

微卫星评价栉孔扇贝雌核发育二倍体纯合性

杨凤影^{1,2}, 杨爱国¹, 刘志鸿¹, 周丽青¹

(1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 辽宁医学院 动物科学技术学院, 辽宁 锦州 121001)

摘要: 采用筛选获得的 5 对多态性微卫星引物对栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 减数分裂雌核发育家系 A 和家系 B、有丝分裂雌核发育家系 A 和家系 B 各 30 个个体、双亲及对照组 40 个个体进行了遗传变异分析, 并对减数分裂和有丝分裂雌核发育后代的纯合性进行了比较。电泳结果表明, 5 对微卫星引物在减数分裂雌核发育和有丝分裂雌核发育个体中均能稳定重复地扩增出相应的序列; 各雌核发育家系中均有部分个体出现父本基因, 表明精子遗传物质失活不彻底, 雌核发育组中存在正常受精个体; 有丝分裂雌核发育二倍体在所有检测位点全部纯合, 减数分裂雌核发育二倍体在部分位点纯合, 但未发现在所有位点全部纯合的个体, 在 CFMSP007、CFMSP075、CFMSM009、CFMSM014 和 CFMSM020 位点, 杂合子比例分别为 0.340 0、0.361 1、0.488 4、0.475 0 和 0.750 0, 平均杂合子比例为 0.482 9。研究结果显示, 栉孔扇贝有丝分裂雌核发育二倍体均为纯合子, 如精子的灭活率达到 100%, 有丝分裂雌核发育二倍体一代即可实现纯合, 如再进行一次减数雌核发育即可建立纯系; 减数分裂雌核发育二倍体由于具有较高的重组率, 其与母本的遗传同质性较高。[中国水产科学, 2008, 15 (1): 55–62]

关键词: 栉孔扇贝; 雌核发育; 微卫星; 纯合性

中图分类号: Q959.215

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)01-0055-08

人工诱导雌核发育是指通过用物理、化学或生物学方法使精子遗传失活, 与正常卵子“受精”, 再通过抑制极体释放或第一次卵裂使单倍性胚胎的染色体加倍。贝类雌核发育可分为减数分裂型雌核发育 (Meiotic-G2N) 和有丝分裂型雌核发育 (Mitotic-G2N) 两种类型。其中减数分裂型仅为部分纯合, 要经过多代连续雌核发育才可能建立纯合度较高的品系; 而有丝分裂型由于通过阻止第一次卵裂, 可在当代产生纯合二倍体, 下一代如重复雌核发育即可以产生克隆种群^[1]。克隆种群的形成, 使过去需要几十年、几百年才能完成的纯系培养, 以及理论上需要无数次兄妹交配才能完成的完全纯系培育在几年内就可以实现^[2]。因此, 人工雌核发育对于快速准确的选育贝类优良品种具有十分重要的意义。

微卫星 DNA 标记 (Microsatellite DNA markers) 由于具有高度多态性、基因组中含量丰富、随机分布等特点, 可用于检测同源精子诱导的雌核发

育后代是否有父方基因表达及其与母本的遗传同质性, 微卫星 DNA 标记共显性遗传的特点也使其能够应用于雌核发育二倍体纯合性研究。迄今为止, 人们已将微卫星 DNA 标记技术应用于长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[3]、皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*)^[4] 等贝类的减数分裂雌核发育检测研究中。而采用微卫星对有丝分裂雌核发育后代纯合性的研究还仅限于如欧鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[5]、非洲鲶 (*Clarias gariepinus*)^[6]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[7] 等鱼类的研究中, 在贝类中还未见这方面的报道。本研究用微卫星 DNA 标记技术比较了抑制栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 第一次卵裂形成的有丝分裂雌核发育二倍体和抑制第二极体排出形成的减数分裂雌核发育二倍体的遗传差异, 并对两种类型雌核发育二倍体的纯合性作了评价, 以期为今后进行栉孔扇贝雌核发育诱导、纯系的建立等遗传育种的研究提供重要遗传学依据。

收稿日期: 2007-04-26; 修订日期: 2007-09-06.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30600465); 国家科技攻关项目 (2004BA526B0103).

作者简介: 杨凤影 (1980-), 女, 硕士, 主要从事贝类遗传育种研究. E-mail: fengyingy@163.com

通讯作者: 杨爱国 (1957-), 男, 研究员. Tel: 0532-85811982; E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

1 材料与方法

1.1 栉孔扇贝雌核发育家系的获得

人工诱导栉孔扇贝雌核发育实验于2006年5月在青岛志诚水产科技公司进行。挑选性腺发育饱满的栉孔扇贝雌雄亲贝各8只,阴干处理约30 min,将8只雌贝分别放入盛有过滤海水的桶内,每桶1只;8只雄贝分别放入盛有过滤海水的烧杯中,每个烧杯1只,分别标记以免混淆。待亲贝分别产卵排精后进行单对单组合实验。参照赵峰等^[8]的方法,对精子紫外线照射50 s(照射强度:800 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$)后,与卵受精。将受精卵分为3组,第1组为二倍体对照组;第2组受精卵受精35~40 min后,在60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 6-DMAP(6-二甲氨基嘌呤)中持续处理15 min,获得减数分裂雌核发育二倍体家系;第3组受精卵受精65~70 min后,在60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 6-DMAP中持续处理20 min,获得有丝分裂雌核发育二倍体家系。

1.2 样品的采集和单个幼虫的分离

取亲贝闭壳肌,置于液氮中带回实验室放于超低温冰箱(-80 $^{\circ}\text{C}$)保存。雌核发育组和正常二倍体对照组的担轮幼虫(受精后约31 h),用无水乙醇固定带回实验室于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。从所获得8个栉孔扇贝雌核发育家系中筛选幼虫固定效果最好的2个进行实验,分别命名:家系A的二倍体对

照组、减数分裂雌核发育组(以下称 Meiotic-A)、有丝分裂雌核发育组(以下称 Mitotic-A);家系B的二倍体对照组、减数分裂雌核发育组(以下称 Meiotic-B)、有丝分裂雌核发育组(以下称 Mitotic-B)。将无水乙醇中保存的担轮幼虫用TE清洗几遍后取几十个平铺于载玻片上,置于解剖镜下,用10 μL 的移液器吸取单个幼虫移入0.2 mL的PCR管内。镜检PCR管,确认管内只有一个幼虫。家系A和B的减数分裂、有丝分裂雌核发育组各挑取30个幼虫、对照组各挑取40个幼虫进行基因组DNA提取及PCR扩增。

1.3 基因组DNA的提取

亲本基因组DNA和各雌核发育家系的担轮幼虫DNA的提取参照刘广绪等^[9]方法。

1.3 PCR反应及电泳

5对微卫星引物的PCR反应体系、反应参数参照Zhan等^[10]的方法。5对微卫星引物序列、GenBank注册号、重复序列及特异退火温度见表1。反应程序于Master cycler gradient 5331型PCR仪(Eppendorf公司)上进行。扩增产物先在1.5%的琼脂糖凝胶上电泳进行预检测,然后于6%的变性聚丙烯酰胺凝胶及300V电压进行电泳分离,电泳结果银染显色。Gel-Pro Analyzer 4.5凝胶分析软件分析电泳结果。

表1 引物序列和特异退火温度
Tab.1 Sequence, linkage group and specific annealing temperature of microsatellite primers

位点 Locus	引物序列 (5' -3') Primer sequence (5' -3')	重复序列 Repeat motif	退火温度 / $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature	GenBank assession No.
CFMSP007	F: CTGACAACCTGGTCAAAC R: GCGTTATCACAAGGAGAC	(CA) ₈	50	AY682116
CFMSP075	F: GAGAAAGACTTCGTTTCGTCG R: GGGACTTTTCGTTTGGTACAGC	(AC) ₁₀ CT (AC) ₆	54	DQ022568
CFMSM009	F: GTAGTCACATGATGACATAGAG R: CACAACCTCCGTCATCATTCTC	(AG) ₄ G(AG) ₅ ...(AC) ₅	56	DQ104704
CFMSM014	F: CATCTGATATGGCAGCTGATAC R: GAACTAACGAGGAGACAACCTG	(AG) ₁₀ ...(AG) ₄	60	DQ104705
CFMSM020	F: CAAAGGCATTTGTAGGAAGGC R: ACGGCACTTCGTTGATTAAC	(CAC) ₁₁	62	DQ104709

1.4 分析方法

根据获得的 SSR 图谱,以雄性特异条带作为诊断性标记,对雌核发育后代进行鉴定。在雌核发育群体遗传变异的数据分析中,将电泳谱带中的每一条 DNA 片段作为该座位的一个等位基因来处理,在每个个体中仅扩增出一条 DNA 带的,视为纯合,扩增出 2 条 DNA 带的,视为杂合^[11]。计算了雌核发育后代的基因-着丝点之间的重组率 (Recombination rate, R)^[12]:

基因-着丝点之间的重组率:

$$R = \frac{\text{杂合个体数}}{\text{总个体数}} \times 100\%。$$

2 结果与分析

2.1 雌核发育鉴定分析

PCR 扩增结果显示 5 对引物均可扩增出清晰的亲本差异条带,其中引物 CFMSP009 和 CFMSP014 扩增结果如图 1。家系 A 和 B 的父本在 5 个位点都存在 8 个特有的等位基因,各组中母本不存在这些特有的等位基因。每对引物在对照组和雌核发育群体中所扩增出产物的个体数、父母本的基因型及对照组后代和雌核发育后代的基因型见表 2。

经比较亲本和子代的基因型,在所有检测个体中部分存在父本的等位基因,表明精子遗传物质失

活不彻底,雌核发育组中存在正常受精个体。家系 A 减数分裂、有丝分裂雌核发育后代在 5 个位点扩增结果显示,300 个子代中有 200 个属于雌核发育个体,未出现父本的等位基因,雌核发育诱导率为 66.7%;家系 B 减数分裂、有丝分裂雌核发育组 300 个子代中有 211 个属于雌核发育个体,雌核发育诱导率为 70.3%。2 组平均诱导成功率为 68.5%。

2.2 亲本杂合位点的筛选

采用栉孔扇贝的 5 对微卫星引物,对亲本 A 和 B 进行杂合位点的筛选,其结果为亲本 A 和 B 在 5 个位点均表现为杂合,后代基因型见表 2。

2.3 减数分裂与有丝分裂雌核发育后代的纯合性分析

经检测,在 Mitotic-A 和 Mitotic-B 的所有鉴定为真正的雌核发育个体中未发现杂合子,证明了有丝分裂雌核发育子代均为纯合子(图 2,表 3)。

5 个位点中,被检测的减数分裂雌核发育二倍体中无全部纯合的个体,Meiotic-A 在 5 个位点均表现为部分杂合(图 2),Meiotic-B 除在位点 CFMSM020 全部为杂合外,在其余 4 个位点均为部分杂合。位点 CFMSP020 杂合比例最高,为 0.750 0。位点 CFMSP007、CFMSP075、CFMSM009、CFMSM014 杂合子比例都小于 0.5,分别为 0.340 0、0.361 1、0.488 4、0.475 0,5 个位点的平均杂合子比例为 0.4829(表 4)。

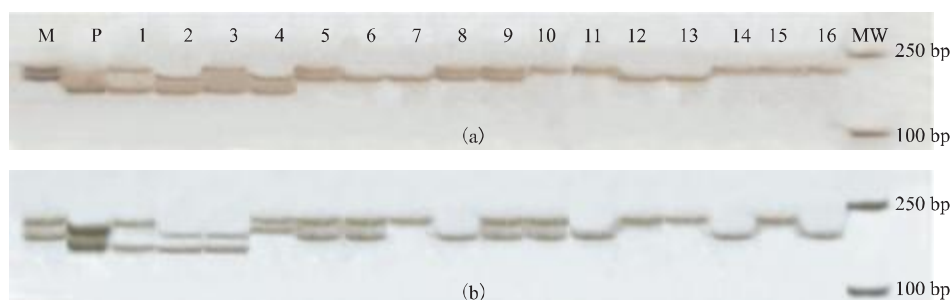


图 1 引物 CFMSP009(a) 和 CFMSP014(b) 在栉孔扇贝亲本、对照组、减数分裂雌核发育后代和有丝分裂雌核发育后代中扩增的微卫星图谱

M 为母本, P 为父本, 1~4 泳道为正常二倍体对照, 5~10 泳道为减数分裂雌核发育个体, 11~16 泳道为有丝分裂雌核发育个体。

Fig.1 Microsatellite locus amplified by CFMSP009 (a) and CFMSP014 (b) primer pairs in *Chlamys farreri* control progeny, meiogynogenetic progeny and mitogynogenetic progeny

M: Female. P: Male. 1-4: Normal diploids. 5-10: Meiogynogenetic diploids. 11-16: Mitogynogenetic diploids.

表 2 每个微卫星位点在栉孔扇贝雌核发育组和对照组后代中的基因型比率

Tab.2 Genotypic proportions in *Chlamys farreri* gynogenetic and control progeny at microsatellite loci

家系及 基因位点 Family and locus	亲本基因型 Parental genotypes	对照组后代基因型 Genotypes of control progeny	减数雌核发育组后代基因型 Genotypes of meiogynogenetic progeny	有丝雌核发育组后代基因型 Genotypes of mitogynogenetic progeny
A				
CFMSP007	♀	203/211	203/203	8
	♂	203/208	203/208	10
			211/211	12
			203/211	8
CFMSP075	♀	125/153	125/128	6
	♂	128/163	125/163	11
			153/153	5
			125/153	6
CFMSP009	♀	142/150	142/145	19
	♂	145/145	150/145	21
			142/150	5
			142/145	7
CFMSP014	♀	229/251	229/194	10
	♂	194/220	229/220	7
			251/194	12
			251/220	11
CFMSM020	♀	161/163	161/185	12
	♂	185/187	161/187	6
			163/185	12
			163/187	10
B				
CFMSP007	♀	197/211	197/183	9
	♂	183/203	197/203	13
			211/183	10
			211/203	8
CFMSP075	♀	155/164	155/128	15
	♂	128/177	155/177	8
			164/128	5
			164/177	12
CFMSP009	♀	127/155	127/143	23
	♂	143/143	155/143	17
			127/155	12
			127/143	4
CFMSP014	♀	210/236	210/199	14
	♂	199/222	210/222	8
			236/199	12
			236/222	6
CFMSM020	♀	172/178	169/178	23
	♂	169/169	172/169	17
			172/178	6
			172/169	7

注: 加粗部分的基因型及后代数为雌核发育组中出现的正常受精个体。

Note: Genotypes of normal fertilized eggs in gynogenetic groups were marked in bold.

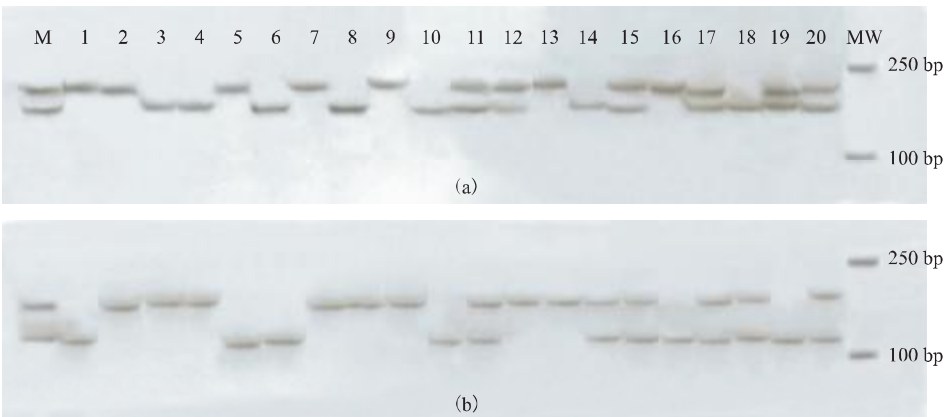


图2 引物CFMSP075在Mitotic-A、Meiotic-A(a)和Mitotic-B、Meiotic-B(b)部分个体中扩增的电泳图谱
MW: 分子量; M: 母本; 1-10 有丝分裂雌核发育家系A、家系B; 11-20: 减数分裂雌核发育家系A、家系B.
Fig. 2 PCR amplification of partial individuals in Mitotic-A, Meiotic-A (a) and Mitotic-B, Meiotic-B (b) amplified with microsatellite primer CFMSP075

MW: Molecular weight; M: Mother; 1-10: Mitotic-A, Mitotic-B; 11-20: Meiotic-A, Meiotic-B.

表3 有丝分裂雌核发育二倍体在5个位点上的基因型及杂合子比例
Tab. 3 Genotypes and heterozygotes proportion at 5 loci in mitogynogenetic diploid

位点 Locus	家系 Family	母本基因型 Maternal genotype	雌核发育二倍体基因型 Gynogenetic diploid genotype			杂合子比例 R
			AA	AB	BB	
CFMSP007	Mitotic-A	203/211	0.533 3	0.000 0	0.466 7	0
	Mitotic-B	197/211	0.400 0	0.000 0	0.600 0	
CFMSP075	Mitotic-A	125/153	0.500 0	0.000 0	0.500 0	0
	Mitotic-B	155/164	1.000 0	0.000 0	0.000 0	
CFMSM009	Mitotic-A	142/150	0.666 7	0.000 0	0.333 3	0
	Mitotic-B	127/155	0.555 6	0.000 0	0.444 4	
CFMSM014	Mitotic-A	229/251	0.571 4	0.000 0	0.428 6	0
	Mitotic-B	210/236	0.000 0	0.000 0	1.000 0	
CFMSM020	Mitotic-A	161/163	0.428 6	0.000 0	0.571 4	0
	Mitotic-B	172/178	0.545 5	0.000 0	0.454 5	

注: AA、BB 表示后代基因型为纯合, AB 表示后代基因型为杂合。
Note: AA and BB indicate homozygous genotypes; AB indicates heterozygous genotypes.

表 4 减数分裂雌核发育二倍体在 5 个位点上的基因型及杂合子比例
Tab.4 Ggenotypes and heterozygotes proportion at 5 loci in meiogynogenetic diploid

位点 Locus	家系 Family	母本基因型 Maternal genotype	雌核发育二倍体基因型 Gynogenetic diploid genotype			杂合子比例 R
			AA	AB	BB	
CFMSP007	Meiotic-A	203/211	0.333 3	0.266 7	0.400 0	0.340 0
	Meiotic-B	197/211	0.250 0	0.450 0	0.300 0	
CFMSP075	Meiotic-A	125/153	0.266 7	0.400 0	0.333 3	0.361 1
	Meiotic-B	155/164	0.285 7	0.333 3	0.381 0	
CFMSM009	Meiotic-A	142/150	0.176 5	0.529 4	0.294 1	0.488 4
	Meiotic-B	127/155	0.192 3	0.461 5	0.346 2	
CFMSM014	Meiotic-A	229/251	0.350 0	0.400 0	0.250 0	0.475 0
	Meiotic-B	210/236	0.250 0	0.550 0	0.200 0	
CFMSM020	Meiotic-A	161/163	0.312 5	0.437 5	0.250 0	0.750 0
	Meiotic-B	172/178	0.000 0	1.000 0	0.000 0	

注: AA、BB 表示后代基因型为纯合, AB 表示后代基因型为杂合。

Note: AA and BB indicate homozygous genotypes; AB indicates heterozygous genotypes.

3 讨论

人工诱导栉孔扇贝的雌核发育过程中,有时会因精子遗传物质失活不彻底,致使部分雄贝基因参与遗传,因此有必要对雌核发育的真实性进一步确认。邹桂伟等^[13]发现雌核发育组鲢有部分个体含有与父本相同的特异 DNA 扩增带,表明雌核发育组有部分鲢整入了雄鲤的遗传物质;Li 等^[3]应用 5 对微卫星引物标记,研究证实了太平洋牡蛎人工雌核发育是一个纯系,即没有任何雄性基因参与遗传。本研究用 5 对微卫星引物对 Mitotic-A、Meiotic-A、Mitotic-B 和 Meiotic-B 进行分析,结果显示,各家系中均有部分个体含有与父本相同的特异 DNA 扩增带,雌核发育平均诱导成功率为 68.5%。本研究的结果显示了微卫星标记方法可以用于雌核发育的鉴定分析,是一种灵敏有效的鉴别手段。

减数分裂雌核发育后代出现杂合现象表明卵细胞减数第一次分裂过程中同源染色体之间发生了联会和交换重组,因此,减数分裂雌核发育二倍体的杂合子比例可以用来反映该位点与着丝粒的重组率,有关贝类雌核发育群体基因重组的报道中,重组率的变动范围较大。Guo 等^[14]研究发现雌核发育长牡蛎的同工酶基因位点平均重组率为 74%。Li 等^[3]利用 8 个微卫星位点对雌核发育长牡蛎研究时发现其平均重组率为 72%。Li 等^[4]利用微卫星标记对雌核发育的皱纹盘鲍进行鉴定时发现所用的 9 个微卫星位点在不同的实验组中均

发生了重组,平均重组率为 22%。本研究所得到的栉孔扇贝 5 个微卫星位点的平均重组率为 0.482 9,与前面所提到的贝类的重组率有一定差异。

造成差异的主要原因可能是所研究的位点不同,在减数分裂时,越接近非姊妹染色单体交叉的区域,越容易发生交换,也就是说,在染色体的这些区域上的位点保留其杂合的可能也就越大;同时,染色体的长度越长,联会时发生多次交叉的可能性就越大^[6]。Purdum^[15]指出交叉的次数越多,杂合子的比例反而趋近 66.7%。本研究所得到的栉孔扇贝 5 个微卫星位点的平均重组率为 0.482 9,小于 66.7%,表明我们所选择的这些位点很可能位于染色体近端,易受着丝点干涉,发生重组的几率比较小,对这一猜测可通过染色体原位杂交实验进行验证。

雌核发育后代的遗传物质主要来源于母本,因此产生的个体基因纯合度很高,理论上通过有丝分裂雌核发育获得的个体其基因纯合率可达到 100%,而减数分裂雌核发育只能获得部分纯合二倍体。朱晓琛等^[7]用 8 个微卫星位点对牙鲆雌核发育二倍体家系纯合性进行检验发现,有丝分裂雌核发育二倍体在所有检测位点全部纯合,减数分裂雌核发育二倍体在部分位点发生纯合,但未发现在所有位点全部纯合的个体,其平均杂合子比例为 0.822 4。Taniguchi 等^[16]在研究香鱼减数分裂和有丝分裂雌核发育二倍体的数量特性的遗传变异时指出,减数分裂雌核发育二倍体后代的杂合子比例很高,而有丝分裂雌核发育二倍体后代未出现杂合

现象。本研究结果显示,减数分裂雌核发育二倍体在 5 个位点的平均杂合子比例为 0.482 9,有丝分裂雌核发育二倍体均为纯合。

从研究结果可以看出,抑制第二极体排出诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体,由于具有较高的重组率,使其不适合用于直接建立纯系,但较高的重组率使其与母本具有高度的遗传同质性,可以形成很好的育种材料。如果精子的灭活率达到 100%,有丝分裂雌核发育二倍体一代即可实现纯合,如再进行一次减数雌核发育即可建立纯系。

参考文献:

- [1] 潘英,李琪,王如才,等. 海洋贝类雌核发育研究进展和展望[J]. 水产学报,2002,26(5): 465-471.
- [2] Purdom C E. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes[J]. Aquaculture, 1983, 33: 287-300.
- [3] Li Q, Kijima A. Microsatellite analysis of gynogenetic families in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Exp Mar Biol Ecol, 2006, 331: 1-8.
- [4] Li Q, Kijima A. Segregation of microsatellite alleles in gynogenetic diploid Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) [J]. Mar Biotechnol, 2005, 7: 669-676.
- [5] Galbusera P, Volckaert FAM, 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.
- [6] 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.
- [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] 赵峰,杨爱国,刘志鸿,等. 紫外辐射对栉孔扇贝精子遗传失活及形态结构的影响[J]. 海洋水产研究,2003,24(4): 26-31.
- [9] 刘广绪,包振民,胡景杰,等. 栉孔扇贝、华贵栉孔扇贝及其种间杂交子代、种内交配子代的 ISSR 分析[J]. 中国海洋大学学报,2006,36(1): 071-075.
- [10] Zhan A, Bao Z, Yao B, et al. Polymorphic microsatellite markers in the Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. Mol Ecol Notes, 2006, 6: 127-129.
- [11] Crooijmans R P M A, Van der Poel J J, Groenen M A M, et al. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Animal Genet, 1997, 28 (2): 129-134.
- [12] Morishima K, Nakayama I, Arai K, et al. Microsatellite-centromere mapping in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Genetica, 2001, 111 (1-3): 59-69.
- [13] 邹桂伟,潘光碧,汪登强,等. 人工雌核发育鲢的遗传多样性及异源遗传物质整合的 RAPD 分析[J]. 水生生物学报, 2004, 28(2): 180-185.
- [14] Guo X, Gaffney P M. Artificial gynogenesis in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, II. allozyme inheritance and early growth [J]. J Hered, 1993, 84: 311-315.
- [15] Purdom C E. Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish [J]. Heredity, 1969, 24: 431-444.
- [16] Taniguchi N, Hatanaka H, Seki S. Genetic variation in quantitative characters of meiotic- and mitotic- gynogenetic diploid ayu, *Plecoglossus altivelis* [J]. Aquaculture, 1990, 85: 223-233.

Assessment of homozygosity in gynogenetic diploid using microsatellite markers in scallop, *Chlamys farreri*

YANG Feng-ying^{1,2}, YANG Ai-guo¹, LIU Zhi-hong¹, ZHOU Li-qing¹

(1.Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Collage of Animal Science and Technology, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China)

Abstract: We used the genotyping data of five microsatellite loci to check the absence of any paternal contribution to the gynogenetic offspring genome, to estimate the M-C recombination rate and to analyze the homozygous ratio in the induced gynogenetic diploids. In this study, gynogenetic diploid *Chlamys farreri* were induced by inhibiting exclusion of the second polar body and by suppressing the first cleavage with 6-DMAP in eggs fertilized with UV irradiated sperm. Five SSR heterozygous loci in *Chlamys farreri* were used to identify the homozygosity of 30 larvae in the gynogenetic families A and B, 40 larvae in their control groups and their parents. Electrophoretic patterns showed that all the 5 pairs of microsatellite primers produced well-identifiable DNA fragments. The results of the five microsatellite analyses revealed that the presence of male DNA in the two gynogenetic families indicated they were derived from normal fertilization. 6-DMAP treatment produced 68.5% gynogenetic diploids. All homozygosity in Mitotic-A and Mitotic-B had a high percentage of heterozygosity in Meiosis-A and Meiosis-B. The rate of heterozygosity in meiogynogenetic progenies at the loci of *CFMSP007*, *CFMSP075*, *CFMSM009*, *CFMSM014* and *CFMSM020* were 0.340 0, 0.361 1, 0.488 4, 0.475 0 and 0.750 0, respectively. The average heterozygous rate of the 5 loci was 0.482 9. The high proportion of heterozygosity for the 5 loci demonstrates that it is not a practical method for producing homozygous inbred lines in the gynogenetic scallop produced by retention of the second polar body, and treatments of suppressing the first cell division were more promising for this purpose. In addition, microsatellite analysis is an effective method for the verification of gynogenesis because of their codominant and highly polymorphic nature. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (1): 55–62]

Key words: *Chlamys farreri*; gynogenesis; microsatellite; homozygosity

Corresponding author: YANG Ai-guo. E-mail: yangag@ysfri.ac.cn