

雌核发育草鱼的遗传结构分析和微卫星鉴别方法的建立

全迎春¹, 韩林强², 白俊杰^{1*}, 姜 鹏¹, 于凌云¹, 樊佳佳¹, 胡重江²

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380;

2. 佛山市南海百容水产良种有限公司, 广东 佛山 528216)

摘要: 采用微卫星标记检测草鱼群体的遗传多样性, 并根据纯合度的变化建立了雌核发育草鱼的鉴别技术。结果显示, 8 个位点共扩增出 33 个等位基因; 在普通草鱼中, 平均纯合度和 PIC 分别为 0.203 1 和 0.552 8; 在雌核发育群体中, 则为 0.716 1 和 0.357 2; 2 个群体间遗传相似度为 0.873 3。其中, 5 个位点在雌核发育草鱼中纯合度明显提高, 雌核发育草鱼在这 5 个位点的扩增总条带数为 5~7 个, 普通草鱼则为 8~10 个, 由此可 100% 区分 2 个草鱼群体。通过概率计算, 理论鉴别概率达到 99.92%。研究表明, 雌核发育技术对草鱼的群体遗传结构改变较大, 是快速建立纯系、固定优良性状的有效手段; 根据群体遗传纯合度的改变、扩增条带数目差异, 应用多态性微卫星分子标记可以简单、有效地区分雌核发育群体(或与之相似的高度近交群体)与普通群体。

关键词: 草鱼; 异精雌核发育; 遗传结构; 微卫星标记; 鉴别方法

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 属于鲤形目 (*Cypriniformes*)、鲤科 (*Cyprinidae*)、草鱼属 (*Ctenopharyngodon*), 又名鲢鱼, 是我国重要的淡水经济养殖鱼类之一。草鱼在我国分布广泛, 年产量约占我国淡水鱼总产量的 20%^[1]。近年来, 草鱼种质资源退化严重, 病害频繁, 给草鱼养殖业带来巨大的损失^[2]。由于繁殖所需周期长(一般 4~5 年性成熟), 传统方法进行草鱼的种质改良和品种选育工作进展缓慢。人工诱导雌核发育技术 (artificial induction of gynogenesis) 是快速建立纯系、固定优良性状的有效手段。雌核发育技术还常用来研究草鱼性别决定机制、染色体定位、草鱼遗传图谱构建等, 是一种应用前景广泛的技术。但是雌核发育草鱼在形态和生理上同普通草鱼难以区分, 在养殖和保种过程中极易混淆, 建立简单有效的鉴别雌核发育草鱼的方法, 具有重要的意义。

微卫星标记 (microsatellite) 具有数量多、分布广、多态性丰富、分析快速方便等一系列优点, 已

经广泛用作种质资源鉴定、系统进化分析、遗传多样性分析等领域^[3-4]。目前, 已有学者采用同工酶^[5]、RAPD^[6-7]、微卫星^[8]等检测技术对雌核发育草鱼的遗传多样性进行了研究, 并发现通过抑制第一次卵裂的雌核发育草鱼的纯合度可达 71.4%^[9]; 普通草鱼 RAPD 多态位点比例为 27.82%, 而两个雌核发育草鱼群体为 16.00% 和 19.59%^[10]; 在人工诱导雌核发育过程存在 RAPD 位点快速丢失现象, 两次人工诱导雌核发育过程中共丢失 17 个位点^[11]。在雌核发育群体与普通群体的鉴别方面, 刘敏等^[11]采用 RAPD 标记寻找湘江流域雌核发育草鱼与普通草鱼群体的分子标记并成功转化为 SCAR 标记 1 个, 鉴别率达 76.7%。张虹^[12]发现 1 个 SCAR 标记在雌核发育群体中频率为 0, 而在普通草鱼中频率为 92%。有关雌核发育草鱼的微卫星分子标记鉴别工作较少报道, 本实验采用微卫星技术进行了异精极体型雌核发育草鱼群体与普通草鱼的遗传结

收稿日期:2014-06-24 修回日期:2014-08-18

资助项目:广东省战略性新兴产业核心技术攻关计划(2012A020800001);国家“八六三”高技术研究发展计划(2011AA100403);国家科技支撑计划(2012BAD26B02);国家大宗淡水鱼产业技术体系(CARS-46-03)

通信作者:白俊杰, E-mail:jjbai@163.net

构进行分析,建立了一种简单可靠的鉴别草鱼雌核发育个体的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验鱼 自2010年5月—7月从湖北省老河子四大家鱼原种场、湖北省石首四大家鱼原种场和湖南省四大家鱼原种场采集一批草鱼种,建立草鱼基础群体。以紫外灭活的兴国红鲤(*Cyprinus carpio* var. *xingguonensis*)精子激活草鱼卵子,冷休克抑制第二极体排出的方法建立草鱼的异精雌核发育群体。以雌核发育的草鱼子代F₁群体为检测组(群体G),以基础群体构建的非雌核发育后代普通草鱼群体为对照组(群体W),2个群体随机各选取48尾样本,取尾鳍保存于95%的乙醇中备用。

微卫星分子标记 以7对鲤的SSR(MFW1、MFW2、MFW4、MFW5、MFW15、MFW17和MFW24)^[13]、2对草鱼磁珠富集法获得的SSR(HLJC118^[14]和HLJC148^[15])、5对草鱼的EST-SSR(4703、30977、23426、17329和25085)^[16]为检测标记,由生工生物工程(上海)(Sangon Biotech)股份有限公司合成。

试剂耗材 PCR常规试剂为天根生化科技(北京)有限公司的PCR反应试剂盒(KP201),其他生化试剂和耗材购自广州威佳科技有限公

司,化学试剂除注明外均为国产分析纯。

1.2 实验方法

基因组DNA提取 基因组DNA抽提采用天根生化科技(北京)有限公司的“血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒”,提取方法参考试剂盒说明书。用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA的完整性和纯度并用紫外分光光度计估计其浓度,用无菌双蒸水稀释至浓度为50 ng/ μ L, -20℃保存备用。

微卫星PCR扩增及筛选 SSR-PCR反应体系和程序如下:20 μ L反应体系含有10 \times buffer 10 μ L,上下游引物各0.5 μ L,基因组DNA 40 ng,灭菌双蒸水补足体积至20 μ L。PCR扩增测序为94℃预变性5 min;94℃30 s,50~60℃30 s,72℃30 s,30个循环;72℃再延伸7 min。PCR产物用12%非变性聚丙烯酰胺凝胶10 V/cm电泳2 h,0.1% AgNO₃染色(临用时配制,1 g AgNO₃定容1 L),1% NaOH显色(临用时配制,1 L显色液含10 g NaOH,1 g无水Na₂CO₃,5 mL 37%的甲醛)。美国Bio-rad的GelDoc XR凝胶成像系统成像并分析PCR产物条带的分子量大小。

以群体W为模版,从合成的14对SSR引物中共筛选出11对扩增稳定、条带清晰而特异的引物,其中MFW4、MFW17、MFW24为单态,8个多态SSR用于群体G与群体W的鉴别分析,其引物信息及扩增条件见表1。

表1 8个微卫星分子标记的引物信息
Tab.1 Information of eight microsatellite primers

位点 locus	引物序列(5'→3') primer sequence(5' to 3')	核心序列 core motif	退火温度/℃ annealing temperature	片段大小/bp size
MFW5	F:GAGATGCCTGGGGAAGTCAC R:AAAGAGAGCGGGTAAAGGAG	-	60	184~190
MFW15	F:CTCCTGTTTTGTTTTGTGAAA R:GTTTACAAGGTCATTTCCAGC	-	55	140~148
HLJC148	F:CAGACGGATGGATGGATG R:CTTTCAAATGTGGAGTCTTGC	(GATA)10	60	176~240
4703	F:AAGTGAGACTATGCTGATAAAACCG R:ATTGAAACAGATGCCTGCTTG	(AC)10	60	222~276
30977	F:AAAATCCCAGTGAGACAATC R:ATCCATAATGCCTTGC	(AC)14	55	214~234
23426	F:AAGGAACAGCATAAACCGAAAT R:GGAACCAAGCATCTGAAACTG	(AC)10	60	253~284
17329	F:ATTTCAAGTAGTAACCCATCAC R:ACAGGACCAATAAGGAACA	(AGAT)6	60	149~168
25085	F:TGTATCAGTAGTAGGCGGTTTA R:GTGTCGCTACCTCGCTAT	(AT)10	60	154~189

注:F.正向引物;R.反向引物

Notes:F. forward primer;R. reverse primer

数据统计与分析 (1) 使用 PopGene (Version 3.2) 软件统计微卫星基因座的等位基因数 (number of alleles, N_e), 观测纯合度 (observed homozygosity, Obs_Ho), 观测杂合度 (observed heterozygosity, Obs_He), 期望杂合度 (expected heterozygosity, Exp_He), Nei 氏^[17] 遗传相似度 (Nei's genetic identity) 及遗传距离 (genetic distance)。参照 Botstein 等方法^[18] 计算多态信息含量 (polymorphism information content, PIC)。

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \left(\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i P_j \right)$$

式中, P_i 、 P_j 分别为群体中第 i 和第 j 个等位基因频率, n 为某一基因座上等位基因数。

(2) 本研究是根据 SSR 位点的纯合度差异来评估该样本是属于群体 G 还是群体 W, 根据概率理论和相关文献^[19], 单个位点的理论鉴别概率 $P = Ho_g \times (1 - Ho_w) \times 100\%$, 其中 Ho_g 为该位点群体 G 的观测纯合度, Ho_w 为该位点群体 W 的观测纯合度。

n 个位点联合使用时的理论概率按如下公式计算:

$$P' = [1 - (1 - P_1)(1 - P_2) \cdots (1 - P_n)] \times 100\%$$

式中, P_1 为第 1 个位点的理论鉴别概率, P_2 为第 2 个位点的理论鉴别概率, P_n 为第 n 个位点的理论鉴别概率。

2 结果

2.1 微卫星分子标记的多态性分析

在普通群体中 PCR 扩增时, 14 对 SSR 引物中共筛选出 11 对扩增稳定、条带清晰而特异的引物, 其中 MFW4、MFW17、MFW24 为单态。用筛选出的 8 个多态 SSR 用于群体 G 与群体 W 共 96 尾草鱼样本的鉴别分析, 共获得 33 个等位基因 (其中, 群体 W 为 33 个等位基因, 群体 G 为 26 个等位基因), 每对引物检测到的等位基因数为 2~8 个, 平均为 4.13 个, 扩增片段大小为 140~284 bp。分析结果发现, 群体 G 的纯合度明显比群体 W 高, 平均观测纯合度由 0.203 1 提高到 0.716 1, 平均期望杂合度从 0.598 0 降低到 0.386 0, 平均多态信息含量由 0.558 2 降低到 0.357 2 (表 2)。

同时, 应用 PopGen32 软件进行 2 个群体的遗传相似度和遗传距离的评估, 发现这雌核发育群体与普通群体的遗传相似度为 0.873 3, 遗传距离为 0.135 4。

表 2 草鱼 8 个微卫星位点的遗传多样性参数

Tab. 2 Genetic diversity parameters of eight microsatellite loci in grass carp

位点 locus	等位基因数 numbers of allele		观测纯合度 observed homozygosity		观测杂合度 observed heterozygosity		期望杂合度 Nei's (1973) expected heterozygosity		多态信息含量 polymorphism information content (PIC)	
	W	G	W	G	W	G	W	G	W	G
	MFW5	4	3	0.270 8	0.208 3	0.729 2	0.791 7	0.630 9	0.565 1	0.614 6
MFW15	3	3	0.270 8	0.583 3	0.729 2	0.416 7	0.517 6	0.377 6	0.507 4	0.352 0
HLJC148	8	4	0.187 5	0.833 3	0.812 5	0.166 7	0.797 1	0.658 9	0.789 9	0.636 7
4703	5	5	0.125 0	0.833 3	0.875 0	0.166 7	0.695 7	0.626 7	0.662 1	0.571 7
30977	4	4	0.125 0	0.666 7	0.875 0	0.333 3	0.678 4	0.495 4	0.648 8	0.474 8
23426	2	2	0.020 8	0.916 7	0.979 2	0.083 3	0.499 8	0.079 9	0.374 9	0.076 7
17329	3	3	0.458 3	0.729 2	0.541 7	0.270 8	0.395 0	0.243 3	0.316 9	0.229 5
25085	3	2	0.166 7	0.958 3	0.833 3	0.041 7	0.569 4	0.040 8	0.508 0	0.039 9
均值 mean	4.13	3.25	0.203 1	0.716 1	0.796 9	0.283 9	0.598 0	0.386 0	0.552 8	0.357 2

2.2 异精雌核发育群体的鉴别分析

根据遗传纯合度的差异, 挑选出 5 个 SSR (23426、25085、4703、HJC148 和 30977), 进行 2 个群体的鉴别分析。由于草鱼为二倍体生物, 理论上 5 个 SSR 可在草鱼个体中扩增的等位基因数目从 5~10 个不等。实验结果发现, 每一尾普

通草鱼在 5 个 SSR 上扩增的实际等位基因数目为 8~10 个, 而每一尾雌核发育草鱼在 5 个 SSR 上扩增的实际等位基因数目为 5~7 个 (其中有 20 个个体在这 5 个位点均为纯合) (图 1)。可见, 联合应用这 5 个 SSR 标记可以 100% 区分这 48 尾雌核发育草鱼与 48 尾普通草鱼。

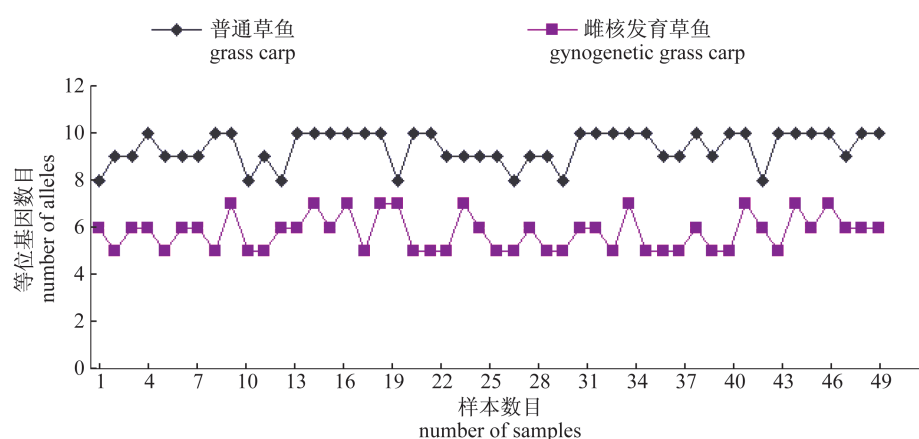


图 1 5 个微卫星标记在 2 个草鱼群体中扩增的等位基因数目

Fig. 1 Numbers of alleles amplified in two grass carp populations using five microsatellite loci

2.3 5 个微卫星位点鉴别雌核发育草鱼与普通草鱼的理论概率

根据雌核发育草鱼在微卫星位点的等位基因型数据,参照 Jamieson 等^[17]进行统计分析发现,

采用单个微卫星位点进行雌核发育草鱼鉴定时,成功鉴别的概率为 58.33%~89.76%。将 5 个位点中的 2、3、4、5 个位点联合使用时,鉴别的概率大大提高,最高可达 99.92% (表 3)。

表 3 5 个微卫星鉴定雌核发育草鱼的理论概率

Tab. 3 Theoretical probability of identification of gynogenesis grass carp using five microsatellite loci

位点 locus	观测纯合度 observed homozygosity		理论鉴别概率/% theory of probability calculation				
	普通草鱼 Ho_w	雌核发育草鱼 Ho_g	1 个位点	2 个位点	3 个位点	4 个位点	5 个位点
23426 (A)	0.020 8	0.916 7	A:89.76	AB:97.94 AC:97.23 AD:96.69 AE:85.73	ABC:99.44 ABD:99.33 ABE:99.14 ACD:99.10 ACE:98.84	ABCD:99.82 ABCE:99.77 ACDE:99.63	ABCDE:99.92
25085 (B)	0.166 7	0.958 3	B:79.86	BC:94.54 BD:93.49 BE:91.61	BCD:98.24 BCE:97.73 BDE:97.29	BCDE:99.27	
4703 (C)	0.125 0	0.833 3	C:72.91	CD:91.25 CE:88.71	CDE:96.36		
HJC148 (D)	0.187 5	0.833 3	D:67.71	DE:86.54			
30977 (E)	0.125 0	0.666 7	E:58.33				

3 讨论

3.1 微卫星标记的选择

在鱼类遗传多样性的研究报道中,很多学者对微卫星、同工酶、mtDNA、RAPD 等标记进行了比较分析,发现微卫星标记检测的遗传变异性明显高于其他标记^[21-22]。同时,由于微卫星标记遵循孟德尔遗传规律呈共显性遗传,在寻找特异标

记、系谱分析方面更显独到优势^[23]。用于遗传多样性分析的 8 个微卫星标记的 PIC 含量均值为 0.552 8(0.316 9~0.789 9),大部分为高度多态座位(PIC>0.5),这说明所选的微卫星座位较适合草鱼群体遗传多样性研究。另外,根据学者报道^[8-9],本研究中用了 7 个来自鲤的多态性微卫星标记,但其中 2 个在草鱼(与鲤同科不同属)中的扩增效果不佳,3 个表现为单态性,MFW5 和

MFW15 则可在草鱼群体中扩增出 3~4 个等位基因,说明在进行遗传多样性分析时不同物种的微卫星标记可以有一定的通用性。

3.2 雌核发育草鱼的遗传多样性分析

本实验采用的极体型雌核发育草鱼群体,是经紫外照射处理灭活的鲤精子激活卵子,温度休克法阻止卵子的第二次成熟分裂,抑制第二极体的排出,从而使染色体加倍。因为在第一次减数分裂时,同源染色体发生交叉互换,可能发生基因-着丝粒的重组,所以不能产生纯系,而只能获得高度纯合的近交系。实验结果发现,虽然雌核发育群体的遗传纯合度大大提高,平均观测纯合度为 0.716 1(与林凯东^[9]得到的结果 0.714,基本相同),但并没有获得完全纯合的雌核发育子代。孙效文等^[20]通过比较鲤和牙鲮 2 种雌核发育鱼类的基因型认为,抑制第二极体的雌核发育技术基本得不到纯合个体。1 次有丝分裂雌核发育相当于 8~10 个世代同胞兄妹交配,1 次有丝分裂加 1 次极体型雌核发育就可以获得纯系^[24]。获得完全纯合子代的难易也与物种的遗传特性有一定的相关性,经过连续两代人工诱导雌核发育可以建立起草鱼纯系^[8]。

由于雌核发育鱼的基因高度纯合,雌核发育后代往往表现为遗传物质缺失^[6,8,11-12],本实验中 8 个多态性的微卫星标记在普通草鱼群体中扩增出的等位基因位点总数为 33 个,而在雌核发育草鱼群体中扩增出的等位基因数目仅为 26 个,有 7 个位点均已丢失。这种雌核发育后的遗传丢失现象或多样性减少现象在其他物种中也有较多报道^[25-26]。

3.3 雌核发育草鱼与普通草鱼的鉴别

本实验采用 5 个微卫星分子标记联合使用,可以有效区分雌核发育草鱼与普通草鱼,在总计 96 尾鱼中检测鉴别的实际概率为 100%,通过概率分析得出理论鉴别概率为 99.92%,证明了根据群体遗传纯合度的差异,应用多态性微卫星分子标记可以简单、有效区分雌核发育群体与普通群体。该方法也可以推广到与之相似的高度近交群体的鉴别分析。本研究有效弥补了传统方法的不足,且操作简单、检测快速、检测成功率高、检测成本低,便于广泛推广使用。

刘敏等^[11]与张虹^[12]均采用 RAPD-SCAR 标记寻找雌核发育草鱼与普通草鱼群体的分子标

记,但 RAPD 标记转化为 SCAR 的成功率不高,而由于地理群体(或不同亚种)间存在遗传背景的差异,对于不同的基础群体,获得群体间通用的 SCAR 标记较难。微卫星分子标记与 RAPD 等分子标记相比,则具有准确性和重复性更高的优点,且在不同地理群体间通用性更高。

参考文献:

- [1] Ge X P, Miao L H. Current state and development suggestion on national conventional freshwater fishery industry [J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2011, 1(3): 22-31. [戈贤平, 缪凌鸿. 我国大宗淡水鱼产业发展现状与体系研究进展. 中国渔业质量与标准, 2011, 1(3): 22-31.]
- [2] Shen Y B, Zhang J B, Li J L. Advances in studies on genetic resources of grass carp [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(7): 369-373. [沈玉帮, 张俊彬, 李家乐. 草鱼种质资源研究进展. 中国农学通报, 2011, 27(7): 369-373.]
- [3] Gao Z X, Wang W M, Zhou X Y. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics [J]. Biotechnology Bulletin, 2007(2): 108-114. [高泽霞, 王卫民, 周小云. DNA 分子标记技术及其在水产动物遗传上的应用研究. 生物技术通报, 2007(2): 108-114.]
- [4] O'Connell M, Wright J M. Microsatellite DNA in fishes [J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1997, 7(3): 331-363.
- [5] Xiao Y M, Luo C. Isozymes analysis of the gynogenetic grass carps [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2004, 13(1): 74-77. [肖亚梅, 罗琛. 雌核发育草鱼同工酶分析. 激光生物学报, 2004, 13(1): 74-77.]
- [6] Chen J H, Huang M M, Zheng K, et al. RAPD analysis on genomic DNA of two artificial gynogenetic groups of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2004, 28(5): 471-477. [陈金辉, 黄明敏, 郑康, 等. 两个不同的人工雌核发育草鱼群体基因组 DNA 的 RAPD 分析. 水生生物学报, 2004, 28(5): 471-477.]
- [7] Liu Z H, Chen J H, Huang M M, et al. Genetic analysis on some RAPD loci for identification of molecular markers in grass carp genomic DNA [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2006, 30(3): 292-297. [刘正华, 陈金辉, 黄明敏, 等. 草鱼基因组 DNA 一些 RAPD 位点的遗传分析及分子标记筛选. 水生生物学报, 2006, 30(3): 292-297.]

- [8] Zheng K, Lin K D, Liu Z H, *et al.* Comparative microsatellite analysis of grass carp genomes of two gynogenetic groups and xiangjiang river group [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, 34 (4) : 321 - 330.
- [9] Lin K D. Microsatellite analyses of genomic studies on artificial gynogenetic grass carp and wild grass carp [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2003. [林凯东. 人工诱导雌核发育草鱼与普通草鱼基因组的微卫星分析. 长沙: 湖南师范大学, 2003.]
- [10] Zhao R R, Xiao Y M, Peng L Y, *et al.* Homozygosity analysis of two artificially gynogenetic group in grass carp [J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2008, 31 (2) : 110 - 114. [赵如榕, 肖亚梅, 彭亮跃, 等. 两个人工雌核发育草鱼群体遗传纯合性分析. 湖南师范大学自然科学学报, 2008, 31(2):110 - 114.]
- [11] Liu M, Xiao T Y, Sun N, *et al.* Preliminary report on SCAR marker for distinguishing allogynogenesis grass carp F_1 and common grass carp [J]. *Journal of Hydroecology*, 2013, 34 (3) : 94 - 100. [刘敏, 肖调义, 孙念, 等. 异精雌核发育草鱼 F_1 与普通草鱼的 SCAR 标记鉴别初报. 水生态学杂志, 2013, 34(3): 94 - 100.]
- [12] Zhang H. Establishment and main biological characterization of gynogenetic grass carp population [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2011. [张虹. 雌核发育草鱼群体的建立及其主要生物学特性研究 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2011.]
- [13] Crooijmans R P, van der Poel J J, Groenen M A M, *et al.* Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Animal Genetics*, 1997, 28 (2) : 129 - 134.
- [14] Li O, Zhao Y Y, Guo N, *et al.* Effects of sample size and loci number on genetic diversity in wild population of grass carp revealed by SSR [J]. *Zoological Research*, 2009, 30 (2) : 121 - 130. [李鸥, 赵莹莹, 郭娜, 等. 草鱼种群 SSR 分析中样本量及标记数量对遗传多度的影响. 动物学研究, 2009, 30(2):121 - 130.]
- [15] Li W S, Liu C, Lu C Y, *et al.* Isolation and characterization of tri- and tetranucleotide repeat microsatellites in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18 (4) : 742 - 750. [李文升, 刘翠, 鲁翠云, 等. 草鱼三、四核苷酸重复微卫星标记的分离与特征分析. 中国水产科学, 2011, 18(4):742 - 750.]
- [16] Wang J X, Yu L Y, Bai J J, *et al.* Development of EST-SSR markers and analysis of genetic diversity in five populations of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2011, 46 (5) : 24 - 32. [王解香, 于凌云, 白俊杰, 等. 草鱼 EST-SSR 标记及 5 个不同地域群体的遗传结构分析. 动物学杂志, 2011, 46(5):24 - 32.]
- [17] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89 (3) : 583 - 590.
- [18] Bostein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32 (3) : 314 - 331.
- [19] Jamieson A, Taylor S C. Comparisons of three peobability formulae for parentage exclusion [J]. *Animal Genetics*, 1997, 28 (6) : 397 - 400.
- [20] Sun X W, Zhang Y, Ji X, *et al.* The genotyping of progenies from two kinds gynogenetic techniques of two fish species [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32 (4) : 545 - 551. [孙效文, 张研, 季旭, 等. 鲤和牙鲮的两种雌核发育子代的基因型分析. 水产学报, 2008, 32(4):545 - 551.]
- [21] Desivignes J F, Laroche J, Durand J D, *et al.* Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio*) based on allozymes and microsatellites [J]. *Aquaculture*, 2001, 194 : 291 - 301.
- [22] Kohlrann K, Kersten P, Flajshans M. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations [J]. *Aquaculture*, 2005, 247 : 253 - 266.
- [23] Bartfai R, Egedi S, Yue G H, *et al.* Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers [J]. *Aquaculture*, 2003, 219 : 157 - 167.
- [24] Streisinger G, Walker C, Dower N, *et al.* Production of clones homozygous diploid zebra fish [J]. *Nature*, 1981, 291 : 293 - 296.
- [25] Zou G W, Pan G B, Wang D Q, *et al.* Genetic diversity of artificial gynogenetic silver carp and RAPD analysis of incorporation of heterologous genetic materials in gynogenetic progeny [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28 (2) : 180 - 185. [邹桂伟, 潘光碧, 汪登强, 等. 人工雌核发育鲢的遗传多样性及异源遗传物质整入的 RAPD 分析. 水生生物学报, 2004, 28(2):180 - 185.]

- [26] Zineb L, Chiharu K, Kagayaki M, *et al.* Genetic verification of induced gynogenesis and microsatellite-centromere mapping in the barfin flounder, *Verasper moseri* [J]. *Aquaculture*, 2007, 272:115 – 124.

Genetic structure analyses and microsatellite identification of gynogenetic grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

QUAN Yingchun¹, HAN Linqiang², BAI Junjie^{1*}, JIANG Peng¹,
YU Lingyun¹, FAN Jiajia¹, HU Chongjiang²

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. Nanhai Bai-rong Aquatic Varieties Co., Ltd., Foshan 528216, China)

Abstract: It is difficult to distinguish the gynogenetic fish from common one by morphology and physiology of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). To establish a molecular method of distinguishing the two groups, an artificially induced gynogenetic grass carp group was produced by activating grass carp eggs by the ultraviolet light (UV) irradiated common carp (*Cyprinus carpio*) sperm and subsequently blocking the release of the second polar body (PB2). Eight microsatellite markers were detected, among which five markers were selected to establish a microsatellite identification method. 33 alleles were amplified on 8 loci. The average value of observed homozygosity and polymorphism information content (PIC) were 0.203 1 and 0.552 8 in the common group, and those were 0.716 1 and 0.357 2 in the gynogenetic group, respectively. The genetic similarity between the two groups was 0.873 3. And then five microsatellite markers were used for genetic identification of gynogenetic grass carp. The total numbers of alleles at these five loci were between 5 and 7 for 48 gynogenetic grass carp, while those were between 8 and 10 for 48 common grass carp. So we can completely distinguish the two groups of grass carp according to the number of alleles amplified at the five loci. The probability of identification of the gynogenetic grass carp reached 99.92%, premised on the theory of probability calculation. In conclusion, the genetic homozygosity in the gynogenetic group was much higher than that in the common group, and therefore the gynogenesis technique was an effective method to quickly establish pure line and fix merits. Using polymorphic microsatellite markers can distinguish gynogenetic group (or highly inbred population) from common group according to the variation of genetic homozygosity.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; allogynogenesis; microsatellite marker; genetic structure; identification method

Corresponding author: BAI Junjie. E-mail: jjbai@163.net