

## 大黄鱼与黄姑鱼异源三倍体的诱导和微卫星分析

蔡明夷, 刘贤德, 武祥伟, 黄铭垚, 王志勇\*

(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)

**摘要:** 参照大黄鱼雌核发育诱导程序,应用冷休克抑制大黄鱼(♀)与黄姑鱼(♂)杂交受精卵的第二极体排出,培育了两个异源三倍体家系(PPN1和PPN2)。异源三倍体家系的受精率、孵化率略低于大黄鱼自繁二倍体对照家系(PP),而初孵仔鱼畸形率略高于PP家系。倍性分析显示,异源三倍体家系初孵仔鱼细胞DNA含量约为大黄鱼自繁对照家系的初孵仔鱼细胞DNA含量的1.46倍,且三倍体率达到100%。5个微卫星标记分析结果表明,父本杂合基因在异源三倍体中分离,后代分别得到父本两个等位基因中的一个,分离比符合孟德尔式遗传预期;由于基因的第二次分离被阻断,母本基因在异源三倍体中的传递表现出半四分子的特点,其中部分个体同时保留了母本两个等位基因,表现为杂合基因型。综合倍性分析和微卫星分析结果可以判断,异源三倍体家系成员为含有2个大黄鱼基因组和1个黄姑鱼基因组的异源三倍体。可见,大黄鱼减数分裂雌核发育或三倍体诱导程序中用于抑制第二极体排放的条件,同样适用于诱导异源三倍体。然而,PPN1和PPN2的仔鱼在15日龄后出现生长停滞,陆续死亡,没有个体存活超过1个月,表明母本染色体加倍不能有效提高杂种成活率,但异源三倍体仔鱼可作为遗传作图、基因组比较和基因表达调控研究的材料。

**关键词:** 大黄鱼;黄姑鱼;异源三倍体;倍性分析;微卫星

**中图分类号:** S 917

**文献标识码:** A

远缘杂交可以把不同种、属的特征和特性结合起来,突破种属界限,扩大遗传变异,从而创造新的变异类型或新物种,是鱼类育种中常用的手段之一<sup>[1]</sup>。然而,由于杂交不亲和,远缘杂交常常无法得到存活的后代<sup>[2]</sup>。大黄鱼(*Larimichthys crocea*)和黄姑鱼(*Nibea albiflora*)都属石首鱼科(*Sciaenidae*),分属黄鱼属(*Pseudosciaena*)和黄姑鱼属(*Nibea*),且都是我国重要的海洋经济鱼类<sup>[3-4]</sup>。刘颖等<sup>[5]</sup>证明大黄鱼♀与黄姑鱼♂杂交受精没有障碍,但是后代的成活率极低。吴清江等<sup>[6]</sup>和吴玉萍等<sup>[7]</sup>提出,诱导人工异源三倍体,增加一套母本基因剂量,使得基因产物的量与母本二倍体相当,可能“缓冲”了种间的遗传不亲和性,得到比二倍体杂种存活率高和生命力强的异源三倍体。我国学者在斑马鱼(*Danio rerio*)、鲫(*Carassius auratus*)等鱼类中开展了诱导异源三倍体的研究,认为诱导异源三倍体是一种重

要的育种技术,在研究天然雌核发育机制、转基因鱼和杂种优势中具有应用潜力,同时也可能在养殖上具有良好前景<sup>[8-9]</sup>。作者实验室在前期研究中已建立并优化了大黄鱼雌核发育诱导程序<sup>[10-11]</sup>。因此,本研究参考了大黄鱼减数分裂雌核发育诱导程序中,冷休克抑制大黄鱼第二极体排放的方法,尝试诱导大黄鱼与黄姑鱼异源三倍体,并利用倍性分析和微卫星标记来检测异源三倍体诱导率,同时初步观察异源三倍体的早期生物学表现和微卫星标记在异源三倍体家系中的传递与分离情况,探讨了大黄鱼与黄姑鱼异源三倍体的在生产实践和基础研究中应用的潜力与前景。

### 1 材料与方法

#### 1.1 亲鱼、催产和授精

从在官井洋海区网箱中养殖2周龄的候选亲

收稿日期:2010-06-16 修回日期:2010-08-07

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A405);集美大学创新团队基金(2006A001);中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室开放基金(LMB091007)

通讯作者:王志勇,Tel:0592-6183816,E-mail:zywang@jmu.edu.cn

本群体中挑选性腺发育良好、体形正常,体表无外伤的大黄鱼和黄姑鱼雌雄个体。注射 LRH-A3 进行催产,雌鱼催产剂量为 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,雄鱼减半。达到效应时间(36 h)后,人工挤取精卵进行干法授精。

试验设置 3 个组:大黄鱼自繁对照组(PP),大黄鱼♀与黄姑鱼♂杂交组(PN)和人工异源三倍体组(PPN)。试验共重复两次,在标识后面加上 1 和 2 加以区分。PPN 在杂交受精后,参照 Li 等<sup>[12]</sup>描述的诱导大黄鱼雌核发育程序经过冷休克处理,授精后 2 min 转移至 0~4  $^{\circ}\text{C}$  海水中休克 10 min,以抑制第二极体的排放。

上浮的卵子收集后在 7.5 L 水桶中分别充气孵育。观察记录总卵数、发育卵数、孵化仔鱼数和正常仔鱼数,并取亲本背鳍和形态正常的仔鱼固定于 95% 酒精中供提取 DNA 用。按下面公式计算发育率,孵化率及仔鱼畸形率:

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

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

$$\text{初孵仔鱼畸形率}(\%) = \text{畸形仔鱼} / \text{总仔鱼数} \times 100$$

## 1.2 倍性分析

PP1、PN1 和 PPN1 家系中分别取 40 尾初孵仔鱼进行测量。仔鱼在磨砂玻璃上挑去卵黄囊

后,磨碎,加入 DAPI 染色液(10 mmol/L Tris, pH 7.4; 5 mg/L DAPI; 146 mmol/L NaCl; 2 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ ; 2 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ; 0.1% Triton X-100; 0.005% 小牛血清),轻轻震荡,过网筛,全程共染色 3 min。用倍性分析仪(PA-I, Partec, German)检测。

## 1.3 基因组 DNA 提取

采用普通的苯酚/氯仿/异戊醇法<sup>[13]</sup>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,其余步骤同普通酚/氯仿/异戊醇法<sup>[13]</sup>。琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的质量,紫外分光光度计测定  $\text{OD}_{260}$  值确定 DNA 的浓度。

## 1.4 微卫星标记基因型分析

筛选了在雌性亲本或雄性亲本杂合的微卫星引物,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,按照李益云等<sup>[14]</sup>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(表 2)。用  $\chi^2$  测验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。微卫星一着丝粒图距根据重组基因型频率估算( $y = \text{重组基因型频率} / 2 \times 100$ )。

表 1 5 个微卫星位点、核心序列、引物序列及退火温度

Tab. 1 Microsatellite loci, motif, primer sequences and annealing temperature of 5 microsatellite markers of large yellow croaker used in this study

微卫星位点 loci	核心序列 motif	引物序列(5'-3') primer sequences(5'-3')	退火温度( $^{\circ}\text{C}$ ) annealing temperature
LYC0004	(TG) <sub>11</sub>	F:CTCTTAGCCGTCATTCATCC R:ATTTAGCCAAGTTCACCTTCC	55
LYC0041	(AC) <sub>8</sub> ACC(AC) <sub>1</sub>	F:AAGCCGTCCAGGATGTA R:ACGTGACCGTGAAACCA	55
LYC0407	(CT) <sub>7</sub> ...(TC) <sub>8</sub>	F:GAGAAGGAGGAGTGAAAGA R:ATGTTGGTGACGGATAGA	55
LYC0066	(AG) <sub>10</sub> (GT) <sub>10</sub> T(TG) <sub>5</sub>	F:TTACATGGGCAGCCTGAG R:ATGACGCAGCAGAATGG	55
HLJDH107	(CA) <sub>12</sub>	R:TCTCCATGTGCAGTTACCA F:ATTCTTCTGCCCTCCAAAT R:ACTCCCCTGATGCGTCTCTA	55

## 2 结果

### 2.1 受精率、孵化率、初孵仔鱼正常率和成活率

大黄鱼与黄姑鱼杂交 F<sub>1</sub> 家系(PN1 和 PN2)、异源三倍体家系(PPN1 和 PPN2)和对照组(PP1

和 PP2)的受精率、孵化率、初孵仔鱼的畸形率和 1 月龄时的成活率如表 2 所示。异源二倍体家系的受精率、孵化率和初孵仔鱼的正常率与母本自繁家系相当。异源三倍体家系的受精率、孵化率和初孵仔鱼正常率略低于大黄鱼二倍体对照家

系。异源二倍体的成活率很低,低温休克诱导后,成活率没有提高。其中,PN1 在孵化时约有 1 万尾,孵出后 1~2 周内大量死亡,孵化后 1 个月 PN1 尚存活 17 尾;PN2 杂交仔鱼在孵出后 1~2 周内逐渐死亡,没有个体存活下来;反交家系 NP 在开口后 1 周内逐渐死亡,没有存活的个体。PPN1 和 PPN2 的仔鱼在 15 日龄后陆续死亡,分别于 23 日龄和 25 日龄全部死亡。

表 2 杂交家系和对照组的受精率、孵化率、畸形率和成活率  
Tab. 2 Fertilization rate, hatching rate, normal rate and survival rate of hybrids and control group

家系 family	受精率(%) fertilization rate	孵化率(%) hatching rate	畸形率(%) abnormal rate	成活率(%) survival rate
PN1	33.33	95.00	2.50	0.17
PPN1	30.13	85.34	3.33	0
PP1	37.84	96.06	0	88.00
PN2	44.12	67.80	0	0.00
PPN2	43.67	50.12	1.66	0.00
PP2	40.00	53.49	0	81.33

## 2.2 倍性分析

图 1 为 PP1、PN1 和 PPN1 倍性分析结果输出图。倍性分析结果图上纵坐标是细胞计数结果,横坐标是每个细胞相对的 DAPI 荧光强度,与 DNA 含量成正比。根据图中各峰所对应的横坐标中值可以知道细胞的相对 DNA 含量。其中,来自 PP 的样品(图 1-A)检测峰所对应的中值(mean)为 26.46,来自 PN 的样品为 27.46,PPN 的样品为 35.60,PN 与 PP 家系初孵仔鱼的 DNA 含量相当,而 PPN 组的 DNA 含量约为 PP 组的 1.5 倍。表 3 是倍性分析测量的统计结果,根据测量结果,PPN1 初孵仔鱼细胞 DNA 含量约为 PP1 的初孵仔鱼细胞 DNA 含量 1.46 倍。40 尾 PPN1 初孵仔鱼 DAPI 强度最小为 35.51,最高为 38.87,表明三倍体率达到 100%。

表 3 杂交家系、异源三倍体家系和对照家系倍性分析结果  
Tab. 3 Average intensity of DAPI for the hybrid and control family in ploidy analysis

家系 family	样本数 sample size	DAPI 平均强度(范围) average intensity of DAPI(range)
PP1	40	25.84 ± 0.55(25.43 ~ 26.46)
PN1	40	26.42 ± 1.38(24.85 ~ 27.46)
PPN1	40	37.67 ± 0.97(35.51 ~ 38.87)

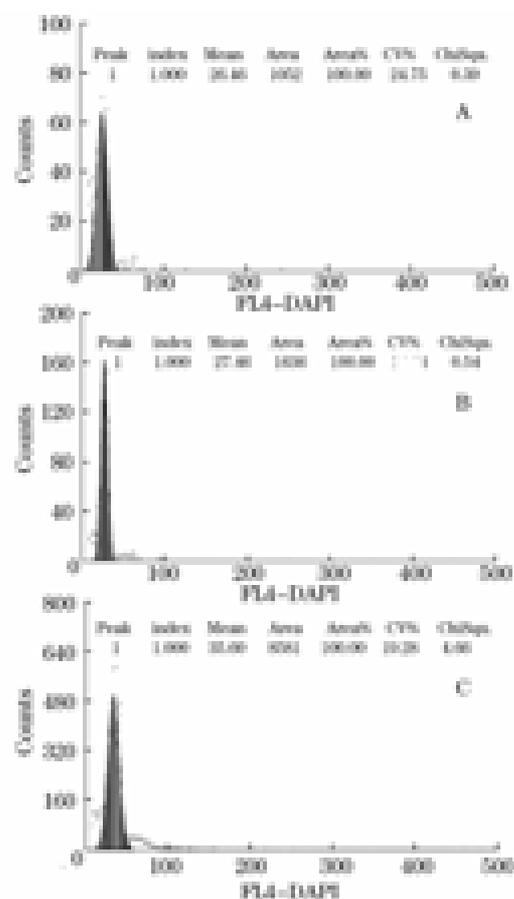


图 1 倍性分析结果

A. 大黄鱼; B. 异源二倍体; C. 异源三倍体。

Fig. 1 Histograms of ploidy analysis

A; *L. crocea*; B; allodiploid; C. allotriploid.

## 2.3 微卫星标记在异源三倍体家系中的传递与分离

微卫星标记在 PPN1 和 PPN2 中的传递和分离情况如表 4 所示。PPN1 在 *LYC0041*、*LYC0004*、*HLJDH107*、*LYC0066* 等 4 个微卫星座位上及 PPN2 在 *LYC0066* 座位上,母本的基因型均为杂合,父本没有检测到相应的等位基因。这 4 个微卫星座位上,除 *LYC0004* 表现出 ABN 和 BBN 两种基因型外,其余 3 个基因座位上,初孵仔鱼表现出 3 种基因型: AAN、ABN 和 BBN(图 2-B)。每个检测个体均能有 1 个以上位点基因型为杂合。除 *LYC0004* 外,其余座位两种纯合基因型的比例均符合 1:1。*LYC0041*、*LYC0004*、*HLJDH107*、*LYC0066* 等 4 座位的 M-C 距离估算值如表 4 所示。

*LYC0407* 微卫星座位上 PPN1 和 PPN2 母本的基因型为纯合(AA),父本为杂合(BC),A 基因传递给全部后代,父本基因在后代中发生分离(图 2-A),分离比符合 1:1 的预期值。

表 4 微卫星标记在两个异源三倍体家系中的传递与分离情况  
Tab. 4 Inheritance and segregations of five microsatellite loci in two allotriploid families

座位 loci	家系 family	样本数 no.	母本 female	父本 male	子代基因型(频率) genotype of progeny (frequency)			y	P
LYC0041	PPN1	36	AB	NN	AAN(5)	ABN(28)	BBN(3)	38.89	0.48
LYC0004	PPN1	47	AB	NN		ABN(32)	BBN(15)	-	-
HLJDH107	PPN1	42	AB	NN	AAN(13)	ABN(11)	BBN(18)	13.10	0.37
LYC0066	PPN1	43	AB	NN	AAN(14)	ABN(14)	BBN(15)	16.28	0.85
LYC0066	PPN2	27	AB	NN	AAN(9)	ABN(10)	BBN(8)	18.59	0.81
LYC0407	PPN1	38	AA	BC	AAB(23)	AAC(15)		-	0.19
LYC0407	PPN2	41	AA	BC	AAB(20)	AAC(21)		-	0.88

注:N:即没有检出扩增条带;y:微卫星-着丝粒图距;P:符合预期分离比的 $\chi^2$ 检验概率值。

Notes:N;bands no detected; y;distance of microsatellite-centromere; P;probability deduced from $\chi^2$ -test.

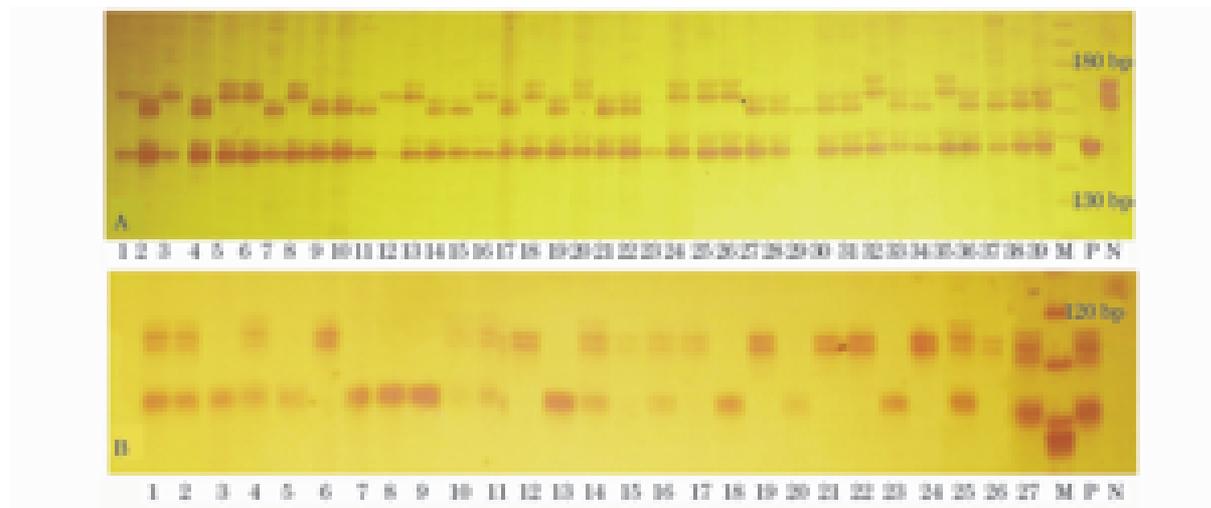


图 2 家系 PPN1 在 LYC0026 座位 (A) 和家系 PPN2 在 LYC0066 (B) 的微卫星标记图谱

M. DNA marker; P. 母本(大黄鱼);N. 父本(黄姑鱼)。

Fig. 2 Electrophoresis patterns of family PPN1 at LYC0026 and family PPN2 at LYC0066

M. DNA marker; P. female parent (*L. crocea*); N. male parent (*N. albiflora*).

### 3 讨论

#### 3.1 异源三倍体的诱导条件

刘颖等<sup>[5]</sup>开展了大黄鱼(♀)与黄姑鱼(♂)杂交试验,证明大黄鱼(♀)与黄姑鱼(♂)杂交可以产生含有双亲染色体组的初孵仔鱼。这表明,通过抑制受精卵第一极体排放可能诱导含有两个大黄鱼基因组和一个黄姑鱼基因组的异源三倍体。温度休克和静水压休克是抑制受精卵第二次减数分裂常用方法。虽然,目前未见关于大黄鱼(♀)与黄姑鱼(♂)杂交受精卵加倍条件的报道,但是由于减数分裂过程主要是由卵子控制完成,因此我们直接套用了大黄鱼雌核发育诱导程序中的方法,用于抑制杂交受精卵第二极体排放。结果表明,诱导后代的发育率、孵化率仅略低于杂交

二倍体组,且三倍体率达到 100%。微卫星分析显示所有异源三倍体样品均有 1 个以上微卫星位点上同时得到母本的两个不同的等位基因,表现出杂合的基因型,证明诱导组检测的全部个体都含有一个父本基因组和两个母本基因组。可见,减数分裂雌核发育或三倍体诱导中,用于抑制第二极体排放的条件同样适用于诱导异源三倍体。

#### 3.2 异源三倍体成活率

理论上,异源三倍体综合了杂交育种和多倍体育种的双重优势,具有良好的应用前景。鱼类遗传育种实践中也有一些异源三倍体育种的成功范例。例如,“湘云鲫”和“湘云鲤”就是以异源四倍体鲫鲤为父本,分别与二倍体白鲫或红鲫和鲤杂交得到的不育异源三倍体,具有生长快、个体大、肉质好、抗逆性强等优点<sup>[15]</sup>。陈敏容等<sup>[16]</sup>通

过用异源四倍体白鲫( $\delta$ )与二倍体白鲫( $\eta$ )杂交,育出了规格较整齐、不易脱鳞、抗病力强、生长迅速的异源三倍体白鲫。然而,人工异源三倍体无法存活的先例也很多。桂建芳等<sup>[17]</sup>通过杂交和压力休克获得鲤、鲢、鲫和白鲫等鲤科鱼类之间6个组合异源三倍体,结果显示,鲤 $\eta \times$  鲢 $\delta$ 、鲫 $\eta \times$  鲢 $\delta$ 、白鲫 $\eta \times$  鲢 $\delta$ 等3个处理组胚胎能够正常发育,孵化出苗;鲢 $\eta \times$  鲤 $\delta$ 、鲢 $\eta \times$  鲫 $\delta$ 、鲢 $\eta \times$  白鲫 $\delta$ 不断发生染色体丢失,形成非整倍体后死亡。孟庆磊等<sup>[18]</sup>使用6-二甲基氨基嘌呤(6-DMAP)处理栉孔扇贝( $\eta$ ) $\times$ 海湾扇贝( $\delta$ )后代,抑制第二极体获得异源三倍体,但无法存活度过附着变态期。本研究中,用冷休克处理大黄鱼( $\eta$ ) $\times$ 黄姑鱼( $\delta$ )受精卵,得到异源三倍体胚胎,可以正常发育,孵化出苗,并度过开口期,但在15日龄以后陆续死亡。可见,母本染色体组加倍是不是能够提高杂种成活率,与亲本组合有很大关系。父源基因表达造成的发育或生物代谢过程的紊乱可能是异源三倍体无法存活的原因。深入研究异源三倍体中父本基因表达对发育和代谢过程的影响,可能帮助揭示一些重要生命过程的基因网络和调控机制。

### 3.3 微卫星标记在异源三倍体中的传递

微卫星标记是共显性标记,可以直观地反映出亲本基因向染色体组操作后代传递的情况。一个物种的微卫星标记引物在其近缘物种中具有一定的通用性<sup>[19-22]</sup>。林能锋等<sup>[23]</sup>发现大黄鱼微卫星标记引物在石首鱼科5个亚科8属10个种中具有通用性。由于黄姑鱼微卫星标记的筛选工作尚未见报道,本研究筛选了5对大黄鱼微卫星标记位点用于大黄鱼( $\eta$ )与黄姑鱼( $\delta$ )人工异源三倍体初孵仔鱼遗传分析。结果表明,其中有1对引物(LYC0407)能够通用于黄姑鱼。在LYC0407位点上,两异源三倍体家系父本均为杂合,杂合的基因在杂交后代中分离,分离比符合孟德尔分离定律。

另一方面,由于初级卵母细胞在第一次减数分裂前期发生染色体片段交换,有些基因在第一次减数分裂分离,有些基因在第二次减数分裂中分离。抑制第2次减数分裂使母本染色体组加倍,阻断了基因在第二次减数分裂的分离,保留了由于染色体片段交换形成的重组杂合基因型。保留了第一次减数分裂前期发生的染色体片段交换

的半四分子,常常被应用于着丝粒作图,定位基因与着丝粒之间的距离<sup>[3,24]</sup>。抑制第二极体排放的异源三倍体的母本基因组也具有半四分子的特点。本研究中,LYC0041、LYC0004、HLJDH107、LYC0066等4个在母本杂合的微卫星标记,在异源三倍体部分后代都可以找到杂合基因型个体。通过计算第二次减数分裂的重组率(y)就可以估算出标记与着丝粒之间的遗传距离。值得注意的是,LYC0004只有两种基因型(AB和BB),这可能是由于LYC0004标记的A等位基因与早期发育致死基因紧密连锁,纯合基因型无法存活至取样。

### 3.4 意义和前景

本研究利用冷休克抑制了大黄鱼( $\eta$ ) $\times$ 黄姑鱼( $\delta$ )杂交受精卵的第二次减数分裂,得到大黄鱼( $\eta$ ) $\times$ 黄姑鱼( $\delta$ )人工异源三倍体仔鱼,并观察了它们的存活率,以及大黄鱼微卫星标记在异源三倍体中的传递与分离。结果表明,大黄鱼( $\eta$ ) $\times$ 黄姑鱼( $\delta$ )人工异源三倍体很难存活,异源三倍体同时含有2个母本基因组和1个大黄鱼基因组,而且母本基因组具有半四分子的特点。由于开口后逐渐死亡,异源三倍体难以直接应用于生产。但是由于两个亲本鱼种取样方便、杂交易行、受精和孵化没有障碍、且染色体操作技术成熟,故异源三倍体仔鱼材料的培育相对简单易行,适合作为遗传学研究的实验材料。例如,用于遗传作图,与异源二倍体共同使用可以整合遗传图谱和着丝粒图谱;也可以用于研究异源三倍体中父母本的染色体行为和基因相互作用,以及对机体代谢、发育和存活的影响。

### 参考文献:

- [1] 楼允东,李小勤. 中国鱼类远缘杂交研究及其在水产养殖上的应用[J]. 中国水产科学, 2006, 13(1): 151-158.
- [2] Chevassus B. Hybridization in fish[J]. Aquaculture, 1983, 33(1-4): 245-262.
- [3] 孟庆闻. 石首鱼科[M] // 鱼类学(形态·分类). 上海: 上海科学与技术出版社, 1989: 269-272.
- [4] 韩志强, 高天翔, 王志勇, 等. 黄姑鱼群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 水产学报, 2006, 30(5): 640-646.
- [5] 刘颖, 蔡明夷, 刘贤德, 等. 大黄鱼 $\eta$ 与黄姑鱼 $\delta$ 杂交 F<sub>1</sub> 家系初孵仔鱼 AFLP 分析[J]. 水产学报, 2010, 34(6): 671-678.

- [6] 吴清江,付洪拓,叶玉珍. 酶的基因剂量效应及其对鱼类远缘杂交的影响[J]. 水生生物学报,1997,21(2):143-151.
- [7] 吴玉萍,叶玉珍,吴清江. 基因叠加生物型的基因表达特征[J]. 遗传学报,2000,27(2):108-113.
- [8] 吴玉萍,叶玉珍,吴清江. 热休克诱导斑马鱼异源三倍体的研究[J]. 海洋与湖沼,2000,31(5):465-470.
- [9] 程汉良,张永春,马国文,王亮,崔海鹏. 热休克诱导鲫鱼异源三倍体的研究[J]. 哲里木畜牧学院学报,1998,8(1):20-29.
- [10] 吴清明,蔡明夷,刘贤德,等. 大黄鱼同质雌核发育的诱导及其微卫星标记鉴定[J]. 水产学报,2009,33(5):735-741.
- [11] 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.
- [12] 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]. *Mar Biotech*, 2008, 10(1):83-90.
- [13] 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(4):139-147.
- [14] 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,2007.
- [15] Liu S J, Liu Y, Zhou G J, *et al.* The formation of tetraploid stocks of red crucian carp  $\times$  common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization[J]. *Aquaculture*, 2001,192(2-4):171-186.
- [16] 陈敏容,杨兴棋,俞小牧,等. 白鲫 $\times$ 红鲫 $\delta$ 异源四倍体鱼的倍性操作及其生殖力的研究[J]. 水生生物学报,1997,21(3):197-206.
- [17] 桂建芳,梁绍昌,朱蓝菲,等. 鲤科鱼类6个正反交人工异源三倍体胚胎的染色体变化及其发育命运[J]. 实验生物学报,1992,25(2):89-103.
- [18] 孟庆磊,黄晓婷,赵海波,等. 扇贝异源三倍体诱导[J]. 中国水产科学,2009,16(5):718-727.
- [19] McConnell S K, Hamilton L, Morris D, *et al.* Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon [J]. *Aquaculture*, 1995,137(1-4):19-30.
- [20] Morris D B, Richard K R, Wright J M. Microsatellites from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their use for genetic studies of salmonids [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1996,53(1):120-126.
- [21] Rico C, Rico I, Hewitt G. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species [J]. *Proc R Soc Lond*, 1996,263(1370):549-557.
- [22] Presa P, Guyomard R. Conservation of microsatellites in three species of salmonids [J]. *J Fish Biol*, 1996,49(6):1326-1329.
- [23] 林能锋,苏永全,丁少雄,等. 大黄鱼微卫星标记引物在石首鱼科几个近缘种中的通用性研究[J]. 中国水产科学,2008,15(2):237-243.
- [24] Li Q, Kijima A. Microsatellite analysis of gynogenetic families in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2006,331(1):1-8.

## Induction and microsatellite analysis of allotriploid between *Larimichthys crocea* and *Nibea albiflora*

CAI Ming-yi, LIU Xian-de, WU Xiang-wei, HUANG Ming-yao, WANG Zhi-yong\*

(The Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety,  
Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** The developed hybrid eggs of *Larimichthys crocea* (♀) and *Nibea albiflora* (♂) were shocked with cold treatment to block the extrusion of the second polar, according to the protocol of inducing meiotogenesis in large yellow croaker. Two allotriploid families (PPN1 and PPN2) and the control families were produced. The embryos developed normally, and the morphologic normal fry were hatched out. The development rate, hatching rate and normality rate of the allotriploids were slightly lower than those of the diploid control of large yellow croaker. The results of ploidy analysis showed that the DNA content of the newly hatched fry in PPN1 family was 1.46 time that of diploid large yellow croaker, and the 100% tested fry in PPN1 were triploid. Each offspring in allotriploid families inherited one of alleles from its male parent. Since the gene segregation in Meiosis II was blocked, both homozygotes and heterozygotes were found in allotriploid families at four maternal heterozygotic microsatellite loci. The results of the ploidy analysis and microsatellite analysis proved the putative triploids contained two genomes from large yellow croaker and a genome from yellow drum. However, the allotriploid fry died one by one from 15th day post hatching and none survived over one month old, showing that the diploidization of the maternal genome did not improve the survival of the hybrids. Nevertheless, the allotriploid fry can still serve as good materials in genetic mapping and to reveal gene expression and regulation in some important biological processes.

**Key words:** *Larimichthys crocea*; *Nibea albiflora*; allotriploid; ploidy analysis; microsatellite

**Corresponding author:** WANG Zhi-yong. E-mail: zywang@jmu.edu.cn