

有丝分裂雌核发育牙鲆的微卫星鉴定

刘海金^{1,2}, 陆桂^{2,3}, 王晓梅¹, 刘永新¹, 王玉芬⁴, 王桂兴⁴

(1. 中国水产科学研究院, 北京 100141; 2. 中国水产科学研究院 鲆鲽类遗传育种功能实验室, 河北 秦皇岛 066100; 3. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 4. 中国水产科学研究院 北戴河中心实验站, 河北 秦皇岛 066100)

摘要: 通过静水压抑制卵裂方法获得多个牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)有丝分裂雌核发育家系, 在仔鱼阶段经历大批死亡后, 将各个家系残存的个体混合饲养, 24个月获得1批存活个体。利用11对微卫星分子标记, 对173尾有丝分裂雌核发育牙鲆进行分析, 结果表明, 其中111尾在11位点全部纯合, 62尾在部分位点杂合, 平均杂合子比例为0.233 8。11个位点的等位基因数为4~8, 平均等位基因数为5.033 6, 有效等位基因数为2.042 1~5.126 8, 平均有效等位基因数为3.281 5。采用NJ法对111尾纯合牙鲆的亲缘关系进行聚类分析, 可分为4群。微卫星标记鉴定结果表明, 通过静水压抑制卵裂法可以获得完全纯合的牙鲆, 但有部分杂合个体出现。分析其原因, 可能是由于某些卵子发育不同步, 静水压抑制其第二极体排出而非全部抑制卵裂, 导致减数分裂雌核发育所致。[中国水产科学, 2010, 17(5): 889-894]

关键词: 牙鲆; 有丝分裂雌核发育; 纯合性; 亲缘关系; 微卫星

中图分类号: Q959.486; S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)05-0889-06

人工诱导雌核发育作为细胞工程育种的一种新技术, 是快速建立纯系的有效手段, 在鱼类染色体操作、遗传改良以及性别控制等方面都具有潜在的应用价值^[1]。迄今为止, 人们已经对20种鱼类成功诱导有丝分裂雌核发育^[2]。关于有丝分裂雌核发育的鉴定, 过去多采用组织移植和同工酶标记的方法^[3-5], 但是组织移植法不能从分子水平上揭示其遗传信息; 同工酶可供检测的座位较少, 多态性低, 大大限制了它的应用。随着科学技术的进步, 新的分子标记不断被开发出来。微卫星作为一种新的分子标记技术, 具有信息量丰富, 多态性高, 呈共显性遗传等特点^[6], 能够准确地鉴别纯合基因型与杂合基因型。因此, 微卫星标记技术已经成为近年纯合子鉴定的主要方法^[7-10]。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是分布于中国沿海的大型经济鱼类, 在海水养殖中占有重要地位。早

在20世纪80年代, 日本学者曾利用有丝分裂雌核发育技术成功克隆出牙鲆^[11]。中国近年应用有丝分裂雌核发育技术也培育出纯合牙鲆, 并将微卫星标记技术应用有丝分裂雌核发育的研究, 如朱晓琛等^[7]利用8个微卫星位点检验了有丝分裂雌核发育牙鲆幼体的纯合性, 指出有丝分裂雌核发育一代即可形成纯合子; 季旭等^[12]对纯合牙鲆做了亲子鉴定实验, 证明了微卫星标记技术是进行亲子鉴定的有利工具, 但是运用微卫星标记技术对有丝分裂雌核发育牙鲆的遗传特性研究尚无报道。

本研究利用微卫星标记对发育成熟的有丝分裂雌核发育牙鲆的纯合性和微卫星位点多态性进行了分析, 对诱导有丝分裂雌核发育过程中产生杂合子的原因进行了探讨, 并鉴定出可用于构建牙鲆纯系的亲本, 明确它们之间的亲缘关系, 旨在为建立牙鲆纯系及其在育种上的应用提供遗传学依据。

收稿日期: 2010-01-18; 修订日期: 2010-02-12.

基金项目: 国家科技支撑计划(2006BAD01A1207); 国家鲆鲽类产业技术体系(NYCYTX-50); 国家农业行业科研专项(nyhyzx-46).

作者简介: 刘海金(1951-), 男, 研究员, 博士, 研究方向为鱼类遗传育种. E-mail: liuhaijin@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

所用亲鱼由中国水产科学研究院北戴河中心实验站培育,为野生牙鲆的后代。参考Yamamoto^[11]的方法,将真鲷(*Pagrosomus major*)精子经紫外线照射后激活牙鲆的卵子,激活的卵子在17℃下培养60 min后,经静水压处理(650 kg/cm²,6 min),抑制其卵裂。2007年5月,在仔鱼阶段经历大批死亡后,由于各家系成活个体不多,为了便于饲养,将数个有丝分裂雌核发育家系于同一池内混合培育。至2009年4月存活173尾,将获得的有丝分裂雌核发育牙鲆全部作为本研究的实验材料,其体长为27.7~44.4 cm,体质量为300.0~2 900.0 g。

1.2 牙鲆基因组DNA的提取及微卫星标记选择

DNA提取参考Salah等^[13]报道的方法略有改动。基因组DNA从鱼的尾鳍中提取,将裂解液[100 mmol/L NaCl,50 mmol/L Tris-HCl,20 mmol/L EDTA (pH 8.0),1%SDS,200 mg/L蛋白酶K]加入剪碎的尾鳍中,50℃消化至澄清,加入5 mol/L NaCl抽提1次,等体积的异丙醇沉淀,75%乙醇清洗沉淀,TE溶解后,-20℃保存待用。

参照牙鲆遗传连锁图谱,选择11个来自不同连锁群上的微卫星标记^[14],根据Coimbra等^[15]克隆的20对微卫星牙鲆引物获得引物序列,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,引物序列及退火温度参见表1。

表1 11个微卫星引物的序列及退火温度

Tab. 1 Sequences of 11 microsatellite markers and their specific annealing temperatures of PCR amplification

位点 Locus	基因数据库序列号 GenBank access no.	退火温度/℃ Ann temp	引物序列 Primer sequence
<i>Poli2TUF</i>	AB037978	57	F: ACAATAGGATGCAGCTGCCT R: AAGCGCAAATTGTTATTCCG
<i>Poli9TUF</i>	AB037980	60	F: GATCTGCAGAAACACACACTCA R: GCGAGTTCTTCTCAAATGC
<i>Poli13TUF</i>	AB037982	60	F: CACCTCCAGGTTCTACAGTCC R: TCCTGCACAGAGGATGAAAA
<i>Poli23TUF</i>	AB037985	60	F: CACAGTGTACAAAGTGCTGG R: GGGTGTCTGTGTCATGCTG
<i>Poli28TUF</i>	AB037986	64	F: ATCTCCCAACTGTCAATCATCA R: GTCGAGTCCAGTATCACTGCC
<i>Poli101TUF</i>	AB086493	57	F: CTCCAGTCAATGCTCCAATGATGAC R: AGGATGTTGTAATGAACATTGTGATGA
<i>Poli108TUF</i>	AB086501	64	F: TAACACGGAGGGTGTCAAGG R: GCTGGGACTCTTGGCTCC
<i>Poli121TUF</i>	AB037993	60	F: ACTGCATGCATAACCAACAGTGTGT R: GGCTGAATTATTTGGAGCAGAAGGT
<i>Poli126TUF</i>	AB037995	52	F: ATAATCACGAGCTGTGTGCTGAATG R: TCACATGTACAAACACACCACTGGA
<i>Poli130TUF</i>	AB037996	60	F: GCGGTGAGGACTTTATTTCTGGACT R: GTGGTACTGCAGAAAAGCGACTGTT
<i>Poli131TUF</i>	AB086523	57	F: TCTCTCTGCACGACGCTATCTTAC R: AGTGTGTCACCTGTTTGGTCCAAAT

1.3 PCR反应及电泳

PCR反应体系为15 μL,包括10×buffer 1.5 μL、Mg²⁺ (25 mmol/L) 1 μL、dNTPs (2 mmol/L) 各1 μL、上下游引物各0.6 μL、模版DNA 1 μL (30~50 ng)、*Taq* DNA聚合酶1 U,加适量dd H₂O。反应程序为:94℃

预变性3 min,94℃ 30 s,52~64℃ 30 s,72℃ 30 s,25个循环,最后72℃延伸10 min。PCR扩增产物经8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,电泳后1%硝酸银染色10 min,显色液(1%甲醛,2% NaOH,0.04%无水Na₂CO₃)显色10 min。凝胶在HP scanjet G4010

扫描仪成像,使用Gel-Pro Analyzer 4.5软件对电泳谱带进行分析。

1.4 数据分析

分析电泳图,将扩增出单一条带的位点视为纯合,扩增出2条带的视为杂合^[16],然后分别统计各个位点的杂合子比例。用Pop-gene 3.2软件计算各微卫星位点等位基因数(A)、平均等位基因数、有效等位基因数(N_e)、平均有效等位基因数和等位基因频率,并根据Nei's遗传距离^[17]使用MEGA4.0软件,采取NJ方法构建系统树。

2 结果与分析

2.1 有丝分裂雌核发育牙鲮的纯合性分析

在173尾有丝分裂雌核发育牙鲮中,111尾在所检测的11个位点全部纯合,纯合个体比例为64%;62尾牙鲮在11个位点未达全部纯合,杂合个体比例为36%。其中,出现4个位点以上杂合的个体为60尾,剩余2尾分别在1~2个位点为杂合。11个高多态性的微卫星位点中,杂合子比例最高为0.3064(*Poli2TUF*),杂合子比例最低为0.1561(*Poli28TUF*),平均杂合子比例为0.2338(表2)。结果表明,通过静水压抑制卵裂法可以获得完全纯合的牙鲮,但同时也存在部分杂合子。

2.2 微卫星位点多态性分析

由表2可知,11个位点的等位基因数为4~8,平均等位基因数为5.0336。等位基因数最多的是位点*Poli13TUF*和*Poli23TUF*,各为8个,等位基因数最少的为4个。有效等位基因数为2.0754~5.1838,平均有效等位基因数为3.2815;有效等位基因数最多的位点是*Poli13TUF*,为5.1268,最少的是*Poli2TUF*,为2.0421。

2.3 聚类分析

本研究利用NJ法构建了纯合牙鲮的系统分化树(图1),由图可知,111尾纯合牙鲮可聚成4群,A群32尾;B群33尾;C群22尾;D群24尾。其中,A和B、C、D的亲缘关系较远,独聚为一类;B和C的亲缘关系最近,先聚为一类,再和D聚成一类。此分类结果可以作为区分纯合牙鲮亲缘关系的基础。

3 讨论

应用微卫星标记证明有丝分裂雌核发育子代的纯合性,在国内外已有报道,Galbusera等^[18]用5个微卫星标记证明非洲鲇(*Clarias gariepinus*)有丝分裂雌核发育二倍体的纯合性,Bertotto等^[19]用6个微卫星标记证明欧鲈(*Dicentrarchus labrax* L.)有丝分裂雌核发育二倍体的纯合性。但是,由于有丝分裂

表2 有丝分裂雌核发育牙鲮在11个位点的等位基因数(A)、有效等位基因数(N_e)和杂合子比例(H)
Tab. 2 Number of alleles (A), number of effective alleles (N_e) and heterozygotes proportion (H) at the 11 microsatellite loci in mitogynogenetic *Paralichthys olivaceus*

位点 Locus	等位基因数 Number of alleles, A	有效等位基因数 Number of effective alleles, N_e	杂合子比例 Heterozygote proportion, H
<i>Poli2TUF</i>	7	2.0421	0.3064
<i>Poli9TUF</i>	5	2.9751	0.2428
<i>Poli13TUF</i>	8	5.1268	0.2659
<i>Poli23TUF</i>	8	4.0488	0.2659
<i>Poli28TUF</i>	4	3.6523	0.1561
<i>Poli101TUF</i>	4	2.0309	0.1908
<i>Poli108TUF</i>	4	3.4702	0.1965
<i>Poli121TUF</i>	5	4.2816	0.3006
<i>Poli126TUF</i>	5	3.4625	0.1965
<i>Poli130TUF</i>	4	2.9582	0.2139
<i>Poli131TUF</i>	4	3.6325	0.2370
平均 Mean	5.0336	3.2815	0.2338



图1 纯合牙鲆亲缘关系的NJ聚类图

Fig. 1 NJ phylogenetic dendrogram of homozygous *Paralichthys olivaceus* based on genetic distance

雌核发育诱导较难,近年诱导成功的鱼类很少,对于其鉴定方法尚无统一标准。

3.1 关于杂合子出现原因的分析

理论上,通过有丝分裂雌核发育可以得到完全纯合的子代,从而在育种中起到固定母本性状和快速建立克隆系的作用。然而,在非洲鲷和欧鲈的有丝分裂雌核发育诱导中,均发现有杂合个体存在^[2-3]。本研究的结果也证实,通过静水压抑制卵裂方法所得到的牙鲆既有纯合的,也有杂合的。究其原因,可能是因为卵子发育具有不同步现象,在进行有丝分裂雌核发育的过程中,当施加静水压力使染色体二倍化时,某些延迟发育的卵子可能仍处在减数分裂期,从而静水压抑制了第二极体排出而非抑制第一次卵裂,形成了减数分裂雌核发育。其数量尽管不多,但由于杂合子成活率高,而纯合子成活率低,最终呈现为杂合个体占有相当的比例;另一方面,卵子的质量和发育状态以及静水压处理的副作用也是影响雌核发育诱导效果的重要因素。关于卵子质量对雌核发育诱导效果的影响是个复杂问题,

目前这方面的研究较少^[2]。卵子的成熟度用肉眼很难准确鉴别,由于卵裂的时间和静水压处理的时间都很短,在卵子未熟或过熟的情况下,即使处理参数完全相同,也不能恰好抑制卵裂,可能对诱导雌核发育的效果产生重要影响,最后导致杂合子出现甚至比例较高。

3.2 关于杂合子比例不同的分析

本实验用11个微卫星位点检测到64%的纯合个体,比朱晓琛等^[7]用8个微卫星位点和王桂兴^[20]用15个微卫星位点所检测到的纯合子比例都要低,除了上述不同亲本的卵子发育不同步和静水压处理时机不同等原因之外,还有可能出自所检测实验鱼年龄不同的原因。本研究所用实验鱼为24月龄,而朱晓琛等和王桂兴用的是约30日龄鱼。有丝分裂雌核发育个体在发育早期几乎全为纯合子,杂合子数量很少而很难采集到,随着生长发育,由于有害隐性基因的纯合而使有遗传缺陷的个体逐渐死亡,直至最后存活率稳定下来,呈现纯合子比例下降而杂合子比例上升的现象。在欧鲈的研究中也出现随日

龄上升而纯合子比例下降的现象^[19]。经过纯合致死的选择性死亡,淘汰了带有有害基因的个体,从而达到了基因筛选的效果。用最终存活下来的纯合个体作为克隆亲本,将可能降低因亲本自身的遗传缺陷而对后代的生长或抗病等表型性状带来的不利影响。

不同亲本的遗传差异也可能对杂合子的形成比例产生影响^[9],但是由于缺乏数据,目前尚无法进行分析。关于诱导有丝分裂雌核发育操作产生杂合子的机制,是个非常有价值的问题,尚有待于深入研究。但是,上述研究结果表明,诱导有丝分裂雌核发育是一种获得纯合牙鲆的有效方法,为获得建立克隆的亲本奠定了基础。如需获得大量纯合个体,可以通过改进诱导方法或者增加诱导卵的数量来解决,从这个角度讲,不必拘泥最终存活的纯合子比例。对于鱼类来讲,无论有丝分裂雌核发育诱导的纯合子比例高与低,该方法获得纯合子的优势是其他生殖方式不可比拟的,因为,其他生殖方式还没有一代即可以形成纯合子的先例。然而,值得注意的是,在利用有丝分裂雌核发育个体作为克隆亲本之前,需要分别验证其纯合性。

3.3 关于纯合子的聚类

用纯合牙鲆作为亲本,再诱导1次减数分裂雌核发育得到的子代即为纯系,而为了获得具有优良经济性状的新品系,往往需要选择亲缘关系较远的不同纯系进行杂交^[11]。本研究由于亲本的意外死亡,而缺失亲本的DNA材料,不便准确地鉴定家系。通过聚类分析,可大致明确不同纯合个体之间的亲缘关系^[21]。根据遗传距离,通过NJ聚类分析,111尾纯合牙鲆可分为4群。这种纯合子亲缘关系的区分对于克隆系建立后的有效利用具有重要意义。

综上所述,利用静水压法诱导有丝分裂雌核发育,繁殖1代即可获得完全纯合的个体,但其中含有杂合个体。运用多个微卫星标记对这些雌核发育子代进行基因型检测,可以鉴别其纯合性,剔除杂合子,为日后建立牙鲆纯系奠定基础。由于每个纯合子都能形成1个独立的纯系,这样不仅可以提供大

量用于选种的良好材料,还可以作为QTL定位和建立遗传连锁图谱的重要研究材料。

参考文献:

- [1] 刘静霞,周莉,赵振山,等. 锦鲤4个人工雌核发育家系的微卫星标记研究[J]. 动物学研究,2002,23(2): 97-105.
- [2] Komen J, Thorgaard G H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review[J]. Aquaculture, 2007,269: 150-173.
- [3] Tabata T, Gorie S. Determination of IDH genotype by biopsy and gene-centromere recombination frequencies in hirame *Paralichthys olivaceus* [J]. Fish Genet Breed Sci, 1987, 12 : 51-56.
- [4] Han H, Taniguchi N, Tsujimura A. Production of ayu chromosome manipulation and confirmation by isozyme marker and tissue grafting[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1991,57(5): 825-832.
- [5] 山本荣一. ヒラメの人為的性統御とクローン集団作出に関する研究[R]. 鳥取県水産試験場報告,1995,34: 1-145.
- [6] Chistiakov D A, Hellemans B, Volckaert F A M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics [J]. Aquaculture, 2006,255: 1-29.
- [7] 朱晓琛,刘海金,孙效文,等. 微卫星评价牙鲆雌核发育二倍体纯合性[J]. 动物学研究, 2006,27(1): 63-67.
- [8] 王晓清,王志勇,柳小春,等. 大黄鱼人工诱导雌核发育后代的微卫星标记分析[J]. 遗传,2006,28(7): 831-837.
- [9] 孙效文,张研,季旭,等. 鲤和牙鲆的两种雌核发育子代的基因型分析[J]. 水产学报,2008,32(4): 545-555.
- [10] 李霞,白俊杰,吴淑勤,等. 剑尾鱼RW-H近交系的遗传结构分析[J]. 水产学报, 2004,28(4): 365-370.
- [11] Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel) [J]. Aquaculture, 1999, 173: 235-246.
- [12] 季旭,孙效文,杨立更,等. 微卫星标记对牙鲆有丝分裂

- 雌核发育家系的亲子鉴定[J]. 动物学研究, 2008, 29(1): 25–30.
- [13] Salah M A, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. Nucl Acids Res, 1997, 25: 4692–4693.
- [14] Coimbra M R M, Kobayashi K, Koretsugu S, et al. A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 2003, 220: 203–218.
- [15] Coimbra M R M, Hasegawa O, Kobayashi K, et al. Twenty microsatellite markers from the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Fish Sci, 2006, 7: 358–360.
- [16] Crooijmans R, Poel J, Groenen M A M, et al. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Anim Genet, 1997, 28(2): 129–134.
- [17] Nei M. Genetic distance between populations [J]. Am Nat, 1972, 106: 283–292.
- [18] Galbusera P, Volckaert F A M, Ollevier F. Gynogenesis in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) III. Induction of endomitosis and the presence of residual genetic variation [J]. Aquaculture, 2000, 185: 25–42.
- [19] Bertotto D, Cepollaro F, Libertini A, et al. Production of clonal founders in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., by mitotic gynogenesis [J]. Aquaculture, 2005, 246: 115–124.
- [20] 王桂兴. 有丝分裂雌核发育牙鲆纯合性的微卫星评价与生长性状分析[D]. 大连: 大连水产学院, 2009.
- [21] 王鸿霞, 张晓军, 李富花, 等. 应用微卫星标记分析野生中国明对虾的亲权关系[J]. 水生生物学报, 2008, 32: 42–46.

Identification of mitogynogenetic Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using microsatellite marker

LIU Haijin^{1,2}, LU Gui^{2,3}, WANG Xiaomei¹, LIU Yongxin¹, WANG Yufen⁴, WANG Guixing⁴

(1.Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China; 2.Laboratory for Genetic Breeding of Flatfishes, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China; 3.College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4.Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China)

Abstract: Gynogenesis was considered to be a useful method to generate clonal lines in fish. Mitogynogenesis has been successfully applied to several fishes. In this study, mitogynogenesis was carried out in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, by fertilizing eggs with UV-irradiated heterologous sperms of red sea bream, *Pagrus major*. One hundred and seventy-three mitogynogenetic diploids belonging to different families had been mixedly raised for 24 months. Eleven microsatellite markers were used to examine homozygosity and genetic relationship of mitogynogenetic Japanese flounders. The results showed that among the 173 mitogynogenetic diploids 111 individuals were completely homozygous at all 11 loci, and 62 were heterozygous at partial loci. The number of the alleles (A) ranged from four to eight, and average number of alleles was 5.033 6. Effective alleles (N_e) were from 2.042 1 to 5.126 8, and average number of effective alleles was 3.281 5. The genetic distance of 111 homozygous individuals was calculated and the cluster analysis was carried out by NJ method. All individuals were pooled into four groups. The results revealed that residual heterozygosity still remained in mitotic gynogenetic diploids. Heterozygous fish was obtained through mitogynogenesis as a result of the presence of meiogynogenesis. Therefore, precise assessment of the homozygosity of mitotic gynogenetic diploids is necessary for successful clonal lines. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(5): 889–894]

Key words: *Paralichthys olivaceus*; mitogynogenesis; homozygosity; genetic relationship; microsatellite