

团头鲂雌核发育后代的微卫星标记分析

张新辉¹ 夏新民² 罗伟¹ 高泽霞¹ 钱雪桥³ 王卫民¹

1. 华中农业大学水产学院/农业动物遗传育种与繁育教育部重点实验室/

农业部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070;

2. 湖北省国家团头鲂原种场, 鄂州 436000; 3. 广东海大集团股份有限公司, 广州 511400

摘要 采用松浦镜鲤(*Cyprinus carpio* Songpu carp)的紫外线遗传灭活精子刺激团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)卵子后冷休克抑制卵子第二极体释放方法, 获得团头鲂雌核发育个体。流式细胞仪检测雌核发育个体的DNA含量与正常团头鲂二倍体的DNA含量并没有显著性差异, 表明雌核发育个体为二倍体。通过引物优化, 筛选父母本具有特异性的8对微卫星引物, 对雌核发育后代进行检测, 结果表明雌核发育个体的遗传物质均来自母本, 没有父本的遗传物质渗入。筛选出母本为杂合的10对微卫星引物对子代的纯合性进行评价, 结果显示雌核发育后代在TTF-EST46、TTF-EST61、TTF-EST851位点全部为纯合, 而TTF-EST12座位上的重组率为86.4%, 其他6个位点的重组率为100%, 这10个位点的平均重组率为68.64%。试验结果表明, 通过抑制第二极体并不能获得纯合性较高的团头鲂雌核发育个体, 但具有与母本较高的遗传同质性, 可以作为良好的育种材料使用。

关键词 团头鲂; 雌核发育; 微卫星; 纯合性

中图分类号 S 961.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)06-0737-07

雌核发育是鱼类单性生殖中一种重要的生殖方式, 人工诱导雌核发育就是采用物理、化学、生物方法使精子遗传失活, 然后刺激正常的卵子, 再通过物理、化学、生物方法使单倍性胚胎的染色体加倍从而发育成雌核二倍体。理论上, 在雌核发育过程中, 雌雄原核并没有融合, 而雌核发育个体后代的遗传物质都来自母本, 在育种中多利用这一点来加快亲本的纯合速度^[1]。人工雌核发育在鱼类的染色体操作、数量性状分析及基因定位等方面都展示了其良好的应用前景^[2]。进行人工诱导雌核发育, 不仅可以迅速获得基因纯合, 使优良性状以最快的速度达到纯合固定, 还可以进行性别控制, 达到培育单性品种的目的。除此之外还可以利用雌核发育单倍体作为材料构建遗传连锁图谱^[3]。

微卫星DNA标记(microsatellite DNA markers)是近几年来发展迅速、应用广泛的分子标记之一^[4], 与其他分子标记相比, 微卫星DNA标记具有较高的多态性并在物种基因组中广泛存在, 可用于

检测雌核发育后代是否含有父本的遗传物质, 同时由于其具有共显性特点, 可用于评价雌核发育后代的纯合性。

团头鲂具有食物链短、病害少、繁殖简单、成活率高及肉质鲜美等特点, 已成为我国重要养殖对象之一^[5]。近年来, 团头鲂在养殖过程中出现了品种退化、产量降低、品质下降等问题^[6]。因此通过人工诱导雌核发育快速建立团头鲂纯系, 并且通过纯系间杂交选育是培育团头鲂优良品种的良好途径。邹曙明等^[7]用鲤(*Cyprinus carpio*)精子诱导了团头鲂的雌核发育, 但并没有对雌核发育个体和雌核发育个体的纯合度进行检测。

笔者采用微卫星DNA标记的方法对诱导的团头鲂减数分裂雌核发育后代进行检测, 并对雌核发育团头鲂后代的纯合性进行评价, 目的在于对团头鲂雌核发育的诱导效果进行评价, 为今后进行团头鲂雌核发育诱导、纯系的建立等遗传育种的研究提供遗传学依据。

收稿日期: 2012-03-20

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-05)、中央高校基本科研业务费专项资金(2011PY023和2011PY043)和海大集团团头鲂育种专项

张新辉, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类遗传育种, E-mail: zhangxhui1987@163.com

通讯作者: 王卫民, 博士, 教授, 研究方向: 鱼类增殖及遗传与育种, E-mail: wangwm@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 雌核发育个体的获得

人工诱导团头鲂雌核发育的试验在华中农业大学水产学院实验室进行,采用松浦镜鲤紫外线遗传灭活的异源精子刺激团头鲂卵子后冷休克诱导团头鲂的雌核发育。雌核发育所用的亲本来自鄂州水产基地,挑选性腺发育良好的团头鲂雌鱼和松浦镜鲤雄鱼,获得雄鱼精子后,加入 1:3 的 Hank's 液,然后开始用功率为 30 W 紫光灯照射鲤鱼精子,紫外灯距盛有精子溶液的培养皿约 10~12 cm,培养皿放在冰上,并放置在摇床上不断摇动。开始每隔 10 min 观察 1 次精子的活力,半小时后,每隔 5 min 观察 1 次,直到观察到鲤鱼精子活力明显减弱,停止照射。采用干法受精,先将团头鲂雌鱼的卵子挤入盆中,加入经过灭活的精液,再加适量 0.6% 的生理盐水,摇荡 1 min 左右,倒入黄泥浆中进行脱粘,受精后 3 min 分别放入 0~2 °C 水中 20、25、30、35 min,后放入孵化桶中 27 °C 水温孵化。同时设置团头鲂♀×团头鲂♂和团头鲂♀×松浦镜鲤♂(精子不做处理)杂交。设 2 个对照组,孵化条件与雌核发育的相同。

1.2 存活率计算

在原肠期、孵化期统计各个试验组和对照组(团头鲂♀×团头鲂♂)的样品数,以对照组为基础,换算出各发育阶段的相对存活率。

1.3 雌核发育个体倍性的检测

通过 DNA 的含量直接确定诱导的团头鲂雌核发育个体的倍性。取 15 日龄的团头鲂 12 尾,将待测的样品放入匀浆器中,加入适量 PBS 进行研磨,将匀浆好的细胞悬液取出后放入 2 mL 的离心管中,放入离心机中 1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,再加入适量的 PBS,用移液器轻轻吹打,使细胞分散开来。取 75 μ L 样品,75 μ L 鸡血细胞液,加入 150 μ L 的 DAPI 染液,染色 5 min 后用流式细胞仪进行检测。取 6 月龄雌核发育个体 10 尾,抽取尾静脉血制备细胞悬液,用流式细胞仪进行检测。采取同期繁殖的二倍体作为对照组。以鸡血作为内参(鸡血细胞 DNA 绝对含量 2.3 pg)。

1.4 微卫星的标记分析

剪取亲本尾鳍鳍条及 44 尾 3 月龄雌核发育个体的尾鳍,放入装有无水乙醇的 2 mL 样品管中,带回实验室,放入 -20 °C 的冰箱中保存待用。DNA 的提取参照文献[8]。松浦镜鲤的微卫星引物设计

参照文献[9],并对退火温度做适当调整。团头鲂微卫星引物由笔者所在实验室人员开发设计。

PCR 反应体系总体积为 10 μ L,含 100 ng/ μ L 模板 DNA 0.5 μ L、100 ng/ μ L 引物各 0.25 μ L、dNTPs 0.2 μ L、PCR 反应 Buffer 1 μ L、50 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.1 μ L、ddH₂O 7.7 μ L。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min;5 °C 变性 30 s;各引物在相应温度下退火 30 s;72 °C 延伸 45 s;33 个循环;72 °C 延伸 5 min。PCR 产物在 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶中分离,硝酸银染色。

1.5 数据的处理与分析

分析微卫星电泳图谱时,将电泳谱带中的每条 DNA 片段作为该座位的 1 个等位基因来处理,个体中出现 1 条带为纯合子,出现 2 条带为杂合子^[10]。计算雌核发育后代的基因-着丝点之间的重组率(recombination rate, R)^[11]: $R = \text{杂合个体数} / \text{总个体数} \times 100\%$ 。采用 *t* 检验(*t*-test)检测雌核发育和正常个体之间的 DNA 含量的差异显著性,若 $P < 0.05$ 表示存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 雌核发育诱导的结果

由表 1 可知,受精率、孵化率、平游存活率随着处理时间的延长逐渐下降,只有处理 25 min 的孵化率稍微高于处理 20 min 的孵化率。畸形率则是随着处理时间的延长而上升。30 min 处理组的孵化率要远远低于 25 min 的处理组,由此可以知道在诱导雌核发育的过程中一定要把握好处理的温度和时间。结果表明,处理 20 min 组的效果最佳。团头鲂♀×松浦镜鲤♂不做处理的杂交后代在孵化出来 1 d 内大量死亡,到正常对照组个体平游时,杂交的个体已全部死亡。这说明团头鲂和松浦镜鲤的杂交后代并不能存活。因此,通过紫外线的精子来诱导团头鲂雌核发育孵化出来的鱼苗都应该是雌核发育个体。

2.2 雌核发育个体倍性的检测

以鸡血作为内参,用流式细胞仪检测雌核发育个体的 DNA 含量,共检测 22 尾雌核发育个体,其中 15 日龄为 12 尾,6 月龄 10 尾。其 DNA 含量的平均值为 2.93,与正常二倍体团头鲂的 DNA 含量没有显著性差异($P > 0.05$)(表 2)。这一结果证实了人工雌核发育团头鲂具有与普通团头鲂相同的倍性,为二倍体团头鲂。

表 1 雌核发育受精率、孵化率、平游后的存活率、畸形率的统计

Table 1 The fertilization rate, hatching rate, survival rate and deformity rate of gynogenetic individuals

试验组 Experimental group	温度/℃ Temperature	起始时间/min Start time	持续时间/min Duration time	受精率/% Hatching rate	孵化率/% Incubation rate	存活率/% Survival rate	畸形率/% Deformity rate
TTF♀×SP♂(G) ¹⁾	0~2	3	20	36.19	19.02	15.13	9.01
TTF♀×SP♂(G)	0~2	3	25	33.90	20.24	14.77	13.13
TTF♀×SP♂(G)	0~2	3	30	27.01	5.08	3.71	11.28
TTF♀×SP♂(G)	0~2	3	35	18.91	2.45	1.84	20.00
TTF♀×SP♂				50.50	40.80	0.00	

1) TTF:团头鲂 *Megalobrama amblycephala*; SP:松浦镜鲤 *Cyprinus carpio* Songpu carp; G:遗传灭活 Genetic inactivation.

表 2 正常二倍体、雌核发育血细胞 DNA 含量

Table 2 The DNA contents of normal diploid and gynogenetic individuals (mean±SD)

样品 Sample	样品消光值 Sample average channel number	鸡血消光值 Chicken average channel number	鱼鸡比 FAC/CAC ¹⁾	DNA 含量/pg DNA contents
二倍体群体 Diploid group	252.7±10.2	199.8±3.1	1.26±0.03	2.90±0.08
雌核发育群体 Gynogenesis group	255.2±4.3	200.0±2.2	1.27±0.02	2.93±0.05

1) FAC /CAC:鱼血细胞消光值/鸡血细胞消光值。Fish blood cell average channel number/Chicken blood cell average channel number.

2.3 雌核发育子代的微卫星鉴定

从松浦镜鲤和团头鲂 40 对微卫星引物中筛选出 8 对在父母本出现特异性并且可在松浦镜鲤和团头鲂中获得重复性好、多态性高的引物。其中, MFW1、MFW5、HLJ393 为松浦镜鲤的引物, EST4、EST6、EST47、EST98、EST179 为团头鲂引物(引物序列及扩增条件见表 3)。利用筛选的 8 对父母本具有特异性的微卫星引物对雌核发育子代及其亲本基因组 DNA 进行 PCR 扩增,产物在 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶中分离,硝酸银染色。结果表明:所选用的 8 对引物均可以相应地在团头鲂、松浦镜鲤以及雌核发育后代得到扩增产物,雌核发育个体在 8 个位点的基因型全部来自母本,在雌核发育

个体中没有发现父本的基因型,所以可以确定,这些个体并没有父本的遗传物质渗入,可以确定为雌核发育个体。(图 1 为部分通用引物 TTF-EST4 (A) 和 SP-MFW5 (B) 在部分雌核发育后代中的扩增图谱。)

2.4 雌核发育后代纯合性的评价

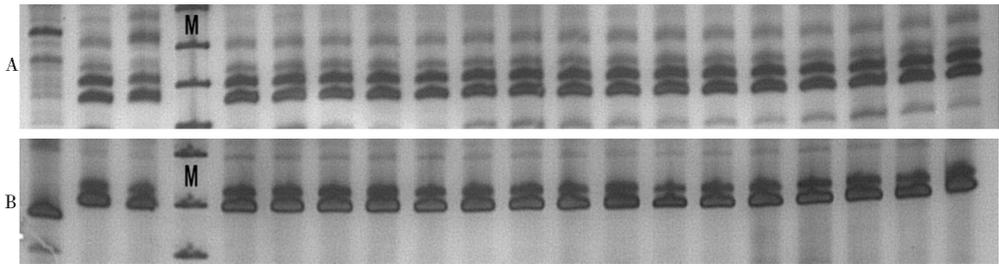
从团头鲂 30 对微卫星引物中筛选出 10 对母本为杂合的位点,用这 10 对引物对雌核发育后代进行纯合性的评价(引物序列及扩增条件见表 4)。结果表明:雌核发育个体在这 10 个位点中, EST46、EST61、EST851 共 3 个位点均表现为纯合, EST12 位点的部分个体表现为杂合,杂合率为 86.4%。其余位点则全部为杂合,10 个位点的平均杂合比例为 68.64%(表 5)。

表 3 用于鉴定雌核发育个体的微卫星引物序列、特异退火温度、重复序列¹⁾

Table 3 Primer sequence, repeat motif, size range and specific annealing temperature of microsatellite primers for identification of the gynogenetic individuals

位点 Locus	引物序列 Primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	重复序列 Repeat motif
SP-MFW1	F:GTCAGACTGTCATCAGGAG R:GAGGTGTACTACTGAGTCACGC	60.0	(TG) ₁₃
SP-MFW5	F:GAGATGCCTGGGAAGTCAC R:AAAGAGAGCGGGGTAAAGGAG	60.0	(TG) ₁₃
SP-HLJ393	F:TGCGGTCATTACTATTTCG R:CCCAGCACCTGTTTCCAC	57.0	(CA) ₁₀
TTF-EST4	F:GCAGTGTGGAGGTCGTG R:CATACTGGAATGTTTGTAGGA	57.5	(TG) ₁₂
TTF-EST6	F:TGTGTCAAAATGCGTTCA R:TCTCCCCCAAGCCTACC	52.0	(GT) ₁₂
TTF-EST47	F:ACGGTGTCAAGTTCAGCA R:CTCCCACGACAGAAAAGA	50.0	(AC) ₁₉
TTF-EST98	F:TCATGCTTGAAGCGTGTGC R:CGCCTGCCATCCTAAGTGTT	57.5	(AC) ₁₆
TTF-EST179	F:ATTCATTATGGCGTGCTG R:TTCTTGCTGAGGGTATT	54.0	(CA) ₁₀

1) SP 表示松浦镜鲤微卫星位点; TTF 表示团头鲂微卫星位点。下同。SP represents the microsatellite locus of *C. carpio* Songpu carp; TTF represents the microsatellite locus of *M. amblycephala*. The same as below.



M, Marker; 第一泳道为父本, 第二泳道为母本, 其余为雌核发育个体。The first lane was for the male parent, the second lane being the female parent, and the remaining being for gynogenetic individuals.

图 1 引物 TTF-EST4 (A) 和 SP-MFW5 (B) 雌核发育后代及其亲本在部分通用微卫星引物中的扩增图谱

Fig. 1 PCR amplifications of TTF-EST4 (A) and SP-MFW5 (B) microsatellite locus in *M. amblycephala* gynogenetic individuals and parents

表 4 评价雌核发育纯和性的微卫星引物的位点、序列、重复序列

Table 4 Primer sequence, repeat motif, size range and specific annealing temperature of microsatellite primers for assessment of homozygosity in gynogenetic individuals

位点 Locus	引物序列 Primer sequence		退火温度/℃ Annealing temperature	重复序列 Repeat motif
TTF-EST6	F: TGTGTCAAAATGCGTTCA	R: TCTCCCCCAAGCCTACC	52.0	(GT) ₁₂
TTF-EST7	F: GTTGTAAAAGGGAGGGACT	R: TGGGGGACAAATAAAAAGC	56.0	(GT) ₁₀
TTF-EST12	F: TCGTGC GAAGTAAACAAG	R: CAGGCAATAATAACAAAACC	54.0	(TCTT) ₁₃
TTF-EST46	F: AGTATAAGTTGAGTGGGTG	R: TAAAGGGAAATTCTGGT	50.5	(ATCT) ₂₅
TTF-EST61	F: CAACGGAAACCAGACAGGA	R: CATCACAATGAGTTTGAGGCT	52.0	(CA) ₁₃
TTF-EST80	F: TCAGCAACCGTTTACATA	R: GCAGACCCTTTCAGACAA	54.5	(TG) ₁₁
TTF-EST84	F: ATGTATTGGGTTGAGGTT	R: GAGCTATGGACTCCGTTAT	53.0	(TG) ₁₄
TTF-EST851	F: ATTGGTCCAGTCTGTTGT	R: TGTATCTTGACAGCTCTA	54.5	(AAGA) ₁₄
TTF-EST90	F: CTTACAGACTCCGACAGG	R: ATCCACGACTTCCAGAAC	57.0	(AC) ₁₂
TTF-EST110	F: GCCTGACAGTCTTCTGC	R: GCTATCCGATTATCATTAC	59.0	(AC) ₁₃

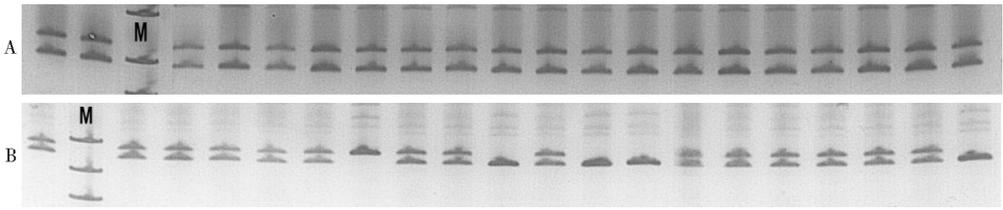
雌核发育二倍体出现杂合现象表明卵细胞减数分裂过程中同源染色体之间发生了交换重组, 因此, 减数雌核发育二倍体的杂合子比例可以用来反映该座位与着丝粒的重组率^[12]。本研究的结果说明了团头鲂在所研究的 10 个微卫星座位的重组率是很

高的。每对微卫星引物扩增出的雌核发育个体数、母本以及后代的基因型和重组率如表 5 所示。每个个体在微卫星位点的等位基因, 按照其迁移率从大到小依次定义为 A、B。部分通用引物 EST12、EST7 在部分雌核发育后代中的扩增图谱见图 2。

表 5 团头鲂雌核发育个体及母本在 10 个位点的基因型及杂合比例

Table 5 The genotypes and proportion of heterozygosity of the female parent and 44 gynogenetic individuals and in 10 microsatellite locus

位点 Locus	母本基因型 Genotype of female parent	雌核发育个体基因型及个体数 Genotype of gynogenetic individuals	重组率/% Combination rate
TTF-EST6	A/B	A/B(44)	100
TTF-EST7	A/B	A/B(44)	100
TTF-EST12	A/B	A/B(38), A/A(3), B/B(3)	86.4
TTF-EST46	A/B	A/A(44)	0
TTF-EST61	A/B	B/B(44)	0
TTF-EST80	A/B	A/B(44)	100
TTF-EST84	A/B	A/B(44)	100
TTF-EST851	A/B	A/A(44)	0
TTF-EST90	A/B	A/B(44)	100
TTF-EST110	A/B	A/B(44)	100



第一泳道为母本,其余为雌核发育个体。M 表示为 marker。The first lane was for the female parent, and the remaining were for gynogenetic individuals. M represents marker.

图 2 引物 EST7(A)和 EST12(B)雌核发育后代及其母本在部分通用微卫星引物中的扩增图谱

Fig. 2 PCR amplifications of EST7 (A) and EST12 (B) microsatellite locus in

M. amblycephala gynogenetic individuals and female parent

3 讨 论

笔者采用组织研磨制备细胞悬液、利用流式细胞计数的方法测定 DNA 的含量来鉴定雌核发育个体的倍性,雌核发育个体的 DNA 含量与正常二倍体的 DNA 含量的比值为 1.01,并没有显著性差异 ($P > 0.05$)。李渝成等^[13]曾对 14 种淡水鱼的 DNA 含量做过研究,并阐述这些鱼的 DNA 含量和相应染色体数目之间存在着密切的相关性,即 DNA 含量高的鱼类,染色体的数目一般较多,含量低的鱼类,染色体数目一般较少。叶玉珍等^[14]对人工复合三倍体鲤的红细胞和精子的 DNA 含量分析结果与李渝成等的观点一致。而松浦镜鲤是在德国镜鲤 (*Cyprinus carpio* L. *mirror*) 的基础上选育出来的,其染色体与德国镜鲤应同为 $2n = 100$ ^[15],远大于团头鲂的 $2n = 48$ 。若松浦镜鲤的精子进入雌核发育个体,则其 DNA 含量应远大于 2.90,而雌核发育个体的 DNA 含量与对照组没有显著性差异,这从一方面表明团头鲂雌核发育个体并没有松浦镜鲤外源遗传物质的渗入。

精子灭活的效果直接关系到雌核发育的成败,有时会因精子的遗传物质灭活不彻底,导致父本的遗传物质整合到雌核发育的子代中,因此,对雌核发育后代遗传物质的来源进行检测是非常重要的。对异源精子诱导团头鲂雌核发育后代的真实性进一步评价也是有必要的。邹桂伟等^[16]利用 RAPD 技术对人工雌核发育鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 进行了分析,发现有部分个体含有与父本相同的特异 DNA 扩增条带,证明父本的遗传物质整合到了雌核发育子代个体中。吴彪等^[17]利用 3 对微卫星引物对栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 雌核发育进行遗传物质检测,后代的遗传物质全部来自母本,

并没有父本的遗传物质整合到子代个体中。Li 等^[18]应用 5 对微卫星引物标记,证实了太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 人工雌核发育是一个纯系,即没有任何雄性基因参与遗传。运用微卫星分子标记技术对本研究所诱导的雌核发育后代进行检验,可以在更深层上证实后代基因的来源情况,能检验后代基因有无父本基因的干扰。本试验利用了 8 对父母本出现特异性的微卫星引物对雌核发育后代进行检测,结果显示了团头鲂雌核发育个体的遗传物质全部来自母本,没有发现父本的遗传物质渗入。本试验的结果证明适当的紫外线处理松浦镜鲤的精子,精子的遗传物质能够被完全破坏,不会对雌核发育团头鲂的基因组造成遗传污染。本试验的结果也表明了利用微卫星分子标记对雌核发育的遗传物质来源进行检测,是一种有效的方法。

人工诱导雌核发育就是为了快速获得纯合的群体,而抑制第一次卵裂的雌核发育在理论上是可以获得纯合率为 100% 的个体,但是抑制第一次卵裂很难获得大量的雌核发育后代,所以在实践中多采用抑制第二极体释放获得的减数分裂雌核发育个体。由于卵细胞在进行第一次减数分裂的过程中同源染色体之间发生联会和交换重组,这就导致了减数分裂雌核发育的后代出现杂合的现象,所以对减数分裂雌核发育后代的纯合性进行检测也就非常重要。由于微卫星分子标记具有共显性的特点,不仅可以检测个体内同源染色体是纯合子还是杂合子,还可以计算基因的杂合率,所以微卫星分子标记被许多学者用于评价雌核发育后代的纯合性。Galbusera 等^[19]利用 2 对微卫星引物对非洲鲶 (*Clarias gariepinus*) 雌核发育的后代进行检测,发现在这 2 个座位上的重组率分别为 86% 和 71%; Francescon 等^[20]发现欧鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 在 6 个微卫

星座位的重组率从 40% 到 94% 不等;朱晓琛等^[21]所得到的牙鲮(*Paralichthys olivaceus*)的 8 个座位的平均重组率为 82.24%;孙效文等^[22]用 8 个位点对雌核发育牙鲮 A、B 2 个家系进行了评价,这 2 个家系的平均重组率为 80% 和 75.6%,C、D 2 个家系在 9 个位点的平均重组率为 77.8% 和 90.6%。本试验中除了 TTF-EST46、TTF-EST61、TTF-EST851 之外其他位点都发生了重组,只有 TTF-EST12 的重组率小于 100%,为 86.4%,其余的 6 个位点重组率为 100%,雌核发育团头鲂个体在这 10 个位点的平均重组率为 68.64%,由此可知,雌核发育团头鲂个体在母本杂合位点的纯合度并不高,没有得到一个完全纯合的个体。依据遗传理论,雌核发育可以提高育种种群的纯合度,但是在实际育种过程中由于不同的育种鱼类有不同的遗传特点,经过不同的雌核发育操作手段可能会有不同的纯合效果,这就造成了不同种鱼或是同一种鱼在经过不同的处理手段后得到的雌核发育后代纯合度有很大差异的原因。母本杂合位点在子代纯合度不高的原因一方面可能由于隐性致死基因纯合位点的表达,导致纯合性高的子代死亡(本试验诱导的团头鲂雌核发育个体在出鱼苗 5 d 后,有大量的鱼苗死亡)。Palti 等^[23]利用 20 个微卫星标记对奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)异质雌核发育后代进行了研究,在 3 个微卫星座位上发现随着发育时期的延长杂合子比例逐渐升高,即发生了纯合子缺失的现象,经过关联分析和显著性检验发现这个座位可能与致死基因相连锁。另外一方面可能由于鱼类的染色体较小,基因座位与着丝点之间比较容易发生重组,因此得到的雌核发育后代的重组率较高。

从本试验的结果可以看出,通过抑制团头鲂卵子第二极体获得的纯合性并不高,由于其具有较高的重组率,使其并不适合用于直接建立纯系,但是雌核发育的遗传物质均来自于母本,基因表达趋于一致,群体遗传的多态性明显降低,这表明经人工诱导雌核发育团头鲂的群体遗传纯合度已获得了明显提高。由于其具有较高的重组率使其与母本具有高度的遗传同质性,从而可以形成很好的育种材料。

参 考 文 献

- [1] 蒋一珪,俞豪祥,陈本德,等. 鲫人工和天然雌核发育[J]. 水生生物学集刊,1982,7(4):471-477.
- [2] 刘静霞,周莉,赵振山,等. 锦鲤 4 个人工雌核发育家系的微卫星[J]. 动物学研究,2002,23(2):97-105.
- [3] LIE O, SLETTAN A, LINGASS F, et al. Haploid gynogenesis: a powerful strategy for linkage analysis in fish [J]. Anim Biotechnol, 1994(5):33-45.
- [4] 蒋鹏,史健全,张妍,等. 应用微卫星多态性分析青海湖裸鲤六个野生群体的遗传多样性[J]. 生态学报,2009,29(2):939-945.
- [5] 柯鸿文. 团头鲂的人工繁殖与饲养试验[J]. 水生生物学集刊,1965,5(2):282-283.
- [6] 李思发,蔡完其,周碧云. 团头鲂种群间的形态差异和生化遗传差异[J]. 水产学报,1991,15(3):204-211.
- [7] 邹曙明,李思发,蔡完其,等. 团头鲂良种雌核发育群体的建立及其遗传变异[J]. 水产学报,2001,25(4):311-316.
- [8] SAMBROOK J, RUSSELL D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂,等,译. 北京:科学出版社,2002:1081-1113.
- [9] 闵霞,贾智英,李池陶,等. 微卫星分子标记与松浦镜鲤 3 个表型性状的相关分析[J]. 基因组学与应用生物学,2011,30(2):197-203.
- [10] CROOIJMANS R P M A, BIERBOOMS V A F, KOMEN J, et al. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Anim Genet, 1997,28(2):129-134.
- [11] MORISHMI A K, NAKAYAMA A I, ARAI K, et al. Microsatellite-centromere mapping in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Genetics, 2001,111:59-69.
- [12] THORGAARD G H, ALLENDORF F W, KNUDSEN K L. Gene-centromere mapping in rainbow trout: high interference over long map distances [J]. Genetics, 1983,103:771-783.
- [13] 李渝成,李康,周曦. 十四种淡水鱼的 DNA 含量 [J]. 遗传学报,1983,10(5):384-389.
- [14] 叶玉珍,吴清江. 人工复合三倍体鲤与亲本相对 DNA 含量及倍性分析[J]. 水生生物学报,1998,22(2):119-122.
- [15] 尹洪滨. 四种鲤鱼染色体核型比较研究 [J]. 水产学杂志,2001,14(1):7-10.
- [16] 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入的 RAPD 分析[J]. 水生生物学报,2004,28(2):180-185.
- [17] 吴彪,杨爱国,王清印,等. 异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育后代的微卫星分析[J]. 水产学报,2009,33(4):542-547.
- [18] LI Q, KIJIMAN A. Microsatellite analysis of gynogenetic families in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Exp Mar Biol Ecol, 2006,331:1-8.
- [19] GALBUSERA P, VOLCKAERT F A M, 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.
- [20] FRANCEESCON 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.
- [21] 朱晓琛,刘海金,孙效文,等. 微卫星评价牙鲮雌核发育二倍体

- 纯合性[J]. 动物学研究, 2006, 27(1): 63-67.
- [22] 孙效文, 张研, 季旭, 等. 鲤和牙鲮的两种雌核发育子代的基因型分析[J]. 水产学报, 2008, 32(4): 545-551.
- [23] PALT I Y, SHIRAK A, CNAANI A, et al. Detection of genes with deleterious alleles in an inbred line of tilapia (*Oreochromis aureus*) [J]. Aquaculture, 2002, 206: 151-164.

Microsatellite marker analysis of artificial gynogenetic *Megalobrama amblycephala*

ZHANG Xin-hui¹ XIA Xin-min² LUO Wei¹ GAO Ze-xia¹ QIAN Xue-qiao³ WANG Wei-min¹

1. College of Fishery/Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. The National Blunt Snout Bream Stock Farm in Hubei Province, Ezhou 436000, China;

3. Animal Husbandry and Fisheries Research Center of Haid Group Co., Ltd, Guangzhou 511400, China

Abstract Artificial gynogenesis has been proved to be a valuable genetic tool for the rapid production of inbred lines, development of all female populations and construction of linkage map. In the present study, meiogynogenesis of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) was induced by cold-shock with the eggs being activated by UV genetic inactivated sperms of *Cyprinus carpio* Songpu carp. DNA contents of gynogenetic individuals were measured by flow cytometry and there were no significant differences between gynogenetic individuals and *M. amblycephala* normal diploids ($P > 0.05$), indicating that the gynogenetic individuals were diploids. Eight pairs of microsatellite primers could amplify clear parental bands were selected to test the gynogenetic progenies. The results of primers MFW1, MFW5 and HLJ393 revealed that no male parent gene exist in gynogenetic individuals. Then ten microsatellites locus where female parent was heterozygous were used to analyze the homozygous ratio of the induced gynogenetic diploids. The results of genetic analysis showed that a high percentage of heterozygosity was found in gynogenetic diploids except for loci TTF-EST46, TTF-EST61 and TTF-EST851. The rate of heterozygosity in meiogynogenetic progenies at the locus TTF-EST12 was 0.864 and the other six loci were 1.000. The average recombination rate of these 10 loci was 0.6864. This study confirmed that it was difficult to get high rate homozygotic *M. amblycephala* gynogenesis through suppression of the meiosis-II, because there was high heterozygosity in the first meiogynogenetic generation owing to crossover between the homologous chromosome during the meiosis-I stage. These gynogenetic diploids could be used as breeding material for its high genetic homogeneity with the female parent.

Key words *Megalobrama amblycephala*; gynogenesis; microsatellite; homozygous

(责任编辑:边书京)