

## 牙鲆减数分裂与有丝分裂雌核发育的遗传差异

刘海金<sup>1\*</sup>, 刘永新<sup>1</sup>, 王玉芬<sup>2</sup>, 侯吉伦<sup>3</sup>, 王桂兴<sup>2</sup>, 孙朝徽<sup>2</sup>, 张晓彦<sup>2</sup>

(1. 中国水产科学研究院, 北京 100141;

2. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站, 河北 秦皇岛 066100;

3. 东北农业大学动物科学技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 利用同一尾牙鲆亲鱼的同一批卵子诱导减数分裂雌核发育二倍体和有丝分裂雌核发育二倍体, 同时用牙鲆精子做人工授精制备普通二倍体, 作为对照组。利用 10 对微卫星引物对普通二倍体和两种雌核发育二倍体进行遗传分析。结果表明, 母本基因型在 8 个位点为杂合, 2 个位点为纯合。普通二倍体有 6 种基因型, 等位基因均来自父母本的随机结合, 类型丰富; 母本与子代、子代个体之间的遗传相似系数分别为 0.452 8 和 0.560 3, 接近随机交配群体的遗传相似性。减数分裂雌核发育二倍体有 3 种基因型, 除在 1 个位点出现异于母本的纯合基因型外, 其他所有位点的基因型与母本完全一致; 母本与子代、子代个体之间遗传相似系数分别为 0.976 6 和 0.959 5, 接近近交系的遗传相似性。有丝分裂雌核发育二倍体有 2 种基因型, 且全部为纯合型; 母本与子代、子代个体之间遗传相似系数分别为 0.806 2 和 0.742 5, 有丝分裂雌核发育二倍体全部为纯合个体。减数分裂雌核发育二倍体具有高度的遗传相似性, 适于固定母本性状; 有丝分裂雌核发育二倍体纯合度高, 适于作为制备克隆的亲本; 两者具有明显不同的遗传特性, 均可作为特征不同的育种材料。

**关键词:** 牙鲆; 减数分裂雌核发育; 有丝分裂雌核发育; 微卫星

**中图分类号:** S 917

**文献标识码:** A

人工诱导鱼类雌核发育有两种方式, 即减数分裂雌核发育和有丝分裂雌核发育。虽然同为雌核发育, 二者具有本质的不同。减数分裂雌核发育是经抑制第二极体排出而形成, 其染色体组由雌性原核和第二极体构成, 为杂合子; 有丝分裂雌核发育是经抑制第一次卵裂而形成, 其染色体组中一条是以另一条为模板复制而成, 遗传组成在理论上为纯合, 亦称双单倍体 (doubled diploid)<sup>[1]</sup>。两种雌核发育诱导方式不同, 遗传特性不同, 因而在遗传育种中的作用也有所不同。

利用染色体操作技术进行鱼类雌核发育诱导, 在国内外已有 20 余种获得成功, 其中多数为淡水鱼类<sup>[1]</sup>。在海产鱼类中, 仅完成减数分裂雌核发育诱导的品种有梭鱼 (*Mugil soiyu* Basilewsky)、河鲀

(*Tetraodon fluviatilis* Hamilton)、黄盖鲷 (*Limanda yokohamae*) 和条斑星鲷 (*Verasper moseri*) 等<sup>[2-5]</sup>。成功诱导有丝分裂的种类有牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、真鲷 (*Pagrosomus major*) 和欧鲆 (*Dicentrarchus labrax*) 等<sup>[6-8]</sup>。牙鲆和真鲷在有丝分裂雌核发育的基础上, 再次诱导减数分裂雌核发育, 实现了雌核发育克隆<sup>[7,9]</sup>。上述研究多报道雌核发育的诱导方法, 如紫外线照射剂量, 冷休克温度和持续时间对孵化率的影响, 以及雌核发育成立的证明方法等。

关于牙鲆雌核发育的研究, 田畑和男等<sup>[10]</sup>利用冷休克和静水压处理, 建立了诱导牙鲆减数分裂和有丝分裂的方法, 并用同工酶证明了纯合子的成立; Yamamoto<sup>[6]</sup>在诱导牙鲆有丝分裂的基础

收稿日期: 2010-02-04 修回日期: 2010-03-29

资助项目: 国家科技支撑计划 (2006BAD01A12017); 国家鲆鲷类产业技术体系建设项目 (nycytx-50-G02); 公益类农业行业科研专项 (nyhycx07-046-鲆鲷)

通讯作者: 刘海金, Tel: 010-68671004, E-mail: liuhaijin2005@126.com

上,再次诱导减数分裂雌核发育,建立了牙鲆克隆,并用 DNA 指纹图谱技术证明其克隆的成立;徐成等<sup>[11]</sup>对减数分裂雌核发育牙鲆两个基因座位与着丝粒之间的重组率进行了探讨,提出减数分裂雌核发育牙鲆存在杂合基因型,不能用于培育克隆;朱晓琛等<sup>[12]</sup>用微卫星标记评价了牙鲆雌核发育二倍体的纯合性;季旭等<sup>[13]</sup>用亲子鉴定的方法对数尾纯合子进行了家系鉴别;尤锋等<sup>[14]</sup>探讨了冷休克法和静水压法诱导牙鲆有丝分裂雌核发育的条件;刘海金等<sup>[15-16]</sup>对减数分裂雌核发育二倍体的胚胎发育进行观察,对减数分裂雌核发育诱导条件进行了优化。但是,关于牙鲆减数分裂雌核发育与有丝分裂雌核发育的遗传差异研究,迄今未见报道。

本文利用微卫星标记分析了牙鲆普通二倍体(normal diploid, ND)、减数分裂雌核发育二倍体(meiotic gynogenetic diploid, MGD)和有丝分裂雌核发育二倍体(mitotic gynogenetic doubled haploid, MGDH)的遗传特性,比较了雌核发育二倍体与普通二倍体的遗传差异,以及两种雌核发育方式之间的遗传差异,以期利用牙鲆雌核发育进行良种选育提供基础数据和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验以中国水产科学研究院北戴河中心实验站牙鲆家系选育基础群亲鱼为材料。利用同一尾雌亲鱼的同一批卵子,通过人工授精制备 ND,利用染色体操作技术诱导 MGD 和 MGDH。

**ND 的制备** 雌性牙鲆亲鱼,5 龄,体重 4 250 g;雄性牙鲆亲鱼,5 龄,2 240 g。分别采用人工挤压腹部的方法获取精液和卵子。将稀释精液与卵子充分混合,室温静置 2 min 后,加入 16 °C 海水激活,搅拌均匀,5 min 后放入网箱中孵化。用普通苗种培育方法培育。

**MGD 的诱导** 雌性亲鱼为制备 ND 的同一批卵子;以真鲷精子作为异源精子,经紫外线灭活。MGD 的诱导方法依刘海金等<sup>[16]</sup>。用普通苗种培育方法培育。

**MGDH 的诱导** 卵子与精子的来源与 MGD 相同。参照山本荣一<sup>[6]</sup>的方法,将灭活的真鲷精液与卵粒充分混合,静置 3 min 后加入 17 °C 海水激活,60 min 后转移至静水压力机

(5406R,大岳,日本制)中,施压 650 MPa,持续 6 min,之后将卵移至 17 °C 海水中孵化。

### 1.2 基因组 DNA 提取

DNA 提取材料为亲本和 ND、MGD、MGDH 的 60 日龄鱼苗各 30 尾的腹面胸鳍,剪取后直接置于 -80 °C 冰箱中保存。提取 DNA 时,将裂解液(50 mmol/L NaCl,30 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),200 mmol/L EDTA(pH 8.0),1% SDS,200 μg/mL Proteinase K)加入剪碎的腹鳍中,50 °C 消化至澄清,等体积的饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提一遍,2.5 倍体积预冷的异丙醇沉淀,0.1 mL 70% 乙醇清洗沉淀,TE 溶解,-20 °C 保存待用。

### 1.3 微卫星引物

10 对微卫星引物来源于牙鲆遗传连锁图谱<sup>[17]</sup>,并根据其提供的牙鲆微卫星引物序列,由上海生工生物工程技术有限公司合成,合成规格为 2.5OD。引物名称、序列及退火温度见表 1。

### 1.4 PCR 反应及电泳

PCR 反应体系(25 μL)包括 10 × Buffer 2.5 μL、Mg<sup>2+</sup>(25 mmol/L)1 μL、dNTPs(各 2 mmol/L)1 μL、上下游引物(10 mmol/L)各 0.6 μL、模版 1 μL(30 ~ 50 ng)、Taq DNA 聚合酶 1 U,加适量 ddH<sub>2</sub>O。

PCR 反应程序:94 °C 预变性 3 min;28 个循环,各循环包括 94 °C 变性 30 s,退火 30 s,72 °C 延伸 30 s;最后 72 °C 延伸 10 min,PCR 扩增在 PE9700 型 PCR 仪上进行。

PCR 产物使用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。电泳结束后,加入 1% AgNO<sub>3</sub>,染色 10 min 后,将硝酸银倒掉,用水冲洗 15 s。加入显色液(1% 甲醛,2% 氢氧化钠,0.04% 无水碳酸钠)显色 10 min。凝胶在 Hp G4010 扫描仪成像,Gel-Pro Analyzer 4.5 软件分析电泳谱带。电泳条带为 1 条,所检测个体在该位点视为纯合;若为 2 条,所检测个体在该位点为杂合<sup>[18]</sup>。

### 1.5 统计指标

统计亲本与子代在不同位点的基因型,亲本与子代、子代个体之间的遗传相似系数(genetic similarity index, GSI)。

$$\text{遗传相似系数: } GSI = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

式中, $N_x$ 、 $N_y$  分别为两个体  $x$ 、 $y$  扩增出的总条带数, $N_{xy}$  为两个体  $x$ 、 $y$  共有的条带数。

表 1 微卫星引物序列,连锁群及特异退火温度  
Tab. 1 Sequence, linkage group and specific annealing temperature of microsatellite primers

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	退火温度(°C) annealing temperature	连锁群 link group	GenBank accession no.
poli2TUF	F:ACAATAGGATGCAGCTGCCT R:AAGCGCAAATTGTTATCCG	57	22	AB037978
poli9TUF	F:GATCTGCAGAAACACACTCA R:GCGAGTTCTTCCTCAAATGC	62	5	AB037980
poli13TUF	F:CACCTCCAGGTTCTACAGTCG R:TCCTGCACAGAGGATGAAAA	60	3	AB037982
poli28TUF	F:ATCTCCCAACTGTCAATCATCA R:GTCGAGTCCAGTATCACTGCC	57	21	AB037986
poli30TUF	F:GAGACAACCCCAAGAAAT R:ATCAGGGTATTGTTTTGCC	57	2	AB037988
poli101TUF	F:CTCCAGTCAT GCTCCAATGA TGAC R:AGGATGTTGT AATGAACATT GTGATGA	60	10	AB086493
Polil16TUF	F:CAAATCTGGCAAATTTAGGAATAGTGG R:GATACCTGGTGATACAGGTGAACACG	57	8	AB037991
Polil30TUF	F:GCGGTGAGGACTTTATTTCTGGACT R:GTGGTACTGCAGAAAAGCGACTGTT	60	1	AB037996
Polil31TUF	F:TCTCTCTGCA CGACGCTTAT CCTAC R:AGTGTGTCAC CTGTTTGGTC CAAAT	57	12	AB086523
Poli9-8TUF	F:GAGAGACAGAAGGTCGTCAACGGTA R:ACAAAGACCACGATGCAAAGTGAC	64	15	AB037989

## 2 结果与分析

### 2.1 基因型分析

采用 10 对微卫星引物对亲本进行多态性位点筛选,结果显示各位点均表现为多态,并分布在 10 个连锁群上(表 1)。利用上述 10 对微卫星引物对 ND, MGD, MGDH 的基因组进行 PCR 扩增,所检测到的基因型见表 2。在 poli116 和 poli28 位点,ND 的父、母本基因型均为纯合,其雌核发育二倍体亦为纯合型,与母本完全相同,两者没有

差别;而在其他位点,亲本所检测出的基因型均为杂合状态(除父本 poli101 位点外)。ND 中最多出现 6 种基因型,全部来自父、母本,系父本和母本等位基因的随机组合,组合类型丰富。MGD 出现 3 种基因型,除在 poli30 和 poli130 位点部分个体出现等位基因的纯合型,与母本不同外,其余 8 个位点所有个体的基因型与母本完全相同,类型简单。MGDH 仅出现 2 种基因型,母本在 10 个位点的等位基因完全纯合,无杂合基因型;基因型较 MGD 更简单。

表 2 10 个微卫星位点的基因型  
Tab. 2 Genotype at 10 microsatellite loci

位点 locus	poli9-8tuf	poli9	poli13	poli30	poli116	poli101	poli130	poli2	poli28	poli131
父本 paternal	141/156 *	143/194 *	127/191 *	125/140 *	183/183	144/144	127/141 *	128/137 *	150/150	103/139 *
母本 maternal	136/147 *	164/176 *	158/175 *	119/125 *	199/199	139/152 *	141/163 *	117/121 *	133/133	112/131 *
ND	141/147 *	143/164 *	158/191 *	119/140 *	183/199 *	139/152 *	127/141 *	137/137 *	133/150	103/112 *
	136/156 *	143/176 *	127/191 *	125/140 *	183/183	144/152 *	141/163 *	121/137 *	150/150	131/139 *
	147/147	164/194 *	127/158 *	119/125 *		139/139	127/163 *	121/128 *	133/133	112/139 *
	156/156	176/194 *	127/175 *	119/119		144/144	141/141	121/121		103/131 *
	136/136		158/158	125/125		152/152				
	141/141		127/127							
母本 maternal	136/147 *	164/176 *	158/175 *	119/125 *	199/199	139/152 *	141/163 *	117/121 *	133/133	112/131 *
MGD	136/147 *	164/176 *	158/175 *	119/119	199/199	139/152 *	141/163 *	117/121 *	133/133	112/131 *
							141/141			
							163/163			
母本 maternal	136/147 *	164/176 *	158/175 *	119/125 *	199/199	139/152 *	141/163 *	117/121 *	133/133	112/131 *
MGDH	136/136	164/164	158/158	119/119	199/199	139/139	141/141	117/117	133/133	112/112
	147/147	176/176	175/175			152/152	163/163	121/121		

注: \* 为杂合基因型,未标记部分为纯合基因型。

Notes: \* heterozygous, unlabeled genotype was homozygous.

## 2.2 纯合度与遗传相似系数

ND, MGD, MGDH 中纯合个体所占比例明显不同(表 3)。ND 仅有个别位点纯合的个体,不存在 10 个微卫星位点全部纯合的个体,母本与子代、子代个体之间的遗传相似系数分别为 0.452 8 和 0.560 3。MGD 在 poli30、poli116、poli28 位点为纯合,其中在 poli116、poli28 位点父母本为纯合状态,其余位点仅个别个体为纯合;母本与子代、子代个体之间的遗传相似系数为 0.976 6 和

0.959 5。MGDH 所有个体在 10 个微卫星位点的等位基因均为纯合,母本与子代、子代个体之间的遗传相似系数为 0.806 2 和 0.742 5(表 4)。结果表明,ND 的遗传相似系数接近随机交配群体;MGD 遗传相似系数高,接近近交系水平,但纯合度较低;MGDH 全部为纯合个体;遗传相似度较 MGD 低。两种雌核发育二倍体均比普通二倍体的遗传相似系数和纯合度高。

表 3 10 个微卫星位点纯合个体数及所占比例  
Tab.3 Number and proportion of homozygous individual at 10 microsatellite loci

基因座 gene locus	普通二倍体 ND		减数分裂二倍体 MGD		有丝分裂二倍体 MGDH	
	个体数	比例(%)	个体数	比例(%)	个体数	比例(%)
	no. of individuals	proportion	no. of individuals	proportion	no. of individuals	proportion
poli9-8	14/30	46.67	2/30	6.67	30/30	100.00
poli9	0/30	0.00	0/30	0.00	30/30	100.00
poli13	05/30	16.67	2/30	6.67	30/30	100.00
poli30	20/30	66.67	30/30	100.00	30/30	100.00
poli116	14/30	46.67	30/30	100.00	30/30	100.00
poli101	16/30	53.33	3/30	10.00	30/30	100.00
poli130	5/30	16.67	8/30	26.67	30/30	100.00
poli2	14/30	46.67	1/30	3.33	30/30	100.00
poli28	15/30	50.00	30/30	100.00	30/30	100.00
Poli131	0/30	0.00	1/30	3.33	30/30	100.00

表 4 母本与子代、子代个体之间的遗传相似系数  
Tab.4 Genetic similarity index between dam and offspring and among offspring

遗传相似系数 GSI	普通二倍体 ND	减数分裂二倍体 MGD	有丝分裂二倍体 MGDH
母本与子代 dam and offspring	0.452 8	0.976 6	0.806 2
子代个体 among offspring	0.560 3	0.959 5	0.742 5

## 3 讨论

为了避免不同亲本对诱导雌核发育所产生遗传差异的影响,本研究将同一尾亲鱼的同一批卵子分成 3 部分,同时制备了两种雌核发育和一种正常受精的子代,以便于进行相同遗传背景下的比较。结果表明,ND 基因型来自父母双方,无 10 个微卫星位点全部纯合个体,遗传相似系数接近 0.5,与随机交配的概率基本一致<sup>[19]</sup>。MGD 和 MGDH 的纯合度和遗传相似系数显著高于 ND,二者具有显著不同的遗传特征。

MGD 基因型与母本基本相同,在 poli116、

poli28 位点,母本为纯合,其雌核发育子代也为纯合;其他位点,母本为杂合,其雌核发育子代也全部为杂合;亲本与子代、子代个体之间的遗传相似系数接近近交系水平。近交系是经过至少连续 20 代的全同胞兄妹交配培育而成,品系内所有个体都可追溯到起源于第 20 代或以后代数的一对共同祖先<sup>[20]</sup>。理论上,近交系的遗传相似系数为 0.986。西双版纳小型猪第 14 代 JS 亚系的 3 个家系内相似系数为 0.908 0 ~ 0.979 0<sup>[21]</sup>,剑尾鱼 RW-H 系 15 代个体在 20 个微卫星位点的平均遗传相似系数为 0.951 8<sup>[22]</sup>。与哺乳类和水生实验动物相比较,MGD 亲子间的遗传相似系数为 0.976 6,表明只经过一代减数分裂雌核发育即可具备很高的遗传相似度。利用鱼类雌核发育的这一特点,筛选经济性状优良的母本,通过雌核发育技术固定母本性状,可以加快新品种或新品系的培育进程,缩短选育周期。

此外,从育种学角度,连续多代诱导减数分裂雌核发育,将提高遗传相似系数,虽然是杂合子,但是亲本的遗传特征已被固定,其子代个体数量

性状表现一致,个体之间差异较小,可以作为良种选育的一种有效方法。其原理为,减数分裂雌核发育二倍体在远离着丝粒的位点,等位基因之间易发生重组交换,多表现为杂合;而距离着丝粒较近的位点,等位基因之间不易发生重组多表现为纯合。因此,重复多次减数分裂雌核发育后,距离着丝粒近的位点,等位基因为纯合型,而距离着丝粒远的位点,等位基因为杂合型,所有个体在不同位点形成的等位基因纯合型和杂合型都将被固定下来<sup>[23]</sup>。现已有报道,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)连续2代诱导雌核发育后,子代具有与母本高相似性的特殊体型<sup>[24]</sup>。真鲷经连续3代雌核发育后,子代采用微卫星技术进行检测,基因型虽然没有纯合,但是相似度却有较大提高<sup>[25]</sup>。

在ND仅有个别位点纯合,无完全纯合个体出现;而MGDH在10个位点实现了等位基因的完全纯合,无杂合个体出现,表明该种雌核发育方式只需经过一代即可实现鱼类基因位点的纯合。在养殖品种的基因池中,为消除有害的隐性等位基因,实现纯合是最有效的途径。在传统育种上使用近交方式逐渐实现纯合,一般需要连续几代的全同胞交配<sup>[2]</sup>。本研究结果表明在鱼类育种中,诱导有丝分裂雌核发育将是最便捷和有效的方法,即一代可实现不同位点等位基因的全部纯合。

抑制第一次卵裂的MGDH是阻止了体细胞分裂而使染色体组加倍,即使发生重组,其所有的基因位点也都为纯合。因此,有丝分裂雌核发育个体都具有一套独立的染色体组,个体之间差异较大<sup>[23]</sup>。MGDH的遗传相似系数比MGD低就是这个原因。减数分裂雌核发育的二倍化是基于对核配对前卵母细胞的操作(抑制第二极体的排出),而有丝分裂雌核发育是对核配对后合子的操作,将单倍体加倍形成双倍体,实现了纯合但并不是克隆,因为在母本配子形成过程中发生染色体的分离与重组,导致纯合个体具有不完全相同的等位基因。纯合的个体再经过一次雌核发育才能形成独立的纯合克隆系<sup>[9]</sup>。完全纯合个体即使发生重组,因是相同的等位基因交换,所以诱导其减数分裂也对克隆的制备没有影响。通过此种方法已经制备了斑马鱼(*Brachydanio rerio*)<sup>[26]</sup>、青鳉(*Oryzias latipes*)<sup>[27]</sup>、鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[28]</sup>、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)<sup>[29]</sup>等数种鱼类的

克隆。

MGDH虽然可以一代实现纯合,为诱导克隆奠定良好基础,但是其诱导、培育和成熟等过程成活率相当低,建立克隆十分困难。为此,曾有学者提议,用连续多次诱导减数分裂的方法,提高遗传相似性,也可以实现固定母本优良性状,达到良种选育的目的<sup>[23]</sup>。鉴于MGD和MGDH各有鲜明的遗传特征,只要诱导成功,都可以在固定母本性状的制备克隆上发挥重要作用,两者均可以成为品种选育的优质素材或优良品系。

#### 参考文献:

- [1] Komen H, Thorgaard G H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review [J]. *Aquaculture*, 2007, 269(1-4): 150-173.
- [2] Suwa M, Arai K, Suzuki R. Suppression of the first cleavage and cytogenetic studies on the gynogenetic loach [J]. *Fish Sci*, 1994, 60(1): 673-681.
- [3] 柿本芳久, 相田 聡, 荒井克俊, 等. *Takifugu rubripes* における低温、高温処理による雌性発生二倍体の誘起 [J]. *広島大生物生産学部紀要*, 1994, 33(1): 103-111.
- [4] 柿本芳久, 相田 聡, 荒井克俊, 等. *Limanda yokohamae* における温度および圧力処理による雌性発生二倍体の作出とメチルテストステロン浸漬処理による性転換 [J]. *広島大生物生産学部紀要*, 1994, 33(1): 113-124.
- [5] Tatsunari M, Saito S, Kishioka C, et al. Induction of triploids and gynogenetic diploids in barfin flounder *Verasper moseri* [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2004, 70(2): 145-151.
- [6] 山本栄一. ヒテメの人為的性統御とクローン集団作出に関する研究 [J]. *鳥取県産試験場報告*, 1995, 34(1): 1-45.
- [7] Kato K, Hayashi R, Yuasa D, et al. Production of cloned red sea bream, *Pagrus major*, by chromosome manipulation [J]. *Aquaculture*, 2002, 207(1-2): 19-27.
- [8] Bertotto D, Cepollarob F, Libertinia A, et al. Production of clonal founders in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., by mitotic gynogenesis [J]. *Aquaculture*, 2005, 246(1-4): 115-124.
- [9] Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel) [J]. *Aquaculture*, 1999, 173(1-4): 235-246.

- [10] 田畑和男,五利江重昭,中村一彦. 紫外線によるヒラメの雌性発生2倍体の誘起条件[J]. 日本水産学会誌,1986,52(11):1901-1904.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 季旭,孙效文,杨立更,等. 微卫星标记对牙鲆有丝分裂雌核发育家系的亲子鉴定[J]. 动物学研究,2008,29(1):25-30.
- [14] 尤锋,许建和,倪静,等. 牙鲆同质雌核发育人工诱导研究[J]. 高技术通讯,2008,18(8):874-880.
- [15] 刘海金,王常安,朱晓琛,等. 牙鲆单倍体、三倍体、雌核发育二倍体和普通二倍体胚胎发育的比较[J]. 大连水产学院学报,2008,23(3):161-167.
- [16] 刘海金,侯吉伦,王玉芬,等. 真鲷精子诱导牙鲆减数分裂雌核发育[J]. 水产学报,2010,34(4):508-514.
- [17] Coimbra M R, Kobayashi K, Koretsugu S, *et al.* A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 2003, 220(1-4):203-218.
- [18] Crooijmans R P M A, Van der Poel J J, Groenen M A M, *et al.* Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Anim Genet, 1997, 28(2):129-134.
- [19] 盛志廉,陈瑶生. 数量遗传学[M]. 北京:科学出版社,2001:113-132.
- [20] 陈主初,吴端生. 实验动物学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2001:248-252.
- [21] 吴开平,魏泓,曾养志. 西双版纳小型猪近交 JS 亚系 RAPD 分析[J]. 中国实验动物学杂志,2000,10(3):129-133.
- [22] 刘宇飞,白俊杰,李凯彬,等. 剑尾鱼 RW2H 近交系 20 个微卫星位点的遗传结构[J]. 中国水产科学,2007,14(4):602-607.
- [23] 荒井克俊. 染色体操作[M] // 魚類のDNA. 東京:恒星社厚生閣,1997:32-62.
- [24] 小林 徹. ニジマス、アマゴにおける雌性発生法の育種への応用とクローン作出[J]. 水産育種,1991,17:1-4.
- [25] 幹田和彦,高木,山口 卓,等. 極体放出型雌性発生3代目における異祖性マイクロサテライト領域の確認[M]. 東京:平成8年度日本水産学会春季大会講演要旨集,1996:85.
- [26] Hörstgen-Schwark G. Production of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. Aquaculture,1993,112(1):25-37.
- [27] Naruse K, Ijiri K, Shima A, *et al.* The production of cloned fish in the medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Experimental Zoology,1985,236:335-341.
- [28] Komen J, Bongers A B J, Richter C J J, *et al.* Gynogenesis in common carp *Cyprinus carpio* L. II: the production of homozygous gynogenetic clones and F<sub>1</sub> hybrids [J]. Aquaculture, 1991, 92(5):127-142.
- [29] Myers J M, Penman D J, Basavaraju Y, *et al.* Induction of diploid androgenetic and mitotic gynogenetic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics,1995,90(2):205-210.

## Genetic difference between meiotic gynogenesis and mitotic gynogenesis in the Japanese flounder

LIU Hai-jin<sup>1\*</sup>, LIU Yong-xin<sup>1</sup>, WANG Yu-fen<sup>2</sup>, HOU Ji-lun<sup>3</sup>,  
WANG Gui-xing<sup>2</sup>, SUN Zhao-hui<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-yan<sup>2</sup>

(1. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China;

2. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China;

3. Animal Science and Technology College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** In this study reproduction by meiotic gynogenetic diploids and mitotic gynogenetic doubled haploids were carried out in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, by the same fertilized eggs from one female. The process of meiotic diploids and mitotic diploids produced involves two steps. First, the DNA of the sperm is fragmented by UV irradiation. Next, the meiotic diploids are made by prevention of the extrusion of the secondary polocyte and the haploid embryo is made diploid by inhibition of the first cell division. This is typically done by a cold and pressure shock administered around the time of the prophase of the second meiotic and first mitotic division, respectively. All the while normal diploids with Japanese flounder sperm were also produced as controls. Normal diploids and two gynogenetic diploids were analyzed by unilocus 10 microsatellites loci. The result showed the parental genotypes were found to be heterozygous at 7 loci and heterozygous at 3 loci. 6 genotypes were found in normal diploid, alleles were random combination from the parents and the types enriched. Genetic similarity indexes were 0.976 6 and 0.959 5 between female and progenies and among progeny individuals, respectively, which approached that of the inbred line. Two genotypes were found to be completely homozygous in mitotic gynogenetic double haploid. Genetic similarity indexes were 0.806 2 and 0.742 5 between female and progenies and among progeny individuals. Furthermore, mitotic gynogenetic doubled haploids were fully homozygous. Meiotic gynogenetic diploids with a high degree of genetic similarity were suitable for fixing traits of female. Mitotic gynogenetic doubled haploids with high homogeneity were suitable as clonal founders. Differently from meiotic gynogenesis diploidization is based on a prekaryogamic oocyte manipulation, in mitotic gynogenesis it is actually a postkaryogamic zygotic manipulation. The resulting mitotic gynogenetic double haploids are all homozygous but not clonal because they do not necessarily share the same alleles owing to variable chromosome segregation and genetic recombination during maternal gametogenesis. Each of them, however, can be a clonal founder capable of giving rise to an isoallelic clone, if reproduced gynogenetically. Although mitotic gynogenesis can achieve homozygote according one generation, but the survival rate of process in induction, incubation and maturation is relatively low, the establishment of clone is extremely difficult. Thus, scholars have proposed to improve the genetic similarity and fix the good traits of female with successive meiosis-induced methods. In view of distinct genetic characteristics in both diploids, as long as the successful induction, it can play an important role in fixing characters of female and clone production. Both kinds of gynogenesis can become high quality breeding materials or improved strains.

**Key words:** Japanese flounder; meiotic gynogenesis; mitotic gynogenesis; microsatellite

**Corresponding author:** LIU Hai-jin. E-mail: liuhaijin2005@126.com