

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16163

牙鲆三个同源纯系的生长和遗传性状比较

田永胜^{1,3}, 段会敏^{1,2}, 李祥孔^{1,4}, 李洪^{1,2}, 宋莉妮^{1,2}, 陈红林^{1,2}, 陈张帆^{1,3},
唐江^{1,2}, 陈松林^{1,3}

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;
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;
4. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023

摘要: 利用同一牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)家系 F09119 的母本, 建立了减数雌核发育系(F1324)、卵裂雌核发育系(F1346)及近交家系(F1313)3个纯系, 对3个纯系群体的生长和遗传性状进行比较分析。在受精后 85~388 d 对3个家系的体长、体宽、体重及成活率进行测定比较, 结果显示: F1346 生长最快, 388 d 时体长、体宽和体重分别为(28.89±2.77) cm、(10.00±1.21) cm 和(254.91±83.11) g, F1313 次之, F1324 最慢($P<0.05$)。388 d 时 F1324 成活率最高(46.50%), F1313 次之(38.00%), F1346 最低(26.80%)。F1346、F1324 和 F1313 平均等位基因数(N_a)分别为 2.0、2.0 和 2.35, 平均有效等位基因数(N_e)分别为 1.87、1.95 和 2.1, 多态信息含量(PIC)分别为 0.35、0.36 和 0.4, 平均观测杂合度分别为 0、0.8155 和 0.6366; 卵裂雌核发育系和减数雌核发育系的遗传多样性明显低于近交系。平均期望杂合度 F1313(0.503)<F1324(0.5105)<F1346(0.532); 平均期望杂合度正好相反, F1313(0.4967)>F1324(0.4894)>F1346(0.4679)。卵裂雌核发育系纯合度是减数雌核发育系的 1.0421 倍, 是近交系的 1.0577 倍; 减数雌核发育系纯合度是近交系的 1.0149 倍。F1346 与 F1313 之间的遗传距离最大(0.1568), 遗传相似度最小(0.8549); F1346 与 F1324 之间的遗传距离最小(0.0406), 遗传相似度最大(0.9602)。本研究结果为牙鲆纯系构建及解析卵裂雌核发育系、减数雌核发育系和近交系的遗传区别提供了理论依据。

关键词: 牙鲆; 卵裂雌核发育系; 减数雌核发育系; 近交系; 表型性状; 遗传性状

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)01-0011-11

利用人工诱导鱼类雌核发育进行全基因组复制是直接而有效的遗传育种方法, 可以创制出完全纯合的遗传后代^[1]。1975—1978 年国内外先后报道鲤鱼雌核发育技术^[2-3], 从 20 世纪 60 年代, 国内外科学家开始利用雌核发育手段来快速建立鱼类纯系^[4]。逐渐在大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[5]、漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)^[6]、真鲷(*Pagrosomus major*)^[7]、欧鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[8]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[9]和大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)^[10]等多种鱼类上建立了雌核发育技术并诱导产生了雌核发育后代。目前雌核发育技术已广泛应用于鱼类性别

决定类型鉴定、优良纯系建立和性状纯化、性别控制、遗传机制研究及品种改良等多个方面^[11-12]。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是中国重要的海水养殖鱼类之一^[13]。但是由于牙鲆苗种养殖成活率低、病害多, 极大地限制了养殖业的发展。为了提高牙鲆种质质量, 推进养殖业的健康可持续发展, 培育高产、抗逆的牙鲆新品种成为牙鲆育种的重要研究方向。从 21 世纪初开始, 国内开展了牙鲆育种研究, 通过家系建立和筛选、抗病力测定、后裔鉴定、家系间杂交等方法^[14], 培育出一个生长快、成活率高的牙鲆新品种‘鲆优 1 号’^[15-16]。利用雌核发育诱导

收稿日期: 2016-05-21; 修订日期: 2016-07-01.

基金项目: 国家 863 高技术研究发展计划项目(2012AA10A408); 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02); 青岛市南区科技发展资金项目(2015-6-023-ZH).

作者简介: 田永胜(1964-), 博士, 研究员, 主要从事鱼类低温生物学及遗传育种研究. E-mail: tianys@ysfri.ac.cn

和性别转化技术相结合获得全雌牙鲆新品种‘北鲆 1 号’和‘北鲆 2 号’^[17]。进而利用雌核发育方法对牙鲆优良性状进行纯化,建立了生长快、抗病力强的优良品系,促进了牙鲆选择育种和杂交育种进程。因此国内外学者在牙鲆减数雌核发育、卵裂雌核发育技术条件的建立方面进行了较多的研究^[18-22]。但是对于减数雌核发育、卵裂雌核发育及近交系在基因纯合、性状纯化等方面的遗传进展与区别还未见有研究报道。本研究对源于同一家系母本的卵裂雌核发育家系、减数雌核发育家系和近交系的生长、成活率等表型性状进行比较,并从牙鲆全基因组图谱连锁群上筛选出具有多态性的微卫星标记,利用这些标记对这 3 种牙鲆家系群体遗传性状进行分析,以期为牙鲆纯系构建及卵裂雌核发育系、减数雌核发育系和近交系的遗传性状解析提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验在山东省海阳市黄海水产有限公司进行,利用 2009 年建立的生长快、成活率高的 F09119 家系为亲本, F09119 的父母本组合为 F0750(♀)×KS42(♂)(F0750 为 2007 年选育生长快、成活率高家系, KS42 为从韩国引进牙鲆), 培育至 2013 年达到性成熟, 在当年 5 月份产卵季节, 选用同一家系中雌性亲鱼进行雌核发育诱导和近交系的建立。

1.2 雌核发育系和近交系的建立

人工采集 F09119 雌性亲鱼的未受精卵, 置于 1000 mL 烧杯中备用。将事先冷冻保存的鲈鱼精液在培养皿中用 MPRS 稀释液以 1:9 的比例稀释^[21], 后利用 40 mJ/cm² 紫外线灭活。以精卵比为 1:20 的比例进行人工授精。在 17℃ 水温条件下, 在受精后 58 min, 利用静水压机以 590 kg/cm² 的压力处理, 压力休克处理 6 min^[22]。处理后受精卵经过海水漂洗, 分离上浮卵和下沉卵, 将上浮卵放入 0.5 m³ 的网箱中孵化, 建立卵裂雌核发育系 F1346。

人工采集 F09119 雌性亲鱼的未受精卵, 利用以上方法灭活鲈鱼精子, 进行人工授精, 授精 3 min 后放入 2~4℃ 海水中冷休克处理 45 min, 然后放入 17℃ 海水中进行孵化和鱼苗饲养, 建立了牙鲆减数雌核发育家系 F1324^[23]。

分别人工采集 F09119 家系中雌雄鱼卵和精液, 采用精卵比 1:200 进行人工干法授精, 受精后 5 min,

利用 17℃ 海水漂洗, 分离死卵, 然后放入 17℃ 海水中孵化, 建立了近交系 F1313。

1.3 家系的培养、测量及 DNA 样本采集

将以上家系受精卵在孵化之前转入 3 m³ 的玻璃缸中孵化, 将孵化后至 125 d 的鱼苗培养在 3 m³ 的玻璃缸中, 125 d 后对每一尾鱼苗进行荧光标记, 为减少环境造成的差异, 标记后放入同一 30 m³ 水泥池中培养, 培养过程中采用工厂化流水养殖方式。

在各家系培育到 80 d、105 d、125 d、388 d 时测量其生长体重、全长和体宽, 全长为吻端到尾鳍末端长度, 体宽为身体最宽处长度(不含背鳍和臀鳍条的长度)。各家系培育到 263 d 时统计成活率。

在各家系培育至 388 d 时, 在 3 个家系中随机采集 30 尾鱼的尾鳍样本, 分别置于 EP 管中, 加入 99.9% 乙醇, -20℃ 保存。在建立家系的同时采集 3 个家系父母本鳍条样本, 利用相同的方法保存, 用于提取 DNA。

1.4 DNA 的提取

将采集鳍条作为提取 DNA 样品, DNA 抽提流程参照刘永新等^[24]的方法, 将裂解液[50 mmol/L NaCl, 30 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 200 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1% SDS, 200 μg/mL 蛋白酶 K]加入剪碎的鳍条中, 56℃ 消化至澄清, 等体积的饱和酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)抽提二遍, 加入无水乙醇出现沉淀, 沉淀离心并用双蒸馏水溶解。琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品质量, 紫外分光光度计测定 OD₂₆₀ 值, 用双蒸水将提取的 DNA 调整浓度至 80 ng/mL, 4℃ 储存备用。

1.5 微卫星引物

从牙鲆二代遗传连锁图谱上选取 80 个微卫星位点^[25], 筛选出在雌核发育家系中有特异性的微卫星位点 40 个, 由 GenBank 获得引物序列或者微卫星序列, 利用引物设计软件 SSR Hunter 和 Primer 3.0 由深圳华大基因设计引物。40 个微卫星位点的引物名称、核心序列、退火温度和 GenBank 登录号见表 1。

1.6 PCR 反应及电泳

采用 15 μL 反应体系, 其中 1.6 μL 10×buffer 缓冲液(TIANGEN, 含 Mg²⁺), 0.8 μL dNTP (CW BIO, 2.5 mmol/L), 0.15 μL Taq DNA 聚合酶(TIANGEN, 5 U/μL)上下引物各 0.6 μL, 模板 1 μL, 用灭菌的双蒸水补充至 15 μL。PCR 反应程序为: 95℃ 预变性

5 min, 35 个循环(95℃变性 30 s, 按每对引物的实际退火温度反应 30 s, 72℃延伸 30 s), 72℃延伸 7 min, 4℃保温。PCR 扩增产物使用 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。电泳结束后, 加入 1% AgNO₃, 染色 10 min, 清水洗净, 然后加入显色液(1%甲醛, 2%氢氧化钠), 显色 10 min。PCR 产物经过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 利用银染显色。最后人工进行基因位点统计分析。

1.7 数据分析

牙鲆表型性状测量数据利用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 采用 Student-Newman-Keuls 进行多重比较和差异显著性分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异, $P > 0.05$ 表示差异不显著, 表型性状值以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。

等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观察杂合度(bs_Het)、无偏差期望纯合度(Exp_Hom^*)、无偏差期望杂合度(Exp_Het^*)和位点多态信息含量(PIC)均由 Popgene(ver. 3.2)计算获得。

2 结果与分析

2.1 卵裂、减数雌核发育系及近交系生长比较

利用牙鲆同一家系 F09119 的母本诱导产生的卵裂雌核发育系、减数雌核发育系和近交系的生长性状上具有不同的表现, 受精后 80 d、105 d、125 d, 卵裂雌核发育系 F1346 显示出较快的生长速度, 体长、体宽和体重显著大于减数雌核发育系 F1324 和近交系 F1313($P < 0.05$)(图 1)。受精后 388 d 时卵裂雌核发育系 F1346 的体长、体宽和体重分别为(28.89±2.77) cm, (10.00±1.21) cm 和(254.91±83.11) g; 减数雌核发育系 F1324 的体长、体宽和体重分别为(25.22±2.97) cm, (8.06±0.91) cm 和(145.82±45.14) g; 近交系 F1313 的体长、体宽和体重分别为(28.01±2.55) cm, (9.49±0.68) cm 和(212.33±47.73) g; F1346 和 F1324 在体长上无显著性差异($P > 0.05$), 但与近交系 F1313 具显著性差异($P < 0.05$), F1346 的体宽和体重两性状仍然显著高于 F1324 和 F1313($P < 0.05$)。结果说明卵裂雌核发育家系的生长速度显著快于减数雌核发育家系和近交家系。

2.2 卵裂、减数雌核发育系和近交系成活率比较

F1346、F1324、F1313 和对照家系 F1319 养殖到 263 d 时, 统计家系成活率, 减数雌核发育系 F1324

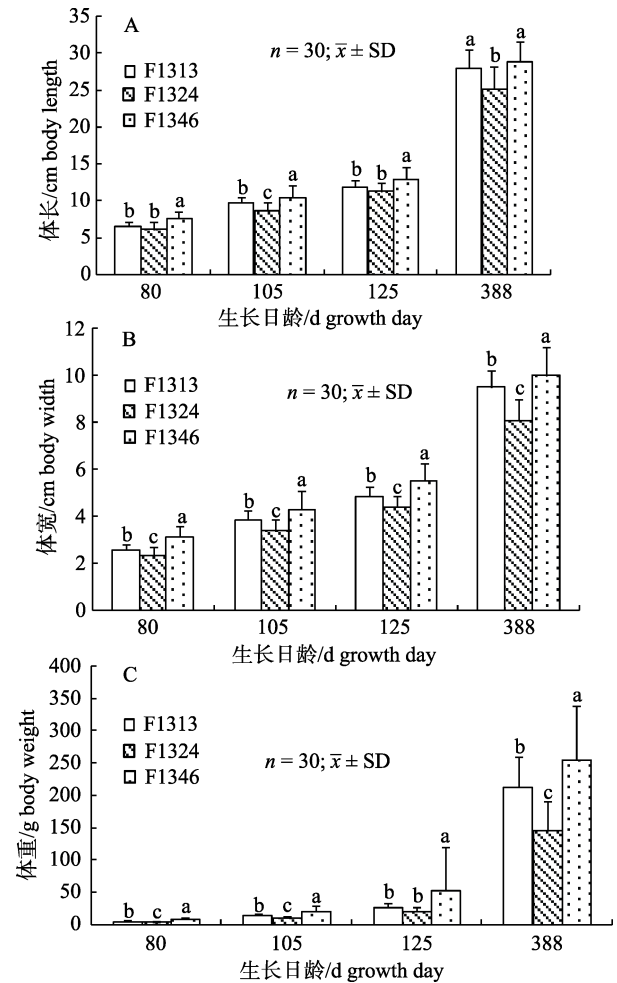


图 1 牙鲆减数雌核发育系 F1324、近交系 F1313 和卵裂雌核发育系 F1346 体长(A)、体宽(B)和体重(C)比较
柱形图上方字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 1 The comparison of body length (A), body width (B) and body weight (C) in meiotic maturation F1324, inbred lines F1313 and cleavage gynogenesis F1346
Different letters on the column indicate significant difference ($P < 0.05$).

成活率最高, 为 46.50%, 卵裂雌核发育家系 F1346 为 26.80%, 近交家系 F1313 为 38.00%, 对照家系 F1319 为 27.00%(图 2)。减数雌核发育系成活率最高, 近交系次之, 卵裂系最低。

2.3 PCR 扩增及电泳结果

40 对微卫星引物在卵裂雌核发育系、减数雌核发育系和近交系 3 个家系中均获得了稳定的扩增, 全部等位基因数分别为 82、82、96 个, 平均等位基因数分别为 2.00、2.00、2.4 个; 有效等位基因数分别为 1.87、1.95 和 2.1(表 2)。减数雌核发育家系 F1324 和卵裂雌核发育家系 F1346 的平均等位基因和平均有效等位基因都明显低于近交家系群体。3 个家系

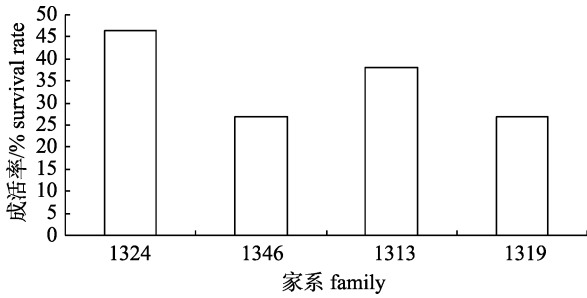


图 2 263 d 减数雌核发育系 F1324、卵裂雌核发育系 F1346、近交系 F1313 和对照家系 F1319 的成活率

Fig. 2 The survival rate of cleavage gynogenesis F1346, meiotic maturation F1324, inbred lines F1313 and control families 1319 in 263 days

的多态信息含量(PIC)由高到低分别为近交系(0.4)、减数雌核发育系(0.36)和卵裂雌核发育系(0.35),表明通过减数分裂和卵裂雌核发育获得的牙鲆群体的遗传多态性明显降低。3 个家系在位点 *scaffold40_4916* 的扩增结果如图 3。

2.4 三个家系微卫星位点的遗传多样性

利用 40 对引物,对 3 个家系的观测杂合度(Obs_het)、无偏期望杂合度(Exp_het*)以及无偏期望杂合度(Exp_Hom*)进行检测统计,结果如表 3 所示。近交

家系、减数雌核发育家系和卵裂雌核发育家系的平均观测杂合度分别为 0.6366, 0.8155 和 0; 平均期望杂合度由低到高依次为 F1313(0.503)、F1324(0.5105)、F1346(0.532), 表明卵裂雌核发育系纯合度最高, 减数雌核发育系次之, 近交系最低。卵裂雌核发育系纯合度是减数雌核发育系的 1.0421 倍, 是近交系的 1.0577 倍; 减数雌核发育系纯合度是近交系的 1.0149 倍。平均期望杂合度正好相反, 由高到低依次是 F1313(0.4967)、F1324(0.4894)、F1346 (0.4679)。

2.5 三个家系间的遗传距离和遗传相似度

根据 40 个微卫星位点的基因型, 计算了卵裂雌核发育系(F1346)、减数雌核发育系(F1324)和近交系(F1313)3 个家系间的遗传相似度和遗传距离(表 4), F1324 和 F1346 间的遗传距离最小(0.0416), 明显小于 F1313 和减数雌核发育系 F1324 之间的遗传距离(0.1178), 更小于 F1313 与卵裂雌核发育系 F1346 之间的遗传距离(0.1568)($P < 0.05$)。减数雌核发育系 F1324 和 F1346 之间的遗传相似度最高(0.9602), 近交系 F1313 与减数雌核发育系间 F1324 的遗传相似度次之(0.8888), 近交系 F1313 与卵裂雌核发育系 F1346 的遗传相似度最低(0.8549)。

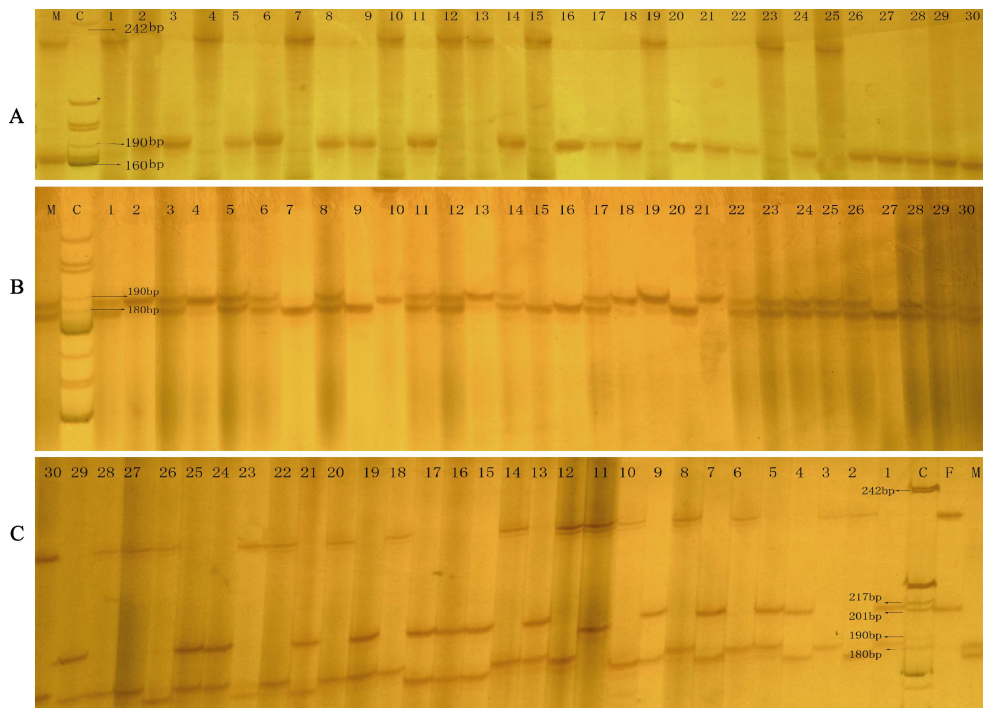


图 3 *scaffold40_4916* 标记在卵裂雌核家系(A)、减数雌核发育家系(B)和近交家系(C)中的 PCR 扩增结果

M: 母本; F: 父本; C: Marker.

Fig. 3 The PCR result of *scaffold40_4916* genetic marker in cleavage gynogenesis (A), meiotic maturation (B) and inbred lines (C) M represents female parent; F represents male parent; C represents marker.

表 1 40 个微卫星位点的引物序列及退火温度
Tab. 1 Sequences and their specific annealing temperature of forty pairs of microsatellite loci

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')		退火温度/℃ annealing temperature	登录号 GenBank access no.
	F	R		
<i>scaffold288_14927</i>	AGTGGATTAGCGTGGTGGATAC	AGATCAGTGTGGTCAAGGTGG	58.5	JN900613.1
<i>scaffold1304_77809</i>	TGGGAAATGTCAGTCCACTCAG	AATCCAGTGGAAAGACGAAGGG	58.5	JN901230.1
<i>scaffold1774_79125</i>	GTCTGTCCATCATGCTCTCAGT	AGGCACAGACACTTTCAGGT	58.5	JN901440.1
<i>scaffold314_34890</i>	GAAAGCATCAGCAGAGCCG	CCTGACAAGTTCGCCAGTG	58.5	JN901432.1
<i>scaffold234_29027</i>	TCACGTACACAGAAGATGTCAGA	GCTCACTGGCCCTTTAAACAT	58.5	JN900562.1
<i>scaffold658_59018</i>	CAAGCTGTGCTGATAATGGTG	CACCCCTAGTCTATGTTGTTGGCT	58.5	JN901651.1
<i>scaffold1380_78434</i>	CGTCACATGTTTCATTTGAGTTCAG	AGTCACTCTCTCTACTGCGGTGT	58.5	JN900999.1
<i>scaffold264_29910</i>	CATTTAGGCCTTGCCCTGTAAC	CTGCATCAGCCACGCTATTG	58.5	JN900999.1
<i>scaffold388_40956</i>	AGCCACACATGGGGATTAAC	GTTTCATCCGTTTACATGTCCTC	58.5	JN901322.1
<i>scaffold1196_76519</i>	ACAGCAGGAATGTTATCGGCA	GCCGTGACAAGGTGACTC	58.5	JN900685.1
<i>scaffold1874_79149</i>	TGTGCCATTAACGCTGTGTG	TCATTCCTCTGACAGGACGG	58.5	JN901635.1
<i>scaffold734_61267</i>	TCAGCATTATCAGCCGCTCA	TGAGTGTTTTTCAGCCCAGAGA	58.5	JN901318.1
<i>scaffold1338_78201</i>	TGTGGCTTTATCCATCCAGCA	CCTGCAGAGGGAAACATGG	58.5	JN901350.1
<i>scaffold860_5128</i>	ACATCAAGGCTCGAGTGTGAG	CTGAAGACAAACAGCGACAGC	58.5	JN901178.1
<i>scaffold200_10602</i>	CCTCTGTAGACCCGACCATC	TCCTGAACCTCAGGTAACACAC	58.5	JN901550.1
<i>scaffold158_18859</i>	AGCGAGACATAAAGTTTCAGACGG	TAGAAAGCTGATTAGGCCGAAGTG	58.5	JN901498.1
<i>scaffold1386_78494</i>	GTCCTGGCAATTTGTTAAGTTTGC	GGGACTTTAGAAGAAAGGCACCAT	58.5	JN901123.1
<i>scaffold419_43475</i>	CCAGCCACCAGTTATTAATGCG	CTTTATGGCTCCCTGTGGAAAC	58.5	JN901239.1
<i>scaffold1084_74297</i>	TGGCAAAACACGTCAACTGATTG	GAAGTGCAAACCTGTGCGA	58.5	JN900800.1
<i>scaffold393_19395</i>	CTGTTGAAGAGATCATGTGGCAAC	GACGTTTGGTGCTCACACATC	58.5	JN900764.1
<i>scaffold297_1030</i>	CTGAAATTGGCCTTGATGTGGAC	CGTCTTTCATCACCAGAAATGTGG	58.5	JN900746.1
<i>scaffold453_22637</i>	GACAGGTCGTGTGCAATGTG	AATGAATCCAATGACCCAGAGTC	58.5	JN900787.1
<i>scaffold389_1656</i>	CCATAGAGGGAGGTCACAGTC	GATGACCTAATTTCCCTTTGGGGA	58.5	JN901751.1
<i>scaffold921_69859</i>	AGGATGTTAACTGGTGAGTGACCG	GAGAGGATTCTGGGCTTTTGTGTA	58.5	JN901080.1
<i>scaffold452_45014</i>	GCAAGCTGGACACTGATGG	GGGTGCTCTGAATGATTGCAG	58.5	JN953229.1
<i>scaffold1157_75734</i>	TCGTGACGTCTGCACATACATAGA	ACGCAGTGACTCTGGTCAAAGAG	58.5	JN900861.1
<i>scaffold520_25100</i>	TACTCTCTGCATGTGACCACG	AGGCATCGGATATACAAGCCC	58.5	JN901188.1
<i>scaffold914_69548</i>	CATGAGGGATTGACCATTTGTGG	TGAAACCCATCTACGACTGCTG	58.5	JN901066.1
<i>scaffold482_2517</i>	GAGTTAGTGTGAGACTCTCTGGC	TTTGTGAGCTGAGTAGCGTTC	58.5	JN901308.1
<i>scaffold114_7180</i>	GGTTCTTTTCGACCAAGGGC	GAACCTGTCTATCACCAGAACT	58.5	JN901601.1
<i>scaffold231_14788</i>	AGACGATTTACGCCTTGAGAG	GTCCATAAGCGCCGACTTTC	58.5	JN900632.1
<i>scaffold404_21589</i>	GAGTTCCAGTATCTAGGCCAGC	CAATGTTCTAAGCAGGGATGGA	58.8	JN900913.1
<i>scaffold30_144</i>	CCATAATGTGGGGGCTCGAATA	CCAACGCAGACACGTTAACAC	58.5	JN900777.1
<i>scaffold393_19395</i>	CTGTTGAAGAGATCATGTGGCAAC	GACGTTTGGTGCTCACACATC	58.5	JN900764.1
<i>scaffold138_16871</i>	CAGAGAAGAGCCACGGCTA	GTGCTTGTGTGTACCCCTG	58.5	JN901407.1
<i>scaffold921_69859</i>	AGGATGTTAACTGGTGAGTGACCG	GAGAGGATTCTGGGCTTTTGTGTA	58.5	JN901080.1
<i>scaffold40_4916</i>	CTGCAGGTGTCTGTGAAGC	TCTTGTGATCACGCTGTCCAT	58.5	JN900634.1
<i>scaffold457_23736</i>	TCAGGATGTCAGGACGCTG	CATTTCTCTGGGTGGGCTG	58.5	JN901496.1
<i>scaffold78_9908</i>	GTAAGGCATGTGAACCCGG	TGTATGCAGTCGGTGGATGAAG	58.5	JN900688.1
<i>scaffold962_71125</i>	GACTACCTTACTGAGCGAGGC	GATTTGCTGTTCACTGTACCCG	58.5	JN901076.1

表 2 3 个牙鲆家系在 40 个微卫星位点上的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)和多态信息含量(PIC)
 Tab. 2 Number of alleles (N_a), effective number of alleles (N_e) and polymorphic information content (PIC) at the 40 microsatellite loci in three family populations of *Paralichthys olivaceus*

位点 locus	近交家系 F1313 inbred line F1313			减数家系 F1324 meiotic gynogenesis F1324			卵裂家系 F1346 cleavage gynogenesis F1346		
	N_a	N_e	PIC	N_a	N_e	PIC	N_a	N_e	PIC
scaffold288_14927	3.00	2.59	0.54	2.00	1.94	0.37	2.00	2.00	0.38
scaffold1304_77809	2.00	1.77	0.34	2.00	2.00	0.38	2.00	1.65	0.32
scaffold1774_79125	2.00	1.65	0.32	2.00	2.00	0.38	2.00	1.91	0.36
scaffold314_34890	2.00	1.87	0.36	2.00	2.00	0.38	2.00	1.82	0.35
scaffold234_29027	2.00	2.00	0.38	2.00	1.99	0.37	2.00	1.72	0.33
scaffold658_59018	4.00	3.93	0.70	2.00	1.98	0.37	2.00	1.98	0.37
scaffold1380_78434	2.00	1.55	0.29	2.00	1.99	0.37	2.00	2.00	0.38
scaffold264_29910	2.00	1.50	0.28	2.00	1.15	0.12	2.00	2.00	0.38
scaffold388_40956	2.00	1.48	0.27	2.00	2.00	0.37	2.00	1.92	0.36
scaffold1196_76519	2.00	1.99	0.37	2.00	1.96	0.37	2.00	2.00	0.37
scaffold1874_79149	2.00	1.53	0.29	2.00	2.00	0.38	2.00	1.89	0.36
scaffold734_61267	2.00	1.60	0.30	2.00	2.00	0.37	2.00	1.80	0.35
scaffold1338_78200	2.00	1.87	0.36	2.00	2.00	0.37	2.00	1.14	0.12
scaffold860_5128	2.00	1.72	0.33	2.00	1.98	0.37	2.00	2.00	0.37
scaffold200_10602	2.00	1.81	0.35	2.00	2.00	0.38	2.00	1.97	0.37
scaffold158_18859	3.00	2.88	0.58	2.00	2.00	0.38	2.00	1.97	0.37
scaffold1386_78494	2.00	1.69	0.32	2.00	1.98	0.37	2.00	2.00	0.38
scaffold419_43475	2.00	1.75	0.34	2.00	2.00	0.38	2.00	1.99	0.37
scaffold1084_74297	2.00	1.84	0.35	2.00	2.00	0.38	2.00	1.38	0.24
scaffold393_19395	2.00	1.70	0.33	2.00	2.00	0.38	2.00	1.97	0.37
scaffold297_1030	2.00	1.60	0.30	2.00	2.00	0.38	2.00	1.89	0.36
scaffold453_22637	2.00	1.65	0.32	2.00	2.00	0.38	2.00	1.87	0.36
scaffold389_1656	2.00	1.77	0.34	2.00	2.00	0.38	2.00	1.87	0.36
scaffold921_69859	2.00	1.99	0.37	2.00	2.00	0.38	2.00	1.87	0.36
scaffold452_45014	4.00	3.59	0.67	2.00	2.00	0.38	2.00	1.99	0.37
scaffold1157_75734	2.00	1.97	0.37	2.00	2.00	0.38	2.00	1.80	0.35
scaffold520_25100	2.00	1.73	0.33	2.00	2.00	0.37	2.00	1.87	0.36
scaffold914_69548	2.00	1.92	0.36	2.00	1.90	0.36	2.00	1.99	0.37
scaffold482_2517	3.00	2.56	0.54	2.00	2.00	0.38	2.00	1.80	0.35
scaffold114_7180	2.00	1.95	0.37	2.00	2.00	0.38	2.00	1.87	0.36
scaffold231_14788	4.00	3.88	0.69	2.00	1.99	0.37	2.00	1.92	0.36
scaffold404_21589	2.00	1.82	0.35	2.00	1.97	0.37	2.00	1.99	0.37
scaffold30_144	4.00	3.03	0.61	2.00	2.00	0.38	2.00	1.92	0.36
scaffold393_19395	2.00	1.68	0.32	2.00	1.99	0.37	2.00	1.56	0.29
scaffold138_16871	3.00	2.90	0.58	2.00	1.34	0.22	2.00	1.87	0.36
scaffold921_69859	2.00	1.95	0.37	2.00	1.98	0.37	2.00	1.92	0.36
scaffold457_23736	2.00	1.90	0.36	2.00	1.90	0.36	2.00	2.00	0.38
scaffold40_4916	4.00	3.89	0.69	2.00	2.00	0.38	2.00	2.00	0.38
scaffold78_9908	2.00	1.98	0.37	2.00	1.99	0.37	2.00	2.00	0.38
scaffold962_71125	4.00	3.55	0.67	2.00	1.97	0.37	2.00	1.92	0.36
平均 mean	2.4	2.10	0.40	2.00	1.95	0.36	2.00	1.87	0.35

表 3 3 个牙鲆家系群体在 40 个微卫星位点的观察杂合度(Obs_Het)、
无偏差期望纯合度(Exp_Hom*)和无偏差期望杂合度(Exp_Het*)

Tab.3 Observed heterozygosity(Obs_Het), unbiased expected homozygosity(Exp_Hom*) and unbiased expected heterozygosity(Exp_Het*) at the 40 microsatellite loci in three *Paralichthys olivaceus* families

位点 locus	近交家系 F1313 inbred line F1313			减数家系 F1324 meiotic gynogenesis F1324			卵裂家系 F1346 cleavage gynogenesis F1346		
	Obs_Het	Exp_Hom*	Exp_Het*	Obs_Het	Exp_Hom*	Exp_Het*	Obs_Het	Exp_Hom*	Exp_Het*
scaffold288_14927	0.8333	0.3732	0.6268	0.0357	0.5071	0.4929	0	0.4909	0.5091
scaffold1304_77809	0.6429	0.5558	0.4442	1	0.4915	0.5085	0	0.5988	0.4012
scaffold1774_79125	0.5385	0.5988	0.4012	1	0.4915	0.5085	0	0.5143	0.4857
scaffold314_34890	0.5185	0.5248	0.4752	1	0.4915	0.5085	0	0.5402	0.4598
scaffold234_29027	0.7273	0.4884	0.5116	0.9333	0.4938	0.5062	0	0.5729	0.4271
scaffold658_59018	1	0.2385	0.7615	0.9	0.4966	0.5034	0	0.4969	0.5031
scaffold1380_78434	0.4615	0.638	0.362	0.9333	0.4938	0.5062	0	0.4915	0.5085
scaffold264_29910	0.4231	0.6599	0.3401	0	0.8693	0.1307	0	0.4915	0.5085
scaffold388_40956	0.4074	0.6695	0.3305	0.9667	0.4921	0.5079	0	0.5119	0.4881
scaffold1196_76519	0.3793	0.4936	0.5064	0.3571	0.5013	0.4987	0	0.4918	0.5082
scaffold1874_79149	0.4444	0.6478	0.3522	1	0.4915	0.5085	0	0.5209	0.4791
scaffold734_61267	0.5	0.6186	0.3814	0.9	0.4921	0.5079	0	0.548	0.452
scaffold1338_78200	0.7407	0.5248	0.4752	0.8333	0.4921	0.5079	0	0.8734	0.1266
scaffold860_5128	0.6	0.5729	0.4271	0.9	0.4966	0.5034	0	0.4918	0.5082
scaffold200_10602	0.6786	0.5435	0.4565	1	0.4915	0.5085	0	0.5006	0.4994
scaffold158_18859	1	0.3339	0.6661	1	0.4915	0.5085	0	0.5006	0.4994
scaffold1386_78494	0.5714	0.5844	0.4156	0.9	0.4966	0.5034	0	0.4915	0.5085
scaffold419_43475	0.6207	0.5644	0.4356	1	0.4915	0.5085	0	0.4938	0.5062
scaffold1084_74297	0.5556	0.5353	0.4647	1	0.4915	0.5085	0	0.7175	0.2825
scaffold393_19395	0.5769	0.5814	0.4186	1	0.4915	0.5085	0	0.5006	0.4994
scaffold297_1030	0.5	0.6182	0.3818	1	0.4915	0.5085	0	0.5209	0.4791
scaffold453_22637	0.5385	0.5988	0.4012	1	0.4915	0.5085	0	0.5277	0.4723
scaffold389_1656	0.6429	0.5558	0.4442	1	0.4915	0.5085	0	0.5277	0.4723
scaffold921_69859	0.5333	0.4938	0.5062	1	0.4915	0.5085	0	0.5277	0.4723
scaffold452_45014	1	0.2667	0.7333	1	0.4915	0.5085	0	0.4938	0.5062
scaffold1157_75734	0.6	0.5006	0.4994	1	0.4915	0.5085	0	0.548	0.452
scaffold520_25100	0.6071	0.5695	0.4305	0.8276	0.4918	0.5082	0	0.5277	0.4723
scaffold914_69548	0.8	0.5119	0.4881	0.6333	0.5192	0.4808	0	0.4938	0.5062
scaffold482_2517	0.7	0.3802	0.6198	1	0.4915	0.5085	0	0.548	0.452
scaffold114_7180	0.3667	0.5056	0.4944	1	0.4915	0.5085	0	0.5277	0.4723
scaffold231_14788	1	0.2444	0.7556	0.6667	0.4938	0.5062	0	0.5119	0.4881
scaffold404_21589	0.5517	0.5402	0.4598	0.7333	0.5006	0.4994	0	0.4938	0.5062
scaffold30_144	1	0.3192	0.6808	1	0.4915	0.5085	0	0.5119	0.4881
scaffold393_19395	0.5667	0.587	0.413	0.9333	0.4938	0.5062	0	0.6362	0.3638
scaffold138_16871	0.7667	0.3339	0.6661	0.1	0.7407	0.2593	0	0.5277	0.4723
scaffold921_69859	0.5385	0.5023	0.4977	0.9	0.4966	0.5034	0	0.5119	0.4881
scaffold40_4916	0.4	0.5729	0.4271	0.1333	0.4938	0.5062	0	0.5119	0.4881
scaffold457_23736	0.7667	0.5192	0.4808	0.7667	0.5192	0.4808	0	0.4915	0.5085
scaffold78_9908	0.3667	0.4966	0.5034	0.4667	0.4938	0.5062	0	0.4915	0.5085
scaffold962_71125	1	0.2692	0.7308	0.8	0.5006	0.4994	0	0.5119	0.4881
平均 Mean	0.6366	0.5033	0.4967	0.8155	0.5105	0.4894	0	0.532	0.4679

表 4 卵裂雌核发育系(F1346)、减数雌核发育系(F1324)和近交系(F1313)间遗传距离(对角线以下)与遗传相似度(对角线以上)

Tab. 4 Genetic distance (below diagonal) and genetic similarity (above diagonal) of three *Paralichthys olivaceus* families

家系 family	F1313	F1324	F1346
F1313	****	0.8888	0.8549
F1324	0.1178	****	0.9602
F1346	0.1568	0.0406	****

3 讨论

中国开展牙鲆育种研究已经有 10 多年的历程,通过选择、杂交和雌核发育等技术培育出了具有一定生长优势的新品种^[15-17],但是牙鲆优良品种的覆盖率依然较低,在生产中养殖品种生长慢、成活率低、苗种免疫力低的问题仍未有效解决,因此牙鲆育种中针对不同性状优良种群、品系的建立及遗传进展等方面的研究依然具有重要的意义。

在鱼类育种和遗传性状的分析中经常以群体为单位,对于某一个体后代的遗传性状研究相对较少,但在实际生产中发现鱼类个体之间的性状差异也相当明显,表现在不同个体后代在生长速度、成活率、繁殖率、受精率等方面。针对鱼类某一优良个体的遗传群体构建具有一定的难度,作者近年来一直致力于牙鲆育种中优良纯系的建立和研究工作,相继建立了牙鲆 F₁ 代家系 F0751 的减数雌核发育系和近交系^[23], F0719 卵裂雌核发育系,并对其遗传性状进行了分析^[22],认为牙鲆育种中不同优良性状纯系的构建是优良品种培育必不可少的环节。本研究利用 2009 年建立的 F₂ 代生长快、成活高牙鲆家系 F09119 中雌鱼为母本,建立了卵裂雌核发育系、减数雌核发育系和近交系,发现卵裂雌核发育系的成活率较低,但其生长速度明显快于减数雌核发育系和近交系,研究结果为生长快牙鲆纯系的建立及品系间的杂交育种奠定了基础,同时为 3 种纯系对遗传进展的影响研究准备了丰富的素材。

刘云国等^[26]利用 10 对微卫星引物对牙鲆一个养殖群体的 30 尾个体的群体遗传结构进行分析,有效等位基因数在 2.123~5.182,平均等位基因数为 7.16,群体平均杂合度为 0.1696。刘海金等^[27]利用 16 对微卫星分子标记对牙鲆的 5 个养殖群体(丹东、北戴河、威海、青岛、荣成)进行遗传多样性分析,5 个养殖群

体的平均等位基因数为 6.0625、平均有效等位基因数 3.692,观测杂合度 0.2200~0.8000;期望杂合度 0.2061~0.8187。邵长伟等^[28]用 5 个多态性的微卫星标记对来自 3 个不同国家(中国、日本和韩国)的牙鲆养殖群体进行了遗传多样性分析,结果表明 3 个牙鲆群体平均等位基因数为 4.8~5.6,平均观测杂合度在 0.3917~0.5643,平均期望杂合度(H_e)在 0.5981~0.6264。本研究利用 40 个微卫星标记对同一家系母本的卵裂、减数雌核发育系和近交系的相关遗传指标进行分析,将结果与以上文献相比较,只有近交系的等位基因和有效等位基因与以上养殖群体相近,而两个雌核发育系的等位基因和有效等位基因低于以上养殖和野生群体,说明雌核发育使其遗传基因发生高度纯合。本研究中卵裂雌核发育系的平均观测杂合度为 0,近交家系、减数雌核发育系观测杂合度高于以上检测群体(0.6366~0.8155),平均期望杂合度低于或接近于以上检测群体(0.4679~0.4967),这一结果与选取的检测群体及采用的微卫星标记数量等有密切关系。从遗传相似度和遗传距离看,卵裂雌核发育系和减数雌核发育系的遗传相似度较高,遗传距离较近,与近交系的相似度较低,遗传距离较远。

鱼类雌核发育系的构建作为一种快速建立育种纯系的技术途径,在很多鱼类中得到了应用,但对于卵裂、减数雌核发育系和近交系的遗传比较及对后代遗传贡献方面还缺乏可靠的研究结论。很多研究者认为一代卵裂雌核发育相当于 8~10 个世代同胞兄妹交配^[4, 29],连续两代雌核发育相当于 11~12 代全同胞交配^[30]。随着现代生物技术的发展,特别是大量微卫星分子标记的开发和利用,为雌核发育后代遗传性状及遗传进展的研究提供了可行的技术手段。近年来不同学者先后利用微卫星标记对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[5]、鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)^[31]、俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedtii*)^[32]、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[33]等鱼类减数雌核发育后代的遗传多态性、相似度及基因的重组率等遗传性状进行了分析。本研究利用同一家系的母本建立了遗传背景相似的 3 个纯系,发现卵裂雌核发育系的遗传纯合度高于减数雌核发育系,而减数雌核发育系高于近交系;卵裂雌核发育系后代基因的纯合速度是减数雌核发育系的 1.0421 倍,是近交系的 1.0577 倍,减数雌核发育系纯合度是近交系的 1.0149 倍。

利用同工酶和微卫星标记对牙鲆减数雌核发育后代进行遗传分析, 发现在基因座位上发生了基因着丝点之间的重组, 重组率在 42.6%~100%, 认为抑制第二极体排出获得的牙鲆雌核发育子代有一定基因杂合, 不能用于培育纯系^[34-35]。减数分裂雌核发育二倍体在远离着丝粒(高重组率)的位点可能易发生等位基因之间的重组交换^[36]。本研究中减数雌核家系的基因型除了 *scaffold264_29910* 等极少数位点出现纯合基因型, 大部分位点均为杂合基因型, 而卵裂雌核发育系的杂合度为 0。

利用传统育种技术进行良种选育是性状不断纯合和杂交的过程。人工雌核发育是一种快速有效制备纯系的方法, 抑制第一次卵裂理论上可以得到完全纯合的子代, 达到固定母本性状的作⽤^[37], 从而在育种中起到加快性状纯化和固定的过程, 本研究结果也说明卵裂雌核发育系后代全部为纯合型。在建鲤的培育和高寒鲤的培育中也利用了雌核发育技术进行性状的纯合^[38-39]。人工诱导雌核发育技术和兄妹交配的方式可以逐步提高鱼类性状纯合度^[40], 大大缩短选育周期, 对于高效率地获得高纯度的育种材料具有重要意义。

本研究利用卵裂雌核发育、减数雌核发育和近交繁殖 3 种途径建立了牙鲆 F₂ 生长快成活率高家系 F09119 的纯系 F1346、F1324 和 F1313, 对其生长、成活率表型性状及基于微卫星位点的遗传性状进行了比较分析, 发现该家系的卵裂雌核发育后代具有较快的生长速度; 其遗传后代的基因型为完全纯合, 遗传纯合度是减数雌核发育系的 1.0421 倍, 是近交系的 1.0577 倍, 减数雌核发育系纯合度是近交系的 1.0149 倍。本研究为牙鲆优良新品种培育建立了优良纯系, 同时为三种遗传纯系的建立和遗传贡献分析提供了丰富的理论依据。

参考文献:

- [1] Heier J, Takle K A, Hasley A O, et al. Ploidy manipulation and induction of alternate cleavage patterns through inhibition of centrosome duplication in the early zebrafish embryo[J]. *Dev Dyn*, 2015, 244 (10): 1300-1312.
- [2] Cherfas N B. Diploid radiation gynogenesis in carp. I. Massive production of diploid gynogenetic progeny[J]. *Genetika*, 1975, 11(7): 78-86.
- [3] Ye Y Z, Wu Q J, Chen D R. Gynogenetic haploid breeding technology and its application prospects of carp[J]. *Reservoir Fisheries*, 1987, (3): 44-46. [叶玉珍, 吴清江, 陈德荣. 鲤鱼雌核单倍体育种技术及其应用前景[J]. *水利渔业*, 1987, (3): 44-46.]
- [4] Wu Q J, Chen R, 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. [吴清江, 陈荣, 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.]
- [5] Castro J, Bouza C, Sanchez L, et al. Gynogenesis assessment using microsatellite genetic markers in turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Mar Biotechnol*, 2003, 5(6): 584-592.
- [6] Luckenbach J A, Godwin J, Daniels H V, et al. Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) with homologous and heterologous sperm[J]. *Aquaculture*, 2004, 237: 499-516.
- [7] Kato K, Hayashi R, Yuasa D, et al. Production of cloned red sea bream, *Pagrosomus major*, by chromosome manipulation[J]. *Aquaculture*, 2002, 207(1-2): 19-27.
- [8] Peruzzi S, Chatain B. Induction of tetraploid gynogenesis in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)[J]. *Genetica*, 2003, 119: 225-228.
- [9] Ji X S, Tian Y S, Yang J F, et al. Artificial gynogenesis in *Cynoglossus semilaevis* with homologous sperm and its verification using microsatellite markers[J]. *Aquac Res*, 2010, 41(6): 913-920.
- [10] Wang D X, Su Y Q, Wang S F, et al. Study on the allogynogenesis of *Pseudosciaena croces*[J]. *Chinese High Technology Letters*, 2006, 16(11): 1206-1210. [王德祥, 苏永全, 王世锋, 等. 异源精子诱导大黄鱼雌核发育的研究[J]. *高技术通讯*, 2006, 16(11): 1206-1210.]
- [11] Mei J, Gui J F. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish[J]. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 124-136.
- [12] Chen S L, Tian Y S, Yang J F, et al. Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Mar Biotechnol*, 2009, 11(2): 243-251.
- [13] Lei J L. Theory and Technology of Marine Fish Farming[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2011: 482-483. [雷霖. 海水鱼类养殖理论与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 482-483.]
- [14] Tian Y S, Xu T J, Chen S L, et al. Parent effects and estimation of genetic parameters for three Japanese flounder breeding populations[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2009, 31(6): 119-129. [田永胜, 徐田军, 陈松林, 等. 三个牙鲆育种群体亲本效应及遗传参数估计[J]. *海洋学报*, 2009, 31(6): 119-129.]
- [15] Tian Y S, Qi W S, Jiang J, et al. Analysis of phenotype and genetic variation of on "Flounder No.1" *Paralichthys Oliva-ceus* and their parental populations[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 36(6): 75-87. [田永胜, 齐文山, 姜静, 等. "鲆优 1 号"牙鲆和亲本群体的表型及遗传性状变异分析[J]. *海洋学报*, 2014, 36(6): 75-87.]
- [16] Chen S L, Tian Y S. Japanese flounder "flounder No.1" [M]/National Fisheries Extension Center. Promotion of New Varieties of Aquatic Guide in 2010. Beijing: China Agriculture Press, 2011: 242-268. [陈松林, 田永胜. 牙鲆"鲆优 1 号"[M]/全国水产技术推广总站. 2010 水产新品种推广

- 指南. 北京: 中国农业出版社, 2011: 242-268.]
- [17] Liu H J, Wang Y F. Japanese flounder "North flounder" [M]//National Fisheries Extension Center. Promotion of New Varieties of Aquatic Guide in 2014. Beijing: China Agriculture Press, 2014: 207-227. [刘海金, 王玉芬. 牙鲆“北鲆 2 号”[M]//全国水产技术推广总站. 2014 水产新品种推广指南. 北京: 中国农业出版社, 2014: 207-227.]
- [18] You F, Xu J H, Ni J, et al. Study on artificial induction of mitogynogenetic diploid in *Paralichthys olivaceus*[J]. Chinese High Technology Letters, 2008, 18(8): 874-880. [尤锋, 许建和, 倪静, 等. 牙鲆同质雌核发育人工诱导研究[J]. 高技术通讯, 2008, 18(8): 874-880.]
- [19] Liu H J, Wang C A, Zhu X C, et al. Embryonic development of gynogenetic diploid and triploid Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2008, 23(3): 161-167. [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.]
- [20] Liu H J, Hou J L, Chang Y M, et al. Induced meiogynogenesis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by sperm of red sea bream (*Pagrus major*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(4): 508-514. [刘海金, 侯吉伦, 常玉梅, 等. 真鲷精子诱导牙鲆数分裂雌核发育[J]. 水产学报, 2010, 34(4): 508-514.]
- [21] Ji X S, Chen S L, Tian Y S, et al. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization[J]. Aquaculture, 2004, 241: 517-528.
- [22] Qi W S, Tian Y S, Jiang J, et al. Establishment and identification of mitotic gynogenesis Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) pure family[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(5): 451-551. [齐文山, 田永胜, 姜静, 等. 牙鲆卵裂雌核发育纯系的建立及鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(5): 451-551.]
- [23] Tian Y S, Wang D, Wang L, et al. Construction and genetic analysis of gynogenetic clone and inbreeding strain of F₁ generation families for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2011, 33(3): 114-124. [田永胜, 汪娣, 王磊, 等. 牙鲆 F₁ 代近交系、雌核发育系的建立及遗传检测[J]. 海洋学报, 2011, 33(3): 114-124.]
- [24] Liu Y X, Sun Z H, Wang Y F, et al. Parentage determination in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families by microsatellite DNA marker analysis[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 52(11): 1593-1603. [刘永新, 孙朝徽, 王玉芬, 等. 牙鲆家系亲权鉴定的微卫星 DNA 标记分析[J]. 水产学报, 2015, 52(11): 1593-1603.]
- [25] Song W, Pang R, Niu Y, et al. Construction of high-density genetic linkage maps and mapping of growth-related quantitative trait loci in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. PLoS ONE, 2012, 7(11): e50404.
- [26] Liu Y G, Chen S L, Li B F. Genetic structure analysis for the cultured stock of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by microsatellite marker[J]. Marine Fisheries Research, 2005, 26(5): 27-34. [刘云国, 陈松林, 李八方. 牙鲆养殖群体遗传变异的微卫星标记研究[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(5): 27-34.]
- [27] Liu H J, Zhu X C, Sun X W, et al. Analysis of genetic structure among 5 cultured stocks of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(1): 30-37. [刘海金, 朱晓琛, 孙效文, 等. 牙鲆 5 个养殖群体的遗传多样性分析[J]. 中国水产科学, 2008, 15(1): 30-37.]
- [28] Shao C W, Liao X L, Tian Y S, et al. Microsatellite marker analysis of genetic structures of three populations of cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30(1): 41-46. [邵长伟, 廖小林, 田永胜, 等. 牙鲆 3 个养殖群体遗传结构的微卫星分析[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(1): 41-46.]
- [29] Hörstgen-Schwark G. Production of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*)[J]. Aquaculture, 1993, 112(1): 25-37.
- [30] Liu H J, Liu Y X, Wang Y F, et al. Genetic difference between meiotic gynogenesis and mitotic gynogenesis in the Japanese flounder[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(6): 898-904. [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(6): 898-904.]
- [31] Yang 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.]
- [32] Jiang Y C, Su J T, Dong Y, et al. Microsatellite marker analysis of gynogenesis by induction in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*)[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2012, 51(4): 106-113. [姜彦超, 苏建通, 董颖, 等. 俄罗斯鲟雌核发育诱导及其后代的微卫星分析[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2012, 51(4): 106-113.]
- [33] Zhang X H, Gao Z X, Luo W, et al. Studies on morphological characteristics and genetic analysis of the gynogenesis nlung snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(1): 126-133. [张新辉, 高泽霞, 罗伟, 等. 雌核发育团头鲂的形态和遗传特征分析[J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 126-133.]
- [34] Xu C, Wang K L, Xu Y L, et al. Recombination and expression of paternal gene of isozymes in gynogenetic olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2002, 33(1): 62-67. [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.]
- [35] Wang W, You F, Gao T X, et al. Microsatellite markers analysis on artificial meiogynogenetic stock of *Paralichthys olivaceus*[J]. Chinese High Technology Letters, 2005, 15(7): 107-110. [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.]
- [36] Wang G X, Liu H J, Zhang X Y, et al. Analysis of homozygosity and genetic similarity between two successive generations in a meiogynogenetic Japanese flounder family[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(3): 381-389. [王桂兴, 刘海金, 张晓彦, 等. 牙鲆连续两代减数分裂雌

- 核发育家系的遗传特征[J]. 中国水产科学, 2012, 19(3): 381-389.]
- [37] Komen H, Thorgaard G H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review[J]. Aquaculture, 2007, 269: 150-173.
- [38] Zhang J S, Sun X Y. Open and comprehensive analysis of breeding techniques of Jian carp[J]. China Fisheries, 2006(9): 69-71. [张建森, 孙小异. 建鲤综合育种技术的公开和分
- 析[J]. 中国水产, 2006(9): 69-71.]
- [39] Liu M H, Shen J B, Bai Q L, et al. New varieties breeding of cold carp[J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 34(4): 391-397. [刘明华, 沈俊宝, 白庆利, 等. 新品种高寒鲤的选育[J]. 水产学报, 1997, 34(4): 391-397.]
- [40] Arai K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan[J]. Aquaculture, 2001, 197(1-4): 205-228.

Growth and genetic analysis among three homologous inbred strains of *Paralichthys olivaceus*

TIAN Yongsheng^{1,3}, DUAN Huimin^{1,2}, LI Xiangkong^{1,4}, LI Hong^{1,2}, SONG Lini^{1,2}, CHEN Honglin^{1,2}, CHEN Zhangfan^{1,3}, TANG Jiang^{1,2}, CHEN Songlin^{1,3}

1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266200, China;
4. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: Establishing meiotic gynogenesis, mitotic gynogenesis, and inbred lines is important for trait purification during selective fish breeding. Yet how these three genetic pathways affect heredity remains the focus of much genetics research. In this study, we used the female parents from *Paralichthys olivaceus* family F09119 to establish mitotic gynogenesis (F1346), meiotic gynogenesis (F1324), and an inbred line (F1313) and analyzed their growth and genetic characteristics. Body length, body width, and weight were measured in the three families from 85 to 388 d post fertilization (dpf). Results on 338 dpf showed that growth rate of F1346 was the highest [body length, (28.89±2.77) cm; body width, (10.00±1.21) cm; and weight, (254.91±83.11) g] and that of F1324 was the lowest ($P<0.05$). Survival rate of F1324 on 263 dpf was the highest (46.50%) and that of F1346 was the lowest (26.80%). The numbers of alleles for mitotic gynogenesis, meiotic gynogenesis, and the inbred line were 2.0, 2.0 and 2.35, respectively. The effective numbers of alleles were 1.87, 1.95, and 2.1; polymorphic information content values were 0.35, 0.36, and 0.4; and mean observed heterozygosity values were 0, 0.8155, and 0.6366, respectively, indicating that genetic variation of mitotic gynogenesis and meiotic gynogenesis was less than that of the inbred line. The trend for unbiased expected homozygosity was F1313 (0.503)<F1324 (0.5105)<F1346 (0.532) and that of unbiased expected heterozygosity was F1313 (0.4967)>F1324 (0.4894)>F1346 (0.4679). Homozygosity of meiotic gynogenesis was 1.0421-fold higher than that of meiotic gynogenesis and 1.0577-fold higher than that of the inbred line, whereas that of meiotic gynogenesis was 1.0149-fold higher than that of the inbred line. The genetic distance between F1346 and F1313 was longest (0.1568) but genetic similarity was the lowest (0.8549), whereas the genetic distance between F1346 and F1324 was the shortest (0.0406), and genetic similarity was the greatest (0.9602). These results provide a theoretical basis for establishing an inbred line of *P. olivaceus* and analyses of genetic variations among meiotic gynogenesis, mitotic gynogenesis, and the inbred line.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; meiotic gynogenesis line; mitotic gynogenesis line; inbred line; phenotypic character; genetic character

Corresponding author: TIAN Yongshen. E-mail: tianys@ysfri.ac.cn