

雌核发育橙黄色锦鲤的遗传、性腺发育及外形特征

刘启智¹, 肖 军², 罗凯坤², 张 勇¹, 王跃群^{2*}

(1. 中山大学生命科学院, 广东 广州 510227;

2. 湖南师范大学生命科学院, 湖南 长沙 410081)

摘要: 用经紫外线灭活的团头鲂精子激活橙黄色锦鲤的卵子, 在 4 °C 的水温下冷休克处理卵子 30 min 使其染色体加倍, 获得了孵化率为 30.6%、存活率为 24.2% 的雌核发育锦鲤, 表明该雌核发育锦鲤研制方法具有较高的效率。利用外周血细胞培养方法制备了雌核发育锦鲤染色体并利用核型分析方法对其核型进行了分析, 发现雌核发育锦鲤染色体数目为 100, 核型公式为 $22m + 34sm + 22st + 22t$; 表明雌核发育锦鲤为二倍体, 其核型与锦鲤母本一致。利用石蜡切片方法, 随机选取 10 尾 1 龄雌核发育锦鲤性腺进行检测, 发现其性腺全部为卵巢; 并且在繁殖季节随机检测 100 尾 2 龄雌核发育锦鲤, 没有 1 尾能挤出精液, 表明雌核发育锦鲤全部为雌性, 为证明雌性锦鲤的性别决定类型为 XX 提供了重要证据。此外, 还对雌核发育锦鲤与母本的 *SOX* 基因遗传关系、外形、体色等进行了比较, 结果表明雌核发育锦鲤与母本有相同的 *SOX* 基因扩增片段, 为证明其为雌核发育锦鲤而非杂交后代提供了重要证据; 同时, 雌核发育锦鲤保留了母本体态优美的特点, 且具有色泽更鲜艳等优点, 表明该雌核发育方法产生了遗传改良效果。雌核发育锦鲤的获得为该观赏鱼的提纯复壮、遗传改良以及性别决定和性别控制研究奠定了基础。

关键词: 锦鲤; 雌核发育; 遗传育种; 染色体

中图分类号: Q 343.2; S 917.4

文献标志码: A

锦鲤 (*Cyprinus carpio* L., Koi) 是一种高档观赏鱼, 目前大多数优秀的锦鲤品种, 主要是通过杂交以及长期的人工选育而得来, 一个好品种的形成往往要经历数十年甚至更长时间的选育。雌核发育是一种快速有效的遗传改良方法, 一代雌核发育的效果可以相当于 8~10 代自交选育的效果^[1]。在雌核发育过程中, 利用灭活的外源精子刺激卵子发育, 再通过人工染色体加倍处理获得雌核发育后代。该方法可以淘汰有害基因, 快速建立遗传纯系, 加快育种速度^[2]; 同时, 在雌核发育过程中存在“异精效应”, 即外源精子的 DNA 片断融合在卵子的遗传物质中, 可以使得雌核发育后代在基因型和表型上发生改变, 导致雌核发育鱼在外形、生长速度等方面产生遗传变异^[3],

因而在鱼类遗传育种中具有重要应用。另一方面, 可以通过检测雌核发育后代的性别情况, 来研究亲本的性别决定机制, 当雌核发育后代全部为雌性时, 可以推断其亲本的性别决定类型为雌性同配型 (如 XX 型)^[4-7]。目前, 研究人员已经在多种鱼类中开展了人工雌核发育研究, 如鲤 (*Cyprinus carpio*)^[8-10], 牙鲮 (*Paralichthys olivaceus*)^[11], 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[12], 草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)^[13], 白鲫 (*Carassius auratus cuvieri*)^[14] 等。

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 精子是一种诱导鲫 (*Carassius auratus*) 和鲤雌核发育的外源精子。本实验利用紫外灭活的团头鲂精子, 成功诱导了橙黄色锦鲤的雌核发育, 并具有较高

收稿日期:2012-08-17 修回日期:2012-11-16

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2011AA100403);国家自然科学基金重点项目(30930071);国家自然科学基金面上项目(31071999,31272396);公益性行业(农业)科研专项(200903046);博士点基金优先发展领域项目(20114306130001)

通信作者:王跃群, E-mail: yuequnwang@yahoo.com

的孵化率和成活率。雌核发育橙黄色锦鲤不仅保留了母本体态优美、全身橙黄的特点,而且具有色泽更鲜艳,性状更整齐等改良特性。这些结果表明,利用雌核发育的方法对锦鲤进行遗传改良是一种有效育种途径。改良的雌核发育橙黄色锦鲤的形成成为橙黄色锦鲤的进一步遗传育种提供了优质的母本。另外,全雌雌核发育锦鲤的形成,为证明雌性锦鲤的性别决定类型为 XX 提供了重要证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

团头鲂(简称 BSB),锦鲤(简称 Koi)及雌核发育锦鲤(简称 GKoi)均取自湖南师范大学教育部“多倍体鱼繁殖与育种技术”工程研究中心。

1.2 实验方法

雌核发育锦鲤的诱导 采用灭活异源精子诱导雌核发育的方法,选产卵质量高、产卵量大而顺的普通橙黄色锦鲤与产精量多而浓的团头鲂按一对一配对原则挑选三组进行雌核发育诱导试验。首先将挤出的团头鲂精子用 Hank 氏液按 5:1 的比例稀释,以薄层分布在培养皿中,然后将培养皿置于垫有冰板的摇床上,并距离 10 cm 用紫外灯照射,照射剂量为 3 600 mJ/cm,处理完后与锦鲤的成熟卵子混合,并用干燥、洁净的羽毛充分搅拌,再把卵子平铺到盛有清水的培养皿中。3 min 后,将培养皿置于冰水混合物中冷休克处理 30 min,然后胚胎在 23~24 °C 水温下孵化。当发育至原肠胚时,统计通过原肠胚的胚胎数目;胚胎脱膜后,统计孵出的幼苗数目;幼苗下池前统计存活的幼苗数目。雌核发育幼苗孵出 3 d 后,将其放入池塘中,按常规方法饲养。

形态特征的测量 当雌核发育鱼长到 1 龄时,随机选取 20 尾,对实验鱼的全长(whole length, WL)、体长(body length, BL)、体高(body height, BH)、尾柄长(caudal peduncle length, PL)、尾柄高(caudal peduncle height, PH)、头长(head length, HL)和头高(head height, HH)等可量性状进行测量;并对实验鱼的背鳍条、腹鳍条、臀鳍条、侧线鳞、侧线上鳞及侧线下鳞等可数性状进行计数。

倍性检测及染色体核型分析 随机取 10 尾雌核发育锦鲤用于染色体制备。采用微量外周

血细胞培养的方法,从实验鱼尾静脉抽血 0.2 mL,0.1% 肝素钠抗凝,加入 10 mL 培养液中(M1640 培养基 + 15% 胎牛血清 + 300 mg/mL PHA),置于 25 °C,5% CO₂ 中培养 72 h,终止培养前 4 h,加入终浓度为 0.07 μg/mL 的秋水仙碱。处理完后将培养物加入 15 mL 离心管中,1 000 r/min,5 min 离心收集细胞,去上清液后,加入 10 mL 0.075 mol/L KCl 溶液低渗 30 min 后,1 000 r/min,5 min 离心收集细胞后,加入新鲜配制的固定液(甲醇:冰醋酸 = 3:1)4 mL,固定 15 min 后 1 000 r/min,5 min 离心收集细胞,重复固定 3 次后加入 0.5 mL 固定液,滴片,空气中自然干燥后,吉姆萨染色,镜检。从每尾鱼中选取 10 个染色体形态好的有丝分裂中期分裂相,Olympus 显微镜下拍摄,计数其染色体数目,并对其染色体数目的分布情况进行统计分析,同时,从中选取较好的分裂相构建染色体组型,染色体组型按 Levan 氏标准。

雌核发育锦鲤性腺发育情况检测 当雌核发育到达 1 龄时,取 10 尾雌核发育锦鲤,全鱼用丁香酚麻醉后,解剖取性腺,性腺材料用 Bouin 氏液固定,系列酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,连续切片厚度为 6~8 μm,H. E 染色,中性树脂封片,Olympus 显微镜镜检并进行显微摄影。性腺分期按文献所述标准^[15]。此外,第二年繁殖季节,当雌核发育锦鲤达到 2 龄,随即选取 100 尾,采用轻压鱼腹部的方法检测其是否可以挤出白色精液。

雌核发育锦鲤 SOX 基因片段扩增 确定了锦鲤的染色体倍性后,采用 ACD 抗凝剂,从普通锦鲤和雌核发育锦鲤尾静脉抽血 1 mL,用于血液基因组 DNA 提取。DNA 提取采用试剂盒方法(上海生工,细菌小量基因组 DNA 抽提试剂盒)。PCR 引物由上海 Sangon 公司合成。上游引物为 5' TGAAGCGACCCATGAA(C/T)G 3';下游引物为 5' AGGTCG(A/G)TACTT(A/G)TA(A/G)T 3',PCR 扩增反应总体积为 25 μL,其中模板基因组 DNA 80 ng,每种 dNTP 200 μmol,每种引物各 0.25 μmol,Taq DNA 聚合酶 1.25 U,反应程序为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,50 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 80 s,共 35 个循环,最后在 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳中分离。对于需要进一步做序列分析的样品的 DNA

片段用上海 Sangon 公司胶回收试剂盒纯化,纯化方法参照产品手册进行。将回收的 DNA 片段克隆于载体 pMD18-T (TaKaRa 公司),连接反应及细菌转化按 pMD18-T 载体试剂盒说明书进行操作。

2 结果

2.1 雌核发育橙黄色锦鲤受精率、孵化率和成活率

雌核发育锦鲤在胚胎发育阶段发育速度慢于普通锦鲤,用灭活的团头鲂精子进行雌核发育时具有较高的受精率,虽然在发育过程中有部分胚胎致畸死亡,但是仍具有较高的孵化率和成活率(表1)。

2.2 普通锦鲤雌核发育锦鲤外形特征比较分析

从表2和表3可以看出,雌核发育锦鲤多数可数性状和可量性状与普通锦鲤无明显差异,但是在某些性状,如雌核发育锦鲤尾柄高/尾柄长明显要大于普通锦鲤,雌核发育锦鲤具有更宽厚的尾部,雌核发育锦鲤在体色上较普通锦鲤要更鲜艳,结果表明,利用异源精子进行的雌核发育对其具有一定的改良作用。

表1 雌核发育锦鲤受精率、孵化率

Tab.1 Fertility rate, hatch rate and survival rate of GKoi

	受精率 fertility rate	孵化率 hatch rate	成活率 survival rate
雌核发育锦鲤 GKoi	68.9 ± 2.7	30.6 ± 3.5	24.2 ± 1.3

表2 雌核发育橙黄色锦鲤与其母本可量性状比例

Tab.2 Comparison of ratios of measurable traits of gynogenetic orange ornamental carp and its maternal parent

	体长/全长 BL/WL	体高/体长 BH/BL	头长/体长 HL/BL	头高/头长 HH/HL	尾柄高/尾柄长 PH/PL	头高/体高 HH/BH
普通锦鲤 Koi	0.79 ± 0.03	0.32 ± 0.04	0.29 ± 0.02	0.72 ± 0.02	0.83 ± 0.02	0.65 ± 0.02
雌核发育锦鲤 GKoi	0.79 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.27 ± 0.02	0.85 ± 0.03	1.15 ± 0.03	0.60 ± 0.02

表3 雌核发育橙黄色锦鲤与其母本可数性状

Tab.3 Comparison of countable traits of gynogenetic orange ornamental carp and its maternal parent

	侧线鳞 lateral line scale	侧线上鳞 upper lateral scale	侧线下鳞 lower lateral scale	腹鳍条 abdominal fin	背鳍条 back fin	臀鳍条 anal fin
普通锦鲤 Koi	36 ± 1.24 (35 ~ 37)	6.21 ± 0.79 (5 ~ 7)	7.18 ± 0.72 (6 ~ 8)	8.15 ± 0.79 (7 ~ 9)	Ⅲ + 17.83 ± 1.05 (Ⅲ + 16 ~ 19)	Ⅲ + 5.52 ± 0.54 (Ⅲ + 5 ~ 6)
雌核发育锦鲤 GKoi	35.12 ± 0.68 (34 ~ 36)	6.02 ± 0.56 (6 ~ 7)	7.08 ± 0.71 (7 ~ 8)	9.24 ± 0.70 (8 ~ 10)	Ⅲ + 19.18 ± 0.69 (Ⅲ + 18 ~ 20)	Ⅲ + 6.55 ± 0.61 (Ⅲ + 6 ~ 7)

注:Ⅲ代表硬鳍条数目。

Notes: Ⅲ represent the number of hard fin.

2.3 雌核发育锦鲤有丝分裂中期染色体及核型

在显微镜下观察外周血细胞培养染色体片,每条鱼选择10个形态好的中期分裂相(表4)。在所统计的中期分裂相中,雌核发育锦鲤的染色体数目主要分布在95~100范围内,占所统计分裂相的98%,其中数目为100的所占比例为92%,这证实了雌核发育锦鲤为二倍体(图1-a)。染色体组型按Levan氏标准确定,分析雌核发育

锦鲤10个有丝分裂中期染色体分裂相,得出雌核发育锦鲤每一套染色体组均由11条中部着丝粒染色体、17条亚中部着丝粒染色体、11条亚端部着丝粒染色体和11条端部着丝粒染色体构成。雌核发育锦鲤组型排列公式为22m + 34sm + 22st + 22t(图1-b),与梁拥军等^[16]中提到的锦鲤核型公式一致,从而进一步证明了雌核发育锦鲤为二倍体,而非与团头鲂的杂交鱼。

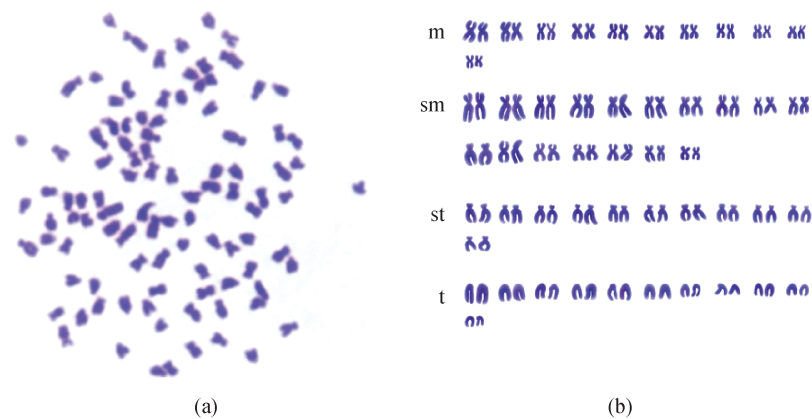


图 1 雌核发育锦鲤中期染色体分裂相及核型

(a) 雌核发育锦鲤有丝分裂中期染色体分裂相($2n = 100$); (b) 雌核发育锦鲤染色体组型。

Fig. 1 Metaphase chromosome spreads and karyotype of GKoi

(a) Metaphase chromosome spreads of GKoi ($2n = 100$); (b) Karyotype of GKoi.

表 4 雌核发育锦鲤中期染色体数目统计

Tab. 4 Distribution of chromosome numbers in metaphase of mitosis in GKoi

鱼名 fish name	个体数 sample no.	分裂相数目 number of spreads	染色体分布 distribution of chromosome numbers			
			< 95	95 ~ 99	100	> 100
雌核发育锦鲤 GKoi	10	100	1	6	92	1

2.4 雌核发育锦鲤性腺发育情况

1 龄时,雌核发育锦鲤石蜡切片显示其性腺结构全部为卵巢型(图 2)。卵巢中存在大量处于 II 时相和 III 时相的卵母细胞,这表明雌核发育锦鲤的卵巢可以正常发育并全部为雌性。同时,在 100 尾检测的雌核发育锦鲤中,无任何鱼可以挤出白色精液,进一步证明了雌核发育锦鲤全部为雌性。

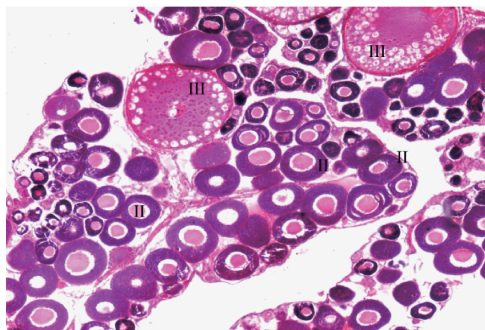


图 2 雌核发育锦鲤性腺石蜡切片图

II, III 分别代表发育至 II 时相和 III 时相卵母细胞。

Fig. 2 Gonad histological sections of GKoi

II, III shows the mature primary oocyte at stage of II and III, respectively.

2.5 雌核发育锦鲤 SOX 基因 PCR 扩增片段分析

SOX(SRY-box) 基因家族是一个具有高度保守的 HMG 盒(high mobility group-box) 编码转录因子的超基因家族。利用参考大量不同物种中 SOX 基因 HMG-box 保守区序列设计的简并引物,可以在不同动物样品的基因组 DNA 中扩增得到大小、数目和序列有差异的 SOX 基因的 DNA 片段;而在同一物种内,PCR 扩增条带具有高度的保守性。雌核发育锦鲤与普通锦鲤具有相同的 SOX 基因扩增片段(200 bp 和 900 bp 处条带),进一步验证了雌核发育锦鲤与其母本的遗传相似性(图 3)。

3 讨论

3.1 人工雌核发育在鱼类遗传育种中的重要性

人工雌核发育是一种快速获得遗传纯系的鱼类遗传育种方法,传统的育种方法一般需要 8 ~ 10 代自交才能建立一个近交纯系,而通过雌核发育只需 1 ~ 2 代便可建立一个纯系^[1];同时,雌核发育还是一种研究鱼类性别决定机制简单而实用

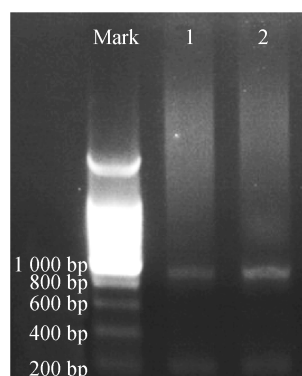


图3 *SOX* 基因 PCR 扩增片段电泳图

左边泳道为分子梯度为 200 bp 的标记; 1 号泳道为锦鲤 *SOX* 基因 PCR 扩增条带, 在 200 bp 以及 900 bp 左右处有条带; 2 号泳道为雌核发育锦鲤 *SOX* 基因 PCR 扩增条带, 具有与母本一致的条带。

Fig. 3 PCR electrophoretogram of *SOX* gene

Mark. DNA ladder markers (200 bp increments); Lane 1. two DNA fragments (approximately 200, and 900 bp) from Koi; Lane 2. two DNA fragments (approximately 200 and 900 bp) from GKoi.

的方法, 在雌性性别决定型为 XX 型的鱼类中, 其雌核发育后代全部为雌性^[4-6], 而在雌性性别决定型为 ZW 型的鱼类中, 其雌核发育后代中会有雄性^[17]; 另外, 将雌核发育技术与性反转技术相结合可以用于生产单性群体。一些经济鱼类中, 单性群体存在明显的优势^[18], 如鲤、鲫、草鱼等雌性生长速度要快于雄性^[19-21], 全雌鱼的养殖能极大地提高养殖效益。

3.2 雌核发育锦鲤形成的生物学意义

目前, 锦鲤已经培育出了 13 种基本花色, 并通过彼此间杂交产生了超过 100 多个色彩斑斓的锦鲤品系^[22]。但目前锦鲤育种仍主要是通过大规模的选育, 在杂交后代中具有较高观赏价值的锦鲤个体比例通常较低 (一般为 0.01% ~ 0.10%)^[23]。因此, 稳定保持锦鲤中优良观赏性状已成为锦鲤遗传育种中亟待解决的问题。通过雌核发育方法建立遗传纯系, 可以快速选育出观赏性状稳定的锦鲤纯系, 繁殖出大量具有优良观赏性状的锦鲤以满足人们的需求。目前, 人工雌核发育过程中仍存在不少问题, 如何优化人工雌核发育的操作过程以提高雌核发育的效率一直是研究人员需要解决的问题。本实验以略带少量杂色的橙黄色锦鲤为母本, 利用灭活的团头鲂精子进行刺激, 采用冷休克的方法, 进行锦鲤的雌核发育研究, 获得了较高孵化率 (30.6%) 和存活率

(24.2%) 的雌核发育锦鲤。为确定其为雌核发育锦鲤, 利用简并引物扩增其 *SOX* 基因片段, 发现其与母本一致, 未出现父本团头鲂中 700 bp 左右条带^[24], 可以排除其为杂交鱼的可能性。雌核发育锦鲤的染色体核型分析结果也证明了这一点。这些结果表明, 本研究中的雌核发育方法在诱导锦鲤雌核发育上具有较好的效果。此外, 本实验中获得的所有雌核发育锦鲤在体色上通体金黄 (图 1), 无任何杂色, 并且在色彩上较母本更加鲜艳, 表明通过雌核发育来保存并改良母本的优良观赏性状是可行的。

本研究中的雌核发育锦鲤在 1 龄时, 10 尾检测的个体性腺类型全部为卵巢型, 在其达到性成熟后的繁殖季节, 100 尾 2 龄雌核发育锦鲤中没有检测到可挤出白色精液的个体, 表明雌核发育锦鲤全部为雌性, 为证明雌性锦鲤的性别决定类型为 XX 提供了重要证据。在此基础上, 我们将进一步进行雌核发育锦鲤的性反转研究, 以期获得性反转雌核发育锦鲤, 从而建立一个雌核发育锦鲤纯系群体。

感谢湖南师范大学刘少军、姚占洲老师指导实验, 感谢湖南师范大学何伟国、王军博士在实验图片处理方面的帮助。

参考文献:

- [1] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. Nature, 1981, 291 (5813): 293 - 296.
- [2] 樊连春. 雌核发育进行银鲫遗传育种新进展 [J]. 生物学通报, 1994, 29(10): 4 - 6.
- [3] 蒋一珪, 梁绍昌, 陈本德, 等. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应 [J]. 水生生物学集刊, 1983, 8(1): 1 - 13.
- [4] Stanley J G. Female homogamety in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) determined by gynogenesis [J]. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1976, 33(6): 1372 - 1374.
- [5] Nagy A, Rajki K, Horváth L et al. Investigation on carp, *Cyprinus carpio* L. gynogenesis [J]. Journal of Fish Biology, 1978, 13(2): 215 - 224.
- [6] Pongthana N, Penman D J, Karnasuta J, et al. Induced gynogenesis in the silver barb (*Puntius gonionotus* Bleeker) and evidence for female

- homogamety [J]. *Aquaculture*, 1995, 135 (4): 267 - 276.
- [7] Penman D J, Gupta M V, Dey M M. Carp genetic resources for aquaculture in Asia [M]. The WorldFish Center Technical Report 65, 2005: 97 - 98.
- [8] Gomelsky B, Cherfas N, Ben-Dom N, *et al.* Color inheritance in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio* L) inferred from color variability in normal and gynogenetic progenies [J]. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 1996, 48(4) : 219 - 230.
- [9] Gomelsky B, Cherfas N, Hulata G. Studies on the inheritance of black patch in ornamental (koi) carp [J]. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 1998, 50(3) : 134 - 139.
- [10] 吴清江,陈荣德,叶玉珍,等. 鲤鱼人工雌核发育及其作为建立近郊系新途径的研究 [J]. *遗传学报*, 1981, 8(1) : 50 - 55.
- [11] 王新成. 全雌牙鲈种苗培育技术 [J]. *海洋科学*, 1994(6) : 63 - 64.
- [12] 李胜忠,陈琳,杜劲松. 热休克诱导虹鳟二倍体雌核发育 [J]. *动物学杂志*, 1997, 32(5) : 7 - 9.
- [13] 李冰霞,罗琛. 热休克法抑制第一次卵裂实现草鱼雌核发育的细胞学观察 [J]. *水生生物学报*, 2003, 27(2) : 155 - 160.
- [14] Sun Y D, Zhang C, Liu S J, *et al.* Induction of gynogenesis in Japanese crucian carp (*Carassius cuvieri*) [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33 (5): 405 - 412.
- [15] 刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学 [M]. 北京:农业出版社, 1993: 22 - 30.
- [16] 梁拥军,孙向军,李文通,等. 红白锦鲤的染色体核型分析 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38 (14): 7717 - 7719.
- [17] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences [J]. *Aquaculture*, 2002, 208(3 - 4) : 191 - 364.
- [18] Piferrer F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish [J]. *Aquaculture*, 2001, 197(1 - 4) : 229 - 281.
- [19] Gomelsky B. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: a review [J]. *Aquatic Living Resources*, 2003, 16(5) : 408 - 415.
- [20] Luo K K, Xiao J, Liu S J, *et al.* Massive production of all-female diploids and triploids in the crucian carp [J]. *International Journal of Biology Science*, 2011, 7 (4): 487 - 495.
- [21] 肖亚梅,刘筠,罗琛. 雌核发育草鱼近交 F₁ 代的生化遗传特性 [J]. *水产学报*, 2001, 25 (6): 495 - 499.
- [22] Kuroki T. *Manual to Nishikigoi* [M]. Shimonoseki: Shuji Fujita, 1990.
- [23] Kataoka M. *Nishikigoi Dangi (Short Stories)* [M]. Kumagayashi: Takayoshi Kataoka, 1989.
- [24] Chen L, Li W, Liu S J, *et al.* Novel genetic markers derived from the DNA fragments of *Sox* genes [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2009, 23 (3 - 4): 157 - 165.

Genetic, gonadal development and shape characteristics researches of gynogenetic orange ornamental carp (*Cyprinus carpio* L.)

LIU Qizhi¹, XIAO Jun², LUO Kaikun², ZHANG Yong¹, WANG Yuequn^{2*}

(1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510227, China;

2. Department of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: Gynogenetic orange ornamental carp (*Cyprinus carpio* L., Koi) with high hatch rate and survival rate was obtained by egg activation using the UV-inactivated sperm from blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) and then chromosomes doubling with cold shock treatment at the temperature of 4 °C for 30 min. The gynogenetic orange ornamental carp was proved to be diploid with 100 chromosomes by chromosome number detection and karyotype analysis. At the age of 1 year, 10 gynogenetic fish were randomly sampled to detect gonad development and only ovary was observed in all the samples; during the spawning season at the age of 2 years, 100 gynogenetic fish were stripped for semen production but none of the samples could strip out semen but green eggs, the presence of all-female gynogenetic orange ornamental carp provided vital evidence to prove that the sex determination type of female orange ornamental carp is XX. In addition, the genetic relationship of *SOX* gene, the phenotypes and body color between gynogenetic orange ornamental carp and its parent were also observed in this study, and the results show that gynogenetic orange ornamental carp inherits the same amplified fragments as the maternal parent, which provides important evidence to get rid of its heterozygosity. Meanwhile, gynogenetic orange ornamental carp inherited the graceful shape of its maternal parent and the body color is brighter. The formation of gynogenetic orange ornamental carp lays foundation for purification, rejuvenation and genetic improvement for orange ornamental carp and also provided good material for fish sex determination and sex control research.

Key words: ornamental carp; gynogenesis; genetic breeding; chromosome

Corresponding author: WANG Yuequn. E-mail: yuequnwang@yahoo.com