

微卫星标记对牙鲆有丝分裂雌核发育家系的亲子鉴定

季 旭^{1,2}, 孙效文¹, 杨立更³, 李雅娟², 刘海金^{1,4,*}

(1. 中国水产科学研究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;
3. 中国水产科学研究院 北戴河中心实验站, 河北 秦皇岛 066100; 4. 中国水产科学研究院, 北京 100039)

摘要: 利用 18 个微卫星标记, 对 6 个家系的 26 尾有丝分裂雌核发育牙鲆进行亲子鉴定, PCR 扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 结果表明: 1 个座位在母本中表现为相同的基因型, 视为单态座位, 其他 17 个座位为多态; 多态座位在亲子鉴定中的累计排除概率和累计个体识别概率分别为 0.9985、0.9999; 根据被测个体在 17 个微卫星座位的基因型, 最后确认 26 尾子代的母本, 其中 7 尾子代在某些座位表现出与其母本不完全匹配的基因型。利用微卫星标记可确定雌核发育后代的亲子关系, 从而构建牙鲆雌核发育家系系谱, 对牙鲆雌核发育的深入研究具有重要意义。

关键词: 牙鲆; 雌核发育; 微卫星标记; 亲子鉴定

中图分类号: Q959.486; Q31 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2008)01-0025-06

Paternity Testing of Mitogynogenetic Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Using Microsatellite Loci

JI Xu^{1,2}, SUN Xiao-wen¹, YANG Li-geng³, LI Ya-juan², LIU Hai-jin^{1,4,*}

(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;
3. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China;
4. Chinese Academy of Fisheries Science, Beijing 100039, China)

Abstract: Eighteen microsatellite markers were analysed with a paternity testing application using 26 mitogynogenetic Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) progeny and their six assumed female-parents. The amplified products of PCR were analyzed by 8% polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis patterns showed that only one pair of primers had a monomorphic pattern, and the others were polymorphic. Cumulate exclusion probability of polymorphic loci was 0.9985 and cumulate power of discrimination was 0.9999. An effective method was applied to track the gynogenetic maternal parents of 26 progeny. The genotypes of six progeny were not completely identical to their mothers on some loci. The construction of pedigree was perfected by looking at microsatellite loci from paternity tests which are essential to the deeper analysis of gynogenetic Japanese flounder.

Key words: Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*); Gynogenesis; Microsatellite marker; Paternity testing

人工雌核发育作为一种有效的纯系建立、遗传定型的育种手段, 已被广泛应用于许多鱼类的遗传育种研究中(Ijiri, 1980; Chourrout, 1982; Pelegri & Schulte-Merker, 1999)。牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是我国沿海的重要经济鱼类, 是成功进行人工雌核发育的海水养殖鱼类之一, 在海水养殖中占有重要地位。Yamamoto (1999)已利用雌核发育原理在一次

有丝分裂雌核发育的基础上, 再进行一次减数雌核发育, 获得了纯系牙鲆。因有丝分裂雌核发育成活率极低 (Tabata, 1991; Bertotto et al., 2005), 样品稀少, 国内外尚未见关于有丝分裂雌核发育牙鲆亲子鉴定的研究报道。在牙鲆雌核发育过程中, 因各家系残存后代少, 在饲养过程中, 需要将各家系少量的存活后代混合一起培育, 否则会因牙鲆尾数少

收稿日期: 2007-10-23; 接受日期: 2007-12-27

基金项目: 国家科技支撑计划 (2006BAD01A1207); 跨越计划 (2006 跨 18)

*通讯作者 (Corresponding author), 刘海金 (1951-), 男, 研究员, 博士, 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: liuhajin2005@126.com

作者简介: 季旭 (1983-), 女, 硕士, 从事水产动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: jixu868@sohu.com

而不摄食，很难养活。因此，培育到一定规格，就需要鉴定它们的家系及亲子关系，以便作为不同的育种材料。

微卫星 DNA (microsatellite) 具有分布广、高度多态、单座位基因呈共显性遗传、检测方法快速稳定等优点，在亲子鉴定中有着其他遗传标记所不可比拟的优势。目前微卫星 DNA 已成功应用于许多物种的亲子鉴定中 (Zhang et al, 2003; Gao et al, 2005)，尤其在法医学领域用于个体识别和亲子鉴定，被认为是准确性最好的一种检测技术 (Li et al, 2001)。Van Zevern et al(1999)利用 7 个微卫星座位对 4 个比利时猪种进行血缘关系鉴定，排除率均在 95% 以上。另外，微卫星标记不仅用于个体识别和亲子鉴定中，还可以用于克隆后代的检测，同样具有很高的准确性。Guo et al(2002)用山羊的 5 个微卫星座位对体细胞克隆山羊及其供体羊和受体羊进行 DNA 分析，结果 2 只体细胞克隆山羊的微卫星 DNA 指纹与供体细胞完全相同，证明体细胞克隆山羊基因组来源于供体细胞。本实验室已采用 8 个微卫星标记对稚鱼期雌核发育牙鲆的纯合度进行检验，发现有丝分裂雌核发育二倍体牙鲆在所有检测座位全部纯合，但未发现在所有座位全部纯合的减数分裂雌核发育牙鲆 (Zhu et al, 2006)。目前关于利用微卫星标记对牙鲆进行亲子鉴定的研究尚未见诸报道。

本文针对 2006 年诱导的 26 尾有丝分裂雌核发育子代（9 尾至今成活，17 尾稚鱼期死亡）和 6 尾候选母本牙鲆进行亲子鉴定，确认其亲子关系，以便分别研究其遗传特性并为进一步育种提供遗传学依据。

1 材料与方法

1.1 有丝分裂雌核发育家系

本研究的染色体操作参考 Yamamoto (1999) 方法，即将真鲷(*Pagrosomus major*) 精子经紫外线照射后分别激活 6 尾牙鲆 (M1-6) 的卵子，激活的卵子在 17℃ 培养下受精 1 h 后，静水压处理抑制细胞有丝分裂 (650 kg/cm^2 6 min)。最后从 6 个家系 (M1-6) 中得到 26 尾 (P1-26) 雌核发育子代，其中 P1-9 至今成活，P10-P26 为稚鱼期死亡个体。用流式细胞仪检测子代倍性，从表型观测有无杂交个

体。

1.2 基因组 DNA 及微卫星座位

基因组 DNA 从鱼的尾鳍中提取，将裂解液 (50 mmol/L NaCl, 30 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L EDTA pH8.0, 1% SDS, 200 mg/L 蛋白酶 K) 加入剪碎的尾鳍中，40℃ 消化至澄清，等体积的饱和酚：氯仿：异戊醇 (25:24:1) 抽提，等体积去离子水稀释，2.5 倍体积预冷的无水乙醇沉淀，0.1 mL 70% 乙醇清洗沉淀，TE 溶解，-20℃ 保存待用。

从牙鲆遗传连锁图谱上选取引物 (Coimbra et al, 2003)，从 GenBank 中选择，并参考 Coimbra et al (2001) 获得引物序列，最后由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列及退火温度参见表 1。

1.3 PCR 反应及电泳

PCR 反应体系为 25 μL，包括 10×buffer 2.5 μL、 Mg^{2+} (25 mmol/L) 1 μL、dNTPs (各 2 mmol/L) 1 μL、上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL、模版 1 μL (30-50 ng)、Taq DNA 聚合酶 1 U，加适量 dd H₂O。PCR 反应程序包括：94℃ 变性 3 min；94℃ 30 s，退火 30 s，72℃ 30 s，25 个循环；最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，电泳后 1% 硝酸银染色 10 min，显色液 (1% 甲醛，2% 氢氧化钠，0.04% 无水碳酸钠) 显色 10 min。凝胶在 Hp Q2624A 扫描仪成像，Gel-Pro Analyzer 4.5 软件对电泳带进行分析。

1.4 统计分析

排除概率 (exclusion probability, EP) 又称父权排除概率，是衡量一个遗传标记排除非父能力的一个客观标准 (Jamieson & Taylor, 1997)。微卫星座位存在突变，亲子鉴定时，通常需使用多个遗传标记系统以确保准确性，因此在求得每个系统的排除概率后还需累积非父排除概率 (cumulative chance of exclusion, CCE)，个体识别率 (power of discrimination, DP) (Fisher, 1951)，累积个体识别率 (cumulate power of discrimination, CDP)，公式如下：

$$EP = \sum_{i=1}^n p_i (1-p_i)^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n (p_i p_j)^2 [4-3(pr+p_j)]$$

表 1 牙鲆18个微卫星座位的引物序列、特异退火温度及连锁群

Tab. 1 Sequence of microsatellite primers, specific annealing temperature and linkage group

基因座位 Locus	引物序列(5'—3') Primer sequence (5'—3')	退火温度 Annealing temperature(℃)	连锁群 Linkage group	GenBank Accession No.
Poli1TUF	F:GATCTCTGGCTGAGTCAGCG R:TGAGTGTGAAGCCAAAGGC	52	12	AB037977
Poli2TUF	F:ACAATAGGATGCAGCTGCCT R:AAGCGCAAATTGTTATTCCG	57	22	AB037978
Poli9TUF	F:GATCTGCAGAACACACACTCA R:GCGAGTTCTCCTCAAATGC	60	5	AB037980
Poli13TUF	F:CACCTCCAGGTTCTACAGTCG R:TCCTGCACAGAGGATGAAAAA	60	3	AB037982
Poli19TUF	F:ATGGCTGTACTGCAGCAGG R:CGCAAAAACAACAGATGTTCA	60	4	AB037984
Poli30TUF	F:GAGACAACCCCCCAAGAAAT R:ATCAGGGTATTGTTTGGCC	60	2	AB037988
Poli101TUF	F:CTCCAGTCATGCTCCAATGATGAC R:AGGATGTTGTAATGAAACATTGATGATGA	57	10	AB086493
Poli107TUF	F:TGGAAGAGATGTGCACTTGACTGTC R:AACTGTCACCTCTGAGTGGACCG	60	6	AB037990
Poli116TUF	F:CAAATCTGGCAAATTAGGAATAGTGG R:GATACCTGGTGATAACAGGTGAACACG	57	8	AB037991
Poli117TUF	F:CAGTGATGAATGCACCCAGTCATAC R:TCTGTACCGAAGAAGTGAGGGTGTC	60	7	AB037992
Poli126TUF	F:ATAATCACGAGCTGTGCTGAATG R:TCACATGTACAAACACACCACTGGA	52	8	AB037995
Poli130TUF	F:GCGGTGAGGACTTTATTCTGGACT R:GTGGTACTGCAGAAAAGCGACTGTT	60	1	AB037996
Poli131TUF	F:TCTCTGACGACGCTATCCTAC R:AGTGTGTCACCTGTTGGTCCAAT	57	12	AB086523
Poli132TUF	F:CTGAGGCAAAATGCTTGGATACAT R:CGCCACTCTAGTTCATCTAAACACG	57	11	AB086525
Poli141TUF	F:TATGCCACAGTTGAATGGGTGAATG R:TATGACTTCCAGTACGACGTGGTGA	52	14	AB086537
Poli145TUF	F:TGTTGCTCTGACACAGAGGAATGTC R:GAATGTATTCGGTTGGCATGA	57	13	AB086545
Poli147TUF	F:TGGAACCTGTGACAAGGAAAGAGG R:ATAAAGCGGAGCTGAACATGTCAC	64	18	AB086549
Poli163TUF	F:ATCCACATCCCCTTAGGCTAGTCC R:ATGGCCTTGTGTTGTTCTGTTG	57	9	AB086571

$$CCE = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - EP_i)$$

$$CDP = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - DP_i)$$

*n*为等位基因数目, *P_i*、*P_j*为每个座位的等位基因频率; *EP_i*为每个座位的排除概率。

*DP_i*为每个座位的个体识别率。

2 结 果

2.1 微卫星座位的多态性

本研究首先采用18个微卫星引物对6尾候选母本(M1-6)DNA进行扩增,其中座位Poli19TUF在所有母本中均扩增出相同的带型,表现为单态座

$$DP = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

*n*为等位基因数目, *P_i*为每个座位的等位基因频率。

位, 其余 17 个座位扩增出多个丰富的片段表现为多态座位。6 尾母本在多态座位中表现出不同数目的杂合座位, M1-6 依次为 6/17 (35.3%), 10/17 (58.8%), 8/17 (47.1%), 11/17 (64.7%), 8/17 (47.1%) 和 2/17 (11.8%)。

2.2 六个有丝分裂雌核发育家系的亲子鉴定

利用流式细胞仪检测子代倍性, 单倍体全部死亡, 并从表型观测无杂交个体出现。6 尾候选母本和 26 尾子代在 17 个多态座位扩增出的等位基因数从 2 至 6 不等, 平均等位基因数为 3.7。亲子合计 32 尾个体在 17 个座位处的排除概率、累计排除概率及个体识别率、累计个体识别率见表 2, 累计排除概率为 0.9985, 累计个体识别率为 0.9999。根据被测个体在 17 个多态座位的基因型, 最后确认 26 个子代的母本 (表 3)。仅用一个微卫星标记 Poli2TUF 即可找到 9 个子代 (P1、P2、P5、P6、P8、P9、P18、P21、P22) 共同的生物学母本 M6, 其中 P1、P2、P6、P8、P9、P18、P21、P22 在其他 16 个座位的等位基因也均来自母本 M6, 而 P5 在座位

Poli132TUF、Poli116TUF、Poli1TUF 座位出现母本 M6 不存在的特殊等位基因。P24 在座位 Poli2TUF 的 104bp 等位基因在母本 M1 中不存在 (图 1)。P5、P24 在 Poli132 座位均出现其母本不存在的等位基因 (111bp) (图 1)。另外, P7、P10、P17、P19、P23 在某些座位也表现出与其母本不完全匹配的基因型。从 17 个多态微卫星座位扩增图谱还可看出有丝分裂雌核发育后代尚有一定比例的杂合体存在。

3 讨 论

目前, 亲子鉴定普遍采用微卫星标记是因其多态程度高, 符合孟德尔遗传规律, 呈共显性遗传, 检测容易、重复性好, 在个体识别 (包括亲子鉴定)、基因连锁分析、群体遗传研究等方面正发挥着巨大作用 (Gao et al, 2005)。牙鲆微卫星 DNA 同样遵循孟德尔遗传定律 (Sekino et al, 2001), 即亲本基因型决定子代基因型, 排除基因突变及基因错配情况下, 子代单座位的等位基因必定一个来自母本, 一

表 2 牙鲆有丝分裂雌核发育家系 17 个微卫星座位的累积排除概率和累计个体识别率

Tab. 2 Power of discrimination and exclusion probability at 17 microsatellite loci in mitogynogenetic Japanese flounder

基因座位Locus	NA	EP	DP	基因座位Locus	NA	EP	DP
Poli9TUF	4	0.3551	0.6314	Poli145TUF	2	0.1772	0.4605
Poli30TUF	4	0.2056	0.4599	Poli163TUF	6	0.4739	0.7080
Poli13TUF	5	0.4750	0.6988	Poli130TUF	4	0.4589	0.6997
Poli107TUF	3	0.3861	0.6421	Poli2TUF	4	0.3192	0.5347
Poli117TUF	3	0.1829	0.3765	Poli116TUF	4	0.3838	0.6919
Poli126TUF	4	0.3606	0.5748	Poli131TUF	3	0.3241	0.6079
Poli141TUF	5	0.3806	0.5800	Poli1TUF	3	0.2254	0.4063
Poli101TUF	2	0.1473	0.3589	Poli147TUF	2	0.1830	0.4824
Poli132TUF	3	0.2289	0.4995	累计Cumulate	61	0.9985	0.9999

NA 为每个座位的等位基因数目; EP 为排除概率; DP 为个体识别率; 累计排除概率及累计个体识别率分别为 0.9985 和 0.9999。

NA is the numbers of allele of per loci; EP is the exclusion probability; DP is the power of discrimination; 0.9985 and 0.9999 are the cumulate exclusion of probability and the cumulate power of discrimination respectively.

表 3 牙鲆有丝分裂雌核发育家系在 17 个微卫星座位处的亲子关系
Tab. 3 Paternity of mitogynogenetic Japanese flounder at 17 microsatellite loci

母本 Maternal parents		子代 Mitogynogenetic progenies							
M1	P7	P10	P24						
M2	P13	P14	P15	P16	P19	P20	P23	P25	P26
M3	P17								
M4	P3	P4	P11	P12					
M5									
M6	P1	P2	P5	P6	P8	P9	P18	P21	P22

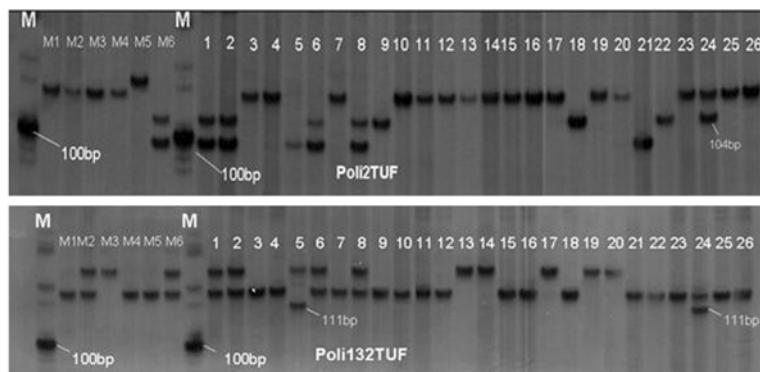


图 1 引物 Poli2TUF 和 Poli132TUF 在 6 个候选母本及 26 个雌核发育子代的扩增电泳图谱
Fig. 1 Electrophoresis patterns of the products amplified by Poli2TUF and Poli132TUF

M 为标准分子量, DL2000; M1-6 池道为 6 个母本; 标号 1-26 为雌核发育子代(P1-26)。
M is standard base pair ladder, DL2000; the lanes of M1 to 6 were six maternal parents; the lanes of 1 to 26 were mitogynogenetic progenies (P1 to 26).

个来自父本。雌核发育家系中, 理论上子代不存在父本等位基因, 子代等位基因应全部来自其母本。

本研究采用微卫星分子标记成功地对牙鲆 26 尾家系不清的雌核发育后代进行鉴定。根据被测个体在 17 个微卫星座位的基因型, 以排除法为基础, 按孟德尔定律逐个检查可疑母本, 最后确认 26 个子代的母本, 降低亲缘关系混乱性。17 个多态微卫星座位累计排除概率为 0.9985, 累计个体识别概率为 0.9999, 完全可用于牙鲆雌核发育家系的鉴定分析。由此可见, 亲子关系鉴别不仅可确定雌核发育后代的母本关系, 并有利于后代繁殖措施的制定。

结果分析中, 仅用座位 Poli2TUF 即可确定候选母本 M6 的 9 个雌核发育子代, 除 P5 外的 8 个子代在其他 16 个座位未出现与母本 M6 不匹配的等位基因, 从而准确地确定亲子关系, 这是由于 M6 在该座位出现与其他 5 个候选母本有明显差异的基因型。但因某些母本的亲缘关系很近, 使得在排除多个可疑母本时需多个微卫星标记, 最终用 17 个微卫星座位确认了 26 个子代的母本。P7、P10、P17、P19、P23、P24 在某些座位也出现与 P5 相同情况, 即存在与母本不匹配的等位基因。这些个体在出现特异基因的单座位上均表现杂合基因型, 并且其中一个等位基因来自其母本。非常有意思的是, P5、P24 在 Poli132 座位不同于其母本的特殊等位基因片段均为 111 bp。根据其他研究人员的结果, 我们推测产生这个特殊等位基因片段的途径可能有两条。一条途径可能是父本基因表达。譬如, Xu et al

(2002) 利用同工酶标记发现同源精子诱导牙鲆减数分裂雌核发育的后代存在父方基因表达的现象, 说明雌核发育过程中父方基因可能在分子水平整合; 雄核发育子代的外源基因片段是因存在母本遗传现象(Corley-Smith et al, 1996; Young et al, 1996; Sarder et al, 1999)。Tanck et al(2001)认为鲤鱼雄核发育子代出现杂合子可能是紫外线照射过的母本染色体片段残留的结果。第二条可能途径是非等位基因的交换重组。非等位基因之间的交换重组同样可能使后代在单座位处出现非母本的基因片段。鱼类的染色体较小, 基因座位在着丝点之间较易发生重组 (Thorgaard et al, 1983)。You et al(1995)对三倍体牙鲆做核型分析时发现牙鲆染色体不仅小且全部为端部着丝点染色体, 这使得同源染色体上的等位基因之间产生较高重组率。这会大大提高非同源染色体上的非等位基因发生重组的机会, 使后代出现与母本不完全相同的等位基因。但在本实验中, 因缺少对父本真鲷 DNA 的分析而使得我们无法判别这些不同于其母本的特殊等位基因片段产生的途径, 其产生原因尚需进一步研究。

实验发现, 有丝分裂雌核发育后代中尚有一定比例的杂合体存在, 其形成原因尚待进一步研究。

在制定牙鲆雌核发育育种策略时, 微卫星标记不仅是亲子鉴定的有利工具, 同时还可用来评价不同家系雌核发育后代的纯合度, 有助于选择纯合度最高的个体, 为建立牙鲆的纯系工作提供依据。

参考文献:

- Bertotto D, Cepollaro F, Libertini A, Barbaro A, Francescon A, Belvedere P, Barbaro J, Colombo L. 2005. Production of clonal founders in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L, by mitotic gynogenesis [J]. *Aquaculture*, **246**: 115-124.
- Chourrout D. 1982. Gynogenesis in vertebrates [J]. *Reprod Nutr Dev*, **22**: 713-734.
- 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.
- 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.
- Corley-Smith GE, Lim CJ, Brandhorst BP. 1996. Production of androgenetic zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Genetics*, **142**: 1265-1276.
- Fisher RA. 1951. Standard calculations for evaluating a blood group system [J]. *Heredity*, **5**: 95-102.
- Gao AB, Wu DJ. 2005. Microsatellite markers for paternity testing of Liangshan Semi-fine Wool Sheep [J]. *Hereditas (Beijing)*, **27**(1): 85-90. [高爱保, 吴登俊. 2005. 利用微卫星标记进行凉山半细毛羊亲权鉴定的研究. 遗传, **27** (1): 85-90.]
- Guo ZK, Guo JT, An ZX, Zhang Y, Cai YB, Chen NC, Chen SM. 2002. Microsatellite DNA analysis of somatic cloned goats [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, **29**(4): 655-658. [郭泽坤, 郭继彤, 安志兴. 2002. 体细胞克隆山羊微卫星DNA分析. 生物化学与生物物理进展, **29**(4): 655-657.]
- Ijiri K. 1980. Gamma-ray irradiation of the sperm of the fish *Oryzias latipes* and induction of gynogenesis [J]. *Radiat Res (Tokyo)*, **21**: 263-270.
- Jamieson A, Taylor SCS. 1997. Comparison of three probability formulae for parentage exclusion [J]. *Animal Genetics*, **28**: 397-400.
- Li SB, Yan CX, Lai JH, Wang J, Yang HM. 2001. Studies and application of DNA-base identity test in Forensic sciences [J]. *Hereditas(Beijing)*, **23**(2): 157-160. [李生斌, 阎春霞, 赖江华, 汪 建, 杨焕明. 2001. DNA鉴定技术在法科学中的应用. 遗传, **23** (2): 157-160.]
- Pelegrí F, Schulte-Merker S. 1999. A gynogenesis-based screen for maternal-effect genes in the zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Methods Cell Biol*, **60**: 1-20.
- Sekino M, Hara Motoyuki. 2001. Inheritance characteristics of microsatellite DNA loci in experimental families of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Mar Biotechnol*, **3**: 310-315.
- Sarder MRI, Penman DJ, Myers JM, McAndrew BJ. 1999. Production and propagation of fully inbred clonal lines in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L[J]. *Exp Zool*, **284**: 675-685.
- Tabata K. 1991. Application of the chromosomal manipulation in aquaculture of hirame, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Fish Exp Stn*, **28**: 1-134. (in Japanese with English abstract)
- Tanck MWT, Palstra AP, Vande Weerd M, Leffering CP, Vaner Poel JJ, Bovenhuis H, Komen J. 2001. Segregation of microsatellite alleles and residual heterozygosity at single loci in homozygous androgenetic common carp, *Cyprinus carpio* L[J]. *Genome*, **44**: 743-751.
- Thorgaard GH, Allendorf FW, Knudsen KL. 1983. Gene-centromere mapping in rainbow trout: High interference over long map distance [J]. *Genetics*, **103**: 771.
- Van Zevern A, peelman L, Van De Weghe A. 1999. A genetic study of four Belgian pig populations by means of seven microsatellites loci [J]. *Animal Genetics*, **60**: 431-438.
- Xu C, Wang KL, Xu YL, Zhang PJ. 2002. Recombination and expression of paternal gene of isozymes in gynogenetic olive flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Oceanol Limnologia 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 populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel) [J]. *Aquaculture*, **173**: 235-246.
- You F, Liu J. 1995. Karyotype evidence of triploidy in the left-eyed flounder, *Paralichthys olivaceus* (T. & S.) [J]. *Oceanol Limnologia Sin Supplement*, **26**(5): 115-118. [尤锋, 刘静. 1995. 三倍体牙鲆的核型证明. 海洋与湖沼, **26**(5): 115-118.]
- Young WP, Wheeler PA, Fields RD, Thorgaard GH. 1996. DNA fingerprinting confirms isogenicity of androgenetically derived rainbow trout lines [J]. *Hered*, **87**: 77-80.
- Zhang YG, Li DQ, Rao LQ, Xiao QM, Liu D. 2003. Identification of polymorphic microsatelite DNA loci and paternity testing of Amur tigers [J]. *Acta Zoologica Sin*, **49**(1): 118-123. [张于光, 李迪强, 饶力群, 肖启明, 刘丹. 2003. 东北虎微卫星DNA遗传标记的筛选及在亲子鉴定中的应用. 动物学报, **49**(1): 118-123.]
- Zhu XC, Liu HJ, Sun XW, Xue LL, Mao LJ. 2006. Assessment of homozygosity in gynogenetic diploid using microsatellite markers in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Zool Res*, **27**(1): 63-67. [朱晓琛, 刘海金, 孙效文, 薛玲玲, 毛连菊. 2006. 微卫星评价牙鲆雌核发育二倍体纯合性. 动物学研究, **27** (1): 63-67.]