

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16323

ENU 诱变草鱼及其雌核发育后代的微卫星遗传分析

王成龙, 郑国栋, 陈杰, 蒋霞云, 邹曙明

上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306

摘要: 为了获得雌核发育 ENU 诱变草鱼(*Cetpharyngodon idellus*)群体的相关遗传参数, 实验采用 Partec CyFlow 倍性分析仪测定 ENU 诱变草鱼群体(Q 群体)和雌核发育 ENU 诱变草鱼群体(E 群体)相对 DNA 含量分别为 24.02 和 23.80, 二者的 DNA 含量接近, 均为二倍体。选取 28 个微卫星标记对 Q 群体和 E 群体多样性进行了检测。结果表明, E 群体和 Q 群体的平均等位基因分别为 3.7143、5.1786, 平均有效等位基因分别为 2.1857、4.0028, 平均期望纯合度分别为 0.5122、0.2814, 平均期望杂合度分别为 0.4878、0.7186, 多态信息含量(PIC)平均值分别为 0.4282、0.6606。从个体在微卫星位点的纯合率分析, 在 E 群体中, 每个个体的纯合度均小于 1.00, 说明没有完全纯合的个体。从每个微卫星位点在群体的纯合率分析, 除了微卫星位点 5476, HLJC118 和 HLJC81 外, 其他位点的纯合度以不同的速率得到明显的提高。综上所述, 经过减数雌核发育方法, ENU 诱变草鱼群体的各微卫星位点的纯合度以不同的速率得到提升, 遗传多样性明显降低, 此方法可以获得纯合度较高的雌核发育 ENU 诱变草鱼个体, 为 ENU 诱变草鱼良种选育提供了重要的遗传数据资料。

关键词: 微卫星; 减数雌核发育; ENU 诱变草鱼; 遗传结构分析

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)05-1013-07

草鱼是我国大宗淡水鱼类中年产量最大的养殖品种^[1]。但近些年来由于盲目引种, 保种繁殖操作不当, 出现了生长遗传力减弱、杂合度降低、抗逆性差和抗病性能弱等严重问题^[2], 人工诱导雌核发育对于快速建立纯系, 在纯系中选育个体大、生长迅速和抗病能力强的优良新品种, 以及进行性别控制和开展遗传学的研究等, 都具有非常重要的意义^[3]。目前, 已有不少利用微卫星检测技术评价人工诱导雌核发育群体的报道, 王晓清等^[4]采用 6 对微卫星引物对冷休克法和静水压法诱导大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)雌核发育群体的遗传结构进行比较分析, 表明冷休克诱导效果明显好于静水压法, 雌核发育是促进基因纯合的一个有效途径; 叶小军等^[5]对大黄鱼异质雌核发育一代群体和与二代群体微卫星位点的纯合度

进行分析, 表明人工诱导异质雌核发育可大大加速大黄鱼大多数基因位点纯合, 是快速建立高纯品系的有效手段; 唐首杰等^[6]研究表明, 连续多代人工诱导减数雌核发育可大大加速团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)大多数基因位点的纯合; 全迎春等^[7]研究表明, 雌核发育技术对草鱼群体的遗传结构改变较大, 是快速建立纯系、固定优良性状的有效手段。

本研究以 5 龄长江水系 ENU 诱变草鱼为亲本, 通过冷休克抑制第二极体排出的方法得到雌核发育 ENU 诱变草鱼群体, 利用 28 个微卫星标记对 ENU 诱变草鱼群体和雌核发育 ENU 诱变草鱼群体遗传结构进行分析, 从每个个体基因纯合率和每个微卫星位点纯合率的角度探讨人工诱导雌核发育对 ENU 诱变草鱼基因纯合的效果, 以期为

收稿日期: 2016-10-27; 修订日期: 2017-02-16.

基金项目: 国家 863 计划主题项目(2011AA100403).

作者简介: 王成龙(1989-), 男, 硕士, 研究方向为动物遗传育种与繁殖. E-mail: long836597116@hotmail.com

通信作者: 邹曙明, 教授. Tel: 021-61900345; E-mail: smzou@shou.edu.cn

ENU 诱变草鱼遗传改良和草鱼良种选育提供重要的分子遗传学数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验繁殖亲本为上海海洋大学农业部团头鲂育种中心保有的 5 龄长江水系 ENU 诱变优良草鱼, 均约 20 kg。实验组为以 UV 灭活(20 min)团头鲂精子激活 ENU 诱变草鱼亲本卵子, 受精后 2 min, 4~6℃冷休克 12 min 抑制第二极体排出, 建立 ENU 诱变草鱼雌核发育群体(E 群体), 取样 25 尾。对照组为 ENU 诱变草鱼自交后代群体(Q 群体), 取样 30 尾。每尾剪取少许鱼鳍放入 95% 酒精中保存于-20℃用于提取基因组。

1.2 ENU 诱变草鱼雌核发育个体的倍性检测

饲养 3 个月后, 分别取 E 群体和 Q 群体个体各 5 尾, 从尾静脉采血, 然后取 1 μL 血样加入到 1 mL DAPI 染液中, 避光染色 30~60 s, 用 500 目过滤管过滤到上样管内, 然后用 Partec CyFlow 倍性分析仪(产地德国)进行 DNA 含量检测。

1.3 基因组 DNA 制备

使用北京天根生物科技有限公司的海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型), 提取鳍条基因组 DNA。提取完成后, 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 DNA 质量和浓度, -20℃保存备用。

1.4 PCR 扩增及电泳检测

本研究采用 28 对微卫星引物, 其中 8 对引物 EST0363、EST1573、EST3746、EST793、EST3643、EST0307、EST0426、EST3860 是本实验室开发的草鱼微卫星引物^[8], 其余 20 对引物设计分别参考文献[9~14], 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 引物特性见表 1。

PCR 扩增反应体系为 10 μL, 包含 5 μL 含染料的 2×Taq PCR MasterMix(Taq DNA 聚合酶: 0.1 U/μL; MgCl₂: 4 mmol/L; dNTPs: 各 0.4 mmol/L, 上下游引物各 0.5 μL(10 μmol/L), 0.5 μLDNA(30~50 ng), 3.5 μL ddH₂O。PCR 扩增反应在 Eppendorf Mastercycler ep gradients 型 PCR 仪上进

行, 反应程序为: 94℃预变性 5 min, 94℃ 30 s, 51~66℃(可根据表 1 进行调整) 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环, 最后 72℃延伸 10 min。

PCR 产物在 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测, 电泳结束后, 参照张倩倩等^[15]的方法进行染色, 显影。最后将胶片平铺于观片灯箱上, 用数码相机照相保存。

1.5 数据统计与分析

将电泳图谱中每个条带视作该微卫星位点的 1 个等位基因, 根据每个个体产生的条带位置确定基因型。用 Popgene(Version 1.32)软件进行分析, 计算每个微卫星座位在群体中的等位基因数(number of alleles)、杂合度(heterozygosity)和纯合度(homozygosity)等指标。多态信息含量(polymeric information content, PIC)参照 Botstein 等的方法^[16]计算

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

式中, P_i 、 P_j 分别为第 i 个和第 j 个等位基因的频率, n 为等位基因数目。

2 结果与分析

2.1 雌核发育 ENU 诱变草鱼个体的倍性检测

Partec CyFlow 倍性分析仪测定 E 群体和 Q 群体的相对 DNA 含量。结果显示, E 群体的相对 DNA 含量为 23.80, 与 Q 群体(24.02)的 DNA 含量接近(表 2)。结果证明雌核发育 ENU 诱变草鱼具有与 ENU 诱变草鱼相同的倍性, 均为二倍体。

2.2 雌核发育 ENU 诱变草鱼群体的遗传多样性

采用 28 个多态性 SSR 位点在 E 群体和 Q 群体中检出的等位基因数、有效等位基因数、期望纯合度、期望杂合度和多态信息含量见表 3。由表 3 可知, E 群体和 Q 群体的平均等位基因数分别为 3.7143、5.1786; 平均有效等位基因数分别为 2.1857、4.0028。在 2 个草鱼群体中, E 群体与 Q 群体相比, 平均期望纯合度由 0.2814 提高到 0.5122; 平均期望杂合度由 0.7186 下降到 0.4878; 平均多态信息含量由 0.6606 下降到 0.4282。从这些遗传参数中可得出, ENU 诱变草鱼的遗传多样性明显降低。

表1 微卫星引物特征
Tab. 1 Characteristics of microsatellite primers

序号 sequence number	位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	重复序列 repeat motif	退火温度/℃ annealing temperature	片段大小/bp fragment size
1	5476	F:GCTAACACTCCTTACTATCAT R:TTGAAACGCTGATTGAGA	(ATCT) ₆	54	298–343
2	17329	F:ATTCAGTAGTAACCCATCAC R:ACAGGACCAATAAGGAACA	(AGAT) ₆	54	149–168
3	EST0426	F:AAACAGCTGCTACCCCTGGAA R:TTGCCAGAAGAGCAAATCA	(CA) ₅ (CA) ₄	57	145–188
4	EST1573	F:GTCATACTATCAACCAGCAA R:GGAACATCCACCTGAACCT	(AC) ₁₀ (AC) ₄	60	162–206
5	HLJC165	F:TCAACTCGCTCTCAAATTCTCA R:AGGGTGTGTGGGCTATGTGT	(CTAT) ₂₅	60	190–256
6	EST3643	F:GGCTGGATAATATCTTGG R:TAACCAGTGCATTCTT	(GA) ₁₂ (G) ₆	58	169–217
7	HLJC20	F:TCACTTGCAGTCCCTCACAC R:AGAGACATGCCCTCTTGG	(GT) ₁₉ (GA) ₁₂	60	167–192
8	HLJC145	F:CACACCTGAACTGAATGACGA R:TGGATTATCGAATGCTGCTG	(ATCT) ₆	65	188–211
9	HLJC222	F:GCATAACACGGTCTGCCTCT R:GGATGGATGGATGCTTGAGT	(TATC) ₇	61	200–244
10	25085	F:TGTATCAGTAGTAGGCGGTTA R:GTGTCGCTACCTCGCTAT	(AT) ₁₀	61	156–210
11	EST793	F:TGAATAAGATGAGATGGAG R:TTCTGGCTACAGTAGTGAT	(CT) ₆ (CA) ₂₉	58	120–240
12	EST3746	F:TCAGGCAGAAGGCAGATA R:CCTCAGTGTGAATCCAG	(CA) ₁₀ (AC) ₄	63	80–190
13	HLJC26	F:GCTAACCGCAAACATGAGA R:GTTAAAGCCATGCTGCAAT	(GT) ₁₇	65	205–223
14	HLJC137	F:CACCCGCTGACATTCTGATT R:AGCAATTATGATGCCCTCG	(ATCT) ₆ (TCCA) ₅	62	221–286
15	HLJC151	F:GATCGACAGACAGACGGACA R:TGCTGGTTAAGATGGTTAGCA	(ATAG) ₁₁ (AGAA) ₁₀	60	104–167
16	EST0307	F:CCGCCAGCTTGCCTCA R:CGTGTAGTTGGTAGCAGTCCCT	(CAG) ₅ (CAA) ₈ (CAG) ₆	62	140–270
17	EST0363	F:CAGTCATACTATCAACCAGCAA R:TAAATGAGGACGGCAACACA	(AC) ₁₁ (AC) ₄	65	260–360
18	CcaI2	F:ACCGTCCGGCTGACATTAGAGC R:ACAACCCCCGATCCCCAACACAA	—	66	233–276
19	GM18	F:GGCTTTCTCATTCCATTGTTG R:GTGGGTTACTGAATAAGGTTG	(CA) ₆₃	62	171–209
20	HLJC118	F:ACAGCACATTCAAGGAGGAC R:AGCAAAGCAGCAAACCTCTC	(GA) ₅₀	61	135–186
21	HLJC57	F:GACCTGGCCCTGTGTTCATCT R:TCGACGATCTCTGCATCATC	(CT) ₃₁ (GT) ₂₆	62	156–198
22	HLJC72	F:AGAGAGCAGCCGTTGACACT R:TACTCCCCAGCTGTTCTG	(GT) ₄₁ (GA) ₈	57	103–194
23	HLJC148	F:CAGACGGATGGATGGATG R:CTTCAAAATGTGGAGTCTTGC	(GATA) ₁₀	59	160–201
24	HLJC9	F:TTGAAGAGGGCCAATGGTTA R:TGCACGACACAAATGAAAAA	(CT) ₂₄	60	310–378
25	4703	F:AAGTGAGACTATGCTGATAAAACCG R:ATTGAAACAGATGCCTGCTTG	(AC) ₁₀	60	185–269
26	EST3860	F:AATGGACCAAGATGAGGAA R:TCAGGCAGAAGGCAGATA	(TG) ₁₁	60	325–362
27	HLJC81	F:CCAGCTCTGCCCTACCATC R:TGCATTTCGTTGGACACAT	(CT) ₁₈	55	156–202
28	GM03	F:TGTATTTGAGTAACCAC R:TTGGGTTCTGATTCTATTTC	(CA) ₅₃	51	145–206

注: F 为正向引物; R 为反向引物。

Note: F denotes forward primer; R denotes reverse primer.

表 2 ENU 诱变草鱼自交后代及雌核发育群体的相对 DNA 含量统计

Tab. 2 Comparison of relative DNA content of offspring and gynogenetic population of ENU mutagenesis grass carp

样品 sample	倍性 ploidy	平均检测细胞数 cell number	相对 DNA 含量 relative DNA content
雌核发育 ENU 诱变草鱼 gynogenetic ENU mutagenesis grass carp	二倍体 diploid	2903	23.80±1.19
ENU 诱变草鱼自交后代群体 ENU mutagenesis grass carp offspring	二倍体 diploid	3012	24.02±1.22

表 3 雌核发育 ENU 诱变草鱼群体的遗传多样性参数

Tab. 3 Genetic diversity parameters of the gynogenetic ENU mutagenesis grass carp group(E) and the ENU mutagenesis grass carp group(Q)

位点 locus	等位基因数 number of allele		有效等位基因数 number of effective alleles		期望纯合度 expected homozygosity		期望杂合度 expected heterozygosity		多态信息含量 polymorphism information content	
	E	Q	E	Q	E	Q	E	Q	E	Q
I7329	3	3	1.8685	2.4862	0.5257	0.3921	0.4743	0.6079	0.4195	0.5258
5476	3	3	1.5964	1.5424	0.6424	0.6188	0.3576	0.3812	0.3172	0.3191
EST0426	2	3	1.3172	2.1713	0.7543	0.4514	0.2457	0.5486	0.2118	0.4761
EST1573	3	3	1.7385	2.9032	0.5665	0.3333	0.4335	0.6667	0.3942	0.5906
EST3643	5	8	1.9440	5.9603	0.5045	0.1537	0.4955	0.8463	0.4372	0.8116
HLJC20	4	6	2.3810	5.5901	0.4082	0.1650	0.5918	0.8350	0.4976	0.7957
HLJC222	2	4	1.2677	2.7231	0.7845	0.3565	0.2155	0.6435	0.1889	0.5706
EST793	4	4	1.7385	3.7344	0.5665	0.2554	0.4335	0.7446	0.3942	0.6829
EST3746	3	4	1.8355	2.9851	0.5355	0.3237	0.4645	0.6763	0.4009	0.6035
HLJC26	5	7	2.1151	5.2023	0.4620	0.1785	0.5380	0.8215	0.4748	0.7795
HLJC137	5	8	3.8941	6.4516	0.2416	0.1407	0.7584	0.8593	0.6979	0.8256
HLJC151	5	7	2.8027	3.4091	0.3437	0.2814	0.6563	0.7186	0.5930	0.6627
EST0307	4	9	1.8968	5.9603	0.5176	0.1537	0.4824	0.8463	0.4357	0.8128
EST0363	5	7	1.6067	5.4054	0.6147	0.1712	0.3853	0.8288	0.3604	0.7899
Cca12	2	3	1.2677	2.699	0.7845	0.4311	0.2155	0.5689	0.1889	0.4610
GM18	3	3	1.8437	2.4096	0.5331	0.4051	0.4669	0.5949	0.3834	0.5023
HLJC118	5	7	4.6125	6.2937	0.2008	0.1446	0.7992	0.8554	0.7480	0.8206
HLJC57	3	3	1.9440	2.4862	0.5045	0.3921	0.4955	0.6079	0.3856	0.5169
25085	2	4	1.8142	3.8877	0.5420	0.2446	0.4580	0.7554	0.3481	0.6948
HLJC148	2	6	1.5746	3.6735	0.6278	0.2599	0.3722	0.7401	0.2983	0.6883
HLJC9	2	4	1.3676	3.5363	0.7257	0.2706	0.2743	0.7294	0.2327	0.6664
4703	3	3	1.5413	2.1127	0.6416	0.644	0.3584	0.5356	0.3020	0.4668
EST3860	4	4	2.3946	2.8169	0.4057	0.3441	0.5943	0.6559	0.5246	0.5768
HLJC81	5	6	4.3860	4.8387	0.2122	0.1932	0.7878	0.8068	0.7334	0.7620
GM03	6	7	2.3364	6.4286	0.4163	0.1412	0.5837	0.8588	0.4824	0.8249
HLJC145	3	5	1.3858	3.8544	0.7159	0.2469	0.2841	0.7531	0.2558	0.6944
HLJC165	4	6	2.7352	4.8649	0.3527	0.1921	0.6473	0.8079	0.5699	0.7628
HLJC72	6	7	3.9936	6.0811	0.2351	0.1503	0.7649	0.8497	0.7121	0.8134
平均 mean	3.7143	5.1786	2.1857	4.0028	0.5122	0.2814	0.4878	0.7186	0.4282	0.6606

2.3 雌核发育 ENU 诱变草鱼的纯合性评价

从每个个体在微卫星位点的纯合率看(图 1), E 群体中个体的纯合度在 0.50~0.82, Q 群体中个

体的纯合度在 0.07~0.29。E 群体中个体的纯合度均小于 1.00, 说明没有完全纯合的个体, 同时 Q 群体中个体的纯合度均大于 0.00。从每个微卫星

位点在群体的纯合率看(图 2),除了位点 5476, HLJC118 和 HLJC81 外,其他位点的纯合度以不同的速率得到提高。

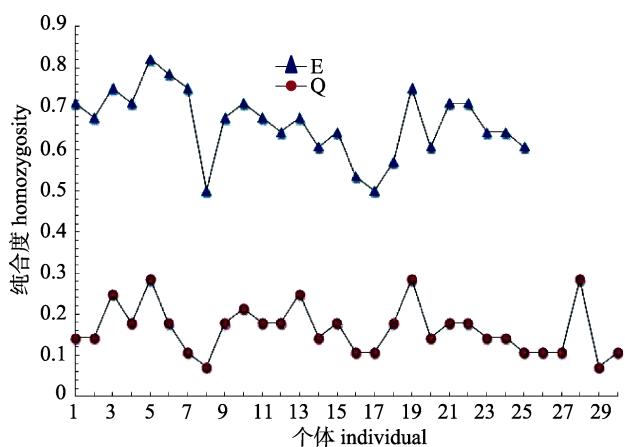


图 1 雌核发育 ENU 诱变草鱼群体(E)和 ENU 诱变草鱼群体(Q)每个个体的纯合率

Fig. 1 Homozygosity of the individuals in the gynogenetic ENU mutagenesis grass carp group(E) and ENU mutagenesis grass carp group(Q)

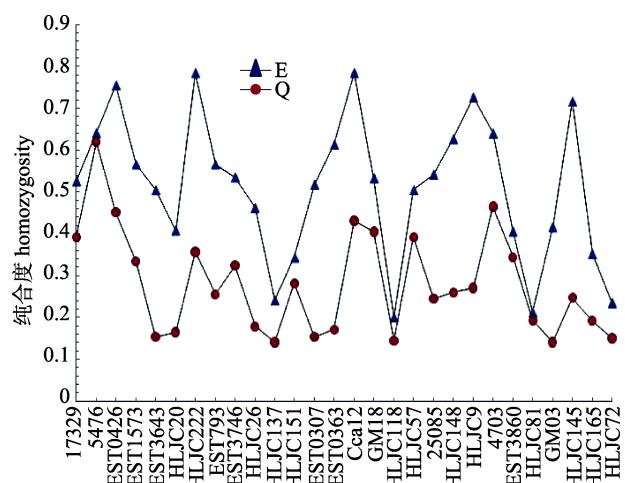


图 2 雌核发育 ENU 诱变草鱼群体(E)和 ENU 诱变草鱼群体(Q)在各个微卫星位点的纯合率

Fig. 2 Homozygosity of microsatellite loci in the gynogenetic ENU mutagenesis grass carp group(E) and ENU mutagenesis grass carp group(Q)

3 讨论

本研究采用静脉抽血,以流式细胞计数测定 DNA 含量的方法鉴定雌核发育个体的倍性,雌核发育 ENU 诱变草鱼与 ENU 诱变草鱼的相对 DNA 含量的比值为 0.991 : 1,与赵如榕等^[17]在雌核发育草鱼及亲本倍性研究中雌核发育草鱼和普通草

鱼的相对 DNA 含量的比值相一致,和理论比值没有显著性差异,因此表明雌核发育 ENU 诱变草鱼为二倍体。

E 群体的等位基因总数、有效等位基因总数、平均期望杂合度和平均多态信息含量都低于 Q 群体,表明 ENU 诱变草鱼雌核发育群体的遗传多样性明显低于自交群体。本研究通过冷休克抑制第二极体排出的方法获得雌核发育 ENU 诱变草鱼群体,由于卵细胞在进行第一次减数分裂的过程中同源染色体之间会发生联会和交换重组,导致只能获得高纯度的雌核发育后代^[18]。实验结果表明在 28 个微卫星位点中,E 群体中的个体具有 14~23 个纯合位点,占总位点的 50.00%~82.14%,平均每个个体有 18.64 个位点纯合,由此可见 ENU 诱变草鱼雌核发育群体中没有完全纯合的个体;而 Q 群体中个体具有 2~8 个纯合位点,占总位点的 7.14%~28.57%,平均每个个体有 4.60 个位点纯合,表明雌核发育 ENU 诱变草鱼群体的纯合度得到明显提高。与 Q 群体相比较,位点 5476 的纯合度提高了 3.81%,位点 HLJC81 的纯合度提高了 9.83%;而位点 EST3643、EST0307、EST0363 的纯合度提高了 2.28~2.59 倍;位点 HLJC20、HLJC222、EST793、HLJC26、25085、HLJC148、HLJC9、GM03、HLJC45 的纯合度提高了 1.20~1.90 倍;其他 14 个位点的纯合度提高了 17.90%~81.98%,表明不同微卫星位点的纯合速率差异很大,推测这与不同基因位点与着丝点之间发生重组的概率有关。E 群体的等位基因位点总数为 103 个,相对于 Q 群体(144)减少了 41 个等位基因位点,这种经过雌核发育导致遗传物质缺失现象已有较多的报道^[19~21]。

从实验结果看,本研究获得雌核发育 ENU 诱变草鱼群体的纯合度不高,但无论从个体还是群体的纯合度比自交群体高出许多,遗传多样性得到明显降低。由于雌核发育群体的遗传物质来源于母本,基因表达趋于一致,具有高度的遗传同质性,因而从雌核发育群体中挑选纯合度高的个体进行第二次雌核发育手段,可为雌核发育 ENU 诱变草鱼群体良种选育和遗传研究提供有效途径,从而建立更好的育种材料。

参考文献:

- [1] 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[J]. 中国农学通报, 2011, 27(7): 369–373.]
- [2] Fisheries Newsletters[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2010, 37(2): 102–104. [渔业简讯[J]. 水产科技情报, 2010, 37(2): 102–104.]
- [3] 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.]
- [4] Wang X Q, Liu X C, Wang Z Y, et al. Microsatellite marker analysis of gynogenesis by artificial induction in *Pseudosciaena crocea*[J]. Hereditas, 2006, 28(7): 831–837. [王晓清, 刘小春, 王志勇, 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.]
- [5] Ye X J, Liu X D, Wang Z Y, et al. Analysis of genetic homozygosity and diversity of two successive generation meio-gynogenetic population in *pseudosciaena crocea* using microsatellite markers[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 144–151. [叶小军, 刘贤德, 王志勇, 等. 大黄鱼连续两代雌核发育群体的微卫星标记分析[J]. 水生生物学报, 2010, 34(1): 144–151.]
- [6] Tang S J, Li S F, Cai W Q. Analysis of genetic homozygosity and diversity of three successive generations of meio-gynogenetic population in *Megalobrama amblycephala* using microsatellite markers[J]. Freshwater Fisheries, 2014, 44(2): 3–8. [唐首杰, 李思发, 蔡完其. 团头鲂连续三代减数雌核发育群体遗传变异的微卫星分析[J]. 淡水渔业, 2014, 44(2): 3–8.]
- [7] Quan Y C, Han L Q, Bai J J, et al. Genetic structure analyses and microsatellite identification of gynogenetic grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(11): 1–7. [全迎春, 韩林强, 白俊杰, 等. 雌核发育草鱼的遗传结构分析和微卫星鉴别方法的建立[J]. 水产学报, 2014, 38(11): 1–7.]
- [8] Zheng G D, Chen J, Zou S M, et al. Detection of EST-SSRS markers and genetic structure of different populations of grass carp in Yangtze river system[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(5): 1003–1012. [郑国栋, 陈杰, 邹曙明, 等. 长江草鱼不同群体 EST-SSR 多态性标记的筛选及其遗传结构分析[J]. 水生生物学报, 2015, 39(5): 1003–1012.]
- [9] Wang J X, Yu L Y, Bai J J, et al. Key laboratory of tropical and subtropical fish breeding and cultivation[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[J]. 动物学杂志, 2011, 46(5): 24–32.]
- [10] Zhou P, Zhang Y, Sun X W, et al. Genetic analysis of grass carp populations from three major watersheds based on 26 microsatellite markers[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(5): 1011–1020. [周盼, 张研, 孙效文, 等. 基于 6 个微卫星标记的三江水系草鱼遗传多样性分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1011–1020.]
- [11] 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[J]. 动物学杂志, 2011, 46(5): 24–32.]
- [12] Li W S, Liu C, Sun X W, et al. Isolation and characterization of tri- and tetranucleotide repeat microsatellites in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(4): 742–750. [李文升, 刘翠, 孙效文, 等. 草鱼三、四核苷酸重复微卫星标记的分离与特征分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(4): 742–750.]
- [13] Liao X L, Yu X M, Tan D Q, et al. Microsatellite DNA analysis of genetic diversity of grass carp in Yangtze River system[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(2): 113–118. [廖小林, 俞小牧, 谭德清, 等. 长江水系草鱼遗传多样性的微卫星 DNA 分析[J]. 水生生物学报, 2005, 29(2): 113–118.]
- [14] Bartfai R, Egedi S, Yue G H, et al. Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers[J]. Aquaculture, 2003, 21(9): 157–167.
- [15] Zhang Q Q, Jiang X Y, Zou S M, et al. Establishment of DNA fingerprinting and analysis on genetic structure of different *Parabramis* and *Megalobrama* populations with microsatellite[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(1): 15–22. [张倩倩, 蒋霞云, 邹曙明, 等. 不同鳊鲂鱼类群体微卫星 DNA 指纹图谱的构建和遗传结构分析[J]. 水产学报, 2014, 38(1): 15–22.]
- [16] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Human Genet, 1980, 32(3): 314–331.
- [17] Zhao R R, Xiao Y M, Liu Y, et al. Ploidy research of the gynogenetic grass carps and its parents[J]. Life Science Research, 2008, 12(2): 100–103. [赵如榕, 肖亚梅, 刘筠, 等. 雌核发育草鱼及亲本倍性研究[J]. 生命科学研究, 2008, 12(2): 100–103.]
- [18] Francescon A, Barbaro A, Bertotto D, et al. Assessment of

- homozygosity and fertility in meiotic gynogens of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)[J]. Aquaculture, 2005, 243: 93–102.
- [19] 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[J]. 水生生物学报, 2004, 28(5): 471–477.]
- [20] 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]. J Genet Genom, 2007, 34(4): 321–330.
- [21] 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. 人工雌核发育鲤的遗传多样性及异源遗传物质整入的 RAPD 分析[J]. 水生生物学报, 2004, 28(2): 180–185.]

Microsatellite genetic analysis of ENU mutagenesis grass carp and gynogenesis offspring group

WANG Chenglong, ZHENG Guodong, CHEN Jie, JIANG Xiayun, ZOU Shuming

Key Laboratory of Genetic Resources for Freshwater Aquaculture and Fisheries, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: This study aimed to obtain the genetic parameters of gynogenetic ENU-induced mutagenesis in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). The relative DNA content in grass carp with ENU-induced mutagenesis (Q group) and gynogenetic ENU-induced mutagenesis (E group) was 24.02 and 23.80, respectively. The Partec CyFlow ploidy analyzer determined that the values were close and that the mutants were diploid. We selected 28 microsatellite markers to investigate the genetic diversity of the two carp groups. Respectively, the E and Q groups had average alleles of 3.7143 and 5.1786, average effective alleles of 2.1857 and 4.0028, average expected homozygosity of 0.5122 and 0.2814, average expected heterozygosity of 0.4878 and 0.7186, and average polymorphism information content (PIC) of 0.4282 and 0.6606. The homozygous rate analysis of microsatellite loci indicated that the E group did not contain completely homozygous individuals, as all exhibited a degree of purity <1.00. The analysis also showed that homozygosity in several microsatellite loci (including 5476, HLJC81, HLJC118) improved significantly at different rates. In summary, meiotic gynogenesis of ENU-induced mutagenic grass carp improved microsatellite homozygosity at different rates and significantly decreased genetic diversity. Thus, this method yields highly homozygous individuals that can provide important genetic data for improved selection of ENU-induced mutagenic grass carp.

Key words: microsatellite; meiotic gynogenesis; ENU-induced mutagenic grass carp; genetic structure analysis

Corresponding author: ZOU Shuming. E-mail: smzou@shou.edu.cn