

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00381

牙鲆连续两代减数分裂雌核发育家系的遗传特征

王桂兴¹, 刘海金², 张晓彦¹, 刘永新², 王玉芬¹, 蒋丽²

1. 中国水产科学研究院 北戴河中心实验站, 河北 秦皇岛 066100;

2. 中国水产科学研究院, 北京 100141

摘要: 对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)减数分裂雌核发育二倍体(Meio-G1)再次诱导减数分裂雌核发育, 获得连续两代雌核发育二倍体家系(Meio-G2), 以 Meio-G1 亲本与 1 尾普通牙鲆雄鱼人工授精获得的家系作为对照组(control)。利用 15 个微卫星标记对 3 个家系进行遗传特征分析。结果显示, 15 个微卫星位点在 Meio-G1、Meio-G2 和对照组 3 个家系中, 分别扩增到 30、28、50 个等位基因, 平均等位基因数为 2.0、1.9、3.3, 平均观测杂合度(H_o)分别为 0.875 3、0.774 2、0.908 3, 平均纯合度分别为 0.124 7、0.221 5、0.091 7。3 个家系个体间的平均遗传相似系数分别为 0.891 7、0.923 8、0.520 2, 亲代与子代之间的平均相似系数分别为 0.916 6、0.930 4、0.560 3。高重组率的 *Poli9-8tuf*、*Poli18tuf*、*Poli107tuf* 3 个位点在 Meio-G1 和 Meio-G2 中观测杂合度均为 1.0, 低重组率的 *Poli33tuf*、*Poli24MHFS* 两个位点在 Meio-G1 和 Meio-G2 中均全部纯合, 观测杂合度为 0。结果表明, Meio-G2 的纯合度、个体间平均相似系数以及亲子之间的平均相似度均略高于 Meio-G1, 显著高于对照组家系, 证明连续两代诱导减数分裂雌核发育, 能提高鱼类纯合度和遗传相似性, 具有固定母本遗传性状的作用。

关键词: 牙鲆; 连续两代雌核发育; 遗传相似性; 纯合度

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)03-0381-09

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)广泛分布于俄罗斯远东海域、日本、朝鲜半岛及中国沿海地区, 是具有重要经济价值的大型鱼类。牙鲆雌性个体生长速度比雄性明显快, 人工养殖条件下, 445 日龄时, 雌性牙鲆的平均体质量是雄性牙鲆的 1.8 倍; 773 日龄时, 达到 2.9 倍^[1], 因此, 实现雌性单性化养殖, 对于提高牙鲆的养殖产量和经济效益具有重要意义。

人工诱导雌核发育被认为是加速动物有利基因纯合及固定的有效方法, 在鱼类染色体操作、性别控制及遗传分析等方面都具有潜在的应用价值^[2-12]。雌核发育技术已成功在鲑科、鲤科、鳅科、鲟科和鲈科等多种经济鱼类中获得单性后代

群体^[3-4], 在鲆鲽类中, 开展的研究主要集中在条斑星鲽(*Verasper moseri*)^[5]、牙鲆^[6-7]、庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)^[8]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[9-10]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther)^[11]、漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)^[12]等。关于牙鲆雌核发育的研究, 1986 年, 田畑和男等^[13]利用冷休克和静水压处理, 建立了诱导牙鲆减数分裂和有丝分裂的方法, 并用同工酶证明了纯合子的成立; Yamamoto^[14]在诱导牙鲆有丝分裂的基础上, 再次诱导减数分裂雌核发育, 建立了纯合子, 并用 DNA 指纹图谱技术证明其纯合子的成立; 徐成等^[15]对减数分裂雌核发育牙鲆两个基因座位与着丝粒之间的重组率进行了探讨, 提

收稿日期: 2011-10-31; 修订日期: 2011-12-31.

基金项目: 国家鲆鲽类产业技术体系建设项目(CARS-50-G2); 农业部公益性行业科研专项(200903046).

作者简介: 王桂兴(1982-), 男, 助理工程师, 硕士, 研究方向为鱼类遗传育种. Tel: 0335-4260806; E-mail: wangguixing_1982@163.com

通信作者: 刘海金, 研究员. Tel: 010-68671004; E-mail: liuhaijin2005@126.com

出减数分裂雌核发育牙鲆存在杂合基因型,不能用于培育克隆;叶小军等^[16]对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)连续两代雌核发育群体的遗传特性做了微卫星标记分析,表明雌核发育能加速基因位点的纯合,但是不同位点纯合速率差异很大。刘海金等^[6,17]对真鲷(*Pagrosomus major*)精子诱导牙鲆减数分裂雌核发育进行研究,对减数分裂雌核发育二倍体胚胎发育进行观察,并优化了技术参数,RAPD 结果证明异源精子的遗传信息没有传递给子代。朱晓琛等^[18]用微卫星标记评价了牙鲆雌核发育二倍体的纯合性。但是,关于牙鲆连续两代减数分裂雌核发育家系遗传特征的研究,迄今未见报道。

本研究利用 15 个微卫星标记分析了 Meio-G1 和 Meio-G2 的纯合度和遗传相似度,比较牙鲆连续两代雌核发育家系与普通两性家系的遗传差异,探讨多代雌核发育对纯合速率的影响,以及不同微卫星位点的纯合差异,以期为利用牙鲆雌核发育进行良种选育提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 减数分裂雌核发育家系的获得

以中国水产科学研究院北戴河中心实验站诱导的雌核发育家系为实验材料。以真鲷精子作为异源精子,经紫外线灭活,雌核发育诱导依据刘海金等^[6]的方法,用普通苗种培育方法培育。2007 年,获得减数分裂雌核发育一代家系,即 Meio-G1,2009 年,利用 Meio-G1 内发育成熟的个体再次诱导雌核发育,获得第二代减数分裂雌核发育家系,即 Meio-G2。同年以 Meio-G1 亲本的卵子与一尾普通牙鲆精子人工授精所孵化的两性家系作为对照组(control)。

1.2 基因组 DNA 提取

采集雌核发育亲本、Meio-G1 的腹面胸鳍、Meio-G2 和对照组家系的 20 日龄鱼苗各 30 尾,样品置于 -80°C 冰箱中保存。将采集的样本置于 400 μL 裂解液(50 mmol/L NaCl, 30 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0), 100 mmol/L EDTA(pH8.0), 1%SDS, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Proteinase K)中,50 $^{\circ}\text{C}$ 温育至澄清,等体积

的饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提 1 遍,等体积异丙醇沉淀,0.4 mL 75%乙醇清洗沉淀,TE 溶解,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

1.3 微卫星引物

微卫星引物来源于 Coimbra 等^[19]绘制的牙鲆遗传连锁图谱,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。以 Meio-G1 亲本 DNA 为模板筛选出 15 对多态性标记。引物名称、序列及退火温度见表 1。

1.4 PCR 及电泳

PCR 反应体系(15 μL)包括:10 \times Buffer 2.5 μL 、 Mg^{2+} (25 mmol/L)1 μL 、dNTPs(各 2 mmol/L)1 μL 、上下游引物(10 mmol/L)各 0.6 μL 、模版 1 μL (30~50 ng)、*Taq* DNA 聚合酶 1 U,加适量 ddH₂O。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 25 个循环,各循环包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,PCR 扩增在 AB9700 型 PCR 仪上进行。PCR 产物使用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染显色。

1.5 统计指标

观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、纯合度(homozygosity)、遗传相似系数(genetic similarity index, GSI)等遗传参数均由 popgene(ver. 3.2)计算获得。重组率^[20]和近交系数^[21]由以下公式计算

$$\text{重组率 } r = \text{杂合子数} / \text{个体总数}$$

$$\text{近交系数 } F_{G_i}^{(r)} = 1 - r^i$$

式中, F 表示第 i 世代的近交系数, G_i 表示第 i 代雌核发育家系, r 为微卫星位点的重组率。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增及电泳结果

15 对引物在 Meio-G1、Meio-G2 和对照 3 个家系中,均获得了特异性和稳定的扩增结果,分别扩增到 30、28、50 个等位基因,平均等位基因数分别为 2.0、1.9、3.3(表 2)。图 1-3 为 *Poli39MHFS* 在 3 个家系中的扩增结果。

2.2 连续两代雌核发育家系的基因纯合度

利用所选 15 个微卫星位点对 Meio-G1、Meio-G2 以及对对照组进行检测,统计了 3 个家系

表 1 微卫星引物的序列和特异退火温度
Tab.1 Sequence and specific annealing temperature of microsatellite primers

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	退火温度/°C annealing temperature	GenBank access. no.
<i>Poli9-8tuf</i>	F: gagagacagaaggtcgtcaacggta R: acaagaccacgatgcaaagtac	64	AB037989
<i>Poli18tuf</i>	F: cagcacacacaagctcc R: cgtgggtgaggttatgg	60	AB037983
<i>Poli107tuf</i>	F: tggaagagatgtcacttgactgc R: aactgtcacctctgagtggaccg	60	AB037990
<i>Poli39MHFS</i>	F: ggccttgttctctgtga R: accgaatgtgaatctgaaaa	60	AB459333
<i>Poli139tuf</i>	F: gacagttagaccatcgggttg R: gcagcctgttctcattaagaga	60	AB459413
<i>Po25A</i>	F: agtcaggtttacggccactg R: cagaagtgtgtcgcaggaa	60	AB046749
<i>Poli2tuf</i>	F: acaataggatgcagctcct R: aagcgcaaatgttattccg	57	AB037978
<i>Po13</i>	F: atcccgtaacagccaatcag R: cgtccagacaatcaggact	60	AB046746
<i>Poli101tuf</i>	F: ctccagtcagctccaatgatgac R: aggatgtgtaatgaacattgtgatga	60	AB086493
<i>Poli121tuf</i>	F: actgcatgcataaccaacagtgtgt R: ggctgaattattggagcagaaggt	62	AB037993
<i>Poli123tuf</i>	F: tatctgaccagaactggagggtctg R: gcgtgtgcattcgatatacatcttg	60	AB037994
<i>poli12MHFS</i>	F: cagtcctaaaccagtgt R: tgtgctaccgtgaataat	60	AB459319
<i>Poli130tuf</i>	F: gcggtgaggactttattctggact R: gtgtactgcagaaaagcagctgtt	57	AB037996
<i>Poli24MHFS</i>	F: ccacctattttctctctctgta R: tctctcttatcaccttcatcc	60	AB459326
<i>Poli133tuf</i>	F: tcagttgtgtgaaaggggacag R: ttctgcattaagaagtgaaattcctgc	60	AB459409

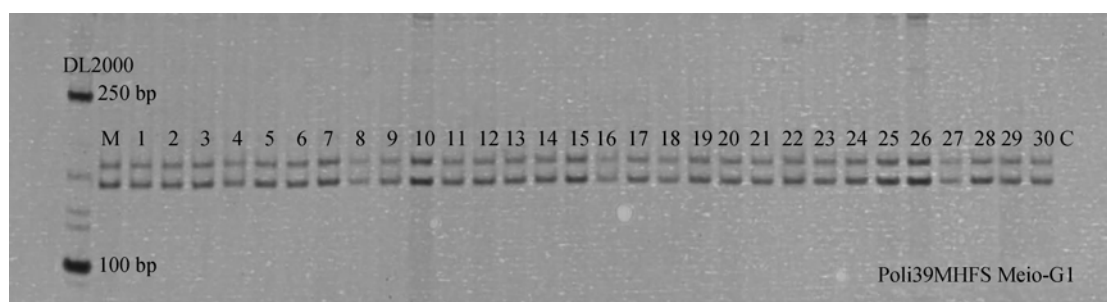


图 1 Poli39MHFS 标记在 Meio-G1 中的 PCR 扩增结果
M 为母本, C 为空白对照.

Fig.1 PCR result of Poli39MHFS genetic marker in Meio-G1
M and C represent female parent and control.

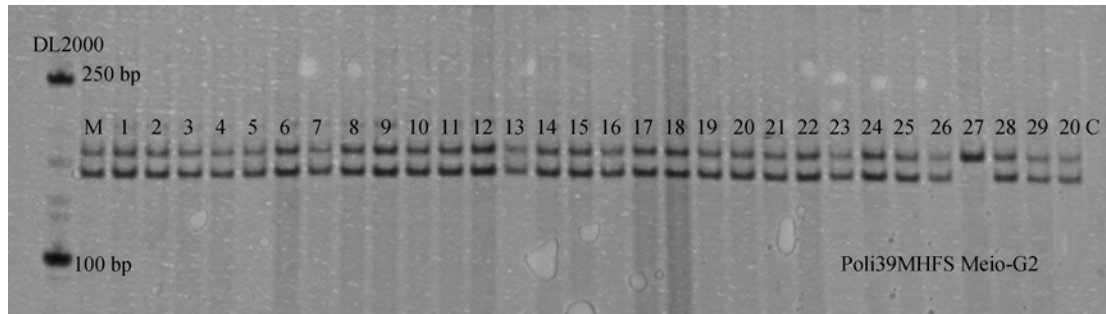


图 2 Poli39MHFS 标记在 Meio-G2 中的 PCR 扩增结果

M 为母本, C 为空白对照.

Fig.2 PCR result of Poli39MHFS genetic marker in Meio-G2

M and C represent female parent and control.

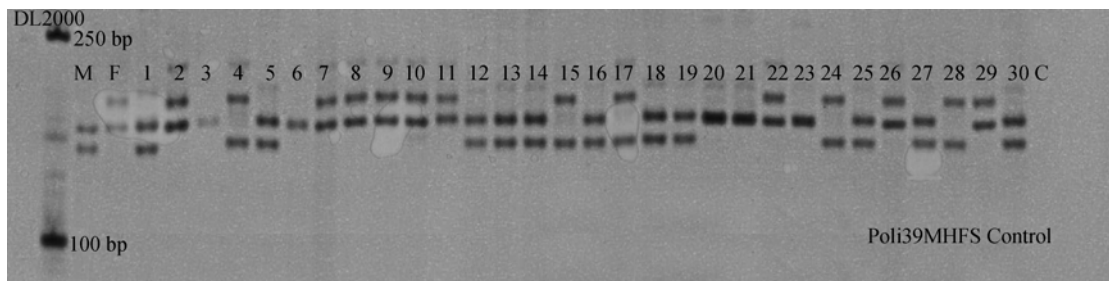


图 3 Poli39MHFS 标记在对照组中的 PCR 扩增结果

M 为母本, F 为父本, C 为空白对照.

Fig.3 PCR result of Poli39MHFS genetic marker in control group

M, F and C represent female, male parent and control.

的等位基因数、平均基因型数、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、多态信息含量和纯合度(表 2)。结果显示, Meio-G1、Meio-G2 的观测杂合度、期望杂合度等遗传指标均低于对照组, 而 Meio-G2 低于 Meio-G1; Meio-G1、Meio-G2 的纯合度分别为 0.124 7 和 0.221 5, 高于对照组(0.091 7), Meio-G2 的纯合度又高于 Meio-G1。

2.3 连续两代雌核发育家系内个体间的遗传相似性

根据所检测的 15 个微卫星位点的基因型, 计算了 Meio-G1、Meio-G2 和对照组 3 个家系内个体间的遗传相似性(表 3)。结果表明, Meio-G1 和 Meio-G2 的遗传相似性均显著高于对照组, 具有很高的遗传相似性。雌核发育家系内个体的遗传差异明显减小, Meio-G2 个体间平均遗传距离远远小于对照组和 Meio-G1。Meio-G1、Meio-G2 平均遗传相似性高于对照组, 并且 Meio-G2 高于 Meio-G1。另外, 两代雌核发育家系亲子之间的平均相似系数分别为 0.916 6 和 0.930 4, Meio-G2 高

于 Meio-G1, 二者均高于对照组(0.560 3)。

2.4 不同位点的纯合效率和近交系数

根据 15 个微卫星座位的数据, 计算了 Meio-G1 和 Meio-G2 的近交系数(表 4), 近交系数反映了在雌核发育家系中各位点基因的纯合速率。结果显示, 不同微卫星位点的纯合速率不同, 并与重组率紧密相关, *Poli133tuf*、*Poli24MHFS* 两个低重组率位点近交系数达 1.00, 纯合较快, 在 Meio-G1 和 Meio-G2 中均全部纯合; *Poli9-8tuf*、*Poli18tuf*、*Poli107tuf* 3 个高重组率位点近交系数为 0, 纯合速率慢, 在 Meio-G1 和 Meio-G2 家系中均为杂合。

3 讨论

为避免不同亲本对遗传差异的影响, 本研究只选取一尾亲鱼的卵子, 通过染色体操作技术, 获得减数分裂雌核发育一代家系 Meio-G1, 再在 Meio-G1 内随机选取 1 尾发育成熟的雌性个体,

表 3 连续两代雌核发育家系内的遗传相似度
Tab.3 Genetic similarity indices between dam and offspring and among offsprings

家系 family	母本与子代间 between dam and offspring			子代个体间 among off springs		
	最大 max	最小 min	平均 mean	最大 max	最小 min	平均 mean
雌核一代 Meio-G1	1.0000	0.8489	0.9166	1.0000	0.7233	0.8917
雌核二代 Meio-G2	1.0000	0.8208	0.9304	1.0000	0.7695	0.9238
对照组 control	0.6309	0.1669	0.5202	0.9037	0.2581	0.5603

表 4 在 15 个微卫星位点上纯合个体数量、比率、重组率和近交系数

Tab.4 Number of homozygote, recombination frequency, breeding coefficients in gynogens of *Paralichthys olivaceus* for 15 detected microsatellite loci

位点 locus	雌核发育一代 Meio-G1				雌核发育二代 Meio-G2			
	纯合个体数 N	比率 ratio	重组率 recombination frequency	近交系数 coefficient of inbreeding (F)	纯合个体数 N	比率 ratio	重组率	近交系数 coefficient of inbreeding (F)
<i>Poli9-Stuf</i>	0	0.00	1.00	0.00	0	0.00	1.00	0.00
<i>Poli18tuf</i>	0	0.00	1.00	0.00	0	0.00	1.00	0.00
<i>Poli107tuf</i>	0	0.00	1.00	0.00	0	0.00	1.00	0.00
<i>Poli39MHFS</i>	0	0.00	1.00	0.00	1	0.03	0.97	0.06
<i>Poli139tuf</i>	1	0.03	0.97	0.03	0	0.00	1.00	0.00
<i>Po25A</i>	2	0.07	0.93	0.07	1	0.03	0.97	0.06
<i>Poli2tuf</i>	1	0.03	0.97	0.03	0	0.00	1.00	0.00
<i>Po13</i>	1	0.03	0.97	0.03	2	0.07	0.93	0.14
<i>Poli101tuf</i>	0	0.00	1.00	0.00	4	0.13	0.87	0.24
<i>Poli121tuf</i>	2	0.07	0.93	0.07	5	0.17	0.83	0.31
<i>Poli123tuf</i>	3	0.10	0.90	0.10	9	0.30	0.70	0.51
<i>Poli12MHFS</i>	3	0.10	0.90	0.10	2	0.07	0.93	0.14
<i>Poli130tuf</i>	2	0.07	0.93	0.07	12	0.40	0.60	0.64
<i>Poli24MHFS</i>	11	0.37	0.63	0.37	30	1.00	0.00	1.00
<i>Poli133tuf</i>	30	1.00	0.00	1.00	30	1.00	0.00	1.00
均值 mean	3.70	0.12	0.88	0.12	6.40	0.21	0.79	0.38

再次诱导雌核发育, 获得第二代减数分裂雌核发育家系 Meio-G2。两代雌核发育家系是同一祖先, 是真正意义上的连续雌核发育家系, 遗传背景一致, 能够准确反映出连续两代雌核发育对鱼类遗传差异和基因纯合的影响。

减数分裂雌核发育能快速固定母本性状, 是一种提高育种效率的好方法, 一般认为一代雌核发育相当于 8~10 个世代的全同胞交配^[2]。减数分裂雌核发育二倍体在远离着丝粒(高重组率)的位点易发生等位基因之间的重组交换, 多表现为杂合; 而距离着丝粒较近(低重组率)的位点, 等位基因之间不易发生重组, 多表现为纯合。因此, 重复多次减数分裂雌核发育后, 低重组率位点等位

基因为纯合型, 高重组率位点等位基因为杂合型, 所有个体在不同位点形成的等位基因纯合型和杂合型都将被固定下来^[16,22]。本研究中 Meio-G1 平均遗传相似度为 0.891 7, 高于对照组(0.560 3), Meio-G2 平均遗传相似度高达 0.923 8, 最高为 1.000 0, 又高于 Meio-G1, 与 Nagy 等^[21]的研究结果比较, 牙鲆 Meio-G1 相当于 9~10 个世代的全同胞交配, Meio-G2 相当于 11~12 个世代的全同胞交配, 说明连续诱导减数雌核发育能够显著提高牙鲆家系的遗传相似度。因此, 诱导减数分裂雌核发育可以作为提高遗传相似度和纯合率的手段, 但是不能作为诱导克隆的亲本。

本研究结果与前人对虹鳟(*Oncorhynchus my-*

mykiss)^[23]和真鲷^[24]的研究结果相似,但是与对大黄鱼^[16]的研究结果差别较大。大黄鱼对照组的纯合度为 0.376,遗传相似系数为 0.468 7,而牙鲆的纯合度为 0.091 7,遗传相似系数为 0.520 2,可见两者纯合度相差较大,而遗传相似系数相差不大,均接近于 0.5。大黄鱼一代雌核发育的纯合度高达 0.661,牙鲆只有 0.124 7;大黄鱼一代雌核发育的遗传相似系数 0.590 3,牙鲆为 0.916 6。可以看出,大黄鱼对照组的纯合度很高,经一代雌核发育后纯合度和相似系数均有一定的提高;但是牙鲆一代雌核发育后,纯合度略有提高,遗传相似系数却提高到 0.900 0 以上,雌核发育牙鲆个体间表型性状很相似,实际上也反映了这个特点。大黄鱼与牙鲆之间差异很大,可能有以下 3 个原因:(1)两物种间的属性差异,遗传背景不同;(2)材料上的差异,本研究用的是野生亲鱼,系由一尾系祖连续诱导两代雌核发育而形成,而大黄鱼使用的是人工养殖的后代,雌核发育的亲本由数尾构成,并非同一系祖;(3)标记上的差异,重组率结果(表 4)显示本研究的微卫星标记,低重组率标记较少,一定程度地消除了近着丝粒位点纯合度高的影响。由此可见,比较雌核发育二倍体遗传特征时,选用实验材料和分子标记很重要,直接关系到比较的效果。

在对减数分裂雌核发育后代的共显性分子标记检测中,一般都会发现存在一些杂合位点。一般认为这是由于卵母细胞减数分裂时同源染色体之间发生交换引起^[25-29]。本研究中 *Meio-G1* 和 *Meio-G2* 的纯合度明显高于对照组,但不同微卫星位点的纯合速率不同,与大黄鱼^[16]的研究结果基本一致。近交系数值反映了在雌核发育家系中各位点基因的纯合速率。低重组率位点(*Poli133tuf*, *Poli24MHFS*)其近交系数达 1.00,纯合较快,在 *Meio-G1* 中已经纯合;而高重组率位点(*Poli9-8tuf*, *Poli18tuf*, *Poli107tuf*)近交系数为 0,纯合较慢。由于牙鲆的 48 条染色体全部为端部着丝粒染色体^[29],着丝粒对交叉的干涉作用可能较小,使得牙鲆较其他鱼类具有更高的重组率^[18],导致 *Poli9-8tuf*、*Poli18tuf*、*Poli107tuf* 这些高重组率位点在减数分

裂雌核发育家系中很难实现纯合。

传统动物良种选育的过程,基本上是不间断纯合和杂交的过程。纯合的过程是漫长的,还需要大量的资金、场所和人力,往往需要几代甚至十几代的动物繁殖过程;而杂交过程是暂短的,一代或二代即可完成。雌核发育方式可以快速实现纯化,高效率地获得高纯度的育种材料,大幅缩短了选育周期,对于鱼类育种是一种非常难得的生殖方式。诱导雌核发育的方法简单,不需要复杂的设备,对于很多种鱼类都适用,其有效性和适用性至今也是其他技术不能比拟的。利用雌核发育技术所制备的遗传材料,不仅可用于遗传育种领域,还可应用于连锁图谱构建、QTL 定位及鱼类遗传特性、性别决定机制研究等遗传学的其他领域,并对快速选育生长性状优良、抗病、抗逆性强的新品种具有重要意义。

参考文献:

- [1] 山本栄一. ヒラメの人為的性制御とクローン集団作出に関する研究[J]. 鳥取県水産試験場報告, 1995, 34(1): 1-145.
- [2] 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.
- [3] 谷口順彦. 魚類の雌性発生 2 倍体における G-C 組み換え率と固定指数[J]. 水産育種, 1986, 11: 49-58.
- [4] Komen H, Thorgaard G H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review [J]. Aquaculture, 2007, 269: 150-173.
- [5] 杨景峰, 陈松林, 苏鹏志, 等. 异源精子诱导条纹星鲷雌核发育的研究[J]. 水产学报, 2009, 33(3): 372-378.
- [6] 田畑和男, 五利江重昭, 中村一彦. ヒラメの雌性発生のための人工授精技術の検討[J]. 兵庫県水産試験場研報, 1986, 24(1): 19-27.
- [7] 刘海金, 侯吉伦, 常玉梅, 等. 真鲷精子诱导牙鲆减数分裂雌核发育[J]. 水产学报, 2010, 34(4): 508-513.
- [8] Harald B T, Tillmann J B, Deborah J M R, et al. Gynogenesis and sex determination in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)[J]. Aquaculture, 2006, 252: 573-583.
- [9] Frances C P, Rosa M C, Castora G, et al. Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): Effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age [J]. Aquaculture, 2004, 238: 403-419.

- [10] Xu J H, You F, Sun W, et al. Induction of diploid gynogenesis in turbot (*Scophthalmus maximus*) with left-eyed flounder *Paralichthys olivaceus* sperm [J]. *Aquacult Int*, 2008, 16: 623–634.
- [11] 季相山, 陈松林, 武鹏飞, 等. 紫外灭活的异源和同源精子诱导的半滑舌鳎单倍体胚胎发育过程比较[J]. *水产学报*, 2009, 33(1): 60–69.
- [12] 杨景峰, 陈松林, 徐巨博, 等. 花鲈冷冻精子诱导漠斑牙鲆雌核发育[J]. *水产学报*, 2010, 34(8): 1175–1181.
- [13] 田畑和男, 五利江重昭, 中村一彦. 紫外線によるヒラメの雌性発生 2 倍体の誘起条件[J]. *日本水産学会誌*, 1986, 52(11): 1901–1904.
- [14] Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned population in hirame flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel) [J]. *Bull Tottori Prefect Fish Exp Station*, 1995, 34(1): 1–45.
- [15] 徐成, 王可玲, 徐永立, 等. 雌核发育牙鲆同工酶基因的重组及父方基因的表达[J]. *海洋与湖沼*, 2002, 33(1): 62–67.
- [16] 叶小军, 王志勇, 刘贤德, 等. 大黄鱼连续两代雌核发育群体的微卫星标记分析[J]. *水生生物学报*, 2010, 34(1): 144–151.
- [17] 刘海金, 王常安, 朱晓琛, 等. 牙鲆单倍体、三倍体、雌核发育二倍体和普通二倍体胚胎发育的比较[J]. *大连水产学院学报*, 2008, 23(3): 161–167.
- [18] 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.
- [19] Coimbra M R, Kobayashi K, Koretsugu S, et al. A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture*, 2003, 220(1-4): 203–218.
- [20] Thorgaard, G H, Allendorf, F W, Knudsen, K L. Gene-centromere mapping in rainbow trout: high interference over long map distance[J]. *Genetics*, 1983, 103: 771–783.
- [21] Nagy A, Csfinyi V. Changes of genetic parameters in successive gynogenetic generations and some calculations for carp gynogenesis [J]. *Theor Appl Genet*, 1982, 63: 105–110.
- [22] 刘海金, 刘永新, 王玉芬, 等. 牙鲆减数分裂与有丝分裂雌核发育的遗传差异[J]. *水产学报*, 2010, 34(4): 898–904.
- [23] 荒井克俊. 染色体操作[M]//魚類の DNA. 東京: 恒星社厚生閣, 1997, 32–62.
- [24] 小林徹. ニジマス、アマゴにおける雌性発生法の育種への応用とクローン作出[J]. *水産育種*, 1991, 17:1–4.
- [25] 幹田和彦, 高木, 山口卓, 等. 極体放出型雌性発生 3 代目における異祖性マイクロサテライト領域の確認[M]. 東京: 平成 8 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 1996: 85.
- [26] Taniguchi N, Kijima A, Tamura T, et al. Color, growth and maturation in ploidy-manipulated fancy carp [J]. *Aquaculture*, 1986, 57: 321–328.
- [27] Francescon A, Barbaro A, Bertotto D, et al. Assessment of homozygosity and fertility in meiotic gynogens of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)[J]. *Aquaculture*, 2005, 243: 93–102.
- [28] 王伟, 尤锋, 高天翔, 等. 人工诱导牙鲆异质雌核发育群体的微卫星标记分析[J]. *高技术通讯*, 2005, 15(7): 107–110.
- [29] 刘静. 牙鲆染色体组型的研究[J]. *海洋科学*, 1995(2): 65–67.

Analysis of homozygosity and genetic similarity between two successive generations in a meiogynogenetic Japanese flounder family

WANG Guixing¹, LIU Haijin², ZHANG Xiaoyan¹, LIU Yongxin², WANG Yufen¹, JIANG Li²

1. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China;

2. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China

Abstract: The artificial induction of gynogenesis is a form of chromosome manipulation that has several applications, including the rapid establishment of inbred lines or strains. The technique offers a high degree of homozygosity, sex-control, and accelerated elimination of recessive deleterious genes from a cultured population. We produced two meiotic gynogenetic Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) family lines: meio-G1 (the first generation) and meio-G2 (the second generation). We evaluated the efficacy of artificial meiotic gynogenesis for producing pure inbred lines by quantifying the homozygosity and genetic similarity of meio-G1 and meio-G2 using microsatellite markers. The average homozygosity among 15 loci was 0.124 7 for meio-G1 and 0.221 5 for meio-G2, which was higher than that in the natural mating family (0.091 7). The average similarity indices among individuals within meio-G1 and meio-G2 were 0.891 7 and 0.923 8, which were higher than within the natural mating family (0.5603). The average similarity in meio-G2 was slightly higher than in meio-G1. The observed heterozygosity in meio-G1 and meio-G2 was 1 at the *Poli9-8tuf*, *Poli18tuf*, *Poli107tuf* loci, all of which were located at some distance from the centromere (i.e., had high recombination frequencies). The loci (*Poli33tuf*, *Poli24MHFS*) closest to the centromere (i.e., with a low recombination frequency) were homozygous in meio-G1 and meio-G2. Our results suggest that artificially induced meiotic gynogenesis is an efficient method for inbreeding to purify the genome, increase genetic similarity, and fix maternal genetic traits in the Japanese flounder. The meiogynogenetic families cultured in our study may be used in further selective breeding research.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; successive meiotic gynogenesis; genetic similarity; homozygosity

Corresponding author: LIU Haijin. Tel: +86 10-68671004, E-mail: liuhaijin2005@126.com