

## 微卫星评价牙鲆雌核发育二倍体纯合性

朱晓琛<sup>1,2</sup>, 刘海金<sup>1,\*</sup>, 孙效文<sup>1</sup>, 薛玲玲<sup>1</sup>, 毛连菊<sup>2</sup>

(1. 中国水产科学院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 采用 8 个微卫星座位分别对牙鲆减数雌核发育二倍体家系和卵裂雌核发育二倍体家系的纯合性进行检验。卵裂雌核发育二倍体在所有检测座位全部纯合。减数雌核发育二倍体在部分座位发生纯合, 但未发现在所有座位全部纯合的个体, 在 Poli9TUF、Poli9-8TUF、Poli11TUF、Poli13TUF、Poli23TUF、Poli30TUF、Poli123TUF 和 Poli130TUF 座位, 杂合子比例分别为 1.000 0、1.000 0、0.194 4、0.945 9、0.861 1、1.000 0、0.777 8 和 0.800 0, 平均杂合子比例为 0.822 4。由此表明, 牙鲆除了 Poli11TUF 外, 在其余 7 个座位均具有很高的重组率。研究结果显示, 牙鲆卵裂雌核发育二倍体一代即可形成纯合子; 而减数雌核发育二倍体由于具有较高的重组率, 使其与母本的遗传同质性较高。

**关键词:** 牙鲆; 雌核发育; 纯合性; 微卫星

中图分类号: Q959.486; Q31 文献标识码: A 文章编号: 0254–5853 (2006) 01–0063–05

## Assessment of Homozygosity in Gynogenetic Diploid Using Microsatellite Markers in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

ZHU Xiao-chen<sup>1,2</sup>, LIU Hai-jin<sup>1,\*</sup>, SUN Xiao-wen<sup>1</sup>, XUE Ling-ling<sup>1</sup>, MAO Lian-ju<sup>2</sup>

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. Life Science and Technology Institute, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** Gynogenesis was thought to be a useful method to generate inbred lines in fish. In this study, analysis of 5–8 heterozygous loci in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) was used to measure the increment of homozygosity in meiogynogenetic diploid (Meiotic-A & Meiotic-B) and mitogynogenetic diploid (Mitotic-A). The result showed all homozygosity in Mitotic-G1, while a high percentage of heterozygosity in Meiosis-A and Meiosis-B except Poli11TUF. The rate of heterozygosity in meiogynogenetic progenies at the locus of Poli9TUF, Poli9-8TUF, Poli11TUF, Poli13TUF, Poli23TUF, Poli30TUF, Poli123TUF and Poli130TUF were 1.000 0, 1.000 0, 0.194 4, 0.945 9, 0.861 1, 1.000 0, 0.777 8 and 0.800 0, respectively. The average recombination rate of these eight loci is 0.822 4. The high proportion of heterozygotes for seven loci demonstrates that it is not a practical method for producing homozygous inbred lines in the gynogenetic fish produced by retention the second polar body; and treatments of suppressing the first cell division were more promising for this purpose.

**Key words:** Japanese flounder; Gynogenesis; Homozygosity; Microsatellite marker

人工雌核发育是快速建立纯系的有效手段, 一次卵裂雌核发育相当于 8~10 个世代全同胞交配, 在一次卵裂雌核发育的基础上再进行一次减数雌核发育就可以获得纯系(Wu et al, 1981; Streinger et al,

1981), 在鱼类遗传育种中, 对于快速准确的选育优良品种具有十分重要的意义。同时, 人工雌核发育在鱼类的染色体操作、性别控制以及遗传分析等方面都具有潜在的应用价值(Liu et al, 2002)。

\* 收稿日期: 2005–11–07; 接受日期: 2005–12–26

基金项目: 国家科技攻关项目(96–920–44–01)

\* 通讯作者 (Corresponding author), 1951–, 研究员, 博士生导师, 从事鱼类遗传育种研究。E-mail: liuhaijin@hotmail.com

与其他分子标记相比,微卫星 DNA 标记 (microsatellite DNA markers) 具有许多优点:微卫星较高的多态性,便于检测出种群及个体间的异质性 (Du et al, 2000), 可以用于检测同源精子诱导雌核发育二倍体是否有父方基因表达及其与母本的遗传同质性;微卫星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,人们已将微卫星技术应用于锦鲤 (*Cyprinus carpio*)、大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 等鱼类的雌核发育的检测研究 (Liu et al, 2002; Castro et al, 2003), 而采用微卫星对雌核发育后代纯合性的研究还仅限于欧鲈 (*Dicentrarchus labrax*)、非洲鲶 (*Clarias gariepinus*) 等 (Galbusera et al, 2000; Francescon et al, 2005)。

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 是较早成功进行人工雌核发育的海水养殖鱼类之一。早在 20 世纪 80 年代,日本学者就采用雌核发育技术研究了牙鲆的性别决定机制、生产全雌牙鲆以及克隆牙鲆的方法 (Yamamoto, 1999); 但到目前为止,对其雌核发育后代的纯合性检测还仅见同工酶方面的报道 (Tabata & Gorie, 1987)。本研究用微卫星标记比较了抑制第一次卵裂形成的卵裂雌核发育二倍体和抑制第二极体排出形成的减数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,以期选择育种方式提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 雌核发育家系的获得

参照 Yamamoto (1999) 的方法,采用异源 [真鲷 (*Pagrus major*)] 精子诱导牙鲆的雌核发育。首先将 1 尾真鲷 (体长 34 cm) 的精液经稀释后用紫外线照射 1 min; 然后将牙鲆亲本 A 的一部分卵子和亲本 B 的卵子用灭活的真鲷精子激活 2 min 后,转移到 0~2 °C 的海水中冷休克处理 45 min, 抑制第二极体排出,获得减数雌核发育二倍体家系 A 和家系 B (以下称 Meiotic-A 及 Meiotic-B)。亲本 A 的另一部分卵子经激活,在 17 °C 培养下 1 h 后,用静水压 (650 kg/cm<sup>2</sup>) 处理以抑制第一次卵裂,获得卵裂雌核发育二倍体家系 (以下称 Mitotic-A)。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

剪取亲本背鳍及 15 日龄的雌核发育二倍体活体 (Meiotic-A 18 尾; Meiotic-B 19 尾; Mitotic-A 20 尾), 将其分装后于液氮中保存,到达实验室后转

移到 -80 °C 冰箱中保存,以防止其降解。DNA 提取参照 Zhou et al (2001) 的方法。

### 1.3 PCR 反应及电泳结果分析

PCR 反应体系为 25  $\mu$ L, 包括 10  $\times$  buffer 15  $\mu$ L、Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L) 1  $\mu$ L、dNTPs (各 2 mmol/L) 1  $\mu$ L、上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L、模板 DNA 1  $\mu$ L、Taq DNA 聚合酶 (Promega) 1 U, 加适量 (dd) H<sub>2</sub>O, 模板 30~50 ng。反应条件为:94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 60~64 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。反应程序于 PE9700 型 PCR 仪 (PE 公司) 上进行。2% 琼脂糖凝胶电泳进行分离, Gel-Pro Analyzer 4.5 凝胶分析软件分析电泳结果。

### 1.4 分析方法

电泳图谱中扩增出 1 条 DNA 带的,视为纯合;扩增出 2 条 DNA 带的,视为杂合 (Crooijmans et al, 1997)。

## 2 结果与分析

### 2.1 亲本杂合座位的筛选

采用 Coimbra et al (2001) 克隆的牙鲆 20 个微卫星引物,对亲本进行杂合座位的筛选,其结果 Mitotic-A 和 Meiotic-A 的亲本在 8 个座位表现为杂合, Meiotic-B 的亲本在 5 个座位表现为杂合。参照牙鲆的遗传连锁图谱 (Coimbra et al, 2003), 这 8 个座位分布在 7 个连锁群上 (表 1)。

### 2.2 微卫星分析

采用异源精子诱导雌核发育,从分类学的角度来看,真鲷和牙鲆亲缘关系很远,形态上的差异很大,分属于鲈形目和鲷形目,其子代是不能成活的 (Tabata, 1991), 因而避免了正常受精二倍体的存在。经比较母本和子代的基因型,在所有检测个体中未发现异于母本的等位基因。母本的 8 个杂合微卫星座位在 Meiotic-A、Mitotic-A 以及 Meiotic-B 的分析结果见表 2。

在 Mitotic-A 的所有检测个体中未发现杂合子,证明了卵裂雌核发育一次即可获得纯合子 (图 1)。

经检测,8 个座位中,被检的减数雌核发育二倍体中无全部纯合的个体,在 Poli9TUF、Poli9-8TUF 和 Poli30TUF 3 个座位全部为杂合。杂合比例最低的座位是 Poli11TUF, 达到了 0.194 4。座位 Poli13TUF、Poli23TUF、Poli123TUF 和 Poli130TUF 杂合的比例都大于 0.5, 分别达到 0.945 9、0.861 1、0.777 8、

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

座位 Locus	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度		GenBank
		Annealing temperature (°C)	连锁群 Linkage group	
Poli9TUF	F : GATCTGCAGAAAACACACTCA R : GCGAGTTCTTCTCAAATGC	62	5	AB037980
Poli9-8TUF	F : GAGAGACAGAAGGTCGTC AACGGTA R : ACAAAGACCACGATGCAAAGTGAC	62	15	AB037989
Poli11TUF	F : ATGAAAACCAAGAATCCC R : GCGCATTTGGTAGTTTGT	60	17	AB037981
Poli13TUF	F : CACCTCCAGGTTCTACAGTCG R : TCCTGCACAGAGGATGAAAA	60	3	AB037982
Poli23TUF	F : CACAGTGTCAAAAGTGGTGG R : GGGTGTCTGTGTCATGCTG	60	2	AB037985
Poli30TUF	F : GAGACAACCCCAAGAAAT R : ATCAGGGTATTGTTTTTGCCC	60	2	AB037988
Poli123TUF	F : TATCTGACCAGA ACTGGAGGGTCTG R : GCGTGTGCATTTCGATATACATTTTG	62	20	AB037994
Poli126TUF	F : ATAATCACGAGCTGTGTGCTGAATG R : TCACATGTACAAACACACCACTGGA	62	8	AB037995
Poli130TUF	F : GCGGTGAGGACTTTATTTCTGGACT R : GTGCTACTGCAGAAAAGCGACTGTT	64	1	AB037996

<sup>1</sup> F : 正向引物 (Forward primer); R : 反向引物 (Reverse primer)。

表 2 雌核发育二倍体在 8 个座位上的基因型及杂合子比例

Tab. 2 Genotypes at 8 loci in gynogenetic diploid and heterozygotes proportion of meiosisgynogenetic diploid

座位 Locus	家系 Family	母本基因型 Maternal genotype	雌核发育二倍体基因型 Gynogenetic diploid genotype			$H^{\dagger}$
			11	12	22	
Poli9TUF	Mitotic-A	190/220	0.600 0	0.000 0	0.400 0	1.000 0
	Meiotic-A	190/220	0.000 0	1.000 0	0.000 0	
Poli9-8TUF	Mitotic-A	152/162	1.000 0	0.000 0	0.000 0	1.000 0
	Meiotic-A	152/162	0.000 0	1.000 0	0.000 0	
	Meiotic-B	143/164	0.000 0	1.000 0	0.000 0	
Poli11TUF	Mitotic-A	134/156	0.450 0	0.000 0	0.550 0	0.194 4
	Meiotic-A	134/156	0.764 7	0.235 3	0.000 0	
	Meiotic-B	109/171	0.368 4	0.157 9	0.473 7	
Poli13TUF	Mitotic-A	145/205	0.650 0	0.000 0	0.350 0	0.945 9
	Meiotic-A	145/205	0.000 0	1.000 0	0.000 0	
	Meiotic-B	164/207	0.052 6	0.894 7	0.052 6	
Poli23TUF	Mitotic-A	121/179	0.450 0	0.000 0	0.550 0	0.861 1
	Meiotic-A	121/179	0.058 8	0.941 2	0.000 0	
	Meiotic-B	107/148	0.105 3	0.882 4	0.105 3	
Poli30TUF	Mitotic-A	123/138	0.550 0	0.000 0	0.450 0	1.000 0
	Meiotic-A	123/138	0.000 0	1.000 0	0.000 0	
Poli123TUF	Mitotic-A	131/183	0.600 0	0.000 0	0.400 0	0.777 8
	Meiotic-A	131/183	0.111 1	0.777 8	0.111 1	
Poli130TUF	Mitotic-A	147/171	0.400 0	0.000 0	0.600 0	0.800 0
	Meiotic-A	147/171	0.235 3	0.764 7	0.000 0	
	Meiotic-B	132/163	0.166 7	0.833 3	0.000 0	

<sup>†</sup> 减数雌核发育二倍体杂合子比例。

<sup>†</sup> Heterozygotes proportion of meiosisgynogenetic diploid.

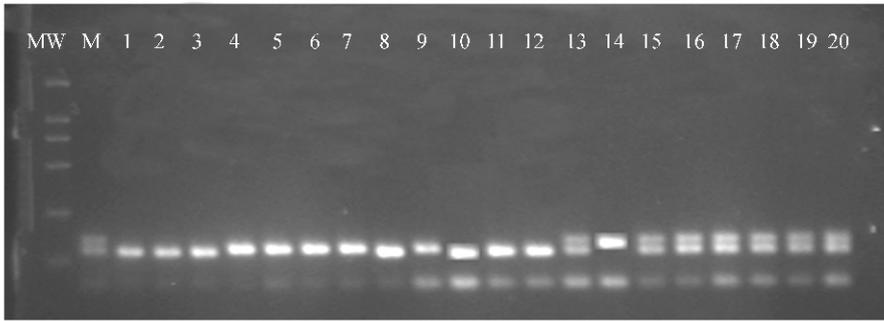


图 1 引物 Poli130TUF 在 Mitotic-A 及 Meiotic-A 部分个体中扩增的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis pattern of PCR product of partial individuals in Mitotic-A and Meiotic-A amplified with microsatellite primer Poli130TUF

MW : 分子量 (Molecular weight); M : 母本 (Mother); 1 - 10 : Mitotic-A; 11 - 20 : Meiotic-A.

0.800 0, 8 个座位的平均杂合子比例为 0.822 4。

雌核发育二倍体出现杂合现象表明卵细胞减数分裂过程中同源染色体之间发生了交换重组, 因此, 减数雌核发育二倍体的杂合子比例可以用来反映该座位与着丝粒的重组率 (Thorgaard et al, 1983), 本研究的结果说明了牙鲆在所研究的 8 个微卫星座位的重组率很高。

### 3 讨论

减数分裂雌核发育后代出现杂合是因为减数第一次分裂时染色单体之间的联会和交换而造成的 (Purdom, 1969)。在有关鱼类的雌核发育子代重组的报道中, 应用同工酶的研究较多, 而且所得到的重组率变动范围也很大。香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) *Gpi-1* 的重组率达 100% (Taniguchi et al, 1987), 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的 9 个同工酶座位的平均重组率为 55% (Thorgaard et al, 1983), 鲤鱼 (*Cyprinus carpio carpio*) 的 9 个基因座位的平均重组率则为 35% (Nagy & Csanyi, 1982), 牙鲆的 *Ldh-C* 和 *Cat* 两个座位的重组率分别为 52.6% 和 29.8% (Xu et al, 2002)。采用微卫星的研究较少, 非洲鲶在两个微卫星座位分别得到了 86% 和 71% 的重组率 (Galbusera et al, 2000), 欧鲈在 6 个微卫星座位的重组率从 40% 到 94% 不等 (Francescon et al, 2005)。

本研所得到的牙鲆的 8 个座位的平均重组率为 0.822, 高于牙鲆的 *Ldh-C* 和 *Cat* 两座位的重组率 (Xu et al, 2002), 较前文提到的其他鱼类也有明显的差异。

造成差异的最主要原因是研究的座位不同, 比

如虹鳟的 9 个基因座位的重组率从 0.135 ~ 1.000 不等 (Thorgaard et al, 1983)。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座位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 (Francescon et al, 2005)。根据 Purdom (1969) 提出的公式:  $P_{(x)} = 1 - 1/2 P_{(x-1)}$  [ $P_{(x)}$  是经过  $x$  次交叉以后仍为杂合的可能性比例], 并指出交叉的次数越多, 杂合子的比例反而趋近 66.7%。本研所得到的牙鲆在 8 个微卫星座位的重组率为 0.822, 大于 66.7%, 反映了交叉具有很强的干涉作用 (Thorgaard et al, 1983)。由于鱼类的染色体绝对长度较短 (Thorgaard et al, 1983), 很有可能在联会时就只发生一次交换, 使得重组率偏高。

Francescon et al (2005) 在研究欧鲈的雌核发育二倍体纯合性时曾指出, 欧鲈的染色体多为近端着丝粒染色体, 着丝粒的干涉作用较低, 导致欧鲈的重组率较高。而牙鲆的核型为  $2n = 48$ , 且 48 条染色体全部为端着丝粒染色体 (Liu et al, 1995), 所以着丝粒对交叉的干涉作用可能更小, 使得牙鲆有可能较其他鱼类具有更高的重组率。比如欧鲈的核型为  $2n = 48$ ,  $46st + 2sm/st$  (Francescon et al, 2005), 虹鳟的核型为  $2n = 60$ ,  $40m + 4sm + 2st + 14t$ , 鲤鱼的核型为  $2n = 100$ ,  $22m + 34sm + 22t$ , 端着丝粒染色体所占的比例都比牙鲆要小。这也可能是导致牙鲆比上述鱼类重组率偏高的原因。

从本研究结果可以看出: 抑制第二极体排出诱导牙鲆减数雌核发育二倍体, 由于具有较高的重组

率,使其不适合用于直接建立纯系,但较高的重组率同时体现了与母本具有高度的遗传同质性,可以形成很好的育种材料;而抑制第一次卵裂诱导的雌

核发育二倍体一代即可实现纯合,是建立纯系的良好办法。

## 参考文献:

- Castro J, Bouza C, Sanchez L, Cal RM, Piferrer F, Martinez P. 2003. Gynogenesis assessment using microsatellite genetic markers in turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Mar Biotechnol*, **5**: 584–592.
- Coimbra MRM, Kobayashi K, Koretsugu S, Hasegawa O, Ohara E, Ozaki A, Sakamoto T, Naruse K, Okamoto N. 2003. A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture*, **220**: 203–218.
- Coimbra MRM, Hasegawa O, Kobayashi K, Koretsugu S, Ohara E, Okamoto N. 2001. Twenty microsatellite markers from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Fish Sci*, **67**: 358–360.
- Crooijmans RPMA, Poel JJ Van der, Groenen MAM, Bierbooms VAF, Komen J. 1997. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Anim Genet*, **28** (2): 129–134.
- Du CB, Sun XW, Lou YD, Shen JB. 2000. The genetic heterozygosity analysis to wild carp and two cultivated strains of common carp using microsatellite technique [J]. *J Shanghai Fish Univ*, **9** (4): 285–289. [杜长斌, 孙孝文, 楼允东, 沈俊宝. 2000. 应用微卫星技术对野鲤和两种鲤选育品系的遗传多样性分析. 上海水产大学学报, **9** (4): 285–289.]
- Francescon A, Barbaro A, Bertotto D, Libertini A, Cepollaro F, Richard J, Belvedere P, Colombo L. 2005. Assessment of homozygosity and fertility in meiotic gynogens of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *Aquaculture*, **243**: 93–102.
- Galbusera P, Volckaert FAM, Ollevier F. 2000. Gynogenesis in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) III. Induction of endomitosis and the presence of residual genetic variation [J]. *Aquaculture*, **185**: 25–42.
- Liu J. 1995. Studies on the karyotype of *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel) [J]. *Mar Sci*, **1995** (2): 65–67. [刘静. 1995. 牙鲆染色体组型的研究. 海洋科学, **1995** (2): 65–67.]
- Liu JX, Zhou L, Zhao ZS, Gui JF. 2002. Studies on microsatellite markers of four artificially gynogenetic families in ornamental carp [J]. *Zool Res*, **23** (2): 97–105. [刘静霞, 周莉, 赵振山, 桂建芳. 2002. 锦鲤 4 个人工雌核发育家系的微卫星标记研究. 动物学研究, **23** (2): 97–105.]
- Nagy A, Csanyi V. 1982. Changes of genetic parameters in successive gynogenetic generations and some calculations for carp gynogenesis [J]. *Theor Appl Genet*, **63**: 105–110.
- Purdom CE. 1969. Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish [J]. *Heredity*, **24**: 431–444.
- Streinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. 1981. Production of clones of homozygous diploid fish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Nature*, **291**: 293–296.
- Tabata T. 1991. Induction of gynogenetic diploid males and presumption of sex determination mechanisms in the hirame *Paralichthys olivaceus* [J]. *Nippon Suisan Gakkaisui*, **57**: 845–850.
- Tabata T, Gorie S. 1987. Determination of IDH genotype by biopsy and gene-centromere recombination frequencies in hirame *Paralichthys olivaceus* [J]. *Fish Genetics and Breeding Science*, **12**: 51–56.
- Taniguchi N, Kijima A, Fukai J. 1987. High heterozygosity at *Gpi-1* in gynogenetic diploids and triploids of ayu *Plecoglossus altivelis* [J]. *Nippon Suisan Gakkaish*, **53** (5): 845–850.
- Thorgaard GH, Allendorf FW, Knudsen KL. 1983. Gene-centromere mapping in rainbow trout: High interference over long map distances [J]. *Genetics*, **103**: 771–783.
- Wu QJ, Ye YZ, Chen DR, Ke HW. 1981. Investigation on the carp gynogenesis with reference to establishing a pure line [J]. *Acta Genet Sin*, **8** (1): 50–55. [吴清江, 叶玉珍, 陈德荣, 柯鸿文. 1981. 鲤鱼人工雌核发育及其作为建立近交系新途径的研究. 遗传学报, **8** (1): 50–55.]
- Xu C, Wang KL, Xu YL, Zhang PJ. 2002. Recombination and expression of paternal gene of isozymes in gynogenetic olive flounder [J]. *Oceanol Limnol Sin*, **33** (1): 62–67. [徐成, 王可玲, 徐永立, 张培军. 2002. 雌核发育牙鲆同工酶基因的重组及父方基因的表达. 海洋与湖沼, **33** (1): 62–67.]
- Yamamoto E. 1999. Studies on sex-manipulation and production of cloned population in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel) [J]. *Aquaculture*, **173**: 235–246.
- Zou SM, Li SF, Cai WQ. 2001. Molecular genetic markers and variations of cultured *Paralichthys olivaceus* and *Scophthalmus maximus* [J]. *J Fish Sci China*, **7** (4): 6–9. [邹曙明, 李思发, 蔡其. 2001. 牙鲆和大菱鲆群体的分子标记和遗传变异. 中国水产科学, **7** (4): 6–9.]