DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00144

大黄鱼连续两代雌核发育群体的微卫星标记分析

叶小军^{1,2} 王志勇¹ 刘贤德¹ 蔡明夷¹ 姚翠鸾¹

(1. 集美大学水产学院水产生物技术研究所,福建省高校水产科学与食品安全重点实验室,厦门 361021;2. 福建省淡水水产研究所,福州 350002)

摘要:通过对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)异质雌核发育一代群体(meio-G₁)与二代群体(meio-G₂)微卫星位 点的纯合度进行分析,研究异质雌核发育对大黄鱼基因纯化的效率。结果显示:meio-G₁和 meio-G₂ 15 个微 卫星座位的平均纯合度分别为 0.661 和 0.803,纯合位点比例最高个体分别为 0.867(13/15)和 0.933(14/15),两 个群体内个体间的平均相似系数分别为 0.5903 和 0.8672,最高分别达 0.9286 和 1.0(遗传距离为 0.0741 和 0), 远高于两性交配繁殖群体(平均纯合度 0.376,平均相似系数 0.4687,个体间最小遗传距离 0.2288);其中 meio-G₂群体有 7 个位点(46.7%)已经完全纯合固定,并与普通养殖群体产生较明显的遗传分化;表明人工诱 导异质雌核发育可大大加速大黄鱼大多数基因位点的纯合,是快速建立高纯品系的有效手段。但不同位点的 纯合度差异很大,部分位点在异质雌核发育后代中迅速纯合,在meio-G₁中就达到很高的纯合度,而有些位 点则在meio-G₁和meio-G₂中仍保持很高的杂合度;meio-G₁和meio-G₂群体中不同个体纯合位点比例差异 也很大。研究培育的雌核发育群体为大黄鱼进一步选育提供了良好的遗传材料。

关键词:大黄鱼;微卫星;雌核发育;纯合度

中图分类号:Q348 文献标识码:A 文章编号:1000-3207(2010)01-0144-08

大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 隶属 鲈形目 (Perciformes)、石首鱼科 (Sciaenidae)、黄鱼属 (*Pseudosciaena*),是我国近海特有的重要海水经济 鱼类^[1,2],也是目前我国养殖量最大的海水鱼类。自 20 世纪 80 年代中期福建省开展大黄鱼人工繁殖和 养殖研究取得成功,人工养殖业随之逐步发展起来 之后,由于在生产中缺乏选育,近年来大黄鱼养殖 群体普遍出现生长减慢、抗病力下降等经济性状退 化现象^[3]。通过选择育种消除或减少群体中的不利 基因,增加有利基因频率,是对养殖群体进行遗传 改良的重要途径。人工诱导雌核发育被认为是加速 动物有利基因纯合固定的有效方法,已经被应用到 数十种不同的鱼类^[4-8],大黄鱼雌核发育的诱导,国 内也已有多个实验室开展了研究,但其他实验室的 工作基本局限于研究雌核发育诱导技术^[9,10]。作者所 在的实验室从 2000 年开始进行大黄鱼人工诱导雌 核发育研究,先后培育出了异质(即减数分裂型)雌 核发育一代群体和二代群体用于良种选育和性别控 制,并用 AFLP 标记和微卫星标记对雌核发育体进 行了鉴定,利用 2 个雌核发育家系测算了 18 个多态 性微卫星标记与着丝粒间的遗传距离^[11-14];但对于 采用多个亲体的卵子混合诱导培育的连续两代雌核 发育群体还没有研究报道。本文采用 16 个多态性微 卫星标记对上述两个雌核发育群体进行分析,并与 普通的两性生殖群体进行比较,研究群体的遗传结 构和各个个体基因的纯合度、群体及个体间的相似 度和遗传距离,探讨大黄鱼人工异质雌核发育中基 因纯合的规律,以期为大黄鱼进一步的遗传改良和

收稿日期: 2008-04-16, 修订日期: 2009-02-19

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA10A405); 国家自然科学基金项目(30771663); 福建省青年创新基金项目(2006F3095); 集 美大学创新团队科研基金(2006A001)资助

作者简介: 叶小军(1980—), 男, 汉族, 福建宁德人; 硕士; 研究方向为水产动物遗传育种及生物技术。E-mail: yxj8658@tom.com 通讯作者: 王志勇, Tel: 0592-6183816; E-mail: zywang@jmu.edu.cn

对雌核发育群体的更好利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 雌核发育群体的培育与样品采集

本研究所用雌核发育一代群体 (meio-G₁)为 2001年4月由4尾优选的雌性大黄鱼所产卵子诱导 培育的异质雌核发育后代,雌核发育二代群体 (meio-G₂)是2003年4月挑选4尾成熟的上述雌核 发育一代个体,对其所产卵子再次诱导异质雌核发 育培育获得,雌核发育的诱导方法已见王晓清等^[12] 的报道,此处从略。2005年4月和2007年3月分别 从meio-G₁和meio-G₂群体随机取50个体(体重 0.8—1.5 kg),剪取活鱼部分背鳍固定于95%乙醇中, 于4℃下保存;2007年3月同时采集普通养殖群体 (Control)样品作为对照组,所有群体均培育于福建 省宁德市官井洋海区网箱。实验前取所有雌核发育 个体的 DNA 与诱导雌核发育时使用的雄性亲鱼的 DNA 进行部分微卫星标记的扩增比较,确认所有个 体均不含有雄性亲本的特有等位基因,为真正的雌 核发育体,然后各选取 48 个个体进行分析。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用传统的酚仿抽提法提取基因组 DNA^[15], 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

1.3 PCR 反应及电泳

微卫星标记引物系本实验室开发^[16], 其序列和 扩增片段的特征(表 1)。PCR 反应体系为 20 μL, 包 括 10×buffer 4.0 μL、Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.2 μL、 dNTPs (10 mmol/L) 1.0 μL、上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.1 μL、模板 DNA 50 ng、*Taq* DNA 聚合酶 (Promega) 1U, 加适量 DDW。反应条件为: 94℃预变

表1 引物序列、退火温度及扩增片段大小

Tab. 1	Microsatellite loci, primer sequences, annealing temperature, size of alleles and access number in GenBank of 16
	microsatellite loci of large vellow croaker used in this study

	己物这列(5/35)	退火温度	片段大小	A agons number in
Loci	Primer sequences $(5'-3')$	Annealing temperature $(^{\circ}\mathbb{C})$	Size of alleles (bp)	GenBank
<i>LYC</i> 0002	F: 5'-ACCTCCAGTGGGATGTGA-3' R: 5'-GGCTGTTTGTTATAATTTGTG-3'	50	60—110	EF372237
<i>LYC</i> 0004	F: 5'-CTCTTAGCCGTCATTCATCC-3' R: 5'-CATTTAGCCAAGTTCACTTCC-3'	55	90—100	EF372239
<i>LYC</i> 0008	F: 5'-GAAACAATAGCTCGCTCCTG-3' R: 5'-GACTCTGCCAGCACATTAGTG-3'	57—55	151—185	EF372243
<i>LYC</i> 0009	F: 5'-GTCAATCACGTCTGTCTCTGC-3' R: 5'-TCAGCCATTGTCTGTGAGGT-3'	60	75—105	EF372244
<i>LYC</i> 0010	F: 5'-GTCTCAGCTGACTCCTGCTTC-3' R: 5'-ATGGCTCTAAACATGGTAGG-3'	55	205—235	EF372245
<i>LYC</i> 0011	F: 5'-CTTTTATTGGCTCCGTATGA-3' R: 5'-CACTCACACTAGCACGCAC-3'	55	82—133	EF372246
<i>LYC</i> 0012	F: 5'-CAGAACAAACAATGAATGGG-3' R: 5'-GAGGAGCTCAACAGCAACA-3'	55	90—145	EF372247
<i>LYC</i> 0013	F: 5'-GCTGCGAGCTACTTTACTCAT-3' R: 5'-AACTCACAAACATGCAC-3'	50	130—220	EF372248
<i>LYC</i> 0015	F: 5'-ACAGTCTAAAGCTGCCAGCA-3' R: 5'-TGAGACCAACCACATTTCTGT-3'	55	103—117	EF372250
<i>LYC</i> 0022	F: 5'-AGAGATAACGTAGACATGATTG-3' R: 5'-CAGCAAAAGTTCAAAATGGAG-3'	55—50	143—50	EF372257
<i>LYC</i> 0024	F:5'-GGCTCGTGCCAGCAGGG-3' R:5'-GTATGAAGAACATGTGCAGTG-3'	55—50	180—190	EF372259
<i>LYC</i> 0027	F:5'-CACCCAATAATATCGCCATA-3' R:5'-GCACACACAATCATCATCATT-3'	50	74—95	EF372262
<i>LYC</i> 0031	F: 5'-GTCCTTCCCTAAAGCGAGG-3' R: 5'-CTCCCGTCCTGAGCTCAAC-3'	55—50	200—210	EF372266
<i>LYC</i> 0032	F: 5'-GGGAGAAGCAGCAGGACA-3' R: 5'-GAAACAAGAGCACTGAGAGCC-3'	50	200—210	EF372267
LYC0033	F: 5'-GGATGGAGGAGTGATGATGG-3' R: 5'-GCACTGAGACCTGAATGCTCC-3'	50	150—160	EF372268
<i>LYC</i> 0036	F: 5'-GCATTCATGGATTAGACTGC-3' R: 5'-GGGTGAGTGTCGGAAGTTC-3'	50	203—225	EF372271

性 5min; 94℃ 30s, 50—55℃ 30s, 72℃ 30s, 25—30 个循环; 最后 72℃延伸 10min。反应程序于 Eppendorf Mastercycler PCR仪(德国Eppendorf公司) 上进行。扩增产物用 BioRad PAC3000 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分 离,银染显色。

1.4 数据分析

用 Cervus 3.0 软件计算 3 个群体每个微卫星位 点的等位基因数 (*K*)、基因型数 (*G*)、多态座位的 观测杂合度 (*Ho*)、预期杂合度 (*He*)和多态信息 含量 (Polymorphism information content, *PIC*),用 Arlequin 进行 AMOVA 分析,用 POPGENE 软件计 算群体遗传分化指数(*Fst*),用 TFPGA 软件计算群体 内个体间以及群体间的相似系数和 Nei 氏遗传距离, 并根据群体间遗传距离按照 UPGMA 法构建 3 个群 体的聚类关系图。有关计算公式如下:

多态信息含量
$$PIC = 1 - \sum_{i=i}^{m} Pi^2 - \sum_{i=i}^{m-1} \sum_{j=i+i}^{m} 2Pi^2 Pj^2$$

式中: *Pi、Pj* 分别为第 *i、j* 个等位基因频率, *m* 为等 位基因数;

Ho = 杂合子观察数/观察个体总数;

 $He = 1 - \Sigma Pi^2$, Pi 为该位点上第 i 个等位基因的频率。 基因(实际)纯合度按下式计算:

纯合度=1-Ho

近交系数 Ft=(Ho-Ht)/Ho

式中: Ft 表示第 t 世代的近交系数, Ho 表示基础群体 (以普通养殖群体代替)的实测平均杂合度, Ht 表示 t 世代的实测平均杂合度。

2 结 果

2.1 基因纯合度和个体间的相似度

本研究共对 16 个多态性微卫星位点进行检测, 其中 *LYC003*1 在 3 个群体所有个体的基因型全部为 杂合,没有发现纯合子,该位点可能与隐性致死基 因紧密连锁,因此没有加入到统计结果中进行比 较。其余 15 个微卫星位点在 3 个群体中检出的等位 基因数、平均基因型数、观测杂合度(*Ho*)、期望杂 合度(*He*)以及多态信息含量和纯合度情况(表 2)。从 表 2 可见,雌核发育一代群体的各项遗传多样性指 标观测值均显著低于普通养殖群体,而雌核发育二 代群体又显著低于雌核发育一代群体;雌核发育一 代平均基因纯合度达 0.661,显著高于普通养殖群 体(0.376), 而雌核发育二代达 0.803, 又明显高于雌 核发育一代。普通养殖群体和雌核发育一代群体在 本研究观测的所有位点均存在着多态现象和杂合子, 未出现群体中所有个体全部纯合的位点; 而雌核发 育二代群体则有 7 个座位 (*LYC*0002、*LYC*0004、 *LYC*0008、*LYC*0011、*LYC*0015、*LYC*0022、*LYC*0033) 所有个体均为纯合子, 其中 *LYC*0008、*LYC*0011、 *LYC*0015、*LYC*0033 4 个座位表现为单态, 各只有 1 个等位基因。

从个体纯合位点比例看,普通养殖群体为 0.067—0.60,15 个观测位点中有 2—9 个位点纯合, 平均 5.6 个;雌核发育一代群体为 0.40—0.87,纯合 位点数 6—13 个、平均 9.9 个;雌核发育二代群体为 0.60—0.93,纯合位点数 9—14 个、平均达 12.0 个。 图 1 显示了 3 个群体全部个体纯合位点比例,从中 也可看出各群体中具有不同纯合度个体的数量分布

表 2	大黄鱼普通养殖群体、雌核发育一代和雌核发育
	二代群体的基因多样性与纯合度
Tab. 2	Genetic diversity and homozygosity of Control,

meio- G_1 and meio- G_2

遗传参数	对照组	雌核一代	雌核二代
Genetic parameters	Control	Meio-G ₁	Meio-G ₂
平均等位基因数(A)	53	39	21
Mean number of alleles	0.0	5.7	2.1
平均基因型数(G) Mean number of genotypes	10.1	4.5	2.9
平均观测杂合度 (H ₀) Mean observed heterozygosity	0.624	0.339	0.197
平均期望杂合度 (He) Mean expected heterozygosity	0.672	0.542	0.219
平均 PIC 值 Mean PIC	0.616	0.455	0.176
纯合度 Homozygosity	0.376	0.661	0.803





Fig. 1 Homozygosity of the individuals in control, meio- G_1 and meio- G_2 of large yellow croaker

情况。该图直观地揭示了雌核发育促进个体和群体 纯合度增加的效果情况。

根据所检测 15 个微卫星位点的基因型,利用 TFPGA 计算群体内个体间的遗传相似度(相似系数) 与 Nei 氏遗传距离(表 3)。由表 3 可见,雌核发育群 体内个体间的遗传差异也明显减小,尤其是雌核发 育二代群体,个体间平均遗传距离远远小于普通养 殖群体和雌核发育一代群体,48 个个体中有 2 个个 体在所检测 15 个基因位点上基因型完全一致,相似 系数达 1。显示该群体已经是一个遗传一致性较高 的高纯品系。

表 3 群体内个体间的相似性系数和遗传距离 3 Genetic similarity and genetic distance within population

1 ab. 5 Genetic similarity and genetic distance within population					
郡	¥体	对照组	雌核一代	雌核二代	
Populations		Control	Meio-G ₁	Meio-G ₂	
相似系数	平均 Mean	0.4687	0.5903	0.8672	
Genetic	最大 Max	0.7955	0.9286	1	
identity	最小 Min	0.2054	0.2357	0.6191	
遗传距离	平均 Mean	0.7808	0.5449	0.1462	
Genetic	最大 Max	1.5828	1.4452	0.4795	
distance	最小 Min	0.2288	0.0741	0	

2.2 不同位点的纯合度

表4列出了本研究所检测15个位点在3个群体 中检出的等位基因数、观测杂合度和纯合度、以及 以普通养殖群体作为基础群根据杂合度的降低计算 的雌核发育一代和二代群体的近交系数(固定指 数)。表中的近交系数值反映了在雌核发育群体中各 位点基因纯合速率。从表 4 可见, 绝大多数观测位 点在雌核发育群体中杂合度都下降、纯合度上升, 基因型表现为纯合化的趋势;但不同微卫星位点其 纯合的速率不一样,有的位点在雌核发育 1 代中就 有很高的纯合率和近交系数,在雌核发育二代中完 全纯合固定, 近交系数达 1; 但也有的位点纯合较 慢, 近交系数较低。LYC0009 和 LYC0013 两个位点 在雌核发育一代和雌核发育二代群体中的纯合度甚 至反而低于普通养殖群体、致使算出的近交系数小 于 0。图 2 是部分个体在 LYC0022 位点的电泳图谱。 2.3 群体间的遗传分化

AMOVA 分析结果表明, 群体间的遗传变异占 总遗传变异的 19.37%, 群体内的遗传变异占总遗传 变异的 80.63%(表 5), 表 6 和表 7 分别列出 3 个群体

表 4 15 个微卫星座位上的等位基因数、观察杂合度、纯合度和近交系数

Tab. 4	Number of alleles (K), observed heterozygosity (H_o), homozygosity and breeding coefficient in gynogens and common
	stock of large yellow croaker for the 15 detected microsatellite loci

		等位基因数	攵		观测杂合度	E		纯合度		近交	系数
位点		K			Ho			Н		1	F.
Loci	对照组	雌核一代	雌核二代	对照组	雌核一代	雌核二代	对照组	雌核一代	雌核二代	雌核一代	雌核二代
	Control	Meio-G ₁	Meio-G ₂	Control	Meio-G ₁	Meio-G ₂	Control	Meio-G ₁	Meio-G ₂	Meio-G ₁	Meio-G ₂
<i>LYC</i> 0002	7	4	2	0.792	0.25	0	0.208	0.75	1	0.68	1.00
<i>LYC</i> 0004	5	4	3	0.396	0.159	0	0.604	0.841	1	0.60	1.00
<i>LYC</i> 0008	4	3	1	0.479	0.068	0	0.521	0.932	1	0.86	1.00
LYC0009	7	5	2	0.667	0.682	0.78	0.333	0.318	0.22	-0.02	-0.17
LYC0010	3	3	2	0.313	0.136	0.073	0.687	0.864	0.927	0.57	0.77
<i>LYC</i> 0011	5	4	1	0.646	0.455	0	0.354	0.545	1	0.30	1.00
LYC0012	8	6	3	0.688	0.545	0.683	0.312	0.455	0.317	0.21	0.01
LYC0013	10	5	2	0.854	0.886	0.878	0.146	0.114	0.122	-0.04	-0.03
LYC0015	4	2	1	0.567	0.182	0	0.433	0.818	1	0.68	1.00
LYC0022	6	5	2	0.604	0.386	0	0.396	0.614	1	0.36	1.00
<i>LYC</i> 0024	5	4	3	0.525	0.273	0.024	0.475	0.727	0.976	0.48	0.95
<i>LYC</i> 0027	6	5	3	0.721	0.522	0.341	0.279	0.478	0.659	0.28	0.53
LYC0032	2	2	2	0.354	0.045	0.024	0.646	0.955	0.976	0.87	0.93
LYC0033	2	2	1	0.792	0.182	0	0.208	0.818	1	0.77	1.00
LYC0036	5	4	3	0.958	0.318	0.146	0.042	0.682	0.854	0.67	0.85
Mean	5.27	3.87	2.07	0.624	0.339	0.197	0.376	0.661	0.803	0.46	0.68

1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57 59 61 63 65 67 69 71 MW 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62 64 66 68 70 72 bp 250 220 200

相互间的遗传分化指数、相似系数和遗传距离,图3 是根据遗传距离绘制的3个群体的亲缘关系图。雌 核发育二代群体与普通养殖群体已产生较明显的遗 传分化,与雌核发育一代群体间的分化指数和平均

表 5 三个大黄鱼群体的 AMOVA 分析结果 Tab. 5 AMOVA analysis results for three populations of large vellow croaker

		J		
变异来源	白由度	平方和	变异组分	变异贡献率
Source of	df	Sum of	Variance	Percentage of
variation	u.1.	squares	components	variation
群体间				
Among	2	180.135	0.89921	19.37
populations				
群体内				
Within	285	1066.781	3.74309	80.63
populations				
台计	287	1246.917	4.64231	
Total	-		-	

表 6 普通养殖群体与雌核发育群体间的遗传分化指数(Fst) Tab. 6 Genetic diversity coefficient Fst between populations

Populations	Control	Meio-G ₁	Meio-G ₂
Control			
Meio-G ₁	0.0555		
Meio-G ₂	0.1566	0.1365	

表 7 普通养殖群体与雌核发育群体间的相似性系数 (对角线上)和遗传距离(对角线下)

 Tab. 7
 Genetic similarity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between populations

Populations	Control	Meio-G ₁	Meio-G ₂
Control		0.8467	0.7558
Meio-G ₁	0.1664		0.829
Meio-G ₂	0.2799	0.1875	
0.300	0.225 0.150	0.075	



遗传距离,也大于雌核发育一代群体与普通养殖群体间的平均遗传距离,因此在聚类图上 meio- G_1 与 Control 聚为一支,而 meio- G_2 则自成距离较远的 1 个独立分支。

3 讨 论

3.1 基因纯合速度显著加快

大黄鱼是我国最重要的海水养殖经济鱼类之一, 借助雌核发育技术快速培育出优良性状能稳定遗传 的品系具有重要的意义。研究者已经对其雌核发育 诱导技术进行了研究,利用培育的雌核发育家系鱼 苗进行分子标记鉴定、分析了部分微卫星位点与着 丝粒间的遗传距离、并培育出有丝分裂雌核发育仔 鱼,证明纯合率可达到100%^[9-14]。但是,由于大黄鱼 鱼苗在数量少、密度过低时培育难度很大,来自单 一亲本的卵子诱导能获得的正常雌核发育鱼苗通常 不多、因此迄今还没有能够培育出雌核发育家系成 鱼。本课题组采用将 4 尾雌鱼的卵子混合诱导雌核 发育, 成功培育出异质雌核发育 1 代和 2 代群体成 鱼,并应用于良种选育和性别控制等育种实践。从 本研究的结果来看,从该两个群体各采集50尾已成 熟产卵个体、经微卫星标记鉴定均未发现诱导雌核 发育时所用雄鱼特有的等位基因(结果未示出),均 为真正雌核发育个体、表明其雌核发育的诱导是成 功的; meio-G1 群体在所检测 15 个微卫星标记位点 上的平均纯合度达 0.661(该数值比李益云等用 2 个异 质雌核发育家系鱼苗检测所获得的结果 0.414 略高, 这可能与所检测位点不完全相同有关),显著高于普 通养殖群体(0.376),群体内个体间的遗传差异减小, 遗传相似度提高(表 3),形态学性状包括背鳍条数、 脊椎骨数等的变异(标准差)也缩小^[17]; meio-G₂群体 平均纯合度达 0.803, 15 个微卫星位点中有 7 个位点 在检测的 48 个个体中完全纯合固定, 其中有 4 个位 点(LYC0008、LYC0011、LYC0015、LYC0033)表现为 单态、只有一种基因和基因型、群体内个体间的遗

图 2 Control、meio-G₁及 meio-G₂部分个体在 LYC0022 位点的电泳图谱 Fig. 2 Electrophoresis pattern of partial individuals in Control, meio-G₁ and meio-G₂ for LYC0022 MW, AFLP ladder; 1-24, Control; 25-48, meio-G₁; 49-72, meio-G₂

传差异进一步缩小,遗传相似度显著提高(表 3),相 似度最高的 2 个个体在所检测 15 个微卫星位点上基 因型完全一样。这些结果说明,减数分裂型雌核发 育能显著加快大黄鱼基因的纯合速度,使控制优良 性状的基因快速纯合化;所培育的雌核发育群体, 尤其 meio-G₂ 群体已经是一个遗传一致性较高的高 纯品系。meio-G₂ 群体已经是一个遗传一致性较高的高 纯品系。meio-G₂ 群体已经是一个遗传一致性较高的高 纯品系。meio-G₂ 群体已经是一个遗传一致性较高的高 纯品系。meio-G₂ 群体已经是一个遗传一致性较高的高 统品系。meio-G₂ 群体已经是一个遗传一致性较高的高 统品系。meio-G₂ 群体已经发生了较明显的遗传 分化。这也说明连续的雌核发育是快速建立具有 特定遗传特征品系的有效途径,与刘静霞等在鲤 鱼^[18]、Zheng, *et al.*在草鱼^[19]以及周裕华等^[20]在鲢观 察到的结果是一致的。

3.2 不同位点纯合速率不同

在对异质雌核发育后代共显性分子标记检测中 一般都会发现存在一些杂合位点,一般认为这是由 于卵母细胞减数分裂时同源染色体之间发生交换引 起^[21-24]。本研究所检测的 15 个微卫星座位中绝大多 数座位在雌核发育后代纯合度显著上升,但不同位 点纯合的速率不同,有的位点纯合较快,如位点 LYC0008 和 LYC0032 在雌核发育 1 代群体中的纯合 度就分别高达 0.932 和 0.955, 位点 LYC0008 在雌核 发育二代中就完全纯合固定。而有的位点纯合较慢、 如位点 LYC0009、LYC0012、LYC0013 的纯合度在 雌核发育1代群体中分别只有0.318、0.455和0.114、 这与李益云等[14]在大黄鱼微卫星标记着丝粒作图研 究中得到的结果相符。我们还发现这 3 个座位分别 位于宁岳等^[25]构建的大黄鱼遗传连锁图 3 个不同连 锁群的末端, 距离着丝粒较远, 而且大黄鱼的染 色体较小, 48 条染色体中有 46 条端部着丝粒染色 体^[26]。因此这些基因座位与着丝点之间比较容易发 生重组、仅经过一两代异质雌核发育难以使这些远 离着丝点的基因座纯合,要进一步使这些座位纯合, 必须通过多代减数分裂雌核发育或诱导有丝分裂雌 核发育来实现。显然,通过对异质雌核发育后代进 行选择、挑选纯合度高的个体繁育后代(继续诱导雌 核发育或通过与同样具有高纯合度的人工转性个体 交配繁育),将可以大大加速构建纯系进程。表4中 出现 LYC0013 和 LYC0009 两个位点在 meio-G2 中的 纯合度与 meio-G₁ 相近甚至比后者还低, 这可能是

由于 meio-G₂ 有更多亲体在该两个位点处于杂合状态, meio-G₁与 meio-G₂在该两个位点的纯合度值都低于普通养殖群体,导致近交系数出现负值,这应该是由于巧合,本研究检测的普通养殖群体中有较多个体恰巧从双亲获得了具有相同迁移率的等位基因。实际上,在雌核发育体中观察到的纯合是真正的纯合,两个等位基因来源于母体同一个基因的复制,而两性杂交后代观察到的微卫星标记纯合体来自双亲的两个等位基因尽管其长度(迁移率)相同,DNA 序列则可能并不一致,因此对其计算的纯合度值只是一种表观纯合度值,以此为基础计算的近交系数,也只有部分参考价值。

3.3 个体间基因纯合度差别大

值得指出的是,如图 1 所示,本研究观察到在大 黄鱼 meio-G₁ 和 meio-G₂ 群体中不同个体其基因纯 合度差别很大,meio-G₁ 群体中纯合度最高的个体有 13 个位点纯合,占全部位点数 86.7%,超过 meio-G₂ 群体的平均纯合度(0.80),最少的只有 6 个纯合位点 (占40%);meio-G₂个体纯合度变化于 0.60—0.93,纯 合位点数 9—14 个,变化幅度也很大。由此可见,通 过对异质雌核发育后代进行筛选,尤其是通过分子 标记辅助从异质雌核发育及其人工转性群体中挑选 基因型相同、纯合度高的个体进行交配,即采用吴 清江等^[27]和 Streisinger, *et al.*^[28]设计的技术方案加 上分子标记辅助选择,就可以在较少的世代数中建 立高纯品系。刘静霞等^[18]通过对锦鲤异质雌核发育 二代进行挑选获得了红白锦鲤纯系,可以作为一个 例证。

综上所述,本研究用本实验室分离的微卫星标 记对大黄鱼人工异质雌核发育一代和二代群体的遗 传结构和纯合度进行分析,发现两个群体、尤其是 meio-G₂ 群体已具有很高的纯合度,并与养殖群体 发生了较明显的遗传分化;在雌核发育群体中,不 同的个体和不同的基因位点纯合度差异甚大。本研 究建立的大黄鱼雌核发育群体为大黄鱼良种选育和 遗传研究提供了很有价值的材料,所鉴定的微卫星 标记为大黄鱼分子育种提供了有用的工具。

参考文献:

 Richardson J. Report on the ichthyology of the seas of China and Japan. Brit. Ass. Adv. Sci. Rep. 15th Meeting (1845), 1846, 187–320

- 水
- Zhu Y D, Wu H L. Fish of Fujian (Vol. 2) [M]. Fuzhou: Fu-[2] jian Science and Technology Publishing Company. 1985, 101-136 [朱元鼎, 伍汉霖, 福建鱼类志 (下卷), 福州: 福建科技出版社. 1985, 101—136]
- Wang Z Y, Wang Y L, Lin L M, et al. Genetic polymor-[3] phisms in wild and cultured large yellow croaker Pseudosciaena crocea using AFLP fingerprinting [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(3): 198-202 [王志勇, 王艺磊,林利民,等. 福建官井洋大黄鱼 AFLP 指纹多态 性的研究. 中国水产科学, 2002, 9(3): 198-202]
- Purdom C E. Radiation induced gynogenesis and androgene-[4] sis in fish [J]. Heredity, 1969, 24: 431-444
- Hulata G. Genetic manipulations in aquaculture: a review of [5] stock improvement by classical and modern technologies [J]. Genetica, 2001, 111: 155-173
- [6] Katsutoshi Arai. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan [J]. Aquaculture, 2001, 197: 205-228
- Lou Y D. Fish breeding [M]. Beijing: China Agriculture [7] Publishing Company. 1999 [楼允东. 鱼类育种学. 北京: 中国农业出版社. 1999]
- Hu Z H, Xu J Z. Progress on artificially induced gynogenesis [8] research of some marine fishes [J]. Marine Fisheries, 2007, 29(1): 78-83 [胡则辉, 徐君卓. 人工诱导海水鱼类雌核 发育的研究进展.海洋渔业,2007,29(1):78-83]
- [9] Wang D H, Su Y Q, Wang S F, et al. Study on the allogynogenesis of Pseudosciaena crocea [J]. 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. 高技术通讯, 2006, 16(11): 1206-1210]
- [10] Xu J H, You F, Wu X F, et al. Preliminary study on artificial induction of diploid gynogenesis in the large yellow croaker Pseudosciaena crocea [J]. Marine Sciences, 2006, 30(12): 37-42 [许建和, 尤锋, 吴雄飞, 等. 大黄鱼雌核发育二倍 体的人工诱导.海洋科学,2006,30(12):37-42]
- [11] Wang Z Y, Xie F J, Liu J F, et al. Studies on Pseudosciaena crocea genetic improvement. Continuable development of aquiculture-challenge and countermeasure [M]. Beijing: Ocean Publishing Company. 2007, 243—245 [王志勇、谢芳 靖, 刘家富, 等. 大黄鱼的遗传改良研究. 海水养殖业的 可持续发展—挑战与对策. 王清印主编. 北京: 海洋出版 社. 2007, 243-245]
- [12] Wang X Q, Wang Z Y, Liu X C, et al. Microsatellite marker analysis of gynogenesis by artificial induction in Pseudosciaena crocea [J]. Hereditas (Beijing), 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. 遗传, 2006, 28(7): 831-837]
- [13] Wang X Q, Wang Z Y, Liu X C, et al. AFLP analysis of artificial gynogenetic Pseudosciaena crocea [J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2007, 38(1): 34-40 [王晓清, 王 志勇, 柳小春, 等. 人工雌核发育大黄鱼的 AFLP 分析.

海洋与湖沼, 2007, 38(1): 34-40]

- [14] Li Y, Cai M Y, Wang Z Y, et al. Microsatellite-centromere mapping in the large yellow croaker (Pseudosciaena crocea) using induced gynogenetic diploid families [J]. Marine Biotechnology, 2007, 10(1): 83-90
- [15] Wang Z, Jayasanka P, Khoo S K, et al. AFLP Fingerprinting reveals genetic variability in common carp stocks from Indonesia [J]. Asian Fisheries Science, 2000, 13(2): 139-147
- [16] Guo W, Wang Z Y, Wang Y L, et al. Isolation and characterization of six microsatellite markers in the large yellow croaker (Pseudosciaena crocea Richardson) [J]. Molecular Ecology Notes, 2005, 5(2): 369-371
- [17] Zhang Y Z, Wang Z Y, Lin L M, et al. Comparative study on differences of morphologic characters of seven different stocks of the cultured large yellow croakers (Pseudosciaena crocea) belonging to the Min-Yuedong Tribe in Guanjingyang sea area, Fujian Province [J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2005, 10(3): 193-200 [张雅芝, 王志勇, 林利民、等.养殖条件下闽—粤东族大黄鱼不同群体形态 特征的比较研究. 集美大学学报(自然科学版), 2005, 10(3): 193-200]
- [18] Liu J X, Zhou L, Wei L H, et al. Microsatellite marker analysis on artificially gynogenetic pure line of red-white ornamental carp [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003, 27(6): 557-562 [刘静霞, 周莉, 魏丽华, 等. 红白锦鲤人工雌核 发育纯系的微卫星标记分析.水生生物学报,2003,27(6): 557-5621
- [19] Zheng K, Lin K, Liu Z, et al. Comparative microsatellite analysis of grass carp genomes of two gynogenetic groups and the Xiangjiang River group [J]. Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34(4): 321-330
- [20] Zhou Y H, Zou G W, Liang H W, et al. Variation in microsatellite DNA of inbreeding F2 progeny of artificial gynogenetic silver carp [J]. Freshwater Fisheries, 2007, 37(14): 30-33 [周裕华, 邹桂伟, 梁宏伟, 等. 人工雌核发育鲢近 交 F₂ 微卫星 DNA 变异分析. 淡水渔业, 2007, 37(14): 30-33]
- [21] Taniguchi N, Kijima A, Tamura T, et al. Color, growth and maturation in ploidy-manipulated fancy carp [J]. Aquaculture, 1986, 57: 321-328
- [22] Francescon A, Barbaro A, Bertotto D, et al. Assessment of homozygosity and fertility in meiotic gynogens of the European sea bass (Dicentrachus labrax L.) [J]. Aquaculture, 2005, 243: 93-102
- [23] Wang W, You F, Gao T X, et al. Microsatellite markers analysis on artificial meiogynogenetic stock of Paralichthys olivaceus [J]. 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. 高技术通讯. 2005, 15(7): 107-110
- [24] 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. 动物学研究, 2006, **27**(1): 63—67]

- [25] Ning Y, Liu X D, Wang Z Y, et al. A genetic map of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* [J]. Aquaculture, 2007, 264: 16–26
- [26] Quan C G, Wang J, Ding S X, et al. The Karyotypes of Pseudosciaena crocea (Richardson) [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2000, 39(1): 107—110 [全成

干, 王军, 丁少雄, 等. 大黄鱼染色体核型研究. 厦门大 学学报(自然科学版), 2000, **39**(1): 107—110]

- [27] Wu Q J, Ye Y Z, Cheng D R. Investigation on the carp gynogenesis with reference to establishing a pure line [J]. Acta Genetica Sinica, 1981, 8(1): 50—55 [吴清江, 叶玉珍, 陈 德荣. 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. 1981, 8(1): 50—55]
- [28] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of homozygous diploid zebra fish [J]. Nature, 1981, 291: 293– 296

ANALYSIS OF GENETIC HOMOZYGOSITY AND DIVERSITY OF TWO SUCCESSIVE GENERATION MEIO-GYNOGENETIC POPULATION IN *PSEUDOSCIAENA CROCEA* USING MICROSATELLITE MARKERS

YE Xiao-Jun^{1,2}, WANG Zhi-Yong¹, LIU Xian-De¹, CAI Ming-Yi¹ and YAO Cui Luan¹

(1. The Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety of Fujian Province, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021 China; 2. Freshwater Fisheries Research Institute of Fujian Province, Fuzhou 350002 China)

Abstract: Artificial induction of gynogenesis is one kind of chromosome manipulation with several applications, including rapid establishment of inbred lines or strains with high degree of homozygosity, sex-control, and accelerated elimination of recessive deleterious genes from aquaculture population. In our laboratory, meiotic gynogenetic populations meio- G_1 (the first generation) and meio- G_2 (the second generation) were successfully produced in large yellow croaker (Pseudosciaena crocea Richardson 1846). To assess the efficiency to pure gene for artificial meiotic gynogenesis in large yellow croaker, the homozygosity of the meio-gynogenetic populations for meio- G_1 and meio- G_2 was studied with microsatellite markers. The results showed that the average homozygosity among the fifteen analyzed loci were 0.661 and 0.803 in meio-G₁ and meio-G₂, respectively, which were much higher than that in the natural mating population (0.376 for the average homozygosity). The average similarity coefficient between individuals within meio- G_1 and meio- G_2 were 0.5903 and 0.8672, respectively, which were also higher than that in the natural mating population (0.4687 for the average similarity index between individuals). Value of diversity coefficient (Fst), genetic similarity and genetic distance showed significant genetic differentiation between the populations of meio- G_2 and the natural mating population. Besides, seven out of analyzed loci (46.7%) were fixed in meio-G₂, showing that the homozygosity of most genes can be accelerated by inducing meiotic gynogenesis in large yellow croaker. However, purity is hard to achieve in some loci for their telomerical location. For these loci, homozygosity can be gained by inducing mito-gynogenesis or control cross between individuals having same genotype. The information obtained in the study suggested that artificially induced meiotic gynogenesis is an efficient inbreeding method to pure the genome and increase the speed to establish pure-lines of large yellow croaker. The meio-gynogenetic populations cultivated in the study are useful for further selective breeding program.

Key words: Large yellow croaker (Pseudosciaena crocea); Microsatellite; Gynogenesis; Homozygosity