

两个不同的人工雌核发育草鱼群体基因组 DNA 的 RAPD 分析

陈金辉 黄明敏 郑康 林凯东 罗琛

(湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081)

摘要: 采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术对连续两代人工诱导雌核发育草鱼群体和一代人工诱导雌核发育草鱼群体的群体内的遗传相似度、遗传距离以及群体多样性进行了分析, 并用一个随机取样的普通草鱼群体作比较。用 26 个多态性引物在 3 个群体中共检测到了 291 个扩增位点; 在 3 个群体中检测到的位点数分别为 265、272 和 282。其中多态性位点数分别为 15、19 和 81。遗传学统计分析结果表明: 3 个群体的多态位点比例分别为 5.66%、6.99%、28.72%; 香农表型多样性指数分别为 0.1702、0.3169 和 0.8450; 按照 Nei 指数统计的三个群体的遗传相似度分别为 0.9851、0.9820、0.9114。这些结果表明: 两个雌核发育草鱼群体的遗传多样性远低于普通草鱼群体, 而其群体的基因组 DNA 同质性远高于普通草鱼。而在两个雌核发育草鱼群体中, 两代雌核发育群体的遗传多样性要低于一代雌核发育群体的遗传多样性; 而群体的遗传纯合度则前者高于后者。

关键词: 雌核发育草鱼; RAPD 分析; 遗传相似度; 遗传距离; 遗传多样性

中图分类号: S965.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)05-0471-07

人工雌核发育根据雌核染色体加倍类型的不同可分为极体型雌核发育(抑制第二极体的排出)和有丝分裂型雌核发育(抑制第一次卵裂)。在极体型雌核发育过程中, 雌核的两套染色体是由两套姐妹染色单体组成的, 而且由于同源染色单体之间在第一次减数分裂时会发生重组交换, 因此这两套姐妹染色单体上可能有一些染色体片段上的等位基因存在差异, 故通过极体型雌核发育所得的子代的基因型可能不是完全纯合的。而在有丝分裂型雌核发育中, 雌核的两套染色体是在完成减数分裂后由同一套染色单体复制而来, 因此所得的子代的基因型可能是完全纯合的。如果连续进行两代雌核发育, 通过第一代有丝分裂型雌核发育可以建立基因型完全纯合的个体, 在此基础上进行第二代有丝分裂型雌核发育, 就可以得到基因型完全一致的个体组成的群体。这样得到的群体, 在理论上, 不仅其个体的基因型是完全纯合的, 而且所有个体之间的基因型是完全一致的。在极体型雌核发育类型中, 经过连续两代人工诱导雌核发育也可以建立起高纯合度的雌核发育品系。所以经过连续两代有丝分裂型雌核发

育可快速建立鱼类纯系或高纯合的品系^[1]。

但在实际的育种过程中, 不同雌核发育类型鱼类群体的遗传纯合度的具体指标如何, 是否能达到遗传育种和遗传分析所需要的纯合度? 此外, 在雌核发育群体中也可能由于经过辐射处理的异源精子的某些未失活遗传物质的影响、物理隔离的不完善、以及在有丝分裂型雌核发育群体中可能存在的极体型雌核发育等因素而影响雌核发育鱼群体的遗传纯合性。因此, 在将培育的雌核发育群体应用于育种实践前, 需要用各种技术在分子水平上对其基因组进行精确的遗传学分析。

基于 PCR 技术的 DNA 指纹标记技术有小卫星 DNA、微卫星 DNA、AFLP 和 RAPD 等。其中近 10 年来发展起来的用任意引物进行基因组 DNA 指纹分析^[2,3]这一技术, 由于具有快速、灵敏, 可同时检测的位点数多, 可显示的多态性强, 无须分子杂交, 特别是能在不知道基因组 DNA 序列的情况下被使用等优点而受到众多生物学工作者的青睐。目前已被广泛的应用于动植物的种质资源鉴定^[4,5], 种群生物学和系统发育学^[6-8], 遗传图谱的构建^[9,10]以及

收稿日期: 2003-04-28; 修订日期: 2003-11-20

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(20065-12)资助

作者简介: 陈金辉(1979-), 湖南新邵人, 硕士

通讯作者: 罗琛, E-mail: cluo@hunnu.edu.cn

其它的研究领域^[11,12]。

草鱼是我国最主要的淡水养殖鱼类。开展草鱼的基因组分析和进行遗传育种研究具有重要的意义。张四明^[13]、章怀云^[14]等利用 RAPD 技术分别对长江水系鲢和草鱼的遗传变异及变异性、草鱼和鲤群体的遗传变异进行了指纹分析。但对人工雌核发育草鱼群体的遗传学分析尚未见报道。本研究利用 RAPD 技术对两个不同人工雌核发育草鱼群体的遗传多样性, 群体内和群体间的遗传变异进行了研究, 并以一个随机取样的湘江流域普通草鱼群体作对照, 为评估不同雌核发育草鱼群体的遗传纯合度和遗传多样性提供准确的科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料 湘江流域普通(正常两性生殖)草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)材料分多次从长沙市的农贸市场随机采取, 雌核发育草鱼材料取自本实验室的实验基地。其中, 一代雌核发育群体为以经紫外线照射过的异源精子启动草鱼卵子的发育, 然后通过抑制第一次卵裂而得到基因纯合型的个体组成的群体(有丝雌核-1)。二代雌核发育草鱼群体为以经紫外线照射过的异源精子启动草鱼卵子的发育, 通过抑制第二极体^[15,16]的排出而得到雌核发育草鱼; 当这些雌核发育草鱼性成熟以后, 以其中的一条雌核发育鱼作亲本, 以经紫外线照射过的异源精子启动其所产卵子的发育, 然后再通过抑制卵子的第一次卵裂^[17]而得到第二次雌核发育草鱼个体组成的群体(极体-有丝雌核-2)。

根据 Tajima 的 DNA 序列抽样分布理论^[18], 在 DNA 水平上估计群体变异时, 样本数量 $N=10$ (甚至为 5) 就能反应群体水平。由于雌核发育草鱼遗传物质全部来自母本并且二个雌核发育群体分别来自同一母本, 因此每一条雌核发育草鱼的纯合度要大大高于普通草鱼, 每一群体内的个体之间的遗传距离也显著降低, 所以本研究在选取样本数时, 普通草鱼随机选取 15 尾, 每个雌核发育草鱼群体各取 10 尾。取材时分别剪取草鱼的幼嫩尾鳍, 用双蒸水漂洗干净后分装入 1.5mL 的离心管中, 放入液氮中快速冷冻 5min 左右, 然后保存于 -70°C 冰箱, 作为提取基因组 DNA 的材料。

1.2 RAPD 反应仪器及试剂 PCR 扩增仪为美国 Applied Biosystems 公司生产的 GeneAmp[®] PCR System 2700 热循环仪。RAPD 扩增引物购自上海生工生物工程技术有限公司(Sangon), *Taq* 酶, dNTP

以及 PCR 反应 Buffer 购自华美生物工程公司(Sino-American Biotechnology Company)。

1.3 DNA 的提取 3 个群体的尾鳍样品, 采用酚/氯仿法, 稍作修改后提取基因组 DNA。提取过程中蛋白酶 K 消化过夜, 用 NaCl、乙醇沉淀, TE (pH8.0) 溶解。通过 Eppendorf 公司的 BioPhotometer 测定基因组 DNA 的紫外光吸收的光度值以检测 DNA 的浓度和纯度, 经 0.7% 浓度的琼脂糖电泳检测 DNA 的完整性以评估所提取的基因组 DNA 能否用于 PCR 扩增, 符合要求的 DNA 贮于 4°C , 备用。

1.4 引物的筛选 从 180 个生工系列引物 S1-S80 S100-S140, S220-S240, S320-S340, S461-S480 中经预备实验选出重复性好、图谱清晰、具有多态性且扩增产物条带数较多的引物 31 个^[19] (选择中等复杂的图谱^[20])。从中选取 26 个用于对 3 个群体的所有的个体的基因组 DNA 进行扩增(引物编号及其序列见表 1)。

1.5 RAPD-PCR 反应条件及其扩增产物的分离 参照 Williams 等的方法, 以 Mg^{2+} 浓度, dNTP 浓度, 引物浓度, *Taq* 酶, 以及退火温度等主要因子对反应条件进行优化, 最后确定适合本实验的反应体系和反应程序。反应体系如下: 总体积 25 μL , 包括 100ng 基因组 DNA, 引物 24.75ng, 0.2mmol/L dNTP (终浓度), 1.5U *Taq* 聚合酶, 2.5mmol/L MgCl_2 (终浓度), 2.5 μL $10\times$ Buffer。反应程序为 95°C 预变性 4min, 然后进行 35 个热循环, 每一个热循环包括 94°C 变性 1min, 36°C 退火 1min, 72°C 延伸 2min, 最后在 72°C 延伸 10min。以上反应程序在 Applied Biosystems 公司生产的 GeneAmp[®] PCR System 2700 热循环仪中进行。为了确定电泳谱带不是在 PCR 扩增过程中由于外源 DNA 的污染而产生的, 每次 PCR 扩增反应均设不含模板 DNA 的空白对照。PCR 产物在以 1.4% 的琼脂糖为支持介质的电泳中分离(外加电场为 4V/cm), 于含溴化乙啶(1%)的染色盒中染色 30min, 然后用凝胶成像系统扫描, 并保存扫描结果。

1.6 多态位点比例 根据 Apostol 等^[21]的假设, 将 RAPD 标记作为等位基因进行多态分析, 多态位点比例 $P = \text{多态位点数} / \text{总位点数}$ 。

1.7 遗传相似度和遗传距离 任意两个个体间的遗传相似度和遗传距离按照 Nei^[22]的公式进行计算, 经电泳以后获得的基因组 DNA 指纹图谱, 由于个体之间序列差异而产生多态性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)。任意两个个体之间的遗传相

似度和遗传距离按下列公式来计算:

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y) \quad P = 1 - F$$

其中 F 为两个个体之间的遗传相似度, P 为两个个体之间的遗传距离。N_{xy} 为个体 x 和个体 y 共同拥有的 RAPD 谱带数, N_x 和 N_y 分别为个体 x 和个体 y 所拥有的谱带数。

群体内遗传相似度和遗传距离通过对群体内所有个体间的遗传相似度 F 和遗传距离 P 值简单平均而求得。

1.8 香农遗传多样性指数^[23] (Shannon's index of phenotypic diversity): $H_o = - \sum \pi_i \ln \pi_i$, 其中的 π_i 为表型频率, 即某一扩增谱带在某一群体中出现的频率, \ln 为自然对数。

2 结果

用 26 个随机引物对 3 个草鱼群体共 35 个个体的基因组 DNA 进行了两次以上重复的 RAPD 分析。单个引物检测到的位点数在 5—14 之间, PCR 扩增片段的长度介于 300—2300 bp 之间。26 个随机引物总共检测到 291 个位点。其中有部分引物扩增出群体特异性的谱带, 如引物 S326 在极体-有丝雌核-2 草鱼群体中扩增出特异于有丝雌核-1 草鱼群体的一条谱带(如图 1B 中箭头所示)。

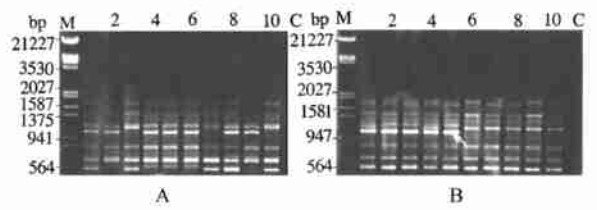


图 1 A 为引物 S326 在普通草鱼群体基因组 DNA 上的 RAPD—PCR 扩增图谱。B 为引物 S326 在二个雌核发育草鱼群体基因组 DNA 上的 RAPD—PCR 扩增效果图(M 为 Lambda DNA/Hind III+ EcoR I Marker DNA, C 为空白对照。B: 1—5 为极体-有丝雌核-2 种群, 6—10 为有丝雌核-1 种群)。

Fig. 1 A is RAPD—PCR amplification profile in a group of common grass carp. Fig. 1 B is RAPD—PCR amplification profile in two artificial gynogenetic groups of grass carp(M represent Lambda DNA/Hind III+ EcoR I Marker DNA and C represent negative control. No. 1—5 is meiotic mitor gynogenetic grass carp group and No. 6—10 is mitor gynogenetic grass carp group in figure. 1 B) .

2.1 多态位点比例

单个引物在 3 个草鱼群体中扩增出的位点数、多态位点数以及多态位点比例见表 1。用 26 个随机引物对 3 个草鱼群体的基因组 DNA 进行 RAPD-PCR 扩增后, 在极体-有丝雌核-2 草鱼群体、有丝雌核-1 草鱼群体及普通草鱼群体中分别检测到 265 个、272 个、282 个位点, 单个引物在 3 个群体中扩增出的谱带数在 5—14 之间, 检测到的平均位点分别为

表 1 26 个引物分别在 3 个草鱼群体中扩增出的位点数和多态位点数

Tab. 1 The number of loci and number of polymorphic loci amplified within three groups of grass carp with 26 primers, respectively.

引物编号 Primers	扩增出的位点数 number of loci			多态位点数 number of polymorphic loci		
	CJY ₂	CY ₁	P ₁	CJY ₂	CY ₁	P ₁
	S8:	12	13	12	0	1
S14:	11	10	10	0	0	4
S29:	10	10	12	0	1	4
S31:	12	11	11	2	1	3
S35:	11	11	10	1	1	3
S49:	6	6	9	0	0	3
S50:	15	14	14	4	0	5
S51:	13	14	14	0	1	3
S52:	10	10	10	0	0	4
S58:	10	11	11	0	1	4
S64:	13	13	13	0	1	3

续表

引物编号 Primers	扩增出的位点数 number of loci			多态位点数 number of polymorphic loci			
	CJY ₂	CY ₁	P ₁	CJY ₂	CY ₁	P ₁	
	S66:	GAACGGACTC	13	13	12	0	0
S69:	CTCACCCTCC	10	10	10	2	2	2
S76:	CACACTCCAG	5	5	5	0	0	2
S102:	TCGGACGTGA	10	10	11	0	0	2
S111:	CTTCCGCACT	9	9	11	0	0	4
S114:	ACCAGGTTGG	10	11	12	1	2	4
S115:	AATGGCCGAG	10	7	10	1	0	2
S117:	CACTCTCCTC	10	10	12	1	1	4
S124:	GGTGATCAGG	12	13	12	0	1	2
S234:	AGATCCCGCC	11	12	12	1	2	2
S326:	GTGCCGTTC A	7	9	10	0	1	3
S331:	CTCAGTCGCA	9	11	11	0	1	4
S332:	TCAACGGGAC	10	9	9	0	0	3
S333:	GACTAAGCCC	8	9	9	1	1	3
S337:	CCTTCCCACT	8	11	10	1	1	3
SUM		265	272	282	15	19	81
Percent of polymorphic loci				0.0566	0.0699	0.2872	

注: CJY₂ 指极体-有丝雌核-2草鱼群体, CY₁ 指有丝雌核-1草鱼群体, P₁ 指普通草鱼群体(下同)。

Note: CJY₂ represent meir mitō gynogenetic 2 group, CY₁ represent mitō gynogenetic 1, P₁ represent common grass carp group.

10.19、10.46、10.85, 其中多态位点数分别为 15 个、19 个、81 个, 由此得出 3 个群体的多态位点比例分别为 5.66%、6.99%、28.72%。其多态位点比例的大小顺序为普通草鱼群体 > 有丝雌核-1草鱼群体 > 极体-有丝雌核-2草鱼群体。

2.2 香农遗传多样性指数 用香农遗传多样性指数计算了 3 个草鱼群体的群体内遗传多样性(表 2)。由不同的随机引物检测到的位点数及多态性位点数均有所不同, 因此按各个引物计算的遗传多样性指数值就有一定的差异, 变化幅度从 0.000—1.2228。由表 2 可知, 3 个群体中, 按照香农遗传多样性指数计算所得的遗传多样性, 普通草鱼的遗传多样性最高(0.8450), 有丝雌核-1草鱼群体次之(0.3169), 极体-有丝雌核-2草鱼群体最低(0.1722)。

表 2 由香农遗传多样性指数计算的 3 个草鱼群体内遗传多样性

Tab. 2 Genetic diversity within three groups of grass carp estimated by

Shannon index of phenotypic diversity

Primers	CJY ₂	CY ₁	P ₁
S8	0.0000	0.1785	0.7479
S14	0.0000	0.0000	0.9803
S29	0.0000	0.1785	1.2228
S31	0.5004	0.3219	0.6863
S35	0.3065	0.3665	0.8987
S49	0.0000	0.0000	0.5553
S50	1.3460	0.0000	1.1713
S51	0.0000	0.1785	0.8462

续表

Primers	CJY ₂	CY ₁	P ₁
S52	0.0000	0.0000	1.0496
S58	0.0000	0.3665	1.1237
S64	0.0000	0.3665	0.9580
S66	0.0000	0.0000	0.3251
S69	0.6730	0.5004	0.5521
S76	0.0000	0.0000	0.4088
S102	0.0000	0.0000	0.5914
S111	0.0000	0.0000	1.1805
S114	0.3665	0.3219	0.8272
S115	0.3065	0.0000	0.5716
S117	0.3064	0.3219	1.0972
S124	0.0000	0.3665	0.4613
S234	0.0000	0.3665	0.6831
S326	0.0000	0.3665	0.9227
S331	0.0000	0.3665	1.0966
S332	0.0000	0.0000	1.0597
S333	0.3665	0.3665	1.0340
S337	0.3065	0.3065	0.9181
Average	0.1772	0.3619	0.8450

2.3 3 个草鱼群体内遗传相似度和遗传距离

参照 Nei 的方法对 3 个群体的群体内遗传相似

度和遗传距离进行了分析, 所得的结果如表 3。

由表 3 可知 3 个草鱼群体的群体内遗传相似度分别为 0.9851, 0.9820, 0.9114, 即极体-有丝雌核 2 草鱼群体的群体相似度最大, 有丝雌核 1 草鱼群体

的次之, 普通草鱼群体的最小。但这 3 个草鱼群体内的遗传距离大小顺序恰恰相反, 其大小顺序为普通草鱼群体 (0.0886) > 有丝雌核 1 草鱼群体 (0.0180) > 极体-有丝雌核 2 草鱼群体 (0.0149)。

表 3 3 个草鱼群体内遗传相似度和遗传距离

Tab. 3 Genetic similarity indices and genetic distance within three populations of grass carp estimated by Nei's index

	极体-有丝雌核 2 草鱼群体 Meior mitor gynogenetic 2 group	有丝雌核 1 草鱼群体 Mitor gynogenetic 1 group	普通草鱼群体 Common grass carp group
遗传相似度 Genetic similarity	0.9851	0.9820	0.9114
遗传距离 Genetic distance	0.0149	0.0180	0.0886

3 讨论

现代遗传学认为, 一个物种的遗传变异的大小往往与此物种的群体大小成一定的比例关系, 而且与此物种对环境的适应能力密切相关。经抑制第一次卵裂产生的雌核发育草鱼, 在理论上, 个体的基因型是纯合的, 又因为这些子代来自同一亲本, 因此个体之间的遗传差异相对较小, 群体内的纯合度高, 此人工群体与野生群体相比, 存在核酸序列丢失的现象, 如果所丢失的核酸序列位于编码区, 或者是与某一基因的表达相关, 将导致个体的某一性状的丢失, 这将导致一个群体的生物多样性水平的降低, 最终会导致整个群体的生存能力下降。但在生产上, 当前的目的主要是要解决一二龄草鱼抗病能力差的问题, 以提高草鱼的产量和草鱼养殖的经济效益, 因此通过雌核发育这一单性生殖方式, 筛选具有抗病能力强这一优良性状的草鱼个体并进而建立遗传背景完全一致的群体纯系是一种有效的遗传育种手段。而且, 通过人工雌核发育建立纯系的速度大于自交或兄妹近交, 一次雌核发育相当于 8—10 个世代同胞兄妹交配^[24]。

Kuhnlein^[25] 等对具有不同近交水平的鸡品系进行 DNA 指纹研究发现当鸡群的平均近交系数为 0.026 时, 不同带纹数为 25 条, 近交系数为 0.39 时, 不同带纹数为 13 条, 当近交系数为 0.98 时, 不同带纹数为 8 条 (近交系数越大, 则不同带纹数越少)。这主要是因为近交水平和遗传纯度高时, 各等位基因在一定程度上被固定, 因而频率上升, 谱带数目减少。本研究利用 26 个 10 碱基的随机引物对从草鱼尾鳍中提取的基因组 DNA 进行 RAPD 检测, 在极体

有丝雌核 2 草鱼群体、有丝雌核 1 草鱼群体、普通草鱼群体中随着它们近交系数的减小, 检测到的位点数依次增加, 分别为 265、272、282。这在说明 RAPD 扩增高效率的同时, 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^[14]。26 个引物在 3 个群体中检测到的多态位点百分率分别为 5.66%、6.99%、28.72%。经香农表型多样性指数分析, 得到 3 个群体的遗传多样性指数分别为 0.1722、0.3169、0.8450。按照 Nei 指数统计的群体内遗传相似度分别为 0.9851、0.9820、0.9114。这三种方法所得的遗传多样性变化趋势基本相同, 即普通草鱼群体的群体多样性 > 有丝雌核 1 草鱼群体的群体多样性 > 极体-有丝雌核 2 草鱼群体的群体多样性。以上数据, 一方面, 说明二个雌核发育群体是高纯度的纯系, 而且极体-有丝雌核 2 草鱼群体的群体纯合度又要高于有丝雌核 1 草鱼群体的群体纯合度。另一方面也说明, 通过极体型雌核发育所得到的个体, 由于卵核的同源染色单体发生重组, 其基因型不是完全纯合的, 因此经过两次雌核发育 (一次极体型雌核发育和一次有丝分裂型雌核发育) 所得到的群体的遗传相似度只比经过一次有丝分裂型雌核发育所得到的群体的遗传相似度高。

随随机扩增多态性 PCR 分析发现, 雌核发育草鱼群体的带谱与正常两性生殖 (普通) 草鱼群体之间也存在差异。有一部分谱带为雌核发育草鱼群体所特有, 有一部分带为某一雌核发育群体所特有, 当然在雌核发育群体中也存在相对于普通草鱼而言的缺失带。出现这种现象的原因可能与雌核发育草鱼的原始母本来源有关, 也可能为异源精子 DNA 碎片的随机插入^[11], 但这还有待于进一步研究确认。

参考文献:

- [1] Wu Q J, Chen R D, Ye Y Z. Investigation on the carp gynogenesis with reference to establishing a pure line [J]. *Acta Genetica Sinica*, 1981, **8**(1): 50—55. [吴清江, 陈荣德, 叶玉珍. 鲤鱼人工雌核发育及其作为建立近交系新途径的研究. 遗传学报, 1981, **8**(1): 50—55]
- [2] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**: 6531—6535
- [3] Welsh J, McClelland M. . Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**: 7213—7218
- [4] Wu Q 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 [邹黎明, 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 genetic 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] Marillia E F, Scoles G J. The use of RAPD markers in *Hordeum* Phylogeny [J]. *Genome*, 1996, **39**: 646—654
- [9] 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. 鲤鱼的遗传连锁图谱. 中国水产科学, 2000, **7**(1): 1—5]
- [10] Lin J Z, Riland K. Construction of a genetic linkage map in the wild plant *Mimulus* using RAPD and isozyme markers [J]. *Genome*, 1996, **39**: 63—70
- [11] 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—303. [周莉, 樊连春, 桂建芳. 银鲫复合种外源遗传物质整入的 RAPD 分析. 水生生物学报, 1998, **22**(4): 301—303]
- [12] Iturra P, Medrano J F, Bagley M. Identification of sex chromosome molecular markers using RAPD and fluorescent *in situ* hybridization in rainbow trout [J]. *Genetica*, 1998, **101**: 209—213
- [13] Zhang S M, Deng H, Wang D Q *et al.* population structure and diversity of silver carp and grass carp from populations 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 分析. 水生生物学报, 2001, **25**(4): 324—330]
- [14] 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]
- [15] Stanley J G. Morphology of androgenetic and gynogenetic grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes) [J]. *J. Fish Biol*, 1976, **9**: 523—528
- [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] Li B X, Luo C. Cytological observations on induction of mitogynogenesis by heat shocking of the eggs in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* [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 [J]. 水生生物学报, 2003, **27**(2): 155—160]
- [18] Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequence in finite populations [J]. *Genetics*, 1983, **105**: 437—445
- [19] Huang M M, Chen J H, Luo C *et al.* screening of polymorphic primers and polymorphic locus for grass carp genomic RAPD analysis [J]. *Science Technology and Engineering*, 2004, **4**(2): 91—96 [黄明敏, 陈金辉, 罗琛等. 草鱼基因组随机引物扩增多态性引物及多态位点的筛选. 科学技术与工程, 2004, **4**(2): 91—96]
- [20] Dieffenbach C W, Dveksler G S. (translated by Huang P T, *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. (黄培堂等译). PCR 技术实验指南 [M]. 北京: 科学出版社. 2000]
- [21] 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
- [22] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**: 5269—5273
- [23] Wachira F N, Waugh R, Hackett C A. *et al.* Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers [J]. *Genome*, 1995, **38**: 201—210
- [24] Streisinger G, Walker C, Dower N, *et al.* Production of homozygous diploid zebra fish [J]. *Nature*, 1981, **291**: 293—296
- [25] Kuhnlein U. Assessment of inbreeding by DNA fingerprinting: Development of a calibration curve using defined strains of chickens [J]. *Genetics*, 1990, **125**: 161—165

RAPD ANALYSIS ON GENOMIC DNA OF TWO ARTIFICIAL GYNOGENETIC GROUPS OF GRASS CARP, *CTENOPHARYNGODON IDELLU*

CHEN Jir-Hui, HUANG Ming-Min, ZHENG Kang, LIN Kai-Dong and LUO Chen

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

Abstract: Genetic similarity, genetic distance and Shannon's genetic diversity of two different artificial gynogenetic grass carp groups and a control common grass carp group were analyzed in the methods of RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA). One of the two different gynogenetic groups was a meiotic-mitō gynogenetic grass carp group that was produced by artificial gynogenesis for two generations. Another gynogenetic group was a mitō gynogenetic grass carp that was generated by artificial gynogenesis only one generation. The common grass carp group was randomly collected from the markets in Changsha.

Total 291 loci were detected in all of the three groups through the RAPD-PCR with 26 polymorphic random primers. The loci number in the three groups, meiotic-mitō gynogenetic group, the mitō gynogenetic group and the common grass carp group, were 265, 272 and 282 and the number of polymorphic loci were 15, 19 and 81 respectively. Genetic statistical analysis showed that percentage of polymorphic loci of the three groups of grass carp, were 5.66%, 6.99%, 28.23%; and the genetic similarity within the three groups of grass carp estimated by Nei's index were 0.9851, 0.9820, 0.9114, respectively. The genetic diversity indices within the three groups of grass carp estimated by Shannon index of phenotypic diversity were 0.1722, 0.3169 and 0.8450 respectively. Generally, the genetic diversity within two artificial gynogenetic groups of grass carp is far lower than that of common grass carp, while the genetic diversity in meiotic-mitō gynogenetic grass carp group is much lower than that of mitō gynogenetic grass carp group. The relatively low level of genetic diversity in each of the two groups of gynogenetic grass carp revealed that the population purity in each of the two gynogenetic grass carp groups is higher than that of common grass carp group.

Key words: Gynogenetic grass carp; RAPD; Genetic similarity; Genetic distance; Genetic diversity