

人工雌核发育大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 的 AFLP 分析*

王晓清^{1,2} 王志勇^{1①} 柳小春² 谢中国² 詹炜² 谢芳靖¹

(1. 集美大学水产学院 厦门 361021; 2. 湖南农业大学动物科技学院 长沙 410128)

摘要 采用6对选择性扩增引物(E-AAG/M-CAG、E-AAG/M-CTC、E-ACA/M-CAA; E-ACG/M-CAT、E-AGG/M-CAA、E-AGG/M-CTA)对冷休克法诱导的大黄鱼雌核发育家系G1、G2和对照组C1、C2的鱼苗及其亲本进行了扩增片段长度多态性(AFLP)标记的比较分析。结果表明,6对引物共检出了33条雄亲特有条带(G1中13条,G2中20条)、31条雌亲特有条带(G1中16条,G2中15条)。家系G1的24尾鱼苗均无雄亲特有条带,雌核发育成功率为100%,G2家系中有3尾鱼苗各出现了不同数量的雄亲特有条带,属正常受精个体(12.5%),其雌核发育成功率为87.5%,两个家系平均雌核发育诱导成功率为93.75%。31条雌亲特有条带中有14条在雌核发育后代中出现了分离。对亲子间遗传关系的分析表明了雌核发育个体之间的遗传差异最小,与雌亲的亲缘关系最近。研究表明,雌核发育是促进基因纯合的一个有效途径,AFLP技术是鱼类雌核发育鉴定和遗传分析的有效方法。

关键词 大黄鱼,人工雌核发育,AFLP分析

中图分类号 Q346

国内外有关鱼类雌核发育诱导的成功报道很多(贾方钧等,2002;李胜忠等,1997; Lou *et al.*, 1984; Felip *et al.*, 2001; Levanduski *et al.*, 1990),但大部分研究仅注重诱导方法的探讨,有关雌核发育的后续研究较少。关于雌核发育的鉴定分析,过去多采用存在一定局限性的外部形态特征、染色体数目和生化遗传标记等常规方法。随着分子生物学的不断发展,目前已产生了大量能够探测高度遗传变异的RFLP、RAPD、AFLP、SSR等分子标记方法,AFLP(Amplified Fragments Length Polymorphism)技术即扩增片段长度多态性,以其重复性好、特异性高等特点亦在水产动物的遗传分析中得到了广泛应用(Vos *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1998; Tariq, 2004; Wang *et al.*, 2000)。大黄鱼(*Pseudoscia-*

aena crocea Richardson)是我国特有的海水重要经济鱼类,Xie等(2004)¹⁾对其雌核发育二倍体的诱导进行了研究,培育出了雌核发育1代和雌核发育2代品系,并应用于性别控制生产全雌鱼群体;作者还用微卫星标记对用冷休克与静水压处理诱导获得的雌核发育二倍体进行了分析鉴定(王晓清等,2006),进行雌核发育鉴定通常需要尝试分析许多个微卫星标记位点,才能得到在雌、雄亲本间存在不同等位基因的微卫星标记引物。AFLP技术可以用少量引物获得数量较多的雌、雄亲本特有标记,因此也是进行雌核发育鉴定的有效方法。本文中报道利用AFLP标记技术对冷休克法诱导的雌核发育大黄鱼进行鉴定,并对AFLP标记在雌核发育大黄鱼中的遗传规律等

* 国家自然科学基金项目,30271037号;国家863计划项目,2002AA603021号;福建省农业科技重大专项,2004NZ03-1号;集美大学创新科研团队基金,2005—2008。王晓清,副教授,博士生,E-mail: wangxiao8258@126.com

① 通讯作者:王志勇,教授,博导,E-mail: zywang@jmu.edu.cn

1) Xie F J, Wang Z Y, Liu J F, 2004. Induction of diploid gynogenesis in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Program & Abstracts of the 4th Marine Biology and Biotechnology Symposium. Hong Kong, 118

收稿日期:2005-10-12,收修改稿日期:2005-12-15

进行分析的结果。

1 材料与方法

1.1 试验材料

雌核发育以及对对照组大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)来自 2 尾雄性、2 尾雌性亲鱼,雌核发育的诱导方法参照作者此前的报道(王晓清等,2006)。诱导试验于 2004 年 10 月在福建省宁德市水产技术推广站试验场进行,试验时自然海水水温为 18.5—22.0℃,受精卵孵化和鱼苗培育均在 100cm×70cm×90cm 的玻璃钢桶内进行。催产成功后,剪取亲鱼部分尾鳍鳍条保存于 95% 的乙醇中。子代标本于孵化后 45 天采集,每个家系(包括 2 个雌核发育家系 G1、G2 和 2 个对照组家系 C1、C2)中各取 60 尾稚鱼,保存于 95% 的乙醇中,带回实验室 4℃ 保存备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

剪取保存在乙醇中的亲鱼鳍条及其后代鱼苗(去内脏和鳃)20—30mg,用苯酚/氯仿/异戊醇法抽提 DNA。为确保 DNA 样品的质量,对提取的 DNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳检测和紫外分光光度计 OD_{260} 测定,并将 DNA 浓度调至 50ng/μl,保存于 -20℃ 备用。

1.3 AFLP 反应

实验所用 AFLP 接头、预扩增引物和选择扩增引物均由上海生工公司合成。所使用选择性扩增引物对序列为: E-AAG/M-CAG、E-AAG/M-CTC、E-ACA/M-CAA、E-AGG/M-CAA、E-ACG/M-CAT、E-AGG/M-CTA,其中 E-代表 GACTGCGTAC-CAATTC, M-代表 GATGAGTCCTGAGTAA。AFLP 反应步骤参考 Wang 等(2004)进行。

1.4 数据处理

以 1 和 0 代表有或无扩增片段,将上述获得的 AFLP 指纹图谱转换成数字矩阵,计算亲本与

雌核发育子代、对照组之间的相似系数(Lynch, 1990)和遗传距离(Nei *et al.*, 1979),并根据遗传距离用 Mega3.0 构建聚类分析图。有关计算公式如下:

$$\text{多态片段比例} = \left(\frac{\text{多态片段数量}}{\text{检出片段总数}} \right) \times 100\%$$

相似系数: $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$ 。式中 N_{ij} 为个体 i 与 j 共有的片段数量, N_i 、 N_j 分别为个体 i 与 j 各自具有的片段数量;

遗传距离: $D = -\ln S$, 式中 S 为相似系数。

2 结果

2.1 雌核发育的鉴定及诱导成功率

作者在对雌核发育和对照组鱼苗进行 AFLP 扩增之前,首先对亲本进行了 16 个引物组合的 AFLP 指纹比较,其中能产生较多雄亲特有条带和适当的扩增片段数目的有 6 个引物组合, G1 和 G2 家系亲本各有 3 个组合,分别为: G1: E-AAG/M-CAG、E-AAG/M-CTC、E-ACA/M-CAA; G2: E-AGG/M-CAA、E-ACG/M-CAT、E-AGG/M-CTA。利用筛选出的引物组合分别对两个家系的亲本、正常受精子代以及雌核发育子代进行 AFLP 分析,在 G1 家系共检出了 13 条雄亲特有条带、16 条雌亲特有条带;在 G2 家系共检出了 20 条雄亲特有条带、15 条雌亲特有条带。各条带在雌核发育后代中出现的频率情况见表 1、表 2、图 1、图 2。家系 G1 的 24 尾鱼苗均无雄亲特有条带,雌核发育成功率为 100%, G2 家系中有 3 尾鱼苗各出现了不同数量的雄亲特有条带,属正常受精鱼苗(12.5%),其雌核发育成功率为 87.5%,两个家系平均雌核发育诱导成功率为 93.75%。

表 1 G1 亲本部分特有标记在后代中的出现数

Tab. 1 The number of parental special marker appeared in the offspring of G1

序号	♂ 1 特有标记			♀ 1 特有标记		
	标记名称	G1 中出现数	C1 中出现数	标记名称	G1 中出现数	C1 中出现数
1	aag-cag592	0	13	aag-cag320	24	20
2	aag-cag520	0	10	aag-cag178	24	20
3	aag-cag248	0	9	aag-cag175	24	20
4	aag-cag162	0	6	aag-ctc530	24	20
5	aag-cag160	0	6	aag-ctc297	17	8

续表

序号	♂ 1 特有标记			♀ 1 特有标记		
	标记名称	G1 中出现数	C1 中出现数	标记名称	G1 中出现数	C1 中出现数
6	aag-ctc575	0	20	aag-ctc126	11	9
7	aag-ctc500	0	7	aag-ctc117	0	13
8	aag-ctc175	0	20	aag-ctc115	24	20
9	aca-caa512	0	8	aag-ctc88	0	11
10	aca-caa325	0	20	aca-caa586	0	9
11	aca-caa218	0	12	aca-caa458	0	6
12	aca-caa128	0	11	aca-caa322	24	20
13	aca-caa76	0	20	aca-caa186	13	10
14				aca-caa185	24	20
15				aca-caa150	6	12
16				aca-caa88	24	20

注:标记名称 = 引物名称 + 扩增片段长度 (bp)

表 2 G2 亲本部分特有标记在后代中的出现数
Tab. 2 The number of parental special marker appeared in the offspring of G2

序号	♂ 2 特有标记			♀ 2 特有标记		
	标记名称	G2 中出现数	C2 中出现数	标记名称	G2 中出现数	C2 中出现数
1	aag-cta325	1(22)	11	aag-cta465	24	20
2	aag-cta169	0	9	aag-cta148	24	20
3	aag-cta85	2(1,18)	9	aag-cta145	12	9
4	agg-caa380	0	20	aag-cta102	24	20
5	agg-caa365	2(1,18)	20	agg-caa580	17	9
6	agg-caa252	0	20	agg-caa520	21	6
7	agg-caa238	2(1,18)	20	agg-caa308	13	0
8	agg-caa180	1(22)	20	agg-caa230	21	10
9	agg-caa172	2(1,18)	20	agg-caa220	13	7
10	agg-caa160	2(1,18)	20	agg-caa78	17	9
11	agg-caa135	1(18)	7	acg-cat280	13	11
12	agg-caa90	0	7	acg-cat270	11	8
13	acg-cat720	1(18)	12	acg-cat110	10	14
14	acg-cat580	0	10	acg-cat108	24	20
15	acg-cat525	2(1,18)	8	acg-cat98	24	20
16	acg-cat328	0	20			
17	acg-cat262	0	9			
18	acg-cat260	1(1,18)	20			
19	acg-cat252	3(1,18,22)	13			
20	acg-cat240	2(18,22)	8			

注:括号内数字为个体序号;标记名称 = 引物名称 + 扩增片段长度 (bp)

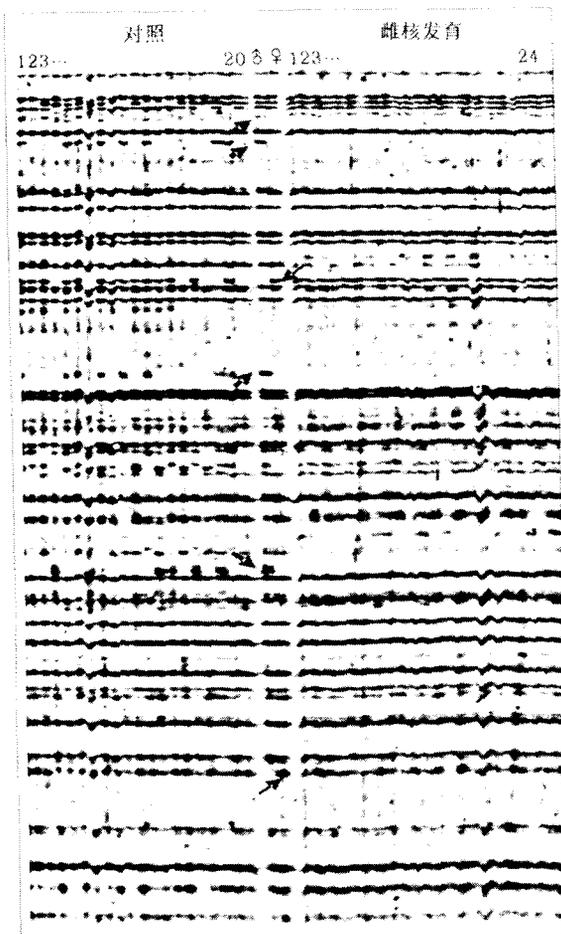


图1 G1及其对照组家系的E-AAG/M-CAG引物的AFLP指纹图

Fig.1 AFLP patterns of G1 and its contrast by primer E-AAG/M-CAG

注:粗线箭头和细线箭头所指分别为部分雄性亲本和雌性亲本特有条带及其在子代中的出现情况

图1为引物E-AAG/M-CAG扩增G1及其对照的部分条带,图2为引物E-AGG/M-CAA扩增G2及其对照的部分条带。如图1所示,引物E-AAG/M-CAG在G1中扩增出的5个雄亲特有条带在24尾鱼苗中都没有出现;图2显示,引物E-AGG/M-CAA在G2中扩增出的9个雄亲特有条带只有3个未在子代中出现,其他条带在1、18和22号个体中都有出现,说明这3个个体为正常受精后代而非雌核发育个体。

2.2 雄亲特有条带在雌核发育和杂交后代中的分离

G1中13个雄亲特有条带在雌核发育子代中都未见出现,但在其对照杂交后代中,有4条带在20个子代中均有出现,说明这些位点是纯合

的;另9条带在后代中出现了分离,说明这些位点是杂合的。同样从G2家系中20条雄亲特有条带在G2中的分离情况可以看出,有9个位点是纯合位点,另11个位点是杂合的。

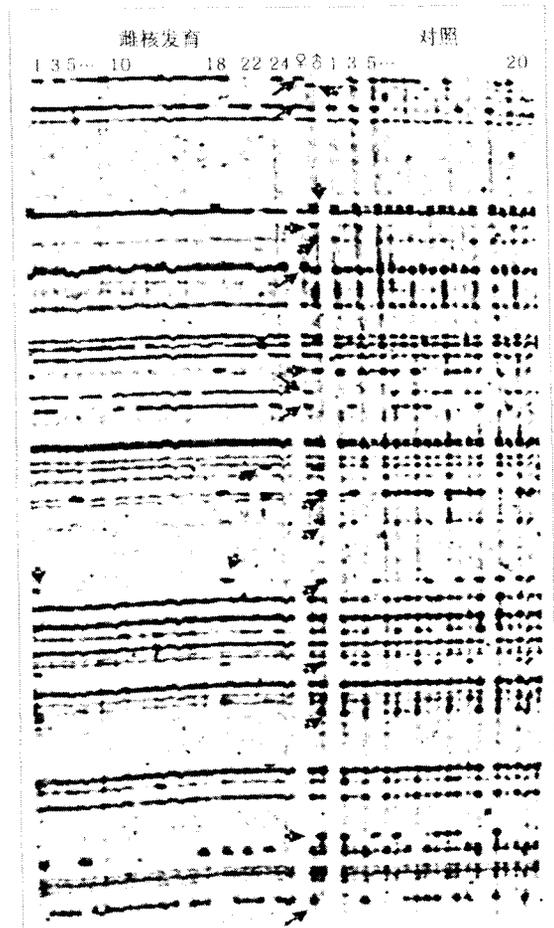


图2 G2及其对照组家系的E-AGG/M-CAA引物的AFLP指纹图

Fig.2 AFLP patterns of G2 and its contrast by primer E-AGG/M-CAA

注:粗线箭头和细线箭头所指分别为部分雄性亲本和雌性亲本特有条带及其在子代中的出现情况

2.3 雌亲特异条带在雌核发育和杂交后代中的分离

从表1、表2中可知,在2个家系的亲本中共找到31条雌亲特有条带(其中G1有16条,G2有15条),有13条带(G1有8条,G2有5条)在24个雌核发育个体中都出现,同时在20个对照杂交个体中也全部出现,说明这些位点全是纯合的;有14条带部分出现于雌核发育和杂交后代个体中,表明这些条带对应的位点在雌亲中是杂合位点;其中8个位点在子代中(24个子代中出

现 10—13 个)的显隐性比接近 1:1,基本符合孟德尔定律,其余位点在后代显隐性比例都偏离了 1:1 的比例;另有 4 条带在 24 个子代样本中均未出现,说明这些位点可能是杂合的,后代样本个体获得的正好是其隐性纯合体。

2.4 群体和个体间的遗传相似性和遗传差异分析

根据 AFLP 指纹图谱,按照 Lynch (1990) 的公式计算亲本与雌核发育后代、亲本与对照组(杂交后代)、雌核发育后代与对照组之间、雌核发育个体之间的相似系数和遗传距离,其结果见表 3 和表 4。

表 3 G1 和对照组家系(杂交后代)及其亲本之间的相似系数(上三角)和遗传距离(下三角)
Tab. 3 The similarities (triangle) and genetic distance (inversed triangle) between parents and their offspring in family G1 and the contrast (hybrid)

项 目	雌性亲本	雄性亲本	雌核发育后代	杂交后代
雌性亲本	0\1	0.907	0.931	0.924
雄性亲本	0.097	0\1	0.917	0.924
雌核发育后代	0.071	0.087	0.019\0.981	0.922
杂交后代	0.079	0.079	0.082	0.076\0.927

表 4 G2 和对照组家系(杂交后代)及其亲本之间的相似系数(上三角)和遗传距离(下三角)
Tab. 4 The similarities (triangle) and genetic distance (inversed triangle) between parents and their offspring in family G2 and the contrast (hybrid)

项 目	雌性亲本	雄性亲本	雌核发育后代	杂交后代
雌性亲本	0\1	0.796	0.966	0.884
雄性亲本	0.229	0\1	0.807	0.97
雌核发育后代	0.035	0.214	0.048\0.953	0.876
杂交后代	0.123	0.108	0.133	0.093\0.911

从表 3 和表 4 中可以看出,由于雌核发育后代中只有雌亲的遗传物质、没有雄亲的遗传物质,两个家系雌核发育后代个体与雌性亲本之间的相似系数都明显高于雌亲与正常受精后代间的相似系数,而遗传距离以及与雄亲之间的相似系数恰好相反。此外,表中还显示,两个家系中雌核发育后代个体之间的平均遗传距离(遗传差异)都显著小于正常受精发育的个体之间的遗传距离,说明雌核发育是促进基因纯合快速形成纯

系的有效方法。根据表 3 及表 4 中的遗传距离数据用邻结法(NJ)对親子间分别进行聚类分析(图 3),两个家系的聚类分析结果完全一致。该图更直观地说明了親子之间的亲缘关系,即雌核发育个体与雌亲的亲缘关系最近,与雄亲的亲缘关系最远。

3 讨论

3.1 大黄鱼雌核发育的 AFLP 鉴定

在人工诱导鱼类雌核发育过程中,精子遗传物质失活常用的紫外线处理法,因其穿透力较差,或因操作不当导致照射不均匀或出现光复活作用,可能导致某些精子未被照射,或者精子遗传物质失活不彻底,使雄性个体的遗传物质或某些 DNA 片段参与遗传,因此有必要对诱导产生的雌核发育后代进行鉴定。AFLP 技术是一种灵敏可靠的 DNA 分子标记技术,可以用少量引物检测到较多的亲本之间基因组差异位点,从而较迅速和准确地给出鉴定结果(Vos *et al.*, 1995)。本研究中选用了 6 对选择性扩增引物对 2 个雌核

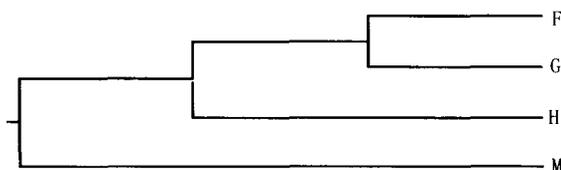


图 3 根据 AFLP 指纹资料分别用 NJ 法构建的各组间谱系关系图

Fig. 3 Phylogenetic tree in NJ method based on AFLP fingerprints

F: 雌性亲本, G: 雌核发育后代, H: 杂交后代, M: 雄性亲本

发育系及其对照组家系进行分析,分别得到 13 条和 20 条雄亲特异条带,在 G1 家系中 13 条雄亲特异条带无一在后代中出现,因此雌核发育诱导成功率 100% (表 1);G2 家系检测的 24 个个体除 1 号、18 号和 22 号个体分别出现了 20 条雄亲特有条带中的 8 条、11 条和 4 条(表 2),因此属正常受精鱼苗,其余 21 个个体不具有雄亲特有条带,是雌核发育个体,雌核发育诱导成功率为 87.5%。两系平均诱导成功率为 93.75%,与 Felip 等(1999)报道的 95% 的成功率接近,也与作者所进行的微卫星标记分析结果相一致(王晓清等,2006)。本研究中的结果表明,AFLP 技术是进行鱼类雌核发育后代鉴定的一种快速和准确有效的方法。

3.2 雌核发育个体之间的差异

试验结果表明,两个雌核发育家系中雌核发育个体之间的相似系数(分别为 0.981、0.953)明显高于相应对照组家系正常受精后代个体间的相似系数(0.927、0.911),而遗传距离(分别为 0.019、0.048)则小于相应对照组家系正常受精后代个体间的遗传距离(0.076、0.093)。这是容易理解的,因为雌核发育个体只含有母本的遗传物质,后代个体之间的差异主要来源于非同源染色体重组以及同源染色体间的等位基因交换,也即只包含卵子基因型之间的差异,而对照组杂交后代个体含有双亲的遗传物质,其个体之间的差异除了卵子之间的差异之外还有精子之间的差异,以及由于随机交配所带来的巨大的变异量。可见,人工诱导雌核发育是快速培育鱼类纯系的一条可靠捷径。

3.3 雌核发育后代与亲本之间的亲缘关系

雌核发育个体理论上接受的只是来自母本的遗传物质,雌核发育个体间的差异只与母本基因的纯合度有关,如果母本等位基因的纯合度高,雌核发育子代与母本的差异就很小。本研究两家系中雌核发育个体与其母本的相似系数(0.931、0.966)明显大于与雄亲的相似系数(0.917、0.807);而遗传距离则相反,与母本的遗传距离较大(0.071、0.035),与雄亲的遗传距离较小(0.087、0.214)。说明雌核发育后代与雌亲的遗传相似度高、亲缘关系近,而与雄亲的遗传距离较远,这从另一个方面证明了所研究个体确实是雌核发育的产物。本研究中采用大黄鱼精子经过紫外线照射灭活后用于诱导雌核发育,雌、雄亲本都是来自少量的奠基亲本经过连续多代人工繁殖而来的后

代,两者之间已有很高的遗传相似度。因此,尽管雌核发育后代没有雄亲的遗传物质参与,但是与雄亲的 AFLP 相似性仍然高达 0.807(G2),甚至 0.91 以上,显示出较高的遗传亲缘关系。采用同种精子诱导雌核发育除了具有操作上的便利之外,最重要的一点是可以避免异源精子部分遗传物质在雌核发育个体中残留,最终所可能造成对大黄鱼自然种群产生基因污染。

3.4 AFLP 标记在雌核发育中的分离

本研究中诱导雌核发育二倍化是通过抑制第二极体排出,因此属于减数分裂型雌核发育,个体中有些位点因突变或由于父本遗传物质的作用而表现出一定的杂合性。在 2 个家系的亲本中共找到 31 条雌亲特有条带,其中 13 个条带出现在所有个体后代中,推测其是已经纯合固定的位点;14 个条带仅出现于部分后代个体,表明这些条带对应的位点在雌亲中是杂合位点,其中 8 个位点在子代中显隐性比接近 1:1,按照孟德尔的分离定律推测,隐性个体全部是纯合体,这些位点的显性个体多数乃至全部可能也是纯合体;其余位点在后代显隐性比例都偏离了 1:1 的比例(χ^2 检验多数差异达到极显著),显示这些位点的等位基因在减数分裂中可能发生了交换。尽管 AFLP 标记是显性标记,无法区分显性纯合体和杂合体,但是根据这些资料和遗传学定律仍然可以估算出分离位点与着丝点之间的遗传距离。结合使用 SSR 等共显性标记,就可以利用雌核发育后代构建大黄鱼的遗传图谱,并定位各个位点与着丝点之间的遗传距离。这对于进一步开展 QTL 分析,以及有用功能基因的图位克隆,都具有很重要的应用价值。

参 考 文 献

- 王晓清,王志勇,柳小春等,2006. 大黄鱼人工诱导雌核发育后代的微卫星标记分析. 遗传,28(7):831—837
- 李胜忠,陈琳,杜劲松,1997. 热休克诱导虹鳟二倍体雌核发育. 动物学杂志,32(5):7—9
- 贾方钧,王剑伟,吴清江,2002. 异源精子诱导异育银鲫的人工雌核发育. 水生生物学报,26(3):246—251
- Felip A, Piferrer F, Carrillo M *et al*, 1999. The relationship between the effects of UV light and thermal shock on gametes and the viability of early developmental stages in a marine teleost fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Heredity*, 83:387—397
- Felip A, Zanuy S, Carrillo M *et al*, 2001. Induction of triploidy

- and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetic*, 111(1—3):175—195
- Levanduski M J, Beck J C, Seeb J E, 1990. Optimal thermalshocks for induced diploid gynogenesis in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 90: 239—250
- Liu Z, Nichols A, Li P *et al*, 1998. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2 and backcross hybrids. *Mol Gen Genet*, 258(3):260—268
- Lou Y D, Purdom C E, 1984. Diploid gynogenesis induced by hydrosatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Fish Biol*, 24:664—670
- Lynch M, 1990. The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol Biol Evol*, 7:478—484
- Nei M, Li W-H, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:5269—5273
- Tariq Ezaz, 2004. Use of microsatellite loci and AFLP markers to verify gynogenesis and clonal lines in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Research*, 35: 1472—1481
- Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al*, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21):4407—4414
- Wang Z Y, Jayasankar P, Khoo S K *et al*, 2000. AFLP fingerprinting reveals genetic variability in common carp stocks from Indonesia. *Asian Fisheries Science*, 13: 139—147
- Wang Z Y, Tsoi K H, Chu K H, 2004. Applications of AFLP technology in genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(4):399—407

AFLP ANALYSIS OF ARTIFICIAL GYNOGENESIS IN *PSEUDOSCIAENA CROCEA*

WANG Xiao-Qing^{1,2}, WANG Zhi-Yong¹, LIU Xiao-Chun²,
XIE Zhong-Guo², ZHAN Wei², XIE Fang-Jing¹

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen, 361021; 2. College of Animal Science and Technology,
Hunan Agricultural University, Changsha, 410128)

Abstract A comparative analysis of AFLP was performed by using 6 pairs of selective primers (E-AAG/M-CAG, E-AAG/M-CTC, E-ACA/M-CAA; E-ACG/M-CAT, E-AGG/M-CAA, E-AGG/M-CTA) in *Pseudosciaena crocea* fries from two groups (G1, G2) of the gynogens induced by cool-shock method, two groups of contrast (C1, C2) and their parents. The similarity coefficient and genetic distance among gynogenetic offspring, the contrast (hybrid) and their parents were calculated along with phylogenetic clustering analysis. A total of 33 special male bands (13 in G1, 20 in G2), and 31 special female bands (16 in G1, 15 in G2) were revealed in 6 pairs of primers. The amplification showed no male gene in 24 fries of family G1, suggesting that they all derived from gynogenesis. The successful induction ratio was 100%. Different special male bands appeared in 3 individuals of family G2, suggesting the origin of normal fertilization (12.5%). Its successful induction ratio was 87.5%. The average gynogenetic ratio of the two families was 93.75%. Thirteen maternal loci (8 in G1, 5 in G2) were homozygotic. 14 of 31 special female bands were separated in the gynogens indicative of heterozygosity. The homozygosity ratio of the offspring from the two families was 87.5% and 76.2% in average of 81.9%, whereas it was zero in their contrast.

It is clear that the similarity coefficient among gynogens of two families was the largest, or the genetic distance among gynogens was the shortest among the hybrids of their contrast. The relation of the gynogens was the closest to the female parent but male one. Therefore, gynogenesis analysis with AFLP marker technique is practical in gene purification, verification and other genetic analyses.

Key words Large yellow croaker, Artificial gynogenesis, AFLP analysis