

文章编号:1000-0615(2009)05-0734-08

大黄鱼同质雌核发育的诱导及微卫星标记分析

吴清明¹, 蔡明夷¹, 刘贤德¹, 刘颖¹, 陈庆凯², 姚翠鸾¹, 王志勇¹

(1. 集美大学水产学院, 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 福建省宁德市水产技术推广站, 福建 宁德 352100)

摘要:为了解大黄鱼同质雌核发育的诱导条件及其效果,用紫外线照射灭活大黄鱼精子的遗传物质,静水压休克抑制第一次卵裂,培育出2个同质雌核发育家系(GF1和GF2),并借助微卫星标记进行鉴定,研究了10个母本中杂合的位点在2个家系中的传递和分离。结果显示,GF1和GF2孵出的仔鱼中分别有40.0%和17.1%形态正常个体,GF1检测8个位点30个个体均表现出雌核发育双单倍体(GDH)的特征,有20种基因型;GF2检测4个位点30个个体中,27个为GDH,2个含有父本基因,余下1个个体扩增条带既不同于母本也不同于父本,遗传本质不明。可见,所采用方法可以诱导出同质雌核发育大黄鱼。10个标记中除了LYC0026和LYC0053标记在GF2中偏离了1:1($P < 0.05$),其余标记在GDH中的分离均符合孟德尔遗传定律的预期比值。研究还发现LYC0002和LYC0014的分离模式完全相同。首次报道了大黄鱼同质雌核发育的人工诱导及微卫星标记在GDH中的传递与分离,为大黄鱼纯系培育及利用GDH与纯系进行基因组作图分析等研究奠定了基础。

关键词:大黄鱼;同质雌核发育;微卫星

中图分类号:Q 953; S 917

文献标识码:A

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)是我国养殖量最大的海洋经济鱼类,经过连续20余年未加选择的人工繁殖,养殖大黄鱼出现了明显的种质退化现象,主要表现在抗病力下降、生长减慢等,严重影响了养殖业的效益和持续发展。因此大黄鱼优良品种的选育日益受到重视。雌核发育是快速建立纯系的有效手段,在鱼类遗传育种中具有重要意义。大黄鱼异质雌核发育诱导及在基因作图中的应用已有多篇报道^[1-5],而同质雌核发育尚未见报道。

人工诱导同质雌核发育先利用遗传失活精子激活卵子的发育,再利用理化方法抑制发育卵的第一次有丝分裂,从而得到每个基因座位都纯合的雌核发育双单倍体(gynogenetic doubled haploid, GDH)。在一次同质雌核发育的基础上再进行一次异质雌核发育就可以获得纯系^[6-7]。

这是快速建立鱼类纯系的有效手段。利用这种方法,已先后建立20多种淡水鱼纯系^[8]。而海水鱼同质雌核发育研究仅见牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[9-10]、真鲷(*Pagrus major*)^[11]和欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[12]等。本文在对诱导培育条件进行反复摸索优化的基础上,从2尾雌性大黄鱼的卵子诱导产生同质雌核发育鱼苗,利用微卫星标记进行遗传鉴定,并研究了这些标记在GDH后代的传递和分离情况,以期为大黄鱼纯系培育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 雌核发育的诱导

试验工作于2007年春季在福建省宁德市水产技术推广站试验场进行,选择已在网箱中养殖2周年,性腺发育良好、无病害的个体做为亲鱼,

收稿日期:2008-07-30 修回日期:2008-11-13

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A405);国家自然科学基金(30771663);福建省青年创新基金项目(2006F3095);集美大学创新团队基金(2006A001)

通讯作者:王志勇, E-mail: zywang@jmu.edu.cn

按照王晓清等^[1]所描述的方法进行人工催产,依李益云^[13]所描述的方法用紫外线照射进行(大黄鱼)精子遗传灭活,卵子在人工授精后 51 min(第一次卵裂开始的时间)施以静水压处理使染色体加倍,压力设定为 40 MPa,处理时间 3 min;留部分已授精卵不作加压处理作为对照。试验期间水温保持在(22±0.5)℃。观察记录总卵数、发育卵数(发育到原肠期时统计)、孵化仔鱼数和正常仔鱼数。亲本取尾鳍固定于 95% 酒精中供提取 DNA 用。在仔鱼孵化后第 2 天,挑取躯干笔直、形态正常且活力强的个体固定于 95% 酒精中供提取 DNA 用。

按下面公式计算发育率,孵化率及仔鱼正常率:

$$\text{发育率}(\%) = \text{发育卵数} / \text{总卵数} \times 100$$

$$\text{孵化率}(\%) = \text{孵化仔鱼数} / \text{发育卵数} \times 100$$

$$\text{初孵仔鱼正常率}(\%) = \text{正常仔鱼数} / \text{总仔鱼数} \times 100$$

1.2 基因组 DNA 提取

采用标准的苯酚/氯仿/异戊醇法^[14]从亲鱼尾鳍提取基因组 DNA,提取仔鱼基因组 DNA 时在蛋白酶消化完成后,仅用酚:氯仿(1:1)抽提一次,其余步骤同标准方法。用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的质量,紫外分光光度计测定 OD₂₆₀ 值,确定 DNA 的浓度。

1.3 微卫星标记基因型分析

首先用 39 对大黄鱼微卫星标记引物对亲本的基因型进行分析,从中筛选了 10 对在雌性亲本杂合,与提供精子的雄鱼有不同等位基因的引物,用于分析仔鱼的基因型,这些引物的序列及退火温度如表 1 所示。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,按照李益云^[13]所述方法进行 PCR 扩增、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳与银染;各个座位的等位基因按其迁移率从大到小依次定义为 A、B、C、D。用 χ^2 测验^[15] 检验母本基因在雌核发育仔鱼中的分离是否符合孟德尔遗传定律。

表 1 10 个大黄鱼微卫星标记的核心序列、引物序列及退火温度
Tab.1 Core sequences, annealing temperature and primer sequences of 10 microsatellite DNA loci of large yellow croaker

微卫星座位 locus	核心序列 core sequence	引物序列(5'-3') primers sequence(5'-3')	退火温度(℃) annealing temperature	GenBank 登录号 GenBank accession no.
LYC0002	(TG) ₂ (AC) ₂ TC (AC) ₁₀ CTAG(AC) ₅	F: ACCTCCAGTGGGATGTGA R: GGCTGTTTGTATAATTTGTG	50	AY885692
LYC0004	(TG) ₁₁	F: CTCTTAGCCGTCATTCATCC R: CATTTAGCCAAGTTCACCTCC	55	AY885694
LYC0011	(TG) ₁₁	F: CTTTATTGGCTCCGTATGA R: CACTCACACTAGCACGCAC	55	EF372246
LYC0012	(AC) ₇	F: CAGAACAACAATGAATGGG R: GAGGAGCTCAACAGCAACA	55	EF372247
LYC0013	(GT) ₂₀	F: GCTGCGAGTACTTTACTCAT R: AACTCACAAACATGCAC	50	EF372248
LYC0014	(AC) ₂ CT(CA) ₁₀ CCTAG (AC) ₅ AATAG(AC) ₂ AG	F: GGGAGAAGCAGCAGGACA R: GAAACAAGAGCACTGAGAGCC	50	EF372249
LYC0026	(AC) ₃₇	F: CATATGTTCCAGTTGTCTG R: CCATTGTACAGTGAAGGAC	55	EF372261
LYC0053	(CA) ₁₃	F: CCCACAATACCTGGACAA R: TGCCACCACTGGATACAAA	55	EU908080
LYC0109	(TG) ₂₅	F: GCCAGTTGGTCTGTAAAGTG R: CTCTTCTCTCTCTCTCCCC	61	EU022010
LYC0114	(CA) ₂₈	F: GACCAGTACTCAATCACTC R: CTATCCAGGTGTAGGTAGG	55	EU022015

2 结果

2.1 同质雌核发育诱导率

授精后 33 h 左右,仔鱼孵化出膜。2 次成功试验诱导的卵子的发育率、孵化率和孵出仔鱼正常率如表 2 所示。同质雌核发育家系(GF1 和 GF2)及其单倍体对照组(GF1-C 和 GF2-C)的发育率均较高,而同质雌核发育家系的孵化率明显低于其单倍体对照组。GF1-C 的孵化率为 40.9%,而 GF1 孵化率仅为 9.2%;GF2-C 的孵化率为 28.6%,而 GF2 仅为 10.8%。两个单倍体对照组初孵仔鱼全部表现明显的单倍体综合症,主要特征是脊柱弯曲,肌节模糊(图 1-A)。经压力休克后正常率明显提高,GF1 为 40%,GF2 为 17.1%。正常仔鱼如图 1-B 所示,鱼体笔直,肌节清晰,与单倍体有明显区别。家系 GF1 共获得约

740 尾正常初孵仔鱼,取样后未进一步培育。家系 GF2 共获得约 2 746 尾初孵仔鱼,培育 15 d 后,存活 76 尾,后因仔鱼数量太少,培育困难中止试验。

表 2 同质雌核发育的发育率、孵化率和正常率
Tab.2 The developmental rate, hatching rate and normal rate of mitotic gynogenetic families

家系 family	发育率(%) developmental rate	孵化率(%) hatching rate	正常率(%) normal rate
GF1-C	99.3	40.9	0
GF1	93.4	9.2	40.0
GF2-C	98.3	28.6	0
GF2	86.5	10.8	17.1

注:GF1-C 和 GF2-C 分别表示是雌核发育家系 GF1、GF2 的单倍体对照组

Notes: GF1-C and GF2-C were the haploid control of gynogenesis families respectively

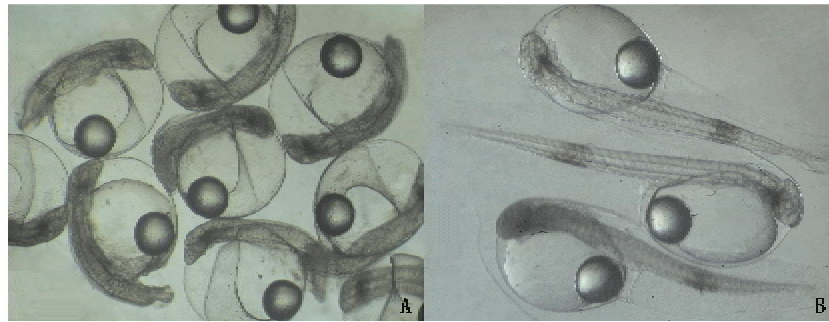


图 1 单倍体综合症的初孵仔鱼(A)和正常二倍体仔鱼(B)

Fig.1 Haploid larvae with typical syndrome (A) and normal diploid larvae just after hatching (B)

2.2 同质雌核发育的鉴定

对 39 对微卫星引物进行筛选的结果,得到 10 对引物母本基因型为杂合、且与提供精子的雄鱼具有不同等位基因,其中适用于 GF1 鉴定的标记有 8 个,适用于 GF2 的鉴定标记有 4 个(表 3)。GF1 的 30 尾形态正常的初孵仔鱼样品在所检测 8 个标记位点上均未出现父本的等位基因,而且所有个体都为纯合体,GDH 比例达 100%;图 2 示其中一个位点的电泳图谱。而 GF2 所检测的 30 尾形态正常的初孵仔鱼中,有 2 尾含有父本特异的等位基因(MSB,图 3),推测是属于正常受精的产物,另有 1 尾(SI,图 3)4 个微卫星位点标记条带的迁移率与父母本都不相同,其本质不明,其余 27 尾都是仅含有母本基因的纯合体,因此,GF2 中只有 90% 个体为 GDH。

2.3 微卫星标记在同质雌核发育家系中的传递与分离

微卫星标记在 GF1 和 GF2 中的传递和分离情况如表 3 所示。GF1 共检测 8 个标记位点,30 尾仔鱼共有 20 种基因型。在每个位点上,每尾仔鱼仅得到母本两个等位基因中的一个,均为纯合体。母本的两个等位基因在同质雌核发育后代中的分离比符合孟德尔分离律的预期值($P > 0.05$, χ^2 检验)。GF2 检测了 4 个标记位点,30 个样品中剔除 2 个含有父本基因个体和 1 个具不明条带个体,共有 27 个 GDH,表现为 12 种基因型。母本基因在 GDH 中分离,LYC0002 和 LYC0012 位点分离比符合 1:1,LYC0026 和 LYC0053 位点则偏离 1:1($P < 0.05$,表 3)。

在 GF1 子代个体中,LYC0002 和 LYC0014

两个标记的分离模式完全一致,即两个标记的基因型完全一致。这表明这两个标记完全连锁。利用 DNAMAN 程序对这两个标记片段的 DNA 序

列进行了比对分析,发现两者之间仅有 3 个碱基差异(图 4)。

表 3 两个同质雌核发育家系微卫星标记在 GDH 中的分离及其 χ^2 检验

Tab.3 Segregation and χ^2 -test of microsatellite markers in two mito-gynogenetic families

座位 locus	家系 family	父本 male	母本 female	后代 offspring*		χ^2 (df=1) F/F : S/S=1:1	P 值 P value
				F/F	S/S		
LYC0002	G1	B/C	A/D	A/A(17)	D/D(13)	0.53	0.467
	G2	C/C	A/B	A/A(18)	B/B(9)	3.00	0.083
LYC0004	G1	A/A	A/B	A/A(16)	B/B(14)	0.13	0.718
LYC0011	G1	B/B	A/B	A/A(10)	B/B(20)	3.33	0.068
LYC0012	G2	C/C	A/B	A/A(9)	B/B(18)	3.00	0.083
LYC0013	G1	A/B	BC	B/B(14)	CC(16)	0.13	0.718
LYC0014	G1	BC	AD	A/A(17)	DD(13)	0.53	0.467
LYC0026	G1	BD	AC	A/A(16)	CC(14)	0.13	0.718
	G2	CD	AB	A/A(8)	B/B(19)	.48	0.034
LYC0053	G2	CC	AB	A/A(7)	B/B(20)	6.26	0.012
LYC0109	G1	AB	CD	C/C(18)	DD(12)	1.2	0.273
LYC0114	G1	AB	AB	A/A(13)	BB(17)	0.53	0.467

注: * 括号中的数字代表每种基因型的个体数;F 和 S 分别代表电泳中迁移快和慢的等位基因

Notes: In parentheses are given the numbers of individuals observed for each genotype; F and S were the fast and slow allele in the electrophoresis patterns respectively

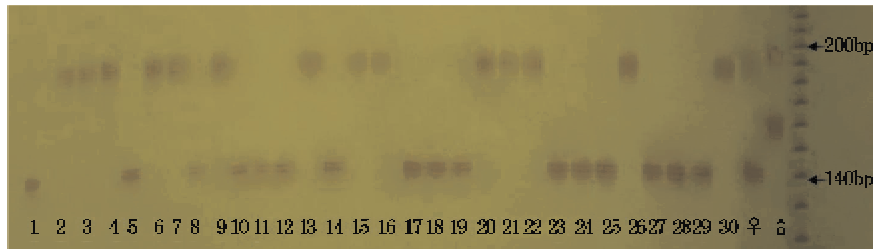


图 2 家系 GF1 在 LYC0026 座位上的微卫星标记图谱

Fig.2 The electrophoresis patterns of family GF1 at LYC0026 microsatellite locus

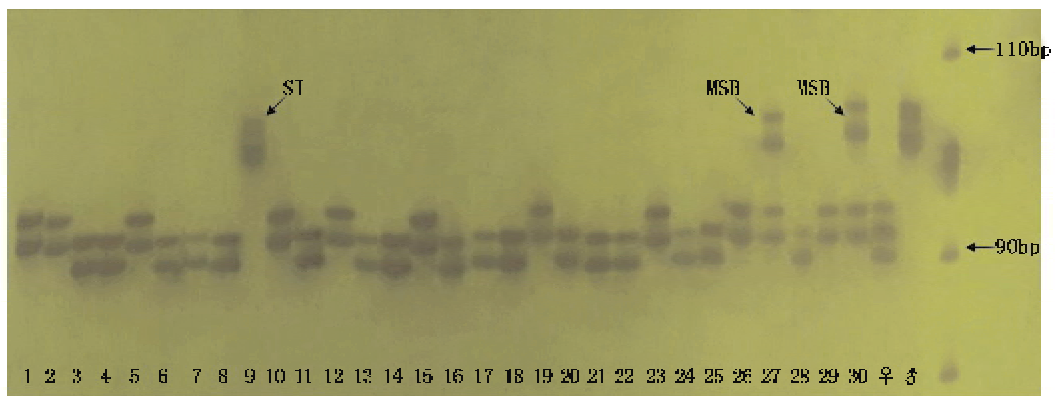


图 3 家系 GF2 在 LYC0002 座位上的微卫星图谱

SI 为扩增条带不同于双亲的特殊个体;MSB 为父本特有条带

Fig.3 The electrophoresis patterns of family GF2 at LYC0002 microsatellite locus

SI; the individual with specific bands;MSB; male parent specific band

LYC0014	CTTGTAGAACATGAGTGTTCATTGTCTTGTGAATCAGTC	40
LYC0002	0
LYC0014	ACACCTCCAGTGGGATGTGACACTCACACACACACACAC	80
LYC0002	ACACCTCCAGTGGGATGTGACACTCACACACACACACACAC	39
LYC0014	ACACACCTAGACACACACACAATAGACACAGAAATAGATC	120
LYC0002	ACACACCTAGACACACACACAATAGACACAGAAATAGATC	79
LYC0014	CACACAAATTTATAACAAACAGCAGTGACAGCT	162
LYC0002	CACACAAATTTATAACAAACAGCCA.....	163

图4 利用 DNAMAN 对 LYC0002 与 LYC0014 的核心序列进行比对的结果

Fig. 4 Comparison of origin core sequences at LYC0002 and LYC0014 microsatellite loci with DNAMAN

3 讨论

同质雌核发育是利用遗传失活精子激活卵子的发育,再通过抑制第一次有丝分裂实现染色体组加倍。利用遗传失活精子激活卵子发育,未经染色体组加倍处理,仔鱼一般呈现单倍体综合症。单倍体综合症个体的比率常常与精子遗传失活效果成正比。而经过染色体组加倍处理后,形态正常仔鱼的比率会显著提高,正常仔鱼的比率也与加倍效果成正比^[16]。因此,对照组的单倍体综合症与处理组仔鱼的正常形态可以作为快速鉴定精子遗传物质失活和染色体组加倍处理效果的表现指标。本研究中,未利用静水压处理诱导染色体组加倍的对照组,100% 初孵仔鱼表现出明显的单倍体综合症,而静水压处理抑制第一次有丝分裂后,具正常形态个体的比率上升到 40.0% (GF1) 和 17.1% (GF2)。这表明精子在紫外线处理后,遗传物质被有效失活;另一方面,通过静水压处理,实现了染色体组加倍。

雌核发育可以通过证明二倍体重建加以鉴定,但是要确定后代是否为完全母本遗传,需要利用分子遗传标记进行遗传鉴定。同质雌核发育遗传上具有 2 个特点:一是完全母本遗传,即不含有父本基因;二是每个基因座位的基因型都是纯合的。要同时检测这两个特点,需要使用共显性标记。已有一些学者分别从不同层次、不同角度对同质雌核发育个体进行遗传分析^[17-21]。微卫星标记是基于 PCR 的共显性标记,在同质雌核发育遗传分析中具有显著优势。本研究分别用 8 个和 4 个诊断性 (diagnostic) 微卫星标记来检测 2 个同

质雌核发育家系初孵仔鱼是否为完全母本遗传。GF1 中,30 尾仔鱼在 8 个微卫星座位上均未发现父本基因,且全部为纯合体,GDH 比例为 100%;而 GF2 的 30 尾仔鱼中,有 27 尾为 GDH,2 尾在 4 个基因座位上均含有父本基因,且为杂合体。这 2 尾鱼是两性融合个体,或是仅含有少量父本基因,需要通过检测更多的微卫星标记位点或利用 AFLP 等可同时检测多个位点的分子标记技术加以验证,但是已有结果已经表明该 2 个个体不是我们所期望获得的 GDH,因此我们未作进一步检测。在人工诱导雌核发育过程中,精子只作为“激活源”,入卵后不形成雄核,不参与胚胎发育,所以理论上后代的遗传物质仅来源于母性亲本。但在实际操作过程中,有时会因精子遗传物质失活不彻底,或者操作不慎使已照射精子受到未照射精子污染,致使全部或部分父本基因参与遗传。例如,王晓清等^[1,22]用微卫星标记和 AFLP 标记分析大黄鱼异质雌核发育时发现,个别后代含有父本特异的 DNA 扩增带。徐成等^[23]利用同工酶标记发现,同源精子诱导牙鲆异质雌核发育的后代存在父方基因表达。因此,在雌核发育体作为种质材料使用前,最好逐尾进行分子鉴定,以确定雌核发育的真实性。另外,鱼类卵子常常可以被远缘物种的精子激活,产生无法存活的杂交胚胎或仔鱼。因此,筛选适宜的远缘物种精子,辅以适量的紫外线辐射,可能是避免精子遗传物质的污染,减轻后续亲子鉴定工作量的一个有效途径。

理论上同质雌核发育个体在所有的基因座位上都是纯合的^[24]。本研究中,GF1 的 30 尾仔鱼在所检测的 8 个微卫星座位均为纯合,GF2 中 27

尾雌核发育仔鱼在 4 个检测位点上也均为纯合。可见,诱导 1 次同质雌核发育就可以实现全部基因座位的纯合。相比之下,异质雌核发育纯化基因的速度要慢得多,特别是那些远离着丝点的基因座位,往往具有很高的交换率。Li 等^[5]利用异质雌核发育家系进行微卫星标记—着丝粒作图时发现,座位 LYC0002 (97.8%)、LYC0012 (92.5%)、LYC0013 (91.6%) 和 LYC0014 (98.4%) 在异质雌核发育后代中具有相当高的杂合率,这是因为这些位点远离着丝粒,有很高的重组率,很难通过异质雌核发育实现纯合。虽然,同质雌核发育一代在个体水平上全部基因是纯合的,但在群体水平上基因型仍然不一致。本研究中,GF1 的 30 尾 GDH 仔鱼 8 个微卫星座位就有 20 种基因型,GF2 的 27 尾 GDH 仔鱼 4 个微卫星座位有 12 种基因型。所以,要培育大黄鱼纯系,还需要以 GDH 为母本,再做一次同质或异质雌核发育^[6-7]。

利用同质雌核发育可以培育双单倍体。双单倍体已广泛应用于作物的遗传图谱构建及基因定位中,但在水产生物基因组研究中的应用尚处于起步阶段。研究基因在 GDH 中的分离情况,可以为 GDH 应用于基因组研究奠定基础。本研究中,在 GF1 中 8 个检测位点的分离全部符合孟德尔规律;在 GF2 中检测的 4 个位点,2 个符合孟德尔分离规律(LYC0002 和 LYC0012),2 个偏离 1:1(LYC0026 和 LYC0053)。基因分离出现偏离孟德尔分离规律的原因可能是因检查的样品数太少、即取样误差导致,也可能是因该位点与致死或亚致死基因连锁遗传。本研究取得大黄鱼同质雌核发育诱导成功,为利用 GDH 构建大黄鱼的遗传图谱和分析与发现致死或亚致死基因奠定了必要的基础。

本研究 GF2 中有 1 个个体在 4 个微卫星座位上扩增出的条带迁移率与父母本双方的等位基因都不一样(SI,图 3),这很可能是由于该家系在培育过程中或取样时、或在实验室操作中混入了家系外个体所致。研究中还发现,LYC0002 和 LYC0014 标记在 GF1 中的分离模式完全一致。利用 DNAMAN 对其 DNA 序列进行比对分析,它们的序列相似性非常高。王伟^[25]在分析牙鲆同质雌核发育子代中也曾观察到同类情况。很可能这两对标记引物扩增的区域其实是处于同一个位

点,但也有可能是来源于基因重复产生的两个紧密连锁的位点。

本研究首次报道了大黄鱼同质雌核发育的诱导及其遗传鉴定,获得了最高达 100% 到双单倍体的诱导率,并研究了 10 个微卫星标记在同质雌核发育双单倍体中的传递和分离。研究结果为大黄鱼纯系培育和利用 GDH 与纯系进行基因组作图分析等研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 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[J]. 遗传, 2006, 28(7): 831-837.
- [2] 许建和,尤 锋,吴雄飞,等. 大黄鱼雌核发育二倍体的人工诱导[J]. 海洋科学, 2006, 30(12): 37-42.
- [3] 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.
- [4] Xu J H, You F, Yan B L, et al. Effects of ultraviolet irradiation on sperm motility and diploid gynogenesis induction in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) undergoing cold shock[J]. Aquac Int, 2007, 15: 371-382.
- [5] Li Y 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]. Mar Biotech, 2008, 10: 83-90.
- [6] 吴清江,叶玉珍,陈德荣,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.
- [7] Streinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. Nature, 1981, 291: 293-296.
- [8] Komen H, Thorgaard G H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review [J]. Aquaculture, 2007, 269: 150-173.
- [9] Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hiramé, *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 1999, 173: 235-246.
- [10] 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[J]. 动物学研究, 2006, 27(1): 63-67.
- [11] Kato K, Hayashi R, Yuasa D, et al. Production of cloned red sea bream, *Pagrus major*, by

- chromosome manipulation[J]. *Aquaculture*, 2002, 207: 19-27.
- [12] Francescon A, Libertini A, Bertotto D, *et al.* Shock timing in mitogynogenesis and tetraploidization of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*[J]. *Aquaculture*, 2004, 236: 201-209.
- [13] 李益云. 大黄鱼雌核发育的诱导及遗传分析[D]. 厦门: 集美大学硕士论文, 2007.
- [14] Wang Z Y, Jayasankar P, Khoo S K, *et al.* AFLP fingerprinting reveals genetic variability in common carp stocks from Indonesia[J]. *Asian Fish Sci*, 2000, 13: 139-147.
- [15] 吴仲庆. 水产生物遗传育种学[M]. 第三版. 厦门: 厦门大学出版社, 2000.
- [16] 瀧川由宇登, 森 勇人, 関 伸吾, 等. マダイにおける第一卵割阻止型雌性発生二倍体の誘導条件の検討[J]. *水産増殖*, 1994, 42: 477-483.
- [17] 赵振山, 吴清江. 人工诱导大鳞副泥鳅雄核发育二倍体克隆鱼的产生[J]. *遗传学报*, 1998, 25(5): 416-421.
- [18] 程汉良, 潘黔生, 马国文, 等. 热休克诱导鲫鱼纯合雌核发育二倍体的研究[J]. *水利渔业*, 2005, 25(3): 25-27.
- [19] Kobayashi T, Ide A, Hiasa T, *et al.* Production of cloned amago salmon *Oncorhynchus rhodurus* [J]. *Fish Sci*, 1994, 60: 275-281.
- [20] Ezaz M T, Sayeed S, McAndrew B J, *et al.* Use of microsatellite loci and AFLP markers to verify gynogenesis and clonal lines in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. [J]. *Aquaculture*, 2004, 35: 1472-1481.
- [21] Bertotto D, Cepollaro F, Libertini A, *et al.* Production of clonal founders in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., by mitotic gynogenesis [J]. *Aquaculture*, 2005, 246: 115-124.
- [22] 王晓清, 王志勇, 柳小春, 等. 人工雌核发育大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)的 AFLP 分析[J]. *海洋与湖沼*, 2007, 38(1): 22-28.
- [23] 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.
- [24] Ihssen P E, Mckay L R, Mcmillan I, *et al.* Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications[J]. *Trans Am Fish Soc*, 1990, 119: 698-717.
- [25] 王 伟. 微卫星遗传标记在牙鲆群体遗传学和人工诱导雌核发育群体遗传变异分析中的应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2005.

Induction and microsatellite analysis of homozygous gynogenesis in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*

WU Qing-ming¹, CAI Ming-yi¹, LIU Xian-de¹, LIU Ying¹,
CHEN Qing-kai², YAO Cui-luan¹, WANG Zhi-yong¹

(1. *The Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety of Fujian University, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;*

2. *Fishery Technical Extension Station of Ningde City, Ningde 352100, China*)

Abstract: In this study, two mitotic gynogenesis families GF1 and GF2 were produced and verified with 10 microsatellite markers, 8 in GF1 and 4 in GF2 respectively. The inheritance and segregation of 10 microsatellite loci in putative gynogenetic doubled haploids (GDH) were investigated. All of fries in control families were abnormal, while normal fries reappeared in GF1 and GF2 after hydrostatic pressure shock, with normality rate of 40.0% and 17.1% respectively. In GF1, twenty genotypes have been observed in 30 assayed progenies. All samples of GF1 were demonstrated as GDH for exclusive maternal inheritance and homozygous at each locus. In 30 tested offspring in GF2, 27 fries were demonstrated as GDH, 2 fries contained male parent specific band, and 1 fry remained undefined. These results suggested that the homozygous gynogenesis could be induced with the method reported in this paper. In addition, the segregations of microsatellite markers in GDHs were consistent with the expected ratio according to Mendel's law at all the loci except LYC0026 and LYC0053. We also found that the segregation mode of GDH was completely identical between LYC0002 and LYC0014. In the present study, the artificial induction of homozygous gynogenesis and the inheritance and segregation of microsatellite markers in GDH in large yellow croaker was first reported, which will server as a foundation for rapid establishment of homozygous lines and making a genome map with GDH and homozygous lines in large yellow croaker.

Key words: *Pseudosciaena crocea*; homozygous gynogenesis; microsatellite