微卫星突变率的影响。结果表明: (1) 具有突变等位基因的 14 个位点,除 *Cca19* 位点外,其余 13 个位点的重复单元数目都在 10 次以上,说明微卫星序列重复单元数目的多少与突变率有密切关系; (2) Weber^[21] 和 Goldstein 等^[28] 研究显示完美重复数目比不完美的变异要高, Yue^[11] 对猪的微卫星位点突变率的研究中发现复合型位点的突变率是完美型的 4 倍,认为微卫星序列的复合结构以某些方式增加突变率。但是在本研究中,11 个复合型微卫星位点的突变率 (1.31×10^{-2}) 与 21 个完美型位点 (1.00×10^{-2}) 的突变率没有明显差异 ($P = 0.67$), 微卫星序列的复合结构与突变率并无相关性; (3) 关于微卫星序列重复单元类型(二核苷酸重复或四核苷酸重复)对突变率的影响已经有很许多相关报道^[14,32], 由于本次实验选取的 33 微卫星序列中仅有 2 个重复单元是四核苷酸重复(其中一个检测到突变等位基因),其余都是二核苷酸重复类型,所以我们无法比较微卫星序列突变率在不同类型重复单元的差异; (4) Glenn 等^[29] 报道微卫星侧翼序列等位基因的差异与 GC 碱基含量呈负相关,然而,我们在微卫星侧翼序列中并未发现突变率与 GC 碱基含量的相关性。这与 Yue^[11]、Bachtrog 等^[30] 和 Balloux 等^[31] 的研究结果相一致。

目前,关于微卫星序列突变模型,很多研究结果都支持逐步突变模型(SMM)^[33,34]。然而,我们的研究结果并不完全符合严格的逐步突变模型(SMM)。例如,在突变位点 *SCM13* 和 *YJ17*, 突变等位基因 (154 bp) 和 (110 bp) 是由 3 个 CA 重复单元和 4 个 GT 重复单元的插入或者缺失造成,这种情况在其他位点 *SCM12* 和 *YJ06* 也同样出现,与另外一些研究结论一致^[34,35,23], 同时在突变位点 *YJ05*, 突

变等位基因 (179 bp和 155 bp)分别由 1 个CA和 1 个CT重复单元的插入或缺失造成, 这又符合逐步突变模型(SMM)。微卫星序列突变模型的复杂性, 同样在其他鱼类中也有所报道, 例如, 研究细鳞大麻哈鱼Pink salmon (*O. gorbuscha*)^[25]和宽吻海龙Pipefish (*S. typhle*)^[24]时, 很多微卫星突变适合逐步突变模型(SMM); 然而在对太阳鱼Sunfish (*Centrarchidae Canad. J.*)^[36]的研究中发现, 无限等位基因模型(Infinite-Allele Model)和两步突变模型(Two Step Mutation Model)更适合。不同种类研究结论的差异, 充分说明了微卫星序列突变模式的异质性^[23]。研究鱼类的起源进化, 特别是雌核发育鱼类, 由于它们本身的复杂性和特殊性, 这就需要更多的数据和更科学的统计方法来合理的估算群体遗传学和进化遗传学的各种参数, 以达到我们研究的要求。

参考文献(References):

- [1] SHEN Jun-Bao, LIU Ming-Hua, FAN Zhao-Ting. Silver crucian carp of Heilongjiang River. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press, 1997.
沈俊宝, 刘明华, 范兆廷. 黑龙江银鲫. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1997.
- [2] ZHU Lan-Fei, JIANG Yi-Gui. Genetic monitoring of different gynogenetic clones of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) by tissue transplantation. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1990, 14(1): 16–21.
朱蓝菲, 蒋一珪. 组织移植对银鲫不同雌核发育系的遗传监测. 水生生物报, 1990, 14(1): 16–21.
- [3] ZHOU Li, LIU Jing-Xia, GUI Jian-Fang. Preliminary investigation on genetic diversity of gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) detected by microsatellite DNA. *Zoological Research*, 2001, 22(4): 257–264.[\[DOI\]](#)
周莉, 刘静霞, 桂建芳. 应用微卫星标记对雌核发育银鲫的遗传多样性初探. 动物学研究, 2001, 22(4): 257–264.
- [4] GE Wei, SHAN Shi-Xin, JIANG Yi-Gui. Fertilization biology of gynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*), with a discussion on the reproductive modes of the naturally gynogenetic crucian carp. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1992, 16(2): 97–100.
葛伟, 单仕新, 蒋一珪. 雌核发育银鲫的受精生物学研究——天然雌核发育银鲫繁殖方式的讨论. 水生生物学报, 1992, 16(2): 97–100.
- [5] GUI Jian-Fang. Retrospect and prospect of studies on the mechanism of natural gynogenesis in silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Bulletin NNSF China*, 1997, 11(1): 11–16.[\[DOI\]](#)
- 桂建芳. 银鲫天然雌核发育机理研究的回顾与展望. 中国科学基金, 1997, 11(1): 11–16.
- [6] CHEN Ling-Ling, PENG Gui-Zi, ZHANG Wei-Li, TIAN Da-Cheng. The significance of mutations in genomic evolution. *Hereditas (Beijing)*, 2006, 28(5): 631–638.
陈玲玲, 彭贵子, 张伟丽, 田大成. 突变在基因组进化中的意义. 遗传, 2006, 28(5): 631–638.
- [7] Nei M. Selectionism and neutralism in molecular evolution. *Mol Biol Evol*, 2005, 22(12): 2318–2342.
- [8] Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review. *Mol Ecol*, 2002, 11(12): 2453–2465.
- [9] Goldstein DB, Schlotterer C. Microsatellites: evolution and applications. Oxford University Press, Oxford. 1999.
- [10] Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Rev Genet*, 2004, 5(6): 435–445.[\[DOI\]](#)
- [11] Yue GH, Beeckmann P, Geldermann H. Mutation rate at swine microsatellite loci. *Genetica*, 2002, 114(2): 113–119.[\[DOI\]](#)
- [12] Ellegren H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet*, 2000, 16(12): 551–558.[\[DOI\]](#)
- [13] Schlotterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 2000, 109(6): 365–371.[\[DOI\]](#)
- [14] Weber JL, Wong C. Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet*, 1993, 2(8): 1123–1128.[\[DOI\]](#)
- [15] Dallas JF. Estimation of microsatellite mutation-rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mamm Genome*, 1992, 3(8): 452–456.[\[DOI\]](#)
- [16] Crawford AM, Cuthbertson R P. Mutations in sheep microsatellites. *Genome Res*, 1996, 6(9): 876–879.[\[DOI\]](#)
- [17] Ellegren H. Mutation-rates at porcine microsatellite loci. *Mamm Genome*, 1995, 6(5): 376–377.[\[DOI\]](#)
- [18] LU Cui-Yun, TONG Guang-Xiang, YANG Yan-Hao, JIA Zhi-Ying, LIANG Li-Qun, SUN Xiao-Wen, LEI Qing-Quan. Segregation of microsatellite heterozygous loci in homologous gynogenetic silver crucian carp (*C. a. gibelio* Bloch) offspring. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(2): 200–205.
鲁翠云, 佟广香, 杨彦豪, 贾智英, 梁利群, 孙效文, 雷清泉. 同源雌核发育银鲫子代微卫星杂合位点的分离. 中国水产科学, 2006, 13(2): 200–205.
- [19] Yue GH, Ho MY, Orban L, Komen J. Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp. *Aquaculture*, 2004, 234(3): 85–98.[\[DOI\]](#)
- [20] Yue GH, Orban L. Polymorphic microsatellites from silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) and cross-amplification in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Mol Ecol Notes*, 2002, 2(4): 534–536.[\[DOI\]](#)

- [21] Weber JL. Informativeness of human (dC-dA)n.(dG-dT)n polymorphisms. *Genomics*, 1990, 7(4): 524–530. [\[DOI\]](#)
- [22] LU Cui-Yun, CAO Ding-Chen, ZHANG Yi-Feng, SUN Xiao-Wen, LIANG Li-Qun, LEI Qing-Quan. Analysis of microsatellite specific sequence in gynogenetic silver crucian carp (*C. a. gibelio* Bloch) offspring. *Acta Zoologica Sinica*, 2007, 53(3): 537–544.
鲁翠云, 曹顶臣, 张义凤, 孙效文, 梁利群, 雷清泉. 雌核发育银鲫子代中微卫星特异序列分析. *动物学报*, 2007, 53(3): 537–544.
- [23] Yue GH, David L, Orban L. Mutation rate and pattern of microsatellites in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Genetica*, 2007, 129(3): 329–331. [\[DOI\]](#)
- [24] Jones AG, Rosenqvist E, Berglund A, Avise JC. Clustered microsatellite mutations in the pipefish *Syngnathus typhle*. *Genetics*, 1999, 152(3): 1057–1063.
- [25] Steinberg EK, Lindner KR, Gallea J, Maxwell A, Meng J, Allendorf FW. Rates and patterns of microsatellite mutations in pink salmon. *Mol Biol Evol*, 2002, 19(7): 1198–1202.
- [26] MacKiewicz M, Fletcher DE, Wilkins SD, DeWoody JA, Avise JC. A genetic assessment of parentage in a natural population of dollar sunfish (*Lepomis marginatus*) based on microsatellite markers. *Mol Ecol*, 2002, 11(9): 1877–1883. [\[DOI\]](#)
- [27] ZHOU Li, GUI Jian-Fang. Evolution of unisexual animals. *Zoological Research*, 2002, 23(4): 329–334. [\[DOI\]](#)
周莉, 桂建芳. 单性生殖动物的进化. *动物学研究*, 2002, 23(4): 329–334.
- [28] Goldstein DB, Clark AG. Microsatellite variation in North American populations of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(19): 3882–3886.
- [29] Glenn TC, Stephan W, Dessauer HC, Braun MJ. Allelic diversity in alligator microsatellite loci is negatively correlated with GC content of flanking sequences and evolutionary conservation of PCR amplifiability. *Mol Biol Evol*, 1996, 13(8): 1151–1154.
- [30] Bachtrog D, Weiss S, Zangerl B, Brem G, Schlotterer C. Distribution of dinucleotide microsatellites in the *Drosophila melanogaster* genome. *Mol Biol Evol*, 1999, 16(5): 602–610.
- [31] Balloux F, Ecoffey E, Fumagalli L, Goudet J, Wyttenbach A, Hausser J. Microsatellite conservation, polymorphism, and GC content in shrews of the genus *Sorex* (*Insectivora mammalia*). *Mol Biol Evol*, 1998, 15(4): 473–475.
- [32] Chakraborty R, Kimmel M, Stivers DN, Davison LJ, Dekar R. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(3): 1041–1046. [\[DOI\]](#)
- [33] Schlotterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucl Acids Res*, 1992, 20(2): 211–255. [\[DOI\]](#)
- [34] Estoup A, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM. Microsatellite variation in honey-bee (*Apis-Mellifera* L.) populations—Hierarchical genetic-structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*, 1995, 140(2): 679–695.
- [35] Colson I, Goldstein DB. Evidence for complex mutations at microsatellite loci in *Drosophila*. *Genetics*, 1999, 152(2): 617–627.
- [36] Neff BD, Fu P, Gross MR. Microsatellite evolution in sunfish (*Centrarchidae canad J.*). *Fish Aquat Sic*, 1999, 56(3): 1198–1205. [\[DOI\]](#)