

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.20186

黄姑鱼异质雌核发育子代的遗传分析

谢仰杰¹, 杨育凯², 王志勇^{1,3}, 蔡明夷¹, 翁朝红¹

1. 集美大学水产学院, 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;
2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266200

摘要: 为了解黄姑鱼(*Nibea albiflora*)异质雌核发育子代的基因纯合情况, 利用微卫星标记(SSR)和扩增片段长度多态性标记(AFLP)对黄姑鱼异质雌核发育家系进行遗传鉴定和分析。结果显示: (1)雌核发育家系在4个SSR位点和5对AFLP引物组合扩增出的位点均未发现父本特异性等位条带, 表明雌核发育体比率为100%。(2)用于遗传分析的7个SSR位点在雌核发育家系和正常交配家系中均未见完全纯合的情况, 雌核发育家系7个SSR位点的平均纯合度为0.382, 是正常交配家系(0.161)的2.37倍。雌核发育家系各个体的纯合位点数为0~6个, 纯合位点所占比例为0~85.7%。(3)5对AFLP引物共扩增出182条清晰的扩增条带, 其中有21条父本特异性条带和16条母本特异性条带。16条母本特异性条带中有7个条带在雌核发育家系中显著偏分离($P < 0.05$)。雌核发育家系和正常交配家系多态性条带比例分别为14.7%和20.3%。(4)雌核发育家系与母本的遗传相似度高于与正常交配家系的遗传相似度, 正常交配家系同父本和母本的遗传距离大致相同。研究结果表明, 黄姑鱼异质雌核发育二倍体家系的遗传纯合度显著高于正常交配家系, 人工诱导雌核发育是促进基因纯合的一个有效途径, 它不仅加速有利基因的纯合固定, 还可以加速有害基因的淘汰, 从而有效提高育种效率。

关键词: 黄姑鱼; 雌核发育; 遗传分析; 基因纯合度

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)11-1285-10

黄姑鱼[*Nibea albiflora* (Richardson)]属硬骨鱼纲(Osteichthyes)鲈形目(Perciformes)石首鱼科(Sciaenidae)黄姑鱼属(*Nibea*), 是中国重要海洋经济鱼类。黄姑鱼的生态习性与大黄鱼(*Larimichthys crocea*)相似, 但严重影响大黄鱼养殖成活率的三大疾病, 即刺激隐核虫引起的体表白点病^[1]、变形假单胞菌引起的内脏白点病^[2]和某种虹彩病毒引起的白鳃病^[3], 对黄姑鱼则基本没有影响, 而且黄姑鱼价格比普通养殖大黄鱼高, 已成为中国福建、浙江沿海近年发展较快的新兴养殖种类。

人工诱导雌核发育(gynogenesis)是水产动物遗传育种的一项重要技术, 是一种染色体操作技术^[4-7]。人工诱导雌核发育不仅可用于控制养殖群

体的性别, 同时也是快速获得纯系或近交系的有效途径, 能大大缩短动物的育种年限, 在许多鱼类的遗传育种中已取得显著成效^[7-12]。

杨育凯等对黄姑鱼雌核发育的诱导条件进行了研究^[13], 对黄姑鱼雌核发育子代的胚胎发育和早期生长进行了观察^[14]。在此基础上, 本研究利用微卫星标记(SSR)和限制性片段长度多态性标记(AFLP)对人工诱导的黄姑鱼异质雌核发育二倍体家系(以下简称雌核发育家系)进行遗传分析, 观察这些分子标记在雌核发育子代的分离情况, 以了解黄姑鱼异质雌核发育子代的基因纯合效果, 为黄姑鱼雌核发育技术应用于遗传育种提供理论依据。

收稿日期: 2020-06-23; 修订日期: 2020-07-21.

基金项目: 福建省高校产学研合作项目(2018N5010; 2014N5011).

作者简介: 谢仰杰(1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向为鱼类增养殖和遗传育种. E-mail: yjxie@jmu.edu.cn

通信作者: 王志勇, 教授, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: zywang@jmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料来源

人工雌核发育二倍体的诱导方法参见此前的报道^[13],按诱导效果最好的诱导条件进行异质(即减数分裂型)雌核发育二倍体的诱导。简言之,挑选网箱养殖 2 龄以上、性腺发育良好的黄姑鱼亲鱼,利用 LRH-A₃ 进行人工催产。精液经 Hank's 液稀释(精液与 Hank's 液的比例为 1:4)后,在 3800 $\mu\text{W}/(\text{cm}^2\cdot\text{s})$ 紫外线下照射 60 s,然后与卵子进行干法人工授精,授精后 2 min 开始冷休克处理,冷休克水温为 3~4 $^{\circ}\text{C}$,冷休克持续时间为 10 min。冷休克后于(24 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 水温的海水中孵化,盐度 26~27。正常交配家系的亲本与雌核发育家系的亲本相同,精液不经过紫外线照射,受精卵不经过冷休克。取亲本胸鳍、雌核发育家系和正常交配家系的初孵仔鱼各 100 尾固定于 95%乙

醇中,用于提取 DNA。

1.2 基因组 DNA 提取

亲本 DNA 采用上海捷瑞生物工程有限公司的组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)提取,初孵仔鱼(全鱼)的基因组 DNA 采用传统的苯酚-氯仿法提取^[13]。

通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测提取的 DNA 质量,用核酸蛋白分析仪测定 DNA 浓度。将 DNA 浓度用灭菌双蒸水调至 25 ng/ μL ,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

1.3 微卫星标记分析

共使用 60 对本实验室开发的 SSR 引物进行引物筛选,筛选出 8 对在黄姑鱼双亲都能良好扩增、且等位基因存在明显差异的引物用于遗传分析,其中 4 对在母本杂合且与父本(供精雄鱼)无相等等位基因,可用于雌核发育鉴定。引物序列特征和退火温度见表 1。

表 1 SSR 位点的引物序列和特征

Tab. 1 Primer sequences and characteristics of SSR loci

位点 locus	核心序列 core sequence	引物序列(5'-3') primer sequence	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ annealing temperature
LYC0012	(AC) ₇	F: CAGAACAAACAATGAATGGG R: GAGGAGCTCAACAGCAACA	55
LYC0017	(TG) ₇	F: CTACCAAGGCCAACCATCG R: GAGCACACTATAACAGAAAAGC	TD55-50
LYC0032	(CA) ₄ (TG) ₃ (AC) ₃ (CA) ₂ (AC) ₅	F: GGGAGAAGCAGCAGGACA R: GAAACAAGAGCACTGAGAGCC	50
LYC0066	(AG) ₁₀ (GT) ₁₀ T(TG) ₅	F: TTACATGGGCAGCCTGAG R: ATGACGCAGCAGAATGG	53
LYC0200	(AC) ₁₆	F: GAGATGAGGGATAAGTGC R: ATAGTTCCATTAGGATACA	55
LYC0231	(CA) ₁₁	F: GGCGAGATGAAAATGAAA R: TCACTGTCTGCCTGCTT	55
LYC0260	(AC) ₃₂	F: TGAGCGATAAACTGTGGT R: GTTGTATTCTGCGTTTG	51
LYC0267	(GT) ₁₃	F: CAGGGCACAGGATGAAAC R: AATAACAAACAACAGAGGG	48

注: TD 表示梯度 PCR (-1 $^{\circ}\text{C}/\text{cycle}$).

Note: TD indicates gradient PCR process (-1 $^{\circ}\text{C}/\text{cycle}$).

本研究参照 Oetting 等^[15]的方法,在 M13 通用引物序列(5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') 5'端添加荧光素 HEX 作为通用荧光引物,并在每个微卫星位点的上游引物 5'端加上上述 M13 通用引物序列作为过渡引物,下游引物不作任何改变。微卫星标记 PCR 反应体系及反应程序参照武祥伟等的报道^[16],此处从略。扩增产物在

Gel-Scan 3000 (CorbeResearch)上用 5%变性聚丙烯酰胺凝胶进行分离和检测。

1.4 AFLP 分析

按照标准的 AFLP 反应程序进行基因组 DNA 酶切、接头连接、预扩增反应^[17],选择性扩增采用本实验室建立的 fAFLP 方法^[18],即在 5'端加荧光素 HEX 标记的荧光引物进行扩增,扩增产物在

Gel-Scan 3000(CorbeResearch)上用 5%变性聚丙烯酰胺凝胶进行分离和检测。首先用 36 对选择性引物(E-primer 和 M-primer 各 6 条)对雌雄亲本 DNA 进行扩增, 从中筛选出 5 对在亲本中特异性条带多的引物用于子代分析。

1.5 数据统计和分析

1.5.1 微卫星标记分析 将各座位的等位基因按其迁移速度从慢到快依次定义为 A、B、C、D。正常交配家系的预测基因型比例和期望杂合度参照刘贤德等^[19]的方法进行计算, 采用 χ^2 测验检验亲本基因在正常交配家系仔鱼中的分离是否符合孟德尔遗传定律。对于雌核发育家系, 根据 Li 等^[20]的方法计算标记-着丝粒遗传距离, 并按照纯合体比例 1:1 的期望值进行 χ^2 测验。将微卫星基因型数据输入 Popgen32 计算出亲本与雌核发育子代、正常交配子代之间的相似系数(Lynch^[21])和遗传距离(Nei 等^[22]), 并根据遗传距离用 MEGA 6 构建聚类分析图^[23]。

观测杂合度 $H_o = \text{杂合子观察数} / \text{观察总个体数}$
 纯合度 $H = 1 - H_o$

相似系数 $S_{ij} = \frac{2N_{ij}}{(N_i + N_j)} \times 100\%$

遗传距离 $D = -\ln S_{ij}$

式中, N_{ij} 为个体 i 和个体 j 共有的片段数量, N_i 、 N_j 分别为个体 i 与个体 j 各自具有的片段数量。

1.5.2 AFLP 分析 AFLP 为显性标记, 因此将有扩增带视为显性表型, 无扩增带视为隐性表型。有条带记为 1, 无条带记 0, 将 AFLP 指纹图谱转换成 1 和 0 构成的数字矩阵。在 Microsoft Excel 中以 Wang 等^[24]编制的程序(AFLP data analyzer), 计算亲本与雌核发育子代和正常交配子代之间的相似系数和遗传距离, 并根据遗传距离用 MEGA 6 构建聚类分析图^[23]。多态性比例的计算公式如下:

$$\text{多态性比例} = \frac{\text{多态条带数量}}{\text{检出条带总数}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 SSR 遗传分析

2.1.1 雌核发育的鉴定 利用筛选出的 SSR 引物对雌核发育家系和正常交配家系各 40 个个体的基因组 DNA 进行扩增和电泳检测, 其中 *LYC0032*、*LYC0200*、*LYC0231* 和 *LYC0267* 等 4 对引物的扩增图谱在父本和母本没有相同的条带, 所有雌核发育子代的基因组 DNA 的扩增图谱上均未发现与父本(供精雄鱼)相同的条带, 表明雌核发育体比率为 100% (图 1)。

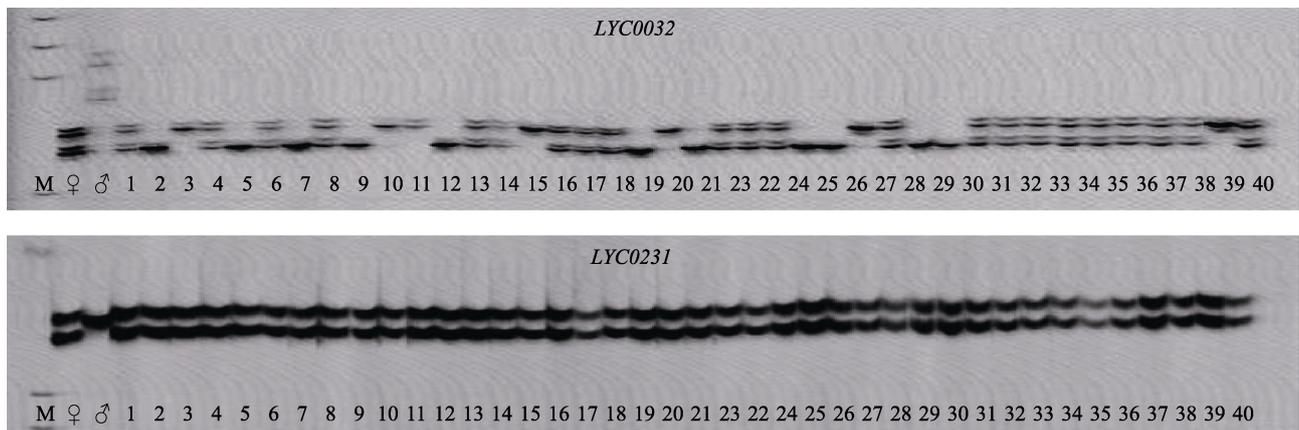


图 1 黄姑鱼雌核发育家系在 *LYC0032* 和 *LYC0231* SSR 位点的扩增结果

M: marker; ♀: 母本; ♂: 父本; 1~40: 雌核发育个体。

Fig. 1 Results of amplification of *LYC0032* and *LYC0231* SSR loci in gynogenetic family of yellow drum
 M: marker; ♀: female parent; ♂: male parent; 1~40: gynogenetic individual.

2.1.2 SSR 位点的纯合度分析 利用 8 对 SSR 引物对雌核发育家系和正常交配家系各 40 尾仔鱼的

基因组 DNA 进行扩增和电泳检测, 其结果是, 在 *LYC0231* 位点上两个家系所有个体的基因型全部为

杂合型, 没有发现纯合型, 该位点可能是来自基因组中的 2 个重复的纯合位点, 也可能与隐性致死基

因紧密连锁, 因此没有加入到统计结果中进行比较。其余 7 个 SSR 位点的观测与分析结果见表 2。

表 2 黄姑鱼正常交配家系和雌核发育家系 7 个微卫星位点的统计信息

Tab. 2 Statistic information of seven SSR loci in normal mating family and gynogenetic diploid family of yellow drum

位点 locus	家系 family	亲本基因型 parents genotype		子代基因型(个体数) genotype of offspring (number)				等位 基因数 K	期望 杂合度 H_e	观测 杂合度 H_o	纯合度 homozygosity	P 值 P-value	标记-着丝 粒遗传距离 D/cM
		♀	♂										
LYC0012	N	AB	AC	AA(8)	AB(10)	AC(10)	BC(12)	3	0.750	0.800	0.200	0.849	-
	G	AB	-	AB(40)				2	-	1.000	0	-	50.0
LYC0017	N	AB	AA	AA(18)	AB(22)			2	0.500	0.550	0.450	0.527	-
	G	AB	-	AA(5)	AB(32)	BB(3)		2	-	0.800	0.200	0.480	40.0
LYC0032	N	CD	AB	AC(7)	AD(8)	BC(17)	BD(8)	4	1.000	1.000	0	0.086	-
	G	CD	-	CC(7)	CD(22)	DD(11)		2	-	0.550	0.450	0.346	27.5
LYC0066	N	BC	AB	AB(8)	AC(14)	BB(8)	BC(10)	3	0.750	0.800	0.200	0.494	-
	G	BC	-	BB(8)	BC(27)	CC(5)		2	-	0.675	0.325	0.405	33.8
LYC0200	N	AB	CC	AC(17)	BC(23)			3	1.000	1.000	0	0.343	-
	G	AB	-	AA(2)	AB(33)	BB(5)		2	-	0.825	0.175	0.257	41.3
LYC0260	N	AC	BC	AB(8)	AC(8)	BC(13)	CC(11)	3	0.750	0.725	0.275	0.615	-
	G	AC	-	AA(10)	AC(12)	CC(18)		2	-	0.300	0.700	0.131	15.0
LYC0267	N	AB	CD	AC(7)	AD(12)	BC(9)	BD(12)	4	1.000	1.000	0	0.615	-
	G	AB	-	AA(12)	AB(7)	BB(21)		2	-	0.175	0.825	0.117	8.8
平均值	N	-	-	-	-	-	-	3.1	0.821	0.839	0.161	-	-
	G	-	-	-	-	-	-	2.0	-	0.618	0.382	-	30.9

注: N 表示正常交配家系; G 表示雌核发育家系, K 表示等位基因数, H_e 表示期望杂合度, H_o 表示观测杂合度, D 表示标记-着丝粒遗传距离。
Note: N indicates normal mating family; G indicates gynogenetic diploid family; K indicates number of allelic gene; H_e indicates expected heterozygosity; H_o indicates observed heterozygosity; D indicates genetic distance between locus and centromere.

各位点的纯合度分析: 两个家系均未发现在全部个体都纯合的位点。在雌核发育家系中, 7 个 SSR 位点的纯合度为 0~0.825, 平均 0.382; LYC0012 位点的纯合度最低, 全部个体均为杂合型; 纯合度最高的位点是 LYC0267, 40 个个体中有 33 个为纯合型, 纯合度为 0.825。在正常交配家系中, 7 个 SSR 位点的纯合度为 0~0.450, 平均 0.161; 其中, LYC0032、LYC0200 和 LYC0267 位点在全个体均为杂合型; 纯合度最高的位点是 LYC0017, 纯合度为 0.450。LYC0012 和 LYC0017 两位点在雌核发育家系的纯合度低于正常交配家系, 其余 5 个位点在雌核发育家系的纯合度均显著高于正常交配家系。根据雌核发育家系各 SSR 位点的观测杂合度, 计算出各位点的标记-着丝粒遗传距离为 8.8~50.0 cM (表 2)。

雌核发育家系和正常交配家系的基因纯合度

分析: 两个家系都没有发现 7 个 SSR 位点全部纯合的个体。雌核发育家系所检测的 40 尾仔鱼在 7 个 SSR 位点上共有 19 种基因型, 所有个体仅含有母本等位基因; 在正常交配家系中, 所检测的 40 尾仔鱼在 7 个 SSR 位点上共有 24 种基因型, 所有个体均同时含有双亲的等位基因, 亲本等位基因在子代的分离比符合孟德尔分离定律($P>0.05$)。7 个 SSR 位点中, 正常交配家系各个体的纯合位点数为 0~4 个, 平均 1.13 个, 纯合位点所占比例为 0~57.1%; 雌核发育家系各个体的纯合位点数为 0~6 个, 平均 2.65 个, 纯合位点所占比例为 0~85.7%, 显著高于正常交配家系(图 2)。

2.1.3 遗传相似度和遗传距离 利用 PopGen 32 计算雌核发育家系、正常交配家系与亲本间的相似系数和遗传距离(表 3)。将遗传距离数据导入 MEGA 6 软件^[23], 用 NJ (neighbor joining)法进行聚

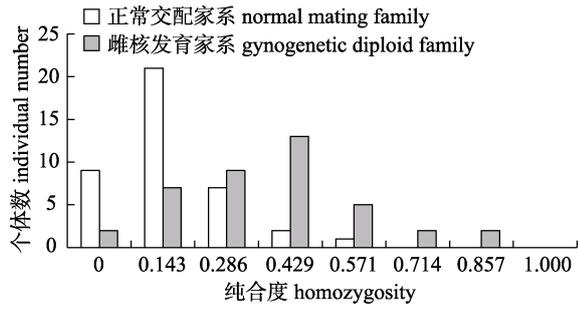


图 2 基于 SSR 标记的黄姑鱼雌核发育家系和正常交配家系个体的纯合度分布

Fig. 2 Homozygosity distribution of gynogenetic diploid family and normal mating family of yellow drum based on SSR markers

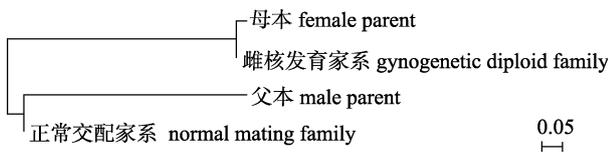


图 3 基于 SSR 标记的 2 个家系与亲本间的聚类关系图

Fig. 3 Clustering diagram of two families and their parents based on SSR markers

表 3 基于 SSR 标记的雌核发育家系、正常交配家系与亲本间的相似系数(上三角)和遗传距离(下三角)

Tab. 3 Similarity coefficient (upper) and genetic distance (lower) between gynogenetic diploid family, normal mating family and their parents based on SSR markers

类别 category	母本 female parent	父本 male parent	雌核发育家系 gynogenetic diploid family	正常交配家系 normal mating family
母本 female parent	-	0.315	0.992	0.778
父本 male parent	1.156	-	0.336	0.830
雌核发育家系 gynogenetic diploid family	0.008	1.091	-	0.788
正常交配家系 normal mating family	0.254	0.186	0.238	-

表 4 5 对 AFLP 选择性扩增引物在两家系的扩增结果

Tab. 4 Amplification results of five pairs of AFLP selective amplification primers in both families

引物 primer	父本特有条带 paternal specific band	母本特有条带 maternal specific band	共有条带 common band	非亲条带 non-parent's band	总计 total
E-ACC/M-CAG	5	4	28	1	38
E-AAC/M-CAA	3	5	34	0	42
E-AAG/M-CAA	6	3	30	0	39
E-AAG/M-CTA	4	2	22	1	29
E-AGA/M-CTA	3	2	29	0	34
总计 total	21	16	143	2	182

表 5 两个家系的 AFLP 多态性

Tab. 5 AFLP polymorphisms in both families

家系 family	单态条带数 monomorphic band	多态条带数 polymorphic band	非亲条带数 non-parent's band	条带总数 total	多态性比例/% polymorphism percentage
雌核发育家系 gynogenetic diploid family	137	24	2	163	14.7
正常交配家系 normal mating family	145	37	0	182	20.3

类分析, 做出树形图(图 3)。结果显示, 雌核发育家系与母本的相似系数最高, 与父本(供精雄鱼)的相似系数低; 而正常交配家系与父本、母本和雌核发育家系的遗传相似度均相近。

2.2 AFLP 分析结果

2.2.1 AFLP 多态性分析 利用 5 对选择性扩增引物对雌核发育家系(24 尾仔鱼)和正常交配家系(22 尾仔鱼)及雌、雄亲本的基因组 DNA 进行扩增, 共得到 182 条清晰的扩增条带。其中, 母本特异性条带 16 条, 占总条带的 8.8%; 父本特异性条带 21 条, 占总条带的 11.5%; 非亲条带 2 条, 占总条带的 1.1% (表 4)。雌核发育家系和正常交配家系多态性条带比例分别为 14.7%和 20.3% (表 5)。图 4 为选择性扩增引物 E-AAG/M-CTA 在雌核发育家系和正常交配家系的 AFLP 扩增图谱。

21 条父本特异性条带在雌核发育家系中均未出现, 表明全部个体均为雌核发育体。这些条带

在正常交配家系中均有出现,其中有 8 条在正常交配家系个体中全部出现,说明父本中这 8 个位点是纯合位点。剩余 13 条父本特异性条带在正常交配家系个体中表现分离,其中 9 条分离比符合孟德尔分离定律,4 条呈显著偏分离($P < 0.05$)。

16 条母本特异性条带中,6 个条带出现于雌核发育家系和正常交配家系的全部子代个体,说明母本中这些条带所在位点是纯合位点。余下 10 个条带只出现在部分后代个体,为杂合位点;其中有 3 个条带在两家系子代中的显隐性比接近 1 : 1,其余 7 个条带在雌核发育家系中表现显著

偏离 1 : 1($P < 0.05$),其中 2 个偏分离的条带出现在全部雌核发育家系个体(图 4)。

2.2.2 家系间的遗传相似度和遗传距离 根据 AFLP 电泳图谱,计算出雌核发育家系、正常交配家系与亲本间的相似系数和遗传距离(表 6),再利用 MEGA 6 软件^[23],使用 NJ 法作出聚类关系图(图 5)。其结果与 SSR 的分析结果相似,雌核发育家系与母本的相似系数最高(0.966),与父本(供精雄鱼)的相似系数最低(0.862);正常交配家系与父本、母本和雌核发育家系的相似系数相近,分别为 0.931、0.920 和 0.907。

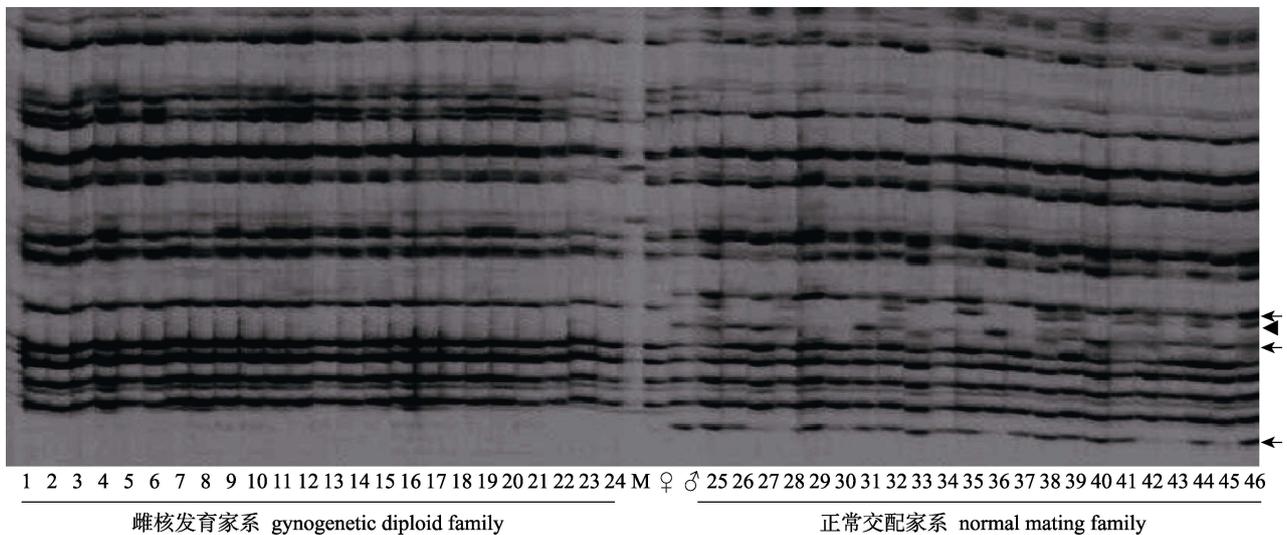


图 4 引物 E-AAG/M-CTA 扩增条带(部分)
 ←表示父本特有条带; ▲表示母本特有条带,该条带可能与致死基因连锁。

Fig. 4 Banding pattern amplified by primer combination E-AAG/M-CTA (partial)
 ← shows paternal specific bands; ▲ shows maternal specific band, this band might link to lethal gene.

表 6 基于 AFLP 标记的雌核发育家系、正常交配家系与亲本间的相似系数(上三角)和遗传距离(下三角)
 Tab. 6 Similarity coefficient (upper) and genetic distance (lower) between gynogenetic diploid family, normal mating family and their parents based on AFLP markers

类别 category	母本 female parent	父本 male parent	雌核发育家系 gynogenetic diploid family	正常交配家系 normal mating family
母本 female parent	—	0.885	0.966	0.920
父本 male parent	0.123	—	0.862	0.931
雌核发育家系 gynogenetic diploid family	0.035	0.149	—	0.907
正常交配家系 normal mating family	0.083	0.072	0.097	—

3 讨论

3.1 雌核发育的遗传鉴定

人工诱导雌核发育有很多方法,但都要通过

两个关键步骤:一是精子的遗传失活,二是卵子的二倍化。在人工诱导鱼类雌核发育过程中,如果精子的遗传物质失活不彻底,就会发育成普通的精卵结合的二倍体^[25-28]。因此,在人工诱导雌

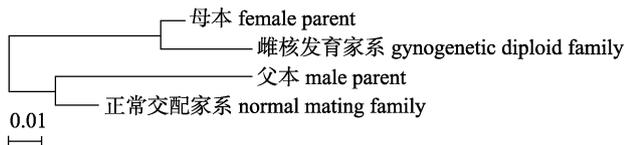


图 5 基于 AFLP 标记的 2 个家系与亲本间的聚类关系图
Fig. 5 Clustering diagram of two families and their parents based on AFLP markers

核发育工作中,有必要对雌核发育的真实性进行确认。本研究利用 4 对 SSR 引物和 5 对 AFLP 选择性扩增引物对黄姑鱼雌核发育家系的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,所有个体均未发现父本(供精雄鱼)特有条带,证明本研究诱导的雌核发育家系中全部个体是雌核发育体。

SSR 和 AFLP 标记均适于进行雌核发育的遗传鉴定,但 SSR 标记需要根据不同的亲本筛选具有父本特异性的 SSR 标记,而 AFLP 标记因为检出的位点数多,一般不需要进行特定引物的筛选。

3.2 异质雌核发育的基因纯合效果

理论上,有丝分裂型雌核发育二倍体其基因纯合率可达到 100%,减数分裂型雌核发育(异质雌核发育)二倍体由于卵母细胞第一次减数分裂时同源染色体间会发生重组,基因的纯合率会受到影响,但相对于正常交配的二倍体而言,其基因纯合率能显著提升^[26, 29-31]。本研究通过抑制第二极体排放获得的黄姑鱼雌核发育家系的 SSR 位点的纯合度显著高于正常交配家系,雌核发育家系的 7 个微卫星位点的平均纯合度为 0.382,是正常交配家系(0.161)的 2.37 倍(表 2,图 2)。利用 5 对选择性扩增引物对雌核发育家系和正常交配家系的基因组 DNA 进行扩增,雌核发育家系和正常交配家系多态性条带比例分别为 14.7%和 20.3%(表 5),也表明雌核发育后代的基因纯合率显著提升。

根据 SSR 分析结果,黄姑鱼雌核发育家系的基因纯合度显著高于正常交配家系,但基因纯合度依然较低,平均为 0.382,而且雌核发育家系在 *LYC0012* 和 *LYC0017* 位点的纯合度反而低于正常交配家系,其中 *LYC0012* 位点的纯合度为 0(表 2)。这种现象在其他研究中也有诸多报道^[32-35]。造成这种现象的原因主要有两个方面:(1)卵母细胞第一次减数分裂期间同源染色体之间会发生重组交换。交换率与基因座在染色体上的位置有关,距

离着丝粒越远的位点重组率越高^[20, 36-38]。本研究中,所分析的 7 个微卫星位点的交换率为 17.5%~100%(表 2,交换率=观测杂合度×100%),平均 61.8%,说明黄姑鱼卵母细胞在第一次减数分裂期间的染色体重组互换的程度很高。(2)人为原因。SSR 标记经过人为筛选,剔除了母本纯合的位点,只检测母本杂合位点。而异质雌核发育的基因纯合度包括母本纯合基因的保持及母本杂合基因的分离两个方面。因此,剔除母本纯合基因后分析所得的纯合度必然偏低。

由于卵母细胞在第一次减数分裂期间同源染色体之间会发生交换,距离着丝点越远的基因位点,利用异质雌核发育进行基因纯化的效果越差,仅经过一两代异质雌核发育难以使那些远离着丝粒的杂合基因座纯合,要使这些座位纯合,必须通过连续多代异质雌核发育或诱导同质雌核发育来实现。诱导有丝分裂型雌核发育二倍体可以使个体的基因型纯合率达到 100%,但技术难度较高。利用分子标记辅助选择从异质雌核发育群体及其人工转性群体中挑选基因型相同且纯合度高的个体进行交配,也可以在较短时间内建立高纯品系^[9, 39-41]。

3.3 利用 SSR 和 AFLP 标记对雌核发育子代进行遗传分析的比较

利用 SSR 和 AFLP 标记分析雌核发育家系、正常交配家系与其亲本的遗传相似度和遗传距离,所作出的聚类关系图相似,但总体上根据 AFLP 标记所获得的遗传相似系数的数值高于根据 SSR 所获得的数值。这主要是因为 SSR 标记是经过人为筛选的,只有母本杂合且区别于父本的 SSR 位点被采用;而 AFLP 标记位点数多,分布均匀,没有人为地剔除母本纯合的基因位点,后代中基因型相同位点的比例必然提高。因此,根据 AFLP 数据统计获得的遗传距离应更接近于真实情况。

SSR 标记是一种共显性标记,在雌核发育的遗传鉴定和纯合性评价方面具有优势,但 SSR 标记需要根据亲本的不同进行筛选,且单个位点包含的信息量偏少,要对群体进行遗传分析时,常需要检测大量标记,工作量较大。AFLP 标记是一种显性标记,难以区分显性纯合体和杂合体,不

适于进行基因纯合度分析,但是可以获得大量遗传信息,既有变异的信息又有保守的信息,更适于群体遗传分析。

当前,二代和三代测序技术已取得长足进步,成本也大幅度下降,但用来进行雌核发育鉴定成本还是偏高,而且技术复杂,环节众多,并且区分来自父本和母本的等位基因比较困难,因此,SSR 和 AFLP 技术还是必要的。

综上所述,本研究同时采用 SSR 和 AFLP 两种分子标记对黄姑鱼异质雌核发育家系和正常交配家系进行遗传分析,均证明本研究的雌核发育体比例达 100%;雌核发育家系的基因纯合度显著高于正常交配家系,但基因纯合率仍然较低,说明黄姑鱼卵母细胞在第一次减数分裂期间同源染色体间的重组交换率较高。虽然如此,人工诱导雌核发育仍然是促进基因纯合的一个有效途径,它不仅可以加速有利基因的纯合固定,还可以加速有害基因的淘汰,从而有效提高育种效率,加快育种进程。

参考文献:

- [1] Xu X J, Sang B H, Qin Y X, et al. Detecting macrophage migration inhibitory factor in tissues of *Larimichthys crocea* with *Cryptocaryon irritans* disease[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(6): 1227-1233. [徐晓津, 桑本红, 覃映雪, 等. 大黄鱼刺激隐核虫病组织中巨噬细胞移动抑制因子的检测分析[J]. 中国水产科学, 2015, 22(6): 1227-1233.]
- [2] Hu J, Zhang F, Xu X J, et al. Isolation, identification and virulence of the pathogen of white-spots disease in internal organs of *Pseudosciaena crocea*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2014, 45(2): 409-417. [胡娇, 张飞, 徐晓津, 等. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)内脏白点病病原分离鉴定及致病性研究[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(2): 409-417.]
- [3] Yang X Q. PCR detection of cage cultured large yellow croaker Iridovirus in the Luoyuan bay, Fujian province[J]. Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2013, 35(2): 5-8. [杨小强. 罗源湾养殖大黄鱼虹彩病毒的 PCR 检测[J]. 福建畜牧兽医, 2013, 35(2): 5-8.]
- [4] Dunham R A. Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches[M]. 2nd Edition. Cambridge, USA: CABI, 2011: 47-57.
- [5] Lou Y D. Fish Breeding[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2009: 153. [楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 153.]
- [6] Chen R Y, Lou B, Xu D D, et al. Induction of meiotic gynogenesis in yellow drum (*Nibea albiflora*, Sciaenidae) using heterologous sperm and evidence for female homogametic sex determination[J]. Aquaculture, 2017, 479: 667-674.
- [7] Liu H J, Hou J L, Liu Y. Gynogenesis in Japanese flounder: A review[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(4): 902-912. [刘海金, 侯吉伦, 刘奕. 牙鲆雌核发育研究进展[J]. 中国水产科学, 2017, 24(4): 902-912.]
- [8] Peruzzi S, Chatain B, Saillant E, et al. Production of meiotic gynogenetic and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. 1. Performances, maturation and carcass quality[J]. Aquaculture, 2004, 230(1-4): 41-64.
- [9] Wu Q J, Chen R D, Ye Y Z, et al. Investigation on the carp gynogenesis with reference to establishing a pure line[J]. Acta Genetica Sinica, 1981, 8(1): 50-55, 98. [吴清江, 陈荣德, 叶玉珍, 等. 鲤鱼人工雌核发育及其作为建立近交系新途径的研究[J]. 遗传学报, 1981, 8(1): 50-55, 98.]
- [10] Chen S L, Tian Y S, Yang J F, et al. Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Marine Biotechnology, 2009, 11(2): 243-251.
- [11] Wu C, Huang X, Hu F Z, et al. Production of diploid gynogenetic grass carp and triploid hybrids derived from the distant hybridization of female grass carp and male topmouth *Culter* [J]. Aquaculture, 2019, 504: 462-470.
- [12] Xu K, Duan W, Xiao J, et al. Development and application of biological technologies in fish genetic breeding[J]. Scientia Sinica Vitae, 2015, 58(2): 187-201. [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.]
- [13] Yang Y K, Xie Y J, Cai M Y, et al. Induction and identification of gynogenesis in *Nibea albiflora* [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(9): 1297-1303. [杨育凯, 谢仰杰, 蔡明夷, 等. 黄姑鱼雌核发育诱导及鉴定[J]. 水产学报, 2013, 37(9): 1297-1303.]
- [14] Yang Y K, Jian L J, Wang Z Y, et al. Comparison of embryonic development and early growth in normal and gynogenetic diploid of yellow drum *Nibea albiflora*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(5): 690-697. [杨育凯, 简林江, 王志勇, 等. 黄姑鱼正常二倍体和雌核发育体胚胎发育及早期生长的比较研究[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(5): 690-697.]
- [15] Oetting W S, Lee H K, Flanders D J, et al. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers[J]. Genomics, 1995, 30(3): 450-458.
- [16] Wu X W, Liu X D, Wang Z Y. Condition exploration and optimization for fSSR system and its application in large yellow croaker *Larimichthys crocea* for parentage assignment[J]. Marine Science Bulletin, 2011, 30(4): 419-424. [武

- 祥伟, 刘贤德, 王志勇. fSSR 分析技术的建立及在大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 亲子鉴定中的应用[J]. 海洋通报, 2011, 30(4): 419-424.]
- [17] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [18] Yang J, Wu X W, Liu X D, et al. Exploration of fAFLP method in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2013, 18(1): 1-7. [杨洁, 武祥伟, 刘贤德, 等. 大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) fAFLP 方法的建立[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2013, 18(1): 1-7.]
- [19] Liu X D, Wei X J, Cai M Y, et al. The segregation patterns of 22 microsatellite markers in an F₁ family of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and correlation analysis with growth-related traits[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(9): 1322-1330. [刘贤德, 韦信键, 蔡明夷, 等. 大黄鱼 22 个微卫星标记在 F₁ 家系中的分离方式及与生长性状的相关分析[J]. 水产学报, 2012, 36(9): 1322-1330.]
- [20] Li Y Y, Cai M Y, Wang Z Y, et al. Microsatellite-centromere mapping in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) using gynogenetic diploid families[J]. Marine Biotechnology, 2008, 10(1): 83-90.
- [21] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting[J]. Molecular Biology and Evolution, 1990, 7(5): 478-484.
- [22] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(10): 5269-5273.
- [23] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [24] Wang Z Y, Ke C H, Wang Y L, et al. Genetic variations and divergence of two *Haliotis* species as revealed by AFLP analysis[J]. Journal of Shellfish Research, 2004, 23: 1147-1151.
- [25] Wang X Q, Wang Z Y, Liu X C, et al. AFLP analysis of artificial gynogenesis in *Pseudosciaena crocea* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2007, 38(1): 22-28. [王晓清, 王志勇, 柳小春, 等. 人工雌核发育大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 的 AFLP 分析[J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(1): 22-28.]
- [26] Wang X Q, Wang Z Y, Liu X C, et al. Microsatellite marker analysis of gynogenesis by artificial induction in *Pseudosciaena crocea* [J]. Hereditas, 2006, 28(7): 831-837. [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.]
- [27] Wu Q M, Cai M Y, Liu X D, et al. Induction and microsatellite analysis of homozygous gynogenesis in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* [J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(5): 734-741. [吴清明, 蔡明夷, 刘贤德, 等. 大黄鱼同质雌核发育的诱导及微卫星标记分析[J]. 水产学报, 2009, 33(5): 734-741.]
- [28] Wang C L, Zheng G D, Chen J, et al. Fingerprint recognition and microsatellite genetic analysis of different populations in gynogenetic grass carp [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(6): 1135-1143. [王成龙, 郑国栋, 陈杰, 等. 草鱼雌核发育后代不同群体的微卫星遗传分析及指纹识别[J]. 水生生物学报, 2016, 40(6): 1135-1143.]
- [29] Tian Y S, Duan H M, Li X K, et al. Growth and genetic analysis among three homologous inbred strains of *Paralichthys olivaceus* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(1): 11-21. [田永胜, 段会敏, 李祥孔, 等. 牙鲆三个同源纯系的生长和遗传性状比较[J]. 中国水产科学, 2017, 24(1): 11-21.]
- [30] Zhu S R, Meng Q L, An L, et al. Microsatellite genetic analysis of gynogenetic grass carp group and two common grass carp groups [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(6): 1236-1244. [朱树人, 孟庆磊, 安丽, 等. 雌核发育草鱼群体及两个普通草鱼群体的微卫星遗传分析[J]. 中国水产科学, 2018, 25(6): 1236-1244.]
- [31] Wang C L, Zheng G D, Chen J, et al. Microsatellite genetic analysis of ENU mutagenesis grass carp and gynogenesis offspring group [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(5): 1013-1019. [王成龙, 郑国栋, 陈杰, 等. ENU 诱变草鱼及其雌核发育后代的微卫星遗传分析[J]. 中国水产科学, 2017, 24(5): 1013-1019.]
- [32] Ye X J, Wang Z Y, Liu X D, et al. Analysis of genetic homozygosity and diversity of two successive generation meio-gynogenetic population in *Pseudosciaena crocea* using microsatellite markers [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 144-151. [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.]
- [33] Sun X W, Zhang Y, Ji X, et al. The genotyping of progenies from two kinds gynogenetic techniques of two fish species [J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(4): 545-551. [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): 545-551.]
- [34] Yan X C, Zhang Y, Sun X W, et al. Heterozygosity in gynogenetic filial generation of common carp [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(1): 47-53. [闫学春, 张研, 孙效文, 等. 鲤雌核发育子代基因的杂合度分析[J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 47-53.]
- [35] Taniguchi N, Seki S, Fukai J J, et al. Induction of two types of gynogenetic diploids, by hydrostatic pressure shock and verification by genetic marker in Ayu [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1988, 54(9): 1483-1491.
- [36] Peruzzi S, Chatain B. Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass,

- Dicentrarchus labrax* L. : Relative efficiency of methods and parental variability[J]. *Aquaculture*, 2000, 189(1-2): 23-37.
- [37] 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(1-4): 93-102.
- [38] Zhu X C, Liu H J, Sun X W, et al. Assessment of homozygosity in gynogenetic diploid using microsatellite markers in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Zoological Research*, 2006, 27(1): 63-67. [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.]
- [39] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*)[J]. *Nature*, 1981, 291(5813): 293-296.
- [40] Wang G X, Zhang X Y, Sun Z H, et al. Genetic analysis of four generations of a successive meiotogynogenetic population in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(6): 48-55. [王桂兴, 张晓彦, 孙朝徽, 等. 牙鲆连续四代减数分裂雌核发育家系的遗传特征分析[J]. *渔业科学进展*, 2019, 40(6): 48-55.]
- [41] Liu J X, Zhou L, Zhao Z S, et al. Studies on microsatellite markers of four artificially gynogenetic families in ornamental carp[J]. *Zoological Research*, 2002, 23(2): 97-105. [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.]

Genetic analysis of yellow drum *Nibea albiflora* meiotic gynogens

XIE Yangjie¹, YANG Yukai², WANG Zhiyong^{1,3}, CAI Mingyi¹, WENG Zhaohong¹

1. Fisheries College, Jimei University, Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xiamen 361021, China;
2. Key Laboratory of South China Sea Fishery Research Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266200, China

Abstract: The yellow drum (*Nibea albiflora*) is an important marine fish and has been cultured widely in South-east China in recent years. To understand the gene homozygosity of meiotic gynogens of yellow drum, microsatellite markers (SSR) and amplified fragments length polymorphism (AFLP) markers were applied to identify gynogenetic diploid offspring and genetic analyze. The results showed: (1) no paternal specific alleles were found in all 4 SSR loci or amplification loci from five pairs of AFLP selective primers in the gynogenetic diploid family, indicating that all individuals in the gynogenetic diploid family were gynogens; (2) no completely homozygous loci were found in seven SSR loci in either gynogenetic diploid family or normal mating family. The average homozygosity of the gynogenetic diploid family was 0.382, 2.37 times that of the normal mating family (0.161). Homozygous loci in gynogenesis individuals was during 0–6, with their homozygous ratio of 0–85.7%, whereas the homozygous loci in normal individuals was during 0–4, with their homozygous ratio of 0–57.1%; (3) 182 clear bands were amplified from five pairs of AFLP selective primers, of which there were 21 paternal and 16 maternal specific bands. Among the 16 maternal specific bands, ten bands were heterozygous loci, and seven loci in the gynogenetic diploid family showed significant partial separation ($P < 0.05$). The percentage of polymorphic bands in the gynogenetic and normal mating families were 14.7% and 20.3%, respectively; (4) based on SSR and AFLP markers, the gynogenetic diploid family had a higher genetic similarity to female parents than to the normal mating family, whereas the normal mating family had approximately the same genetic distance to both parents. The results showed that the genetic homozygosity of the meiotic gynogenetic diploid family was significantly higher than that of the normal mating family, and artificial induction of gynogenetic development is an effective way to promote gene homozygosity, since it can accelerate favorable homozygous gene fixation, and also accelerate harmful gene elimination; thus, effectively improve breeding efficiency.

Key words: *Nibea albiflora*; yellow drum; genetic analysis; gene homozygosity

Corresponding author: WANG Zhiyong. E-mail: zywang@jmu.edu.cn