异源四倍体鲫鲤雌核发育后代的 RAPD 分析

颜金鹏　刘少军　孙远东　张　纯　刘　筠
(蛋白质化学与鱼类发育生物学教育部重点实验室, 湖南师范大学生命科学学院, 长沙　410081)

摘要: 在优化 RAPD(随机扩增多态性 DNA)检测条件基础上, 从 134 个随机引物中筛选出 53 个扩增较好且多态性强的引物, 对异源四倍体鲫鲤第 1 代(G_1)、第 2 代(G_2)人工诱导的雌核发育二倍体后代群体的 DNA 多态性及分子标记进行了分析。结果显示, 53 个随机引物在 G_1 群体和 G_2 群体中检测到的位点数分别为 541、511, 其中多态性位点数分别为 70、52, 多态位点比例分别为 12.94%、10.18%。两个群体的平均遗传距离分别为 0.0732、0.0464。研究表明, 经过连续 2 代人工雌核发育, G_2 的遗传多样性明显减少, 种质进一步纯化。还从 53 个随机引物的扩增谱带中找到了 2 个引物(S50、S223)的特异扩增谱带, 可以作为第 1、2 代雌核发育群体间的分子遗传标记。由计算机软件程序构建的分支系统树清晰地反映了两个雌核发育群体及其个体间的相互关系。

关键词: 异源四倍体鲫鲤; 雌核发育; 随机扩增多态 DNA; 遗传多样性
中图分类号: S961.6　　文献标识码: A　　文章编号: 1000-3207(2005)03-0259-07

国内外学者在人工诱导四倍体鱼方面已经做了大量的工作[1—6], 但是至今, 成功获得两性可育、遗传性状稳定且能自然繁殖后代的四倍体鱼的报道还少见。作者研究室与其协作单位湘阴县东湖渔场合作制备出两性可育的异源四倍体鲫鲤, 目前已连续繁殖了 12 代(F_3—F_{14}), 形成了一个遗传性状稳定的四倍体鱼群体[7,8]。以前的研究证明[9]: 异源四倍体鲫鲤产生的二倍体卵子(2n=100), 在没有染色体加倍情况下, 经紫外线照射的散鳞镜鲤精子激活, 二倍体卵子能发育成为存活的全雌性二倍体后代(G_1, 2n=100)。由此证明异源四倍体鲫鲤的雌性个体具有 XXXX 的性别决定类型[9]。雌核发育鱼在生殖特性上与 F_2 很相似, 也能产生二倍体的卵子, 其证据为: ①G_1 与红鲫交配产生了三倍体鱼(3n=150)[9]; ②G_1 产生的二倍体卵子, 无须染色体加倍, 经遗传失活的散鳞镜鲤精子激活形成了存活的二倍体雌核发育鱼(G_2)[9]; ③G_1 产生的卵子中, 93.33% 的卵子直径为 0.17cm, 其直径明显比单倍体卵子直径(0.13cm)要大, 而与四倍体鲫鲤产生的二倍体卵子直径一样[9]。④G_1 与四倍体鱼交配产生了四倍体鱼(4n=200)(实验数据待发表)。二倍体雌核发育鱼产生二倍体卵子的原因可能是由于一些早期生殖细胞进行了核内复制[7,9]。这种二倍体卵子的形成为四倍体、三倍体的制备及二倍体雌核发育杂交纯系的建立提供了重要的配子资源。

随机扩增多态 DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)是由 Williams[10] 等和 Welsh[11] 等同时建立起来的基于 PCR 的分子标记技术, 具有简便, 准确, 快速的特点, 既有大量的随机引物可供选择, 又不受种属的限制, 因此被广泛应用于物种及种群的鉴定、新缘关系的探讨、基因定位、遗传多样性分析以及构建遗传图谱等方面的研究中[12—20]。从理论上讲, 雌核发育的 G_2 比 G_1 的遗传纯度要高。为了验证这种推测, 作者采用 RAPD 方法对异源四倍体鲫鲤两个人工雌核发育群体(G_1、G_2)进行了分析, 得出的实验结果与理论推测一致, 而且还获得了区分两个群体的 DNA 分子遗传标记。本研究为评估不同雌核发育群体的遗传纯合度和遗传多样性提供了依据, 并为人工雌核发育杂交纯系的建立提供了理论依据。

收稿日期: 2004-06-25　修订日期: 2004-09-27
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30170733 和 No. 30330480); 国家"973"项目(No. 2001CB109006); 教育部跨世纪人才培养基金(No. 200248)资助
作者简介: 颜金鹏(1979—), 男, 湖南永州祁阳人; 硕士; 研究方向: 鱼类发育生物学
通讯作者: 刘小军, E-mail: lsj@hunnu.edu.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1 材料和方法

1.1 人工雌核发育鱼的获得 异源四倍体鲫鲤 F_{10} 取自位于湖南师范大学校内的四倍体鱼国家保护基地。用经紫外线照射(两盏15W, 254nm)而遗传失活的散鳞镜鲤精子与异源四倍体鲫鲤 F_{10} 卵子授精激活其发育, 不作任何处理或用冷休克(0—4℃)处理, 都获得了二倍体雌核发育第1代鱼(简称 G_1)。当 G_1 性成熟以后, 用其中的一条 G_1 作亲本, 用经紫外线照射过的散鳞镜鲤精子启动其卵子的发育, 没有经过染色体加倍处理, 获得二倍体雌核发育第2代鱼(简称 G_2)。经染色体检测和性腺切片观察 G_1 和 G_2 均为二倍体($2n=100$), 而且全是雌性的[9]。因而本实验所选用的鱼全是雌核发育二倍体鱼, 没有三倍体杂交鱼。从 G_1 和 G_2 群体中分别随机选取5尾和7尾用于RAPD分析。

1.2 基因组总 **DNA** 的提取 两个群体的基因组总DNA的提取参照标准酚/氯仿法从全血中提取[12]。以Lambda DNA/Hind Ⅲ+ EcoR Ⅰ Markers DNA为标准, 用0.8%琼脂糖凝胶(含0.5μg/mL的溴化乙锭)电泳(5—10V/cm) 1h, 紫外灯下拍照, 确定DNA的质量及浓度。

1.3 引物的筛选 分别以5尾 G_1、7尾 G_2 的基因组DNA混合构建成的两个DNA池为模板, 采用134个上海生工系列随机引物 S50—S100, S120—S140, S220—S240, S320—S340, S461—S480 进行RAPD扩增, 从中选出重复性好、图谱清晰、扩增产物条带数较多且多态性强的53个随机引物用于两个群体内所有个体的基因组DNA的RAPD扩增。

1.4 **RAPD** 反应 PCR扩增仪为美国Applied Biosystems公司生产的GeneAmp® PCR System 2700热循环仪。Taq酶和dNTPs为北京华美生物工程公司产品。RAPD反应的总体积为25μL, 内含2.5μL 10× reaction buffer, 2.5μL 25mmol/L $MgCl_2$, 5μL 1.0mmol/L dNTP, 1μL 引物(约15ng), 1.5U 的Taq酶, 50—100ng 核DNA。RAPD反应的扩增程序参照Williams 等[10]的方法, 94℃预变性4min, 然后循环35次(94℃, 1min→36℃, 1min→72℃, 2min), 最后72℃延伸10min。扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶上含0.5μg/mL溴化乙锭进行电泳, 用GDS 7500凝胶成像分析系统进行扫描和分析。

1.5 遗传相似度和遗传距离 经PCR扩增后获得的RAPD图谱, 由于个体之间DNA序列差异而产生多态性可用双等位座系统来解释, 即每个座位上相应谱带的存在(此时记为1)或缺失(此时记为0)。统计时仅记录清晰稳定的扩增条带, 任意两个体间的遗传相似度按照Lynch 等[22]提出的相似率公式: $S_{xy}=2N_{xy}/(N_x+N_y)$ 计算, 其中 N_{xy} 表示个体x和y之间共有的DNA扩增片段的数目, N_x 和 N_y 分别是个体x和y的DNA扩增片段的数目。用公式 $D=1-S$ 计算任意两个体间的遗传距离。群体内或群体间的遗传相似系数和遗传距离由群体内或群体间的所有个体间的遗传相似度S和遗传距离D值简单平均而求得。

1.6 多态位点比例 根据Apostol 等[23]的假设, 将RAPD标记作为等位基因进行多态分析, 所有的具有相同迁移率的扩增条带可看作为一个位点来统计。

多态位点比例(P) = 多态位点数/总位点数 × 100%

1.7 分支系统树的构建 根据遗传距离, 个体间和两个人工雌核发育群体间相互关系的分支图通过SAS 6.12(Statistical Analysis System)软件进行构建。

2 结果

2.1 **RAPD** 扩增 分别从异源四倍体鲫鲤人工雌核发育群体 G_1 和 G_2 中随机选取了5尾和7尾用于RAPD分析, 2个群体的12个个体的基因组DNA均进行了两次以上重复的扩增, 并且每次扩增反应均设立了空白对照。用于扩增的53个引物扩增效果良好, 均可用于统计分析。每个引物在每尾鱼中扩增出3—15条稳定清晰的条带, 扩增片段的大小在0.2Kb至3Kb之间。筛选出的53个引物共扩增出5432条带, 其中 G_1 和 G_2 分别扩增出2332和3100条带, 平均每个引物在每尾鱼中扩增出8.80和8.35条带。

在53个引物扩增产生的RAPD图谱中, 发现2个引物(S50、S223)产生的RAPD图谱在 G_1 和 G_2 间出现了特异的DNA片段。如图1所示, 引物S50扩增出了一条特异于 G_1 长约1900bp的DNA带; 引物S223扩增出了两条特异的DNA片段, 一条特异于 G_1, 长约700bp, 另一条特异于 G_2, 长约570bp。因此, 这2个引物产生的RAPD特异片段可以作为区分这两个雌核发育群体的分子遗传标记。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

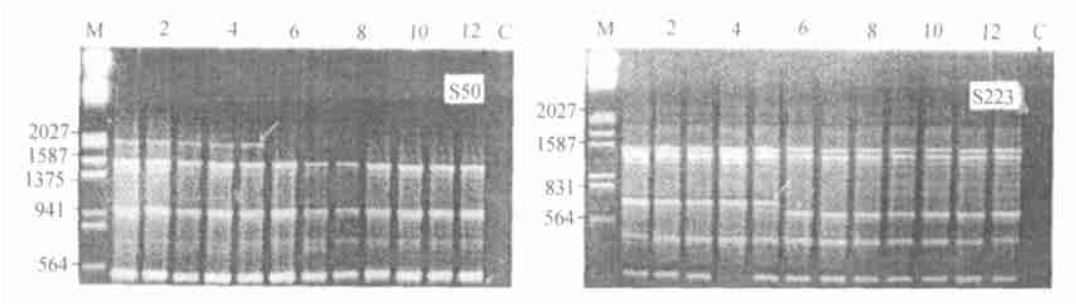

图 1　引物 S50、S223 扩增的 2 组典型的 RAPD 产物电泳图, 箭头示特异的 DNA 片段, 1—5 为 G_1, 6—12 为 G_2, M 示 Lambda DNA/Hind Ⅲ+ EcoR Ⅰ Markers DNA, C 为空白对照

Fig. 1　Electrophoretograms of 2 typic RAPD products obtained from primers S50, S223, the arrows show the specific DNA fragments 1—5 represent G_1 individuals, 6—12 represent G_2, C represent negative control

2.2　遗传距离分析

同一雌核发育群体内不同个体间的遗传距离都比较小, 其中最大的是 G_1-3 和 G_1-5(为 0.089), 最小的是 G_2-5 和 G_2-6(为 0.021)(表 1)。G_1 群体和 G_2 群体内个体的平均遗传距离分别为 0.0732、0.0464(表 2)。但是, 不同人工雌核发育群体的个体之间的遗传距离都比较大, 其中最大的是 G_1-4 和 G_2-1(为 0.118), 最小的是 G_1-2 和 G_2-6(为 0.091)(表 1)。G_1 和 G_2 群体间个体的平均遗传距离为 0.1000(表 2)。

表 1　两个不同雌核发育群体 12 个个体的遗传距离

Tab. 1　The genetic distances between the twelve individuals of two different diphloid gynogenetic populations of allotetraploid fish

	G_1-1	G_1-2	G_1-3	G_1-4	G_1-5	G_2-1	G_2-2	G_2-3	G_2-4	G_2-5	G_2-6	G_2-7
G_1-1	0.0											
G_1-2	0.084	0.0										
G_1-3	0.035	0.042	0.0									
G_1-4	0.087	0.080	0.087	0.0								
G_1-5	0.056	0.084	0.089	0.088	0.0							
G_2-1	0.110	0.090	0.090	0.118	0.103	0.0						
G_2-2	0.114	0.092	0.097	0.095	0.092	0.076	0.0					
G_2-3	0.109	0.093	0.115	0.093	0.093	0.037	0.009	0.0				
G_2-4	0.107	0.099	0.094	0.115	0.100	0.022	0.037	0.034	0.0			
G_2-5	0.099	0.095	0.097	0.099	0.099	0.070	0.058	0.054	0.066	0.0		
G_2-6	0.097	0.091	0.100	0.100	0.104	0.069	0.060	0.060	0.064	0.021	0.0	
G_2-7	0.105	0.093	0.097	0.104	0.100	0.030	0.031	0.023	0.026	0.054	0.073	0.0

表 2　两个不同雌核发育群体内及群体间的平均遗传距离

Tab. 2　Average genetic distances between and within the two different diploid gynogenetic populations of allotetraploid fish

	G_1	G_2
G_1	0.0732±0.02087	
G_2	0.1000±0.00765	0.0464±0.02050

2.3　多态位点比例

单个引物在两个雌核发育群体的检测到的位点数、多态位点数以及多态位点比例见表 3。用 53 个 10bp 随机引物对两个群体的 12 个个体基因组 DNA 进行 RAPD-PCR 扩增后, 在 G_1、G_2 群体中检测到的位点数分别为 541、511, 平均每个引物检测到的位点数分别为 10.21、9.64; 检测到的多态位点数分别为 70、54, 多态位点比例分别为 12.94%、10.18%。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表3 53个引物分别在两个雌核发育群体中检测到的位点数和多态位点数

Tab. 3 The number of loci and number of polymorphic loci amplified within two diploid gynogen populations with 53 primers, respectively

引物 Primers	序列(5'→3') Sequence	位点数 No. of loci		多态位点数 No. of polymorphic loci	
		G_1	G_2	G_1	G_2
S50	GGTCTACACC	4	3	0	0
S56	AGGGCGTAAG	7	5	2	1
S60	ACCCGGTCAC	14	13	1	1
S64	CCGCATCTAC	10	11	1	2
S80	ACTTCGCCAC	12	11	3	2
S87	GAACCTGCGG	12	12	2	1
S91	TGCCCGTCGT	15	15	2	2
S93	CTCTCCGCCA	8	8	2	2
S96	AGCGTCCTCC	9	9	1	1
S97	ACGACCGACA	11	11	0	0
S98	GGCTCATGTG	11	11	0	1
S121	ACGGATCCTG	12	10	1	0
S126	GGGAATTCGG	11	8	1	0
S128	GGGATATCGG	11	11	2	1
S129	CCAAGCTTCC	6	6	1	0
S130	GGAAGCTTGG	9	9	1	0
S133	GGCTGCAGAA	12	14	2	1
S136	GGAGTACTGG	8	7	2	2
S139	CCTCTAGACC	9	9	1	2
S140	GGTCTAGAGG	12	12	2	2
S221	TGACGCATGG	6	6	1	0
S222	AGTCACTCCC	11	11	1	1
S223	CTCCCTGCAA	7	7	1	0
S224	CCCCTCACGA	9	9	1	1
S226	ACGCCCAGGT	14	14	2	1
S227	GAAGCCAGCC	13	14	2	2
S232	ACCCCCCACT	13	12	1	1
S235	CAGTGCCGGT	7	6	1	1
S236	ACACCCCACA	11	10	1	1
S237	ACCGGCTTGT	9	9	1	0
S238	TGGTGGCGTT	9	8	2	1
S240	CAGCATGGTC	14	15	2	2
S321	TCGTTGCCAC	9	9	1	1
S323	CAGCACCGCA	11	11	1	0
S325	TCCCATGCTG	12	11	1	0
S326	GTGCCGTTCA	11	10	1	0
S327	CCAGGAGGAC	8	5	1	0
S328	GGGTGGGTAA	13	12	0	0
S329	CACCCCAGTC	12	12	1	1
S331	CTCAGTCGCA	9	7	1	1
S332	TCAACGGGAC	10	10	2	2
S333	GACTAAGCCC	10	8	0	1
S334	TCGGAGGTTC	9	9	2	2
S336	TCCCCATCAC	14	9	1	0
S339	GTGCGAGCAA	16	16	2	1
S340	ACTTTGGCGG	10	8	2	1
S461	GTAGCACTCC	7	7	2	1
S463	CTGATACGCC	7	5	2	2
S468	ACATCGCCCA	9	9	2	2
S470	TCCCGCCTAC	6	6	2	2
S471	AACGCGTCGG	8	8	1	1
S474	CCAGCCGAAC	12	11	1	1
S477	TGACCCGCCT	12	12	1	1
合计(Total)		541	511	70	52
多态位点比例(Percent of polymorphic loci)				12.94%	10.18%

2.4 分支系统树分析

依据RAPD谱带由计算机SAS 6.12软件程序构建的分支树状图(图2),可明显地将异源四位体鲫鲤第1代、第2代人工雌核发育二倍体群体的所有个体区分开来。如属于G_1的5尾个体聚成一个分支,而属于G_2的另7尾个体聚成另一个分支。

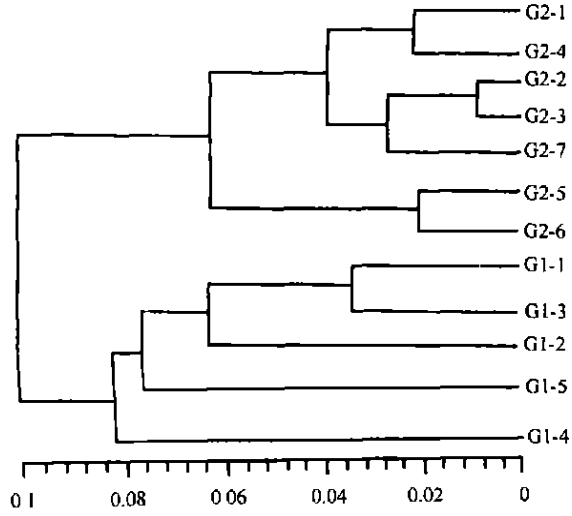

图2 两个雌核发育二倍体群体的12个个体的扩增结果

Fig. 2 The dendrogram of twelve individuals from two different diploid gynogenetic populations of allotetraploid fish obtained by SAS 6.0 software

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

在鱼类遗传育种工作中, 人工雌核发育是快速建立纯系的有效方法, 因为一次人工雌核发育所获后代的遗传纯度相当于 8—10 个世代的同胞兄妹交配[24]。同时, 人工雌核发育在性别决定、性别人工控制、稳定杂交优势、提高选择效率以及基因图谱的建立等研究和应用中都有着重要的意义和价值[24,25]。结合性反转技术开展异源四倍体鲫鲤进行雌核发育的目的主要有两个: 一是确定异源四倍体鲫鲤的性别遗传机制; 二是纯化异源四倍体鲫鲤, 同时可以检测其后代的性状是否发生分离。刘少军[9]等通过雌核发育实验已经证实了异源四倍体鲫鲤的雌性个体的性别决定类型为 XXXX。有趣的是, G_1、G_2 均产生二倍体的卵子, 因此 G_1 和 G_2 为四倍体和三倍体的产生提供了重要的二倍体配子资源。而且, 最近发现 G_1、G_2 的生长速度要比异源四倍体鲫鲤快 20.6% 左右(实验数据待发表)。人工诱导鱼类单倍体卵子雌核发育是否成功, 关键在两个方面: 一是在使精子染色体遗传物质失活的同时, 要保持精子激活卵子的能力; 二是使卵子染色体组加倍以克服单倍体胚胎不能发育成仔鱼的缺点。然而使卵子染色体组加倍是关键的一步。异源四倍体鲫鲤产生的二倍体(2n= 100) 卵子无需染色体的加倍就能发育成存活的鱼, 克服了单倍体胚胎不能发育成仔鱼的缺陷, 同时也克服了卵子中的染色体在处理加倍时可能受到的损伤, 大大提高了人工雌核发育实验的成功率。

本研究利用 53 个 10 碱基的随机引物对从 G_1、G_2 血液中提取的基因组 DNA 进行 RAPD 检测, 在 G_1、G_2 中随着近交系数的增大, 检测到的位点数依次减少, 分别 541、511。这充分说明了 RAPD 扩增的高效性, 也证明了扩增出的总位点数与群体的遗传纯度有一定的关系[26]。在 G_1、G_2 两个群体中检测到的多态位点分别是 70、52, G_1 的多态位点比例(12.94%) 要比 G_2(10.18%) 高; 同时, G_1 的平均遗传距离(0.0732) 也要比 G_2(0.0464) 高。这充分说明, 经过连续的两代雌核发育后, 遗传多样性明显降低。G_2 个体之间的遗传相似度比 G_1 的高, 揭示遗传性状进一步纯化。从 G_1 和 G_2 的外型来看它们还保留了杂交的特征(处于原始父母本的中间类型的外型)[9], 可见经过连续的人工雌核发育是可以建立高纯合度的雌核发育杂交品系的。

根据 Tajima[27] 的 DNA 序列抽样分布理论, 在 DNA 水平上估计群体变异时, 样本数量 N= 10(甚至 5) 就能反映群体水平, 由于雌核发育鱼遗传物质全部来自母本, 纯合度增加, 遗传距离明显降低, 因此, 本研究从 G_1、G_2 群体中分别只随机选取了 5 个、7 个个体。通过 RAPD 技术分析, 由计算机软件程序构建的分支系统树清晰地反映了两个雌核发育群体内个体的遗传相似性。

基于PCR 技术的 DNA 指纹标记技术有微卫星 DNA、AFLP 和 RAPD 等。在某种程度上, 这些方法都能提供丰富的有关鱼类遗传变异的信息。但是, RAPD 技术具有操作简单、快捷、无需知道目标序列的有关信息、同样的引物可用于不同物种等优点而被广泛地用于鱼类不同品系的研究。贾海波[28]等在采用 RAPD 检测技术对两个人工雌核发育红白锦鲤群体进行了多态性及分子标记分析, 找到了可以作为区分两个雌核发育锦鲤群体的遗传标记。毛晗[29]等采用 RAPD 检测技术, 不但揭示出两个人工雌核发育鲢家系的遗传背景存在明确差异, 而且检测到可区分这两个雌核发育家系的特异 DNA 片段。邹桂伟[30]等运用 RAPD 技术对连续两代人工雌核发育鲢的遗传多样性进行了分析, 研究揭示经过连续两代人工雌核发育后, 其遗传多样性明显减少, 种质得到了进一步纯化。本研究在采用 RAPD 技术检测异源四倍体鲫鲤的第 1 代雌核发育鱼(G_1) 和第 2 代雌核发育鱼(G_2) 时, 发现第 2 代雌核发育鱼的遗传相似度比第 1 代雌核发育鱼高, 揭示经过连续两代人工雌核发育后第 2 代的遗传性状较第 1 代得到了进一步纯化, 遗传多样性明显减少, 并检测到了可区分这两代人工雌核发育群体的 DNA 标记。再一次表明, RAPD 作为一种指纹分析技术应用于鱼类雌核发育群体及其分子遗传标记鉴定是一种有效的方法。进一步的研究将采用周莉[31]等发展起来的 SCAR 标记技术, 在克隆并测序了本研究所找到的特异 RAPD 标记的基础上, 根据所测得的 DNA 片段的碱基序列, 设计合成相应引物, 利用该引物通过 PCR 就可简捷而有效地扩增出可区分不同雌核发育群体的 DNA 片段标记。

参考文献:

[1] Chourrout D. Tetraploidy induced by heat shock in the rainbow trout (*Salmo gairdneri R.*)[J]. *Reprod. Nutr. Develop.*, 1982, **22**: 569—574

[2] Refstie T. Tetraploid rainbow trout produced by cytochalas in B[J]. *Aquaculture*, 1981, **25**: 51—58

[3] Myers J M. Tetraploid induction in *Oreochro mis spp* [J]. *Aquaculture*,

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1986, **57**: 281—287

[4] Hong Y H. Tetraploidy induced by heat shock in big head carp *Aristichthys nobilis*[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1990, **36**(1): 70—75[洪云汉. 热休克诱导鳙鱼四倍体的研究. 动物学报, 1990, **36**(1): 70—75]

[5] Gui J F, Sun J M, Liang S C, *et al*. Studies on genome manipulation fish Ⅱ. Tetraploid induced by hytrostatic pressure treatment and a combination of hytrostatic pressure treatment and cold treatment in Transparent Colored Crucian Carp[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1991, **15**(4): 333—341. [桂建芳, 孙建民, 梁绍昌, 等. 鱼类色体组操作的研究Ⅱ. 静水压处理和静水压与冷休克结合处理导水晶彩鲫四倍体. 水生生物学报, 1991, **15**(4): 333—341]

[6] Chen M R, Yang X Q, Yu X M, *et al*. Chromosome Ploidy manipulation of allotetraploids and their fertility in Japanese Phytophagous Crucian Carp(JPCC) (♀) × Red Crucian Carp(RCC) (♂)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1997, **21**(3): 197—205[陈敏容, 杨兴淇, 俞小牧, 等. 白鲫(♀) × 红鲫(♂)异源四倍体鱼的倍性操作及其生殖力的研究. 水生生物学报, 1997, **21**(3): 197—205]

[7] Liu S J, Liu Y, Zhou G J, *et al*. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization[J]. *Aquaculture*, 2001, **192**: 171—186

[8] Sun Y D, Liu S J, Zhang C, *et al*. The chromosome number and gonadal structure of F_9-F_{11} allotetraploid crucian-carp[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2003, **30**(5): 414—418[孙远东, 刘少军, 张纯, 等. 异源四倍体鲫鲤 F_9-F_{11}染色体和性腺观察. 遗传学报, 2003, **30**(5): 414—418]

[9] Liu S J, Sun Y D, Zhang C, *et al*. Production of gynogenetic progeny from allotetraploid hybrids of red crucian carp × common carp[J]. *Aquaculture*, 2004, **236**: 193—200

[10] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, *et al*. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**: 6531—6535

[11] Welsh J, Mc Clelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**: 7213—7218

[12] Zhou L, Fan L C, Gui J F. RAPD Analysis of incorporation of heterologous genetic materials in multiple species of silver crucian carp[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1998, **22**(4): 301—306[周莉, 樊连春, 桂建芳. 银鲫复合种外源遗传物质整入的分析. 水生生物学报, 1998, **22**(4): 301—306]

[13] Yao J H, Lou Y D. Preliminary report on the RAPD analysis of three populations of *Carassius auratus gibelio*[J]. *Journal of Shanghai Fish University*, 2000, **9**(1): 11—14[姚纪花, 楼允东. 三种群银鲫的RAPD分析. 上海水产大学学报, 2000, **9**(1): 11—14]

[14] Xia D Q, Cao Y, Yang H, *et al*. The relationships between F_1 hybrids from tilapia and their parents and the use of their heterosis[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1999, **6**(4): 29—32[夏德全, 曹萤, 杨弘, 等. 罗非鱼杂交F_1代与亲本的遗传关系及其杂种优势的利用. 中国水产科学, 1999, **6**(4): 29—32]

[15] Long L Q, Zhao Z S, Tang B G, *et al*. Analysis of genetic variation in hybrids between *Misgurnus anguillicandatus* cross *Paramisgurnus dalryanus* reciprocally by using RAPD[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(6): 659—662[龙良启, 赵振山, 汤保贵, 等. 泥鳅与大鳞副泥鳅正反交子代遗传变异的RAPD分析. 水生生物学报, 2000, **24**(6): 659—662]

[16] Teng C B, Sun X W, Shen J B, *et al*. RAPD analysis of gynogeneic crucian carp activated by heterologous sperm and their parents[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1999, **23**(4): 420—423[藤春波, 孙效文, 沈俊宝, 等. 利用异源精子激发雌核发育的银鲫及其亲本的RAPD分析. 水产学报, 1999, **23**(4): 420—423]

[17] Zhang S M, Deng H, Wang D Q, *et al*. Population structure and genetic diversity of silver carp and grass carp from population of Yangtze River system revealed by RAPD[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(4): 324—330[张四明, 邓怀, 汪登强, 等. 长江水系鲢和草鱼遗传结构及变异性的研究[J]. 水生生物学报, 2001, **25**(4): 324—330]

[18] Sun X W, Liang L Q. A genetic linkage map of common carp[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, **7**(1): 1—5[孙效文, 梁利群, 鲤鱼的连锁遗传图谱(初报). 中国水产科学, 2000, **7**(1): 1—5]

[19] Liang L Q, Sun X W, Yan X C. RAPD analysis of the genomic change in red common carp[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1998, **5**(1): 6—9[梁利群, 孙效文, 闫学春. RAPD技术分析荷包红鲤抗寒品系与亲本的基因组变化. 中国水产科学, 1998, **5**(1): 6—9]

[20] Zhou L, Gui J F. Studies on genetic diversity in gonochoristic offspring produced from mating between two different gynogeneticclones of silver crucian carp[J]. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, 2001, **34**(3): 169—176[周莉, 桂建芳. 银鲫两个雌核发育克隆间两性生殖子代的遗传多样性分析. 实验生物学报, 2001, **34**(3): 169—176]

[21] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A libratory manual ed2[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989, 463—468

[22] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting[J] *Mol. Biol. Evo.*, 1990, **7**: 478—484

[23] Apostol B L, Black Ⅳ W C, Reiter P, *et al*. population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of Aedes aegypti in Puerto Rico[J]. *Heredity*, 1996, **76**: 325—334

[24] 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

[25] Wu Q J, Gui J F. Fish genetics and breeding engineering[M]. Shanghai: Scientific and Technology Publisher. 1999[吴清江, 桂建芳. 鱼类遗传育种工程. 上海: 上海科学技术出版社, 1999]

[26] Zhang H Y, Liu R Z, Zhang X W, *et al*. Assessment of population genetic variation of grass carp and common carp using RAPD fingerprints[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1998, **22**(2): 168—173[章怀云, 刘荣宗, 张大明, 等. 草鱼和鲤鱼群体遗传变异的RAPD指纹分析. 水生生物学报, 1998, **22**(2): 168—173]

[27] Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequence in finite populations[J]. *Genetics*, 1983, **105**: 437—460

[28] Jia H B, Zhou L, Gui J F. RAPD marker analysis of two artificial gynogenetic populations in red white ornamental carp[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26**(1): 1—7[贾海波, 周莉, 桂建芳. 两

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

个人工雌核发育红白锦鲤群体的RAPD 分析. 水生生物学报, 2002, **26**(1): 1—7]

[29] Mao H, Zhou L, Gui J F. RAPD marker analysis of two artificial gynogenetic families in Silver Carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(5): 1—7[毛晗, 周莉, 桂建芳, 鲢两个人工雌核发育家系的 RAPD 分析. 水生生物学报, 2003, **27**(5): 1—7]

[30] Zou G W, Pan G B, Wang D Q, *et al*. Genetic diversity of artificial gynogenesis silver carp and RAPD analysis of incorporation of heterologous genetic matetials in gynogenetic progeny [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(2): 180—185[邹桂华, 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]

[31] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Molecular analysis of silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) clones by SCAR markers [J]. *Aquaculture*, 2001, **201**: 219—228

RAPD ANALYSIS OF DIPLOID GYNOGEN POPULATIONS OF ALLOTETRAPLOID HYBRIDS OF RED CRUCIAN CARP(♀) × COMMON CARP(♂)

YAN Jin-Peng, LIU Shao-Jun, SUN Yuan-Dong, ZHANG Chun and LIU Yun

(Key Laboratory of Protein Chemistry and Fish Developmental Biology of Ministry of Education, College of life sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081)

Abstract: Following activation by scatter scale carp sperm (a variety of common carp) that were UV-irradiated for 30 min, the diploid eggs stripped from F_{10} female allotetraploid hybrids of red crucian carp(*Carassius auratus* red var., ♀) × common carp (*Cyprinus carpio* L., ♂), without or with the cold shock at 0—4 ℃ for 30min, developed in normal live first-generation diploid gynogens(G_1). Interestingly, like the diploid F_2 hybrids, these diploid gynogens(G_1) also produced diploid eggs. Without the treatment for doubling the chromosome number, the diploid eggs produced by the first-generation gynogens, developed into the second-generation gynogens(G_2) subjecting to activation by UV-irradiated scatter scale carp sperm. In the present paper, genetic heterogeneity and molecular markers were analyzed by RAPD technique in the first and second generation of artificial induced diploid gynogen population generated by the gynogenesis of F_{10} allotetraploid hybrids. Of one hundred and thirty-four 10-nucleotide-long random primers used in the preliminary analysis, 53 primers produced well-amplified and reproducible band patterns. They were selected and used in the further analysis. The number of loci detected in the first-generation gynogen population and second-generation gynogen population were 541、511, and the number of polymorphic loci were 70、52, respectively. The percentage of polymorphic loci(12.94%) was considerately higher in the G_1 than that(10.18%) of G_2. The average genetic distances estimated by Lynch's index were 0.0732、0.0464, respectively. The results showed that the genetic diversity of G_2 was significantly decreased after two continued generation gynogenesis, and the genetic purity of G_2 was considerately higher than that of G_1. Two primers, such sa S50、S223, were observed to produce specific bands, and these bands could be used as molecular markers for discriminating the first-generation diploid gynogens from the second-generation diploid gynogens. A phylogenetic tree which was constructed using Statistical Analysis System computer programme based on genetic distances clearly revealed that all individuals in the first-generation gynogen population were clustered into one group, while all the individuals originated from the second-generation gynogen population were joined into another group.

Key words: Allotetraploid crucian-carp; Gynogenesis; Random amplified polymorphic DNA; Genetic diversity

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net