

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21620100153874

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

博 士 学 位 论 文

中国海域文昌鱼遗传多样性及实验室品系培育

Genetic diversity of amphioxus in China Seas and  
strain breeding in the laboratory

李 伟 业

指导教师姓名: 王义权 教授

专业名称: 动 物 学

论文提交日期: 2013 年 4 月

论文答辩日期: 2013 年 6 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2013 年 6 月



## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日



## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日



# 目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	4
<b>第一章 文献综述</b> .....	<b>8</b>
<b>一 分子标记概述</b> .....	<b>8</b>
1 以杂交技术为核心的分子标记.....	8
2 以 PCR 技术为核心的分子标记.....	9
3 PCR 与限制性酶切技术结合的分子标记.....	12
4 以测序和芯片技术为核心的分子标记.....	12
5 基于特定序列的分子标记.....	13
<b>二 遗传图谱的构建与应用</b> .....	<b>14</b>
1 遗传图谱的定义和理论基础.....	14
2 遗传图谱的构建过程.....	14
3 遗传图谱的应用前景.....	17
<b>三 雌核发育研究进展</b> .....	<b>18</b>
1 人工诱导雌核发育的原理.....	18
2 人工诱导雌核发育的方法.....	18
3 人工诱导雌核发育后代鉴定.....	20
4 雌核发育的意义和应用前景.....	21
<b>四 文昌鱼概述</b> .....	<b>22</b>
1 文昌鱼的科研价值和经济价值.....	23
2 文昌鱼分类学和遗传多样性研究.....	23
3 文昌鱼养殖和育种研究.....	26
<b>五 选题意义和研究目的</b> .....	<b>27</b>
<b>参考文献</b> .....	<b>29</b>
<b>第二章 短刀侧殖文昌鱼的属名及线粒体基因组结构</b> .....	<b>37</b>
<b>一 材料和方法</b> .....	<b>37</b>
1 样品采集、形态鉴定和基因组提取.....	38

2 线粒体基因组 DNA 扩增和序列测定.....	38
3 线粒体基因组序列分析.....	38
4 遗传距离和系统发生关系分析.....	39
<b>二 结果.....</b>	<b>40</b>
1 短刀侧殖文昌鱼形态特征.....	40
2 线粒体基因组结构.....	41
3 遗传距离.....	46
4 系统发生关系.....	47
<b>三 讨论.....</b>	<b>48</b>
1 短刀侧殖文昌鱼线粒体基因组.....	49
2 短刀侧殖文昌鱼属名及 <i>Asymmetron</i> 属的有效性.....	49
<b>参考文献 .....</b>	<b>51</b>
<b>第三章 基于 <i>COX I</i> 基因的文昌鱼遗传多样性及地理种群分化研究</b>	<b>54</b>
.....	54
<b>一 材料和方法 .....</b>	<b>55</b>
1 样本采集.....	55
2 基因组 DNA 提取和 <i>COX I</i> 基因片段扩增.....	56
3 测序和序列分析.....	56
<b>二 结果.....</b>	<b>57</b>
1 太平洋西岸 <i>Branchiostoma</i> 属的文昌鱼种类.....	57
2 种间差异和地理种群的遗传分化.....	57
3 文昌鱼种群的遗传多样性.....	59
<b>三 讨论.....</b>	<b>61</b>
1 太平洋西岸文昌鱼的种类.....	61
2 太平洋西岸三种文昌鱼的分布和遗传多样性.....	61
<b>参考文献 .....</b>	<b>63</b>
<b>第四章 白氏文昌鱼微卫星标记开发 .....</b>	<b>66</b>
<b>一 材料和方法 .....</b>	<b>66</b>
1 样品来源.....	66



2 引物和试剂.....	66
3 磁珠富集文库法筛选白氏文昌鱼微卫星标记.....	67
4 数据库筛查法筛选白氏文昌鱼微卫星标记.....	70
<b>二 结果.....</b>	<b>71</b>
1 白氏文昌鱼微卫星富集文库.....	71
2 白氏文昌鱼数据库筛查.....	77
<b>三 讨论.....</b>	<b>78</b>
1 开发微卫星位点的方法.....	78
2 文昌鱼微卫星位点的特征.....	79
<b>参考文献 .....</b>	<b>81</b>
<b>第五章 基于微卫星标记的白氏文昌鱼遗传多样性研究.....</b>	<b>82</b>
<b>一 材料和方法 .....</b>	<b>82</b>
1 样本采集和基因组提取.....	82
2 微卫星位点的 PCR 扩增 .....	82
3 计算遗传多样性参数.....	84
<b>二 结果.....</b>	<b>84</b>
1 微卫星位点的多态性.....	84
2 微卫星位点的适用性.....	84
3 白氏文昌鱼遗传多样性.....	84
<b>三 讨论.....</b>	<b>86</b>
1 哈迪-温伯格平衡与无效等位基因现象 .....	86
2 连锁不平衡与位点的适用性.....	86
3 文昌鱼群体遗传多样性水平及保护策略.....	87
<b>参考文献 .....</b>	<b>89</b>
<b>第六章 文昌鱼全同胞家系建立及早期生长发育 .....</b>	<b>92</b>
<b>一 材料和方法 .....</b>	<b>92</b>
1 日本文昌鱼全同胞家系建立.....	92
2 白氏文昌鱼全同胞家系建立.....	94
<b>二 结果.....</b>	<b>95</b>

1 日本文昌鱼全同胞家系的存活与变态.....	95
2 日本文昌鱼不同家系间早期发育模式的比较及成因.....	96
3 日本文昌鱼家系畸形与死亡.....	97
4 白氏文昌鱼全同胞家系的存活与变态.....	100
<b>三 讨论.....</b>	<b>101</b>
1 文昌鱼全同胞家系建立的可行性.....	101
2 发育模式与仔鱼存活的关系.....	102
3 文昌鱼幼体主要死因的解决办法.....	102
<b>参考文献 .....</b>	<b>104</b>
<b>第七章 文昌鱼遗传连锁图谱初步构建 .....</b>	<b>107</b>
<b>一 材料和方法 .....</b>	<b>107</b>
1 作图群体的构建和选择.....	107
2 作图标记的来源和筛选.....	108
3 微卫星分型结果统计.....	108
4 连锁图谱构建和整合.....	108
5 连锁图谱长度和覆盖率计算.....	109
<b>二 结果.....</b>	<b>109</b>
1 作图群体.....	109
2 微卫星分型结果.....	110
3 遗传连锁图谱.....	114
<b>三 讨论.....</b>	<b>119</b>
1 作图策略和作图群体.....	119
2 作图标记的选择.....	119
3 标记的偏分离现象.....	120
4 遗传图谱的评价.....	121
<b>参考文献 .....</b>	<b>123</b>
<b>第八章 人工诱导文昌鱼雌核发育的研究 .....</b>	<b>127</b>
<b>一 材料和方法 .....</b>	<b>127</b>
1 亲本来源及精卵获取.....	127

2 紫外线灭活精子最佳剂量筛选.....	128
3 冷休克法诱导卵子加倍条件的探索.....	128
4 染色体倍性检测.....	129
5 胚胎孵育和幼体饲养.....	131
<b>二 结果.....</b>	<b>131</b>
1 文昌鱼单倍体综合症.....	131
2 紫外线照射对精子活力的影响.....	134
3 冷休克起始时间和持续时间对加倍率的影响.....	135
4 染色体倍性检测结果.....	138
5 文昌鱼雌核发育个体的生存能力.....	140
<b>三 讨论.....</b>	<b>141</b>
1 紫外线照射对文昌鱼精子活力和胚胎发育的影响.....	141
2 冷休克法诱导文昌鱼卵子加倍的条件.....	142
3 文昌鱼雌核发育二倍体的生存能力.....	143
4 文昌鱼性别决定方式.....	143
5 文昌鱼雌核发育成功的意义.....	144
<b>参考文献 .....</b>	<b>146</b>
<b>论文总结与创新点 .....</b>	<b>149</b>
<b>附表.....</b>	<b>152</b>
<b>博士期间已发表论文 .....</b>	<b>159</b>
<b>致谢.....</b>	<b>160</b>



## Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	1
<b>Abstract in English</b> .....	4
<b>Chapter 1 Intrduction</b> .....	8
1 Summary of molecular marker .....	8
2 Construction and application of genetic linkage map.....	14
3 Progress in the study of gynogenesis .....	18
4 Summary of amphioxus .....	22
5 Goal of our research.....	27
Reference .....	29
<b>Chapter 2 Generic name identification and mitogenome structure of</b> <b><i>Epigonichtys cultellus</i></b> .....	37
1 Materials and methods .....	37
2 Results.....	40
3 Discussion.....	48
Reference .....	51
<b>Chapter 3 Analysis of amphioxus genetic diversity and geographic</b> <b>populations divergence based on <i>COX I</i> gene</b> .....	54
1 Materials and methods .....	55
2 Results.....	57
3 Discussion.....	61
Reference .....	63
<b>Chapter 4 Development of microsatellite markers in <i>Branchiostoma</i></b> <b><i>belcheri</i></b> .....	66
1 Materials and methods .....	66
2 Results.....	71

3 Discussion .....	78
Reference .....	81
<b>Chapter 5 Study on genetic diversity of <i>Branchiostoma belcheri</i> based on microsatellite markers.....</b>	<b>82</b>
1 Materials and methods .....	82
2 Results.....	84
3 Discussion .....	86
Reference .....	89
<b>Chapter 6 Establishment of full-sib families in amphioxus .....</b>	<b>92</b>
1 Materials and methods .....	92
2 Results.....	95
3 Discussion .....	101
Reference .....	104
<b>Chapter 7 Primary construction of genetic map for amphioxus .....</b>	<b>107</b>
1 Materials and methods .....	107
2 Results.....	109
3 Discussion .....	119
Reference .....	123
<b>Chapter 8 Induction of Diploid Gynogenesis in Amphioxus .....</b>	<b>127</b>
1 Materials and methods .....	127
2 Results.....	131
3 Discussion .....	141
Reference .....	146
<b>Conclusion .....</b>	<b>149</b>
<b>Supplementary .....</b>	<b>152</b>
<b>Publications .....</b>	<b>159</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>160</b>

## 中国海域文昌鱼遗传多样性及实验室品系培育

### 摘 要

头索动物文昌鱼进化地位特殊,具有脊索动物门祖先的原始特征,是进行脊椎动物起源和演化、胚胎发育和比较基因组学研究的重要材料,具有重要的科研价值,同时文昌鱼还是一种有养殖前景的经济物种。目前对文昌鱼的研究主要集中在进化和发育生物学方面,对其分类学、遗传多样性和育种方面的研究则相对滞后。

将材料运用于科学研究之前,首先必须对其进行正确的物种鉴定。本文根据形态特征鉴定了采集于粤东海域的短刀侧殖文昌鱼,并测定了其线粒体基因组全序列,结合已报道的其它8种文昌鱼线粒体基因组数据,对文昌鱼属的分类进行了探讨。文昌鱼线粒体基因排列顺序、系统发育树和遗传距离均表明9种文昌鱼应分为3个属,侧殖文昌鱼属、鳃口文昌鱼属和偏殖文昌鱼属,短刀侧殖文昌鱼是侧殖文昌鱼属的一种。虽然在形态学特征上鳃口文昌鱼生殖腺位于身体两侧,侧殖文昌鱼和偏殖文昌鱼生殖腺均位于一侧;但在分子水平,鳃口文昌鱼和侧殖文昌鱼的线粒体基因排列顺序一致,偏殖文昌鱼则发生了较大的重组,系统发生关系也显示侧殖文昌鱼与鳃口文昌鱼亲缘关系更近。本文通过线粒体基因组全序列澄清了短刀侧殖文昌鱼的属名,并进一步探讨了文昌鱼属之间的分类和进化关系,支持恢复偏殖文昌鱼属的分类地位。

作为国际生命条形码项目的主要分子标记,*COX 1*序列能够很好地区分各个物种。进一步用*COX 1*基因对太平洋西岸最常见的鳃口文昌鱼属的分类、分布、遗传多样性和地理种群分化情况进行了调查,结果表明太平洋西岸主要分布着三种鳃口文昌鱼,即白氏文昌鱼、日本文昌鱼和马来文昌鱼。结合前人的文献报道,白氏文昌鱼的分布区域应在厦门以南,包括厦门、香港、茂名、北海等海域;日本文昌鱼的分布范围应在香港以北,包括我国香港、厦门、青岛、威海、昌黎和日本天草、西淡、南势、渥美等海域;马来文昌鱼则分布在香港以南,包括我国香港和泰国的阁科考等海域。基于*COX 1*基因的系统发育树,遗传距离和AMOVA分析结果均显示,采自厦门、北海、茂名的白氏文昌鱼没有明显分化,而我国青岛、厦门和日本天草、西淡、南势、渥美的日本文昌鱼也没有明显分化。文昌鱼各群体的单倍型多态性很高,核苷酸多态性与其它水生动物相当,总体来讲太平

洋西岸鳃口文昌鱼属的3种文昌鱼群体遗传多样性均处于较高水平，同一物种的不同地理种群间没有出现明显的遗传分化。

研究文昌鱼遗传多样性可以为文昌鱼资源的保护和合理利用提供理论依据，同时也为文昌鱼成为进化和发育生物学研究的模式动物提供遗传学基础资料。厦门海域的白氏文昌鱼是世界上唯一形成过渔场的文昌鱼，为了进一步研究白氏文昌鱼遗传多样性，并为文昌鱼遗传育种工作做准备，本文构建了白氏文昌鱼微卫星富集文库，从中筛选到13个多态性位点，通过筛查基因组数据库开发了289个多态性微卫星标记。并使用其中20个微卫星标记，对20尾个体组成的白氏文昌鱼厦门群体进行遗传多样性研究。结果表明白氏文昌鱼厦门群体等位基因丰富，杂合度高，遗传多样性处于较高水平。微卫星标记与线粒体标记的研究结果一致，均表明野生文昌鱼群体遗传多样性高，个体差异大。对于文昌鱼经济价值的开发和资源保护而言，遗传多样性高给文昌鱼经济养殖和野生资源恢复带来了希望，也给良种选育提供了遗传基础；但对于科学研究而言，遗传多样性高给文昌鱼作为模式生物的应用带来了困难，用不同个体作为材料进行的发育生物学研究常常因个体差异大而影响实验的重复性。因此，开发文昌鱼经济价值，保护文昌鱼野生资源，需要保存和利用文昌鱼遗传多样性；而推动文昌鱼模式化，则需要建立纯度较高的品系，降低文昌鱼实验室养殖群体的遗传多样性。

遗传多样性的降低需要经过小群体繁殖、近亲交配、雌核发育等途径实现，然而文昌鱼幼体阶段死亡率很高，前人估算一对文昌鱼的后代仅能存活5尾，因此我们首先探索提高文昌鱼幼体存活率的方法，以我国科学研究者最常用的白氏文昌鱼和日本文昌鱼为材料，尝试建立全同胞家系。在文昌鱼性成熟时期，挑选健康雌雄个体作为备选亲本，诱导其产卵释精，将雌雄个体一对一配对，获得全同胞家系。通过对受精卵质量、海水清洁程度、光照强度等因素的控制和调节，提高了幼体存活率，一个家系最多有2300尾个体存活，最终成功建立了4个白氏文昌鱼家系和7个日本文昌鱼家系，为下一步的品系培育打下基础。

根据实验室模式动物和经济养殖物种的不同特点，需要筛选不同性状的文昌鱼，分别建立品系。与传统的选育方法相比，构建文昌鱼遗传连锁图谱可以为分子标记辅助育种做准备，有助于快速进行目的性状的选育，加快文昌鱼品系建立进程。本文运用微卫星标记和全同胞家系，尝试构建了白氏文昌鱼遗传连锁图谱。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫