基于ISSR, AFLP分子标记和*cyclins*基因克隆的 异源四倍体鲫鱼进化分析

刘良国*, 颜金鹏*, 刘少军†, 刘东, 尤翠平, 钟欢, 陶敏, 刘筠

湖南师范大学生命科学学院, 教育部蛋白质化学及鱼类发育生物学重点实验室, 长沙 410081

* 同等贡献

† 联系人, E-mail: lsj@hunnu.edu.cn

2008-12-19 收稿, 2009-06-08 接受

国家杰出青年科学基金(批准号: 30725028)、国家基础研究发展计划(批准号: 2007CB109206)和湖南省“芙蓉学者”特聘教授基金资助项目

摘要 为了解两性可育、遗传性状稳定的异源四倍体鲫鱼基因组的进化情况, 用 ISSR, AFLP 分子标记及 *cyclin A1* 和 *B1* 基因克隆的方法, 从多倍体基因组和单个基因在多倍体形成前后的变化两个角度对上述问题进行了探讨分析. 研究表明, 异源四倍体鲫鱼经过连续 15 代培育, 仍然保持了原始亲本遗传性状的稳定性, 但基因组的遗传相似性及 *cyclins* 基因的碱基变异水平都说明异源四倍体鲫鱼具有明显的偏母性遗传特性. ISSR 和 AFLP 分析表明, 在异源四倍体鲫鱼基因组中, 除了新产生的、原始亲本中没有的 DNA 条带外, 还发生了原始亲本的 DNA 带纹消失, 而且消失的带纹倾向于父本基因组. *cyclins* 基因序列分析表明, 在异源四倍体鲫鱼不同于原始亲本的核苷酸变异位点中, 由于存在密码子单个碱基的非同义突变导致了异源四倍体鲫鱼新的氨基酸位点的产生. 异源四倍体鲫鱼上述基因组的非加性变化, 可能是应对杂交和多倍化冲击而使其趋于遗传稳定的一种适应性变化.

关键词

异源四倍体鲫鱼

ISSR 和 AFLP

cyclin A1 和 *cyclin B1* 基因
基因组进化

多倍化是物种进化的主要动力之一. 有报道表明, 约 70% 的被子植物和 80% 的蕨类植物在其进化史上都曾经历过多倍化的过程 [1,2]. 多倍化不仅仅是植物进化的特征, 在包括从原生动物到人类的所有动物的进化历程中都可能发生过多倍化事件 [3]. 特别是在鱼类, 多倍化更是一个非常普遍的事件 [4-6]. 多倍化导致的基因组复制和基因拷贝的增加, 为生物的进化跃迁提供了必要的物质基础, 在生物的进化历程中起着非常重要的作用 [7-11]. 多倍体形成之后, 对其重复基因组的分子演化机制研究已成为当前分子进化研究领域的热点之一. 然而, 在以远缘杂交方式形成的异源多倍体物种中, 其祖先基因组间如何相互作用和进化, 目前的研究仅主要集中在芸

薹属 (*Brassica*) [12], 山羊草属 (*Aegilops*) [13] 和棉属 (*Gossypium*) [14] 等一些异源多倍体植物中, 而关于异源多倍体动物的分子进化研究则还知之甚少.

异源四倍体鲫鱼 (Allotetraploid crucian-carp) 是世界上首次在脊椎动物中人工培育的两性可育、遗传性状稳定的四倍体鱼 [15], 其原始母本为二倍体红鲫 ($2n = 100$), 原始父本为二倍体湘江野鲤 ($2n = 100$), 红鲫和湘江野鲤远缘杂交后代 F_1 和 F_2 为二倍体 ($2n = 100$), 在 F_3 中存在染色体数目加倍、两性可育的雌雄四倍体个体 ($4n = 200$), 它们自交产生 F_4 四倍体群体, 四倍体鱼的两性可育性能代代相传, 目前已连续传代 ($F_3 \sim F_{17}$) 形成了一个染色体数目为 200 的新群体. 远缘杂交产生的两性可育的异源四倍体鲫鱼为自

引用格式: 刘良国, 颜金鹏, 刘少军, 等. 基于 ISSR, AFLP 分子标记和 *cyclins* 基因克隆的异源四倍体鲫鱼进化分析. 科学通报, 2009, 54: 2096~2107

Liu L G, Yan J P, Liu S J, et al. Evolutionary analysis of allotetraploid hybrids of red crucian carp $\times$ common carp, based on ISSR, AFLP molecular markers and cloning of *cyclins* genes. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0476-9

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2009-54-14-2096>

自然界中新型多倍体物种的形成奠定了基础。异源四倍体鲫鲤形成后具备 2 套红鲫和 2 套鲤鱼基因组,红鲫和鲤鱼的两个不同基因组处于同一个异源多倍体核中,它们之间将会发生怎样的相互作用和改变,是一个令人关注而有趣的问题。以异源四倍体鲫鲤及其原始亲本为材料,探讨异源四倍体鲫鲤基因组的遗传变化,对了解鱼类乃至脊椎动物多倍体的进化机制都具有十分重要的意义。

ISSR(inter-simple sequence repeat)^[16]和 AFLP(amplified fragment length polymorphism)^[17]是两种无需知道 DNA 序列即可用引物进行扩增的分子标记技术,由于它们具有多态检出率高、重复性和稳定性强等优点^[18-20],目前已广泛应用于动植物的遗传作图、基因定位、遗传多样性和进化等多个研究领域^[21-26]。此外,Cyclin A1 和 Cyclin B1 是真核细胞周期运转中起关键作用的调控因子,其中 Cyclin A1 主要调控 S 期 DNA 复制并在 G₂/M 转换中发挥一定作用^[27],Cyclin B1 与 p34^{cdc2}/CDK1 结合形成 MPF (M phase-promoting factor, M 期促进因子),协同启动 G₂ 期向 M 期的过渡^[28-30]。Cyclin A1 和 Cyclin B1 中均含有一段相当保守的周期蛋白框(Cylin box)序列(约含 100 个左右的氨基酸残基),介导周期蛋白与 CDK 结合。此外,Cyclin A1 和 Cyclin B1 还可能参与一些核内复制细胞的有丝分裂调控过程^[31]。本研究利用 ISSR、AFLP 分子标记对异源四倍体鲫鲤及其原始亲本群体的遗传结构与基因组变化进行了分析,同时,在分离和克隆出异源四倍体鲫鲤及其原始亲本 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因 cDNA 序列基础上,对异源四倍体鲫鲤及其原始亲本进行了序列比较分析。旨在从高多态分子标记和单个重要核基因的变化角度,探讨异源四倍体鲫鲤经过连续 15 代培育后其基因组的变化并比较与其原始父母本的分子遗传关系,初步揭示异源四倍体鲫鲤这一特殊物种的分子进化规律。

1 材料与方法

() 材料。随机选取异源四倍体鲫鲤 F₁₇ 及其原始亲本红鲫(♀)和湘江野鲤(♂)各 8 尾,每尾鱼分别先进行尾鳍静脉抽血(用于总 DNA 提取),接着取其性腺用于总 RNA 提取。实验鱼均取自湖南师范大学教育部多倍体鱼繁殖及育种技术工程研究中心。

() DNA 和 RNA 的提取。血液总 DNA 的提取按照 UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒(Sangon,

上海)进行,总 DNA 检测其质量和纯度后,-20 °C 保存备用。性腺组织总 RNA 的提取按照 Trizol 试剂盒(Invitrogen)说明书进行,将提取的总 RNA 沉淀溶解于无 RNA 酶的水中,并将同一种鱼不同个体的 RNA 混合,-70 °C 保存备用。

() ISSR 和 AFLP 分析。采用加拿大 British Columbia 大学公布的 ISSR 引物序列,由上海 Sangon 公司合成。PCR 反应体系为 25 μL,其中 10×PCR 缓冲液 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2.5 μL,10 μmol/L ISSR 引物 1.0 μL,Taq 酶 1.0 μL(1 U/μL),100 ng/μL DNA 模板 1.0 μL,高纯甲酰胺 0.5 μL,ddH₂O 13.5 μL。PCR 扩增程序为:94 °C,5 min;94 °C,30 s,52 °C,45 s,72 °C,1.5 min,35 个循环;最后 72 °C,7 min。扩增产物在含有 EB 的 2% 琼脂糖凝胶上电泳检测,100 V 电压,150~180 min,并以 100~2000 bp 标准分子质量进行对照。

AFLP 分析参照 AFLP 试剂盒(鼎国生物技术有限公司,北京)方法并稍加改进。简单介绍如下:首先基因组 DNA (200 ng)经两种限制性内切酶 *EcoR* 和 *Mse* 酶切,同时加接头连接(T₄ DNA 连接酶)过夜;酶切片段连接上接头后进行预扩增。预扩增引物为 *EcoR* (5'-GTAGACTGCGTACCAATTC-3')和 *Mse* (5'-GACG ATGAGTCCTGAG-3')。预扩增反应程序为:94 °C,2 min,然后 94 °C,30 s,56 °C,30 s,72 °C,80 s,30 个循环后 4 °C 保存备用。预扩增产物稀释 20 倍后用于选择性扩增,选择性扩增引物 3'端带有 3 个选择性碱基,使用的选择性引物对分别为 E-AAC/M-CAA, E-AAC/M-CAT, E-AAC/M-CTC, E-AAC/M-CTG 和 E-AAC/M-CTT,其中 *Mse* 引物为荧光标记物,选择性扩增反应程序为:94 °C,30 s,65 °C,30 s,72 °C,80 s;94 °C,30 s,65 °C,30 s,72 °C,60 s,12 个循环,每个循环降低退火温度 0.7 °C;最后 94 °C,30 s,56 °C,30 s,72 °C,60 s,23 个循环;4 °C 保存备用。

选择性扩增产物在 4% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳(50 W 恒功率 2.5 h),ABI 377 测序仪扫描,得到电泳图。

() ISSR 和 AFLP 数据分析。根据 Apostol 等人^[32]的假设,将每个条带视为一个位点进行多态分析,多态位点比例(P) = 多态位点数/总位点数×100%。对 ISSR 和 AFLP 电泳图谱进行扫描分析并给予 0/1 赋值记带,将所有个体的 ISSR 条带和 AFLP 条带转换成二元数据矩阵。按照 Nei 等人^[33]方法计算群体内、群体

间的遗传相似性指数和遗传距离。根据各样本之间的遗传距离,采用 MEGA4.0 软件 [34] 的邻接 (neighbor-joining, NJ) 程序进行聚类分析。

() cDNA 第一链的合成及 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因片段的克隆。以总 RNA 为模板, oligo (dT_{12~18}) 为引物, AMV 逆转录酶 (Promega 公司) 70 作用 5 min, 42 作用 60 min 合成 cDNA 第一链。

根据 GenBank 中报道的斑马鱼 (登录号: BC095579 和 NM_131513)、金鱼 (登录号: S79215 和 S48758) 和银鲫 (登录号: AF173864 和 AF273494) *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因 cDNA 保守序列, 分别设计异源四倍体鲫鱼及其原始亲本 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因片段 PCR 引物, 扩增 *Cyclin A1* 基因片段引物为 S (5'-CTGGACCGCTTCCTTTTCG-3') 和 A (5'-GCAGGGACACGCCACAAT-3'); 扩增 *Cyclin B1* 基因片段为引物 S (5'-ACACGACAGGCTTTGA(G/A)G-3') 和 A (5'-AAGGA(G/T)GACTT(G/A)AG(T/C)TGGAAAT-3')。取 1 μ L RT 反应产物进行 PCR 扩增, 反应程序为: 94 预变性 5 min; 94 变性 30 s, 55 退火 35 s, 72 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 延伸 6 min。

扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和胶回收试剂盒 (Sangon) 纯化后, 克隆到 pMD18-T 载体 (TaKaRa), 转化大肠杆菌 DH5 α , 经蓝白斑筛选和 PCR 鉴定, 每个片段选取 3 个阳性克隆送上海 Sangon 测序, 序列分析使用为美国 ABI 公司 377 型全自动序列分析仪, 对

DNA 双链进行双向测序, 以确保 DNA 序列的可靠性。

() RACE 分析和全长 cDNA 的获得。

(1) 异源四倍体鲫鱼及其原始亲本 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因 5' 末端的扩增。使用 SmartTM RACE cDNA amplification Kit (BD Bioscience Clontech Company, USA) 提供的 5'-CDS 和 SMARTTM II A 通用引物, 按照试剂盒的方法体系进行反转录合成 5'-RACE Ready cDNA。根据已克隆的 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因 cDNA 片段序列合成特异 5'-RACE 引物 GSP1 和 NGSP1, 结合通用引物 UPM 和 NUP, 进行两轮 PCR。第 1 轮 PCR 以 5'-RACE Ready cDNA 为模板, GSP1 和 UPM 为引物, 扩增程序: 94 , 5 min; 94 , 30 s, 68 , 30 s, 72 , 1 min, 30 个循环; 72 , 6 min。然后以第 1 轮 PCR 的产物为模板, NGSP1 和 NUP 为引物进行第 2 轮巢式 PCR, PCR 方法程序同前。5'-RACE PCR 引物序列见表 1。

(2) 异源四倍体鲫鱼及其原始亲本 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因 3' 末端的扩增。采用 SmartTM RACE cDNA amplification Kit (BD Bioscience Clontech Company, USA) 提供的 3'-CDS 通用引物, 根据试剂盒的方法体系进行反转录合成 3'-RACE Ready cDNA。根据已克隆的 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因 cDNA 片段序列合成特异 3'-RACE 引物 GSP2 和 NGSP2 (表 2), 结合通用引物 UPM 和 NUP, 进行两轮 PCR。PCR 方法程序与 5'-RACE 相同。3'-RACE PCR 引物序列见表 2。

表 1 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因 5'-RACE 的 PCR 引物

引物	序列	
	<i>Cyclin A1</i>	<i>Cyclin B1</i>
5'-CDS	5'- (T) ₂₅ VN-3' (N=A, C, G 或 T; V=A, G 或 C)	
SMART II TM A	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'	
UPM	长: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'	
	短: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	
GSP1	5'-GCAAGGTTTACGGTCTTGGCACA-3'	5'-TCAAGCAGAACATCGGAGAACGCCT-3'
NGSP1	5'-TCTTGGTGTTAGGTGTCATCCGTG-3'	5'-AGGAGAGGAGGGCTCGGACACAATC-3'
NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'	

表 2 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因 3'-RACE 的 PCR 引物

引物	序列	
	<i>Cyclin A1</i>	<i>Cyclin B1</i>
3'-CDS	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ VN-3' (N=A, C, G 或 T; V=A, G 或 C)	
UPM	长: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'	
	短: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	
GSP2	5'-GAGTTGAGCCTGCTTGAGGTGGA-3'	5'-CACTTTCCTCCCTCTCAGGTGGCTA-3'
NGSP2	5'-CCTTCACTGGTTACTCACTGGC-3'	5'-TGTTGTGAGAGTCAATGAGGGGC-3'
NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'	

与上述克隆方法一样, RACE 巢式 PCR 扩增反应产物经测序和拼接, 得到异源四倍体鲫鲤及其原始亲本 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因全长 cDNA 序列。

() 序列分析及分子进化树的构建 运用 ClustalW(1.83) 软件(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)和 MEGA4.0 软件对异源四倍体鲫鲤及其原始亲本 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因进行序列同源性比较及变异位点分析, 利用 MEGA4.0 软件中的 Kimura 二参数模型 [35] 估计不同物种间的遗传距离, 并根据遗传距离用 NJ (Neighbor-Joining) 法构建基因的系统进化树, 置信度 (Bootstrap) 经 1000 次重复抽样检验 [36]。

2 结果

2.1 ISSR 和 AFLP 扩增结果

在对异源四倍体鲫鲤及其原始亲本群体进行

PCR 扩增的 12 个 ISSR 引物中, 共检测到 127 个扩增位点, 片段大小在 200~2000 bp 之间(图 1(a)). 在 127 个扩增位点中, 多态性位点数 105 个, 多态性位点比例 82.7% (表 3)。

5 对 AFLP 引物组合共检测到异源四倍体鲫鲤及其原始亲本群体 624 个扩增位点, 片段大小在 70~500 bp 之间(图 1(b)). 在 624 个扩增位点中, 多态性位点数 553 个, 多态性位点比例 88.6% (表 3)。

2.2 遗传距离和聚类分析

根据 ISSR 和 AFLP 扩增结果, 分别计算出异源四倍体鲫鲤及其原始亲本红鲫和鲤鱼群体内和群体间的平均遗传距离(表 4)。

从表 4 看到, 由两种分子标记计算出的种群内和种群间平均遗传距离结果一致: 种群间的平均遗传距离高于种群内的平均遗传距离, 其中种群间以

图 1 异源四倍体鲫鲤及其原始亲本群体的 ISSR 和 AFLP 扩增图谱

(a) 引物 $(AG)_8CTA$ 的 ISSR 扩增图谱; (b) E-AAC/M-CAT 引物组合的 AFLP 扩增图谱. 1~8, 红鲫; 9~16, 鲤鱼; 17~24, 异源四倍体鲫鲤

红鲫和鲤鱼的平均遗传距离最高 (ISSR, 0.5410 ± 0.0202 ; AFLP, 0.5633 ± 0.0338), 红鲫和异源四倍体鲫鲤的最低 (ISSR, 0.2522 ± 0.0137 ; AFLP, 0.3659 ± 0.0342); 种群内的平均遗传距离以鲤鱼最高 (ISSR, 0.0564 ± 0.0209 ; AFLP, 0.2700 ± 0.0806), 异源四倍体鲫鲤最低 (ISSR, 0.0177 ± 0.0102 ; AFLP, 0.2080 ± 0.0438).

根据异源四倍体鲫鲤及其原始亲本共 24 个个体间的遗传距离数据 (结果未显示), 采用 MEGA4.0 软件的 NJ 程序进行聚类分析, 得到 3 种鱼 24 个个体的分支树状图 (图 2). 从图中可见, 由 ISSR 和 AFLP 两种分子标记得到的分支树状图均可将异源四倍体后代及其两个亲本物种区分开来, 每个群体聚成一个分支, 而异源四倍体鲫鲤的 8 个个体聚成一个分支后首先与其原始母本红鲫 8 个个体又聚成一个大的分支, 然后再与其原始父本鲤鱼群体聚合.

2.3 基因组的变化情况

将每个群体内所有个体都出现或都不出现的 DNA 条

带用于统计, 都出现的带记为“+”, 都不出现的带记为“-”, 并通过比较在异源四倍体鲫鲤及其原始亲本中出现或不出现的这些带纹, 观察异源四倍体鲫鲤形成后其基因组组成与其原始亲本基因组相比发生的变化. 结果发现一些有意义的现象, 如在异源四倍体鲫鲤及其两个原始亲本中都出现的带纹 (表 5 中 A 所指代的情况); 只在两个原始亲本种之一中出现而在四倍体中没有出现的带纹 (表 5 中 B 和 C 所指代的情况); 在两个亲本种中都出现而在四倍体中没有出现的带纹 (表 5 中 D 所指代的情况); 只在两个原始亲本种之一中出现且在四倍体中出现的带纹 (表 5 中 E 和 F 所指代的情况); 在两个原始亲本种中都没有出现但在多倍体中出现的带纹 (表 5 中 G 所指代的情况).

从表 5 可见, ISSR 分析方法在原始母本红鲫中都出现的带有 $22 + 8 + 3 + 25 = 58$ 条, 其中在异源四倍体中消失了的有 $8 + 3 = 11$ 条; 在原始父本鲤鱼

表 3 ISSR 引物和 AFLP 引物组合在异源四倍体后代及其两个亲本物种中检测的多态位点数及多态位点比例

引物	扩增位点数	多态性位点数	多态性位点百分率(%)
ISSR ^{a)}			
(AG) ₈ G	11	9	81.8
(AG) ₈ T	13	10	76.9
(AG) ₈ C	12	10	83.3
(CA) ₈ A	8	7	87.5
(CT) ₈ A	12	10	83.3
(AG) ₈ CTA	15	13	86.7
(GAA) ₆	13	10	76.9
(GACA) ₄	6	5	83.3
(GA) ₈ CTA	11	9	81.8
(GA) ₈ YG	9	8	88.9
(TG) ₈ RC	7	5	71.4
(CT) ₈ RG	10	9	90.0
合计	127	105	82.7(平均)
AFLP			
E-AAC/M-CAA	139	123	88.5
E-AAC/M-CAT	119	107	89.9
E-AAC/M-CTC	124	110	88.7
E-AAC/M-CTG	136	118	86.8
E-AAC/M-CTT	106	95	89.6
合计	624	553	88.6(平均)

a) R = (A, G), Y = (C, T)

表 4 异源四倍体鲫鲤及其原始亲本群体内和群体间平均遗传距离^{a)}

	RC	CC	AT
RC	$0.0540 \pm 0.0083 (0.2142 \pm 0.0472)$		
CC	$0.5410 \pm 0.0202 (0.5633 \pm 0.0338)$		
AT	$0.2522 \pm 0.0137 (0.3659 \pm 0.0342)$		
	$0.0564 \pm 0.0209 (0.2700 \pm 0.0806)$		
	$0.4265 \pm 0.0117 (0.4127 \pm 0.0536)$		
	$0.0177 \pm 0.0102 (0.2080 \pm 0.0438)$		

a) 括号外和括号内分别为 ISSR 和 AFLP 分析平均遗传距离. RC, 红鲫; CC, 鲤鱼; AT, 异源四倍体鲫鲤

图2 由ISSR(a)和AFLP(b)分析获得的异源四倍体鲫鱼及其原始亲本24个个体的NJ分支树状图
1~8, 红鲫; 9~16, 鲤鱼; 17~24, 异源四倍体鲫鱼

表5 异源四倍体鲫鱼基因组的变化情况^{a)}

	原始母本红鲫	原始父本鲤鱼	异源四倍体鲫鱼	DNA 带纹数	
				ISSR	AFLP
A	+	+	+	22	71
B	+	-	-	8	33
C	-	+	-	26	33
D	+	+	-	3	7
E	+	-	+	25	40
F	-	+	+	11	30
G	-	-	+	5	9

a) “+”表示群体内都出现的带,“-”表示群体内都不出现的带

中都出现的带有 $22 + 26 + 3 + 11 = 62$ 条, 其中在异源四倍体中消失了的有 $26 + 3 = 29$ 条。原始母本红鲫基因组带纹消失的比例为 19% (11/58), 原始父本鲤鱼基因组带纹消失的比例为 46.8% (29/62)。同样地, AFLP 分析方法在原始母本红鲫中都出现的带有 $71 + 33 + 7 + 40 = 151$ 条, 其中在异源四倍体中消失了的有 $33 + 7 = 40$ 条; 在原始父本鲤鱼中都出现的带有 $71 + 33 + 7 + 30 = 141$ 条, 其中在异源四倍体中消失了的有 $33 + 7 = 40$ 条。原始母本红鲫基因组带

纹消失的比例为 26.5% (40/151), 原始父本鲤鱼基因组带纹消失的比例为 28.4% (40/141)。此外, ISSR 和 AFLP 分析方法在异源四倍体鲫鱼中新出现的带纹数分别为 5 和 9 条。

2.4 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因 cDNA 全长序列克隆

利用所设计的引物对异源四倍体鲫鱼及其原始亲本 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因编码区扩增, 分别得到 550 和 1000 bp 左右片段, 测序结果表明, 550 bp 左右 *Cyclin A1* 片段大小为 553 bp, 1000 bp 左右

Cyclin B1 片段大小为 1025 bp. 借助 Jellyfish 软件和 BLAST 检索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 对测序结果进行同源性分析, 结果表明, 两个片段分别为斑马鱼(登录号: BC095579 和 NM_131513)、爪蟾(登录号: NM_001016239 和 NM_001086727)和人(登录号: NM_003914 和 NM_031966) *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因的同源片段序列.

对异源四倍体鲫鲤及其原始亲本 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因的 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增产物进行测定, 并与之前测出的编码区序列拼接, 分别得到 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因 cDNA 全长. 基因 cDNA 序列已递交 GenBank, *Cyclin A1* 登录号为: 红鲫, EU380204; 鲤鱼, EU380205; 异源四倍体鲫鲤, EU380206. *Cyclin B1* 登录号为: 红鲫, EU293851; 鲤鱼, EU293852; 异源四倍体鲫鲤, EU293850.

2.5 序列同源性及变异位点分析

运用 ClustalW1.83 软件对红鲫、异源四倍体鲫鲤、鲤鱼、爪蟾和人 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 氨基酸序列进行同源性比较, 发现它们之间都具有较高的同源性, 特别是在介于人 *Cyclin A1* 第 206~305 位、*Cyclin B1* 第 166~264 位氨基酸的周期蛋白框 (Cyclin boxes) 区序列之间, 这种同源性尤为显著, 其中, 异源四倍体鲫鲤与红鲫、鲤鱼、爪蟾和人 *Cyclin A1* 氨基酸同源性分别为 96%, 95%, 77%, 76% (图 3), *Cyclin B1* 氨基酸同源性分别为 99%, 94%, 81%, 83% (图 4).

利用 MEGA4.0 软件对 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因编码区序列位点 (不包括缺失位点) 进行统计分析 (表 6), 发现在 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因中, 异源四倍体鲫鲤及其原始亲本除了具有共享的碱基位点外, 还具有与母本相同而与父本不同和与父本相同而与母本不同的碱基位点. 此外, 在异源四倍体鲫鲤中还出现与其原始父母本都不相同的碱基位点.

根据表 6 数据, 由 *Cyclin A1* 基因统计的碱基位点总数为 1176, 在异源四倍体中, 相对于原始母本红鲫变异了的位点数为 $13 + 8 = 21$, 变异水平为 1.8% ($21/1176$), 相对于原始父本鲤鱼变异了的位点数为 $47 + 8 = 55$, 变异水平为 4.7% ($55/1176$). 同样地, 由 *Cyclin B1* 基因统计的碱基位点总数为 1194, 在异源四倍体中, 相对于原始母本红鲫变异了的位点数为 $4 + 7 = 11$, 变异水平为 0.9% ($11/1194$), 相对于原始父

本鲤鱼变异了的位点数为 $61 + 7 = 68$, 变异水平为 5.7% ($68/1194$).

2.6 进化树分析

以斑马鱼的同源序列为外群, 用 NJ 法构建异源四倍体鲫鲤及其原始亲本 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因编码区序列系统进化树 (图 5). 从图 5 可见, 两个基因序列构建的系统进化树其拓扑结构、置信度和聚类关系完全相同. 二者均显示, 异源四倍体鲫鲤首先与原始母本红鲫聚为一支, 然后再与其原始父本湘江野鲤聚合.

3 讨论

ISSR 标记是在 SSR 的 5' 或 3' 端加锚 1~4 个碱基, 以此为引物, 对两侧具有反向排列的一段基因组 DNA 进行扩增; AFLP 标记则结合了 RFLP 和 PCR 的优点, 是一种选择性扩增限制性片段的方法. 在扩增结果的多态性和稳定可靠性上, ISSR 和 AFLP 标记具有较大的优越性. 从表 3 看到, ISSR 和 AFLP 分子标记对 3 个不同群体的扩增结果均表现出较高的遗传多态性, 两种分析方法反映出的 3 个群体内和群体间的遗传关系也基本一致 (表 4, 图 2), 说明两种分子标记用于异源四倍体鲫鲤基因组的遗传变异与进化研究是行之有效的.

周期蛋白框 (cyclin box) 是细胞周期蛋白的主要功能区, 含有约 100 个氨基酸残基, 介导周期蛋白与 CDK 的结合 [37]. 同源性分析表明, 异源四倍体鲫鲤及其原始亲本与爪蟾和人的周期蛋白框序列具有高度的保守性 (图 3, 4), 这种高度保守性一方面证实了我们所克隆的 cDNA 正是异源四倍体鲫鲤及其原始亲本的 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1*, 而非 *Cyclin* 家族的其他成员 [38], 同时这种结构上的保守性也与其在调控细胞周期活动中的功能保守性相符合.

基因组 ISSR, AFLP 和 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因序列分析表明, 异源四倍体鲫鲤与其原始亲本都具有较高的遗传相似性和序列同源性, 说明异源四倍体鲫鲤在经过连续 15 代繁育后仍然保留了原始父母本的遗传物质, 为异源四倍体鲫鲤起源于红鲫和鲤鱼提供了分子生物学证据. 而异源四倍体鲫鲤群体内遗传距离相对较小 (表 4), 说明其群体基因组遗传组成相对稳定.

从表 4 可见, 异源四倍体鲫鲤与原始母本红鲫的遗传距离为: 0.2522 (ISSR) 和 0.3659 (AFLP), 与原始

RC	-----MASRGFAPLSG-----RQENIMVLGRADG-----	24
AT	-----MASRGFAPLSG-----RQENIMVLGRADG-----	24
CC	-----MASRGLAPLSS-----RQENIMGLGRADG-----	24
Xenopus	-----MRRSMVSGGHILTASSLVGTGN---AFQNQCLAKVEVQSN-----	37
Human	METGFPAIMYPGSFIGGWGEEYLSWEGPGLPDFVFQQQPVSEAMHCSNPKSGVVLATVA	60
		
RC	-----LHALKPGQRVVLGVLTENDQHNRAFGQ--VSSKYVPALRDASTLDVST	70
AT	-----LHALKPGQRVVLGVLTENDQNRVFGQ--VSSKYLALRDASTLDVST	70
CC	-----LRALKPGQRVVLGVLTENDQNRVFGQ--VPSEYVPALRDASTLDVST	70
Xenopus	-----LLPPRVSRQTVLGVISDNDQQRVSVGGGAPAKCLPGIENVLPFAG-K	84
Human	RGPDACQILTRAPLGDPPQRTVLGLLTANGQYRRTCGGQITRIRCYSGSENAFPAPGKK	120
	*.:***::*:.*.* **	
RC	SSATLGVHVVEP-----VLAQATKP-TSFLLPSEPLLVD-----DVVQDLG	110
AT	SSATLGVHVVEP-----VIAQATKP-TSFLLPSELLVD-----DVVQDLG	110
CC	SRATLGDHVVEP-----VIAQSTKQSSSFVLPSSELLVD-----DAVQDLG	111
Xenopus	ILPTNPALVAPKPIFTVYVDEPEE--PTETYSIEEDCPTLD--EVDSDNIVKQNIHLLDL	141
Human	ALPDCGVQEPKQGFDIYMLELEQGDSDSCSVREGMAFEDVYEVDGTGLKSDLHFLDFN	180
	. : : . : : . : *	
RC	SGS--CMDSSMQSLPEE--AAYEDILCVPEYAEDIHRYLRECEVKYRPKPGYMRKQPDIT	166
AT	SGS--CMDSSMQSLPEE--AAYEDILCVPEYAEDIHRYLRECEVKYRPKPGYMRKQPDIT	166
CC	SGS--RMDSSMQSLLEEEAAASEDVLCVPEYAEDIHRYLRGCEVKYRPKPGYMRKQPDIT	169
Xenopus	AASPMVVDTSLQASPEDDSITDPDAVAVSEYIDEIHQYLREAELEKHPKAYYMRKQPDIT	201
Human	TVSPMLVDSSLLSQSEDISSLGTDVINVTEYAEIYQYLREAEIRHRPKAHYMKKQPDIT	240
	: * :*: : : : * : *.** :*:*** .*:***. **:*	
RC	<u>NCMRVILVDWLVEVGEEYKLCSETLFLAVNCLDRFLSCMSVLRGKLQLVGTAAVLLAAKY</u>	226
AT	<u>NCMRVILVDWLVEVGEEYKLCSETLFLAVNYLDRFLSCMEVLRGKLQLVGTAAVLLAAKY</u>	226
CC	<u>NCMRIILVDWLVEVGEEYKLCSETLFLAVDYLDRLFLSCMSVLRGKLQLVGTAAELLAAKY</u>	229
Xenopus	<u>SAMRTILVDWLTEVGEEYKLRTEITLYLAVNYLDRFLSCMSVLRGKLQLVGTAAILLASKY</u>	261
Human	<u>EGMRTILVDWLVEVGEEYKLRAETLYLAVNFDRLFLSCMSVLRGKLQLVGTAAMLLASKY</u>	300
	. ** * :*:***. ** * :*:***. * :*:***. * :*:***. * :*:***. * :*:***	
RC	<u>EEVYPPEVDEFVYITDDTYTKQVLRMEQHLLRVLAFDMTAPTQVHQLMQYTLEGNICAR</u>	286
AT	<u>EEVYPPEVDEFVYITDDTYTKQVLRMEQHLLRVLAFDMTAPTQVHQLMQYTLEGNICAR</u>	286
CC	<u>EEVYPPEVDEFVYITDDTYTKQVLRMEQHLLRVLAFDMTAPTQVHQLMQYTLEGNICAR</u>	289
Xenopus	<u>EEIYPPDDEFVYITDDTYSKQLLRMEHLLKVLAFDLTVPTISQFLLQYLQRRAVSVK</u>	321
Human	<u>EEIYPPPEVDEFVYITDDTYTKRQLKMEHLLKVLAFDLTVPTTNQFLLQYLRRQGVQVVR</u>	360
	**:*	
RC	TVNLALYSELSSLLEVDPFVQYLPSTKATAAAYCLANYTLNGVLWPNLYAFTGYSLAVII	346
AT	TVNLALYSELSSLLEVDPFVQYLPSTKATAAAYCLANYTLNGVLWPNLYAFTGYSLAVII	346
CC	TVNLALYSELSSLLEVDPFVQYLPSTKATAAAYCLANYTLNGVLWPNLYAFTGYSLAVII	349
Xenopus	TEHLAMYLAESSLDEVPFLKYVPSITATAAAYCLANYALNKVFWPETLETFTGYTLSEIT	381
Human	TENLAKYVAELSSLLEADPFLKYLPSTLAAAACFLANYTVNKHFWPETLAFTGYSLSEIV	420
	* : * * :*:***. :*:***. * :*:***. * :*:***. * :*:***. * :*:***. * :*:***	
RC	PCLMELHKLHLGAAGRPQQAIEKYKSKYCGVSLLEPVESLPLP	391
AT	PCLMELHKLHLGAAGRPQQAIEKYKSKYCGVSLLEPVESLPLP	391
CC	PCLMELHKLHLGAAGRPQQAIEKYKSKYCGVSLLEPVESLHLP	394
Xenopus	PCLSDLHQASLRAPFQAQAIREKYKTPKYMVQVSLLEMPAVLPLN	426
Human	PCLSELHKAYLDIPHRPQAIREKYKASKYLCVSLMEPPAVLLQ	465
	*** :*: * :*:***.***. ** * :* * *	

图 3 不同物种 *Cyclin A1* 氨基酸序列比较

下画线为周期蛋白框序列, 方框示异源四倍体鲫鲤不同于原始亲本的氨基酸位点. “*”代表完全相同的氨基酸; RC, 红鲫; AT, 异源四倍体鲫鲤; CC, 鲤鱼; Xenopus, 爪蟾; Human, 人

RC	-MALVRSNRTRLASS-ENQSALPGKA-----AVANKPGLRPRALGEIGNNPQ---TRQ	49
AT	-MALVRSNRTRLASS-ENQSALPGKA-----AVANKPGLRPRALGEIGNNPQ---TRQ	49
CC	-MALVTRNTRLASS-ENRSALPRKA-----AVANKPGLRPRALGEIGNNPQ---TRQ	49
Xenopus	-MSLRITRNMANTENNVTTLAGKR-----VVATKPGLRPRALTALGDIGNKA---ELK	49
Human	-MALRVTRNSKINAENKAKINMAGAKRVPTAPAATSKPGLRPRALTALGDIGNKVSEQLQAK	59
	*: *: *: *: * : . : : : *****: *: *: *: :	
RC	ALRKKEVKVAPKVEVVAEKAPVVQQPK-----KESPKVQHD---VP	87
AT	ALRKKEVKVAPKVEVVAEKAPVVQQPK-----KESPKVQHD---VP	87
CC	ALRKKEVKVAPKVEVVAEKAPVVQQPK-----KESPKVQHD---VQ	87
Xenopus	VPAKKELKP----AVKAVKTKTPIDKV-----LEPLKVSEENVCPKP	87
Human	MPMKKEAKPSATGKVIDKKLPLEKVPMLVPVPVSEPVEPEPEPEPEPVKKEKLSPEP	119
	*** * * * . : * .	
RC	IVSEPSSVPVPMETSGCAS--DDLQCAFSDVLLDIKDVDADDYDNPMLCSEYVKDIYLYLH	145
AT	IVSEPSSVPVPMETSGCAS--DDLQCAFSDVLLDIKDVDADDYDNPMLCSEYVKDIYLYLH	145
CC	IVSEPSSVPVPMETSGCAS--DDLQCAFSDVLLDIKDVDADDYDNPMLCSEYVKDIYLYLH	145
Xenopus	TPVEPSSPSMETSGCLP--DELQCAFSDVLIQVKDVDADDGDNPMLCSEYVKDIYGYLH	145
Human	ILVDTASPSMETSGCAPAEEDLCQAFSDVILAVNDVDAEDGADPNLCSEYVKDIYAYLR	179
	: . : * ***** . : *****: : : *: * * ***** * :	
RC	<u>QLEITQAVKPKYLEGKEITGNMRAILIDLWLQVQIKFRLQETMYMTVAVIDRFLQDHPV</u>	205
AT	<u>QLEITQAVKPKYLEGKEITGNMRAILIDLWLQVQIKFRLQETMYMTVAVIDRFLQDHPV</u>	205
CC	<u>QLETEQAVKPKYLEGKEVTGNMRAILIDLWLQVQIKFRLQETMYMTVAIDRFLQDHPV</u>	205
Xenopus	<u>SLEDAQAVRPNYLHGREVGTGNMRAILIDLWLQVQMKFRLQETMFMTVGIIDRFLQEHVP</u>	205
Human	<u>QLEEEQAVRPKYLLGREVTGNMRAILIDLWLQVQMKFRLQETMYMTVSIIDRFMQNCCV</u>	239
	. * * * *: * * * * : * : *****: *****: * * * * : * * * * : * :	
RC	<u>PKKQLQLVGVMTAMFIASKYEEMYPPEIADFVTDRAVTTGQIRDMEMKILRVLDIFSFGK</u>	265
AT	<u>PKKQLQLVGVMTAMFIASKYEEMYPPEIADFVTDRAVTTGQIRDMEMKILRVLDIFSFGK</u>	265
CC	<u>PKKQLQLVGVMTAMFIASKYEEMYPPEIADFVTDRAVTTGQIREMEMKILRVLDIFSFGK</u>	265
Xenopus	<u>PKNQLQLVGVMTAMFLAAKYEEMYPPEIGDFTFVTDHTYTKAQIRDMEMKILRVLKAIGR</u>	265
Human	<u>PKKMLQLVGVMTAMFIASKYEEMYPPEIGDFAFVTDNTYTKHQIRQMEMKILRALNFGLR</u>	299
	* * : *****: * : *****: * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * :	
(RC	PLPLQLRRLASKIGDVTAEHHTLAKYFLELTMDVYDMVHFPPSQVASAAYALTLKFVNCG	325)
AT	PLPLQLRRLASKIGDVTAEHHTLAKYFLELTMDVYDMVHFPPSQVASAAYALTLKFVNCG	325
CC	PLPLQLRRLASKIGDVTAEHHTLAKYFLELTMDVYDMVHFPPSQVASAAYALTLKFVNCG	325
Xenopus	PLPLHFLRLASKIGEVTAEQHSLAKYLMELTMDVYDMVHFPPSQIASASRLSLKILNAG	325
Human	PLPLHFLRLASKIGEVTDVQHTLAKYLMELTMDVYDMVHFPPSQIAGAFCLALKILDNG	359
	*****: *****: * . * : * : *****: * * : * * * * : * * * * : * * * * : * :	
RC	DWTPTLQHYMGYTEDSLVPVMQHIARNVVRVNEGLSKHLAKNKYSSQKQMRIASISQLK	385
AT	DWTPTLQHYMGYTEDSLVPVMQHIARNVVRVNEGLSKHLAVKNKYSSQKQMRIASISQLK	385
CC	DWTPTLQHYMGYTEDALVPVMQHIARNVVRVNEGLSKHLAVKNKYSSQKQMRIASISHLK	385
Xenopus	DWTPTLHHYMAVSEEDLVPVMQHMMAKNIKVNGKLTGHLTVKNKYASSQKQKISMIPQLK	385
Human	EWTPTLQHYLSYTEESLLVPVMQHLAKNVVMVQGLTKHMTVKNKYATSKHAKISTLPQLN	419
	: *****: * * : * * : * : *****: * * : * * * * : * * * * : * * : * * :	
RC	SSLIKDLAKQIS--	397
AT	SSLIKDLAKQIS--	397
CC	SSLIKDLAKQIS--	397
Xenopus	SDVVAMARPLV--	397
Human	SALVQDLAKAVAKV	433
	* : : : * : :	

图 4 不同物种 *Cyclin B1* 氨基酸序列比较

下画线为周期蛋白框序列, 方框示异源四倍体鲫鲤不同于原始亲本的氨基酸位点, “*”代表完全相同的氨基酸; RC, 红鲫; AT, 异源四倍体鲫鲤; CC, 鲤鱼; Xenopus, 爪蟾; Human, 人

父本湘江野鲤的遗传距离为: 0.4265 (ISSR)和 0.4127 (AFLP), 与原始母本的遗传差异明显小于原始父本. ISSR和AFLP聚类分析及由*Cyclin A1* 和*Cyclin B1* 基因编码区和先前由*Cyclin B*基因内含子序列 [39]构建的系统进化树显示, 异源四倍体鲫鱼总是先与原始母本聚成一个稳定分支, 然后再与原始父本聚合. 表 6 数据表明, 在异源四倍体鲫鱼中, 作为母本供体的红鲫*Cyclin A1* 和*Cyclin B1* 基因碱基变异水平分别为 1.8%, 0.9%, 作为父本供体的鲤鱼*Cyclin A1* 和*Cyclin B1* 基因碱基变异水平分别为 4.7%, 5.7%, 母本基因的碱基变异水平明显小于父本. 以上数据表明, 双亲的遗传物质对异源四倍体鲫鱼子代的贡献并不对等, 异源四倍体鲫鱼在进化上具有明显的偏母性遗传特性. 异源四倍体鲫鱼的偏母性遗传, 我们推测可能与这一物种的杂交起源和多倍化有关. 根据 Wendel [40] 的报道, 在异源多倍化过程中, 两个不同的基因组组合到同一核中, 并处于由单一亲本提供的细胞质环境中, 因此在控制性状表达过程中, 两个基因组之间、核基因组与细胞质之间都要进行一定程度的调整与协作. 红鲫和鲤鱼分属于鲤科鱼的两个不同属, 亲缘关系较远, 当二者的基因组结合在一起后, 势必进行较大程度的改变, 以维持新基因组遗传性状的稳定, 特别是对于父本鲤鱼基因组, 由于面临一个全新的细胞质环境, 因此需要作更大程度的调整才能保证与红鲫细胞质之间的相容性. 由此可能出现原始父本基因组变化程度高于原始母本, 原始母本的遗传物质则相对保守, 异源四倍体鲫鱼表现出偏母性遗传的特性. 异源四倍体鲫鱼的偏母性遗传特性同时也意味着母本红鲫在异源四倍体鲫鱼基因组进化中的重要作用.

从表 5 的 DNA 带纹分析发现, 在异源四倍体鲫鱼中, 其核基因组组成并不是原始亲本基因组的简单加和, 统计结果显示, 在异源四倍体鲫鱼基因组中, 明显发生了原始亲本基因组带纹的消失, 而且消失的 DNA 带纹数远高于新产生的 DNA 带纹数. 由 ISSR

和AFLP分子标记统计的原始母本基因组带纹消失比例分别为 19%和 26.5%, 原始父本基因组带纹消失的比例分别为 46.8%和 28.4%, 父本基因组带纹消失的比例大于母本. 有关基因组序列消除的现象, 在异源多倍体植物中早有报道, Feldman等人 [41]和Liu等人 [42,43]通过研究不同倍性小麦基因组的特点, 结果发现由异源多倍化引发的序列消除在异源四倍体和异源六倍体小麦中普遍存在. 而且, 在芸薹属(*Brassica*) [12]和山羊草属(*Aegilops*) [13]中观察到的消除序列在某种程度上倾向于来自其中一个亲本基因组. Feldman等人 [41]研究表明, 序列消除并非是染色体加倍所致, 而是由杂交多倍化引起, 可能是新的异源多倍体物种稳定过程中出现的一个普遍现象. Liu等人 [42,43]认为, 快速的序列消除总出现在自然界中已存在的异源多倍体中, 似乎与异源多倍体的成功进化相关联. 异源四倍体鲫鱼是通过远缘杂交的方式首次在脊椎动物中人工培育的两性可育、遗传性状稳定的多倍体鱼, 本实验在异源四倍体鲫鱼中也同样发现了类似异源多倍体植物的序列消除现象, 而且被消除的序列倾向于来自父本鲤鱼基因组. 据此我们推测, 异源四倍体鲫鱼基因组的序列消除也可能是应对杂交和多倍化冲击而使其趋于稳定的一种. 基因组调节方式. 当然, 这一推论是否正确, 还有待更多的实验来证实.

表 6 异源四倍体鲫鱼 *Cyclin A1* 和 *Cyclin B1* 基因编码区碱基变化位点统计^{a)}

碱基位点数	<i>Cyclin A1</i>	<i>Cyclin B1</i>
A	1108	1122
B	47	61
C	13	4
D	8	7
总计	1176	1194

a) A, 共享位点数; B, 与母本相同与父本不同位点数; C, 与父本相同与母本不同位点数; D, 与父母本都不相同位点数

表 5 和 6 的统计数据表明, 在异源四倍体鲫鱼中除了来自原始亲本的 DNA 片段和碱基位点外, 还

图 5 异源四倍体鲫鱼及其原始亲本 *Cyclin A1*(a)和 *B1*(b)基因系统进化树

RC, 红鲫; AT, 异源四倍体鲫鱼; CC, 湘江野鲤; ZB, 斑马鱼. 分支上数字为 bootstrap 值

出现了不同于原始亲本的DNA条带和碱基位点。由ISSR和AFLP扩增产生的异源四倍体鲫鲤不同于原始亲本的DNA条带数分别是5和9条;在*Cyclin A1*和*Cyclin B1*基因编码区,不同于原始亲本的碱基位点数分别是8和7个。在*Cyclin A1*基因编码区的8个不同于原始亲本位点中有4处(图略)为密码子单个碱基的非同义突变,结果导致第45, 206, 362, 387位氨基酸的变异(图3);在*Cyclin B1*基因编码区的7个不同于原始亲本位点中有2处(图略)为密码子单

个碱基的非同义突变,导致第187, 317位氨基酸的变异(图4)。新的DNA片段和非亲位点的产生,可能是由于细胞分裂过程中染色体的结构重排、断裂或丢失所致,也可能是由于异源四倍体鲫鲤基因突变引起。目前普遍认为点突变是基因组进化的重要驱动力^[44]。因此,我们认为,新的DNA片段、非亲位点的产生和密码子的点突变也可能是异源四倍体鲫鲤经过连续15代培育,仍能保持其遗传性状稳定的重要原因。

参考文献

- Grant V. Plant Speciation. 2nd ed. New York: Columbia University Press, 1971
- Masterson J. Stomatal size in fossil plant: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, 1994, 264: 421—424[doi]
- Baatout S. Molecular basis to understand polyploidy. *Hematol Cell Ther*, 1999, 4: 4169—4170
- 替瑞光. 鱼类中的多倍性及其在鱼类演化中的作用. *云南大学学报*, 1985, 7: 331—337
- Leggatt R A, Iwama G K. Occurrence of polyploidy in the fishes. *Rev Fish Biol Fish*, 2003, 13: 237—246[doi]
- 郭宝成, 李俊兵, 童超波, 等. 一种四倍体鲤科鱼*Sox*基因的克隆和序列分析. *科学通报*, 2008, 53: 1395—1402
- Ohno S. Evolution by Gene Duplication. New York: Springer-Verlag, 1970
- Becak M, Becak W. Evolution by polyploidy in Amphibia: New insights. *Cytogen Cell Genet*, 1998, 80: 28-33[doi]
- Holland P W H. The effect of gene duplication on homology. In: Bock G R, Cardew G, eds. *Homology*. Chichester: Wiley, 1999. 226—242
- Wolfe K H. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nat Rev Genet*, 2001, 2: 333—341[doi]
- Comai L. The advantages and disadvantages of being polyploidy. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 836—846[doi]
- Song K M, Lu P, Tang K L. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7719—7723[doi]
- Ozkan H, Levy A A, Feldman M. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Plant Cell*, 2001, 13: 1735—1747[doi]
- Hanson R E, Zhao X P, Islam-Faridi M N, et al. Evolution of interspersed repetitive elements in *Gossypium* (Malvaceae). *Am J Bot*, 1998, 85: 1364—1368[doi]
- Liu S J, Liu Y, Zhou G J, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of inter-specific hybridization. *Aquaculture*, 2001, 192: 171—186[doi]
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, 20: 176—183[doi]
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 4407—4414[doi]
- Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 408—417[doi]
- Nagaoka T, Ogiwara Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 597—602[doi]
- Bagley M J, Anderson S L, May B. Choice of methodology for assessing genetic impacts of environmental stressors: Polymorphism and reproducibility of RAPD and AFLP fingerprints. *Ecotoxicology*, 2001, 10: 239—244[doi]
- Sanker A A, Moore G A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the genetic linkage map. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 206—214[doi]
- Becker J, Vos P, Kuiper M. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol Gen Genet*, 1995, 24: 65—73[doi]
- Olsen M, Bieman M, Kuiper M T. Use of AFLP markers for gene mapping and QTL detection in the rat. *Genomics*, 1996, 37: 289—294[doi]
- Jin S B, Harold C, Mei S. Analysis of genetic diversity and relationships in waxy rice (*Oryza sativa* L.) using AFLP and ISSR markers.

- Genet Resour Crop Evol, 2006, 53: 323—330[doi]
- 25 Jun S, Zhao B S, Bi S Y. Assessing genetic diversity of wild populations of *Prenant's schizothoracin*, *Schizothorax prenanthi*, using AFLP markers. *Environ Biol Fish*, 2006, 77: 79—86[doi]
- 26 Ai H L, Jian B W. Genomic evolution of *Brassica allopolyploids* revealed by ISSR marker. *Genet Resour Crop Evol*, 2006, 53: 603—611[doi]
- 27 Lehber C F, Ofarrell P H. The roles of *Drosophila* Cyclin A1 and B1 in mitotic control. *Cell*, 1990, 61: 535—547[doi]
- 28 Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, 1990, 344: 503—508[doi]
- 29 King R W, Jackson P K, Kirschner M W. Mitosis in transition. *Cell*, 1994, 79: 563—571[doi]
- 30 Morgan D O. Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and micro-processors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1997, 13: 261—291[doi]
- 31 Bruce A, Terry L O. Endoreplication cell cycles: More for less. *Cell*, 2001, 105: 297—306[doi]
- 32 Apostol B L, Black W C, Reiter P, et al. Population genetics with RAPD-PCR markers: The breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*, 1996, 76: 325—334[doi]
- 33 Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 5269—5273[doi]
- 34 Koichiro T, Joel D, Masatoshi N, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596—1599[doi]
- 35 Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 1980, 16: 111—120[doi]
- 36 Felsenstein J. Confidences limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, 39: 783—791[doi]
- 37 翟中和, 王喜中, 丁明孝. 细胞生物学. 北京: 高等教育出版社, 2001. 394—401
- 38 Pines J. *Cyclins* and cyclin-dependent kinase: a biochemical view. *Biochem J*, 1995, 308: 697—711
- 39 刘良国, 陶敏, 段巍, 等. 异源四倍体鲫鲤及其原始父母本细胞周期蛋白 B 基因克隆与分子遗传分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 23: 849—858
- 40 Wendel J F. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol Biol*, 2000, 42: 225—249[doi]
- 41 Feldman M, Liu B, Segal G, et al. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: A possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics*, 1997, 147: 1381—1387
- 42 Liu B, Vega M J, Feldman M. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. I. Changes in low-copy non-coding DNA sequences. *Genome*, 1998, 41: 272—277[doi]
- 43 Liu B, Vega M J, Feldman M. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. II. Changes in low-copy non-coding DNA sequences. *Genome*, 1998, 41: 535—542[doi]
- 44 Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt S C, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 2001, 409: 928—933[doi]