

草鱼基因组 DNA 一些 RAPD 位点的遗传分析及分子标记筛选

刘正华 陈金辉 黄明敏 郑康 罗琛

(湖南师范大学生物研究所, 长沙 410081)

摘要: RAPD 技术的实验结果很容易因实验条件和反应参数的不同而造成差异。为了建立能通用的草鱼基因组多态性分析 RAPD 分子标记体系, 需要利用 RAPD 位点按照孟德尔共显性规律遗传的特点, 用不同遗传背景的材料对多态性的 RAPD 位点进行统计遗传学比较分析以判断其真实性。为此, 本实验选择具有遗传多态性的湘江流域草鱼群体和经连续两代人工诱导雌核发育获得的雌核发育草鱼品系, 对一些可能作为草鱼基因组 DNA 分子标记的 RAPD 位点进行了遗传学比较分析。所用的 10 条多态性随机引物共检测到 30 个多态性 RAPD 位点。两个不同遗传背景群体的遗传统计对比分析结果表明: 这 30 个多态性位点在湘江流域草鱼群体和雌核发育草鱼群体中的分布符合孟德尔遗传规律, 可以作为草鱼基因组 DNA 分析的可靠分子标记。本实验的观察结果还表明: 在人工诱导雌核发育过程中, 存在 RAPD 位点的快速丢失现象, 两次人工诱导雌核发育过程中共丢失了 17 个多态性位点。因此, 加强对自然水体中草鱼种质资源多样性的保护和利用各种现代生物学技术纯化、筛选和组合优良性状基因, 是草鱼遗传育种中同样重要和不可或缺的两个方面。

关键词: 草鱼; 多态性位点; 遗传分析; 分子标记

中图分类号: Q334 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2006)03-0292-06

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) 具有生长快、养殖成本低等优点, 是中国淡水养殖渔业中最重要的养殖鱼类之一。近年来, 由于亲鱼选择的盲目性及人工近亲繁殖, 在养殖过程中已导致种群出现明显退化和人工养殖草鱼病害严重的现象。自然界的草鱼种群则由于环境的污染和改变, 导致了数量的明显下降和种质资源的破坏。为了有效地保护和利用这一特有的淡水鱼类资源, 高效培育出具有优良经济性状的草鱼养殖品系, 需要开发和利用各种分子遗传标记, 在分子水平上建立草鱼基因组的遗传标记体系。

Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) 即 DNA 随机扩增多态性分子标记技术^[1,2], 是建立在聚合酶链式反应(PCR) 基础之上, 用寡聚核苷酸为引物, 通过专门的 PCR 反应扩增获得长度不同的多态性 DNA 片段的基因组分析技术。该技术因其简单易行, 覆盖的基因组范围广, 无放射性, 周期短, 引物无种族特异性等优点^[3] 而已被广泛地应用于种质资源鉴定^[4,5]、系统发育学^[6,7]、遗传图谱构建^[8] 以

及其他领域的研究^[9,10]。RAPD 技术已经较多地应用于草鱼基因组 DNA 的分析^[11-14]。薛国雄等对三江水系的草鱼种群进行了 RAPD 分析^[12]; 陈金辉等对湘江流域草鱼及一代有丝雌核发育草鱼和连续两代极体有丝雌核发育草鱼进行了遗传分析^[13]。但由于 RAPD 技术很容易因实验条件和反应参数的不同而造成差异, 为了建立能通用的草鱼基因组多态性分析的 RAPD 分子标记体系, 作者利用具有较高遗传多态性的湘江流域草鱼群体筛选出了 31 条多态性随机引物和 93 个重复性好、分辨率高的多态性位点^[14]。但这些筛选出的 RAPD 分子标记的真实性仍需要用不同遗传背景的材料进行对比分析和检验才能确定。

Williams 等创立 RAPD 技术在研究其可靠性时^[15] 证明了 RAPD 标记符合孟德尔遗传规律, 属于共显性遗传。因此, 鉴定草鱼基因组 RAPD 分子标记的真实性可以根据所得到的 RAPD 扩增位点是否符合共显性的孟德尔遗传规律来进行判定。为此, 作者选

收稿日期: 2005-07-14; 修订日期: 2006-01-20

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(39830300); 教育部高校骨干教师基金项目(2006-12) 资助

作者介绍: 刘正华(1979—), 湖南衡阳人, 硕士研究生

通讯作者: 罗琛, E-mail: cluo@hunnu.edu.cn

择了具有遗传多态性的湘江流域草鱼群体和来源清楚、遗传背景一致的雌核发育草鱼群体为实验对象,对一些可能作为草鱼基因组 DNA 分子标记的 RAPD 位点进行了遗传学比较分析,以草鱼的遗传育种、品系的遗传分析以及群体的多态性分析筛选出真实可靠的 RAPD 分子标记体系。同时也对人工诱导雌核发育过程中草鱼群体中基因位点的丢失速度和频率这一遗传育种中的重要问题进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料及来源 湘江流域正常两性生殖草鱼群体总数为 36 尾,其中 11 尾由长沙国家鱼类原种场提供,其他 25 尾分多次从长沙各不同的农贸市场随机采取。29 尾人工雌核发育草鱼^[16-18]材料系随机取自本实验室经连续两代人工诱导雌核发育和抑制其第二极体的排出所得到的极体型雌核发育草鱼群体,称为极体雌核-2 群体。前一个群体因其具有的遗传多样性,便于检测和确定草鱼基因组 DNA 中的多态性 RAPD 位点;后一群体则因其来源清楚、遗传背景一致和纯合度较高而便于判断多态性 RAPD 位点的真实性。本实验选择剪取草鱼的幼嫩尾鳍作为分析样品。每尾鱼的样品用灭菌双蒸水漂洗两次后装入 1.5mL 的离心管中,标号,放入液氮中快速冷冻 5min 左右,然后保存于-80℃冰箱,作为提取基因组 DNA 的材料。

1.2 基因组 DNA 的提取 两个群体的尾鳍样品,采用酚/氯仿法,稍做修改后提取基因组 DNA。提取时蛋白酶 K 消化过夜,酚/氯仿抽提,NaCl、无水乙醇沉淀,灭菌去离子水溶解。通过 Eppendorf 公司的 Bio-Photometer 测定提取的基因组 DNA 的紫外光吸收光度值以检测 DNA 的浓度和纯度,经琼脂糖电泳检测 DNA 的完整性以评估所提取的基因组 DNA 能否用于 PCR 扩增反应,符合要求的 DNA 于 4℃保存备用。

1.3 RAPD 反应仪器及试剂 PCR 扩增仪为美国 Applied Biosystems 公司生产的 GeneAmp PCR System2700 热循环仪。RAPD 扩增引物购自上海生工生物工程技术服务有限公司(Sangon),Taq 酶、dNTP 以及 PCR 反应 Buffer 购自华美生物工程公司(Sino-American Biotechnology company)。

1.4 多态性引物及 PCR 反应条件 所用 10 条多态性引物选自陈金辉、黄明敏等所筛选出的多态性引物^[13-14],分别为 S8、S14、S31、S64、S66、S69、S115、S326、S331、S333。反应条件也是采用陈、黄等已优化的条件^[13-14],所得到的结果用凝胶成像系统扫

描,并保存扫描结果供最后分析。

1.5 RAPD 位点的遗传分析 将所检测到的每一个具有多态性的扩增片段作为一个位点进行分析^[19-20]。由于 RAPD 方法所检测到的真实位点在群体中的分布必须符合孟德尔遗传规律,而且为共显性遗传,因此,在本实验中以此作为标准,根据卡平方公式

$$\chi^2 = \sum [(实得数 - 预期数)^2 / 预期数]$$

对两个不同遗传背景草鱼群体中的遗传统计分析来判断真实的 RAPD 多态性位点和确定哪些扩增片段可作为分子标记。为了描述的方便,本实验将每一个位点上能扩增出 DNA 片段的等位基因称为野生型,而不能扩增出 DNA 片段的等位基因称突变型。

2 结果

2.1 两个不同遗传背景群体中所检测到的多态性 RAPD 位点

所选择的 10 条随机引物在草鱼基因组 DNA 上都能扩增出重复性好,群体特征性明显且具多态性的电泳条带(图 1)。单条引物检测到的位点数在 8—14 之间,PCR 扩增的片段长度介于 300—2300bp 之间。每条引物在两个群体中检测到的平均位点数分别为 11.5、9.6。10 条引物共检测到了 117 个位点(表 1)。湘江流域普通草鱼群体共检测到的总位点数为 115 个。极体雌核-2 群体检测到的总位点数为 96 个,但其中有两个位点是在湘江流域群体中没有检测到的位点。

表 1 10 条 RAPD 多态性引物在两个群体中所检测到的总位点数及多态位点数

Tab. 1 Detected number of loci and polymorphic loci of the two grass carp groups using 10 RAPD primers

引物编号 Primers	检测的位点数 Detected loci		检测的多态性位点数 Detected polymorphic loci	
	XJ	MG-2	XJ	MG-2
S8: GTCACACGG	12	10	4	3
S14: TCCGCTCTGG	14	10	5	3
S31: CAATCGCCGT	11	8	3	0
S64: CCGCATCTAC	13	10	3	0
S66: GAACGGACTC	12	11	2	1
S69: CTCACCGTCC	10	9	2	1
S115: AATGGCGCAG	12	10	2	1
S326: GTGCGGTTCA	10	8	3	1
S331: CTCAGTCGCA	11	10	4	3
S333: GACTAAGCCC	10	10	2	0
总位点数(Total)	115	96	30	13

注: XJ 指湘江流域草鱼群体, MG-2 指极体雌核-2 草鱼群体(下同)。
Note: XJ represents Xiangjiang River grass carp group, MG-2 represents Meio-2 grass carp group 2.

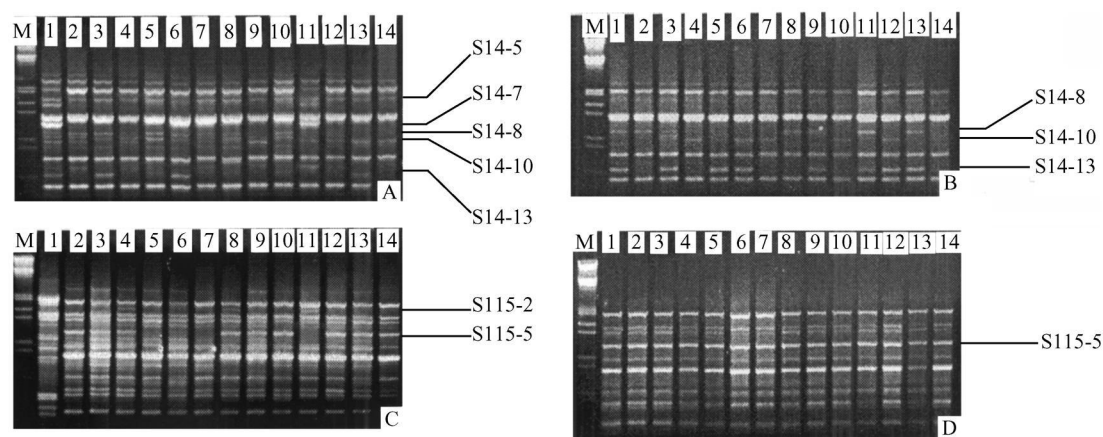


图 1 随机引物 S14 和 S115 在湘江流域草鱼群体和极体雌核- 2 草鱼群体中的扩增产物电泳图谱
Fig.1 Electrophoretic patterns of the products amplified by random primer S14 and S115 in Xiangjiang group
and meio-gynogenetic-2 group of grass carp

A: 引物 S14 在湘江流域群体中的扩增产物; A:The products amplified by random primer S14 in Xiangjiang group; B: 引物 S14 在极体雌核- 2 群体中的扩增产物; B:The products amplified by random primer S14 in meio-gynogenetic-2 group; C: 引物 S115 在湘江流域群体中的扩增产物; C:The products amplified by random primer S115 in Xiangjiang group; D: 引物 S115 在极体雌核- 2 群体中的扩增产物; D:The products amplified by random primer S115 in meio-gynogenetic-2 group. M 为 Marker DNA, 数字(1—14)表示样品编号; 湘江流域群体中检测到的各个多态性位点在极体雌核- 2 群体中有丢失(S14-5、S14-7、S115-2), 有的仍然在杂合状态(S14-8、S14-10、S14-13), 一个位点为野生型纯合状态(S115-5)。M represents DNA marker, the numerals(one to fourteen) represent the number of samples. In meio-gynogenetic-2 group, some of the polymorphic loci identified in the Xiangjiang group have been lost (S14-5、S14-7、S115-2), some are still in heterozygous state (S14-8、S14-10、S14-13), one is in wild homozygous state (S115-5).

2.2 30 个多态性位点在两个群体中的分布

在湘江流域普通草鱼群体和极体雌核- 2 群体中检测到的多态性位点数分别为 30、13。湘江流域群体中检测到的多态性位点占总位点数的 25.64%；极体雌核- 2 群体检测到的多态性位点占总位点数的 11.11%。30 个多态性位点在两个群体中的分布情况见表 2。

表 2 30 个多态性位点在两个群体中的分布
Tab.2 Distribution of 30 polymorphic loci in the two groups of grass carp

Polymorphic loci*	XJ		MG-2		P 值** P value
	野生型	突变型	野生型	突变型	
	Wild	Mutant	Wild	Mutant	
S8- 1+	17	19	0	29	
S8- 2	21	15	29	0	
S8- 3	15	21	29	0	
S8- 7	30	6	29	0	
S14- 5+	6	30	0	29	
S14- 7+	6	30	0	29	
S14- 8	16	20	18	11	0.1936
S14- 10	19	17	13	16	0.5775
S14- 13	11	25	17	12	0.3532
S31- 4+	17	19	0	29	
S31- 5+	21	15	0	29	

Polymorphic loci*	XJ		MG-2		P 值** P value
	野生型	突变型	野生型	突变型	
	Wild	Mutant	Wild	Mutant	
S31- 8+	9	27	0	29	
S64- 2+	14	22	0	29	
S64- 5+	4	32	0	29	
S64- 7+	12	24	0	29	
S66- 5+	12	24	0	29	
S66- 12	27	9	29	0	
S69- 3+	9	27	0	29	
S69- 6	15	21	17	12	0.3532
S115- 2+	5	31	0	29	
S115- 5	29	7	29	0	
S326- 5+	26	10	0	29	
S326- 9+	18	18	0	29	
S326- 10	32	4	16	13	0.5775
S331- 2	27	9	29	0	
S331- 5+	25	11	0	29	
S331- 8	21	15	12	17	0.3532
S331- 9	21	15	16	13	0.5775
S333- 2+	21	15	0	29	
S333- 5+	12	24	0	29	

* 指电泳图谱从负极到正极方向的多态性位点序号; ** 指按符合 1:1 预期时所得的 P 值; + 指雌核发育过程中已丢失的多态性位点。
* The number of polymorphic loci on the map of electrophoresis from negative to positive. ** P value accord with the 1:1 expected ratio, + represents the lost polymorphic loci during the process of gynogenesis.

30 个多态性位点在极体雌核-2 群体中的对应位点上有三种不同的表现情况(图 1): (1) 在极体雌核-2 群体的所有个体中都能检测到的野生型, 共 6 个位点。(2) 在极体雌核-2 群体的所有个体中都不能检测到的突变型, 共 17 个位点。(3) 在极体雌核-2 群体中野生型和突变型以一定的比例存在的杂合型, 共 7 个位点。为了检测第三种情况位点的真实性, 用卡平方公式对其进行了统计分析, 以 1:1 分离的预期为标准进行计算所得到的 P 值列于表 2 中。这 7 个多态性位点在极体雌核-2 群体中的 P 值介于 0.1936 和 0.5775 之间。

2.3 RAPD 位点的丢失

两个群体的多态性位点的统计数据也表明, 在人工诱导雌核发育的过程中存在 RAPD 位点的快速丢失现象。湘江流域普通草鱼中本实验所用的 10 条引物可检测到 30 个多态性位点, 经过两次人工诱导雌核发育所得到的极体雌核-2 群体中只能检测到 13 个多态性位点, 丢失了 17 个, 分别为 S8-1、S14-5、S14-7、S31-4、S31-5、S31-8、S64-2、S64-5、S64-7、S66-5、S69-3、S115-2、S326-5、S326-9、S331-5、S333-2、S333-5, 丢失的位点数占总位点数的 14.53%, 占总多态性位点数的 56.67%。

3 讨论

3.1 30 个 RAPD 多态性位点的真实性

RAPD 位点上等位基因的分离是以孟德尔方式遗传和共显性的。为了筛选出可用于草鱼基因组分析的可靠 RAPD 分子标记, 以孟德尔共显性分离规律为判断标准, 对这 30 个 RAPD 多态性位点在极体雌核-2 群体中存在的三种情况进行了遗传分析。

第一和第二种情况显然是符合 1:1 分离规律的。因为在人工诱导雌核发育时, 当所选择的母本个体中被检测分析的位点是野生型纯合状态时, 所得到的雌核发育群体中的所有个体上就都能检测到这些位点; 而当人工选择的母本个体中被检测分析的位点是缺失型的纯合体时, 所得到的雌核发育群体中所有的个体就都完全检测不到这些位点。所以, 以这两种情况在雌核发育草鱼群体中出现的 23 个多态性位点是符合孟德尔遗传规律的真实位点, 可以作为草鱼基因组分析的分子标记。

在雌核发育草鱼群体中所检测到的第三种位点是在群体水平上的杂合位点。在雌核发育草鱼群体中导致出现第三种情况 RAPD 位点的可能性有两种。第一种是原来所选择的亲本个体是杂合状态

的, 因人工诱导雌核发育使两个不同的等位基因按 1:1 分离, 经染色体加倍处理后所得到的个体是基因纯合型的。因此, 两个不同的等位基因在雌核发育群体中将以一定的比例出现。第二种可能性是所检测到的电泳条带不是基因组上的真实位点; 则这种条带在群体中的分布不会按孟德尔共显性遗传规律以 1:1 的比例出现。对本实验在极体雌核-2 群体中所检测到的 7 个杂合型位点进行的卡平方分析结果表明, 其符合 1:1 预期的 P 值均在 0.1936 与 0.5775 之间。按照统计遗传学的判断标准, 当 P 值大于 0.05 时, 则预先推测的分布规律符合科学依据^[21]。因此, 这 7 个 RAPD 多态性位点的分布也是符合孟德尔遗传规律的真实位点, 可以作为草鱼基因组 DNA 分析的分子标记。

3.2 人工诱导雌核发育的过程会发生 RAPD 位点的快速丢失

本实验所得到的湘江流域草鱼群体, 连续两代极体型人工诱导雌核发育草鱼群体中遗传分析数据也表明: 湘江流域普通草鱼群体的多态位点多于极体雌核-2 群体; 就各群体中多态位点数占群体内为点位总数比例来说, 湘江流域普通草鱼群体内的多态位点比例为 26.09%, 大于极体雌核-2 群体内的多态位点比例(13.54%)。说明在人工诱导雌核发育过程中存在 RAPD 多态性位点的快速丢失现象。本实验的结果表明, 经过连续两代人工诱导后, 30 个多态性位点就丢失了 17 个。RAPD 位点的丢失是基因纯化和人工选择双重作用造成的。由于部分 RAPD 位点在湘江流域野生草鱼群体某些个体的一个或两个基因组中缺失, 在人工诱导雌核发育过程中这些位点被纯化后, 当人工选择的母本是缺失这些位点的个体时, 所得到的雌核发育群体中就会完全缺失这些位点。大量等位基因的丢失将导致草鱼群体适应不同生存环境的能力下降; 从而可能使种群在某些环境条件和因子改变时因无法适应而面临灭绝的危险。因此, 在用人工诱导雌核发育技术进行草鱼人工育种的同时, 还应该重视野生草鱼群体种质资源的多样性, 使野生草鱼能更好的繁衍生存下去和为进行遗传育种提供更多的遗传性状选择。因此, 加强对自然水体中草鱼种质资源多样性的保护, 以及利用各种现代生物学技术, 筛选和组合优良性状基因, 以培育出新的抗病力强的草鱼品系, 都是草鱼遗传育种中必须同样重视和不可或缺的两个内容。

3.3 关于极体雌核-2 群体中的杂合型 RAPD 位点在连续两代人工诱导极体型雌核发育的草鱼群

体中,笔者在 30 个 RAPD 多态性位点中仍然检测到了 7 个在群体水平上是杂合型的位点。这些杂合位点表明第一代人工诱导的极体型雌核发育草鱼不仅在群体水平上,而且在个体水平上也仍然存在一定程度的杂合性。原因是由于卵子在减数分裂时存在一定程度的染色体交换,因此人工诱导雌核发育后抑制第二极体排出所得到的第一代雌核发育二倍体的两套染色体虽然是姐妹染色体,但由于其中一条上的某些片段与同源染色体发生了交换,另一条上的相应片段没有发生交换,从而导致这两条染色体上有一些基因座位上不是纯合的。经第二次人工诱导雌核发育所得到的极体雌核-2 群体中检测到的群体水平的杂合 RAPD 位点是否在个体水平上已经全部纯合,尚需要进一步的分析来确定。

参考文献:

- [1] Williams J G K, Kubelk A R. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**: 6531—6535
- [2] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**: 7213—7218
- [3] Carl W. Diffenbath and Gabriela S. Dveksler (Translated by Huang Peitang, Yu Weiyuan, Chen Tianmi *et al.*). PCR Primer: A Laboratory Manual [M]. Beijing: Science Press, 2000 [C. W. 迪芬巴赫, G. S. 德维克斯勒著 (黄培堂, 俞伟源, 陈添弥, 等译). PCR 技术实验指南. 北京: 科学出版社, 2000]
- [4] Wu C J, Gui J F. Fish Genetics and Breeding Engineering [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 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]
- [5] Zou S M, Li S F, Cai W Q *et al.* Establishing gynogenetic groups of genetic improved *Megalobrama amblycephala* and its genetic analysis [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, **25**(4): 311—316 [邹暑明, 李思发, 蔡完其, 等. 团头鲂良种雌核发育群体的建立及其遗传变异. 水产学报, 2001, **25**(4): 311—316]
- [6] Lu R Rank G H. Use of RAPD population genetics parameters in the alfalfa leafcutting bee, *Megachile rotundata* [J]. *Genome*, 1996, **39**: 63—70
- [7] Xia D Q, Cao Y, Wu T T *et al.* Study on lineages of *Protosalanx chinensis*, *Neosalanx taihuensis* and *N. oligodontis* in Taihu Lake with RAPD technique [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2000, **7**(1): 12—15 [夏德全, 曹莹, 吴婷婷, 等. 用 RAPD 方法分析太湖大银鱼、太湖新银鱼和寡齿新银鱼的亲缘关系. 中国水产科学, 2000, **7**(1): 12—15]
- [8] Lin J Z, Ritland K. Construction of a genetic linkage map in the wild plant *Mimulus* using RAPD and isozyme markers [J]. *Genome*, 1996, **39**: 63—70
- [9] Iturra P, Medrano J F, Bagley M *et al.* Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout [J]. *Genetica*, 1998, **101**: 209—213
- [10] Zhou Li, Fan L C, Gui J F *et al.* RAPD analysis of incorporation of heterologous genetic materials in multiple species of Silver Crucian carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, **22**(4): 301—303 [周莉, 樊连春, 桂建芳, 等. 银鲫复合种外源遗传物质整合的 RAPD 分析. 水生生物学报, 1998, **22**(4): 301—303]
- [11] Zhang S M, Deng H, Wang D Q *et al.* Population structure and 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 RAPD 指纹分析. 水生生物学报, 2001, **25**(4): 324—330]
- [12] Xue G X, Liu J. RAPD analysis of grass carp population in three river water [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1998, **5**(1): 1—5 [薛国雄, 刘棘. 三江水系草鱼种群 RAPD 分析. 中国水产科学, 1998, **5**(1): 1—5]
- [13] Chen J H, Huang M M. RAPD analysis on genomic DNA of two artificial gynogenetic groups of grass carp, *Cenopharyngodon idellus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(5): 471—477 [陈金辉, 黄明敏. 两个不同雌核发育群体基因组 DNA 的 RAPD 分析. 水生生物学报, 2004, **28**(5): 471—477]
- [14] Huang M M, Chen J H. Screening of polymorphic primers and polymorphic locus for grass carp genomic RAPD analysis, *Cenopharyngodon idellus* [J]. *Science Technology and Engineering*, 2004, **4**(2): 91—96 [黄明敏, 陈金辉. 草鱼基因组随机扩增多态性引物及多态性位点筛选. 科学技术与工程, 2004, **4**(2): 91—96]
- [15] Liu C L, Guan C Y. Studies on the authenticity of plant marker [J]. *Biotechnology Information*, 1999, **2**: 31—34 [刘春林, 官成云. 植物 RAPD 标记的可靠性研究. 生物技术通报, 1999, **2**: 31—34]
- [16] Luo C, Liu Y. Studies on production of gynogenetic grass carp and crucian carp [J]. *Acta Sci. Univ. Norm. Hunan*, 1991, **14**(2): 154—159 [罗琛, 刘筠. 人工诱导草鱼和鲫鱼雌核发育的研究. 湖南师范大学自然科学学报, 1991, **14**(2): 154—159]
- [17] Stanley J G. Morphology of androgenetic and gynogenetic grass carp, *Cenopharyngodon idella* (Valenciennes). *J. Fish Biol*, 1976, **9**: 523—528
- [18] Li B X, Luo C. Cytological observations on induction mitogynogenesis by heat-shocking of the eggs in grass carp, *Cenopharyngodon idellus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(2): 155—160 [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. 水生生物学报, 2003, **27**(2): 155—160]
- [19] Damato, M. E., D. Corach. Genetic diversity of populations of the fresh shrimp *Macrobrachium borellii* evaluated by RAPD analysis [J]. *Journal of Crustacean Biology*, 1996, **16**(4): 578—588
- [20] Wang J, Quan C G. RAPD analysis of the reared and wild *Pseudosciaena crocea* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2001, **23**(3): 87—91 [王军, 全成干. 宫井大黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析. 海洋学报, 2001, **23**(3): 87—91]

GENETIC ANALYSIS ON SOME RAPD LOCI FOR IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKERS IN GRASS CARP GENOMIC DNA

LIU Zheng-Hua, CHEN Jin-Hui, HUANG Ming-Min, ZHENG Kang and LUO Chen

(*Institute of Biology, Hunan Normal University, Changsha 410081*)

Abstract: The products amplified by Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) techniques are always variable in different experiments. In order to establish a universal RAPD molecular marker system for grass carp genomic DNA polymorphism analysis, selected polymorphism RAPD loci should be checked by using different strains with distinct genetic backgrounds according to the law of Mendelian genetics. In this experiment, some polymorphic RAPD loci that could be employed as molecular markers for grass carp genomic DNA analysis have been examined by comparatively analyzing the genomes of the Xiangjiang River grass carp group (Xiangjiang group) and a two-generation artificial induced meio-gynogenetic grass carp group (meio-gynogenetic-2 group). The Xiangjiang group can provide distinct genetic background samples and may include all the genotype of grass carp, while the meio-gynogenetic-2 group can provide clear genetic background samples. The different characterizations of the two groups can help identify the polymorphic RAPD loci in grass carp. Total 36 individuals of the Xiangjiang group and total 29 individuals of meio-gynogenetic-2 group were examined with 10 polymorphism random primers in this experiment. With RAPD-PCR method, total 30 polymorphic loci have been identified in Xiangjiang group. In meio-gynogenetic-2 group, 17 of the polymorphic loci identified in Xiangjiang group were not detected in all the examined individuals. Only 13 of the 30 polymorphic loci in Xiangjiang group were identified in meio-gynogenetic-2 group. However only 7 of the 13 detected loci showed polymorphism, the other 6 loci were identified in all the individuals in meio-gynogenetic-2 group and no polymorphism was observed. Because the meio-gynogenetic-2 individuals are highly purified during the gynogenesis and artificial selection for two generations, obviously, the 17 polymorphic loci that were undetected in meio-gynogenetic-2 group but in Xiangjiang group and the 6 polymorphic loci that detected in all the examined individuals of the meio-gynogenetic-2 group are the real polymorphic loci in grass carp. A chi-squared test was done on the 7 loci that show polymorphism to determine if the ratio of the detected and undetected individuals were consistent with the 1:1 expected ratio. The P values of the 7 polymorphic loci are from 0.1936 to 0.5775. This genetic statistical analysis indicated that the 7 polymorphic loci in Xiangjiang group and meio-gynogenetic-2 group are also consistent with the law of Mendelian genetics well. The 30 polymorphic RAPD loci, therefore, could be used as reliable molecular markers for the grass carp genomic DNA analysis. The observation that 17 polymorphic loci have been lost during the process of the two-generation artificial gynogenesis strongly suggested that protection of the diversity of natural grass carp resource and selection of homozygous traits with desired economic genotypes are both very important for grass carp breeding.

Key words: Grass carp; Polymorphic loci; Genetic analysis; Molecular marker