DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17448

雌核发育草鱼群体及两个普通草鱼群体的微卫星遗传分析

朱树人, 孟庆磊, 安丽, 李宁, 张龙岗, 杨玲, 许国晶, 付佩胜

山东省淡水渔业研究院, 山东省淡水水产遗传育种重点实验室, 山东 济南 250017

摘要:以草鱼(Ctenopharyngodon idellus)养殖群体(YZ)为母本,以紫外线灭活的鲤鱼精子激活草鱼卵子,冷休克抑制第二极体排出的方法诱导获得异精雌核发育草鱼群体(CH)。利用 12 对微卫星引物对 YZ 群体、YS (扬州广陵长 江系家鱼原种场引进草鱼群体)群体、CH 群体进行 PCR 扩增并分析,共检测出 194 个等位基因,其中 75.8 个有效 等位基因。YZ 群体、YS 群体、CH 群体的平均等位基因数依次为 13.0、12.6、4.7;平均有效等位基因数依次是 7.7、6.6、2.3;平均期望杂合度依次为 0.87、0.82、0.56;平均多态信息含量依次为 0.84、0.79、0.49。从每个个体 在微卫星位点的纯合率看,YZ 群体中个体的纯合度在 0.00~0.33,YS 群体中个体的纯合度在 0.00~0.42,CH 群体中 个体的纯合度在 0.42~0.92。这表明与 YZ 群体和 YS 群体相比,CH 群体的遗传多样性显著下降,并且在每个位点 的纯合率 CH 群体均高于普通草鱼群体,表明人工诱导减数雌核发育可加速草鱼大多数基因位点的纯合,是快速 建立高纯品系的有效手段。同时,本研究筛选并利用微卫星位点组合建立了雌核发育草鱼子代不同家系及其母本 亲缘关系的简易、高效鉴别技术,旨在为雌核发育草鱼标记辅助育种打下基础。

关键词:微卫星;草鱼;雌核发育;遗传分析中图分类号: S917文献标志码: A

草鱼(Ctenopharyngodon idellus)是中国主要 淡水养殖种类之一,据《中国渔业统计年鉴》, 2016 年养殖产量为 589.88 万 t,位居中国淡水养 殖鱼类产量首位^[1]。然而,长期以来,养殖草鱼因 没有经过系统地选育与遗传改良,经济性状逐渐 退化,赤皮、肠炎、烂鳃三大病始终困扰着其产 业发展^[2]。加之草鱼性成熟需要 4~5 年,应用传统 方法选育草鱼育种周期太长,培育一个新品种需 20 年以上,导致目前草鱼尚无国家审定的良种, 严重影响了其养殖产业的健康可持续发展。

人工诱导雌核发育技术是快速建立纯系、固 定优良性状的有效手段。近年来,雌核发育技术 已成功应用于鲤科、鳅科、鲑科、鲆科、鲽科等 多种经济鱼类中获得单性后代群体^[3-4]。早在 1985

文章编号:1005-8737-(2018)06-1236-09

年,中国水产科学研究院淡水渔业研究中心科研 人员采用紫外线灭活的鲤鱼精子刺激草鱼卵子, 并利用冷休克法获得了雌核发育草鱼苗种,对雌 核发育草鱼及其亲本几种同工酶进行了比较研究, 证实了雌核发育后代为全雌性遗传^[5]。随着分子 生物学技术的发展,RAPD、SSR等分子标记被用 于对雌核发育草鱼进行了遗传研究,结果表明雌 核发育草鱼群体的纯合度远高于普通草鱼群体, 雌核发育可加速大多数基因位点的纯合,有利于 固定其优良性状^[6-9]。

本研究利用紫外线灭活的鲤鱼精子激活草鱼 卵子,采用冷休克抑制第二极体排出的方法诱导 出草鱼雌核发育二倍体子代,利用12对微卫星位 点对亲本群体(YZ)、对照群体(YS)、雌核发育群

- 作者简介: 朱树人(1986-), 男, 博士, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: zhshr229@163.com
- 通信作者: 孟庆磊, 副研究员. E-mail: qingleimeng@126.com

收稿日期: 2017-12-25; 修订日期: 2018-04-22.

基金项目:国家自然科学基金项目(31440090);国家大宗淡水鱼产业技术体系济南综合试验站项目(CARS-45-43);山东省农业 良种工程项目(2014lz042);山东省现代农业产业技术体系鱼类创新团队项目(SDAIT-14-011-01);山东省重点研发 计划项目(2018GNC110034).

体(CH)进行扩增并分析遗传结构,研究其群体的 遗传多样性、群体的纯合性、母本及雌核发育子 代的亲权鉴别,以期为利用雌核发育技术进行草 鱼良种选育提供基础数据和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料和方法

雌核发育母本来源于 2015 年 2 月从山东省微山县采集的一批养殖草鱼群体(YZ); 2015 年 4 月 从国家级扬州广陵长江系家鱼原种场引进一批草 鱼群体(YS)。

遗传灭活:选取成熟度较好的普通雄性鲤鱼, 轻轻挤压腹部,收集精液。将精液与预冷 Hank's 液按1:4混合均匀,加入直径为9 cm的塑料培养 皿,轻轻震荡使之平铺在培养皿底部,精子稀释 液厚度控制在 0.1~0.2 mm。将盛精皿置于紫外照 射装置内的摇床上,摇床振荡频率为40 r/min,紫 外灯管为 2 支 18 W 紫外灭菌灯(254 nm),进行精 子遗传灭活 50 min。

卵子获取及雌核发育诱导:从 YZ 群体中挑

选成熟度好的 4 尾雌性草鱼注射催情素,达到效 应期后,进行人工挤卵。采用干法授精法,将草鱼 卵子挤入干燥的脸盆中,立刻加入遗传失活的鲤 鱼精子稀释液,用干燥的鹅毛轻轻搅拌使其充分 混匀,再加水启动卵子发育,受精后 2 min,冷休 克4℃处理 10 min,孵化出鱼苗,建立草鱼异精雌 核发育群体(CH)。

1.2 基因组 DNA 提取

从 YZ、YS、CH 群体中采集胸鳍样本各 30 尾,活体剪取胸鳍小块保存于无水乙醇,采用苯 酚法从鳍条中提取总 DNA,用分光光度计检测其 浓度和纯度,-20℃保存备用。

1.3 微卫星 PCR 扩增及分型

本研究所采用微卫星标记来自于草鱼遗传连锁图谱^[10]及已开发的标记^[11]。各微卫星标记的引物由上海生工生物技术服务公司合成,上游引物5′端加 FAM 或 HEX 荧光标记(表 1)。

PCR 扩增体系为 25 μL, 包括 10× PCR Buffer 2.5 μL、MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μL、dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL、TaqDNA 聚合酶(2.5 U/μL)

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	复性温度/℃ annealing temperature	重复序列 repeat motif	片段大小/bp fragment size
CID0001	F: HEX-GTGTTGCTGGATAATGGGA R: TGGTGAACTCAAGAGGTGTG	57	(AC) ₁₆	197271
CID0002	F: FAM-GCAGGCTGCTGAAGAATA R: AACTTACTGACCCCAAACC	56	(AC) ₂₃	244314
CID0004	F:HEX-ATCCCCTCTCAATTGACTCACAGTT R: GCTGGCATCTATTTTGAATTCTTATTG	55	(TG) ₁₈	144214
CID0012	F: FAM-ACAGTGCTAAACCTGCCAGTCAGTG R: ACAGCAGCACCAGTGGACATCAT	55	(TG) ₁₅	124198
CID0017	F: FAM-CTGGCCCCGGAGGAGACG R: AGCAGCGACCGCAGAAGATGAT	58	(CA) ₂₀	318368
CID0036	F: FAM-CCAGGGGCAAAACACAGACAATACTC R: AGGAAGCCATTCTTTGGATCTCATTAG	57	(CA) ₁₈	101149
CID0044	F: HEX-TTGTGGTGGATCGGCCTGTATTT R: GAGCTGCCCAAGCGTGTGC	55	(GT) ₁₆	358414
CID0058	F: HEX-AAGGGAGAGGGAGAAGGAAGAGA R :AGGCGGAGGAGTGAAACGAA	56	(TG) ₂₁	136200
CID0909	F: HEX-CATGTAGTCCACCGCCTGATGAT R: GAAGGGGCAGCTTGAAATCCA	55	(CA) ₁₃	308352
CID1525	F: FAM-AAGAGCCCACACTTACGTGACTGT R: GTTTTTCCCTTTAACCCGTCTCT	55	(GA) ₂₆	225267
CID1528	F: HEX-GCTGGTTTAAACAGGCACACCTTC R: TTGGGACGGAAAGCTGCTCTG	55	(CT) ₁₈	323359
CID1529	F: FAM-AGGGGTTTGGGATGACACAG R: TAACAGGCTTGTAAACATCCAATG	55	(GA) ₃₁	391455

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

0.5 μL、上游及下游引物(10 mmol/L)各 0.5 μL、 基因组 DNA(20 ng/μL)1 μL,补充无菌水 16.5 μL。

PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 55~58℃(表1)复性 30 s, 72℃延伸 1 min, 扩增 35 个循环; 最后再 72℃延伸 10 min, 4℃保 温。扩增反应在 Eppendorf 梯度 PCR 仪上完成。 反应产物送上海迈浦生物科技有限公司检测, 利 用 ABI3730XL 全自动 DNA 测序仪分析, 并通过 Genemapper 3.5 软件读取扩增产物的分子量数据, 部分如图 1 所示。



部分草鱼个体的分型图 Fig. 1 Chromatomap for genotypes of CID0017 and CID0044 in Ctenopharyngodon idellus

1.4 数据统计与分析

根据分子量数据确定个体各位点基因型。用 Genemapper 3.5 软件读取扩增数据,采用 POP-GEN 3.2^[12]进行群体遗传多样性分析,计算等位 基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、期望杂合度 (H_e)。用 Botstein 等^[13]的公式计算微卫星位点多 态信息含量(polymorphism information content, PIC)。利用 ARLEQUIN 3.1^[14]软件计算分子方差 分析 (AMOVA)。基于个体间遗传距离,用 MEGA3.1 构建系统树。利用 Cervus 3.0 软件对 4 个母本及雌核发育相应子代的基因型数据进行亲 权鉴定,并用 Excel 进行校准。

2 结果与分析

2.1 微卫星分子标记的多态性分析

利用 12 对(CID0001、CID0002、CID0004、 CID0012、CID0017、CID0036、CID0044、CID0058、 CID0909、CID1525、CID1528、CID1529) 微卫星 引物对 60 个个体(YZ 和 YS 群体)进行 PCR 扩增, 12 个微卫星位点的多态性检测分析结果如表 2 所 示,平均等位基因数、平均有效等位基因数、平 均期望杂合度、平均多态信息含量分别为 16.08、 8.36、0.86、0.84;在所有检测的位点中,CID0002 位点的 N_a最高(24),CID1529 位点的 N_e(14.73)、 H_e(0.942)、PIC(0.928)都最高。

表 2 微卫星引物的多态性检测 Tab. 2 Polymorphism detection for SSR primers

位点 locus	等位 基因数 <i>N</i> a	有效等位 基因数 <i>N</i> e	期望 杂合度 <i>H</i> e	多态信 息含量 PIC
CID0001	15	3.03	0.676	0.653
CID0002	24	13.48	0.934	0.921
CID0004	18	9.10	0.898	0.881
CID0012	13	5.32	0.819	0.797
CID0017	16	7.91	0.881	0.861
CID0036	14	9.05	0.898	0.879
CID0044	13	6.53	0.854	0.834
CID0058	16	9.03	0.898	0.880
CID0909	15	10.34	0.912	0.895
CID1525	15	7.71	0.879	0.858
CID1528	14	4.08	0.761	0.724
CID1529	20	14.73	0.942	0.928

2.2 3个草鱼群体的遗传多样性分析

利用这 12 对微卫星引物对 3 个草鱼群体进行 遗传多样性检测, 共检测出 194 个等位基因数, 其中有效等位基因数为 75.8 个。YZ、YS、CH 群 体的平均等位基因数($\overline{N_a}$)依次为 13.0、12.6、4.7; 平均有效等位基因数($\overline{N_e}$)依次是 7.7、6.6、2.3; 平 均期望杂合度($\overline{H_e}$)依次为 0.87、0.82、0.56; 平均 多态信息含量(\overline{PIC})依次为 0.84、0.79、0.49 (表 3)。

表 3 3 个草鱼群体的遗传多样性参数 Tab. 3 Genetic diversity parameters of three *Ctenopharyngodon idellus* stocks

遗传参数 genetic parameter	对照组 YS	养殖群体 YZ	雌核发 育群体 CH	
平均等位基因数($\overline{N_a}$)	12.6	13.0	4.7	
平均有效等位基因数($\overline{N_e}$)	6.6	7.7	2.3	
平均期望杂合度($\overline{H_e}$)	0.82	0.87	0.56	
平均多态信息含量 (\overline{PIC})	0.79	0.84	0.49	

3 个草鱼群体分子方差分析结果表明(表 4): 大多数变异来自个体内(74.55%), 群体间变异占 8.70%, 群体内个体间占 16.74%。对非雌核发育 群体个体(YS 群体和 YZ 群体)的 60 个个体遗传距 离构建 UPGMA 系统树(图 2), 结果表明 YZ 群体 与 YS 群体各群体的大部分个体先聚在一起, 2 个 群体的个别个体交叉聚在一起。

2.3 雌核发育子代及其亲本的亲权鉴别

根据雌核发育草鱼在微卫星位点的等位基因 型数据,采用单个微卫星位点进行雌核发育草鱼 鉴定时,不能鉴别出雌核发育子代的亲本。本研 究根据微卫星位点基因型的差异,筛选并利用 2 个微卫星位点有效组合建立了雌核发育草鱼子代 不同家系及其母本亲缘关系的简易、高效鉴别技 术。例如,表5所示,CID0017和CID0058同时使 用,可鉴别出这30尾雌核发育草鱼子代所属的家 系及其母本。基于4个母本及30个草鱼雌核发育

表 4 3 个草鱼群体分子方差分析 Tab. 4 AMOVA analysis among three *Ctenopharyngodon idellus* stocks

变异来源	白山宦	平方和	方差组分	方差比例/%
source of variation	百田)及 df	sum of	variance	percentage of variance
群体间	2	19.590	0.13404 Va	8.70
群体内个体间 among individual within populations	88	146.448	0.25792 <i>V</i> b	16.74
个体内 within individuals	91	104.500	1.14835 Vc	74.55
总变异 total variation	181	270.538	1.54031	

子代个体间遗传距离,构建 NJ 进化树,如图 3 所示, CH-1~CH-24 和母本 YZ-7 先聚在一起, CH-25、CH-26 与母本 YZ-3 先聚在一起, CH-27 与母本 YZ-2 先聚在一起, CH-28~CH30 与母本 YZ-12 先聚在一起,这与雌核发育子代及其亲本的亲权鉴别的结果相一致。



图 2 基于草鱼个体间遗传距离的 YZ 群体和 YS 群体个体 UPGMA 聚类树 Fig. 2 UPGMA molecular trees based on genetic distance for 60 individuals from YZ and YS groups of *Ctenopharyngodon idellus*

and	gynog	enetic Ctenopharyngodon idellus individuals
Tab. 5	Geno	types of loci CID0017 and CID0058 in maternal
		雌核发育后代个体中的基因型
	表り	位点 CID0017 和 CID0058 在母本及

+ 13 +

	个休疟县 number	基因型/个 genotype		
	一个细 与 IIUIIIDEI	CID0017	CID0058	
母本	YZ-2	338/348(AB)	154/178(ab)	
female parent	YZ-3	332/342(CD)	154/176(ac)	
	YZ-7	332/342(CD)	178/180(bd)	
	YZ-12	332/354(CE)	172/178(eb)	
雌核发育子代	CH-1、CH-7	CC	dd	
gynogenetic individual	CH-2、CH-6、CH-9、 CH-13、CH-22	CC	bd	
	CH-3、CH-11	DD	dd	
	CH-4、CH-15、 CH-17、CH-24	CD	bd	
	CH-5、CH-8、CH-12、 CH-14、CH-18、 CH-21	DD	bd	
	CH-10	CC	bb	
	CH-16、CH-23	CD	bb	
	CH-19、CH-20	CD	dd	
	CH-25	CD	ac	
	CH-26	DD	ac	
	CH-27	BB	ab	
	CH-28	CE	eb	
	CH-29	EE	bb	
	CH-30	CE	bb	







2.4 3个草鱼群体的纯合性评价

从每个个体在微卫星位点的纯合率看(图 4), YZ 群体中个体的纯合度在 0.00~0.33, YS 群体中 个体的纯合度在 0.00~0.42; CH 群体中个体的纯 合度相对较高,在0.42~0.92;3个群体的所有个体 纯合率均小于 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看(图 5), CH 群体在每个位点的纯合率均明显高于 YZ 群体和 YS 群体。





3 讨论

3.1 雌核发育草鱼群体与普通草鱼群体的遗传 多样性

与同工酶、mtDNA、RAPD、RFLP、ISSR 等

1241

标记相比,微卫星(SSR)标记因其具有共显性、 PCR 需要的 DNA 样本少、数量丰富、可重复性 好、多态性高等优点,已广泛应用于群体遗传多 样性、遗传连锁图谱构建、亲缘关系鉴别等方面 研究^[15-19]。本研究中所采用的 12 个 SSR 位点在 2 个普通草鱼群体中检测,位点 PIC 位于 0.653~ 0.928,都属于高度多态基因座(PIC>0.5),均可用 于草鱼群体的遗传多样性分析。

 N_{a} 、 N_{e} 、 H_{e} 、PIC 等是衡量群体遗传资源丰 富与选育潜力的重要参数^[20],在一定范围内其数 值越高,说明该群体的遗传资源越丰富,选育潜 力也越大;反之遗传多样性越低,选育潜力也越 小。本研究中的两个普通草鱼群体(YZ、YS)的 N。 为 7.2、比研究 4 个中国草鱼群体 (长江水系的沅 江群体、宁乡群体、洪湖群体和珠江水系的西江 群体)所用的等位基因数($\overline{N_s}$ =8.6)低^[21],也比研 究8个草鱼野生地理群体(长江水系的邗江群体、 吴江群体、九江群体、石首群体、木洞群体、万 州群体、珠江水系的肇庆群体和黑龙江水系的嫩 江群体)所用的等位基因数(N_{e} =8.0)略低^[22],而 比研究三江水系 4 个野生草鱼群体所用的有效等 位基因数(Ne = 3.5)高^[23],这一方面可能与所用实 验鱼来源不同、位点检测的方法(与用聚丙乙烯胺 电泳方法检测相比,用 ABI3730XL 全自动 DNA 测序仪分型读取的基因型数据更客观、准确。) 有关,另一方面也可能与我们与前两者所采用微 卫星位点的多态性较高有关。该研究中的雌核发 育草鱼群体(CH)的等位基因总数为 56 个,低于 YS 群体(151)和 YZ(156), 这种经过诱导雌核发育 导致等位基因数明显减少的现象在其他研究中已 有所报道^[23-24]。两个普通草鱼群体(YZ、YS)的 $\overline{H_e}$ 、 $\overline{\text{PIC}}$ 为 0.85、0.82, 与三江水系(长江水系、 珠江水系、黑龙江水系)草鱼群体的 He (0.71)、 PIC (0.77)都比较高^[21-23],表明中国草鱼群体的 遗传资源比较丰富, 而该研究的雌核发育草鱼群 体的 $\overline{H_e}$ (0.56)、 $\overline{\text{PIC}}$ (0.49)低于正常草鱼群体。 这说明 CH 群体的遗传多样性低于正常草鱼群体, 其遗传纯合度得到显著提高,同时也表明 CH 群

体还存在一定数量的杂合子,不能达到完全 纯合。

AMOVA 分析结果显示,遗传变异的 74.55% 来自个体内,群体间变异只占了 8.70%,说明遗 传分化主要来自个体之间,群体之间遗传差异较 小。YS 群体和 YZ 群体的 60 个个体间遗传距离 聚类结果表明两个群体各群体的大部分个体先聚 在一起,其中也存在部分个体交叉混在一起,这 说明 YS 群体和 YZ 群体有各自的遗传结构,同时 两个群体又有一定程度的遗传交流,这可能与地 区之间频繁引种有关。

3.2 雌核发育群体亲缘关系鉴别

去除环境影响等非遗传因素对表型性状的影 响是提高育种准确度和育种效率必须考虑的重要 方面,同时,准确鉴别亲权关系对于利用子代个 体或家系的性状表现进行亲本选择具有十分重要 的意义。因此,开发适宜的分子标记并利用标记 开展辅助育种已逐渐成为育种工作的重要前提和 基础内容。本研究同时,根据微卫星位点基因型 的差异, 筛选并利用 2 个微卫星位点有效组合建 立了雌核发育草鱼子代不同家系及其母本亲缘关 系的简易、高效鉴别技术。例如,利用微卫星位 点 CID0017 和 CID0058 对 30 个雌核发育子代及 其亲本的亲权关系进行鉴别, 与基于 NJ 进化树 聚类获得了相同的结果: CH-1~CH-24 为母本 YZ-7 的子代, CH-25、CH-26 为母本 YZ-3 的子代, CH-27 为母本 YZ-2 的子代, CH-28~CH-30 为母本 YZ-12 的子代。该研究为不同雌核发育草鱼家系 在同一池塘混养以尽可能消除环境差异对表型的 影响以及后续育种研究奠定了基础。

3.3 位点纯合速度差异

人工诱导雌核发育是为了快速获得纯合的群体,普遍认为一代雌核发育相当于 8~10个世代的 全同胞交配^[26]。在用 SSR 检测雌核发育子代时, 经常发现雌核发育后代存在杂合的现象^[8,9,25], 因此对减数分裂雌核发育后代的纯合性检测也非 常重要。CH 群体在所检测的 12 个微卫星标记位 点中的平均纯合度为 0.717,该数值比王成龙等^[9] 用 28 个微卫星标记位点测得雌核发育家系的结

果 0.512 略高, 这可能与所检测的位点不同有关, 显著高于 YZ 群体(0.133)和 YS 群体(0.155)。本研 究中, CH 群体与 YZ 群体相比较, 位点 CID0909 纯合度提高了 94.12%, 其他位点纯合度提高了 1.48~28 倍; CH 群体与 YS 群体相比较, 位点 CID0001 与位点 CID1528 分别提高了 58.73%、 90.00%, 其他位点提高了 3.15~26.67 倍; 与普通 草鱼群体(YZ 群体、YS 群体)相比, CID0044、 CID1525、CID1529等位点在 CH 群体纯合速度明 显大于其他位点(如 CID0909、CID0909、CID1528); 这一方面可能与所检测的 YZ 群体、YS 群体遗传 多样性较高、纯合度较低有关,另一方面可能与 位点的多态性高低以及位点离着丝粒的远近(基 因位点离着丝粒位置越远, 越容易发生基因重 组^[24])有关。CH 群体位点虽然没有完全纯合,但 较普通草鱼群体纯合度已有较大提高,因此可以 从 CH 群体中选出性状优良的个体进行二次甚至 多次雌核发育诱导,继续加大目标性状的纯合速 度,从而建立更好的育种材料。

致谢:感谢中国水产科学研究院淡水渔业研究中 心傅建军博士在数据处理方面给予的帮助。

参考文献:

- China Fisheries Law Enforcement. 2017 China Fisheries Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017: 25. [农业部渔业局. 2017 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 25.]
- [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[J]. 中国农学通报, 2011, 27(7): 369-373.]
- [3] Suwa M, Arai K, Suzuki R. Suppression of the first cleavage and cytogeneitc studies on the gynogenetic loach[J]. Fisheries Science, 1994, 60(6): 673-681.
- [4] Komen H, Thorgaard G H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review[J]. Aquaculture, 2007, 269: 150-173.
- [5] Liu A Z, Hu G D. Comparison of several isoenzymes between gynogenetic grass carp and its parents[J]. Freshwater Fisheries, 1989(3): 21-23. [刘爱珠, 胡庚东. 雌核发育草鱼 与其亲本几种同工酶的比较[J]. 淡水渔业, 1989(3):

21-23]

- [6] Zhao R R, Xiao Y M, Peng L Y, et al. Homozygosity analysis of two artificially gynogenetic group in grass carp[J]. Journal of Nartural 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[J]. 湖南 师范大学: 自然科学学报, 2008, 31(2): 110-114.]
- [7] 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.]
- [8] 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): 1801-1807. [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): 1801-1807.]
- [9] Wang C L, Zheng G D, Chen J, et al. Microsatellite genetic analysis of ENU mutagenesis grass carp and gynogenesis offspring group[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(6): 1135-1143. [王成龙, 郑国栋, 陈杰, 等. 草鱼雌核发育后 代不同群体的微卫星遗传分析及指纹识别[J]. 水生生物 学报, 2016, 40(6): 1135-1143.]
- [10] Xia J H, Liu F, Zhu Z Y, et al. A consensus linkage map of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on microsatellites and SNPs[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 135.
- [11] Li D, Shen Y, Fu J, et al. Isolation and characterization of 25 novel polymorphic microsatellite markers from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Conservation Genetics Resources, 2013, 52(2): 143-148.
- [12] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics, 1978, 89(3): 583-590.
- [13] Botstein 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.
- [14] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2005, 1: 47-50.
- [15] Liu Z, Cordes J. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics[J]. Aquaculture, 2004, 238(1): 1-37.
- [16] Zhao Y W, Song W T, Liao X L, et al. Construction of a

microsatellite-based genetic linkage map for Cynoglossus semilaevis [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 19(6): 939-945. [赵永伟, 宋文涛, 廖小林, 等. 半滑舌鳎 微卫星标记遗传连锁图谱的构建[J]. 中国水产科学, 2011, 19(6): 939-945.]

- [17] Niu Y Z, Liao X L, Song W T, et al. Genetic mapping and QTLs analysis of growth traits in olive flounder (*Paralich-thys olivaceus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(11): 1640-1649. [牛余泽, 廖小林, 宋文涛, 等. 牙鲆遗传作图及生长性状 QTL 定位[J]. 水产学报, 2012, 36(11): 1640-1649.]
- [18] Hu X S, Ge Y L, Li C T, et al. Highly effective identification of genetic relationship of Songpu Mirror Carp (*Cyprinus carpio* Songpu) using microsatellite markers[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2016, 29(5): 37-42. [胡雪松, 葛彦龙, 李池陶, 等. 利用微卫星标记高效鉴定松浦镜鲤的亲缘关 系[J]. 水产学杂志, 2016, 29(5): 37-42.]
- [19] Zeng Q K, Sun C F, Dong J J, et al. Establishment and utilization of paternity identification in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) using microsatellites[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2017, 25(6): 976-984. [曾庆凯, 孙成飞, 董浚键, 等. 翘嘴鳜微卫星标记亲权鉴定技术的建立与应用[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(6): 976-984.]
- [20] Yang H, Li D Y, Cao X, et al. Genetic potential analysis of six Tilapia populations by microsatellite DNA markers[J]. Hereditas, 2011, 33(7): 768-775. [杨弘, 李大宇, 曹祥, 等. 微卫星标记分析罗非鱼群体的遗传潜力[J]. 遗传, 2011, 33(7): 768-775]
- [21] Zhu B, Fan J J, Bai J J, et al. Gold grass carp microsatellite polymorphism and its comparative analysis with four grass

carp populations from China[J]. South China Fisheries Science, 2017, 13(2): 51-58. [朱冰, 樊佳佳, 白俊杰, 等. 金 草鱼与中国4个草鱼群体的微卫星多态性比较分析[J]. 南 方水产科学, 2017, 13(2): 51-58.]

- [22] Fu J J, Li J L, Shen Y B, et al. Genetic variation analysis of wild populations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) using microsatellite markers[J]. Hereditas, 2013, 35(2): 192-201. [傅建军, 李家乐, 沈玉帮, 等. 草鱼野生群体遗 传变异的微卫星分析 [J]. 遗传, 2013, 35(2): 192-201.]
- [23] Zhou P, Zhang Y, Xu P, 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, 徐鹏, 等. 基于26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.]
- [24] Ye X J, Wang Z Y, Liu X D, et al. Analysis of genetic homozygosity and diversity of two successive generation meio-gynogenetic population in *Pesudosciaena* crocea using microsatellite markers[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 144-151. [叶小军, 王志勇, 刘贤德, 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.]
- [25] Qi W S, Tian Y S, Jiang J, et al. Establishment and identification of mitotic gynogenesis Japanese flounder (*Paralich-thys olivaceus*) pure family[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(5): 541-551. [齐文山, 田永胜, 姜静, 等. 牙鲆卵裂雌核发育纯系的建立及鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(5): 541-551.]
- [26] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of homozygous diploid zebra fish[J]. Nature, 1981, 291: 293-296.

Microsatellite genetic analysis of gynogenetic grass carp group and two common grass carp groups

ZHU Shuren, MENG Qinglei, AN Li, LI Ning, ZHANG Longgang, YANG Ling, XU Guojing, FU Peisheng

Shandong Provincial Key Laboratory of Freshwater Genetics and Breeding, Shandong Freshwater Fisheries Research Institute, Jinan 250017, China

Abstract: We induced the gynogenetic offspring of the breeding grass carp (YZ) using UV-inactivated grass carp sperm and cold shock method to inhibit extrusion of the second polar body. Twelve pairs of microsatellite primers were used for amplification and genetic analysis of the YZ population and control population (YS). A total of 194 alleles were detected in the YZ and YS populations, of which 75.8 were effective alleles. The average number of alleles in the YZ, YS and CH populations was 13.0, 12.6, and 4.7, respectively; the average number of effective alleles was 7.7, 6.6, and 2.3, respectively; the average expected heterozygosities were 0.87, 0.82, and 0.56, respectively; and the average polymorphism information content was 0.84, 0.79, and 0.49, respectively. Homozygosity was analyzed for the microsatellite loci: the homozygosity of individuals in the YZ population was 0.00–0.33, the homozygosity of individuals in the YS population was 0.00–0.42, and the homozygosity of individuals in the CH population was 0.42–0.92. The results showed that the genetic diversity of the CH population was significantly lower than that of the YZ population and the YS population, and the homozygosity of the CH population at each locus was higher than that of the common grass carp groups. This suggests that artificially induced meiotic gynogenesis can accelerate the homozygosity of most grass carp gene loci and is an effective means of rapidly establishing a high purity strain. At the same time, this study screened and used microsatellite loci combinations to establish a simple and efficient identification technique for the genetic relationship among different families and their female parent, laying a foundation for the marker-assisted breeding of gynogestidium.

Key words: microsatellite; grass carp; gynogenesis; genetic analysis Corresponding author: MENG Qinglei. E-mail: qingleimeng@126.com